

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 9 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791098
 研究課題名（和文） 敗血症・エンドトキシンショック時の抵抗血管の病態：腸間膜動脈の膜電位への影響
 研究課題名（英文） Effects of endotoxemia on resistance arteriole: Effects on membrane potential on submucosal small intestine.

研究代表者

高野 博充 (TAKANO HIROMICHI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：70410313

研究成果の概要（和文）：モルモット回腸粘膜下細動脈で直径と血管の膜電位を同時測定し、エンドトキシンショックによる影響を調べた。静止膜電位に有意差はなかった。塩化バリウム投与により膜の脱分極と収縮を起こした状態でアセチルコリンを投与するとおこる再分極と弛緩はLPS投与群有意に減弱していた。この再分極と弛緩は二種類のカルシウム依存性カリウムチャンネルによるものだがその二種類の働きにコントロール群とエンドトキシンショック群に差は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：The effects of endotoxemia on the diameter change and the membrane potential of submucosal arteriole in guinea pig small intestine were simultaneously measured. The endotoxemia did not significantly change the membrane potential. Acetylcholine (ACh) repolarized and relaxed the vessel in presence of BaCl. Endotoxemia inhibited these effects of ACh. The repolarization and vasorelaxation were due to the activation of the two types of the calcium dependent potassium channels. No difference on the role of these channels was observed between the control and the endotiximia model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	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・麻酔・蘇生学

キーワード：ショック

1. 研究開始当初の背景

敗血症や感染細菌のエンドトキシンによって起こるショック時には、抵抗血管の弛緩反応や神経伝達物質に対する反応低下の生じることが示唆されている。また、エンドトキシンショックの主要原因物質である LPS を投与した時には血管の静止張力を決定する静止膜電位が正常よりも深くなっていることが報告されている。血管平滑筋の膜電位の変化は収縮弛緩を調節する重要な因子のひとつであるが、血圧の主要な決定要素である細動脈における膜電位と敗血症・エンドトキシンショックのメカニズムの関係はいまだ不明である。

2. 研究の目的

全身血圧を制御する小動脈の中でも直径 100 マイクロメートル以下の細動脈の静止膜電位および神経伝達物質に反応の敗血症・エンドトキシンショックによる変化を測定し、そのイオン機序の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 実験対象：モルモットから単離した回腸粘膜下層の細動脈（直径 50 - 100 マイクロメートル。標本はクレブス食塩水で灌流し、実験槽をヒートステージによって 37°C に保って実験を行う。

(2) エンドトキシンショックモデル動物の作成：モルモットの腹腔内にリポポリサッカライド (LPS : エンドトキシン、4mg/Kg) を注射して作成。直腸温度の低下をもってショック状態とする。ショック状態確認後、回腸を取り出し、粘膜層と平滑筋層を剥離して粘膜下層のみにしたものを実験に供する。

(3) 細動脈直径測定：切り出した回腸粘膜下層標本を実験槽（容積 1ml）の底に敷いたシリコンラバーにタングステンピンを用いて固定する。倒立顕微鏡に取り付けたビデオカメラで撮影をしたビデオ画像をダイヤモンドラックシステムに取り込み、リアルタイムに粘膜下層細動脈の直径を測定する。

(4) 細動脈膜電位側底：細動脈直径測定装置の標本に bolociliate グラスキャピラリーを用いたガラス微小電極法による細胞内導出を行い、細動脈直径測定と同時に膜電位を記録する。

(5) 神経伝達物質、チャネル抑制剤による反応：形質膜上チャネル抑制剤および神経伝達物質を灌流溶液中に投与しその膜電位および張力に対する作用を記録解析する。

4. 研究成果

(1) LPS 投与による直腸温度の変化

生理食塩水を投与したコントロールでは、直腸温度は投与時には 38.7 度で、4 時間後には 38.4 度だった。腹腔内に LPS を投与されたエンドトキシンショックモデル動物では、一時間後には 35.6 度まで下がり、一旦回復傾向を見せた後さらに低下し、四時間後には 34.6 度まで低下した（図 1: n=10）。このことから、モルモットは LPS 腹腔投与四時間で重篤なショックの症状を呈していると考えられた。

