

原 著

肺移植における再灌流障害に対する Urinary Trypsin Inhibitor の効果

堀口 倫博

要 旨

肺移植において、移植後早期の大きな問題点とされている再灌流障害に対する Urinary Trypsin Inhibitor (UTI) の効果につき実験的に検討した。雑種成犬で左肺の温阻血モデルを作成し、温阻血時間、再灌流時間は2時間とした。コントロール群と UTI 群に分け、UTI 群には再灌流時に1万単位/kgの UTI を投与した。コントロール群は、再灌流終了時において肺血管抵抗、肺湿乾燥重量比共に有意に上昇し、病理組織でも間質の肥厚および好中球の浸潤が認められ、生存実験では7日間以上生存したのは5例中2例のみであった。それに対し、UTI 群では、肺血管抵抗は軽度の上昇がみられたが肺湿乾燥重量比は有意な上昇はなく、病理組織でもほとんど変化が認められず、生存実験で5例全例が7日間以上生存した。以上より UTI が肺の再灌流障害を有意に抑制することが示された。これは、UTI の好中球プロテアーゼ阻害作用によるものと考えられる。

索引用語：肺移植，再灌流障害，好中球プロテアーゼ，好中球エラスターゼ，尿中トリプシンインヒビター
lung transplantation, reperfusion injury, neutrophil protease, neutrophil elastase, urinary trypsin inhibitor

はじめに

肺移植後の再灌流障害による術後肺機能低下は移植後早期の大きな問題点とされている。再灌流障害は、臨床的には肺水腫として表現され、そのメカニズムとして近年白血球、特に好中球の関与が指摘されている¹⁾。好中球の生体防御としての機能は異物や細菌の非特異的な破壊機能であり、これは活性酸素とプロテアーゼの共同作業によって発揮される。活性酸素と再灌流障害の関連については多くの検討がなされているが^{2,3)}、プロテアーゼとの関連についての検討はまだ少ない。今回我々は、プロテアーゼインヒビターである Urinary Trypsin Inhibitor

(UTI: Urinastatin. 持田製薬) を用いることによって再灌流障害が軽減されるか否か実験的に検討した。

対象と方法

体重5.2 kg~13.5 kg の雑種成犬33頭を用いた。pentobarbital sodium 30 mg/kg を静注後、気管内挿管を行いハーバード式人工呼吸器を用い、空気吸入下に一回換気量20~30 ml/kg、毎分10~15回の調節呼吸を行った。術中輸液は、肘静脈より乳酸リンゲル液を10 ml/kg/h で投与した。左外頸静脈より5Fr スワンガンツカテーテルを挿入して主肺動脈に留置した。左大腿動脈にカニューレを挿入し、動脈圧をモニターした。左第5肋間にて開胸して左肺の hilar stripping を行った後、ヘパリン200 U/kg 投与下に肺動静脈、主気管支をクランプし、温阻血モデルを作成した。主気管支は気道内圧20

浜松医科大学 第一外科
原稿受付 1992年1月23日
原稿採択 1992年3月2日

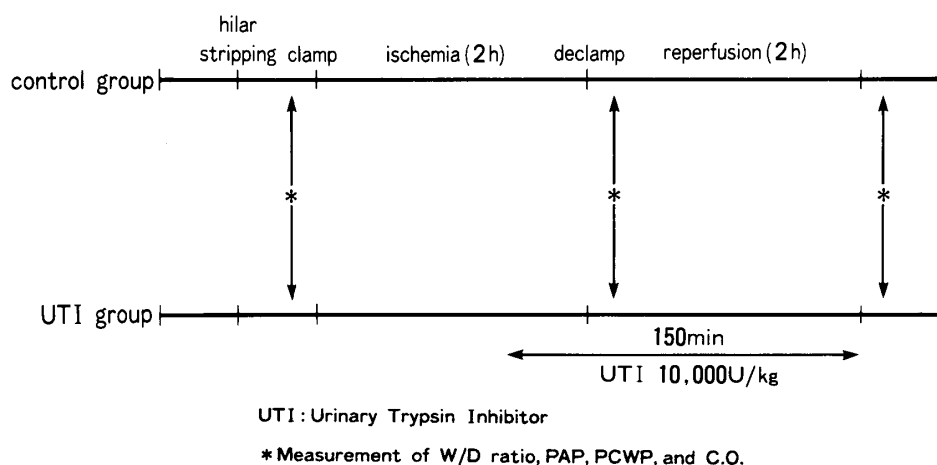


Fig. 1 Protocol of experiment

cmH₂O で肺を拡張させてクランプした。温阻血時間は2時間とし、クランプ解除後2時間再灌流を行った。

実験群をコントロール群、UTI群の2群に分けた(それぞれn=6)。UTI群は、UTI 10.000 U/kg を乳酸リンゲル液に混入して、温阻血終了30分前より再灌流終了まで投与した。阻血前、阻血終了時、再灌流終了時にクランプ側(左)の肺組織を採取し、湿乾燥重量比を求め、肺動脈圧、肺動脈 wedge 圧、心拍出量を測定して肺血管抵抗を計算した。肺湿乾燥重量比は、下葉

