

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592300

研究課題名(和文)新規抗酸化物質ETS-GSを用いた敗血症時の副腎不全に対する新しいアプローチ

研究課題名(英文)A new strategy for adrenal insufficiency in septic shock: a new antioxidant ETS-GS

研究代表者

松本 重清(Matsumoto, Shigekiyo)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：90274761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：LPSを投与して作製した敗血症ラットにおいて、電子スピン共鳴装置を用いて、リアルタイムにビタミンC(VC)を測定する方法を確立した。高用量のLPS投与後24時間では、抗酸化物質のVCは著減し、炎症反応は増加した。このモデルに対して、酸化ストレスと炎症を制御する、新規抗酸化物質のETS-GS投与すると、VCの減少や炎症反応の増加は抑制される傾向にあった。しかし、下垂体-副腎系ホルモンの変化に有意差はなかった。よって、ETS-GSと副腎機能の関連は明らかにすることができなかった。

今後は、ヒトと同様に、VCを合成できない、SMP30ノックアウトマウスを用いて、同様の研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：In the septic rat model administered lipopolysaccharide(LPS), we established the method to measure in real time serum vitamin C levels by using an electron spin resonance spectrometer. Twenty four hours after high dose LPS, serum vitamin C decreased remarkably and the inflammatory response increased.

The new antioxidant, ETS-GS which has very strong antiinflammatory and antioxidant effects tended to inhibit serum vitamin C loss and the inflammatory response. The hormones of pituitary and adrenal, however, didn't increase significantly. Therefore, I could not figure out the relationship between the ETS-GS and the hypothalamus-pituitary-adrenal axis.

In the future, I will plan to use the SMP30 knockout mouse which cannot synthesize vitamin C like human and continue this study.

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：敗血症 酸化ストレス ビタミンC 電子スピン共鳴 副腎不全 ETS-GS

1. 研究開始当初の背景

敗血症などの重症病態に生じる critical illness related-corticosteroid insufficiency (CIRCI)のメカニズムは不明であるが、我々は本病態に過剰な酸化ストレスが関与していると推測した(図1)。

図1. 敗血症などの重症病態に生じるCIRCIの機序(仮説)

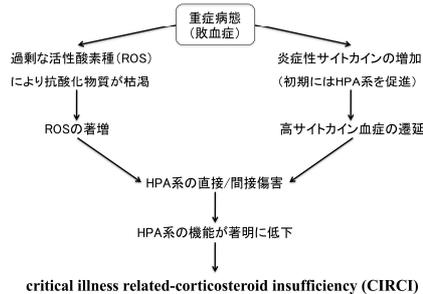
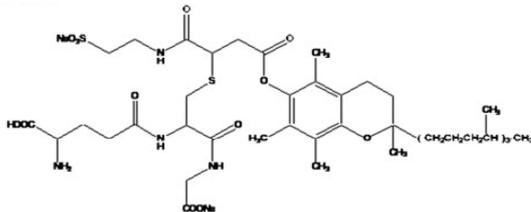


図2. ETS-GSの化学構造式



2. 研究の目的

ラット敗血症モデル作成し、新規ビタミンE誘導体で強力な抗酸化作用や臓器保護効果を有する ETS-GS (図2) により、炎症反応や酸化ストレスが制御され、予後の改善つながらんことを証明し、CIRCI と酸化ストレスの関係を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 以前に我々はヒト血清に DMSO を添加した後、ESR 装置にて2分で測定可能なビタミンCラジカル(VCR)/DMSO がビタミンC(VC)の指標となることを報告(J Trauma, 2010)したが、この方法によりリアルタイムに酸化ストレスの程度を評価することが可能となった。本研究ではラットにおいてもVCR/DMSO、その他の酸化ストレスマーカーを計測して、リアルタイムにVCあるいは酸化ストレスの程度をモニタリングすることが可能であるかどうかを検討する。

(2) LPS 敗血症モデルを作成し、酸化ストレスマーカーやVCR/DMSOを経時的に測定し、過剰な酸化ストレスが生じていることを証明する。

(3) 新規ビタミンE誘導体 ETS-GS が LPS 敗血症モデルの炎症反応や副腎機能を測定し、ETS-GS による抗酸化・抗炎症作用が副腎機能を改善し、予後を改善することを証明する。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレスをリアルタイムで評価する指標として、酸化ストレス時に最も速く反応してダイナミックに変化し、比較的安定な抗酸化物質のビタミンC(VC)に注目した。このVCがより減少しているほど、より過剰な酸化ストレスが生じている、すなわち、VCの減少の程度により、酸化ストレスの程度を評価できる。

まず、これまでに当講座が報告してきた、ヒトにおけるVCのリアルタイム・モニタリング(図3、4)がラットにおいても可能かどうかを検討した。ラット LPS 敗血症モデルにおいて、ESR 装置にて短時間で測定可能な血清 VC ラジカル/DMSO(VCR/DMSO)と高速液体クロマトグラフィーで測定された血清 VC は正の相関を示したが、この方法を用いると、ラットにおいてもヒトと同様に VC のリアルタイム評価が可能であることが証明された。

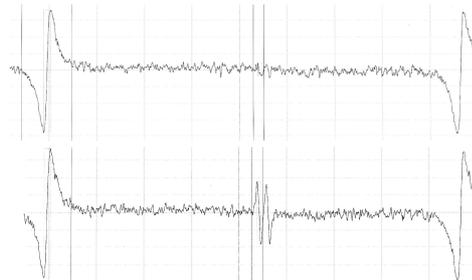


図3. 両端はESR装置の内部標準マーカーであるマンガンのシグナル。上図は健康人の血清のみで測定、ESRシグナルは検出されない。下図は同一血清にDMSOを添加、典型的なVCRのシグナルが検出(中央の2本線)。

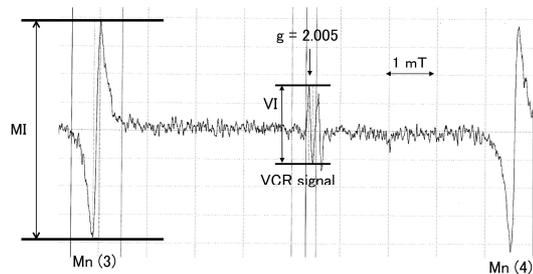
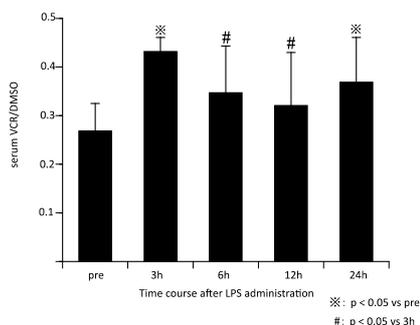


図4. DMSOを添加した血清VCRの典型的なESRシグナル。ESR装置の内部標準マーカーであるマンガンのシグナル高(MI)に対するVCRのシグナル高(VI)の比を血清VCR/DMSOとした。

(2) ラットは酸化ストレスに対してVC合成を増加させることが知られている。我々の研究においても同様に、低用量のLPSを投与した場合、血清VCR/DMSOは3時間で増加し以後も高値を持続した(下図)。VC以外

の酸化ストレスの指標（8-OHdG や malondialdehyde）に関してはいずれも有意に高値となり、過剰な酸化ストレスが生じていることが示された。



一方で、高用量の LPS を投与した場合、初期には軽度増加したが、24 時間後には VCR/DMSO は著減し、低用量とは全く異なる結果が得られた。8-OHdG や malondialdehyde は、低用量より有意に高値となり、より過剰な酸化ストレスが生じていることが証明された。

すなわち、軽度酸化ストレスでは VC 合成が増加し、逆に高度酸化ストレスが生じると VC は減少することがわかった。

(3) 低用量 LPS ラットでは、炎症反応を示す IL-6 が 3~6 時間後をピークに高値が遷延し、これは VCR/DMSO の変化とほぼ同様であった。低用量 LPS ラットに ETS-GS を投与すると、VCR/DMSO ピーク値や IL-6 が抑制される傾向にあった。

また高用量 LPS ラットでは、低用量と比較して、IL-6 は有意に著増し、以後も有意に高値が遷延した。高用量ラットに ETS-GS を投与すると、24 時間後の VCR/DMSO の減少や IL-6 の増加が抑制される傾向にあった。

低用量・高用量 LPS ラットにおいて、視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系に関する各種ホルモン (コルチゾール、バソプレシン、ノルエピネフリン) も測定したが、測定値のばらつきが大きいので、ETS-GS 投与の効果を確認することはできなかった。

(4) ラットは炎症や酸化ストレスの刺激に反応して、数時間以内に肝での VC 合成を増加させるため、VC の増加の程度は炎症反応や酸化ストレスの程度を示すよい指標となる。しかし、炎症反応や酸化ストレスがあまりにも強すぎると、肝傷害が高度となり、VC 合成能が低下して、血清 VCR/DMSO が低下するのではないかと推測される。これは、ヒトの高度侵襲時に生じた過剰な活性酸素種 (酸化ストレス) を消去するために、大量の VC が消費されることにより VC が著減するのは大きく異なる。一方、IL-6 に関しては、T 細胞や B 細胞、線維芽細胞、単球、内皮細胞、メサングウム細胞などの様々な細胞によ

り産生されるため、VC と異なり、ヒトと同様、炎症の程度に応じて上昇する。また HPA 系ホルモンの測定値が安定しなかったのは、これらのホルモンが生体内 VC 量に影響を受けていることを示しているのかもしれない。

副腎機能の改善を証明するために、今後は、都健康長寿医療センター研究所・分子老化制御の石神昭人先生が開発した、ヒトと同様に、VC を合成できない、SMP30 遺伝子破壊マウスを用いて、LPS 敗血症モデルを作成、血中 VC やその他の酸化ストレスの指標、HPA 系ホルモンを経時的に測定し、LPS が VC を含む酸化ストレスや HPA 系に与える影響を明らかにした後、ETS-GS の有効性を検討する予定である。

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)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 重清 (MATSUMOTO, SHIGEKIYO)
大分大学・医学部麻酔科学講座・准教授
研究者番号：90274761

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：