

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度
 課題番号：19592103
 研究課題名（和文） 運動トレーニングの循環ショックへの影響 ―肝循環に注目して―
 研究課題名（英文） The effect of exercise training on circulatory shock with special reference on hepatic circulation
 研究代表者
 宮前 俊一（MIYAMAE SHUNICHI）
 金沢医科大学・医学部・講師
 研究者番号：30121263

研究成果の概要：

運動トレーニングがアナフィラキシーショック、敗血症によるショックのモデルであるエンドトキシンショック、出血性ショックを軽減できるかどうか、ラット実験モデルで検討した。運動はトレッドミルで、速度 10m/min、持続 10 分から 30m/min、30 分間まで 4 週かけて漸増し負荷した。運動トレーニングはアナフィラキシー肝血管収縮を抑制したがアナフィラキシー低血圧は抑制しなかった。エンドトキシンショック、出血性ショックでは抑制効果はみられなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

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：救急蘇生学、循環ショック

1. 研究開始当初の背景

近年、運動トレーニングが冠循環の虚血再灌流障害を抑制することが報告されている。その機序として血管拡張物質である一酸化窒素(Nitric oxide;NO)の産生を担う eNOS の発現増加、虚血耐性をもたらす heat shock protein (HSP)72 の産生ならびに合成遺伝子発現が挙げられる。一方、循環ショックも虚血再灌流障害の一面を有する。したがって、

運動トレーニングが循環ショックの予防となることが期待される。

また、循環ショックが不可逆性となり致死的になる機序に末梢血管の血管収縮物質に対する反応性の低下が指摘されている。

一方、肝血管収縮が静脈還流減少を惹起し、循環ショックの病態形成に重要な役割が示されてきている。すなわち、肝血管の反応性は循環ショック時の静脈還流量を決定する

上で極めて重要である。

我々は肝循環をモニターする循環ショックモデルならびに摘出灌流肝臓モデルを確立しており、*in vivo* 及び *ex vivo* で多面的かつ統合的に肝循環の挙動を捉えることができる。今回の検討では両者のモデルを駆使して肝血管の反応性に注目して循環ショック耐性に及ぼす運動の効果を検討する画期的なものであった。

2. 研究の目的

運動トレーニングが循環ショックの血圧低下と血管反応性を改善させるか、肝循環に注目して生理学的に明らかにする。

ラットで長期的なトレッドミル運動トレーニングを行い、そのアナフィラキシーショックならびに敗血症・エンドトキシンショック、出血性ショックへの効果を致死率、体血圧低下、肝血管と体循環血管反応性について生理学的に明らかにする。

3. 研究の方法

循環ショックの体血圧の低下への影響は *in vivo* のモデルを用い、肝循環への影響は摘出灌流肝臓のモデルを用いた。実験は運動トレーニングラット（運動群）と運動をさせないラット（対照群）で行った。

(1) 運動トレーニング

雄性 SD ラット (5 週令) を用いた。運動はトレッドミルで、速度 10m/min、持続時間 10 分間を週 5 回施行よりはじめ、負荷を漸増して 4 週間には 30m/min、30 分間を負荷した。

(2) アナフィラキシーショック

① *In vivo* ラットのアナフィラキシーショック：麻酔下での実験は我々の既報のモデル (Shibamoto et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(4):H1436-41,2005) を用い、無麻酔実験でも行った。

アナフィラキシーショックは抗原とする卵白アルブミン(1 mg)を完全アジュバントとともに皮下投与して 2 週間後に、抗原(0.6 mg)を静脈内投与して惹起した。

麻酔下での実験ではベントバルビタール麻酔、自発呼吸下に右外頸静脈と総頸動脈にカニューレ後、開腹し門脈にカニューレ後して閉腹した。中心静脈圧、体血圧、門脈圧を連続的に測定した。運動実験に先立ち、超音波変位測定システムを用いて、クリスタルを肝左葉上面 3 個と下面 1 個に接着させて三角錐の頂点となるようにして、その三角錐の容積を測定して肝臓のうっ血状態を連続的にモニターし肝血管収縮の肝内血液量に及ぼす影響を検討した。また、一部のラットでは開腹下に肝臓左葉の肝細静脈の圧をマイクロピペット法で測定し、肝血管抵抗

の分布の変化、すなわちアナフィラキシー時に肝血管収縮部位を解明した。

無麻酔下の実験では、麻酔下に外頸静脈と総頸動脈、さらに開腹して門脈にカニューレ後した。手術後 24 時間以上経過してから覚醒下で体血圧、門脈圧、心拍数を連続的に測定した。なお、運動の実験に先立ち、覚醒ラットモデルの確立と下記の摘出灌流肝増での運動の効果に及ぼす NO の影響を検討する実験のために *in vivo*、無麻酔でアナフィラキシーショックに及ぼす NO の影響を eNOS, iNOS, nNOS の阻害剤を用いて検討した。

運動トレーニングの効果の評価は抗原投与後の体血圧の低下と門脈圧の上昇を運動群と対照群で比較検討した。

② 摘出灌流肝のアナフィラキシー：我々の既報のモデルを用いた (Shibamoto et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(4):H1436-41,2005)。

運動群ならびに対照群の感作ラットから肝臓を摘出し、門脈からヘパリン加自家血液で定流量で灌流した。門脈圧、肝静脈圧、肝重量（肝血液量の指標として）を測定した。

アナフィラキシー反応は卵白アルブミン抗原(0.1 mg)を灌流液内に投与して惹起した。

さらに、運動トレーニング効果に一酸化窒素(nitric oxide; NO)が関与しているかを NO synthase 阻害剤である L-NAME (100 μ M) を前処置して抗原投与による反応を比較検討した。

(3) エンドトキシンショック

運動群と対照群において、アナフィラキシーショックの *in vivo* 実験と同様の方法で覚醒下に体血圧、門脈圧ならびに心拍数を連続的に測定した。E. coli. のエンドトキシン(10 mg/kg)を静脈内投与した。抗原投与後の体血圧の下降程度と門脈圧の上昇程度、致死率を判定し、運動群と対照群で比較した。

(4) 出血性ショック

運動群と対照群において、アナフィラキシーショックの *in vivo* 実験と同様の方法で体血圧、門脈圧ならびに心拍数を連続的に測定した。

出血性ショックは麻酔下ラットの大腿動脈から体血圧が 60mmHg になるまで毎分 1ml/kg を脱血させ、その後、脱血血液を還血した。さらに、門脈内に Norepinephrine (Nor;50nmol/kg)を出血前後で投与し門脈圧の反応性を比較検討した。

4. 研究成果

(1) アナフィラキシーショック

In vivo 実験：抗原投与後の体血圧の低下と

門脈圧の上昇、心拍数の変化を運動群と対照群の無麻酔ラットで比較した。運動ラットで体重ならびに心拍数は対照ラットと比較して有意に小さかった。しかしながら、抗原投与後の体血圧の低下、門脈圧の上昇、心拍数の上昇の程度は両群間に有意差がみられなかった。

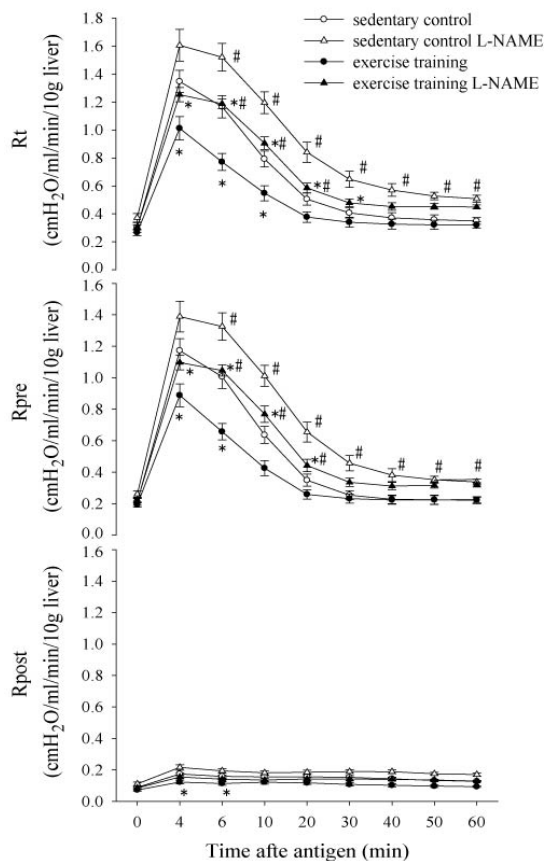
なお、覚醒下ラットのアナフィラキシーショックモデルを確立した。そのモデルにおいて、ラットアナフィラキシーショックにおけるNOの役割を検討した。その結果、コントロールのアナフィラキシーでは血圧低下、門脈圧上昇がみられたが、抗原投与後48時間後においても死亡は無かった。一方、nNOS阻害剤では血圧低下が軽減され、アナフィラキシー低血圧への関与が示唆された。しかし、iNOS阻害剤はなんら関与を認めなかった。eNOS阻害剤のL-NAMEは致死的となった。

また、麻酔下のラットアナフィラキシーショックモデルにおいて肝血管反応を解明するためにマイクロピペット法により肝細静脈圧を測定した結果、アナフィラキシー低血圧時には門脈圧の上昇に対して肝細静脈圧の上昇が非常に小さく、後述の摘出灌流肝臓での成績と合致する結果が得られた。すなわち、アナフィラキシー肝臓血管収縮は前類洞血管収縮が優位であることが判明した。

さらに、ラットアナフィラキシー時の肝臓容積を測定する超音波クリスタル法を新たに確立した。その方法により、アナフィラキシーショック時ともなる肝血管収縮はイヌのアナフィラキシーショックとは異なり肝臓内の血液を減少させることを *in vivo* ラットで初めて明らかにした。

摘出灌流肝臓実験: *in vivo* と同様に感作したラットから肝臓を摘出し、ヘパリン加自家血液で定流量灌流した肝標本を作成し、抗原を灌流液内に投与して肝アナフィラキシーを惹起した。抗原投与後の門脈圧上昇は運動負荷ラットの肝臓では対照群に比べて有意に小さかった。このことから、運動トレーニングにより摘出灌流肝臓においては肝血管収縮反応が抑制されることが明らかとなった。一方、肝臓の毛細管圧を反映する *double occlusion pressure* は両群間で差がなかった。以上の結果から、運動トレーニングラットではアナフィラキシー肝血管収縮反応は前類洞血管で低下していることが判明した。

さらに、eNOS阻害剤であるL-NAME前処置で運動群および対照群のアナフィラキシーによる前類洞抵抗の増加をともに有意にはほぼ同程度増強させた。このことから、運動トレーニングによるアナフィラキシー肝血管収縮の抑制効果には一酸化窒素が関与していないことが示唆された(図参照)。



図の説明: Rt, 総肝血管抵抗; Rpre, 前類洞抵抗; Rpost, 後類洞抵抗; *P<0.05 between the exercise training and the sedentary control group; #P<0.05 between livers with L-NAME and livers without L-NAME.

(2) エンドトキシンショック

無麻酔ラットに *E. coli* エンドトキシン (LPS:10 mg/kg)を静脈内投与した。運動群と対照群ともにLPSの投与により体血圧は一過性に10mmHg低下し、門脈圧は一過性に8cmH₂O上昇した。その後、運動群では体血圧は40分に再び一過性に低下したが元に復した。しかしながら、体血圧と門脈圧ともに両群間に有意差はなかった。なお、運動群では心拍数が投与前には有意に低かった。また、今回のLPSの投与では48時間後にも全例生存し両群間に有意差がなかった。今回のLPS投与量では運動の効果は見られなかった。

(3) 出血性ショック

麻酔下ラットの大動脈から体血圧が60mmHgになるまで毎分1ml/kgで脱血させ、その後還血した。さらに、門脈内にNorepinephrine (Nor;50nmol/kg)を投与し、門脈圧の反応性を比較検討した。体重は運動

群が対照群に比べて 20g 少なかった。体血圧は basal level から運動群で高く、その後も対照群よりも高いレベルを維持したが両群ともに 50 分には 60mmHg に達した。脱血血液量も両群間で有意差はなかった。また、還血後の体血圧も 120 分まで両群間に有意差はなかった。一方、Nor に対する門脈圧の上昇反応は出血前では運動群で有意に大きかったが、出血後には両群間に差異は見られなかった。生存時間についても全例が出血後 48 時間に生存しており、運動の効果は評価し得なかった。以上より、basal level では運動ラットで体血圧ならびに門脈圧の反応性は高かったが、今回採用した運動の強度では出血に対する有意な効果は見られなかった。なお、この結果には両群間の体重差も影響していた可能性がある。

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 5 件)

- ① Cui S, Shibamoto T, Zhang W, Kurata Y, Kashimura O, Miyamae S. Exercise training attenuates anaphylactic venoconstriction in perfused rat livers, but does not affect anaphylactic hypotension in conscious rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (in press)
- ② Takano H, Shibamoto T, Zhang W, Kurata Y. Liver volume, as assessed by four ultrasonic crystals arranged to form a tetrahedron, decreases during anaphylactic shock in anesthetized rats. *Shock*. (in press), 査読有.
- ③ Takano H, Shibamoto T, Zhang W, Kurata Y, Toga H. Hepatic microvascular pressure during anaphylactic shock in anesthetized rats. *Microvasc. Res.* 78(2):169-173, 2009, 査読有.
- ④ Zhang W, Shibamoto T, Cui S, Takano H, Kurata Y. 7-nitroindazole, but not L-name or aminoguanidine, attenuates anaphylactic hypotension in conscious rats. *Shock*. 31(2):201-6, 2009, 査読有.
- ⑤ Shibamoto T, Shimo T, Cui S, Zhang W, Takano H, Kurata Y, Tsuchida H. The roles of mast cells and Kupffer cells in rat systemic anaphylaxis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293(6):R2202-9, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 張 偉、芝本利重、宮前俊一、倉田康孝、

運動トレーニングのラットアナフィラキシーショックへ及ぼす影響、第 56 回中部日本生理学会、2009 年 12 月 4 日、石川県金沢市

- ② Wei Zhang, Toshishige Shibamoto, Sen Cui, Hiromichi Takano, Yasutaka Kurata. The role of nitric oxide in anaphylactic shock in conscious rats. 第 85 回日本生理学会大会、2008 年 3 月 27 日、東京都新宿

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮前 俊一 (MIYAMAE SHUNICHI)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：30121263

(2) 研究分担者

芝本 利重 (SHIBAMOTO TOSHISHIGE)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90178921