

腎微小循環の可視化と DIC の評価

仲 本 博^{1,2}, 小笠原 康 夫^{1,2}

Visualisation of Renal Microcirculation and Its Application to Disseminated Intravascular Coagulation as an Index

Hiroshi NAKAMOTO^{1,2} and Yasuo OGASAWARA^{1,2}

キーワード : PAF, DIC, 生体顕微鏡, 可視化

概 要

生理的条件下での腎微小循環の観察を可能とする生体顕微鏡を開発し、可視化を試みた。播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) による循環障害を、血流速度を用いて評価し、ヘパリンと血小板活性化因子阻害薬である CV3988 の効果を比較検討した。実験動物には 22 匹の Wistar ラットを用いた。DIC は、リポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) 5 mg/kg を静注し誘発した。本研究で用いた CCD 生体顕微鏡の空間分解能は、 $0.86\mu\text{m}$ で時間分解能は 33 msec である。血流速度は、血球の移動速度を解析することで算出した。LPS 5 mg/kg の投与後、腎糸球体毛細管における血流速度は、120 分で $809\pm 41\mu\text{m/s}$ から $335\pm 44\mu\text{m/s}$ ($44\pm 5\%$) まで低下した。ヘパリン 100 IU の前投与により、血流速度の低下は、 $54\pm 4\%$ に抑えられた。CV3988 の前投与により、血流速度は、 $98\pm 2\%$ と変化しなかった。CCD 生体顕微鏡を用いて DIC へと推移する際の腎微小循環障害を可視化し治療法を検討したところ、ヘパリンよりも血小板活性化因子阻害薬である CV3988 が、微小循環血流を保存するという点から有効であることが判明した。

緒 言

Disseminated intravascular coagulation (DIC, 播種性血管内凝固症候群) は、歴史的には産科領域における周産期の合併症として報告され、その後固形癌、白血病、動脈瘤、血管腫、感染症なども病因となることが判明した。このような基礎疾患が持続し、何らかの原因により組織因子が活性化され、凝固系のカスケードが進行すると微小血栓が形成されるようになる。その結果、一方で、消費性凝固障害が進行することで出血傾向が出現し、もう一方で微小循環障害が進行し臓器障害が出現する。治療を施しても致死率は、20~50% と言われる。

DIC は、エンドトキシンである lipopolysaccharide (LPS) を投与することで誘発することが出来る。我々

は、エンドトキシンの投与によって血小板数が数時間で 50% 以下に減少し、FDP の上昇、PT 比の延長など、救急領域での DIC 診断基準を満たすことを確認している。血管内に入った LPS は、凝固系を刺激することとなる。元来エンドトキシンは、炎症を誘発するが、その際フリーラジカルが産生される。この一連の流れは、組織因子を活性化し凝固系をトリガーする。このような状況の中で炎症細胞は、サイトカインを放出し炎症が進行するが、platelet activating factor (PAF) も放出し血小板を活性化する。我々は、直接にフリーラジカルを抑制はしないが、フリーラジカルが関わったことで放出された PAF を阻害することで、凝固系のカスケードを抑制出来ないかと考えた。そのような DIC の治療法は、まだ確立されていない。そこで、治療法に検討を加えた。

腎微小循環の可視化による観察は、これまでは技術的に困難なことから、摘出ネフロンや病的な水腎症といった動物モデルによって行なわれて来た。我々は、この困難を CCD 生体顕微鏡を開発することで克服し、ラットにおいて生理的条件下での観察を可能にした¹⁾ (図 1)。この技術を応用して、腎微小循環において

(平成 18 年 9 月 28 日受理)

¹⁾川崎医療短期大学 臨床工学科, ²⁾川崎医科大学 医用工学システム循環器¹⁾Department of Medical Engineering, Kawasaki College of Allied Health Professions²⁾Department of Medical Engineering and Systems Cardiology, Kawasaki Medical School

DIC に至る様子の可視化を試みた。循環に関わる重篤かつ重要な疾患の一つに DIC があるからであり、その剖検の報告では微小循環障害は腎臓が最も著しく、次いで肺、脾臓と続く。

本研究の目的は、DIC に至る過程を生理的条件下のラットにおいて生体顕微鏡を用いて可視化評価し、PAF 阻害薬を投与しその効果を評価することである。

方 法

Wistar ラット (n = 24) をセボフルレンで入眠させ、イナクチン (thiobutabarbital, 100mg/kg, ip) で持

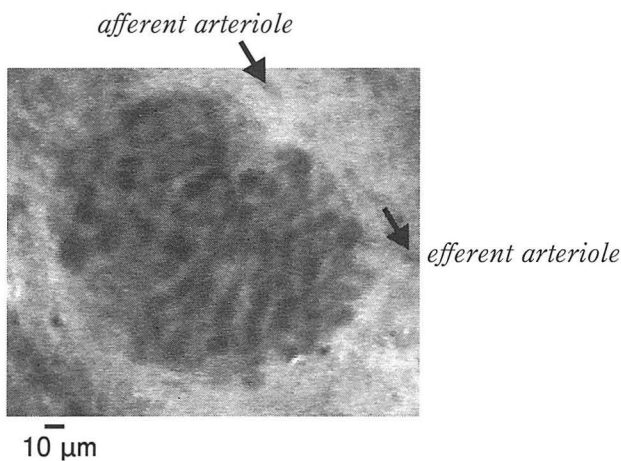


図1 糸球体の画像例

続麻酔した。右の大腿静脈よりカニューラを挿入し薬物投与路とした。右の頸動脈よりカニューラを挿入し血圧を測定した。ラットの左腎を剖出し、左腎動脈にトランスソニック血流計を装着し腎血流量を測定した(図2)。

DIC は、LPS の投与によって誘発される。プロトコールとしては、薬剤投与は大腿静脈からとし、LPS を 5 ないし 10mg/kg で投与するが、1) LPS 単独群、2) LPS に先立ちヘパリン (100IU) 前投与群、3) LPS に先立ち PAF の阻害薬である CV3988 (2 mg/kg) を前投与する群²⁾、4) LPS に先立ちヘパリン (100IU) と PAF の阻害薬である CV3988 (2 mg/kg) を前投与する群に分けて行なった。

いずれの群でも LPS 投与10分前に前投与を施す。CV3988 は日本国内で市販されている数少ない PAF 阻害薬の一つであり、PAF を抑制するため、血小板が活性化されず、微小循環が閉塞するのを防ぐ効果がある。

腎臓の皮質表面を薄く剥ぎ、ペンシル型 CCD 顕微鏡のレンズプローブをその切り口に挿入、観察のための視野を決定してから、腎微小循環をビデオテープに連続で記録した。ペンシル型 CCD 顕微鏡は、鉛筆のような外観を呈していて CCD 画像センサを備えている。本システムの空間分解能は $0.86\mu\text{m}$ 、時間分解能は 33 msec であり、腎糸球体の鮮明な画像を得ることが

