

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2007～2008
課題番号：19890263
研究課題名（和文） 出血性ショック時の肺障害における炎症性サイトカインの役割と法医診断への応用
研究課題名（英文） Role of inflammatory cytokines on lung dysfunction following hemorrhagic shock and its application to forensic diagnosis
研究代表者 佐藤 寛晃（SATO HIROAKI） 産業医科大学・医学部・産業医学基礎研究医員 研究者番号：50441845

研究成果の概要：ラットを出血させてショック状態とし、その肺を観察した。すると出血の5時間後には肺障害が生じていて、肺における炎症反応がその原因と考えられた。また、炎症反応の際に増加する好中球という白血球の一種が肺の中で有意に増加していたので、実際の出血性ショック死例の肺を調べたところ他の死因よりも有意に好中球が増加していた。このことから肺での好中球の増加は、出血性ショックの診断マーカーになる可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	970,000	0	970,000
2008年度	590,000	177,000	767,000
総計	1,560,000	177,000	1,737,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , neutrophil, inflammation, lung dysfunction

## 1. 研究開始当初の背景

法医解剖においては、出血性ショックから臓器機能不全を経て死亡した事例を多く経験する。しかし、出血性ショックから多臓器不全に陥り死に至る病態は未だ明確に解明されておらず、法医学的診断において出血と死亡との因果関係がしばしば問題となる。そこで、出血性ショックにより臓器障害が生じるメカニズムと、それに関連した臓器の器質的变化を明らかにすることができれば、法医実務における出血性ショックの診断が可能となると考え、本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

これまでに(1)出血性ショックから3時間以内に心臓と腎臓において炎症性サイトカインである TNF(tumor necrosis factor)- $\alpha$

および IL(interleukin)-1 $\beta$  が発現し、5時間後には臓器中に好中球が増加する、(2)好中球の生理活性作用により臓器の機能的障害・器質的变化が生じる、(3)臓器中の好中球の増加が出血性ショックの診断根拠となりうることを明らかにした。本研究では、出血性ショックによって障害を受けやすい肺について、同様の研究を行い、さらに、上記の実験結果を当教室の解剖事例において検討し、問題点などを明らかにして法医診断への応用を試みた。

## 3. 研究の方法

おもに次の7項目について検討した。

- (1) ラット出血性ショックモデルの作製
- (2) 血圧・心拍数の変化
- (3) 肺における炎症性サイトカイン発現

- (4) 肺実質傷害
- (5) 呼吸機能障害
- (6) 肺組織変化と免疫組織学的検討
- (7) 解剖事例の肺での検討

これらの方法論を検討項目別に順次記載する。

#### (1) ラット出血性ショックモデルの作製

出血性ショックモデルには雄 Wistar ラット (体重 250~400g) を使用した。ウレタン (470mg/体重 kg) とクロラロース (23mg/体重 kg) の腹腔内投与により麻酔し、適温 (37±1°C) に維持された実験台の上に仰向けにし、自発呼吸が可能な状態で固定した。麻酔導入後に左総頸動脈に 3 フレンチのポリエチレンカテーテルを挿入した。カテーテル挿入 40 分後に全血液量の 25% (6.5±0.1ml/体重 100g) を 20 分間かけて出血させた。

実験モデルは

- ・ カテーテル挿入 30 分後に生理食塩水を皮下注射し、出血させない Sham 群
- ・ 生理食塩水を皮下注射し、出血させる Hemorrhage 群
- ・ 炎症性サイトカインの発現を阻害する FR167653 を 5mg/体重 kg を皮下注射にて投与し、出血させない FR 群
- ・ FR167653 を投与し、出血させる FR+Hemorrhage 群

の計 4 群において各群 5 匹ずつ実験を行った。

出血 1, 3 および 5 時間後に動脈血を 2ml 採集し、瀉血してラットを殺した後、開胸して肺静脈血と肺を採取した。肺静脈血は 3000 回転/20 分間遠心分離して血清のみを採取し、血清と肺は -80°C で保存した。また、器質の変化や免疫組織学的検討を行うために出血 5 時間後の肺の一部はホルマリンにて固定した。

#### (2) 血圧・心拍数の変化

左総頸動脈に挿入されたカテーテルの一端を圧センサーに接続し、持続的に動脈圧を測定し、同時に第 II 誘導心電図により心拍数を測定した。これらの結果は 30 秒ごとにポリグラフ装置に記録され、20 分ごとに数値化した。

#### (3) 肺における炎症性サイトカイン発現

炎症性サイトカインのうち最も早期に発現し、好中球の活性化や集簇など様々な炎症反応を引き起こす TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の肺における mRNA レベルでの発現の経時的变化を RT-PCR 法を用いて検討した。検出されたバ

ンドと GAPDH のバンドの比を Scion Image Beta 4.02 によって解析して数値化した。また、採取した肺静脈血中における TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の濃度を ELISA 法によって測定した。

#### (4) 肺実質傷害

肺実質傷害は急性肺傷害の際に上昇する lactate dehydrogenase-3 isozyme (LDH-3) の肺静脈血中濃度を電気泳動法によって測定することにより評価した。

#### (5) 呼吸機能障害

出血 1, 3 および 5 時間後に採取された動脈血を動脈血ガス分析装置 (ABL 520 Blood Gas System) にて測定し、測定値のうち、動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>) および肺動脈血酸素較差 (A-aDO<sub>2</sub>) を用いて呼吸機能の評価した。

#### (6) 肺組織変化と免疫組織学的検討

出血 5 時間後における肺の器質的变化を確認するため、ホルマリンにて固定した肺の組織切片を作製した。

さらに炎症反応が傷害に関与していることを明確にするため、5 時間後の肺において好中球に特異的に存在する Myeloperoxidase (MPO) を免疫組織学的に染色して可視化し、組織 (250  $\mu$ m)<sup>2</sup> の範囲に出現する好中球の数をカウントシグラフ化した。

#### (7) 解剖事例の肺での検討

当教室における過去 17 年間の解剖事例から出血性ショックにより死亡した事例において、死後変化や病的変化を考慮して死後経過 24 時間以内かつ病的所見を認めない事例の肺実質内 (1000  $\mu$ m)<sup>2</sup> の範囲に存在する好中球の数を死後経過時間によって 3 群に分けてカウントシグラフ化した。

## 4. 研究成果

研究成果を前記の検討項目別に順次記載する。

#### (1) ラット出血性ショックモデルの作製

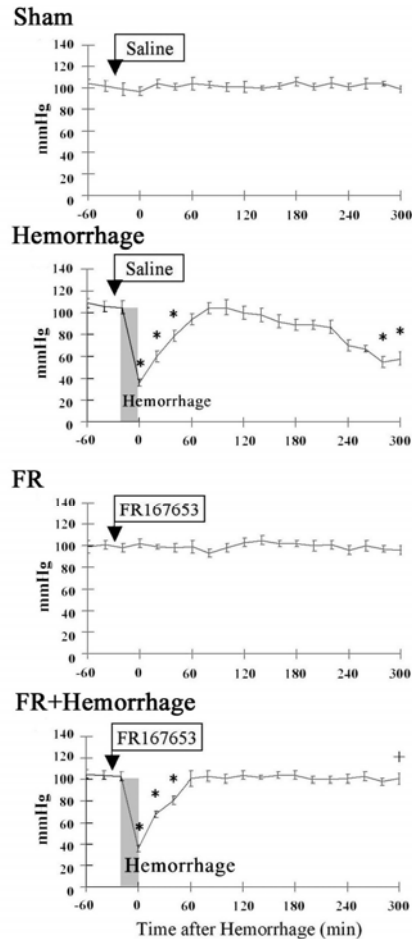
前記ラット出血性ショックモデルにおいて、問題なく実験を行うことができた。

#### (2) 血圧・心拍数の変化

平均血圧の経時的变化を示す (図 1)。Sham 群と FR 群は実験を通じて血圧の変化をほとんど認めなかった。出血によって血圧は有意に低下 (Hemorrhage 群: 105±6 mmHg から 36±3 mmHg, FR+Hemorrhage 群: 103±4 mmHg か

