



Change in nitric oxide in humans due to application of a pneumatic tourniquet

八木, 正義

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1999-01-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2289

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002289>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	やぎ まさ よし 八 木 正 義	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医 学）	
学位記番号	博ろ第1662号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成11年1月13日	
学位論文題目	Change in nitric oxide in humans due to application of a pneumatic tourniquet (虚血再灌流モデルとしての駆使帯装着によるヒト血中一酸化窒素(NO)の変動)	
審 査 委 員	主査 教授 水 野 耕 作 教授 龍 野 嘉 紹	教授 石 井 昇

論 文 内 容 の 要 旨

1. 緒言

平成7年1月17日に発生した阪神・淡路大震災では崩壊した建造物や家具によって四肢や体幹に圧迫を受け、腎機能障害やショック症状を特徴とする挫滅症候群が多発した。本症候群は救出直後は軽症にみえても以後急速に症状が悪化することから、虚血再灌流障害が一因をなしていると推測されている。虚血再灌流障害とは心筋梗塞、脳梗塞および四肢の再接着などの際に再灌流により障害がさらに悪化する現象で、近年、その発症には一酸化窒素（nitric oxide: NO）が関与している事が注目されている。そこで今回は、人為的な虚血再灌流のモデルとして駆血帯を使用した手術における血中 NO 代謝物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

対象

駆血帯を使用して下肢の手術を受けた15症例を対象とした。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。手術内容は膝前十字靱帯再建術6名、半月切除術6例、膝関節授動術2名、膝関節全置換術1名であった。駆血帯は大腿近位に装着し、使用圧は350mmHgに設定した。駆血帯の使用時間は30～137分（平均85.5分）であった。

方法

駆血帯使用前、駆血帯解除直前、解除5分後、および翌日の計4回、手術対側の正中肘静脈より血液を採取した。遠心を行った後、血漿を分離し分析まで-85℃で保存した。血漿100μlをオートクレーブしたチューブにとり、メタノール300μlを加え2640gで1分間遠心し除蛋白した後、上清10μlを高速液体クロマトグラフ（以下液クロ）に注入しNO代謝物濃度を測定した。液クロのカラムによりNO₂⁻とNO₃⁻に分離した後、NO₂⁻は還元カラムをそのまま通過させ、NO₃⁻はカラム通過中に還元しNO₂⁻にした。その後NO₂⁻は Griess 試薬と混合し紫色の色素を生じ、この色素の540nmにおける吸光度を分光光度計で測定を行った。Griess 試薬は、5 g/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 0.5

g/EDTA・4 Na を含む10%メタノールで1分間に0.33ml 流した。なお分離および還元カラムと反応コイルは35℃に保った。

また、駆血帯解除直前と駆血帯解除5分後の計2回、手術同側の上肢で血圧測定を行った。

3. 結果

試料を液クロに注入すると、 NO_2 のピークは4.2分に、 NO_3 は7.0分に出現した。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 NO_3 濃度はそれぞれ、 21.8 ± 3.9 , 21.7 ± 3.7 , 25.0 ± 3.4 , 21.5 ± 4.8 (μM) と、駆血帯解除5分後において他の測定値と比較して有意な上昇を認めた。これに対し NO_3 と同様の時間の NO_2 濃度はそれぞれ、 0.20 ± 0.06 , 0.20 ± 0.07 , 0.21 ± 0.10 , 0.19 ± 0.06 (μM) であり、各測定間に有意差を認めなかった。

次に駆血帯の使用時間によってNO代謝物濃度や血圧の変動に影響があるかを検討するため、駆血帯使用時間が90分以上の群をI群(7人)、90分未満をII群(8人)とし比較を行った。I群では駆血帯解除直前および解除5分後のNO($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$)代謝物濃度は、それぞれ 21.4 ± 4.4 , 25.1 ± 4.9 , (μM) であり駆血帯解除に伴い上昇する傾向がみられ、II群でもそれぞれ、 22.4 ± 3.8 , 25.3 ± 2.7 (μM) と同様に上昇する傾向がみられたが、両群間で駆血帯解除に伴うNO代謝物濃度の変動率に有意差を認めなかった。血圧も同様に両群で比較すると、両群間とも収縮期血圧については駆血帯解除に伴い低下する傾向がみられたが両群間に有意差は認めない。また拡張期血圧についても、両群間とも駆血帯解除に伴う有意な変動は認めなかった。

4. 考察

駆血帯を使用した手術においては駆血帯解除に伴い血圧の低下、心拍数や血清カリウムの上昇、アシドーシスなどの全身性の変化が報告されている。今回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。これは、今回の検討が駆血帯解除5分後での計測のみであり、より早期の時点の測定を追加すれば有意な変動が認められた可能性があると思われる。

一酸化窒素(NO)は様々な臓器で産生され多彩な生理活性を示すことから、各臓器での恒常性維持や病態への関与に関して注目され、近年、虚血再灌流障害においてもNOの関与が注目されている。脳、心筋および肝臓などを使用した動物実験においても虚血再灌流時のNO濃度が上昇することが報告されているが、ヒトにおける虚血再灌流時のNO濃度の変動についての報告は少ない。今回、私はヒトにおける虚血再灌流時のNOの変動を調べるために、人為的な虚血再灌流モデルとして駆血帯使用時の血中NO代謝物濃度の変動について調べた。

今回の検討の範囲では血中NO代謝物濃度は虚血時には有意な変動がみられず、駆血帯解除に伴う再灌流時に有意な上昇がみられた。駆血帯解除に伴うNO代謝物濃度の上昇率と駆血時間においては、有意な相関がみられなかったが、これは生体において安全とされている時間内で検討であることや、関節鏡を使った侵襲の小さい手術が多かったために生じた結果である可能性があり、さらに長い虚血時間や筋肉に高度の侵襲を加える手術であれば結果が異なっていた可能性もある。虚血再灌流時のNO産生の機序について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。虚血再灌流時に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。これらのNO合成酵素の活性化によりNOの産生が増大すると推測される。

このように虚血再灌流障害において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の 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や、一方 NO 合成阻害剤である NG-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) により再灌流障害が軽減された報告もある。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は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。

以上のように駆血帯を使用した手術において駆血帯解除に伴い血中の NO 代謝物の増大が認められた。しかし虚血再灌流時に生じる NO 産生の機序については未だ不明な点もあり、今後その治療法も含めてさらに検討の必要があると思われる。

5. 結論

1) 駆血帯を使用した手術において血中 NO 代謝物濃度および血圧の測定を行ったところ、駆血帯解除 5 分後の血圧は駆血帯解除直前に比べて有意な変動は認めなかった。

2) 駆血帯解除 5 分後の測定において、駆血帯解除直前に比べて血中 NO 代謝物濃度の有意な上昇がみられた。

論文審査の結果の要旨

はじめに

阪神淡路大震災の際に発生した挫滅症候群は多くの不幸をもたらした。この挫滅症候群は家具や建造物の下敷きになった四肢や体幹が一時的に虚血状態になり、助けられたのちに血液の再灌流により生じる。腎機能障害やショック症状を特徴としてしばしば生命を奪われるという恐怖を伴う傷害である。しかし、その原因は未だに不明であるが、それは実験モデルの作成が困難なことも原因している。今回人体の研究において、最もこれに近いと考えられる、手術中に四肢を駆血帯により止血し、終了後に駆血帯を除去する状態で研究した。挫滅症候群の発生には一酸化窒素（以下 NO）が関与するといわれているが、駆血帯により止血され再灌流された四肢の血中 NO 代謝物濃度を測定して、NO のこの傷害に関する影響を研究した。

対象と方法

駆血帯を使用して手術した15症例を対象とした。平均年齢は26.9歳である。駆血帯の使用圧は350 mmHg に設定した。駆血帯の使用時間は平均85.5分である。

方法として駆血帯使用前、解除直前、解除 5 分後および翌日の計 4 回手術反対側の正中肘静脈より採取した。遠心後、血漿100μl にメタノール300μl を加え2640g で 1 分間遠心し除蛋白した後に上清10 μl を高速液体クロマトグラフに注入し NO 代謝物を測定した。NO₂と NO₃⁻を分離した後に、NO₂は還元カラムをそのまま通過させ、NO₃⁻はカラム通過中に還元して NO₂⁻にした。その後 NO₂⁻は Griess 試薬と混合し紫色の色素を生じるのでこれを分光光度計で測定した。

結果

試料を液クロマトグラフに注入すると、NO₂⁻のピークは4.2分に、NO₃⁻は7.0分に出現した。駆血帯使用前、解除直前、解除 5 分後および翌日の NO₂⁻濃度は、21.8±3.9, 21.7±3.7, 25.0±3.4, 21.5±4.8 (μM) と駆血帯解除 5 分後に有意に上昇した。NO₃⁻では有意な差は生じなかった。つぎに、駆血帯の使用時間による差を検討した。駆血帯使用時間90分以上と未満に分けて比較した。90分以上群ならびに90分未満群のいずれでも解除 5 分後に上昇の傾向がみられた。しかし、統計学的には

有意な差ではなかった。

考察

駆血帯解除に伴い、血圧の低下、心拍数や血清カリウムの上昇、アシドーシスなどの変化が報告されている。NOは様々な臓器で、恒常性の維持あるいは病態への関与などが注目されている。近年、虚血再灌流障害においてもNOの関与が注目され、動物実験において再灌流時にNO濃度が変動することを報告している。しかし、ヒトについての報告は少ない。本研究においては、虚血時には、NO代謝物濃度の変化は見られず、駆血帯除去にともなう再灌流時に有意に上昇している。したがって、虚血再灌流が挫滅症候群の発生に有意に関係していることが予測できる。

結語

本研究は不幸な結果をもたらした挫滅症候群の発生原因を追求するために行われた研究であるが、NOが有意に上昇することを解明したものである。それが如何に関与するのは今後の問題であるが、従来ほとんど検討されなかったヒトにおける挫滅症候群の一因がNO代謝物の上昇にある点を解明したものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。