

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670761

研究課題名(和文)臓器・組織壁応力を考慮した新しい循環管理法の開発に関する研究

研究課題名(英文)Understanding an impact of tissue wall stress to develop a novel strategy of circulatory management

研究代表者

鎌方 安行(KUWAGATA, Yasuyuki)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：50273678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：家兔を用い、全身麻酔下に空腸組織粘膜血流観察ステージを作成し、血行動態をモニターしながら粘膜血流をLaser Dopplerスキャン法で測定した。空腸壁に生理食塩水を浸潤して壁応力を0～+12mmHgまで変化させた場合、個体・腸管系の血行動態変化はみられず、粘膜血流に有意の変化はきたさなかった。大腸菌内毒素 1mg/kgを静脈内投与した実験的敗血症モデルでは、空腸壁応力変化はみられず、粘膜血流は投与60分～90分後の観察で有意に低下した。管腔臓器である腸管において、病的浮腫による想定範囲(～+12mmHg)の組織応力増加は、感染に伴い放出される血管作動性メディエータの影響を凌駕しない。

研究成果の概要(英文)：The present study was performed to clarify the relationship between wall stress and mucosal perfusion of the gut with or without experimental sepsis in rabbits. Increase in wall stress up to 12 mmHg by intramural drip infusion of normal saline did not significantly alter mucosal perfusion of the small intestine evaluated by using Laser Doppler surface scanning (Moor LDI). Intravenous administration of endotoxin (E.coli O111, dissolved in normal saline at 1 mg/mL) at the dosage of 1 mg/kg significantly decreased mean arterial pressure, mucosal perfusion of the small intestine at 60, 90min after the administration of endotoxin, but did not alter the wall stress of the small intestine by 120min. These results suggest that vasoactive mediators released during sepsis seem to play more significant role in circulatory disturbance of the intestinal mucosa than that of increased intestinal wall stress due to pathological edema formation.

研究分野：救急医学

キーワード：循環障害 壁応力 腸管 敗血症

1. 研究開始当初の背景

生体にさまざまな侵襲が加わると、血漿を含む細胞外液の相当量が機能を失い、非機能的細胞外液として組織に死蔵される。大量かつ持続的な非機能的細胞外液形成をきたす代表的病態が敗血症であるが、感染のみならず出血や外傷といった侵襲が一次的に解決できなかった場合にも、炎症性メディエータの過剰産生を生じ、敗血症類似の血行動態・末梢血管制御異常を生じて、深刻で制御困難な状態を呈して多臓器不全、そして死という結果をまねく。従来 of 輸液理論では、容量血管・ポンプ・抵抗血管の閉鎖系コンパートメントを原則としているので、持続的な血漿喪失による臓器・組織応力の変化は想定していない。現状の輸液理論に限界のあることは、国内外の研究者には周知のことがらとなっている(鎌方安行、渋谷正徳、吉岡敏治、杉本壽: 肺動脈楔入圧は敗血症患者の前負荷指標として適切か? 日本救急医学会雑誌 9:1-7, 1998.)。壁応力は、臓器・組織への灌流圧差の重要な決定要因の一つであり、心腔壁を含む血管壁の distensibility を規定している。壁応力を考慮に入れることにより初めて in vivo における心・血管腔の圧容積関係を論じることができる。すなわち、今日の循環生理指標に臓器・組織壁応力を反映できるような測定因子を加味したモニタリングシステムを開発することこそが、次世代への進歩につながると着想するに至った。

2. 研究の目的

臓器・組織壁応力を実測しながら、非機能的細胞外液(病的浮腫)形成が、血行および組織酸素化状態に及ぼす影響を明らかにし、この情報を加味した輸液理論の基礎を築くための基礎的知見を収集する試みとして実施した。今回の研究では、特に心臓器として侵襲時虚血の標的となりやすい腸管を選択する。臓器・組織の壁応力が増加することによって、壁応力と臓器・組織血流の相関関係および組織酸素化との相関関係を明らかにすることを目的とする。また、腸管粘膜の血流分布を二次元で把握することにより、臓器・組織壁応力を含む多様な因子と腸管粘膜血流変化の関わりについて考察することを併せて目的とした。

