

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10532

研究課題名(和文)敗血症性中枢神経障害における高血糖の功罪とその是正による神経障害軽減の可能性

研究課題名(英文)The effects of adequate blood glucose control on neurological dysfunction induced by septic shock

研究代表者

門井 雄司 (KADOI, YUJI)

群馬大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10292591

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)：ラットの培養細胞を用いての実験では高血糖をインスリン+抗HMGB-1抗体をした場合は細胞生存率が約10%改善した。海馬神経細胞活動は高血糖に曝された神経細胞ではEPSP増大率の減弱が観察された。これらの実験を参考にしてin vivoの動物実験では、敗血症が完成した6時間後からインスリン投与を行い高血糖を改善されることによる、血中RAGEとHMGB-1の変化と中枢神経障害への効果を検討したが、高血糖を改善させでも、血中RAGEとHMGB-1は減少せず、また中枢神経障害の改善も認めなかった。敗血症由来の中枢神経障害は高血糖を改善させるだけでは中枢神経障害を改善させることは出来ないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vitroの実験においては敗血症由来の中枢神経障害は高血糖を改善させることにより神経細胞活性を改善させたが、一方、動物実験では敗血症由来の中枢神経障害は高血糖を改善させるだけでは各種サイトカインレベルを減少させることが出来ず、中枢神経障害も改善させることは出来なかった。これらの知見は敗血症由来の中枢神経障害は高血糖由来ではないことを証明したものであり、他の因子が中枢神経障害に関与していることを推測するものである。

研究成果の概要(英文)：in neural cells, high glucose level induced neural cell death, in contrast, adequate glucose level induced the improvement of neural cell death. In vitro patch clamping showed that high glucose level induced the decrease on the degree of long-term potential (LTP), in contrast adequate glucose level had no effects on the degree of long-term potential (LTP). In septic shock model rats, adequate blood glucose control could not improve the blood levels of RAGE and HMGB-1. In addition, no effects of neurological dysfunction induced by sepsis was found even when keeping adequate blood glucose. These data showed that higher blood glucose was not associated with neurological dysfunction induced by septic shock in rats.

研究分野：麻酔科学

キーワード：敗血症 高血糖 中枢神経障害 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

周術期医学領域では、細菌感染による敗血症の原因究明と治療は早急な課題である。敗血症は、心臓、肝臓、腎臓、中枢神経系などの臓器障害を引き起こすが、中枢神経障害の発生は、患者の予後と後遺症を左右する。これまで脳障害や脳保護の作用を探求した研究は期待される成果をあげることが出来ていないのが現状である。

一方、敗血症は高血糖を誘発し、高血糖は活性酸素の産生を亢進し、酸化ストレスによる神経細胞障害を起こす。この神経細胞障害には最終糖糖化産物(AGE)とその受容体である RAGE が深く関与している。RAGE は nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)を介して HMGB-1 産生を促進し、心臓、肝臓、腎臓、中枢神経系などの臓器障害を引き起こす。以前の我々の研究課題において HMGB-1 が脳内 CA3-CA1 領域においてアポトーシスを誘導し(平成 18 年度～平成 20 年度:科学研究費助成)、脳内 CA3-CA1 領域において転写因子である NF- $\kappa$ B の増加を観察した(平成 21 年度～平成 23 年度:科学研究費助成)。さらに HMGB-1 抗体を投与することで HMGB-1 が脳内 CA3-CA1 領域においてアポトーシスを軽減することを観察した(平成 24 年度～平成 26 年度:科学研究費助成)。

## 2. 研究の目的

敗血症での高血糖のメカニズムはまだ解明されておらず、そのメカニズムを分子生物学的に明確にし、その高血糖を是正することにより中枢神経障害を軽減可能かどうかを *in vitro* と *in vivo* 研究を行い検討し、臨床につながる治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞を用いて高血糖による神経細胞の生存率低下の検討

顕微鏡撮影終了後にグルコース 10nM から 100  $\mu$ M の 5 段階の濃度を投与して、6 時間後に再び観察した。投与濃度は実際の臨床濃度(血中濃度、脳組織内濃度)を参考にした培養皿の格子にしたがって暴露前と同一視野の細胞を観察した。

### (2) *in vivo* パッチクランプ法を用いた大脳皮質神経細胞活動のシナプス伝達変動の検討。

#### ・ラットモデルの作成

Wistar 系 Rat(250-300g)を用いて pentobarbital 麻酔下に、盲腸穿孔モデルを作成する。気管切開を行い人工呼吸器に装置してセボフルラン 1 MAC で維持する。持続的血压の測定と採血のために頸動脈、輸液用に尾静脈にそれぞれ PE50 カテーテルを挿入する。体温と呼吸炭酸ガスを一定に保つ。脳固定器具を利用して大脳を固定し、ドリルを利用して大脳皮質を露出する。

#### ・記録方法

海馬 CA1 領域の錐体細胞からの全細胞記録:

赤外線顕微鏡下に直接細胞の形態を観察しながら、CA1 領域の錐体細胞からホールセルパッチを行った。

### 記録の解析：

CA3-CA1 シナプスでの long-term potential (LTP) の誘導； CA3 領域細胞の軸索(Schaffer 側枝)を刺激電極で刺激して、細胞外記録法を用いて興奮性シナプス電圧(field EPSP)を記録。0.1 Hz のテスト刺激に対する反応を調べてその振幅（あるいは傾き）の変化率を経時的に測定した。

