

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19983

研究課題名(和文)肺切除術後の残存肺に生じる潜在的肺損傷が間質性肺炎を悪化させる

研究課題名(英文)Occult injury in the residual lung after pneumonectomy

研究代表者

大岩 加奈(OIWA, Kana)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：30548045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ビーグル犬で左肺全摘術を施行し、マイクロサンプリング法を用いて残存右肺から気道上皮被覆液(ELF)を採取した。ELF中のTNF-alpha濃度はbaselineでは検出限界以下であったが、切除後5時間までに $214 \pm 11$  pg/mlの濃度上昇を認めた。IL-1betaはbaselineでは $864 \pm 142$  pg/mlであったが、 $2928 \pm 1447$  pg/mlまでの上昇を認めた。IFN-gammaはbaselineでは $310 \pm 142$  pg/mlで、 $689 \pm 384$  pg/mlまでの上昇を認めた。イヌ肺切除モデルでも残存肺の潜在的肺損傷occult lung injuryの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously determined the impact of pneumonectomy with respect to injury in the remaining lung using a murine model. In the present study, we investigated the profiles of inflammatory mediators on a canine pneumonectomy model. Animals received left pneumonectomy under general anesthesia. Epithelial lining fluid (ELF) was collected in the residual right lungs by microsampling technique up to 5 hours after pneumonectomy. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha concentration in ELF was lower than detection limit in the baseline, but increased to  $214 \pm 11$  pg/ml after pneumonectomy. Interleukin (IL)-1 beta concentration was  $864 \pm 142$  pg/ml in the baseline, but also increased to  $2928 \pm 1447$  pg/ml. Interferon (IFN)-gamma concentration was  $310 \pm 142$  pg/ml in the baseline, but increased to  $689 \pm 384$  pg/ml. It was suggested pneumonectomy itself may cause occult lung injury in the canine model. TNF-alpha, IL-1 beta, and IFN-gamma might be involved in the pathogenesis of the occult lung injury.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺切除 肺癌 間質性肺炎

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は肺癌を中心とする悪性肺腫瘍の外科的治療に従事しているが、術後の感染性肺炎や間質性肺炎の急性増悪で患者を失うことを経験した。肺葉切除や肺全摘術などの後、最も頻度が高い合併症は残存肺に生じる急性肺損傷である(Dulu A. Chest. 2006)。肺切除患者は感染性肺炎が通常の肺炎に比べて悪化しやすく致命的となる率が高い。術後は肺機能が低下しているためと解釈されるが、肺炎を重篤化させ、急性肺損傷やARDSに陥らせる機序は不明である。

一方、術前に間質性肺炎を合併する肺癌患者に肺切除術を施行すると間質性肺炎の急性増悪を来すことがある(Kumar P. et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003)。麻酔や人工呼吸器管理、酸素投与を含めた手術侵襲により増悪すると考えられているが、メカニズムは不明であり、有効な治療法もないため致命的となることが多い。

肺炎などによる急性肺損傷 Acute Lung Injury(ALI)の本態は種々のサイトカイン産生と肺への炎症細胞の集積、そして肺血管透過性の亢進と浮腫である。肺切除術後に血液中の種々のサイトカイン濃度が上昇し、炎症細胞数も増加していることは知られているが、残存肺に生じる変化をALIの観点から詳しく評価、検討した研究は少ない。これまでに研究代表者らのグループではマウス左肺全摘術モデルを作成し、術後残存肺に生じる変化について次のことを明らかにしている。

(1) 肺切除術後の残存肺には炎症細胞が集積し IFN- $\gamma$  や IL-12、high mobility group box 1 protein (HMGB1)などの炎症メディエーター濃度も上昇する。肺血管透過性の亢進と肺浮腫が生じている(図1,2)。(Kakizaki T, Kohno M et al. Exacerbation of bleomycin-induced injury and fibrosis by pneumonectomy

in the residual lung of mice. *J Surg Res.* 2009)

- (2) 残存肺にエンドトキシンが加わると肺切除しないマウスと比較して、肺胞洗浄液中の炎症性サイトカインの濃度が上昇し肺損傷が増悪する。(Tajima A, Kohno M et al. Occult injury in the residual lung after pneumonectomy in mice. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2008)
- (3) 肺全摘後のマウスは傷害を加えなければ数時間後には回復し、長期生存して肺損傷が顕在化することはないので、この肺の変化を潜在的肺損傷 occult lung injuryと呼ぶことにした。しかし、傷害を生じさせるエンドトキシンやブレオマイシンなどが加わると炎症反応が増幅して肺損傷が増悪するのである。つまり肺切除術後の残存肺には肺損傷の予備段階といえる状態が既に存在している。この潜在的肺損傷が残存肺へ及ぼされた外科的侵襲の本態と考えられ、残存肺の過膨張や肺血管床の減少がトリガーの一つではないかと考えている(Tajima A, Kohno M et al. *ICVTS.*2008)。
- (4) 肺切除術後の残存肺にブレオマイシンを加えると、肺切除していない群と比較して、急性期の肺損傷が悪化し、その後の肺線維化も有意に悪化する。(Kakizaki T, Kohno M et al. *J Surg Res.* 2009)