3. 研究の方法

本研究のうち、動物を用いた実験については、関西医科大学動物実験規定第4条に基づいて動物実験委員会に承認を受けた動物実験計画書 13-118、14-094、および 15-101 に従って実施した。

(1) 臓器・組織応力と血流を同時測定する実験系の構築: 実験系のプレパレーション

New Zealand White ウサギ(♀、3.0~3.5kg)をペントバルビタール 25 mg/kg i.v. で麻酔導入し、10 mg/kg/hr 持続静脈内投与で維持した。加温手術台上で気管切開し、

PaO₂ 40 mmHg を指標として調節呼吸とした(F_IO₂ = 0.5)。一側頸動脈から動脈ラインを作成し、持続動脈圧モニター、脈派による心拍数計測、動脈血採血用ルートとした。剣状突起下の横切開で開腹し、脾静脈合流遠位の上腸間膜静脈を剥離して ultrasonic flow probe を装着し、血流を持続モニタリングすることで、消化管全体の血流の経時的評価とした。加えて、単位長(同一の流入動脈に支配される約 8cm)の空腸の腸管壁の口側・肛側をそれぞれ結紮したのち、そのうち口側の約 4cm の腸間膜対側を電気凝固止血下に縦切開して粘膜面を露出する。腸管を自作の黒色ステージに置き、粘着性クリアフィルムで被覆し、黒色ステージ上で観察対象腸管壁を密封する。前述の Fiber Optic 圧センサをセルジंगाー法により対象腸管平滑筋層の組織内に留置して壁応力変化を連続モニターする構成とした。1 時間の回復期間において、各プロトコルを実施した。なお、麻酔導入後、プレパレーション、プロトコルを遂行する実験期間中は、生理食塩水 10 ml/kg/hr を経静脈的に持続投与し、維持輸液とした。実験終了後は、ペントバルビタール過量投与により、安楽死とした。

(2) プロトコル

壁応力の増加が局所血流に及ぼす影響(n = 5)

組織含水量が増加する際(□浮腫形成時)のメディエータによる影響を除外するため、組織内への生理食塩水浸潤による応力増加が組織血流に及ぼす影響を検討した。1)-2)で観察用ステージに固定した空調の遠位 4cm 部分の漿膜側から平滑筋層に 24G テフロン針を留置し、内部を生理食塩水で満たした後 cyanoacrylate gel で固定した。これを輸液用生理食塩水バッグと点滴セットを用いて接続し、Fiber Optic センサの測定値を参照しながらバッグを高位に懸架することで組織内に生理食塩水を浸潤させ、壁応力を増加させた。同時に黒色ステージ上の空腸血流を Laser Doppler Scanner (Moor LDI) を用いて測定し、壁応力と組織血流の関係を検討した。

実験的敗血症モデルにおける壁応力変化と腸管局所血流変化の検討(n = 9)

プレパレーション 1) を実施したウサギを用いた。実験群(n = 5)には、E.coli O111 B4 由来の endotoxin (LPS)(生理食塩水に溶解し、1mg/ml に調整) 1 mg/kg を、対照(n = 4)には同量の生理食塩水を経静脈的に投与した(time 0)。動脈圧、心拍数、上腸間膜静脈血流量、空腸組織応力を Power Lab を通じて持続モニタリングするとともに、投与前値(baseline) 30 分後、60 分後、90 分後、120 分後の空腸血流を Moor LDI によるレーザードプラー法によって測定した。なお、組織応力の変化については、baseline 値からの増

減 (\pm mmHg) で評価した。

4. 研究成果

(1) 空腸組織応力の増加が空腸粘膜血流に及ぼす影響について

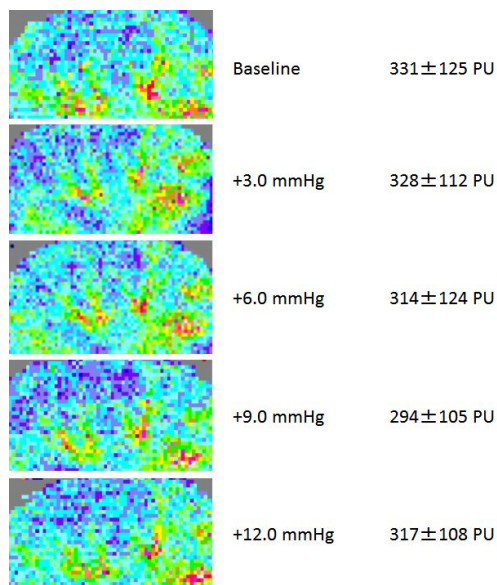
完成した空腸観察用の実験系セットアップ



を示す。(図1)

