

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16525

研究課題名（和文）ARDSに対するVV-ECMO環境下における一酸化窒素吸入投与の有効性の検討

研究課題名（英文）Efficacy of Inhaled Nitric Oxide under VV-ECMO for ARDS

研究代表者

森 彰平（Mori, Shohei）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30648100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：VV-ECMO体外循環回路にNO吸入療法を併用する治療モデルは問題なく構築可能であり、本研究の目的のひとつである、ラットでのプレクリニカルモデルの開発を達成できた。また、循環動態の比較ではVV-ECMO群と比べてVV-ECMO + NO吸入群ではVV-ECMO開始後の血圧が維持されており、NO吸入による右心負荷軽減が、VV-ECMO中の血圧維持に寄与した可能性があると考えられた。非VV-ECMO環境下ではNO吸入による一部の炎症性サイトカインの低下効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VV-ECMO体外循環回路にNO吸入療法を併用する治療モデルは問題なく構築可能であり、ラットでのプレクリニカルモデルの開発を達成できた。今後、条件を変えてARDSに対するNO吸入効果を検証する動物実験モデルになりうる。VV-ECMOだけではなく体外式CO2除去治療との併用やNO濃度を増減させた治療効果の検証なども期待される。また本研究で得られた結果からはNO吸入が、血清中炎症性サイトカイン低下させる効果がある可能性や、VV-ECMO開始後の循環動態維持に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The treatment model combining the VV-ECMO with NO inhalation therapy could be constructed without problems, and one of the aims of this study, the development of a preclinical model in rats, was achieved. In addition, a comparison of circulatory dynamics showed that blood pressure was maintained after the start of VV-ECMO in the VV-ECMO with NO inhalation group compared to the VV-ECMO group, suggesting that the reduction of right heart load by NO inhalation may have contributed to the maintenance of blood pressure during VV-ECMO. NO inhalation induced a decrease in some inflammatory cytokines (CXCL3, GRO gamma, CINC-2, IL-1 alpha, IL-1F1, L-Selectin, CD62L), and no differences were observed in group comparisons under VV-ECMO, but NO inhalation therapy was found to reduce serum inflammatory cytokines in the rat ARDS model.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：一酸化窒素吸入 ARDS VV-ECMO

1. 研究開始当初の背景

COVID-19 の世界的なパンデミックが起こり、Acute respiratory distress syndrome(ARDS)に至った重症低酸素患者に対する最後の砦として extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) の果たす役割が注目されている (Schmidt, *Lancet Respir*, 2020)。ARDS における VV-ECMO による肺保護戦略は、人工呼吸器の高濃度酸素・高換気圧によるさらなる肺障害を回避し、ダメージを受けた肺組織の修復と自己肺機能の改善を待つことである (Abrams, *Am J Respir Crit Care Med*, 2020)。しかし、回復に至るまでに長期の ECMO 維持が必要となり、回路内血栓、抗凝固による出血性合併症、カテーテル関連血流感染症などが問題となる。現在の ARDS に対する VV-ECMO による肺保護戦略は人工呼吸器による肺へのダメージを回避し、自己の肺修復を待つ治療であり、積極的に肺の修復を促すわけではない。そのため、VV-ECMO 下で利用可能な、自己肺機能の回復を積極的に促進させ、ECMO に依存する期間を短縮させる治療の開発が望まれる (Figure 1)。そこで、本研究では一酸化窒素(NO)に着目した。

NO は生体内において広範な生理作用に関わるシグナル伝達因子である。血管内皮細胞由来の NO は血管平滑筋細胞内でグアニル酸シクラーゼを活性化し cGMP の産生を促して血管平滑筋弛緩作用や血小板凝集抑制作用を示し、さらに PGI₂ の産生促進を介しても様々な生理作用を発揮する (Figure 2)。また、NO の酸化代謝物である NO₂ は虚血再灌流障害における細胞保護作用が報告され (Duranski, *J Clin Invest*, 2005) ている。さらに、NO 吸入療法は選択的肺血管拡張効果を有することが報告 (Frostell, *Circulation*, 1991) されて以来、肺高血圧に対する治療として広く臨床応用されている。NO 吸入による肺の化学的・組織学的な影響については、抗炎症・抗血栓・細胞保護作用を示したという報告 (Fioretto, *Respir Care*, 2012. Qi, *PLoS One*, 2012) があるものの、多くの部分は未解明である。しかし、既知の NO の作用機序を鑑みると、NO 吸入は ARDS における VV-ECMO の肺保護戦略に上乗せして肺血流の増加作用や血栓形成抑制作用、好中球の接着抑制作用、代謝産物である NO₂ による細胞保護作用予防により、肺組織の修復・正常化を促進させる可能性がある。NO 吸入は選択的に末梢肺血管へ作用するため、体循環における血圧低下作用がなく、さらに VV-ECMO 下では薬物動態が不安定になる静脈内投与と違い、吸入による投与は薬物動態を考慮する必要がない。

