

機関番号：20101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791770

研究課題名 (和文)：乳酸値 (*d*体) を用いた腸管虚血・壊死の早期診断法の確立研究課題名 (英文)：Establishment of the early diagnostic method of mesenteric ischemia using *d*-lactate

研究代表者：

異 博臣 (TATSUMI HIROOMI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70404613

研究成果の概要 (和文)：

ラットの腸管虚血モデルと下肢虚血モデルを作成し、採取した血漿中の *l* 体および *d* 体乳酸濃度の経時的変化を測定した。腸管虚血で特異的に産生される *d* 体乳酸は腸管虚血群でのみ阻血後 30 分以降に上昇したのに対し、全身の組織虚血に伴って産生される *l* 体乳酸は両群ともに高値で推移した。*d* 体乳酸が腸管虚血・壊死の鋭敏なマーカーとなる可能性が示され、迅速診断キットの開発により早期診断が可能となると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

We measured the change in plasma levels of *l*-lactic acid and *d*-lactic acid, using a rat mesenteric and iliac ischemia model. The plasma level of *d*-lactic acid, which is specifically produced in mesenteric ischemia, increased from 30 minutes after ischemia only in mesenteric ischemia group. The rise in plasma level of *l*-lactic acid, which is produced in general ischemia of the whole body, was continuously observed in the both groups. The possibility that *d*-lactic acid become a sensitive marker of mesenteric ischemia and necrosis was indicated, and it was thought that a quick diagnostic kit enabled early diagnosis of mesenteric ischemia and necrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学

## 1. 研究開始当初の背景

嫌気性代謝の最終産物である乳酸は、組織の酸素需給バランスを反映する。心拍出量や酸素飽和度などの酸素供給量を規定する因子が障害される病態で、血中乳酸値 (以下、乳酸値) が経時的に増加あるいは高値が持続する場合には、生命予後と強く関連する。同

様に虚血による乳酸産生が増加する急性腸管虚血では、補助診断として乳酸値の有用性が報告されているが、経時的な推移と腸管虚血の診断・予後との関連については十分に検討されていない。

## (1) 乳酸値の上昇

心拍出量が抑制される高度の低拍出量症候群 (low output syndrome; LOS) よりも、ヘモグロビン (Hb) と心拍出量がともに抑制され、酸素供給量が異常に低下する出血性ショックにおいて、乳酸値は 50mg/dL の異常増加を認める。しかし、Hb が維持され、高心拍出量を呈する初期の敗血症性ショックで 50mg/dL を超えることは極めて稀なことである。

#### (2) 腸管虚血と乳酸値の上昇

臨床的には、高度の LOS や出血性ショックがないにもかかわらず、乳酸値が 50mg/dL 以上を呈する敗血症であれば、腸管虚血を疑い、造影 CT などの画像検査を行い、必要な場合は試験開腹を行うべきとされている。Kurimoto らは、腹部大動脈瘤術後の腸管虚血合併症例では乳酸値が最低値で 50mg/dL (非合併例の最高値は 21mg/dL) であったと報告している。われわれの施設でも、カテコラミンを必要とするような敗血症性ショックにおいて、臨床症状や高乳酸血症 (>50mg/dL) から腸管虚血を疑い、造影 CT 検査後に試験開腹し、腸管壊死と確定診断しえた症例を経験している。これらの症例では高度の LOS や出血性ショックを合併していないにもかかわらず、乳酸値は病状の進行とともに急速に上昇し、その多くを失っている。また、乳酸値の変化は同じく腸管虚血時に上昇する AST、LDH の変化よりも早い段階で認められた。

#### (3) 乳酸値の利点・欠点

現在では、乳酸値は血液ガス分析の際に同時に測定可能であるため、経時的变化を簡便に捉えられる利点がある。組織が虚血に陥った場合、乳酸値の上昇とともに代謝性アシドーシスの進行 (pH 低下、Base Excess [BE] 低下) を認めるが、pH や BE は人工呼吸器の設定や血液浄化法・炭酸水素ナトリウム投与などの治療により病態自体が改善していなくても容易に変動する。一方、乳酸値はこのような治療による影響をほとんど受けない。しかし、乳酸値は組織酸素代謝の指標であるため、高度の LOS や出血性ショックなどでも上昇するなど特異性は必ずしも高くなく、また、高血糖の影響も受ける。

われわれが経験した症例の中には、乳酸値が 50mg/dL 以上となった時点で腸管虚血を疑い、肉眼的に腸管壊死と確定診断した段階では 100mg/dL を超えていた症例も多い。これらの症例はいずれも壊死腸管の完全切除が困難であったため、虚血・壊死部位を残したまま経過を観察した。その結果、一旦上昇した乳酸値は腸管虚血が解除されず、しかも循環動態が改善していないにもかかわらず、緩徐に低下するという経過をたどった。この乳酸値の推移から、腸管虚血は存在するが血流

が残存している時点では腸管で産生された乳酸が門脈血流を介して体循環へと放出されるが、虚血部位の血流が完全に途絶すると、洗い出しが行われなくなるため壊死腸管からの乳酸の流出が低下し、乳酸値が低下するとわれわれは推測している。また、これらの症例はいずれも死亡直前に乳酸値の再上昇を認めたが、これは循環不全の進行に伴う全身の組織からの乳酸産生増加と、肝血流低下および肝細胞障害に伴う乳酸代謝の低下を反映しているものと考えられる。したがって、一旦高値となった乳酸値が低下した場合は、臨床経過、循環動態、画像診断や他の検査データなどとともに、腸管虚血の完成か改善かの鑑別を総合的に判断しなければならない。また、腸管虚血の範囲によって乳酸産生量が変化することも考えられる。

#### (4) 乳酸の光学異性体

乳酸には *l* 体と *d* 体の光学異性体が存在する。*l* 体は虚血腸管に伴う嫌気性代謝によっても産生されるが、あらゆる臓器において低酸素の状況で増加するため、心停止など重篤な循環不全を伴う患者では常に高値を示す。一方、細菌由来の *d* 体は哺乳類の組織では産生されず、極めて緩徐に代謝される。*d* 体は腸管組織に特異的なものではなく、腸管虚血そのものを示すわけではないが、腸管虚血による粘膜障害が生じ、腸内細菌の異常増殖が起こると門脈血流へ放出される。すなわち、*d* 体は腸管虚血に特異的なマーカーとなりうる。現在は迅速に両者を区別して測定することはできないため、早期診断には応用できないが、*d* 体のみを迅速に測定可能となれば小範囲の腸管虚血を高感度で検出できる可能性がある。

以上より、高度の LOS や出血性ショックがなく乳酸値が 50mg/dL 以上に増加する場合、腸管虚血を疑い、画像診断や試験開腹などを行うことが必要である。その際、乳酸値の上昇とともにその推移が重要となるが、一旦上昇した乳酸値の低下は完全閉塞による虚血の完成の可能性もあり、循環動態を含めた注意深い観察が重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、乳酸の光学異性体の *l* 体、*d* 体の特異的な測定法を確立する。また、腸管虚血・壊死時における、血中乳酸 (*l* 体、*d* 体) 値の推移を把握することにより、早期の腸管虚血のモニターとしての乳酸値の有用性を確立し、その結果から、腸管虚血・壊死の新たな診断法の臨床応用の可能性を探求する。

## 3. 研究の方法

### (1) 虚血モデルの作成

ラット (Wistar, 体重 250g, ♂) に吸入麻酔器で麻酔薬 (5%イソフルラン) を吸入させ、気管切開を行い、人工呼吸器を装着した。その後、腹部正中切開により開腹した。上腸間膜動脈の結紮による腸管虚血モデル、腸骨動脈の結紮による下肢虚血モデルを作成し、①虚血モデル作成なし (開腹時、下大静脈より採血)、②作成後 30 分、③60 分、④120 分後に下大静脈から採血し、血漿を分離した。この間、吸入麻酔を継続し、人工呼吸器で管理した。採血後、麻酔薬を過量吸入させ犠死させた。

## (2) 乳酸の測定原理

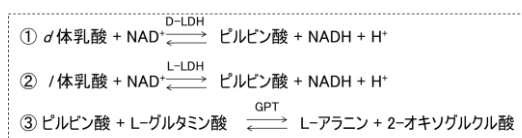


図1 乳酸の測定原理

*d*体および *l*体乳酸の量は、図1の①、②により生成した NADH の量に相当する。したがって NADH の吸光度の増加を測定し、乳酸の増加量とした。①、②の平衡は乳酸の方向に傾いているので、③によりピルビン酸を消費させた。

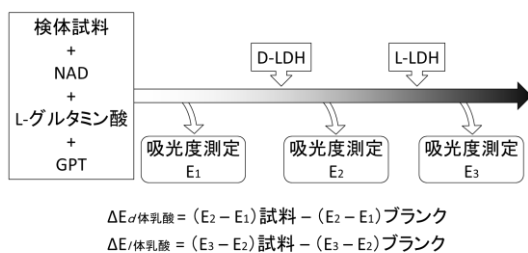


図2 乳酸値の測定方法

検体試料に NAD、L-グルタミン酸、GPT を加えて、マイクロプレートリーダーで吸光度 (E1) を測定した。その後、D-LDH を添加して、吸光度 (E2) を測定した。さらに、L-LDH を添加して、吸光度 (E3) を測定した (図2)。測定には F-キット ((株) J. K. インターナショナル) を用いた。ブランクおよび試料の吸光度差から  $\Delta E$  を求めた。

## 4. 研究成果

### (1) 虚血モデル



図3 腸管虚血モデル(左)および下肢虚血モデル(右)

腸管虚血モデルと下肢虚血モデルの写真を示す (図3)。腸管虚血モデルでは、阻血開

始から 30 分後には小腸壁の一部が暗赤色に変化し、その変化は徐々に広範囲となり、小腸全体の拡張が増強した。下肢虚血モデルでは、足底の色調が健側ではピンク色であるのに対し、阻血側は白色に変化した。

### (2) *l*体および *d*体乳酸の測定法の確立

乳酸の2つの光学異性体は F-キットを応用して測定した。それぞれ *l*体乳酸、*d*体乳酸のみを溶解し濃度を調整した溶液を用いて、吸光度を測定し、 $\Delta E_{l\text{-乳酸}}$  と  $\Delta E_{d\text{-乳酸}}$  と濃度をプロットした検量線を作成した。

### (3) *l*体乳酸の推移

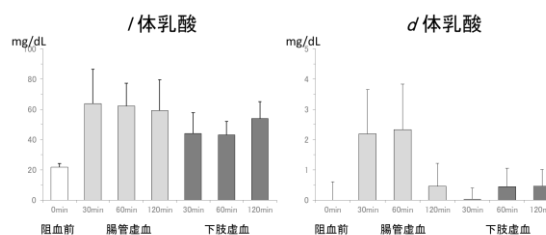


図4 乳酸値の推移

*l*体乳酸は、腸管虚血群で 30 分後から阻血前に比べて高値となり、60 分後、120 分後も高値のまま持続した (図4左)。下肢虚血群も同様に 30 分後以降高値のまま経過した。腸管虚血群、下肢虚血群の間に差はなかった。

### (4) *d*体乳酸の推移

*d*体乳酸は阻血前はほとんど検出されず、腸管虚血群で 30 分後から高値となり、60 分後まで高値のまま経過した後、120 分後には低下した (図4右)。一方、下肢虚血群では 30 分後は阻血前と同様に極めて低値であった。60 分後、120 分後は軽度上昇したが、その濃度は腸管虚血群の 30 分後および 60 分後の 1/5 程度であった。

### (5) 考察とまとめ

*l*体乳酸は虚血に伴い全身の臓器で産生され、非特異的であるため、腸管虚血群、下肢虚血群ともに早期から上昇した。通常、血液ガス分析などで測定される乳酸値は *l*体乳酸のみを測定しているため、臨床的に乳酸値の上昇を認めた場合、腸管虚血を他の高乳酸血症を来す疾患 (LOS など) から鑑別することは困難である。一方、*d*体乳酸は腸管虚血に伴い腸内細菌から産生されるため、腸管虚血群のみで特異的に早期から上昇し、下肢虚血群では変化しなかった。腸管虚血時には AST や LDH などの他の生化学的パラメーターも高値を呈するが、これらの変化に比べて乳酸の上昇は鋭敏であるため、*d*体乳酸は腸管虚血・壊死に特異的で鋭敏なマーカーとなりうると考えられた。

本研究では、NADH を介した間接的な手法に

より乳酸の2つの光学異性体を測定することが可能であった。腸管虚血・壊死では、速やかに診断・治療することにより腸管の切除範囲を軽減することができるため、高度の侵襲を伴う大量腸管切除後の臓器障害・臓器不全や、術後の短腸症候群を回避することが可能となる。今回は食品に含まれる乳酸を測定するためのF-キットを応用することにより *l* 体および *d* 体乳酸値を測定したが、今後、この測定方法を応用して *d* 体乳酸の迅速測定キットの開発が実現できれば、高乳酸血症時を呈して腸管虚血・壊死が疑われる症例の早期診断・治療が可能となると考えられた。

#### 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)

〔学会発表〕(計1件)

巽 博臣、吉田真一郎、升田好樹、後藤京子、名和由布子、巖 玲子、今泉 均、浅井康文：腸管虚血・壊死モデルにおける *d* 体乳酸測定の実験的検討。第38回日本集中治療医学会学術集会。2011.2.24-26、横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

巽 博臣 (TATSUMI HIROOMI)

札幌医科大学・救急・集中治療医学講座・助教

研究者番号：70404613