

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24167

研究課題名(和文)動物モデルを用いた出血による局所的循環障害の評価と血液凝固機能への関与の研究

研究課題名(英文)Evaluation of the relationship between local circulation disorder and coagulation/fibrinolysis-system induced by hemorrhage in animal model

研究代表者

古川 翔太(Furukawa, Shota)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任助教

研究者番号：90849093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：出血様式(動脈性出血または静脈性出血)の違いがラット臓器のミトコンドリア呼吸に与える影響について検討した。雄性Sprague-Dawley ラット(300-339 g)を対照群、動脈出血群、静脈出血群の3群に分けた。総出血量はどちらの出血群においても全身血液量(56 mL/kg)の50%とした。動脈出血群及び静脈出血群では血圧低下がみられたが、動脈性出血と静脈性出血で差は認められなかった。動脈性出血では心臓ミトコンドリア呼吸の予備呼吸能が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は出血による各臓器のミトコンドリア機能への影響の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to compare different hemorrhage style (arterial hemorrhage or venous hemorrhage) for clarifying their effects on the mitochondrial respiration in organs of rat.

Male Sprague-Dawley rats (300-339 g) were randomly assigned to three groups: control, arterial bleeding, and venous bleeding. Hemorrhage was induced by withdrawing blood until 50% (28 ml/kg) of their estimated blood volume (56 ml/kg) in both bleeding groups. Blood pressure in both bleeding groups was decreased compared with the control group. Blood pressure showed no significant difference between the arterial and venous bleeding groups. Preliminary respiratory capacity of mitochondria in heart in the arterial bleeding group was lower compared with the control group.

研究分野：法医学

キーワード：出血 組織低酸素 ミトコンドリア呼吸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

出血は外傷による死亡の主な原因であり、生体に様々な悪影響を及ぼす。出血の合併症のひとつに血液凝固障害がある。血液凝固の機序には、凝血の形成を促す凝固系と凝血の分解を促す線溶系がある。凝固系と線溶系の均衡が崩れると血栓症や易出血性といった血液凝固異常が生じるとされている。法医学分野では、病死などの緩徐に死に至る場合は心臓内に軟凝血がみられるが、外傷や突然死などの急死事例では心臓内に流動血がみられることがよく知られている。また、救急医療分野においては、外傷・出血により血液凝固が正常になされず止血困難な症例が報告されている。これらの病態には出血性ショックによる循環障害、それに伴う組織低酸素状態が線溶系の亢進に関わっているとされている (Xu et al. 2015) が、その機序は十分に解明されていない。

近年の出血性ショックモデルを用いた研究では、出血によりショック状態を維持することで確実な循環障害を引き起こすモデルや、出血量にのみ着目し出血の影響を評価するモデルが採用されることが多く、出血様式 (出血速度の違いや動脈性・静脈性出血の違い) に着目した研究の報告は少ない。この背景から、我々は出血速度の違いが血液凝固機能に与える影響についての研究を実施し、出血速度は循環障害と線溶系に關与する PAI-1 生成に影響を与えることを過去に報告した (Furukawa et al. 2020)。この研究のなかで我々は、PAI-1 は多くの組織・臓器から放出されるが、出血様式が異なることで PAI-1 放出を促進される組織・臓器も異なるのではないかと仮説を立てた。循環障害の指標として血中 Lactate が用いられることが多いが、Lactate は主に筋肉で産生されるため心臓や肝臓といった各臓器の組織低酸素状態を正確に反映していないと考えられる。そこで、細胞外フラックスアナライザー (Seahorse XFe24 Analyzer, Agilent) を用いてミトコンドリア呼吸を測定することで各臓器の組織低酸素状態の評価を検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、出血性ショックモデルラットにおける出血様式の違い (動脈性出血と静脈性出血) による局所循環の違いの評価を行い、局所循環と凝固系・線溶系の関連を検討することである。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア呼吸の測定

ラットから採取した心臓・肝臓・腎臓・脾臓組織をサンプルとした。細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリアの酸素消費速度 (OCR) を測定した。

