

---

マウスの皮膚血管透過性を用いた敗血症性  
ショック予防薬開発のための基礎的研究

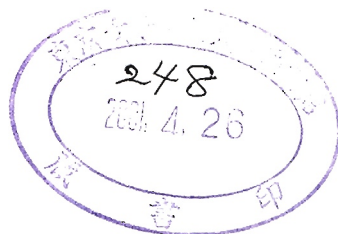
---

研究課題番号：11672279

平成11年度科学研究費補助金 基盤研究 (C) (2)  
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 藤井恵美子  
(東京女子医科大学・医学部・助教授)



## はしがき

グラム陰性菌由来内毒素（エンドトキシン、LPS）は、種々のメディエーターを産生、遊離し、発熱、炎症さらにショックの原因となる。我々は、LPSによる血管透過性亢進作用は、一酸化窒素（NO）、プロスタグランジン（PG）サイトカインを介して生じることを明らかにした。グラム陽性菌由来のリポタイコ酸（LTA）も、LPSと極めて類似した病態を生じるが、生体におけるLTAの作用機序に関しては報告がない。本研究では先づ、LTAとLPSによる急性炎症のメカニズムの相違を調べた。更に、我々は、少量のLPS前処置でその後に投与したLPSやLPS以外の他の炎症メディエーターによる血管透過性亢進が抑制され（トレランス）、トレランス発現には副腎皮質ホルモン、サイトカイン（TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ ）、NOが直接関与することを明らかにしたので、本研究では、LTA少量前投与によってもLTAに対するトレランスが生じるかどうかを調べ、敗血症性ショックにおけるLTA、LPSの予防的役割を比較した。

## 研究組織

研究代表者：藤井恵美子（東京女子医科大学・医学部・助教授）

研究分担者：入江かをる（東京女子医科大学・医学部・助手）

## 研究経費

平成11年度	1200千円
平成12年度	1200千円
計	2400千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Emiko FUJII, Keiji WADA, Kaoru IRIE, Toshimasa YOSHIOKA & Takamura MURAKI  
Role of various inflammatory mediators in lipopolysaccharide (LPS)-induced increase in vascular permeability studied in mouse skins.  
Inflamm. Res. 46 Suppl 3 S252, 1997
2. 藤井恵美子・村木 篁  
エンドトキシンおよびリポタイコ酸によるマウス皮膚炎症反応の比較  
臨床薬理 29(1, 2): 137-138, 1998
3. Emiko FUJII, Toshimasa YOSHIOKA, Keiji WADA, Hiroyasu ISHIDA, Kaoru IRIE & Takamura MURAKI  
Microvascular permeability change induced by platelet-activating factor is impaired in diabetic mice.  
Microvas. Res. 58(1): 74-78, 1999
4. Emiko FUJII, Keiji WADA, Hiroyasu ISHIDA, Toshimasa YOSHIOKA & Takamura MURAKI  
Role of endogenous nitric oxide in the nitric oxide donor-induced plasma extravasation of mouse skin.  
Eur. J. Pharmacol. 377(2/3): 219-222, 1999
5. Toshimasa YOSHIOKA, Emiko FUJII, Masahiko ENDO, Keiji WADA, Yukiko TOKUNAGA, Naomasa SHIBA, Hiroshi HOHSHO, Hirotaka SHIBUYA & Takamura MURAKI  
Antiinflammatory potency of dehydrocurdione, a zedoary-derived sesquiterpene.  
Inflamm. Res. 47(12): 476-481, 1998
6. Emiko FUJII, Toshimasa YOSHIOKA, Hiroyasu ISHIDA, Kaoru IRIE & Takamura MURAKI  
Evaluation of iNOS-dependent and independent mechanisms of the microvascular permeability change induced by lipopolysaccharide.  
Br. J. Pharmacol. 130(1): 90-94, 2000

