

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月18日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591722

研究課題名（和文） 敗血症におけるバソプレッシン投与に対する心筋の反応性の検討

研究課題名（英文） Examination of the reactivity of the cardiac muscle to the vasopressin medication in sepsis.

## 研究代表者

日野原 宏 (HINOHARA HIROSHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：70361376

研究成果の概要(和文):動物敗血症モデルとICUでの敗血症性ショック患者に対し vasopressin 投与による心筋収縮能変化の関連を調べた。動物敗血症モデルでは、摘出した心室の細胞収縮及び細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の測定を行った。また、患者では心機能変化を3D経食道エコーを用いて調べた。いずれも vasopressin 投与と心筋の収縮率との間に相関関係は認められなかった。しかしながら、動物敗血症モデルでのある個体では vasopressin の濃度依存性に心筋の収縮を変化させることが示唆された。

研究成果の概要(英文): Relation of vasopressin and myocardial contraction function changes were investigated in septic shock patients in the ICU and sepsis animal models. In sepsis animal models, contraction of ventricular resection and concentration of the Ca<sup>2+</sup> in the cells were measured. Also, in patients, the cardiac changes were investigated with 3D esophageal echo. Both of the investigation, the relation of myocardial contraction function changes and vasopressin were not observed. However in a septic animal model, some animal suggested that the change of the cardiac muscle contraction depended on the vasopressin concentration.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：バソプレッシン、敗血症、心筋

## 1. 研究開始当初の背景

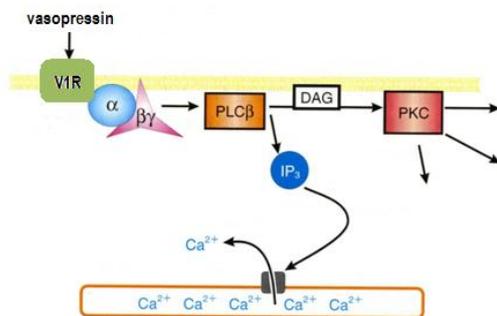
敗血症性ショックでは、著しい低血圧が惹起される。その主たる原因は全身の血管拡張に

よるものである。今日、集中治療領域では、norepinephrine等の血管作動薬に抵抗性な低

血圧の治療に際し、低用量の vasopressin が使用されるようになってきている。(N Engl J Med 2008)

vasopressin は文字通り強力な血管収縮作用を有する。Vasopressin と血管平滑筋の V1R との相互作用で細胞内酵素 phospholipase C (PLC) が活性化される。PLC はリン脂質である phosphatidylinositol

4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) を加水分解し、第二メッセンジャーである inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) を生産する。IP<sub>3</sub> は小胞体の Ca<sup>2+</sup> 貯蔵庫から細胞質へと Ca<sup>2+</sup> を放出させる。平滑筋細胞質内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇すると、Ca<sup>2+</sup> は calmodulin と結合し、myosin light chain kinase を活性化する。この酵素が収縮タンパクを構成する myosin のリン酸化を触媒する。リン酸化された myosin は actin と反応して筋を収縮させる。(Crit Care 2003)



一方、心筋にも V1R mRNA が発現していることが知られている。しかしながら vasopressin 投与による心筋の反応については十分に解明されていない。敗血症患者に vasopressin を投与すると、一回拍出量が増加し脈拍が減少する症例に遭遇する。さらに末梢冷感の消失・尿量増加といった、vasopressin 本来の作用とは逆の効果が現れることがあるとの報告がある (Anesthesiology 2002)。この現象は心拍出量の増大によるものと考えられ、vasopressin 心筋への作用を解明するた

めこの研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は敗血症における vasopressin 投与に対する心筋の反応性を解明することを目的とする。動物敗血症モデルを用い、単離した心室心筋での vasopressin 還流中の細胞収縮及び細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化を測定する。また、リアルタイム PCR を用いて心筋での vasopressin 1 receptor (V1R) mRNA の発現量を測定する。さらに臨床研究として、3D エコー装置を用いて敗血症性ショックで vasopressin 投与を開始された患者の心機能 (左室壁運動) 変化を観察する。