一方、マイクロサンプリングプローブ(オリンパス)はワイヤの先端に長さ30mm、直径1.1mmのポリエチレン製ファイバースティックが付いており、約20 $\mu$ Lの水分を吸収できる。これらがプラスチック製のチューブシースに入っており、気管支鏡下で末梢気管支に到達したところで、先端からプローブを出して、気道上皮被覆液 epithelial lining fluid

(ELF)を回収することが出来る。ELF中の各種サイトカインやメディエーターなどを測定することにより、肺損傷や呼吸器感染を評価できる。イヌを用いて肺切除術を行い、その後、レシピエントにおいてマイクロサンプリング法を用いて気道上皮被覆液を採取し、解析することで遺残肺中のサイトカインプロファイルの変化が明らかとなる。

## 2. 研究の目的

肺切除術後の残存肺に生じる潜在性肺損傷 Occult lung injury は、頻度の高い感染性肺炎などの重篤化と、致死率が最も高いにもかかわらず病態解明の糸口さえつかめていない肺癌術後の間質性肺炎急性増悪の発症機序に関与している可能性がある。これまでのマウスモデルから発展させ、より臨床に即した中型動物で実験を行い、occult lung injuryの検証と病態解明を行った。将来、肺癌術後の急性肺損傷や間質性肺炎の急性増悪に対する予防法や治療法を見出し、肺切除をさらに安全に施行できるようにすることが、最終目的である。

## 3. 研究の方法

中型動物(ビーグル犬、雄性、10kg)を使用した。手術は全身麻酔、人工呼吸器による調節呼吸下に行う(麻酔導入:メドミジン 20 $\mu$ g/kg + ミダゾラム 0.3mg/kg im., 挿管操作:プロポフォル 3 ~ 10 mg/kg + エスラックス 0.6mg/kg iv., 麻酔維持:酸素 1/2、笑気 1/2、セボフルレン 0.5 ~ 3%)。右大腿動静脈より動脈ラインとスワンガンツカテーテルを挿入する。左開胸し左肺動脈、左肺静脈、左主気管支を順に切断し、左肺を摘出する。人工呼吸器の設定は FiO<sub>2</sub> 40%、一回換気量 7 ~ 9ml、換気回数 12/分、PEEP 5cm/H<sub>2</sub>O で維持する。人工呼吸器誘発肺損傷 ventilator-induced lung injury (VILI)の影響を減らすため、肺切除術後は一回換気量を減量し、気道内圧のピーク値は 15cm/H<sub>2</sub>O 以

下とする。挿管からすべての手技が終了するまでの人工呼吸管理の時間はすべての群で 60 分とする。肺切除前および切除直後から 1 時間ごとに 5 時間まで右肺にて経気管支マイクロサンプリング法を用いて、気道上皮被覆液を採取する。急性期実験では全身麻酔を維持したまま、1 時間ごとに 5 時間までデータ採取を行った後、動物を安楽殺処分する。残存肺に生じる変化を肺損傷の観点から評価し、潜在的肺損傷 occult lung injury の存在を検証する。非侵襲的な経気管支マイクロサンプリング法を用いて呼気凝縮液を採取し、サイトカインを測定する。肺切除に特異的な炎症メディエータープロファイルを明らかにする。

BAL 中及び ELF 中の TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IFN-gamma 等を含むサイトカインを ELISA で経時的に測定する。

## 4. 研究成果

ビーグル犬に対して全身麻酔下に左肺全摘術を施行し、マイクロサンプリング法を用いて残存右肺の末梢気管支から気道上皮被覆液(Epithelial lining fluid; ELF)を採取した。肺切除後 5 時間まで経時的に採取し、種々の炎症性サイトカイン濃度を測定した。ELF 中の TNF-alpha 濃度は baseline では検出限界以下であったが、切除後 5 時間までに残存対側肺で 214  $\pm$  11 (mean  $\pm$  SD) pg/ml の濃度上昇を認めた。

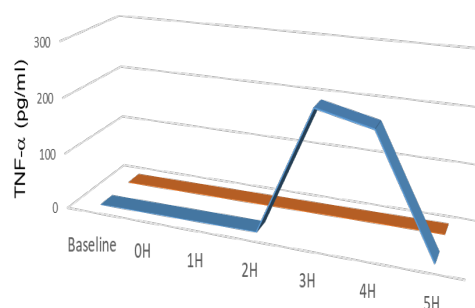


図1 肺切除後、残存肺で採取した気道上皮被覆液中(ELF)中、Tumor necrosis factor (TNF)-alphaの経時的濃度変化

IL-1beta は baseline では 864  $\pm$  142 pg/ml

であったものが、 $2928 \pm 1447$  pg/ml までの上昇を認めた。

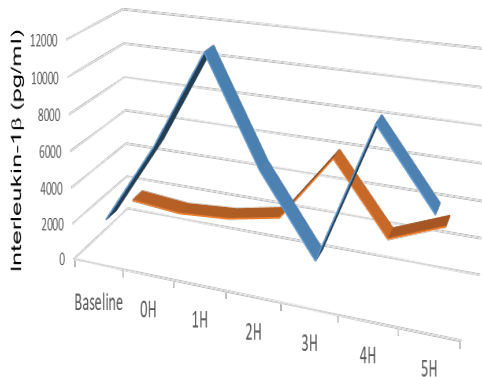


図2 肺切除後、残存肺で採取した気道上皮被覆液中(ELF)中、Interleukin-1betaの経時的濃度変化

IFN-gamma は baseline では  $310 \pm 142$  pg/ml で、 $689 \pm 384$  pg/ml までの上昇を認めた。

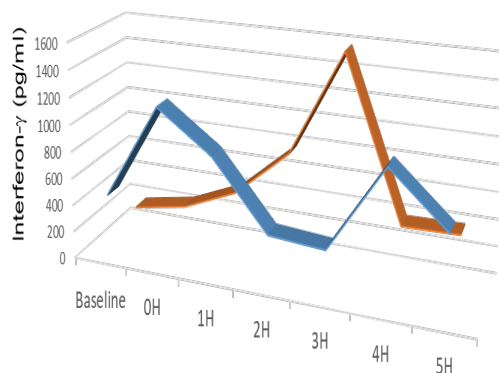


図3 肺切除後、残存肺で採取した気道上皮被覆液中(ELF)中、Interferon-gammaの経時的濃度変化

また、IL-6 は baseline は  $20 \pm 20$  pg/ml で切除後は  $32 \pm 24$  pg/ml であった。

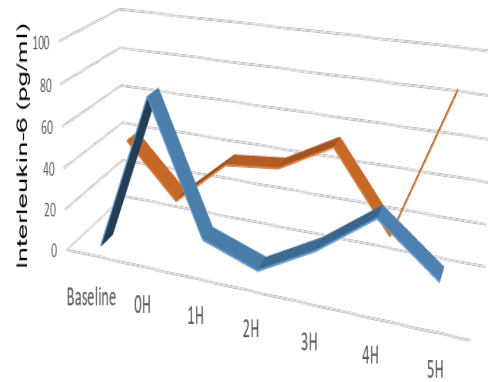


図4 肺切除後、残存肺で採取した気道上皮被覆液中(ELF)中、Interleukin-6の経時的濃度変化

一方、肺切除前後で行った気管支肺胞洗浄液中の種々のサイトカイン濃度は表1のようであった。洗浄液で希釈されるため、それぞれの濃度は ELF 中の濃度の 100 分の 1 から 10 分の 1 であり、肺切除前後で有意な変化を認めなかった。マイクロサンプリング法で採取された ELF 中のサイトカイン解析の方が肺内の変化をより鋭敏に反映していると考えられた。

表1 .イヌ肺切除モデルにおける残存肺の気管支肺胞洗浄(BAL)液中の炎症性サイトカイン濃度

Cytokines	pg/mL	
	ベースライン	肺切除後
TNF- $\alpha$	$0.90 \pm 1.51$	$0.80 \pm 1.12$
IL-1 $\beta$	$5.4 \pm 6.3$	$154 \pm 196$
IL-6	$0.0 \pm 0.0$	$0.16 \pm 0.19$
IFN- $\gamma$	$0.19 \pm 0.25$	$0.47 \pm 0.39$

イヌ肺切除モデルでは、肺切除後の残存肺に TNF-alpha、IL-1 beta、IFN-gamma が産生され、occult lung injury の存在が示唆された。

中型動物(ビーグル犬)でも肺切除術後の残存肺に顕在化しない肺損傷 occult lung injury が存在し、肺炎の悪化や間質性肺炎の

急性増悪に関与していることが示唆された。気道から非侵襲的に得られる気道上皮被覆液の解析で、TNF-alpha 等の炎症性サイトカインの濃度上昇が確認された。メカニズムの解明により、感染性肺炎の重篤化や間質性肺炎の急性増悪に対する予防法や治療法を導き出す手がかりとなることが期待される。呼吸器外科領域で最大の問題の1つである“間質性肺炎の術後急性増悪”を解明する糸口が見つかる可能性がある。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大岩 加奈 (OIWA, Kana)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：30548045

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

岩崎正之 (IWAZAKI, Masayuki)

東海大学・医学部・教授

河野光智 (KOHNO, Mitsutomo)

東海大学・医学部・准教授