

NF- κ B デコイ型核酸医薬を用いた
ショック時の治療と予防

(課題番号 17591896)

平成 17, 18 年度科学研究費補助金 (基盤研究C)

研究成果報告書



平成 19 年 4 月

研究代表者 高田 勝美

(東京女子医科大学麻醉科学講座 助教授)



NF- κ B デコイ型核酸医薬を用いた
ショック時の治療と予防

(課題番号 17591896)

平成 17, 18 年度科学研究費補助金 (基盤研究C)

研究成果報告書

平成 19 年 4 月

研究代表者 高 田 勝 美

(東京女子医科大学麻醉科学講座 助教授)

目次

はしがき	1
1. 研究課題名・研究組織・研究経費・研究発表	3
2. 研究成果	
1. この度の研究計画および成果の概要	7
2. Effects of colloid resuscitation on peripheral microcirculation, hemodynamics, and colloidal osmotic pressure during acute severe hemorrhage in rabbits	14
3. 膠質液と微小循環	22
4. Urinary trypsin inhibitor improves peripheral microcirculation and bronchospasm associated with systemic anaphylaxis in rabbits <i>in vivo</i>	30
5. Single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber	36
6. 軽量で開閉可能な家兎耳介観察窓の開発	43
7. 血管新生過程の観察、-ND フィルターの利用による観察域の拡大-	50
8. Macroscopic sequential pictures of angiogenesis in a rabbit ear chamber	56
9. 麻酔管理関連モデルにおける REC 法による微小循環動態の研究	65
10. NF- κ B デコイは幼若ラットにおいてモノクロタリン誘発性の肺高血圧と内膜増殖を抑制する	79
3. 参考論文	
1. 局所止血材の細胞毒性と組織親和性の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 評価	82
2. コラーゲン製止血材の生体顕微鏡による評価；組織親和性及び吸収性	89
3. 血管新生の速度：創傷治癒において血管新生を促進する条件	97
4. Effect of Ulinastatin on microcirculation during excessive hemorrhage using fluid therapy	102

はしがき

東京女子医科大学麻酔科 高田勝美

ショック研究には長い歴史があり、ショックの救命率も向上してきている。しかし研究されるにつれ、原因によって異なる病態の複雑さが判明し、未解決な問題も多い。敗血症性ショックは高齢化人工の増加と侵襲的治療の普及および耐性菌の出現などにより増加傾向にあり、まだまだ死亡率の高い病態である。また、近年の新薬のめざましい開発により使用される薬物の種類の増加や同一患者での薬物の使用頻度の増加に伴い、アナフィラキシーショックが増加する傾向にあり、これは一度発症すると重篤な循環不全に陥り、死亡することがある。各種ショックの改善に貢献する治療法の開発が必要となる。

最近、ショックなどの生体侵襲時には、細胞内で核内転写因子であるNF- κ Bが活性化され、細胞内に移行し種々のサイトカイン遺伝子の転写活性を高め、白血球よりサイトカインが産生され、血管内皮細胞による接着因子の発現が誘導されやすい状況にあることがわかった。ショック反応の開始点として、微小循環系があげられる。我々は、各種ショックモデルにおいて微小循環を観察することによりショックのメカニズムを解明できれば、現在の治療に比べより特異的な治療を行い得ると考え、研究をすすめてきた。この報告書はこの2年間の我々の研究成果である。今後この成果が臨床に応用できるよう発展させていく所存である。

1. 研究課題名：研究組織・研究経費・研究発表

【研究課題名】

NF- κ B デコイ型拡散医薬を用いたショック治療と予防

研究課題番号 17591896

【研究組織】

研究代表者 高田勝美 (東京女子医科大学麻醉科助教授)

研究分担者 小森万希子 (東京女子医科大学東医療センター
麻醉科助教授)

富澤康子 (東京女子医科大学循環器外科助手)

尾崎眞 (東京女子医科大学麻醉科教授)

【研究経費】

平成 15 年度 1,700 千円

平成 16 年度 1,500 千円

計 3,200 千円

【研究発表】

学術雑誌

1. 佐藤章、富澤康子、小森万希子、高田勝美. 軽量で開閉可能な家兎耳介観察窓の開発. 呼と循 2007; 55: 359-362
2. K. Nishiyama, M. Komori, M. Narushima, H. Yoshizawa, M. Kawamata, and M. Ozaki. A woman who required long-term mechanical ventilation to treat limbic encephalitis during pregnancy. Acta Anaesthesiol Scand 2007; 51: 252-254
3. Komori M, Fukuuchi A, Mae T, Nishiyama K, Mawamata M, Ozaki M. Milnacipran hydrochloride for the treatment of postherpetic neuralgia. Pain Clinic 2006; 18: 421-423
4. 小森万希子. 膠質液と微小循環. 体液・代謝管理 2006; 22: 45-52
5. Makiko Komori, Katsumi Takada, Yasuko Tomizawa, Keiko Nishiyama, Makoto Ozaki: Permissive Hypercapnia Range for Improved Peripheral Microcirculation and Cardiac Output in Rabbits. Anesthesiology 2006;

105:A1061

6. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Ozaki M : Single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber. *Anesth Analg*, 100: 830-4, 2005.
7. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Uezono S, Nishiyama K, Ozaki M : Effects of colloid resuscitation on peripheral microcirculation, hemodynamics, and colloidal osmotic pressure during acute severe hemorrhage in rabbits. *Shock*, 23: 377-382, 2005.
8. 富澤康子 : 平成 16, 17 年度文部科学省科学研究補助金 (基盤研究C) 課題番号 16500304『機能的足場に rhbFGF を組み込んだ人工臓器・生体材料への血管新生と組織再構築』研究成果報告書、360 万円
9. Tomizawa Y, Hanawa T, Kuroda D, Nishida H, Endo M. Corrosion of stainless steel sternal wire after long-term implantation. *J Artif Organs*. 2006;9:61-66.
10. Sawa Y, Horiuchi T, Kishida A, Masuzawa T, Mizuguchi K, Nishimura M, Okoshi T, Shinzato T, Tatsumi E, Tomizawa Y, Watanabe H. Journal of Artificial Organs 2005: the year in review. *J Artif Organs*. 2006;9:1-7.
11. Sughiura T, Nishida H, Ishitoya H, Tomizawa Y, Saito S, Endo M, Kurosawa H. Chronic expanding intrapericardial hematoma after pericardial paracentesis. *J Card Surg*, 21:491-493, 2006.
12. Tomizawa Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. *J Artif Organs* 2005; 8:137-42.
13. Nishida H, Tomizawa Y, Endo M, Kurosawa H. Survival benefit of exclusive use of in situ arterial conduits over combined use of arterial and vein grafts for multiple coronary artery bypass grafting. *Circulation* 2005; 112:1299-303.
14. Tomizawa Y. Endothelialization and functional neointima on vascular grafts in humans. *Ann Thorac Surg* 2005; 79:1465.
15. Sato M, Endo M, Tomizawa Y, Nishida H. Left ventricular true aneurysm with pseudoaneurysm detected five years and nine months following repair for oozing type free wall rupture. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 53:147-9.

シンポジウム

脳死移植手術の麻酔：腎・膵腎移植の麻酔. 日本麻酔科学会第 53 回学術集会 (2006 年 6 月, 神戸)

学術講演

膠質液と微小循環. 第 21 回体液・代謝管理研究会 (2006 年 1 月, 川越)

Book section

小森万希子：麻酔の実践マニュアル；喘息患者の麻酔 246-249、糖尿病患者の麻酔 250-253、肥満患者の麻酔 254-256、精神疾患患者の麻酔 322-331、ハンチントン舞踏病の麻酔 257、診断と治療社、尾崎眞、野村実編集：108-109, 2006

【研究成果 1】

この度の研究計画及び成果の概要

東京女子医科大学麻酔科 高田勝美

はじめに

ここでは本研究の全貌の大まかな理解のために、研究計画および成果について簡単に解説した。同時にこの研究を始めるに当たっての背景、社会的意義や位置づけについても明らかにしておきたい。そうすることによって、この研究の意義および成果の意味を浮き彫りにすることができ、また、この研究により導かれた論文、さらにわれわれの参考論文を読むに際して、一層深い理解が得られると思われる。

研究の背景

最近、ショックなどの生体侵襲時には、細胞内で核内転写因子である NF- κ B が活性化され、細胞核内に移行し種々のサイトカイン遺伝子の転写活性を高め、白血球よりサイトカインが産生され、血管内皮細胞による接着因子の発現が誘導されやすい状況にあることがわかった。ショック反応の開始点として微小循環系があげられる。侵襲が惹起する白血球依存性の微小循環障害では NF- κ B および接着分子の関与を無視できないことが判明した。ショック研究には長い歴史があるが、研究されるにつれ、原因によって異なる病態の複雑さが判明し、未解決な問題も多い。なかでも敗血症性ショックは高齢化人工の増加と侵襲的治療の普及および耐性菌の出現などにより増加傾向にあり、その死亡率の高さから世界中で盛んに研究されている。一方、新薬のめざましい開発により使用される薬物の種類の増加や同一患者での薬物の使用頻度の上昇に伴って、アナフィラキシーショックが増加する傾向にあり、一度発症すれば、重症な循環虚脱に陥り、死亡することもあるので注目を集めている。これらのショックは単に循環系の異常にとどまらず組織の微小循環障害を前景とした各種代謝異常を伴う複雑な全身反応であり、確立した治療がないのが現状である。我々は、各種ショックモデルにて微小循環を観察することによりメカニズムを解明できれば、現在の治療に比べより特異的な治療を行い得、治療方法を新しい方向に向かわせることができると考える。

研究の目的

エンドトキシン (LPS) 刺激によりサイトカインおよび接着因子などのメディエータが遊離され、微小循環障害を引き起こし、ショック症状を惹起することは知られている。本研究の目的は微小循環障害が増強されるメカニズムを解明することにある。サイトカインや接着因子の発現には核内転写因子である NF- κ B の関与が知られており、本研究ではショック時の微小循環現象を直視下に経時的に観察し、同時に血液中の細胞や内皮細胞相互間の補体反応、サイトカインの放出や ICAM などの接着分子の関与等を評価し、また治療により緩解する過程を観察することによりその機序を解明し新しい治療法の開発へと結びつけることである。微小循環障害の治療経過を調べるために、急性循環不全治療薬、Protease inhibitor、ステロイド等を用いてその効果を評価する。さらに近年開発された抗サイトカイン薬と抗接着分子抗体、アンチセンス NF- κ B、NF- κ B デコイ型核酸医薬、フリーラジカルスカベンジャーによる新しい治療への応用と発展させる。

この研究の独創的な点

①NF- κ B および接着因子のショックへの関与のメカニズムを解明する in vivo の実験である。②ショック惹起前後の経過を連続して同じ毛細血管を観察可能である。③ショック後の細動脈の血管内皮細胞障害を赤血球、白血球、血小板を巡る現象と共に直視下で観察できる。④ショック時および抗ショック薬等の投与後にサイトカイン類および接着因子 (ICAM, VCAM) を測定した研究は少ない。以上のようにこの研究は学術的な特色および多数の独創的な点を有している。この研究により、各種ショック時の NF- κ B、接着因子 (ICAM, VCAM) の関与の解明を行えば、必ず有効な治療法を開発することができ、新しい抗ショック療法の発展へとつなげることができると考えている。機序の解明により今までの対症療法から特異的な治療法が確立すれば、死亡率を下げることも可能となる。

この研究から予想される社会的意義

現在、本邦では医療費高騰のおり cost-effective なより良い治療システムに対する要求度も高く、その開発が重要かつ緊急性を有することは明白な事実である。この抗ショック療法により、各種ショックの治療成績をおおいに向上させ、高額な薬剤や人的支援の削減、入院期間の短縮により、国家予算の多大な割合を占める医療費の軽減に大きく貢献できるため、社会的意義は大きいと考える。

