

特異的トロンビン活性阻害による人工心肺後肺機能不全の抑制

田中, 健一郎
九州大学大学院医学研究院附属心臓血管研究施設外科部門

<https://doi.org/10.15017/7218217>

出版情報：福岡醫學雜誌. 92 (1), pp.7-20, 2001-01-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



原 著

特異的トロンビン活性阻害による人工心肺後肺機能不全の抑制

九州大学大学院医学研究院附属心臓血管研究施設外科部門

田 中 健 一 郎

Specific Inhibition of Thrombin Activity during Cardiopulmonary Bypass Reduces Ischemia-reperfusion Injury of the Lung

Kenichiro TANAKA

*Division of Cardiovascular Surgery, Research Institute of Angiocardiology,
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan*

Abstract The pathophysiologic role of thrombin in the development of lung injury after the normothermic cardiopulmonary bypass (CPB) was studied in the rabbit model. A control group (group D) was subjected to the pericardiotomy without institution of CPB. Group A rabbits (n=6) underwent left heart bypass (80 ml/kg/min) for 60 minutes without occlusion of the systemic or pulmonary artery and a succeeding reduced flow (20-30 ml/kg/min) for another 30 minutes, group B rabbits (n=6) underwent complete CPB (80 ml/kg/min) for 60 minutes in the working mode with occlusion of the pulmonary arterial trunk and a succeeding reduced flow without occlusion of the pulmonary artery for another 30 minutes, group C rabbits (n=6) underwent the same CPB technique as group B in conjunction with continuous intravenous infusion of argatroban (60 μ g/kg/min), the specific thrombin inhibitor. In this group, infusion of argatroban was initiated 60 minutes prior to institution of CPB and terminated at the end of the experiment. We sacrificed rabbits four hours after the experiment began, and assessed not only morphometrically thrombus formation, leukocytic infiltration and luminal narrowing of small-sized pulmonary arteries but also immunohistochemically the expression of tissue factor (TF) and IL-1 β , and physico-functionally respiratory index (RI) and pulmonary vascular resistance (PVR).

Rabbits in group A showed multiple occurrence of lung thrombi, luminal narrowing of small arteries, and mild infiltration of macrophages and neutrophils positive for TF, and, in addition, their RI and PVR became mildly worse. In group B, all these morphological and physico-functional parameters became much worse than those observed in group A rabbits ($p < .01$). In contrast, argatroban treatment could significantly improve these parameters ($p < .01$). The expression of TF and IL-1 β , however, was not significantly different in group A, B and C.

These findings indicate that thrombin function intimately participates in the development of pulmonary ischemia-reperfusion injury during CPB. In addition, the anti-thrombin treatment would be an effective therapeutical tool for the prevention of not only activation of extrinsic coagulation pathway but also its sequential inflammatory and circulatory disturbance in ischemia-reperfusion injury of lung during CPB.

はじめに

人工心肺 (CPB) は、開心術の補助手段として、あるいは重症呼吸・循環不全の治療法として広く使用されているが、ときに CPB 後の多臓器機能不全を合併症として発生する事が広く知られており²⁵⁾³⁸⁾, CPB 後症候群 (PPS) とも呼ばれている。特に CPB 後肺機能不全 (postperfusion lung) による呼吸障害は最も重大な合併症の一つである。PPS は、従来より、血液が CPB 装置と接触することにより血球や血小板、さらに凝固、線溶、補体系が活性化され組織の炎症、循環障害が惹起されることによると考えられてきた¹²⁾。近年、CPB における interleukin (IL)-1, IL-6 や $\text{TNF}\alpha$ など種々の炎症性サイトカインの血中増加が報告され¹⁴⁾³¹⁾³²⁾, その発生病態の複雑な機構が解明されつつある⁴⁴⁾。CPB 後の肺障害発生には、血液と CPB 装置との接触のみならず肺虚血・再灌流障害により非特異的炎症応答による高サイトカイン血症が全身性に血管内皮細胞、単球/マクロファージを活性化し、全身性過凝固状態⁴⁾⁴³⁾ を起こしていることが推測される。血液過凝固状態の一因として活性化マクロファージが発現した組織因子 (TF) による外因系凝固活性化が関与している可能性が示唆されているが、その詳細はいまだ不明である⁵⁾⁹⁾²¹⁾。

TF は、膜蛋白でサイトカイン受容体スーパーファミリーの一つであり、第 VII/VIIa 因子と複合体を形成し、第 VIIa 因子の補酵素として Ca^{++} 存在下にリン脂質膜上で第 IX, X 因子を活性化して凝固カスケードを増幅する¹¹⁾。TF の発現は、最近の *in vitro*, *in vivo* の研究より、血管平滑筋、単球/マクロファージや血管内皮細胞等多くの細胞が IL-1 や $\text{TNF}\alpha$ などの炎症性サイトカイン³⁾, エンドトキシン¹⁶⁾ やトロンビン²⁾ などの種々の刺激を受けて、誘導されることが明らかとなっている¹³⁾¹⁹⁾³⁷⁾。第 Xa 因子は、プロトロンビンをトロンビンに活性化し、トロンビンはフィブリノゲンをフィブリンに変換して血液凝固を生じることとなる。更に、トロンビンは上述の凝固系酵素としての役割のみならず間葉系細胞の増殖因子として、また催炎因子として作用する多機能因子である⁴²⁾。

従って、我々は、凝固、炎症の増幅因子として重要なトロンビン機能を調節することにより CPB 後肺機

能不全を軽減する可能性があるとの仮説をたて、家兎 CPB モデルを作製し、本モデルの呼吸循環動態の生理学的検討および肺の組織学的検討を行った。さらに TF, IL-1 β とその IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1ra) の組織内発現を免疫組織化学的に検討し、形態計測法による定量化をおこない PPS の発生病態についても検討し、特異的トロンビン活性阻害薬であるアルガトロバン (argatroban) の CPB 後症候群に対する治療の効果を検討した。

材料と方法

試薬、抗体

ヒト TF の 48-50 番目のアミノ酸配列, Lys-Cys-Phe を認識する抗ヒト TF モノクロー抗体 (K108) は、中村伸博士 (京都大学霊長類研究所分子生理部門) より供与された。このエピトープは、ヒト、家兎、ウシ、マウス TF のアミノ酸配列において共通である。ヤギ抗家兎 IL-1 β ならびにヒツジ抗家兎 IL-1ra ポリクロー抗体は、吉永秀博士 (熊本大学医学部病理学教室) より供与された。抗家兎フィブリノーゲンポリクローナル抗体、抗家兎マクロファージ抗体 (RAM11) は、それぞれ Cappel 社 (Durham, NC), Dako 社 (Carpinteria, CA) より購入した。アルガトロバン ((2R, 4R)-4-methyl-1-[N²-[(3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinoliny)-sulfonyl]-L-arginyl]-2-piperidine carboxylic acid) は三菱東京製薬より供与された²²⁾³⁵⁾。

実験動物の前処置

実験に用いた日本白色家兎 (雄, 体重 2.8-3.2 kg) 60 羽 (実験群 24 羽, 脱血家兎 36 羽) は、Biotech Co. (佐賀) より購入し、九州大学医学部附属動物実験施設にて飼育した。以下の実験プロトコルは、九州大学大学院医学系研究院動物実験倫理委員会の認可を受け『九州大学大学院医学系研究科における動物実験に関する指針』、『動物の保護および保管に関する法律』(法律第 105 号) ならびに『実験動物の飼育および保管に関する基準』(総理府告示第 6 号) のガイドラインの下に行った。全ての実験は清潔操作にて行い、thiamylal sodium (吉富製薬, 大阪, 5 mg/体重 kg) を静注の後、気管内挿管後、Harvard 型動物人工呼吸器にて 50% 酸素濃度, 1 回換気量 15-20 ml/体重 kg, 呼吸回

数 30 回/分，終末呼吸圧 2 cmH₂O にて呼吸管理を行った。麻酔の維持を fentanyl citrate（三共（株），東京，0.2 mg/体重 kg/分）および筋弛緩剤 vecuronium bromide（三共（株），東京，6 mg/体重 kg/分）の持続点滴静注で行った。

実験群の作製

図 1 に示すように，4 群を作製した。

左心バイパス（LHB）肺血流維持モデル（A 群，n = 6）：CPB の肺組織，呼吸機能に与える影響を検索する目的で本群を作製した。胸骨正中切開にて開胸した後，heparin sodium（15 mg/体重 kg）を耳静脈より注入，左心耳にカテーテルを挿入し左房圧を測定した。左心室心尖部より脱血し，回路内に人工肺を間置し，右大腿動脈より送血して，肺血流を保ったまま LHB を行った。60 分間最大流量（80 ml/体重 kg/分）にて

LHB を行った後，流量を下げて（20～30 ml/体重 kg/分）30 分間の補助循環後に LHB を終了した。LHB 終了 2.5 時間後に家兎を失血屠殺した。

CPB，肺虚血・再灌流モデル（B 群，n = 6）：CPB および肺の虚血・再灌流障害が呼吸・循環機能に与える影響を判定する目的で本群を作製した。右心房より脱血し左大腿動脈から送血して CPB を行い，その開始直後に肺動脈主幹部を閉塞し，A 群に準じて 60 分間最大流量（80 ml/体重 kg/分）にて完全バイパスを行った。その後肺動脈遮断を解除し 30 分間の部分 CPB を中心静脈圧 8 mmHg 以下に保つように調節し CPB を終了した。その後 2.5 時間観察して家兎を屠殺した。

アルガトロバン投与群（C 群，n = 6）：B 群と同様の実験操作に加え，アルガトロバンを CPB 開始 1 時

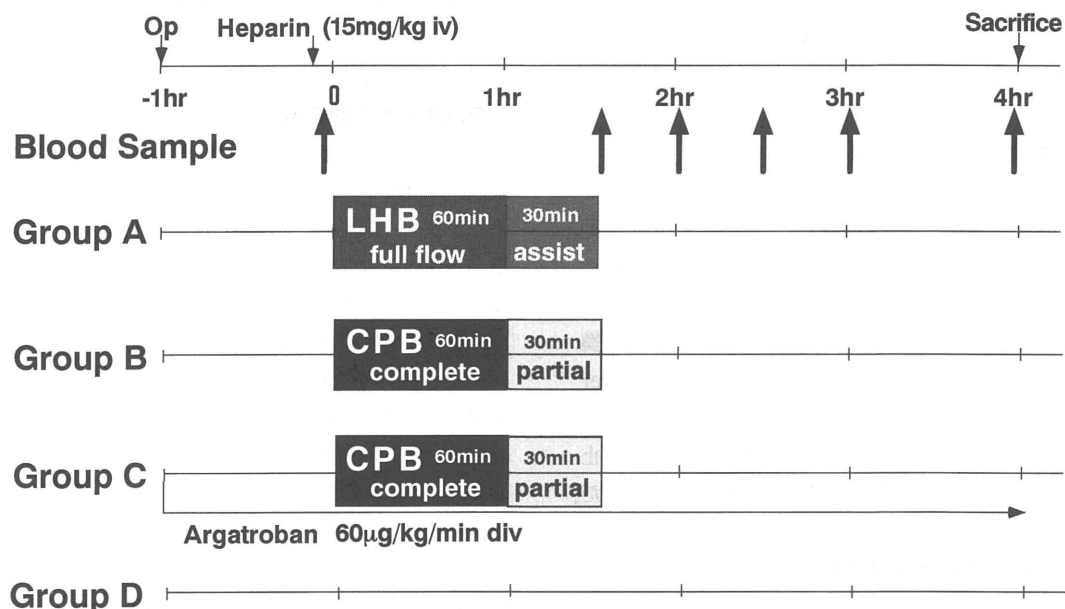


図 1 実験群

体外循環は A 群では左心室-右大腿動脈間で 60 分間最大流量（200 ml/分）の後，流量を下げて 30 分間補助循環を行った。B ならびに C 群では右心房-左大腿動脈間で CPB を 60 分間行い，その開始直後に肺動脈主幹部を閉塞し，60 分間の完全体外循環を行った。その後肺動脈遮断を解除し 30 分間の部分体外循環を行い CPB を終了した。アルガトロバン投与は手術開始時より実験終了時まで持続静注にて投与した。コントロール群を含めて，全ての実験動物は実験開始 5 時間後に屠殺した。

Group A：LHB 肺血流維持モデル（n = 6），Group B：CPB 肺虚血，再灌流モデル（n = 6），Group C：アルガトロバン投与群（n = 6），Group D：コントロール群（n = 6），：完全左心バイパス，：補助循環，：完全人工心肺，：部分体外循環，Op：手術

間前より 60 μg /体重 kg/分にて、実験終了時まで持続点滴静注した。

コントロール群 (D 群, $n=6$): 胸骨正中切開の後、全ての圧測定ラインを装着後、CPB はせず、手術開始後 4.5 時間で家兔を屠殺した。

以上の実験群において、CPB 中の活性化凝固時間を 500 秒以上に維持し、実験中のプロタミンによる中和は施行しなかった。

アルガトロバン投与量の決定

アルガトロバンの至適投与濃度を決定するために家兔 5 羽を用いて、アルガトロバンの家兔プロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) に与える影響を検討した。アルガトロバンを 10, 30, 60 μg /体重 kg/分の濃度で 30 分間持続投与し、PT ならびに APTT を測定した。PT および APTT が処置前値 ($39.8 \pm 9.1 \text{ sec}$, $9.1 \pm 1.0 \text{ sec}$) を 2 倍以上に延長させたアルガトロバンの投与量、即ち 60 μg /体重 kg/分、で上述の実験を行った。上記投与量にて各実験群において脳出血等の異常出血は認められなかった。

体外循環 (CPB) の手技

CPB 回路はポリビニルチューブ、ポリカーボネート連結管およびポリビニル貯血バッグを用いた九大式動物実験用 CPB 回路 (泉工医科工業、東京) を用いた。回路の充填血液には、手術直前に正常家兔 2 羽より採血した全血 200 ml を用いた。人工肺は回路内に熱交換装置を組み込んだ BABYVOX 膜型人工肺 (Baxter Healthcare Corp., Duare, CA) を用い、ローラーポンプ定常流にて還流した。完全 CPB 中の呼吸は停止し、終末呼気圧を人工換気にて 3 cmH_2O に維持した。鼻腔食道温を 37°C に保つように灌流温度を調節した。

血行動態、呼吸機能の判定

実験中の血行動態を把握するために、図 1 に示すごとく大動脈圧、中心静脈圧、肺動脈圧、左房圧を測定し、また各圧測定カテーテルより採血を行い、血液ガス分析を行った。また白血球数、血小板数の計測を行った。肺血流量の測定は主肺動脈にて 2 チャンネル超音波血流計 (Transonic, New York, NY) を装着して行った。以上の測定値より、循環動態の指標としての肺血管抵抗 ($\text{PVR} [\text{dyne/sec/cm}^5] = (\text{平均肺動脈圧} - \text{平均左房圧}) \times 79.9 / \text{肺動脈血流量}$) を算出した。それ

ぞれの PVR 値は、各実験動物の CPB 開始前の PVR 値との比にて表した。

呼吸機能の指標として、一般に手術後の気管内挿管の抜管の指標として臨床的に用いられており、酸素化能を示す呼吸指数 ($\text{RI} = \text{A-aDO}_2 / \text{PaO}_2$) を算出した。通常、臨床的な抜管基準としての RI 値は、1 以下とされている。

組織学的検索

屠殺時に気管・肺ならびに心臓を en bloc にて摘出後、肺は 4% パラフォルムアルデヒドにて肺動脈灌流 (灌流圧: 20 cmH_2O) ならびに気管内注入 (注入圧: 20 cmH_2O) により固定し、4 時間後に組織片を左下葉より切り出し、さらに同固定液にて 1 昼夜、4°C にて浸漬固定を行った。パラフィンブロックより 4 μm 厚の薄切切片を作製し、光顕的観察および以下に述べる免疫組織化学的検索を行った。光顕的観察は、hematoxylin eosin (HE), elastica van Gieson (EVG) ならびに phosphotungstic acid hematoxylin (PTAH) 染色を用いて検索した。

免疫組織化学的検索

免疫染色は Histofine SAB-PO キット (ニチレイ、東京) を用い、ストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (ABC) 法にて行った¹⁸⁾。非特異結合を抑えるために正常家兔血清にて 30 分間前処置後、1 次抗体 (濃度: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 4°C、1 晩反応させた。それぞれの切片は、対応する一次抗体の動物種 Ig に対する抗体を 30 分間反応させた後、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害する目的で、0.3% H_2O_2 -methanol で 30 分間処置し、その後ペルオキシダーゼ・アビジン・ビオチン複合体 (ニチレイ) を 30 分間反応させた。最後に呈色反応を 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を基質として用いて行った後、Mayer's hematoxylin もしくは methyl green にて後染色を行った。免疫特異性の確認のために、それぞれ一次抗体の代わりに非感作マウス、ヤギもしくはヒツジの IgG (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を使用し、陰性対照とした。

肺小動脈における内腔面積率の算出

EVG 染色を施した切片を用いて、細気管支レベルでの直角に切断された肺小動脈の少なくとも 20 個 (家兔 1 羽) について、それら血管の内弾性板と中膜筋層の辺縁をトレースすることにより内外の円周を Cos-

mozone 1S image analyzer (Nikon, Tokyo) を用いて計測し、それぞれより内腔面積と血管面積を算出した²⁸⁾。内腔面積/血管面積の比率より内腔面積率(%)を算出した。各個体の平均値より各群の平均値を算出し、統計学的に比較検討した。

多形核白血球(PMN), 血栓および組織因子, IL-1 β ならびに IL-1 ra 陽性細胞の密度

得られた標本の HE 染色及び PTAH 染色において、それぞれの強拡大($\times 400$) 1 視野当たりの PMN, 血栓数, TF, IL-1 β ならびに IL-1 ra 陽性細胞数を 1 羽当たり 20 視野測定し、各群の平均値を算出し、各々の密度を統計学的に比較検討した。測定にあたり、検者は組織切片の詳細を伏して測定を行った。

統計学的処理

測定結果は平均値 $\pm$ SD で表し、各群間の統計学的検定は unpaired student's t-test で行い、 $p < .05$ を統計学的有意差と判定した。

結 果

末梢血白血球数, 血小板数の経時的変化

図 2 a に各群の末梢静脈血白血球数の変化を示す。4 群の CPB 開始前の平均値は、 $2.27 \pm 0.20 \times 10^3 / \text{mm}^3$

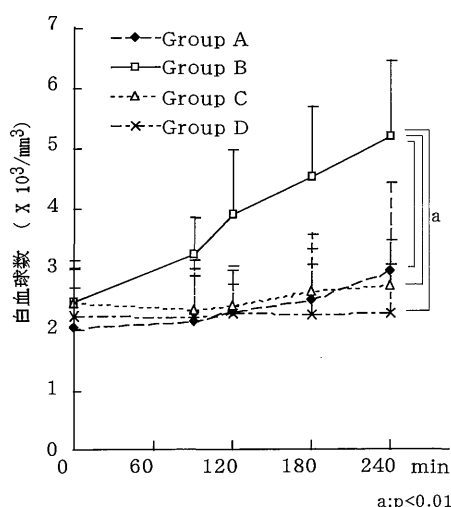


図 2 a 末梢静脈血白血球数の変化

図 2 a, b 末梢血白血球数 (a) ならびに血小板数 (b) の経時的変化

Group A: CPB (左心バイパス) 群 (n = 6), Group B: 肺虚血, 再灌流群 (n = 6), Group C: アルガトロバン投与群 (n = 6), Group D: コントロール群 (n = 6)

mm^3 で各群間に有意差を認めなかった。LHB (A) 群の実験終了時の末梢白血球数は $2.94 \pm 1.47 \times 10^3 / \text{mm}^3$ で有意の上昇を認めなかった。CPB 完全バイパス (B) 群では、CPB 開始前値に比して 120 分時には明らかに増加し ($p < .02$) 実験終了時にはさらに増加した ($p < .01$)。一方アルガトロバン投与 (C) 群の白血球数は実験開始前値と差がなく、実験終了時には B 群のそれに比べると有意に減少していた ($p < .01$)。

図 2 b に各群の末梢静脈血中の血小板数の変化を示す。CPB 開始前値ならびにコントロール (D) 群に比して CPB を行った CPB 完全バイパス (B) 群とアルガトロバン投与 (C) 群の血小板数は、CPB 終了時以降著明に減少した (A, B 群; $p < 0.001$, C 群 $p < 0.01$)。さらにアルガトロバン投与 (C) 群の実験終了時の血小板数は、A, B 群のそれぞれの値に比べて有意に高値であった ($p < .05$)。

なお中心静脈, 左心房から採取した血液の白血球, 血小板数についても検索したが末梢動脈血における数値と差異を認めなかった。

呼吸機能 (RI) と肺血管抵抗 (PVR) の経時的変化

図 3 a に各群の RI 値の変化を示す。4 群の CPB 開始前の平均値は、 0.86 ± 0.21 であった。LHB (A) 群

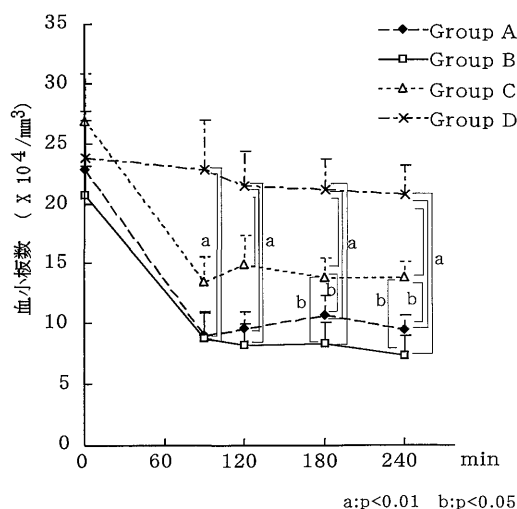


図 2 b 末梢静脈血血小板数の変化

では LHB 後の呼吸機能の変化は比較的軽微であり、LHB 終了時には 1.71 ± 1.29 、実験終了時には 1.86 ± 1.56 とコントロール (D) 群に比して上昇傾向を認めたが統計学的に有意差はなかった。CPB 完全バイパス (B) 群では、CPB 後の RI 値は次第に増悪し、CPB 終了時には 2.00 ± 1.35 、150 分の時点では 2.50 ± 1.35 、実験終了時には 4.29 ± 2.26 と CPB 開始前値に比して ($p < .01$)、また他群に比して有意に RI 値の悪化を認めた (対 C, D 群: $p < .01$, 対 A 群: $p < .05$)。アルガトロバン投与 (C) 群では、CPB 終了時の RI 値は 1.80 ± 1.87 、その後漸減し実験終了時には 1.11 ± 10.51 と減少し、B 群の実験終了時に比して有意に改善され ($p < .05$)、さらにコントロール (D) 群との有意差もなくなった。

図 3 b に各群の経時的 PVR 比の変化を示す。LHB (A) 群では、CPB 終了時と終了の 30 分までは 1.33 前後と軽度上昇に留まったが、以後上昇して CPB 終了 90 分で最高値に達し、その後下降傾向を示したものの実験終了時の値は 1.88 ± 0.70 (開始前値に比し $p < 0.01$) と高値を示した。CPB 完全バイパス (B) 群では CPB 離脱時に著明な PVR の上昇を認め ($p <$

0.01)、一旦減少した後に再び増加し実験終了時には 2.58 ± 0.70 ($p < 0.01$) となった。アルガトロバン投与 (C) 群の PVR は、CPB 終了時に 1.57 ± 0.56 、実験終了時には 1.65 ± 0.64 であり B 群に比していずれも低値を示した ($p < 0.05$)。これら C 群の PVR は、コントロール (D) 群のそれと比べて統計学的な有意差を認めなかった。

肺の組織学的変化

図 4 a-d に各群の代表的な HE 所見を示す。LHB (A) 群では、間質の軽度の浮腫と白血球、とくに PMN の浸潤を、また肺泡毛細血管のうっ血と一部の血栓形成を、また細気管支レベルでの肺小動脈の内腔狭窄を認めた。CPB 完全バイパス (B) 群では、これらの変化、とくに間質の PMN 集簇、肺小動脈ならびに肺泡毛細血管内の血栓形成が一層顕著となった。アルガトロバン投与 (C) 群は、B 群に比してこれら所見のいずれもが軽微であった。

図 5 a に、各群の高視野あたりの肺組織内 PMN 数を示す。特に、CPB 完全バイパス群では、肺泡隔壁に著明な PMN の集簇を認めた ($55.6 \pm 11.3/\text{HMF}$) が、アルガトロバン投与 (C) 群では $35.0 \pm 5.5/\text{HMF}$

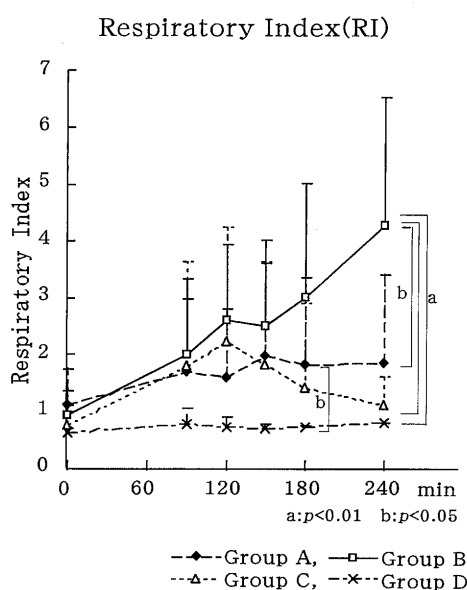


図 3 a 呼吸機能 (RI) の変化

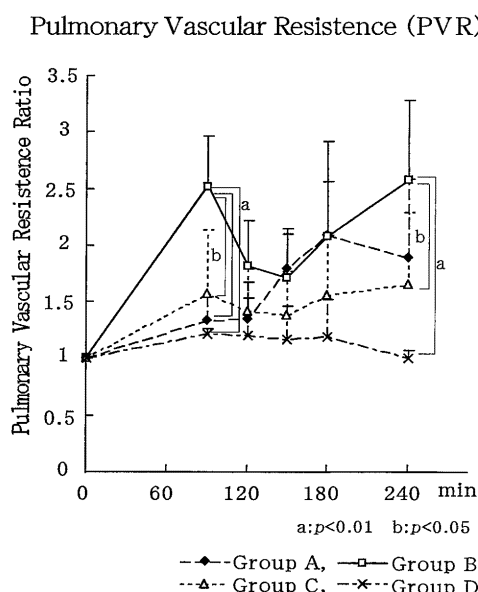


図 3 b 肺血管抵抗 (PVR) の変化

図 3 a, b 呼吸機能 (RI) ならびに肺血管抵抗 (PVR) の経時変化

Group A: CPB (左心バイパス) 群 ($n = 6$), Group B: 肺虚血, 再灌流群 ($n = 6$), Group C: アルガトロバン投与群 ($n = 6$), Group D: コントロール群 ($n = 6$)

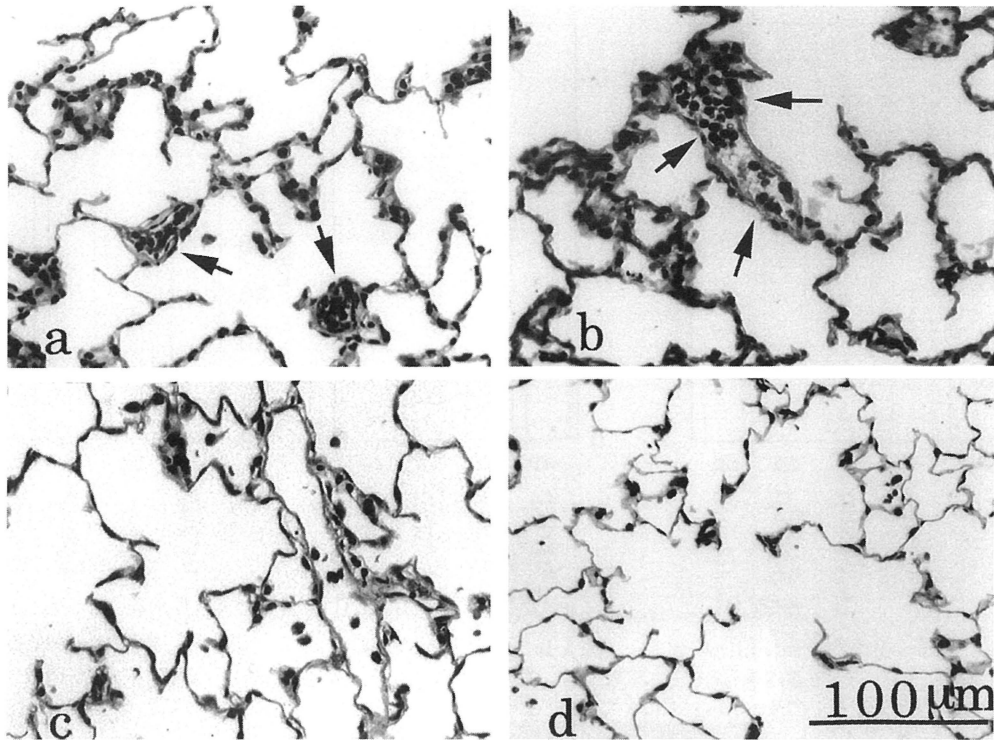


図4 光顕的組織所見

a: ECC (A) 群, b: 肺虚血, 再灌流 (B) 群, c: アルガトロバン投与 (C) 群, d: コントロール (D) 群. HE 染色, a-d の倍率は同じでスケールは 200 μm を表示. $\leftarrow$: 血栓

と有意に抑制された ($p < 0.01$). しかしながら C 群のそれは, コントロール (D) 群に比しては有意に高値であった ($p < .05$).

図 5 b に, 各群の高視野あたりの肺血栓形成の頻度を示す. LHB (A) 群では $0.9 \pm 0.2/\text{HMF}$ と血栓形成を認め, CPB 完全バイパス (B) 群ではさらに血栓形成が $2.8 \pm 1.1/\text{HMF}$ と多く, アルガトロバン投与 (C) 群では $0.4 \pm 0.5/\text{HMF}$ と血栓形成が著明に少く, A, B 群いずれに比しても有意に抑制されていた (それぞれ $p < .05$, $p < .01$).

図 6 a-d に各群の細気管支レベルでの典型的な肺小動脈の EVG 所見像を示す. LHA (A) 群 (図 6 a) では, 肺小動脈の軽度の中膜の肥厚および内腔の狭小化を認め, これらの変化は CPB 完全バイパス (B) 群 (図 6 b) でより顕著となったが, アルガトロバン投与 (C) 群では著明に減少した (図 6 c). 図 5 c に各群の肺小動脈内腔面積率 (%) を示す. LHA (A) 群のみならず CPB 完全バイパス (B) 群の肺小動脈内腔面積

率 (それぞれ $35.1 \pm 6.0\%$, $20.5 \pm 7.0\%$) は, コントロール (D) 群 ($54.8 \pm 6.4\%$) に比して著明に減少していた (それぞれ $p < .05$, $p < .01$). アルガトロバン投与 (C) 群の内腔面積率 ($62.5 \pm 12.2\%$) は, A ならびに B 群に比して著明に増大した ($p < .01$) が, コントロール (D) 群とは有意な差を認めなかった ($p = .15$).

