

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791937

研究課題名(和文)クラッシュ症候群における臓器障害メカニズムの解明：新規抗酸化剤による治療戦略

研究課題名(英文)ETS-GS, a Novel Vitamin E Derivative, can Reduce theCrush-Injury relatedDamages in a Rodent Model

研究代表者

中川 淳一郎 (NAKAGAWA, JUNICHIRO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60597508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々はクラッシュ症候群の多臓器不全にいたるメカニズムに活性酸素種が強く関与していると考え、活性酸素種を制御するために抗酸化物質ETS-GSを用いて本研究を行った。

その結果、抗酸化物質を経静脈的に投与することにより活性酸素種や炎症性サイトカインの産生が抑制され、引き続く生じる遠隔臓器障害が軽減し、生存率改善効果が得られた。活性酸素種はクラッシュ症候群において病態進行を誘導する一因であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of crush syndrome in which the local traumatic injuries affect distant organs remain unknown. The purposes of this research were to reveal the involvement of reactive oxygen species (ROS) in systemic inflammation association with distant organ injuries and to evaluate the effects of ETS-GS, a novel vitamin E derivative in a rat model.

The ETS-GS treatment ameliorated the survival in a rat model of crush syndrome. Serum levels of inflammatory cytokines and oxidative stress were significantly decreased in the ETS-GS group compared with those in the control group. Ex vivo imaging confirmed that ETS-GS treatment reduced ROS generation in both the lung and the muscle following crush injury. Administration of ETS-GS could reduce ROS generation, systemic inflammation, and distant organ damage and improve survival in a rat model of crush injury. These results suggest that ROS play an important role in the mechanisms of crush injury.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：クラッシュ症候群 活性酸素 抗酸化療法 蛍光イメージング 全身性炎症反応

## 1. 研究開始当初の背景

クラッシュ症候群は地震などによる家屋の倒壊や交通事故による車体変形により身体が長時間圧搾されることにより生じる重篤な疾患である。しかしその病態は十分に解明されておらず、治療法は高カリウム血症による致死的不整脈と hypovolemic shock の予防のため、大量輸液投与や血液透析が有効とされるが、これらはいずれも対症療法の域を出ない。クラッシュ症候群の主たる病態と考えられる全身性炎症反応症候群(SIRS)の進行と、それに伴う多臓器障害の発生に関しては、十分に効果的な治療法が存在しないのが現状である。我々はすでにラットクラッシュ症候群モデルを開発し、筋組織損傷後に生じる血管内皮細胞障害が全身炎症を誘導することを明らかにするとともに、血管内皮細胞保護効果が報告されているアンチトロンピン製剤や遺伝子組み換えトロンボモジュリン製剤を投与することにより生存率が改善し、全身炎症反応・臓器障害が抑制されることを報告してきた。しかしながら、現在でもクラッシュ症候群の病態は十分に解明されていない。

組織虚血再灌流が生じると活性酸素種が産生され、組織損傷や細胞死が誘導されることが明らかにされている。我々はクラッシュ症候群でも身体圧搾により組織虚血再灌流が生じて大量の活性酸素種が産生され、臓器障害進行の病因となると考えた。これに対して抗酸化作用を持つビタミン E・グルタチオン・タウリンは活性酸素の産生を抑制し、虚血・再灌流による組織損傷や細胞死を防ぐ効果が報告されている。しかし、ビタミン E は脂溶性で不安定なビタミンであり生来内への吸収は速やかではない。今回我々はすでに肝・腎虚血再灌流モデルや敗血症モデルにおいて活性酸素抑制効果や抗炎症作用が報告されている新規抗酸化製剤 ETS-GS に注目した。本製剤はビタミン E・グルタチオン・タウリンの合剤で水溶性で安定性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、クラッシュ症候群において多臓器不全が進行するメカニズムとして、損傷組織からの活性酸素とそれに引き続く全身性炎症反応との関連性を明らかにし、抗酸化療法による臓器保護効果を明らかにすることである。これらを明らかにするために以下の2点に絞って研究を実施した。

(1) クラッシュ症候群における活性酸素種の産生と全身性炎症反応を血清学的に評価するとともに、抗酸化剤 ETS-GS 投与による生存率改善効果および活性酸素種・全身性炎症反応抑制効果を検討すること。

(2) クラッシュ症候群により生じる活性酸素種の発現を近赤外蛍光イメージング法を用いて可視化し、臓器障害進行のメカニズムを捉え、効果的

な新規抗酸化製剤による治療法の開発をめざすこと。

## 3. 研究の方法

本研究には specific pathogen-free Wistar ラット雄 (260g-319g) を用いた。これらのラットは自由に食餌・飲水が出来るように管理した。本動物実験は大阪大学動物実験規定に基づき、倫理委員会からの承認を受けた。

