

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名： 内藤 善介

専攻分野： 麻酔学

指導教授： 井上 莊一郎

主論文の題目：

Deterioration of Myofibrils Affected by Experimental Partial Immobilization in a Septic Rat Model

(敗血症ラットモデルにおける下肢固定化による筋原線維の破壊)

共著者：

Hirofumi Hino, Miyuna Kimura, Hirokiyo Nomura, Hirotaka Okuda, Takanari Yoshikawa, Soichiro Inoue

緒言

ICU-Acquired Weakness (ICU-AW) は、集中治療が必要な重症患者において四肢筋力や呼吸筋力の低下を認める疾病である。現在まで重症敗血症下や下肢ギプス固定での筋組織の変化は、動物モデルにおいても十分に解明されていない。我々は下肢ギプス固定ラットと Lipopolysaccharide (LPS) を持続的に静脈内に注入し、重症敗血症モデルを新たに確立すること、持続的敗血症状態と下肢ギプス固定の組み合わせのヒラメ筋への影響を病理学的に検証した。

方法・対象

10 週齢の雄性ラットを用い、実験施行前に麻酔下に右外頸静脈にカ

テーテルを留置した。実験中は動物が自由に移動し、食物および水も自由に摂取できる環境において以下の実験を施行した。

本研究の前段階実験 1 では、LPS の投与量と投与期間の確認を行った。24 匹のラットを無作為に 4 群に分け、それぞれ 6 匹ずつ、対照群、L1 群、L2 群、L3 群とした。L1 群、L2 群および L3 群は小動物用シリンジポンプを用いて、それぞれ LPS 1、2 および 3mg/kg/日量を、対照群では同量の生理的食塩水を 120 時間まで持続投与した。実験開始 0、24、48、72、96、120 時間後に、ラットの体重測定、採血を行い、結果より LPS 投与量、投与期間を決定した。

本研究の実験 2 では、24 匹のラットを無作為に対照群 (C 群)、下肢ギプス固定群 (CC 群)、LPS 投与群 (L 群)、LPS 投与に下肢ギプス固定を加えた LPS・下肢ギプス固定群 (LC 群) の 4 群 (各 6 匹) に分けた。L、LC 群では実験 1 の結果で得られた LPS を、また、C、CC 群では生理的食塩水をカテーテルより LPS 投与量と同量を同期間持続投与した。CC 群および LC 群にはイソフルランで麻酔後、両後肢を伸展させて膝部および足首部をギプス固定した。持続投与終了の後にイソフルラン麻酔下で体重を測定、また、血液を採取した。ギプス除去後、高濃度のイソフルランを追加吸入した後、両ヒラメ筋を下肢から慎重に分離した。各ヒラメ筋の湿重量を測定し、相対湿重量比を計算した。筋組織は、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて病理学的観点から分析した。

統計は正規性および均一性についての検定を行った後、複数群間の差を Kruskal Wallis 検定と Steel-Dwass 検定で評価した。筋線維と平均空胞数は、Tukey 検定を用いた。ヒストグラムは筋線維横断面積を総筋線維数の割合で表した。筋断面積 (cross sectional area :CSA) 分布の差は、Bonferroni の多重比較検定を用いた Kolmogorov-Smirnov 2 標本検定により評価した。

なお、本実験は聖マリアンナ医科大学動物実験委員会 (承認番号 : 1902027、1904009) により承認を得た。

結果

実験 1 では対照群の全てのラットは 120 時間の観察期間中、正常な活動を示した。L3 群のラットは全例、72 時間以内に死亡、または呼吸パターンの異常と重度の体重減少を示したため、実験より除外した。LPS 投与量の規定では L1、L2 では、LPS 投与後に血小板数が劇的に減少し、L1 および L2 群では 24 時間後に最低値となり、その後は徐々に回復した。L1 群では 48 時間後より L2 群と比較して有意に回復し、LPS に対する抵抗性を認めた。LPS 投与期間の規定では 120 時間後では L1 群の体重は対照群との有意差を認めず、また、L2 群では血小板数の急激な上昇を認めた。この結果から、実験 2 の LPS 投与量を 2mg/kg/日、LPS 投与期間を 96 時間と規定した。

実験 2 の結果より、C 群に対して CC、L、LC 群では 96 時間後に有意な体重差を認めない一方、CC、L、LC 群ともにヒラメ筋湿重量およびヒラメ筋相対体重比の有意な低下（各群 $p=0.021$ ）が認められ、特に LC 群では著明に見られた。

光学顕微鏡像では、LC 群では他の全ての群と比較して CSA の有意な増加と平均筋線維数の減少が観察され、CSA 画像分析の結果、大小の筋線維の混在が確認された。また、筋線維内の平均空胞数は CC 群と LC 群で有意に増加していた。電子顕微鏡像では、縦断面でサルコメアの歪み、Z バンド破壊を認め、アクチン・ミオシンフィラメント消失を認めた。一方、ミトコンドリア変性、グリコーゲン顆粒、空胞様構造物は有意差を認めず変性に至っていないことが判明した。

考察

本研究では、敗血症と固定による不動化が筋量、筋線維数、筋線維 CSA、CSA 分布および筋線維の病理学的変化に及ぼす影響を同時に検討した。その結果、今回の研究では LC 群では筋量や筋線維数の減少がよ

り激しく、筋原線維の破壊がより極端になることが観察され、不動化された敗血症ラットモデルが最も筋線維に深刻な影響を及ぼすことが示された。研究で観察された筋組織の破壊にもかかわらず、細胞小器官への有意な影響は認めず、筋変性を示唆する所見は認めなかった。しかし、これらの変化が長期に及ぶ場合には、重症疾患多発筋炎が成立する可能性がある。不動化と敗血症を標的とした早期介入は治療戦略となると考えられる。

結論

本研究は、この分野における今後の研究課題を数多く提供するものであり、今回の知見は ICU-AW の病態解明に重要と考えられる。