

## 学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	金 子 篤
学 位 論 文 題 目			
Intestinal anastomosis surgery with no septic shock primes for a dysregulatory response to a second stimulus ( 低侵襲性腸管術が引き起こす二次刺激に対する応答不制御 に関する研究 )			
共 著 者 名			
木戸敏孝, 山本雅浩, 加瀬義夫, 鷲澤尚宏, 油田正樹, 竹田秀一			
Journal of Surgical Research 134巻(2) 215頁～222頁 平成18年8月			
研 究 目 的			
外科手術侵襲は免疫機能の低下や易感染性を引き起こすものと考えられている。最近では、外科手術を受けた患者にみられる多臓器不全の発症に、炎症反応の「two-hits」仮説が受け入れられてきた。我々の研究では、敗血症を伴わない低侵襲性の消化管外科手術が、二次刺激として後に注入するエンドトキシン(LPS)に対する免疫応答に影響を与えるかを検討した。			
材 料 ・ 方 法			
外科手術: エーテル麻酔下、雄性Wistarラット(9週令)の腹部の毛剃りを行い正中線に沿って約2cm開腹した。十二指腸空腸曲から10cm位置で、3mm幅で5号絹糸にて2箇所縛り、その中央を切断した。切断面を合わせて腸管を並行に固定し、穿孔した後、5号絹糸を用いた側・側吻合術(4針)にて、消化管内容物の通過路を確保した。消化管を腹腔内に戻し、腹筋を2号絹糸で縫合し、皮を外科用ホチキスで3箇所止めた。最後に、10 mL量の5% glucose含蒸留水を皮下注射した。手術から24時間は絶食絶水、24-48時間は絶水とし、48時間目以後で普通飼育とした。			
採血と血球数: エーテル麻酔下、尾静脈より翼状針を用い採血した。18 $\mu$ L血液相当量にFACS lysing buffer(BD PharMingen社)を加えて溶血処理を行い、その血球ペレットに対して、20 $\mu$ L量の既知濃度FlowCount原液(Coulter社), 0.5 $\mu$ g/mL propidium iodide(PI), 5%FBS, 0.04% NaN <sub>3</sub> を含有するPBSを300 $\mu$ L量加え、フローサイトメリー解析を行った。先ず、FL3陽性集団(PI陽性)にゲートをかけ、FSC/SSC解析にて、単核球と多核球(顆粒球)が表示されるエリアをそれぞれ定義し、蛍光標識ビーズの単位数に対する細胞数を求め、血中の各細胞数を算出した。白血球数は両細胞数の合算とした。			
深部体温: 無麻酔下でラットをタオルで包み固定して、婦人体温計を肛門から3.5mmの深さまで挿入し、深部体温を測定した。			
二次侵襲: 生理食塩水中に調製したLPS(DIFCO社, Escherichia coli 0127:B8)を尾静脈内又は気管支内より投与した。尾静脈内注射では術後1, 3, 5, 10日目に1mg/kgで、気管支内注射では術後7, 10, 13日目に15mg/kgでLPSをチャレンジした。			
BAL細胞の調製と培養: エーテル麻酔下に腹下大動脈を切断した後、気管支に設置した留置針(16Gx2)より15mL量のEDTA含PBS液を注入し、BALFを回収した。常法に従って、BAL細胞を調製し10% FBS含RPMI1640培地中に懸濁し、48穴プレート内 1x10 <sup>5</sup> cells/0.5mL/wellで分注した。食能試験においては、			

1x10<sup>7</sup> beads/well濃度のFITC標識ビーズ(Polysciences社、径2μm)の共存下で37°C、3時間インキュベートし、EDTA含PBSで回収後、フローサイトメトリー解析にて貪食活性を計測した。TNFα産生能は24時間の培養上清を被験試料として評価した。

サイトカイン測定：血漿及びBAL培養上清中のIL-6, IL-10, TNFα, IFNγの定量は、BD PharMingen社製Opt ELISA kitシステムを使用した。

