



Kupffer cells modulate splenic interleukin-10 production in endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 倉地, 清隆 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1247

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 394号	学位授与年月日	平成15年 3月26日
氏 名	倉 地 清 隆		
論文題目	<p>Kupffer cells modulate splenic interleukin-10 production in endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy (クッパー細胞は肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝障害における脾臓でのインターロイキン-10 産生を調節する)</p>		

博士(医学) 倉 地 清 隆

論文題目

Kupffer cells modulate splenic interleukin-10 production in endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy

(クッパー細胞は肝部分切除後のエンドトキシン誘発肝障害における脾臓でのインターロイキン-10産生を調節する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

周術期管理の進歩した現在でも、感染症に起因する肝切除後の肝不全は重篤な致死合併症である。この病態に関する従来の研究では、炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor (TNF)- α と好中球が肝障害の進展に重要であると報告されているが、抗炎症性サイトカイン、特に interleukin (IL)-10 の関わり合いに着目して行った研究はない。本研究の目的は、肝部分切除後のエンドトキシン血症における炎症性・抗炎症性サイトカインの産生とその産生調節に及ぼすクッパー細胞と脾臓の役割を明らかにすることである。

〔材料ならびに方法〕

Wistar 系雄性ラット (180–200g) を用いた。肝切除群として、70%肝部分切除のみを行った H 群、肝切除後にクッパー細胞機能を抑制するため gadolinium chloride (GdCl₃; 7mg/kg) を 2 日間投与した HG 群、肝切除と同時に脾摘除を行った後に GdCl₃ を投与した HGS 群を作成した。コントロール群として、開腹術のみ行った S 群と開腹術後に GdCl₃ (7mg/kg) を 2 日間投与した SG 群を作成した。開腹術および肝切除後 48 時間後に lipopolysaccharide (LPS; 1.5mg/kg) を静脈内投与した。この LPS 投与量は正常ラットにとって非致死量である。LPS 投与後 24 時間生存率に加え、LPS 投与前、投与 1、4 時間後の血漿 alanine aminotransferase (ALT)、TNF- α 、IL-10 値、肝および脾組織中 TNF- α と IL-10 mRNA 発現、組織学的所見を 5 群間で比較した。

〔結果〕

1) LPS 投与後 24 時間生存率は非肝切除群 (S 群、SG 群) では 100% であった。肝切除のみの H 群の生存率は 20% と低かったが、HGS 群 67%、HG 群 80% と有意な改善がみられた。2) 非肝切除群では LPS 投与による血漿 ALT 値の有意な変動は認めなかった。LPS 投与 4 時間後の H 群の血漿 ALT 値は $2,100 \pm 920$ IU/L まで上昇したが、GdCl₃ 投与あるいは脾摘併施 (HG 群、HGS 群) によりこの上昇は有意に抑えられた。3) LPS 投与 1 時間目の H 群の血漿 TNF- α 値 ($8,039 \pm 280$ pg/ml) は、HG 群と HGS 群に比較し、著しく上昇した。4) LPS 投与 1 時間目の血漿 IL-10 値は TNF- α 値とは異なり、H 群と HGS 群に比較し、HG 群で有意に高値であった。血漿 TNF- α /IL-10 比は血漿 ALT 値と死亡率の高い順に一致し、H 群で最も高く、HGS 群、HG 群の順に低下した。5) GdCl₃ 前処置により、LPS 投与後の肝組織中の TNF- α と IL-10 mRNA 発現は抑制されたが、LPS 投与 1 時間後の脾臓の IL-10 mRNA 発現は H 群に比し、有意に増強していた。6) 組織学的には非肝切除群では LPS 投与による肝組織壊死はみられなかった。一方、H 群では LPS 投与 4 時間目に門脈域周囲から中間帯にかけての肝類洞内鬱血や肝組織壊死に加え、脾リンパ濾胞構造の消失と鬱血が観察された。このような組織障害は HG 群と HGS 群で軽減していた。

〔考察〕

本研究において肝障害が最も強くみられた H 群では、LPS 投与 1 時間後に著明な血漿 TNF- α 値の上昇を示したが、クッパー細胞機能を抑制した HG 群および HGS 群では血漿 TNF- α 値の上昇を抑えられ、肝障害が軽減された。しかし、本病態での血漿 TNF- α 値の上昇は一過性であり、その値は LPS 投与後の死亡率と相関しなかった。これは TNF- α は一連の炎症反応カスケードが進行する際の早期のメディエーターとして重要であるが、その値は必ずしも炎症の状態を反映しないという従来の報告と一致する。

IL-10 は抗炎症性サイトカインとして知られており、エンドトキシン血症や敗血症モデルにおいて、このメディエーターが病態の改善に関与することが報告されている。その作用機序として、IL-10 が nuclear factor kappa B (NF- κ B) の活性化を抑え、TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生抑制を引き起こすものと考えられている。肝切除後早期の肝再生過程でのエンドトキシン血症では、H 群で観察されたように、肝での TNF- α と IL-10 mRNA 発現の増強と脾臓での HG 群と同程度の TNF- α mRNA 発現がみられた。一方、GdCl₃ によりクッパー細胞機能を特異的に抑制すると、肝での TNF- α 、IL-10 mRNA の発現は完全に抑えられ、脾臓での IL-10 mRNA の強発現が認められた。血漿 TNF- α /IL-10 比が H 群で高く、HG 群で低かったのはこのような結果が反映されており、この比は LPS 投与後の肝障害や死亡率と関連した。クッパー細胞は IL-10 の主要な産生源の 1 つと考えられているが、我々の研究は脾臓で産生された IL-10 が肝切除後早期のエンドトキシン誘発肝障害の進展防止に重要であることを示した。生体内に炎症反応が惹起されると、TNF- α や IL-10 に代表される炎症性および抗炎症性サイトカインが単独にメディエーターとして作用することは少なく、相互に作用を及ぼしながら複雑なカスケードが形成される。本研究で明らかになったように、炎症性および抗炎症性サイトカインのバランスが肝切除術後の敗血症の病態や予後に関与するため、クッパー細胞と脾臓による炎症性および抗炎症性サイトカインの産生調節が本病態の進展防止に重要である。

〔結論〕

肝切除後早期のエンドトキシン血症では、活性化クッパー細胞による TNF- α 産生の増加と脾臓での IL-10 産生の抑制が肝障害を悪化させる原因として考えられた。本病態の進展防止には、クッパー細胞と脾臓による炎症性および抗炎症性サイトカインの産生調節が重要である。

論文審査の結果の要旨

肝切除後の感染症による肝不全は重篤な致死合併症である。グラム陰性菌由来のエンドトキシンは炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 β 、IL-6 などを介してこの肝不全を惹起することが知られている。一方、抗炎症性サイトカインである IL-10 はエンドトキシンに反応して、肝臓のクッパー細胞やマクロファージおよび脾細胞から産生され炎症を抑制することが知られている。従って、炎症性および抗炎症性サイトカインのバランスが、本疾患の予後に関与すると考えられる。そこで、申請者らは肝部分切除後のエンドトキシン血症における炎症性および抗炎症性サイトカインの産生と、その産生調節に及ぼすクッパー細胞と脾臓の役割を明らかにすることを試みた。この目的のため、Wistar 系雄ラットの (1) 70% 肝切除群 (H 群)、(2) 肝切除後にクッパー細胞を特異的に抑制する gadolinium chloride (GdCl₃) を投与した HG 群、(3) 肝切除と同時に摘脾を行った後に GdCl₃ を投与した HGS 群を作製した。また、コントロールとして (4) 開腹術のみを行った S 群、(5) 開腹術後に GdCl₃ を投与した SG 群を作製した。これらのラットの術後 48 時間に正常ラットでは非致死的な量のリボ多糖体

(LPS: 1.5mg/kg)を投与し、生存率、血漿 alanine aminotransferase (ALT)、TNF- α 、IL-10 値、肝および脾組織中の TNF- α と IL-10 mRNA 発現、組織学的所見を検討した。得られた主な結果は以下の通りである。

1) 生存率：LPS 投与後24時間における非肝切除群(S 群、SG 群)の生存率は100%であったが、H 群の生存率は20%に低下した。しかし、HG 群、HGS 群では各々80%、67%と有意な改善が認められた。2) 血漿 ALT 値：非肝切除群では LPS 投与による ALT 値に変動は認めなかったが、H 群では LPS 投与 4 時間後に高値を示した。しかし、HG 群、HGS 群では ALT 値の上昇は有意に抑制された。3) 血漿 TNF- α 値：H 群では LPS 投与後 1 時間目に一過性の高値を示したが、HG 群、HGS 群では有意に抑制された。4) 血漿 IL-10 値：LPS 投与後 1 時間目に HG 群では H 群、HGS 群に比し有意に高値を示した。5) 血漿 TNF- α /IL-10 比：H 群>HGS 群>HG 群の順であり、これは血漿 ALT 値、死亡率と相関した。6) TNF- α 、IL-10 mRNA 発現：LPS 投与後の肝臓、脾臓におけるこれら mRNA の発現を認めた。しかし、GdCl₃ 前処置により肝臓におけるこれら mRNA 発現は完全に抑えられた。一方、脾臓における TNF- α mRNA は抑制されず、IL-10 mRNA は有意に増強した。7) 組織学的所見：非肝切除群では LPS による肝組織壊死は認めなかった。H 群では LPS による門脈域周囲から中間帯にかけての肝類洞内鬱血、肝組織壊死および脾リンパ濾胞構造の消失と鬱血が観察された。HG 群と HGS 群ではこのような組織障害は軽減していた。

以上より、申請者らは肝切除後早期のエンドトキシン血症では肝クッパー細胞による TNF- α 産生の増加と脾臓での IL-10 産生の抑制が肝不全を惹起すると考察した。審査委員会では、肝切除後のエンドトキシン血症による肝不全のメカニズムを IL-10 に着目して詳細に明らかにした点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) 肝切除を70%にした根拠は
- 2) Sham operation の具体的な方法について
- 3) LPS の純度は
- 4) GdCl₃ のクッパー細胞抑制に関する特異性について
- 5) 実験前にラットを12時間絶食させる理由は
- 6) ラット ALT の正常値と半減期は
- 7) HS(肝部分切除、脾摘除)群は実験しなかったか
- 8) LPS 刺激後 4 時間で血漿中の IL-4、IL-10 はほとんど消失するのに対し、肝臓、脾臓におけるこれら mRNA 発現が維持されているのは何故か
- 9) SG 群で脾臓 IL-10 mRNA が上昇しない理由は
- 10) 肝切除によるクッパー細胞活性化の機序は
- 11) 脾臓における IL-10 産生細胞について
- 12) 調節性 T 細胞は LPS 誘発肝障害に関与しないか
- 13) IL-10 による NF- κ B 阻害の機序について
- 14) クッパー細胞による脾臓 IL-10 産生の調節機構について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 小 出 幸 夫

副査 前 川 真 人 副査 花 井 洋 行