7. Keiji WADA, Emiko FUJII, Hiroyasu ISHIDA, Toshimasa YOSHIOKA & Takamura MURAKI  
Effect of lipoteichoic acid on dermal vascular permeability in mice.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 294(1): 280-286, 2000
8. Hiroyasu ISHIDA, Emiko FUJII, Kaoru IRIE, Toshimasa YOSHIOKA, Takamura MURAKI & Ryou OGAWA  
Role of inflammatory mediators in lipid A analog (ONO-4007)-induced vascular permeability change in mouse skin.  
Br. J. Pharmacol. 130(6): 1235-1240, 2000
9. Kaoru IRIE, Toshimasa YOSHIOKA, Ai NAKAI, Kumiko OCHIAI & Takamura MURAKI  
A Ca<sup>2+</sup> channel blocker-like effect of dehydrocurdione on rodent intestinal and vascular smooth muscle.  
Eur. J. Pharmacol. 403(3): 235-242, 2000

## (2) 口頭発表

1. 村木 篁・入江かをる・落合久美子・中井 愛・蓬生博史・藤井恵美子・吉岡俊正  
ガジュツに含有されるセスキテルペン、デヒドロクルジオンのカルシウム拮抗薬様平滑筋抑制作用  
第72回 日本薬理学会年会 1999.3.24 Jpn. J. Pharmacol. 79 (Suppl I): 269P, 1999
2. 石田浩康・藤井恵美子・入江かをる・吉岡俊正・村木 篁  
ONO-4007 (Lipid A analog) によるマウス皮膚血管透過性亢進作用における各種炎症メディエーターの役割  
第100回 日本薬理学会関東部会 1999.6.5 日薬理誌 114 (4): 58P, 1999
3. 石田浩康・藤井恵美子・入江かをる・吉岡俊正・村木 篁  
LPS 誘発マウス皮膚血管透過性亢進作用に対する lipid A アナログ前投与の保護的効果  
第102回 日本薬理学会関東部会 2000.6.10 日薬理誌 116 (4): 64P, 2000

4. 入江かをる・石田浩康・藤井恵美子・錦織知弘・吉岡俊正・村木 篁  
LPS によるトレランス誘導の iNOS 欠損マウスにおける検討  
第21回 日本炎症学会 2000.7.4 炎症 20 (4): 466, 2000
5. 菅沼太陽・入江かをる・藤井恵美子・吉岡俊正・村木 篁  
LPS 血管透過性亢進作用の熱ショックによる抑制  
第103回 日本薬理学会関東部会 2000.11.2
6. 菅沼太陽・入江かをる・塚原富士子・吉岡俊正・村木 篁・藤井恵美子  
熱ショックによる LPS 血管透過性亢進作用の抑制  
第6回 日本エンドトキシン研究会 2000.11.24 抄録集 p56
7. 入江かをる・和田圭司・菅沼太陽・藤井恵美子・吉岡俊正・村木 篁  
腫瘍壊死因子 (TNF) - $\alpha$  遊離に対するリポポリサッカライド (LPS) およびリポ  
タイコ酸 (LTA) の in vivo および in vitro における効果  
第74回 日本薬理学会年会 2001.3.21-23
8. 菅沼太陽・入江かをる・藤井恵美子・吉岡俊正・村木 篁  
熱暴露による LPS 血管透過性亢進作用の抑制  
第74回 日本薬理学会年会 2001.3.21-23

### (3) 出版物

1. Kaoru IRIE, Fujiko TSUKAHARA, Emiko FUJII, Yoko UCHIDA, Toshimasa YOSHIOKA, Wen-Rong HE, Miki SHITASHIGE, Sei-itsu MUROTA & Takamura MURAKI  
Induction of cationic amino acid transporter-2 mRNA by tumor necrosis factor- $\alpha$  is associated with nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells.  
[The Biology of Nitric Oxide Pt 6] (Moncada S et al. eds) pp350-196, Portland Press, London, 1998

## 研究成果：

### 方法

#### 1. 動物

ddY系5週令雄性マウスを購入後、恒温恒湿下（ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 5\%$ ）、6：00－20：00時照明の条件下、固型飼料と水を自由に摂取させて飼育し、9－10週令を実験に供した。

#### 2. マウス皮膚血管透過性測定法

ポントアミンスカイブルー（PSB）50 mg/kgの尾静脈内投与5分後にLPS（ネズミチフス菌由来）またはLTA（黄色ブドウ球菌由来）をそれぞれ0.1 ml/site背部皮下に投与し、2時間後に頸椎脱臼により屠殺し、投与部位の背部皮膚を切り出し細切後、色素をアセトンで抽出し比色定量した。トレランスに関する実験では、LPS少量腹腔内投与またはLTA少量静脈内投与の4時間後にLPSまたはLTAによる色素漏出量を測定した。

#### 3. 血中コルチコステロン量測定法

LPS（0.15 mg/kg, i.p.）またはLTA（0.2 mg/kg, i.v.）投与4時間後の13：00時に断頭採血し、血清中コルチコステロン量をRIA kitで測定した。

## 成績

### 1) LTA による色素漏出量の経時的变化

LTA (200  $\mu\text{g}/\text{site}$ ) を背部に皮下投与すると、投与後60-180分に色素漏出量の著しい増加がみられた(図1)。以後の実験ではLTA投与後120分に色素漏出量を測定した。

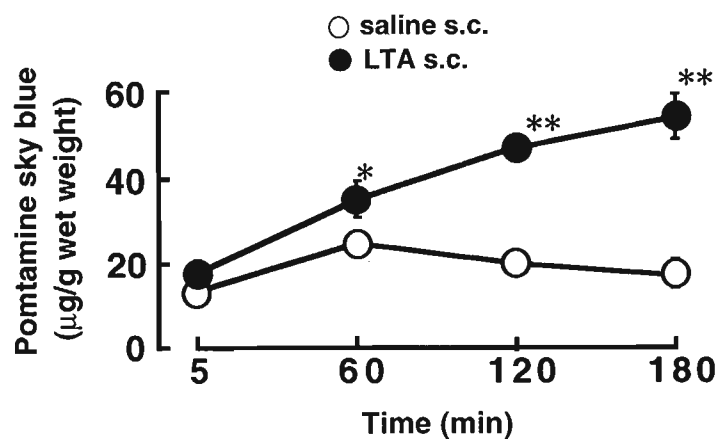


図1. LTA (200  $\mu\text{g}/\text{site}$ ) 皮下投与による色素漏出量の経時的变化  
縦軸：色素漏出量、横軸：LTA 皮下投与後の時間経過  
\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs. saline

2) LTA による血管透過性亢進作用に対するエイコサノイドの関与  
 インドメタシンは LTA による色素漏出量を 40%抑制し、その抑制作用は PGE<sub>2</sub> 投与で部分的に回復した (図 2 A)。しかし、LTA の作用は NS-398 (COX-2 選択的) による影響を受けなかった (図 2 B)。これらの結果から、LTA による血管透過性亢進作用には PG は関与するが、COX-2 は殆んど関与しないことが明らかとなった。

