

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成21年度～平成23年度

課題番号：21591800

研究課題名（和文）脳死ドナー体内における摘出前臓器保護-副交感神経系を介した炎症制御の検討

研究課題名（英文）Reduction of inflammatory response in brain dead donor through activation of parasympathetic nervous system

研究代表者

田ノ上 禎久 (TANOUE YOSIHISA)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：40372742

研究成果の概要（和文）：

脳死ドナー体内における臓器機能の低下は以前より指摘されており、これに対して種々の治療法が試みられているものの依然として確立した方法は存在しない。この臓器機能低下の原因としてはカテコラミン過剰分泌ならびに炎症反応の増強が考えられており、本研究においてわれわれは副交感神経系の活性化による制御について検討を行った。（方法）体重2.8～3.2kgの日本白色ウサギを2群に群別（VNS群，sham群）。麻酔導入後に頭頂部にバーホールを開け、8Frバルーンカテを挿入。急速拡張により脳死を作成した。呼吸停止，瞳孔散大を確認。VNS群では脳死作成前15分より両側頸部迷走神経刺激を開始（10Hz，4ms，1-3V），sham群では電極の装着のみを行った。以後3時間に渡って心機能，血中カテコラミン濃度の推移を観察した。（結果）sham群ではバルーン拡張直後に血圧の急上昇を認めたが（200～250mmHg）VNS群ではこれが有意に抑制されていた。これを裏付けるべく血中カテコラミン濃度を検討したところ，sham群ではエピネフリン・ノルエピネフリンともにバルーン拡張1分後に急上昇を認めた（Epi:22→1717pg/mL；Nor:72→1183pg/mL）。一方VNS群ではこれらカテコラミンの急上昇は有意に抑えられていた。脳死作成後1時間毎に測定した心機能(dp/dt最大値，最小値)もsham群では経時的な悪化を認め、3時間後の観察終了時にはdp/dt max 1804mmHg/s，dp/dt min -1145mmHg/sであったが、VNS群ではdp/dt max 3397mmHg/s，dp/dt min -1762mmHg/sとほぼ脳死作成前値を維持できていた。以上をまとめると、頸部迷走神経刺激により、脳死作成時のカテコラミン過剰流出が抑制され、これにともなうhyperdynamic stateが軽減された。また脳死後も3時間に渡って心機能が維持されることが確認された。本年度はこれらの結果を踏まえ、生化学的に評価を行い、一部はいまだ進行中である。現時点では酸化ストレスの軽減を介した心保護のメカニズムが明らかにされつつあるため、さらなる検討を行うこととしている。

研究成果の概要（英文）：

Remarkable dysfunction of vital organ in brain dead donor is associated with poor outcome of the organ transplantation. Excessive catecholamine release followed by inadequate response of inflammatory system plays a pivotal role in the organ dysfunction. In the current study, we attempted to inhibit the deleterious response through activation of parasympathetic nervous system. 【Materials and Methods】 Japanese white rabbit weighing 2.8-3.2 kg was divided into two groups (VNS group and sham group). In each group, rabbits were anesthetized and brain death was introduced with rapid inflation of balloon catheter inserted into cranial epidural space. In VNS group, electrical stimulation of bilateral cervical vagal nerves was initiated at 15 minutes before brain death, and continued for 180 minutes. The left ventricular systolic function and serum concentration of catecholamine was evaluated. 【Results】 Increment of blood pressure together with excessive catecholamine release was

observed immediately after brain death in sham group. In contrast, these responses were significantly reduced in VNS group. Sham group showed gradual deterioration of the left ventricular function. However, these parameters kept unchanged in VNS group.

【Conclusion】Mandatory activation of parasympathetic nervous system inhibited excessive catecholamine release followed by hyperdynamic state. This homeostatic effect reduced myocardial damage and contributed to maintain the optimal ventricular function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、胸部外科学

キーワード：脳死ドナー、臓器保護、心臓移植

1. 研究開始当初の背景

脳死ドナー体内における臓器機能の低下は以前より指摘されており、これに対して種々の治療法が試みられているものの依然として確立した方法は存在しない。

2. 研究の目的

この臓器機能低下の原因としてはカテコラミン過剰分泌ならびに炎症反応の増強が考えられており、本研究においてわれわれは副交感神経系の活性化による制御について検討を行った。

3. 研究の方法

体重2.8~3.2kgの日本白色ウサギを2群に群別(VNS群, sham群)。麻酔導入後に頭頂部にバーホールを開け、8Frバルーンカテを挿入。急速拡張により脳死を作成した。呼吸停止、瞳孔散大を確認。VNS群では脳死作成前15分より両側頸部迷走神経刺激を開始(10Hz, 4ms, 1-3V), sham群では電極の装着のみを行った。以後3時間に渡って心機能、血中カテコラミン濃度の推移を観察した。

(動物実験)

本動物実験は九州大学大学院医学研究院動物実験倫理審査委員会の承認を得て行われた。

(使用動物種)

系統・性別：日本白色種ウサギ・雄
試験時年齢・体重：12週・3kg以上

脳死ウサギの作成、機器の装着

塩酸ケタミン 50mg/kg, 塩酸キシラジン 3mg/kg の筋肉内注射により麻酔を導入し、気管内挿管を行う。左耳静脈に輸液ラインを確保する。酸素濃度 50%, 1回換気量 50ml, 呼吸回数 30回/min で人工呼吸を行いつつ、維持麻酔として濃度 2%のイソフルレンを吸入させる。直腸温は 38°C以上 に維持する。ウサギを腹臥位とし、頭頂骨に 3~5mm の小孔を作成、硬膜外腔に 8Frバルーンカテーテル (Bardex Biocath 0165PL, Convinton, USA) を留置する。また脳波測定用の電極を装着する。

再度仰臥位とし、頸部・胸部を正中切開の後、ヘパリン 300 単位/kg を投与する。右頸動脈・左心耳に圧ラインを挿入する。また迷走神経を頸部で剥離・露出する。下大動脈を剥離しテーピングを行う。肺動脈幹に超音波血流計 (T206, Transonic Systems Inc. New York, USA) を装着し、これを測定して心拍出量の代用とする。右心耳には心房ペースティング用電極を縫着する。心尖部から左室内に 3F, 6 電極のコンダクタンスカテーテル (Sigma 5DF, CD Leycom, Oegstageest. The Netherlands) に接続する。

以上を装着した上で脳死を作成する、十分な吸入麻酔下に 3ml の生理食塩水をバルーンに注入し瞬時に拡張させる。脳波計を介して脳死の完成を確認する。

迷走神経刺激

頸部迷走神経に双極プラチナ電極を装着

し、シリコンゲルを用いて固定する。電極は刺激発生装置 (Electronic Stimulator SEN-7203, Nihon koden, Tokyo, Japan) に接続する。予備実験は両側迷走神経刺激、十分な刺激強度で行い、刺激時間も脳死作成前 15 分～作成後 3 時間で行った。

群の設定, 測定ポイント

迷走神経刺激の有無で 2 群に分ける (刺激群 VS 非刺激群), 非刺激群は電極の装着まで行うが, 実際の刺激は加えない。心機能は脳死前, 脳死後 60, 120, 180 分に測定する。血液サンプルは脳死前, 脳死後 1, 5, 30, 60, 120, 180 分に採取, 遠心分離の後, 血漿成分を分離する, 実験終了後, ウサギは安楽死させ心臓を取り出す, 冷生食でリンスしたのち, 病理標本, タンパク解析用に心筋組織を採取する。血漿, 組織は -80°C で保存する。

心機能測定

各測定ポイントにて血液ガス・電解質補正の後, 下大動脈に流入する血液量を変化させて左室への前負荷を連続的に調節し, 複数の左室圧-容積ループを作成して左室の収縮能と拡張能を評価する。測定中は心拍数を 250 回/分に固定する。デジタル化されたデータは C 言語のプログラムを用いて Windows コンピューター (ThinkPad Lenovo, North Carolina, USA) で解析する, コンダクタンカテーターより得られた左室容量は心拍出量で補正する。パラレルコンダクタンス容量は 10% 食塩水 2ml の注入により一過性に血液の電導性を変化させて測定する。

病理組織学的評価

心筋組織標本作製し, HE 染色・TUNEL 染色にて炎症細胞湿潤とアポトーシスの程度を評価する, さらに免疫染色にて心筋組織中の炎症性サイトカイン発現についても評価する。

内因性カテコラミン測定, タンパク発現量解析

血漿中エピネフリン, ノルエピネフリンは高速液体クロマトグラフィーにて定量する。血漿・心筋組織中タンパク発現量は ELISA 法, Western blotting を用いて定量する。

4. 研究成果

sham 群ではバルーン拡張直後に血圧の急上昇を認めたが (200~250mmHg) VNS 群ではこれが有意に抑制されていた。これを裏付けるべく血中カテコラミン濃度を検討したところ, sham 群ではエピネフリン・ノルエピネフリンともにバルーン拡張 1 分後に急上昇を認めた (Epi: 22→1717pg/mL; Nor: 72→1183pg/mL)。一方 VNS 群ではこれらカテコラミンの急上昇

は有意に抑えられていた。脳死作成後 1 時間毎に測定した心機能 (dp/dt 最大値, 最小値) も sham 群では経時的な悪化を認め, 3 時間後の観察終了時には dp/dt max 1804mmHg/s, dp/dt min -1145mmHg/s であったが, VNS 群では dp/dt max 3397mmHg/s, dp/dt min -1762mmHg/s とほぼ脳死作成前値を維持できていた。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

“脳死ドナー臓器保護における副交感神経系の役割”

前田武俊 他 5 名

第 42 回日本胸部外科学会九州地方会

2009 年 7 月 18 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田ノ上 禎久 (TANOUE YOSHIHISA)

研究者番号: 40372742

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :