

クラッシュシンドロームモデルラットを用いた

薬物治療に関する研究

村田 勇

目次

総論の部	page
緒言	1
第1編:臨床症状を反映したCSモデルラットの作製	4
第1章:生存率に影響を及ぼす病態の評価	5
第1節:CSモデルラット作製のための圧迫条件に関する検討	5
第2節:CSモデルラットの生存率曲線	7
第3節:心電図測定および血漿中カリウム値測定による心機能の評価	8
第4節:平均動脈圧およびヘマトクリット値測定による循環動態の評価	10
第5節:血液ガス分析による代謝性アシドーシスの評価	11
第6節:本章の小括および考察	14
第2章:圧迫による局所傷害および遠隔臓器への影響	16
第1節:細胞逸脱酵素およびMb値測定による筋肉傷害性の評価	16
第2節:傷害筋肉の組織観察および浮腫の評価	19
第3節:局所および遠隔臓器傷害の評価	21
第4節:本章の小括および考察	26
第3章:本編のまとめ	27
第2編:CSモデルラットを用いた治療薬剤の評価	28
第1章:CSモデルラットに対する輸液薬剤の治療効果	29
第1節:輸液持続投与の条件およびアルカリ化剤の配合濃度の決定	29
第2節:生存率に対する輸液持続投与の効果	30

第3節:血漿中K ⁺ 値およびMAP値に対する輸液持続投与の効果	31
第4節:血液ガスパラメーターに対する輸液持続投与の効果	32
第5節:腎機能に対する輸液持続投与の効果	35
第6節:局所および全身炎症に対する輸液持続投与の効果	37
第7節:本章の小括および考察	40
第2章:CSに対するDexamethasone 静脈内急速投与の効果	42
第1節:生存率に対するDexの効果	42
第2節:血漿中K ⁺ 値およびMAP値に対するDexの効果	43
第3節:代謝性アシドーシスに対するDexの効果	44
第4節:局所および全身炎症に対するDexの効果	47
第5節:一酸化窒素機構の関与の可能性	50
第6節:本章の小括および考察	51
第3章:本章のまとめ	54
結論	55
謝辞	56
実験の部	57
参考文献	66

本論文で使用した略語一覧

ARDS: 急性呼吸窮迫症候群

B.E.: 塩基過剰量

BUN: 血中尿素窒素

Ca²⁺: カルシウムイオン

CPK: クレアチンホスホキナーゼ

CPK-BB: クレアチンホスホキナーゼ-脳型

CPK-MB: クレアチンホスホキナーゼ-心筋型

CPK-MM: クレアチンホスホキナーゼ-骨格筋型

Cr: クレアチニン

CS: Crush syndrome

Dex: Dexamethasone

ECG: 心電図

FENa: 尿中ナトリウム排泄分画

GFR: 糸球体濾過速度

HCO₃⁻: 重炭酸イオン

Ht: ヘマトクリット

IL-6: インターロイキン-6

K⁺: カリウムイオン

LDH: 乳酸脱水素酵素

MAP: 平均動脈圧

Mb: ミオグロビン

MODS: 多臓器不全症候群

MPO: ミエロペルオキシダーゼ

Na⁺: ナトリウムイオン

NO: 一酸化窒素

NOx: 総窒素酸化物

PaCO₂: 二酸化炭素分圧

PaO₂: 酸素分圧

Re: 再灌流後: reperused

SIRS: 全身炎症反応症候群

総論の部

緒言

Crush syndrome (CS)という病名で臨床像が初めて報告されたのは、1941年Bywatersらの報告である¹⁾。それは、第2次世界大戦のロンドン大空襲で、倒壊物の下敷きとなり救出後患肢の著しい腫脹を呈し、急性腎不全で死亡する疾患群であった^{2,3)}。この時、彼らは約200名のCS患者を治療し、臨床例の解析や筋壊死と急性腎不全に関する研究を行い、CSの臨床像を明らかにしている⁴⁻⁶⁾。そして、1965年以降、災害、テロリズム、事故⁷⁻¹⁰⁾などでこのCSの症例が多く報告されるようになり更なる病態の解明がなされた。日本では、1995年に発生した阪神淡路地震の際にこの病態が浸透し、入院治療患者2718症例のうち、372症例がCSを発症し¹¹⁾、死亡率は13.4%と報告された¹²⁾。その後、1999年のトルコで発生したMarmara地震では、CSに至った被災者は639人とされている¹³⁾。そして2008年の中国の四川省で発生したWenchuan地震においては詳細な死亡数は不明であるが、西部中国病院に搬送された1358人の被災者のうち20.7%がCSを発症したと報告されている¹⁴⁾。

CSは、災害時などで生じる倒壊物の下敷きになることで四肢が長時間圧迫を受け、救助などの圧迫解除によって急速に現れる骨格筋の損傷と、これによって引き起こされる全身症状を呈する疾患群であり、圧迫またはクラッシュの結果生じる骨格筋細胞損傷によって引き起こされる全身症状と定義されている¹⁵⁾。圧迫という機転があれば、昏睡患者¹⁶⁾や、術中患者¹⁷⁻²⁰⁾の長時間臥床^{21,22)}、ギプス固定²³⁾など臨床現場でも起こる。

このCSの臨床所見は、圧迫解除時や救出時は、外見上の異常は乏しいが、患肢の腫脹や広汎な点状出血を伴い、また、血流は保たれ拍動は確認出来る。救出後は、意識は鮮明であり循環動態は安定していることが多く、障害があっても軽度である。初期症状は、患肢の運動麻痺と知覚麻痺が生じ、下半身麻痺の形をとることが多いが、脊髄損傷による下半身麻痺とは異なり肛門括約筋の機能が保たれている^{24,25)}。このように、初期症状はあまり

重篤な状態ではないため、救出現場や圧迫解除直後では、診断は非常に困難である。しかし、傷害を負った時より病態が進行しており、傷害を受けた筋肉から、細胞内容物のカリウム(K^+)やミオグロビン(Mb)、さらには傷害によって惹起された炎症性サイトカインなどのメディエーターが全身循環に放出されている。これら全身循環に放出された因子は、高 K^+ 血症による不整脈や低循環性ショックを引き起こすため、病院搬送までの大きな死亡要因となっており、それらによって死亡に至らない患者においても病院に搬送された後にも約半数以上の患者が、Mb尿性急性腎不全に発展して腎臓からの K^+ 排泄が障害されるため、高 K^+ 血症による死亡リスクは依然として高いままとなる。また、高度治療管理下におかれた患者は、上記の症状を回避できていても、炎症反応によって引き起こされる全身炎症反応症候群(SIRS)に伴う急性呼吸窮迫症候群(ARDS)および多臓器不全(MODS)などを引き起こし、重篤な病態を呈する^{24,26-29)}。

救出直後の診断が遅れると重篤な状態を辿るため、それらの病態を回避するためには救出後初期から治療を施すことが重要であるとされている^{30,31)}。救出現場などで用いられている治療方法として、心不全や低循環性ショック、Mb尿性急性腎不全を回避するために、現場での輸液の大量投与が行われ高 K^+ 血症や低循環性ショックによる死亡の回避が可能となり、病院搬送後の高度治療管理下での輸液療法や血液透析などにより低循環性ショック、高 K^+ 血症による不整脈およびMb尿性急性腎不全リスクを低減することで、1995年の阪神淡路地震の際では救命率が約60%、1999年のMarmara地震においては、約80%に上昇し、これら初期治療によって、CSによる死亡率や重篤化の低減が可能となってきた^{10,24,31)}。しかしながら救命率は100%ではなく、Marmara地震においては死亡率が15.2%(CS患者97/639人)であった。それらの原因には、救出現場やその付近では、血液透析を十分に施行出来ない場合があることや、これら治療方法を施行してなおMODSの発症といった一部症状を十分に抑えられないこと^{15,24,31)}が挙げられるため、そのような状況下でも施行可能であり、より効果の高い治療方法の確立が望まれている。

そこで著者は、救出後から致死的な症状が時間経過とともに進行する CS に対し、初期治療に用いることで高い効果を発揮する薬剤の検討を行うことにした。

しかし CS は救出直後の急性期から常に致死的な症状のリスクを負うため、新たな治療薬物の臨床試験を行うことは非常に困難である。そのため治療法確立に向けて効果の高い治療薬剤を検討していくためには、経時的な病態進行を適切に再現出来る動物モデルを利用することが必要である。これまでに、ラット後肢にブロックで圧迫したモデル^{32,33)}やラバーバンドなどで後肢を圧迫したモデル^{34,35)}が報告されている。しかし CS で発症する複数の症状に焦点をあてた研究はほとんどない。

そこで本研究では、CS の重篤化を防ぎ予後を改善出来る薬物治療を確立することを目的に以下 2 編に分けて検討を行った。まず第 1 編では、CS に対する薬剤の治療効果を病態レベルで評価可能な簡便で再現性のあるモデルラットを作製した。次いで第 2 編では、このモデルを用いて現在行われている輸液投与の効果、さらには新規に抗炎症性ステロイド薬である Dexamethasone の効果を明らかにした。以下、検討結果を論じる。

第1編 臨床症状を反映したCSモデルラットの作製³⁶⁾

CSは、長時間に亘り筋肉が圧迫され、そのことから解放された後、数時間間に低循環性ショックや高 K^+ 血症による不整脈などが発症し、その後も、Mb尿性急性腎不全やSIRSによるARDSやMODSといった全身におよぶ病態が進行し^{24,26-29)}、極めて重篤な状態に陥る。そのため、治療効果を適切に評価するためには、このような病態の進行を再現できるモデルが必要である。

近年、Akimauらは、ラット後肢に特殊なブロックを6時間適用したCSモデルを報告し³²⁾、そのモデル動物を用いて治療薬剤の効果についても検討している³³⁾。一方、止血帯やラバーバンドなどのデバイスを用いることによって、簡便な虚血再灌流モデルを再現できるとして様々な方法が試みられてきた^{34,35)}。しかしながらCS患者のような長時間の圧迫(平均5-8時間³⁷⁾)を受ける検討はこれまでになく、CSにおいて認められる複数の症状に焦点をあてた検討もほとんどない。そのため、薬剤の治療効果を評価するためには、圧迫によってCSの複数の臨床的症状を反映したモデル動物が必須である。

そこで本検討では、四肢の圧迫が可能でありモデルを作製するための簡便な方法として、ラバーバンドを用いて一定の圧迫を加えることが出来るように、過去の報告³⁸⁾に改良を加えた方法によりCSモデルラットの作製を試みた。なお、低循環性ショック、心不全、代謝性アシドーシス、腎不全および炎症反応をCSの評価項目として、これらの発症と経過を評価するために、生存率、観血的動脈圧測定、心電図、血液ガス分析、生化学的検査、炎症マーカーの測定および組織学的観察を行った。

第1章 生存率に影響を及ぼす病態の評価

第1節 CSモデルラット作製のための圧迫条件に関する検討

本節では、虚血再灌流モデル動物で汎用されるラバーバンドを用いてCSモデルラットを作製するために、ラバーバンドの適用条件を決定するための検討を行った。

臨床報告によると、CS患者は、圧迫を受けた患肢の運動神経や知覚神経の麻痺を認めるが、裂傷はなく、血流があり、時間経過とともに浮腫を認め、そしてCSの極めて重篤な状態に陥るとされている²⁴⁾。このことから、ラバーバンドの適用条件を決定するために、ラバーバンド適用による裂傷の有無、同側屈筋反射および歩行異常の観察による麻痺の確認、ドップラー血流計による血流の有無の確認、およびラバーバンド除去後、すなわち再灌流後24時間の生存率の評価によって検討した。さらに、傷害部位の筋肉湿重量からの浮腫の評価を行った。適用するラバーバンドの圧迫する方法は、Rosenthalの方法³⁸⁾を参考に、ステンレスパイプに5回巻き付け(Fig. 1A)、これをラット後肢にスライドさせ適用した(Fig. 1B)。圧迫する強さの調整は、ステンレスパイプにラバーバンドを巻きつける際の荷重の大きさによって行い、本検討では、1.0、2.0、2.5 および 3.0 kgとした。CS患者の74%が下肢に傷害を受けることや傷害肢が増加することで重症度が上がるというOdaらの報告¹²⁾を参考に、ラットの両後肢に適用することとした(Fig. 1C)。また、CSを発症する患者の多くのケースで、5-8時間の圧迫を受けていること³⁷⁾、およびCSモデルラットを用いた以前の検討で圧迫時間を6時間としていたことから³²⁾、本検討では、圧迫時間を3、4、5 および 6時間として適切な圧迫時間についても検討した。

2.5 および 3.0 kg の荷重で調整したラバーバンドの適用は、適用後すぐに裂傷を引き起こしたが、1.0 および 2.0 kg で調整したラバーバンドの適用では、適用直後の裂傷は確認されなかった。このことから圧迫する強さとして 1.0 および 2.0 kg で調整したラバーバンドを用いることが適当であると考えられ、ラバーバンド適用時間の検討にはこれらの強さを用い、裂

傷、麻痺、血流、浮腫および生存率を観察した。1.0 kg で調整したラバーバンドの適用は、どの圧迫時間においても裂傷はなく、血流の回復および浮腫を認めしたが、再灌流 24 時間には両後肢の麻痺が改善され、死亡例は観察されなかった。一方、2.0 kg の場合では、5 時間の圧迫によって、裂傷はなく、その後血流は回復するものの、麻痺の残存と浮腫の進行が確認され、高い死亡率(再灌流 24 時間後: 75%)も示した。さらに 6 時間まで圧迫時間を延長すると、裂傷を引き起こすだけでなく、血流が回復せず、死亡率も 10%に低下したことから、虚血再灌流傷害である CS モデルの条件としては適切でないと考えられた。

以上のことから、2.0 kg 荷重下でステンレスパイプに巻き付けたラバーバンドをラット両後肢に適用し、5 時間圧迫する条件を用いることにした。

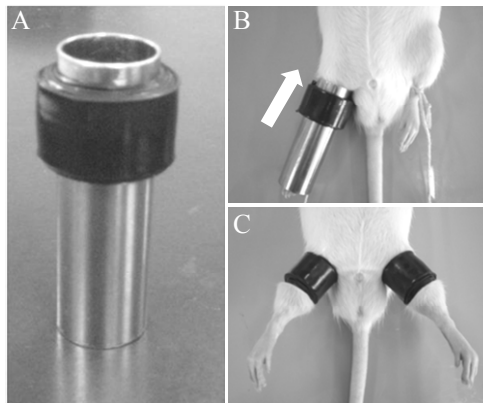


Fig.1 Rubber tourniquet and hind limb compression

(A)Rubber tourniquet applicator for hind limb compression. (B)Application of the tourniquets by sliding in the direction of an arrow. (C)Representative position of the rubber tourniquets on both hind limbs.

第2節 CSモデルラットの生存率曲線

CSモデルラットの作製条件として決定した、2.0 kg 荷重下で調整したラバーバンドをラット両後肢に5時間適用したときの生存率を観察した。生存率の変化は、再灌流0、1、3、6、18、24 および48時間後に観察を行い、経時的变化を算出することとした。また、再灌流48時間以降は、ラットによる傷害部位の自傷行動がみられるようになるため上記の時間設定とした。得られた観察結果は、Kaplan-Meier法により算出した。

Fig. 2は、再灌流48時間後までの生存率曲線を示している。CS群は、再灌流3、6、18、24 および48時間後で、それぞれ76、45、28、24 および24%であり、麻酔処置のみのsham群と比較して時間経過とともに有意に低下した。CSは救出直後から致死的な症状を呈し、その後も時間経過とともに重篤化し高い致死率を示すことが知られており³¹⁾、そのような状況と一致するものと考えられた。また、Akimauらによって報告されているCSモデルラットの生存率は、再灌流12、24 および72時間後において75、30 および10%であり、その死因は高 K^+ 血症による不整脈と低循環によるショックであったと報告している³²⁾。本検討で用いたラバーバンド適用は、再灌流24時間後までに死亡していたが、その生存率低下の要因には高 K^+ 血症による不整脈および低循環を引き起こしていることが推察された。

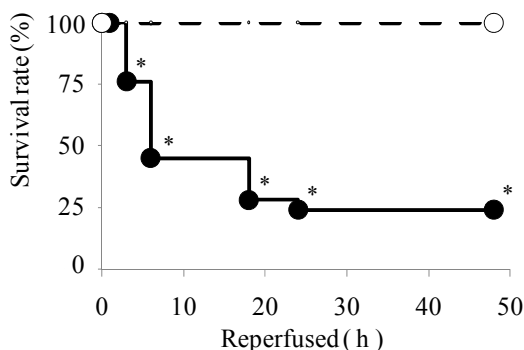


Fig. 2 Survival rate reperfusion from reperused 0 to 48 h

○: sham (n=10), ●: CS (n=29) (Logrank-test)

第3節 心電図測定および血漿中カリウム値測定による心機能の評価

前節より、CS群で再灌流後の生存率低下には、高 K^+ 血症による不整脈や心機能低下などによって引き起こされる低循環が示唆された。CS患者の死因の一つには、高 K^+ 血症による不整脈が致命的な症状を引き起こす。よって本節では、その心機能の評価のために心電図(ECG)および血漿中 K^+ 値を測定し、さらにECG測定により得られた波形から、心房の電氣的興奮を示すP波、心室筋の再分極時間を示すT波、心筋の収縮時間を示すQT間隔、心室内の電気刺激の伝導時間を示すQRS間隔および房室伝導時間を示すPR間隔のパラメーターを算出した。さらに不整脈の程度を解析するためにバゼット式を用いてQTc値についても算出し、血中 K^+ 値による不整脈について検討した。

Fig. 3は、再灌流直後から3時間および死亡直前のラットのECG測定、Table 1は、その結果を定量化したECGパラメーターを示す。sham群は、実験期間中にECGの顕著な変化を示さなかった(Fig. 3A)。CS群は時間経過とともにP波の消失、QRS間隔の延長およびT波の増高を生じ(Figs. 3B – D and Table 1)、死亡直前で不整脈を引き起こしていたことから(Fig. 3E)、経時的に心機能不全が進行し、不整脈を生じて死に至っていると考えられた。一方、再灌流直後の血漿中 K^+ 値を経時的に測定したところ(Fig. 4)、再灌流直後は、sham群と同等なレベルであったが、その後顕著に上昇した。ヒトでは、血漿中 K^+ 値が8.0–10.0mEq/Lに達すると心室性不整脈を生じ、その際にP波の消失、T波の増高およびQRS間隔の延長などを引き起こすことが知られており³⁹⁾、QTc値の上昇を示す。したがって、Table 1およびFig. 5で得られた結果は、そのような状況によく一致しており、再灌流後の高 K^+ 血症に伴う不整脈が経時的に進行していくものと考えられた。

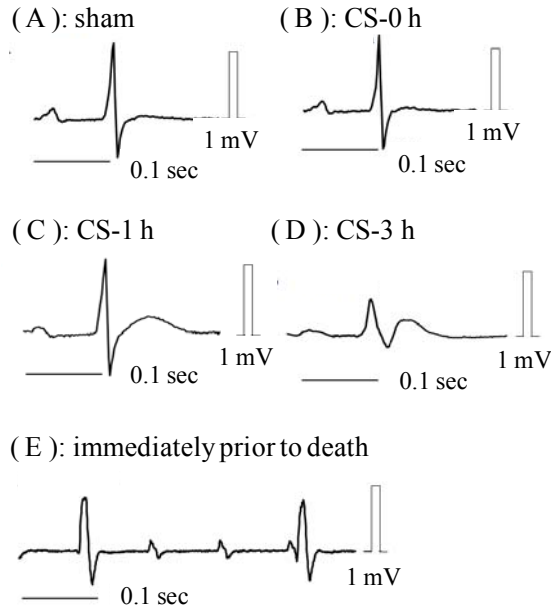


Fig. 3 Representative ECG traces after reperfusion

electrocardiogram (ECG) traces corresponding from (A) sham-0 to 3 h, (B) CS-0 h, (C) CS-1 h, (D) CS-3 h and (E) immediately prior to death.

