

犬のエンドトキシンによる血球反応に於ける血漿成分の関与

Role of plasma components on endotoxin-induced blood cell reactions in dogs

土屋 亮

麻布大学獣医学部

Ryo Tsuchiya

School of Veterinary Medicine Azabu University

Abstract. Bacterial endotoxin induces transient activation of canine granulocyte in artificial mediums without plasma. The purpose of this research is assessing the effects of plasma components in the LPS induced granulocyte activation in dogs. Luminol amplified chemiluminescence assay was used to estimate the granulocyte activation. The transient activation of granulocyte described above was completely inhibited by adding plasma; however, irreversible activation was found with a lag time for approximately 3 minutes. The data indicate that plasma contains a factor that inhibits PAF induced granulocyte activation as well as another factor that induces granulocyte activation.

We hypothesized that the complement system plays a pivotal role in the irreversible activation of granulocyte induced by LPS. Anti-complement treated plasma did not induce the granulocyte activation by LPS stimulation and the result suggests that the hypothesis is correct.

The LPS induced granulocyte activation with plasma was strongly inhibited by co-incubation with canine platelets. Furthermore, co-incubation with human erythrocytes did inhibit the granulocyte activation also whereas co-incubation with canine erythrocytes and human platelets did not. It is known that primate's erythrocyte plays a scavenger role for activated complement by its complement receptor. The effect of canine platelet above suggest that platelet may play a scavenger role of activated complement in dogs.

1. 目的

グラム陰性桿菌の重度感染は全身性炎症反応を引き起こし、罹患動物はしばしば、播種性血管内凝固や急性呼吸器症候群など致死的な状態に陥る。この疾患の病態発現には、細菌の産生するエンドトキシン (LPS) に対する複雑な生体反応が関与すると考えられているが、その詳細については未解明な点が少なくない¹⁰⁾。小動物臨床に於いても、グラム陰性桿菌の重度感染症例にしばしば遭遇する事から、我々はこれまで、LPSに対する犬の生体反応について研究を行ってきた^{6, 13, 14)}。

LPSを犬に投与すると、顆粒球と血小板が肺に集まる事が古くから知られており、この反応は急性呼吸器症候群の発現と関連すると考えられている³⁾。我々は過去に於いて、このメカニズムを調べるため、血漿が存在しない *in vitro* 条件下でのLPS誘導性顆粒球活性化を、顆粒球が産生する活性酸素によるルミノール発光を指標として観察した。その結果、顆粒球は、後述するとおりLPS添加直後に強い一過性のルミノール発光を示した。そして、その反応には顆粒球の産生するリソリン脂質“血小板活性化因子 (PAF)”が関与する事、さらにはPAFが血小板の活性化をもたらす要因となっている事を確認した⁶⁾。

本研究では、LPS誘導性顆粒球活性化に於ける血漿成分（特に補体）の関与並びにそれに対する血小板の影響について調べた。

2. 方法

(1) サンプル調整方法

サンプル血液は、麻布大学生物科学総合研究所又は獣医臨床センター内で飼育した临床上健康な実験用ビーグル犬（雌雄ほぼ同数、2～13歳、体重7～13kg）から採取し、1/10量の3.8%クエン酸3Naで抗凝固処理を施した。この全血から2,000G・1分間の遠心により多血小板血漿（PRP）を分離した。残りの全血に、除去したPRPと同量の3%デキストラン加生理食塩水を加えて混和後、25分間静置して赤血球を沈澱させ、多白血球血漿を得た。この多白血球血漿から70%及び85%パーコール液を用いた密度勾配遠心により顆粒球を分離し⁸⁾、PBS（pH7.4）に約5,000個/ μ lの濃度で再浮遊させ、顆粒球活性化の評価用サンプルとした。

(2) 顆粒球活性化の評価法

上記の顆粒球浮遊液250 μ lにPBSを加えて総量750 μ lとし、1回分のサンプルとした。LPSは*E. Coli* O127:B8由来品を用い、顆粒球浮遊サンプルに最終濃度1mg/mlを添加した。顆粒球の活性化はルミノール発光反応により評価した（発光試験^{1,5)}。ルミノールは最終濃度5 μ Mとなるように添加し、発光強度はルミ・アグリゴメーター（米国クロノログ社 Model 550）を用いて測定した。

(3) 血漿成分の影響に関する検討

上記のLPS刺激に於けるPAFが関与する顆粒球発光反応⁶⁾には血漿成分が含まれておらず、生体内の環境と大きく異なっている。そこで、この反応に対する血漿成分の影響を観察した。血漿はクエン酸処理全血を2,000G・20分間遠心して採取し、これを顆粒球浮遊液250 μ lに同量添加した。以後の操作法は、上記の血漿不添加（PBS添加）の場合と同様に行った。

(4) 血漿に対する各種抗補体処理の効果検討

後述するとおり血漿の添加によって、PAFによる一過性の発光反応は消失したが、新たに非可逆的な発光反応を認めた。LPSは血漿中の補体を活性化させる事が知られており^{2,11)}、我々はこの顆粒球非可

逆反応に補体の活性化が関与していると考えた。それを確認するために、血漿に抗補体処理を施して同様の測定を行った。文献的に、抗補体物質にはコブラ毒素が最適とされているが、国内では入手出来なかったため、次の方法による各種抗補体処理を施した⁴⁾。

a. 加熱

56℃・5分間加熱して補体を失活させ、2,000G・15分間遠心後、上清を得た。

b. 脱カルシウム（Ca）処理

血漿に200mM EDTA-2Na液を最終濃度5mMになるように添加した。

c. ザイモサンA処理

ザイモサンA（ザイモサン）は補体経路のalternative pathwayを活性化し、更にそれを吸着する作用を持つ。そこで、ザイモサンを血漿と反応後、遠心して上清を得た。

(5) 補体依存性と思われる顆粒球反応に対する、血小板による抑制効果の検討

後述するとおり、血漿存在下に於けるLPS誘導顆粒球発光反応には補体が関与する事が唆された。犬の血小板には補体リセプターが存在すると考えられており、これがLPSによる活性化補体を除去すると考えた。それを確認するために、血漿存在下でのLPS誘導顆粒球発光試験に、血小板浮遊液を添加してその抑制効果を観察した。なお、血小板は、EDTA処理後洗浄し20～30 \times 10⁴個/ μ lに調整したもの250 μ lを、顆粒球浮遊液250 μ l及び血漿250 μ lと混和して、LPS刺激による顆粒球発光試験を行った。

3. 結果と考察

(1) LPS誘導顆粒球活性化に対する血漿成分の影響 (Fig. 1)

顆粒球浮遊液に同量の同一個体血漿を添加して、LPS刺激後のルミノール発光による受光器の電圧変化を観察し、結果をFig. 1に示した。前述の血漿無添加時にLPS刺激によって生じる一過性の顆粒球発光反応（破線）は、血漿添加によってほぼ完全に抑制され、やや遅れて非可逆的な発光が認められた（実線）。

LPSを事前に加えて37℃で10分間反応させた血

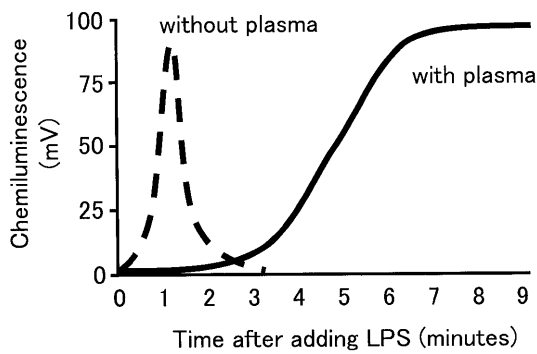


Fig. 1 Luminol amplified granulocyte chemiluminescence induced by LPS with and without plasma (n = 4). 1mg/ml LPS from *E. Coli* O127; B8 was added to 250 μ l of 5000 cells/ μ l granulocytes suspension with/without 250 μ l plasma. Final volume was adjusted up to 750 μ l with PBS, pH7.4.

漿を顆粒球浮遊液に添加した場合は、直ちに発光が始まり、その発光強度は上記の顆粒球浮遊液に血漿添加後LPS刺激を加えた場合と同程度であった（データは示さない）。すなわち、Fig. 1に実線で示したLPS添加から発光開始までのタイムラグは、顆粒球刺激作用を持つ何らかの血漿成分の反応に要する時間である事が確認された。

(2) 血漿に対する各種抗補体処理の効果 (Fig. 2)

加熱、EDTAによる脱Ca、ザイモサン処理のいずれの抗補体処理に於いても、LPS誘導性の発光反応は有意に抑制され、この発光は補体の活性化による事が強く示唆された。

なお、Fig. 2の右半分に示したとおり、ザイモサン処理血漿を顆粒球浮遊液に添加した場合、LPSを添加しなくとも発光反応が観察され、これにLPSを加える事で更に若干の発光増強を認めたが、その強度は、無処理血漿添加後LPS刺激を加えたコントロールより有意に低かった。又、ザイモサンとともにLPSを事前添加して反応させた血漿の遠心上清に於いては、加熱及びEDTA処理血漿を添加した場合と同程度まで強く発光が抑制された。

(3) 血小板による抑制効果 (Fig. 3 [A], [B])

次に、前述の補体が関与するLPS誘導性顆粒球活性化に対する血小板の影響を調べた。

顆粒球浮遊液に血漿とEDTA処理後洗浄血小板(500 ~ 750 $\times 10^6$ 個/250 μ l)を混和後、LPSを添加して発光反応を観察した。その結果、Fig. 3 [A]に実線で示したとおり、発光の開始時期と非可逆性パタ

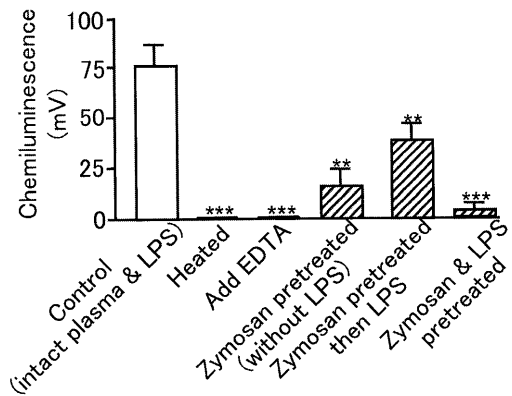


Fig. 2 Effects of plasma anti-complement treatments on LPS-induced granulocyte chemiluminescence (n = 4). Heated; 56 $^{\circ}$ C for 5 minutes. Add EDTA; 1/40 volume of 200mM EDTA-2Na was added (final concentration was 5 mM). Zymosan A pretreatment; plasma was preincubated with 1.56mg of boiled and washed zymosan A at 37 $^{\circ}$ C for 30 minutes and then zymosan A was removed by centrifugation. Finally, 250 μ l of the supernatant plasma was added to the granulocyte suspension before LPS stimulation. Significant inhibition: *** p < 0.001, ** 0.001 \leq p < 0.01 (same in the figures below).

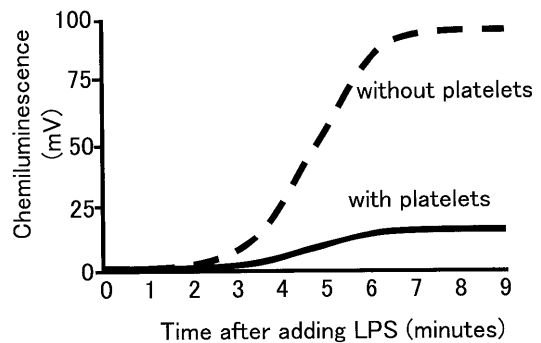


Fig. 3[A] Effect of co-incubation with platelets on LPS induced granulocyte chemiluminescence. 250 μ l of EDTA treated and washed platelet suspension (20-30 $\times 10^4$ / μ l) was added to the granulocyte suspension before LPS stimulation.

ーンはコントロール（破線）と同様であったが、その強度（電圧）はコントロールに比べ50%以下に低下した。

同様の反応を5頭の犬のサンプルについて実施したところ、血小板による発光抑制効果は統計的にも有意であり、又、LPSで事前処理する際に血小板を混和させた血漿を顆粒球に添加した場合も同様に、発光は有意に抑制された。

さらに、顆粒球浮遊液にザイモサン処理血漿を混和後にLPSを添加した時も、活性化補体により顆粒

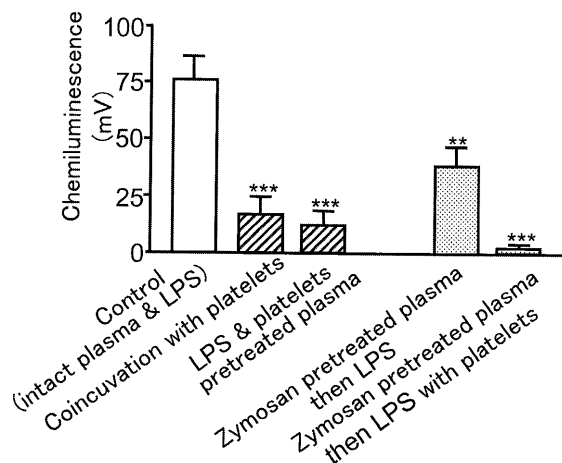


Fig. 3[B] Effects of co-incubation with platelets on LPS or zymosan A induced granulocyte chemiluminescence (n = 4).

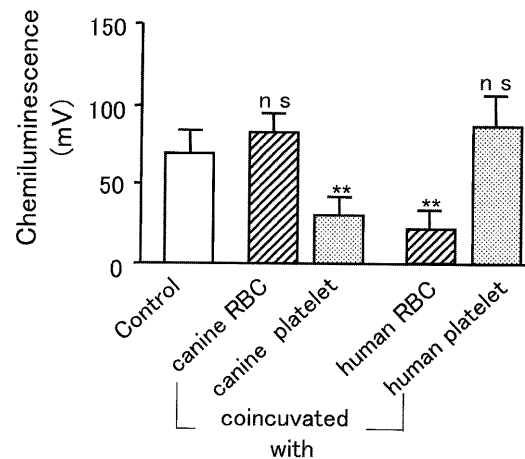


Fig. 4 Comparison of inhibitive effects on LPS induced canine granulocyte chemiluminescence between canine/human erythrocytes and platelets (n = 4). ns: not significant. Platelets and/or erythrocytes were similarly added as platelets in Fig. 3[A].

球反応が起きるが、これに血小板を混和した場合も、発光は抑制された (Fig. 3 [B])。

(4) 犬と人の血中活性化補体除去機序の比較 (Fig. 4)

上記のとおり犬に於いては、補体が関与する顆粒球活性化に対し、血小板が抑制する事が示唆された。その機序はおそらく、犬の血小板表面に存在すると推定されている補体第3因子リセプター (C3b-R) を介した活性化補体の結合除去によるものと考えられた。霊長類動物に於いては、C3b-R は赤血球表面に存在し、活性化補体の除去役を果していると言われている¹²⁾。又、補体によるこの反応は、結果的に血中のLPS除去にも介在する事が知られている⁹⁾。そこで、血漿存在下LPS誘導性顆粒球活性化に対する、犬と人の血小板と赤血球の影響を調べた。混和させる赤血球の数は、上記の血小板混和とほぼ同程度にした。その結果、Fig. 4に示したとおり、人では犬と対比的に赤血球が顆粒球活性化を抑制した。この事は、犬血小板によるLPS誘導顆粒球発光抑制効果が、活性化補体の血小板表面C3b-Rへの結合除去による事を裏付けた。

4. 要約

血漿を含まない人工培地に浮遊した犬の顆粒球にエンドトキシン (LPS) 刺激に加えると一過性に活性化が起きる。

本研究ではこの顆粒球反応に対する血漿成分の影響について調べた。血漿を顆粒球浮遊液に加え、

LPS刺激による顆粒球活性化をルミノール発光反応により観察したところ、血漿は上記の一過性顆粒球活性化を抑制し、数分後に非可逆的な活性化を起こした。

この非可逆的の反応がLPS刺激で活性化する血漿中補体によるものと推定し、その確認のために血漿に抗補体処理を施して同様の実験を行った。その結果、LPS刺激による顆粒球の非可逆的活性化反応は顕著に抑制され、この顆粒球反応は補体による可能性が強く示唆された。

血漿存在下でのLPS刺激の際に血小板を添加すると、顆粒球の活性化は顕著に抑制された。これはおそらく、犬の血小板表面に存在するであろうと言われる補体リセプターを介し活性化補体が除去された結果と考えられた。

さらに、LPS誘導による犬の顆粒球反応に人の赤血球を添加したところ、犬の血小板を添加した場合と同様に顆粒球活性化は有意に抑制された。犬の赤血球と人の血小板にはそのような作用は認められなかった。霊長類動物では赤血球表面に存在する補体C3bリセプターCR1が活性化補体の除去に重要な役割を果す事が知られており、この結果は、犬の血小板表面に補体リセプターがLPS刺激により活性化した補体を除去している可能性が高い事を裏付けた。

文 献

- 1) 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子. 1992. 活性酸素測定マニュアル, 講談社サイエンティフィック.
- 2) From, A.H., Gewurz, H., Gruninger, R.P., Pickering, R.J. and Spink, W.W. 1970. Complement in endotoxin shock: Effect of complement depletion on the early hypotensive phase. *Infect. Immunol.* 2: 38-41.
- 3) Gutmann, F.D., Murthy, V.S., Wojciechowski, M.T., Wurm, R.M. and Edzards, R.A. 1987. Transient pulmonary platelet sequestration during endotoxemia in dogs. *Circ. Shock.* 21: 185-95.
- 4) 近藤元治. 1980, 補体学入門, 南江堂.
- 5) McCapra, F. 2000. Demonstrations of chemiluminescence. *Methods in Enzymol.* 305: 633-659.
- 6) 大谷誠. 2003. 麻布大学獣医学部卒業論文.
- 7) Perlik, V., Li, Z., Goorha, S., Ballou, L.R. and Blatteis, C.M. 2005. LPS-activated complement, not LPS per se, triggers the early release of PGE2 by Kupffer cells. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R332-R339.
- 8) Pycock, J.F., Allen, W.D. and Morris, T.H. 1987. Rapid, single-step isolation of equine neutrophils on a discontinuous percoll density gradient. *Res. Vet. Sci.* 42: 411-412.
- 9) Quezado, Z.M., Hoffman, W.D., Winkelstein, J.A., Yatsiv, I., Koev, C.A., Cork, L.C., Elin, R.J., Eichacker, P.Q. and Natanson, C. 1994. The third component of complement protects against *Escherichia Coli* endotoxin-induced shock and multiple organ failure. *J. Exp. Med.* 179: 569-578.
- 10) 坂口修平. 2004. 敗血症性ショックモデルとしてのエンドトキシンの病態生理—酸化ストレスからのアプローチ—, 薬学雑誌 124: 69-87.
- 12) Shibazaki, M., Kawabata, Y., Yokochi, T., Nishida, A., Takada, H. and Endo, Y. 1999. Complement-dependent accumulation and degradation of platelets in the lung and liver induced by injection of lipopolysaccharides. *Infect. Immunol.* 67: 5186-5191.
- 13) Takemura, S., Deguchi, M., Ueda, M., Yoshida, N., Kato, H., Yoshikawa, T., Sugino, S. and Kondo, M. 1984. C3b receptor (CR1) on erythrocytes in various diseases. *Immunol. Lett.* 7: 325-328.
- 14) Tsuchiya, R., Kyotani, K., Scott, M.A., Nishizono, K., Ashida, Y., Mochizuki, T., Kitao, S., Yamada, T. and Kobayashi, K. 1999. Role of platelet activating factor in development of thrombocytopenia and neutropenia in dogs with endotoxemia. *Am. J. Vet. Res.* 60: 216-221.
- 15) 土屋亮, 京谷一末, 山田隆紹, 小林好作. 2007. 犬の実験的エンドトキシン血症における血清微量元素濃度の変動とデキサメサゾン投与による緩和効果, 日獣会誌 60: 510-514.