

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17326

研究課題名（和文）動物モデルを用いた出血様式の違いが局所的循環障害と血液凝固障害に与える影響の研究

研究課題名（英文）Evaluation of relationship between local circulation disorder and coagulation/fibrinolysis-system induced by differences between arterial and venous bleeding in animal model

研究代表者

古川 翔太（Furukawa, Shota）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任助教

研究者番号：90849093

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：動脈出血・静脈出血の影響の比較のため、出血性ショックモデルラットでバイタル・血液検査・ミトコンドリア機能及び形態を評価した。動脈・静脈いずれの出血も血圧低下がみられたが、静脈出血は血圧低下が遷延し、代謝性アシドーシスに陥った。肝臓ミトコンドリアでは静脈出血で最大酸素消費速度が低下し、ミトコンドリア分裂を制御する膜蛋白s-OMA1が増加した。心臓・腎臓のミトコンドリアに有意な変化は認めなかった。一般的に静脈出血よりも動脈出血の方が危険とされているが、過去の報告は出血から長時間経過した場合についてがほとんどであり、本実験から静脈出血であっても条件によっては循環障害を強く引き起こすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出血による循環障害は様々な悪影響を及ぼす。臨床医学だけでなく法医解剖においても出血による循環障害の評価は重要である。出血には動脈性・静脈性といった様々な出血様式があり、出血様式によって臓器の血流変化が異なる可能性がある。出血による身体への影響を把握するためには、全身を巡る血液の検査だけでなく、各臓器の循環障害を把握する必要がある。しかし、こういった出血様式の違いが臓器にどのように影響するのかほとんど報告されていない。本研究では、臓器のミトコンドリアの機能・形態を臓器循環障害の指標として、出血様式の違いが各臓器に与える影響について検討した。

研究成果の概要（英文）：To compare the effects of arterial and venous bleeding, we used a rat model of hemorrhagic shock and evaluated vital signs, blood gas analysis, and mitochondrial function and morphology. Both arterial and venous bleeding caused a drop in blood pressure. Venous bleeding caused a prolonged decrease in blood pressure and led to metabolic acidosis. In liver mitochondria, venous bleeding reduced the maximum respiration and increased the membrane protein s-OMA1, which controls mitochondrial fission. No significant changes were observed in heart or kidney mitochondria. Arterial bleeding is generally considered to be more dangerous than venous bleeding. However, most previous reports have been based on conditions in which a long time had passed since the bleeding. This study suggests that even venous bleeding can cause severe circulatory disorders in some cases.

研究分野：法医学

キーワード：出血性ショック ミトコンドリア 細胞外フラックスアナライザー 血液凝固線溶系

1. 研究開始当初の背景

法医学の役割のひとつにご遺体の死因究明がある。解剖や各種検査の結果から死亡に至る経緯や原因を明らかにしている。外傷による死亡の場合、その 30-40%に出血が関与するとされており (Juan et al. 2010)、外傷の有無、範囲、出血の性状といった所見は、外傷の機序や直接死因を鑑別するための重要な情報である。出血量が少なく外傷も乏しい場合であっても死に至る事例も存在しているため、出血量だけではなく、出血による生体への様々な悪影響を考慮する必要がある。

血液凝固障害は外傷による出血の約半数にみられる重要な合併症である。凝血の形成を促す凝固系と凝血の分解を促す線溶系の均衡が崩れた場合、血栓症や易出血性といった異常が生じるとされている。救急医療分野においては、外傷・出血により血液凝固が正常になされず止血困難な症例が報告されている。また、法医学分野においても、病死などの緩徐に死に至る場合は心臓内に軟凝血がみられるが、外傷や突然死などの急死事例では心臓内に流動血がみられることがよく知られている。法医学領域では死体血、救急医療領域は生体の血液と違いはあるものの、これらの病態はどちらも線溶系が密接に関わるとされている。線溶を活性化する tissue type plasminogen activator (tPA)、tPA を抑制する plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) はいずれも循環障害によって血中に放出される (図 1)。出血性ショックモデルの動物実験においては、PAI-1 産生・放出は出血の条件すなわち循環障害の程度によって左右されるものの (Xu et al. 2015)、その機序は十分に解明されていない。

