

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350820

研究課題名(和文)改良型機械的人工換気システムを用いた横隔膜の筋萎縮回復メカニズムの解明

研究課題名(英文)Development of improved mechanical ventilation model for recovery

研究代表者

関根 紀子 (Ichinoseki-Sekine, Noriko)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・客員准教授

研究者番号：10393175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：不測の事態により人工呼吸器を装着する場合、予め横隔膜萎縮への予防手段を講じておくことは困難であるため、効果的な回復方法の確立が望まれる。そこで本研究では、改良型ラット横隔膜萎縮モデルを構築し、横隔膜萎縮からの回復メカニズムを実験的に解明することを試みた。しかしながら、研究を進める過程において様々な問題点が明らかとなり、モデルの完成までに至らなかった。

そこで、予めの処置が不要な方法として人工換気中の間欠的自発呼吸に着目し、1分間/時の自発呼吸が横隔膜萎縮を抑制することを明らかにした。そのメカニズムとしてカスパーゼ3などの関与が示されたが、未だ不明な点が多く今後更なる取り組みが必要である。

研究成果の概要(英文)：We focused on development of improved rodent model of mechanical ventilation (MV) and clarify the mechanisms of the recovery from ventilator-induced diaphragm dysfunction (VIDD). However, new improved model was not completely developed since there are lot of problems that should be resolved.

Thus, we changed our plan and focused on the effect of intermittent spontaneous breathing which can apply during MV without any preparation before MV. Limited data exist regarding the impact of intermittent spontaneous breathing during MV on protection against VIDD. Adult male rats were randomly assigned to one of three groups: control (CON) with no MV; controlled MV (CMV) for 12 hours; and intermittent spontaneous breathing during MV (IMV). Our findings reveal that as little as 1-min/hour of spontaneous breathing during MV is protective against VIDD, in part, by prevention of MV-induced activation of caspase-3 and STAT3 in the diaphragm.

研究分野：運動生理学

キーワード：機械的人工換気 間欠的自発呼吸 横隔膜 筋萎縮 回復期

1. 研究開始当初の背景

四肢骨格筋と同様に、健康で活動的に過ごすために重要な筋である横隔膜は、主に速筋線維で構成される骨格筋である。主な呼吸筋である横隔膜は生命維持のため常に活動しているが、人工呼吸器の装着などによりその活動を軽減すると、急激な萎縮を呈す。そのため、医療現場において、人工呼吸器の装着期間の決定は難しい課題となっている。

ところで、不測の事態により人工呼吸器を装着する場合などを鑑みると、横隔膜萎縮に対し予防手段を講じておくことは困難である。したがって、効果的な回復方法の確立が望まれるが、横隔膜萎縮からの回復期に関する実験的研究は世界的にほとんど見当たらない。

横隔膜萎縮の実験的研究には、実験動物による横隔膜萎縮モデルを用いた研究が用いられることが多いが、これまでは横隔膜萎縮が引き起こされるメカニズムを中心に研究が行われてきた。そのため、従来の横隔膜萎縮モデルは気管切開や動静脈カテーテル挿入などを要する侵襲度の高いものであり、人工換気後も継続的に飼育するには適さない。横隔膜萎縮からの回復期に焦点を当てた研究を行うためには、簡便で侵襲度が低い新たなモデルの構築が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、改良型ラット横隔膜萎縮モデルを構築し、横隔膜萎縮からの回復メカニズムを世界に先駆けて実験的に解明しようとするものである。前述の通り、従来の横隔膜萎縮モデルは侵襲度が非常に高く、高度で繊細な技術を要するため、実施している研究機関は我々を含め世界で数カ所のみである。本研究で確立を目指す新たなモデルは簡便で低侵襲であり、実験の成功率の向上と世界的な普及が期待できるモデルであるといえる。

3. 研究の方法

本研究は、【テーマ1】改良型横隔膜萎縮モデルの構築、【テーマ2】萎縮からの回復過程の解析、【テーマ3】温熱処置が横隔膜萎縮からの回復を促進するか否か、の3つのテーマに焦点を絞って研究を進め、回復過程の経時変化を生理学的・生化学的に明らかにすることで、総合的な回復メカニズムの解明を目指した。

しかしながら、研究を進める過程で改良型横隔膜萎縮モデルには様々な問題点があることがわかった。また、他の研究グループが先行して横隔膜萎縮からの回復過程について論文を発表し、その結果予想に反して横隔膜の萎縮からの回復が速く、6時間後には50%の機能が回復することが明らかとなった。

そのため、当初の計画ではテーマ1の改良型横隔膜萎縮モデルの構築は初年度で完了する見込みであったが、その後も引き続き改良に取り組むこととした。また、他の研究グ

ループの研究成果により、横隔膜の機能回復に長期にわたって焦点を当てる必要性は低くなったため、テーマ2およびテーマ3については研究内容を変更し、人工換気中に実施可能な横隔膜萎縮予防法として間欠的自発呼吸に着目し、その効果を明らかにすることとした。

【改良型横隔膜萎縮モデルの構築】

従来の横隔膜萎縮モデルは、麻酔下のラットに対し、気管切開後に人工呼吸器を用いた12時間の人工換気を行うものである。頸部動静脈に挿入したカテーテルを介し、静脈より麻酔を維持し、動脈より血圧および血ガスのモニタを行う。本研究では、横隔膜萎縮モデルの改良点として以下の4点に注目した。

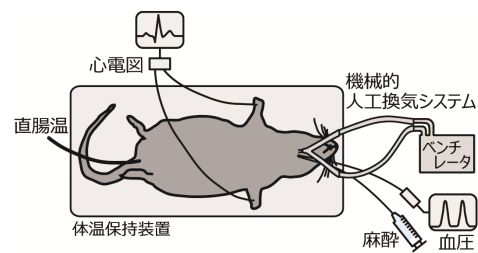


図1. 横隔膜萎縮モデル (従来法)

1. 気管挿管：気管切開→経口挿管
2. 血ガス：動脈血分析→終末期呼吸ガス分析
3. 血圧：頸部動脈カテーテル→尾部非観血式血圧計
4. 麻酔：頸部静脈カテーテル→下肢静脈留置針

これらの項目を改良し、従来法との比較評価を行って改良型モデルを構築する。はじめに改良点1および2に着手し、12時間の人工換気を正常に実施可能であることを確認すると同時に、摘出した横隔膜サンプルの機能評価および組織化学的分析による萎縮の程度の評価を試みた。

【間欠的自発呼吸が横隔膜萎縮に及ぼす影響】

雄性 Wistar ラット (n=10) をコントロール (CON), 12 時間人工換気 (CMV), 間欠的自発呼吸 (IMV) の3群に分け、CMV および IMV 群は12時間の機械的人工換気を行った。使用モデルは従来型の横隔膜萎縮モデルとした。さらに IMV 群には、12時間の人工換気中に1時間おきに1分、計11分の自発呼吸期間を設けた。CON 群は麻酔後、CMV および IMV 群は人工換気後に横隔膜を摘出し、一部は横隔膜の機能評価のための張力測定を行い、その他は液体窒素で凍結したのち -80 にて保存した。

横隔膜凍結サンプルより横断切片を作成し、免疫組織化学法にて筋線維タイプごとの

萎縮の評価を行った。さらに、生化学的分析として SDS-PAGE による電気泳動分離を行い、主に分解系シグナル伝達経路について分析を行った。

4. 研究成果

【改良型横隔膜萎縮モデルの構築】

1. 気管挿管
経口挿管のためのラット用挿管チューブを作成し、ラットの気管に挿管した。その後人工換気を行ったところ、挿管のみでは肺に送り込める空気量をうまく調節することができず、皮膚を切開し気管とチューブを固定することで対応した。
2. 血ガス
動脈血の分析から終末期呼気ガス分析を行うことを計画したが、実験動物用パルスオキシメータで対応可能であることがわかった。パルスオキシメータでは二酸化炭素の分析を行うことはできないが、呼気ガス分析に比べ非常に簡単に血中酸素濃度を評価することが可能である。
3. 血圧
尾部非観血式血圧計では急激な血圧の変化に対応することができなかったが、緩やかな血圧の変化をモニタすることは可能であった。
4. 麻酔
下肢静脈留置針や尾静脈留置針を用いることを試みたが、12 時間の間に使用不可能になる場合があった。

以上のように改良型モデルの開発を行ったが、12 時間の人工換気が可能であっても、その後呼吸が回復せず回復期の観察を行うことが困難であった。原因としては麻酔深度が深すぎることで、抜管後に痰や舌などが詰まり呼吸困難になることなどが挙げられた。

さらに、他の研究グループとのディスカッションにより、多くの改良点が明らかとなった。最も大きな点は、人工換気の方法である。我々はこれまで、ボリュームコントロールによる人工換気を行ってきたが、この方法では 12 時間の人工換気中、時間の経過とともに換気量を増大させることがほとんどである。しかし、経口挿管では増大した換気量に対応できないため、皮膚を切開し気管と挿管を固定する必要が生じていたことがわかった。この問題を解決するため、今後は圧コントロール式の人工換気に切り替える必要があるものと考えられた。この研究グループとのさらなる情報交換により、共通の問題点や我々が解決すべき問題点が明らかとなった。たとえば麻酔は、低濃度の麻酔薬を定期的に腹腔内投与することで、大きな血圧の変化もなく 12 時間麻酔を維持することが可能であることがわかった。また、人工換気後に呼吸が停止する一因として、麻酔が深い場合は舌が巻き

込まれ気道を塞いでしまうことがあることがわかった。今後は、様々に情報交換を行いながらこれらの問題点の解決を図りたい。

【間欠的自発呼吸が横隔膜萎縮に及ぼす影響】

1 分間の自発呼吸中に、平均 89.2 ± 6.8 回の横隔膜の収縮が観察された。3 群の筋線維横断面積を比較したところ、CON と IMV との間に有意な差は見られず、CMV でのみ有意な面積の低下が観察された ($p < 0.05$, 図 2)。したがって、12 時間の人工換気中に 1 分/時の自発呼吸を設けることで、横隔膜萎縮を抑制可能であることが明らかとなった。また、CON と IMV との間に筋張力の差が見られなかったことから、間欠的自発呼吸により、横隔膜の機能不全を抑制できることも明らかとなった (図 3)。

アポトーシスに關与するカスパーゼ 3 を評価するため、II スペクトリン分解物質を評価した。その結果、CMV と IMV との間に有意な差が観察され、間欠的自発呼吸によりカスパーゼ 3 の活性化が抑制されることが明らかとなった (図 4)。一方、カルパイン 1 では、CMV および IMV とともに CON との差は観察されなかった。

間欠的自発呼吸により CMV で見られた STAT3 のリン酸化が抑制される傾向が観察された。一方、ユビキチン化タンパク質および LC3 II の発現量では、CMV と IMV との間に有意な差は観察されなかった。以上のことから、自発的間欠呼吸による横隔膜萎縮および

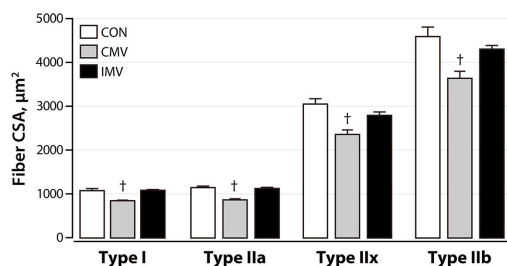


図 2. Fiber cross-sectional area (CSA) of diaphragm.

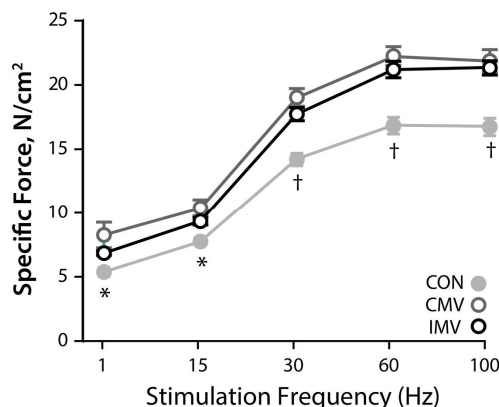


図 3. Force-frequency curve

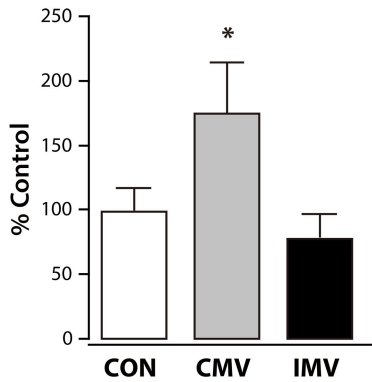


図 2. Caspase-3-specific spectrin breakdown product (SBDP)

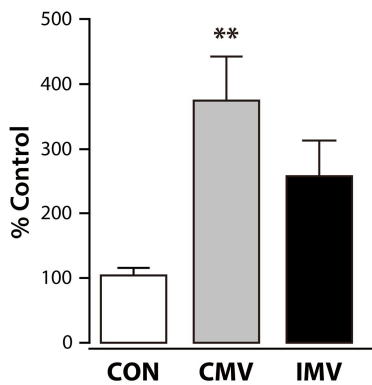


図 3. Phosphorylation ratio of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)

機能不全の抑制には、カスパーゼを中心としたアポトーシス経路が関与しているものと考えられる。しかしながら、カルパイン1の応答など先行研究とは異なる結果が示されていることや、CMVとIMVとの間に明確な違いを示すには至らなかったことなどから、間欠的自発呼吸が横隔膜萎縮を抑制するメカニズムの解明には更なる分析が必要なものと考えられる。

メカニズムに不明な点が多いものの、本研究の結果、1分間/時の自発的間欠呼吸により、横隔膜の萎縮及び機能不全を抑制することが可能であることが示された。本手法は予め施しておく必要がなく、人工換気が必要となったときに実施可能であることから、応用性が高い方法であると考えられる。今後は、1分間の自発呼吸が血中酸素濃度へ及ぼす影響などを明らかにし、臨床における有用性を示すことで学術論文への採択を目指す。また、計11分の間欠的自発呼吸が12時間の人工換気による横隔膜萎縮および機能不全を抑制するメカニズムの解明に取り組む予定である。

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)

〔学会発表〕(計2件)

Intermittent spontaneous breathing prevents mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy and dysfunction, Ichinoseki-Sekine N, Yoshihara T, Tsuzuki T, Morton A, Hinkley MJ, Powers SK, Naito H. Experimental Biology 2017, Chicago, USA, 2017年4月

Intermittent spontaneous breathing does not cause mechanical ventilation-induced diaphragm atrophy and dysfunction, Ichinoseki-Sekine N, Yoshihara T, Tsuzuki T, Sugiura T, Powers S, Naito H. 2016 Advances in Skeletal Muscle Biology in Health & Disease Conference, Florida, USA, 2016年1月

6. 研究組織

(1)研究代表者

関根 紀子 (ICHINOSEKI-SEKINE, Noriko)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・客員准教授

研究者番号：10393175

(2)研究分担者

内藤 久士 (NAITO, Hisashi)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・教授

研究者番号：70188861

(4)研究協力者

都築 孝允 (TSUZUKI, Takamasa)

Scott K Powers (POWERS, Scott K)