

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 5 月 10 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592021

研究課題名（和文） クラッシュ症候群に及ぼす亜硝酸塩の治療効果に関する研究

研究課題名（英文） Study of therapeutic effect of sodium nitrite on crush syndrome

研究代表者

小林 順 (KOBAYASHI JUN)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：20153611

研究成果の概要（和文）：クラッシュ症候群に及ぼす亜硝酸塩の治療効果に関する研究

クラッシュ症候群と同様の臨床経過を示すラットモデルを作成し、一酸化窒素供与体としても注目される亜硝酸塩の治療効果を検討した。生存率 25%が亜硝酸塩腹腔内単回投与により 64%まで改善した。更に現行治療の大量輸液と酸血症補正を併用した亜硝酸持続投与は 100%の生存率を得た。これは亜硝酸由来一酸化窒素の虚血再灌流後の組織保護効果によるもので、同様の機序による救命効果はデキサメサゾン単回投与でも見られクラッシュ症候群の新規治療法としての可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

We developed crush syndrome (CS) rat model to evaluate the therapeutic effect of nitrite on crush syndrome. Intraperitoneal single injection of nitrite improved survival rate of this CS model from 25% to 64%, furthermore combined therapy of continuous infusion of nitrite with conventional therapies including massive fluid infusion and correction of acidosis resulted in 100% survival rate. This might be due to the tissue protective effect of nitrite-derived nitric oxide (NO) against ischemia/reperfusion injury. A 100% survival rate was also achieved by the treatment of the CS rat with single injection of dexamethasone through a mechanism involving NO production in the injured skeletal muscle. These results provide not only a new protective mechanism against ischemia/reperfusion injury in this syndrome, but also a simple and promising drug therapy especially useful in the field of disasters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：クラッシュ症候群・虚血再灌流・一酸化窒素・亜硝酸・デキサメサゾン

1. 研究開始当初の背景

クラッシュ症候群は、災害等で生じる倒壊物の下敷きで四肢が長時間圧迫され、その後救助による圧迫解除と血流再開によって急激に進行する致死的多臓器不全を背景とす

る症候群である。我々はクラッシュ症候群が骨格筋の虚血再灌流傷害を主体とした病態であると考え、心筋、腎臓、脳等における虚血再灌流傷害を改善することが報告されている亜硝酸も同様の治療効果があるのでは

ないかと考えた。虚血組織では低酸素に対応した代謝が進行するが、急激な血流再開による酸素負荷は、活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)の産生による細胞傷害を起こす。この時期での局所的ー酸化窒素(nitric oxide: NO)産生は、組織保護に作用することは知られている。しかし虚血組織では、酸素を必要とするNO合成酵素(NOS)は働かず、再灌流に対応できるNOをまかなうことができない。亜硝酸は組織が虚血である程、NOの産生源となり、逆に好気的環境下である程、安定な硝酸へ酸化され尿中へ排泄される。実際、亜硝酸をNOへ還元する酵素的、非酵素的生体内反応は数多く認められ、非常時でのNO産生源となっている。NO供与体としての亜硝酸の炎症性ショック等での救命効果が注目される中(Cauwels et al. Nitrite regulation of shock, *Cardiovasc Res*, 89: 553-559, 2011)、虚血再灌流後の全身性炎症性疾患であるクラッシュ症候群についても、その効果が認められるか検討するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、(1)クラッシュ症候群の治療効果を検討するためのモデル動物(ラット)を作成すること、(2)次にこのモデルの臨床経過、病理・血液所見、転帰等についてクラッシュ症候群との類似性を検討すること、(3)亜硝酸投与による治療効果と副作用をその投与量、投与方法、そして現行治療(大量輸液療法やアシドーシス補正等)との比較等において検討すること、(4)更には本症の病態を解明し、より有効な新規治療法へと展開させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)モデルラットの作成

クラッシュ症候群を発症する多くの患者は、四肢に5~8時間の圧迫を受けていることが多い。ラバーバンド等による虚血再灌流実験の多くは、圧迫時間が3時間以下で多臓器不全に至る重篤な病態を再現できていないことが多い。我々はWistar系雄性ラット(250~330g)を用いステンレスパイプに5回巻付けた(2kg荷重下)ラバーバンド(図1A)をラット両後肢にスライドさせた(図1B,C)。先行実験より、圧迫時間は再灌流後24時間の死亡率に影響し、5時間圧迫の76%死亡率(22/29)に対し、4時間圧迫では0%(0/10)、また6時間圧迫では10%(1/10)と低下した。これは動物種にもよるが、より長い虚血時間はno-reflow現象により、横紋筋融解によるミオグロビン等の炎症性メディエーターの全身への溢流が起こらないこと、逆に虚血時間が短いと横紋筋融解自体が少なく全身への影響も少なく、致死的不是なことが考えられる。よって目的とする致死クラッシュ

症候群モデルとして、以降の実験は5時間を虚血時間とした。なおすべての動物実験は、城西大学動物実験規定に従い、城西大学生命科学研究センターの承認を得ている。

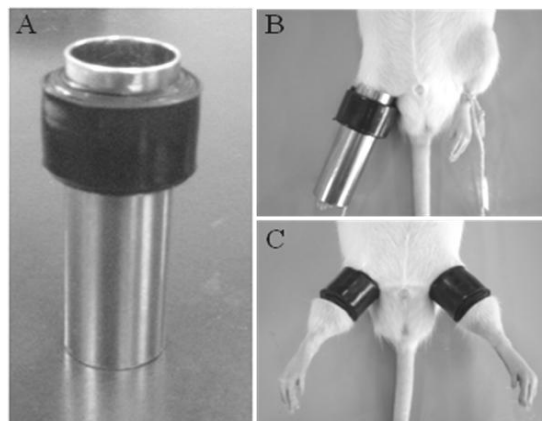


図1. ラバーバンドによる両下肢圧迫

(2)クラッシュ症候群との類似性: 臨床経過、血液所見、心電図、腎機能、病理組織、生存率等について

クラッシュ症候群モデルラットは、ラバーバンド実施以外の麻酔、採血、血圧測定、動脈確保等について全く同じ処置を施したsham群と、以上の項目について比較した。ペントバルビタール腹腔投与後、warm matで体温を保持し、大腿動脈での観血的動脈圧測定と心電図のモニターを記録した(PowerLab data acquisition system)。再灌流後、0、1、3、24時間後に、各々のグループで採血を行い、動脈血ガス分析、ミオグロビン、血液生化学、凝固系、更に病理標本と組織ミエロペロキシダーゼ(MPO)活性測定のための組織採取(筋肉、腎、肺)を行った。また別実験にて、個別代謝ケージによる腎機能(採尿と採血による糸球体濾過量: GFRとナトリウム排泄率: FENa)と再灌流後48時間までの生存率も検討した。

(3)亜硝酸投与による効果

クラッシュ症候群モデルラットに各濃度の亜硝酸塩(NaNO_2) 100、200、500 $\mu\text{mol/kg}$ の腹腔内投与を行い、同濃度の生理食塩水(NaCl)群と上記項目について比較した。また亜硝酸の副作用としての血圧低下とメトヘモグロビン血症についても検討した。更に亜硝酸塩の持続投与と大量輸液(再灌流後3時間まで生理食塩水30ml/kg/時間の静脈輸液)やアシドーシス補正(25 mEq/Lの重炭酸)の併用療法との比較検討も行った。血中、組織中の亜硝酸、硝酸濃度はHPLC法にて定量した。

(4)クラッシュ症候群の病態解明とより有効な新規治療法の検討

①虚血時の組織内NOの生物学的活性と再灌流時の横紋筋融解、それに続く全身性炎症との関連を検討した。

② 更により簡単で実践的なデキサメサゾン投与 (0.1 と 5.0mg/kg) と NOS 活性との関連を調べ、その治療効果を検討した。

③ 従来からの治療である細胞外液型大量輸液やアシドーシス補正と比較し、有効性を検討した。NOS 活性は Akt-eNOS リン酸化シグナルを western blot にて評価し、NO 産生は亜硝酸濃度を HPLC にて定量した。ROS 産生の定量は、脂質過酸化反応であるチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) にて測定した。

4. 研究成果

(1) モデルラットとクラッシュ症候群との類似性

5時間虚血後の再灌流24時間後の生存率は25%(3/12, shamは6/6で100%)であった。死亡原因の多くは、再灌流後の横紋筋融解による炎症性メディエーター(ミオグロビン等)の全身への溢流とそれに続く全身血管内皮傷害と細胞外液流出による血液量減少性ショック、更には血清カリウム値上昇(再灌流3時間で 8.90 ± 0.19 mEq/L, shamは 4.02 ± 0.23 mEq/L: 図2D)による不整脈(図2AとB-D: 再灌流後カリウム値上昇と共にP波平低化、T波増高、PR延長、QRS及びQTc幅延長、多くは最後、完全房室ブロックによる除脈が見られた: 図2E)によるものであった。

