

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592346

研究課題名(和文) ヒト血管の反応性；正常反応から病態変化に関する研究

研究課題名(英文) Human vascular reactivity from normal status to pathophysiological conditions

研究代表者

恒吉 勇男 (Tsuneyoshi, Isao)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90301390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：血管径を一定に保とうとする筋原性収縮反応(Myogenic response)を検討した研究は少ない。当施設のPressure Servo Control systemを用いて臍帯動脈のmyogenic responseの変化を観察可能し、発生機序ならびにカルシウム拮抗薬の効果を検討した。

また臨床研究において心房利尿ペプチド(hANP)の腎障害に対する保護効果に関して検討を行った。さらに、液性因子であるtumor necrosis factor- α (TNF- α)のTTX-S Nav1.7 Na channelに及ぼす影響について実験を行い、疼痛発生のメカニズムに関して検討を行った。

研究成果の概要(英文)：The myogenic responses of vascular smooth muscle produces vasomotion in response to changes in vessel transmural pressure. In this study, we examined the effect of calcium antagonist on this myogenic responses in mice umbilical arteries. In this experiments, murine umbilical artery were cannulated and studied in vitro. A pressure servo-system maintained a constant transmural pressure. The diameter of the perfused vessel was constantly monitored and measured using a video camera and a video dimension analyzer.

We further studied the effectiveness of human atrial natriuretic peptide (hANP) on management of acute kidney injury. Intravenous low dose of hANP was useful as acute kidney injury management in gastrointestinal perforation and ileus patients undergoing non-elective surgery. In additional in vitro experiments, we evaluated whether tumor necrosis factor- α (TNF- α) affects the function and expression of the TTX-S Nav1.7 Na channel, which plays crucial roles in pain generation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管平滑筋 筋原性収縮反応 ショック ペプチド 腎保護 血管反応性

1. 研究開始当初の背景

生命を維持する上で循環動態の安定は不可欠である。循環系は、心機能と全身に張り巡らされている血管系とそれを介して伝達されるさまざまな生理活性物質が深く関与している。当教室では、ヒト血管に着目し、手術時に破棄される摘出臓器から血管を切り出し、その張力を測定するユニークな実験系を用いて数多くの研究成果を発表してきた。このヒト血管を用いた実験系は、シンプルではあるが、生体における血管反応性を直接観察することができることから、人体の血管トーンの恒常性や病態変化をリアルに再現できる優れた特性を有している。従って、本実験は臨床に則したショックの研究が可能であり、敗血症性ショック時に認められる血管反応性の低下とその病態解明に有用な知見が得られ、ショック患者の循環管理に役立つ新しい治療法の開発へ繋がることを期待される。さらに、新しい麻酔薬や循環作動薬のヒト血管に及ぼす影響を臨床効果と比較検討できること、また従来あまり着目されていない筋源性収縮反応を研究することで、autoregulation のメカニズムとショック時の機能破綻に関する研究を今後のテーマとして取り上げたい。

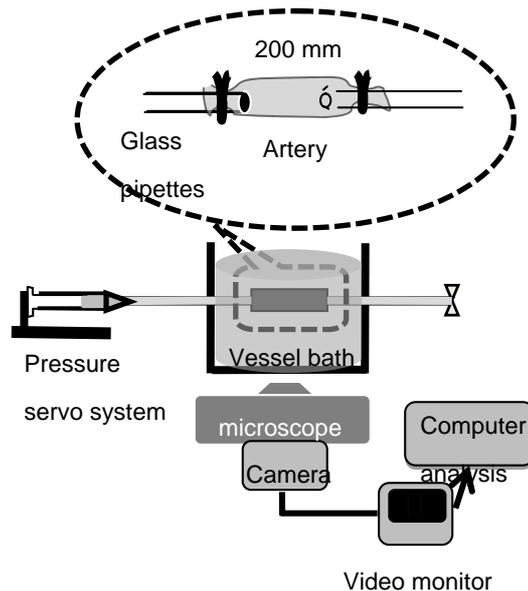
2. 研究の目的

麻酔やショック時における血管反応性の変化について、ヒト血管を用いて等尺性張力測定実験を行い、種差に影響を受けない臨床に則した研究を行う。さらに、血管内圧の上昇で収縮反応が生じる myogenic response に関する研究を、血管内腔を加圧して血管径の変化を観察するシステム pressure servo system を用いて検討する。このシステムを用いた研究では、各種臓器に張り巡らされている血管系と臓器特異的な auto-regulation 機能の関連を明らかにすることが可能となる。血管反応性に関して、正常反応からショックに至る変化を観察することで、その病態メカニズムの解析、解明を主眼に実験を行う。

