

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462365

研究課題名(和文)敗血症性ショックの機序の解明とリアルタイム測定によるビタミンC補充療法の確立

研究課題名(英文) A new endocrinological mechanism of septic shock and vitamin C supplementation in septic shock under real-time vitamin C monitoring with electron spin resonance spectroscopy

研究代表者

松本 重清 (Matsumoto, Shigekiyo)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：90274761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：SMP30遺伝子破壊マウスにて、ビタミンC(VC)欠乏あるいはVC正常マウスを作成した。このマウスに致死量のlipopolysaccharide (LPS)を投与して3時間後の生理パラメーター、臓器傷害を評価した。結果は両群間に有意差を認めなかったが、LPS投与してから擬死させるまでの時間が短すぎたと考えられた。現在、新たにVC欠乏マウスを作成中で、次回の研究では、VC欠乏マウスにVCを腹腔内投与あるいは非投与した後LPSを投与し、6-12時間後に擬死させ、下垂体・副腎ホルモン、炎症マーカーおよび臓器傷害などを評価する予定である。

研究成果の概要(英文)：Senescence marker protein-30 (SMP30) / gluconolactonase (GNL) knockout (KO) mice were divided into vitamin C (VC) (+) or VC (-). VC (+) mice were given water containing 1.5 g/L ascorbic acid (AA), whereas VC (-) mice received water without AA. Mice were intraperitoneally injected with lethal dose of lipopolysaccharide (LPS) evaluated physiological parameters and liver and lung injury at 3h after LPS. These results show no significant differences both groups. We speculate that sacrifices after LPS may be too early. Currently SMP30/ GNL KO mice are receiving water without AA and will become VC (-) mice in October of this year. In next study, high dose of AA or saline will be intraperitoneally administered to VC (-) mice 30 min before lethal dose of LPS injection. At 6-12h after LPS, pituitary-adrenal hormones, oxidative stress markers, inflammatory markers and various organ injuries are going to be measured and evaluated.

研究分野：麻酔、周術期管理

キーワード：敗血症、ビタミンC、酸化ストレス、下垂体後葉ホルモン、副腎髄質ホルモン、副腎皮質ホルモン、カテコラミン、コルチゾール

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症性ショック患者では、視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系の機能不全が生じている。現在、初期輸液や血管収縮薬に全く反応しないショックに対して、ステロイドが使用されているが、ショックからは早期に離脱できても、重複感染などの副作用の増加により 28 日死亡率は改善していない。抗酸化物質のビタミン C (VC) (アスコルビン酸、AA) はステロイドと同様の抗ショック作用や抗炎症作用を有するが副作用は認めないため、敗血症性ショック患者に対するステロイド療法に取って代わる可能性を秘めている。さらに注目すべきは、VC は生体内では副腎や下垂体に最も多く含まれており、副腎皮質ホルモンやカテコラミンの生合成に必須の補因子である。

(2) 敗血症性ショックにおいて、活性化好中球から大量に放出される活性酸素種 (ROS) は血管内皮を傷害するため、ショックや微小循環障害が助長され、多臓器傷害が進行する。この ROS を消去するために、生体内の抗酸化物質は急速に消費される。特に VC は、最も早期から大量に消費されるが、生体内では合成できないため、病態が遷延すると著明に減少する。さらに、敗血症の初期には、炎症性サイトカインが HPA 系を活性化して、コルチゾールやカテコラミンの産生を増加させることにより抗ショック作用や抗炎症作用がもたらされるが、これらのホルモン生合成に必須の VC は大量に消費される。

(3) 敗血症では体内に貯蔵されている VC が短期間で枯渇、その結果、副腎からのコルチゾールやカテコラミンの産生が著明に減少してショックに陥ってしまう。すなわち、我々は、敗血症性ショックの機序の一部には、VC の枯渇による HPA 系の著明な機能不全が大きく関与していると推測した。