以後の実験はこの 4 時間後のモデルを用

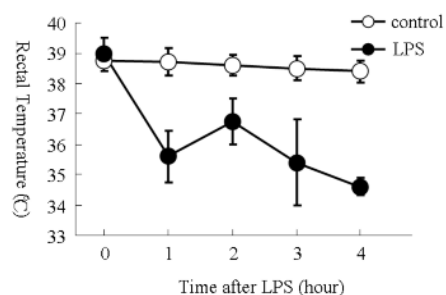


図1：直腸温度の変化

いて行った。

(2) LPS の静止膜電位への影響

静止状態での膜電位を測定し、コントロールと LPS 投与群で比較をした (図 2)。

静止膜電位はコントロール群と LPS 投与群では有意な差は見られなかった (コントロール $-71 \pm 3 \text{ mV}$ 、LPS 投与群 $-70 \pm 4 \text{ mV}$ $n=30$)。

一酸化窒素合成酵素阻害薬であるニトログリセリン ($100 \cdot \text{M}$) を投与したところ、コントロール群でも右の LPS 投与群では静止膜電位からの脱分極が見られた (コントロール $-70 \pm 4 \text{ mV}$ 、LPS 投与群 $-61 \pm 9 \text{ mV}$ $n=6$)。ATP 感受性 K チャネル抑制剤であるグリベンクラミド ($10 \cdot \text{M}$) は両群とも膜電位に影響はみられなかった。

以上の結果から、エンドトキシンショックモデルでは回腸粘膜下細動脈において、一酸化窒素が静止膜電位の形成にかかわるように変化した可能性が示唆された。

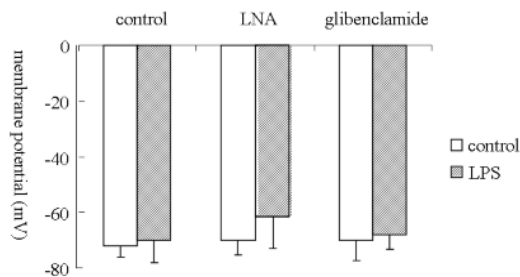


図2 LPSの膜電位への影響

(3) アセチルコリンの反応へのエンドトキシンショックの影響

静止状態での血管径はコントロール群、LPS 投与群の間に有意差はなかった (コントロール $85 \pm 15 \cdot \text{m}$ $n=55$ 、LPS 投与群 $79 \pm 20 \cdot \text{m}$ $n=43$)。

内向き整流性カリウムイオンチャネル抑制を示す塩化バリウム (BaCl_2 , 0.5 mM) を投与

すると、両群とも脱分極とそれにとまなう血管収縮を起こした (図 3)。

コントロール群では BaCl_2 によってバースト状に繰り返し起こる活動電位を伴いながら $-40 \pm 5 \text{ mV}$ まで脱分極した ($n=11$)。同時に血管は収縮をおこした。活動電位が発生しているときは律動的な収縮と弛緩を繰り返し、最後には $15 \pm 8 \mu\text{m}$ 収縮した状態で静止した。

LPS を投与群では、 BaCl_2 の投与により、 $-38 \pm 8 \text{ mV}$ まで脱分極をした ($n=10$)。このとき活動電位になる直前の小さな膜電位のゆらぎがみられたが、活動電位はみられなかった。血管は脱分極と同時に収縮 ($16 \pm 9 \cdot \text{m}$) をおこしたが、コントロール群でみられる律動的な収縮弛緩は見られなかった。

両群の間に脱分極量、収縮量の有意な差はなかった。

以上の結果から、エンドトキシンショック時には回腸の粘膜下細動脈は興奮性を抑制されると考えられた。

コントロール群では、 BaCl_2 存在下、アセチルコリン (ACh , $1 \cdot \text{M}$) を投与すると膜は $-65 \pm 5 \text{ mV}$ まで再分極 (変化量 $15 \pm 3 \text{ mV}$ $n=10$) し、血管弛緩した ($10 \pm 5 \cdot \text{m}$)。