ミトコンドリアの単離

ミトコンドリア単離は、文献 (Leger et al. 2020, Frezza et al. 2007) の方法を参考に適宜修正を加えて実施した。ミトコンドリア単離は単離用バッファー (バッファー A: KCl 100 mM, MPOS 50 mM, EGTA 2 mM, FA-free BSA 0.2%) を用い実施した。心臓・脾臓はバッファー A 液中で細かく刻んだ後、ダウンス型ホモジナイザーでホモジナイズ、その後ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。心臓サンプルは遠心 (800 × g, 10 min, 4 °C) により上清 (A) と沈殿に分離した。沈殿はバッファー A で再懸濁した後、サブチリシン (1110 unit/ml) を加え、ポッター型ホモジナイザーで再びホモジナイズし、遠心 (8000 × g, 10 min, 4 °C) 沈殿をバッファー A で再懸濁後に再び遠心 (800 × g, 10 min, 4 °C) し得られた上清 (B) を上清 (A) に加えた。上清 (A+B) を遠心 (8000 × g, 10 min, 4 °C) 沈殿を蛋白定量用バッファー (バッファー B: KCl 100 mM, MPOS 50 mM, EGTA 2 mM) で再懸濁し再び遠心 (8000 × g, 10 min, 4 °C) 沈殿をバッファー B で再懸濁し蛋白量測定を行った。肝臓・腎臓はバッファー A 液中で細かく刻んだ後、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。肝臓・腎臓・脾臓サンプルは遠心 (800 × g, 10 min, 4 °C) 上清を回収し再び遠心 (8000 × g, 10 min, 4 °C) 沈殿をバッファー B で再懸濁し再び遠心 (8000 × g, 10 min, 4 °C) 沈殿をバッファー B で再懸濁し蛋白量測定を行った。蛋白定量は Qubit Fluorometer (Invitrogen) を用いて測定した。

細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア酸素消費速度の測定。

取扱説明書の内容に従い実施した。アナライザー用のセンサーカートリッジは non-CO₂ incubator に一晩置き、実験当日に 4 つのインジェクションポートに Adenosine diphosphate (ADP) 50 μl、oligomycin 55 μl、fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazine (FCCP) 60 μl、20 μM rotenone/100 μM antimycin A (Rot/AA) 65 μl をそれぞれ注入した。細胞培養プレートに上記で得た単離ミトコンドリアを 50 μl ずつ注入し、遠心 (2000 × g, 10 min, 4 °C) 予め 37 °C に加温した測定用バッファー (sucrose 70 mM, Mannitol 220 mM, KH₂PO₄ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, HEPES 2 mM, EGTA 1 mM, FA-free BSA 0.2%) を 450 μl 加え、アナライザーで測定に使用した。単離ミトコンドリア濃度、ADP、Oligomycin、FCCP については適切な濃度を検討した。

(2) 動脈性出血、静脈性出血それぞれの出血性ショックモデルラットの作成

SD ラット (300-339 g, male) は無作為に対照群、動脈出血群、静脈出血群に分けた。ラットにイソフルラン吸入による麻酔を行い、右大腿動脈及び右大腿静脈にカテーテルを挿入した。カテーテル内はヘパリン生理食塩水 (10 unit/ml) で満たした。動脈カテーテルは血圧測定及び動脈性出血操作に使用し、静脈カテーテルは静脈性出血操作に使用した。総出血量は動脈性・静脈性出血ともに全身血液量 (56 mL/kg) の 50 % とした。出血操作はまず全身血液量の 40 % を 5 分以内で出血させた後、10 分おきに 5 % の出血操作を 2 回実施した (出血操作は合計 3 回、出血処置の総時間 25 分間) (図 1)。最後の出血操作から 10 分間観察を行った後、サンプル採取を実施した。対照群はカテーテル挿入のみを行い、出血操作は実施しなかった。麻酔濃度は、導入時は 4%、カテーテル挿入処置時は 3%、出血処置及び経過観察時は 1.5-2.0% とした。心臓・肝臓・腎臓・脾臓組織を前述のミトコンドリア呼吸測定サンプルとした。残りの心臓・肝臓・腎臓・脾臓組織及び血清・血漿を -80 °C で保存した。

