

が聴取されない場合は通常はこの時点で気管内挿管をする必要がある。

児の状態が悪化し続けていたり、改善が得られない場合、そして30秒間の十分な陽圧換気にもかかわらず心拍数が60回/分未満である場合は、胸骨圧迫心臓マッサージを開始する。

### おわりに

マスク&バッグは蘇生の中でも最も基本的で、

\* \* \*

最も重要な手技のひとつである。蘇生用器具にはさまざまな種類が存在し、施設によって使用する器材が異なるため、蘇生前の器材の有無と機能の確認は入念に行うことが重要である。また蘇生者同士のコミュニケーションも大切である。

### 文献

- 1) American Heart Association, American Academy of Pediatrics: Neonatal Resuscitation Textbook, 5th ed, pp1-58, 2006

検査の選択や検査結果の使い方について、実践の場でのポイントを簡潔に確実に示したテキスト

## そこが知りたい 小児臨床検査のポイント

小児内科 2005 Vol. 37 増刊号  
「小児内科」「小児外科」編集委員会共編

Vol.30 (1998年) 増刊号「小児の検査結果の考え方」を全面改訂

- ① 総論：臨床検査の意義、基準値の意味、インフォームドコンセント他、必須知識他を精選、ベテラン医師にも最近の考え方を知るのに役に立つ。
- ② 鑑別が重要な症候について、「検査の進め方」を追加。
- ③ 検査項目は、外注を含めて一般病院で可能なものに限定、実施可能な施設が限られる検査では依頼可能な施設名を記載。
- ④ 個々の検査項目では、関連項目をまとめ相互の関連をわかりやすくした。
- ⑤ 腫瘍マーカーの項目を新設。
- ⑥ 染色体・遺伝子検査の項を新設、染色体検査の最新の知識、遺伝子検査一覧表、検査可能な施設を記載。
- ⑦ 各検査項目に「検査の原理」、「検査のアーチファクト」の項を入れ、自分で考えて判断応用できるようにした。
- ⑧ 付録に迅速診断の項目まとめた。

\*その他各論細部で新知見を盛り込むなど、利便のための見直しを図った。



B5判 738頁  
定価 10,500円  
(本体10,000円+税)

東京医学社

TEL 03-3265-3551 FAX 03-3265-2750  
URL <http://www.tokyo-igakusha.co.jp>  
E-mail: [hanbai@tokyo-igakusha.co.jp](mailto:hanbai@tokyo-igakusha.co.jp)

# 長野県母子衛生学会誌

NAGANO JOURNAL OF  
MATERNAL AND CHILD HEALTH

第9号

2007. 3

長野県母子衛生学会

Nagano Society of Maternal and Child Health

## 目 次

会長あいさつ

会長 小林 隆 夫

### 第9回長野県母子衛生学会学術講演会

#### 特別講演

院内助産の導入と実際について..... 1

医師の立場から 深谷赤十字病院 副院長 山下 恵 一

助産師の立場から 深谷赤十字病院 助産師長 柿 沼 直 美

#### 一般講演

1. 出産体験がその後の育児に与える影響についての考察 ..... 19

信州大学医学部附属病院 吉沢奈緒子 他

2. 初めて立ち会い出産を体験した夫の妊娠期の思い・行動の変化と、夫の立ち会い体験との関係について 20  
— 出産後のインタビューを通して —

伊那中央病院 近藤美未子 他

3. 実母の育児に対する関わりの実態と思い..... 21

医療法人抱生会 丸の内病院 千葉 敦子 他

4. 分娩時における在日外国人産婦の援助について..... 22

諏訪赤十字病院 田中 里美 他

5. 分娩中の学生が行う声かけとその根拠 ..... 23

— 分娩介助数・分娩進行による変化から —

伊那中央病院 澤木奈津子 他

6. 完全母乳同室、自律頻回授乳導入に伴う新生児の栄養と体重管理..... 24

— 体重増減グラフを作成し、授乳援助で活用 —

飯田市立病院 田畑 暁子 他

7. 超・極低出生体重児の母親へ児の経過・育児について説明することの効果..... 25

長野県立こども病院 百瀬 咲子

8. 当院におけるカンガルーケアの実際 ..... 26

信州大学医学部附属病院 寺坂 由紀 他

9. 正常産児生後早期の母子接触（通称：カンガルーケア）中に心肺蘇生を必要とした症例..... 27

長野県立こども病院 中村 友彦

10. 長野県における仮死児発生状況、対処法に関するアンケート結果 — 全国研修施設と県内施設の比較 —	28
長野県立こども病院 中村 友彦 他	
11. 飯田下伊那地域における産科地域連携システムの運用状況 — 助産師の立場から —	29
飯田市立病院 近藤世音子 他	
<b>寄 稿</b>	
新生児心肺蘇生講習会 信州モデル	30
長野県立こども病院総合周産期母子医療センター長 新生児科部長 中村 友彦	
<b>第9回長野県母子衛生学会 総会報告</b>	
1. 総会報告	37
2. 平成17年度 庶務報告	37
3. 平成17年度 事業報告	37
4. 平成17年度 決算報告	38
5. 平成18年度 事業計画	38
6. 平成18年度 予算	39
7. 平成18年度 総会までの報告	39
長野県母子衛生学会会則	40
長野県母子衛生学会役員名簿	42
長野県母子衛生学会会員名簿	43
編集後記	46

## 【 寄 稿 】

### 新生児心肺蘇生講習会 信州モデル

長野県立こども病院 総合周産期母子医療センター長 新生児科部長

中 村 友 彦

はじめに

出生直後の児のおおよそ5~10%は出生時になんらかの積極的な蘇生を必要とし、病院で出生した約1~10%の出生直後の児が補助呼吸を必要とすると報告されている。全世界では毎年500万人以上の新生児死亡がある。これらの死亡の19%は出生時仮死によるものと推定されており、簡単な蘇生技術を導入することで年間約100万以上の出生直後の児の予後を改善できる可能性を示唆している。出生直後の児が蘇生を要するかどうかは予見できることが多いが、突然発生し出生直後の児に対する集中治療設備のない施設で起こることもある。したがって、蘇生の知識と技術を新生児の養護に携わるすべての人に教育することが必須である。しかし、日本には新生児蘇生法の体系的な教育システムがなかった。厚生労働科学研究補助金「アウトカムを指標とし、ベンチマーク手法を用いた質の高いケアを提供する周産期母子医療センターネットワークの構築に関する研究（主任研究者：藤村正哲）分担研究「小児科医・産科医・助産師・看護師向けの新生児心肺蘇生法の研修プログラムの作成と研修プログラムの作成と研修システムの構築とその効果に関する研究」（分担研究者 田村正徳）では、日本独自の新生児蘇生講習会の構築のための研究を平成16年度より開始し、その研究の一貫として、長野県で出生した新生児は必要であれば、「いつでも、どこでも、だれでも、同じ」新生児蘇生が受けられるように新生児心肺蘇生講習会・信州モデルを開始した。

新生児蘇生に関する長野県分娩施設でのアンケート結果

長野県での本格的な新生児蘇生講習会を開催する

に当たって、長野県分娩施設53施設に2004年もしくは2005年の新生児蘇生に関する項目に関して、郵送によるアンケート調査を行い36施設（回収率 68%）から回答を得た。日本周産期新生児医学会 周産期（新生児）専門医研修施設（2005年6月時点の暫定基幹施設、暫定指定施設）の産科部門（以下、全国研修施設）に行った（前記厚生労働省研究班）全国研修施設261施設 回答 164 施設（回収率 62.8%）と比較した。結果を、図1から図5に示す。県内産科における新生児心肺蘇生法の現状としては、基本となる保温や気道開通に関する意識は高く、設備も整っていた。実技を伴った新生児心肺蘇生法講習会を受けたことのある施設は80%となり、講習会への参加はほぼ全ての施設が希望していた。また、わが国独自の新生児心肺蘇生法のガイドラインは80%以上の施設が必要と考えており、さらに、ほとんどの施設がその配布を希望していた。低アプガースコア児の頻度は1~2%であり、有意に県内施設で頻度が低かったが、専門施設に、よりハイリスク症例が集まっていることが原因の一つと考えられる。

