

## 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 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390334

研究課題名（和文） 血管内皮障害を伴う敗血症の新しい診断法の確立

研究課題名（英文） New diagnostic establishment of septic shock complicating endothelial dysfunction.

### 研究代表者

水谷 太郎（MIZUTANI TARO）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80181890

研究成果の概要（和文）：敗血症ショックにおいて、急性期治療における循環管理は患者の予後に大きく関わる。しかし、そのベースにある血管内皮障害の与える影響は全く不明である。本研究の目的は、基礎疾患として存在する血管内皮障害が敗血症ショック患者の病態に与える影響とそのメカニズムを解明して、新しいバイオマーカーの開発・検討・応用、基礎疾患も考慮に入れたハイおよびローリスク群などの層別化、新しい治療ターゲットの確立とその治療薬の開発・検討を行う。そのことによる本患者の短期・長期予後予測、短期生命予後および QOL の改善を目的とする。

研究成果の概要（英文）：Septic shock is mortal status for infectious patients. Circulatory, inflammatory and coagulant regulations on the acute phase critically affect their prognosis. However, the effect of potentially underlying endothelial dysfunction has not been revealed. The purpose of this study is to elucidate whether underlying endothelial dysfunction affects the prognosis of the patients after septic shock status or not, and the mechanism of the pathway. Next we aim to establish the new biomarker to the prognosis the patients and discover the new target of therapeutic molecule for the patients.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	7,300,000	2,190,000	9,490,000

研究分野：救急・集中治療学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療学、敗血症ショック、 $\beta$ 1 選択的遮断薬、急性循環不全、バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 現在の敗血症ショック（感染性ショック）の診断と治療

重症敗血症（感染に起因する二次的な急性臓器不全）および敗血症ショック（fluid resuscitation によって回復しない低血圧を伴う重症敗血症）は、毎年世界中で数百万人が罹患しその 4 人に 1 人（あるいはそれ以上）

が死亡する。いわゆる医療先進国においても未だ敗血症は集中治療領域での死因の第 1 位の病態である。医学的および社会的にも重大な問題であり、その発生率は増加しつつある（重症敗血症および敗血症ショック治療のための国際ガイドライン 2008）。多発外傷や急性心筋梗塞、脳卒中等と同様に、重症敗血症発症後数時間以内に施される治療のスピー

ドと適切さが予後を大きく左右すると考えられている。現行の治療では、プロテイン C など凝固系の抑制、インスリンによる血糖コントロール、生理的な量のステロイド、血行動態維持のためのカテコラミン、バソプレッシンがあげられ、DIC 合併例には recombinant thrombomodulin やアンチトロンビンⅢの有用性も報告されている。しかしながら、大規模検討において、いずれも議論の余地を残しており、その効果も決して十分とは言えない。急性期における早期の循環不全および全身の炎症に対する治療が予後を大きく左右する病態と言えるが、現在の重症度分類では、APACHE スコアなどショック自体の重症度および DIC の合併の有無の評価のみが唯一治療法に影響を与える評価・診断法である。

### (2) 敗血症による血管内皮障害

敗血症に合併するショックの初期病態は NO やプロスタノイドの産生による体血管抵抗の減弱した血流分布異常性ショック (warm shock) である。しかし、敗血症の持続により血管内皮細胞障害が進行すると、ショック病態は体血管抵抗の高い末梢循環の損なわれた cold shock へ移行する。米国集中治療医学会が中心となって定める Surviving Sepsis Campaign guidelines (敗血症救命ガイドライン、2004 年) においても、重症敗血症や敗血症ショックにおける血管内皮細胞保護の治療が重視されている。しかし、現行の医療において敗血症における内皮機能をターゲットにした検査および治療は未だ開発されていない。敗血症は感染を基盤とした全身性炎症反応症候群であり、血管内皮細胞の NF- $\kappa$ B 活性を中心とする炎症性シグナルが活性化する。また、敗血症血管では Death 受容体ファミリーの細胞膜発現の亢進からプロアポトーシス因子であるカスパーゼ 8、3 が活性化しており、また、Akt の活性も損なわれており、抗アポトーシス因子である Bad のリン酸化の低下が報告されている。以上から、血管内皮細胞障害を導く重要な因子として、アポトーシスが関与することが近年注目されている (松田ら、日本薬理学会雑誌、2008 年)。このように、敗血症による血管内皮障害の研究が進む一方で、血管内皮障害を基礎疾患にもつ敗血症患者の予後への影響やそのメカニズムに関する研究の報告はない。

### (3) 血管内皮細胞障害を伴う基礎疾患

先に、敗血症による血管内皮細胞への影響を示してきたが、血管内皮細胞障害を伴う疾患としては虚血性心疾患、脳血管疾患、末梢動脈疾患など、いわゆる動脈硬化との関連が大きい。また、基礎疾患としての血管内皮障害を引き起こす循環器疾患として、高血圧、