外傷による出血には、出血速度の違いや動脈性・静脈性出血の違いなど様々な出血様式が考えられる。しかし、動物実験においては、動脈性出血による急速な出血によりショック状態に陥らせる動物モデルが多く (Elgjo et al. 1996)、静脈性出血や緩徐な出血による影響との比較は報告が少ない。出血様式の違いが血液凝固線溶系にもたらす影響についても不明である。我々は、出血速度の違いが血液凝固機能に与える影響についての研究を実施し、出血速度は循環障害と PAI-1 生成に影響を与えることを過去に報告した (Furukawa et al. 2020)。この研究のなかで我々は、PAI-1 は多くの組織・臓器から放出されるが、出血様式が異なることで PAI-1 放出を促進される組織・臓器も異なるのではないかと仮説を立てた。一般に循環障害の指標として血中 Lactate が用いられることが多いが、Lactate は主に筋肉で産生されるため心臓や肝臓といった各臓器の組織低酸素状態を正確に反映していないと考えられる。そこで、細胞外フラックスアナライザー (Seahorse XFe24 Analyzer, Agilent) を用いてミトコンドリア呼吸を測定することで各臓器の組織低酸素状態の評価を検討した。

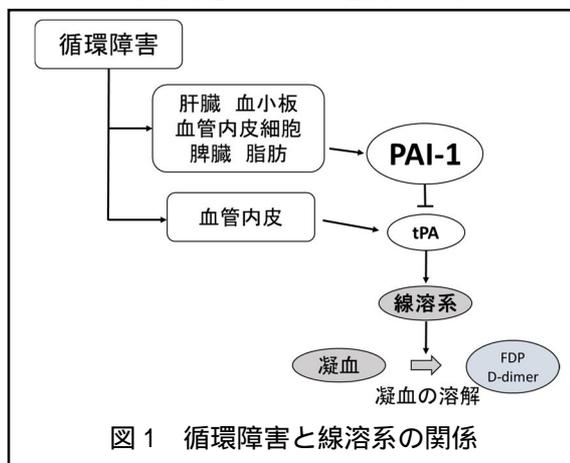


図 1 循環障害と線溶系の関係

2. 研究の目的

本研究の目的は、出血性ショックモデルラットにおける出血様式の違い (動脈性出血と静脈性出血) による局所循環の違いの評価を行い、局所循環と凝固系・線溶系の関連を検討することである。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア呼吸の測定

ラットから採取した心臓・肝臓・腎臓組織をサンプルとした。細胞外フラックスアナライザーを用いてミトコンドリアの酸素消費速度 (Oxygen consumption rate; OCR) を測定した。

ミトコンドリアの単離

ミトコンドリア単離は、文献 (Agilent web サイト, Leger et al. 2020, Frezza et al. 2007) の方法を参考に適宜修正を加えて実施した。肝臓・腎臓は単離用バッファー (バッファー A: KCl 100 mM, MPOS 50 mM, EGTA 2 mM, FA-free BSA 0.2%) の液中で細かく刻んだ後、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。肝臓・腎臓サンプルは遠心 (800 × g, 10 min, 4 ℃) 上清を回収し再び遠心 (肝臓: 3000 × g, 10 min, 4 ℃、腎臓: 8000 × g, 10 min, 4 ℃) 沈殿を蛋白定量用バッファー (バッファー B: KCl 100 mM, MPOS 50 mM, EGTA 2 mM) で再懸濁し再び遠心 (肝臓: 3000 × g, 10 min, 4 ℃、腎臓: 8000 × g, 10 min, 4 ℃) 沈殿をバッファー B で再懸濁し蛋白量測定を行った。心臓はバッファー A 液中で細かく刻んだ後、ダウンス型ホモジナイザーでホモジナイズ、その後ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。心臓サンプルは遠心 (800 × g, 10 min, 4 ℃) により上清 (a) と沈殿に分離した。沈殿はバッファー A で再懸濁した後、

サブチリシン (1110 unit/ml) を加え、ポッター型ホモジナイザーで再びホモジナイズし、遠心 (8000 × g, 10 min, 4 ℃) 沈殿をバッファーA で再懸濁後に再び遠心 (800 × g, 10 min, 4 ℃) し得られた上清 (b) を上清 (a) に加えた。上清 (a+b) を遠心 (8000 × g, 10 min, 4 ℃) 沈殿を蛋白定量用バッファーB で再懸濁し再び遠心 (8000 × g, 10 min, 4 ℃) 再び沈殿をバッファーB で再懸濁し蛋白量測定を行った。蛋白定量は Bradford 法を用いて測定した。

細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア酸素消費速度の測定

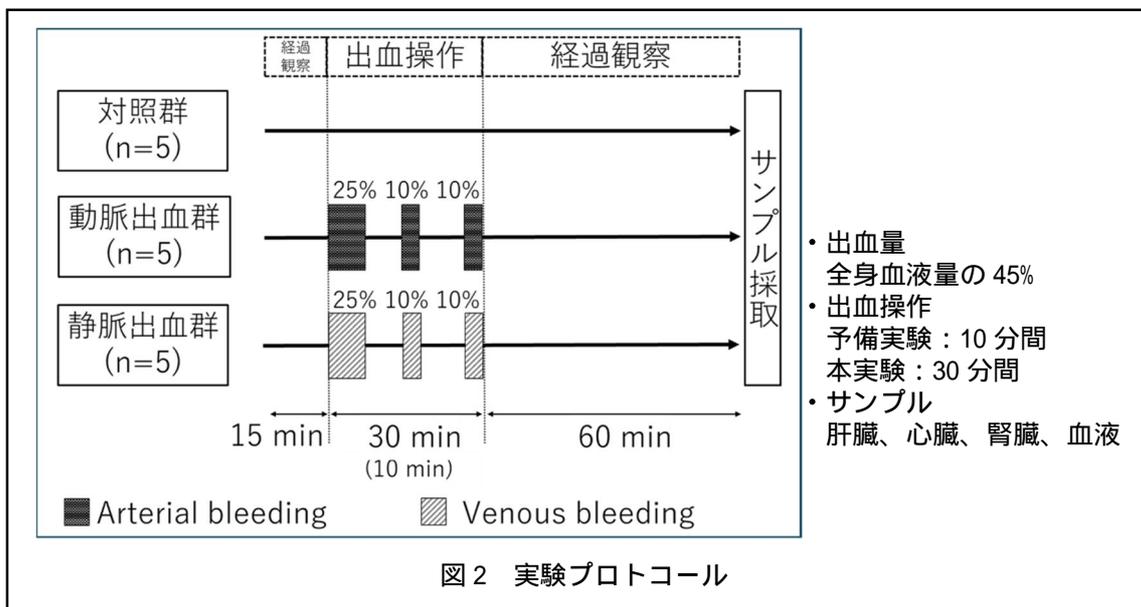
ミトコンドリアアッセイ溶液 (Mitochondrial assay solution; MAS) (sucrose 70 mM, Mannitol 220 mM, KH₂PO₄ 5 mM, MgCl₂ 5 mM, HEPES 2 mM, EGTA 1 mM, FA-free BSA 0.2%) を作成し、水酸化カリウムで pH7.2 に調整した。MAS に Adenosine diphosphate (ADP) 〇ligomycin、Fluorocarbonyl cyanide phenylhydrazone (FCCP)、20 μM-Rotenone/100 μM-Antimycin A (Rot/AA) をそれぞれ添加した。アナライザー用のセンサーカートリッジは non-CO₂ incubator に一晩置き、実験当日に 4 つのインジェクションポートに ADP 50 μl、oligomycin 55 μl、FCCP 60 μl、Rot/AA 65 μl をそれぞれ注入した。細胞培養プレートに上記 で得た単離ミトコンドリアを 50 μl ずつ注入し、遠心 (2000 × g, 10 min, 4 ℃) 予め 37 ℃ に加温した測定用バッファー (MAS に Pyruvate 11.1 μM, Malate 2.2 μM を添加) を 450 μl 加え、アナライザーで酸素消費速度を測定した。

ミトコンドリア膜蛋白の相対定量

上記 記載と同様の方法で、凍結臓器からミトコンドリアを単離した。単離ミトコンドリアに溶解バッファー (RIPA lysis buffer with PMSF, Sodium orthovanadate, and Protease inhibitor, Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) を用いた後、遠心 (10,000 × g, 10min, 4 ℃) し上清を回収した。Bradford 法を用いて蛋白濃度を測定した。同量の蛋白質を含むバッファーと混和し 95 ℃ で 5 分間加熱した。これを 15% SDS-polyacrylamide electrophoresis gel (e-PAGEL, ATTO Corp., Tokyo, Japan) に注入し、電気泳動 (150V, 1h 30 min) の後、PVDF メンブレン (Immun-Blot, BIO-RAD, Hercules CA, USA) に転写した (100V, 15 min)。メンブレンは 3% BSA で 30 分間ブロッキング、その後、0.2%TTBS で洗浄した。一次抗体として OMA1 抗体 (1:500, Santa Cruz) Vinculin 抗体 (1:2000, Cell signaling) を反応させ (4 ℃, over night) 二次抗体として Goat Anti-mouse IgG HRP (1:5000, Cayman) を反応させた (室温, 1 h)。

(2) 動脈性出血、静脈性出血それぞれの出血性ショックモデルラットの作製

Sprague-Dawley ラット (300-339 g, male) を無作為に対照群、動脈出血群、静脈出血群に分けた。ラットにイソフルラン吸入による麻酔を行い、右大腿動脈及び右大腿静脈にカテーテルを挿入した。カテーテル内はヘパリン生理食塩水 (10 unit/ml) で満たした。動脈カテーテルは血圧測定及び動脈性出血操作に使用し、静脈カテーテルは静脈性出血操作に使用した。カテーテル挿入後 15 分間観察したのち、出血操作時間を設けた。出血操作時間は予備実験では 10 分間、本実験では 30 分間とした。総出血量は動脈性・静脈性出血ともに全身血液量 (56 mL/kg) の 45% とした (図 2)。最後の出血操作から 60 分間観察を行った後、サンプル採取を実施した。対照群はカテーテル挿入のみを行い、出血操作は実施しなかった。麻酔濃度は、導入時は 4%、カテーテル挿入処置時は 3%、出血処置及び経過観察時は 1.5-2.0%とした。心臓・肝臓・腎臓組織を前述のミトコンドリア呼吸測定用のサンプルとした。残りの心臓・肝臓・腎臓組織及び血清・血漿を -80 ℃ で保存した。



(1) 細胞外フラックスアナライザーのサンプル及び試薬濃度の検討

出血操作を実施していないラットの臓器を用いて、単離ミトコンドリア濃度、ADP、Oligomycin、FCCP については適切な濃度を検討した。ADP、Oligomycin、FCCP の濃度については表1の通りである。単離ミトコンドリア濃度は、各試薬を加えていない段階 (base line) のOCRが約 200 pmol/min になるものを適切な濃度と判断した (図3)。単離ミトコンドリア濃度は肝臓 800 µg/ml、心臓 280 µg/ml、腎臓 220 µg/ml により概ね適切な結果が得られた。また、肝臓については、当初、心臓・腎臓と同様に最終的に 8000 x g の遠心操作を実施していたが、base line のOCRが安定せず、ミトコンドリア以外の不純物が多いと考えられた。そのため、上記方法に記載の通り 3000 x g の遠心とし、ミトコンドリアを単離した。

	ADP	Oligomycin	FCCP
肝臓	20 mM (2 mM)	100 µM (10 µM)	50 µM (5 µM)
心臓	10 mM (1 mM)	10 µM (1 µM)	50 µM (5 µM)
腎臓	10 mM (1 mM)	10 µM (1 µM)	50 µM (5 µM)

表1 センサーカートリッジへの注入濃度 (括弧内は細胞培養プレートでの最終濃度)

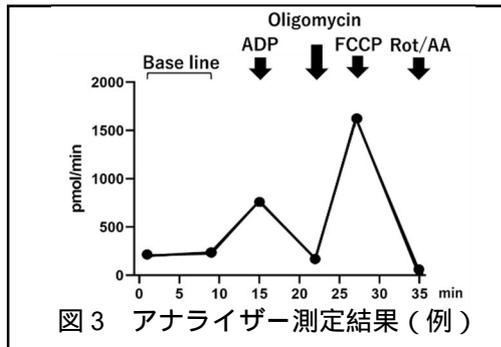


図3 アナライザー測定結果 (例)

(2) バイタル変化

予備実験では有意差は認めなかったものの、静脈出血処置により死亡する個体が多い印象であった。出血操作時間を30分に延長し、本実験を行った。動脈出血群・静脈出血群ともに出血操作によって血圧が低下した。動脈出血群では、時間経過とともに血圧が回復する傾向にあったが、静脈出血群では血圧低下が持続し、実験終了時には動脈出血に比べて有意に血圧が低下していた (図4)。一方、心拍数については、出血操作時には心拍数が低下したが、時間経過とともに回復した。動脈出血群と静脈出血群との間に有意差は認められなかった。