ARDS に対する VV-ECMO 使用下での NO 吸入による肺組織修復に関する治療効果の検証は、これまでにない。

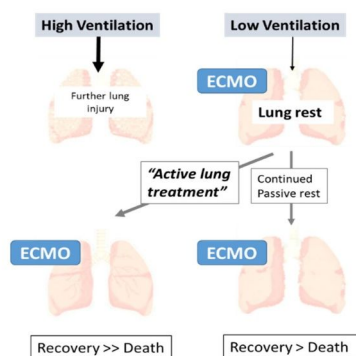


Figure 1 積極的に肺修復を促す治療の開発により予後を改善させる

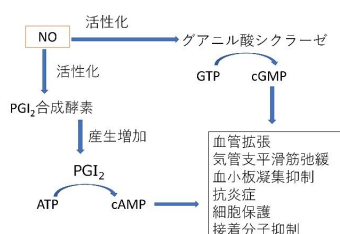


Figure 2 一酸化窒素(NO)の生理作用

2. 研究の目的

ARDS に対する ECMO による肺保護戦略を更に前進させた、積極的に肺の修復を促進させる治療の開発として、NO 吸入療法を検証することが本研究の目的である。我々は、VV-ECMO 下での NO 吸入が肺組織の修復を促進させる効果があるという仮説を立て、我々が新規に開発し研究を継続しているラット VV-ECMO モデルを用いて、ARDS に対する VV-ECMO 使用下における NO 吸入の肺組織における治療効果と生体に与える影響を動物実験で明らかにする。

3. 研究の方法

ラット ARDS モデルには、確立された lipopolysaccharide(LPS)気管内投与モデルを使用する。VV-ECMO あり/なしと NO 吸入あり/なしの組み合わせで実験を行うためラットを 4 群(各 N=7)に分ける (Figure 3): 1) 通常換気、2) 通常換気+NO 吸入 (20 ppm)、3) VV-ECMO 下の肺保護換気、4) VV-ECMO 下の肺保護換気+NO 吸入 (20ppm)。VV-ECMO 群の人工呼吸器設定は肺保護換気(FiO₂ 0.3, TV 5ml/kg, PEEP 5 cmH₂O and RR 5)、VV-ECMO なし群の人工呼吸器設定は高換気圧・高濃度酸素換気(FiO₂ 1.0, TV 8ml/kg, PEEP 15 cmH₂O and RR 60)とする。各群で LPS 投与から 3 時間の呼吸サポートを行い犠牲死させ、検体を採取する。

治療効果・生体反応の評価はリアルタイムでの循環動態(血圧、心拍数)と血液ガス分析、血清中のサイトカイン測定、組織学的評価(組織学的肺障害スコア、肺胞上皮細胞のアポトーシスの頻度、微小血栓形成の程度)、肺組織 RT-PCR により炎症・免疫・細胞増殖に関わる mRNA の発現定量を行う。これらの各群での比較・解析を行い ARDS に対する VV-ECMO 環境下における NO 吸入療法の治療効果と生体に与える影響を検討する。

