

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591559
 研究課題名（和文） 白血球—内皮相互反応の麻酔による外科治療低侵襲化
 研究課題名（英文） The effect of inhibition of leukocyte-endothelial interaction to the organ injuries by surgical stress.
 研究代表者
 佐藤 幸夫（SATO YUKIO）
 自治医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：10312844

研究成果の概要：

緑色蛍光蛋白遺伝子導入ラットにおいて麻酔下に肺微小循環を蛍光顕微鏡下に観察、肺循環の毛細血管における白血球の通過を可視化した。これを高感度蛍光観察用 CCD にて記録、PC にて解析し、白血球の毛細血管通過時間および毛細血管における集積、細静脈における白血球動態を評価するモデルを確立した。このラットにエンドトキシンを静注し、肺循環においては、細静脈に白血球の集積がおこる体循環とは異なり、肺循環においては毛細血管に白血球が毛細血管に集積することを、標識による修飾の加わらない状態での白血球の動態をリアルタイムで観察することにより、証明した。この研究の成果の一部は日本外科学会総会サージカル・フォーラムにて発表した。このモデルにおいて白血球の cGMP 濃度を、NO のドナーである SNAP 等を用い、cAMP 濃度は cAMP 合成を促進するプロスタグランディン I₂ 及び cAMP 分解を抑制する phosphodiesterase type4 阻害薬を用い、増加させ白血球の集積への影響を評価した。

また、肺循環の定量的評価を行う目的で MRI を用い実験を行った。FAIR 法は造影剤を使用することなく血流を評価できる MRI の撮像法であり、これを肺循環の評価に用いた。体位変換により、肺内の血流分布が変化する事を示す事ができた。腹臥位では、仰臥位に比し肺循環の不均等が減少することを定量的に示した。これは急性肺障害の患者の体位を腹臥位にすると酸素化が改善する理由の一つと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	630,000	3,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：白血球、内皮、肺障害、ARDS

1. 研究開始当初の背景

手術・体外循環・外傷・熱傷・出血・感染等の外科的侵襲に対し、生体においては様々な生体反応が惹起される。過剰な炎症反応は、全身性炎症性反応症候群、急性呼吸窮迫症候群に代表されるように、肺・心・肝・腎を始めとした重要臓器の障害を来す。

近年、患者の高齢化とともに、予備力の低い患者が増加し、外科的侵襲による臓器障害が外科治療上、大きな問題となり、外科治療を低侵襲化する必要性が生じてきている。そのためには外科侵襲自体をできるだけ小さく抑えるのみならず、外科侵襲に対する反応を低く抑えることが重要と考えられる。侵襲自体を低くするため創の縮小・内視鏡下手術等が試みられているが、確実かつ安全に手術を施行するためには限界がある。一方侵襲に対する反応のコントロールは不十分なままで、現状では有効な対策がない。活性化された白血球と内皮の相互作用に代表される過剰な炎症反応による肺微小循環の障害が、外科侵襲後の臓器障害の基本的なメカニズムであり、手術において患者に麻酔をかけるように、外科侵襲時に白血球及び内皮の活性化を抑制することにより、いわば白血球及び内皮に麻酔をかけることにより、白血球-内皮の相互作用を抑制し、過剰な炎症反応・肺微小循環障害および臓器障害の発症を防ぐ事ができると考えられる。我々は白血球及び内皮細胞のシグナル伝達における重要なセカンドメッセンジャーとして機能し、活性化において全般的に抑制的に働く cAMP および cGMP に注目している。本研究の目的は、白

血球及び内皮細胞の cAMP および cGMP を調節し、侵襲に対する生体反応をコントロールすることである。

また、急性肺障害の患者を腹臥位で管理すると酸素化が改善することが知られているがそのメカニズムには肺微小循環の改善が関係していると考えられるが明らかにはされていない。

2. 研究の目的

白血球及び内皮細胞の cAMP 濃度は Adenylate cyclase による産生と Phosphodiesterase による分解により調節されている。また cGMP 濃度は Guanylate cyclase による産生と Phosphodiesterase による分解により調節されている。

本実験では、不要な白血球及び内皮細胞の活性化を抑制するために Adenylate cyclase の agonist である Prostaglandin I₂、白血球に特異的な Phosphodiesterase (PDE) type 4 の阻害薬を用い cAMP 濃度を増加させる。また Guanylate cyclase の agonist である NO、内皮に特異的な Phosphodiesterase (PDE) type 3 の阻害薬を用い、cGMP 濃度を増加させる。これらの方法の組み合わせにより、白血球及と内皮の相互作用を評価する。

また、肺循環の定量的評価を行う目的で MRI を用い評価する。FAIR 法は造影剤を使用することなく血流を評価できる MRI の撮像法であり、これを肺循環の評価に用い、腹臥位での肺微小循環の変化を評価する。

3. 研究の方法

(1) cAMP および cGMP 濃度と白血球及び内皮細胞機能の関係 (研究代表者、連携研究者：蘇原)

In vitro 実験系で、ヒト白血球及びヒト臍帯静脈内皮細胞を用い、cAMP および cGMP 濃度と白血球活及び内皮細胞機能の関係を評価する。

白血球の cAMP 濃度を cAMP 合成を促進するプロスタグランジン I₂ 及び cAMP 分解を抑制する phosphodiesterase type4 阻害薬を用い増加させ以下の白血球機能への影響を評価する。内皮細胞の cGMP 濃度を、cGMP 合成を促進させる NO 及び cGMP 分解を抑制する phosphodiesterase type3 阻害薬を用い増加させ以下の内皮細胞機能への影響を評価する。

