

A potential role of hyperbaric oxygen exposure through intestinal nuclear factor-k B

著者	迫田 雅彦
ファイル(説明)	学位論文の要旨
別言語のタイトル	腸管のNF-KBを介しての高気圧酸素療法の有益な効果
学位授与番号	17701乙医論第1420号
URL	http://hdl.handle.net/10232/22103

論文要旨

A potential role of hyperbaric oxygen exposure through intestinal nuclear factor- κ B

(腸管の NF- κ B を介しての高気圧酸素療法の有益な効果)

迫田 雅彦

【目的】

術後感染症と、それに続く多臓器不全 (MOF) は消化器外科領域の致命的合併症の 1 つである。重症感染症下では消化管粘膜の虚血、低灌流により酸素化はもっとも早期から障害され、さらにシャント形成・浮腫などが加わり消化管粘膜の防御機構は破綻する。そのバリアー機構の破綻により惹起される Bacterial translocation (BT) もしくは、バクテリア産物の体内への移行が SIRS 状態を持続させたり、あるいは重症化し多臓器不全進展への原因の一つともされている。また分子生物学的には高サイトカイン血症による Nitric oxide (NO) の過剰産生や好中球活性化による異常集積等の影響も知られており、このような低酸素状態に基づく消化管不全を改善すべく、著者らは臨床的に術後感染症に対し積極的に高気圧酸素療法を施行してきた。しかしながら、これまで分子生物学的に BT もしくは敗血症に対する高気圧酸素療法の効果を検討した研究はほとんどみられない。本研究では、エンドトキシン投与の Septic モデルにおいて消化管粘膜の防御機構障害及び、BT に対する高気圧酸素療法の効果について分子生物学的側面から実験的に検討した。

【対象・方法】

1. Wister 系雄性ラットに大腸菌由来の lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与し、高気圧酸素療法 (HBOT) は LPS 投与 3 時間後に開始し 100%O₂, 2.5atm, 維持 60 分とした。検体は LPS 投与 2, 4, 8, 12, 24 時間後、犠牲にし血液及び各臓器を採取した。各グループは Control 群: 生理食塩水腹腔内投与、LPS 群: LPS 腹腔内投与、LPS+HBOT 群: LPS 腹腔内投与後、HBOT 施行の 3 群で比較検討した。
2. 実験 1) 致死量の LPS (24 mg/kg) を投与し、LPS 投与 72 時間後までの各群における生存状況を観察した。

実験 2) 10 mg/kg の LPS を投与し、以下の項目について測定した。

- 1) 動脈血中 TNF- α
- 2) 動脈血中 Nitric oxide (NO)、小腸粘膜での NO 合成酵素 (NOS) 活性
- 3) 小腸粘膜内 myeloperoxidase (MPO) 活性
- 4) 小腸粘膜での NF- κ B 発現 (免疫染色および activation score での評価)
- 5) LPS 投与 24 時間後の小腸 (回腸末端) 粘膜組織障害 (H.E. 染色)
- 6) LPS 投与 24 時間後の各主要臓器 (腸管膜リンパ節, 肝臓, 脾臓) 細菌培養

【結果】

実験 1) 72 時間生存率は LPS+HBOT 群が 75%、LPS 群が 33%と有意に HBOT 施行群が高値であり生存率を改善した。

実験 2)

- 1) TNF- α は侵襲が加わった際のサイトカインの first mediator の一つであるが、LPS 投与 2 時間後にピークとなり、LPS 投与 3 時間後から HBOT を施行した本実験ではその後の値で両群間で差はみられなかった。
- 2) 小腸粘膜では誘導型 NOS 活性が LPS+HBOT 群で有意に抑制されており、血中 NO 産生も HBOT 施行で有意に抑制された。
- 3) LPS 投与 4 及び 8 時間後で、有意に LPS+HBOT 群が LPS 群に比し、MPO 活性が低値であり好中球の活性化が抑制された。
- 4) 免疫染色による activation score による評価にて、小腸粘膜での NF- κ B 発現は LPS 投与 4 及び 6 時間後に LPS+HBOT 群で有意に抑制されていた。
- 5) H.E.染色による回腸末端部の組織障害は LPS+HBOT 群が LPS 群に比し軽度であった。
- 6) 各臓器への BT 頻度は腸間膜リンパ節、肝臓、脾臓にて LPS+HBOT 群 : 63%、38%、25%、LPS 群 : 75%、50%、50%と有意差なくも LPS+HBOT 群で少ない傾向であり、各臓器の細菌培養コロニー数でも抑制されていた。

【考察】

HBOT の基本原理は、高圧環境下での高濃度酸素吸入による血中酸素分圧の増大および組織内酸素拡散距離の増加に伴う組織低酸素症の改善である。近年、適応症以外でも重症感染症などに対する有効性も報告されており適応が拡がりつつある。したがって HBOT の有効性としては、溶存酸素を増強させることで組織酸素代謝の失調を防ぐこと以外に、抗炎症作用として好中球、サイトカイン等の活性化を抑制し臓器障害を軽減することが示唆されている。本研究においては、エンドトキシン投与の sepsis モデルにおいて、高気圧酸素療法は小腸粘膜の組織障害を軽減し、Bacterial translocation を抑制することが可能であったと思われる。その機序として、hypoxia に対する改善作用とは別に、小腸粘膜での NF- κ B 活性化の抑制により NO の過剰産生や好中球集積が抑制されることが示された。細胞内の redox state が NF- κ B 活性化に関与することが報告されてきており、HBOT による本モデルの redox state の変化が NF- κ B 活性化を抑制することが示唆される。本研究結果は、Sepsis 時の臓器障害進展に対する HBOT の作用を各相で詳細に検討したものであり、今後の臨床的有効性に関する理解をさらに推し進めるものと考えられる。

(Critical Care Medicine Vol. 32, No.8, 1722-1729, 2004 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医論 第1420号	氏名	迫田 雅彦
審査委員	主査	有田 和徳	
	副査	上村 裕一	小宮 節郎

A potential role of hyperbaric oxygen exposure through intestinal nuclear factor- κ B (腸管のNF- κ Bを介しての高気圧酸素療法の有益な効果)

術後感染症と、それに続く多臓器不全は消化器外科領域の致命的合併症の1つである。重症感染症下では消化管粘膜の虚血、低灌流により酸素化はもっとも早期から障害され、さらにシャント形成・浮腫などが加わり消化管粘膜の防御機構は破綻する。そのバリアー機構の破綻により惹起される Bacterial translocation (BT) もしくは、バクテリア産物の体内への移行がsepsis状態を持続させたり、あるいは重症化し多臓器不全進展への原因の一つともされている。また分子生物学的には高サイトカイン血症によるNitric oxide (NO)の過剰産生や活性化好中球の異常集積等の影響も知られており、このような低酸素状態に基づく消化管不全を改善すべく、学位申請者らは臨床的に術後感染症に対し積極的に高気圧酸素療法(HBOT)を施行してきた。しかしながら、これまで分子生物学的にBTもしくは敗血症に対するHBOTの効果を検討した研究はほとんどみられない。本研究では、エンドトキシン(LPS)投与のseptic modelにおいて消化管粘膜の防御機構障害及び、BTに対するHBOTの効果について分子生物学的側面から実験的に検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 72時間生存率はLPS+HBOT群：75%、LPS群：33%と有意にHBOTにより生存率を改善した。
- 2) 小腸粘膜では誘導型NOS活性がLPS+HBOT群で有意に抑制されており、血中NO産生もHBOT施行で有意に抑制された。
- 3) LPS投与4時間後および8時間後で、有意にLPS+HBOT群がMyeloperoxidase(MPO)活性が低値であり好中球の活性化が抑制された。
- 4) 免疫染色に基づくactivation scoreによる評価にて、小腸粘膜でのNF- κ B発現はLPS投与6時間後にLPS+HBOT群で有意に抑制されていた。
- 5) HE染色による回腸末端部の組織障害はLPS+HBOT群がLPS群に比し軽度であった。
- 6) HBOTにより各臓器へのBT頻度は減少し、各臓器の培養細菌コロニー数も抑制された。

HBOTの基本原理は、高圧環境下での高濃度酸素吸入による血中酸素分圧の増大および組織内酸素拡散距離の増加に伴う組織低酸素症の改善である。近年、従来の適応症以外でも重症感染症などに対する有効性も報告されており適応が拡がりつつある。したがってHBOTの有効性としては、溶存酸素を増強させることで組織酸素代謝の失調を防ぐこと以外に、抗炎症作用として好中球、サイトカイン等の活性化を抑制し臓器障害を軽減することが示唆されている。本研究においては、エンドトキシン投与のsepsisモデルにおいて、HBOTは小腸粘膜の組織障害を軽減し、BTを抑制することが可能であったと思われる。その機序として、hypoxiaに対する改善作用とは別に小腸粘膜でのNF- κ B活性化の抑制によりNOの過剰産生や好中球集積が抑制されることが示された。また細胞内のredox stateがNF- κ B活性化に関与することが報告されてきており、本モデルにおいてもHBOTによるredox stateの変化がNF- κ B活性化を抑制する可能性が示唆されるので、今後その点について追求が必要であると思われる。

本研究結果は、sepsis時の急性期消化管粘膜障害に対するHBOTの作用を炎症反応の各相で分子生物学的に検討したものであり、今後の消化器外科領域におけるHBOTの臨床的使用をさらに推し進めるものと考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論 第1420号	氏名	迫田 雅彦
審査委員	主査	有田 和徳	
	副査	上村 裕一	小宮 節郎

主査および副査の3名は、平成18年2月16日、学位申請者 迫田雅彦 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下の様な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- (1) LPS投与は臨床的に何を想定したのものか？
→肺炎、腹腔内膿瘍、腹膜炎などの感染症より敗血症を起こし、臓器不全へと進展する一連の経過のなかで、敗血症の状態を想定したものである。
- (2) LPS投与を腹腔内にした理由は？
→実験的には静脈内投与と腹腔内投与どちらも使われている。今回、尾静脈からの静脈内投与も試みたが手技的に難しく、安定したseptic modelを得るために腹腔内投与を選択した。
- (3) 実験1と2でLPS投与量を変更した理由は？
→実験1では生存率を検討するため致死量の24mg/kgを投与した。実験2では分子生物学的検討のために100%生存が条件であり、かつその中でsepsisを起こしうる量として文献を参考にし、10mg/kgでおこなった。
- (4) HBOT開始をLPS投与3時間後に設定した理由は？
→臨床的に敗血症に対する効果を想定したので、ある程度炎症反応が惹起された状態でのHBOT導入による効果検討を目的とした。したがって、時間的にprimary mediatorの惹起されていない早期実施は避け、3時間後に設定した。
- (5) 今回のHBOTの加圧、維持、減圧等の時間設定は何に基づいているか？
→臨床的には加圧15分、維持60分、減圧15分である。文献的にも殆どの動物実験が加圧5分、維持60分、減圧5分とされているので本研究も同様に施行した。
- (6) HBOTでも25%の死亡率があるが、全例救命できないことをどう考えるか？
→HBOTによる抗炎症作用は認めたが、全く正常状態(Control群と同等)までの改善効果は得られないため、単独治療での25%死亡率はやむを得ないと思われる。実際、臨床的にも抗生剤などとの併用治療であり、一般的にHBOTだけの単独治療はされていない。
- (7) LPS投与での循環動態への影響は？ またLPS+HBOT群で血圧の変化はあるか？
→今回の実験を開始するに当たり、非観血的に尾動脈で血圧測定を行っている。LPS10mg/kg投与では、2時間後より低下傾向を示した。しかし最大低下時も、平均血圧で最大30mmHg(100→70)の下降で、その後上昇傾向を認め12時間後にはLPS投与前まで回復した。したがって、10mg/kgのLPS量はショック状態までいかない敗血症の状態に対する効果検討を目的とする本研究に合致した投与量であると思われる。またHBOTにより低下した血圧の回復は未施行群より早期であった。
- (8) iNOSのピークは4時間後となっているが、それより早い時間ではどうなるか？
→本実験ではHBOTをLPS投与3時間後より開始したので、HBOT群で一番早い検体採取が4時間後となっている。今回、HBOT未施行群にて測定はしていないが、もっと早い時期にピークとなる可能性は否めない。
- (9) iNOSのピークが4時間で、NOが12時間後であるが、本当にそのくらいの時間差があるのか？
→文献的にiNOSとNOのピークの時間差に決まった値はないが、文献上報告される時間差の範囲内である。今回の時間差に関しては、iNOSが小腸粘膜で測定されたのに対し、NOは血中における代謝産物の濃度測定であり他器官(マクロファージ、血管内皮)から産生されたものの影響もあると思われる。
- (10) 腸管上皮でのNOS、NOの役割は（血管内皮での作用との違いは）？
→生体防御作用として血小板凝集阻害、白血球付着阻害、抗菌・抗ウイルス作用、末梢血管拡張、粘膜血流維持等、消化管粘膜保護作用であるが、侵襲によるiNOS由来のNOが多量産生されると細胞・組織障害を来すと思われる。

- (11) Myeloperoxidase (MPO)活性上昇は何を意味するか？
→MPOは好中球に固有のライソゾーム酵素であり、炎症に伴い活性をしめす。したがって組織中のMPO活性化は組織内に浸潤した活性化好中球の指標となる。
- (12) 免疫染色で細胞質に存在するNF- κ Bはなぜ染まらないのか？
→NF- κ Bは細胞質内ではI- κ Bと結合し複合体の形で存在しており、subunitであるp65はマスクされている。その状態ではNF- κ Bは活性化していないが、各種侵襲刺激によりI- κ Bが分解され、NF- κ Bが活性化、核内へ移行することによりp65が表面に出現し抗p65抗体で染色される。したがって抗p65抗体で染色されるものは活性化したNF- κ Bと判断される。
- (13) NF- κ Bの発現はLPS投与6時間後がピークなのか？
→発表論文上、tableでは6時間後までしか示していないが、12時間後も評価している。結果は発現が低下しており両群間に差は認めない。したがって、本実験での小腸粘膜での発現のピークは6時間後と思われる。
- (14) NF- κ Bとredox stateの関連は？
→侵襲に伴う酸化ストレスにより、I- κ Bの分解が進みNF- κ B活性化が促進すると言われている。本実験において、HBOTによるNF- κ B活性化抑制の機序に関する検討はなされていないが、一つの可能性として酸化還元状態の改善によるものも推測された。
- (15) LPS、TNF- α とNF- κ B間のmediatorは？
→文献的に様々なmediatorが研究報告されているが、本研究では検討していない。
- (16) TNF- α 阻害でも、同じような効果が期待できるか？
→TNF- α の作用として生体防御的な働きもあるので、臨床的にTNF- α の完全阻害は免疫力低下を招く可能性が考えられるが、実験的にはTNF- α 阻害により高サイトカイン血症を抑制し臓器障害を軽減すると思われる。またそのような報告も散見される。
- (17) 小腸の組織障害はnecrosisが主体か？ apoptosisとの関連は？
→実験的にapoptosisの評価はしていない。組織障害としてnecrosisとapoptosisどちらも存在すると思われるが、炎症細胞浸潤等による所見が著明であることを考えると、necrosis主体による組織障害と思われる。
- (18) 臨床症例の多臓器不全でTNF- α は上昇するか、また他のサイトカインはどうなるか？
→過去、臨床的に測定した結果では上昇していた。またIL-6、IL-8も上昇を認めた。今回の実験検討ではIL-8も測定し上昇を認めているが、TNF- α と同様、HBOTによる差は認めなかった。
- (19) 臨床的にHBOTの術後肝不全、高ビリルビン血症への作用機序は？
→末梢hypoxiaに対する改善作用に加え、肝細胞障害、類洞内皮障害に対する改善作用によるものと思われる。その機序として肝Kupffer細胞からのNO産生抑制、好中球活性化抑制等が推測される。
- (20) HBOTでの活性酸素産生はないか？
→NO以外の活性酸素は測定していないが、文献的報告では本実験と同様のプロトコールにて明確な活性酸素上昇は認められない。副作用実験として維持気圧を上げたり、長時間にすることにより産生増大の報告はある。
- (21) HBOTでの副作用、有害事象はないのか？
→LPS投与をせずにHBOTのみ施行した例も観察したが、特に問題となる点はなかった。また臨床的にも一般的に行われる方法では特に大きな副作用はみられない。
- (22) 高濃度酸素だけでもHBOTと同じような効果が期待できるか？
→酸素需給状態を改善することにより同様な改善効果は期待できる。また実験的に侵襲時にhyperoxiaで抗炎症効果を発揮する報告も見られる。
- (23) Zymosanショックとエンドトキシンショックの違いは？ またZymosanショックではなぜHBOTによりTNF- α が抑えられているのか？
→Zymosanは酵母菌の細胞壁を構成する多糖類であり、投与により無菌性腹膜炎を惹起する。しかしエンドトキシンよりは緩徐に炎症反応が進んでいき、実験報告的にもTNF- α 、NOのピークは本実験より後期である。したがって参考文献ではピークの前にHBOTが導入されており抑制効果が報告されている。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。