

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592353

研究課題名(和文)人工呼吸器関連肺障害に対する二酸化炭素血症の保護作用機序解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Protective effect of hypercapnia for ventilator induced lung injury and develop a new drug for ventilator induced lung injury.

研究代表者

有馬 一(Arima, Hajime)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20254295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：人工呼吸器関連肺障害予防のための高二酸化炭素血症による肺保護作用の機序を解明するために、マウスを使った人工呼吸器関連肺障害モデルを作成した。  
この人工呼吸器関連肺障害モデルで高二酸化炭素血症による肺保護作用が確認できた。  
各種サイトカインを測定したところ、高二酸化炭素血症による肺保護作用に対して、インターロイキン6(IL-6)が重要な役割を担っていると考えられた。IL-6の細胞内シグナルのうち、JAK-STAT経路が何らかの関連を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Hypercapnia has been reported to have a protective effect for ventilator induced lung injury, however the detail is unknown. To demonstrate a mechanism of protective effect of the hypercapnia for the ventilator induced lung injury, mice model of ventilator induced lung injury was developed. Large amount of ventilatory volume increased lung injury in a time dependent manner. Hypercapnia significantly decreased the ventilator induced lung injury. Cytokines such as IL-1b, IL-6, MIP-1a and TNFa from bronchoalveolar lavage solution were measured. Interleukin-6 was significantly increased by the artificial ventilation and significantly decreased by hypercapnia. JAK-STAT signal pathway, which is downstream pathway from IL-6, was associated with mechanism of protective effect of the hypercapnia to the ventilator induced lung injury. These results raise hopes developing a new drug for the ventilator induced lung injury.

研究分野：麻酔学

キーワード：人工呼吸器関連肺障害

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 集中治療領域では人工呼吸療法は普遍的な治療法であり、その効果は周知の事実である。しかし、その人工呼吸自体が呼吸器に対して害があることも知られており、人工呼吸器関連肺障害とされている。その発症には、肺胞の過伸展、虚脱再開通、肺胞細胞間の摩擦など様々な因子が関与するとされるが、いまだに発症機序は明確ではない。

(2) 人工呼吸器関連肺障害に対する予防法としては少ない一回換気量での人工呼吸法(肺保護的な人工呼吸)が予後を改善するとの報告もある。さらに、少ない一回換気量に由来する高二酸化炭素血症による肺保護作用の関与も示唆されている。しかしながら、いまだに有効な予防法はほとんどないのが現状である。

(3) 高二酸化炭素による臓器保護作用は古くから研究されており、その効果も証明されている。一方で非生理的であるとの判断により、臨床応用はほとんどされてこなかった。近年、肺保護的な人工呼吸法の普及により、必然的に高二酸化炭素血症が許容されるようになって臨床で認められてきたと言える。しかしながら、高二酸化炭素血症による肺保護作用の機序は十分に解明されていない。

(4) 人工呼吸器関連肺障害では各種サイトカインの上昇が起きると考えられるが、中でもインターロイキン 6 (IL-6) は重要な役割を担っていると考えられている。IL-6 は生体内において、様々なシグナルを惹起することが知られている。IL-6 受容体に IL6 が結合すると、主に JAC-STAT 経路あるいは MAP キナーゼ経路で細胞内へシグナルを伝える。JAK-STAT 経路では JAK1/2 が活性化し、次に転写因子である STAT1/3 が活性化し、核内へ移行した後に DNA 上の配列に結合することにより転写活性化を引き起こす。JAK-STAT 経路は様々な疾患との関連が報告されているが、敗血症では JAK2 と STAT3 が活性化していることが報告されている。しかし、人工呼吸性肺障害における高二酸化炭素血症による肺保護作用と、JAK-STAT 経路の関連は十分解明されていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究ではマウス人工呼吸器関連肺障害モデルを確立する。

(2) 確立されたモデルで高二酸化炭素血症の肺保護作用を確認する。

(3) 同モデルで高二酸化炭素血症による IL-6 の抑制を調べる。

(4) 同モデルで IL-6 と JAC-STAT 経路の活性化の病態への関連を調べる。

(5) 最終的には、臨床において抗 IL-6 レセプターモノクローナル抗体(トシリズマブ: tocilizumab)などを用いた、人工呼吸器関連肺障害の予防法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス人工呼吸器関連肺障害モデル  
動物はマウス c57BL/6 20-25g を用い、体重測定の後、イソフルランの吸入(1.0-1.5%)による全身麻酔下に気管切開を施行した。気管切開チューブを挿入後、筋弛緩薬(ベクロニウム 1mg/kg)を投与した後に人工呼吸を開始した。麻酔の維持はイソフルランで行った。人工呼吸器は Minivent Type 845 を使用した。肺保護的な人工呼吸は 7.5ml/kg 135 回/分 PEEP1cmH<sub>2</sub>O とした。肺障害モデルの人工呼吸は 15ml/kg 50 回/分 PEEP0.5cmH<sub>2</sub>O とした。呼吸回数の設定は動脈血炭酸ガス濃度を 40mmHg に保つように設定した。人工呼吸時間は 4 時間とした。

