

# 肺虚血再灌流障害における虚血前短時間虚血効果の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9461">http://hdl.handle.net/2297/9461</a>

## 肺虚血再灌流障害における虚血前短時間虚血効果の検討

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡邊洋宇教授)

中 田 浩 一

肺移植は末期肺疾患に対して確立した治療手段となっているが、肺虚血再灌流障害による術後急性期の肺水腫、肺機能低下は依然として重要な課題である。近年心筋、肝臓、小腸などにおいて、虚血再灌流障害に対して虚血に先行する短時間虚血の有効性が注目されている。心筋における虚血前短時間虚血の急性期効果はいったん消失した後、24時間後に再度出現するが、これには熱ショック蛋白質 (heat shock protein 72, HSP72) の関与が報告されている。本研究では虚血前短時間虚血による肺再灌流障害の抑制効果およびHSP72の関与に関して、ウサギ肺虚血再灌流モデルを作製し検討した。左肺の常温2時間の虚血終了後、左肺のみによる2時間の再灌流を行った0時間後対照群 (n=6)、2時間の虚血の前に5分間の虚血前短時間虚血を行い0時間後対照群と同様に再灌流を行った虚血前短時間虚血後0時間群 (n=6)、左肺門にターニケットの留置のみを行った6時間後に2時間虚血再灌流を行った6時間後対照群 (n=6)、虚血前短時間虚血の6時間後に2時間虚血再灌流を行った虚血前短時間虚血後6時間群 (n=6)、ターニケットを留置した24時間後に2時間虚血再灌流を行った24時間後対照群 (n=6)、虚血前短時間虚血の24時間後に2時間虚血再灌流を行った虚血前短時間虚血後24時間群 (n=6) の6群を作製した。虚血再灌流後の全経過を比較して虚血前短時間虚血後0時間群は0時間後対照群と比較して有意に動脈血酸素分圧が高かった。6時間後対照群と虚血前短時間虚血後6時間群では動脈血酸素分圧、動脈血酸素飽和度、平均肺動脈圧に有意差はなかった。一方、虚血前短時間虚血後24時間群は24時間後対照群に比べて動脈血酸素分圧が有意に高かった。病理組織学的にも虚血前短時間虚血後24時間群に比べて24時間後対照群で肺胞隔壁、肺胞内への著明な好中球の浸潤、高度な肺胞内出血、肺水腫を認めた。虚血前短時間虚血後0時間、6時間、12時間、24時間、48時間に摘出した左肺を抗HSP72抗体を用いて免疫組織学的に検討したところ、虚血前短時間虚血後12時間、24時間、48時間でHSP72の染色が気管支上皮の細胞質に認められた。以上より、肺においても虚血前短時間虚血の急性期効果と後期効果が存在し、後期効果にはHSP72の発現が関与している可能性が示唆され、虚血前短時間虚血は肺虚血再灌流障害の抑制に有効な手段であると考えられた。

**Key words** ischemia-reperfusion injury, ischemic preconditioning, heat shock protein, lung transplantation

近年、肺移植は移植手技および免疫抑制療法の進歩により、欧米では重症末期の肺疾患に対して確立した治療手段となっている。しかし遠隔期死亡の最大原因である閉塞性細気管支炎とともに、臓器保存や肺移植後急性期の肺機能不全および肺水腫の克服は依然として問題となっている。

虚血再灌流障害の原因としては活性酸素とともに好中球が深く関与していると考えられ、好中球エラスターゼ阻害剤の投与などが注目されている。一方、心筋においては虚血に先行する短時間の虚血が心筋の虚血再灌流障害に対して臓器保護効果を有することをMurryら<sup>1)</sup>が1986年に報告した。その後肝臓<sup>2)</sup>、小腸<sup>3)</sup>などにも同様の効果が確認されており、虚血前短時間虚血効果 (ischemic preconditioning, IP) と呼ばれている。心臓における急性期のIP効果は3時間後にはいったん消失し、24時間後に再度出現することが報告されている<sup>4)</sup>。この後期のIPの効果には72kDaの熱ショックタンパク質 (heat shock protein 72, HSP72) の発現が深く関与していると考えられている<sup>5)</sup>。肺虚

血再灌流障害に対しても急性期および後期のIP効果が期待される。本研究ではウサギの左肺門遮断による虚血再灌流モデルを用いて急性期および後期のIP効果とともにHSP72の関与を検討した。

### 対象および方法

#### I. 実験動物

体重2.8~3.8kg (平均3.4kg) のニュージーランド白色種の雌性ウサギ (北山ラベス, 長野) 52羽を用いた。前投薬として硫酸アトロピン (田辺, 大阪) 0.5mgを筋肉内注射した後、耳介の静脈に点滴路を確保し、ペントバルビタールナトリウム (田辺) 25mg/kgを緩徐に静脈内注射した。実験動物を手術台に仰臥位で固定し、前頸部および前胸腹部を剃毛した。前頸部に気管切開を行い径6mmの気管内挿管チューブを約1.5cm挿入固定し、ハーバード型従量式人工呼吸器SN-480-5 (シナノ, 東京) に接続した。人工呼吸器が接続されると同時に臭化パンクロニウム

平成11年11月26日受付, 平成12年1月6日受理

Abbreviations: FIO<sub>2</sub>, fraction of inspiratory oxygen; HSP, heat shock protein; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IP, ischemic preconditioning; mPAP, mean pulmonary arterial pressure; NO, nitric

プロマイド (日本オルガノン, 東京) 1mg を静脈内投与して非動化し, 調節呼吸を行った. 換気回数は30回/分, 1回換気量は15~20ml/kg (片肺換気時は15ml/kg) に設定した. 術中は吸入酸素濃度 (fraction of inspiratory oxygen,  $FI_{O_2}$ ) を50% ( $FI_{O_2}=0.5$ ) に設定した.

## II. 実験系の作成

### 1. IP効果の検討

動脈血採血用に, カットダウン法にて右大腿動脈を露出し, 24Gハッピーキャス針 (メディキット, 東京) を挿入, 留置した. 前胸部正中に胸骨上端から剣状突起まで皮切を加え, 胸骨後面を剥離後, 胸骨を縦切開した. 開胸器を用い胸壁を左右に開大, メスにて胸膜を切開し開胸した. 左右の肺靭帯を切離後, 左右の肺門に4-0プロレン糸 (エチコン, 東京) を用いてターニケットを回した後, ヘパリンナトリウム (武田, 東京) 200単位/kg を静脈内投与し全身をヘパリン化した. 心膜を切開し心臓を露出し, 肺動脈圧測定用に24Gハッピーキャス針を右心室より挿入して先端を肺動脈幹に留置した. 維持麻酔として塩酸ケタミン (三共, 東京) を10mg/時間で持続点滴静注するとともに, 臭化パンクロニウムプロマイドおよびジアゼパム (田辺) を適宜静脈内投与して麻酔深度を維持した. 一侧のターニケットを遮断する時には, 遮断側の肺が十分に膨らんだ状態で行った. 以上の実験系に対して左肺を虚血の対象とし6群を作成した (図1).

