

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592745

研究課題名(和文)腎内血流不均衡が敗血症性急性腎障害を引き起こす

研究課題名(英文)Does an imbalance in intrarenal blood perfusion cause septic acute kidney injury?

研究代表者

石川 健(Ken, Ishikawa)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：30326649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動物モデルで大腸菌Lipopolysaccharide(LPS)による敗血症導入によって、尿量の減少と血清クレアチニン値の上昇があり、敗血症性急性腎障害が誘導された。敗血症性急性腎障害では糸球体が多く存在する腎表層の酸素分圧の変動は少なく、糸球体の組織学的変化はなかった。一方、尿細管間質が存在する腎深部の酸素分圧は変動が大きく、組織学的変化も認められた。しかし、血圧の低下と酸素分圧との間に有意な相関は無かった。LPSによる敗血症では、敗血症性急性腎障害の主因は尿細管障害で、必ずしも虚血(酸素分圧の低下)のない状態でも尿細管障害が誘導されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Injection of Lipopolysaccharide(LPS) from E.coli could cause septic acute kidney injury with decrease in urinary output and increase in serum creatinine.

The oxygen partial pressure at surface area in the kidney where there were numerous of glomeruli did a little change during sepsis. The glomeruli did not show histological change. On the other hand, the oxygen partial pressure at deep area in the kidney where there were numerous of tubules did more change during sepsis compared with the surface area. The tubules did show histological change.

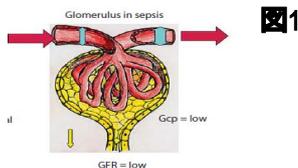
However, there was no significant correlation in changes between blood pressure and oxygen partial pressure in both deep and surface area in the kidney. In sepsis induced by injection of LPS, injury of tubules might be a main cause, which did not need to require decrease in oxygen partial pressure.

研究分野：小児科

キーワード：敗血症 急性腎障害 腎内血流不均衡

1. 研究開始当初の背景

敗血症は集中治療室で治療される重症患者の主要な死亡原因である。特に敗血症に伴い二次的におきる敗血症性急性腎障害 (septic acute kidney injury: septic AKI) を合併した場合には死亡率は 70% を超える¹。しかしながら、未だ septic AKI の病態の理解が不十分で²、有効な治療法が確立されず、予後の改善は得られていない。これまで、septic AKI の原因は低血圧・腎血管収縮による腎血流低下・腎虚血がもたらす尿細管壊死と考えられてきた³。しかし、この仮説は低心拍出量の敗血症モデルを用いた実験結果に基づいていた。ヒトの敗血症では心拍出量は増大し、過剰に産生された一酸化窒素 (nitric oxide: NO) によって全身の血管が拡張し低血圧を引き起こす (hyperdynamic septic shock)。我々が行った包括的 review によって、hyperdynamic septic shock では、腎血流は増加または変化しない⁴、尿細管壊死を示す組織所見は乏しいこと⁵が明らかになった。加えて、申請者らが羊を実験モデルに行った敗血症の実験では血圧の低下がなく、腎血流が増加した状態で septic AKI が起きることを証明した⁶。「血圧の低下がなく、腎血流の増加している敗血症で、なぜ起きるのか」という疑問が想起される。Bellomo らは以下の仮説を示している。



敗血症では糸球体の輸出入動脈のアンバランスな拡張が引き起こされ、糸球体輸出動脈の相対的拡張の結果、糸球体内圧の低下がおき、これが septic AKI の主因であると仮定している^{2,7} (図2)。この仮説は輸出動脈側により多くの作動レセプターがある Angiotensin II⁸ や長時間作用型アルギニン

バゾプレッシン合成薬 (Terlipressin) が septic AKI の腎機能を改善させたという結果にも支持されている⁹。

この結果を基に、我々は他臓器と同様、過剰に産生された NO が糸球体輸出入動脈のアンバランスを引き起こすと仮定し、動物モデルを用い検証を行った。Septic AKI を呈した動物モデルの腎動脈に直接、非選択的 NO 合成酵素阻害薬を投与し過剰産生された NO の抑制を試みた。その結果、敗血症の導入で増加した腎血流を元に戻すことはできたが、腎機能を改善することは出来なかった⁶。