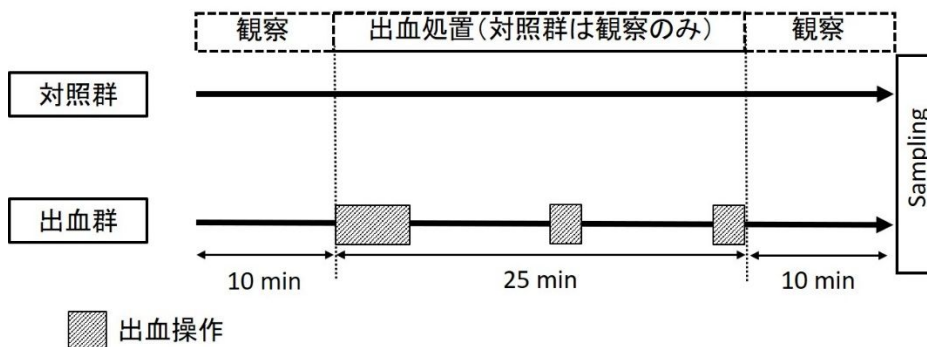


図 1 実験プロトコール

4. 研究成果

(1) 細胞外フラックスアナライザーのサンプル及び試薬濃度の検討

出血操作を実施していないラットの臓器を用いて、単離ミトコンドリア濃度、ADP、Oligomycin、FCCP については適切な濃度を検討した。単離ミトコンドリア濃度は心臓 200 µg/ml、腎臓 350 µg/ml、脾臓 400 µg/ml により概ね適切な結果が得られた。これらの単離ミトコンドリア濃度は、各試薬を加えていない段階 (base line) の OCR が 200-400 pmol/min に収まるものを適切な濃度と判断した (図 2)。200 µg/ml 以下または 400 µg/ml 以上では各試薬に対する反応が鈍化した。200 µg/ml 以下ではミトコンドリア濃度の不足、400 µg/ml 以上では base line で酸素が消費され枯渇することが原因と考えられた。肝臓については単離ミトコンドリアの蛋白濃度と OCR との関係が不安定であり、適切な蛋白濃度を決定することができなかった。ミトコンドリア以外の蛋白質の含有率に問題があると考えられ、遠心条件等の再検討を実施中である。試薬の適切な濃度は ADP・FCCP は OCR が最大になる最小濃度、Oligomycin は最も OCR が最低になる最小濃度とした (表 1)。

	ADP	Oligomycin	FCCP
心臓	5 mM (0.5 mM)	10 µM (1 µM)	10 µM (1 µM)
肝臓	-	-	20 µM (2 µM)
腎臓	5 mM (0.5 mM)	10 µM (1 µM)	10 µM (1 µM)
脾臓	10 mM (1 mM)	40 µM (4 µM)	20 µM (2 µM)

表 1 試薬の最適濃度
センサーカートリッジへの注入濃度
(括弧内は細胞培養プレートでの最終濃度)

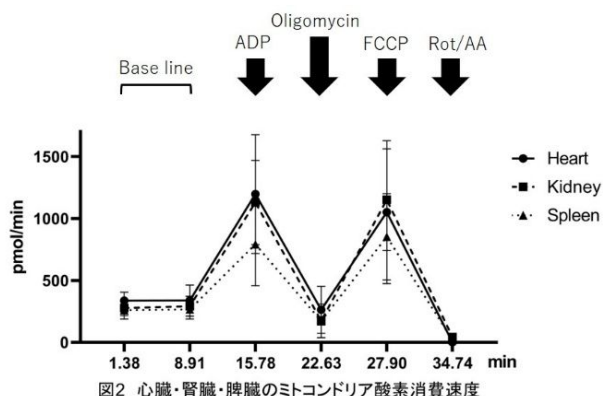


図2 心臓・腎臓・脾臓のミトコンドリア酸素消費速度

(2) バイタル変化

対照群、動脈出血群、静脈出血群においてバイタル測定及び、後述の血液ガス分析及びミトコンドリア呼吸の測定を実施した。なお、研究実施期間中は各群の十分なサンプル数を確保することはできなかったため、統計的処理は実施していない。対照群では時間経過による血圧の変化は認められなかった。動脈性出血、静脈性出血どちらも 1 度目の出血操作で血圧が大きく低下した (図 3)。その後、観察終了まで血圧の回復は見られなかった。動脈性出血と静脈性出血とで血圧に差は認められなかった。

