

Fig. 1 Absorption spectra of Hb solution and HbV measured with or without an integrating

測定している。赤血球を界面活性剤添加により破壊して測定する場合、Hb小胞体の脂質二分子膜は赤血球膜よりも耐性があるため、測定が阻害されることを以前報告した。また、赤血球を非破壊的に測定する方法(例えばパルスオキシメータ)においても、Hb小胞体が血中に存在すると、二波長パルスオキシメータ(日本光電製)では酸素飽和度が実際よりも低く測定されることが明らかにされた。この対処法としては、二波長を四波長とし、プログラム変更することで対処できる(須崎ほか, 多波長パルス分光法を用いたHb小胞体用パルスオキシメータに関する研究. *人工血液*, 16, 198-204 (2008))。また、最近日本で臨床認可された多波長(七波長)パルスオキシメータ(マシモ社製)を用いると、Hb小胞体を投与した後も酸素飽和度とmetHbレベルが精度高く測定できることを家兎による実験で明らかにした。しかし、HbCOレベルの測定には誤差があり、光散乱の影響をさらに排除することが課題として残った。

近年、患者への侵襲を抑えるため非接触型の積

分球式反射型パルスオキシメータが試験的に開発されている。この装置はHb小胞体による光散乱の影響を低減させるためは有効であると思われる。そこで本研究では、まずHb小胞体の紫外可視吸収スペクトルにおける光散乱の影響を明らかにするため、積分球を用いたスペクトル測定を行い、分光学的に詳細な検討を行った。

B. 方法

1. Hb小胞体、Hb溶液

Hb小胞体(HbV, Oxy体; [Hb] = 10 g/dL)をリン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH 7.4)で希釈し、0.02 g/dLとした([heme] = 12.4 μ M)。また精製ヒトHb溶液(CO体, 40 g/dL)をPBSで希釈して0.02 g/dLとし、酸素ガス気流下、可視光照射によってHbO₂体とした。それぞれ5 mLを石英製二面キュベット(光路長: 1 cm)に入れ、ゴムキャップで密栓した。

2. 紫外可視吸収スペクトル測定

測定装置は、日本分光社製JASCO V-650を用い、

積分球装置 (ISN-470) を取り付けて測定した。酸素が結合したOxy体の測定、また窒素ガス通気を約5分間行い、酸素を完全に除去し、deoxy体の測定を行なった。

C. 結果および考察

積分球を使用していない条件で測定したHbVのスペクトルは、短波長側ほど吸光度が高く、300 nm付近ではSoret帯の吸高度を上回った(Figure 1)。これはHbV粒子による光散乱の影響である。積分球を使用することにより、その影響は大幅に低減され、スペクトルはかなりHb溶液に近づいたが、完全には一致していない。これはキュベットの光路長が1 cmと長いため、積分球が隣接しているにもかかわらず、散乱光を完全には集光できていないことによる。最大吸収波長(λ_{max})を比較したところ(Table 1)、HbVのSoret帯の λ_{max} 値には若干(~3 nm)の赤方シフトが見られた。これは光散乱によりベースラインが高くなり、特に短波長側でピーク位置にずれが生じたためと考えられる。Q帯 λ_{max} 値の差は、半値幅が広く、モル吸光係数が小さいピーク形状に基づく誤差と言ってよい。Deoxy-HbVのQ帯は明確でなく、ショルダーとして認められるに過ぎなかったが、積分球を使用することにより、 λ_{max} 550 nmにピークが検出され、Hb溶液のスペクトルに近いものとなった。

Table 1. HbVおよびHb溶液の λ_{max}

試料	λ_{max} (nm)
O ₂ -HbV	418, 540, 576
O ₂ -HbV(積分球)	417, 542, 576
O ₂ -Hb溶液	415, 541, 576
O ₂ -Hb溶液(文献値)*	415, 541, 576
Deoxy-HbV	432, (shoulder)
Deoxy-HbV(積分球)	430, 551
Deoxy-Hb溶液	430, 554
Deoxy-Hb溶液(文献値)*	430, 555

*E.E. Di Iorio, *Methods Enzymol.* 76, 57-87 (1981).

今回の実験は、キュベットを用いた通常の分光測定における検討であったが、光散乱の影響は、①特に短波長域で顕著であること、②積分球の利用によりこれを低減できることが明確となった。パルスオキシメータは、拍動のある末梢血管、つまり細動脈での酸素飽和度を計測する装置であり、透過性の高い近赤外領域のレーザーを利用している。多波長計測にはより短波長のレーザーが必要で、その場合には積分球式反射型パルスオキシメータの活用が有効であると期待される。

2. 出血性ショック蘇生における再灌流障害の低減に関する検討

A. 研究目的

出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流を伴う。虚血状態では細胞内ATPが代謝されヒポキサンチンとなり、これが組織内に高濃度で蓄積する。また、マクロファージが活性化されて炎症性サイトカインを産生し、これに応答して好中球などが遊走される。各種接着因子も誘導され、好中球は血管内皮細胞に接着、血管外組織にまで浸潤する。このような状態で再灌流により酸素が供給されると、まずキサンチンオキシダーゼの作用により活性酸素が発生する。さらに、好中球細胞膜にあるNADPH-オキシダーゼも大量の活性酸素を産生する。従って、急激な酸素供給は再灌流傷害を助長する可能性がある。通常の医療処置では、まず生理食塩水やリンゲル液などの晶質液を投与し、その後コロイドの投与や輸血へと移行する。また、外傷部位の止血が施される前に血圧を正常値に戻すと出血が促進され、却って死亡率を増大させることがあるので、血圧を低く保つHypotonic resuscitationが行われる。つまり、人工赤血球(酸素運搬体)を用いる出血性ショックからの蘇生については、単なる酸素供給の観点のみならず、後続する障害についても充分考慮した対応が求められる。内因性のCOが情報伝達分子として極

めて重要な役割を果すことも明らかにされているが、COの抗炎症作用も興味深い。実際にCOを結合したHb小胞体(CO-HbV)を出血性ショック状態のラットに投与すると、蘇生6時間後に細胞保護効果が得られることを見出している。そこで本研究では、同一実験モデルを用い、酸素輸液のみならず晶質液を投与し、6時間後の肝機能パラメータを評価した。

B. 研究方法

1. 蘇生液

蘇生液としては、生理食塩水(大塚製薬製、Saline)、リコンビナントアルブミン溶液(5wt%, rHSA)、Hb小胞体をrHSAに分散させたもの(HbV/rHSA, [Hb]=10g/dL)、脱血液(SAB)、洗浄したラット赤血球をrHSAに再分散させたもの(wRBC/rHSA)、一酸化炭素(CO)を結合したHbV(HbV-CO/rHSA)およびwRBC(wRBC-CO/rHSA)、またHbを内包しない空の小胞体をrHSAに分散させたもの(EV/rHSA)とした。Saline群については、脱血量の2~3倍量を投与した。その他については、脱血量と同量を投与した。wRBCの調製にあたっては、採血から投与試験に用いるまでの所要時間は、3時間以内とした。

2. 出血性ショック蘇生試験

実験法は既報(Sakai et al., *Crit. Care Med.* 33, 806-12 (2004))に従った。Wistar rat(約250g, ♂)にsevoflurane(1.5%)を吸入させ麻酔状態とし、自発呼吸を維持した。頸動脈、頸静脈にカテーテルを留置した。ラットの全血液量を56 mL/kgと仮定し、28 mL/kg(約8.4 mL/匹)を1 mL/minの速度で頸動脈より脱血した。脱血後15分間放置してから試料を頸静脈から投与した[rHSA (n=4)、EV/rHSA (n=7)、HbV/rHSA (n=7)、HbV-CO/rHSA (n=9)、wRBC/rHSA (n=9)、SAB (n=7)、saline (n=7)、wRBC-CO/rHSA (n=9)]。投与後6時間まで血行動態、血液ガス組成を観察。測定ポイントは、脱血前、脱血後、投与直後、0.5、1、3、6時間後とした。計測終