## 3. 研究の方法

### (1) CLP ラット作成

Wistar 系ラット (200-300g) を用いて pentobarbital 麻酔科に cecal ligation and puncture を施し 4 日後以下の実験に供する。

### (2) 心室筋細胞単離

麻酔したラットより心臓を摘出し、大動脈部分でランゲンドルフ灌流装置に接続する。Ca<sup>2+</sup>溶液 (126 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 13 mM NaOH, 24 mM HEPES, 2.5 g/L taurine, 0.65 g/L creatinemonophosphate, 0.55 g/L sodium pyruvate, 0.14 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/L glucose) で 5 分間灌流した後、0.1 mM Ca<sup>2+</sup> の入った酵素液 (Ca<sup>2+</sup>溶液に 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> を加え、100 mg/dL type II collagenase (Worthington Biochemicals, Freehold, NJ, USA) と 10 mg/dL の protease (Sigma) を加えて作成) で 8~12 分灌流する。灌流液は 37°C・pH 7.4 で維持し、灌流圧が十分に低下したことを確認した後、酵素を含まない 0.1 mM Ca<sup>2+</sup>溶液 (Ca<sup>2+</sup>溶液に 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> を加えた溶液) で 5 分間洗い、左心室を切り出し同溶液中で左心室を鉗で細かく切り細胞懸濁液を作成する。細胞懸濁液の Ca<sup>2+</sup>濃度を

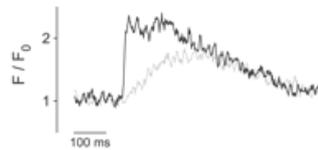
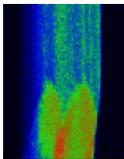
1.0 mM まで上昇させて室温で保存し、単離後 6 時間以内に使用する。

### (3) 細胞収縮の測定

心室筋細胞はプラチナ電極を用いて 4 秒毎 (0.25Hz) にパルス幅 4 msec、閾値 1.5 倍の電圧で収縮を誘発する。細胞の両端の長さは持続的に video motiondetector で記録し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度と同時測定する。

### (4) 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の測定

単離した細胞は Laminin でコーティングした chamber に付着させ、30 分間 3~4 μM の Ca<sup>2+</sup> 蛍光色素である fluo-3AM が含まれた HEPES 溶液 (126 mM NaCl, 4.4 mM KCl, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.08 mM CaCl<sub>2</sub>, 13 mM NaOH, 11 mM glucose, 24 mM HEPES, 25 °C, pH 7.4) で感作処理する。その後 fluo-3 の含まれない normal HEPES 溶液で 15 分以上洗う。細胞に 485 nm の励起光を照射し、530 nm の蛍光を測定する。530 nm の蛍光強度の増加は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の増加を意味する。測定には蛍光顕微鏡システムを使用する。灌流速度は約 2.0 ml/min とし、chamber 内の還流液は実験中 1~1.5 ml でほぼ一定に維持する。測定は 30±1°C で行い、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の指標として F/F<sub>0</sub> を用いる。F<sub>0</sub> は細胞を 0.25 Hz で電気刺激した時の拡張終期の 530 nm の蛍光値を、F は実際の測定値を示す。



video motiondetector

細胞内 Ca<sup>2+</sup>の指標としての F/F<sub>0</sub>

細胞収縮及び細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の測定は、それぞれの濃度の vasopressin (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000nmol/L) を溶解した HEPES 溶液で還流し

た状態で測定する。

### (5) データ処理

カルシウム発光シグナルおよび細胞収縮はアナログアンプ (日本光電) により処理した後 AD コンバーターによりオンラインで時系列データ記録ソフトを用いて汎用 PC によりハードディスク装置に保存する。データは平均値±標準誤差で表示し比較を行う。また、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度・細胞短縮 (細胞径の変化) を比較する際、最大収縮までの時間の逆数 (1/TP) を細胞の収縮性、50%まで弛緩する時間 (T<sub>1/2</sub>) を細胞の弛緩性を示す指標として用いる。

