

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 1 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462838

研究課題名(和文) ショック後腸管リンパ液生理活性および臓器障害に対する組織損傷の影響

研究課題名(英文) The effect of soft tissue injury on mesenteric lymph bioactivity and organ injury following hemorrhagic shock

研究代表者

増野 智彦 (masuno, tomohiko)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：00318528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：出血性ショック後に生じる遠隔臓器障害の発生には腸管虚血および虚血腸管から腸間膜リンパ液内に産生される炎症性メディエータが深く関与していることを我々は示してきた。実際の重症外傷例では出血性ショックに加え、広範な軟部組織損傷を合併していることが多いが、臓器障害発生における損傷組織の影響に関しては十分に検討されていない。本研究では、外傷に随伴する組織損傷に着目し、腸管リンパ液のもつ生理活性および臓器障害発生に、組織損傷がどのような影響を及ぼすかを検討した。ラット腸管リンパ液活性は、軟部組織損傷(同種ラットの軟部組織を粉碎したTissue matrixの皮下移植)を加えることにより上昇した。

研究成果の概要(英文)：We have shown that mesenteric hypoperfusion due to circulatory shock elaborates bioactive agents in mesenteric lymph which result in subsequent distant organ injury. Severe traumatic shock cases usually involve soft tissue injury. The purpose of this study was to investigate the effect of soft tissue injury on mesenteric lymph bioactivity and organ injury. Homogenized tissue matrix transplantation increased mesenteric lymph bioactivity.

研究分野：救急医学

キーワード：出血性ショック 組織損傷 腸管リンパ液 臓器障害

## 1. 研究開始当初の背景

外傷初期診療の進歩・標準化にもかかわらず、出血性ショック後に生じる多臓器不全による死亡率は依然高いままであり、その発生機序は未だ解明されていない。これまでの研究により、出血性ショック後に生じる遠隔臓器障害の発生には、臓器低灌流、特に腸管血流の低下が深く関わっていることが示されている。我々は今日まで「多臓器不全発生のメカニズム解明」をテーマとし、「腸管低灌流がどのような機序で遠隔臓器障害発生に関与しているのか？」を中心に研究を行ってきた。我々のこれまでの研究により、出血性ショック後に虚血腸管から産生され胸管を経由し、肺・体循環へと流れ込むショック後腸管リンパ液は、好中球および血管内皮細胞を活性化させる炎症性メディエータを含有することを示した。また、腸管リンパ液の持つ生理活性はショックの深度・期間に相関すること、生理活性は動物種によらず保たれていることを報告している。出血性ショック後に生じる肺障害が腸間膜リンパ管の離断により抑制されたとのDeitchらの報告も、炎症性メディエータの主要運搬経路として腸管リンパ液に注目することになった理由である。また、これまでの基盤研究にて、出血性ショック後にはホスホリパーゼA<sub>2</sub>が活性化されること。活性化ホスホリパーゼA<sub>2</sub>の作用により腸管からアラキドン酸が遊離され、生じた脂質メディエータが腸管リンパ液を介して好中球を活性化させ、遠隔臓器障害を生じさせることを示した。

一方、出血性ショック単独では、その後に臓器障害まで至ることはまれである。我々の動物実験にても同様の結果を得ており、臓器障害を生じるには更なる侵襲（組織損傷・エンドトキシン投与等）が必要となる。

近年、外傷後の生体反応として損傷組織より放出される内因性因子が注目されている。外傷時には、細胞構成成分である damage-associated molecular patterns (DAMPs) (high mobility group box 1; HMGB1, heat shock proteins; HSPs, hyaluronan等)が損傷された組織より放出され、toll-like receptors (TLRs) や receptor for advanced glycation end products (RAGE) 等のレセプターを介してinnate immune cellsを活性化し、炎症反応を引き起こすことが報告されている。また、細胞破壊により放出される自らのミトコンドリアDNA (mtDNA) は、細菌と同様の塩基配列を持つためDAMPsとして認識

されることが明らかとなり、外傷後の炎症を引き起こすDanger Signalsとしてこれら内因性因子の関与が注目されている。

実際の外傷症例では、出血性ショックに加え、同時に広範な軟部組織損傷が生じていることが多く、前述の背景も踏まえ、組織損傷が虚血腸管から産生される炎症性メディエータと相加・相乗的に作用し、外傷性ショック後の病態悪化に関与しているのではないかとの考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、外傷に随伴する組織損傷に着目し、ショック後腸管リンパ液のもつ生理活性および臓器障害発生に、組織損傷がどのような影響を及ぼすかを解明することを目的とする。

【目的1】組織損傷により腸管リンパ液の生理活性・メディエータに変化が生じるかを検討する。

TX(Tissue matrix: 粉碎した軟部組織)を移植することにより、血液中および腸管リンパ液中の炎症性メディエータ・生理活性（好中球活性化能）に変化が生じるか、出血性ショックを加えた場合に血液中および腸管リンパ液中の炎症性メディエータ・生理活性はどう変化するかを調べ、組織損傷による腸管リンパ液活性への影響を検討する。

【目的2】組織損傷を加えることによりショック後肺障害が増悪するか？肺障害の増悪は組織損傷による腸管リンパ液活性の上昇によるものか？全身性の影響かを検討する。

TXを移植した後、ラットを出血性ショックとし、ショック後肺障害の程度をTX移植の有無で比較する。ショックに晒したTX移植ラットの腸管リンパ液を体外へドレナージすることによりショック後肺障害が改善されるかを測定することで、組織損傷によるショック後肺障害発生の機序にどれだけ活性化腸管リンパ液が関与しているのか（全身性・リンパ行性）を検討する。

## 3. 研究の方法

実験 : TXが生体に与える影響を検討する。

ラット(Sprague-Dawley rat)に体重あたり5、10、20%のTXを移植し、24時間

後の生存率を調べる。

**TX 作製** : Sprague-Dawley rat (donor)を犠牲死させる。全身の毛、皮膚を除去した後、四肢・胸郭を採取し、骨成分を除いた後ミンチ状にした。TX への細菌混入を防止するため抗菌薬を混合している。

**TX移植** : 同種ラット (recipient)を使用し、麻酔下に背部皮下に作成したポケット内にTX(体重に対し5、10、20%)を移植した。

**実験** : TX移植ラットから採取した腸管リンパ液が生理活性を持つかを検討する。

ラット(Sprague-Dawley rat)に体重あたり5、10%のTXを移植し、TX移植後0、3、6、24時間後に採取したリンパ液を、分離した安静ヒト好中球に添加し、産生される活性酸素量を測定することにより、腸管リンパ液生理活性を調べた。

**腸管リンパ液採取** : 麻酔下に腹部正中切開をおき、上腸間膜動脈根部に沿って走行する腸間膜リンパ管に0.02inchシリコンチューブをカニューレションし、冷水槽内マイクロチューブ内に腸管リンパ液を採取した。

**好中球活性酸素産生の測定** : 分離した好中球をリンパ液・血漿で5分間刺激した後、 $1 \mu\text{M}$ のformylmethionyl-leucyl-Phenylalanineで活性化し、産生された活性酸素をSOD-inhibitable cytochrome c reduction法にて測定した。

**実験** : TX移植後ラットを出血性ショックとし、ショック後に採取した腸管リンパ液が生理活性を持つかを検討する。

**出血性ショックモデル** : オスSprague-Dawley ratを使用。ペントバルピタール ( $50\text{mg}/\text{kg}$ )腹腔内投与にて麻酔した後、大腿動静脈をカニューレション。大腿動脈カテーテルより脱血し、平均動脈圧を $30\text{mmHg}$ まで低下させ45分間維持した。ショック完了後、脱血した血液+2倍量の生理食塩水を2時間かけ輸液し蘇生を施行。ショック導入前1時間および蘇生完了後1時間の腸管リンパ液(ショック後リンパ液)を採取した。蘇生完了後1時間のリンパ液を使用する理由は、これまでの研究によりこの時間帯のリンパ液が最も生理活性を強く持つためである。

#### 4. 研究成果

**実験** : TXが生体に与える影響を検討する。

5%TXを移植したラットでは24時間後の生存率は100%であったが、10%TX移植ラットでは生存率は67%、20%TX移植ラットでは0%であった。

**実験** : TX移植ラットから採取した腸管リンパ液が生理活性を持つかを検討する。

Sham群(TX移植なし)での活性酸素産生量は $3.08 \pm 0.75 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ であった。

5%TX移植群において移植直後の腸管リンパ液のもつ活性酸素産生能は $3.72 \pm 0.86 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ であったが、移植3時間後では $4.48 \pm 1.11 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ 、6時間後では $5.36 \pm 1.21 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ 、24時間後では $5.08 \pm 1.57 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ と、いずれも有意ではないものの腸管リンパ液の持つ生理活性は、移植後6時間をピークに上昇した。

10%TX移植群において移植直後の腸管リンパ液のもつ活性酸素産生能は $3.68 \pm 1.10 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ であったが、移植3時間後では $4.82 \pm 1.48 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ 、6時間後では $5.28 \pm 1.38 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ 、24時間後では $5.52 \pm 1.15 \text{ nmolO}_2^-/3.75 \text{ cells}/\text{mL}/\text{min}$ と、5%TX移植群と同様に、有意ではないものの腸管リンパ液の持つ生理活性は、移植後24時間をピークに上昇した。

**実験** : TX移植後ラットを出血性ショックとし、ショック後に採取した腸管リンパ液が生理活性を持つかを検討する。

これまでの実験では平均動脈圧を $30\text{mmHg}$ まで低下させ45分間維持する出血性ショックモデルではショック・蘇生中にラットが死亡する確率はわずかであったが、TX移植後ラットにおいては脱血量が安定せず、ショック・蘇生を安定して完遂することができなかった。

我々はこれまでの研究により出血性ショック後に生じる臓器障害の発生には臓器低灌流、特に腸管血流の低下が深く関与していること。出血性ショック後腸管リンパ液は、好中球および血管内皮細胞を活性化する能力を有しており、虚血腸管から産生される炎症性メディエータは、腸管リンパ液を介して

肺・体循環へと流れ込み、ショック後遠隔臓器障害の発生に関与することを示してきた。

実際のショックを伴う外傷症例では、ショックによる全身性の組織低灌流に加え、広範な軟部組織損傷を合併していることが多い。そこで本研究では、これまでの研究を更に進め、ショック後臓器障害発生、ショック後腸管リンパ液活性に対する軟部組織損傷の影響を検討する研究を立案した。これまでも出血性ショックに軟部組織損傷を加えた動物実験モデルは複数存在し、我々も開腹時に腹壁を鈍的に切開することにより軟部損傷を作成してきたが、加える組織損傷の程度を定量的に調節できないのが欠点であった。本研究で使用した軟部組織損傷モデルは軟部組織をホモジナイズしたものを同種のマウスに移植することにより定量的に組織損傷の影響を評価することが可能な実験モデルであり、研究分担者塚本のこれまでの実験では軟部組織損傷の程度に応じて腸管麻痺が生じることを報告している。

本研究の結果より、出血性ショック後腸管リンパ液活性に対する軟部組織損傷の影響は知ることができなかつたものの、組織損傷自体が、腸管リンパ液活性を上昇させることが確認できた。また、組織損傷による腸管リンパ液活性の上昇は比較的長期に影響を及ぼしていることが示された。

現在も当初の目的を達成するべく、移植するTX量とショックの程度を調整し研究を継続している。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

1 . Sakamoto W, Masuno T, Tsukamoto T, et al. Comprehensive analysis of microRNA profiles in normal rodent mesenteric lymph. The 38<sup>th</sup> Annual conference on Shock, 2015 年6月6日, Denver (USA)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

増野 智彦 (Tomohiko Masuno)  
日本医科大学 医学部 講師  
研究者番号 : 0031528

### (2)研究分担者

横田 裕行 (Hiroyuki Yokota)  
日本医科大学 医学系研究科 教授  
研究者番号 : 60182698

新井 正徳 (Masatoku Arai)

日本医科大学 医学部 助教  
研究者番号 : 6027127

塚本 剛志 (Takeshi Tsukamoto)  
日本医科大学 医学部 助教  
研究者番号 : 2062670

### (2)研究協力者

坂本 和嘉子 (Wakako Sakamoto)