

学 位 論 文 題 名

モルモット気道収縮および弛緩反応に対する

Interferon- γ と Interleukin-1 β の作用

学位論文内容の要旨

I 研究目的

炎症性肺疾患，特に気管支喘息では，その病態形成に活性化Tリンパ球やマクロファージから産生される各種サイトカインが重要な役割を担っていることが明らかになりつつある。Interferon(IFN)- γ やInterleukin(IL)-1 β は，気管支喘息患者の気管支肺胞洗浄液中に存在することが知られ，免疫担当細胞に作用し，気道炎症の惹起・拡大に関与すると推測されている。しかし，ある種のサイトカインでは平滑筋などへの作用も確認され，炎症過程の修飾以外の機序でも病態形成に関与する可能性が出てきている。本研究の目的はこのような機序が炎症性肺疾患でも存在し得るかを検討することである。このため，IFN- γ やIL-1 β が気道平滑筋の収縮・弛緩反応に対し直接効果を持つか否か，仮に効果があるとすれば，それがどのような機序を介するかを検討した。また，刺激を受けた気道上皮や平滑筋は種々の化学伝達物質を産生し，これが平滑筋の収縮・弛緩に影響を与えることが知られているため，気道上皮剥離の効果やこれら化学伝達物質の合成阻害薬などの効果も同時に検討した。

II 実験材料と方法

モルモットの気管条片を作成し，95% O₂, 5% CO₂ ガスで通気した37°CのKrebs-Henseleit(K-H) 液を含む組織槽に装着し，等尺張力を測定した。サイトカインとして，ヒトIFN- γ (1,000 Uと25,000 U/ml)とIL-1 β (25 ngと250 ng

/ml)を、コントロールとしてはそれぞれの溶媒を用いた。サイトカインの効果は、カルバコール(CARB)とKClの最大収縮とEC₅₀、イソプロテレノール(ISO)の最大弛緩とIC₅₀の変化で判定した。

収縮薬への効果では、まずCARB (3 nM-10 μ M)とKCl (10 mM-100 mM)の濃度反応曲線を測定し、洗浄後組織槽に各濃度のIFN- γ とIL-1 β を加え1ないし5時間接触させ、その後再び濃度反応曲線を測定し、コントロールと比較した。弛緩薬への効果では、各濃度のIFN- γ とIL-1 β と1ないし5時間接触させた気管条片をそれぞれのCARB EC₅₀にて前収縮させた後、ISO (1.0 nM-10.0 μ M)を漸次加え濃度反応曲線を測定し、コントロールと比較した。更にIFN- γ とIL-1 β の効果が気道上皮剥離、Cyclooxygenase阻害薬(インドメサシン: 2 μ M), 一酸化窒素(Nitric Oxide; NO)合成阻害薬(N ω -nitro-L-arginine methyl ester: N ω -NAME, 30 μ M)により影響されるか否かも検討した。

また、IFN- γ は種特異性が強いいため以下の実験を追加した。モルモット腹腔洗浄細胞(約60%がマクロファージ)を1,000 U/mlのIFN- γ 存在下で72時間培養後、MHC Class II抗原の発現を組織染色にて検討した。抗体としては抗モルモットMHC Class II抗原単クローン抗体(MSgp 8)を用いた。また、70⁰Cで1時間加熱処理したIFN- γ (25,000 U/ml)の気道条片に対する効果も検討した。

III 結果

IFN- γ は、25,000 U/ml 5時間接触で最大収縮の僅かな増強を示した以外、CARB収縮に影響を与えなかった。IFN- γ 1時間と5時間処理ではKClに対する最大収縮とEC₅₀の有意な変化は認められなかった。IFN- γ (25,000 U/ml) 1時間と5時間接触により、ISOのIC₅₀値の低下が認められ、コントロール群に比べ有意差を認めた(P<0.01, P<0.05)。モルモット腹腔洗浄細胞のMHC Class II抗原発現は、IFN- γ (1,000 U/ml)刺激により増強された。また、熱処理IFN- γ は気道条片のISOに対する反応に全く影響しなかった。

IL-1 β との1時間と5時間の接触ではCARB最大収縮とEC₅₀に変化を認めなかった。IL-1 β (250 ng/ml) 1時間と5時間ではKClに対する感受性の有意な低下が認められた(P<0.05, P<0.01)。IL-1 β (250 ng/ml) 1時間と5時間処理により、ISOのIC₅₀値の増加が認められ、コントロール群に比べ有意差を認め

た($P<0.05$, $P<0.01$)。

上皮剥離によりIFN- γ のISOに対する効果、IL-1 β のKClとISOに対する効果はともに消失した。更に、IFN- γ のISOに対する効果はインドメサシンにより完全に抑制されたが、N ω -NAMEでは抑制されなかった。IL-1 β のKClのEC₅₀に対する効果はインドメサシンにより抑制されたが、N ω -NAMEでは抑制されなかった。IL-1 β のISO弛緩に対する効果はインドメサシン及びN ω -NAMEにより抑制された。

IV 考察ならびに結語

IFN- γ は5時間処理でCARB最大収縮の僅かな増加を惹起した以外、CARB及びKCl収縮にはほとんど影響を与えなかったが、ISOに対する感受性を有意に増強させた。

この効果は気道上皮剥離とインドメサシン処理により完全に抑制されたが、N ω -NAMEでは抑制されなかった。この結果から、IFN- γ の効果は平滑筋への直接作用ではなく、気道上皮細胞からのProstaglandin(PG)の産生を介するものであることが示唆された。気道上皮細胞はPG-E₂を産生することが知られており、PG-E₂は気道平滑筋を弛緩させる。したがって、IFN- γ による気道条片のISOに対する感受性の増強にはPG-E₂が関連している可能性が考えられる。また、ヒトIFN- γ はモルモット腹腔洗浄細胞のMHC ClassII抗原発現を増強、加熱処理IFN- γ ではISO弛緩への効果は認めず、本研究でのIFN- γ の作用は特異的なものと考えられた。

IL-1 β はCARB収縮には全く影響を与えなかったが、KClとISOに対する感受性を有意に低下させた。また、これらの効果は気道上皮剥離により抑制された。この結果から、IL-1 β の効果はその気道上皮への作用を介するものと考えられた。またIL-1 β が、いずれもその作用に細胞膜電位の変化を伴うKClとISOにのみ影響を与えたことから、IL-1 β は平滑筋膜電位の変化を惹起する何らかの物質を気道上皮から産生させた可能性が考えられた。更に、IL-1 β のKClへの効果はインドメサシンにより抑制されたが、N ω -NAMEでは抑制されなかった。また、IL-1 β のISOへの効果はインドメサシンとN ω -NAMEの両方で抑制された。これから、IL-1 β の気道に対する効果にも気道上皮か

らのPGやNOの産生が何らかの関与をしているものと考えられた。

以上の結果から、IFN- γ とIL-1 β などのサイトカインは気道炎症の修飾以外に、気道平滑筋の収縮・弛緩反応の修飾作用をも持つ可能性があり、その作用はこれらサイトカインの気道上皮細胞への作用を介することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 阿 部 和 厚

学 位 論 文 題 名

モルモット気道収縮および弛緩反応に対する

Interferon- γ と Interleukin-1 β の作用

目的：Interferon (IFN)- γ やInterleukin (IL)-1 β などのサイトカインは気道炎症に関与すると推測されている。しかし、ある種のサイトカインには血管平滑筋への直接作用があり、炎症の修飾以外の機序でも病態形成に関与する可能性が指摘されている。本研究の目的はこのような機序が炎症性肺疾患でも存在し得るかを検討することである。このため、IFN- γ やIL-1 β が気道条片の収縮・弛緩反応に対し直接効果を持つか否かを検討した。更に、気道上皮は化学伝達物質の産生を介して平滑筋反応に影響することが知られているため、気道上皮剥離や化学伝達物質の合成阻害薬などの効果も検討した。

方法：モルモットの気管条片の等尺張力を測定した。サイトカインとして、ヒトIFN- γ (1,000 Uと25,000 U/ml)とIL-1 β (25 ngと250 ng/ml)を用いた。収縮薬への効果は、IFN- γ あるいはIL-1 β との接触の有無によるCARB (3 nM-10 μ M)とKCl (10 mM-100 mM)の濃度反応曲線の変化で判定した。弛緩薬への効果は、IFN- γ あるいはIL-1 β と接触させた気管条片をそれぞれのCARB EC₅₀にて前収縮させた後、ISO (1.0 nM-10.0 μ M)を暫時加え濃度反応曲線を測定し、コントロールと比較した。更にIFN- γ とIL-1 β の効果が気道上皮剥離、Cyclooxygenase阻害薬(インドメサシン: INDO, 2 μ M)、一酸化窒素(Nitric Oxide; NO) 合成阻害薬(N ω -nitro-L-arginine methyl ester: N ω -NAME, 30 μ M)により影響されるか否かも検討した。

結果：IFN- γ は、25,000U/ml 5時間接触で最大収縮の僅かな増強を示した以外、CARB, KCl収縮に影響を与えなかった。IFN- γ (25,000 U /ml)との1 及び5時間接触によりISOに対する感受性の有意な増加が認められた(P<0.01, P<0.05)。IL-1 β はCARB収

縮に影響を与えなかった。IL-1 β (250 ng/ml) 1 及び 5 時間接触ではKClに対する感受性の有意な低下が認められた($P<0.05$, $P<0.01$)。IL-1 β (250 ng/ml) 1 及び 5 時間処理により、ISOのIC₅₀値の有意な増加が認められた($P<0.05$, $P<0.01$)。上皮剥離によりIFN- γ のISOに対する効果、IL-1 β のKClとISOに対する効果はともに消失した。更に、IFN- γ のISOに対する効果はINDOにより完全に抑制されたが、N ω -NAMEでは抑制されなかった。IL-1 β のKClのEC₅₀に対する効果はINDOにより抑制されたが、N ω -NAMEでは抑制されなかった。IL-1 β のISO弛緩に対する効果はINDO及びN ω -NAMEにより抑制された。

結論：IFN- γ はCARB及びKCl収縮にはほとんど影響を与えなかったが、ISOに対する感受性を有意に増強させ、この効果は気道上皮剥離とINDO処理により完全に抑制された。IL-1 β はCARB収縮には全く影響を与えなかったが、KClとISOに対する感受性を有意に低下させた。これらの効果は気道上皮剥離により抑制された。更に、IL-1 β のKClへの効果はINDOにより抑制されたが、N ω -NAMEでは抑制されなかった。IL-1 β のISOへの効果はINDOとN ω -NAMEの両方で抑制された。以上の結果から、IFN- γ とIL-1 β は気道平滑筋の収縮・弛緩反応の修飾作用を持ち、その効果は平滑筋への直接作用ではなく、気道上皮細胞からのProstaglandinやNOの産生を介するものであることが示唆された。

口答発表にあたり、皆川教授からIL-1 β とINF- γ の作用の特異性につき、また阿部(和)教授からは上皮を除去する際の機械的影響などにつき質問があり、この際充分に答えたとは考えられなかった。しかし、後日両教授より個別に審査をうけ、日本語の発音にやや難解な点はあるものの、内容は合格とのご返事をいただいている。

本論文はIFN- γ やIL-1 β などのサイトカインが、気道上皮細胞への作用を介して気道平滑筋の収縮・弛緩反応に影響を与えることを見いだした初めての報告であり、これらサイトカインが気道炎症の修飾以外の機序でも炎症性肺疾患の病態形成に関与する可能性を示したことは意義あるものと考えられ、よって本論文は博士(医学)に相当するものと認めた。