### (6) リアルタイム PCR を用いた心筋での V1R mRNA 発現量の測定

心筋に Trizol を加えホモジナイズしたものから AGPC 法で RNA を抽出する。得られた RNA 1 μg を oligo dT 法で逆転写反応させ cDNA を得て、リアルタイム PCR を行う。(Crit Care 2009)

PCR: : 94°C15 秒, 58°C30 秒, 72°C30 秒を 40 サイクル

フォワードプライマー:

TCGTCCAGATGTGGTCAGTC

リバースプライマー:

AGCTGTCAAGGAAGCCAGT

SYBR Green を伸長反応後の二本鎖 DNA の検出に用いる

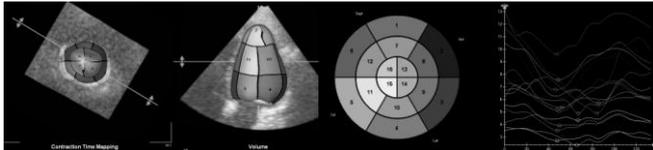
### (7) 臨床研究

ICU で敗血症性ショックに対し vasopressin 投与を開始された患者の心機能変化を観察する。

エンドトキシン血症の重症度を測定するためにエンドトキシン活性 (EA, endotoxin activity) を測定し、敗血症の重症化のリスクを区分する。

E Aレベル区分	E Aレベルの解説	MEDIC試験で示唆されたE A結果
0.00-0.39	Low Level	敗血症の重症化リスクが低い グラム陰性菌感染の可能性が低い
0.40-0.59	Intermediate Level	敗血症の重症化リスク上昇の可能性がある
≥0.60	High Level	敗血症の重症化リスクが高い

3D 経食道エコー装置を用い、心室壁を 16 分割し収縮力の変化を調べる。



エンドトキシン活性による重症度リスクと vasopressin 投与前後の 3D 経食道エコーから得られる心筋収縮能変化の関連を調べる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 基礎研究

動物敗血症モデルとしてcecal ligation and puncture (CLP) ラットを実験材料とし、摘出した左心室の細胞懸濁液を作成して細胞収縮及び細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定を行った。プラチナ電極を用いて誘発させた細胞の収縮率は、還流液中のvasopressin 濃度との相関関係は認められなかった。しかしながら個体によっては濃度依存的に増加傾向を示すものもあり、モデルの敗血症の重篤度によって変化があることが示唆された。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定は、fluo - 3AMが含まれたHEPES 溶液で感作処理した後、蛍光顕微鏡システムを使用し測定した。vasopressin濃度の違いで蛍光強度に差を認めることはできなかった。今回の研究の限りでは心筋の収縮に関してvasopressinの関与は明らかにされなかったが、その問題点としてCLPラットが均一の敗血症状態にならなかったこと、蛍光測定システムにおいて細胞への試薬の取り込みが不十分であったことなどが考えられた。

##### (2) 臨床研究

ICUで敗血症性ショックに対しvasopressin投与を開始された患者の心機能変化を観察した。エンドトキシン活性を測定し、敗血症の重症化のリスクを区分した。エンドトキシン活性による重症度とvasopressin投与前後の3D経食道エコーから得られる心筋収縮能変化の関連を調べたが、vasopressin投与による血圧の変化は認められても心筋収縮能変化をvasopressin投与によるものと認めることはできなかった。臨床においては、敗血症と同時に心不全・呼吸不全・腎不全などの合併症を生じているため、また、治療で他の強心剤が投与されている状況でvasopressin投与による心筋収縮変化を捉えきることはできなかった。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日野原 宏 (HINOHARA HIROSHI)  
群馬大学・医学部・講師  
研究者番号：70361376

### (2) 研究分担者

門井 雄司 (KADOI YUJI)  
群馬大学・医学部・准教授  
研究者番号：10292591  
齋藤 繁 (SAITO SHIGERU)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40251110