

# 侵襲とサイトカイン

## — 臓器障害の発生と関連して —

熊本大学第2外科

小 川 道 雄

### 1. はじめに

従来から侵襲に対して生体反応が起こる際に、誘導される液性因子があることが知られてきた。1940年代に明らかにされた endogenous pyrogen (EP) や1960年代に報告された leukocyte endogenous mediator (LEM) などがそれである。近年これらの因子が精製され、その多彩な作用が次々に明らかにされるようになった。当初、リンパ球や単球などの免疫担当細胞が産生するとされてきたこれらの因子は、現在では線維芽細胞、血管内皮細胞、好中球などを含めて、ほとんどすべての細胞において産生されることが明らかにされた。この結果、リンパ球の産生するリンフォカイン、単球の産生するモノカインという概念がなくなり、これらの因子はサイトカインと総称されるようになった。

サイトカインは侵襲に対する生体反応を惹起するための重要な情報伝達物質である。この情報伝達は本来生体防御を目的としたものであるが、ときに目的とは反対に、重要臓器に臓器不全を惹起してしまう可能性がある。本稿では侵襲時のこのような生体防御機構の変化をサイトカインを中心に示し、あわせて侵襲後の臓器障害の発生機序として、筆者の提唱している second attack theory を紹介したい。

### 2. 侵襲に対する生体反応の発動とサイトカイン

侵襲に対して生体の内部環境を一定に維持するための一連の反応を生体反応という。従来この生体反応は自律神経—内分泌系反射としてとらえられてきた。いわゆる神経内分泌反応である。これに対して近年、サイトカインによる情報伝達がこ

の反応の背後にあり、生体反応の発動にきわめて重要な役割を果たしている事実が次々に明らかにされた。とくに Michie ら<sup>1)</sup>が報告した侵襲時にみられる種々の生体反応の発動に先行して、サイトカインの変動が起こるといふ事実はきわめて重要である。

サイトカインは免疫反応を惹起するための情報伝達物質である。侵襲時の組織の破壊、出血とその修復のためにも、サイトカインは重要な役割を果たしている。サイトカインの特徴をまとめてみると、表1のようになる。

現在までに知られているサイトカインとしては、インターロイキン、TNF(腫瘍壊死因子)、CSF(コロニー刺激因子)、インターフェロンなど多数がある。このうち侵襲と生体反応に最も深く関与しているのがインターロイキン1(IL-1)、IL-6、IL-8、TNFである。これらはいずれも多彩な生理活性を示すが、IL-1、IL-6、TNFの三者には共通した生物活性が多い。その意義は明らかではないが、少なくとも1つの系の異常に際して、fail-safe ないし back-up system となることは間違いない。多数のサイトカインの作用の発現がカスケードというよりも、網の目のからみ合ったネット

表1 サイトカインの特徴

- |   |
|---|
| 1) 免疫担当細胞はじめ種々の細胞(線維芽細胞,血管内皮細胞,上皮系細胞,神経系細胞など)において産生される。 |
| 2) 分子量は10~50 KDa の糖蛋白質である。                              |
| 3) 標的細胞が特定せず,種々の細胞に働く。                                  |
| 4) きわめて微量で多彩な生理活性を示す。                                   |
| 5) 作用の多重性,相乗性があり,いわゆるサイトカインネットワークを成す。                   |
| 6) 本来の働きは生体の恒常性の維持にある。                                  |

ワークとなっていることも、それを裏付けている。

現在種々のサイトカインの測定系が開発されているが、侵襲時に血中レベルを恒常的に測定するのは IL-6 と IL-8 である。しかし、これらの測定によって IL-1 や TNF の誘導の状況を推測することは可能である。これらのサイトカインは IL-1 や TNF の上昇より遅れて血中に増加するが、それは IL-1 や TNF によってこれらが誘導されるからである<sup>23)</sup>。つまり侵襲に際して、局所の細胞の破壊や炎症が起こると、その場でまず IL-1 や TNF が誘導され、局所周辺の細胞（たとえば線維芽細胞や血管内皮細胞）でその信号が、IL-6 や IL-8 に変換、増幅され、この IL-6 や IL-8 が全身を循環して、局所の状況を全身の細胞に知らせ、生体反応を惹起させているのである。

