

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591795

研究課題名（和文） 急性呼吸不全に対する一酸化炭素吸入療法の開発

研究課題名（英文） Development of CO inhalation therapy for acute lung injury

研究代表者

高橋 徹 (TAKAHASHI TORU)

岡山大学・岡山大学病院・准教授

研究者番号：40252952

研究成果の概要（和文）：

出血性ショック・蘇生 (HSR) は肺に炎症を引き起こし、急性肺障害を来す。一酸化炭素 (CO) は有毒ガスであるが極低濃度では細胞保護及び抗炎症効果を有する。本研究では、ラット出血性ショックモデルにおける肺障害に対する低濃度 CO 吸入の保護効果について検討した。ラット HSR モデルを room air で維持するか、蘇生前 1 時間蘇生後 3 時間 CO 濃度 250ppm の吸入を施した。その結果、HSR は炎症反応カスケードを活性化することにより、著明な肺傷害を起こしたが、CO 吸入は炎症反応を減弱し肺傷害を軽減した。

研究成果の概要（英文）：

Hemorrhagic shock and resuscitation (HSR) induces pulmonary inflammation that leads to acute lung injury. Carbon monoxide (CO), a by-product of heme catalysis, was shown to have potent cytoprotective and anti-inflammatory effects. The aim of the present study was to examine the effects of CO inhalation at low concentration on lung injury induced by HSR in rats. Rats were subjected to HSR by bleeding to achieve mean arterial pressure of 30 mmHg for 60 min followed by resuscitation with shed blood and saline as needed to restore blood pressure. HSR animals were maintained either in room air, or exposed to CO at 250 ppm for 1 hour before and 3 hours after HSR. HSR caused an increase in the DNA binding activity of nuclear factor (NF)- κ B and activator protein 1 (AP-1) in the lung followed by the upregulation of pulmonary gene expression of tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase and interleukin (IL)-10. HSR also resulted in an increase in myeloperoxidase activity and wet-weight to dry-weight ratio in the lung, and more prominent histopathological changes including congestion, edema, cellular infiltration and hemorrhage. In contrast, CO inhalation significantly ameliorated these inflammatory events as judged by fewer histological changes, less upregulation of inflammatory mediators and less activation of NF- κ B and AP-1. Interestingly, the protective effects against lung injury afforded by CO were associated with further increases of mRNA expression of IL-10 in the lung. These findings suggest that inhaled CO at a low concentration ameliorated HSR-induced lung injury and attenuated inflammatory cascades by upregulation of anti-inflammatory IL-10.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：麻酔・蘇生学

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：周術期管理学、炎症、出血性ショック、急性肺障害、一酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまで出血性ショック蘇生 (Hemorrhagic shock followed by resuscitation: HSR) 後急性肺傷害/急性呼吸促進症候群 (ALI/ARDS) モデルを用いて ALI/ARDS に対するストレス蛋白 heme oxygenase-1 (HO-1) の薬理的誘導がその抗炎症作用を介して ALI/ARDS を改善することを報告してきた (Biochem Pharmacol, 2005)。一方、近年の研究により、HO-1 の抗炎症作用は HO-1 の酵素反応 (ヘム分解反応) の結果生ずる一酸化炭素 (CO) を介することが明らかとなった。また、その抗炎症作用には、細胞情報伝達系の一つである MAP-kinase の関与が示唆されている (Nat Med, 2000)。

2. 研究の目的

本研究では低濃度の CO をラット ALI/ARDS モデルに吸入投与し、その治療効果とメカニズムを分子生物学的側面から検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物

体重 380~420g の雄 Sprague-Dawley ラットを使用。

(2) 出血性ショックプロトコール

ラットをペントバルビタール (50mg/kg) 腹腔内投与麻酔し、左大腿動静脈を露出しカテーテル挿入。出血操作を行い、平均血圧 30 ± 5mmHg に 60 分間瀉血維持した後、返血蘇生。