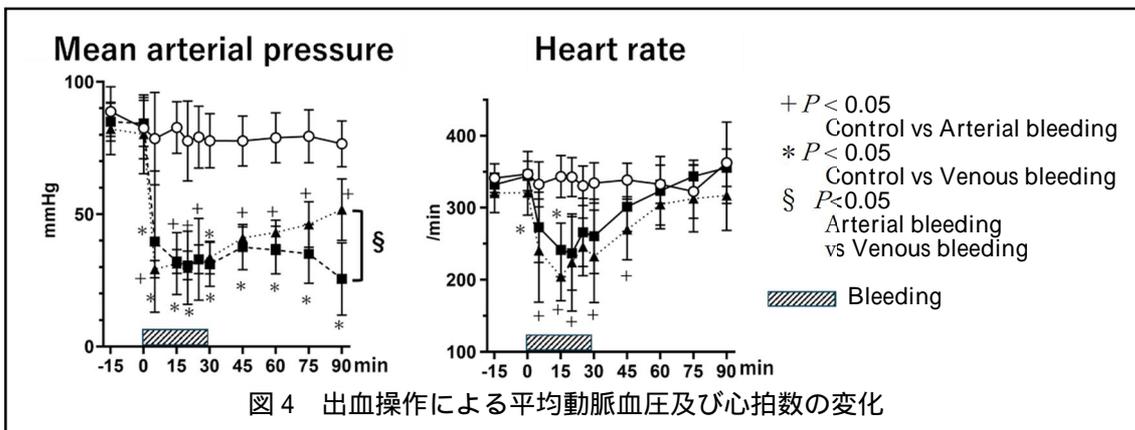


図4 出血操作による平均動脈血圧及び心拍数の変化

(3) 血液ガス分析

pH では明らかな差は認められなかった。pCO₂、Base excess では対照群に比べて静脈出血群は有意に低下しており、代謝性アシドーシスに陥っていると考えられる。Lactate は対照群・動脈出血群に比べて静脈出血群で有意に上昇していた (図5)。静脈出血群では前記の通り血圧低下が持続しており、全身の循環障害が顕著に表れたと考えられる。

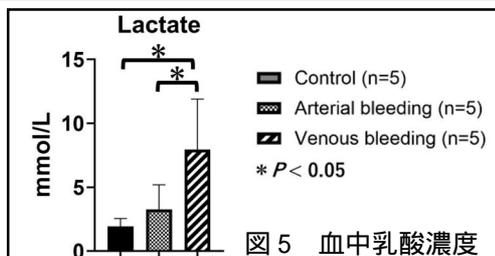


図5 血中乳酸濃度

(4) ミトコンドリア酸素消費速度 (OCR) 測定

本実験では肝臓、心臓、腎臓においてミトコンドリアOCRの測定を実施した。肝臓において、FCCP投与時に静脈出血群の酸素消費速度が有意に低下した (図6)。過去の報告では出血により脾臓ミトコンドリアの予備呼吸能が低下したとされ (Warren et al. 2017) FCCP投与

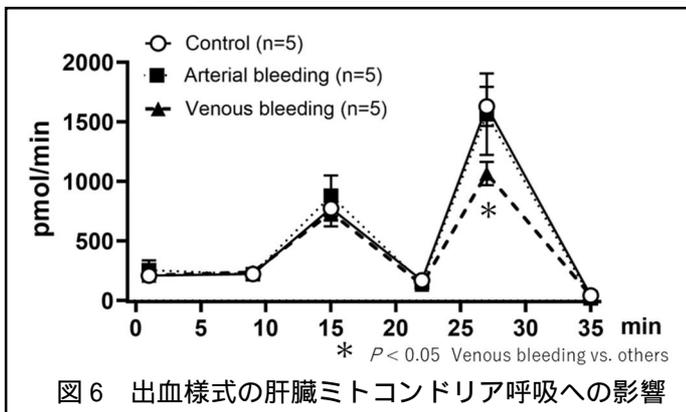


図6 出血様式の肝臓ミトコンドリア呼吸への影響

時の酸素消費速度はミトコンドリアの予備能を反映すると考えられている。本実験では動脈出血群よりも静脈出血群の方が、血圧低下による循環障害が顕著となり、肝臓ミトコンドリアへの負担が増加したと考えられる。心臓・腎臓では各群間に有意差は認めなかった。

(5) ミトコンドリア膜構造蛋白質の相対定量

ミトコンドリア酸素消費速度において差がみられた肝臓について、ミトコンドリア膜構造維持に關する蛋白質の定量を実施した。ミトコンドリア膜蛋白である OMA については、虚血再灌流障害により pre-OMA、OMA (成熟型)、s-OMA (活性型) のうち s-OMA が増加すると報告されている (Marina Fuertes-Agudo et al. 2022)。本実験においても s-OMA が対照群・動脈出血群に比べて静脈出血群で増加していた (図 7)。pre-OMA、OMA については各群で有意差は認められなかった。

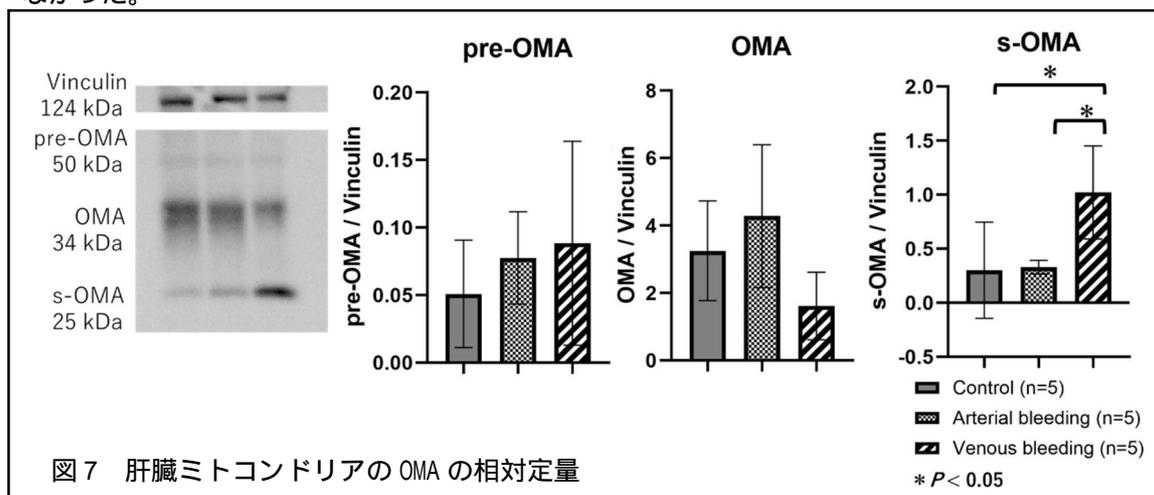


図 7 肝臓ミトコンドリアの OMA の相対定量

(6) 凝固系・線溶系の測定

凝固系の指標として、プロトロンビン時間 (PT) 及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、血中フィブリノーゲン濃度を測定した。いずれも対照群・動脈出血群、静脈出血群で有意差は認めなかった。当初の目的の一つであった線溶系の測定はまだ実施していない。

(7) 今後の展望

出血の線溶系への影響、特に PAI-1 の各臓器での産生や血中への放出量について測定する。また、動脈性出血・静脈性出血により血圧変動に差が生じる原因について検討する。

<参考文献>

- 1) Juan et al. Damage control resuscitation: The new face of damage control. *J Trauma* 2010;69(4):976-990.
- 2) Xu et al. Impact of b-adrenoceptor blockade on systemic inflammation and coagulation disturbances in rats with acute traumatic coagulopathy. *Med Sci Monit* 2015; 21:468-476.
- 3) Elgjo and Knardahl. Low-dose hypertonic saline (NaCl 8.0%) treatment of uncontrolled abdominal hemorrhage: effects on arterial versus venous injury. *Shock* 1996; 5(1):52-8.
- 4) Furukawa et al. Effects of arterial hemorrhage speed on the blood coagulation/fibrinolysis system and hemodynamics in rats. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2020; 31:198-206
- 5) Isolated Mitochondria Assay using the XF24 Analyzer (revision 091104) (www.seahorsebio.com)
- 6) Leger et al. A procedure to extract functional isolated mitochondria from small-sized human atrial samples. Application to obesity with a partial characterization of the organelles. *Free Radic Biol Med* 2020; 153:71-79.
- 7) Frezza et al. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2007;2(2):287-95.
- 8) Warren et al. Mitochondrial dysfunction in rat splenocytes following hemorrhagic shock. *Biochim Biophys Acta* 2017; 1863(10 Pt B):2526-2533.
- 9) Marina et al. COX-2 expression in hepatocytes improves mitochondrial function after hepatic ischemia-reperfusion injury. *Antioxidants* 2022, 11, 1724. <https://doi.org/10.3390/antiox11091724>.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古川 翔太
2. 発表標題 出血様式の違いによるミトコンドリア膜蛋白への影響
3. 学会等名 第108次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古川 翔太
2. 発表標題 出血様式の違いによるミトコンドリアの酸素消費速度への影響
3. 学会等名 第107次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------