Table 1. Changes in ECG parameters after reperfusion

		Re-0h	Re-1 h	Re-3 h
P wave amplitude (mV)	sham	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.01
	CS	0.17 ± 0.01	0.09 ± 0.07 **	0.05 ± 0.01 **
T wave amplitude (mV)	sham	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	CS	0.04 ± 0.01	0.15 ± 0.07 **	0.27 ± 0.04 *
QT interval (msec)	sham	61.7 ± 2.2	64.2 ± 3.6	66.7 ± 1.7
	CS	59.2 ± 3.0	88.3 ± 1.7 **	97.5 ± 1.4 **
QRS interval (msec)	sham	26.7 ± 1.7	27.5 ± 1.4	29.2 ± 2.2
	CS	35.0 ± 1.4 *	39.2 ± 3.0 *	60.0 ± 2.5 **
PR interval (msec)	Sham	46.7 ± 2.4	46.0 ± 2.0	50.0 ± 1.2
	CS	52.2 ± 5.2	45.8 ± 1.9	71.3 ± 4.7 *
QTc	sham	13.8 ± 0.5	14.2 ± 0.8	14.3 ± 0.2
	CS	13.5 ± 0.8	19.7 ± 0.4 **	20.8 ± 0.1 **

Values are shown as mean ± SEM. * $p < 0.05$ vs. sham; ** $p < 0.01$ vs. sham (*t*-test)

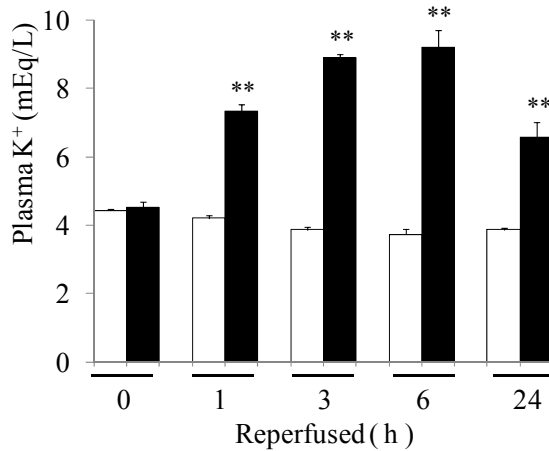


Fig. 4 Plasma K⁺ levels after reperfusion 0 to 24 h

□: sham (n=3), ■: CS (n=3), Values are shown as mean ± SEM., **: $p < 0.01$ vs. sham (*t*-test)

第4節 平均動脈圧およびヘマトクリット値測定による循環動態の評価

本節では、前節の心機能低下の結果から、低循環を伴っていると考えられたことから、循環動態の指標として平均動脈圧(MAP)およびヘマトクリット(Ht) 値を測定した。

MAP および Ht 値の結果を Fig. 5 に示す。CS 群の MAP 値は再灌流 1 時間後から 6 時間後まで急速に低下し、再灌流 24 時間後の MAP 値では、sham 群では 118.1 ± 2.7 mmHg に対し、CS 群では 59.7 ± 3.5 mmHg に有意な低下を示した(Fig. 5a)。Ht 値は、sham 群と比較して CS 群では再灌流 1 時間後から有意に上昇し始め、再灌流 3 時間後をピークに再灌流 24 時間後においても高い値を推移していた(Fig. 5b)。

このことから、MAP 値が、再灌流 1 時間後から急激に低下することには圧迫の解放によって患肢に血流が再開することが関連すると考えられるが、MAP 値の経時的且つ持続的低下を示すのは、Ht 値が関与すると考えられた。Yokota は、CS 患者の傷害を受けた患肢に血液中の水分が移行することで腫脹を伴い慢性的な血漿量の低下によって低循環を引き起こしてい

ると報告している²⁴⁾。したがって、Fig. 5 に示したMAPおよびHt値の顕著な変化から、CSモデルラットで低循環を引き起こしていることが示唆された。

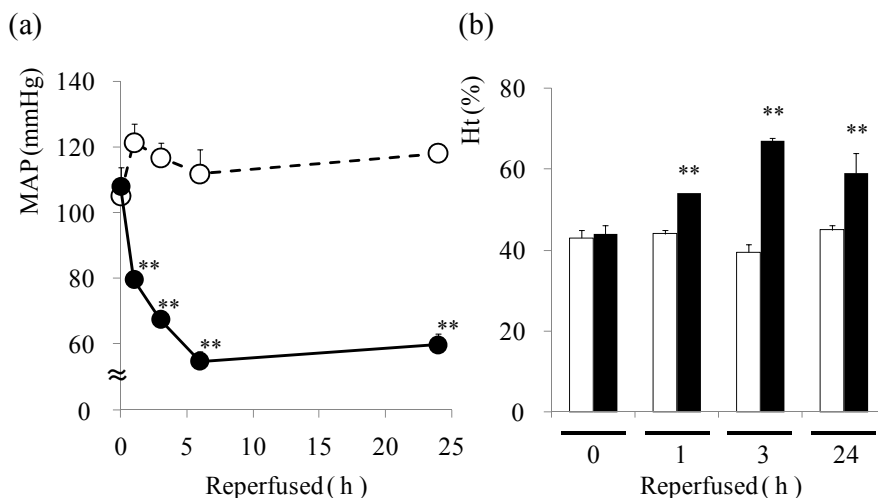


Fig. 5 Changes in MAP and Ht levels after reperfusion

(a) MAP levels, ○: sham (n=3), ●: CS (n=3), (b) Ht levels from reperused 0 to 24 h, □: sham (n=3-6), ■: CS (n=3-6); Values are shown as mean ± SEM., **: $p < 0.01$ vs. sham (*t*-test)

第5節 血液ガス分析による代謝性アシドーシスの評価

前節までの結果から、CSの致死的状況が、不整脈や低循環性ショックによることが明らかになった。さらにCS患者の多くは代謝性アシドーシスを発症する^{10,24,31)}。よってその循環動態および代謝性アシドーシスの指標となる各種血液ガスパラメーターを検討した。パラメーターは、動脈血のpH、塩基過剰量(B.E.)、重炭酸イオン(HCO_3^-)、酸素分圧(PaO_2)、二酸化炭素分圧(PaCO_2)および乳酸(Lactate)値を測定した。

Fig. 6 は、再灌流 24 時間後までの動脈血pHおよびB.E.値を示している。再灌流 3 時間後からCS群の動脈血pH値は、sham群と比較して有意に低下し始め、再灌流 24 時間後においてはsham群が 7.42 ± 0.02 を示したのに対し

てCS群では 7.28 ± 0.02 であり、最も低い値を示した(Fig. 6a)。B.E.値は、再灌流 0 時間後から有意に低下し始め、pHが最も低下した再灌流 24 時間後でも sham群が 1.3 ± 0.3 mmol/Lであるのに対し、CS群では -6.7 ± 1.2 mmol/L であり、有意に低い状態であった(Fig. 6b)。Table 2 は、再灌流 24 時間後までの HCO_3^- 、 PaO_2 、 PaCO_2 および Lactate 値の結果を示している。CS群の HCO_3^- 値は、再灌流 1 時間後から 24 時間後まで有意に低下した。さらに PaO_2 値は、再灌流 3 時間後、 PaCO_2 および Lactate 値は再灌流 6 時間後から顕著な変化を示した。代謝性アシドーシスは、動脈血 pH が 7.4 以下になったアシデミアに加え、Lactate などの有機酸の過剰産生や血液中の HCO_3^- の消費によって緩衝されて発生する二酸化炭素を肺のガス交換により代償するため、 PaCO_2 の低下を生じ PaO_2 の上昇を示したと考えられる。したがってラバーバンドで両下肢に圧迫を加えたことで Fig. 6 および Table 2 に示すそれらパラメーターが示す経時的な変化は、代謝性アシドーシスを反映したと考えられた。

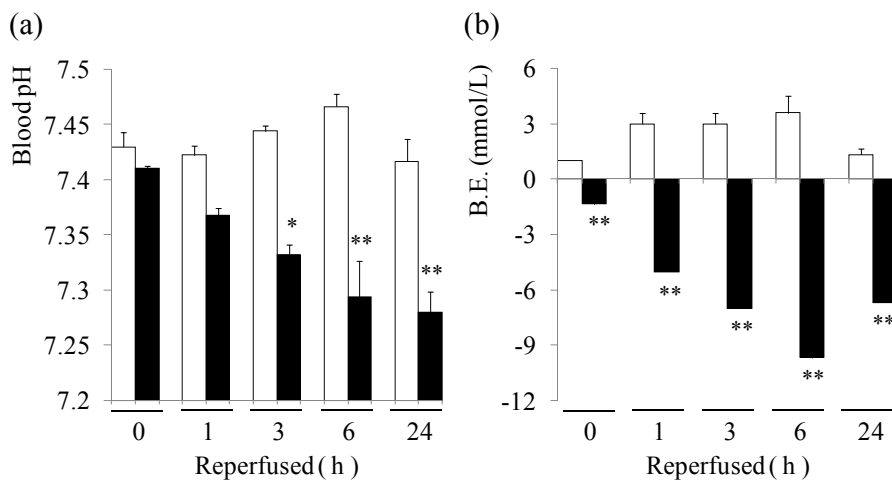


Fig. 6 Changes in blood pH and B.E. levels after reperfusion

(a) Blood pH and (b) B.E. level from reperfusion 0 to 24 h; □: sham (n=3), ■: CS (n=3), Values are shown as mean \pm SEM., *: $p < 0.05$ vs. sham, **: $p < 0.01$ vs. sham (*t*-test)

Table 2 Changes in blood gas parameters after reperfusion

	Re-0 h	Re-1 h	Re-3 h	Re-6 h	Re-24 h	
HCO ³⁻ (mEq/L)	sham	27.3 ± 0.3	27.3 ± 0.3	30.0 ± 0.4	27.0 ± 1.2	
	CS	22.7 ± 0.3	19.9 ± 1.3 **	19.3 ± 0.3 **	16.0 ± 0.6 **	15.7 ± 0.3 **
PaO ₂ (mmHg)	sham	84.7 ± 2.0	84.5 ± 1.4	78.7 ± 4.1	94.3 ± 3.4	82.4 ± 1.3
	CS	85.7 ± 2.3	94.7 ± 3.0	117.0 ± 2.1 *	126.3 ± 4.1 *	105.4 ± 9.6 *
PaCO ₂ (mmHg)	sham	40.1 ± 2.8	42.5 ± 1.0	39.5 ± 0.3	41.6 ± 1.5	41.6 ± 1.7
	CS	36.3 ± 0.6	34.2 ± 0.6	36.0 ± 0.9	30.2 ± 1.0 *	32.7 ± 1.4 *
Lactate (mmol/L)	sham	1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.1
	CS	0.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1 **	2.9 ± 0.3 **

Values are shown as mean ± SEM. * $p < 0.05$ vs. sham, ** $p < 0.01$ vs. sham (*t-test*)

第 6 節 本章の小括および考察

本章では最初に、簡便な方法としてラバーバンドによる CS モデルラットの作製条件について、裂傷および麻痺の有無、血流回復の見込および生存率を基に検討した。その結果、2.0 kg 荷重下で調製したラバーバンドをラット両後肢に 5 時間適用したとき、CS の状態を最も反映しているものと考えられ、病態に基づいた以降の検討における作製条件とすることにした。

これらの条件を用いて、再灌流 48 時間後までの生存率に影響をもたらす因子について検討を行った。Fig. 2 の結果から明らかなように、ラバーバンド除去後の生存率曲線は、再灌流 3 時間後から時間経過とともに有意に低下し、それには、2 つの死因が関与することが明らかとなった。1 つ目の死因として、臨床報告では CS の初期からの死因として高 K^+ 血症による不整脈が報告されている^{24,26,31})。本モデルラットによって、その血漿中 K^+ 値および ECG を測定した結果、再灌流 1 時間後から上昇した血漿中 K^+ 値の変化に伴って ECG パラメーターが、顕著に変化し、最終的には心房と心室伝導障害を引き起こした完全房室ブロックを伴う高 K^+ 血症特有の不整脈となり、循環不全による血圧低下のための心筋ポンプ不全と相まって、再灌流 3 時間後からの致死的な状態が、急激生存率の低下につながったと示唆された(Figs. 3, 4 and Table 1)。2 つ目の死因には、低循環性ショックが考えられた。低循環性ショックは、CS の早期における致死的な状態を引き起こす症状である。Bywaters らによる後肢にラバーバンドを適用した CS モデル動物は、傷害に伴う筋肉への体液のシフトを引き起こし、全身循環の虚脱を明らかにしている³⁵)。この要因には、筋肉細胞の膜伸展などが関与する⁴⁰)。圧迫などの物理的な傷害によって、非選択的な膜伸展活性型によるナトリウムイオン(Na^+)やカルシウムイオン(Ca^{2+})チャネルの活性化により、細胞内のイオンバランスを乱す。CS 患者では低 Na^+ 血症および低 Ca^{2+} 血症を引き起こすことも報告されており^{24,31})、本モデルラットでも経時的な血中 Na^+ および Ca^{2+} 値の低下を生じている (data not shown)。そして血漿量を表す Ht 値の上昇を示していたことから、CS モデルラットでは、循環血漿量の低下による MAP 値の低下が考えられた(Fig. 5)。また CS 患者は、進行する代謝性

アシドーシスを発症する。本検討ではその評価のために血液ガスパラメーターを測定した。動脈血pHは、 HCO_3^- およびB.E.値の低下、 PaCO_2 、 PaO_2 およびLactate値の上昇に伴って低下していたことから、Lactateなどの酸性物質の産生によって HCO_3^- を消費してpHが緩衝されていることが示唆された。そして緩衝された結果生じる二酸化炭素を肺によって代償するため PaCO_2 値は低下し、 PaO_2 値の上昇を生じていると考えられた。加えて再灌流24時間後まで上昇し続けるLactate値は、MAP値の低下およびHt値の上昇から考えられる低循環が相まって、血液循環の低下に伴う嫌氣的代謝の進行を意味していると推察された。このことから本CSモデルラットは、代謝性アシドーシスが時間経過とともに進行することが明らかとなった(Fig. 6 and Table 2)。

これまでに、いくつかのCSモデル動物や虚血再灌流モデルが報告されているが、臨床報告にあるようないくつかの症状に焦点を当てた経時的な死因の変化については検討されていなかった。本章において、ラバーバンドによって圧迫したCSモデルの経時的な病態変化をとらえることで、致死的な病態である低循環性ショック、高 K^+ 血症による不整脈および代謝性アシドーシスを引き起こしていることと、それらが時間経過とともに進行するさまを明らかにし、臨床現場で問題となる致死的な病態を反映するに至った。

第2章 圧迫による局所傷害および遠隔臓器への影響

前章において、ラバーバンド適用によって高 K^+ 血症による不整脈や低循環性ショックが初期の死因に関与することが明らかとなった。これらを引き起こす要因には、圧迫局所の傷害が引き金となり、細胞崩壊によって放出される細胞内容物が関与することが考えられる。細胞内容物の K^+ であれば不整脈を引き起こすが、筋肉組織中に分布するMbの放出ではMb尿性急性腎不全を引き起こす。実際に、CS患者の約半数はMb尿性急性腎不全を発症する。そして、輸液や血液透析の治療を施行してなおCS患者ではSIRSに伴うARDSやMODSなどを呈し死亡するケースが存在する^{24,26-29})。このような症例では、虚血再灌流傷害に伴う全身性炎症反応の関与が強く示唆されている²⁷)。Mohriらは³³)、CSモデルラットによって全身炎症および肺の傷害性を明らかにしており、後肢虚血再灌流モデル動物などにおいても、炎症性サイトカインの惹起に伴う全身炎症を引き起こすことが示唆されている^{27,41-43})。したがって、CSにおいても局所の虚血再灌流に伴う全身炎症反応が関与していると考えられた。

本章では、まず圧迫部位の筋肉の傷害性を評価した。次いで、傷害に伴う炎症反応を評価し、影響されると考えられる肺および腎臓について評価を行うこととした。

第1節 細胞逸脱酵素およびMb測定による筋肉傷害性の評価

本節では、ラバーバンド適用による筋肉の傷害性を評価するために、その指標として血漿中クレアチンホスホキナーゼ(CPK)、乳酸脱水素酵素(LDH)およびミオグロビン(Mb)値を測定し、CPKおよびLDHについてはアイソザイムも測定した。

Fig. 7は、再灌流0、1、3および24時間後の血漿中CPK値および再灌流3時間後の血漿中CPKアイソザイムを示している。CS群の血漿中CPK値は、再灌流直後より上昇し、再灌流3時間後のsham群では 281 ± 37 IU/Lであるのに対してCS群は 44474 ± 4037 IU/Lに顕著な上昇を示した(Fig. 7a)。そし

