



## Pancreatic proteases inflammatory mediators in peritoneal fluid during splanchnic arterial occlusion and reperfusion

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石丸, 啓 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/271">http://hdl.handle.net/10271/271</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 396号	学位授与年月日	平成16年 2月10日
氏 名	石 丸 啓		
論文題目	Pancreatic proteases inflammatory mediators in peritoneal fluid during splanchnic arterial occlusion and reperfusion (腹腔内臓器虚血再灌流ショックにおける腸管内プロテアーゼ及び腹水の役割)		

博士(医学) 石 丸 啓

## 論文題目

Pancreatic proteases and inflammatory mediators in peritoneal fluid during splanchnic arterial occlusion and reperfusion

(腹腔内臓器虚血再灌流ショックにおける腸管内プロテアーゼ及び腹水の役割)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

虚血再灌流障害とは、虚血に陥った組織に血流が再開した際に急激な組織障害を生じる現象のことをいい、その発生機序として再灌流後に大量に産生されるinflammatory mediator(IM)が障害因子として作用することが明らかにされている。腹腔内臓器が虚血再灌流にさらされた時には腎臓、肺、心臓などの遠隔臓器にも障害を引き起こし、多臓器不全(MOF)に至るとされている。一般に腹腔内臓器虚血再灌流で発生するショック(SAOショック)ではIMは虚血腸管で産生され、経門脈的あるいはリンパ行性に全身循環に入ると考えられている。SAOショックでは循環白血球の活性化は腸管虚血中にすでに発生しているが、門脈血流やリンパ流は虚血中には極度に低下することが示されている。そこで今回われわれは、それらの経路に加えてIMは経腹膜的に全身循環に吸収されるという仮説をたて、SAOショックにおける腸管内プロテアーゼの役割と、腸管虚血により腹腔内に産生されたIMがSAOショックの経過においていかなる働きをしているかを検討した。

### 〔材料ならびに方法〕

実験動物はWistarラットを使用し、SAOショックモデル(腹腔動脈、上腸間膜動脈を90分遮断(O-90)し再灌流後120分(R-120)まで観察)を作成した。2群(ANGD群: 6-amidino-2-naphtyl *p*-guanidinobenzoate dimethanesulfate, nafamostat mesilateを溶解した生理食塩水で腸管内を灌流した群、C群: 腸管内を灌流しないコントロール群)に分け、両群間で血圧、血球数(赤血球、白血球)、肝機能(GOT、GPT)、腹腔内洗浄液中TNF- $\alpha$ 値につき比較検討を行った。また、この2群において腹腔内に腸管虚血によりIMが発生し循環血漿中に吸収されるという仮説の妥当性を検討するために動脈血漿および腹腔内洗浄液の好中球の活性化能(偽足形成能)につきO-90、R-120での検討を行い、さらにclosure群(腹腔内を閉鎖した群)drainage群(腹腔内を洗浄し腹水をドレナージした群)につきSAOショック後の生存率を比較した。

### 〔結果〕

ANGD群ではC群に比較して再灌流後の血圧低下、脱水の程度(赤血球数の上昇)、末梢血液中の白血球数の著明な低下、および肝機能の低下が有意差をもって軽減された。さらに腹腔内洗浄液の好中球の活性化能は、C群においてはO-90で著明に上昇するのに対し(虚血前6%、O-90 38%、 $p=0.001$ )、ANGD群ではこの上昇が認められなかった。O-90での腹水の白血球活性化能にはC群とANGD群において有意な差を認めた( $p=0.002$ )が、2群のO-90での腹腔内洗浄液内TNF- $\alpha$ 値は両群間で有意差を認めなかった。drainage群ではclosure群に比較して生存率が向上した。( $p=0.04$ )

## 〔結論〕

今回の実験結果から、SAOショックにおいて虚血腸管内のプロテアーゼにより産生されたIMは、MOFを引き起こす重要な因子であると考えられた。プロテアーゼインヒビターで腸管内を灌流すると、循環血液および腹腔内洗浄液の細胞活性化が軽減することから、本法はSAOショックにおける比較的早期の時点でのMOFを防ぐ治療手段になる可能性が示唆された。また虚血の時点(0-90)で、腹腔内洗浄液の好中球活性化能が動脈血漿に先行して上昇し、さらに腹腔内を洗浄し腹水をドレナージすることにより生存率を上昇しうることが示された。腹腔内臓器虚血中には臓側腹膜の血流およびリンパ流は遮断されているが、壁側腹膜のそれは遮断されていないため、虚血腸管内プロテアーゼにより腹腔内に産生されたIMは、臓器虚血の早期には、主に壁側腹膜経由で全身に循環し、MOFを発生させる重要な役割を演じている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

