

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K17058

研究課題名(和文)敗血症における乳酸生成はアドレナリンが誘導するのか？

研究課題名(英文)Is lactate production in sepsis induced by adrenaline?

研究代表者

文屋 尚史(Bunya, Naofumi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50721586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症における乳酸上昇が嫌気性代謝と呼ばれる酸素運搬に起因するものだけでなく、感染に伴う侵襲ストレスによるアドレナリン分泌による乳酸生成が、敗血症における乳酸上昇に大きな役割を果たしていることを証明することを目的とした。敗血症における乳酸上昇には複数の経路が関係するとされる。経路の中で酸素運搬低下による乳酸上昇の関与が大きいとされる。まず低酸素ストレス負荷を行い、アドレナリン分泌の無い副腎摘出ラットと対象群を比較した。結果、酸素化・血圧・心拍数・ヘモグロビン値に差の無いラット間でアドレナリン値と乳酸値に関連を認めた。乳酸上昇の機序の一つがアドレナリンによるストレス反応であること示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症における乳酸上昇が死亡率上昇と有意に相関する独立した予後予測因子である。この乳酸上昇が従来言われていたような、酸素運搬主体の考え方である嫌気性代謝ではなく、アドレナリンの関与するストレス反応であることを示すことで、酸素運搬を改善させる治療以外の、侵襲を軽減する治療に注目させるメッセージになる可能性がある。今回の研究の結果は、酸素運搬にほぼ差がないラット間でアドレナリン-乳酸の間に関連性を示すことができたことから、乳酸が上昇するような死亡率の高い病態の治療の際は、酸素運搬に関わる要因以外の他の要因にも治療介入を検討する必要があることに着目するという教訓を伝えられたのではないだろうか。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to show that lactate elevation in sepsis is not only due to oxygen delivery, called anaerobic metabolism, but also that lactate production by adrenergic secretion due to stress associated by infection plays a major role in the elevation of lactate in sepsis.

Multiple pathways are believed to be involved in lactate elevation in sepsis. Among these pathways, lactate elevation due to decreased oxygen delivery is considered to play a major role. First, hypoxic stress loading was applied, and the subject group was compared to adrenalectomized rats without adrenaline secretion. The results showed an association between adrenaline and lactate levels among rats that did not differ in oxygenation, blood pressure, heart rate, and hemoglobin levels. The results suggest that one of the mechanisms of lactate elevation is an adrenergic stress response.

研究分野：救急医学、集中治療医学

キーワード：乳酸 敗血症 嫌気性代謝 ストレス反応

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症において、血中乳酸値の上昇は死亡率上昇と優位に相関する独立した予後予測因子である。これまで敗血症における血中乳酸値上昇は嫌気性代謝によりもたらされると説明されてきた。すなわち低酸素血症や酸素運搬量の低下により、細胞に到達する酸素が不足することで、好気性代謝の維持が困難となり、酸素を要しない嫌気性代謝からエネルギーを産生する方向へ転換するとするものである。しかしながら、近年、低酸素という条件のみでは乳酸上昇が認められなかったとする報告や、酸素運搬量の低下と血中乳酸値が相関しないとする報告も見られ、低酸素血症や酸素運搬量の低下から引き起こされる、嫌気性代謝という考え方は敗血症における血中高乳酸血症を説明することはできないと考えられる。

歴史的に、この嫌気性代謝による乳酸上昇という解釈は長い年月をかけて多くの臨床医に浸透していった。1922年にノーベル生理学・医学賞を受賞したOtto Meyerhoffは骨格筋での糖質の代謝に関わる多くの反応について明らかにしたが、この中には嫌気性環境下で、糖代謝の一つの反応として乳酸が生成されることも示した。その後、各種ショックをきたす重症病態における研究で、酸素需要に匹敵するだけの酸素供給が行われなかった場合に乳酸の上昇を認めたとするいくつかの研究結果から、酸素供給の不足が生じた場合に乳酸値が上昇するとすると考えられる様になり、今日に至っている。これらの関係は、間接的なデータの相関関係から導かれたものであるけれども、臨床的にも重症患者の診療時によく遭遇する状況であることから、嫌気性代謝による高乳酸血症として広く知られることとなり、現在でも正しい理解のないまま臨床の現場で使用される考え方となっている。

現在、敗血症における乳酸値上昇のメカニズムとして、骨格筋に存在する $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaseポンプがアドレナリンにより刺激され、解糖が生じ、その結果乳酸上昇をきたす機序が注目されている。しかしながら、現時点ではこのアドレナリンにより刺激された乳酸生成が、敗血症における乳酸上昇にどの程度関与しているか明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、敗血症における乳酸上昇が嫌気性代謝と呼ばれる酸素の運搬量に起因するものだけでなく、感染に伴う侵襲ストレスにより副腎より分泌されるアドレナリン刺激による乳酸生成が、敗血症における乳酸上昇に大きな役割を果たしていることを証明することを目的として立案した。

## 3. 研究の方法

アドレナリンの唯一の産生臓器である副腎を切除したラットを用い研究を計画した。副腎は副腎皮質からの副腎皮質ホルモンの分泌と、副腎髄質からのアドレナリン産生の2つ機能を担っている。基本的にアドレナリンは副腎髄質からのみ分泌されるため、この副腎を切除したモデルではアドレナリン濃度は上昇しないはずである。このアドレナリン分泌が抑制されたモデルと対照群に敗血症を誘導し、生成される乳酸値を比較する事と考えた。

ラットは若齢ラットを用いて行うことを計画した。すべてのラットに対し尾静脈を確保し輸液を施行する。細胞外液として生理食塩水の点滴を施行する。実験開始から実験終了まで継続して経気道的にイソフルレンを用いた吸入麻酔を使用する。麻酔深度は、呼吸数の半減かつ痛覚反射の消失が確認される深度を選択した上で外科的処置を行う。

アドレナリンの産生臓器である副腎を摘出するため腹部切開を行い両側の副腎を摘出する。副腎が摘出され、アドレナリン分泌がないと考えられる群をIntervention群とし、対象群として、開腹は同様に行うものの副腎は摘出しない群を設置しsham群とする。循環動態の観察、また繰り返し必要となる採血のために大腿動脈に動脈ラインの留置を行う。

動脈ラインの留置が終了したところ、盲腸結紮穿刺 cecal ligation and puncture (CLP)を行い敗血症を誘導するか、LPSを5mg/kg/hr持続静注により誘導する。より安定して敗血症を誘導できる方法を選択する予定である。敗血症の誘導開始後、心拍数のベースラインからの10%の上昇、もしくは血圧の10%の低下を確認し、敗血症に至ったかを判断する。両群で血中乳酸値、血中アドレナリン採血を行い比較を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 両側副腎摘出によるアドレナリン分泌抑制モデルの作成

アドレナリン分泌がないラット作成のため両側副腎の摘出を試みた。まず、腹部正中切開を行い左右の副腎摘出を行うこととした。しかしながら、左の副腎摘出は比較的容易であったが、右の副腎摘出が安定せず、出血の頻度が高かった。このため、背側からの後腹膜アプローチにより両側副腎を摘出する方法に方針を変更した。左右の最下部肋骨尾側に皮切を行い、後腹膜を開放し、そこから腹腔を開放し、副腎を腹腔外に受動し摘出する方法に切り替えた。これにより比較的安定して両側副腎の摘出が可能になった。

背側からの後腹膜アプローチからの両側副腎摘出ラットのアドレナリン値を計測した結果、予想通りアドレナリン分泌を抑制できたことを確認した。

この後の研究ではアドレナリン分泌のないモデルとして本モデルを使用することとした。本研究において後腹膜アプローチにより両側副腎を摘出した群を intervention 群とし、後腹膜アプローチにより両側の副腎を直視下に確認し、腹腔外に受動はするものの副腎の摘出は行わない群を sham 群とした。

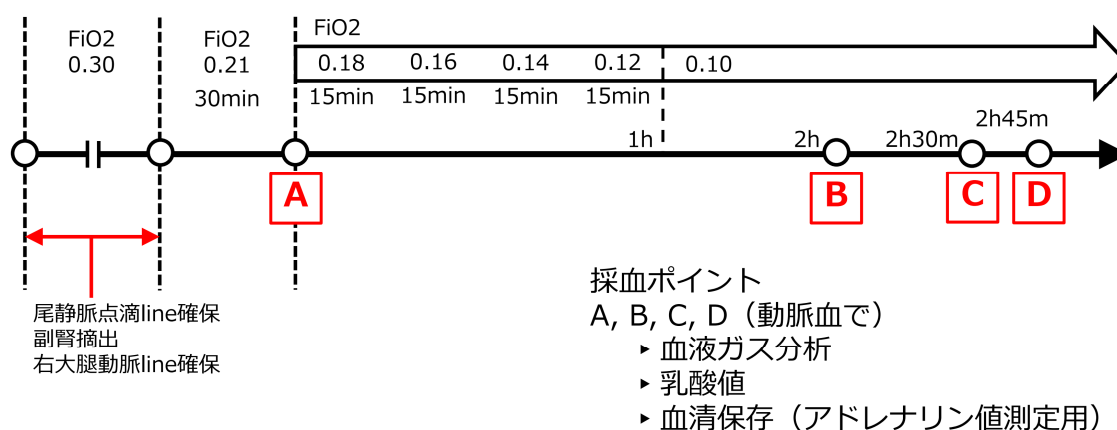
### (2) 低酸素モデルにおけるアドレナリン値と乳酸値の比較

敗血症における乳酸値上昇には複数の経路の関係が示唆されている。

両側副腎を摘出したラットでは血中へのアドレナリン分泌が抑制されていることを確認できたが、このモデルは侵襲にしてより脆弱であることが予測された。敗血症における乳酸値上昇の一つ目の経路として低酸素によるものが想定される代表的なものであるため、まずは低酸素におけるアドレナリン値と乳酸値の関係性を明らかにすることとした。酸素濃度を段階的に下げていくこととした。

低酸素モデルに着手した初期段階で、酸素濃度を空気の酸素濃度 21%から段階的に下げていき酸素濃度 10%に到達したところで死亡するラットが多かった。また、低酸素にしてから 3 時間程度で死亡することが多かったことから、研究モデルとして以下の低酸素モデルでアドレナリン値と乳酸値を比較することとした。図 1 に本研究で使用した酸素濃度の調整及び採血のタイミングについて示した。まずイソフルレンでラットを深麻酔し尾静脈を確保、その後両側の副腎を上記の方法で摘出する。その後、循環動態の観察と定期的な採血のため右大腿動脈に動脈ラインを挿入する。その後酸素濃度を 21%とし 30 分間観察し採血を行う (A 点)。そこから徐々に酸素濃度を段階的に下げていき、酸素濃度が 10%に達したあと 1 時間後に採血を行う (B 点)、その 30 分後、45 分後にもそれぞれ採血を行う (それぞれ C 点、D 点)(図 1)。A, B, C, D 点でそれぞれで平均動脈圧 (mBP)、心拍数 (HR)、酸素を運搬する担体であるヘモグロビン値も測定した。

図 1. 研究の流れ



A, B, C, D 点すべてで Intervention 群でアドレナリン分泌は抑制されていた (表 1 A-D)。Intervention 群と比較し、Sham 群では乳酸値は低酸素曝露時間の経過とともに上昇していき、Intervention 群との差は拡大していった (図 2)。両群間の mBP、HR、tHb、pO2 に差がないにも関わらず、乳酸値の差が拡大していったことは酸素運搬に起因しない、乳酸上昇があったと考えられるだろう。アドレナリンの分泌がない Intervention 群で乳酸値が低いことは、アドレナリンによるストレス反応により乳酸上昇が生じなかった分、Sham 群の乳酸値より低かったことを示唆する結果であったと考えている。

