

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592283

研究課題名(和文)人工呼吸器誘発肺傷害(VILI)の硫化水素による治療

研究課題名(英文)Effects of hydrogen sulfide on ventilator induced lung injury

研究代表者

張 尔泉(Zhang, Erquan)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30456727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：高一回換気量の人工呼吸管理は人工呼吸器誘発肺傷害(Ventilator Induced Lung Injury, VILI)を引き起こす。本研究では、ラットでVILIを起こす換気条件で、NaHSによるVILI抑制作用について検討した。高一回換気量の人工呼吸換気条件では低一回換気量に比し、Evans Blueを指標とした肺血管透過性及び肺水分量は増加した。NaHSの一回と二回腹内投与実験では、肺水分量、Evans Blue、動脈血肺酸素化などに明らかな変化は見られなかった。一方、肺組織のIL-6、IL-1、MCP1 mRNAの発現はNaHS投与によって低下傾向がみられた。

研究成果の概要(英文)：Ventilator induced lung injury (VILI) was caused by mechanical ventilation with high tidal volume. In this study, the mechanical ventilation conditions that caused VILI was demonstrated in rats. Inhibitory effect of VILI was investigated by administration of NaHS. The lung water content and protein permeability (Evans Blue) were increased in mechanical ventilation by high tidal volume (35ml/kg) compared with low tidal volume (6ml/kg). In both one time and two time administration of NaHS, the lung water content, Evans Blue and arterial oxygen pressure (PaO₂) had no change in mechanical ventilation by high tidal volume. The mechanical ventilation with high tidal volume increased IL-6, IL-1, and MCP-1 mRNA expression, which had trend to decrease by administration of NaHS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：人工呼吸器誘発肺傷害 硫化水素

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸の条件(高一回換気量、高气道内圧)が適切でないと、人工呼吸そのものにより人工呼吸器誘発肺傷害 (Ventilator Induced Lung Injury, VILI) が発生する。臨床的には、急性肺傷害患者で低一回換気量 (6ml/Kg) が導入されているが、これはすでに損傷を持つ肺に対する換気である。一方、正常肺に対する換気法でも、最近では、片肺換気中の一回換気量を以前の 10ml/Kg から 5-6ml/Kg にするという報告が増えている。つまり、病的肺でも健常肺でも高一回換気量は避けた方がよい。この人工呼吸による肺損傷の発生機序は、当初、肺の過伸展という機械的な刺激により、物理的に断裂するという比較的単純な機序が想定されてきたが、最近では、機械外力による細胞代謝変化・遺伝子発現変化 (mechano-transduction) に注目した研究が行われるようになってきた。VILI は病理学的には肺水腫であり、生理学指標として、動脈血酸素化能の低下、肺動脈圧上昇、肺コンプライアンス低下および気道内圧上昇などが発生する。VILI の肺組織での顆粒球浸潤および TNF- α と c-fos の mRNA 上昇、肺胞洗浄液 (BAL) 中の TNF- α 、MIP-2、INF- γ 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10 上昇が報告されている。また、BAL 中の NO₃⁻ (NO の代謝産物) の上昇や肺組織での内皮型一酸化炭素合成酵素 (eNOS) や誘導型一酸化炭素合成酵素 (iNOS) の上昇も報告されている。これらの変化が VILI の原因なのか、結果なのかは未だ確定していない。応募者らは、これまで低酸素暴露や炎症により惹起された肺高血圧では、内因性および外因性 NO や cyclicGMP が肺血管拡張作用や肺血管平滑筋の増殖抑制作用を持つことを報告し (Circulation 96:689-97, 1997; Chest 125:2247-52, 2004; J Thorac Cardiovasc Surg 136:142-9, 2008)、最近、末梢肺動脈での eNOS 発現が上昇していることを報告した (Circ J 74:1698-703, 2010)。NO のように血管拡張作用を持つ物質は VILI における肺高血

圧の治療にも有効かもしれないが、NO 吸入そのものに、ALI 患者の予後改善効果はみとめられていないため、VILI の予防・治療薬としては、別の新規物質での検討が必要である。

硫化水素ナトリウム (NaHS) は、体内に投与すると分解され H₂S を放出する H₂S ドナーである。硫化水素 (Hydrogen sulfide) は人間の体内でも産生される生理活性物質であり、生体内で Cystathionine β -synthase (CBS) と Cystathionine γ -lyase (CSE) という酵素によりシステイン (Cysteine) から産生され、これらの云わば硫化水素産生酵素は、血管内皮細胞や脳細胞に存在することが既に明らかになっている。実際、H₂S は、①血管平滑筋拡張作用、②酸化ストレスに対するグルタチオン産生を介した抑制作用、③虚血再灌流障害の抑制作用、④ iNOS の抑制作用、⑤炎症性サイトカイン産生抑制作用などが報告されている。最近、他の研究者により、マウスを用いた実験で、H₂S が心停止後の蘇生率が改善し、同時に NO 合成酵素のリン酸化が上昇していることが報告された (Circulation 120:888-96, 2009)。そこで、本課題では、NaHS による VILI 発生抑制作用効果を生理学的、組織学的、分子生物学的に明らかにする。

2. 研究の目的

高一回換気量による人工呼吸は、人工呼吸器誘発肺損傷 (Ventilator Induced Lung Injury, VILI) を引き起こす。病態として、炎症性サイトカイン、活性酸素、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の増加が報告されている。最近、硫化水素 (H₂S) は血管内皮などで産生される生理活性物質として注目され、虚血再灌流障害抑制効果、炎症性サイトカイン産生抑制作用、iNOS 抑制効果が明らかとなりつつある。本研究課題では、ラットで VILI を起こす換気条件や VILI を起こしやすい肺環境 (例: 吸入酸素濃度) を明らかにし、H₂S による VILI 発生抑制作用を明らかにする。

3. 研究の方法

250g—350g の SD ラット 80 匹、ネンブタール 45mg/Kg 腹内注射麻酔下で、右頸動脈に動脈カテーテルを挿入し、右頸静脈に肺動脈カテーテル（内径 0.31mm、外径 0.64mm）を挿入する。ラットを気管切開し、チューブ（外径 2.5mm、内径 1.5mm）を挿入し、呼吸器に接続し、6ml/kg 低換気量で 30 分間人工呼吸管理してから、以下の実験群に分けた。

(1)、プロトコール 1 : ①低一回換気量群 (6ml/Kg) + 生理食塩水を腹内注射 (LV/H₂S (-)) (n=3)、空気で呼吸管理、②高一回換気量群 (35ml/Kg) + 生理食塩水を腹内注射 (HV/H₂S (-)) (n=5)、100% 酸素で呼吸管理、③高一回換気量群 (35ml/Kg) + NaHS を腹内投与 (HV/H₂S (+)) (n=12)、100% 酸素で呼吸管理、NaHS 3mg/Kg 1 回呼吸管理開始前 15 分前に腹内注射、Evans Blue 30mg/kg 呼吸開始前 15 分で頸動脈に注射、30 分毎に血液ガスを測定、肺動脈血圧 (mean pulmonary arterial pressure: mPAP)、大動脈血圧 (mean artery pressure: mAP)、最高気道内圧 (peak inspiratory pressure: PIP) を記録、呼吸管理 2 時間後、肺水分量、肺組織 Evans blue 量を測定した。

(2)、プロトコール 2 : ①低一回換気量群 (6ml/Kg) + 生理食塩水を腹内注射 (LV/H₂S (-))、②高一回換気量群 (35ml/Kg) + 生理食塩水を腹内注射 (HV/H₂S (-))、③高一回換気量群 + NaHS を腹内注射 (HV/H₂S (+))、NaHS を 3mg/kg で人工呼吸開始前 15 分と一時間後二回腹内注射、Evans Blue 30mg/kg 呼吸開始前 15 分で頸動脈に注射血管内投与、100% 酸素で呼吸管理、30 分毎に血液ガスを測定、肺動脈血圧、大動脈血圧、最高気道内圧を記録、呼吸管理 2 時間後、肺水分量、肺組織 Evans blue 量を測定した。

(3) プロトコール 3 : ①低一回換気量群 (6ml/Kg) + 生理食塩水を腹内注射 (LV/H₂S (-))、②高一回換気量群

(35ml/Kg) + 生理食塩水を腹内注射 (HV/H₂S (-))、③高一回換気量群 + NaHS を腹内注射 (HV/H₂S (+))、NaHS を 3mg/kg で人工呼吸開始 15 分前腹内注射、④高一回換気量群 + NaHS を腹内持続投与 (HV/H₂S 0.3mgC)、NaHS を 0.3mg/kg で人工呼吸開始 15 分前から腹内持続投与、⑤高一回換気量群 + NaHS を腹内持続投与 (HV/H₂S 3mgC)、NaHS を 3mg/kg で人工呼吸開始 15 分前から腹内持続投与、⑥高一回換気量群 + NaHS を腹内持続投与 (HV/H₂S 6mgC)、NaHS を 6mg/kg で人工呼吸開始 15 分前から腹内持続投与、100% 酸素で呼吸管理、人工呼吸管理 2 時間後、肺組織をとり、-80°C 冷凍庫に保存した。

(4) 肺水分量 : 肺組織を 90°C の Oven で 24 時間乾燥して、肺組織の重さを測定した。計算式肺水分量 (%) = (wet lung - dried lung) / wet lung X 100%。

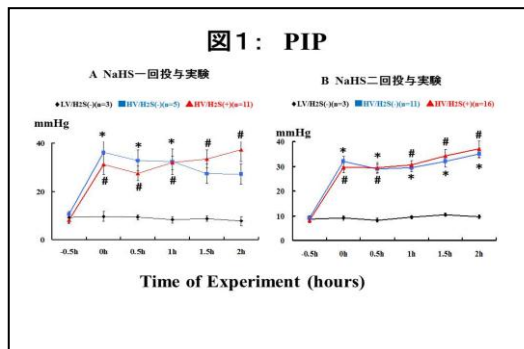
(5) Evans Blue : 90°C で乾燥した肺組織を 2ml の Formamide に浸し、Evans Blue を溶出して、Evans Blue を測定した。(The American Journal of Surgery (2008)195: 861-873)

(6) real time PCR: 50-100mg 肺組織を 1ml Trizol reagent でホモジナイズし、クロロホルムに 5 分間反応させ、4°C 15000rpm で 20 分遠心し、上清液をとってイソプロピルに 10 分反応させ、4°C 15000rpm x 10 分遠心、上清液を捨て、残った塊をエタノールで洗浄、乾燥し、RNase free 水 100 μl で溶解して、RNA の濃度を Gene Quant Pro で測定した。1μg の RNA を ReverTra Ace Kit で cDNA に逆転写し、SYBR qPCR Mix Kit を利用してリアルタイム PCR で IL-6, IL-1β, MCP1 mRNA 変化を測定した

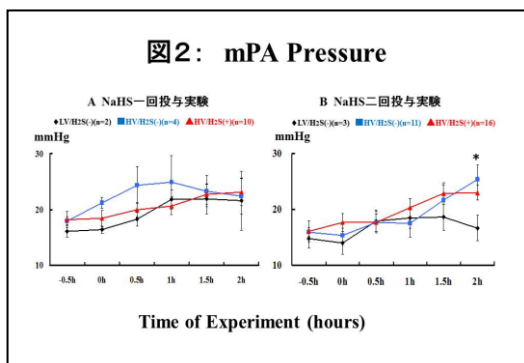
4. 研究成果

(1) 最高気道内圧 (PIP) : NaHS 一回投与と二回投与実験で、人工呼吸管理開始後、PIP は HV/H₂S (-) 群、HV/H₂S (+) 群ともに LV/H₂S (-) 群に比べ、有意に上昇した。NaHS 一回投与群では、HV/H₂S (+) 群が

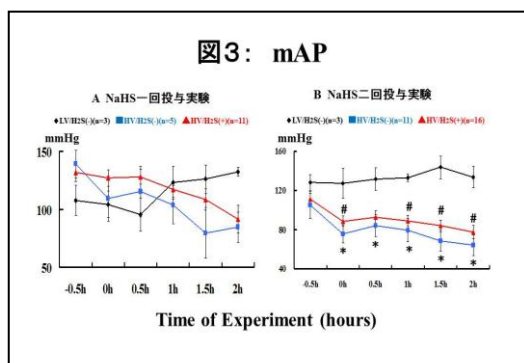
HV/H₂S (-) に比べ、呼吸開始から 0.5h まで低値傾向で、1 時間後 HV/H₂S(+) 群は高値傾向があった。(図 1) * $p < 0.05$, HV/H₂S(-) Vs. LV/H₂S (-) 群、# $p < 0.05$, HV/H₂S(+) 群 Vs. LV/H₂S(-) 群、* $p < 0.05$, HV/H₂S (-) 群 Vs. HV/H₂S (+)。



(2) 平均肺動脈圧 (mPA) : ①NaHS 一回投与実験では、人工呼吸管理開始から二時間まで、三群間有意差は見られなかったが、HV/H₂S(-) 群の方が HV/H₂S(+) 群に比べ、0.5h、1h、において高い傾向が見られた。②NaHS 二回投与実験では、HV/H₂S(-) 群の方が 2h において LV/H₂S(-) 群に比べて有意に高値を示した。(図 2)



