

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592271

研究課題名(和文)敗血症性副腎不全への挑戦的治療戦略

研究課題名(英文)The aggressive treatment strategy for septic adrenal insufficiency

研究代表者

江島 豊(EJIMA, YUTAKA)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：90301051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイドは、糖質コルチコイドと鉱質コルチコイドという2種類に分けられる。鉱質コルチコイドの代表はアルドステロンである。アルドステロンは一般に悪玉と考えられているが、重症敗血症患者では低アルドステロン血症を呈することもあり、低アルドステロン血症が病態に関与している可能性がある。そこでラット重症敗血症副腎不全モデルにアルドステロン、糖質コルチコイドであるデキサメサゾン、それらの組み合わせ投与して治療を行った。

重症敗血症副腎不全ラットでは、糖質または鉱質コルチコイド単独の補充では生存できず、100%生存には鉱質コルチコイドと糖質コルチコイドの両者が必須であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Steroid is divided into two kinds of glucocorticoid and mineral corticoid. The representation of mineral corticoid is aldosterone. Most of medical scientists consider aldosterone as a cause of inflammation and useless. But blood aldosterone level shows low in some severe septic patient, and low aldosterone concentration in itself cause one of inflammation pathogenesis possibly. We studied steroid supplement treatment for severe septic adreanal insufficiency rat. The supplement method is only dexamethasone or only aldosterone or both. Adrenalectomized sepsis rat supplemented with only dexamethasone or aldosterone could not survive. We thought that the existence of both corticoids has specific effective effect on adrenalectomized sepsis rat living.

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：敗血症 アルドステロン

### 1. 研究開始当初の背景

今回の研究は、基盤研究(C) 研究期間 2008-2010、課題番号 20592114、「重症敗血症を救命する新たなアルドステロン治療戦略」に引き続く研究である。

アルドステロンは、コルチゾールの 100 分の 1 以下の血中濃度で作用を発揮する非常に強力なホルモンであり、体液・電解質バランスを維持する鉱質コルチコイドとして必要不可欠である。しかし、近年は、炎症を惹起させ、心筋の線維化、左室肥大を引き起こし、動脈硬化も促進させ、腎の線維化にも関与すると言われ、重症心不全にアルドステロン拮抗薬が有効であることも報告され、アルドステロンは生体にとって不利益なホルモンとも考えられている。一方、重症敗血症患者において、糖質コルチコイド投与について賛否両論の報告があるが、SCCM (Society of Critical Care Medicine), ESICM (European Society of Intensive Care Medicine) による Surviving Sepsis Campaign において ACTH 刺激試験で副腎不全が確認される場合は、糖質コルチコイドの投与が推奨され、重症敗血症患者における糖質コルチコイド投与は、ほぼ確立された治療法である。しかし、このような重症敗血症患者では Hyperreninemic hypoaldosteronism を呈することも知られており、その場合、急性腎不全を合併しやすく、ICU 滞在日数も延長する。本疾患群での腎機能を悪化の機序は不明であり、必ずしも糖質コルチコイドの不足だけでは病態の全体像を説明することができず、低アルドステロン血症も病態に関与している可能性は否定できない。また、このような血漿アルドステロンが低い患者においてアルドステロンを治療として用いた報告はない。従って、低アルドステロン血症を合併し、予後不良な病態の治療を検討するには、重症敗血症副腎不全モデルを作成し、腎機能との関連性で検討する必要がある。

### 2. 研究の目的

急性敗血症副腎不全モデルを作成し、副腎不全がどのように生存、病態(呼吸不全、心不全、特に腎不全)に関わっているかを、糖質コルチコイド、やアルドステロンを補充し、組織学的に解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用動物

体重 180-200g の雄性 Sprague Dawley ラット

#### (2) 副腎不全ラットの作成

副腎不全を発症させるために両側副腎摘出 (bilateral adrenalectomy, ADX) を行った。

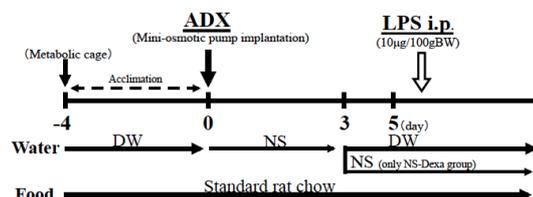
#### (3) ラット敗血症副腎不全モデル治療群

副腎不全ラットに各種の治療(下記 6 種類)を行った後、ADX 術後第 6 病日に LPS 10 µg/体重 100g を腹腔内投与して敗血症を惹起させるラット敗血症副腎不全モデル治療群を

作成した。無治療群(W 群): ADX のみ施行し、他の治療は行わない、アルドステロン治療群 (Ald 群): ADX 後に鉱質コルチコイド(アルドステロンの補充を行う群、デキサメサゾン治療群 (Dexa 群): ADX 後に糖質コルチコイド(デキサメサゾン)の補充を行う群、生理食塩水摂取デキサメサゾン群 (NS-Dexa 群)、アルドステロン・デキサメサゾン治療群 (Ald-Dexa 群): ADX 後にアルドステロンとデキサメサゾンの両者の補充を行う群、偽手術群 (Sham 群) の以上である。

#### (4) 検体採取

ADX 術後第 6 病日に検体採取を行った。LPS 投与前をコントロールとして敗血症前の状態を評価した。LPS 投与 2 時間後に採取した検体を使用して超急性期反応の検討を行った。また、W 群は LPS 投与後に死亡する直前もしくは LPS 投与 6 時間後、Ald 群、NS-Dexa 群、Ald-Dexa 群、Sham 群については LPS 投与 6 時間後に採取した検体を使用して急性期反応の検討を行った。



#### (5) 病理組織学的検討

採取した検体の固定と保存は、肝、肺、空腸には 10% 中性緩衝ホルマリン液(和光純薬工業、大阪)、腎には 90% エタノール溶液(和光純薬工業)を使用した。標本はパラフィンにて埋包し、厚さ 5 µm の横断切片を作成した。肝、肺、空腸の切片はヘマトキシリンエオシン染色(HE 染色)、腎の切片は HE 染色およびヨウ素酸シッフ染色(PAS 染色)を行った。各組織標本は病理診断医による評価を受けた。各臓器の検討項目を以下にあげる。

) 肺: 肺胞内硝子膜, 好中球数。

) 腎: 糸球体うっ血, 静脈うっ血, 静脈拡張, 尿細管上皮障害。

) 空腸: 線毛上皮障害, 血管周囲好中球数。

) 肝: 肝細胞内脂肪滴, うっ血, 視野内好中球数。

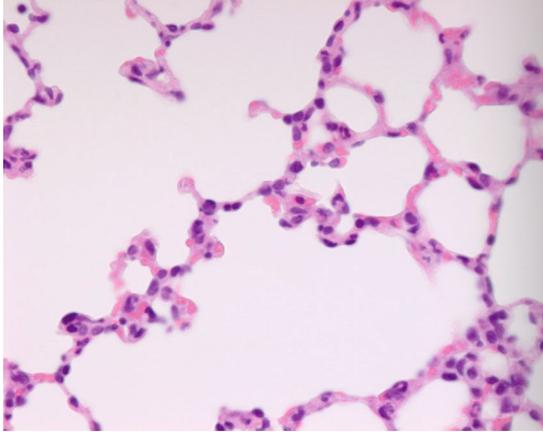
各々の標本の評価は、検討項目に高度に該当した場合を 3 点、中等度を 2 点、軽度を 1 点、該当しない場合を 0 点として点数化し、任意 5 視野の平均値を算出した。各群の評価は群内全標本の平均値とした。好中球数の評価は任意 5 視野(1 視野の面積 = 90 µm × 105 µm) 内好中球数の平均値とし、各群の評価

方法は群内全標本の好中球数の平均値とした。

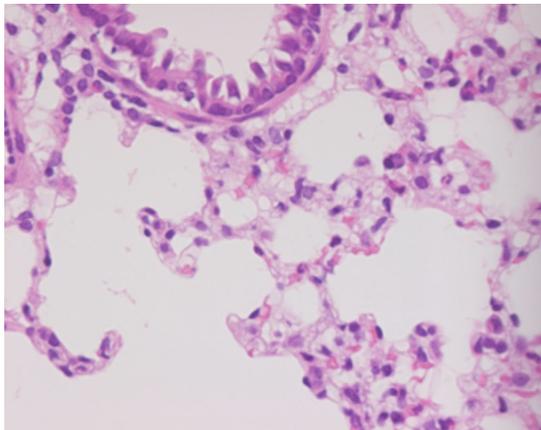
#### 4. 研究成果

##### (1) 肺

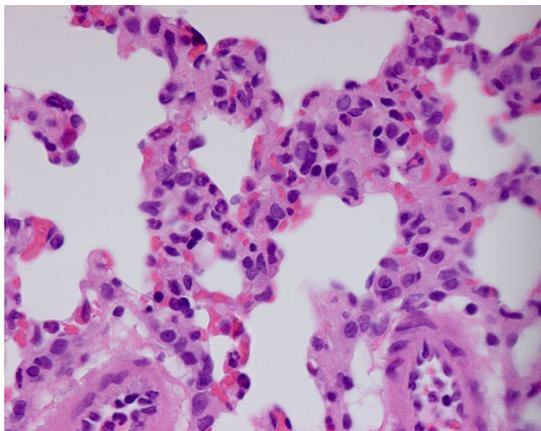
Sham群 LPS 投与前の標本から得られた正常肺組織像を示す。



Ald 群では肺胞内に硝子膜形成を強く認めた。



LPS 投与 2 時間後には、全ての群で好中球数の増加を認めた。



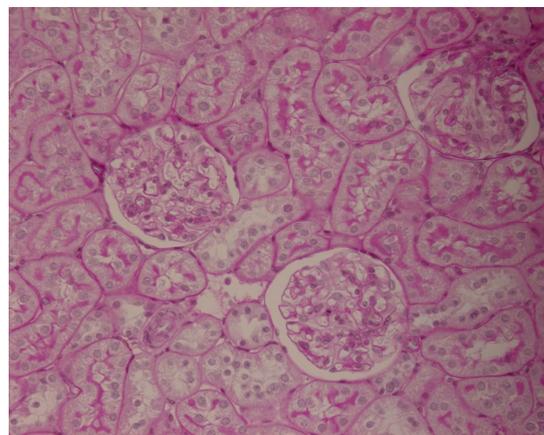
各検討項目についての各群のスコアを示す。

		肺胞内硝子膜	好中球数
W群	LPS投与前	0.1	5.7
	2時間後	0.0	19.6
Ald群	LPS投与前	1.6	3.3
	2時間後	1.3	13.0
Dexa群	LPS投与前	0.6	6.0
	2時間後	0.3	17.3
NS-Dexa群	LPS投与前	0.3	5.0
	2時間後	0.0	18.1
Ald-Dexa群	LPS投与前	0.3	4.7
	2時間後	0.1	21.1
Sham群	LPS投与前	0.0	4.0
	2時間後	0.3	17.9

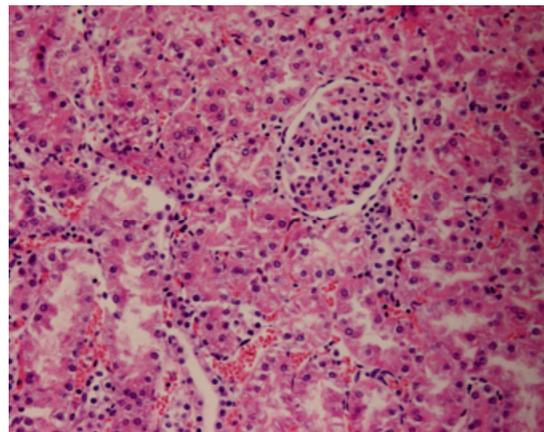
各群のn=7。肺胞内硝子膜はなし=0点、軽度=1点、中等度=2点、高度=3点。好中球数は視野(90 μm×105 μm)内好中球数。

##### (2) 腎

Sham群 LPS 投与前の標本から得られた正常腎組織像を示す。



LPS 投与 2 時間後には、全ての群で糸球体と静脈のうっ血、静脈の拡張と血球の充満を認めた。



各検討項目についての各群のスコアを示す。

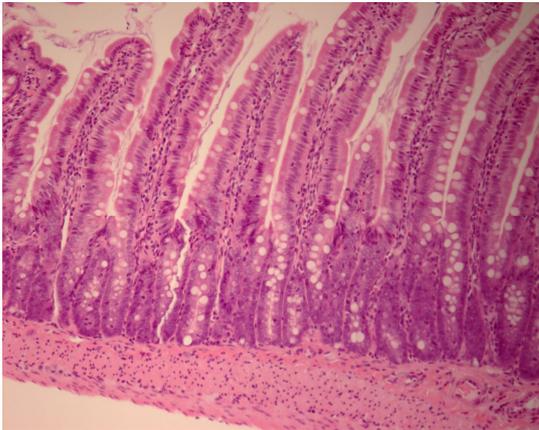
		糸球体うっ血	静脈うっ血	静脈拡張	尿管上皮障害
W群	LPS投与前	0.7	0.6	0.9	1.4
	2時間後	1.5	1.9	2.3	1.8
Ald群	LPS投与前	0.0	0.0	0.6	0.4
	2時間後	0.9	0.9	1.1	1.4
Dexa群	LPS投与前	1.3	1.0	0.9	1.0
	2時間後	1.6	1.3	1.4	2.3
NS-Dexa群	LPS投与前	0.6	0.3	0.6	1.0
	2時間後	1.3	1.1	1.0	2.0
Ald-Dexa群	LPS投与前	0.4	0.6	1.0	1.0
	2時間後	0.9	0.9	1.1	1.6
Sham群	LPS投与前	0.1	0.1	0.3	0.6
	2時間後	0.1	0.6	0.4	1.1

各群のn=7。各項目は、なし=0点、軽度=1点、中等度=2点、高度=3点。

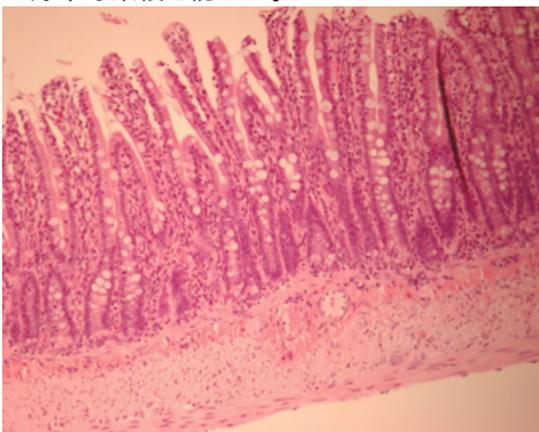
糸球体うっ血は、LPS 投与前はDexa 群に強く、LPS 投与 2 時間後は Dexa 群、W 群、NS-Dexa 群に強く認め、LPS 投与前後の変化はAld 群、W 群が大きかった。静脈うっ血は、LPS 投与前はDexa 群に強く、LPS 投与 2 時間後はW 群、Dexa 群、NS-Dexa 群に強く認め、LPS 投与前後の変化は W 群、Ald 群、NS-Dexa 群が大きかった。静脈拡張は、LPS 投与 2 時間後は W 群、Dexa 群に強く認め、LPS 投与前後の変化は W 群が大きかった。尿細管上皮障害は、LPS 投与前はW 群に強く、LPS 投与 2 時間後はDexa 群、NS-Dexa 群に強く認めた。

( 3 ) 空腸

Sham 群 LPS 投与前の標本から得られた正常空腸組織像を示す。



LPS 投与 2 時間後には、全ての群で血管周囲の好中球集積を認めた。



各検討項目についての各群のスコアを示す。

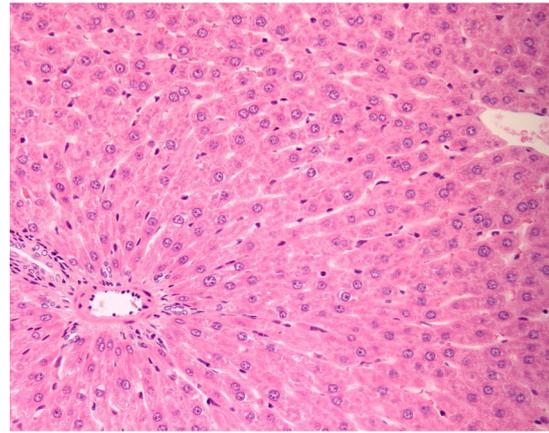
		線毛上皮障害	血管周囲好中球数
W 群	LPS 投与前	0.1	4.7
	2 時間後	1.9	9.8
Ald 群	LPS 投与前	0.1	3.1
	2 時間後	0.0	6.7
Dexa 群	LPS 投与前	0.1	2.1
	2 時間後	0.0	3.4
NS-Dexa 群	LPS 投与前	0.3	2.1
	2 時間後	0.1	5.3
Ald-Dexa 群	LPS 投与前	0.3	1.7
	2 時間後	0.4	5.9
Sham 群	LPS 投与前	0.0	2.7
	2 時間後	0.1	6.7

各群のn=7。線毛上皮障害は、なし=0点、軽度=1点、中等度=2点、高度=3点。血管周囲好中球数は、視野(90 μm×105 μm)内好中球数。

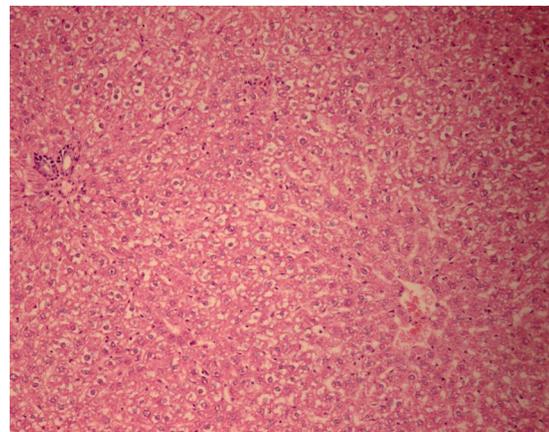
LPS 投与後の線毛上皮障害は W 群に強く認めた。好中球数は、LPS 投与 2 時間後は W 群、Ald 群、Sham 群に強く、LPS 投与前後の変化は W 群、Ald-Dexa 群、Sham 群、Ald 群に強く認めた。

( 4 ) 肝

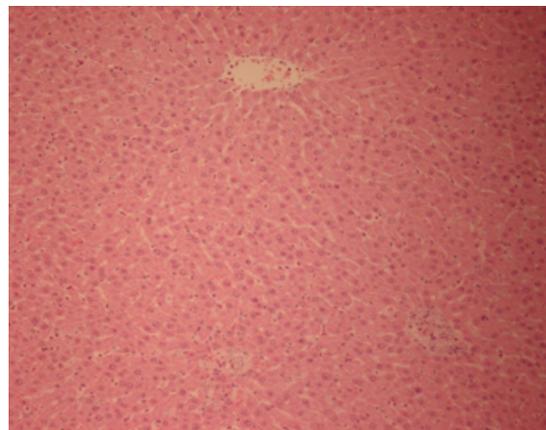
Sham 群 LPS 投与前の標本から得られた正常肝組織像を示す。



W 群を除く全ての群で、LPS 投与前に肝細胞内に脂肪滴を認めた。



LPS 投与 2 時間後には、全ての群で肝細胞の脂肪滴が減少し、好中球の浸潤を認めた。



各検討項目についての各群のスコアを示す。

		脂肪滴	うっ血	好中球数
W群	LPS投与前	0.0	0.4	0.6
	2時間後	0.0	0.8	4.5
Ald群	LPS投与前	1.1	0.1	1.0
	2時間後	0.1	0.0	5.1
Dexa群	LPS投与前	2.0	0.0	0.6
	2時間後	1.6	0.0	1.3
NS-Dexa群	LPS投与前	3.0	0.0	0.6
	2時間後	2.4	0.0	2.0
Ald-Dexa群	LPS投与前	2.9	0.0	0.7
	2時間後	1.1	0.0	4.1
Sham群	LPS投与前	1.3	0.0	0.3
	2時間後	0.9	0.0	3.6

各群のn=7。脂肪滴とうっ血は、なし=0点、軽度=1点、中等度=2点、高度=3点。好中球数は視野(90 $\mu$ m $\times$ 105 $\mu$ m)内好中球数。

LPS 投与前の肝細胞内脂肪滴は、NS-Dexa 群、Ald-Dexa 群、Dexa 群に強く認め、LPS 投与前後の変化はAld-Dexa 群 Ald 群が大きかった。うっ血は W 群に強く認めた。好中球数は、LPS 投与 2 時間後と LPS 投与前後の変化とともに Ald 群、W 群、Ald-Dexa 群、Sham 群で多かった。

## 考察

Ald 群は LPS 投与前から肺水腫の傾向にあり、LPS 投与 2 時間後にはそれが減少していることがわかった。これは、基盤研究(C)、研究期間 2008-2010、課題番号 20592114、「重症敗血症を救命する新たなアルドステロン治療戦略」での肺の湿重量/乾燥重量比の動きとも一致していた。LPS 投与 2 時間後には、肺の組織像では全群で好中球数が増加しているのに対し、血中白血球数の変動と一致していない。血中白血球分画や組織中の好中球の位置が血管内なのか血管外なのかも今後検討が必要であると考えられた。

LPS 投与 2 時間後には、Sham 群を除く全群で糸球体と静脈のうっ血、静脈の拡張とうっ血を認めた。尿細管上皮障害は、うっ血の強さと相関する傾向があった。特に W 群は前述の実験結果より低血圧が認められたが、それにもかかわらず静脈のうっ血が強いので、心不全により血圧低下と静脈還流障害が発生していることが示唆された。Dexa 群は高血圧にもかかわらず静脈のうっ血が強いので、心臓の拡張障害と血管収縮が発生していることが示唆され、NS-Dexa 群はその程度が軽いものと考えられた。逆に Ald 群は LPS 投与後にうっ血、静脈拡張とも比較的弱いにもかかわらず尿細管上皮障害を認めたので、循環血漿量減少と血圧低下による腎前性の腎血流低下が示唆された。

空腸絨毛の変化は比較的認めにくかった。LPS 投与 2 時間後には、全群で血管周囲の好中球集積を認めたが、W 群は特に強く線毛上皮障害も伴っていた。

W 群を除く全ての群で、LPS 投与前に肝細胞内脂肪滴を認め、LPS 投与 2 時間後には、全ての群で減少した。この動きは前述の実験結果である血清グルコース濃度の変化と同様の経過を示し、肝臓からのエネルギー動員

を覗かせた。糖質コルチコイドのない群、特に W 群はエネルギー貯蔵量が LPS 投与前から少なく生存に不利であると想像された。うっ血所見は W 群のみに見られた。好中球の集積は、Ald 群に強く、Dexa 群と NS-Dexa 群では反応は抑制されていた。

## 結論

本研究と前述の研究結果から、副腎不全を合併した重症敗血症性ショックの治療において、糖質コルチコイドを単独投与すると、心収縮力、血管抵抗を維持し血圧の維持に有効であると推察されるが、循環血漿量が過少となり適切な末梢循環が維持されない可能性があることが示された。しかし、一方で、糖質コルチコイドの投与は肺内水除去を促進し、敗血症時の呼吸不全を改善させる可能性を有していることが示唆された。また、鉱質コルチコイドの単独投与は、循環血漿量を維持することは可能であるものの、糖質コルチコイドがもつ心収縮力、血管抵抗維持作用を喪失しているため、適切な末梢循環の維持は困難であると推測される。さらに、肺水腫の発生、肺内水分量増加などに伴う肺障害を増悪させる可能性があると考えられる。本研究の結果から明らかにされた両者の特性を考慮した場合、糖質コルチコイド、鉱質コルチコイドの併用投与は適度な循環血漿量を維持し、心収縮、血管抵抗も保たれることから末梢循環の維持には最適であると考えられる。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江島 豊 (EJIMA, YUTAKA)  
東北大学・大学病院・准教授  
研究者番号：90301051

### (2) 研究分担者

松原 光伸 (MATSUBARA, MITSUNOBU)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：30282073

外山 裕章 (TOYAMA, HIROAKI)  
東北大学・大学病院・講師  
研究者番号：00375007

遠藤 康弘 (ENDO, YASUHIRO)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号：40375051