

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月24日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791753

研究課題名（和文）細胞外ATP測定を応用した人工呼吸関連肺損傷の病態解析

研究課題名（英文）Role of extracellular ATP in the pathogenesis of ventilator-induced lung injury

研究代表者

松山 広樹（MATSUYAMA HIROKI）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80515289

研究成果の概要（和文）：

人工呼吸関連肺損傷発症における細胞外ATPの関連性について検討を行った。換気容量の増加に伴いATPは増加した。sepsisモデルマウスでは健常マウスよりその増加が大きい傾向が見られ、VALI発症における炎症反応惹起に関与していることが示唆された。ATP作用の抑制によるVALIの改善効果は十分に検討することができなかった。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the role of extracellular ATP in ventilator-induced lung injury. Extracellular ATP increased with the increase in tidal volume of mechanical ventilation. The increase of ATP in the sepsis model mice tended to be larger than that in the healthy mice, suggesting that ATP had some role in the inflammatory reaction in VALI. It was not fully examined whether the inhibition of ATP could improve the VALI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,600,000	480,000	2,080,000
23年度	700,000	210,000	910,000
24年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

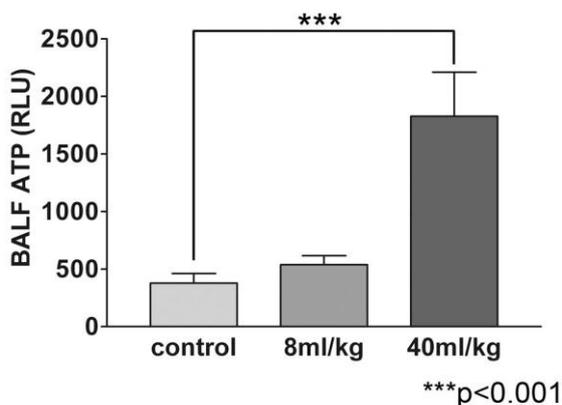
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：人工呼吸関連肺損傷

## 1. 研究開始当初の背景

機械式人工呼吸は呼吸不全患者の治療法として有用である一方、非生理的な呼吸メカニクスによる機械的ストレスが肺組織の炎症を惹起することもある。機械式人工呼吸に伴う肺損傷は Ventilator associated lung injury (VALI) と総称され、その予防と有効な治療法の確立は救急・集中治療医学における喫緊の課題である。敗血症(sepsis)患者の多くは機械的人工呼吸を必要とするが、敗血症による全身性炎症反応そのものが肺に傷害を与えることは広く知られており、その影響を考慮すると、VALI の発症は Sepsis 患者において、より高頻度かつ重篤である可能性がある。

細胞内に豊富に存在するアデノシン三リン酸(ATP)はさまざまな刺激に反応して細胞外に放出され、局所の炎症反応に関与していることが指摘されている。研究代表者らは、侵襲的人工呼吸によって肺胞洗浄液中に ATP が増加すること(図)、分泌された細胞外 ATP が肺の炎症反応を惹起することを報告し、ATP が VALI において機械的ストレスを炎症反応に転換する key molecule である可能性を提示した。



## 2. 研究の目的

本研究では、sepsis モデルマウスに second hit となり得る機械式人工呼吸を行うモデルを確立し、種々の換気条件によって生じる肺の病理学的変化を細胞外 ATP ならびに炎症性サイトカインに注目して解析し VALI の病態メカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。

また ATP の作用抑制による VALI の病態改善効果の有無について検討し VALI の新たな治療標的を提案したいと考えた。

さらに、人工呼吸での呼気中 ATP 濃度を連続かつ非侵襲的に測定するモニターを確立することにより、肺における細胞外 ATP 濃度をモニタリングし、肺の炎症所見と比較することで細胞外 ATP が人工呼吸中の肺損傷のバイオマーカーとなる可能性を検討したいと考えた。

