

原 著

好中球の接着能亢進による肺血管透過性亢進と活性酸素種の関与

谷田 達男 宋 純 植田 信策 星川 康
 芦野 有悟 野田 雅史 田畑 俊治 鈴木 聡
 小野 貞文 藤村 重文

要旨：我々は、機械的な刺激で好中球に接着因子が発現し、肺へ集積し、肺血管透過性が亢進することを報告してきた。この現象に活性酸素種が関与するのか、またキサンチンオキシダーゼ(XO)系を介するのかを検討するために superoxide dismutase (SOD) 及び allopurinol (ALLO) を用いて抑制効果を SD ラットの摘出灌流肺を用い重量法にて検討した。好中球の肺への集積は myeloperoxidase (MPO) の測定によって定量化した。好中球はガラス容器内で振盪して、膜表面に Mac-1 を発現させた。被刺激好中球を摘出ラット肺に加えると非刺激好中球を加えた群に比し濾過係数は約 5 倍に増加した。この系に SOD または ALLO を前投与すると濾過係数の増加はほぼ完全に抑制された。被刺激好中球群の MPO 値は SOD では変化しなかったが、ALLO によって部分的に抑制された。以上から機械的刺激を加えた好中球による肺血管透過性亢進は XO 系を介した活性酸素種の生成によることが示唆された。

キーワード：肺血管透過性、機械的刺激、Mac-1 (CD 11 b/CD 18)、スーパーオキシド、キサンチンオキシダーゼ

pulmonary vascular permeability, mechanical stimulation, Mac-1 (CD 11 b/CD 18), superoxide, xanthine oxidase

緒 言

急性呼吸促進症候群 (ARDS: acute respiratory distress syndrome) は好中球 (PMN) の関与する急性の肺の炎症反応と考えられている¹⁾。ARDS の中で特に好中球への機械的刺激が関与すると考えられる場合として、開心術に伴う体外循環回路の使用によって好中球膜表面に接着分子が発現されることが報告されている²⁾。血流の擾乱による機械的刺激が好中球に加わり、活性化した好中球が肺血管内皮に接着し、血管内皮細胞に傷害を与える³⁾ことが推測される。これまで我々は、ヒト好中球に機械的刺激を与えることで、好中球表面に接着因子が発現し、これらの好中球が肺に集積し、肺血管透過性亢進が生じる事を示してきた。今回我々はこの肺血管透過性亢進が活性酸素種によるものか否かを検討し、またもし活性酸素種が関与しているならばどの様な系を介して生成されるかを知るために以下の実験を行った。

方 法

1. 濾過係数および肺循環動態の測定

〒980 8575 仙台市青葉区星陵町 4 1
 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野

(受付日平成 9 年 7 月 25 日)

摘出灌流肺の作成：摘出灌流肺は Tanita 等の方法⁴⁾を用いて作成した。SD ラット (Sprague-Dawley rat: 船橋農場) を Pentobarbital 50 mg/kg (ip) で麻酔した後、総頸動脈から Heparin を 500 単位/kg を注入し、脱血犠牲死させた。開胸後、カテーテル (PE 200, Dow-Corning) を左心室および肺動脈に挿入し、肺血管内を生理食塩水約 50 ml にて洗い流した。摘出心肺を張力トランスデューサー (FTpickup TB-611 T, 日本光電) に接続しポリグラフ (Model RMP 6008 M, 日本光電) 上に連続的に重量を記録した。肺動静脈圧および気道内圧 (Ppa, Ppv, Palv) を圧トランスデューサー (P 23 ID, Gould) で測定し、連続的に記録した。灌流液は 6% 牛血清 Albumin 加 Krebs-Henseleit 液を用いた。灌流中は 5% CO₂, 30% O₂, 65% N₂ の混合ガスをレザボア内に持続的に送気した。動静脈レザボアを温水槽の中に浸し灌流液を 37℃ に保った。灌流液流量は電磁流量計 (FF 050 T: MF-27, 日本光電) を用いて連続的に測定した。肺動静脈の 0 点は肺の最頂部とした。肺静脈圧と気道内圧はそれぞれ 2.5 および 2.0 cmH₂O に保った。等重量状態で動静脈のカテーテルを同時に閉じて肺微小血管内圧を示す double occlusion pressure (Pdo) を測定した⁵⁾。等重量状態を確認した後、動静脈のレザボアを 3 cm 上昇させ、微小血管内に圧負荷 (ΔPmv) を行ない肺重量変化を測

