

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09439

研究課題名(和文) EDHFに着目した腸管由来敗血症における新しい重症度評価の試み

研究課題名(英文) New attempt to assess the severity of sepsis due to bowel infection by focusing on the function of EDHF (Endothelial-Driven Hyperpolarizing Factor)

研究代表者

服部 友紀(Hattori, Tomonori)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：90363936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞障害が病態の本質である敗血症において、最も重要な弛緩因子である血管内皮依存性過分極反応(EDH)に関する研究報告はない。穿孔性腹膜炎に起因する敗血症患者に対する準備段階として、まずはLPS(5mg/kg)投与モデルラットの右胃大網動脈を用いて微小電極法によりEDHについて検討した。アセチルコリンで誘発されるEDHはLPS投与直後から抑制された。投与3日後以降で回復し、早期の回復にはNOが補完的に作用していた。またEDHは2成分(SK、IK)で構成されるが本病態下ではIK成分のみが抑制されていた。一方SK成分はIK抑制を補うように作用し(反応が増大し)EDHは維持されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮細胞は3つの重要な弛緩因子(一酸化窒素、プロスタサイクリン、血管内皮由来過分極因子;EDHF)により組織血流を維持するがこれらのうちEDHFはより細い動脈で作用しており最も重要である。敗血症の主病態は血管内皮障害であり、全身組織への血流障害から多臓器不全に至る。敗血症病態においてEDHFを研究することは必須であるが、過分極反応という電位変化を捉える特殊な実験系が必要で着手することが困難なため研究報告は皆無という状況であった。本研究成果はLPSで傷害されたEDHの回復過程にNOとSK/IK反応を解明した世界初の結果であり、未だ致命率の高い敗血症病態を解明する重要な知見になりうる。

研究成果の概要(英文)：There are no studies on Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH), the most important relaxing factor in sepsis, where vascular endothelial cell damage is the essence of the pathology. As a preparatory step for patients with sepsis due to perforated peritonitis, we first examined EDH by microelectrode method using the right gastroepiploic artery of LPS (5mg/kg)-administered rat. Acetylcholine-induced EDH was suppressed immediately after LPS administration. Recovery was achieved 3 days after administration, and NO was complementary to the early recovery. EDH is composed of two components (SK and IK), but only the IK component was suppressed under this pathological condition. On the other hand, the SK component acted to supplement the suppression of IK and EDH was maintained.

研究分野：救急医学、集中治療学、災害医学、麻酔科学

キーワード：敗血症 血管内皮由来過分極反応 EDHF LPS

1. 研究開始当初の背景

敗血症では血管内皮が傷害され凝固異常や弛緩反応低下による組織・臓器への血流障害が起こる。血管内皮細胞からは「内皮由来弛緩因子」と総称される弛緩因子が産生・遊離され血管平滑筋の弛緩により組織への血流が維持されるが、その弛緩因子として、一酸化窒素(NO)、プロスタサイクリン(PGI₂)、血管内皮由来過分極因子(EDHF; Endothelium-Driven Hyperpolarizing Factor)の3つが重要である。このうちNOは比較的太い血管で重要な役割を果たし、EDHFは血管径が細くなるほどその重要性が増し、PGI₂はNO/EDHFほどの関与はないが血管径によらず一定の関与があることがわかっている。組織・臓器血流は細動脈によって維持されるため、EDHFは最も重要な血管内皮由来の血流調節因子であると考えられている。敗血症病態でのEDHF機能の検討は最も重要な課題であるが、NOやPGI₂に関する研究と比べて非常に少ない。EDHFはその名が示すように血管平滑筋を過分極させて弛緩させる内皮由来因子であり、本質的な研究は血管平滑筋の過分極反応を検討することである。しかし過分極反応を確認するには微小電極法による血管平滑筋の膜電位測定が必要であり、そのために必要な実験系には、わずか数mmの摘出血管標本の作成と先端径が0.5μm以下の微小ガラス電極を操作する繊細さと器用さが要求される。それゆえこの研究に着手することが技術的に難しい。これまでのEDHFに関する研究は、阻害薬によってNO/PGI₂の作用を阻害した上で残存する内皮由来血管弛緩反応を確認する、というものが主であり過分極反応を確認した本質的な研究報告は少ない。敗血症時における血管内皮傷害について微小電極法によってEDHFの反応を本質的に評価した報告は動物実験ですら皆無であった。

2. 研究の目的

我々にはすでに確立した微小電極法の実験系があり、これまでも微小血管平滑筋の膜電位変化に関する研究を行ってきたため、敗血症病態下でのEDHFに関する研究に着手した。

本研究の目的は、

「敗血症病態下におけるEDH(Endothelium-derived hyperpolarization)の変化を検討する」ことである。

* EDHFの呼称について、「Factor」が議論が分かれているため以後の記載をEDH;

Endothelium-derived hyperpolarization(内皮由来過分極反応)で統一する

* 当初は実際の穿孔性腹膜炎による敗血症患者の開腹手術の際に切除される大網から血管標本を作成して研究を遂行する予定であったが、(Covid重症者に対応する必要があったと言う社会的責務も重なり)症例が蓄積できなかったため、その準備段階としてモデル動物(LPS投与したラット)を用いたEDHの反応について検討した。

3. 研究の方法

敗血症モデルとしてLPS(5mg/kg)を雄のラット(Wister/ST aged 6 weeks)に投与した。投与前(Control)、翌日(Day1)、3日目(Day3)、6日目(Day6)にそれぞれ腸間膜動脈(収縮-弛緩反応、wire myography 図1a)、右胃大網動脈(微小電極法 図1b)を摘出し血管標本を作成し

た。アセチルコリン(Ach)で誘発される血管内皮依存性弛緩反応及び過分極反応(EDH)を測定し、比較検討した。

図1a; wire myography (収縮-弛緩反応)

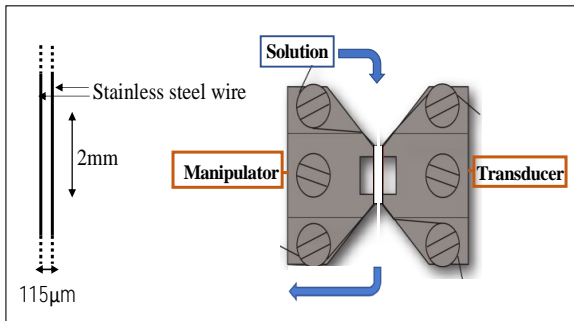
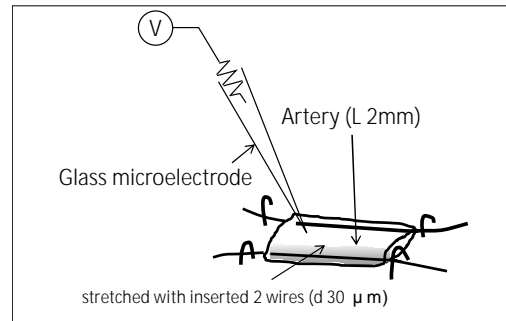


図1b; glass microelectrode(ガラス電極法)



4. 研究成果

LPS 5mg/kg 投与(静脈内投与)により約半数は死亡した。生存したラットは day2-3 で体重が回復傾向となった(図 2)。また炎症活性化の指標である Interleukin-6(IL-6)は、Day3 には正常化していた(表 1)

図2; LPSラットの体重変化

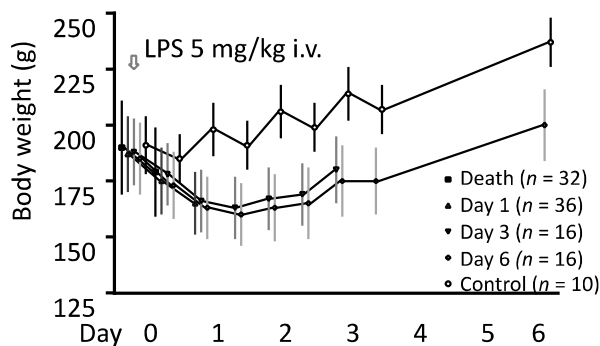
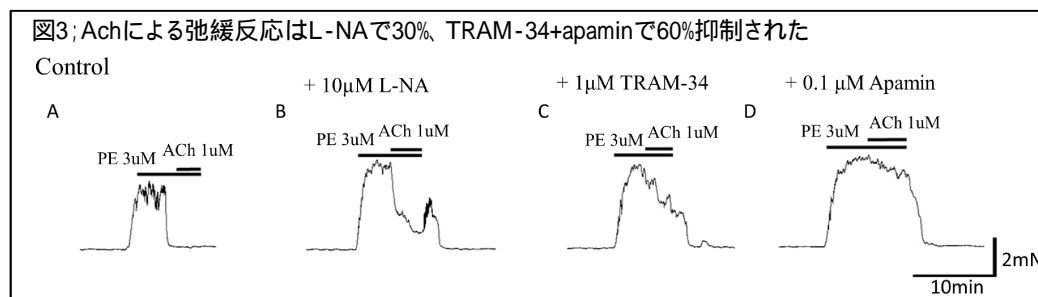


表1; LPS投与後のIL-6値

treatment	IL-6 (pg/mL)	number
normal	59.4 ± 22.7 *	4
DAY0	47631.4 ± 21077.2	10
DAY1	11840.0 ± 30697.2	8
DAY3	66.0 ± 12.1 *	7
DAY6	55.6 ± 23.2 *	8

収縮-弛緩反応

ラットの腸間膜動脈で見られる弛緩反応は 60%が EDH、30%が NO が関与した(図 3)。LPS 投与 1 日後(Day1)ではこの弛緩反応は L-NA(NO 阻害薬)存在下で完全に抑制された。Day3 では L-NA 存在下でも弛緩反応を認め、残存した弛緩反応は Kca チャンネルブロッカーの apamin+TRAM-34(EDH を抑制する)で抑制された(図 4)。



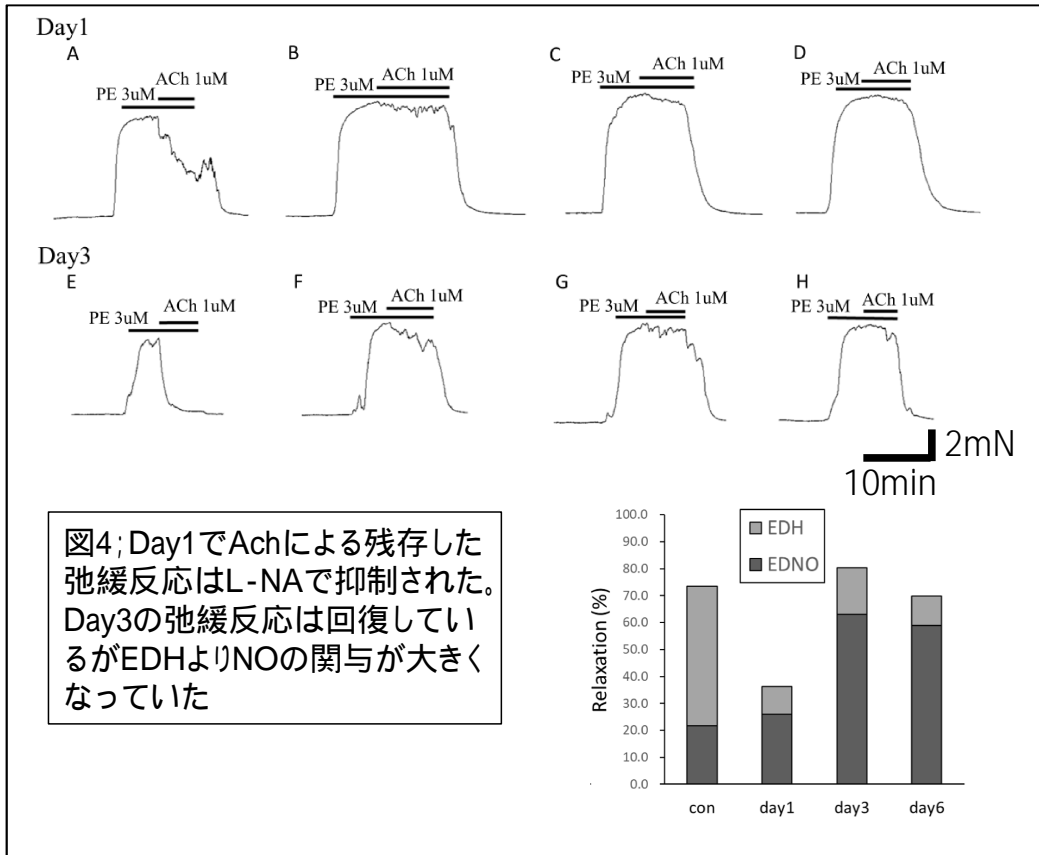
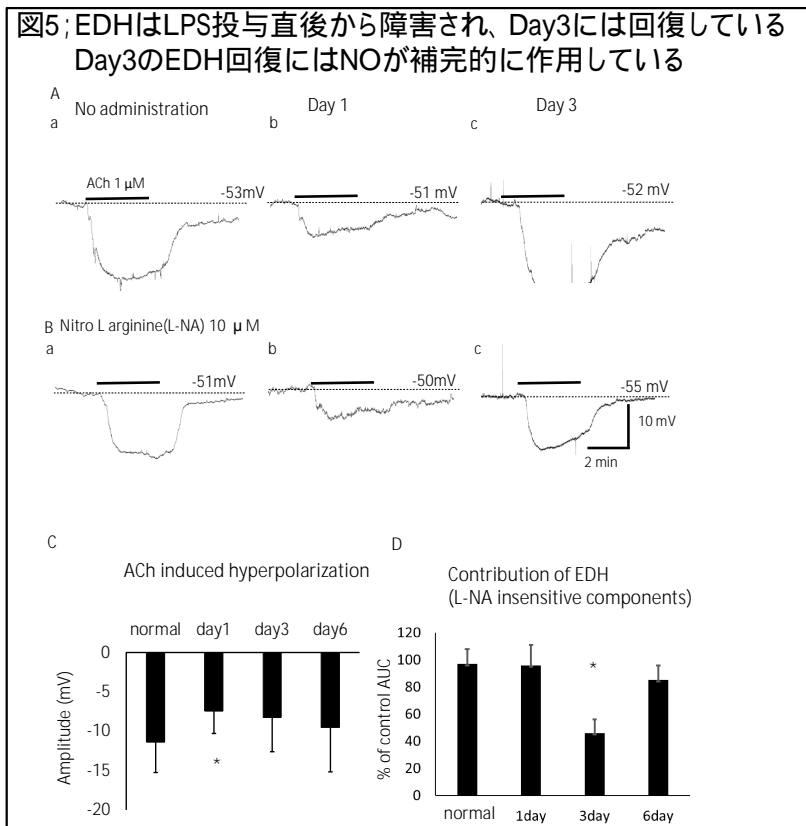


図4; Day1でAChによる残存した弛緩反応はL-NAで抑制された。Day3の弛緩反応は回復しているがEDHよりNOの関与が大きくなっていた

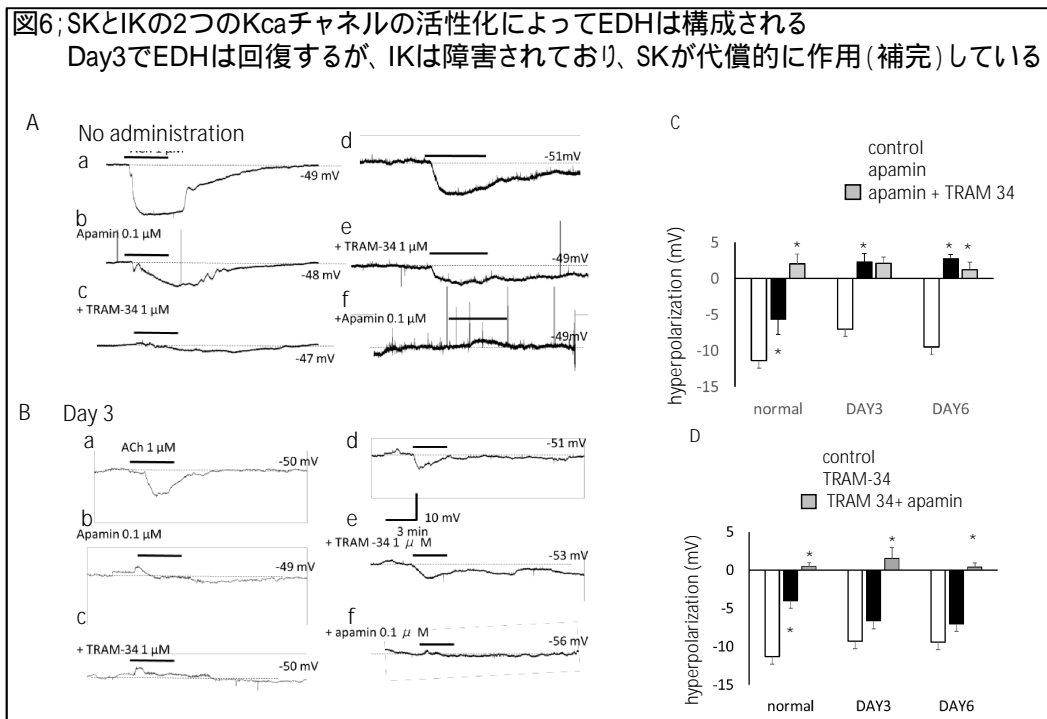
微小電極法による膜電位測定(EDHの検討)

LPS非投与下(Control)ではACh投与でEDHを認めた(図5)。EDHはDay1で抑制されておりDay3では回復していた。この回復はL-NA投与下で抑制された。

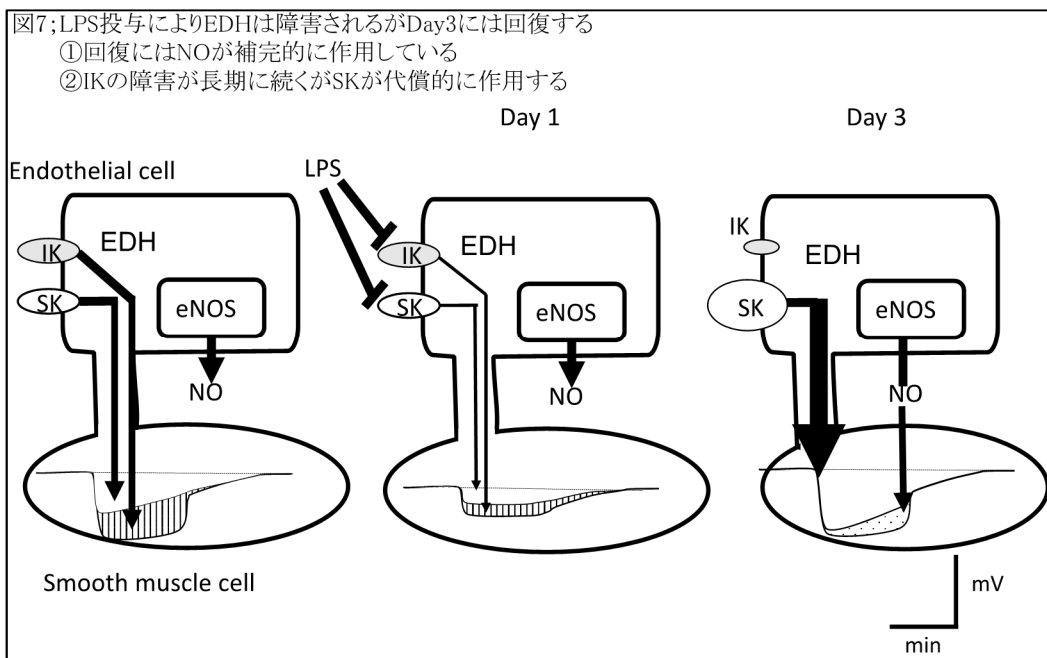


EDHはsmall conductance Ca activated K channels (SK)の阻害薬; apaminとintermediate conductance Ca activated K channels (IK)の阻害薬; TRAM-34で完全に抑制される。EDHを構成する2成分(SKとIK)とLPS投与の影響を見ると、Controlで認め

た反応と異なり Day3 の EDH は TRAM-34 では抑制されず apamin で完全に抑制された (図 6)。



本研究で得られた結果のまとめを図7に示す。LPS 投与による endotoxemia の状態では、EDH は障害されるが炎症の改善と共に回復する。 EDH 回復の過程には NO が補完的に作用する EDH の IK 成分が障害されており、これを SK 成分が代償して回復させている。



本研究により、高度炎症状態で EDH は障害されているが早期から回復に向かい、この回復には NO と EDH を構成するチャンネル間での代償作用が関与していることが判明した。EDH は血管内皮細胞の臓器血流調整に重要な因子であり、さらなる EDH の解明が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsubota M, Kato A, Goshima T, Imai K, Yamagishi Y, Matsushima A, Sasano H, Hattori T.	4. 巻 Dec 9;7(1)
2. 論文標題 Rapidly progressive acute necrotizing encephalopathy associated with influenza A in an elderly adult.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acute Med Surg	6. 最初と最後の頁 e611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ams2.611	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 該当する
1. 著者名 Fukuta H, Mitsui R, Takano H, Hashitani H.	4. 巻 Apr;472(4)
2. 論文標題 Neural regulation of the contractility of nutrient artery in the guinea pig tibia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Arch.	6. 最初と最後の頁 481-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-020-02362-9	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 該当する
1. 著者名 Takeya M, Hayashi T, Hashitani H, Takano M.	4. 巻 1124
2. 論文標題 Mucosa-Dependent, Stretch-Sensitive Spontaneous Activity in Seminal Vesicle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 217-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-13-5895-1_9	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 該当する
1. 著者名 Goshima T, Terasawa T, Iwata M, Matsushima A, Hattori T, Sasano H.	4. 巻 Feb 25;101(8)
2. 論文標題 Treatment of acute hypernatremia caused by sodium overload in adults: A systematic review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e28945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.0000000000028945	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 該当する

1. 著者名 Matsui R, Sasano H, Azami T, Yano H, Yoshikawa H, Yamagishi Y, Goshima T, Miyazaki Y, Imai K, Tsubouchi M, Matsuo Y, Takiguchi S, Hattori	4. 巻 Feb;32(2)
2. 論文標題 Effectiveness of a novel semi-closed barrier device with a personalized exhaust in cough aerosol simulation according to particle counts and visualization of particles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Indoor Air	6. 最初と最後の頁 e12988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ina.12988	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 該当する

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 笹野 寛
2. 発表標題 感染対策としてのエアロゾル拡散防止を目的とした移動式遮蔽スペース
3. 学会等名 第48回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹野 寛
2. 発表標題 血管内の針先の位置とガイドワイヤ挿入困難は関係し、挿入時の抵抗は必ずしも後壁穿刺を意味しない
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部友紀
2. 発表標題 敗血症病態における血管内皮依存性過分極因子(EDHF)の反応の検討
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坪田真美
2. 発表標題 急激な経過を辿ったインフルエンザ脳症の一例
3. 学会等名 第34回日本救命医療学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Hattori
2. 発表標題 The influence of tying the extremity with a tourniquet for sampling venous blood on peripheral venous blood gas and lactate level
3. 学会等名 10th Asian Conference for Emergency Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五島隆宏
2. 発表標題 醤油多量摂取による超急性高Na血症に対し、急速な補正を行い良好な神経学的予後を得た一例
3. 学会等名 第46回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部友紀
2. 発表標題 治療成績から見えてくる超高齢重症患者の治療の改善余地と限界
3. 学会等名 第34回日本救命医療学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部友紀
2. 発表標題 Covid-19重症者管理におけるチームリーダーとしての救急医
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野博充
2. 発表標題 LPS誘発敗血症モデルラットの胃大網動脈における内皮依存性過分極の変
3. 学会等名 第63回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部友紀
2. 発表標題 医療崩壊を防ぐ! ~「災害モード」で病院全体で取り組むCovid-19対応~ Prevent overwhelming hospitals! ~Handling of the Covid-19 crisis cooperated with all departments as the disaster mode~
3. 学会等名 第27回日本災害医学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	橋谷 光 (hashitani hikaru) (10315905)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	高橋 広城 (takahashi hiroki) (30381792)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	

	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
研究 協 力 者	高野 博充 (takano hiromitsu)		

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