

氏名・(本籍)	藤 野 光 廣 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士第287号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成10年3月24日
学 位 論 文 題 目	脱血性ショックにおけるBacterial Translocationの意義 —in situ hybridization法によるgut hypothesisの検討—

審査委員	主査 教授	瀬 戸 昭
	副査 教授	野 坂 修 一
	副査 教授	小 玉 正 智

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

敗血症の原因又は増悪因子として、消化管内の細菌が腸管上皮を通過して血中やリンパ組織に至り、全身に拡がるというBacterial translocation (BT) の概念が注目されている。さらに近年では、translocationによる消化管内の細菌やエンドトキシンなどの活性物質が契機となって、systemic inflammatory response syndrome (SIRS) やmultiple organ dysfunction syndrome (MODS) が発症するという gut hypothesis が提唱されている。

SIRSの基本病態は単球やマクロファージによるサイトカインの多量産生と考えられている。しかし、侵襲時に障害部位以外にサイトカイン産生についてBTの関与があるか否か、又、生体内のどの部位で最初にサイトカイン産生のシグナルが出されるのか明らかでない。

ところでTNFはサイトカインの中でもキーマディエーターといわれ、当初腫瘍細胞を出血壊死させる物質として注目されてきたが、1986年のTracyらの報告以後ショックのメディエーターとして追求されてきた。

そこで、非感染性モデルにおけるBT発生に伴って、消化管や腸間膜リンパ節内免疫担当細胞が局所でどのような影響をうけるのかについて、リンパ節の細菌培養および消化管粘膜とリンパ節についてin situ hybridization法を用いてTNF mRNA発現について検討した。

### 【方 法】

#### 1) 脱血性ショックモデル

ラットのsham群と脱血群に、血圧測定および動脈採血のためカニューレションを施行した。脱血群では、Bakerらの方法に準じて平均動脈圧30mmHgまで脱血し、ショック状態とした。ショック状態を30分間維持した後返血し、その後30分間観察した。両群とも60分後にカニューレションから急速に脱血し、清潔操作下に開腹して腸間膜リンパ節、回腸、肺、肝、腎を採取した。

#### 2) BT発生の検討

Deitchらの方法に準じて腸間膜リンパ節を採取して37℃で24時間培養した。コロニー発育の有無によりBT発生の有無を判定した。

#### 3) RNAプローブの合成

TNF- $\alpha$ のテンプレートDNAをプラスミドにサブクローニング後、制限酵素でリニアライズし、T3 RNAポリメラーゼをもちいてin vitro transcriptionによりRNAプローブを合成した。標識はdigoxigeninでおこない、陰性コントロールにはsenseプローブを使用した。

#### 4) in situ hybridization法による検討

腸間膜リンパ節、回腸、肺、肝、腎におけるTNF- $\alpha$  mRNAの発現とその局在を内藤らの方法にて準じて検討した。

### 【結 果】

#### 1) BT発生率

sham群では腸間膜リンパ節および大腿動脈の留置カニューレからの動脈血ともに培養陰性であった。脱血群では腸間膜リンパ節で80%と有意差をもって高率にコロニーの発育を認め、BTが発生していた。しかし動脈血の培養は陰性で菌血症は発生していなかった。

## 2) in situ hybridization法による検討

sham群ではTNF mRNAの発現を認めなかった。脱血群では回腸粘膜のパネート細胞の核周囲細胞質に局在する強いTNF mRNAの発現を認めた。同様に腸間膜リンパ節内にも強いシグナルを認めた。両群ともに肺、肝、腎ではTNF mRNAの発現を認めなかった。

### 【考 察】

当初BTは、生菌が腸管外組織に移行することと定義されていたが、その後の検討により生菌以外にも死菌やエンドトキシンなどが腸管腔内から腸管壁を越えて移行することをも意味することに變遷してきている。いわゆるgut hypothesisでは腸管や腸間膜リンパ節などのgut-associated lymphoid tissue (GALT) においてサイトカインが産生されることでサイトカインカスケードが進行し、MODSなどの病態形成に関与するとされている。

今回の実験結果から考えると、sham群における侵襲は麻酔や処置によると思われる血圧低下のみであるが、これによる腸管血流低下の程度や持続時間ではBTは発生しなかった。よってsham群と脱血群の侵襲量の差異は脱血ショックであり、BTを阻止し得る生体防御力の限界を示している。

脱血性ショックモデルの結果から非感染性侵襲下にBTでも発生し、GALTでTNF mRNAが発現し、gut hypothesisの妥当性が強く示唆された。

### 【結 論】

脱血性ショックでBT発生が確認され、同時に腸管壁と腸管膜リンパ節でTNF mRNAの発現が認められた。侵襲により粘膜バリアー機構が障害され、BTが発生し、TNF mRNAの産生がGALTや領域リンパ節で開始されることがin situ hybridization法によりin vivoで確認された。この結果はSIRSやMODSで表される生体障害の発症や増悪因子として主病態とは別に腸内容の刺激により腸管で産生されるサイトカインが関与すると考えられた。

この結果は、侵襲下にみられるSIRSとMODSにおけるサイトカイン血症が、局所の反応と同時に、腸管で発生するBTが関与することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ラットの脱血性ショックモデルを用い、Bacterial translocation (BT) に伴うTumor necrosis factor (TNF) 遺伝子発現をin situ hybridization法を用いて検討し以下の結果を得ている。

全身麻酔下に脱血性ショック状態を30分続けるとその30分後にBTが認められるようになり、同時に腸間膜リンパ節の細胞と回腸パネート細胞にTNF mRNAの発現が認められた。動脈血の細菌培養は陰性で、肝、肺、腎の細胞ではTNF mRNAの発現はみられなかった。この結果は、脱血性ショック回復の初期にBTが起こっていることを示し、またBTが発生すると、この刺激により、他の臓器に先がけて回腸と腸間膜リンパ節でTNFの産生が開始されると解釈された。

本研究はBTに対する生体の初期反応でみられるTNF産生の部位を同定したものであり、BTの病原論的意義の研究に寄与するところ大であり、博士(医学)の学位に価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月12日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。