

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590692

研究課題名（和文）

出血性ショック時の重症度判定・死因診断における好中球の評価

研究課題名（英文）

A study of neutrophils on diagnosis of the severity in organ dysfunction and the cause of death following hemorrhagic shock

研究代表者

田中 宣幸 (TANAKA NORIYUKI)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：60126597

研究成果の概要（和文）：

重症度の異なる 4 群の出血性ショックモデルを作製し、ショック時に障害が生じやすい（いわゆるショック臓器）の一つである腎臓において検討した。出血量に応じて p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) の活性化と tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-1 β などの炎症性サイトカインの発現が上昇し、機能的・器質的腎障害も増悪した。腎障害の重症度と好中球の出現頻度とは正の相関関係を示し、好中球の出現頻度が出血性ショック時の重症度判定・死因診断に有用である可能性が明らかとなった。また、その病態メカニズムとして出血量の増加に応じて上昇する p38MAPK 活性化に基づく一連の炎症性臓器障害の増悪が関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The role of neutrophils was studied by quantitatively grading four groups of hemorrhaging rats, focused on the kidney, so-called shock organ. As the amount of bleeding increased, the initial activation of p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) and the expression of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β , were progressively enhanced. The severity of renal dysfunction, manifested by serum creatinine concentration, was well correlated with the degree of neutrophils accumulation in the kidney. The present results confirmed that the frequency of activated neutrophils recruited into the kidney might be a useful for morphological diagnosis on the severity of renal dysfunction and that the increase of initial p38 MAPK activation following hemorrhagic shock quantitatively enhanced the ensuing inflammatory renal dysfunction in response to the degree and the progression of hemorrhagic shock.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：社会医学，法医学，ショック，サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

法医学領域においては、出血性ショックに陥って死亡する事例を度々経験するが、出血による生命機能の障害程度と死亡との因果関係が問題となることがしばしば生じる。これまでの研究によって、出血性ショック後の臓器障害発生メカニズムに関して一定の仮説を立てることができたが、臓器障害の程度をより明確にできなければ実際の法医診断への応用には至らないと考え、本研究を企画した。

2. 研究の目的

これまで私共は、ラットの出血性ショックモデルを用いてショック時に障害を受けやすい(いわゆるショック臓器)である腎臓、心臓および肺における臓器障害の病態メカニズムの検討を行ってきた。その結果、(1)出血性ショック後の腎臓において p38MAPK の活性化、炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 β の発現および好中球の増加、(2)好中球の生理活性作用による臓器の機能的障害・器質的変化の発生、(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。しかし、出血性ショックと死亡との因果関係を明確にするためには、臓器障害の程度を明らかにすることが重要である。そこで、重症度すなわち出血量の異なる4群のショックモデルを作製し、出血性ショック後の臓器障害の程度と臓器中の好中球出現頻度との関連を、機能的および器質的障害が評価しやすい「腎臓」において検討し、法医診断における出血性ショックの重症度判定への応用を試みた。

3. 研究の方法

おもに、次の項目について検討した。

- (1)出血量の異なる出血性ショックモデルの作製
- (2)血圧・腎血流量の変化
- (3)腎臓における p38MAPK 活性化
- (4)腎臓における炎症性サイトカイン発現
- (5)血清学的腎臓障害
- (6)組織学的腎臓障害
- (7)好中球発現の免疫組織学的検討

これらの方法論を、検討項目別に順次記載する。

- (1)出血量の異なる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 \pm 1 $^{\circ}$ 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

後に左大腿動脈に3フレンチのポリエチレンカテーテルを挿入した。また、左側腹切開により左腎動脈を露出し、血流量測定用プローベを留置した。一連の操作の終了40分後から20分間かけて出血させた。

