

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462369

研究課題名(和文) 抗酸化作用に注目した人工呼吸器関連肺傷害予防法の開発

研究課題名(英文) Development of ventilator-associated lung injury prevention method focused on antioxidant action.

研究代表者

平手 博之 (HIRATE, Hiroyuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20363939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：人工呼吸器関連肺傷害(VILI)の有効な予防法は確立されていないため、本研究では、マウスのVILIモデルを、換気回数、換気量、換気時間、呼気終末陽圧値を組み合わせた人工呼吸条件で確立し、これを用いて肺保護的な換気条件とVILI軽減に有用な薬物や栄養素を検討した。

抗酸化作用のある薬物を投与した後、人工呼吸を実施してVILIの軽減を検討したが、有効性を確認できなかった。抗酸化物質を含む経管栄養剤を事前に投与したマウスにも人工呼吸を行ったが、VILIの軽減作用は認められず、糖尿病モデルマウスであるAKITAマウスへの人工呼吸も試みたが、呼吸条件と血糖値のコントロールが難しく、検討は困難だった。

研究成果の概要(英文)：Ventilator-related lung injury (VILI) is a problem, but effective prophylaxis has not been established, so this study investigated the VILI model of the mouse as a function of ventilation frequency, ventilation rate, ventilation time, end-tidal expiration. This model was used to establish drugs and nutrients useful for pulmonary protective ventilation conditions and VILI alleviation.

After administering antioxidant substances, artificial respiration was performed to examine the reduction of VILI, but it was not possible to identify effective substance. Artificial respiration was also given to mice to which containing antioxidant was administered in advance, but no reduction effect of VILI was observed. We tried artificial respiration to AKITA mouse which is a model mouse of diabetes, but it was difficult to control breathing condition and blood glucose level, and it was difficult to study.

研究分野：集中治療医学

キーワード：人工呼吸器関連肺障害 肺保護 抗酸化物質

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸療法は、呼吸不全患者の呼吸サポートだけでなく、手術患者における全身麻酔時の呼吸管理など、非呼吸不全患者に対しても広く適用されている療法である。人工呼吸療法は、呼吸サポートにより酸素化を改善し、組織に必要な酸素の需給アンバランスの改善や炭酸ガスの除去、呼吸努力に必要な仕事量の軽減による心臓の仕事量の減少などの治療的側面を持つ。一方、人工呼吸療法による、肺組織や脈管系からの reactive oxygen species (ROS) の発生 (Martinez-Caro L, et al. Intensive Care Med 2009) や、損傷組織から放出される尿酸による炎症反応 (Kuipers MT, et al. PLOS ONE 2012) が知られている。さらには、肺全体に傷害を与える人工呼吸器関連肺傷害 (ventilator induced lung injury: VILI) を引き起こすことも報告されており、負の側面を併せ持つことも臨床医療においては事実である。治療上必要な医療行為である人工呼吸療法に付随して起こりうる VILI の発症は、医療費増加、治療期間延長、後遺障害による患者パフォーマンスの低下など、多大な損失を社会にもたらすことが考えられる。

VILI を予防あるいは軽減し、人工呼吸療法の必要不可欠な利点のみを引き出すことは、上記損失を改善させ、社会の大きな恩恵をもたらさう。しかしながら現実には、VILI を完全に予防する手段は確立されていない。肺に保護的な換気条件、すなわち低めの 1 回換気量で肺の過膨張を防ぎ、呼気終末陽圧 (PEEP) で肺の虚脱を防ぐ手法は現在広く取り入れられているが、肺保護的換気を行っても、完全に炎症を防ぐことは困難である (Vaneker M, et al. Anesthesiology 2007)。また、一部の薬物による VILI 軽減が動物実験で示されている (Kuipers MT, et al. PLOS ONE 2012) が、臨床において VILI に適応のある薬物療法は現在なく、薬物療法は一般的に

副作用の懸念もある。

様々な抗酸化物質が、臓器保護作用を発揮することが知られており、申請者の研究室でも、抗酸化物質の経口摂取によるラット肝炎モデルにおける炎症軽減を報告している (Takayanagi T, et al. J Parenter Enteral Nutr 2011)。また、ビタミン E の一種である α -tocopherol の抗酸化作用が酸化ストレスに対して有効的に作用する可能性を示唆した報告がある (Yamaoka S et al. :Free Radic Res, 2008)。

申請者は予備的研究により、 α -tocopherol の α -TTP を介した肺保護作用により、VILI の発症抑制を確認している。その他にも、いくつかのポリフェノールの経口摂取により、VILI 予防効果を確認している。これらの予備的研究の結果を踏まえ、本研究計画では抗酸化作用に注目した VILI 予防法の開発を目指した。

多くの抗酸化物質がすでに臨床応用可能であり、かつ経口あるいは経静脈的に投与可能であることから、臨床応用を目指した研究とした。

2. 研究の目的

本研究では様々な抗酸化物質に注目し、新たな VILI 予防法の開発を目指した。

まず、マウスを用いた人工呼吸肺傷害モデルを確立し、様々な換気条件を組み合わせる肺傷害を作成して、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中に漏出する蛋白質濃度などを指標に評価を予定した。

次に、モデルマウスに抗酸化物質を経口投与し、肺保護効果を同様の指標で確認して、さらには、効果を確認した抗酸化物質を組み合わせ、最良の効果を発揮するベストミックスをモデルマウスで検討し、臨床応用を視野に入れて検討を行う予定とした。

そこで、次の 4 点を本研究の目標とした。

- (1)マウス VILI モデルの確立
- (2)各種抗酸化物質のマウス VILI モデルにおける効果と機序解明
- (3)簡便な VILI 予防薬の開発
- (4)VILI 予防栄養剤の臨床評価

3. 研究の方法

(1)マウス VILI モデルの確立

C57BL/6 マウスに吸入麻酔薬を投与して気管切開を行い、人工呼吸器 (MidiVent、Hugo Sachs Elektronik 社) を用いて、換気回数、換気量、換気時間、PEEP 値を様々な値で組み合わせた条件で、陽圧呼吸による人工呼吸を行った。血液ガス分析で炭酸ガス分圧が正常範囲内におさまる条件を検討し、各々の条件で BALF のタンパク濃度や BALF 中の炎症性サイトカイン、ケモカインの測定を行い、今後の実験でマウスに施す人工呼吸条件を検討した。

1 回換気量を「肺保護換気：7.5mL/kgBW」、「標準的換気：10mL/kgBW」、「高用量換気：15mL/kgBW」の設定として人工呼吸を試み、適切な炭酸ガス分圧を維持できる換気回数、PEEP 値および人工呼吸後の BALF 中のタンパク濃度を検討し、VILI モデルの確立を試みた。

(2)各種抗酸化物質のマウス VILI モデルにおける効果の確認

VILI の発生しやすい集中治療領域において、実際に使用頻度が高く、抗酸化作用があると言われているアジスロマイシンをマウスの VILI モデルに試した。

また、集中治療領域で経管による栄養療法が非常に重要な地位を占めることから、消化管からの栄養療法で肺傷害軽減を実現できないかということに着目し、抗酸化作用のあるポリフェノールやビタミン E を含む経管栄養剤と、それらを含まないコントロールの経管栄養剤を 1-2 週間マウスに与え、それらに人工呼吸を施し、肺の検体を採取して肺傷害

の軽減作用が認められるかを検討した。

(3)糖尿病モデルマウスを用いた VILI モデルの確立

糖尿病が免疫力に影響を与える事実が確認されており、多くの疾患において糖尿病がリスク因子になっていることが多いが、VILI に関しては糖尿病が保護的に働くという報告が多い一方、逆に悪化したという報告もあり、何らかの影響を肺にも与えうる可能性があった。糖尿病の患者は近年増加傾向にあり、また、集中治療を要する患者の多くは耐糖能異常を来しており、糖尿病の影響に人工呼吸の侵襲を加え、それらに抗酸化作用のある薬物と栄養を組み合わせ、肺傷害の差を確認できないかについて検討することにした。

糖尿病モデルマウスの AKITA マウスを使用し、徐放型インスリン (Ins) 埋め込みによる血糖コントロールモデルを作成し、人工呼吸を実施した。

4. 研究成果

(1)マウス VILI モデルの確立

1 回換気量を「肺保護換気：7.5mL/kgBW」、「標準的換気：10mL/kgBW」、「高用量換気：15mL/kgBW」の設定とし、それぞれの換気量で、換気回数 (回/分) が 160、135、80、PEEP 値 (cmH₂O) は 2、2、0.5 で、換気時間が 4 時間であれば、21%酸素濃度人工呼吸換気下で管理でき、かつ換気容量を増加させるにつれ、BALF 中のタンパク濃度が上昇することが確認できた。BALF 中の炎症性サイトカイン、ケモカインも、ほぼ換気容量依存的に増加しており、上記設定条件のいずれかを選択し、様々な程度の VILI を発症させる条件、手技を確立した。

申請者は、当施設外で VILI モデルの作成手技を習得し、今回、当施設で同様のモデルで研究を開始したが、学んだ時とは異なる条

件がいくつかあったためか、スムーズなモデルの作成ができず、適切な条件の再設定に時間を要した。

(2)各種抗酸化物質のマウス VILI モデルにおける効果確認

アジスロマイシンをマウスの VILI モデルに試したが、肺傷害の軽減作用の有意差は認められなかった。

次に、抗酸化作用のあるポリフェノールやビタミン E を含む経管栄養剤と、それらを含まないコントロールの経管栄養剤を 1-2 週間マウスに投与後に人工呼吸を実施したが、抗酸化物質含有栄養剤投与群とコントロール群のいずれも、通常の固形食よりも人工呼吸による侵襲自体に対する耐用性が低く、人工呼吸プロトコルの再検討が必要となった。様々な呼吸条件で試してみたものの、経管栄養剤の種類による肺傷害の軽減作用を確認するには至らなかった。

特定の薬剤の抗酸化作用が、人工呼吸時に肺保護的に作用し、VILI を軽減する報告は実際あるが、今回の条件では肺傷害自体が顕著ではなく、いろいろな条件の修正を余儀なくされた。

集中治療領域ではしばしば人工呼吸療法を行うが、主に急性期の短期治療であり、本研究の薬物投与も事前から継続した長期投与ではなく、短期併用であったため、集中治療の実際には即しているものの、動物実験としては有意な結果が出なかった可能性が考えられる。また、栄養的なアプローチは、一定期間事前投与して人工呼吸を試みたが、強制給餌による定量投与ではなく自由摂取だったため、十分量投与できていなかったなど、解決すべき課題が多かった。

(3)糖尿病モデルマウスを用いた VILI モデルの確立

糖尿病モデルマウスの AKITA マウスを使用

し、徐放型インスリン (Ins) 埋め込みによる血糖コントロールモデルを作成したが、メーカーおよび文献による推奨投与量の Ins3 錠では低血糖になりすぎ、2 錠に減らしても安定せず、1 錠では効果がなかった。最終的には Ins2 錠で血糖コントロールモデルを完成させたが、かなり時間を要してしまった。

このモデルに人工呼吸を実施したが、AKITA マウスのバックグラウンドである C57BL/6 マウスで 4 時間以上良好な状態で生存できる設定では、Ins 埋め込み群が過度の低血糖となり死亡した。Ins 埋め込み群が生存できる条件に変更しても、Ins 非埋め込み群が致死的な高血糖となり死亡した。人工呼吸中の糖負荷も行ったが血糖の維持ができず、AKITA マウスによる VILI の検討は困難だった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

平手 博之 (HIRATE, Hiroyuki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20363939

(2)研究分担者

有馬 一 (ARIMA, Hajime)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20254295

祖父江 和哉 (SOBUE, Kazuya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90264738