

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

エンドトキシン・トレランス誘導による手術侵襲反応軽減の試み：  
----その機序における交感神経系の関与について----

指導教官 上西紀夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程  
外科学専攻  
氏名 小島淳一

## <背景>

エンドトキシン・トレランス (ExT) とは、あらかじめ少量のエンドトキシンを投与しておく、その後のエンドトキシン投与に対して生体の応答性が低下した状態になることであり、この状態では炎症性サイトカインの産生は低下する。また、ExT を誘導することで、他の侵襲(出血性ショック、熱傷、低酸素など)に対しても耐性(交叉耐性)を示すことが知られている。

外科的侵襲に対する過度の炎症性免疫反応は、炎症性サイトカイン優位である SIRS の病態を呈し、サイトカイン・ストームや好中球のプライミングの原因となっており、引き続き起こる侵襲による臓器不全に繋がる。そこで、ExT を利用して手術時の炎症性サイトカイン産生を抑制することにより、周術期における侵襲反応を軽減することが出来るのではないかと考えた。しかし手術侵襲とエンドトキシンによる侵襲との交叉耐性が存在するか否かの研究報告はない。

一方、ExT の機序に関して様々な研究報告はあるが、未だ十分に解明されていない。交感神経系の活性化反応は外科的侵襲反応の一つであるが、カテコラミン (CA) の過度の分泌は血圧や心拍出量の維持には必要だが、重要臓器の血管収縮による虚血障害や異化反応の亢進をきたし、さらにはノルエピネフリンが Th 細胞を介して細胞性免疫能低下をもたらす。諸家の報告では ExT を誘導すると、交感神経系活性は抑制されることがわかっており、さらに、CA の前投与によって、その後に与えたエンドトキシンに対して耐性を示すことが動物モデルにて認められている。つまり交感神経系が ExT 誘導の機序に関与していることが示唆されるが、その関係についての報告は今までになされていない。そこで以下の研究を行った。

## <実験 1>ラットにおける ExT 誘導による手術侵襲反応軽減の試み

[目的] ExT を誘導することにより手術侵襲反応を抑制することが出来るか、ラットで調べた。

[方法] Wistar 系雄性ラットを用いて、LPS 0.2 mg/kg を 1 日 1 回 2 日間連続で腹腔内注射し、ExT の誘導を行った (LPS 群) . LPS の代わりに生理食塩水 (saline) を投与した rat を Sal 群とした. この方法で ExT が TNF  $\alpha$  産生抑制を指標として誘導されるのを確かめた上で、上記の 2 群を手術侵襲の有無でさらに 2 つに分けた. 最初の LPS 投与から 5 日目に、頸静脈カニューレシオンと開腹、胃切開縫合術を施行し、シーベルに固定して完全静脈栄養下で管理した (Op 群). 頸静脈カニューレシオンのみを行った群を control (Sham 群) とした. 侵襲度の評価は、手術後 6, 24, 48, 72, 96 時間後に採血を行い、血漿 IL-6, AST 濃度を測定した. また蛋白代謝の評価として、手術後 7 日間にわたり窒素平衡を測定した. 4 群間での比較検定を Two-way ANOVA 法で行い、 $P < 0.05$  を有意差ありとした.

[結果] (1) 手術侵襲により血漿 IL-6 濃度は増加した. (手術侵襲後 6 時間のデータは、Sal-Sham 群 =  $83 \pm 8$  pg/ml, Sal-Op 群 =  $197 \pm 37$  pg/ml,  $P < 0.01$ ), 術後 24, 96 時間でも同様であった.

(2) LPS 前投与により、術後 6 時間の血漿 IL-6 濃度 (LPS-Op 群 =  $73 \pm 19$  pg/ml) は Sal-Op 群より有意に減少し ( $P < 0.01$ ), LPS-Sham 群と同じレベルになった. (3) 窒素平衡は、手術侵襲により明らかに不良となった. (術後 2 日から 5 日までの Sal-Sham 群 =  $1.34 \pm 0.29, 2.02 \pm 0.19, 3.50 \pm 0.20, 3.19 \pm 0.34$  mg/day ; Sal-Op 群 =  $-0.80 \pm 0.43, -0.56 \pm 0.73, 0.09 \pm 0.49, 1.37 \pm 0.29$  mg/day) (4) LPS を前投与しておくとも手術侵襲下であっても窒素平衡は有意に改善した (LPS-Op 群 =  $1.77 \pm 0.25, 2.79 \pm 0.48, 2.56 \pm 0.39, 4.18 \pm 0.27$  mg/day). (5) 血漿 AST 濃度は手術侵襲後 6 時間、24 時間で、Sal-Sham 群 ( $135 \pm 14.2, 96 \pm 4.2$  IU/ml) に対し、Sal-Op 群 ( $237 \pm 18.4, 174 \pm 19.2$  IU/ml) では有意に ( $P < 0.01$ ) 増加した. LPS 前投与を行う (LPS-Op 群) と、術後 6 時間で  $166 \pm 24$  IU/ml と、Saline-Op 群と比較して有意に ( $P < 0.05$ ) 減少した.

[考察] ExT 誘導を行うと、手術侵襲に対する生体反応を軽減する可能性が示唆されたが、今後は経時的变化や長期予後も含めて検討する必要がある. さらに、臨床応用を考慮するにあたり、毒性のない Monophosphoryl Lipid A や免疫促進剤が LPS に対する耐性誘導を示すことから、それらの薬剤を前投与に用いることが考えられるが、その効果に関しては今後の研究課題である.

## <実験 2> ExT 誘導における交感神経系の関与

### -----実験 2-A ; *in vivo* study-----

[目的] ExT 誘導と交感神経系との関係を見るため、LPS 前投与によるトレランス誘導時に、交感神経受容体阻害薬を使用することにより、その誘導に与える影響をラットで調べた.

[方法] Wistar 系雄性ラットを用いて、頸静脈にカニューレシオンを行い、シーベルに固定して 72 時間は自由経口摂取とした. その後、完全静脈栄養下にて管理を行い、LPS 0.2 mg/kg を 1 日 1 回 3 日間連続で静注し、ExT の誘導を行った (LPS 群). Control 群では LPS の代わりに saline を投与した (Sal 群). LPS 又は saline 投与後 3 時間で採血を行い、ExT 誘導段階での血漿カテコラミン(CA), TNF- $\alpha$ , IL-6 を測定した. また ExT 誘導段階にて Phentolamine (10 mg/kg/day)

または Propranolol(10 mg/kg/day)を持続投与することにより交感神経系を制御した. LPS 0.2 mg/kg 最終投与から 48 時間後に LPS 5 mg/kg を静注して, その 2, 4 時間後に採血し, 血漿 CA, TNF  $\alpha$ , IL-6, AST 濃度を測定した.

[結果] (Table 1)

LPS 5 mg/kg 投与後の炎症性サイトカイン, AST 濃度は, 1) LPS の前投与により有意に減少した. これは Phentolamine, Propranolol の投与の有無にかかわらなかった. 2) LPS 前投与群間で比較すると, Propranolol 投与により血漿 NE 濃度も含めて Saline 投与と比較して有意に増加した.

**Table 1.** Plasma TNF-alpha, IL-6, NE, AST level after LPS 5 mg/kg administration

Pretreatment		Saline			LPS		
		Saline	Phen	Pro	Saline	Phen	Pro
n		5	5	5	6	8	6
TNF- $\alpha$	2 h	1000 $\pm$ 0	1000 $\pm$ 0	1000 $\pm$ 0	188 $\pm$ 28*	94 $\pm$ 19* †	503 $\pm$ 92* †
(pg/mL)	4 h	400 $\pm$ 136	294 $\pm$ 31	804 $\pm$ 108	38 $\pm$ 9.8*	13 $\pm$ 5.6*	87 $\pm$ 31*
IL-6	4 h	2000 $\pm$ 0	2000 $\pm$ 0	2000 $\pm$ 0	217 $\pm$ 97*	346 $\pm$ 148*	1124 $\pm$ 366* †
(pg/mL)							
NE	2 h	2.3 $\pm$ 0.4	3.1 $\pm$ 0.4 †	4.1 $\pm$ 1.2	0.9 $\pm$ 0.1*	1.8 $\pm$ 0.2* †	4.0 $\pm$ 1.4 †
(ng/mL)	4 h	10.9 $\pm$ 3.6	2.1 $\pm$ 0.2	7.0 $\pm$ 2.2	1.1 $\pm$ 0.3*	1.3 $\pm$ 0.1*	2.8 $\pm$ 0.8 †
AST (IU/L)		420 $\pm$ 75	332 $\pm$ 97	806 $\pm$ 166	113 $\pm$ 12*	106 $\pm$ 32	279 $\pm$ 56* †

NE ; Norepinephrine, Phen ; Phentolamine, Pro ; Propranolol. Values are mean  $\pm$  SE.

\*  $p < 0.05$  vs. saline pretreated rats, †  $p < 0.05$  vs saline infusion rats, Two-way ANOVA.

#### -----実験 2-B *in vitro* study-----

[目的] ExT 誘導における CA の役割と  $\alpha$ ,  $\beta$  受容体の役割をマウス・マクロファージである RAW 264 cell line を用いて細胞レベルで調べた.

[方法]

##### (a) ExT 誘導における CA の影響

RAW 264 cell ( $1 \times 10^6$  cell) を 24 穴ポリスチレンプレートに分注し, その 30 分後に epinephrine と norepinephrine を  $10^{-7}$ M 加えた群を CA 群, saline 0.1 ml 加えた群を Sal 群とした. その 30 分後に LPS 10 ng を加え, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 環境下で 24 時間培養した. PBS による洗浄後, さらに 24 時間培養し, LPS 100 ng を加え, その 3, 6, 24 時間後の細胞上清中の TNF  $\alpha$ , IL-6, IL-10 濃度を ELISA 法にて測定した. 検定は ANOVA 法にて行い  $P < 0.05$  を有意差ありとした.

##### (b) ExT 誘導における $\alpha$ または $\beta$ 受容体の影響

RAW cell の分注と同時に phentolamine  $10^{-7}$ M または propranolol  $10^{-7}$ M または saline 0.1 ml を加え, その 30 分後に CA を加えて, 以下は (a) と同様とした. LPS 前投与の有無, phentolamine または propranolol 投与の有無で群に分け各群間の比較検定は ANOVA 法を用いて,  $P < 0.05$  を有意差ありとした.

[結果] (Table 2)

1, LPS 10 ng を加えた 24 時間の培養で, LPS 100 ng に対する耐性が獲得された. 2, ExT 誘導時に CA を加えることにより, その誘導は促進された. 3, ExT 誘導時に CA に加えて,  $\beta$  受容体阻害剤を用いることにより, その誘導は抑制された. 4, IL-10 濃度は全ての群で測定感度以下であった. 5, CA のみの前投与によって LPS に対する耐性が獲得されている可能性が IL-6 を指標として示された.

[考察]

RAW cell における ExT 誘導実験で, カテコラミン投与が ExT 誘導を促進させた. さらに, ExT 誘導において交感神経系が  $\beta$  受容体を介して密接に関係していることが *in vivo* study と *in vitro* study の両者で示された. 今回の実験でその機序を解明するデータは得られていないが,  $\beta$  受容体を介する細胞内 cAMP の上昇が NF $\kappa$ B 活性を抑制し ExT 誘導に関係していることや, cAMP の上昇が抗原抗体反応などの免疫反応には不可欠であるという文献的考察より,  $\beta$  受容体阻害剤投与が細胞内 cAMP の上昇を抑制し, ExT 誘導が制限された可能性を考察した. さらに,  $\beta$  受容体そのものの変化や, IL-10 の関与も考慮すべきことであるが, 今回の実験からはそれらの関与は証明されなかった.

Table 2. Effect of catecholamine and adrenergic antagonist in endotoxin tolerance induction in RAW 264 cell line

		Saline pretreatment				LPS pretreatment			
		Saline	catecholamine			Saline	catecholamine		
		Saline	Saline	Phentolamine	Propranolol	Saline	Saline	Phentolamine	Propranolol
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	3 h	1593 $\pm$ 57	1042 $\pm$ 166	870 $\pm$ 28	1458 $\pm$ 133	525 $\pm$ 37 *	371 $\pm$ 60 *	422 $\pm$ 21*	1456 $\pm$ 120 #
	6 h	2687 $\pm$ 96	2439 $\pm$ 174	2080 $\pm$ 166	3003 $\pm$ 43	1687 $\pm$ 113*	800 $\pm$ 88 * $\dagger$	917 $\pm$ 37 *	2989 $\pm$ 217 #
	24 h	3431 $\pm$ 166	3303 $\pm$ 300	3088 $\pm$ 295	4444 $\pm$ 77 #	1916 $\pm$ 60 *	1292 $\pm$ 96 * $\dagger$	1407 $\pm$ 73 *	3460 $\pm$ 168 * #
IL-6 (pg/mL)	3 h	88 $\pm$ 20	21 $\pm$ 11 $\dagger$	26 $\pm$ 17	200 $\pm$ 41 #	26 $\pm$ 26	4 $\pm$ 4	20 $\pm$ 2.3 #	145 $\pm$ 5.8 #
	6 h	498 $\pm$ 43	400 $\pm$ 32	268 $\pm$ 27 #	849 $\pm$ 70 #	242 $\pm$ 21 *	196 $\pm$ 36 *	162 $\pm$ 32	658 $\pm$ 36 #
	24 h	3733 $\pm$ 144	2965 $\pm$ 68 $\dagger$	2186 $\pm$ 133 #	3597 $\pm$ 190 #	1428 $\pm$ 108 *	954 $\pm$ 55 * $\dagger$	829 $\pm$ 98 *	2430 $\pm$ 198 * #

All data represents the mean of triplicate determinations  $\pm$  S.E. \*  $p$ <0.05 vs. saline pretreated group (unpaired *t*-test),  $\dagger$   $p$ <0.05 vs. group that treated without catecholamine (unpaired *t*-test), # $p$ <0.05 vs. group that treated without adrenergic antagonist (One-way ANOVA).

[結語]

1, ラットに LPS 前投与による ExT 誘導を行うと, 引き続き施行した手術による炎症性サイトカインや CA, AST 上昇を指標とした侵襲反応と窒素平衡の悪化を改善した.

2, ExT 誘導の機序に交感神経系は  $\beta$  受容体を介して関与している可能性が, ラットとマウス・マクロファージレベルにおいて, 示された.