

平成 23 年 5 月 13 日現在

機関番号 : 37116

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790615

研究課題名 (和文)

出血性ショック時の肺障害の重症度判定・死因診断における好中球の評価

研究課題名 (英文)

Role of neutrophils on diagnosis of the severity in lung dysfunction following hemorrhagic shock

研究代表者

佐藤 寛晃 (SATO HIROAKI)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 50441845

研究成果の概要 (和文) :

重症度の異なる 4 群の出血性ショックモデルを作製し, 同ショック時の肺障害の重症度と好中球の出現頻度との関係について検討を行った。出血後, 炎症性サイトカインである tumor-necrosis factor (TNF)- α および interleukin (IL)- 1β の mRNA の肺実質における発現および肺静脈血中濃度が出血量の増加に応じて強く上昇し, 出血 5 時間後の肺実質における好中球の出現頻度も増加した。また, 機能的肺障害を反映する partial pressure of arterial oxygen (PaO₂) および alveolar-arterial oxygen tension difference (A-aDO₂) は出血量に応じて増悪し, 器質的肺障害を反映する血清 lactic dehydrogenase-3 isozyme (LDH-3) 濃度は出血量の増加に応じて上昇した。出血 5 時間後では好中球の出現頻度と血清 LDH-3 濃度とに正の相関関係が認められ, 出血性ショック後の肺障害の重症度と好中球の出現頻度との関連性を明らかにすることができ, 出血量の増加に応じた炎症性サイトカインの上昇が一連の病態に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) :

We examined the role of neutrophils on diagnosis of the severity in lung dysfunction by grading four groups of severity of bleeding in rats. As the amount of bleeding increased, the expression of mRNA for TNF- α and IL- 1β in the lung tissue and the pulmonary serum levels of both cytokines increased progressively up to 5 hours, and the frequency of activated neutrophils increased likewise. The lung dysfunction indices serum lactic dehydrogenase-3 isozyme (LDH-3), partial pressure of arterial oxygen (PaO₂) and alveolar-arterial oxygen tension difference (A-aDO₂) in blood deteriorated as the amount of bleeding increased. The frequency of activated neutrophils in the lung correlated well with the LDH-3 level 5 hours after hemorrhagic shock. The present results demonstrate that the increases of the recruitment of neutrophils into the lung activated by proinflammatory cytokines are quantitatively related to progression of lung dysfunction following hemorrhagic shock.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 法医学

キーワード : 社会医学, サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

出血性ショックの解剖事例において、肺は液分が増加して含気が低下し、組織学的に肺胞内の浮腫、肺胞腔への出血および硝子膜形成などが観察され、いわゆる「ショック肺」に陥っている。重篤な「ショック肺」の時には、肺胞におけるガス交換能が低下し肺機能障害から死に至ることもあるので、その病態変化を明確にすることは法医診断学上重要であるが、未だ詳細な検討が見当たらないため本研究を企画した。

2. 研究の目的

これまで私は、ラット出血性ショックモデルを用いてショック後に肺障害が生じるメカニズムを検討し、(1)出血性ショック後の肺における炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 β の発現、(2)炎症性サイトカインによる好中球の肺への遊走・集簇、(3)好中球の生理活性作用による肺の機能的障害・器質的変化の発生、(4)肺実質の好中球の増加が、肺障害の器質的な診断根拠となりうる可能性などを明らかにした。

しかし、好中球の増加という器質的変化から肺障害の重症度を明確にできなければ、肺障害と死亡との因果関係を説明できないと考え、重症度の異なる4群のショックモデルを作製し、出血性ショック後の肺障害の重症度と肺実質における好中球出現頻度との関係について検討した。

3. 研究の方法

おもに、次の項目について検討した。

- (1) 出血量の異なる出血性ショックモデルの作製
- (2) 血圧・心拍数の変化
- (3) 肺における炎症性サイトカイン発現
- (4) 機能的肺障害
- (5) 器質的肺障害
- (6) 好中球発現の免疫組織学的検討