免疫組織化学的所見

図 7 に, CPB 完全バイパス (B) 群の TF, IL-1 β , IL-1ra の代表的な免疫組織化学的所見を示す. TF 蛋白発現は, コントロール (D) 群では, 一部の肺胞内マクロファージ, II 型肺胞上皮細胞や血管ならびに気管支平滑筋細胞に見られるのみであったが, LHB (A) 群での肺内陽性細胞はその数を増し, とくに浸潤した PMN や単球/マクロファージの多くが TF 陽性であった. 血管内皮細胞の明らかな陽性所見は認められなかった. 一方, CPB 完全バイパス B 群では, 陽性浸潤白血球細胞の増加が顕著でその反応強度も増した.

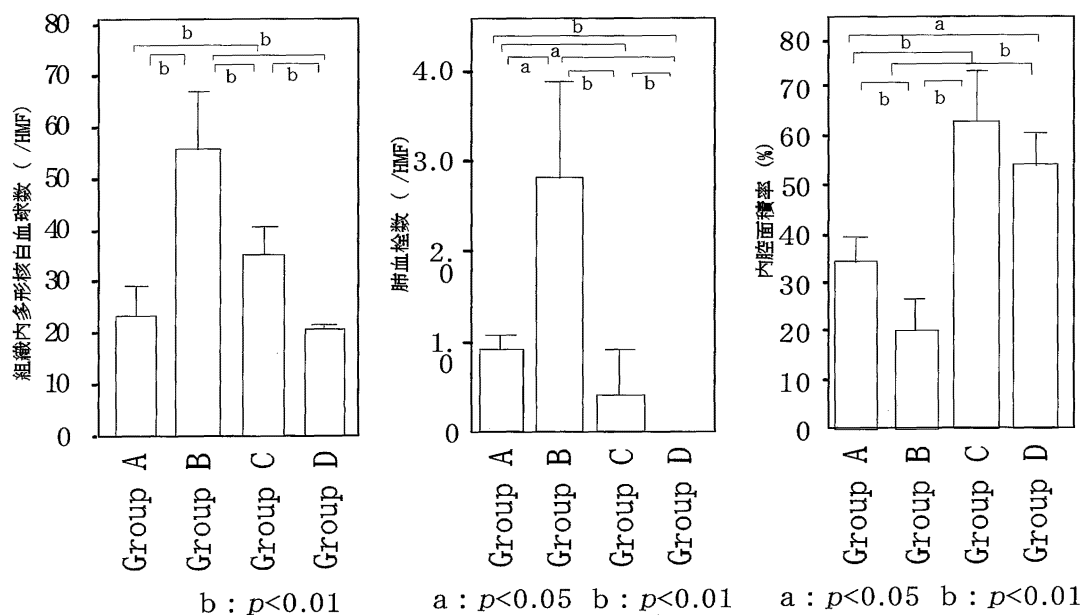


図 5 a 各群の組織内多形核白血球数 図 5 b 各群の肺血栓頻度 図 5 c 各群の内腔面積率
 図 5 a-c 各群の肺組織内多形核白血球数 (a), 血栓発生頻度 (b) ならびに肺小動脈の内腔面積率 (c)
 Group A: CPB (左心バイパス) 群 (n = 6), Group B: 肺虚血, 再灌流群 (n = 6), Group C: アルガトロバン投与群 (n = 6), Group D: コントロール群 (n = 6)

TF 陽性肺胞内マクロファージ, II 型肺胞上皮細胞もその数と免疫反応性を増した. さらに肺胞隔壁毛細血管ならびに細静脈の一部の内皮細胞も TF 陽性を示した.

各群の TF 陽性細胞の出現頻度を比較する為に, 肺胞領域の高視野あたりの TF 陽性細胞数を形態計測的に測定した. その結果を図 8 a に示す. LHB (A) 群では TF 陽性細胞数は, $14.6 \pm 7.2/\text{HMF}$ とコントロール (D) 群の $4.5 \pm 1.3/\text{HMF}$ に比し著明な増加を認め ($p < .05$), CPB 完全バイパス (B) 群では $28.5 \pm 8.6/\text{HMF}$ とさらに有意に増加した ($p < .001$). アルガトロバン投与 (C) 群での TF 陽性細胞数は $25.6 \pm 6.8/\text{HMF}$ であり, B 群のそれと比べ有意差を認めなかった.

各群の IL-1 β と IL-1ra 陽性細胞は, 主として PMN, 肺胞内マクロファージであったが一部の内皮細胞も IL-1ra 陽性であった. 図 8 b に各群の高視野あたりの IL-1 β 陽性細胞数を示す. CPB 完全バイパス (B) 群のみ, $20.8 \pm 7.0/\text{HMF}$ と有意にその発現細胞数の増加を認めた ($p < .05$). 図 8 c に各群の高視野

あたりの IL-1ra 陽性細胞数を示す. CPB 完全バイパス群は, IL-1ra 陽性細胞数の増加傾向を認めるも統計学的有意差はなかった.

上述の TF, IL-1 β , IL-1ra の免疫組織化学的検索における陰性対照群には, いずれも偽陽性所見を認めなかった.

考 察

本研究における CPB・肺再灌流障害モデルの病態学的特徴

本実験で用いた CPB 完全バイパス時の肺虚血・再灌流障害モデルにおける肺の主な病理学的変化は, 1) 肺間質に見られる PMN, 単球/マクロファージの集簇, 2) 肺小, 細動脈ならびに微小循環系の血栓多発, 3) 肺動脈収縮による内腔狭小化, により特徴付けられる. これらの変化は, これ迄報告されたヒトならびに動物モデルに見られる肺虚血・再灌流障害後の肺病変に極めて類似している¹⁾²⁰⁾. さらにこれら病理学的変化に一致して肺生理学的には, RI 値の悪化, PVR 値の著明な亢進が肺虚血・再灌流障害群の動物に認めら

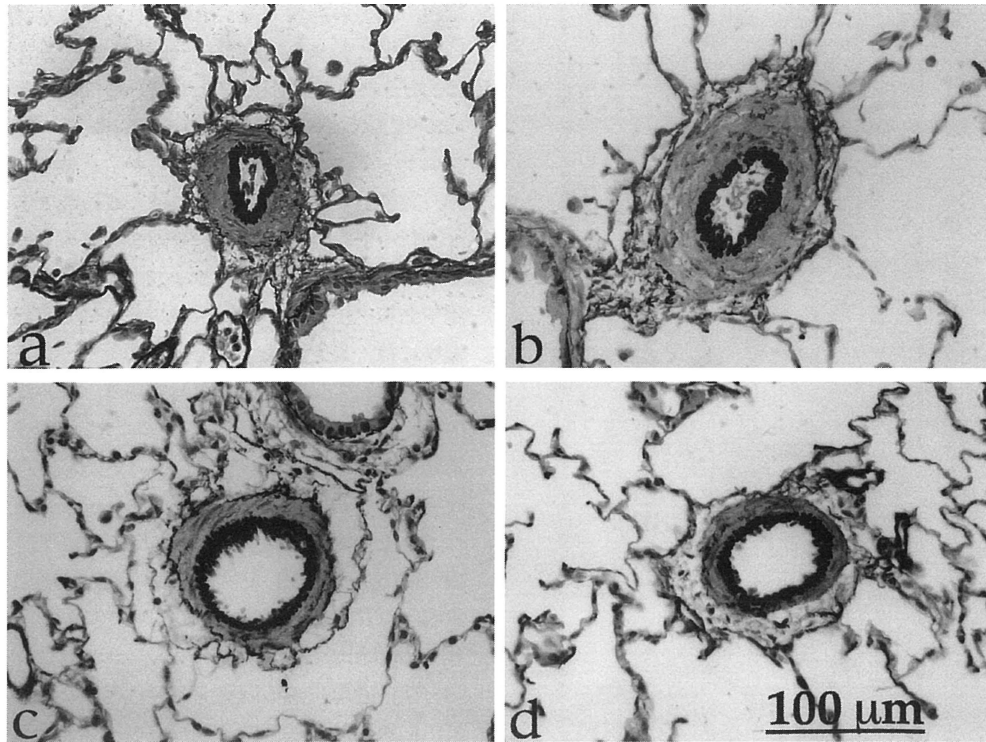


図6 各群の肺小動脈の光顕所見
a: CPB (左心バイパス, A) 群, b: 肺虚血, 再灌流 (B) 群, c: アルガトロバン投与 (C) 群, d: コントロール (D) 群, EVE 染色

れたことから, 本研究での家兎モデルは, ヒトの CPB 後肺機能不全に見られる病態¹⁵⁾³⁶⁾ を良く再現していると考えられる. 従って, 本モデルはその発生病理の解析や薬剤の治療効果判定に極めて有用と考えられる. これ迄, プタ⁴⁶⁾ や犬²⁹⁾ を用いた動物モデルの報告は多いが, 両肺動脈の血流を遮断して作製した家兎モデルの報告は, 我々の知る限りでは, 本実験が初めてである.

CPB・肺再灌流障害の病態発生には浸潤白血球の TF 過剰発現が関与している

今回の CPB 完全バイパスモデルで認められた肺動脈ならびに毛細血管の血栓多発ならびに末梢動脈血の血小板減少の機序を明らかにする為に免疫組織化学的に TF 蛋白の局在を検討すると, 肺組織に集簇した PMN, 単球/マクロファージの多くが TF を発現しており, とりわけ高度に浸潤した PMN の TF 陽性所見が明らかであった. 肺血流を維持した LHB (A 群) にも, 血液過凝固と肺組織の TF 陽性白血球数の増加が

認められたが, 肺虚血・再灌流障害群 (B 群) ではこれらの所見は, 明らかに高度であった. 従って本モデルの血液過凝固状態に浸潤白血球が発現している TF が密に関与している可能性が推測される. 血栓の多くに TF 陽性白血球がしばしば混在していたこともこの可能性を裏付ける所見と考えられる. 単球/マクロファージや血管平滑筋細胞の TF 発現が, 炎症性サイトカイン, エンドトキシン, 低酸素などの刺激により亢進することはよく知られている²⁾³⁾¹¹⁾¹³⁾¹⁶⁾¹⁹⁾²⁹⁾³⁷⁾. しかしながら, 好中球による TF 発現については, 今なお議論を残している. 近年, Higure ら¹⁷⁾ は, 家兎閉塞性胆管炎モデルにおいて浸潤 PMN が免疫組織化学的に TF 陽性であることから, 活性化 PMN が TF を発現しうることを, さらにこの TF 過剰発現が肝組織の過凝固状態の原因となっている可能性を示唆している. 我々の免疫組織化学的所見も彼らの結果と類似しているが, 好中球の TF 発現機構ならびにその臓器虚血・再灌流障害時の病態学的意義については, *in vitro* の

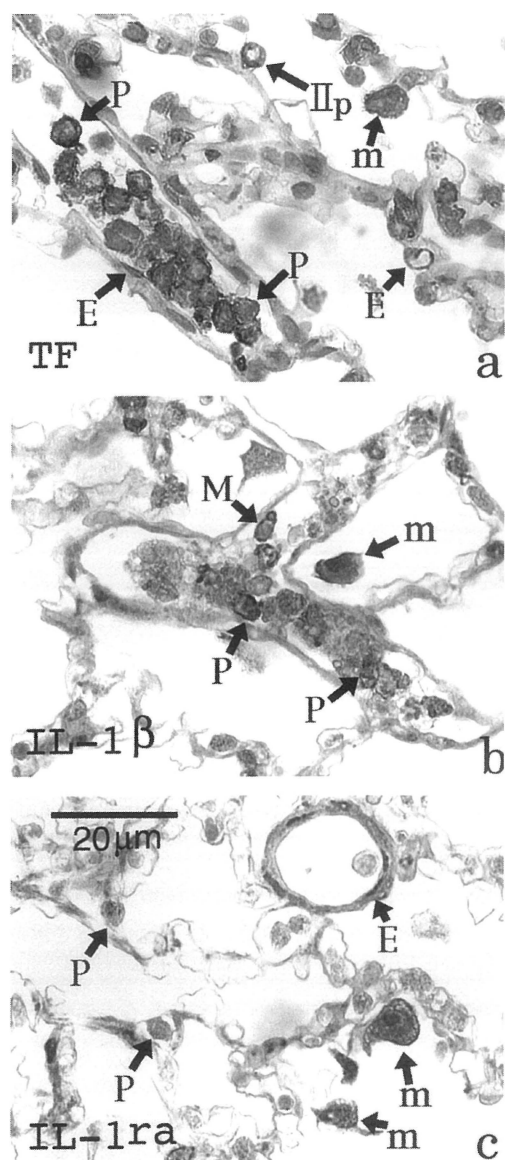


図7 肺虚血、再灌流(B)群のTF, IL-1 β , IL-1raの免疫組織化学的所見
P: 多形核白血球(PMN), M: 単球, m: 肺胞内マクロファージ, E: 血管内皮細胞, IIp: II型肺胞上皮 $\times 100$

実験を含めて今後の検討課題である。本実験では、肺血管内皮細胞の明らかなTF発現は一部にしか確認することが出来なかったが、培養血管内皮細胞を用いた*in vitro*実験では、単球/マクロファージや血管平滑筋細胞と同様に、上述の種々の刺激によりTF mRNA,

蛋白、活性の発現亢進が誘導されることが証明されている²⁾³⁾¹¹⁾¹⁶⁾。また血管内皮細胞におけるTF発現には、好中球、血小板、フィブリンの関与も示唆されている²³⁾。しかしながら血管内皮細胞のTF発現は、マクロファージのそれに比して明らかに低値であることから、実験群の血管内皮細胞の多くが陰性であったのは、今回行った免疫組織化学的検索法の感度と関係しているかもしれない。単球/マクロファージ、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞の凝固活性、とくにTF活性の亢進機序には、最近の*in vitro*研究により、以下の様な要因が関与していると考えられている。1)炎症性サイトカイン、エンドトキシン、トロンビン、PAFや低酸素による産生細胞の活性化、2)TF遺伝子上流域に存在するNF κ B, AP-1, Sp-1やEgr-1などの転写活性部位を介するmRNA転写亢進と持続³⁰⁾、3)TF蛋白合成の促進、4)細胞膜表面に局在することによる細胞性TF活性の発現と5)TFに富む空胞の脱落過程(shedding of TF-rich vesicles)⁴⁰⁾による細胞からの分離、遊離による間質での活性発現、である。一般に、血液過凝固状態の発生におけるTF発現亢進に重要な病態学的要因は、種々の刺激による細胞の活性化過程である。本実験のCPB完全バイパス群では、浸潤白血球によるTFの発現亢進が免疫組織化学的検索にて認められたことから、CPBならびに肺虚血・再還流障害による白血球や血小板の活性化に加えてIL-1 β などの諸要因により誘導されうる白血球のTF発現亢進が、血液外因性凝固系の活性化を招来した可能性が推測される。

CPB・肺再灌流障害はIL-1 β により助長される

今回作製したCPB完全バイパスモデル(B群)は、末梢白血球数の著増と肺組織内白血球、とくにPMNの集簇が顕著であり、陰性対照群(D群)に比して明らかにIL-1 β 陽性白血球数の増加を認めた。本実験におけるこのPMNならびにマクロファージのIL-1 β 産生亢進機序の詳細は明らかでないが、肺虚血による組織障害、再灌流による凝固・線溶系、補体、キニン・カリクレイン系の活性化や接着因子を介する内皮細胞・白血球接着ならびに白血球の組織内遊走が関与することが報告されている³³⁾³⁸⁾。さらにこのIL-1 β に加えてTNF α やIL-6⁶⁾などの炎症性サイトカインによる自己分泌、傍分泌機序、さらに白血球が産生する活

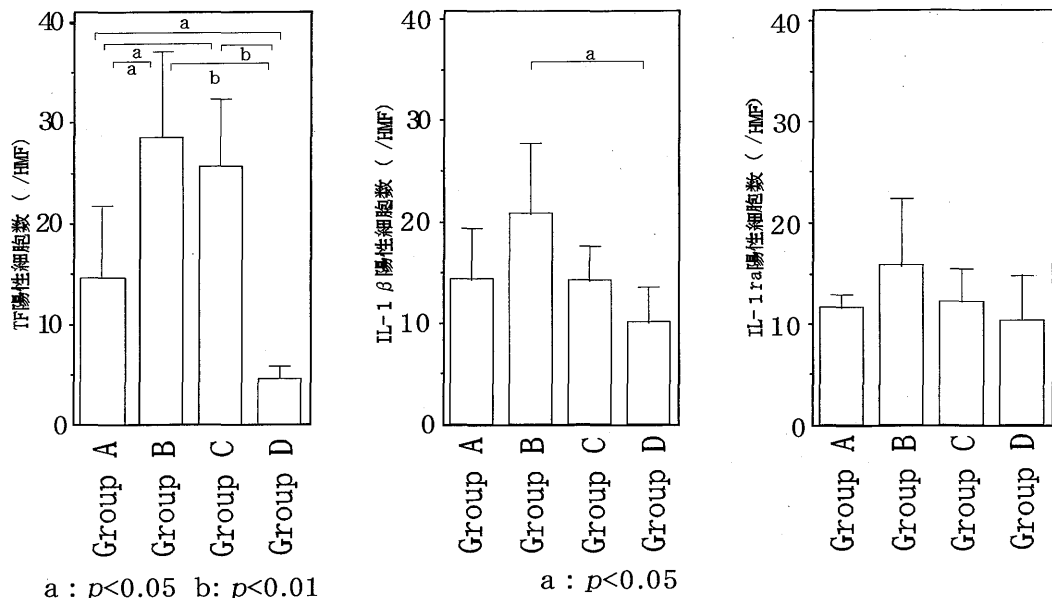


図8 a 各群のTF陽性細胞数 図8 b 各群のIL-1 β 陽性細胞数 図8 c 各群のIL-1ra陽性細胞数
 図8 a-c 各群の肺組織内のTF (a), IL-1 β (b) ならびにIL-1ra (c) 陽性細胞出現頻度
 Group A: CPB (左心バイパス) 群 (n=6), Group B: 肺虚血, 再灌流群 (n=6), Group C: アルガトロバン投与群 (n=6), Group D: コントロール群 (n=6), HMF: High magnification field

性酸素やスーパーオキシドは、IL-1 β の産生を増幅すると考えられている³⁸⁾。CPBのみでもCPB装置に血液が接触することにより、白血球、血小板の活性化のみならず凝固・線溶系、補体、キニン・カリクレイン系の活性化が起こり、肺機能障害を誘発するが²⁷⁾³⁸⁾、TNFやIL-1などの血中炎症性サイトカイン値の上昇を引き起こすか否かについては議論を残している⁸⁾²⁷⁾⁴⁵⁾。今回の実験結果では、肺血流を維持したLHB (A群) では血液過凝固状態は誘発されるものの肺組織内の白血球浸潤やIL-1 β 陽性細胞数の明らかな増加には認められなかった。従って、CPB後肺機能不全には、肺虚血・再灌流後の血管内皮細胞や白血球の活性化による高サイトカイン血症が重要な役割を果たしていると考えられた。さらにアルガトロバン処置 (C群) では、肺組織のTF陽性細胞数には変化がなかったが、IL-1 β 陽性細胞数は減少する傾向にあった。したがって、血液過凝固により生じたトロンビンは、白血球の内皮細胞との接着やIL-1 β 産生をも促進してCPB後肺機能不全の発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

トロンビン活性阻害は血栓形成のみならず肺動脈収縮をも改善する

CPB後の肺動脈圧上昇は、臨床的にもCPB症候群の治療を困難にしている重要な要因の一つである。今回のCPB完全バイパスモデルにおいても、肺再灌流後のPVRは高値を示し、実験終了時の3時間迄漸増した。このPVRの経過に一致してRIも漸次悪化した。CPB後のPVR上昇には、本モデルに認められた血栓多発とともに肺動脈収縮による内腔狭窄が関与したと考えられる。この肺動脈収縮には、CPBならびに虚血・再灌流障害による白血球や血小板の活性化の他に、低酸素血症や虚血による内皮細胞障害の為に、内皮細胞由来弛緩因子 (EDRF)¹⁰⁾やPGI₂の産生低下、トロンビンによる平滑筋収縮³⁴⁾、血小板活性化によるTXA₂の増加⁴¹⁾や接着した活性化PMNが産生するスーパーオキシドラジカルによるNOの分解³⁹⁾などが関与していると考えられている。実際に、アルガトロバン投与により (C群)、PVRが明らかに改善されるとともにRIは陰性対照群 (D群) と有意差を認めない程に回復した。このPVRの改善は、アルガトロバン

処置による血栓形成の抑制のみならず上述のトロンビン活性に依存する肺動脈平滑筋細胞の収縮を抑制したと推定される。しかしながら動脈平滑筋細胞のトーン調整には、CNP、アドレノメデュリン、エンドセリンなど他の要因が関与している⁷⁾²⁴⁾²⁶⁾。従ってこれら因子の産生、代謝に与えるトロンビンならびにアルガトロバンの影響については未だ不明であり、今後の検討が必要である。

総 括

トロンビンの特異的活性阻害薬であるアルガトロバンは、我々が開発した家兎 CPB 完全バイパス（肺虚血・再灌流障害）モデルにおける肺機能障害を著明に改善した。アルガトロバン投与は、CPB 完全バイパスにより生じた血液過凝固、肺組織白血球浸潤とともに著明な肺動脈収縮のいずれをも有意に減少することが病理形態学的に確認された。免疫組織化学的に、末梢肺組織内の TF 陽性細胞数には変化がなかったが、IL-1 β 陽性細胞数は減少する傾向にあった。以上の所見より、CPB 完全バイパス時のトロンビン活性抑制は、肺内血液凝固、炎症を軽減するのみならず肺循環障害を予防するものに有効であることが示唆された。従って、トロンビン活性は肺虚血・再灌流障害の発生に重要な役割を果たしており、その制御は本症の有効な治療法の 1 つとなりうることを期待される。

謝 辞

抗ヒト TF モノクロー抗体 (K 108)、ヤギ抗家兎 IL-1 β ならびにヒツジ抗家兎 IL-1 α ポリクロー抗体をご供与頂いた中村伸博士（京都大学霊長類研究所分子生理部門）、吉永秀博士（熊本大学医学部病理学教室）に深甚の謝意を表します。動物実験のご指導を頂いた中島淳博先生（九大医学研究院心臓外科）、また動物実験助手、病理標本作製ならびに論文作成にあたり多大なご助力を頂いた中峰香織、藤井浩、緒方明子諸氏に深甚の謝意を表します。

参 考 文 献

1) Asada S and Yamaguchi M: Fine structural change in the lung following cardiopulmonary bypass. Its relationship to early postoperative course.

Chest 59: 478-483, 1971.

2) Bartha K, Brisson C, Archipoff G, de la Salle, C, Lanza F, Cazenave JP and Beretz A: Thrombin regulates tissue factor and thrombomodulin mRNA levels and activities in human saphenous vein endothelial cells by distinct mechanisms. J Biol Chem 268: 421-429, 1993.

3) Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS and Gimbrone MA Jr: Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium; characterization and comparison with the action of interleukin 1. Proc Natl Acad Sci USA 83: 4533-4537, 1986.

4) Boisclair MD, Lane DA, Philippou H, Esnouf MP, Sheikh S, Hunt B and Smith KJ: Mechanisms of thrombin generation during surgery and cardiopulmonary bypass. Blood 82: 3350-3357, 1993.

5) Burman JF, Chung HI, Lane DA, Philippou H, Adami A and Lincoln JC: Role of factor XII in thrombin generation and fibrinolysis during cardiopulmonary bypass. Lancet 344: 1192-1193, 1994.

6) Butler J, Chong GL, Baigrie RJ, Pillai R, Westaby S and Rocker GM: Cytokine responses to cardiopulmonary bypass with membrane and bubble oxygenation. Ann Thorac Surg 53: 833-838, 1992.

