

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21692

研究課題名(和文)糖尿病患者が補助循環中に受ける炎症と臓器傷害の機序解明 -小動物モデル評価-

研究課題名(英文) Diabetic patients clarify the mechanisms of inflammation and organ injury during extracorporeal membrane oxygenation

研究代表者

藤井 豊 (Fujii, Yutaka)

新潟医療福祉大学・医療技術学部・助教

研究者番号：20589303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病患者が補助循環中に受ける炎症と臓器傷害のメカニズムを解明することを目的とし研究を行ってきた。

非糖尿病および糖尿病に群分けし、補助循環後の各種臓器における病理評価の結果、腎臓の近位尿細管領域において、糖尿病群で傷害のレベルが高い傾向であることが分かった。また、糖尿病群で炎症を受けやすく、さらに酸化ストレスが高いことが示された。本研究成果は、糖尿病患者が補助循環中に受ける炎症と臓器傷害のメカニズムおよび酸化ストレスの関連性を解明する材料となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the mechanisms of inflammation and organ injury which diabetic patients undergo during extracorporeal membrane oxygenation.

As a result of the pathological evaluation after the auxiliary circulation, it was found that the injury level tended to be higher in the proximal kidney tubule in the diabetic group. It was also shown that diabetic group was susceptible to inflammation and had high oxidative stress. Our research results can be a material to elucidate the mechanism of inflammation and organ injury suffered by diabetic patients during extracorporeal membrane oxygenation and the relationship between oxidative stress.

研究分野：循環生理学

キーワード：糖尿病 補助循環 炎症反応 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年、補助循環は循環器疾患のみならず呼吸器疾患まで適応を拡大し、全世界で約6万症例、本邦でも4千症例以上施行されており今後も症例数の増加が予測されている(ECLS Registry Report 2014)。しかしながら、この補助循環は患者を救命する一方で、生体に様々な悪影響を及ぼすことが知られている。具体的には、循環動態の変動、各臓器への血流の不均衡分布、虚血再灌流、炎症反応など多岐に渡っておりこれらが複雑に関連し合併症を引き起こすとされている。その中でも血液が体外循環回路・血液ポンプ・人工肺を中心とした体外循環デバイスなどの異物に接触することで起こるとされている炎症反応は臓器傷害につながる重要な因子となっている。

また、世界の糖尿病患者数は約4億人とされており(国際糖尿病連合:IDF)、本邦でも800万人以上いるとされており、さらに糖尿病予備軍の人口を合わせると2000万人を超えるとされている(厚生労働省ホームページ)。総人口に占める糖尿病患者の増加に加え、糖尿病患者は健常人に比べ、心疾患合併率が2~4倍高い(JDCS: Japan Diabetes Complications Study)ことや、呼吸器合併症のリスクも高いということも重なり、糖尿病患者に対する補助循環施行数も増加している。これに関連して、糖尿病患者に対して体外循環法を用いた心臓手術では非糖尿病患者に比べて術後合併症(主要臓器不全)が有意に多いという報告や(Brinbaum DH, et al. Perfusion. 2006) さらに、糖尿病患者は酸化ストレスを受けやすく、組織傷害が起こる割合が高いことも報告されている(Sampio AF, et al. Biometals. 2014)。このような状況にも関わらず、糖尿病患者の体外循環中および体外循環後の生体反応を緻密に分析した研究は世界的に見ても少なく、未解明なことが多い。

2. 研究の目的

本研究では、これまで我々が構築してきた小動物補助循環モデル(Fujii Y et al. ASAIO J. 2012)と糖尿病モデルラットを用いることで、糖尿病に対する補助循環中の炎症と臓器傷害、さらに酸化ストレス(活性酸素種の発生)の影響を解明することを目的とした。図1にラット体外循環モデルを示す。

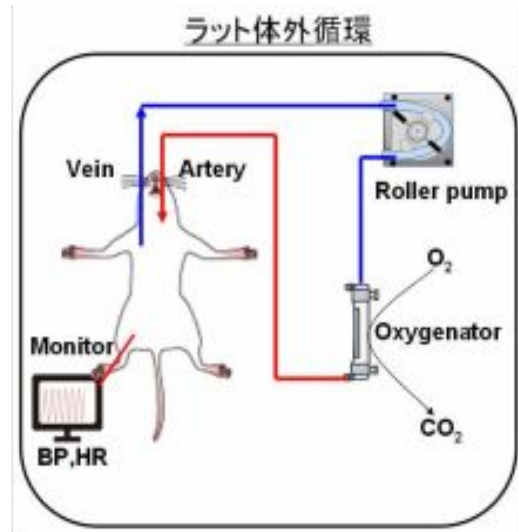


図1. ラット体外循環モデル

3. 研究の方法

実験は、Sprague Dawley (SD) ラット群(非糖尿病モデル N=7)および SDT (Spontaneously Diabetic Torii) fatty ラット群(肥満2型糖尿病モデル N=7)を用いた。麻酔導入後、人工呼吸器に接続し、血圧モニター用カテーテルを大腿動脈に挿入した。送血管を左総頸動脈、脱血管を右外頸静脈から挿入し右房に留置し、両群に補助循環を導入した。体外循環中は循環動態をモニタリングし、平均血圧70 mmHg以上、血中ヘモグロビン8 g/dL以上を維持した。また、灌流量60-70 ml/kg/min、直腸温36-37℃、PaO₂: 300-400 mmHg、PaCO₂: 30-40 mmHgで維持した。補助循環前、補助循環中、補助循環終了時(2時間)で動脈血を採取し、血球分析(赤血球・白血球・血小板)、生化学データ(LDH・AST・ALT)、炎症マーカー(TNF- α 、IL-6、IL-10)を検査し比較検討を行った。加えて、実験終了後、主要臓器を取り出し、Hematoxylin-Eosin (HE)染色法およびPeriodic acid-methenamine-silver stain (PAM)染色法にて組織形態学的評価、活性酸素の一種であるスーパーオキシドが検出可能なDihydroethidium (DHE)染色法を用い酸化ストレスを評価し臓器傷害との関連性を検討した。

尚、体外循環システムは、回路、人工肺(膜面積:0.03 m²、充填量:3.0 ml 泉医科工業製)およびローラポンプ(ペリスタポンプ:東京理化学工業)で構成され、充填量は15 mlで小動物用のシステムとしては世界最小クラスである。

4. 研究成果

SD ラット群(非糖尿病モデル)および SDT fatty ラット群(肥満2型糖尿病モデル)に群分けし、補助循環後の各種臓器における

HE 染色による組織形態的評価の結果、腎臓の近位尿管領域において、糖尿病群で傷害のレベルが高い傾向であることが分かった。さらに SDT fatty ラット群において、補助循環後、糸球体が委縮していることが確認できた。HE 染色および PAM 染色の結果を図 1 に示す。さらに、補助循環中の血液中のサイトカインを計測した結果、SDT fatty ラット群で炎症性サイトカインである IL-6、TNF- α の値が高く、炎症を受けやすいことが証明できた。図 2a、2b に血漿中の IL-6 および TNF- α の推移を示す。また、主要臓器の酸化ストレスにフォーカスを当て、直接的にスーパーオキシドの測定が可能である DHE 染色の結果から、糖尿病群で補助循環中の酸化ストレスが高いことが示唆された。特徴的であった肝臓および肺の染色画像を図 3 に示す。

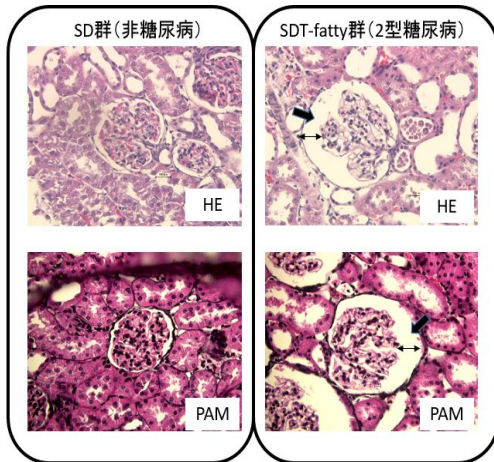


図 1 . 補助循環後の腎病理画像

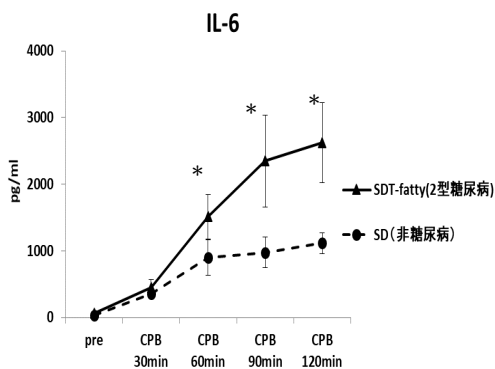


図 2a. 補助循環中 IL-6 の推移
(平均値 ± 標準誤差)

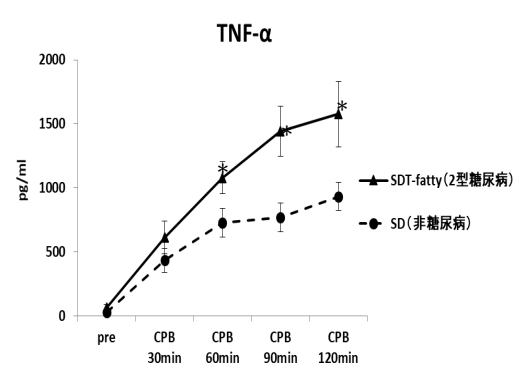


図 2b. 補助循環中 TNF- α の推移
(平均値 ± 標準誤差)

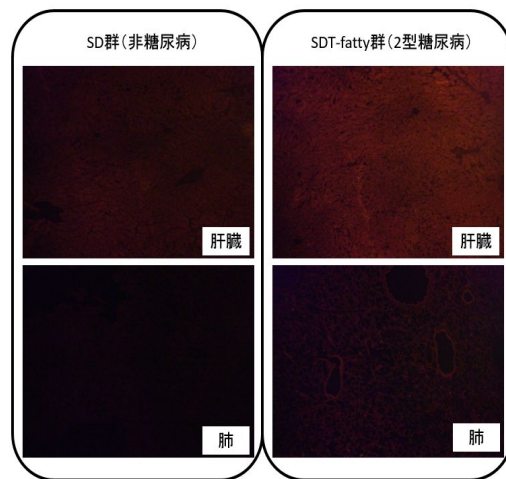


図 3 . 補助循環後の DHE 染色画像 (肝臓・肺)

今回の研究成果をまとめると、糖尿病群で補助循環中のサイトカイン上昇が顕著であり、炎症性反応が高いと言える。これに伴い、臓器傷害受けやすく、活性酸素発生による酸化ストレスが一因となっていることが示唆された。本研究の成果は、糖尿病患者が補助循環中に受ける炎症反応と臓器傷害のメカニズムおよび酸化ストレスの関連性を解明する材料となり得ると考えられる。今後、詳細なメカニズム解明のために研究を継続していく予定である。

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 3 件)

Fujii Y, Tanabe T, Yamashiro T, Shirai M, Takewa Y, Tatsumi E. Effect of hydroxyethyl starch priming on the systemic inflammatory response and lung

edema following cardiopulmonary bypass in a rat model. ASAIO J. 2017 63(5):618-623.

Fujii Y, Shirai M, Takewa Y, Tatsumi E. Cardiopulmonary bypass with low-versus high-priming volume: comparison of inflammatory responses in a rat model. ASAIO J. 2016; 62(3):286-90.

Fujii Y.
The potential of the novel leukocyte removal filter in cardiopulmonary bypass. Expert Rev Med Devices. Review 2016;13(1):5-14.

〔学会発表〕(計7件)

藤井豊, 田辺貴幸, 山城翼, 武輪能明, 巽英介, 追手巍
代用血漿製剤プライミングは補助循環中の炎症反応上昇を抑制する -小動物モデルを用いた検討- 第45回日本集中治療医学会学術集会 2018.2.23 千葉(幕張)

笠原莉奈 池上喜久夫 榎幸太 石山恵利加 糸井拓人 杉森勇斗 轟香奈絵 追手巍 藤井豊
糖尿病における腎虚血 - 小動物モデルを用いた病理学的評価 - 第55回 日本糖尿病学会関東甲信越地方会 2018.1.20 新潟

Fujii Y, Takewa Y, Tatsumi E, Oite T
High Oxygen Partial Pressure Generates Reactive Oxygen Species and Pro inflammatory Cytokines During Cardiopulmonary Bypass. ASAIO 63th Annual Conference 2017.6.23 Chicago, IL, USA

水野茜、糸井拓人、石山恵利加、榎幸太 笠原莉奈、杉森勇斗、轟香奈絵、藤井豊
体外循環中の血糖値と炎症反応の関係性 - 小動物体外循環モデルを用いた検討- 第24回日本体外循環医学会関東甲信越地方会大会 群馬・水上 2017,04,22

藤井豊, 追手巍, 白井幹康, 武輪能明, 巽英介
体外循環回路血液接触面積の違いによる全身性炎症反応の検討 第42回日本体外循環技術医学会大会 2016.10.22 東京

Fujii Y, Shirai M, Takewa Y, Tatsumi E. Cardiopulmonary Bypass With Low-versus High-blood Contact Surface Area: Comparison of Cytokine Level During Cardiopulmonary Bypass in a Rat Model」ASAIO 62th Annual Conference 2016.6.16 San Francisco, CA, USA

藤井豊, 白井幹康, 武輪能明, 巽英介
補助循環中、PaO₂ 300mmHg 以上での管理は全身炎症性反応を助長する。 - 小動物モデルを用いた検討 - 第26回日本臨床工学会 2016.5.15 京都

6. 研究組織

(1)研究代表者 藤井豊 (FUJII, Yutaka)
国立循環病研究センター・研究所・特任研究員
新潟医療福祉大学・医療技術学部・臨床技術学科・助教
研究者番号：20589303