

機関番号：31201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592126

研究課題名 (和文) ARDS 患者の呼吸不全評価における全自動マイクロバブルテストの有用性の検討

研究課題名 (英文) Studies on the efficacy of automatic micro bubble test on the evaluation of respiratory failure in ARDS

研究代表者

諏訪部 章 (SUWABE AKIRA)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：20241713

研究成果の概要 (和文)：ARDS 患者の肺サーファクタント活性の指標として気道吸引液中のマイクロバブル (MB) 数を測定した。MB 数が少ない場合、検体中に活性のある肺サーファクタントが存在するか、または抑制活性が存在するかを検討するために、人工肺サーファクタントに検体を混和して MB 数を計測することで両者を鑑別することができた。特に、ARDS 症例で、経時的に MB 数が減少し、死亡 4 日前では抑制活性が 85.9 % まで増加している症例が認められ、人工肺サーファクタント補充の適応を考える上で有用な判断材料になる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The number of microbubbles (MB) in the aspirated specimen from the airway was measured to speculate the native surfactant activity in the patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS). If the MB numbers were small, we could differentiate whether they had an insufficient amount of surfactant or they had an inhibitory activity to surfactant, by adding the specimen to the artificial surfactant (Surfactant-TA, 0.1 mg/ml) as a positive control. It was noticeable that there was a patient whose MB number decreased with his clinical course and also that his inhibitory activity was increased to 85.9 % in the last sample 4 days before his death. These results may provide a judgmental hint whether the physician administers the artificial surfactant to the patients with ARDS or not.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：ARDS、肺表面活性、MB テスト

## 1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促進症候群 (ARDS) は重篤な呼吸不全であり、いったん発症すると致死率が 50% 前後と予後が極めて不良である。その発症機序として、種々の原因により肺毛細血管の透過性が亢進し、活性化好中球や血清成分

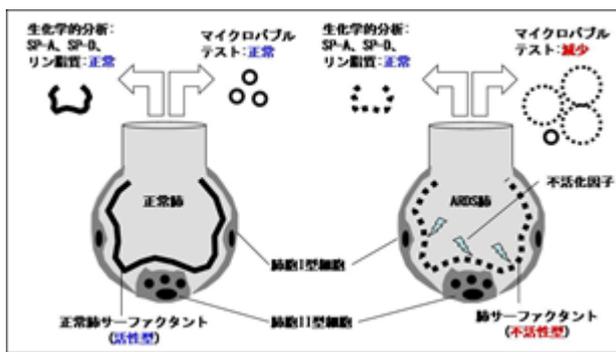
が肺胞内へ流入することで、内因性肺サーファクタント機能が失活することが提唱されている。その結果、呼気終末における肺胞虚脱が生じ、無気肺が引き起こされ、酸素化が著しく阻害される。

ARDS 管理においては、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> などが重

症度の指標として用いられるが、これはあくまで進行した呼吸不全の重症度の指標であって、早期診断には役立たない。その意味で、発症早期でいかに肺損傷の程度を予測するかが重要であり、その指標として、肺サーファクタント特異蛋白 (SP-A や SP-D など) や炎症性サイトカイン (IL-1、IL-8、TGF- $\beta$ 、TNF など) が検討されてきたが、いずれも満足行くものではなかった。

その原因として、ARDS では内因性肺サーファクタントの絶対量が不足しているのではなく、血清由来の蛋白成分などによってその活性が阻害されることが挙げられる。つまり、内因性肺サーファクタントの絶対量や阻害物質などを測定しても、実際の内因性肺サーファクタント活性を反映していないことが問題であった (図 1)。

図 1. ARDS における肺サーファクタントの活性阻害



ARDS における内因性肺サーファクタント活性を測定する方法として、採取した肺胞洗浄液 (BAL 液) 中の大凝集塊 (large aggregates) の割合を測定する方法 (Ikegami M, et al, Am Rev Respi Dis, 1992) があるが、分析には相当量の肺サーファクタントが必要であり、評価法も煩雑であり、臨床応用までには解決すべき問題が山積されていた。

今回の研究で用いるマイクロバブル (MB) テストとは、未熟児の RDS の早期診断として、羊水または出生直後の児の胃液または気道吸引液を泡立て、顕微鏡下に直径  $15\mu\text{m}$  以下の安定した MB 数をカウントし、未熟児の肺サーファクタント活性が十分か否かを判定する検査法である。しかし、この検査では、泡立ての手技や顕微鏡下での MB 数のカウントに熟練を要し、不慣れた医師による誤判定が問題となっていた。

これに対し、研究分担者である千田らが未熟児の RDS 診断用に開発した全自動 MB テスト装置 (図 2) は、 $100\mu\text{l}$  程度の微量検体を用い、サンプル攪拌から MB 数のカウント (図 3) までを全自動化することで、これまでの問題を一挙に解決した (塚原央之、千田勝一ら、岩手医学会誌、59(4):277-282、2007)。今回の研究では、この装置を用いて、ARDS 患者で

予想される内因性肺サーファクタントの活性低下の程度を評価することが目的となる。

図 2. 全自動マイクロバブル測定装置

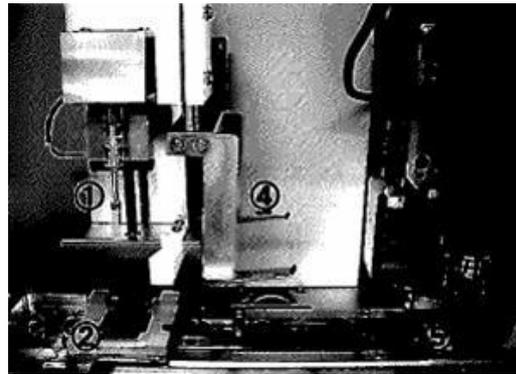
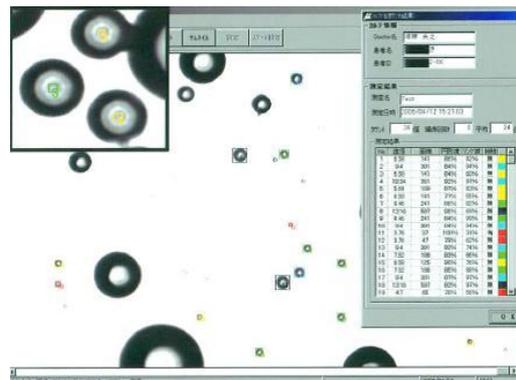


図 3. 全自動マイクロバブル測定装置



## 2. 研究の目的

ARDS では、内因性肺サーファクタント機能が失活し、肺コンプライアンス低下と無気肺によって重篤な呼吸不全が引き起こされる。現在までこの疾患の重症度や予後予測に対する有効な指標はない。今回の研究では、研究分担者である千田らが未熟児の RDS 診断用に開発した全自動 MB テスト装置を用いて、ARDS 患者で予想されている内因性肺サーファクタント機能障害の有無を迅速かつ客観的に評価し、重症度や予後予測の評価に役立てることが目的である。

今回の研究では、①ARDS 患者の末梢気道から得られた種々の微量検体 ( $100\mu\text{l}$  程度) を材料として、全自動 MB 法により内因性肺サーファクタントの活性を測定しうるか否か、②適切な検体採取法や保存条件は何か、③この装置から得られる、一定検体量あたりの MB 数から、ARDS の重症度、治療効果、予後など推測が可能か否かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 全自動 MB 装置の原理:

本装置は、サンプルのスライド上での泡立て部分、検体移動部分、CCD カメラに接続した顕微鏡部分、パソコンによる解析部分とか

らなる。サンプルの泡立て部分は、茶筌(せん)をモデルに開発されたプラスチック製の回転式攪拌装置である。これにより、100 $\mu$ l という微量検体で、これまでの手技による気泡作成のばらつきの問題が解消された。次に、顕微鏡下に複数視野を CCD カメラで撮影し、良好な肺サーファクタント活性を反映する直径 15 $\mu$ m 以下の MB を瞬時に認識しカウントする。これにより、検査に要する時間が大幅に短縮され、かつ判定のばらつきが解消される。

(2) 検体採取法の検討：

ARDS 患者は人工呼吸管理下にあることが多く、下気道からのサンプルは比較的得やすい。今回は、気道吸引液を材料とし比較検討する。

(3) 検体保存の影響：

未熟児の RDS では、人工肺サーファクタント投与の適応を可及的に迅速に決定しなければならないが、ARDS の場合には重症度や治療効果の判定などには比較的余裕がある。その際、検体保存によって測定結果が変化しうるかが重要な検討事項になる。

(4) 生化学分析データとの相関：

得られた下気道の各種検体は、標記の肺サーファクタント活性検討の他に、SP-A や SP-D などの蛋白成分、特異脂質である飽和リン脂質成分、IL-1、IL-8、TGF- $\beta$ 、TNF などの炎症性サイトカインなどをあわせて測定し、活性値との関係を検討する。

(5) カットオフ値の設定：

良好な肺サーファクタント活性を反映する直径 15 $\mu$ m 以下の MB が一定量の検体中に何個以上あれば重篤な呼吸不全に進展しないかを予測できれば重要な ARDS の管理指標となる。そのために、ARDS を発症していない急性呼吸不全患者からも下気道検体を採取し、後に ARDS を発症する群と発症しない群との間に、MB 数のカットオフ値が設定しうるか検討する。

(6) 重症度、治療効果、予後との関係：

比較検討する臨床データとしては、①ARDS のタイプ(敗血症由来、肺炎由来、外傷由来など)、②呼吸不全の重症度(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> 比など)、③治療経過(ステロイド投与の有無、気管内挿管期間、ICU 滞在日数など)、④予後(生存率)などを取り上げ、MB 数との関係を解析する。

4. 研究成果

(1) 2008 年度の研究成果

今年度の補助金申請は、11 月末に採択通知が届いたことから、時間的な余裕がなく、本学倫理委員会での承認、予備的・基礎的実験に充てられた。

まず、2009 年 1 月 8 日開催の本学倫理委員会にて、本研究の目的や倫理的問題などにつ

いて提示し、1 月 20 日づけで本研究の実施が承認された(受付番号 H20-107)。

承認後、直ちに種々のサイトカインなどの実験試薬を発注し、予備的実験を開始した。予備的実験としては、まず採取検体の安定性(凍結保存の影響)の検討を、ラットの肺洗浄液を用いて行った。ラットの肺洗浄液(1 匹あたり 10 ml で 2 回洗浄)を、-20 $^{\circ}$ C で凍結し、1 週間保存して、MB テストを実施した。

その結果、凍結前の平均 MB 数は 10 個であり、これは凍結によっても減少することはなかった。検体中のリン脂質濃度は 18 mg/dl と凍結前後での減少は見られなかった。しかし、同じラットの 10%血清を混入させると MB 数は 1 個まで減少した(表 1、図 4・5)。

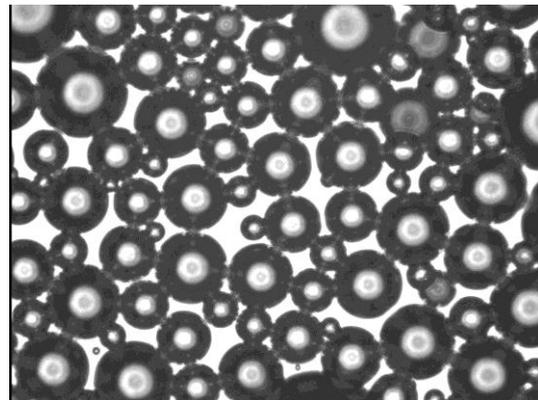
表 1. 肺洗浄液を用いたマイクロバブルテストのまとめ

検 体	MB 数	リン脂質濃度
ラット肺洗浄液(新鮮)	10	18 mg/dl
ラット肺洗浄液(結融解後)	10	18 mg/dl
ラット肺洗浄液+10%ラット血清	1	-
ラット肺洗浄液+50%生理食塩水	0	-

図 4. ラット肺洗浄液中のマイクロバブル



図 5. ラット肺洗浄液への血清添加によるマイクロバブルの消失



以上の結果から、①臨床検体は凍結保存しても解凍後に測定可能であること、②血清成

分の混入により十分に活性低下がおきること、が示された。

このシステムは肺サーファクタント活性を安定的に測定でき、かつ ARDS における活性低下を評価しうると考えられた。

### (2) 2009 年度の研究成果

2009 年度は、岩手県高度救命救急センターに熱傷で入院された症例の蓄積に充てられた。今年度は 4 症例 (24 検体) が集まった。検体は、人工呼吸器に連結された患者で、喀痰喀出が少ない場合は、少量の生理食塩水を注入し回収した。膿性痰の場合は、採取後生理食塩水を混ぜて、ガーゼフィルタで膿性部分を除去し、濾過液を測定まで $-20^{\circ}\text{C}$ で測定まで凍結保存した。

症例蓄積を継続しつつ、これまでに収集された検体を 2 度に分けて MB テストを実施した。凍結した検体を測定前に溶解し、室温に戻した状態で  $80\mu\text{L}$  を測定に用いた。独自に作成した茶筌型のブラシで検体を回転混和し、CCD カメラで直径  $15\mu\text{m}$  以下の MB 数を測定した。それぞれ 1 視野あたり 3 深度、全 9 視野で合計 27 視野の MB 数をカウントした。測定結果では、MB が 1 個も測定されない検体から最大 23 個まで観測され、気道吸引液から MB が測定できることが示された。

2009 年度の 4 症例 (24 検体) からは、ARDS 発症見られず、ARDS 発症や予後予測は検討できなかった。

### (3) 2010 年度の研究成果

2010 年度は、岩手県高度救命救急センターならびに集中治療室 (ICU) での検体採取を継続した。昨年度の 4 症例 (24 検体) に加え、今年末までに 20 症例 (41 検体) が集まった。

このうち、2011 年 3 月の時点で病名や転帰が追跡できたのは 15 例で、特に肺疾患のない対照症例 6 例、熱傷や大腸穿孔による敗血症を併発した 9 例中、5 例で ARDS を発症した。ARDS 5 例中 4 例が死亡した。

収集検体  $80\mu\text{L}$  を用いて MB テストを実施した。解析結果では MB 数が 0~5 個と少ない症例が多かった。この理由として検体中に活性のある肺サーファクタントが含まれていないのか、あるいは検体中に肺サーファクタント活性抑制物質が存在したためなのかが不明であったので、検体中のサーファクタント・プロテイン-A (SP-A) 濃度を測定した。

しかし、いずれの検体も SP-A は検出できなかった (この一因として、研究機関の終了直前の 3 月 11 日に東日本大震災が発生し、その後の余震も含めて何度か実験室の冷凍庫が停電の影響を受け、温度が上昇するというアクシデントが発生した。保存検体または購入マーカーが凍結・融解し失活した結果、満足のゆく結果が得られなかった可能性もある)。

