

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592686

研究課題名(和文) 出血性ショック後臓器障害発生における軟部組織損傷の役割に関する研究

研究課題名(英文) A study of tissue trauma with hemorrhagic shock induced remote organ failure.

研究代表者

大泉 旭 (Ohizumi, Akira)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20277502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、骨軟部組織損傷後に全身性の炎症が惹起され、時に多臓器不全に陥るメカニズムを解明するべく研究を行った。まず、外傷モデルを開発し、モデルの有効性を調べ、次いでそのモデルを用い、グラム陽性菌であるリボタイコ酸(LTA)を腹腔内注射するTwo-hitモデル(外傷+敗血症)を作成した。我々のモデルは、動物の骨軟部組織を細かくミンチし(TBX)、それを同種の動物の背部に移植するものである。このモデルの有効性、およびTwo-hit後の評価は、腸管運動抑制の有無で行った。我々のモデルは、移植するTBXの量依存性に腸管運動が抑制され、さらにTwo-hit後には高度に腸管運動が抑制された。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study was to investigate the mechanism of multiple organ failure after soft tissue trauma. First, we produced an animal model of tissue trauma, and verified the validity of the model for the study of trauma. Our produced trauma model was a non-analgesic murine tissue trauma model, which was constructed by the dorsal subcutaneous implantation of minced donor syngeneic tissue-bone matrix (TBX) precisely adjusted to body weight and studied after 21 hrs. Next, we investigated the effect of two-hit phenomenon (tissue trauma/sepsis) on gastrointestinal motility using our produced mode. Syngeneic TBX model was a highly controllable and reliable survival model of tissue injury, and two hit synergy occurred as gastrointestinal motility was only severely altered in the combined tissue trauma/sepsis model.

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：外傷 遠隔臓器障害

1. 研究開始当初の背景

外傷は局所および全身の炎症反応を惹起し、さらに全身性炎症は遠隔臓器傷害を引き起こす。現代において、外傷における集中治療学の進歩は目覚ましいにもかかわらず、外傷後の遠隔臓器傷害による死亡率は依然として高い。外傷後の生体反応としては、innate immune response が知られる。Innate immune system は感染や外傷に対して生体が最初に反応する生体防御反応である。Innate immune system を構成する complements, T cells (CD4+ and CD8+), neutrophils, monocytes, macrophages, natural killer (NK) cells, dendritic cells (DC) 等の細胞は damage-associated molecular patterns (DAMPs) により刺激を受け、炎症性メディエータを放出する。現在までに DAMPs は、外因性の danger signals (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs; lipopolysaccharide[LPS], bacterial DNA, viral RNA) や内因性の danger signals (alarmins; high mobility group box 1 (HMGB1), heat shock proteins (HSPs), S100, hyaluronan, oxygen free radicals 等が報告されている。内因性の danger signal は通常は細胞構成成分であるが、細胞壊死や細胞障害により放出され、toll-like receptors (TLRs) や receptor for advanced glycation end products (RAGE) により認識され、刺激を受けた TLRs や RAGE は NFκB 介して血管内皮細胞への好中球の遊走、接着を促進させ、組織障害の修復を図るが、過度の細胞・組織障害による danger signal の放出は過剰な炎症性細胞の産生をもたらす、結果、更なる細胞・組織障害を引き起こす。DAMPs のなかで特に HMGB1 は最近組織損傷後の遠隔臓器障害の key mediator として注目されている。最近の研究で、外傷後の全身性炎症やそれに引き続く遠隔臓器傷害の発生に HMGB1-TLR4 pathway が関与し、また、外傷モデルへの抗 HMGB1 抗体の投与で、炎症性サイトカインの上昇が抑えられたという報告³⁾がされている。臨床において、出血性ショックを伴った骨軟部組織損傷は重症外傷患者によく見られる病態である。現在までに、出血性ショックと骨軟部組織損傷合併後の全身性変化の病態や遠隔臓器傷害発生メカニズム解明を目的とした動物実験は多数報告されている。これらの実験に使用された骨軟部組織損傷モデルは開腹モデル、骨折モデル、筋挫滅モデル等であるが、これらのモデルは実際の臨床的な外傷を反映していなかったり(開腹モデル) 外傷に伴う疼痛や、それに対する鎮痛が外傷後に起こる炎症反応を修正または増強してしまい(骨折、筋挫滅モデル) さらに、与える外傷の重傷度が評価できない、などの欠点があり、外傷後の炎症、免疫反応を検討する上で有用なモデルが存在しないのが現状である。今回我々は、移植前の TBX 中

の DAMPs 含有の有無を調べ、この新しい骨軟部組織損傷モデルに出血性ショックを加えるモデルを作製し、臨床現場で日常よく見かける外傷パターン後の遠隔臓器傷害(腸管運動障害)を検討することを目的とする。

2. 研究の目的

我々の開発した骨軟部組織損傷モデルの有効性を調べる。
骨軟部組織モデルに敗血症を惹起させ、腸管運動抑制が起きるか検討する。

3. 研究の方法

【骨軟部組織損傷モデルの作成】

マウスの筋肉、骨をミンチし(tissue-bone matrix 以下 TBX)、同種マウスの背部皮下に TBX を移植する外傷モデル(図1)を作製し、このモデルの腸管研究における妥当性を検討した。方法としてまず TBX 移植後の消化管輸送能を調べるため(*in vivo*)、腸管から吸収されない蛍光デキストランを移植後 2 1 時間で経口的に投与し、経口投与後 7 5 分で消化管を摘出し、摘出した腸管を 1 5 分割(胃(1)、十二指腸と小腸(10)、盲腸(1)、大腸(3))し、腸管の蛍光デキストランの分布を調べた(図2)。

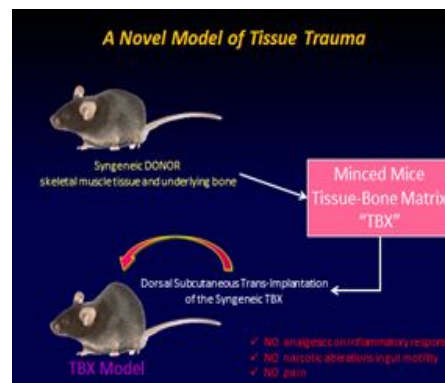


図 1



図 2

【Two-hit モデルの研究】

T B Xグループ：体重の15%のT B Xを同種マウスに移植し、移植した21時間後にマウスを犠牲死させる。

敗血症グループ：体重あたり10mgのリポタイコ酸(L T A)をマウスの腹腔内に注射し、その後3時間ごとに同量のL T Aを2回腹腔内注射し、最後の注射から12時間後にマウスを犠牲死させる。

T w o - h i tグループ：体重の15%のT B Xを移植し、その3時間後にL T A(10mg / k g)を腹腔内注射し、その後3時間ごとに同量のL T Aを2回腹腔内注射し、最後の注射から12時間後にマウスを犠牲死させる。

各グループとも犠牲死75分前に、腸管から吸収されない蛍光デキストランを移植後21時間で経口的に投与し、経口投与後75分で消化管を摘出し、摘出した腸管を15分割(胃(1) 十二指腸と小腸(10) 盲腸(1) 大腸(3))し、腸管の蛍光デキストランの分布を調べた(図3)。

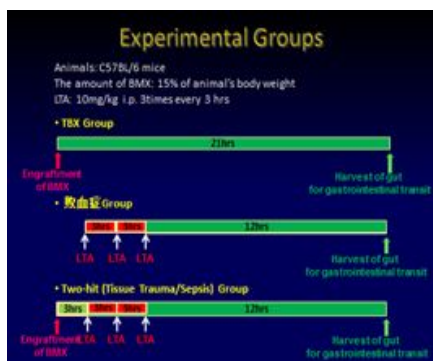


図3

4. 研究成果

T B Xは容量依存性にマウス腸管運動を抑制することが分かった。また体重あたり20%以上の移植は、致死的事であることも分かった(図4, 5)。

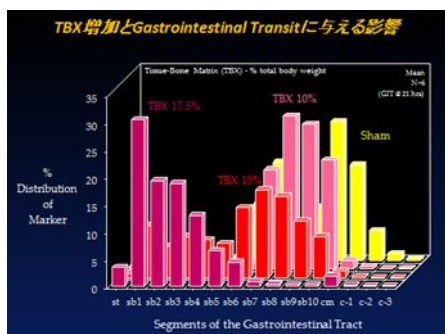


図4

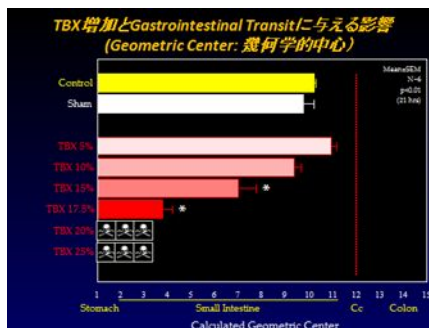


図5

L T A腹腔内注射単独または、体重の15%のT B X移植単独では、マウス腸管運動抑制に影響を与えなかったが、両者を合わせたT w o - h i tモデルにより、有意にマウス腸管運動が抑制された(図6)。

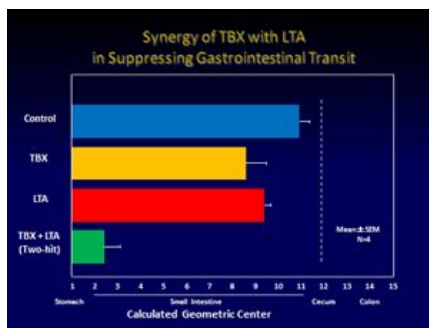


図6

T w o - h i tモデルによる、腸管運動抑制の機序として、骨軟部組織損傷(F i r s t - h i t)により全身性炎症が惹起され、さらに敗血症(S e c o n d - h i t)が加わることにより、相乗効果によって腸管の炎症(遠隔臓器不全)が惹起され、腸管運動の抑制が起こったと考えられる。

今回の研究により、我々の開発した骨軟部組織損傷モデルは、今後、外傷後の全身性炎症発生に関する研究に有用であり、さらにこのモデルを利用したT w o - h i tモデルの実験は、外傷後に多臓器不全に陥るとい、T w o - h i t理論を裏付ける結果となった。

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

大泉 旭 (OIZUMI Akira)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：20277502

(2) 研究分担者

新井 正徳 (ARAI Masatoku)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：60267127

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：