

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19592101
研究課題名 (和文) ショック後腸管リンパ液中に産生されるホスホリパーゼ A2 の臓器障害に対する影響
研究課題名 (英文) The role of phospholipase A2 in post-hemorrhagic shock mesenteric lymph on the development of distant organ injury.
研究代表者
増野 智彦 (MASUNO TOMOHIKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：00318528

研究成果の概要 (和文)：

出血性ショックにより生じる臓器障害発生機序解明を目的とした本研究より、出血性ショック後腸管リンパ液には虚血腸管より生物活性をもつメディエータが産生されることが確かめられた。ショック後腸管リンパ液中にはショック前には見られない PLA2 タンパクが確認され、ショック後リンパ液のもつ生理活性は *in vitro* および *in vivo* での PLA2 阻害薬投与により抑制された。更に、ショック後に生じる肺障害は、PLA2 阻害薬投与により軽減された。以上の結果から、出血性ショック後臓器障害の発生には、出血性ショック・蘇生により腸管リンパ液内に産生される PLA2 由来メディエータが関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this study is to determine the role of phospholipase A2 in post-hemorrhagic shock mesenteric lymph (PSML) on the development of distant organ injury. Mesenteric ischemia increases or generates PLA2 protein in PSML. PLA₂ inhibition, *in vitro* and *in vivo*, attenuates the neutrophil priming effect of PSML and prevents acute lung injury in a two-event model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：ショック、腸管リンパ液、脂質メディエータ、腸管虚血、ホスホリパーゼ A2、臓器障害

1. 研究開始当初の背景

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る。しかし、出血性ショック後臓器不全発症のメカニズムについては未だ十分に解明されていない。これまでの研究より、出血性ショック時に生じる臓器低灌流、特に腸管血流の低下が遠隔臓器障害の発生に深く関わっていることが示されている。

①腸管粘膜は平常時心拍出量の30%の灌流を受けているが、ひとたびショックに陥ると重要臓器への血流再分配により腸管血流は著しく低下し、体循環(血圧)が回復した後も腸管低灌流は長期にわたり遷延する。我々のグループで行ったラット小腸虚血再灌流モデルを用いた研究において、小腸虚血再灌流後には虚血に曝されていない肺に障害が生じることを示し、ショック下における腸管低灌流が遠隔臓器障害発生に深く関与していることを示した¹⁾。また、この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ることが他のグループにより報告²⁾され、遠隔臓器障害を生じさせる炎症性メディエーターの主要運搬経路として、これまで提唱されていた門脈血とは異なる、腸管リンパ液に注目することとなった。その後の研究にて、ショック後腸管リンパ液には好中球および血管内皮細胞を活性化するメディエーターが含まれていることが示され³⁾、その生理活性は動物種によらず保たれていることを増野らが報告した⁴⁾。更に増野は、腸管リンパの持つ生理活性はショックの深度・期間に相関することを報告している⁵⁾。しかし、これまでのところ生理活性を有するメディエーターの同定には至っていない。

②腸管内免疫担当細胞内にはPLA₂が豊富に存在することより、腸管はPLA₂の貯蔵庫と考えられる。PLA₂阻害薬の全身投与による小腸虚血再灌流後の肺障害発生への影響をみた研究では、PLA₂阻害薬投与により虚血再灌流後肺障害の発生が抑制されることが報告され、腸管虚血再灌流時に生じるメディエーターの産生にPLA₂が重要な役割を果たしていることが示された⁶⁾。また、重症外傷患者における血中PLA₂値の上昇はその後のARDS・MOFの発症率に相関することも報告されている⁷⁾。

参考文献)

- 1) Koike K *et al*, *Crit Care Med* (1994): Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin.
- 2) Magnotti LJ *et al*, *Ann Surg* (1998): Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial ce

ll permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock.

- 3) Gonzalez RJ *et al*, *J Trauma* (2001): Mesenteric lymph is responsible for post-hemorrhagic shock systemic neutrophil priming.
- 4) Salin EL, Masuno T *et al*, *J Trauma* (2004): Systemic neutrophil priming by lipid mediators in post-shock mesenteric lymph exists across species.
- 5) Masuno T *et al*, *Shock* (2006): Bioactivity of postshock mesenteric lymph depends on the depth and duration of hemorrhagic shock.
- 6) Koike K *et al*, *Ann Surg* (2000): Group IIA phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion.
- 7) Parttrick DA *et al*, *Crit Care Med* (2001): Secretory phospholipase A2 activity correlates with postinjury multiple organ failure.

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では「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、「腸管リンパ液内ホスホリパーゼA₂(PLA₂)およびPLA₂由来脂質メディエーター」に注目しその役割を明らかとすることを目的とし、下の実験仮説を立てた。

「First hit である出血性ショック後、虚血腸管より腸管リンパ液に産生されるPLA₂あるいはPLA₂由来脂質メディエーターにより好中球primingが生じ、好中球集積が遠隔臓器に起こる。更にSecond hitが加わった場合、好中球はactivationされ臓器障害を引き起こす」

本仮説を証明すべく以下のステップにて研究を行った。

【目的1】ショック後腸管リンパ液の持つ生物活性がPLA₂由来であるかを検討する。

リンパ液刺激による分離好中球からの活性酸素産生量を指標とし、ショック後リンパ液の持つ生物活性がPLA₂阻害薬のin vitro およびin vivo投与により変化するかを検討する。更にPLA₂抗体を用いたウエスタンブロット法により、リンパ液内PLA₂タンパクを検出する。

【目的2】ショック後に生じる肺障害がPLA₂阻害で軽減するかを検討する。

Two hit (hemorrhagic shock + IV LPS) 肺障害 model (詳細後述) を用い、PLA₂阻

害により肺障害の程度が軽減するかを検討する。

3. 研究の方法

【目的1】 ショック後腸管リンパ液の持つ生物活性が P L A 2 由来であるかを検討する。

ラット出血性ショックモデルおよびリンパ液の回収

オスSprague-Dawley ratを使用し、ペントバルビタール(50mg/kg)腹腔内投与にて麻酔した後、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ーションし、冷水槽内マイクロチューブ内に腸管リンパ液を経時的に採取。腹部正中創を縫合閉鎖した後、大腿動静脈をカニューレーション、動脈カテーテルは脱血および動脈圧モニターリングに、静脈カテーテルは輸液用に使用。ショック導入前1時間にショック前腸管リンパ液を採取。その後大腿動脈カテーテルより脱血し、平均動脈圧を30mmHgまで降下させ、同レベルを45分間維持。ショック完了後、脱血した血液および2倍量の生理食塩水を2時間かけ輸液し蘇生。蘇生完了後更に1時間腸管リンパ液を採取し、これをショック後腸管リンパ液として以下の実験に使用した。ショック後腸管リンパ液として蘇生完了後1時間のリンパ液を使用する理由は先行研究より、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。

実験1-1：出血性ショック後腸管リンパ液の持つ生物活性が P L A 2 阻害薬in vitro投与により抑制されるかを検討する。

ショック前、およびショック後腸管リンパ液をそれぞれ2群に分け、一方に P L A 2 阻害薬を加え、各々のリンパ液を分離好中球に添加し、産生される活性酸素量を測定し、リンパ液の持つ生理活性の指標とする。

好中球活性酸素産生の測定

ヒトあるいは同系ラットから分離した正常好中球を腸管リンパ液で5分間刺激し、その後1 μ Mのformylmethionyl-leucyl-phenylalanineあるいは200ng/mlのphorbol12-myristate13-acetateで活性化し、産生された活性酸素をSOD-inhibitable cytochrome c reduction法により測定する。