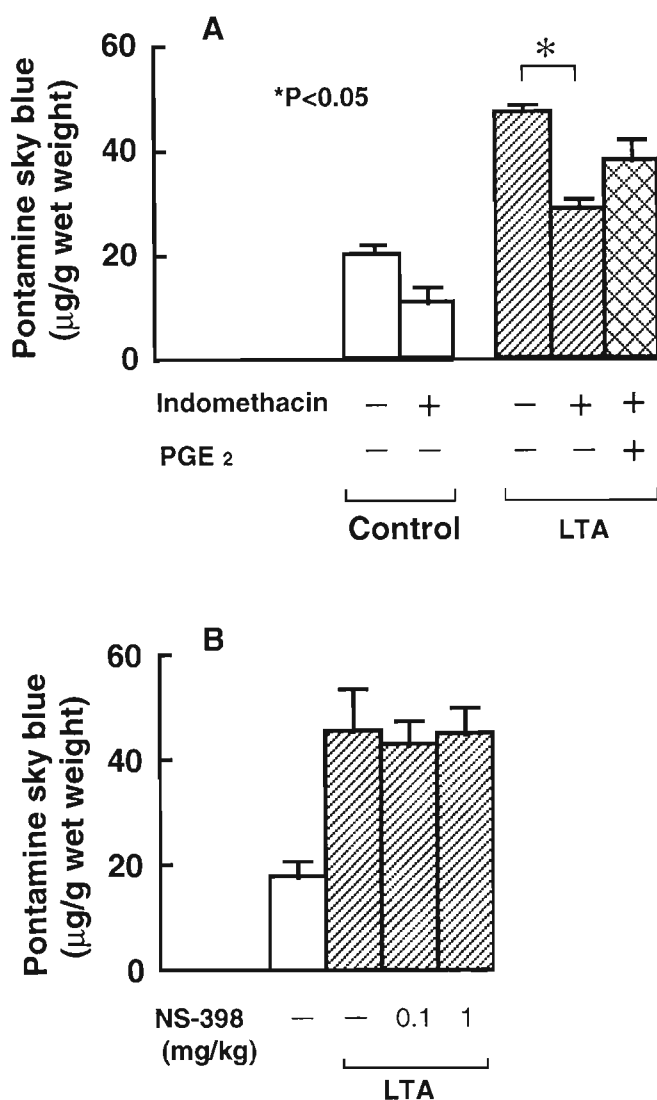


図 2. LTA による血管透過性亢進作用に対するエイコサノイドの関与  
 A : COX 阻害薬 (インドメタシン 5mg/kg) は LTA (200 µg/site) 皮下投与と 35 分前に腹腔内投与。LTA 単独または LTA および PGE<sub>2</sub> (3 nmol/site) を同時皮下投与し、2 時間後に色素漏出量を測定。  
 B : COX-2 選択的阻害薬 (NS-398 0.1, 1 mg/kg) を LTA (200 µg/site) 皮下投与と 35 分前に腹腔内投与。LTA 投与 2 時間後に色素漏出量を測定。



3) LTA および LPS による血管透過性亢進作用に対するヒスタミンの関与  
 ジフェンヒドラミン (H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬) は、用量依存的に LTA および LPS による色素漏出量の増加を抑制した。ラニチジン (H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬) またはチオペラミド (H<sub>3</sub> 受容体拮抗薬) は、LTA および LPS による色素漏出量増加を抑制しなかった (図 3)。これらの結果から、LTA による血管透過性亢進作用には、LPS の場合と同様 H<sub>1</sub> 受容体が関与することが明らかとなった。

