

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792077

研究課題名（和文） 敗血症性ショックに対する新規治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of new drugs for the treatment of the septic shock

研究代表者

矢野 武志 (YANO TAKESHI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80521707

研究成果の概要（和文）：敗血症性ショックは、過度の血管拡張をもたらす持続的な低血圧状態であり、血圧の維持に難渋することが多い。血管拡張の原因物質は過剰な一酸化窒素であり、これは高度な炎症の結果発現した誘導型一酸化窒素合成酵素によって作り出される。過剰な一酸化窒素存在下ではカテコラミン類の感受性が低下し、有効な昇圧作用を得るためには多量に投与する必要がある。血管平滑筋の収縮と弛緩は、平滑筋構成タンパク質であるミオシン軽鎖のリン酸化および脱リン酸化によって引き起こされる。本研究では、ラットから摘出した大動脈を用いて、ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬の血管収縮作用について調べた。ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬は濃度依存性に血管収縮作用を示し、一酸化窒素供与体であり血管拡張物質であるニトロプルシドナトリウム存在下でも血管収縮作用は変化しなかった。また、血行動態への影響を調べるため、ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬をラット生体モデルに経静脈的に投与したが、血圧と心拍数に変化は生じなかった。

研究成果の概要（英文）：Vasodilatory septic shock is resulted from excessive vascular smooth muscle relaxation and decreased sensitivity to endogenous vasoconstrictors. Myosin phosphorylation induces smooth muscle contraction, and myosin dephosphorylation, which is occurred by myosin phosphatase, is related to muscle relaxation. In this study, we investigated whether myosin phosphatase inhibitor regulated vascular smooth muscle contraction even though presenting of sodium nitroprusside, nitric oxide donor, in aortic ring of the rats. Myosin phosphatase inhibitor had an effect of vasoconstriction in the dose dependent manner. The vasoconstriction effects were not attenuated by sodium nitroprusside. However, in vivo rat model, intravenous administration of myosin phosphatase inhibitor did not show any hemodynamic changes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

敗血症性ショック時に生じる血管機能の変調は、過剰な血管平滑筋の拡張に加えて、代償性血管収縮能の破綻が原因である(N Engl J Med 2001)。ノルエピネフリンに代表

されるカテコラミンに対する血管平滑筋の感受性鈍化は、敗血症性ショック時にしばしば認められる状態であり、血圧を維持するために高濃度のカテコラミン投与量を必要とする(Crit Care Med 2004)。高濃度のカテコ

ラミン投与は様々な副作用をもたらし、死亡率を高めてしまう恐れがある。これらの血管平滑筋におけるカテコラミン感受性低下状態は、敗血症患者から取り出した血管や、敗血症モデルの実験動物の血管において確認されている(Crit Care Med 2001)。

血管拡張の原因物質は一酸化窒素 (NO) である。敗血症モデルを用いた動物実験において、NO 合成酵素阻害薬が低血圧からの離脱を可能とすることから、NO が血管拡張性低血圧の原因であることが証明されている (Am J Physiol 1993)。敗血症時に分泌されるサイトカインが NO 合成酵素の発現を誘導し、過剰な NO を産生させる。過剰に産生された NO は、活性化グアニル酸シクラーゼを介して細胞内カルシウムイオン濃度を低下させ、血管平滑筋の持続的な弛緩を引き起こす。これらの結果をふまえて、敗血症患者に対する NO 合成酵素阻害薬の有効性が検討されたが、投与群において死亡率が高くなってしまったため、研究が途中で終了した経緯がある (Cri Care Med 1999)。このため、NO を直接阻害する方法ではなく、拡張している血管平滑筋に作用しうる、異なったアプローチによる循環補助薬の開発が期待されている。

血管平滑筋の収縮と弛緩は、平滑筋構成タンパク質であるミオシン軽鎖のリン酸化および脱リン酸化によって引き起こされる (J Appl Physiol 2001)。リン酸化および脱リン酸化は、それぞれ、ミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK) とミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (MLCP) によって生じる反応である。ノルエピネフリンなどのアゴニストによって、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することにより、MLCK が活性化され、平滑筋の収縮が生じる。また、アゴニストによって活性化されたプロテインキナーゼ C および Rho キナーゼによって、ミオシン軽鎖のカルシウムイオン感受性が高められ、さらに MLCP 活性を抑制することによって、結果的に平滑筋の収縮を引き起こす経路も知られている (J Biol Chem 1996)。現在、MLCP 活性は、アゴニストに対する血管平滑筋の感受性や、カルシウムイオンの制御など、血管収縮の生理学的メカニズムにおいて、中心的な役割を果たしていると考えられている (Biochem Biophys Res Commun 2008)。

トートマイシンは放線菌より単離された抗生物質の一種であり、顕著な MLCP 阻害作用を持つことが知られている (J Antibiotics 1987)。MLCP 阻害薬は、ミオシン軽鎖のカルシウムイオン感受性も上昇させ、平滑筋に対し直接的な収縮作用を示す。また、カルシウムイオン非存在下であっても血管および腸管平滑筋を収縮させることが知られている (Bioorg Med Chem 1997)。研究代表者は、このトートマイシンによる

MLCP 阻害作用、直接的な平滑筋収縮作用、およびカルシウムイオン感受性向上作用を利用して、敗血症ショック時に認められる、過剰な NO によって生じた血管平滑筋の拡張やアゴニストへの反応性低下状態を回復し得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、MLCP 阻害作用を有するトートマイシンおよびカリクリン A に関して、正常時および敗血症性ショック様状態における血管収縮作用を調べた。また、ラット生体モデルにおける血行動態への影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) 血管モデルにおけるミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬の血管収縮作用

10 週齢程度の Wistar 系雄性ラットを用いた。セボフルラン 5 % を含有する混合空気を吸入させてラットの意識消失を得て、さらに過剰投与することで安楽死させ、開胸開腹した。心、肺を摘出し、露出した胸腹部大動脈を、周囲の結合織を含めて摘出した。取り出した胸腹部大動脈を冷却されたリンゲル液に浸けて、対物顕微鏡下に用手的に結合織を剥離除去した。胸腹部大動脈を観察し、損傷の無い胸部大動脈より、長さ 2 mm の血管リングを作成した。血管リングは、37 °C に保温したリンゲル液中に 1 時間放置し、収縮能の回復を図った。次に、血管収縮力を測定するため、血管リングを微小血管運動観察装置の測定バスにセットした。測定バスはおよそ 1 ml の容量があり、血管リングが完全に浸水した状態で、37 °C に温度調整されたリンゲル液を持続灌流した。血管リングは、タングステン線で作成されたフックに懸架し、タングステン線に連続する張力トランスデューサを介して収縮力を測定した。初期状態として、2g の張力を示す位置に血管リングを調整し、1 時間の回復期において、血管収縮力の測定を開始した。血管収縮の初期値は、高濃度カリウム (80 mM) 含有リンゲル液 (High K) を灌流させて求めた。High K やその他の試験薬は、7 分間灌流させ、続いて 23 分間の洗い出しを行った。High K 灌流によって得られた血管収縮を基準に、その他の試験薬の収縮力は相対的な収縮率として求めた。ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬の血管収縮の特徴を評価するため、一般的な血管作動薬であるノルアドレナリンと比較した。ノルアドレナリンは 0.001 μ M から 100 μ M に濃度を変化させながら 50 % 効果濃度 (EC50) を求めた。ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬であるトートマイシンおよびカリクリン A は 0.02 から 3 μ M の範囲で濃度を変化させて試験薬を投与した。また、敗血症性ショック時の血管収

縮機能の失調を再現するため、NOの供与体であるニトロプルシドナトリウム(SNP 10 μ M)存在下におけるノルアドレナリンまたはミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬の血管収縮作用を調べた。

(2) ラット生体モデルにおけるミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬の循環動態への影響

10週齢程度のWistar系雄性ラットを用いた。ラットへペントバルビタール(64.8mg/kg)を腹腔内投与し麻酔した。意識消失および痛み刺激に対する無動化を確認した後、右単径部を切開し、大腿動脈および静脈へカテーテルを対物顕微鏡下に留置した。左単径部も同様に切開し、大腿静脈へカテーテルを留置した。また頸部を正中切開し、対物顕微鏡下に鈍的剥離を加えながら気管を露出させ、気管切開して気管切開用チューブを挿入した。必要に応じて1%リドカイン溶液を局所浸潤麻酔として用いた。切開創を絹糸で縫合した後、ラットを測定ボックスへ固定した。大腿動脈に挿入したカテーテルを圧トランスデューサへ接続し、アナログデジタル変換器を介して、観血的動脈圧測定を連続的に行った。右大腿静脈へ挿入したカテーテルからはペントバルビタールを32.4 mg/kg/hで持続投与し、麻酔を維持した。左大腿静脈へ挿入したカテーテルからは、試験薬を投与した。動脈圧測定開始から1時間の回復期間を設けた。実際の血圧測定は、最初に10分間の測定を行って基準値とした。次の10分間で総容量を0.5 mlに調整した試験薬を持続静脈内投与した。さらに10分間の血圧測定を行い、試験薬投与後の変化を観察した。記録した血圧データは解析用コンピュータに保存し、比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) 血管モデルにおける各試験薬の血管収縮作用

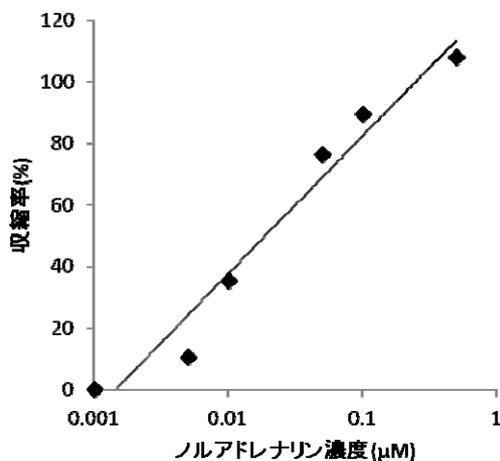


図1 ノルアドレナリンの用量反応曲線

ノルアドレナリンは濃度依存性に血管収縮作用を示し、EC50は0.035 μ Mであった(図1)。

ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬のカリクリンAも濃度依存性に血管収縮作用を示し、EC50は0.33 μ Mであった(図2)。

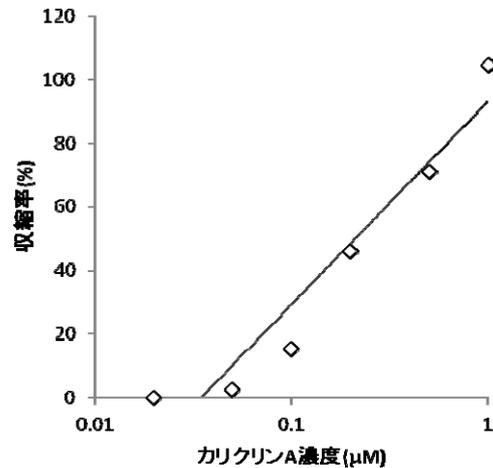


図2 カリクリンAの用量反応曲線

SNP存在下では、ノルアドレナリンの血管収縮作用は減弱し、EC50は90.2 μ Mであった。カリクリンAは、SNP存在下であっても血管収縮性は減弱せず、EC50は0.25 μ Mであった(図3)。

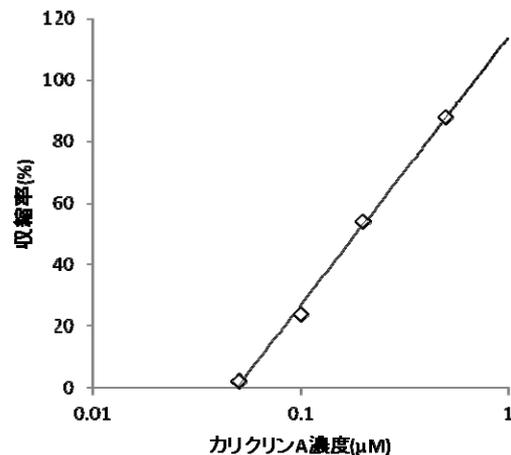


図3 SNP存在下におけるカリクリンAの用量反応曲線

ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬のトートマイシンは、低濃度では反応を認めなかったが、3 μ Mへ濃度を上昇させると軽度の血管収縮作用(平均5.6%)を認めた。さらに高濃度のトートマイシン溶液を作用させることが困難であったため、EC50の測定は不可能であった。

(2) ラット生体モデルにおけるミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬の循環動態への影響

各濃度のカリクリンA(0.1, 1, 5, 10, 20, 50, 100 μ g/kg)、およびトートマイシン(1, 2, 10, 50, 100 μ g/kg)を静脈内投与したが、血圧および心拍数は変動せず、投与前後および対照群(生理食塩液)との比較において、いずれも有意な血行動態の変化は認められなかった。

以上より、ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害薬が敗血症による血管拡張性ショックに対して有効である可能性が示唆されたが、血行動態への作用は認めず、摘出した血管標本と生体内では薬理作用が異なる可能性が考えられた。

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4件)

1. 矢野武志, 與那覇哲, 田村隆二, 丸田豊明, 松岡博史, 押川満雄, 谷口正彦, 恒吉勇男: 血球貪食症候群に合併したDICにトロンボモデュリンアルファを投与した1症例 血漿中プラスミノゲンアクチベーターインヒビターの消長から. ICUとCCU 37: 75-79, 2013 (査読有り)
2. 與那覇哲, 田村隆二, 丸田豊明, 矢野武志, 松岡博史, 押川満雄, 谷口正彦, 恒吉勇男: ダイナミックスケールは術後早期の血糖コントロールに有用である. 日本集中治療医学会雑誌 20: 91-92, 2013 (査読有り)
3. 矢野武志, 與那覇哲, 田村隆二, 丸田豊明, 松岡博史, 押川満雄, 谷口正彦, 恒吉勇男: 全身性エリテマトーデス発症後早期に肺胞出血を呈して死亡した一症例. 日本集中治療医学会雑誌 19: 681-682, 2012 (査読有り)
4. Takeshi Yano, Tatsuma Iwasaki, Hiroaki Naruo, Isao Tsuneyoshi: Comparison of predicted and perceived pain from epidural and spinal puncture in patients undergoing elective caesarean section. Anaesthesia and Intensive Care 39: 646-649, 2011 (査読有り)

[学会発表] (計5件)

1. 矢野武志, 宮里岳志, 長浜真澄, 越田智

広, 長野健彦, 與那覇哲, 押川満雄, 谷口正彦, 白阪哲朗, 恒吉勇男: 人工呼吸中の小児の気管チューブ固定にアンカーファストを使用した経験. 第40回日本集中治療医学会学術集会, 2013年2月28日, 長野

2. 矢野武志, 長濱真澄, 與那覇哲, 田村隆二, 矢野都子, 松岡博史, 押川満雄, 谷口正彦, 恒吉勇男: 間質性肺炎患者の抜管後呼吸不全に対する高流量鼻酸素カニューラ OptiflowTM の使用経験. 第34回日本呼吸療法医学会学術総会, 2012年7月14日, 沖縄
3. 矢野武志, 長濱真澄, 與那覇哲, 田村隆二, 丸田豊明, 矢野都子, 松岡博史, 押川満雄, 谷口正彦, 白阪哲朗, 恒吉勇男: 血球貪食症候群にトロンボモデュリン製剤を投与し plasminogen activator inhibitor-1を測定した1症例. 第39回日本集中治療医学会学術集会, 2012年2月28日, 千葉
4. 矢野武志, 池ノ上実, 太田尾剛, 與那覇哲, 田村隆二, 矢野都子, 谷口正彦, 恒吉勇男: ICUにて抜管困難を認めた後頭下開頭手術後の小児2症例. 日本臨床麻酔学会第31回大会, 2011年11月3日, 沖縄
5. 矢野武志, 小田信子, 矢野都子, 松岡博史, 谷口正彦, 恒吉勇男: 肺胞出血および高カリウム血症を呈し死亡した全身性エリテマトーデスの一症例. 九州麻酔科学会第49回大会, 2011年9月17日, 宮崎

[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

矢野 武志 (YANO TAKESHI)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 80521707