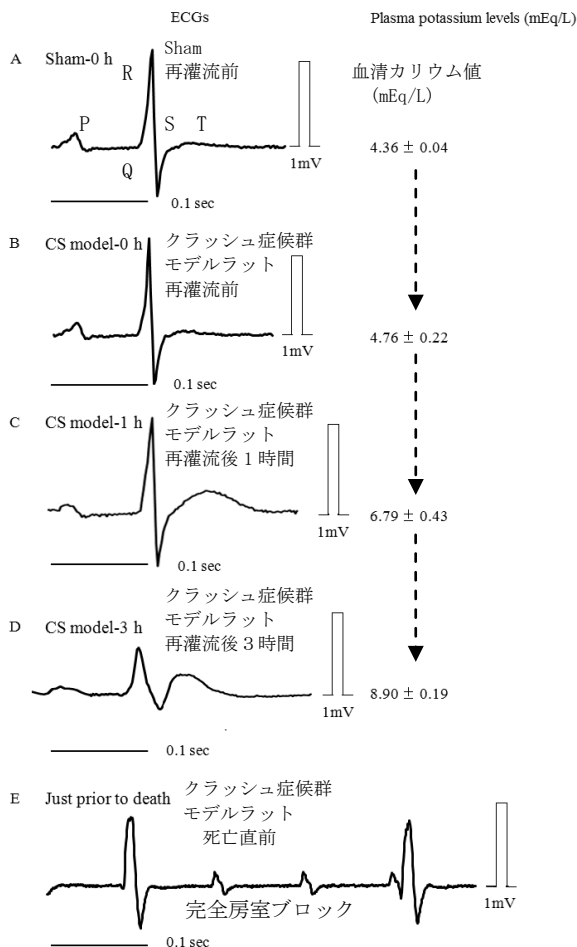


図2. クラッシュ症候群モデルラットの心電図と血清カリウム値の経時変化

横紋筋融解に伴う血清LDH、CPK、ミオグロビン値等は、再灌流後3時間をピークに著明に増加していた。同時に血圧低下(再灌流後3時間の平均動脈圧で 43.5 ± 4.0 , shamは 117.5 ± 0.7 mmHg)も著明で、循環不全に伴う著明なアシドーシス(再灌流後3時間のpH: 7.28 ± 0.02 , shamは 7.46 ± 0.01 , base excess: -9.7 ± 1.2 , shamは 2.6 ± 0.3 mmol/L、乳酸: 4.9 ± 0.4 , shamは 2.2 ± 0.4 mmol/L)も認められた。また多臓器不全へと発展する血管炎症反応も著明で傷害骨格筋のみならず、肺、腎臓でのMPO活性の増加も見られた。

骨格筋の病理組織所見は再灌流後、著しい間質浮腫とその後の細胞壊死が見られ、肺は白血球浸潤を伴う肺胞水腫が見られ、臨床的にみられる急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の原因と思われた。腎臓は尿細管腔の拡大が見られミオグロビン等による尿細管障害と思われる。再灌流24時間後生存例でのFENaはshamに比べ著明に低下していた。GFRの低下も見られたが、多くは腎前性ショックによるものと思われる。尿細管障害を特徴とするクラッシュ症候群と同様の所見であった。

(2) 亜硝酸投与による治療効果

我々が特に注目した点は、再灌流前の虚骨格筋内の亜硝酸濃度である。Shamが 12.3 ± 1.6 に対しクラッシュ症候群モデルラットは 6.1 ± 1.3 nmol/g・tissueと有意に低く、低酸素下でのエネルギー消費軽減と組織保護のため、亜硝酸由来のNOが消費されたと思われる。そこへの血流再開と高濃度酸素負荷は、ROS産生による細胞傷害をより受けやすくした可能性がある。それを裏付けるように再灌流前の亜硝酸の投与は、横紋筋融解を示す血清カリウム、CPK、LDHの値を濃度依存的に下げ、その後の全身血管炎症の指標である血中インターロイキン6値や肺のMPO活性を低下させた。これらは循環動態の改善にも繋がり、平均血圧の上昇、アシドーシスの改善も見られた。結果として生存率の改善に繋がった(図3)。