エンドトキシン及び活性化補体による白血球及び内皮細胞機能活性化への影響

- 白血球接着分子の変化 (CD62L・CD18・CD11b を flowcytometry で測定)。
- 白血球細胞骨格の変化 (F-actin を flowcytometry で測定)。
- 白血球変形能の変化 (細胞マイクロレオロジー測定装置で評価)。
- 白血球エラストラーゼ産生能 (ELISA 法で評価)。
- 内皮細胞接着分子の変化 (E-selectin・ICAM-1 を免疫染色で評価)。
- 内皮細胞細胞骨格の変化 (F-actin を免疫染色で評価)。
- 内皮細胞サイトカイン産生 (ELISA 法で評価)。

(2) *in vivo* では連携研究者の小林英司らが開発した緑色蛍光蛋白遺伝子導入ラットを用い、白血球-内皮相互作用を評価する。

敗血症性肺障害モデル (研究代表者、連携研究者：蘇原)

我々が開発した緑色蛍光蛋白遺伝子導入ラットの肺微小循環における白血球動態観察法を用いる。緑色蛍光蛋白遺伝子導入ラッ

トは組織によって緑色蛍光の発現度が異なる。肺組織においてはほとんど緑色蛍光が発現していないが、白血球には緑色蛍光が強く発現している為、肺微小循環での白血球動態が明確に観察される。

蘇原らが開発した蛍光生体顕微鏡肺微小循環観察装置を用い肺微小循環での白血球動態を評価する。画像は高感度 CCD カメラでリアルタイムに HDD に記録し、肺微小循環での白血球-内皮相互反応を評価する。

評価項目

白血球-内皮相互作用

- 蛍光生体顕微鏡によるリアルタイムの観察により、白血球の集積及びその部位を解析。毛細血管での白血球通過速度、毛細血管への白血球集積、細静脈内皮への白血球のローリング及び接着を評価する。
 - 犠牲死後摘出標本で肺組織の Myeloperoxidase 含量を評価。
- 惹起されたサイトカインの放出
- 血中 IL-6・TNF 等炎症性サイトカイン濃度 (ELISA キットで測定)。

肺障害の程度

- 肺組織の乾湿重量比
- このラットにエンドトキシンを微量持続静注し、白血球-内皮相互反応の変化を評価するモデルとする。

このモデルにおいて白血球の cAMP 濃度は cAMP 合成を促進するプロスタグランジン I₂ 及び cAMP 分解を抑制する phosphodiesterase type4 阻害薬を用い、増加させ上記の項目への影響を評価する。

4. 研究成果

緑色蛍光蛋白遺伝子導入ラットにおいて麻酔下に肺微小循環を蛍光顕微鏡下に観察、肺循環の毛細血管における白血球の通過を可視化した。これを高感度蛍光観察用 CCD にて記録、PC にて解析し、白血球の毛細血管通過時間および毛細血管に

における集積、細静脈における白血球動態を評価するモデルを確立した。このラットにエンドトキシンを静注し、肺循環においては、細静脈に白血球の集積がおこる体循環とは異なり、肺循環においては毛細血管に白血球が毛細血管に集積することを、標識による修飾の加わらない状態での白血球の動態をリアルタイムで観察することにより、証明した。この研究の成果の一部は平成 18 年日本外科学会総会サージカル・フォーラムにて発表した。このモデルにおいて白血球の cGMP 濃度を、NO のドナーである SNAP 等を用い、cAMP 濃度は cAMP 合成を促進するプロスタグランディン I₂ 及び cAMP 分解を抑制する phosphodiesterase type4 阻害薬を用い、増加させ白血球の集積への影響を評価した。

また、肺循環の定量的評価を行う目的で MRI を用い実験を行った。FAIR 法は造影剤を使用することなく血流を評価できる MRI の撮像法であり、これを肺循環の評価に用いた。体位変換により、肺内の血流分布が変化する事を示す事ができた。腹臥位では、仰臥位に比し肺循環の不均衡が減少することを定量的に示した。これは急性肺障害の患者の体位を腹臥位にすると酸素化が改善する理由の一つと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Suzuki H, Sato Y, Shindo M, Yoshioka H, Mizutani T, Onizuka M, Sakakibara Y. Prone positioning improves distribution of pulmonary perfusion: noninvasive magnetic resonance imaging study in healthy humans. *European radiology*. 18(3):522-528, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 佐藤幸夫: 急性肺障害における肺微小循環障害—緑色蛍光蛋白導入ラットを用いた、活性化好中球集積のリアルタイム観察—. サイトカインストーム研究会 2008, 2008 年 2 月 8 日, 宇都宮.
② 佐藤幸夫, 遠藤哲哉, 手塚康裕, 大谷真一, 手塚憲志, 長谷川剛, 遠藤俊輔, 蘇原泰則: 緑色蛍光蛋白導入ラットを用いた, 侵襲により活性化された好中球の肺微小循環集積のリアルタイム観察. 第 106 回日本外科学会定期学術集会, 2006 年 3 月 29 日, 東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

自治医科大学・医学部・准教授

佐藤 幸夫 (SATO YUKIO)

研究者番号: 10312844

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

自治医科大学・医学部・教授

蘇原 泰則 (SOHARA YASUNORI)

研究者番号: 60114097

自治医科大学・医学部・教授

小林 英司 (KOBAYASHI EIJI)

研究者番号: 00245044