

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791942

研究課題名(和文) 低酸素応答への介入による非脱分極性筋弛緩薬の肺保護効果についての研究

研究課題名(英文) Lung protective effects due to the low oxygen response of non-depolarizing muscle blockers

研究代表者

船木 一美 (Funaki, Kazumi)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30423263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非脱分極性筋弛緩薬(NDNB)による低酸素性肺血管収縮(HPV)抑制作用は低酸素応答機能に対する可逆的抑制作用であることを見出した。今回の無気肺・肺再膨張性急性肺傷害モデルでは、NDNBの肺保護効果はみられず、培養細胞実験における低酸素負荷でもHIF-1 α への明らかな影響はみられなかった。今回の無気肺・肺再膨張性急性肺傷害モデルでは、無気肺時間は1時間と短時間で急性肺傷害として弱く、培養細胞実験における低酸素負荷時間についての検討の余地がみられた。NDNBのHPV抑制およびHIF-1 α を介した低酸素応答による肺保護効果の有無については本研究では評価しきれなかった。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic pulmonary vasoconstriction(HPV) suppressive action by non-depolarizing muscle blockers(NDNB) was found to be reversible inhibitory effect on hypoxic response function. In the atelectasis-lung re-expansion of acute lung injury model, lung protective effects of NDNB was not clear. Effects on HIF-1 α of NDNB at hypoxic condition in cultured cell experiments were not clear. In this atelectasis-lung re-expansion of acute lung injury model, atelectasis time may be weak as acute lung injury in an hour and a short period of time. Hypoxic condition time in cultured cell experiments may be too short. Lung protective effects due to the low oxygen response through the HPV suppression and HIF-1 α of NDNB were not fully evaluated.

研究分野：肺傷害、肺循環

キーワード：非脱分極性筋弛緩薬 低酸素性肺血管収縮 HIF-1 肺循環 肺傷害 肺保護効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 低酸素に対する哺乳類の応答には、秒単位の低酸素応答と、時間や日の単位で表現系が明らかになってくる低酸素応答の2種類がある。前者は、HPV (低酸素性肺血管収縮) や頸動脈小体・神経上皮体の興奮としてみられ、カリウムチャンネルが重要な役割を果たしている。後者は、HIF-1 が細胞内遺伝子発現の制御を司る転写因子であり、炎症反応にも関与していることが知られている。これらの低酸素応答は重要なホメオスタシス機能であるが、HPV や血管作動物質の作用増強によって肺高血圧の惹起や、敗血症などによる臓器低酸素環境状態では HIF-1 を介した炎症性サイトカインの増加が各臓器へ炎症性細胞の集積を誘発し臓器障害を惹起することも知られている。

(2) 申請者は、非脱分極性筋弛緩薬 (NDNB) であるベクロニウムが、HPV を用量依存性に抑制するし、パンクロニウムにはその作用がないことを明らかにし報告した。その後、多くの NDNB が用量依存性に HPV 抑制作用をもつことも確認した。また、ベクロニウムのような NDNB が低酸素性呼吸応答を抑制することもすでに報告されている。頸動脈小体の低酸素応答はカリウムチャンネルが関与しているので、NDNB の HPV 抑制作用は低酸素シグナルのカリウムチャンネルへの伝達経路のいずれかに作用すると推測された。一方で、NDNB が、HIF-1 に影響するかどうかについてははっきりとしていない。しかし、HIF-1 は麻酔関連薬によって影響を受けることは報告されており、NDNB が HIF-1 に影響を与える可能性は十分にあり得る。

(3) 急性肺傷害では HPV が誘発する肺血管のリモデリングとそれに伴う肺血管内皮傷害が急性肺傷害の増悪がみられることが報告されており、NDNB はまずこの HPV 抑制作用によって急性肺傷害に対する肺保護効果を有する可能性がある。また、プロポフォールの HIF-1 抑制作用は抗炎症作用を引き起こして急性肺傷害を改善することが報告されており、NDNB に HIF-1 抑制作用があれば急性肺傷害を改善する可能性も考慮される。実際、早期 ARDS 患者への NDNB (シタラクリウム) の投与が死亡率を低下させることが報告されている。

