

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592741

研究課題名(和文)重症敗血症における酸化ストレス制御を目的とした新たな血液浄化カラムの開発

研究課題名(英文)Development of new therapeutic strategies for severe sepsis by blood purification therapy targeting at control of oxidative stress.

研究代表者

日高 正剛 (HIDAKA, SEIGO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00404385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：重症敗血症で多臓器不全、死へと病態が悪化する過程において、酸化ストレスが重要な役割を持つことが示されている。集中治療領域における死亡原因として頻度の高い病態であるにもかかわらず、臨床的に確立した治療法は未だないのが現状である。我々は今回の研究で、酸化ストレス制御手段として血液浄化療法に着目し、ラット敗血症モデルにおいてその有効性を検討した。結果として、抗酸化作用を有する新規血液浄化膜により、酸化ストレスおよび炎症反応が抑制されることで、組織傷害の軽減、生存率の改善を認めた。

研究成果の概要(英文)：Severe sepsis can result in multiple organ dysfunction syndrome, a potentially life-threatening condition. In the process, oxidative stress was found to be a key factor of exacerbating inflammatory responses and organ injury. Although sepsis is the common cause of mortality in intensive care units, few therapies have established sufficient evidence. In the present study, we evaluated the effects of blood purification therapy targeting at inhibition of oxidative stress in a LPS-induced systemic inflammatory rat model. As a result, we showed that blood purification therapy prevented organ injury, and increased survival in our model owing to the antioxidant activity and early attenuation of inflammation associated with vitamin E-coated polysulfone membranes.

研究分野：麻酔学，集中治療医学

キーワード：敗血症 臓器傷害 血液浄化療法 酸化ストレス ビタミンE

1. 研究開始当初の背景

重症敗血症は集中治療領域における死因の第一位であり、現在も依然として致死率の高い病態である。その上、ハイリスク患者や免疫能に異常がある患者（糖尿病、ステロイド治療、免疫抑制剤治療、化学療法など）が増加していることから、敗血症罹患患者数も増加する傾向にある。従って、重症敗血症の効果的治療法の開発は喫緊の課題といえる。

敗血症性ショックに至った患者の多くは急性の臓器傷害を併発する。特に急性腎傷害 (Acute Kidney Injury; AKI) の頻度は高く、腎機能不全は病態悪化を加速させて生死を決定しうるので、集中治療領域では腎機能の代替を目的として血液浄化療法が頻用されてきた (renal indication)。それが近年の研究で、単に腎機能を代替する効果だけでなく、病因物質の除去により病態を改善する効果も示唆されており、その適応は広がっている (non-renal indication)。しかしながら、より有効な施行法や血液浄化カラムの開発が模索されているものの、治療標的は未だ特定されておらず、有効性も確立していない。

当教室の研究では、敗血症による急性炎症性臓器傷害の増悪に酸化ストレスが深く関与することを明らかにしており、新規合成ビタミンE誘導体の抗酸化作用により臓器傷害が抑制されることから、酸化ストレスの軽減が本病態においてサイトカイン制御と並んで重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

当教室では、強力な抗酸化能を有した各種新規合成ビタミンE誘導体が全身性炎症反応モデルにおいて非常に有効である事を報告してきた。このことは、酸化ストレスと敗血症の病態が深く関わり合っていることを示しており、抗酸化物質を用いた抗酸化療法が、敗血症治療戦略の一つとなり得ると確信している。更に、最新の研究で開発した新規合成ビタミンE誘導体 Lypoil-Vitamin E には、強力な臓器保護効果を有していることや、常温にて液状で、ファイバー等のコート剤として非常に適した素材の開発に成功した。

従って、最終的には新規合成ビタミンE誘導体 Lypoil-Vitamin E をコートした血液浄化用カラムが、敗血症性全身性炎症反応の有効な治療法となる可能性が高く、本研究では、LPS 投与によるラット全身性炎症反応モデルに対する Lypoil-Vitamin E コート血液浄化療法の臓器傷害抑制効果を解析して、重症敗血症の臓器傷害に対する治療法としての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