て再灌流 3 時間後の血漿中CPKアイソザイムは、CPK-MM、CPK-MBおよびCPK-BB値を測定した。特に、筋肉由来であるCPK-MM値は、sham群の $64.9 \pm 5.3\%$ であるのに対してCS群では $91.5 \pm 0.6\%$ に有意な上昇を示した (Fig. 7b)。Fig. 8 は、血漿中LDH値および再灌流 3 時間後のLDHアイソザイム値を示している。血漿中LDH値は、血漿中CPK値の上昇と同様の傾向を示し、再灌流 3 時間後のsham群では 173 ± 42 IU/Lであるのに対してCS群は 3630 ± 342 IU/Lに上昇していた (Fig. 8a)。そのことからLDHアイソザイムのLDH₁、LDH₂、LDH₃、LDH₄およびLDH₅値を測定し、筋肉組織中に多く分布するLDH₅値が、sham群の $55.5 \pm 4.3\%$ に対してCS群では $72.7 \pm 0.9\%$ に上昇していた (Fig. 8b)。Fig. 9 は、再灌流 0、1、3 および 24 時間後の血漿中Mb値を示している。血漿中Mb値は、再灌流直後より上昇し、3 時間後では、sham群が 1.7 ± 0.1 ng/mLであるのに対して 845.8 ± 126.0 ng/mLに顕著な上昇を示した (Fig. 9)。

以上の結果より、ラバーバンド適用によって血漿中CPKおよびLDH値が上昇し、その上昇は、筋肉由来のアイソザイムであったことから時間経過とともに筋肉の傷害が進行していることが推察された。さらにMb値も同様に上昇していた。しかしながら、それら数値は、再灌流 24 時間後においてsham群と比較すれば有意な上昇を示していたが、再灌流 3 時間後と比較すれば低下していた。これは、再灌流 24 時間までに死亡例が多く生じているため、生存例によって測定を行っていることが関係しているものと推察された。

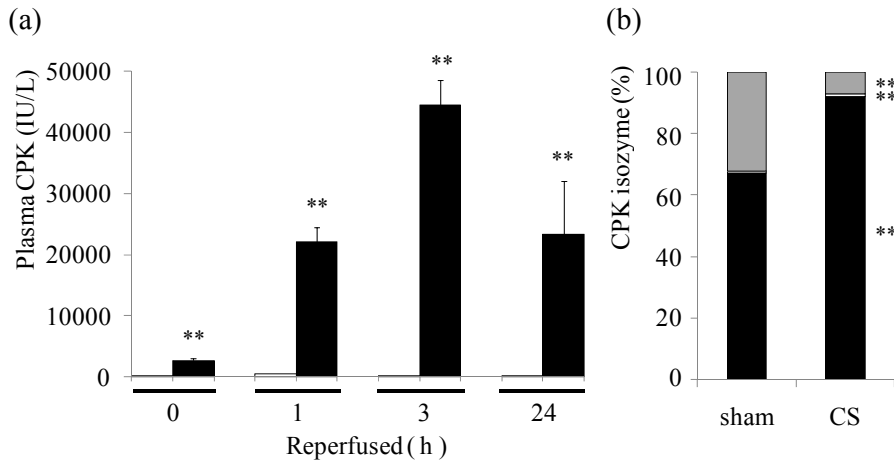


Fig. 7 Plasma CPK levels after reperused 0 to 24 h and CPK isozyme levels after reperfusion 3 h

(a) Plasma CPK levels; □: sham (n=3-6), ■: CS (n=3-6), (b) Plasma CPK isozyme levels; ■: CPK-MM, □: CPK-MB, ■: CPK-BB, Values are shown as mean \pm SEM., **: $p < 0.01$ vs. sham (*t-test*)

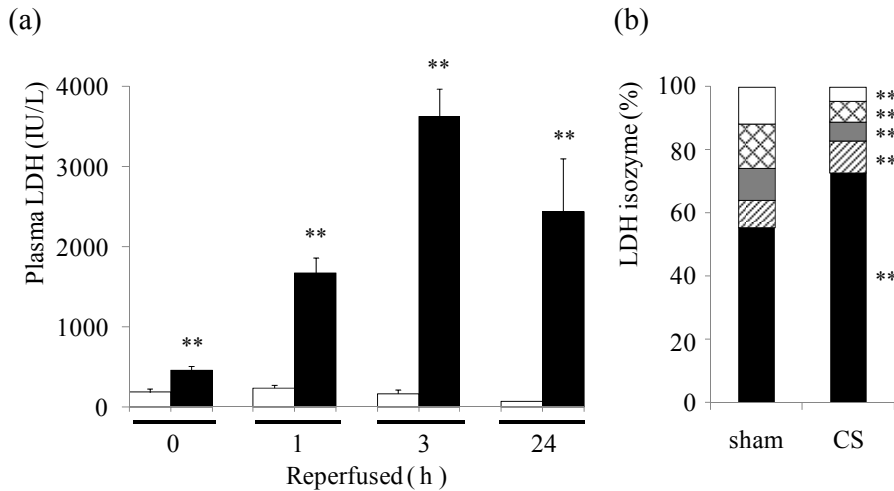


Fig. 8 Plasma LDH levels after reperused 0 to 24 h and LDH isozyme levels after reperfusion 3 h

(a) Plasma CPK levels; □: sham (n=3-6), ■: CS (n=3-6), (b) Plasma LDH isozyme levels; □: LDH₁, ▨: LDH₂, ■: LDH₃, ▩: LDH₄, ■: LDH₅, Values are shown as mean \pm SEM., **: $p < 0.01$ vs. sham (*t-test*)

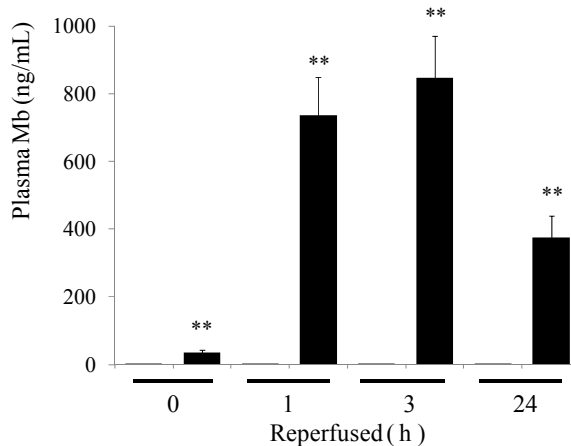


Fig. 9 Plasma Mb levels after reperfusion 0 to 24 h

□: sham (n=3-6), ■: CS (n=3-6), Values are shown as mean \pm SEM., **: $p < 0.01$ vs. sham (*t*-test)

第 2 節 傷害筋肉の組織観察および浮腫の評価

前節より、圧迫による筋肉傷害の進行が示唆されたため、筋肉の組織切片による組織学的評価を行った。

再灌流 3 および 24 時間後の筋肉組織切片は、Fig. 10 に示し、再灌流 24 時間後までの圧迫部位の浮腫の指標として用いた筋肉湿重量比は、Fig. 11 に示している。CS群の筋肉組織切片は、sham群と比較して筋細胞の崩壊 (Figs. 10B and D: arrows) を観察し、筋肉湿重量の経時的な上昇に示されるように筋細胞内外の明らかな浮腫が進行していた (Figs. 10 and 11)。そして CS群の再灌流 3 時間後の組織切片では好中球の浸潤が観察され、再灌流 24 時間後ではさらに多くの好中球が観察された (Figs. 10B and D: arrow heads)。

以上の結果より、ラバーバンド適用は、傷害部位の筋肉に対して細胞崩壊を引き起こすだけでなく、浮腫が時間経過とともに増悪することが明らかとなり、血液の水分の組織移行が引き起こされて、これが血液濃縮に関連すると推察された。再灌流 24 時間後の組織切片においては、血管外に

傷害を引き起こす好中球の浸潤が観察され、炎症が惹起されていることが推察された。

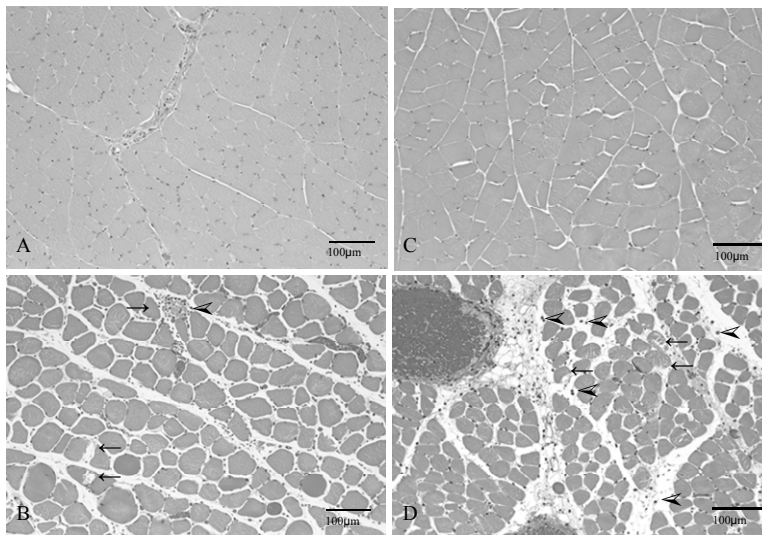


Fig. 10 Histopathological findings in the muscle after reperused 3 and 24 h

(A) sham-3 h, (B) CS-3 h, (C) sham-24 h, (D) CS-24 h; Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$., arrow: cytolysis, arrow head: neutrophil cell

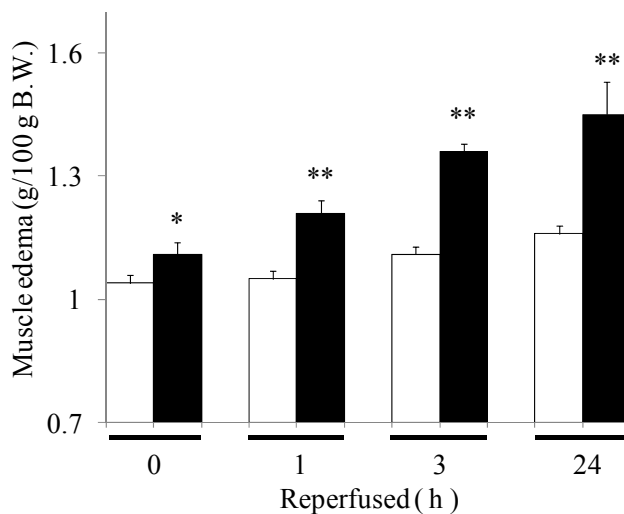


Fig. 11 Muscle edema index changes levels after reperused 0 to 24 h

□: sham (n=3-6), ■: CS (n=3-6), Values are shown as mean \pm SEM.,
*: $p < 0.05$ vs. sham, **: $p < 0.01$ vs. sham (*t-test*)

第3節 局所および遠隔臓器傷害の評価

CSでは、全身炎症が惹起されることが知られている^{24,31)}。また前節では、筋肉組織中への好中球の浸潤が観察され、組織傷害に伴い炎症が惹起されていることが示唆された。そこで本節では、組織傷害と局所および全身炎症の関連性について検討することとした。炎症性サイトカインとして血漿中インターロイキン6(IL-6)、炎症によって惹起される好中球の指標として組織中ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性を経時的に測定した。なお、全身性の炎症を評価するために、CS患者では腎臓や肺の傷害が報告されていることから³¹⁾、遠隔臓器として腎臓および肺を選んだ。

血漿中IL-6値は、sham群では実験期間中に検出されなかった。一方、CS群のIL-6値は、経時的に増大する傾向を示し、再灌流6時間後では 4053 ± 250 pg/mL、24時間後でも 3361 ± 316 pg/mLを示していた(Fig. 12)。このことから、ラバーバンド適用は、時間経過とともにIL-6を誘導していることが明らかとなった。

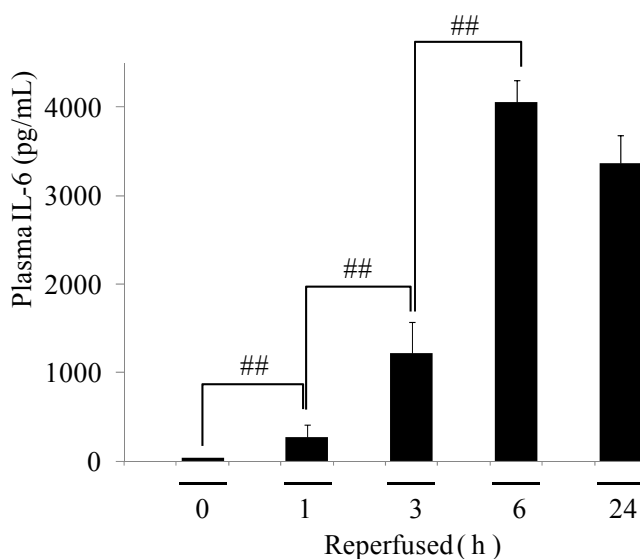


Fig. 12 Plasma IL-6 levels after reperused 0 to 24 h

■: CS (n=3), Values are shown as mean \pm SEM., ##: $p < 0.01$ vs. CS (Tukey Kramer test)

筋肉組織中MPO活性値は、sham群では実験期間中の変化はなかったが、CS群では再灌流 3、6 および 24 時間後に 2.3 ± 0.3 、 3.7 ± 0.2 および 8.7 ± 0.5 unit/g tissueの経時的な上昇を示し、特に再灌流 24 時間後ではsham群と比べて約 10 倍、CS群の再灌流 6 時間後と比較して約 2 倍に上昇した(Fig. 13)。このことから、局所の傷害が、炎症反応を惹起させて組織中の好中球の活性化が過剰に行われていることが明らかとなった。

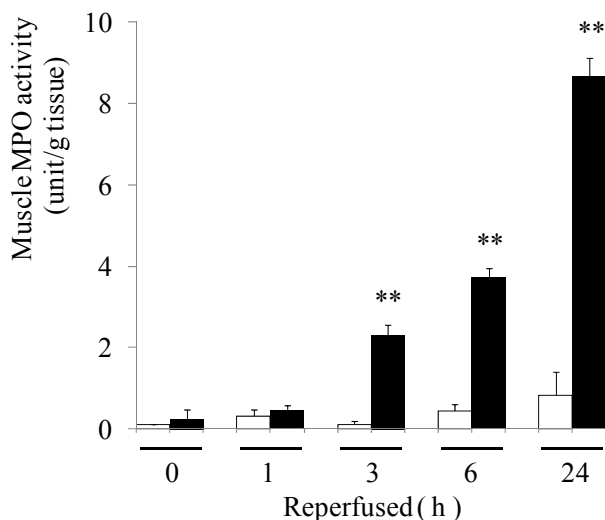


Fig. 13 Muscle MPO activity after reperfused 0 to 24 h

□: sham (n=3), ■: CS (n=3), Values are shown as mean \pm SEM., **: $p < 0.01$ vs. sham (*t-test*)

局所で増大された炎症反応は、IL-6 などの炎症性サイトカインによって遠隔臓器に影響をもたらすと考えられるため、遠隔臓器のMPO活性値を検討した。肺および腎臓組織中MPO活性は、Fig. 14 に示す。肺および腎臓組織中MPO活性値は、時間経過とともに上昇した。再灌流 24 時間後の肺組織中MPO活性値はsham群の 5.4 ± 0.4 unit/g tissueに対して、CS群は 28.7 ± 3.1 unit/g tissueであり、約 5 倍の上昇を示した(Fig. 14a)。そして、腎臓組織中MPO活性値は少ないものの顕著な変化を示し、sham群の 0.03 ± 0.00 unit/g tissueに対してCS群では約 13 倍に上昇した(Fig. 14b)。よって、傷害局所で生じた炎症反応は、遠隔臓器である肺および腎臓に波及していることが示唆された。

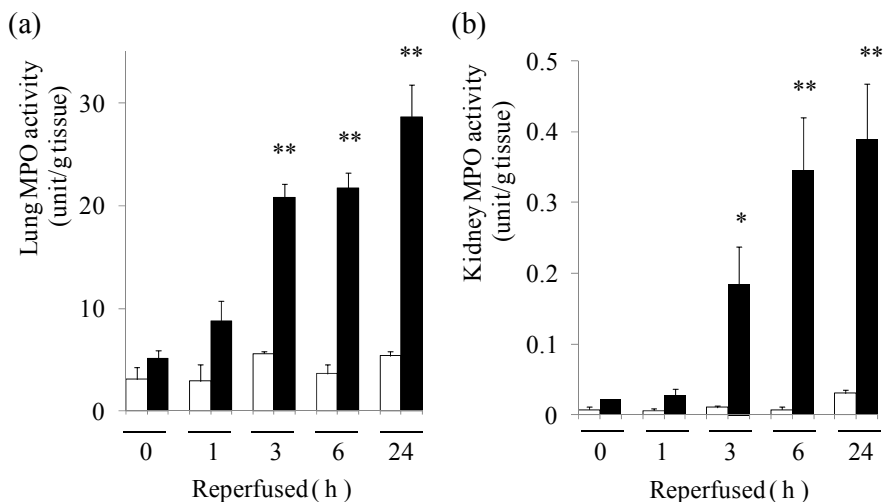


Fig. 14 Lung and kidney MPO activity after reperfusion 0 to 24 h

(a) Lung MPO activity, (b) Kidney MPO activity from reperfusion 0 to 24 h; □: sham (n=3), ■: CS (n=3), Values are shown as mean \pm SEM, *: $p < 0.05$ vs. sham, **: $p < 0.01$ vs. sham (*t-test*)

このことから、肺および腎臓に影響が及んでいることが考えられたことから、組織学的評価を行うために再灌流3時間後の腎臓および肺組織切片によって検討を行い、その切片画像をFig. 15に示した。肺組織切片は、sham群と比較してCS群において明らかな肺胞の隔壁の浮腫を観察し、好中球の浸潤が観察された(Figs. 15A and B: circle)。腎臓では、好中球の確認はされなかったが、遠位尿細管拡張が観察された (Figs. 15C and D: arrows)。

腎機能の評価するために血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cr)値、尿pHおよび尿量の測定結果をTable 3、再灌流24時間後の腎糸球体濾過速度(GFR)および尿中ナトリウム排泄分画(FENa)値をFig. 16に示した。CS群のBUNおよびCr値は、再灌流3時間後から有意に上昇し、尿pHおよび尿量は有意に低下し始めた。そして再灌流24時間後のGFRおよびFENa値は、それぞれsham群で 1.88 ± 0.24 mL/minおよび 0.46 ± 0.11 mL/minに対して 0.78 ± 0.18 mL/minおよび 0.16 ± 0.05 mL/minに低下し顕著な変化を示した(Fig. 14)。

