原 著

トロンボキサン A₂ 合成酵素阻害剤である OKY-046 の肺保存における有効性

M. M. R. Bhuiyan, 中元 賢武, 岡本 卓, 杉田 礼典
 亀山耕太郎, 林 栄一, 小関 萬里, 前田 昌純

要 旨

家兎心肺自己血灌流モデルでトロンボキサン A₂ 合成酵素阻害剤 OKY-046 のフラッシュ効果と機能温存効果を検討した. *in vivo*, 30 cm 落差の前灌流 (50 ml/kg) で, EP₄ 液単独滴下を対照群 (Grp 1, N=10), OKY-046 (0.1 mmol) 添加を実験群 (Grp 2, N=10) とし, 8℃18時間保存後機能評価した.

前灌流: Grp 1, 2 の PAP は 10.7 ± 1.0 cmH₂O, 9.5 ± 0.33 cmH₂O で, Grp 2 の方が有意に低値であった ($p < 0.005$).

再灌流: PAP は10秒間隔の全ての点で Grp 2 が1に比較し有意に低かった ($p < 0.01 \sim 0.04$). Grp 2 の PAP(Y) と灌流時間(X) が負相関し ($Y = 0.058X + 21.0$, $r = 0.486$, $p < 0.01$), W/D 比は Grp 1, 2 各々 6.47 ± 0.33 , 5.62 ± 0.27 で Grp 2 が有意に低かった ($p < 0.001$). pO₂ は Grp 1, 2 各々 97.0 ± 25.2 torr, 144.6 ± 8.1 torr で Grp 2 が有意に高かった ($p < 0.001$). OKY-046 にフラッシュ効果と機能温存効果が認められた.

索引用語: トロンボキサン A₂ 合成酵素阻害剤 OKY-046, EP₄ 液, 肺保存, 虚血再灌流障害
 thromboxane A₂ synthetase inhibitor, EP₄ flush solution, Lung preservation
 Ischemia reperfusion injury

はじめに

トロンボキサン A₂ (以下TXA₂) はアラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼ系の主な代謝産物で, 血小板凝集作用に始まり¹⁾, 血管収縮作用¹⁾, 肺血管の permeability injury²⁾ など, 肺循環不全に係わる重要な血管作働物質である. 肺高血圧症^{3,4)}, 肺水腫²⁾ などの病態と関連した報告がみられる. TXA₂ は血小板を始めとして^{1,5)}, 体内臓器の諸所で生合成される. その阻害剤の発見に伴い, 腎^{6,7)}, 肝^{5,8)}, 脾⁹⁾ などでは

虚血障害に関連して TXA₂ と, 阻害剤 OKY-046 の作用が追究されてきた. TXA₂ は肺血管内皮細胞でも産生され^{10,11)}, 肺循環不全での研究はみられるのに, 臓器保存に関連した報告は見当たらない.

以上, 保存肺の虚血再灌流障害への TXA₂ の関与と OKY-046 の効果について検討する.

対象と方法

2.8~3.4 kg (平均3.1 kg) の日本白色在来種雄性家兎20羽を対象とした. グラフトの機能評価は, Stuart・Cooperの変法により行った¹²⁾. 麻酔は, 塩酸ケタミン35 mg/kg, 硫酸アトロピン0.25 mg/kg の筋注, ペントバルビタール30 mg/kg, ヘパリンナトリウム800単位/kg の静

注により行った。気管切開で挿管し、Harvard型人工呼吸器 (SN480-7シナノ製作所) で室内気換気 ($V_T=8\text{ ml/kg}$, $f=40/\text{分}$, $PEEP=0.5\text{ cmH}_2\text{O}$) を行った。

