

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 25 年 6 月 30 日現在

機関番号： 32666
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22592025
 研究課題名（和文） ショック後腸管リンパ液生理活性および臓器障害に対する腸管由来アラキドン酸の関与
 研究課題名（英文） The role of gut derived arachidonic acid in post-hemorrhagic shock mesenteric lymph on the development of distant organ injury
 研究代表者
 増野 智彦（MASUNO TOMOHIKO）
 日本医科大学・医学部・講師
 研究者番号：00318528

研究成果の概要（和文）：

出血性ショック後に生じる遠隔臓器障害の発生には、腸管虚血が深く関与しており、腸管リンパ液は虚血腸管より産生されるメディエータの主要な運搬経路であることをこれまでの研究で示した。また、出血性ショック後腸管リンパ液の生理活性発現にはPhospholipase A₂ が深く関与していることを示した。現在、出血性ショック後腸管リンパ液内に産生されるアラキドン酸が腸管リンパ液を介してどのように好中球の活性化に関与し、臓器障害を発生させるかに関して研究継続中である。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to determine the role of arachidonic acid in post-hemorrhagic shock mesenteric lymph (PSML) on the development of distant organ injury. We have shown that mesenteric ischemia generates phospholipase A₂ protein in PSML, which induce neutrophil priming and acute lung injury in a two-event model. We have been investigating further mechanism of post-hemorrhagic shock mesenteric lymph induced organ injury including arachidonic acid.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：腸管リンパ液、脂質メディエータ、腸管虚血、アラキドン酸、臓器障害

1. 研究開始当初の背景

外傷初期診療の標準化に伴い、近年出血性ショック患者に対する初期治療は急速に進歩している。しかし、出血性ショック後に生じる多臓器不全による死亡率は依然高いままであり、その発生機序は未だ解明されていない。これまでの研究により、出血性ショック後に生じる遠隔臓器障害の発生には、臓器低灌流、特に腸管血流の低下が深く関わっていることが示されている^{1), 2)}。我々はこれまでショック後腸管リンパ液中に産生されるホスホリパーゼA2 (PLA2) に注目し、臓器障害発生に対するPLA2の役割を研究してきた。

1998年Deitchらは、腸間膜リンパ管の離断により出血性ショック後に生じる肺障害が抑制されることを報告し、これにより我々も炎症性メディエーターの主要運搬経路として腸管リンパ液に注目することとなった³⁾。その後の研究にて腸管リンパ液には好中球および血管内皮細胞を活性化するメディエーターが含まれていることが示され⁴⁾、その生理活性は動物種によらず保たれていることを増野らが報告した⁵⁾。さらに増野は、腸管リンパの持つ生理活性はショック深度・期間に相関することを報告している⁶⁾。ショック後の腸管リンパ液が生理活性を持つことは分かったが、生理活性を有するメディエーターがどのような物質であるかは依然明かではない。増野は前研究 (H19~H21年度基盤研究C) にて出血性ショック後腸管リンパ液のもつ生理活性はPLA2 inhibitorの *in vivo* および *in vitro* の投与により抑制されることを、また、PLA2 inhibitorの全身投与にて肺障害の発生が抑制されることを明かとし、ショック後に生じるメディエーターの産生にPLA2が重要な役割を果たしていることを示した⁷⁾。臨床研究においても血中PLA2値の上昇は

その後のARDS・MOFの発症率に相関することが報告されている。PLA2は脂質二重膜からのアラキドン酸等の遊離脂肪酸を切り出す初期律速酵素であり、そこから生じるアラキドン酸由来エイコサノイド(LT, TX, PG)はいずれも高い生物学的活性を持つ脂質メディエーターである。しかし、これまでの研究では腸管リンパ液内にこれらのメディエーターは確認されていない。

参考文献)

- 1) Hassoun HT *et al*, *Shock* (2001): Post-injury multiple organ failure. The role of the gut.
- 2) Reilly PM *et al*, *Shock* (2001): The mesenteric hemodynamic response to circulatory shock.
- 3) Magnotti LJ *et al*, *Ann Surg* (1998): Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock.
- 4) Gonzalez RJ *et al*, *J Trauma* (2001): Mesenteric lymph is responsible for post-hemorrhagic shock systemic neutrophil priming.
- 5) Salin EL, Masuno T *et al*, *J Trauma* (2004): Systemic neutrophil priming by lipid mediators in post-shock mesenteric lymph exists across species.
- 6) Masuno T *et al*, *Shock* (2006): Bioactivity of postshock mesenteric lymph depends on the depth and duration of hemorrhagic shock.
- 7) 増野智彦, H19~H21年度基盤研究C「ショック後腸管リンパ液中に産生されるホスホリパーゼA2の臓器障害に対する影響」

2. 研究の目的

本研究では、腸管からPLA2の働きにより切り出されたアラキドン酸が腸管リンパ液を介して運搬され、好中球や肺などの標的臓器で、高い活性をもつ脂質メディエーターに変換され細胞毒性を生じるのではないかとの仮説に基づき、前研究を進展させ、「PLA2の働きにより腸管より遊離されるアラキドン酸(AA)が腸管リンパを介してどのように臓器障害発生に関与するか？」を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

【研究1】ショック後腸管リンパ液の持つ生物活性がアラキドン酸由来であるかを検討する。

ラット出血性ショックモデルおよびリンパ液の回収

オスSprague-Dawley ratを使用し、ペントバルビタール(50mg/kg)腹腔内投与にて麻酔した後、腹部正中切開をおき、上腸間膜動脈根部に沿って走行する腸間膜リンパ管に0.02inchシリコンチューブをカニューレションし、冷水槽内マイクロチューブ内に腸管リンパ液を経時的に採取。腹部正中創を縫合閉鎖した後、大腿動静脈をカニューレション、動脈カテーテルは脱血および動脈圧モニターリングに、静脈カテーテルは輸液用に使用。ショック導入前1時間にショック前腸管リンパ液を採取。その後大腿動脈カテーテルより脱血し、平均動脈圧を30mmHgまで降下させ、同レベルを45分間維持。ショック完了後、脱血した血液および2倍量の生理食塩水を2時間かけ輸液し蘇生。蘇生完了後更に1時間腸管リンパ液を採取し、これをショック後腸管リンパ液として以下の実験に使用した。ショック後腸管リンパ液として蘇生完了後1時間のリンパ液を使用する理由は先行研究より、この時間帯のリンパ液が最も生理活性を強く持つためである。

実験①：出血性ショック後腸管リンパ液内でAAが増加するかを検討する。

ショック前リンパ液およびショック後リ

ンパ液内のAAを測定し比較する。

実験②：AAを含む腸管リンパ液は生理活性を持つかを検討する。

ショック前リンパ液(生理活性なし)にAAを加えたものを、安静ヒト(またはラット)好中球に添加し、産生される活性酸素量を測定することにより、生理活性の指標とする。

好中球活性酸素産生の測定

分離した好中球をリンパ液で5分間刺激し、その後1 μ Mのformylmethionyl-leucyl-phenylalanineあるいは200ng/mlのphorbol12-myristate13-acetateで活性化し、産生された活性酸素をSOD-inhibitable cytochrome c reduction法により測定する。

【研究2】腸管上皮のAA含有量が、ショック後リンパ液の生理活性に及ぼす影響を検討する。

腸管上皮高AA含有、低AA含有モデル：ラットに経皮的にfeeding tubeを挿入し、7日間n-6系またはn-3系脂肪酸高含有流動食を投与することにより高AA含有、低AA含有モデルを作成する。

実験③：出血性ショック前後のリンパ液中AA含有量の変化、生理活性を測定する。

4. 研究成果

【研究1】ショック後腸管リンパ液の持つ生物活性がアラキドン酸由来であるかを検討する。

出血性ショックモデルの作成および実験動物からのサンプリングは比較的順調に進んでおり、生理活性の測定はできているものの、腸管リンパ液中の脂質を分離、測定する段階での抽出に難渋している。抽出方法の調整を行い、実験を継続している。

【研究2】腸管上皮のAA含有量が、ショッ

ク後リンパ液の生理活性に及ぼす影響を検討する。

投与栄養成分調節による体内脂質含有量を変化させた動物の作成を試みたが、栄養調節後の動物は脆弱であり出血性ショックに耐えることができず、本研究は計画した実験を行うことができなかった。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 森下幸治、三上さおり、相星淳一、増野智彦、小池薫、横山友里、小林哲幸、大友康裕：出血性ショック後の腸間膜リンパ液の脂質メディエーターと Ca^{2+} 非依存性ホスホリパーゼ A2 (iPLA₂γ)。第 38 回 日本救急医学会総会，2010
2. 森下幸治、相星淳一、増野智彦、小池薫、小林哲行、横田裕行、大友康裕：出血性ショック後の腸間膜リンパ液の脂質メディエーターと Ca 非依存性のホスホリパーゼ A2。第 24 回日本外傷学会，2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増野 智彦 (MASUNO TOMOHIKO)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：00318528

(2) 研究分担者

佐藤 格夫 (SATO NORIO)
京都大学・医学部・講師
研究者番号：30409205

久志本 成樹 (KUSHIMOTO SHIGEKI)
東北大学・医学研究科・教授
研究者番号：50195434

横田 裕行 (YOKOTA HIROYUKI)
日本医科大学・医学研究科・教授