国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

LPS で単球/マクロファージを刺激すると、細胞接着因子、サイトカインなどが遊離し、ショック症状を呈し、これは細胞内で NF- κ B が活性化されて種々の免疫関連遺伝子を誘導することが報告された (Wheeler AP, 1999)。近年、合成アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを用いて特異的に標的遺伝子の発現をおさえ、癌やウイルス感染を治療しようという新しい治療法が注目されている。LPS 投与で septic shock と DIC を誘発したマウスにアンチセンスを投与すると死亡率が低下し (北島, 1994)、ステロイドも NF- κ B の活性化を強く阻害することが報告された (Sheiman RI, 1995)。エンドトキシンショックに接着分子の抗体リガンドを投与することによってショックが予防できることが報告された (Ikeda, 1995)。本研究は in vivo ショックモデルにおいて微小循環が直接観察でき、ショック過程への経路を阻害するという、より選択性を高めた治療法の開発を試みることができる。

研究計画

平成 17 年度には①～⑧、および臨床研究を中心に、また平成 18 年度にはひき続き、③を、さらに⑧⑨を予定した。臨床研究は基礎研究の結果にもとずいて行うこととした。

【基礎研究】

- ①Rabbit ear chamber (REC) モデル作成：家兎の耳介にアクリル樹脂製透明窓を装着する。6 週間経て新生血管再生後この窓を通して毛細血管を 3-CCD ビデオテレビを装備し生体顕微鏡下にリアルタイムに観察する。
- ②腸間膜毛細血管網モデルの作成：家兎の腸間膜内の毛細血管網を剥離し、生体顕微鏡下に観察する。
- ③a) 全身型凝集性アナフィラキシーショック：家兎に抗原としてウマ血清 (Cat. No. 1650-015; GibcoLab, Grand Island, New York.) を 3ml 皮下注し、2 日後に 3ml 静注する。ショックは 14 日経てから、ウマの血清 4ml を点滴静注してアナフィラキシーショックを惹起させる。b) 敗血症性ショック：Sigma 社製 E coli, B4 lipopolysaccharide) を 0.5～10mg を濃度を変えて生理食塩水に溶解し、20 分かけて点滴静脈内投与する。c) 出血性ショックモデル：15ml の脱血を 5 回に分けて行い、人為的大量出血とする。
- ①および②において全身麻酔下、生体顕微鏡下に抗原あるいは LPS 注入し。心電図、

動脈圧、中心静脈圧、心拍出量等の循環動態評価を行い、微小循環は血管径、血流速度、血流量を測定する。

④内皮細胞損傷と顆粒球の膠着の評価：luminol 依存性化学発光を用い活性酸素を撮影し顆粒球の細静脈内皮への膠着数を acridine orange を用いた生体蛍光顕微鏡により測定し血管内皮細胞障害を monstral blueB で評価する。

⑤メディエーターの評価：経時的に採血し、顆粒球エラスターゼおよび TNF、IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, sICAM-1, sVCAM-1, ELAM-1 の血中濃度を ELISA 法にて測定する。

⑥接着分子の発現の評価：腸間膜の血管を直ちに 4%PFA・0.1MPB で固定後パラフィン包埋し、連続切片を作製し、抗 ICAM-1 抗体、抗 VCAM-1 抗体を用いて蛍光抗体法により免疫染色を行い接着分子の発現を評価する。

⑦血管透過性の評価：毛細血管透過性亢進による血液の血管外漏出をエバンスブルー静注により観察する。

⑧抗ショック薬の治療効果の評価：③のショックモデルにそれぞれ 1) メチルプレドニゾロン 40mg/kg 2) エピネフリン 0.1mg 3) Phosphodiesterase4 および 1 選択的阻害薬 KF19514 1mg/kg 4) ウリナスタチン 50000 単位/kg を投与し、抗ショック薬を投与しないコントロール群と微小循環改善の程度およびメディエーター、接着分子の評価を各々比較検討する。さらに現在同定できている抗 IL-8 モノクローナル抗体 (WS-4; Chugai Pharmaceutitical Co., Tokyo, Japan)、IL-1 アンタゴニスト (Eisenberg, 1990) および抗接着因子抗体 (antiLFA-1 α) アンチセンス NF- κ B (NF- κ B SN 50, NF- κ B SN 50M, PDTC; Calbiochem, LaJolla, CA)、NF- κ B デコイ型核酸医薬、フリーラジカルスカベンジャーの投与を試みる。

⑨アンチセンス NF- κ B、NF- κ B デコイ型核酸医薬、フリーラジカルスカベンジャー投与の効果：投与の時期により (1群) ショック惹起前に投与、(2群) ショック惹起後に投与に分け、さらにこれらの投与量を変え、用量反応の有無を検討する。

【臨床研究】

⑩手術時の投与薬剤によるアナフィラキシーショック症例の評価：経時的に循環、および呼吸 (気道内圧、EtCO₂ および PaO₂, PaCO₂) の変化を観察する。発症したら、抗ショック薬投与の前後で尿中 N-methyl-histamine, 肥満細胞トリプターゼ、血中 TNF 値、sICAM-1, sVCAM-1 等を測定する。術後に原因薬物を検索するために皮膚反応試験、薬剤刺激リンパ球幼若化試験、薬剤刺激による患者末梢血単核球の INF- γ 産生試験を行う。

⑪エンドトキシンショックで集中治療室に収容された患者：血行動態（平均血圧、脈拍数、中心静脈圧）の変化、メディエーター（TNF、IL1、IL-6、IL-8 および顆粒球エラスターゼ、接着因子）の血中濃度の変化。

⑫以下に述べる他の多種類のショックにおいても、同時進行で検討する。

- a. 腹部大動脈人工血管置換時の大動脈遮断の影響：循環動態の変化、尿中ウリナスタチンを定量する。大動脈遮断前後および周術期の血中サイトカイン値の変動についても測定。
- b. 腎移植時：移植臓器血流量の維持および改善作用、また移植臓器機能の変化。周術期の血中サイトカイン値、接着因子の変動を測定。血中Cr値、BUN値、尿中NAGおよび $\beta 2$ ミクログロブリン値等も測定する。
- c. 悪性高熱発症時：循環不全および腎機能障害に対するウリナスタチン投与の効果。
- d. 肺梗塞でショックに陥った患者：D-ダイマー、動脈血液ガス分析、心エコー、肺血流シンチの変化。メディエーター（TNF、IL1、IL-6、IL-8）の測定。

研究成果と参考論文

この報告書の研究成果論文として、まず、ショック時の微小循環動態の重要性に注目し、基礎的検討として『Effects of colloid resuscitation on peripheral microcirculation, hemodynamics, and colloidal osmotic pressure during acute severe hemorrhage in rabbits』『膠質液と微小循環』を記した。家兎の出血性ショックモデルを作成し、ショック時の微小循環動態を観察し、輸液療法での変化を検討した。耳介にアクリル樹脂製透明窓を装着した体重3kgの家兎を用いて、透明窓に再生された微小循環の循環動態を耳介を生体顕微鏡下に固定して、顕微鏡用ビデオカメラで記録、観察した。麻酔はイソフルレンで維持し、脱血量は循環血液量の40-50%を目標とした。コントロール群（C群）は脱血操作後、Lactate Ringerを20ml急速静注したのち、10ml/min点滴静注し、総量100mlを静注内に投与する。Hydroxyethyl starch群（H群）ではHydroxyethyl starchを同様の方法で投与する。Hydroxyethyl starchはLactate Ringerに比し、1) 血圧回復効果は速く、血圧保持作用が強かった、2) 中心静脈圧は速く回復した、3) 尿量は有意に多く得られた、4) 血漿膠質浸透圧は有意に保たれた、5) 細動脈の血管径、血流速度、血流量は有意に保たれた、という知見が得られた。