2. 研究の目的

東京都健康長寿医療センター研究所の老化制御研究チーム (分子老化制御) の石神昭人先生から提供していただいた、ヒトと同様に VC を合成できない SMP30 遺伝子破壊マウスに対して Lipopolysaccharide (LPS) を投与して、ヒト敗血症に近似したモデルを作成。血液や組織中の VC や酸化ストレスの指標、HPA 系ホルモンを経時的に測定し、LPS が VC を含む酸化ストレスや HPA 系に与える影響を明らかにする。さらに、このモデルを用いて、VC を投与した群 (投与群) と投与しなかった群 (非投与群) に分けて、HPA 系ホルモン、炎症反応、酸化ストレス、多臓器障害への影響を比較検討し、敗血症モデルにおける VC と HPA 系機能の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) まず、野生型マウスに、致死量の LPS 40 mg/kg を腹腔内投与して、3 時間後に犠死させ、心臓採血、肝・肺摘出。以下の項目を測定、評価する。

Bioplex : サイトカイン、ケモカイン

ELISA : バソプレシン、エピネフリン、

ノルエピネフリン、コルチコステロン

TBARS : マロンジアルデヒド (MDA)

HE 染色 : 肝、肺組織傷害

電子スピン共鳴 (ESR) :

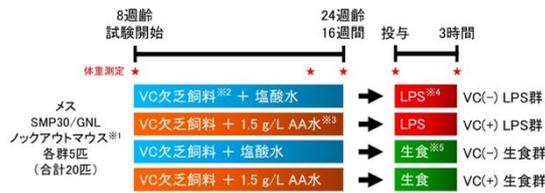
AA ラジカル/DMSO (AFR/DMSO) 測定。

これは AA 濃度を反映 (J Trauma, 2010)。

これらの測定値を評価して、SMP30 遺伝子破壊マウスに対する LPS 投与量や犠死させる時間を決定する。

(2) 8 週齢のメス SMP30 遺伝子破壊マウスを VC 欠乏飼料にて 16 週間飼育すると VC が枯渇する。また、このマウスに、1.5 g/L AA 水を飲ませると、1 日あたり約 7 mg の VC が摂取され、体内 VC 量が野生型マウスと同等になる。この組み合わせにより、24 週齢の VC 欠乏マウス (VC(-)) と VC 正常マウス (VC(+)) が作成され、これらのマウスに LPS あるいは

生食を腹腔内投与することにより4群に分類し、以下の項目を比較検討。



生理パラメーター

肝機能マーカー：AST、ALT

腎機能マーカー：CRE、BUN

VC (HPLC-電気化学検出法)

AA、デヒドロアスコルビン酸

HPA系ホルモン

ELISA：バソプレシン、エピネフリン、

ノルエピネフリン、コルチコステロン

炎症マーカー

Bioplex：サイトカイン、ケモカイン

4. 研究成果

(1) 野生型マウスに対する致死量LPS投与の影響

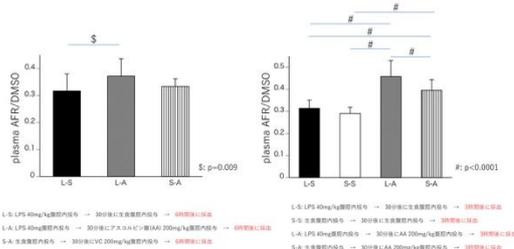


図1 LPS致死量マウスに対するアスコルビン酸投与が6時間あるいは3時間後の血漿AFR/DMSOに与える影響

LPS 40 mg/kg をマウス腹腔内に投与、30分後に AA 200 mg/kg あるいは生食を腹腔内投与し、6 あるいは 3 時間後に採血。3 時間後のほうが AA 投与群でより大きく AFR/DMSO が増加したため、3 時間後のほうが AA の影響が認められやすいのではないかと考えた (図 1)。

また、各種ホルモン濃度の結果を以下に示す (図 2、3、4)。

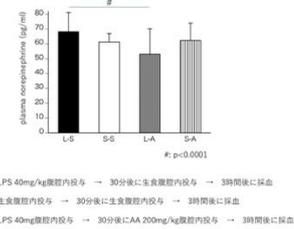


図2 LPS致死量マウスに対するアスコルビン酸投与が血漿ノルエピネフリン濃度に与える影響

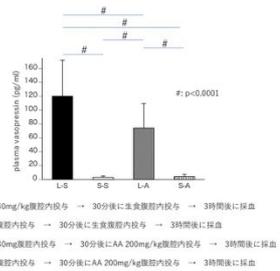


図3 LPS致死量マウスに対するアスコルビン酸投与が血漿バソプレシン濃度に与える影響

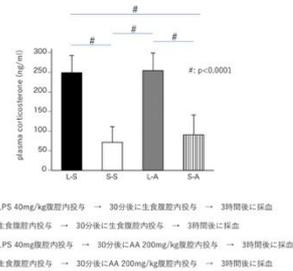


図4 LPS致死量マウスに対するアスコルビン酸投与が血漿コルチコステロン濃度に与える影響

コルチコステロンや MDA、肝・肺組織傷害は AA 投与群と生食群で有意差はなかった。

Bioplex の解析では数が少なく統計処理はできなかったが、AA 群にてサイトカインが少ない傾向を認めた。

ノルエピネフリンやバソプレシンは AA 群よりも生食群にて有意に高値となった。これは当初予想していた結果と逆であったが、臨床においても、敗血症初期には、炎症反応が高度であるほど、また、状態が悪いほど、これらのホルモンがより上昇するとの報告も多いため、LPS 投与後、評価するまでの時間が3時間と短すぎたのが問題だったのかも示れない。

SMP30 遺伝子破壊マウスにおいても、同様に、3 時間では早すぎて内分泌学および組織学的変化が認められないことも懸念されたが、致死量の LPS 投与後、長時間は生存で

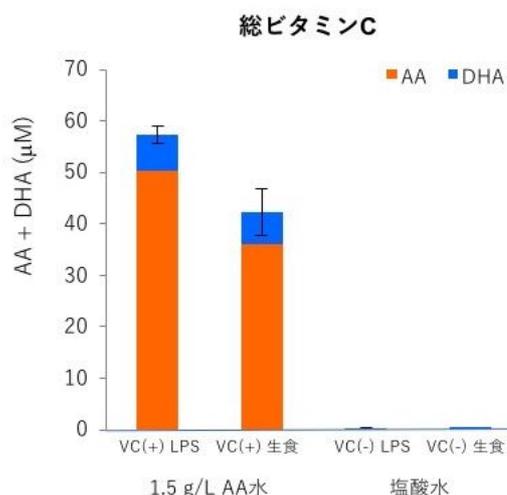
きない可能性も考慮して、3 時間後に犠死させ、評価する方針とした。

(2) SMP30 遺伝子破壊マウスに対する

致死量 LPS 投与の影響

血漿ビタミン C 濃度

VC(-)とVC(+)の総ビタミンC血漿濃度を以下に示す。



VC(+)の LPS 投与群は生食投与群に比べて高値となった。LPS により全身性炎症反応が誘導されれば活性化好中球からの ROS が著増することにより AA は著減すると予想していたが、逆の結果となった。その理由としては、LPS 投与後 3 時間という急性期では、おそらくは肝臓など他の臓器から AA が血中に動員されたのではないかと推測される。

HE 染色 (肝、肺)

各群間ともに傷害の程度は軽度で、有意差は認められなかった。

AST、ALT および BUN、CRE の結果より、肝腎機能傷害は軽度であった。

その他、炎症パラメータや HPA 系ホルモンに関しては今後、測定予定である。

(3) 今後の方針

本研究では致死量の LPS を投与したにもかかわらず、臓器傷害が軽度であり、本来の目的を検討することができなかった。次回、SMP30 遺伝子破壊マウスの生存率を調べ、野生型と同等の生存率であれば、LPS 投与後 6 時間～24 時間で評価する予定である。また、

VC 正常マウスにおいて、LPS 投与後に AA が増加したが、これは肝臓など他の臓器から血中に動員されたことが考えられ、この影響を除外するためにも、LPS 投与後から評価するまでの時間は重要である。さらに興味深いことに、VC 欠乏マウスでは LPS 投与後も AA の増加が認められていない。

よって、今回は LPS 投与前に AA を経口投与したモデルを使用したが、次回、より臨床の敗血症性ショックに近い病態での評価を行うため、VC 正常マウスでなく VC 欠乏マウスに対して致死量の LPS を投与して大量の AA を腹腔内投与する群と投与しない群と比較検討する予定である。

現在、VC(-)マウスを作成中であるが、VC が枯渇マウスするまでに 8 週間を要するため、次回の研究は、最短でも 10 月上旬となる。それまでに野生型マウスにおいても、LPS 投与後 12 時間～24 時間で評価を行う予定である。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 重清 (MATSUMOTO, Shigekiyo)
大分大学・医学部麻酔科学講座・准教授
研究者番号：90274761

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

古賀 寛教 (KOGA, Hironori)
石神 昭人 (ISHIGAMI, Akihito)