

学位論文題名

Inflammatory Exudates Modulate the Function and Apoptosis of Neutrophils

(炎症性滲出液は、好中球の機能とアポトーシスを調節する)

学位論文内容の要旨

【緒言】白血球は好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球に分類され、その中で好中球は最も数が多い細胞であるが、寿命が最も短い細胞でもある。侵襲に対する生体局所の防御反応である炎症が起こった際に、主役となる好中球は炎症局所に浸潤し、活性酸素などの活性の高い毒性物質を産生することにより殺細菌作用を示すが、同時に局所の正常組織にも障害を与える。そこで生体には炎症初期に好中球の機能を活性化・維持し、炎症末期に好中球の機能を抑制して組織障害を防止する制御システムがあると考えられている。

浸出液は、炎症の際に組織表面または組織間隙に浸出する液で、細胞に対する増殖因子作用や免疫制御作用があり、これまでに浸出液が線維芽細胞などの細胞に与える影響についての報告があることから、同様に浸出液は好中球についても影響を与えている可能性が考えられる。従来、浸出液に関する研究は炎症初期に限られており、炎症初期と末期で、炎症の場での主役である好中球に与える影響を比較した研究はみられない。今回、炎症初期と炎症末期それぞれの浸出液が好中球にどのような影響を与えているのかを明らかにすることを目的に好中球機能の変化、細胞変化、これらに影響する因子について研究を行った。

【材料】浸出液については、北海道大学病院歯科診療センターで頸部廓清術を受け、治癒経過が良好であった30名の患者の創部から、炎症初期として術後1日目と炎症末期として術後5日目に得られたものを、遠心分離し上清液を検体とした。好中球については、健常人より末梢血を採血し、血清、血小板、赤血球、リンパ球を取り除いたものをHBSS(ハンクス液)に浮遊させて好中球浮遊液として用いた。

【方法】

1. 浸出液と混和した好中球からの活性酸素産生量の測定

活性酸素産生量の測定方法として、二波長分光光度計を用いたチトクロームC還元法を用いた。好中球と希釈した(10-70%)浸出液を37°Cで30, 45, 60分間incubation後、刺激剤としてphorbol myristate acetateを加えて計測した。

2. 浸出液と混和した好中球の形態的変化の観察

好中球の形態観察については、浸出液濃度 10% で 37°C 60 分間 incubation した好中球を走査型電子顕微鏡 (SEM ; 日立 S-4000) を用いて観察した。

3. 浸出液と混和した好中球から放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) の測定

浸出液濃度 10% で好中球を 37°C 60 分間 incubation したのちに、Lactate Dehydrogenase C II-Test を用いて乳酸基質ジアホラーゼ法により比色定量し LDH を測定した。

4. 浸出液中の hAPO-1/Fas の測定

浸出液中の hAPO-1/Fas を hAPO-1/Fas ELISA KIT を用いて測定した。

5. 好中球のアポトーシスの検出

浸出液と混和した好中球の DNA を Apoptosis Ladder Detection Kit を用いて判定した。

6. 浸出液中のサイトカイン量の測定

ELISA 法による Immunoassay Kit を用いて、IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , INF- γ , G-CSF, GM-CSF の浸出液中の濃度を測定した。

7. 抗 IL-10 抗体を添加した術後 5 日目の浸出液が好中球に与える影響

TUNEL 法の原理を利用した Apoptosis Screening Kit wako を使用して、アポトーシス細胞をマイクロプレート内で標識し発色させ、その吸光度を測定した。

【結果と考察】

1. 浸出液と混和した好中球からの活性酸素産生量について

術後 5 日目の浸出液よりも術後 1 日目の浸出液と混和した好中球の方が活性酸素の産生量が有意に高いことが認められた。さらに 10-70% の範囲の浸出液濃度でも、30, 45, 60 分と異なった混和時間でも同様の結果であった。このことから術後 1 日目の浸出液と混和した好中球の機能は亢進し、術後 5 日目の浸出液では機能は低下していることが認められた。また、その機能は浸出液の濃度 10-70% の範囲内では濃度に影響しないこと、30-60 分の範囲内では混和時間に影響しないことが認められた。*in vitro* の本研究では、好中球を HBSS 液に浮遊させているため、浸出液と好中球を混和させた際に浸出液が希釈されることになるものの、浸出液の希釈が本研究の結果に影響しないことが認められた。

2. SEM 像による好中球の形態変化の観察

術後 1 日目の浸出液と混和した好中球の細胞表面は、コントロールよりも突起が長く、突起形態が複雑であった。一方、術後 5 日目の浸出液とでは突起が短小化し、突起形態も滑らかであった。術後 1 日目では好中球表面に突起が多数見られたことから好中球の活性化が示唆された。一方術後 5 日目では好中球の表面平滑化、細胞縮小が見られたことから、壊死やアポトーシスが示唆された。

3. 好中球からの LDH の測定

術後 1 日目の浸出液と混和した好中球からはコントロールよりも LDH 値がわずかに低く、術後 5 日目ではわずかにたかかったものの、有意な差を認めなかった。術後 5 日目の浸出液と混和した好中球の壊死は否定的と考えられた。

4. 浸出液中の hAPO-1/Fas の発現

hAPO-1/Fas の値は、術後 1 日目よりも術後 5 日目の浸出液が有意に高値であった。

5. 好中球のアポトーシスの検出

好中球の DNA を抽出し電気泳動を行ったところ、術後 5 日目の浸出液と混和した好中球に DNA ladder を認めた。

これらの結果から、術後 5 日目の浸出液と混和した好中球に機能低下を認めたい要因としては、細胞壊死ではなく、アポトーシスを起こしていたからと考えられた。

6. 浸出液中のサイトカイン

IL-1 β の濃度は術後 1 日目よりも 5 日目の浸出液が有意に低いことを認めた。

IL-10 の濃度は術後 1 日目よりも 5 日目の浸出液が有意に高いことを認めた。

IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ , G-CSF, GM-CSF には有意差を認めなかった。IL-1 β は炎症性サイトカインとして知られており、好中球機能を活性化する作用がある。一方、IL-10 は抗炎症性サイトカインとして知られている。この結果から、IL-10 が術後 5 日目の浸出液と混和した好中球のアポトーシスに関連している可能性が予想された。

7. 術後 5 日目浸出液に抗 IL-10 抗体を混和したときの好中球アポトーシスの変化について

術後 5 日目浸出液に抗 IL-10 抗体を混和したところ、有意に好中球のアポトーシスが抑制された。この結果から術後 5 日目の浸出液に含有する IL-10 は好中球のアポトーシスに関連する因子と考えられた。

以上のことから、1. 炎症初期では浸出液によって好中球機能は活性化し、炎症末期では抑制されていた。2. 炎症末期において、好中球機能が抑制されたのは好中球のアポトーシス発現が要因と考えられた。3. 炎症末期における、好中球のアポトーシス発現は IL-10 が関連していると考えられた。すなわち、炎症初期では炎症反応を増強させ、炎症末期では抑制するという好中球の制御システムが浸出液には存在すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 亘 理 文 夫

副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

Inflammatory Exudates Modulate the Function and Apoptosis of Neutrophils

(炎症性滲出液は、好中球の機能とアポトーシスを調節する)

審査は、審査員個別に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

侵襲に対する生体局所の防御反応である炎症において、主役となる好中球の機能を発症初期には活性化・維持し、収束期にはその機能を抑制して組織障害を防止する制御システムが存在すると考えられているが、その詳細は明らかではない。

本研究は、急性炎症の発症初期と収束期における浸出液が好中球の機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、好中球の機能の変化、細胞形態の変化、ならびにこれらに影響する因子について検索したものである。

北海道大学病院歯科診療センターで頸部廓清術を受け、治癒経過が良好であった 30 名の患者の創部から、術後 1 日目と 5 日目に浸出液を採取し、遠心分離した上清液を検体として用いた。好中球については、健常人より末梢血を採血し、血清、血小板、赤血球、リンパ球を取り除き、ハンクス液に浮遊させたものを用いた。

最初に、好中球と希釈した浸出液を 37°C で 30, 45, 60 分間 incubation 後、刺激剤として phorbol myristate acetate を加え、二波長分光光度計を用いたチトクローム C 還元法を用いて、浸出液と混和した好中球からの活性酸素産生量を計測し、術後 1 日目の浸出液と混和した好中球の方が術後 5 日目の浸出液と混和した好中球よりも活性酸素の産生量が有意に高いこと、10-70% の範囲では活性酸素の産生量は浸出液の濃度と関係のないこと、ならびに 30, 45, 60 分の範囲では混和時間とも関係しないことを明らかにした。

走査型電子顕微鏡 (SEM ; 日立 S-4000) による観察では、術後 1 日目の浸出液と混和した好中球の細胞表面はコントロールよりも突起が長く、突起形態も複雑であり、一方術後 5 日目の浸出液と混和したものでは突起が短小化し、形態も滑らかであった。この結果は、術後 1 日目の浸出液との混和により、好中球が活性化されたことを示唆する。

術後 1 日目の浸出液と混和した好中球から放出された乳酸脱水素酵素値はコントロール

よりもわずかに低く、術後5日目のものでは逆にわずかに高かったが、有意差はなかった。hAPO-1/Fas ELISA KITを用いた測定で、hAPO-1/Fas値は術後1日目よりも術後5日目の浸出液において有意に高値であった。また、Apoptosis Ladder Detection Kitを用いた測定で、術後5日目の浸出液と混和した好中球に明らかなDNA ladderを認めた。これらの結果は、術後5日目の浸出液との混和により、好中球がアポトーシス陥ったことを示している。

Immunoassay Kitによる浸出液中のIL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 、INF- γ 、G-CSF、GM-CSFの測定では、IL-1 β 値は5日目の浸出液で有意に低く、一方IL-10値は有意に高かった。IL-6、IL-8、TNF- α 、INF- γ 、G-CSF、GM-CSFには有意差はなかった。さらに術後5日目の浸出液に抗IL-10抗体を混和したところ、好中球のアポトーシスが有意に抑制された。これらの結果は、術後1日目の浸出液との混和による好中球の活性化にIL-1 β が、また術後5日目の浸出液との混和による好中球の不活性化やアポトーシスにIL-10が関わっていることを示している。

以上のことから、炎症初期には炎症反応を増強させ、収束期には抑制するという好中球の制御システムが浸出液に存在し、炎症初期の好中球の活性化にはIL-1 β が関与し、収束期の好中球の不活性化やアポトーシスにはIL-10が関わっていることが明らかとなった。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、

- 1) 急性炎症時、好中球は壊死に陥ることにより、その機能を発揮するのではないのか、蛋白(サイトカイン)は好中球に対して濃度依存性に作用が変化するとされているが、本研究では浸出液の希釈濃度が異なっても結果が変わらないのはどう解釈するのか、
- 2) 術後5日目の浸出液と混和した好中球にアポトーシス小体は観察されたのか、
- 3) 好中球の電顕写真で偽足が長いのはどういう状態か、
- 4) 一般に、炎症初期では好中球は細菌や異物を貪食して細胞死を起こすが、本研究では壊死の際に逸脱するLDHが炎症初期で増加が見られないのはなぜか、
- 5) APO1/Fas ELISA Kitは何を測定しているものか、
- 6) TNF- α は標的細胞のレセプターに結合してアポトーシスを起こすとされている。本研究ではアポトーシスが起きていない術後一日目にTNF- α が増大しているがこれをどう考えるか、
- 7) Apoptosis Screening kitは、細胞の何を標識しているのか、

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、炎症初期には炎症反応を増強させ、収束期には抑制するという好中球の制御システムが浸出液に存在することを確認し、炎症初期の好中球の活性化にはIL-1 β が、収束期の好中球の不活性化やアポトーシスにはIL-10が関わっていることを明らかにしたことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。