これらの方法論を、検討項目別に順次記載する。

- (1) 出血量の異なる出血性ショックモデルの作製

出血性ショックモデルには、雄 Wistar ラット(体重 250~400g)を使用した。ウレタン(470mg/体重 kg)とクロラロース(23mg/体重 kg)の腹腔内投与により麻酔し、適温(37 \pm 1 $^{\circ}$ C)に維持された実験台の上に仰向けにし、自発呼吸が可能な状態で固定した。麻酔導入後に左大腿動脈に3フレンチのポリエチレンカテーテルを挿入し、一連の操作の終了40分後から20分間かけて出血させた。

実験モデルは

- 出血させない Sham 群
 - 全血液量の 16.7% (1.1375ml/体重 100g) を出血させる群 (以下、「16.7%群」という)
 - 全血液量の 25% (1.625ml/体重 100g) を出血させる群 (以下、「25%群」という)
 - 全血液量の 33% (2.145ml/体重 100g) を出血させる群 (以下、「33%群」という)
- の計4群において各群5匹ずつ実験を行った。

出血1, 3 および5時間後に動脈血を約1ml採取し、瀉血によってラットを殺した後、開胸して肺静脈血を約2ml および肺を採取した。肺静脈血は3,000回転/10分間遠心分離して血清のみを試料とし、血清と肺は-80 $^{\circ}$ Cで保存した。また、器質的変化や免疫組織学的検討を行うために肺の一部はホルマリンにて固定した。

(2) 血圧・心拍数の変化

左大腿動脈に挿入されたカテーテルの一端を圧センサーに接続し、持続的に動脈圧を測定し、同時に第II誘導心電図により心拍数を測定した。これらの結果は30秒ごとにポリグラフ装置に記録され、20分ごとに数値化した。

(3) 肺における炎症性サイトカイン発現

炎症性サイトカインのうち最も早期に発現し、好中球の活性化や集簇など様々な炎症反応を引き起こす TNF- α と IL-1 β の肺における mRNA レベルでの発現の経時的変化を RT-PCR 法を用いて検討した。検出されたバンドと GAPDH のバンドとの比を Scion Image Beta 4.02 によって解析して数値化した。また、採取した肺静脈血中における TNF- α と IL-1 β の濃度を ELISA 法によって測定した。

(4) 機能的肺障害

動脈血を動脈血ガス分析装置 (ABL 520 Blood Gas System) にて測定し、動脈血酸素分圧 (PaO₂) および肺動脈血酸素較差 (A-aDO₂) を用いて呼吸機能を評価した。

(5) 器質的肺傷害

急性肺傷害の時に上昇する LDH-3 の肺静脈血中濃度を電気泳動法によって測定することにより評価した。

(6) 好中球発現の免疫組織学的検討

肺の組織切片を作製し、好中球に特異的に存在する Myeloperoxidase (MPO) を免疫組織学的に染色して可視化し、組織 250 μ m² の範囲に出現する好中球の数をカウントしグラフ化した。

4. 研究成果

研究成果を前記の検討項目別に順次記載する。

(1) 出血量の異なる出血性ショックモデルの作製

前記ラット出血性ショックモデルにおいて、問題なく実験を行うことができた。

(2) 血圧・心拍数の変化

平均血圧の経時的変化を示す(図1)なお、*: $p<0.01$, **: $p<0.001$ を示している(以下同じ)。Sham群は実験を通じて血圧の変化をほとんど認めなかった。出血群では、出血直後に出血量の増加に応じて強く低下し(16.7%群: $100\pm 3\text{mmHg}$ から $45\pm 3\text{mmHg}$, 25%群: $105\pm 6\text{mmHg}$ から $36\pm 3\text{mmHg}$, 33%群: $105\pm 5\text{mmHg}$ から $31\pm 3\text{mmHg}$), 約60分後には一旦回復したが、約180分後以降には再び出血量の増加に応じて低下した。

心拍数(図2)も平均血圧と同様にSham群は実験を通じて血圧の変化をほとんど認めなかった。出血群では、出血直後に出血量の増加に応じて強く低下し(16.7%: $412\pm 5\text{bpm}$ から $312\pm 11\text{bpm}$, 25%群: $424\pm 12\text{bpm}$ から $261\pm 19\text{bpm}$, 33%群: $422\pm 7\text{bpm}$ から $268\pm 10\text{bpm}$), 約60分後には一旦回復したが、約280分後以降に再び出血量の増加に応じて低下した。

(3) 肺における炎症性サイトカイン発現

TNF- α のmRNAレベルでの肺実質における発現と肺静脈血中濃度との経時的変化を示す(図3)。Sham群は実験を通じて発現の変化をほとんど認めなかった。出血群におけるTNF- α mRNAの発現は出血1時間後で最も強く上昇し、その程度は出血量の増加に応じて高度で(16.7%群: 2.03 ± 0.34 , 25%群: 3.79 ± 0.61 , 33%群: 4.03 ± 0.36), その後は徐々に低下したが、出血5時間後まで出血量の増加に応じて高度に上昇していた。

肺静脈血中TNF- α 濃度も同様に、出血群は出血1時間後で出血量の増加に応じて強く上昇し(16.7%群: $74.4\pm 29.3\text{pg/ml}$, 25%群: $117.6\pm 23.4\text{pg/ml}$, 33%群: $148.1\pm 16.1\text{pg/ml}$), その後は徐々に低下したが、出血量の増加に応じて強く上昇していた。

IL-1 β のmRNAレベルでの肺実質における発現と肺静脈血中濃度との経時的変化を示す(図4)。Sham群は実験を通じて発現の変化をほとんど認めなかった。出血群におけるIL-1 β mRNAの発現は出血1時間後から有意に上昇し3時間後で最も強く上昇し、その程度は出血量の増加に応じて高度で(16.7%群: 3.35 ± 0.63 , 25%群: 5.23 ± 0.55 , 33%群: 5.68 ± 0.57), 5時間後には統計学的に有意ではなかったが、出血量の増加に応じて高度に上昇していた。

肺静脈血中IL-1 β 濃度も同様に、出血3時間後で出血量の増加に応じて強く上昇し(16.7%群: $126.0\pm 56.7\text{pg/ml}$, 25%群: $250.0\pm 53.6\text{pg/ml}$, 33%群: $366.4\pm 63.7\text{pg/ml}$), 5時間後には低下したが、出血量の増加に応じて強く上昇した。

(4) 機能的肺障害

動脈血酸素分圧(PaO₂)および肺動脈血酸素較差(A-aDO₂)の経時的変化を示す(図5)。

Sham群のPaO₂は実験を通じて変化をほとんど認めなかった。出血群では出血3時間後までは各群でほとんど変化を認めなかったが、出血5時間後には25%群と33%群は有意に低下し、出血量の増加に応じて強く低下した(25%群: $77.1\pm 3.5\text{mmHg}$, 33%群: $61.9\pm 4.4\text{mmHg}$)。

A-aDO₂もSham群において経時的な変化をほとんど認めなかった。出血群では出血3時間後までは各群でほとんど変化を認めなかったが、出血5時間後には25%群と33%群は有意に上昇し、出血量の増加に応じて強く上昇した(25%群: $18.4\pm 2.7\text{mmHg}$, 33%群: $26.0\pm 10.7\text{mmHg}$)。

(5) 器質的肺傷害

血清LDH-3濃度の経時的変化を示す(図6)。Sham群は実験を通じて変化をほとんど認めなかった。出血群では経時的に、特に出血5時間後で有意に上昇し、出血量の増加に応じて強く上昇した(16.7%群: $13.0\pm 2.1\text{IU/l}$, 25%群: $32.6\pm 8.5\text{IU/l}$, 33%群: $47.4\pm 12.6\text{IU/l}$)。

(6) 好中球発現の免疫組織学的検討

出血5時間後の肺の組織像(MPO染色)を示す(図7)。好中球は茶色に染色されている。Sham群には血管腔や間質に好中球の出現がわずかに認められた。一方、出血群では血管腔や間質の好中球は有意に増加していた。

好中球の単位面積あたりの平均出現頻度を示す(図8)。Sham群は実験を通じて増加をほとんど認めなかった。出血群では出血5時間後で有意に上昇し、その程度は出血量の増加に応じて高度であった(16.7%群: 2.21 ± 0.9 個/ $250\mu\text{m}^2$, 25%群: 3.44 ± 1.01 個/ $250\mu\text{m}^2$, 33%群: 5.07 ± 1.93 個/ $250\mu\text{m}^2$)。