### (1) 実験モデル

動物モデルは我々が既に確立している、ラットクラッシュ症候群モデルを応用し用いた。ラットに対してペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与し全身麻酔を行い、全身麻酔の維持はペンとバルビタール (10mg/kg) を 1 時間ごとに腹腔内投与し行った。実験中は動物体温測定用サーミスタセンサと保温パッド (BIO-MEDICA, Osaka, Japan) を用いて、直腸温を 37 にコントロールした。

ラットの左外頸静脈に 0.3mm ポリエチレン製チューブを外科的に挿入し、輸液および薬剤投与ルートを確認した。

全身麻酔下のラットを仰臥位とし、両後脚の虚血には専用器具 (Asai Works Co, Osaka, Japan; Konan Medical Laboratory Co, Kobe, Japan) を用いてそれぞれ計 3.0kg で圧迫した。圧迫時間は両後脚とも 6 時間とした。圧迫開始時から左外頸静脈ルートより生理食塩水 (1ml/kg/h) を持続投与した。圧迫解除 1 時間前 (圧迫開始から 5 時間後) からは大量輸液 (生理食塩水 10ml/kg/h) を持続投与した。圧迫解除後も 3 時間大量輸液を継続した。圧迫解除 3 時間後 (大量輸液開始 4 時間後) に左外頸静脈ルートを抜去し、ラットをケージに戻した。

### (2) 実験プロトコール

本研究ではラットを 1. Sham 群 (SH group)、2. ETS-GS 投与群 (ETS group)、3. control 群 (CR group) の 3 群に分けて検討した。Sham 群は両後脚の圧迫を行わず、輸液および大量輸液のみを行った。ETS-GS 投与群は両後脚圧迫を行い圧迫解除直前に ETS-GS を phosphate-buffer saline (PBS) で溶解し、10mg/ml に調整した溶液を 10mg/kg 左外頸静脈から単回投与した。Control 群は両後脚圧迫を行い、圧迫解除直前に ETS-GS 調整溶液と同量の PBS を左外頸静脈ルートから単回投与した。

#### 生存率の検定

生存率の確認は圧迫解除 7 日間行った。個体数は sham 群:n=6、ETS-GS 投与群:n=19、control 群:n=20 とした。

#### 血清学的検討

それぞれ独立した個体から血清検体を採取した。採取方法はラットに対して全身麻酔

を行い、外科的に腹部大動脈からポリプロピレンチューブを用いて採取した。血液は一晚4に保存した後に、遠心分離(3000g, 15分, 4℃)し、上清を測定まで-20℃まで保存した。血清は圧迫解除後6時間、20時間に採取し測定した。

血清活性酸素種は Malondialdehyde (MDA) と Superoxide Dismutase (SOD) を測定した。測定にはそれぞれ thiobarbituric acid reactive substances (TBARA Assay Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)、Superoxide Assay Kit (Superoxide Assay Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を用いた。

炎症性サイトカインは IL-6、HMGB1 を測定した。ELISAキットは IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, Minn)、HMGB1 (Shino-Test Corp., Kanagawa, Japan) をそれぞれ用いた。

#### 組織学的評価

臓器障害の形態変化をパラホルムアルデヒドによる灌流固定標本を作成し、薄層切片をヘマトキシリン-エオジン染色を行い肺組織を評価した。組織は圧迫解除20時間後に採取し測定した。

#### Ex vivo 蛍光イメージング法を用いた評価

活性酸素種の産生を評価するために、蛍光プローブは CellRox Deep Red Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いた。圧迫解除20時間後のラットに対して全身麻酔を行った後に、PBSで25µMに調整した CellRox Deep Red Reagent を2.0ml 経静脈的に投与した。1時間後に安楽死させた後に、速やかに肺・下腿筋を摘出し測定した。蛍光イメージング測定には MS-FX-PRO imaging system (Carestream Health, Rochester, NY) を用いた。蛍光強度の比較はバックグラウンドを基準とし、その倍率を用いた。

#### 統計学的検定

統計解析には IBM SPSS Statistics version 21.0 for Macintosh (SPSS Inc., Chicago, IL) を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier method を用い、検定には log-rank test を用いた。それぞれの血清データおよび稽古イメージングデータは mean ± SEM で表記し、統計学的解析には分散分析 (ANOVA) を用い、post hoc 比較には Dunnett t 法を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 生存率

生存曲線を Figure 1 に示す。両後脚圧迫解除後7日間の生存率は Sham 群:100% (6/6)、ETS-GS 投与群:57.9% (11/19)、control 群:15.0% (3/20)であった。Sham 群と比べて

control 群では有意に死亡率が増加した。ETS-GS 投与群では control 群に比べて有意に生存率改善効果が認められた。(p<0.01)

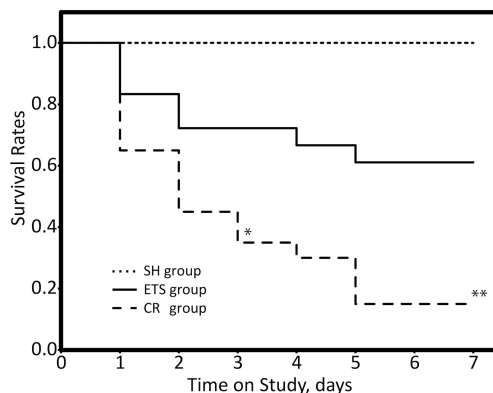


Figure 1

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01

#### (2) 血清活性酸素レベル

血清 MDA、SOD 値 (平均値 ± SEM) を Figure 2A, B に示す。

血清 MDA 値は両後脚圧迫解除6時間後では有意差を認めなかったが、圧迫解除20時間後では control 群が  $14.7 \pm 1.64 \mu\text{M}$  であったのに対して、ETS-GS 投与群では  $9.72 \pm 0.87 \mu\text{M}$  と有意に上昇を抑制した (p<0.05)。

血清 SOD 値は両後脚圧迫解除6時間後では control 群が  $0.35 \pm 0.01 \text{ U/ml}$  であったのに対して、ETS-GS 投与群では  $0.41 \pm 0.01 \text{ U/ml}$  と有意に上昇を認めた (p<0.05)。両後脚圧迫解除20時間後では control 群が  $0.36 \pm 0.02 \text{ pg/ml}$  であったのに対して、ETS-GS 投与群では  $0.52 \pm 0.03 \text{ pg/ml}$  と有意に上昇を認めた (p<0.01)。

#### (3) 血清炎症性サイトカインレベル

血清 IL-6、HMGB1 値 (平均値 ± SEM) を Figure 2C, D に示す。

血清 IL-6 値は両後脚解除6時間後では control 群が  $1482.1 \pm 200.3 \text{ pg/ml}$  であったのに対して、ETS-GS 投与群では  $524.4 \pm 231.8 \text{ pg/ml}$  と有意に血清 IL-6 の上昇を抑制した (p<0.01)。両後脚圧迫解除20時間後では control 群が  $310.4 \pm 20.7 \text{ pg/ml}$  であったのに対して、ETS-GS 投与群では  $227.8 \pm 10.74 \text{ pg/ml}$  と有意に上昇を抑制した (p<0.01)。

血清 HMGB1 値は両後脚圧迫解除6時間後では control 群が  $16.22 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$  であったのに対して、ETS-GS 投与群では  $10.39 \pm 0.21 \text{ ng/ml}$  と有意に上昇を抑制した (p<0.01)。圧迫解除20時間後では sham 群・ETS-GS 投与群・control 群間に有意差を認めなかった。

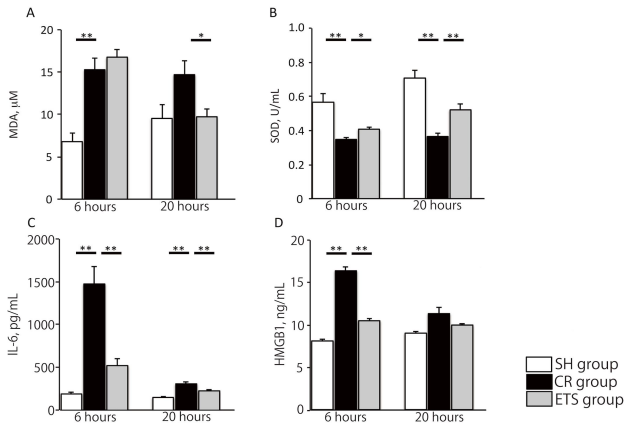


Figure2

A:MDA、B:SOD、C:IL-6、D:HMGB1

(4) 組織学的評価

圧迫解除 20 時間後の肺組織のヘマトキシリン-エオジン染色を Figure3 に示す。

Control 群では、著明な肺胞構造の破壊や、間質の浮腫、炎症細胞浸潤、肺胞内出血が認められたが、ETS-GS 投与群ではこれらの損傷は明らかに抑制されていた。

