



Title	Activated Polymorphonuclear Leukocytes Enhance Production of Leukocyte Microparticles with Increased Adhesion Molecules in Patients with Sepsis
Author(s)	藤見, 聡
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44699
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	藤 見 聡
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 18020 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 4 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Activated Polymorphonuclear Leukocytes Enhance Production of Leukocyte Microparticles with Increased Adhesion Molecules in Patients with Sepsis (sepsis 患者の活性化された多核白血球は、接着因子の強く発現している白血球由来のマイクロパーティクル産生を亢進する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 杉 本 壽 (副査) 教 授 真 下 節 教 授 金 倉 譲

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

近年、多核白血球 (PMNL) が活性化された膜成分を有する小胞 (マイクロパーティクル) を産生することが発見され注目されている。in vitro では、PMNL のマイクロパーティクルが血管内皮を有意に活性化することが報告されている。しかし侵襲時の生体反応におけるマイクロパーティクルの役割は不明である。本研究の目的は、sepsis 患者におけるマイクロパーティクルの動態を明らかにし、sepsis の病態におけるマイクロパーティクルの役割を検討することである。

〔対象と方法〕

sepsis の診断基準を満たし、かつ血清 C reactive protein (CRP) が 10 mg/dL 以上の重症 sepsis 患者 21 名と健康人 21 名を対象とした。①ヘパリン下採血後比重遠心法で分離後、細胞膜標識である PKH26 と多核白血球にのみ存在する CD 抗原である CD16b に対するモノクローナル抗体を加え、フローサイトメーターで PMNL マイクロパーティクルを解析した。PMNL に比べ side scatter (SSC) 値、forward scatter (FS) 値の小さい集団が PKH26 と CD16b のダブルポジティブであったことより、PMNL 由来のマイクロパーティクルとして定量評価した。この際、白血球走化性ペプチドである formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) の刺激の有無によりマイクロパーティクル産生を測定した。測定は PMNL 10000 個あたりのマイクロパーティクルの数をカウントし、%PMNL で表示した。② 1.0 μ m の標準ビーズを用いて、マイクロパーティクルの大きさを 1.0 μ m 以上と 1.0 μ m 未満に分け、各々のマイクロパーティクル表面上の接着因子 (CD11b) 発現をフローサイトメーターにて測定した。③多核白血球機能として、多核白血球の活性酸素産生能を FMLP 刺激の有無により、フローサイトメーターで測定した。④血管内皮細胞障害の指標である、血清 E-セ렉チン、トロンボモジュリンと多核白血球のプロテアーゼ産生能として血漿好中球エラスターゼも判定した。⑤PC 標識 PKH26、FITC 標識抗 CD16b モノクローナル抗体を用い、蛍光顕微鏡にて PMNL マイクロパーティクルを観察した。統計処理は、t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

〔結果〕

①無刺激状態でのマイクロパーティクル産生は、健康人において 7.1 ± 1.2 (%PMNL)、sepsis 患者において 10.8

±3.4 (%PMNL)、FMLP 刺激状態でのマイクロパーティクル産生は健常人において 8.4 ± 1.8 (%PMNL)、sepsis 患者において 17.7 ± 8.0 (%PMNL) であり、いずれにおいても、sepsis 患者のマイクロパーティクル産生は、健常人に比して有意に増加していた。②大きさが $1.01 \mu\text{m}$ 未満のマイクロパーティクル上の CD11b 発現は、健常人において 168.4 ± 13.7 (mean fluorescence/cell)、sepsis 患者において 192.4 ± 22.4 (mean fluorescence/cell) であり、sepsis 患者において有意に増加していた。大きさが $1.0 \mu\text{m}$ 以上のマイクロパーティクル上の CD11b 発現は、両者に有意差は認められなかった。③活性酸素産生能は、FMLP 刺激の有無に関わらず sepsis 患者において有意に増加していた。④血中の E-セ렉チン、トロンボモジュリン、好中球エラスターゼは sepsis 患者において増加していた。⑤蛍光顕微鏡下でマイクロパーティクル産生の実像をとらえる事に成功した。以上より sepsis 患者において活性化された多核白血球はマイクロパーティクルの産生を亢進し、CD11b 発現の増強している $1.0 \mu\text{m}$ 未満のマイクロパーティクルは、血管内皮細胞と接着して活性化する可能性が推測された。

〔総括〕

1. 白血球マイクロパーティクルをフローサイトメトリー法にて測定した。
2. sepsis 患者において、活性化された多核白血球からのマイクロパーティクル産生は亢進していた。
3. sepsis 患者において、産生された $1.0 \mu\text{m}$ 未満のマイクロパーティクル表面には、CD11b の発現が亢進していた。
4. sepsis 患者において、白血球由来のマイクロパーティクルは接着因子の発現を介して、血管内皮細胞の活性化や白血球-血管内皮細胞連関に新たな一役を担う可能性が示唆された。

以上、本研究は侵襲時に PMNL によるとされてきた急性臓器障害の発生機序について、重大な変更を迫るものである。

論文審査の結果の要旨

近年 *in vitro* において多核白血球から産生される膜成分を有する小胞であるマイクロパーティクルが血管内皮細胞を有意に活性化することが報告されている。本研究は侵襲時の急性臓器障害発生機序における多核白血球由来のマイクロパーティクルの関与を検討したものである。侵襲として重症外傷と sepsis の患者を対象とした。侵襲時の患者において多核白血球マイクロパーティクル産生が有意に増加している事を明らかにするとともに、産生されたマイクロパーティクル表面の接着因子発現が亢進していることを示した。よって生体内でも多核白血球由来のマイクロパーティクルは、接着因子の発現を介して血管内皮細胞の活性化や白血球-血管内皮細胞連関に関与する可能性を示した。本研究は侵襲時に多核白血球によるとされてきた急性臓器障害の発生機序について、重大な変更を迫るものであり、本論文は学位の授与に値するものと認める。