

r05a およびブレオマイシンで誘導される肺の実験的炎症過程における
単核食細胞の動態に関する研究

一 統 野 守

rC5a およびプレオマイシンで誘導される肺の実験的炎症過程における
単核食細胞の動態に関する研究。

中野 純一

研究の背景

van Furth等は、単球や組織マクロファージなどを骨髄の同一の前駆細胞から由来する単核食細胞系(mononuclear phagocytes)としてとらえることを提唱した¹。当初は、組織マクロファージの由来は局所での分裂増殖によらず、末梢血液からの単球の局所への遊走、定着のみによるとされていた²。しかし、その後の研究で肺胞マクロファージは少なくともそれ自身が肺局所で分裂増殖し得ることが判明してきた³⁻⁵。さて、これら単球、マクロファージは肺線維症など肺の炎症の成立に重要な役割を果たしていることが知られている^{6,7}。古く、Leibovitchらは末梢血液中の単球や組織マクロファージを実験的に減少させると、皮膚の炎症における修復過程が障害されることを示し、その線維化に単球、マクロファージがかかわっていることを報告している^{8,9}。またこれら単核食細胞は、線維化を促進するサイトカインを産生し、肺組織の構築蛋白質を変化させた時に生ずる、肺の線維化の過程においても働いていることが報告されている^{2,10-16}。しかし、肺の炎症過程のなかで単核食細胞がどのような動態を示して、炎症の成立あるいは修復に関わっているのかについては不明の部分が多く、これらを研究することは、その病態の解明に役立つものと考えられる。

単核食細胞の動態に関する研究においては、正常あるいは炎症を起こした肺へ、単球が遊走することがすでに明らかにされている^{12,16-20}。しかし、それら遊走してきた細胞が肺の局所にどのようにして留まるのか、あるいはその局所から消失する場合どのような機序によるのかについては、解析が進んでいない。また急性炎症の過程と、慢性炎症の過程における単核食細胞の動態の相違に関しての研究報告はない。一方、肺胞内に存在するマクロファージが、経気管支的に投与された粒子を貪食し、所属のリンパ節や肝臓、脾臓に集積することを示した報告がある^{21,22}。これは、単核食細胞が肺胞内からクリアーされる経路の一つとしてリンパ系が関与しうることを示唆したものであるが、肺の炎症過程で単核食細胞がどのような経路で肺胞内から消失するのかは、明らかではない。

さて、recombinant C5a(rC5a)による家兎を使った肺の炎症モデルでは、投与後4時

間までを頂点として単球の遊走など、肺の炎症が認められるが、その後、炎症は終焉に向かい1週間後には正常の組織像に戻ることが報告されている^{10,14}。これに対し、同じく家兎を使った実験で、プレオマイシンにより誘導される肺の炎症においては1週間目を頂点とする単球の遊走が観察され、しかもその後も長期にわたり肺胞、肺間質における単球、マクロファージの増加が認められる。そして、最終的には肺の線維化を生じることが報告されている²³。以上の所見はプレオマイシンによる慢性の肺炎症においては、単核食細胞の長期にわたる肺への滞留(retention)が存在し、それが肺の線維化にとって重要な機序である可能性を示唆している。

すでに述べたように、単核食細胞の肺局所への遊走、滞留、あるいはクリアランスを含めた動態についての研究は、肺炎症の病態の解明、特に肺線維症の病態の解明にとって重要である。本論文においては、急性の肺炎症としてrCSaを、慢性の肺炎症としてはプレオマイシンをマウスの気管支に直視下で投与し、これら肺の炎症過程における単核食細胞の動態を明らかにし、肺炎症の成立する機序について考察することを目的に実験を行った。

すなわち、まず最初に、これらの系における単球の肺への遊走を調べるために、放射性ヨウ素 ¹²⁵I(Iodine-125)で標識した単球を尾静脈より経静脈的にマウスに投与し、肺への遊走が最大となる時点を観察した。その後、炎症によって肺胞内に遊走した滲出性マクロファージ(exudative macrophage)がどのようにして肺に滞留、あるいは除去されるかを明らかにするために、肺胞内への単球の移行が最大となる時点で、¹²⁵I-標識マクロファージを肺内に投与し、その動態を観察した。

材料と方法

材料

C3H/HeJ マウス (The Jackson Lab, Bar Harbor, ME) の雄、第6-8週齢を実験に供した。マウスの骨髄から単核食細胞の前駆細胞を採取した。使用したC3H/HeJ マウスはLPS非感受性の系統(strain)であり、骨髄から得られた細胞はLPSによる非特異的な細胞の活性化を受けにくいため、この種の研究に適した系統と考えた。マウスより骨髄細胞を採取する際には二酸化炭素の吸入により、それ以外の場合にはペントバルビツールの腹腔内投与により安楽死させた。

試薬等

マウス骨髄細胞由来の単核食細胞を培養するためにDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; BioWhittaker, Walkersville, ME)に、L929 cell conditioned medium (LCCM; ATCC, Rockville, MD), 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma, St. Louis, MS), Glutamine Pen-Strep (グルタミン 29.2 mg/ml, ペニシリンG 10,000 U/ml, 硫酸ストレプトマイシン 10,000 µg/ml; Irvin Scientific, Santa Ana, CA) を加えた培養液を使用した。肺の組織固定には10%ホルムアルデヒド溶液を使用した。KRPD溶液(Kreb's Ringer Phosphate with Dextrose)、PBS溶液はGibco (Grand Island, NY)より購入した。単球、マクロファージのラジオアイソトープ標識は¹²⁵Iodine-linked labeling system (PKH95; Zynaxis, Malvern, PA)を用いた。

単球、マクロファージの分離、標識、および固定の方法

単球、マクロファージはマウスの骨髄細胞を、Stewartの変法(Riches, et al.) で培養し資料に供した^{24,25}。すなわち、まず骨髄細胞から得た単球、マクロファージの前駆細胞を上記培養液を用い、 11×10^6 cells/ml に調整した。この細胞浮遊液13mlを径100mmの培養容器 (8-757-12; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)を用い、37°C、10%CO₂の環境下で培養を行った。3日間培養した前駆細胞は、形態学上および機

能上から単球へと分化(> 95 % ベルオキシターゼ染色陽性、> 98 % エステラーゼ染色陰性)していることを認めた。上記の環境下で5日間培養後、5日目に25mlの上記培養液で交換し計7日間培養すると、前駆細胞はマクロファージへと分化(< 5% ベルオキシターゼ染色陽性、> 98% エステラーゼ染色陰性)していることを確認した。

これらマウスの骨髓細胞から得られた単球、マクロファージをZynaxis社により標準化された方法によって、0.5 から1.0 μ Ciの放射性ヨウ素(125 I)にて標識した。この方法によるラジオアイソトープの標識は単球、マクロファージの性質を変化させず、かつ本研究の期間を通じて安定であることがすでに確認されている。

固定マクロファージの作製

一部の実験においては、 125 Iで標識したマクロファージをグルタルアルデヒドで固定後、使用した。方法としては、 125 I-標識マクロファージを1.0 % グルタルアルデヒド-KRPD溶液中で30分間室温に静置し、その後グルタルアルデヒドによる非特異的な凝集を防止するために0.1 M グリシン-PBS溶液を加えて余分なグルタルアルデヒドを洗浄処理し、実験に使用した。グルタルアルデヒドで固定処理した細胞は、マクロファージとしての形態を保っているが、生細胞としての機能を失うため²⁶、固定マクロファージとして用いた。

実験の方法 (マウスでの肺炎症モデルの作成)