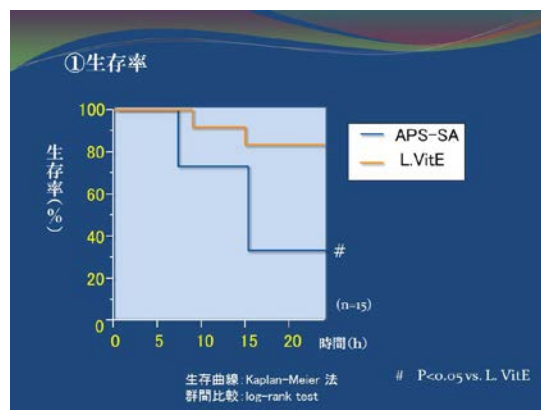
ラット全身性炎症反応モデルとして、リポポリサッカライド (LPS) を静脈内に 10mg/kg 投与することでモデルを作成した。LPS 投与 6 時間後に、セボフルレンを用いた全身麻酔下に大腿動静脈を確保したうえで、ヒト用の体外循環カラム 200 分の 1 スケールで作成したものをを用いて体外循環を 30 分間行った。使用した透析膜としては、ポリスルホン膜とポリスルホン膜上に新規合成ビタミンE誘導体 Lypoil-Vitamin E をコートしたものを用意し無作為に 2 群に分けて比較することで、各膜素材における効果の違いを検証した。体外循環終了後は、返血を行い、創部を縫合したうえで全身麻酔から覚醒させ、その後の経過を観察した。

今回の研究における検証項目としては以下の通りである。

- (1) 24 時間生存率
- (2) 血中 IL-6 の経時的変化並びにろ液中の除去量
- (3) 血清中 MDA (malondialdehyde) の経時的変化並びに肺・肝臓のタンパク中における濃度
- (4) PAO (Potential Anti Oxidant) の経時的変化
- (5) 肺の病理組織像

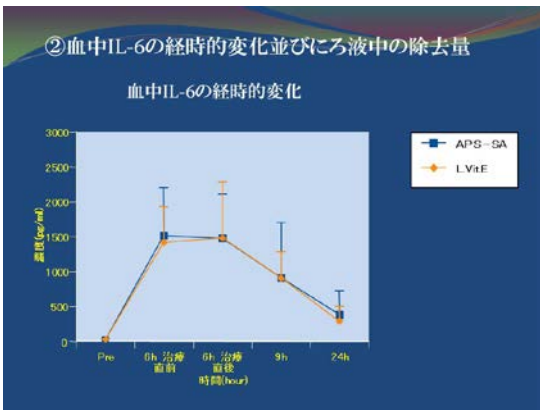
4. 研究成果

- (1) 24 時間生存率

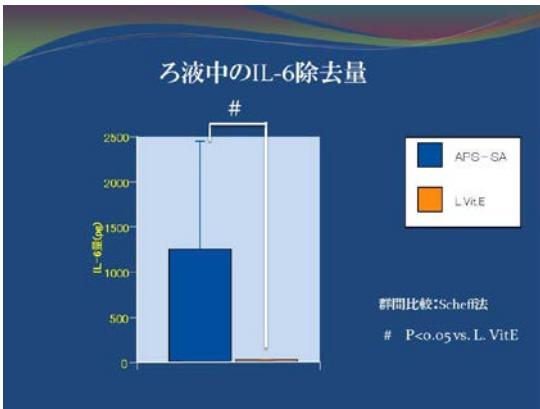


24 時間生存率の比較において、ポリスルホン膜で血液透析を施行した群は開始後早期から死亡するラットを認めたが、新規合成ビタミンE誘導体 Lypoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜を用いることで、生存率の有意な改善を認めた。

- (2) 血中 IL-6 の経時的変化並びにろ液中の除去量



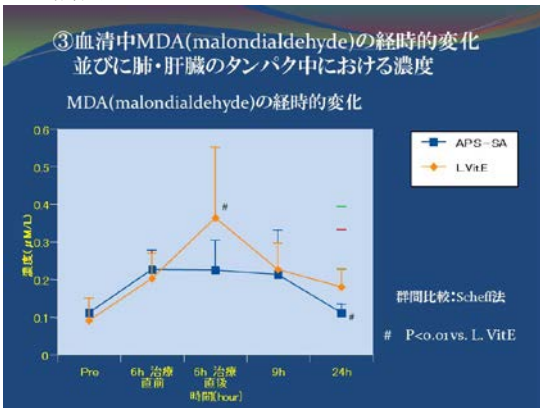
初めに、炎症反応の経過を確認するために、血液中サイトカインの一つである IL-6 濃度について測定した。今回の結果では、ポリスルホン膜とポリスルホン膜上に新規合成ビタミンE誘導体 Lypoil-Vitamin E をコートした群との間で差を認めなかった。



更なる検討として、30分間施行された濾過透析における IL-6 の除去量について検討を加えた。すると、血液濃度では差を認めなかったが、Lypoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜群において除去量が有意に低下していた。

