

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791465

研究課題名（和文） 一側肺換気が急性肺損傷に及ぼす影響についての検討

研究課題名（英文） Effect of one-lung ventilation on acute lung injury

研究代表者

上野 博司（UENO HIROSHI）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20381965

研究成果の概要（和文）：

一側肺換気を行った場合に ALI/ARDS が惹起される原因を、虚脱肺とその再換気の影響から検討した。ラットの一側肺換気モデルで、左肺を虚脱させ再換気を行った。両肺での人工呼吸を行った群を対象とした。組織学的所見では対照群はほぼ正常組織であったのに対し、一側肺換気群では虚脱肺には強い肺出血と炎症を伴い急性肺損傷の所見が見られた。換気肺では、人工呼吸関連肺損傷（VILI）の所見が見られた。また、対照群に比べ、一側肺換気群では血中、気管支肺胞洗浄液（BALF）中の炎症性サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8）、HMGB1が高い傾向を示した。また、一側肺換気群の BALF では、虚脱肺が換気肺に比べて、HMGB1が高値である傾向を示した。これらから、一側肺換気に引き続いて生じる ALI/ARDS の原因は、換気肺の障害だけでなく、虚脱、再換気も強く関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to investigate the effect of one-lung ventilation (OLV) on acute lung injury (ALI), especially in relation to re-inflated after deflated lung. This experiment involved general anesthetized rats. OLV was performed for 60min, and then double-lung ventilation (DLV) was performed 60min (OLV group). Only DLV was performed for 120min (control group). No destructive change was observed in the control group. On the contrary, destruction of pulmonary cell walls, migration of inflammatory cells, and pulmonary hemorrhages were present in OLV group. In OLV group, such damaged change in deflated lung was more remarkable than in ventilated lung. Inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8), HMGB1 concentrations in both plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in OLV group tended to be higher than in control group. Particularly in OLV group, HMGB1 concentration in BALF in deflated lung was higher than in ventilated lung. In conclusion, ALI following the OLV had possibility to be caused by effect of deflated lung as well as injury of ventilated lung.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：一側肺換気・急性肺損傷・ARDS・虚脱肺・炎症性メディエータ・人工呼吸関連肺損傷

## 1. 研究開始当初の背景

食道疾患（食道悪性腫瘍、食道穿孔など）、噴門側胃癌、肺疾患（肺悪性腫瘍、気胸など）、胸部大動脈瘤の外科的治療時には、全身麻酔が必要となる。その際、手術を安全かつスムーズに施行するために、一側肺を人為的に虚脱させ、片肺換気による人工呼吸を行うことが多い。

これらの手術の術後全身管理では呼吸管理が特に重要で、管理を誤ると急性肺損傷から急性呼吸窮迫症候群（ALI/ARDS）を発症し予後不良となるケースを多数経験している。特に食道癌に対する食道切除および3領域リンパ節廓清術では、手術が長時間に及びALI/ARDSの発症率が比較的高い。

研究代表者らの研究グループでは、食道癌根治術を施行された患者において気管支肺胞洗浄液中および血漿中の誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）と各種炎症性サイトカインが高値を示し、肺損傷の程度がiNOSおよび炎症性サイトカインの肺胞マクロファージでの発現の強さと相関関係を示すことを報告していた（*Crit Care Med* 30(1):71-76, 2002）。

また研究開始時には、上記のような手術の術後にALI/ARDSが惹起される原因は、換気側肺の人工呼吸関連肺損傷（VILI/VALI）と考えられていた。これらは動物モデルを用いて換気条件の影響、肺損傷の組織学的評価、肺組織および血漿中の炎症性サイトカインの定量、mRNAの発現などが検討されており、ALI/ARDSの発症原因としてこれらの関与が指摘されていた（*J Surg Res.* 2008 Apr 28, *Respir Physiol Neurobiol.* 2008 Jun 30;162(1):100-2. Epub 2008 Apr 22）。

そこで、一側肺換気時に換気される肺だけではなく、虚脱させている肺もALI/ARDSの発症に関連しているのかを調べることで、さらに病態の解析が進むと考え本研究を考案した。

## 2. 研究の目的

一側肺換気を行うことにより、ALI/ARDSが惹起されることは明らかとなっているが、その原因・メカニズムは十分に解明されているとは言い難い。研究背景の項でも述べたとおり、換気肺の人工換気によって、物理的肺損が生じ、機械的シグナル伝達（mechanotransduction）によって、炎症性サイトカインの発現が増加し、ALI/ARDSの

発症に関与することは実験的にも明らかとなっているが、ALI/ARDSの発症にはさらに多くの要因が関与している可能性が高い。

片肺を換気することではなく、片肺を虚脱させることに注目し、ALI/ARDS発症にどのような影響を及ぼしているのかを検討した研究は見当たらない。そこで研究代表者は、一側肺換気時に虚脱させた肺ではどのような変化が起こるのか、また、それがALI/ARDSの発症とどのような関連性を持つのかを検討することが必要であり、さらに、肺の虚脱を解除し換気を再開することで肺にどのような変化が生じるのかも検討し、ALI/ARDSの発症予防、治療法を考案することが、本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### <概略>

片肺を虚脱させ一側肺換気を行った場合に虚脱肺にどのような変化が起こるのかを解明する。具体的には、肺組織像の変化と肺内でのケミカルメディエーターの動態を解析し、ALI/ARDSの発症との関係を明らかにする。次に、虚脱肺を再換気した後に、虚脱側および対側の肺にどのような変化が生じるのかを時間を追って解析する。

### 1) 一側肺換気を行ったときの虚脱肺で起こる変化の解明

最初に、マウスを用いて片肺換気を行うモデルを作成する。人工呼吸器を用いて全身麻酔下にマウスに一定時間片肺換気を行う。その後、虚脱肺を摘出し肺の組織学的評価、肺損傷の程度を評価する。評価の具体的指標としては、湿乾重量比およびヒトアルブミンを用いて、その肺胞側への漏出を測定して肺透過性を測定するPermeability Indexを用いる。また、気管支肺胞洗浄液、血漿中の炎症性サイトカイン、HMGB蛋白、好中球エラストラーゼなどをELISA法で測定する。同時に換気側の肺についても同様に評価を行う。さらに必要に応じて各肺組織中の炎症性メディエーターの定量、免疫染色法を用いて局在の確認、RT-PCR法でmRNAの発現を調べる。

次に、臨床において一側肺換気を行う症例に対して同意を得た後、血漿の採取、および虚脱肺、換気肺のそれぞれから気管支ファイバースコープを用いたマイクロサンプリング法を用いて気道上皮被覆液を採取し、それぞ

れに含まれる各種炎症性メディエーターを定量する。マイクロサンプリング法とは、気管支ファイバーの鉗子口からサンプルプローブを挿入して気管支壁に数秒間プローブを接触させて上皮の被覆液を採取する方法で、気管支肺胞洗浄液と比較して希釈率を考慮する必要がないため各種メディエーターの定量性に優れている。また、採取部位は気管支上皮であるが肺胞上皮レベルの情報も反映されることが確認されている。

これらの結果を併せて虚脱肺が術後の急性肺損傷の発症に関与しているのか否か、また関与しているならばどのメディエーターがどのようなメカニズムで影響するのかを解明する。

## 2) 虚脱肺の再換気が肺および全身に及ぼす影響の解明

マウス片肺換気モデルを用いて、一定時間片肺換気を行う。その後、一定時間両肺換気を行った後に上記と同様の手法を用いて、肺組織の評価および肺損傷の程度を評価する。また、気管支肺胞洗浄液および血漿中の炎症性メディエーターについても同様に測定する。

また、一側肺換気を行う臨床症例についても再換気を開始した直後から、時間を区切って術後まで、血漿および気道上皮被覆液を採取し、炎症性メディエーターの定量を行う。通常、虚脱肺では、低酸素性肺血管収縮反応 (HPV) が生じるため、虚脱肺は虚血状態に近いと考えられる。つまり虚脱肺の換気を再開することは虚血再灌流に類似すると考えられる。これも考慮して、データ解析を行い、術後の ALI/ARDS、多臓器不全との関連を解明する。

## 3) 片肺換気を必要とする手術の周術期に ALI/ARDS の発症を予防する具体的方法の開発

1)、2) で得られた結果を受けて、如何に虚脱肺を保護するかを検討し、その手法を開発する。一側肺を虚脱させる許容限界時間の解明、明らかにされた炎症性メディエーターに対する抗体投与の効果、現在臨床使用できるものでは好中球エラスターゼ阻害剤投与の効果を検討する。さらには、虚脱肺に少量の気体 (酸素、一酸化窒素など) を接触させその肺保護効果の検討を行う。

## 4. 研究成果

1) 一側肺換気モデルの作成に非常な時間を費やした。まず、マウスを用いて左肺の一側肺換気モデルの作成を試みた。マウスの一側肺換気モデルで、虚脱、再換気を行った後の肺組織は、マクロ、ミクロ所見ともに肺出血が強く認められた。しかし一側肺換気の実

