

実験的急性肝障害に対する gomisin A の防御作用—肝マクロファージのインターロイキン 1 および tumor necrosis factor (TNF) 産生に及ぼす影響

溝口 靖紘,*^{a)} 河田 則文,^{a)} 久保井広志,^{a)} 小林 絢三,^{a)} 森沢 成司,^{b)} 山本 祐夫^{c)}^{a)}大阪市立大学医学部第三内科学教室, ^{b)}大阪市立大学医学部第一生化学教室, ^{c)}大阪社会医療センター

The protective effects of gomisin A in an experimental massive hepatic cell necrosis model

Yasuhiro MIZOGUCHI,*^{a)} Norifumi KAWADA,^{a)} Hiroshi KUBOI,^{a)} Kenzo KOBAYASHI,^{a)}
Seiji MORISAWA^{b)} and Sukeo YAMAMOTO^{c)}^{a)}The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School^{b)}The Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School, ^{c)}The Osaka Socio-Medical Center Hospital

(Received June 15, 1989. Accepted October 23, 1989.)

Abstract

When gomisin A was administered with lipopolysaccharide into mice which had been injected with heat-killed *Propionibacterium acnes* 7 days before, remarkable improvements in the survival rate and in the histological changes of the liver were observed. In order to find out how gomisin A suppresses the induction of massive hepatic cell necrosis in this experimental model, we studied the effects of gomisin A on the activation of liver adherent cells, from which the interleukin 1 and tumor necrosis factor (TNF) is released. As a result, gomisin A inhibited the activation of liver adherent cells and suppressed the release of the interleukin I and TNF.

Key words gomisin A, acute hepatic failure, interleukin 1, tumor necrosis factor (TNF).

Abbreviations Con A, concanavalin A; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt; HBSS, Hanks' balanced salt solution; HEPES, *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; NK, natural killer; PBS, phosphate buffered saline; PG, prostaglandin; *P. acnes*, *Propionibacterium acnes*; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; ³H-TdR, tritiated thymidine; TNF, tumor necrosis factor.

緒 言

さきに、著者らはグラム陽性嫌気性菌である *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 加熱死菌をマウスやラットに静注し、7日後に微量のグラム陰性菌由来の内毒素, lipopolysaccharide (LPS) を静注すると、ほとんどの動物は広範な肝細胞壊死を起こして死亡することを観察した¹⁾。また、この肝細胞

障害は *P. acnes* 加熱死菌によって肝に集積し、primingを受けた粘着性細胞が、LPSによって活性化され、細胞障害因子を産生するために誘導されることを実験的に示した^{2,4)}。この肝細胞障害因子は蛋白性の物質であり、熱に比較的不安定な性質を有する⁵⁾。

一方、五味子から抽出精製されたりグナン化合物である gomisin A は、四塩化炭素⁶⁾、D-ガラクトサミン⁶⁾、dl-エチオニン⁷⁾ そしてオロトン酸誘発実験

*〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7
1-5-7, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545, Japan

的肝障害モデル⁸⁾に対してトランスアミナーゼの漏出を、組織学的には肝細胞の変性、壊死、それに伴う炎症反応を著明に抑制することが観察されている⁹⁾。

そこで、著者らはこのような急性肝不全モデルを用いて gomisin A の作用を検討し、gomisin A が肝障害を著明に軽減することを認めた。¹⁰⁻¹²⁾

すなわち、*P. acnes* 加熱死菌静注 7 日後に LPS を静注する際に、gomisin A を経口的に投与すると、マウスの生存率が著しく改善され、肝の組織学的変化も軽減された。

このような *P. acnes* の肝細胞障害防御作用を解析するため、著者らは肝粘着性細胞より産生分泌される tumor necrosis factor (TNF) およびインターロイキン 1 (IL1) に及ぼす影響について、*in vitro* の実験系で検討した。

材料と方法

1. 材料

マウスは BALB/c マウス (6 週齢) および C₃H/HeJ マウス (6 週齢) を用い、クレア社から購入した。マウス肝マクロファージを分離する際に用いた pronase E は Merk 社から、collagenase type IV は和光純薬から、HEPES (*N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid) は Sigma 社から、metrizamide (2-[3-acetamido-5-*N*-methylacetamide-2, 4, 6, -triiodobenzamido]-2-deoxy-D-glucose) は Sigma 社から、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt) は和光純薬からそれぞれ購入した。細胞の培養には 20% のウシ胎児血清、100 µg/ml の streptomycin および 100 U/ml の penicillin を含む Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 を用いた。

P. acnes は大阪市立大学医学部細菌学教室から贈与を受けた。LPS は *Salmonella enteritidis* 由来のもので Difco 社から購入した。Tritiated thymidine (以下 ³H-TdR) は NEN 社から購入した。

TNF 量の測定に用いた L-M 細胞は大日本製薬から供与された。

Gomisin A は五味子 (*Schizandra chinensis*) の乾燥果実から抽出精製されたりグナン化合物の一種であり、(株)ツムラ・薬理研究所から提供されたものを用いた。

2. 方法

(1) 急性肝不全の誘導法：マウス尾静脈から 1 mg の *P. acnes* 加熱死菌を注入し、7 日後に 1 µg

の LPS を静注した。

(2) Gomisin A の投与方法：*P. acnes* 加熱死菌をマウスに静注し、6 日後に 50 mg/kg 体重の gomisin A を経口的に投与し、24 時間後に肝を実験に使用した。

(3) 肝マクロファージの分離：*P. acnes* 加熱死菌を静注し、7 日後の BALB/c マウスの腹腔内にペントバルビタール 1 mg を注入して麻酔後、開腹して門脈を露出し、カテーテルを挿入した。このカテーテルからまず Ca⁺⁺-free HEPES 加 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 溶液 10 ml を流し、続いて 0.05% collagenase を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 10 ml、0.2% pronase E を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 10 ml をそれぞれ流速 3 ml/min で流した。灌流後、肝臓を摘出して眼科用バサミで細切し、0.2% pronase E を含有した HEPES 加 HBSS 溶液 50 ml 中に入れて、37℃で20分間、振盪、消化した。未消化物をガーゼで濾過したのち遠心 (400 g, 10 min, 4℃) により cell debris を取り除いた。得られた cell pellet を 5 ml の HBSS 溶液に浮遊させ、30% の metrizamide 溶液 7 ml と混合して、遠心 (1400 g, 15 min, 4℃) した。最上相の肝非実質細胞相をとり、洗浄後、20% ウシ胎児血清含有 RPMI 1640 溶液に浮遊させ、プラスチックシャーレに注入して、5% CO₂, 37℃にて18時間培養した。培養終了後、プラスチックシャーレに非付着性の細胞を取り除いたのち、4℃に冷やした 0.02% EDTA 含有 phosphate buffered saline (PBS) 溶液を注入して15分間静置し、プラスチックシャーレから浮遊した細胞を採取して洗浄し、5% ウシ胎児血清含有 RPMI 1640 溶液に浮遊させて実験に使用した。なお、このようにして採取した細胞の生存率は98%以上であり、95%以上が peroxidase 染色陽性の細胞であった。

(4) 肝マクロファージからの IL1 および TNF 産生誘導：5 × 10⁵ cells/ml に調整した肝マクロファージ浮遊液を 1 ml ずつプラスチックプレート (FALCON 3047) に注入した。各種濃度の LPS (最終濃度 0-100 µg/ml) を添加して 18 時間培養した。反応停止後、遠心 (400 g, 10 min, 4℃) してその上清を回収し、IL1 および TNF 測定用のサンプルとした。サンプルは測定まで -80℃で凍結保存した。

(5) IL1 の測定：IL1 は Simon ら¹³⁾ の方法に準じて測定した。すなわち、C₃H/HeJ マウスの胸線細胞を摘出し、5% ウシ胎児血清および 5 × 10⁻⁵ M 2-メルカプトエタノールを含む RPMI 1640 培養液

で 5×10^6 cells/ml の細胞浮遊液を調製した。この浮遊液を $100 \mu\text{l}$ ずつ 96 穴プレート (FALCON 3047) に注入し, concanavalin A (Con A) を最終濃度 $0.75 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し, さらに, LPS 刺激肝マクロファージ培養上清液を $100 \mu\text{l}$ ずつプレートに添加し, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ の条件下で 44 時間培養した。培養後, $0.5 \mu\text{Ci}/10 \mu\text{l}$ の ^3H -TdR を添加し, さらに 24 時間培養し, 培養後 cell harvester を用いてフィルター上に細胞を集め, 細胞への ^3H -TdR のとり込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。なお, コントロールとしてサンプルの代わりに medium を添加した。

(6) TNF の測定: 培養上清中の TNF 量の測定は, TNF 高感受性のマウス肺線維芽細胞由来の細胞株 L-M 細胞を用いた ^3H -TdR uptake 阻害法にておこなった。すなわち, L-M 細胞を 5% ウシ胎児血清含有 RPMI 1640 溶液にて 5×10^4 cells/ml に調整し, $100 \mu\text{l}$ ずつ 96 穴プレート (FALCON 3047) に注入した。次に前述のようにして作製したサンプルを希釈して $100 \mu\text{l}$ ずつプレートに注入した。注入後, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ の条件下で 44 時間培養し, 次いで, 各 well に $0.5 \mu\text{Ci}/10 \mu\text{l}$ の ^3H -TdR を添加してさらに 4 時間培養した。培養終了後, cell harvester を用いてフィルター上に細胞を集め, 細胞への ^3H -TdR のとり込みを液体シンチレーションカウンターにて測定した。なお, データはサンプルの代わりに medium $100 \mu\text{l}$ を添加した場合をコントロールとして以下の式にて計算した。

$$\text{Inhibition of } ^3\text{H-TdR uptake (\%)} = \left(1 - \frac{\text{sample dpm}}{\text{control dpm}}\right) \times 100$$

(7) 統計学的検討: 実験データはすべて mean $\pm$ S.E.M. であらわし, 有意差検定は Student's *t* test にて行なった。

結 果

1. LPS 刺激肝マクロファージのインターロイキン 1 産生量

P. acnes 加熱死菌をマウスに静注し, 7 日後に微量の LPS を静注すると, 急性肝不全が誘導されて 80% 以上のマウスは死亡する。しかし, LPS 静注後に gomisin A を投与すると, マウスの生存率は著明に高くなる (死亡率 20% 以下)。

P. acnes 加熱死菌静注 7 日後にマウス肝から肝マクロファージを分離した。このマクロファージに種々の濃度の LPS を加えて 18 時間培養し, その培

養上清中の IL1 を $\text{C}_3\text{H}/\text{HeJ}$ マウスの胸腺を用いて定量した。その結果, Fig. 1 に示すように肝マクロファージからの IL1 産生量は LPS 濃度依存性に増加した。したがって, 以後の実験は $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度の LPS を用いて実験に供した。

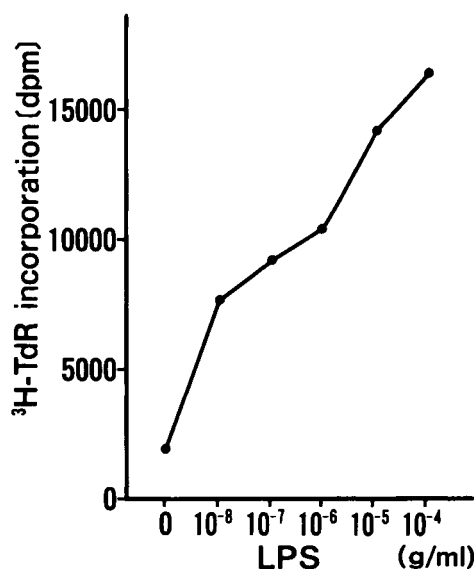


Fig. 1 Interleukin 1 synthesis by *Propionibacterium acnes*-elicited liver macrophages stimulated with lipopolysaccharide.

2. LPS 刺激肝マクロファージのインターロイキン 1 産生に及ぼす gomisin A の影響

P. acnes 加熱死菌をマウスに静注し, 6 日後に, 50 mg/kg 体重の gomisin A を経口的に投与し, 24 時間後にマウス肝からマクロファージを採取した。このマクロファージに $10 \mu\text{g/ml}$ の LPS を添加して培養し, 経時的に培養上清中の IL1 を測定した。その結果, Fig. 2 に示すように, gomisin A 非投与マウスの肝マクロファージを LPS で刺激すると IL1 は経時的に増加し, LPS 非刺激肝マクロファージの IL1 に比して, 有意に増加した (各群 $n=10$, $p<0.01$)。

一方, gomisin A 処理マウスの肝マクロファージを LPS で刺激してもほとんど IL1 は増加せず ($n=10$), gomisin A 非処理マウスの肝マクロファージに比して有意に低下した ($p<0.01$)。

3. LPS 刺激肝マクロファージの TNF 産生量

P. acnes 加熱死菌静注 7 日後にマウス肝からマク

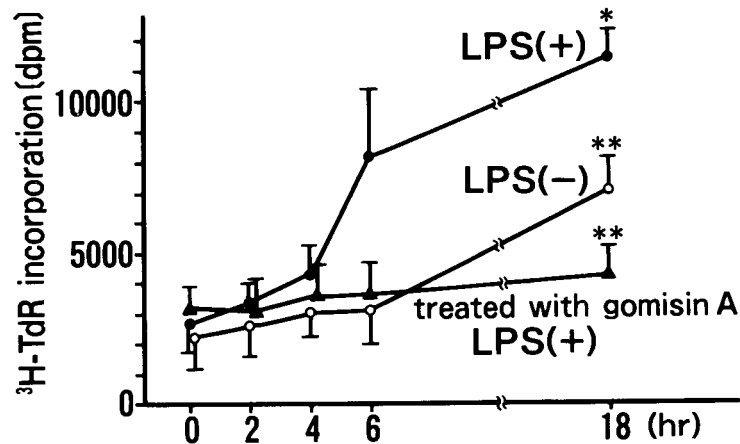


Fig. 2 Kinetics of interleukin 1 synthesis by *Propionibacterium acnes*-elicited liver macrophages.

*—** : $p < 0.01$.

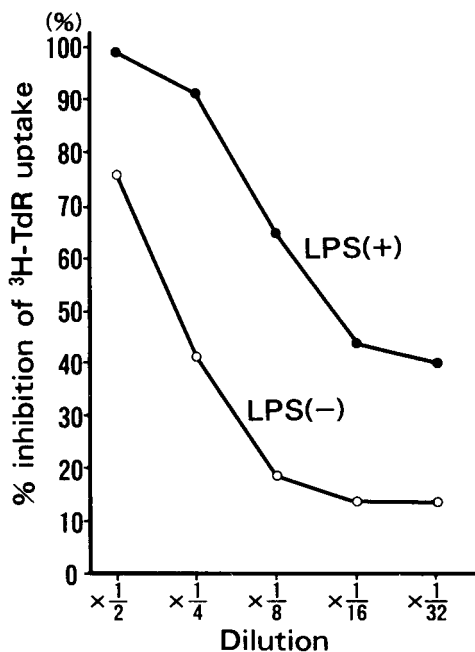


Fig. 3 Tumor necrosis factor (TNF) synthesis by *Propionibacterium acnes*-elicited liver macrophages stimulated with lipopolysaccharide.

ロファージを分離し、10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS を加えて18時間培養した。培養後、培養上清を採取し、RPMI 1640 で希釈して培養上清中に含まれる TNF 量を L-M 細胞を用いて ^3H -TdR の uptake 阻害法を用いて定量した。その結果、Fig. 3 に示すように

LPS 刺激肝マクロファージの TNF 産生量は希釈濃度依存性に減少した。したがって、以後の実験には培養上清液を RPMI 1640 で 1/4 に希釈して実験に供した。

4. LPS 刺激肝マクロファージの TNF 産生に及ぼす gomisin A の影響

P. acnes 加熱死菌を静注し、6 日後に 50 mg/kg 体重の gomisin A を経口的に投与し、24 時間後にマウスから肝マクロファージを採取した。これに種々の濃度の LPS を添加し、18 時間培養し、培養後上清中の TNF 量を定量した。その結果、Fig. 4 に示すように、gomisin A 非処理マクロファージでは 1 $\mu\text{g/ml}$ まで直線的に増加し、1 $\mu\text{g/ml}$ 以上でプラトーに達した。しかし、gomisin A 処理肝マクロファージを種々の濃度の LPS で刺激しても TNF の産生量はほとんど差を認めず、gomisin A 非処理マクロファージ群に比して有意に低下を認めた (各群 $n = 10$, $p < 0.01$)。

また、gomisin A 処理肝マクロファージに 10 $\mu\text{g/ml}$ の LPS を添加し、培養上清中の TNF 量を経時的に定量した。その結果、Fig. 5 に示すように、肝マクロファージからの TNF 量は 6 時間までほぼ直線的に増加し、6 時間でプラトーに達した。しかし、LPS 非刺激肝マクロファージは 3 時間まで TNF を産生したが、以後ほとんど TNF 量は増加せず、LPS 刺激肝マクロファージ群に比して有意に低下した (各群 $n = 10$, $p < 0.01$)。

一方 gomisin A 処理マクロファージを 10 $\mu\text{g/ml}$

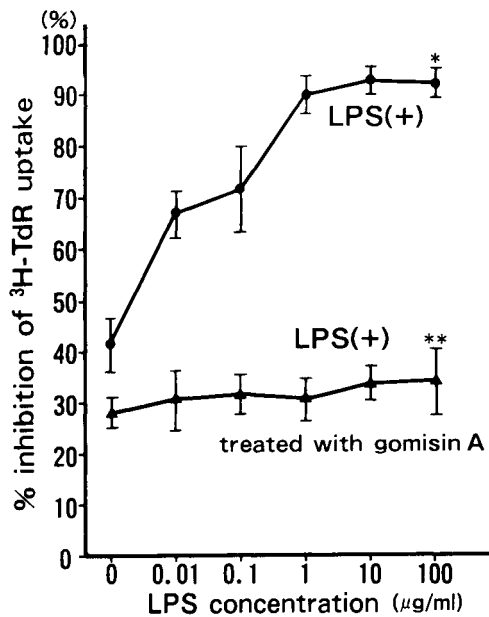


Fig. 4 Tumor necrosis factor (TNF) synthesis by *Propionibacterium acnes*-elicited liver macrophages stimulated with lipopolysaccharide.
*—** : $p < 0.01$.

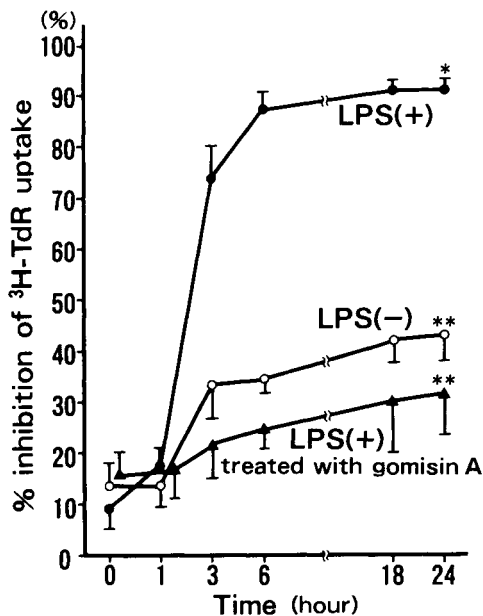


Fig. 5 Kinetics of tumor necrosis factor (TNF) synthesis by *Propionibacterium acnes*-elicited liver macrophages.
*—** : $p < 0.01$.

のLPSで刺激して、経時的に観察してもほとんどTNF量の増加は認められず、gomisin A非処理群の間に有意な差を認めた (各群 $n = 10$, $p < 0.01$)。

考 察

著者らが確立した急性肝不全モデル¹⁻⁵⁾は病態においてヒトの劇症肝炎とは異なるが、肝障害が重篤な点で類似しており、劇症肝炎の治療法の研究に有利であると考えられる。

著者らはすでに五味子より抽出精製された gomisin A が、著者らが確立した急性肝不全の誘導抑制に極めて有効であり、急性肝不全誘導時またはその直後に投与すると著明な生存率の改善をもたらす、肝における組織学的変化も著しく軽減することを報告した。¹⁰⁻¹²⁾

一方、Kupffer 細胞を含むマクロファージ系細胞から遊離するTNFやIL1などのcytokineは非特異的な免疫反応に対して、あるいは炎症反応に対して重要な役割を果たすと考えられている。特にIL1はT、Bリンパ球や単球、マクロファージなどの免疫担当細胞に作用して、それらの細胞の増殖や分化を誘導する一方で、脳の温度中枢、肝細胞、筋肉細胞等に働いて発熱、acute phase proteinの誘導、筋肉細胞の損傷や破壊をもたらすといった炎症反応の修飾を行なうことが知られている。¹⁴⁾また、TNFもマクロファージやnatural killer (NK) 細胞、Tリンパ球等の免疫担当細胞に働いて、抗腫瘍活性や細胞障害性の増強、IL2レセプターの発現誘導などを行なう一方、線維芽細胞の増殖、血管内皮細胞への好中球の付着、さらには滑膜細胞のプロスタグランジン (PG) E₂ 産生促進などを介して炎症反応に関与する。¹⁵⁾したがって、IL1やTNFに代表されるcytokineを明らかにすることは免疫反応と炎症反応を考えるうえで重要なポイントであり、Kupffer cellを含めた肝組織内浸潤マクロファージの肝局所反応を解析する上で大きな課題であると言える。

以上のような観点から、今回著者らは肝マクロファージのIL1あるいはTNFの産生に対するgomisin Aの影響について検討した。

その結果、gomisin A投与マウスではLPS刺激肝マクロファージによるIL1およびTNF産生は著明に低下した。

マクロファージやKupffer細胞が活性化されてIL1やTNF活性を示すためには、primingとexcitationの二段階刺激が^{16,17)}必要であるが、本実

験では excitation の段階を gomisin A が抑制して IL1 や TNF の産生をおさえたものと考えている。*P. acnes* 加熱死菌による priming に対して gomisin A がどのような影響を及ぼすかについては今後の課題である。

いずれにしても著者らが確立した急性肝不全モデルに対する gomisin A の作用機序として、Kupffer 細胞を含めた肝マクロファージからの IL1 および TNF 産生を抑制することが示唆された。

以上の結果は今後肝細胞障害を解析する上に、肝局所の免疫反応特に cytokine の重要性を提起したものと考え、今後の研究に新しい方向性を提供するものである。

結 論

これまでの研究で、gomisin A は、*P. acnes* 加熱死菌を前処理後、LPS を静注して発症する肝障害を抑制することを明らかにした。今回はこの gomisin A の肝障害抑制作用を明らかにするため、肝マクロファージから産生される TNF および IL1 に及ぼす gomisin A の影響について検討した。その結果、gomisin A は肝マクロファージからの IL1 および TNF 産生を阻止した。

文 献

- 1) Tsutsui, H., Mizoguchi, Y., Yamamoto, S. and Morisawa, S.: Studies on experimentally - induced acute hepatic failure: Possible involvement of activated liver adherent cells. In "Cells of the hepatic sinusoid" (Eds. by A. Kirn, D.L. Knook, and E. Wisse), Kupffer Cell Foundation, The Netherlands, pp. 307-314, 1986.
- 2) 筒井ひろ子, 溝口靖紘, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 関 守一, 山本祐夫, 原 久子, 巽 陽一, 門奈丈之, 森沢成司: 急性肝不全実験モデルによる肝細胞障害の検討 (1) 肝内粘着性細胞による肝細胞障害の誘導について, 日消誌 **82**, 603-609, 1985.
- 3) 筒井ひろ子, 溝口靖紘, 宮島慶治, 山本祐夫, 原 久子, 門奈丈之, 森沢成司: 急性肝不全実験モデルによる肝細胞障害の研究 II, 脾細胞, 末梢血単核細胞および腹水滲出細胞の機能変化, 日消誌 **82**, 1520-1526, 1985.
- 4) 筒井ひろ子, 溝口靖紘, 加藤寛子, 福井美智留, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 山本祐夫, 森沢成司: 急性肝不全実験モデルによる肝細胞障害の検討, III 脾細胞の抗体産生能について, 消火器と免疫 **14**, 157-160, 1985.
- 5) 筒井ひろ子, 宮島慶治, 溝口靖紘, 阪上吉秀, 関 守一, 山本祐夫, 森沢成司: 実験的に誘導した急性肝不全マウスに認められる肝細胞障害因子の性状について, 日消誌 **83**, 1161-1186.
- 6) 前田信也, 須藤和彦, 宮本吉昌, 竹田茂文, 新保真澄, 油田正樹, 池谷幸信, 田口平八郎, 原田正敏: 五味子の薬理学的研究 (第2報), 五味子成分の薬物性肝障害に対する作用, 薬誌 **102**, 579-588, 1982.
- 7) 竹田茂文, 前村俊一, 須藤和彦, 加藤義夫, 新井一郎, 大倉靖史, 布野秀二, 新井祐一, 油田正樹, 細谷英吉: 実験的肝障害および肝薬物代謝酵素系に及ぼす五味子リグナン成分 gomisin A の作用, 日薬理誌 **87**, 169-187, 1986.
- 8) Maeda, S., Takeda, S., Miyamoto, Y., Aburada, M. and Harada, M.: Effects of gomisin A on liver functions in hepatotoxic chemicals-treated rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **38**, 347-353, 1985.
- 9) 竹田茂文, 加瀬義夫, 新井一郎, 大倉靖史, 長谷川雅之, 関口裕子, 立本朱美, 布野秀二, 油田正樹, 細谷英吉: 四塩化炭素誘発慢性肝障害ラットにおける肝線維化ならびに肝部分切除後の肝再生におよぼす五味子リグナン成分 TJN-101 の作用, 日薬理誌 **90**, 51-65, 1987.
- 10) 筒井ひろ子, 溝口靖紘, 宮島慶治, 阪上吉秀, 東森俊博, 小林絢三, 山本祐夫, 森沢成司, 大倉靖史: 実験的急性肝障害に対する gomisin A の防御作用, 日消誌 **84**, 670-674, 1987.
- 11) 大倉靖史, 溝口靖紘, 筒井ひろ子, 阪上吉秀, 宮島慶治, 山本祐夫, 竹田茂文, 油田正樹, 森沢成司: 急性肝不全マウスの生存率に及ぼす gomisin A の影響, 消火器と免疫 **17**, 111-114, 1986.
- 12) Ohkura, Y., Mizoguchi, Y., Sakagami, Y., Kobayashi, K., Yamamoto, S., Morisawa, S., Takeda, S. and Aburada, M.: Inhibitory effect of TJN-101 ((+)-(6S, 7S, R-Biar)-5,6,7,8-tetrahydro-1,2,3,12-tetramethoxy-6,7-dimethyl-10,11-methylenedioxy-6-dibenzo[a, c] cyclooctenol) on immunologically induced liver injuries. *Jpn. J. Pharmacol.* **44**, 179-185, 1987.
- 13) Simon, P.L. and Willoughby, W.F.: The role of subcellular factor in pulmonary immune function: Physicochemical characterization of two distinct species of lymphocyte activating factor produced by rabbit alveolar macrophages. *J. Immunol.* **126**, 1534-1541, 1981.
- 14) Dinarello, C.A.: Interleukin 1: Amino acid sequences, multiple biological activities and comparison with tumor necrosis factor (cachectin). *Year Immunol.* **2**, 68-89, 1986.
- 15) Beutler, B. and Cerami, A.: Cachectin and tumor necrosis factor: Two sides of the same biological coin. *Nature* **320**, 584-588, 1986.
- 16) Meltzer, M.S.: Macrophage activation for tumor cytotoxicity: Characterization of priming and trigger signals during lymphokine activation. *J. Immunol.* **127**, 179-183, 1981.
- 17) Krammer, P.H., Kubelka, C.F., Falk, W., et al.: Priming and triggering of tumoricidal and shistosomulicidal macrophages by two sequential lymphokine signals: Interferon- γ and macrophage cytotoxicity inducing factor 2. *J. Immunol.* **135**, 3258-3263, 1985.