

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463145

研究課題名(和文) 脳組織の恒常性に対する麻酔薬の障害作用に関する細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Vulnerable effect of anesthetics on developing brain and vascular permeability

研究代表者

飯島 毅彦 (IIJIMA, TAKEHIKO)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：10193129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔薬は発達期の脳においては発育に影響を与えると考えられている。本研究当初は麻酔薬自身の脳組織に対する影響を検討するものであったが、炎症にともなう血管透過性の亢進もその障害作用のメカニズムに重要な影響を与えることがわかってきた。そのため、本研究では血管透過性の亢進のメカニズムを内皮細胞表面にあるグリコカリックス層を中心に形態学的及び機能的に検討することとした。その結果、生体内でのグリコカリックス層の描出に成功し、さらにLPS(Lipopolysaccharide)によりこれらの構造物が崩壊する様子をとらえることができた。さらに血管透過性の亢進も血管外への漏出を画像化することで示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Vulnerable effect of anesthetics on developing brain is a major concern of anesthesiologist. We have approached this subject from a point of view of vascular permeability. We have accomplished a model of intravital image of the glycocalyx in mice. Glycocalyx was visualized by labelling lectin under fluorescent microscope. This layer was fragile constitutes, which was easily disrupted by LPS (lipopolysaccharide). Ultrastructural image analysis has also confirmed the layer as glycocalyx, and this positive charged layer was denuded by LPS. Its function was also analysed by using labelled dextran. We have observed the macromolecular leakage after disruption of glycocalyx layer. Our model is feasible to observe real-time alteration of vascular permeability. This model could enable to investigate how glycocalyx can be restored and regenerated once it was damaged. We offer our model to develop the pharmacoprotection of pathological sequence of damaged vessel.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：glycocalyx permeability lectin intravital scopy

### 1. 研究開始当初の背景

麻酔薬の中枢その他の重要臓器に対する作用は、細胞生物学的なアプローチにより詳細に検討することが可能である。本研究では近年注目されている血管内皮あるいは細胞表面を覆い、さまざまな生理活性作用を発揮する heparan sulphate proteoglycan(HSPGs) に着目し、麻酔薬による中枢神経の apoptosis の誘導の機序を解明する。このような臓器の恒常性に対する麻酔薬の影響を明らかにすることにより安全な麻酔管理の構築を目指すことを目的とする。

### 2. 研究の目的

麻酔科領域では周術期における体液管理が重要となる。特に毛細血管から間質への水分移動、すなわち浮腫は、術後機能の回復を遅延させ、術後合併症の原因ともなることから適切な管理が必要である。体液管理を学ぶ上で Starling の法則は広く用いられ、現在でもこれに基づいた術中管理を行っている。しかし近年、この法則では十分ではないことが議論され、そして血管内外の物質透過性制御にグリコカリックス層(GCX)の存在が重要であることがわかってきた。

血管内皮表層に存在する GCX については、これまでも、その形態学的観察や、病態時に GCX が崩壊すると血管透過性の亢進が起こるとの報告があるが、GCX は複雑かつ脆弱な超微細構造を有しているため、電子顕微鏡観察での報告が主であり、生体内での挙動を観察するのは困難である。そこで、私の研究では GCX を生体内で可視化し、あわせて生体内の機能を明らかにすることを目的とした。

血管内皮表層にはグリコサミノグリカンや糖タンパク質からなる glyocalyx layer (GCX) が存在している。GCX の傷害は血管透過性亢進や白血球粘着能亢進にも関していると考えられ、周術期の輸液管理において重要な位置づけの一つである。本研究では、敗血症モデルマウスに蛍光標識レクチンを用いて GCX を動物が生きた状態で可視化し、GCX の動的観察および病態時の挙動変化を調べた。さらに GCX の崩壊に伴う白血球と内皮細胞の相互関係及びそれに伴う血管透過性の亢進について検討を加えた。