次にアナフィラキシーショック時の微小循環動態の研究をREC法を用いて行った。家兎の全身型凝集性アナフィラキシーモデルを用いて微小循環改善作用のあるウリナスタチン（UTI）に着目し、細動脈の血流の変化を直視下に観察しUTI投与の有効性を検討した。ウサギの全身型凝集性アナフィラキシーはウマの血清を3ml皮下注し、2日

後に3ml 静注さらに14日後にウマの血清3ml 静注してアナフィラキシーを惹起させた。UTI 非投与群 (C群)、UTI 5万単位/kg 投与のU1群、UTI 15万単位/kg 投与のU2群の3群にわけ、アナフィラキシー惹起前後で比較した。気道内圧はアナフィラキシー惹起2分後から45分後までU群に比し、C群で有意に高かった。細動脈血管径はアナフィラキシー惹起2分後から減少し、C群ではU群に比し有意に減少した。45分後はU群で有意に血管径は保たれた。細動脈の血流速度、血流量も同様の傾向を示した。UTIにはショック時のサイトカイン抑制作用やヒスタミンの抑制や気道炎症の指標である血中の顆粒球エラスターゼおよび気道収縮のメディエータの指標であるTXB₂の減少作用がある。本研究で家兎の全身型凝集性アナフィラキシーにおける微小循環の維持および気管支攣縮にUTIは用量依存性に有効であることが判明した。

さらに血管新生起こり方の研究として『Single local application of recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates initial angiogenesis during wound healing in rabbit ear chamber.』を記した。血管新生過程を知るのを目的に経時的に同一部位で観察することが可能な家兎の耳介に作成した観察窓を用いた。方法は、家兎(2.5kg)の一侧に浅野らの方法に準じてアクリル樹脂製透明窓(Rabbit Ear Chamber ; REC)を装着して微小循環用窓を作成した。観察窓を術後1日から6週目まで経時的に生体顕微鏡で観察した。また、同時にCCDカメラを装備し、S-VHSビデオに録画した。術後1日目には、透明な組織浸出液で満たされ、円形の細胞が拍動性に方向を変えながら動いていた。出血部位には線維素網の形成がみられた。一週間目には、線維芽細胞やマクロファージが窓の表面に付着したが、円形の炎症細胞が拍動性に動いている。2〜3週間目には周囲から鮮赤色の出血およびループ状の血管が観察窓の視野内に出現した。血管から赤血球がつまった瘤状の突出(sprout)がみられ、なかには出血していることもあった。周囲から中心に向かって伸展および分枝してくる細小血管は先端に鮮赤色の出血を伴っており、細小血管の分岐部の位置は変化していなかった。3週目以降は観察窓内には細く直線的に走行する動脈、および屈曲した太い静脈が形成された。4週目で血管新生は完成したが、5週目でも変化していた。血管成長因子である recombinant human basic fibroblast growth factor を投与すると血管新生が促進した。

また、血管新生および微小循環の正確な観察法として、『軽量で開閉可能な家兎耳介観察窓の開発』『血管新生過程の観察、-ND フィルターの利用による観察域の拡大』『Macroscopic sequential pictures of angiogenesis in a rabbit ear chamber』を述べた。そしてこれまで行なってきた微小循環の研究の成果を『麻酔管理関連モデルにおけるREC法による微小循環動態の研究』としてまとめた。

NF- κ Bに関する研究としては、『NF- κ B デコイは幼若ラットにおいてモノクロタリン誘発性の肺高血圧と内膜増殖を抑制する』を集中治療学会で発表した。

他に血管新生に関する研究として、『局所止血材の細胞毒性と組織親和性の *in vitro* および *in vivo* 評価』、『コラーゲン製止血材の生体顕微鏡による評価；組織親和性及び吸収性』、『血管新生の速度：創傷治癒において血管新生を促進する条件』微小循環に関する研究として、大量出血時の微小循環におよぼす影響についても示した。

まとめ

REC 法を用いて、ショック時の微小循環を直視下に観察した。我々の目指しているショックの特異的治療によりショック患者の死亡率を下げることができるようこの研究をさらに進めたい。