

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25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791412

研究課題名（和文） 敗血症に関連する尿濃縮の破綻機序解明とナトリウムを主体とした体液量維持療法の検討

研究課題名（英文） The study of sepsis induced urine concentrating mechanism failure and body fluid maintenance based mainly on sodium administration

研究代表者

外山 裕章（HIROAKI TOYAMA）

東北大学・病院・助教

研究者番号：00375007

研究成果の概要（和文）：副腎不全ラットに対し、食塩水飲水（ナトリウム負荷）、アルドステロン補充のモデル群を作製した。また、各群に敗血症を誘発したモデル群も作製した。各群の循環血液量、尿量と尿浸透圧を検討した。また、腎の各層における組織ナトリウム濃度、浸透圧の細胞内伝達系蛋白である TonEBP 発現量を免疫組織化学にて検討した。副腎不全では組織ナトリウム濃度（浸透圧）の低下が著しいために尿濃縮力が低下しており、ナトリウム負荷では組織ナトリウム濃度の上昇は小さく、アルドステロン補充でのみ上昇していた。

研究成果の概要（英文）： Adrenalectomized rats were assigned to three groups. ADX group was administered oral distilled water. NS group was administered oral saline and ALD group was administered aldosterone by osmotic mini pump. And part of the each group was administered lipopolysaccharide. In all of the groups, circulating blood volume, urine volume and urine osmolality were measured. And tissue sodium concentration of the cortex, outer medulla and inner medulla of the kidney of the all groups were measured. Expression of tonicity-responsive enhancer binding protein in the kidney tissue was also measured by immunohistochemical staining. Tissue sodium concentration of the kidney was decreased in adrenal failure and which was slightly attenuated by oral sodium administration. Only aldosterone administration maintained the urine osmolality by the preservation of the kidney tissue sodium concentration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

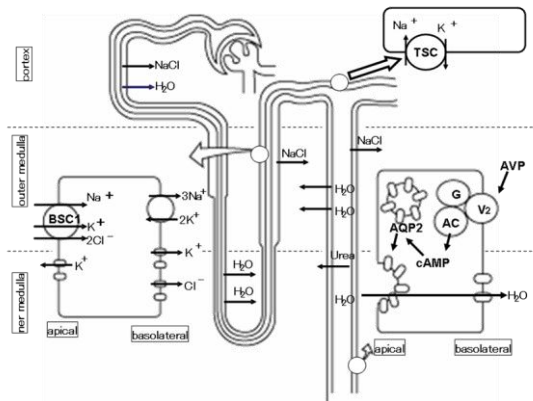
研究分野：医歯薬学

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：ナトリウム、アルドステロン、副腎不全、循環血液量、敗血症

1. 研究開始当初の背景

副腎不全は敗血症に伴って発症しやすく、尿濃縮能や希釈能障害を起こすが、現在も副腎不全における尿濃縮障害の発生機序の解明には至っていない。解明に支障をきたしている原因の1つとして、動物実験での副腎不全の研究は外因性に塩分投与を行った状態で検討されており、ナトリウム投与の影響を大きく受けていることが挙げられる。ラット副腎不全モデル（ラット両側副腎摘出（AdX）モデル）を長期生存させる場合、術後に食塩水（0.9%NaCl）を飲ませることが必要であり、蒸留水を飲ませると高度の脱水と低ナトリウム血症を来して死亡してしまう。つまり、AdX 後、蒸留水のみ服用がより副腎不全の病態を反映しており、ナトリウム投与は純粋な副腎不全の病態をマスクしているとも考えられ、副腎不全の病態解明には、ナトリウムの生理作用の解明が不可欠と考えられる。加えて、個体全体で見ると、血中ナトリウム濃度に大きな影響を与えるアルドステロンも絡めた生理作用の解明が不可欠と考えられる。

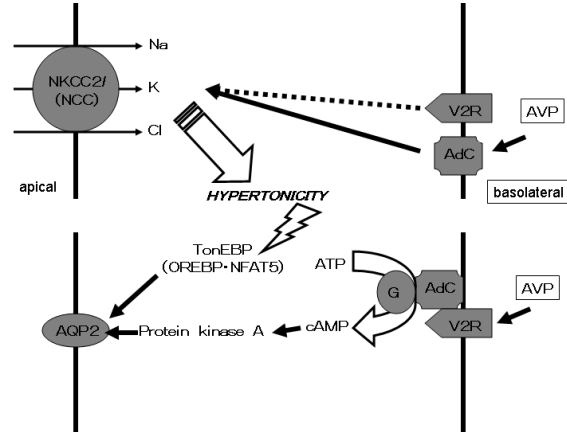


尿濃縮に対するナトリウムの生理作用を検討する場合、腎 Henle ループ上行脚のナトリウム共輸送体 NKCC2 (BSC1) と集合管腔側細胞膜の水チャンネル AQP2 が重要である（上図）。NKCC2 は尿からナトリウム再吸収を行い、AQP2 は水再吸収を強力に行うが、共に血清オソプレッシン AVP 濃度に対する応答性が高く、尿濃縮の主体を成しているからである。AQP2 発現に直接的に影響を与える副腎不全における尿濃縮障害の発生機序を解明するためには、尿濃縮の主体である NKCC2 と AQP2 の発現に対し、ナトリウム自体とアルドステロンがどのような作用機序で影響を及ぼしているかを解明する必要がある。

1990 年、AQP2 発現に直接的に影響を与える転写促進蛋白である TonEBP (tonicity-responsive enhancer binding protein) が同定されており、TonEBP は、腎間質の高浸透

圧に反応して、その分布を細胞質内から核内に変化させ、AQP2 遺伝子の転写活性を亢進させる。近年、TonEBP は AVP 非依存性に AQP2 発現を増加させることが細胞系実験では示されているが、動物実験系では示されていない。

副腎不全における尿濃縮障害の発生機序を



解明するためには、尿濃縮の主体である NKCC2 と AQP2 の発現に対し、ナトリウムがどのような作用機序で影響を及ぼしているかを解明し、AQP2 発現の調節を行う因子（TonEBP 他）とそのメカニズム解明を行う必要がある。副腎不全時の循環血液量と重要臓器の血管透過性の検討を行い、まだ不明な点が多い副腎不全時の循環動態を解明する必要がある。

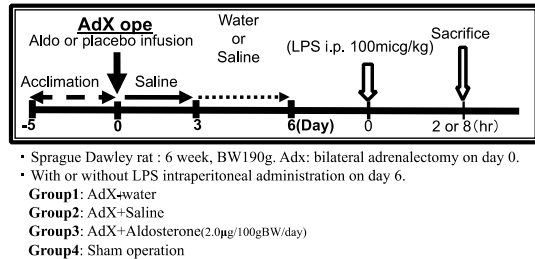
2. 研究の目的

重症敗血症の死亡率は今もなお高い。死亡率が高くなる原因として、副腎不全と腎不全を併発しやすいことが挙げられる。副腎不全に敗血症を合併したモデルを用いて、副腎不全に関連した腎不全の病態の解明と治療法の検討を行い、将来的には臨床応用可能にする。副腎不全によるアルドステロン欠乏に起因するナトリウムの再吸収障害が誘引と想定される尿濃縮機構の破綻機序の解明を行う。また、副腎不全時の循環血液量や重要臓器の血管透過性変化を検討することで、血行動態への影響の検討も行う。敗血症に伴う循環血液量変化に全身各臓器の血管透過性変化を絡めた血行動態の検討も行うことで、血行動態変化が副腎不全と腎不全の発症に影響するかも検討する。病理組織像も加えて検討することで血行動態変化と副腎不全や腎不全の関連を詳細に検討する。

3. 研究の方法

本研究は副腎不全時の腎トランスポーターの生理機能、病態への関わりを明らかにする。また、細胞内外の浸透圧較差を検討し、浸透圧変化を細胞内に伝達するシグナル伝達機

構を解明することにより尿濃縮機構とナトリウムの生理的意義を明らかにする。血行動態の解明は、循環血液量測定を副腎不全・敗血症・両者の併発モデルに行い、各病態について検討を行う。また、血管透過性の変化を各臓器の漏出色素定量と組織学的評価により検討する。以下に具体的方法を提示する。



(1) AdX ラットにナトリウム投与(+)群と(-)群、アルドステロン投与(+)群と(-)群を設定し、AdX6 日後にこれらの群にエンドトキシン投与による敗血症を誘発するものと誘発しないものを設定し、解析のための検体摘出を行う系で検討を行う(上図)。これにより、敗血症誘発前後の AdX ラットの尿濃縮不全の原因解明に取り組む。

- (2) 上記(1)モデルを犠牲死させて得られた検体により、
- ①腎組織のNKCC2 と AQP2 蛋白の発現変化をウェスタン法にて解析する。
 - ②腎組織ナトリウム濃度と間質の浸透圧を測定する。
 - ③腎組織の TonEBP の組織内・細胞内局在を免疫組織化学法にて検討する。
 - ④腎組織の TonEBP の mRNA をリアルタイム PCR 法にて解析し、さらに蛋白量をウェスタン法にて解析する。

(2) 上記(1)モデルラットの股動静脈にカニューレ後皮下トンネルを作製してフリームービングキットに接続して飼育する。安静状態下に輸血採血法により採取した血液検体から血清 AVP 濃度を測定する。血清 AVP 濃度がナトリウム摂取量により影響を受けるかどうかを解析する。血清 AVP 濃度と AQP2 発現の関係や浸透圧と AQP2 発現の関係を考察する事で、AdX ラットの尿濃縮不全を解明する。

- (3) 上記(1)モデルラットの股動静脈にカニューレ後、エバンスブルー (EBD) の静脈内投与を行う。
- ①動脈血を時間ごとに採取し、その EBD 濃度を測定する。色素希釈法により循環血液量を算出し、各病態の循環血液量を解析する。投与薬による循環血液量の変化を検討する。
 - ②EBD の血管内投与後に全身の血液を PBS で灌流・洗浄を行った後に肝・肺・腎・小腸の摘出を行い、各組織内の EBD 残留量の定量と組織標本から病理学的検討もを行い、循環血

液量の変化と臓器灌流、各臓器の血管透過性の変化を検討する。

副腎不全では、AVP 非依存性の AQP2 発現を認め、AQP2 発現は塩分依存性であり、塩分摂取による腎組織 tonicity 上昇が関係していることが示されている。腎組織 tonicity 上昇により AVP 非依存性に AQP2 発現を増加させる TonEBP 系路を証明する為に、輸血採血法による血清 AVP 濃度測定と、TonEBP の組織内・細胞内局在の検討と mRNA や蛋白量の比較定量を行う。

4. 研究成果

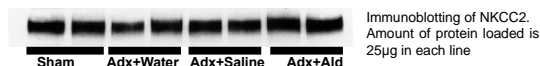
ナトリウム・アルドステロンと循環血液量との関連を明らかにするため、副腎不全ラット(ADX-Water)、副腎不全生理食塩水飲水ラット(ADX+NS)、副腎不全アルドステロン補充ラット(ADX+Ald)、偽手術ラット(Sham)を作成し、これらモデルの循環血液量の検討を行った。また、各モデルに腹膜炎による敗血症を誘発し、敗血症誘発前後の循環血液量の変化も検討した。循環血液量の測定はエバンスブルー色素を利用した色素希釈法を用いた。敗血症誘発前の単位体重あたりの循環血液量は ADX-Water 61.7 ml/kg、ADX-NS 63.1 ml/kg、ADX-Ald 74.1 ml/kg、Sham 65.8 ml/kg であった。副腎不全では循環血液量が減少し、生理食塩水の飲水により若干の循環血液量増加効果を認めた。アルドステロンの生理的用量補充により循環血液量は過剰となり、グルココルチコイドによるミネラルコルチコイド作用の抑制が無い状態ではアルドステロンの作用が過剰に出現してしまう事が示された。敗血症誘発後の単位体重あたりの循環血液量は ADX-Water 57.0 ml/kg、ADX+NS 56.4 ml/kg、ADX+Ald 65.2 ml/kg、Sham 62.9 ml/kg であった。敗血症による血管外への血漿の漏出による循環血液量減少は、ADX-Water 4.7 ml/kg、ADX+NS 6.7 ml/kg、ADX+Ald 8.9 ml/kg、Sham 2.9 ml/kg であった。生理食塩水の飲水によるナトリウム負荷により、循環血液量の軽度の増加作用を認めた。しかし、敗血症状態では循環血液量の維持には有効ではなかった。アルドステロン補充は過度の循環血液量増加を来した。敗血症状態では血漿漏出を抑制できず、エンドトキシン非投与に比べ循環血液量の減少を認めるものの、循環血液量の絶対値は正常値に維持されていた。

EBD の投与を行う実験では、正常ラットと副腎不全ラットで血管透過性が異なり、臓器による差異も認めた。

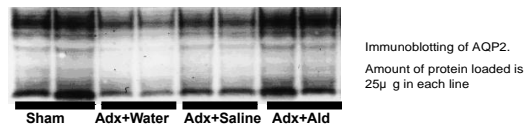
組織ナトリウム濃度は、塩分負荷依存性に上昇することが認められ、アルドステロン投与は塩分負荷を上回る組織ナトリウム濃度上昇を来していた。

NKCC2 発現をウェスタン法により解析した結果では、塩分依存性の発現変化は観察され

なかった。(下図)



AQP2 発現はナトリウム投与依存性に発現が増加し、さらにアルドステロン投与は塩分負荷を上回ることが判明した。(下図)



副腎不全では、AVP 非依存性の AQP2 発現を認め、AQP2 発現は塩分依存性であり、塩分摂取による腎組織 tonicity 上昇が関係していることが示された。これにより、腎組織 tonicity 上昇により AQP2 転写が促進されることにより AQP2 発現増加が起きるという経路が想定された。

輸血採血法による血清 AVP 濃度測定では、 $ADX\text{-}Water < Sham < ADX\text{+}NS < ADX\text{+}Ald$ の傾向を認めた。副腎不全ではナトリウム負荷により若干の AVP 濃度の上昇傾向を認めた。アルドステロンの補充により更に AVP 濃度は上昇する傾向を認めた。敗血症誘発後も同様であった。

次に副腎不全時の尿濃縮能力の維持に関して、各群の尿量と尿浸透圧を検討した。アルドステロンを補充したもののみ尿濃縮能力を維持しており、敗血症を誘発しても維持していた。

腎組織の組織ナトリウム濃度を腎の各層で検討した結果では、副腎不全 (ADX-Water) では組織ナトリウム濃度の低下が著しく尿濃縮力が低下することを裏付けていた。ナトリウム負荷 (ADX+NS) では組織ナトリウム濃度の上昇は小さく、アルドステロン補充 (ADX-Ald) でのみ組織ナトリウム濃度が上昇していた。

続いて、浸透圧の細胞内伝達系蛋白である TonEBP に関して、腎組織の細胞質内と細胞核内での発現量を組織免疫化学法で検討した。アルドステロン投与 (ADX-Ald) とナトリウム投与 (ADX+NS) において、TonEBP の細胞質内での発現の増加を認め、続いて生じる細胞核内への移動によると考えられる細胞核内発現の増加を認めた。特にアルドステロン投与では強く発現していた。エンドトキシン投与後は、組織損傷が激しく検討不能であった。上記の結果から、ナトリウム投与による組織浸透圧上昇により細胞内 TonEBP の細胞質内での合成増加と核内移動が、AQP2 発現に影響を与えている可能性が示唆された。この作用は、ナトリウム投与よりもアルドステロン投与でより強く出現していた。AQP2 発現増加による、腎での水再吸収増加による循環血液量増加作用に TonEBP を介する経路が関与して

いる可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

外山 裕章 (HIROAKI TOYAMA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：00375007

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者