### 3. 研究の方法

重症敗血症病態モデルを用いて、病態時における GCX の変化も検討した。

(1)はじめに、GCX はグリコサミノグリカンを主な構成要素としている点に着目し、生体内での挙動観察方法として糖鎖構造を認識するレクチンの性質を用いることにした。レクチンは糖鎖に対して特異的な結合活性をもつタンパク質の総称であるが、植物由来のレクチンでは血管内皮細胞表層の糖鎖と結合することが報告されており、微小循環観

察の報告もある。レクチンによる血管内皮表層の描出に際し、本研究では、蛍光標識されたレクチンを静脈内投与し全身循環させることで血管内腔から描出する方法を用いた。(2)血管内腔から描出することで、観察の経時変化を捉えることができる。観察方法としてマウスに背側皮膚透明窓 (DSC) を装着することで、動物が生きたまま観察可能とした。背側皮膚透明窓 (DSC) を装着した BALB/c マウスを用いた。はじめに蛍光標識レクチン 7 種による GCX に対する染色度を画像解析で比較し、小麦胚芽レクチン (WGA) による特異性を確認した。敗血症モデルは LPS (<I>E.coli</I>026:B6 由来) を 2mg/kg 体重で腹腔内投与し、18 時間後に同量投与し作成した。LPS 初回投与の 24 時間後に蛍光 WGA を静脈内投与し、GCX を生体蛍光顕微鏡下で可視化すると共に、GCX の循環生理学的機能評価のため白血球粘着能および血管透過性を調べた。また、ランタンを含む固定液で灌流固定を行い、蛍光顕微鏡観察と同部位を電子顕微鏡で観察し検討した。

(3)さらに白血球が血管内皮表面をローリングする現象をとらえるため rhodamine 6G を用いて白血球をラベルし、血管表面に接着あるいはローリングする白血球の量を定量化した。敗血症モデルでは GCX の崩壊に伴い血管透過性が亢進するが、巨大分子の漏出を FITC-dex40 および TMR-dex75 で可視化し、血管外への漏出を観察した。

### 4. 研究成果

(1)敗血症モデルでは、対照群と比べ血管内皮表層の蛍光標識 WGA 染色度において明らかな減弱がみられ、これは GCX 染色電顕像の結果と一致していた。またこの敗血症モデルでは血管透過性および白血球粘着能の有意な亢進が認められた。植物由来の 7 種類のレクチンの中から、本研究の目的に最も適切なレクチンの評価を行い、小麦胚芽凝集素 (WGA) が適していることを明らかにし (Fig.1)、報告した (Microscopy Research and Technique 79:31-37 (2016))。

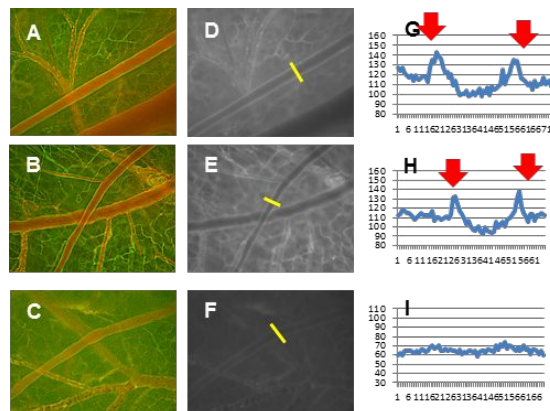


Fig1 各種レクチンによる ESL の可視化  
 A WGA, B SBA, C;DBA それぞれのレクチンによる蛍光を D,E,F の蛍光強度で定量化し、その横断面をグラフ(G,H,I)にした。

また、固定標本を作製し、この WGA が電子顕微鏡観察レベルでも血管内皮表面層を標識していることを確認した。そして、GCX 構成要素を基質とする糖鎖分解酵素を静脈内投与し、GCX の形態学的変化を観察したところ、一部 GCX の剥落を認めたため、これまで観察していたレクチン陽性の血管内皮表面層が GCX を含んでいることを決定づけた (Fig.2)。

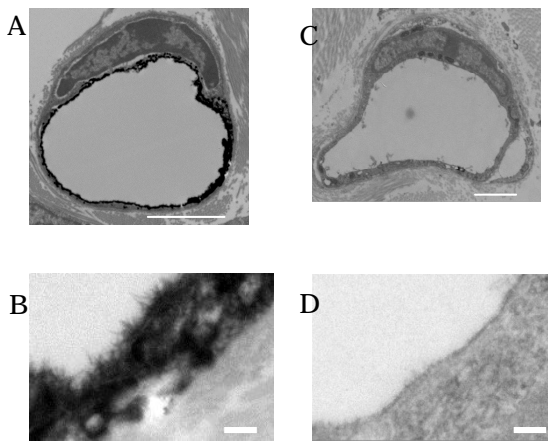


Fig.2 LPS による内皮細胞表面の構造物の変化 control: A,B, LPS: C,D  
 LPS により内皮細胞表面の構造物が消失しているのがわかる。

(2) 生体内での観察では敗血症モデルで GCX の崩壊を観察することができた (Fig.3)。

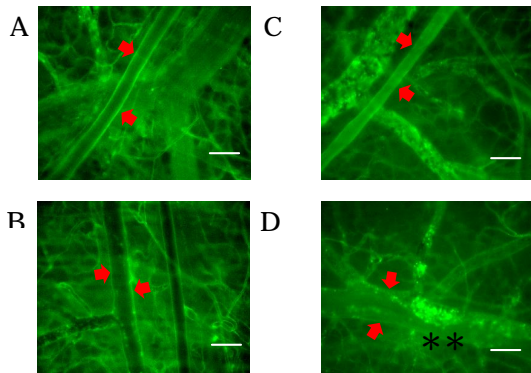


Fig.3 生体内観察による血管の表面を縁取る構造物の変化  
 control: A,B, LPS: C,D, 動脈: A,B 静脈: C,D LPS 投与により血管内皮表面構造が崩壊している

(3)白血球は血管内皮表面を rolling し、時にはその部位で停滞する。LPS 投与により、白血球の rolling と停滞は頻度を増した (Fig.4)。

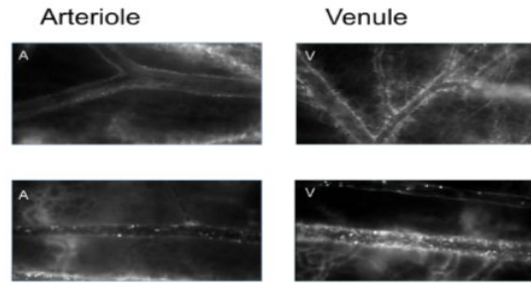


Fig.4 白血球の rolling と停滞 上段: control, 下段: LPS 投与  
 rhodamin6G によりラベルした白血球が動脈静脈ともに LPS 投与により rolling し、停滞するものが増えている。

血管の透過性は LPS 投与により亢進した。高分子デキストランの血管外濃度は投与直後より増加し、観察期間 120 分の間高い値を保った。

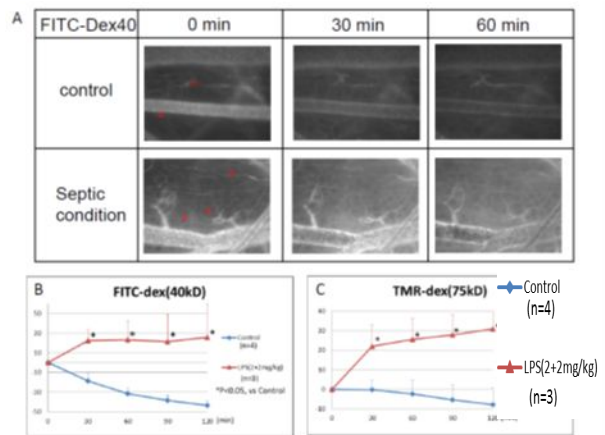


Fig.5 デキストランの血管外漏出

A control と敗血症モデルの血管外漏出を FITC および TMR で可視化した。敗血症モデルで投与後血管外スペースの傾向が喪失しない。B FITC-dex40kD の蛍光強度の推移 C TMR-dex75kD の蛍光強度の推移。いずれも 120 分に渡り敗血症モデルでは血管外蛍光強度が高く保たれている。

敗血症を誘導した重症敗血症モデルにおいてGCXの挙動変化とともに、血管内皮 - 白血球相互作用および血管透過性亢進も生体イメージングにより定量的に評価した。その結果、敗血症群ではGCXの明らかな崩壊を認め、同時に血管内皮 - 白血球相互作用と血管透過性の亢進も見られ、病態におけるGCXの重要性を明確に示した。

#### 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 2件)

Continuous monitoring of caspase-3 activation induced by propofol in developing mouse brain.  
Konno A, Nishimura A, Nakamura S, Mochizuki A, Yamada A, Kamijo R, Inoue T, Iijima T. Int J Dev Neurosci. 2016 Apr 25. (査読有)

Fluorescent imaging of endothelial glycocalyx layer with wheat germ agglutinin using intravital microscopy.

Kataoka H, Ushiyama A, Kawakami H, Akimoto Y, Matsubara S, Iijima T.  
Microsc Res Tech. 2016 79(1):31-7. (査読有)

[学会発表](計 6件)

Kataoka H, Ushiyama A, Kawakami H, Akimoto Y, Matsubara S, Ochi H, Iijima T; The effect of the endothelial glycocalyx layer and the microcirculatory parameters under septic condition in mice  
World Congress for microcirculation, Kyoto, JAPAN, Sept., 26th, 2015

Kataoka H, Ushiyama A, Kawakami H, Akimoto Y, Matsubara S, Miyao H, Iijima T Behavior of endothelial glycolcalyx layer during sepsis in mice as observed using fluorescence in vivo microscopy IARS 2015 Annual Meeting and International Science Symposium program : 91 (IARS 2015 Annual Meeting and International Science Symposium, Honolulu, USA, March, 2015)

Konno A, Nishimura A, Nakamura S, Yamada A, Kamijo R, Inoue T, Iijima T  
Live imaging of apoptogenic change induced by general anesthetic neurotoxicity in developing mouse IARS 2015 Annual Meeting and International Science Symposium program : 88 (IARS 2015 Annual Meeting and International Science Symposium, Honolulu, March, USA, 2015)

片岡華恵 牛山明 飯島毅彦 敗血症モデルマウスにおけるグリコカリックス層減衰と白血球粘着能亢進の生体顕微鏡観察 日

本バイオレオロジー学会 2014年6月5日  
大宮

片岡華恵, 牛山明, 飯島毅彦: 光学顕微鏡による glycocalyx 層のリアルタイム可視化技術と敗血症モデルにおけるその崩壊  
日本麻酔科学会 第61回学術集会, 横浜, 2014年5月

片岡華恵, 牛山明, 田中麻雄, 飯島毅彦: 蛍光標識レクチンを用いた血管内皮表面 glycocalyx のイメージング  
第23回日本バイオイメージング学会学術集会, 吹田, 2014年9月

[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]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
飯島 毅彦 (IIJIMA Takehiko)  
昭和大学歯学部・教授  
研究者番号: 10193129

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
西村晶子 (NISHIMURA Akiko)  
昭和大学歯学部・助教  
研究者番号 551227

(4)研究協力者  
牛山 明 (USHIYAMA Akira)  
国立保健医療科学院・上席主任研究官  
研究者番号 60291118

秋元 義弘 (AKIMOTO Yoshihiro)  
杏林大学医学部・教授  
研究者番号 60184115

片岡華恵 (KATAOKA Hanae)  
昭和大学大学院歯学研究科学生

越智英行 (OCHI Hideyuki)  
昭和大学大学院歯学研究科学生