糖尿病、脂質異常症、心房細胞など基礎疾患に注目することにより血管内皮障害のレベルを評価できる。また、その検査方法としては、PWV、FMD、血管内皮前駆細胞の血中濃度、その基礎疾患として、動脈硬化リスクファクターと言われる、高血圧、高血糖、高脂血症、禁煙、メタボリック症候群などが挙げられる。酸化ストレスが大きなファクターと考えられ、物質として最も重要なものは酸化 LDL で、血管内皮由来血管弛緩因子 (EDRF) の産生を抑制する。なかでもリゾホスファチジルコリン (LPC) は内皮機能を直接低下させ、それらの血管弛緩物質の生成を抑制する。

一方、糖尿病など糖化 LDL が増えるような状態でも AP-1、NF- $\kappa$ B、MCP-1 などの物質が内皮細胞ならびにその周囲の細胞から産生され、マクロファージの遊走を惹起するなどして PGI<sub>2</sub> や NO の産生を抑えることが知られている。それらが集積すると、接着因子の活性亢進、組織因子の発現亢進、PAI-1 の亢進などで動脈硬化が進んでくる。近年、心房細動の原因として、基礎疾患に内皮細胞障害の存在があることも示され、その病態の現れ方も多様化してきている (Guazzi M, Arena R. Heart, 2009)。これらの結果から敗血症患者に対する内皮細胞障害の影響は長期的予後のみならず、急性期での評価を含んだ評価とそのメカニズムの解明が必要である。それによる治療法への反映が期待される。

## 2. 研究の目的

初めに、現時点での敗血症と血管内皮障害との関連を正確に把握することを目的とし、これまでの敗血症患者の基礎疾患・危険因子をカルテベースで把握し、内皮細胞障害の観点からリスク層別化を図り、現時点での予後調査を行う。同時に、血管内皮障害を持つ患者登録を行い、定期的な血管内皮障害の測定・評価を行い、リスク層別化を行い、最長で3年間の追跡調査を開始する。登録患者の敗血症の発症頻度、重症度、急性期予後を評価および調査する。また、登録患者の敗血症発症時の血管内皮障害評価として、エコー検査、バイオマーカーによる評価を行い、得られたデータベースと比較・検討し、実際の治療方針に反映させる。

In vivo を中心とした基礎実験も平行して開始する。動物実験による運動、食事の予防的介入、および薬剤による治療的介入を行い、リポポリサッカライド (LPS) 投与による敗血症モデル動物を中心に血管内皮障害の敗血症に及ぼす影響のメカニズムを解明する。

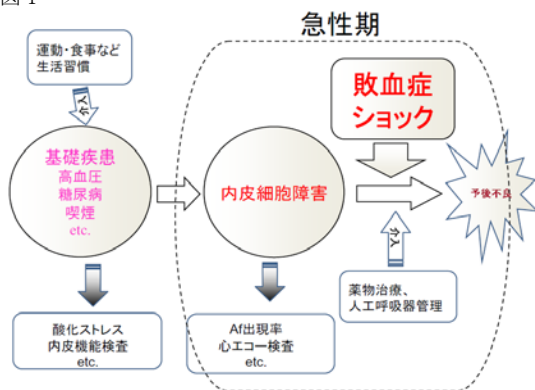
### (1) 本研究の結果の予想および意義

ベースにある血管内皮障害が感染性ショック患者に与える影響をそのメカニズムを解明するとともに、各種検査法の応用や血中バイオマーカーの検討・開発・応用によって、基礎疾患を考慮したリスク層別化、短期予後予測まで可能となる。また、現行の感染性ショックに対する急性期治療は血行動態管理が中心となるが、血管内皮機能に着目することにより、新機軸からの感染性ショック急性期治療の導入の可能性がある。さらには、血管内皮機能の改善は、急性期の予後だけ無く、慢性期の生命予後の改善も期待できる。つまり、本研究による結果はそのまま臨床应用到に直結するだけでなく、次の研究への展開につながる。本研究登録患者を臨床的に追跡調査することにより感染性ショックの生命予後の改善と言う新たな、かつ根本的な目標へ本研究の展開できる。医療経済学の観点からも本治療法が確立すれば、急性期治療期間の短縮により医療費削減効果も十分期待できる。

### (2) 本研究の学術的な特色・独創的な点

これまで、敗血症が引き起こす血管内皮細胞障害のメカニズムについて、炎症、アポトーシスの関与が研究・解明されてきたが、基礎疾患として存在する血管内皮細胞障害が敗血症患者に与える影響についてはメカニズムから臨床診断、治療までほとんどなされていない。高齢社会に突入し、さらに欧米食化された日本の現状を考えると血管内皮障害をベースにもつ患者は増加の一方であり、それに伴うリスク層別化と新たな治療方針の構築は急務である。そのまま成果が現場に結びつく、臨床現場でも非常に有用な研究課題である。

