体外循環における抗サイトカイン療法の臨床的検討

軽部義久 小菅宇之 山崎一也 坂本 哲
浦中康子* 市川由紀夫* 安達隆二* 相馬民太郎

体外循環におけるウリナスタチンの抗炎症性サイトカイン効果と臓器障害軽減効果を検討した。冠動脈バイパス術施行 33 例をウリナスタチン投与群 (UTI 群, $n=16$) と非投与群 (Control 群, $n=17$) に分け比較した。術中術後にインターロイキン 6 (IL-6)・8 (IL-8), 顆粒球エラスターゼ (PMNE) を測定した。また肝臓 (GOT, GPT, T-Bil), 腎臓 (BUN, Cr), 肺 ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$) の術後機能障害を検討した。大動脈遮断解除 5 分後 IL-8 ($25.5 \pm 12.8 \text{ pg/dl}$ vs. $47.8 \pm 38.9 \text{ pg/dl}$), 経過中最高 IL-8 ($28.6 \pm 13.2 \text{ pg/dl}$ vs. $58.4 \pm 40.0 \text{ pg/dl}$), 術後 BUN, Cr が Control 群に比べて UTI 群で有意に低値を示した ($p < 0.05$)。IL-8, PMNE が BUN, Cr と正の相関, IL-8 と $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ が負の相関を認めた。ウリナスタチンの抗 IL-8 効果と IL-8, PMNE の抑制による術後腎臓, 肺機能障害予防の可能性が示唆された。日心外会誌 28 巻 3 号: 151-157 (1999)

Keywords: 体外循環, SIRS, 炎症性サイトカイン, 抗サイトカイン療法, ウリナスタチン

Clinical Study of Anticytokine Therapy during Cardiopulmonary Bypass

Norihisa Karube, Takayuki Kosuge, Ichiya Yamazaki, Akira Sakamoto, Yasuko Uranaka*, Yukio Ichikawa*, Ryuji Adachi* and Tamitaro Soma (Department of Cardiovascular Surgery, Saiseikai Yokohama City Nanbu Hospital, Yokohama, Japan and Department of Cardiovascular Surgery, Yokohama Minami Kyosai Hospital*, Yokohama, Japan)

Cardiac operations involving cardiopulmonary bypass can cause a systemic inflammatory response such as elevation of inflammatory cytokines, which can cause organ failure. We investigated cytokine production and its inhibition by ulinastatine in patients undergoing elective coronary artery bypass grafting under cardiopulmonary bypass. Thirty-three patients received either ulinastatine (300,000 units, intracoronary artery injection immediately after aortic cross-clamping, UTI group, $n=16$) or no ulinastatine (control group, $n=17$). Arterial blood samples were obtained at aortic cross-clamping, 5 minutes after aortic declamping, and 6, 12 and 18 hours after surgery and there were assayed for interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and polymorphonuclear leukocyte elastase (PMNE). In addition, we examined liver function (GOT, GPT, and total bilirubin), renal function (blood urea nitrogen and serum creatinine), and oxygenatory function ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$) postoperatively. IL-8 levels at 5 minutes after aortic declamping and maximum IL-8 levels were significantly lower in the UTI group than in the control group (25.5 ± 12.8 vs. $47.8 \pm 38.9 \text{ pg/dl}$, $p < 0.05$, and 28.6 ± 13.2 vs. $58.4 \pm 40.0 \text{ pg/dl}$, $p < 0.05$). Blood urea nitrogen on the second post operative day (POD) and three POD and creatinine on the second POD were also significantly lower in the UTI group than the control group. Furthermore, IL-8 and PMNE levels significantly correlated positively with blood urea nitrogen and creatinine. There was significant negative correlation between IL-8 and oxygenatory function. These results shows that the ulinastatine can inhibit IL-8 levels following cardiac surgery. To combat the increase of inflammatory cytokines such as IL-8 after cardiopulmonary bypass, the ulinastatine should be used for anticytokine therapy to protect the kidneys, lungs, and other organs, and thereby decrease the risk of complications. Jpn. J. Cardiovasc. Surg. 28: 151-157 (1999)

