

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790983

研究課題名（和文） 片肺換気による好中球細胞骨格の変化

研究課題名（英文） Cytoskeletal rearrangement of neutrophils after one-lung ventilation

研究代表者

江口 隆 (EGUCHI TAKASHI)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50447744

研究成果の概要（和文）：片肺換気中に換気していない肺を再膨張させることで、肺へ好中球が集まり、肺障害を引き起こすと考えられているが、再膨張前後の好中球形態変化やそれに伴う機能的変化は明らかにはされていない。本研究では片肺換気後の再膨張が循環血中好中球の形態変化を引き起こし、肺への好中球動員が生じることを示した。また、好中球エラスターゼ阻害剤であるシベレスタットがこれらの減少を抑制し、肺の酸素化を改善した。

研究成果の概要（英文）：Re-expansion following one-lung ventilation (OLV) leads to neutrophil recruitment into the lung and causes alveolar damage. The morphological and functional behaviors of neutrophils that are associated with OLV have not been thoroughly elucidated. Our study shows that lung re-expansion following OLV induces cytoskeletal rearrangements in circulating neutrophils and promotes their capillary sequestration and migration, particularly in the ventilated lung. Blockade of neutrophil elastase by sivelestat inhibits these events and improves pulmonary oxygenation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：片肺換気，虚血再灌流障害，好中球，細胞骨格，シベレスタット

1. 研究開始当初の背景

肺切除術後に Acute lung injury (ALI) および Adult respiratory distress syndrome (ARDS) を合併することがあり、その発生率は葉切除でそれぞれ 2.2% と 5.2%、片肺全摘でそれぞれ 1.9% と 4.9% で、死亡率はそれぞれ 29% と 88% と報告されている。また食道手術も肺障害の risk factor として知られており、Tandon らは食道切除後症例の 23.8% に ALI が発生し、その死亡率は 50% と報告している。

肺切除術後および食道切除術後に急性肺障害が生じる原因は術中片肺換気であり、その機序として次のように考えられている。①虚脱肺には血流が著しく低下するため、片肺解除後に再灌流が生じ Ischemia-reperfusion injury を生じる。②換気肺は高濃度の酸素で換気されるため、好中球が産生した Reactive oxygen species (ROS) による Oxidative stress injury が生じる。③換気肺の換気量増加により肺障害が生じる (Ventilator-induced lung injury)。④換気肺の血流増加により肺障害が生じる (Pulmonary capillary stress failure)。①②の機序には好中球が深く関与している。

通常 の 体 循 環 に お い て は 好 中 球 の 遊 走 migration は、rolling、adhesion を 経 て 生 じ る が、肺循環では異なっている。肺循環では肺毛細血管の内径が細いため、好中球は rolling せず、停滞 sequestration が生じ、それに続いて adhesion、migration が起こると考えられている。Sequestration が生じる

原因は、好中球が活性化されると細胞骨格を構成する g-actin が f-actin へと重合し、細胞膜下に rim 状に分布することで、好中球の変形能が低下し、肺毛細血管内を通過しがたくなるためとされている。ラットの肺炎モデルを用いた実験では、肺障害時において、活性化され細胞骨格の再構築により変形能が低下した好中球が、肺に集まることが示唆されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では片肺換気による Ischemia-reperfusion に着眼し、これにより好中球が活性化され Sequestration を引き起こすのではないかとの仮定の上で、片肺換気を行う肺切除術において、虚脱させる前後、および虚脱を解除し再換気を行う前後で、患者の血液を採取し、活性化した好中球がどれくらい存在するかを調査する。

また、近年好中球エラスターゼ阻害剤であるシベレスタットナトリウムが、急性肺障害に対し臨床の現場で効果を上げているが、その作用は単にエラスターゼ阻害のみではなく ICAM-1 等の接着因子に対しても作用し、好中球の内皮細胞への接着と塞栓形成、それに惹起される内皮障害を抑制することにより発現するといわれている。ALI 患者の血液を用いて、マイクロチャンネル・フロー分析装置の全血通過時間や、好中球膠着によるマイクロチャンネルの閉塞を評価した実験では、シベレスタットナトリウムが好中球の変形能にも直接影響を与え、その結果好中球の

内皮細胞への接着を抑制している可能性が示唆されている。好中球の形態変化を直接観察した実験は、前述したラットの肺炎モデルを用いた実験があるが、ヒトでは行われていない。そこでシベレスタットナトリウムを用いることで、前述した Ischemia-reperfusion による好中球の活性化（仮定）が抑制されるのではないかと考え、好中球の細胞骨格の変化を調査することで実証したい。

(2) この臨床研究に加えて、ラットの片肺モデルを作成し、片肺換気による好中球の活性化と肺毛細血管への好中球の停滞や肺胞への遊走などとの関連について、血液に加えて、肺胞洗浄液や組織標本を用いて調査する。

3. 研究の方法

(1) 臨床研究

対象：片肺換気下で手術を受ける方とし、以下の条件を満たす。

- ・ 術前の肺機能検査で%VC:80%以上および FEV1.0%:70%以上を満たし、低肺機能でない。
- ・ 術前の血液検査で貧血がない(ヘモグロビン値が男性 12.9g/dl 以上, 女性 10.7g/dl 以上)。

方法：次の 2 群に無作為に群分けをする。

A. 術中に好中球エラスターゼ阻害剤を投与する群

B. 術中に生理食塩水を投与する群

全身麻酔導入後から手術終了まで末梢静脈ラインより持続静注する。A 群ではシベレスタットナトリウム 1mg/kg を生理食塩水 50ml に溶解し 10ml/h (0.2mg/kg/h) で持続点滴する。B 群では生理食塩水を 10ml/h で持続点滴する。

術中に下記のタイミングであらかじめ留置されている動脈ラインより血液を約 9ml ずつ採取する。

- ① 片肺換気開始前
- ② 片肺換気開始後 30 分
- ③ 両肺換気再開直前
- ④ 両肺換気再開後 10 分
- ⑤ 両肺換気再開後 20 分
- ⑥ 両肺換気再開後 30 分

評価項目：

採取した動脈血を用いて、下記の項目を測定する。

- ① 好中球数
- ② 形態変化した好中球の比率
- ③ エラスターゼ・IL-8・Malondialdehyde(MDA)
- ④ P/F比

(2) 動物実験

ラットの片肺換気モデルを作成し、次の 3 群に群分けする。

- ・ OLV/TLV S-群 (片肺換気 3 時間/両肺換気 0.5 時間・シベレスタット非投与)
- ・ OLV/TLV S+群 (片肺換気 3 時間/両肺換気 0.5 時間・シベレスタット投与)
- ・ Sham1 群 (両肺換気 3.5 時間単独)
気管切開を行い、片肺換気を 3 時間施行し、再膨張後に両肺換気を 0.5 時間施行し (Sham1 群においては両肺換気のみ 3.5 時間施行)、血液・気管支肺胞洗浄液(BALF)・肺組織を採取し、以下の項目を測定した。

- ・ 活性化した好中球数
- ・ PaO₂
- ・ 肺毛細血管に停滞した好中球数 (組織標本)
- ・ 遊走した好中球数 (BALF)
- ・ 血漿中および BALF 中の CINC-1

4. 研究成果

(1) 臨床研究

片肺換気後の再膨張によって、循環血液中において細胞骨格の変化を伴った好中球が増加した。エラスターゼ、IL-8、MDA は上

昇しなかった。シベレスタット投与群では、形態変化した好中球数が減少し、P/F 比は改善した。

(2) 動物実験

臨床研究と同様に、再膨張によって、循環血液中において細胞骨格の変化を伴った好中球が増加し、PaO₂ が低下した。また、換気肺を中心に、毛細血管中に停滞した好中球および肺胞へ遊走した好中球が増加した。また、これらはシベレスタット投与によって抑制された。

(3) まとめ

片肺換気後の再膨張により、好中球細胞骨格変化を介して肺障害が生じると考えられた。これらはシベレスタット投与で抑制されたことから、術中にシベレスタットを投与することで、肺切除後の急性肺障害の発症率を減少できる可能性がある。今後さらなる研究を予定している。

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)

[学会発表] (計 6 件)

① Takashi Eguchi, Re-expansion after one-lung ventilation induces elevation of cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 in plasma and sequestration of neutrophils into the ventilated lung in rats, European respiratory society, 2009/9/14, Vienna, Austria

② 江口隆, ラットにおける片肺換気および再膨張による血漿 CINC-1 上昇および好中球遊走について, 日本呼吸器学会, 2009/6/12, 東京

③ 江口隆, ラットにおける片肺換気後の急性

肺障害に対する sivelestat の効果, 日本外科学会, 2009/4/3, 福岡

④ Takashi Eguchi, Sivelestat, a Slective Neutrophil Elastase Inhibitor, Suppresses Acute Lung Injury after One-Lung Ventilation in Rat, Asian Pacific Society of Respirology, 2008/11/20, Bangkok, Thai

⑤ 江口隆, 肺切除術時における好中球活性化と肺障害 —術中片肺換気の影響とシベレスタットの効果について—, iPUC2008, 2008/6/28, 東京

⑥ Takashi Eguchi, Sivelestat Suppresses Neutrophil Activation after One-Lung Ventilation at Thoracic Surgery, American Thoracic Society, 2008/5/20, Toronto, Canada

6. 研究組織

(1)研究代表者

江口 隆 (EGUCHI TAKASHI)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50447744