LPS 投与群では BaCl_2 存在下、 ACh 投与により膜は再分極した (変化量 $10 \pm 4 \text{ mV}$ $n=6$) が、再分極量はコントロールよりも有意に少なかった。また、コントロールとは異なり、最大の細分極レベルに達した後、膜電位は浅くなり、 BaCl_2 による脱分極レベルにはほぼ等しくなった (変化量 $2 \pm 3 \text{ mV}$)。血管は同時に弛緩を起こした ($14 \pm 8 \cdot \text{m}$)。コントロール群と LPS 投与群の間に弛緩量に有意差はなかった。

以上の結果から、エンドトキシンショック時 ACh による膜の再分極が抑えられ、それに伴う弛緩反応も抑制されると考えられた。

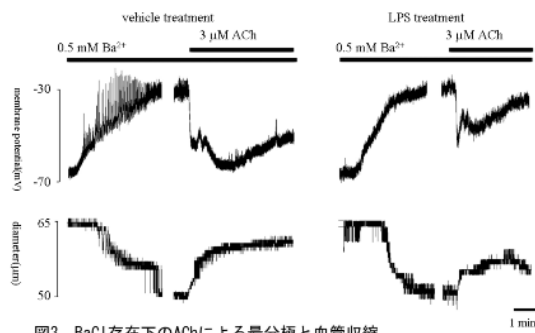


図3 BaCl存在下のAChによる最分極と血管収縮

一方、これらの再分極反応と弛緩反応は中コンダクタンスカルシウム依存性カリウムイオンチャンネルを抑制するカリブドトキシン(50nM)によって抑制され、小コンダクタンスカルシウム依存性カリウムイオンチャンネルを抑制するアパミン(100nM)により完全に消失した。これはLPS投与群でも同じ変化が見られた。

以上の結果から、AChによる再分極と弛緩を形成する内皮依存性過分極機構による反応に関与するチャンネルの働きは変化がないことが示唆された。

(4) 考察

ショック時の血圧の急激な低下は抵抗血管の収縮性の低下によるものと考えられているが、その詳細な機構にはいまだ未知の部分が多い。これまでのところ、直径 300 μm 前後のより大きな動脈での実験がなされているのみである。抵抗血管としての主力は直径が 100 μm 以下のより小さい血管であることだけでなく、複数ある内皮依存性血管弛緩が主にどの機構により行われるかなど、血管の性質はその大きさにより異なることが知られており、より末梢の血管がエンドトキシンショックの形成にどのようにかわるかは解明が待たれるところであった。今回の研究により、より大きな動脈と異なり、静止膜電位に違いがないこと、ATP 感受性カリウムイオンチャンネルの静止膜電位の関与にも違

いがないこと、さらに、AChによる膜電位の変化と弛緩に特徴的な変化が見られることがわかった。このAChによる膜電位変化を伴う弛緩反応は内皮依存性過分極機構として知られ、中コンダクタンスカルシウム依存性カリウムイオンチャンネルと小コンダクタンスカルシウム依存性カリウムイオンチャンネルの活性化を通して引き起こされていることが知られている。一方で、AChによる膜電位変化にはそのほかのカリウムチャンネルも関与するとする報告もあり、エンドトキシンショックではその機構に変化が見られる可能性も考えられたが、今回の研究結果ではこの機構には変がないことが確認された。

以上のように今回の研究により、エンドトキシンショックによる血管径の維持の気候には血管の種類により違いがあることがわかった。今後はAChによる再分極の違いがどのような機構が変化したことによるのかを検討することで、新しい敗血症ショックの治療法の開発につながると考えられる。

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)

[学会発表] (計2件)

① Hiromichi Takano、 Hikaru Suzuki: Effects of endotoxemia on submucosal arteriole of guinea pig small intestine、第87回日本生理学会大会、2010年5月19日、盛岡市

② 高野博充、鈴木光: モルモット小腸粘膜下細動脈でのエンドトキシンショックの膜電位への影響、第56回中部日本生理学会大会、2009年12月4日、金沢市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 博充 (TAKANO HIROMICHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70410313