

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590915

研究課題名（和文） 小動物呼吸器疾患モデルにおける呼吸機能の解析

研究課題名（英文） Pulmonary function of small animals in experimental model of respiratory diseases

研究代表者

近藤 哲理（KONDO TETSURI）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90147132

研究成果の概要：

ラットのフローボリューム(FV)曲線とボディプチスモグラフ(BPG)測定を行った。BPGは熱交換能力強化で飛躍的に精度が向上し、メサコリン吸入時の肺気量増加を確認した(論文済)。FV曲線では測定方法の検証を行い、さらに、FVCとピークフローが良い指標であること、曲線の下行脚が3相に分かれることを見出した(投稿中)。これらの装置で喘息モデルの肺機能を6週間測定したところ、第2週で強い閉塞性変化と肺気量の増加が得られた後、反応は徐々に消失した(執筆中)。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：ラット、スパイログラム、機能的残気量、気道収縮

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性呼吸器疾患の病態の研究では、ラット・マウスなどの小動物に疾患モデルを作成して形態変化や生化学的性状を観察する手法が多く用いられている。これらの方法は局所変化の解析では高い精度が得られるものの、疾患に基づく呼吸器系全体の変化は評価できない。また、通常は組

織採取に動物を殺す必要があるために、同一動物での経時的な追跡も不可能である。

我々は、これまでの研究において麻酔下であればラットでも臨床に準じた呼吸機能測定が可能であることを示してきた。臨床的には、血液ガス以外の肺機能を評価するための因子は、気道抵抗、肺気量分画、静肺コンプライアンスであり、この他にフ

ローボリューム(FV)曲線もしばしば評価の対象となる。我々は Diamond(J Appl Physiol 1977)らの手法を改良した装置を作成し、気道収縮物質(メサコリン: Mch)吸入実験を行って、これまで不可能とされていた小動物の末梢気道収縮の評価がフローボリューム曲線によって可能であることを報告した(Tanigaki et al, 2007)。

2. 研究の目的

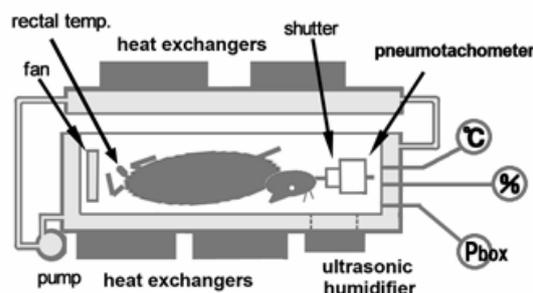
本研究の目的は、第一に慢性呼吸器疾患の病態解明のためにラットで低侵襲な肺機能測定方法を確立することであり、次に、疾患モデルとして、ラットの気管支喘息モデルにおける肺機能変化を経時的に追跡して病態の解明を行うことである。このために、我々が開発したラット用のボディプレチスモグラフ(BPG)とスパイロメトリーを用いて、BPGは肺気量と気道抵抗を測定し、スパイロメトリーは、ピークフローとFV曲線の下行脚の解析から末梢気道成分の分離を行った。

BPGとスパイロメトリーでは、ウィスター系ラットにMch吸入を行った気道収縮で、閉塞性変化評価の適切な指標を検討した。ついで、Brawn-Norway ラットを卵白アルブミン(OA)で感作した気管支喘息の標準モデルに対して、OA吸入で発生させた喘息発作の前後で肺機能を測定し、感作の成立過程で呼吸機能がどのように推移してゆくかを、同一個体で経時的に観察した。

3. 研究の方法

A) BPGは2層の外廓で構成された1170mlの密閉箱で、内層は真鍮、外層はアクリル製とした。2層間に温水を還流させ、加温と冷却が可能な半導体素子(ペルチェ素子, 800W)の熱交換機を用いて測定時に一過性に箱内を体温と同一とした。箱内に設置した超音波加湿ユニットで測定時には

