

氏 名 (本籍)	都 築 英 之 (徳島県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士 (論) 第293号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成14年3月25日
学 位 論 文 題 目	Lipopolysaccharide neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor κ B in peripheral blood mononuclear cells, even during activation (末梢血単核球においてLPS刺激をpolymyxinで中和したとき、NF κ B 活性は活性化状態の細胞でも低下する。)

審査委員	主査 教授	瀬 戸 昭
	副査 教授	堀 池 喜八郎
	副査 教授	小笠原 一 誠

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

エンドトキシンショックを伴う重症敗血症時の治療として、当科が開発したポリミキシンB (PL-B) 固定化ファイバーを充填したエンドトキシン吸着カラムによるエンドトキシン除去療法 (PMX) が広く施行されている。PMX治療の臨床効果として2時間の治療により血中サイトカインレベルの有意な低下が確認されているが、その機序は不明である。今回、PL-Bのエンドトキシン中和によるサイトカイン濃度低下と、細胞がすでに活性化している状態での同様の効果の機序解明を目的として、サイトカイン産生細胞であるヒト健常人の末梢血単球を分離 in vitroでLPSを添加、あるいはPL-BでLPSを中和したときのNF κ BおよびTNF- α の経時的変動を検討した。

【方 法】

健常人より濃度勾配遠心法にて採取した末梢血単核球をヒト血漿加PRMI1640培養液中で培養し、以下に示す種々の濃度のLPS及びPL-Bを添加した。反応後細胞を回収し、核蛋白を抽出した後、RI標識したNF κ B consensus oligonucleotideを用いelectrophoretic mobility shift assay (EMSA) にてNF κ B活性を測定した。EMSAの解析はInstant Imagerにて行い、また、同時に培養液上清を回収し、ELISA法にてTNF- α 濃度を測定した。

【結 果】

コントロールとして、LPS (1 ng/ml, 10ng/ml) のみ投与、LPS、PL-B (10 μ g/ml) 同時投与について、前、30分、60分、120分での経時的変化を検討した。LPS 1 ng/mlを投与したモデルにおいては、NF κ Bは60分でピークを示し、その後120分にかけて漸減した。TNF- α は60分までは産生されないが、120分で産生された。LPS 10ng/mlを投与したモデルにおいても、NF κ Bは60分でピークを示し、その後120分にかけて漸減した。TNF- α は60分からは産生されはじめた。NF κ B活性は各ポイントにおいて濃度依存性となっていた。1 ng/ml, 10ng/ml LPSと同時に10 μ g/mlのPL-Bを投与した場合はLPS単独投与でみられたNF κ B活性の増加はなく、TNF- α の産生も認められなかった。すなわち、PL-BでLPS活性は中和されたことを示した。上記の実験結果から、NF κ B活性化は惹起されているがTNF- α は産生されていないLPS投与30分後と、NF κ B活性化によってTNF- α が産生されているLPS投与120分後の2点に着目し、1 ng/ml LPS刺激30分後に10 μ g/ml PL-B投与、1 ng/ml LPS刺激120分後に10 μ g/ml PL-B投与の2種類のモデルにおいて30、60、120分後のNF κ B活性、TNF- α 産生の経時的変化を検討した。LPS刺激30分後にPL-Bを投与したモデルではNF κ B活性はPL-B投与後から減少し、TNF- α の産生も認められなかった。これは、LPSの中和にてNF κ B活性が急速に低下し、このためサイトカインの産生が抑制されたことを意味するものと考えられた。LPS刺激120分後にPL-Bを投与したモデルでは、このモデルのコントロー

ルであるLPS刺激のみのモデル(240分)の2群間で比較検討した。NF κ B活性については、中和群はPL-B投与30分後から低下しはじめ、60、120分後はコントロール群と比較し有意に減少した。TNF- α 産生はコントロール群では0分から120分にかけてTNF- α は増加したが、中和群は30分から120分にかけてTNF- α の上昇の程度が減少し、60分からはコントロール群と比較して有意に低下していた。この結果からサイトカインが産生されている細胞でもLPSを中和することによりNF κ B活性は急速に低下しサイトカインの産生が抑制されることが示された。

【考 察】

本実験で、LPS刺激をPL-Bで中和した場合、2時間以内にNF κ B結合活性は急速に低下し、サイトカインの新たな産生を停止し、これは細胞の活性化の状態にかかわらず起きていることが示された。エンドトキシンショックの患者の循環血中にはエンドトキシンによって様々な程度に活性化された単核球が存在すると考えられる。この時PMXカラムによってエンドトキシン(LPS)を吸着させた場合、本実験結果からNF κ B活性が急速に低下し、サイトカイン産生量が低下しうることが示唆された。NF κ Bは炎症時のサイトカインのみならずケモカインやインターフェロン、接着分子の発現にも関与しており、更に重症病態での循環血中単核球NF κ B活性は死亡率と相関するという報告もあることから、重症病態に対し施行するPMX治療はNF κ B活性を低下させる可能性があることが示唆された。

【結 論】

末梢血単核球へのLPS刺激をPL-Bで中和した場合、2時間以内にNF κ B結合活性の急速な低下を惹起し、TNF- α の産生を抑制した。これは細胞のTNF- α 産生状態の如何に関わらず起きることが示された。

論文審査の結果の要旨

エンドトキシン・ショックを伴う重症敗血症の治療法として、滋賀医大で開発されたポリミキシンB固定化ファイバーによるエンドトキシン除去療法があり、この治療により症状の改善と共に血中炎症性サイトカインのレベルが有意に低下することが知られている。

本研究では、炎症性サイトカイン遺伝子の発現に関与するNF κ Bに着目し、培養末梢血単核球を用いて、NF κ B活性とTNF- α 産生の変動を、ポリミキシンBによるリポ多糖(LPS)活性中和との関連において検討している。

その結果、LPS刺激によってみられるNF κ Bの活性化とTNF- α 産生誘導はポリミキシンBの添加によって抑制され、このポリミキシンBの効果はすでに活性化されている細胞に対しても認められた。

この結果は、エンドトキシン除去療法による症状改善にNF κ B活性の抑制を介する機序が関与することを示唆するものであり、この療法の臨床的有用性を考える上で重要な知見である。これにより、本論文は博士(医学)の学位に値するものと認められた。