

# Phenylhydrazine 投与ラットにおける 急性肺血栓症の形成機序に関する研究

佐藤 寛子

# Phenylhydrazine 投与ラットにおける 急性肺血栓症の形成機序に関する研究

(Studies on pathogenesis of acute thrombosis in  
Phenylhydrazine treated rat)

佐藤 寛子

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科  
獣医学専攻 博士課程

(指導教授：高橋 公正)

平成 28 年 3 月

# 目次

第1章. 序論.....	4
1.1 本研究の背景.....	4
1.2 Phenylhydrazine の一般的毒性.....	4
1.3 肺血栓症.....	5
1.4 一般的な血栓誘発剤とその病理学的特徴.....	5
1.5 図.....	7
第2章. Phenylhydrazine 投与ラットに認められた急性肺血栓症および 主要臓器の病変.....	8
2.1 緒言.....	8
2.2 材料と方法.....	9
2.2.1 試験デザイン（動物・被験物質・投与方法）.....	9
2.2.2 病理解剖学的検査.....	9
2.2.3 病理組織学的検査（光学顕微鏡検査）.....	9
2.2.4 電子顕微鏡検査.....	10
2.3 結果.....	11
2.3.1 死亡および一般状態.....	11
2.3.2 病理解剖学的所見.....	11
2.3.3 病理組織学的所見.....	11
2.3.4 肺の電子顕微鏡所見.....	12
2.4 考察.....	13
2.5 小括.....	15
2.6 図.....	16
第3章. Phenylhydrazine 投与ラットの経時的な血液学的・病理組織学 的变化.....	20
3.1 緒言.....	20
3.2 材料と方法.....	21
3.2.1 試験デザイン（動物・被験物質・投与方法）.....	21
3.2.2 血液学的検査.....	21
3.2.3 病理組織学的検査.....	22
3.2.4 統計学的解析.....	22
3.3 結果.....	23
3.3.1 血液および凝固系パラメータの変動.....	23
3.3.2 病理組織学的検査（光学顕微鏡検査）.....	23
3.3.3 電子顕微鏡検査.....	23
3.4 考察.....	25
3.5 小括.....	27

3.6 表および図 .....	28
第 4 章. Phenylhydrazine 投与ラットの肺における経時的な遺伝子発現 解析 33	
4.1 緒言 .....	33
4.2 材料と方法 .....	34
4.2.1 試験デザイン（動物・被験物質・投与方法） .....	34
4.2.2 病理組織学的検査 .....	34
4.2.3 遺伝子発現解析 .....	34
4.2.4 統計学的解析 .....	35
4.3 結果 .....	36
4.3.1 病理組織学的検査 .....	36
4.3.2 内皮細胞に発現する血栓症関連遺伝子の発現変動 .....	36
4.3.3 PHZ 投与により変動した遺伝子の GO 解析 .....	37
4.4 考察 .....	39
4.5 小括 .....	41
4.6 表および図 .....	42
第 5 章. 総括 .....	45
謝辞 .....	48
参考文献 .....	49
英語要旨 .....	55

# 第1章. 序論

## 1.1 本研究の背景

血液毒性・造血毒性を示す薬剤を若齢ラットに投与した際の病理学的変化を整理する目的で、我々はいくつかの代表的な毒性物質を用いた短期毒性試験を計画した。その1つとして Phenylhydrazine (PHZ) を選択した。PHZ が末梢赤血球を標的とした血液毒性を示すことが報告されていたからである。この毒性試験において、我々はこれまでに PHZ の毒性としては報告のない急性肺血栓症に遭遇したことから、本病変の発生メカニズムを探索することとした。

## 1.2 Phenylhydrazine の一般的毒性

PHZ は化学式  $C_6H_5NHNH_2$  で表される有機化合物で (Fig. 1-1)、医薬品、農薬、化学工業の分野で化学的中間体として世界中で使用されている (Cary et al., 2008)。また、PHZ はヒトを含む動物において強い溶血を引き起こすことが知られており、溶血性貧血の動物モデル作製や (Cristwell et al., 2000; Redondo et al., 1995)、ヒトにおいては赤血球増多症の治療に用いられていた歴史もある (Reinhardt and Brittelli, 1981)。PHZ によって引き起こされる溶血は、赤血球の主要酵素や膜成分である蛋白・リン脂質、ヘモグロビンを酸化的に傷害することに起因する (Jain, 1985; Bloom and Brandt, 2008)。傷害された赤血球は、肝臓や脾臓のマクロファージに貪食されることで循環血液中から選択的に除去され、その結果、急性貧血が発症するのである (Redondo et al., 1995)。この血管外溶血以外に、PHZ が血管内での溶血を引き起こすとの報告もある (Magnani et al., 1986; Adachi, 1977)。また、PHZ は生体分子に一般的に存在するカルボニル基の  $-C=O$  と容易に反応するため、生体分子へ直接結合して障害を起こすことや、PHZ がチトクロム P450 によって代謝を受ける際にフリーラジカルが生じ、二次的に細胞傷害を引き起こされることが推定されている (Cary et al., 2008)。

短期間の PHZ の暴露によって引き起こされる毒性学的所見は、溶血性貧血を示唆する一般状態 (チアノーゼ)、血液学的所見 (赤血球、ヘマトクリット、ヘモグロビンの低値、網状赤血球の高値、メトヘモグロビンやハインツ小体の形成) に加え、それに関連した病理学的所見である。具体的には、肉眼所見として脾臓の腫大、諸臓器の褐色調変化、組織所見として脾臓・肝臓・腎臓における赤血球貪食像、

褐色色素沈着，髄外造血亢進などである（Cary et al., 2008）。これらの所見はラット・マウス・イヌ・ウサギ等を用いた急性～亜急性の毒性試験において報告されており、経口、経皮、吸入のいずれの経路でも起こり得る。しかしながら、これらの毒性試験の報告は古くあいまいな記載が多いため、上述した所見以外については利用できる情報はほとんどない。また、近年の文献を含めても、PHZによる血栓症の発生については報告がない。

一方、限られた情報ではあるが、赤血球増多症治療の目的で投与されたヒトにおいては、副作用として黄疸、拒食症、吐き気、皮膚炎に加え、血栓症の報告がある（Reinhardt and Brittelli, 1981）。

### 1.3 肺血栓症

肺血栓症は静脈血栓塞栓症に関連する病態であるが、ヒトの一般集団において罹患率・死亡率ともに高い心血管系疾患の一つである（White, 2003; Cohen et al., 2007）。肺血栓症の原因となるリスク因子は様々であり、外科手術、外傷、長期間の不動状態といったものだけでなく、血液学的異常も主要な因子に数えられる（Anderson and Spencer, 2003）。また、鎌状赤血球症や自己免疫性溶血性貧血のようないくつかの溶血性疾患では、多くの場合に肺血栓症と高血圧を伴うことが報告されている（Kato and Taylor, 2010）。

### 1.4 一般的な血栓誘発剤とその病理学的特徴

一般的に、血栓が形成されるメカニズムには大きく分けて、1)血管内皮傷害、2)うっ血や乱流などの血流障害、3)血液の凝固性亢進、の3つの因子が単独あるいは相互に複雑に関与していると考えられている（Mitchel, 2013）。これらのメカニズムを利用して、血栓症など血液疾患の研究分野では様々な血栓症モデルが提唱・利用されている（Suzuki, 2007）。光・レーザーで血管傷害を惹起するもの、結紮により内皮傷害とうっ血を起こすもの、塩化鉄との接触により血管壁を酸化傷害するものなど、物理的・化学的刺激により作製するモデルもあれば、Lipopolysaccharide (LPS)やTissue factorを投与することにより血液凝固を亢進さ

せて作製する血栓症モデルもある。これらのモデルは動脈あるいは静脈に血栓を誘発するが、そのメカニズムが異なるために血栓の性状も異なっている。

LPSは播種性血管内凝固症候群（DIC）を誘発する、よく知られた化学物質である（Suzuki, 2007）。LPSは短期間の投与で肺・肝臓・腎臓をはじめとする諸臓器の微小血管にフィブリンを主成分とした血栓を形成するのが特徴で、その病態発生の主要因はLPSにより活性化された単球・マクロファージ系と内皮細胞により発現されるTissue factorであると考えられている（Hara et al., 1997; Sueishi, 1994; Kawamura et al., 1993）。LPS処置ラットでは、血小板減少、プロトロンビン時間（PT）の延長、フィブリノーゲンの減少といった凝固異常を示唆する血液学的所見とともに、肺においては初期には肺泡毛細血管内に、続いて動脈内にも、フィブリンを主体とする血栓が認められることが報告されている（Hara et al., 1997）。

2-Butoxyethanol（2-BE）は、血栓症ではなく鎌状赤血球症のモデル作製に利用できると報告されているものだが、諸臓器での血栓形成を誘発する（Nyska et al., 1999; Ezov et al., 2002; Ramot et al., 2007）。2-BEは赤血球を膨化・溶血させる化学物質であり、赤血球と血小板の相互作用が促進されることによって血栓が形成される可能性が示唆されている（Lewis et al. 2006）。血栓は様々な組織の様々なサイズの血管に認められ、その成分は多くが赤血球であり、それに多少のフィブリンと顆粒状物質が混在する（Ghanayem et al. 2001）。2-BE処置ラットでは、トロンビン・アンチトロンビン複合体の高値は認められるものの、フィブリノーゲン、PT、活性化部分トロンボプラスチン（APTT）の変動は小さく、凝固系への影響はマイルドである。明確なのは赤血球の形態異常と減数であり、これとともに肺では主に中型～大型の血管内に凝集赤血球を主体とした血栓が認められている。

このように、化学物質により誘発される血栓症のメカニズムは多様かつ複雑である。しかし、化学物質投与初期の血液学的・組織学的変化にはメカニズムを反映した特徴的な像が認められるため、詳細を検索することで何が最も重要な因子となっているかを理解することが可能である。

上記のようにPHZは、溶血作用とそれに関連する二次的毒性所見については有用な情報があるものの、血栓症に関する実験報告はない。一方ヒトにおいてはPHZと血栓症、あるいは溶血性疾患と肺血栓症との関連性が示唆されている。今回我々は、ラットにPHZを短期反復投与することで肺に特異的な血栓症を誘発することを発見したので、血液学的・組織学的に病変の特徴を整理し、遺伝子発現解析を用いてその病態発生のメカニズムについて研究を行った。

## 1.5 図

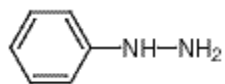


Fig. 1-1 Phenylhydrazine の化学構造

ベンゼンの水素 1 つをヒドラジン基で置換した構造を持つ。黄色ないし薄茶色の結晶、または黄色味を帯びた油状の液体として存在する。



## 第2章. Phenylhydrazine 投与ラットに認められた急性肺血栓 症および主要臓器の病変

### 2.1 諸言

血液毒性あるいは造血毒性を示す薬剤や化学物質を若齢ラットに投与した際の病理学的変化を整理する目的でいくつかの代表的な毒性物質を用いた毒性試験を実施した。第1章で述べたように、PHZは溶血性貧血を引き起こす化学物質としてよく知られており、短期間の投与で赤血球系への傷害や二次的な造血反応を示唆する病理変化が期待された (Cary et al., 2008)。そこで我々は、PHZを若齢ラットに短期間反復投与し、病理学的検査を実施することとした。

この毒性試験において、上述したような期待される組織学的変化のほかに、これまでに報告のない肺血栓症の組織像が確認された。本章では、主要臓器の病変に加え、肺については詳細な病理学的検索の結果を述べる。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 試験デザイン（動物・被験物質・投与方法）

5週齢の雄の Sprague-Dawley (SD) ラット (Charles River Laboratories Japan Inc. Tsukuba, Japan) を購入した。動物はステンレスケージに3匹～5匹ずつに収容し、温度  $23 \pm 2$  °C、湿度  $55 \pm 15\%$ 、明暗周期 12 時間で制御されたバリアシステムの動物室で飼育した。飼育期間中の餌は CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)、水は水道水の自由摂取とした。1 週間の検疫・馴化を実施した後、7 匹に、 $50 \text{ mg/kg/day}$  の PHZ (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) を 3 日間反復腹腔内投与した。PHZ は生理食塩液に溶解し、 $10 \text{ mL/kg}$  の用量で投与した。また、別の 7 匹を対照群として設定し、同様の手技で生理食塩液を投与した。計画解剖動物は最終投与後 24 時間の時点で麻酔し、放血安楽死させた。死亡動物は死亡発見後速やかに病理解剖学的検査に供された。この実験は田辺三菱製薬株式会社の動物倫理委員会による承認を受け、実験動物の使用に関する倫理規定を順守して実施された。

### 2.2.2 病理解剖学的検査

死亡した、あるいは安楽死させた動物の肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓を摘出し、肉眼観察を実施した。

### 2.2.3 病理組織学的検査（光学顕微鏡検査）

摘出した臓器を肉眼観察後、速やかに 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬固定した。定法に従ってパラフィンに包埋し、厚さ  $4 \mu\text{m}$  の切片を作製した。この組織切片にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、マッソン・トリクローム (MT) 染色、およびリンタングステン酸・ヘマトキシリン (PTAH) 染色を施して光学顕微鏡下で観察した。また、同様に作製された組織切片を用いて、ポリマー法によるフィブリンの免疫組織化学的染色を実施した。一次抗体にはフィブリン、フィブリノーゲン、およびフィブリノーゲンフラグメント D・E に対するウサギのポリクローナル抗体 (DAKO Japan Co., Ltd., Kyoto, Japan) を希釈倍率 1000 倍で使用した。詳細は以下のとおりである。

#### a) 脱パラフィン処理

- b) 内因性ペルオキシダーゼの不活化  
0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加メタノール処理 30分
- c) proteinase K 処理 36°C 5分
- d) 非特異的反応のブロッキング  
スキムミルク 30分
- e) 一次抗体 4°C一晩
- f) 標識ポリマー（二次抗体と酵素のポリマー；Histofine Simple Stain  
MAX-PO (MULTI), Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan) 30分
- g) 発色  
Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 基質溶液 1~3分
- h) ヘマトキシリンによる対比染色
- i) 脱水・封入

#### 2.2.4 電子顕微鏡検査

ホルマリン固定された肺を細切し、1%四酸化オスミウムで後固定した。定法に従ってエポキシ樹脂に包埋し、超薄切切片を作製した。この超薄切切片に酢酸ウラン・クエン酸鉛の二重染色を施し、電子顕微鏡下で観察した (JEOL-1210; JEOL, Tokyo, Japan)。

## 2.3 結果

### 2.3.1 死亡および一般状態

PHZ 投与ラットにおいて、初回投与後 6 時間から皮膚の蒼白・眼球の褪色などの貧血症状が確認され、この症状は反復投与により増悪した。最終投与後には活動性の低下が数例で散発的に観察された。PHZ 投与群 7 例のうち、2 例が最終投与後数時間で、別の 2 例が最終投与後 23 時間で死亡したため、これらの動物については死亡発見後速やかに病理解剖学的検査および臓器の採取を行った。残りの 3 例は最終投与後 24 時間で計画解剖した。

### 2.3.2 病理解剖学的所見

病理解剖学的検査は全例の肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓について実施した。

PHZ 投与ラットの肺は全葉にわたって赤色～暗赤色調を呈し、やや腫大していた。また、計画解剖した動物の肺にはホルマリン固定後に小さな白色斑が確認された (Fig. 2-1)。その他、肝臓および腎臓の暗調、脾臓の腫大が認められた。

### 2.3.3 病理組織学的所見

病理組織学的検査は全例の肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓について実施した。

全例の PHZ 投与ラットの肺で、多病巣性に肺胞壁への好酸性物質の沈着が認められた (Fig. 2-2A, B)。これらの病巣は死亡例より計画解剖例でより顕著であり、肉眼的に認められた白色斑と一致していた。これに加えて、広範なうっ血と軽度の水腫が認められた。

肺胞壁に沈着した好酸性物質は、MT 染色では赤色に染色され (Fig. 2-2C)、PTAH 染色では陰性～弱陽性に染色された (Fig. 2-2D)。免疫組織化学的染色では、フィブリノーゲンに陽性を示した (Fig. 2-2E)。

その他の臓器においては、溶血に関連すると考えられる赤血球貪食像 (肝臓・脾臓)、髄外造血亢進 (肝臓・脾臓)、褐色色素沈着 (肝臓・脾臓・腎臓) が高度に認められた。加えて、肝細胞の空胞化・壊死、腎臓近位尿細管の壊死が高頻度に認められた。また、死亡動物のうち 3 例と計画解剖動物のうち 1 例に左心耳内血栓が認められた。

#### 2.3.4 肺の電子顕微鏡所見

電子顕微鏡検査は計画解剖された PHZ 投与ラットの肺について実施した。

PHZ 投与ラットの肺胞毛細血管は拡張し、内腔には変形した赤血球、血液細胞の断片、細線維の蓄積が認められた (Fig. 2-3)。この細線維には稀に周期的な横紋がみられ、これらが集合・伸長し電子密度の高い束状構造をとる像も認められた。これらの特徴はフィブリン線維を示唆するものであった。細線維はときに肺胞中隔に沿って確認された。肺胞毛細血管の内皮細胞には著変は認められなかった。

## 2.4 考察

本章では、PHZ の短期毒性試験において認められた肺血栓症、およびその他の主要臓器における病理学的変化について整理した。

PHZ 投与ラットでは、死亡例・計画解剖例のいずれにおいても、肺胞壁に好酸性物質の沈着が認められ、MT 染色、免疫組織化学的染色および電子顕微鏡検査によりこれが肺胞毛細血管内に形成されたフィブリン血栓であることが証明された。血栓は比較的短いフィブリン線維の集合から成り、形成初期であることが示唆された。一方、PTAH 染色は、通常フィブリン血栓を確認するために用いられる染色だが、今回は明確な陽性像が確認できなかった。これは、PTAH 染色が成熟したフィブリンには陽性を示すのに対し、重合不十分の未熟なフィブリン線維を検出することができないためであると考えられた (Kawasaki et al., 1987)。

肺でのフィブリン沈着あるいは血栓形成は、死戦期や死後の変化として認められることがあるが、計画解剖動物において病巣がより顕著に認められたことから、生前に形成されたものと考えられた。一方、左心耳血栓は溶血剤の投与により発生することが知られているが (Yoshizawa et al., 2005)、今回は死亡動物でより顕著であったことから死戦期あるいは死後の変化である可能性も考えられた。死亡の原因は、肺や心耳の血栓というよりは重度の貧血状態であると推察された。一般状態の変化および肺以外の臓器における病理組織所見はいずれも PHZ による溶血反応が重度であったことや細胞機能の低下を示している。

PHZ 投与動物において、急性に肺血栓症が発生することはこれまでに報告がなく、その発生メカニズムは不明である。しかしながら、本試験の限られたデータおよび過去の文献情報からいくつかの可能性が推察された。第 1 章でも述べたように、一般的な血栓形成メカニズムには大きく分けて、1)血管内皮傷害、2)うっ血や乱流などの血流障害、3)血液の凝固性亢進、の 3 つの因子が挙げられ、それらが単独あるいは相互に関与していると考えられている (Mitchel, 2013)。このうち、血管内皮傷害は内因系・外因系の両カスケードに直結する強力な血栓形成要因であり、わずかな傷害も血栓形成に作用する (Kumar, et al., 2013)。この血管内皮傷害の関与については、電子顕微鏡検査において明確な傷害像を捉えられなかったため可能性は低いと考えられた。しかしながら今回はホルマリン固定後の材料を用いたもどし電顕しか実施できなかったため、詳細な変化がアーチファクトによりマスクされている可能性がある。また、ヘムには血管内皮細胞を傷害し、炎症反応や Tissue factor の発現を引き起こすポテンシャルがあることが *in vivo* あるいは *in vitro* の実験で

報告されている (Wagener et al., 2001; Setty et al., 2008)。本試験においても、PHZ により溶解した赤血球から多量のヘムが血中に放出されていることが予想され、何らかの形で血管内皮に影響を及ぼし、機能的変化を誘発している可能性も考えられた。次に、血液の凝固性亢進についてだが、本試験では血液学的検査結果がないものの、いくつかの酸化剤 (PHZ を含む) を用いた実験報告からその可能性が強く疑われた。第 1 章でも述べたように、PHZ は赤血球の膜成分を酸化的に傷害するが (Jain, 1985; Bloom and Brandt, 2008)、これによって生じる膜の変化 (脂質の過酸化、リン脂質の externalization) は血液の凝固性を亢進することが *in vivo* あるいは *in vitro* の実験で示唆されている (Jain, 1985; Ramot and Nyska., 2007)。また、不適合輸血などにより血管内溶血が起こった際に血中の凝固因子レベルが増加することが動物やヒトで報告されている (Hardaway et al., 1956; Mannucci et al., 1969)。最後に、血流障害についてだが、本試験では計画解剖動物においても肺に高度のうっ血が認められていたことから血流うっ滞が血栓形成に関与した可能性が考えられた。しかしながら血栓が先か、うっ血が先かについては不明であった。

## 2.5 小括

PHZ を 50 mg/kg/day の用量でラットに 3 日間反復腹腔内投与したところ、これまでに報告のない肺血栓症（肺胞毛細血管内のフィブリン血栓）が認められた。この血栓症の発生メカニズムを、一般的な血栓形成メカニズム、本試験の結果、既知の情報と照らし合わせて考察すると、1)血管内皮傷害、2)血流障害、3)血液の凝固性亢進、の 3 要因の全てが関与している可能性が考えられた。

本試験では投与量が高く死亡例が多かったこと、最終投与後の病理学的検査しか行えなかったことから、肺血栓症の発生メカニズムを探索するには別の試験デザインを設定し、経時的により詳細な検査を実施する必要があると考えられた。



2.6 図



Fig. 2-1 PHZ 投与ラットの肺の肉眼変化（ホルマリン固定・切り出し後）  
肺は全葉にわたって暗調であり、白色斑（矢頭）が散見される。

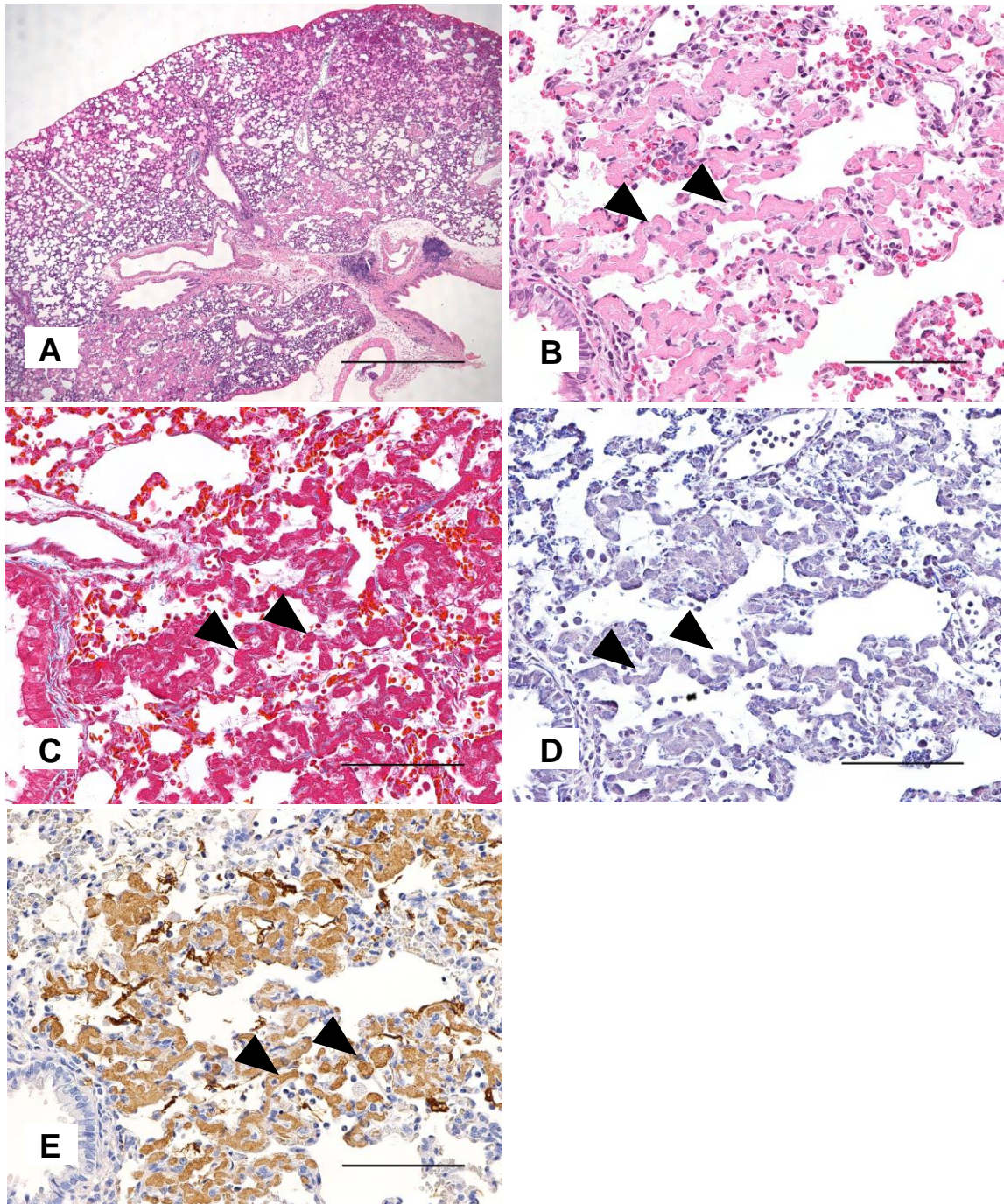


Fig. 2-2. PHZ 投与ラットの肺の組織学的変化

- (A) HE 染色、低倍像。多病巣性に好酸性物質の沈着、うっ血、水腫が認められる。  
Bar = 1000  $\mu\text{m}$ 。
- (B) HE 染色、高倍像。肺胞壁に好酸性物質(矢頭)が沈着している。Bar = 100  $\mu\text{m}$ 。
- (C) MT 染色。上述の好酸性物質は赤色に染色されている(矢頭)。Bar = 100  $\mu\text{m}$ 。
- (D) PTAH 染色。上述の好酸性物質は陰性～弱陽性を示す(矢頭)。Bar = 100  $\mu\text{m}$ 。
- (E) フィブリンの免疫染色。上述の好酸性物質は陽性(褐色に染色)を示す(矢頭)。Bar = 100  $\mu\text{m}$ 。

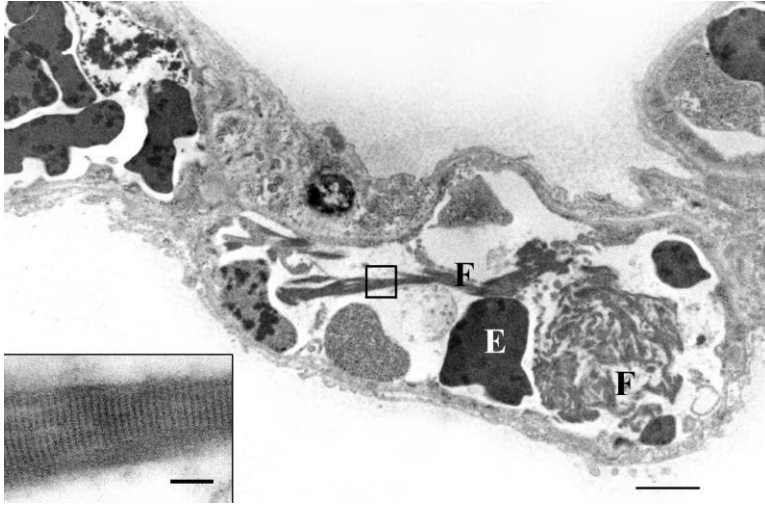


Fig. 2-3. PHZ 投与ラットの肺の超微形態学的変化

拡張した肺泡毛細血管内に変形赤血球 (E) および細線維 (F) の蓄積が認められる。細線維には周期的に横紋が認められる (挿入図)。Bar = 100 nm。

## 第3章. Phenylhydrazine 投与ラットの経時的な血液学的・病理組織学的変化

### 3.1 緒言

第2章で、我々は溶血性貧血を誘発することでよく知られる PHZ をラットに短期反復投与した結果、肺泡毛細血管にフィブリンを主成分とする血栓が形成されたことを報告した。PHZ が肺血栓症を誘発すること、あるいは溶血剤の投与が肺特異的に微小血栓を形成するといったような報告はこれまでにないことから、本病態の再現性を確認するとともに、病態発生のメカニズムを探索することとした。

本章では、既に述べた一般的な血栓形成の要因である 1)血管内皮傷害、2)血流障害、3)血液の凝固性亢進の3つに視点を置き、PHZ 投与ラットを経時的に血液学的・組織学的に検査することでそれぞれの要因がどの時点でどのように関与しているのか検討した。

## 3.2 材料と方法

### 3.2.1 試験デザイン（動物・被験物質・投与方法）

5週齢の雄のSDラット（Charles River Laboratories Japan Inc. Tsukuba, Japan）を購入した。動物はステンレスケージに3匹～5匹ずつに収容し、温度 $23\pm 2$  °C、湿度 $55\pm 15\%$ 、明暗周期12時間で制御されたバリアシステムの動物室で飼育した。飼育期間中の餌はCRF-1（Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan）、水は水道水の自由摂取とした。

1週間の検疫・馴化を実施した後に群わけを行った。動物を6匹ずつ8群に分け、うち4群には40 mg/kg/dayのPHZ（Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA）を1、2、3あるいは4日間反復腹腔内投与した。PHZは生理食塩液に溶解し、5 mL/kgの用量で投与した。また、別の4群をそれぞれの時点の対照群として設定し、同様の手技で生理食塩液を投与した。動物は最終投与後24時間の時点（これをそれぞれDay 1～4とする）で麻酔し、腹大動脈から採血した後に放血安楽死させた。採材された血液、臓器は血液学的検査、光学顕微鏡検査、電子顕微鏡検査に供された。この実験は田辺三菱製薬株式会社の動物倫理委員会による承認を受け、実験動物の使用に関する倫理規定を順守して実施された。

### 3.2.2 血液学的検査

血液は麻酔下にて真空採血管によって採取した。赤血球数（RBC）、ヘモグロビン（Hb）、ヘマトクリット（Ht）についてはEDTA-2K処理した採血管を用い、採血後1時間以内に測定した。凝固系パラメータについてはクエン酸ナトリウム処理した採血管を用い、採血後に遠心して血漿分離し測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。RBCとHbは全自動血球測定装置（ADVIA120; Sysmex Corp., Hyogo, Japan）で、Htはマイクロヘマトクリット法で測定した。PT、APTT、フィブリノーゲンは全自動血液凝固測定装置（CA-7000; Sysmex Corp.）で測定し、血漿トロンビン・アンチトロンビン複合体（TAT）は市販のELISAキット（Enzygnost TAT micro, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany）で測定した。このELISAキットはラットでの血液凝固性亢進状態を検出するのに有用であることが示されている（Ravanat et al., 1995）。これらの血液学的検査は全動物において実施したが、RBCおよびHbはDay 1でのみの測定とした。これはPHZ投与群での溶血が重篤で、自動測定装置での正確な測定が困難だったためである。

### 3.2.3 病理組織学的検査

安楽死させた動物から、肺、肝臓、腎臓を摘出した。光学顕微鏡検査用に、それぞれの臓器を 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬固定した。定法に従ってパラフィンに包埋し、厚さ 4  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。この組織切片にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、ポリマー法によるフィブリンの免疫組織化学的染色を実施した。免疫組織化学的染色に用いた抗体および手法は第 2 章と同様である。HE 染色による評価には、その所見の程度や範囲により+ (軽度、限局性)、++ (中等度、多病巣性)、+++ (重度、広範囲) の 3 段階のグレード分類を用いた。

また、電子顕微鏡検査用に、肺の小片を 2.5%ホルムアルデヒドに浸漬固定した後、1%四酸化オスミウムで後固定した。定法に従ってエポキシ樹脂に包埋し、超薄切切片を作製した。この超薄切切片に酢酸ウラン・クエン酸鉛の二重染色を施し、電子顕微鏡下で観察した (H-7000; Hitachi High-Tech Fieldings Corp., Tokyo, Japan)。

### 3.2.4 統計学的解析

血液学的検査データは統計解析を行った。結果は  $\text{mean} \pm \text{SD}$  で表示した。また、各時点の PHZ 投与群と対照群との差は、Student の  $t$  検定による  $p$  値が 0.05 より小さいものを有意と判断した。



### 3.3 結果

#### 3.3.1 血液および凝固系パラメータの変動

PHZ 投与群では急性貧血が認められた。RBC、Hb は Day 1 で顕著に減少し、Ht は反復投与に伴って徐々に減少した (Fig 3-1)。一方、凝固系パラメータの顕著な変動は Day 4 でのみ認められた。Day 4 の対照群に比較して、PHZ 投与群では PT、APTT は延長し (それぞれ  $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ )、TAT は 10 倍以上の値を示した ( $p < 0.001$ ) (Fig 3-1)。また、同じく Day 4 において PHZ 投与群では統計学的には有意でないものの、フィブリノーゲンの減少が認められた (Fig 3-1)。

#### 3.3.2 病理組織学的検査 (光学顕微鏡検査)

全動物の肺 (右葉および左葉)、肝臓、腎臓について実施した。組織学的所見およびその頻度は Table 3 に示す。

PHZ 投与群の肺では Day 2 において肺泡毛細血管に中等度のうっ血が認められ、これは反復投与に伴ってより顕著となった (Fig 3-2B~D)。また Day 3 において、限局性の肺泡壁への好酸性物質沈着が 6 匹中 3 匹の PHZ 投与ラットに認められた (Fig 3-2C)。この変化は Day 4 になると多病巣性・広範囲となり、全ての PHZ 投与ラットで確認された (Fig 3-2D)。加えて水腫が認められる個体もいた。この好酸性物質はフィブリノーゲンに対する免疫組織化学的染色に陽性を示したため (Fig 3-2E)、フィブリン血栓であると考えられた。これらのフィブリン血栓は右葉・左葉の毛細血管内にランダムに形成されていた。対照的に、中型あるいは大型の肺静脈血管内にはうっ血や血栓といった変化はどの時点においても観察されなかった。

肝臓および腎臓においては、これまでに述べたような溶血性貧血時に認められる組織学的変化である赤血球貪食像、色素沈着、髄外造血といった所見が認められた。Day 4 において肺で最も顕著な血栓症が認められた 1 個体でのみ腎系球体に限局的なフィブリン血栓を認めたが、他の個体ではうっ血あるいは血栓といった変化はどの時点においても観察されなかった。

#### 3.3.3 電子顕微鏡検査

各群 3 例の肺について実施した。



PHZ投与群の肺ではDay 2において肺泡毛細血管内に不正形あるいは顆粒状の高電子密度の小体（ハインツ小体）を持つ変形赤血球が集積していた（Fig. 3-3A）。加えて、細胞質の電子密度が減少しゴースト状になった赤血球も散見された。Day 3になると、これらの赤血球、特にゴースト状のものはより顕著に認められ（Fig. 3-3B）、毛細血管内には血液細胞の破砕物も認められるようになった。このようなゴースト状の赤血球は末梢血の溶血を示唆するもので、血管内でヘモグロビンが遊離していると考えられている（Adachi, 1977）。肺泡毛細血管の非常にわずかな領域において血管内皮細胞の連続性が不明瞭化していたが、観察したほとんどの領域で内皮細胞は基底膜上に整列し、隣接する細胞同士は細胞間結合によって接着しており、正常の形態を保持していた。Day 4では、多数の高電子密度の細長い線維の束、つまりフィブリン血栓が、毛細血管内に認められた。血栓は血液細胞の破砕物を巻き込んで、しばしば血管内を閉塞していた（Fig. 3-3C）。血管内皮細胞は基底膜上に並び、細胞質の一部を伸長して血栓表面を覆っていた。これは血管内皮細胞の活性化状態を示唆する。また一方で、内皮が剥離し、同部にフィブリンが沈着する像が認められた（Fig. 3-3C）。

### 3.4 考察

PHZ をラットに短期反復投与した結果、肺胞毛細血管を主とした血栓症が高頻度に認められ、第 2 章で報告した病変の再現性が確認できた。この病態発生メカニズムを考察するため、我々は経時的に血液学的・組織学的検査を実施した。

組織学的検査の結果から、Day 3 において肺胞毛細血管に限局性に血栓が形成されはじめ、Day 4 までに急速に病変が拡大することが明らかとなった。血栓が形成されるより前の変化（貧血所見を除く）は Day 2 で認められた毛細血管のうっ血のみであった。この病巣は変形赤血球の集積であることが電子顕微鏡検査で確認された。PHZ が赤血球の変形能を減弱させ、微小循環における赤血球の移動を妨げることは広く知られている (Bloom and Brandt, 2008)。本試験においても PHZ により変形能を失った異常形態を示す赤血球が局所血流の乱れを引き起こしたと推察され、これが血栓症の最初の大きなイベントであると考えられた。一方、同じく Day 2 から血管内容血を示唆するゴースト状の赤血球が確認されたことから、溶解赤血球からヘムが遊離し、血管内皮細胞を傷害あるいは活性化して血栓形成を促している可能性も考えられた (Wagener et al., 2001; Setty et al., 2008)。内皮細胞の傷害を示唆する超微形態学的変化としては、内皮細胞の管腔側表層に微絨毛が増加する、小胞が増加する、核の一部が管腔側に向かって突出する、細胞膜の部分的破裂、最終的には細胞内小器官の異常や基底膜からの剥離といった所見が挙げられる (Ramot and Nyska, 2007) が、本試験の電子顕微鏡検査においてはそれらを示唆する形態学的変化は Day 4 まで認められなかった。Day 4 では形成された血栓に対する内皮細胞の活性化反応や基底膜からの脱落が認められているため、少なくともこの時点では血栓形成に関与していると考えられた。また、Day 4 では血液学的検査において TAT の高値、PT および APTT の延長、フィブリノーゲンの減少といった所見が認められ、全身性に血液凝固異常の状態（凝固性が亢進しているにも関わらず凝固が遅延している状態）であることが示唆された。このような凝固系パラメータの変動は DIC の血液学的所見と類似するものであり、肺血栓の形成に促進的に働くとともに、血栓により凝固異常をきたしている可能性も考えられた。この凝固異常は部分的には PHZ が赤血球膜リン脂質を酸化することによって起きていると推察される (Jain, 1985; Ramot and Nyska., 2007)。

以上をまとめると、PHZ 投与ラットで認められる肺血栓症のトリガーは、変形赤血球が肺胞毛細血管内に塞栓することで生じる局所血流のうっ滞であると考

えられた。また、これに引き続く全身性の血液凝固異常や血管内皮傷害が、血栓症の病態を助長していると考えられた。

本試験では、肺以外に肝臓・腎臓についても経時的な組織学的検査を実施したが、うっ血や血栓といった所見は肺胞毛細血管に特異的であった。このような特徴は第 1 章で述べたような既知の血栓症モデルとは異なっている。なぜ PHZ 投与ラットでは肺胞毛細血管に特異的に血栓が形成されるのかについては明らかではないが、肺では毛細血管が非常に複雑に枝分かれしていることや血圧が低いことなど、解剖学的・生理学的要因が関連していると考えられる (Barrett et al., 2010)。

### 3.5 小括

本章では PHZ 投与ラットでみられる肺血栓症の要因のいくつかが明らかとなった。それらを 1)血管内皮傷害、2)血流障害、3)血液の凝固性亢進に照らし合わせ、関与した時点を整理すると、2)の血流障害が最も早期かつ血栓形成に先んじて惹起されており、重要な病態発生要因であると考えられた。1)の血管内皮傷害、および 3)の血液凝固性亢進は、最初の血栓形成時点より遅く、広範囲に血栓が形成された時点で生じており、病態を悪化させる要因に位置づけられた。しかしながら血管内皮傷害については、本章では形態学的変化のみから考察したにすぎない。内皮細胞の機能的変化の有無やその性質についても理解する必要があると考えられた。

### 3.6 表および図

Table 3. PHZ 投与ラットの肺・肝臓・腎臓の経時的な組織学的変化

Compound	PHZ																
	1				2				3				4				
	6				6				6				6				
Grades	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Organ/findings																	
Lung																	
Congestion	6	0	0	0	0	3	3	0	0	0	3	3	0	0	0	1	5
Thrombus	6	0	0	0	6	0	0	0	3	3	0	0	0	0	2	3	1
Edema	6	0	0	0	6	0	0	0	5	1	0	0	0	3	1	1	1
Liver																	
Erythrophagia/pigmentation	1	5	0	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0
Extramedullary hematopoiesis	6	0	0	0	4	2	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0	0
Degeneration/necrosis of hepatocyte	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	3	3	0	0
Kidney																	
Pigmentation	6	0	0	0	6	0	0	0	1	5	0	0	0	0	1	5	0
Degeneration/necrosis of renal tubule	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0
Thrombus	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0	0	5	1	0	0

-, no findings; +, slight/focal; ++, moderate/multi focal; +++, severe/widespread.

No noteworthy changes were observed in the control animals.

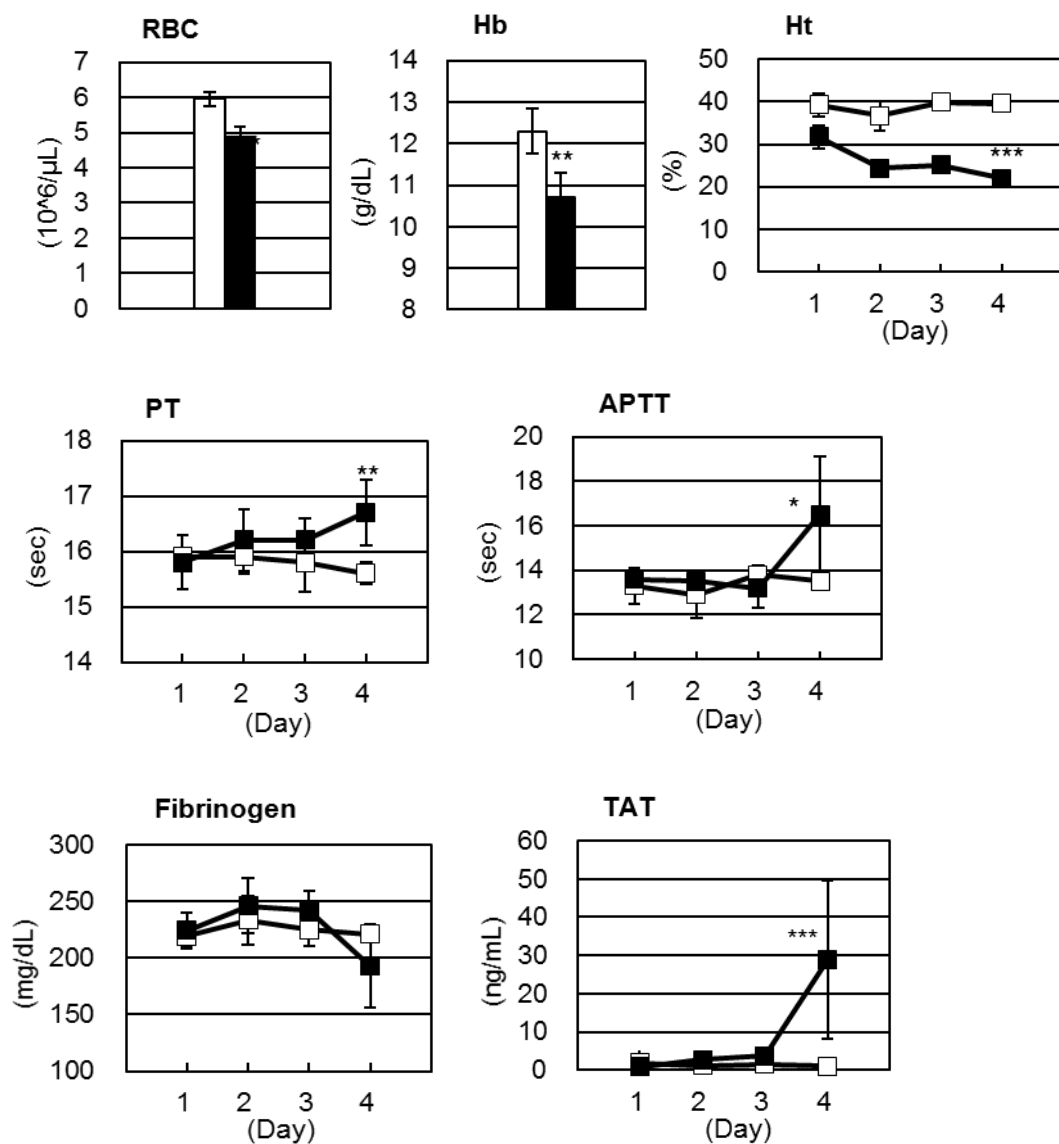


Fig. 3-1. PHZ 投与ラットの経時的な血液学的変化

PHZ 投与ラット (■)、対照群 (□)。データは平均±SD、各時点での対照群に対する有意差を Student の *t* 検定により算出した \**p* < 0.05、\*\**p* < 0.01、\*\*\**p* < 0.001 で示す。

PHZ 投与ラットでは、Day 1 に RBC と Hb が顕著に減少し、Ht は投与期間を通じて徐々に減少している。Day 4 において、PT、APTT の延長、TAT の高値が統計学的有意差をもって顕著に認められる。フィブリノーゲン は Day 4 で軽度に減少している。

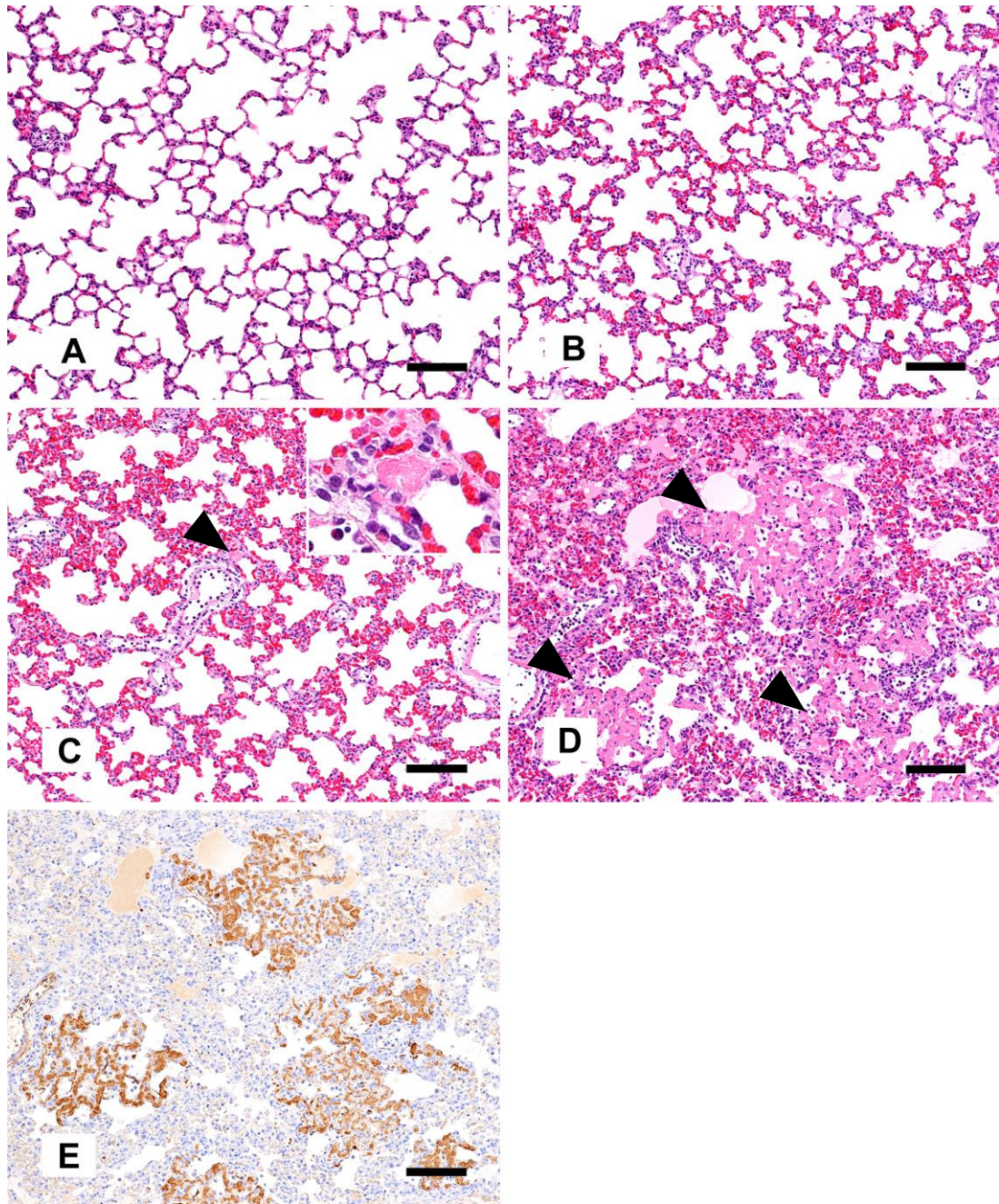


Fig. 3-2. PHZ 投与ラットの経時的な肺の組織学的変化  
 対照群(A)および PHZ 投与群(B~E)。HE 染色 (A~D) およびフィブリンの免疫  
 染色(E)。Bar = 100  $\mu$ m。

- (A) 対照群。
- (B) Day 2。肺胞壁（肺胞毛細血管）に中等度のうっ血が認められる。
- (C) Day 3。うっ血はより顕著となる。限局的な好酸性物質の沈着（矢頭）が認められる。
- (D) Day 4。好酸性物質は広範囲に認められる（矢頭）。加えて肺胞内水腫が認められる。
- (E) Day 4。好酸性物質はフィブリンの免疫染色に陽性反応（褐色に染色）を示す。



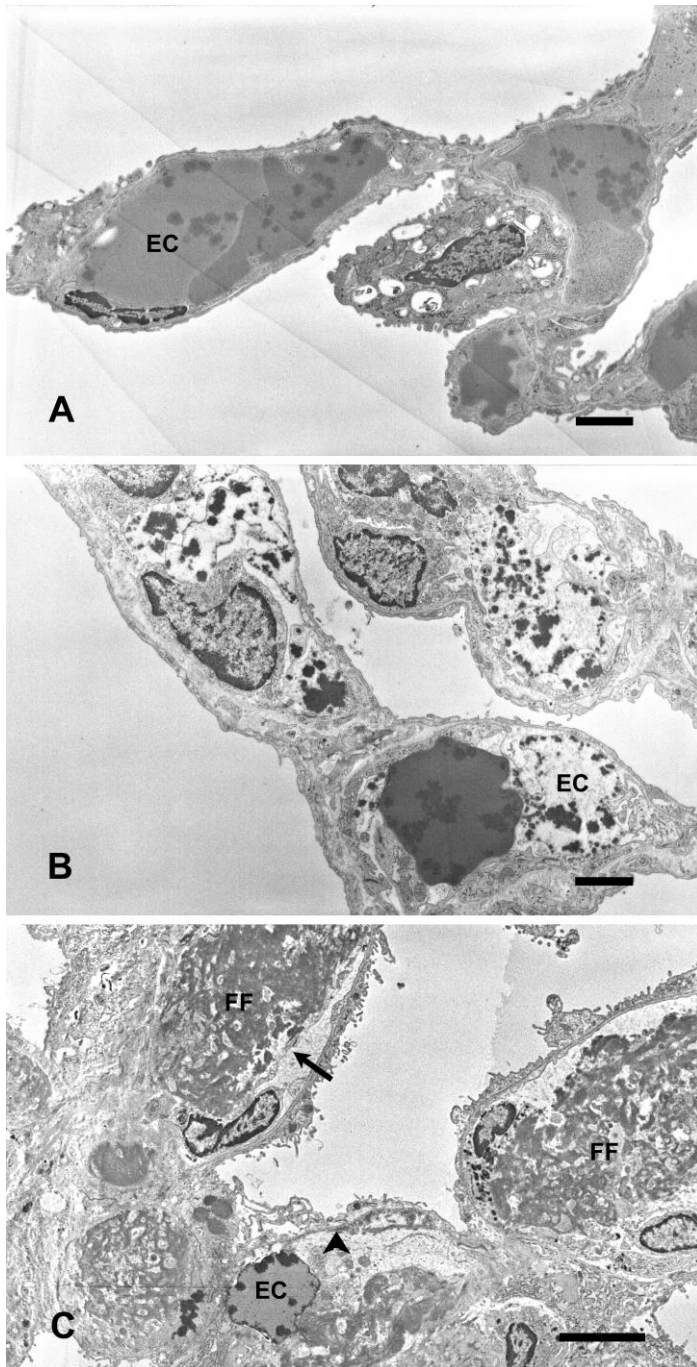


Fig. 3-3. PHZ 投与ラットの経時的な肺の超微形態学的変化

(A) Day 2. 高電子密度の斑点を有する変形赤血球(EC)が毛細血管内に充満する。  
Bar = 2  $\mu$ m。

(B) Day 3. ゴースト状の溶解した赤血球が目立つ。Bar = 2  $\mu$ m。

(C) Day 4. 大量のフィブリン線維 (FF) が凝集し毛細血管内を栓塞する。内皮細胞が血栓を囲む像 (矢印) や、剥離した部分へのフィブリン沈着 (矢頭) が認められる。Bar = 4  $\mu$ m。

## 第4章. Phenylhydrazine 投与ラットの肺における経時的な遺

### 伝子発現解析

#### 4.1 緒言

これまでの実験において、我々は PHZ がラットに急性肺血栓症を引き起こすこと、その発生機序として局所の血流障害（変性赤血球が毛細血管を閉塞することによるうっ血）がトリガーとなり、引き続く全身性の血液凝固異常が血栓形成を促進していることを明らかにした。また、影響が大きいと考えられている血管内皮細胞の傷害（形態学的変化）については血栓形成よりも後に生じていることが確認された。しかしながら、血管内皮細胞の機能的変化については未だ不明である。血管内皮細胞は、血液凝固の生理学的バランスを調節する重要な因子を産生することで血液凝固系の制御に関わっており、血管内皮細胞の機能不全は凝固活性と線溶活性のインバランスを引き起こすことになる。このような現象は血栓性疾患の主要因と考えられており（Margetic, 2012; Gresele et al., 2010）、血管内皮細胞の機能的障害の有無は血栓症の病態発生を考える上で欠かせないと考えられる。そこで本研究では、PHZ 投与ラットの肺において、血管内皮細胞に発現する既知の血栓症関連遺伝子の発現変動を確認することとした。また、網羅的遺伝子解析により、変動遺伝子から生物学的な影響を推察する（Gene ontology 解析をする）ことで血栓症の病態発生をより詳細に理解することを試みた。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 試験デザイン（動物・被験物質・投与方法）

第3章と同様にラットを購入・飼育した。

動物を4匹ずつ4群に分け、うち3群には40 mg/kg/dayのPHZ（Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA）を1、2、3日間反復腹腔内投与した。PHZは生理食塩液に溶解し、5 mL/kgの用量で投与した。最終投与後24時間の時点（これをそれぞれDay 1~3とする）で麻酔し、放血安楽死させた後に肺を採材した。残りの1群は対照群とし、同様の手順で生理食塩水を投与してDay 1で安楽死および採材を実施した。この実験は田辺三菱製薬株式会社の動物倫理委員会による承認を受け、実験動物の使用に関する倫理規定を順守して実施された。

### 4.2.2 病理組織学的検査

各動物の左肺を採取し、10%リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬固定した。定法に従ってパラフィンに包埋し、厚さ4 µmの切片を作製した。この組織切片にHE染色を施し、光学顕微鏡下で観察した。

### 4.2.3 遺伝子発現解析

各動物の右肺を採取し、RNA安定化試薬（RNAlater, QIAGEN Co. Ltd., Tokyo, Japan）に4°Cで一晩浸漬した後、RNA抽出作業を行うまで-20°Cで保存した。Mixer Mill（Retsch GmbH, Haan, Germany）を用いて肺組織を粉碎し、組織溶解液（RLT buffer, QIAGEN Co. Ltd.）に溶解した。RNAは自動核酸抽出装置（QIAcube, QIAGEN Co. Ltd.）およびRNeasy Mini QIA cube Kit（QIAGEN Co. Ltd.）を用いて製造メーカーのプロトコールに従い抽出した。抽出したRNAの品質は分光光度計（NanoDrop ND-1000, Asahi Glass Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いて260 nmと280 nmの吸光度比（A260/A280）で評価するとともに、Bioanalyzer（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA）により算出されるRNA integrity number（RIN）により確認した。A260/A280が1.8を、かつRINが6を超える試料は品質基準を満たすものと判断し、解析に使用することとした。結果、各群4匹の全個体のRNA試料を解析に使用した。

RNA 試料をもとに、GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA) を用いてビオチン標識した cRNA を合成した。方法は製造メーカーのプロトコールに従った。トランスクリプトーム解析にはラット網羅的遺伝子発現アレイである GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix Inc.) を用いた。ハイブリダイゼーション、洗浄、および染色は Fluidics Station 450 (Affymetrix Inc.) を用い、GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix Inc.) によって実施した。ハイブリダイゼーションのシグナルは GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix Inc.) により検出した。スキャンイメージを遺伝子発現解析ソフトウェアである Expression Console Ver.1.1 (Affymetrix Inc.) で処理した。ハウスキーピング遺伝子の 1 つである GAPDH の 3' /5' シグナル比を遺伝子発現データの品質の指標とし、どの試料もその値が 3 を超えない範囲であることを確認した。GeneChip データは GeneSpring Gx (Agilent Technologies) を用いて MAS 5.0 アルゴリズムにより正規化した。各投与群の対照群 (Day 1) に対する Fold change は正規化された遺伝子発現データに基づき算出した。Fold change の値が対照群の平均よりも 1.5 倍より高い、あるいは 0.67 倍より低く、かつ、Mas 5.0 によって算出される detection call が、対照群 (Day 1) および投与群のうち、より発現値が高いほうの群のすべてのサンプルで P または M であるものを変動遺伝子と定義した。PHZ 投与により発現増加あるいは発現低下した遺伝子は DAVID 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いた Gene Ontology (GO) 解析に供された。GO 解析は、解析に供した変動遺伝子リストと最も関連性が高い GO 用語 (生体機能カテゴリー) を抽出し、変動遺伝子から生物学的な影響を推察する解析である。

#### 4.2.4 統計学的解析

GO 解析において、DAVID アノテーションシステム (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いた Fisher の正確確率検定を実施した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 病理組織学的検査

肺の組織学的所見およびその頻度は Table 4-1 に示す。

PHZ 投与ラットでは Day 1 において肺胞毛細血管に軽度のうっ血が認められ、反復投与により顕著となった。また、Day 3 で肺胞毛細血管に限局性あるいは多病巣性の血栓形成が認められ、軽度の水腫を伴っていた。

### 4.3.2 内皮細胞に発現する血栓症関連遺伝子の発現変動

以下に示す血管内皮に発現することが知られている凝固・線溶系因子、接着分子、血管作動性メディエーターに注目した。

tissue factor pathway inhibitor (TFPI), thrombomodulin (TM), endothelial cell protein C receptor (EPCR), heparan sulfate, dermatan sulfate, tissue plasminogen activator (t-PA), urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, tissue factor (TF), von Willebrand factor, E-selectin, P-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), platelet endothelial cell adhesion molecule-1, endothelial nitric oxide synthase, prostacyclin および endothelin-1

これらは局所の血栓形成を制御している、あるいは血栓形成性疾患に随伴して異常が認められる、と報告されている因子である (Kleinegris et al., 2012; Gresele et al., 2010)。これらの遺伝子の発現変動を Table 4-2 に示す。

Day 2 から Day 3 にかけて、*protein C receptor, endothelial (Procr)*、*selectin E (Sele)* および *selectin P (Selp)* は発現増加していた。加えて、Day 3 では *tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor) (Tfpi)* および *thrombomodulin (Thbd)* は発現低下し、*plasminogen activator, tissue (Plat)*、*coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor) (F3)*、*prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase (Ptgis)* および *endothelin 1 (Edn1)* は発現増加していた。

凝固・線溶系に関連する遺伝子の変動について言えば、EPCR をコードしている *Procr* は発現増加していたが、TM (EPCR 上のプロテイン C を活性化して抗凝固作用を付与する) をコードしている *Thbd* は発現低下していた。また、外因

系凝固経路の主要因子である TF をコードする *F3* は発現増加し、その阻害因子をコードする *Tfpi* は発現低下していた。一方、線溶系因子である t-PA をコードする *Plat* は発現増加していた。*Dermatan sulfate epimerase-like (Dsel)*、*plasminogen activator, urokinase (Plau)* および *von Willebrand factor (Vwf)* は変動が認められなかった。*serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 3* および *heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5* の変動はほぼすべての試料で detection call が“A”となり、信頼性が低いと判断されたため解析に用いなかった。

接着分子に関連する遺伝子の変動については、白血球のローリングに関わる *Sele* および *Selp* は発現増加していた一方、白血球の接着と遊走に関わる *Icam1* や *Vcam1* は変動を示さなかった。

血管作動に関連する遺伝子の発現変動は、*Ptgis* および *Edn1* の発現増加を鑑みるに、拡張および収縮の両方向への変動が考えられた。しかしながら強力な血管拡張作用を示す nitric oxide (NO) の合成には影響はないようであった。

#### 4.3.3 PHZ 投与により変動した遺伝子の GO 解析

PHZ 投与により発現増加した (Fold change が 1.5 より大きかった)、あるいは発現低下した (Fold change が 0.67 より小さかった) 遺伝子は、Day 1 においてはそれぞれ 291 遺伝子、93 遺伝子あった。反復投与により変動遺伝子数は増加し、Day 3 においては 1179 遺伝子が発現増加し、1005 遺伝子が発現低下した。

これらの変動遺伝子を時点ごとに GO 解析に供した。関連が深いと判断された上位 20 の機能カテゴリーを Table 4-3 に示す。

発現増加した遺伝子のカテゴリーについては、Response to wounding (GO:0009611)、Defence response (GO:0006952) あるいは Inflammatory response (GO:0006954) などの免疫・炎症反応に関連するカテゴリーが Day 1 から Day 3 にかけてリストの上位に位置していた。Blood coagulation (GO:0007596) や Hemostasis (GO:0007599) は Day 2 において  $p$  値<0.001 の有意差をもってリストにランク付けされた。リスト中のそれ以外のカテゴリーはアポトーシス・細胞死に関連するもの (Day 1)、造血に関連するもの (Day 2) であった。

発現低下した遺伝子については、Day 3 において M phase of mitotic cell cycle (GO:0000087) や Mitosis (GO:0007067) など、細胞周期に関連するカテゴリー

一がリストの上位にランク付けされたが、Day 1 および Day 2 においては変動遺伝子数が少なかったため、リストにランク付けされたカテゴリーに一定の傾向を見出すことができなかった (data not shown)。

#### 4.4 考察

これまでの実験と同様に PHZ がラットの肺毛細血管に急性血栓症を引き起こすこと、この血栓症に先んじて、組織学的に毛細血管内のうっ血が認められることを確認した。これに加えて、本章での遺伝子発現解析により、既知の血栓症関連遺伝子が、主に血栓形成期において顕著に変動していることが明らかとなった。凝固・線溶系に関連する遺伝子の変動は、血栓形成に対して促進的にも抑制的にも作用していることを示していたが、凝固活性化を示唆する変動に対し、抗凝固活性あるいは線溶活性を示唆する変動は欠如するか弱いものであり、全体のバランスとしては凝固促進状態に傾いていたと考えられた。

さらに、注目した血栓症関連遺伝子の中で、*Sele* や *Selp* といった細胞接着に関わる遺伝子の変動が最も顕著であった。血管内皮細胞におけるセレクチン・ファミリーは白血球上のリガンドと一過性に相互作用することで、血管内皮に沿って白血球のローリング（回転）とテザリング（接触）を引き起こす（Lasky, 1992）が、この因子は炎症だけでなく血液凝固反応においても重要なものとみなされている（Margetic, 2012）。一方、*Icam1* や *Vcam1* は本試験では変動がみられなかった。ICAMs や VCAMs も炎症や血液凝固反応、特に白血球の接着と遊走のステージに関わる因子である（Kumar et al., 2013）。本試験でみられたこれらの遺伝子の変動の意義については明らかではないが、少なくとも PHZ 投与ラットの肺において、血管内皮細胞が炎症性の状態にあることは確かである。同様に、Day 3 で認められた血管作動関連遺伝子の変動は血管内皮刺激を暗に示している可能性がある。このように、血管内皮細胞における血栓症関連遺伝子の発現変動は PHZ 投与ラットの肺で血管内皮細胞が凝固促進性かつ炎症性の状態であることを示唆しており、このような機能的変化は血栓形成に寄与していると考えられた。

炎症と血液凝固は、病態生理学的な過程において互いに密接に関わり合い相互に強い影響力を持つこと、また、例えば関節リウマチや炎症性腸疾患など様々な炎症性疾患においてしばしば血栓症が併発することが知られている（Margetic, 2012; Aksu et al., 2012）。炎症によって誘発される血栓症の病態発生については複雑で定説がないが、炎症性サイトカインが主体となって血管内皮細胞の機能不全を含む様々なメカニズムで血液凝固系の攪乱を引き起こしていると考えられている（Margetic, 2012）。本研究で実施した GO 解析において、PHZ 投与ラットの肺では Day 1 から Day 3 にかけて炎症・免疫反応が顕著かつ継続的に誘導されていることが示された。同時に、炎症により誘発されるとされる TM 合成の発現



低下や TF の発現増加も認められた (Kleinegris et al., 2012)。このように、本試験において示された血管内皮細胞の機能的変化は炎症性刺激に起因する可能性が示唆された。他の論文が、溶解した赤血球から遊離したヘムやヘモグロビン、それに引き続く酸化ストレスが炎症反応を引き起こすことを示している (Wagener et al., 1997; Setty et al., 2008; Jeney et al., 2002)。これらの論文では、*in vitro* でセレクチン、CAMs、TF の発現増加、および NO バイオアベイラビリティの低下が示されている。また、遊離ヘムが好中球活性化やサイトカイン産生を促すという報告がある (Kumar and Bandyopadhyay, 2005)。これらのデータに比較すると、本研究においてもヘム代謝酵素をコードする *heme oxygenase-1* が Day 2 から Day 3 にかけて約 3~5 倍に発現増加していることから、酸化ストレスの影響が加わっていると考えられた。また、イヌを用いた PHZ の毒性試験において末梢血好中球数の増加 (Cary et al., 2008)、酸化ストレス下の赤血球によるサイトカイン産生の増加 (Liese et al., 2001) が報告されている。本試験では組織学的な炎症反応や CAMs の発現増加は認められなかったものの、血管内皮細胞の微小環境を攪乱するには十分な炎症性刺激があったものと推察された。

#### 4.5 小括

本章では血管内皮細胞の機能的変化に着目し、血管内皮細胞に発現することが知られている血栓症関連遺伝子の発現変動を解析した。その結果、組織学的に血栓の形成が確認される時点を主体として関連遺伝子の発現変動が認められた。それらの変動は凝固促進のほうにバランスが傾いていると考えられ、そのような機能的変化は PHZ が誘発する血栓症の病態悪化に寄与していると考えられた。また、網羅的遺伝子解析により、PHZ 投与ラットの肺で影響を受けた生体機能を解析したところ、炎症・免疫反応が投与後早期から顕著かつ継続的に誘導されていることが示され、上述した血管内皮細胞の機能的障害を含む血栓症病態への関与が示唆された。

#### 4.6 表および図

Table 4-1 PHZ 投与ラットの肺の組織学的変化

Compound	PHZ											
	1				2				3			
Dosing period												
Number of animals	4				4				4			
Grades	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Organ/findings												
Lung												
Congestion	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4
Thrombus	4	0	0	0	4	0	0	0	1	1	2	0
Edema	4	0	0	0	4	0	0	0	2	2	0	0

Grades: -, no findings; +, focal; ++, multifocal; +++, widespread.

No noteworthy changes were observed in the control animals.

Table 4-2 血管内皮細胞に発現する血栓症関連遺伝子の発現変動

Functional category	Affymetrix ID	Gene symbol	Gene Title	Fold change <sup>a</sup>		
				PHZ		
				day 1	day 2	day 3
Coagulation / fibrinolysis	1389780_at	Tfpi	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	0.77	0.76	0.66
	1368901_at	Thbd	thrombomodulin	0.90	0.72	0.62
	1372729_at	Procr	protein C receptor, endothelial	1.10	1.63	2.16
	1385481_at	Dsel	dermatan sulfate epimerase-like	0.78	0.83	1.13
	1367800_at	Plat	plasminogen activator, tissue	1.36	1.30	2.04
	1387675_at	Plau	plasminogen activator, urokinase	0.89	0.91	0.83
	1369182_at	F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	0.91	0.87	1.92
	1389234_at	Vwf	von Willebrand factor	1.09	1.32	1.44
Cell adhesion	1388018_at	Sele	selectin E	0.83	1.80	3.98
	1391946_at	Selp	selectin P	1.14	2.05	4.74
	1387202_at	Icam1	intercellular adhesion molecule 1	0.96	0.97	0.99
	1368474_at	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	0.92	0.96	0.91
	1371545_at	Pecam1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	1.28	1.10	1.20
Vascular activation	1371166_at	Nos3	nitric oxide synthase 3, endothelial cell	1.10	0.85	1.02
	1370012_at	Ptgis	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	1.16	1.04	1.75
	1369519_at	Edn1	endothelin 1	1.15	0.90	1.54

<sup>a</sup> Comparison with control group on day 1.

Table 4-3 発現増加した遺伝子の上位 20 の Gene Ontology カテゴリー

	Category ID	Category name	Gene No.	<i>p</i> -value
day 1	GO:0009611	Response to wounding	15	2.34E-03
	GO:0006952	Defense response	13	2.81E-03
	GO:0006954	Inflammatory response	9	1.03E-02
	GO:0009617	Response to bacterium	8	1.28E-02
	GO:0008624	Induction of apoptosis by extracellular signals	4	2.41E-02
	GO:0060348	Bone development	6	2.99E-02
	GO:0048468	Cell development	16	3.22E-02
	GO:0019058	Viral infectious cycle	3	3.82E-02
	GO:0043065	Positive regulation of apoptosis	10	4.10E-02
	GO:0043068	Positive regulation of programmed cell death	10	4.17E-02
	GO:0042742	Defense response to bacterium	4	4.17E-02
	GO:0030182	Neuron differentiation	12	4.23E-02
	GO:0010942	Positive regulation of cell death	10	4.38E-02
	GO:0031915	Positive regulation of synaptic plasticity	2	4.39E-02
	GO:0045113	Regulation of integrin biosynthetic process	2	4.39E-02
	GO:0048666	Neuron development	10	4.61E-02
	GO:0051789	Response to protein stimulus	5	4.77E-02
	GO:0016079	Synaptic vesicle exocytosis	3	4.88E-02
	GO:0012502	Induction of programmed cell death	7	4.90E-02
	GO:0006917	Induction of apoptosis	7	4.90E-02
day 2	GO:0006952	Defense response	29	4.62E-06
	GO:0009611	Response to wounding	31	4.06E-05
	GO:0030097	Hemopoiesis	20	8.59E-05
	GO:0048534	Hemopoietic or lymphoid organ development	21	1.12E-04
	GO:0006935	Chemotaxis	11	2.22E-04
	GO:0006954	Inflammatory response	18	5.60E-04
	GO:0009617	Response to bacterium	16	6.77E-04
	GO:0050776	Regulation of immune response	17	7.17E-04
	GO:0050778	Positive regulation of immune response	13	8.13E-04
	GO:0007596	Blood coagulation	9	9.40E-04
	GO:0007599	Hemostasis	9	1.05E-03
	GO:0030595	Leukocyte chemotaxis	7	1.08E-03
	GO:0060326	Cell chemotaxis	7	1.69E-03
	GO:0007626	Locomotory behavior	16	1.89E-03
	GO:0006778	Porphyrin metabolic process	6	1.98E-03
	GO:0033013	Tetrapyrrole metabolic process	6	1.98E-03
	GO:0051188	Cofactor biosynthetic process	10	3.08E-03
	GO:0032945	Negative regulation of mononuclear cell proliferation	6	3.22E-03
	GO:0070664	Negative regulation of leukocyte proliferation	6	3.22E-03
	GO:0050672	Negative regulation of lymphocyte proliferation	6	3.22E-03
day 3	GO:0009611	Response to wounding	71	1.85E-15
	GO:0006954	Inflammatory response	42	1.54E-11
	GO:0006952	Defense response	55	1.86E-11
	GO:0002526	Acute inflammatory response	22	3.55E-08
	GO:0042060	Wound healing	30	3.64E-07
	GO:0055072	Iron ion homeostasis	11	1.26E-05
	GO:0007599	Hemostasis	15	1.99E-05
	GO:0033013	Tetrapyrrole metabolic process	10	2.56E-05
	GO:0006778	Porphyrin metabolic process	10	2.56E-05
	GO:0051188	Cofactor biosynthetic process	18	2.98E-05
	GO:0006959	Humoral immune response	12	3.27E-05
	GO:0045087	Innate immune response	16	3.46E-05
	GO:0030099	Myeloid cell differentiation	17	3.83E-05
	GO:0033014	Tetrapyrrole biosynthetic process	8	4.36E-05
	GO:0006779	Porphyrin biosynthetic process	8	4.36E-05
	GO:0007596	Blood coagulation	14	7.46E-05
	GO:0002541	Activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response	10	8.75E-05
	GO:0048821	Erythrocyte development	7	1.21E-04
	GO:0019724	B cell mediated immunity	12	1.27E-04
	GO:0018130	Heterocycle biosynthetic process	12	1.56E-04

## 第5章．総括

PHZ は、医薬品、農薬等の化学的中間体として世界中で使用されている有機化合物で、ヒトを含む動物において赤血球を酸化的に傷害することに起因した溶血を引き起こすことが知られている。PHZ の毒性としては、この溶血に付随する種々の血液学的・組織学的変化が報告されている。例えば、赤血球数やヘモグロビンの低値、脾臓の腫大、諸臓器における赤血球貪食像や褐色色素沈着といった所見である。一方、血栓症の発生については、赤血球増多症治療の目的で投与されたヒトの副作用としてわずかに報告があるのみで、実験データで利用できる情報は少なくその発生機序については不明である。

本研究では、偶然にも PHZ をラットに短期間投与することにより、これまでに報告のない急性肺血栓症が誘発されることを発見したことから、その病理発生メカニズムを明らかにするための血液学的・組織学的変化検索、遺伝子発現解析を用いた生物学的機能への影響の考察を行った。

### 1. Phenylhydrazine 投与ラットに認められた急性肺血栓症および主要臓器の病変（第2章）

血液・造血毒性の組織学的変化を整理する目的で、若齢の雄の SD ラットに PHZ を短期反復投与し、主要臓器の病理解剖学的検査、病理組織学的検査を実施した。病理解剖学的検査において、肺は全葉が赤色～暗調を呈し、白色斑が散在していた。組織検査においては白色斑と一致してフィブリン血栓が肺胞毛細血管内に形成されていた。

その他に検査を実施した肝臓、腎臓、心臓、脾臓では溶血に関連すると考えられる赤血球貪食像、髄外造血亢進、褐色色素沈着といった変化が認められた。また、死亡例を中心に、心臓の左心耳内に血栓が認められた。しかしながら、微小血栓の形成は肺以外の臓器には認められず、PHZ が肺毛細血管に特異的に急性血栓症を引き起こすことがわかった。

## 2. Phenylhydrazine 投与ラットの経時的な血液学的・病理組織学的変化(第3章)

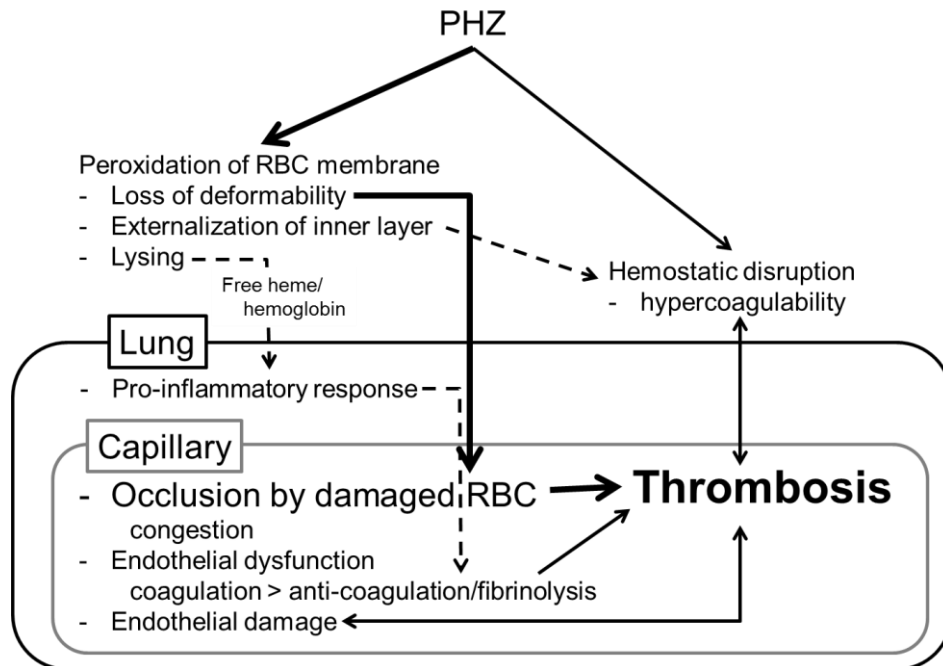
PHZ 投与ラットに認められた急性肺血栓症の病態発生メカニズムを解析するため、経時的に血液学的検査、病理組織学的検査を実施した。その結果、貧血以外に最も早期かつ血栓形成に先んじて認められたのは肺胞毛細血管内のうっ血(変形赤血球の集積)であった。また、組織学的に血栓が広範囲に認められた時点において、血液凝固系パラメータの異常、限局的な血管内皮細胞の傷害が確認された。これらを一般的な血栓形成の要因とされる 1)血管内皮傷害、2)血流障害(うっ血、乱流)、3)血液の凝固性亢進に照らし合わせると、2)の血流障害が病態発生に重要な役割を果たしているほか、1)の血管内皮傷害、3)の血液凝固性亢進が病態の悪化に関わっていると考えられた。

## 3. Phenylhydrazine 投与ラットの肺における経時的な遺伝子発現解析(第4章)

前章では PHZ 投与ラットにおける急性肺血栓症の病態悪化に血管内皮細胞の傷害が関与していることが明らかとなったが、血管内皮細胞の機能障害については未明である。そこで我々は、PHZ 投与ラットの肺において、血管内皮細胞に発現する既知の血栓症関連遺伝子の発現変動を確認した。また、網羅的遺伝子解析および Gene ontology 解析により、血栓症の病態発生をより詳細に理解することを試みた。その結果、我々が解析したうちのいくつかの血栓症関連遺伝子が、主に血栓形成期において顕著に変動しており、凝固・線溶のバランスは凝固促進に傾いていると考えられた。また、網羅的遺伝子発現解析により、PHZ 投与ラットの肺では炎症・免疫反応が早期から顕著かつ継続的に誘発されていることが示された。炎症性反応は血管内皮細胞の機能的変化を誘発することや、血液凝固と深い相互関係が報告されており、PHZ 投与ラットにおいても炎症状態が血栓症の病態発生・悪化に関与していることが示唆された。

本研究の結果と他の関連文献から、PHZ 投与ラットにおける急性肺血栓症のメカニズムは下図のように推察される。つまり、PHZ は赤血球を傷害し、赤血球の変形能喪失と形態異常をもたらすが、それが局所血流の障害、全身性の血液凝固異常(血液凝固性亢進)、血管内皮細胞の機能障害を引き起こす。肺において早期から惹起される炎症性の反応が血管内皮細胞の機能障害に影響を及ぼしている

可能性がある。これらの要因のインパクトや発生時点を鑑みるに、PHZ 投与ラットにおいては、初期の肺毛細血管内の血流障害がトリガーとなり、引き続く血管内皮細胞の機能異常（凝固促進状態）、血液凝固性の亢進が血栓症の病態を悪化させていると考えられた。





## 謝辞

日本獣医生命科学大学 獣医病理学教室 教授・高橋公正先生には、本研究に際し実験実施段階から1つの学位論文として完成するまでの様々な過程で、多くのご指導・ご助言を賜りましたことを心から感謝いたします。

また、業務の多忙にもかかわらず、本研究における各種試験の実施、データの取得、論文校閲にご協力いただきました田辺三菱製薬株式会社 安全性研究所の皆様へ深く感謝いたします。特に、長きにわたり学位取得までの道のを励まし一緒に走り続けてくださいました坂入鉄也博士、田中雅治博士に熱く御礼申し上げます。

## 参考文献

Adachi H. Pathological study on experimental Heinz body anemia: intracellular changes of phagocytized red cells in macrophages of the spleen and liver. *Acta Pathol Jpn* 1977;27:657-75.

Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. *Curr Pharm Des* 2012;18:1478-93.

Anderson FA Jr, Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation* 2003;107:I9-16.

Respiratory physiology. In: Barrett KE, Boitano S, Barman SM, Brooks HL, editors. *Ganong's review of medical physiology*, 23th ed. McGraw-Hill companies, Inc., New York; 2010. 587-625.

Bloom JC, Brandt JT. Toxic responses of the blood. In: Klaassen CD, editor. *Casarett & Doull's Toxicology*, 7th ed. McGraw-Hill companies, Inc., New York; 2008. 455-484.

Cary R, Dobson S, Brooke I. Concise International Chemical Assessment Document 19:PHENYLHYDRAZINE. Retrieved July 11, 2008, from World Health Organization website: <http://www.who.int/entity/ipcs/publications/cicad/en/cicad19.pdf>

Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M; VTE Impact Assessment Group in Europe (VITAE). Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007;98:756-64.

Criswell KA, Sulkanen AP, Hochbaum AF, Bleavins MR. Effects of phenylhydrazine or phlebotomy on peripheral blood, bone marrow and erythropoietin in Wistar rats. *J Appl Toxicol* 2000;20:25-34.

Ezov N, Levin-Harrus T, Mittelman M, Redlich M, Shabat S, Ward SM, et al.

A chemically induced rat model of hemolysis with disseminated thrombosis. *Cardiovasc Toxicol* 2002;2:181-94.

Ghanayem BI, Long PH, Ward SM, Chanas B, Nyska M, Nyska A. Hemolytic anemia, thrombosis, and infarction in male and female F344 rats following gavage exposure to 2-butoxyethanol. *Exp Toxicol Pathol* 2001;53:97-105.

Gresele P, Momi S, Migliacci R. Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events. *Thromb Haemost* 2010;103:56-61.

Hara S, Asada Y, Hatakeyama K, Marutsuka K, Sato Y, Kisanuki A, et al. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in rats lungs with lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation. *Lab Invest* 1997;77:581-9.

Hardaway RM 3rd, McKay DG, Wahle GH Jr, Tartock DE, Edelstein R. Pathologic study of intravascular coagulation following incompatible blood transfusion in dogs. I. Intravenous injection of incompatible blood. *Am J Surg*. 1956;91:24-31.

Jain SK. In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. *J Clin Invest* 1985;76:281-6.

Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 2002;100:879-87.

Kato GJ, Taylor JG 6th. Pleiotropic effects of intravascular haemolysis on vascular homeostasis. *Br J Haematol.* 2010;148:690-701.

Kawamura M, Terashita Z, Imura Y, Shino A, Nishikawa K. Inhibitory effect of TCV-309, a novel platelet activating factor (PAF) antagonist, on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats: possible role of PAF in tissue factor generation. *Thromb Res* 1993;70:281-93.

Kawasaki H, Hayashi K, Awai M. Disseminated intravascular coagulation (DIC). Immunohistochemical study of fibrin-related materials (FRMs) in renal tissues. *Acta Pathol Jpn.* 1987;37:77-84.

Kleinegris MC, Ten Cate-Hoek AJ, Ten Cate H. Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis. *Pol Arch Med Wewn* 2012;122:557-66.

Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 2005;157:175-88.

Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Inflammation and repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins basic pathology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2013. p. 31-42.

Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 1992;258:964-9.

Lewis DA, Nyska A, Potti A, Hoke HA, Klemp KF, Ward SM, et al. Hemostatic activation in a chemically induced rat model of severe hemolysis and thrombosis. *Thromb Res* 2006;118:747-53.

Liese AM, Siddiqi MQ, Siegel JH, Denny T, Spolarics Z. Augmented TNF-alpha and IL-10 production by primed human monocytes following interaction with oxidatively modified autologous erythrocytes. *J Leukoc Bio.* 2001;70:289-96.

Magnani M, Stocchi V, Cucchiarini L, Chiarantini L, Fornaini G. Red blood cell phagocytosis and lysis following oxidative damage by phenylhydrazine. *Cell Biochem Funct* 1986;4:263-9.

Mannucci PM, Lobina GF, Caocci L, Dioguardi N. Effect on blood coagulation of massive intravascular haemolysis. *Blood.* 1969;33:207-13.

Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochem Med* 2012;22:49-62.

Mitchel RN. Hemodynamic Disorders, Thromboembolism, and Shock. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins basic pathology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2013. p. 86-90.

Nyska A, Maronpot RR, Long PH, Roycroft JH, Hailey JR, Travlos GS, et al. Disseminated thrombosis and bone infarction in female rats following inhalation exposure to 2-butoxyethanol. *Toxicol Pathol* 1999;27:287-94.

Ramot Y, Nyska A. Drug-induced thrombosis--experimental, clinical, and mechanistic considerations. *Toxicol Pathol.* 2007;35:208-25.

Ramot Y, Lewis DA, Ortel TL, Streicker M, Moser G, Elmore S, et al. Age and dose sensitivities in the 2-butoxyethanol F344 rat model of hemolytic anemia and disseminated thrombosis. *Exp Toxicol Pathol* 2007;58:311-22.

Ravanat C, Freund M, Dol F, Cadroy Y, Roussi J, Incardona F, et al. Cross-reactivity of human molecular markers for detection of prethrombotic states in various animal species. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:446-55.

Redondo PA, Alvarez AI, Diez C, Fernández-Rojo F, Prieto JG. Physiological response to experimentally induced anemia in rats: a comparative study. *Lab Anim Sci* 1995;45:578-83.

Reinhardt CF, Brittelli MR. Phenylhydrazine. In: Clayton GD, Clayton FE, editors. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*, 3rd ed. Wiley-Interscience publication, New York; 1981. 2804-2805.

Setty BN, Betal SG, Zhang J, Stuart MJ. Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. *J Thromb Haemost* 2008;6:2202-9.

Sueishi K. Vascular endothelial system--from the pathological aspects (in Japanese). *Rinsho Byori* 1994;42:553-62.

Suzuki K. Method of preparing animal model of thrombosis and arterial sclerosis (in Japanese). Kyoto: Kinpodo Inc.; 2007.

Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;216:456-63.

Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T, Figdor CG. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood*. 2001;98:1802-11.

White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 2003;107:I4-8.

Yoshizawa K, Kissling GE, Johnson JA, Clayton NP, Flagler ND, Nyska A. Chemical-induced atrial thrombosis in NTP rodent studies. *Toxicol Pathol*. 2005;33:517-32.

# **Studies on pathogenesis of acute thrombosis in Phenylhydrazine treated rat**

Summary of Doctor Thesis

**Hiroko Sato**

Graduate School of Veterinary and Life Science  
Nippon Veterinary and Life Science University

Under Supervisor of  
Prof. Dr. Kimimasa Takahashi

March 2016



Phenylhydrazine (PHZ) is used worldwide, mainly as a chemical intermediate in the pharmaceutical, agrochemical, and chemical industries. PHZ is well known for its ability to induce hemolysis via auto-oxidation of erythrocyte in animals including human. Several toxicities of PHZ has been reported in hematology and histopathology, e.g. decreased erythrocyte and hemoglobin, splenomegaly, erythrophagia and blown pigment deposition in various organs. On the other hand, thrombosis caused by PHZ has not been reported in the animal experiments. We could see a few cases of thrombosis in the patients treated with PHZ for polycythemia; however, the mechanism is unknown.

We found that a short-term administration of PHZ caused acute thrombosis in rat lung. In this study, we determined the hematological and histological changes of PHZ-treated rats to reveal the pathogenesis of the pulmonary thrombosis. In addition, we used gene expression profiling to provide a better understanding of biofunctional changes in lungs of PHZ-treated rats.

### **1. Acute pulmonary thrombosis and other histopathological findings in major organs of PHZ-treated rats (Second chapter)**

To obtain the pathological reference data for blood or hematopoietic toxicity, we conducted a short-term repeated administration study of PHZ in young male SD rat. Macroscopically, PHZ-treated rats showed red or dark discoloration in all lobes of lungs and small white lesions are scattered. Microscopically, fibrinous thrombi were formed in alveolar capillaries coincided with the white lesions macroscopically observed. In the other organs, hemolysis-related changes such as erythrophagia, extramedullary hematopoiesis and brown pigment deposition were observed in the liver, kidney, heart and spleen. Thrombi were observed in the left cardiac auricle mainly in dead animals; however, no microthrombosis were observed in the organs except for the lung. Therefore, it is

considered that PHZ caused acute thrombosis specific to the alveolar capillaries in rats.

## **2. The hematological and histopathological time course of change in PHZ-treated rats (Third chapter)**

To investigate the pathogenesis of the acute pulmonary thrombosis in PHZ-treated rats, we evaluated the hematological and histopathological time course. As a result, the earliest change except anemia that preceded thrombus formation was congestion (i.e. accumulation of deformed erythrocyte). In addition, abnormality in coagulation parameters and limited endothelial injury in the alveolar capillaries were also observed accompanied by diffuse thrombus formation. Applying these changes to the three major causes of thrombus formation as follows: 1) endothelial injury, 2) stasis or turbulence of blood flow, and 3) blood hypercoagulability; the trigger for acute pulmonary thrombosis in PHZ-treated rats was considered to be regional stasis (Factor 2). Endothelial injury (Factor 1) and blood hypercoagulability (Factor 3) was considered to accelerate thrombus formation.

## **3. The time course change of mRNA in the lungs of PHZ-treated rats (Forth chapter)**

As mentioned above, it was revealed that endothelial injury contributed to acceleration of thrombosis; however, the potential of endothelial dysfunction remains unclear. Therefore, we evaluated the expression changes of well-known thrombosis-related genes in endothelium in the lungs of PHZ-treated rats. In addition, we used gene expression profiling and Gene ontology analysis to provide a better understanding of the pathogenesis of the thrombosis. As a result, some of the thrombosis-related genes we examined were significantly changed mainly during thrombus formation and the

balance between coagulation and fibrinolysis was considered to be inclined to pro-coagulant force. This change would be contribute to the development of the pulmonary thrombosis in PHZ-treated rats. The gene expression analysis showed that inflammation/immune response was significantly and continuously induced in the lungs of PHZ-treated rats from the early phase of treatment. It has been reported that inflammatory response causes endothelial dysfunction and interact with blood coagulation. Therefore, inflammatory condition in lungs of PHZ-treated rats would be play a role in acute thrombosis.

To summarize the findings of our studies and other relevant reports, we propose a putative mechanism for acute pulmonary thrombosis in PHZ-treated rats (figure below). PHZ affected erythrocytes and might cause various types of disruption, including loss of deformability and morphological alteration, which are attributable to regional stasis, endothelial dysfunction and systemic hemostatic disruption (i.e. blood hypercoagulability). Inflammatory condition in the lung provoked from early phase might induce the endothelial dysfunction. Considering the impact and the onset of the events observed in our study, regional stasis could serve as a trigger, and subsequent endothelial dysfunction in the lungs and blood hypercoagulability would be important contributors to acute thrombosis in the lungs of PHZ-treated rats.