100%水蒸気飽和とした。これらによって箱内環境は肺内と同様のBTPS (body temperature, atmospheric pressure and water vapor-saturated) となるので、パントニングど特殊な動作を行わなくとも、安静呼吸で気道抵抗の測定ができる(Tajiri et al., J Physiol Sci, 2006)。



図、BPGの概略図

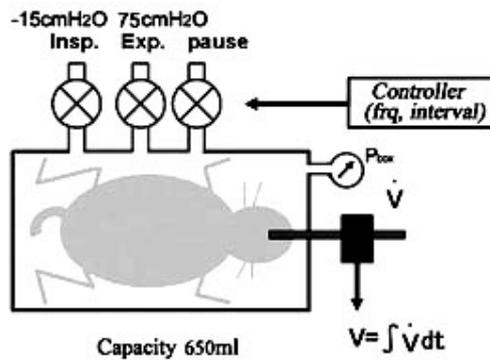
ラットの直腸温と箱内の温度(°C)、湿度(%), 圧(Pbox)は連続測定している。

ラットはペントバルビタールの腹腔内投与にて麻酔し、挿管後に超音波ネブライザーを用いてメサコリン(Mch)の各濃度(0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/ml)を吸入させて、直後にBPGを用いて気道抵抗(Raw)と機能的残気量(FRC)を測定した。

B) スパイログラムおよびFV装置は内容積650mlの密閉箱で、-25cmH₂Oの陰圧と平圧を交互に負荷する一種の体外式人工呼吸器である。ラットの呼吸に合わせた換気を行えば、呼吸は容易に人工呼吸にphase-lockさせることができる。吸気直後に75cmH₂Oの陽圧を突然に負荷することによって強制呼出を行わせた。

ラットはペントバルビタール腹腔内投与にて麻酔し、挿管ついで気管切開して、超音波ネブライザーを用いてMchの各濃度(0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/ml)を吸入させて

後に、forced expirationを行わせた。



図、スパイログラム・FV 曲線測定装置

C) 気管支喘息実験では、Brawn-Norway ラットを感作群と対照群に分け、感作群では OA の腹腔内投与 (day 0, 2, 7) で感作を行い、気管支喘息モデルを作成した。対照群は生理食塩水を注射した。OA 群では day 7, 10, 16, 19, 21, 24, 28, 30, 33, 35, 38, 42 において挿管して OA をジェットネブライザーで吸入させ、対照群では生理食塩水を吸入させた。第 0, 14, 21, 28, 35, 42 日に、BPG と forced expiration 装置を用いての測定を行ったが、第 14 日以降の測定では OA 群で OA 吸入前後、対象群では生理食塩水吸入前後での測定を行った。

day	0	2	5	7	10	14	16	19	21	24	28	30	33	35	38	42
OA Inhalation				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
OA i.p.	○	○	○													
Measurement	●					●				●	●			●	●	

図、実験プロトコール

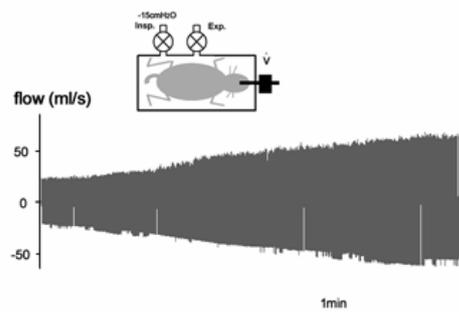
採取データは解析システムであるパワーラブにて A/D 変換後、解析ソフト「チャート」にて処理を行った。有意差検定は paired *t* test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

A) BPG による FRC、R_{aw} の測定。

前研究 (Tajiri et al., J Physiol Sci, 2006) では、Mch 吸入に対し濃度依存性に R_{aw} の増加が得られたが、FRC に有意差が得られなかった。この理由として、Mch 吸入後に BPG で測定を行っても、内部が BTPS 状態になるまでの時間経過が長すぎた可能性が考えられた。今回の研究では BPG を新たに製作し、温度調節能力は前機の 8 倍に強化したため、有意差が得られると考えた。

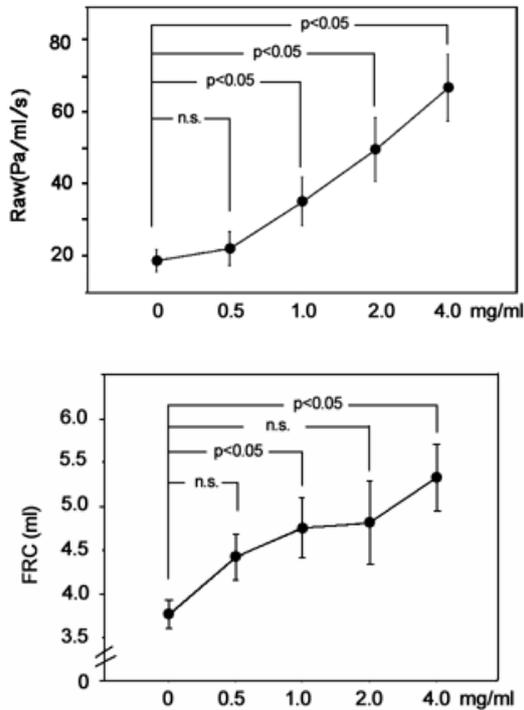
まず、ラットでの Mch による気道収縮時間がどの程度持続するかを評価するために、FV 曲線測定装置に類似した体外式人工呼吸器を作成し、Mch 吸入直後から呼吸の flow を観測した。その結果は Mch 吸入直後に flow は強く抑制されるが、時間経過とともに回復し安定には 6 ~ 16 分を要した。すなわち、Mch 吸入による気道抵抗の増加を評価するには、吸入後 5 分程度以内の測定が適切であることが分かった。今回の装置では BTPS 状態に達する時間は約 2.5 分であって、適切な評価が行えることが証明された。



図、人工呼吸中、Mch 吸入後の flow の変化。挿入図は計測の図解

そこで、牡ウィスター系ラット 9 匹を対象に、Mch 吸入後の R_{aw} と FRC を測定すると濃度依存性の変化が観測され。装置の改良で合理的な結果が得られ、研究の信頼性が格段に向上した。測定された R_{aw} も前研究時よ

り高値であり、吸入直後ならば、より強い反応が観測されるとの仮説も実証された。この結果は近々公刊される (J Physiol Sci)。

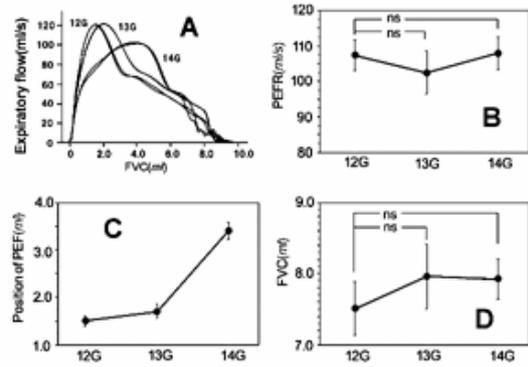


図、Mch吸入後の気道抵抗(上図)と機能的残気量(下図)の濃度依存性増加

B) スパイログラムおよびFV測定

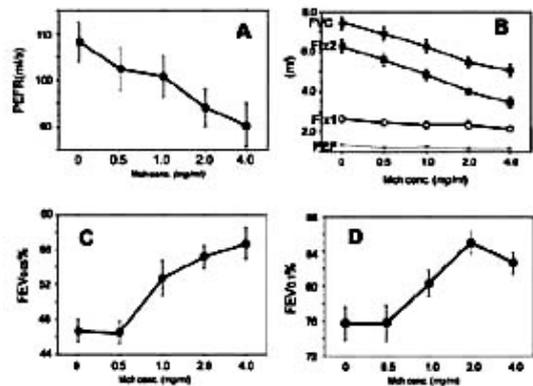
ラットの気道は細いために、気管内挿管チューブのサイズに制約がある。そこで、約4.5 cmに切断した各針の気道抵抗を測定すると、12G針は0.22 cmH₂O/ml/s、13Gは0.35 cmH₂O/ml/s、14Gは0.53 cmH₂O/ml/sと、挿管針の抵抗は14G針は12G針の約2倍と無視できないことが分かった。

実際に各サイズの針で気管内挿管をして得た(12G針は挿管困難なため気管切開)FV曲線は下図のように異なっていたが、12Gと13Gでは大きな差異はなかった。



図、12, 13, 14G針でのFV曲線とパラメータ

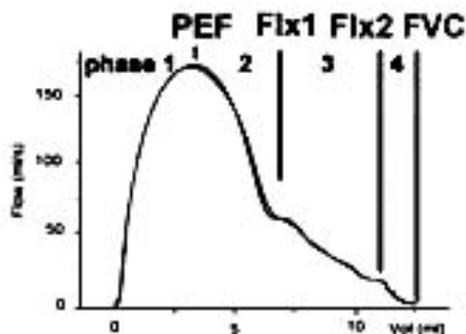
Mch吸入によるFV曲線の各パラメータの推移を下図に示す。FVCとPEFR (peak expiratory flow rate)は濃度依存性に低下し、閉塞性換気障害の良いパラメータと考えた。一方、1秒率に対応して求めた、FEV_{0.05}、FEV_{0.1}はMch濃度増加に対して、逆に増加傾向を呈し、良い指標とは考えられなかったが、FEV_{0.05}とFEV_{0.1}自体は濃度依存性に減少が見られた。



図、Mch吸入に対するFV曲線のパラメータ変化

FV曲線は4相から構成される。上図のBには各変曲点の位置を示しているが、FVCの変化は第3相短縮が主要な要因である。FV曲線の理論では、この相は中小気管支での気流制限部分を反映していることから、Mch吸入によるFVC低下は中小気管支収縮を反映

すると考えられる。一方PEFR低下は、理論的には大気道収縮を反映すると考えられる。

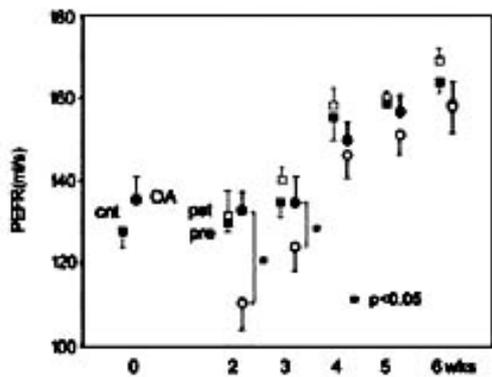


図、代表的なF V曲線は4相に分かれている

これらの結果は欧州呼吸器学会で発表し、現在専門誌に投稿中である。

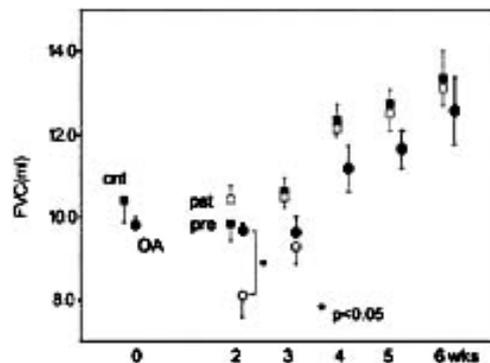
C) 気管支喘息モデル

下図にOA感作群と対照群における、OA吸入前後のPEFRの経時的な推移を示す。対照群では、いずれの週においても生理食塩水吸入前後でPEFRの有意な変化は見られなかった。一方、OA感作群においては、PEFRは第2週、第3週でOA吸入後に有意な低下を示すが、その後には有意差は消失していた。両群ともに吸入前のPEFRが経時的に増加しているのは、成長によって体重が増加していることが関係していると思われた。



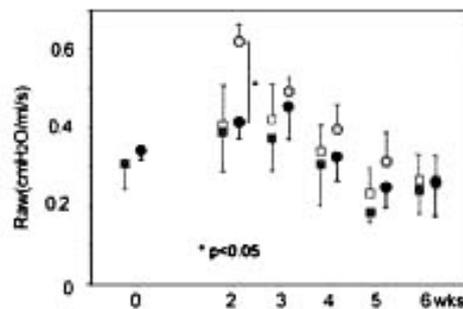
図、感作群と対照群における、OA吸入前後のPEFR推移

下図にOA感作群と対照群における、OA吸入前後のFVCの経時的な推移を示す。OA感作群ではFVCは第2週でOA吸入後に有意な低下を示すが、その後には有意差は消失していた。FVCもまた成長に伴う増加が認められた。



図、感作群と対照群における、OA吸入前後のFVC推移

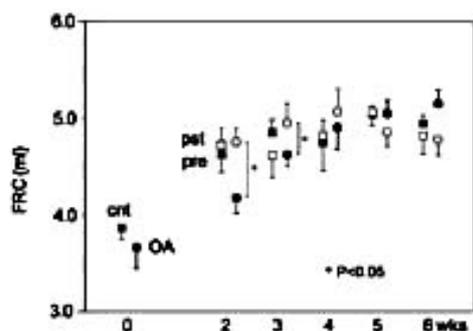
下図にOA感作群と対照群における、吸入前後のRawの経時的な推移を示す。OA感作群ではRawは第2週でOA吸入後には有意な増加を示し、気管支収縮を示唆していたが、その後の測定では有意差は消失していた。



図、感作群と対照群における、OA吸入前後のRawの推移

下図にOA感作群と対照群における、吸入前後のFRCの経時的な推移を示す。OA感作群ではFRCは第2週、第3週でOA吸入後には有意な増加を示し、肺の過膨張を示唆し

ていたが、その後には有意差は消失していた。



図、感作群と対照群における、OA吸入前後のFRCの推移

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4件)

- ① Kondo T, Tanigaki T, Tsuji C, Ishii H, Tazaki G, Kondo Y. Aerosolized Methacholine Induced Bronchoconstriction and Pulmonary Hyperinflation in Rats. J. Physiol Sci 2009, in press. (査読有)
- ② 近藤哲理、田崎巖、石井博司、谷垣俊守、辻千鶴子、モルモットのforced expirationおよびflow-volume曲線の測定、日本呼吸器学会雑誌、第47巻、278-278, 2009(査読無)
- ③ 近藤哲理、谷垣俊守、田崎巖、フローボリューム曲線によるラットの実験的気管支喘息の評価、アレルギー：第57巻3/4号454-454、2008(査読無)
- ④ 近藤哲理、谷垣俊守、田崎巖、石井博司、ラット肺機能の加齢変化、日本呼吸器学会雑誌、第46巻、277-277, 2008(査読無)

[学会発表] (計4件)

- ① 近藤哲理、谷垣俊守、田崎巖、フローボリューム曲線によるラットの実験的気管支喘息の評価、第20回日本アレルギー学会春季大会、2008年6月12日、東京

- ② 近藤哲理、谷垣俊守、田崎巖、石井博司、ラット肺機能の加齢変化、日本呼吸器学会学術講演会、2008年6月16日神戸
- ③ Kondo T, Tanigaki T, Tsuji C, Influence of tracheal tube caliber and bronchoconstriction on flow-volume curve and suitable parameters for obstructive impairment in rats. European Respiratory Society Annual Congress. 2008年10月5日, Berlin, Germany
- ④ Kondo T, Tanigaki T, Tsuji C, Changes of airway resistance and lung volume in asthmatic rats, European Respiratory Society Annual Congress, 2008年10月5日, Berlin, Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 哲理 (KONDO TETSURI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 90147132

(2) 研究分担者

谷垣 俊守 (TANIGAKI TOSHIMORI)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号: 90246091

(3) 連携研究者