長野県における新生児心肺蘇生講習会

2005年アメリカ小児科アカデミー（AAP）とアメリカ心臓協会（AHA）は新しい新生児心肺蘇生法のガイドラインを公表し、アメリカの新生児心肺蘇生法講習会（Neonatal resuscitation program :NRP）の教材も2006年に改訂された。長野県立こども病院の医師4名、看護師6名、助産師2名は平成16年に、アメリカ合衆国、ハワイ州のKapiolani小児病院で行われた、AAP認定 NRP プロバイダーコースならびにインストラクターコースを受講して、AAP 認定 NRP インストラクターの資格を獲得したのを機会に、平成17年11

月より地域周産期センターで、半日コースの新生児蘇生講習会を開始した(図6.7)。今までの講習会参加者は245名で、助産師37%、看護師32%、小児科医15%、産科医14%である。この新生児心肺蘇生講習会・信州モデルの特徴は、インストラクターが、地域周産期母子医療センターに出向いて現場で、地域周産期医療従事者に講習をする点にあり(図8)、ほぼ県内を一巡した来年度以降は、地域周産期母子医療センターのスタ

ッフにインストラクターとなって頂き、講習会に必要な人形等は今後、各地域総合周産期母子医療センターへ順次整備して、各病院または各地域で頻りに講習会を開催して頂くようにしていきたい。この新生児蘇生講習会・信州モデルは、来年度から実施予定の日本周産期・新生児医学会のNeonatal life support(NLS)講習会のモデルとなった。

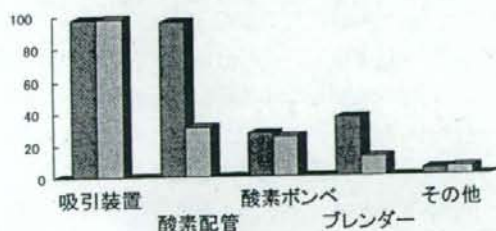
図1 心肺蘇生時、保温していますか？



保温設備は？(複数回答可)



医療設備は？(複数回答可)



吸引装置は？(複数回答可)



図2 換気バッグの種類は？(複数回答可)



新生児用の酸素マスク準備は？

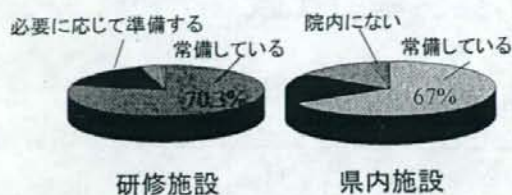


新生児用の喉頭鏡の準備は？



図3

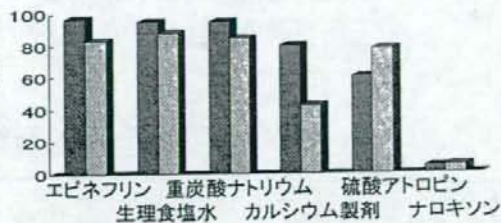
新生児蘇生用の薬剤の準備は？



新生児蘇生担当者を決めているか？



準備している薬剤の種類は？  
(複数回答可)



蘇生担当者の職種は？(複数回答可)

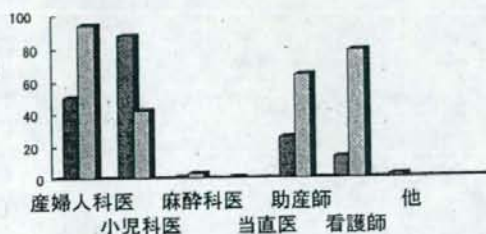


図4

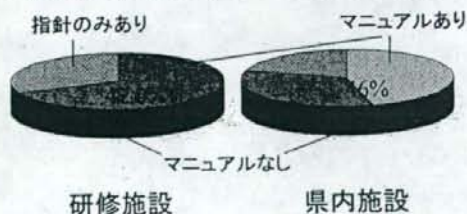
新生児心肺蘇生法講習会の受講は？



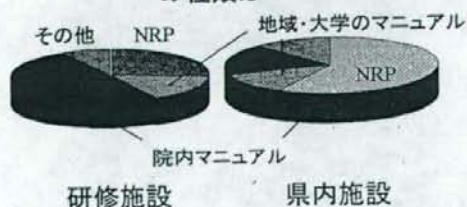
新生児心肺蘇生法実技講習会の参加希望は？



新生児心肺蘇生のマニュアルの有無は？



新生児心肺蘇生のマニュアルの種類は？



新生児蘇生法の実際

新生児の蘇生は次の4種の操作に分けられる。

- ・即座に状態を評価し、安定化の最初の段階を行う基礎的な段階
- ・バッグマスク法もしくはバッグチューブ法を含む換気

- ・胸骨圧迫心臓マッサージ
- ・薬物投与や輸液

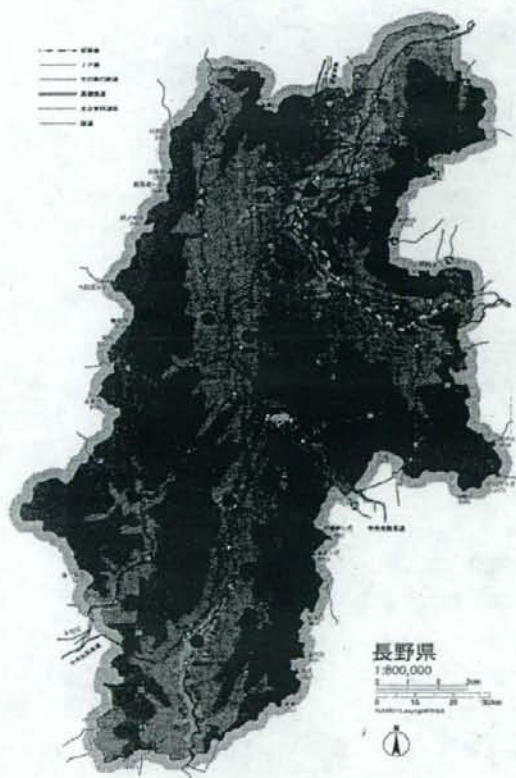
評価法

出生直後の児は、羊水混濁がないか？、呼吸はしているか、泣いているか？、筋緊張は良好か？、在胎週数は満期か？をチェックして、心肺蘇生法が必

図 5

正期産・過期産児の低アプガースコア児、  
胎便吸引症候群児の発生率の比較

項 目	研修施設	一般施設
全出生児	83,634	11,611
対象児(37週以上、奇形なし)数	66,527 (79.55%)	11,055 (95.2%)
低アプガースコア児数 (1分のアプガースコアが6点以下)	1,478 (2.22%)	124 (1.12%)
胎便吸引症候群数	334 (0.50%)	31 (0.2%)



北信:長野赤十字病院

(2006/5/20 60名)

東信:国立病院機構長野病院

(2006/7/1 35名)

佐久総合病院

(2006/3/18 30名)

中信:信州大学病院

(2006/1/14 24名)

こども病院

(2005/12/17 25名)

南信:飯田市立病院

(2005/11/19 35名)

伊那中央病院

(2007/1/27 36名)

図 6



## 図7 新生児蘇生プログラム講習会 内容

あいさつ(日程説明・スタッフ紹介)	
プレテスト	(15分)
講義	(60分)
DVD視聴と解説	(15分)
休憩、実技講習準備	
基本的手技の実習	(60分)
ケースシナリオ実習	(70分)
ポストテスト	(15分)
アンケート・習熟度自己評価	
総括・講評・修了証書授与	

## 図8 新生児蘇生プログラム普及 信州モデル

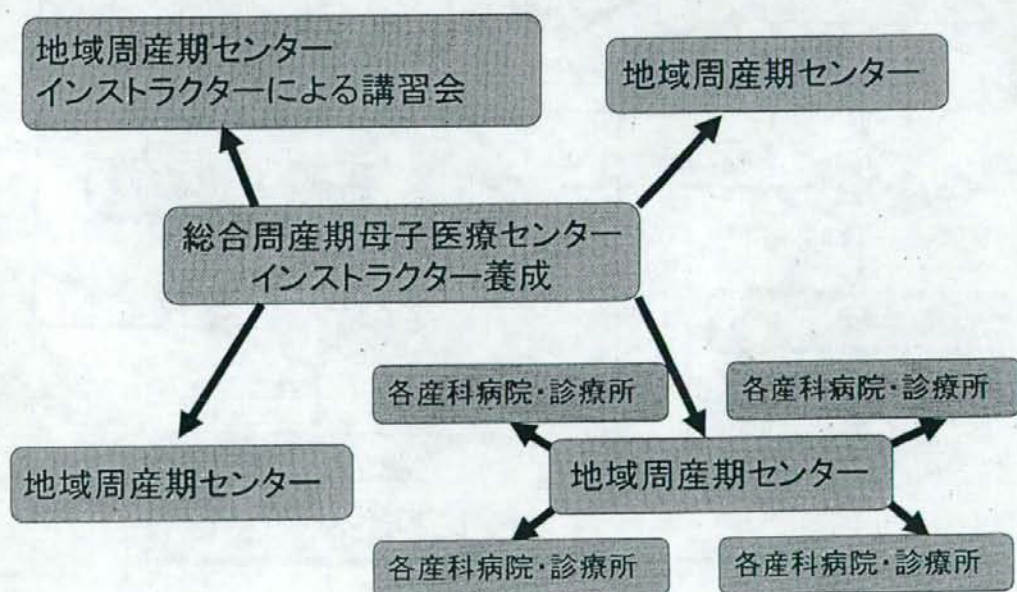
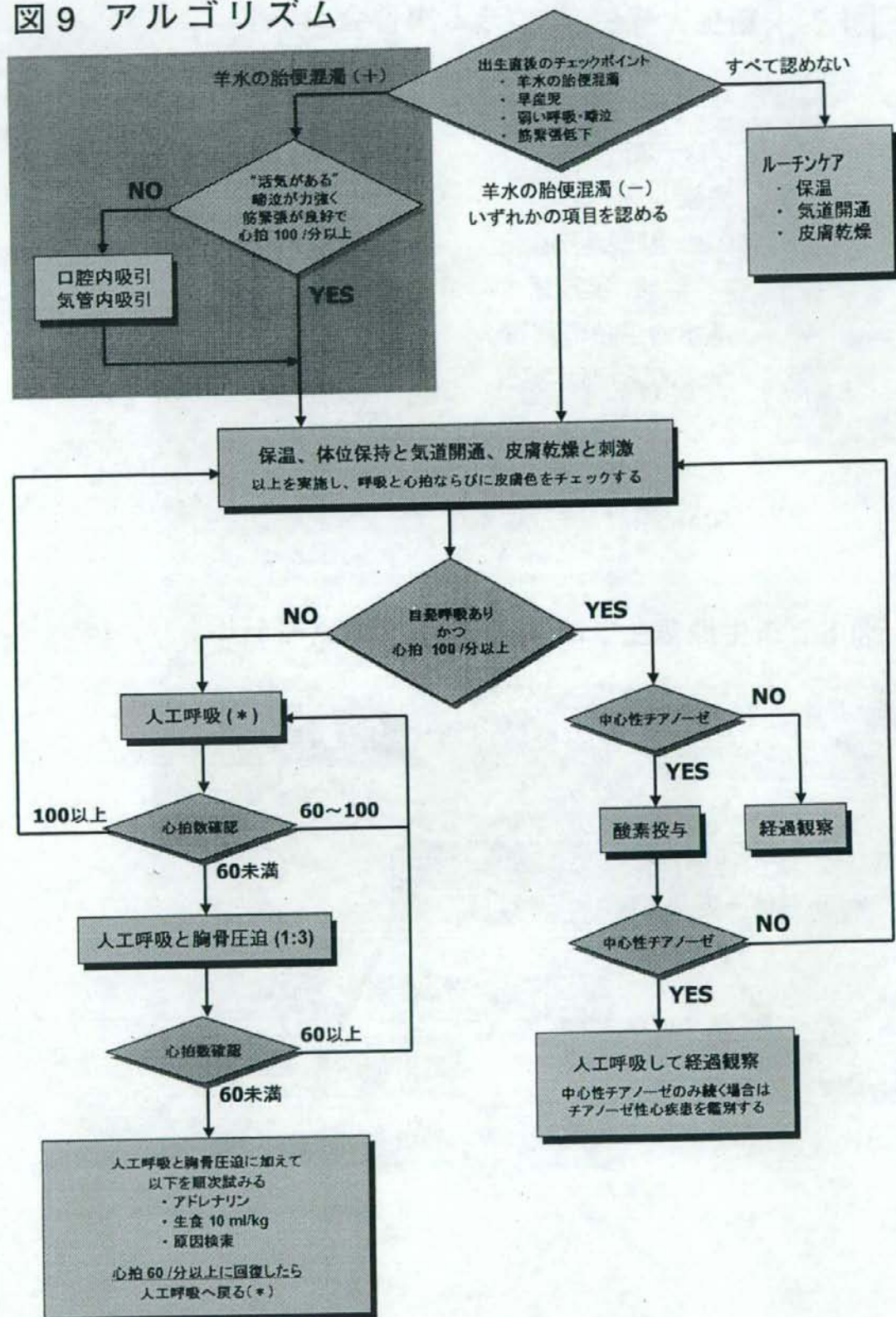


図9 アルゴリズム



要かを判断し、チェック項目のいずれかを認めたら、先に示すアルゴリズム(図9)に従って心肺蘇生を開始する。保温、体位保持と気道開通、皮膚乾燥と刺激を行って、さらに皮膚色、呼吸、心拍数をチェックし、無呼吸または心拍数が100/分未満、酸素投与後も中枢性チアノーゼが持続する場合には、陽圧換気を開始する。その後は各ステップを30秒間施行後に、心拍数60/分を基準とした評価により心臓マッサージ、薬物投与の適応があるかどうか判断する。

#### 治療の実際

##### 1. 陽圧換気

蘇生アルゴリズムにおいて陽圧換気は非常に大切である。フェイスマスクは顎の先、口、鼻を覆い目にはかからないサイズを選択する。蘇生用バッグには流量膨張式バッグと自己膨張式バッグがあり、それぞれの利点、欠点をふまえて使用する。初期の換気が充分か否かの一番の指標は心拍数の迅速な改善である。マスクの密着性、胸郭の動き、体位、分泌物による気道閉塞の有無等をチェックし、換気が有効に行われているかどうかを確認する。

##### 2. 酸素投与

現時点では100%未満の酸素を推奨するには根拠が不十分であるため、陽圧換気を必要とする児、中心性チアノーゼが続く児には100%酸素が推奨されている。早産児の蘇生においては、酸素障害がより懸念されるため、酸素ブレンダーとパルスオキシメーターを準備し、酸素飽和度90~95%の範囲内で酸素濃度を調節することが推奨される。

##### 3. 気管挿管

新生児蘇生においては以下の適応で気管挿管を行う。

- ・胎便を気管内から吸引する必要がある場合
- ・バッグマスク換気を長期に必要とする、または効果的でない場合
- ・薬物の気管内投与が望ましい場合
- ・超低出生体重児、横隔膜ヘルニアなどの特別な蘇生状況の場合

適切なサイズの気管チューブを準備し、挿管手技は20秒以内に施行する。

気管チューブが適切な位置にあるかの確認は聴診、胸郭の動きのほかに呼吸炭酸ガスモニターが迅速に診断するのに有用である。

##### 4. 胸骨圧迫心臓マッサージ

適切な換気後も心拍数が60/分未満の場合に適応となる。圧迫位置は、胸骨の下1/3の部分で深さは胸郭前後径の1/3を目安にする。必ず適切な換気と連動して行い、マッサージと換気の回数比は3:1の割合で、1分間に120回の動作(90回的心臓マッサージと30回の換気)のペースで行う。両手の親指で圧迫し、残りの指は抱え込むように背中へまわし支える、サム法が推奨される。

##### 5. 薬物投与

100%酸素で十分に換気を行い、胸骨圧迫心臓マッサージを行っても心拍数が60/分未満が続く場合は、薬物投与の適応となる。

##### A. エピネフリン(ボスミン)

溶液の濃度は10,000倍を使用し、日本では通常1,000倍溶液となっているため、10倍に薄めて使用する(0.01-0.03 mg/kg)。推奨投与経路は静脈内投与であるが、静脈確保されていない状況では気管内投与も可能で、静脈内投与に比べて多い気管内投与量(0.03 mg/kg~0.1 mg/kg)を推奨される。

##### B. 循環血液増量薬

児がショックに陥ったと考えられる場合や、他の蘇生操作に反応しない場合にはさらに循環血液増量薬の使用を考える。生理食塩水や乳酸化リンゲル液10ml/kgを5-10分かけてゆっくり静脈内投与する。

##### C. 重炭酸塩

重炭酸塩のルチーンでの投与は進められていない。蘇生が遅延した場合、また代謝性アシドーシスの存在確認下で、適切な換気が確立された後に投与が考慮される。重炭酸塩は組織腐敗性があるため、投与経路は静脈内のみであり、確実な静脈ラインから投与される必要がある。また高浸透圧のため、急速投与は頭蓋内出血を起こす危険もあり、通常は2倍に薄め、ゆっくりと(1mEq/kg/min未満)投与する。

##### おわりに

長野県の周産期医療従事者すべてが、繰り返し新生児蘇生講習を受けることによって、より良い長野県の周産期医療体制が構築されると期待される。

##### 参考図書

AAP/AHA 新生児蘇生テキストブック 監訳 田村正徳  
医学書院 2006

## 編集後記

長野県母子衛生学会誌第9号を発刊できることとなり、ご協力いただきました会員のみなさまに感謝いたします。

昨年11月に開催されました第9回の長野県母子衛生学会には多数のご出席をいただき、盛況に開会できたこと、事務局を代表いたしまして、改めてここで感謝いたします。長野県内でも産科閉鎖・休止、助産師外来の開設、分娩施設の集約化・重点化の話もあり、少子高齢化がますます進むなか、今後の産科医療の動向に注目が集まります。今回のテーマでもありました、助産師と医師の協働（コラボレーション）の充実性が求められ、様々な職種がお互いの専門性を高め、発揮される必要性が増している現状にあります。

この3月、信州大学医学部保健学科1回生が卒業し、社会に羽ばたいていきます。また、4月には信州大学大学院医学系研究科保健学専攻が開校します。社会におけるニーズが高まり時代に即した研究・医療者の育成が望まれ、信州大学にまた新たなページが加わります。

昨年末、2006年の世相を示す漢字に「命」が選ばれました。秋篠宮ご夫妻にご親王悠人様ご誕生、という明るい話題と、いじめや自殺、虐待、飲酒運転や自然災害による死亡事故などの痛ましい話題の増加が選ばれた理由です。他にも命に関する話題といえば親が子を殺したり、子が親を殺したりという話題も後を尽きません。命を扱う現場にいる医療に携わる者としても、明るい話題が増えるような社会になるよう祈らずにはられません。

私は、今回初めて本学会に参加しました。また、事務局の一員となり今後も会員の皆様のご協力を得て、本学会のさらなる発展につなげていきたいと思っています。勤務先・連絡先等変更のある方は事務局までご連絡ください。

みなさまのご健康とご多幸をお祈り申し上げます。

(芳賀亜紀子)

---

長野県母子衛生学会誌 第9号

平成19年3月20日 発行

発行所 長野県母子衛生学会  
事務局 〒390-8621 松本市旭 3-1-1  
信州大学医学部保健学科  
(坂口研究室：0263-37-2384)  
印刷所 こまくさ印刷  
発行責任者 小林 隆夫

---

## Liquid ventilation 研究の最新の知見と 臨床応用の可能性

三ツ橋偉子\* 広間武彦\* 田村正徳\*\* 中村友彦\*

### liquid ventilation の原理

通常的气体呼吸時には、肺胞はガス（気相）を肺胞上皮細胞（液相とみなすことができる）が取り囲んだ状態にあり、肺胞は表面張力により、その表面積を最小にする方向に力を受けている。呼吸窮迫症候群（RDS）などで肺胞の表面張力が大きく肺胞が虚脱しやすい病態下では、肺胞を液体で満たして気体-液体境界を液体-液体界面に置換すると、小さな圧で肺胞を膨らませることができる。この原理を利用したのが液体換気療法（liquid ventilation：LV）である。

### perfluorocarbon (PFC)

perfluorocarbon (PFC) は有機物質の炭素に結合した水素原子をフッ素原子に置換した物質の総称で、化学的にも生物学的にも不活性で非常に安定した物質である。PFCは無色・透明・無臭で、水や脂肪に溶解せず、水や脂肪も溶解させない。現在LVで使用されているliquivent<sup>®</sup>（Alliance社）は酸素と二酸化炭素の溶解度は生理食塩水のそれぞれ16倍、2.6倍であり、水とは違ってガスの溶解度は温度には依存しない。また、低表面張力によるサーファクタント的作用、高比重による無気肺の物理的開存作用が特徴である。この分子構造はC<sub>8</sub>F<sub>17</sub>Brであり、Brを含むPFCは生体からの排泄が早いこと、X線非透過性という特徴をもっている。FC84は動粘度が小さいのでtotal

liquid ventilation (TLV) にはむいているが、蒸散圧が大きく常温でも蒸散しやすいので絶えず気道内に補充する必要がある。その点ではliquivent<sup>®</sup>は蒸散圧が小さく頻回の補充をしなくても効果が安定している。

### liquid ventilation で酸素化や ガス交換が改善する機序

1. 肺胞の気体-液体界面の表面張力が小さくなる
2. 無気肺の防止と治療 (alveolar recruitment)  
肺胞コンプライアンスが増大して肺胞が膨らみやすくなるだけではなく、PFCは空気と比し動粘度が約1,000倍も大きいので、それ自体が無気肺の防止や治療に効果的である。特に高濃度酸素投与が必要な患者では吸収性無気肺の防止効果が重要である。さらにPFCは比重が大きい上にそれ自体の表面張力が小さいので、体位を変えることにより無気肺部に誘導することが可能なので無気肺の治療に応用できると期待される。
3. 換気/血流比の改善  
気体よりもPFCの比重のほうが血液比重に近いので、換気/血流 (V/Q) のミスマッチが改善する。さらに、LV中の肺血管は均一に拡張し、肺内の血流分布はガス換気よりも均等になるという報告もある。また、無気肺がある場合はPLVではV/Q mismatchingが改善し、肺のrecruite-