出血5時間後の血清LDH-3濃度と好中球の出現頻度との相関関係を示す(図9)。両者の間には正の相関関係が認められた($r=0.96$)。

まとめ

出血性ショック後の肺障害の重症度と免疫組織学的な好中球の出現頻度との関連性を明確にすることができ、肺障害と死亡との因果関係を器質的に説明できる可能性が示された。

さらに、その病態メカニズムとして出血量の増加に応じて $TNF-\alpha$ や $IL-1\beta$ などの炎症性サイトカインの上昇と、好中球の遊走・集簇などに基づく一連の炎症性臓器障害の増悪が関与することが明らかとなった。

図1 平均血圧の経時的変化

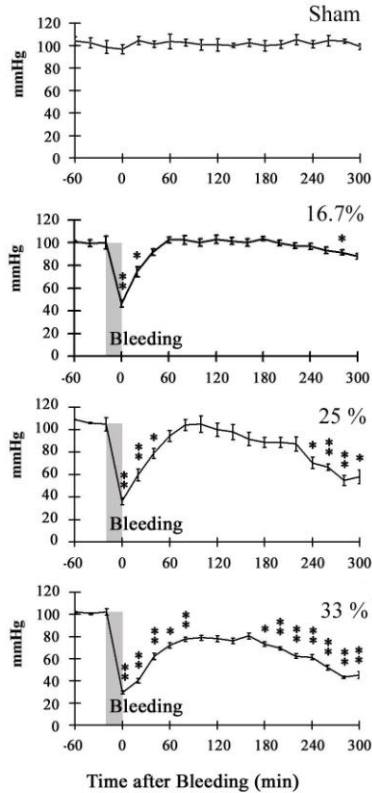


図2 心拍数の経時的変化

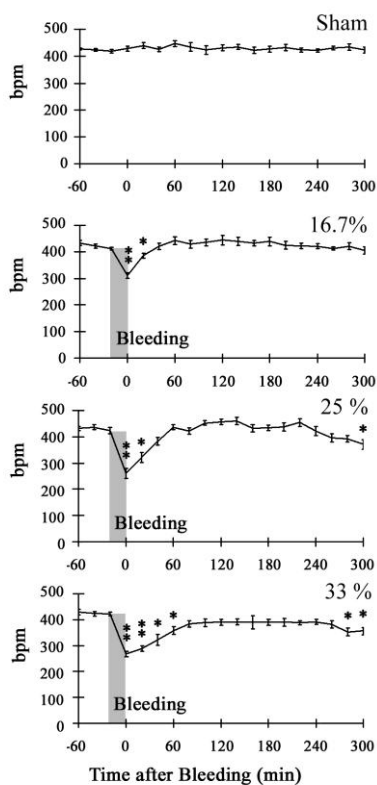


図3 肺における $TNF-\alpha$ の発現

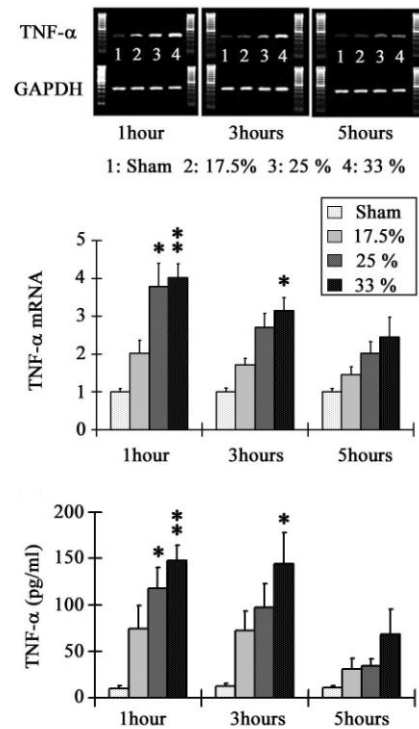


図4 肺における $IL-1\beta$ の発現

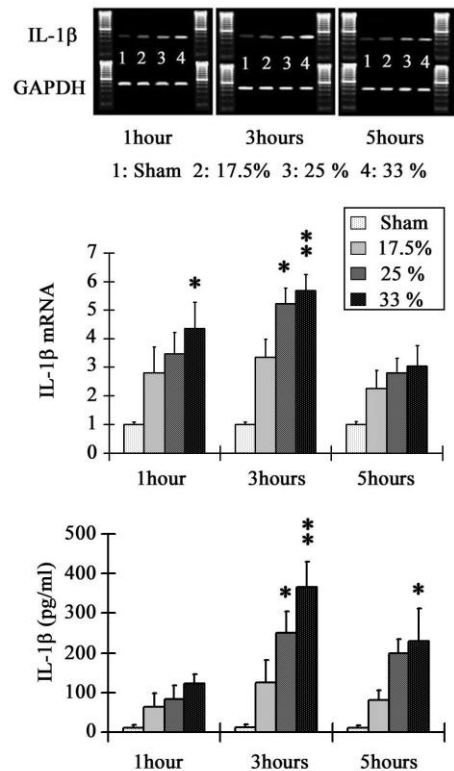


図 5 動脈血酸素分圧 (PaO₂) および肺動脈血酸素較差 (A-aDO₂) の経時変化

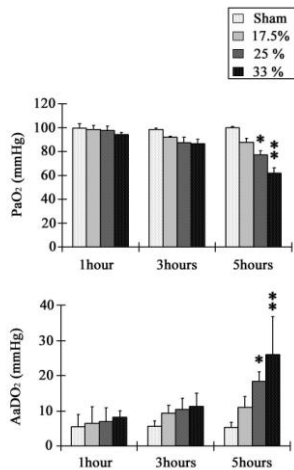


図 6 血清 LDH-3 濃度の経時変化

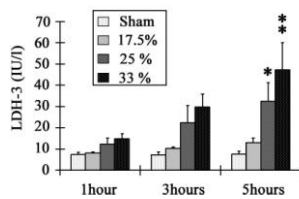


図 7 出血 5 時間後の肺の組織像 (MPO 染色)

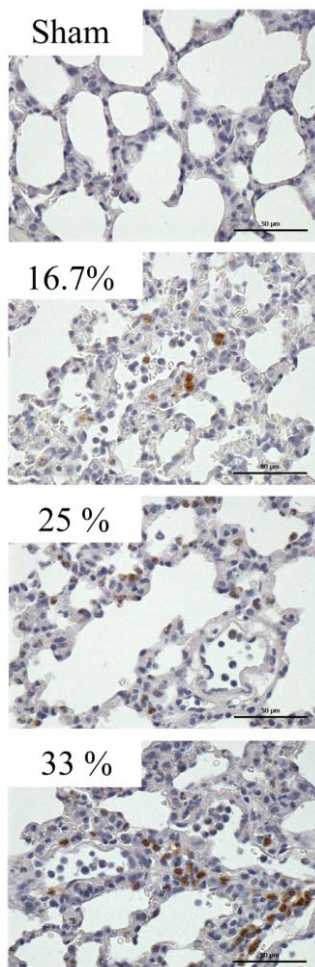


図 8 肺の単位面積あたりの好中球の出現頻度

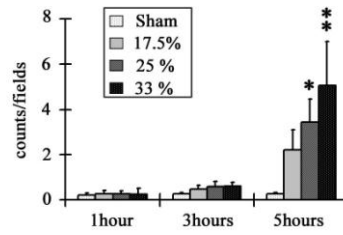
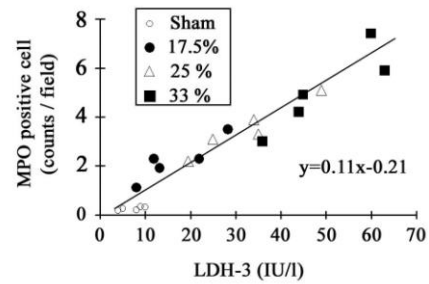


図 9 出血 5 時間後の血清 LDH-3 濃度と好中球の出現頻度との相関関係



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 1 件)

H Sato, T Tanaka, T Kita, N Tanaka. A quantitative study of lung dysfunction following hemorrhagic shock in rats. International journal of experimental pathology, 査読有, 91:267~275, 2010

[学会発表] (計 1 件)

佐藤 寛晃, 山口 裕樹, 笠井 謙多郎, 田中 敏子, 北 敏郎, 田中 宣幸: 出血性ショック時の肺障害の重症度判定における好中球の評価. 第 93 次日本法医学会総会, 2009 年 5 月 14 日, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 寛晃 (SATO HIROAKI)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50441845