肺に炎症を作成するためには、rC5a(5 μ g) あるいはプレオマイシン (0.05mg)を20 μ lの生食に溶解し、微量注入用注射筒 (Microlitter Syring, Hamilton 805, Hamilton Co., Reno, NE)を使って直視下で経気管支的に、マウスの肺内に投与した。対照(非炎症性)として20 μ lの生食のみを、同様にマウスに投与した。マウスの麻酔にはアベルチン(2,2,2-tribromoethanol; Aldrich, Milwaukee, WI)を生食で2.5%に希釈し、0.3mlを腹腔内に投与した。

各々の炎症過程での単球の肺への遊走を調べるために、rC5a、プレオマイシン、あるいは生食のみを気管内投与した後、rC5aでは投与後2-4時間に、プレオマイシンでは投与後0-4日に、 1×10^6 個の 125 I-標識単球のKRPD懸濁液(カルシウム無添加)

0.65 ml を25Gの注射針を用いて尾静脈より静注した。 ^{125}I -標識単球の静注後、3-24時間後に肺および気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中の放射能 (radioactivity) を測定し、肺および肺胞 (alveolar space)あるいは末梢肺区画 (distal lung unit)への単球の遊走が最大となる時間を確認した。

次に、炎症の過程で肺胞、末梢肺区画での単球、マクロファージの滞留、クリアランスを調べるために、各々の炎症において単球の肺への遊走が最大となった時点で、最終容量20 μl のKRPD溶液 (カルシウム無添加)に懸濁した 5×10^5 個の ^{125}I -標識マクロファージを経気管支的に肺内に投与し、その生体内分布の経時的变化を観察した。方法としては、各々の炎症の極期、すなわちrC5aではその投与と同時に (C5a群)、またはプレオマイシンではその投与後7日目に (プレオマイシン群)、 ^{125}I -標識マクロファージを肺内に投与した。対照群としては、上記のrC5aとプレオマイシンとを入れ替えて ^{125}I -標識マクロファージを投与したC5a投与後7日目群とプレオマイシン同時投与群あるいは、炎症を伴わない対照群としてrC5a、プレオマイシンに換え生食を投与した生食同時投与群、生食投与後7日目群を作成した (図1)。

さらに一部の実験では、プレオマイシンによる肺炎過程で、マクロファージ自体の能動的な機能が、いかに関与しているかを研究するために、グルタルアルデヒドで固定処理した ^{125}I -標識マクロファージ (固定マクロファージ)を使用した。この実験では、固定マクロファージを、プレオマイシンの投与後7日目に、マウスの肺内に投与した。

^{125}I -標識マクロファージの肺内投与後21日までの動態を観察した。その解析に際しては、生食1mlで3回、合計3mlで気管支肺胞洗浄を施行した。その後、気管支肺胞洗浄液、肺、肝臓、脾臓、腎臓、消化管の放射能をガンマカウンター (Compu Gamma CS, LKB Wallac, Turku, Finland)で測定した。実験中のマウスの糞便と尿 (マウスゲージの飼育床)をすべて回収し、その放射能も測定した。気管支肺胞洗浄液中の総細胞数は Neubauer 血算盤を使用してカウントした。ディフクイック法 (modified Wright's stain Diff-Quik, American Scientific Products, McGaw, IL)で染色し、好中球と単核球を分別し、またエステラーゼ染色 (Alpha-Naphthyl-Butyrate Esterase

Stain, Technicon Instruments Co., Atlanta, CA)を併用して細胞をリンパ球と単球・マクロファージとに区別し、それぞれの細胞成分の総数と割合について算出した。

すべての実験において、投与した量と同量の¹²⁵I-標識マクロファージの放射能を、各臓器、気管支肺胞洗浄液、飼育床(bedding)の放射能の測定時に同時に測定して、測定誤差や半減期の影響を除外した。データはマウスに投与した総放射能に対する比率(%)として表現した。

組織

肺の炎症過程を組織学的に検討するために、rC5a投与後、6時間目、48時間目、7日目に、あるいはブレオマイシン投与後7日目、14日目、21日目にマウスより肺を取り出し組織標本を作製した。マクロファージの肺内投与自体による影響を調べるために、¹²⁵I-標識マクロファージのみを投与し、4時間後、48時間後の時点で肺組織を観察した。これらマウスの肺中に、25 cmH₂Oの一定圧のもと、10%ホルムアルデヒド溶液を24時間投入固定した。その後、パラフィン封埋を作成、2 μm 切片の組織標本を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色をほどこして検鏡した。

統計

データは平均値±標準誤差(mean±SE)にて示した(ただし、図 3a, 3b, 4a, 4b は平均値のみ)。各々のデータは、図8, 10a, 10bを除き5匹のマウスの平均値よりなっている。統計処理は Fisher PSLD と Scheffe F-test によるANOVA法により行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

結果

1. 肺炎症部位への単球・マクロファージの集積

1) 組織学的検討; rC5aによる炎症においては、単球・マクロファージの肺への集積は6時間目の時点よりみられるが、7日目の時点においては、炎症細胞は肺局所より消失し、組織像は正常に戻る事が観察された(図2a)。プレオマイシンによる炎症では、投与後7日目から14日目にかけて、単球・マクロファージの肺への強い集積がみられ、21日目の時点においても炎症細胞の集積が継続しているのが観察された(図2b)。なお、¹²⁵I-標識マクロファージの肺への投与では、局所の炎症反応は認めなかった。

2) 標識単球の肺への遊走; rC5aの炎症においては、肺全体としては、¹²⁵I-標識単球の集積は生食対照群に比して、投与後2時間目より増加傾向を認めた(図3a)。一方、気管支肺胞洗浄液中の放射能は、rC5a投与後2時間目に¹²⁵I-標識単球を静注した場合に最大 ($p < 0.05$) であった(図3b)。したがって、rC5a投与後2時間が単球の肺胞内、末梢肺区画への遊走活性が最大であり、rC5aによる肺炎症の頂点の時期にあたると考えた。

プレオマイシンの炎症においては、肺全体の放射能をみると、その投与と同日あるいは14日後に¹²⁵I-標識単球を静注した場合、生食対照群に比し有意に ($p < 0.05$) 高く肺に集積していた。しかし、プレオマイシン投与後の時間の差では肺全体の放射能に有意差を認めなかった(図4a)。気管支肺胞洗浄液中の放射能の検討では、プレオマイシン投与後7日目に¹²⁵I-標識単球が静注された場合、有意かつ最も高い放射能が示された(図4b)。すなわち、プレオマイシン投与後7日目が単球の肺胞内、末梢肺区画への遊走活性が最大 ($p < 0.05$) となり、プレオマイシンによる肺炎症の頂点の時期にあたると思われる。

プレオマイシンの炎症においては、単球の遊走活性が最大になる7日の時点では、0日(プレオマイシン投与と同日)あるいは14日の時点と比較して、肺全体への単球の集積はむしろ減少している傾向にあった(図4a)。この一つの要因として、炎症の極期である7日目の時点では、強度の炎症性変化による肺胞低換気が生じ、著明な肺血流量の低下が起こり、0日や14日に比して単球の肺への集積が低下した可能が考えられる。

2. マクロファージの肺への滞留

¹²⁵I-標識マクロファージの気道への投与後の肺の放射能を指標に、マクロファージの滞留につき検討した。¹²⁵I-標識マクロファージの肺への滞留に関しては、二つの生食対照群、すなわち生食同時投与群と生食投与後7日目群の結果はほぼ同様であり、有意差がなかった。

rC5aによる炎症とプレオマイシンによる炎症を比較すると、¹²⁵I-標識マクロファージの気管支内投与後3日目（プレオマイシン群 86.8±8.9%, C5a群 58.4±3.1%, $p < 0.01$ ）および21日目（プレオマイシン群 60.2±6.3%, C5a群 35.7±3.7%, $p < 0.01$ ）の時点でプレオマイシンによる肺炎症において有意に高いマクロファージの肺への滞留を認めた。生食群と比較すると、プレオマイシンによる炎症では全経過を通して、rC5aによる炎症では¹²⁵I-標識マクロファージの気管支内投与後7日、10日、14日の時点において有意に高いマクロファージの滞留を認めた(図5a)。

