

原 著

肺再灌流障害に対する抗接着分子抗体の抑制効果

今泉 強

要 旨

肺再灌流障害に対する抗接着分子抗体の抑制効果について、ラットで肺温阻血モデルを作成し検討した。温阻血時間を45分、再灌流時間を8時間とした。阻血10分前に、mouse IgG 1 mg/kg を投与したI群、抗 LFA-1 抗体 1 mg/kg 投与したII群、抗 LFA-1 抗体、抗 ICAM-1 抗体を各々 1 mg/kg ずつ投与したIII群に分け、阻血前、阻血後、再灌流2時間後、8時間後に wet/dry weight ratio (W/D ratio), myeloperoxidase activity (MPO activity), respiratory index (RI) を測定した。

II群はI群に比べて再灌流2時間後、8時間後において、RI, W/D ratio, MPO activity が有意に低値であった。III群では更にII群に比べて再灌流8時間後で、RI, W/D ratio が有意に低値であった。抗接着分子抗体は、肺再灌流障害を抑制する可能性があることが示唆された。

索引用語：再灌流障害、抗 LFA-1 抗体、抗 ICAM-1 抗体
 reperfusion injury, anti-LFA-1 antibody, anti-ICAM-1 antibody

はじめに

肺移植後早期に reimplantation response と呼ばれる一過性肺機能低下がみられる¹⁾。この原因として再灌流障害が重要と考えられている^{2,3)}。再灌流障害の原因として好中球による血管内皮細胞傷害が重要な役割をしている^{4,5)}。好中球による血管内皮細胞傷害は好中球がまず血管内皮細胞に接着することが必要である⁶⁾。また再灌流による活性化された血管内皮細胞では接着分子の発現が増強し、好中球との結合性の増強が見られることが近年明らかになってきている⁷⁾。接着分子による好中球、血管内皮細胞間の接着は複数のレセプター・リガンド（カウンターレセプター）系によって支配されている。この系の一つに LFA-1, ICAM-1 系がある。LFA-1 (lymphocyte function associated

antigen-1 : CD11a/CD18) は膜貫通糖蛋白で、 α 鎖+ β 鎖のヘテロダイマー構造をとりインテグリンファミリーに属し、腹腔マクロファージを除くほぼ全ての白血球に発現する。LFA-1 のリガンドである ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1 : CD54) は特徴的な S-S 結合を含む IgG 様ドメインを5個もち、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、血管内皮細胞に発現する⁸⁾。

今回、この系に対する抗体として抗 LFA-1 抗体：WT. 1 (anti-rat CD 11a : mouse IgG₂ a)⁹⁾、抗 ICAM-1 抗体：1A29 (anti-rat CD54 : mouse IgG₁)¹⁰⁾を用いて、再灌流障害の抑制効果について実験的に検討した。

対象と方法

体重250~300 g の Wister 系ラットを用いてエーテル吸入麻酔、気管内挿管下に人工呼吸器を用いて FIO₂ 0.21, 1 回換気量 8~10 ml/kg, 換気数70~80回/分の調節呼吸を行った。左第5肋間にて開胸、ヘパリン200 U/kg 静注後に左

浜松医科大学 第一外科
 原稿受付 1993年10月18日
 原稿採択 1994年1月10日

肺動静脈をクランプ、主気管支を肺虚脱状態でクランプし、温阻血モデルを作成した。温阻血時間を45分、再灌流時間を8時間とし¹¹⁾、以下の3群を作成した。

I群：control 群

クランプ10分前に control 抗体として、mouse IgG 1 mg/kg を大腿静脈より静注した。

II群：WT.1投与群

クランプ10分前に WT.1 1 mg/kg を大腿静脈より静注した¹²⁾。

III群：WT.1, 1A29投与群

クランプ10分前に WT.1 と 1A29 を各々 1 mg/kg ずつ大腿静脈より静注した¹²⁾。

I-III群について、阻血前（各群 n = 6）、阻血終了直後（各群 n = 6）、再灌流2時間後（各群 n = 6）、再灌流8時間後（各群 n = 6）に左肺組織を採取し、正肺の lung tissue wet/dry weight ratio (W/D ratio), lung tissue myeloperoxidase activity (MPO activity) を測定した。また阻血前、阻血終了直後、再灌流2時間後、再灌流8時間後に動脈血を採取し、respiratory index (RI) を測定した（各群 n =