定した。濾過係数(K)は Tanita 等の方法にて求めた⁴⁾。1分毎の肺重量変化を時間軸に対して片対数にとり後半の7分間のデータを最小自乗法により外挿して時間0の値を初期濾過率(Q)として計算した。これを圧負荷分(ΔPmv)で除し、湿肺重量1gあたりの値に補正した($K=Q/\Delta Pmv/g$ wet weight)。

肺循環動態の測定: Ppa, Ppv, Pdo および灌流液流量(Qp)から肺動脈側, 肺静脈側の血管抵抗 Ra および Rv, さらに全肺血管抵抗 Rt を以下の計算式を用いて計算した。

$$Ra = (Ppa - Pdo) / \dot{Q}_p \quad (1)$$

$$Rv = (Pdo - Ppv) / \dot{Q}_p \quad (2)$$

$$Rt = (Ppa - Ppv) / \dot{Q}_p \quad (3)$$

また肺動静脈の血管抵抗比 Ra/Rv を求めた。

2. 好中球の分離・刺激

一名の健常成人男性より21ゲージ針を用いて約20mlヘパリン採血し、密度勾配法により好中球を分離した。全血を分離用溶媒(Polymorphprep: Nycomed)に重層し500xgにて30分遠心後、好中球を採取し、等量の1/2濃度生理食塩水を添加しさらに500xgで10分遠心洗浄した。生理食塩水にて $10^3/\mu l$ の濃度に調整した。好中球をシンチレーションカウンター用ガラス容器内で静かに10秒間振盪することによって刺激した。

3. 実験プロトコール

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (263±79g) 22頭を以下の4群に分けた。灌流を開始して対照値(濾過係数, 肺循環動態)を測定した後, vehicleとして生理食塩水を投与し, 濾過係数, 肺循環動態を測定し, さらに無処置のまま(非刺激好中球群: n=6), またはガラス容器内で振盪して活性化させた(被刺激好中球群: n=6)好中球を最終濃度 $25/\mu l$ となるように投与した。vehicle投与時にSOD(20 $\mu g/ml$ Cu-Mn superoxide dismutase: Sigma), またはallopurinol(100 $\mu M/L$: Sigma), を投与し, 濾過係数, 肺循環動態を測定し, 被刺激好中球を最終濃度 $25/\mu l$ となるように投与した(SOD群: n=6, ALLO群: n=4)。90分後, 濾過係数, 肺循環動態を測定した。MCLA(ウミホタルルシフェリン誘導体)法によるMPO測定のために, 濾過係数, 肺循環動態測定終了後に好中球浮遊液を前述と同様の処置(非刺激好中球群はそのまま, 被刺激好中球群, SOD群, ALLO群は10秒間のガラス容器内での振盪)を行った後, 好中球の最終濃度が $250/\mu l$ となるように投与し, 20分間灌流した。その後肺の血管内を生理食塩水約50ml, 15cm H₂Oにて洗い流し, 肺重量を測定後, -80℃の冷凍庫に保存した。

