

学 位 論 文 題 名

Role of pulmonary intravascular macrophages
in anti-platelet serum-induced pulmonary
hypertension in sheep

(抗血小板血清投与による羊の肺動脈圧上昇における
肺血管内マクロファージの役割)

学位論文内容の要旨

【目的】

近年、肺血管内マクロファージ (以下PIMs) の存在が羊, ヤギ, 豚, 猫などであきらかにされ, 肺循環における重要性が報告されている. PIMsの分布には種差があり, PIMsの存在する羊ではエンドトキシンに対するLD50は $10\mu\text{g/kg}$ で, その量を投与したときの肺動脈圧の上昇は $60\text{cmH}_2\text{O}$ にも達するが, PIMsの存在しないラットではLD50は $10,000\mu\text{g/kg}$ で, その量を投与しても肺動脈圧の上昇は認められない. この違いはエンドトキシンに対するこのような肺循環反応の相違にもPIMsが関与していることを示唆している.

一方, 肺障害における血小板の役割を調べるため, 抗血小板抗血清が用いられてきた. 抗羊血小板血清を羊に投与すると一過性の肺動脈圧の上昇がおこることが報告されているが機序については解明されていない. その機序を解明することは抗羊血小板抗血清を用いた動物実験結果を解釈する上で重要な意味をもつ. 本研究ではこの昇圧反応にPIMsが関与することを証明する目的でPIMsの存在する羊及びPIMsの存在しないラットを用いて実験を行った.

【方法ならびに結果】

Binderらの方法により羊洗浄血小板及びラット洗浄血小板を家兎に免疫し抗羊血小板血清 (AsPS) 及び抗ラット血小板血清 (ArPS) を作成した. コントロール血清として無処置の家兎血清を用いた. 力価はオクタロニー法を用いて測定し, AsPS及びArPSと同程度であった.

I. 羊の実験. 右房, 肺動脈, 大動脈にビニルカテーテルを留置した22匹の覚醒羊 (体重 $32.5 \pm [\text{SD}] 2.2\text{ kg}$) を用いた.

A. 抗羊血小板血清に対する羊肺動脈圧の変化. AsPS は以下の3種類の方法で投与した. 1) AsPS3mlを1回動脈内投与 ($n=5$), 2) AsPS0.5mlを繰り返し20

分間隔で6回動脈内投与 (n=4) , 3) AsPS10mlを12時間で動脈内持続投与 (n=4) . AsPS1回投与後30秒以内に肺動脈圧は上昇し始め2分以内に 14 ± 2 mmHgから 49 ± 2 mmHgへピークに達した. 血小板数は前値の $63.0 \pm 4.8 \times 10^4 / \mu$ lから1時間後には $7.7 \pm 2.5 \times 10^4 / \mu$ lへと減少した. コントロール血清3ml1回動脈内投与では肺動脈圧, 血小板数には変化を認めなかった. AsPS繰り返し投与では, 1, 2, 3回目では約25mmHgの肺動脈圧の上昇を認めたが, 4回目以降肺動脈圧の上昇は減少し, 6回目の投与では 24 ± 1 mmHgから 27 ± 2 mmHgとわずかに上昇したのみであった. 白血球数は変化せず, 血小板数は前値の $56.5 \pm 10.8 \times 10^4 / \mu$ lから6回投与後には $5.9 \pm 1.3 \times 10^4 / \mu$ lへと減少した. 初回AsPS投与時に動脈血, 混合静脈血のトロンボキサンB2濃度を測定したが, それぞれ 106 ± 18 pg/mlから 2400 ± 451 pg/ml, 68 ± 14 pg/mlから 890 ± 105 pg/mlへと動脈血におけるトロンボキサンB2濃度の上昇は混合静脈血の上昇の3倍であった. 持続投与では肺動脈圧は前値 20 ± 2 mmHgから30分で 32 ± 3 mmHgまで上昇した. 血小板数は減少したが, 白血球数は変化しなかった.

B. 抗羊血小板血清投与後の羊肺組織の検討. PIMsが抗血小板抗体と結合した血小板を貪食していることを証明するために以下の検討を行った.

1) AsPSの分布. 3頭の羊それぞれにAsPS3ml, コントロール血清3ml, 生理食塩水3mlを1回動脈内投与し, 1時間後に肺をPLP固定し凍結包埋し, 薄切切片をFITC標識したanti-rabbit IgGで染色した. AsPS投与した肺実質に蛍光の分布が認められた.