MB 数が少なかった原因検索の一環として、

検体中に活性抑制因子が含まれているか否かを検討する目的で、IL-1 $\beta$ 、IL-8、TGF $\beta$ 、TNF $\alpha$ などのサイトカイン含有量を測定する他に、人工肺サーファクタント (サーファクテン:  $0.1\text{ mg/ml}$ ) を陽性対照として検体添加による抑制活性も同時に測定した。その結果、検体の中には肺サーファクタント活性自体が低い検体の他に、抑制活性の強い検体も含まれていることが判明した。

今回の解析結果では、ARDS の発症症例における MB 数の低下や抑制活性の増加など一定の傾向及び各種サイトカインマーカーとの有意な関係は認められなかった (表 2)。

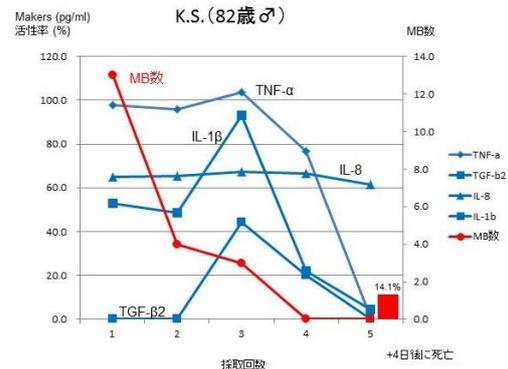
表 2. 初回採取検体中のサイトカイン濃度と MB 数

	n	TNF-a	TGFb2	IL-8	IL-1b	MB 数
対 照	6	31.1	19.1	50.5	22.4	10.5
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
非 ARDS	4	40.3	18.0	19.7	31.0	9.2
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
ARDS	5	20.0	28.6	45.5	36.3	4.0
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
ARDS	5	19.9	26.1	28.1	44.9	4.7
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
ARDS	5	20.8	6.0	53.6	11.5	6.6
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
ARDS	5	43.0	13.4	20.9	23.3	7.4
		$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$

※サイトカイン濃度は pg/ml、mean $\pm$ SD で表示。

しかし、ARDS で死亡した 82 歳男性患者での経時的な観察から、死亡直前までにこの MB 数が経時的に低下する症例が見られた (図 6)。

図 6. ARDS で死亡した患者の MB 数の経時変化



さらに、この症例の死亡 4 日前に得られた検体の人工肺サーファクタントに対する抑制活性は 85.9%まで増加しており、興味深い結果であった (図 7)。

図 7-1. 82 歳男性(図 6)の検体の抑制活性①:人工肺サーファクタント(0.1 mg/ml) では、多数のマイクロバブルが認められる。

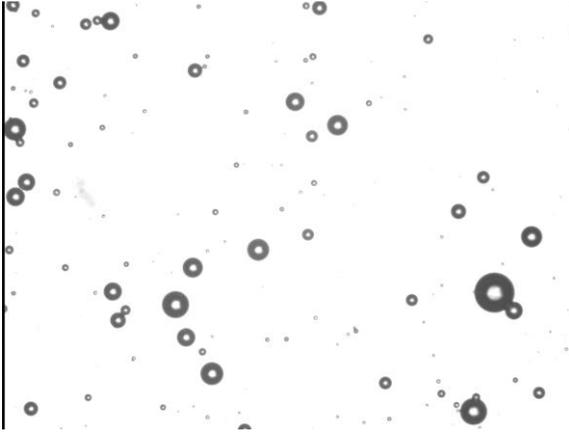
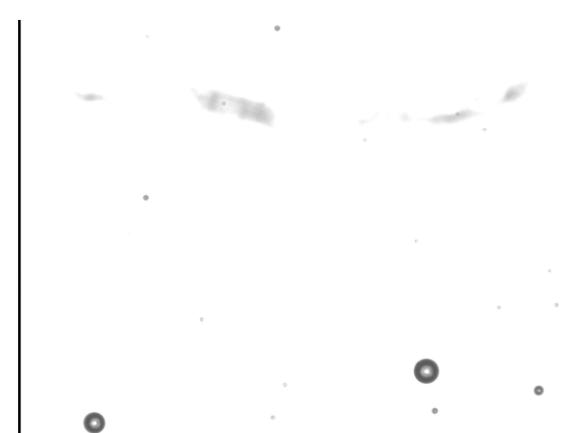


