The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	虚血肺細胞内ATPレベル低下にともなう細胞障害と界面活性物質分泌能の変化 : 気管支肺胞洗浄法による評価
Author(s)	明石, 章則
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3052213
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

①

主論文

虚血肺細胞内ＡＴＰレベル低下にともなう細胞障害と界面活性物質分泌能の変化

－気管支肺胞洗浄法による評価－

Cell injury and decrease of excretory activity of pulmonary surfactant accompanied by decrease in intracellular ATP content in ischemic rat lung

—Evaluation by bronchoalveolar lavage procedure—

大阪大学医学部外科学第一講座

Dept. of Surgery Ⅰ, Osaka Univ. Med. School

明石　　章則

Akinori Akashi

（主任：川島康生教授）

Key Words:

Adenine nucleotide,

Purine catabolite,

Enzyme release,

Pulmonary surfactant,

Bronchoalveolar lavage,

Ischemic rat lung

抄　　録

細胞内ATPレベルの変動を基礎にして、虚血肺の細胞障害を気管支肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid:BALF)中における界面活性物質及び細胞内局在物質の回収の面から検討した。結果：1)虚血後120分で空気膨張肺の細胞内ATP量は8.0±0.7μmol/g dwと、虚脱肺や窒素膨張肺と比べて有意($p<0.001$)に高レベルに保たれた。2)細胞内酵素のBALによる回収は空気膨張肺が虚脱肺や窒素膨張肺よりも有意($p<0.001$)に少なかった。3)保存前にBALを行った空気膨張肺は虚血後120分で界面活性物質回収量が0.46±0.07μmolと窒素膨張肺よりも有意($p<0.001$)に高値を示した。これらの成績より、細胞内ATP量に相応して細胞内物質の漏出が抑えられ、Ⅱ型肺胞上皮細胞による界面活性物質の分泌能は維持されていることが示された。

ABSTRACT

To assess the severity of ischemic lung injury accompanied by the decrese of intracellular ATP content, I have studied cell injury and excretory activity of pulmonary surfactant by bronchoalveolar lavage procedure in ischemic rat lung. Cellular ATP contents of lungs inflated with room air after warm ischemia for 120 min were significantly higher than those deflated or inflated with N_2 gas ($p<0.001$). Amounts of enzyme release into the fluid obtained from lungs inflated with room air by lavage showed significantly lower than those deflated and inflated with N_2 gas ($p<0.001$). Ischemic lungs inflated with room air after lavage excreted significantly more pulmonary surfactant than those inflared with N_2 gas for 120 min ($p<0.001$). These data demonstrate that ischemic lungs inflated with room air were protected from cell injury and kept the excretory activity of pulmonary surfactant.

緒　　言

虚血障害や臓器保存における細胞障害のメカニズムの解明に、細胞生化学的方法で研究が多くなされている。これらの研究の結果、虚血障害の生化学的過程に2つの大きな問題が明らかになっている(1)。第一は、虚血中の無酸素下に進行する障害で、ATPレベルの低下に伴うNa^{+}、Ca^{2+}イオン濃度の調節機構の破綻によって生ずる生体膜、細胞骨格系及びミトコンドリアの障害(2,3)。今一つは虚血後血流再開時に多量に発生する活性酸素による細胞成分の酸化や過酸化を伴う障害である。肺はエネルギー代謝回転が遅く、脳、心臓、肝臓などに比べ無酸素障害に対しては抵抗性の強い臓器と考えられてきた(4)。実際にも、虚血・無酸素下でのエネルギー代謝の研究報告は最近10年間行われていない。肺の虚血障害に関する最近の細胞生化学的な研究は活性酸素によるものに限定されているようである(4,5)。従って、虚血肺にとって酸素はむしろ毒物

と見なされる傾向が強い。

最近、空気または100%酸素を用いて持続換気した保存肺では、100%窒素を用いた保存肺よりガス交換能が悪く、肺動脈圧の上昇、肺内シャント率の増加、肺重量の増加の点ですべて悪結果であったことが報告されている(6)。しかし、古典的な研究では酸素を含んだガスで換気もしくは膨張させた保存肺の方が好結果をもたらした報告が多い(7-10)。活性酸素の毒性は非常に強いので、虚血再酸素化による障害は不可避的なものである。しかし、肺は全身中で最も好気的な臓器であり、活性酸素の除去能力も大きいので、その障害を最小限にすることは可能である。また、嫌気的解糖だけではエネルギーの供給が不十分で、どうしても酸化的燐酸化によるATP合成が必要であることも充分考えられる。

本研究では、以上の観点より、他の虚血臓器で最も明瞭な障害指標とされてきた細胞内ATP量及びその関連代謝物の変化を調べた。そ

の結果、嫌気的条件下では細胞内ATP量は急速に減少し、それに伴い様々の細胞障害が現れることを、BALF中への細胞内酵素の漏出で確認した。しかし、空気膨張肺ではATPレベルは維持され、障害から保護されることが明らかになった。又、肺胞表面の表面活性物質の主成分であるDPPC量の簡便正確な測定法を開発し、空気膨張保存肺ではII型肺胞上皮細胞からの表面活性物質の分泌能が保持されることを明らかにした。

実験方法

I.肺摘出の方法。

約250gの雄性Sprague-Dawley ラットを用いた。一晩絶食後にketamine 100 mg/kgを腹腔内投与し、気管切開後に長さ 2 cmの柔らかいプラスチック・チューブ(気管カニューレ)を気管内に挿入した。小動物用人工呼吸器(Aika, model EVM-50A)を用いて空気で呼吸回

数 60回/分、一回換気量 1.0 ml/100 g、PEEP 2cmH$_2$O で換気した。開腹後、肺に接触しないように注意深く横隔膜を肋骨付着部から切離した。切開を胸骨に沿って伸ばし、胸骨縦切開を行った。ヘパリン1,000 IU/kgを右室に注入後、下大静脈と腹部大動脈を切断し、右室を通して肺動脈、左室を通して左房にカニューレを挿入した。直ちに4℃のKrebs-Henseleit (K-H) 液を拍動ポンプ(TAITEC type N-18)を用いて流速 10 ml/分で肺動脈に注入し肺血管内の血液をflush した。左室カニューレからの液が透明になったことを確認してから、心・肺・気管と縦隔組織を気管カニューレと共に迅速に摘出した。

Ⅱ.摘出肺の保存条件。

虚血肺に対して肺胞内酸素濃度の影響を経時的に検討するために、以下のような条件で保存した。

① control肺(n=10): 保存前の摘出肺をcontrol肺とした。

②虚脱肺(n=10): 全身麻酔30分前にキサンチン酸化酵素の阻害剤であるallopurinol(5 mg/kg)を腹腔内投与した。その摘出肺を大気圧下に気管カニューレを開放にして肺を虚脱にし、37℃のK-H液に浸漬保存した。

③窒素膨張肺(n=24):アルカロシース是正のために5%炭酸ガスを添加した窒素ガスで、換気量1.0 ml/100 g、呼吸回数60回/分、PEEP 2 cmH_2Oの条件にて摘出肺を2分間人工換気した。その後、同混合ガスで気道内圧15cmH_2Oで持続膨張させて37℃のK-H液に浸漬保存した。その保存肺を窒素膨張肺とした。

④空気膨張肺(n=24):5%炭酸ガスを添加した空気で、換気量1.0 ml/100 g、呼吸回数60回/分、PEEP 2 cmH_2Oの条件にて摘出肺を2分間人工換気した。その後、同混合ガスで気道内圧15cmH_2Oで持続膨張させて37℃のK-H液に浸漬保存した。その保存肺を空気膨張肺とした。

Ⅲ.経時的肺生検の方法。

虚血肺組織のadenine nucleotideとプリン

代謝物の変化量を検討するために肺生検をした。control肺(n=5)は摘出直後に1肺葉を切除した。虚脱肺(n=5)、窒素膨張肺(n=6)、空気膨張肺(n=6)の各群は温虚血120分までの間、経時的に1肺葉毎に切除して肺生検とした。肺生検で得られたラット肺組織を直ちに液体窒素の中でfreeze clampし、凍結乾燥した。

Ⅳ.気管支肺胞洗浄法。

気管支肺胞洗浄法(bronchoalveolar lavage:BAL)の手技を使って虚血肺の細胞障害と界面活性物質の虚血性変化を検討した。虚血保存肺の気管カニューレに10ml注射器の筒部を接続して、その筒内に37℃の生理食塩水10mlを入れた。液面から肺底部までの高さは15cm以内で、gravimetricな圧で生理食塩水を肺内に注入した。肺は生理食塩水で満たされ、軽くマッサージをした。洗浄液は倒立位で回収され、滅菌ガーゼで濾過した。その洗浄液を4℃10分間、1,500 rpmで遠心して、細胞成分を除去した。気管支肺胞洗浄液(bronchoal

veolar lavage fluid:BALF)中の液性成分であるdipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)とunsaturated phosphatidylcholine (USPC)、可溶性蛋白、lactate dehydrogenase (LDH)、cytoplasmic aspartate aminotransferase (cAST)、mitochondrial aspartate aminotransferase (mAST)の細胞内酵素、そしてプリン代謝物を測定した。

実験1：BALによる液性成分の回収量をみるために、control肺(n=5)と虚血後120分の虚脱肺(n=5)に対して連続7回のBALを行った。

実験2：4群間の虚血性細胞障害を比較検討するために、実験1に加えて虚血後120分の窒素膨張肺(n=6)と空気膨張肺(n=6)に対して連続4回のBALを行い、回収液について液性成分の分析をした。

実験3：肺胞表面の界面活性物質を除去するために保存前に1回のBALを行った。保存前に洗浄された窒素膨張肺(n=6)と空気膨張肺(n=6)は、虚血後120分のみに1回のBALを行い、

回収されたDPPC量を測定した。洗浄後の肺組織はadenine nucleotideを測定するために液体窒素内でfreeze clampし、凍結乾燥した。

別の窒素膨張肺（n=6)と空気膨張肺（n=6)は虚血後60分と120分に各々1回のBALを行い回収されたDPPC量を測定した。

V.生化学的分析の方法。

1. adenine nucleotide及びプリン代謝物の定量：肺生検で得られた凍結乾燥肺を、上池らの方法(2)で抽出した。すなわち、乾燥重量を測定した肺組織をhomogenateして12,000 rpmで遠心し、その上清を 9.2N perchloric acidで除蛋白した後に1N KOHを用いて中和した。その抽出液を用いて細胞内adenine nucleotide であるadenosine triphosphate(ATP)、adenosine diphosphate(ADP)、 adenosine monophosphate(AMP)とプリン代謝物であるadenosine、inosine、IMP、hypoxanthine、xanthine、uric acidを以下の方法で高速液体クロマトグラフイー(high-perfomance liquid

chromatography: HPLC)を用いて測定した。すなわち、ATP、ADP、AMP量はDEAE-2SW (4.6×250 mm)の陰イオン交換カラム、360 mM燐酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)の溶離液、波長260nmで測定した(3)。adenosineとinosine量はCLC-ODS(16×150 mm)の逆相カラム、6%アセトニトリル加100 mM燐酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)の溶離液、波長260nmで測定した。更に、IMP、hypoxanthine、xanthine、uric acid量は同逆相カラム、3%メタノール加100mM燐酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)の溶離液、波長260nmで測定した。

BALF中のadenosine、inosine、IMP、hypoxanthine、xanthine、uric acidは、無処置のBALFを用いて肺組織と同じ方法でHPLCにて測定した。

2. phosphatidylcholine (PC) の定量。BALF中のPCの定量には鉄ロダン法(11)およびコバルトロダン法(12)をそれぞれ一部改良して併用した。すべてのPCは鉄ロダン錯塩と結

合するのに対して、コバルトロダン錯塩は不飽和脂肪酸を含むPCと同様に結合するが、飽和脂肪酸だけで構成されるPCとは結合しない特性を利用したもので鉄ロダン法によりPC総量を、コバルトロダン法からunsaturated phosphatidylcholine (USPC)量をそれぞれ求め、両者の差からdipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)量を算出した。

実際の鉄ロダン法(11)の実施には1.5mlのBALFに200μlの9.2N perchloric acidを加え全リン脂質を沈澱させ、その沈渣に50μlのエタノールと水150 μlを加えた。その混和物を60℃で10分間保温した。その後、500 mM燐酸ナトリウム緩衝液(pH6.2) 20 μl、9M $NH_4(SCN)_4$を含む2.56 mM $Fe(NO_3)_3$(ロダン鉄試薬) 780μlを加えて、さらに35℃で10分間保温した。この反応液に1,2-dichloroethane 1.5 mlを加えてVortex型撹拌器で2分間激しく撹拌した。3,000 rpm、2分間で遠心し、下層にある1,2-dichloroethaneで抽出されたロダン

鉄・リン脂質複合物を波長 470nmで測定した。この分子吸光係数は ε_{470} = 7.5mM^{-1}・cm^{-1}である。

コバルトロダン法(12)では、同じくperchloric acidで沈澱させた試料に、エタノール150μlと、50mM燐酸ナトリウム緩衝液(pH6.2)に 2M $NH_4(SCN)_4$と 50mM $Co(NO_3)_2$を含むロダンコバルト試薬 400μlを加え、35℃10分間保温した後に1,2-dichloroethane 1.5mlでリン脂質複合物を抽出し、波長 316nm 又は622nm で吸光度測定を行った。分子吸光係数はそれぞれ ε_{316} = 5.65mM^{-1}・cm^{-1}、ε_{622} = 0.85mM^{-1}・cm^{-1}を用いた。DPPC量は全PC量からUSPC量を差し引いた量とした。