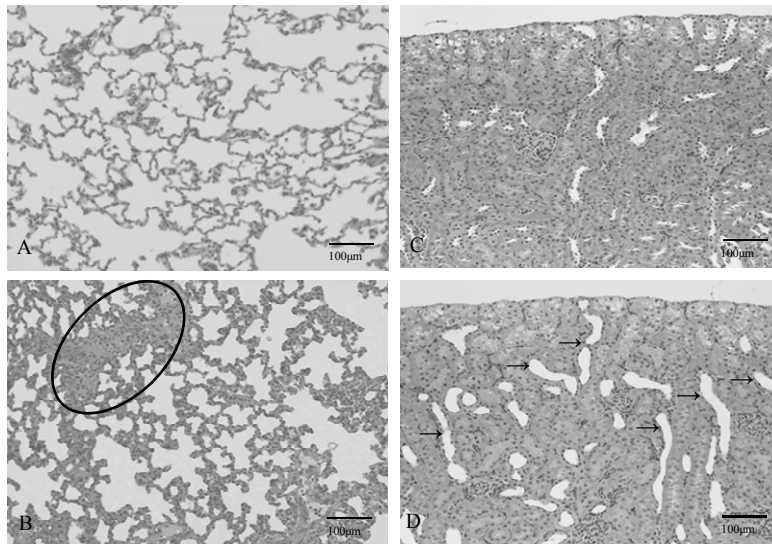


Fig. 15 Histopathological findings in the lung and kidney after reperfusion 3 h

(A) sham rat lung, (B) CS rat lung, (C) sham rat kidney, (D) CS rat kidney, Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$. circle: neutrophil cell, arrow: distal tubular dilatation

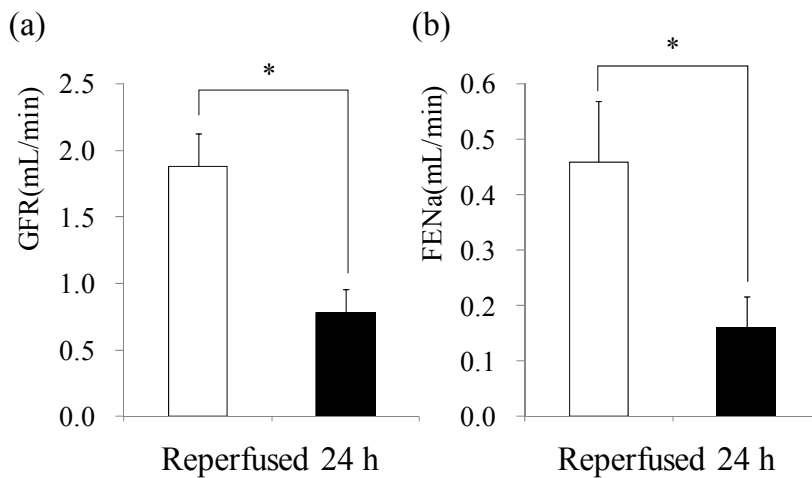


Fig. 16 GFR and FENa after reperfusion 24 h

(a) GFR levels, (b) FENa levels; □: sham, ■: CS, * $p < 0.05$ vs. sham (*t-test*)

Table 3 Kidney function parameters from reperfused

	Re-1 h	Re-3 h	Re-6 h	Re-24 h
BUN (mg/dL)	Sham	13.5 ± 1.3	11.7 ± 0.9	20.4 ± 1.2
	CS	41.3 ± 3.7 **	56.6 ± 2.1 **	37.0 ± 1.6 **
Cre (mg/dL)	Sham	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.24 ± 0.01
	CS	1.51 ± 0.33 **	0.79 ± 0.07 **	0.53 ± 0.05 *
Urine pH	Sham	5.67 ± 0.41	6.33 ± 0.41	6.00 ± 0.00
	CS	6.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00 **	5.00 ± 0.00 **
Urine volume (mL/h)	Sham	0.31 ± 0.01	0.38 ± 0.06	0.41 ± 0.07
	CS	0.32 ± 0.09	0.15 ± 0.08 *	0.28 ± 0.02 *

Values are shown as mean ± SEM. *: $p < 0.05$ vs. sham, **: $p < 0.01$ vs. sham (*t-test*)

本章では、ラバーバンド適用によって筋肉を傷害することで局所の炎症反応が惹起され、好中球による傷害が時間経過とともに進行することが示唆された。そして局所で惹起されたIL-6は遠隔臓器の炎症反応を引き起こすことが示唆された。加えて腎臓では、Mb尿性急性腎不全の病理像である遠位尿細管拡張と腎機能の低下が引き起こされていることが明らかとなった。以上のことから、局所の傷害が全身に波及することで多臓器に傷害をもたらしていることが考えられた。

第4節 本章の小括および考察

CS患者は、局所の傷害によって全身の炎症反応が引き起こされることから局所および遠隔臓器の評価を行った。

ラバーバンド除去直後から筋肉細胞の内容物であるCPKおよびLDH値の顕著な上昇が経時的に認められ(Figs 7 and 8)、筋肉組織切片からもその傷害が明らかに進行していることを明らかにし(Figs. 10 and 11)、炎症反応に伴って惹起される好中球の浸潤が観察されたことから血漿中IL-6値および筋肉組織中のMPO活性値を測定した。血漿中IL-6値は、時間経過とともに上昇し、それに伴って組織中MPO値も上昇しており、局所の炎症反応が進行していた(Figs. 12 and 13)。さらにその炎症は、遠隔臓器の肺や腎臓に及ぶ可能性が考えられた。肺組織中MPO活性値は筋肉および腎臓と比較しても高い値を示していた(Fig. 14a)。疫学的調査ではCS患者の7.3%は、肺の傷害に代表されるARDSを伴うと報告され⁴⁴⁾、Stalloneらは、後肢の虚血実験後の筋肉組織傷害に伴う肺の微小循環および肺の浮腫を組織学的変化から報告している⁴⁵⁾。さらに近年の研究では、これらの臨床的特徴は、炎症性メディエーターなどにより傷害を受けた肺血管内皮細胞は、好中球の集積や肺微小循環における血小板凝固を引き起こすと報告されており³³⁾、本CSモデルラットも同様に、血小板の有意な低下を観察している(data not shown)。このことから、肺の炎症反応による傷害は、重要な病態に関連する要因である一方、本CSモデルラットでは、肺の傷害が経時的に進行していることが示唆された。

筋肉細胞の崩壊によるMbの放出は、CSにおいて腎不全を起こす最大の原因であり、それを発症する因子には、低循環による尿量の低下および尿pHの低下が明らかにされており^{25,46-48)}、これらは尿細管でのMbキャストの形成による閉塞に関与する。Mbは、分子量が約18000であることから糸球体を通じて尿中に排泄されるようになる。本検討においても血漿中Mb値は、顕著な上昇を示し(Fig. 9)、尿検査試験紙によって尿中への排泄を確認し(data not shown)、前章ではMAP値の低下および代謝性アシドーシスの進行を明らかにしている。MAP値の低下は、腎臓への血流量を低下させることでGFR値や尿量の低下を引き起こし、血漿中BUNおよびCr値は、腎排泄を障害されることで上昇を示したと考えられた(Fig. 16 and Table 3)。代謝性アシドーシスの進行は、血中の酸性物質の過剰を腎排泄によって動脈血pHを維持する代償機構が働くことで尿pHの低下を示していると考えられた。すなわちCSにおけるMb尿性急性腎不全の発症の因子である低循環による尿量の低下および尿pHの低下が引き起こされる結果、Fig. 15 Dに示す尿細管閉塞によって引き起こされる遠位尿細管拡張を示したと推察された。また、腎臓組織中MPO活性値の上昇と再灌流24時間後のFENa値の低下は、局所の炎症反応が波及して影響するとともに、Mbに含まれる鉄によって酸性される活性酸素種などによって⁴⁹⁻⁵²⁾、尿細管傷害を引き起こして尿細管の機能の指標であるFENa値が低下し、MPO活性値を高く上昇させたと考えられる。

第3章 本編のまとめ

本検討で改良を加えて作製したCSモデルラットは、高K⁺血症による不整脈および低循環性ショックに伴う代謝性アシドーシス、Mb尿性急性腎不全、炎症反応が経時的に進行し、それら病態進行の時間推移が臨床所見と一致した。本CSモデルラットは、複数の症状を同時に反映させていることから、治療薬剤の効果を検討するうえで複合的にその効果を様々な視点から評価が可能となることが考えられた。

第2編 CSモデルラットを用いた治療薬剤の評価

前編の結果より、臨床的に観察される複数の症状を時間経過に沿って反映させるモデルを作製した。

CSは長時間に亘り虚血状態にあった筋肉が、再灌流によって傷害を受けることにより、救出直後から低循環性ショックや心不全などの致死的な症状を呈するだけでなく、Mb尿性急性腎不全、SIRS、ARDSおよびMODSといった経時的な病態も同時に進行していくため^{24,26-29}、再灌流後の早期の治療を施すことが重要である³⁰。CS治療のための輸液療法の施行は、基本的な処置の一つであり、CS患者に対して初期から長期に亘って投与が行われている^{12,24,53}。この治療法は、高度に進行する低循環の改善や強制利尿による K^+ の排泄を期待して救出現場などで可及的早期に大量投与されており、その後のショック状態や腎不全発症のリスクを低減することが可能となった^{54,55}。さらに、アルカリ化剤を配合することによって、Mb尿性急性腎不全への効果が高まることから臨床現場においては、アルカリ化剤として重炭酸塩を添加した輸液の投与が救命効果を高めている^{15,24,25,31,46,47}。一方、病院搬送後の高度な医療管理下では、血液透析などの集中的な治療を施行することによって死亡率の低減や重篤化の低減が可能となってきた。しかしながら、炎症反応に関連して重篤化する病態に対する有効な治療法は確立されていない。

そこで本編では、まず第1章において、現在施行されている輸液の治療効果をCSモデルラットによって検証し、これら輸液がCSの病態に対してどのような効果をもたらすのかについて、第1編で用いた評価項目に基づいて検討することとした。また、CSでは全身炎症を惹起することが明らかことから、続く第2章では、新たな治療薬剤としての抗炎症性ステロイド薬であるDexamethasoneの可能性について検討した。

第1章 CSモデルラットに対する輸液薬剤の治療効果

臨床現場では、CS治療のために救出直後から生理食塩液や生理食塩液にアルカリ化剤である重炭酸塩を配合した輸液の持続投与が行われている。生理食塩液の投与は、低循環性ショック、高 K^+ 血症およびMb尿性急性腎不全を回避することが主な目的とされ⁵⁶⁾、一方、アルカリ化剤配合輸液は、代謝性アシドーシスの抑制、さらには代謝性アシドーシスに付随する尿の酸性化に伴うMb尿性急性腎不全の発症を防ぐことが目的とされている^{15,24,25,31,46,47)}。しかしそれら輸液の投与速度や、重炭酸塩の配合濃度など、最適な投与条件は検討されていない。そこで本章では、生理食塩液および生理食塩液に重炭酸塩を配合した輸液投与に関して、投与速度、投与タイミングおよび重炭酸塩配合濃度について検討した。

第1節 輸液持続投与の条件およびアルカリ化剤の配合濃度の設定

本節では、輸液の治療効果を検討するにあたり、投与速度、投与タイミングおよびアルカリ化剤の配合濃度の条件を検討した。まず投与速度を決定するために、臨床現場で標準的に用いられている生理食塩液を選択した。臨床現場での投与速度は、Betterらの提唱した1–1.5 L/h (成人 75 kg: 13–20 mL/kg/h)^{25,57,58)}やHaraらの報告したカリウムを含まない輸液を200 mL/h投与する方法などが報告されている⁵⁹⁾。そこで、これら報告を参考に、投与速度を10、20 および 30 mL/kg/hに設定した。投与タイミングおよび投与時間について、第1編で検討したCSモデルラットが再灌流3時間までに低循環性ショックや高 K^+ 血症による不整脈を引き起こしていること、および他のCSモデル動物で報告されている条件を参考に^{32,33)}、投与速度を決定するための予備検討においては、再灌流1時間前から3時間後の計4時間の持続投与とした。生理食塩液を再灌流1時間前から再灌流3時間後まで投与し、その後再灌流48時間後までに生存率によって投与速度の影響を評価したところ、生理食塩液の10、20 および 30 mL/kg/hのそれぞれの生存率は、

20、10 および 30%(それぞれn=10)であった。試験した投与速度のうち生存率の最も高かった 30 mL/kg/hを以後の検討で用いる投与速度に設定した。

一方、重炭酸塩濃度の設定に際し、重炭酸塩を 25 mEq/L含有する市販の重炭酸リンゲル液(Bicarbon[®])を用いて生存率に対する効果を検討した。その結果、生存率は 80%であり、高い生存率改善効果が期待できたことから、生理食塩液に配合する重炭酸塩濃度を 25 mEq/Lに設定した。

なお、上述の予備検討では、過去の報告を参考に再灌流 1 時間前から輸液を持続投与したが、災害現場においては、倒壊物の下敷きになっていることが想定され、そのような投与タイミングは現実的でないため、救出直後から投与を開始することを想定して、再灌流直後から 3 時間行うこととした。

第 2 節 生存率に対する輸液持続投与の効果

輸液の持続投与の効果を検討するために、生理食塩液および生理食塩液に 25 mEq/Lの重炭酸塩を配合した輸液を再灌流直後から 3 時間持続投与し、再灌流 48 時間後までの生存率を検討した。Fig. 17 は、その時の生存率曲線を示している。生理食塩液投与群(saline群)は、再灌流 18 時間までは control群と同様の生存率曲線を辿ったが、再灌流 48 時間後では、control群の 24%に対し、40%であった。一方、生理食塩液に重炭酸塩を配合した輸液投与群(NaHCO₃群)は、再灌流 3 および 6 時間後には死亡例はなく、再灌流 18 時間後から再灌流 48 時間後まで 80%で推移し、control群に比べ、有意な生存率の改善効果を示した。これらの結果から、従来から行われてきた生理食塩液投与は、生存率を上昇させることが可能であるが、重炭酸塩のようなアルカリ化剤を配合することによってこの効果が高まることが明らかとなった。そこで次節以降では、第 1 編で用いた評価項目に基づき、CSの病態に対する生理食塩液および重炭酸配合輸液投与の作用について検討することにした。

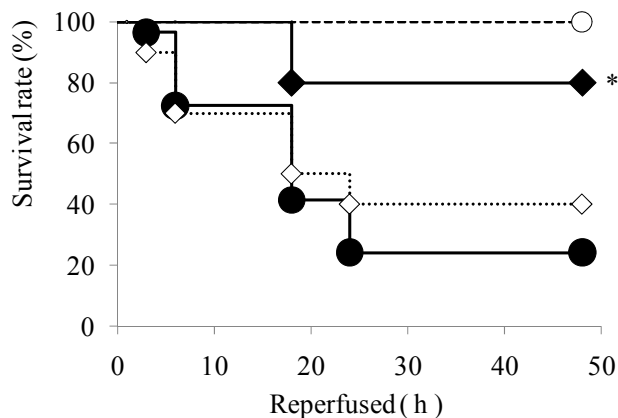


Fig. 17 Change in survival rate in therapeutic effect of fluid for CS rat

○:sham (n=10), ●: control (n=29), ◇: saline (n=10),
 ◆: NaHCO₃ (n=10); *: $p < 0.05$ vs. control (*Logrank-test*)

第3節 血漿中K⁺値およびMAP値に対する輸液持続投与の効果

本節では、血漿中K⁺値およびMAP値の測定結果に基づき心機能に対する影響について考察した。

Fig. 18は、血漿中K⁺値およびMAP値を示している。血漿中K⁺値は、いずれの時間においても輸液投与によって低下し、NaHCO₃群で低い値を示した。再灌流3時間以降は、control群に対して有意に低下させる傾向を示し、特に再灌流6時間後のcontrol群が 9.2 ± 0.5 mEq/Lと高い値を示しているのに対して、輸液投与群のsaline群では 7.3 ± 0.6 mEq/L、NaHCO₃群では 5.9 ± 0.1 mEq/Lを示し、有意に低下した(Fig. 18a)。そして実験期間中の血漿中K⁺値は、重炭酸塩の配合によって高い抑制効果を示した。一方、salineおよびNaHCO₃群のMAP値は、再灌流24時間後までcontrol群に比べて有意に高い値で推移した(Fig. 18b)。また、saline群とNaHCO₃群を比較すると、再灌流6時間後までのMAP値に有意な差はないが、再灌流24時間後のMAP値は、control群の 59.7 ± 3.5 mmHgに対し、saline群では 81.0 ± 3.2 mmHg、

NaHCO₃群では 112.9±3.6 mmHgに有意な上昇を示し、NaHCO₃群は、sham群の 118.1±2.7 mmHgに匹敵するレベルまで改善された。

これらの結果から、CSに対する生理食塩液および重炭酸塩配合輸液投与は、高K⁺血症および低循環の進行を抑制し、その効果はアルカリ化剤であるNaHCO₃を配合した輸液のほうが高いことが明らかとなった。また、第1編で得られた知見と併せて考えると、再灌流直後からのこれら輸液投与は、高K⁺血症に伴う不整脈の抑制など心機能の増悪を抑制することにより循環動態を安定化していることが推測された。

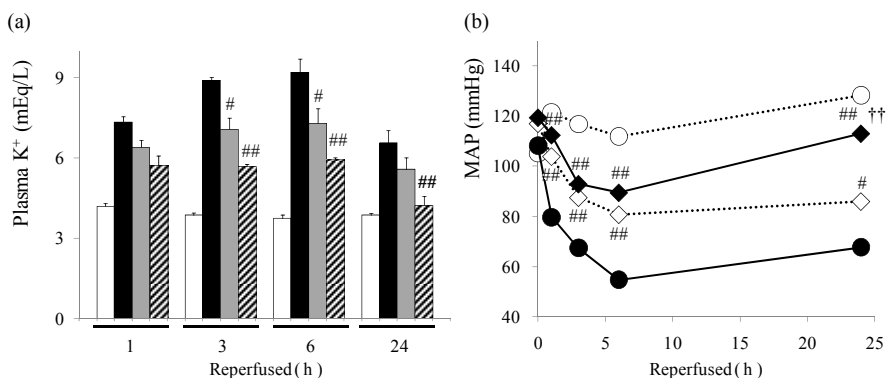


Fig. 18 Change in plasma K⁺ levels and MAP in therapeutic effect of fluid for CS rat

(a) Plasma K⁺ levels from reperused 1 to 24h, □: sham, ■: control, ■: saline, ▨: NaHCO₃, (b) Effect of MAP levels from reperused 0 to 24h, ○: sham (n=3), ●: control (n=3), ◇: saline (n=3), ◆: NaHCO₃ (n=3); Values are shown as mean ± SEM., #: *p* < 0.05 vs. control, ##: *p* < 0.01 vs. control, †: *p* < 0.05 vs. saline, ††: *p* < 0.01 vs. saline (Tukey Kramer test).

第4節 血液ガスパラメーターに対する輸液持続投与の効果

本節では、生理食塩液および重炭酸塩配合輸液投与開始後の血液ガスパラメーターを測定し、CSモデルラットで認められた代謝性アシドーシスに対する影響を考察した。

Fig. 19aおよびbは、それぞれ輸液投与開始後の動脈血pHおよびB.E.値を示している。control群の再灌流1、3、6および24時間後の動脈血pHは、7.37±0.01、7.33±0.01、7.29±0.03 および 7.28±0.02 に低下した(Fig. 19a)。saline

群では各時間の動脈血pHはcontrol群の値と有意な差はなかった。NaHCO₃群の動脈血pHは、再灌流 24 時間後までの実験期間に亘り 7.39±0.02~7.42±0.01 であり、sham群と同じレベルのほぼ一定値で推移した。一方、B.E. 値について、control群では再灌流 24 時間後まで、-5.0±0.8~-9.7±0.9 mmol/Lの値で推移し、塩基量が不足している状態であり、生理食塩液の持続投与では、control群に比べてB.E.値はほとんど同じ値を示した(Fig. 19b)。これに対してNaHCO₃群のB.E.値は、実験期間中-1.0±1.0~1.7±0.8 mmol/Lで推移し、塩基量の過不足がほとんど生じていないものと考えられた。Table 4 は、再灌流 24 時間後までの動脈血のHCO₃⁻、PaO₂、PaCO₂およびLactate値を示している。controlおよびsaline群では、sham群に比べてHCO₃⁻値が低下傾向にあるのに対し、NaHCO₃群ではsham群と同じレベルで推移していること、さらにはNaHCO₃群ではPaO₂、PaCO₂およびLactate値が、sham群と同じレベルになっていることが明らかとなった。

以上のことから、再灌流直後からの生理食塩液投与は、CS モデルラットで生じる代謝性アシドーシスの発症を抑制する効果をほとんど示さないものと考えられた。一方、25 mEq/L の重炭酸塩を配合した輸液の投与は、代謝性アシドーシスの発症を防ぐことが明らかとなり、この発症抑制効果は輸液投与を終了した再灌流 3 時間以降も維持するものと考えられた。

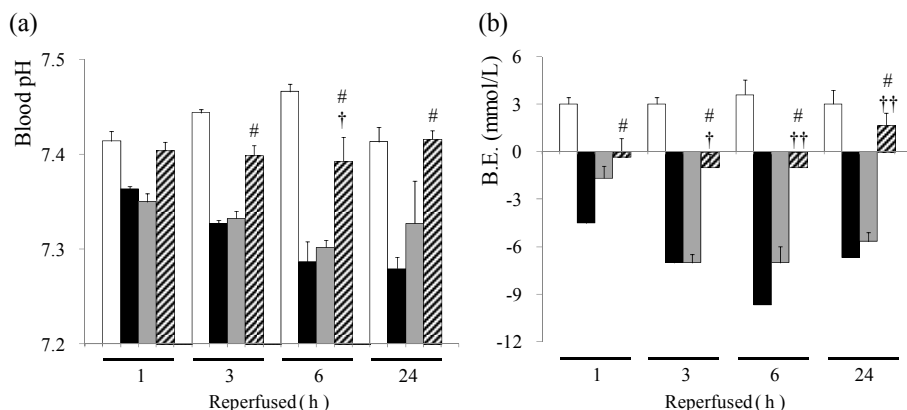


Fig. 19 Blood pH and B. E. in therapeutic effect of fluid for CS rat

(a) Blood pH, (b) B.E. levels from reperused 1 to 24h, □: sham, ■: control, ▒: saline, ▨: NaHCO₃, Values are shown as mean ± SEM, #: $p < 0.05$ vs. control, †: $p < 0.05$ vs. saline, ††: $p < 0.01$ vs. saline (Tukey Kramer test).

Table 4 Blood gas parameters in therapeutic effect of fluid for reperused 1 to 24 h

	Re-1 h	Re-3 h	Re-6 h	Re-24 h
HCO ³⁻ (mEq/L)	sham	27.3 ± 0.3	27.3 ± 0.3	30.0 ± 0.4
	control	19.9 ± 1.3 ##	19.3 ± 0.3 ##	16.0 ± 0.6 ##
	saline	23.3 ± 1.3	19.3 ± 0.3	18.3 ± 0.3
	NaHCO ₃	24.5 ± 1.5 *	24.0 ± 1.1 *†	23.9 ± 0.8 **;††
PaO ₂ (mmHg)	sham	84.5 ± 1.4	78.7 ± 4.1	94.3 ± 3.4
	control	94.7 ± 3.0	117.0 ± 2.1	126.3 ± 4.1 #
	saline	79.7 ± 6.1	97.0 ± 5.1	100.7 ± 4.8
	NaHCO ₃	102.3 ± 1.5 †	106.3 ± 1.9	111.0 ± 3.2
PaCO ₂ (mmHg)	sham	42.5 ± 1.0	39.5 ± 0.3	41.6 ± 1.5
	control	34.2 ± 0.6	36.0 ± 0.9	30.2 ± 1.0 #
	saline	43.4 ± 3.0	36.0 ± 0.9	37.5 ± 0.8
	NaHCO ₃	39.3 ± 2.9	38.9 ± 2.3	39.3 ± 2.1
Lactate (mmol/L)	sham	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3
	control	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1 ##
	saline	1.13 ± 0.08	1.86 ± 0.12	2.52 ± 0.26
	NaHCO ₃	1.48 ± 0.10	0.73 ± 0.11	0.78 ± 0.02 *;††

Values are shown as mean ± SEM. #: $p < 0.05$ vs. sham, ##: $p < 0.01$ vs. sham, *: $p < 0.05$ vs. control, **: $p < 0.01$ vs. control, †: $p < 0.05$ vs. saline, ††: $p < 0.01$ vs. saline (Tukey Kramer test)

第 5 節 腎機能に対する輸液持続投与の効果

代謝性アシドーシスは、尿の酸性化をもたらす CS における合併症のなかで最も深刻な Mb 尿性急性腎不全の発症に関与する。そのため本節では、その腎機能への効果を評価するために BUN、Cr 値および尿 pH を測定した。

Table 5 は、再灌流直後から 3 時間輸液を投与したときの再灌流 24 時間後までの BUN、Cr 値および尿 pH を示している。いずれの輸液投与群でも BUN および Cr 値は、control 群に比べ実験期間中で有意に低下した。saline 群の尿 pH は、再灌流 3 時間後まで低下が抑制されていたが、投与終了後は control 群と同じレベルまで低下した。一方、NaHCO₃ 群では、投与中および投与終了後も尿 pH の低下が有意に抑制されていた。

これらの結果から、CS に対する生理食塩液および重炭酸塩配合輸液の持続投与は、いずれも腎機能の悪化を防ぐものの、以下のような違いがあると推測された。すなわち、CS に対する生理食塩液の投与は、投与している最中の尿 pH の低下を抑制するものの、前節で示したように代謝性アシドーシス改善効果がほとんどないことから、投与終了後には、アシドーシスに伴う尿の酸性化を引き起こす。一方、重炭酸塩を配合した生理食塩液投与は、投与終了後も代謝性アシドーシスの発症を防ぐことから、尿の酸性化が抑制されているものと考えられた。Mb 尿性急性腎不全の発症には、尿の酸性化が関与していることから、用いる輸液の種類によって時間経過後の Mb 尿性急性腎不全の発症に影響する可能性があり、初期の輸液選択の重要性が示された。

Table 5 Changes in kidney function parameters in therapeutic effect of fluid

	Re-1 h	Re-3 h	Re-6 h	Re-24 h
BUN (mg/dL)	sham	13.3 ± 2.2	13.5 ± 1.3	11.7 ± 0.9
	control	24.8 ± 0.5	41.3 ± 3.7	56.6 ± 2.1
	saline	22.7 ± 2.4	26.7 ± 0.5	34.2 ± 8.2
	NaHCO ₃	18.6 ± 1.8	23.0 ± 1.3	37.2 ± 5.6
Cr (mg/dL)	sham	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.01
	control	0.30 ± 0.05	1.51 ± 0.33	0.79 ± 0.07
	saline	0.21 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.07
	NaHCO ₃	0.24 ± 0.00	0.20 ± 0.01	0.30 ± 0.05
Urine pH	sham	5.67 ± 0.41	6.33 ± 0.41	6.33 ± 0.41
	control	6.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.00 ± 0.00
	saline	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00	5.33 ± 0.41
	NaHCO ₃	6.33 ± 0.41	6.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00

Values are shown as mean ± SEM. #: $p < 0.05$ vs. sham, ##: $p < 0.01$ vs. sham; *: $p < 0.05$ vs. control, **: $p < 0.01$ vs. control; †: $p < 0.05$ vs. saline, ††: $p < 0.01$ vs. saline (Tukey Kramer test)

第 6 節 局所および全身炎症に対する輸液持続投与の効果

本節では、圧迫局所の筋肉組織の傷害に伴って惹起される局所および全身炎症に対する輸液投与の効果について評価した。

Fig. 20 は、輸液投与実験の再灌流 24 時間後までの血漿中CPKおよびLDH値を示している。saline群の再灌流 3 時間後の血漿中CPK値は、47100±5699 IU/Lであり control群の 24320±1930 IU/Lに比べて有意に上昇したが、再灌流 24 時間後では、control群の 15240±1930 IU/Lに対して 4675±825 IU/Lに有意に低下した。NaHCO₃群の血漿中CPK値は、再灌流 6 および 24 時間後には、control群に比べ有意に低下した(Fig. 20a)。一方、血漿中LDH値は、saline群では低下を示さず、NaHCO₃群はcontrol群に比べて再灌流 24 時間後まで抑制傾向を示した(Fig. 20b)。これらの結果から、圧迫部位における筋肉細胞の崩壊や組織傷害の進行は、輸液投与により影響を受け、特にアルカリ化剤配合輸液投与では、それらの進行を抑制するものと考えられた。

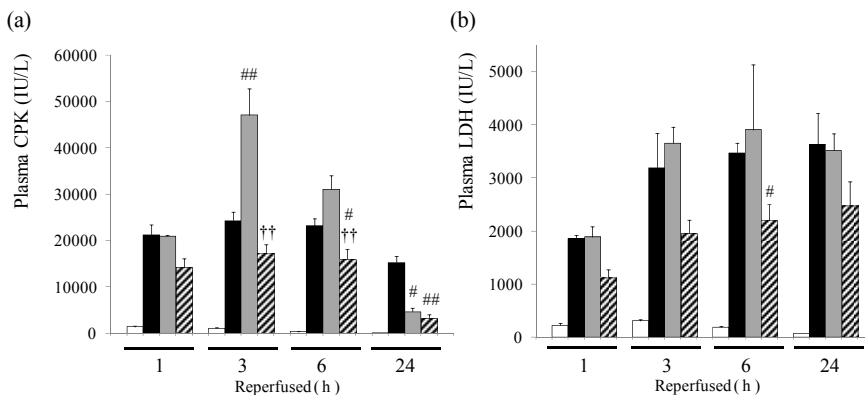


Fig. 20 Change in plasma LDH and plasma CPK levels in therapeutic effect of fluid for CS rat

(a) Plasma CPK levels, (b) Plasma LDH levels from reperused 1 to 24h, □: sham, ■: control, ▒: saline, ▨: NaHCO₃, Values are shown as mean ± SEM., #: $p < 0.05$ vs. control, ##: $p < 0.01$ vs. control, ††: $p < 0.01$ vs. saline (Tukey Kramer test).

Fig. 21 は、輸液投与実験における再灌流 24 時間後までの血漿中IL-6 値を示している。いずれの時間においてもsaline群の値は、control群と有意な差はないことから、生理食塩液の投与は、炎症性サイトカインの放出には影響しないものと考えられた。一方、NaHCO₃群では、血漿中IL-6 値がcontrol群に比べて有意に低下し、炎症反応の抑制が期待された。

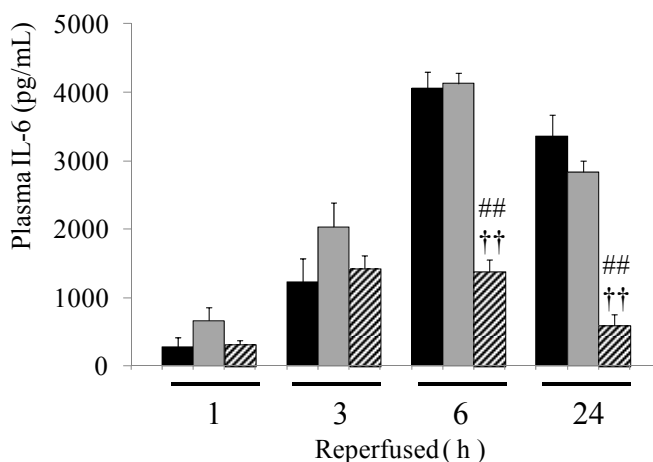


Fig. 21 Plasma IL-6 levels in therapeutic effect of fluid for CS rat

□: sham, ■: control, ■: saline, ▨: NaHCO₃, Values are shown as mean ± SEM., ##: $p < 0.01$ vs. control, ††: $p < 0.01$ vs. saline (Tukey Kramer test).

次に、輸液投与後の筋肉および肺組織中MPO活性を測定し、局所および全身炎症を評価した(Fig. 22)。筋肉組織中MPO活性値は、いずれの輸液投与でも再灌流 6 時間後までcontrol群に比べて低下する傾向にあった(Fig. 22a)。再灌流 24 時間後では、saline群では 7.3 ± 0.7 unit/g tissue、NaHCO₃群では 6.1 ± 1.6 unit/g tissueであり、control群の 8.7 ± 0.5 unit/g tissueに対してNaHCO₃群で有意な低下を示したものの、sham群に比べて約 8 倍であった。このことから、輸液投与は再灌流 6 時間後までの比較的初期の局所炎症の惹起を抑制するが、再灌流 24 時間後のような時間経過後に惹起される局所炎症に対して顕著な抑制作用を示さないものと考えられた。一方、遠隔臓器である肺組織中MPO活性値は、control群の 8.8 ± 1.9 unit/g tissueに対して

saline群では 18.6 ± 3.3 unit/g tissue に有意な上昇が認められたが、再灌流 3 時間以降では saline と NaHCO_3 群ともに control 群に比べて有意に低かった。さらに NaHCO_3 群の再灌流 24 時間後の MPO 活性値は sham 群と同じレベルまで低下しており、アルカリ化剤を配合した輸液投与により、持続的に全身炎症の惹起を抑制することが可能と思われた (Fig. 22b)。

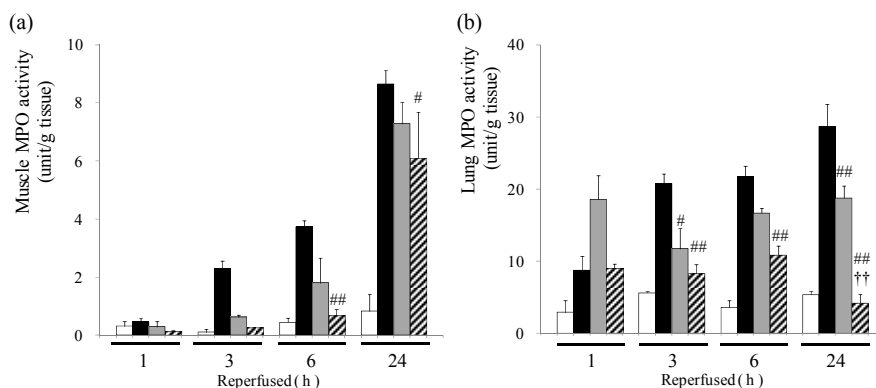


Fig. 22 Muscle and lung MPO activity in therapeutic effect of fluid for CS rat

(a) Muscle MPO activity, (b) Lung MPO activity from reperused 1 to 24h, □: sham, ■: control, ■: saline, ▨: NaHCO_3 , Values are shown as mean \pm SEM, #: $p < 0.05$ vs. control, ##: $p < 0.01$ vs. control, ††: $p < 0.01$ vs. saline (Tukey Kramer test).