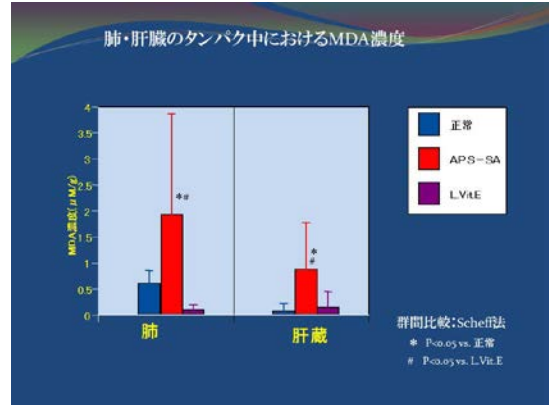
これらのことから、ポリスルホン膜に Lypoil-Vitamin E をコートすることで、サイトカインの全体としての産生量を低下できる可能性が示唆された。

(3) 血清中MDA(malondialdehyde)の経時的変化並びに肺・肝臓のタンパク中における濃度



これら Lypoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜の効果がなぜ生じているか

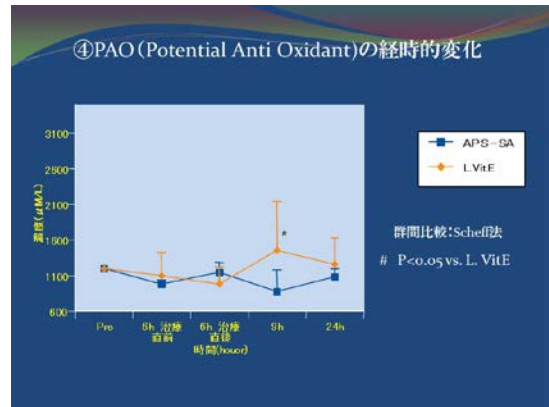
を明らかにするために、酸化ストレスの観点から、検討を加えることとした。初めに、血液中の酸化ストレスの指標として血中MDAの測定を行った。高い抗酸化能を有した Lypoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜群において、透析終了直後の時点においてMDAの有意な上昇を認めた。



一方、リポポリサッカライド投与24時間後の時点において、主要臓器である肺並びに肝臓の酸化ストレスをMDAで評価すると、ポリスルホン膜群ではリポポリサッカライド投与により、有意にMDAが上昇したが、Lypoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜群においては正常とほぼ同じ程度まで低下させていた。

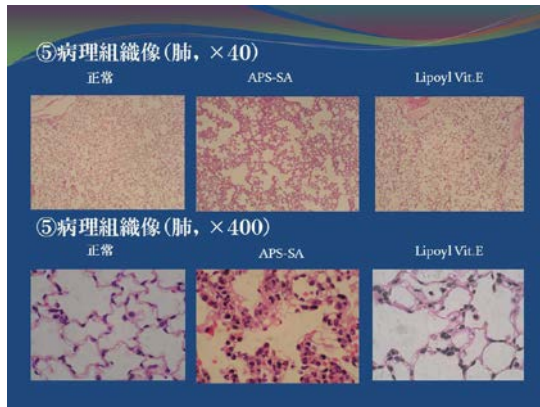
これらのことから、Lypoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜群では、組織中の酸化ストレスを軽減できることが示された。

(4) PAO(Potential Anti Oxidant)の経時的変化



Lypoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜群では、全身性炎症反応に伴う酸化ストレス上昇に対する抗酸化能が示されが、このメカニズムとして血液中の抗酸化能がどの程度変化したかを検討することとした。PAO を経時的に測定して評価すると、リポポリサッカライド投与により全身性炎症反応が生じると、酸化ストレスの増大からPAOの低下を認めるが、Lypoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜による血液浄化療法で酸化ストレスの制御を行うと、特に投与9時間後の時点において有意にPAO濃度の上昇を認めた。

(5) 肺の病理組織像



主要臓器である肺のリポポリサッカライド投与 24 時間後における組織像を示す。ポリスルホン膜群では、間質への炎症細胞の浸潤や肥厚等を認め急性肺傷害の像を呈していたが、Lipoil-Vitamin E をコートしたポリスルホン膜群では、これらの炎症に伴う肺の傷害性変化が最小限に抑制された。

今回の研究において、

- 新規合成ビタミン E 誘導体 Lipoil-Vitamin E を合成できたこと。
- Lipoil-Vitamin E をコートした新規血液浄化膜を開発できたこと。
- Lipoil-Vitamin E の抗酸化作用、抗炎症作用が示され、新たな敗血症治療法開発に道筋をつけたこと。

以上が成果としてあげられる。

しかし、安全性や大量生産など克服すべき課題もあり、引き続き研究を重ね、新規の治療法開発につなげていきたい。

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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

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

日高 正剛 (HIDAKA SEIGO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 00404385

(2) 研究分担者

北野 敬明 (KITANO TAKAAKI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 20211196

野口 隆之 (NOGUUCHI TAKAYUKI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 90156183

萩原 聡 (HAGIWARA SATOSHI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号: 50527661

(3) 連携研究者

()

研究者番号: