

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19806

研究課題名(和文) 体外循環モデルラットの骨格筋における酸素・循環動態の解明

研究課題名(英文) Dynamics of interstitial oxygen partial pressure in skeletal muscle of ECMO model rats

研究代表者

堀田 一樹 (Hotta, Kazuki)

新潟医療福祉大学・リハビリテーション学部・講師

研究者番号：30791248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：体外式膜型人工肺(ECMO)は、重篤な呼吸循環障害に対する救命措置として用いられている。本研究の目的は、ECMO管理中の骨格筋における酸素動態を明らかにすることである。Sprague Dawleyラット頸静脈に脱血管、頸動脈に送血管を設置し、ポンプを用いて脱血した血液をECMOで酸素化し再び生体内に血液を戻した。ラット前脛骨筋を露出し、リン光クエンチング法により間質内の酸素分圧を計測した。人工肺を設置しないsham群と比較した結果、骨格筋の酸素分圧はECMO群とsham群の間に差を認めなかった。以上のことから、ECMOにより動脈血は酸素化するが骨格筋には影響しないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ECMOは重症な呼吸循環不全患者を救命する最後の砦である。救命された後の臨床的問題として、日常生活への復帰が骨格筋萎縮によって阻害されることである。骨格筋の低酸素あるいは高酸素は、日常生活の自立を阻害する因子であり、ECMOは動脈血を高酸素化する。本研究により、ECMOは骨格筋の近藤先生には影響しないことが明らかとなった。したがって、ECMO管理によって生ずる筋萎縮は酸素動態以外の炎症や酸化ストレスなどが影響している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) is currently used as a life-saving treatment for patients with severe cardiopulmonary disease. This study aims to reveal the effect of ECMO on pO₂ in artery and skeletal muscle. Tibialis anterior muscle was exposed under isoflurane anesthesia. Phosphorescence quenching techniques were used to measure pO₂ in muscle interstitium of sham and ECMO model rats. Arterial partial pressure of oxygen (PaO₂) was significantly increased in ECMO model rats as compared to the sham. However, interstitial pO₂ did not change during ECMO as compared to the sham. Therefore, ECMO did not likely affect the interstitial pO₂ in rat skeletal muscle.

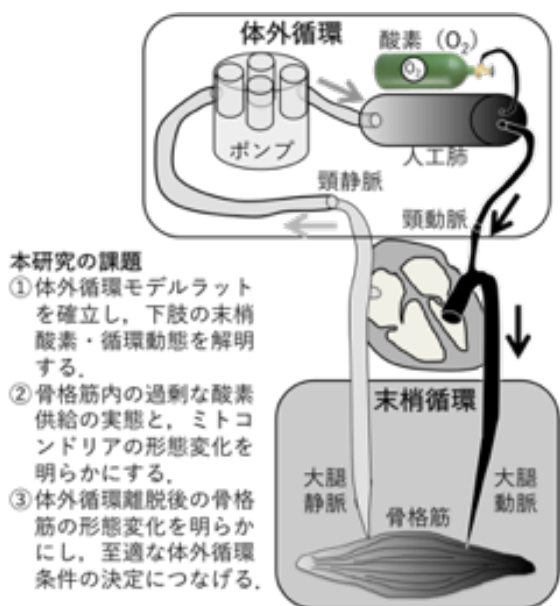
研究分野：微小循環

キーワード：骨格筋 酸素 ECMO

1. 研究開始当初の背景

近年の医療技術の進歩に伴い、重度の呼吸器・循環器疾患を有する患者が救命されるようになった。体外式膜型人工肺 (ECMO, 図1) とは、肺の血液酸素化と心臓の血液拍出を、体外に設けられた人工肺とポンプで補助する治療法であり (図1), 心停止に至った患者の予後を改善することが示された (Sakamoto, Resuscitation 2014)。

呼吸循環動態が安定化すると、体外循環から離脱し退院へ向けた準備が開始される。申請者らの研究により、体外循環を必要とする重症心不全患者では、体外循環から離脱後に下肢筋力 (最大発揮張力) の低下および筋萎縮が生じ、リハビリテーションの積極的介入にも関わらず歩行獲得に難渋し在院日数が長期化する (Hotta, ACSM Annual Meeting 2007)。Hayes らは体外循環を受けた患者の下肢筋厚を計測し、体外循環から離脱後 1 日目から 20 日目にかけて 30.1%減少することを報告した (Hayes, J Crit Care 2018)。この筋萎縮を引き起こす要因として、本研究課題では、体外循環中の酸素・循環動態の特性に着目し研究を進めることとした。



- 本研究の課題
- ① 体外循環モデルラットを確立し、下肢の末梢酸素・循環動態を解明する。
 - ② 骨格筋内の過剰な酸素供給の実態と、ミトコンドリアの形態変化を明らかにする。
 - ③ 体外循環離脱後の骨格筋の形態変化を明らかにし、至適な体外循環条件の決定につなげる。

図1. 体外循環システムの概観

2. 研究の目的

本研究課題では、独自の体外循環モデルラットを確立し、体外循環中の骨格筋の酸素・循環動態の特性の解明に取り組んだ。これを明らかにすることで、体外循環後に臨床的にみられる骨格筋機能障害の一因として、体外循環中の骨格筋微小血管における循環動態の変化が関与するかが明らかとなる。

3. 研究の方法

本研究では、体外循環中の酸素・循環動態を明らかにするために、体外循環モデルラットというユニークなモデル動物を作成した (図1)。申請者と同機関で研究を行っている藤井らは、頸静脈から血液を脱血し頸動脈に酸素化した血液を送血する体外循環モデルをラットに適用した (図1; Fujii, Conf Proc IEEE Eng Med Biol 2015)。本研究の課題①では、動脈血の酸素がどの程度骨格筋に到達しているかを明らかにするために、図2に示すように骨格筋の間質における酸素分圧を計測した。酸素プローブ (Oxyphor PdG4, Oxygen Enterprises) を骨格筋の間質内に投与し、リン光クエンチング法の原理を用いて毛酸素分圧を計測した (Watanabe, J Appl Physiol 2017)。りん光寿命の計測によるリアルタイムかつ生体内で測定可能な本手法は、骨格筋微小循環の研究を推進する革新的方法である。

対象動物として、雄性 Sprague Dawley ラット (10-18 週齢, n=11) を使い、イソフルラン麻酔および人工呼吸器による管理下にて、右頸静脈に脱血管を、左頸動脈に送血管を留置した。脱血管と送血管の間にポンプと ECMO を連結することで、ECMO によって酸素化された血液を動脈へと送血した。全身の酸素動態の指標として、動脈血酸素分圧 (PaO₂) を計測した。加えて、末梢の酸素動態の指標として酸素プローブを右前脛骨筋 (TA) に投与し、リン光クエンチング法により骨格筋の間質酸素分圧 (PO_{2is}) を計測した (使用機器 OxyLED, Oxygen Enterprises)。まず

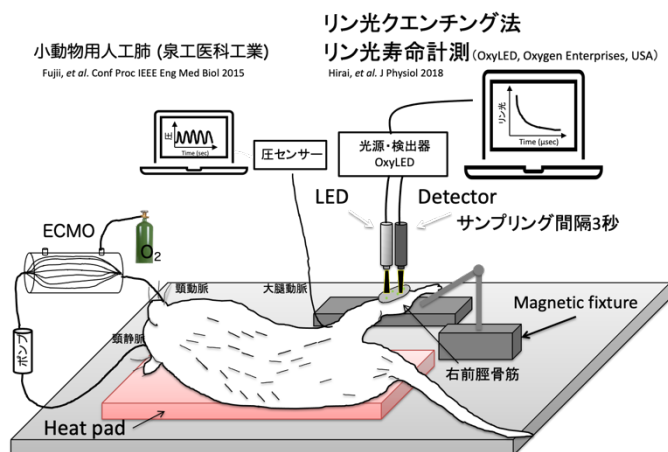


図2. 実験方法

吸入気酸素濃度 (FiO₂) 21%で10分間のベースラインの後, FiO₂ 100%で10分間計測し, 続いてECMOへの灌流を開始し10分間の計測を行った. 最後に, 血管拡張薬(ニトログリセリンおよびα1, 2受容体拮抗薬)を血管内に投与して10分間の計測を行った. ECMOがガス交換に及ぼす影響については, 血管拡張薬投与直前に動脈血を採取し, ガス分析 (VetStat, IDEXX) を行い PaO₂に加えて動脈血二酸化炭素分圧 (PaCO₂), 動脈血酸素飽和度 (PaO₂), ヘモグロビン (Hb), 動脈血酸素含有量 (CaO₂)

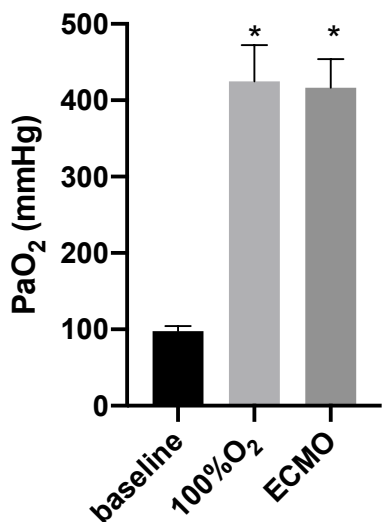


図3. 動脈酸素分圧

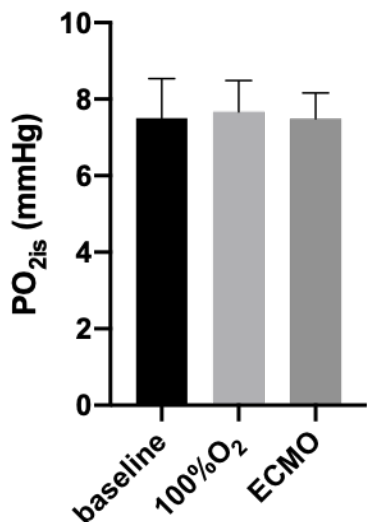


図4. 骨格筋間質分圧(PO_{2is})

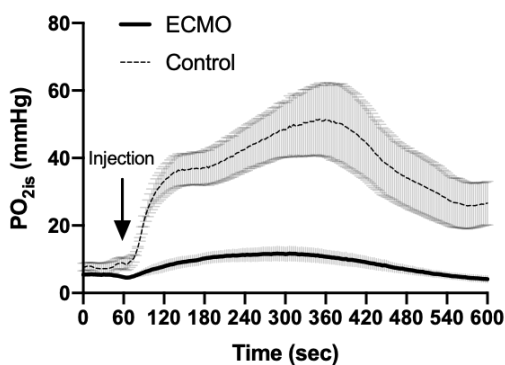


図5. 血管拡張薬投与後の骨格筋間質分圧(PO_{2is})の変化. 矢印の時点で投与.

4. 研究成果

ベースラインと比べて, FiO₂ 100%およびECMO中のPaO₂は有意に高値を示した (99±9 vs. 454±56 vs. 418±74 mmHg, ベースライン vs. FiO₂ 100% vs. ECMO, P<0.01; 図3). 一方で, 骨格筋間質における酸素分圧をみると, 各条件間でPO_{2is}は差を認めなかった (7.5±1.0 vs. 7.7±0.8 vs. 7.5±0.7 mmHg, ベースライン vs. FiO₂ 100% vs. ECMO; 図4). 血管拡張薬の投与によりPO_{2is}は一過性に上昇し, 最高で12±2 mmHgまで増加した (P<0.01 vs. baseline). しかしながら, ECMO処置をしていないcontrol群と比較すると, 血管拡張薬投与後のPO_{2is}は, controlと比べてECMOでは50%以下に減少していた.

以上をまとめると, 本研究の成果として体外式膜型人工肺 (ECMO) を小動物に導入し, 骨格筋の酸素動態を計測することに成功した. 本研究で明らかとなったことは, ECMOの高いガス交換能により, 動脈血は高度に酸素化された. しかしながら, 骨格筋の酸素分圧をみると, ECMOによって高酸素血症となった後においても, ベースラインから変化を認めなかった. 以上のことから, ECMO中に骨格筋の酸素動態を一定に調整する機構が働いていると考えられるが, その詳細は不明である. 我々の予備実験によると, 高酸素血症に至ったラットの骨格筋毛細血管血流は顕著に減少することが明らかとなった (2021年の国際学会 AsiaPrevent で発表). また, この背景には, 微小血管による血流調節機構が存在している可能性がある. ECMOモデルラットにおいても, 図5に示す通り, 血管拡張薬を投与すると骨格筋間質の酸素分圧は増加することが明らかとなった. ただし, その増加の程度をみると, コントロールと比較してECMOで顕著に制限されていることから, 何らかの理由でECMOモデルラットの骨格筋においては血流調節に障害をきたしている可能性がある.

臨床現場においては, ECMO導入患者に対して骨格筋萎縮を予防するために早期離床や物理療法, 歩行練習などが実施される. その際に, 過度な筋疲労を回避するためには運動時に適切な骨格筋の血流増加応答が必要となる. 本研究はあくまでも安静時の条件ではあるが, ECMO患者のリハビリテーション進行を阻害する因子の一つとして, 骨格筋への血流・酸素供給の減少が影響する可能性が考えられた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hotta Kazuki, Batchelor Wayne B., Graven James, Dahya Vishal, Noel Thomas E., Ghai Akash, Katopodis John N., Dixon William C., Andrews Rebecca, Pragle Aimee, Chheda Jegghna, Liberatore Lia, Behnke Brad J., Muller-Delp Judy	4. 巻 20
2. 論文標題 Daily Passive Muscle Stretching Improves Flow-Mediated Dilation of Popliteal Artery and 6-minute Walk Test in Elderly Patients with Stable Symptomatic Peripheral Artery Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cardiovascular Revascularization Medicine	6. 最初と最後の頁 642 ~ 648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carrev.2019.05.003	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

1. 著者名 Morishita Shinichiro, Tsubaki Atsuhiko, Hotta Kazuki, Fu JackB, Fuji Shigeo	4. 巻 2
2. 論文標題 The benefit of exercise in patients who undergo allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of the International Society of Physical and Rehabilitation Medicine	6. 最初と最後の頁 54 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/jisprm.jisprm_2_19	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

1. 著者名 Shimotsu Rie, Hotta Kzuki, Ikegami Ryo, Asamura Tomoyo, Tabuchi Ayaka, Masamoto Kazuto, Yagishita Kazuyoshi, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 320
2. 論文標題 Vascular permeability of skeletal muscle microvessels in rat arterial ligation model: in vivo analysis using two-photon laser scanning microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R972 ~ R983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00135.2020	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀田一樹, 白山 彰人, 伊藤 有紀, 佐藤 大地, 森下 慎一郎, 椿 淳裕
2. 発表標題 自転車サイクリング運動中の上腕動脈における血流増加応答は背臥位姿勢で顕著である
3. 学会等名 第10回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀田一樹, 小島 将, 森下慎一郎, 椿 淳裕
2. 発表標題 近赤外分光法で得られた反応性充血の時定数は筋微小循環を反映する
3. 学会等名 心臓リハビリテーション学会 第4回関東甲信越支部地方会心臓リハビリテーション学会 第4回関東甲信越支部地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Hotta, Sho Kojima, Shinichiro Morishita, Atsuhiko Tsubaki
2. 発表標題 keletal muscle stretching prolongs time constant of reactive hyperemia detected by a multi-channel near-infrared spectroscopy in healthy male volunteers
3. 学会等名 The International Society on Oxygen Transport to Tissue
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuki Hotta, Rie Shimotsu, Kazuto Masamoto, Kazuyoshi Yagishita, Brad J Behnke, David C Poole, Yutaka Kano
2. 発表標題 The Onset of Exercise-induced Microvascular Hyperpermeability is Delayed in Diabetic Skeletal Muscle: In Vivo Imaging Using Two-Photon Laser Scanning Microscopy
3. 学会等名 Experimental Biology
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 堀田一樹	4. 発行年 2020年
2. 出版社 MEDICAL VIEW	5. 総ページ数 358
3. 書名 Crosslink 理学療法学テキスト 内部障害理学療法学. 解良武士, 椿淳裕 (編集)	

1. 著者名 音部雄平, 平野康之, 堀田千晴, 堀田一樹	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 337
3. 書名 PT・OT入門 イラストでわかる内部障害. 上杉雅之(監修), 堀江淳(編集)	

1. 著者名 堀田一樹	4. 発行年 2020年
2. 出版社 MEDICAL VIEW	5. 総ページ数 459
3. 書名 改訂第2版循環器リハビリテーションの理論と技術	

〔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
研究協力者	藤井 豊 (Fujii Yutaka)		
研究協力者	椿 淳裕 (Tsubaki Atsuhiko)		

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
---------	---------