

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17390481

研究課題名（和文） 肺の虚血・再環流障害の機序解明とその治療・予防策の開発

研究課題名（英文） Elucidation of the mechanism of ischemia/reperfusion injury of the lung and development of preventive and therapeutic maneuvers

研究代表者

今井 孝祐（IMAI TAKASUKE）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60091964

## 研究成果の概要：

片側肺を虚血、対側肺をコントロールとして用いることのできる遊離環流肺標本の確立、本モデルを用いて正常組織酸素、炭酸ガス分圧下で虚血傷害が oxygen radicals, TNF- $\alpha$  の産生により起こることを実証した。さらに、肺静脈圧を一定陽圧に保つことにより虚血傷害が阻止できることを見出した。また、虚血傷害により傷害肺からは TNF- $\alpha$ , oxygen radicals が放出されて、対側肺（遠隔臓器の代表）の透過性亢進を来すことを立証し、肺傷害による多臓器傷害発現機序の研究の端緒を開いた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	4,600,000	0	4,600,000
2006年度	2,700,000	0	2,700,000
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	11,500,000	1,260,000	12,760,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：移植・再生医療、細胞・組織、生理学、虚血再環流傷害、肺循環

## 1. 研究開始当初の背景

肺の虚血再環流傷害が低酸素症以外の原因で起こることは確立しており、その機序として炎症性サイトカインの影響も想定されていた。しかし、虚血肺が遠隔臓器に及ぼす影響に関しては推測の閾を越えず、よいモデルもない状況であった。遊離環流肺標本は、神経系、体液性、血球系の影響を受けない実験モデルであり、肺の虚血/再環流の病態生理の解明に優れているが、実験操作の影響を受け

やすい欠点をもっていた。我々の開発した同一個体から得られた肺の片側を虚血にさらし、対側肺を内部コントロールとするモデルは、全く同一実験条件下で虚血/再環流傷害をコントロール肺と比較できる特質があり、このモデルを用いての研究を企図した。

## 2. 研究の目的

肺の虚血再環流傷害が低酸素症によらずにどのような機序で起こるかを、RT-PCR, in

situ hybridization, immunohistochemistry の手法を用いて解明し、虚血再還流肺傷害が遠隔臓器傷害をおこすことを、遊離肺還流標本で実証し、その機序を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ラット遊離環流肺標本において、左右肺動脈を遊離させて個別に閉塞して片側肺を実験条件にさらし、対側肺を内部コントロールとして比較し得るモデルを完成させ、このモデルにおいて左肺を60分間37度Cで虚血にさらし、この間右肺は正常還流を維持し、呼吸は5%炭酸ガス加空気で両肺を換気することにより虚血肺の組織PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>を正常に保つモデルを作製した。虚血後30分再還流を行うと、虚血肺には顕著な肺水腫が発生した。正常酸素分圧維持下の虚血が虚血再還流傷害を来す機序の解明を、炎症性サイトカインの発現(RT-PCRおよびinsitu hybridizationによる肺組織での炎症性サイトカイン mRNAの半定量、蛍光免疫染色によるサイトカインの増加の証明)の観点から検討した。また、血管内圧との関係を探るために、虚血中に血管内圧を一定陽圧に保った場合の虚血傷害発現への影響を検討した。さらに、虚血再還流により対側健常コントロール肺の透過性が亢進することを見出し、この機序として虚血肺から分泌されるTNF- $\alpha$ が原因の一つであることを、TNF- $\alpha$  converting enzyme inhibitor を使用して証明した。また、再還流の際に還流液をsingle passとしてコントロール肺に虚血肺を還流した還流液が作用しないようにしたモデルを用いた。TNF- $\alpha$ のみでは対側健常肺の傷害が説明できず、還流液にNADPH oxidase inhibitorであるapocyninを加えて検討、さらにTNF- $\alpha$ とoxygen radicalの協調的作用を考へてSuperoxide dismutase(SOD)を加えて検討した。

### 4. 研究成果

組織酸素分圧、炭酸ガス分圧が生理的状态に保たれている状態で虚血/再還流はTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 mRNAの発現を増強させ、TNF- $\alpha$ を血管内皮に産生させる。虚血中に肺血管内圧を5mmHgに保ち、5%炭酸ガス加空気で換気を維持することにより、虚血/再環流傷害は防止される。虚血/再環流傷害の引き金は血管内圧の虚脱により引き起こされる炎症性サイトカインを主とする炎症反応であり、低酸素症ではない。虚血再還流により虚血肺で産生されたTNF- $\alpha$ は還流液中に分泌され、対側コントロール肺の透過性を亢進させた。TNF- $\alpha$  converting enzyme inhibitor(TACEI)を虚血前に虚血肺に作用させておくことによ

り、虚血/再環流傷害は阻止できなかったが、対側コントロール肺の透過性亢進は、TACEIを加えなかった場合に比較して75%抑制でき、傷害肺から遊離されるTNF- $\alpha$ が還流液を介して遠隔臓器を傷害することが明らかにできた。

TNF- $\alpha$ に加える何が遠隔臓器傷害の原因となっているかを明らかにする目的で、NADPH oxidase inhibitor, superoxide dismutase inhibitorのいずれかを虚血肺に作用させると、虚血肺の傷害を完全に抑制することはできなかったが、対側コントロール肺の傷害を完全に阻止できた。

以上より、虚血/再還流肺はTNF- $\alpha$ , superoxide anionを還流液中に遊離して、対側コントロール肺(遠隔臓器)の傷害をおこすことが明らかになった。

### 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3件)

Chenting Zhu, Aishan Bilali, Gabriela S Georgieva, Shunichi Kurata, Chieko Mitaka, Takasuke Imai

Salvage of nonischemic control lung from injury by unilateral ischemic lung with apocynin, a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase inhibitor, in isolated perfused rat lung

Translationa Research 2008;152:273-282

査読有

Gabriela S Georgieva, Shunichi Kurata, Satoshi Ikeda, Yoshinobu Eishi, Chieko Mitaka, Takasuke Imai

Nonischemic lung injury by mediators from unilateral ischemic reperfused lung: ameliorating effect of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme inhibitor

SHOCK 2007;27:84-90

査読有

Gabriela S Georgieva, Shunichi Kurata, Satoshi Ikeda, Shu Teng, Iyoko Katoh, Yoshinobu Eishi, Chieko Mitaka, Takasuke Imai

Prevention of ischemia reperfusion injury by positive pulmonary venous pressure in isolated rat lung

SHOCK 2006;25:66-72

査読有

[学会発表](計16件)

Aisha Bilali, Chenting Zhu, Gabriela Georgieva, Shunichi Kurata, Satoshi Ikeda, Takasuke Imai

Induction of TNF- $\alpha$  on respiratory epithelium in unilateral hyperventilated lung an increased permeability by the recirculated perfusate in control lung maintained at CPAP (2.5 cmH<sub>2</sub>O) in isolated, separately ventilated, perfused rat lung  
38<sup>th</sup> Critical Care Congress, Feb 1, 2009  
Gaylord Opryland Resort and Convention Center, Nashville, Tennessee, USA

Aishan Bilali, Satoshi Ikeda, Shunichi Kurata, Takasuke Imai  
TNF- $\alpha$  induction on respiratory epithelium in isolated, unilaterally hyperventilated rat lung  
第 3 6 回日本集中治療医学会学術集会、2009 年 2 月 26 日  
大阪国際会議場、大阪

Aishan Bilali, Chenting Zhu, Gabriela S Georgieva, Takasuke Imai  
Injury of CPAP lung by mediators from isolated perfused unilateral hyperventilated rat lung  
37<sup>th</sup> Critical Care Congress, Feb 3, 2008  
Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA

Gabriela S Georgieva, Shunichi Kurata, Aisan Bilari, Chenting Zhu, Takasuke Imai  
Unilateral ischemic lung induces contralateral lung injury by liberating mediators in circulation  
Symposium " Acute Respiratory Failure and remote organ damage "  
第 35 回日本集中治療医学会学術集会、2008 年 2 月 16 日  
京王プラザホテル、東京

Bilali Aishan, Zhu Chenting, Georgieva S Gabriela, Kurata Shunichi, Imai Takasuke  
Injury of CPAP lung by mediators from isolated perfused unilateral hyperventilated rat lung  
第 35 回日本集中治療医学会、2008 年 2 月 14 日、京王プラザホテル、東京

Georgieva Gabriela S, Kurata Shunichi, Bilali Aishan, Zhu Chengting, Imai Takasuke  
The effect of TNF- $\alpha$  on microvascular permeability in an isolated perfused lung  
第 35 回日本集中治療医学会、2008 年 2 月 14 日、京王プラザホテル、東京

Aishan Bilali, Chenting Zhu, Gabriela S Georgieva, Shunichi Kurata, Takasuke Imai  
High tidal volume (TV) ventilation induced cytokine mRNA and edema in hyperventilated

lung in isolated perfused unilateral hyperventilated lung  
36<sup>th</sup> Critical Care Congress, Feb 18, 2007  
Gaylord Palms Resort and Convention Center Orlando, Florida, USA

Chenting Zhu, Aishan Bilali, Gabriela S Georgieva, Shunichi Kurata, Takasuke Imai  
Ameliorating effect of combination of NADPH oxidase inhibitor (Apocynin) and TNF- $\alpha$  converting enzyme inhibitor (TACEI) on ischemia/reperfusion injury  
36<sup>th</sup> Critical Care Congress, Feb 18, 2007  
Gaylord Palms Resort and Convention Center Orlando, Florida, USA

Chenting Zhu, Bilali Aishan, Gabriela Georgieva, Shunichi Kurata, Takasuke Imai  
Ameliorating effect of combination of apocynin and TACEI on ischemia/reperfusion (I/R) injury  
第 3 4 回日本集中治療医学会学術集会、2007 年 3 月 2 日  
神戸国際展示場、神戸

Bilali Aishan, Chenting Zhu, Gabriela Georgieva, Shunichi Kurata, Takasuke Imai  
Induction of cytokine mRNA and edema in isolated perfused unilateral hyperventilated rat lung  
第 3 4 回日本集中治療医学会学術集会、2007 年 3 月 2 日  
神戸国際展示場、神戸

Georgieva GS, Kurata S, Zhu C, Bilali A, Imai T  
Effect of positive (5 mmHg) pulmonary venous pressure on isolated ischemic-reperfused rat lungs maintained at CPAP  
20<sup>th</sup> Annual Congress of European Society of Intensive Care Medicine, Oct 8, 2007, Berlin, Germany

Gabriela S Georgieva, Takasuke Imai, Shunichi Kurata  
Tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme inhibitor (TACEI) ameliorates control right lung (RL) injury by humoral mediators liberated from unilateral ischemia/reperfused (I/R) left lung (LL)  
35<sup>th</sup> Critical Care Congress, Jan 8, 2006  
Moscone west convention center, SF, CA, USA

Gabriela S Georgieva, Takasuke Imai  
TNF- $\alpha$  converting enzyme inhibitor (TACEI)

decreases control right lung injury induced by I/R left lung

第33回日本集中治療医学会学術集会、2006年3月2日、大阪国際会議場、大阪

Chenting Zhu, Asahn Bilali, Gabriela S Georgieva, Shunichi Kurata, Takasuke Imai  
Amelioration of ischemia-reperfusion (I/R) injury by NADPH oxidase inhibitor in isolated perfused rat lung

第34回日本救急医学会学術集会、2006年10月30日、福岡国際会議場、福岡

Aishan Bilali, Chenting Zhu, Georgieva Gabriela, Shunichi Kurata, Takasuke Imai  
Development of a novel model for high tidal volume lung injury

第34回日本救急医学会学術集会、2006年10月30日、福岡国際会議場、福岡

Gabriela S Georgieva, Takasuke Imai, Shunichi Kurata

Ischemic reperfused left lung (LL) increases expression of inflammatory cytokines mRNA in the control right lung (RL)

第33回日本救急医学会学術集会、2005年10月27日、大宮ソニックシティ、大宮

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井孝祐、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科救命救急医学分野、教授

### (2) 研究分担者

倉田俊一：東京医科歯科大学難治疾患研究所准教授、遺伝生化学

江石義信：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授、病理学

### (3) 連携研究者

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書