

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：21201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463212

研究課題名(和文) 気管内吸引による粘膜損傷に栄養状態が及ぼす影響についての基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study on the effects of nutritional status on mucosal damage due to intratracheal aspiration

研究代表者

平野 昭彦 (Hirano, Akihiko)

岩手県立大学・看護学部・准教授

研究者番号：30305255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：先に我々が行った低栄養状態の患者の気管吸引を想定し低栄養ウサギの気管を吸引した実験では、健常群より低栄養群は気管粘膜の損傷が生じやすい傾向にあった。要因として、上皮細胞と基底細胞とを接着するラミニン、基底膜と結合組織とを接着するフィブロネクチンの減少による接着力の脆弱化、上皮細胞を裏打ち支持している基底膜を構成する成分であるⅣ型コラーゲンの減少による基底膜の脆弱化が考えられた。

仮説を検証するために、水だけ与え絶食した場合と減食した場合により低栄養ウサギを作製し気管組織に含まれる3種の蛋白質の量を測定した。いずれの実験においても健常群より低栄養群は蛋白質の量が低下し、仮説を支持する結果であった。

研究成果の概要(英文)：We aspirated the trachea of rabbits in undernutrition state under the assumption of tracheal aspiration of malnourished patients. Tracheal mucosal damage tended to occur in the undernutrition group than in the healthy group. Responsible factors were laminin, which adheres to epithelial cells and basal cells, weakening of adhesive force due to decrease in fibronectin adhering to the basement membrane and connective tissue, and weakening of the basement membrane due to decreased type IV collagen (constituent of the basement membrane supporting epithelial cell adhesion).

We prepared rabbits in a state of undernutrition (rabbits that fasted while receiving only water and those that received reduced intake of food) and measured the quantity of three proteins contained in tracheal tissue. The quantity of all proteins in the undernutrition group was lower than that in the healthy group.

研究分野：基礎看護学

キーワード：看護技術 気管内吸引 吸引圧 粘膜損傷 動物実験 細胞接着分子 Ⅳ型コラーゲン 栄養状態

### 1. 研究開始当初の背景

気管内吸引は人工気道を有している患者には必要不可欠な処置であるが、気管粘膜損傷の合併症を生じる危険性がある。

米国呼吸療法医学会、日本呼吸療法医学会では気管粘膜損傷等の合併症を生じない安全な気管内吸引のためにガイドラインを作成している。その根拠となる研究は動物実験によるものが多く、それも健常な動物を使用した実験であった。吸引を受けるのは疾患をもっている患者であり様々な病態を有している。動物実験も臨床の患者の様々な病態を想定して実験することが必要と考える。

臨床の現場で気管吸引を受ける患者には、脳卒中、ALS、パーキンソン病等の疾患により嚥下障害を合併し、経管栄養または中心静脈内栄養により栄養補給を受けている患者がいる。このような状態が長期になると、経口摂取とは異なり十分な栄養を確保することは困難であることから栄養状態が低下している患者が多数いる。

栄養状態が低下することによって線維芽細胞のタンパク質合成は不良となることが明らかにされている。基底膜と結合組織とを接着するフィブロネクチンは、線維芽細胞で産生される。そして、上皮細胞と基底細胞とを接着するラミニン、基底膜を構成するコラーゲンを産生しているのは上皮細胞であるが、上皮細胞に基底膜成分を供給しているのは線維芽細胞である。以上から、フィブロネクチンの産生の減少およびラミニン、コラーゲンの成分となるタンパク質の上皮細胞への供給が減少し、上皮細胞でのラミニン、コラーゲンの産生が減少している可能性があると考えられた。

そこで我々は、臨床で行われている吸引の状況を考慮し、病的な状態の1つである栄養不良に着目して吸引圧の基礎研究を行った。

健常ウサギと水のみで飼育し低栄養状態にしたウサギの気管を吸引して粘膜損傷の程度を比較したところ、低栄養状態のウサギの方が粘膜損傷が強い傾向がある結果を得た。その要因として、⑦上皮細胞と基底細胞とを接着するラミニンがあるが、これが減少することによる接着の脆弱化が生じること、⑧基底膜は上皮細胞を裏打ち支持しているが、これを構成する主要成分であるⅠ型コラーゲンの減少による基底膜の脆弱化が生じること、⑨基底膜と結合組織とを接着するフィブロネクチンの減少による接着の脆弱化が生じることが関与していると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究ではこの仮説を検証するため、気管組織中に含有するラミニン、フィブロネクチンとⅠ型コラーゲンの量を健常ウサギと低栄養状態ウサギで比較し差異を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験方法

##### 動物実験

##### 実験動物

日本白色種雄性ウサギ(日本白色種 JW)を用いた。購入時の週齢は実験 20~24 週、実験 20~21 週、減食実験 21 週であった。

対照群の健常ウサギと低栄養状態にさせる実験群のウサギとを給餌以外には同様に飼育した。

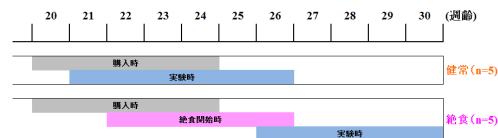
##### 低栄養状態ウサギの作製と気管摘出までのスケジュール

##### 【絶食による実験】

約 2 週間馴化飼育の後、Takeda が報告しているウサギをヒトと同様の栄養不良状態を導くウサギの作製方法に準拠して、餌を与えず水道水のみで実験 26~28 日間、実験 25~27 日間飼育した。

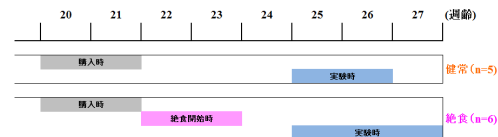
実験 26 日には、絶食前と絶食後の気管組織に含有する 3 種類のタンパク質の量を比較するために、健常群は絶食群の絶食を開始した同時期に安楽死をさせ気管を摘出し、絶食群は絶食後に安楽死させて気管を摘出した。

##### 実験スケジュール



実験 26 日には、健常群と絶食群を絶食後の同時期に安楽死させて気管を摘出した。

##### 実験スケジュール



##### 【減食による実験】

臨床では食事摂取困難が長期になり低栄養となることが想定される。そこで実験群のウサギを減食させた。

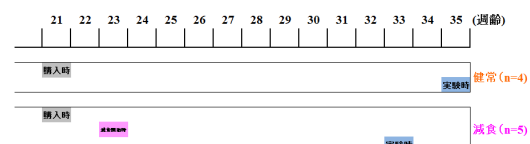
2 週間程度の馴化飼育期間をおき、馴化期間の 1 日の摂取量を測定し、1 日摂取量の平均の 1 割を給餌した。

1 割減食を 6 週間継続しそれ以後は体重の減量の程度に応じて給餌量を加減した。

減食を 7 週間継続し減食前の体重より 25% 以上減少しない場合は水のみで飼育した。

気管の摘出は健常群と減食群を減食後の同時期とした。

##### 実験スケジュール



動物実験は「動物実験に関する指針」(日本実験動物学会, 1987) に準拠して動物福祉の観点から適正に実施した。

## (2) 分析方法

血清総タンパク質, アルブミン濃度測定  
ウサギの栄養状態を確認するため, 健常ウサギは実験日に, 絶食したウサギは, 絶食前と絶食後(実験日)に採血した。減食したウサギも同様に減食前と減食後(実験日)に採血した。

採血後 3,000rpm で 15 分間遠心により調製し血清を得た。血清に臨床検査薬を用いて血清総タンパク質, アルブミン濃度を分光光度計により測定した。

気管組織中に含有するタンパク質の定量分析

安楽死させたウサギから気管を摘出し, 精秤後, ポリトロンホモジナイザーで 100mg あたり 1ml の PBS とともに破碎し, その後, -30 °C での凍結と融解を 2 回繰り返して組織を破壊し, 5,000 × g で 5 分間遠心分離後, 上清組織抽出液(試料)を得た。

測定は, ELISA 法により, 測定キット(CUSABIO 社製)を用いて行った。

対照群と実験群のラミニン, フィブロネクチン, Ⅳ型コラーゲンの量を t 検定により比較検討した。危険率 5% 以下で評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 絶食による実験

#### 実験

健常群 5 匹(実験日 21~26 週齢), 絶食群 5 匹(実験日 26~30 週齢, 26~28 日間の絶食)を使用した。

飼育結果は下の表の通りであった。

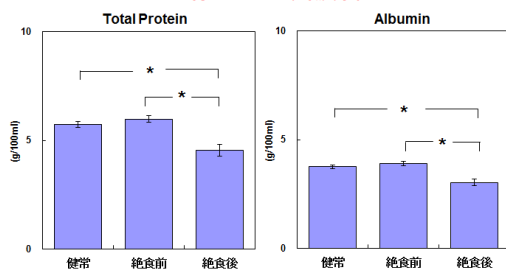
#### 飼育結果

	健常	絶食
絶食開始時体重(g)		3,706 ± 47
絶食日数(日)		26~28
実験時体重(g)	3,294 ± 73	2,546 ± 73
絶食前後体重比(%)		68.7 ± 1.9

※ 平均 ± 標準誤差

血清中の総タンパク質とアルブミンは, 絶食後は絶食前より有意に低下して低栄養状態であった。

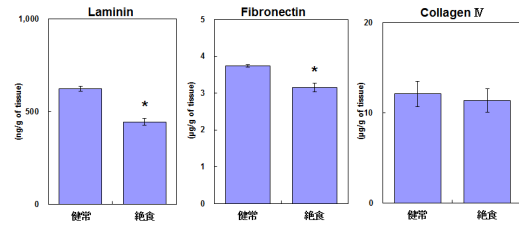
#### 血清タンパク質濃度



気管組織中に含有している 3 種類のタンパク質は, 健常群と比較して絶食群のフィブ

ロネクチンとラミニンは有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。Ⅳ型コラーゲンも低下していたが有意ではなかった。

#### 気管組織から抽出したタンパク質量



#### 実験

健常群 5 匹(実験日 25~26 週齢), 絶食群 6 匹(実験日 25~27 週齢, 24~26 日間の絶食)を使用した。

飼育結果は下の表の通りであった。

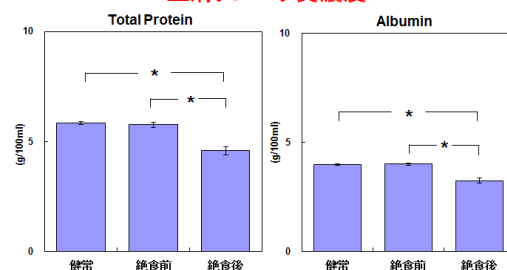
#### 飼育結果

	健常	絶食
絶食開始時体重(g)		3,698 ± 39
絶食日数(日)		24~26
実験時体重(g)	3,650 ± 27	2,524 ± 56
絶食前後体重比(%)		68.2 ± 0.8

※ 平均 ± 標準誤差

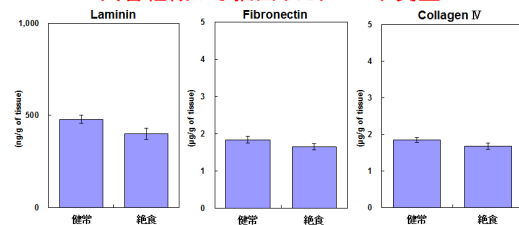
血清中の総タンパク質とアルブミンは, 絶食後は絶食前より有意に低下して低栄養状態であった。

#### 血清タンパク質濃度



気管組織中に含有する 3 種類のタンパク質は, 健常群と比較して絶食群がいずれも低下したが有意ではなかった。

#### 気管組織から抽出したタンパク質量



### (2) 減食による実験

健常 4 匹(実験日 35 週齢)と低栄養 5 匹(実験日 33 週齢)のウサギを使用した。

飼育結果は下の表の通りであった。

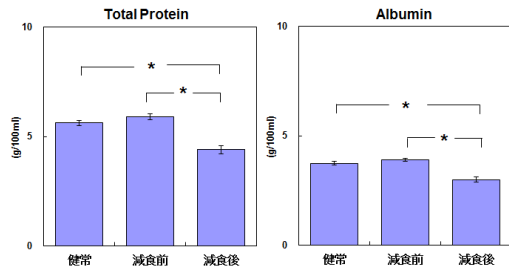
### 飼育結果

	健常	減食
飼育開始時体重 (g)	3,561 ± 40	3,768 ± 33
飼育日数 (日)	73~74	59~61
飼育終了時体重 (g)	3,762 ± 25	2,565 ± 36
飼育前後体重比 (%)	106 ± 1	68 ± 1

※ 平均 ± 標準誤差

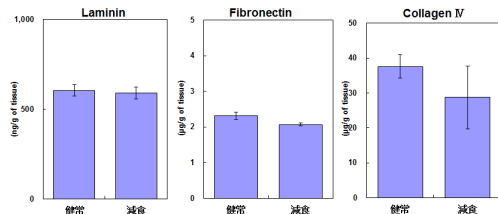
血清中の総タンパク質とアルブミンは、絶食後は絶食前より有意に低下して低栄養状態であった。

### 血清タンパク質濃度



気管組織中に含有する3種類のタンパク質は、健常群と比較して絶食群がいずれも低下したが有意ではなかった。

### 気管組織から抽出したタンパク質量



### 【まとめ】

3つの異なる条件のいずれの実験においても低栄養状態となった場合、気管組織に含有するラミニン、フィブロネクチン、型コラーゲンは低下または低下傾向であることが明らかになった。

ラミニンは上皮細胞と基底細胞を接着する分子、フィブロネクチンは基底膜と結合組織を接着する分子である。型コラーゲンは上皮細胞と基底細胞を裏打ち支持している基底膜を構成する主要成分である。これらのタンパク質が低下することは細胞間、基底膜と結合組織の接着が脆弱化、基底膜自体の強靭性が脆弱化することを意味している。

ウサギの気管を吸引した実験において低栄養状態のウサギの方が粘膜損傷を生じやすかったのはラミニン、フィブロネクチン、型コラーゲンの低下が関与していると仮説を立てたがそれが支持する実験結果を得たと考えられた。

以上より低栄養状態にある患者の気管内

吸引を実施する場合には粘膜損傷を生じるリスクが高くなることを十分に考慮して観察し、実施する必要性がある。

### <引用文献>

武田利明: 栄養状態を加味した実験系での褥瘡の基礎研究. 褥瘡会誌 2007;9(2):132-139.

平野昭彦, 武田利明, 他: 栄養状態が気管内吸引による粘膜損傷に及ぼす影響についての基礎研究. ウサギ気管を用いた検討. 岩手看護学会誌, 4巻2号, 3-11, 2010.

平野昭彦, 武田利明, 他: ウサギ気管を用いた粘膜損傷の検討. 岩手県立大学看護学部紀要, 11巻, 95-102, 2009.

Takeda T, et al. Effects of malnutrition on development of experimental pressure sore. J Dermatol. 1992;19(10):602-609.

### 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)

平野昭彦, 川崎雅志, 武田利明: 気管内吸引による粘膜損傷に栄養状態が及ぼす影響についての基礎的研究. コ・メディカル形態機能学会第15回学術集会, 2016年9月17日, 京都市.

平野昭彦, 川崎雅志, 武田利明: 気管内吸引による粘膜損傷に栄養状態が及ぼす影響についての基礎的研究(第2報). コ・メディカル形態機能学会第16回学術集会, 2017年9月, 名古屋市.

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

平野 昭彦 (HIRANO, Akihiko)  
岩手県立大学・看護学部・准教授  
研究者番号: 30305255

#### (2) 連携研究者

武田 利明 (TAKEDA, Toshiaki)  
岩手県立大学・看護学部・教授  
研究者番号: 40305248

川崎 雅志 (KAWASAKI, Masashi)  
岩手県立大学・盛岡短期大学部・准教授  
研究者番号: 80299833