

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791947

研究課題名(和文)急性肺傷害における肺被覆液中の炎症消退脂質分子のLC-ESI-MS(n)解析

研究課題名(英文)LC-ESI-MS(n) analysis of pro-resolving lipid mediators in epithelial lining fluid of ARDS

研究代表者

徳平 夏子(Tokuhira, Natsuko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60597227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性肺傷害においてレゾルビン等の脂質活性分子が炎症消退に大きな役割を持つことが発見された。今回、急性肺傷害患者の肺上皮被覆液を気管支マイクロサンプリング法(BMS法)で採取し、含まれる炎症消退脂質分子が急性肺傷害の病態形成にどのように関わるか調べた。その結果気管支鏡下マイクロサンプリングBMS法を用いて、人工呼吸下の患者を対象に肺上皮被覆液ELFを採取し、市販のレゾルビン等を利用してLC-ESI-MS(n)分析できるように繰り返し行ない調整することで、BMS法による微量サンプル中の炎症消退に関わる脂質分析ができることが確認された。今後疾患ベースの分析に応用していく道が開けるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent findings indicate that pro-resolving lipid mediators have a major role to regress inflammation. In this study, the lung epithelial lining fluid of acute lung injury patients were taken at bronchial micro-sampling (BMS) method, thus inflammation withdrawal lipid molecules contained was examined whether related to how the pathogenesis of acute lung injury. As a result using a micro-sampling BMS method with bronchoscope, the lung epithelial lining fluid (ELF) was collected in patients on mechanical ventilation, so as to LC-ESI-MS (n) analyzed using a commercially available resolvin by the adjustment repeatedly, it was confirmed that enables lipid analysis involved in inflammation regression by the BMS method. This leads future study to apply to disease based analysis.

研究分野：麻酔科学

キーワード：急性肺障害 炎症消退脂質分子 LC-ESI-MS(n) レゾルビン 気管支マイクロサンプリング法(BMS法)
ARDS

1. 研究開始当初の背景

急性肺傷害のなかでも、急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)は炎症が全臓器性、そして全身性に広く波及して、その制御が破綻した病態である。このような病態に対して、炎症の惹起・誘導に関わる分子の発現・効果を抑制または中和することで、治療成績の改善を期待する多くの試みが行われてきた。しかしながら、これらの試みは明確な治療成績の改善を示すに至らず、期待された結果を残せていない。

現在では機械的人工呼吸法、人工肺補助(extra-corporeal lung assist, ECLA)、また血液浄化法などにより、一時的に低下した臓器機能を人工的に補助し、その間に循環動態の維持や体液管理、感染制御などをより積極的かつ集中的に行う「総合戦略」によって立て直しが図られている。しかしながら、臓器機能が改善せずに炎症が慢性化した場合や、肺において致命的な線維化が発生した場合、救命は困難となる。この生命予後の分岐点は不可逆的な臓器損傷に至らずに炎症が無事に消退するのかどうかに関わっている。

近年、オメガ(ω)6 多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA)であるアラキドン酸由来の脂質分子リポキシンや、fish oilに含まれる ω 3-PUFAであるドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid, DHA)やエイコサペンタエン酸(eicosapentaenoic acid, EPA)由来のレゾルビンなどの脂質分子が、炎症消退に関わることが報告されている。これらは炎症部位で血管内皮細胞や多核白血球細胞、血小板細胞の協調作用の結果、cyclooxygenase-2 (COX-2)や lipooxygenase (LOX)、もし

くはアスピリンの作用を受けた acetyl-COX-2 の作用などにより、中間代謝物質を經由して生成される。そして抗原提示細胞や単球細胞膜上の G タンパク競合受容体を介して抗炎症性に作用することで、抗炎症性サイトカインの分泌を促したり、アポトーシスを誘導したり、貪食能を更新させたりすることで、侵襲に対する正常な生理反応として、能動的に炎症の消退を誘導させていることが示唆されている。

2. 研究の目的

急性肺傷害は、時に炎症反応が慢性化して急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)のように極めて予後不良な致死性病態に陥る。その機序には炎症反応の消退が何らかの原因により失敗し、慢性化してしまうことが関与する。近年、アラキドン酸やドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)などの多価不飽和脂肪酸由来のリポキシン、レゾルビンなどの脂質活性分子が炎症消退に大きな役割を持つことが発見された。