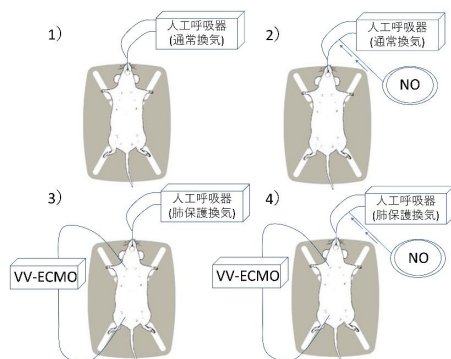


Figure 3 ラット ARDS モデルにおける VV-ECMO +/- と NO 吸入 +/- の比較群

4. 研究成果

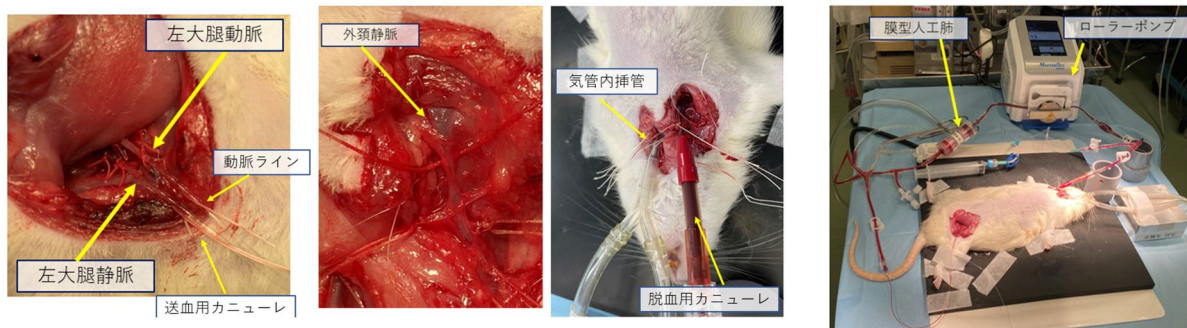
I. 実験モデル構築

ARDS モデルラットにおいて、VV-ECMO に NO 吸入療法を併用する回路を構築した。このモデルを用いて、問題なく実験が遂行可能であった(Figure 4)。

II. 各群での循環動態・血液ガス分析の比較

Control 群と NO 吸入群の比較では治療開始前後の循環動態 (MAP, SBP, DBP, HR) に差はなく(治療前 MAP 117±20 mmHg vs. 123±17 mmHg, $p = 0.587$; 治療開始後 MAP 102±10 mmHg vs. 99±16 mmHg, $p = 0.653$)、ECMO 群と ECMO+NO 吸入群の比較では治療開始前の循環動態には差がなかった(MAP 106±4 mmHg vs. 114±9 mmHg, $p = 0.059$)が、治療開始後は ECMO+NO 吸入群において MAP, SBP, DBP が高く維持されていた(MAP 68±7 mmHg vs. 82±14 mmHg, $p = 0.038$) (Table 1, Figure 5)。ECMO 群と比べて ECMO + NO 吸入群では治療開始後の血圧が維持されており、NO 吸入による右心負荷軽減が、ECMO 中の血圧維持に寄与した可能性がある。

Control 群と NO 吸入群の比較では治療開始前後の血液ガス分析の結果(pH, pCO₂, pO₂, HCO₃⁻, Hb)に差はなかった。ECMO 群と ECMO+NO 吸入群の比較でも治療開始前後の血液ガス分析の結果に差はなかった。



