

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09059

研究課題名(和文) 出血性ショック下大動脈遮断解除後臓器障害おける病態解明

研究課題名(英文) Clarification of the pathology of organ damage after aortic declamping in hemorrhagic shock

研究代表者

安松 比呂志 (YASUMATSU, HIROSHI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：80614809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：重症外傷に対する胸部下行大動脈遮断解除後の病態を解明するため、本研究では実臨床に即したラットモデルを作成し病態解明について探求した。出血性ショック下のラットは救命率が非常に低く実験モデルとしては成り立たず、大動脈遮断モデルを作成した。これによる血行動態や循環不全のデータを集積した。また大動脈遮断による局所の虚血再灌流障害を調べるためにcaspaseと特異的に結合する蛍光試薬であるFLIVOを使用して、脳・心・肺でのアポトーシス変化をとらえるためIVISイメージングシステムを使用した。有意な結果は得られなかったが、大動脈遮断モデルは安定したモデルとなり得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈遮断解除後の病態は非常に複雑な要因がからんでいることが予想され、本研究では有意な結果が得られなかった。本研究を今後も遂行していくため、ある程度安定した大動脈遮断モデルは作成できたためここに学術的意義はあった。重症外傷患者の救命率を上げるためには大動脈遮断解除後の病態解明は必要であり、社会的意義があるものと考えられる。今回の研究では有意な結果は得られなかったものの、今後も研究は継続していくことに意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the pathology following release of the descending thoracic aorta clamp in severe trauma, this study created a rat model based on actual clinical practice and sought to clarify the pathology.

Rats in hemorrhagic shock have an extremely low survival rate and are not viable as an experimental model, so an aortic clamp model was created. Data on hemodynamics and circulatory failure resulting from this model was accumulated. In addition, FLIVO, a fluorescent reagent that specifically binds to caspase, was used to investigate local ischemia-reperfusion injury due to aortic clamping, and an IVIS imaging system was used to capture apoptotic changes in the brain, heart, and lungs. Although no significant results were obtained, the aortic clamp model was a stable model.

研究分野：外傷外科学

キーワード：胸部下行大動脈遮断 蘇生的開胸術 虚血再灌流障害

## 1. 研究開始当初の背景

重症体幹部外傷患者に対して、脳・冠血流の維持と横隔膜以下体幹部出血コントロールを目的に蘇生的開胸術による胸部下行大動脈遮断が行われる(図1)。開胸止血術、開腹止血術後に大動脈遮断を解除するが、再灌流障害による末梢血管拡張などにより循環動態を維持できず遮断解除が困難であることがある。また、解除が可能となったとしても引き続きの集中治療において腎障害、肝障害といった再灌流障害によると考えられる多臓器不全を呈し、救命が困難となることがある。

外傷の蘇生に関する研究は数多くあり、その中で damage control surgery や damage control resuscitation などの概念が形成され重症外傷に対する救命率は向上してきた。しかし大動脈遮断に関連した文献では、体幹部外傷に対して大動脈遮断を行った患者の生存率は 10-19.7%とその成績は決して十分ではない。当施設は重症体幹部外傷に対して大動脈遮断を積極的に行っており、近年少なからず自己心拍の再開が得られる症例が増え、当施設での開胸大動脈遮断後の 24 時間生存率は 50%、生存退院は 20%を越えるようになってきた。しかし、その中で集中治療における凝固障害や多臓器不全を呈する例を経験する様になり、以前は考えられなかった新たな問題に直面する様になった。

このような経験から大動脈遮断を行った傷病者の救命率を上げるには何が必要であるのかを考えたようになったことがこの研究の背景である。

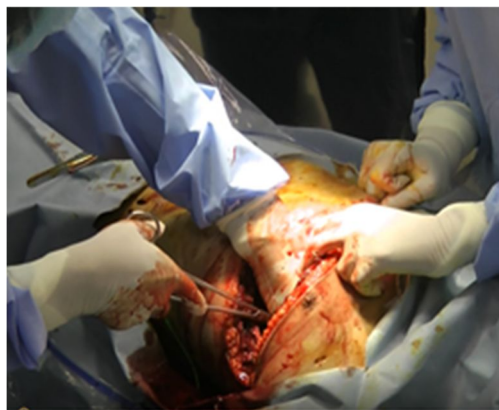


図1 蘇生的開胸術による胸部下行大動脈

## 2. 研究の目的

本研究の目的は「大動脈遮断解除後臓器障害における病態解明」である。従来、心臓外科手術などにおける再灌流障害なども報告されているが、外傷患者の病態は凝固障害や免疫応答など、より複雑であることが想定されるが、この病態における本質は解明されておらず、実験的研究や臨床報告も皆無である。