グラフトの摘出と前灌流：胸骨縦切開で開胸した。上行大動脈、肺動脈本幹をテーピングし、右心房から機能評価時の再灌流用自己血65mlを採取し4℃の保冷库に18時間保存した。前灌流は7Fのダブルルーメン送血カニューレを用い、右心室 out flow より肺動脈弁を通して肺動脈本幹に挿入後留置した。前灌流は上行大動脈を結紮、灌流液を肺動脈本幹へ30 cmH₂O 高からの自然滴下で行った。灌流液組成は Table 1 に示すように、EP₄ modified solution (以下 EP₄ 液)¹³⁾ を用い、それを対照群 (Grp 1, N = 10), OKY-046 (0.1 mmol/l) 添加 (小野薬品工業®) を実験群 (Grp 2, N=10) とした。両群はランダムに2群にわけた。前灌流終了後左心房を結紮、終末吸気で気管をクランプし、気管、頸部食道、左右無名動静脈、下大静脈、横隔膜レベルで食道、大動脈を切断して、心肺を en block に摘出した。心肺ブロックは、8℃生理食塩水内に浸漬し、8℃で18時間保存した。

グラフト機能評価 (Fig. 1)：グラフトは supine position で vapor chamber 内に固定し、37℃まで復温した。drainage tube は心尖を通して左心室に挿入、末端を開放しこの部位から計測用血液を採取した。ドナー肺は、再灌流の2分前から室内気換気 ($V_T=4\text{ ml/kg}$, $f=40/\text{分}$, $PEEP=0.5\text{ cmH}_2\text{O}$) を開始した。グラフト

機能評価は、右肺門をクランプし左肺灌流を行った。37℃に復温した自己血を、ローラーポンプ (古河サイエンス社製, PR-NE3) で定流量灌流 (40ml/分) し、灌流中の肺動脈灌流圧 (PAP) をポリグラフで持続的にモニタリングした。再灌流終了直後に、pO₂ 測定用の左心室の肺静脈血サンプルと、W/D 比測定用の肺組織を採取した。

推計検定は対応のない t 検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

I. 無処置群

われわれが常用している家兎、5羽で4分間再灌流し、血液ガス、PAP、W/D 比でデータの再現性を検定した (Table 2)。標準偏差 (SD) を平均値で除した変異係数 C. V. (coefficient of variation) で異なる単位で測定されたデータのバラツキを検討した。C. V. は0.44~12.5%の

Fig. 1 Ventilation and reperfusion system for assessing pulmonary function of isolated rabbit lung.

The left lung was used for reperfusion. TV: tidal volume, RR: respiratory rate, PEEP: positive end-expiratory pressure, PA: pulmonary artery, LV: left ventricle, PAP: pulmonary artery pressure, Rec: recorder (polygraph system).

Table 1 Composition of modified EP₄ solution.

K ₂ HPO ₄	2.60 g/L
Na ₂ HPO ₄	6.40 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.78 g/L
NaCl	5.80 g/L
MgSO ₄	0.24 g/L
Glucose	10.00 g/L
Low molecular dextran (LMD)	20.00 g/L
Na ⁺	142 mEq/L
K ⁺	26 mEq/L
Cl ⁻	97 mEq/L
Osmotic pressure	360 mosm
pH	7.46

Table 2 Postischemic pulmonary function data in 5 rabbits after 4 minutes of closed circuit reperfusion.

pO ₂ (torr)	pH	PAP (cmH ₂ O)	W/D
168.2±12.2 (7.2%)	7.50±0.033 (0.44%)	22.0±2.1 (9.5%)	6.87±0.86 (12.5%)
$\bar{x} \pm SD$ (coefficient of variation)			

値を示し、再現性のある分析可能と判断した。

II. 予備実験

家兎1羽を用いて OKY-046 4 mg/kg を肺動脈主幹から注入，1分毎の肺動脈圧変化を Fig. 2 に示した。前値は24.8 cmH₂O で注入後4分間は上昇傾向を示し，4分値で最大25.6 cmH₂O を示した。5分後より低下傾向を示し34分値で最小21.8 cmH₂O を示し前値の12.0%の低下を示した。35分値からは再び上昇傾向を示した。

III. グラフト機能評価

1. 前灌流：全例，問題なく前灌流が可能であった。in vivo, 30 cm 落差の自然滴下で Grp 1 と 2 の PAP は，各々10.7±1.0 cmH₂O, 9.5±0.33の値を示し，対照群の Grp 1 に比べて OKY-046添加の Grp 2 の方が有意に低値をとった (p<0.01)。

2. 再灌流：全例，再灌流時間を通じて肺胞内水腫などの所見はみられず，問題なく灌流が

Fig. 2 Pulmonary artery pressure (PAP) values before and for 40 minutes after administration of OKY-046 (4 mg/kg) to truncus of pulmonary artery. **Fig. 3** Pulmonary artery pressure (PAP) values (mean±SD) for both lungs in both groups during flushing. * p<0.01 as compared to Group 1 (Student's *t*-test).