( 3 ) 敗血症性中枢神経障害での血液脳関門の機能破綻とラット意識レベルの変化との関連の検討と、さらに同時に( 4 )病態の進行に相応したインスリン補正による血糖コントロールによる大脳皮質神経細胞内の神経細胞活動とラット意識レベルの改善の検討を行った。

#### <ラットモデルの作成>

Rat を用いて pentobarbital 麻酔下に、盲腸穿孔モデルを作成。気管切開を行い人工呼吸器に装置してセボフルラン 1 MAC で維持。持続的血压の測定と採血のために頸動脈、輸液用に尾静脈にそれぞれ PE50 カテーテルを挿入。体温と呼気炭酸ガスを一定に維持。

敗血症モデルから 4 時間ごとに採血を実施し RAGE と HMGB-1 の変動を時系列で追跡する。各メディアータ濃度は ELLISA kit を用いて測定。それと伴に中枢神経障害を評価。

#### <意識レベルの評価法>

- ( ) 熱せられた板の上に動物をおいて回避行動発現までの潜時(hot-plate test)
- ( ) ガラス板の下から後肢に熱刺激を加えて回避行動発現までの潜時(paw flick test)
- ( ) 熱刺激を尾に加えて回避反応を起こすまでの潜時(tail flick test)
- ( ) 後肢に一定のスピードで連続的に増加する力を与えて回避反応を起こす圧力の測定(paw pressure test)

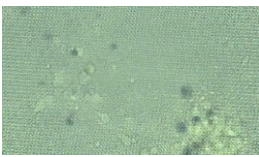
の 4 項目で評価。

敗血症が完成した 6 時間後からインスリン投与を行い、 RAGE と HMGB-1 の血中濃度変化、 中神経障害への効果、を測定した。

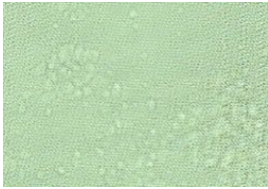
## 4 . 研究成果

( 1 ) 高血糖にさらした培養細胞の生存率を検討した顕微鏡での観察結果。

<トリパンブルーで染色された細胞は不活性化（死亡）細胞>



### 血糖値を正常化した培養細胞



( 2 ) 高血糖により血糖依存性に大脳 CA-1 領域から HMGB-1 が遊離・生産されること Western blot 法により確認した。また、血糖是正により血糖依存性に大脳 CA-1 領域から HMGB-1 の遊離・生産が減少すること Western blot 法により確認した。

( 3 ) 盲腸穿孔モデルによる敗血症性ショックラットを用いて、CA3 領域細胞を刺激電極で刺激し、細胞外記録法を用いて興奮性シナプス電圧(field EPSP)を記録した結果では、long-term potential (LTP)は敗血症性ショックではコントロールラットと比較して約 30% の振幅低下を観察した。インスリン投与により敗血症性ショックでの振幅低下はやや改善したが正常値までは回復せず、振幅は低下したままであった。

( 4 ) 盲腸穿孔モデルから 4 時間ごとの RAGE と HMGB-1 の測定では、敗血症性ショックではコントロールラットと比較して約 5 倍の血中濃度上昇を認めた、また意識レベルの評価でも 12 時間後には 4 項目すべてにおいて評価が低下した。敗血症が完成した 6 時間後からインスリン投与を行い血糖レベルを正常化したが、RAGE と HMGB-1 の血中濃度上昇を抑制不可能であり、また意識レベルの評価でも 12 時間後には 4 項目すべてにおいて評価が低下したままであった。

( 5 ) In vitro の実験においては敗血症由来の中樞神経障害は高血糖を改善させることにより神経細胞活性を改善させたが、一方、動物実験では敗血症由来の中樞神経障害は高血糖を改善させるだけでは各種サイトカインレベルを減少させることが出来ず、中樞神経障害も改善させることは出来なかった。これらの知見は敗血症由来の中樞神経障害は高血糖由来ではないことを証明したものであり、他の因子が中樞神経障害に関与していることを推測するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uchida S, Kadoi Y, Saito S	4. 巻 45
2. 論文標題 Effect of Low Dose Remifentanil on Postoperative Pain Relief and Heart Rate Variability in Post-Anaesthesia Care Unit.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Turk J Anaesthesiol Reanim	6. 最初と最後の頁 297-302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5152/TJAR.2017.34341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kadoi Y, Saito S	4. 巻 31
2. 論文標題 Effects of adding remifentanil to propofol anesthesia on systemic hemodynamics, cardiac output, and middle cerebral artery flow velocity during electroconvulsive therapy: a pilot study	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 J ECT	6. 最初と最後の頁 98-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/YCT.0000000000000202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本吉谷真理子、黒田昌孝、門井雄司、斉藤繁
2. 発表標題 ECT中にST低下が観察された症例への対応
3. 学会等名 第57回日本麻酔科学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Saito S, Kadoi Y.	4. 発行年 2016年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 153
3. 書名 anesthesia management for electroconvulsive therapy	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----