

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20348

研究課題名(和文)敗血症心筋ミトコンドリアに対する亜硝酸塩の保護作用機序の解明

研究課題名(英文)Protective effect of nitrite on septic cardiac dysfunction

研究代表者

川口 亮一 (Kawaguchi, Ryoichi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30609003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、亜硝酸塩の心保護作用が注目されているが、敗血症病態における作用は不明である。本研究では盲腸結紮穿孔(CLP)によるラット重症敗血症モデルに対して亜硝酸塩を投与し、その心保護作用や安全性について検討した。亜硝酸塩1mg/kg投与により、臓器レベルでは心収縮能を、細胞レベルでは心筋ミトコンドリア機能を、それぞれ有意に改善させることが明らかになった。また、in vivo血行動態、血中炎症性サイトカイン、心筋ニトロ化ストレスを悪化させず、生存率を改善させることを確認した。本研究により、敗血症性心機能障害に対する亜硝酸塩の安全性および治療薬としての可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Recently, the cardioprotective effect of nitrite has been reported, but the effects of nitrite in sepsis is unknown. In this study, we administered nitrite to rats with severe sepsis model by cecal ligation and puncture, and examined its cardioprotective effect and safety. We elucidated that 1mg / kg of nitrite improved a cardiac contractility and myocardial mitochondrial function. Furthermore, in vivo hemodynamic, blood inflammatory cytokines, and myocardial nitrating stress were not exacerbated by nitrite. Nitrite administration also significantly improved the survival rate of septic rats. In the present study, our results showed a potential of nitrite for cardioprotection in severe sepsis.

研究分野：麻酔科学、集中治療医学

キーワード：敗血症性心機能障害 ミトコンドリア機能障害 亜硝酸塩 一酸化窒素 心保護作用

1. 研究開始当初の背景

過去の膨大な研究にも関わらず、敗血症は依然として集中治療医学領域における主要な死因であり、その病態解明と新規治療開発は喫緊の課題である。敗血症では様々な臓器障害を合併するが、心機能障害を併発した場合の予後は不良とされる。敗血症性心機能障害の病態としては細胞のミトコンドリア機能不全が重要とされ、メディエーターとして一酸化窒素の関与が指摘されているが、その詳細機序は未だ解明されていない。

一方で近年、心臓を中心とした虚血再灌流傷害の病態に対する亜硝酸塩の保護作用が報告されている。その作用機序の一つに、生体内で一酸化窒素に変換されてミトコンドリア機能を保護するという可能性が指摘されている。亜硝酸イオンは生体内における一酸化窒素の代謝産物であり生理的物質であることから、循環器領域では亜硝酸塩の治療応用が期待されている。

我々は敗血症性心機能障害および亜硝酸塩の両者に共通する「ミトコンドリア」「一酸化窒素」に着目し、治療応用の可能性を想起した。これまで、敗血症病態における亜硝酸塩の影響について検討した報告は存在しない。

2. 研究の目的

重症敗血症の早期より生じる心機能障害に対する亜硝酸塩の影響を明らかにすることが本研究の目的である。亜硝酸塩は高濃度投与により血行動態の悪化やメトヘモグロビン血症、ニトロ化ストレス増大などの副作用発現も懸念されるため、臨床応用を視野に入れ、様々な用量を用いて効果的かつ安全な投与量を検討する。本研究では、(1)心機能への影響、(2)心筋ミトコンドリアへの影響、(3)全身への影響(血行動態、メトヘモグロビン、炎症性サイトカイン、ニトロ化ストレス指標、生存率)、について検討を行った。

3. 研究の方法

Wister ラットを用い、臨床の敗血症病態を最もよく反映するとされる盲腸結紮穿孔 (CLP) モデルを作製した。確実に心機能障害を発症するよう、重症度は最重症となるよう処置を行った。CLP 処置後、補液蘇生として「生理食塩水単独」または「生理食塩水 + 亜硝酸塩」を皮下投与した。近年、CLP モデルの一般的なコントロール群とされてきた「単開腹 (sham)」については、単開腹処置のみでも微小循環障害などの敗血症反応を生じ、一酸化窒素動態にも影響することが報告されている。本研究で用いる亜硝酸塩は一酸化窒素を介して作用する可能性があり、sham はコントロール群として不適切と考え