図1 開腹部を介して空腸を挙上した自作の Laser Doppler スキャン測定用のステージ(つや消し黒の背景に空腸を固定し、保護用フィルムで被覆したもの)同時に任意の血管血流(本研究では上腸間膜静脈)や近傍の組織圧をモニタリング可能。ステージ上の赤色スポットは、測定用のレーザー光。

これを用いて、生理食塩水の近傍組織への浸潤を行った結果、組織応力の baseline 値に対する増加応力と空腸粘膜血流は、それぞれ以下の通りであった(測定対象 ROI は 360pixel の矩形範囲とした)。増加応力 0 (baseline 値): 299 ± 60 pixel unit (以下 PU)(mean \pm SD)、応力+3 mmHg: 283 ± 68 PU、応力+6 mmHg: 273 ± 63 PU、応力+9 mmHg: 275 ± 77 PU、応力+12 mmHg: 268 ± 79 PU。分散分析の結果、これら 5 段階の壁応力変化時における空腸粘膜血流の平均値に有意差を認めなかった ($P < 0.05$)。図2は、5 段階に壁応力を増加させた場合に空腸粘膜血流を Laser



Doppler スキャンで測定した記録例である。図2 壁応力を増加させて Laser Doppler スキャン法によって空腸粘膜血流を測定した記録例。左の測定図は実際のスキャン画像で、中央は fiber optic センサを介して実測しながら設定した組織応力値、右は関心領域 (ROI) 360pixel の測定値 (pixel unit) の mean \pm SD を示す。

なお、観察期間中の平均動脈圧、心拍数、上腸間膜静脈血流に有意の変化は認めなかった。

(2) LPS 投与による実験的敗血症が血行動態、腸管組織応力、局所組織血流に及ぼす影響について

・血行動態の変化: 実験群、対照の baseline、30 分、60 分、90 分、120 分後の測定値は以下の通り。

平均動脈圧 (mmHg): 実験群、 73 ± 9 、 $58 \pm 12^*$ 、 $53 \pm 15^*$ 、 $46 \pm 17^*$ 、 $48 \pm 15^*$; 対照、 77 ± 9 、 76 ± 10 、 78 ± 10 、 78 ± 9 、 79 ± 8 。

心拍数 (bpm): 実験群、 245 ± 18 、 228 ± 24 、 244 ± 23 、 241 ± 23 、 242 ± 23 ; 対照、 255 ± 15 、 250 ± 14 、 251 ± 16 、 250 ± 25 、 253 ± 23 。

心係数 (ml/min/kg): 実験群、 129 ± 8 、 116 ± 14 、 126 ± 17 、 132 ± 18 、 142 ± 19 ; 対照、 123 ± 26 、 123 ± 23 、 119 ± 24 、 116 ± 21 、 114 ± 19 。

上腸間膜静脈血流 (ml/min/kg): 実験群、 18 ± 3 、 15 ± 6 、 $26 \pm 7^*$ 、 $28 \pm 6^*$ 、 $31 \pm 7^*$; 対照、 18 ± 3 、 17 ± 4 、 18 ± 4 、 18 ± 5 、 18 ± 4 。

いずれの測定値についても、実験群、対照の baseline 値に有意差を認めなかった。実験群の平均動脈圧は 30 分、60 分、90 分、120 分後に対照より有意に低値をとった。上腸間膜静脈血流は、60 分、90 分、120 分後に対照より有意に高値をとった ($P < 0.05$)。