通常的人工呼吸は空気(酸素濃度 21%)にて行った。高二酸化炭素血症の保護作用を検討する場合は上記モデルの吸入ガスを二酸化炭素濃度 10%、酸素濃度 21%に設定し、吸入ガスは混合ガスボンベを用いた。

### (2) 人工呼吸器関連肺障害の評価

肺障害は肺胞洗浄液中のたんぱく量、好中球の肺組織内浸潤を用いて評価した。肺組織標本での評価も同時に行った。人工呼吸終了後、気管カニューレから生理食塩水 0.1ml で洗浄し肺胞洗浄液の検体を得た。好中球の肺組織内浸潤は人工呼吸終了後、肺動脈から生理食塩水を注入し、血液を肺から除去し検体を得た。肺組織標本は人工呼吸終了後、ホルマリン液を気管から 5 cmH<sub>2</sub>O の圧力で注入し肺胞を拡張した後にホルマリン液で固定した。

たんぱく量は市販のキットを用い BCA プロテインアッセイ法で測定した。好中球の肺組織内浸潤は市販のキットを用い MPO アッセイ法にて測定した。肺組織標本はホルマリンで固定後、切片を作成し、HE 染色を行った。

### (3) 肺胞洗浄液中のサイトカインの測定

肺胞洗浄液中の炎症性サイトカインの測定は IL-1、IL-6、MIP1-a、TNF-a を測定した。サイトカインは市販のキットを用い ELISA 法により測定した。

### (4) JAC-STAT 経路の関与の解明

JAC-STAT 経路の各蛋白の量、活性は各蛋白質に対する抗体、リン酸化蛋白質に対する抗体を用

いたウエスタンブロット法、転写因子に対してはゲルシフトアッセイ法を用いて測定した。

(5) マウス人工呼吸器関連肺障害モデルにおける各種阻害薬の肺保護効果の確認

JAC-STAT 経路の阻害薬を用いて肺障害に対する効果を測定。

(6) ヒトにおける肺保護効果の確認  
最終的には患者における肺保護効果を確認し、新規の肺保護法の開発を目指したい。

#### 4. 研究成果

(1) マウス人工呼吸器関連肺障害モデル  
全身麻酔下で気管切開したものをコントロールとした(NV), 肺保護的な人工呼吸をLS、肺障害的な人工呼吸をHSとした。4時間の人工呼吸で肺胞洗浄液(BAL)のタンパク質はNV<LS<HSとなりHSのBALタンパク質はNVとLSに比較して有意に上昇した。また、HSのBALタンパク質では2時間、4時間と時間依存的に上昇し4時間でNVに比較して有意に上昇した(図1左)。MPOアッセイで測定した好中球の肺組織内浸潤はHS4時間後でNVに比較して有意に増加した(図1中)。肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン(IL-1、IL-6、MIP1-a、TNF-a)は4時間のHSでIL-6(図1右)とMIP1-aが有意に上昇した。IL-1とTNF-aは有意な上昇がみられなかった。肺組織標本のHE染色では4時間のHSで若干の浮腫の増加がみられたのみで有意な変化は同定できなかった。  
以上より今回我々が作成したモデルでは人工呼吸器関連肺障害が引き起こされることが分かった。

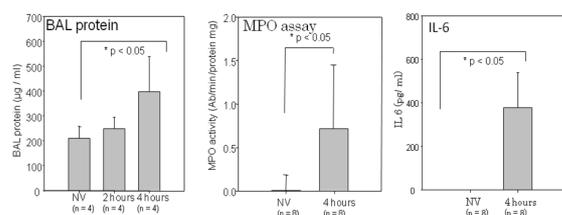


図1

(2) 高二酸化炭素血症による肺保護効果  
15ml/kgの一回換気量(HS)により肺障害が引き起こされることが確認されたので、HSの状態高二酸化炭素血症による肺保護効果を検討した。空気呼吸をコントロールとした(NC), 吸入ガスを二酸化炭素濃度10%、酸素濃度21%に設定したものをHCとした。人工呼吸時間は4時間とした。BALタンパク質は、HCではNCに比較して有意に低下した(図1左)。MPOアッセイで測定した好中球の肺組織内浸潤は、HCではNCに

比較して有意に低下した(図1中)。肺胞洗浄液中のIL-6は、HCではNCに比較して有意に低下した(図1右)。MIP1-aはHCによって有意な変化は見られなかった。

以上より、今回我々が作成した人工呼吸器関連肺障害モデルで、10%の二酸化炭素吸入は肺保護作用があることが分かった。

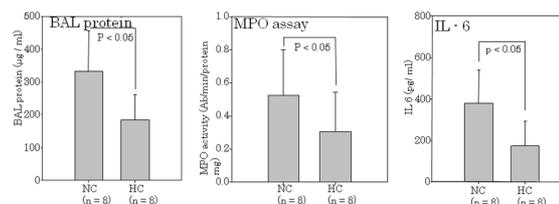


図2

(3) JAC-STAT 経路の関与の解明  
JAC-STAT 経路の各蛋白の量、活性は各蛋白質に対する抗体、リン酸化蛋白質に対する抗体を用いたウエスタンブロット法、転写因子に対してはゲルシフトアッセイ法を用いて測定している。現在研究中であるが、人工呼吸器関連肺障害モデルにおける、10%の二酸化炭素吸入の肺保護作用に何らかの関連性があることは分かっている。

(4) マウス人工呼吸器関連肺障害モデルにおける各種阻害薬の肺保護効果の確認  
残念ながら着手できていない。  
(5) ヒトにおける肺保護効果の確認  
残念ながら着手できていない。

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7件)  
Yamamoto N, Arima H, Sugiura T, Hirate H, Kusama N, Suzuki K, Sobue K. Midazolam inhibits the formation of amyloid fibrils and GM1 ganglioside-rich microdomains in presynaptic membranes through the gamma-aminobutyric acid A receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有、20;457(4):547-53, 2015  
DOI: 10.1016/j.bbrc.  
Arima H, Hirate H, Sugiura T, Suzuki S, Takahashi S, Sobue K. IV injection of polystyrene beads for mouse model of sepsis causes severe glomerular injury.

査読有、J Intensive Care. 6;2(1):21, 2014

DOI: 10.1186/2052-0492-2-21.

Yamamoto N, Arima H, Naruse K, Kasahara R, Taniura H, Hirate H, Sugiura T, Suzuki K, Sobue K. Ketamine reduces amyloid -protein degradation by suppressing neprilysin expression in primary cultured astrocytes. Neurosci Lett. 査読有、17;545:54-8, 2013

DOI: 10.1016/j.neulet.

Yamamoto N, Arima H, Sugiura T, Hirate H, Taniura H, Suzuki K, Sobue K. Propofol and thiopental suppress amyloid fibril formation and GM1 ganglioside expression through the -aminobutyric acid A receptor. Anesthesiology. 査読有、118(6):1408-16, 2013

DOI: 10.1097/ALN.0b013e31828afc16.

志田恭子、祖父江和哉、平手博之、有馬一、藤田義人、笹野寛、麻酔中の誤薬防止のための薬剤シリンジラベル標準カラーコードについての史的研究、日本臨床麻酔学会誌 査読有、33 巻 5 号 808-814,2013

<http://jsca.umin.jp/index.html>

吉村真一郎、小島大樹、平手博之、杉浦健之、有馬一、祖父江和哉、小児心臓外科術後に悪性高熱症の診断に難渋した 1 症例、日本臨床麻酔学会誌 査読有、33 巻 5 号 820-825,2013

<http://jsca.umin.jp/index.html>

杉浦 健、大内田絵美、平手博之、有馬一、笹野寛、祖父江和哉、マネキンを用いたエアウェイスコープ®補助下経鼻気管挿管の検討、日本医学シミュレーション学会誌 査読有、34 巻 1 号 95-100,2014

<http://jsca.umin.jp/index.html>

〔学会発表〕(計 1 件)

Takeuchi N, Arima H, Ohta H, Sasano H, Sobue K. Preoperative oral intake of an amino acid and no-fat carbohydrate liquid diet keep body temperature during general anesthesia and improve patient's satisfaction. AMERICAN SOCIETY OF ANESTHESIOLOGISTS 2012 ANNUAL MEETING. 2012.10.13 Washington, DC. (USA)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

有馬 一 (ARIMA HAJIME)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：20254295

(2)研究分担者

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：70212462

祖父江 和哉 (SOBUE KAZUYA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90264738