

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10973

研究課題名(和文)重症病態における内皮細胞機能変化の時間空間的イメージング手法による病態生理の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Pathophysiology by in vivo Imaging of Changes in Endothelial Cell Function in Severe Disease

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年注目が集まっているglycocalyx (GCX)に着目し、脱血 輸液(生食(NS)、アルブミン(ALB)、HES130)蘇生を行ったマウスを用いてGCXの障害を比較検討した。NS群は対照群と比較しGCXの厚さが減少し、syndecan-1の濃度は、対照群と比較し高値であった。FITC-HES70の間質蛍光強度は、対照群と比べて各測定時間でHES130群において低値であった。HES70の局在は、対照群、NS群、ALB群で血管内壁に局在し、HES130群では血管内腔に均一に存在した。生食はGCX機能を障害するが、HES130はGCXの崩壊を抑制し、血管透過性亢進を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年注目されている血管内皮細胞表面に存在するグリコカリックス(GCX)の障害にかqんする研究を行った。本研究期間内に、大量出血直後の輸液蘇生に関して、GCXが障害されること、生食輸液蘇生でそれが助長されること、ヒドロキシエチルスターチ(HES)やアルブミンがGCXの障害を抑制されることを証明した。本研究では、大量出血時のアルブミンの投与とHESの投与において、内皮細胞障害、特にGCX障害に関して同様の結果となった。本研究結果を踏まえれば、今後、同様の病態では、アルブミンの使用を抑制できる可能性があり、医療費の抑制に効果があるかもしれない、医療費や医療資源に関して重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on glycocalyx (GCX), which has been attracting attention in recent years, we compared the impairment of GCX using mice model subjected to blood removal fluid resuscitation (Saline (NS), albumin (ALB), HES 130). The NS group had a decreased thickness of GCX compared with the control group and higher concentrations of syndecan -1 compared with the control group. The interstitial fluorescence intensity of FITC-HES 70 was lower in the HES 130 group at each measurement time compared to the control group. Localization of HES 70 was on the inner vessel walls in the control, NS, and ALB groups. But it was uniform in the vessel lumen in the HES 130 group. Although saline impairs GCX function, HES 130 inhibited GCX breakdown and vascular hyperpermeability.

研究分野：麻酔科 集中治療

キーワード：大量出血 蘇生輸液 グリコカリックス ヒドロキシエチルスターチ 末梢循環 内皮細胞機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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（特に急性出血や敗血症患者）」の病態解明や、大量出血等の危機的状態に陥った患者の救命率向上のために、その微小循環やその病態生理の解明は必須である。臨床では、重症患者の治療効果評価や正確な病態把握をリアルタイムで行う方法がない。本研究は、急性出血モデルや敗血症モデルにおける実験動物の微小循環環境を「生体顕微鏡画像技術」を用いて観察し、変化に富む血管内皮細胞機能を明らかにすることである。具体的には、急性大量出血マウスモデルを使用し、様々な輸液製剤に対する初期輸液治療の内皮細胞機能に対する効果を評価し、グリコカリックスの機能障害の程度を生体でリアルタイムでの解明を目指す研究である。

2. 研究の目的

重症病態下にある個体の微小循環環境をリアルタイムに観察し、同時に組織科学的観点から内皮細胞構造の病的変化（血管内皮細胞管腔側の糖鎖構造であるグリコカリックス層:GCX の脱落や血管内皮細胞の形状変化）の関連性明らかにし、大量出血時の初期蘇生輸液療法に関する効果を比較検討する。

3. 研究の方法

生体でしか観察できない複雑な微小循環環境の解明では、in vitro では構築不可能である。本研究では、『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)』を用いて、従来法を改良した軽量樹脂製 DSC フレームを使用した。計画当初、敗血症モデルと急性出血モデルを想定していたが、急性出血モデルでの GCX の撮影に成功したので、本研究では敗血症モデルは使用しなかった。また、マウスアルブミンの精製に想定以上の時間を費やし、電子顕微鏡撮影、白血球粘着能の評価、酸化ストレス可視化トランスジェニックマウスの実験は実施できなかった。下記実験の具体的な概要を述べる。使用した蛍光色素は、血管透過性亢進の程度の評価として、TMR-DEX40kDa (TMR で蛍光標識した 40000 の平均分子量をもつデキストラン) と FITC-HES70 (FITC で蛍光標識した平均分子量 700000 の HES 製剤) を使用し、GCX の脱落の程度の評価として FITC-WGA (Wheat Germ Agglutinin:レクチン) を使用した。15 週前後の雄の BALB/c マウスに DSC を移植し、1 週間後に DSC が安定したのを確認後、右総頸静脈にカテーテルを挿入し、1.5ml 脱血し当量の各種輸液製剤 (生理食塩水;group NS、生理食塩水 + アルブミン;group NS-A、生理食塩水 + ボルペン®: 第 3 世代 HES (ヒドロキシエチルスターチ)(6%HES 130/0.4/9);group NS-V) を投与した。その後、TMR-DEX40kDa、FITC-HES70、FITC-WGA を投与し、それぞれの蛍光色素の蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

各種蘇生輸液製剤による GCX の損傷の程度であるが、(Fig.1)のように各群で鮮明に FITC-WGA で GCX が染色された。各群の蛍光強度の平均値 (GCX の厚さ) は、< group C:4.63 ± 1.96 μm、groups NS:2.39 ± 0.30 μm、NS-A:3.15 ± 1.06 μm、NS-V:3.09 ± 1.06 μm > であり、

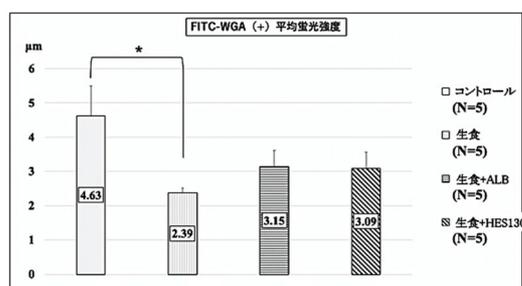
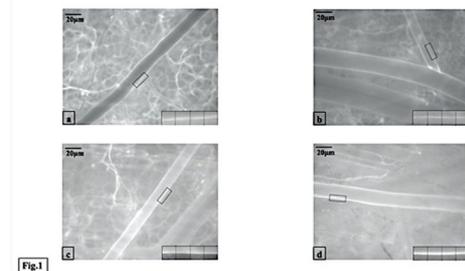


Fig.2

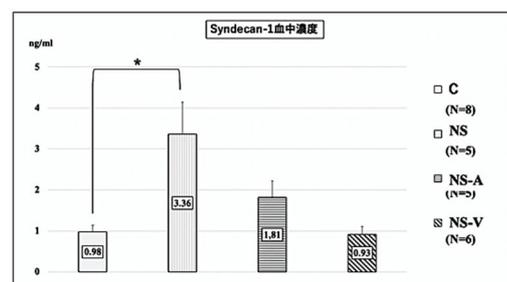


Fig.3

group C と比較して、group NS で有意に低値 ($P = 0.03$) であった。(Fig.2) また、各群の syndecan-1 の血中濃度の平均値は、 $< \text{group C}: 0.98 \pm 0.45 \text{ ng/ml}, \text{groups NS}: 3.36 \pm 1.78 \text{ ng/ml}, \text{NS-A}: 1.81 \pm 0.92 \text{ ng/ml}, \text{NS-V}: 0.93 \pm 0.44 \text{ ng/ml} >$ であり、group C と比較して、group NS で有意に高値 ($P = 0.0009$) であった (Fig.3)。group C では、内皮細胞障害が高度であったことが予想され、group NS-A と group NS-V では、GCX 層の崩壊が軽度であったことが示唆された。

次に間質での蛍光強度 (Fig.4) の比較であるが、TMR-DEX40 の各群での平均蛍光強度は、0 であり、group C と比べて、各群有意差はなかった。しかし、group NS-V では、全体的に平均蛍光強度が低値で、血管透過性亢進を抑制している可能性が示唆された (Fig.5)。一方、FITC-HES70 の間質での各群の各時間の平均蛍光強度に関しては、処置後 90 分を除き、group NS-V において、各時間で、全ての群に比べて有意に平均蛍光強度が低値であった (Fig.6)。血管透過性亢進状態を抑制している結果となった。