性が低く、虚脱肺の作成が困難であり、経時的に血液ガスデータを得られないことからマウスでのモデル作成を断念した。

次に、ラットを用いて再度、一側肺換気モデルの作成を開始した。ラットにセボフルレン吸入による全身麻酔を施し、気管切開を加え、プラスチックカニューレを挿入し、左肺の一側肺換気モデルを作成した。ラット用人工呼吸器を用いて、1 時間、左一側肺換気を行った。1 回換気量は実臨床と同様に、両肺換気の時と同等にした。その後、血液ガスを経時的に採取するため、腹部を小切開して腹部大動脈を露出、テーピングして、カニューレーションを行い、観血的動脈圧測定、経時的血液ガス測定を行った。その結果、左肺一側肺換気を行うと、極端に動脈血酸素分圧が低下し、アシドーシスが著明となり、15 分程度経過しても酸素分圧の上昇は軽微で、低酸素性肺血管収縮 (HPV) の効果はほとんど見られなかった。また、貧血も進行し、1 時間の一側肺換気に耐えられない状態であった。これは、腹部大動脈へのカニューレーションが、生体侵襲として過剰であると判断し、モデルの変更を考案する必要が出てきた。この時点までかなりの時間を費やした。なお、このモデルから得られた虚脱肺の組織所見は、好中球の浸潤を伴い一部肺胞構造の破壊が見られる、急性肺損傷像が見られた。しかし、再換気を行っていないためか、肺出血所見は見られなかった。また、血液及び気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症性メディエーターを ELISA 法を用いて測定したが、データは安定した結果を得ることができなかった。

次の段階として、動脈血採取に腹部大動脈ではなく、大腿動脈を用いるモデル作成を計画した。実体顕微鏡を用いて、特別に加工した極細のカテーテルを用いて、開創した大腿動脈にカニューレーションを施し、血行動態と経時的採血ができるモデルを開発した。この時点で実験計画の 3 年の内 2 年以上経過していたこともあり、虚脱肺のみの解析は中止し、次の課題である、虚脱肺の再換気による影響を検討することに計画変更した。

2) これまでに作成した、ラットの一側肺換気、大腿動脈カニューレーションのモデルを用いて虚脱肺の再換気の影響を検討した。

ラットを全身麻酔下に人工呼吸を施す。一側肺換気群では 1 時間、左肺一側肺換気を行い、その後両肺換気を 1 時間行う。コントロール群では 2 時間両肺換気を行う。この間、経時的に血液ガス分析、観血的動脈圧測定、心拍数測定を実施する。

終了後、肺組織 (虚脱肺、換気肺) の採取を行い、組織学的検討を行った。さらに採血及び BALF (虚脱肺、換気肺) 中の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8)、HMGB1

の測定を行った。  
結果を示す。まず、肺組織については、コントロール群では、ほぼ正常な肺組織が得られた。これに対して、一側肺換気群では、虚脱肺では、肺出血、肺胞構造の破壊像、好中球の浸潤がみられ、LPS を気管内投与して急性肺損傷を惹起させた像と類似していた。また、換気肺では肺胞構造は比較的保たれるが、好中球浸潤、肺出血がみられる検体もあり、人工呼吸関連肺傷害 (VILI) との関連が強く示唆された。

次に、ELISA 法を用いて行った、血液及び BALF 中の炎症性メディエータの測定に関しては、個体数が少ないので有意差検定はできないが、血中の炎症性メディエータは、コントロール群に比べて、一側肺換気群で高い傾向が見られた。また、BALF 中の炎症性メディエータについては対照群より一側肺換気群の方が高い傾向を示した。一側肺換気群では、虚脱肺の方が換気肺よりも、HMGB 1 に関しては高い傾向が見られた。これは、虚脱、再換気にもなって、組織破壊が強く起こっていることを示唆すると考えられた。

また、一側肺換気モデルの血液ガス分析の結果からは、一側肺換気中の低酸素性肺血管収縮 (HPV) による酸素化の代償機構はあまり認められず、一側肺換気中は低酸素血症が持続した。これは、非換気肺での虚脱が不十分であったことに起因すると推測された。

以上より、一側肺換気によって急性肺障害が起こるメカニズムは、換気肺の VILI だけでなく、虚脱肺の再換気も大きな役割を担っていることが示唆された。

3) については、研究期間の関係で、一側肺換気に引き続いて生じる急性肺損傷の予防、治療、ひいては、臨床症例での検討を遂行することができなかった。今後、より詳細な虚脱、再換気に伴う肺障害の発症メカニズムを解明していくことにより、一側肺換気を用いた手術の周術期予後改善につながると考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Shibasaki M, Sasaki M, Miura M, Mizukoshi K, Ueno H, Hashimoto S, Tanaka Y, Amaya F. Induction of high mobility group box-1 in dorsal root

ganglion contributes to pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. Pain 149(3): 514-521, 2010. 査読有

- ② Izumi Y, Amaya F, Hosokawa K, Ueno H, Hosokawa T, Hashimoto S, Tanaka Y. Five-day pain management regimen using patient-controlled analgesia facilitates early ambulation after cardiac surgery. J Anesth 24: 187-191, 2010. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

松山広樹, 天谷文昌, 橋本壮志, 上野博司, 志馬伸朗, 橋本悟. マウス人工換気モデルを用いた人工呼吸器誘発肺損傷発生における細胞外 ATP の役割の検討. 第 37 回日本集中治療医学会学術集会, 広島, 2010.3.4.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 博司 (UENO HIROSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 18791025