られたので、「無処置 Naive 群」を設定した。

(1) 亜硝酸塩が敗血症性心機能障害に対して及ぼす影響および有効濃度の検討

過去の報告より、虚血再灌流傷害に対して亜硝酸塩が保護作用を示す濃度は、臓器毎に異なることが分かっている。本研究ではそれらを参考とし、CLP 作製直後に 0.1, 0.3, 1, 3, 10mg/kg の亜硝酸塩を投与した。早期敗血症となる 8 時間後に心臓を摘出し、Langendorff 灌流法を用いて、亜硝酸塩が心収縮能、冠灌流量へ及ぼす影響について評価した。

(2) 亜硝酸塩が敗血症心筋ミトコンドリアに対して及ぼす影響の検討

敗血症性心機能障害の機序としてミトコンドリア機能不全の重要性が、また、亜硝酸塩の心保護作用機序としてはミトコンドリア機能保護の可能性が、それぞれ指摘されている。そこで CLP 8 時間後、摘出した心臓を粉碎、遠心分離を繰り返すことで得られた単離心筋ミトコンドリアを用い、ミトコンドリア機能の指標である Respiratory control ratio(RCR)の測定を行った。

(3) 敗血症病態における亜硝酸塩の安全性の検討

過去の報告より、亜硝酸塩の作用機序として、生体内で一酸化窒素に変換されて保護作用を示すことが示唆されている。しかし、これまで敗血症病態における一酸化窒素は、血行動態や炎症の悪化などの有害作用への関与が大きいと考えられてきた。よって敗血症病態に対する亜硝酸塩投与は、有害作用の危険性が懸念される。本研究では敗血症ラットにおける亜硝酸塩の安全性を確認するため、in vivo での血行動態評価、メトヘモグロビン測定、血中炎症性サイトカイン、心筋ニトロ化ストレス指標などについて検討を行った。また、敗血症ラットの生存率へ与える影響についても評価を行った。

4. 研究成果

(1) 亜硝酸塩が敗血症性心機能障害に対して及ぼす影響および有効濃度の検討

摘出心を用いた Langendorff 灌流法により、左室収縮能の指標である Left ventricular developed pressure(LVDP)や冠灌流の指標である Coronary flow rate(CFR)が CLP によって有意に低下することを確認した。これは敗血症性心機能障害が生じていることを反映する。CLP ラットに対して異なる用量の亜硝酸塩を投与した結果、1 mg/kg の投与量において、有意な LVDP 改善が認められた(図1)。一方、全ての用量において CFR は不変であった。以上より、CLP ラットに対する 1mg/kg の亜硝酸塩投与は敗血症性心機能障害を改善させること、またその機序として冠灌流増加

は否定的であることが明らかになった。

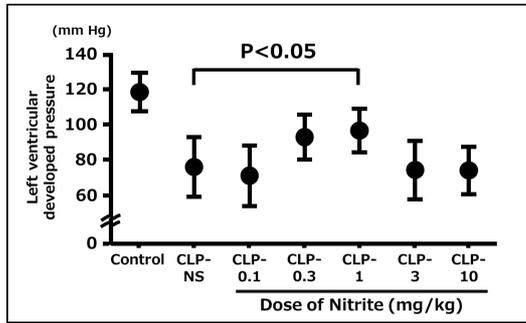


図 1. 亜硝酸塩が敗血症性心機能障害へ及ぼす影響

(2) 亜硝酸塩が敗血症心筋ミトコンドリアに対して及ぼす影響の検討

本検討での亜硝酸塩投与量として、検討(1)において敗血症性心機能障害を有意に改善させた投与量である 1mg/kg を用いて実験を行った。

ラット単離心筋ミトコンドリアに基質を投与し、酸素電極を用いてミトコンドリア機能の指標である RCR を測定した。CLP に生理食塩水単独を投与した群ではコントロール群と比較して有意な RCR 低下が認められ、ミトコンドリア機能の低下が示唆された。一方、亜硝酸塩 1 mg/kg を投与したラット単離心筋ミトコンドリアでは、有意な RCR 改善が認められた(図 2)。以上より、亜硝酸塩 1 mg/kg 投与は敗血症心筋において生じるミトコンドリア機能障害を改善させることが明らかになった。