下縁の肺組織を採取し、同組織重量を湿重量とし、2日間60℃にて乾燥させた同組織重量を乾燥重量として算定した。病理組織学的検索も行った (Fig. 1)。

さらに、同様の実験系で生存実験を行い生存日数を調べ、胸部X線所見の評価および病理組織学的検討を行った(それぞれn=5)。胸部X線写真の撮影は3日目、7日目(生存例)を行った。

有意差の検定は、Student-T test によって行い危険率5%未満を有意とした。

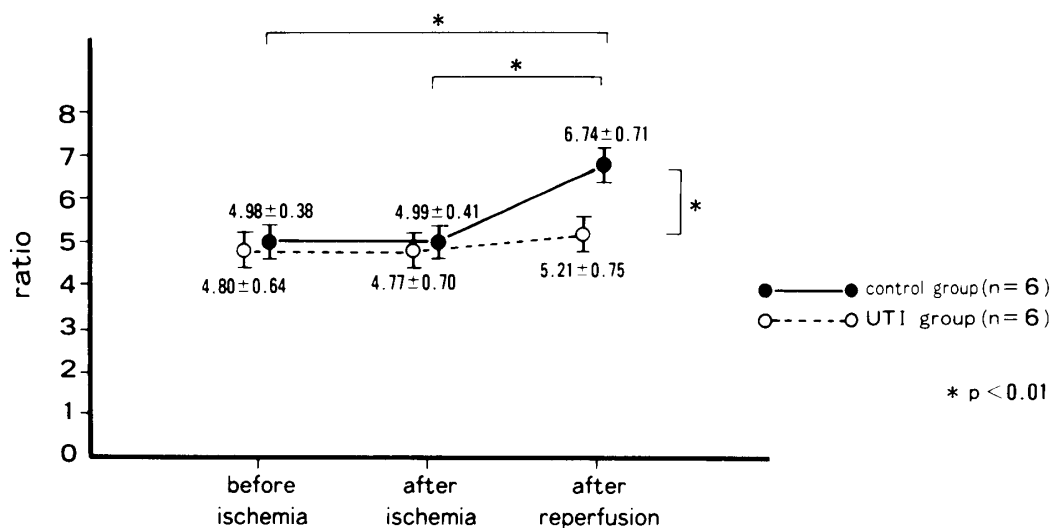


Fig. 2 Wet/Dry weight ratio

No significant differences were noted in the ratios in the UTI group. The ratio at the termination of reperfusion was significantly higher in the control group.

結 果

肺湿乾燥重量比：阻血前，阻血終了時，再灌流終了時において UTI 群はそれぞれ 4.80 ± 0.64 ， 4.77 ± 0.70 ， 5.22 ± 0.75 で，阻血前に比

べ阻血終了時および再灌流終了時においては，いずれも有意な変化は認められなかった．それに対し，コントロール群はそれぞれ 4.98 ± 0.38 ， 4.99 ± 0.41 ， 6.74 ± 0.71 であり，阻血前に比べ阻血終了時は有意な変化は認められなかったが，

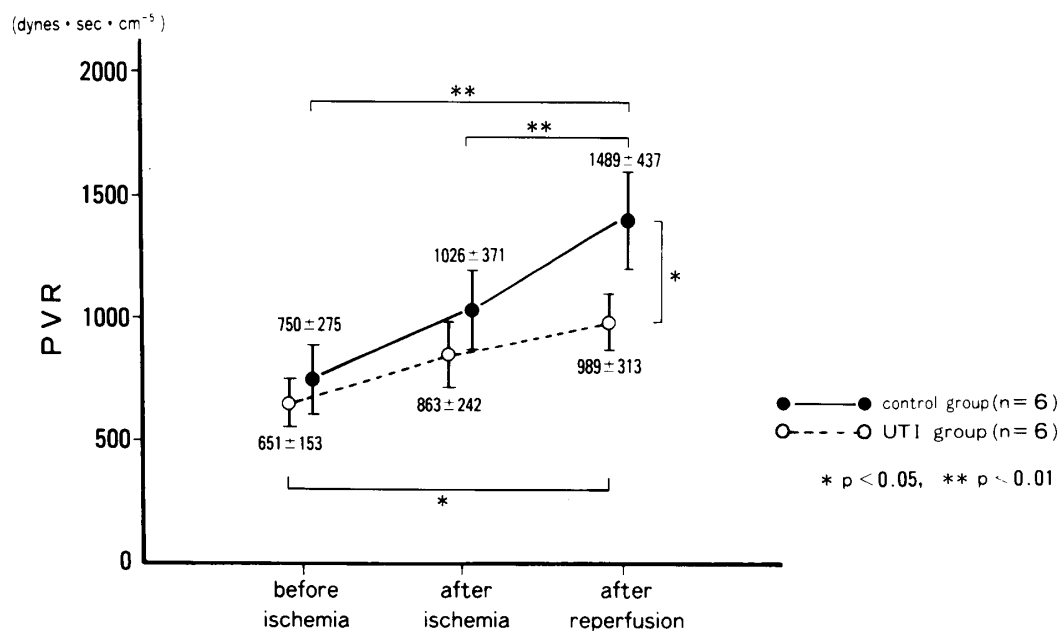


Fig. 3 Pulmonary Vascular Resistance (PVR)

PVR was increased in both groups at the termination of the ischemic procedure and after reperfusion.