#### 1) 0時間後対照群 (n=6)

左肺門のターニケットを遮断し, 左肺の常温2時間の虚血を開始した. 2時間の虚血終了後左肺門のターニケットを解放し, 左肺の虚脱が改善した時点で右肺のターニケットを遮断, すべての肺循環および換気を左肺のみで行った. 右肺のターニケット遮断後2時間の左肺の再灌流を行い, 再灌流後2時間の時点で実験を終了した.

#### 2) IP後0時間群 (n=6)

左肺門のターニケットを5分間遮断してIPを行った後, 10分間解放した. 以後は対照群と同様に左肺の常温2時間の虚血を

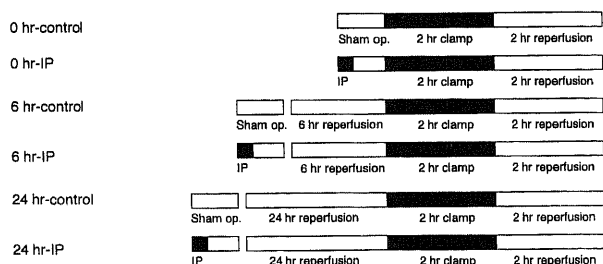


Fig. 1. Time course of the experimental groups. In 0 hr-control group, 2 hr single left lung reperfusion was performed after 2 hr ischemia. In 0 hr-IP group, IP was performed 10 min before the experiment. In 6 hr-control group, sham operation was performed 6 hr before of the experiment. In 6 hr-IP group, IP was performed 6 hr before the experiment. In 24 hr-control group, sham operation was performed 24 hr before the experiment. In 24 hr-IP group, IP was performed 24 hr before the experiment.

行い, その後2時間の左肺のみによる再灌流を行った.

#### 3) 6時間後対照群 (n=6)

左第5肋間にて開胸後, 左肺門に4-0プロレン糸を回してターニケットを留置した. 肺門は遮断せずにターニケットを外し, 閉胸した. ターニケットを留置した6時間後に再開胸して左肺の2時間虚血2時間再灌流を0時間後対照群と同じ方法で行った.

#### 4) IP後6時間群 (n=6)

6時間後対照群と同様に左開胸にて左肺門にターニケットを回し, IPを5分間行い閉胸した. IPの6時間後に再開胸して左肺の2時間虚血2時間再灌流を0時間後対照群と同じ方法で行った.

#### 5) 24時間後対照群 (n=6)

6時間後対照群と同様の実験モデルで, ターニケットを留置した24時間後に再灌流を開始した.

#### 6) IP後24時間群 (n=6)

6時間後対照群と同様に左開胸にて左肺門にターニケットを回し, IPを5分間行い閉胸した. IPの24時間後に再開胸して左肺の2時間虚血2時間再灌流を0時間後対照群と同じ方法で行った.

### 2. HSP72発現の検討

左第5肋間にて開胸し, 4-0プロレン糸を用いて左肺門にターニケットを回した. ヘパリンナトリウム200単位/kgを静脈内投与し全身をヘパリン化した. 左肺門を5分間遮断し, IPを行った. IP後は十分に肺を膨張させてから閉胸した. 気管孔を複製し, 麻酔から覚醒するのを待って気管内挿管チューブを抜去した. IP後0時間, 6時間, 12時間, 24時間, 48時間に左肺を摘出し, HSP72発現の有無を経時的に検討した (各n=3).

### III. 血行動態の測定

実験IIの各群において動脈血酸素分圧 (arterial oxygen pressure,  $Pa_{O_2}$ ), 酸素飽和度 (oxygen saturation,  $Sa_{O_2}$ ), 平均肺動脈圧 (mean pulmonary arterial pressure, mPAP) を測定した.

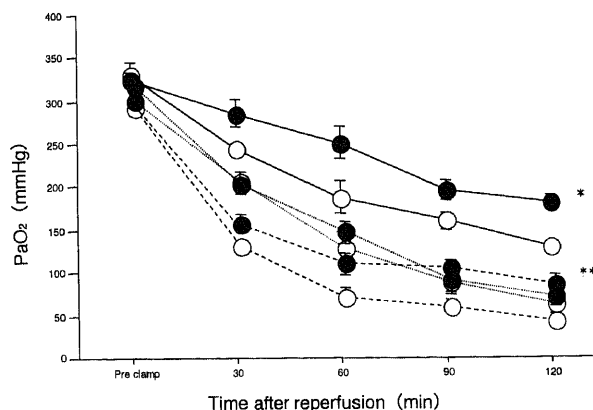


Fig. 2. Changes in  $Pa_{O_2}$  of 0 hr-control group, 0 hr-IP group, 6 hr-control group, 6 hr-IP group, 24 hr-control group and 24 hr-IP group. Each point indicates as  $\bar{x} \pm SD$ . —○—, 0 hr-control group; —●—, 0 hr-IP group; —□—, 6 hr-control group; —■—, 6 hr-IP group; —△—, 24 hr-control group; —▲—, 24 hr-IP group. \*,  $P < 0.05$  VS 0 hr-control group, \*\* $P < 0.05$  VS 24 hr-control group, by repeated measure ANOVA.

oxide;  $Pa_{O_2}$ , arterial oxygen pressure; PKC, protein kinase C; PTP, permeability transition pore;  $Sa_{O_2}$ , oxygen saturation;  $TNF \alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$

測定時間は再灌流開始前, 再灌流開始後30, 60, 90, 120分とした。PaO<sub>2</sub>, SaO<sub>2</sub>の測定は右大腿動脈に挿入したハッピーキャス針から採取した動脈血で行った。mPAPは肺動脈幹に留置したハッピーキャス針をポリグラフシステムRM-6000(日本光電, 東京)に接続して記録した。

#### IV. 病理組織学的検討

実験Ⅱ. 1. の各群において再灌流2時間後に摘出した左肺を, 10%中性緩衝ホルマリン液(武藤化学, 東京)による固定後にパラフィン切片を作製し, HE染色を施行した。好中球の浸潤の程度は, - (なし), + (軽度), ++ (中等度), +++ (高度)の4段階に分類した。肺胞内の水腫, 出血の程度は, - (なし), + (軽度), ++ (中等度), +++ (高度)の4段階に分類して評価した。