3. 酵素と蛋白量の測定。LDH活性は、German Society for Clinical Chemistry(G.S.C.C.)の方法(13)、AST活性は西村らによるG.S.C.C.の変法(14)で測定した。cASTとmASTのアイソザイムは寺西らによる免疫学的方法(15)で分別定量した。試料中のcASTを、ブタ

cASTに対する抗体で感作されたヒツジ赤血球に吸着させ、上清でmAST活性を測定した。

BALF中の蛋白量はLowryらの方法(16)によって測定した。

Ⅵ.統計学的分析。データは平均±標準偏差で表した。有意差検定は、Newman Keuls multiple comparison test で行った。$p < 0.05$を有意差とした。

結　　果

Ⅰ. 虚血肺細胞内ATP量の減少とプリン代謝物の蓄積。

図1は37℃の温虚血中の肺細胞内ATP量の変化を示す。摘出直後のcontrol肺(■)のATP量は、9.7±0.7μmol/g dry weightであった。窒素膨張肺(△)と虚脱肺(▲)は虚血15分でcontrol値の1/4～1/2に急減し、その後は漸減して120分では窒素膨張肺で2.0±0.7μmol/g dry weightとcontrol値の約20%になり、虚脱

肺で0.8±0.7μmol/g dry weightとcontrol値の約8%になった。しかし、空気膨張肺(●)は、120分でも8.0±0.7μmol/g dry weightとcontrol値の80%以上に保たれた。

虚脱肺は、他の虚血臓器でみられるように、ATPの分解はAMPを経て種々のプリン代謝物に分解された(2)(17)(18)。図2は、キサンチン酸化酵素の阻害剤であるallopurinolを投与したラットの虚脱肺におけるプリン代謝物の蓄積過程を示している。allopurinolが投与されているためにhypoxanthine(▲)が最も多く、次にxanthine(□)とuric acid(■)が蓄積した。しかし、adenosine(●)とinosine(△)は極めて少量であり、IMPは認められなかった。そのためAMPが5′nucleotidaseによって分解されてAMP→adenosine→inosineか、AMP deaminaseによって脱アミノされてAMP→IMP→inosineのどちらの経路を通るかは決定することができなかった。

表1は虚血120分間中の虚脱肺について、

adenine nucleotides量と全プリン代謝物量の時間的変化を示している。虚血時間の進行にともないATP、ADP、AMPを合計したadenine nucleotides量は減少したが全プリン代謝物量は増加しており、両者の合計量は約13μmol/g dry weightとほぼ一定であった。

II. 連続的気管支肺胞洗浄法による液性成分の回収。

保存肺の虚血障害を評価するために、BALF中の液性成分の分析を行った。BALF中には肺胞表面の界面活性物質だけでなく、虚血障害により上皮細胞内物質の漏出が考えられるので、phosphatidylcholineの他に可溶性蛋白、LDH、cAST、mASTなどの細胞内酵素およびプリン代謝物を測定した。連続7回のBALを行い、control肺と最もATPの減少が著しい虚血後120分の虚脱肺について比較した(図3、4)。BALF中の各液性成分量は洗浄回数に応じて減少したが、肺胞表面を被覆している界面活性物質の主成分であるDPPCの回収量は両群で大

差がないうえに、control肺及び虚脱肺共に最初1回のBALで約70%以上の大部分が回収され、2回目以降のBALでは回収量が急減して少なかった。これに対し、虚脱肺の可溶性蛋白や細胞内酵素、プリン代謝物は2回目以降のBALF中にかなりの量が回収される傾向を示した。

表2はcontrol肺及び120分虚脱肺において、BAL1回、連続4回及び連続7回で回収された各液性成分の合計量を示している。虚脱肺の各細胞内成分の回収量はBALの回数が増えるにつれて当然増大する。しかし、その回収量は回数だけでなく、BALの液量及び操作方法により大きく変化することが考えられるので、適切な基準がなければ障害に対応する定量的指標とすることができない。DPPCは肺胞表面に存在して、そのBALF中への回収が虚血によって変化しないので、この回収量がBALF中の各成分量に対する絶好の標準指標になると考えられる。実際に、表2にみられるように各成分の回収量とDPPC量の比をとれば、1回の

BALだけで虚血障害の充分な指標になることが明かである。

Ⅲ. 虚血後120分に気管支肺胞洗浄で回収された液性成分の比較。

図4は各種虚血肺の連続4回のBALで回収される液性成分量を比較検討したものである。どの虚血肺でもDPPCの回収量は変化しなかったが、虚脱肺や窒素膨張肺では総蛋白量が6倍以上の増量を示し、USPC量には若干の増加がみられた。この蛋白質とUSPCの増加分は虚血障害による上皮細胞の破損からもたらされたのものと考えられる。何故ならばcontrol肺のBALF中には極く少量しか認められない細胞内酵素であるLDH、cASTや虚血中に蓄積したプリン代謝物が、虚脱肺や窒素膨張肺ではBALF中に大量に存在するからである。肝臓(14)や心臓(19)の虚血の初期にはほとんど血中に漏出しないミトンコンドリア酵素がかなりの量含まれているのは、障害が深刻であることを示している。本実験ではBALにより回収され

た全ての指標物質からみて、空気膨張肺が障害に対して強い抵抗性を示していることが窺われる。

Ⅳ. 虚血肺中の界面活性物質分泌能。

好気的条件下での保存肺の保護効果は、Ⅱ型肺胞上皮細胞の界面活性物質の分泌能力についても確認することができた。正常肺ではBALにより界面活性物質、特にそのアポ蛋白質を取り除くとⅡ型肺胞上皮細胞からの分泌が促進されることが知られている(20)。表3にみられるように、虚血前に肺胞中の界面活性物質(DPPC)をBALで除去後に、虚血後120分のみにBALを行うと、空気膨張肺は0.46±0.07μmolで保存前値の75%となった。窒素膨張肺は0.18±0.05μmolで保存前値の30%であった。空気膨張肺の回収されたDPPC量は窒素膨張肺よりも有意($p<0.001$)に高値を示した。

その時の肺組織ATP量とBALで回収されたDPPC量の関係を図5に示す。空気膨張肺(○)は細胞内ATP量が6.8±0.8μmol/g dry weightで

あった。それに対して、窒素膨張肺(●)のATP量は2.1±0.7μmol/g dry weightと有意($p<0.001$)に低値を示した。

更に、虚血後60分と120分の2回BALを行っても、DPPCの回収量は空気膨張肺と窒素膨張肺の間に有意差($p<0.01$)が認められた。

考　　案

肺はanoxiaに強い臓器であると言われている(5)。極めて低い肺胞内酸素分圧に直面しても肺細胞内のミトコンドリアの機能は維持されると報告されている(21)。また、1時間に及ぶ完全なanoxiaでも、肺細胞構造は正常であったと報告されている(22)。従って虚血肺の障害は、再灌流の際に発生する活性酸素による障害によるものであると報告されている(5)。

しかし、今回の実験で、anoxia中に肺細胞内のATPレベルは最初の15分間の平均で0.3μ

mol/min/g dry weight と急速に減少することが示された。このATP消費速度はラット肝の約1/2に相当する(2)。脳、心臓、肝臓では多量のATPを消費する代謝系が存在し、嫌気的解糖系だけでは必要なATPを供給することができないためにATPレベルの減少を来して種々の細胞障害が惹起することが明らかになっている。肺ではこれらの臓器と違って、多量のATPを消費する代謝系は知られていないが、肺は多くの異なった種類の細胞から構成されており、その中のいくつかの細胞はATPを速い速度で消費する代謝系を持っていることが示唆されている。

