



駆血帯装着に伴うヒト血中一酸化窒素代謝物濃度の変動

八木, 正義
足立, 順子
龍野, 嘉紹
三枝, 康宏
水野, 耕作

(Citation)

神戸大学都市安全研究センター研究報告, 2:273-278

(Issue Date)

1998-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00317508>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317508>



駆血帯装着に伴うヒト血中一酸化窒素代謝物濃度の変動

A change of nitric oxide due to application of pneumatic tourniquet in human

八木 正義¹⁾
Masayoshi Yagi
足立 順子²⁾
Junko Adachi
龍野 嘉紹³⁾
Yoshitsugu Tatsuno
三枝 康宏⁴⁾
Yasuhiro Saegusa
水野 耕作⁵⁾
Kosaku Mizuno

概要：阪神・淡路大震災で発生した挫滅症候群の発症には救出後に生じる虚血再灌流障害が深く関与しているとされ、近年、一酸化窒素(nitric oxide:NO)の関与が注目されている。我々は虚血再灌流のモデルとして駆血帯を装着して手術を行った患者のNO濃度について検討した。測定にはNO代謝物である nitrite と nitrate をNO濃度の指標として計測を行った。nitrite は駆血帯使用前、駆血帯解除直前、駆血帯解除5分後、および翌日の計測において有意差を認めなかった。nitrate は駆血帯解除5分後の計測において他の3回の計測と比較して有意な上昇を認めた。NO代謝物濃度の上昇は虚血再灌流障害に重要な役割をはたしている可能性があると思われる。

キーワード：一酸化窒素、虚血再灌流障害、駆血帯、地震

1. はじめに

1995年1月17日に発生した阪神・淡路大震災では6000人以上の死者が発生し、崩壊した建造物によって四肢や体幹に圧迫を受け救出後に挫滅症候群が多発した¹⁾。挫滅症候群は1941年に Bywaters²⁾らが最初に報告して以来、地震³⁾や戦争⁴⁾などでの発症が報告されているが病態については不明な点も多い。本症候群は救出時に生じる虚血再灌流障害が深く関与しているとされ⁵⁾、近年、その発症には一酸化窒素(nitric oxide:NO)が関わっている事が報告されている^{6,7)}。そこで今回我々は挫滅症候群の病因を調べる目的で虚血再灌流のモデルとして駆血帯を使用したヒトの手術におけるNO濃度および血圧の変動について検討を行った。

2. 対象および方法

(1) 症例

対象は駆血帯を使用して下肢手術を受けた 15 症例である。症例は男性 7 例、女性 8 例であり、年齢は 15～57 歳（平均 26.9 歳）であった。手術内容の内訳は膝前十字靱帯再建術が 6 名、関節鏡視下半月形成術が 4 名、関節鏡視下授動術が 2 名、関節鏡視のみを行った症例が 2 名である（表 1）。なお駆血帯の使用時間は 30～137 分（平均 85.5 分）であった。

血圧と NO 濃度について駆血時間により評価を行うため、症例を 2 群に分類した。駆血時間が 90 分以上の 7 人を I 群とした（平均 112.9 分、90～137 分）。また駆血時間が 90 分未満の 8 人を II 群とした（平均 61.4 分、30～84 分）。

症例の術前における血液検査 (AST, ALT, LD, CK, BUN, Cr, K) を行った。

表1 症例の内訳

Group	Case	Age	Sex	Period (min)	Operation
I	1	57	F	137	Total knee arthroplasty
	2	21	F	130	ACL reconstruction, meniscal repair
	3	22	M	120	ACL reconstruction, meniscectomy
	4	18	F	115	ACL reconstruction, meniscectomy
	5	16	F	105	ACL reconstruction
	6	32	F	93	Arthroscopic manipulation
	7	30	M	90	Arthroscopic manipulation
II	8	16	F	84	ACL reconstruction
	9	15	M	80	ACL reconstruction
	10	17	M	65	Arthroscopic meniscal repair
	11	37	M	60	Arthroscopic meniscectomy
	12	40	M	60	Arthroscopic meniscectomy
	13	23	F	55	Arthroscopic meniscectomy
	14	41	M	37	Second look arthroscopy
	15	30	F	30	Second look arthroscopy

Period : application time of tourniquet ACL : Anterior cruciate ligament

(2) 血液採取方法

駆血帯は大腿近位に装着し、駆血圧を 350mmHg に設定した。血液採取は手術側と反体側の肘関節の静脈から計 4 回 (A: 駆血帯使用前、B: 駆血帯解除直前、C: 解除 5 分後、D: 翌日) 採血を行った。採血後ただちに 4℃ 800g 10 分間遠心した後、血漿を分離し分析まで -85℃ で保存した。

