

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592325

研究課題名(和文)敗血症における中枢神経障害でのRAGEとHMGB-1の関与と治療法の確立

研究課題名(英文)The mechanisms of septic encephalopathy during sepsis

研究代表者

門井 雄司(Kadoi, Yuji)

群馬大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10292591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症由来の中枢神経障害において大脳皮質の変化と治療法の確立を目的とした。敗血症での大脳皮質神経細胞活動のシナプス伝達変動とラット意識レベルの変化との関連の検討を行った。次に、病態の進行状態とHMGB-1上昇との関連を検討し、HMGB-1の濃度変化と病態進行具合の一致が観察された。病態の進行に相応した抗HMGB-1抗体(Edaravone)を投与することによる大脳皮質神経細胞内の神経細胞活動とラット意識レベルの改善の検討したが、Edaravoneは神経症状悪化を食い止めることは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the mechanism of septic encephalopathy and to examine the effects of edaravone on septic encephalopathy. Decreased neuronal activity was observed during septic shock induced by cecal ligation and puncture model. However, administration of edaravone could not improve the septic encephalopathy during septic shock.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：敗血症 脳障害 ショック

### 1. 研究開始当初の背景

周術期医学領域では、細菌感染による敗血症の原因究明と治療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、とりわけ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。これまで脳障害や脳保護の作用を探索した研究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。その原因の一端には大脳皮質の主要構成成分である神経軸索(axon)やグリア(オリゴデンドログリア)に対する効果が調査されていないためである。

一方、敗血症は高血糖を誘発し、高血糖は活性酸素の産生を亢進し、酸化ストレスによる神経細胞障害を起こす。この神経細胞障害には最終糖酸化産物(AGE)とその受容体であるRAGEが深く関与している。RAGEはnuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)を介してHMGB-1産生を促進し、心臓、肝臓、腎臓、中枢神経系などの臓器障害を引き起こす。以前の我々の研究課題においてHMGB-1が脳内CA3-CA1領域においてアポトーシスを誘導し(平成18年度~平成20年度:科学研究費助成)、脳内CA3-CA1領域において転写因子であるNF- $\kappa$ Bの増加を観察した(平成21年度~平成23年度:科学研究費助成)。これまでの研究でHMGB-1がNF- $\kappa$ Bを介して脳内CA3-CA1領域においてアポトーシスを誘導して中枢神経障害を起こすことがわかってきたが、そのHMGB-1が作用する細胞表面receptorの関与については探求してこなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では敗血症由来の中枢神経障害において大脳皮質に対するRAGEの関与と治療法の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

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1MACで維持する。持続的血圧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カテーテルを挿入する。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。赤外線顕微鏡下に直接細胞の形態を観察しながら、CA1領域の錐体細胞からホールセルパッチを実施した。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する。

### 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豊富であることから、シナプスの可塑的变化を観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)を記録する。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するが、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。

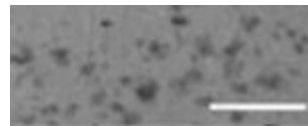
シナプス伝達効率に変化が観察されたら、次にこの変化がシナプス前性(伝達物質放出量)の変化なのか、シナプス後性(伝達物質に対する反応性)の変化なのかを区別するために、2回連続刺激によるEPSP増大率(paired-pulse facilitation:PPF)が測定される。海馬Schaffer側枝の刺激では、2回目の刺激反応において1回目よりも20-30%ほど大きな振幅が観察されるが、この増大率に変化が観察された場合には、シナプス前性の変化と判定する。

盲腸穿孔モデルにより作成した敗血症モデルから4時間ごとに採血を実施しHMGB-1の変動を時系列で追跡した。それと併に中枢神経障害を評価する。

意識レベルの評価は、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。急性侵害刺激は、( )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)、( )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)、( )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)、( )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)で評価。さらに、敗血症が完成した6時間後にEdaravone投与を行い中枢神経障害への効果も検討した。

### 4. 研究成果

消化管穿孔により約6時間くらいからショック状態となり血中HMGB-1やサイトカインが上昇し、24時間でピークとなった。6時間後に測定したCA1領域の錐体細胞の細胞活動電位は敗血症状態では現弱していた。急性侵害刺激に対する反応も6時間、12時間、24時間ともコントロール群と比較して約30%の低下が観察された。消化管穿孔6時間後にEdaravoneを1mg/kg投与することにより12時間後の血行動態は若干の改善を認めたが神経所見に関しては改善せず、HMGB-1やサイトカインの上昇も食い止めることは出来なかった。



< Edaravone 投与群 CA-1 領域 >

### 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7件)

Narahara H, Kadoi Y, Hinohara H, kunimoto F, Saito S.

Comparative effects of flurbiprofen and fentanyl on natural killer cell cytotoxicity, lymphocyte subsets and cytokine concentrations in post-surgical intensive care unit patients : Prospective, randomized study. 査読有、  
J Anesthesia vol27,2013, pp676-683.

Sawano Y, Miyazaki M, Shimada H, kadoi Y.

Optimal fentanyl dosage for attenuating systemic hemodynamic changes, hormone release and cardiac output changes during the induction of anesthesia in patients with and without hypertension: A prospective, randomized, double-blinded study. 査読有、

J Anesthesia vol27, 2013,pp505-511.

Kadoi Y, Nishida A, Saito S.

Recovery time after sugammadex reversal of rocuronium-induced muscle relaxation for electroconvulsive therapy is independent of cardiac output in both young and elderly patients. 査読有、

J ECT vol 29, 2013, pp33-36.

Kadoi Y, Saito S, Fujita N, Mizutani A.

Effects of balloon-induced pulsatile perfusion on postoperative short- and long-term cognitive dysfunction in diabetic patients with impaired cerebrovascular carbon dioxide reactivity. 査読有、

J Cardiothoracic Vascular Anesthesia vol 27,2013, pp238-244.

門井雄司

無痙攣電気治療の麻酔 最近の話題.

臨床麻酔 vol 37, 2013,pp1345-1350

門井雄司

心臓手術と臓器保護 中枢神経系.

Cardiovascular Anesthesia vol17,2013, pp113-125.

門井雄司、麻生知寿、齋藤繁.

当院における一年間の術中大量出血症例の検討.

蘇生 vol32, 2013, pp84-87.

〔学会発表〕(計7件)

松本 直樹, 久保 和宏, 門井 雄司, 齋藤 繁 .

ECT 麻酔中に於ける landiolol/nicardipine の投与タイミングの検討.

第 59 回日本麻酔科学会総会 (神戸) 2012 年 6 月.

金本国史、柳澤晃弘、榎原 創、大川牧生、戸部 賢、日野原宏、国元文生、高澤知規、門井雄司、齋藤繁.

急性呼吸不全患者における N-terminal pro B-type natriuretic peptide (NT-proBNP)測定の有効性.

第 40 回日本集中治療医学会総会(松本)2013 年 2 月.

柳澤晃弘、榎原 創、金本国史、大川牧生、戸部 賢、高澤知規、日野原宏、国元文生、門井雄司、齋藤繁.

L-FABP による腎機能低下の早期診断における有効性.

第 40 回日本集中治療医学会総会(松本)2013 年 2 月

柳澤晃弘、福土宙之、神山治朗、榎原 創、金本国史、久保和宏、戸部 賢、日野原宏、門井雄司、国元文生、齋藤繁.

プロカルシトニン(PCT)値と各種細菌培養結果との検討.

第 22 回日本集中治療医学会関東甲信越地方会(筑波)2013 年 8 月

門井雄司.

「非心臓手術後の認知障害」

第 61 回 日本麻酔科学会総会(横浜) 2014 年 5 月(シンポジウム)

松本直樹、門井雄司.

「ECT 麻酔の筋弛緩」

第 61 回 日本麻酔科学会総会(横浜) 2014 年 5 月(シンポジウム)

門井雄司.

「ECT 麻酔管理のポイント」

精神神経学会 第 1 回 ECT 講習会(福岡市) 2014 年 2 月(招請講演)

〔図書〕(計2件)

標準生理学 第 8 版、丸善(株) 編集：鯉淵典之監修、分担執筆：門井雄司：酸 - 塩基平衡の調節、B・ヒトにおける酸 - 塩基平衡の調節、2014 p492-498.

敗血症の病態 / メカニズムと診断薬・新薬開発 (株)技術情報協会 監修：丸藤 哲、分担執筆：門井雄司：第 7 章「敗血症性脳症の原因とその治療法確立の可能性」2013. p449-451,

〔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：  
出願年月日：  
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

門井雄司 ( KAD01 Yuji )  
群馬大学・医学部附属病院・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：