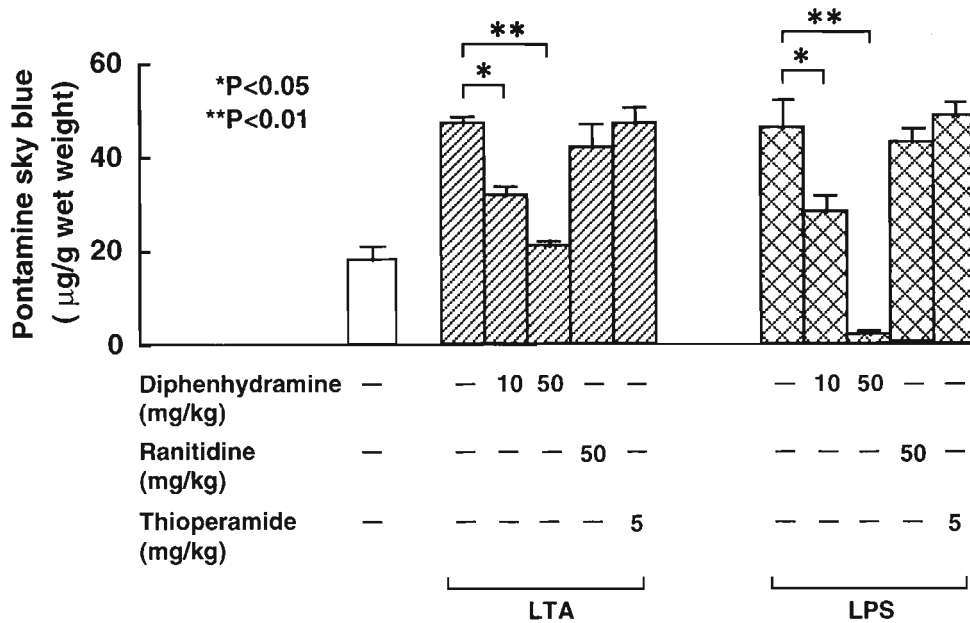


図 3. LTA および LPS による血管透過性亢進作用に対するヒスタミンの関与  
 ヒスタミン受容体拮抗薬を LTA (200 µg/site) または LPS (400 µg/site) 皮下  
 投与 20分前に皮下投与し、LTA または LPS 投与 2 時間後に色素漏出量を測  
 定。

4) LTA および LPS による血管透過性亢進作用に対する血小板活性化因子 (PAF) の関与

PAF 受容体拮抗薬 (WEB 2086, WEB 2170, TCV 309) は全て、LPS による色素漏出量増加を抑制したが、LTA による色素漏出量増加は、WEB 2086 で抑制されたが、WEB 2170、TCV 309 では抑制されなかった (図 4)。以上の結果から、LTA による血管透過性亢進作用にも PAF が少なくとも一部関与することが示唆された。

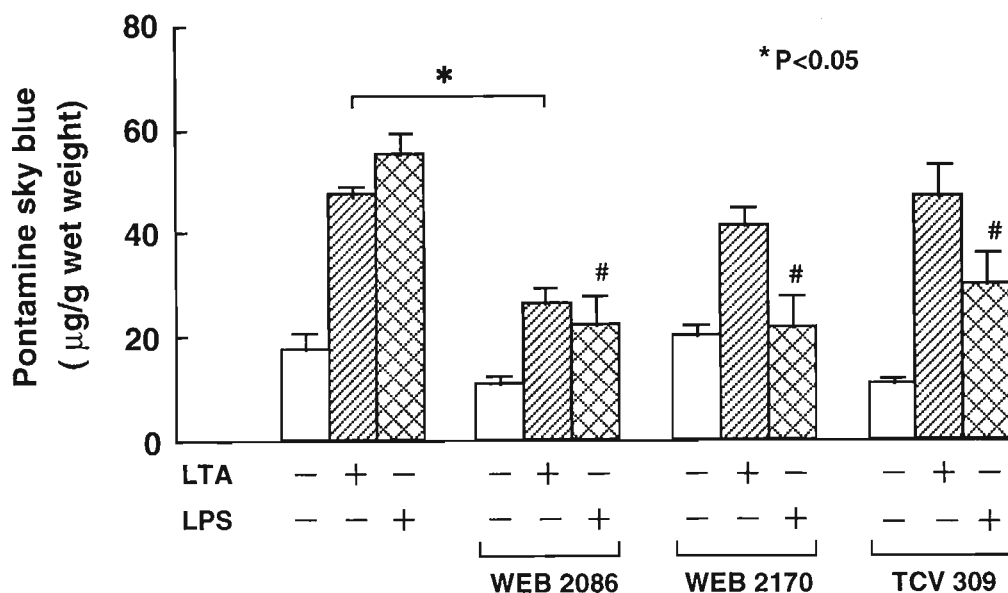


図 4. LTA および LPS による血管透過性亢進作用に対する血小板活性化因子 (PAF) の関与  
 PAF 受容体拮抗薬 (WEB 2086 10 mg/kg, WEB 2170 10 mg/kg) は LTA (200 µg/site) または LPS (400 µg/site) 皮下投与 65分前に腹腔内に投与し、TCV 309 (10 mg/kg) は LTA または LPS 皮下投与の 5分前に静脈内投与し、LTA または LPS 投与 2 時間後に色素漏出量を測定。#P < 0.05 LPS 単独に対し。

5) LTA による血管透過性亢進作用に対する NO の関与

LTA による色素漏出量の増加は、NO 合成阻害薬およびグアニル酸シクラーゼ阻害薬のどちらでも抑制されなかった (図 5)。これらの結果は、LTA による血管透過性亢進作用に NO は主要な役割を演じないことが示唆された。

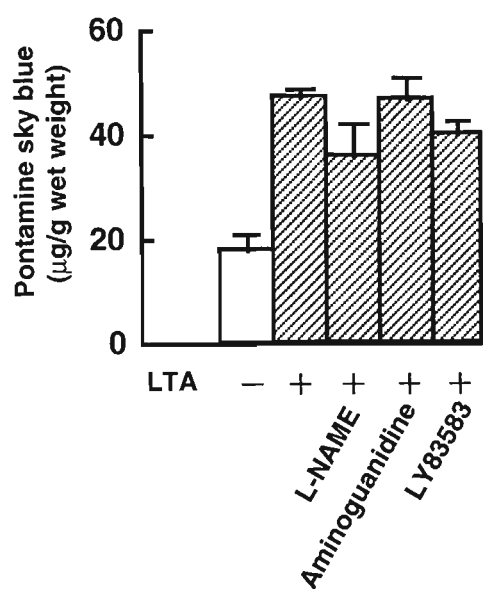


図 5. LTA による血管透過性亢進作用に対する NO の関与  
NO 合成阻害薬 (L-NAME 10 mg/kg、iNOS 選択的：アミノグアニジン 10 mg/kg) は LTA (200 µg/site) 皮下投与の 5 分前に静脈内投与し、グアニル酸シクラーゼ阻害薬 (LY 83583 10mg/kg) は、LTA 皮下投与の 35分前に腹腔内投与し、LTA 投与 2 時間後に色素漏出量を測定。

6) LTA および LPS による血管透過性亢進作用に対するサイトカインの関与  
 LPS による色素漏出量増加は、抗 TNF- $\alpha$  抗体および抗 IL-1 $\alpha$  抗体で抑制されたが、LTA による色素漏出量増加は、いずれの抗サイトカイン抗体によっても影響されなかった (図 6)。以上の結果より、LTA による血管透過性亢進作用には、サイトカインの関与はないことが示唆された。

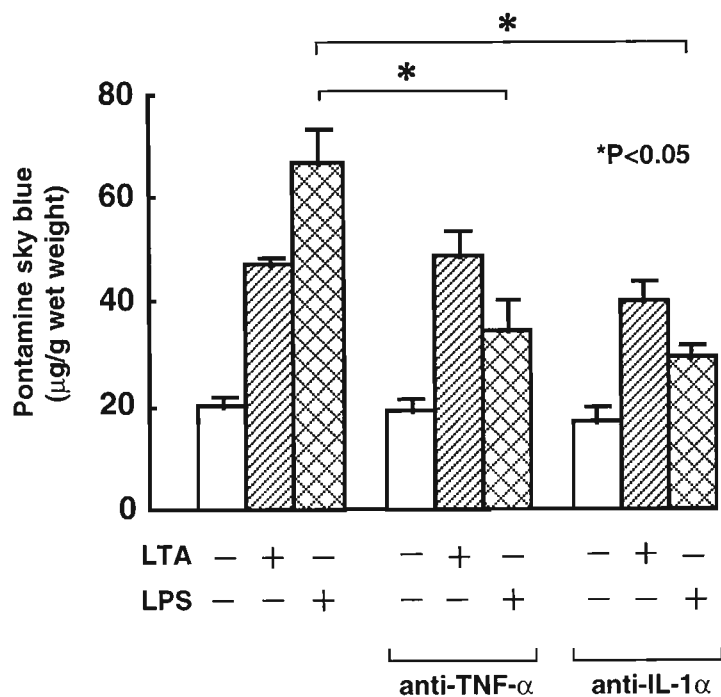


図 6. LTA および LPS による血管透過性亢進作用に対するサイトカインの関与  
 抗 TNF- $\alpha$  抗体 (1:400; 10 ml/kg) または抗 IL-1 $\alpha$  抗体 (1:400; 10 ml/kg) を  
 LTA (200  $\mu$ g/site) または LPS (400  $\mu$ g/site) 皮下投与の 24 時間前に皮下投与  
 し、LTA または LPS 投与 2 時間後に色素漏出量を測定。

7) LPS 前処置後の LPS または LTA による血管透過性トレランスの発現効果

LPS 前処置後 LPS による血管透過性のトレランスは発現したが、LTA によるトレランスは発現しなかった (図 7)。

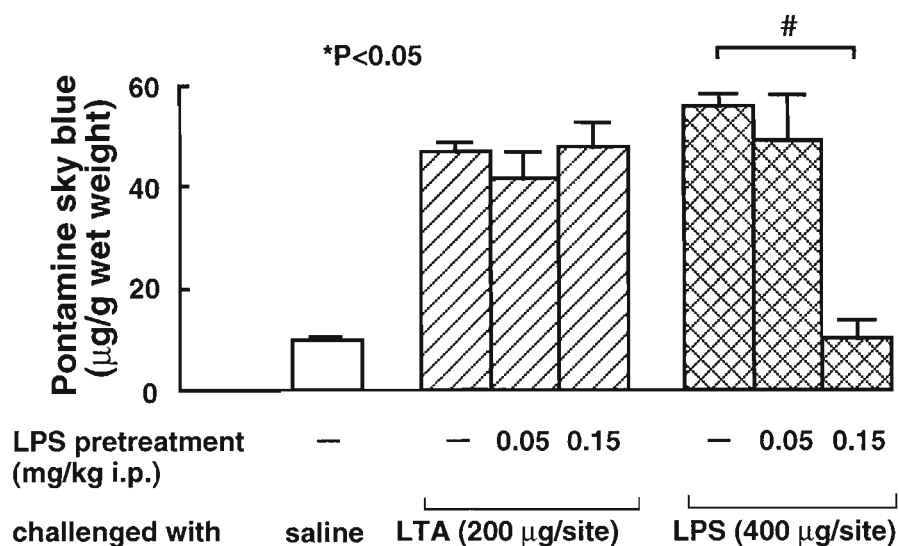


図 7. LPS 少量前処置後の LPS または LTA による血管透過性トレランスの発現効果  
LPS (0.05, 0.15 ml/kg) を腹腔内 1 回投与 4 時間後に、LPS (400 µg/site) または LTA (200 µg/site) を皮下投与し、2 時間後の色素漏出量を測定。

8) LTA 前処置後の LPS または LTA による血管透過性トレランスの発現効果  
 LTA 前処置後は、LTA によるトレランスも LPS によるトレランスも発現しな  
 かった (図 8)。

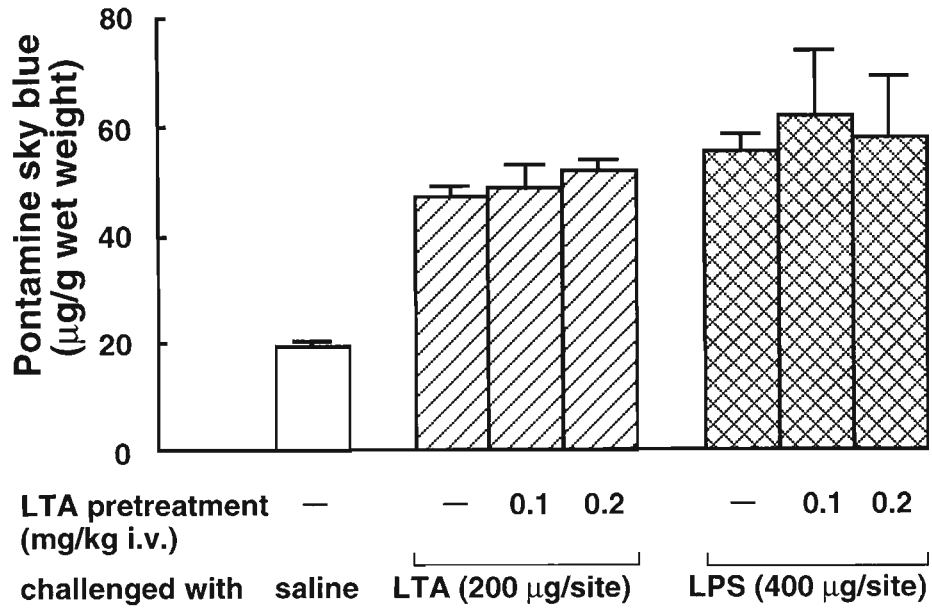


図 8. LTA 少量前処置後の LPS または LTA による血管透過性トレランスの発現効果  
 LTA (0.1, 0.2 mg/kg) を静脈内 1 回投与 4 時間後に、LPS (400 µg/site) または LTA (200 µg/site) を皮下投与し、2 時間後の色素漏出量を測定。

9) LPS または LTA 前処置後の血清中コルチコステロン量の変化

LPS 前処置による血管透過性の抑制が、内因性副腎皮質ステロイドホルモンの放出増加に起因する可能性を調べた。血清コルチコステロン量は、LPS 前処置後対照値に比べ著しく増加したが、LTA 前処置後には増加がみられなかった (表 1)。LPS による血管透過性トレランス発現時には、血清コルチコステロン量が増加するので、LPS によるトレランスのメカニズムはコルチコステロン分泌増大の可能性がある。また、LTA 前処置後に血清コルチコステロン量が増加しないことが、LTA による血管透過性トレランスを生じない一因と考えられる。

表 1 LPS または LTA 前処置後の血清中コルチコステロン量の変化

	serum corticosterone (ng/ml)
saline (10 mg/kg, i.p.)	35.7 ± 5.4
LPS (0.15 mg/kg, i.p.)	194.1 ± 47.9*
LTA (0.2 mg/kg, i.v.)	32.8 ± 4.7

生理食塩液、LPS または LTA 投与 4 時間後の 13:00 時に採血し、血清中コルチコステロンを RIA kit で測定した。  
平均値 ± 標準誤差 (n = 7)、\*P < 0.01 vs. saline

## 結語

エンドトキシンショックの原因となる LPS と極めて類似した病態を生じる LTA による急性炎症時においても、LPS と同様に遅効的で用量依存性の血管透過性亢進作用がみられた。我々は LPS による血管透過性亢進作用には NO、プロスタグランジン (PG)、サイトカイン類 (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ )、ヒスタミン、PAF が関与することを既に明らかにした (Fujii et al. 1996)。今回の実験では、LTA による血管透過性亢進作用は、PG、ヒスタミン、PAF を介するが、意外にも NO やサイトカインは関与せず、LPS と LTA の作用機序は全く同じではないことを明らかにした。

LPS 前処置後 LPS による血管透過性のトレランス発現時には血中コルチコステロン量が増加し、トレランス発現の一因として下垂体-副腎皮質ホルモン系の活性化が関与することを示唆した (Fujii et al. 1996) が、LTA 前処置後血中コルチコステロン量は増加しなかった。従って、LPS によるトレランス発現には副腎皮質ホルモンが関与することがより確からしいと思われる。以上の結果から、敗血症時のショックの予防に LPS に構造が類似した物質は応用可能と考えられるが、LTA 関連物質は有用ではないことが示唆された。

近年 LPS の受容体として 10 以上の Toll-like receptor (TLR) がクローニングされた。LPS の受容体は TLR 4、LTA の受容体は TLR 2 と考えられている。マウス血管透過性に関与するメディエーターが LPS と LTA の間で異ったのは、作用する受容体が異なることによると想像される。我々の予備実験によれば、Tlr 4 遺伝子に変異があるマウス (C3H/HeJ) では、LPS による血管透過性亢進が見られなかったが、LTA による血管透過性亢進は正常対照 (C3H/HeN) と同様に発現した。LPS の血管透過性亢進作用も TLR 4 を介して生じることが推察された。