

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16626

研究課題名（和文）重度肺傷害モデルのウサギによる人工呼吸器中の自発呼吸が横隔膜に与える影響について

研究課題名（英文）Effects of spontaneous breathing on the diaphragm during ventilation by rabbit models of severe lung injury

研究代表者

小山 有紀子（Yukiko, koyama）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70942423

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：ウサギを用いて重症肺傷害モデルを作成する。ウサギを自発呼吸を強く残した群、自発呼吸のない群に分け、人工呼吸管理を行う。0時間、4時間、10時間の終了後にウサギの横隔膜を取り出し、横隔膜の傷害の程度を調べた。自発呼吸を強く残した群では、経時的に横隔膜に傷害を認めた。病理学的に炎症細胞浸潤、筋腹の変性などの変化を認めた。自発呼吸のない群では炎症細胞浸潤も筋腹の変性も認められなかった。これにより、自発呼吸を強く残すと横隔膜に炎症が起こり、筋腹に変性が起こることが証明された。さらに、経時的に最大吸気圧を測定しており、8時間をピークに下がってきていることから、筋疲労が起こったと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症肺傷害が起こった際に肺の治療に重点が置かれるが、横隔膜も傷害を受けており、横隔膜傷害によって人工呼吸器離脱が遅れることは以前から言われていた。筋弛緩薬を用いて横隔膜の委縮が生じることについては組織学的に証明されているが、強い自発呼吸努力を残した後に組織学的にどのようなことが起こるのかは証明されていなかった。今回の研究では横隔膜傷害を証明した結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：A model of severe lung injury was created using rabbits. Rabbits were divided into two groups, one with strong spontaneous respiration and the other without spontaneous respiration, and were placed on ventilatory management; at the end of 0, 4, and 10 hours, the diaphragm of the rabbit was removed and the extent of diaphragm injury was examined. In the group that remained strongly spontaneously breathing, injury to the diaphragm was observed over time. Pathology showed inflammatory cell infiltration, degeneration of the muscle belly, and other changes. In the group without spontaneous breathing, neither inflammatory cell infiltration nor degeneration of the muscle belly was observed. This proves that the diaphragm is inflamed and the muscle belly is degenerated when spontaneous breathing is left strongly. Furthermore, the maximum inspiratory pressure was measured over time, and it peaked at 8 hours and then dropped, suggesting that muscle fatigue had occurred.

研究分野：人工呼吸関連横隔膜傷害

キーワード：横隔膜傷害 重症肺傷害 炎症

1. 研究開始当初の背景

昨今の COVID のような急性肺傷害に対して人工呼吸器管理を行った患者では、長期人工呼吸を必要とする場合がある。原因のひとつとして、人工呼吸器による肺傷害 (VILI; ventilator induced lung injury) が考えられてきた。酸素化が低下した患者への人工呼吸器管理について、様々な研究が発表されたが、2000 年に the ARDS network によって発表された低一回換気量による肺保護換気戦略 (N Engl J Med 2000 ; 342 : 1301 – 8) から始まり、2010 年に ARDS 患者に早期に 48 時間筋弛緩を行うことで死亡率が低下した、という研究 (Laurent Papazian, et al. N Engl J Med. 2010 Sep 16;363(12):1107-16.) が発表され、急性肺傷害、人工呼吸管理の早期に筋弛緩薬を使用することを治療の一環として行うようになってきた。さらに、2019 年に筋弛緩薬を使用しなくても適度に自発呼吸努力を残すことで筋弛緩薬を使用するのと同じ死亡率、予後であったとする研究結果も発表されている (N Engl J Med. 2019 May 23;380(21):1997-2008.)。筋弛緩薬の使用の有無の議論が進むにつれて、筋弛緩薬使用による筋萎縮にも注目が集まるようになってきた。筋弛緩薬は骨格筋に働き、呼吸筋にも影響する。横隔膜は安静時呼吸の 80% を担う大きな呼吸筋で、筋弛緩薬によって抑制される。筋弛緩薬を使うことで横隔膜が萎縮し、横隔膜機能不全による人工呼吸期間が延長する可能性があると考えられ始めた。実際に横隔膜の厚さをエコーで測定した臨床研究では、横隔膜の厚さの変化が 10% 以上変化する場合に人工呼吸期間が延長するという報告がすでに出されている (Ewan C. Goligher, et al. Am J Respir Crit Care Med 2018;197:204)。横隔膜の厚さが減少する場合は、人工呼吸器との不同調、長期間の筋弛緩薬の影響、あるいは人工呼吸器の過度なサポートによる、横隔膜の筋萎縮が原因と考えられてきた (Ewan C Goligher, et al. Am J Respir Crit Care Med 2015;192:1080, Satoru Ebihara, et al. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:221)。一方で横隔膜が肥厚する場合については、人工呼吸器のサポート不足により、自発呼吸努力が強く残った場合と考えられている (Ewan C Goligher, et al. Am J Respir Crit Care Med. 2018 Jan 15;197(2):204-213.)。以上のように、臨床では急性肺障害の治療中に横隔膜の厚さが変化し、人工呼吸期間を延長させることは証明されているが、筋弛緩薬の使用と横隔膜の厚さの関係、自発呼吸努力の強さと横隔膜の厚さの関係について、基礎実験を行った研究結果はなく、横隔膜に起こっている炎症や傷害などは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ウサギを用いて急性肺傷害モデルでの自発呼吸努力の違いが横隔膜に与える影響について、呼吸生理学、病理組織学的に解析を行う。これは、我々が今までに行ってきた肺傷害の発生メカニズムを研究する中で、自発呼吸努力を作り出す横隔膜の働きの重要性に着想したものである。横隔膜が 10% 以上変化する場合に人工呼吸器期間が延長することは臨床では証明されており、人工呼吸器関連横隔膜傷害があることは確かである。しかし、横隔膜の変化を呼吸生理学と結び付けて、さらに病理組織、プロテオミクス解析、遺伝子解析 (RNA シーケンス) を行った研究はない。そこで、我々はすでに確立されたウサギを用いた急性肺傷害を使って、自発呼吸努力の違うグループを作り、人工呼吸管理を行った後で横隔膜を取り出し、組織学的解析と RNA シーケンス解析、及び血清からのプロテオミクス解析、を行うものである。

3. 研究の方法

- (1) 大阪大学動物実験規定に従い、動物実験計画書を提出、動物実験研究倫理審議会を通った計画書に沿って実験を行う。規定に従い、動物に苦痛を与えないよう最大限配慮して行うこととする。
 - (2) ウサギに麻酔を十分に行ったうえで気管切開を行い、気管切開孔から生理食塩水を注入し肺洗浄によってサーファクタントを除去。その後、高一回換気量による人工呼吸管理を1時間行い、ウサギ重度肺傷害モデルを作成する。
 - (3) その後、ランダムに3群、筋弛緩使用群、適度な自発呼吸を残した群、過度な自発呼吸努力を残した群に分ける。の適度な自発呼吸を残した群について、以前の研究で我々は呼気終末陽圧を変化させることで、自発呼吸努力を抑制できることを証明している。呼気終末陽圧を調節することで、適度な自発呼吸努力を残した群を作ることができる。
 - (4) 3群に分けたのち、10時間の人工呼吸管理を行う。横隔膜電気活動カテーテルを留置し、人工呼吸器Servo-i (Maquet, Solna, Sweden)を使用し、横隔膜電気活動(呼吸ドライブ)を経時的に測定する。また全群に胃・食道パルーンを留置することで、経横隔膜圧(横隔膜が発生する筋力)を経時的に測定し筋疲労を評価する。毎時間、血液ガス分析、IL-6及びトロポニンC測定用の採血を行う。呼吸回路閉塞による最大吸気陰圧、横隔膜筋力発生効率を測定し、10時間後に安楽死させる。
 - (5) 横隔膜を取り出し、腹側から背側にかけて横隔膜の3領域凍結切片を作成し、HE染色を行い、横隔膜傷害スコア、周囲長を測定する。またこれら3領域の横隔膜からtotal RNAを抽出しwhole transcriptome解析を行う。また終了時の血液サンプルでプロテオミクス解析を行う。
 - (6) 4時間終了の実験も行い、継続的な変化についても検討を行う。
- 病理組織については、以前から共同研究をさせていただいている (Am J Respir Crit Care Med. 2018 May 15;197(10):1285-1296.) 分子病理学の山本浩文先生に研究協力をお願いする。
- (7) プロテオミクス解析、Whole transcriptome解析については共同研究者の国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 今井由美子先生に研究協力をお願いする。

