

マウス炎症性反応における血液成分の変動

多項目自動血球計数装置用動物解析ユニット SFVU-1 を用いた解析

岡田 清孝, 上嶋 繁, 松尾 理

近畿大学医学部第二生理学：大阪府大阪狭山市大野東377-2（〒589-8511）

SUMMARY

細菌性毒素エンドトキシン（Lipopolysaccharide; LPS）刺激による炎症性細胞の挙動と血液凝固・線溶系の変動との関係についてマウスの系で検討した。LPSはマウスに対して、凝固活性の亢進と線溶活性の低下及び血小板の局所組織への動員を起こさせることから各組織での血栓形成傾向を生じさせ、さらに炎症性細胞の誘導を引き起こさせた。このLPS刺激のような種々の実験動物モデルにおいて、それぞれの現象を解析する際に、多項目自動血球計数装置用動物解析ユニットSFVU-1は、血球成分の変動を測定解析するのに非常に有用であることが示唆された。

Key Words 多項目自動血球計数装置用動物解析ユニット, SFVU-1, エンドトキシン, 血液凝固系, 血液線溶系, 炎症性細胞

はじめに

グラム陰性細菌による重症感染症では、その菌が産生するエンドトキシン（Lipopolysaccharide; LPS）によって播種性血管内凝固（DIC）及び敗血症性ショックが引き起こされる¹⁾。敗血症性ショックの主因は、微小血管内凝固とその後の多臓器不全である。また、播種性に生じる血管内の微小血栓形成は、LPSにより広範囲の血管内皮細胞が刺激・障害されて生じる。LPSの動物投与は敗血症モデルとして利用されている。LPSにより誘起された炎症反応では、主として免疫担当細胞からインターロイキン等の種々の因子が放出され、それらの因子が凝固・線溶系因子などの発現に影響を与えられ²⁾。その影響は、凝固系において活性化系の増強と抑制系の低下を、線溶系において活性化系の低下とその

抑制系の増加を生じるとされている。その結果として、凝固活性の増加及び線溶活性の低下を生じ、各組織でフィブリン形成が生じる³⁾（**図1**）。

そこで、マウスでのLPSによる炎症性細胞の挙動と凝固・線溶系の変動との関係について検討した。マウスの血球細胞の測定にはフローサイトメトリー法を基本として動物用に開発された多項目自動血球計数装置用動物解析ユニットSFVU-1（以下SFVU-1、シスメックス（株））を用いた。

材料及び方法

マウスはC57BL/6Jの雄6～8週令を用いた。LPS（*Escherichia coli* serotype 0111: B4; シグマ）をマウス腹腔内に50 μ g（2.0mg/kg）投与し、各時点で採血と

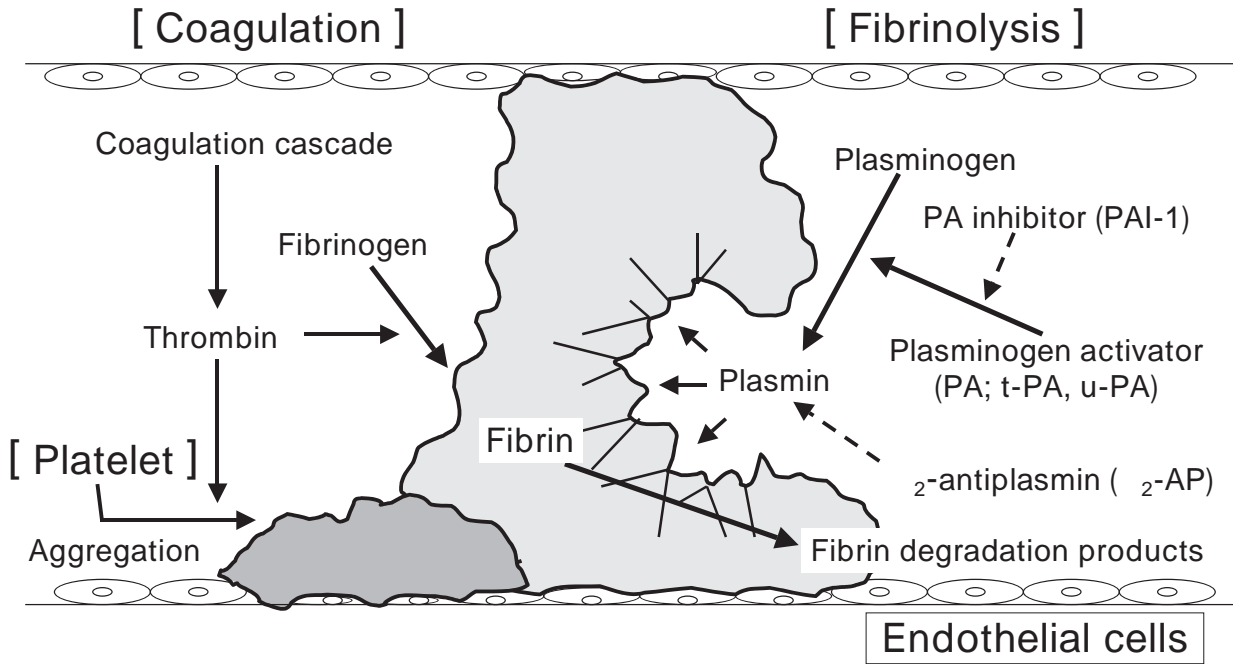


図1 . 止血機構

組織を採取した。各組織は、組織切片解析用として10%ホルマリン固定保存、遺伝子及び蛋白発現用として液体窒素固定後に - 80℃ 保存した。血球分布はSFVU-1と、ライト・ギムザ染色法による血液塗抹標本で計測した。血漿中の線溶活性と plasminogen activator (PA) 活性は血漿の酸処理によりユーグロブリン分画とした後、それぞれフィブリンプレート法⁴⁾とフィブリンザイモグラフィー法⁵⁾で測定した。また、血漿 PA inhibitor-type 1 (PAI-1) 活性はリバースフィブリンザイモグラフィー法⁶⁾で検討した。各マウスの腎臓または肝臓中の凝固・線溶系因子 [tissue factor (TF), PAI-1, urokinase-type PA (u-PA), 2-antiplasmin (2-AP)] の遺伝子発現は、それぞれの組織から抽出した total RNA に対して、³²P 標識した各因子の cDNA fragment probe を用いてノーザンプロット法で検討した。各因子の mRNA 発現量は、画像解析装置 (LAS 1000; FUJI) で測定し、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) で補正した。腎臓におけるフィブリン沈着の出現は、フィブリノーゲンに対する抗体を用いた免疫組織染色で検討した。

結 果

LPS 投与によるマウスの血球数の変化を SFVU-1 で測定した。図2はLPS投与前と3, 24及び72時間後の血液スキャタグラムを示す。リンパ球を主とする白血球数は未処置マウス(0時間)に比べ、LPS投与後3時間で顕著に低下し、24時間で好中球が主に増加し、72時間後に未処置マウスとほぼ同様の血球分布を示した。C57BL/6マウス(6~8週令の雄)の白血球数は、 $5,220 \pm 710/\mu\text{L}$ であったが、LPS投与により3時間をピークに低下し、その後増加し72時間後で回復した(図3)。また、白血球のうち好中球の割合は、LPS投与8時間後より増加し24時間で最大になり(投与前 $9.5 \pm 2.05\%$ に対し24時間後 $32.1 \pm 5.35\%$)、その後減少し72時間で元に戻った(図3)。また、血小板数は、 $821,000 \pm 132,000/\mu\text{L}$ であったがLPS投与によって3時間~3日後に $332,000 \pm 73,000/\mu\text{L}$ まで低下しその後増加回復した(図4)。これに対して、赤血球数はLPSの影響を受けなかった(図4)。このSFVU-1で測定したLPS投与後の白血球の変化について、血液塗抹標本と比較

