

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月15日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591643

研究課題名（和文） 酸化ビリルビンを指標とした全身性炎症反応症候群での標的臓器内ラジカル生成の解明

研究課題名（英文） The examination of oxidative stress under systemic inflammatory response syndrome evaluated by oxidative bilirubin.

研究代表者

岡田 浩晋 (OKADA HIRONOBU)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：10444770

研究成果の概要（和文）：全身性炎症反応症候群(SIRS)における臓器障害には酸化ストレスの関与が疑われる。酸化ビリルビン(バイオピリン)を用い、全身臓器に生じる酸化ストレスと、その経時変化を尿中酸化ビリルビンを測定評価した結果、肺、肝臓および腎臓に発現するバイオピリンを尿バイオピリンが反映した。尿中バイオピリンを測定することで、SIRS時の酸化ストレス動態を評価することができた。

研究成果の概要（英文）：Systemic Inflammatory Response Syndrome might influence organs by oxidative stress. We assessed the oxidative bilirubin, named biopyrrins, in organs and urine. The biopyrrins were synthesized in organs, such as lung, liver and kidney. Furthermore, urinary biopyrrins concentration was elevated biphasically under SIRS.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科総論、酸化ストレス、全身性炎症反応症候群、SIRS、ビリルビン

1. 研究開始当初の背景

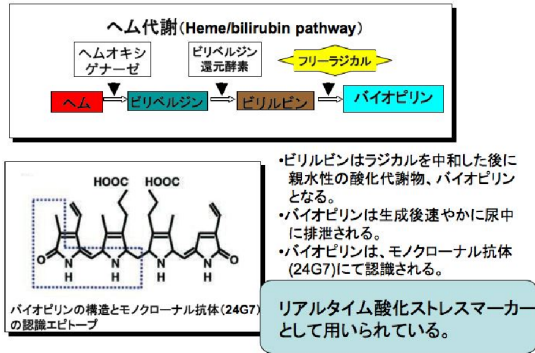
SIRSは、感染症、手術侵襲、熱傷、外傷など様々な原因により全身的な炎症反応を起こした病態である。SIRSでは、炎症性サイトカインをはじめとする液性因子が過剰に発現し、全身標的臓器での臓器障害が惹起されるが、中でも特に肺障害と全身重症度との関連が言われている。組織障害には炎症細胞活の関与が示唆されている。活性化炎症細胞は、

局所において活性酸素種を産生し、このラジカルが臓器組織障害に関与すると考えられる。しかし、生体内、組織内における酸化ストレス動態は未だ解明されていない。

我々は、酸化ビリルビンを用いた酸化ストレス評価法を開発、使用してきた。生体内に存在するビリルビンは抗酸化作用を示し、局所産生される酸化ストレスを中和する。代謝された酸化ビリルビンをバイオピリンと命名した。バイオピリンは親水性で尿代謝され

生成後速やかに尿中に排泄されることから、リアルタイムな酸化ストレス動態の把握を非侵襲的に行うことが可能とした。共同研究者 山口登喜夫(東京医科歯科大学)らの開発した抗 24G7 抗体(図 1)を用いた ELISA 法により測定でき、持続的採尿により経時的酸化ストレス評価を可能とした。

尿中バイオピリン測定法は簡便であり、SIRS 発症後の酸化ストレス動態を経時的に測定できる可能性があり、さらに簡便故に、臨床応用の可能性が考えられる。



(図 1. バイオピリン)

2. 研究の目的 (図 2)

SIRS の生体内酸化ストレス分布を定性的、定量的に評価する。特に血液検査、尿検査など生体外、非侵襲的検査により SIRS 時の重症度、酸化ストレス産生量を評価する方法を開発する。今回は、バイオピリンを測定することで、組織に生じる酸化ストレスを生体外における尿検査で反映するかを研究する。

その結果、有用であれば SIRS 時の生体内酸化ストレス分布を免疫学的手法により解明する。

それらの結果を現在、同時進行している抗酸化治療研究に反映させる。

目的を以下のように分ける。

(1) SIRS 発症時の肺障害を評価する。

SIRS 発症時に生じる急性肺水腫における酸化ストレス産生に関しては、その経時的変化が不明である。動物実験により、SIRS 時の肺障害を測定、評価する。肺内での酸化ストレス産生部位を解明し、産生量の定量的評価を行う。