また、敗血症では誘導型 NO 合成酵素 (inducible NOS: iNOS) の発現増加が著しく、それによって過剰産生された NO が septic AKI を引き起こすとの主張に対し¹⁰、選択的 iNOS 阻害薬を用いて同様の検討を行ったが、腎機能を改善することは出来なかった¹¹。

これまでの結果から、septic AKI の病態を腎糸球体の輸出入動脈のアンバランスだけで説明するのは難しく、septic AKI では腎内の糸球体それぞれの血流量・濾過量に差があるのではないかと考えた。

我々の実験では、腎動脈の本幹で腎臓に流入する総腎血流量を測定し、腎血流が増加した状態で septic AKI が進展することを証明してきた⁶。しかし、腎内の血流分布についての検討は不十分であった。腎内の血流分布は生理的に不均衡で、腎髄質の血流量は皮質血流量の 5 分の 1 程度である。加えて、腎内の糸球体はその存在する位置によって糸球体輸出動脈に連なる血管系が異なる。腎表層に近い糸球体では近位尿細管周囲の毛細血管に、皮髄境界の傍髄質糸球体では尿細管に併走する下行直血管が続き尿細管周囲毛細血管に連なる。糸球体濾過量 (glomerular filtration rate: GFR) にも不均衡があり、皮質外層・中間層・内層に存在する糸球体の順に GFR

は減少し, Angiotensin IIへの反応もそれぞれ異なる⁹.

Septic AKIでは皮質と髄質の血流量の差だけでなく, 皮質外層・中間層・内層でも血流量やGFRの不均衡がNOによって増幅されているのではないかと考えた.

Septic AKIで腎血流量が増加する一方でGFRが減少する病態として, 以下の両論の並存を仮定した.

表層に近い糸球体では輸出入動脈は拡張し灌流する血液量は増加する. しかし相対的に輸出動脈の拡張が大きく, 糸球体内圧は低下しGFRは減少する.

皮髄境界の傍髄糸球体への血流は減少し, それに引き続く尿細管周囲毛細血管への血流減少は尿細管障害を続発する.

2. 研究の目的

これまで我々は腎血流が増加するにもかかわらず腎機能が低下する septic AKI の病態解明を進めてきた. 腎糸球体の輸出入動脈のアンバランスにその原因を求めたが, それだけでは病態を説明することは困難であった. そこで腎内にもともとある生理的な血流・GFRの不均衡に着目し, septic AKI では過剰に産生された NO によって腎内血流・GFRの不均衡が更に増幅するのではないかと考えた. 本研究は急性尿細管壊死・尿細管障害と糸球体輸出入動脈のアンバランスを融合させ septic AKI の病態を, 新しい観点から説明できる可能をもつ.

本研究では septic AKI 動物モデルを用い septic AKI の前後で, 腎内の血流分布の違いと, その変化について明らかにする.

3. 研究の方法

敗血症性急性腎障害 (septic AKI) モデルにおける腎内酸素分圧の不均衡とその変化の評価

1. septic AKI モデルとして 3-4kg 前後のウサギ (Japanese White 種オス) を用いる.
2. 処置の前に ketamine (25 mg/kg) と xylazine (5 mg/kg) を筋注し, 処置の間には 30 毎に xylazine (15 mg/kg) の筋注を追加する¹¹.

3. 左側臥位の状態で, 保温テーブル (38 度) 上に固定する. 耳介動脈に血圧・心拍数測定と採血用の留置針を挿入する. 剃毛した右足で酸素飽和度を測定する. 薬剤投与用の耳介静脈に静脈路を確保する. 膀胱に 6Fr のバルーンカテーテルを挿入し尿の採取と尿量測定に使用する.
4. 剃毛した皮膚と皮下組織にプロカインを用い局所麻酔を行った後に, 皮膚切開を加え外科的に左側背部から左腎を露出する.
5. 露出した左腎の腎被膜を持ち上げ一部切開する. 酸素分圧測定用のストッパーのついた針電極を腎表層 (深さ 0.2cm), 髄質部 (深さ 1cm) にそれぞれ挿入する. それぞれの針電極のストッパーは腎被膜と腎の間に挟み込む形で挿入し, 針付きナイロン糸を用い周囲の組織とともに固定する. 電極の対側を皮下を通して体外に出し測定器に接続する. 切開部は生理食塩水で浸潤した滅菌ガーゼで覆う.
6. 処置の後には鎮痛・鎮静にバランス麻酔 (neuroleptanalgesia: NLA) を用いる. 実際にはフェンタニールとドロペリドールの合剤 (タラモナル) を用い, 導入時にはフェンタニールとして 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を生理食塩水で希釈し緩徐に静注しする. その後, 実験の最中はフェンタニールとして 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ の速さで持続的に点滴静注する.
7. 処置と敗血症による虚脱 (septic shock) を回避するために, 処置時から生理食塩水を 8ml/kg/h で投与する¹⁴.
8. 敗血症導入の 1 時間前から血圧心拍数・酸素飽和度・腎内酸素分圧の連続測定を開始する. 得られたデータは連続的にコンピュータに保存する.
9. 1 時間の baseline データの収集後, 耳介動脈から採血し血液ガス (pH, CO₂, O₂, HCO₃⁻, BE, Ht, Na, K), 血清クレアチニン, 血液一般検査 (白血球数, 赤血球数, Ht, Hb, 血小板数), 血糖を測定する.
10. 膀胱留置カテーテルから尿を採取し, 尿中クレアチニンと Na に加え, 尿細管障害の指標として尿中 NAG (N-acetyl-D-glucosaminidase) を測定した.
11. 敗血症の導入は当初, cecum ligation and puncture (CLP) で行っていたが, 敗血症の導入が安定してできなかった. このため, Lipopolysaccharides (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma) を生理食塩水で溶解し 1mg/ml の濃度となるように調整し, 0.5mg/kg を静脈内投与し, 敗血症を導入した.
12. 導入後 2・4・6 時間で前述の内容の採血・採尿, 尿量測定を行った.
13. 敗血症導入後 6 時間にペントバルビタールを

過量投与し安楽死させ両腎を摘出した。得られた左腎はホルマリン固定し、HE染色を行い、光学顕微鏡で組織学的評価を行った。また、得られた右腎は小切片に分割し冷凍保存した。

統計解析

LPS 投与前と投与後 2, 4, 6 時間のそれぞれの各種測定値の比較を行った。正規性の検定に Shapiro-Wilk normality test を用いた。データに正規性のある場合には one-way ANOVA を用い、Post hoc comparisons には Bonferoni 法を用いた。データに正規性のない場合には Kruskal-Wallis test を用い比較を行った。有意差を $p < 0.05$ とした。

全てのデータは中央値(範囲)で示した。

4. 研究成果

(1) 敗血症モデルの作成に伴う困難：

cecum ligation and puncture (CLP)による敗血症導入では、敗血症の程度に個体差が大きく研究の継続が困難であった。

(2) 大腸菌 Lipopolysaccharide (LPS) による敗血症導入による各種変化

LPS 投与を行った動物モデル(n=10)のうち LPS 投与直後に死亡したもの(n=2)を除いたもの(n=8)で LPS 投与の評価を行った。LPS 投与による敗血症の導入によって心拍数は増加し、血圧は低下した。血液ガスでは CO_2 と HCO_3^- は低下した(表 1)。また、血液一般検査では白血球と血小板は有意に減少した(表 1)。これらの所見は敗血症および敗血症性ショックの定義を満たした¹¹。

表 1.

血液一般	Pre-LPS	Post-LPS 2h	Post-LPS 4h	Post-LPS 6h
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	3,200 (2,700-6,400)	600 [†] (300-1,000)	650 [†] (500-1,000)	1,050 (600-2,900)
PLT ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	20.2 (16.9-31.9)	12.1 [†] (5.5-19.4)	10.5 [†] (5.8-18.9)	8.8 [†] (4.2-15.3)
Ht (%)	41.7 (39.1-48)	41 (39.3-44.9)	38.2 [†] (35.8-40.6)	35.6 [†] (32.3-38.4)
血液ガス				
CO_2 (Torr)	44.2 (36.8-49)	26.5 [†] (15.7-32)	26.2 [†] (13.1-29.4)	25.7 [†] (16-34.7)
pH	7.364 (7.313-7.432)	7.374 (7.343-7.481)	7.367 (7.258-7.488)	7.366 (7.162-7.481)
O_2 (Torr)	81.9 (44.5-86.9)	133.7 [†] (84.6-151.3)	109.7 (74.2-158)	106.7 (36.4-139.6)
HCO_3^- (mmol/l)	23.8 (22.3-26.8)	14.9 [†] (10.8-23)	15 [†] (9.7-17.4)	14.1 [†] (10.6-15.8)
電解質・血糖				
Na (mmol/l)	146 (132.9-153.8)	150.8 (145.1-160.7)	154.6 [†] (151-158.1)	155.4 [†] (147.4-159.6)
K (mmol/l)	4 (3.6-4.6)	3.3 [†] (2.9-3.6)	3.7 (3.1-4)	3.9 (3.3-4.5)
血糖(BS) (mg/dl)	278.5 (154-345)	148.5 (107-214)	98.5 [†] (84-126)	85.5 [†] (80-130)

* $p < 0.05$, † $p < 0.01$

e. LPS による敗血症性急性腎障害

(septic acute kidney njury: septic AKI)

LPS 投与による敗血症の導入によって尿量は減少した(表 2)。また、血清クレアチニン(CRE)は上昇し,AKI の基準の satge1 を満たした(表 2)¹²。尿中 NAG は上昇し尿細管障害が起きたことを示した(表 2)。

septic AKI	Pre-LPS	Post-LPS 2h	Post-LPS 4h	Post-LPS 6h
尿量 (ml/h)	13.5 (3.6-41)	3.7 (1.3-12.5)	1.1 [†] (0.3-13.3)	1.6 [†] (0.5-9.5)
CRE (mg/dl)	0.865 (0.76-0.99)	1.095 (0.98-1.44)	1.575 [†] (1.13-2.13)	1.63 [†] (1.14-2.25)
NAG (IU/L)	1.3 (0.5-1.8)	3.6 (2.2-17.8)	31.6 (1.4-60.7)	28.9* (2.1-95.8)

septic AKI: septic acute kidney injury, * $p < 0.05$, † $p < 0.01$

f. LPS による腎内酸素分圧変化

LPS 投与による敗血症の導入によって、腎深部・表層ともに酸素分圧の有意な変化はなかった(表 3)が、深部の変動大きい傾向にあった(表 3)。

表 3.

腎内酸素分圧	Pre-LPS	Post-LPS 2h	Post-LPS 4h	Post-LPS 6h
深部酸素分圧 (mmHg)	51 (23.6-134.2)	45.7 (23.2-102.8)	41.9 (8.2-125.8)	50.3 (21.9-147.4)
深部変化率 (%)	100	98.06 (24.07-197.4)	99.48 (18.85-225.6)	115.7 (16.32-218.1)
表層酸素分圧 (mmHg)	77.9 (8.4-147.7)	85.3 (6.4-158.2)	89.2 (5.4-172.2)	79.9 (5.1-205.4)
表層変化率 (%)	100	106.9 (76.19-124.5)	109.7 (64.29-167.6)	123.6 (60.71-181)

g. 血圧変動と AKI

血圧の変動と AKI の関係の評価するため、血圧変動率(%)と LPS 投与後 6 時間の CRE、尿中 NAG との相関を検討した。

(血圧の変動率(%)は LPS 投与前の血圧に対する LPS 投与後 6 時間の血圧の比を百分率(%)で示した。

LPS 投与による血圧の低下が大きいほど、CRE (P=0.0512)と尿中 NAG (P=0.0611) は、有意ではないが、高くなる傾向を示した。

h. 血圧変動と腎内酸素分圧変化

血圧の変動と腎内酸素分圧との関係の評価するため、血圧変動率(%)と LPS 投与後 6 時間の腎深部・表層の酸素分圧との相関を検討した。

(血圧の変動率(%)は LPS 投与前の血圧に対する LPS 投与後 6 時間の血圧の比を百分率(%)で示した。

LPS 投与による血圧の変動と酸素分圧変動率は深部(P=0.216)・表層(P=0.1907)

ともに有意な相関はなかった。

i. 組織学的評価

HE 染色による各腎組織評価。

LPS 投与後 6 時間まで観察が可能であった個体(n=8)の各腎組織において、糸球体に変化はほとんど認められず、尿細管・間質の障害がほとんどであった。

結果のまとめ

大腸菌 Lipopolysaccharide (LPS) による敗血症導入による各種変化 LPS 投与を行った動物モデル(n=10)のうち LPS 投与直後に死亡したのもの(n=2)を除いたもの(n=8)で LPS 投与の評価を行った。

LPS 投与による敗血症の導入によって心拍数は増加し、血圧は低下し、血液ガスでは CO₂ と HCO₃⁻ は低下し(表 1)、血液一般検査では白血球と血小板は有意に減少した(表 1)。これらの所見は敗血症および敗血症性ショックの定義を満たした¹¹。

LPS 投与による敗血症の導入によって尿量は減少し(表 2)、血清クレアチニン(CRE)は上昇し、AKI の基準の satge1 を満たした(表 2)¹²。

また、尿中 NAG は上昇し尿細管障害が起きたことを示した(表 2)。

LPS 投与による敗血症の導入によって、腎深部・表層ともに酸素分圧の有意な変化はなかった(図 4a, 5a)(表 3)が、深部の酸素分圧の変動は表層に比べ大きい傾向にあった(図 4b, 5b)(表 3)。

LPS 投与による血圧の低下が大きいほど、CRE(P=0.0512)と尿中 NAG(P=0.0611)は、高くなる傾向を示した(図 6a, b)。

LPS 投与による血圧の変動と酸素分圧変動率は深部(P=0.216)・表層(P=0.1907)ともに有意な相関はなかった。

LPS 投与後 6 時間まで観察が可能であった個体(n=8)の各腎組織において、糸球体に変化はほとんど認められず、尿細管・間質の

変化がほとんどであった。

今後の展開

動物モデルにおいて LPS による敗血症モデルの導入が可能であった。敗血症導入によって、尿量の減少と血清クレアチニン値の上昇があり、septic AKI の誘導された。

Septic AKI では糸球体が多く存在する腎表層の酸素分圧の変動は少なく、糸球体の組織学的変化はなかった。一方、尿細管間質が存在する腎深部の酸素分圧は変動が大きく、組織学的変化も認められた。しかし、血圧の低下と酸素分圧との間に有意な相関は無かった。

LPS による敗血症では、septic AKI の主因は尿細管障害で、必ずしも虚血(酸素分圧の低下)のない状態でも尿細管障害が誘導されることが分かった。

今後、ヒトの septic AKI に近い形での敗血症の導入方法の確立と、腎血流を変化させるアンギオテンシン II や一酸化窒素合成阻害薬や、心房性ナトリウム利尿ペプチドなどの腎保護作用のある薬剤投与時の腎機能と酸素分圧の変化評価が必要である。

<引用文献>

1. Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, et al. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes. Clin J Am Soc Nephrol. May 2007;2(3):431-439.
2. Bellomo R, Wan L, Langenberg C, Ishikawa K, May CN. Septic acute kidney injury: the glomerular arterioles. Contrib Nephrol. 2011;174:98-107.
3. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. N Engl J Med. Jul 8 2004;351(2):159-169.
4. Langenberg C, Bellomo R, May C, Wan L, Egi M, Morgera S. Renal blood flow in sepsis. Crit Care. Aug 2005;9(4):R363-374.
5. Langenberg C, Bagshaw SM, May CN, Bellomo

- R. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. Crit Care. 2008;12(2):R38.
6. Ishikawa K, Bellomo R, May CN. The impact of intrarenal nitric oxide synthase inhibition on renal blood flow and function in mild and severe hyperdynamic sepsis. Crit Care Med. Apr 2011;39(4):770-776.
7. Ishikawa K, May CN, Gobe G, Langenberg C, Bellomo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: a different view of tubular injury. Contrib Nephrol. 2010;165:18-27.
8. Wan L, Langenberg C, Bellomo R, May CN. Angiotensin II in experimental hyperdynamic sepsis. Crit Care. 2009;13(6):R190.
9. Heemskerk S, Masereeuw R, Russel FG, Pickkers P. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. Nat Rev Nephrol. Nov 2009;5(11):629-640.
10. Treeck B, Roald AB, Tenstad O, Aukland K. Effect of exogenous and endogenous angiotensin II on intrarenal distribution of glomerular filtration rate in rats. J Physiol. Jun 15 2002;541(Pt 3):1049-1057.
11. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med. Feb 2013;41(2):580-637.
12. Kellum JA, Lameire N. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1). Crit Care. 2013;17(1):204.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件) 未

〔学会発表〕(計 件) 未

〔図書〕(計 件) 無

〔産業財産権〕

出願状況(計 件) 無

取得状況(計 件) 無

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石川 健

(岩手医科大学・小児科学講座・講師)

研究者番号 : 30326649

(2)研究分担者 無

(3)連携研究者

高田 彰

(岩手医科大学・小児科学講座・助教)

研究者番号 : 30438494