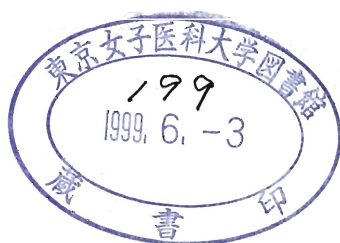

細菌性毒素による炎症反応の機序の研究

研究課題番号：09672336

平成10年度科学研究費補助金 基盤研究 (C) (2)
研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 藤井恵美子
(東京女子医科大学・医学部・助教授)



はしがき

敗血症はショック、多臓器不全など、死亡率の高い病態を惹き起こす重大な疾患である。敗血症時に細菌より放出されるエンドトキシン（LPS）などの細菌性毒素はサイトカイン、一酸化窒素（NO）などのケミカルメディエーター産生を亢進し、エンドトキシンショックの誘因となると考えられている。我々はLPSをマウスの皮下に注射すると、注射部位の皮膚血管透過性が亢進し、この皮膚血管透過性亢進は、LPSにより誘導されるサイトカイン、誘導型NO合成酵素（iNOS）により産生されるNOやシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）により産生されるプロスタグランジンを介して生じることを明らかにした。一方、心拍数や血圧に影響を与えない少量のエンドトキシン（LPS）前投与により、LPSによる血管透過性亢進が抑制され（同分子種間トレランス）、この時LPS以外の炎症メディエーター（5-HT、PAF、サブスタンスP、ヒスタミン）による血管透過性も抑制される（異分子種間トレランス）ことを発見した。エンドトキシンによる血管透過性の亢進は、エンドトキシンショックの原因のひとつと考えられているが、血管透過性亢進作用に関するトレランスの研究はまだ報告されていない。本研究は、この血管透過性におけるエンドトキシントレランスの性質をより明らかにすることを目的に、トレランス成立時に関与するメディエーター即ち、副腎皮質ホルモン、サイトカイン（TNF- α 、IL-1）、NOおよびプロスタグランジンとの関連に焦点を絞り研究した。

研究組織

研究代表者：藤井恵美子（東京女子医科大学・医学部・助教授）

研究分担者：入江かをる（東京女子医科大学・医学部・助手）

研究経費

平成9年度 1600千円

平成10年度 1300千円

計 2900千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Emiko FUJII, Keiji WADA, Kaoru IRIE & Takamura MURAKI
Changes in vascular permeability elicited by lipoteichoic acid (LTA) and lipopolysaccharide (LPS) in mouse skin.
Jpn. J. Pharmacol. 73 Suppl I 146p 1997
2. Emiko FUJII, Keiji WADA, Kaoru IRIE, Toshimasa YOSHIOKA & Takamura MURAKI
Role of various inflammatory mediators in lipopolysaccharide (LPS)-induced increase in vascular permeability studied in mouse skins.
Inflamm. Res. 46 Suppl 3 S252 1997
3. 藤井恵美子・村木 篁
エンドトキシン誘発炎症反応における IL-1 α と内因性 nitric oxide (NO) の関与
臨床薬理 28(1) 321-322 1997
4. Emiko FUJII, Kaoru IRIE, Ken-ichi OHBA, Akira OGAWA, Toshimasa YOSHIOKA, Mitsunori YAMAKAWA & Takamura MURAKI
Role of nitric oxide, prostaglandins and tyrosine kinase in vascular endothelial growth factor-induced increase in vascular permeability in mouse skin.
Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. 356(4) 475-480 1997
5. Emiko FUJII, Keiji WADA, Kaoru IRIE, Toshimasa YOSHIOKA, Ikuko URAKAWA & Takamura MURAKI
Suppressive effects of phosphodiesterase (PDE) inhibitors and β -adrenoceptor agonists on the dermal vascular permeability change induced by lipopolysaccharide (LPS) in mice.
Jpn. J. Pharmacol. 76 Suppl I 160p 1998
6. Emiko FUJII, Keiji WADA, Kaoru IRIE, Toshimasa YOSHIOKA, Ken-ichi OHBA, Ikuko URAKAWA & Takamura MURAKI
Inducible nitric oxide synthase (iNOS)-deficient mice show altered dermal vascular permeability elicited by lipopolysaccharide.
Jpn. J. Pharmacol. 76 Suppl I 62p 1998

7. Takamura MURAKI, Emiko FUJII, Keiji WADA & Toshimasa YOSHIOKA
Impaired response of dermal microvessels to platelet activating factor (PAF) in streptozotocin-diabetic mice.
Naunyn-Schmied Arch Pharmacol 358(1) Suppl II R552 1998
8. Emiko FUJII, Keiji WADA, Kaoru IRIE, Toshimasa YOSHIOKA & Takamura MURAKI
Inhibition by adenosine 3', 5' cyclic monophosphate (cAMP) of lipopolysaccharide (LPS)-induced increase in mouse dermal microvascular permeability.
Naunyn-Schmied Arch Pharmacol 358(1) Suppl II R737 1998
9. 藤井恵美子・和田圭司・村木 篁
エンドトキシン前処置によって惹起されるマウス皮膚血管透過性抑制作用
炎症 18(4) 301-304 1998

(2) 口頭発表

1. 藤井恵美子・村木 篁
起炎物質および細菌性毒素によるマウス皮膚血管透過性亢進作用における内因性一酸化窒素 (NO) とプロスタグランジンの関与
日本薬学会 第117年会 1997.3.27
2. 藤井恵美子・村木 篁
エンドトキシンによるマウス皮膚血管透過性亢進に対するトレランスについて
第3回 日本エンドトキシン研究会 1997.9.5
3. 藤井恵美子・和田圭司・村木 篁
エンドトキシンによる血管透過性亢進作用に対するトレランスについて
第18回 日本炎症学会 1997.11.21
4. 藤井恵美子・村木 篁
エンドトキシンおよびリポタイコ酸によるマウス皮膚炎症反応の比較
第18回 日本臨床薬理学会 1997.12.11
5. 和田圭司・藤井恵美子・入江かをる・吉岡俊正・浦川育子・村木 篁
エンドトキシン (LPS) 誘発マウス皮膚血管透過性亢進作用に対するホスホジエステラーゼ阻害薬および β -アドレナリン受容体作動薬による抑制効果
第71回 日本薬理学会年会 1998.3.24

6. 藤井恵美子・和田圭司・入江かをる・吉岡俊正・大場謙一・浦川育子・村木 篁
iNOS 欠損マウスにおけるエンドトキシン (LPS) 誘発皮膚血管透過性亢進作用
第71回 日本薬理学会年会 1998.3.24
7. 藤井恵美子・和田圭司・石田浩康・村木 篁
アラキドン酸によるマウス皮膚血管透過性亢進作用
第19回 日本炎症学会 1998.9. 4
8. 藤井恵美子・和田圭司・石田浩康・吉岡俊正・村木 篁
エンドトキシン投与24時間後におけるマウス皮膚血管透過性亢進作用と内因性 NO
第4回 日本エンドトキシン研究会 1998.9.25

(3) 出版物

1. 藤井恵美子・村木 篁
エンドトキシンによる血管透過性亢進に対するトレランス
エンドトキシン研究1 基礎と臨床
菜根出版 155-159, 1998

研究成果：

方法

ddY系成熟雄性マウスを用い、皮膚微小循環に及ぼす作用を血管透過性亢進作用を指標として、色素漏出法により調べた。LPS（ネズミチフス菌由来）0.15 mg/kgを腹腔内に1回投与し、一定時間後にポンタミンスカイブルー 50 mg/kgを尾静脈内に投与し、その5分後にLPSまたは炎症メディエーター（5-HT、PAFなど）をマウスの背部皮下に注射し、LPSでは2時間後（遅効性反応のため）に、炎症メディエーターでは1時間後（速効性反応のため）に投与部位を切り出し細切後、色素をアセトンで抽出し比色定量した。

成績

1) 血管透過性トレランス発現の時間経過による変化

血圧および心拍数に変化を与えない用量のLPS 0.15 mg/kg（腹腔内1回投与）で前処置したマウスでは、LPS（400 μ g/site）を背部に皮下投与した時、局所皮膚に起る血管透過性亢進が抑制されトレランスが見られる（LPSトレランス、同分子種間トレランス）。LPSによるトレランスは一過性で、LPS前処置2時間以後24時間までみられるが2日後には消失する（図1）。