了後直ちに開腹し下大静脈から血液6 mLを採取、採血管に取り遠心分離または超遠心分離により透明血漿を得て、血液生化学的検査を実施した(BML社依頼)。本研究では、肝機能の反映項目としてALT、AST、LDHについて注目した。

C. 結果

血圧、血液ガス組成については、酸素を運搬するHbV/rHSA、wRBC/rHSA、SAB群、またCOを結合したHbV-CO/rHSA、wRBC-CO/rHSA群はともに同等の推移を示した。平均血圧は脱血前には約100 mmHgであったが、脱血後には約30 mmHgまで低下した。投与直後には85~90 mmHgに回復、その後6時間は80 mmHg付近を推移した。血液ガス組成については、脱血後に代償機能によるPaO₂の上昇、PaCO₂の低下、またpHの低下と乳酸値の上昇が見られた。蘇生液の投与直後に、両群ともPaO₂、PaCO₂が初期値にまで回復した。pHは投与直後に最低値を示した。また乳酸値も投与直後の回復はなかったが、1時間後には初期値に回復し、6時間後まで推移した。pH、乳酸値の回復の遅れは、投与直後に末梢微小循環が回復に向い、蓄積していた代謝産物がwash outされたために見られる現象と判定した。rHSA群では死亡例があった。EV/rHSA群は全例が生存し、蘇生直後に血圧が脱血前値にまで回復したが、3時間後には低下し始めた。Saline群では全例が生存したが、血圧は低い値を推移し、6時間後でも約60 mmHgであった。血行動態と血液ガス組成を見る限りにおいては、酸素運搬機能を有する蘇生液あるいはそのCO結合体が回復を早め、6時間安定に推移した。

6時間経過後の血中AST、ALT、LDH値をFigure 2に示す。酸素運搬機能を有する蘇生液の投与により、これら酵素濃度は増大したが、酸素運搬機能を持たない蘇生液、ならびにCO結合体の投与では、酵素濃度は比較的低い値となった。

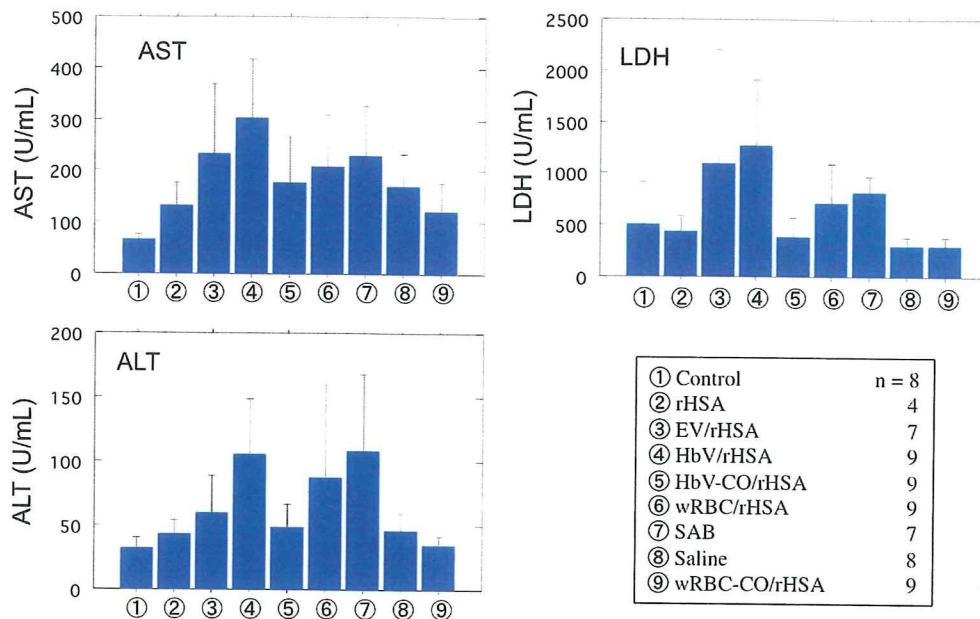


Figure 2. Plasma enzyme levels (AST, ALT, and LDH) 6 hr after resuscitation. Mean±SD.

D. 考察

出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流を意味し、活性酸素の産生による様々な障害、いわゆる虚血再灌流障害、さらには多臓器不全に繋がる可能性がある。一般的に虚血状態では細胞内ATPが代謝されてヒポキサンチンとなり、これが組織内に高濃度で蓄積する。再灌流により酸素が供給されると、キサンチンオキシダーゼの作用により活性酸素(スーパーオキシド)が多量に発生する。また、マクロファージが活性化されて炎症性サイトカインを産生し、これに応答して好中球などが遊走される。各種接着因子も誘導され、好中球は血管内皮細胞に接着し、さらに血管外組織にまで浸潤する。このような状況下で急激に酸素が供給されると、好中球細胞膜にあるNADPH-オキシダーゼが大量の活性酸素を産生する。つまり出血性ショックに対する輸血は、初期の状態においては生体に対し酸素を過剰に供給して活性酸素の産生を促し、虚血再灌流障害を助長させる可能性があるのである。今回観測された血中酵素濃度(AST、ALT、LDH)の増大は、この虚血再灌流傷害が一因と推察される。従って、蘇生の初期には酸素の供給を制限することが理想的なのかもしれない。

Salineの投与では、血圧や血液ガスの回復は遅れ

るものの、血中酵素濃度は低い傾向にあった。このようにSaline投与による蘇生は、初期段階における虚血再灌流障害を抑えるが、その後輸血あるいは酸素運搬体の投与により血行動態を回復させる必要がある。

CO結合体投与では、蘇生初期における酸素供給はないが、血液循環量は直ちに回復し、血液粘弾性も維持されていた。面白いことにCO放出に伴い、徐々に酸素供給量が回復する。さらにCOの放出により血管拡張効果も期待できる。その機序としては、① COが血管壁平滑筋にあるグアニル酸シクラーゼ(GC)に直接結合して血管を拡張し、末梢血流を改善する、② また正常組織では血管弛緩因子であるNOがミオグロビン(Mb)と反応し失活する経路が存在するが、このとき投与したCOがMbに結合することにより、NOの失活が抑制される。GCに対する作用はCOよりもNOの方が数千倍強く、血管拡張により末梢血流を改善する。そして、末梢血流の改善は、代謝産物の除去と酸素供給を促進することになる。

NADPH-オキシダーゼはヘム蛋白質なので、これにCOが結合することにより活性酸素の産生量が低減する説、また炎症反応で誘導されるiNOSもヘム蛋白質なので、過剰量のNO産生を抑制しているという説もある。一般的にASTは心筋、肝、脳に高濃

度に存在し、ついで骨格筋、腎などに多く含まれる。また、ALTは肝臓に最も多く分布し、以下は腎、心筋、骨格筋の順番である。臨床的には、AST、ALTの上昇は主に肝疾患の時に見られる。AST値およびALT値が顕著に増大したことから、出血性ショックによる虚血と酸素を結合したHbV、RBCの投与による再灌流の結果、肝臓で虚血再灌流障害が生じたものと考えられる。一方、COを結合したHbV、RBCの投与ではこれが低減されていた。

E. 結論

出血ショック蘇生液としてHb小胞体を投与する際は、虚血再灌流障害を低減させることを考慮する必要がある。酸素を結合したHb小胞体を使用する場合には、先ず晶質液を投与してから経過を見ながら投与することが好ましい。また、COを結合したHb小胞体は、初期段階で投与しても再灌流障害を惹起することなく、徐々に酸素運搬機能を回復させるので、理想的な蘇生液といえる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi. Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes, based on bioconjugate chemistry. *Bioconjugate Chem.* 20, 1419-1440 (2009).
2. A. Nakagawa, T. Komatsu, S. Curry, E. Tsuchida. O₂ binding properties of human serum albumin quadruple mutant complexed iron protoporphyrin IX with axial His-186 coordination. *Chem. Lett.* 38, 776-777 (2009).