可能であった。

Fig. 4 は再灌流時の PAP の経時的変化を示している。

対照群 Grp 1 は，21.8～24.7 cmH₂O の値を推移し PAP 灌流時間とは有意の相関を示さなかった。その平均値は23.0±4.5 cmH₂O の値を示した。一方，OKY-046添加の Grp 2 は，灌流10秒値ですでに20.5±2.4 cmH₂O の値を示し，Grp 1 の同時点の24.7±5.2 cmH₂O と比べて有意に低値であった (p<0.05)。各10秒間隔で

Fig. 4 Correlation between pulmonary artery pressure (PAP) values (mean±SD) and reperfusion time for the left lung in both groups during 60 seconds reperfusion after cold ischemia.

両群の比較を行ったが、Grp 2 は 1 に比べて各時点では有意に低値を示した ($p < 0.01 \sim 0.04$). Grp 2 の PAP と灌流時間とは負の相関があり ($r = 0.486$, $p < 0.01$), 回帰式は

$$\text{PAP} = -0.058(\text{reperfusion time}) + 21.0$$

の式が得られた. Grp 2 の PAP の低下を経時的にみると, 10秒値と比べて40秒値の時点から有意の低下がみとめられた ($p < 0.03$).

60秒灌流時点の W/D 比を Fig. 5 に示した.

Grp 1 の W/D 比の平均値は 6.47 ± 0.33 , Grp 2 は 5.62 ± 0.27 で, Grp 1 と比べて Grp 2 の W/D 比は低値を維持していた ($p < 0.001$).

同時点での pO_2 値を Fig. 6 に示した. Grp 1 の平均値, 97.0 ± 25.2 torr は, 無処置対照群の 102.8 ± 23.55 torr の値と近似していて有意の差はなかった ($p > 0.10$). Grp 2 の 144.6 ± 8.1 torr の値は, 無処置対照群のそれに比べて有意に高値であった ($p < 0.02$). Grp 1 との比較では, 有意に高値を示した ($p < 0.01$).

考 察

1977年, Moncada によりイミダゾール誘導体の TX 合成酵素阻害作用が見いだされ¹⁴⁾, 生体内で産生される TXA_2 による血小板凝集と血管平滑筋収縮を抑制することが知られるようになった.

Fig. 5 Wet/dry weight (W/D) ratio (mean ± SD) for the left lung in both groups after reperfusion. * $p < 0.01$ as compared to Group 1 (Student's *t*-test).

Fig. 6 Oxygen tension (pO_2) values (mean ± SD) for the left lung in both groups after reperfusion. * $p < 0.001$ as compared to Group 1 (Student's *t*-test).

アラキドン酸代謝産物である TXA_2 は, 腎移植時の再灌流障害因子として働き^{6,7)}, その障害が TXA_2 阻害剤により抑制されることが報告されている¹⁵⁾. また, 低温保存肝で TXA_2 が増加し, 肝類洞の収縮が肝移植時の再灌流障害の主要なメカニズムと考えられている⁸⁾. さらに, 肝保存液, 灌流液に TXA_2 の阻害剤である OKY-046 を添加すると, 有意に TXA_2 が減少し保存肝の灌流圧を低下させたという成績⁸⁾, 他の TXA_2 合成阻害剤が, 虚血肝の血小板凝集を阻害して微少循環の保護作用に働いたという報告¹⁶⁾ などが見られる.

腎¹⁷⁾, 脳¹⁸⁾, 心¹⁹⁾, 肝²⁰⁾ の移植時にみられる, いわゆる no-reflow phenomenon は肺でも起りうる⁵⁾. その成因は単一ではないが, 現象的には循環不全とみることができる. その機序に関連した研究は多数にのぼるが, 上述の肝, 腎におけるトロンボキサン(以下 TX)の作用機序が保存肺機能温存ではどのような影響を与えるるかについての報告は見あたらない.

肝, 腎などの実質臓器と比べて, 肺は血管の構築と機能, また機能にまつわるイオン環境など, 特有な臓器特性をもっている²¹⁾. 一方, Fig. 7 で示したように, アラキドン酸・カスケードに組み込まれた TX は, 肺内の重要な機能作働物

Fig. 7 Arachidonic acid cascade, showing the action of the thromboxane A_2 synthetase inhibitor, OKY-046, which not only inhibits the production of TXA_2 but also stimulates the production of PGI_2 by changing the direction of prostanoid metabolism (redrawn from 5).

質と関連して多彩である。すなわち、ドナー肺機能温存に関連するTx動態追究は広範な研究領域になりうると予想される。本研究は、そのpilot studyとして位置づけられる。

TXA_2 は血小板に存在し^{1,5)}、兎肺では肺動脈内皮細胞など^{10,11)}から産生されることが報告されている。その産生は、虚血²²⁾、oxygen free radical²²⁾、ライソゾーム酵素²³⁾、ロイコトリエン B_4 ²³⁾などで刺激される。とくに虚血時の反応はドナー保存時に重要な問題点になりうる。腎において TXA_2 が細胞内への Ca^{++} フラックスを増加させ、そのoverloadでcalcium paradoxが発生しうることが報告されている²⁴⁾。一般的に、 Ca^{++} 細胞内フラックス増は血管平滑筋を収縮させ圧上昇に働くとされている。家兎肺では、 Ca^{++} 拮抗剤がreal timeに肺動脈圧を下降させ、in vivoフラッシュ圧、再灌流圧を低下させていることから、肺動脈でも Ca^{++} フラックスが圧上昇に関与していると考えられる²⁵⁾。従って、 TXA_2 の阻害剤であるOKY-046がフラッシュ圧を低下させていることは、この

ような機序でよく理解され、同時に TXA_2 が再灌流障害一因として関与している可能性を示唆している。ただ、細胞内 Ca^{++} フラックスは、 $K^{+26)}$ 、 $Na^{+27)}$ 、 Mg その他の金属イオンなどの関与も知られており、ドナー肺特有の保存液作製のためには、これらの細胞内外のイオン環境の場での TXA_2 の作用として追究する必要がある。

TXA_2 は、血管内皮細胞のtight junctionのactin filamentを分解し、蛋白の透過性を亢進させるといわれている²⁾。肺では、肺高血圧や肺水腫を発生させ、それらが TXA_2 合成阻害剤で抑制されることが報告されている²⁾。さらに TXA_2 阻害剤が、 $TNF-\alpha$ 肺水腫を抑制²⁸⁾、 $IL-2$ による肺高血圧、肺血管透過性を抑制²⁹⁾、また血小板、血管内皮細胞由来の PGI_2 、 PGE_2 産生を促進する^{1,5)}という報告がある。またFig. 7に示すように、 TXA_2 合成阻害剤は、 PGH_2 から TXA_2 への転換を選択的に阻害し、 PGI_2 合成が促進される。すなわち、OKY-046は肺実質領域での血管内外水フラックスの微妙な調整に合目的、多面的に作用している。従って、実験におけるOKY-046添加群において、再灌流時点でのPAPの低下、W/D比の低値、グラフト酸素化能がよく温存されていたことは機序的にはよく理解できる。ただ、in vivoフラッシュ時点で添加した阻害剤が8℃の低温下で18時間の間、温存されているかどうかは不明である。しかし、Fig. 2で示されているように、保存後のPAPは経時的に低下している。すなわち、OKY-046の作用はなんらかの形で温存されていることを窺わせる。その確認、機序、OKY-046や PGI_2 、 TXA_2 の濃度とPAP、 pO_2 といったグラフト機能の評価する因子との相関関係などの解析は今後の追究にまたれる。しかし本剤がドナー肺保存時に、①フラッシュ効果、②グラフト温存効果、③移植肺への治療効果などへ寄与しうる可能性は大と考える。