7) Cacoub P, Dorent R, Maistre G, Maistre G, Nataf P, Carayon A, Piette C, Godeau P, Cabrol C and Gandjbakhch I: Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome. Am J Cardiol 71: 448-450, 1993.

8) Cameron D: Initiation of white cell activation during cardiopulmonary bypass: cytokines and receptors. J Cardiovasc Pharmacol 27 Suppl 1: S1-S5, 1996.

9) Chung JH, Gikakis N, Rao AK, Drake TA, Colman RW and Edmunds LH Jr: Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass. Circulation 93: 2014-2018, 1996.

10) Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, Large SR, Wells FC and Wallwork J: Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in chronic obstructive lung disease. N Engl J Med 324: 1539-1547, 1991.

11) Edginton TS, Mackman N; Brand K and Ruf W: The structural biology of expression and function of tissue factor. Thromb Haemost 66: 67-79, 1991.

- 12) Edmunds LH Jr: Blood-surface interactions during cardiopulmonary bypass. *J Card Surg* 8: 404-410, 1993.
- 13) Elsayed YA, Nakagawa K, Kamikubo Y, Enjoji K, Kato H and Sueishi K: Effects of recombinant human tissue factor pathway inhibitor on thrombus formation and its *in vivo* distribution in a rat DIC model. *Am J Clin Pathol* 106: 574-583, 1996.
- 14) Frereng B, Philip I, Dehoux M, Rolland C, Langlois JM and Desmonts JM: Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108: 636-641, 1994.
- 15) Friedman M, Sellke FW, Wang SY, Weintraub RM and Johnson RG: Parameters of pulmonary injury after total or partial cardiopulmonary bypass. *Circulation* 90: II262-268, 1994.
- 16) Heyderman RS, Klein NJ, Daramola OA and Levin M: Modulation of the endothelial procoagulant response to lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- α in-vitro: the effects of dexamethasone, pentoxifylline, iloprost and a polyclonal anti-human IL-1 α antibody. *Inflamm Res* 44: 275-280, 1995.
- 17) Higure A, Okamoto K, Hirata K, Todoroki H, Nagafuchi Y, Takeda S, Katoh H, Itoh H, Ohsato K and Nakamura S: Macrophages and neutrophils infiltrating into the liver are responsible for tissue factor expression in a rabbit model of acute obstructive cholangitis. *Thromb Haemost* 75: 791-795, 1996.
- 18) Hsu S-M, Raine L and Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
- 19) Ichikawa K, Nakagawa K, Hirano K and Sueishi K: The localization of tissue factor and apolipoprotein (a) in atherosclerotic lesions of the human aorta and their relation to fibrinogen-fibrin transition. *Path Res Pract* 192: 224-232, 1996.
- 20) Johnson D, Thomson D, Hurst T, Prasad K, Wilson T, Murphy F, Saxena A and Mayers I: Neutrophil-mediated acute lung injury after extracorporeal perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107: 1193-1202, 1994.
- 21) Kappelmayer J, Bernabei A, Edmunds LH Jr, Edgington TS and Colman RW: Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation. *Circ Res* 72: 1075-1081, 1993.
- 22) Kikumoto R, Tamao Y, Tezuka T, Tonomura S, Hara H, Ninomiya K, Hijikata A and Okamoto S: Selective inhibition of thrombin by (2R, 4R)-4-methyl-1-[N²-[(3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinoliny)-sulfonyl]-L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid. *Biochemistry* 23: 85-90, 1984.
- 23) Kirchhofer D, Sakariassen KS, Clozel M, Tschopp TB, Hadvary P, Nemerson Y and Baumgartner HR: Relationship between tissue factor expression and deposition of fibrin, platelets, and leukocytes on cultured endothelial cells under venous blood flow conditions. *Blood* 81: 2050-2058, 1993.
- 24) Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H and Eto T: Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 720-725, 1993.
- 25) Kolff WJ, Effler DB, Groves LK, Hughes CR and McCormack KJ: Pulmonary complications of open-heart operations: their pathogenesis and avoidance. *Clev Clin Q* 25: 65-83, 1958.
- 26) Komatsu Y, Nakao K, Itoh H, Suga S, Ogawa Y and Imura H: Vascular natriuretic peptide. *Lancet* 340: 622, 1992.
- 27) Kruse-Elliott KT and Olson NC: CGS 8515 and indometacin attenuate cytokine-induced cardiopulmonary dysfunction in pigs. *Am J Physiol* 264 (4 Pt 2): H1076-H1086, 1993.
- 28) Kumamoto M, Nakashima Y and Sueishi K: Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol* 26: 450-456, 1995.
- 29) Lawson CA, Yan SD, Yan SF, Liao H, Zhou YS, Sobel J, Kiesel W, Stern DM and Pinsky DJ: Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest* 99: 1729-1738, 1997.
- 30) Mackman N: Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost* 78: 747-754, 1997.
- 31) Marti F, Munoz J, Peiro M, Bertran E, Ferran C, Octavio C, Garcia J and Rueda F: Higher cytotoxic activity and increased levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Am J Hematol* 49: 237-239, 1995.
- 32) Menasche P, Hayder S, Peynet J, Du Buit C, Merval R, Bloch G, Piwnica A and Tedgui A: A potential mechanism of vasodilation after warm heart surgery. The temperature-dependent release of cytokines. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107: 293-

299, 1994.

33) Montruccio G, Alloatti G, Mariano F, Comino A, Cacace G, Polloni R, De Fillipi PG, Emanuelli G and Camussi G: Role of platelet-activating factor in polymorphonuclear neutrophil recruitment in reperfused ischemic rabbit heart. *Am J Pathol* 142: 471-480, 1993.

34) Murohara T, Buerke M and Lefer AM: Polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. Role of selectins. *Arterioscler Thromb* 14: 1509-1519, 1994.

35) Okamoto S, Hijikata A, Kikumoto R, Tonomura S, Hara H, Ninomiya K, Maruyama A, Sugano M and Tamao Y: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic carboxamide portion. *Biochem Biophys Res Commun* 101: 440-446, 1981.

36) O'Leary CE, Fiori R and Hakim TS: Perioperative distribution of pulmonary vascular resistance in patients undergoing coronary artery surgery. *Anesth Analg* 82: 958-963, 1996.

37) Osterud B: Tissue factor: a complex biological role. *Thromb Haemost* 78: 755-758, 1997.

38) Royston D: The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 11: 341-354, 1997.

39) Rubanyi GM and Vanhoutte PM: Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 250: H815-H821, 1986.

40) Ryan J, Brett J, Tijburg P, Bach RR, Kisiel W and Stern D: Tumor necrosis factor-induced endothelial tissue factor is associated with subendothelial matrix vesicles but is not expressed on the apical surface. *Blood* 80: 966-974, 1992.

41) Slotman GJ, Burchard KW and Gann DS: Thromboxane and prostacyclin in clinical acute respiratory failure. *J Sug Res* 39: 1-7, 1985.

42) Stiernberg J, Redin WR, Warner WS and Carney DH: The role of thrombin and thrombin receptor activating peptide (TRAP-508) in initiation of tissue repair. *Thromb Haemost* 70: 158-162, 1993.

43) Tabuchi N and van Oeveren W: Procoagulant triggers during cardiopulmonary bypass. *Blood* 85: 1405-1406, 1995.

44) Taylor KM: SIRS-the systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 61: 1607-1608, 1996.

45) Yanagi F, Terasaki H, Matsukawa A, Ohkawara S, Morioka T and Yoshinaga M: Cytokine generation in rabbits during extracorporeal lung assists with mini hollow fiber lung. *Artif Organs* 20: 209-217, 1996.

46) Zehr KJ, Poston RS, Lee PC, Uthoff K, Kumar P, Cho PW, Gillinov AM, Redmond JM, Winkelstein JA, Herskowitz A and Cameron DE: Platelet activating factor inhibition reduces lung injury after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 59: 328-335, 1995.

(受付 2000-10-18)