

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591812

研究課題名（和文） 肝阻血再灌流後の肺損傷の予防と治療に関する基盤研究

研究課題名（英文） Prevention of acute lung injury after liver ischemia-reperfusion

研究代表者

太田 周平（OTA SHUHEI）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20381478

研究成果の概要：肝部分阻血再灌流後の全身への影響及び肺傷害についてラットを用いたモデルで生理学的、分子生物学的検討を行った。血清 TNF- $\alpha$  は肝部分阻血再灌流後の十分な変化がなかった。肺の病変は組織学的には認められたが、エダラボンでの脂質酸化抑制は認められず、フリーラジカルを直接責任分子として同定はできなかった。今後、肝阻血時間・阻血部位の変更や異なったサイトカインを測定し、さらに肝虚血再灌流による遠隔臓器傷害の機序を検討する予定である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：麻酔科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：虚血再灌流障害・フリーラジカル・肺傷害・全身性炎症反応症候群

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な臓器不全症の最終治療手段として臓器移植術が選択されることがある。移植臓器はドナーからの摘出時点から一時的な疎血状態となり、レシピエントへの移植・血流再開により再灌流される。この際移植臓器自身の再灌流傷害だけでなく、SIRS・遠隔臓器傷害を引き起こすことが考えられる。肺はこのような状況下での遠隔臓器傷害を起こしやすく、いったん肺損傷を発症すれば死亡率は

40%-50%ときわめて高く、また手術後の人工呼吸期間の長期化やICU在室の延長等の原因となり、移植医療の高額化にもつながる。再灌流傷害の成因にはいくつかのサイトカイン（TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ など）や接着因子（E-Selectin, ICAM-1など）やフリーラジカル等の関与が示唆されている。

現在まで多くの臓器虚血再灌流後の肺傷害を検討されており、我々も全肝阻血再灌流後の人工呼吸の様式が肺傷害を重症化する

る可能性について報告した。しかし *in vivo* の肝阻血再灌流モデルでのフリーラジカルの関与や肺傷害の予防法の詳細な検討は不十分である。またエダラボンは臨床応用可能な唯一のフリーラジカルスカベンジャーであるが、保険適応可能なのは日本のみであり、海外からの報告はないのが現状である。従って再灌流に伴う肺傷害でのエダラボンの応用についてはほとんど検討はされていない。

## 2. 研究の目的

### (1) 再灌流による肺傷害の機序解明

臓器の虚血再灌流後に起こる SIRS の機序を明らかにすることにより、臓器移植術の術後集中治療などに応用可能な治療の可能性を探る。臨床で行われる手術をできるだけ忠実に再現するよう、ラットを用いて肝切除時にしばしば多用される肝血流遮断と同様の肝阻血を行う。SIRS の病態解明のために必要な生理学的データを記録、*in vivo* でのフリーラジカルやサイトカインの関与について明らかにしていく。

### (2) フリーラジカルスカベンジャーの効果

エダラボン投与を行い、サイトカインや脂質酸化にどのような影響が生じるか検討していく。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝部分疎血再灌流動物モデル作製

11-12週令の雄性SDラットを用いる。腹腔内ネンブタール投与で麻酔を行い、肝門部を露出し、頭側の肝臓3葉に分布する肝動脈、門脈を血管クリップで閉塞させ（図1参照）、90分後にクリップをはずすことで部分肝阻血再灌流のモデルを作成した。この門脈分枝の同定及び血管へのアプリケーションは、しばしば肝臓の損傷や不十分な血流遮断などを起こし、手術手技の熟練を要した。先行研究では2時間と4時間を再灌流時間として設定し、実験途中での動物死亡による脱落がないことを確認した。脱血と摘出臓器の保存期間中の酸化の影響を取り除くため、EDTAリン酸バッファーで安楽死後すぐに全身灌流を行ってから、肺、虚血肝、非虚血肝を摘出した。摘出した臓器は下記の実験に用いるまで-80度で保存した。

### (2) 組織学的肺傷害、肝障害の検討

組織学的検討のために EDTA リン酸バッファーで灌流を行わずに臓器を取り出すサブグループをもうけた。臓器摘出後、すぐに4%ホルムアルデヒドに浸漬した。研究分担者である矢澤卓也によってブラインドマナーで組織学的検討が行われた。

### (3) サイトカイン等の定量

マイクロプレートリーダー、分光光度計などを用い、キット化された assay システムで TNF- $\alpha$  や MPO などの定量を行った。

### (3) 脂質酸化物の定量

細胞膜に広く存在する脂質の酸化をフリーラジカルによる酸化の指標とし、肺及び虚血肝、非虚血肝の Malondealdehyde(MDA)を測定した。

### (4) 介入方法

大腿静脈に持続輸液及び薬剤投与のためのカニューレーションを行い、人工膠質液を動物の安楽死まで持続投与をした。脳梗塞治療薬として認可されているフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンを介入群の動物に投与した。投与方法は門脈の血流遮断解除直後から投与し、15分間で3mg/kgと6mg/kgの投与を行った。コントロール群には生食の同容量の投与を行った。

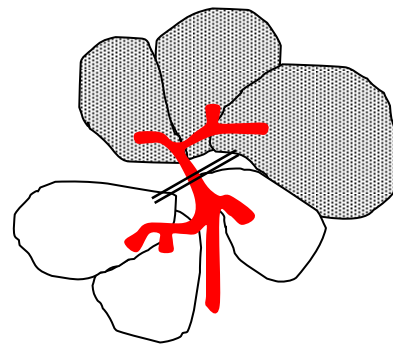


図1：ラットの肝臓は6葉に分かれる。上3葉と下3葉の間で門脈をクリップすることで速やかに上3葉の肝臓の色は変化する

## 4. 研究成果

### (1) 虚血肝および非虚血肝組織変化

### ①肝臓学的変化

虚血肝では中心静脈領域に強い肝細胞壊死を認めた。壊死の範囲の程度はエダラボン投与によって有意に変化したとは言い難かった。非虚血肝では細胞配列の乱れや一部に好中球浸潤が目立つなどの所見が得られたが、サンプル個体間差が大きく、一定の評価ができなかった。

### ②肺組織学的変化

細動脈における微小血栓や気管支平滑筋の肥厚を認めた。エダラボン投与群とコントロール群でこれらの所見に大きな差は認められなかった。肝部分疎血再灌流により肺微小循環の破綻が予想された。

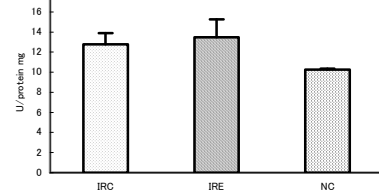
### (2) 動物実験中の生理学的変化

部分肝阻血により虚血肝は速やかに血色が悪化した。再灌流後に充血し、肝表面から微少な出血の持続を認めた。酸塩基平衡は肝部分阻血中・再灌流後も大きく変化することはなかった。血圧は内頸動脈の観血的動脈圧を測定したが、個体により実測値そのものの差が大きく、麻酔深度による影響と考えられた。またエダラボン投与がこれらには影響しなかった。再灌流中の動物の死亡は手術手技による明らかな肝臓損傷などを除けば1匹もいなかった。

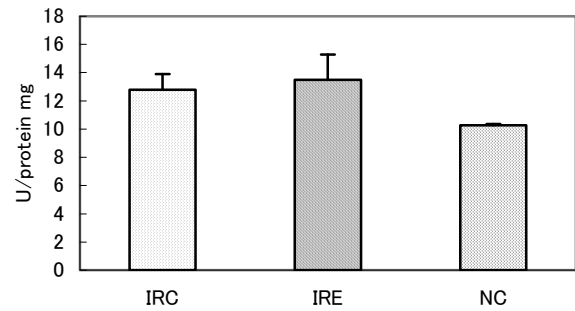
### (3) 血清 TNF- $\alpha$ の変化

血清中のTNF- $\alpha$ を経時的に測定したが肝部分阻血により十分な上昇が認められなかった。以前、我々はラットの全肝阻血を行ったモデルではベースラインの100倍以上の血清TNF- $\alpha$ の上昇を認めている (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007 Mar;292(3):L625-31)。またラット肝中左葉部分阻血再灌流で血清TNF- $\alpha$ の上昇を認めた報告 (J. Clin. Invest. 1990 Jun;85(6):1936-43) もある。今回の我々の部分肝阻血モデルでは異なった結果が生じた理由は現在のところはっきりしていない。ラットの個体によっては阻血した肝臓の色調変化が時に不十分かと思われるときもあり、側副血行の存在はその理由のひとつには挙げられるだろうと考えている。

(4) 肺の MPO を好中球の accumulation の指標として測定した。MPO 活性は肝部分阻血再灌流群で sham 手術群より上昇を認めたが、エダラボン投与による差は認められなかった。



肺MPO



mean  $\pm$  SE

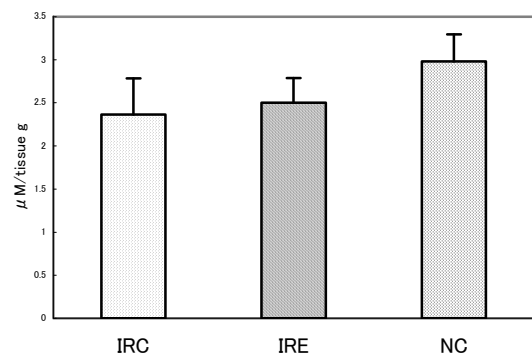
IRC: 肝虚血再灌流群

IRE: 肝虚血再灌流+エダラボン 6mg/kg 投与群

NC: sham operation

(5) 肺の MDA 濃度はエダラボンの投与によって軽減はしなかった。また肝阻血を行わなくても開腹手術操作だけで肺でのMDA上昇が認められた。

肺MDA



mean  $\pm$  SE

IRC: 肝虚血再灌流群

IRE: 肝虚血再灌流+エダラボン 6mg/kg 投与群

NC: sham operation

TNF- $\alpha$  の測定結果からは肝部分阻血再灌流では遠隔臓器に明確な障害を与えるほどSRISが惹起されていなかった可能性が示唆された。血圧や酸塩基平衡の変化に乏しく、酸素化能の変化も認めなかった。TNF- $\alpha$  の変化だけでSIRSのすべてを論じることは困難だが、肝臓のKupffer細胞は阻血によりTNF- $\alpha$  産生源となることは広く知られている。阻血時間の検討・阻血する肝臓の割合など今後の検討課題として残った。

またMDAは開腹手術手技だけで十分に上昇してしまっただけの可能性もある。モデルは異なるが腸管や四肢の阻血でMDAの遠隔臓器での上昇を認め (World J Gastroenterol. 2003 Jun;9(6):1318-22)、アスコルビン酸等による軽減効果を報告している論文 (Ann Vasc Surg. 2006 Jan;20(1):49-55) もある。

直接的な再灌流障害臓器であった肝臓の組織変化について、本研究ではエダラボンを投与しても虚血肝の壊死領域の軽減はほとんど認められていない。虚血再灌流後の遠隔臓器傷害をターゲットとしたため、肺傷害をひきおこすほど全身状況ではフリーラジカルだけの制御では組織障害をくい止めるのには不十分なのかもしれない。また肺での脂質酸化にエダラボンが影響しなかったのは遠隔臓器に対しての再灌流障害の主体となるのがフリーラジカルではない可能性もあるし、フリーラジカルをスカベンジするにはエダラボンの投与量が不足していたのかもしれない。エダラボンの投与方法の工夫によってこれらの問題が解決可能かどうか今後の課題となった。

## 5. 主な発表論文等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 周平 (OTA SHUHEI)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：20381478

### (2) 研究分担者

倉橋 清泰 (KURAHSHI KIYOYASU)  
横浜市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：50234539

矢澤 卓也 (YAZAWA TAKUYA)  
横浜市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：50251045

大木 浩 (OKI HIROSHI)  
横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号：30336565