ついでC5a群とC5a投与後7日目群でのマクロファージの滞留を比較検討した。rC5aの炎症の極期より7日後に投与されたマクロファージ（C5a投与後7日目群）は全経過を通じて生食群と同様の結果であった。rC5a投与後7日目では炎症は修復され、肺内のマクロファージの状態も正常に帰っていたと考えられた。一方、rC5aの炎症極期に肺内に投与されたマクロファージ（C5a群）はその炎症が終焉した時点で肺内に投与されたマクロファージ（C5a投与後7日目群）と比較して、7日（52.4±1.6% 38.5±4.0% $p < 0.05$ ）、10日（56.7±4.7% 26.0±2.5% $p < 0.01$ ）、14日（45.3±3.6% 28.3±3.8% $p < 0.01$ ）の時点において有意に高い肺への滞留が認められた(図5b)。

プレオマイシン群とプレオマイシン同時投与群でのマクロファージの滞留に関しても検討した。¹²⁵I-標識マクロファージの気管支内投与後21日の時点で、プレオマイシン群はプレオマイシン同時投与群と比較して有意に高い肺への滞留を示した（プレオマイシン群 60.2±6.3%, プレオマイシン同時投与群 41.0±3.6%, $p < 0.01$ ）。生食群との比較では、7日目を除いてプレオマイシン同時投与群は有意に高い肺へのマクロファージ滞留を示した(図5c)。

以上より、プレオマイシン、rCa5各々の炎症過程において、その炎症が極期にあり、単球・マクロファージの肺胞内・末梢肺区画への遊走活性が最大である時に、肺内に投与されたマクロファージは有意差をもって、rC5a群では高い滞留を、あるいはプレオマイシン群では高かつ長期の滞留を示すことが明らかとなった(図5b,5c)。

3.マクロファージの肺からのクリアランス

マクロファージのクリアランスの経路を調べるために、実験中マウスの飼育床はすべて回収し、その放射能を測定した。マウスの各臓器の放射能も各々の実験終了時に測定し、¹²⁵I-標識マクロファージの生体内分布と排泄経路を観察した。予備実験として、rC5aと同時、あるいはプレオマイシン投与後6日目に¹²⁵I-標識マクロファージを肺内に投与し、その糞便および尿を別々に回収しその放射能を測定した。飼育床中の放射能の95%以上が糞便によることを認めた。また胆汁への放射能の排泄はほとんどないことも確認した。¹²⁵I-標識マクロファージ投与後21日の時点では、生食投与対象群とC5a投与後7日目群に対し、その他の炎症のある群の糞便中への排泄は有意に少量であった(図6)。¹²⁵I-標識マクロファージ投与後7日、10日の時点でも同様の傾向を認めた。各群の総放射能の回収率は投与量の70%以上であった。

以上の結果より、肺胞内・末梢肺区画からのマクロファージは、主に気管支線毛上皮により、気管支から気管へと上行し、さらに嚥下により消化管から除去されること、炎症の極期ではこの活性化が低下していることが明らかとなった。

この気管支線毛上皮の機能(mucociliary escalator)以外の経路について検討した結果、肺から網内系臓器、肝臓・脾臓へのマクロファージの集積に関し各実験群に相違のあることが判明した(図7)。すなわち、¹²⁵I-標識マクロファージの肺内への投与後21日目の時点でのプレオマイシン群($1.193 \pm 0.346\%$)は、C5a投与後7日目群($0.079 \pm 0.021\%$, $p < 0.01$)、生食同時投与群($0.860 \pm 0.337\%$, $p < 0.05$)、生食投与後7日目群($0.074 \pm 0.017\%$, $p < 0.05$)と比較して有意に高いマクロファージの肝臓・脾臓への集積を認めた。C5a群($0.860 \pm 0.337\%$)は、C5a投与後7日目群($p < 0.05$)、生食投与後7日目群($p < 0.05$)と比較して有意に高いマクロファージの肝臓・脾臓への集

積を認めた。 ^{125}I -標識マクロファージ投与後10日の時点でも同様の傾向がみられ、炎症極期におけるマクロファージの肝臓・脾臓への集積が他の群（C5a投与後7日目群、生食投与後7日目群）に比較して有意に高いことが示された。

結論として、炎症の極期に肺内に投与されたマクロファージは肺へ滞留する傾向を示し、消化管への排除が減少する一方、肝臓・脾臓への遊走、集積を示すことも判明した。

4. 気管支肺胞洗浄からのマクロファージの回収（洗浄液中の放射能、細胞数についての検討）

^{125}I -標識マクロファージ肺内投与後3日の時点において、気管支肺胞洗浄液の放射能を検討すると、C5a群（ $9.63 \pm 1.26\%$ ）はC5a投与後7日目群（ $6.05 \pm 0.89\%$ ）と比較して有意（ $p < 0.05$ ）に低い結果を示した。この3日目の時点では肺全体の放射能、 ^{125}I -標識マクロファージの肺への滞留は、C5a群（ $58.4 \pm 3.1\%$ ）とC5a投与後7日目群（ $56.3 \pm 2.6\%$ ）であり有意な差は認めなかった。同様に、 ^{125}I -標識マクロファージ肺内投与後3日の時点において、プレオマイシン群とプレオマイシン同時投与群を比較すると、肺全体としての ^{125}I -標識マクロファージの滞留は、両群に有意差がなかったが（プレオマイシン群 $86.8 \pm 8.9\%$ 、プレオマイシン同時投与群 $90.4 \pm 6.5\%$ ）、気管支肺胞洗浄液の放射能ではプレオマイシン群（ $3.74 \pm 1.25\%$ ）はプレオマイシン同時投与群（ $9.48 \pm 2.75\%$ ）より有意（ $p < 0.05$ ）に低い結果を示した（図8）。

次にプレオマイシン投与後の気管支肺胞洗浄液中の単球・マクロファージの総数について検討した（図9）。マウスに投与した 5×10^5 個の ^{125}I -標識マクロファージと、回収された気管支肺胞洗浄液中の放射能の比較より、各時点での気管支肺胞洗浄液中に占める ^{125}I -標識マクロファージは、最大でも単球・マクロファージの総数の3%であった。従って、気管支肺胞洗浄液中の総単球・マクロファージ数の増加は移入によるものではなく、主にマウス自身の単球・マクロファージの増加によるものと考えられた。プレオマイシン投与後10日目の時点において、気管支肺胞洗浄液中の単球・マクロファージ数は一過性に減少が認められた。この10日目の単球・マクロファージ総数（ $5.6 \pm 1.1 \times 10^5$ ）は、7日目（ $11.2 \pm 2.5 \times 10^5$ ）、14日目（ $11.7 \pm 2.1 \times 10^5$ ）と比較して有意に（ $p < 0.05$ ）減

少していた。

これらの結果は、肺内に投与された¹²⁵I-標識マクロファージのみならず、マウス自身の単球・マクロファージもプレオマイシンの炎症の極期において洗浄されにくい状態にあることを示している。

5. マクロファージと固定マクロファージの動態の比較

rC5a、プレオマイシンの炎症過程において、マクロファージが肺に滞留を示し、特にプレオマイシンの炎症では長期化することを認めた。さらに、炎症の極期においてはマクロファージは少ない割合(%)ではあるが有意に肝臓・脾臓へと集積し、同時に気管支肺胞洗浄されにくい状態にあり、炎症部位へのマクロファージの接着などの現象が関与していると考えられた。

そこで、このような肺への滞留、接着あるいは肝臓・脾臓への遊走における、マクロファージ自体の能動的な機能を検討するために、グルタルアルデヒドで固定したマクロファージと、固定していないマクロファージと比較し研究した(図10a)。

