

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390384

研究課題名（和文）白血球の複合的薬理制御による体外循環後肺傷害に対する新たな予防法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel prophylaxis for the post-cardiopulmonary bypass lung injury by a pharmacological leukocyte control

研究代表者

後藤 行延（GOTO YUKINOBU）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20451700

研究成果の概要（和文）：(1) 骨髄由来白血球（好中球・単球）の体内動態をフローサイトメトリーで解析するカニクイザル体外循環モデルを確立した。(2) 骨髄由来白血球（好中球・単球）の血中での半減期および、骨髄通過時間を指標として、これまで示唆していた体外循環で惹起される骨髄刺激を定量的に証明した。(3) 体外循環刺激により骨髄から循環血中に放出された白血球が肺に集積することを示した。(4) 体外循環刺激により骨髄から循環血中に新たに放出された白血球が、体外循環術後肺傷害の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have applied a well-established method to assess the BM reaction *in vivo* in monkeys. This method proved to be a model relevant for humans by showing the release of PMN and monocytes from the BM to be quantified and their $T_{1/2}$ in the circulation pool to be estimated. Using this technique, we confirmed that CPB accelerates the release of leukocytes (PMN and monocytes) from the BM and showed their delayed recruitment to the lungs. We postulate that the behavior of BM-derived leukocytes following CPB, rather than of circulating leukocytes, plays an important role in the pathogenesis of post-CPB lung injury as a part of a whole-body inflammatory reaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	7,200,000	2,160,000	9,360,000

研究分野：呼吸器外科学

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：呼吸器外科、心臓血管外科、病態生理学、体外循環、肺傷害、白血球、骨髄

1. 研究開始当初の背景

(1) Cardiopulmonary bypass (CPB)は循環白血球を活性化し肺血管内皮細胞を傷害、急性呼吸促拍症候群(ARDS)に代表される多臓器不全のリスクを高める。ARDSは好中球が主体となって肺胞上皮細胞、血管内皮細胞を傷害する結果、肺微小血管レベルでの血管透過性が亢進して起こる肺水腫とされる一方、ARDS

は種々の危険因子が誘因となって起こる肺での過剰炎症でもあり、免疫学的に単球/マクロファージ系が果たす役割も大きい。

(2) 代表者らは、炎症によって新たに動員される骨髄由来白血球（未熟活性化単球・好中球）の体内動態解析により、これら白血球の優先的な肺循環系への動員と集積について研究を重ね、骨髄由来白血球の炎症制御にお

ける重要性を国内外で発表してきた。

(3) 活性化白血球の由来は循環血中プール、もしくは新たに骨髄より放出されたもの、あるいはその両方と考えられる。これまで CPB の骨髄への影響、CPB 後肺障害に関する骨髄由来白血球の役割についての知見は乏しい。

2. 研究の目的

(1) カニクイザル体外循環モデルの確立

(2) 体外循環による骨髄への作用と、骨髄由来白血球の体内動態の解析

(3) 複合的薬理制御による炎症機転の制御の評価 ①体外循環による白血球活性化の抑制、②体外循環による骨髄刺激により動員された活性化白血球の抑制、および③炎症性メディエーターを介した肺への白血球動員・集積を効果的な制御

3. 研究の方法

(1) カニクイザル体外循環モデル

①動物:

Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)

②手術: 全身麻酔下に胸骨正中切開、心膜切開し、ヘパリン 3mg/kg 静注後、上行大動脈に 10-12Fr. の送血用カニューラを、上、下大静脈に 14-18Fr. の脱血用カニューラを挿入する。カニューラを人工心肺回路に接続して体外循環を開始、30 分後に total bypass とし、肺虚血モデル (30 分間) を作成、計 120 分間の常温体外循環をおこなう。遮断解除から 60 分後、体外循環を停止、カニューレを抜去して十分な止血ののち閉創し、覚醒後サルを cage に戻す。

③人工心肺: 膜型人工肺、ソフトリザーバー、ローラーポンプを組み込んだ回路を lactate ringer 液で充填する (充填量約 250 ml、無血充填)。流量 2.0 L/min/m² で、120 分間の体外循環をおこなう。体外循環中は ACT 480 秒以上をヘパリンで維持し、これを下回る場合は初回量の半分のヘパリンを追加する。体外循環終了後、ヘパリンをプロタミンで中和する。回路残血は可及的に返血する。