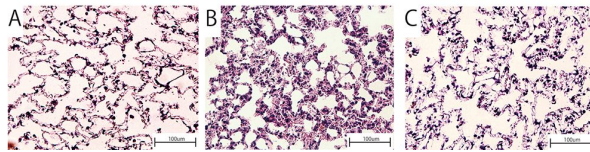


Figure3

A:SH group、B:SR group、C:ETS group

(5) ex vivo 蛍光イメージング法による組織活性酸素産生の評価

圧迫解除 20 時間後の肺・筋におけるイメージング画像および蛍光強度を Figure4 に示す。

肺では control 群では蛍光強度はバックグラウンドに比べて  $4.00 \pm 0.01$  倍であったのに対して、ETS-GS 投与群では  $3.29 \pm 0.15$  倍と有意に蛍光強度の抑制を認めた ( $p < 0.01$ )。

筋では control 群では蛍光強度はバックグラウンドに比べて  $3.44 \pm 0.08$  倍であったのに対して、ETS-GS 投与群では  $2.96 \pm 0.15$  倍と有意に蛍光強度の抑制を認めた ( $p < 0.05$ )。

今回の研究結果は、クラッシュ症候群において骨格筋が長時間圧挫されることにより虚血状態が生じ、その後引き続く再灌流障害により生じる活性酸素がクラッシュ症候群における組織障害や遠隔臓器障害の病態の主因となっていることを証明するものである。

特に圧迫解除 20 時間後の蛍光イメージング法を用いた検討では、クラッシュ症候群において活性酸素が産生されるのは直接損傷を筋組織のみならず、直接損傷を受けていない遠隔臓器である肺でも蛍光強度の上昇を認め、活性酸素が産生されることが明らかと

なった。この結果は、クラッシュ症候群は局所損傷のみならず、全身の臓器障害が生じるとされる知見を支持するものであり、その主因の一つとして活性酸素種が関連していることが明らかとなった。

また、本研究からクラッシュ症候群に対して抗酸化療法の有効性が証明された。

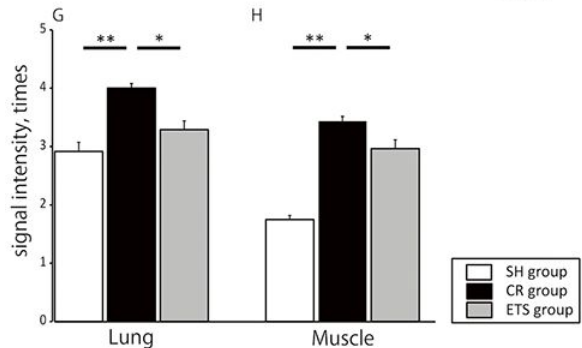
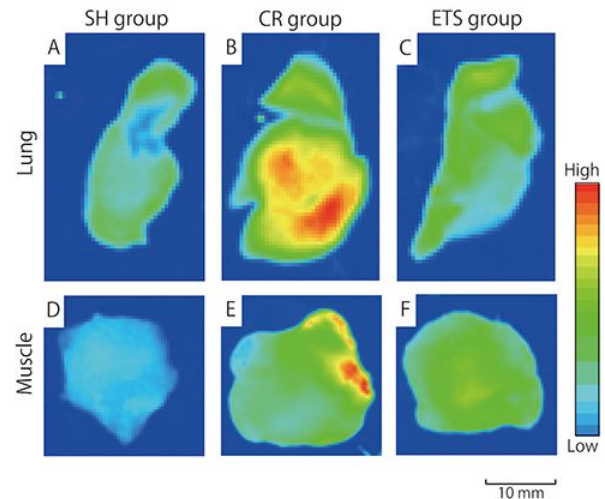


Figure 4

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)

[学会発表](計 4件)

Junichiro Nakagawa, ETS-GS, a novel vitamin E derivative, can reduce the crush injury-related damages in a rodent model., 第7回 Asian Conference on Emergency Medicine, 2013.10.24., Tokyo

中川 淳一郎、クラッシュ症候群における病態解明と新たな治療戦略, 第27回日本外傷学会総会, 2013.5.24., 久留米

Junichiro Nakagawa, ETS-GS, a Novel Vitamin E Derivative, Ameliorates Crush Syndrome in a Rodent model.,

Society of Critical Care Medicine's 42<sup>nd</sup>  
Critical Care congress, 2013.1.20, San  
Juan

中川 淳一郎、クラッシュ症候群におけ  
る ETS-GS の治療効果に関する研究、第  
3回 CIA 研究会、2012.11.10、湯布院

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中川 淳一郎 (NAKAGAWA Junichiro)

大阪大学医学部附属病院・医員

研究者番号：60597508

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：