The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	P-selectin participates in cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response in association with nitric oxide and peroxynitrite production
Author(s)	林, 叔隆
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41853
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	林（はやし）　叔（よし）　隆（たか）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15327　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	P-selectin participates in cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response in association with nitric oxide and peroxynitrite production （体外循環により惹起される炎症反応と nitric oxide および peroxynitrite 産生に対する P-selectin の関与）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松田　暉 （副査） 教　授　妙中　義之　　教　授　真下　節

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

体外循環（CPB）による血液成分の artificial surface との接触は炎症反応を惹起し、これにより引き起こされる術後出血及び多臓器障害は現在もなお大きな問題である。これまでの研究報告によりこの炎症反応の進行及び inflammatory mediator の変動が明らかにされつつあるが、CPB による生体侵襲をさらに軽減するにはこの炎症動態のメカニズムを解明することが肝要である。

一般に炎症反応の初期において、P－selectin が好中球と血管内皮細胞との接着に重要な役割を果たすことが報告されており、心臓血管外科領域では、P－selectinの発現が心筋虚血再灌流における心筋障害進展の一因であるとされている。しかしながら、CPB においてはその変動及び血小板機能への関与が示唆されているが、この CPB により惹起される炎症反応における P－selectin の役割は明らかにされていない。

一方で、CPB において nitric oxide（NO）の産生が亢進することが報告されているが、この炎症の制御が NO の変動自体に及ぼす影響は明らかでない。特に呼気 NO および peroxynitrite（$ONOO^-$）に関しては各種炎症においてその濃度が増加するとされているが、CPB におけるその変動に関する実験は報告はなされていない。そこでラット CPB モデルにおいて抗 P－selectin 抗体を用いて、この炎症動態の進展及び NO・$ONOO^-$ の産生に対する影響を検討した。

【方法】

体重400～450 g の adult male SD rat を用いて上大静脈・大腿静脈脱血、大腿動脈送血で、34℃・100 ml／kg／min・60分間の partial CPB を施行した。P 群（n＝10）において ARP2-4（anti－rat specific P－selectin monoclonal antibody）3 mg／kgを CPB 開始前に回路充填液に投与、Control として C 群（n＝10）において PNB1.6（nonblocking monoclonal antibody）3 mg／kgを同様に投与した。実験は無輸血にて施行し、CPB 開始直前・CPB 終了直後・終了 3 時間後の 3 ポイントにて動脈血を採取し、血清 P－selectin、炎症性 cytokine である IL－6 及び IL－8、血中 NO 及び呼気 NO 濃度、nitrotyrosine、respiratory index（RI）を測定し、その変動を比較検討した。なお、$ONOO^-$ の産生量は、総 tyrosine に対する nitrotyrosine 比（$\%NO_2$－Tyr）とした。CPB 終了 3 時間後にラットを犠死せしめ、肺組織における P－selectin の発現及び好中球の接着を比較検討した。好中球の接着に関しては切片当たり10視野において好中球数及び肺胞数を計測し、これを異なる10切片において施行し、肺胞当たりの好中球数

を比較検討した。

【成績】

血清P－selectinはCPB終了直後において前値より低下、CPB終了後3時間において前値より上昇し、P群ではC群に比し、CPB終了直後は有意に高値（P群：179.3±23.9、C群：154.3±27.1ng／mL、$p<0.05$）、CPB終了3時間後では有意に低値（P群：216.2±32.9、C群：304.6±42.8ng／mL、$p<0.01$）であった。IL－6、IL－8は経時的に上昇し、CPB終了直後（IL－6；P群：56.2±11.8、C群：80.2±15.6pg／mL、$p<0.01$、IL－8；P群：2.49±0.68、C群：4.61±0.88ng／mL、$p<0.01$）・終了3時間後（IL－6；P群：164.9±42.2、C群：307.1±78.7pg／mL、$p<0.01$、IL－8；P群：8.07±1.97、C群：16.99±2.79ng／mL、$p<0.01$）の双方においてP群でC群に比し、その上昇が有意に抑制された。NOの動態に関して、血中NOは終了3時間後においてP群でC群に比し有意に低値（P群：39.1±3.9、C群；53.3±5.4、$p<0.01$）であった。%NO_2－TyrはCPB前測定感度以下であったが、経時的に上昇し、CPB終了直後（P群：0.37±0.06、C群：0.55±0.09%、$p<0.05$）・終了3時間後（P群：0.88±0.14、C群：1.41±0.27%、$p<0.01$）の双方においてP群でC群に比し、その上昇が有意に抑制された。呼気NOはCPB終了直後において前値より低下、終了3時間後においては前値より上昇し、P群でC群に比しCPB終了直後は有意に高値（P群：8.45±1.09、C群：6.84±0.82ppb、$p<0.01$）、CPB終了3時間後では有意に低値（P群：11.60±1.14、C群：14.98±2.24ppb、$p<0.01$）であった。RIはIL－6・IL－8と同様に経時的に上昇し、CPB終了直後（P群：0.61±0.13、C群：0.91±0.17、$p<0.01$）・終了3時間後（P群：0.94±0.17、C群：1.54±0.21、$p<0.01$）の双方においてP群でC群に比し、その上昇が有意に抑制され、CPB終了直後において呼気NO濃度と有意な相関関係を認めた（P群：$r=0.78$、$p<0.01$、C群：$r=0.81$、$p<0.01$）。肺組織染色ではP群において、P－selectinの発現及び好中球の接着（P群：0.8±0.3／alveoli、C群：4.5±0.4／alveoli、$p<0.01$）が抑制された。

【総括】

1．血清P－selectinの濃度はCPB前値に比し、CPB終了直後に低下し、CPB終了3時間後に上昇した。抗ラットP－selectin抗体をCPB開始前に回路充填液に投与することにより、その上昇が有意に抑制され、また肺組織におけるP－selectinの発現および好中球の接着が抑制された。

2．炎症性cytokineであるIL－6・IL－8、肺障害の指標であるRespiratory Index（RI）はCPB後経時的に上昇し、抗ラットP－selectin抗体投与によりその上昇が抑制された。

3．CPBにより血中NOおよび$ONOO^-$産生は経時的に亢進し、呼気NO濃度はCPB前値に比し、CPB終了直後に低下し、CPB終了3時間後に上昇した。抗ラットP－selectin抗体投与により血中NOおよび$ONOO^-$産生が抑制され、呼気NO濃度はCPB終了直後の低下、CPB終了3時間後の上昇が有意に抑制された。またCPB終了直後の呼気NO濃度は、RIと有意な相関関係を認めた。

4．以上より、CPBにより惹起される炎症反応にP－selectinが関与すること、P－selectinを介する炎症の進展がNOおよび$ONOO^-$の変動に関与すること、P－selectin monoclonal antibodyをCPBにおいて使用することにより、その炎症反応を軽減する可能性があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

これまでの体外循環により惹起される炎症反応のメカニズムの解明及びその制御に関する研究報告は、その最終的な炎症性mediatorの制御を目的としており、より有効な生体侵襲の軽減には炎症反応進展の初期の段階での制御が必要不可欠であると考えられる。一方、各種炎症反応におけるnitric oxide（NO）の動態に関しては現在もなお未知の部分が多く、体外循環におけるNOの動態についても未だ一定の見解が得られていない。本研究では、炎症反応の初期における好中球を介する炎症のinitiatorであるP－selectinに着目し、ラット体外循環モデルにおいて抗P－selectin monoclonal抗体を体外循環回路充填液中に前投与することにより、その抗炎症効果について検討した。その結果として、血管内皮細胞におけるP－selectinの発現・好中球の接着および炎症性サイトカインの放出が抑制され、体外循環後の肺障害が軽減された。また抗P－selectin monoclonal抗体による炎症反応の抑制により、体外循

環後の血中NOおよびperoxynitriteの増加が抑制された。以上より、P－selectinが体外循環により惹起される炎症反応の進展に関与すること、このP－selectinを介する炎症反応の進展が体外循環におけるNOおよびperoxynitriteの変動に関与することを示唆した本研究は極めて独創的であり、今後、当該分野の研究の発展や臨床応用に寄与するであろうことが予想されるのみならず、他領域におけるNOに関する研究においても興味のある発表と考えられる。以上より、本研究を学位に値するものと認める。