本研究では、動物を用いた出血性ショックモデルおよび大動脈遮断モデル、また臨床に即した出血性ショック下大動脈遮断モデルを作成し、各モデルが臓器に及ぼす臓器障害のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験モデル作成

1. 雄SDラットを使用し、全身麻酔をかける。

2. ラットに麻酔が十分に効いている事を確認後、頸部を切開し、頸動脈/静脈を露出、カテーテルを挿入する(図2)。動脈カテーテルは持続的血圧モニタリングに用い、静脈カテーテルは蘇生ラインとする。大腿動脈にカテーテルを挿入し脱血ラインとする。また外傷を模倣し、すべてのモデルに腹部正中切開を置く。コントロールとして正中切開後血液を採取しガス分析を行う。

下記に示す各モデルの内、決められた時点で血液採取を行い遠心分離にかけ、血漿を凍結し保存する。最低2mlの血液が必要であり、1匹ですべての段階で血液を採取することは困難であるため各々の段階で血液採取をしたら、安楽死させホルマリンによる還流固定を行う。各モデル群で最低でもn=3以上を目標としサンプルを採取した。

出血性ショックモデル(HS): 大腿動脈カテーテルより脱血し、平均動脈圧(MAP)が30mmHgとなった時点をもとに0分として、血液を採取しながらMAP30mmHgを45分間維持しショック完了とする。ショック完了の時点で全身性の虚血に陥っているため、この時点で血液採取を行うHS-S群、ショック完了後、shed bloodとその2倍の生理食塩水(NS)で120分かけて蘇生し再灌流させ血液採取を行うHS-R群。蘇生後120分観察し血液採取を行うHS-O群とする。脱血時、ショック完了時と120分蘇生後、120分観察後に血液採取を行い還流固定

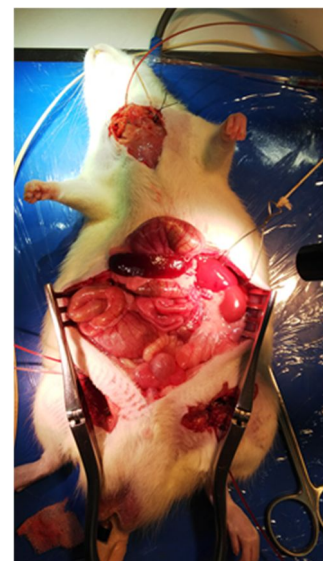


図2 カニュレーション

を行う(図3)。

大動脈遮断モデル: 同様に頸動脈/静脈、大腿動脈にカテーテルを留置する。開腹し腹腔動脈より頭側の腹部大動脈を露出し、血管クリップにより大動脈を遮断する(図3)。遮断開始を0分として30分間遮断し、その後解除する。遮断直前、遮断解除直後(A0-A群)、120分観察後(A0-O群)に血液採取を行い還流固定を行う(図6)。

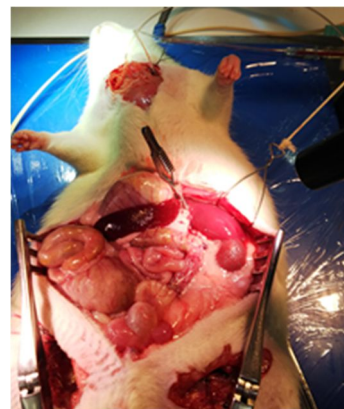


図3 横隔膜下大動脈遮断

出血性ショック+大動脈遮断モデル(HS+A0): 出血性ショック下(実験モデル)に大動脈遮断(実験モデル)を加える。ショック完了後(HS+A0-S群)に120分間の蘇生と並行して30分間腹部大動脈を遮断し、蘇生終了後(HS+A0-R群)、観察120分後(HS+A0-O群)に血液を採取する(図7)。

#### (2) 基礎データの収集

それぞれのモデルで収縮期血圧測定、血液ガス分析による循環不全の評価を行う。

#### (3) 局所臓器での虚血再灌流障害の評価

虚血再灌流障害のアポトーシスに着目し、アポトーシス反応の重要な調節因子である caspase-3 を局所臓器で検出することを試みた。活性型 caspase-3 に特異的に結合する Fluorescein v10(FLIVO)を大動脈遮断解除直前に静脈内投与をする。FLIVOにより caspase-3 が蛍光認識されるため、IVIS イメージングシステムを用いて生きたまま臓器局所のアポトーシスを検出できないか試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) モデル作成と基礎データの収集

HSモデルはMAP30mmHgを30分維持すると、pH、BEは低下し、乳酸は上昇する典型的な出血性ショックの代謝性アシドーシスを呈し、蘇生によりその数値は改善傾向となり、生存率は5/9の55.5%であった(図4)。

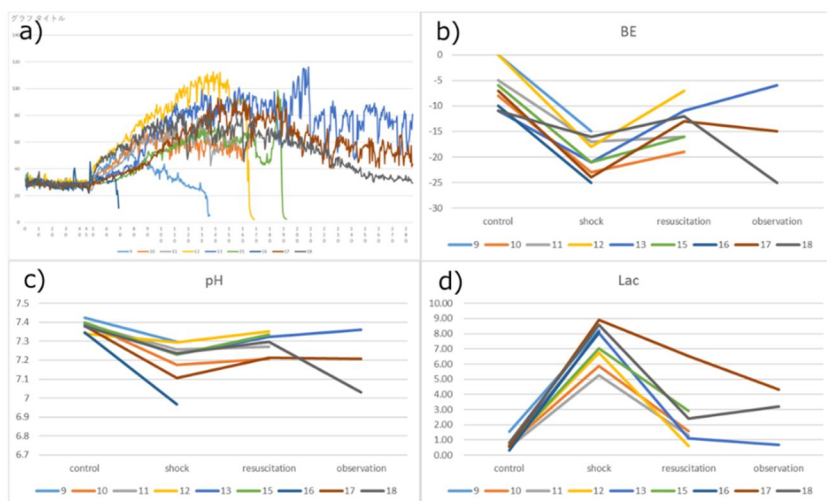


図4 HSモデルの各種データ a)収縮期血圧の時間経過、b)BE、c)pH、d)Lactate

HS+A0モデルはショック後に大動脈遮断を行うと後負荷が増大し収縮期血圧の上昇を認めた(図5a)。大動脈遮断後の蘇生でもpH、BE、乳酸値はHSと比較し改善が乏しく(図5b-d)、すべて死亡した。この後、大動脈遮断の時間やショックの程度をMAP40mmHgなど条件をいろいろと変更するも、生存率は30%にも満たずに、モデルとしては現時点では適さないと判断した。

A0モデルは30分の遮断であると生存率が50%を下回ったが、20分であると70%程度の生存が得られたため、まずは遮断20分のA0モデルを用いて以後の実験を進めた。



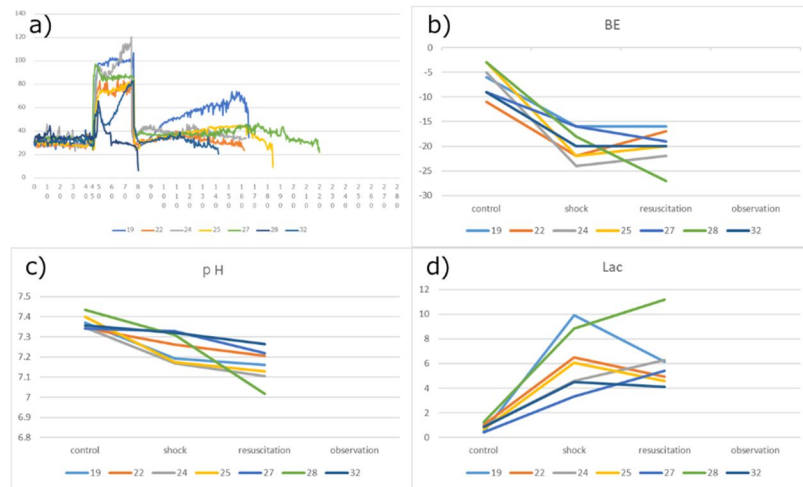


図5 HS+A0 モデルの各種データ a)収縮期血圧の時間経過、b)BE、c)pH、d)Lactate

(2) 局所臓器での再灌流障害の評価。

大動脈遮断後の生存率の低さは、再灌流障害による脳や心臓の影響が大きいと考えているがその病態の解明はなされていない。各種炎症メディエーターや乳酸値などは全身性の数値であり、局所臓器の影響は反映されない。そのため、本研究では脳や心臓に遠隔での再灌流障害が起こっていると仮定して、局所臓器のアポトーシスを評価することとした。

Caspase は細胞死や炎症を含む多数のプロセスにおいて中心的な役割を果たすプロテアーゼファミリーであり、caspase-3はアポトーシスの重要な調節因子として知られている。また活性型 caspase-3 に特異的に結合する蛍光試薬である Fluorescein vIVO (FLIVO) を大動脈遮断解除直前に静脈内投与し、IVIS イメージングシステムを用いて生きたまま臓器局所のアポトーシスを検出できないか試みた。

図6aは大動脈遮断前のcontrolであり、IVIS イメージングシステムでの撮像である。消化管内容物に影響を受けるため小腸が高輝度となっている。大動脈遮断を20分行い、解除前にFLIVOを投与し、2時間後(図6b)、4時間後(図6c)に撮像を行った。いずれも、横隔膜上の脳や肺、心臓において蛍光される部位は認められなかった。ラット11匹に対して撮影を行っているが現時点では有意な所見は得られなかった。また11匹の内1匹は24時間後、もう1匹は48時間後に撮影したが、これも有意な所見は得られていない。

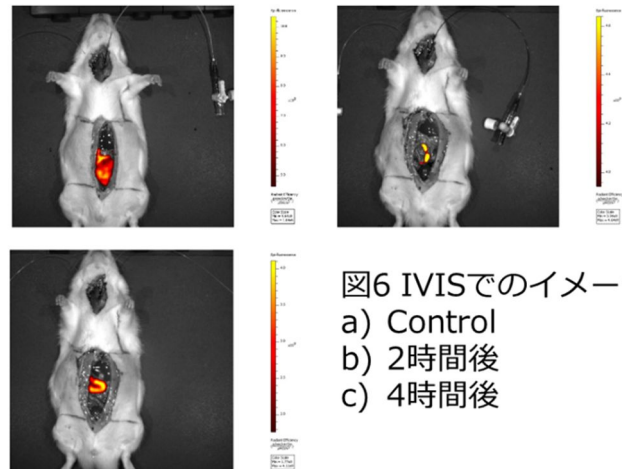


図6 IVISでのイメージ  
a) Control  
b) 2時間後  
c) 4時間後

<考察>

大動脈遮断は臨床でも救命率は低く、HS+A0モデルの確立には困難を極めると同時に、この病態は非常に複雑な要因が含まれていることが示唆された。大動脈遮断モデルは、一応の成果は認められたが、limitationとして救命率が高かったのは虚血再灌流障害の程度が低いためであり、イメージングシステムでも十分にアポトーシスをとらえられるほどの変化がなかった可能性がある。また試薬の量や撮影条件なども挙げられる。

虚血再灌流障害の程度を高くするとHS+A0モデルのように生存率が低くなり、有意な結果を得るにはかなりの実験数を行わなければならないため今後の課題である。

大動脈遮断モデルはある程度の成果を得られたため、今後どのように病態をとらえていくかは再考の余地があると考えられる。さらなる結果を得るため実験を継続していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	増野 智彦  (MASUNO TOMOHIKO)  (00318528)	日本医科大学・医学部・講師    (32666)	
研究分担者	岡田 一宏  (OKADA KAZUHIRO)  (40740593)	日本医科大学・医学部・助教    (32666)	
研究分担者	松本 尚  (MATSUMOTO HISASHI)  (60242559)	日本医科大学・医学部・教授    (32666)	

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