細胞内のATPレベルが低下すると、種々のイオンポンプが作動できなくなり、細胞内のイオン濃度の調整作用が破綻し、ミトコンドリアの障害や細胞表面膜のbleb形成が起こることが、肝(23)や心筋(19)の虚血で観察されている。虚脱肺や窒素膨張肺においても、多量の細胞内酵素がBALF中に回収されることは、

肺上皮細胞の肺胞腔側にblebが形成され、BAL操作によって破壊されることを示唆している。

虚血肺でも、空気を経気道的に送る膨張肺では細胞内ATPレベルが維持されることは、ATP合成のための細胞呼吸に必要充分量の酸素が肺胞側から補給され得ることを示している(図1)。Faridyら(24)は、犬の切除肺を空気で膨張させると3時間にわたり一定速度で酸素の吸収が続くことを観察しており、この酸素消費からのATP合成速度は、1μmol(22.4μl O_2)/min/g dry weight で、上記ATPの消費速度を充分補うことができることを示している。

今回の実験では、肺における嫌気的解糖によるATP合成能を判定することができなかったが、図1に示す結果からは、酸化的リン酸化に比較すると、その寄与は小さいものと考えられる。

II型肺胞上皮細胞が合成・分泌する界面活性物質は、肺胞虚脱を防ぎ肺胞でのガス交換を維持する機能がある(25)。界面活性物質は

phospholipid(90%) とアポ蛋白(10%)で構成されているが、phohspholipidの主成分は phosphatidylcholine (PC)で、しかもdipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)がその60%以上を占めている(26)。従来のDPPC量の測定はchloroform-methanolによる抽出とthin-layer chromatographyで分離後、灰化による燐酸の定量など多大の時間と労力を必要とし煩雑である。本研究では、我々が先に開発したロダン鉄法(11)やロダンコバルト法(12)を直接BALFに適用し、総PC量とUSPC量とが簡単かつ正確に測定できる事を示した。

私たちの実験結果では、120分間の温虚血後でも虚脱肺、窒素膨張肺、空気膨張肺はすべてcontrol肺と比べて、BALで回収されたDPPC量に有意差がなかった。虚血肺でもBALに回収されたDPPC量が変化しないことは、虚血障害によるII型肺胞上皮細胞内のlamellar bodiesの崩壊と漏出が起きていないことを示している。同時に、BALF中へのこのDPPCの回

収量を基準にして各液性成分の回収量との比を取れば、その値は洗浄回数や液量に関係なく虚血障害を示す指標となり得ることは非常に重要である(表2)。特に、臨床検査では毎回のcontrol測定や、多量のBALを行うことが不可能であるので、その適用が期待される。

空気膨張肺では、細胞内ATPレベルの維持によりII型肺胞上皮細胞の分泌機能も保持されている事が示された。II型肺胞上皮細胞による界面活性物質の分泌は、肺胞表面のphospholipidとアポ蛋白によってfeed back controlされることが知られている(20)。虚血前に1回のBALでDPPCを除去した後に120分間の虚血にすると、ATPが高レベルに保持された空気膨張肺では窒素膨張肺と比べてDPPC量が有意($p<0.001$)に多く回収された(図5)。この増加量はII型肺胞上皮細胞の分泌によると考えられる。

Hildebranら(27)も、摘出したラット肺を90分間空気で持続的に膨張させておくと15分

毎のBALで表面活性物質は直線的に増加したと報告している。この分泌がATPに依存的に行われ、従って虚血障害の一つの指標になることに注目せねばならない。

結　語

細胞内ATPレベルの変動を基礎にして、虚血肺の細胞障害を気管支肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid:BALF)中における界面活性物質及び細胞内局在物質の回収の面から検討し、以下の結論を得た。

1)虚血肺の細胞内ATP量(μmol/g dry weight)は、虚血後120分で空気膨張肺は8.0±0.7であったが虚脱肺では0.8±0.7、窒素膨張肺では2.0±0.7となり、虚脱肺や窒素膨張肺と比べて空気膨張肺は有意($p<0.001$)に高レベルに保たれた。

2)control肺、虚脱肺、窒素膨張肺、空気膨張肺の4群について虚血後120分の時点で連続

4回のBALを施行し、液性成分を分析すると、肺胞表面の界面活性物質の主成分であるDPPC量は4群間で有意差がなく一定であった。一方、細胞内酵素のLDH、cAST、mASTは空気膨張肺が虚脱肺や窒素膨張肺と比べて回収された量が有意($p<0.001$)に少なかった。

3)保存前にあらかじめBALでDPPCを除去した後、虚血後120分にBALを行うと、空気膨張肺のDPPC回収量は0.46±0.07μmolだが、窒素膨張肺のDPPC量は0.18±0.03μmolと、空気膨張肺は窒素膨張肺よりも有意($p<0.001$)に高値を示した。II型肺胞上皮細胞による表面活性物質の分泌能は、細胞内ATP量に相応して維持されていることが示された。

以上より、空気膨張肺では虚脱肺や窒素膨張肺よりもATPレベルが高く維持され、BALF中への細胞内物質の漏出の面からみると虚血による細胞障害から保護されることが明らかになった。また、界面活性物質の分泌能も保持された。

謝　　辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました川島康生教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導、御鞭達をいただきました田川邦夫教授、中原数也講師および第一外科、分子生理化学教室の方々に深謝致します。

文　献

(1)

Nishida T, Shibata H, Koseki M, Nakao K, Kawashima Y, Yoshida Y and Tagawa K. Peroxidative injury of the mitochondrial respiratory chain during reperfusion of hypothermic rat liver. Biochim Biophys Acta 890: 82-88, 1987.

(2)

Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T, Tagawa K, Ikeda Y, Nakao K and Kawashima Y. Changes in cellular levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. J Biochem 91: 1349-1356, 1982.

(3)

Watanabe F, Hashimoto T and Tagawa K. Energy-independent protection of the oxidative phosphorylation capacity of mitochondria against anoxic damage by ATP and its non-metabolizable analogs. J Bioch

em 97: 1229-1234, 1985.

(4)

Repine JE, Cheronis JC, Rodell TC, Linas SL and Patt A. Pulmonary oxygen toxicity and ischemia-reperfusion injury. Am Rev Respir Dis 136: 483-485, 1987.

(5)

Grum CM. Pulmonary ischemic syndromes, In: Zelenock GB. Clinical ischemic syndromes; Mechanisms and consequences of tissue injury. St Louis: The CV Mosby Company, 1989: 549-564.

(6)

Koyama I, Toung TJK, Rogers MC, Gurtner GH, Traystman RJ. O_2 radicals mediate reperfusion lung injury in ischemic O_2 ventilated canine pulmonary lobe. J Appl Physiol 63: 111-115, 1987.

(7)

Thomas PA, Buchman RJ. Successful 20

hour preservation of ischemic canine lung by hypothermia combined with minimal ventilation. J Thorac Cardiovasc Surg 62: 176-182, 1971.

(8)

Stevens GH, Sanchez MN, Chappel GL. Enhancement of lung preservation by prevention of lung collapse. J Surg Res 14: 400-405, 1973.

(9)

Fonkalsrud EW, Sanchez M, Lassaletta L, Smeesters C and Higashijima I. Extended preservation of the ischemic canine lung by ventilation with PEEP. J Surg Res 18: 437-445, 1975.

(10)

Toledo-Pereyra LH, Hau T, Simmons RL, Najarian JS Lung preservation techniques. Ann Thorac Surg 23: 487-494, 1977.

(11)

Yoshida Y, Furuya E and Tagawa K. A direct colorimetric method for the determination of phospholipids with dithiocyanatoiron reagent. J Biochem 88: 463-468, 1980.

(12)

Yoshida Y, Furuya E and Tagawa K. A simple method for measuring phosphatidylcholine as its hydrophobic complex with tetrathiocyanatocobaltate. J Biochem 86: 825-828, 1979.

(13)

G.S.C.C.(German Society for Clinical Chemistry) Recommendations of the German Society of clinical chemistry. Z Klin Chem Klin Biochem 10: 281-291, 1972.

(14)

Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F, Kosek M, Nishida T, Tagawa K, Kawshima Y. Blood level of the mitochondrial asparta

te aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. Hepatology 6: 701-707, 1986.

(15)

Teranishi H, Wada H. Sawada Y. A simple immunological method for differential determination of serum glutamic-oxaloacetic transaminase isoenzymes using anti-pig-GOT antibody. Med J Osaka Univ 29: 191-198, 1978.

(16)

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275, 1951.

(17)

Morimoto K, Tagawa K, Hayakawa T, Watanabe F, Mogami H. Cellular level of purine compounds in ischemic gerbil brain by high perfomance liquid chromatography.

J Neurochem 38: 833-835, 1982.

(18)

Kaneko M, Hirose H, Matsuda H, Nakano S, Takami H, Tagawa K and Kawashima Y. Non invasive assessment of myocardial viability by measuring adenosine triphosphate degradation product in coronary sinus effluent of preserved dog heart. J Heart Transplant 6: 8-14, 1987.

(19)

Takami H, Matsuda H, Kuki S, Nishimura Y, Kawashima H, Furuya E and Tagawa K. Leakage of cytoplasmic enzymes from rat heart by the stress of cardiac beating after increase in cell membrane fragility by anoxia. Europ J Physiol in press.

(20)

Dobbs LG, Wright JR, Hawgood S, Gonzalez R, Venstrom K and Nellenbogen J. Pulmonary surfactant and its components inhib

it secretion of phosphatidylcholine from cultured rat alveolar type II cells. Proc Natl Acad Sci USA 84: 1010-1014, 1987.

(21)

Fisher AB and Dodia C. Lung as a model for evaluation of critical intracellular P_{O_2} and Pco. Am J Physiol 241; E47-E50, 1981.

(22)

Bassett DJP, Fisher AB and Rabinowitz JL. Effect of hypoxia on incorporation of glucose carbons into lipids by isolated rat lung. Am J Physiol 227: 1103-1108, 1974.

(23)

Koseki M, Nishida T, Kamiike W, Nakao K, Kawashima Y, Dan C, Wake K, Yoshida Y and Tagawa K. Mechanism of leakage of cytosolic enzymesfrom anoxic rat liver

cells: disruption of blebs by blood flow . Biomedical Research 9: 47-57, 1988.

(24)

Faridy E and Naimark A. Effect of distension on metabolism of excised dog lung. J Apply Physiol 31: 31-37, 1971.

(25)

King RJ. Pulmonary surfactant. J Appl Physiol 53: 1-8, 1982.

(26)

King RJ and Clements JA. Lipid synthesis and sufactant turnover in the lungs. In: Fishman AP. Handbook of Physiology. Section 3. The respiatory system Vol.1. Maryland: Waverly Press, 309-336.

(27)

Hildebran JN, Goerke J and Clements JA. Surfactant release in excised rat lung is stimulated by air inflation. J Appl Physiol 51: 905-910, 1981.

