

ラット体外循環慢性期モデルの確立に向けた基礎研究

藍野大学 医療保健学部 臨床工学科

三室 統麻

要旨

現在、大動物を用いた実験は継続が困難な状況である。これまで我々はラット体外循環における急性期モデルの研究を行ってきたが、遠隔予後に対して限界があるため慢性期モデルを確立する必要がある。術式の変更を行い出血量の軽減を図った。さらに長期生存には経口挿管が必要となり、挿管に適した留置針の検証を行った結果 14 G が最も適していると判断された。また術式の変更により出血量が 1/3 に改善され長期生存に寄与するものと期待される。

1. 背景

現在各研究施設において多くの動物実験が行われている。しかし動物愛護および価格高騰などの観点から、大動物を用いた実験は継続が困難な状況となりつつある 1)。体外循環に関する研究は、これまで大動物が主流であったが、今後実験を継続的に行うためには小動物（ラット、ウサギ等）による実験系が必要となる 2,3)。当研究室では、これまでラットを用いた体外循環における急性期モデル（実験後直ちに死亡する）の研究を行ってきた 4-6)。しかし、遠隔予後に関しての限界があり、さらに研究の方向性を拡大させるとともに信頼性を向上させるため、慢性期実験モデル（実験後 1 か月以上生存する）を確立する必要がある。

2. 研究目的

本研究は、ラット体外循環慢性期モデル確立のため、体外循環直前の条件を検証することを目的とする。

3. 研究方法

3-1 動物

本研究は、藍野大学動物実験委員会の承認を受けて行われた（第 10D-23013 号）。また全ての手順は、動物管理のための国立衛生研究所ガイドライン標準に沿って行われた。

3-2 外科的手技

実験には、(Sprague Dawley) SD ラット（オス、300~500 g n=3）が用いられ、専用 BOX に酸素 1 L/min イソフルラン 5%を吸入させ、全身麻酔を導入した。ラットを仰臥位で固定し局所麻酔として 2%キシロカインを声帯に滴下、分泌物は適宜吸引ポンプを用いて除去した。ヒト用の気管チューブには固定を目的としたバルーンが具備されているが、留置針外筒には存在しない。そのため声帯 (Vocal cord) を目標に直視下で各気管チューブ 3 種類 (14 G, 16 G, 18 G 留置針外筒) を挿入し適正なサイズの検証を行った (図 1, 図 2)。

気管挿管終了後、ラットを仰臥位で固定し、小動物用人工呼吸器を用いて一回換気量 6~10 ml/kg, 呼吸回数 60 b/min, 酸素濃度 100 %の条件下で呼吸管理を行った。さらにモニタリングとして心電図電極と直腸温度プローブを装着した。

次にラットの頸部正中右辺に 1.5 cm の小切開を施し，右総頸動脈を剥離した後，送血管（外径 1.1 mm polyethylene tube）を挿入した．さらに，右内頸静脈より 18 G 留置針外筒を用いて右心房に脱血管を留置した．その後，送血ラインより全身 heparin 化（5.0 mg/kg）を行い体外循環開始可能とした．実験配置図を(図 3, 図 4)に示す．

3-3 評価項目

各気管チューブに対して一回換気量を変化させた 15 分後に採血を行い，動脈血酸素分圧（PaO₂），動脈血二酸化炭素分圧（PaCO₂）を測定した．本来，PaO₂は酸素濃度により規定されるが，換気量によるオートピープを合わせて検証する目的で測定された．さらに長期生存のマイナス因子である出血に関しては，気管切開および胸骨縦切開を伴わない手技を用い，各時点（挿管時，送血管挿入時，脱血管挿入時）における出血量をガーゼの重量（g）で計測し，これまでの急性期モデルと比較した．

4. 研究結果

全症例において，手術時間，中枢温，酸塩基平衡に有意な差は認められなかった．

4-1 動脈血酸素分圧

肺の酸素化能を検証する目的で動脈血酸素分圧を測定した．各測定時における酸素濃度は 100%，設定呼吸回数 60 b/min で一定であった．結果，14 G における各 1 回換気量（6, 7, 8, 9, 10 ml/kg）での平均値は，それぞれ 324±18, 338±11, 355±12, 364±7, 381±9 mmHg であった．16 G における平均値は，それぞれ 301±17, 319±18, 329±15, 334±8, 349±5 mmHg であり，18 G は，それぞれ 277±3, 290±6, 316±7, 327±3, 340±7 mmHg であった．実験結果を(図 5)に示す．

4-2 動脈血二酸化炭素分圧

一回換気量の評価を行う目的で，動脈血二酸化炭素分圧の測定を行った．各測定時における酸素濃度は 100%，設定呼吸回数 60 b/min であった．結果，14 G における各 1 回換気量（6, 7, 8, 9, 10 ml/kg）での平均値は，それぞれ 44.5±1.7, 40.8±2.0, 38.4±2.8, 33.8±4.0, 30.7±2.0 mmHg であった．16 G における平均値は，それぞれ 48.9±1.3, 44.3±1.0, 40.4±1.0, 36.8±0.6, 35.0±0.2 mmHg であり，18 G は，それぞれ 65.6±6.0, 60.0±3.1, 54.2±3.9, 50.5±2.6, 44.4±2.5 mmHg であった．実験結果を(図 6)に示す．

4-3 出血量

従来の急性期モデルと慢性期モデル両者における各時点（気管挿管時，送血管挿入時，脱血管挿入時）での出血量を示す．急性期モデルにおける各時点の総出血量は，それぞれ 1.3±0.3, 2.3±0.3, 6.0±0.4 g であった．慢性期モデルにおける各時点の出血量は，それぞれ 0±0, 0.9±0.2, 1.7±0.3 g であった．実験結果を(図 7)に示す．

5. 考察

第一に，各気管チューブにおける酸素化能を評価する目的で，それぞれの一回換気量で PaO₂の計測を行った．結果より，14 G では 324±18 から 381±9 mmHg, 16 G では 301±17 から 349±5 mmHg, 18 G では 277±3 から 340±7 の範囲内であった．これらより，今回使用した 3 種類の気管チューブは全て肺の酸素化能を保つために適したサイズであったと考えられる．

第二に、一回換気量を評価する目的でPaCO₂を測定した。結果、14Gでは30.7±2.0から44.5±1.7 mmHg, 16Gでは35.0±0.2から48.9±1.3 mmHg, 18Gでは44.4±2.5から65.6±6.0 mmHgの範囲内であった。14Gと16Gでは大きな差異が見られないが、18Gでは約1.5～2.0倍の高値となった。これらから、18Gではリークが発生して十分な換気が得られず、呼吸管理は困難であると考えられる。また実験中の自然抜去を考慮し、より径の大きい14Gが最適であると考えられる。

最後に、両者の出血量を計測した結果、急性期および慢性期における最大出血量はそれぞれ6.0±0.4 g vs 1.7±0.3 gとなり、慢性期モデルでの最大出血量は急性期モデルに対して約1/3の低値を示した。これらは全身へパリン化での胸骨縦切開が急性期モデルの主な出血原因であったと考えられる。

● Limitation

今回一回換気量に対する肺のガス交換評価について不完全な部分があるため、今後体外循環を併用した場合、再度気管チューブの適正について検証する予定である。

6. 結語

今回、ラット体外循環慢性期モデルを確立する目的で、体外循環開始直前の適正条件を検証した。結果、大量出血に繋がる胸骨縦切開を伴わない術式および経口挿管には14G留置針外筒が有用であった。

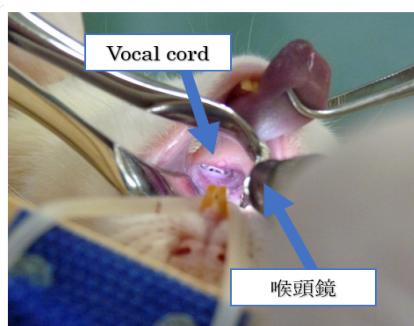


図1 喉頭展開により確認される声帯

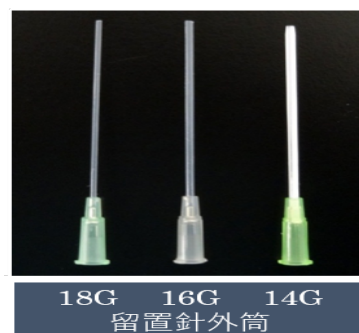


図2 各種(18G・16G・14G)留置針外筒

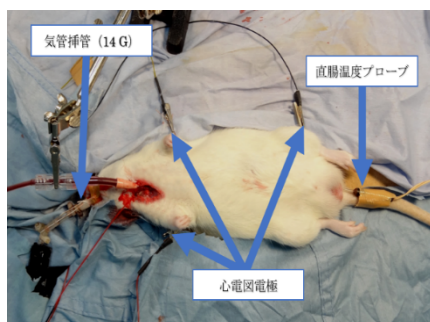


図3 実験配置図

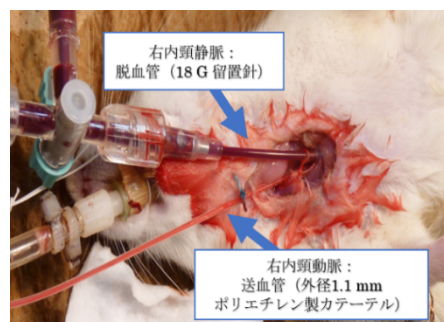


図4 カニューレーション位置

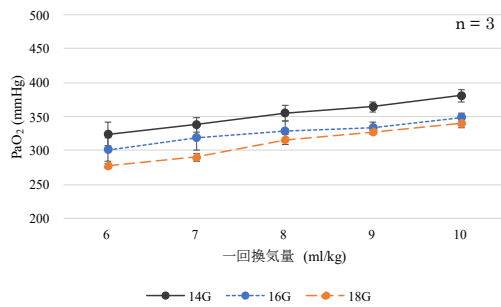


図5 各留置針における酸素化能 (PaO₂)

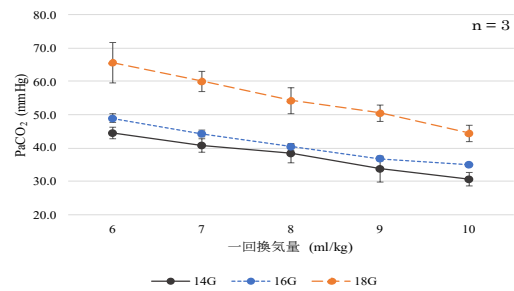


図6 各留置針における一回換気量の評価 (PaCO₂)

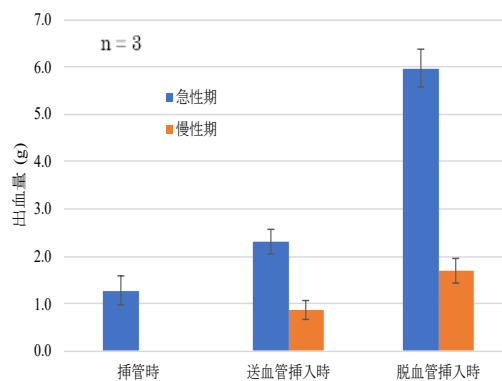


図7 各時点における急性期と慢性期の出血量

文献

- [1] Post S.G.: Baboon livers and the human good. Arch. Surg, 128, pp. 131-133, 1993, doi:10.1001/archsurg.1993.01420140008001.
- [2] Fellery de Lange, Yoshitani K., Mihai V.P., et al.: A novel survival model of cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass in rats, a methodology paper. Journal of Cardiothoracic Surgery, 3 (51), 2008.
- [3] Modine T., Azzaoui R., Fayad G., Lacroix D., et al.: A recovery model of minimally invasive cardiopulmonary bypass in the rat. Perfusion, 21, pp. 87-92, 2006, doi:10.1191/0267659106pf854oa.
- [4] Hamamoto M., Suga M., Nakatani T., Takahashi Y., Sato Y., Inamori S., Yagihara T., Kitamura S.: Phosphodiesterase type 4 inhibitor prevents acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in a rat model. Eur J Cardiothorac Surg, 25 (5), pp. 833-838, 2004, doi:0.1016/j.ejcts.2004.01.054.
- [5] Fujii Y., Shirai M., Inamori S., Shimouchi A., Sonobe T., Tsuchimochi H., Pearson J.T., Takewa Y., Tatsumi E., Taenaka Y.: Insufflation of hydrogen gas restrains the inflammatory response of cardiopulmonary bypass in a rat model. Artif Organs, 37 (2), pp. 136-141, 2013, doi:10.1111/j.1525-1594.2012.01535.x.
- [6] Inamori S., Shirai M., Yahagi N., James T.P., Fujii Y., et al.: A comparative study of cerebral microcirculation during pulsatile and non-pulsatile selective cerebral perfusion: assessment by synchrotron radiation microangiography. Comparative Study, ASAIO J., 59 (4), pp. 374-379, 2013, doi: 10.1097/MAT.0b013e3182976939.

指導教員

藍野大学 医療保健学部 臨床工学科

稲盛 修二