今回、急性肺傷害患者の肺上皮被覆液を気管支マイクロサンプリング法 (BMS法)で採取し、その中に含まれるこれらの炎症消退脂質分子について液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析法LC-ESIMS(n)で解析し、これらの脂質分子が急性肺傷害の病態形成にどのように関わり、治療に応用可能となるかどうかを探索する。

3. 研究の方法

急性肺傷害患者において、診断的もしくは治療的気管支ファイバー処置を行う機会を利用して、肺上皮被覆液 (ELF)の採取を病変部近傍の気管支壁上より気管支鏡下マイクロサンプリング

グ(BMS)法にて施行し、BMS用プローベ先端より採取したELFを定量希釈法により回収し、抽出成分の中から、リポキシン(LXA4, LXB4)とレゾルビン(RvD1 ~ D2, RvE1 ~ E2)についてLC-ESI-MS(n)にて解析することを試みた。同時にELF中のプロスタグランディン(PGE2), トロンボキサン(TXB2), 炎症性サイトカイン (TNF- α , L-1 β , IL-6, IL-8) についてもLC-ESI-MS(n)やELISA(もしくはEIA)法にて測定を行い、血液ガス交換能、臨床検査上の炎症所見等との解析を行い、急性肺傷害に関わる患者の病態と炎症消退に関わる脂質分子の動態についての相関関係を調べた。

4. 研究成果

急性肺傷害は、時に人工呼吸器からの離脱が困難になるなどの予後不良な致死性病態に陥る。その機序には炎症反応の消退が何らかの原因により失敗し、炎症反応が慢性化して急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)のようになってしまうことが関与する可能性が示唆されている。アラキドン酸やドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)などの多価不飽和脂肪酸由来のリポキシン、レゾルビンなどの脂質活性分子が炎症消退に大きな役割を持つことが発見された。今回、急性肺傷害患者の肺上皮被覆液を気管支マイクロサンプリング法(BMS法)で採取し、含まれる炎症消退脂質分子を液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析法LC-ESI-MS(n)で解析し、これらの脂質分子が急性肺傷害の病態形成にどのように関わるか、研究を進めた。その結果、侵襲度が低い気管支鏡下マイクロサンプリングBMS法を用いて、人工呼吸下

にある患者を対象に肺上皮被覆液ELFを引き続き採取し、市販のレゾルビン等を利用して、LC-ESIMS(n)分析できるように繰り返し行ない調整することで、BMS法で採取された微量なサンプル中の炎症消退に関わる脂質分析を行うことができることが確認された。今後、疾患ベースの分析に応用していく道が開けるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. Tokuhira N, Shime N, Inoue M, Kawasaki T, Sakurai Y, Kurosaka N, Ueta I, Nakagawa S; Writing Committee of AH1N1. Investigators; Japanese Society of Intensive Care Medicine Pediatric Intensive Care Unit Network. Mechanically ventilated children with 2009 pandemic influenza A/H1N1: Results from the national pediatric intensive care registry in Japan. *Pediatr Crit Care Med* 査読有 13, 2012,e294-8, 2012.
2. Tonan M, Hashimoto S, Kimura A, Matsuyama H, Kinose H, Sawada M, Shime N, Tokuhira N, Kato Y, Sasaki M, Tsuchiya K, Higaki S, Oomae T, Hashimoto S. Successful treatment of severe asthma-associated plastic bronchitis with extracorporeal membrane oxygenation. *J Anesth* 査読有, 26, 2012, 265-268. doi: 10.1007/s00540-011-1288-z.
3. 徳平夏子, 志馬伸朗. 重症インフルエンザ感染:インフルエンザ関連肺炎の

診断治療を中心に. 小児内科 査読無.

45, 2013, 1994-1998.

4 徳平夏子, 橋本悟. 急性呼吸促迫症候群に対するNPPV療法. 人工呼吸 査読無 31, 2014,167-171

6 . 研究組織

(1)研究代表者

徳平 夏子 (TOKUHIRA Natsuko)

京都府立医科大学、医学研究科、助教

研究者番号 : 60597227