NO inhalation

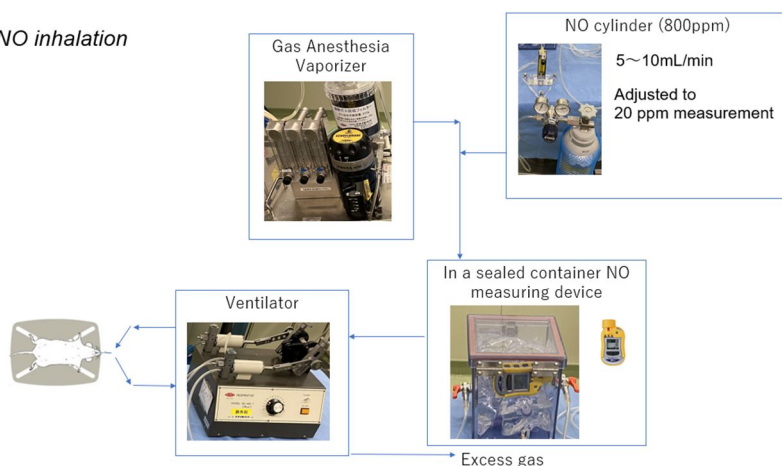


Figure 4 VV-ECMO に NO 吸入療法を併用するモデルの構築

Table 1. Comparison of circulatory dynamics before and after treatment

	Control group N = 7		NO inhalation group N = 7		p value
	Mean	SD	Mean	SD	
Term 1					
mean arterial pressure	117	20	123	17	0.587
systolic blood pressure	123	20	127	18	0.672
diastolic blood pressure	111	21	118	17	0.505
heart rate	248	41	257	37	0.671
Term 2					
mean arterial pressure	102	10	99	16	0.653
systolic blood pressure	109	10	104	16	0.564
diastolic blood pressure	95	11	93	15	0.762
heart rate	279	23	260	48	0.345
	ECMO group N = 7		ECMO + NO inhalation group N = 7		p value
	Mean	SD	Mean	SD	
Term 1					
mean arterial pressure	106	4	114	9	0.059
systolic blood pressure	112	5	119	9	0.113
diastolic blood pressure	100	4	109	9	0.050
heart rate	255	83	287	43	0.389
Term 2					
mean arterial pressure	68	7	82	14	0.038
systolic blood pressure	73	7	87	14	0.033
diastolic blood pressure	62	7	75	14	0.045
heart rate	233	31	247	36	0.450

Circulation dynamics of each group (representative example)

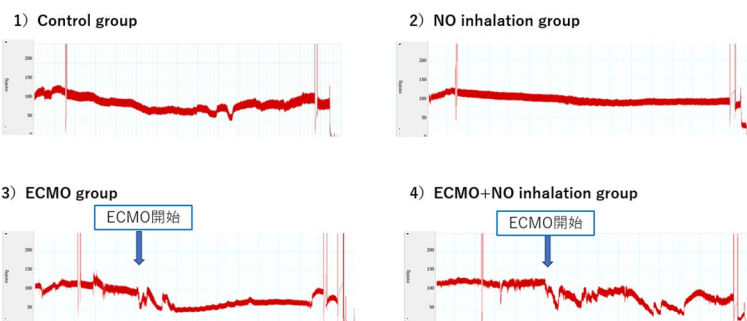


Figure 5 各群の循環動態の比較 (代表例)

III. 各群での血清サイトカインの比較

血清サイトカインは CXCL3_GRO gamma_CINC-2, CXCL2_GRO beta_MIP-2, GM-CSF, ICAM-1_CD54, IFN-gamma, IL-1 alpha_IL-1F1, IL-1 beta_IL-1F2, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18_IL-1F4, L-Selectin_CD62L, TIMP-1, TNF-alpha, VEGF を測定した。

Control 群と NO 吸入群の比較において、CXCL3_GRO gamma_CINC-2、IL-1 alpha_IL-1F1、L-Selectin_CD62L が治療開始前では差がなかったが治療開始後の比較では NO 吸入群で低下していた（それぞれ $p=0.084, 0.095, 0.038$ ）（Figure 6）。ECMO 群と ECMO+NO 吸入群の比較においては治療開始前・後いずれも各サイトカイン値に差はなかった。

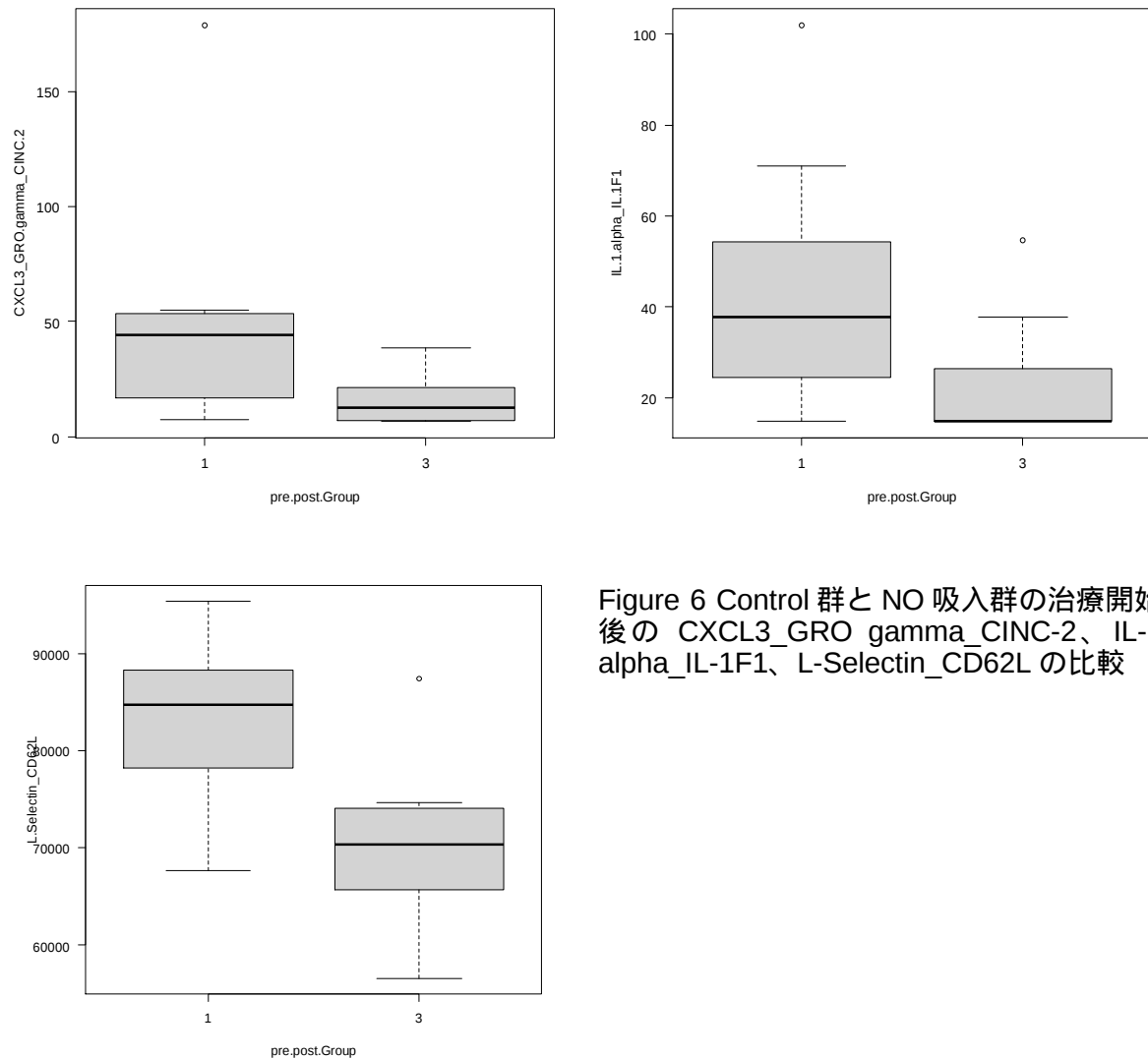


Figure 6 Control 群と NO 吸入群の治療開始後の CXCL3_GRO gamma_CINC-2、IL-1 alpha_IL-1F1、L-Selectin_CD62L の比較

IV. 今後の実験計画の展望

本研究のこれまでの成果は第 41 回日本呼吸器外科学会学術集会において「ARDS に対する新規治療開発 - VV-ECMO に一酸化窒素吸入療法を併用するラットでのプレクリニカルモデル」の演題名で発表を行った。

今後は採取・保存された各種検体を用いて、組織学的肺障害スコアの比較、肺組織での RT-PCR による免疫調節や細胞障害/細胞増殖に関連する mRNA の発現量の比較を行い、VV-ECMO サポートに NO 吸入療法を追加することの有効性をさらに検証していく。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 森 彰平
2．発表標題 重症肺炎に対するVV-ECMO体外循環回路にサイトカイン吸着カラムを組み込むラットでのプレクリニカルモデルの開発
3．学会等名 第39回日本呼吸器外科学会学術集会
4．発表年 2022年

1．発表者名 森 彰平
2．発表標題 ARDSに対する新規治療開発 - VV-ECMOに一酸化窒素吸入療法を併用するラットでのプレクリニカルモデル—
3．学会等名 第41回日本呼吸器外科学会学術集会
4．発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------