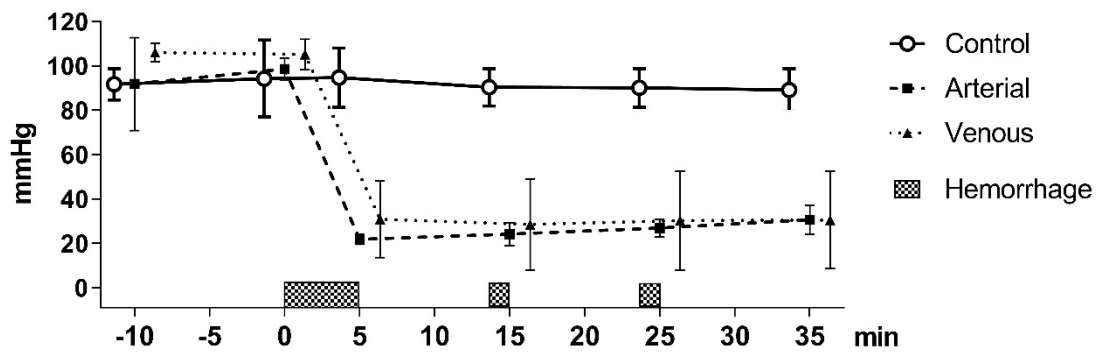


図3 平均動脈圧

(3) 血液ガス分析

pH、pCO₂ では明らかな差は認められなかったが、Lactate は動脈出血群及び静脈出血群で上昇していた(図4)。動脈出血群と静脈出血群との間に差は認められなかった。

(4) ミトコンドリア呼吸測定

心臓、腎臓、脾臓において OCR の測定を実施した。心臓ミトコンドリアにおいて、動脈出血群では FCCP 投与時における OCR の上昇が乏しかった(図5)。これは、ミトコンドリアの予備呼吸能が低下したことを意味する。静脈出血群はサンプル数が極めて少ないものの、ADP・FCCP による OCR 上昇が乏しい傾向にあった。臓器のミトコンドリア呼吸に対する出血の影響として、出血により脾臓ミトコンドリアの予備呼吸能が低下したと報告がある(Warren et al. 2017)。本実験では出血による脾臓のミトコンドリア呼吸の変化を認めなかった。

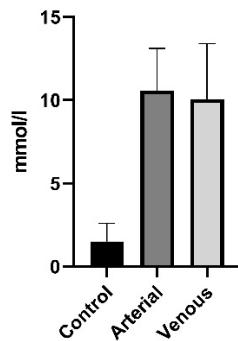


図4 血中Lactate

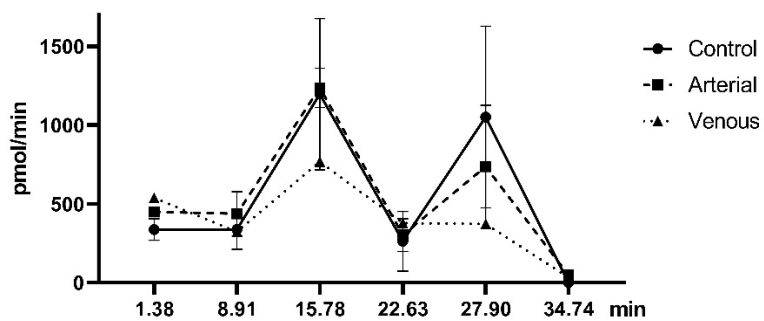


図5 心臓ミトコンドリアの酸素消費速度

(5) 凝固系・線溶系の測定

当初の目的の一つであった凝固系・線溶系の測定はまだ実施していない。各群十分なサンプル数を確保したのち実施する予定である。

<参考文献>

- 1) Xu et al. Impact of b-adrenoceptor blockade on systemic inflammation and coagulation disturbances in rats with acute traumatic coagulopathy. *Med Sci Monit* 2015; 21:468-476.
- 2) Furukawa et al. Effects of arterial hemorrhage speed on the blood coagulation/fibrinolysis system and hemodynamics in rats. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2020; 31:198-206
- 3) Leger et al. A procedure to extract functional isolated mitochondria from small-sized human atrial samples. Application to obesity with a partial characterization of the organelles. *Free Radic Biol Med* 2020; 153:71-79.
- 4) Frezza et al. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2007;2(2):287-95.
- 5) Isolated Mitochondria Assay using the XF24 Analyzer (revision 091104) (www.seahorsebio.com)
- 6) Warren et al. Mitochondrial dysfunction in rat splenocytes following hemorrhagic shock. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1863(10 Pt B):2526-2533.

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------