

氏 名 (本籍) ち だ まさ ゆき
千 田 雅 之

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 1 0 6 0 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 外 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 白 血 球 の 活 性 化 過 程 に お け る 被 刺 激 性 の 亢 進 と 急
性 肺 障 害 に 関 す る 研 究

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 藤 村 重 文 教 授 橋 本 保 彦
教 授 滝 島 任

論文内容要旨

【目 的】

透過性肺水腫に代表される急性肺障害の発生機序には好中球を中心とした炎症細胞の活性化が重要な役割を果たしている。近年, *in vitro*の研究において, 異なる二種の微量刺激を受けることにより, 好中球は強い活性化を受けることが明らかとなった。しかし, この現象が*in vivo*において持つ意義は未だ明らかでない。本研究は, 微量の複数刺激が, 好中球の活性化及びその際の肺血管壁透過性に与える影響を知ることを目的とした。

【方 法】

はじめに, ①*in vitro*における白血球刺激物質前処置が多核白血球活性化に及ぼす影響を検討した。羊頸動脈より採血を行い, Ficoll-Hypaque重層法により多核白血球を分離した。分離多核白血球を, 10^{-7} Mのカルシウムイオノホア (CaI) にて15分間incubationした後CaIを洗浄除去した。この後, 10^{-9} – 10^{-6} MのPMA (Phorbol Myristate Acetate) で第2刺激を行い, チトクロームC還元法を用いスーパーオキシド (SO) 産生能を550nmにおける吸光度の変化として測定した。

次に, ②生体への刺激物質投与が多核白血球に及ぼす影響を検討した。対照としての多核白血球を分離した後, 羊にエンドトキシン (ETX) $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ を投与, 30分後再度多核白血球を分離した。これらの多核白血球を 10^{-9} – 10^{-6} MのPMAで刺激し, SO産生能, dimethoxy benzidine法によりライソゾーム酵素放出能, Boyden chamber法により白血球遊走能を測定した。

次に, ③生体への異なる2回刺激が多核白血球, 肺循環及び肺リンパ動態に及ぼす影響を検討した。体重30~50kgの羊を用い, Staubらの方法に準じ慢性肺リンパ瘻を作成した。対照群 ($n=4$), ETX群 ($n=5$), PMA群 ($n=4$), ETX+PMA群 ($n=5$) の4群に分け覚醒下立位で実験を行った。各群とも2時間のbaseline測定の後第1刺激を加え, 更に1時間後第2刺激を加えた。この後4時間各項目を測定した。対照群では第1, 第2刺激ともに生理食塩水を用いた。ETX群では第1刺激に $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ のETXを, 第2刺激には生理食塩水を用いた。PMA群では第1刺激に生理食塩水を, 第2刺激に $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ のPMAを用いた。ETX+PMA群では第1刺激に $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ のETX, 第2刺激に $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ のPMAを用いた。baseline時, 第1刺激後30分, 第2刺激後3時間で多核白血球を分離しSO産生能を各群で測定した。肺循環及び肺リンパ動態の指標として, 肺動脈圧, 肺リンパ流量, リンパ血漿蛋白濃度比 (L/P比) を測定した。

【成 績】

①分離多核白血球を 10^{-6} MのPMAにて刺激した際のSO産生能を100とした。 10^{-7} MのCaIで前処置することにより、 10^{-7} M PMA刺激時のSO産生能は、 $40.2 \pm 13.1\%$ から $77.0 \pm 32.5\%$ と亢進した。

②対照として分離した多核白血球の 10^{-6} M PMA刺激に対するSO産生能を100とした。対照多核白血球及びETX刺激後30分に分離した多核白血球の 10^{-7} M PMA刺激に対するSO産生能はそれぞれ $44.5 \pm 33.1\%$ 、 $67.7 \pm 26.9\%$ であり、ETX投与後30分の多核白血球でSO産生能の亢進がみられた。細胞融解による最大放出量を100とし表したライゾーム酵素放出能は、それぞれ $6.2 \pm 5.5\%$ 、 $19.7 \pm 5.5\%$ であった。Boyden chamberの上室より下室へ移行した細胞の比率で表した白血球遊走能は、それぞれ $16.5 \pm 8.3\%$ 、 $35.3 \pm 8.5\%$ であった。

③対照群、ETX群、PMA群では、第2刺激3時間後の末梢血多核白血球のSO産生能はbaseline時のものに比し変化は認められなかった。しかし、ETX+PMA群において第2刺激3時間後の末梢血多核白血球のSO産生能はbaselineに比し $180.5 \pm 78.5\%$ と亢進した。対照群、ETX群、PMA群では、肺循環、肺リンパ動態に変化を認めなかった。一方、ETX+PMA群ではPMA投与後に肺動脈圧は一過性に上昇した。肺リンパ流量はPMA投与後に増加しその後も高値を持続した。L/P比は、PMA投与後に一過性に減少しその後baseline値より上昇した。

【結 論】

生体内の好中球は、微量の第1刺激により被刺激性が亢進し、微量の第2刺激で活性化が得られた。異なる二つの微量刺激で肺血管壁透過性に基づく肺リンパ流量の増加が認められ、これに活性化された好中球の関与が考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

成人型呼吸促症候群（ARDS）に代表される透過性肺水腫は、肺微小血管内皮細胞障害に基づく急性肺障害である。その病態には多核白血球を中心とした炎症細胞の遊走と活性化に伴う種々のケミカルメディエーターの放出が重要であるとされている。一方、ARDSはこれら炎症反応の進行による急性肺障害の終末像であるとの考えから、ARDS発症以前のメカニズムの解明が急務である。すなわち、ARDSのハイリスクグループと考えられている敗血症などにおいて、その炎症反応が増強され急性肺障害にいたる過程のメカニズムの解明が求められている。

一方、*in vitro*において、白血球は刺激物質の前処置を受けることにより被刺激性が亢進し引き続く異なる第2刺激による活性化が増強されるという現象の存在が知られている。この現象は第1刺激によるプライミング及び第2刺激によるエンハンスメントと呼ばれている。この現象は生体における炎症反応の増強のメカニズムを考える際興味深いのが、この現象が*in vivo*において持つ意義は未だ明らかでなかった。

また最近、臨床におけるARDSハイリスクグループの検討において C_{6a} 、エンドトキシンの両者の上昇したものが C_{6a} のみ上昇したものに比し高率にARDSの発症をみたことから、異なる二種刺激による白血球のプライミングを介した活性化の過程が急性肺障害の発症に関与している可能性が示唆されている。

そこで本研究は、生体への異なる二種刺激が白血球の活性化と急性肺障害に及ぼす影響を明らかにする目的で、慢性肺リンパ瘻を有する羊肺水腫モデルを用い、白血球機能及び肺リンパ動態の検討を行った。白血球機能として、スーパーオキシド産生能、ライソゾーム酵素放出能、遊走能を測定し、白血球活性化の指標とした。

その結果、生体への微量刺激投与後に分離した白血球は、被刺激性が亢進していること、異なる二つの微量刺激により単剤では起こらない白血球の活性化が認められることから、白血球のプライミングが生体内においても存在することを明らかにした。また、肺リンパ動態の検討から微量刺激であっても異なる二種刺激により急性肺障害を示唆する肺リンパ流量の増加をきたすこと、またこれにプライミングの機序を介した白血球の活性化が関与することを明らかにした。

従来白血球のプライミングは炎症細胞の細胞機能として*in vitro*において研究がなされてきており、*in vivo*において白血球のプライミングが存在することを示した報告はなかった。また、プライミングを介した活性化機序により急性肺障害をきたしうることを示したことは、ARDS発症過程の研究に重要な知見をあたえるものであり、本研究は学位論文に相当する。