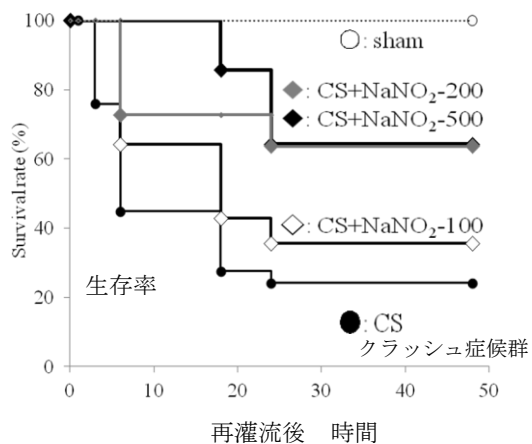


図3. 亜硝酸のクラッシュ症候群生存率に与える影響

亜硝酸 200 と 500 $\mu\text{mol/kg}$ (図3: CS+NaNO₂-200, -300) の腹腔単回投与は共に 48 時間生存率は 64% (クラッシュ症候群モデルラットは 24%) であったが、500 $\mu\text{mol/kg}$ は再灌流 1 時間での平均血圧が 56.5 \pm 6.3 mmHg (クラッシュ症候群モデルラットは 79.6 \pm 1.5 mmHg、その後再灌流 6 時間で 54.7 \pm 7.3 mmHg と低下、一方 200 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群の再灌流 1 時間は 83.7 \pm 2.6 mmHg でその後も安定) と一過性に低下したが再灌流 6 時間後では 80.8 \pm 5.9 mmHg と回復した。しかしメトヘモグロビン血症(再灌流 3 時間で 18.5 \pm 7.6%、200 $\mu\text{mol/kg}$ 投与群とクラッシュ症候群モデルラット、sham はそれぞれ 2.2 \pm 0.1%、1.6 \pm 0.1%、1.2 \pm 0.1%) が見られ、このクラッシュ症候群モデルラットにおいては 200 $\mu\text{mol/kg}$ 投与が安全と考えられた。

なお、未発表のデータではあるがクラッシュ症候群モデルラットへの生理食塩水大量輸液では、再灌流 48 時間後の生存率は 40% であった。これに 25 mEq/L の重炭酸を併用すると 80% に上昇した。更に 200 $\mu\text{mol/kg}$ 亜硝酸塩を生理食塩水に加え 30ml/kg/時間で投与すると 25 mEq/L の重炭酸の有無に関わらず、血圧低下やメトヘモグロビン血症等の副作用もなく 100% の生存率を得ることができた。

(3) クラッシュ症候群の病態解明と新規治療法の検討

今回の研究により虚血時の外因性亜硝酸由来 NO が再灌流による組織傷害を抑制できることが認められた。最近、心筋、脳、腎での虚血再灌流傷害時に、デキサメタゾン投与が内皮型 NOS (eNOS) 活性を誘導し治療薬としての可能性が検討されている。我々もデキサメタゾンが内因性 NO 産生を介した機序によりクラッシュ症候群の治療薬として使用できないか検討した。

デキサメタゾン (5mg/kg) の再灌流直前の静脈内投与は、再灌流後 48 時間で 100% の生存率を示した。しかし 0.1mg/kg のデキサメタゾンは、生存率に改善が見られず、48 時間後の結果としてクラッシュ症候群モデルラットと同じ生存率であった (図4)。

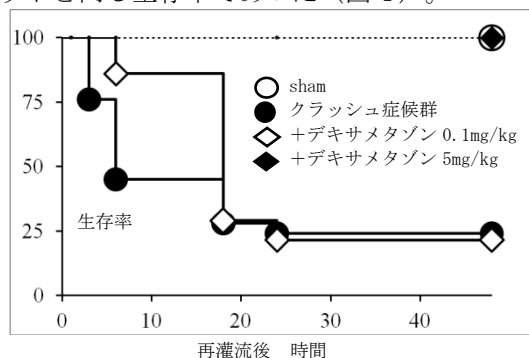


図4. デキサメタゾンのクラッシュ症候群生存率に与える影響

デキサメタゾンの eNOS 活性を介する NO 産生は non-genomic 経路を介した転写後修飾によるものであり、シグナル伝達系のリン酸化によるものである。これには高容量のデキサメタゾンが必要であることが報告されており、我々の結果も 0.1mg/kg では Akt-eNOS のリン酸化シグナルは有意な上昇を見ず 5mg/kg で初めて、再灌流 3 時間で有意な上昇を認めた (図5、6)。