(3) CO の暴露

CO 混合空気を 25°C で保湿維持したチャンバーに流し、CO 濃度を常時 250 ppm で維持。ラットをチャンバー内に 1~3 時間置く。

(4) 実験デザイン

肺での組織 CO 含有量への CO 暴露の効果を調べるため、ラットをチャンバー内で 1 時間、CO 濃度 250ppm で暴露。その後ラットをペントバルビタール (50mg/kg) 腹腔内投与麻酔し、腹部を正中開腹。腹部大動脈より血液を吸引し、血管からの流出が透明になるまで生理食塩水で肺を還流し、ホモジネートの試料として肺を採取。HSR 誘発性肺障害への CO 吸入の効果を調べるため、ラットを模擬手術 (Sham)、CO 処置模擬手術 (CO/Sham)、HSR ラット (HSR)、CO 処置 HSR ラット (CO/HSR) の 4 群に分類。CO 暴露は出血性ショック前 1 時間および蘇生後 3 時間行う。蘇生後定めた時間にラットをエチルエーテルで浅麻酔断頭

犠死し、肺を切除、液体窒素で凍結、 -80°C 保存。

(5) COHb 計測

動脈血での 血液 COHb レベルを計測。

(6) 組織 CO 含有量の計測

ホモジネートした肺組織 1 mL と 3 mL のフタル酸液 (pH 4.01) を真空管に移し、0.5 mL のフェリシアン化カリウムを加え、常温で混和すると CO が放出される。そのガス層 1ml を 10ml 真空管に取り、放出された CO を、組織 CO 含有量として計測 (pmol/mg 組織重量)。

(7) 組織学的研究

組織学的検査として、組織をヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡で検査した。さらに組織病理スコア分析も行った。各々のラットの組織でうっ血、浮腫、炎症細胞浸潤、出血の 4 要素について、0 (正常)、1 (軽度)、2 (中等度)、3 (重度) に分類した。各々の要素でのスコア平均、及び個々のスコア分類の合計平均で評価。肺での好中球はナフトール AS-D クロロアセテイトエステラーゼ染色を行い、染色陽性細胞数を 400 倍の倍率でカウント。

(8) 肺ミエロペルオキシダーゼ分析

0.5%臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウムを含む 50mM 磷酸緩衝液 (pH6.0) で組織をホモジナイズし、 4°C 下 15 分間 15000 回転で遠心分離する。遠心分離後、0.1mL の浮遊液を 0.167mg/ml の α -ジアニジンデヒドロクロライドを含む 50mM 磷酸カリウム緩衝液 2.9mL に混和する。続いて 0.3%過酸化水素水 5mL を加え、分光光度計にて 1 分間 460nm で計測 (O. D. /mg 蛋白の変化 (Δ O. D.))。

(9) 肺 wet/dry ratio

肺組織を採取し重量を量り、24 時間 110°C で乾燥させた後、乾燥組織の重量を量り、wet/dry ratio を計算。

(10) cDNA プローブ

TNF- α 及び iNOS の cDNA テンプレートを準備。ノーザンブロットでのプローブは [α - ^{32}P]dCTP で標識。

(11) RNA の分離およびノーザンブロット解析

Total RNA $20\mu\text{g}$ をとり 6.5%ホルムアルデヒドを含む 1.2%アガロースゲルで電気泳動する。メンブランにブロッティング後、RNA サンプルを [α - ^{32}P]dCTP で標識された cDNA プローブとハイブリダイゼーション、ウォッシング。そのメンブランを X 線フィルムに -70°C で露光させ、18S リボソーム RNA を定量。

(12) リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

DNaseI で汚染された DNA を除去した後、Total RNA $5\mu\text{g}$ をとり、逆転写し一重鎖 cDNA を生成。IL-10 mRNA 分析の特定の上位と下位のプライマーと PCR 反応の混合物を 10 秒間 95°C で初期変性し、続いて 60°C 20 秒および 95°C 5 秒を 45 サイクル行う。IL-10 mRNA レベルは、 β -アクトチン mRNA レベルで標準化。

(13) 核抽出および電気泳動移動度変移検定

二重鎖 NF- κ B 及び AP-1 と一致するオリゴヌクレオチド プローブをそれぞれ [γ - ^{32}P] ATP で標識。核の抽出物を γ - ^{32}P で標識された NF- κ B また AP-1 と一致する オリゴヌクレオチド プローブとともに合計 $10\mu\text{l}$ の Binding buffer (10 mM Tris HCl, pH 7.5、

50 mM NaCl、1 mM MgCl₂、0.5 mM EDTA、0.5 mM DTT、4% glycerol、および 0.5 μg poly dI: dC)の中で20分間室温でインキュベート。その後、5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、そのゲルを真空乾燥させ、-70℃でX線フィルムに露光させ、定量計測。

(14) 統計分析

データは平均値±標準誤差で表した。分析には Student's t-test および分散分析 (ANOVA) を用い比較検討。AP 値 0.05 未満を有意とした。

4. 研究成果

(1) 血中 COHb レベル及び肺組織 CO 含有量に対する CO 吸入の効果

ラットを 250ppm で1時間 CO に暴露させた後、血液 COHb および肺 CO 含有量を計測した。CO 処置したラットの血液 COHb は 19.4±0.88%と、コントロールの 1.75±0.26%に比し著明に増加していた。肺 CO 含有量は CO 暴露後で 5.44±0.58pmol/mg 組織重量と著明に増加し、コントロールでは 0.85±0.11pmol/mg 組織重量であった。

(2) CO は HSR の血行動態に影響を及ぼさなかった

CO の前投与は HSR の血行動態に影響せず、蘇生での循環系の回復への遅延もなかった。また、動脈血中の pH、PO₂、PCO₂ にも明らかな影響はなかった。

(3) HSR 後の肺での組織学的変化に対する CO 吸入の効果

HSR では、蘇生 12 時間後、著明な炎症細胞浸潤を伴う間質性浮腫の進行を認めた。CO 処置 HSR ではうっ血、浮腫、炎症、出血等の病理組織変化が劇的に軽減していた。CO の著し

い効果は、組織病理スコアによっても確認された。

(4) HSR 後の肺での好中球の集積に対する CO 吸入の効果

肺 MPO 活性は、シャムと比較し、HSR で蘇生 12 時間後著明に上昇していたが、CO 処置により肺での MPO 活性はシャムレベルまで減少していた。MPO 活性での変化同様、浸潤好中球数も HSR で著明に増加し、CO 処置 HSR では好中球の漸増が減弱、数も減少していた。

(5) CO 吸入は HSR 後の肺水腫を減弱させた

肺水腫の指標である肺 wet/dry ratio は、シャムと比較し、HSR 後 12 時間で明らかに増加していたが、CO 吸入により HSR 誘発性肺水腫は著明に減弱した。

(6) TNF-α, iNOS 等 HSR 誘発性炎症性メディエーターの遺伝子発現に対する CO 吸入の効果

シャムでは CO に関わらず TNF-α, iNOS mRNA はほとんど検出されないが、HSR ラットでは蘇生後 3 時間では著明に増加した。CO 処置により、HSR に比較し、TNF-α では約 30%に、iNOS では約 50%に mRNA レベルが減少した。

(7) CO は HSR 後、肺 IL-10 の遺伝子発現を増強する

リアルタイム RT-PCR における肺 IL-10 mRNA はシャムではほとんど検出されず、CO 処置でも増加はなかった。HSR では 3 時間後、シャムと比較し、IL-10 mRNA が著明に増加した。しかし、CO 処置によりさらに IL-10 mRNA の増加を認めた。

(8) HSR 後肺での NF-κB, AP-1 の DNA 鎖活性

に対する CO 吸入の効果

HSR では、シャムに比し NF- κ B の DNA 鎖活性が著明に増加したが、CO 処置により、HSR に伴った NF- κ B の DNA 鎖活性はシャムレベルまで著しく減少した。同様に AP-1 の DNA 鎖活性も HSR で著明に増加し、シャムではほとんど検出されなかった。CO 処置 HSR の AP-1 活性のレベルは HSR の 25% のレベルであった。

(9) 国際的位置づけと今後の展望

集中治療管理で HSR の患者が改善傾向であるにも関わらず、引き続いて来す多臓器不全により死に至る可能性が残っている。これは、急性肺障害を HSR 患者の 50% 以上に来すことから特に重要である。早期炎症反応の引き金となる正確な分子学的事象の解明が、HSR に関連する急性肺障害の治療の発展に重要であり、最終的に HSR 患者により良い成果をもたらすと考えられる。低濃度 CO 吸入が、低酸素症、リポポリサッカライド、人工呼吸器誘発性肺障害を含む急性肺障害の他の動物モデルを改善させるとの報告があり、Zuckerbraun らも CO 吸入がマウスにおける HSR 誘発性肺障害を改善すると報告している。CO の抗炎症性特性のメカニズムは十分に解明されていないが、p38MAPK シグナリングパスウェイでの抗炎症効果や、subunit1 κ B- α のリン酸化や分解を抑制し LPS 誘導性 NF- κ B 活性を拮抗、JNK シグナリングパスウェイを介す LPS 刺激性 AP-1 活性を減弱、さらに最近、CO の抗炎症効果には TLR シグナリングパスウェイの上流側の拮抗も報告されている。このように、CO の作用には多数のメカニズムが考えられている。これらの報告からも CO が、酸化ストレスや炎症に関連する急性肺障害に対する治療薬となる可能性があることは明らかである。しかし、吸入された CO の逆の効果が臨床上の使用に対し主な懸念と

なっているのも事実である。肺障害に対する蘇生後の CO 投与の効果には、将来臨床試験において急性肺障害に対して CO 吸入の治療適用を明確化することが必要である。今回、我々の研究で IL-10 mRNA のアップレギュレーションが HSR 後の急性肺障害に対する CO の保護効果に伴って見られた。HSR に関連した病態には、内在的にも外在的にも IL-10 が有益な効果を持つことは明らかに証明されている。さらに最近、Kobbe らは増加した IL-10 が HSR における肺及び全身性炎症の調節に寄与すると報告している。IL-10 中和抗体や IL-10 ノックアウト動物を使用したさらなる研究により HSR における IL-10 の機能を明らかにすることも重要であろう。

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 20 件)

- ① Takahashi T, Morimatsu H, Morita K, et al., (1th author, other 7 authors): Heme Oxygenase-1 is an Essential Cytoprotective Component in Oxidative Tissue Injury Induced by Hemorrhagic Shock. *J Clin Biochem Nutr*, Vol. 44, pp. 28-40, 2009. (査読有)
- ② Kanagawa F, Takahashi T, Morimatsu H, Morita K, et al., (2nd author, other 6 authors): Protective effect of carbon monoxide inhalation on lung injury after hemorrhagic shock/resuscitation in rats. *J Trauma*, 2009 (In press). (査読有)
- ③ Umeda K, Takahashi T, Morimatsu H, Morita K, et al. (2nd author, other 6 authors) Prevention of hemorrhagic shock-induced intestinal tissue injury

by glutamine via heme oxygenase-1 induction. *Shock*, Vol.31, pp. 40-49, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 30 件)

- ① Toru Takahashi, PROTECTIVE ROLE OF HEME OXYGENASE-1/CARBON MONOXIDE SYSTEM IN PULMONARY INJURY AND INFLAMMATION, The 11th International Symposium on Molecular Medicine, Crete, Greece, October 11, 2008
- ② Toru Takahashi, HEME OXYGENASE-1/CARBON MONOXIDE SYSTEM: A NOVEL MOLECULAR TARGET AGAINST OXIDATIVE TISSUE INJURIES, The 10th International Symposium on Molecular Medicine, Crete, Greece, October 10, 2007
- ③ Toru Takahashi, Protective Role Played by HO-1 Gene Expression and CO in Critically Ill Conditions, The 5th International Congress Heme Oxygenases 2007, September 9, 2007, Krakow, Poland

[図書] (計 3 件)

1. 高橋 徹、森松博史、松崎 孝、清水裕子、井上一由、井戸佳奈、松三昌樹、片山 浩、森田 潔：全身性炎症反応における呼気中一酸化炭素 (CO)濃度の上昇, (分担)「エンドトキシン研究10 基礎と臨床の最新知見」, 上西紀夫、小川利久、小玉正智、横地高志、谷 徹編、pp. 65-68, 医学図書出版株式会社、東京、2007

[その他]

ホームページ等

<http://www.okadamasui.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 徹 (TAKAHASHI TORU)
岡山大学・岡山大学病院・准教授
研究者番号：40252952

(2) 研究分担者

森松 博史 (MORIMATSU HIROSHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：30379797

森田 潔 (MORITA KIYOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40108171