6）。(実験総数各群30) (Fig. 1)。

W/D ratio は、採取した肺組織重量を湿重量とし、60℃48時間乾燥後の同組織重量を乾重量として算定した¹³⁾。

MPO activity は、肺組織と 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) を混和し、過酸化水素にて酸化し、650 nm にて吸光度測定を行った^{14), 15)}。

RI は、挿管 tube 内 FiO₂ を 0.21 として、(A-aDO₂)/PaO₂ にて算定した。

抗接着分子抗体は、各抗体を産生する hybridoma (mouse IgG) を BALB/c mouse の腹腔内へ注入し腹水型として生産させ、caprylic acid にて精製し、ConA blast aggregation assay にて活性を測定した。更に SDS-PAGE にてモノクローナル抗体であることを確認し、比色計にて 1 mg/ml であることを確認してから投与した。

統 計

実験値は mean ± S. D. で表示し、平均値の差の検定は、2群間では対応の無い場合を二標本 t 検定、対応のある場合を一標本 t 検定で行い、

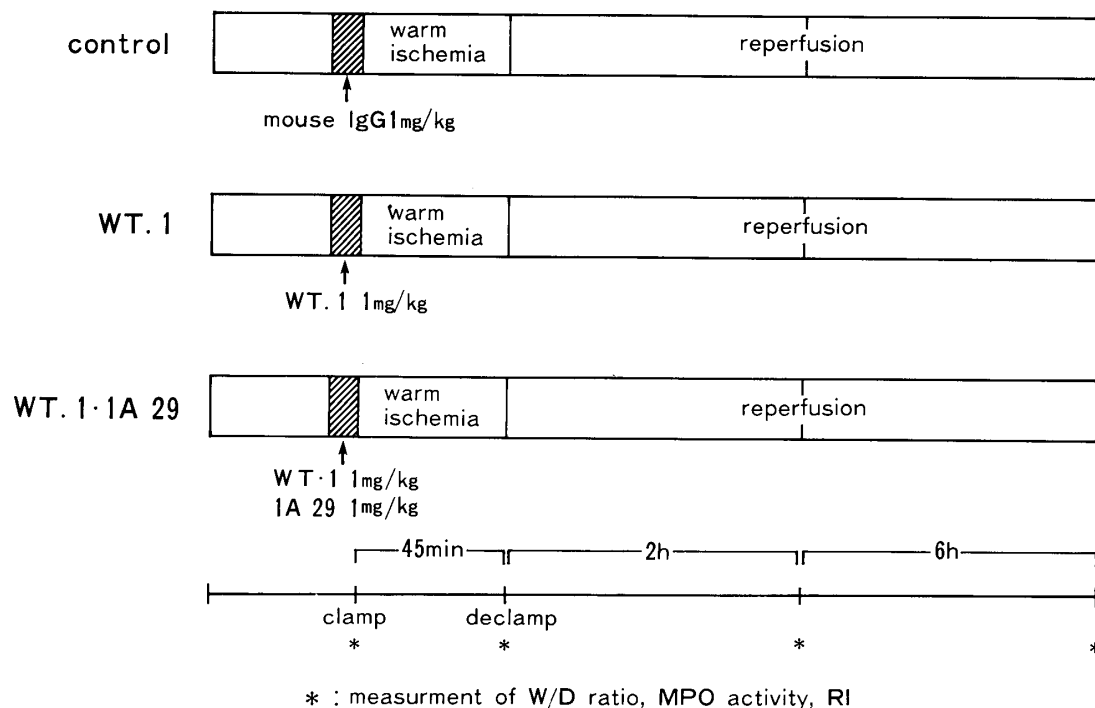


Fig. 1 Protocol of experiment

3 群間是对应の無い場合を一元配置分散分析法, 対応のある場合を二元配置分散分析法にて行った。危険率は, 5 %未満を有意とした。

結 果

W/D ratio: 阻血前と阻血終了直後では各群とも有意差を認めなかった。

阻血終了直後から再灌流 8 時間後まででは, control 群は阻血終了直後 3.56 ± 0.18 , 再灌流 2 時間後 4.74 ± 0.35 , 8 時間後 5.41 ± 0.22 で, 3 時点間で有意差を認めた。更に阻血終了直後と再灌流 2 時間後, 阻血終了直後と再灌流 8 時間後, 再灌流 2 時間後と 8 時間後で各々 2 時点間に有意差を認めた。WT.1 単独投与群は, 阻血終了直後 3.52 ± 0.26 , 再灌流 2 時間後 3.71 ± 0.21 , 8 時間後 4.65 ± 0.21 で, 阻血終了直後と再灌流 8 時間後, 再灌流 2 時間後と 8 時間後の 2 時点間に有意差を認めた。WT.1/1A29 併用投与群では, 阻血終了直後 3.59 ± 0.19 , 再灌流

2 時間後 3.79 ± 0.38 , 8 時間後 4.02 ± 0.32 で, 阻血終了直後と再灌流 8 時間後の 2 時点間で有意差を認めた。

I-III 群間で比較すると, 阻血前と阻血終了直後では有意差を認めなかったが, 再灌流 8 時間後で 3 群間に有意差を認めた。更に 2 群間で比較すると, 再灌流 2 時間後で control 群と WT.1 単独投与群, control 群と WT.1/1A29 併用投与群で有意差を認めた。また再灌流 8 時間後で, control 群と WT.1 単独投与群, control 群と WT.1/1A29 併用投与群, WT.1 単独投与群と WT.1/1A29 併用投与群で各々有意差を認めた (Fig. 2)。

MPO activity: 阻血前と阻血終了直後では各群とも有意差を認めなかった。

阻血終了直後から再灌流 8 時間後まででは, control 群は阻血終了直後 0.46 ± 0.07 , 再灌流 2 時間後 1.52 ± 0.34 , 8 時間後 1.44 ± 0.36 で, 阻血終了直後と再灌流 2 時間後, 阻血終了直後

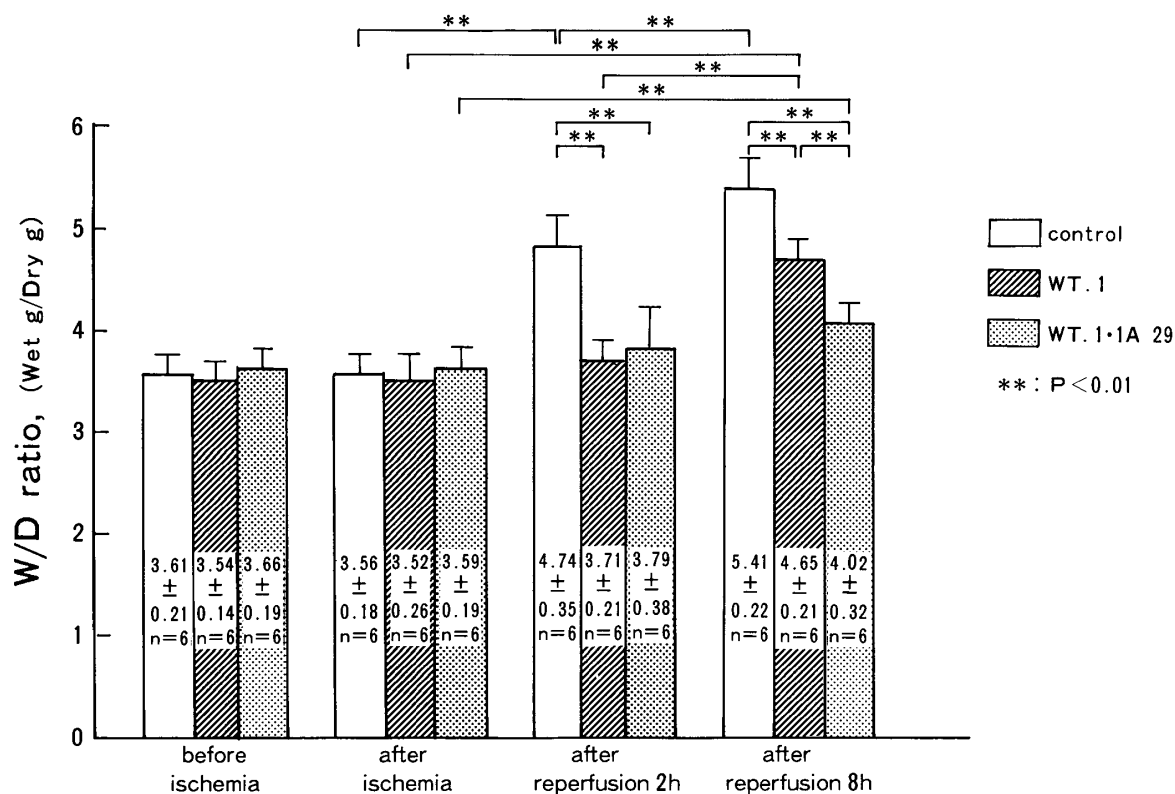


Fig. 2 Comparison among the 3 groups showed significant differences after 2 hours and 8 hours of reperfusion between control group and WT.1 group, and between control group and WT.1/1A29 group. The significant differences were shown after 8 hours of reperfusion between WT.1 group and WT.1/1A29 group.

と再灌流8時間後で各々2時点間に有意差を認めた. WT.1 単独投与群は, 阻血終了直後 0.50 ± 0.09 , 再灌流2時間後 0.61 ± 0.14 , 8時間後 0.67 ± 0.10 で, 阻血終了直後と再灌流8時間後の2時点間に有意差を認めた. WT.1/1A29 併用投与群では, 阻血終了直後 0.49 ± 0.06 , 再灌流2時間後 0.58 ± 0.21 , 8時間後 0.71 ± 0.12 で, 阻血終了直後と再灌流8時間後の2時点間で有意差を認めた.

I-III群間で比較すると, 阻血前と阻血終了直後では有意差を認めなかった. 再灌流2時間後, 8時間後で control 群と WT.1 単独投与群, control 群と WT.1/1A29 併用投与群で各々2群間に有意差を認めた (Fig. 3).

RI: 阻血前と阻血終了直後では各群とも有意差を認めなかった.

阻血終了直後から再灌流8時間後までは, control 群は阻血終了直後 0.51 ± 0.07 , 再灌流2時間後 0.96 ± 0.09 , 8時間後 1.29 ± 0.16 で, 3時点間で有意差を認めた. 更に阻血終了直後

と再灌流2時間後, 阻血終了直後と再灌流8時間後, 再灌流2時間後と8時間後で各々2時点間に有意差を認めた. WT.1 単独投与群は, 阻血終了直後 0.50 ± 0.11 , 再灌流2時間後 0.66 ± 0.16 , 8時間後 0.84 ± 0.06 で, 再灌流2時間後と8時間後の2時点間に有意差を認めた. WT.1/1A29 併用投与群では, 阻血終了直後 0.51 ± 0.13 , 再灌流2時間後 0.63 ± 0.22 , 8時間後 0.70 ± 0.12 で, 阻血終了直後と再灌流8時間後で2時点間に有意差を認めた.

I-III群間で比較すると, 阻血前の阻血終了直後では有意差を認めなかった. 再灌流2時間後, 8時間後で control 群と WT.1 単独投与群, control 群と WT.1/1A29 併用投与群で各々2群間に有意差を認めた. また再灌流8時間後で, WT.1 単独投与群と WT.1/1A29 併用投与群で2群間に有意差を認めた (Fig. 4).

考 察

細胞間の相互作用には, 離れた細胞同士が液

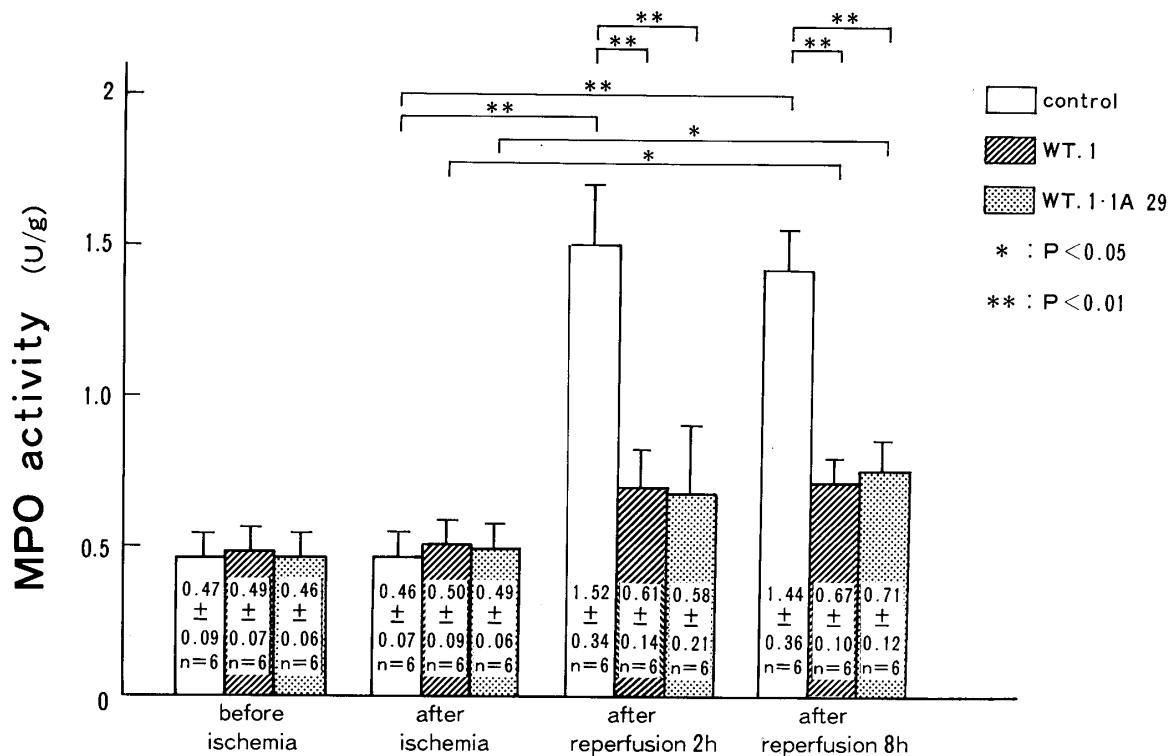


Fig. 3 Comparison among the 3 groups showed significant differences after 2 hours and 8 hours of reperfusion between control group and WT.1 group, and between control group and WT.1/1A29 group.

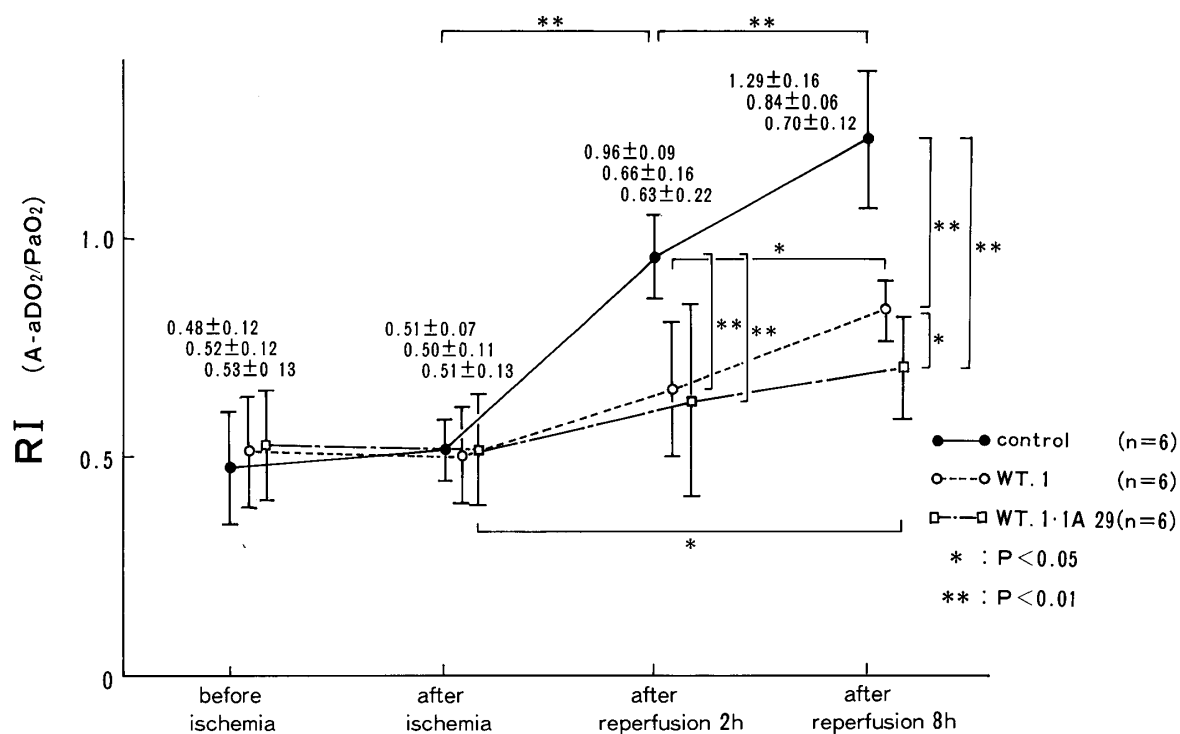


Fig. 4 Comparison among the 3 groups showed significant differences after 2 hours and 8 hours of reperfusion between control group and WT.1 group, and between control group and WT.1/1A29 group. The significant differences were shown after 8 hours of reperfusion between WT.1 group and WT.1/1A29 group.

性因子を介して行う場合と細胞同士が接触して行う場合がある。後者の病的な状態としては、炎症の場における好中球の集積、移植臓器の拒絶の際のリンパ球浸潤などがあげられる。これらの現象を司る因子として接着分子の存在が注目されている。また近年、諸臓器の虚血再灌流障害においても好中球浸潤と接着分子の関与が指摘されている。

肺においては、肺移植時に拒絶反応が起こる以前の早期に一過性に呼吸機能低下が見られることが指摘されており、reimplantation response と呼ばれている¹⁾。reimplantation response の原因として再灌流障害^{2,3)}、hilar stripping 時の除神経による neuropathic pulmonary edema¹⁶⁾、リンパ管や気管支動脈の遮断があげられているが、これらの原因のうち、再灌流障害が重要であると考えられている^{3,17)}。再灌流障害においては、好中球による血管内皮細胞傷害が重要な役割をしている^{4,5)}。肺再灌流

障害における血管内皮細胞傷害は、好中球が放出する蛋白分解酵素と活性酸素の共同作用により起こされる。再灌流による活性化された好中球は、蛋白分解酵素（ことに好中球エラスターゼ）を放出し肺組織、肺胞、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透過性肺水腫を引き起こす^{18,19)}。活性酸素は、生体内に存在する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を不活性化することにより蛋白分解酵素の作用を増強している²⁰⁾。また活性酸素は、好中球において NADPH oxidase により O_2^- が発生し血管内皮細胞傷害を引き起こす²¹⁾。

しかし流血中において好中球は通常状態では血管内皮細胞に付着することはない。従って、虚血再灌流において好中球が血管内皮細胞の傷害を起こすためにはまず好中球が血管内皮細胞に接着することが必要である⁶⁾。再灌流によって活性化された血管内皮細胞は接着分子の発現

が増強し、好中球との結合性が増強することが近年明らかになってきた⁷⁾。この現象は、再灌流によって活性化された血管内皮細胞が分泌する IL-1, IL-6, TNF などのサイトカインが関与することが推測されている²²⁾。

従って、好中球が血管内皮細胞に接着する段階を抗接着分子抗体を用いて抑制すればその後の肺組織障害を軽減できる可能性があると考えて本実験を行った。今回の実験で使用した抗体 WT. 1, 1A29 は、好中球上の接着分子 LFA-1, 血管内皮細胞の接着分子 ICAM-1 をおのおの特異的に阻害する中和抗体である。

病理組織上、虚血再灌流障害において好中球による肺組織障害は虚血再灌流側では再灌流直後より見られると言われている。また対側に及ぶ増量は再灌流後 2～3 日後より見られ、その場合は MOF と同様の状態になることが推測されている¹⁸⁾。今回の実験では左肺組織を採取して、好中球の虚血再灌流側肺組織への集積の指標として MPO activity を測定した。また虚血再灌流側肺の血管内皮細胞傷害に伴う透過性肺水腫による肺血管外水分量の増加を測る指標として左肺の W/D ratio を用い、肺血管外水分量増加による呼吸機能の低下の指標として RI を用いた。従って本実験では障害が対側へ及ぶ前の段階を虚血再灌流側で観察しており、実験データは虚血再灌流側肺の障害を反映しているものと考えられる。

各群とも MPO activity, W/D ratio が温阻血中はほとんど変化がないが、再灌流 2 時間後で control 群では MPO activity, W/D ratio 共に上昇しており、これに伴い RI も上昇している。このことは、好中球の肺組織への集積、肺組織障害が阻血中でなく主に再灌流中に進行し呼吸機能低下がおこることを示している。それに対し WT. 1 投与群は、再灌流に伴う MPO activity の上昇が control 群に比べて有意に抑制されている。このことより、好中球の肺組織への集積が WT. 1 による抑制されていることが推測される。更に W/D ratio の上昇とそれに伴う RI の上昇も control 群に比べて有意に抑制され、その後の血管内皮細胞傷害、肺組織

障害が抑制されていることがわかる。更に 1A29 を併用投与することによって再灌流 8 時間後において、W/D ratio, RI の上昇が WT. 1 単独投与群に比べて有意に抑制されている。このことより血管内皮細胞上の接着分子発現増強が 1A29 併用投与により併せて抑制される為、より血管内皮細胞傷害、肺組織障害が抑制されるものと推測される。また 1A29 併用投与による抑制効果増強は、再灌流 8 時間後から見られていた。このことより肺再灌流障害において、血管内皮細胞上の ICAM-1 の発現増強が LFA-1 の発現増強に比べて遅れることが推測され、抗体の抑制効果の発現にも時間差がでてきているものと推測される。しかし、心筋の再灌流障害においては ICAM-1 の発現増強は、再灌流 16 時間後より見られるとの報告もあり²³⁾、肺再灌流障害における発現増強時間についての今後の検討が必要である。

また今回は、LFA-1, ICAM-1 系について検討した。しかし、接着分子による好中球、血管内皮細胞間の接着はセレクチンと糖鎖を含む複数のレセプター、リガンド系が関与しており、再灌流障害抑制の為には、今後更なる研究が必要である。

結 論

ラットで左肺温阻血モデルを作成し、再灌流障害に対する抗接着分子抗体の投与効果を検討した。その結果、抗接着分子抗体 WT. 1 投与により再灌流後の好中球の血管内皮細胞への接着が抑制され、その後の肺組織障害は抑制されることが示唆された。更に 1A. 29 を併用投与することによってその抑制効果は有意に増強され、肺再灌流障害の抑制に有効である可能性が示唆された。

なお本研究は、東京臨床医学総合研究所の玉谷卓也先生(現在 JT 医薬基礎研究所)、宮坂昌之先生との共同研究の一環である。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った原田幸雄教授に深甚なる謝意をささげるとともに、多大なる御協力をいただいた川辺昭浩先生をはじめとする教室の諸兄に深謝の意を表し

ます。

本研究の要旨の一部は第10回日本呼吸器外科学会総会（千葉），第29回日本移植学会総会（金沢）において発表した。

文 献

- 1) Coopdr JD, Pearson FG, Patterson GA, et al : Technique of successful lung transplantation in humans. *J Thorac Cardiovasc Surg* **93** : 173-181, 1987.
- 2) Siegelmann SS, Sinha SB, Veith FJ, et al : Pulmonary reimplantation response. *Ann Surg* **177** : 30-36, 1973.
- 3) 伊達洋至 : 肺移植における reimplantation response の実験的研究. *日胸外会誌* **37** : 510-521, 1989.
- 4) Breda MA, Hall TS, Stuart RS, et al : 24 hour lung preservation by hypothermia and leukocyte depletion. *J Heart Transplant* **4** : 325-329, 1985.
- 5) Bishop MJ : Lung reperfusion in dogs causes bilateral lung injury. *J Appl Physiol* **63** : 942-950, 1987.
- 6) Harlan JM : Leukocyte-endothelial interactions. *Blood* **65** : 513-525, 1985.
- 7) Carden DL, Korthurs RJ : Mechanisms of postischemic vascular dysfunction in skeletal muscle. *Microric Endoth Lymphatics* **5** : 277-298, 1989.
- 8) 宮坂昌之編 : 接着分子, メジカルビュー社 : 2-22, 1991.
- 9) Tamatani T, Kotani M, Miyasaka M : Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* **21** : 627-633, 1991.
- 10) Tamatani T, Miyasaka M : Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells. *Int Immunol* **2** : 165-171, 1990.
- 11) Frank JV, S. B. P. Sinha, John SG, et al : Ischemic tolerance of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* **61** : 804-810, 1971.
- 12) 山本直樹 : 虚血再灌流障害における好中球と血管内皮細胞の相互作用. *免疫薬理* **10** : 291-297, 1992.
- 13) Pearce ML, Yamashita J, Beazell J : Measurement of pulmonary edema. *Circ Res* **16** : 482-488, 1965.
- 14) Simon EG, Kuei-Meng WU : Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* **59** : 1978-1985, 1985.
- 15) Cecilia Schierwagen : Improved method of quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharma Methods* **23** : 179-186, 1990.
- 16) Farbers : Neuropathic pulmonary edema further observations. *Arch Pathol* **30** : 180-197, 1939.
- 17) 木田孝志 : 肺移植における温阻血再灌流障害に対する EPC の効果. *日移会誌* **27** : 15-25, 1992.
- 18) Horiguchi T, Harada Y : The effect of protease inhibitor on reperfusion injury after unilateral pulmonary ischemia. *Trans* **55** : 254-258, 1993.
- 19) Senior RM, Tegner H, Kuhn C : The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis* **116** : 469-475, 1977.
- 20) Weiss SJ : Tissue destruction by neutrophils. *New Engl Med* **320** : 365-376, 1989.
- 21) Wakeyama H, Takeshige K, Takayanagi R, et al : Superoxide forming NADPH oxidase preparation of pig polymorphonuclear leukocytes. *Biochem J* **205** : 593-601, 1982.
- 22) 宮坂昌之 : サイトカインによる接着分子の発現と調節. *現代医療* **23** : 1615-1619, 1991.
- 23) 山崎 力, 世古義規, 矢崎義雄 : 心筋虚血再灌流障害における接着分子の役割. *最新医学* **46** : 37-43, 1991.

Effect of antibodies against neutrophil and endothelial adhesion molecules on reperfusion injury after unilateral pulmonary ischemia in rats

Tsuyoshi Imaizumi

First Department of Surgery, Hamamatsu University School of Medicine

We examined the preventive effect of monoclonal antibodies against neutrophil and endothelial adhesion molecules on reperfusion injury after unilateral pulmonary ischemia.

Warm ischemic lung models were prepared in rats. Warm ischemia was maintained for 45 minutes, and the reperfusion time was 8 hours. The rats were divided into three experimental groups. In group I (control group), the rats were treated with 1 mg/kg mouse IgG antibody before ischemia. In group II (WT. 1 group), the rats were treated with 1 mg/kg anti-LFA-1 antibody (WT. 1) before ischemia. In group III (WT. 1/1A29 group), the rats were treated with 1 mg/kg anti-LFA-1 antibody and 1 mg/kg anti-ICAM-1 antibody (1A29) before ischemia. In all 3 groups, the lung tissue wet/dry weight ratio (W/D ratio), lung tissue myeloperoxidase activity (MPO activity) and respiratory index (RI) were measured.

In group I, the W/D ratio, MPO activity and RI were significantly increased after 2 hours and 8 hours of reperfusion. In groups II and III, these parameters were increased after 8 hours of reperfusion, but the increase was significantly less than in group I. In group III, the increase of W/D ratio and RI was significantly less than in group II after 8 hours of reperfusion.

These results suggest that antibodies against neutrophil and endothelial adhesion molecules effectively reduced reperfusion injury.