

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11580

研究課題名（和文）ラット低体温モデルを用いた高度低体温の膵傷害と軽度低体温の膵保護効果の機序解明

研究課題名（英文）Pathophysiologic Mechanisms of Hypothermia-induced Pancreatic Injury in a Rat Model of Body Surface Cooling

研究代表者

井上 弘行 (Hiroyuki, Inoue)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30721568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：低体温症はしばしば高アミラーゼ血症や急性膵炎などの膵傷害を引き起こすが、その機序については不明であった。ラット体表冷却モデルを用いて血清学的、形態学的にその現象を検討した。低体温は膵に対して相対する二面性を持ち、形態学的にはVacuoleに代表される特徴的な膵傷害をきたすと同時に、血清学的には血清アミラーゼや炎症性サイトカインの上昇を抑制することなどによって膵保護にも作用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低体温は病態としての偶発性低体温症のみならず、治療としての体温管理療法や低体温手術などにも広く使用されており、さらには将来的に他の領域にも低体温は応用されていくと考えられる。低体温により引き起こされる膵傷害発現の機序を解明し、治療法や予防法を新たに確立することは重要な課題である。

研究成果の概要（英文）：Hypothermia induced bilateral effects on the pancreas. Morphologically, hypothermia induced pancreatic injury based on characteristic pathology typified by vacuoles. Serologically, hypothermia induced protective effects on the pancreas by suppressing amylase and inflammatory cytokine levels.

研究分野：救急医学

キーワード：低体温 膵傷害 膵保護 Vacuole

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低体温は高アミラーゼ血症や急性膵炎などの膵傷害を臨床でしばしば経験する。急性膵炎は重症化するケースもあり、いったん重症化すれば治療に難渋し死亡することもある。深部体温が 35 以下と定義される偶発性低体温症のうち、およそ半数で血清アミラーゼが上昇すると指摘された。そこで私たちのチームは体温低下と膵傷害との相関関係とリスクファクターを証明し、深部体温 28.5 以下になると膵炎のリスクが約 4 倍になることを初めて明らかにした。偶発性低体温症以外にも低体温管理下の開心術後の膵傷害例や、集中治療室で行われる蘇生後症候群や重症頭部外傷などに対する体温管理療法中に発症する膵傷害も指摘されている。低体温に起因した急性膵炎は、CT 画像上、膵浮腫が強く膵周囲組織変化の範囲が広いものの、膵造影不良所見が乏しいという特徴がある。自己消化や壊死を主体とするアルコール性などを原因とした一般的な急性膵炎とは所見が相違しており、病態が異なる可能性を考えた。

2. 研究の目的

これまで低体温により膵傷害が引き起こされる機序については明らかにされておらず、その解明は治療法や予防法の確立のために重要課題であった。そこで、2 つのラット体表冷却モデルを用いて血清学的、形態学的にその発現メカニズムを検討した。

3. 研究の方法

(1) 低体温ラット循環正常モデル

ヒト同様に冬眠せず低体温に弱いとされるラットの体表にアイスパックを接触させて 1 時間で目標温まで体温を低下させる。温度毎に以下のようにグループ設定した(各 n=5)。平温群(36 ~ 38 :NT) 軽度低体温群(33 ~ 35 :HT1) 中等度低体温群(30 ~ 32 :HT2) 高度低体温群(27 ~ 29 :HT3) 低体温導入前に尾動脈から採血を行い、目標温 1 時間維持後に採血および膵組織を採取した。血液の測定項目は、膵傷害の指標として血清アミラーゼ、組織虚血を示す乳酸値、膵細胞壊死を示す LDH、炎症性サイトカイン(TNF-、IL-6、IL-1)とした。

(2) 低体温ラット循環不全モデル

前述の私たちの臨床研究において、膵傷害を呈した群は有意に血圧低下が見られた。つまり、低体温だけではなく、低体温や脱水などに伴う血圧低下といった循環不全が膵傷害に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、高濃度吸入麻酔薬による循環不全モデルを作成し、平温群と低体温群(27 ~ 29)(各 n=5)で膵への影響を検討した。循環不全導入後に採血し、平温または低体温で 1 時間維持した。

(3) 特殊染色(TUNEL、免疫染色)

前述の実験で Vacuole 内部に貯留した液体の正体が膵酵素かどうかを確かめるため、抗アミラーゼ抗体を使用した免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 低体温ラット循環正常モデル

体温が低下するにしたがって、アミラーゼは低下したが有意差は認めなかった(p=0.056)。体温が低下するほど有意に乳酸値は低下した(p=0.021)。LDH は変動しなかった。体温低下に伴って IL-1、IL-6、TNF- は低下した。IL-1 (p=0.011)、IL-6 (p=0.013)は統計学的有意差を認めた。