2. 研究の目的

NDNB が低酸素応答に介入することで肺保護作用をもつのか、家兎および培養細胞を用いて検討することが目的である。

(1) NDNB による HPV 抑制作用が低酸素応答機能に対する不可逆的損傷によって生じているのかについての検討

(2) NDNB による HPV 抑制作用が肺保護作用をもつのかについての検討

(3) NDNB が HIF-1 に影響をするのか

どうかを検討し、HIF-1 を介した肺保護作用も有するのかについての検討

3. 研究の方法

(1) NDNB による HPV 抑制が低酸素応答機能への不可逆的損傷によって生じているのかについての検討

家兎を用いて摘出灌流肺標本を作製した。灌流開始とともに混合ガス (21% O₂、74% N₂、5% CO₂) による換気を行い、灌流液が pH 7.40 になるように炭酸水素ナトリウムを用いて調整した。HPV 反応は低酸素負荷 (5% O₂、90% N₂、5% CO₂) 5 分間中の肺血管抵抗の増加 (PVR) によって評価した。また、NDNB は低酸素負荷の 5 分前に投与した。不可逆性の有無について、NDNB 投与後の HPV 反応を観察後に灌流液を用いて摘出灌流肺標本を洗い流し再度 HPV 反応を観察した。NDNB のうちベクロニウム、ロクロニウムについてスガマデックスを用いて観察した。

(2) NDNB による pH 変化が HPV 抑制にもたらすのかについての検討

家兎摘出灌流肺標本によって検討した。NDNB による pH 変化と HPV 反応を観察するとともに、対照群で同様な pH 変化を作り出しながら HPV 反応を観察した。

(3) 肺血管収縮に対する NDNB の影響についての検討

家兎摘出灌流肺標本によって検討した。肺血管収縮を引き起こした後に、NDNB を投与して肺血管抵抗に与える影響を観察した。灌流液は pH 7.40 になるように炭酸水素ナトリウムを用いて調整した。

(4) 長期間低酸素負荷による急性肺傷害に対する NDNB の肺保護効果の検討 (IN VIVO)

家兎をミダゾラムとケタミンで全身麻酔を行い、低酸素負荷による NDNB の循環動態および肺傷害への影響を観察した。

(5) 無気肺・肺再膨張による急性肺傷害モデルにおける NDNB の肺保護効果の検討

Funakoshi の方法を参考に家兎摘出灌流肺標本を用いて検討した。無気肺は 1 時間とし、再膨張後 2 時間観察した。そして、NDNB による循環動態および肺傷害への影響を観察した。また、NDNB は無気肺開始 5 分前に投与した。

(6) 培養細胞の HIF-1 発現に対する NDNB の影響についての検討

型肺胞上皮細胞のモデル細胞として頻用される樹立細胞株 A549 細胞を用いて、HIF-1 発現に対する NDNB の影響について検討した。

4. 研究成果

(1) NDNB による HPV 抑制が低酸素応答機能への不可逆的損傷によって生じているのかについての検討

NDNBによるHPV抑制作用は灌流液を用いて摘出灌流肺標本を洗い流すことで消失した。NDNBのうちベクロニウム、ロクロニウムのHPV抑制作用はスガマデックスによって拮抗された。この拮抗作用は短時間で生じた。NDNBによるHPV抑制作用は低酸素応答機能に対する不可逆的損傷によって引き起こされているのではなく、可逆的抑制作用であることが見出された。また、パンクロニウムにHPV抑制作用がないことも再度確認し、NDNBのHPV抑制作用にヒスタミンやシクロオキシゲナーゼ系の関与がみられないことも確認した。

(2) NDNBによるpH変化がHPV抑制にもたらすのについての検討

NDNBの投与によってpHがアシドーシスに傾いたものの、高用量投与でのみ変化がみられ、しかもHPV抑制作用はpH変化がみられる前の用量から出現した。対照群として塩酸を用いてpHをアシドーシスに傾けるように調整して観察したところ、アシドーシス自体はHPVを増強させた。このことから、NDNBによるHPV抑制作用はpH変化と無関係であることを見出した。

(3) 肺血管収縮に対するNDNBの影響についての検討

家兔摘出灌流肺標本を用いて、まず血管収縮を引き起こして、NDNBの用量を変えながら投与したところ、血管拡張作用がみられた。したがって、HPV抑制にこの血管拡張作用が関与している可能性が伺えたが、パンクロニウム以外はシクロオキシゲナーゼ系の関与はみられなかった。ただし、HPV抑制作用のないパンクロニウムにも肺血管拡張作用がみられたことから、NDNBのHPV抑制作用は単純な血管拡張作用だけでないことが推測された。

(4) 長期間低酸素負荷による急性肺傷害に対するNDNBの肺保護効果の検討(IN VIVO)

家兔をミダゾラムとケタミンで全身麻酔を導入・維持し、低酸素負荷を行い、NDNBによる循環動態および肺傷害への影響を観察した。しかし、酸素濃度8%による低酸素負荷を行ったところ突然死する家兔がみられたため、低酸素負荷の酸素濃度は15%として観察した。NDNBであるベクロニウムの比較的大量投与を行ったところ、6時間後の肺動脈圧の上昇は抑えられる傾向がみられたが、心拍出量などの測定ができていないため、肺血管抵抗は求めてらずHPV抑制作用があると判断するには不十分な結果であった。また、肺の乾湿重量比でもはっきりとした有意差はみられなかった。したがって、ベクロニウムの投与量をもっと増やせばIN VIVOでもNDNBであるベクロニウムのHPV抑制作用が証明される可能性が伺えた。

(5) 無気肺・肺再膨張による急性肺傷害モデルにおけるNDNBの肺保護効果の検討

NDNBの投与による無気肺・肺再膨張の影響を観察したところ、無気肺・肺再膨張によりTNF- α 、IL-1のmRNAの発現量は有意に増加したが、NDNBの投与は明らかな影響を与えなかった。また、無気肺・肺再膨張はHIF-1のmRNAの発現量に明らかな影響を与えなかった。ただし、対照群と比較して無気肺・肺再膨張は肺乾湿重量比に有意な影響を示さず、肺血管外水分透過量、ミエロパーオキシターゼ、肺血管抵抗についてもNDNBは有意な影響を与えなかった。急性肺傷害モデルとしては弱いモデルであった。NDNBの用量は1 μ Mと少量であったが、電磁流量計の故障のため、HPVを有意に抑制する用量での実験はできなかった。

(6) 培養細胞のHIF-1発現に対するNDNBの影響についての検討

A549細胞の低酸素負荷(30分間、1時間、2時間)において、NDNBはHIF-1発現量に有意な影響を与えなかった。

(7) NDNBによるHPV抑制作用は低酸素応答機能に対する可逆的抑制作用であることを見出し、NDNBによるHPV抑制作用を用いた肺保護効果は十分に検討の余地があると判断し研究を継続した。しかし、今回の無気肺・肺再膨張性急性肺傷害モデルにおける無気肺時間は1時間と短時間で急性肺傷害としては弱かった。また、NDNBの用量についても十分には検討できなかった。その上、肺傷害モデルの無気肺時間を参考に培養細胞実験における低酸素負荷も最大2時間で検討したことがこのことも検討として不十分であったかもしれない。したがって、NDNBのHPV抑制およびHIF-1を介した低酸素応答による肺保護効果の有無については本研究では評価しきれなかった。ただし、IN VIVO実験の結果から、NDNBが肺高血圧症進展を抑制する可能性はあるので、今後もNDNBの肺保護作用の可能性について検討する必要があると判断した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

南ゆかり、舩木一美、森山直樹、仲宗根正人、北川良憲、山崎和雅、坂本成司、齋藤憲輝、稲垣喜三 心臓手術では術後しばしば筋弛緩作用が残存する

第 42 回日本集中治療医学会学術集会
2015/2/9～2/11 東京都・ホテル日航東京

舩木一美、仲宗根正人、遠藤涼、持田晋輔、南ゆかり、齋藤憲輝、稲垣喜三

冠動脈バイパス術後の右左シャントを伴う右室梗塞による循環不全に対して経皮的心配補助が奏功した一症例

第 32 回日本集中治療医学会中国四国地方会 2015/1/17 徳島市・徳島大学大塚講堂

舩木一美、坂本成司、山崎和雅、持田晋輔、原田知実、齋藤憲輝、稲垣喜三

重症無力症患者の胸腺摘出術における術後人工呼吸管理の必要性に影響する因子の検討

第 41 回日本集中治療医学会学術集会
2014/2/27～3/1 京都市・国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

舩木 一美 (Kazumi Funaki)

鳥取大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：30423263