(3) 血圧測定

血圧は計 2 回 (B: 駆血帯解除直前、C: 解除 5 分後)、手術側と同側の上肢にて計測した。

(4) 試料調整法

血漿 100 μ l をオートクレーブ (圧熱滅菌) したチューブにとり、メタノール 300 μ l を加え 2640 g で 1 分間遠心し除蛋白する。血漿のかわりに蒸留水をブランクとして用いた。濾液の 10 μ l を HPLC カラムに注入した。

(5) クロマトグラフィー

図 1 に示すようにエイコム製の高速液体クロマトグラフ (ENO-10) システムを用いた。血漿中の nitrite と nitrate は逆相系のポリスチレンポリマーをつめたステンレススチールカラム (NO-PAK 長さ 50mm, 内径 4.6mm) により分離した。カドミウム銅をつめた還元カラム (NO-RED) を次に通過させるが nitrite はそのまま通過し、nitrate は通過中に還元し nitrite にした。その後 nitrite は反応コイル中で Griess 試薬と混合し、紫色の色素を生じる。生じた色素の 540nm における吸光度をフローセルを付した分光光度計

(NOD-10)で測定した。Griess 試薬は、5g/lのスルファニルアミドと0.25g/lのN-(1-ナフチル)エチレンジアミンを含む1.25% HClで1分間に0.1mlを流した。溶離液は0.15M NaCl/NH₄Cl 0.5g/l EDTA・4Naを含む10%メタノールで1分間に0.33ml流した。分離、還元カラムと反応コイルは35℃に保った。検量線はnitriteの0.1、0.5、1、2、5 μMとnitrateの6、10、20、40、80、100 μMの濃度を用いた。個々のピーク面積はクロマトパック CR6Aで計算した。

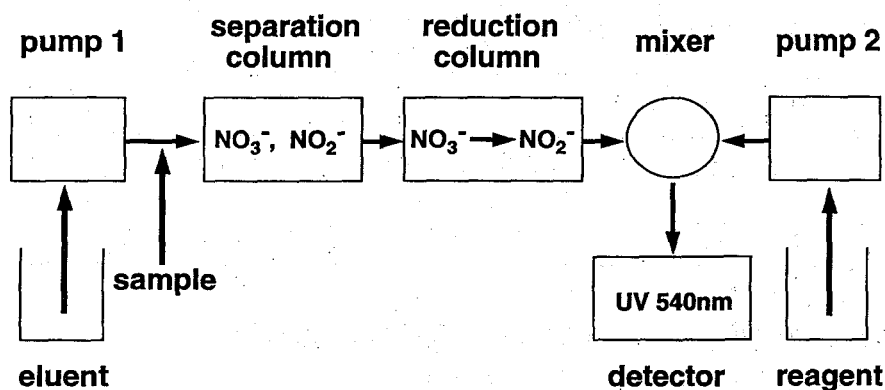


図1 HPLC システム

(6) 統計処理

統計は対応のあるT検定にて行った。p値が0.05以下を統計的に有意であるとした。

3. 結果

症例の血液検査において異常はみられなかった。標準液 (A)、症例の駆血解除直前の血漿 (B)、駆血解除5分後の血漿 (C) から得た nitrite と nitrate を図2に示す。蒸留水からは nitrite と nitrate も検出しなかったが、患者血漿中からいずれも検出した。それぞれの出現時間は nitrite が4.2分、nitrate が7.0分であった。標準の nitrite と nitrate を加えてそれぞれのピークを同定した。2つの標準品のピーク面積と濃度の回帰直線は直線性を示し、相関係数は nitrite が $r=1$ 、nitrate が $r=1$ であった。検出限界はそれぞれ0.3p moleであった。

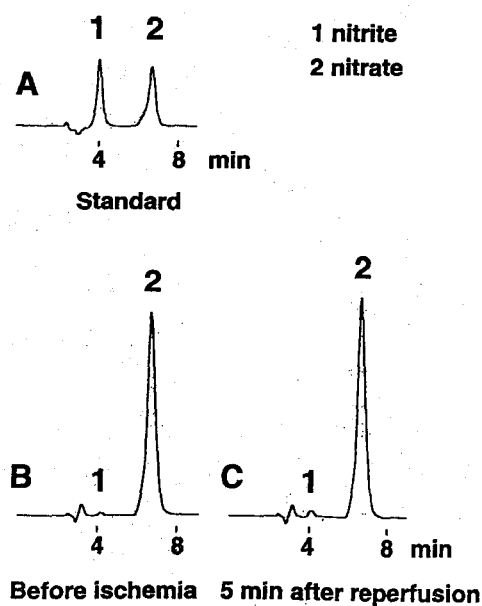


図2 クロマトグラム

症例の血中の nitrite と nitrate を表 2 に示す。nitrite は駆血帯使用前、駆血帯解除直前、解除 5 分後、翌日のそれぞれにおいて各測定値に有意差を認めなかった。nitrate は駆血帯解除 5 分後の計測において他の 3 回と比較して有意な上昇を認めた。

表2 血中一酸化窒素代謝物(NO_2^- , NO_3^-)濃度

	n	A	B	C	D
NO_2^- (μM)	15	0.20 ± 0.06	0.20 ± 0.07	0.21 ± 0.10	0.19 ± 0.06
NO_3^- (μM)	15	21.8 ± 3.9	21.7 ± 3.7	$25.0 \pm 3.4^*$	21.5 ± 4.8

Values are means $\pm$ SD. * ($p < 0.05$).

A: before ischemia B: immediately before reperfusion

C: 5 min after reperfusion D: next day

表 3 は症例を駆血時間により 2 群に分け、駆血解除前と解除後の血圧と NO 代謝物濃度について示している。収縮期血圧については両群とも駆血帯解除前に比べて駆血帯解除 5 分後にやや低下する傾向がみられたが、両群間に有意差は認めない。拡張期血圧においては両群とも駆血帯解除に伴い変動はみられなかった。同様に nitrite と nitrate の合計値について両群において比較すると、両群間に有意差は認めなかった。

表3 2群における駆血帯解除前後の血圧と NO ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) 濃度の変動

		I	II	
Blood pressure (mmHg)	systolic	B	133.1±11.5	129.7±8.3
		C	127.9±10.8	125.4±7.3
	diastolic	B	71.6±10.2	70.5±9.3
		C	70.8±6.8	69.5±6.9
NO ₂ ⁻ +NO ₃ ⁻ (μ M)		B	21.4±4.4	22.4±3.8
		C	25.1±4.9	25.3±2.7

Values are means $\pm$ S.D

I : ischemic time is over 90 min. II : Ischemic time is under 90 min.

B : immediately before reperfusion C : 5 min after reperfusion

において、収縮期血圧が駆血帯解除前は $125 \pm 22 \text{ mmHg}$ から解除 2 分後には $100 \pm 22 \text{ mmHg}$ 、10 分後には $113 \pm 22 \text{ mmHg}$ と低下した報告している。われわれの検討では駆血帯解除 5 分後の収縮期血圧は解除直前に比べて低下の傾向はあるものの、有意な変動ではなかった。また拡張期血圧については、ほとんど変化を認めなかった。この差は遠藤ら¹⁰⁾はより鋭敏な方法で血圧を測定しており、我々よりも駆血帯解除早期の時点で計測しているためと考えられる。

ヒトの駆血帯を用いた手術時の NO 濃度の変動についての報告はない。虚血再灌流時における NO 濃度の変化については、心筋や脳を使用した実験において虚血早期や再灌流時に NO 濃度上昇することが報告^{11, 12)}されている。Malinski ら¹³⁾は、ラットを使用して中大脳動脈の閉塞を行い、電極装置を用いて NO 産生変動を検討している。動脈閉塞後数分から NO 産生は上昇し、30~86 分後には徐々に減少し、再灌流後に徐々に上昇したと初めて連続的な定量を行った。今回の検討の範囲では NO 濃度は虚血だけでは変化がみられず、再灌流により有意な上昇がみられた。これは今回ヒトにおいて虚血時間が安全とされている時間内で検討したためであり、さらに長い虚血時間であれば変動していた可能性もあると思われる。また、動物とヒトで違いが関連している可能性もあると思われる。

虚血再灌流時に NO 産生が増大する機序は十分には解明されていないが、以下の要因が推測されている。まず虚血再灌流時には細胞内カルシウム濃度の上昇によりカルシウム依存性構成型 NO 合成酵素 (constitutive NO synthase: cNOS) が活性化される。一方、再灌流に伴いサイトカイン等の産生を介してカルシウム非依存性誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO synthase: iNOS) が活性化される。以上の過程で産生された NO は O_2^- と反応して強力な酸化剤である ONOO⁻ (peroxynitrite) に変化し、ONOO⁻ は細胞膜の脂質過酸化を起こし、さらに反応性の高い $\cdot\text{OH}$ を発生する。このラジカル種は細胞傷害性が高く透過亢進し、虚血再灌流時にみられる浮腫を発生させる考えられている¹⁴⁾。我々は¹⁵⁾は阪神・淡路大震災において発生した挫滅症候群の患者の血中 NO を測定し、対照群と比較して nitrate が有意に上昇しており、BUN および Cr が NO 代謝物 (nitrite + nitrate) と正の相関を示し、腎機能障害が強い症例ほど血中 NO 代謝物濃度が高く、腎機能障害発生に NO 代謝物が関与している可能性を報告している。

このように虚血再灌流傷害において NO が重要な役割をなしている事が報告されているが、実際に虚血再灌流障害を軽減させるために NO の役割については未だ議論の別れるところである。NO の前駆物質である L-arginine の投与を行うと再灌流障害が軽減されたとする報告¹⁶⁾や、一方 NO 合成阻害剤である N^G-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) により再灌流傷害を軽減された報告⁶⁾もある。このように虚血再灌流時における NO の役割については細胞傷害性と保護作用の相反する結果が得られている。これは実験動物、実験系、投与薬剤の種類や量などが異なる可能性が推測されているが、NO の虚血再灌流時の役割については今後さらなる解明が必要と思われる。

以上のように駆血解除に伴う生体の諸変化と NO が重要な役割を演じている可能性が示唆された。しかし、虚血再灌流時に生じる NO の機序については未だ不明な点もあり、今後は虚血再灌流障害の治療法も含めてさらに検討の必要があると思われる。

参考文献

- 1) 水野耕作: 阪神大震災 (兵庫県南部地震) その発生から圧挫症候群まで一神戸大学医学部整形外科学教室の目を通して、整形外科, Vol. 46, pp. 515-523, 1995.
- 2) Bywaters EGL, Beall D: Crush injuries with impairment of renal function, Br Med J, Vol. 1, 427-432, 1946.
- 3) Sheng ZY: Medical support in the Tangshan Earthquake: A review of the management of mass casualties and certain major injuries, J Trauma, Vol. 27, 1130-1135, 1987.
- 4) Reiss ND, Michaelson M: Crush injury to the lower limb, J Bone Joint Surg, Vol. 68A, 414-418, 1986.
- 5) 横田順一朗: Crush syndrome, 日外傷会誌, Vol. 10: 71-80, 1996.
- 6) Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD, Haybron DM, Young HH, Ignarro L: Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial re-oxygenation injury, Am J. Physiol, Vol. 262: 616-620, 1992.
- 7) Nakanishi K, Vinten JJ, Zhao Z, Fowler WC, McGee S, Johnston WE: Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size, Am J Physiol, Vol. 263, 1650-1658, 1992.
- 8) Lynn AM, Ficher T, Brandford HG, Pendergrass TW: Systemic responses to tourniquet release in children, Anesth analg. Vol. 65, 865-872, 1986.
- 9) Modig J, Kolstad K, Wigren A: Systemic reactions to tourniquet ischemia, Acta Anesth Scand,

Vol. 22, 609-614, 1978.

10) 遠藤拓男、土居修司、松宮直樹、田中 誠、内藤裕史、福林 徹: 空気駆血帯の呼気炭酸ガス濃度、筋内圧の変化, 臨床麻酔, Vol. 12, 1649-1651, 1988.

11) Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Komamura K, Minamino T, Tada M, Inoue M, Hori M, Kamada T: Plasma nitric oxide endproducts are increased in the ischemic canine heart, Biochem Biophys Res, Commun. 211, 370-374, 1995.

12) Nagafuji T, Sugiyama M, Matsui T: Temporal profiles of Ca^{2+} /calmodulin-dependent and independent nitric oxide synthase activity in the rat brain microvessels following cerebral ischemia, Acta Neurochir, Vol. 60, 285-288, 1994.

13) Malinski T, Radomski MW, Taha Z: Nitric oxide measured by porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion, J Cereb Flow Metab, Vol. 13, 355-358, 1993.

14) 長藤寿昭、松居徹: NO産生増大による虚血脳損傷, 実験化学 13, 127-135, 1995.

15) Adachi J, Morita S, Yasuda H, Miwa A, Ueno Y, Asano M, Tatsuno Y: Elevated plasmanitritate in patients with crush syndrome caused by the Kobe earthquake, Clin Chim Acta Vol. 269, 137-45, 1998.

16) Nakanishi K, Zhao ZQ, Vinten JJ, Hudepeth DA, McGee DS, Hammon JW: Blood cardioplegia enhanced with nitric oxide donor SPM-5185 counteracts postischemic endothelial and ventricular dysfunction, J Thorac Cardiovasc. Surg, Vol. 109, 1133-1140, 1995.

筆者: 1) 八木正義、医学部 整形外科、研究生; 2) 足立 順子、医学部 法医学、助手; 3) 龍野 嘉紹、医学部 法医学、教授; 4) 三枝 康宏、医学部 整形外科、講師; 5) 水野耕作、医学部 整形外科、教授