

## ●原 著

## ラット肺胞マクロファージに対する高気圧酸素被曝の影響

八塚秀彦\* 塩飽善友\* 小坂二度見\*

高気圧酸素被曝 (OHP) が、ラット肺胞マクロファージの免疫能に及ぼす影響を検討した。

動物実験用小型チェンバーで、1日1回、3ATA、2時間の純酸素によるOHPを連日行い、2、3、7、14日目に、肺胞洗浄によりマクロファージを回収した。肺胞マクロファージの免疫能は、化学発光能と遊走能で評価した。OHP 3日目、7日目、14日目に、活性酸素産生能の総合的な指標である化学発光能は有意に上昇し、遊走能もOHP 2日目、3日目、7日目に、有意ではないものの上昇傾向を示した。

3ATA、2時間の高気圧酸素被曝によって、ラットの肺胞マクロファージは活性化されることが明らかとなった。

キーワード：高気圧酸素、肺胞マクロファージ、化学発光能、遊走能

### Effect of Hyperbaric Oxygenation on Immunological Functions of Rat Alveolar Macrophages

Hidehiko Yatsuzuka, Yoshitomo Shiwaku, Futami Kosaka

Division of Hyperbaric Medicine, Okayama University Hospital, Japan

Rats were exposed to 100% oxygen at 3 ATA for two hours a day. On the second, third, seventh or fourteenth day, alveolar macrophages (AMP) were collected by bronchoalveolar lavage.

Immunological functions of alveolar macrophages were evaluated by chemiluminescence and chemotaxis. Chemiluminescence, which indicates the production of active oxygen by macrophages, increased significantly after three, seven and fourteen days exposure to OHP. Chemotaxis increased also but not significantly after two, three and seven days exposure.

These results indicate that the OHP (100% Oxygen, 3 ATA, 2 hours) enhanced the immunological activity of rat AMP. The present findings imply that the activation of AMP due to repeated OHP causes alveoli damages. (author's abstract)

### Keywords:

OHP  
Alveolar macrophage  
Chemiluminescence  
Chemotaxis

### はじめに

高濃度酸素吸入により、呼吸器障害が発生するが、障害発生の一因として、好中球から遊離される活性酸素による肺胞内皮の障害が報告されている<sup>1)~4)</sup>。さらに高濃度酸素は、肺胞マクロファージにも影響を与える<sup>5)6)</sup>。しかし、高気圧酸素被曝 (OHP) が肺の好中球や肺胞マクロファージの機能に影響を与えるという報告はない。

また、肺は生体が直接に外部環境と接する場所であり、高気圧酸素が肺胞マクロファージの生体防御能に与える影響を解明する必要がある。今回われわれは、3ATA、2時間の高気圧酸素被曝ラットの肺胞マクロファージに生ずる免疫能の変化を検討したので報告する。

### 対象および方法

実験には、体重200~300gのWistar系雄性ラットを用いた。

純酸素加圧は、われわれの施設で特注した動物

\*岡山大学医学部附属病院高気圧治療部

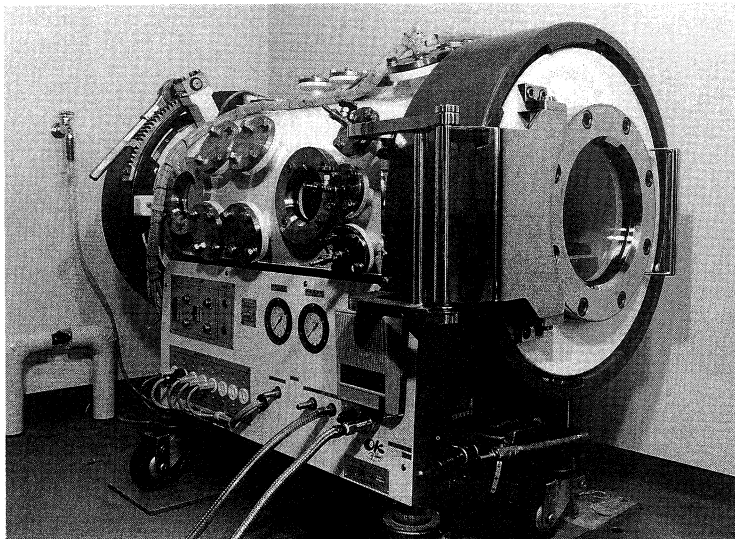


図1 動物実験用小型高压タンク  
(PHC-特型, タバイエスベック製)

実験用小型高压タンク, PHC-特型(タバイエスベック製)(図1)にて行った。チェンバーは鋼製の横型円筒形で, 内容積は約300Lあり, 酸素または圧縮空気を用いて手動制御で常用6ATAまで加圧可能である。

加圧は約10分かけて行い, 3ATAに達した後は, 毎分100L以上の酸素流量で100分間換気を行い, 約10分間で減圧した。

OHP群は, 4群に分け, 1日1回(3ATA, 2時間)のOHPを, 2, 3, 7, 14日間連日行った。各群ラットは8匹とし, 実験期間中は, OHP中も自由に摂食, 摂水させた。なお, ラットは3ATA, 2時間のOHPでは14日間まで全例生存した。また, 対照群はroom airで飼育した。

OHP群は実験終了後ただちにケタミン麻酔下に開腹し, 腹部大動脈より脱血した。対照群から採取した血液は, 後に述べるザイモザン粒子のオプソニン化に用いた。開腹と同時に気管切開を行い16ゲージのテフロン針を気管内に挿入し, 自発呼吸のもとに開胸し, 心肺を一塊に摘出した。摘出した肺のうち, 肉眼的に著明な浮腫, 出血, 感染などを認めないものを以下の実験対象とした。

肺胞マクロファージの調製はMcCarronらの方法に準じて<sup>7)~9)</sup>行なった(図2)。

摘出肺は, 37°Cの生理食塩水中で肺胞洗浄を行なった。一回の洗浄は, 0.25% EDTAを含む生理食塩水7~8mlを肺内に注入し, 肺をマッサー

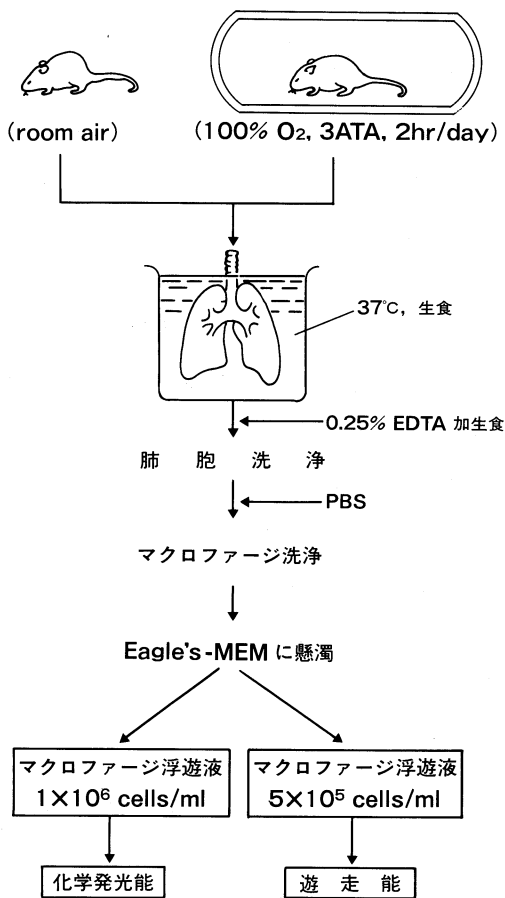


図2 肺胞マクロファージの調整および免疫能の測定

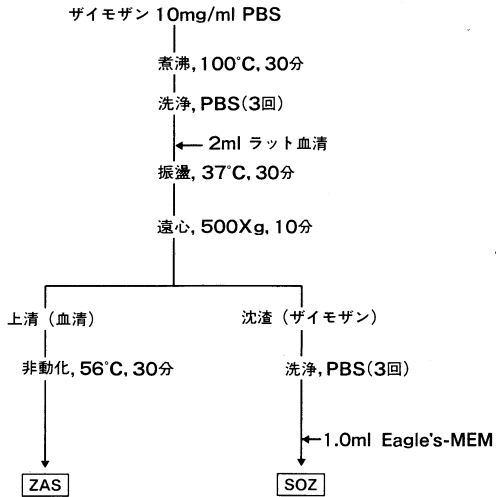


図3 オブソニン化ザイモザン (SOZ) および補体活性化血清 (ZAS) の調製

ジした後、洗浄液を回収した。一個体の肺につき約10回洗浄を繰り返し、回収した肺胞洗浄液を  $500 \times g$  で10分間遠心した。得られた細胞沈渣はリン酸バッファー (phosphate-buffered saline: PBS) で3回洗浄した後、Eagle's-MEM 培地(ニッスイ社製)に浮遊させた。回収した細胞の同定と細胞数の計算は、チュルク染色で行い、細胞の生存率は、トリパンブルーで染色されない細胞を生存細胞として計算した<sup>10)</sup>。

肺胞洗浄によって回収した細胞の90%以上はマクロファージであり、その生存率は80%以上であった。実験に用いる細胞浮遊液の細胞数は、生存細胞の数として  $1 \times 10^6$  個/ml, または  $5 \times 10^5$  個/ml となるように Eagle's-MEM で希釈調製した。以下この細胞浮遊液を肺胞マクロファージとして使用した。

肺胞マクロファージの免疫能は、化学発光能<sup>11)</sup>と、遊走能<sup>12)</sup>で評価した。

化学発光能測定には、ラット血清でオブソニン化したザイモザン粒子 (serum opsonized zymosan: SOZ と略) を用い、遊走能測定には、ザイモザン粒子で補体を活性化したラット血清 (zymosan activated serum: ZAS と略) を用いた。SOZ および ZAS は、以下の方法で調製した (図3)。

ザイモザン粒子 (ZYMOZAN A, SIGMA 社)

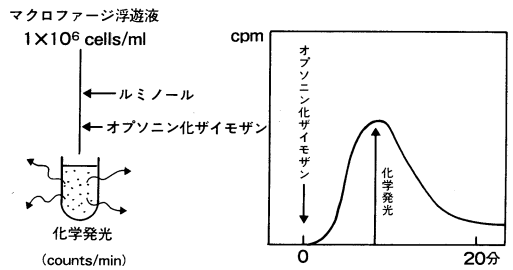
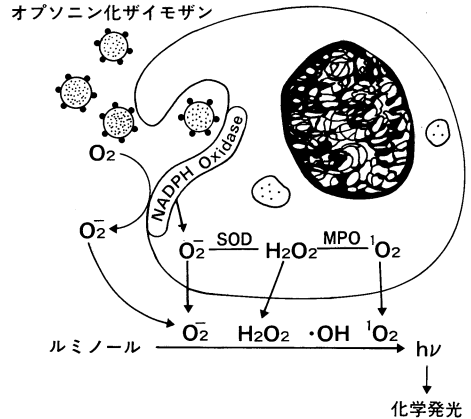


図4 マクロファージによるルミノール依存性化学発光能の測定方法  
SOD: Superoxide dismutase  
MPO: Myeloperoxidase

10mg に1ml の PBS を加えて、100°C で30分間煮沸した。このザイモザンを PBS で3回洗浄した後、2ml のラット血清を加え、37°C で30分間振盪し、ラット血清中の補体を活性化した。さらに  $500 \times g$  で10分間遠心を行い、血清とザイモザン粒子とに分離した。上清 (補体を活性化したラット血清: ZAS) は、56°C で30分間非動化した後、-80°C で保存し、使用時は Eagle's-MEM で2% に希釈した。一方、沈渣 (オブソニン化ザイモザン: SOZ) は、PBS で3回洗浄した後1ml の Eagle's-MEM に懸濁し、-80°C で保存し、測定時に融解して用いた<sup>13)</sup>。

化学発光能は、Lumiphotometer, TD4000 (LABO-SCIENCE 社製) を用い、マクロファージが SOZ を貪食する際に発する光をカウントし、そのピーク値 (counts/min: cpm と略) を測定した (図4)。肺胞マクロファージ浮遊液 ( $1 \times 10^6$  cells/ml) 100 $\mu$ l に1mM ルミノール液 (N/100 NaOH, pH9.0) 100 $\mu$ l を加え、さらに被貪食粒子