本節の結果から、重炭酸塩のようなアルカリ化剤を配合した輸液投与は、圧迫局所である筋肉における組織傷害の経時的な進行を抑制する作用があり、炎症性サイトカインの放出を抑制し、さらに肺のような遠隔臓器に波及する全身性炎症の惹起を抑えるものと考えられた。一方、アルカリ化剤を含有しない生理食塩液も同様の作用を有するが、アルカリ化剤配合輸液に比べて作用が弱いものと考えられる。一方、再灌流 24 時間後のデータから明らかのように、炎症性サイトカインレベルが抑制されたとしても (Fig. 21)、MPO 活性値を指標とした筋肉局所の炎症反応は十分に抑制されないなど (Fig. 22a) 十分に説明出来ない事象も存在することから、さらに詳細な検討が期待される。

第7節 本章の小括および考察

本章では、CS モデルラットを用いて CS の治療に対して臨床的に施行されている輸液投与の効果を検証し、さらに CS の病態に対する影響について考察した。生理食塩液および生理食塩液に 25 mEq/L の重炭酸塩を配合した輸液を用い投与速度を 30 mL/kg/h とし、再灌流直後から 3 時間、尾静脈から持続投与することとした。その結果、生理食塩液および重炭酸塩配合輸液投与後の再灌流 48 時間までの CS モデルラットの生存率は、それぞれ 40% および 80% であり、control 群の 24% に対して重炭酸塩の配合によって有意に改善された (Fig. 17)。第 1 編で用いた評価項目に基づき輸液投与時の CS の病態に対する影響を検討したところ、輸液投与によって (1) 心機能改善に伴い循環動態が安定すること、(2) 代謝性アシドーシスの経時的な進行が抑制されること、(3) 局所および全身炎症の惹起が抑制され、これらの効果が生存率の改善につながっているものと考えられた。すなわち、輸液の種類による生存率改善効果の違いは、これら CS の病態の進行を抑制する程度の違いに起因しているものと推測される。

輸液の投与は、高度に進行する低循環の改善や強制利尿によって尿中 K^+ 排泄を高める、その後のショック状態や腎不全発症のリスクを低減することが可能である^{54,55}。さらに、アルカリ化剤の配合により代謝性アシドーシスを改善させると救命効果を高めると報告されている¹⁵。すなわち、輸液投与が心機能の低下を防ぐことにより低循環性ショックのリスクを低減することに加え、アルカリ化剤として重炭酸塩を配合することにより、代謝性アシドーシスの進行が抑制され、相乗的に作用するものと考えられた (Fig. 18)。代謝性アシドーシスは、Mb 尿性急性腎不全の発症に関連^{25,46,47}するだけでなく、細胞に存在する Na^+-K^+ ATPase の活性抑制により K^+ の細胞内取り込みや腎臓での尿中 K^+ 排泄を低下させ血中の K^+ 値を上昇させると報告されている⁶⁰。代謝性アシドーシスを評価した結果から、重炭酸塩の配合は、動脈血 pH を sham 群と同等なレベルで推移させ、塩基量の低下を防ぐだけでなく、 PaO_2 、 $PaCO_2$ および Lactate 値も正常な値を示した。一方で、saline 群では、それら代謝性アシドーシスの指標の改善効果を示さなかった

(Fig. 19 and Table 4)。それに対応して、実験中の尿pHは、saline 群よりもNaHCO₃群で維持されており(Table 5)、尿量は、control群に対してsaline群よりもNaHCO₃群で有意に上昇した(data not shown)。これらの知見は、代謝性アシドーシスの改善によるMb尿性急性腎不全の発症の抑制に加え、それに伴い尿中K⁺排泄と細胞内へのK⁺取り込みを改善させている可能性を示しており、重炭酸塩を配合した輸液では、saline群と比べて作用が強く現れるものと推察された。したがって、代謝性アシドーシスの改善が血漿中K⁺レベルの正常化に対しても効果的に作用することで、生存率を高められると考えられる。

一方、CSでは、圧迫局所の傷害が局所および全身炎症を惹起し、低循環や代謝性アシドーシスと複雑に関連しながら遠隔臓器に影響を与え、MODSやARDSのような重篤な症状の発症に関与している可能性がある。輸液投与は、筋肉局所だけでなく肺の炎症の惹起を抑制していることから(Fig. 22)、局所炎症に加えて全身炎症(SIRS)の発症や肺の機能不全から生じるARDSの発症を抑制することが可能であり、この作用は重炭酸塩を配合することにより高まると考えられた。また、輸液投与は炎症惹起の引き金となる細胞崩壊や組織傷害の進行を防ぐことが示唆され(Fig. 20)、これら炎症に対する効果とよく一致していた。さらに、アシドーシスの発症はIL-6レベルを上昇させることから^{61,62}、重炭酸塩を配合した輸液の投与による代謝性アシドーシスの改善は、CSモデルラットでのIL-6レベルの上昇を防ぐことを介してもSIRS、ARDSおよびMODSなど全身性の重篤な症状を抑えているものと推察される。

以上、CSモデルラットに対して輸液の効果を検討し、重炭酸塩の配合によって代謝性アシドーシスの改善を介して心機能低下、低循環、腎機能および炎症反応への効果が高まり、CSの重篤化を回避するためには、初期の輸液選択が重要であることが示唆された。

第2章 CS に対する Dexamethasone の静脈内急速投与の効果

前章においてCSに対する再灌流直後からの輸液投与のうち、特に重炭酸塩を配合した輸液の投与は、CSの重篤化を防ぐ上で有効性が高いことを示した。しかしながら、臨床現場においてCS患者に対して効果をあげている輸液療法や血液透析の施行によっても炎症反応によって引き起こされるSIRSによるARDSやMODSなどの症状が防げないケースが報告されている^{15,24,31)}。CSの重篤化を回避するためには救出後初期から治療を施すことが重要であると報告されているが^{30,31)}、災害現場において長時間に亘り薬剤を持続的に投与することは困難な場合もあると考えられるため、短時間の処置で高い効果を期待出来る治療法が望まれる。CSにおいてこのような症状を引き起こす症例においては、虚血再灌流に伴う全身炎症反応が強く示唆されるが^{27,28)}、これまでに虚血再灌流に伴う全身炎症反応に対する治療法に関する報告はない。そこで炎症反応に対する新たな治療薬候補として様々な炎症性メディエーターの産生抑制⁶³⁻⁶⁵⁾、抗ショック効果^{64,66)}および不整脈を抑制する効果⁶⁷⁾があると報告されている抗炎症性ステロイド薬であるDexamethasone (Dex)に着目し、CSに対するDexの静脈内急速投与の効果を検討した。

第1節 生存率に対する Dex の効果

CSモデルラットにDexを静脈内急速投与し、再灌流 48 時間までの生存率からDexの有効性を評価した。Dexの投与量は、虚血再灌流モデルで抗炎症効果が報告されている 0.1 mg/kg⁶⁴⁾ (Dex-0.1 群)と高用量で抗ショック効果があると報告されている 5.0 mg/kg⁶⁶⁾ (Dex-5.0 群)とした。投与タイミングは、救出現場に即した状況を考慮し、再灌流直後とした。

Dex 投与後の再灌流 48 時間後までの生存率曲線を Fig. 23 に示す。Dex-0.1 群は、再灌流 48 時間後において 23% で control 群と変わらなかったが、再灌流 18 時間後までは有意な生存期間の延長が認められた。一方、Dex-5.0 群では、死亡例はなく再灌流 48 時間後まで 100% を示し、control および

Dex-0.1 群に比べて明らかな生存率の改善が認められた。このことから、CS モデルラットに対する Dex の生存率改善効果は、投与量に依存するものと考えられた。また、再灌流 18 時間後までの比較的早期には Dex-0.1 群でも生存期間の延長が認められたことから、低用量においても、初期には CS の病態進行を抑えることが可能と思われた。

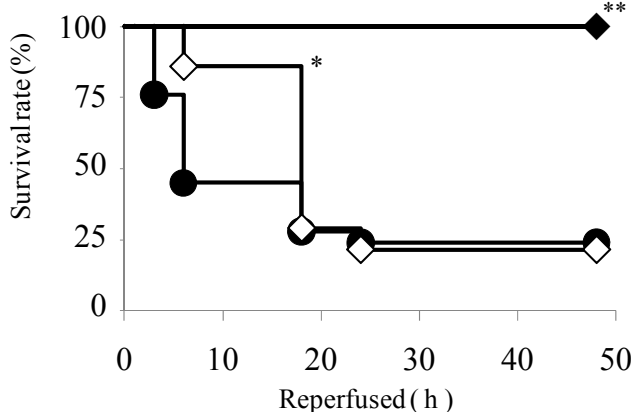


Fig. 23 Change in survival rate in therapeutic effect of Dex on CS rat

Survival rate from reperfusion 0 to 48h, ●: control (n=29), ◇: Dex-0.1 (n=14), ◆: Dex-5.0 (n=10); *: $p < 0.05$ vs. control, **: $p < 0.01$ vs. control, ††: $p < 0.01$ vs. Dex-0.1 (Logrank-test)

第 2 節 血漿中 K^+ 値およびMAP値に対するDexの効果

Dex の静脈内急速投与は、劇的な生存率改善効果が認められたため、次に CS の病態進行に対する影響について検討した。

Fig. 24aおよびbは、Dex投与後 24 時間までの血漿中 K^+ およびMAP値を示している。血漿中 K^+ 値は、Dex投与によって改善傾向にあり、特にDex-5.0 群は、再灌流 3 時間後から 24 時間後までcontrol群の 8.9 ± 0.1 、 9.2 ± 0.5 および 6.6 ± 0.5 mEq/Lのそれぞれに対して 6.4 ± 0.2 、 6.5 ± 0.3 および 4.3 ± 0.4 mEq/Lに低下させ、再灌流 24 時間後ではsham群と同等なレベルまで改善された(Fig. 24a)。Dex投与後のMAP値は、再灌流 6 時間後まではいずれの投与量でもcontrol群に比べて高い値を示す傾向にあった。Dex-5.0 群のMAP

値は、再灌流 3 時間後以降、有意に高く、再灌流 24 時間後ではcontrolおよびDex-0.1 群で示した 59.7 ± 3.5 および 72.1 ± 1.4 mmHgに対して 100.3 ± 1.5 mmHgに顕著な上昇を示し、sham群の 118.1 ± 2.7 mmHgに匹敵した(Fig. 24b)。これらの結果から、Dexの静脈内急速投与は、高 K^+ 血症を防ぐことにより不整脈の進行を抑え、循環動態を安定化するものと考えられた。

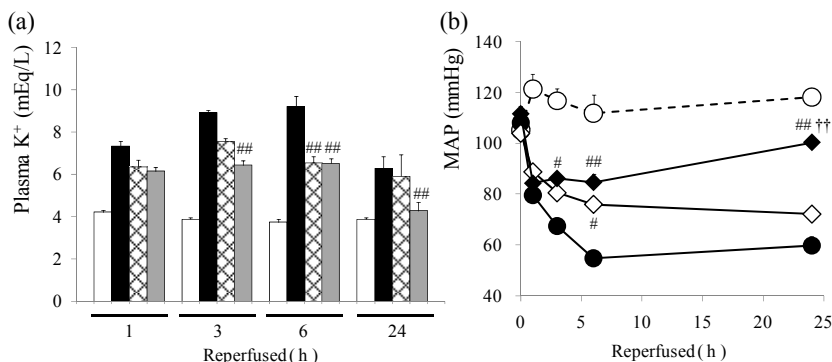


Fig. 24 Change in plasma K^+ levels and MAP in therapeutic effect of Dex on CS rat

(a) Plasma K^+ levels from reperused 1 to 24h, □: sham, ■: control, ☒: Dex-0.1, ■: Dex-5.0, (b) MAP levels from reperused 0 to 24h, ○: sham, ●: control, ◇: Dex-0.1, ◆: Dex-5.0; Values are shown as mean \pm SEM.; #: $p < 0.05$ vs. control, ##: $p < 0.01$ vs. control, †: $p < 0.01$ vs. Dex-0.1 (Tukey Kramer test).

第3節 代謝性アシドーシスに対する Dex の効果

次に、代謝性アシドーシスに対する Dex の効果を検討した。

Table 6 は、代謝性アシドーシスの評価に用いた動脈血pH、B.E.、 HCO_3^- 、 PaO_2 、 $PaCO_2$ およびLactate値の結果を示す。低用量のDex-0.1 群の動脈血pHでは、実験中に亘り 7.35~7.28 で推移し、control群と有意差はなかった。一方、高用量のDex-5.0 では、再灌流 3 時間後から 24 時間後までcontrol群に比べて有意に高い値を示し、動脈血pHは正常域にあった。血中の塩基量の指標である HCO_3^- 量およびB.E.値についてDex-0.1 群では、再灌流 1 時間後ではsham群と同等なレベルであったが、3 時間以降はcontrol群と同等なレベルで推移する傾向が認められた。一方、Dex-5.0 群では、これらの値

は実験中に亘り control群より有意に高く、また sham群と同等なレベルで推移した。これらのことから低用量の Dex投与では再灌流後の極初期には血液塩基量の不足を抑制し代謝性アシドーシスの進行を抑制するが、それ以降ではその進行を抑制することができないものと考えられた。一方、高用量では、実験中に亘り塩基量の過不足が解消され、代謝性アシドーシスの進行が抑制されていると考えられた。また、Dex-5.0 群では、再灌流 6 時間以降の PaO_2 、 $PaCO_2$ および lactate 値が sham群と同じレベルに改善されているという結果も、高用量の Dex投与が代謝性アシドーシスを抑制するという知見と一致していた。

Table 6 Blood gas parameters in therapeutic effect of Dex on CS rat

	Re-1 h	Re-3 h	Re-6 h	Re-24 h
pH	sham	7.42 ± 0.01	7.44 ± 0.00	7.47 ± 0.01
	control	7.37 ± 0.01	7.33 ± 0.01 *	7.29 ± 0.03 **
	Dex-0.1	7.35 ± 0.03	7.33 ± 0.01	7.28 ± 0.02
	Dex-5.0	7.41 ± 0.03	7.35 ± 0.04 #	7.36 ± 0.04 #
HCO ³⁻ (mEq/L)	sham	27.3 ± 0.3	27.3 ± 0.3	30.0 ± 0.4
	control	19.9 ± 1.3 **	19.3 ± 0.3 **	16.0 ± 0.6 **
	Dex-0.1	24.2 ± 0.7	21.1 ± 0.2	19.9 ± 0.8
	Dex-5.0	26.8 ± 0.6 ##	25.0 ± 0.4 ##,†	23.8 ± 0.8 ##,†
B.E. (mmol/L)	sham	3.0 ± 0.6	3.0 ± 0.6	6.3 ± 0.3
	control	-5.0 ± 0.8 **	-7.0 ± 0.6 **	-9.7 ± 0.9 **
	Dex-0.1	-0.3 ± 1.2	-4.7 ± 0.3	-6.0 ± 0.0
	Dex-5.0	2.0 ± 0.6 ##	1.0 ± 1.2 ##,†	-1.7 ± 1.5 ##,†
PaO ₂ (mmHg)	sham	84.5 ± 1.4	78.7 ± 4.1	94.3 ± 3.4
	control	94.7 ± 3.0	117.0 ± 2.1 *	126.3 ± 4.1 **
	Dex-0.1	107.0 ± 2.1	120.7 ± 4.7	132.7 ± 8.1
	Dex-5.0	101.0 ± 1.2	117.0 ± 3.1	123.3 ± 2.3
PaCO ₂ (mmHg)	sham	42.5 ± 1.0	39.5 ± 0.3	41.6 ± 1.5
	control	34.2 ± 0.6	36.0 ± 0.9	30.2 ± 1.0 **
	Dex-0.1	42.2 ± 3.9	42.4 ± 2.9	34.7 ± 4.7 #
	Dex-5.0	43.0 ± 3.2	44.6 ± 3.4	43.1 ± 3.2 #
Lactate (mmol/L)	sham	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3
	control	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1 **
	Dex-0.1	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1
	Dex-5.0	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2 #

Values are shown as mean ± SEM, *, $p < 0.05$ vs. sham, **, $p < 0.01$ vs. sham, #, $p < 0.05$ vs. control, ##, $p < 0.01$ vs. control, †, $p < 0.05$ vs. Dex-0.1, ††, $p < 0.01$ vs. Dex-0.1 (Tukey Kramer test).

第4節 局所および全身炎症に対する Dex の効果

Dex は炎症性メディエーターの産生抑制などを介して抗炎症作用を示す薬物として知られている。そこで本節では局所および全身炎症に対する Dex の効果を検討した。

Fig. 25 は、Dex 投与後の血漿中 CPK および LDH 値を示している。Dex 投与群の血漿中 CPK 値は、再灌流 1 時間後の control 群では 21220 ± 2229 IU/L に対して Dex-0.1 群では 8960 ± 1620 、Dex-5.0 群では 8893 ± 924 IU/L に半減した。そして再灌流 3、6 および 24 時間後の control 群ではそれぞれ、 24320 ± 1930 、 23187 ± 1494 および 15240 ± 1335 IU/L に上昇するのに対して Dex-5.0 群のみが 18227 ± 2715 、 14487 ± 2517 および 5743 ± 322 IU/L に有意な低下を示した(Fig. 25a)。また血漿中 LDH 値は、Dex 投与によって再灌流 1 時間後から 3 時間後まで低い傾向を示しており、再灌流 6 および 24 時間後の control 群ではそれぞれ、 3466 ± 198 および 3633 ± 583 IU/L に上昇したのに対して Dex-5.0 群のみで 2328 ± 301 および 2324 ± 214 IU/L に有意な低下を示した(Fig. 25b)。これらの結果から、Dex 投与は再灌流後の圧迫局所の筋肉傷害の進行を抑制することが示唆され、この効果は、高用量の Dex 投与で効果が高まるものと考えられた。

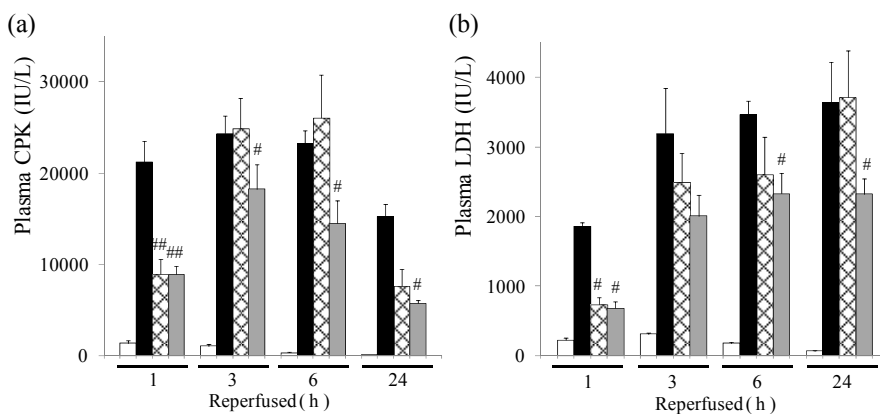


Fig. 25 Change in CPK and LDH levels in therapeutic effect of Dex on CS rat

(a) CPK levels, (b) LDH levels from reperused 1 to 24h, □: sham, ■: control, ▨: Dex-0.1, ▩: Dex-5.0, Values are shown as mean \pm SEM., #: $p < 0.05$ vs. control, ##: $p < 0.01$ vs. control (Tukey Kramer test).

Fig. 26 は、Dex 投与後 24 時間までの血漿中 IL-6 値の結果を示している。Dex-0.1 および Dex-5.0 群のいずれの場合も、Dex 投与によって血漿中 IL-6 値は、再灌流 3 時間後以降に有意に低下した。再灌流 6 および 24 時間後の control 群ではそれぞれ、 4053 ± 250 および 3361 ± 316 pg/mL に上昇したのに対して、Dex-0.1 では 2050 ± 350 および 1890 ± 39 に低下し、Dex-5.0 群では 474 ± 144 および 387 ± 39 pg/mL に顕著な低下を示した。投与量間で比較すると Dex-5.0 群での低下は、Dex-0.1 群と比較して再灌流 6 時間以降で有意に低かった。

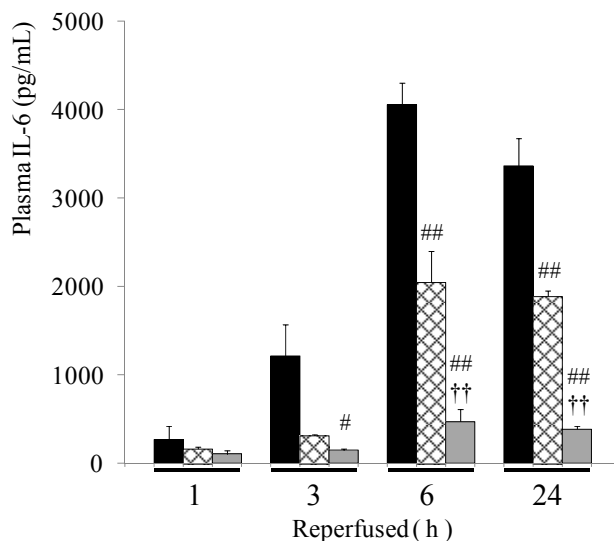


Fig. 26 Plasma IL-6 levels in therapeutic effect of Dex on CS rat

■: control, ▨: Dex-0.1, ■: Dex-5.0, Values are shown as mean \pm SEM, #: $p < 0.05$ vs. control, ##: $p < 0.01$ vs. control, ††: $p < 0.01$ vs. Dex-0.1 (Tukey Kramer test).

Fig. 27 は、Dex 投与による筋肉および肺組織中 MPO 活性値の結果を示している。筋肉組織中 MPO 活性値は、いずれの投与群でも再灌流 24 時間後まで低下する傾向にあり、再灌流 6 時間までは sham 群と同等なレベルで推移した。再灌流 24 時間後では control 群の 8.7 ± 0.5 unit/g tissue に対して Dex-5.0 群のみが 4.0 ± 1.6 unit/g tissue に有意な低下を示したものの、sham 群に比べ約 5 倍であった (Fig. 27a)。このことから、Dex 投与は、再灌

流 6 時間までの比較的初期の局所炎症の惹起を抑制するが、再灌流 24 時間後のような時間経過後では、局所炎症に対して効果が弱まるものと考えられた。一方、遠隔臓器である肺組織中 MPO 活性値は、Dex 投与によって再灌流 3 時間以降低下する傾向を示していた(Fig. 27b)。再灌流 6 および 24 時間後の Dex-5.0 群は、control 群の 20.8 ± 1.4 、 21.7 ± 1.5 に比べ再灌流 3 時間後から有意に低下し、Dex-0.1 より低下させており、再灌流 24 時間後では sham 群と比べると上昇するが、高用量の Dex 投与による持続的に全身炎症の惹起を抑制することが可能と考えられた。

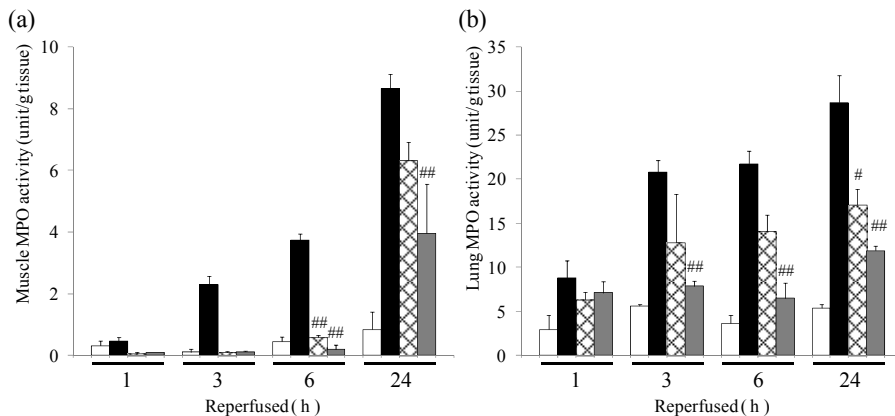


Fig. 27 Muscle and lung MPO activity in therapeutic effect of Dex on CS rat

(a) Muscle MPO activity, (b) Lung MPO activity, from reperused 1 to 24h, □: sham, ■: control, ▨: Dex-0.1, ▩: Dex-5.0, Values are shown as mean \pm SEM., #: $p < 0.01$ vs. control, ††: $p < 0.01$ vs. Dex-0.1 (Tukey Kramer test).

本節の結果から、高用量の Dex 投与は、圧迫筋肉における組織傷害の経時的な進行を抑制する作用があり、炎症性サイトカインの放出を抑制し、さらに肺のような遠隔臓器に波及する全身性炎症の惹起を抑えるものと考えられた。一方、低用量の Dex 投与も同様の作用を有するが、高用量比べて作用が弱いものと考えられる。一方、再灌流 24 時間後のデータから明らかのように、炎症性サイトカインレベルが抑制されたとしても(Fig. 26)、筋肉局所では control 群より有意に低いものの、再灌流 24 時間後の MPO 活性値は高くなる傾向にあり(Fig. 27a)、長時間経過後の局所炎症の進

行に対して十分な抑制効果を示さないことが示唆された。したがって、CSモデルラットにおけるDex体内動態や局所に対する他の機構の関与の可能性などについてさらに検討する必要があると考えられる。

第5節 一酸化窒素機構の関与の可能性

前節までの検討から、抗炎症薬として知られるDexは、CSにおける炎症の惹起を抑えることが明らかであるが、その作用機構については明らかでない。そこで本節では、炎症メカニズムに深く関与することが知られている一酸化窒素(NO)機構のCS病態進行への関与の可能性について検討することにした。NOは、体内に恒常的に存在し、酸化ストレスの除去、血管拡張および神経伝達物質として機能するなどさまざまな細胞機能の調節を行っている。一方、虚血再灌流に伴って惹起された炎症では、NOの過剰産生によって活性酸素種を形成して細胞傷害が助長され、炎症反応や循環動態の低下を悪化させることが報告されている^{68,69}。これまでにクラッシュ傷害モデル⁷⁰や後肢虚血再灌流傷害のモデル動物によってその関連性が明らかにされているように、CSのような虚血再灌流傷害ではNO機構がその病態進行に深く関与していることが推測される。実際、阪神淡路地震⁷¹やトルコのMarmara地震⁷²の際には、CS患者の血中NO量が測定され、CS患者では血漿中NOレベルが上昇していることが示されている。したがって、本研究においてもCSモデルラットにおけるNO機構の働きが亢進した状態にあり、Dex投与はそのような状態に対して影響している可能性がある。そこで、生体内でのNO産生の指標として血漿中の総窒素酸化物(NOx)量を測定し、CSモデルラットにおけるNO産生およびNO産生に対するDex投与の影響について考察した。

Fig. 28 は、control 群および Dex 投与における再灌流 24 時間までの血漿中 NOx レベルを示している。Dex 未投与の control 群の血漿中 NOx レベルは、再灌流 3 時間後までは sham 群と変わらないが、再灌流 6 時間以降有意に上昇し、その上昇は、24 時間までは時間依存的だった。このことから、CS では再灌流初期よりはむしろ長時間経過後に NO 産生が亢進することが

考えられた。

一方、再灌流 24 時間後の Dex 投与群では、Dex-0.1 群の NOx レベルは control 群と差が無かったが、Dex-5.0 群では control および Dex-0.1 群と比較しても有意に低下し、sham 群のレベルと同等だった。これらの結果から、CS において NO がメディエーターとして関与していることが推測され、CS に対する高用量の Dex 投与は炎症の惹起を防ぐとともに、NO 機構に対しても作用していることが示唆された。

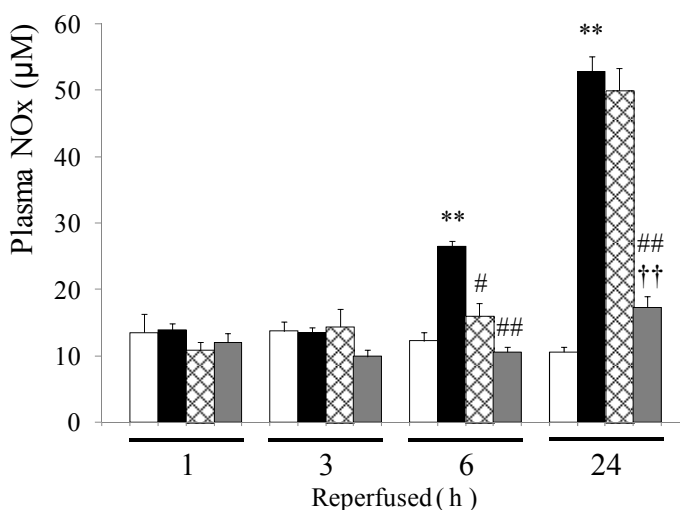


Fig. 28 Plasma NOx levels in therapeutic effect of Dex on CS rat

□: sham, ■: control, ▨: Dex-0.1, ■: Dex-5.0, Values are shown as mean \pm SEM., **: $p < 0.01$ vs. sham, #: $p < 0.05$ vs. control, ##: $p < 0.01$ vs. control, ††: $p < 0.01$ vs. Dex-0.1 (Tukey Kramer test).

第 6 節 本章の小括および考察

CSは、虚血再灌流に伴う全身炎症反応によって引き起こされる症状が報告されているのにも関わらず^{15,24,30,31}、炎症反応に着目した治療は行われてこなかった。そこで本章では、CSモデルラットに対して抗炎症性ステロイド薬であるDexを静脈内急速投与し、その生存率とCSの病態の進行に対する効果から、Dexの新たな治療薬剤としての可能性を探った。

Dex投与後の生存率は、control群に比べDex-0.1群では有意な延長を示し、またDex-5.0群では再灌流48時間後まで死亡例はなく、劇的な効果を示した(Fig. 23)。そこで、第1編の評価項目を用いてCSの病態進行に対するDexの効果を検討したところ、前章の輸液投与の結果と同様に(1)高 K^+ 血症に伴う不整脈の進行を抑えることによる循環動態の安定化、(2)代謝性アシドーシスの進行抑制、および(3)局所および全身炎症の惹起の抑制により、生存率改善効果を発揮しているものと考えられた。また、これら病態に対するDexの作用メカニズムには部分的にNO機構が関与していることが明らかとなった。

本検討の結果、CSモデルラットにおける経時的な血漿中 K^+ 値の増大に対して、Dexは用量依存的な抑制効果を示し(Fig. 24a)、再灌流6時間後まで有意な低下傾向にあった。一方、MAP値は、低用量のDex投与では再灌流24時間後にはcontrol群と比べて差がなかったが、高用量のDex投与ではsham群と同じレベルまで上昇していたことから、Dexにより循環動態が安定化していると考えられた(Fig. 24b)。Davidらは、Dexが K^+ による心膜電位の上昇を抑制することにより不整脈を改善すると報告している⁶⁷⁾。したがって、本検討で認められた血漿中 K^+ レベルの低下とMAP値の正常化から、Dexによる心機能の低下を防いでいるものと考えられた。

そして、代謝性アシドーシスに対するDex投与の効果は、高用量のDex投与にのみ実験期間中の塩基量の過不足をsham群と同等なレベルで推移させており、代謝性アシドーシスの改善を示した(Table 6)。代謝性アシドーシスは、 K^+ の尿中排泄や細胞内移行を抑制することで高 K^+ 血症の発症因子でもある⁶⁰⁾。ことから、高用量Dex投与による代謝性アシドーシスへの効果は、血漿中 K^+ 値の低下に関与したかもしれない。しかし、今回用いた評価項目では、高用量のDex投与による代謝性アシドーシスの効果を明らかに出来なかったことから今後の検討で明らかにされることが期待される。とはいえ、Dex投与は、心機能の改善や循環動態の安定化に用量依存的な効果をもたらすことが生存率の改善の違いに関与するものと考えられる。

Dexは、抗炎症作用を有する代表的な薬剤であり、CSで惹起される局所および全身炎症を抑制することが期待される。虚血再灌流傷害では、虚血

を受けた局所だけでなく遠隔臓器に対しても傷害を拡大させることが知られ^{24,41-43,73,74}、多臓器不全を引き起こすなど、症状を重篤化することがある^{31,44}。虚血再灌流傷害の一つであるCSにおいても肺のような遠隔臓器に傷害を引き起こすことが報告され^{33,75}、本研究においても第1編で示したように、CSモデルラットにおいて肺や腎臓に対して炎症を惹起し、傷害を引き起こしていることが明らかとなった(Fig 14)。これに対し、Dex投与は低用量および高用量ともに再灌流6時間後までは顕著に筋肉組織中MPO活性値の上昇を抑え(Fig. 27a)、肺においても高用量では有意に抑えていた(Fig. 27b)。Dexは用量依存的に血漿中CPKとLDH値およびIL-6値の上昇を抑制する傾向を示したことから(Figs. 25 and 26)、圧迫局所の傷害進行を防ぐことにより局所および全身炎症の惹起を抑制しているものと考えられた。

Dex投与は、CSモデルラットでの代謝性アシドーシスの進行を抑制し、その効果は、特に高用量のDex投与で顕著だった。代謝性アシドーシスの発症には、腎不全などによって酸性物質の排泄が低下し、pHの低下に対して代償的に作用する重炭酸塩の再吸収が阻害されることが関係する。第1編で示したように、CSでは筋肉組織の傷害により血中に放出されたMbが腎尿細管を閉塞してMb尿性急性腎不全を生じていることに加え(Figs. 15D, 16 and Table 3)、全身性に惹起された炎症が腎臓にも及んでいることが明らかとなった(Fig. 14b)。これらのことから、Dex投与は圧迫された筋肉局所での虚血再灌流傷害を防ぐことにより腎機能の低下を防ぎ、代謝性アシドーシスの発症を抑制している可能性が考えられた。加えて、代謝性アシドーシスによるMb尿性急性腎不全の発症の促進^{25,46-48}や炎症性メディエーターであるIL-6レベルの増大^{61,62}は、CSの病態悪化を助長する因子になっていると考えられるため、上記のようなDex投与による局所傷害の進行抑制が腎不全の発症を抑え、その結果として代謝性アシドーシスを抑制し、病態の重篤化の回避につながっているものと考えられる。

一方、CSのような虚血再灌流傷害では、傷害局所におけるNO産生が炎症反応に深く関与している可能性があり、本検討ではCSモデルラットにおいて再灌流6時間以降に時間依存的にNO産生が亢進することが明らか

となった(Fig. 28)。この結果は、CSにおいて誘導型 NO 合成酵素の誘導を介して NO 産生が亢進している可能性を示唆しており、CS の病態進行に対して NO 機構がどのように関与しているのかについても検討する必要があると思われる。また、高用量の Dex 投与では血漿中 NOx レベルは、sham 群とほぼ同じレベルまで低下していることから Dex の作用機構に NO 機構が関与しているものと考えられ、CS に対する有効性の高い治療薬を確立するためにも、このような機構について詳細に検討することは重要であると思われる。

第3章 本編のまとめ

本編では、CS 治療に対して臨床的に用いられている輸液の持続投与の効果および新規の薬物療法として Dex の急速静脈内投与の効果を病態レベルで評価した。その結果、いずれも心機能の低下を防ぐことによる循環動態の安定化、代謝性アシドーシスの抑制、および局所および全身炎症を防ぐことにより、生存率を高めていることが明らかとなった。本研究で評価した項目に基づけば、アルカリ化剤配合輸液と高用量 Dex 投与の有効性および病態に対する影響はよく類似しているが、救出現場の状況を想定した場合、短時間で簡便な処置により高い有効性が得られる高用量 Dex 投与は、CS に対する新規薬物療法としての可能性が高いものと考えられる。また、本研究では、Dex の作用メカニズムに対して NO 機構が関与していることも明らかとなり、今後の Dex の詳細な作用メカニズムを明らかにしていくことで、投与量や投与法の最適化、さらには補助療法の最適化など、より有効性の高い治療法の確立につながるものと期待される。

結論

本研究では、CS に対する薬剤の効果を適切に評価できる CS モデルラットを作製し、輸液および Dex 投与の効果を検討した。その結果、それら薬剤の効果を病態レベルで明らかにすることができ、臨床研究を実施することが困難なクラッシュシンドローム研究における動物モデルの有用性を明らかにすることができた。高用量での Dex 静脈内急速投与は、CS モデルラットの生存率を劇的に改善することができ、災害現場において短時間の処置で高い救命効果を期待できる有用性の高い新規治療法になり得ると考えられた。今後、炎症応答や NO 機構のような CS の重篤化に関連する因子などを詳細に検討することにより、治療薬の開発、投与量や投与方法の最適化、さらには、補助療法や維持療法の最適化が可能となり、CS に対して有効性の高い治療法の確立が可能になるものと期待される。

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部病態解析学講座 教授 小林順先生ならびに病院薬剤学講座 教授 森本雍憲先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました城西大学薬学部食毒性学講座 教授 加園恵三先生、城西大学薬学部臨床薬理学講座 教授 荻原政彦先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、有益な御意見、ご指導を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部病態治療学分野臨床薬理学研究室 教授 大井一弥先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始多大なる御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部病院薬剤学講座 准教授 上田秀雄先生、城西大学薬学部病院薬剤学講座 助手 木村聡一郎先生ならびに城西大学薬学部病態解析学講座 准教授 内田博之先生、城西大学薬学部病態解析学講座 助教 大竹一男先生に深く感謝致します。

また、本研究の遂行にあたり、御理解および御協力を賜りました、ニプロファーマ株式会社営業学術部 弘津一郎先生ならびにニプロ株式会社医薬品研究所 吉澤直也氏、筒井康浩氏、安井紀陽氏に深謝致します。

最後に、本研究の遂行にあたり、有益な御意見、御協力を頂きました城西大学薬学部病院薬剤学講座、城西大学薬学部病態解析学講座諸氏に厚く御礼申し上げます。

実験の部

第1編

(1) 動物

Wistar 系雄性ラット(250 - 330 g)は、日本チャールズ・リバー(株)ならびに埼玉実験動物(株)より購入した。

(2) 麻酔試薬

麻酔は、下記の表をもとにペントバルビタールナトリウムを注射用水に溶解させ、安定化剤のプロピレングリコールおよびエタノールを加え、pH調整剤の塩酸によって pH を 9.0~9.5 に調整した。

配合目的	規格	成分名	基本分量
主薬		ペントバルビタールナトリウム	2.5 g
安定化剤	日局	プロピレングリコール	20 mL
安定化剤	日局	エタノール	5.25 mL
pH調整剤	日局	塩酸	適量
溶剤	日局	注射用水	適量
		全量	50 mL

pH 9.0~9.5

(3) 圧迫用ラバーバンドの作製

天然ゴム製黒ゴム管(外径 8mm、内径 6mm、長さ 450mm) を切開し、シート状(幅 24mm、厚さ 1mm) にし、ステンレスパイプ(外径 22mm、内径 20mm、長さ 70mm) に、2kg 荷重下で 5 回巻きつけ固定した。

(4) CSモデルラット作製方法

実験期間中はペントバルビタールナトリウムを、初回量を 50mg/kg、維持量を 20mg/kg/hr で腹腔内投与した。ラットを仰臥位で固定し、後肢を伸ばした状態でステンレスパイプの中に入れ、圧迫用ラバーバンドをスライドさせて適用し、両後肢を 5 時間圧迫した。その後、ラバーバンドを切開し除去、圧迫を解除した。

(5) 実験デザイン

ラットは、無作為に以下に示す2群に分けた。sham群は、圧迫を行わず麻酔対照とし、5時間麻酔下においた。CS群は、ラバーバンドを用いて5時間圧迫した後、それを除去して再灌流させた。

(6) 生存率曲線

各処置群のラットは、圧迫終了後、ケージに移して自由行動をとれるようにし、再灌流後0、1、3、6、18、24および48時間後に生存を確認した。その結果を、Kaplan-Meier法で表記し、Logrank testによって有意差を算出した。