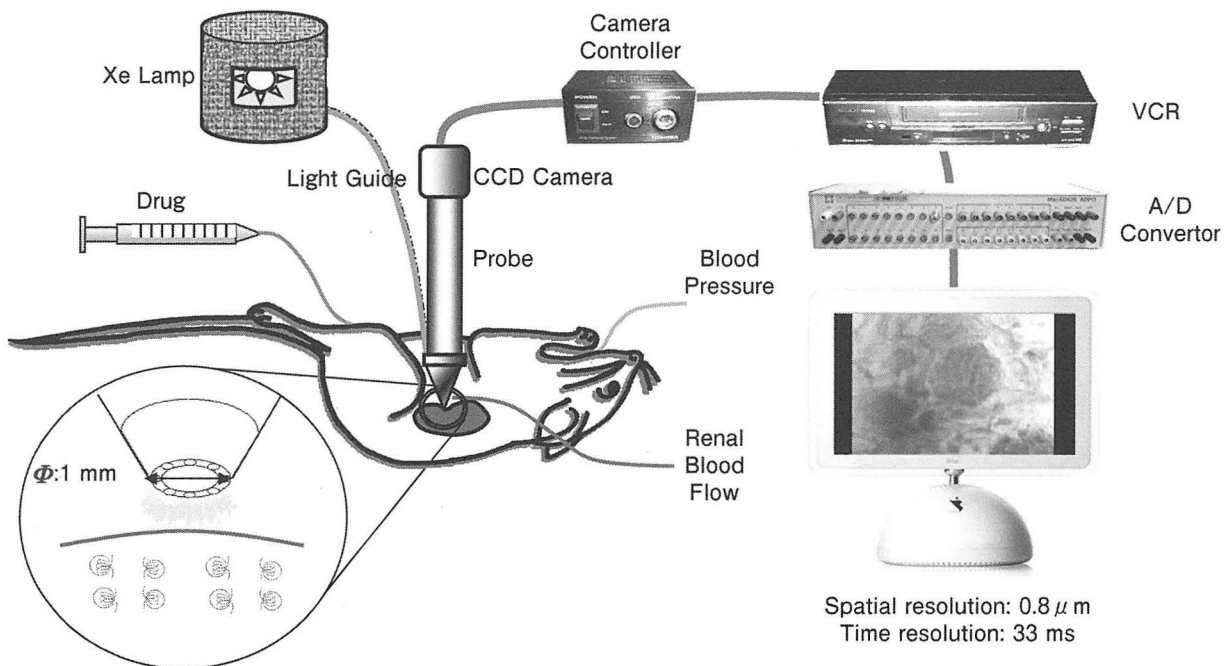


図2 実験のセットアップ

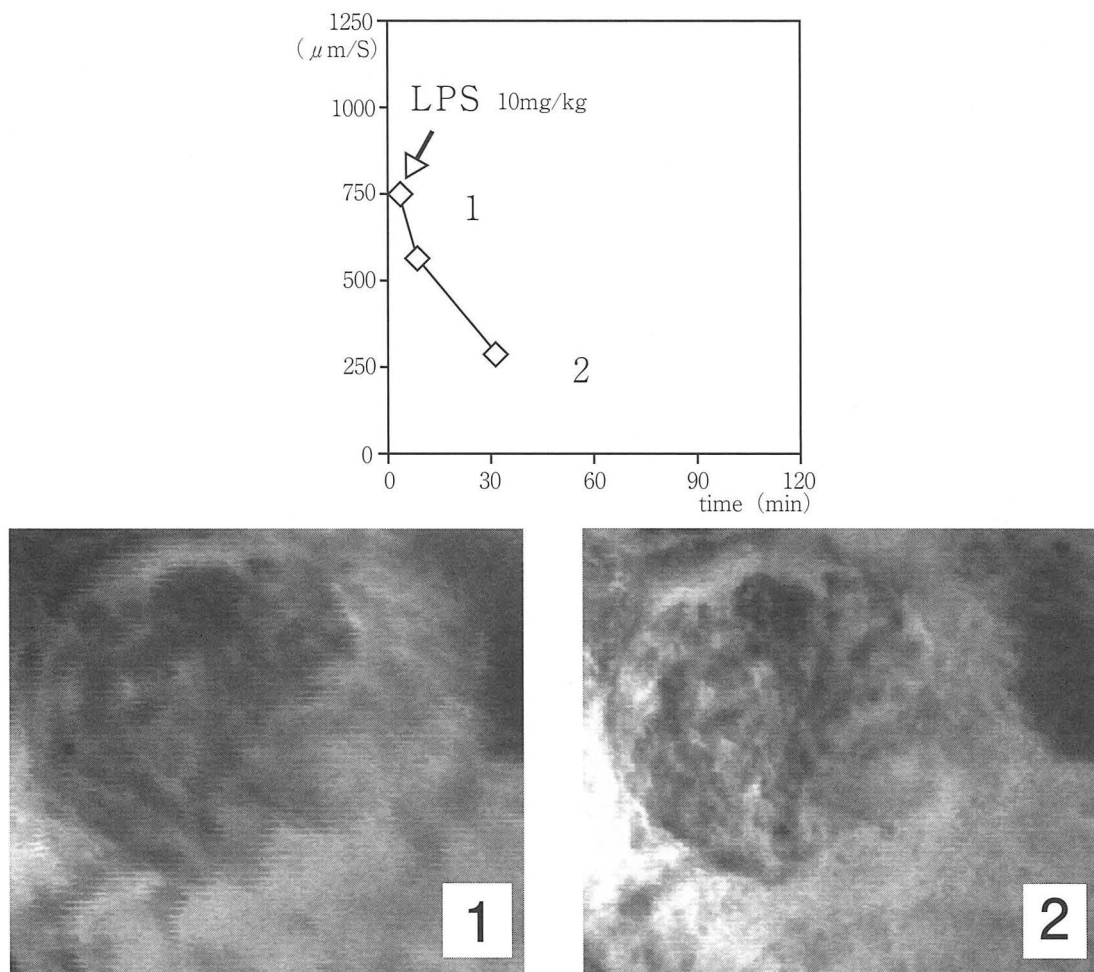


図3 DICによる血流速度変化例

出来る。

可視化した画像は、ビデオテープに録画した。解析は、オフラインでコンピューターに取り込み行なった。糸球体内の毛細管に沿って関心領域を定め、専用に開発したソフトウェアによって、血球の移動速度によって角度の異なる斜めの縞模様となる時空間画像を求め、Nelder-Meadのパラメータ推定法を用いて血流速度を求めた³⁾(図3)。

なお本研究は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を平成16年に受け(No. 04-042)、川崎医科大学の動物実験指針に従って実施された。

結 果

糸球体での血流速度は、LPS 5 mg/kgを投与した際の1群では、2時間で44%にまで低下した。2群では、54%まで低下し、改善を示した。3群では、89%にしか低下せず、改善を示した。4群では、98%までの低下で、血流速度の低下が認められなかった。(図4)

LPS 10mg/kgを投与した際の、1群では、30分で50%にまで低下した。2群では、70%まで低下し、改善を示した。3群では、88%にしか低下せず、改善を示した。4群では、100%で、血流速度の低下が認められなかった。(図4)

考 察

腎微小循環を可視化する手法を用いて、DICに至る状態の評価に糸球体毛細管における血流速度を用いることが出来るかを検討した。LPSの投与量を増加することで、血流速度の低下に要する時間が短縮した。すなわち、低い投与量では2時間で、高い投与量では30分で血流速度が約50%低下したが、この違いはDICの進展と連動しており、ある程度の容量依存性があると考えられることから、DICの評価に応用可能であることが示された⁴⁾。生化学的見地からでなく、血流速度でDICを評価するという研究はいまだ見当たらないから、本研究は独自性を有していると言える。PAF