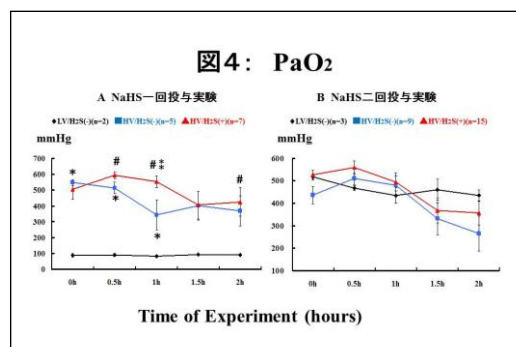
(3) 平均血圧 (mAP) : ①NaHS 一回投



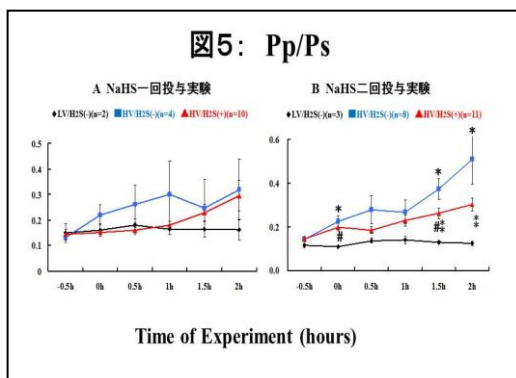
与実験では、mBP は HV/H₂S(+) 群で HV/H₂S(-) 群に比べ有意ではないが、高い

傾向があった。②NaHS 二回投与実験では、LV/H₂S(-) 群に比べ、HV/H₂S(+) 群、HV/H₂S(-) 群共に人工呼吸管理から二時間まで有意に低値を示した。HV/H₂S(+) 群の方が HV/H₂S(-) 群より高い傾向を示した。(図 3)

(4) PaO₂: ①NaHS 一回投与実験では、人工呼吸管理後 1h において、HV/H₂S(+) 群で HV/H₂S(-) 群に比べ有意に高値となった。0.5h において、HV/H₂S(+) 群の方が高い傾向がみられた。②NaHS 二回投与実験では、人工呼吸管理から二時間まで三群間有意差はないが、HV/H₂S(+) 群の方が HV/H₂S(-) 群に比べ、0.5h、1.5h、2h において高い傾向が見られた。(図 4)

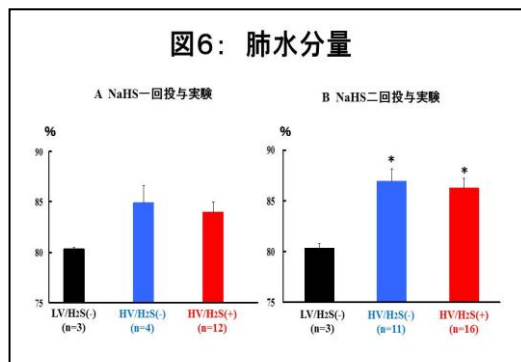


(5) 平均肺動脈血圧/平均動脈血圧 (Pp/Ps) : ①NaHS 一回投与実験では、HV/H₂S(-) 群で人工呼吸開始から二時間まで有意ではないが、高値であった。HV/H₂S(+) 群の方が 1.5h、2h において低い傾向を示した。②NaHS 二回投与実験では、HV/H₂S(-) 群が LV/H₂S(-) 群に比べ、人工呼吸管理 0h、1.5h、2h において有意に高値を示した。HV/H₂S(+) 群が HV/H₂S(-) 群に比べ、1.5h、2h において有意に低値を示した。(図 5)

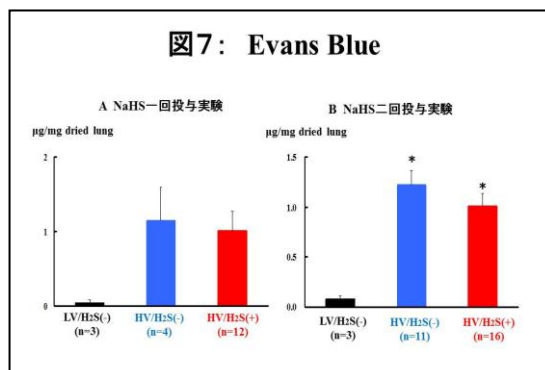


(6) 肺水分量 : ①NaHS 一回投与実験で

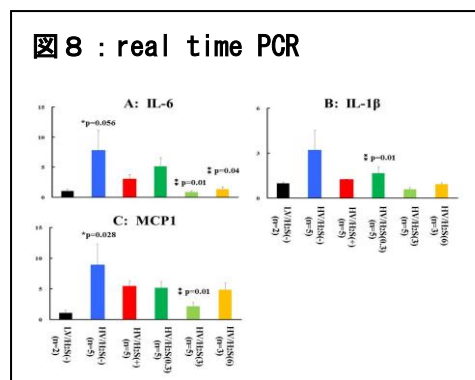
は、HV/H₂S(-)群と HV/H₂S(+)群と共に LV/H₂S(-)群に比べ、高値を示した。② NaHS 二回投与実験では、HV/H₂S(-)群と HV/H₂S(+)群と共に LV/H₂S(-)群に比べ、有意に上昇した。HV/H₂S(-)群と HV/H₂S(+)群の間に有意差は認められなかった。(図6)



(7) Evans Blue : ①NaHS 一回投与実験では、HV/H₂S(-)群と HV/H₂S(+)群と共に LV/H₂S(-)群に比べ、高値を示した。② NaHS 二回投与実験では、HV/H₂S(-)群と HV/H₂S(+)群と共に LV/H₂S(-)群に比べ、有意に上昇した。HV/H₂S(-)群と HV/H₂S(+)群の間に有意差は認められなかった。(図7)



(8) 炎症性サイトカイン IL-6、IL-1 β 、MCP1 mRNA の発現 (図8) : 肺組織の IL-6、IL-1 β 、MCP1 mRNA 発現では、HV/H₂S(-)群の方が LV/H₂S(-)群に比べ上昇傾向を認め、NaHS 一回投与群と持続投与群共に HV/H₂S(-)群にくらべ、低下傾向を認めた。*p は各グループと LV/H₂S(-)群との比較、‡ p は各グループと HV/H₂S(-)群との比較。(図8)



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 2 件)

- (1) Yamada Y, Maruyama J, Zhang E, Okada A, Yokochi A, Sawada H, Mitani Y, Hayashi T, Suzuki K, Maruyama K. Effect of thrombomodulin on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. J Anesth. 28:26-33 (2014) 査読あり
- (2) Junko Maruyama, Ayumu Yokochi, Erquan Zhang, Hirofumi Sawada, Kazuo Maruyama. Nitric oxide in the pathophysiology and treatment of pulmonary hypertension. Pulmonary Hypertension. ISBN 980-953-307-704-3 InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/55680> (2013) 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 張尔泉、山田康晴、丸山淳子、横地歩、大元文香、丸山一男. モノクロタリン (MCT) 誘発性肺高血圧発症に対するトロンボモジュリン (TM) の抑制効果の検討. 麻酔 (2014) Vol.63 P.63. (抄録) 第 61 回日本麻酔科学会 (横浜) (2013.7.21)
- (2) 張尔泉、南波里奈、陳通、横地歩、丸山淳子、丸山一男. 慢性低酸素暴露肺高血圧に対する H₂S による血管病

変の抑制効果. 麻酔 (2013) Vol.62
P.75. (抄録) 第 60 回日本麻酔科学会
(札幌) (2013.5.23)

- (3) 山田康晴、丸山淳子、張尔泉、上野
浩明、小林睦、岩下義明、横地歩、澤
田博文、大元文香、原田慎一、陳通、
南波里奈、今井寛、丸山一男. 従圧式
人工呼吸における VILI ラットモデル
の作成. 抄録集(2013) P.181.第 35 回
日本呼吸療法医学会学術総会 (東京)
(2014.5.17)

[図書] (計 1 件)

- (1) 丸山一男、張尔泉、横地歩. 呼吸の
生理. クリテイカルケアにおける呼吸
管理. 編集 : 氏家良人. 克誠堂出
版.P.3-12 (2013)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

張尔泉 (Erquan Zhang)
三重大学大学院 医学系研究科 助教

研究者番号 : 30456727

(2) 研究分担者

丸山 一男 (Maruyama Kazuo)
三重大学大学院 医学系研究科 教授

研究者番号 : 20181828

研究分担者 :

丸山 淳子 (Maruyama Junko)
鈴鹿医療科学大学 医用工学部 教授

研究者番号 : 50263017

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :