

一般演題6 O6-02

In vitro CD40L評価系の構築と HBO による効果の検討

○河野圭将^{1,2)} 都留雅史³⁾ 山口 喬⁴⁾ 川嶋眞之⁴⁾
 右田平八^{2,3)} 宮本朋幸^{2,3)} 吉武重徳²⁾ 渡辺 渡^{2,3)}

[1) 独立行政法人地域医療機能推進機構 南海医療センター
 2) 九州医療科学大学大学院保健医療学研究科
 3) 九州医療科学大学生命医科学部
 4) 社会医療法人玄真堂 川嶋整形外科病院]

【緒言】

高気圧酸素治療 (hyperbaric oxygen therapy : HBO) は様々な炎症性疾患の治療に用いられている。我々は川嶋整形外科病院との共同研究で、HBO による炎症性疾患に対する治療効果の客観的指標を見出すことを目的として、患者血清中のサイトカインの変動を調べる研究を行っている。そのなかで、昨年の日本高気圧潜水医学にて HBO により骨髄炎患者血清中の sCD40L が顕著に減少していることを報告した。このメカニズムを明らかにするために、本研究では培養細胞を用いた CD40L 評価系を構築し、HBO の効果を検討した。

【材料と方法】

(1) 培養上清中の sCD40L の検出

培養細胞は Molt-4 細胞など 4 種類の細胞を用いた。培養細胞にマイトジエンなど各種試薬を添加し活性化させ、3~4 日間培養後に培養上清を回収した。その後、特異的 ELISA キットを用いて sCD40L の定量を行った。

(2) フローサイトメトリー (flow cytometry : FCM) による細胞表面の CD40L の検出

培養細胞は MT-4 細胞などの 3 種類の細胞を用いた。フローサイトメーターは BD FACSAria III (ベクトン・ディッキンソン社) を用いた。培養細胞に抗 CD40L 抗体を反応させたのち、FITC 標識された二次抗体を反応させ、FCM を用いて細胞表面の CD40L 発現を確認した。

(3) 細胞表面に発現した CD40L に対する HBO の効果

培養細胞は MT-4 細胞を用いた。HBO は実験用装置 (P-5100, パロテックハニウェル社) を用いて 2.4ATA, 100% O₂ で 1 時間行うことを experimental HBO (eHBO) とした。MT-4 細胞の入った培養フラスコごと eHBO を実施し、対照は同時に室温で静置した。その後、(2) と同様に CD40L 発現強度を測定した。

【結果】

- (1) 4 種類の培養細胞を用いた実験では培養上清中の sCD40L の検出系は構築できなかった。
- (2) MT-4 細胞においてはフローサイトメトリーを用いて

細胞表面に発現した CD40L を検出することができ、CD40L 評価系を構築することができた。Molt-4 細胞および THP-1 細胞では細胞表面に発現した CD40L を検出することができなかった。

- (3) 細胞表面に発現した CD40L に対する HBO の効果を検討したところ、HBO により対照と比較して細胞表面上の CD40L 発現量が多かった (Fig.1)。

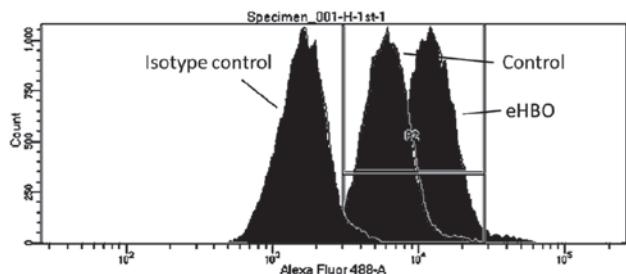


Fig.1 : Effect of eHBO on the CD40L expressed of cell surface of MT-4 cells

【考察】

HBO による sCD40L が減少する現象は、CD40L の産生が抑制されるためであると予想していた。しかし、今回の実験では逆の結果が得られた。HBO は、膜結合型の CD40L 分子を安定させることにより、可溶性 CD40L 分子の産生を抑制している可能性が示された。これは、可溶性分子の産生に関わる切断酵素の一種に対して HBO が効果を発揮している可能性があると考えられ、今後さらなる検討を実施していきたい。