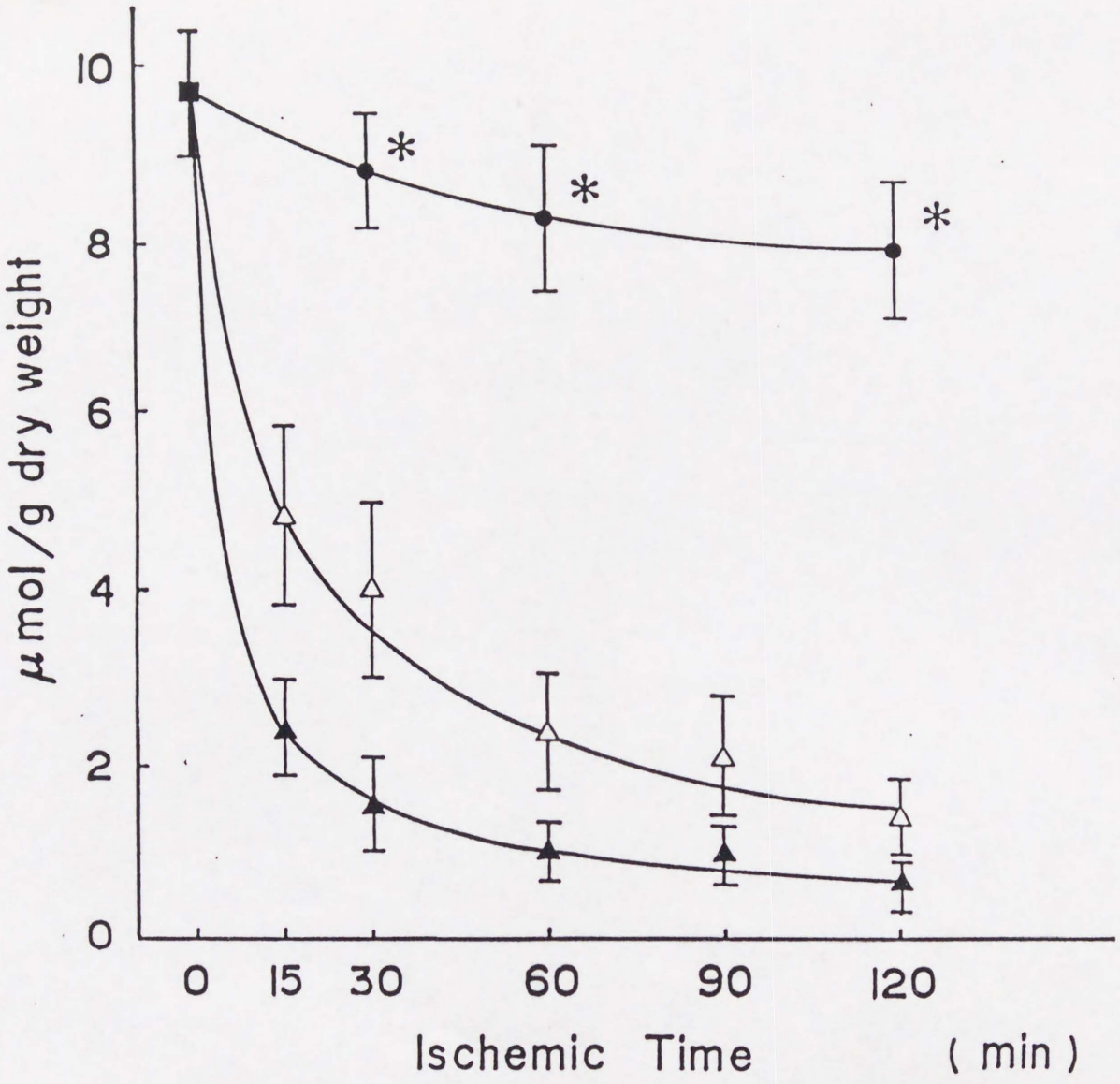

Figure 1. Cellular ATP level of control rat lungs (■ C-group:n=5) and the time course of cellular ATP levels of warm ischemic rat lungs in the conditions of deflation(▲ D-group :n=5), inflation with 95%N_2-5%CO_2 (△ N-group:n=6) and 95% room air-5%CO_2 (● R-group:n=6). * $p<0.001$ vs. D-group or N-group.

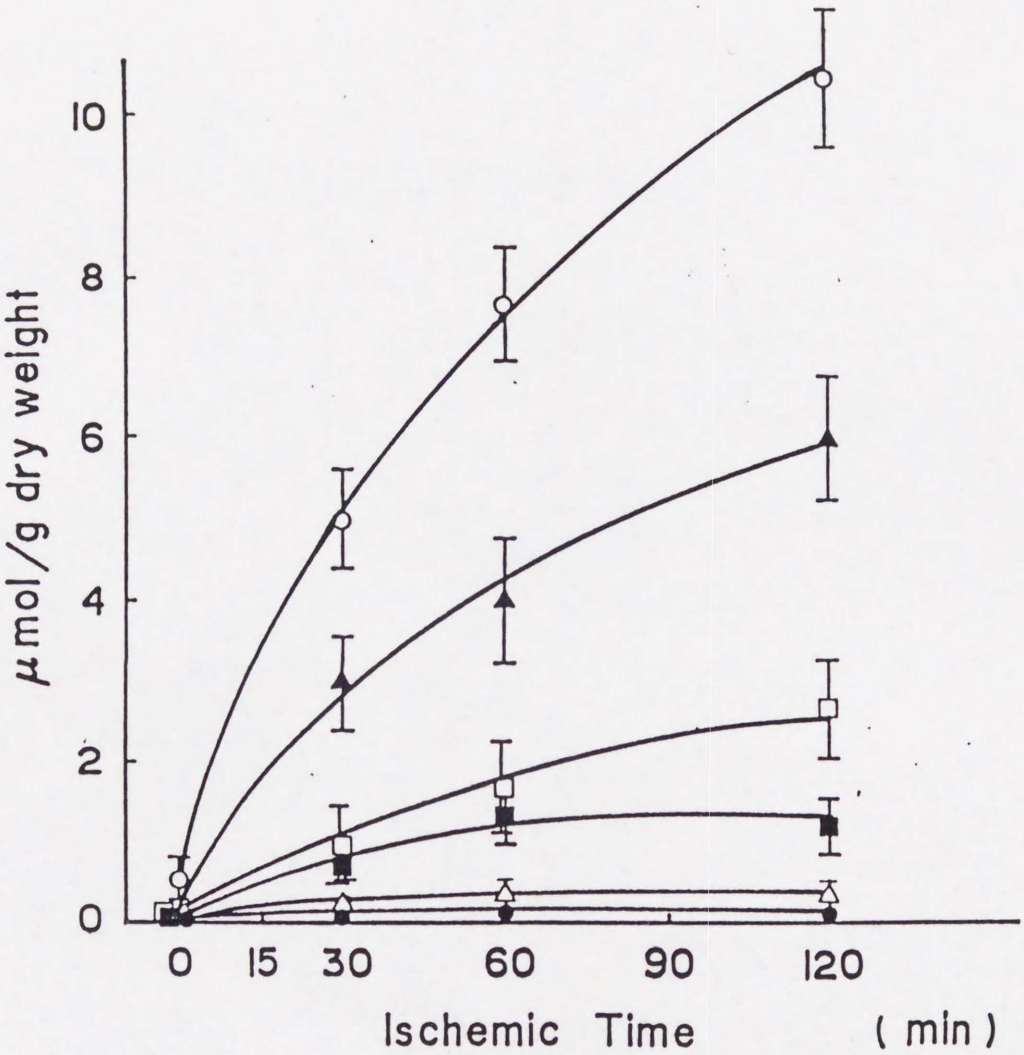

Figure 2. The time course of cellular purine compounds levels of deflated ischemic rat lung pretreated with allopurinol(n=5). (○) total purine compounds; (●) adenosine; (△) inosine; (▲) hypoxanthine; (□) xanthine; (■) uric acid.

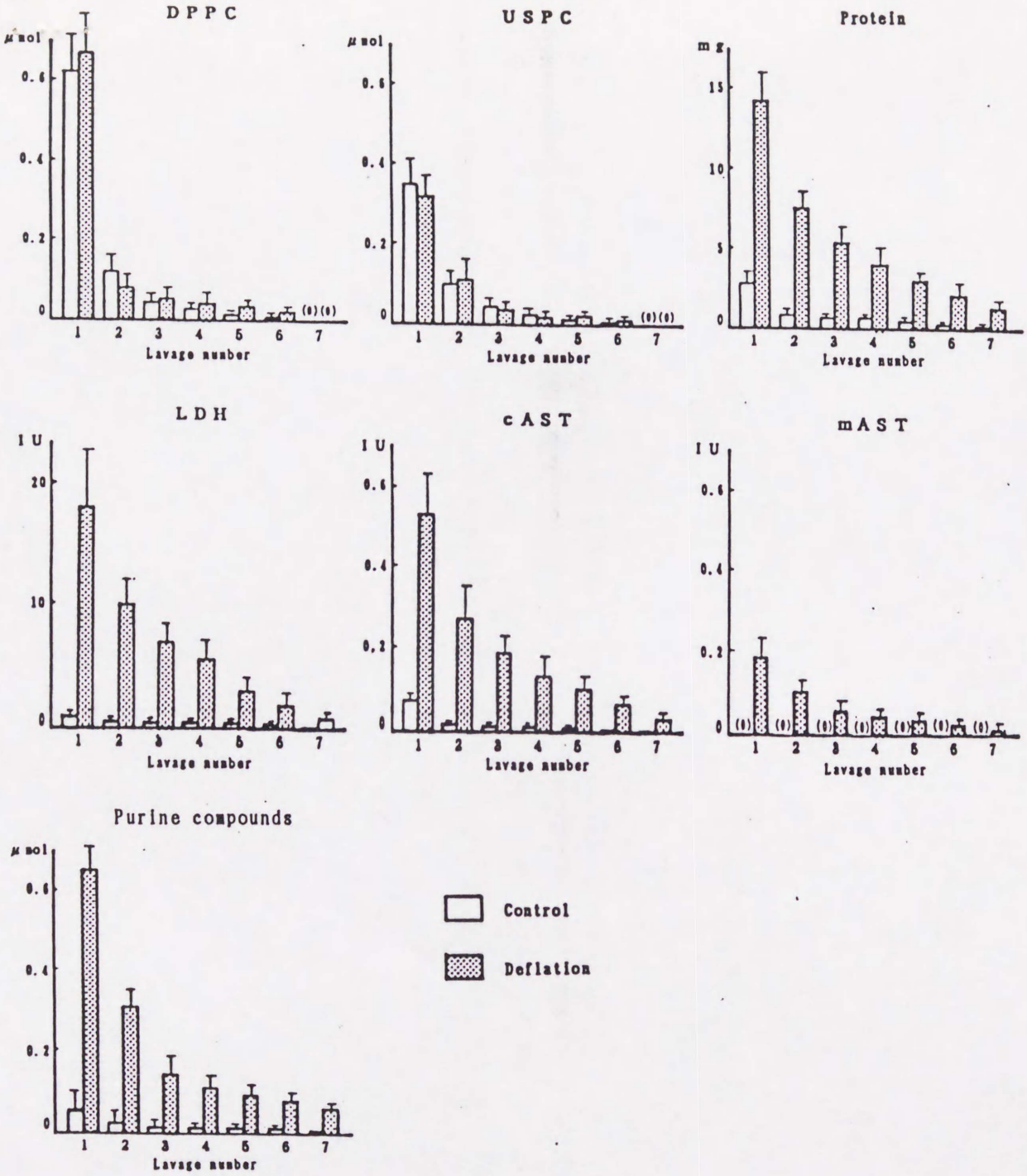

Figure 3. Contents of extracellular components in BALF for control and deflated ischemic rat lungs by 7 sequential lavages. Control lungs (n=5) and deflated lungs after warm ischemia for 120 min (n=5). DPPC; dipalmitoyl phosphatidylc holine, USPC; unsatulated phosphatidylcholine, LDH; lactate dehydrogenase, cAST; cytoplasmic aspartate aminotransferase, mAST; mitochondrial aspartate aminotransferase.

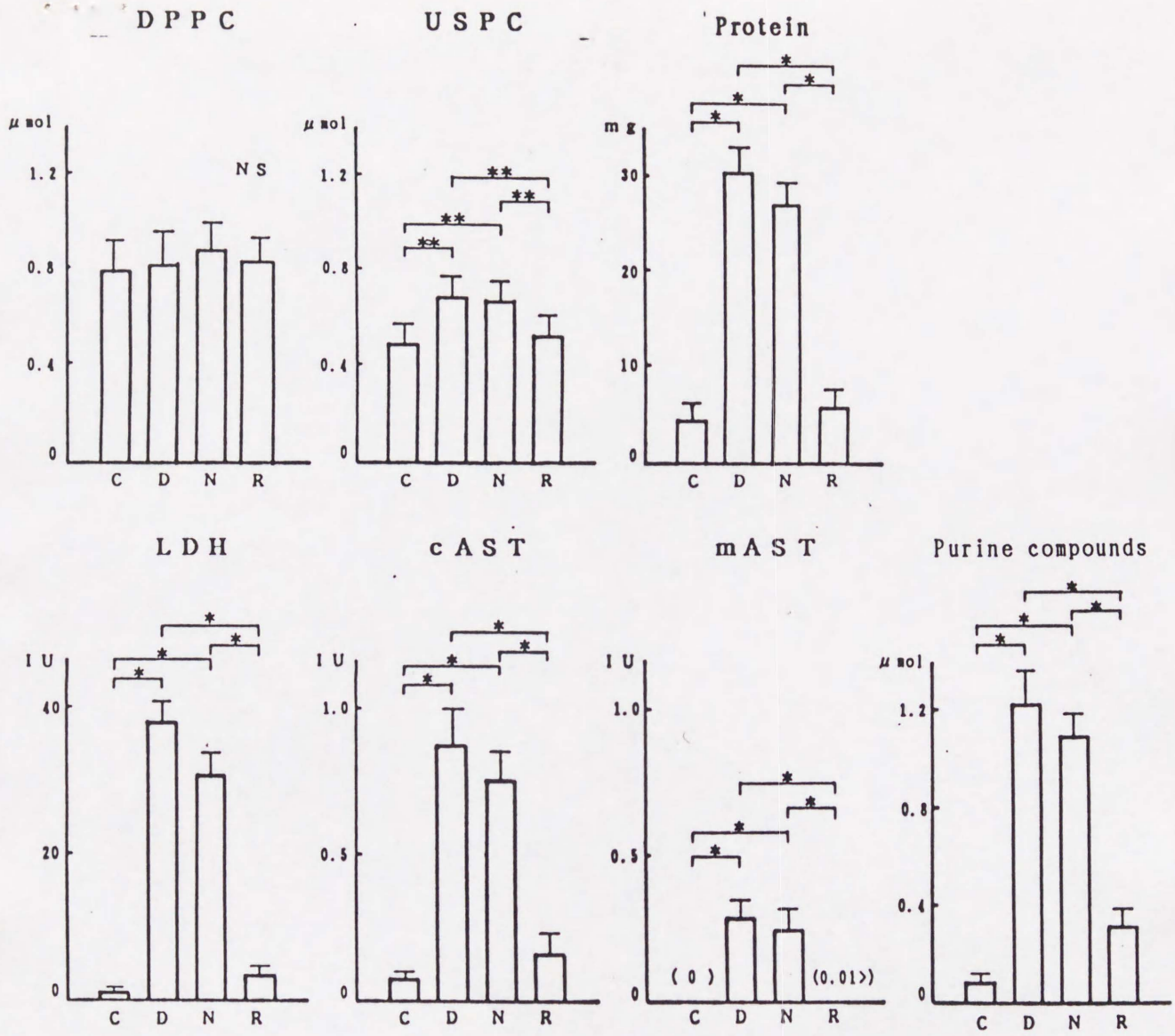

Figure 4. Comparison of total amount of extracellular components in the fluid obtained by 4 bronchoalveolar lavages from warm ischemic rat lungs after 120 min. (C) control before ischemia (n=5); (D) deflation (n=5); (N) inflation with 95%N_2-5%CO_2 (n=6); (R) inflation with 95% room air-5%CO_2 (n=6). * $p<0.001$. ** $p<0.01$. NS; not significant.