ま と め

虚血保存肺の再灌流障害の一因として、 TXA_2 の関与が示唆された。

TXA₂ 合成酵素阻害剤である OKY-046 には、グラフトのフラッシュ効果と機能温存効果が認められ、肺移植時の reperfusion injury 阻止のための一療法となる可能性がある。

文 献

- 1) Oates JA, FitzGerald GA, Branch RA, et al: Clinical implications of prostaglandin and thromboxane A₂ formation (1). *N. Engl J Med* **319** (11): 689-698, 1988.
- 2) Welles SL, Shepro D, Hechtman HB: Eicosanoid modulation of stress fibers in cultured bovine aortic endothelial cells. *Inflammation* **9**: 439-450, 1985.
- 3) Kubo K, Kobayashi T: Effects of OKY-046, a selective thromboxane synthetase inhibitor, on endotoxin-induced lung injury in unanesthetized sheep. *Am Rev Respir Dis* **132**: 494-499, 1985.
- 4) Littner MR, Lott FD: Edema from cyclooxygenase products of endogenous arachidonic acid in isolated lung. *J Appl Physiol* **67**: 846-855, 1989.
- 5) Suehiro T, Yanaga K, Itasaka H, et al: Beneficial effect of thromboxane A₂ synthetase inhibitor on cold-stored rat liver. *Transplantation* **58**: 768-773, 1994.
- 6) Mangino MJ, Jendrisak MD, Brunt E, et al: Eicosanoid synthesis inhibition and renal allograft function during acute rejection. *Transplantation* **45**: 902-907, 1988.
- 7) Anderson C, Jendrisak M, Brunt E, et al: Thromboxane synthesis inhibition and renal allograft function. *Transplant proc* **21**: 1161-1164, 1989.
- 8) Ishiguro S, Arai S, Monden K, et al: Involvement of thromboxane A₂-thromboxane A₂ receptor system of the hepatic sinusoid in pathogenesis of cold preservation/reperfusion injury in the rat liver graft. *Transplantation* **59**: 957-961, 1995.
- 9) Kin S, Stephanian E, Gores P, et al: Successful 96-hr cold-storage preservation of canine pancreas with UW solution containing the thromboxane A₂ synthesis inhibitor OKY-046. *J Surg Res* **52**: 577-582, 1992.
- 10) Salzman PM, Salmon JA, Moncada S: Prostacycline and thromboxane A₂ synthesis by rabbit pulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther* **215**: 240-247, 1980.
- 11) Peeters FAM, Van Den Bossche R, Bult H, et al: Thromboxane and Prostacycline production in the perfused rabbit lung. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **43**: 239-246, 1991.
- 12) 中元賢武: 肺移植における donor 肺保存の研究. *大阪大学医学雑誌* **42**: 505-516, 1990.
- 13) 半田政志, 藤村重文, 近藤 丘, 他: 肺移植における48時間および96時間保存. *臨床胸部外科* **6**: 539-542, 1986.
- 14) Moncada S, Bunting S, Mullane K, et al: A selective inhibitor of thromboxane synthetase. *Prostaglandins* **13**: 611-618, 1977.
- 15) Kuzu MA, Koksoy C, Alacayir I, et al: Thromboxane synthase inhibitor, UK-38485, Prevents renal injury in the rabbit isolated perfused kidney exposed to ischemia. *Transplantation* **59**: 1096-1099, 1995.
- 16) Kuroe K, Kurokawa T, Nishikimi M, et al: Effects of thromboxane A₂ synthetase inhibitor on post ischemic liver injury in rats. *Eur Surg Res* **23**: 20-26, 1991.
- 17) Lauson HD, Badley SE, Cournand A: The renal circulation in shock. *J Clin Invest* **23**: 381-402, 1944.
- 18) Norwood WI, Norwood CR, Castaneda AR: Cerebral anoxia: effect of deep hypothermia and pH. *Surgery* **86**: 203-209, 1979.
- 19) Willerson JT, Powell Jr WJ, Guiney TE, et al: Improvement in myocardial function and coronary blood flow in ischemic myocardium after manitol. *J Clin Invest* **51**: 2989-2998, 1972.
- 20) Mckeown CMB, Edwards V, Phillips MJ, et al: Sinusoidal living cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allograft in the rat. *Transplant* **46**: 178-191, 1988.
- 21) 内藤和世, 岡 隆宏, 中根佳宏, 他: 低温保存細胞の K⁺ 輸送におけるエネルギー勾配について. *移植* **15**: 343-346, 1980.
- 22) Paterson IS, Klausner JM, Goldman G, et al: Thromboxane mediates the ischemia-induced neutrophil oxidative burst. *Surgery* **106**: 224-229, 1989.
- 23) Tate RM, Repine JE: Neutrophils and adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **128**: 552-559, 1983.
- 24) Ueda N, Mayeux PR, Walker PD, et al: Receptor-mediated increase in cytosolic calcium in LLC-PK₁ cells platelet activating factor and thromboxane A₂. *Kidney Int* **40**: 1075-1081, 1991.
- 25) 谷口清英, 前田昌純, 坪田典之, 他: 肺移植におけるドナー肺保存の研究: カルシウム拮抗剤によるグラフト機能温存効果. *日呼外会誌* **6**: 143-153, 1992.
- 26) Hachida M, Morton DL: The protection of ischemic lung with verapamil and hydralazine. *J Thorac Cardiovasc Surg* **95**: 178-183, 1988.
- 27) 中村元臣, 平 則夫編: カルシウム拮抗剤—基礎と臨床—改訂版, 医薬ジャーナル社, 大阪, 1986.
- 28) Hocking DC, Phillips PG, Ferro TJ, et al: Mechanisms of pulmonary edema induced by

