

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792076

研究課題名(和文) 新規 リポ酸誘導体を用いた敗血症に対する抗酸化療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new antioxidant therapy for sepsis using DHLH-Zn, a novel alpha-lipoic acid

研究代表者

古賀 寛教 (KOGA, HIRONORI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：50468013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：新規 リポ酸誘導体であるDHLH-Znの臓器保護効果を検討し、敗血症に対する新規治療薬剤としての可能性を模索した。敗血症ラットモデルにおける検討では、DHLH-Zn投与によって、酸化ストレスを制御することが示唆されたが、さらなる抗酸化作用の機序解明を目指し、ESR(電子スピン共鳴)装置を用いた、生体内の酸化ストレスの評価法の確立を試みた。生体試料の測定には、難渋したが、様々な検討を行う中で、より精度の高い測定法へと集約されてきた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether Sodium Zinc Histidine Dithiooctanamide (DHLH-Zn), a novel alpha-lipoic acid derivative, had therapeutic effect against sepsis. The results of the present study indicated that DHLH-Zn ameliorated sepsis-induced organ damage by suppression of oxidative stress in rat model. In addition, we tried to clarify the mechanism of antioxidative effect. We attempted to establish the assessment method of oxidative stress in some biotic samples with the use of electron spin resonance (ESR) apparatus. It was hard to measure the oxidative stress directly because of various interfering factors in samples, however, we improved the accuracy of measurement after careful consideration.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔科学

キーワード：抗酸化 敗血症

1. 研究開始当初の背景

敗血症性ショックは集中治療部における死因の第一位であり、近年、劇的に増加しつつある。その要因として、ハイリスク患者の延命率の向上、侵襲の大きい治療の増加、および免疫能に異常がある宿主（化学療法、免疫抑制によって）が増加していることなどが挙げられる。従って、敗血症性ショックに対する効果的治療法の開発は喫緊の課題といえる。ほとんどの敗血症性ショックは、グラム陰性桿菌の産生するエンドトキシンによって引き起こされ、その本体は、細胞壁の lipopolysaccharide (LPS) である。これまで敗血症性ショックにおける臓器障害の発症メカニズムについては、LPS によって TNF, IL-1, IL-6/IL-8 などの炎症性サイトカインが誘導され、さらに NO, PAF などの二次的因子が重要な働きをするとの考えが支持されている。加えて、近年、臓器障害発症メカニズムに reactive oxygen species (ROS) による酸化ストレスが深く関わっていることが報告されている。炎症カスケードの重要な因子である NF- κ B の活性化に ROS が関与していることも報告されており、ROS を効率的に除去する抗酸化療法によって、敗血症性ショックによる臓器障害を軽症化させ、敗血症性ショックの死亡率を改善できる可能性がある。ROS が臓器障害に関わる病態として周知となっている虚血再灌流障害においては、抗酸化剤投与が有効であることを、我々のグループは報告している。しかしながら、敗血症性ショックの臓器障害に抗酸化剤投与が有効であるか否かは明かでない。

我々は近年、リポ酸誘導体誘導体の Sodium Zinc Histidine Dithiooctanamide (DHLH-Zn)を開発し、それが ROS を強く抑制し除去させる作用があることを見いだした。申請者は、炎症時に重要な役割を果たしている、マクロファージ系の細胞 (RAW264.7) に対して、アンチマイシン A (ミトコンドリア内に存在するシトクロム還元酵素の構成要素である、シトクロム bH からの電子の流れを妨げることで、細胞内の ROS を増加させる) を添加した時に、従来より知られている強力な抗酸化剤である EPCK1 と DHLH-Zn の作用を比較した実験において、DHLH-Zn は EPCK1 に比較して、さらに強力な活性酸素種除去能を有することを明らかにした。また、申請者は、これまでの酸化ストレス研究を通し、重度の敗血症性ショックを呈している患者血清のラジカル除去能が低下する傾向にあることを、ESR (電子スピン共鳴) 装置を用いた検討で見出している。さらに、生体内抗酸化物質であるアスコルビン酸の変化もその病態と相関していることを発見した。このことは、酸化ストレスと敗血症の病態が深く関わり合っていることを示しており、抗酸化物質を用いた抗酸化療法が、敗血症治療戦略の一つとなり得ることを

示唆している。

従って、このように DHLH-Zn が高い ROS 除去能を有することから、ROS がその病態に関わる種々の疾患において、有効な治療薬になる可能性が高い。そこで、本研究では、LPS 投与によるラット全身炎症モデルに対する DHLH-Zn の臓器障害抑制効果を解析して、敗血症性ショックの臓器障害に対する治療薬としての可能性を検討したい。

2. 研究の目的

敗血症などの重症病態における Reactive Oxygen Species (ROS) の役割は不明な点も多く、本病態に対する治療法に関しては一定の見解が得られていない。我々は最近、新規リポ酸誘導体である Sodium Zinc Histidine Dithiooctanamide (DHLH-Zn) が強力な臓器保護効果を有し、各種臓器障害に対して著しく有効であることを発見した。DHLH-Zn はリポ酸誘導体であるが、水溶性でかつ安定であり、これまでの同種誘導体の欠点がみられない。本研究では、DHLH-Zn 投与により、敗血症などの重症病態において、より速やかに血行動態を安定化し、炎症反応や酸化ストレスを制御することができるということを証明し、新規薬剤としての臨床応用への道を切り開くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LPS 投与モデルでの検討

