

論文の内容の要旨

論文題目 好中球の血管内皮への接着に関する研究

氏 名 韓 一秀 (ハン イルス)

第1章 緒言：肺障害を惹起する好中球は、組織内への遊走、活性化に先立ち肺毛細血管内皮細胞に接着する。肺での好中球接着を評価する簡便な方法は、好中球由来の肺障害に対する治療戦略を立てる上で極めて有用である。本研究の目的は、肺での好中球接着を評価する *in vivo* 蛍光顕微鏡を用いた簡便な評価方法を確立することである。

第2章 ラット LPS モデルにおける肺微小循環での生体蛍光顕微鏡を用いた標識好中球の動態の経時的観察：採血用ラット末梢血から好中球を分離し、蛍光標識した。麻酔下に各ラットに頸静脈カテーテルを挿入した。**検討）肺標識好中球の動態の経時的観察 -intravital 法-**：ラットに蒸留水、または LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内投与し、その4時間後に肺標識好中球の動態を従来の生体蛍光顕微鏡法で観察した。ラットに気管切開をおき、蛍光顕微鏡のステージ上に左側臥位で固定し人工呼吸器に接続し呼吸管理をおこなった。次いで右開胸をおこない、紫外線照射装置を備えた蛍光顕微鏡の照準を右下肺野に40倍率で合わせた。標識好中球 $1 \times 10^6 / 0.5 \text{ mL}$ を10~15秒かけてゆっくり右頸静脈カテーテルから注入を開始し、それと同時に右下肺野表面に紫外線を照射、CCDカメラでモニターしながら、標識好中球の動態をデジタルビデオカセットテープレコーダーで録画した。呼吸動作を止めるため、最大吸気時に20秒間人工呼吸器を停止した。標識好中球投与開始直後、60、120、180、240秒後の各時点で録画したビデオテープを解析し、毎秒7フレーム、10秒間にわたって肺表面の標識好中球数を計測した。その結果、蛍光顕微鏡の観察視野内の肺標識好中球数は、LPS投与群、非投与群ともに標識好中球投与開始後60秒の時点でピークに達し120

秒後には減少し、それ以降は定常状態を維持した。120 秒以降には、視野内のほとんどの好中球が静止していた。さらに標識好中球数は、いずれの時点においても LPS 投与群で非投与群にくらべ有意な高値を示した。したがって、標識好中球投与 2 分後の観察が好中球接着の評価に有用と考えられた。

第 3 章 肺微小血管への好中球接着の新しい評価法 (*in vivo* 蛍光顕微鏡法) の確立

-ラット LPS モデルにおける検討- 検討 1) LPS 投与量が肺標識好中球数、肺 MPO 活性、肺

湿/乾重量比におよぼす影響：ラットを 4 群にわけ、それぞれ LPS 0, 20, 200, 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内投与し、その 4 時間後に標識好中球 $1 \times 10^6/\text{mL}$ を 10~15 秒かけてゆっくり右頸静脈カテーテルから投与した。その 2 分後に犠死させ、両側肺を摘出した。摘出した肺の表面を、画像解析装置を接続した蛍光顕微鏡下に 40 倍率で観察した。肺は両側とも上肺野、下肺野から各 1 視野のデジタル化した蛍光像(合計 4 視野)をコンピューターに記録して、画像解析装置を用い標識好中球数を計測した。また、肺 MPO 活性と湿/乾重量比も測定した。その結果、LPS 200 群および LPS 2000 群での肺標識好中球数は LPS 0 群、LPS 20 群より有意な高値を示した。しかし、LPS 200、LPS 2000 両群間の肺標識好中球数に有意差はなかった。肺 MPO 活性は LPS 2000 群が、他群にくらべ有意な高値を示した。また、肺標識好中球数と肺 MPO 活性は、有意な正の相関を示した。肺湿/乾重量比に群間の有意差はなかった。したがって、以後の実験では LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与にて検討を進めることにした。**検討 2)**

