

原

著

LPS 誘導性急性肺障害に対する塩酸オルプリノンの 肺障害軽減効果

ムハマド・ナデーム・クタブ

土田 正則・竹久保 賢

斎藤 正幸・林 純一

新潟大学医歯学総合研究科

呼吸循環外科学分野

Olprinone Ameliorates Endotoxin — Induced Acute Lung Injury in Rat

Muhammad Nadeem QUTAB

Masanori TSUCHIDA, Ken TAKEKUBO

Masayuki SAITHO and Jun-ichi HAYASHI

Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

エンドトキシンであるリポ多糖体 (LPS) をラットに投与し ARDS の動物モデルを作成した。このモデルでは肺への好中球の集積と炎症性サイトカイン上昇が認められたが、LPS 投与前にホスホジエステラーゼⅢ阻害薬である塩酸オルプリノンを腹腔内投与することで肺障害の軽減が認められた。LPS 投与群に比較して、組織学的には肺胞内への好中球集積が軽減し、血清サイトカイン測定では炎症性サイトカインである $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6 の低下と抗炎症性サイトカインである IL-10 の増加を認めた。肺胞マクロファージを分離、培養し培養上清中のサイトカインを測定したところ、塩酸オルプリノン投与群で IL-10 が増加し、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6 が減少していた。以上から肺障害の軽減機序の機序として肺胞マクロファージからの IL-10 分泌増加を介した抗炎症作用が考えられた。

塩酸オルプリノンは重症患者における循環作動薬としてのみならず、抗炎症作用を介した肺障害の予防効果が期待できると考えられる。

キーワード：急性肺障害、ホスホジエステラーゼ阻害薬、肺胞マクロファージ、インターロイキン 10

Reprint requests to: Muhammad Nadeem QUTAB
Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学医歯学総合研究科呼吸循環外科学分野
ムハマド・ナデーム・クタブ

緒 言

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) は外傷や術後患者に一定の頻度で認められ、一旦発症すると各種の積極的な集中治療にもかかわらずその死亡率は高い^{1)–3)}。ARDSの病態としては肺への広範な好中球の集積⁴⁾と各種炎症性サイトカインの上昇が挙げられる^{5)–7)}。肺に集積した好中球やマクロファージは活性化されると炎症性サイトカインを放出し、これがさらに障害を増強することが明らかになっている。一方、抗炎症性サイトカインであるIL-10はマクロファージ、肥満細胞、T細胞、B細胞から分泌され⁸⁾⁹⁾、主にマクロファージの機能を調節し単球、マクロファージからの炎症性サイトカインの放出を抑えて炎症の抑制に働く¹⁰⁾¹¹⁾。従って肺障害においてIL-10を増加させることにより障害の程度を軽減できる可能性が考えられる¹²⁾。

ホスホジエステラーゼⅢ阻害薬である塩酸オルプリノンは強心作用、末梢血管拡張作用の両者を併せ持つ強心薬であるが¹³⁾、その作用機序はホスホジエステラーゼを阻害することによるcAMPの増加にある。主な薬理作用以外にも炎症性サイトカイン産生の抑制を介した抗炎症作用が報告されており^{14)–16)}、IL-10の産生増加も認められている。

心不全や開心術後の管理の循環作動薬としてホスホジエステラーゼⅢ阻害薬が使用されているが、本研究では塩酸オルプリノンの抗炎症作用に着目し、塩酸オルプリノンが急性肺障害を抑制するか否かを検討した。

材料と方法

動物：すべての実験は体重180gから220gのウイスターラット(チャールスーリバー・ジャパンより購入)を用いて行った。動物は動物実験の指針に従い愛護的に扱った。

薬剤：ホスホジエステラーゼⅢ阻害薬として塩酸オルプリノン(コアテック、エーザイ株式会社)を、エンドトキシンはlipopolysaccharide (LPS:

Escherichia coli; sero type 055: B5, シグマ社)を用いた。

薬剤投与量と投与経路：塩酸オルプリノンは0.2mg/kgを腹腔内投与、LPSは5mg/kgを尾静脈から投与した。

実験群：

LPS投与群：生理食塩水投与30分後にLPS(5mg/kg)を尾静脈から投与した。

OPL + LPS投与群：塩酸オルプリノン0.2mg/kgを腹腔内投与し、30分後にLPS(5mg/kg)を尾静脈から投与した。

コントロール群：生理食塩水を腹腔内投与30分後に生理食塩水を尾静脈から投与した。

肺の組織学的評価：

LPSあるいは生理食塩水投与後6時間後に肺を摘出し肺の組織学的評価を行った。肺の摘出に先立ち開胸下に右心室から20mlの生理食塩水を注入し肺内の血液をフラッシュした。肺は3日間8%フォルマリンで固定後、右肺は上葉、中葉、下葉、副葉、左肺は上葉、中葉、下葉から4μmの切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。各切片は肺胞構築、毛細血管鬱血、肺水腫、好中球浸潤の項目に関して評価した。

各切片から無作為に抽出した視野を200倍で観察し好中球浸潤の程度は一肺胞あたりの細胞数に換算し現した¹⁷⁾。

血清サイトカイン測定：

血液を4℃10分間2,000回転で遠心し血清を分離した。TNFαはGenzyme techne ELISAキット、IL-6はENDOGEN ELISAキット、IL-10はPharMingen OptEIA ELISAキットを用いて測定した。

気管支肺胞洗浄：

実験終了時ラットを気管切開し静脈留置用のカニューレ(14ゲージ)を挿入、PBS4mlを6回注入、回収し気管支肺胞洗浄を行った。肺胞洗浄液の回収率は80%程度で各群間に回収率に有意差はなかった。回収した洗浄液は10分間1,000回転で遠心し細胞成分を回収し後の培養実験に使用した。上清は別に回収しサイトカイン測定用に-80℃で保存した。

肺胞マクロファージの分離と培養：

気管支肺胞洗浄で回収した細胞成分を PBS で 2 回洗浄後 10 % FCS を含む RPMI1640 培養液に再浮遊させ 37 °C, 5 % CO₂ 下で 2 時間培養した。2 時間後培養上清を除去し 37 °C の PBS で 4 回洗浄し、ラバーポリスマンを用いてディッシュに付着した細胞を剥離した。

回収された細胞は 98 % 以上が肺胞マクロファージで、これを RPMI 液で洗浄し 0.5×10^6 個 / 500 μ l に調整し 24 ウェルのプレートで培養した。培養の条件は以下の 3 群を設け、各々の群の培養上清を 48, 72 時間で分離、回収し上清中のサイトカインを測定した。

LPS 群：培養液 + LPS (10 μ g/ml)

LPS + OLP 群：培養液 + LPS (10 μ g/ml) + OLP (10^{-5} mole/ml)

コントロール群：培養液のみ

統計学的検討

数値は平均値 ± 標準偏差で記載した。多群間の比較は Bonferroni の多重比較を行い、 $p < 0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

結 果

肺の組織学的変化

各群における組織像を図 1 に示した。LPS 投与群 (図 1-A)、塩酸オルプリノン前投与群 (図 1-B) とともにコントロール群 (図 1-C) に比べて好中球浸潤の増加が認められた。これを 1 肺胞あたりの好中球浸潤の程度と比較すると LPS 群は 1.2, 塩酸オルプリノン前投与群 0.4 と後者で好中球浸潤の程度が有意に軽減した (図 2)。

血清サイトカイン測定

各群における血清中 TNF- α 、IL-6、IL-10 の測定結果を表 1 に示した。TNF- α はコントロール群では 1 時間、6 時間とも測定感度以下であったが、LPS 投与群では投与後 1 時間値が $5,185 \pm 1,394$ pg/ml, 6 時間値が 176 ± 49 pg/ml であった。一方塩酸オルプリノン前投与群では 1 時間値は

$2,680 \pm 1,461$ pg/ml, 6 時間値 108 ± 24 pg/ml で、1 時間、6 時間とも LPS 投与群に比べて有意に低値であった。

IL-6 はコントロール群では 1 時間、6 時間とも測定感度以下であった。LPS 投与群では 1 時間値は 331 ± 129 pg/ml, 6 時間値は $14,175 \pm 189$ pg/ml で、投与後 6 時間で著明に上昇した。塩酸オルプリノン前投与群では 1 時間値 417 ± 306 pg/ml と LPS 投与に比べ変化を認めなかったが、6 時間値が $10,696 \pm 2,293$ pg/ml と有意に低下した。抗炎症性サイトカインである IL-10 はコントロール群では 1 時間、6 時間とも測定感度以下であった。LPS 投与群では 1 時間値 $1,633 \pm 125$ pg/ml, 6 時間値 692 ± 246 pg/ml, 塩酸オルプリノン前投与群では 1 時間値 $2,122 \pm 261$ pg/ml, 6 時間値 660 ± 72 pg/ml と 1 時間値が LPS 投与群に比べて有意に高値であった。

気管支肺胞洗浄液中細胞数とサイトカインの変化

各群で気管支肺胞洗浄液中の細胞数に有意な差はなく、又、サイトカイン値はいずれの群でも測定感度以下であった。

肺胞マクロファージ培養上清中のサイトカイン測定

表 2 に各群におけるサイトカインの経時的変化を示した。コントロール群から分離したマクロファージの培養上清中ではどの時点でも測定感度以下であった。LPS 群の培養上清中 IL-10 は 48 時間値 687 ± 6 pg/ml, 72 時間値 673 ± 68 pg/ml, LPS + OPL 群では 48 時間値 883 ± 51 pg/ml, 72 時間値 952 ± 48 pg/ml と 48 時間、72 時間値ともに LPS 群に比較して有意に高値であった。同様に TNF α は LPS 群で 48 時間値 $6,700 \pm 228$ pg/ml, 72 時間値 6376 ± 242 pg/ml, LPS + OPL 群では 48 時間値 $4,872 \pm 504$ pg/ml, 72 時間値 $5,544 \pm 295$ pg/ml と 48 時間値が LPS 群に比較して低値であった。IL-6 は LPS 群で 48 時間値 $1,158 \pm 127$ pg/ml, 72 時間値 $1,111 \pm 29$ pg/ml, LPS + OPL 群では 48 時間値 718 ± 16 pg/ml, 72 時間値 872 ± 76 pg/ml で 48 時間、72 時間値ともに LPS + OPL 群が有意に低値であった。

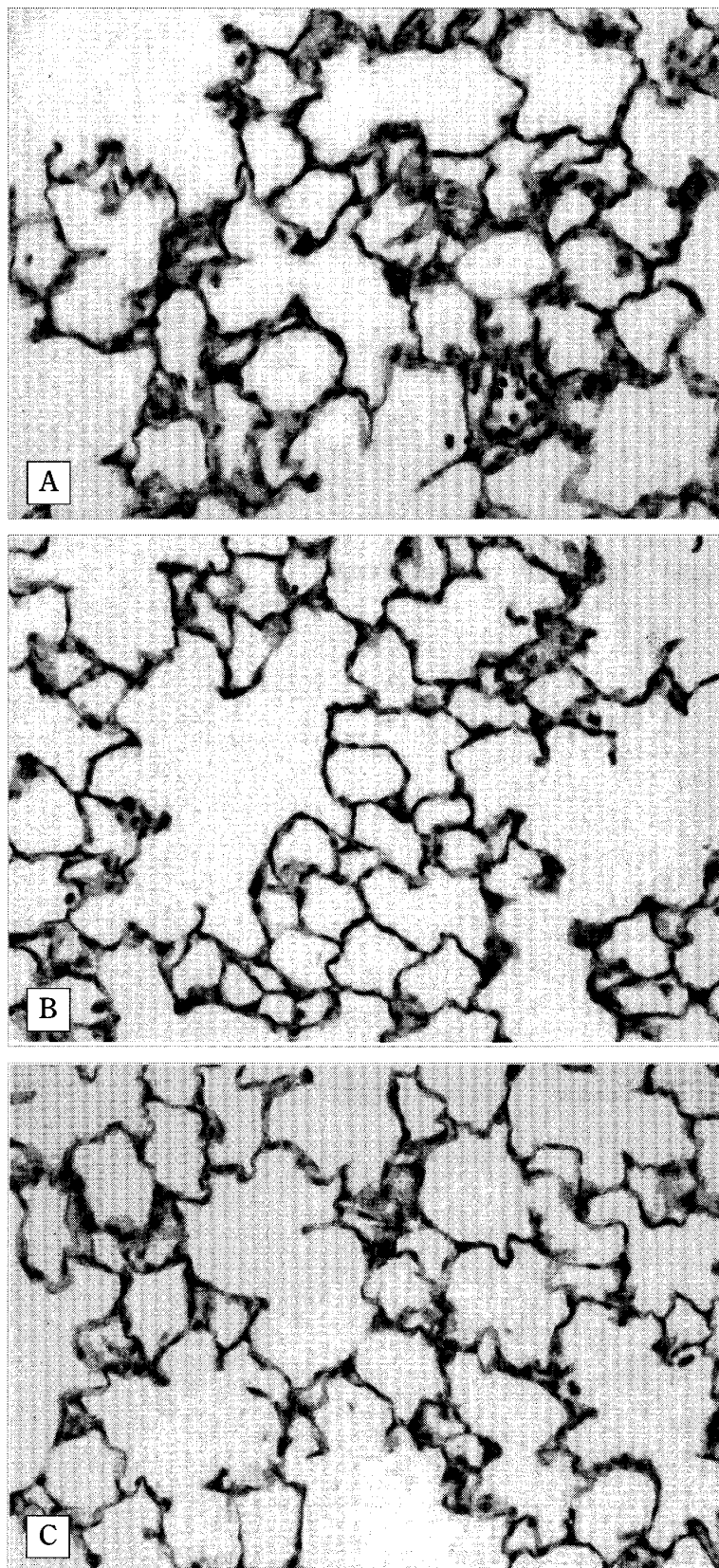


図1 各群における組織像

A: LPS 投与群, B: 塩酸オルプリノン前投与群, C: コントロール群

LPS 投与群では好中球の浸潤が目立つが, 塩酸オルプリノン前投与群では好中球浸潤程度が軽減している。

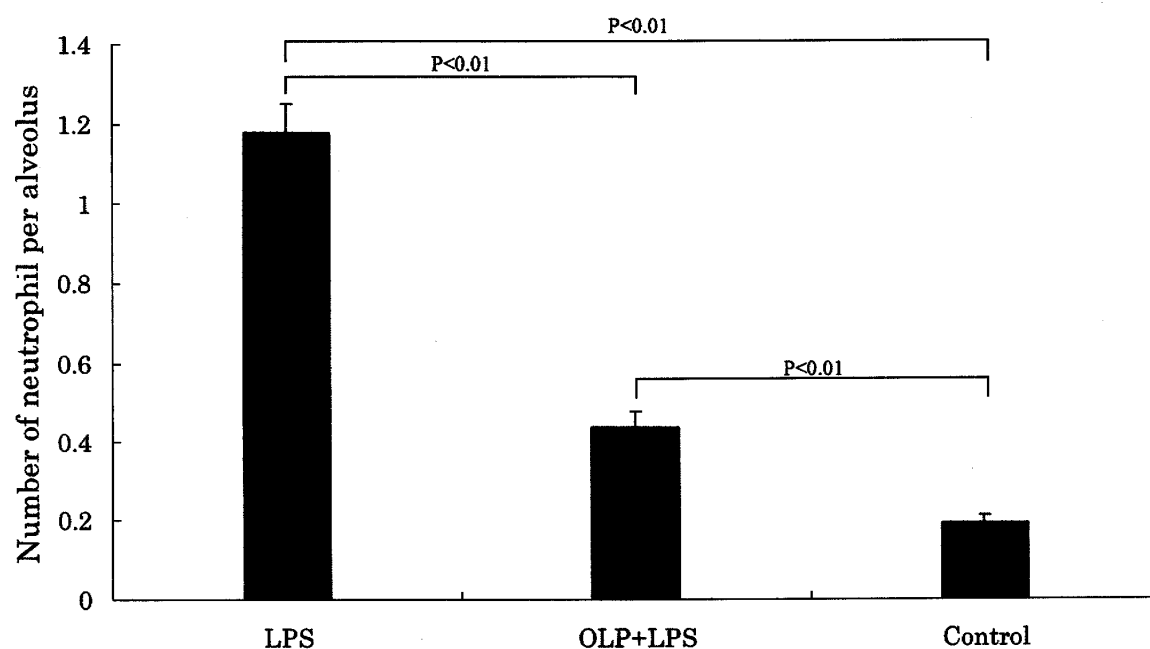


図2 1肺胞あたりの好中球浸潤の程度
LPS群に比較してOPL前投与群で有意に好中球浸潤が軽減した。

表1 各群における血清サイトカイン値

	LPS	OLP+LPS	Control
TNF α at 1h	5,185 \pm 1,394	2,680 \pm 1,461 *	ND
TNF α at 6h	176 \pm 49	108 \pm 24 *	ND
IL- 6 at 1h	331 \pm 129	417 \pm 306	ND
IL- 6 at 6h	14,175 \pm 189	10,696 \pm 2,293 *	ND
IL- 10 at 1h	1,633 \pm 125	2,122 \pm 261 *	ND
IL- 10 at 6h	692 \pm 264	660 \pm 72	ND

OLP：塩酸オルプリノン

* LPS投与群と比較して有意差あり (p < 0.05)

ND：測定感度以下

表2 各群におけるマクロファージ培養上清中のサイトカイン値

	LPS	OLP+LPS	Control
TNF α at 48h	6,700 \pm 228	4,872 \pm 504 *	ND
TNF α at 72h	6,376 \pm 242	5,544 \pm 295	ND
IL- 6 at 48h	1,158 \pm 127	718 \pm 16 *	ND
IL- 6 at 72h	1,111 \pm 29	872 \pm 76 *	ND
IL- 10 at 48h	687 \pm 6	883 \pm 51 *	ND
IL- 10 at 72h	673 \pm 68	952 \pm 48 *	ND

OLP：塩酸オルプリノン

* LPS投与群と比較して有意差あり (p < 0.05)

ND：測定感度以下

考 察

本研究ではLPS投与による肺障害モデルを用いてホスホジエステラーゼⅢ阻害薬である塩酸オルプリノンの肺障害軽減作用を検討した。その結果、塩酸オルプリノン前投与が肺局所への好中球浸潤を軽減すること、*in vivo*, *in vitro*の両者で抗炎症性サイトカインのIL-10産生を促進し、炎症性サイトカインであるTNF α 、IL-6の産生を抑制することが示された。塩酸オルプリノンは強心作用と血管拡張作用を併せ持つ循環作動薬であるが¹³⁾、気管支拡張作用¹⁴⁾や、体外循環時に抗炎症作用を示す¹⁵⁾¹⁶⁾ことが報告されている。このような循環作動薬のサイトカインに対する影響はイソプロテレノール¹⁸⁾、プロスタグランジンE₂¹⁹⁾、エピネフリン²⁰⁾、アデノシンレセプター拮抗薬²¹⁾などでも報告されている。しかし、これらの検討はサイトカインや免疫担当細胞に対する影響が主であり実際の臓器障害に対する効果に言及したものは少なく、肺障害に対する軽減効果を示した点で本研究の価値があると考えている。

ホスホジエステラーゼⅢ阻害薬の薬理作用はホスホジエステラーゼを阻害することによりcAMPを増加させることにあり、免疫担当細胞の不活化もcAMPの増加によると考えられている。cAMPの増加がどのように、免疫担当細胞を不活化するかに関してEiglerらはプロテインカイネースAの活性化を介したIL-10の増加とTNF α の低下が関与していることを示した²²⁾。本研究でも*in vivo*, *in vitro*でIL-10が上昇し、TNF α とIL-6が低下していたことからサイトカインバランスの抗炎症方向への変化が肺障害軽減機序の1つと考えている。さらにIL-10増加自体がマクロファージの活性化を抑制する機序も考えられる²³⁾。今回は示さなかったが本モデルでIL-10遺伝子を導入したところ肺障害の軽減を認めたことからIL-10は肺障害抑制に関して鍵になる因子と考えられる。

肺障害の際には肺胞に存在する免疫担当細胞が活性化されサイトカインネットワークを通して炎症の拡大が起こるが、その際マクロファージは中

心的な役割を果たしている。ホスホジエステラーゼはほぼ全ての細胞に存在しているが特にマクロファージにはその活性が高い²⁴⁾ことから、塩酸オルプリノンは肺障害の発生や進展を効率よく抑制できる可能性がある。今回の実験では塩酸オルプリノンをLPS投与前に投与したので肺障害に関しては予防効果ということになる。臨床では開心術後や心不全では肺水腫、人工呼吸管理に伴う感染など潜在的な肺障害のプライミング状態であり、感染が契機として急性肺障害を合併することもある。このような状態ではカテコラミンが必要となることが多いが、塩酸オルプリノンの使用は重症患者における循環作動薬としてのみならず、抗炎症作用を介した肺障害の予防効果が期待できると考えられる。

結 語

LPS誘導性の急性肺障害モデルにおいてLPS投与前にホスホジエステラーゼⅢ阻害薬である塩酸オルプリノンを腹腔内投与することで肺障害の軽減が認められた。サイトカイン測定および培養実験結果から肺障害の軽減にはマクロファージからのIL-10分泌を介した抗炎症作用の可能性が考えられた。

引用文献

- 1) Murray JF, Matthay MA, Luce JM and Flick MR: An expanded definition of the ARDS. *Am Rev Respir Dis* 138: 720-723, 1989.
- 2) Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A and Spragg R: The American-European Consensus Conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824, 1994.
- 3) Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, and Hudson LD: Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 132: 485-489, 1985.

- 4) Delclaux C, Delclaux SR, Delacourt C, Buisson BC, Lafuma C and Harf A: Alveolar neutrophils in endotoxin - induced and bacteria - induced acute lung injury in rat. *Am J Physiol* 273: 104 - 112, 1997.
- 5) Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R and Leeper K: Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts of a poor outcome in ARDS. Plasma IL - 1 (and IL - 6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 107: 1062 - 1073, 1995.
- 6) Flohe S, Fernandez ED, Ackermann M, Hirsch T, Borgermann J and Schade FU: Endotoxin tolerance in rats: Expression of TNF - α , IL - 6, IL - 10, VCAM - 1 and HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine* 11: 796 - 804, 1999.
- 7) Zimmerman GA, Renzetti AD and Hill HR: Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. Evidence for activated neutrophils in the pulmonary circulation. *Am Rev Respir Dis* 127: 290 - 300, 1983.
- 8) Kambayashi T, Jacob CO, Zhou D, Mazurek N, Fong M and Strassmann G: Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL - 10 and in the subsequent inhibition of TNF - α and IL - 6 released by endotoxin - stimulated macrophages. *J Immunol* 155: 4909 - 4916, 1995.
- 9) Kozak YD, Goldenberg BT, Naud MC, Costa AV, Auriault C and Verwaerde C: Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis by systemic and subconjunctival adenovirus - mediated transfer of the viral IL - 10 gene. *Clin Exp Immunol* 130: 212 - 223, 2002.
- 10) Malefyt RW, Abrams J, Bennett B, Figdor CG and Vries JE: Interleukin 10 (IL - 10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL - 10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174: 1209 - 1220, 1991.
- 11) Malefyt RW, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yassel H and Varis JE: Interleukin 10 (IL - 10) and viral IL - 10 strongly reduce antigen - specific human T cell proliferation by diminishing the antigen - presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174: 915 - 924, 1991.
- 12) Lo CJ, Fu M and Cryer HG: Interleukin 10 inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in adult respiratory distress syndrome. *J Surg Res* 79: 179 - 184, 1998.
- 13) Mizushige K, Ueda T, Yukiiri K and Suzuki H: Olprinone: a phosphodiesterase III inhibitor with positive inotropic and vasodilator effects. *Cardio - vascular Drug Reviews* 20: 163 - 174, 2002.
- 14) Hirota K, Kabara S, Hashimoto H, Ishihara H and Matsuki A: Use of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, in an asthmatic patient. *Acta Anaesthesiol Scand* 45: 510 - 512, 2001.
- 15) Yamamura K, Akiyoshi K, Irita K, Taniyama T and Takahashi S: Effects of olprinone, a new phosphodiesterase inhibitor, on gastric intermuscular acidosis and systemic inflammatory responses following hypothermic cardiopulmonary bypass. *Acta Anaesthesiol Scand* 45: 427 - 434, 2001.
- 16) Okuda K, Kudo H, Ohishi K, Kitano T, Imasaka H and Noguchi T: Effect of olprinone on IL - 6 and IL - 10 production during and after cardiac surgery. *Jpn J Anesthesiol* 46: 1580 - 1585, 1997.
- 17) Goel V, Chang C, Salama JV, Barton R, Bauer R, Gahler R and Basu TK: Echinacea stimulates macrophage function in the lung and spleen of normal rat. *J Nutrit Biochemistry* 13: 487 - 492, 2002.
- 18) Szabo C, Hasko G, Zingarelli B, Nemeth ZH, Szlzman AL, Kvetan V, Pastores SM and Vizi ES: Isoproterenol regulates tumour necrosis factor, interleukin - 10, interleukin - 6 and nitric oxide production and protects against the development of vascular hyporeactivity in endotoxaemia. *Immunology* 90: 95 - 100, 1997.
- 19) Strassmann G, Patil KV, Finkelman F, Fong M

- and Kambayashi T: Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E₂. *J Exp Med* 180: 2365, 1994.
- 20) Van PT, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC and Lowry SF: Epinephrine inhibits tumor necrosis factor and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest* 97: 713, 1996.
- 21) Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastorek SM and Vizi ES: Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10 and TNF production in endotoxemic mice. *J Immunol* 157: 4634, 1996.
- 22) Eigler A, Siegmund B, Emmerich U, Baumann KH, Hartmann G and Endres S: Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol* 63: 101-107, 1998.
- 23) O'Farrell AM, Lui Y, Moore KW and Mui AL: IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanism: evidence for src 3-dependent and -independent pathways. *Embo J* 17: 1006-1018, 1998.
- 24) Schudt C, Tenor H and Hatzelmann A: PDE isoenzymes as targets for anti-asthma drugs. *Eur Respir J* 8: 117-1183, 1995.

(平成16年1月20日受付)