Wistar 系ラットを吸入麻酔下、外頸静脈よりカニューレ挿入し、薬剤投与ルートおよび採血ルートとした。LPS10mg/kg を静脈内投与し、血中サイトカイン、NOx、酸化ストレスマーカー (MDA、8-OHdG) 測定。肺障害の検討を行った。DHLH-Zn は LPS 投与 30 分前の皮下投与 (10mg/kg) とした。(これまでの研究において、腎虚血再灌流障害モデルで、改善効果を認めた投与方法であったため)

(2) 盲腸結紮穿孔モデルでの検討

Wistar 系ラットを吸入麻酔下、開腹し、穿刺針 (21G) により盲腸穿孔施行。便を漏出させ、閉腹。下部消化管穿孔による腹膜炎モデルとし、24 時間後に血中サイトカイン MDA 測定。肺障害の検討を行った。DHLH-Zn は、1 週間経口プレ投与とした。(この投与法は、別の実験系で、飼料に DHLH-Zn を混在させ 1 週間経口摂取を続けたマウスモデルで、LPS 投与において生存率を改善する可能性が示唆されたため)

(3) ESR (電子スピン共鳴) 装置を用いた生体試料の評価法の検討

(a)

最も細胞傷害性の強い、ヒドロキシルラジカルを、ESR 装置キャビティー内で人為的に発生させ、試料と混和させ、試料中の

抗酸化物質と反応させる。ESR（電子スピン共鳴）装置を用い、残存ヒドロキシルラジカルを測定することで抗酸化力を推定しようと試みた。

(b)

血液中に存在する物質（ヘモグロビン、ブドウ糖、アルブミン等）に人為的に発生させたヒドロキシルラジカルが反応してしまう問題を解決するために、各成分がどれだけラジカル消去能に関わっているかを検討した。同個体から採血し、血球成分のみを分離し、検体を数倍ずつ薄めてヘモグロビン（赤血球）濃度を変えて、ラジカル消去能がどう変化するか、その変化率から、もともとの消去能を推定することを試みた。

4. 研究成果

(1)

LPS 投与において、IL-6、TNF、NF- κ B、NOx の著明な一定した上昇をきたしたが、DHLH-Zn 投与群において、その上昇が抑制される傾向が認められた。しかし、統計学的に有意差を認めるには至らなかった。肺障害の組織学的評価においては、DHLH-Zn 投与によって改善が認められる個体と、認められない個体が存在し、肺胞壁、間質に浸潤する炎症細胞カウントによる組織障害の評価でも有意な改善ではなかった。改善が認められた個体においては、サイトカインおよび MDA、8-OHdG の低下を認め、他の実験系でも抗酸化作用が関与する可能性が示唆されていたため、予定通り ESR を用いた酸化ストレス評価を行うこととした。

(2)

盲腸結紮穿孔モデルにおいて、24 時間後の生存率は約 60%であったが、DHLH-Zn 投与による有意な生存率の改善は認めなかった。LPS 投与同様、盲腸結紮穿孔による組織障害、炎症の程度は一定であったが、DHLH-Zn 投与による炎症軽減作用は、個体により差が大きく、統計学的な有意差を見いだせなかった。しかし、明らかに組織学的にも改善を認める個体があり、投与方法による薬物動態との関連について再検討が必要であると考えられた。今後、最大効果をもたらす用量、タイミング、投与経路を詳細に検討する予定である。

(3a)

ヒドロキシルラジカルの酸化力が強いことから、血液中に存在する様々な物質（ヘモグロビン、ブドウ糖、アルブミン等）にも反応性を示してしまい、こうしたパラメーターの扱いをどうすべきかを検討した。こうした、体内物質も含めたヒドロキシルラジカル消去能をトータルでの抗酸化力として判断すべきかは、病態と連動しているかどうか、今後判断していく必要があると考える。

(3b)

生食を溶媒として血球希釈を行ったが、ヒドロキシルラジカルのアダクトは一定化せず、ヘモグロビン以外の要素が関与している可能性が示唆された。また、血漿を ESR 装置の測定用扁平セルに直接注入して測定しようとする、ラジカル発生のために照射する紫外線装置によって生じる熱により気泡を生じるためラジカルアダクトが安定しないことが判明した。水溶液では気泡は発生しないため、血漿中の脂質、タンパク質等が関与している可能性があった。測定セルをヘマトクリット毛細管に変更すると、気泡の発生はなく、測定値が安定化したため、血漿を ESR 測定にかけるときは、今後ヘマトクリット毛細管を使用することとした。

各モデルにおいて、コントロール群で、どの個体も同程度の障害をもたらした点では、モデルとして確立しているといえる。したがって、このような安定した障害モデルにおいて、DHLH-Zn 投与によって改善を認めた個体が存在したことは、本研究で治療群として有意な改善ではなかったにしても、治療薬としての可能性が否定されたわけではないと考えられる。標的臓器における薬物血中濃度にばらつきがあったことが、治療効果が一定しなかった理由として考えられるが、その安定した薬物血中濃度を維持できる投与方法を今後検討する必要があると思われる。

また、ESR を用いた生体内の抗酸化能の評価においては、生体試料を用いる難しさがあったが、数ある抗酸化物質が、どの程度生体内で抗酸化作用を発揮しているのかを一つ一つ検討していくことで、有効な治療戦略を見出すきっかけとなると考えられる。

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
古賀 寛教 (Koga Hironori)
大分大学・医学部・助教
研究者番号：50468013

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：