3. T. Komatsu, A. Nakagawa, S. Curry, E. Tsuchida, K. Murata, N. Nakamura, H. Ohno. The role of an amino acid triad at the entrance of the heme pocket in human serum albumin for O₂ and CO binding to iron protoporphyrin IX. *Org. Biomol. Chem.* 7, 3836-3841 (2009).
4. T. Komatsu, A. Nakagawa, X. Qu. S. Structural and mutagenic approach to create human serum albumin-based oxygen carrier and photosensitizer. *Drug metab. Pharmacokinet.* 24, 287-299 (2009).
5. 小松晃之、屈 雪、土田英俊、中川明人. ヒト血清アルブミンを用いた機能分子・材料の創製. *人工血液*, 17, 82-89 (2009).

2. 学会発表

1. 堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、小松晃之、土田英俊、小林紘一 / 実験腫瘍における腫瘍酸素分圧のマッピングと人工酸素運搬体投与による腫瘍の酸素加 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009.10.16-17.
2. T. Komatsu, X. Qu, E. Tsuchida / Protein Nanotubes: Synthesis, Structure, and Molecular Capturing Ability / 13th IUPAC International Symposium on Macro-Molecular Complexes / Conception (Chile) / 2009.11.15-18.
3. 小松晃之 / 血漿蛋白質を用いた機能分子・材料の創製 / 日本学術振興会分子ナノテクノロジー第147委員会第31回研究会 / 中央大学理工学部 / 2009.12.8 (招待講演)

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業
 分担研究報告書
 人工赤血球の ICU 使用を目的とした最適化および ME 技術の改良

分担課題：マウス脳虚血モデルに対する人工赤血球投与による影響の検討

分担研究者

富田 裕	慶應義塾大学医学部	神経内科	非常勤講師
鳥海春樹	慶應義塾大学医学部	神経内科	大学院博士課程学生
畝川美悠紀	慶應義塾大学医学部	神経内科	助教
鈴木則宏	慶應義塾大学医学部	神経内科	教授

研究要旨

本研究ではマウス脱血モデルに対する人工赤血球投与による影響を検討したので報告する。脳梗塞時、微小循環の維持は患者の予後を左右する。中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)梗塞時、前大脳動脈(anterior cerebral artery; ACA)から血液が供給されると思われるが、その動態については不明な点が多い。本研究では、MCA と ACA 間に形成される細動脈吻合(arteriolo-arteriolar anastomose; AAA)の挙動と血流動態、血管新生の様子を検討することによって微小循環動態を明らかにすることを目的とした。また、その際の人工赤血球の投与による影響を検討した。さらに、これまでラットにおいて確立してきた高速度カメラ共焦点レーザー顕微鏡および KEIO-IS2 を用いた赤血球速度測定法をマウスにも応用するため、ラットと同様にマウスの赤血球速度を測定して、種差があるか否かを検討した。AAA が、正常状態時および脳虚血時の側副血行路そして再血管構築の進展における、局所の血行動態のホメオスタシスに重要な役割を果たしていると考えられた(下記業績<原著>1にて報告)。このモデルを用いることにより、MCAO 後に人工赤血球を投与した場合の影響について、より詳細な情報が得られると考えられ、さらなる検討が必要である。また、当研究室において、ラットを用いて確立した毛細血管内赤血球速度計測法はマウスにも応用できることがわかった。さらに、従来から知られているような脳代謝速度などの生理的パラメータの差異にもかかわらず毛細血管内赤血球速度が同程度であったことから、赤血球速度は酸素交換に最適な物理的要因によって調節されていることが推察された

A. 研究目的

脳梗塞時、微小循環の維持は患者の予後を左右する。中大脳動脈(middle cerebral artery; MCA)梗塞時、前大脳動脈(anterior cerebral artery; ACA)から血液が供給されると思われるが、その動態については不明な点が多い。本研究では、MCA と ACA 間に形成される細動脈吻合

(arteriolo-arteriolar anastomose; AAA)の挙動と血流動態、血管新生の様子を検討することによって微小循環動態を明らかにすることを目的とした。また、その際の人工赤血球の投与による影響を検討した。さらに、これまでラットにおいて確立してきた高速度カメラ共焦点レーザー顕微鏡および KEIO-IS2 を用いた赤血球速度測定法をマウスに

も応用するため、ラットと同様にマウスの赤血球速度を測定して、種差があるか否かを検討した。

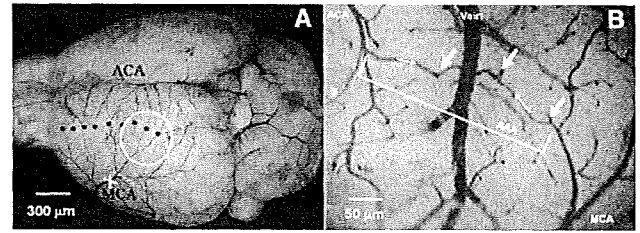
B. 研究方法

C57BL/6J マウス(8-12 週齢、体重 22-25g、n=16)を用い、イソフルレン麻酔下で頭部を定位固定装置に固定し、左頭頂側頭葉に硬膜温存下で頭窓を作成した。尾静脈カテーテルから FITC ラベル赤血球を注入し、頭窓における血流動態を観察した。また、小動物用血圧計(室町機械)にて、全身血圧を持続的にモニターした。左中大脳動脈起始部を電気凝固(田村の変法)にて完全閉塞モデルを作成し(Tran Dinh A, Kubis N, Tomita Y, Karaszewski B, et al. *Neuro Image*. 31: 958-968, 2006. Kubis N, Tomita Y, Planat V, Tran Dinh A, et al. *Neuro Image*. 34: 1-11, 2007.)、脳皮質の約 50 μm の深さにおける関心領域(ROI)の FITC ラベル赤血球の挙動をビデオカメラ(30 frames/s)あるいは高速度カメラ(~500 frames/s)共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、連続記録した(Tomita M, et al. *Microcirculation*. 15: 163-174, 2008. Unekawa M, et al. *Asian Biomed*. 2: 203-218, 2008.)。その後、再び麻酔して同部位における血流動態および血管新生の様子を 7 日まで観察した。MCAO 直後に人工赤血球を投与した場合の脳表の変化は、既に報告したように観察・記録した。また、21 匹の C57BL/6J マウス(8-12 週齢、体重 22-25g)において高速度カメラ共焦点レーザー顕微鏡にて記録した画像から単一毛細血管内を流れる赤血球速度を KEIO-IS2 を用いて計測し、ラットと比較した。

C. 結果および考察

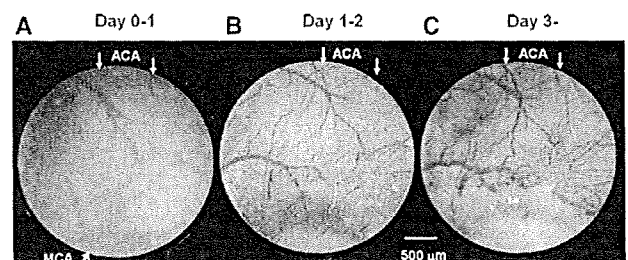
AAA 部位にて、逆流する血流を観察した。FITC 蛍光赤血球は MCA と ACA の両方向から流入し、その相対する血流は T 結合部にて合流していた。その合流した血流は穿通動脈の中に流入していた。二重に栄養されている T 結合部の位置は固定されておらず、血行動態の変化に

合わせて、隣の T 結合部へと機能が移動していた(図 1)。



(図 1) A. カーボンブラックを含む Mercocox を全身血管内に注入後に摘出したマウス脳における外側皮質動脈の背側図。黒点は、ACA と MCA との間の AAA を示している。白い X 印は MCAO の場所を示している。白い丸は頭窓の位置を、点線はおおよその虚血中心部の位置をそれぞれ示している。B: 生体脳における AAA が白線によって示されている。一本の大きな皮質静脈がその中心を横切っている。AAA の中では、矢印によって示された 3 つの T-結合部が認められた。小さい矢印は、対面する血流の方向を示している。

MCAO によって、MCA 側からの赤血球の血流がただちに停止した。一瞬の“時間の遅れ”の後で、血液は、MCA 分枝から MCA 本幹に向けて逆行性に流れ始めた。その逆行性の血流は、統計学的に有意な現象であった ($p < 0.05$)。これは、一瞬の時間の遅れの後で、MCA の他の枝へ血液を供給する役割を果たしていた。毛細血管においては、MCAO により脳虚血中心部において赤血球の即時の消失をもたらした。AAA 近くの辺縁領域においてもその程度は軽いが赤血球の消失をもたらした。脳虚血 3 日後には、AAA を中心とした血管新生を伴うリモデリングが始まる様子が確認された(図 2)。



(図 2) MCA 後の ROI 内の血管構造の変化。A: Day 0-1。

MCA が栄養する小血管および毛細血管は、不明瞭となり、血管構造の破壊を伴った。脳虚血中心部(底部)は、まるで暗いカーテンに覆われているかのように見えた。矢印は、ACA と MCA の末梢の枝を示している。B: Day 1-2。カーテンのように見える部分が持ち上がり、無定形の白い梗塞部分が観察された。取り囲んでいる領域はマクロファージが浸潤し、血管の破片があり、明らかにその破片を除去しているように観察された。C: Day 3-。梗塞を取り巻く領域に再生血管の発達が観察された。血管新生によって形作られた新しい直線的な毛細血管が MCA 分枝の段端(矢印)から芽生えているように見受けられた。MCA の本幹は、B および C では、消失していた。

MCAO 直後に Rhodamine ラベルした人工赤血球を投与した場合、既に観察したとおり、モニター画面上で軟膜動脈、毛細血管内の赤色調が増強し、人工赤血球の微小血管内の通過が確認された。Rhodamine ラベルされた人工赤血球は小粒径であるため、梗塞によって赤血球が停滞し、プラズマしか流れていない毛細血管内でも通過したことが示唆された。

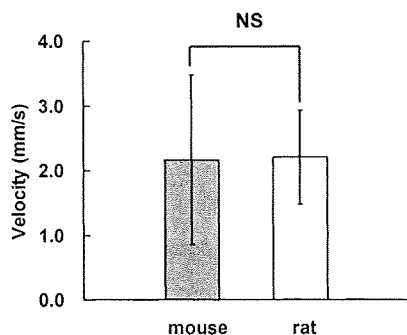


図 1. マウス(n=21) およびラット(n=37)における単一毛細血管内赤血球速度の比較。

マウスはラットに比べて体重は 1/10 ほどである(26.3±3.1g vs 327±32g)。心拍数(461.4±50.5bpm vs 314.5±50.6bpm)などの生理的パラメータにも有意差が認められた。しかし、大脳皮質において単一毛細血管内を流れる赤血球速度にはラットの場合(Unekawa M, et al. Asian Biomed. 2: 203-218, 2008.)と比べて有意差は認められなかった(図 1, 図 2)

D. 結論

AAA が、正常状態時および脳虚血時の側副血行路そして再血管構築の進展における、局所の血行動態のホメオスタシスに重要な役割を果たしていると考えられた(下記業績<原著>1にて報告)。このモデルを用いることにより、MCAO 後に人工赤血球を投与した場合の影響について、より詳細な情報が得られると考えられ、さらなる検討が必要である。

また、当研究室において、ラットを用いて確立した毛細血管内赤血球速度計測法はマウスにも応用できることがわかった。さらに、従来から知られているような脳代謝速度などの生理的パラメータの差異にもかかわらず毛細血管内赤血球速度が同程度であったことから、赤血球速度は酸素交換に最適な物理的要因によって調節されていることが推察された(下記業績<原著>9にて報告)。

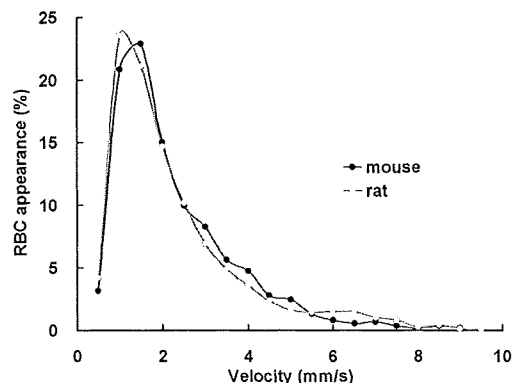


図 2. マウス(検出された赤血球数;1655) およびラット(同;4311)における単一毛細血管内赤血球速度の速度分布曲線。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 主な論文発表

1. Toriumi H, Tatarishvili J, Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, Suzuki N, Dually Supplied

- T-Junctions in Arteriolo-Arteriolar Anastomosis in Mice. Key to Local Hemodynamic Homeostasis in Normal and Ischemic States? *Stroke*, 2009. 40:3378-3383.
2. Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Unekawa M, Suzuki N, Coupling of capillary RBC flow failure with neuronal depolarization. *Nature Proceedings*, 2009: [The data are available at <http://proceedings.nature.com/documents/3220/versions/1>].
 3. Hattori H, Tomita M, Toriumi H, Tomita Y, Unekawa M, Suzuki N, Transient hemiparesis after topical application of 0.3 M KCl to the sensorimotor cortex in awake unrestricted mice (abstr.). *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2009. 29:S289.
 4. Tomita M, Tatarishvili J, Toriumi H, Tomita Y, Unekawa M, Hattori H, Suzuki N, When does angiogenesis accompanied with RBC flow develop in ischemic tissue after permanent MCA occlusion in C57BL/6J mice? (abstr.). *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2009. 29:S27-S28.
 5. Tomita Y, Toriumi H, Hattori H, Unekawa M, Tomita M, Itoh Y, Hoshino H, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Suzuki N, Artificial RBC transiently improved microcirculatory derangement produced by blood-loss hypotension or MCA occlusion in mice (abstr.). *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2009. 29:S405-S406.
 6. Toriumi H, Tatarishvili J, Tomita M, Tomita Y, Hattori H, Unekawa M, Suzuki N, FITC-labeled RBC tracking in arteriolo-arteriolar anastomoses in control state and during ischemia after MCA occlusion in mice (abstr.). *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2009. 29:S127.
 7. Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Hattori H, Suzuki N, Shift of frequency distribution of RBC velocity in parenchymal capillaries during potassium-induced cortical spreading depression in rats (abstr.). *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2009. 29:S298.
 8. Tomita M, Osada T, Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N, Exogenous nitric oxide increases microflow but decreases RBC attendance in single capillaries in rat cerebral cortex. *Microvasc. Rev. Commun.*, 2010. 3(1):11-16.
 9. Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Miyaki K, Suzuki N, RBC velocities in single capillaries of mouse and rat brains are the same, despite 10-fold difference in body size. *Brain Res.*, 2010. 1320:69-73.
 10. Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Suzuki N, Oscillating neuro-capillary coupling during cortical spreading depression as observed by tracking of FITC-labeled RBCs in single capillaries. *Front. Neurosci.*, 2010. submitted.
2. 主な学会発表 (国内学会)
 1. 第37回日本頭痛学会総会 (宇都宮) 2009.11.28-29. (口演) 畝川美悠紀, 富田稔, 富田裕, 鳥海春樹, 鈴木則宏, 麻酔下および覚醒時のK⁺誘発性皮質性拡張性抑制によるDC電位の変化および片麻痺.
 2. 第37回日本頭痛学会総会 (宇都宮) 2009.11.28-29. (口演) 鳥海春樹, 富田稔, 富田

裕, 清水利彦, 畝川美悠紀, 鈴木則宏, 片頭痛発作時の血流変化に関する検討—硬膜動脈と板間静脈の血管構造とA-V シヤント.

