

平成 21 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 B
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791338
 研究課題名（和文）菌体成分、特に LPS 投与マウスの血小板動態とアナフィラキシー様反応
 研究課題名（英文）Bacterial component-induced platelet response and anaphylaxis-shock in mice.
 研究代表者
 船山 ひろみ（FUNAYAMA HIROMI）
 鶴見大学・歯学部・助教
 研究者番号：19791338

研究成果の概要：

グラム陰性菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide (以下 LPS) を BALB/c マウスに静脈注射すると、肺と肝臓への血小板の急速な集積とその脱顆粒によるアナフィラキシー様ショックが誘導される。今回、血小板との反応が心内膜炎に関与するとの報告もある真菌細胞壁成分マンナンによる血小板反応をマウスで検討したところ、LPS とは異なるメカニズムでショックを誘導することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：血小板

1. 研究開始当初の背景

様々な細菌・真菌の全菌体や菌体成分をマウスに静脈注射すると、マウスは10～15分で急性のショック（アナフィラキシー様ショック）を起こす。ある種のLPS注射では、この反応に先立って、血小板が肺と肝臓に集積・脱顆粒を起こす。このような血小板反応の機序を解明できれば、様々な感染症に付随する急性ショックの予防・治療に資すると考えられる。

(1) アナフィラキシー様反応： *Porphyromonas gingivalis* や *Prevotella Intermedia* を含むある種のLPSをマウスに静脈注射するとTLR4非依存的に10～15分で急性ショックに陥り、反応が強いと1時間以内に死亡する

(*Infect Immun* 1987, *J Infect Dis* 1990等)。

(2) 血小板反応： 前述急性ショックに先行して、血液中の血小板が2～3分で肺・肝臓に急激に移動・集積する。血小板が血液に戻ると回復するが、臓器で崩壊し、脱顆粒すると強いショックに至る (*Infect Immun* 1996, *J Infect Dis* 1997等)。

(3) 補体系の関与： 血小板反応とそれに引き続いて起こる急性ショックは補体依存的に発症する (*Infect Immun* 1999)。特に0多糖としてマンノースホモポリマーを有するLPSはレクチン経路を介して強力に補体を活性化するので、血小板反応ならびに急性ショック惹起活性が強い (*Shock* 2000,

Blood 2002) .

- (4) マクロファージの関与: Clodronate含有リポゾームでマクロファージを枯渇させたマウスでは, LPSによる血小板反応・急性ショックは起こらない (*Biochim Biophys Acta* 2006) .
 - (5) 神経系の関与の可能性: アドレナリン投与によって, LPSより急激な血小板・ショック反応が誘導される. また, アドレナリンレセプター α 1Rないし α 2RのアンタゴニストはLPSによる血小板反応・急性ショックを抑制する.
 - (6) 様々な菌体成分による類似反応: LPSの他, ある種のリポタイコ酸, 結核菌類縁菌のリポアラビノマンナン, 真菌マンナン等の菌体成分や, 真菌全菌体ならびに各種グラム陽性菌の菌全体 (*Oral Microbiol Immunol* 2004) でも急性ショックが誘導される.
 - (7) NOD系による反応の増幅: 細菌細胞壁の要構造に当たるムラミルジペプチド (MDP) を前投与したマウスでは, LPSならびに上記各種惹起物質に対する感受性が高まり, ショック反応が亢進する (*Infect Immun* 1987, *J Infect Dis* 1990等) . 近年MDPの細胞内レセプターはNOD2と証明された. 類縁のNOD1もペプチドグリカン構成するジアミノピメリン酸 (DAP) を含むペプチド部分を認識する (*J Immunol* 2006) .
 - (8) 歯肉内注射: 眼科用針 (32G) を用いて, LPSをマウスの歯肉内に注射すると, 静脈内投与に匹敵する炎症反応を誘導することを明らかにした (*J Infect Dis* 1990) .
- 機序解明を目指すこれら一連の研究は, 申請者が所属する研究グループにて独自に展開したものである.