#### V. 免疫組織化学染色

実験Ⅱ. 2. において摘出した標本は10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し, パラフィン包埋した後, 4 μm切片を作製した。100%キシレン3回, 各10分間の脱パラフィンを行った後, エタノール中での20回振盪を100%エタノールで3回, 90%, 70%エタノールで各1回施行し親水を行った。水道水にて1分間洗浄後, PBS (pH7.2) に浸した。5%尿素中で500W, 5分間, 3回のマイクロウェーブ処理を行い抗原の賦活を行った。室温まで放置した後, 0.3%過酸化水素水加メタノールにて15分間室温にて内因性ペルオキシダーゼを阻害し, 10分間流水水洗した。ウシ血清アルブミン(ダコジャパン, 京都)にて10分間ブロッキングを行った後, 抗HSP72/73モノクローナル抗体(Oncogene Research Products, Cambridge, USA)をPBSで200

Table 1. Comparisons of pulmonary function

Group	PaO <sub>2</sub> (mmHg)	SaO <sub>2</sub> (%)	mPAP (mmHg)
0 hr-control			
Pre	332±30	99.8±0	14±1.3
30	244±18 *	99.6±0.1	16±0.8
60	188±46 **	99.2±0.6	18±1.6
90	161±26 **	99.0±0.5	20±1.9
120	129±17 **	98.7±0.3	22±3.1
0 hr-IP			
Pre	366±18	99.8±0	14±1.0
30	286±18	99.7±0.1	14±0.8
60	251±47	99.7±0.1	16±1.2
90	196±29 **	99.4±0.2	16±1.5
120	182±21 **	99.4±0.3	18±3.2
6 hr-control			
Pre	301±16	99.8±0	15±0.8
30	221±23	99.6±0.1	16±1.5
60	154±31	98.9±0.8	15±0.8
90	122±31	98.6±0.5	21±3.3
120	99±26	93.2±11.8	25±3.0
6 hr-IP			
Pre	316±13	99.8±0	15±0.8
30	219±26	99.6±0.1	16±0.9
60	171±29	99.1±0.5	17±1.6
90	123±32	98.2±1.5	19±2.7
120	107±28	97.2±1.6	23±2.9
24 hr-control			
Pre	289±8	99.7±0.1	19±2.6
30	148±12 **	98.8±0.3	20±2.4
60	97±24 **	93.1±8.5	21±3.0
90	86±18 **	91.3±10.2	24±3.4
120	71±21 **	81.1±18.6	26±2.9
24 hr-IP			
Pre	297±9	99.8±0	17±1.6
30	171±22	99.3±0.1	18±2.2
60	131±28 **	98.0±1.5	19±1.9
90	126±21 **	98.2±0.7	20±3.0
120	107±24 **	97.8±1.1	21±2.3

0 hr-control, 2 hr single left lung reperfusion was performed after 2 hr ischemia and no treatment was performed; 0 hr-IP, IP was performed from beginning of the experiment; 6 hr-control, sham operation was performed 6 hrs before the experiment; 6 hr-IP, IP was performed 6 hrs before the experiment; 24 hr-control, sham operation was performed 24 hrs before the experiment; 24 hr-IP, IP was performed 24 hrs before the experiment. Pre, before interception of right hilum; 30, 30 min after interception of right hilum; 60, 60 min after interception of right hilum; 120, 120 min after interception of right hilum. Data are shown as  $\bar{x} \pm SD$ . \*P<0.05. \*\*P<0.01 vs data of pre clamp by Scheffes F method after one-factor ANOVA.

倍に希釈し、一晚4℃にて反応させた。次にPBSで5分間3回洗浄し、二次抗体としてアミノ酸ポリマーに、ペルオキシダーゼとFab'にした抗マウスIg(動物種:ヤギ)を結合させたヒストファインシンプルステインPO[M](ニチレイ,東京)を室温で30分間反応させた。PBSにて5分間3回洗浄後、ジアミノベンゼジン(3,3-diaminobenzidine)(和光純薬,東京)にて顕微鏡で発色状態を確認しながら約5分間室温で反応させた。水道水で10分間洗浄した後、マイヤー・ヘマトキシリン(武藤化学)にて1分間核染色を行い、水道水で10分間色出しを行った。次に100%エタノール3回各3分間の脱水を行った後、100%キシレンで3分間の透徹を3回行い、マリノール(武藤化学)にて封入を行った。

染色の陽性コントロールとして、ウサギに亜砒酸ナトリウム(sodium arsenite, Sigma, St. Louis, USA) 8mg/kgを静脈内投与し、8時間後に摘出した左肺を用いた<sup>6)</sup>。

#### VI. 統計学的検討

測定結果は平均値±標準偏差( $\bar{x} \pm SD$ )で表記した。各群の平均値の差の検定には一元配置分散分析法を、多重比較にはScheffeのF検定を用いた。また各群間の検定には重複測定分散分析法を用いた。危険率5%未満をもって有意差ありとした。

### 成 績

#### I. 血行動態

##### 1. PaO<sub>2</sub>

0時間後対照群では再灌流開始後PaO<sub>2</sub>は経時的に減少し、再灌流開始前値に比べて再灌流後30分以降のPaO<sub>2</sub>は有意に低かった( $p < 0.05$ ) (表1)。IP後0時間群でも再灌流開始後PaO<sub>2</sub>は経時的に減少し、再灌流開始後90分以降のPaO<sub>2</sub>は有意に低かった( $p < 0.01$ ) (表1)。全経過を比較してIP後0時間群は0時間後対照群に比べて有意にPaO<sub>2</sub>は高かった( $p < 0.05$ ) (図2)。

6時間後対照群、IP後6時間群ともに再灌流後PaO<sub>2</sub>は経時的に減少した。全経過を比較して両群間に有意差は認めなかった(図2)。また各時間毎の比較でも両群間に有意差は認めなかった。

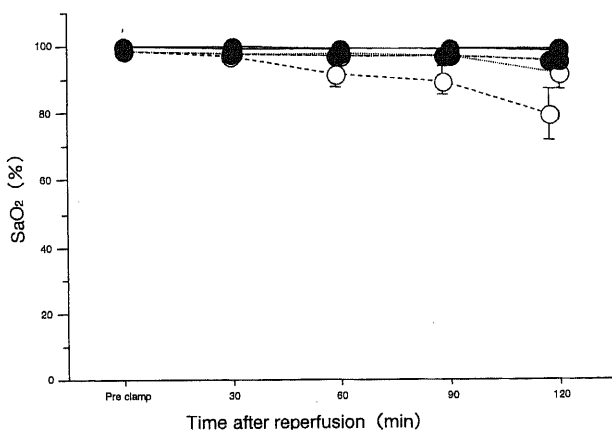


Fig. 3. Changes in SaO<sub>2</sub> of 0 hr-control group and 0 hr-IP group, 6 hr-control group, 6 hr-IP group, 24 hr-control group and 24 hr-IP group. Each point indicates as  $\bar{x} \pm SD$ . —○—, 0 hr-control group; —●—, 0 hr-IP group; —○- - -, 6 hr-control group; —●- - -, 6 hr-IP group; —○· ·, 24 hr-control group; —●· ·, 24 hr-IP group.

24時間後対照群、IP後24時間群ともに再灌流後PaO<sub>2</sub>は経時的に減少した。24時間後対照群では再灌流開始前値に比べて再灌流開始後30分以降のPaO<sub>2</sub>は有意に低かった( $p < 0.01$ ) (表1)。IP後24時間群でも再灌流開始前値に比べて再灌流後30分以降のPaO<sub>2</sub>は有意に低かった( $p < 0.01$ ) (表1)。全経過を比較するとIP後24時間群は24時間後対照群に比べてPaO<sub>2</sub>は有意に高かった( $p < 0.05$ ) (図2)。

##### 2. SaO<sub>2</sub>

0時間後対照群、IP後0時間群ともに経時的に有意なSaO<sub>2</sub>の変動は示さなかった。全経過を比較して両群間に有意差は認めなかった。(図3)。

6時間後対照群、IP後6時間群ともに再灌流後SaO<sub>2</sub>は経時的に減少した。全経過を比較して両群間に有意差は認めなかった(図3)。

24時間後対照群、IP後24時間群ともに再灌流後SaO<sub>2</sub>は経時的に減少した。全経過を比較して両群間に有意差は認めなかった(図3)。

##### 3. mPAP

0時間後対照群、IP後0時間群ともに再灌流開始後mPAPは上昇した。全経過を比較して両群間に有意差は認めなかった(図4)。

6時間後対照群、IP後6時間群ともにmPAPは上昇を示した。全経過を比較して両群間に有意差は認めなかった(図4)。

24時間後対照群、IP後24時間群ともにmPAPは上昇を示した。再灌流後90分、120分においてIP後24時間群は24時間後対照群に比べmPAPは有意に低く( $p < 0.05$ )、全経過を比較してIP後24時間群が24時間後対照群に比べてmPAPが低い傾向を示した( $P=0.617$ ) (図4)。

#### II. 組織学的所見

IP後0時間群では再灌流後2時間で摘出した肺には肺胞隔壁および肺胞内への軽度の好中球の浸潤がみられ、肺胞内への赤血球の浸出、肺水腫も軽度であった(図5B)(表2)。0時間後対照群、6時間後対照群、IP後6時間群、IP後24時間群では肺胞隔壁および肺胞内への中等度の好中球の浸潤がみられ、肺胞内への赤血球の浸出、肺水腫も中等度であった。(図5A, C, D,

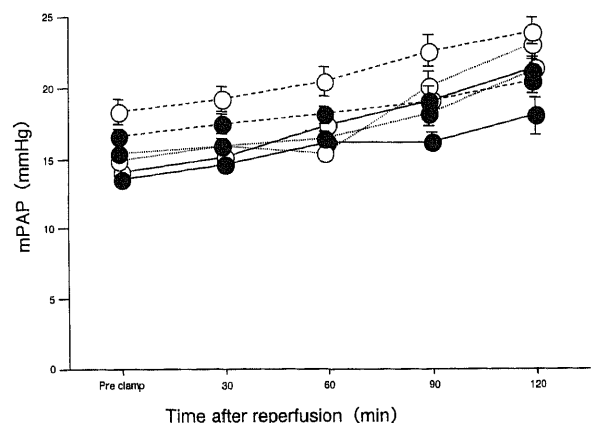


Fig. 4. Changes in mPAP of 0 hr-control group and 0 hr-IP group, 6 hr-control group, 6 hr-IP group, 24 hr-control group and 24 hr-IP group. Each point indicates as  $\bar{x} \pm SD$ . —○—, 0 hr-control group; —●—, 0 hr-IP group; —○- - -, 6 hr-control group; —●- - -, 6 hr-IP group; —○· ·, 24 hr-control group; —●· ·, 24 hr-IP group.

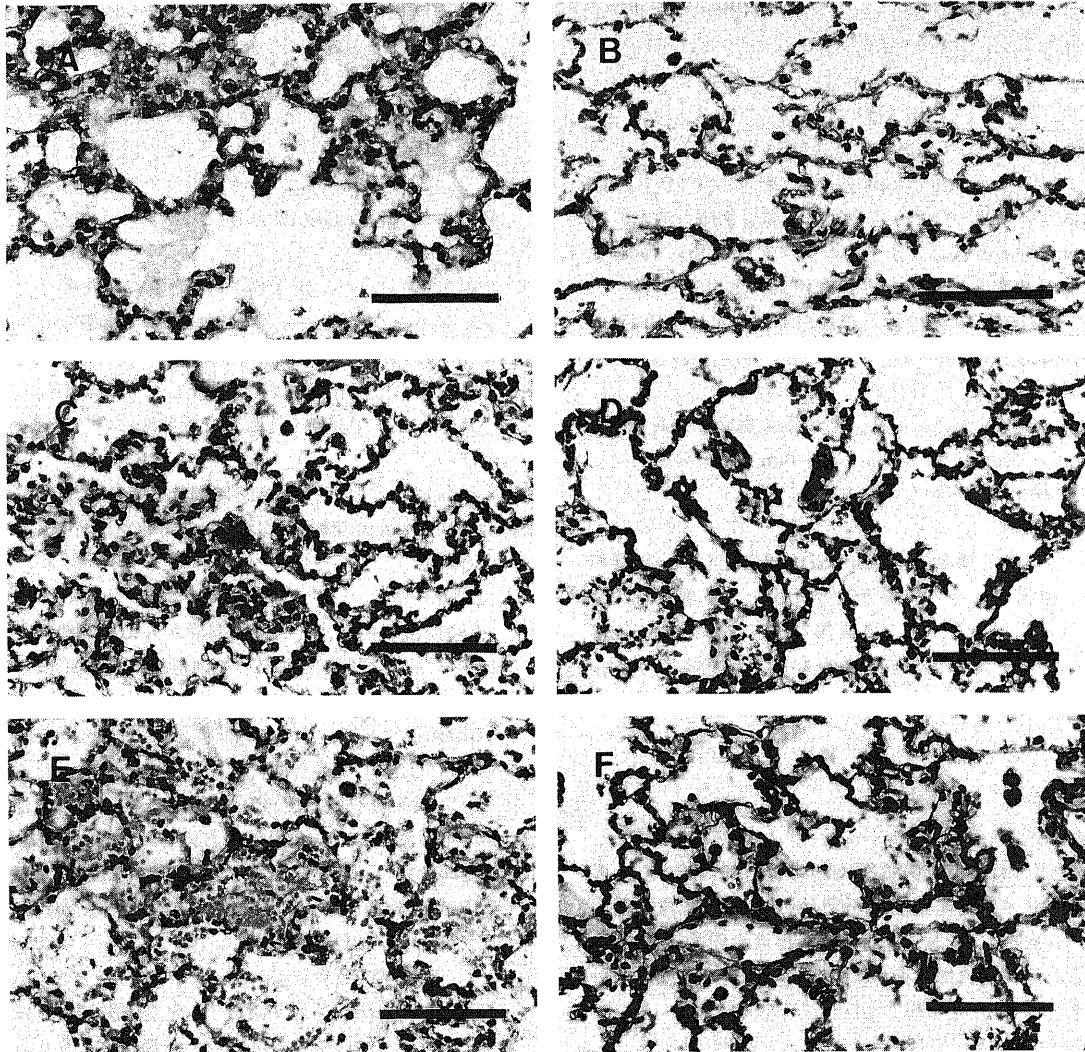


Fig. 5. Histological findings of the rabbit lung stained with hematoxyline and eosin. (A) 0 hr-control group, after 2 hr reperfusion with no treatment. (B) 0 hr-IP group, the experiment performed after IP. (C) 6 hr-control group, the experiment was performed at 6hr after sham operation. (D) 6 hr-IP group, the experiment was performed at 6hr after IP. (E) 24 hr-control group, the experiment was performed at 24hr after sham operation. (F) 24 hr-IP group, the experiment was performed at 24 hr after IP. In (A), The interstitium and intraalveolar septa moderately infiltrated by neutrofiles and moderate edema and hemorrhage are seen in the alveoli. In (B), The interstitium and intraalveolar septa mild infiltrated by neutrofiles and mild edema and hemorrhage are seen in the alveoli. In (C), The interstitium and intraalveolar septa moderately infiltrated by neutrofiles and moderate edema and hemorrhage are seen in the alveoli. In (D), The interstitium and intraalveolar septa moderately infiltrated by neutrofiles and moderate edema and hemorrhage are seen in the alveoli. In (E), The interstitium and intraalveolar septa severe infiltrated by neutrofiles and severe edema and hemorrhage are seen in the alveoli. In (F), The interstitium and intraalveolar septa moderately infiltrated by neutrofiles and moderate edema and hemorrhage are seen in the alveoli. Scale bar indicates 100  $\mu$ m.

Table 2. Histopathological findings of the lung

Group	No. of Rabbits used	Neutrophilic infiltration		Intraalveolar change	
		Interstitium	Alveoli	Edema	Hemorrhage
0 hr-control	6	++	++	++	++
0 hr-IP	6	+	+	+	+
6 hr-control	6	++	++	++	++
6 hr-IP	6	++	++	++	++
24 hr-control	6	+++	+++	+++	+++
24 hr-IP	6	++	++	++	++

0 hr-control, 2 hr single left lung reperfusion was performed after 2 hr ischemia and no treatment was performed; 0 hr-IP, IP was performed 10 min before the experment; 6 hr-control, sham operation was performed 6 hrs before the experiment; 6 hr-IP, IP was performed 6 hrs before the experimet; 24 hr-control, sham operation was performed 24 hrs before the experiment; 24 hr-IP, IP was performed 24 hrs before the experiment.  
 -, nothing; +, mild; ++, moderate; +++, severe.

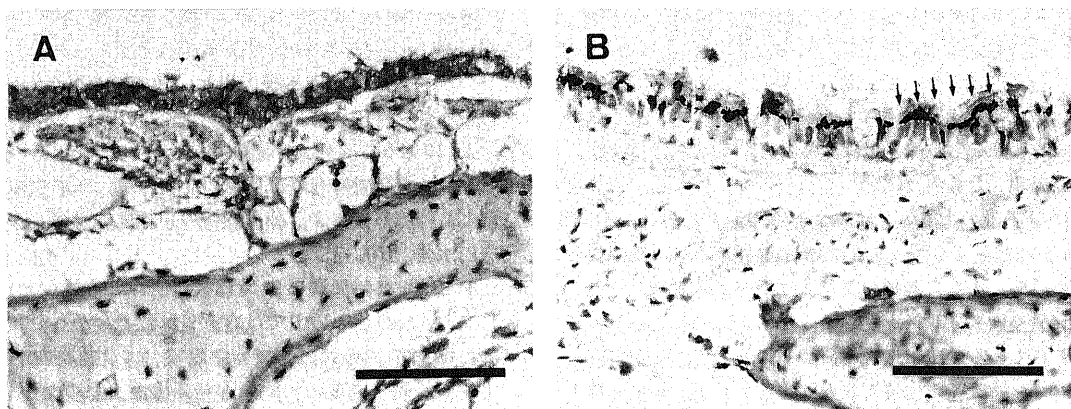


Fig. 6. Immunohistochemical staining of HSP72. (A) the section of the lung from a rabbit 0, 6 hr after IP. (B) the section of the lung from a rabbit 12, 24, 48 hr after IP. (A) HSP72 was not stained. (B) HSP72 was stained in bronchiolar epithelium. Scale bar indicates 100  $\mu$ m.

F) (表2) 24時間後対照群では肺胞隔壁、肺胞内への著明な好中球の浸潤がみられ、肺胞内への赤血球の浸出、肺水腫は高度であった(図5E)(表2)。

### Ⅲ. 免疫組織化学的所見

ウサギ肺の免疫組織染色においてIP後0時間、6時間ではHSP72は染色されなかった(図6A)。IP後12時間、24時間、48時間で気管支上皮の細胞質にHSP72が染色された(図6B)。気管支上皮全体にしめる染色された気管支上皮細胞の割合は、IP後12時間、24時間、48時間で著変はみられなかった。

### 考 察

一時的に虚血に陥った臓器の流入血行が急速に再開され、急激に酸素負荷が加わるにより臓器障害が進展する。これがいわゆる虚血再灌流障害であり、その原因としては、Grangerら<sup>7)</sup>が活性酸素の関与を報告して以来、虚血の解除により供給された酸素とヒポキサンチンを基質として産生される活性酸素が重要視されてきた<sup>8)9)</sup>。しかしBishopら<sup>10)</sup>がキサンチン酸化酵素の阻害剤で再灌流性肺血管障害を抑制できなかったと報告したように、ヒポキサンチン-キサンチン酸化酵素系の関与だけでは肺虚血再灌流障害は説明しえない。

近年、アラキドン酸系により産生される活性酸素<sup>11)</sup>や、NADPHオキシダーゼ反応により好中球が産生する活性酸素の再灌流障害に対する関与<sup>12)13)</sup>が示されている。また、好中球と血管内皮細胞との相互作用により活性化された好中球の活性酸素遊離能の増強<sup>14)15)</sup>や、好中球エラスターゼの分泌による組織障害<sup>16)~18)</sup>が注目されている。一酸化窒素(nitric oxide, NO)も再灌流障害にかかわる重要な因子である。NOは通常、構成一酸化窒素産生酵素(constitutive nitric oxide synthase)によって産生されている<sup>19)20)</sup>。NOは低濃度では肺血管拡張作用や肺気管支拡張作用を示し、肺高血圧や気管支喘息に対して極めて有用であるが<sup>21)</sup>、大量に産生されるとスーパーオキシドアニオンと反応してパーオキシ亜硝酸塩を産生し細胞を強く障害する<sup>22)23)</sup>。再灌流障害においては活性化した炎症性細胞より誘導されるインターロイキン $1\beta$ (interleukin- $1\beta$ , IL- $1\beta$ )、腫瘍壊死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF  $\alpha$ )、インターフェロン $\gamma$ (interferon  $\gamma$ )によって誘導一酸化窒素産生酵素(inducible nitric oxide synthase, iNOS)が誘導され<sup>24)</sup>、このiNOSが大量のNOを産生する。

上述の機序による虚血再灌流障害に対して、心筋を中心にIPの有効性が報告されている<sup>25)~27)</sup>。IPによる急性期の虚血耐性の獲得の機序としてIPによるアデノシン産生の亢進がある<sup>28)</sup>。虚血組織においてはATPの効率的な再合成が阻害されAMPが蓄積しやすくなり、その結果アデノシンが増加する。アデノシンはアデノシン $A_1$ 受容体を刺激してGi蛋白を活性化することによりホスホリパーゼCを活性化し、プロテインキナーゼC(protein kinase C, PKC)を活性化する。PKC活性化によってミトコンドリアATP感受性 $K^+$ ( $K_{ATP}$ )チャンネル、アデノシン産生酵素がリン酸化される。アデノシン産生酵素によって産生されたアデノシンは、またアデノシン $A_1$ 受容体を刺激して一連の反応を促進する<sup>29)~31)</sup>。ミトコンドリア $K_{ATP}$ チャンネルがリン酸化され開口するとミトコンドリア基質内に $K^+$ が流入し、その結果膜電位が低下して電位依存性の $Ca^{++}$ の流入が抑制される。 $Ca^{++}$ の流入が抑制されず大量の $Ca^{++}$ が流入した場合にはミトコンドリア内膜上のパーミアビリティランジション孔(permeability transition pore, PTP)の開口を誘導し<sup>32)33)</sup>、開口部より細胞質内のATPがミトコンドリア基質内に流入する。流入したATPがミトコンドリアATPaseにより分解され、細胞死をもたらす。ミトコンドリア $K_{ATP}$ チャンネルの開口は、PTPの開口を抑制することにより細胞内のATP枯渇を防ぎ保護効果をおよぼすものと思われる<sup>34)</sup>。さらにアデノシンは $A_2$ 受容体を介して活性化好中球の活性酸素産生抑制作用も有している<sup>35)</sup>。活性酸素を消去するスーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase)のIP急性期での産生も報告されている<sup>36)</sup>。本研究では肺虚血再灌流障害における急性期IPの効果を検討したが、0時間後対照群に対しIP後0時間群は $PaO_2$ が有意に高く、心筋において認めた急性期のIP効果が肺においても存在することが示唆された。病理組織学的にも好中球の浸潤、肺水腫、肺胞内出血が0時間後対照群で中等度であったのに対し、IP後0時間群では軽度であり、IPによる急性期の保護効果が確認された。

また心筋においてIPには急性期効果に加え、24時間後に再び効果が出現する後期効果が存在し、これにはHSPの関与が考えられている<sup>5)</sup>。本研究ではIP後6時間群と6時間後対照群との比較で $PaO_2$ に有意差はなく、急性期に認めたIP効果の消失がみられた。IP後24時間群と24時間後対照群との比較ではIP後24時間群で再灌流後の $PaO_2$ が有意に高く、また病理組織

学的検討でもIP後24時間群に比べ24時間後対照群で肺胞隔壁、肺胞腔への著明な好中球の浸潤と高度の肺水腫、肺胞内出血がみられた。肺においても急性期に認めたIP効果が一旦消失し、24時間後に再び出現することを確認した。また、免疫組織化学染色にてもIP後6時間までは認められなかったHSP72がIP効果が再び出現したIP後24時間で認められた。

HSPはその分子量の大きさによって分類されており、8kDaから110kDaまで存在する<sup>37)</sup>。現在ではHSPはストレス蛋白質と称され、重金属、虚血、各種の薬剤、グルコース飢餓、ウイルス感染など種々のストレスを受けることによって産生されることが報告されている。HSPは正常組織にもわずかながら存在し、シャペロンとして蛋白質の成熟、すなわち正しい三次構造や四次構造の形成と共に蛋白質の細胞内輸送に関与している<sup>38)39)</sup>。ストレスを受けた際には異常蛋白や変性蛋白が生成されて構造変化を起こし、蛋白質分子内部に隠されていた疎水性アミノ酸残基が分子表面に露出する。それらが結合し蛋白同士が凝集しようとするが、ストレスによって誘導されたHSPは疎水性アミノ酸残基に結合し、その凝集を抑え、また蛋白の構造を正常に戻して再生するように働く<sup>40)</sup>。虚血再灌流時に誘導されるHSPは分子量72kDaのHSP72であり<sup>41)42)</sup>、これが障害された細胞や組織を修復すると考えられている<sup>43)</sup>。

HSPによる臓器保護効果には他にもいくつかの機序が考えられる。IPに代表されるようなストレスが細胞にかかる時、HSPが優先的に産生され、他の蛋白の産生は抑制される<sup>44)~51)</sup>。ストレスのかかった肺胞上皮細胞では、呼吸機能に不可欠なサーファクタント蛋白AおよびBの発現は阻害されずにiNOSの発現が阻害されたとの報告がある<sup>52)</sup>。またプラスミドにより遺伝子を転移させHSP72を過剰発現させるとiNOSの発現が阻害されたとの報告もある<sup>47)</sup>。IPでHSP72が産生されることによりiNOSの産生が抑制され、その結果大量のNOの産生が回避され、臓器保護効果が発揮されている可能性もある。

また、HSPによるサイトカインの調節機構も報告されている。内皮細胞との相互作用で活性化し血管外へ浸潤した好中球は肺水腫、肺胞内出血を引き起こし、肺の非換気領域を生じさせるなど、肺虚血再灌流障害において重要な役割を演じている。好中球と内皮細胞との相互作用にはTNF $\alpha$ などのサイトカインが関与している<sup>53)14)15)</sup>。HSPのプロモーター領域に存在する熱ショックエレメント(heat shock element)に特異的に結合し転写を調節している熱ショック転写因子(heat shock factor)遺伝子をプラスミドによって導入し発現を増加させると、プロインターロイキン-1 $\beta$ の遺伝子が抑制されたとの報告がある<sup>54)</sup>。またHSP72が細胞内のTNF $\alpha$ と結合しその放出を妨げるとの報告<sup>55)</sup>もあり、IPによるHSP72の発現がサイトカインの制御を介して虚血再灌流障害を抑制していると考えられる<sup>37)</sup>。

## 結 論

ウサギ肺虚血再灌流モデルを作製し、IPの虚血再灌流障害の抑制効果とHSP72の関与を検討した。IPを行わない0時間後対照群、6時間後対照群、24時間後対照群と、IPを行ったIP後0時間群、IP後6時間群、IP後24時間群の6群を作成し、血行動態、病理組織学的観点から検討を加えた。またIP後、0時間、6時間、12時間、24時間、48時間で摘出した肺を用いて免疫組織学的にHSP72の発現を検討し、以下の結果を得た。

1. IP後0時間群は0時間後対照群と比較してPaO<sub>2</sub>、が有意

に高く、SaO<sub>2</sub>、mPAPでは両群間に有意差は認めなかった。病理組織学的にはIP後0時間群で肺胞隔壁および肺胞内への好中球の浸潤と、肺胞内水腫、出血が軽度であったものが、0時間後対照群では中等度であった。

2. IP後6時間群と6時間後対照群を比較してPaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>、mPAPは両群間に有意差は認めなかった。病理組織学的には両群とも肺胞隔壁および肺胞内への中等度の浸潤と、中等度の肺胞内水腫、出血を認めた。

3. IP後24時間群は24時間後対照群と比較してPaO<sub>2</sub>が有意に高く、SaO<sub>2</sub>、mPAPでは有意差は認めなかった。病理組織学的には24時間後対照群で肺胞隔壁および肺胞内への著明な好中球の浸潤と高度の肺胞内水腫、出血を認めたが、IP後24時間群では肺胞隔壁、肺胞内への好中球の浸潤および肺胞内水腫、出血は中等度のものだった。

4. 免疫組織学的検討ではIP後0時間、6時間でHSP72が染色されず、IP後12時間、24時間、48時間では染色された。

以上の結果より、肺虚血再灌流障害においては急性期のIP効果と後期のIP効果が存在し、後期のIP効果にはHSP72が関与していることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なる御指導、御校閲を賜りました渡邊洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。また、病理学的検討に際し御助言、御指導を賜りました第一病理学教室中西功夫教授、今井美和博士に心からの感謝の意を表します。さらに実験の御指導、御教示を賜りました小田誠講師に心からの感謝の意を表します。併せて本研究にご協力いただきました外科学第一講座各位、病理標本作製にご協力を惜しまれなかった田中洋子氏に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Murry CE, Jennings RB. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136, 1986
- 2) Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 128: 251-258, 1996
- 3) Tsuruma T, Yagihashi A, Matsuno T, Zou XM, Asanuma K, Sasaki K, Hirata K. The heat-shock protein 70 family reduces ischemia/reperfusion injury in small intestine. *Transplant Proc* 28: 2629-2630, 1996
- 4) Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 72: 1293, 1993
- 5) Marber MS, Latchman DS, Walker JM. Cardiac stress protein elevation 24 hr after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88: 1264, 1993
- 6) Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS. Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. *Crit Care Med* 22: 922-929, 1994
- 7) Granger DN, Rutigli G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81: 22-29, 1981
- 8) Tate RM, Vanbenthuyzen KM, Shasby DM, McMurtry IF,



- Repine JE. Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 126: 802-806, 1982
- 9) McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985
- 10) Bishop MJ, Kowalski TF, Guidotti SM, Harlan JM. Lung reperfusion in dogs causes bilateral lung injury. *J Appl Physiol* 63: 942-950, 1987
- 11) 藤田 直, 藤本陽子. アラキドン酸カスケードとラジカル過酸化反応. *日臨* 46: 2155-2160, 1988
- 12) Bando K, Pillali R, Cameron DE, Brawn JD, Winkelstein JA, Hutchins GM, Reitz BA, Baumgartner WA. Leukocyte depletion ameliorates free radical-mediated lung injury after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 99: 873-877, 1990
- 13) Shasby DM, Vanbenthuyzen KM, Tate RM, Shasby SS, McMurry I, Repine JE. Granulocytes mediate acute edematous lung injury in rabbits and in isolated rabbit lungs perfused with phorbol myristate acetate: Role of oxygen radicals. *Am Rev Respir Dis* 125: 443-447, 1982
- 14) Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992
- 15) Fuortes M, Jin WW, Nathan C. Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 120: 777-784, 1993
- 16) Weiss SJ, Curnutte JT, Regiani S. Neutrophil-mediated solubilization of the subendothelial matrix: Oxidative and nonoxidative mechanisms of proteolysis used by normal and chronic granulomatous disease phagocytes. *J Immunol* 136: 636-641, 1986
- 17) Cochrane CG, Spragg R, Revak SD. Pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome; Evidence of oxidant activity in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Invest* 71: 754-761, 1983
- 18) 小川道雄. ARDSのメカニズム. *Mebio* 7: 18-26, 1990
- 19) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-41, 1991
- 20) Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-64, 1992
- 21) Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 48: 1034-1043, 1993
- 22) Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 258: 1898-902, 1992
- 23) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-4, 1990
- 24) Nakayama DK, Geller DA, Lowenstein CJ, Davies P, Pitt BR, Simmons RL, Timothy RB. Cytokines and lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 471-6, 1992
- 25) Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation* 84: 341-349, 1991
- 26) Schot RJ, Rohmann S, Braun E, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 66: 1133-1142, 1990
- 27) Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* 263: 1107-1112, 1992
- 28) Lin GS, Thornton J, Winkle DK. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84: 350-356, 1991
- 29) Kitakaze M, Hori M, Tamai J.  $\alpha$  1-Adrenoreceptor activity regulates release of adenosine from the ischemic myocardium in dogs. *Circ Res* 60: 631-639, 1987
- 30) Kitakaze M, Hori M, Sato H. Beneficial effects of  $\alpha$  1-Adrenoreceptor activity on myocardial stunning in dogs. *Circ Res* 68: 1322-1339, 1991
- 31) Kitakaze M, Hori M, Morioka M.  $\alpha$  1-Adrenoreceptor activation increases ecto-5-nucleotidase activity and adenosine release in rat cardiomyocytes by activating protein kinase C. *Circulation* 91 : 2226-2234, 1995
- 32) Bernardi P, Petronilli V. The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 28: 131, 1996
- 33) Kroemer G, Zamzami N, Susin S. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 44: 43, 1997
- 34) 三浦哲嗣, 三木隆幸. Ischemic preconditioningとKATP channel. *循環器科* 45: 328-333, 1999
- 35) Hori M, Kitakaze M. Adenosine, the heart, and coronary circulation (Brief review) . *Hypertension* 18: 565-574, 1991
- 36) Li G, Chen E, Lu E, Hu T. Protective effects of ischemic preconditioning on lung ischemia reperfusion injury: an in-vivo rabbit study. *Thorac Cardiovasc Surg* 47: 38-41, 1999
- 37) Wong HR, Jonathan RW. The stress response and the lung. *Am J Physiol* 273: L1-L9, 1997
- 38) Ang D, Liberek K, Skowrya D, Zylicz M, Georgopoulos. Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J Biol Chem* 266: 24233-24236, 1991
- 39) Neupert W, Hartl FU, Craig EA, Pfanner N. How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? *Cell* 63: 447-450, 1990
- 40) Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* 66: 191-197, 1991
- 41) Minowada G, Welch WJ. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 95: 3-12, 1995
- 42) Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063-1081, 1992
- 43) 中井 彰. ストレス蛋白質の機能と構造. ストレス蛋白質-基礎と臨床 (永田和宏編), 第1版, 100-114頁, 中外医学社, 東京, 1994
- 44) Buchman T, Cabin E. Molecular biology of circulatory shock III: HepG 2 cells demonstrate two patterns of shock-induced gene expression which are independent, exclusive, and prioritized. *Surgery* 108: 902-911, 1990
- 45) deVera ME, Kim YM, Wong HR, Wang Q, Billiar TR, Geller DA. Heat shock inhibits cytokine-inducible nitric oxide synthase

