

平成22年 5月 6日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19592087  
研究課題名（和文） Septic shockにおけるVasopressinの役割についての解明

研究課題名（英文） Role of vasopressin during septic shock

## 研究代表者

日野原 宏 (HINOHARA HIROSHI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：70361376

## 研究成果の概要（和文）：

Wistar系Ratを用いてpentobarbital麻酔下に、盲腸穿孔モデルを作成。血圧及び血液採血用にFemoral arteryにカテーテルを挿入。薬剤投与用にJugular veinにPE50カテーテルを挿入。上行大動脈と腎動脈にultrasonic flowprobeを装着して持続的に心拍出量と腎血流量を測定した。NorepinephrineとVasopressinとInducible Nitric Oxide Inhibitor (L-NIL)を投与して投与後6時間まで血行動態、心拍出量、腎血流量を測定し、iNOSへの影響の比較検討も実施した。またstreptozotocinにより作成した糖尿病ratについても同様の検討をおこなった。敗血症Ratでは血圧低下と心拍数の増加、心拍出量と腎血流量の低下が観察されたが、Vasopressin投与で血圧低下、心拍数増加、心拍出量低下は改善し、L-NILを加えると腎血流量も改善した。一方、糖尿病ratではVasopressin投与でも血行動態はあまり改善せず、L-NIL投与で血行動態の改善をみた。iNOS活性を比較したところ、糖尿病ratでは著明なiNOS活性の上昇を認め、L-NILがブロックすることで血行動態の改善が可能であった。今回の観察から敗血症での血行動態の不安定にはiNOS活性が強く関与し、糖尿病状態ではより強い関与が示された。この結果から、iNOS活性を抑制することが敗血症からの回復に寄与することが分かった。

## 研究成果の概要（英文）：

Purpose: The purpose of this study was to compare the effects of norepinephrine (NE) and vasopressin on systemic hemodynamics, renal and mesenteric artery blood flow, inflammatory response and inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity during endotoxin shock in streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods: The study was designed to include 3 sets of experiments: 1) measurement of changes in systemic hemodynamics and mesenteric and renal artery blood flow; 2) measurement of biochemical variables; and 3) measurement of iNOS activity in the

mesenteric artery. Systemic hemodynamics, regional artery blood flow changes and biochemical variables were assessed before treatment and 1, 2 and 3 h after treatment. Results: Vasopressin, but not NE, prevented the decreases in aortic blood flow, but did not restore mesenteric artery blood flow. In addition, vasopressin partially restored renal artery blood flow in diabetic rats. Plasma nitrite levels and iNOS activity in the mesenteric artery were elevated after intravenous LPS in diabetic rats. Endotoxin-induced decreases in mesenteric arterial blood flow were partially restored by vasopressin with non-selective NOS inhibitor, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), in diabetic rats. Moreover, L-NAME prevented increases in plasma nitrite levels and iNOS activity in the mesenteric artery. In contrast, endotoxin-induced decreases in renal arterial blood flow were partially restored by vasopressin with L-NAME, but not by NE in diabetic rats. Conclusions: Nitric oxide may be one possible contributor to reduced sensitivity of the mesenteric and renal arteries to vasopressin during septic shock in streptozotocin-induced diabetic rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 救急医学

キーワード：敗血症、Vasopressin、糖尿病、循環動態

1. 研究開始当初の背景

集中治療医学領域では、細菌感染の予防と治療は、もっとも重要な研究課題である。特に細菌感染が敗血症に移行すると致命的であり、その原因究明は早急な課題である。敗血症ではとりわけ早期に循環器系に障害をひ

きおこし、各臓器の血流障害を起こす。その臓器血流障害の程度が患者の予後を左右する。その循環障害の改善目的に臨床においては循環作動薬を使用するが、敗血症状態では循環作動薬に非常に抵抗性の低血圧が持続し、それが多臓器不全へとつながり死亡に至

る。近年この抵抗性の低血圧に対して vasopressin の有効性を示すことが報告されている。さらに心肺蘇生時においてはアメリカ心臓病学会の指針では vasopressin 投与が推奨されている。しかしながら、なぜ vasopressin がいかなる機序で循環動態を改善するのかいままでもまったく解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究ではその vasopressin がいかなる機序で循環動態を改善するのかを分子生物学的に解析することを研究の主題とした。

## 3. 研究の方法

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(22ゲージ針を使用して盲腸を2回穿孔する。このモデルの24時間死亡率は約20%)。血圧及び血液採血用に Femoral artery に PE50 カテーテルを挿入。薬剤投与用に Jugular vein に PE50 カテーテルを挿入。上行大動脈と腎動脈に ultrasonic flowprobe (Transonic System 社製)を装着して持続的に心拍出量と腎血流量を測定。Vasopressin と Inducible Nitric Oxide Inhibitor (L-N6-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL))を投与して投与後6時間まで血行動態、心拍出量、腎血流量を測定した。上記で作成した盲腸穿孔モデルに Vasopressin と Inducible Nitric Oxide Inhibitor (L-N6-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL))を投与して投与後の血中 Cytokine と Nitric Oxide 濃度への影響の比較検討を行った。血中 adrenaline, noradrenaline 濃度は HPLC 法

で測定、血中 TNF- $\alpha$  活性は rabbit の L929 細胞を用いて、血中 Interleukin-1 濃度は radioimmunoassay 法で測定した。血中 Nitric Oxide 濃度は 550nm の波長を用いた蛍光抗体法で測定した。

上記で作成した盲腸穿孔モデルの24時間後にイソフルラン麻酔下に Rat の Aorta を4%パラホルムアルデヒドで還流固定する。固定2時間後に Rat の Aorta を取り出し、クライオスタット(Leica CM1900)を使用して10 $\mu$ m の Aorta スライスを作成する。作成した脳スライスに ABC 法を用いた Immunohistochemistry 法で測定する。具体的には、組織片中の内因性の peroxidase をブロックするために 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を30分間投与。Phosphate buffer solution (PBS;pH=7.4)で洗浄後、3%の normal goat serum で抗原を固定。1000倍に希釈した1次抗体である Nitrotyrosine 抗体 (Sigma 社製品)で24時間攪拌。PBSでその Aorta スライスを洗浄した後、Avidin-Biotin Complex(ABC kit:アマシヤム社製)を投与し発色させ1時間後に Hematoxylin した。Nitrotyrosine 発現の程度は Densitometry で解析する。

同様の一連の検討を streptozotocin を投与して糖尿病状態にした rat を用いて行った。

## 4. 研究成果

敗血症 Rat では血圧低下と心拍数の増加、心拍出量と腎血流量の低下が観察されたが、Vasopressin 投与で血圧低下、心拍数増加、心拍出量低下は改善し、L-NIL を加えると腎血流量も改善した。一方、糖尿病 rat では

Vasopressin 投与でも血行動態はあまり改善せず、L-NIL 投与で血行動態の改善をみた。iNOS 活性を比較したところ、糖尿病 rat では著明な iNOS 活性の上昇を認め、L-NIL がブロックすることで血行動態の改善が可能であった。今回の観察から敗血症での血行動態の不安定には iNOS 活性が強く関与し、糖尿病状態ではより強い関与が示された。この結果から、iNOS 活性を抑制することが敗血症からの回復に寄与することが分かった。

#### 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 3 件)

1. Hinohara H, Kadoi Y, Tokue A, Saito S, Kawauchi C, Mizutani A.  
Comparison of the effects of vasopressin and norepinephrine on organ perfusion during septic shock in streptozotocin-induced diabetic rats.  
J Anesthesia. 2010 (in press) 査読有
2. Kadoi Y, Hinohara H, Kunimoto F, Saito S: Effects of the cannabinoid antagonist AM281 on systemic hemodynamics and mortality rate in streptozotocin-induced diabetic rats with endotoxic shock - Comparison between non-diabetic and diabetic rats. 査読有  
Acta Anaesthesiol. Scand. 52:664-672, 2008.
3. Kadoi Y, Saito S, Kawauchi C, Hinohara

H, Kunimoto F:

Comparative effects of propofol versus dexmedetomidine on cerebrovascular carbon dioxide reactivity in patients with septic shock.

Br. J Anesth. 100:224-229, 2008. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 第 37 回日本集中治療医学会総会 (広島) 2010 年 3 月 5 日

Pneumocystis carinii pneumonia (PCP) を疑い ICU にて治療した 9 例の検討  
内藤雅仁、国元文生、大川牧生、日野原宏、大嶋清宏、門井雄司、吉川大輔、斎藤繁

2. 第 37 回日本集中治療医学会総会 (広島) 2010 年 3 月 5 日

集中治療室入室症例における EAA(Endotoxin Activity Assay)測定の意義 - 感染症症例に関する検討 -

大嶋清宏、国元文生、日野原宏、大川牧生、門井雄司、斎藤繁

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野原宏 (HINOHARA HIROSHI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号 : 70361376

(2) 研究分担者

門井 雄司 (KADOI YUJI)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号 : 10292591

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :