

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月12日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591998

研究課題名（和文）敗血症性中枢神経障害での脳内転写因子活性と治療法の確立

研究課題名（英文） the role of intercellular factor in the brain during septic encephalopathy and establishment of the treatment for septic encephalopathy

研究代表者

門井 雄司 (KADOI YUJI)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：10292591

研究成果の概要（和文）：Rat を用いて pentobarbital 麻酔下に、盲腸穿孔モデルを作成する。24時間後にイソフルラン麻酔下に Rat 脳を4%ハラホルムアルデヒドで還流固定。クライオスタットで脳スライスを作成し、作成した脳スライスに ABC 法を用いた Immunohistochemistry 法で NF- κ B と AP-1 発現部位を測定した。NF- κ B と AP-1 は海馬の CA-1 領域に NF- κ B と AP-1 が多く発現していることがわかった。また同時刻での中枢神経障害の解析では、侵害刺激に対する逃避応答が抑制されていた。また電気生理学的手法による CA-1 領域の細胞活動も減弱していた。敗血症由来の中枢神経障害では、海馬の CA-1 領域が特に障害されることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to examine the role of NF- κ B and AP-1 during septic encephalopathy. After the establishment of septic shock using cecal ligation and puncture rat model, brain was removed. Brain slices were examined by ABC methods. The expression of NF- κ B and AP-1 was highly observed in CA-1 region in hippocampus. In addition, response to noxious stimulation was also diminished at the same time. This data indicated that over expression of NF- κ B and AP-1 in CA-1 region in hippocampus may have one of important role in the pathogenesis of septic encephalopathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：集中治療医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：敗血症、脳障害、海馬

1. 研究開始当初の背景

周術期医学領域では、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、中でも、中枢神経障害の発生は、患者の予後と後遺症を左右する。敗血症の病態進行には様々なメディエータが関与している。これまでは単一のメディエータを標的とした治療法を検討した研究では、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。

2. 研究の目的

本研究では TNF- α や IL-1 などの炎症カスケードの初期メディエータ、プロテイン C や活性化補体、HMGB-1 などの炎症カスケードにおける中間的および遅発的メディエータの発現時系列とこれらの炎症メディエータ産生に關与する nuclear factor- κ B (NF- κ B) や activator protein-1 (AP-1) を中心とした転写因子活性上昇の発現経過を檢討、その關与を証明する。

3. 研究の方法

① Immunohistochemistry 法を用いた転写因子の脳内発現部位の決定

Wistar 系 Rat (250-300g) を用いて pentobarbital 麻酔下に、盲腸穿孔モデルを作成。2 4 時間後にイソフルラン麻酔下に Rat 脳を 4 % ハラホルムアルデヒドで還流固定する。固定 2 時間後に Rat 脳を取り出し、クライオスタット (Leica CM1900) を使用して 10 μ m の脳スライスを作成。作成した脳スライスに ABC 法を用いた Immunohistochemistry 法で測定した。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 % H2O2 を 30 分間投与。Phosphate buffer solution (PBS; pH=7.4) で洗淨後、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 NF- κ B と AP-1 抗体 (アマシャム社製品) で 24 時間攪拌。PBS でその脳スライスを洗淨した後、Avidin-Biotin Complex (ABC kit: アマシャム社製) を投与し発色させ 1 時間後に Hematoxylin で Counter 染色する。

② 脳内 NF- κ B と AP-1 の定量

上記で作成した脳スライスに対して Immunohistochemistry 法において敗血症で脳内 NF- κ B と AP-1 が多く発現する部位を取り出し、0.32M sucrose を 10 倍量加えた後、Polytron PT-10 型ホモジナイザー及び Potter 型ホモジナイザーを利用して、脳組織のホモジネートを行う。ホモジネートした組織は Beckman 遠心器を利用して 100,000 x g. 60 分で P2 分画に精製分離し、Bradford 法でタンパク定量する。その精製した P2 分画を利用して SDS-PAGE と Immunoblotting 法 (Western Blot 法) を用いて MAP kinase の定量を行う。20 μ g に分割した P2 分画を電気泳動 (Bio-Rad 社製 Immune Blot Kit) に流して NF- κ B と AP-1 を分離し、それを Nitrocellulose 膜に転写。200 倍に希釈した 1 次抗体である抗 NF- κ B 抗体ならびに抗 AP-1 抗体 (Sigma 社製品) を投与し、Avidin-Biotin Complex (ABC kit: アマシャム社製) を投与し発色させる。発色した部位を Densitometry で解析した。

③② in vivo パッチクランプ法を用いた大脳皮質神経細胞内の神経細胞活動の変動の検討、

i. 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。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。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させた。

ii. 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觀察しながら、CA1 領域の錐体細胞からホールセルパッチを行った。また錐体細胞は層上に多くの細胞が集まってくるために、この記録は実体顕微鏡を使って盲目的にアプローチが可能であった。

膜電位固定下に興奮性シナプス後電流、膜電位固定下に自発性・刺激性誘発性の電圧測定をして海馬 CA1 領域の錐体細胞ニューロンの膜の電気生理学的性質を測定。

記録の解析:

CA3-CA1 シナプスでの long-term potential (LTP) の誘導; このシナプスはグルタミン酸作動性の興奮入力が豊富であることから、シナプスの可塑的变化を觀察する実験で頻用されている。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) を記録した。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が、この間に条件刺激 (100 Hz) を行うと、その後は持続的にシナプス電位の振幅が長時間にわたって上昇する。シナプス伝達効率に変化が觀察されたら、次にこの変化がシナプス前性 (伝達物質放出量) の変化なのか、シナプス後性 (伝達物質に対する反応性) の変化なのかを区別するために、2 回連続刺激による EPSP 増大率 (paired-pulse facilitation: PPF) が測定される。海馬 Schaffer 側枝の刺激では、2 回目の刺激反応において 1 回目よりも 20-30% ほど大きな振幅が觀察されるが、この増大率に変化が觀察された場合には、シナプス前性の変化と判定した。

④ 意識レベルの評価法: 急性侵害刺激は、(動物行動学的研究において用いられる、侵害刺激に対する逃避反応の疼痛閾値を測定することで意識レベルを評価した。急性侵害刺激は、(i) 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)、(ii) 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)、

(iii) 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)、(iv) 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)、などを用いて評価した。

4. 研究成果

NF- κ B と AP-1 は海馬の CA-1 領域に NF- κ B と AP-1 が多く発現していることがわかった。また同時刻での中枢神経障害の解析では、侵害刺激に対する逃避反応が抑制されていた。また電気生理学的手法による CA-1 領域の細胞活動も減弱していた。敗血症由来の中枢神経障害では、海馬の CA-1 領域が特に障害されることが判明した。

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 14 件)

(1) Kadoi Y, Hoshi H, Nishida A, Saito S. Comparison of recovery times from rocuronium-induced muscle relaxation after reversal with three different doses of sugammadex and succinylcholine during electroconvulsive therapy

J Anesthesia. 23:855-859, 2011. 査読有

(2) Kadoi Y, Kawauchi C, Kuroda M, Takahashi K, Saito S, Fujita N, Mizutani A. Association between cerebrovascular carbon dioxide reactivity and postoperative short-term and long-term cognitive dysfunction in patients with diabetes mellitus

J Anesthesia. 25:641-647, 2011. 査読有

(3) Hinohara H, Kadoi Y, Takahashi K, Saito S, Kawauchi C, Mizutani A.

Time course of changes in cerebral blood flow velocity after tourniquet deflation in patients with diabetes mellitus or previous stroke under sevoflurane anesthesia

J Anesthesia. 25:409-414, 2011. 査読有

(4) Hoshi H, Kadoi Y, Kamiyama J, Nishida A, Saito H, Taguchi M, Saito S.

Use of rocuronium-sugammadex, an alternative to succinylcholine, as a muscle relaxant during electroconvulsive therapy

J Anesthesia. 25:286-290, 2011. 査読有

(5) Kadoi Y, Horiuchi T, Uchida S, Saito S. Adequacy of control of preoperative hypertension can affect landiolol-induced hemodynamic changes in elderly patients during emergence from anesthesia

J Anesthesia. 25:271-277, 2011. 査読有

(6) Kadoi Y, Kawauchi C, Ide M, Kuroda M,

Takahashi K, Saito S, Mizutani A. Preoperative depression is a risk factor for postoperative short-term and long-term cognitive dysfunction in patients with diabetes mellitus

J Anesthesia. 25:10-17, 2011. 査読有

(7) Hinohara H, Kadoi Y, Ide M, Kuroda M, Saito S, Mizutani A.

Differential effects of hyperventilation on cerebral blood flow velocity after tourniquet deflation during sevoflurane, isoflurane or propofol anesthesia

J Anesthesia. 24: 587-593, 2010. 査読有

(8) 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. 24: 553-563, 2010. 査読有

(9) Ide M, Kadoi Y, Saito S, Takahashi K, Sawano Y, Miyazaki M, Shimada H.

Effects of landiolol on left ventricular function during electroconvulsive therapy -A transthoracic echocardiographic study

J Anesthesia. 24:272-276, 2010. 査読有

(10) Miyazaki M, Kadoi Y, Saito S.

Effects of landiolol, a short-acting beta-1 blocker, on hemodynamic variables during emergence from anesthesia and tracheal extubation in elderly patients with and without hypertension.

J Anesthesia. 23:483-488, 2009. 査読有

(11) Matsumoto N, Tomioka A, Sato T, Kawasaki M, Kadoi Y, Saito S.

Relationship between cardiac output and onset of succinylcholine chloride action in electroconvulsive therapy patients.

J ECT 25:246-249, 2009. 査読有

(12) Kadoi Y, Kawauchi C, Ide M, Saito S, Mizutani A.

Differential increases in blood flow velocity in the middle cerebral artery after tourniquet deflation during sevoflurane, isoflurane or propofol anesthesia

Anaesth Intensive Care. 37:598-603, 2009. 査読有

(13) Kadoi Y, Kawauchi C, Saito S, Takahashi K:

The comparative effects of equipotent Bispectral Index dosages of propofol versus sevoflurane on cerebrovascular carbon dioxide reactivity in elderly patients

J Clinical Anesth. 21:173-177, 2009. 査読有

(14) Mizutani A, Okajima K, Murakami K, Mizutani S, Kudo K, Uchino T, Kadoi Y, Noguchi T.

Activation of sensory neurons reduces ischemia/reperfusion-induced acute renal injury in rats.

Anesthesiology 110:361-369, 2009. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) Kadoi Y, Saito S.

Preoperative depression is a risk factor for postoperative short-term and long-term cognitive dysfunction in patients with diabetes mellitus.

85th Annual Meeting of International Anesthesia Research Society. Vancouver (Canada) May 21, 2011

(2) Kadoi Y, Saito S.

Association between cerebrovascular carbon dioxide reactivity and postoperative short-term and long-term cognitive dysfunction in patients with diabetes mellitus.

33th Annual Meeting of American Cardiovascular Anesthesia. Savannah, GA (USA) April 30, 2011.

(3) Kadoi Y, Saito S.

Differential effects of hyperventilation on cerebral blood flow velocity after tourniquet deflation during sevoflurane, isoflurane or propofol anesthesia Euroanaesthesia 2010 (Helsinki, Finland) June 12, 2010.

(4) 大嶋清宏、国元文生、日野原宏、大川牧生、門井雄司、斎藤繁.

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－

第 37 回日本集中治療医学会総会 (広島) 2010 年 3 月 1 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門井 雄司 (KADOI YUJI)

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：10292591

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：