1998 年 4 月 21 日受付, 1998 年 12 月 24 日採用
済生会横浜市南部病院心臓血管外科 〒234-0054 横浜市港南区港南台 3-2-10

*横浜南共済病院心臓血管外科

本論文の要旨は, 第 50 回日本胸部外科学会総会 (1997 年 10 月, 東京) において発表した。

手術により過剰に産生された炎症性サイトカインは本来防御すべき正常組織をも破壊する臓器障害因子であり, また近年提唱されている SIRS (systemic inflammatory response syndrome: 全身性炎症反応症候群) の本質は高サイトカイン

表 1 対象症例背景

	UTI 群	Control 群	
症例	16	17	NS
年齢(歳)	61.9±6.5	64.4±10.4	NS
性(男性：女性)	12：4	15：2	NS
体外循環時間(分)	153±53	167±51	NS
大動脈遮断時間(分)	89±28	102±33	NS
バイパス数(本)	2.2±0.4	2.6±0.7	NS
最低直腸温(°C)	30.9±0.9	31.0±1.3	NS
最低食道温(°C)	29.7±0.8	29.1±3.3	NS

血症にあるとされている^{1,2)}。従って手術侵襲により産生された炎症性サイトカインの適切な抑制は生体の良好な回復と術後臓器障害の予防に有効であると考えられる。このため種々の薬剤投与や吸着除去による抗サイトカイン療法が研究されており、一部その臨床応用も報告されている。われわれは体外循環時の炎症性サイトカインの変動に着目し、蛋白分解酵素阻害剤の1つであるウリナスタチン(urinary trypsin inhibitor：ミラクリッド®)が体外循環症例の炎症性サイトカインの上昇を抑制し術後臓器障害の軽減に効果があるかどうかについて検討した。

対象と方法

1995年4月から1998年3月までに体外循環下に施行した待機の初回単独冠状動脈バイパス術症例のうち体外循環時間が100分以上の33例を対象とした。これらを2群に無作為に分類しウリナスタチン投与群(UTI群, $n=16$)と非投与群(Control群, $n=17$)とした。両群の患者背景は表1のとおりで2群間にそれぞれ有意差を認めなかった。

体外循環はローラーポンプおよび膜型肺を使用し軽度低体温下にて行った。心筋保護法はcontinuous warm blood cardioplegia法, intermittent cold blood cardioplegia法, cold crystalloid cardioplegia法のいずれかを用いた。UTI群にはウリナスタチン30万単位を大動脈遮断直後にYoung氏液につづいて冠状動脈内に投与した。

検討項目はインターロイキン6 (Interleukin-

6：IL-6), インターロイキン8 (Interleukin-8：IL-8), 顆粒球エラスターゼ (polymorphonuclear leukocyte elastase：PMNE), GOT, GPT, 総ビリルビン (T-Bil), 血中尿素窒素 (BUN), 血中クレアチニン (Cr), 動脈血酸素分圧とした。大動脈遮断直前, 大動脈遮断解除5分後, 手術終了6時間後, 12時間後, 18時間後に動脈血を採取しIL-6, IL-8, PMNEをそれぞれenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。術後臓器障害は肝臓, 腎臓, 肺について検討した。肝機能の指標には術後1日目から3日目のGOT, GPT, T-Bilを, 腎機能の指標には術後1日目から3日目のBUN, Crを, 肺酸素化能の指標には術後集中治療室入室時, 術後1および2日目の動脈血酸素分圧/吸入気酸素濃度 ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$) をそれぞれ用いた。

結果はすべて平均値±標準偏差で示した。統計学的検討は2群間の比較には対応のない t 検定を用い, また相関関係はPearsonの相関関係を用いて検定し, いずれも危険率5%未満を有意差ありとした。

結 果

1. IL-6

Control群では大動脈遮断直前 7.6 ± 6.2 pg/dl から大動脈遮断解除5分後 84.1 ± 49.9 pg/dl と高値を示した後, 手術6時間後 32.0 ± 28.3 pg/dl, 手術12時間後 20.2 ± 18.3 pg/dl, 手術18時間後 18.9 ± 16.1 pg/dl と漸減していった。UTI群では大動脈遮断直前 7.4 ± 5.7 pg/dl から大動

図1 IL-6の変動と最高値

図2 IL-8の変動と最高値

脈遮断解除5分後 60.5 ± 42.6 pg/dl と高値を示した後、それぞれ 24.9 ± 19.2 , 21.4 ± 14.9 , 28.5 ± 21.8 pg/dl と変動した。各測定地点で2群間には有意差を認めなかった。また経過中の最高値も2群間で有意差を認めなかった (図1)。

2. IL-8

Control 群では大動脈遮断直前 3.7 ± 3.2 pg/dl から大動脈遮断解除5分後 47.8 ± 38.9 pg/dl と高値を示した後、手術6時間後 28.3 ± 28.3 , 12時間後 17.2 ± 26.0 , 18時間後 11.3 ± 18.7 pg/dl と漸減していった。UTI 群でもやはり大動脈遮断直前 4.1 ± 2.8 pg/dl から大動脈遮断解除5分後 25.5 ± 12.8 pg/dl と高値を示した後、以後 18.0 ± 12.4 , 10.1 ± 7.1 , 8.6 ± 4.5 pg/dl と漸減していった。大動脈遮断解除5分後にUTI 群が有意に低値であった。経過中の最高値はControl 群 58.4 ± 40.0 pg/dl に対してUTI 群 28.6 ± 13.2 pg/dl が有意に低値を示した (図2)。

3. PMNE

Control 群では大動脈遮断直前 209 ± 93 μ g/l から大動脈遮断解除5分後 $1,740 \pm 1,060$ μ g/l と高値を示した後、手術6時間後 $1,034 \pm 728$, 12時間後 629 ± 323 , 18時間後 $745 \pm 1,226$ μ g/l と変動した。UTI 群では大動脈遮断直前 357 ± 596 μ g/l から大動脈遮断解除5分後 $1,422 \pm 694$ μ g/l と高値を示した後、以後 871 ± 560 , 455 ± 194 , 568 ± 535 μ g/l と変動した。手術12時間後でUTI 群がControl 群に比べて低値をとる傾向にあった。経過中の最高値は2群間で有意差を認めなかった (図3)。

4. 術後臓器障害

GOT, GPT, T-Bil, BUN, Cr, $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2$ の変動は表2のとおりであった。これらのうち術後2日目のCrと2, 3日目のBUNでUTI 群がControl 群に比べ有意に低値を示した。

IL-6, IL-8, PMNE と術後臓器障害の指標と

図3 PMNEの変動と最高値

表2 GOT, GPT, T-Bil, BUN, Cr, PaO₂/FIO₂の推移

		術前	術後1日目	術後2日目	術後3日目
GOT (IU/l)	UTI 群	21.6±9.1	114.9±145.4	85.4±84.1	44.5±33.3
	Control 群	24.6±12.8	85.7±55.3	74.1±50.8	50.4±33.9
GPT (IU/l)	UTI 群	24.0±19.4	27.7±22.5	27.3±22.8	24.0±17.2
	Control 群	23.7±16.4	27.5±15.0	25.5±10.9	28.0±15.1
T-Bil (mg/dl)	UTI 群	0.47±0.21	1.74±1.47	1.71±2.33	1.77±2.99
	Control 群	0.65±0.43	1.17±0.45	0.98±0.40	0.94±0.46
BUN (mg/dl)	UTI 群	17.0±7.1	17.2±4.9	18.0±6.4*	16.2±7.5*
	Control 群	16.6±4.8	19.7±4.6	27.2±10.9*	27.9±15.7*
Cr (mg/dl)	UTI 群	0.89±0.22	0.90±0.22**	0.80±0.22*	0.74±0.21**
	Control 群	0.90±0.32	1.21±0.56**	1.36±0.94*	1.25±1.06**
		術前	ICU 入室時	術後1日目	術後2日目
PaO ₂ /FIO ₂	UTI 群	412.4±43.8	314.4±104.2	261.1±72.6	242.1±70.1
	Control 群	406.2±50.5	325.9±123.0	300.9±104.7	198.1±74.6

* $p<0.05$, ** $p<0.10$.

表3 IL-6, IL-8, PMNE と術後臓器機能との相関(有意差を認めたもののみ示す)

		相関係数	p value
IL-8 手術6時間後	—BUN 術後1日目	0.397	0.029
IL-8 手術6時間後	—BUN 術後2日目	0.400	0.028
IL-8 手術12時間後	—Cr 術後1日目	0.382	0.036
IL-8 手術12時間後	—Cr 術後3日目	0.362	0.049
IL-8 手術12時間後	—BUN 術後1日目	0.437	0.015
IL-8 手術12時間後	—BUN 術後2日目	0.428	0.017
PMNE 手術18時間後	—Cr 術後1日目	0.685	<0.0001
PMNE 手術18時間後	—Cr 術後2日目	0.724	<0.0001
PMNE 手術18時間後	—Cr 術後3日目	0.765	<0.0001
IL-8 大動脈遮断解除5分後—PaO ₂ /FIO ₂	ICU 入室時	—0.373	0.032

した GOT, GPT, T-Bil, BUN, Cr, PaO₂/FIO₂ との相関関係について検定した。表 3 に示すように IL-8, PMNE と BUN, Cr に有意な正の相関を認めた。また大動脈遮断解除 5 分後の IL-8 と ICU 入室時 PaO₂/FIO₂ に負の相関を認めた (表 3)。

考 察

今回の検討で UTI 群の大動脈遮断解除 5 分後 IL-8 値および経過中最高 IL-8 値が Control 群に比べて有意に低値を示し、腎機能の指標である BUN, Cr がやはり UTI 群において有意に低値を示した。これは体外循環症例におけるウリナスタチン投与による抗 IL-8 効果と術後の臓器障害、特に腎機能障害の予防効果を示唆するものである。また IL-8 や PMNE が術後の腎機能および肺酸化能と相関を認めたことは、IL-8 や PMNE の適切な抑制が術後臓器障害の予防に結びつくであろうことを示している。

近年、外科学領域でも手術侵襲とこれによるサイトカインの変動が注目され、サイトカインが手術侵襲に対する生体反応に多大な役割を果たしていることが明らかにされてきた³⁾。体外循環はコントロールショックと称されるように生体に著しい侵襲を与えるため、開心術症例においても外科的侵襲の例に漏れず種々のサイトカインが大きく変動する^{4,5)}。一方、元来敗血症に対する臨床治験の entry criteria を目的として提唱された SIRS は、最近では各種の侵襲による全身的な炎症反応とされ、多臓器不全状態の前段階および warning sign として注目されている。さらにこの病態の本質が高サイトカイン血症にあると考えられるに至り、侵襲に対するサイトカインを含んだ炎症性 mediator への対策の合理性、必要性、重要性が理解されるようになってきた。そして過度の高サイトカイン血症を適切に抑制することが術後臓器障害や多臓器不全の予防につながると認識されるようになった⁶⁾。

今回検討した IL-6 は当初 B 細胞の最終分化段階を誘導する因子として報告された。また IL-8 は主要な好中球活性化遊走制御因子であり、その主な作用は組織への好中球の動員による炎症反応

の惹起である。いずれも単球、血管内皮細胞など種々の細胞で産生され、重症感染症、敗血症、手術侵襲の重症度や程度、予後などと相関するとされている^{7,8)}。PMNE は IL-8 や IL-6 に活性化された好中球より放出され、細胞障害、臓器障害の一因とされている。一部の疾患ではこれらの多寡が病像を反映することが明らかにされている。体外循環症例でも IL-6, IL-8, PMNE の変動は検討されており、体外循環終了後高値をとり、体外循環時間に相関することが報告されている^{9,10)}。IL-6, IL-8 は血中で感度よく安定して測定できるサイトカインとして外科的侵襲に対して鋭敏に変動する生体反応のよい指標になりうると考えられる。しかしサイトカインの特徴として 1 つのサイトカインが複数の作用を有する pleiotrophy と複数のサイトカインが同じ作用を有する redundancy があげられ、互いにネットワークを形成しているため、単一、一時点のサイトカインの多寡を論じるのではなく、複数のサイトカインの推移をとらえることも重要なことであると考えられる¹¹⁾。

これら IL-6 や IL-8 をはじめとする炎症性サイトカインを抑制する抗サイトカイン療法としては、抗サイトカイン抗体 (例：抗 TNF- α 抗体¹²⁾)、可溶性受容体 (例：可溶性 TNF 受容体¹³⁾)、受容体拮抗物質 (例：IL-1 受容体拮抗物質¹⁴⁾)、持続的血液濾過透析による吸着除¹⁵⁾ 等が報告されているものの、臨床応用され一般的に使用しうるものはいまだ少ない。現在のところでは以前よりその抗炎症性サイトカイン効果が推察、報告されているステロイド¹⁶⁾ や種々の蛋白分解酵素阻害剤の投与¹⁷⁾ が現実的である。今回われわれが検討したウリナスタチンは急性膀胱炎や急性循環不全を保険適応としているヒト尿中に存在する分子量 67,000 の糖蛋白質の多価酵素阻害剤である。種々のプロテアーゼを阻害するだけでなく、炎症性サイトカインである、IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α や活性酸素などの産生を抑えるとの報告がなされている¹⁸⁾。今回われわれはその心筋保護効果も期待して急性循環不全時の一日投与量である 30 万単位を大動脈遮断開始直後に冠動脈内に one shot で投与した。既に報告してい

るようにわれわれの検討では IL-6, I-8, PMNE については動脈血と冠静脈洞血でのそれぞれの濃度が同値であり, これらによるウリナスタチンの心筋保護効果の評価は行いえなかった¹⁹⁾. また, このシリーズにおいて使用した 3 つの心筋保護法の違いで IL-6, IL-8, PMNE は有意差を認めなかった. 以前より推測されているウリナスタチンの心筋保護効果については他のサイトカイン等による評価が必要と考えられる. 加えてより有効な抗サイトカイン療法として使用するためにはその投与量および投与経路はさらなる検討が必要であろう.

体外循環後のサイトカインの変動をはじめとする炎症反応は主に①人工心肺回路や空気等異物と血液が接触すること, ②心臓をはじめとする諸臓器の虚血再灌流障害, の両者によると考えられる^{19,20)}. 特に前者については, 人工心肺が生体を与える影響としていわゆる血液の denaturation という概念が以前より存在しており, サイトカイン産生, 賦活化の大きな要因と考えられる. この影響を考慮し本研究では検討症例を人工心肺時間 100 分以上のものとした.

今回の結果より体外循環症例におけるウリナスタチンの炎症性サイトカイン, 特に IL-8 の抑制効果が示唆された. しかしながら, 体外循環症例における抗サイトカイン療法の意味するところは酵素阻害剤や抗サイトカイン抗体等の薬剤投与のみにあるわけではない. すなわち体外循環時間短縮への努力や生体適合性人工心肺回路の開発などは, 体外循環における炎症性サイトカイン産生を直接抑制するものとして最も基礎的かつ有効な抗サイトカイン療法と考えられ, 抗サイトカイン効果をもつ薬剤の開発と併せて炎症性サイトカインの抑制および臓器障害軽減のために必要不可欠であることはいうまでもない.

ま と め

(1) 体外循環下に冠状動脈バイパス術を施行した症例について, IL-6, IL-8, PMNE を測定し, ウリナスタチンの抗炎症性サイトカイン効果と臓器障害予防効果について検討した.

(2) ウリナスタチン投与群の大動脈遮断解除

5 分後 IL-8 および経過中最高 IL-8 が Control 群に比べて有意に低値を示し, 腎機能, 肺酸素化能もよく保持された.

(3) IL-8, PMNE は腎機能, 肺酸素化能と関連し, これらの適正な抑制が術後臓器障害を軽減すると推測された.

(4) 体外循環時におけるウリナスタチン投与は炎症性サイトカイン, 特に IL-8 を適切に抑制し, ひいては腎臓, 肺等の術後臓器障害を軽減せしめることが示唆された.

文 献

- 1) The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* **20**: 864-874, 1992.
- 2) Bone, R.C.: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: What we do and do not know about cytokine regulation. *Crit. Care Med.* **24**: 163-172, 1996.
- 3) Roumen, R.H., Hendriks, T., van der Ven-Jongekrijik, J. et al.: Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann. Surg.* **218**: 769-776, 1993.
- 4) 古永晃彦: 体外循環時におけるサイトカインの変動. *日胸外会誌* **42**: 2200-2206, 1994.
- 5) Finn, A., Naik, S., Klein, N. et al.: Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **105**: 234-241, 1993.
- 6) 北村信哉, 平澤博之: 重症患者における systemic inflammatory response syndrome (SIRS) の転帰および病態の検討. *日救急医会誌* **6**: 662-672, 1995.
- 7) Hack, C.E., De Groot, E.R., Felt-Bersma, R.J.F. et al.: Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* **74**: 1704-1710, 1989.
- 8) Sakamoto, K., Arakawa, H., Mita, S. et al.: Elevation of circulating interleukin-6 after surgery: Factors influencing the serum level. *Cytokine* **6**: 181-186, 1994.
- 9) 山崎一也, 相馬民太郎, 小菅宇之ほか: 体外循環中の諸因子がサイトカインに及ぼす影響. *人工臓器* **26**: 34-37, 1997.
- 10) Frerking, B., Philip, I., Dehoux, M. et al.: Circu-

- lating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. **108**: 636-641, 1994.
- 11) Kishimoto, T., Taga, T. and Akira, S.: Cytokine signal transduction. Cell **76**: 253-262, 1994.
- 12) Emerson, T.E., Lindsey, D.C., Jr., Jesmok, G.J. et al.: Efficacy of monoclonal antibody against tumor necrosis factor alpha in an endotoxemic baboon model. Circ. Shock **38**: 75-84, 1992.
- 13) Van Zee, K.J., Kohno, T., Fischer, E. et al.: Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α *in vitro* and *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 4845-4849, 1992.
- 14) Fischer, E., Marano, M., Van-Zee, K.J. et al.: Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in *Escherichia coli* septic shock, but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia. J. Clin. Invest. **89**: 1551-1557, 1992.
- 15) Bellomo, R., Tipping, P. and Boyce, N.: Continuous venovenous hemofiltration with dialysis removes cytokines from the circulation of septic patients. Crit. Care Med. **21**: 522-526, 1993.
- 16) Teoh, K.H.T., Bradley, C.A., Gauldie, J. et al.: Steroid inhibition of cytokine-mediated vasodilation after warm heart surgery. Circulation **92**: II-347-II-353, 1995.
- 17) Sawa, Y., Shimazaki, Y., Kadoba, K. et al.: Attenuation of cardiopulmonary bypass-derived inflammatory reactions reduces myocardial reperfusion injury in cardiac operations. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. **111**: 29-35, 1996.
- 18) Nakamura, H., Abe, S., Shibato, Y. et al.: Inhibition of neutrophil elastase-induced Interleukin-8 gene expression by urinary trypsin inhibitor in human bronchial epithelial cell. Int. Arch. Allergy Immunol. **112**: 157-162, 1997.
- 19) Karube, N., Adachi, R., Ichikawa, Y. et al.: Measurement of cytokine levels by coronary sinus blood sampling during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. ASAIO J. **42**: M787-M791, 1996.
- 20) Butler, J., Rocker, G.M., Westaby, S. et al.: Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. Ann. Thorac. Surg. **55**: 552-559, 1993.