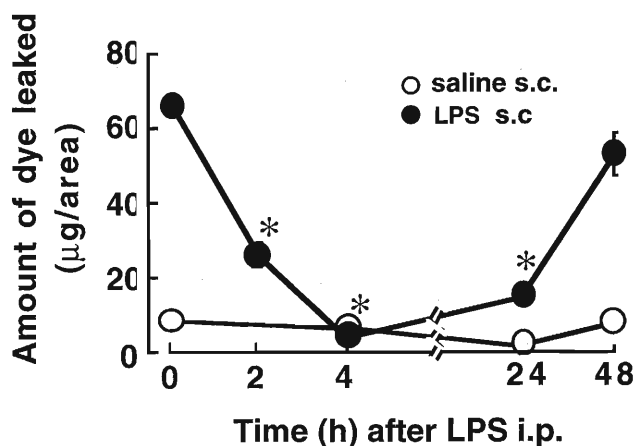


図1. LPS (0.15 mg/kg) 腹腔内1回前投与後のLPS (400 μ g/site) 皮下投与による色素漏出量の経時的変化

縦軸：色素漏出量、横軸：LPS 腹腔内投与後の時間経過

2) トレランス発現と副腎皮質ホルモン

LPS 投与による血中腫瘍壊死因子 (TNF- α) の一過性の上昇は、LPS トレランス成立時には消失することが知られている。副腎皮質ホルモンは LPS による TNF- α 産生を抑制し、一方、LPS 投与後には血中コルチコステロン量が増加するので、LPS によるトレランス発現機序の一つに内因性副腎皮質ホルモンを介する抑制が考えられている。そこで、LPS による血管透過性亢進に対するトレランスにも血中副腎皮質ホルモンの上昇が関与するか否かを調べた。事実、血清コルチコステロン量は対照マウス ($7.98 \pm 0.31 \mu\text{g/dl}$) (mean \pm S.E.) に比べ、LPS の腹腔内投与 4 時間後には LPS の投与量 (0.15mg/kg , 1.5mg/kg) に依存して、それぞれ 49.45 ± 2.69 , $63.86 \pm 3.66 \mu\text{g/dl}$ と著しく増加した。さらに内因性副腎皮質ホルモンの役割を明らかにするため、術後 1 週目の副腎摘除動物を用いて LPS の血管透過性亢進作用にトレランスが生じるかどうかを検討した。副腎摘除は LPS による色素漏出作用に影響を与えなかったが、副腎摘除マウスでは LPS トレランスが消失した (図 2)。血中 TNF 上昇に対するトレランス発現の機序の一つとして、LPS によって放出される副腎皮質ホルモンに依存する機序が示唆されているが、血管透過性亢進作用についても、LPS 前処置によるトレランスには、LPS 前処置で分泌された副腎皮質ホルモンが何らかの方法でトレランス抑制に関与することが考えられる。

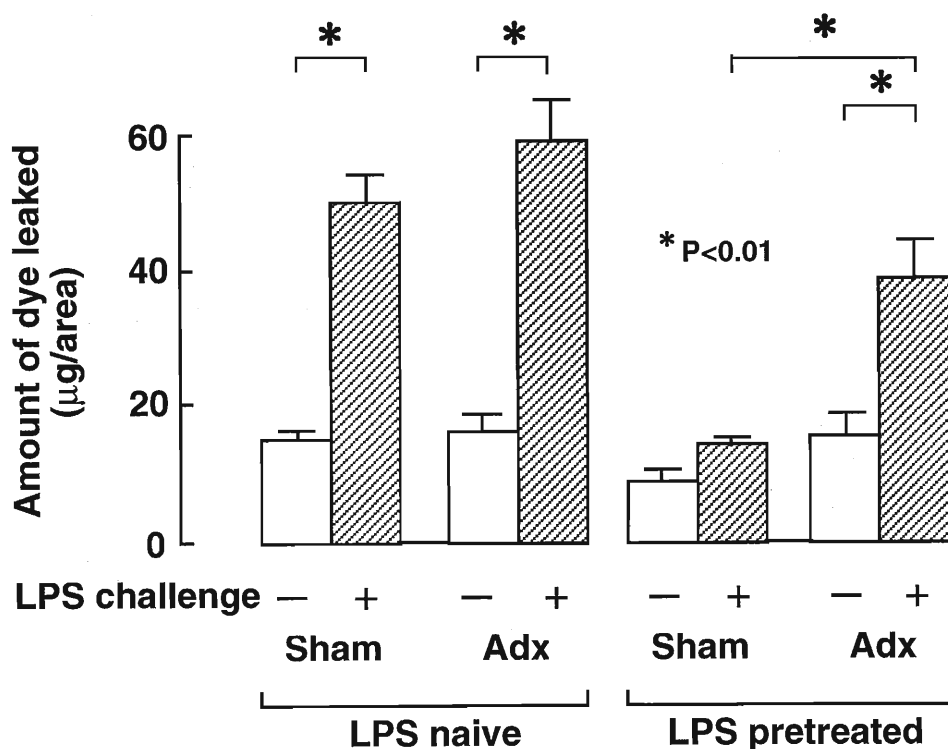


図 2. 副腎摘除マウス (Adx) における LPS 前処置後の LPS による血管透過性トレランスの消失効果

LPS (0.15 mg/kg) 腹腔内 1 回投与 4 時間後に、LPS ($400 \mu\text{g/site}$) を皮下投与し、さらに 2 時間後に色素漏出量を測定。