4. Myeloperoxidase 測定⁶⁾

肺重量測定後に保存した肺を解凍後, 肺重量の10倍

の0.02% CTAB(cethyltrimethyl ammonium bromide)を加え, 氷冷下にホモジナイズした。低温超遠心機(HITACHI 18PR-3, 日立製作所)にて4, 10,000rpm, 15分遠心後, ペレットを液体窒素内で凍結, 氷上で解凍しながら超音波破碎機(UD 201, トミー精機)にて30W, 0.5秒間隔でburstと静止を繰り返し30秒間破碎した。この過程を7回施行した後, 4, 12,000rpm, 15分遠心し, 上清を試料とした。標準反応液(50mM SOD: 20mL, 2mM desferrioxamine: 20mL, 50mM KBr: 20mL, 40mM H₂O₂: 25mL, 0.2M acetate-buffer: 1mL, distilled water: 765mL, 0.2mM 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one(MCLA): 100mL)をLuminescence Reader(BLR 301, Aloka)に注入し3分間の基礎発光を計測後, 50 μl の試料を注入し, 最大発光強度(Kcpm)を計測した。

統計

すべてのデータは平均±SDで表示し, 分散分析にてp<0.05未満を有意と判定した。

結 果

1. 濾過係数および肺循環動態

基準値(baseline)とvehicle又はSOD,ALLOを加えた時点(treatment)の濾過係数はすべての群で変化しなかった。好中球投与後90分経過した実験時(experiment)の濾過係数は非刺激好中球の投与では変化しなかったが, 被刺激好中球の投与によって基準値及び非刺激好中球投与群の実験時の値の約5倍に上昇した(p<0.05)。また, SOD群, ALLO群では被刺激好中球を投与しても濾過係数は変化しなかった。(Fig. 1)。

baselineとtreatment時, experiment時のPpa, Pdo, QPはすべての群間および群内で有意の変化がなかった。またRa, Rv, Rt, Ra/Rvも変化しなかった(Table 1)。

2. MPO 測定

被刺激好中球群ではMPOは 57.87 ± 27.40 (Kcpm)であり非刺激好中球群の 5.86 ± 6.73 に比して有意に高値を示した(p<0.01)。また, SOD群では 77.93 ± 4.67 (N.S.: vs 被刺激好中球群)と高値であったがALLO群では 35.11 ± 9.14 (N.S.: vs 被刺激好中球群)と低値を示した(p<0.01: SOD群 vs ALLO群)。更に非刺激好中球群, 被刺激好中球群のみでMPOの値と濾過係数をグラフ上にプロットすると $r^2=0.82$ ($y=0.35+4.8$: p=0.0001)で有意な正の相関を示した(Fig. 2)。しかし, SOD群は前2者とは異なり, MPOは高値を示したが濾過係数は低値に留まっていた(Fig. 2)。ALLO群はMPO値で見るとSOD群と非刺激好中球群の中間にあり, 被刺激好中球群と同程度の値を示していた。

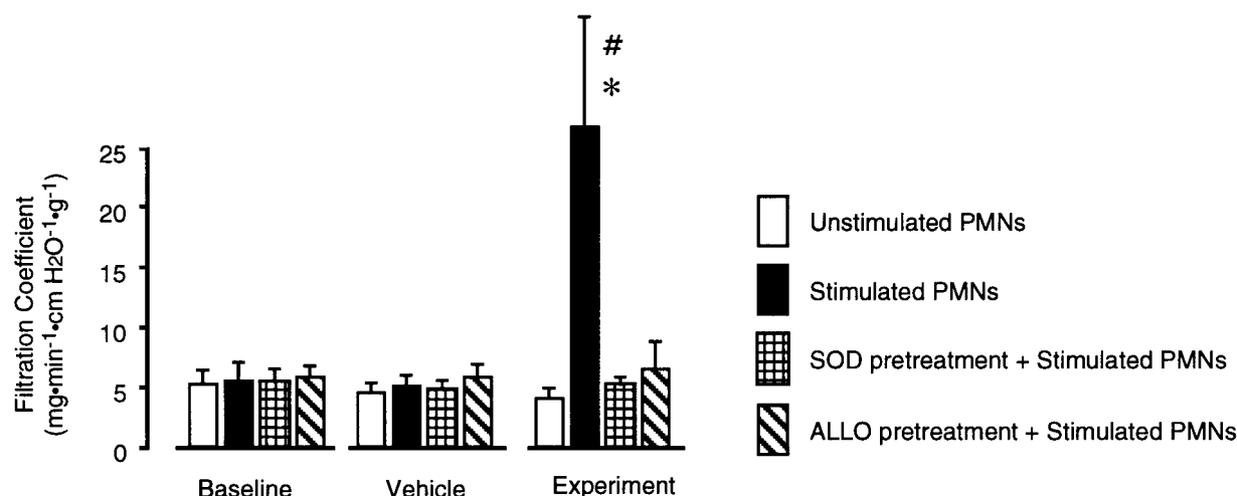


Fig. 1 Stimulated PMNs increased the filtration coefficient in rat lungs, but not if rat lungs were treated with SOD or allopurinol. Values are means \pm SD. # p <0.01 vs. filtration coefficient before infusion of PMNs. * p <0.01 vs. group exposed to inactive PMNs.

Table 1 Hemodynamic data

	Ppa	Pdo	\dot{Q}_p	Ra	Rv	Rt	Ra/Rv
without stimulation							
Baseline	11.4 \pm 1.1	6.1 \pm 0.5	14.8 \pm 4.7	0.39 \pm 0.13	0.27 \pm 0.12	0.66 \pm 0.24	1.53 \pm 0.50
Treatment	11.2 \pm 1.3	5.9 \pm 0.5	15.0 \pm 4.6	0.37 \pm 0.13	0.25 \pm 0.09	0.62 \pm 0.20	1.56 \pm 0.51
Experiment	11.2 \pm 1.4	6.4 \pm 0.8	14.7 \pm 5.5	0.35 \pm 0.11	0.30 \pm 0.15	0.66 \pm 0.25	1.26 \pm 0.38
Stimulated PMNs							
Baseline	10.7 \pm 1.5	6.2 \pm 0.5	12.7 \pm 2.7	0.36 \pm 0.05	0.30 \pm 0.09	0.66 \pm 0.09	1.26 \pm 0.35
Treatment	10.6 \pm 0.7	6.0 \pm 0.4	12.7 \pm 2.8	0.37 \pm 0.05	0.29 \pm 0.07	0.66 \pm 0.10	1.33 \pm 0.23
Experiment	12.1 \pm 3.5	6.3 \pm 0.3	13.4 \pm 3.7	0.48 \pm 0.14	0.30 \pm 0.09	0.77 \pm 0.23	1.53 \pm 0.12
Stimulated PMNs treated with SOD							
Baseline	10.8 \pm 0.4	6.2 \pm 0.2	14.3 \pm 3.2	0.33 \pm 0.09	0.28 \pm 0.09	0.61 \pm 0.17	1.22 \pm 0.10
Treatment	10.7 \pm 0.5	6.0 \pm 0.2	15.7 \pm 3.2	0.31 \pm 0.07	0.24 \pm 0.05	0.55 \pm 0.12	1.33 \pm 0.16
Experiment	10.7 \pm 1.0	6.2 \pm 0.3	12.0 \pm 2.2	0.38 \pm 0.09	0.32 \pm 0.07	0.70 \pm 0.15	1.19 \pm 0.16
Stimulated PMNs treated with allopurinol							
Baseline	10.0 \pm 1.2	6.2 \pm 0.8	9.9 \pm 2.3	0.40 \pm 0.11	0.39 \pm 0.13	0.79 \pm 0.24	1.03 \pm 0.11
Treatment	9.6 \pm 0.6	5.9 \pm 0.4	9.3 \pm 3.0	0.43 \pm 0.17	0.41 \pm 0.17	0.83 \pm 0.34	1.06 \pm 0.13
Experiment	9.7 \pm 0.7	6.2 \pm 0.5	8.6 \pm 4.2	0.49 \pm 0.21	0.51 \pm 0.27	0.93 \pm 0.48	1.00 \pm 0.16

Values are expressed as means \pm SD, Ppa and Pdo; pulmonary arterial and double occlusion pressures [cm H₂O], \dot{Q}_p ; perfusate flow [ml·min⁻¹]. Ra, Rv and Rt; pulmonary arterial, venous and total vascular resistances [cm H₂O·ml⁻¹·min⁻¹].

考 案

機械的に刺激した好中球は CD 11 b/CD 18 (Mac-1) を表出する。また、この被刺激好中球を摘出ラット肺に投与すると肺血管透過性を亢進する。この反応は被刺激好中球を抗 CD 18 抗体で処理した際には抑制されるため好中球が肺血管内皮細胞に接着し透過性を亢進したものと考えている⁷⁾。今回我々はこの被刺激好中球による肺血管透過性亢進が SOD または ALLO (Allopurinol) の投与によって抑制されることを示した。

これまでこの肺血管透過性亢進がどのような機序で生じ

たのかは検討されていなかった。今回、SOD の投与によって肺血管透過性の亢進が抑制されたことで、スーパーオキシド (O₂⁻) の関連が示された。SOD は O₂⁻ を過酸化水素 (H₂O₂) に変換する。H₂O₂ は細胞内の peroxisome に含まれる catalase によって H₂O に変換される。SOD は血管内皮細胞にも含まれるがその多くは赤血球内に存在し⁸⁾、酸素傷害から生体を保護していると考えられる。我々の実験では赤血球を含まない系を使用している。赤血球は白血球による肺損傷を抑制している⁹⁾ との実験結果も見られ、今回の実験をサポートするデータと考えられる。

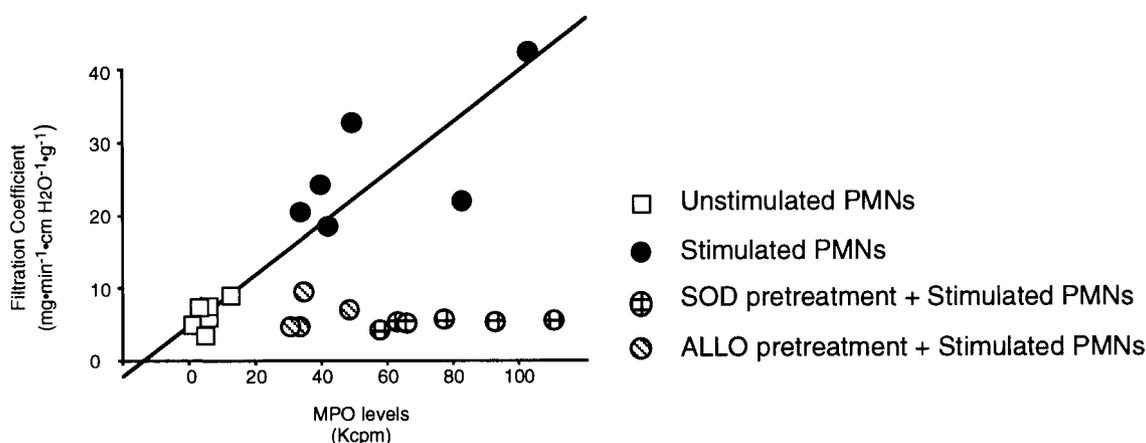


Fig. 2 Relationship between MPO levels and filtration coefficient. Each symbol represents a single experiment.