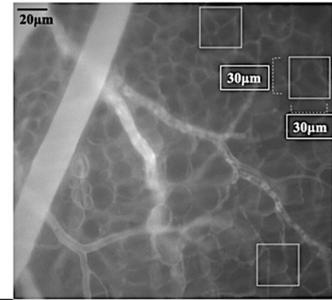


Fig.4

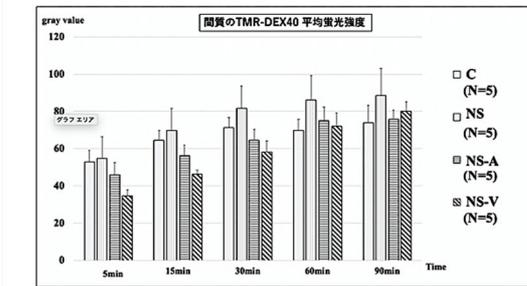


Fig.5

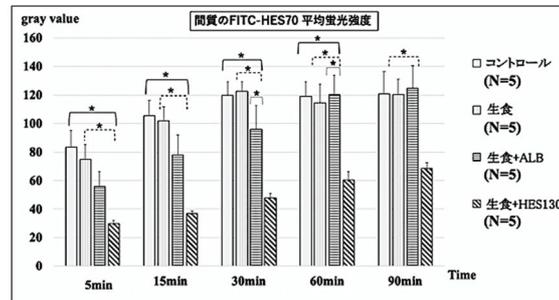


Fig.6

一方で、TMR-DEX40 と FITC-HES70 の血管内の局在に注目すると、(Fig.7) に蛍光色素が処置後 60 分後の写真を示すが、TMR-DEX40 は、細動脈の血管内に均一に存在しているが、FITC-HES70 は、group C、group NS、group NS-A では血管内腔の内壁に局在しているが、group NS-V では、血管内腔に均一に存在していた。上記の結果から考察すると、HES70 血管内腔への局在は、障害を受けた GCX への保護的なシーリング作用によると推察され、group NS-V では、HES130 の先行投与によりその作用は減弱されたのではないかと推察された。

FITC-HES70投与60分後の細動脈

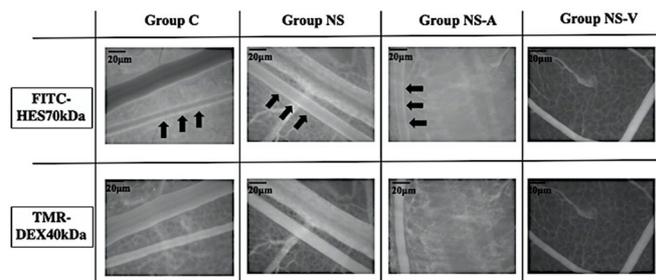


Fig.7

本研究では、急性出血病態のマウスを作成し、リアルタイムに末梢循環環境を観察し、内皮細胞機能障害、特に GCX の構造変化に注目し、様々な蛍光色素を用いて生体蛍光顕微鏡を用いて実験を行ったが、内皮細胞障害事の HES 製剤と GCX の親和性の可能性について観察できた。本実験系では、少なくとも大量出血時の生理食塩水投与の有害性に関しては、明確に証明できたが、HES と ALB に関する優劣は証明できなかった。少なくとも両者に関して group C と比較して、有意差がないことから考察すれば、ALB と HES は大量出血において、血管透過性や内皮細胞機能に関して同等の効果が望める。これは、社会的および医療経済学的にも問題視されている ALB の過剰使用に関して、その使用量が多い我が国では使用量を抑制できる可能性がある。本研究の結果は、大量出血の外傷患者管理や敗血症患者管理に今まで投与されてきた ALB の代替薬としての HES130 の妥当性について科学的根拠を与える可能性が高く、医療費の削減や重症患者の予後改善等に寄与する可能性があります。

研究成果として、本研究結果を発表いたしましたので下記に明示いたします。

<本研究に関する論文・著書>

- ・鵜澤 康二 輸液療法の考え方 micro & macro circulation approach 体液・代謝管理 Vol.32 15-22 2016.
- ・鵜澤 康二 安藤 直朗 満田 真吾 エキスパートに学ぶ 輸液管理のすべて; アドバンス編 重症患者の輸液管理をワンランクアップさせるために 18. 重症患者の輸液管理にはどの製剤を用いるべきなのか? 救急・集中治療 29巻11・12号 2017.11
- ・Uzawa K, Ushiyama A, Mitsuda S, Ando T, Sawa M, Miyao H, Yorozu T. The protective effect of hydroxyethyl starch solution on the glycocalyx layer in an acute hemorrhage mouse model. J Anesth. 2019 Oct 15.

<本研究に関する海外発表>

- ・Kohji Uzawa Akira U, Tomoko Y, 「Tetrastarch Suppresses Vascular Permeability in an Acute Hemorrhage Mouse Model」 45th Critical Care Congress U.S.A. Orland 2016.
- ・Kohji Uzawa Akira U, Tomoko Y 「Fluorescence microscopy evaluation of the protective effect of tetrastarch on the glycocalyx layer in an acute hemorrhage mouse model」 Anesthesiology Annual Meeting U.S.A. Chicago 2016.10.

<本研究に関する招待講演・シンポジウム>

- ・鵜澤 康二「周術期の輸液に HES は、本当に必要か? ~臨床データと動物実験データからの提案~」教育講演 第28回 多摩麻醉懇話会 杏林大学 2017.02.25
- ・鵜澤 康二「術中輸液療法の今: 血圧、尿量、動的パラメータの再考! ~グリコカリックスの真の姿とは? マウス出血モデルからわかること~」招待講演 首都圏麻醉カンファレンス 東京ミッドタウン 2017.3.4
- ・鵜澤 康二 牛山明 萬知子「目標思考型輸液管理戦略の提言~重症病態下 HES 製剤投与による末梢循環環境からの考察~」教育講演 第4回輸液管理研究会 品川プリンスホテル 2018.8.4
- ・鵜澤 康二「重症病態でのグリコカリックスの役割 ~大量出血アニマルモデルによる研究と臨床への架け橋~」シンポジウム 臨床麻醉学会北九州 2018.11.2
- ・鵜澤 康二「周術期体液管理 最近の話題」チーム医療 CE 研究会東日本主催新春セミナー 招待講演 東京 2019.1.
- ・鵜澤康二 牛山明: HES は ALB の代替療法になるのか? -重症病態下 HES 製剤投与による末梢循環環境動物実験からの考察-日本外科代謝栄養学会 56 回学術集会 体液代謝管理研究会・日本輸血細胞治療学会 ジョイントシンポジウム 招待講演 神戸 2019.7.4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鵜澤康二、満田真吾、安藤直朗	4. 巻 29
2. 論文標題 重症患者の輸液管理にはどの製剤を用いるべきか? (特集 エキスパートに学ぶ輸液管理のすべて) -- (アドバンス編: 重症患者の輸液管理をワンランクアップさせるために)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 救急・集中治療	6. 最初と最後の頁 911-918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鵜澤康二
2. 発表標題 Protection of endothelial glycocalyx layer through localization of hydroxyethyl starch in murine models of acute severe hemorrhage
3. 学会等名 微小循環学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鵜澤康二
2. 発表標題 過去-現在 Patient First Anesthesia とは? -15年前と比べて麻酔の質は向上したのか?
3. 学会等名 東京・埼玉・多摩 周術期循環モニタリングセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鵜澤康二
2. 発表標題 周術期体液管理 最近の話題
3. 学会等名 チーム医療CE研究会東日本主催 新春セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴澤康二
2. 発表標題 重症病態でのグリコカリックスの役割 大量出血アニマルモデルによる研究と臨床への架け橋
3. 学会等名 臨床麻酔学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴澤康二
2. 発表標題 目標思考型輸液管理戦略の提言 重症病態下HES製剤投与による末梢循環環境からの考察
3. 学会等名 第4回輸液管理研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴澤康二
2. 発表標題 重症病態におけるHESの役割について動物実験から新たに分かったHESの局在性
3. 学会等名 周術期の輸液・栄養管理に関する3領域合同検討会 第4回 Advisory Board Meeting（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴澤康二
2. 発表標題 目標思考型輸液戦略
3. 学会等名 Enhanced Surgical Recovery Forum in Tokyo（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鵜澤康二
2. 発表標題 目標思考型輸液戦略
3. 学会等名 福岡周術期管理セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鵜澤康二
2. 発表標題 周術期の輸液管理（術前、術中、術後の水分管理）
3. 学会等名 六本木周術期管理セミナー（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鵜澤康二、萬知子、牛山明、宮尾秀樹
2. 発表標題 Fluorescence microscopy evaluation of the protective effect of tetrastarch on the glycocalyx layer in an acute hemorrhage mouse model
3. 学会等名 Anesthesiology 2016 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鵜澤康二
2. 発表標題 生体蛍光顕微鏡を用いたテトラスターチ6%HES(130/0.4/9)のグリコカリックス保護効果の検討
3. 学会等名 第32回 体液・代謝管理研究会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴澤康二
2. 発表標題 周術期の輸液にHESは本当に必要か？臨床データと動物実験データからの提案
3. 学会等名 第28回 多摩麻酔懇話会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鶴澤康二
2. 発表標題 術中輸液療法の今：血圧、尿量、動的パラメータの再考！グリコカリックスの真の姿とは？マウス出血モデルからわかること
3. 学会等名 第14回 首都圏麻酔カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔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	萬 知子 (Yorozu Tomoko) (40210801)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	
研究分担者	牛山 明 (Usiyama Akira) (60291118)	国立保健医療科学院・その他部局等・上席主任研究官 (82602)	
研究分担者	安藤 直朗 (Ando Tadao) (10752199)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	