低体温は血清アミラーゼ、乳酸、炎症性サイトカイン活性を抑制した。急性膵炎ラットモデルの研究で IL-6、IL-1、TNF は初期炎症プロセスを担うキーとなるサイトカインであり、それらの遮断により急性膵炎の発生は抑制されると報告されている。低体温による膵膵傷害抑制は、炎症性サイトカイン抑制による間接的な機序である可能性が考えられる。他にも細胞の代謝速度を低下、膵酵素合成および放出のプロセスを低下または停止、アポトーシスを誘導することによる腺房細胞に対する保護効果などが考えられた。

膵組織は HE 染色を行い、顕微鏡で 100 倍、200 倍及び 400 倍で観察した。Vacuole、膵浮腫、膵腺房細胞壊死が低体温による膵の特徴的組織変化であることがわかった。体温が低下するほど Vacuole の出現頻度は上がり、HT3 群では全例に認めた。Vacuole は低体温および循環障害による低酸素によって腺房細胞壁が障害され、膵液分泌障害によって腺房細胞に液胞形成したものと考えられる。Vacuole 以外にも、低体温によって膵浮腫、膵腺房細胞壊死が出現したが、一方で一般的な膵炎で見られるような膵出血や炎症細胞浸潤は見られなかった。

(2) 低体温ラット循環不全モデル

血清アミラーゼは有意差を認めなかったものの、循環不全で上昇し(p=0.37)、低体温により抑制される傾向(p=0.31)であった。乳酸値は循環不全により上昇が見られ(p=0.017)、低体温群において抑制された(p=0.008)。炎症性サイトカインは循環不全において上昇は見られず、平温

群と低体温群にも変化は見られなかった。以上のように循環不全モデルでも低体温は血清学的には保護的に作用したことが示唆された。

膵組織 HE 染色では、低体温群において循環正常モデルと同様に Vacuole が全例で確認された。浮腫と膵腺房細胞壊死は平温でも低体温でも同程度に認められた。循環正常モデルとの違いは、低体温群において膵出血が 5 例中 4 例で見られた。循環不全によって組織学的に膵傷害は引き起こされたが、低体温によってさらに膵傷害は進行した。

(3) 特殊染色 (TUNEL、免疫染色)

膵腺房細胞に形成された Vacuole の内部は染色され、Vacuole 内部にはアミラーゼが含有されることが明らかになった。他の内部成分は脂肪が変性したものなどが推測されるが、今回の研究では検討していない。

アポトーシスの有無を調べるため、膵腺房細胞壊死を認めたすべての膵組織に TUNEL 染色をして観察すると、アポトーシスは少数しか見られておらず、低体温による膵保護の機序として今回の実験系においてはアポトーシス現象を認めず否定的であった。

(4) まとめ

低体温は Vacuole、浮腫に代表される特徴的な組織所見を呈する膵傷害を引き起こす。一方で低体温は血清アミラーゼ、炎症性サイトカインなどを抑制していた。低体温は膵に対して相対する二面性を持ち、形態学的に傷害をきたすと同時に、血清学的には保護に作用することがわかった。本研究における研究限界は、体表冷却モデルにおいて、指標にした体温測定部位は臨床に準じて直腸とした。直腸温は膵そのものの温度ではないため、膵における実測的な影響を見ていない。次に、循環正常および循環不全モデルの循環状態をラットの足での酸素飽和度モニターで判断した。膵血流の実測による評価ではない。最後に、吸入麻酔薬自体が膵に及ぼす影響については考慮していない。しかし生体内で代謝を受けるイソフルレンは吸入量の 0.2%未満であり、事実上ほとんどすべて肺から代謝を受けずに排泄されるため影響は少ないと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 井上弘行	4. 巻 53
2. 論文標題 低体温による膵傷害のメカニズム解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 248-251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Hiroyuki, Harada Keisuke, Narimatsu Eichi, Uemura Shuji, Aisaka Wakiko, Bunya Naofumi, Nomura Kazuhito, Katayama Yoichi	4. 巻 50
2. 論文標題 Pathophysiologic Mechanisms of Hypothermia-Induced Pancreatic Injury in a Rat Model of Body Surface Cooling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 235 ~ 242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上弘行
2. 発表標題 体表冷却ラットモデルを用いた低体温に起因する膵傷害発現の病態解明
3. 学会等名 日本救急医学会学術集会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原田 敬介 (Harada Keisuke) (00560004)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	文屋 尚史 (Bunya Naofumi) (50721586)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	成松 英智 (Narimatsu Eichi) (70295343)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関