図 2. 低酸素曝露時間と乳酸値とアドレナリン値の関係

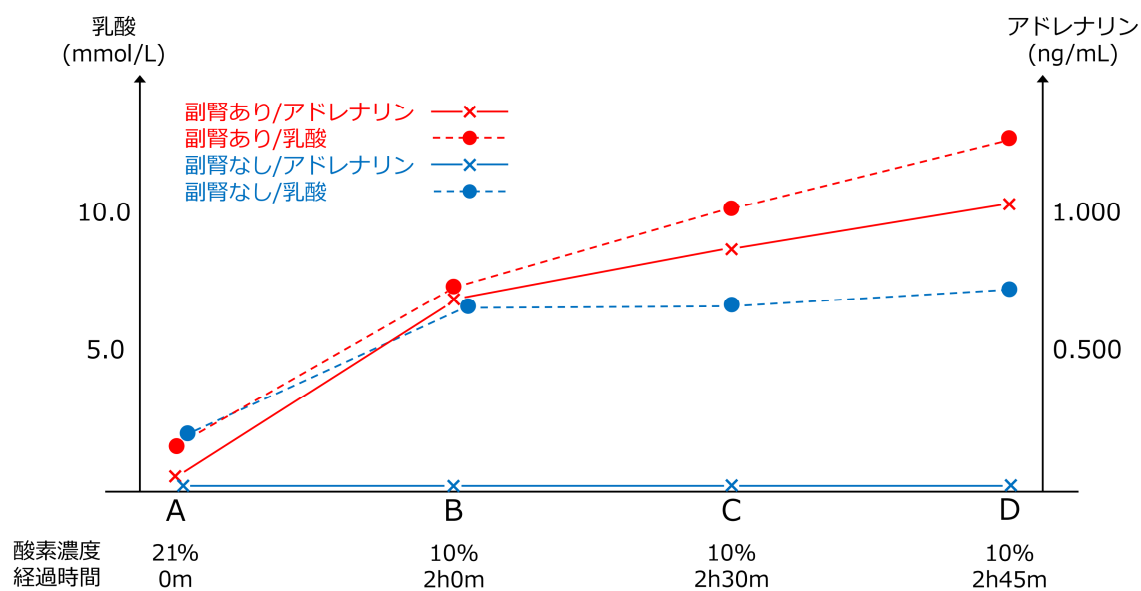


表 1. 酸素濃度と曝露時間におけるパラメーター比較

| A            | Adrenaline            | Adrenaline                    | p value | B            | Adrenaline            | Adrenaline                    | p value |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|---------|--------------|-----------------------|-------------------------------|---------|
|              | 0.078ng/mL (Sham) n=4 | 0.003ng/mL (Intervention) n=4 |         |              | 0.715ng/mL (Sham) n=4 | 0.005ng/mL (Intervention) n=4 |         |
| mBP (mmHg)   | 63.3                  | 78.3                          | 0.038   | mBP (mmHg)   | 59.5                  | 57                            | 0.573   |
| HR (bpm)     | 354                   | 381                           | 0.376   | HR (bpm)     | 446                   | 418                           | 0.546   |
| tHb (g/dL)   | 12.7                  | 12                            | 0.253   | tHb (g/dL)   | 12.5                  | 11.0                          | 0.038   |
| pO2 (mmHg)   | 66                    | 72                            | 0.274   | pO2 (mmHg)   | 30                    | 31                            | 0.946   |
| Lac (mmol/L) | 1.8                   | 2.2                           | 0.089   | Lac (mmol/L) | 7.2                   | 6.7                           | 0.82    |

| C            | Adrenaline            | Adrenaline                    | p value | D            | Adrenaline            | Adrenaline                    | p value |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|---------|--------------|-----------------------|-------------------------------|---------|
|              | 0.872ng/mL (Sham) n=4 | 0.004ng/mL (Intervention) n=4 |         |              | 1.019ng/mL (Sham) n=4 | 0.000ng/mL (Intervention) n=4 |         |
| mBP (mmHg)   | 61.5                  | 57.8                          | 0.638   | mBP (mmHg)   | 47.3                  | 56.3                          | 0.226   |
| HR (bpm)     | 464                   | 446                           | 0.666   | HR (bpm)     | 442                   | 453                           | 0.712   |
| tHb (g/dL)   | 12.1                  | 11.2                          | 0.331   | tHb (g/dL)   | 12.6                  | 10.9                          | 0.547   |
| pO2 (mmHg)   | 29                    | 31                            | 0.400   | pO2 (mmHg)   | 29                    | 30                            | 0.111   |
| Lac (mmol/L) | 10.2                  | 6.6                           | 0.254   | Lac (mmol/L) | 12.9                  | 7.3                           | 0.230   |

A : FiO2 0.21 にして 30 分後の各パラメータ

B : 徐々に FiO2 を 0.10 まで下げ、FiO2 0.10 で 1 時間経過後のパラメータ

C : 徐々に FiO2 を 0.10 まで下げ、FiO2 0.10 で 1 時間 30 分後のパラメータ

D : 徐々に FiO2 を 0.10 まで下げ、FiO2 0.10 で 1 時間 45 分後のパラメータ

### (3) 敗血症モデルにおけるアドレナリン値と乳酸値の関係性について

低酸素モデルでアドレナリン値と乳酸値の間にある程度の相関関係が示唆された。

次に実際に敗血症を生じさせ、アドレナリン値と乳酸値を比較する研究を進めた。これまでと同様の両側副腎摘出モデルを使用して、CLP にて敗血症の誘導を行っている。現時点では、副腎摘出モデルにおいて敗血症が発症するタイミングが安定していない。今後はまず、副腎摘出モデルを用いて安定した敗血症の誘導を行い、敗血症における乳酸値上昇の経路について明らかにすることを目標とする。

### (4) 考察とまとめ

複雑な敗血症における乳酸値上昇の経路の中の一つと考えられる、低酸素経路におけるアドレナリン値と乳酸値に一定の関係を示すことができた。

今後、両側副腎を摘出した不安定な状態で敗血症を安定して誘導し、アドレナリン値と乳酸値

を比較することで、敗血症におけるストレス反応としてのアドレナリン値と乳酸値の関係性について明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|