肺への滞留に関し、プレオマイシンによる肺の炎症において、¹²⁵I-標識マクロファージ投与後7日および14日の時点で、マクロファージと固定マクロファージとの間には有意差を認めなかった。しかし、¹²⁵I-標識マクロファージ投与後21日の時点では、プレオマイシンの肺炎においてマクロファージは固定マクロファージと比較して明らかに高い肺への滞留を示した(マクロファージ 60.2±6.3%, 固定マクロファージ 36.4±4.1%, $p < 0.01$)。プレオマイシンによる炎症では固定マクロファージの肺への滞留を生食を投与した対象群とを比較すると、¹²⁵I-標識マクロファージ投与後14日、および21日いずれにおいても、プレオマイシンの炎症での固定マクロファージは有意に高く肺に滞留することを認めた。

固定マクロファージの肺から肝臓・脾臓への遊走について検討した(図10b)。すでに示しているように、¹²⁵I-標識マクロファージ投与後7日、および21日いずれにおいてもプレオマイシンによる炎症では対象群に比し、有意に高い肝臓・脾臓への集積を認めた。これに対して21日の時点において、プレオマイシンの炎症での固定マクロファージの肝

臓・脾臓への集積 ($0.25 \pm 0.03\%$) は、生食対象群 ($0.16 \pm 0.03\%$) と比較して 有意に ($p < 0.05$) 高かったが、プレオマイシンの炎症でのマクロファージ ($1.19 \pm 0.35\%$) よりはるかに低い集積であった ($p < 0.01$)。

考案

1. 集積したマクロファージにおける動態の解析法について

本実験においてはまず、rC5aあるいはブレオマイシンによる肺の炎症で、単球が肺へ有意に遊走することが示された。炎症の過程における単核食細胞の動態の研究のためには、多数の単球が肺へと遊走した後、次にそれら滲出性マクロファージがいかに肺から除去されるのか、あるいはいかに肺に滞留するのかを調べる必要がある。その研究のためには、実際に肺胞内・末梢肺区画に遊走してきた単球・マクロファージをさらにその後も引き続き観察する方法が理想的と考えられた。しかし(図3a-4b)の結果でも明らかなように、経静脈的に投与された¹²⁵I-標識単球は24時間後には、わずかその2-3%のみしか肺には集積していない。従って、そのようなわずかな細胞数の¹²⁵I-標識単球・マクロファージの動態を追跡してゆく方法では、低レベルの放射能の変動を追跡するため、測定誤差等が生じやすく、詳細な細胞の動態の研究は困難である。さらに経静脈的に投与された¹²⁵I-標識単球の多く(50%以上)が肝臓・脾臓に集積することが判明した。すなわち、静注した¹²⁵I-標識単球を使って肺からのマクロファージのクリアランスを測定することは、肺から肝臓・脾臓へのマクロファージの遊走、集積の経路を解析するためには、よい方法ではないと考えられた。以上の理由より、本実験のように炎症の過程で肺胞内・末梢肺区画への単球の遊走が最大である時、つまり単球が最も多くの滲出性マクロファージとなる時点で、¹²⁵I-標識マクロファージを経気管支的に肺内に投与しその動態をモニターすることは、より正確なマクロファージの肺への滞留あるいは肺からのクリアランスの解明の手がかりとなると考えられた。

2. 炎症極期に投与された標識マクロファージの動態

本研究では肺内に投与した¹²⁵I-標識マクロファージをモニターすることによって、rC5a、ブレオマイシンいずれの肺炎症においても、その極期にはマクロファージが肺に滞留していることが明らかとなった。とくにブレオマイシンによる慢性炎症ではそのマクロファージの滞留が長期にわたることも認めた。一方、肺内に投与したマクロファージの内、肺全体から回収されたのは30%から60%にすぎなかった。このことは、肺内のマ

クロファージが局所でレジデント化（定着）して、肺泡マクロファージへと分化してゆく以外に、肺より除去されてゆく細胞のあることも示している。単球・マクロファージの動態を知るうえで、その除去される経路の解明も重要である。その可能性として、1) マクロファージが他の細胞に貪食される場合、2) 気管支線毛上皮により排除される場合、3) 局所のリンパ系、あるいは血管系によって網内上皮系臓器、あるいは腎臓などに集積する場合、4) アポトーシス (apoptosis) を含む細胞死あるいは細胞融解などによる局所からの消失する場合などが考えられる。本研究の結果まず第一に、投与したマクロファージはおもに気道を上行し、消化管を介して除去されるが、炎症時にはこの過程が働きにくいことが明らかとなった。この場合、細胞が死滅、破損している場合には、フリーのラジオアイソトープ (^{125}I iodine) が血中に遊離し、腎臓あるいは尿中の放射能が高くなる可能性が考えられるが、本実験ではそのような所見は見られなかった。従って、この経消化管的な除去を受けるマクロファージの細胞融解あるいは破壊はないと考えられる。第二に、本実験では、炎症において肺から肝臓・脾臓への有意なマクロファージの集積を認めた。また炎症の極期において、マクロファージが気管支肺泡洗浄されにくい状態にあることも示された。すなわち、炎症のある時期ではマクロファージは肺泡上皮や末梢肺の気道上皮に強く接着しており、場合によりそこから組織内に侵入していることが考えられる。

3. マクロファージと固定マクロファージの動態の相違

グルタルアルデヒドで固定したマクロファージを使って検討した実験では、プレオマイシンの肺炎症において、マクロファージの長期の肺への滞留、あるいは肝臓・脾臓への集積にはマクロファージが生存して、能動的に働くことが重要であることが明らかとなった。

マクロファージの能動的な働きを考える上では、rC5a、プレオマイシンが直接マクロファージを活性化した可能性と、これら薬剤により誘導された炎症によって生じたサイトカインの産生などの変化により、マクロファージが二次的に影響を受けた可能性を考える必要がある。rC5a、プレオマイシンの肺内への投与に引き続いて、単球・マクロファ

ジの肺への有意な遊走が観察されたが、rC5a、プレオマイシン自体が遊走因子 (chemoattractant) として単球・マクロファージへ作用することが、まず考えられる。実際、rC5aは *in vitro* で単球・マクロファージに対して遊走活性を有している。しかし *in vivo* の実験において、rC5aのみの肺内への投与では、単球の肺への遊走が起らないことが知られている¹⁰。一方、プレオマイシンには単球・マクロファージに対する遊走活性がないことが、*in vitro* の実験で示されている¹⁸。従って本実験でみられたマクロファージの能動的な働きは、rC5a、プレオマイシンによる直接の影響以外の機序が考えられる。rC5aを投与したマウスにおいて、単球・マクロファージへ作用すると考えられるサイトカインの産生誘導としてはinterleukin (IL)-8が報告されている。また同条件下で、接着分子のCD11/CD18, intercellular adhesion molecule(ICAM)-1、p-selectin, very late antigen(VLA)-4、などが発現するという報告がなされている²⁷⁻³⁰。また、プレオマイシン投与時に産生誘導されるサイトカインで、単球・マクロファージに影響を与えるものとして、IL-1, IL-2, IL-6, tumor necrosing factor (TNF)- α , transforming growth factor (TGF)- β などが報告されている³¹⁻³⁶。さらに肺線維症におけるマクロファージの役割として、IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1の産生や³⁷⁻³⁹, CD11/CD18, ICAM-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1の発現⁴⁰⁻⁴²などが報告されており、これらがマクロファージに作用する可能性がある。また、IL-1やTGF- β などは、肺の炎症において気道上皮や肺胞マクロファージからのmacrophage chemotactic protein (MCP)-1の産生を促進することも報告されている^{43,44}。

従って、炎症時のマクロファージの肺での滞留や、他の臓器への移行には、これらのサイトカインや接着分子が複雑にからみ合って影響している可能性が考えられるが、その詳細は未だ不明である。今回の実験を通じて、急性の肺炎と慢性の肺炎における単球・マクロファージの動態に有意な相違が明らかとなったが、各々の炎症過程においていかなるサイトカインあるいは接着分子が関係するかについては、今後の検討が必要である。また、マクロファージは異なる刺激を受けると、刺激に応じて異なる性質および機能を発現

する能力のあることが報告されている⁴⁵。rC5aの投与により起こった炎症により刺激されたマクロファージは、肺の線維化を起こすことなく炎症を終焉させる機能を発現しているのに対して、プレオマイシンの投与によって起こった炎症により刺激されたマクロファージは、最終的には肺の線維化へと進行させる能力を獲得している可能性も考えられる。

結語

rC5a投与による急性の肺炎症および、プレオマイシン投与による慢性の肺炎症において、標識したマクロファージを用いてその動態を定量的に解析し、以下の2点を明らかにした。

①両炎症の極期には、肺へのマクロファージの滞留があり、特に慢性の炎症においては、その滞留は長期にわたる。

②長期の滞留にはマクロファージ自身が生存して機能を発揮してることが必要である。

これらのことから、プレオマイシンによる慢性の肺炎症では、マクロファージが活性化し、その長期にわたる肺への滞留が、肺線維症を起こす一つの重要な要因であると考えられる。

文献

1. van Furth R, Cohn ZA, Hissoh JG. The mononuclear phagocyte system. A new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. Bull WHO 1972;46: 845-52.
2. Blusse van Oud Alblas A, van der Linden-Schrever B, Mattie H, van Furth R. The effect of glucocorticosteroids on the kinetics of pulmonary macrophages. J Reticuloendothel Soc 1981;30:1-14.
3. Volkman A, Chang NC, Strausbauch PH, morahan PS. Differential effects of chronic monocyte depletion on macrophage populations. Lab Invest 1983;49:292-8.
4. Sawyer RT. The significance of local resident pulmonary alveolar macrophage proliferation to population renewal. J Leukoc Biol 1986;39:77-87.
5. Tarling JD, Lin HS, Hsu S. Self-renewal of pulmonary macrophages: Evidence from radiation chimeric studies. J Leukoc Biol 1987;42:443-6.
6. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA. Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (first of 2 parts). N Engl J Med 1984;310:154-66.
7. Keogh BA, Crystal RG. Alveolitis: the key to the interstitial disorders. Thorax 1982;37:1-10.
8. Lebovitch SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. Am J Pathol 1975;78:71-91.
9. Lebovitch SJ, Ross R. A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of fibroblast in vitro. Am J Pathol 1976;84:501-13.

10. Doherty DE, Downey GP, Worthen GS, Haslett C, Henson PM. Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils. *Lab Invest* 1988;59:200-13.
11. Doherty DE, Henson PM, Clark RA. Fibronectin fragments containing the RGDS cell-binding domain mediate monocyte migration into the rabbit lung. A potential mechanism for C5 fragment-induced monocyte lung accumulation. *J Clin Invest* 1990; 86:1065-75.
12. Adamson I, Bowden D. The origin and turnover of mononuclear and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages. *Lab Invest* 1980;42:518-24.
13. Revak SD, Rice CL, Schraufstatter IU, et al. Experimental pulmonary inflammatory injury in the monkey. *J Clin Invest* 1985;76:1182-92.
14. Shaw JO, Henson PM, Henson J, Webster RO. Lung inflammation induced by complement-derived chemotactic fragments in the alveolus. *Lab Invest* 1980;42:547-58.
15. Hance A, Douches S, Winchester R. Characterization of mononuclear phagocyte subpopulations in the human by use of monoclonal antibodies; changes in alveolar macrophage phenotype associated with sarcoidosis. *J Immunol* 1985;134:284-92.
16. Velo G, Spector W. The origin and turnover of alveolar macrophages in experimental pneumonia. *J Pathol* 1973;109:7-19.
17. van Furth R, Blusse van oud Alblas A. The current view of the origin of pulmonary macrophages. *Path Res Pract* 1982;175:38-49.
18. Denholm EM, Wolber FM, Phan SH. Secretion of monocyte chemotactic activity by alveolar macrophages. *Am J Pathol* 1989;135:571-80.

19. Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II epithelial cells. *J Biol Chem* 1991;266:9912-8.
20. Brieland JK, Kunkel R, Fantone JC. Pulmonary alveolar macrophage function during acute inflammatory lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1987;135:1300-6.
21. Harmsen AG, Muggenburg BA, Snipes MB, Bice DE. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science* 1985;230:1277-80.
22. Harmsen AG, Mason MJ, Muggenburg BA, Gillett NA, Jarpe MA, Bice DE. Migration of neutrophils from lung to tracheobronchial lymph node. *J Leukoc Biol* 1987;41:95-103.
23. Doherty DE, Hirose N, Zagarella L, Cherniack RM. Prolonged monocyte accumulation in the lung during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A noninvasive assessment of monocyte kinetics by scintigraphy. *Lab Invest* 1992;66:231-42.
24. Stewart CC. Murine Mononuclear Phagocytes from Bone Marrow. Method for Studying Mononuclear Phagocytes. New York: Academic Press, 1981:5-20. (Adams DO, Edelson PJ, Koren H, ed.
25. Riches DW, Henson PM, Remigio LK, Catterall JF, Strunk RC. Differential regulation of gene expression during macrophage activation with a polyribonucleotide. The role of endogenously derived IFN. *J Immunol* 1988;141:180-8.
26. Haston WS. F-actin distribution in polymorphonuclear leucocytes. *J Cell Sci* 1987;88:495-501.

27. Collins PD, Jose PJ, Williams TJ. The sequential generation of neutrophil chemoattractant proteins in acute inflammation in the rabbit in vivo. Relationship between C5a and proteins with the characteristics of IL-8/neutrophil-activating protein 1. *J Immunol* 1991;146:677-84.
28. Argenbright LW, Letts LG, Rothlein R. Monoclonal antibodies to the leukocyte membrane CD18 glycoprotein complex and to intercellular adhesion molecule-1 inhibit leukocyte-endothelial adhesion in rabbits. *J Leukoc Biol* 1991;49:253-7.
29. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, et al. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;94:1147-55.
30. Chuluyan HE, Issekutz AC. VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18-independent transendothelial migration of human monocytes. *J Clin Invest* 1993;92:2768-77.
31. Piguet PF, Vesin C, Grau GE, Thompson RC. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine* 1993;5:57-61.
32. Janick BD, Ranges GE, Hacker MP. Alteration of bronchoalveolar lavage cell populations following bleomycin treatment in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;100:465-73.
33. Karmiol S, Remick DG, Kunkel SL, Phan SH. Regulation of rat pulmonary endothelial cell interleukin-6 production by bleomycin: effects of cellular fatty acid composition. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;9:628-36.
34. Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 1992;18:29-43.

35. Hoyt DG, Lazo JS. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens, fibronectin and transforming growth factor-beta precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;246:765-71.
36. Phan SH, Gharaee KM, Wolber F, Ryan US. Stimulation of rat endothelial cell transforming growth factor-beta production by bleomycin. *J Clin Invest* 1991;87:148-54.
37. Carre PC, Mortenson RL, King TEJ, Noble PW, Sable CL, Riches DW. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. *J Clin Invest* 1991;88:1802-10.
38. Rosenthal GJ, Germolec DR, Blazka ME, et al. Asbestos stimulates IL-8 production from human lung epithelial cells. *J Immunol* 1994;153:3237-44.
39. Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, et al. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. *J Immunol* 1993;151:2852-63.
40. Erzurum SC, Downey GP, Doherty DE, Schwab B3, Elson EL, Worthen GS. Mechanisms of lipopolysaccharide-induced neutrophil retention. Relative contributions of adhesive and cellular mechanical properties. *J Immunol* 1992;149:154-62.
41. Dalhoff K, Bohnet S, Braun J, Kreft B, Wiessmann KJ. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in the pathogenesis of mononuclear cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 1993;48:1140-4.
42. van Dinther Janssen A, van Maarseveen T, Eckert H, Newman W, Meijer CJ. Identical expression of ELAM-1, VCAM-1, and ICAM-1 in sarcoidosis and usual interstitial pneumonitis. *J Pathol* 1993;170:157-64.

43. Paine R3, Rolfe MW, Standiford TJ, Burdick MD, Rollins BJ, Strieter RM. MCP-1 expression by rat type II alveolar epithelial cells in primary culture. *J Immunol* 1993;150:4561-70.

44. Joan KB, Craig MF, Michael LJ, et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:104-9.

45. Laszlo DJ, Henson PM, Remigio LK, et al. Development of functional diversity in mouse macrophages. Mutual exclusion of two phenotypic states. *Am J Pathol* 1993;143:587-97.

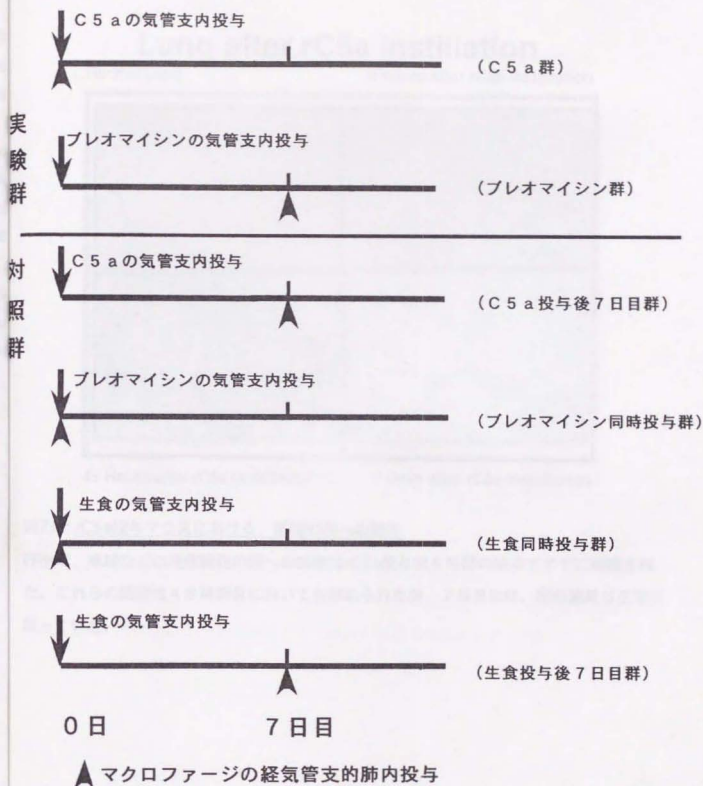
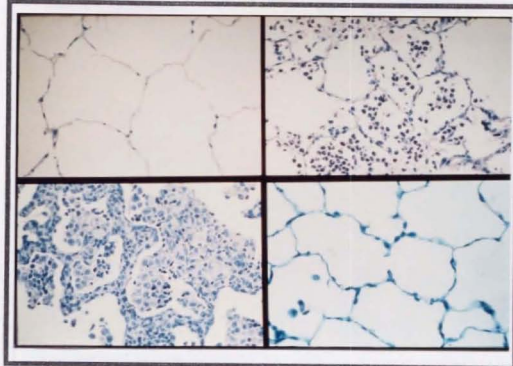


図1：薬剤（rC5a、プレオマイシン）と¹²⁵I-標識マクロファージの気管内への投与日程

Lung after rC5a Instillation

Normal Lung

6 Hours after rC5a Instillation



48 Hours after rC5a Instillation

7 Days after rC5a Instillation

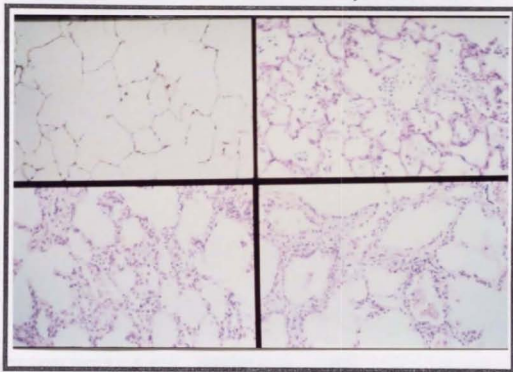
図2a : rC5a投与マウスにおける、単球の肺への遊走

好中球、単球などの炎症細胞の肺への集積はrC5a投与後6時間の時点ですでに観察された。これらの細胞は48時間目においても認められたが、7日目には、肺の組織は正常に戻っていた。

Lung after Bleomycin Instillation

7 Days after
Saline Instillation

7 Days after
Bleomycin Instillation



14 Days after Bleomycin
Instillation

21 Days after Bleomycin
Instillation

図2b: ブレオマイシン投与マウスにおける、単球の肺への遊走

ブレオマイシン投与後7日目から14日目にかけて、単球など炎症細胞の肺への集積を認めた。また、投与後21日目の時点でも、継続して炎症性反応を認めた。

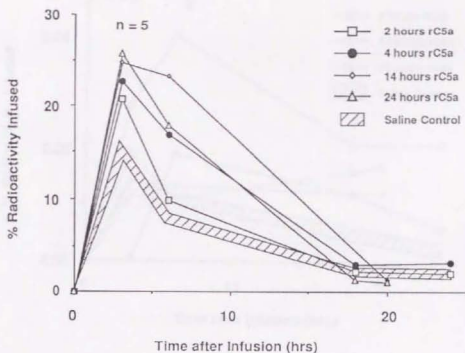


図3a : rC5a投与マウスにおける、標識単球の肺への集積

5 μ gのrC5aを気管内投与の後、2、4、14、24時間の時点で、 1.0×10^6 個の ^{125}I -標識単球を尾静脈からマウスに投与した。その後、3-24時間(横軸)にわたり、 ^{125}I -標識単球の肺への集積を観察した。最初に投与した ^{125}I -標識単球の放射能に対する肺の放射能の割合(%)を縦軸に示した。rC5a投与による炎症の過程で、生食群と比較して単球は、肺へ多く集積する傾向を示した。しかし各時間での集積には、有意差を認めなかった。データは平均値(mean, n=5)で示した。

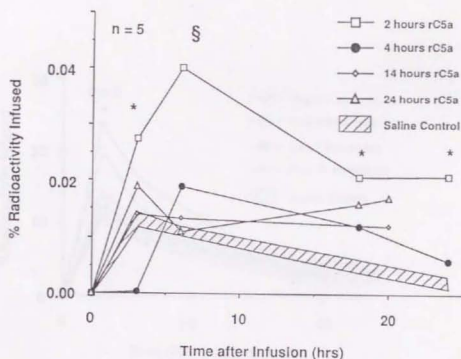


図3b : rC5a投与マウスにおける、標識単球の肺胞・末梢肺区画への遊走

図3aと同様に、rC5a投与マウスに¹²⁵I-標識単球を尾静脈から投与した。標識単球投与後3-24時間の時点で、マウス肺の気管支洗浄を行い、単球の肺胞・末梢肺区画への遊走を調べた。投与した¹²⁵I-標識単球の放射能に対する気管支肺胞洗浄液の放射能の割合

(%)を縦軸に示した。rC5a投与後、2時間の時点で単球の遊走は最大であった。データは平均値 (mean, n=5)で示した。* = $p < 0.05$, 2 hours rC5a vs. Saline Control.

§ = $p < 0.01$, 2 hours rC5a vs. Saline Control.

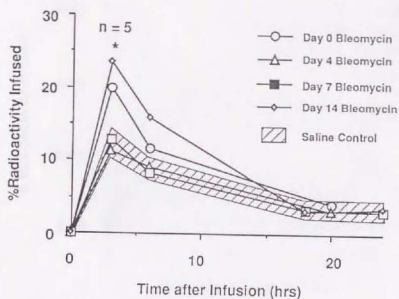


図4a : ブレオマイシン投与マウスにおける、標識単球の肺への集積

0.05mgのブレオマイシンを気管内投与し、同日あるいはその後4、7、14日の時点で、 1.0×10^6 個の ^{125}I -標識単球を尾静脈からマウスに投与した。その後、3-24時間にわたり、 ^{125}I -標識単球の肺への集積を観察した。投与した ^{125}I -標識単球の放射能に対する肺の放射能の割合(%)を縦軸に示した。ブレオマイシン投与と同日、あるいはその後14日の時点で、単球の肺への集積は生食対照群より、有意に多かった。ブレオマイシンの投与後4、7日の時点では、単球の肺への集積に、有意差を認めなかった。データは平均値(mean, n=5)で示した。

*=p < 0.05, Day 0 Bleomycin or Day 14 Bleomycin vs Saline Control.

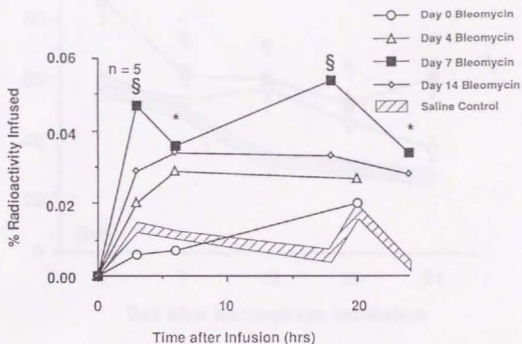


図4b: プレオマイシン投与マウスにおける、標識単球の肺胞・末梢肺区画への遊走

図4aと同様に、プレオマイシン投与マウスに ^{125}I -標識単球を尾静脈から投与した。標識単球投与後3-24時間の時点で、マウス肺の気管支洗浄を行い、単球の肺胞・末梢肺区画への遊走を調べた。投与した ^{125}I -標識単球の放射能に対する気管支肺胞洗浄液の放射能の割合(%)を縦軸に示した。プレオマイシンの投与後7日の時点で、単球の遊走が最大となった。データは平均値(mean, n=5)で示した。

*=p<0.05, Day 7 Bleomycin vs Saline Control. §=p<0.01, Day 7 Bleomycin vs Saline Control.

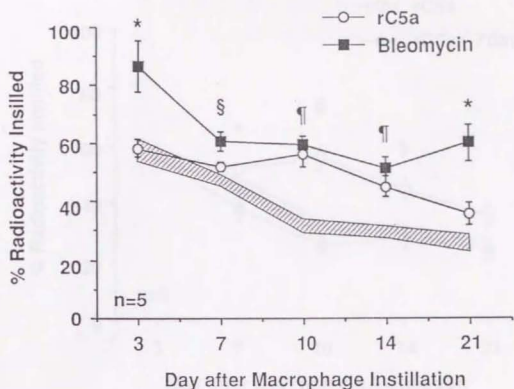


図5a : rC5a、ブレオマイシン投与マウスの肺における、長期の単球・マクロファージの滞留

rC5a、ブレオマイシン各々の炎症が頂点の時点で、 5.0×10^5 個の ^{125}I -標識マクロファージを気管内に投与して、その肺への滞留を観察した。標識マクロファージは、rC5aと同時(白色丸)、あるいはブレオマイシンの投与後7日目に(黒色四角)、投与した。生食対照群は斜線で示した。投与した ^{125}I -標識マクロファージに対する肺および気管支肺胞洗浄液の放射能の割合(%)を縦軸とした。横軸には ^{125}I -標識マクロファージを投与したのちの時間(日)を示した。rC5a投与と比較してブレオマイシン投与の方が、マクロファージの肺での長期の滞留が認められた。データは平均値±標準誤差(mean±SE)で示した。

* $p < 0.01$, Bleomycin vs rC5a and Saline Control. § $p < 0.05$, Bleomycin vs Saline Control. ¶ $p < 0.01$, Bleomycin or rC5a vs. Saline Control.

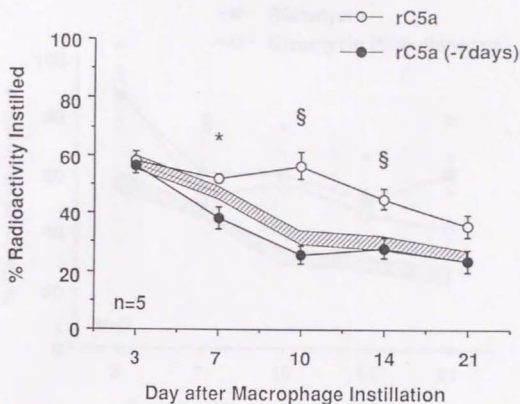


図5b: rC5a投与マウスの肺における、マクロファージの滞留

5 μ gのrC5aを気管内投与し、5.0 \times 10⁵個の¹²⁵I-標識マクロファージをそれと同時 (rC5a群、白色丸)、あるいはその7日後に (rC5a-7日群、黒色丸)、気管内に投与して、マクロファージの肺への滞留を調べた。縦軸と横軸は、図5aと同様である。生食投与の対照群の結果は斜線で示した。rC5aの炎症が終焉している投与後7日目の時点では、マクロファージの肺への滞留は生食対照群都ほぼ同様の傾向を示し、炎症の極期に比較して肺から早く除去された。データは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE)で示した。

*=p < 0.05, rC5a vs rC5a (-7 days). §=p < 0.01, rC5a vs rC5a (-7 days) and Saline Control.

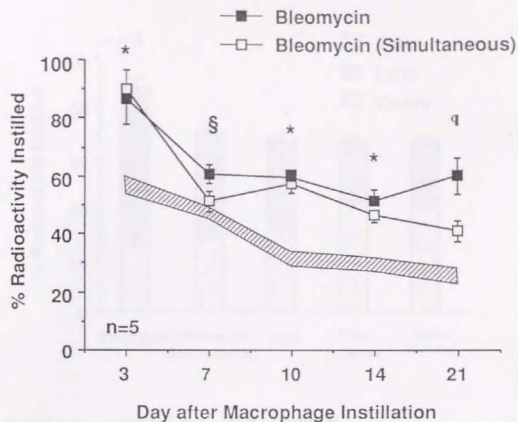


図5c: プレオマイシン投与マウス肺の炎症での、マクロファージの滞留

0.05mgのプレオマイシンを気管内投与し、 5.0×10^5 個の ^{125}I -標識マクロファージを同時(プレオマイシン同時群、白色四角)、またはその7日後に(プレオマイシン群、黒色四角)気管内に投与して、マクロファージの肺への滞留を調べた。縦軸と横軸は、図5aと同様である。プレオマイシン投与による炎症の極期では、それ以前の時点と比較して、長期にマクロファージが肺へ滞留した。データは平均値±標準誤差(mean±SE)で示した。

*= $p < 0.01$, Bleomycin or Bleomycin (Simultaneous) vs. Saline Control. §= $p < 0.05$, Bleomycin vs Saline Control. ¶= $p < 0.01$, Bleomycin vs. Bleomycin (Simultaneous) vs. Saline Control.

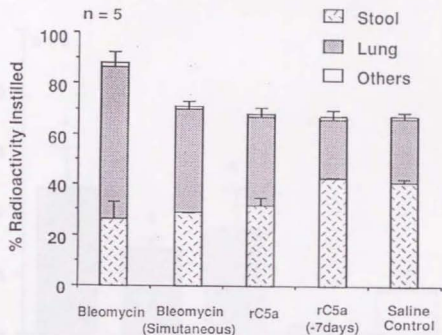


図6：マクロファージの肺からのクリアランスの経路

各マウスの群は図5a-cと同様である。 ^{125}I -標識マクロファージの気管内への投与後21日の時点で、肺、肝臓、脾臓、腎臓、消化管の放射能を測定し、投与した ^{125}I -標識マクロファージの放射能に対する割合(%)で示した(縦軸)。マウス・ゲージの飼育床(bedding)を実験中回収してその放射能を測定し、糞便へのマクロファージの排除とした。マクロファージは主に、経気管支的に消化管へとクリアランスを受け、またこのクリアランスの過程は炎症によって阻害された。肺と糞便のデータは 平均値±標準誤差(mean±SE)で、その他の臓器のデータはまとめて平均値のみを示した。

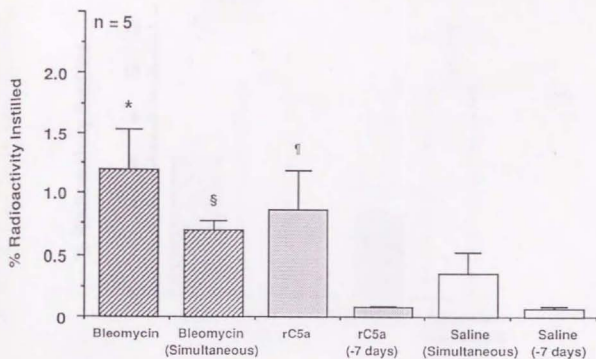


図7：マクロファージの肺からの肝臓、脾臓への集積

各マウスの群は図5a-cと同様である。標識マクロファージの肺内への投与後 21日の時点での、肝臓、脾臓の放射能を測定し、投与した¹²⁵I-標識マクロファージの放射能に対する割合(%)で示した(縦軸)。炎症の過程では正常の状態よりも多く、マクロファージが肺から肝臓・脾臓へ集積した。データは平均値±標準誤差(mean±SE)で示した。

* = Bleomycin vs. rC5a(-7days)($p < 0.01$) and both Saline Controls ($p < 0.05$).

§ = $p < 0.01$, Bleomycin (Simultaneous) vs. rC5a (-7days) and Saline Control (-7days).

¶ = $p < 0.01$, rC5a vs. rC5a (-7days) and Saline Control (-7days).

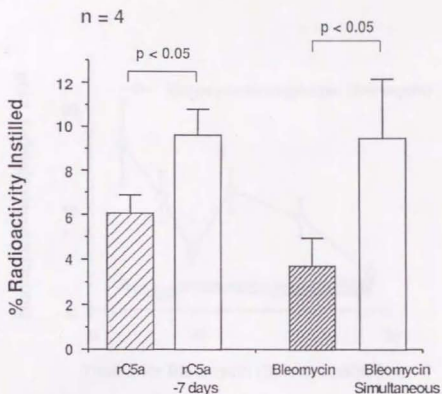


図8：炎症極期における気管支肺胞洗浄液中の標識マクロファージの割合

各マウスの群は図5a-cと同様である。 ^{125}I -標識マクロファージの肺内への投与後3日の時点での、気管支肺胞洗浄液の放射能を測定し、投与した ^{125}I -標識マクロファージの放射能に対する割合(%)で示した(縦軸)。rC5a群とrC5a-7日群の、肺全体の放射能(^{125}I -標識マクロファージの滞留)は同様であったが、気管支肺胞洗浄液中の放射能は、rC5a群(6.05±0.89%)はrC5a投与後7日目群(9.63±1.26%)よりも有意に($p < 0.05$)低値であった。プレオマイシン群とプレオマイシン同時投与群についても、肺全体の放射能は同様であるにもかかわらず、気管支肺胞洗浄液中の放射能は、プレオマイシン群(3.74±1.25%)はプレオマイシン同時投与群(9.48±2.75%)よりも有意に($p < 0.05$)低値であった。すなわち炎症の極期に肺内に投与されたマクロファージは、気管支肺胞洗浄されにくい状態にある。データは平均値±標準誤差(mean±SE)にて示した。

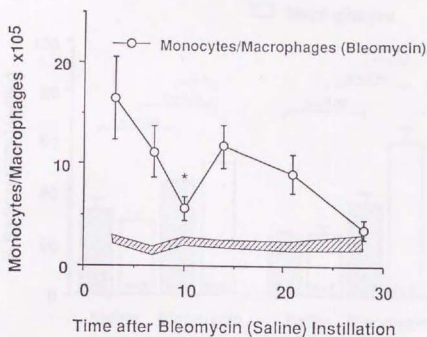


図9: プレオマイシン投与による肺炎症の過程における、気管支肺胞洗浄液中の単球・マクロファージ総数の経時的な変化

プレオマイシン投与後のマウス自体の単球・マクロファージの気管支肺胞洗浄液中の総数を調べた。生食対照群は斜線で示している。プレオマイシン投与後10日目に、一過性の有意な ($p < 0.05$) 単球・マクロファージ数の減少を認めた。これは、図8のプレオマイシン群における、¹²⁵I-標識マクロファージの投与後3日目と同じ時期にあたる。従って、プレオマイシンの炎症極期には、¹²⁵I-標識マクロファージのみならず、マウス自身の単球・マクロファージも気管支肺胞洗浄されにくいことを示している。データは平均値±標準誤差 (mean±SE) で示した。

* = $p < 0.05$, total number of monocytes/macrophages (Day 10) vs. (Day 7) and (Day 14).

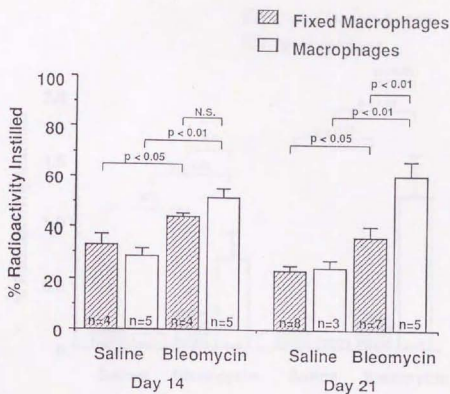


図10a : プレオマイシンによる炎症過程での、マクロファージと固定マクロファージの肺での滞留の比較

グルタルアルデヒドで固定処理した¹²⁵I-標識マクロファージ (Fixed Macrophages、斜線コラム) を用い、固定を行わないマクロファージ (Macrophages、白色コラム) と、肺での滞留を比較した。縦軸は図5aと同様である。固定マクロファージの滞留は、プレオマイシン群が生食群よりも有意に高かった。また、生きたマクロファージは、固定したマクロファージより多く肺に滞留した。データは平均値±標準誤差 (mean±SE) で示した。

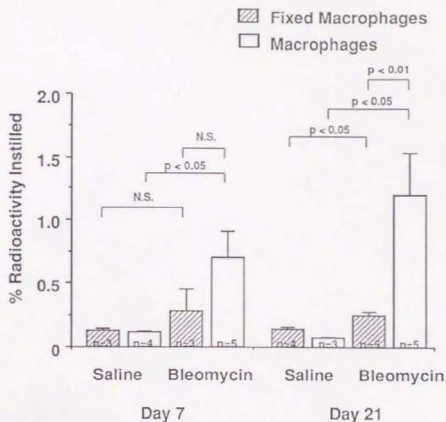


図10b: プレオマイシンによる炎症過程での、マクロファージと固定マクロファージの肝臓・脾臓への集積の比較

図10aと同様にプレオマイシン群、生食群を作製し、固定マクロファージ (Fixed Macrophages、斜線コラム)とマクロファージ (Macrophages、白色コラム) の肝臓・脾臓への集積を比較した。両マクロファージは、プレオマイシン群では生食群より、肝臓・脾臓へ多く集積した。しかし、マクロファージの方が、固定マクロファージより、プレオマイシンによる炎症過程で、より有意な($p < 0.01$)肝臓・脾臓への集積を示した。データは平均値±標準誤差 (mean±SE)で示した。

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS



Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak