

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861723

研究課題名(和文)敗血症性ショック治療薬としてのトロンボモデュリンの効果

研究課題名(英文)The effects of recombinant thrombomodulin for the treatment of 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症性ショックでは、血管内皮細胞が傷害され播種性血管内凝固障害(DIC)が生じる。また、血管内皮傷害は敗血症性ショックの病態悪化に関連している可能性が考えられる。本実験では、DIC治療薬のトロンボモデュリン(rTM)による敗血症時の血管収縮能への影響や、ショックからの離脱作用について検討した。rTMには、リポポリサッカライド(LPS)によって生じる血管のノルアドレナリン反応性低下を軽減する傾向が認められた。またLPSによって誘発されたラット敗血症性ショックモデルでは、rTMを投与した群において、より早期の回復を認めた。

研究成果の概要(英文)：Disseminated intravascular coagulopathy (DIC) is developed by endothelial cell injury resulted from vasodilatory septic shock. The endothelial cell injury may also affect excessive vascular smooth muscle relaxation and decreased sensitivity to endogenous vasoconstrictors. In this study, we investigated whether recombinant thrombomodulin (rTM), which was used for the treatment of DIC, regulated vascular smooth muscle contraction and recovery from vasodilatory shock. Reactivity of vasoconstriction was measured using the aortic ring of the rat. Recovery effect from vasodilatory shock was evaluated using the rat model of septic shock induced by intravenous lipopolysaccharide (LPS) administration. rTM had a preventable effect for the decrease of sensitivity of noradrenaline vasoconstriction effect caused by LPS. Recovery from vasodilatory shock was accelerated by intravenous administration of rTM.

研究分野：医歯薬学

キーワード：集中治療医学 敗血症

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症性ショックにおける血管の病態生理

敗血症が重篤化すると、過剰な血管平滑筋の拡張、および代償性血管収縮能の破綻が原因である敗血症性ショックに陥る(N Engl J Med 2001;345:588)。血圧を維持するためにはカテコラミン投与を行うが、カテコラミンに対する血管平滑筋の感受性鈍化が起きているため、しばしば高用量を必要とする(Crit Care Med 2004;32:858)。高濃度のカテコラミン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。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;264:H660)。敗血症時に分泌される炎症性サイトカインが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;27:855)。このため現在では、NOを直接阻害する方法ではなく、新しいアプローチによる循環補助薬の開発が期待されている。

(2) トロンボモデュリン

トロンボモデュリンは、557個のアミノ酸によって構成され、レクチン様ドメインをはじめとする5つのドメインによって形成される血管内皮表在性タンパク質である(EMBO J 1987;6:1891)。凝固促進因子であるトロンピンと結合することによって、抗凝固作用を示す。また、凝固抑制因子であるプロテインCを活性化させることによって抗凝固作用を発揮する(Science 1987;235:1348)。近年、本邦では遺伝子組換えトロンボモデュリン製剤が播種性血管内凝固(DIC)治療薬として市販されている。

トロンボモデュリンは強力な抗炎症作用を持つ。トロンピンによる炎症増幅作用を軽減させるほか、活性化したプロテインCによる間接的な抗炎症効果を示す(Blood 2005;105:3178)。また、トロンボモデュリンのN末端から155個のアミノ酸によって形成されるレクチン様ドメインには、直接的な抗炎症作用が認められており、血管内皮に対する好中球接着抑制や、Nuclear factor-kappa B(NF-kB)の抑制が報告されている(J Exp Med 2002;196:565)。近年の研究では、強力な炎症惹起物質である

Highmobilitygroupboxprotein1(HMGB1)に対する阻害作用も明らかにされている(J

Clin Invest 2005;115:1267)。

(3) トロンボモデュリンの敗血症治療薬としての可能性

大腸菌の内毒素であるリポポリサッカライド(LPS)を投与したラット敗血症モデルに対して、遺伝子組換えトロンボモデュリン製剤を予防的に使用したところ、炎症性サイトカインの発現が抑制され、肺や肝での炎症細胞浸潤は減少し、有意な死亡率の低下を認めた(Crit Care Med 2009;37:2181)。臨床研究では、遺伝子組換えトロンボモデュリン製剤を用いた第Ⅰ相臨床試験において高いDICからの離脱率を認め(J Thromb Haemost 2007;5:31)、また最近の後向き調査では、敗血症患者に対する臓器障害抑制効果、死亡率の低減効果が報告されている(J Trauma Acute Care Surg 2012;72:1150)。このため、トロンボモデュリンの敗血症治療薬としての有用性が示唆されている。しかしながら、敗血症性ショックに関する研究は過去に存在せず、血管収縮および血行動態への影響は明らかでない。

研究代表者は、トロンボモデュリンによる抗炎症作用が、敗血症性ショック時に認められる、過剰なNO産生を抑制し、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可能性に着目した。より早期に敗血症性ショックから離脱し、多臓器不全を防ぐことにより、結果的に敗血症による死亡率を低下し得ると期待される。

2. 研究の目的

敗血症性ショック患者では低血圧からの回復に難渋するケースが多く、結果として多臓器不全を引き起こしてしまう。本研究では、血管内皮表在性タンパク質であるトロンボモデュリンの抗炎症作用に着目し、敗血症性ショックからの早期離脱および臓器不全の予防に対する有効性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 血管モデルにおけるトロンボモデュリンの血管収縮作用

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2mmの血管リングを作成した。血管リングは、37℃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1mlの容量があり、血管リングが完全に浸水した

状態、37℃ 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)を灌流させて確認した。High K、およびその他の試験薬は、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。予備実験の結果より、一般的な血管作動薬であるノルアドレナリンを、50%効果濃度(EC50)に近い0.025 μM溶液として使用した。トロンボモデュリンの敗血症性ショック時におけるノルアドレナリンによる血管収縮への影響を評価するため、ノルアドレナリンの血管収縮能をLPS(0.05 mg/ml)存在下で評価した。ノルアドレナリンとLPSを灌流させたLPS群と、ノルアドレナリンとLPSに加えてトロンボモデュリン 30 ng/mlを灌流させたrTM群の血管収縮力を測定し、ノルアドレナリン単独で得られた収縮力に対する相対収縮力で比較検討した。

(2) ラット生体モデルにおけるトロンボモデュリン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、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。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。試験薬としてLPS 4 mg/kgを投与したLPS群、あるいはLPS 4 mg/kg投与に加えてトロンボモデュリン 1 mg/kgを投与したrTM群に群分けした。それぞれにおいて、4時間の血圧測定を行い、試験薬投与後の変化を観察した。血圧測定終了時、動脈血を採取し、血液ガス検査、ELISA法を用いたTNF

濃度測定を行った。記録した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) トロンボモデュリンのLPS存在下におけるノルアドレナリンによる血管収縮への影響(図1)

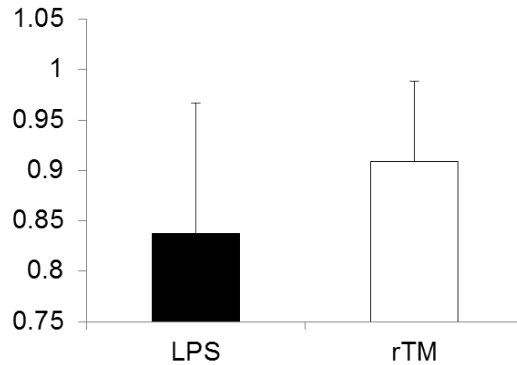


図1 血管リングの相対収縮力

ノルアドレナリン単独での血管収縮への相対収縮力として、LPS存在下では、LPS群で0.84 ± 0.13 (平均 ± SD)、トロンボモデュリン(rTM)群では0.91 ± 0.08であり、いずれも収縮力の減弱を認めた。LPS群ではrTM群に比し、より多く収縮力が減弱する傾向を認めた。

(2) ラット敗血症性ショックモデルにおけるトロンボモデュリンの血行動態への影響(図2)

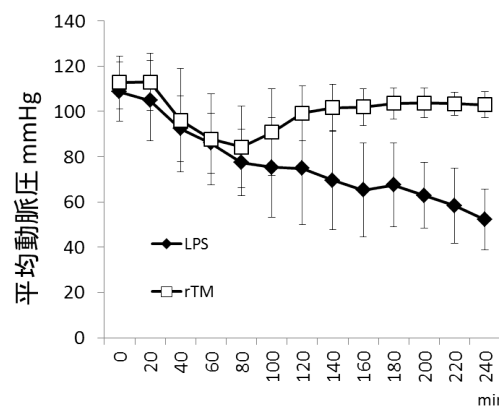


図2 ラット敗血症性ショックモデルにおける循環動態変動

トロンボモデュリン投与による直接的な血圧変動は認めなかった。LPS投与から20分後より、両群ともに平均血圧の下降を認めた。rTM群では、LPS投与から80分後より血圧回復傾向を示したが、LPS群では、血圧はさらに下降し、4時間後には著しい低血圧を呈した。