LPS 投与後の肺標識好中球数および肺湿/乾重量比の経時的変化：ラットに LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を腹腔内投与後、0, 1, 4, 8 時間での、肺標識好中球数を計測した。また、摘出した肺の湿/乾重量比を計算した。その結果、肺標識好中球数は LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与後 4 時間の時点で、他のいずれの時点よりも有意な高値を示した。肺湿/乾重量比は 4 群間で有意差を認めなかった。この結果から、LPS 投与 4 時間後の評価が有用と考えられた。**検討 3) LPS 投**

与前の抗 ICAM-1 抗体投与が肺標識好中球数におよぼす影響：ラットを 3 群に分けた。対照群には蒸留水の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より蒸留水を投与した。LPS 群には LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より蒸留水を投与した。抗 ICAM-1 抗体群では LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より抗 ICAM-1 抗体 1 mg/kg を投与した。各群とも LPS 腹腔内投与 4 時間後に肺標識好中球数を計測した。その結果、LPS 群の肺標識好中球数は、対照群・抗 ICAM-1 抗体群にくらべ有意な高値を示した。以上から、本検討法で観察される肺標識好中球数の増加は ICAM-1 発現増加による好中球接着増加を反映していると推察された。**検討 4) LPS 投与前の抗エンドトキシン抗体 (E5) 投与が肺標識好中球数におよぼ**

す影響：ラットを対照群、LPS 群、E5 群の 3 群に分けた。検討 4 と同様のラット LPS モデルで、抗 ICAM-1 抗体の代わりに E5 2 mg/kg を用いて、各群の肺標識好中球数を計測した。その結果、LPS 群の肺標識好中球数は、対照群・E5 群にくらべ有意な高値を示した。

第 4 章 タンパク分解酵素阻害剤が好中球接着におよぼす影響：**検討 1) ラット LPS モデルにおいてメシル酸ガベキサート (GM) が肺好中球接着におよぼす影響** -*in vivo* 蛍光顕微鏡法-：ラットを 3 群に分けた。対照群には蒸留水の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より蒸

留水を投与した。LPS 群には LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より蒸留水を投与した。GM 群には LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与 1 時間前に尾静脈より GM 25 mg/kg を投与した。各群とも腹腔内投与 4 時間後に肺標識好中球数を計測した。その結果、LPS 群の肺標識好中球数は、対照群・GM 群にくらべ有意な高値を示した。GM は、LPS 投与時の肺好中球接着抑制に有用と考えられる。**検討 2) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) モノレイヤーにおいてメシル酸ガベキサート (GM) がヒト好中球接着におよぼす影響 -in vitro フローチャンバー法-** [ヒト好中球分離] 健常成人より末梢血採血を行い、この末梢血から好中球を分離した。[ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 培養] HUVEC をディッシュ上に均一になるまで培養し、実験には 3~4 継代の内皮細胞を用いた。実験開始 4 時間前に、内皮細胞培養液に TNF- α 1 ng/mL を添加して HUVEC を刺激した。[メシル酸ガベキサートの添加] 好中球の HUVEC への接着に対する GM の効果を、フローチャンバー法を用いて評価した。GM の HUVEC に対する効果を確認するため、GM-HUVEC 群には、HUVEC を TNF- α で刺激する直前に HUVEC 培養液に GM (100 μM) を添加した。対照群には HUVEC 培養液への GM 添加を行わなかった。これとは別に、GM の好中球に対する効果を確認するため、GM-PMN 群には、分離好中球に GM (100 μM) を添加して 30 分後に同様の検討を行った。対照群の好中球には GM を添加していない。[フローアッセイ] 均一に HUVEC を培養してあるディッシュ上にフローチャンバーを据え付けた。このディッシュを倒立型位相差顕微鏡のステージ上に置き 10 倍率で観察した。フローチャンバーに接続した自動シリンジポンプを用いて好中球懸濁液 ($10^6/\text{mL}$) をフローチャンバー内に一定の流速で灌流した。この際、フローチャンバー内のずり応力が 1.5 dyn/cm^2 となるように流速を設定した。準備した好中球懸濁液は灌流開始 2 分 30 秒後に流れが終了する。フローチャンバー内の好中球の動態は、位相差顕微鏡で観察すると同時に、顕微鏡に接続した CCD カメラを通してデジタルビデオカセットテープレコーダーで録画した。灌流開始 2 分 30 秒後に 4 視野画面で静止好中球数を計測した。その結果、TNF- α で刺激した HUVEC への、好中球灌流前の GM 添加の有無は、接着好中球数に有意な影響を与えなかった。一方、灌流前の好中球に GM を添加した場合は、添加しなかった場合に比べて、接着好中球数は有意に少なかった。したがって、本モデルにおける GM による好中球接着抑制は、好中球への直接作用と考えられる。

第 5 章 ラット LPS モデルにおいて各種薬剤が肺好中球接着におよぼす影響 (in vivo 蛍光顕微鏡法) : **検討 1) メチルプレドニゾロン (MP) が肺好中球接着におよぼす影響:** ラットを 3 群に分けた。対照群には蒸留水の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より蒸留水を投与した。LPS 群には LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より蒸留水を投与した。MP 群には LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より MP 10 mg/kg を投与した。各群とも腹腔内投与 4 時間後に肺標識好中球数を計測した。その結果、LPS 群の肺標識好中球数は、対照群・MP 群にくらべ有意な高値を示した。**検討 2) プロスタグランディン E1 (PGE1) が肺好中球接着におよぼす影響:** ラットを 3 群に分けた。対照群には蒸留水の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より蒸留水を投与した。LPS 群には LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投

与 1 時間前に、尾静脈より蒸留水を投与した。PGE1 群には LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与 1 時間前に、尾静脈より PGE1 5 ng/kg を投与した。各群とも腹腔内投与 4 時間後に肺標識好中球数を計測した。その結果、LPS 群の肺標識好中球数は、対照群・PGE1 群にくらべ有意な高値を示した。検討 1、2 から、MP, PGE1 の好中球接着抑制作用が示された。

第 6 章 考 察: 肺微小循環での好中球集積を評価する生体蛍光顕微鏡を用いた検討では、これまでウサギやイヌをモデルにした観察が行われてきた。しかしこの方法は、開胸し肺表面を顕微鏡で観察するため多大な外科的侵襲が加わり、血行動態に大きな影響をおよぼす。本研究では、これら生体蛍光顕微鏡法の問題点を克服し、簡便で侵襲の少ない評価方法を確立することを目的とした。第 2 章の結果から、*in vivo* 蛍光顕微鏡法においてラットを犠牲させるタイミングを標識好中球投与後 2 分と決定した。第 3 章では、標識好中球の肺血管内皮細胞への接着が LPS 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でプラトーに達すること、そして LPS 投与後 4 時間でピークに達しその後減少することを明らかにした。さらに、本研究でみられる LPS 投与後の肺標識好中球数の増加が、接着分子 ICAM-1 を介した接着の増加であるということを示した。これらの結果は、この簡便な方法によって好中球が血管内皮細胞に接着する度合いを検知することが可能であることを示している。第 4 章では、*in vivo* 蛍光顕微鏡法と *in vitro* フローチャンバー法を対比させ、メシル酸ガベキサートの好中球接着抑制効果を明らかにした。そして第 5 章で、本研究で確立したラット LPS モデルにおける *in vivo* 蛍光顕微鏡法を用いて、臨床の場で広く使用されているメチルプレドニゾロンとプロスタグランジン E1 の好中球接着抑制効果を明らかにした。本法の利点として 1) 好中球接着の視覚化、定量化が可能 2) 小動物モデルで実験可能 3) 好中球接着に影響をおよぼす不必要な外科的侵襲回避が可能 4) 同時に多数の動物で実験可能などが考えられる。

第 7 章 結 語: 本研究では、肺好中球接着数を視覚的に定量化する蛍光顕微鏡を用いた簡便な評価方法を確立し、各種薬剤の好中球接着におよぼす効果を検討した。本法は、敗血症やショックなど、重篤な病態のメカニズムを解明するうえで大きな助けとなる可能性がある。さらに、今後、様々な薬剤の好中球接着に対する効果を検証し、好中球由来の組織傷害によって生じる重症臓器不全の新しい治療戦略を立てるうえで、多大な貢献が期待される。