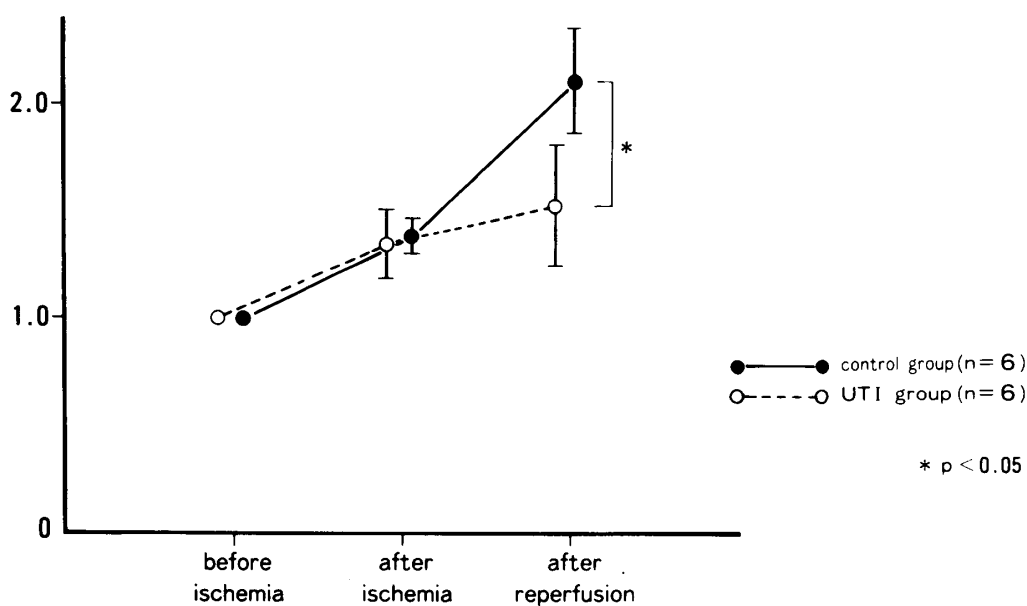


Fig. 4 PVR/pre-PVR

In the control group the ratio after reperfusion was much higher than after ischemia, but in the UTI group there was little change.

再灌流終了時において有意に ($P < 0.01$) 高値であった。また、再灌流終了時においてコントロール群と UTI 群を比較するとコントロール群が有意に ($P < 0.05$) 高値であった (Fig. 2)。

肺血管抵抗：両群とも阻血前に比べ阻血終了時、再灌流終了時に有意な ($P < 0.05$) 上昇が認められた (Fig. 3)。各群の変化をみると、阻血前から阻血終了時までの変化に比べ、再灌流時の変化がコントロール群では大きくなり、UTI 群では小さくなっており、有意差 ($P < 0.05$) が認められた (Fig. 4)。

生存実験：コントロール群は、実験後2日間生存したものが1例、3日間生存したものが2例で、7日以上生存したのは2例のみであった。それに対し UTI 群は5例全例が7日以上生存した (Table 1)。

胸部X線所見：3日目には UTI 群は、クランプ側に軽度の胸水を認めたものの両肺とも清明で陰影は認められなかった。それに対しコントロール群はクランプ側肺全体に浸潤影を認め、

含気も低下していた (Fig. 5)。早期死亡例では対側肺にも浸潤影を認めた。7日目の所見でも、UTI 群は両側肺ともに清明であったのに対し、コントロール群の生存例では、対側肺は清明であったが、クランプ側肺は全体に浸潤影を認めた。

Table 1 Survival period

In the control group, dogs 1 and 2 survived for 2 and 3 days, and only 2 survived for more than 7 days. In the UTI group, all 5 dogs survived for more than 7 days.

days	1	2	3	4	5	6	more than 7
control group		1	2				2
UTI group							5

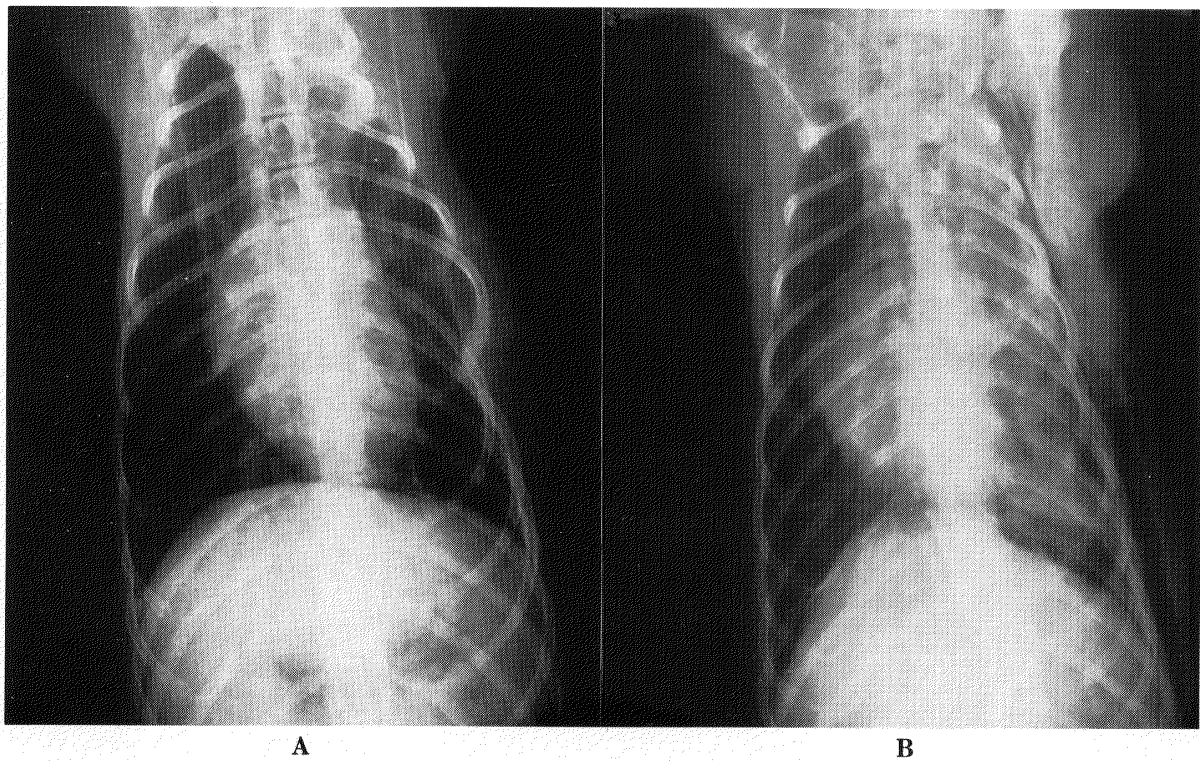


Fig. 5 Thoracic roentgenograms at 3 days.

A : Both lung fields are clear in the UTI group.

B : Infiltration in the entire lung on the clamped side in the control group.

病理組織像：虚血終了時の組織像は両群ともクランプ前と比較して変化が認められなかった。再灌流終了時には、UTI 群は変化が認められなかったが、コントロール群は間質の肥厚と好中球の浸潤が認められた (Fig. 6)。UTI 群は3日目、7日目、14日目の組織像にもほとんど変化が認められなかった。それに対し、コントロール群は3日目には肺胞細胞の変性がみられ、肺胞内は蛋白を含む浸出液によって満たされていた (Fig. 7)。7日目には著明な好中球、リンパ球、マクロファージの浸潤がみられ、肺胞構造の破壊が散見された。間質の肥厚もあり、フィブリンの沈着も認められた。14日目にはリンパ球優位の細胞浸潤がみられ、間質は著明に肥厚し肺胞細胞および血管内皮細胞の脱落が認められた (Fig. 8)。コントロール群の早期死亡例では対側肺にも間質の肥厚と好中球の浸潤が認められた。

考 察

再灌流障害は活性酸素が主な原因であるとされている^{2,3}。McCord³ は活性酸素の発生源として、虚血細胞内の hypoxanthine-xanthine oxidase 系による O_2^- の発生を提唱した。活性酸素の scavenger である superoxid dismutase (SOD) や catalase, あるいは xanthine oxidase (XO) を阻害する allopurinol を投与することによって、再灌流障害が抑制されたという報告も数多くみられる⁴⁻⁶。

しかし、SOD は分子量が3万余と大きく細胞膜を容易に通過するとは考えにくく、実際、SOD の活性酸素消去作用は細胞外液中で発揮されることが示されている⁷。また、XO は動物の種や組織によってその含量が異なっており、ラットなどの小動物に比べブタや人間では含量が低く⁸⁻¹⁰、さらにラットにおいても xanthine

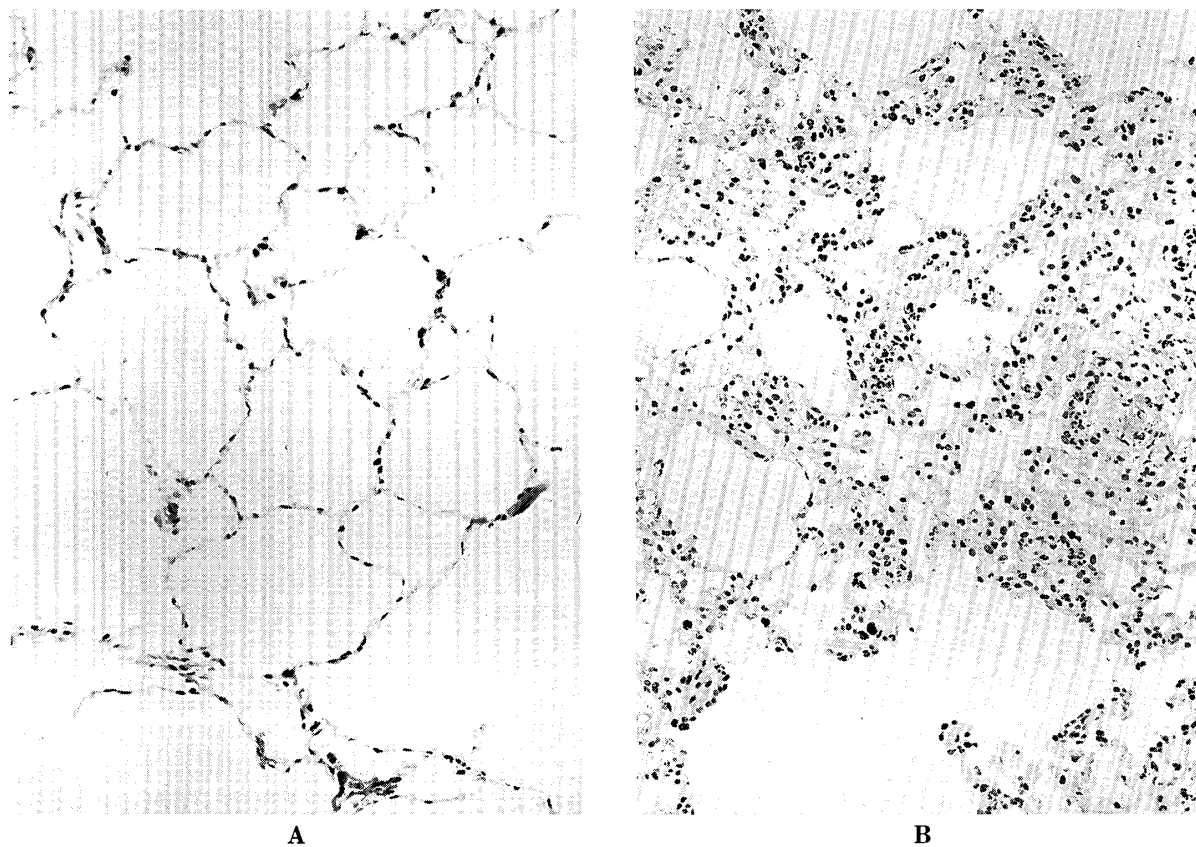


Fig. 6 Histological appearance of lung at termination of reperfusion.

A : No change is seen in the UTI group.

B : Thickened interstitium and infiltration of neutrophils are noted in the control group.

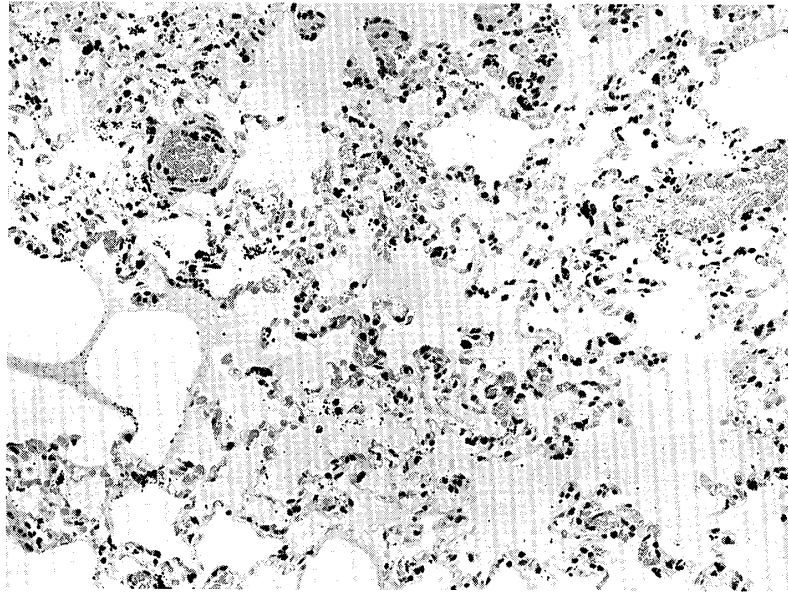
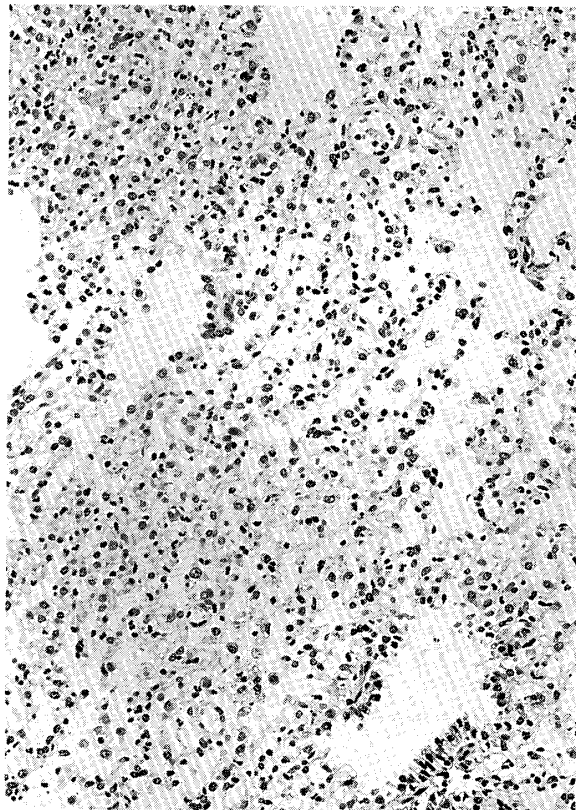
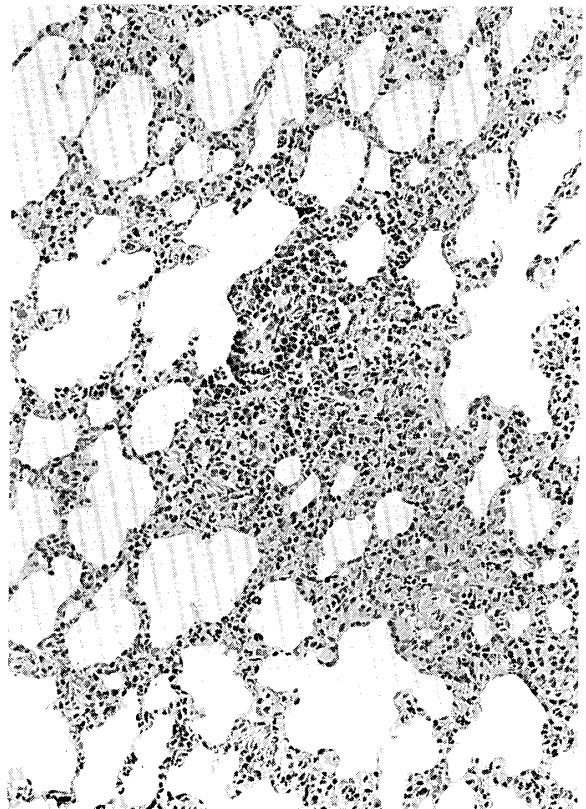


Fig. 7 Histological appearance at 3 days in the control group.
Degeneration of alveolar cells is seen, and air spaces are filled with pale-staining, protein-containing fluid.



A



B

Fig. 8 Histological appearance at 7 and 14 days in the control group.
A : Marked infiltration with neutrophils, lymphocytes and macrophages at 7 days.
B : Infiltration contains more lymphocytes than other cells at 14 days; marked thickening of the interstitium is noted; alveolar structures have been destroyed completely.

dehydrogenase から xanthine oxidase への変化は、ほとんど細胞の viability がなくなってから起こっているという報告もあり¹¹⁾、活性酸素の発生源を他にも考慮する必要がある。

近年、再灌流障害に白血球、特に好中球が関与することが指摘されてきており^{1,12)}、活性酸素の主な発生源として注目されている。好中球は生体防御機能として異物や細菌の非特異的な破壊機能を持っているが、本来防御すべき生体側の組織をも破壊してしまう可能性もある。この機能は主に活性酸素とプロテアーゼの共同作用によってなされており^{13,14)}、再灌流障害における活性酸素の発生源を好中球に求めた場合、活性酸素だけが単独で作用することは考えにくく、プロテアーゼの存在を無視できないと思われる。すなわち、好中球プロテアーゼが再灌流障害に何らかの関与をしていると考えられる。この仮定のもとに、今回我々は好中球プロテアーゼの阻害剤である UTI (Urinastatin: 持田製薬) が再灌流障害に与える影響について実験的に検討した。UTI は人の尿中に含まれる分子量67000の蛋白で血中の蛋白分解酵素が腎において低分子化され、尿中に排泄されたものであろうと言われている¹⁵⁾。

肺再灌流障害による肺障害は、臨床的には肺水腫とそれに伴う肺高血圧として表現されるので再灌流障害の程度を測る指標として、肺血管外水分量と肺血管抵抗を用いた。肺血管外水分量の測定法としては、最も精度が良いとされている直接法¹⁶⁾に基づき肺湿乾燥重量比を算定した。また、生存実験を行ったが、長期的には胸部X線写真の所見や病理組織学的所見から肺障害の程度と広がり調べた。

両群とも肺湿乾燥重量比が阻血前と阻血2時間後ではほとんど変化がなく、病理組織所見でも変化がみられないのは、阻血中には肺水腫が進行していないことを示しており、虚血自体による障害が軽度であることを意味している。肺血管抵抗は両群で阻血2時間後に上昇しているが、これは虚血による vasoconstriction によるものと考えられる。再灌流2時間後にコントロール群では湿乾燥重量比が有意に ($P < 0.01$) 高

値を示し、病理組織学的にも間質の肥厚と好中球の浸潤がみられたことから、再灌流障害による肺障害の結果、肺水腫が進行したことがわかる。それに対し UTI 群では、再灌流2時間後でも湿乾燥重量比に有意な上昇はなく、肺血管抵抗の上昇も軽度で病理組織学的にも間質の肥厚や好中球の浸潤は認められず、UTI によって再灌流障害が抑制されたと思われる。

コントロール群における再灌流2時間後の病理組織所見で、クランプ側肺に好中球の蓄積がみられたのは、好中球の2次的な関与によるものであると考えられる。すなわち、虚血・再灌流によって血管内皮細胞に何らかの変化が起こり、その変化が好中球を活性化させたと考えられる。Krieger ら¹⁷⁾は hyperoxia のみでも肺障害が起こるが、さらに好中球を加えると、より大きな障害が起こることを示している。Bowman ら¹⁸⁾は hyperoxia が直接血管内皮細胞を障害し、障害された血管内皮細胞は好中球の粘着を促進させることを示している。そして、この原因として血管内皮細胞のアラキドン酸代謝産物の濃度変化、血管内皮細胞の表面蛋白の変化、血管内皮細胞の走化性物質の産生などを挙げている。McCord ら¹⁹⁾は炎症モデルにおいて、血漿成分中に活性酸素と反応して好中球を刺激する物質が存在することを示しており、血管内皮細胞で産生された活性酸素自体が好中球を活性化している可能性もある。

活性化された好中球は活性酸素の生成とともに好中球プロテアーゼを放出する。好中球プロテアーゼのうち肺障害に最も関与すると思われるものは、好中球エラスターゼである。好中球エラスターゼは肺結合組織、肺胞および血管内皮細胞基底膜の構成成分であるコラーゲンを分解し、その結果、透過性亢進型の肺水腫を引き起こすと言われており^{20,21)}、種々の肺障害への関与が指摘されている^{22,23)}。Ruth ら²⁴⁾は好中球が仲介する急性肺水腫性の肺障害において大きな障害をおこすには、好中球エラスターゼが必要不可欠であることを示している。

UTI は好中球エラスターゼと好中球カタレプシンGを強く阻害する²⁵⁾。好中球エラスターゼ

と好中球カタプシンGは、細胞間マトリックスの構成成分のひとつであるプロテオグリカンも分解すると言われている²⁶⁾。プロテオグリカンは血管の透過性との関連性が指摘されており²⁷⁾、再灌流障害における肺水腫の発生に関与している可能性もある。さらに、UTIはライソゾーム膜の安定化作用もあり¹⁵⁾、間接的にも好中球エラスターゼを抑制していると考えられる。UTIの活性酸素除去作用については、高濃度においてその作用があると言われるが²⁸⁾、常用量では弱くその影響は少ないと思われる。

以上のことから、今回我々の実験でみられたUTIの再灌流障害抑制作用は、UTIが、好中球エラスターゼおよび好中球カタプシンGなどのライソゾーム酵素を直接的または間接的に抑制することによって得られたと考えられる。この結果は、SODやカタラーゼなどの活性酸素除去剤が再灌流障害を抑制するのと矛盾しない。なぜなら活性酸素種は、生体に存在する主要な蛋白分解酵素阻害物質である α_1 -プロテアーゼインヒビター(α_1 -PI)を不活化する²⁹⁾からである。 α_1 -PIは好中球エラスターゼおよび好中球カタプシンGを強く阻害する。すなわち、活性酸素除去剤は活性酸素を除去することによって間接的に好中球エラスターゼや好中球カタプシンGなどの蛋白分解酵素を抑制しているのである。また、先に述べたように、血管内皮細胞から放出された活性酸素が好中球を活性化しているとしたら、活性酸素除去剤によってその活性化が抑制され、結果的に再灌流障害が抑制されることになる。

生存実験においてもUTI群は5例全例が7日間以上生存し、胸部X線写真および病理組織所見でもほとんど異常を認めなかった。このことから再灌流直後の障害を抑制できれば長期的にも障害が起こらないと考えられる。それに対しコントロール群は障害が進行して死亡したものが多く、クランプ側肺は破壊され障害が対側肺にまでおよんでいるものもあった。これは、再灌流直後の障害によってさらに好中球が活性化され、障害が相乗的に進み、その際に血中に流出した走化因子によってMOFと同様の状態

が引き起こされ、障害がクランプ側肺以外にまでおよんだものと考えられる。

いずれにしても、再灌流障害は単純な反応によって引き起こされるのではなく、様々な要素が関連して起こっているのは明らかであり、今回の実験で好中球プロテアーゼがその要素のひとつであることが示唆された。そして、好中球プロテアーゼの阻害作用を持つUTIが再灌流障害を抑制し、肺移植の成績を向上させる可能性が示された。

稿を終えるに当たり、御指導並びに御校閲を賜った恩師原田幸雄教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、多大なる御協力をいただいた文部技官長谷川敏彦氏に深く感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨は第8回日本呼吸器外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Breda MA, Hall TS, Stuart RS, et al: Twenty-four hour lung preservation by hypothermia and leukocyte depletion. *J Heart Transplant* 4: 325-329, 1985.
- 2) Shlafer M, Kane PF, Kirsh MM, et al: Superoxide dismutase plus catalase enhance the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, reperfused heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83: 830-839, 1982.
- 3) McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
- 4) Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, et al: Ischemic injury in the cat small intestine: roll of superoxide radicals. *Gastroenterology* 82: 9-15, 1982.
- 5) Casale AS, Bulkley GB, Bulkley BH, et al: Oxygen free-radical scavengers protect the arrested, globally ischemic heart upon reperfusion. *Surg Forum* 34: 313-316, 1983.
- 6) Allison RC, Kyle J, Adkins WK, et al: Effect of ischemia reperfusion or hypoxia reoxygenation on lung vascular permeability and resistance. *J Appl Physiol* 69(2): 597-603, 1990.
- 7) Kennedy TP, Rao NV, Hopkins C, et al: Role of reactive oxygen species in reperfusion injury of the rabbit lung. *J Clin Invest* 83: 1326-1335, 1989.
- 8) Eddy LJ, Stewart JR, Jones HP, et al: Free radical-producing enzyme, xanthine oxidase, is undetectable in human hearts. *Am J Physiol* 253 (Heart Circ Physiol 22): H709-H711, 1987.

- 9) Picard-Ami LA Jr, Andrew Mackay BA, Kerrigen CL, et al: Pathophysiology of ischemic skin flaps: differences in xanthine oxidase levels among rats, pigs and humans. *Plast Reconstr Surg* **87**: 750-755, 1991.
- 10) Downey JM, Miura T, Eddy LJ, et al: Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* **19**: 1053-1060, 1987.
- 11) de Groot H, Littauer A: Reoxygenation injury in isolated hepatocytes: cell death precedes conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **155**: 278-282, 1988.
- 12) Ide H, Ino T, Hasegawa T, et al: The role of leukocyte depletion by in vivo use of leukocyte filter in lung preservation after warm ischemia. *Angiology* April: 318-327, 1990.
- 13) Smolen JE, Korchak HM, Weissmann G: Increased levels of cyclicadenosine-3, 5-monophosphate in human polymorphonuclear leukocytes after surface stimulation. *J Clin Invest* **65**: 1077-1085, 1980.
- 14) Weissmann G, Smolen JE, Korchak HM: Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N Engl J Med* **303**: 27-34, 1980.
- 15) 大西治夫, 小雀浩司, 延原政弘: 蛋白分解酵素阻害剤 Urinastatin (Miraclid) の薬理作用. *応用薬理* **31**(3): 663-675, 1986.
- 16) Pearce ML, Yamashita J, Beazell J: Measurement of pulmonary edema. *Circ Res* **16**: 482-488, 1965.
- 17) Krieger BP, Loomis WH, Czer GT, et al: Mechanisms of interaction between oxygen and granulocytes in hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol* **58**: 1326-1330, 1985.
- 18) Bowman CM, Butler EN, Repine JE: Hyperoxic damages cultured endothelial cells causing increased neutrophil adherence. *Am Rev Respir Dis* **128**: 469-472, 1983.
- 19) McCord JM, Wong K, Stokes SH, et al: Superoxide and inflammation: a mechanism for the anti-inflammatory activity of superoxide dismutase. *Acta Physiol Scand suppl* **492**: 25-30, 1980.
- 20) Mainardi CL, Dixit SN, Kang AH: Degradation of type IV (basement membrane) collagen by proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules. *J Biol Chem* **255**: 5435-5441, 1980.
- 21) Senior RM, Tegner H, Kuhn C: The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis* **116**: 469-475, 1977.
- 22) Lee CT, Fein AM, Lippmann M, et al: Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **304**: 192-196, 1981.
- 23) Janoff A: Elastase and emphysema: current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis* **132**: 417-433, 1985.
- 24) McDonald RJ, Bruckner LV, Repine JE: Neutrophil elastase augments acute edematous injury in isolated rat lungs perfused with neutrophil cytoplasts. *Am Rev Respir Dis* **140**: 1825-1827, 1989.
- 25) 渋谷靖義, 国広靖之: ウリナスタチンの組織崩壊防御作用. *薬理と治療* **14**: 17-32, 1986.
- 26) Starkey PM, Barrett AJ, Burleigh MC: The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochem Biophys Acta* **483**: 386-397, 1977.
- 27) Klynstra FB: On the passage-restricting role of acid mucopolysaccharides in the endothelium of pig aortas. *Atherosclerosis* **19**: 215-220, 1974.
- 28) 吉田憲正, 吉川敏一, 谷川 徹, 他: ヒト多形核白血球ウミホタルルシフェリン誘導体依存性化学発光に対するプロテアーゼインヒビターの影響. *医学のあゆみ* **140**: 765-766, 1987.
- 29) Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *New Engl J Med* **320**: 365-376, 1989.

Effect of urinary trypsin inhibitor on reperfusion injury after lung transplantation

Tomohiro Horiguchi

First Department of Surgery, Hamamatsu University School of Medicine

Reperfusion injury is a large problem in the early stage after lung transplantation. Its prevention by Urinary Trypsin Inhibitor (UTI) was evaluated experimentally. Warm ischemic models were made with left lungs of adult mongrel dogs. The time for the warm ischemic procedure was set at 2 hours, and the lungs were reperfused for 2 hours. The experimental group was divided into a control group and a UTI group, the latter received 10,000 units/kg of UTI from 30 minutes before the termination of warm ischemia to the termination of reperfusion. In the control group, the pulmonary vascular resistance and the wet and dry weight ratios (W/D ratio) increased significantly, and a thickened interstitium and infiltration of neutrophils were observed histologically after the reperfusion ended. Only two of the five dogs in the survival experiment survived for more than 7 days. In the UTI group, the pulmonary vascular resistance increased slightly, but the W/D ratio did not increase significantly, and there were no histological abnormalities at the termination of reperfusion. All five dogs survived for more than 7 days in the survival experiment. These results indicate that UTI significantly attenuates reperfusion injury, perhaps by inhibiting neutrophil protease.