2) 電子顕微鏡によるPIMsの観察. 6頭の羊それぞれにAsPS3ml (n=2) , コントロール血清3ml (n=2) を1回動脈内投与, AsPS0.5mLを繰り返し20分間隔で6回動脈内投与 (n=1) , AsPS10mLを12時間で動脈内持続投与 (n=1) した.

1時間後に肺を2.5%グルタルアルデヒド固定液で4℃で灌流固定した後, 各羊肺を細切し無作為に10ブロックを選び, 固定, 包埋, 超薄切, 染色し電子顕微鏡H800にて観察した. 各ブロック1個につき10個, 1頭の羊につき100個の核のある面で切れているPIMを無作為に観察し, 血小板, 赤血球を貪食しているPIMを数えた. 以下の表に示すように, AsPS投与により血小板を貪食しているPIMsの比率が増加したが, 赤血球の貪食には影響を与えなかった.

羊No.	処置	血小板貪食 (+)	赤血球貪食 (+)
羊 1	AsPS1回投与	72	20
羊 2	AsPS1回投与	83	14
羊 3	コントロール血清1回投与	4	18
羊 4	コントロール血清1回投与	8	26
羊 5	AsPS繰り返し投与	98	12
羊 6	AsPS持続投与	18	27

II. ラットの実験 (PIMsが存在しない) .

A. 抗ラット血小板血清に対するラット肺動脈圧の変化.. 肺動脈, 大動脈にカテーテルを留置した8匹の覚醒ラットを用いた.

5匹の覚醒ラット (体重260 - 390 g) にArPS100 μ l/kgを1回動脈内投与し肺動脈圧の変化, 投与前, 投与後1時間の血小板数, 白血球数を調べた. 肺動脈圧は投与後30秒以内に上昇し始め2分以内に 13 ± 1 mmHgから 18 ± 2 mmHgへと上昇したが羊に比べごく軽度であった. 血小板数は前値の $60.0 \pm 4.5 \times 10^4 / \mu$ lから1時間後には $9.6 \pm 1.1 \times 10^4 / \mu$ lへと減少した. 抗ラット血小板血清による血小板数の減少は抗羊血小板血清に比べ同程度であった. 別の3匹の覚醒ラットに同量のコントロール血清を投与したが肺動脈圧, 血小板数, 白血球数は変化しなかった.

【考案】

本研究では以下の理由により, 抗羊血小板血清による一過性の肺動脈圧の上昇に肺血管内マクロファージが関与すると結論した. 1) 抗羊血小板血清投与によりトロンボキサン産生を伴う肺動脈圧上昇を伴った. 2) 抗羊血小板血清投与後に羊肺組織に抗羊血小板血清の主成分であるウサギIgGの分布が認められ, 形態学的に肺血管内マクロファージに血小板が多数貪食されていた. 3) 動脈血におけるトロンボキサンB2濃度の上昇は混合静脈血の上昇の3倍でありトロンボキサンの主な産生部位として肺が推測された. 4) 肺血管内マクロファージの存在しないラットにおいては抗ラット血小板血清投与後に認められるラット肺動脈圧の上昇が羊肺動脈圧の上昇より極めて小さかった. 5) 一般的にマクロファージは異物貪食の際に細胞膜のinternalizationに伴いアラキドン酸代謝産物を放出すること. 6) 肺血管内マクロファージはリポソームを異物として貪食する際トロンボキサン産生を伴う一過性の肺動脈圧上昇を惹起しこれには種差があることがすでに報告されていること.

肺血管内マクロファージは肺障害モデル実験においては重要な役割をしており, この細胞の存在する動物において抗羊血小板血清を用いる場合はその存在を念頭に実験を行うことが必要である.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

Role of pulmonary intravascular macrophages in anti-platelet serum-induced pulmonary hypertension in sheep

(抗血小板血清投与による羊の肺動脈圧上昇における
肺血管内マクロファージの役割)

【目的】近年、肺血管内マクロファージが羊などで存在すること、及びその分布には種差がありラットなどでは存在しないことが明らかにされている。また、急性肺障害における血小板の役割を調べるため、血小板を減少させる目的で抗血小板血清が用いられており、抗血小板血清を羊に投与すると一過性の肺動脈圧上昇が報告されているが、その上昇における機序については解明されていない。

【方法】本論文は、抗血小板血清投与による一過性の羊肺動脈圧の上昇における肺血管内マクロファージの関与について検討したものである。肺血管内マクロファージの存在する羊の実験では、抗羊血小板血清投与後の羊肺動脈圧、血小板数、トロンボキサンB₂濃度の変化、羊肺組織の抗血小板抗体の分布、肺血管内マクロファージについて観察した。肺血管内マクロファージの存在しないラットでは抗ラット血小板血清投与後のラット肺動脈圧、血小板数、ラット肺組織について検討した。

【結果】抗羊血小板血清 (AsPS) 投与3ml 1回投与により羊肺動脈圧は 14 ± 2 mmHgから 49 ± 2 mmHgと一過性に上昇し、血小板数は $63.0 \pm 4.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ から $7.7 \pm 2.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ と減少した。繰り返し投与では3回目まで25 mmHg程度の肺動脈圧上昇が認められたが、4回目以降肺動脈圧の上昇は減少し、6回目の投与では 24 ± 1 mmHgから 27 ± 2 mmHgとわずかに上昇したのみであった。血小板数は前値の $56.5 \pm 10.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ から6回投与後には $5.9 \pm 1.3 \times 10^4 / \mu\text{l}$ へと減少した。AsPS投与前、投与直後に肺動脈圧上昇がピークに達したときの動脈血、混合静脈血のトロンボキサンB₂濃度は、それぞれ 106 ± 18 pg/mlから 2400 ± 451 pg/ml、 $68 \pm$

14pg/mlから 890 ± 105 pg/mlへと動脈血におけるトロンボキサンB₂濃度の上昇は混合静脈血の上昇の3倍であった。AsPS投与により肺実質への抗血小板抗体の分布、肺血管内マクロファージの血小板貪食の増加が認められた覚醒ラットへの抗ラット血小板血清 (ArPS100 μ l/kg) 1回動脈内投与では肺動脈圧は投与後30秒以内に上昇し始め2分以内に 13 ± 1 mmHgから 18 ± 2 mmHgへと上昇したが羊に比べごく軽度であった。血小板数は前値の $60.0 \pm 4.5 \times 10^4 / \mu$ lから1時間後には $9.6 \pm 1.1 \times 10^4 / \mu$ lへと減少し、減少の程度はAsPSに比べ同程度であった。

【結論】 1) 抗羊血小板血清投与によりトロンボキサン産生を伴う肺動脈圧上昇を伴った。2) 抗羊血小板血清投与後に羊肺組織に抗血小板抗体の分布が認められ、肺血管内マクロファージが血小板を多数貪食していた。3) 動脈血におけるトロンボキサンB₂濃度の上昇は混合静脈血の上昇の3倍でありトロンボキサンの主な産生部位として肺が推測された。4) 肺血管内マクロファージの存在しないラットにおいては抗ラット血小板血清投与後に認められるラット肺動脈圧の上昇が羊肺動脈圧の上昇より極めて小さかった。5) 一般的にマクロファージは異物貪食の際に細胞膜のinternalizationに伴いアラキドン酸代謝産物を放出すること。6) 肺血管内マクロファージはリボソームを異物として貪食する際トロンボキサン産生を伴う一過性の肺動脈圧上昇を惹起しこれには種差があることがすでに報告されていること。以上のことより、抗羊血小板血清による一過性の肺動脈圧の上昇に肺血管内マクロファージが関与すると結論した。

口頭発表にあたり、阿部（和）教授より肺血管内マクロファージの存在しない動物の肝クッパー細胞、脾臓マクロファージ、肺泡マクロファージと肺血管内マクロファージの生物学的特性の差異、および抗体の生体投与で肺血管内マクロファージ以外のマクロファージに影響を与えないかどうかについて、皆川教授よりこの論文の意義およびサイトカインの関与について、西教授より抗体の力価の測定について、小山教授より産生されたトロンボキサンの出所についてそれぞれ質問、コメントがあった。申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また、阿部（和）教授、皆川教授より個別に審査を受け、合格との御返事をいただいている。

これまで抗血小板血清投与による羊の肺動脈圧上昇における肺血管内マクロファージの役割については明らかにされておらず、肺循環応答における肺血管内マクロファージの意義を示したことは意義あるものと考えられ、よって本論文は博士（医学）に相当するものと認めた。