## 成 績

### 血球、体温及び血中サイトカイン

未処理群、絶食対照群及び手術群の3群に分け試験を行った。先ず、術後3時間、3, 5, 7, 10日目に採血を行い、血球数を調べた。顆粒球が3時間で著しい増加を示し(272% vs未処理群)、3日後で一時的に低下した後、7日目をピーク(323%)とする持続的な増加が観察された。単核球にあつては、3時間で一過性の低下を示したが、その以降では有意な変化を示さなかった。体温測定は、0.5, 3時間、3, 5, 7, 10日後に行った。この結果、絶食対照群及び手術群の体温が未処理群に比べ術後0.5時間で有意に低下したが、その以降では正常値であつた。術後から3時間、1, 3, 5, 7, 10日目の血中IL-6, IL-10, TNFα, IFNγを定量したところ、手術に伴った有意な変化がなかった。

### LPS尾静脈内投与系

手術から1, 3日後に、非致死量のLPS(1mg/kg)を尾静脈内投与し 1, 2, 4, 24時間後に採血を行い、各種サイトカイン(IL-6, IL-10, TNFα, IFNγ)の誘導能を調べた。術後1日では、いずれのサイトカイン共に群間差がなかった。一方、術後3日目の場合、I型サイトカインに属するIFNγが低下し、II型サイトカインに属するIL-10が増加することがわかった。次に、術後3, 5, 10日目にLPSを尾静脈内投与し、各種サイトカインの誘導能を再検討した。この結果、IFNγ低下が術後3日目でみられ、IL-10にあつてはいずれの評価日においても手術による誘導増強がみられた。IL-6も術後5日目で有意な増加を示した。

正常ラットにLPSを尾静脈内投与した翌日に回収したBAL細胞が、同投与前のそれと比べ、貪食能とTNFα産生能の亢進を示すことが知られている。同系にて、術後1, 3, 5, 10日目にLPSを尾静脈内投与した際に得られるBAL細胞の機能を調べたところ、術後3日群に限って、貪食能とTNFα産生能の亢進阻害がみられた。

### LPS気管支内投与系

病原性微生物の気管支内感染を想定して、15mg/kg量のLPSを気管支内投与し、手術の影響を生存率で評価した。術後7, 10, 13日目にLPSを投与したところ、術後10, 13日群の生存率が有意に下がった。

## 考 案

外傷患者にみられる肝障害や肺障害等の病因を論じる場合に、「two-hits」仮説が受け入れられ、その動物モデルも複数報告されている。既存系と比べ、本モデルの特徴は、血中サイトカインの上昇を伴わない低侵襲モデルを利用したことである。本研究の狙いは、外科的手術侵襲からの回復過程で、微生物感染等の二次刺激が加わった際、宿主の免疫応答がどのような変化を示し、またその変化を経時的に観察することであつた。術後1日目には、LPS尾静脈内投与による血中サイトカイン上昇やBAL機能亢進が正常であつたにも関わらず、術後3日目には、血中IFNγ誘導が低下しIL-10誘導が増加した。BAL機能亢進も阻害され、宿主の感染抵抗力が低下している状態が示唆された。術後5, 10日目にあつては、LPS尾静脈内投与による血中IL-6, IL-10誘導が未処理群に比べて持続的に高値であつた。これらサイトカインはII型サイトカインに属し感染

免疫系を抑制する側面をもつことから、感染防御系が術後5-10日目でも完全に正常化していないことがわかった。また、同時期には、顆粒球増加に依存した血球数の著明な増加がみられ、臨床上の顆粒球増加症の特徴をもつと予想する。微生物感染を模倣してLPSを気管支内投与すると、術後10, 13日目群は未処理群に比べ生存率が下がった。以上の結果は、血中サイトカイン上昇を伴わない低侵襲手術であっても、術後の感染防御システムの正常化には長時間を要し、微生物感染時の応答様式が経時的に異なることを示唆するものである。

## 結 論

本報告の術式は低侵襲性の外科手術であるが、生存率が低下する等、二次刺激(LPS)に対する反応を修飾するのに十分なプライミング効果に成り得ることがわかった。本研究は、外科手術による病態生理の経時的変化を理解することに役立ち、術後合併症に対する予防的或いは治療的な戦略を検討するための有効な動物モデルであることを示すものである。

## 引 用 文 献

- (1) Bone, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 24: 1125, 1996
- (2) Nystrom, P. O. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J Antimicrob Chemother* 41: 1, 1998.
- (3) Lang, J. D., and Hickman-Davis, J. M. One-hit, two-hit . . . is there really any benefit? *Clin Exp Immunol* 141: 211, 2005

## 参 考 論 文

1. Ikeda Y., Kaneko A., Yamamoto M., Ishige A., Sasaki H. Possible involvement of suppression of Th2 differentiation in the anti-allergic effect of Sho-seiryu-to in mice: *Jpn. J. Pharmacol* 2002, 90(4), 328-36.
2. Hojo H., Kaneko A., Kayagaki N., Saki M., Hashimoto Y. Subcellular localization and characterization of interleukin-1 alpha produced by rat bladder cancer cells: 1994, *Immunol. Lett.*, 43(3), 215-20
3. Hojo H., Kaneko A., Nanya K., Kayagaki N., Hashimoto Y. Characterization of a cytotoxic factor produced by rat bladder cancer cell line: its identity to TNF alpha: 1994, *Immunol. Lett.*, 41(1), 19-24
4. Tamaki T., Morita T., Kawamura H., Maruyama., Kaneko A., Nunome S., Komatsu Y., Qin WZ., Yang BH., Kawamura A. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of phenolic norriterpenoid, demethylzeylasteral, from tripterygium wilfordii: *Natural Medicines* 1997, 51(2), 98-104

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	金 子 篤
審査委員長 柿崎 秀宏 ㊟			
審査委員 渡部 剛 ㊟			
審査委員 葛西 眞一 ㊟			
学位論文題目			
Intestinal anastomosis surgery with no septic shock primes for a dysregulatory response to a second stimulus (低侵襲性腸管術が引き起こす二次刺激に対する応答不制御に関する研究)			

## 学位論文審査結果の要旨

以下に、金子 篤氏による学位論文の審査結果の要旨を述べる。

外科手術による侵襲は、免疫機能の低下や易感染性を引き起こす可能性がある。最近では、外科手術を受けた患者における多臓器不全の発症に、炎症反応の“2ヒットモデル”の概念が受け入れられるようになってきた。本論文は、敗血症を伴わない低侵襲の消化管外科手術が、二次刺激として後から注入するエンドトキシン (LPS) に対する免疫応答に影響するかどうかを検討している。

研究手法としてラットの腸切断・再吻合モデルを用い、本手術を受けた個体の血球数、体温、血中サイトカインの変化を経時的に測定した。また、術後数日目に尾静脈内又は気管内よりLPSを注入し、気管支肺洗浄液 (BAL) 細胞の食食活性とTNF $\alpha$ 産生、血中サイトカイン及び生存率を評価した。

得られた結果の主たる点を列挙する。本手術単独では、深刻なショックや高サイトカイン血症を引き起こさなかったが、血中の顆粒球が有意に増加した。尾静脈内からLPSを注入して誘導される血中IFN $\gamma$ は術後3日目において有意に低値であり、逆にIL-10は術後3～10日目には高値であった。術後3日目にはBAL細胞の機能低下がみられた。また、術後10～13日目にLPSを気管内注入すると、その致死率が増加した。

以上より、低侵襲の外科手術でも、二次刺激 (LPS) に対する反応を修飾するのに十分なプライミング効果になりえることが判明した。本研究は、外科手術による病態生理の経時的変化の理解に役立ち、術後合併症に対する予防的あるいは治療的な戦略の検討するために有用な動物モデルであることが示された。また、本論文は金子 篤氏の十分な学問的知識に裏打ちされたものであり、学位論文としてふさわしい内容であると判断する。