

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 24 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791424

研究課題名（和文） 敗血症モデルラットにおける脳血管内皮機能の検討

研究課題名（英文） Endothelium-Dependent Cerebral Vasodilation at Early Stage in Sepsis in Rats.

研究代表者

福岡 尚和（FUKUOKA NAOKAZU）

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00402181

研究成果の概要（和文）：

敗血症における脳微小循環に関する *in vivo* での初めての情報である。敗血症モデルラットにおいて、敗血症早期では脳血管内皮拡張能は障害されない。敗血症性脳症では、脳血管内皮機能が障害され、脳血管のアセチルコリンに対する反応性が低下するという仮説をもとに、性差を含めて検討したが、それが否定された。仮説どおりの結果は得られなかったが、逆に敗血症性脳症の病態生理として、早期では脳血管内皮機能はあまり関与しないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Endothelium-dependent cerebral vasodilation is preserved at early stage in sepsis in rats. This study provides the first information of the cerebral microcirculation in a rat model of septic shock *In Vivo*.

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	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：麻酔科学

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：

敗血症性脳症、脳血管内皮機能

1. 研究開始当初の背景

敗血症性脳症 (Septic Encephalopathy :SE) は 50-70% の敗血症患者に合併する頻度の高い脳障害であり、その死亡率は非常に高い。その病態は、動物実験レベルにおいて、脳血管内皮機能障害、血液脳関門 (Blood Brain Barrier : BBB) の障害などが指摘されている。しかし、いずれも摘出脳血管を用いた *In vitro* での研究報告しか存在せず、未知の部分

が多い。申請者らは Cranial Window 法と呼ばれる、*In vivo* において脳血管内皮機能を評価する技術を有しており、これまで様々な薬剤が脳血管内皮機能に与える影響をこの方法を用いて研究、報告してきた。本研究では、Cranial Window 法を用いて SE のより詳細な病態を解明することを目的とする。**【SE とは】** 見当識障害、せん妄、昏睡などの意識障害を呈し、頭蓋内以外に存在する感染・炎症が原因となって起こる脳障害

である。診断は、臨床症状、既存の頭蓋内病変が存在しないこと、頭蓋内以外に感染・炎症の病巣が存在することの証明、さらに他の器質的脳疾患を除外して、初めて診断される。現在のところ、治療法は原疾患の治療と対症療法が中心で、決定的な治療法は存在しない。SE 合併患者の死亡率は高く、意識障害の程度を表す、Glasgow Coma Scale (GCS) が 3-8 点と意識障害の高度な患者における死亡率は 63% という報告もある。

【sepsis の病態生理】

SE 合併患者の死亡率が高いのにもかかわらず、SE に関する研究報告は少なく不明な点が多い。敗血症 (sepsis) では脳組織以外からの活性酸素種 (Reactive oxygen species:ROS) の過剰産生、誘導型 nitric oxide synthase(iNOS)の活性化による NO (nitric oxide) の合成増加と強力な血管拡張作用、炎症性サイトカイン (NF- κ - β 、TNF- α 、IL-6、IL-1 β など) の増加などさまざまな要素が複雑に関与した病態を呈する。この結果、免疫・炎症・凝固のバランスが崩壊し血管内皮機能障害、多臓器不全をきたすと考えられている (N Engl J Med 2006;355:1699)。

【SE に関するこれまでの研究報告】

(1) 一般的に脳以外の臓器 (肺、心臓など) では好中球が浸潤して ROS を産生することが知られている。一方、脳では好中球の浸潤が少ない。これは BBB の特性によるとされる。好中球のかわりに脳血管内皮細胞が ROS を産生して細胞傷害をきたしたり、脳以外の他臓器で産生された ROS が直接、脳血管内皮障害をきたすことが推測されている。

(2) 脳以外の血管内皮細胞から産生される NO は ROS に対して相反する相互作用があり、iNOS により誘導される NO は炎症を促進させ、eNOS により誘導される NO は抗炎症作用を有する。

(3) マウスの摘出した脳血管内皮細胞と、敗血症モデルのマウスから抽出した血漿との反応を見たモデルでは eNOS の誘導を阻害すると脳血管内皮細胞の酸化ストレスが軽減された。

(4) TNF α には TNFR1 と TNFR2 の相反する 2 つの受容体が存在する。マウスの敗血症モデルでは星状細胞に TNFR1 の発現増加がみられ、これに TNF α が結合することで炎症を促進する。

(5) 炎症性サイトカインが直接、神経細胞あるいは BBB を障害する (ラットにおいて)。

(6) 人体において BBB 障害に関する研究報告はほとんどない。重症 SE 患者において脳脊髄液中のタンパク量の中程度の増加を認め BBB の障害が示唆された。→人体にお

ける報告はほとんどない。

SE に関してこれまでに上記の内容が報告されている。現在、sepsis において体血管に対する iNOS、eNOS、それぞれから誘導される NO の作用・役割に関してかなりのことが解明されている。それに対し、脳血管内皮や BBB をはじめとした脳への影響に関する解析はまだまだ発展途上であり、さらに、動物実験レベルでは in vivo のものが全く行われていない。In vivo の面からのアプローチはこの病態の解析に新たな局面を与え、SE に対する特異的な治療法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

Cranial Window 法と呼ばれる、In vivo において脳血管内皮機能を評価する技術を有しており、これまで様々な薬剤が脳血管内皮機能に与える影響をこの方法を用いて研究、報告してきた。本研究では、Cranial Window 法を用いて SE のより詳細な病態を解明することを目的とする。また性差についても検討する。

【具体的な目的・検討項目】

(1) sepsis モデルラットを作成し、経時的に脳血管径の変化を観察する。

(2) アセチルコリン (NO ドナー) を直接、硬膜を切開した脳表に局所投与し、BBB の影響をできうるだけ除外した環境でかつ、全身の血管に影響を与えることなく、sepsis における脳血管内皮機能を評価する。

(3) アセチルコリンを大腿静脈よりボラス投与し、投与前後における体血圧の変化率を測定しそれを経時的に評価する。

(4) Sepsis において脳血管と体血管の内皮機能の障害の程度に差がみられるかどうか?、BBB の影響で脳血管内皮機能が障害されるまでの時間は体血管のそれと比べて遅いのかどうか?、in vivo において明確にする。

(5) さらに、最近、性差医療という言葉が聞かれるが雌雄で差がみられるか検討する。

3. 研究の方法

(1) sepsis モデルラットにおける脳血管内皮機能の評価

① 300-350 g、雄の SD ラットを使用。ペントバルビタール 0.1mg/kg を腹腔内投与し全身麻酔を行う。

② 気管切開により気道確保後、大腿動静脈にカニューレションしてルート確保。次いで、大腿静脈よりペントバルビタール 5mg/hr の持続投与により麻酔深度を一定に保つとともに、大腿動脈より観血的動脈圧モニタリングを行う。

③ 吸入酸素濃度 50% で人工呼吸器による陽

圧強制換気を行う。終末呼気二酸化炭素分圧は 35-40mmHg になるように分時換気量を調節する。

④ラットの開頭、硬膜切開を行い Cranial Window を作成し、光学顕微鏡下に脳軟膜血管を観察する。これが今回の研究において基本となるモデルである。Cranial Window 作成後、アセチルコリン (Ach) 10^{-6} M、 10^{-5} M の脳表への局所投与(5分間、12ml/h)により脳血管の反応性を評価 (Ach 投与前後の脳血管径の計測)。

⑤lipopolysaccharide(LPS) 10mg/kg を大腿静脈よりボーラス投与。投与後 1、2、3、4 時間ごとに Ach に対する脳血管径の反応性の評価を行う。同時に平均血圧、心拍数、血液ガス分析、直腸温を記録する。

⑥合わせて LPS 投与前と投与 4 時間後の血中 TNF- α を測定する。

(2) sepsis モデルラットにおける体血管内皮機能の評価

① (1) の①~③までは同じ。

②Ach 0.003 μ g/kg を大腿静脈より全身投与。投与前の平均血圧と投与後の最低平均血圧を記録 (コントロール)。10 分後、LPS 10mg/kg を大腿静脈よりボーラス投与。以降、LPS 投与後 1、2、3、4 時間後ごとに Ach を大腿静脈より 0.003 μ g/kg ボーラス投与し、投与前の平均血圧と投与後の最低血圧を記録。同時に心拍数、血液ガス分析、直腸温を記録。

③LPS 投与前と投与 4 時間後の血中 TNF- α を測定する。

④Ach 自体が sepsis に影響を及ぼす可能性があるため、コントロール群として、LPS を全く投与せず Ach のみ投与する群と、LPS のみ投与し Ach を投与しない群を作成し同様に実験を行う。

(3) 性差がみられるか検討する

4. 研究成果

はじめに、雄の SD ラットの脳血管内皮機能の評価したが、LPS (リポポリサッカライド) 静脈内投与 4 時間後まで、脳血管内皮細胞のアセチルコリンに対する反応性は維持されており、脳血管内皮細胞は障害されていないという結果を得た。これに対し、体血管のアセチルコリンへの反応性は LPS 静脈内投与 4 時間後までは比較的保たれてはいたものの、有意差はないが軽度の反応性の低下傾向を認めた。この結果から、脳血管内皮は体血管と比べて障害されにくい可能性が示唆された。病態生理として、血液脳関門により、脳血管内皮が体血管と比べ保護されていることが推測されるが、脳血管内皮細胞が果たし

て LPS 静脈内投与後、何時間程度で障害され始めるのか、それとも全く障害されないのかが、問題点として浮かびあがってきた。もう少し、観察時間を長くする必要があると考え、パイロットとして観察期間を 6 時間にとってみたが敗血症モデルラットが死亡してしまい実験が成立しなくなってしまうという新たな問題を生じた。そこで雄の SD ラットにおける実験を一旦、ここで終了し、雌の SD ラットにおいて同様の実験を行い性差を検討することに本研究をシフトした。雌の SD ラットにおいても雄とおおむね同様の結果であり本実験法では性差を認めなかった。敗血症性脳症では、脳血管内皮機能が障害され、脳血管のアセチルコリンに対する反応性が低下するという仮説をもとに、本研究を性差を含めて検討したが、それが否定された。仮説どおりの結果は得られなかったが、逆に敗血症性脳症の病態生理として、脳血管内皮機能は敗血症の早期ではあまり関与しないことが示唆された。今回の Cranial Window 法では敗血症性脳症の病態生理は明らかにできなかったため、方法を変えたアプローチが必要と判断された。

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)

この研究結果についてアメリカ麻酔科学会 (ASA) に応募するも演題は不採択であった。

[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

福岡 尚和 (FUKUOKA NAOKAZU)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00402181

(2) 研究分担者

(none)

研究者番号：

(3) 連携研究者

(none)

研究者番号：