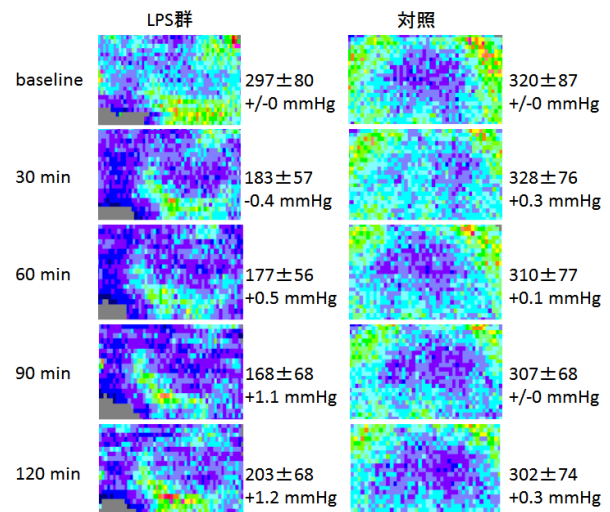


図3 実験群(左)、対照(右)の代表的な

測定例を示した。それぞれ左は実際のスキャン画像、右の数値は関心領域 (ROI) 360pixel の測定値 (pixel unit) の mean \pm SD (上段) と空腸壁応力の baseline 値からの増減 (mmHg) である。

・空腸局所血流、応力の変化: 実験群、対照の baseline、30分、60分、90分、120分後の測定値は以下の通り。

空腸粘膜血流 (ROI: 360pixel, PU): 実験群、290 \pm 78、188 \pm 57、153 \pm 68*、153 \pm 58*、170 \pm 54; 対照、283 \pm 53、263 \pm 47、266 \pm 67、253 \pm 47、250 \pm 45。

・空腸組織応力 (baseline 値よりの増減、mmHg): 実験群、0、0.16 \pm 0.25、0.22 \pm 0.24、0.56 \pm 0.25、0.90 \pm 0.54; 対照、0、0.13 \pm 0.05、0.18 \pm 0.39、0.35 \pm 0.20、0.28 \pm 0.25。

実験群の空腸粘膜血流は、60分、90分後において対照より有意に低値をとった ($P < 0.05$)。一方、実験群、対照の組織応力の平均値の経時変化に有意差を認めなかった。図3に実験群、対照の代表的な測定例を示した。

<考察>

侵襲後早期には、生体は水、電解質なかでも Na^+ を保持しようとする。具体的には、外傷や手術、重篤な感染発症急性期において水・電解質を輸液によって補充すると、明らかな浮腫形成や胸腹水の貯留をみてなお濃縮尿を平時以下の少量排泄する状態が続く。侵襲時における毛細血管から組織間への水・電解質の移動の解釈は、Starling 仮説に基づき、毛細血管の静水圧の上昇または毛細血管透過性の亢進、あるいは増加した組織間への水・電解質を回収するリンパ流の障害と一般に理解されるが、結果として生体内では無視できない臓器・組織応力の変化を生じる。今回の研究は、このようにして増加した臓器・組織応力が、局所血流に及ぼす影響の大きさを把握できる実験系を作成し、その影響を検出することであった。

ファントムを使用して組織応力検出精度の確認を行ったのち、まず生理食塩水の組織内浸潤にもなった応力増加が、空腸粘膜血流に与える影響を明らかにする実験をおこなった。これは、損傷をうけた局所の反応として種々の chemical mediators が産生され、結果として毛細血管を介して生じる異常な体液変動による浮腫形成 (組織応力増加) ばかりでなく、血管への薬理作用によって局所血流を変化させる可能性がある、その要因を除外して、純粋に細胞外液体貯留による組織応力増加の影響を知るためのプロセスである。結果として、持続的な生理食塩水組織浸潤による 0 ~ +12mmHg までの範囲の組織応力増加は、空腸粘膜血流に有意の変化を与えるには至

らないことが明らかとなった。

一方で、LPS の経静脈投与により敗血症性ショックの血行動態 (末梢血管抵抗減弱による血圧低下) を再現したモデルでは、空腸粘膜血流変化について異なった結果が得られた。すなわち、LPS 投与後 30 ~ 120分後に、心拍出量の変化を伴わずに有意な平均動脈圧低下をきたし、末梢血管抵抗減弱型の血行動態を呈したが、上腸間膜静脈の血流すなわち腸管系への総血流量は 60 ~ 120 分後に有意に増加していた。また、空腸組織応力のモニタリングから、LPS 投与後の壁応力増加はわずかであり、有意な変化はみられなかったが、空腸粘膜血流は 60、90 分後に有意に減少しており、腸管全体への血液供給増加と相反する変化をしていた。対照には、このような変化は 120 分間にわたってみられなかった。従って、LPS 投与モデルでみられる空腸粘膜血流の顕著な低下は、壁応力変化以外の局所血流調節機序の破綻が要因と考えられる。