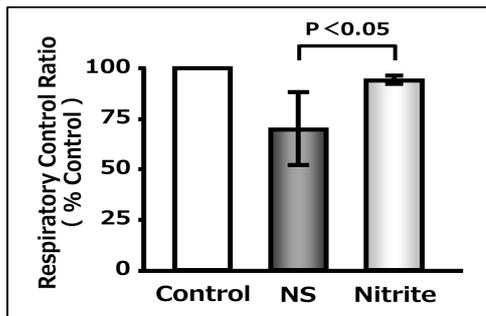


図 2. 亜硝酸塩が敗血症心筋ミトコンドリア機能へ及ぼす影響

(3) 敗血症病態における亜硝酸塩の安全性の検討

本検討では、敗血症病態における亜硝酸塩の安全性を確認するため、以下の検討を行った。

in vivo 血行動態の評価

敗血症における一酸化窒素の有害作用として、マクロのレベルでは血管拡張による血圧の低下が挙げられる。本検討では生体モニタリングシステムを用い、CLP4 時間後および 8 時間後にラット大腿動脈より観血的血圧および脈拍数の測定を行った。ベースライン(コントロール群)と比較して、CLP8 時間後に有意な血圧低下が認められた。しかし、生理食塩水単独群と亜硝酸塩群の間に有意差

は認められなかった。

メトヘモグロビン測定

CLP4 時間後および 8 時間後に血液ガス分析を行い、亜硝酸塩投与で懸念される副作用であるメトヘモグロビン血症について評価を行った。その結果、コントロール群、生理食塩水単独群、亜硝酸塩群のいずれもメトヘモグロビンは 0.5% 未満であり、有意差は認めなかった。

血中炎症性サイトカインの検討

敗血症で上昇するとされる血中炎症性サイトカインのうち、TNF- α (4 時間後)、IL-1 および IL-6 (8 時間後) について、ELISA 法を用いて測定した。コントロール群と比較して、敗血症ではいずれのサイトカインも有意な上昇が認められた。しかし、生理食塩水単独群と亜硝酸塩群の間に有意差は認められなかった。

心筋ニトロ化ストレスの検討

敗血症における一酸化窒素の分子レベルの有害作用としては、ニトロ化ストレスの原因となる Peroxynitrite を生成する可能性が指摘されている。Peroxynitrite は反応性の強いラジカルであり、タンパク質のチロシン残基をニトロ化し機能障害をひき起こす。本検討では、ELISA 法を用いて、心筋細胞質分画および心筋ミトコンドリア分画におけるニトロ化ストレス指標 (3-nitrotyrosine) を測定した。その結果、いずれの分画においても、亜硝酸塩投与による 3-nitrotyrosine の有意な上昇は認められなかった。

生存率の評価

CLP ラットに対する亜硝酸塩が生存率に及ぼす影響を検討した。亜硝酸塩 1 mg/kg 投与により、生存率は有意に改善した(図 3)。

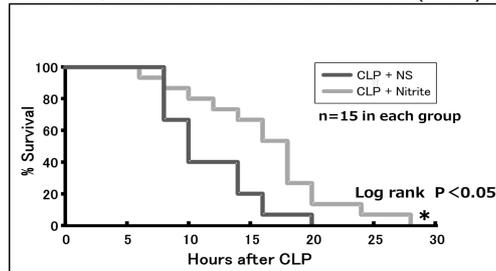


図 3. 亜硝酸塩が敗血症ラットの生存率へ及ぼす影響

以上、本研究より、CLP 重症敗血症ラットに対する亜硝酸塩 1 mg/kg 投与は心筋ミトコンドリア機能を改善させることにより心機能障害を改善させること、in vivo レベル、分子レベルのいずれにおいても懸念された副作用は認められず安全であること、そして生存率を改善させること、が明らかになった。これまで報告されてきた虚血再灌流傷害のみならず、亜硝酸塩は敗血症性心機能障害に対する新規治療薬としての有効性が示唆された。

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1件)

- 1) Kawaguchi R, Hirata N, Tokinaga Y, Hayashi S, Inoue S, Watanabe N, Yamakage M. Nitrite administration improves sepsis-induced myocardial and mitochondrial dysfunction by modulating stress signal responses. J Anesth 2017; 31: 885-894

[学会発表](計2件)

Kawaguchi R, Hirata N, Yoshikawa Y, Chaki T, Yamakage M. Nitrite Ameliorates Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction via Mitochondrial Protection. American Heart Association Scientific Sessions 2015. Orlando, USA. Nov. 7-11, 2015.

川口亮一, 平田直之, 井上茂亮, 渡邊伸央, 吉川裕介, 茶木友浩, 宮下龍, 山蔭道明: 敗血症性心機能障害に対する亜硝酸塩の保護作用. 第43回日本集中治療医学会学術集会(神戸) 2016.2.11-14

[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:
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

川口亮一 (Kawaguchi Ryoichi)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30609003

(2) 研究分担者

平田直之 (Hirata Naoyuki)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 00438045