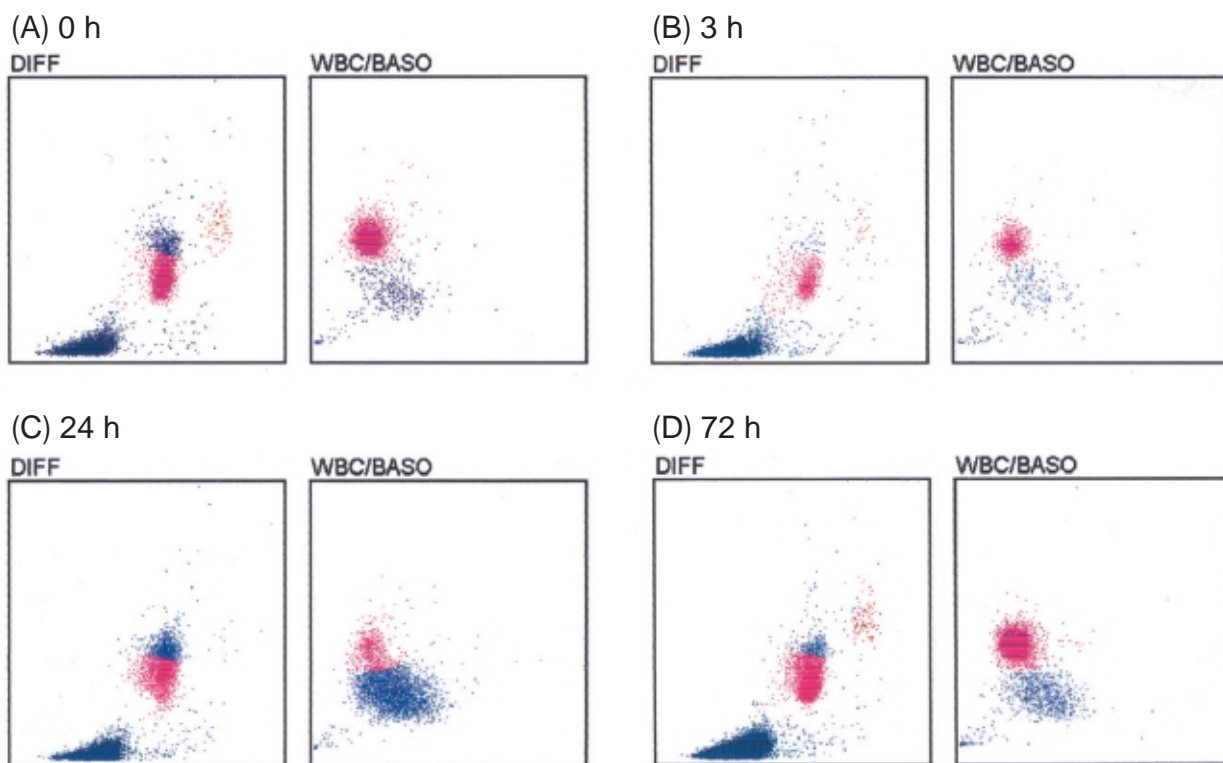


図2 . LPS 投与によるマウス血液スキャタグラムの変化
血液スキャタグラムはLPS 投与前 (0 h), 投与後 (3 h, 24 h, 72 h) の血液検体

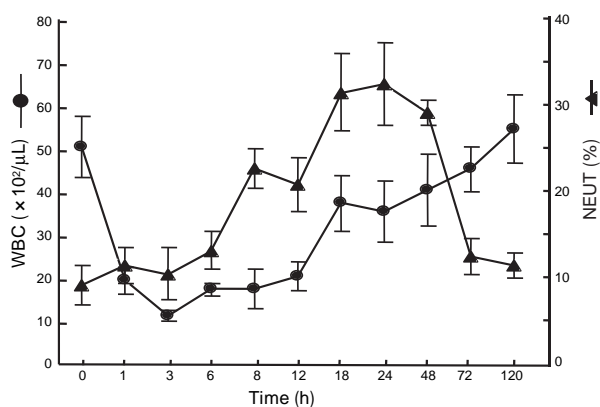


図3 . LPS 投与によるマウス白血球数と好中球の変化
好中球 (NEUT) は総白血球数中の割合 (%) を示す。
Mean \pm SD, n=3-5

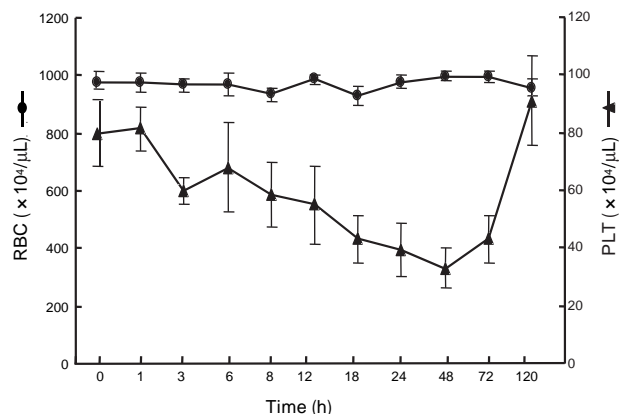


図4 . LPS 投与によるマウス赤血球数 (RBC) と血小板数 (PLT) の変化
Mean \pm SD, n=3-5

検討した。各時間の血液塗抹標本の染色像は、SFVU-1で得られた血液スキャタグラムでの白血球分布と類似していた(図5)。

LPS投与後の血漿中の線溶活性を、図6に示す。血漿中のPA活性は、フィブリンザイモグラフィ法で測定した(図6A)。マウス血漿中のPAは、70kDaのt-PAと42kDaのu-PAが存在していた。LPS投与によって血漿中のu-PA活性は3時間をピークに低下し、その後回復した。これに対し、血漿中のt-PA活性はLPSの影響を受けず、変化しなかった。また、血漿中のPAI活性はリバースフィブリンザイモグラフィ法で検討した(図6B)。マウス血漿中のPAI活性は、LPS投与後6時間をピークに45kDaのPAI-1の増加として示され、その後消失した。血漿中の全体的な線溶活性は、フィブリンプレート法により測

定した。その結果、血漿中の全体的な線溶活性は、LPS投与によって3時間をピークに低下し、その後回復した。ノーザンブロット法によるLPS投与後の腎臓における凝固・線溶系蛋白のmRNA発現を表1に示す。凝固系活性化因子であるTFと線溶系抑制因子であるPAI-1のmRNA量は、LPS投与によりそれぞれ3時間と8時間を最大に増加し、その後低下した。これに対し、線溶系の活性化因子であるu-PA mRNA量は、3時間後を最大に低下しその後回復した。また、定常状態の腎臓で発現している α_2 -APのmRNA量に対してLPS投与は影響を示さなかった。LPS投与後のマウス腎臓についてフィブリン沈着の出現を免疫組織染色法で検討した。その結果、フィブリン沈着はLPS投与後4~8時間をピークに出現し、24時間後に消失していた。

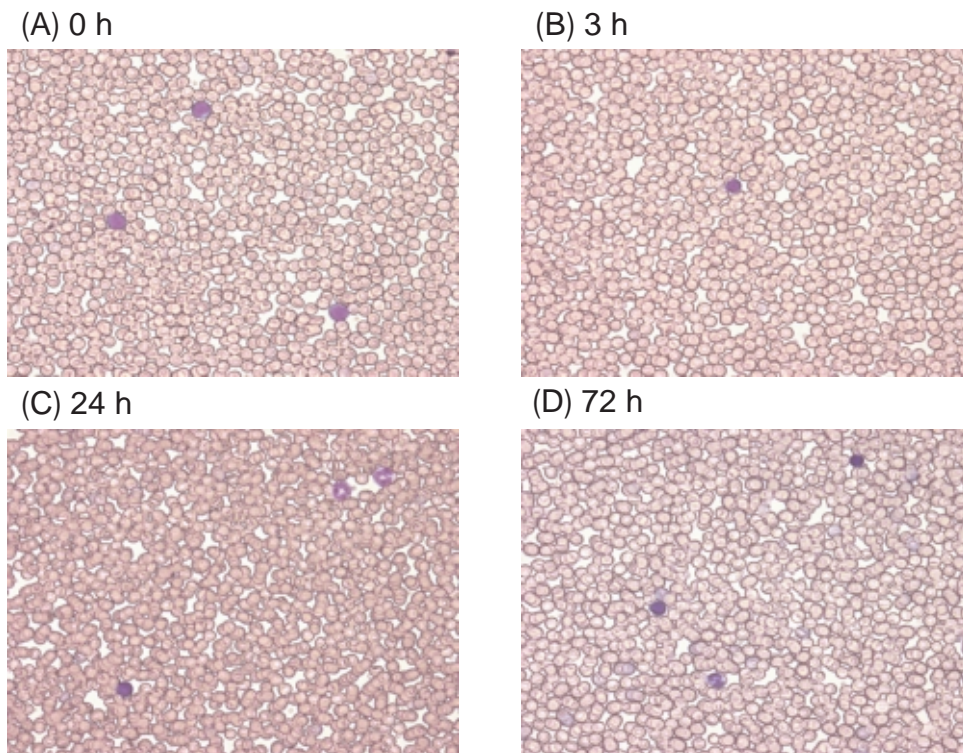
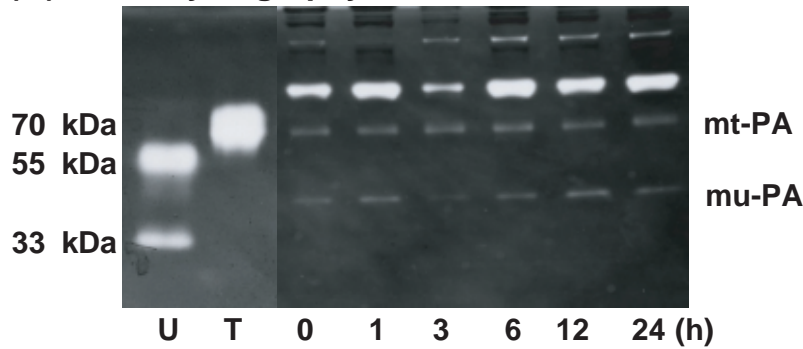


図5. LPS投与によるマウス血液塗抹標本のライト・ギムザ染色像の変化
塗抹標本はLPS投与前(0h)、投与後(3h, 24h, 72h)の血液検体

(A) Fibrin zymography



(B) Reverse fibrin zymography

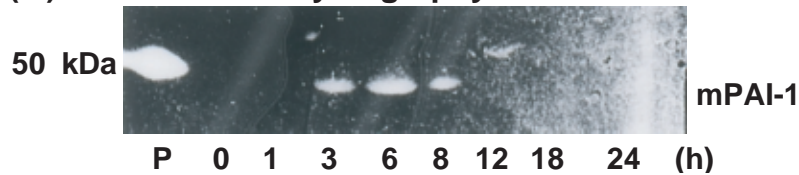


図6. LPS投与による血漿中の線溶系因子の活性変動
 (A): フィブリンゼイモグラフィー法による血漿中のPA活性。検体は、LPS投与前(0 h)、投与後(1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h)の血液のユウグロブリン分画。U;ヒトu-PA(55kDa, 33kDa), T;ヒトt-PA(70kDa), mt-PA;マウスt-PA(70kDa), mu-PA;マウスu-PA(42kDa)。
 (B): リバースフィブリンゼイモグラフィー法による血漿中のPAI活性。検体は、LPS投与前(0 h)、投与後(1 h, 3 h, 6 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h)の血液。P;ヒトPAI-1(50kDa), mPAI-1;マウスPAI-1(45kDa)。

表1 . LPS投与による腎臓中の凝固・線溶系因子の遺伝子発現

mRNA	0 h	1 h	3 h	6 h	8 h	12 h	24 h	48 h
TF	1.0	2.1	2.8	3.5	4.0	2.2	1.7	1.55
PAI-1	1.0	1.3	55.2	8.0	35.0	10.2	5.1	4.3
u-PA	100.0	90.3	12.0	55.8	105.2	101.5	102.4	102.2
α_2 -AP	100.0	95.5	108.5	102.1	97.3	108.5	103.3	113.5

各 mRNA の発現はノーザンブロット法を用いて測定した。各 mRNA の発現量は、GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) の発現量で補正し、TF (tissue factor) と PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) mRNA は投与前 (0 h) を 1.0 として、また、u-PA (urokinase-type plasminogen activator) と α_2 -AP (α_2 -antiplasmin) mRNA は投与前 (0 h) を 100 として、それぞれの発現量を投与前 (0 h) と比較表示した。

考 察

マウスに対する LPS 投与後の炎症性細胞の挙動と凝固・線溶系の変動との関係について検討した。LPS 投与マウスでは、一時的な末梢血液中の白血球数の低下とそれに少し遅れて好中球の増加が見られた(図2, 図3)。また、血漿中及び腎臓中では、一時的な凝固活性の増加及び線溶活性の低下が生じた(図6, 表1), 腎臓中でフィブリン沈着が見られた。

LPS 投与マウスでの一時的な末梢血液中の白血球

数の低下と好中球の増加は、マウス体内への LPS の侵入に対する防御反応の一つとして、各組織への炎症性細胞の誘導が引き起こされたと考えられる。また、白血球は LPS 刺激により各組織周囲の毛細血管細静脈領域の血管内皮細胞に接着することが報告されている⁷⁾。さらに、LPS は微小循環障害の初期段階に活性化好中球の誘導に関与していると考えられる。

また、LPS 投与マウスでは末梢血中の血小板の低下を生じた。これは LPS 刺激により障害を受けた血

管内皮細胞上で血小板凝集を伴う血栓形成により、消費されたものと考えられる。LPS投与のラットでは、各組織への血小板の取り込みについて5-hydroxytryptamine (5-HT)のマーカーを用いた結果が報告されている⁸⁾。LPS投与後末梢血液中の血小板数及び5-HTの低下に相関して、各組織内の5-HTの増加が示された。

LPS投与マウスでの組織中のフィブリン沈着は、凝固活性の増加及び線溶活性の低下によると考えられる³⁾。凝固系因子では腎臓中でTFの発現増加が見られた(表1)。このTFの発現は、通常発現していない腎皮質の尿細管上皮細胞で生じていると考えられる。また、LPSは、トロンビンの制御蛋白として血管内皮細胞上に存在しているトロンボモジュリンの発現を低下させることが報告されている⁹⁾。線溶系因子では、腎臓中でPAI-1の発現増加とu-PAの発現低下が見られた(表1)。PAI-1の発現は、腎全実質の血管内皮細胞で生じていると考えられる。また、LPS投与前から発現しているu-PAは、腎髄質での発現が低下すると考えられる。しかし、LPS投与後の肝臓では、腎臓で見られた顕著なフィブリン沈着像を認めなかった。これは、LPSによって肝臓でもPAI-1発現が増加したが、TFの顕著な発現増加が見られず、さらにLPSによる発現減少の標的であるu-PAが通常から発現していないことに起因すると考えられる。これらのLPS刺激後の腎臓と肝臓での凝固・線溶系因子の発現の相違が、フィブリン沈着の出現の有無に関与すると考えられる。また、腎臓中の α_2 -AP mRNA量の発現はLPS投与の影響を示さなかった(表1)。しかし、著者らは α_2 -APの遺伝子欠損マウスでLPSによる腎臓でのフィブリン沈着が対照マウスに比べて軽減したことを報告している¹⁰⁾。これらの結果から、 α_2 -APは腎臓中での線溶活性を制御していることが示唆される。

これらのLPS刺激により変動した凝固・線溶系因子は、LPSの直接的反応または他の系を介した間接的反応の両者が考えられる。すなわち、LPSによる血管内皮細胞の直接的刺激によってPAI-1発現が増加することが報告されている。一方、LPSによって誘導された炎症性細胞はTNF- α を放出し、このTNF- α による血管内皮細胞からのPAI-1発現を引き起こすことも報

告されている²⁾。また、LPSは炎症性細胞からIL-6を放出され、プラスミノゲン遺伝子のプロモータ領域に存在するIL-6 responsive elements (CTGGG/AA)を介してプラスミノゲンの発現を増加させることが知られている¹¹⁾。しかし、マウス α_2 -AP遺伝子のプロモータ領域にもIL-6 responsive elementsが存在するが¹²⁾、IL-6の直接投与¹³⁾や今回のLPS投与の結果では、その発現変動が見られなかった。

マウスやラットに対するLPS投与は、敗血症のモデルとして汎用されている。このモデルは敗血症の発症機序やそれに対する薬剤の開発などへの使用だけでなく、LPSの多細胞・多因子への影響を解析するのにも応用されている。このように、動物を用いた実験では、それぞれの組織や因子の変化を追跡するとともに、血液成分の変動についても検討が必要である。動物モデルでの血液の血球成分の変動を解析する場合、今回使用した動物用の多項目自動血球計数装置用動物解析ユニットSFVU-1は、少量の血液(約170 μ L)を用いた測定が可能であり、方法は簡単・迅速で、その結果は血液塗抹標本とも良い相関性を示し、データの再現性も優れており、非常に有用である。

結 語

LPSは凝固活性の亢進と線溶活性の低下や血小板の局所組織への動員から各組織での血栓形成傾向を生じ、さらに炎症性細胞を誘導すると考えられる。このような種々の動物モデルにおけるそれぞれの現象を解析する際、多項目自動血球計数装置用動物解析ユニットSFVU-1は、血球成分の変動の測定に有用である。

謝 辞

この研究の一部は、近畿大学医学部におけるハイテクリサーチの助成で行われた。

参考文献

- 1) Coalson JJ : Pathology of sepsis, septic shock, and multiple organ failure. In Perspective on Sepsis and Septic Shock. Anonymous Society of Critical Care Med. CA, 27 ~ 59, 1986.
- 2) Feams C, Loskutoff DJ : Induction of plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in murine liver by lipopolysaccharide. Cellular localization and role of endogenous tumor necrosis factor- . Am J Pathol, 150 : 579 ~ 590, 1997.
- 3) Yamamoto K, Loskutoff DJ : Fibrin deposition in tissues from endotoxin-treated mice correlates with decreases in the expression of urokinase-type but not tissue-type plasminogen activator. J Clin Invest, 97 : 2440 ~ 2451, 1996.
- 4) Okada K, et al.: Purification and characterization of a plasma factor which cleaves single-chain form of t-PA and u-PA. Thromb Res, 57 : 27 ~ 43, 1990.
- 5) Matsuo O, et al.: Plasminogen activator in bronchoalveolar fluid. Haemostasis, 16 : 43 ~ 50, 1986.
- 6) Loskutoff DJ, et al.: Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. Proc Natl Acad Sci, 80 : 2956 ~ 2960, 1983.
- 7) McCuskey RS : Hepatic microvascular responses to endotoxemia and sepsis. Prog Appl Microcirc, 19 : 76 ~ 84, 1993.
- 8) Endo Y, Nakamura M : The effect of lipopolysaccharide, interleukin-1 and tumour necrosis factor on the hepatic accumulation of 5-hydroxytryptamine and platelets in the mouse. Br J Pharmacol, 105 : 613 ~ 619, 1992.
- 9) Moore KL, et al.: Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium *in vitro*. J Clin Invest, 79 : 124 ~ 130, 1987.
- 10) Lijnen HR, et al.: α_2 -Antiplasmin gene deficiency in mice is associated with enhanced fibrinolytic potential without overt bleeding. Blood, 93 : 2274 ~ 2281, 1999.
- 11) Bannach FG, et al.: Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression. J Biol Chem, 274 : 38579 ~ 38588, 2002.
- 12) Okada K, et al.: Characterization and targeting of the murine α_2 -antiplasmin gene. Thromb Haemost, 78 : 1104 ~ 1110, 1997.
- 13) Okada K, et al.: Regulation of plasminogen and α_2 -antiplasmin gene expression in the mouse liver and kidney by LPS stimulation. Thromb Haemost CD abstract, 2734, 2001.

Variations of Blood Components in Mouse Inflammatory Reactions Analysis Using the Automated Hematology Analyzer for Veterinary Use, SFVU-1

Kiyotaka OKADA, Shigeru UESHIMA, and Osamu MATSUO

Department of Physiology, Kinki University School of Medicine,
377-2 Ohno-higashi, Osakasayama, Osaka 589-8511.

SUMMARY

We studied the relationship between inflammatory cell profiles stimulated by a bacterial toxin, endotoxin (Lipopolysaccharide; LPS), and variations in blood coagulation/fibrinolytic system factors in mice. Since LPS stimulates coagulation activity, decrease in fibrinolytic activity and mobilization of platelets to local tissues in mice, it tends to induce thrombogenesis in tissues, and to induce inflammatory cells. The results of the present study suggest that the automated hematology analyzer for veterinary use, SFVU-1 is very useful for determining and analyzing variations of blood components in various experimental animal models such as those with stimulation by LPS.

Key Words Automated Hematology Analyzer for Veterinary Use, SFVU-1, Endotoxin, Blood Coagulation System, Fibrinolytic System, Inflammatory Cells