本研究とセットアップは異なるが、ウサギを用い、炎症性サイトカインである IL-1 β 投与により敗血症性ショックを惹起したモデル、IL-1 β 投与モデルで血管拡張を誘導するメディエータである血管拡張性プロスタグランジン投与して類似の血行動態を作成したモデルを比較した関連研究を行い、興味深い知見を得た。(雑誌論文 1.) この研究では、上腸間膜静脈血流や空腸粘膜血流の実測は行っておらず、門脈血の酸素分圧と二酸化炭素分圧較差から門脈血流の変化を類推した。その結果、血管拡張性プロスタグランジンを外部から経静脈的に全身投与した場合、IL-1 β 投与による実験的敗血症性ショックモデル時と同様の全身性血行動態変化、すなわち心拍出量低下を伴わずに平均動脈圧低下をきたす末梢血管抵抗減弱型血行動態を呈したが、IL-1 β 投与でみられた全身の酸素消費量 / 運搬量関係の異常、乳酸アシドーシス、門脈血・動脈血二酸化炭素分圧較差の増加を伴わない門脈血酸素分圧の上昇すなわち splanchnic circulation における酸素利用障害はいずれも再現されなかった。また、それ以前にこの結果は、敗血症時における血管拡張性メディエータの作用は、単なる全身性血管拡張作用ではなく、病的メディエータの発現の臓器・組織局在が病態生理の要点となっていることを示唆している。

過去の基礎的研究から、一般に Starling 仮説にもとづく急速な浮腫形成時であっても、precapillary resistor が一気に低下することで毛細血管内圧が上昇し、あるいは血管内皮の接着が破綻してアルブミンが血管外に漏出し、毛細血管 - 組織間膠質浸透圧差が消失する場合、浮腫形成の圧較差は 15 mmHg 程度が限界とされる。今回の研究では、生理食塩水浸潤による +12 mmHg までの空腸壁応力増加は、空腸粘膜血流に有意

に影響しなかった。また、LPS 投与モデルで観察された有意の空腸粘膜血流低下時にも、壁応力変化は数 mmHg 以内のわずかなものであり、今回観察対象にした空腸組織における実験的敗血症時の血流変化の主体は、局所血流に影響を及ぼすメディエータの存在であって、壁応力変化の寄与は少ないことを確認した。

一方で、重症敗血症、重症急性膵炎、広範囲熱傷など高度の血管透過性亢進にともなう全身性浮腫形成時には、胸郭・腹部軟部組織の拘束性障害から、循環虚脱を生じることが知られている。この病態は、abdominal compartment 症候群と称され、前述の傷病などにおいて進行性の循環虚脱がみられ、かつ膀胱内圧の絶対値が 15～20 mmHg に達した時点で診断され、減圧開腹術を施行することで一定の改善をみることから、このレベルの体幹応力増加が個体全体の血行動態に重大な影響を与えることは間違いない。今回の研究モデルは、図 1 で示したように、管腔臓器を対象とし、大気に開放した実験系を採用しているため、体幹組織応力増加の影響を論じることができず、今後さらに進んだ循環管理法を開発するには、遠隔臓器・組織の応力変化が個体全体の血行動態に及ぼす視点から、さらに研究を進める必要があると考える。

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 3 件)

1. Matsuyama S, Hayakawa K, Sakuramoto K, Muroya T, Nakamori Y, Ikegawa H, Shimazu T, Kuwagata Y: Vasodilating prostaglandin E1 does not reproduce interleukin-1 β -induced oxygen metabolism abnormalities in rabbits. *Acute Medicine and Surgery* 2:4-47, 2015, 査読有り.
2. 鎌方安行: 熱傷による全身病態の変化 *救急医学* 38:1168-1178, 2014, 査読無し.
3. 鎌方安行, 櫻本和人, 高橋弘毅, 岩村拓, 中村文子: 侵襲時の体液変動. *救急医学* 37:1671-1675, 2013, 査読無し.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌方 安行 (KUWAGATA, Yasuyuki)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：50273678

(2) 研究分担者

早川 航一 (HAYAKAWA, Koichi)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：60403086

(3) 連携研究者

()

研究者番号：