ら  $36 \pm 3$  mmHg)したが、出血 60 分後には出血前まで回復した。Hemorrhage 群は一旦回復した血圧が出血 280 分後以降に再び有意に低下した。しかし FR+Hemorrhage 群では後期の血圧低下を認めなかった。

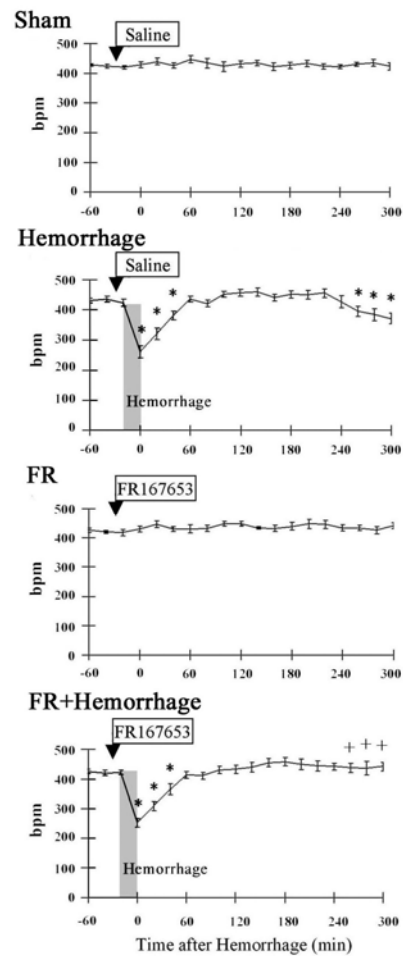
図 1 平均血圧の経時的変化



\*  $p < 0.05$  vs Sham  
+  $p < 0.05$  between Hemorrhage and FR+Hemorrhage

心拍数 (図 2) も平均血圧と同様に Sham 群と FR 群間には実験を通じて変化はほとんど認められなかった。一方、Hemorrhage 群および FR+Hemorrhage 群は出血直後に心拍数の有意な低下を認めた (Hemorrhage 群:  $424 \pm 12$  bpm から  $261 \pm 19$ , FR+Hemorrhage 群:  $423 \pm 7$  bpm から  $253 \pm 15$  bpm) が、出血 60 分後には出血前の値まで回復した。その後、Hemorrhage 群では徐々に低下し出血 260 分後以降に再び有意に低下した。しかし、FR+Hemorrhage 群では後期の心拍数低下を認めなかった。

図 2 心拍数の経時的変化



\*  $p < 0.05$  vs Sham  
+  $p < 0.05$  between Hemorrhage and FR+Hemorrhage

(3) 肺における炎症性サイトカイン発現 TNF- $\alpha$  の mRNA レベルでの肺実質における発現と肺静脈血中濃度の経時的変化を示す (図 3)。なお、ND とは検出限界以下であることを示している。Sham 群と FR 群間には実験を通じて発現の変化をほとんど認めなかった。Hemorrhage 群における TNF- $\alpha$  mRNA の発現は出血 1 時間後で強く上昇し ( $4.83 \pm 0.50$ )、その後は徐々に低下を認めるものの出血 5 時間後まで有意に上昇した。FR+Hemorrhage 群では Hemorrhage 群のような有意な上昇を認めなかった。肺静脈内血液中 TNF- $\alpha$  の濃度も同様に、Hemorrhage 群では出血 1 時間後で強く上昇し ( $97.4 \pm 25.7$  pg/ml) その後は徐々に低下を認めるものの出血 5 時間後まで有意に上昇しており、FR+Hemorrhage 群では Hemorrhage 群のような有意な上昇を認めなかった。

図3 肺実質における TNF- $\alpha$  の発現

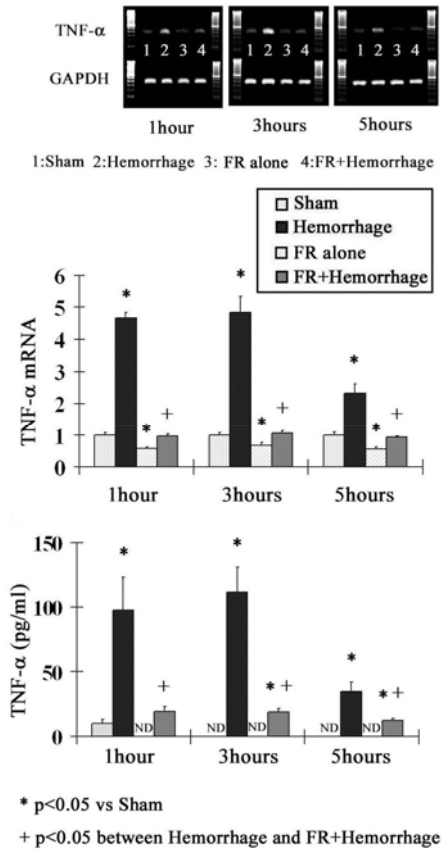
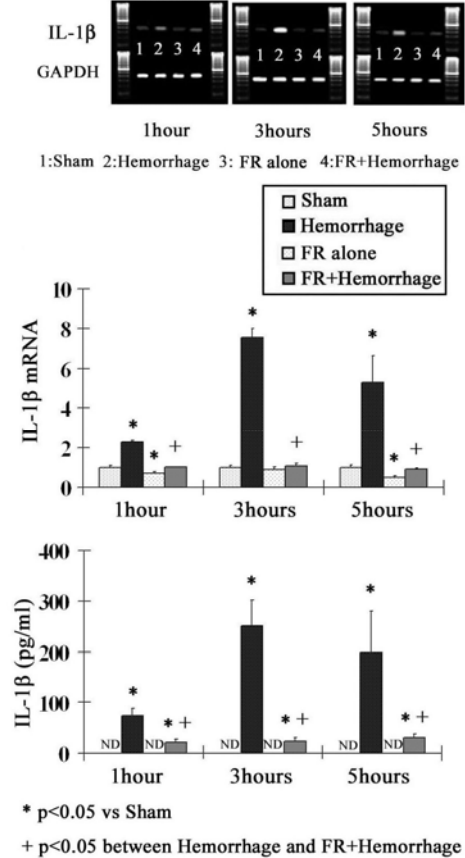


図4 肺実質における IL-1 $\beta$  の発現

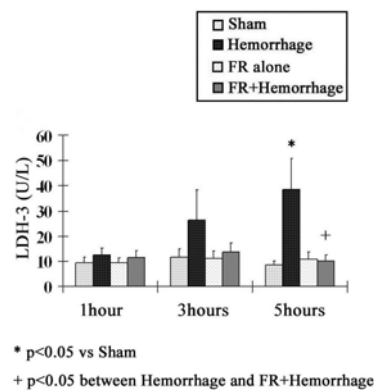


次に IL-1 $\beta$  の mRNA レベルでの肺実質における発現と肺静脈血中濃度の経時的変化を示す (図 4)。Sham 群と FR 群に実験を通じて発現の変化をほとんど認めなかった。Hemorrhage 群における IL-1 $\beta$  mRNA の発現は出血 1 時間後から 5 時間後まで有意に上昇し、出血 3 時間後で最も強く上昇した ( $7.54 \pm 0.46$ )。FR+Hemorrhage 群では Hemorrhage 群のような有意な上昇を認めなかった。肺静脈内血液中の IL-1 $\beta$  濃度も同様に、Hemorrhage 群では出血 3 時間後で最も強く上昇し ( $251.0 \pm 51.1$  pg/ml) 徐々に低下を認めるものの出血 5 時間後まで有意に上昇を認めた。FR+Hemorrhage 群では Hemorrhage 群のような有意な上昇を認めなかった。

#### (4) 肺実質傷害の検討

LDH-3 の経時的変化を示す (図 5)。Sham 群と FR 群間には実験を通じて経時的な変化をほとんど認めず、また両者の間に有意差を認めなかった。Hemorrhage 群は出血 1 時間後から徐々に上昇し始めて出血 5 時間後には有意な上昇を認めた (出血 1 時間後:  $12.4 \pm 2.8$  IU/L, 出血 3 時間後:  $28.4 \pm 11.8$  IU/L, 出血 5 時間後:  $38.6 \pm 12.2$  IU/L)。一方、FR+Hemorrhage 群では出血後もほとんど変化を認めなかった。

図5 LDH-3 の経時的変化



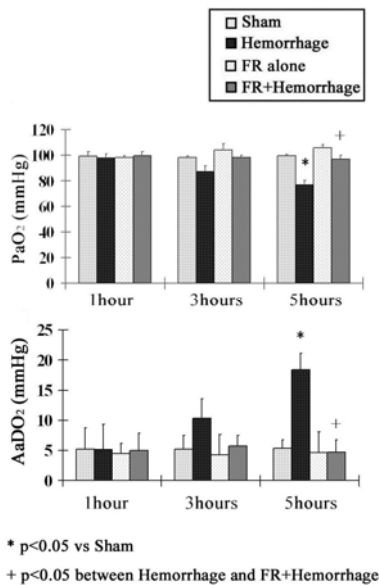
(5) 呼吸機能障害の検討

動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>) および肺胞動脈血酸素較差 (A-aDO<sub>2</sub>) の経時的变化を示す (図 6)。

PaO<sub>2</sub>はSham群とFR群間に実験を通じて経時的な変化をほとんど認めず、また両者の間に有意差を認めなかった。Hemorrhage群のPaO<sub>2</sub>は経時的に低下し(出血 1 時間後: 97.8 ± 3.4 mmHg および出血 3 時間後 87.5 ± 4.3 mmHg), 出血 5 時間後には有意な低下を認めた (77.1 ± 3.5 mmHg)。一方, FR+Hemorrhage 群ではほとんど変化を認めなかった。

また, AaDO<sub>2</sub>も同様にSham群とFR群間に実験を通じて経時的な変化をほとんど認めず、また両者の間に有意差を認めなかった。Hemorrhage群では経時的に上昇し(出血 1 時間後: 5.1 ± 4.2 mmHg および出血 3 時間後: 10.4 ± 3.2 mmHg), 出血 5 時間後には有意な上昇を認めた (18.4 ± 2.7 mmHg)。一方, FR+Hemorrhage 群では変化をほとんど認めなかった。

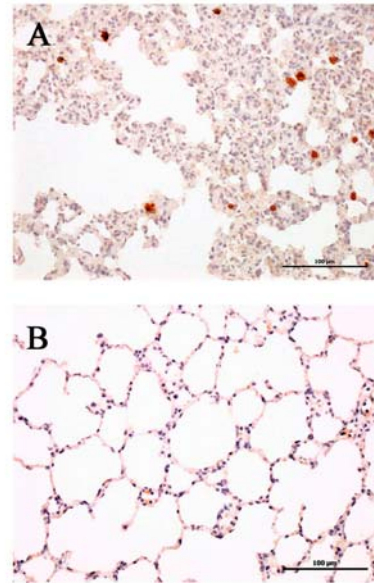
図 6 動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>) および肺胞動脈血酸素較差 (A-aDO<sub>2</sub>) の経時的变化



(6) 肺組織変化と免疫組織学的検討

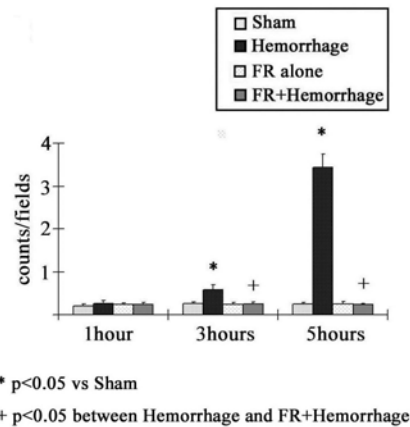
出血 5 時間後の肺組織を提示する (図 7)。Myeloperoxidase (MPO) を免疫組織学的に染色して可視化すると、好中球は茶色に染色されている。Sham 群や FR 群に組織変化を認めなかった。Hemorrhage 群 (A) では血管腔や間質に好中球の出現、間質の浮腫および出血を認めた。一方, FR+Hemorrhage 群 (B) では組織変化を認めなかった。

図 7 出血 5 時間後の肺組織像



次に, 好中球の単位面積あたりの平均出現数を示す (図 8)。Hemorrhage 群は出血 3 時間後から有意な増加を認めた (出血 3 時間後: 0.58 ± 0.11 個/範囲, 出血 5 時間後: 3.44 ± 0.31 個/範囲)。一方, FR+Hemorrhage 群は増加を認めなかった。

図 8 肺における好中球の単位面積あたりの平均出現数

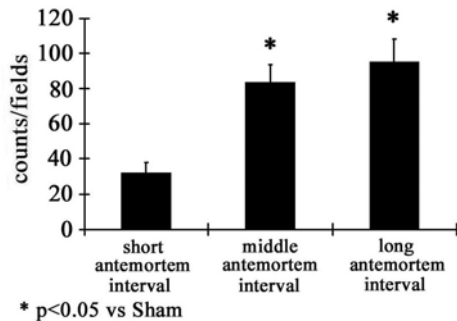


(7) 解剖事例の肺での検討

当教室における実際の解剖事例において, 出血性ショックにより死亡したと診断されたもののうち死後経過 24 時間以内かつ病的所見を認めない事例の肺において, 死後 2 時間以内 (short antemortem interval), 死後 2 ~ 5 時間 (middle antemortem interval) および死後 5 ~ 8 時間 (long antemortem interval) の 3 群に分けて各群 5 例の好中球出現頻度の平均出現数をカウントした (図 9)。

死後 2 時間以降では有意に増加を認めた (2~5 時間:83.6±9.9 個/範囲, 5~8 時間:95.3±13.1 個/範囲)。

図 9 出血性ショック解剖事例の肺における好中球の単位面積あたりの平均出現数



まとめ

TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  は, その生理活性作用によって好中球の活性化および血管内皮へ接着因子の発現などを生じることにより好中球の集簇を引き起こす。活性化した好中球は蛋白分解酵素や活性酸素など組織障害を引き起こす生理活性物質を分泌するため, 好中球が集簇すると, 組織傷害を生じさせる。また, TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  自体も直接的に組織傷害を引き起こす。

本研究によって出血性ショック後の肺において炎症性サイトカインの発現を経た炎症反応が発生し, 実質傷害や呼吸機能障害が生じることが明らかとなった。また, 肺実質中における好中球の集簇を「出血性ショック」の診断マーカーとして応用できる可能性が明らかとなった。

## 5. おもな発表論文等

(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 2 件)

1. H Sato, T Kita, T Tanaka, K Kasai, N Tanaka. Marker of death from hemorrhagic shock. Legal Medicine, 査読有, 14, 2009, in press.

2. H Sato, K Kasai, T Tanaka, T Kita, N Tanaka, Role of Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  on lung dysfunction following hemorrhagic shock in rats. Medical Science Monitor, 査読有, 14, 2008, BR79-87.

[学会発表] (計 2 件)

1. H Sato, T Kita, T Tanaka, K Kasai, N Tanaka, Markers of death from hemorrhagic shock. 7th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2008 年 9 月 3 日, Osaka.

2. 佐藤 寛晃, 笠井 謙多郎, 田中 敏子, 北 敏郎, 田中 宣幸: 出血性ショックにおける多臓器不全の発生メカニズム (第五報) 肺障害に関する検討. 第 91 次日本法医学会総会, 2007 年 5 月 18 日, 秋田.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 寛晃 (SATO HIROAKI)

産業医科大学・医学部・産業医学基礎研究医員

研究者番号: 50441845