図 1



### 3. 研究の方法

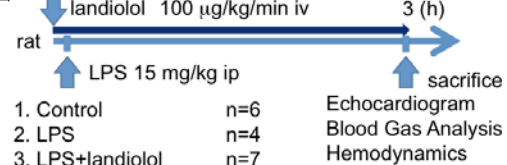
本研究の目的達成のために、以下の3つのプロジェクトを計画・実行する。  
 プロジェクト① 血管内皮障害をもつ敗血症ショック併発患者の実態調査と予後調査  
 プロジェクト② 基礎的病態研究：LPS 投与モデル動物による分子病態・病理的研究

プロジェクト③ 血管内皮障害による敗血症ショック患者のリスク層別化の臨床研究：新たなバイオマーカー・検査法の検討・開発・応用、基礎疾患からの予測

上記、プロジェクトを臨床研究は、筑波大学附属病院集中治療室を中心に患者登録を行い、横断的、後ろ向き、前向きの検討・評価を行う。基礎研究については、筑波大学集中治療部研究室を中心に国立国際医療センター研究所とも連携し、リポポリサッカライド (LPS) 投与による敗血症モデル動物を中心に実験を進めていく。

プロジェクト②においては、LPS 投与モデル動物で LPS 投与後 1、3、6、10 時間後の血中 TNF- $\alpha$  濃度の上昇を確認し、エンドトキセミアモデルとした。また、ランジオロール投与実験では、各臓器でサイトカインの上昇が確認できた 3 時間のモデルを使用した (図 2)。

図 2



### 4. 研究成果

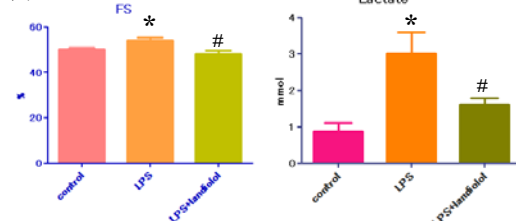
プロジェクト①および③については、現在、データの整理、解析中である。プロジェクト②について、予想以上の結果が得られており、その結果を示す。In vivo レベルにおいて、エンドトキセミアモデルラットの心、肺、腎について、ランジオロールの効果が示されており、その効果について説明する。

心について、

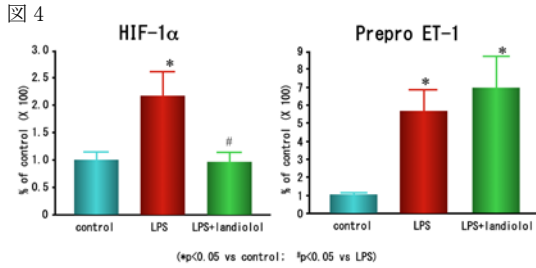
エンドトキセミアラットの異常亢進した心機能は、ランジオロール投与群で改善していた。同時に、末梢循環不全の指標である Lactate の上昇も有意に低下した (図 3)。さらに、そのメカニズムとしてランジオロールによる HIF(hypoxia inducible factor)-1 およびエンドセリン-1 の発現亢進の抑制が心臓内 mRNA で示された (図 4)。

心エコーによる評価では、心収縮能の指標である %FS は control 群と比べ、LPS 投与群で有意に上昇したが、ランジオロールの投与により有意に抑制された (図 3)。また、血中の Lactate 濃度は、LPS 投与群で有意に上昇したが、ランジオロールの投与によりその上昇は有意に抑制された (図 3)。

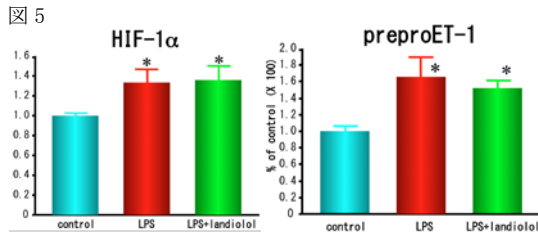
図 3



(\*p<0.05 vs con, #p<0.05 vs LPS)

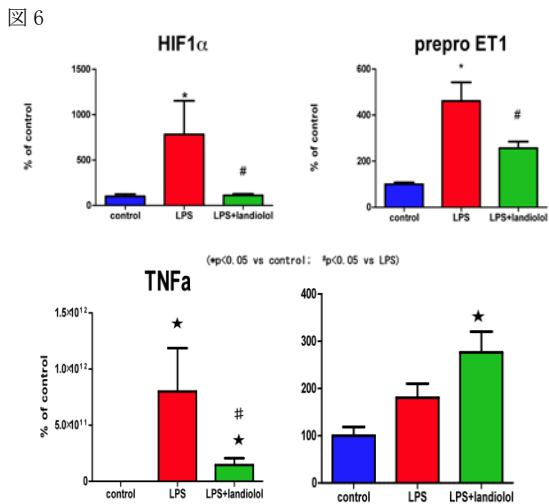


エンドセリンは血管内皮機能と関連する重要なキーワードである。一方、肺組織については、HIF-1 およびエンドセリンは LPS 投与により有意に上昇するもののランジオロール投与による変化は見られなかった(図 5)。



さらに、腎については、LPS で上昇した HIF-1 およびエンドセリン系のランジオロールによる抑制が認められ、さらに抗炎症サイトカインである IL-10 の上昇が確認できた。この結果は、ランジオロールが直接的な抗炎症作用を示すことを表している(図 6)。

なお、血中クレアチニン濃度については、有意な変化は無く、明らかな腎障害の起きる分子レベルでの変化の可能性を示唆する。



以上から、エンドトキセミアモデルの心臓において、ランジオロールが HIF-1 およびエンドセリン系を介した経路による循環コントロール (図 7-1)、さらに腎臓では、IL-10 を介した抗炎症作用を示した(図 7-2)。

図 7-1 Hu et al. Biochem Biophys Res Commun, 1998

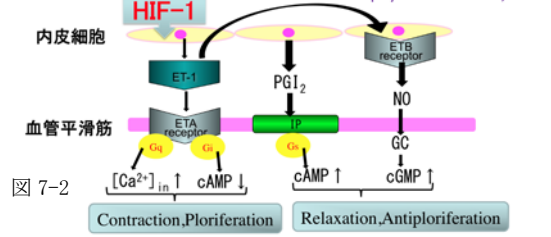
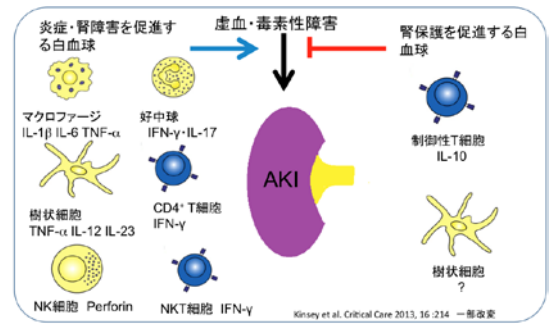


図 7-2



これまでの結果から、エンドトキセミアモデル動物において、ランジオロール投与による心機能正常化、末梢循環不全の改善、急性腎障害の改善の可能性が示された。これらは、敗血症ショックにおいて患者の予後を左右する重要な合併症でありさらなる検討および臨床研究への応用の根拠となる。また、同様に脳組織および肝組織についても解析を進めており、ICU せん妄や凝固障害など合併症との関連を評価する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

(1) 小倉吉保、下條信威、関 義元、櫻本秀明、宮 顕、萩谷圭一、河野 了、西野衆文、サブリーナ ジェスミン、水谷太郎、ランジオロールの endotoxemia rat に対する抗炎症作用を介した腎保護作用の検討、第 40 回日本集中治療医学会学術集会、2013/02/28、松本市総合体育館、長野県松本市

(2) 小倉吉保、下條信威、河野了、萩谷圭一、安田貢、津田恭治、高田智也、西野衆文、水谷太郎、ランジオロールの endotoxemia rat に対するエンドセリン-1 を介した腎保護作用の検討、第 39 回日本集中治療学会学術集会、2012/02/28、幕張メッセ、千葉県千葉市

(3) 関 義元、下條信威、櫻本秀明、萩谷圭一、西野衆文、安田 貢、河野 了、水谷太郎、landiolol は敗血症モデルラットの充進した肺の endothelin 系は抑制しなかった、第 38 回日本集中治療医学会学術集会、2011/02/25、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

(4) 下條信威、関義元、櫻本秀明、萩谷圭一、安田貢、西野衆文、河野了、青沼和隆、水谷太郎、Landiolol は HIF-1 を介して敗血症モ

デルラットの亢進した心臓の endothelin 系を抑制した、第4回茨城県周術期循環管理セミナー、2010/08/06、茨城県つくば市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水谷 太郎 (MIZUTANI TARO)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：80181890

### (2) 研究分担者

下條 信威 (SHIMOJO NOBUTAKE)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：20462210

酒井 俊 (SAKAI SATOSHI)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：30282362

河野 了 (KAWANO SATORU)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：90323295

### (3) 連携研究者

山口 直人 (YAMAGUCHI NAOTO)  
茨城県立医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：40239900

ジェスミン サブリナ (JESMIN SUBRINA)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：60374261