tumor necrosis factor- α . Circ Res **67**: 68-77, 1990.
29) Klausner JM, Paterson IS, Morel NML, et

al: Role of thromboxane in interleukin 2-induced lung injury in sheep. Cancer Res **49**: 3542-3549, 1989.

OKY-046, 1 selective thromboxane A₂ synthetase inhibitor enhances lung preservation in an *ex vivo* rabbit heart-lung model

*M. M. R. Bhuiyan, Kembu Nakamoto, Taku Okamoto, Ayanori Sugita
Kotaro Kameyama, Eiichi Hayashi, Masato Koseki, Masazumi Maeda*

Second Department of Surgery, Kagawa Medical School, Kagawa, Japan

The effect of the thromboxane A₂ synthetase inhibitor, OKY-046 on pulmonary flushing and preservation of lung was studied using an *ex vivo* perfused rabbit model. The grafts were divided into the following groups: Group 1) flushed *in vivo* with modified EP₄ solution (50 ml/kg) alone (n=10); and Group 2 flushed *in vivo* with modified EP₄ solution (50 ml/kg) containing OKY-046 (0.1 mmol) (n=10). After preservation for 18 hours at 8°C, the function of preserved grafts was examined for 60 seconds with autologous blood using an *ex vivo* perfusion system.

During flushing, the mean ($\pm$ SD) pulmonary artery pressure (PAP) was significantly lower ($p < 0.005$) in Group 2 (9.5 ± 0.33 cmH₂O) than in Group 1 (10.7 ± 1.0 cmH₂O). During reperfusion, the mean ($\pm$ SD) PAP for Group 2 was significantly lower than that for Group 1 at each time point ($p < 0.01-0.04$). During the 60 seconds of reperfusion, a direct significant correlation was found between time (X) and PAP (Y) in Group 2 ($Y = -0.058, X + 21.0$; $r = 0.486, p < 0.01$). In the functional assessment of grafts, the mean ($\pm$ SD) wet/dry weight ratio of reperfused lung for Group 2 (5.62 ± 0.27) was significantly lower than for Group 1 (6.47 ± 0.33) ($p < 0.001$). The mean ($\pm$ SD) pO₂ of reperfused lung for Group 2 (144.6 ± 8.1 torr) was significantly higher than that for Group 1 (97.0 ± 25.2 torr) ($p < 0.001$).

The results of the present study show a significant effect of modified EP₄ solution containing OKY-046 on lung preservation. These findings indicate a potential approach to ameliorate the effects of ischemia-reperfusion injury.