(7) 採血および血液検査法

麻酔下で開腹し、ヘパリンリチウム(1,000単位/mL)でリンスしたシリンジおよび注射針22Gを用いて腹大動脈より約0.5mL採血を行った。その後、大動脈を鉗子で止め、同様に下大静脈より約5mL採血を行い、約1mLは自動血球計測装置用採血ビン(シスメックス(株))に移し、残りの血液はガラス製試験管内に移し速やかに遠心分離(2,900×g、10分間、4°C)後、上清を採取しさらに遠心分離(2,900×g、10分間、4°C)を行い、血漿を採取し測定時まで凍結保存(-60°C)した。

動脈血は、採血後速やかにpH、二酸化炭素分圧(PCO₂)、酸素分圧(PO₂)およびCa²⁺を電極法で測定し、重炭酸イオン(HCO₃⁻)とBase excess(B.E.)は計算法(バイエル 348、バイエルメディカル(株))、ナトリウムイオン(Na⁺)およびカリウムイオン(K⁺)はイオン電極法(バイエル 644、バイエルメディカル(株))で、そして乳酸(Lactate)は酵素法(ラクテートプロ、アークレイ(株))で測定を行った。ヘマトクリット(Ht)は赤血球パルス波高値検出法(Sysmes F-800、シンメックス(株))で測定した。また、血漿は、血中尿素窒素(BUN)をウレアーゼ・LED・UV法、クレアチニン(Cr)を酵素法、乳酸脱水素酵素(LDH)およびクレアチンリン酸化酵素(CPK)をJSCC標準化対応法、尿酸(UA)をウレアーゼ・ペルオキシダーゼ法(7170形自動分析装置、日立製作所(株))で測定した。またミオグロビン(Mb)測定はELISA法(RAT

MYOGLOBIN ELISA、Life Diagnostics,Inc.)で行った。

(8) 組織学的評価

再灌流 3 および 24 時間後に腓腹筋、肺および腎臓を摘出し、10%中性ホルマリン液(和光純薬工業(株))で固定保存し、パラフィン包埋し薄切を作成し、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行った。組織学的評価は、組織科学研究所(株)に依頼した。

(9) 浮腫の評価

再灌流 0、1、3 および 24 時間後に摘出した筋肉重量を測定し、体重 100g あたりに換算した。

(10) MAP測定、血液ガス分析およびECG測定

麻酔下のラットを仰臥位で固定し、右頸動脈に 5000 単位のヘパリンナトリウム(持田製薬)を 100 倍希釈したものを充満させたポリエチレンチューブ(INTRAMEDIC™ PE50)を約 20mm挿入し、軟質縫合糸(夏目製作所(株) No.3)にて結紮固定後、圧トランスデューサーを介し血圧測定を行い、同時にそのチューブより動脈血を採取しi-STAT300F®(扶桑薬品工業(株))にてpH、PaCO₂、PaO₂、B.E.、HCO₃⁻、sO₂およびLactate値の測定を行った(i-STATカートリッジCG4+(扶桑薬品工業(株))を使用)

心電図測定は、ラットの左右胸部、左右鼠径部の 4ヶ所に注射針を皮下に貫通させ、右鼠径部はアースとし、双極誘導によって測定を行った(PowerLab /8sp、CORNERSTONE)。血圧を安定化させるために 30 分間の安定期間の後、実験を開始した。処置群は死亡に至るまで、非処置群は再灌流 3 時間後まで測定をした。また、実験期間中はヒーティングランプで体温を維持した。得られた波形は 15 波形の平均値から P 波(mV)、ORS 間隔(msec)、RR 間隔(msec)、QT 間隔(msec)および T 波(mV)を算出し、Bazett 式($QTc = QT/\sqrt{RR}$)を用いて心機能を評価した。

(11) 尿サンプル採取

麻酔下で固定したラットのペニスを軟質縫合糸で縛り、尿が出ないようにした後、膀胱上の皮膚および筋層を白線に従って 1-2cm 切開し、膀胱を外部に露出させた。その膀胱の頂点を切開し生理食塩液を充満させたポリエチレンチューブ (INTRAMEDIC™ PE50) を挿入して軟質縫合しにて膀胱に固定し、再度腹腔内にもどし、筋層および皮膚の順に縫合して固定した。その後、正常に尿が採取出来る事を確認して圧迫を開始し、再灌流 6 時間後までは 1 時間毎に採取し尿量、尿 pH (プレテスト 7s II (和光純薬工業(株)) を使用) を測定した。また、再灌流 24 時間後のサンプルも同様の処置にて採取および測定を行った。また、再灌流 24 時間後は、尿中クレアチニン (urine-Cr) および尿中ナトリウムイオン (urine-Na⁺) を測定し、糸球体ろ過速度 (GFR) および尿中ナトリウム排泄分画 (FENa = [(urine-Na / plasma-Na) / (urine-Cr / plasma-Cr)] × 100 (%)) を算出した。

(12) Plasma IL-6 値測定

再灌流 0、1、3、6 および 24 時間後に血液を採取し、その後速やかに EDTA-2Na の入ったマイクロチューブに移し 3,000×g、5 分、4℃ で遠心分離し血漿を得た。使用するまで -80℃ で保存した血漿を氷上で解凍し、Rat IL-6 ELISA kit (Endgen, Inc) を用いて測定した。一連の工程は Rat IL-6 ELISA kit の取扱説明書に従い、マルチラベルカウンター (Wallac 1420 ARVOsx) で測定した。

(13) 組織サンプル採取

血漿サンプルを採取した後、リン酸緩衝性生理食塩 (PBS) で灌流し、腓腹筋、肺および腎臓を摘出した。摘出した組織は、使用するまで -80℃ で保存した。

(14) 筋肉、肺および腎臓組織中MPO活性値測定

-80°Cで保存した腓腹筋、肺および腎臓のMPO活性はBradley P.P.⁷⁶⁾らおよびKihara N.ら⁷⁷⁾の方法に従って測定した。組織は、0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide溶液中、POLYTRON[®]PT-MR 2100 で、ホモジナイズし、超音波処理した後、12,000×g、10分、4°Cで遠心分離した。上清を50 mM KH₂PO₄ bufferで10~100倍希釈し、0.53 mM O-dianisidine dihydrochlorideと0.15 mM H₂O₂をそれぞれ30μL加え、紫外可視分光光度計(SHIMAZU UV mini 1240)を用いて460nmの吸光度を測定した。

(15) データ解析

データは、平均値±標準誤差で表記した。

sham群とCS群でt-testを行い、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$ で有意差ありとした。

第2編

第1章

(1) 動物

Wistar系雄性ラット(250–330 g)は、埼玉実験動物(株)より購入した。

(2) 麻酔試薬

第1編(2)と同様に行った。

(3) ラバーバンド作製

第1編(3)と同様に行った。

(4) CSモデルラット作製方法

第1編(4)と同様に行った。

(5) 実験デザイン

ラットは、無作為に以下に示す 4 群に分けた。sham群は、圧迫を行わず麻酔対照とし、5 時間麻酔下においた。control群は、ラバーバンドを用いて 5 時間圧迫した後、それを除去して再灌流させ、薬剤の投与は行わなかった。輸液投与群は、尾静脈に留置針(ニプロ セーフレットキャスNIC-24G×1)および投与ルート(ニプロ エクステンションチューブEX5-45AT)を連結し、再灌流直後よりシリンジポンプを用いて投与速度 30mL/kg.hrで生理食塩液(saline群)および生理食塩液に 25mEq/Lになるように重炭酸ナトリウムを配合した輸液(NaHCO₃群)を 3 時間持続投与した。

(6) 生存率曲線

第 1 編(6)と同様に行った。

(7) MAP測定および血液ガス分析

第 1 編(10)と同様に行った。

(8) 尿サンプル採取

第 1 編(11)と同様に行った。

(9) 採血および組織摘出

採血は、麻酔下のラットを開腹し下大静脈より、圧迫解除 1、3、6 および 24 時間後に行った。採取した血液は、速やかに EDTA-2Na の入ったマイクロチューブに移し、3,000×g、5 分、4℃で遠心分離し、血漿を得た。血漿は使用するまで-80℃で保存した。

採血後、ラットは PBS で灌流し、腓腹筋および肺を摘出した。摘出した腓腹筋および肺は使用するまで-70℃で保存した。

(10) 血漿中K⁺、BUN、Cr、CPKおよびLDH値測定

保存していた血漿サンプルを、(株)SRLに依頼して測定を行った。K⁺、BUN、Cr、CPKおよびLDHの測定原理は、イオン電極法、LED・UV法、酵素法およびJSCC標準化対応法を用いて測定した。

(11) 血漿中IL-6 値測定

第1編(12)と同様に行った。

(12) 筋肉および肺組織中MPO活性値測定

第1編(14)と同様に行った。

(13) データ解析

データは、平均値±標準誤差で表記した。

sham 群と control 群間、control 群と輸液投与群間の比較は、Tukey-Kramer test で評価し、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$ で有意差ありとした。

第2編

第2章

(1) 動物

第2編第1章(1)と同様に行った。

(2) 麻酔試薬

第1編(2)と同様に行った。

(3) ラバーバンド作製

第1編(3)と同様に行った。

(4) CSモデルラット作製方法

第1編(4)と同様に行った。

(5) 実験デザイン

ラットは無作為に以下に示す 4 群に分けた。sham 群は麻酔対照とし、5 時間麻酔下においた。control 群はラバーバンドを用いて 5 時間圧迫した後、それを除去した直後に生理食塩液 0.1 mL を尾静脈より急速静注した。Dex(0.1 および 5.0 mg/kg)投与群は control 群と同様に圧迫および解除した後、生理食塩液 0.1 mL を用いて Dex(Dexamethasone 21-phosphate disodium salt, SIGMA-ALDICH) 0.1 および 5.0 mg/kg で、尾静脈より急速静注した。

(6) 生存率曲線

第 1 編(6)と同様に行った。

(7) MAP測定、血液ガス分析およびECG測定

第 1 編(10)と同様に行った。

(8) 採血および組織摘出

第 2 編第 1 章(9)と同様に行った。

(9) 血漿中K⁺、BUN、Cr、CPKおよびLDH

第 2 編第 1 章(10)と同様に行った。

(10) 血漿中IL-6 値測定

第 1 編(12)と同様に行った。

(11) 筋肉および肺組織中MPO活性値測定

第 1 編(13)と同様に行った。

(12) 血漿中NO_x値測定

NO₂およびNO₃濃度測定のために、血漿サンプル 100 μ Lは等量のメタノールにて抽出し、その後速やかに 15000 \times g、10分で上清を得た。その上清は、グリース反応を利用したHPLCシステムのENO-20を用い測定を行った。調整したサンプルは、10 μ L注入し、組織抽出液は等倍のエタノールで希釈した。検量線は、NO₂およびNO₃濃度をそれぞれ 100、50、25、10、5、2.5、1.0、0.5、0.25 および 0.05 μ Mから求め、それぞれのサンプルの濃度を算出した。

(13) データ解析

データは、平均値 \pm 標準誤差で表記した。

sham 群と control 群間、control 群と Dex 投与群間の比較は、Tukey-Kramer test で評価し、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$ で有意差ありとした。

参考文献

- 1) Bywaters E.G.L., *et al.*, *B.M.J.*, **1**: 427-432 (1941).
- 2) Mayon-White R.W., *et al.*, *B.M.J.*, **1**: 434-435 (1941).
- 3) Patey D.H., *et al.*, *Lancet.*, **1**: 780-782 (1941).
- 4) Bywaters E.G.L., *B.M.J.*, **301**: 1412-1415 (1990).
- 5) Bywaters E.G.L., *et al.*, *J.A.M.A.*, **124**: 1103-1109 (1944).
- 6) Corcoan A.C., *et al.*, *J.A.M.A.*, **134**: 436-441 (1947).
- 7) Whittaker R., *et al.*, *J. Trauma.*, **14**: 37-43 (1974).
- 8) Santangelo M.L., *et al.*, *Surg. Gynecol. Obstet.*, **154**: 372-374 (1982).
- 9) Sheng Z.Y., *J. Trauma.*, **27**: 1130-1135 (1987).
- 10) Sever M.S., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **354**: 1052-1063 (2006).
- 11) 杉本侃, 阪神・淡路大震災に係る初期救急医療実態調査
平成7年度厚生科学研究費補助金健康政策調査研究事業報告書(1996).
- 12) Oda J., *et al.*, *J. Trauma.*, **42**: 470-476 (1997).
- 13) Sever M.S., *et al.*, *Kidney. Int.*, **60**: 1114-1123 (2001).
- 14) Shi Y.K., *et al.*, *Chin. J. Traumatol.*, **13**: 131-136 (2010).
- 15) Greaves I., *et al.*, *J. R. Army. Med.*, **149**: 255-259 (2003).
- 16) Shaw A.D., *et al.*, *B.M.J.*, **309**: 857-859 (1994).
- 17) Keim H.A., *et al.*, *J. Bone. Join. Surg. Am.*, **52**: 1248-1250 (1970).
- 18) Goldberg M., *et al.*, *J. Urol.*, **124**: 730-731 (1980).
- 19) Lydon J.C., *et al.*, *Anesthesiology.*, **60**: 236-238 (1984).
- 20) Rommel F.M., *et al.*, *J. Urol.*, **135**: 809-811 (1986).
- 21) Godbout B., *et al.*, *J. Trauma.*, **24**: 1052-1056 (1984).
- 22) Taylon D.C., *et al.*, *Injury.*, **19**: 43-44 (1988).
- 23) Raukhverger A.B., *et al.*, *Sud. Med. Ekspert.*, **20**: 56 (1977).
- 24) Yokota J., *J.M.J.A.*, **48**: 341-352 (2005).
- 25) Better O.S., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **322**: 825-829 (1990).
- 26) Sever M.S., *et al.*, *Clin. Nephrol.*, **59**: 326-333 (2003).
- 27) Yassin M.M., *et al.*, *World. J. Surg.*, **26**: 115-121 (2002).

- 28) Seekamp A., *et al.*, *Agents. Actions. Suppl.*, **41**: 137-152 (1993).
- 29) Smith J., *et al.*, *J. Trauma.*, **54**: S226-S230 (2003).
- 30) Sonoi H., *et al.*, *Shock.*, **32**: 593-600 (2009).
- 31) Gonzalez D., *Crit. Care. Med.*, **33**: S34-S41 (2005).
- 32) Akimau P., *et al.*, *J. Trauma.*, **58**: 51-58 (2005).
- 33) Mohri T., *et al.*, *Shock.*, **26**: 581-586 (2006).
- 34) Wakai A., *et al.*, *J. Trauma.*, **51**: 922-926 (2001).
- 35) Bywaters E.G.L., *et al.*, *Surg. Gynecol. Obstet.*, **75**: 612-627 (1942).
- 36) Murata I., *et al.* *J. Trauma.*, (Accepted).
- 37) Sever M.S., *et al.*, *Crit. Care. Med.*, **30**: 2443-2449 (2002).
- 38) Rosenthal S.M., *Public. Health. Rep.*, **58**: 1429-1436 (1943).
- 39) Slovis C., *et al.*, *B.M.J.*, **324**: 1320-1323 (2002).
- 40) Malinoski D.J., *et al.*, *Crit. Care. Clin.*, **20**: 171-192 (2004).
- 41) Woodruff T.M., *et al.*, *J. Surg. Res.*, **116**: 81-90 (2004).
- 42) Welbourn R., *et al.*, *Circ. Res.*, **71**: 82-86 (1992).
- 43) Klausner J.M., *et al.*, *Ann. Surg.*, **208**: 761-767 (1988).
- 44) Eerk E., *et al.*, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **17**: 33-40 (2002).
- 45) Stallone R.J., *et al.*, *Ann. Thorac. Surg.*, **7**: 539-549 (1969).
- 46) Thiel G., *et al.*, *Nephron.*, **4**: 276-297 (1967).
- 47) Bywaters E.G.L., *et al.*, *Q. J. Exp. Physiol.*, **33**: 53-70 (1942).
- 48) Perri G.C., *et al.*, *Br. J. Exp. Pathol.*, **33**: 440-444 (1952).
- 49) Bosch X., *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **361**: 62-72 (2009).
- 50) Crowin H.L., *et al.*, *Hypertension.*, **29**: 194-198 (1997).
- 51) Holt S., *et al.*, *Exp. Nephrol.*, **8**: 72-76 (2000).
- 52) Moore K.P., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **273**: 31731-31737 (1998).
- 53) Shimazu T., *et al.*, *J. Trauma.*, **42**: 641-646 (1997).
- 54) Michaelson M., *World. J. Surg.*, **16**: 899-903 (1992).
- 55) Gunal A.I., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**: 1862-1867 (2004).
- 56) Better O.S., *Nephron.*, **55**: 97-103 (1990).
- 57) Abassi Z.A., *et al.*, *Semin. Nephrol.*, **18**: 558-565 (1998).

- 58) Better O.S., *Mil. Med.*, **164**: 366-369 (1999).
- 59) Hara I., *et al.*, *Int. J. Urol.*, **4**: 202-205 (1997).
- 60) 武藤重明, *日本内科学会雑誌*, **92**: 728-736 (2004).
- 61) John A., *et al.*, *CHEST.*, **130**: 962-967 (2006).
- 62) John A., *et al.* *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **286**: R686-R692 (2004).
- 63) Askar I., *et al.*, *Microsurgery.*, **22**: 361-366 (2002).
- 64) Cuzzocrea S., *et al.*, *J. Immunol.*, **159**: 5089-5097 (1997).
- 65) Knight K.R., *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **332**: 273-278 (1997).
- 66) Sambhi M.P., *et al.*, *Circulation.*, **31**: 523-530 (1965).
- 67) David G.B., *et al.*, *Int. J. Cardiol.*, **22**: 67-73 (1989).
- 68) John W., *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, **83**: 195-203 (2009).
- 69) Cameron D., *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, **75**: 327-338 (2007).
- 70) Rubinstein I., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **101**: 1325-1333 (1998).
- 71) Adachi J., *et al.*, *Clinica. Chimica. Acta.*, **269**: 137-145 (1998).
- 72) Derici U., *et al.*, *Clinica. Chimica. Acta.*, **322**: 99-103 (2002).
- 73) Linfert D., *et al.*, *Transplant. Rev(Orlando).*, **23**: 1-10 (2009).
- 74) Hill J., *et al.*, *Surgery.*, **112**: 166-172 (1992).
- 75) 平井昭博ら., *日外傷会誌*, **11**: 250-255 (1997).
- 76) Bradlet P.P., *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, **78**: 206-209 (1982).
- 77) Kihara N., *et al.*, *Gut.*, **52**: 713-719 (2003).