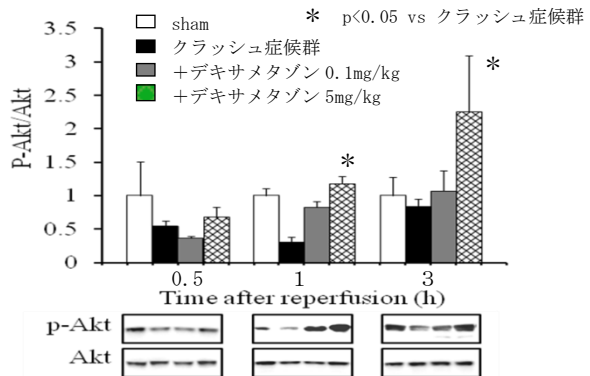


図5. デキサメタゾンの Akt シグナルリン酸化への影響 (下段は western blot、上段はデンストメトリー定量によるリン酸化比率)

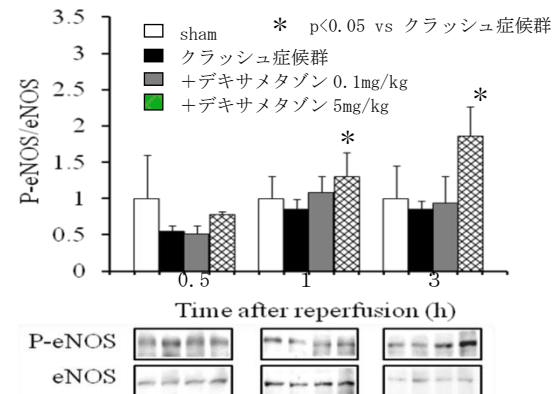


図6. デキサメタゾンの eNOS リン酸化への影響 (下段は western blot、上段はデンストメトリー定量によるリン酸化比率)

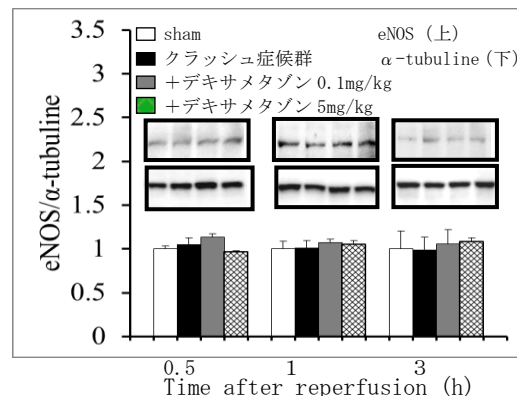


図7. デキサメタゾンの eNOS 総蛋白量への影響 (上段は western blot、下段はデンシトメトリー定量による α -tubuline 比率)

ちなみにデキサメタゾンによる eNOS 蛋白発現への影響はなく、デキサメタゾンによる eNOS 活性はリン酸化によるものであることが分かる (図7)。

in vivo における生体内 NO 産生の定量は手技的に非常に難しいが、我々は筋肉中の亜硝酸 (NO の直近の安定酸化物) を測定して間接的に評価した。クラッシュ症候群モデルラットにおいて再灌流直前は著明に低下していた傷害骨格筋中の亜硝酸は、5mg/kg のデキサメタゾン投与により再灌流1時間から上昇し eNOS 由来の NO によることを示していた。しかし 0.1mg/kg のデキサメタゾンではこの効果は認められなかった (図8)。

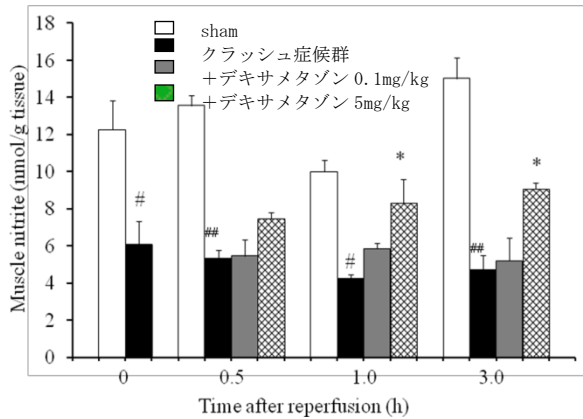


図8. デキサメタゾンの傷害骨格筋中亜硝酸濃度への影響

* p<0.05 vs クラッシュ症候群
p<0.05 vs sham; ## p<0.01 vs sham

5mg/kg のデキサメタゾン投与による虚血骨格筋での NO 産生は、再灌流3時間後の ROS 産生を有意に抑制した (図9)。しかし 0.1mg/kg ではその効果は認められず Akt-eNOS リン酸化シグナルの結果と一致していた。

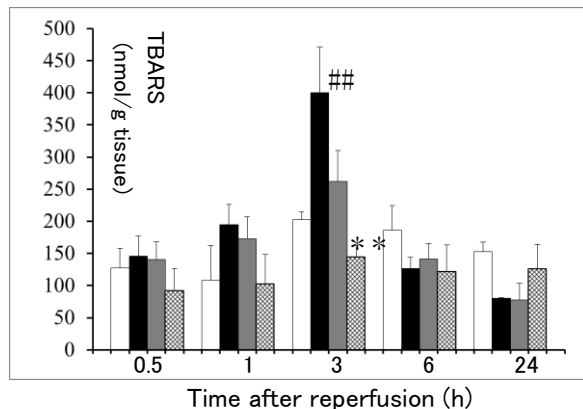


図9. デキサメタゾンの傷害骨格筋中 ROS 産

生への影響

** p<0.01 vs クラッシュ症候群
p<0.01 vs sham

ROS による組織傷害は横紋筋融解を起こし、ミオグロビン等の炎症性メディエーターを全身循環へ放出するが、デキサメタゾンは内因性 NO による ROS 産生抑制を介して横紋筋融解を抑制し、すべての炎症性メディエーターの放出を抑えた (data not shown, Murata et al. J Trauma, 2013 参照)。全身炎症であるサイトカインストームを示す血清インターロイキン6はクラッシュ症候群で有意に上昇するがデキサメタゾンによる抗炎症効果により濃度依存的に抑制された (図10)。

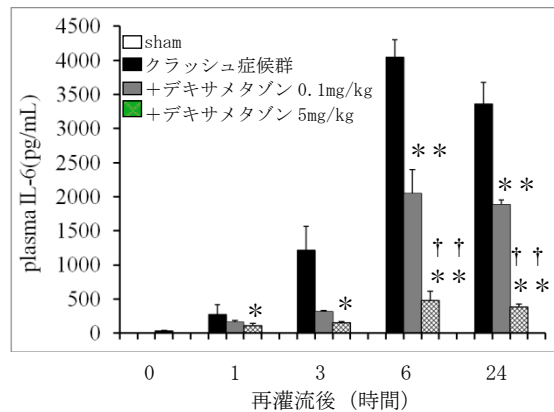


図10. デキサメタゾンの血中インターロイキン6への影響

*p<0.01; **p<0.01 vs クラッシュ症候群
†† p<0.01 vs デキサメタゾン 0.1mg/kg

全身血管内皮と白血球との異常反応の指標である遠隔臓器 (筋、肺、腎臓) での MPO 活性はデキサメタゾンにより有意に抑制された (図11)。

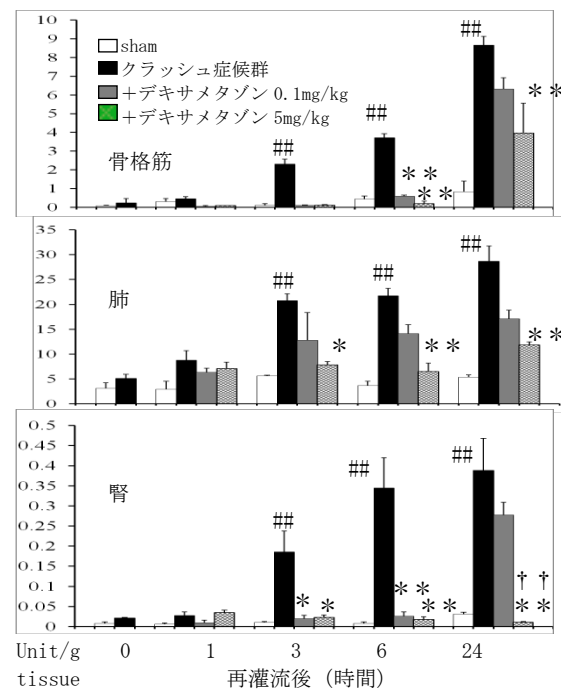


図 1 1. デキサメタゾンの臓器 MPO 活性 (骨格筋、肺、腎) への影響

*p<0.05; **p<0.01 vs クラッシュ症候群

#p<0.05; ##p<0.01 vs sham

†† p<0.01 vs デキサメタゾン 0.1mg/kg

また亜硝酸による治療効果と同様に骨格筋、肺、腎の組織所見の改善も認められた。(data not shown, Murata et al. J Trauma, 2013 参照)

本研究の成果は、クラッシュ症候群の病態における NO の重要性と外因性亜硝酸投与及びデキサメタゾン投与による内因性 eNOS 活性が共に NO 産生を上げ、虚血後再灌流による一連の病態進行を見事に抑制した。これらの治療はクラッシュ症候群に対する新規治療法として災害や事故現場での実践的応急処置としての可能性を提供できるものと考えている。

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 3 件)

① Isamu Murata, Kazuya Ooi, Shingo Shoji, Yohei Motohashi, Miwa Kan, Kazuo Ohtake, Soichiro Kimura, Hideo Ueda, Genya Nakano, Kunihiro Sonoda, Yutaka Inoue, Hiroyuki Uchida, Ikuo Kanamoto, Yasunori Morimoto, and Jun Kobayashi.

Acute lethal crush-injured rats can be successfully rescued by a single injection of high-dose dexamethasone through a pathway involving PI3K-Akt-eNOS signaling
Journal of Trauma and Acute Care Surgery, (査読有り), 2013, in press.

② Isamu Murata, Ryo Nozaki, Kazuya Ooi, Kazuo Ohtake, Soichiro Kimura, Hideo Ueda, Genya Nakano, Kunihiro Sonoda, Yutaka Inoue, Hiroyuki Uchida, Ikuo Kanamoto, Yasunori Morimoto, Jun Kobayashi.

Nitrite reduces ischemia/reperfusion-induced muscle damage and improves survival rates in rat crush injury model.

Journal of Trauma, (査読有り), Vol. 72, 2012, 1548-1554.

③ Isamu Murata, Kazuya Ooi, Hiromi Sasaki, Soichiro Kimura, Kazuo Ohtake, Hideo Ueda, Hiroyuki Uchida, Norikiyo Yasui, Yasuhiro Tsutsui, Naoya Yoshizawa, Ichiro Hirotsu, Yasunori Morimoto, Jun Kobayashi.

Characterization of systemic and histologic injury following crush syndrome and intervals of reperfusion in a small an

imal model.

Journal of Trauma (査読有り), Vol. 70, 2011, 1453-1463.

[学会発表] (計 3 件)

① 鈴木隆太、村田勇、大竹一男、井上裕、小林順、金本郁男

Crush syndrome ラットモデルに対する亜硝酸塩と輸液大量投与の相乗効果に関する研究
日本薬学会 第 133 年会 3 月 30 日, 2013
横浜

② 後藤麻依、村田勇、大竹一男、井上裕、小林順、金本郁男

Crush syndrome に対する筋肉内 Dexamethazone 投与の効果に関する研究
日本薬学会 第 133 年会 3 月 30 日, 2013
横浜

③ Jun Kobayashi, Ryo Nozaki, Isamu Murata, Kazuo Ohtake, Kazuya Ooi, Kunihiro Sonoda, Genya Nakano, Soichiro Kimura, Hideo Ueda, Hiroyuki Uchida, Yasunori Morimoto.

Nitrite ameliorates ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle in rat crush injury model.

Approaching the Clinic: Nitrite and Nitrate Pathophysiology and Therapy
Conference 2011 年 5 月 (アトランタ 米国)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 順 (KOBAYASHI JUN)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号: 20153611

(2) 研究分担者

大竹一男 (OHTAKE KAZUO)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号: 50337482

(3) 研究分担者

村田 勇 (MURATA ISAMU)

城西大学・薬学部・助手

研究者番号: 80610667

(4) 連携研究者

なし