

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791090
 研究課題名（和文） 人工呼吸時の気道内圧の差が気道内の MUC(mucin)2 の発現に及ぼす影響
 研究課題名（英文） Effects of airway pressure on the expression of MUC(mucin)2 during mechanical ventilation
 研究代表者
 吉良 慎一郎(KIRA SHINICHIRO)
 大分大学・医学部・講師
 研究者番号：70404374

研究成果の概要：救急集中治療領域において人工呼吸を含む機械的換気を肺に施すと、サイトカインを含む炎症性メディエータが放出されるが、この研究では気道の粘膜上皮を覆うムチンの一種である MUC2 が気道内圧の変化で影響を受けるかを HSP（熱ショック蛋白）70 とともに検討した。結果として、気道内圧が上昇するとともに HSP70 の増加は見られたが、MUC2 は増加傾向にあるものの今回の研究では有意な変化は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,900,000	0	1,900,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	150,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：人工呼吸、肺傷害、ムチン

1. 研究開始当初の背景

集中治療室に入室する患者は、呼吸循環管理を目的に入室する患者が多く、挿管下に人工呼吸管理を行う例が大多数である。人工呼吸を行う際の人工呼吸器の設定や人工呼吸を行う期間は、患者の状態により様々であるが、概して人工呼吸の期間が長期間にわたる例や高い気道内圧で管理が行われる例等は

いわゆる人工呼吸器関連肺炎(ventilator associated pneumonia:VAP)もしくは人工呼吸器誘発肺傷害(ventilator induced lung injury:VILI)と言われる状態に至るものが見受けられ、患者の予後に与える影響は多大である。また、人間が本来持っている気道内の免疫防御反応である喀痰は、喫煙をしているものや呼吸器自体に過敏性の病変を有し

ているものには、人工呼吸時に多量の排出が認められるが、元来このような病変もなく、心不全の兆候もないものにも多量の排出が見られることがある。このような症例の発症機序としての人工呼吸と喀痰との関係を明らかにしようとする点からこの研究の着想に至った。

2. 研究の目的

人工呼吸を含む機械的伸展を肺に施すと、サイトカインを含む様々な炎症性メディエータが放出されることが知られている。これらのサイトカインの中で IL-1 β や TNF- α などは、気道の粘膜上皮を覆う mucin の一種である MUC2 などの遺伝子を活性化し、粘液の産生を亢進することが判明してきた。粘液の産生自体は、外界からの異物や刺激に対し、物理的に上皮を覆って、生体を守るために必要な生体防御反応の一つと考えられるが、過剰な産生はガス交換を妨げ、血液の酸素化を悪化することにつながると思われる。また、mucin 自身が緑膿菌などの細菌の colonization に関与するという報告がある。今回の研究では、人工呼吸器で気道内圧を変化させることによる肺への機械的伸展が、気道における MUC2 の活性に与える影響を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) ラットにおける人工呼吸中の気道内圧の設定

まず、ラットに人工呼吸を行うにあたってラットが気道損傷により死亡しない程度の気道内圧の設定を知るための予備実験を行った。実験には雄性の SD ラット (250-350g) を使用した。吸入麻酔薬セボフルランで迷妄麻酔後、腹腔内に静脈麻酔薬ペントバルビタールを投与し麻酔導入した。その後気管切開を施し、16G の静脈留置針の外筒を気管内に

挿入し、固定した。麻酔の維持と血液のサンプリングに 24G 静脈留置針の外筒を、右外頸静脈と左大腿動脈にそれぞれ挿入した。麻酔（鎮静）の維持は鎮静薬ミダゾラムを持続投与して行った。Harvard 社製のプレッシャー・コントロールのデジタルレスピレーターで、補助調節呼吸を行い、最高気道内圧の値とラットの状態の観察を行った。

(2) 気道内圧を変化させたときの HSP70 および MUC2 の発現の検討

これまでの我々の研究 (Kira S, Mori, M, Takatani J, et al. Effects of high peak airway pressure on the expression of heat shock protein 70 in rat lungs: a preliminary study. *Acta Anaesthesiologica Scand* 2006; 50: 469-74) でラットの気道に陽圧を加えると、数時間後に生体防御因子である HSP (heat shock protein) 70 が発現する事が判明していたので、今回も MUC2 とともにその発現を検討することにした。

ラットの人工呼吸前の前処置は上記と同様にした。圧設定は 10, 15, 20cmH₂O の 3 群を設定し、対照群はミダゾラムの鎮静のみの群とした。時間設定は 0, 4, 8, 16 時間とし、体温管理を行いながらそれぞれの時間に以下の実験用に数匹ずつ犠牲させ、気管から気管支にかけての組織を摘出した。同時に血液も採取し、血液ガス分析を行った。摘出した組織とともに、HE 組織による組織学的検討、HSP70 と MUC2 に対する免疫組織化学、HSP70 と MUC2 蛋白に対する Western blotting を行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① 人工呼吸中の気道内圧の設定に関して

ラットに人工呼吸を行うと、最高気道内圧が 30 cmH₂O では著明な肺水腫を伴う低酸素血症により 2 時間以上は生存が困難であること

が判明した。よって、ラットに安全に人工呼吸を行うためには気道内圧が 30 cmH₂O を超えない範囲で安全域を見て最高気道内圧を 20 cmH₂O までとすることにした。

②気道内圧を変化させたときの HSP70 および MUC2 の発現の検討

HE 染色においてはいずれの気道内圧および時間設定においても肺胞や気管支の破壊、肺水腫等は見られず有意な変化は認められなかった。免疫染色では、気道内圧を上昇させるに従って、そして時間の経過に伴って HSP70 は呼吸細気管支の上皮に強く発現していった。この結果は Western blotting においても認められた。

しかしながら、MUC2 は気道内圧の上昇と時間経過に伴い呼吸細気管支に発現の増加傾向は免疫染色、Western blotting ともに見られるものの統計学的に有意な増加は残念ながら今回の研究では認められなかった。

また、組織に変化がなかった事を反映するように血液ガスにも有意な変化は認められなかった。

③上記の結果に関する考察

今回研究対象とした MUC2 は一般的に気道上皮の goblet cell に発現し、緑膿菌の LPS、黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸、インフルエンザ菌などの存在で発現が増強するといわれている。また、IL-1 β 、TNF- α 、IL-9 などの炎症性サイトカインやケモカインが遺伝子の発現を調節し、その転写調節には NF- κ B が関わっているとされる。

そして、近年 MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) 蛋白と CSP (cysteine string protein) が mucin 類の気道分泌を調節するカギとなる分子として注目されている。さらに、侵襲時の生体防御因子として知られる HSP70 がこれら MARCKS と CSP とともに mucin の分泌にかかわること

も判明してきた。今回の研究では、これらのことから仮説上、人工呼吸という刺激を気道に加えると、HSP70 のみならず MUC2 の発現も増強することが予想されたが残念ながら予想通りの結果には至らなかった。

これに対し臨床研究において、VAP で気道内の mucin を調べた研究がある。それによると気道内圧の関与は定かではないが、感染を合併すると非合併例に比し有意に mucin の量が増加すると報告している。

今回の研究では、人工呼吸を施しただけで事前に何も肺傷害を加えなかったことで、それが mucin の増加を認めなかった理由の一つかもしれない。また、MUC2 の mRNA の発現と蛋白の発現には相違があるという報告もあるので、実際には増加していたのが見かけ上は認められなかった理由になることも考えられる。しかし、過去の文献においては機械的傷害が mucin の過剰分泌を促したり、気管挿管するという行為だけで粘液の産生が過剰になるという報告もあるため、もう少し詳細な条件設定と測定項目の追加があれば MUC2 の有意な増加が認められたかもしれない。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけ

人工呼吸器が誘導する肺傷害に関連する基礎的研究としては、in vitro では主に欧米において培養した肺胞上皮細胞を用い、機械的伸展を施すことによる様々なサイトカインの誘導を観察した研究が行われている。In vivo の研究では、ラットなどのげっ歯類に陽圧人工換気を行うことによる肺組織に起こる遺伝子上の変化が最近のトピックスとなっている。粘液の mucin に関する研究では、MUC 遺伝子自身が現時点で 9 種類クローニングされており、研究対象も粘液を分泌する臓器はすべて研究対象となっている。mucin の中で今回の対象としている MUC2 は、気管や気管支で発現することが判明しており、ウ

ウイルス感染、エンドトキシン、マイコプラズマ、緑膿菌感染などの刺激で発現が上昇するといわれている。今回の研究では、人工呼吸が気道内圧の上昇とともに HSP70 に関しては増加を認めたが、MUC2 に関しては有意な増加は認められなかった。しかし、これまでの国内外の研究で、この mucin の産生と人工呼吸器を結びつけた研究は見当たらなかったため、得られた成果は直接的には臨床にフィードバックできないが、これからの人工呼吸器関連肺炎や肺傷害の研究の発展させる上での一研究領域を築いた可能性がある。

(3) 今後の展望

これまでの MUC2 の研究では in vivo でも in vitro でもある種の刺激を加えて、発現を検討するスタイルが多かった。今回の研究では確かに人工呼吸という刺激を気道に加えたが、MUC2 の発現という面からみると刺激としては若干弱かったかもしれない。また、実際の臨床の場面から想定すると、呼吸器に問題がない患者に人工呼吸をすることはありえないので、今後は何らかの傷害を一定程度加えたうえで人工呼吸を施し MUC2 の発現を見る必要があると思われる。そして、mRNA と蛋白レベルの両方で詳細な検討が必要と考えられる。また同時に組織レベルでの IL-1 β , TNF- α , IL-9 などの炎症性サイトカインの濃度の測定も検討項目として必要であろう。

気道に発現する mucin は MUC2 だけではなく、MUC1、MUC3、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC7、MUC8 があることが判明している。この中でも MUC5AC は MUC2 と並んで気道傷害時に発現することが知られており、プロスタグランジン類、タンパク分解酵素 (好中球エラスターゼ、ヒト気道トリプシン、組織カリクレイン、メタロプロテイナーゼなど)、活性酸素種、喫煙、大気汚染物質などが引き起こす気道炎症が誘因として認められている。また、気道上

皮での発現は MUC2 よりも MUC5AC のほうが強いとされ、喀痰に占めるゲルを形成する mucin の割合としては圧倒的には MUC2 よりも多いので、今後の研究では MUC5AC の発現を検討したほうが良いかもしれない。

HSP70 の発現に関しては、MARCKS 蛋白、CSP とともに mucin の産生に関与することがわかってきたので今後の展望としては人工呼吸という圧負荷が気道にかかる状況での発現の詳細な機序の解明が待たれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉良 慎一郎 (KIRA SHINICHIRO)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：70404374