(3) ラット敗血症性ショックモデルにおけ

る血中 TNF 濃度の比較(図 3)

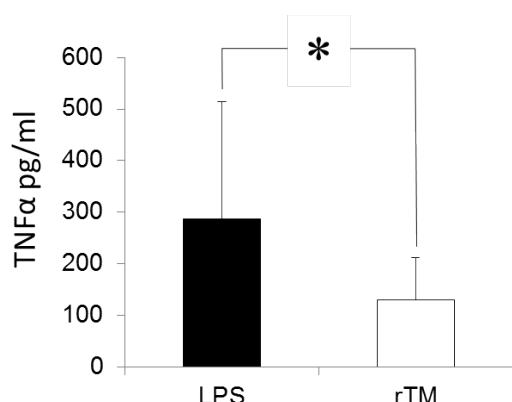


図3 ラット敗血症性ショックモデルにおける血中TNFα濃度

血行動態観察 4 時間後の血中 TNF 濃度は、LPS 群で 287 ± 227 pg/ml、rTM 群では 130 ± 81 pg/ml であり、rTM 群の方が有意に低値であった(P = 0.013)。

(4) ラット敗血症性ショックモデルにおける動脈血液ガス検査結果の比較(表 1)

表1 血液ガス検査結果

	LPS		rTM		P値
	平均	SD	平均	SD	
pH	7.21 ±	0.11	7.42 ±	0.05	*0.004
PaCO ₂	56.5 ±	15.5	42.7 ±	9.9	*0.041
PaO ₂	62.0 ±	24.3	78.7 ±	9.2	0.081
Hb	13.9 ±	2.2	14.6 ±	0.9	0.431
Ht	42.7 ±	6.6	44.6 ±	2.8	0.451
K	5.9 ±	1.1	4.6 ±	0.5	*0.006
Lac	61.3 ±	38.0	22.9 ±	3.1	*0.016
HCO ₃	18.6 ±	3.4	26.2 ±	1.9	*0.001

LPS 群では rTM 群に比べて、pH、重炭酸イオンが有意に低値であり、PaCO₂、カリウム、乳酸が有意に高値であった。

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 5 件)

Tetsuro Shirasaka, Takeshi Yano, Takato Kunitake, Isao Tsuneyoshi: High-dose remifentanil increases blood pressure and heart rate mediated by sympatho-activation in conscious rats. Journal of Anesthesia 27: 325-332, 2013 (査読有り)

Takeshi Yano, Shoichiro Ibusuki, Mayumi Takasaki, Isao Tsuneyoshi: Dimethylsulfoxide potentiates the nerve conduction? blocking effect of lidocaine without augmentation of the intracellular lidocaine

concentration in the giant axon of crayfish in vitro. Fundamental & Clinical Pharmacology 27: 402-408, 2013 (査読有り)

矢野武志, 宮里岳志, 長濱真澄, 越田智宏, 長野健彦, 與那覇哲, 押川満雄, 谷口正彦, 白阪哲朗, 恒吉勇男: 低体温療法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. 麻酔 63: 84-87, 2014 (査読有り)

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: 抜管後の低酸素血症にネーザルハイフローシステム Optiflow を使用した 1 症例. 麻酔 62: 939-941, 2013 (査読有り)

矢野武志: 人工呼吸器関連肺炎のリスクと予防. 看護研究 46: 442-453, 2013 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

矢野武志, 須江宣俊, 越田智広, 與那覇哲, 谷口正彦, 恒吉勇男: 気管軟化症の低酸素発作に対してロクロニウム持続投与が有効であった 1 症例. 日本臨床麻酔学会第 33 回大会, 2013 年 11 月 1~3 日, 石川

矢野武志, 須江宣俊, 長濱真澄, 越田智広, 與那覇哲, 石山健次郎, 押川満雄, 谷口正彦, 長田直人, 恒吉勇男: 肺出血患者の予後と呼気終末陽圧に関する検討. 第 4 1 回日本集中治療医学会学術集会, 2014 年 2 月 27, 28 日~3 月 1 日, 京都

矢野武志, 須江宣俊, 太田尾剛, 長濱真澄, 與那覇哲, 松岡博史, 押川満雄, 谷口正彦, 長田直人, 恒吉勇男: 集中治療を必要とした血液腫瘍患者の予後の検討. 第 4 2 回日本集中治療医学会学術集会, 2015 年 2 月 9~11 日, 東京

〔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