実験1-2：出血性ショック後腸管リンパ液の持つ生物活性が P L A 2 阻害薬in vivo投与により抑制されるかを検討する。

同じ実験系を用いショック導入30分

前より蘇生完了まで、P L A 2 阻害薬を経静脈的に持続投与する。P L A 2 阻害薬投与前、およびP L A 2 阻害薬を投与したラットから取り出したショック後腸管リンパ液を、実験1-1と同様に分離好中球に添加し、産生される活性酸素量を測定し、リンパ液の持つ生理活性の指標とする。

実験1-3：出血性ショック後腸管リンパ液内に産生された P L A 2 を検出する。

P L A 2 は分子量14kDのタンパク質である。実験1-1で得られたショック前、およびショック後腸管リンパ液を電気泳動し、P L A 2 抗体を用いたウエスタンブロット法により、リンパ液内 P L A 2 タンパクを検出する。

【目的2】 ショック後に生じる肺障害が P L A 2 阻害で軽減するかを検討する。

Two hit 肺障害 model

実験1と同様に出血性ショック(First hit)平均動脈圧30mmHg x 45分間に続き蘇生を行い、蘇生完了後Second hitとしてLPS(100 μ g/kg)を静脈内投与する。Evans-blue色素を同時に投与し、6時間後に肺胞洗浄液内に漏れだしたEvans-blue濃度により肺障害程度の指標とする。

実験2：Two hit 肺障害 modelを用い P L A 2 阻害薬投与によりショック後肺障害の発生が抑制できるかを検討する。

上記Two hit 肺障害 modelを使用し、P L A 2 投与群ではショック前30分前より蘇生終了まで P L A 2 阻害薬を投与し、6時間後に肺胞洗浄液内に漏れだしたEvans-blue濃度により肺障害程度を P L A 2 投与群、非 P L A 2 投与群で比較する。合わせてmyeloperoxidase assayにて評価した肺内好中球集積を両群間で比較する。

肺障害の測定評価

Second hitと同時にEvans-blue 1mgを静脈内投与し、6時間後に採血をする。ratをsacrificeしたのち生理食塩水5mlx3回にて気管肺胞洗浄を行う。気管肺胞洗浄液および血漿中のEvans-blue吸光度を測定し、その比率(気管肺胞洗浄液/血漿)を肺障害の指標とする。

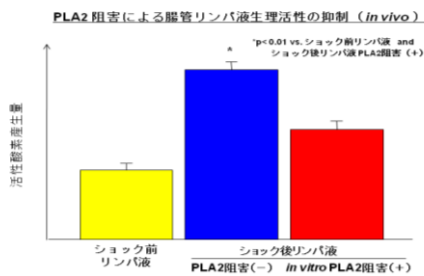
好中球集積測定

Second hit後6時間においてratをsacrificeし、肺を摘出し直ちに凍結保存する。保存された試料の重量を測定後、リン酸緩衝液内で粉碎し遠心分離する。上清に過酸化水素とdimethoxybenzidineを混合し、吸光度を測定する。

4. 研究成果

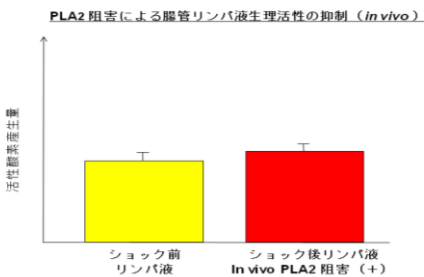
実験1-1：出血性ショック後腸管リンパ液の持つ生物活性がPLA2阻害薬in vitro投与により抑制されるかを検討する。

先行研究と同様に、出血性ショック後には腸管リンパ液の持つ生理活性は増大していた。ショックラットより採取した腸管リンパ液にin vitroにてPLA2阻害薬を投与すると、ショック後腸管リンパ液の持つ好中球活性化能は下図のごとく減弱することが示された。



実験1-2：出血性ショック後腸管リンパ液の持つ生物活性がPLA2阻害薬in vivo投与により抑制されるかを検討する。

PLA2阻害薬をin vivoに投与したラットから採取した腸管リンパ液を分離好中球に加え、リンパ液の持つ好中球活性化能を観察したところ、in vivoにPLA2阻害薬を投与されたラットから採取したショック後腸管リンパ液はショック前リンパ液と同程度にまで生理活性が抑制されていた。



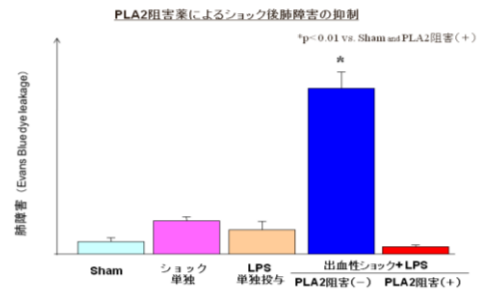
実験1-3：出血性ショック後腸管リンパ液内に産生されたPLA2を検出する。

PLA2抗体を用いたウエスタンブロット法により、ショック前後の腸管リンパ液内に存在するPLA2タンパク同定をおこなったところ、ショック前腸管リンパ液内ではPLA2タンパクは同定されなかったが、ショック後腸管リンパ液内にはPLA2タンパクの存在が同定され、ショックにより腸管リンパ液内にはPLA2タンパクが増加しているこ

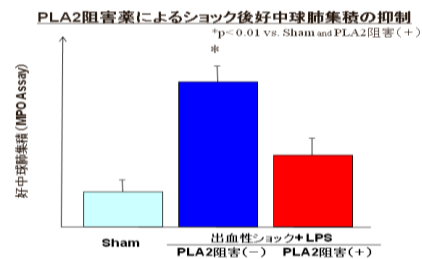
とが示された。

実験2：Two hit 肺障害 modelを用いPLA2阻害薬投与によりショック後肺障害の発生が抑制できるかを検討する。

下図のごとくsham群、出血性ショック単独群、LPS単独投与群ではいずれも肺障害の程度に大差はなかったが、出血性ショックに引き続きLPS投与を行った群では、肺障害の程度は優位に増大した。一方、PLA2阻害薬をin vivoに投与しつつ出血性ショックに引き続きLPS投与を行った群では、肺障害の程度はsham群と同程度まで抑制されていた。



Two hit後の肺に集積した好中球量をMPO assayにてPLA2阻害薬投与群、非投与群の2群で比較したところ、PLA2阻害薬非投与群に比べPLA2阻害薬投与群にて好中球の肺への集積が優位に抑制されていた。



以上の本研究の結果より、出血性ショック後にはPLA2関連メディエーターが腸管リンパ液内に産生され、好中球活性化を介して肺障害を引き起こしていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1件)

- ① 増野 智彦、出血性ショック後に生じる臓器不全と腸管リンパ液の関与、生体と侵襲、査読無、18巻、2009、19～28

〔学会発表〕(計 3件)

- ① 増野 智彦、出血性ショック後に生じる臓器不全と腸管リンパ液の関与、第 10 回 侵襲と生体反応研究会、2009 年 2 月 21 日、東京
- ② 増野 智彦、出血性ショック後肺臓器は腸管リンパ液を介し発生する-IIa 型ホスホリパーゼ A2 由来メディエーターの関与-、第 45 回日本腹部救急医学会総会、2009 年 3 月 12 日、東京
- ③ 増野 智彦、出血性ショック後に生じる臓器不全と腸管リンパ液の関与、Young Investigators Supporting Critical Care Conference、2009 年 6 月 27 日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増野 智彦 (MASUNO TOMOHIKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：00318528

(2) 研究分担者

佐藤 格夫 (SATO NORIO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30409205

横田 裕行 (YOKOTA HIROYUKI)

日本医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：60182698