- expression in rat hepatocytes. *Hepatology* 24: 1238-1245, 1996
- 46) deVera ME, Wong JM, Zhou JY, Tzeng E, Wong HR, Billiar TR, Geller DA. Cytokine-induced nitric oxide synthase gene transcription is blocked by the heat shock response in human liver cells. *Surgery* 120: 144-149, 1996
- 47) Feinstein DL, Galea E, Aquino DA, Li GC, Xu H, Reis DJ. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric oxide synthase expression by decreasing NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 271: 17224-17232, 1996
- 48) Schmidt JA, Abdulla E. Down-regulation of IL-1 $\beta$  biosynthesis by inducers of the heat-shock response. *J Immunol* 141: 2027-2034, 1988
- 49) Schoeniger LO, Reilly PM, Bulkey GB, Buchman TG. Heat-shock gene expression excludes hepatic acute phase gene expression after resuscitation from hemorrhagic shock. *Surgery* 112: 355-363, 1992
- 50) Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Kronis C, Luger TA, Schwarz T. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. *J Clin Invest* 95: 926-933, 1995
- 51) Snyder YL, Guthrie L, Evans GF, Zuckerman S. Transcriptional inhibition of endotoxin-induced monokine synthesis following heat shock in murine peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 51: 181-187, 1992
- 52) Wong HR, Ryan M, Gebb S, Wispe JR. Selective and transient in vitro effects of heat shock on alveolar type II cell gene expression. *Am J Physiol* 272: L132-L138, 1997
- 53) 山口 康雄, 小川 道雄. 虚血再灌流障害における好中球と血管内皮細胞の interaction. *日外会誌* 100: 319-324, 1999
- 54) Cahil CM, Waterman WR, Xie Y, Auron PE, Calderwood SK. Transcriptional repression of the prointerleukin-1 $\beta$  gene by heat shock factor 1. *J Biol Chem* 271: 24874-24879, 1996
- 55) Ribeiro SP, Villar J, Downey GP, Edelson JD, Slutsky AS. Effects of the stress response in septic rats and LPS-stimulated alveolar macrophages: evidence for TNF- $\alpha$  posttranslational regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 1843-1850, 1996

**Effects of Ischemic Preconditioning in Ischemia-Reperfusion Injury In Rabbit Lung** Koichi Nakada, Department of Surgery (1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, 109, 2 — 10 (2000)

**Key words** ischemia-reperfusion injury, ischemic preconditioning, heat shock protein, lung transplantation

#### Abstract

Ischemia-reperfusion injury remains a significant problem in lung transplantation. In the first study, to determine the effects of ischemic preconditioning in ischemia-reperfusion injury of the lung, 36 rabbits were divided into 6 groups: 2 hr of single left reperfusion followed by 2 hr of ischemia (0 hr-control group, n=6); preconditioning with 5 min of occlusion and 10 min of reperfusion of the left hilum (IP) and followed by the experiment as described above (0 hr-IP group, n=6); the experiment was performed 6 hr after a sham operation (6 hr-control group, n=6); the experiment was performed 6 hr after IP (6 hr-IP group, n=6); the experiment was performed 24 hr after a sham operation (24 hr-control group, n=6); the experiment was performed 24 hr after IP (24 hr-IP group, n=6). The 0 hr-IP group showed significantly higher arterial oxygen pressure (PaO<sub>2</sub>) compared to the 0 hr-control group. The 24 hr-IP group showed significantly higher PaO<sub>2</sub> compared to the 24 hr-control group. Histopathological features of the 0 hr-control group revealed moderate infiltration by neutrophils into the interstitium and the intraalveolar septa, moderate pulmonary edema, and hemorrhage in the alveoli. Histopathological features of the 0 hr-IP group revealed decreases in neutrophil infiltration, pulmonary edema, and intraalveolar hemorrhage, compared with the 0 hr-control group. Histopathological features of the 24 hr-control group revealed diffuse infiltration by neutrophils into the interstitium and the intraalveolar septa, severe pulmonary edema and hemorrhage in the alveoli. Histopathological features of the 24 hr-IP group revealed decreases in neutrophil infiltration, pulmonary edema, and intraalveolar hemorrhage, compared with the 24 hr-control group. In the second study, rabbits underwent IP and then were sacrificed 0, 6, 12, 24, 48 hr after IP. Positive immuno-reactivity of HSP72 was observed in the bronchiolar epithelium as early as 12 hours after IP, and persisted for up to 48 hr. These results suggest that IP improves lung function in the rabbit lung ischemia-reperfusion model, IP has two effective phases, the acute and late phases, and the late phase of IP is associated with HSP72.