

ホスホマイシン投与による 肺虚血再灌流障害の抑制効果に関する検討

林 博 樹 梶 原 直 央 平 良 真 博
木 村 雅 一 鈴 木 明 彦 内 田 修

東京医科大学外科学第一講座
(指導: 加藤治文 主任教授)

【要旨】 拒絶反応は、移植医療において解決されるべき最重要課題の一つとされ、その中でも周術期における急性拒絶反応の頻度と程度は術後成績を左右し、その要因として再灌流障害による影響が挙げられる。これまでに我々の研究室では犬肺同種移植モデルにおける Fosfomycin (FOM) 添加保存液の有用性が証明されたが、FOM の肺に対する免疫学的メカニズムに関しては未だ不明な点が多く残されている。ラット肺の虚血再灌流障害モデルを用いて FOM の虚血再灌流障害の効果について生理学的かつ病理学的、さらには免疫学的に検討した。対象群を FOM 非投与群、FOM 投与群に分類し、虚血再灌流後の動脈血酸素濃度、摘出肺における湿乾燥重量比、bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 中の tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interferon- γ (INF- γ)、interleukin-10 (IL-10) のサイトカインの濃度測定、病理組織学的検討を行なった。

再灌流後の酸素化は FOM 非投与群に比し FOM 投与群で良好であった。さらに FOM 投与後の摘出肺では、肺水腫の軽減効果が確認された。免疫組織染色および BALF 中のサイトカイン濃度の結果から、INF- γ に関して 3 群間に有意差は認めなかった。しかしながら IL-10 および TNF- α においては FOM 投与群で抑制効果が有意に認められた。また摘出肺の免疫組織染色においても同様な結果が得られた。

本研究により FOM 投与が虚血肺再灌流障害を抑制することが確認され、そのメカニズムとして炎症性サイトカインを介した免疫反応の関与が考えられた。

はじめに

世界で初めての肺の移植実験は 1907 年 Carrel が行なったネコの心肺ブロックの頸部移植¹⁾とされる。人体での肺移植は 1963 年米国ミシシッピ大学の JD Hardy により行なわれた²⁾。本邦では 1965 年に東京医科大学で左下葉肺の移植が行なわれた³⁾。しかし長期生存を得ることが出来ず、その原因として様々な問題点が浮き彫りになってきた。特に再灌流障害は臓器移

植後急性期障害の一因として考えられ、臓器移植に際し解決されるべき問題の一つであると考えられる。

Fosfomycin (FOM) は他に類薬のない、グラム陽性・陰性菌に幅広く効果を認める抗菌薬であり、感染症治療の場において長年使用されてきた。その治療過程において気管支喘息やアトピー性皮膚炎などの炎症性疾患に対する治療効果も知られる様になり、また薬剤性腎障害の軽減作用などがあることも臨床的に報告されてきた⁴⁾。これらの蓄積された臨床例は、

2008 年 1 月 8 日受付、2008 年 2 月 5 日受理

キーワード: ホスホマイシン、肺虚血再灌流障害

(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第一講座 林 博樹)

Tel: 03-3342-6111 (内線 5070) Fax: 03-3349-0326

FOMの持つ抗菌作用のみでは説明がつかず、薬剤作用における免疫系への関与、特に臓器保護効果が示唆されてきた⁵⁾。

最近の基礎的研究により、FOMは抗菌作用と共にリソソーム膜の安定化作用・免疫担当細胞の機能修飾作用等を有していることが明らかになってきた⁶⁾⁷⁾。また抗炎症作用・細胞障害の予防・抗アレルギー作用等の薬理作用も証明されており、現在までに腎臓でのこれらの効果が動物実験において報告されている⁵⁾。これまで我々の施設ではFOM添加肺保存液を用いて20時間肺保存を行ない、移植後6時間までのグラフトの機能評価を行なった。その結果、再還流後のガス交換能、肺湿乾重量比および病理組織学的所見においてFOM添加肺保存液が一般に臨床肺移植で使用されているEuro Collins肺保存液に比し優れていることが示され、犬肺同種移植におけるFOM含有肺保存液の有用性が確認された⁸⁾。しかしながらこのような効果がどのような免疫系システムに基づいて呼吸器病態の改善をもたらしているのかは依然として不明のままであり、呼吸器系臓器のviabilityを保護するFOMの有効性については未だに解明されていないメカニズムが多く存在するのが現状である。FOMはin vitroにおいてtumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 α (IL-1 α)、interleukin-1 β (IL-1 β)などに対する産生抑制作用や炎症性サイトカイン産生の修飾作用および膜の安定化作用を有することが証明されてきた⁹⁾¹⁰⁾。さらに一酸化窒素合成酵素(iNOS)mRNA発現を抑制し、iNOS産生量を減少させることによりNOの産生を抑制し、生体内での免疫応答の調節にも関与していると考えられてきた¹¹⁾。

本研究では様々な生物学的活性を有するFOMを用いて、*vivo*における肺虚血再還流障害の抑制を試みた。すなわち大型動物では困難とされたFOM投与後の免疫系システムのメカニズム解析を、FOM投与による肺虚血再還流障害軽減効果及び、*in vivo*におけるメカニズムの検討と共に行なった。

FOMのヒト末梢血を用いた実験ではTNF- α 、INF- γ の産生抑制、IL-10の産生増強作用が報告されており⁵⁾、また虚血再灌流障害の研究でも使用されているTNF- α およびINF- γ 、さらにIL-10を選択しbronchoalveolar lavage fluid内のサイトカインの濃度測定、摘出肺組織の免疫組織学的染色を行ない比較検討した。

研究材料および方法

I. 実験動物

体重250~350g、週齢8~10週のLewis系雄性ラット(日本クレア)を使用した($n=7\sim 8$)。尚、本研究は、動物実験に関する東京医科大学動物実験指針(東京医科大学雑誌51巻3号1993年)を遵守し、博愛の精神に基づき実験を行なった。

II. 使用薬物・機材

実験には以下の薬物を使用した。ラットの吸入麻酔としてイソフルレン(ダイナボット)、ヘパリン化目的でヘパリンナトリウム(アベンティスファーマ)を使用した。抗体としてanti-rat IL-10、anti-rat INF- γ 、anti-rat TNF- α (BioSource international, inc. CA. USA)を使用し、免疫組織染色にも1次抗体として使用した。免疫組織学的染色の2次抗体としてBiotinylated anti-Rat IgG(Vector, Laboratories, Inc. Burlingame. CA. USA)さらに発色目的にてABCキット(Vector, Laboratories, Inc. Burlingame. CA. USA)を使用した。

また組織標本作成のため10%中性緩衝ホルマリン液(武藤化学)、ジアミノベンチデン(和光純薬)、100%キシレンおよび100%エタノール(武藤化学)、1%過酸化水素加メタノール(三徳化学)、クエン酸緩衝液およびPBSならびに2%NSS加PBS(三菱化学ヤトロン)、マイヤー・ヘマトキシリンおよびマリノール(武藤化学)を使用した。ELISA法はImmunoassay Kit: Rat TNF- α , Rat IL-10, Rat INF- γ (BioSource international, inc. CA. USA)を使用した。

また小動物用人工呼吸器にはSN-480-7-10cc-2T(シナノ製作所)、全身麻酔器compact15(木村医科器械株式会社)および吸入麻酔剤気化器にはAV-5(木村医科器械株式会社)を使用した。PaO₂、PaCO₂の測定はSTAT PROFILE M(Nova Biomedical, USA)を使用した。また湿乾燥重量の測定には定温恒温器ベストアクメBL-111S(いすず製作所)を使用した。

III. 実験モデルの作成

ラットに前処置としてガラスチャンバー内でイソフルレンガスを吸入させ、仰臥位に固定し前頸部および前胸腹部に剃毛処理を施した。前頸部気管切開を行ない、14Gエラストー針外筒を気管内挿管チューブとして約2cm挿入固定、小動物用人工呼吸器SN-480-

7-10 cc-2T に接続、換気回数を 80 回/分、一回換気量を 5 ml/kg に設定、さらに術中は吸入酸素濃度 (fraction of inspiratory oxygen, FiO_2) を 100% ($FiO_2=1.0$) に設定した。人工呼吸器には全身麻酔器 compact15 および吸入麻酔剤気化器 AV-5 を接続、1% イソフルレンの持続投与による維持麻酔下での調節呼吸を行なった。前胸部正中に皮膚切開を加え胸部筋肉を剥離した後、第 4 肋間にて両側開胸、同部位にて胸骨を横切断し心および両側肺を露出した。左右の肺靭帯を切断後、左右の肺門部を剥離し、左肺門部全周性に血管用ターニケットを巻いて留置後、ヘパリンナトリウム 500 u/kg を経静脈的に投与し全身のヘパリン化を行なった。片側肺門部をターニケットで遮断する時には、遮断側の肺が十分に膨らんだ状態でターニケットにより肺門部の血流循環および換気遮断のためクランプを行なった。以上の実験系に対して左肺を虚血再灌流の対象とし、以下の 3 群に分けて実験群を作成した。

A 群：開胸後、2 時間経過観察のみ

開胸した状態のまま 2 時間経過観察のみを行なった。観察終了 5 分前に右肺門部をターニケットでクランプし、右肺すべての血流循環および換気を遮断、その間左肺換気のみで評価を行なった。

B 群：左肺を 1 時間クランプして後、再還流を 1 時間施行する群

左肺門部をターニケットでクランプし、常温で 1 時間左肺の虚血を行なった。1 時間後クランプを解放して、さらに 1 時間左肺の再灌流を行なった。再灌流操作の終了 5 分前に対側 (右) 肺門部をターニケットでクランプし、A 群と同様の操作を行なった。

C 群：処置 3 時間前に FOM 30 mg/kg 投与後、B 群と同様の操作

B 群と同様の操作を行なう 3 時間前に FOM 30 mg/kg を静脈内投与し、B 群と同様の評価を行なった。

IV. 評価方法

(1) 動脈血酸素分圧の測定

各群において動脈血酸素分圧 (PaO_2)、動脈血二酸化炭素分圧 ($PaCO_2$) を測定した。対側 (右) 肺門部をターニケットでクランプ後、動脈血を採取した。

(2) 病理組織学的検討

各群において摘出した左肺を、10% 中性緩衝ホルマリン液により固定、パラフィン切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を施行した。

(3) 肺湿乾燥重量比 (Wet/Dry ratio) の測定

左肺を摘出後直ちに湿重量を測定、その後定温恒温器ベストアクメ BL-111S 中に摘出肺を 70°C の状態で 1 週間留置し、乾重量を測定、肺湿乾重量比を算出した。

(4) 気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid) の検討

操作終了後、気管内挿管チューブより 3 回施行して左肺の気管支肺胞洗浄液を採取、-25°C にて凍結保存した。解凍後、遠心分離を行ない、ELISA 法にて各サイトカインの濃度を解析した。

(5) 免疫組織学的検討

呼吸器炎症反応の指標として TNF- α および INF- γ 、さらに IL-10¹²⁾ を選択し摘出肺組織の免疫組織学的染色を行ない比較検討した。各群において摘出肺を、10% 中性緩衝ホルマリン液に固定後パラフィン包埋を行ない、4 μ m 切片を作成した。100% キシレン中にて 3 回、各 10 回振盪の脱パラフィンを行なった後、100% エタノール中にて 3 回、各 10 回振盪を施行し親水を行なった。1% 過酸化水素加メタノール中に室温にて 30 分間浸し内因性ペルオキシダーゼを阻害、PBS にて 1 分間洗浄後、さらに PBS にて 5 分間洗浄してクエン酸緩衝液に浸した。抗原の賦活目的のため 120°C 10 分のオートクレーブ処理を行なった。室温で放置後、PBS にて 3 回、各 10 回振盪を行ない洗浄した。各一次抗体 (anti-rat IL-10 Ab、anti-rat INF- γ Ab、anti-rat TNF- α Ab) を 2%NSS 加 PBS にて 200 倍に希釈し、16 時間 4°C にて反応させた。次に PBS で 5 分間、3 回洗浄した後、Biotinylated anti-Rat IgG を 2% NSS 加 PBS にて 200 倍に希釈し室温で 30 分間反応させた。PBS で 5 分間、3 回洗浄した後、2%NSS 加 PBS にて 200 倍に希釈した ABC キットを室温 30 分間反応させた。再度 PBS で 5 分間、3 回洗浄した後デアミノベンチジン (3,3-diaminobenzidine) にて約 10 分間室温で反応させた。PBS で 10 分間洗浄した後、マイヤー・ヘマトキシリンにて 2 分間核染色を行ない PBS で 10 分間洗浄行なった。次に 100% エタノール 3 回、各 10 回振盪の脱水操作を行なった後、100% キシレンにて 10 回振盪の透徹を 3 回行ない、マリノールにて封入を行なった。

V. 統計処理

測定結果は平均値±標準誤差で表記した。各群間の統計学的有意差検定には一元配置分散分析および多重比較検定を用いた。危険率 5% 未満 ($P<0.05$) の場

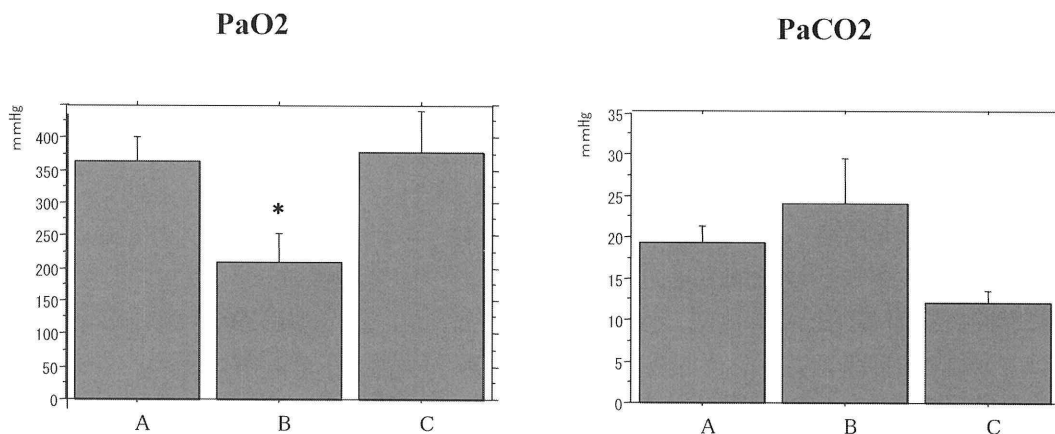


Fig. 1 Measurement of Arterial Oxygen Pressure
 The mean PaO₂ was 366.2±37.9 mmHg in group A, and 207.6±46.3 mmHg in group B, with a significant difference between the two groups (*P*<0.01). The mean PaO₂ in group C was 378.4±61.1 mmHg, which was significantly different from that in group B (*P*<0.05). There was no significant difference in the mean PaCO₂ among the three groups. (*A vs B; *P*<0.01 *B vs C; *P*<0.05)

合を有意差有りとして評価した。

結 果

(1) 動脈血酸素分圧の測定 (Fig. 1)

PaO₂ に関して A 群は平均 366.2±37.9 mmHg を示し、それに対し B 群では平均 207.6±46.3 mmHg であり両群間に有意差 (*P*<0.01) が認められた。一方 C 群の平均は 378.4±61.1 mmHg であり、B 群との間に有意差 (*P*<0.05) が認められた。また PaCO₂ に関し

ては A 群では平均 19.3±1.9 mmHg、B 群では平均 24.0±5.5 mmHg、C 群の平均は 12.0±1.4 mmHg であり 3 群間に有意差は認められなかったが、B 群と C 群の平均値の差は 10 mmHg 以上の差が示された。以上より A および C の両群では B 群に比し有意に酸素化が良好であることが示され、FOM を再灌流前に投与することで虚血再灌流後も酸素化の良好な状態が維持されることが示唆された。

(2) 肺湿乾燥重量比 (Wet/Dry ratio) の測定 (Fig. 2)

Wet/Dry ratio に関しては A 群では平均 5.7±0.2、B 群では平均 6.5±0.3、C 群の平均は 5.3±0.3 であった。A 群は B 群に比し有意 (*P*<0.01) に低値を示し、C 群は B 群に比し有意 (*P*<0.05) に低値を示した。また A 群と C 群の間には有意差は認められなかったことから B 群にのみ有意に肺水腫の程度が高かったことが示され、すなわち FOM を再灌流前に投与することで未然に肺水腫を防げる可能性が示唆された。

(3) 気管支肺胞洗浄液の分析 (Fig. 3)

ELISA 法にて肺胞洗浄液中の各サイトカイン蛋白発現濃度を測定した。IL-10 の測定では A 群で平均 58.5±10.1 pg/mL、B 群で平均 101.1±34.0 pg/mL、C 群で平均 12.9±3.4 pg/mL であった。3 群の比較では A 群と C 群の間に有意差 (*P*<0.05) を認めた。INF-γ の測定では 3 群間に有意差は認めなかった。TNF-α の測定では A 群で平均 0.1±0.0 pg/mL、B 群では平均 5.1±0.4 pg/mL、C 群では平均 0.0±0.0 pg/mL であった。A-B 群、A-C 群、B-C 群のいずれの群間でも有意差 (*P*<0.05) を認めた。A 群と C 群との間に有

W/D ratio

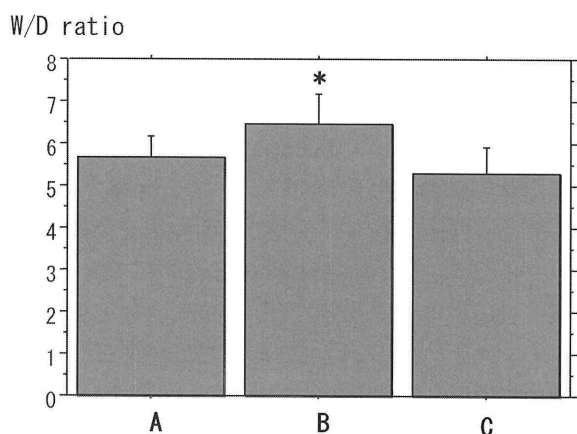


Fig. 2 Measurement of the Wet-to-Dry Weight Ratio of the Lungs
 Each column represents the mean with S.E.M. of 7 rats. The mean wet-to-dry weight ratio showed 5.7±0.2 in group A, 6.5±0.3 in group B and 5.3±0.3 in group C. The ratio in group A was significantly lower than in group B (*P*<0.01), and the ratio in group C was significantly lower than in group B (*P*<0.05). (*A vs B; *P*<0.01 *B vs C; *P*<0.05)

意差を認めたことにより、FOM 投与により炎症性サイトカインである TNF- α の分泌が BALF 中においても抑制されていたことが示された。

(4) 病理組織学的所見 (Fig. 4)

A 群では肺胞構造も保たれ、炎症性細胞の浸潤や血管内皮の障害も認められず、正常な組織構造が保たれていた。一方 B 群では血管内皮の腫脹、炎症性細胞の気道上皮への浸潤など重度の肺水腫様所見が認められ、出血も散在性に多発に認められた。それに対し C 群では再灌流障害に見られる炎症性細胞の浸潤、血管内皮の腫脹は殆ど認められず、また気道上皮下への炎症性細胞の蓄積も認められず肺胞構造は保たれており A 群に類似した組織所見が認められた。

(5) 免疫組織化学的所見 (Fig. 5)

IL-10、TNF- α 、INF- γ のいずれの染色においても A 群では組織内に炎症性サイトカインの発現を認めるような所見は認められなかった。一方 B 群では TNF- α 、INF- γ の両染色において気道上皮細胞上および気道上皮下に散在する免疫細胞の一部に TNF- α および IL-10 の強い発現を認め、気道上皮下にはサイトカインの発現を伴った炎症性細胞浸潤が多数認められた。それに対し C 群では HE 染色同様に A 群に近似した組織所見が認められ、気道上皮細胞上に炎症性サイトカインの発現を認めるような所見は認められなかった。すなわち全ての免疫染色において A 群および C 群では炎症性サイトカインにおける蛋白レベ

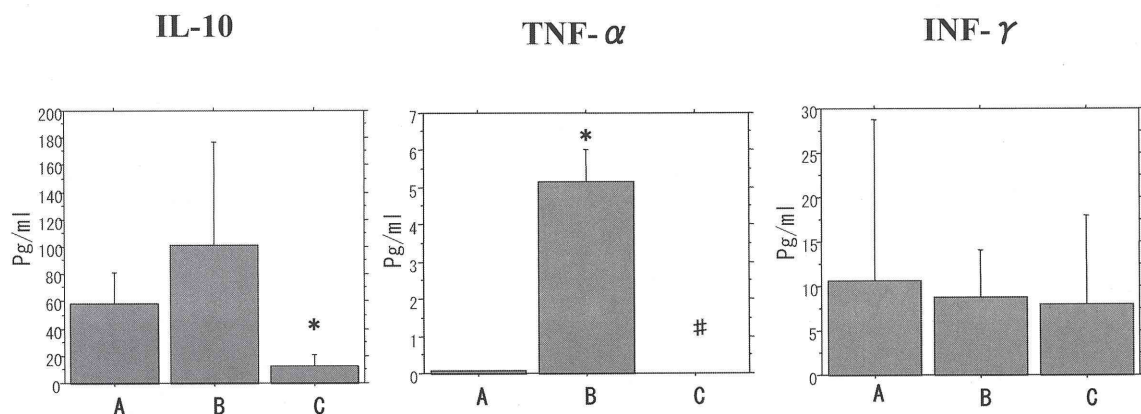


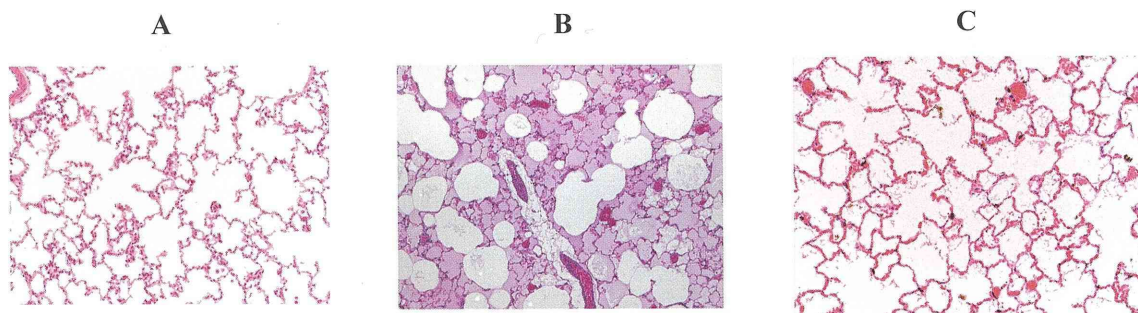
Fig. 3 Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid

The mean concentration of IL-10 showed 58.5 ± 10.1 pg/mL in group A, 101.1 ± 34.0 pg/mL in group 4B and 12.9 ± 3.4 pg/mL in group C. Comparison of the three groups showed a significant difference between group A and C ($P < 0.05$). There was no significant difference in INF- γ among the three groups.

The mean concentration of TNF- α showed 0.1 ± 0.0 pg/mL in group A, 5.1 ± 0.4 pg/mL in group B and 0.0 ± 0.0 pg/mL in group C. Significant differences were found between groups A and B, between groups A and C, and between groups B and C ($P < 0.05$).

There was no significant difference in the mean concentration of INF- γ among three groups.

(*A vs B; $P < 0.05$ *A vs C; $P < 0.05$ #B vs C; $P < 0.05$)

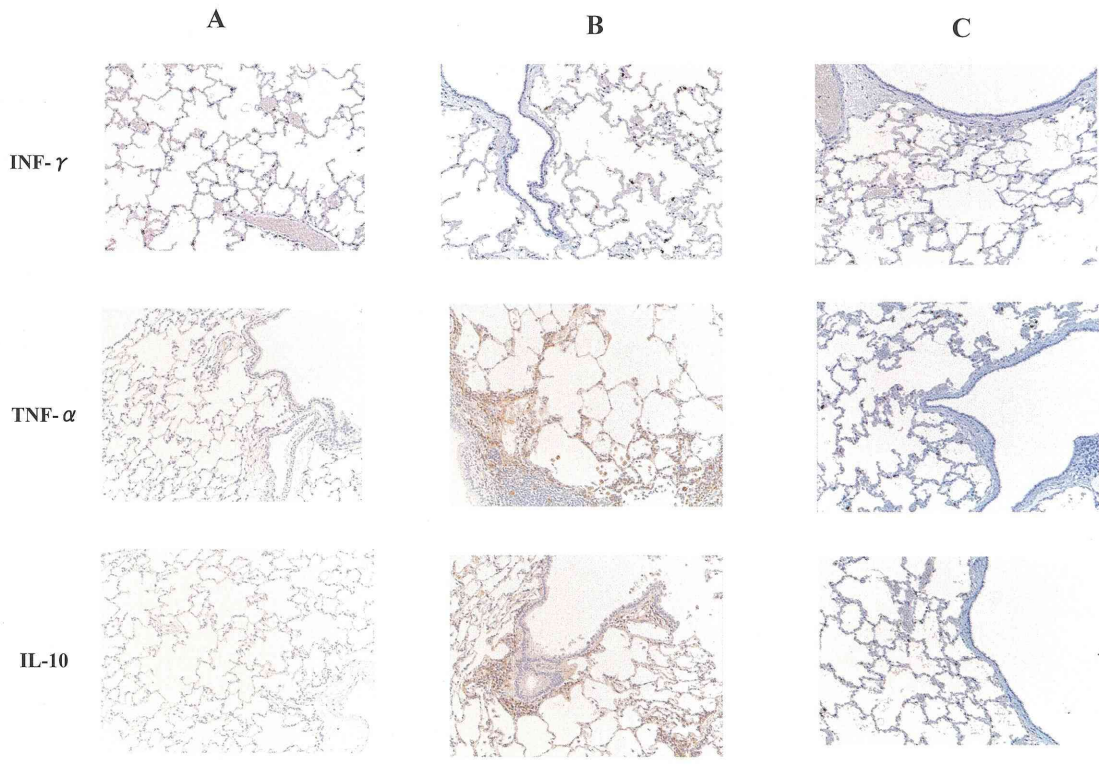


×200

Fig. 4 Histopathological Findings

In group B, changes suggestive of severe pulmonary edema were found, vascular endothelial swelling, and infiltration of inflammatory cells into the airway epithelium. Multiple bleeding diffuse lesions were found diffusely. In contrast, inflammatory changes were rarely found in group A and C.

Magnification, ×200.



×200

Fig. 5 Immunohistological Findings

In group B, strong expression of TNF- α and IL-10 was found in airway epithelial cells and immunocytes in the subepithelial region. However, no expression of INF- γ was noted. In contrast, no immunohistochemical staining for cytokines was observed in any specimens in groups A and C. Magnification, $\times 200$.

ルでの発現が認められなかったが、B群では気道上皮細胞とマクロファージやT細胞などの遊走中の免疫細胞に強い発現が認められた。

考 察

肺移植後 72 時間以内に発症する急性期障害の一つに肺虚血再灌流障害がある。肺虚血再灌流障害の程度は肺移植後の生存率に寄与する術後早期のグラフト機能不全に大きく影響し、また慢性期の閉塞性細気管支炎の発生との関連も数多く報告されてきた。肺における虚血再灌流障害の特徴は発症要因によって大きく2つに分類されている¹³⁾。

第1の要因として肺血管抵抗の上昇と血管透過性亢進による間質や肺胞腔の浮腫から生じる肺水腫が挙げられる。この病態によりガス交換能の低下を招くとされている¹⁴⁾。当教室における犬肺同種移植における FOM 含有肺保存液の研究⁸⁾で、有効な酸素化、湿乾燥重量比および組織学的検討により虚血再灌流障害後の肺水腫の軽減作用が確認され、本研究においても同様の結果が示された。FOM は臨床の場において、抗

菌活性以外の作用を有することが報告されており、これまでに多くの基礎的、臨床的な研究が報告されてきた。抗菌作用以外の点では、腎毒性の軽減作用やシスプラチン (CDDP)¹⁵⁻¹⁷⁾ およびアミノ配糖体の副作用軽減効果¹⁸⁾、難治性口内炎、アトピー性皮膚炎¹⁹⁾²⁰⁾、HAM (HTLV-1 associated myelopathy) などの治癒寛解効果²¹⁾ などが報告されている。しかし肺水腫軽減のメカニズムについては依然として不明であり、FOM の抗菌作用以外の多様な作用から説明しうる有力な報告は見当たらない。肺水腫の治療において肺毛細血管透過性と滲出機構の抑制目的のために用いられるステロイドの類似作用として、*In vitro* ではマクロファージのサイトカイン産生の修飾、肥満細胞の脱顆粒抑制、そして抗 IgE 抗体刺激によるヒト好塩基球のヒスタミン遊離抑制などが報告されている。しかしながら肺水腫とこれらの作用との関連性を示唆する報告はなく²²⁾²³⁾、今後の研究が望まれるところである。

第2の要因として移植後のドナー肺には再灌流後に好中球が集積し、フリーラジカルや炎症性ケミカルメディエーターによって肺血管内皮細胞透過性の亢

進と肺上皮細胞の損傷が発生することが挙げられる²⁴⁾。虚血再灌流障害のメカニズムは現時点では完全には解明されていないが、これらの細胞障害機構が移植後早期のグラフト機能不全発生への大きな要因と考えられる。

本研究ではヒト腎における研究報告を参考に虚血再灌流障害時に強い発現を示し、尚且つ FOM 効果の影響が予想される炎症性サイトカインとして TNF- α 、IL-10、INF- γ を選択し解析を行なった。

犬同種肺移植実験において、BALF 中の IL-2、TNF- α 、INF- γ が再灌流 4 時間後で著明な高値に示したとの報告があり²⁵⁾、炎症性サイトカインを抑制することにより虚血再灌流障害の軽減が期待できると考えられる。特に虚血再灌流障害の初期では活性化マクロファージや TNF- α 、INF- γ 、MCP-1 などの発現が認められており、さらに障害後期では活性化された好中球や TNF- α の発現が認められている²⁶⁾。抗 TNF- α 抗体の投与により虚血再灌流障害の抑制が報告²⁴⁾ されており、虚血再灌流障害への TNF- α の関与が考えられているが、その機能的役割についてはまだ解明されていない。本実験結果では INF- γ は優位に抑制を認めなかったが、FOM の強力な TNF- α 産生抑制効果が虚血再灌流障害の改善に寄与したことが推察された。また Concanavalin A で刺激したヒト末梢血由来単核球の FOM による各種サイトカイン産生に対する影響は、TNF- α 、INF- γ 、IL-2 など Th1 型サイトカインと Th2 型サイトカインの IL-4 の産生を抑制するが、その他の Th2 サイトカインである IL-5、IL-6、IL-10 などの産生抑制効果は認めなかったとの報告があり²³⁾。この研究は FOM 投与が Th1 型サイトカインを主体とする免疫反応を抑制する可能性を示している。

抗炎症性サイトカインである IL-10 は虚血再灌流障害後の肺静脈へのフィブリン沈着や末梢静脈の塞栓を plasma plasminogen activator inhibitor (PAI) や tissue-type plasminogen activator (t-PA) などの不均衡を変化させることにより減少させる²⁷⁾ とされ、別な報告では虚血再灌流障害よりむしろ炎症と T-cell が介在する免疫反応を抑制することにより肺を保護する²⁴⁾ と考えられている。ラットでは FOM 投与による IL-10 の産生増加作用の報告はなく、本研究においては FOM 投与による、IL-10 値の有意な上昇を認めなかった。この要因としてヒトとラットとの免疫や、FOM 投与の条件の違いなどが関係していると考えさ

れるが今後実験の追従が必要と考えられる。

最近の報告で虚血再灌流障害に導く経路の一つとして、好中球活性化との関連がコンセンサスを得ている²⁶⁾。本田らは FOM の好中球機能抑制作用を報告しており²⁸⁾²⁹⁾、好中球における本モデルに関する詳細な検討の余地があると考えられる。

一般的には虚血再灌流障害のメカニズムは、虚血によりマクロファージが活性化し各種炎症性サイトカインを放出、次に再還流後ドナー肺に好中球が集積、フリーラジカルや炎症性メディエーターによる肺血管内皮細胞のアポトーシスが進行した結果、透過性亢進が出現するとされている。その結果として肺上皮細胞の傷害が発生し肺水腫、低酸素血症、肺高血圧症などの一連の病態を引き起こすと考えられている。さらに血管内膜細胞の傷害による内皮細胞での一酸化窒素 (NO) 産生の低下、活性酸素種 (ROS) とエンドセリン (ET-1) の増加が肺血管抵抗の上昇をもたらし¹³⁾³⁰⁾、アラキドン酸や platelet activating factor (PAF) の関与も解明されてきている。これらの様々な要因が複雑に絡み合っググラフト機能不全の発生原因となっている³¹⁾。

現時点では FOM の抗菌作用以外の効果に不明な点が多く残っており、本研究により虚血再灌流障害軽減のメカニズムの一部が解明されたに過ぎない。今後、FOM 投与における呼吸免疫システムのネットワークの解明に更なる研究が必要と思われた。

結 論

- 肺移植後虚血再還流障害は FOM 投与により抑制された。
- そのメカニズムとして炎症性サイトカイン、特に TNF- α の関与が示唆された。
- FOM が有する細胞保護効果や好中球機能抑制作用なども再還流障害の軽減に関与していると推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対しご懇篤なご指導とご高配を賜りました東京医科大学、Patoric J. Barron 教授に厚くお礼申し上げます。また、東京医科大学外科学第一講座医局員および同動物実験センターの方々よりご理解、ご支援を頂きましたことに深く感謝いたします。また本論文の要旨は第 160 回東京医科大学医学会総会 (2007 年 11 月) において発表した。

文 献

- 1) Carrel A : V190, P18, J Hopkins Hospital B, 1907
- 2) Hardy JD : The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc* **31**(1-2) : 25-29, 1999
- 3) Shinoi K, Hayata Y, Aoki H, Kozaki M, Yoshioka K, Shinoda A, Iwahashi H, Ito M, Endo M : Pulmonary lobe homotransplantation in human subjects. *American journal of surgery* **111**(5) : 617-628, 1966
- 4) 武田 元、和田光一 : 抗生剤の腎毒性に関する研究、1家兎における fosfomycin と aminoglycoside 併用時の腎障害について。日本化療学会雑誌 **30** : 588, 1982
- 5) 渡部宏臣 : Fosfomycin の抗菌作用以外の薬理作用に関する基礎的、臨床的検討。日本化学療法学会雑誌 **47** : 129-146, 1999
- 6) Schinetti ML, Greco R, Giovannini L : In vitro effects of phosphomycin on intracellular cyclic nucleotides and histamine releases. *Drugs Exptl Clin Res* **5** : 363-365, 1979
- 7) Bertelli A, Giovannini L : Fosfomycin inhibition of pulmonary histamine release induced by aminoglycosides. *Exptl Clin Res* **6** : 329-332, 1980
- 8) Nagatuka Y, Nakajima S, Ogata K, Takahashi M, Nagata S, Hayashi A, Uchida O, Kouno T, Tsuboi M, Saito M, Konaka C, Kato H : Evaluation of a new solution containing fosfomycin for twenty-hour lung preservation. *Organ Biology* **7**(3) : 69-76, 2000
- 9) 森川景子、渡部宏臣、荒明美奈子 : Fosfomycin のヒト単球による chemokine 産生能に及ぼす効果。日本化学療法学会雑誌 **43** : 992, 1995
- 10) Morikawa K, Watanabe H : Modulatory effect of antibiotics on cytokine production by human monocytes in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother* **40** : 1366-1370, 1996
- 11) 渡部宏臣、三國谷雄、村瀬えるみ : エンドトキシン投与マウスの一酸化窒素産生に対するホスホマイシンの抑制作用。日本化学療法学会雑誌 **46** : 35, 1998
- 12) 中川朋幸、井上 玄、杉原徳彦 : ホスホマイシンのリンパ球に対する影響。日本化学療法学会雑誌 **45** : 37, 1998
- 13) Bhabra MS, Hopkinson DN, Shaw TE : Critical importance of the first 10 minutes of lung graft reperfusion after hypothermic storage. *Ann Thorac Surg* **16** : 1631-1635, 1996
- 14) Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Boucek MM, Novick RJ : The registry of the international Society for Heart and lung transplantation : sixteenth official report-1999. *J Heart Lung Transplant* : **18** : 611, 1999
- 15) 大谷 巖、大槻好正、相川 通 : Cisplatin の毒性に対する Fosfomycin の軽減効果に関する実験的研究。癌と化学療法 **11** : 2400-2407, 1984
- 16) 松岡 良、井上哲朗、宮村研二 : シスプラチンの腎障害の指標としての尿中 N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) 排泄量の測定の意義と Fosfomycin (FOM) 併用による腎毒性軽減効果。日産婦誌 **38** : 2037-2044, 1986
- 17) Umeki S, Watanabe M, Yagi S : Supplemental Fosfomycin and/or steroids that reduce cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am J Med Sci* **295** : 6-10, 1988
- 18) 藤田公生、藤田弘子、阿曾佳郎 : アミノ配当体系抗生物質の腎蓄積の対するホスホマイシンの効果。Jpn J Antibiotics **36** : 3392-3394, 1983
- 19) 田中 信、高槻 覚 : 蕁麻疹に対するホスホマイシンカルシウムの臨床効果。基礎と臨床 **23** : 593-596, 1989
- 20) 田中 信 : アトピー性皮膚炎に対する FOM の効果。日化療会誌 **43** : 996, 1995
- 21) Mituhiro N : HAM (HTLV-1-associated myelopathy) current concepts in infectious disease. 16-17, 1991
- 22) 三國谷雄、長井苑子、佐竹範夫、泉 孝英 : サルコイドーシス症例由来肺胞マクロファージのサイトカイン産生に対する作用。ホスホマイシン新たな展開 (泉 孝英、橋本 一、林 泉) 165-168, 臨床医薬研究協会 2001
- 23) 森川景子 : ホスホマイシン ヒト T, B リンパ球、単球に対する作用。ホスホマイシン新たな展開 (泉 孝英、橋本 一、林 泉) 159-164, 臨床医薬研究協会 2001
- 24) Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS : The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* **125** : 261-272, 2003
- 25) Serrick C, Adoumie R, Giaid A, Shennib H : The early release of interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma after ischemia reperfusion injury in the lung allograft. *transplantation* **58** : 1158-1162, 1994
- 26) Eppinger MJ, Deeb GM, Bolling SF, Ward PA : Mediators of ischemia-reperfusion injury of rat lung. *Am J Pathol* **150** : 1773-1785, 1997
- 27) Okada K, Fujita T, Minamoto K, Liao H, Naka Y, Pinsky DJ : Potentiation of endogenous fibrinolysis and rescue from lung ischemia/reperfusion injury in interleukin-10-reconstituted IL-10null mice. *J Biol Chem* **275** : 21468-21476, 2000
- 28) 猿渡直子、本多順一、杉原栄一郎 : Fosfomycin の好中球機能抑制作用について。日化療会誌 **44** : 86, 1996
- 29) 本多順一、杉原栄一郎、草場珠郁子 : Fosfomycin の好中球機能の及ぼす影響について。日化療会誌 **45** : 372, 1997
- 30) de Perrot M, Liu M, Waddell TK : Ischemia-reper-

fusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 490-511, 2003

Reperfusion Injury **36**: 205-214, 2006

- 31) Calvin SH, Wan NS, Arifi AA, Anthony PC:
Inflammatory Response to Pulmonary Ischemia-

Control for ischemic reperfusion injury of the lung by fosfomycin

Hiroki HAYASHI, Naohiro KAJIWARA, Masahiro TAIRA,
Masakazu KIMURA, Akihiko SUZUKI, Osamu UCHIDA

First Department of Surgery, Tokyo Medical University
(Leader: Harubumi KATO, The Chairman of First Department of Surgery)

Abstract

Organ transplant rejection is one of the most significant problems to be addressed in the field of transplantation, and reperfusion injury may contribute to perioperative acute rejection. The usefulness of preservation solution containing fosfomycin (FOM) has been demonstrated in a canine lung allograft model; however, the immunological mechanism remains largely unclear. A rat model of ischemia-reperfusion injury was used to investigate the effect of FOM on lung ischemia-reperfusion injury by physiological, histological, and immunological techniques. In rats untreated or treated with FOM, the arterial oxygen concentration, the wet-to-dry weight ratio, and the cytokine levels (TNF- α , INF- γ , and IL-10) in bronchoalveolar lavage fluid were measured after ischemia-reperfusion, and histopathological examination was performed. In this study, oxygenation after reperfusion was satisfactory in the FOM treatment group. Histopathological findings and wet-to-dry ratios suggested a positive effect on pulmonary edema. Measurement of cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid showed no significant difference in INF- γ among the three groups. A significant reduction in the production of IL-10 and TNF- α was found in the FOM treatment group. Immunohistochemical staining of isolated lungs showed similar results. The results of the present study using a rat model of ischemia-reperfusion injury suggest that treatment with FOM may reduce ischemic-reperfusion injury.

<Key words> Fosfomycin, Lung ischemia-reperfusion injury
