

論文内容の要旨

Intravenous immunoglobulin attenuates cecum ligation and puncture -induced acute lung injury by inhibiting apoptosis of alveolar epithelial cells

免疫グロブリン経静脈投与は、盲腸結紮穿刺法によって生じた急性肺障害を肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制することにより軽減させる

日本医科大学大学院医学研究科

外科系侵襲生体管理学分野

大学院生 萩原 純

Journal of Nippon Medical School 第 87 卷 第 3 号(2020)掲載予定

<はじめに>

敗血症の院内死亡率は依然として 10%を超える。敗血症によって炎症性サイトカインが放出され、種々の臓器に影響を及ぼし、急性肺障害 (ALI) や急性腎傷害 (AKI) をはじめとする多臓器不全へと至る。このうち ALI は、肺胞上皮細胞のアポトーシスが関与するということが先行研究で明らかになっている。

免疫グロブリン G は、ヒトの抗体で最も多い型のグロブリンで、サイトカインが関与する炎症反応に対し抗炎症性作用も持つことが分かっている。経静脈的グロブリン療法 (IVIg) は、敗血症の他、川崎病や ITP に使用される。経皮的または経腹腔内的に免疫グロブリンの投与を行った動物実験において、免疫グロブリンは敗血症の死亡率や血中の炎症性サイトカイン濃度の改善に有効であるとの結果が示されている。また Turgeon らによる臨床研究でのメタ解析でも、高用量 IVIg (約 2000mg/kg) の有効性が示されている。しかし、日本をはじめ諸外国の臨床上の IVIg は総投与量が 200~300mg/kg 程度であり、その効果は依然として議論の余地がある。

本研究では、盲腸結紮穿孔法 (CLP) によって生じた敗血症モデルのマウスを用い、100mg/kg (臨床量) または 400mg/kg の IVIg を行い、死亡率の改善、炎症性サイトカインの動向、肺病変の評価と肺胞上皮細胞のアポトーシスの様子を観察し、IVIg のメカニズム解明の一助とすることを目的とした。

<方法>

マウス：C57BL/6N (体重 20~25g 程度) を、次の 4 群に分けた。1) 生食を尾静脈から投与後し開腹手術 (CLP は行わず腹部の開け閉めのみ) を行った「Sham」群、2) 生食を尾静脈から投与し CLP を行った「Vehicle」群、3) 尾静脈から 100mg/kg の IVIg を実施し CLP を行った「IVIg100」群、4) 尾静脈から 400mg/kg の IVIg を実施し CLP を行った「IVIg400」群。いずれの外科的手技もイソフルレンを用いた麻酔を行い、倫理的な配慮を最大限留意した。

<評価>

①Kaplan-Meier 法による 72 時間死亡率、CLP 4 時間後の②ELISA による血漿サイトカイン (IL-6 および TNF- α) 濃度の評価、③Wet-Dry ratio による肺組織の浮腫の評価、④H-E 染色による肺組織の病理学的検索、および⑤TUNEL 染色による肺胞上皮細胞のアポトーシスの評価を行った。統計学的解析は、Student の t 検定、one-way ANOVA、Tukey の Post Hoc 検定、Kruskal-Wallis 検定を用い、p 値<0.05 をもって有意差ありと判断した。

<結果>

①死亡率： Vehicle 群では 72 時間で全てのマウスが死亡した。一方、IVIg100 群、IVIg400 群の生存率は、30%および 50%であり、いずれも Vehicle 群と有意差をもって死亡率が改善した。

②IL-6 および TNF- α の血漿中濃度：Vehicle 群では、いずれのサイトカインも著明に

上昇した。IVI100 群および IVI400 群いずれにおいても、Vehicle 群と比して有意差をもってサイトカイン濃度は低下した。一方、IVI100 群と IVI400 群の両群の比較で差は認められなかった。

③肺 Wet-Dry ratio: Vehicle 群に比して、IVI100 群では $p=0.046$ をもって、IVI400 群では $p<0.001$ をもって、いずれの群でも改善した。

④肺組織の病理学的検索: うっ血、浮腫、炎症細胞浸潤、出血について評価したが、いずれの評価項目において Vehicle 群と IVI400 群では差が見られた。しかし、IVI100 群では明らかな差が見られなかった。

⑤TUNEL 染色による肺胞上皮細胞のアポトーシス: Vehicle 群と比して IVI400 群は、アポトーシスを呈する肺胞上皮細胞は減少していた。しかし IVI100 群ではその傾向は認められなかった。

<考察>

死亡率および血漿サイトカイン濃度は、いずれの濃度でも改善に寄与していることが示された。一方で、ALI の改善およびアポトーシス抑制作用は、用量依存的に改善していることが示唆された。

免疫グロブリンには免疫担当細胞が産生したサイトカインを抑制する作用を持ち、また抗 HMGB1 抗体を投与した CLP マウスでの先行研究でも死亡率の改善が示されている。我々の研究でも、IVI は、臨床量でも血中の IL-6 および TNF- α を抑制することが確認された。

敗血症によって生じた ALI に関し、H-E 染色や TUNEL 染色による病理学的評価、では、IVI400 で改善が見られた。IVI が肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制していると考えられるが、本実験においてはその細かい機序については言及はできていない。また、IVI100 群では、ALI の改善は乏しいものの、一方で死亡率は改善しているということに関する解釈として、多臓器不全における個々の臓器間、たとえば ALI と AKI との間には「クロストーク」が存在し、また IVI が炎症性サイトカインを抑制する機序で AKI の改善に寄与したという研究結果もあることから、IVI による肺のみへの影響と、生体反応の総和としての死亡率との間に、差が生じたと考えられる。

以上より、IVI の各臓器へのアポトーシス抑制の機序をはじめとした、様々な作用機序の解明は今後も十分な検討が行われることが必要である。

<結語>

本研究では、IVI が敗血症を誘発したマウスの生存率を改善できることを示した。また、IVI が血漿中の炎症性サイトカインのレベルを低下させ、肺胞上皮細胞の ALI とアポトーシスを改善することも示された。肺胞上皮細胞のアポトーシスの阻害は、IVI が生存率を改善する 1 つのメカニズムであると思われる。