2. 研究の目的

前述の作業仮説を実証して, 血小板・急性ショック反応の機序解明を目指す.

- (1) 血小板集積の機序: 肺等に集積した血小板の崩壊は補体依存的に起こる (おそらくはC5以降の活性化による膜侵襲性複合体, MAC形成による) . 他方, 血中の血小板が肺・肝臓に移動する機序は不明である. この過程にも補体が関与するかどうかを解明する.
- (2) アドレナリンの役割: α 1Rは血小板に α 2Rはマクロファージに発現している. 従って, 両レセプターの役割は異なるものと推測される.
- (3) LPS以外の菌体成分による類似反応: 前述の通り様々な菌体・菌体成分でも類似の反応が惹起されるが, その機序は必ずしも同一ではない. 例えば, 真菌マンナンもレ

クチン経路を介して補体を活性化すると報告されているが, 補体非依存的にショックを誘導する結果も得ている. いくつかの惹起物質による血小板・急性ショックの特性を比較検討する.

- (4) NOD系による反応増幅: NOD2と同様にNOD1の活性化によっても反応が増幅されるかを検討する. NOD1ならびにNOD2 KOマウス (分与の交渉中) が得られれば, これらを介して増幅されていることを異論の余地無く証明する. さらに, 腸内細菌等がNODを刺激して感受性を高めている可能性を探る.
- (5) 歯肉内注射: 前述の通り, 歯周病原菌と目される*P. gingivalis*や*P. Intermedia*のLPSも血小板・急性ショック反応を惹起する. さらに口腔レンサ球菌や真菌 (マンナン) でも, 類似の反応が起こる. そこで, これらを歯肉内注射しても同様の反応が惹起されるかどうかを検討する.

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物として日本 SLC (静岡) より購入した雄性 ddY マウス (4 週齢), および日本クレア (東京) より購入した雄性 BALB/c マウス (6-7 週齢) を用いた. なお, 本研究で実施した動物実験計画については東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会および鶴見大学歯学部動物実験委員会の審査を経て承認を受けている.

(2) テスト標品

Saccharomyces cerevisiae 由来の中性マンナンは東北薬大・松本教授より, *Klebsiella pneumoniae* O3 LEN-1 (K03) LPS は, 愛知医大・横地教授より恵与された. MDP (muramyl dipeptide; *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) はペプチド研究所 (大阪) より購入した. 補体 C5 阻害薬の K-76 は大塚製薬 (徳島), Platelet-activating factor (PAF) および PAF antagonist (CV3988) は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した.

いずれのテスト標品も Saline (S) に溶解し, 腹腔内および尾静脈注射した.

(3) 血中血小板数の測定

マウスの血中血小板数は, 断頭後採血し, 自動血球分析装置; Cell counter (Sysmex SF-300; Toa Medical Electronics) を用いて測定した.

(4) 肺および肝臓への血小板の集積

マウス血液中には大量の 5HT (セロトニン) が存在し, そのほとんどは血小板に含まれる. また, 肺や肝臓の組織自体には 5HT は存在し

でもごく微量である。従って、血液や組織中の5HTを測定することにより血小板の挙動を追跡できる (Ohtaki et al., Thrombo Res 2003;108:303). 5HT の測定は、カラムクロマトグラフィーで分離後、蛍光反応により測定した。

(5) 血小板の枯渇

抗マウス血小板モノクローナル抗体 IgG (Pm1, 筑波大・長沢先生より供与) を皮下注射した。対照として control IgG (cIgG) を用いた。

(6) マクロファージの枯渇

マクロファージの枯渇は Rooijen らの方法に従って調製した Clodronate-liposome を用いた。

(7) ショックの評価

室温 28±1 度下でテスト標品を尾静脈注射し。血液、肺、肝臓の5HTと血液中の血小板数、30分以内の急性ショックのスコアを測定した。便宜的に平均値 ± SD で表示。

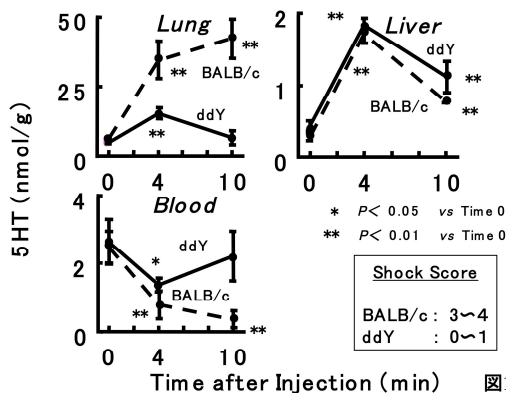
Shock Score: 0 (no signs of shock), 1 (staggering), 2 (crawling and prostration), 3 (prostration and weak convulsions), 4 (prostration and strong convulsions), 5 (death).

(8) 統計処理

実験データは、平均値±標準偏差 (SD) で表した。二群間の平均値の差の検定は Student's unpaired t test, Shock Score は Ridit test を実施して、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

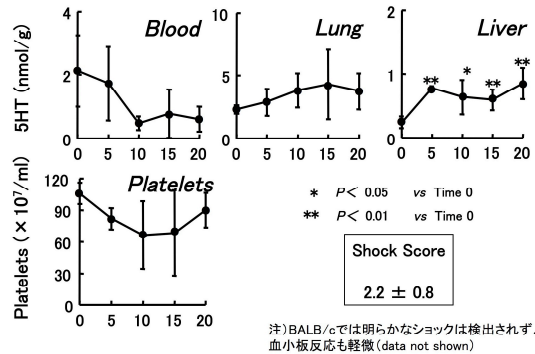
(1) K03-LPS による血小板反応: BALB/c と ddY の比較。



横軸は K03-LPS (0.5 mg/kg) を尾静脈注射してからの時間を、縦軸は 5HT 量を示す。BALB/c において K03-LPS は血小板の肺と肝臓への著しい集積をもたらし、アナフィラキシー様の急性ショックを誘導した。ddY では K03-LPS は BALB/c 同様の血小板反応を誘導し

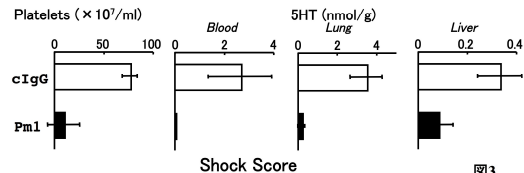
たが、その程度は弱く、血中 5HT の低下は 10 分後にほぼもとのレベルまで回復した。ショックの程度も軽微だった。

(2) ddY におけるマンナンによる血小板反応。



横軸は ddY にマンナン (20 mg/kg) を尾静脈注射してからの時間を、縦軸は 5HT 量および血中の血小板数を示す。ddY でマンナンはショックを誘導したが、血中血小板の減少と肺・肝臓での 5HT の上昇はわずかだった。また、BALB/c では、マンナンによるショックは検出されず、血小板反応も軽微だった (data not shown).

(3) マンナンおよび LPS によるショックに対する血小板枯渇の効果。



	Mannan (in ddY)	K03-LPS (in BALB/c)
cIgG	1.1,2,2,2(1.6 ± 0.6)	3.4,4.4,4(3.8 ± 0.4)
Pm1	1.1,5,5,5(3.4 ± 2.2)*	0.0,0.1(0.2 ± 0.4)*

* $P < 0.5$ vs cIgG-treated ddY or BALB/c mice.

図 3. は、control IgG または Pm1 (20mg/kg) を皮下注射し、24h 後の 5HT 量および血中の血小板数を示す。Pm1 を投与することにより、血小板は著しく減少する。

表 1. は、control IgG または Pm1 (20mg/kg) を皮下注射し、24h 後にマンナンまたは K03-LPS を尾静脈注射後、30 分以内の急性ショックのスコアを示す。LPS の場合は (BALB/c) 血小板を枯渇することによりショックの誘導は抑制されるが、マンナンによるショック (ddY) は血小板を枯渇しても誘導されるだけではなく、逆に増強された。

(4) 補体 C5 阻害薬(K-76)の効果。

	Mannan (in ddY)	K03-LPS (in BALB/c)
S	4.4 ± 1.3	5.0 ± 0.0
K-76	4.3 ± 1.6	0.4 ± 0.5*

* $P < 0.5$ vs S-treated BALB/c mice.

表2.

生食 (S) または K-76 (100mg/kg) を腹腔内注射し、1h 後にマンナンまたは KO3-LPS を尾静脈注射して、30 分以内の急性ショックのスコアを測定した。BALB/c における LPS による急性ショックは、補体 C5 阻害薬 K-76 投与により抑制されるが、ddY におけるマンナンによるショックは、抑制されない。

(5) PAF antagonist (CV3988) の効果。

	Shock Score	
	Mannan (in ddY)	KO3-LPS (in BALB/c)
S	3.6 ± 1.3	5.0 ± 0.0
CV3988	0.4 ± 0.5 *	5.0 ± 0.0

*P < 0.5 vs S-treated ddY mice. 表3.

表 3 は、生食 (S) または CV3988 (10mg/kg) を尾静脈注射し、30 分後にマンナンまたは KO3-LPS を尾静脈注射した場合の急性ショックのスコアを示す。PAF 拮抗薬投与により LPS によるショック (BALB/c) は抑制されないが、マンナンによるショック (ddY) は抑制された。

	Shock Score	
	Mannan (in ddY)	
Pm1 + S	4.2 ± 1.8	
Pm1 + CV3988	0.4 ± 0.5 *	

*P < 0.5 vs Pm1 + S-treated ddY mice. 表4.

表 4 は、さらにマンナンに関して、Pm1 を投与したマウスで同様の条件で、急性ショックのスコアを測定したところ、PAF 拮抗薬は、血小板を枯渇することによって増強されたショックをも抑制した。

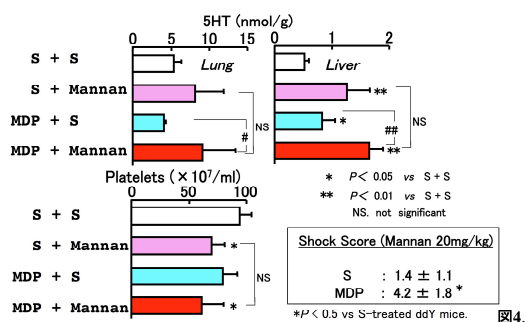
(6) マクロファージ枯渇の効果

Shock Score	
Mannan	Clo-lip + Mannan
4.2 ± 1.8	0.9 ± 0.5 *

*P < 0.5 vs Mannan only-treated ddY mice. 表5.

Clodronate 封入 liposomes を用いてマクロファージを枯渇すると、マンナンによるショック (40 mg/kg) も抑制した。

(7) MDP の効果。



*P < 0.5 vs S-treated ddY mice. 図4.

ddY に生食 (S) または MDP (5mg/kg) を尾静脈注射し、4h 後にマンナン (10 mg/kg) を尾静脈注射して、15 分後の 5HT 量および血中

の血小板数を示す。MDP のプライミングにより、血小板反応は増強されないが、マンナンによるショック (20 mg/kg) は MDP により増強された。

過去の報告と今回のデータのまとめ

	Mannan to ddY	LPS to BALB/c
MDP	ショック ↑ 血小板反応 -	ショック ↑ 血小板反応 ↑
K-76 補体C5阻害薬	ショック -	ショック ↓ 血小板反応 ↓
Pm1 血小板枯渇	ショック ↑	ショック ↓
CV3988 PAF拮抗薬	ショック ↓ 血小板反応* ↓	ショック -
Clo-lip マクロファージ枯渇	ショック ↓	ショック -

マウスの系統差											
KO3-LPS					Mannan						
BALB/c	C57BL/6	C3H/HeN	C3H/HeJ	DBA/2	ddY	BALB/c	C57BL/6	C3H/HeN	C3H/HeJ	DBA/2	ddY
+	+	-*	+	-	±	±	+	+	+	-	+

*MDP投与マウスでの報告あり

LPS の場合は血小板を枯渇することによりショックの誘導は抑制されるが、マンナンによるショックは血小板を枯渇しても誘導されるだけではなく、逆に増強された。LPS やレンサ球菌菌体は血小板の肺や肝臓への集積・脱顆粒を介して急性ショックを誘導するが、真菌マンナンの場合は PAF 依存性、血小板非依存性のメカニズムでショックを誘導するものと思われる。むしろマンナンにおいては、血小板はショックに対して防御的な働きを誘導する可能性がある。NOD2 リガンドの MDP によるショック増強のメカニズムとしては、PAF 産生増強、あるいは PAF に対する感受性増強等が予想され、今後の検討課題である。NOD1 リガンドにおいても、ショックの増強が起こるとの結果を得ている。本知見から、真菌はグラム陽性菌やグラム陰性菌と協同的に働き血小板を活性化する可能性が考えられる。

LPSによる急性ショックは、補体とマクロファージに加えて、神経系の関与も想定される。アドレナリン受容体は肺への血小板集積に関与を示唆する結果も得ている。補体系・血小板・マクロファージ等の免疫系に加えて新たな多因子モデルの構築は、感染性ショック研究への新規アプローチとなる。また、*Candida albicans*(マンナン)、口腔レンサ球菌、歯周病原細菌(LPS)によって血小板・急性ショック反応が誘導されることが予想される。今後、これらの反応が歯肉内注射しても惹起されるかどうかを検討する。歯肉内注射でも惹起されるならば、口腔微生物の新たな病原作用の報告となると思われる。

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 2 件)

- ① Oizumi T, Yamaguchi K, Funayama H, Kuroishi T, Kawamura H, Sugawara S, Endo Y. Necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) and their inhibition by clodronate (a non-NBP) in mice: potential for utilization of clodronate as a combination drug with an NBP. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* (in press). 査読有.
- ② 佐藤直毅, 金原正敬, 高橋春江, 黄 玲, 船山ひろみ, 黒石智誠, 山本照子, 佐々木啓一, 高田春比古, 菅原俊二, 遠藤康男. ニッケルアレルギーの自然免疫を背景とした発症機序. *臨床免疫・アレルギー科*, 50 巻, 618-624, 2008). 査読無.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 船山ひろみ, 黄玲, 金原正敬, 柴田健一郎, 朝田芳信, 菅原俊二, 高田春比古, 遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギー: elicitation step における自然免疫の関与. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2008 年 9 月 25 日, 東京.

- ② 大泉丈史, 山口晃史, 船山ひろみ, 黒石智誠, 菅原俊二, 遠藤康男. 骨吸収抑制薬 bisphosphonates (BP) の壊死作用: 窒素含有 BP (NBP) と窒素非含有 BP (non-NBP) の作用の違い. 第 37 回 日本免疫学会, 2007 年 11 月 20-22 日, 東京.
- ③ 中目晴子, 大泉丈史, 船山ひろみ, 山口晃史, 黒石智誠, 川村仁, 菅原俊二, 遠藤康男. 窒素含有 bisphosphonates (NBPs) の壊死作用: etidronate (non-NBP) の NBPs 代用薬としての可能性. 第 49 回 歯科基礎医学会学術大会, 2007 年 8 月 30-31 日, 札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船山 ひろみ (FUNAYAMA HIROMI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号: 19791338

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し