・エクソソームの単離とプロテオミクス解析

採取した血液から血清を分離する。得られた血清 0.2~1ml から超遠心法(4℃、100,000g、60min×2回)を用いてエクソソームを単離する。エクソソームマーカー(CD9、flotillin-1等)抗体を用いたウエスタンブロッティング法で単離エクソソームを確認し、エクソソームのサイズや数を、ナノパーティクルトラッキング解析法(NTA)を用いて測定する。その後、質量分析法を用いて得られたエクソソームについて、含まれるタンパク質の網羅的解析(プロテオミクス解析)を行う。プロテオミクス解析で同定されたタンパク質について Gene Ontology 解析やパスウェイ解析、分子ネットワーク解析を行い、病態に関連した分子群を抽出する。

・横隔膜標本の whole transcriptome 解析

摘出した横隔膜標本から total RNA を抽出し Stranded ライブラリーを作製し、HiSeq を用いてシーケンスすることで whole transcriptome 解析を行う。シーケンスデータを参照ゲノム配列にマッピングし、膨大なデータから遺伝子発現量を算出する。これにより、炎症系マーカー、壊死系マーカー、線維化系マーカー等どの系が動いているのかを明らかにすることができる。

4．研究成果

(1)横隔膜傷害について

長時間、自発呼吸努力を残した群では病理組織学的に異常組織の上昇をみとめ、筋腹の周囲長、面積の膨張、炎症細胞浸潤や筋組織の変性が認められるなど、横隔膜傷害が組織学的に認められた。

(2)経時的な変化について

肺傷害モデルを作成してから0時間、4時間、10時間での横隔膜組織を染色した結果、上記にあるような傷害が時間がたつごとに多くあらわれることが証明された。MIPの変化を測定しており、8時間をピークに下がってきていることから、筋疲労も示唆された。

(3)横隔膜に特有の炎症変化

自発呼吸の有無にかかわらず、肺傷害モデル作成から人工呼吸管理を行うと、肺傷害は進行し、炎症細胞浸潤が認められる。それと異なり、自発呼吸のない群では横隔膜に炎症細胞浸潤は認められず、自発呼吸を残した群のみで炎症細胞浸潤が認められた。これにより、自発呼吸を残した群では、横隔膜特有に炎症が起こっていることが証明された。

(4) プロテオミクス解析、Whole transcriptome 解析について

自発呼吸あり10時間の群で細胞増殖、細胞再生に関わるパスウェイが動いており、RNAシーケンスではたんぱく質フォールディング遺伝子、ストレス対応、制御応答関連遺伝子、アポトーシス、細胞死関連遺伝子が発現しており、組織学的な結果と矛盾しないと考えられる。

(5)成果の位置づけとインパクト

人工呼吸関連横隔膜傷害を考えるうえで、横隔膜の厚さが委縮する場合と肥厚する場合に予後が悪くなることは知られている。これまで、肥厚する場合については原理は考えられていたが横隔膜自体にどのような変化が起こるのかについては不明のままであった。今回、この実験結果は、横隔膜自体にも傷害が起こり、さらに経時的に進行していくこと、それに伴って筋力が低下していくことが証明されたことは大きな意味があると考ええる。今後、臨床で問題となっている事象と横隔膜変化についても組織学的に証明されるものと考ええる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 小山有紀子
2．発表標題 人工呼吸の害と自発呼吸の害
3．学会等名 日本呼吸療法学会
4．発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------