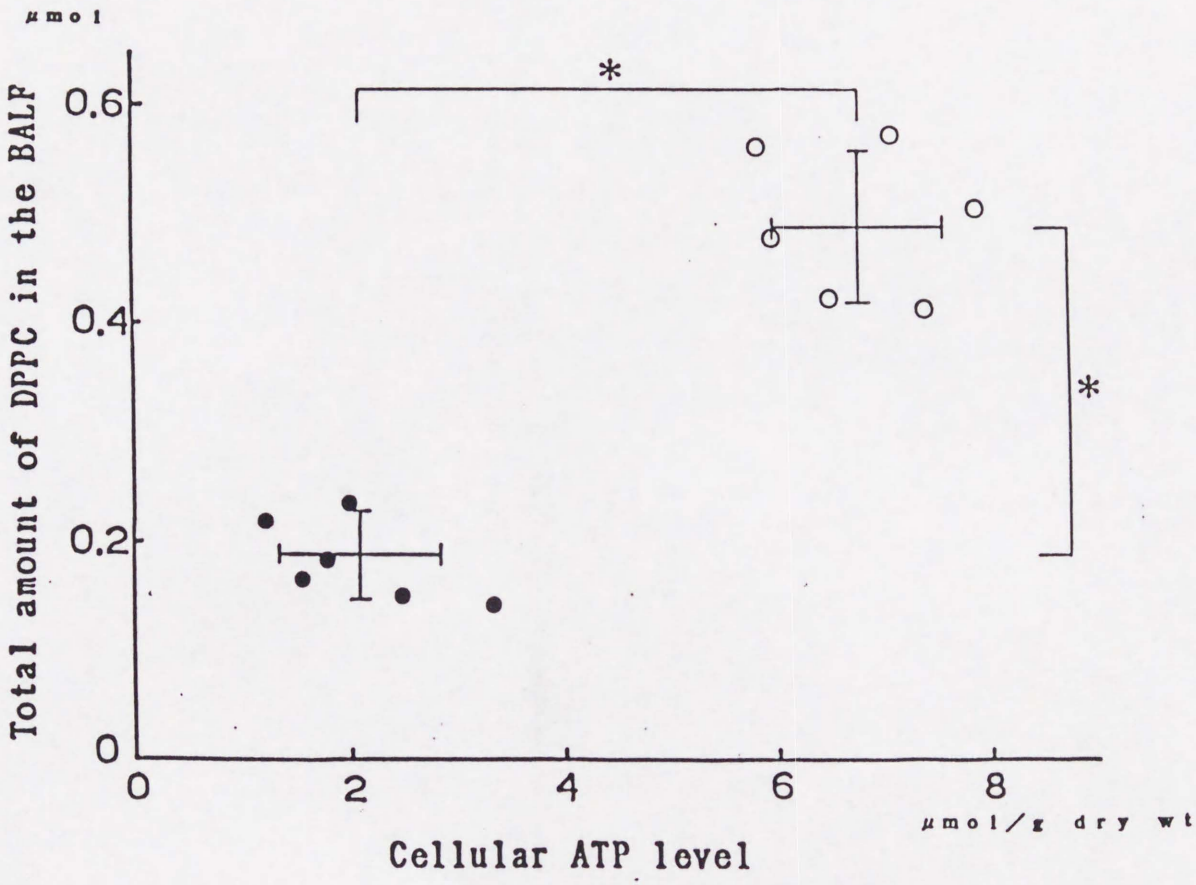

Figure 5. Cellular ATP level and total amount of dipalmitoyl phosphatidylcholine in the fluid obtained by bronchoalveolar lavage in the conditions of inflation with 95%room air-5%CO_2 (○ n=6: R-group) and 95%N_2-5%CO_2 (● n=6: N-group). DPPC; dipalmitoyl phosphatidylcholine. * $p<0.001$ vs. N-group.

Table 1. Changes in contents of adenine nucleotides and purine compounds in deflated rat lungs during warm ischemia at 37℃.

Ischemic time (min)	0	60	120
ATP+ADP+AMP	12.9±0.9	5.2±1.2	3.3±0.9
Purine catabolites	0.7±0.3	7.6±0.7	10.6±1.0
Total	13.6	12.8	13.9

Values are expressed as mean±SD of 5 rat lungs (μmol/g dry weight)

Table 2. Total amount of extracellular components in the fluid obtained by sequential bronchoalveolar lavage in control and deflated ischemic rat lungs.

extracellular component	total amount obtained		
	7 lavages	4 lavages	1 lavage
DPPC, μmol			
control	0.80±0.10	0.76±0.12	0.63±0.06
deflation	0.87±0.07	0.82±0.13	0.67±0.12
	(1.09)	(1.08)	(1.06)
USPC, μmol			
control	0.51±0.09	0.50±0.09	0.35±0.06
	(0.63)	(0.66)	(0.56)
deflation	0.72±0.10	0.69±0.08	0.52±0.08
	(0.83)	(0.84)	(0.78)
protein, mg			
control	5.4±0.8	4.7±0.8	2.8±0.7
	(6.8)	(6.2)	(4.4)
deflation	36.1±3.4	30.6±2.3	14.2±0.7
	(41.5)	(37.3)	(21.2)
LDH, IU			
control	0.9±0.1	0.8±0.1	0.5±0.1
	(1.1)	(1.1)	(0.8)
deflation	45.2±5.5	39.6±4.7	17.5±4.2
	(51.9)	(48.3)	(26.1)
cAST, IU			
control	0.10±0.01	0.09±0.01	0.07±0.01
	(0.13)	(0.12)	(0.11)
deflation	1.22±0.10	1.04±0.06	0.52±0.09
	(1.40)	(1.27)	(0.78)
mAST, IU			
control	0	0	0
	(0)	(0)	(0)
deflation	0.41±0.06	0.35±0.06	0.18±0.02
	(0.47)	(0.43)	(0.27)
purine compounds, μmol			
control	0.09±0.01	0.08±0.01	0.06±0.01
	(0.11)	(0.11)	(0.10)
deflation	1.33±0.34	1.12±0.22	0.65±0.06
	(1.53)	(1.37)	(0.97)

Control rat lungs (n=5) and deflated ischemic rat lungs (n=5) after warm ischemia for 120 min were lavaged sequentially with 0.9% NaCl at 37℃ as described in METHODS. ( ) : ratio of extracellular component to total amount of DPPC in the fluid obtained by 1, 4 or 7 sequential bronchoalveolar lavages.

Table 3. Excretion of dipalmitoyl phosphatidylcholine of inflated ischemic lungs after lavage.

inflation	warm ischemic time (min) 0	60	120	n
95%room air-5%CO_2	0.70±0.10	—	0.46±0.07**	6
	0.64±0.09	0.25±0.06*	0.19±0.04*	6
95% N_2-5%CO_2	0.68±0.11	—	0.18±0.05	6
	0.65±0.08	0.13±0.06	0.08±0.02	6

The time course of excretion of dipalmitoyl phosphatidylcholine of prelavaged warm ischemic lungs in the conditions of inflation with 95% room air-5%CO_2 (R-group:n=6) and 95%N_2-5%CO_2 (N-group:n=6). Warm ischemic lungs for 120 min were lavaged with 0.9% NaCl at 37℃ as described in METHODS. Values are expressed as mean±SD of 6 rat lungs (μmol). * $p<0.01$ vs. N-group.
** $p<0.001$ vs. N-group.