3. 研究の方法

血管平滑筋は血流、圧、温度に対し血管径を一定に保とうとする自動能 (Myogenic response) を有していると考えられている。ショック時にはこれらの刺激に対する myogenic response は失調し患者の循環動態に強い影響を与えているものと推察されるが、これまでにヒト血管における myogenic response を検討した研究は皆無である。Pressure Servo Control system はサーボコントロールで血管内圧を細かく調整でき shear stress や血圧に対する myogenic response の変化が観察可能となる。さらに、従来から当研究室で検討しているショック血

管モデルにこれらのシステムを導入することでショック患者の血管に生じる myogenic response の変化を in vitro で研究できる。これらの結果は、ショック患者における myogenic response の循環への影響を知り得るのみならず、vascular auto-regulation 機構の変化を知るうえでも貴重なデータとなり得ると思われる。



また敗血症ショック患者のノルアドレナリン抵抗性の血管拡張反応に対し、バソプレシンの投与が有効に昇圧作用を発現することは周知されつつある。我々は、コロムビア大学 Dr. Landry らの報告に続き世界で 2 番目にその有用性を報告した。さらに、ヒト血管平滑筋を用いた等尺性張力測定実験において、臨床的に投薬するバソプレシンの量 0.04 単位 / 分では直接的な血管収縮作用が弱い割にノルアドレナリンの収縮作用を強力に改善する、いわゆる supersensitivity を誘発することがその一因であることを明らかにした。バソプレシンの投薬で明らかな副作用の報告が少ないのは、バソプレシンによる直接血管収縮作用が弱いことがその理由として挙げられる。このように、ホルモンや薬剤の血管反応性とその生理活性発現のメカニズムを解明することは、単なる基礎医学の枠を超えて、臨床上役に立つ知見として有用である。しかしながら、臨床上投薬されている麻酔薬や循環作動薬のヒト血管に作用する直接的効果に関しては、研究も少なく、不明な点も数多く残されている。今後の課題として、アンギオテンシンの血管平滑筋に及ぼす影響やバソプレシンの血管部位による反応性の違いなどを検討する。

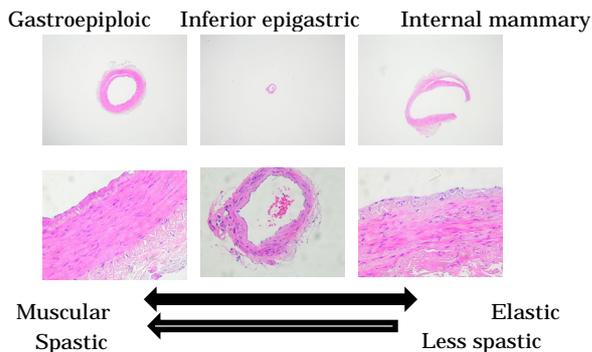
4. 研究成果

研究成果 1.

ヒト血管の反応性；実験的手法から臨床治療まで

J Anesth. 2012 Feb;26(1):147-51.

ヒト血管の収縮力と血管反応性を測定する実験方法を解説し、あわせて実験に用いる血管の部位を組織学的に検討した。当研究室では、血管の反応性は等尺性張力測定とプレッシャーサーボシステムを用いた血管径の変化をビデオで測定し、コンピュータを用いて血管径の変化を解析するビデオアナライシスシステムの両方を用いて実験を行っている。等尺性張力測定法は血管径が2~3mmの比較的大きな抵抗血管の張力測定が可能であるのに対し、ビデオアナライズシステムでは、100~200 μ mの径の小さい血管の反応性の測定が可能である。また実験に用いる血管はヒト血管を用いるが、手術で廃棄された臓器から摘出するため、倫理的な問題を生じない。図に実験に用いたヒト血管の組織標本を示した。胃体網動脈、体網の末梢にある内胃体網動脈、および内胸動脈は、組織学的に筋性血管から弾性血管へ順次移行しているのが分かる。これらの事から、胃体網動脈はより攣縮を起こしやすく、内胸動脈では攣縮の程度が軽い可能性が示唆された。



研究成果 2

臍帯動脈におけるMyogenic mechanism(筋原生収縮機構)の発生機序と抑制因子に関する研究

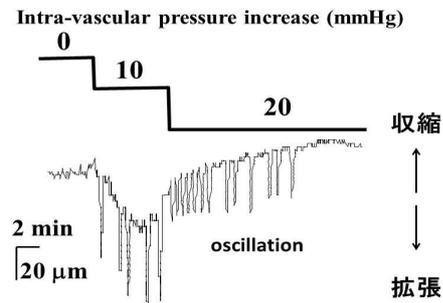
Myogenic mechanism(筋原生収縮機構)とは、動脈や毛細血管において体血圧が急激に上昇、下降した際に、血管が自動的に収縮または拡張して血流を一定に保たせる生体反応である。動脈の血管平滑筋は、平滑筋を脱分極させるイオンチャンネルを開口させることで収縮反応を惹起する。これにより血管を通過できる血液が大幅に低下し、血流量が減少することになる。

このシステムは、腎臓において特に発達しており、血圧の変化に影響を受けることなく糸球体濾過量を一定に維持するauto-regulation 反応として機能している。

腎臓以外の臓器として、心臓の冠動脈、冠動脈、脳動脈などにこのメカニズムは発達しており、血圧の上昇・下降に伴う血流の増減に対する臓器障害を回避する防衛機能として重要な役割を担っている。

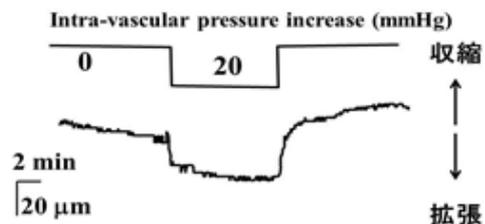
これまでの研究からマウス臍帯動脈にも強いmyogenic mechanismが存在することを発見した。研究方法に示したPressure Servo Control systemを用いて、マウスの胎児から摘出した臍帯動脈を血管灌流装置に取り付け、灌流する水圧を急激に上昇させると臍帯動脈はoscillationを生じて血管内腔の面積を一定に保つmyogenic responseを発生させた。このmyogenic responseは、血管内圧を10ないし20mmHgへ急激に上昇させた際に発生し、血管内圧の上昇に抵抗する形で血管径の拡大を抑制する機能として考えられた。一方、マウスの腸管脈動脈では内腔の加圧によりoscillationを生じることなく、拡張反応を呈するのみであった。このことから、臍帯動脈は急激な圧変化に対して、myogenic responseを誘発し、胎盤の血流を制御することで胎児に流入する血流を一定に保つ作用があると推測された。

図1. マウス臍帯動脈の内腔加圧によるmyogenic response



またマウス臍帯動脈において血管内腔の加圧により生じた myogenic response による収縮反応をカルシウム拮抗薬であるニフェジピンが強く抑制することを発見しており、この myogenic response にはカルシウムの細胞内外からの流入および排泄が重要な機能と

図3. Myogenic contraction に対するニフェジピンの効果

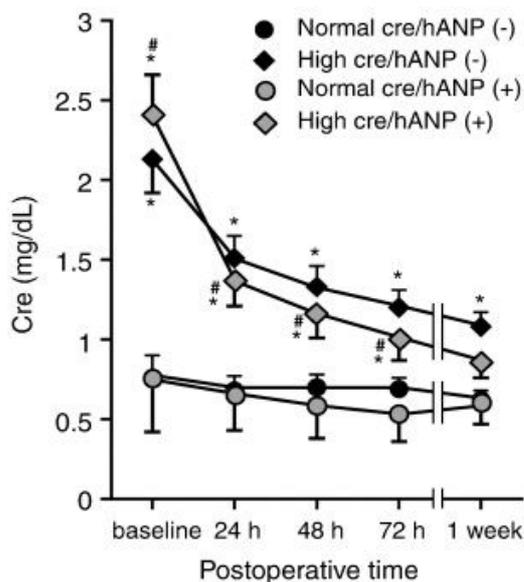


ヒト血管を用いた筋原生収縮反応に関する検討は期間内に完了しなかった。

研究成果3

低用量 hANP の持続投与がイレウスや腸穿孔患者の腎障害に与える保護効果に関する検討: A retrospective single-center study
J Crit Care Vol 28, Issue 2, Pages 133-140

目的: 今回我々は、human atrial natriuretic peptide (hANP) の腎機能障害に対する効果を検討した。方法: 2007年1月から2010年2月に腸管穿孔やイレウスに対して開腹手術を受けた患者43名を対象とした。患者は、hANP投薬の有無で2群に分けられ、さらに血漿クレアチニン値が <1.2 mg/dL; normal cre/hANP (-) (n = 22), high cre/hANP (-) (n = 10), normal cre/hANP (+) (n = 4), そして high cre/hANP (+) (n = 7) の4群に細分された。hANPは手術開始とともに投与が開始された。結果: hANPの投与量は、一人の患者を除き、分時0.02から0.05 μ g/kgであり、術後の平均投与時間は、 167 ± 237 h (range, 8-888 h)であった。4群に分けた対象患者の体重を除く特性には有意差がなかった。高 cre/hANP (+) グループの血漿クレアチニンは高 cre/hANP (-) グループの患者群より有意に低下した。28日生存率は4群で有意さが無かった。すべての患者において、腎代替療法を必要とした患者はいなかった。結語: 低用量 hANP の持続投与は、イレウスや腸穿孔患者の腎障害を軽減する上で有用な薬剤となり得ることが示唆された。



図説: クレアチニンの高い患者と正常範囲の患者に hANP を投与し、血漿クレアチニンの経時的変化をプロットした。

研究成果4

培養ブタクロマチン細胞とラット dorsal root ganglion (DRG) 神経根細胞における tumor necrosis factor- α によるナトリウムチャンネル

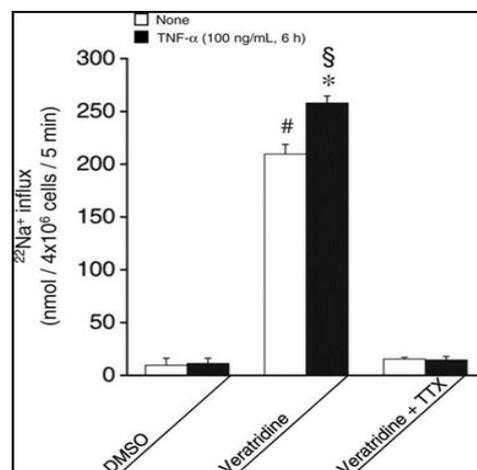
NaV1.7 のアップレグレーション効果について

Anesth Analg. 2014 Feb;118(2):318-24.

背景: Tumor necrosis factor- α (TNF- α) は単に炎症反応のキーマediator のみならず疼痛反応においても重要な役割を担っていることが示唆されている。TNF- α は、tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) および tetrodotoxin-resistant Na チャネルの内向き電流を培養された dorsal root ganglion (DRG) neurons で発生させた。しかしながら、TNF- α が痛みの発生メカニズムに深く関与する TTX-S NaV1.7 Na チャネルにどのような影響を及ぼすかに関する検討は十分ではない。方法: NaV1.7 Na チャネルのアイソザイムを発現したブタクロマチン細胞とラットの DRG neurons を用いて実験を行った。クロマチン細胞の TNF receptor 1 and 2 (TNFR1 and TNFR2) 発現を Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain 反応を用いて観察した。TNF- α の NaV1.7 発現に関する影響は、reverse transcription-polymerase chain 反応とウエスタンブロット法を用いて解析した。結果は平均 \pm 標準誤差で示した。

結果: TNFR1 および TNFR2 はブタクロマチン細胞とラットの DRG neurons の両方で発現した。TNF- α によりブタクロマチン細胞の NaV1.7 mRNA は $132\% \pm 9\%$ (N = 5, P = 0.004)、また DRG neurons では $117\% \pm 2\%$ (N = 5, P < 0.0001) アップグレードした。ウエスタンブロット解析では、TNF- α は NaV1.7 をクロマチン細胞で $166\% \pm 24\%$ (N = 5, corrected P < 0.0001) 濃度依存性に、かつ継続的にアップグレードさせた。

結語: TNF- α は、クロマチン細胞と DRG neurons で NaV1.7 mRNA の産生をアップグレードさせた。加えて、TNF- α は、TTX-S NaV1.7 チャンネルを黒マフィン細胞で増加させた。これらの研究結は、末梢性の侵害受容性疼痛発生に関する TNF- α の関与を理解する上で重要な知見と思われる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- 1) Tamura R, Nemoto T, Maruta T, Onizuka S, Yanagita T, Wada A, Murakami M, Tsuneyoshi I. Up-regulation of NaV1.7 sodium channels expression by tumor necrosis factor- α in cultured bovine adrenal chromaffin cells and rat dorsal root ganglion neurons. *Anesth Analg*. 2014 Feb;118(2):318-24. (査読有)
- 2) Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Ueda Y, Ohba T, Yanagita T, Watanabe H, Shirasaka T, Tsuneyoshi I, Ishida Y, Hirota K, Sawaguchi A, Murakami M. Involvement of the orexin system in adrenal sympathetic regulation. *Pharmacology*. 2013;91(5-6):250-8. (査読有)
- 3) Shirasaka T, Yano T, Kunitake T, Tsuneyoshi I. High-dose remifentanyl increases blood pressure and heart rate mediated by sympatho-activation in conscious rats. *J Anesth*. 2013 Jun;27(3):325-32. (査読有)
- 4) Maruta T, Otao G, Miyazato T, Maruta N, Yamauchi K, Yano T, Kawano T, Tsuneyoshi I. Effects of intravenous low-dose recombinant human atrial natriuretic peptide on renal function in the perioperative management for gastrointestinal perforation or ileus: a retrospective single-center study. *J Crit Care*. 2013 Apr;28(2):133-40. (査読有)
- 5) Yano T, Ibusuki S, Takasaki M, Tsuneyoshi I. Dimethylsulfoxide potentiates the nerve conduction-blocking effect of lidocaine without augmentation of the intracellular lidocaine concentration in the giant axon of crayfish in vitro. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013 Aug;27(4):402-8. (査読有)
- 6) Tsuneyoshi I. Vascular reactivity in human arteries: from experimental study to clinical application. *J Anesth*. 2012 Feb;26(1):147-51. (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

1. 黒木俊介, 日高康太郎, 丸田豊明, 森信一郎, 恒吉勇男. 術前に診断されなかった大動脈弁狭窄症により心停止を来した一例. 日本心臓血管麻酔学会第19回学術大会, 2014, 9.21(大阪府、大阪市)
2. 丸田豊明, 古澤高廣, 川崎祐子, 丸田望, 恒吉勇男. 好感度免疫測定法を用いた心筋障害患者の尿中トロポニン測定法の検討(ポスターディスカッション). 日本麻酔科学会第61回学術集会, 2014, 5.15(神奈川県、横浜市)
3. 田村隆二, 丸田豊明, 根本隆行, 田村真由子, 丸田望, 恒吉勇男, TNF- α により Nav1.7 の発現は増加する(ポスターディスカッション). 日本麻酔科学会第61回学術集会, 2014, 5.15(神奈川県、横浜市)
4. 丸田豊明, 越田智広, 與那覇, 阪哲朗, 谷口正彦, 恒吉勇男: 超急性期心筋障害

の発見における高感度心筋トロポニンの有用性について. 第41回日本集中治療医学会学術集会, 2014, 2.27(京都府、京都市)

5. 白阪哲朗, 門田瑤子, 内村修二, 恒吉勇男, レミフェンタニルの循環作用における自律神経活動の関与. 第34回日本循環制御医学会総会, 2013, 6.7(福井県、福井市)
6. 白阪哲朗, 宮里岳志, 越田智広, 田村隆二, 矢野武志, 恒吉勇男: 新規鎮静・催眠化合物 JM-1232(-) の循環および腎交感神経活動に及ぼす影響. 第40回日本集中治療医学会学術集会, 2013, 2.28(長野県、松本市)
7. 恒吉勇男: 心血管の反応性 通常反応からショック時までの変化. 第29回旭川全身管理研究会, 2012, 12.15(北海道、旭川市)
8. 長嶺佳弘, 宮里岳志, 小西紗織, 柏田政利, 恒吉勇男: 胎盤用手剥離直後に大量出血を来した緊急手術中に心停止に至った癒着胎盤の1症例. 九州麻酔科学会第50回大会, 2012, 9.8(福岡県、久留米市)

〔図書〕(計5件)

1. 河野太郎, 柏田政利, 恒吉勇男: 加齢による生理機能の変化. For Professional Anesthesiologists 高齢者の周術期管理, pp13-30, 克誠堂出版, 東京, 2014. (2014.11.1)
2. 恒吉勇男: 全身麻酔薬と麻酔関連薬 麻酔性鎮痛薬(オピオイド系鎮痛薬). TEXT 麻酔・蘇生学, 改訂4版, pp176-179, 南山堂, 東京, 2014. (2014.3.14)
3. 恒吉勇男: 全身麻酔薬と麻酔関連薬 静脈麻酔薬. TEXT 麻酔・蘇生学, 改訂4版, pp167-175, 南山堂, 東京, 2014. (2014.3.14)
4. 恒吉勇男: バソプレシン. For Professional Anesthesiologists 心血管作動薬, pp229-239, 克誠堂出版, 東京, 2013. (2013.5.23)
5. 恒吉勇男: ノルアドレナリン. For Professional Anesthesiologists 心血管作動薬, pp133-142, 克誠堂出版, 東京, 2013. (2013.5.23)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

国内外の別:

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恒吉 勇男 (Isao Tsuneyoshi)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 90301390

(2) 分担者 なし