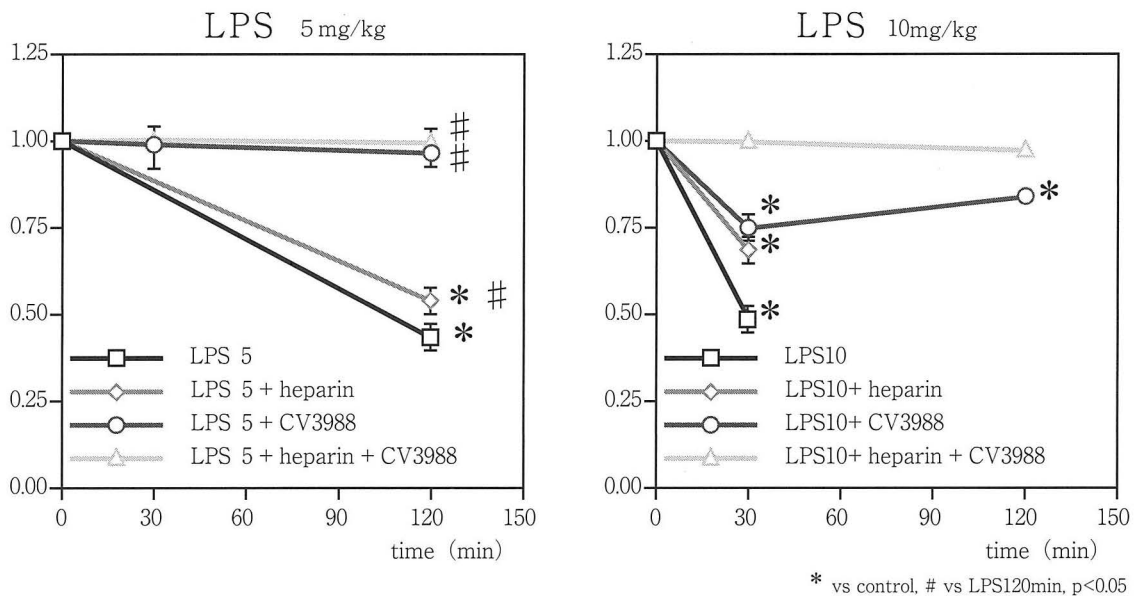


図4 LPS, ヘパリン, CV3988 (PAF 阻害剤) による血流速度変化

は、主として白血球、血小板、内皮細胞で生成され、生体内のすべての組織で観測される。そして炎症、止血、血栓形成、平滑筋細胞の緊張など多くの生理学的過程に関与しており、流血中の血小板数を低下させる。ラットでは、血管内血小板凝集を惹起し、好中球、単球、抗酸球の脱顆粒を促進し、細胞の走化性を亢進させる。PAF 阻害薬は、種々知られているが、我が国において入手可能なものは、実際のところ CV3988のみである⁵⁾。その作用は、血小板に結合することで生じると推定され、血小板凝集を妨げると報告されている。現在の我が国における DIC の治療法については、原疾患の治療とともにタンパク分解酵素阻害剤、アンチトロンビン製剤、ヘパリン製剤が併用されている。従来使用されているヘパリン製剤の DIC への有用性については、予後改善の点から意見の一致をみえない。また、米国では、活性化プロテイン C が重症敗血症の治療の主軸として用いられているが⁶⁾、我が国では認可されておらず、臨床治験のめどはたっていない。PAF 阻害剤は、その有用性が指摘されているが、これは国内外において臨床応用されておらず、我が国では治療薬として認可されていない。本研究によってヘパリンの効果は、血流速度の観点からは大きくなく、寧ろ PAF 阻害薬が有効であることが判明した。つまり、DIC の成り立ちには血小板が大きく関わることを意味する。本研究では、主に抗凝固剤の前投与を検討しているが、それは DIC 惹起後の状態が揃いにくいという技術的困難さに負うところが大きい。ヘパリンの

投与量については、我が国の医療現場での DIC 治療法から算出した。投与量は 5 ~ 15/kg/hr が一般的であり、体重 50kg の人で概算では通常 1 日当たり 1 万 U を使用することから、0.5kg のラットでは 100U となり、実験時間が 3 時間弱の本研究では治療量としては充分である。PAF 阻害剤である CV3988 の投与量については、過去の文献に倣った。Terashita 等²⁾はエンドトキシン (15mg/kg, iv) 投与後 10 分に CV3988 を 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0mg/kg 静脈投与してその後の血圧変動を調べているが、エンドトキシンによる血圧低下を妨げる効果は、投与後直ちに 0.5mg の投与量から出現し、1.0mg の投与と比較して差がなく、その効果は投与後 2 分以降持続するが、続く 60 分における改善は僅かである。また、DIC に対する CV3988 投与後のサバイバルレートには、1 mg/kg と 10mg/kg で比較しているが、エンドトキシン投与後 17 時間は、差が認められない。このようなことから、エンドトキシン投与後約 3 時間弱の観察からなる本実験においては、2.0mg/kg の量は充分であると考えられる。追加実験として、DIC 惹起後の薬物の効果を調べてみた。図 5 に示すように、LPS の投与後 30 分で本実験と同量のヘパリンや PAF 阻害剤を投与したが、これは DIC の治療を意味しており、その後 30 分においてヘパリンでは血流速度の減少分の約 50% 以上の回復をみることはなく (n = 4)、PAF 阻害薬では、全例で血流速度の回復をみた (n = 12)。そのうち 4 例について、血流回復傾向をさらに観察を続けたところ、PAF 阻害剤投与後 60 分で初期の血流速

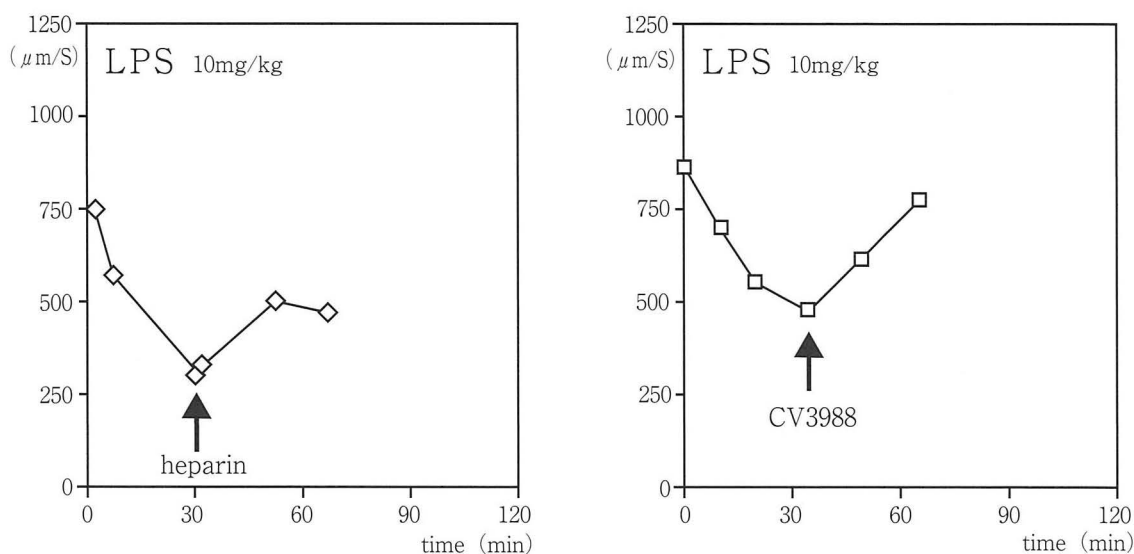


図5 LPS, ヘパリン, CV3988 (PAF 阻害剤) の後投与による変化例

度を上回るに至った。血流速度が増加しているかは、モニター画面から目視で分かることであるが、このような血流速度の増加は、ヘパリンでは投与後20分以降は認められなかった。このことから、抗凝固剤のDIC惹起後の効果は、前投与の結果と同様であることが分かった。これらのことを併せて総合的に考慮すると、PAF 阻害薬をDICの従来の治療法に併用すれば更なる効果が得られることが期待される。

ま と め

DICに至る腎微小循環を糸球体のレベルで可視化することが出来た。毛細管を流れる血流の速度を指標としてDICの程度を評価することが出来た。治療としては、従来のヘパリンは、血流を保つという点からは有効でなく、寧ろDICの形成には血小板の関与が大きく、PAF 阻害薬が極めて有効であり、この薬剤を従来の薬物と併用することが治療に有効であろうと期待される。

文 献

1) Yamamoto T, Tomura Y, Tanaka H and Kajiya F : In vivo

visualization of characteristics of renal microcirculation in hypertensive and diabetic rats, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 281(3) : F571—7, 2001.

2) Terashita Z, Imura Y, Nishikawa K and Sumida S : Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxin shock? *Eur. J. Pharmacol.* 109(2) : 257—261, 1985.

3) Ogasawara Y, Takehara K, Yamamoto T, Hashimoto R, Nakamoto H and Kajiya F : Quantitative blood velocity mapping in glomerular capillaries by in vivo observation with an intravital videomicroscope, *Methods Inf. Med.* 39 (2) : 175—178, 2000.

4) Nakamoto H, Ogasawara Y and Kajiya F : Prevention of DIC induced glomerular ischemia by PAF inhibition : *Circ. J.* 69 : 169, 2005.

5) Terashita Z, Imura Y and Nishikawa K : Inhibition by CV-3988 of the binding of [3H]-platelet activating factor (PAF) to the platelet, *Biochem. Pharmacol.* 34(9) : 1491—1495, 1985.

6) Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL and Levy MM : Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee : Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 32(3) : 858—873, 2004.