腹腔内臓器血流の全阻血と一定時間経過後の再灌流は、生体に致死的な侵襲を及ぼすことが知られ、distribution shockの実験モデルとして確立されている。虚血再灌流によって腸管内あるいは腸管壁で産生される炎症性メディエータには、エンドトキシン、サイトカイン、補体、反応性酸素種、エイコサノイド、脾酵素関連メディエータなどがあげられている。申請者らは脾酵素関連メディエータに注目し、腸管内に蛋白分解酵素阻害剤を投与して脾酵素(キモトリプシン、トリプシン)を不活化することにより、虚血再灌流後の脾酵素関連メディエータの発生を抑制し、ショックの転帰を改善させ得るという仮説を立てた。また、従来から炎症性メディエータの波及経路は、腸管壁の静脈系とリンパ系の2経路とされていたが、第3の経路として経腹膜的に全身循環に入るという仮説を立て、その立証を試みた。

実験動物はSDラットを使用し、splanchnic arterial occlusion(腹腔内臓器支配動脈の遮断、以下SAO)として腹腔動脈・前腸間膜動脈を90分遮断後、120分間再灌流した。この実験モデルは再現性があり、再灌流後120分で全個体が死亡する。申請者らは、蛋白分解酵素阻害剤として、6-amidino-2-naphtyl p-guanidinobenzoate dimethanesulfate、nafamostat mesilate(以下、ANGD)を選択し、その投与の有無で対象を2群に分けた。すなわち、ANGD投与群(以下、ANGD群)(n=5)は、腹腔動脈・前腸間膜動脈の遮断15分前に、前処理としてANGD 0.37mMを溶解した生理食塩水 1Lで小腸管腔内を全長に渡って洗浄し、その後、洗浄液を全量回収した。対照群(control群、以下C群)(n=5)は、小腸管腔内を洗浄せず腸管内容をそのままとした。申請者らが得た結果は次の通りである。

- 1) ANGD群における平均動脈圧の変動は、全経過を通じてほぼ安定していたが、C群は再灌流直後よりショック状態が続いた。2群間には有意差が見られた。
- 2) ANGD群はC群に比較し、遮断90分、再灌流120分の2時点で、赤血球数の増加(血液濃縮)、白血球数減少、肝機能障害について有意に軽減された。
- 3) ANGD群における腹水の好中球活性化能(ラット好中球の偽足形成率)はほとんど増加しなかったが、一方、C群では、遮断90分ですでにピークとなり、再灌流120分においても高値が持続した。2群間には有意差が見られた。
- 4) 腹水中のTNF- $\alpha$ は、どの時点においても増加し2群間に差を認めなかった。
- 5) C群において、腹水をドレナージせず閉鎖した群は、再灌流60分後に全例死亡したが、ドレナージした群は、再灌流120分後に死亡し、60分の生命延長が見られた。

以上の結果から、SAOによるdistribution shockの起因物質として、腸管で腓酵素によって産生される腓酵素関連メディエータの関与が立証された。また、動脈遮断を解除する前の時点で、すでに腹水の好中球活性化能が血漿よりも先行して上昇しており、この時点では腸管壁の血流およびリンパ流は遮断されていることから、腓酵素関連メディエータは壁側腹膜経由で全身に播種しショック状態を引き起こす可能性が示唆された。さらに、SAOによるdistribution shockの治療手技として、可及的早期に腹腔内を洗浄しドレナージすることが、生存率を改善させることを立証し、臨床上、重要な知見が得られた。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 動脈遮断90分、再灌流120分の実験モデルとした根拠について
- 2) 用いた実験動物数について
- 3) 腹腔動脈・前腸間膜動脈の遮断により腹腔内臓器血流の完全遮断が可能か
- 4) 好中球活性化指標としての偽足形成能の測定方法、採用した根拠について
- 5) ANG2を選択した理由および投与量の妥当性について
- 6) C群で生理食塩水による腸管腔内洗浄を行わなかった理由
- 7) 遮断90分で血液中の白血球数が減少した機序について
- 8) 発生した腹水量、腹水の採取法について
- 9) 腹水中のエンドトキシン、および白血球遊走能に關与するサイトカインの測定について
- 10) 腸管内の腓酵素活性の測定について
- 11) ANG2の循環血液中および局所での抗プロテアーゼ活性の相違について
- 12) 血液中の $\alpha_1$ アンチトリプシンなどの変動について
- 13) 腹水および血漿において好中球活性化能の亢進が出現する時相に相違が生じた機序について
- 14) 再灌流前の遮断90分の時点で、腹水の好中球活性化能が亢進した機序について
- 15) 腸管で産生されたメディエータが腹水中に漏れる機序について
- 16) 腹水中の好中球数について
- 17) ANG2投与により、小腸粘膜絨毛高の保持が得られた知見の機序について
- 18) 腹腔神経節へのエンドトキシン等のメディエータによる刺激について
- 19) メディエータの経腹膜的経路による播種の画像解析について
- 20) 腓酵素関連メディエータの同定について

これらの質問に対する申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 青 木 克 憲

副査 浦 野 哲 盟 副査 金 山 尚 裕