

氏名	三原 良介
(ふりがな)	(みはら りょうすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成31年1月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Prolonged severe hemorrhagic shock at a mean arterial pressure of 40 mmHg does not lead to brain damage in rats (ラット出血性ショックモデルにおいて平均動脈血圧 40 mmHg でのショック遷延では蘇生後の脳障害を引き起こさない)
論文審査委員	(主) 教授 黒岩 敏彦 教授 石坂 信和 教授 荒若 繁樹

学位論文内容の要旨

《目的》

生命を脅かす出血が持続し止血処置が完了してないときに血圧を上昇させると、出血量が増加し失血死に至る可能性がある。そのため、手術や塞栓術などの止血処置が行われるまで意図的に血圧を低くコントロールすることがしばしば行われている。しかし、血圧レベルとその維持可能期間は未だ明らかにされていない。脳は虚血に最も脆弱な臓器であるため、障害を引き起こさせない血圧レベルと維持可能期間を明らかにすることは重要である。脳血流は平均動脈血圧 (Mean Arterial Pressure (MAP)) が 50 mmHg 以上で自動制御が機能し維持されるが、MAP 30 mmHg 以下でその機能が破綻し不可逆的な脳損傷が起こるとされている。申請者は、細胞死の一つの形態であるアポトーシスを指標として、MAP

40 mmHg での出血性ショック(Hemorrhagic Shock; HS) の遷延が脳障害を引き起こすかを検討した。

《方法》

(実験動物)

15 匹のラット (オス、平均体重 $380 \text{ g} \pm 28 \text{ g}$) を用い、自発呼吸下 (笑気 : 酸素 = 50% : 50%) でセボフルラン麻酔を行った。心電図モニター後、直腸温度計を留置、大腿動脈にポリエチレン (PE 50) カテーテルを、左大腿静脈から下大静脈に PE 60 カテーテルを留置した。麻酔、モニタリング、カテーテル挿入が 45 分以内であったラットだけを実験に用いた。

(実験概要)

実験は 5 分間のベースライン (BL) を記録後、HS 期 (MAP = 40 mmHg) では、大腿静脈カテーテルから 1 mL/分で 5 分間脱血し、静脈血の脱血・投与を繰り返して MAP = 40 mmHg を維持した。脱血・回収血液はヘパリンを添加し蘇生期に輸血するため室温で保存した。蘇生期 (MAP ≥ 70 mmHg) は、保存した血液をラットの体重 100 g あたり 1 mL を 1 分間で、続いて生理食塩水をラットの体重 100 g あたり 2 mL を 4 分間で投与し、MAP 70 mmHg 以上に達しなかった場合、同様の輸血・輸液を 1 回のみ繰り返した。観察期 (麻酔から覚醒後) では、大腿部閉創処置後に麻酔から覚醒させた後、自由に食物と水分を与え、ラット観察室で 24 時間毎に 96 時間まで神経学的機能評価 (overall performance categories (OPC) (歩行、飲水、食事の状態を 5 段階で評価、1 : 正常、5 : 死亡)、neurologic deficit scoring (NDS) (意識・呼吸障害、脳神経機能障害、運動・感覚機能障害、協調障害を 0~100% で評価、0% : 正常、100% : 脳死)) を行った。HS 期と観察期で心拍数、血圧、直腸温度、呼吸数をモニタリングし、体温 $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に維持した。BL、HS 期と蘇生期の最後にそれぞれ動脈血サンプリング (300 μL) を行った。観察期に入って 96 時間後に再度麻酔を行い、脳ホルマリン灌流固定後に大脳を取り出し、TUNEL 染色で海馬のアポトーシスの有無を調べた。

15 匹のラットを 6 匹ずつグループ 1 (HS 期 60 分と蘇生期 60 分)、グループ 2 (HS 期 75 分と蘇生期 75 分)、また 3 匹で 150 分間の麻酔を行ったグループ 3 (シャム群) に分け、生存率を比較した。

(統計解析)

血行動態と生理学的変数は repeated measures ANOVA と unpaired t-test、生存時間は Kaplan Meier 法を用いて 2 群間 (グループ 1 vs. 2) で比較した。各グループの BL と時系列の比較は repeated measures ANOVA と paired t-test で解析した。P<0.05 を有意差ありとした。

《結果》

1) MAP: グループ 1 と 2 の 6 匹の MAP は BL 値 87 ± 11 mmHg から 5 分後に 35 ± 5 mmHg へ低下し、その後 40 mmHg にコントロールした。グループ 1 と 2 に HS 期では有意差は認められなかった。蘇生期の最初 5 分の輸血・輸液で 119 ± 9 mmHg (グループ 1) と 97 ± 21 mmHg (グループ 2) へ上昇した (P<0.05)。蘇生期に 2 回目の輸血・輸液を必要としたのは 2/6 匹 (33%) (グループ 1) と 6/6 匹 (100%) (グループ 2) (P<0.01) であった。グループ 3 (シャム群) の MAP は 150 分間を通して 85 mmHg 以上で経過した。

2) 心拍数: グループ 1 と 2 の 6 匹の心拍数は BL 値 353 ± 43 b.p.m から 5 分後の 287 ± 87 b.p.m に減少した後、HS 期終了までに 389 ± 40 b.p.m (グループ 1) と 412 ± 34 b.p.m (グループ 2) に徐々に増加し、蘇生期終了まで同レベルで経過し、2 群間で有意差はなかった。グループ 3 では 150 分間を通しておよそ 350 b.p.m で推移した。

3) 血液サンプリング: グループ 1 と 2 で BL での血液ガス所見やヘマトクリット値に有意差はなかった。HS 期終了時 Base Excess (BE) 値は -9.1 ± 2.8 nmol/L (グループ 1) と -14.0 ± 6.0 nmol/L (グループ 2) でともに著明に低下したが (vs. BL 値、P<0.05)、2 群間で有意差はなかった。グループ 3 の BE 値は BL と同レベルで推移した。

4) 生存時間：グループ 1 と 2 のラットは蘇生期終了時まで生存したが、観察期終了の 96 時間まで生存したのは 5/6 匹 (83%) (グループ 1) と 2/6 匹 (33%) (グループ 2) ($P < 0.05$) であった。グループ 3 の 3 匹はすべて 96 時間生存した。生存した 10 匹のラットの神経学的機能評価は経過中すべて OPC=1、NDS=0% であった。

5) TUNEL 染色の結果: 96 時間生存ラットの海馬において TUNEL 染色によるアポトーシス細胞は認められなかった。

《考察》

本研究では脳血流の自動制御が破綻する最低血圧 (MAP = 40 mmHg) で HS 時間を 60 分間 (グループ 1) と 75 分間 (グループ 2) とした 2 群で、蘇生後の神経学的障害や海馬でのアポトーシス発現について調べた。HS 中の BE 値は著明に低下し、深い侵襲が加わったと考えられるが、HS を遷延させたグループ 2 はグループ 1 と比較して高い死亡率を示し、より深い侵襲があったと考えられた。しかし、HS 後 96 時間生存した全てのラットにおいて神経学的障害や脳アポトーシス発現が見られなかった。HS 遷延で侵襲度が深くなったとしても MAP = 40 mmHg での脳虚血に対する耐用性が示された。死亡したラットでは TUNEL 染色を施行しなかったが、死亡原因は蘇生後の循環不全の可能性も考えられ、ラット蘇生後集中治療、特に循環維持のプロトコルが困難であり、本研究の限界と考える。

《結語》

ラット HS モデルで、MAP = 40 mmHg の状態を遷延させても、蘇生後の神経機能は正常を保ち、脳の虚血に最も脆弱な海馬でアポトーシスは認められなかった。脳血流自動制御が保証されない血圧レベルで HS を遷延させても脳虚血に対する耐用性があることが示唆された。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

救急医療の現場では、外傷による重度の出血性ショックの治療を行うことがある。しかし、生命を脅かす出血が持続し止血処置が完了していないときに、輸液、輸血により血圧を上昇させると、出血量が増加し失血死に至る可能性がある。そのため、手術や塞栓術などの止血処置が行われるまで意図的に血圧を低くコントロールすることがしばしば行われているが、血圧レベルとその維持可能期間は未だ明らかではない。脳は虚血に最も脆弱な臓器であるため、障害を引き起こさせない血圧レベルと維持可能期間を決定することが重要である。脳血流は平均動脈血圧 (Mean Arterial Pressure (MAP)) が 50 mmHg 以上で自動制御が機能し維持されるが、MAP 30 mmHg 以下でその機能が破綻し不可逆的な脳損傷が起こるとされている。申請者は、細胞死の一つの形態であるアポトーシスを指標として、MAP 40 mmHg での出血性ショック (Hemorrhagic Shock; HS) の遷延が脳障害を引き起こすかを検討した。ラットの出血性ショック (HS) モデルを用い、脳血流の自動制御が破綻する最低血圧 (MAP = 40 mmHg) で HS 時間を 60 分間と 75 分間にした 2 群で、蘇生後の神経学的障害や虚血に最も脆弱な海馬のアポトーシス発現について調べた。HS 時間を 75 分間に延長させると、高い死亡率を示したが、HS 後 96 時間生存した全てのラットにおいて蘇生後の神経機能は正常を保ち、海馬でのアポトーシスは認められなかった。以上の結果から、脳血流自動制御が保証されない血圧レベルで HS 時間を遷延させても脳虚血に対する耐用性があることが示唆された。本研究の結果は、重症出血性ショックの治療を考える上で、新たな知見を供するものと考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Acute Medicine & Surgery 5(4): 350-357, 2018