



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | The Mechanism of Hepatic Cellular Injury in Sepsis : An In Vitro Study into The Implications of Cytokines and Neutrophils in Its Pathogenesis   |
| Author(s)    | 岡, 義雄   |
| Citation     | 大阪大学, 1992, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38410">https://hdl.handle.net/11094/38410</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 岡 義 雄  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)  |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 0 4 6 0 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 4 年 12 月 2 日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第2項該当   |
| 学 位 論 文 名     | The Mechanism of Hepatic Cellular Injury in Sepsis: An <i>In Vitro</i> Study into The Implications of Cytokines and Neutrophils in Its Pathogenesis<br>(敗血症時の肝細胞障害発生機序 —特にサイトカインと好中球の関与について) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 森 武 貞<br>(副査)<br>教 授 鎌 田 武 信    教 授 平 野 俊 夫  |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目 的]

重症感染症や敗血症時には、呼吸障害や肝障害、腎不全などの遠隔重要臓器の機能障害がしばしばみられ、その予後を悪くしている。この遠隔臓器障害の発生機序についてはまだ不明の点が多いが、最近、サイトカインを含めた種々のケミカルメディエーターと好中球の関与が注目されている。

好中球は生体防御機構の中で重要な役割を担っているが、大量のケミカルメディエーターにより過剰の活性化がおこると逆に自己組織をも攻撃する可能性がある。本研究は、in vitro モデルを用いて、サイトカインとそれによって活性化された好中球による細胞障害機序を明らかにすることを目的とした。

### [方法ならびに成績]

#### 1) 標的細胞

正常肝細胞の代用として高分化型ヒト肝芽腫由来の培養細胞株 HuH-6 を用いた。HuH-6 細胞は肝細胞由来の各種血漿蛋白だけでなく、急性相反応物質として腭分泌性トリプシンインヒビター (PSTI) や  $\alpha$  フェトプロテイン (AFP) を分泌する。

#### 2) 好中球の分離

健常ヒト末梢血から、Ficoll-Paque を用いた濃度勾配法により好中球を分離した。

#### 3) サイトカインによる好中球の活性化

好中球に、ザイモサン存在下、あるいは非存在下に腫瘍壊死因子 (TNF) 0.1, 1.0ng/ml を添加し、5%CO<sub>2</sub>, 37℃で培養した。培養上清中の好中球エラスターゼ量を好中球活性化の指標とすると、TNF 添加3, 20, 24時間後の好中球エラスターゼ量はザイモサン存在下に TNF を添加した群で有意に増加した。

#### 4) 細胞障害

HuH-6 細胞と好中球をコラーゲン付着プレート上で混合培養し、ザイモサン存在下に TNF 0.1, 1.0ng/ml を添加した (effector/target cell ratio=15:1)。TNF 添加3, 20, 24時間後の HuH-6 細胞からの LDH 放出量は

有意に増加した。この HuH-6 細胞からの LDH 放出量と培養上清中の好中球エラスターゼ放出量との間には正の相関関係があった。また、精製したヒト好中球エラスターゼを HuH-6 細胞に添加したところ、HuH-6 細胞からの LDH 放出量は増加した。

#### 5) 細胞機能

同系において、TNF 添加24時間後の HuH-6 細胞からの AFP 分泌量は有意に低下した。更に TNF 添加24時間後に HuH-6 細胞を洗浄し、interleukin 6 (IL-6) 500 units/ml を加え HuH-6 細胞を刺激すると、その24時間後の HuH-6 細胞からの PSTI 分泌量は、HuH-6 細胞+好中球+TNF 群（細胞障害群）では HuH-6 細胞単独群に比べ低下していた。

#### 6) 活性化好中球による細胞障害の抑制

HuH-6 細胞と好中球の混合培養系に、好中球エラスターゼの阻害物質であるウリナスタチン (UTI)、または活性酸素消去剤である superoxide dismutase (SOD) を添加したところ、UTI は HuH-6 細胞からの LDH 放出を抑制したが、SOD は抑制効果を示さなかった。

#### [総括]

- 1) TNF はザイモサン存在下で好中球を活性化し、好中球エラスターゼを放出させた。
- 2) HuH-6 細胞と好中球を混合培養し、ザイモサン存在下に TNF を添加すると、HuH-6 細胞からの LDH 放出量は有意に増加し、培養上清中の LDH 放出量とエラスターゼ量との間には有意の正の相関が認められた。また、精製ヒト好中球エラスターゼは HuH-6 細胞に対して細胞障害活性を有していた。
- 3) 同混合培養系において HuH-6 細胞からの AFP 分泌量は低下し、また IL-6 刺激に対する HuH-6 細胞からの PSTI 分泌量も低下した。
- 4) 好中球エラスターゼの阻害物質である UTI は、同混合培養系における HuH-6 細胞からの LDH 放出を抑制したが、SOD は効果を示さなかった。以上より、好中球は TNF などのサイトカインで活性化され、好中球エラスターゼを放出して細胞障害を惹起する機序が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、高分化型ヒト肝芽腫由来の培養細胞株 HuH-6 と健常人末梢血より分離した好中球との混合培養系を用いて、肝細胞障害発症におけるサイトカインと好中球の関与を解析したものである。

その結果、好中球は zymosan 存在下で腫瘍壊死因子 (TNF) によって活性化され、好中球エラスターゼを放出すること、この好中球エラスターゼによって HuH-6 細胞は障害を受け、同細胞からの LDH 放出量が有意に増加すること、好中球エラスターゼの阻害物質であるウリナスタチン (UTI) はこの HuH-6 細胞からの LDH 放出を抑制することが明らかになった。

これらの知見は、重症感染症や敗血症時にしばしば合併する遠隔多臓器障害の発生機序を理解する上で重要であり、学位に値する。