図 7-2. 82 歳男性(図 6)の検体の抑制活性②:気道吸引検体のみではマイクロバブルは認められない。



図 7-3. 82 歳男性(図 6)の検体の抑制活性③:人工肺サーファクタント(0.1 mg/ml) + 気道吸引検体ではマイクロバブルの減少が認められる(抑制率 85.9%)。



また、ARDS を発症した 5 例中 4 例が死亡したが、この 4 例中 3 例で経過中に得られた気道吸引検体の人工肺サーファクタントに対する抑制活性が見られたことは特筆に値す

る(それぞれ 85.9%、43.8%、63.6%)。

#### (4) 研究成果のまとめと今後の課題

今回の検討では、ARDS 患者の気道吸引液中の肺サーファクタント活性の指標として MB 数を測定することができた。今回は集積症例が十分でなかったこと、東日本大震災による停電などの影響で検体や試薬が失活した可能性があることなどから、MB と ARDS の予後や各種マーカーとの関連性を明らかにすることはできなかった。しかし、MB 数が少ない場合、検体中に活性のある肺サーファクタントが存在するか、または抑制活性が存在するかを検討するために、人工肺サーファクタントに検体を混和して MB 数を計測することで両者を鑑別することができた。特に、ARDS 症例で、経時的に MB 数が減少し、死亡直近では抑制活性が増加している症例が認められ、人工肺サーファクタント補充の適応を考える上で有用な判断材料になる可能性が示唆された。今後さらに症例を増やしての検討を行う必要がある。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

①Harayama T, Shindou H, Ogasawara R, Suwabe A, Shimizu T: Identification of a novel non-inflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor, J Biol Chem, 査読有、283(17)、2008、11097-11106

②山田友紀、小笠原理恵、諏訪部章、館田一博: 肺サーファクタントおよび肺胞 II 型細胞と緑膿菌 quorum sensing 機構との相互作用、日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌、査読無、39、2008、35-37

③Ogasawara R, Yoshida Y, Tohyama K, Satoh Y, Suwabe A: Isolated rat alveolar type II cells protrude intracellular lamellar bodies by forming bubble-like structures during surfactant secretion, Cell Tissue Res, 査読有、335、2009、397-405

④小笠原理恵、菱川大介、進藤英雄、清水孝雄、林秀一郎、吉田康夫、遠山稿二郎、諏訪部章: 肺胞 II 型細胞の新しい分化維持システムの開発—肺サーファクタント特異蛋白とリン脂質合成酵素の遺伝子発現を指標とした検討、分子呼吸器病学、査読無、14(1)、2010、96-100

⑤諏訪部章: ALI/ARDS 治療の新展開 人工肺サーファクタント製剤による ALI/ARDS の治療、呼吸と循環、査読無、58(6)、2010、587-594

⑥ 諏訪部章：特集号「免疫反応と臨床検査 2010」V 生化学 F 線維化マーカー肺の線維化マーカー、検査と技術、査読無、38(109)、2010、926-930

〔学会発表〕(計 1 件)

① 小笠原理恵、菱川大介、進藤英雄、清水孝雄、林秀一郎、吉田康夫、遠山稿二郎、諏訪部章：ラット肺胞 II 型上皮細胞の表現型保持のための培養条件の検討、日本肺サーファクタント・界面医学会、2009.10.10、金沢

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

諏訪部 章 (SUWABE AKIRA)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20241713

### (2) 研究分担者

小笠原 理恵 (OGASAWARA RIE)  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70347871

千田 勝一 (CHIDA SYOICHI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30108930

遠藤 重厚 (ENDO SHIGEATSU)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30160394

### (3) 連携研究者

なし