

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861248

研究課題名(和文)重症病態における内皮細胞機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of endothelial cell function in severe pathology

研究代表者

鶴澤 康二(Uzawa, Kohji)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30530703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症や大量出血時の重症病態時の患者予後は極めて悪い。各種重症病態での末梢循環の病態生理の解明により、その予後を改善することが本研究の最大目的である。微小循環レベル、生体下で可視化できるマウスモデル(背側皮膚透明窓(Dorsal Skinfold Chamber:DSC))を実験に使用し、生理食塩水の輸液で救命したマウス群とヒドロキシエチルスターチ(HES130)で救命したVOL群で末梢循環の画像を継続的に比較した。敗血症モデルマウスでは、VOL群で血管透過性を有意に抑制した。また脱血モデルでも、血管透過性亢進を抑制し、7日生存率を改善し、血液ガスデータを改善した。

研究成果の概要(英文)：The patient's prognosis is very bad at severe condition during sepsis or massive bleeding. The purpose of this research is to improve the prognosis by elucidating the pathophysiology of peripheral circulation in the serious conditions. Using a mouse model (Dorsal Skinfold Chamber (DSC)), which can be visualized in vivo, microcirculation level, lifesaving with mouse group and hydroxyethyl starch (HES 130) rescued with physiological saline infusion. We compared the images of peripheral circulation in the VOL group that we did over time. In sepsis model mice, vascular permeability was suppressed in the VOL group. In the blood removal model also, the vascular hyperpermeability was suppressed, the 7-day survival rate was improved, and the blood gas data was improved.

研究分野：末梢循環

キーワード：輸液 グリコカリックス 内皮細胞 ヒドロキシエチルスターチ

1. 研究開始当初の背景

麻酔や集中治療領域における重症患者をより安全に管理するため、その微小循環生理の病態解明は必須である。危機的状態に対する治療効果の判定やその正確な病態把握を微小循環レベルで解明することは非常に重要である。

現在臨床では、マクロな血行動態をリアルタイムに監視する装置は豊富に存在するが、患者の微小循環をリアルタイムにモニターできるものは存在しない。つまり、現在の患者の状態をリアルタイムに正確に理解し、治療が行われているとは必ずしも言えない。そこで組織低灌流時における実験動物の微小循環レベルでの事象を *in vivo* 顕微鏡イメージング技術を用いて観察する事により、変化に富む血管内皮細胞の機能を明らかにし、今後の急性期医療の足がかりとなる研究が必要であると考えた。

2. 研究の目的

生体でしか観察できない複雑な微小循環の解明に関しては、*in vitro* の系では構築できないため、『生体顕微鏡的観察法 (intravital microscopy)』の一種である『背側皮膚透明窓 (Dorsal Skinfold Chamber: DSC)』を使用し、重症病態における皮膚の同一血管床を長期間にわたって観察し、様々な知見を得ることが主要な目的である。具体的には、個体の微小循環及びその環境をリアルタイムに観察し、同時に組織化学的観点から内皮細胞構造の病的変化 (グリコカリックスの脱落やポアの形状変化) の関連性を解明し、正常状態及び失血や炎症等の異常環境を抑制する輸液戦略を検討し、新しい知見を得ることを目的にした。

3. 研究の方法

本研究において脱血モデルおよび敗血症モデルにおける生体反応を生体顕微鏡イメージングによって観察し、その反応機序ならびに血管透過性について生理食塩水、ヒドロ

キシエチルスターチ (HES)、アルブミン (ALB) について比較検討する。方法としては、脱血モデルのマウスに、蛍光色素 (FITC) で標識した様々な分子量の DEX、HES さらに ALB を投与し、DSC 装着 (図 1)、観察、定量化を行う。具体的にはそれぞれの病態における血管透過性を評価し、HES の抗炎症作用の程度、HES と ALB 投与の有効性の程度を比較検討する。

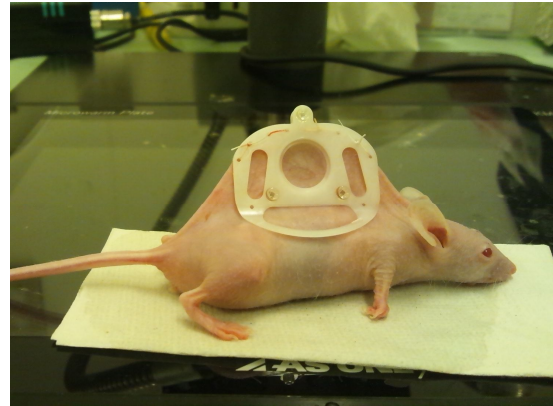


図 1 : DSC 装着マウス

具体的には、15W 前後の BALB/C マウスに DSC を装着、飼育、安定させ、Lipopolysaccharide: LPS を 2mg/kg 投与、18 時間後に 1mg/kg 投与し敗血症モデルを作成した DSC マウスを 3 群に分け、体重減少の 50% 量の 6% HES130 を投与 (HES 群、N=7)、同量の生理食塩水を投与 (生食群、N=6)、投与なし (対照群、N=6) とした。その 6 時間後に尾静脈より FITC-DEX40/75 kD を投与し、生体蛍光顕微鏡で 2 時間程度観察した。同様に群分けされた急性出血モデル (60% 脱血モデル: Hb5 前後、N=15;) についても検討した。解析は血管を含まない部分 (30 × 30 μm 四角; 図 2) 3 か所を任意で選択し、その蛍光強度を測定した。

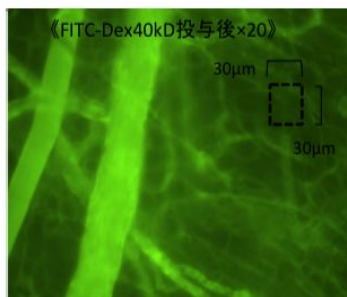


図2：FITC-DEX40kDa 投与後の補足画像

4. 研究成果

当初アルブミンは牛アルブミンを想定していたが、マウスとの適合性に問題が生じ、マウスのアルブミンを生成することに止まった。今後の継続研究においてアルブミンの効果に関しては検討する。したがって、アルブミンの比較は本実験ではできなかった。

敗血症モデルでは、FITC-DEX40 kD 投与に関しては、その蛍光強度の低下が HES 群で最も低く、FITC-DEX75 kD 投与に関しては、その蛍光強度上昇を有意に抑制した(図3)。急性出血モデルでは、HES 投与群では FITC-DEX40 kD の蛍光強度や乳酸値は低い傾向であった(図4)。HES を投与した群では、FITC-DEX40/75 kD の蛍光強度が比較的小さく、透過性亢進病態を抑制する可能性が示唆された。また、血液ガスデータや7日間生存率に関しても HES 投与で有意に改善した(図4、5)。

血管透過性に関しては、内皮細胞やその表層に存在するグリコカリックス層が深く関わっており、近年非常に注目されている事柄である。本実験結果は、重症病態における内皮細胞機能解明に非常に大きな役割を果たしたと考える。そして重症病態において、HES が何らかの内皮細胞保護効果を有する可能性を示唆され、今後も継続的にこの分野の研究をする。

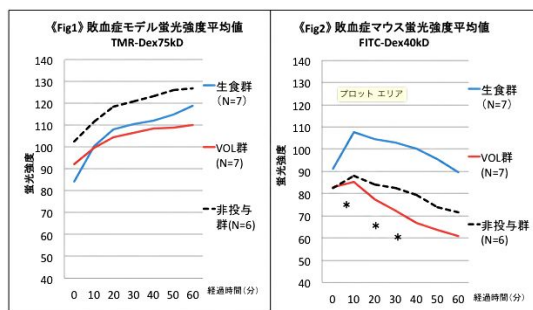


図3：敗血症モデル血管透過性比較

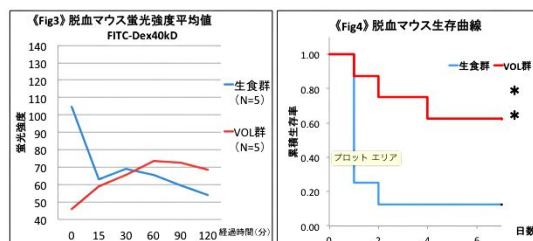


図4：脱血モデル血管透過性比較及び生存率比較

《table1:脱血マウス血液ガス分析結果》

	生食群(N=8) 平均値(±SD)	VOL群(N=10) 平均値(±SD)	P値 (Welchのt検定)
脱血前:SaO2	56.75(±12.59)	59.2(±10.97)	0.671
脱血前:Lac	1.46(±0.52)	1.02(±0.45)	0.084
脱血後:pH	6.974(±0.067)	7.056(±0.061)	0.017
脱血後:PO2	43.25(±9.32)	44.5(±6.95)	0.757
脱血後:BE	-11.75(±4.10)	-6.7(±2.91)	0.011
脱血後:HCO3	19.9(±3.17)	23.8(±2.36)	0.014
脱血後:SaO2	50.25(±12.26)	57.5(±12.21)	0.231
脱血後:Lac	4.07(±1.16)	2.44(±1.54)	0.021
脱血後:Hb	5.86(±1.08)	3.97(±0.84)	0.001

図5：脱血後のマウス血ガスデータ比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

鵜澤康二 『輸液療法の考え方-micro & macro circulation approach-』 体液・代謝管理 査読あり 2017年 32巻 15-22

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 鵜澤康二 『輸液療法の考え方~micro & macro circulation approach~』 教育講演 福島県周術期管理セミナー 2016.3.5 福島
- 2) Kohji Uzawa Tomoko Yorozu Akira Ushiyama Hideki Miyao 『Tetrastarch Suppresses Vascular Permeability in an Acute Hemorrhage Mouse Model』 45th Critical Care

Congress (Society of Critical Care
Medicine) 2016.2.23 Orlando. USA

3) 鵜澤康二 『輸液療法の考え方~micro &
macro circulation approach~』ランチョン
セミナー 第 31 回体液・代謝管理研究会年次
学術集会 2016.1.23 東京

4) 鵜澤康二 『マウス重症病態モデルにおけ
る第3世代HES(6%HES130/0.4/9)の投与効果』
第2回麻酔管理セミナー 招待講演 2015.8.8
埼玉

5) 鵜澤康二 萬知子 牛山明 宮尾秀樹 『マウ
ス重症病態モデルにおける第3世代HES(6%HES
130/0.4/9)の投与効果』第1回輸液管理研究会
招待講演 2015.8.1 東京

6) 鵜澤康二 山田達也 萬知子 牛山明 飯島
毅彦 宮尾秀樹 『マウス重症病態モデルにお
ける第3世代HES(ヒドロキシエチルスター
チ)(6%HES 130/0.4/9)の投与効果』第62
回日本麻酔科学会 2015.5.29 神戸

〔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

鵜澤 康二(UZAWA, Kohji)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 30530703

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

牛山 明(USHIYAMA, Akira)

萬 知子(YOROZU, Tomoko)

宮尾 秀樹(MIYAO, Hideki)