

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462053

研究課題名(和文) 二光子励起顕微鏡を用いた敗血症マウス微小循環障害の生体内リアルタイムイメージング

研究課題名(英文) Intravital imaging of microcirculation on murine sepsis model using two-photon laser scanning microscopy

研究代表者

小林 美奈子 (KOBAYASHI, MINAKO)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30359765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス敗血症モデルを用い、微小循環における白血球-血小板-血管内皮細胞の相互作用を二光子励起顕微鏡下で生体内可視化した。

盲腸壁内の後毛細管細静脈や肝類洞では、白血球の血管内皮細胞への接着、白血球への血小板接着、血小板凝集が観察できた。また、これらの反応で惹起されるNeutrophil Extracellular Traps(NETs)を可視化できた。NETsは形態学的に、anchored NETsとcell-free NETsに分類できた。組織微小血管内における白血球-血小板-血管内皮細胞の過剰な相互作用は循環障害を引き起こす可能性があり、NETsも関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We developed a method of intravital imaging of interaction between leukocytes, platelets and vascular endothelium in tissue microcirculation of a lipopolysaccharide -induced sepsis model using a two photon laser scanning microscopy.

We imaged the rolling or adhesion of leukocytes to vascular endothelium, leukocyte-platelet aggregates, and platelet aggregation in postcapillary venules of the cecum and hepatic sinusoids in vivo real-time. We also imaged neutrophil extracellular traps (NETs) which are activated by these interactions. NETs were classified as two distinct forms; cell-free NETs that were released away from neutrophils (fragmented or cotton-like structures) and anchored NETs that were anchored to neutrophils (linear, reticular, membranous, or spot-like structures). NETs seemed to be associated with the formation of platelet aggregates or leukocyte-platelet aggregates. These observations may suggest the adverse effect of intravascular NETs on the host during a sepsis.

研究分野：消化器外科

キーワード：二光子励起顕微鏡 敗血症 リアルタイムイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

重症感染症は感染によって生じた炎症反応が全身に波及し(systemic inflammatory response syndrome: SIRS)、敗血症(sepsis)、ショック、播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation syndrome: DIC)をきたす状態で、様々な臓器障害(multiple organ failure: MOF)を引き起こす。腹部外科領域とくに消化器系疾患での sepsis, DIC 合併率は高く、その病態解明と新たな治療法の開発は喫緊の課題である。

二光子励起顕微鏡(Two-Photon Laser Scanning Microscopy; TPLSM)は物質励起に二光子過程を利用した顕微鏡で、長波長の励起光を用いるため共焦点顕微鏡より退色・光毒性が低く、生きたまま組織や細胞の観察が可能(低光毒性)である。また、組織表面から数百マイクロメートルの深部まで観察でき(高透過性;我々の腹腔内臓器の生体内イメージングでは400 $\mu$ mまで)、形態学的な3次元解析も可能である。さらに、蛍光波長の異なる二つの蛍光色素(Green Fluorescent Protein; GFP と Red Fluorescent Protein; RFP など)を1波長で同時励起する多重同時染色により標識された2つの標的の相互作用の解析が容易にできる。

我々は独自の腹腔内臓器固定法を確立し(Japanese Patent No. 5268282)、その高倍率かつ高分解能な生体内リアルタイム画像を得ることに成功し、さまざまな病態モデルで細胞レベルの形態学的解析を行ってきた。二光子レーザー誘発性、選択的血管内皮傷害による血小板血栓形成モデルでは、ヘパリンや組織プラスミノゲン活性化因子の血栓形成予防効果や血栓溶解効果の生体内評価法を確立し報告した(Koike Y, Tanaka K et al. J Thromb Thrombolysis. 2011)。

近年、炎症と凝固のクロストークから敗血症性 DIC をとらえる研究報告が多くみられる(1. 血小板による細菌処理機能、2. 活性化血小板による NETs : neutrophil extracellular traps 促進など)。我々は、これらの病態の全体像を統合的かつ実体的にとらえ形態学的に解析するために TPLSM を用いた生体内イメージングを用いることとした。

## 2. 研究の目的

敗血症性 DIC における組織微小循環における白血球-血小板-血管内皮細胞の相互作用を、細胞レベルで生体内可視化(600-1200倍以上)し、形態学的解析を行い評価する(生体内リアルタイムイメージング)。さらに、組織微小循環障害に対する抗凝固薬や抗炎症薬の反応を継時的に生体内で形態学的変化を TPLSM 下 'dynamic pathology' により可視化し、薬物の作用点および作用機序を統合的に評価する。

## 3. 研究の方法

Green Fluorescent Protein (GFP) マウスに lipopolysaccharide (LPS: B4) 20mg/kg を腹腔内投与し敗血症モデルを作成した。盲腸または肝臓を創外に脱転し、Organ Stabilizing System (Japanese Patent No. 5268282)にて固定。TPLSM で盲腸壁内の毛細血管後細静脈(10-50 $\mu$ m)または肝類洞を水浸600倍~1200倍で生体内観察し、白血球-血小板-血管内皮細胞の相互作用を形態学的に解析した。

Red Fluorescent Protein (RFP) 標識大腸菌(E.coli)を静脈内投与し、血管内に侵入した生菌の動態を生体内観察し、白血球-血小板-血管内皮細胞との相互作用を形態学的に解析した。

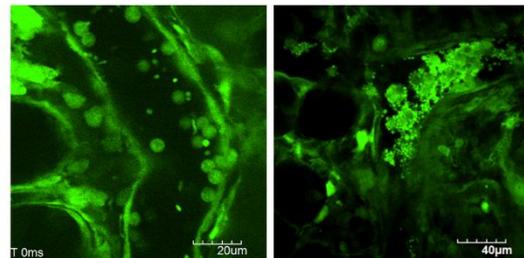
Antithrombin III (AT-III 製剤) (250単位/kg)を投与し、微小循環における白血球-血小板-血管内皮細胞に対する効果およびその作用点を形態学的に解析・評価した。

核酸染色試薬(SYTOX Orange Nucleic Acid Stain; Invitrogen)を静脈内投与し、微小循環における細胞外DNAを生体内観察し、形態学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) マウス敗血症モデルにおける白血球-血小板-血管内皮細胞との相互反応

Figure 1. 白血球-血小板-内皮細胞反応



GFP マウスに LPS (B4) 20mg/kg 腹腔内投与24h後の生存率は約50%であった。生存マウスでは活動性低下、立毛、震えを認め、消化管微小循環(盲腸壁内の後毛細管細静脈)において高率に白血球が血管壁をローリングしたり、血管内皮細胞に接着していた。白血球と血小板から成る凝集塊は微小血管を閉塞するようにも見えた。

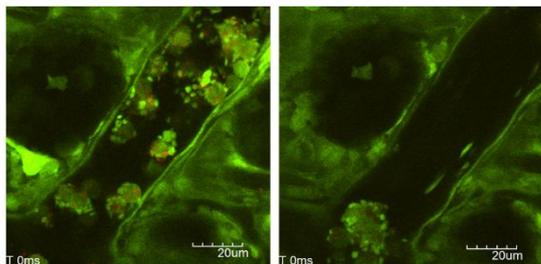
(2) 微小循環における血管内皮細胞に接着した好中球-血小板凝集塊に対する Antithrombin III (AT-III) 製剤の効果

基礎研究では、敗血症に対する AT-III 製剤の有効性が報告されている (Iba T, et al. Intensive Care Med. 2005;31:1101-8.)。

白血球が血管内皮細胞に接着し、白血球と血小板から成る凝集塊が微小血管を閉塞するようにも見える部位を同定し、AT-III 製剤を静脈内投与し観察した。

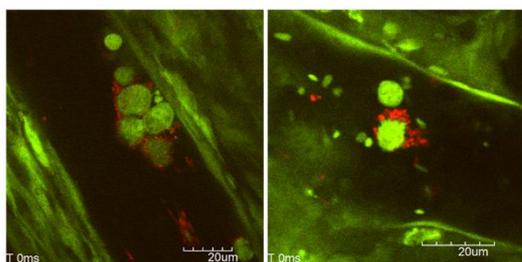
時間の経過とともに接着した白血球が遊離し、最終的には凝集塊は消失した。AT-III 製剤の末梢循環障害改善作用が示唆された。

Figure 2. 白血球-内皮細胞反応に対するATIII製剤作用



### (3) 血管内皮細胞に接着した好中球と血管内浮遊大腸菌との反応

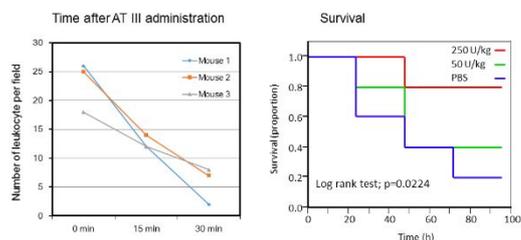
Figure 3. 大腸菌と血管内皮に接着した白血球との反応



敗血症マウスに RFP 標識 E.coli を静脈内投与すると、E.coli と血小板とが凝集塊となって血管内を流れるのが観察できた。また、血管内皮細胞に接着した白血球周囲に E.coli が網状に接着するのが観察された。以上より、LPS で活性化され血管内皮細胞に接着している白血球（主に好中球）が NETs を放出している可能性が示唆された。

### (4) 血管内皮細胞に接着した好中球に対する AT-III 製剤の効果

Figure 4. マウス敗血症モデルにおけるAT-IIIの効果

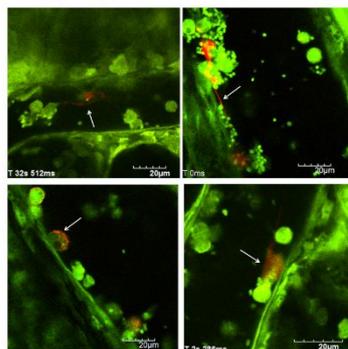


AT-III 製剤により血管内皮細胞に接着している白血球数（同一視野、単位面積当たり）は経時的に現小していった。

また、LPS 投与前に AT-III 製剤を投与し、敗血症による死亡が予防できるかどうかを検討したところ、AT-III 製剤は有意に LPS 誘発性敗血症関連死亡率を改善した。

### (5) マウス敗血症モデルの微小循環における NETs の形態学的解析

Figure 5. マウス敗血症モデルにおける NETs (Anchored)



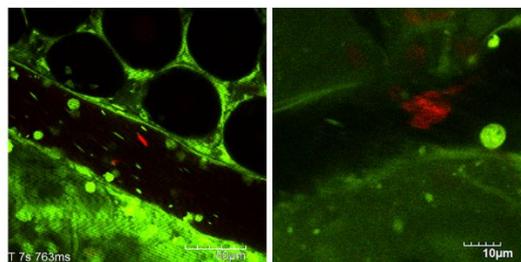
好中球は感染防御の最前線で機能する免疫細胞である。Neutrophil Extracellular Traps (NETs) は好中球自身の DNA や granule protein を含む網目状の構造物を放出する現象で、細菌などの感染源を効率的に補足し除去する機構と考えられている。

敗血症性 DIC における組織微小循環における白血球-血小板-血管内皮細胞の相互作用を検討するために、細胞外 DNA を染色し NETs の形態学的解析を行った。

NETs は血管壁に接着している白血球から網状、直線状、斑点状、膜状構造物として付着しているように存在していた。

### (6) NETs の形態学的解析 - 2

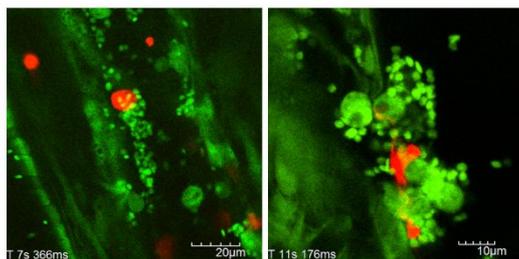
Figure 6. マウス敗血症モデルにおける NETs (Cell-free)



白血球より遊離した NETs は断片状または綿花状の構造物として観察でき、血中を流れていた。

(7) マウス敗血症モデルの微小循環における NETs の機能(形態学的解析から想定される仮説)

Figure 7. NETsと組織微小循環との関連

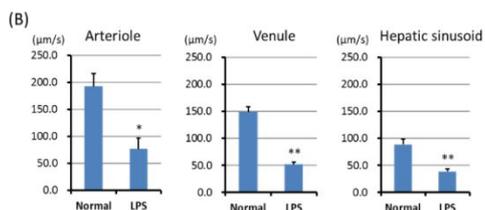


白血球から放出された Anchored NETs は周囲の白血球および血小板の凝集を促進し、組織微小血管を閉塞する可能性が示唆された。

白血球から放出され血管内に遊離した Cell-free NETs は血管内皮細胞に接着し、血小板とも結合・血小板凝集塊を形成することで、微小血管を閉塞する可能性が示唆された。

(8) マウス敗血症モデルの微小循環の血流の変化

Figure 8. マウス敗血症モデルにおける血流



LPS 誘発性敗血症マウスの盲腸壁内の細動脈や毛細血管後細静脈の血流は、正常マウスに比べ有意に低下していた。

LPS 投与により生じた血管内皮細胞に接着した白血球-血小板凝集塊や NETs が関与する白血球-血小板凝集塊は、末梢循環障害を引き起こす可能性がある。

ATIII 製剤や DNase は、白血球-血小板-血管内皮細胞との反応を改善し、末梢循環を改善する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Impact of Surgical Infection Society/Infectious Disease Society of

America-recommended antibiotics on postoperative intra-abdominal abscess with image-guided percutaneous abscess drainage following gastrointestinal surgery. Okita Y, Kobayashi M, Araki T, Fujikawa H, Koike Y, Otake K, Mikihiro I, Toiyama Y, Ohi M, Tanaka K, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Yamakado K, Kusunoki M. Surg Today. 2015 Aug;45(8):993-1000. doi: 10.1007/s00595-014-1047-5. 査読あり

2. Dynamic pathology for leukocyte-platelet formation in sepsis model. Koike Y, Tanaka K, Kobayashi M, Toiyama Y, Inoue Y, Mohri Y, Uchida K, Mizoguchi A, Kusunoki M. J Surg Res. 2015 May 1;195(1):188-95. doi: 10.1016/j.jss.2014.05.016. 査読あり
3. Risk factors for anastomotic leakage and favorable antimicrobial treatment as empirical therapy for intra-abdominal infection in patients undergoing colorectal surgery. Kobayashi M, Mohri Y, Ohi M, Inoue Y, Araki T, Okita Y, Kusunoki M. Surg Today. 2014 Mar;44(3):487-93. doi: 10.1007/s00595-013-0575-8. 査読あり
4. Infantile Crohn's disease is one of the risk factors for catheter-related bloodstream infection. Koike Y, Uchida K, Inoue M, Ide S, Hashimoto K, Matsushita K, Otake K, Ohkita Y, Araki T, Kobayashi M, Mohri Y, Kusunoki M. Pediatr Int. 2014 Jun;56(3):364-8. doi: 10.1111/ped.12304. 査読あり

[学会発表](計9件)

1. 第115回日本外科学会定期学術集会 平成27年4月16日~18日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 虚血再灌流臓器障害における全身性炎症反応と Neutrophil Extracellular Traps との関連 田中光司、小池勇樹、井出正造、今岡裕基、野口智史、森浩一郎、沖上正人、川村幹雄、奥川喜永、三枝晋、間山裕二、大井正貴、小林美奈子、井上靖浩、荒木俊光、内田恵一、毛利靖彦、楠正人
2. 日本外科感染症学会 第28回学術集会、平成27年12月2日~3日、名古屋東急ホテル(愛知県・名古屋市) 外科・救急領域における重症感染症の治療戦略術後腹膜炎 下部消化管手術後縫合不全のマネジメント 小林美奈子、大北喜基、大井正貴、廣純一郎、藤川裕之、川村幹雄、井上幹大、間山裕二、田中光司、荒木俊光、井上靖浩、毛利靖彦、楠正人
3. 日本外科感染症学会 第28回学術集会、平成27年12月2日~3日、名古屋東急

- ホテル(愛知県・名古屋市) 在宅静脈栄養中に肺 Nocardia 症から菌血症を発症した一例 川村 幹雄, 小林 美奈子, 市川 崇, 近藤 哲, 大北 喜基, 問山 裕二, 大井 正貴, 荒木 俊光, 井上 靖浩, 毛利 靖彦, 楠 正人
4. 日本外科感染症学会 第28回学術集会、平成27年12月2日~3日、名古屋東急ホテル(愛知県・名古屋市) アポトーシス陽性好中球吸着除去により末梢血好中球生存率を改善する新規血液浄化療法 田中 光司, 荒木 俊光, 近藤 哲, 今岡 裕基, 大北 喜基, 川村 幹雄, 井出 正造, 問山 裕二, 奥川 喜永, 大井 正貴, 小林 美奈子, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人
  5. 日本外科感染症学会 第27回学術集会、平成26年12月4日~5日、東京コンファレンスセンター・有明(東京都・江東区) 腹腔内感染症の Total management 大腸術後縫合不全のマネジメント 小林 美奈子, 大井 正貴, 廣 純一郎, 問山 裕二, 井上 靖浩, 藤川 裕之, 大北 喜基, 荒木 俊光, 田中 光司, 毛利 靖彦, 楠 正人
  6. 日本外科感染症学会 第27回学術集会、平成26年12月4日~5日、東京コンファレンスセンター・有明(東京都・江東区) 術後腹腔内膿瘍における SIS/IDSA ガイドラインを遵守した抗菌薬の与える影響 大北 喜基, 小林 美奈子, 荒木 俊光, 藤川 裕之, 井上 幹大, 大井 正貴, 田中 光司, 問山 裕二, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人
  7. 日本外科感染症学会 第26回学術集会、平成25年11月25日~26日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) SSI 予防対策の標準化 術前腸管処置 小林 美奈子, 毛利 靖彦, 大北 喜基, 井上 幹大, 荒木 俊光, 田中 光司, 井上 靖浩, 問山 裕二, 大井 正貴, 内田 恵一, 楠 正人
  8. 日本外科感染症学会 第26回学術集会、平成25年11月25日~26日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 腹腔内汚染モデルにおける縫合糸の抗菌性の評価 モノフィラメントの有用性 沖上 正人, 小林 美奈子, 田中 光司, 北嶋 貴仁, 松下 航平, 大北 喜基, 井上 幹大, 大井 正貴, 荒木 俊光, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人
  9. 日本外科感染症学会 第26回学術集会、平成25年11月25日~26日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市) 二光子励起顕微鏡を用いたマウス敗血症モデルにおける Neutrophil Extracellular Traps の生体内可視化 田中 光司, 小池 勇樹, 志村 匡信, 井出 正造, 今岡 裕基, 近藤 哲, 北嶋 貴仁, 問山 裕二, 小林 美奈子, 井上 幹大, 井上 靖浩, 荒木

俊光, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 小林 美奈子 (KOBAYASHI Minako)  
三重大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 30359765

(2) 研究分担者 小池 勇樹 (KOIKE Yuki)  
三重大学・医学部附属病院 助教  
研究者番号: 10555551

(3) 研究分担者 問山 裕二 (TOIYAMA Yuji)  
三重大学・医学系研究科・助手  
研究者番号: 00422824

(4) 研究分担者 田中 光司 (TANAKA Koji)  
三重大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 10345986

(5) 研究分担者 毛利 靖彦 (MOHRI Yasuhiko)  
三重大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 70345974

(6) 研究分担者 溝口 明 (MIZIGUCHI Akira)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 90181916

(7) 研究分担者 楠 正人 (KUSUNOKI Masato)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 50192026

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：