

論文の内容の要旨

論文題目「イヌ肺移植モデルにおける気道上皮被覆液中炎症性サイトカインプロファイルの経時的変化」

学位申請者：和田 篤史

キーワード：経気管支鏡マイクロサンプリング法、気道上皮被覆液、虚血再灌流傷害、肺移植、末梢気道

【背景】肺移植は慢性進行性肺疾患患者に対する治療法として確立され、移植数は年々増加している。しかし、肺移植後の成績は他の臓器移植と比較して劣っている。移植後早期には虚血再灌流障害が生じやすい。肺は外界と交通しているため免疫機構が発達し急性及び慢性拒絶反応が起こりやすい。そのため、免疫抑制剤の使用が強化され感染症も合併しやすくなる。いまだ、肺移植後に生じる様々な肺障害の病態には不明な点も多く、研究の発展が望まれている領域である。一般に肺の病態把握には気管支肺胞洗浄 (Broncho-alveolar lavage: BAL) や経気管支的肺生検 (Transbronchial lung biopsy: TBLB) が用いられている。しかし、これらの検査は侵襲が大きく、肺移植後の呼吸状態、循環動態が不安定な状態では施行できないことが多い。一方、気管支鏡下マイクロサンプリング法 (Bronchoscopic microsampling: BMS) は、BAL に代わる低侵襲な検査として開発された。気道上皮被覆液 (Epithelial lining fluid: ELF) の原液を複数回、連続的に採取することが可能である。BMS を肺移植に適応し、ELF を解析することによって、移植肺に生じる様々な肺障害の病態解明や診断、治療法の確立に役立つ可能性がある。

【目的】肺移植モデルにおいて移植後再灌流肺に BMS を適応し、ELF を連続的に採取し、虚血再灌流障害に関与すると思われる数種の炎症性サイトカインを測定、解析し、プロファイルの経時的変化を明らかにする。また、BAL 液、血漿中のサイトカインも測定し、比較検討する。炎症性サイトカインは Tumor necrosis factor (TNF)- α 、Interleukin(IL)-1 β 、Interleukin(IL)-6、Interferon(IFN)- γ を選択した。虚血後非再灌流肺においても BMS による ELF の採取と BAL 液の採取を行い、保存の前後で炎症性サイトカインの測定、解析を行う。

【方法】雄性ビーグル犬 (10-12 kg) を用いたイヌ同種左肺移植モデルで実験を行った。無作為に移植群 (ドナー4匹、レシピエント4匹) とシャム手術群 (2匹) に振り分けた。ドナー手術では 4℃ の臓器保存液を肺動脈から注入して肺を灌流した後、心肺を一塊とし

て摘出する。ドナー肺の保存時間は 12 時間の 4℃冷保存後、6 時間の 20℃温保存し、計 18 時間とする。レシピエント手術は生理学的指標を測定するため、スワングアンツカテーターと動脈カテーターを挿入留置する。レシピエント左肺摘出後、ドナー左肺を移植し、血流を再開させる。シャム群は肺門周囲の剥離のみ行う。再灌流開始後は 1 時間ごとに 5 時間後まで、BMS による ELF の採取と採血を行う。生理学的指標(血圧、脈拍、平均肺動脈圧、最高気道内圧)の記録と、動脈血液ガス分析により移植肺の機能評価を行う。5 時間後、レシピエントを安楽死させ、肺を摘出して BAL 液を採取する。摘出したドナー右肺を用いて、18 時間の保存の前後で、BMS による ELF 採取と BAL 液の回収を行う。ELF、BAL 液、血漿中のサイトカイン濃度は ELISA で測定した。18 時間保存後のドナー肺と、5 時間再灌流後の移植肺で、TNF- α と IL-6 の抗体を用いて免疫組織学的検討を行う。

【結果】動脈血液ガス分析では、移植群においてシャム群と比較して PaO₂ の有意な低下を認め($P < 0.05$)、気道内圧はシャム群と比較し上昇した($P < 0.05$)。BMS の施行中、血圧、脈拍、平均肺動脈圧に有意な変化は認めず、5 時間後までの ELF の採取が可能であった。ELF 採取量はシャム群に比べ移植群に有意に多かった($P < 0.05$)。ELF 中の TNF- α 濃度は、シャム群では多くが測定限界以下であったのに対し、移植群では再灌流開始後から上昇し、5 時間後まで有意な上昇を認めた(反復測定分散分析 $P < 0.05$)。ELF 中 IL-6 濃度は、再灌流 1 時間後から 5 時間後までにおいてシャム群と比較して有意な上昇を認めた(反復測定分散分析 $P < 0.05$)。ELF 中 IFN- γ 濃度は再灌流 3 時間後から 5 時間後において、移植群で低下し、シャム群と有意差を認めた(反復測定分散分析 $P < 0.05$)。ELF 中 IL-1 β 濃度は移植群で有意な変化はなく、シャム群とも有意差を認めなかった。再灌流開始直後から 5 時間後までに採取した血漿中サイトカイン濃度はいずれも ELF 中濃度の 100 分の 1 以下で、有意な変化を認めず、シャム群との比較でも有意差を認めなかった。再灌流開始 5 時間後に採取した BAL 液中のサイトカイン濃度はいずれも ELF 中濃度の 100 分の 1 以下で、群間で有意差を認めなかった。移植しない虚血後非再灌流肺において採取した ELF 中の TNF- α 、IL-6、IFN- γ で虚血前と比較し有意な変化は認められなかった。IL-1 β のみ虚血後に有意な低下を認めた。免疫組織学的検討では、再灌流開始 5 時間後の移植肺において、TNF- α 発現を血管内皮細胞と肺胞マクロファージに認め、IL-6 発現を肺胞マクロファージとリンパ球に認めた。

【考察】様々な炎症性サイトカインが肺移植後の虚血再灌流障害の発症のメカニズムに関与していると考えられているが、個々のサイトカインに関する詳細な検討は不十分であった。従来の方法、BAL や TBLB では検体の連続的採取が困難であることが、その一因となっている。本研究では、虚血再灌流障害を生じたと考えられるイヌ肺移植モデルにおいて、動物を犠牲死させることなく、かつ再灌流後 5 時間にわたり明らかな有害事象

を生じることなく、BMS による ELF の連続的採取が可能で、4 つの炎症性サイトカイン濃度の経時的变化の解析を行うことが出来た。その経時的变化はサイトカインごとに異なり、TNF- α と IL-6 は再灌流開始 5 時間まで ELF 中濃度が上昇していたが、IFN- γ 濃度は再灌流 3 時間以降に低下していた。これらのサイトカインプロファイルの変化が、移植肺に生じる虚血再灌流障害発症のメカニズムに関与している可能性がある。一方、血漿中のサイトカイン濃度は低く、ダイナミックな変化は検出できなかった。障害を生じている局所で採取された検体でのサイトカイン解析の方が、虚血再灌流障害の病態の把握に適していると考えられた。BMS を用いた ELF の採取とサイトカイン濃度の測定は、保存（虚血）中のドナー肺に適応することが可能である。虚血中のドナー肺では ELF 中のサイトカイン濃度の上昇は認められなかったことから、サイトカインは再灌流開始後に急速に放出されると考えられた。再灌流開始 5 時間後の移植肺において、免疫組織学的に肺胞マクロファージやリンパ球に TNF- α と IL-6 の発現が確認でき、これらの細胞から放出されたサイトカインが末梢気道に流出したと考えられた。

【結論】肺移植モデルで BMS によって採取した ELF 中の 4 つの炎症性サイトカインプロファイルの経時的变化を明らかにした。虚血再灌流障害に伴い、再灌流開始後早期に ELF 中の TNF- α と IL-6 の持続的な上昇を認めた一方で、IFN- γ 濃度は低下していた。ELF 中のサイトカイン濃度変化の解析は肺の病態の理解、把握、解明に有用である可能性があると思われた。