今回 ALLO 投与によって濾過係数の上昇が抑制されたことは Xanthine oxidase (XO) 系を介した O_2 生成系が関与していることを示唆している。ALLO は XO の選択的競合阻害薬であり、Hypoxanthine から Xanthine に、また Xanthine から Uric Acid に変化する際に発生する O_2 の生成を抑制するものと考えられる¹⁰⁾。しかし、一方で細胞接着に関与している可能性も指摘されている¹¹⁾¹²⁾。今回の実験で、ALLO を使用した実験群では、非刺激好中球群の MPO 値と比べると高値であるが、SOD を用いた実験群に比して有意に低値であった。これは部分的に ALLO が直接または活性酸素種生成抑制によって好中球の接着を抑制した可能性を残しているものと考えられる。今後検討する必要があるものと考えられた。

一般に、好中球における XO の関与する活性酸素生成のポテンシャルは小さいと考えられている。また、好中球の O_2 の生成は細胞膜成分の NADPHoxidase の関与がその殺菌機構から重要であると考えられている。また、CD 11 b-ICAM の複合体形成が好中球の過酸化水素生成を増加させるとの報告もある¹³⁾。

一方、低酸素状態や、活性化好中球が血管内皮細胞に接着した血管内皮細胞では Xanthine dehydrogenase (XD) から XO への変換が起こり¹⁴⁾、結果的に大量の O_2 が発生する。細胞内に存在する SOD などの防御因子の許容範囲を超えると、3 価鉄を 2 価鉄に還元させる物質として作用し、さらに鉄のフェントン反応を惹起し H_2O_2 からヒドロキシルラジカルを生成させ細胞傷害を引き起こす。細胞質 SOD の阻害剤を使用した実験で、 H_2O_2 による細胞傷害が増加し、3 価鉄、2 価鉄のキレート剤を用いることで、その細胞傷害が抑制されることが示されている¹⁵⁾。さらに、内皮細胞内の鉄イオンを増加させると H_2O_2 による血管内皮細胞傷害を増加させ¹⁶⁾、逆に細

胞内のフェリチンを増加させると H_2O_2 による血管内皮細胞傷害を抑制する事が報告されている¹⁷⁾。今回の実験でもこのフェントン反応が重要な役割を担っていたことが推測される。

XD-XO の変換をもたらす機構は未だに不明であるが、tyrosin kinase を阻害することによってこの変換を抑制し、また、CD 11 a/CD 18-ICAM の複合体形成が関与しているとの報告もある¹⁸⁾。本実験系では Mac-1 の upregulation のみが認められている系であるが好中球分離の際にすでに CD 11 a または CD 11 c の upregulation が生じていて⁷⁾、この CD 11 a/CD 18-ICAM の複合体形成が XD-XO の変換をもたらした可能性も考慮しなければならない。

今回の実験で、肺血管内皮細胞透過性亢進に Xanthine oxidase の関与が示唆された。しかし、 O_2 の生成から連鎖反応的に脂質過酸化反応を惹起する何らかの増幅機構を介し酸素ストレスのシグナルが増強されると考えられている¹⁹⁾²⁰⁾。今後、細胞内の情報伝達機構の解明によって検討を加える必要がある。

文 献

- 1) Hogg JC: Neutrophil kinetics and lung injury. *Physiol Rev*, 1987; 67: 1249-1295.
- 2) Gillinov AM, Bator JM, Zehr KJ, et al.: Neutrophil adhesion molecule expression during cardiopulmonary bypass with bubble and membrane oxygenators. *Ann Thorac Surg* 1993; 56: 847-853.
- 3) Powe JE, Short A, Sibbald WJ, et al.: Pulmonary accumulation of polymorphonuclear leukocyte in the adult respiratory distress syndrome. *Critical Care Med* 1982; 10: 712-718.
- 4) Tanita T, Koike K, Ono S, et al.: Simultaneous esti-

- mation of filtration variables in isolated rat lungs in zone 3 conditions. *Tohoku J Exp Med* 1996; 179: 193-203.
- 5) Dawson CA, Linehan JH, Rickaby DA: Pulmonary microcirculatory hemodynamics. *Ann NY Acad Sci* 1982; 384: 90-106.
 - 6) Uehara K, Hori K, Nakano M, et al: Highly sensitive chemiluminescence method for determining myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 1991; 199: 191-195.
 - 7) 谷田達男, 宋 純, 植田信策, 他: 好中球の Mac-1 発現による接着能亢進と肺血管透過性亢進. *日胸疾会誌* 1997; 35: 396-401.
 - 8) Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, et al: The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975; 85: 337-341.
 - 9) Onizuka M, Tanita T, Staub NC: Erythrocytes reduce liquid filtration in injured dog lungs. *Am J Physiol* 1989; 256: H 515-H 519.
 - 10) Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 6 Pt 2: H 1269-H 1275.
 - 11) Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, et al: Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1989; 257: G 683-G 688.
 - 12) Suzuki M, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte-endothelial cell adhesive interactions: role of xanthine oxidase-derived oxidants. *J Leukocyte Biol* 1991; 50: 488-494.
 - 13) Shappell SB, Toman C, Anderson DC, et al: Mac-1 (CD 11 b/CD 18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils. *J Immunol* 1990; 144: 2702-2711.
 - 14) Phan SH, Gannon DE, Varani J, et al: Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its alteration by activated neutrophils. *Am J Pathol* 1989; 134: 1201-1211.
 - 15) Hiraishi H, Terano A, Razandi M, et al: Role of cellular superoxide dismutase against reactive oxygen metabolite injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Bio Chem* 1992; 267: 14812-14827.
 - 16) Balla G, Vercellotti GM, Eaton J W, et al: Iron loading of endothelial cells augments oxidant damage. *J Lab Clin Med* 1990; 116: 546-554.
 - 17) Balla G, Jacob HS, Balla J, et al: Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Bio Chem* 1992; 267: 18148-18153.
 - 18) Wakabayashi Y, Fujita H, Morita I, et al: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in bovine carotid artery endothelial cells induced by activated neutrophils: involvement of adhesion molecules. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1265: 103-109.
 - 19) Goldman R, Ferber E, Zort U: Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A 2. *FEBS Letters* 1992; 309: 190-192.
 - 20) Grisham MB, Yamada T: Neutrophils, nitrogen oxides, and inflammatory bowel disease. *Ann New York Acad Sci* 1992; 664: 103-115.

Abstract

Increase in Pulmonary Vascular Permeability Caused by Increased Adhesiveness of Polymorphonuclear Leukocytes and Superoxide

Tatsuo Tanita, Chun Song, Shinsaku Ueda, Yasushi Hoshikawa, Yugo Ashino,
Masafumi Noda, Toshiharu Tabata, Satoshi Suzuki,
Sadafumi Ono and Shigefumi Fujimura

Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer,
Tohoku University, Sendai 980 8575, Japan

We report that mechanical stimulation of human neutrophils results in their accumulation in isolated rat lungs and in an increase in pulmonary vascular permeability. To determine whether reactive oxygen species were involved in this increase and, if so, whether it is mediated by xanthine oxidase metabolites, we assessed the effect of stimulated and unstimulated neutrophils, and of a superoxide scavenger, superoxide dismutase (SOD), and a xanthine oxidase inhibitor, allopurinol (ALLO) on pulmonary vascular permeability in isolated perfused lungs from Sprague-Dawley rats. Pulmonary vascular permeability in isolated rat lungs was assessed using a filtration coefficient determined by gravimetry. To quantify neutrophil accumulation in the lung, we measured myeloperoxidase (MPO). Neutrophils were stimulated by gentle agitation in a glass container for 10 s and Mac-1 was subsequently upregulated on the surface of the neutrophils. In lungs that received stimulated neutrophils, the pulmonary vascular filtration coefficient was about 5 times higher than in lungs that received unstimulated neutrophils. An increase in filtration coefficient was almost completely blocked by pretreatment with SOD or ALLO. However, the accumulation of stimulated neutrophils was not, or only partly, blocked by SOD or ALLO, respectively. We conclude that the increase in pulmonary vascular permeability caused by mechanically stimulated neutrophils was partly mediated by reactive oxygen species generated via the xanthine oxidase system.