実験モデルは

- 出血させない Sham 群
 - 全血液量の16.7% (1.1375ml/体重100g)を出血させる群(以下、「16.7%群」という)
 - 全血液量の25% (1.625ml/体重100g)を出血させる群(以下、「25%群」という)
 - 全血液量の33% (2.145ml/体重100g)を出血させる群(以下、「33%群」という)
- 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 時間後に腎静脈血を約 2ml 採取し、瀉血によってラットを殺した後、腎臓を採取した。腎静脈血は 3,000 回転/分にて 10 分間遠心分離して血清のみを試料とし、血清と腎臓は -80 $^{\circ}$ C に保存した。また、器質的変化および免疫組織学的検討を行うために腎臓の一部はホルマリンにて固定した。

(2) 血圧・腎血流量の変化

左大腿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。

また、左腎動脈上に留置した血流量測定用プローベによって 20 分ごとに、腎血流量を測定した。

(3) 腎臓における p38MAPK 活性化

p38MAPK はリン酸化することによって活性化することから Western blotting 法を用いてリン酸化されていない p38MAPK とリン酸化された p-p38MAPK のバンドを検出した。そして両者の比を Scion Image Beta 4.02 によって解析して数値化し統計学的処理を行い、p38MAPK の活性化を検討した。

(4) 腎臓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- α と IL-1 β の腎臓における mRNA レベルでの発現の経時的変化を 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、採取した腎静脈血中における TNF- α と IL-1 β の濃度を ELISA 法によって測定した。

(5) 血清学的腎臓障害

血清学的腎臓障害は、腎機能障害の時に上昇する血清クレアチニンの腎静脈血中濃度をセルロース・アセテート膜電気泳動法を用いて測定することにより評価した。

(6) 組織学的腎臓障害

腎臓の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った後、腎臓の組織障害スコア（①間質浮腫，②尿細管腔の拡張，③尿円柱の出現，④尿細管上皮の変性の4項目を各項目ごとに0から4点：0=0%，1=0-25%，2=25-50%，3=50-75%，4=75-100%）を用いて点数化することにより評価した。

(7) 好中球発現の免疫組織学的検討

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、糸球体1個あたりの好中球の平均出現数をカウントしグラフ化した。

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) 出血量の異なる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・腎血流量の変化

平均血圧の経時的変化を示す(図1)。なお、* : $p < 0.01$, ** : $p < 0.001$ を示している(以下同じ)。Sham群は実験を通じて血圧の変化をほとんど認めなかった。出血群では、出血直後に出血量の増加に応じて強く低下し(16.7%群: 100 ± 3 mmHg から 45 ± 3 mmHg, 25%群: 105 ± 6 mmHg から 36 ± 3 mmHg, 33%群: 105 ± 5 mmHg から 31 ± 3 mmHg), 約60分後には一旦回復したが、約180分後以降に再び出血量の増加に応じて強く低下した。

腎動脈血流量(図2)も平均血圧と同様にSham群は実験を通じて血圧の変化をほとんど認めなかった。出血群では、出血直後に出血量の増加に応じて強く低下し(16.7%群: 1.00 ± 0.03 から 0.48 ± 0.04 , 25%群: 1.03 ± 0.02 から 0.37 ± 0.03 , 33%群: 1.04 ± 0.03 から 0.31 ± 0.02), 約60分後には一旦回復したが、約200分後以降に再び出血量の増加に応じて強く低下した。

(3) 腎臓における p38MAPK 活性化

腎臓実質における p38MAPK 活性化の経時的変化を示す(図3)。Sham群は実験を通じて活性化の変化をほとんど認めなかった。出血群では出血1時間後で最も強く活性化し、その程度は出血量の増加に応じて高度であった(16.7%群: 1.54 ± 0.22 , 25%群: $2.05 \pm$

0.19 , 33%群: 2.84 ± 0.22)。3時間以降は、統計学的に有意な上昇はなかったが、出血量の増加に応じて高度に活性化していた。

(4) 腎臓における炎症性サイトカイン発現

TNF- α の mRNA レベルでの腎臓実質における発現と腎静脈血中濃度の経時的変化を示す(図4)。Sham群は実験を通じて発現の変化をほとんど認めなかった。出血群における TNF- α mRNA の発現は出血1時間後で最も強く上昇し、その程度は出血量の増加に応じて高度で(16.7%群: 1.84 ± 0.21 , 25%群: 3.44 ± 0.40 , 33%群: 4.67 ± 0.40)、その後は徐々に低下したが、出血5時間後まで出血量の増加に応じて高度であった。

腎静脈血中 TNF- α 濃度も同様に、出血群は出血1時間後で出血量の増加に応じて強く上昇し(16.7%群: 74.5 ± 22.4 pg/ml, 25%群: 154.9 ± 26.2 pg/ml, 33%群: 207.6 ± 17.2 pg/ml), その後は徐々に低下したが、出血量の増加に応じて強く上昇していた。

IL-1 β の mRNA レベルでの腎臓実質における発現と腎静脈血中濃度の経時的変化を示す(図5)。Sham群は実験を通じて発現の変化をほとんど認めなかった。出血群における IL-1 β mRNA の発現は出血1時間後から有意に上昇し3時間後で最も強く上昇し、その程度は出血量の増加に応じて高度で(16.7%群: 4.90 ± 0.86 , 25%群: 5.90 ± 0.84 , 33%群: 7.28 ± 0.50)、5時間後には、統計学的に有意ではなかったが、出血量の増加に応じて高度に発現していた。

腎静脈血中 IL-1 β 濃度も同様に、出血3時間後で出血量の増加に応じて強く上昇し(16.7%群: 127.6 ± 60.4 pg/ml, 25%群: 234.6 ± 42.0 pg/ml, 33%群: 306.1 ± 33.1 pg/ml), 5時間後には低下したが、出血量の増加に応じて強く上昇していた。

(5) 血清学的腎臓障害

腎静脈血中の血清クレアチニン濃度の経時的変化を示す(図6)。Sham群は実験を通じて変化をほとんど認めなかった。出血群では出血5時間後で有意に上昇し、出血量の増加に応じて強く上昇した(16.7%群: 0.81 ± 0.11 mg/dl, 25%群: 1.08 ± 0.14 mg/dl, 33%群: 1.59 ± 0.15 mg/dl)。

(6) 組織学的腎臓障害

出血5時間後の腎臓の組織像(ヘマトキシリン・エオジン染色)を示す(図7)。Sham群には組織学的な変化を認めない。出血群では間質は浮腫状で、尿細管腔は拡張状である。好酸性尿円柱がボーマン嚢内や尿細管腔内に出現し、尿細管上皮には好酸性変性を認める。これらは、血管内皮障害、糸球体内皮障害および尿細管上皮障害に基づく変化であ

る。

腎臓の組織障害スコアの経時的変化を示す(図8)。Sham群は実験を通じて変化をほとんど認めなかった。出血群では出血後徐々に増加し、その程度は出血量の増加に応じて高度であった(出血5時間後 Sham群: 3.0 ± 0.6 , 16.7%群: 5.9 ± 1.3 , 25%群: 7.5 ± 1.2 , 33%群: 9.8 ± 1.2)。

(7) 好中球発現の免疫組織学的検討

出血5時間後の腎臓の組織像(MPO染色)を示す(図9)。好中球は茶色に染色されている。Sham群には血管腔や間質に好中球の出現がわずかに認められた。一方、出血群では血管腔や間質の好中球は有意に増加していた。

糸球体1個あたりの好中球の出現数の経時的変化を示す(図10)。Sham群は実験を通じて増加をほとんど認めなかった。出血群では出血後徐々に増加し、その程度は出血量の増加に応じて高度であった(出血5時間後 Sham群: 1.36 ± 0.21 個/糸球体, 16.7%群: 2.62 ± 1.16 個/糸球体, 25%群: 4.52 ± 1.04 個/糸球体, 33%群: 6.91 ± 1.20 個/糸球体)。

出血5時間後の血清クレアチニン濃度と好中球の出現数との相関関係を示す(図11)。両者の間には正の相関関係が認められた($r=0.80$)。

まとめ

出血性ショック後の腎機能障害の重症度と免疫組織学的な好中球の出現頻度との関連性を明確にすることができ、出血性ショック時の重症度判定・死因診断に有用である可能性が明らかとなった。

さらに、その病態メカニズムとして出血量の増加に応じて上昇するp38MAPK活性化に基づく一連の炎症性臓器障害の増悪が関与することが明らかとなった。

図1 平均血圧の経時的変化

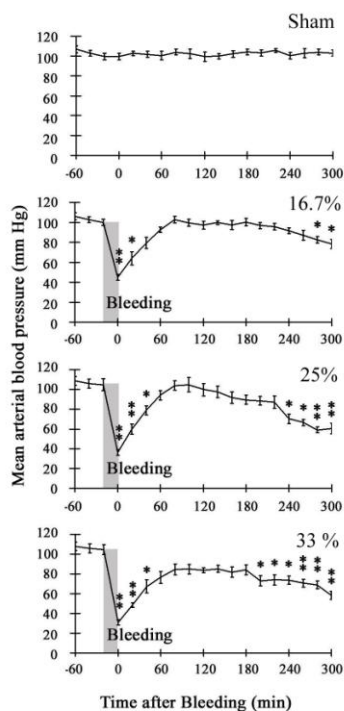


図2 腎動脈血流量の経時的変化

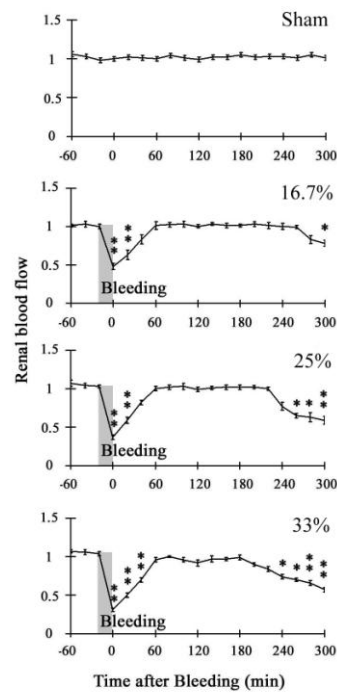


図3 腎臓における p38MAPK 活性化

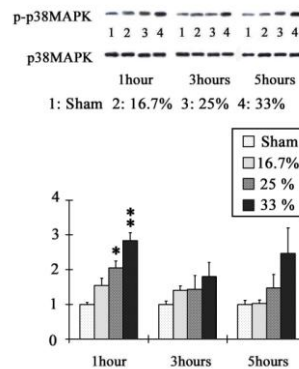


図4 腎臓における TNF-α の発現

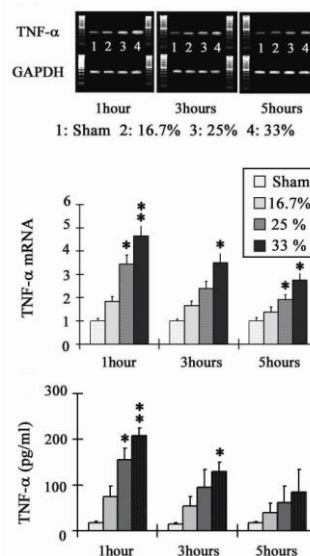


図5 腎臓における IL-1 β の発現

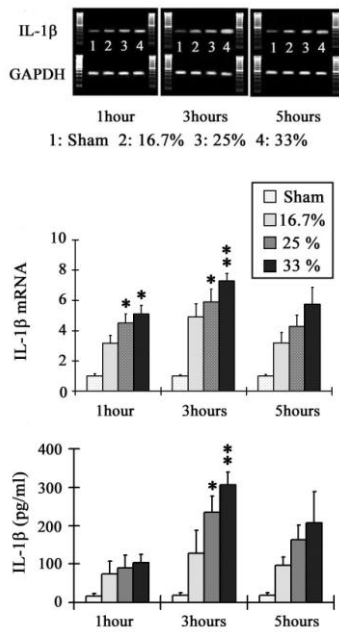


図6 血清クレアチニン濃度の経時的変化

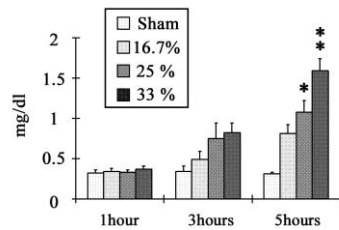


図7 出血5時間後の腎臓の組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

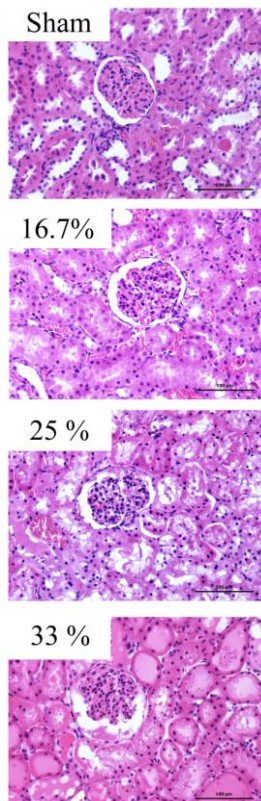


図8 腎臓の組織障害スコア

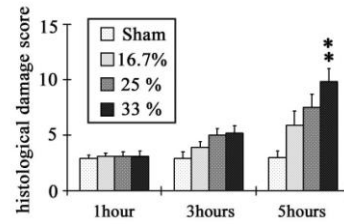


図9 出血5時間後の腎臓の組織像 (MPO染色)

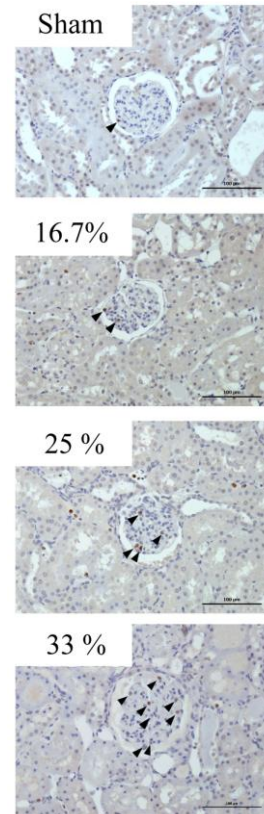


図10 糸球体1個あたりの好中球の出現数

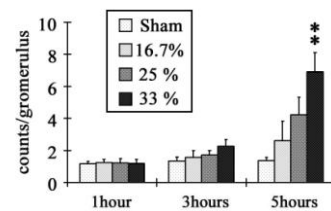
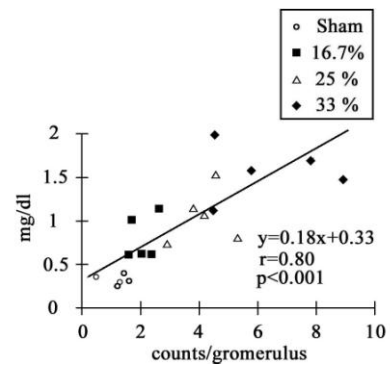


図11 血清クレアチニン濃度と好中球の出現数との相関関係



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1件)

H Sato, T Tanaka, K Kasai, N Tanaka. A quantitative study of p38 mitogen activated protein kinase on renal dysfunction following hemorrhagic shock in rats. The Journal of Trauma, 査読有, in press.

[学会発表] (計1件)

佐藤 寛晃, 笠井 謙多郎, 田中 敏子, 田中 宣幸: 出血性ショック時の腎障害と炎症性サイトカインとの関連に関する検討. 第94次日本法医学会総会, 2010年6月24日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 宣幸 (TANAKA NORIYUKI)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60126597

(2) 研究分担者

北 敏郎 (KITA TOSHIRO)
産業医科大学・医学部・准教授 (平成22年3月31日まで)
研究者番号: 00131912
(H20→H21)

田中 敏子 (TANAKA TOSHIKO)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号: 80141745

佐藤 寛晃 (SATO HIROAKI)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50441845

笠井 謙多郎 (KASAI KENTARO)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40169397