3) トレランス発現とサイトカイン

LPS の作用の一部は TNF- α やインターロイキン (IL) -1 α 分泌を介すると考えられている。マウスに LPS を投与すると 1 時間後に血中 TNF- α 量の一過性の上昇がみられるが、マウスはそれ以後 LPS トレランス状態になり、LPS のくり返し投与によっても血中 TNF- α 上昇が認められなくなる。トレランス状態では、LPS に対する反応性が低下し、マクロファージがサイトカイン類を十分産生出来なくなっていると考えられている。LPS の代わりに、TNF- α 、IL-1 α または IL-6 を前処置して LPS による血管透過性をみると、TNF- α および IL-1 α 前処置では LPS による血管透過性亢進にトレランスを生じたが、IL-6 ではトレランスを生じなかったため、LPS トレランスには少なくとも TNF- α および IL-1 α が関与するが IL-6 は関与しないことが示唆された (図 3)。従って、血管透過性についての LPS トレランスにも、LPS により分泌された TNF- α および IL-1 α などのサイトカインが関与することが明らかとなった。

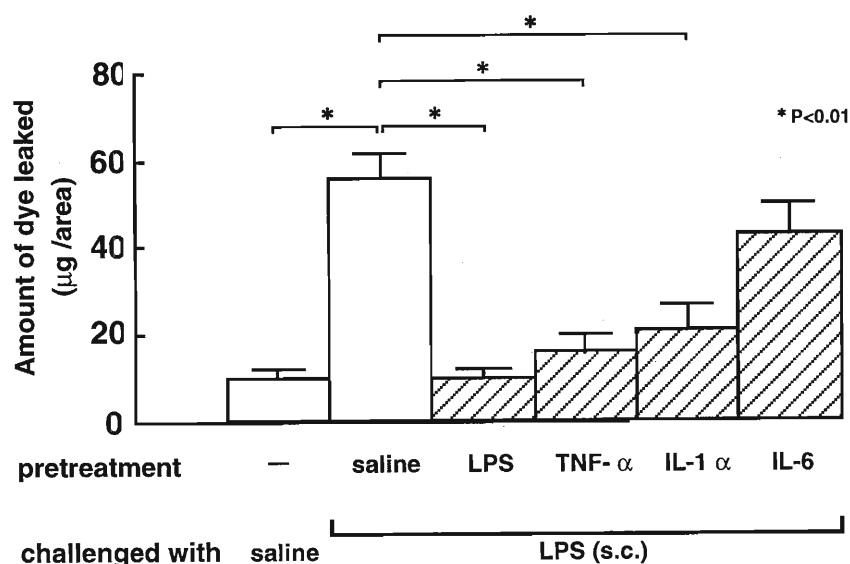


図 3. LPS、TNF- α 、IL-1 α および IL-6 前処置後の LPS による血管透過性トレランスの発現効果

LPS (0.15 mg/kg)、TNF- α (0.68 μ g/kg)、IL-1 α (0.32 μ g/kg) または IL-6 (9.6 μ g/kg) を腹腔内 1 回投与 4 時間後に、LPS (400 μ g/site) を皮下投与し、さらに 2 時間後の色素漏出量を測定。

4) トレランス発現と NO

血管系の NO は、血管トーンを制御し、局所血流量や血圧調節に関与しているが、敗血症時には過剰な NO 産生が低血圧やショックの誘因となると考えられている。我々は既に、LPS による血管透過性亢進作用に iNOS による NO 産生が関与していることをみとめているので、血管透過性トレランスにも NO が関与するかどうかを、NO 合成酵素阻害薬の L-ニトロアルギニンメチルエステル (L-NAME) を用いて調べた。L-NAME の前処置により LPS トレランスは抑制されたが、トレランス成立後に L-NAME を投与しても、LPS トレランスは消失しなかった (図 4) ので、LPS 前処置により産生される内因性 NO が LPS トレランス発現に関与することが明らかとなった。iNOS 欠損マウスでは、LPS による血管透過性亢進は減弱しているが、このマウスでは LPS 前処置後の LPS トレランスを生じない (未発表) ことから、LPS トレランス発現に iNOS により産生される NO が重要な役割を果たしていることが考えられる。

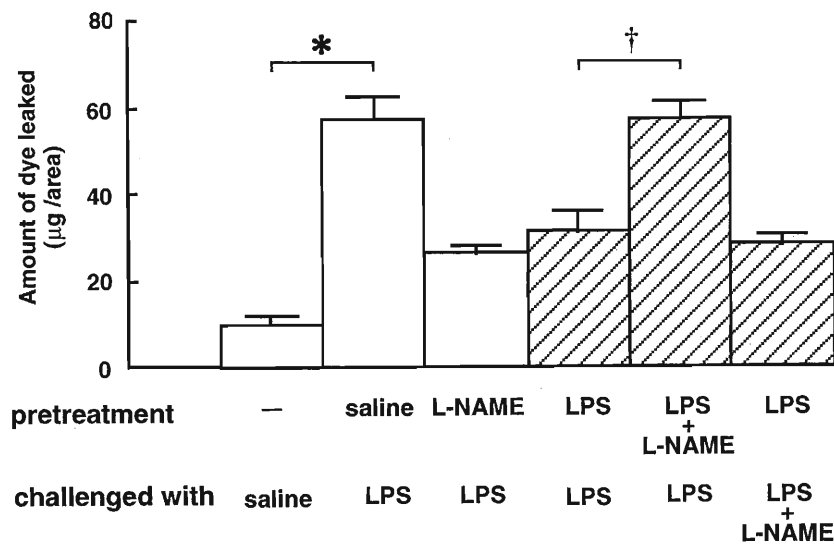


図 4. LPS 前処置後の LPS による血管透過性トレランスに対する一酸化窒素 (NO) の関与 (L-NAME 前処置によるトレランスの消失効果)

実験条件は図 2 と同じ。† L-NAME (10 mg/kg iv) は、LPS 前処置と同時投与によりトレランスを抑制する。*, † P<0.01

5) LPS 以外の炎症メディエーターに対するトレランス (異分子種間トレランス)

LPS 前処置 4 時間後には LPS (表 1) のみならず各種炎症メディエーター (5-HT、PAF、サブスタンス P およびヒスタミン) による血管透過性亢進も抑制される異種間トレランスを生じ、LPS 前処置後の血管透過性亢進の抑制率は、いずれも 60-90% であった。特に 5-HT による血管透過性亢進に対するトレランスは、L-NAME、抗 TNF- α 抗体、抗 IL-1 α 抗体で抑制されるので、LPS 前処置後の LPS による血管透過性亢進の抑制 (同種間トレランス) と同じメカニズムによると考えられる。

表 1 LPS 前処置後の LPS、5-HT、サブスタンス P、PAF およびヒスタミンによる血管透過性トレランスの発現効果

Mediators	% inhibition
LPS (400 μ g/site)	82.0
5-HT (0.1 μ g/site)	84.3
Substance P (1.35 μ g/site)	86.2
PAF (0.1 μ g/site)	60.4
Histamine (1 μ g/site)	60.4

LPS (0.15 mg/kg ip) 投与 4 時間後に、LPS、5-HT、サブスタンス P、PAF、ヒスタミンを 0.1 ml/site 皮下注射し、LPS では 2 時間後に、その他のメディエーターでは 1 時間後に色素漏出量を測定。LPS 前処置前のそれぞれのメディエーターによる色素漏出量を 100% とし、抑制率で表わした (n=5)。

結語

LPS 少量前処置後に LPS の血管透過性亢進作用についてもトレランスが生じることが明らかになった（同分子種間トレランス）。さらに同様の LPS 前処置後に LPS 以外の炎症メディエーターによる血管透過性亢進も抑制され、異分子種間トレランスが生じることを発見した。トレランスを生じさせる因子として LPS 以外に、LPS により産生が誘導されるサイトカイン（TNF- α 、IL-1 α ）によってもトレランスを生じることを明らかにした。さらに、副腎皮質ホルモン、サイトカインおよび NO について検討した結果、LPS により分泌される TNF- α や IL-1 α のようなサイトカインは関与するが IL-6 は関与しないこと、iNOS により産生される NO や LPS の投与により産生・分泌が増加する副腎皮質ホルモンも関与することが明らかとなった。しかし、副腎皮質ホルモン、サイトカイン、NO の相互の関係は不明である。炎症メディエーターのうち、特に 5-HT に対する異分子種間トレランスにも同様のサイトカインや NO が関与することが明らかになった。エンドトキシンによるトレランスは、エンドトキシンのみならず他の炎症メディエーターの作用も抑制し、広範囲にわたってトレランスを生じる可能性がある。トレランス発現に iNOS により産生される NO が重要な因子であり、また、LPS のみならず LPS の作用を仲介する TNF- α や IL-1 α などによってもトレランスを生じるので、これらの物質の中からエンドトキシントレランスを成立させる安全な物質が発見出来れば、重症敗血症の危険性がある患者に予防的に応用出来る薬物としての可能性が生じると考えている。