

氏 名（本籍）	つほ 坪	ち 地	ひろ 宏	よし 嘉
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 7 7 8 号			
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 26 日			
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当			
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 外 科 学 系 専 攻			
学 位 論 文 題 目	肺 胞 内 の 炎 症 が 肺 胞 上 皮 の 能 動 的 イ オ ン ト ラ ン ス ポ ー ト に 及 ぼ す 影 響 に 関 す る 研 究 － 特 に 肺 胞 マ ク ロ フ ェ ー ジ 由 来 の 一 酸 化 窒 素 の 役 割 に つ い て －			

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 近 藤 丘 教 授 貫 和 敏 博

教 授 松 野 正 紀

# 論文内容要旨

## 研究目的

肺胞Ⅱ型上皮細胞は肺胞側に  $\text{Na}^+$  チャネルを、間質側に  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-adenosinetriphosphatase}$  ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) を発現し、肺胞腔内から間質にむけて  $\text{Na}^+$  イオンを移動させ、この能動的イオントランスポートに伴い肺胞腔からの水分吸収が生じる。しかしながら、肺胞上皮の能動的イオントランスポートが炎症の場でどのような影響を受けるのかという点については不明な点が少なくない。本研究の目的は、肺胞内の炎症が肺胞上皮の能動的イオントランスポートに及ぼす影響を明らかにすることである。本研究では特に肺胞マクロファージ由来の一酸化窒素 (nitric oxide ; NO) が肺胞上皮の能動的イオントランスポートに及ぼす影響について検討した。

## 研究方法

体重 250-350 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用し、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  の大腸菌エンドトキシンをラット気道内に注入した。肺胞マクロファージや誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible NO synthase ; iNOS) の阻害剤としてそれぞれ塩化ガドリニウム、アミノグアニジンを使用した。肺組織における iNOS の発現を免疫染色により観察した。肺組織の NO 産生を電子常磁性共鳴法 (electron paramagnetic resonance ; EPR) により測定した。肺組織の guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) を enzyme immunoassay により測定した。塩化ガドリニウムやアミノグアニジンを投与した際の肺組織の NO と cGMP を測定した。摘出肺と麻酔換気下の肺を用い、エンドトキシン投与後の肺胞水分クリアランスを fluid-filled lung model により測定した。アミロライドにより  $\text{Na}^+$  チャネルを阻害した時の肺胞水分クリアランスの測定も行った。さらに塩化ガドリニウムやアミノグアニジンを投与した際の肺胞水分クリアランスも測定した。テルブタリン ( $\beta$ -アゴニスト) の肺胞水分クリアランスに及ぼす影響について検討した。分離した肺胞Ⅱ型上皮細胞の  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性を phosphate release assay で測定した。

## 研究結果

エンドトキシン投与後 6 時間での肺組織の iNOS の発現は肺胞マクロファージで認められた。肺組織における NO 産生はエンドトキシン投与後 6 時間で最大に達しその後低下した。肺組織の cGMP レベルもエンドトキシン投与後 6 時間で最大に達した後漸減した。塩化ガドリニウムやアミノグアニジンはエンドトキシン投与後の肺組織の NO や cGMP レベルを有意に低下させた。肺胞水分クリアランスはエンドトキシン投与後 6 時間で有意に低下し、24 時間で逆に有意に増

大した。この変化はアミロライド感受性の分画に依存した。塩化ガドリニウムやアミノグアニジンによりエンドトキシン投与後の肺胞水分クリアランスの低下や増大は消失した。テルブタリンによる肺胞水分クリアランスの増大は、エンドトキシン投与後6時間において対照群と同等であった。エンドトキシン投与後6時間で分離した肺胞Ⅱ型上皮細胞の $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性は有意に低下した。この低下はアミノグアニジンにより回復した。

## 結 論

エンドトキシンを気道内に投与して肺胞内に炎症を惹起すると、肺胞マクロファージからiNOSによりNOが産生される。このNOはcGMPを介して肺胞上皮の $\text{Na}^+$ チャネルや $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ を抑制し能動的イオントランスポートを低下させる。一方、24時間後には肺胞上皮の能動的イオントランスポートが逆に亢進するが、この機序にも肺胞マクロファージ由来のNOが関与している。

## 研究の意義・独創的な点

本研究は、肺胞内の炎症では肺胞マクロファージ由来のNOが肺胞上皮の能動的イオントランスポートを多様に調節していることを明らかにした最初の報告である。すなわち、摘出肺と麻酔換気下の肺ではエンドトキシンを気道内投与すると、早期ではNO産生の増大に一致して肺胞上皮の能動的イオントランスポートが低下し、24時間以上経つと逆に増大するという二相性の変化を示すことを見出した。さらに、従来NOをin vivoで直接測定することは困難であるため、肺組織の炎症においてNOを直接測定し経時的变化をみた報告は今までされてこなかったが、本研究ではEPRを用いることによって、エンドトキシン気道内投与後の肺組織におけるNO産生を直接測定し経時的变化を明らかにした。

## 審査結果の要旨

今日、肺胞上皮は物理的なバリアー構造としてだけでなく、能動的イオントランスポートの場としても重要視されるようになった。この機構は、水分漏出に対抗して肺胞腔内を乾燥した環境に保ちガス交換を良好に維持する上で極めて重要であると考えられている。これまでも肺胞上皮の能動的イオントランスポートを活性化すると肺水腫からの速やかな回復が期待できることを示す多くの成績が報告されている。このことから肺胞上皮の能動的イオントランスポートの調節は、将来の急性肺傷害の治療戦略において重要な柱の一つになるであろうとの期待も寄せられるようになった。しかしながら、肺胞上皮の能動的イオントランスポートが炎症の場でどのように変化するのかという点については不明な点が少なくない。本研究では肺胞マクロファージ由来の一酸化窒素 (NO) に着目し、NO が早期には cGMP を介して肺胞上皮の  $\text{Na}^+$  チャネルや  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  機能を低下させることにより能動的イオントランスポートを抑制することをラットを用いた実験モデルにより示した。さらに、その後は逆に肺胞上皮の能動的イオントランスポートが活性化されるが、この機序にも肺胞マクロファージ由来の NO が関与していることを明らかにした。

筆者は、まずラットの気道内にエンドトキシンを投与し肺組織における NO 産生の変化を明らかにすることを試みた。従来肺組織中の NO 産生の経時的変化を観測することは困難であったが、本研究では電子常磁性共鳴法により気道内エンドトキシン投与後の肺組織における NO 産生の経時的変化を明らかにすることに成功した。すなわち気道内にエンドトキシンを投与すると肺組織の NO 産生は 6 時間の時点で最大に達し、以後漸減することが示された。さらに、肺組織の cGMP レベルも NO 産生と同様の経時的変化を示すことも明らかとなった。

ついで、本研究では肺胞水分クリアランスの測定をラット摘出肺と麻酔換気肺を用いておこなった。肺胞水分クリアランスは、気道内エンドトキシン後の 6 時間の時点で低下し 12 時間でコントロール値に回復した後、24 時間では逆に増大したが、この変化は  $\text{Na}^+$  チャネル機能に依存することが示された。さらに、この変化は肺胞マクロファージや iNOS の阻害剤により消失したことから、肺胞マクロファージ由来の NO により惹起された変化であると考えられた。また 6 時間の時点で分離した肺胞 II 型上皮細胞の  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活性も NO に依存して低下した。

以上の成績より、エンドトキシンで刺激された肺胞マクロファージは早期に iNOS を介して NO を産生し、肺胞 II 型上皮細胞の cGMP レベルを増大させ、 $\text{Na}^+$  チャネルや  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  機能を低下させることにより能動的イオントランスポートを抑制すると考えられた。さらにその後の能動的イオントランスポートの増大にも NO が関与していると考えられた。

本研究は、肺胞内の炎症において肺胞マクロファージ由来の NO が  $\text{Na}^+$  チャネルや  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  活性に影響を及ぼし、肺胞上皮のイオントランスポートを多様に調節することを動物実験で示した初めての報告である。本論文は、予備審査で指摘された点が適切に訂正されており、博士論文に値すると思われる。