## 3. 研究の方法

(1) 人工換気容量と肺組織中 ATP 及び炎症性サイトカインの関連性の解析

マウスを用いた Cecal ligation and puncture (CLP) 法および LPS 腹腔内投与による sepsis モデルを作成した上で健常マウスおよび sepsis モデルマウスに second hit としての人工呼吸器を用いた人工呼吸を施行した。一回換気量を低容量から侵襲的高容量まで段階的に設定し、人工呼吸による肺損傷の程度を組織学的評価、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-8、IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子の発現定量および肺組織の ATP 濃度測定によって評価を行うことにより、人工呼吸そのものによる肺損傷および背景に敗血症のある肺で

の人工呼吸による肺損傷の程度と炎症性サイトカインおよび肺組織 ATP の関連性の調査を行う。

#### (2) ATP 作用抑制による VALI での炎症軽減効果の検討

ATP は炎症性サイトカインの産生および放出に関与しているとされており (Khakh BS, North A Nature. 2006; 442: 527-532)、ATP の代謝産物である adenosine の受容体を介するシグナル伝達は人工呼吸器関連肺損傷を軽減するとの報告があるが、(Eckle T et al, J Clin Invest. 2008; 118: 3301-3315) sepsis モデルにおける同様の効果を検討した文献は見当たらない。本研究では肺損傷を惹起する換気容量設定での人工呼吸を施した sepsis モデルマウスを用いて ATP 分解酵素である apyrase または adenosine を肺局所に経気道的投与を行い、人工呼吸関連肺損傷における組織学的な炎症軽減効果および種々の炎症性サイトカイン発現抑制効果について、real-time PCR 法による mRNA の発現定量などにより調査を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 背景病態の差異による人工換気容量変化に対する肺損傷への影響

実験前の予想通り、人工換気容量が大きくなるにつれて炎症性サイトカインの発現および細胞外 ATP は増加した。また同一の換気容量での比較においては、sepsis モデルマウスでは健常マウスに比して人工呼吸中に死亡に至るものが多く、ATP 濃度も増加する傾向にあった。予想以上に個体間のばらつきが大きく統計的な有意差は得られなかったが、VALI において ATP が炎症反応の増大に関与している可能性が示唆された。

##### (2) ATP 作用抑制による VALI 改善効果

LPS 腹腔内投与により作成した sepsis モデルマウスに人工呼吸を施し、組織学的に人工呼吸による肺損傷を惹起する換気容量設定での人工呼吸を施した sepsis モデルマウスにアデノシンまたは ATP 分解酵素アピラーゼを経気道的に投与し、肺損傷軽減効果および全身性の炎症軽減効果の有無を調査する予定であったが、sepsis モデルマウスにおいては、経気道的薬物投与後の人工呼吸中に死亡に至るマウスが多かった。投与自体の侵襲が大きい可能性も考えられたため、安定した投与方法を模索しその確立に難渋した結果、薬物投与による VALI 改善の効果を十分検討することは出来なかった。

また、当初予定していた人工呼吸中における呼気 ATP 濃度の非侵襲的な連続測定を行うモニターの確立は、時間的余裕がなく施行できなかつたため、再度研究費の申請を行い遂行していきたいと考えている。

#### 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 1 件)

- ① Momoka Tonan, Soshi Hashimoto, Akio Kimura, Hiroki Matsuyama, Hiromi Kinose, Maiko Sawada, Nobuaki Shime, Natsuko Tokuhira, Yuko Kato, Masayuki Sasaki, Kunihiko Tsuchiya, Satoshi Higaki, Tadaki Oomae, Satoru Hashimoto Successful treatment of severe asthma-associated plastic bronchitis with extracorporeal membrane oxygenation. J Anesth. 2012 Apr;26(2):265-8. (査読有)

② 松山広樹, 橋本悟

人工呼吸離脱困難患者への対応

Modern Physician. 2011 (31):566-69.

(査読無)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 広樹 (MATSUYAMA HIROKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80515289

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし