

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462760

研究課題名(和文) オピオイドはTLR4を介して急性肺障害を増悪させるか？

研究課題名(英文) Can opioid exacerbate acute lung injury via TLR4?

研究代表者

松山 広樹 (Matsuyama, Hiroki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：80515289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：レミフェンタニルが免疫細胞を活性化して急性肺障害を誘発する可能性を検討した。ラットを用いて実験を行い、レミフェンタニルは持続皮下注射を行った。レミフェンタニルの至適投与量は投与終了後の反跳性痛覚過敏をもとに決定した。レミフェンタニルを投与しつつLPS刺激を加えたラット肺組織の炎症性サイトカイン発現量をリアルタイムPCRで定量した。また、肺組織におけるオピオイド受容体ならびにTLR4の発現を確認した。LPSの投与によりサイトカイン発現量は増加したが、レミフェンタニル投与の影響は明確にすることができなかった。肺組織ではオピオイド受容体およびTLR4陽性な細胞が認められた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of remifentanil on the inflammatory reaction in the lung during acute lung injury. Remifentanil was continuously infused to rats. Remifentanil dose was determined based on the behavioral assessment of withdrawal hyperalgesia. Expression of inflammatory cytokines in the lung of rats treated with LPS with or without remifentanil was measured by real time PCR. Opioid receptor and TLR5 expression in the lung was investigated by immunohistochemistry. LPS induced induction of inflammatory cytokine in the lung. The effect of remifentanil on the LPS induced induction of inflammatory cytokine was not clear. We detected cells positive for opioid receptors or TLR4 in the lung tissue.

研究分野：集中治療

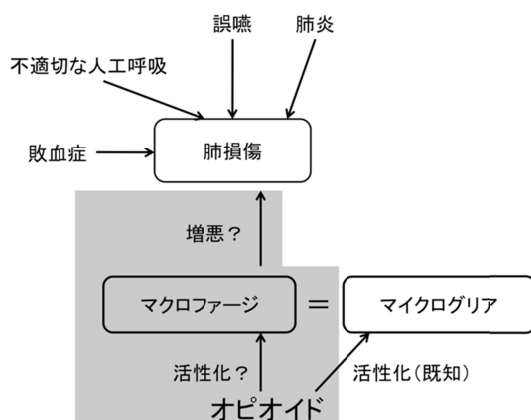
キーワード：オピオイド acute lung injury 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は敗血症や機械的人工呼吸などに続発し、全身または肺の炎症刺激によって肺組織が損傷される疾患である。Berlin definitionによる severe ARDSの死亡率は40%以上と高く、適切な治療法の確立が喫緊の課題である。急性肺損傷からARDSを発症し、酸素化が不良となれば機械的人工呼吸が必要となる。人工呼吸中の患者には苦痛軽減のためオピオイド鎮痛薬の積極的な投与が推奨されている。

オピオイドは急性耐性を誘発するが、この際中枢神経系にはグリア細胞の増殖と活性化が生じている(Hutchinson MR 2009 Brain Behav Immun)。この現象はグリア細胞上に発現するToll like receptor (TLR)-4をオピオイドが直接刺激することによるとされ、培養条件のマクロファージでも同様の現象が確認されている(Hutchinson MR 2010 Brain Behav Immun)。

さまざまな要因で肺損傷が生じると、肺組織におけるマクロファージなど炎症細胞の活性化が引き起こされ、活性化した炎症細胞がサイトカインなど生理活性物質を合成分泌することで肺損傷がさらに悪化することが知られている。我々は機械的人工呼吸によって肺組織の炎症性サイトカインが増加し、急



性肺損傷を増悪させることを明らかにしている(Matsuyama H 2008 Respiratory research)。同様に、オピオイドの投与はTLR-4を介してマクロファージを活性化させ、肺損傷を増悪させる可能性が考えられる(図)が、現時点において両者の関連を検討した研究は存在しない。

2. 研究の目的

オピオイドと急性肺損傷の関連について明らかにするため、以下の4点について検討を行う計画とした。オピオイドとしてはフェンタニル又はモルヒネを使用する予定としていたが、より強力なオピオイドであるレミフェンタニルが研究用として入手可能となったため、レミフェンタニル又はモルヒネを用いた実験に変更した。

1)ラットにレミフェンタニル、またはモルヒネを投与し、肺組織における炎症性サイトカイン量、肺組織に存在するマクロファージ数を測定、オピオイド投与により変化が生じるか明らかにする。

2)ラット急性肺損傷モデルを作成し、肺毛細血管の透過性が亢進すること、肺組織の炎症性サイトカイン量が増加することを確認する。レミフェンタニルまたはモルヒネを投与して、肺損傷の程度が悪化するか検討する。肺胞洗浄液を採取し、肺損傷に伴い増加した炎症細胞について、オピオイド投与後の変化を検討する。

3. 研究の方法

(1)オピオイド投与量の決定

ラットにレミフェンタニルまたはモルヒネを投与する。レミフェンタニルの場合、持続

投与が必要であるため、レミフェentanil水溶液を作成し、シリンジポンプに装着して持続皮下注入を行う（図）。



レミフェentanilでは投与終了後より反跳性痛覚過敏が生じることが知られており、この痛覚過敏にはグリア細胞の活性化が関与しているため、行動解析を行って痛覚過敏をきたす容量を調査する。

レミフェentanilの持続投与量を変化させ持続投与を行う。投与終了後2週間までの期間、von Frey hairによる機械的刺激を足底部に与え、逃避行動が観察される最小の刺激を閾値として決定する。

一方、モルヒネの場合は反跳性痛覚過敏の観察は困難であるため、術後痛モデルを作成したラットにモルヒネを投与することで鎮痛効果を確認する。ラット足底部に1.5cmの切開を加え、メスで足底筋を数回切開したのち縫合する。処置終了後2日間にわたり von Frey filament 刺激による行動解析を行い、機械刺激に対する逃避閾値を決定する。足底切開施行直前にモルヒネを投与し、機械刺激への逃避閾値に与える影響を調査する。

肺組織を採取しリアルタイムPCRによって肺組織におけるIL-1、IL-6、TNF- α 、MIP2、HMGB-1など炎症性サイトカインの発現量を定量する。同時にELISA法によって肺胞洗浄

液に含まれるサイトカインを定量する

(2)肺組織におけるオピオイド受容体の発現
肺組織においてオピオイド受容体の発現を検証し、どのような細胞がオピオイド受容体を有しているか確認する。ラット肺組織を摘出し、mRNAを抽出、リアルタイムPCRにより μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体ならびにTLR4の発現量を定量する。同時に免疫組織化学法により μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体ならびにTLR4陽性細胞の同定を行う。

(3)オピオイドによる炎症増強作用の検証
ラットにオピオイドを投与し、肺組織を採取、IL-1、IL-6、TNF- α 、MIP2、HMGB-1など炎症性サイトカインの発現量をリアルタイムPCRにより定量する。同時にELISA法によって肺胞洗浄液に含まれるサイトカインを定量する。

続いてラットに急性肺損傷モデルを作成する。急性肺損傷モデルとして、LPS投与モデルを用いる。作成したラットにフェentanilまたはモルヒネを投与、投与前後で肺組織の状態を比較する。

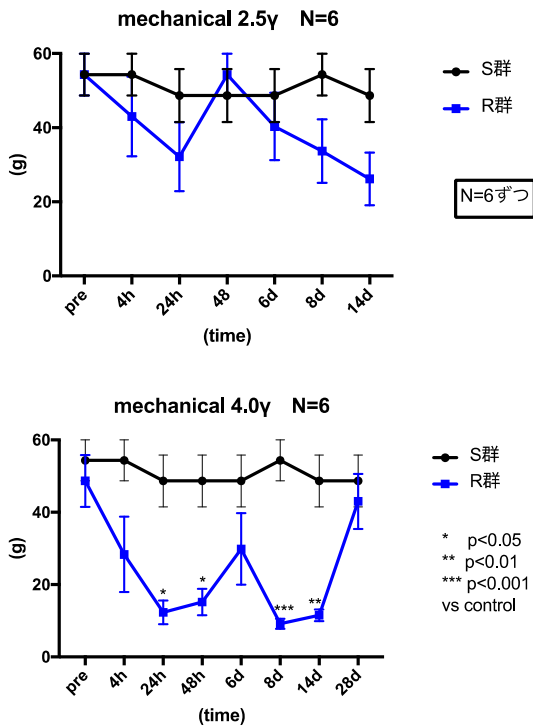
肺損傷の評価は組織学的観察、肺の乾湿重量比の測定で行う。肺血管透過性はヒトアルブミン漏出量を測定して評価する。炎症性サイトカインは肺組織をサンプルとしたリアルタイムPCRとELISAによる胞洗浄液中のサイトカイン発現量によって行う。肺組織における炎症細胞数の変化は組織学的な観察と肺胞洗浄液に含まれる細胞数の測定により行う。

4. 研究成果

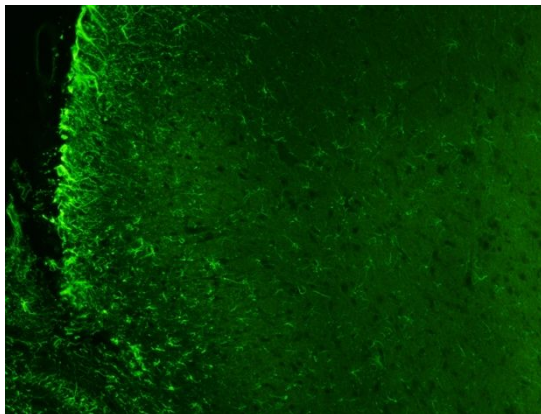
(1)オピオイド投与量の決定

レミフェentanilは2.5 μ g/Kg/minと4

μg/Kg/min と投与量を変化させ、60 分間の皮下持続投与を行った。投与後の行動解析の結果、投与 48 時間後および 1-2 週間後の間にそれぞれ機械的刺激への閾値が二相性に低下し、痛覚過敏が観察された。痛覚過敏の程度は容量に依存して増大した (図)



4 μg/Kg/min のレミフェンタニルを投与したラットの神経組織を採取し、マイクログリアに特異的な抗体である OX42 で免疫染色を行った結果、脊髄後角において OX42 陽性な細胞の有意な増加を認めた。



モルヒネについては術後痛モデルを施したラットに投与したが、容量を変化させても足

底切開による痛覚過敏を完全に抑制することは不可能であったため、これ以上の解析を見送ることにした。

(2)肺組織におけるオピオイド受容体の発現
ラットに LPS 投与による急性肺障害を作成し、肺組織において IL-1、IL-6、TNF- の発現をリアルタイム PCR によって確認したところ、LPS 投与群で炎症性サイトカインの有意な上昇し、肺組織における炎症反応が確認された。この状態において μ、
、オピオイド受容体ならびに TLR4 の発現量を定量したが、LPS 投与群での発現量は対照群と比較して有意な変化を認めなかった。免疫組織化学法を用いて、肺組織に μ、
、オピオイド受容体ならびに TLR4 陽性な細胞が存在することを確認した。

(3)オピオイドによる炎症増強作用の検証

レミフェンタニルを前投与したラットに LPS を投与し、肺組織を採取して IL-1、IL-6、TNF- の発現をリアルタイム PCR によって確認したところ、炎症性サイトカインの値はレミフェンタニル投与により有意な変化を示すことはできなかった。

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 5 件)

(1) Yamakita S, Horii Y, Takemura H, Matsuoka Y, Yamashita A, Yamaguchi Y, Matsuda M, Sawa T, Amaya F. Synergistic activation of ERK1/2 between A-fiber neurons and glial cells in the DRG contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. Mol Pain. 2018 in

press. (査読有)

(2) Ohsima N, Amaya F, Yamakita S, Nakayama Y, Kato H, Muranishi Y, Numajiri T, Sawa T. Difficult tracheal intubation and post-extubation airway stenosis in an 11-month-old patient with unrecognized subglottic stenosis: a case report. JA Clinical Reports. 3: 10, 2017.

(3) Yamashita A, Yamasaki M, Matsuyama H, Amaya F. Risk factors and prognosis of pain events during mechanical ventilation: a retrospective study. J Intensive Care. 5:17, 2017.

(4) Izumi Y, Sasaki M, Hashimoto S, Sawa T and Amaya F. mTOR signaling controls VGLUT2 expression to maintain pain hypersensitivity after tissue injury. Neuroscience. 308: 169-79, 2015. (査読有)

(5) 前田知香, 松岡豊, 下里豪俊, 平田学, 天谷文昌. 急性腹症の緊急手術における予後不良因子の検討. 麻酔. 64: 591-596, 2015.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松山 広樹 (Hiroki Matsuyama)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師

研究者番号 : 80515289

(2)研究分担者

天谷 文昌 (Fumimasa Amaya)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 60347466