3. 第21回日本脳循環代謝学会総会 (大阪)
2009.11.19-20. (口演) 畝川美悠紀, 富田稔, 富田裕, 鳥海春樹, 鈴木則宏, ラットK⁺による脳皮質性拡張性抑制伝播の際の赤血球速度、DC電位、脳波、酸素分圧、脳血流の相互関係.
4. 35回日本微小循環学会総会 (埼玉) 2010.2.26-27.
(口演) 富田稔, 富田裕, 畝川美悠紀, 鳥海春樹, 鈴木則宏, Neuro-capillary coupling during cortical spreading depression.
5. 第35回日本微小循環学会総会 (埼玉)
2010.2.26-27. (口演) 富田裕, Brain microcirculation during cortical spreading depression.
6. 第35回日本微小循環学会総会 (埼玉)
2010.2.26-27. (口演) 畝川美悠紀, 富田稔, 富田裕, 鳥海春樹, 鈴木則宏, Variation of red blood cell velocities in intraparenchymal capillaries on potassium-induced cortical spreading depression in anesthetized rats.

(国際学会)

1. The 10th International Symposium on Vasodilatation (松島) 2009.6.2. (ポスター) Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Hattori H, Suzuki N, A hypothesis: Virchow-Robin space as an integrating cleft of cerebrocortical local arteriolar responses.
2. 24th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Chicago, USA) 2009.6.29-7.3. (ポスター) Hattori H, Tomita M,

Toriumi H, Tomita Y, Unekawa M, Suzuki N, Transient hemiparesis after topical application of 0.3 M KCl to the sensorimotor cortex in awake unrestricted mice.

3. 24th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Chicago, USA) 2009.6.29-7.3. (口演) Tomita M, Tatarishvili J, Toriumi H, Tomita Y, Unekawa M, Hattori H, Suzuki N, When does angiogenesis accompanied with RBC flow develop in ischemic tissue after permanent MCA occlusion in C57BL/6J mice?
4. 24th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Chicago, USA) 2009.6.29-7.3. (ポスター) Tomita Y, Toriumi H, Hattori H, Unekawa M, Tomita M, Itoh Y, Hoshino H, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Suzuki N, Artificial RBC transiently improved microcirculatory derangement produced by blood-loss hypotension or MCA occlusion in mice.
5. 24th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Chicago, USA) 2009.6.29-7.3. (ポスター) Toriumi H, Tatarishvili J, Tomita M, Tomita Y, Hattori H, Unekawa M, Suzuki N, FITC-labeled RBC tracking in arteriolo-arteriolar anastomoses in control state and during ischemia after MCA occlusion in mice.
6. 24th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Chicago, USA) 2009.6.29-7.3. (ポスター) Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Hattori H, Suzuki N, Shift of frequency distribution of RBC velocity in parenchymal capillaries during potassium-induced cortical spreading depression in rats.

7. 24th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Chicago, USA) 2009.6.29-7.3. (ポスター) Yamada S, Toriumi H, Kimura H, Tomita Y, Itoh Y, Hoshino H, Suzuki N, Distribution of transfused bone marrow cells

following endothelial damage of a cortical artery.

G. 知的財産権の出願・登録状況
新規出願なし

別添 5

表 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
Hypercapnic acidosis minimizes endotoxin-induced gut mucosal injury in rabbits. Intensive Care Med (2009) 35:129-135	2009年4月	Springer-Verlag	Hiroshi Morisaki, Satoshi Yajima, Yoko Watanabe, Takeshi Suzuki, Michiko Yamamoto, Nobuyuki Katori, Saori Hashiguchi, Junzo Takeda
Difference in autologous blood transfusion-induced inflammatory responses between acute normovolemic hemodilution and preoperative donation. J Anesth (2009) 23:61-66	2009年4月	Springer	Yoshifumi Kotake, Michiko Yamamoto, Midori Matsumoto, Takashige Yamada, Hiromasa Nagata, Hiroshi Morisaki and Junzo Takeda
An individualized recruitment maneuver for mechanically ventilated patients after cardiac surgery. J Anesth (2009) 23:87-92	2009年4月	Springer	Ryohei Serita, Hiroshi Morisaki and Junzo Takeda
Recurrent ST-segment elevation on ECG and ventricular tachycardia during neurosurgical anesthesia. J Anesth (2009) 23:115-118	2009年4月	Springer	Yoshifumi Kotake, Midori Matsumoto, Tomoko Yoroze and Junzo Takeda
Orengedokuto and berberine improve indomethacin-induced small intestinal injury via adenosine J Gastroenterol. 2009; 44(5):380-9	2009年4月	Springer	Watanabe-Fukuda Y, Yamamoto M, Miura N, Fukutake M, Ishige A, Yamaguchi R, Nagasaki M, Saito A, Imoto S, Miyano S, Takeda J, Watanabe K.
Tumor necrosis factor- α mediates hyperglycemia-augmented gut barrier dysfunction in endotoxemia. Crit Care Med 2009; 37 (3):1024 -1030	2009年4月	Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins	Satoshi Yajima, Hiroshi Morisaki, Ryohei Serita, Takeshi Suzuki, Nobuyuki Katori, MD; Takashi Asahara, Koji Nomoto, Fujio Kobayashi, Akitoshi Ishizaka, Junzo Takeda

ステントグラフト内挿術後の腹部大動脈瘤に対し人工血管置換術を施行した1例 臨床麻酔。33(6) : 1049-1050, 2009	2009年6月	臨床麻酔	鈴木康生、加藤純悟、 藍 公明、森山 潔、 志水秀行、武田純三
Can Mixed Venous Hemoglobin Oxygen Saturation Be Estimated Using a NICO Monitor? Anesth Analg 2009;109:119-23	2009年6月	International Anesthesia Research Society	Yoshifumi Kotake, Takashige Yamada, Hiromasa Nagata, Takeshi Suzuki, Junzo Takeda
Epidural Cooling Minimizes Spinal Cord Injury after Aortic Cross-clamping through Induction of Nitric Oxide Synthase. Anesthesiology 2009 111(4): 818-25.	2009年10月	Lippincott Williams & Wilkins	Akiko Ishikawa, Atsuo Mori, Nobuyuki Kabei, Akihiro Yoshitake, Takeshi Suzuki, Nobuyuki Katori, Hiroshi Morisaki, Ryohei Yozu, Junzo Takeda.
ADAM28 is a serological and histochemical marker for non-small-cell lung cancers. Int. J. Cancer (2010)	2010年1月	Wilkey-Blackwell	Hiroaki Kuroda, Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Miyuki Chijiwa, Kazunori Kamiya, Yotari Izumi, Masazumi Watanabe, Hirohisa Horinouchi, Masahumi Kawamura, Koichi Kobayashi, Yoasunori Okada
Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery. Interact Cardio Vasc Thorac Surg 10 (2010): 356-359.	2010年4月	European Association for Cardio-thoracic Surgery	Yotaro Izumi, Masafumi Kawamura, Masatoshi Gika, Hiroaki Nomori
Artificial Oxygen Carriers, Hemoglobin Vesicles and Albumin-Hemes, Based on Bioconjugate Chemistry. Bioconjugate Chemistry (2009) 20(8): 1419-1440.	2010年2月	American Chemical Society	Eishun Tsuchida, Keitaro Sou, Akito Nakagawa, Hiromi Sakai, Teruyuki Komatsu, Koichi Kobayashi
O ₂ Binding Properties of Human Serum Albumin Quadruple Mutant Complexed Iron Protoporphyrin IX with Axial His-186 Coordination. Chemistry Letters (2009) 38(8): 776-777.	2009年8月	Chemical Society of Japan	Akito Nakagawa, Teruyuki Komatsu, Stephen Curry, Eishun Tsuchida
The role of an amino acid triad at the entrance of the heme pocket in human	2009年7月	Royal Society of Chemistry	Teruyuki Komatsu, Akito Nakagawa, Stephen

serum albumin for O ₂ and CO binding to iron protoporphyrin IX. Org. Biomol. Chem. (2009)7: 3836-3841			Curry, Eishun Tsuchida, Kenichi Murata
Structural and Mutagenic Approach to Create Human Serum Albumin-Based Oxygen Carrier and Photosensitizer. Drug Metab. Pharmacokinet. 24 (4): 287-299 (2009).	2009年6月	日本薬物動態学会	Teruyuki Komatsu, Akito Nakagawa, Xue Qu
ヒト血清アルブミンを用いた機能分子・材料の創製. 人工血液 17(2) (2009): 82-89.	2009年5月	中外医学社	小松晃之、屈雪、土田英俊、中島晶人
Exogenous nitric oxide increases microflow but decreases RBC attendance in single capillaries in rat cerebral cortex. Microvascular Reviews and Communications 3(1) (2009): 11-16.	2009年8月	Japanese Society for Microcirculation	Minoru Tomita, Takashi Osada, Miyuki Unekawa, Yutaka Tomita, Haruki Toriumi, Norihiro Suzuki
Dually Supplied T-Junctions in Arteriolo-Arteriolar Anastomosis in Mice: Key to Local Hemodynamic Homeostasis in Normal and Ischemic States? Stroke (2009) 40: 3378-3383.	2009年9月	American Stroke Association	Haruki Toriumi, Jemal Tatarishvili, Minoru Tomita, Yutaka Tomita, Miyuki Unekawa, Norihiro Suzuki
RBC velocities in single capillaries of mouse and rat brains are the same, despite 10-fold difference in body size. Brain Research 1320 (2010) 69-73.	2010年1月	ELSEVIER	Miyuki Unekawa, Minoru Tomita, Yutaka Tomita, Haruki Toriumi, Koichi Miyaki, Norihiro Suzuki.

研究成果の刊行物・別冊
(2009.4～2010.3)

Hiroshi Morisaki
Satoshi Yajima
Yoko Watanabe
Takeshi Suzuki
Michiko Yamamoto
Nobuyuki Katori
Saori Hashiguchi
Junzo Takeda

Hypercapnic acidosis minimizes endotoxin-induced gut mucosal injury in rabbits

Received: 16 November 2007
Accepted: 19 June 2008
Published online: 15 July 2008
© Springer-Verlag 2008

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-008-1212-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. Morisaki (✉) · S. Yajima ·
Y. Watanabe · T. Suzuki ·
M. Yamamoto · N. Katori ·
S. Hashiguchi · J. Takeda
Department of Anesthesiology,
Keio University School of Medicine,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku,
Tokyo 160-8582, Japan
e-mail: morisaki@z8.keio.jp
Tel.: +81-3-53633810
Fax: +81-3-33568439

Abstract Objective: Recent evidence demonstrated that hypercapnic acidosis due to lung protective strategy was not only permissive but also even therapeutic for injured lung. Since the effects of hypercapnic acidosis on extra-pulmonary organs remain to be clarified, we tested the hypothesis that hypercapnic acidosis protects gut mucosal barrier function by modulating inflammation in a rabbit model of endotoxemia.

Design: Prospective randomized animal study. **Setting:** University research laboratory. **Subjects:** Male New Zealand white rabbits. **Interventions:** Thirty-two animals were randomly allocated into two groups: normocapnia ($n = 17$) and hypercapnia ($n = 15$). The latter group received F_1CO_2 5% under mechanical ventilation to achieve hypercapnia throughout the study periods, whereas the former with F_1CO_2 0%.

Measurements and results: Arterial blood gas, intramucosal pH (pHi) and portal blood flow were assessed at baseline, 2-h and 4-h infusion of lipopolysaccharide. At 4 h, ileal myeloperoxidase (MPO) activity and intestinal permeability were measured. The animals in the hypercapnia group showed apparent hypercapnic acidosis and progressive intramucosal acidosis at 4 h, accompanied by significantly lower intestinal permeability versus normocapnia group. Ileal MPO activity was comparable between the study groups. **Conclusions:** Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced gut barrier dysfunction possibly through neutrophil-independent mechanisms.

Keywords Hypercapnia · Bacterial translocation · Intramucosal pH · Myeloperoxidase

Introduction

Lung protective strategy has been recognized as a valuable approach to improve the outcome of critically ill patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) [1, 2]. With this strategy, low tidal volume ventilation to obviate alveolar overextension results in hypercapnic acidosis. Recent study demonstrated that hypercapnic acidosis had a protective or even therapeutic effect on injured lungs [3, 4], whereas the other group alarmed that hypercapnic acidosis retarded plasma membrane wound resealing in a model of ventilator-induced lung injury [5].

Although the key component to provide its protective property is primarily considered as being acidosis, hypercapnic acidosis is more effective to minimize lung injury rather than metabolic acidosis [6]. On the contrary, hypercapnia by itself has potent vasodilating property to provide sufficient oxygen delivery to tissues, particularly in the coronary and cerebral circulation [7, 8]. In addition, an increasing amount of evidence indicates that several components of inflammation, including production of reactive oxygen species and cytokines and activation of nuclear factor- κ B, were diminished under hypercapnic acidosis [9, 10]. Collectively, protective effects of

hypercapnic acidosis on injured organs are mainly produced through its vasodilating and/or anti-inflammatory mechanisms.

While critically ill patients complicated by ARDS is believed to die not owing to respiratory failure but to the other organ failure, the effect of hypercapnic acidosis on extra-pulmonary organs remains to be fully determined. In *ex vivo* experimental condition, previous studies showed that reperfusion with hypercapnic perfusate augmented the recovery of myocardial function after prolonged ischemia and reduced the infarct size after coronary artery occlusion [11, 12]. On the other hand, the impact of hypercapnic acidosis on the gut, the most fragile organ against any type of insults [13], remains unclear and may differ depending on conditions of critically ill or study subjects. Besides, at the microcirculatory level of gut mucosa, hypercapnia by itself possesses the contra-lateral effects, i.e., direct local vasodilation and indirect local vasoconstriction by sympathetic stimulation [10]. Since tissue accumulation of activated neutrophils plays consequential roles to regulate gut barrier function [14], we tested the hypothesis that hypercapnic acidosis preserved gut mucosal function through the modulation of neutrophil dynamics in splanchnic area in a rabbit model of endotoxemia.

Materials and methods

Detailed descriptions of all procedures are available in the online supplement.

Study protocol

After preparatory surgery as described previously [15, 16], 32 healthy rabbits were randomly assigned to two groups, normocapnia ($n = 17$) and hypercapnia ($n = 15$) groups: the former was mechanically ventilated with $F_i\text{CO}_2$ 0% and the latter with $F_i\text{CO}_2$ 5%. After baseline measurements (Fig. 1), lipopolysaccharide (LPS: 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per minute) infusion was initiated with aggressive fluid

therapy throughout the study periods. At 4-h study period, we determined the changes of gut mucosal permeability using fluorescein isothiocyanate-conjugated dextran (FD4). Lung and ileal tissues were obtained for the measurement of wet to dry weight ratio. To examine the time-course effects of hypercapnic acidosis on normal rabbits, we also studied eight sham animals that received the same catheterization without LPS infusion under the same study protocol.

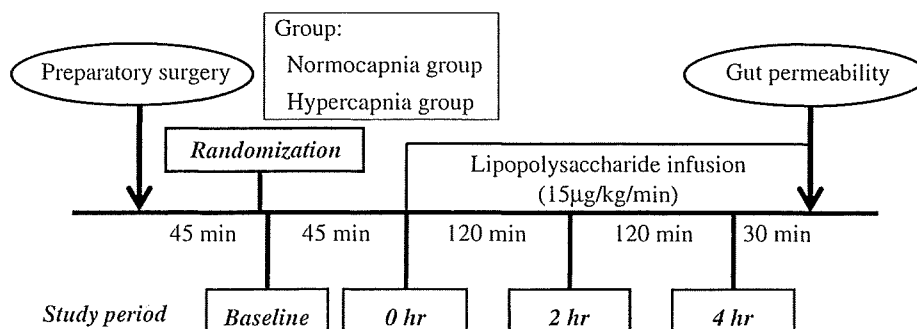
Measurement of intramucosal pH, gut mucosal permeability and biochemical analyses

Gut intramucosal pH (pHi) was monitored using an automated air tonometry (Tonocap, Datex Ohmeda, Helsinki, Finland) [16, 17] throughout the study period. To examine the effects of systemic acidosis on pHi over the hypercapnic and endotoxemic stages, we further examined the PCO_2 gap defined as the difference between measured PrCO_2 and PaCO_2 . Gut mucosal permeability was measured using an *in situ* loop preparation as described previously [16, 18]. The results were corrected for the plasma protein contents measured by the Lowry method [19]. Arterial blood samples were used to determine white blood cell (WBC), blood gas and lactate. Residual arterial blood and portal blood samples were centrifuged and stored for measurements of lactate dehydrogenase (LDH) activity [16]. As an index of leukocyte sequestration, MPO activity of ileal wall was assayed [20]. At the completion of experiments, a randomly selected left or right lung was lavaged to measure protein concentration of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) [21].

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation unless otherwise specified. Analysis of variance with repeated measures and Friedman test was applied where appropriate. Differences were considered statistically significant if $P < 0.05$.

Fig. 1 Schematic drawing of experimental protocol



Results

Systemic effects of hypercapnic acidosis during LPS infusion

Table 1 shows the effects of hypercapnic acidosis and LPS infusion on systemic circulatory and biochemical parameters versus the sham animals. Hypercapnia group showed a marked hypercapnic acidosis to match the criteria of this group as described in "Materials and methods" versus the normocapnia group. By fluid resuscitation during LPS infusion, mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) remained constant throughout the study period in both normocapnia and hypercapnia groups, while hypercapnia apparently increased MAP in sham group possibly through the activation of sympathetic system versus normocapnia. The number of circulating WBC in LPS-treated animals was significantly reduced to a similar extent in both study groups versus the baseline, whereas those in the sham groups remained constant throughout the study periods. Lactate dehydrogenase (LDH) activity to reflect the extent of LPS-induced tissue injury was increased in both the study groups, but those in normocapnia group were slightly but

significantly higher versus hypercapnia group at 4 h ($P < 0.05$), which was comparable to the sham. Simultaneously, arterial lactate in normocapnia group was significantly elevated versus hypercapnia group, indicating that tissue hypoxia caused by LPS infusion was reduced by hypercapnic acidosis.

Splanchnic effects of hypercapnic acidosis during LPS infusion

Figure 2 illustrates the changes of pHi, PCO₂ gap and portal blood flow at baseline and at 0–4 h of LPS infusion. The pHi values of both normocapnia and hypercapnia groups were progressively depressed, but the extent of the latter group was significantly greater versus the former. PCO₂ gap in hypercapnia group was significantly greater at 2 and 4-h study periods versus normocapnia group. On the other hand, portal blood flows in both normocapnia and hypercapnia groups increased at 2 and 4-h study periods compared to the baseline while the latter was increased significantly greater at 4 h versus the former.

Table 1 Effects of hypercapnic acidosis and lipopolysaccharide (LPS) infusion on systemic circulatory and biochemical parameters

	Group	Baseline	0 h	2 h	4 h	
Mean arterial pressure (mmHg)	LPS	Normocapnia	55 ± 9	54 ± 4	53 ± 5	58 ± 11
		Hypercapnia	58 ± 5	58 ± 5	59 ± 12	60 ± 10
	Sham	Normocapnia	64 ± 1	60 ± 13	64 ± 12	67 ± 13
		Hypercapnia	67 ± 12	71 ± 10	70 ± 19	75 ± 25
Heart rate (beats/min)	LPS	Normocapnia	283 ± 24	273 ± 35	267 ± 21	268 ± 30
		Hypercapnia	275 ± 26	254 ± 27	259 ± 30	258 ± 25
	Sham	Normocapnia	272 ± 12	280 ± 24	262 ± 9	270 ± 24
		Hypercapnia	285 ± 12	287 ± 33	272 ± 22	272 ± 37
Arterial pH	LPS	Normocapnia	7.42 ± 0.06	7.43 ± 0.07	7.40 ± 0.05	7.38 ± 0.04
		Hypercapnia	7.25 ± 0.05**	7.27 ± 0.02**	7.25 ± 0.03**	7.24 ± 0.04**
	Sham	Normocapnia	7.40 ± 0.02	7.41 ± 0.01	7.46 ± 0.03	7.45 ± 0.02
		Hypercapnia	7.22 ± 0.07	7.26 ± 0.02	7.27 ± 0.03	7.27 ± 0.04
PaCO ₂ (mmHg)	LPS	Normocapnia	39 ± 4	37 ± 3	38 ± 3	40 ± 3
		Hypercapnia	68 ± 6**	70 ± 5**	68 ± 5**	71 ± 5**
	Sham	Normocapnia	42 ± 3	40 ± 2	39 ± 3	39 ± 3
		Hypercapnia	74 ± 5	73 ± 5	72 ± 7	70 ± 7
White blood cell count (/mm ³)	LPS	Normocapnia	5,440 ± 830	3,330 ± 1,420†	1,560 ± 430‡	1,870 ± 620‡
		Hypercapnia	5,530 ± 1,470	3,300 ± 1,560†	1,680 ± 930‡	2,020 ± 1,380‡
	Sham	Normocapnia	5,450 ± 500	5,460 ± 1,027	5,280 ± 1,800	5,360 ± 700
		Hypercapnia	5,330 ± 2590	5,470 ± 1,350	6,180 ± 1,500	5,660 ± 1,400
Lactate dehydrogenase (IU/L)	LPS	Normocapnia	120 ± 36	133 ± 41	174 ± 70	184 ± 94†
		Hypercapnia	135 ± 31	135 ± 31	145 ± 20	148 ± 22*
	Sham	Normocapnia	135 ± 21	145 ± 30	139 ± 12	141 ± 19
		Hypercapnia	124 ± 11	135 ± 7	127 ± 29	132 ± 38
Arterial lactate (mmol/L)	LPS	Normocapnia	2.9 ± 1.0	2.9 ± 1.6	3.4 ± 1.1	3.7 ± 1.4
		Hypercapnia	1.9 ± 0.8	1.8 ± 0.9	1.9 ± 0.6*	2.2 ± 0.7*
	Sham	Normocapnia	2.1 ± 0.5	2.1 ± 1.5	2.5 ± 0.8	2.2 ± 1.0
		Hypercapnia	1.9 ± 0.6	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.9	1.7 ± 1.2

Baseline = 45 min after preparatory surgery; 0, 2 and 4 h = study period during lipopolysaccharide infusion

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Normocapnia

† $P < 0.05$, ‡ $P < 0.01$ versus Baseline

Data are expressed as mean ± SD. No statistical analyses were performed between LPS and Sham

Fig. 2 Changes of intramucosal pH (pHi), PCO₂ gap and portal blood flow during 4-h study periods. Data are expressed as mean ± SD. Significance: * *P* < 0.05 versus normocapnia group. † *P* < 0.05, ‡ *P* < 0.01 versus baseline in each group

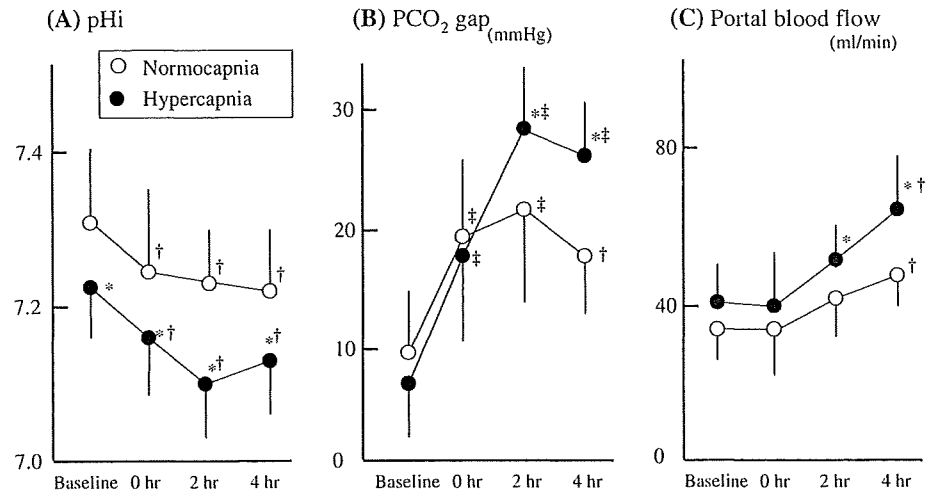


Figure 3 illustrates the changes of plasma FD4 concentration, wet/dry weight ratio of gut and ileal MPO activity. Plasma FD4 concentration in hypercapnia group, which was comparable with those in two sham groups was significantly less versus normocapnia group. Simultaneously, the wet/dry weight ratio of terminal ileum in hypercapnia group was significantly lower versus normocapnia group. However, ileal MPO activity to reflect neutrophil accumulation in the intestinal wall was similar

between the study groups, both of which appeared to be augmented versus the sham animals.

Pulmonary effects of hypercapnic acidosis during LPS infusion

To verify the effects of hypercapnic acidosis on injured lungs evoked by LPS infusion in this model, we measured

Fig. 3 Changes of plasma FD4 concentrations, wet/dry weight ratio of terminal ileum and ileal myeloperoxidase (MPO) activity. Data are expressed as mean ± SD. Significance: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 versus normocapnia group

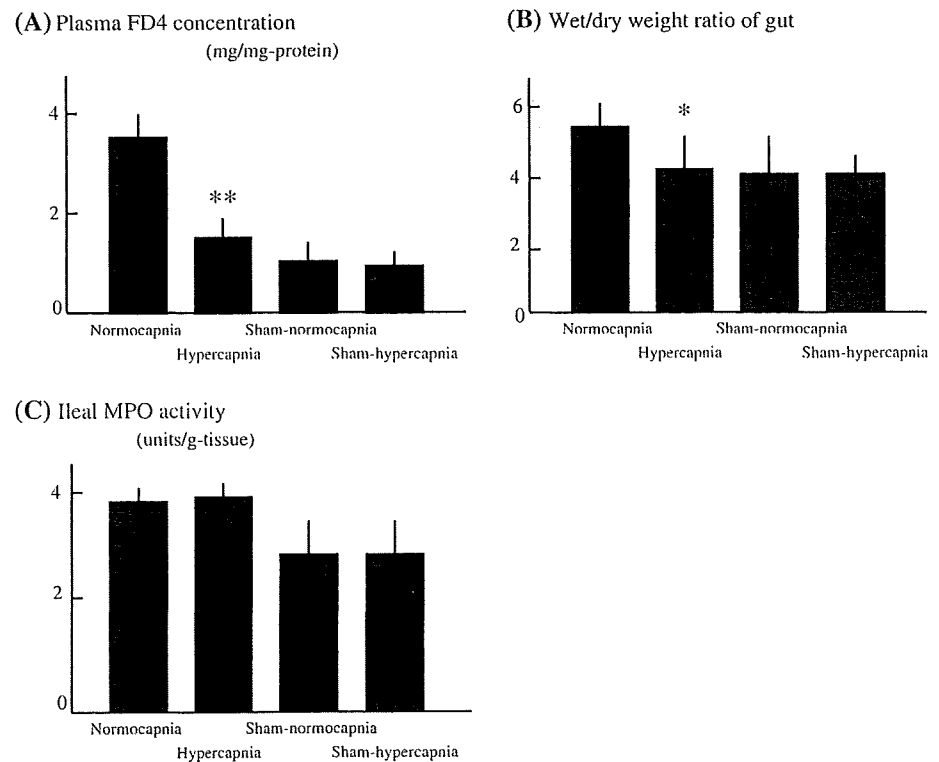
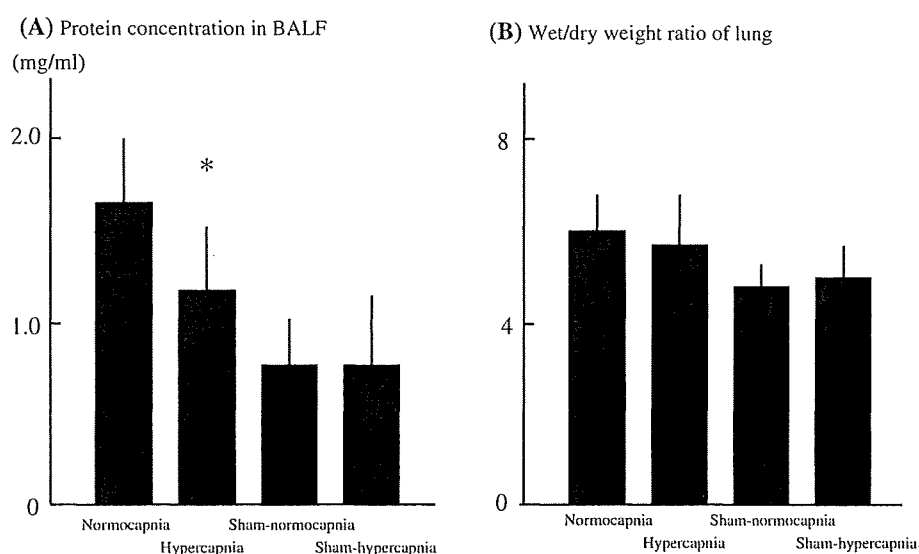


Fig. 4 Changes of protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and wet/dry weight ratio of lung. Data are expressed as mean \pm SD. Significance: * $P < 0.05$ versus normocapnia group



the changes of protein concentration in BALF and wet/dry weight ratio of lung (Fig. 4). We then found that the protein concentration in BALF was significantly less in hypercapnia versus normocapnia group, whereas wet/dry weight ratio of lung was not significantly different between the groups.

Discussion

The present study indicates that hypercapnic acidosis, approximately at 70 mmHg of PaCO₂, ameliorates LPS-induced gut barrier dysfunction associated with the progression of intramucosal acidosis, and that intramucosal acidosis per se is not directly associated with deterioration of mucosal barrier function. In addition, overall tissue and cellular destruction, including the alterations of microvascular and alveolar permeability in endotoxemia, were minimized by short-term application of hypercapnic acidosis. These findings bring up a new hypothesis that lung protective strategy, subsequently inducing hypercapnic acidosis, could be another approach to prevent bacterial translocation from gut in critically ill state like endotoxemia.

To obviate confounding factors such as hypotension but concurrently to elicit gut mucosal injury, we applied low-dose endotoxin infusion model of rabbits with aggressive fluid resuscitation. These animals showed normotensive hyperdynamic circulatory responses as previously reported [16] although it remains unclear why MAP in the LPS-treated animals was kept slightly lower even at baseline period versus the sham (Table 1). Besides, progressive reduction of circulating WBC counts with mild elevation of arterial lactate fit well with the

finding in septic patients who were adequately resuscitated [22], suggesting that injected LPS was biologically active for 4-h study periods. Since hypercapnic acidosis ameliorated LPS-induced lung injury as shown in the protein leakage into BALF, our model could be comparable with previous studies, demonstrating protective property of hypercapnic acidosis on several types of injured lung [3, 4, 9]. Protective properties of hypercapnic acidosis on injured organs could be produced by its vasodilating and/or anti-inflammatory mechanisms. Tashkin et al. [23] demonstrated that hypercapnic acidosis caused a significant vasodilator effect, which was not related to arterial pH or β -adrenergic stimulation, on mesenteric arterial beds depending on the extent of hypercapnia. Indeed, we found that hypercapnic acidosis augmented the elevation of portal blood flow evoked by endotoxemia and fluid resuscitation. Such augmentation of blood flow to splanchnic area by hypercapnic acidosis might be able to reduce plasma FD4 concentration and show restoration of gut mucosal permeability by a simple dilution effect. However, portal blood flow was augmented to approximately 20% extent in hypercapnia group, which was unable to account for a marked increase of FD4 concentration, twice as much as higher versus normocapnia. Among inflammatory mediators and cells, tissue accumulation of activated neutrophils is a major contributor to develop gut mucosal injury [14]. Although tissue MPO activity alone may be insufficient to determine the precise involvement of activated neutrophils, the data in the LPS-treated animals showed apparently higher level compared to the sham group as previously reported in lung injury model [24]. However, it should be noted that the effects of hypercapnia on neutrophil function in situ such as phagocytosis and/or bactericidal capacity are not necessarily assessed using MPO activity.