みつはし よりこ、ひろま たけひこ、たむら まさのり、なかむら ともひこ

\*長野県立こども病院新生児科 〒399-8288 安曇野市豊科3100 \*\*埼玉医科大学総合医療センター小児科

ment と肺胞組織・毛細血管の引き伸ばしにより血管抵抗は減少する。

#### 4. PFC の抗炎症作用

PFC はマクロファージの活性化を抑制する効果が報告されている。また、Kawamae ら<sup>1)</sup>が、ラットの誤嚥性モデルで従来のガス換気療法に比較して PLV では血中の炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の出現が少ないことを報告している。また、Baba ら<sup>2)</sup>、Nakata ら<sup>3)</sup>は *in vitro* の実験で PFC が肺胞内で感染防御のためのバリアになっていることを報告した。

#### 5. PLV による PEEP 増強効果

PLV における PEEP 増強効果の特徴は、①吸気時よりも呼気時に顕著となるため一回換気量が増えるにもかかわらず、気道内圧変動が小さくなる、②仰臥位で寝ている患者では、腹側 (non dependent) よりも背側 (dependent) 部に PEEP 効果が顕著であることである。すなわち、最も無気肺の生じやすい dependent 部の呼気時に最も大きな PFC による静水圧がかかる。dependent 部は長期臥床や全身麻酔などで容易に無気肺に陥りやすく、人工呼吸中の無気肺は低酸素血症・感染症・肺損傷の原因となることも稀ではない。PFC はそれ自体の表面張力も小さいので、低圧でも肺内に均等に分布しやすい。一旦肺胞が PFC で満たされると、密度が高いためなかなか虚脱しにくい。PFC を用いた PLV により肺内分布としては non dependent 部よりも dependent 部に重点的に、また呼吸時相としては吸気時よりも呼気時に高い PST がかかることは無気肺の防止と治療の観点からみて非常に有益である。さらに吸気時と呼気時の肺胞内圧変動が小さいことは肺損傷防止の観点からも魅力的である。しかし、このような PLV の利点も PFC が過量投与されると dependent 部では急性期には高い気道内圧 ( $P_{AW}$ ) と静水圧 ( $P_{ST}$ ) を同時に受けることになるので、気胸のリスクが増える可能性が危惧される。我々は、高

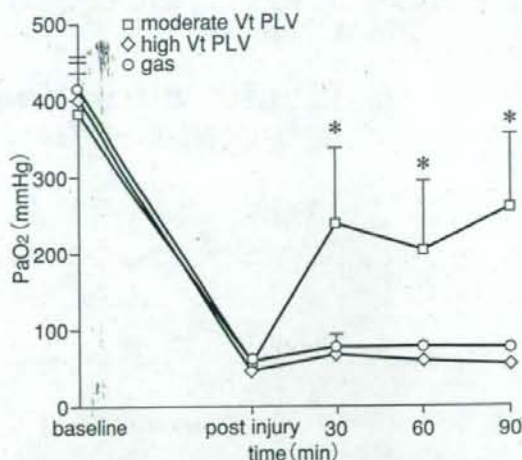


図1 Changes in PaO<sub>2</sub> in the three study groups following surfactant depletion

PLV=partial liquid ventilation GAS=gas ventilation  
\*p<0.05 vs other groups

度な ARDS モデルの家兎に 6 mL/kg という少量の PFC と適切な PEEP の組合わせにより中等量の換気量で有意な酸素化の改善が得られることを報告している<sup>4)</sup>(図 1)。

### ほかの呼吸管理法との組合わせ

#### 1. HFO

我々の肺洗浄家兎を用いた動物実験では、ガスを用いた HFO に反応しない高度な ARDS モデルの家兎に 6 mL/kg という少量の PFC を投与することで HFO による酸素化が劇的に改善することを報告した<sup>5)</sup>(図 2)。これは PFC が volume recruitment に貢献するためと考えられる。

#### 2. 一酸化窒素 (NO) 療法

一酸化窒素 (NO) は選択的肺血管拡張薬としてすでに臨床応用されているが、先天性横膈膜ヘルニア (CDH) や胎便吸引症候群 (MAS) などのように重篤な肺病変を伴う疾患では、新生児特発性肺高血圧 (PPHN) ほどは効果がよくないことが知られている。その機序は、肺病変のために

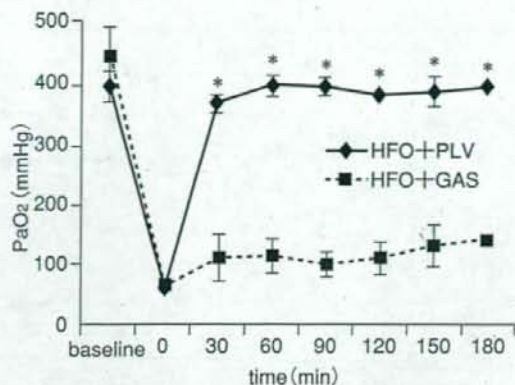


図2 Changes in PaO<sub>2</sub> in experiment 1

HFO=high-frequency oscillation PLV=partial liquid ventilation GAS=gas ventilation \*p<0.05 vs other group

吸入した NO が肺血管床に到達できないためと考えられている。NO はまた PFC によく溶解するので、NO 吸入療法と PLV を組み合わせることによって、NO の効果を増強することが期待される。Albert らは、MAS モデルの新生ヤギにおいて PLV のほうが PaO<sub>2</sub> と肺コンプライアンスが改善しただけでなく、NO による肺血圧低下効果が顕著であったと報告している。

## PLV と対象疾患

新生児領域で PLV の対象となる疾患は有効な酸素化を得るために従来のガス換気法よりも高い PEEP や換気圧を必要とする MAS や急性肺障害 (ARDS) と慢性肺疾患 (CLD) を考えており、我々は新生児での PLV の臨床応用に向けて、新生ブタまたは成熟ウサギを用いての実験を行っているのでその結果を紹介する。

### 1. MAS での PLV の効果

新生ブタの MAS モデルでは、現在臨床で行われている人工肺サーファクタントによる気管内洗浄と PLV の組み合わせによって、人工肺サーファクタントと従来のガス換気または PLV 単独より

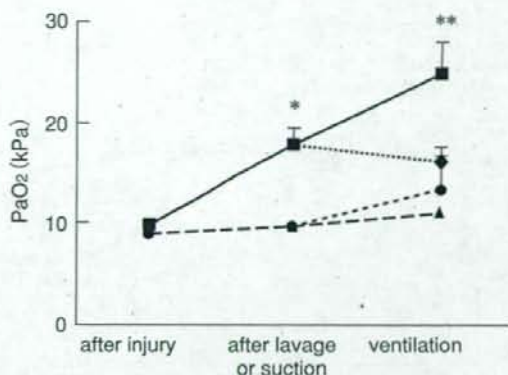


図3 PaO<sub>2</sub> data

サーファクタント洗浄後、有意に酸素化が改善、さらにサーファクタント洗浄+PLV 群は、他群に比べて有意に酸素化が改善した

も有効な酸素化と換気効果が得られることがわかった (図3, 4)<sup>6)</sup>。サーファクタント洗浄による中枢気道の胎便除去効果と PFC の抗炎症作用、PEEP 効果によって、従来よりも低い換気圧で対応でき、エアリークの危険性が少なくなると思われる。

### 2. ARDS での PLV の効果

肺炎・敗血症などの感染症やショック後にみられる ARDS の患者では、重力のかかる背側の肺損傷が著しく、従来のガス換気法では健常な肺胞が残存する腹側が主に換気されて換気-血流不分布が起き、ガス換気不全とともに健常な腹側肺胞の圧 (容量) 損傷も起こり悪循環に陥ることが知られている。我々の動物実験の結果から、ARDS に対する換気法として、比較的高い PEEP と小さな換気量、または高頻度換気法 (HFO) と PLV との組み合わせが呼吸不全の改善に有効であるだけでなく、二次的な肺損傷や全身性臓器障害の発症を予防できると期待される。

### 3. CLD での PLV の効果

出生後早期の人工呼吸による酸素傷害や圧・容

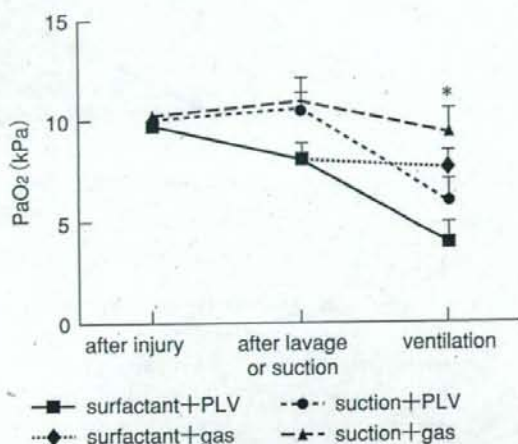


図4 The PaCO<sub>2</sub> data

サーファクタント洗浄後、炭酸ガス分圧は低下する傾向があり、さらにサーファクタント洗浄+PLV群は、吸引+ガス換気群に比べて有意に炭酸ガス分圧は低下した

量損傷を少なくすることがCLDの発症予防につながると考えられる。重症肺損傷モデルでは6 mL/kgのPFCとHFOとの組み合わせで、HFOガス換気と比較して有効な酸素化が得られることがわかり、HFOを用いたPLVによって、吸入酸素濃度と換気条件を下げるができる(図5)<sup>6)</sup>と考えられ、CLD発症予防ができるのではないかと期待している。

## 我が国での臨床応用の可能性

我が国の新生児領域でLVの臨床応用にあたって解決しておくべき諸問題を以下にあげる。

### 1. 適応疾患

新生児領域でPLVの対象となる疾患は、有効な酸素化を得るために従来のガス換気法よりも高いPEEPや換気圧を必要とするMASや、ARDSとCLDを考えている。LVでは、病理学的検索では肺胞硝子膜形成や無気肺や細胞浸潤などの異常所見がガス交換群に比較して軽微な点である。PFCの抗炎症作用の点からも、生存率の向上に伴

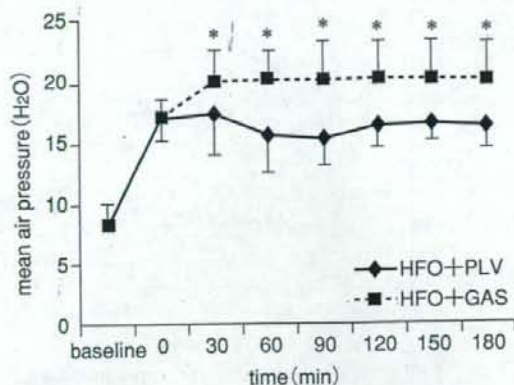


図5 Changes in mean air pressure of ventilator HFO=high-frequency oscillation PLV=partial liquid ventilation GAS=gas ventilation \*p<0.05 vs other group

い増加する早産児のCLDの防止効果にLVが期待できるのでないと思われる。

### 2. PFCの至適投与量と維持量の決定法

北米の治験プロトコールでは、気管内チューブ内に“meniscus”がみられるまで気管内チューブの側枝からPFCを1 mL/kg/分ずつ注入しているようである。これは気管内チューブを一時的に呼吸器回路から離れた時に、気管内チューブ内にPFCの液柱がみえる状態を指し、この量がliquid functional residual capacityに相当するとされている。LVでは肺胞表面張力の影響が小さくなるので、この方法に従えば、コンプライアンスが低下した肺でも正常の機能的残気量に近い肺容量を維持して人工換気が可能であるかもしれないし、この“meniscus”は臨床的には簡単な指標である。

しかし、“meniscus”では過量投与の危険性があり、我々の実験でも、適切なPEEPまたはHFOとの組み合わせにより、少量(6 mL/kg)の投与量で十分PLVの効果が期待できる。しかし、少量投与の場合、追加投与の時期、目安が不明で、呼気中の蒸散したPFC量を測定できる方法の開発が待たれる。



### 3. 生体への長期的影響

PFC は生物学的にも不活性であり、ほとんどが肺から揮発して排出されるため生体に対して安全であるといわれている。厚生省薬務局医療機器開発課長が各都道府県衛生主管部長にあてた「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的試験のガイドラインについて（薬機第 99 号：平成 7 年 6 月 27 日）」の I 細胞毒性試験法に従って検討した結果でも、PFC の一種である FC84 と接触させながらの 10 日間の細胞培養ではチャイニーズハムスターの肺癌由来細胞、ヒトの肺癌由来細胞、胎児肺線維芽細胞すべてに対して細胞毒性が認められなかった。

### おわりに

LV は 1970 年代より動物実験で基礎的研究が行われ、1990 年代より臨床応用の始まった新しい呼吸管理法である。北米の成人 ARDS での PLV 臨床試験は、従来の換気法と比較して、10 mL/kg と 20 mL/kg の PFC を用いた PLV を行い、死亡率に有意差はなく、むしろ PLV 群で気胸、低血圧の頻度が高く、ARDS の治療法として PLV は推奨できないとの結論を報告した<sup>7)</sup>。この結果をもって、小児 ARDS での PLV 使用も控えられ、さらに新生児領域でもサーファクタント補充療法を上回る治療法としては認められていないのが現状である。しかしながら人工換気療法に関連した新生児の肺損傷の発生率は相変わらず高く、超低出生体重児では生存例の約半数に慢性肺疾患が合併して、長期の人工換気や酸素投与を余儀なくされている。PFC を用いた PLV では、その呼吸生理学的特徴を正しく理解して使用すれば、従来のガス換気法に比較して酸素化とガス交換が

改善するだけでなく、肺損傷を防止できる可能性が示唆されている。近年、ヨーロッパ、オセアニア、台湾から PLV の基礎的研究が再び報告されるようになっており、新生児領域における 21 世紀の新しい呼吸管理法の一つとなるのではないかと期待している。

### 文献

- 1) Kawamae K, Pristine G, et al : Partial liquid ventilation decreases serum tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations in rat acid aspiration lung injury model. *Critical Care Med* 28 : 479-483, 2000
- 2) Baba A, Kim KY, et al : Perfluorocarbon blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-8 release from alveolar epithelial cells *in vitro*. *Crit Care Med* 28 : 1113-1118, 2000
- 3) Nakata S, Nakamura T, et al : Perfluorocarbon suppresses lipopolysaccharide and alpha-toxin-induced interleukin-8 release from alveolar epithelial cells. *Neonatology* 91 : 127-133, 2007
- 4) Nakamura T, Tamura M : Partial liquid Ventilation<sup>TM</sup> with low-dose of perflubron and a low stretch ventilation strategy improves oxygenation in a rabbit model of surfactant-depletion. *Biol Neonate* 82 : 66-69, 2002
- 5) Wakabayashi T, Nakamura T, et al : Partial liquid ventilation with low-dose perfluorochemical and high-frequency oscillation improves oxygenation and lung compliance in a rabbit model of surfactant depletion. *Biol Neonate* 89 : 177-182, 2005
- 6) Nakamura T, Matsuzawa S, et al : A randomized control study of partial liquid ventilation after airway lavage with exogenous surfactant in a meconium aspiration syndrome animal model. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 82 : F160-162, 2000
- 7) Kacmarek RM, Wiedemann HP, et al : Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 173 : 882-889, 2006

\* \* \*

## Perfluorocarbon Suppresses Lipopolysaccharide- and $\alpha$ -Toxin-Induced Interleukin-8 Release from Alveolar Epithelial Cells

Setsuko Nakata<sup>a</sup> Kozo Yasui<sup>a</sup> Tomohiko Nakamura<sup>b</sup> Noriko Kubota<sup>c</sup>  
Atsushi Baba<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine, Divisions of <sup>b</sup>Neonatology and <sup>c</sup>Clinical Pathology, Nagano Children's Hospital, Nagano, Japan

### Key Words

Perfluorocarbon · Ventilator-associated pneumonia · Human pulmonary alveolar epithelial cells (A549) · Lipopolysaccharide ·  $\alpha$ -Toxin · Interleukin-8

### Abstract

**Background/Aims:** Human pulmonary alveolar epithelial (A549) cells release interleukin-8 (IL-8) on stimulation by lipopolysaccharide (LPS) and  $\alpha$ -toxin. We hypothesised that the perfluorocarbons (PFCs), perflubron and FC-84, would block stimulation of A549 cells by these toxins. **Methods:** The levels of IL-8 production in A549 cells were measured following exposure to toxins for 24 h with or without PFC. The amount of IL-8 released from A549 cells was measured by enzyme-linked immunosorbent assay, and the level of IL-8 mRNA was measured by real-time RT-PCR. **Results:** When stimulated with LPS or  $\alpha$ -toxin, IL-8 release from A549 cells increased. There were no significant differences in level of IL-8 release between cells pre-incubated for 24 h with or without PFC after toxin stimulation for 24 h. When PFC was administered along with LPS stimulation, the level of IL-8 release was decreased (LPS control,  $1,398 \pm 110$  pg/well; FC-84,  $686 \pm 50$  pg/well; perflubron,  $749 \pm 137$  pg/well;  $p < 0.05$ ). Levels of IL-8 mRNA expression were significantly higher with than without LPS, and those with LPS and perflubron were significantly lower than those with LPS alone. **Conclusions:** The results show that PFCs block stimulation

of A549 cells by LPS or  $\alpha$ -toxin. PFC may be useful clinically in treatment of pulmonary inflammation in the alveolar space.

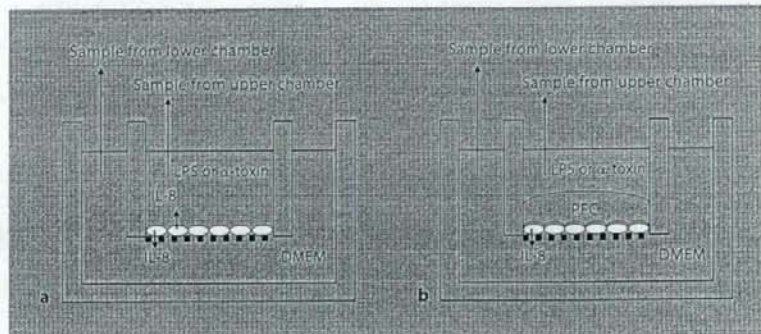
Copyright © 2007 S. Karger AG, Basel

### Introduction

The incidence of ventilator-associated pneumonia (VAP) ranges from 15 to 30% in patients requiring mechanical ventilation [1–3]. VAP is clinically important in not only adults [1, 2] but also neonates [3, 4], because it increases mortality [1–4], lengthens hospitalisation [2, 3] and increases medical costs [2]. The levels of interleukin-8 (IL-8) in bronchoalveolar lavage fluid are higher in patients with VAP than in controls [5]. In addition, the presence of IL-8 in the bronchial secretions from patients early in the course of mechanical ventilation is significantly associated with a high incidence of nosocomial bacterial pneumonia [6]. Administration of anti-IL-8 antibody was shown to alleviate pulmonary inflammatory reactions in different lung injury models [7–9], suggesting that IL-8 facilitates pulmonary inflammatory reactions in vivo. High levels of circulating IL-8 in patients with VAP are associated with higher mortality rates [10].

Various clinical [11, 12] and animal [13–17] studies have shown that liquid ventilation improves oxygenation and respiratory function. While several perfluorocar-

**Fig. 1.** Cell culture system. **a** Monolayers of human pulmonary alveolar epithelial cells were cultured on filters in Transwell tissue culture plates. A549 cells were stimulated with LPS or  $\alpha$ -toxin. Samples were collected from both upper and lower chambers for IL-8 assay. DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium. **b** As soon as PFC was added to the medium, it rapidly spread over the apical surface of the A549 cell monolayer and separated the medium from the cells.



bons (PFCs) have been used in liquid ventilation, the results of histopathological analyses in animal studies indicated that several PFCs exhibit anti-inflammatory effects on the lung [14, 15]. Many studies have shown that PFCs have the ability to modulate in vitro cellular responses associated with inflammation, such as blocking macrophage and neutrophil infiltration and activation [18, 19]. Perflubron blocks IL-8 release from A549 cells stimulated with tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [20]; this cytoprotective effect is thought to be due to the action of perflubron as a physical barrier.

Both Gram-negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, and Gram-positive bacteria, such as *S. aureus*, are responsible for VAP [3, 21]. Administration of lipopolysaccharide (LPS) into the trachea is a well-known lung injury model [22], and animal studies have shown that  $\alpha$ -toxin is involved in lung injury caused by intratracheal administration of *Staphylococcus aureus* [23]. A549 cells [24] release IL-8 on stimulation by LPS, a component of Gram-negative bacteria, or  $\alpha$ -toxin released by *S. aureus* [25, 26]. Therefore, we investigated the effects of PFC on IL-8 release from A549 cells stimulated with LPS or  $\alpha$ -toxin using an in vitro cell culture system.

In the present study, we used perflubron, which is used clinically, and FC-84, which is used in animal studies in Japan, to verify the hypothesis that PFCs block stimulation of A549 cells by LPS or  $\alpha$ -toxin.

## Materials and Methods

### Preparation of Monolayers of Human Pulmonary Alveolar Type II Epithelial Cells

For our cell culture system, we used a human pulmonary alveolar cell carcinoma cell line derived from epithelial type II (A549) cells (American Type Culture Collection; Manassas, Va.,

USA) [24]. The cells were grown as monolayers in Falcon tissue culture flasks (Becton Dickinson Labs, Franklin Lakes, N.J., USA) under conditions of 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C; cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, N.Y., USA) with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) and 1% penicillin G/streptomycin/ampicillin B (Gibco). The cells were incubated with trypsin-EDTA to induce detachment. After washing once with DMEM containing 10% FCS, cells were centrifuged and resuspended in fresh medium.

The A549 cells were then plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well in Falcon Microtest 96-well plates with a well surface area of 0.32 cm<sup>2</sup> in 200  $\mu$ l of DMEM with 10% FCS. In addition, the cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells on filters in the upper chamber of Transwell plates (Corning Inc., Corning, N.Y., USA) in 200  $\mu$ l of DMEM with 10% FCS. The Transwell tissue culture plates have 24 wells, with each well separated into an upper and lower chamber by a polycarbonate filter with a diameter of 6.5 mm, a pore size of 0.4  $\mu$ m and insert membrane growth area of 0.33 cm<sup>2</sup>. We added 1,000  $\mu$ l of DMEM with 10% FCS to the basolateral side (lower chamber) of the monolayer. After 48 h, the cells reached confluence, which was determined by microscopic observation that the cells were not discrete. Medium was removed from the cells by washing twice with serum-free DMEM.

A549 cells were grown as monolayers on 96-well culture plates in 200  $\mu$ l of DMEM without FCS in the presence or absence of LPS purified from *P. aeruginosa* serotype 10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) or  $\alpha$ -toxin purified from *S. aureus* (Sigma-Aldrich) at various concentrations. Aliquots of 120  $\mu$ l of the culture supernatants were sampled 24 h after stimulation and frozen at -80°C until assayed for IL-8 production.

To examine the direct effects of perflubron (Alliance Pharm. Co., San Diego, Calif., USA) and FC-84 (Sumitomo 3M Ltd., Tokyo, Japan) on production of IL-8 by alveolar epithelial cells, we first treated A549 cells with PFC. A549 cells were grown as monolayers on the upper wells of Transwell tissue culture plates. The apical side of the A549 cell monolayer was exposed to 120  $\mu$ l of PFC covered with 150  $\mu$ l of DMEM to prevent evaporation of PFC and we added 1,000  $\mu$ l of DMEM to the lower chamber. After 24 h of incubation, A549 cells were washed twice with DMEM and stimulated with 200  $\mu$ l of LPS (100  $\mu$ g/ml) or  $\alpha$ -toxin (1  $\mu$ g/ml) in the upper chamber (fig. 1a). The production of IL-8 was

measured following stimulation with LPS or  $\alpha$ -toxin for a further 24 h of incubation. Aliquots of 180  $\mu$ l of culture supernatants from the upper chamber and 900  $\mu$ l of culture supernatants from the lower chamber were sampled at 24 h and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed for IL-8 production.

To examine the blocking effect of perflubron and FC-84 on production of IL-8 by alveolar epithelial cells, A549 cells were stimulated with 150  $\mu$ l of LPS (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or 150  $\mu$ l of  $\alpha$ -toxin (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the upper chamber for 24 h. Aliquots of 120  $\mu$ l of PFC were added to the upper chamber immediately after LPS or  $\alpha$ -toxin administration, we added 1,000  $\mu$ l of DMEM to the lower chamber (fig. 1b). After 24 h of incubation, aliquots of 180  $\mu$ l of culture supernatant from the upper chamber and 900  $\mu$ l of culture supernatant from the lower chamber were sampled and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed for IL-8 production.

After each experiment, the cells were harvested with trypsin-EDTA. After neutralisation of trypsin-EDTA with DMEM containing 10% FCS, cell number and viability were examined by the trypan blue exclusion method under light microscopy. To determine RNA expression, DMEM (control), LPS (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and LPS + perflubron groups were incubated for 24 h as mentioned in the experiment to examine the blocking effects of perflubron and FC-84. Cultures were washed twice with DMEM and the cells were treated with trypsin-EDTA. After neutralisation of trypsin-EDTA with DMEM containing 10% FCS, cells were centrifuged and resuspended in DMEM. A549 cells ( $1 \times 10^6$ ) were mixed with 1 ml of Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies, Tokyo, Japan) and 200  $\mu$ l of chloroform. The mixture was vortexed, incubated for 5 min at room temperature and centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The upper phase was precipitated with 500  $\mu$ l of 2-propanol and mixed well, incubated for 10 min at room temperature and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . After centrifugation, the pellet was washed with 70% ethanol, air-dried and finally resuspended in 10  $\mu$ l of DEPC-treated water.

Each group was represented by at least three specimens.

#### IL-8 Assay

The concentration of IL-8 was analysed using a commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kit (BioSource International Inc., Camarillo, Calif., USA). IL-8 concentrations were analysed spectrophotometrically at 450 nm with a microplate reader. The final concentration was calculated by comparison of the optical density readings with a standard curve. The total amount of IL-8 production was calculated by multiplying the concentration of IL-8 with the volume of the medium. The detection limit of this kit is 5–1,000 pg/ml. The samples that were  $>1,000$  pg/ml were diluted with standard diluent buffer. The samples of the groups stimulated with LPS or  $\alpha$ -toxin at various concentrations, pre-incubation with PFC in the upper chamber, or stimulated with LPS or  $\alpha$ -toxin without PFC in the upper chamber were diluted by 20%. The samples of the groups pre-incubated with PFC in the lower chamber, stimulated with LPS or  $\alpha$ -toxin without PFC in the lower chamber were diluted by 50%. The samples of the group stimulated with LPS or  $\alpha$ -toxin with PFC in the upper chamber were not diluted.

#### Real-Time RT-PCR

The following sense and antisense primers were used for RT-PCR: IL-8 sense, 5'-TTCCTGATTTCTGCAGCTCT-3'; IL-8 antisense, 5'-TTTCTGTGTGGCGCAGT-3'; GAPDH sense, 5'-

GAAGGTGAAGGTCGG-3'; GAPDH antisense, 5'-AAGATG-GTGATGGGATTTC-3'.

A SYBR Green I system was utilised in the reaction: 20  $\mu$ l of the PCR mixture containing 2  $\mu$ l of RNA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$  of each primer and 10  $\mu$ l of the reagent supplied with QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) were added to a capillary tube and loaded into a LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). PCR conditions consisted of 20 min at  $50^{\circ}\text{C}$ , 15 min at  $95^{\circ}\text{C}$ , followed by 35 cycles of 15 s at  $95^{\circ}\text{C}$ , 20 s at  $58^{\circ}\text{C}$  and 30 s at  $72^{\circ}\text{C}$ . Amplification of the PCR products was monitored by measuring SYBR Green I dye fluorescence. The results were analysed with LightCycler software. The identity of the PCR product was confirmed by automated determination of the melting temperature of the PCR products, followed by gel electrophoresis. Quantities of specific RNA in the same sample were measured according to the corresponding gene-specific standard curve. A standard curve was prepared from 10-fold serial dilutions of RNA by plotting the relation between the crossing points and the logarithm of copy numbers of amplified products. The results for IL-8 were normalised relative to GAPDH expression measured in parallel in each sample.

#### Statistics

All data were analysed by non-repeated measures ANOVA, followed by the Bonferroni test or Student-Newman-Keuls test. All data are presented as means  $\pm$  SD. Significance was defined as  $p < 0.05$ .

## Results

#### IL-8 Release from Alveolar Epithelial Cells

The release of IL-8 from A549 cells induced by LPS increased in a dose-dependent manner. Significant potentiation was observed at both concentrations of LPS (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $850 \pm 244$  pg/ml, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $1,791 \pm 314$  pg/ml), in comparison to the control value ( $242 \pm 163$  pg/ml;  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ; fig. 2).

$\alpha$ -Toxin also stimulated IL-8 production by A549 cells. The levels of products were increased by  $\alpha$ -toxin (0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $463 \pm 98$  pg/ml,  $p < 0.05$ ; 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $1,866 \pm 62$  pg/ml,  $p < 0.01$ ) in comparison to the control value ( $226 \pm 41$  pg/ml). A significant increase in the production of IL-8 from the alveolar epithelial cells was observed with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$ -toxin as compared with controls (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $1,631 \pm 233$  pg/ml,  $p < 0.01$ ), and the level of production in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$ -toxin was decreased relative to that seen at 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $p < 0.05$ ) ( $n = 3$ ; fig. 3).

After the experiments, the viability of cells in each of the groups was  $>90\%$  as determined by trypan blue exclusion.