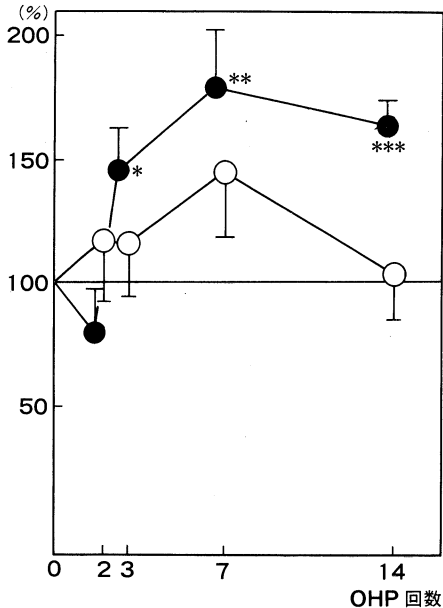


図5 ラット肺胞マクロファージの化学発光能(●)と遊走能(O)に対する高気圧酸素被曝(OHP)の影響  
各群はn=8, 数値はmean±SEMで示し, \*p<0.01, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.0005とした。

として, SOZ 100 $\mu$ lを加えた後, 37 $^{\circ}$ Cで反応させた。

遊走能の測定には, blind well chamber (Bio-Rad社製)を用いた。チェンバー下室に遊走因子として, ZAS 200 $\mu$ lを入れ, 遊走孔径5 $\mu$ mのケモタキシスメンブレン(Nuclepore社)を介し, 上室には肺胞マクロファージ浮遊液(5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml) 200 $\mu$ lを加えた。このチェンバーを, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% AirのCO<sub>2</sub>インキュベーター, MCO-165(三洋電気社製)内で90分間インキュベートした後, メンブレンを取り出した。メンブレンはメタノール固定, ギムザ染色の後, 400倍の拡大で検鏡し, メンブレン下面に完全に遊走したマクロファージの数を任意に5視野カウントし, その平均数を遊走能とした。

化学発光能, 遊走能ともに, 対照群(room air群)を100%とし, OHP群は対照群に対する変化率で表示した。有意差の検定は, Studentのt検定によった。

## 結 果

図5に示すように, ラット肺胞マクロファージの化学発光能は, 2日目(OHP 2回後)に一度減少するが有意でなく, 3日目, 7日目, 14日目には有意に増加した。遊走能は, 2日目, 3日目, 7日目と有意差はないが対照群に対して, いずれも増加傾向が認められた。また, 化学発光能, 遊走能ともに7日目に最高値を示した後, 14日目には化学発光能は依然増加していたが, 遊走能は対照値に復した。

## 考 察

マクロファージは, 生体防御に関して, 二つの大きな機能をもっている。一つはマクロファージ自体が食食, 殺菌を行う機能で, もう一つは, マクロファージがeffector cellとして, 好中球, リンパ球などのほかの細胞に作用して, その活性を調節する機能である<sup>14)</sup>。

今回は, とくにマクロファージ自身の食食, 殺菌能の指標である化学発光能と, 遊走能に関して実験を行った。

化学発光能, 遊走能ともに高気圧酸素被曝7日目にその最高値を示し, 14日目には化学発光能は, 有意の増加を保ち, 遊走能は再び対照値に復する傾向を示した。この結果から, 肺胞マクロファージの機能の一部, 特に活性酸素産生能の総合的な指標である化学発光能は, 高気圧酸素被曝によって活性化されることが明らかになった。

活性酸素産生能の増加は, 直接的に肺の組織障害につながる可能性がある。しかし, 肺胞マクロファージの活性酸素産生能は, 好中球に比べて, 数十分の一から数百分の一のオーダーであり<sup>15)</sup>, マクロファージ由来の活性酸素産生の増加が, ただちに肺の組織障害につながるとは考えにくい。Foxら<sup>16)</sup>は, 95% O<sub>2</sub>に曝露したラットの肺胞洗浄液は, 好中球の遊走能を著明に高めるという報告をしている。また, Hensonら<sup>17)</sup>は, コブラ毒によってウサギ血中の補体を活性化すると, 好中球が肺血管へ移動すること, 補体C5の分解産物を気道内へ注入すると, 好中球が肺胞内へ移動すること, さらにC5aの分解産物であるC5a des Argは, 肺胞マクロファージに作用して好中球に対する走化因子を産生させることなどを報告してい

る。

したがって高気圧酸素被曝によって活性化された肺胞マクロファージは、直接に肺組織を傷害するよりむしろ、effector cellとして好中球の遊走能を高め、その結果、好中球が肺に遊走し、活性酸素を産生し、肺の血管内皮細胞あるいは肺胞上皮細胞を障害する可能性が大きい<sup>18)19)</sup>。

高気圧酸素被曝が肺胞マクロファージの機能(活性酸素産生能、遊走能)を活性化するという本実験の結果は、平圧下、高濃度酸素吸入時のFox, Hensonらの報告<sup>16)17)</sup>とも一致する。

OHPによる肺障害のメカニズムや生体防御能への影響を明らかにする目的で、OHPによる肺胞マクロファージ自体の機能変化を調べた。さらにこの研究を進めるためには、好中球機能に及ぼす活性化肺胞マクロファージの影響、肺胞上皮細胞、繊維芽細胞、など各種細胞間の相互作用、あるいは補体の活性化を中心とした体液性因子との関連などの解明が必要である。

#### ま と め

- 1) Wistar系ラットを用いて、高気圧酸素被曝(100% O<sub>2</sub>, 3ATA, 2時間)が肺胞マクロファージに及ぼす効果を検討した。
- 2) 化学発光による活性酸素産生能は、OHP 3日目、7日目、14日目に有意に増加した。
- 3) 遊走能は、OHP 2日目、3日目、7日目、いずれも増加する傾向にあった。
- 4) 3ATA, 2時間の高気圧酸素被曝によって、ラットの肺胞マクロファージは、活性化された。

#### 〔参 考 文 献〕

- 1) Crapo, J.D., Barry, B.E., Foscue, H.A. and Shelburne, J.: Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am. Rev. Respir. Dis.* 122: 123-143, 1980.
- 2) Freeman, B.A. and Crapo, J.D.: Biology of disease. *Lab. Invest.* 47: 412-426, 1982.
- 3) Repine, J.E., Bowman, C.M. and Tate, R.M.: Neutrophils and lung edema. *Chest* 81: 47S-50S, 1982.
- 4) Dabis, W.B., Rennard, S.I., Bitterman, P.B. and Crystal, R.G.: Pulmonary oxygen toxicity. *N. Engl. J. Med.* 309: 878-883, 1983.
- 5) Jacquet, B. and Gougerot-Pocidallo, M.A.: Functional activities of alveolar macrophages in rat exposed to hyperoxia (normobaric O<sub>2</sub>). *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 134C: 93-104, 1983.
- 6) Wolff, L.J., Boxer, L.A., Allen, J.M. and Baehner, R.L.: The selective effect of hyperoxia on the guinea pig alveolar macrophage membrane. *J. Reticuloendothel. Soc.* 24: 377-382, 1978.
- 7) McCarron, R.M., Goroff, D.K., Luhr, J.E., Murphy, M.A. and Herscovitz, H.B.: Methods for the collection of peritoneal and alveolar macrophages. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds., *Methods in Enzymology*, 108, New York, Academic Press, 1984, P.274-284
- 8) Maxwell, K.W., Dietz, T. and Marcus, S.: An in situ method for harvesting guinea pig alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* 89: 579-580, 1964.
- 9) Brain, J.D. and Frank, R.: Alveolar macrophage adhesion: wash electrolyte composition and free cell yield. *J. Appl. Physiol.* 34: 75-80, 1973.
- 10) Oren, R., Farnham, A.E., Saito, K., Milofsky, E. and Karnovsky, M.L.: Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. *J. Cell Biol.* 17: 487-501, 1963.
- 11) 中野稔: 発光化合物を用いる顆粒球、マクロファージの酸化種生成能の測定法. *炎症*. 5: 277-284, 1985.
- 12) 上田啓司, 前田省三, 神原武: マクロファージ chemotaxis の in vitro 測定法. *日本免疫学会編, 免疫実験操作法*, 東京, 日本免疫学会, 1975, 1365-1369.
- 13) Walker, E.B., Van Epps, D.E. and Warner, N.L.: Macrophage chemiluminescence., Herscovitz, H.B., Holden, H.T., Bellanti, J.A. and Ghaffar, A., eds., *Manual of macrophage methodology (Immunology series; 13)* New York, Marcel Dekker, Inc., 1981, p.389-397.
- 14) Nathan, C.F., Murray, H.W. and Cohn, Z.A.: The macrophage as an effector cell. *N. Engl. J. Med.* 303: 622-626, 1980.
- 15) 八塚秀彦: 未発表
- 16) Fox, R.B., Hoidal, J.R., Brown, D.M. and Repine, J.E.: Pulmonary inflammation due to oxygen toxicity: Involvement of chemotactic factors and polymorphonuclear leucocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123: 521-523, 1981.
- 17) Henson, P.M., McCarthy, K., Larsen, G.L., Webster, R.O., Giclas, P.C., Dreisin, R.B., King, T.E. and Shaw, J.O.: Complement fragments, alveolar macrophages, and alveolitis.

Am. J.Pathol. 97:93-110, 1979.

- 18) Harada, R.N., Bowman, C.M., Fox, R.B. and Repine, J.E.: Alveolar macrophage secretions. Chest 81:52S-54S, 1982.
- 19) Repine, J.E.: Neutrophils, oxygen radicals,

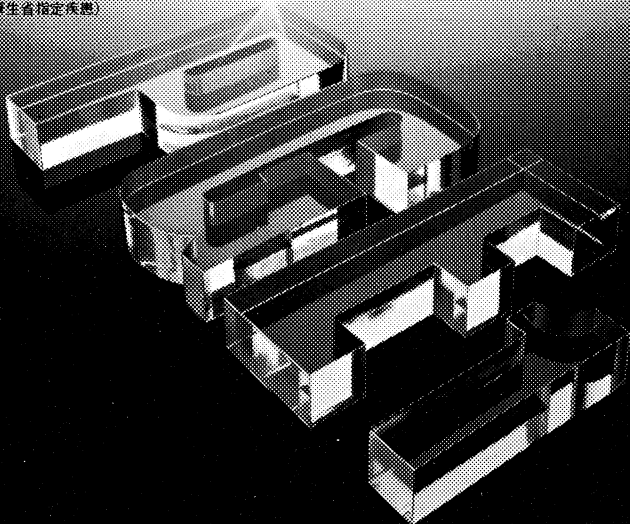
and acute pulmonary edema. Zapol, W.M. and Fake, K.J., eds., Acute respiratory failure, New York, Marcel Dekker, Inc., 1985, p.347-377.

循環器系のプロスタグランジン

# 難病に曙光!!

## パーシャール病、閉塞性動脈硬化症の新しい治療薬

(厚生省指定疾患)



プロスタグランジンE<sub>1</sub>製剤

注射用 **プロスタンディン**  
**PROSTANDIN for Inj.**

薬価基準  
緊急収載

**組成** 1管中、アルプロスタジル20 $\mu$ gを含有。

**作用** 1.末梢血管拡張作用 2.血小板凝集抑制作用 3.潰瘍形成阻止作用 4.抗ショック作用 5.脳血管攣縮抑制作用 6.脂肪異化抑制作用

**適応症** 下記疾患における四肢潰瘍・壊死ならびに安静時疼痛の改善。慢性動脈閉塞症(パーシャール病、閉塞性動脈硬化症)

**用法・用量** 1.通常成人1日量アルプロスタジルとして10 $\mu$ g~15 $\mu$ g(およそ0.1ng~0.15ng/kg/分)を生理食塩液5mlに溶かし、インフュージョンポンプを用い持続的に動脈内へ注射投与する。2.症状により0.05ng~0.2ng/kg/分の間で適宜増減する。

**使用上の注意**

1.次の患者には慎重に投与すること。1)心不全の患者(心筋収縮力の低下を起すことがある)。2)緑内障、眼圧亢進のある患者(眼圧を亢進させる作用がある)。2.副作用 1)注入肢 鈍痛 疼痛、腫脹、発熱、ときに発赤、脱力感、痒痒があらわれることがある。2)その他 ときに頭痛があらわれることがある。また血漿蛋白分画の変動などの臨床検査成績に異常がみられることがある。3.適用上の注意 1)本剤投与により、注入肢に鈍痛・疼痛、腫脹、発熱、発赤等の症状があらわれることがあるので、このような症状があらわれた場合には、すみやかに投与速度を遅くすること。2)インフュージョンポンプ使用に際しては、バッグあるいはシリンジ内に気泡が混入しないように注意すること。3)アンプルカット時にガラス微小片の混入を避けるため、カットする前にエタノール綿等で清拭すること。 **保険薬価** 1管(20 $\mu$ g) 3,611.00(54.9.27収載)



**小野薬品工業株式会社**  
 大阪市東区道修町2丁目14