(2) SIRS 発症時の組織酸化ストレスを測定評価する。

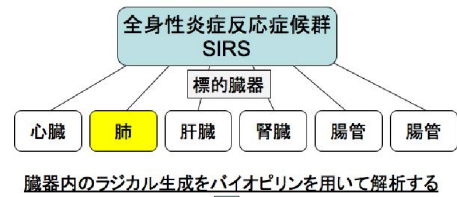
SIRS 発症時に生じる酸化ストレスの生体内分布を免疫組織学的に検索し、肺障害、全身性酸化ストレス量との関係性を評価する。同様に動物モデルにより、各臓器を採取し、免疫組織学的検査法による評価方法にて遂行

する。

(3) SIRS 発症時の全身性酸化ストレス動態を評価する。

動物モデルにより SIRS 時の全身性酸化ストレスを尿中バイオピリン測定により評価し、経時的変動を検討する。

(4) 臓器虚血再灌流と SIRS 時の病態を酸化ストレス産生において類似点、相違点を評価し、抗酸化治療の可能性についての予備実験を行う。



- ① SIRSでの各臓器内のラジカル生成の動態と局在評価
- ② SIRSでの組織傷害(特に肺傷害)とラジカル生成との関連の解析
- ③ SIRSでのラジカル生成また組織傷害の制御法の開発

(図 2. 実験目的)

3. 研究の方法

(1) 本研究は動物実験を用い、LPS (リポポリサッカライド) 投与による SIRS モデルを作成し、サンプル採取、測定を行うことによる。

① 実験モデル作成

Wister 系雄性ラット(体重 250~300g)を用い、LPS(0127:B8, 7.5mg/Kg)を腹腔内投与することにより実験モデルを作成する(LPS 群)。対照群には同様に生理食塩水を腹腔内投与する(Sham 群)。その後、飼育室で常温(25度)下に置く。

② サンプル採取

i. 尿サンプル

LPS 投与後、2 時間毎の新尿採尿を行い、4 8 時間まで継続する。同様に採尿する。採尿後、-20 度で冷凍保存する。

ii. 組織サンプル

各群のラットに対し、24 時間で薬物的擬死を行った後、臓器を採取する。採取臓器は、心臓、肺、脾臓、肝臓および腎臓とし、採取直後に液体窒素による急速凍結の後、-80 度で凍結保存する。

③ バイオピリン測定

採取した尿サンプルと、採取組織から作成した組織ホモジネート(RIPA バッファーで溶解)からバイオピリン測定を行った。バイオ

ピリン測定は共同研究者 山口らの作成したプロトコールにより、ELISA 法で測定した。

④ 組織学的検討

採取臓器からパラフィン切片を作成し、組織学的、免疫組織学的検討を行う。

(染色項目)

- i. HE 染色
- ii. 24G7 抗体(抗バイオピリン抗体)
- iii. Hememoxygenase-1 (HO-1)

⑤ 肺障害測定

各群のラット SIRS モデルに対し、LPS 投与後 24 時間で全身麻酔下に肺を採取し、重量測定により肺水腫としての肺障害レベルを比較検討する。肺水腫は wet weight to dry weight ratio(W/D)を用いた方法により評価する。

⑥ 臓器虚血再灌流後に生じる SIRS 類似病態の解明に関する予備実験

i. 実験モデル

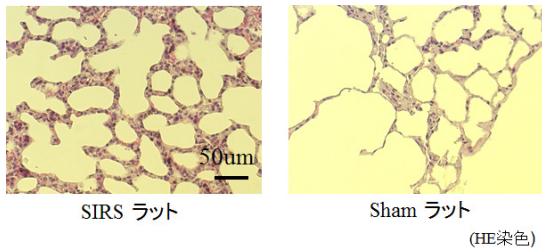
Wister 系雄性ラット(体重 250~300g)を用い、全身麻酔(気管内挿管、フォーレン使用)を行い、右肺を開胸し、右気管支に一時的遮断を置く(分離肺換気)。遮断解除後に閉胸し、研究の方法③④⑤に準じて測定を行う。気管支遮断時に生じる肺血流の低下は HyperEye Medical System (HEMS)を用いた造影法(同時開発中)で確認する。HEMS 画像は AVI フォーマットで記録し、輝度測定法(Intensity.ver. 2)で解析する。

4. 研究成果

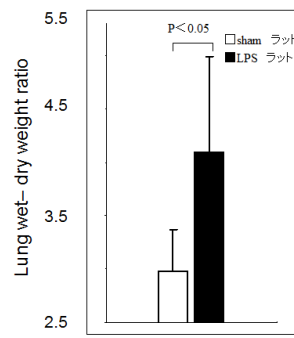
(1) SIRS での肺障害、肺酸化ストレス

ラット SIRS モデルにおける肺障害を組織学的評価(HE 染色)と肺水腫として重量評価を行った(図 3, 図 4)。

SIRS モデルでは著明な肺胞隔壁に肥厚および肺胞壁内に単核球(ED-1 陽性)の多数の浸潤を認めた。また、部位により肺胞腔内の虚脱を認め、肥厚肺胞隔壁による細気管支の閉塞所見を呈するものと考えられた。



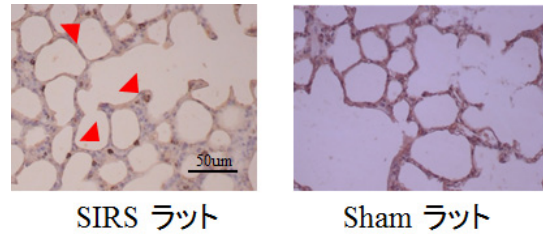
(図 3. 肺 HE 染色)



(図 4) 肺水腫

SIRS モデルにおける肺 W/D は有意に上昇し、肺水腫を示している。(図 4)

肺組織からの肺バイオピリン、HO-1 発現では肺胞隔壁内に浸潤する単核球にバイオピリン発現を認め、SIRS 時の肺酸化ストレスの主座が、単核球にあることが示唆された(図 5)。

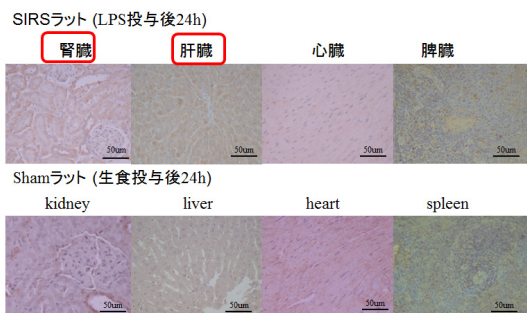


(図 5. 肺バイオピリン)

HO-1 に対する免疫染色は同様に肺胞壁内単核球に発現が認められた。

(2) SIRS での肺以外の臓器における酸化ストレス産生

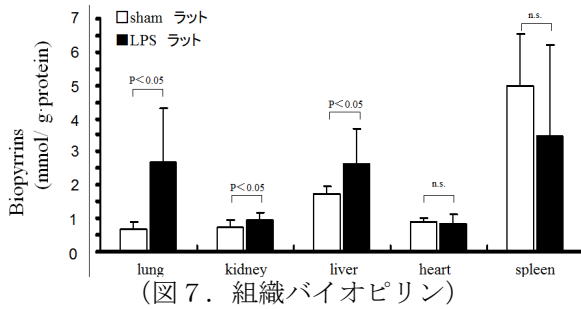
SIRS 時の多臓器でのバイオピリン発現を免疫組織学的に測定し、腎臓での尿細管、肝臓での肝細胞内にバイオピリン発現を認めた。(図 6)



(図 6. 組織バイオピリン)

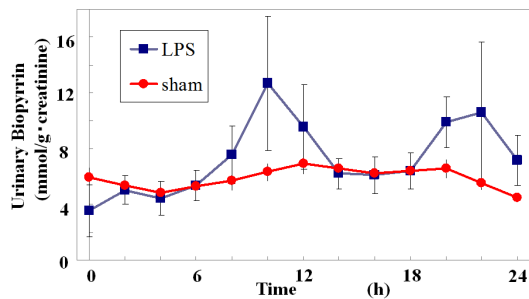
組織ホモジネートから組織バイオピリン産生量を定量評価した結果、肺、肝臓、腎臓で有意な上昇を認め(図 7)、SIRS 時の酸化ストレス酸性の focus がこれらに存在することが示された。また、Sham 群においても脾臓でのバイオピリン量は高値であり、破碎血球で産生されるビリルビン代謝物を測定してい

る可能性があり、今後の研究で解明する。



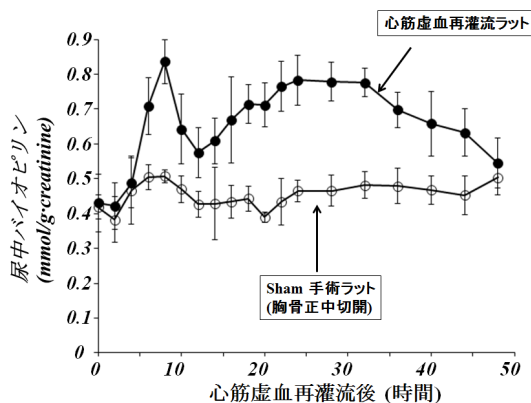
(3) SIRSでの全身酸化ストレスを尿中バイオピリンにより測定する。

ラット SIRS モデルにおいて、経時的採尿を行い、尿中バイオピリン濃度を測定した。



(図 8. 尿中バイオピリン濃度)

SIRS 時の尿中バイオピリンは LPS 投与後約 10 時間での上昇後に一旦減少し、20 時間で再上昇を認めた。これはこれまでの研究(心筋虚血再灌流)でも同様の変動パターンを認めており(参考図 9)、生体内ビリルビンの代謝の特徴ではないかと考察している。



(図 9. 心筋虚血再灌流後尿バイオピリン)

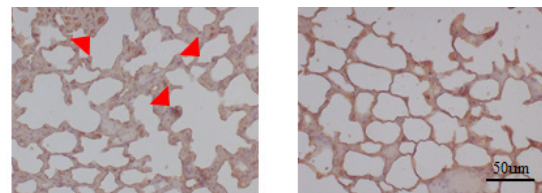
*図 9 注釈；心筋虚血再灌流後 8 時間で尿バイオピリンは上昇後に、一旦減少し、24 時間で再上昇を認める。

1 相目に一過性上昇は血中ビリルビンが抗酸化作用を示し、バイオピリンを産生する。2 相目は組織内でビリルビン酸化が生じているものではないかと考える。これらは同時研究中の心筋虚血モデルで心筋虚血早期には臓器バイオピリンの上昇は見られず、後期相に心臓、肺でのバイオピリン発現を認めており、今研究でも追加研究による解明を予定している。

結果(1), (2), (3)より、SIRS 発症時は肺に炎症の主座が存在し、その原因に酸化ストレスが関与していることが示された。その他、肝細胞、腎尿細管にもバイオピリン発現が確認された。尿バイオピリンはそれらの組織内バイオピリンが示す酸化ストレスを反映している可能性があり、尿中バイオピリン測定法により SIRS 発症時の経時的酸化ストレス評価を可能とする。

(4) 臓器虚血再灌流後に生じる SIRS 類似病態の解明

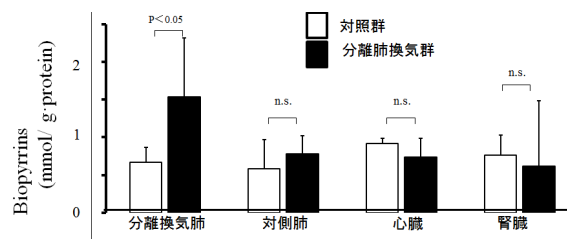
肺分離換気による肺虚血再灌流後の肺バイオピリンを免疫染色(バイオピリン染色)と、ELISA 法により測定した。(図 10, 図 11)



片肺分離換気後 対照

(図 10. 肺バイオピリン)

免疫染色では SIRS に類似するバイオピリン発現を認めた。

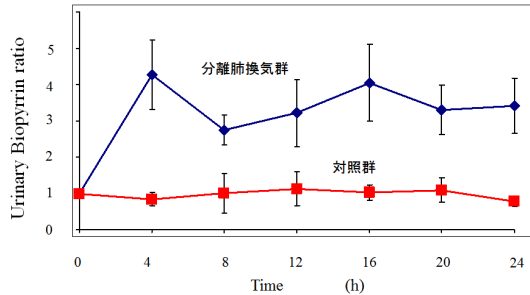


(図 11. 臓器バイオピリン)

(図 11)に示すように、分離肺換気を行った肺では著明なバイオピリン上昇を認めたが、対側肺、心臓、腎臓では有意差を認めなかった。しかし、肺虚血再灌流後の対側肺にサイトカイン増加、細胞浸潤が報告されており、今回の実験モデルで十分な虚血が得られていない可能性がある。虚血の確認ができれば実験モデルの再考ができるため、HEMS 血管造影法による分離換気肺の血流を確認し、再度

モデル実験を予定する。

分離肺換気モデルにおける尿中バイオピリンは(図1 2)に示す如く、有意に上昇し、酸化ストレス障害の主座は分離換気肺にあることまでは本研究で報告できる。本研究では分離肺換気後 24 時間までの尿中バイオピリン濃度測定を行ったが、予想以上に遷延するため、測定時間の延長を予定している。



(図1 2. 分離肺換気モデルの尿中バイオピリン)

(参考文献)

1. Yamamoto M, Circ J 2008;72: 1520-1527
2. Yamamoto M, Am J Transplant 2007;7:1897-1906
3. Yamaguchi T, Biochem Biophys Res Commun 1996;223:129-135
4. Yamamoto M, Surgery Today 2011;41:1467-1474
5. Park JL, Ann Thorac Surg 1999;68:1905-1912

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9件)

- ① Masaki Yamamoto, THE EFFICACY OF ANTIOXIDANT THERAPY FOR MYOCARDIAL ISCHEMIA REPERFUSION. 20th Annual meeting The Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery. 2012. 3. 7-3. 11, Bali Indonesia
- ② 山本正樹, 酸化ビリルビンにより評価された冠動脈バイパス術周術期の酸化ストレス動態. 第111回日本外科学会定期学術集会, 2011. 5. 26-28, 紙上開催(東京)
- ③ 山本正樹, 心筋虚血再灌流後の酸化ストレス評価と抗酸化治療の導入. 第98回中国四国合同地方会, 2011. 5. 13-5. 14

徳島

- ④ 山本正樹, 酸化ビリルビンによる冠動脈バイパス術後の酸化ストレス評価と抗酸化治療の導入. 第9回 KMS Research Meeting, 2011. 2. 3 -2. 4, 高知
- ⑤ 山本正樹, 心臓手術周術期における抗酸化治療の開発. 第63回日本胸部外科学会定期学術集会. 2010. 10. 24-27, 大阪
- ⑥ Masaki Yamamoto, Bilirubin Oxidation Reflects the Influence of Nitric Oxide after Myocardial Ischemia Reperfusion. American college of surgeon the 96th clinical congress. October 3-7, 2010, Washington DC
- ⑦ 宮川 弘之, 山本 正樹. 全身性炎症反応症候群(SIRS)における局所酸化ストレスマーカーによるモニタリング. 第110回日本外科学会学術集会. 2010. 4. 8-4. 10 名古屋
- ⑧ Masaki Yamamoto, Bilirubin oxidation reflect generation of systemic oxidative stress after Myocardial Ischemia Reperfusion. The 5th China-Japan Cardiovascular Forum. 2009. 10. 12, Beijing.
- ⑨ 山本正樹, 心筋虚血再灌流は心筋以外にも影響を与えるのか。第109回日本外科学会定期学術集会, 2009. 4. 2-4, 福岡

また、研究期間内(平成21年度から23年度)に上記内容を学会報告できず、本研究の最新報告は第112回日本外科学会学術集会(宮崎涼平, 山本正樹. 酸化ビリルビンを指標とした全身性炎症反応症候群での酸化ストレス動態, 2012. 4. 12-4. 14 千葉), 第29回呼吸器外科学会学術総会(宮崎涼平, 山本正樹. 酸化ビリルビンによる片肺換気後の酸化ストレスの評価と他臓器でのラジカル生成の解明 2012. 5. 17-5. 18. 秋田)で報告している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 浩晋 (OKADA HIRONOBU)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 10444770

(2) 研究分担者

山本 正樹 (YAMAMOTO MASAKI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 20437718

山口 登喜夫(YAMAGUCHI TOKIO)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准
教授
研究者番号 : 30134745

前田 博教 (MAEDA HIRONORI)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号 : 20335946
(H21→H22)

笹栗 志朗 (SASAGURI SHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号 : 60196186
(H21)