### 3. 外科手術後の血中サイトカインの変動

主に測定感度の関係で、サイトカインのうち恒常的に変動を検索するのは、現在のところ IL-6 と IL-8 のみである。特に IL-6 は安定したデータが得られている。

図 1<sup>4)</sup>は一般外科手術33例の術前・術後の血中 IL-6 の変動を示す。血中 IL-6 は全例術後第 1 日目に最高値に達し、以後急速に低下し、合併症のないものでは術後 3 日目にほぼ術前値となる。図 2<sup>5)</sup>はこれを手術術式別にみたものである。一期的食道癌根治手術や臍頭十二指腸切除術など手術侵襲の大きなもので、血中 IL-6 の上昇は著しい。血中 IL-6 の術後最高値が、出血量 ( $r=0.452$ )、手術時間 ( $r=0.573$ ) と有意の正の相関を示すこ

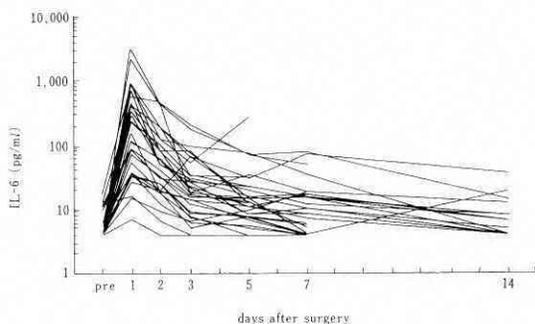


図 1 外科手術後の血中 IL-6 の変化

ともこれを裏付けている<sup>7)</sup>。なお同一出血量、同一手術時間で比較すると、開胸術を伴う手術（食道切除、肺切除など）では、開胸術を伴わない手術と比べ有意に血中 IL-6 の最高値が大きい<sup>5)</sup>。このことは生体が開胸手術をより大きな侵襲としてとらえていることを示している。

### 4. 血中に増加するサイトカインの誘導部位

手術後血中に IL-6 は著明に増加する。IL-8 について IL-6 とほぼ同様の経過である。手術侵襲の最も大きい食道癌の一期的根治術の一例について、血中とドレーン浸出液中の IL-6 と IL-8 の変動を示したものが図 3<sup>6)</sup>である。血中の IL-6 と IL-8 の濃度は血中のそれよりはるかに高値を示した。さらに筆者らはドレーン浸出細胞中に術後早期から多量の IL-6 および IL-8 mRNA が発現していることを Northern blot 法によって明らかにしている。

これらの事実は、血中に増加する IL-6 IL-8 は手術によって損傷を受けた局所で誘導され、それが血中に spill over した結果であることを示している。

### 5. 侵襲後の高サイトカイン血症の意義

サイトカインの誘導は免疫応答反応を惹起して生体防御にあたらせようとするものである。特に IL-1 や TNF は全身的にも作用するが、どちらかといえば主に局所的に作用するのに対し、IL-6 や IL-8 は全身的に作用する。

IL-6 は B リンパ球の最終段階の分化を誘導する

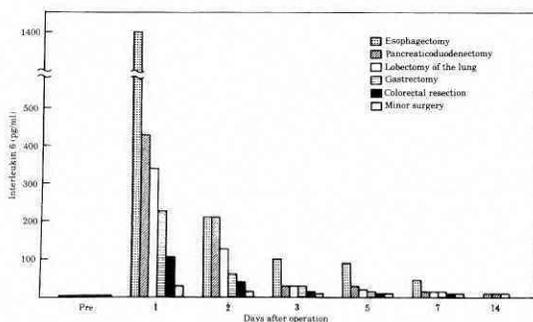


図 2 術式別にみた術後血中 IL-6 の変化

B細胞分化誘導因子として Hirano ら<sup>6)7)</sup>によって報告された。その他に IL-6 は T細胞の活性化、血小板産生刺激、ACTH 産生誘導、急性相反応物質の誘導、発熱作用をはじめ、多くの生体防御のため重要な生理活性を有している。

一方 IL-8 は主に IL-1, TNF, LPS 刺激によって種々の細胞から誘導される強力な好中球の遊走・活性化因子である<sup>8)9)</sup>。さらに最近 Koch ら<sup>10)</sup>は IL-8 が強力な血管新生因子であることを明らかにしている。血管新生現象は創傷治癒に極めて重要な役割を果たす。

6. 侵襲時の局所以外の重要臓器に対する好中球の浸潤

従来から各種の臓器不全の病理所見に共通するものがある。それは不全臓器の組織中の大量の好中球の集積である。ARDS では肺血管内の好中球

の集積、間質内、肺胞内への好中球の遊走が病理学的な特徴である<sup>11)12)</sup>。また肺胞洗滌の際の洗滌液中にエラスターゼ活性が上昇しており、これも好中球の肺胞への集積を示唆している<sup>13)14)</sup>。セルレイン肺炎においても肺毛細血管の透過性亢進と好中球の増加が明らかにされている<sup>15)</sup>。一方肝臓でも白血球や好中球の集積が大腸菌や緑膿菌の注射後に認められている<sup>16)17)</sup>。しかし、生体への侵襲のみでこのような好中球の集積は起こるであろうか。

前述の手術のほかに外傷、あるいは重症肺炎などでは著明な高サイトカイン血が認められる。1985年以降、サイトカインによって好中球が血管内皮細胞に付着することが次々と報告されるようになった。Gamble ら<sup>18)</sup>は TNF によって好中球の血管内皮細胞への付着が著明に増加することを報告した。同年 Bevilacqua ら<sup>19)</sup>は IL-1 で血管内皮細胞を4時間あらかじめ処置しておく、好中球や単球の血管内皮細胞への付着が著明に増加(好中球の場合 $18.3 \pm 2.6$ 倍)することを明らかにした。このように好中球と血管内皮細胞の付着にサイトカインが重要な役割を果たしていることがまず in vitro の系で確認された。その後 in vivo でも Goldblum ら<sup>20)</sup>は IL-1 の注射によって肺に好中球の集積がおこることを示した。好中球は血管内皮細胞に付着すると、好中球の形態学的変化と内皮細胞障害がおこることが明らかにされている<sup>21)</sup>。また血管内皮細胞が傷害されると、さらに好中球の粘着性が増すことが知られている<sup>22)</sup>。

内皮細胞の破壊に際しては、細胞間接着物質、結合織マトリックスも同時に破壊される<sup>23)</sup>。その結果細胞間隙が広がり、好中球は間質内に遊走する。この好中球の遊走には肺胞マクロファージや血管内皮細胞から誘導される走化因子である IL-8 が関与している<sup>24)–28)</sup>。そこで、臨床例について手術侵襲に際して好中球が重要臓器に集積することを証明するために、教室の荒川は食道癌の術後患者の BALF (気管肺胞滌液) を採取し、食道癌の手術による高サイトカイン血症で、肺胞への好中球の浸潤が起こるか否かを検討した<sup>28)</sup>。サイトカインの全身の循環によって、もし重要臓器に好中球が集まるとすれば、当然血管側から肺胞内へ好中球

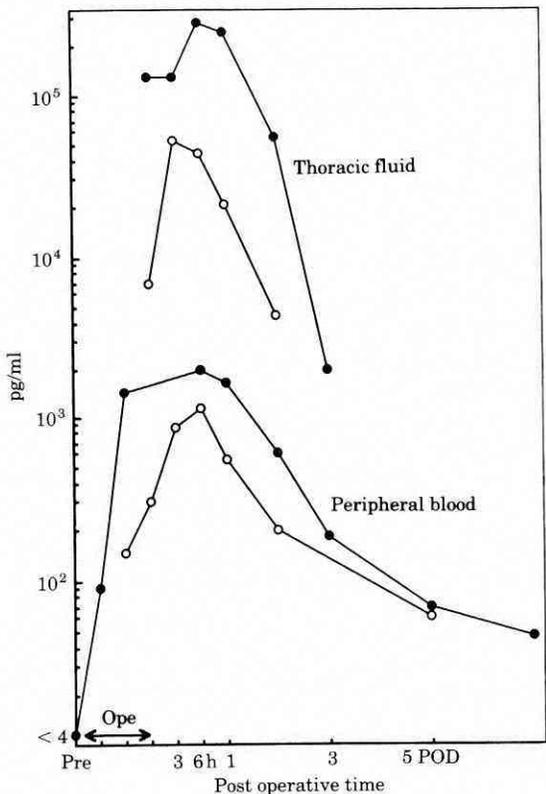


図3 食道癌術後のドレイン中と血中 IL-6 とIL-8 の変化 (●● : IL-6 ○○ : IL-8)

は遊走してくるので、BALF 中でサイトカインや好中球を検索することによって好中球の集積を証明できる。図 4<sup>28)</sup>のように BALF 中の細胞数の変動をみると、術後 3 日目をピークとした増加がみられる(2 日目は検討していない)。増加する細胞のほとんどが好中球で、リンパ球、肺泡マクロファージは変化がみられない。また BALF 中の IL-8 の変動をみると、手術は右開胸で食道切除が施行されるので、術後 3 日目は当然のことながら右側の BALF 中の IL-8 の有意な増加がみられるが、全く手術侵襲を加えていない左側でも同様に IL-8 の増加が認められ、さらに左側、右側ともに同様の好中球のエラスターゼの増加が認められた。この結果は、手術侵襲でサイトカインが全身を循環すると、流血中の好中球が重要臓器、少なくとも肺に集積されるということを示している。

LPS, IL-1, TNA はマクロファージから IL-8 を誘導する。したがって LPS や局所で産生されたサイトカインが全身を循環することによって、遠隔の重要臓器でも IL-8 が誘導され、好中球が集積すると考えられる。これが侵襲に際して好中球が重要臓器に集積してくる機序であろう。

ただし、IL-8 の誘導によって重要臓器に集まった好中球は、直ちに臓器を攻撃・破壊して臓器障害をもたらすのではない。1991年に Jaeschke ら<sup>29)</sup>は肝臓の阻血および再灌流によって、好中球が肺に集積するが、組織の酸化つまり臓器障害の指標となるグルタチオンと GSSG には全く変動がみら

れないことを明らかにした。このことは、好中球が重要臓器に集積しても、それによって直ちに臓器障害がもたらされるものではないことを示している。

いいかえると、好中球の活性化は priming と triggering の二段階で起こることがわかる。priming とは、好中球がもう一度刺激因子や活性化物質によって刺激を受けた際に反応して、直ちにプロテアーゼや活性酸素で攻撃する態勢にある状態を指す。Priming では fMLP レセプター、C3B レセプター、Fc レセプターの増加、細胞内 Ca<sup>++</sup>の増加やプロテインカイネース C のトランスロケーションなどによる細胞内情報伝達の変化、NADPH オキシダーゼの可溶因子の膜への移行、プロテアーゼ、エラスターゼ、カテプシン G などの膜への移行、などがみられる。この priming は次の刺激に対して好中球が容易に反応して攻撃する状態であり、その一つとして好中球の血管内皮細胞への付着、重要臓器への浸潤もある。

### 7. 侵襲後の臓器障害発生の second attack theory

高サイトカイン血症では抗体の産生、血球の分化など様々な生体防御系が作動するが、同時に好中球が priming され、重要臓器に集積する。これが侵襲に対する生体反応の完成像である、と筆者は考えている。このような状況下で再度サイトカインが誘導されると、priming を受けて重要臓器

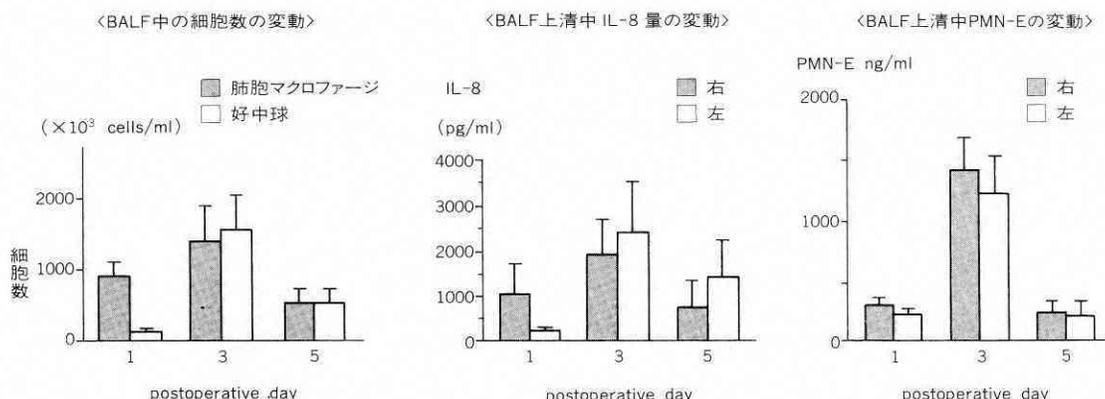


図 4 食道癌術後 BALF 中の細胞数の変動, BALF 上清中の IL-8 ならびに好中球エラスターゼの変動

に集積した好中球がその臓器を攻撃し、臓器の機能を障害する可能性がある。

好中球が重要臓器に集積した段階で、さらにサイトカインの誘導が起こるモデルとして、岡ら<sup>30)-32)</sup>は正常細胞と好中球を混合培養しておき、その好中球をサイトカインによって刺激する *in vitro* の実験系を開発した。この系では正常肝細胞の代用としてヒト肝芽腫由来の培養細胞系 HuH6 を用いているが、好中球を TNF で刺激することによって、HuH6 からの LDH の放出量は有意に増加している。生体反応の完成時にもう一度サイトカインの大量の誘導が起こると、臓器障害が発生することが示唆される。

以上より侵襲後の臓器障害の発生機序として図 5<sup>33)</sup> のようなものが考えられる。まず大手術などの侵襲によって組織破壊・消化が起こると、高サイトカイン血症が発現し、損傷を修復するための防御系作動する。しかし、サイトカインは同時に好中球を priming して、重要臓器に集積させる。そして、その後合併症が起こると、マクロファージが再活性化され、サイトカインの再誘導が惹起される。このサイトカインが重要臓器に集積した好中球に作用する。その結果、好中球はそこに異物、異種蛋白、細菌などが存在しないにもかかわらず、臓器を攻撃して臓器障害をもたらす。これが筆者

の提唱してきた侵襲後の重要臓器の機能不全の発生機序である。筆者はこれを second attack theory と名付け、数年前から欧米の学会でも繰り返し提唱してきた。

### 8. Second attack theory を証明するための *in vivo* 実験

次にこの second attack theory を *in vivo* の実験系で証明することにした。実験系のセルレイン肺炎は、セルレイン 50 µg/kg を 4 回、筋肉内投与することで生じた軽症の肺炎で、全例が治癒し死亡例はみられない。Sameshima ら<sup>34)</sup>はセルレイン初回投与 6 時間後に、腹腔内からマクロファージを採取して、LPS 刺激によるマクロファージからの TNF 産生量、つまりマクロファージが活性化しているか否か、priming を受けているか否かについて、生理食塩水投与を対照群として比較検討した。その結果、セルレイン肺炎の腹腔内から採取したマクロファージの TNF 産生量は、対照群と比較して有意に高値を示し、約 100 倍の産生増加が認められた。つまりセルレイン肺炎は軽度の肺炎で必ず治癒する肺炎であるが、TNF 産生については対照群をはるかに凌ぐ量が認められた。したがってセルレイン肺炎における腹腔内マクロファージは priming を受けている状態であることが明らかである。

このように priming が起こった状態に、second attack として LPS を腹腔内に投与し、侵襲の後に感染を合併したモデル実験系を設定した。その結果、肺炎では血清 TNF 活性は測定が不可能であったが、肺炎に LPS 投与の群では有意な血清 TNF 値の上昇が認められた。そして 50% は死の転帰をたどった。各群の肝組織の壊死、出血、空胞化を liver injury score を用いてスコア化してみると、肺炎のみでは病理学的には肝障害はないのに対し、LPS 単独投与の群では liver injury score は 1.6 を示し、セルレイン肺炎に LPS 投与した群では 3.1 と、liver injury score は有意に高値を示した。また血液生化学的な検討でも、対照群に比べ LPS の投与群では高度の肝障害の発現が認められた。つまり、侵襲後にマクロファージが活性

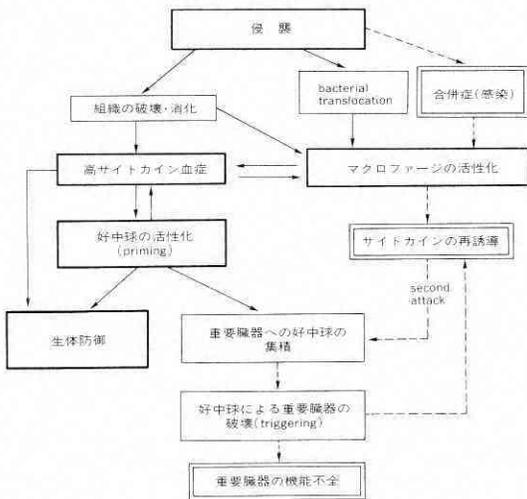


図 5 侵襲に対する生体反応と重要臓器の機能不全の発症機序 (Second attack theory)

化し重要臓器に priming された好中球が集積しているような状態で、感染を合併すると、遠隔の重要臓器においても臓器が攻撃され破壊されるのである。

以上の結果は、大手術や重度外傷などの生体への侵襲は生体に危うい「綱渡り」を強いるということを示している。その経過中に感染、出血、ショック、低酸素血症などの何か大量のサイトカインが誘導される二次的なアクシデントが生じれば、臓器不全が引き起こされる可能性が非常に高いのである。

## 9. おわりに

侵襲が生体内の情報伝達物質であるサイトカインにどのような影響を与えるかについて、その変動を中心に述べた。そして特に生体反応の完成像の一つとして、好中球の priming と重要臓器への好中球の集積を提唱し、この時もう一度サイトカインが大量に誘導されるような合併症があると、重篤な臓器障害が起こるという筆者の作業仮説を示した。侵襲時にはこのような危険があることに留意して、患者管理にあたる必要がある。

稿を終えるにあたり、特別講演の機会をお与え下さいました元木良一会長に深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- 1) Michie H R, Manogue K R, Spriggs D R, et al : Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* (1988) **318**, 1481—1486.
- 2) Van Zee KJ, Deforge LE, Fischer E, et al : IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol* (1991) **148**, 3478—3482.
- 3) Erias JA, Lentz V : IL-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol* (1990) **145**, 161—166.
- 4) 荒川博文, 酒本喜与志, 安倍利彦, 他 : 手術侵襲

によるインターロイキン 6 (IL-6) の変動とその意義について. *Biotherapy* (1992) **6**, 845—848.

- 5) Sakamoto K, Arakawa H, Mita S, et al : Elevation of circulating interleukin 6 after surgery : Factors influencing the serum level. *Cytokine* (1994) **6**, 181—186.
- 6) Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al : Complementary DNA for a novel human interleukin 6 (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* (1986) **324**, 73—76.
- 7) Andus T, Geiger T, Hirano T, et al : Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN2) regulates fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett* (1987) **221**, 18—22.
- 8) Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, et al : Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* (1988) **167**, 1883—1893.
- 9) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL : Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* (1989) **84**, 1045—1049.
- 10) Koch A E, Polverini P J, Kunkel S L, et al : Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* (1992) **258**, 1798—1801.
- 11) Ratliff N B, Wilson J W, Mikat E, et al : The lung in hemorrhagic shock. IV. The role of the polymorphonuclear leukocyte. *Am J Pathol* (1971) **65**, 325—334.
- 12) Balk R A, Jacobs R F, Tryka A F, et al : Effect of ibuprofen on neutrophil function and acute lung injury in canine endotoxin shock. *Crit Care Med.*, (1988) **16**, 1121—1127.
- 13) Lee C T, Fein A M, Lippman M, et al : Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress

- syndrome. *N Engl J Med* (1981) **304**, 192—196.
- 14) McGuire W W, Spragg R G, Cohen R G, Cohen A M, et al : Studies on the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* (1982) **69**, 543—553.
  - 15) Guice K S, Oldam K T, Johnson, K J, et al : Pancreatitis-induced acute lung injury : An ARDS model. *Ann Surg* (1988) **208**, 71—77.
  - 16) Sato T, Tanaka J, Kono Y, et al : Hepatic cellular injury following lethal *Escherichia coli* bacteraemia in rats. *Lab Invest* (1982) **47**, 304—310.
  - 17) Holman J M, Jr and Saba T M, : Hepatocyte injury during post-operative sepsis : Activated neutrophils as potential mediators. *J Leukocyte Biol* (1988) **43**, 193—203.
  - 18) Gamble J R, Harlan J M, Klebanoff S J, et al : Stimulation of adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985) **82**, 8667—8671.
  - 19) Bevilacqua M P, Pober J S, Wheeler M E, et al : Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* (1985) **76**, 2003—2011.
  - 20) Goldblum S E, Cocen D A, Gillespie M N, et al : Interleukin-1-induced granulocytopenia and pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol* (1987) **162**, 122—128.
  - 21) 河合 伸 : 敗血症性 ARDS の病態に関する研究 —とくに好中球系作用について, 杏林医学会誌 (1986) **17**, 3—17.
  - 22) Bowman C M, Batler E N, and Repine J E : Hyperoxia damages cultured endothelial cells causing increased neutrophil adherence. *Am Rev Respir Dis* (1983) **128**, 469—472.
  - 23) Weiss S J, Curnutte J T and Regiani S : Neutrophil-mediated solubilization of the subendothelial matrix : Oxidative and nonoxidative mechanisms of proteolysis used by normal and chronic granulomatous disease phagocytes. *J Immunol* (1986) **136**, 636—641.
  - 24) Fox R B, Hoidal J R, Brown D M, et al : Pulmonary inflammation due to oxygen toxicity : Involvement of chemotactic factors and polymorphonuclear leukocytes. *Am Rev Respir Dis* (1981) **123**, 521—523.
  - 25) Merrill W W, Naegel G P, Matthay R A, et al : Alveolar macrophage-derived chemotactic factor : Kinetics of in vitro production and partial characterization. *J Clin Invest* (1980) **65**, 268—276.
  - 26) Hunninghake G W, Gadek J E, Fales H M. et al : Human alveolar macrophage-derived chemotactic factor for neutrophils : Stimuli and partial characterization. *J Clin Invest* (1980) **66**, 473—483.
  - 27) Mantovani A and Dejana E : Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today* (1989) **10**, 370—375.
  - 28) 荒川博文, 岩越 一, 酒本喜与志, 他 : 食道癌術後の気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中 Interleukin-8 (IL-8) および好中球エラストラーゼの変動, *Biotherapy* (1993) **7**, 736—738.
  - 29) Jaeschke H and Farhood A : Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* (1991) **260**, G335—362.
  - 30) 岡 義雄, 小川道雄, 村田厚夫, 他 : 重症感染症における肝障害の発生機序 : 特に活性化好中球の関与について, *腫瘍と感染* (1989) **2**, 803—807.
  - 31) 岡 義雄, 小川道雄, 村田厚夫, 他 : 重症肺炎における多臓器障害の発生機序と対策, *消化器科* (1990) **13**, 330—333.
  - 32) Oka Y, Murata A, Nishijima J, et al : The mechanism of hepatic cellular injury in sepsis : An in vitro study of the implications of cytokines and neutrophils in its pathogenesis. *J*

- Surg Res (1993) **55**, 1-8.
- 33) 小川道雄：サイトカインによる好中球の活性化と臓器障害. 医学のあゆみ (1994) **169**, 845-849.
- 34) Sameshima H, Ikei S, Mori K, Yamaguchi Y, et al : The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the aggravation of cerulein-induced pancreatitis in rats. Int J Pancreatol (1993) **14**, 107-115.