

学 位 論 文 題 名

Bleeding induced interleukin-6 decreases
blood loss via activation of coagulation

(内因性インターロイキン6の出血量に及ぼす影響)

学位論文内容の要旨

「目的」 炎症性サイトカインの1つである interleukin-6 (IL-6) は、敗血症性ショックのみならず、出血性ショック、手術侵襲によっても誘導されることが報告されている。また IL-6 は凝固・線溶系に対して活性化を促すとの報告がある。これらの知見から、出血時に産生された IL-6 は、凝固・線溶系への亢進促進効果により、出血量に影響を及ぼすことが予想されるが、この点について検討した報告は未だ無い。出血量に及ぼす IL-6 の影響を評価するため、以下の実験を行った。

「方法」 ddY マウス（雌 体重 18-28g）を用い、①uncontrolled hemorrhage model（75%尾切断モデル）において産生される血清中の IL-6 量を ELISA 法により評価した ②抗マウス IL-6 モノクローナル抗体（anti-IL-6 mAb）、または対照として正常ラットグロブリン（NRG）により前処置した個体を 75%尾切断モデルを用い出血させ、出血量および生存率を測定した ③同様に anti-IL-6 mAb または NRG により前処置した個体において、75%尾切断時の左室血圧を測定した。更に血栓弾性計（TEG）を用い、血小板、凝固・線溶系に関する評価を行った ④同じく anti-IL-6 mAb、または NRG により前処置し、75%尾切断により実験的出血状態とさせた個体において、血漿中トロンビン-アンチトロンビンⅢ複合体（TAT complex）濃度を ELISA 法により測定し、凝固系活性化の程度を評価した。

「結果」 ①75%尾切断モデルでは出血開始の 30 分後から有意な血清 IL-6 濃度の上昇が認められた ②anti-IL-6 mAb 投与群では、対照である NRG 投与群と比較し、出血開始の 30、60 分後の出血量が有意に増加した。また、両群において生存率に差は認められなかった ③anti-IL-6 mAb 投与は NRG 投与と比較し、出血前の左室圧に有意な影響を及ぼさなかった。また、出血に伴い両群の平均左室圧は低下傾向を示したが、群間に有意差は認められなかった。更に TEG を用いた測定では、主に凝固系を反映する項目においては、anti-IL-6 mAb 投与群では NRG 投与群と比較し、亢進の抑制が見られたのに対し、主に血小板を反映する項目、線溶系を反映する項目においては、群間に有意差を認めなかった ④

血漿 TAT complex 濃度は、anti-IL-6 mAb 投与群では、NRG 投与群と比較し、有「考察」 75% 尾切断モデルは、止血が不十分な状態での等張輸液による出血量増加の危険性を検討する為に提唱されたモデルである。本研究では、IL-6 の出血量に及ぼす影響を評価するため、このモデルを採用した。同モデルでの IL-6 産生量については未だ報告されていなかったため、血清中の IL-6 濃度を確認した。その結果、他の出血性ショックモデルと同様に同モデルにおいても、尾切断による出血後、速やかに血清中の IL-6 濃度が上昇することが示された。anti-IL-6 mAb 投与群では、対照とした NRG 投与群と比較して有意な出血量の増加を見た。生存率に関しては、マウスを用いた敗血症性ショックモデルにおいては、抗 IL-6 抗体投与は有意な生存率改善効果を示す、との報告がある一方、外傷患者における腫瘍壊死因子 (TNF)、IL-6 値は生命予後を予見する因子とはならないという報告もある。本研究では、anti-IL-6 mAb 投与に生存率を改善させる効果は認められなかった。

出血量を左右する因子としては、凝固・線溶系のほか、血圧、血小板数および、血小板機能などが考慮されねばならない。anti-IL-6 mAb 投与自体が、血圧に影響を及ぼす可能性は、出血開始前の平均左室圧測定において、対照である NRG 投与群と比較し有意差を認めなかったことから棄却された。血圧に関しては、IL-6 は α アドレナリン性血管収縮を抑制するとの報告がある一方、IL-6 投与は循環動態に有意な影響を及ぼさないとの報告もある。本研究では、出血開始後も両群の平均左室圧に有意差は認められず、産生された IL-6 は血圧に有意な影響を与えなかったと推定された。内因性カテコラミンが凝固・線溶系、および IL-6 産生に影響を及ぼすとの報告があり、本研究では出血侵襲に伴うカテコラミン値の増加が生じていた可能性はあるが、平均左室圧に両群間で有意差は無く、血圧差を生じる程の、カテコラミン値の差異は無かったと推定された。

IL-6 には血小板数増加および、血小板機能亢進をもたらす作用があるが、これらの効果発現には IL-6 投与開始後 1-3 日間を要すると報告されている。本研究の TEG 測定結果では、血小板数の増加は否定的であり、出血開始の 60 分後という短時間では、血小板への影響は発現していなかったことが示唆された。また、TEG 測定、TAT complex 濃度測定により、出血後の凝固系の活性化亢進と、anti-IL-6 mAb 投与群における、凝固系活性化の亢進抑制が確認された。

出血量、平均左室圧、TEG、および TAT complex 濃度の測定結果は、一致して、出血侵襲により産生された IL-6 が凝固系活性化を促進する機序により、出血量の抑制に寄与するという仮説を支持するものと考えられた。

「結論」 出血により産生された内因性 IL-6 は、生存率には影響を与えないが、凝固系活性化を促進する効果により出血量を減少させるという機能を果たしている可能性が示された。この IL-6 が関連する反応は、外傷、および出血状態における生体の防御機構の一つと見なすことができよう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 劔 物 修

学 位 論 文 題 名

Bleeding induced interleukin-6 decreases blood loss via activation of coagulation

(内因性インターロイキン6の出血量に及ぼす影響)

本論文は、炎症性サイトカインの1つであるインターロイキン6 (IL-6) が、敗血症性ショックのみならず、外傷、出血性ショックにおいても産生されること、及び IL-6 の多様な生理活性の中に、凝固系活性化を促進する効果があるとの知見に基づき、出血状態において産生された内因性 IL-6 が凝固系を介在して出血量に対して何らかの影響を及ぼすのではないかと、この仮説を検証したものである。

この目的を達成するためには、出血性ショック研究において多く用いられている、脱血操作による一定の低血圧の維持、もしくは体重当たり一定の脱血を行う手法は、出血量が予め規定されるために不适当であり、よって Uncontrolled hemorrhage model (75%尾切断モデル) を採用するものとなった。このモデルは止血が不十分な状態における輸液療法が、血小板、凝固因子等の希釈により出血量の増大を招くのでは無いかとの論点を検証するために提唱されたものであり、最近 10 年間の間に多数の論文が同モデルを採用し、種々の報告がなされている。

75%尾切断モデルにおける IL-6 産生の動態については、ELISA 法を用いた血清 IL-6 濃度測定により、従来の知見同様、出血開始の 30 分以降には有意な IL-6 濃度の上昇が見られたことが示されている。

内因性 IL-6 の出血量に及ぼす影響を検討するため、抗 IL-6 抗体及び対照として正常ラットグロブリンを投与した群とを比較し、出血量、血圧、血栓弾性計を用いた凝固系、血小板、線溶系の評価、及びトロンビン-アンチトロンビン III 複合体 (TAT 複合体) の濃度測定が行われている。論文に示された結果によれば、抗 IL-6 抗体投与は対照群との比較において、出血量の増大と凝固系活性の亢進抑制作用を有する可能性が示唆され、かつ体血圧、血小板および線溶系に対しては影響をもたなかったことが示された。これらの結果より、出血侵襲により産生された内因性 IL-6 は凝固系活性化を促進する機序により、出血量自体を低減する可能性がある

の結論を展開した。

血圧測定については従来多くの報告において採用されている大腿動脈へのカテーテル留置法ではなく、経横隔膜的左室直接穿刺法を採用しているが、これはヘパリン化を回避しなければならない条件下における、カテーテル内凝固による血圧測定不能を回避する一法であると主張している。

また、凝固系活性化の指標として TAT 複合体測定のみを実施した理由として、ヒト用測定系とマウス由来の資料との Cross reactivity の知見から、唯一 TAT 複合体の測定のみが高い交叉性を有しているためと述べている。

更に、カテコラミンと凝固系活性の関係については、本論文における実験系においてカテコラミン値の上昇が生じた可能性は否定しないものの、血圧測定において両群間に有意差を認めなかったことから、有意なカテコラミン値の差異は無かったと推論している。

本論文に示された実験系においては被験動物としてマウスを採用したため、出血性ショック研究上の手技や採血量などの点において制約があったことが推定される。提示されたデータは必ずしも多くはないが、抗 IL-6 抗体投与法により内因性 IL-6 が、他の機序ではなく、凝固系活性化を促進する機序により出血量を低減せしめたことを示したものと評価される。

これは、出血および外傷状態で産生された IL-6 が、凝固系を介在して出血量を減少させるという、一種の保護的作用を有する可能性を示したものであり、出血性ショックにおいて産生された炎症性サイトカインの生理的意義について興味深い知見を付加するものである。

本論文において一例が示された炎症性サイトカインの生体保護的作用についての検討は、臨床における抗サイトカイン療法の在り方にも影響を与えることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。