(2) 骨髄由来白血球の体内動態の解析

①BrdU を静注 (100mg/kg) しカニクイザル (male; B. W. 5kg) の骨髄前駆細胞を標識。

②24 時間 (BrdU 標識白血球が骨髄より放出され始める) 後、全身麻酔下に胸骨正中切開、体外循環回路を確立。

③回路に薬剤を投与し、120 分間循環。薬理制御の手法で 3 群に分け炎症機転制御を検証。

【コントロール (生食投与) 群】

【エラスターゼ阻害剤 + PDEIV 阻害剤群】

【エラスターゼ阻害剤 + PDEIV 阻害剤 + 副腎皮質ステロイド群】

回路に選択的好中球エラスターゼ阻害剤 (elaspol) を中心に、PDEIV 阻害剤 (roripram)、グルココルチコイドを投与、単球・好中球活

性の薬理的制御およびステロイド併用効果を、flow cytometry による多重免疫染色法により、骨髄由来白血球 (BrdU 陽性) と循環血中白血球 (BrdU 陰性) に分けて比較、検討。④骨髄から循環血中に放出された BrdU 標識の好中球・単球 (骨髄由来白血球) を末梢血、および気管支肺胞洗浄液を経時的術後 1 週間にわたり採取し、その出現を flow cytometry を用いて同定、解析。

<骨髄刺激>: 好中球・単球の骨髄通過時間を解析し、体外循環による骨髄刺激を評価。

<肺組織浸潤>: 気管支肺胞洗浄 (BAL) 液を採取し、液中に存在する BrdU 標識単球/マクロファージ・好中球を、免疫組織学的に染色・同定し、肺微小循環系への集積と肺胞腔への遊走・滲出を評価。

4. 研究成果

(1) カニクイザル体外循環モデルの確立



図 1: サル CPB circuit

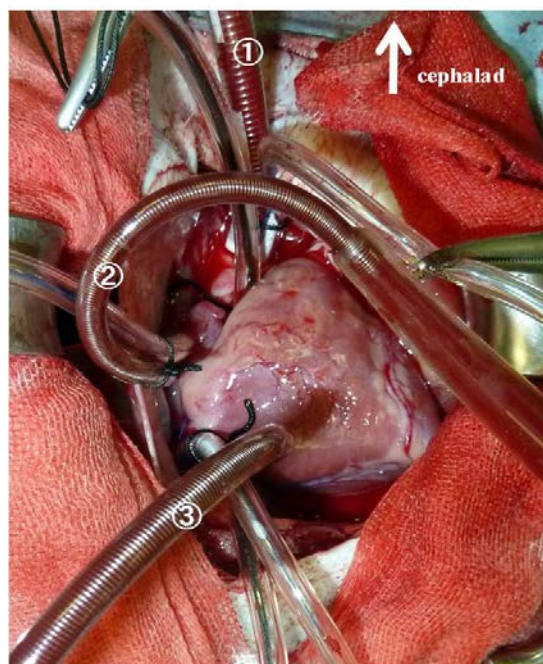


図 2: Cannulation: An ascending aortic (①;12Fr) cannulation for arterial inflow,

and superior (②;10Fr) and inferior (③;10Fr) vena cava cannulations for venous outflow.

(2) 体外循環による骨髄への作用と、骨髄由来白血球の体内動態の解析

① 骨髄からの好中球、単球の放出促進

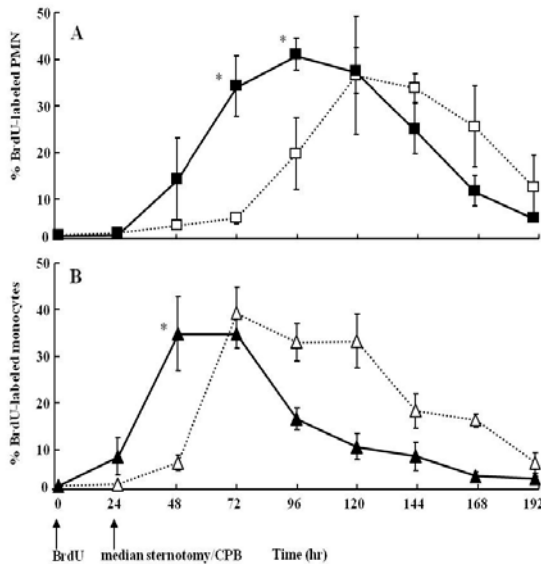


Figure1 : Percentages of circulating BrdU-labeled PMN (A) and monocytes (B) following surgery with CPB (solid line) or without CPB (control group: dashed line). The peak of each BrdU-labeled cell appearance after the BrdU injection (100 mg/kg) in the CPB group was significantly earlier than in the control. Each value represents the mean \pm SE obtained for 3 to 4 monkeys. * p < .05 versus the control group.

② 白血球の骨髄通過時間の短縮

Transit Times of leukocytes through the Marrow		
Group (n)	PMN (hrs)	monocytes (hrs)
Surgery		
with CPB (4)	91.6 \pm 5.1 ^a	60.1 \pm 3.3 ^a
without CPB (Control) (3)	123.3 \pm 13.3	90.9 \pm 3.2
No surgery (5)	143.6 \pm 4.5 ^b	100.9 \pm 7.6

All values are means \pm SE. n = no. of subjects. hrs = hours.
^a p < .05 versus control group. ^b p < .02 versus monocytes.

Table : the calculated transit time of PMN through the BM was 143.6 \pm 4.5 hrs with a half-life ($T_{1/2}$) of 6.0 hrs and that of the monocytes was 100.9 \pm 7.6 hrs with a $T_{1/2}$ of 8.4 hrs. CPB shortened their BM transit of BrdU-labeled PMN and monocytes to 91.6 \pm 5.1 and 60.1 \pm 3.3 hrs, respectively.

③ 骨髄由来白血球の肺への集積増加

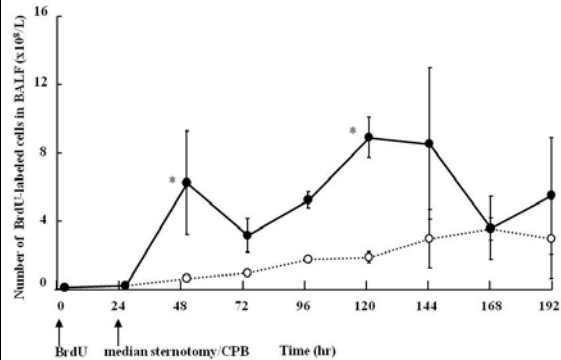


Figure2 : Number of BrdU-labeled cells in the BALF following the surgery with CPB (filled circles, solid line) or without CPB (control; unfilled circles, dashed line). The recruitment of BrdU-labeled cells into the alveolar spaces was accelerated when compared with that of the control, but their peak was delayed (96 hrs after CPB). Each value represents the mean \pm SE. * p < .05 versus the control group.

* (3) 複合的薬理制御による炎症機転の制御の評価—震災等の影響もあり、成果に至っていない。

成果の意義と重要性 :

- (1) 骨髄由来白血球 (好中球・単球) の体内動態をフローサイトメトリーで解析するカニクイザル体外循環モデルを確立した。
- (2) 骨髄由来白血球 (好中球・単球) の血中での半減期および、骨髄通過時間を指標として、これまで示唆していた体外循環で惹起される骨髄刺激を定量的に証明した。
- (3) 体外循環刺激により骨髄から循環血中に放出された白血球が肺に集積することを示した。
- (4) 体外循環刺激により骨髄から循環血中に新たに放出された白血球が、体外循環術後肺傷害の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- (1) Goto Y, Hiramatsu Y, Ageyama N, Sato S, Kobayashi N, Suzuki H, Sakai M, Kanemoto S, Onizuka M, Sato Y, Sakakibara Y: Cardiopulmonary Bypass Accelerates Bone-marrow Leukocyte Release And Recruitment Into The Lung In Primate Model. American Thoracic Society International Conference. 2012;169:K83 2012年 5月 20日 San Francisco, USA

- (2) Goto Y., Hiramatsu Y., Ageyama N., Kobayashi N, Sakai M, Onizuka M, Sato Y, Kanemoto S, Sakakibara Y: Bone-marrow-derived Leukocyte Induced by Cardiopulmonary Bypass Recruit into the Lung in Our Established Primate Model. General Thoracic and Cardiovascular Surgery 2011;59:171 (Outstanding Works). 2011年10月10日 名古屋国際会議場
- (3) Goto Y., Hiramatsu Y., Ageyama N., Sato S., Sakai M., Onizuka M., Sato Y., Sakakibara Y.: A novel primate model to study bone-marrow-derived leukocyte kinetics induced by cardiopulmonary bypass. Chest. 2010; 138: 580A. 2010年11月3日 VANCOUVER, BC, CANADA

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/respiratory/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 行延 (GOTO YUKINOBU)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：20451700

(2) 研究分担者

平松 祐司 (HIRAMATSU YUJI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30302417
揚山 直英 (AGEYAMA NAOHIDE)
独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類研究所・研究員
研究者番号：50399458
榊原 謙 (SAKAKIBARA YUZURU)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：60192085
徳永 千穂 (TOKUNAGA CHIHO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：30451701