

ハロタン投与後 24 時間の BALB/c マウスにおいて、投与量 100 または 600 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ で ALT の活性は対照群と比べ、有意な増加が認められた。また 300 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ において ALT は有意ではないが増加傾向にあった。以下、ハロタン

の投与量を 600 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ として検討を行った。BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスのハロタン投与群について 3、6、12 および 24 時間の血漿試料中の AST および ALT の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig.5)。

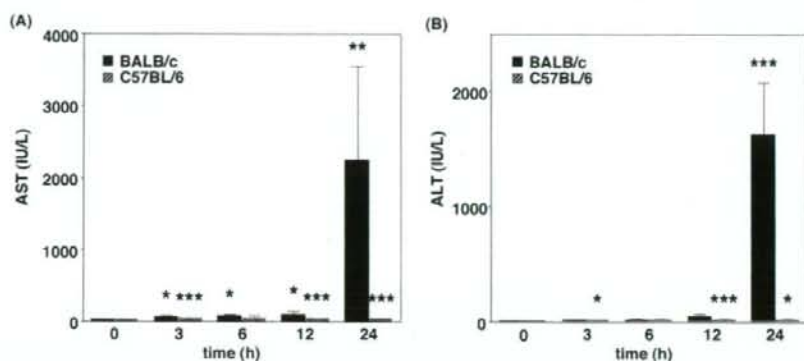


Fig. 5. Plasma AST and ALT levels in halothane-treated BALB/c and C57BL/6 mice. Mice were given halothane (600 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$, i.p.), and plasma for the AST (A) and ALT (B) assay were collected 3, 6, 12, and 24 h after administration. The data are means \pm S.D. of three to fourteen mice. Significantly different from control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

BALB/c マウスにおいては、ハロタン投与後 3、6、12 および 24 時間で AST の活性は対照群と比べ、有意な増加が認められた。AST は投与後 3 時間から増加し始め、24 時間で最も高い値を示した。C57BL/6 マウスにおいては、ハロタン投与後 3、12 および 24 時間で AST の活性は対照群と比べ、有意な増加が認められた。AST は投与後 3 時間から増加し始め、6 時間で最大となり、その後も 24 時間

まで活性は維持された。BALB/c マウスにおいては、ハロタン投与後 24 時間で ALT の活性は対照群と比べ、有意な増加が認められた。ALT は投与後 3 時間から増加し始め、24 時間で最も高い値を示した。C57BL/6 マウスにおいては、ハロタン投与後 3、12 および 24 時間で ALT の活性は対照群と比べ、有意な増加が認められた。ALT は投与後 3 時間から増加し始め、12 時間で最大となり、

その後減少する傾向にあった。24 時間において ALT は 12 時間に比べ減少したが対照群の活性値には至らなかった。

BALB/c および C57BL/6 マウスにおけるハロタン投与による肝障害の程度と好中球の肝臓への浸潤について検討するため、H&E 染色および抗 MPO 抗体を用いた免疫染色による肝組織像の評価を行った (Fig. 6)。その結果として、ハロタンを投与された BALB/c マウスにおいて中心静脈周囲の肝細胞の脱落が認められた。これは薬物誘導性肝障害の一般的な所見である。また、ハロタンを投与された BALB/c マウスにおいて多数の MPO 陽性細胞の浸潤が認められ、ハロタンによる肝障害の誘導に好中球が寄与していることが示唆された。一方、対照群の BALB/c マウス、C57BL/6 マウスおよびハロタンを投与された C57BL/6 マウスにおいては肝細胞の脱落や MPO 陽性細胞の浸潤は認められなかった。

I-C-2 ハロタン投与マウス血漿中の IFN γ および IL-4 タンパク質量の変動解析

ハロタンの投与後 3、6、12 および 24 時間のマウス血漿中の IFN γ および IL-4 タンパク質量の変動を ELISA を用いて検討した。BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスについて各時間において得られた血漿 3 匹分を等量ずつ混合し、検討に用いた (Fig. 7)。

BALB/c マウスにおいてハロタンの投与後 24 時間において血漿中の IFN γ および IL-4 タンパク質が検出された。しかし他のいずれの時間においても血漿中の IFN γ および IL-4 タンパク質は検出されなかった。一方 C57BL/6 マウスにおいてはいずれの時間においても血漿中の IFN γ および IL-4 タンパク質は検出されなかった。

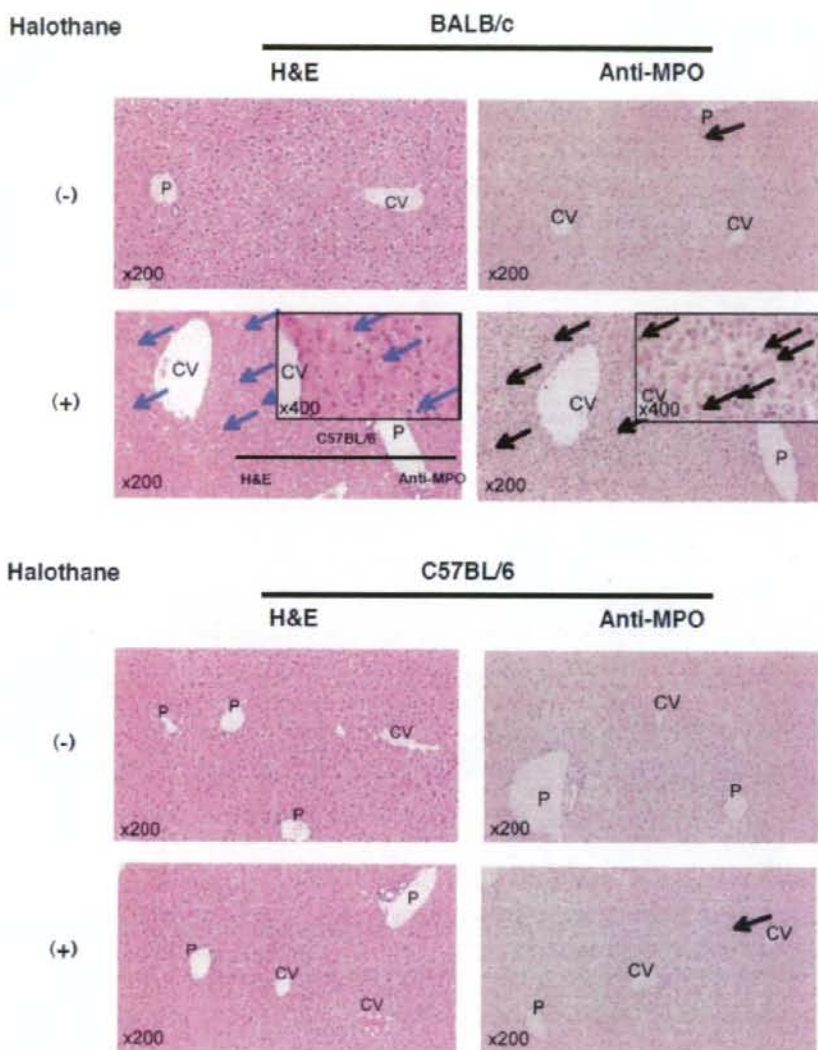


Fig. 6. Halothane-induced liver injury in female BALB/c and C57BL/6 mice. Mice were given halothane (600 μ mol/head, i.p.), and liver specimens were sampled 24 h after halothane administration. Then liver tissue sections were stained with H&E or immunostained with anti-MPO Ab. CV: central vein, P: portal vein

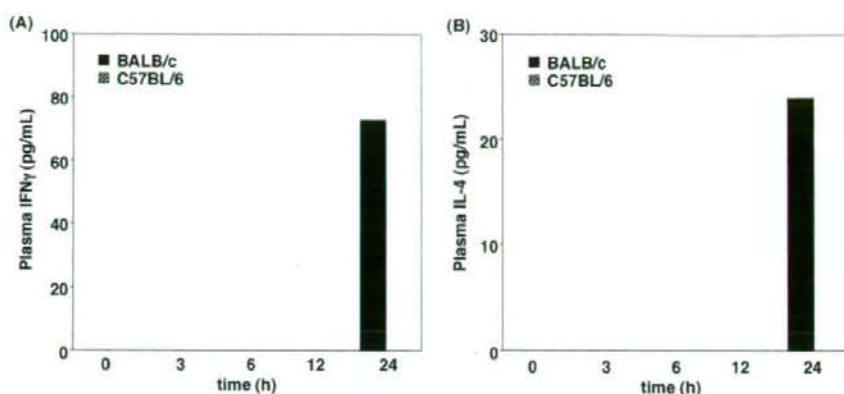


Fig. 7. Changes of plasma IFN γ and IL-4 levels in halothane-treated BALB/c and C57BL/6 mice. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). Plasma were collected 3, 6, 12, and 24 h after halothane administration and IFN γ (A) and IL-4 (B) concentration was measured using ELISA.

I-C-3 ハロタン投与マウス肝における炎症・免疫に関与する遺伝子の mRNA の変動解析

ハロタン投与後 3、6、12 および 24 時間のマウス肝における炎症・免疫に関与する遺伝子の mRNA の発現変動を、real-time RT-PCR を用いて検討した。各サンプルについて T-bet、GATA-3、IFN γ 、IL-10、TNF α 、MIP-2、 β -actin の

mRNA の量を測定し、T-bet 量には GATA-3 量を、IFN γ 量には IL-10 量を、TNF α および MIP-2 量には β -actin 量を補正に用いて対照群に対する T-bet/GATA-3 比、IFN γ /IL-10 比 (Fig. 8)、TNF α / β -actin 比および MIP-2/ β -actin 比 (Fig. 9) の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した。

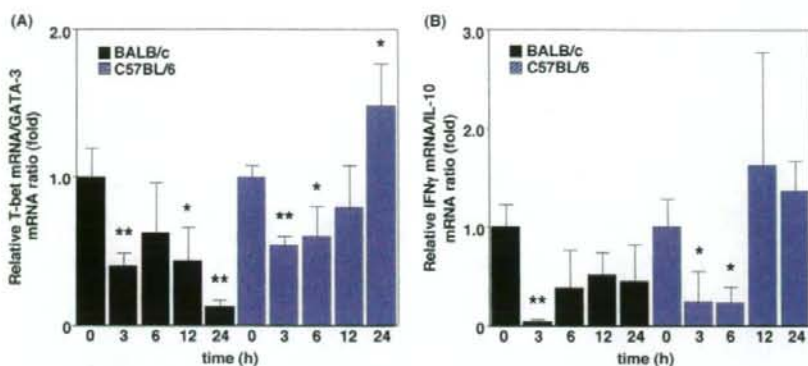


Fig. 8. Time-dependent changes of hepatic mRNA expression levels in BALB/c and C57BL/6 mice treated with halothane. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). After 3, 6, 12, and 24 h, mice were sacrificed and livers were removed for mRNA extraction. Relative mRNA expression was measured for T-bet and GATA-3 (A) and IFN γ and IL-10 (B) by real-time RT-PCR. The data are means \pm S.D. of three mice. Significantly different from control group (* p < 0.05, ** p < 0.01).

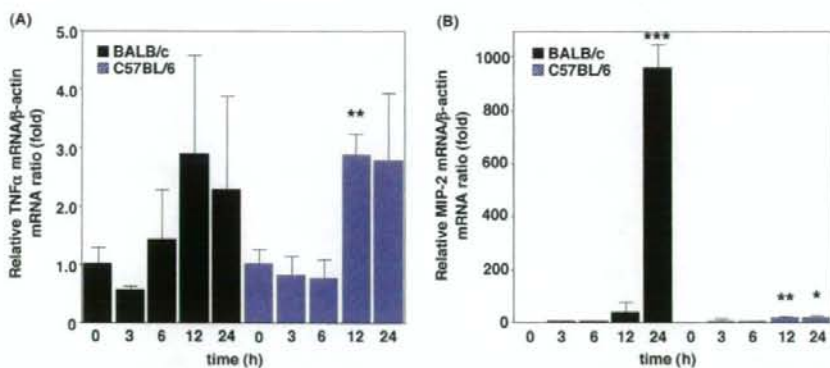


Fig. 9. Time-dependent changes of hepatic mRNA expression levels in BALB/c and C57BL/6 mice treated with halothane. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). After 3, 6, 12, and 24 h, mice were sacrificed and livers were removed for mRNA extraction. Relative mRNA expression was measured for TNF α / β -actin (A) and MIP-2/ β -actin (B) by real-time RT-PCR. The data are means \pm S.D. of three mice. Significantly different from control group (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

BALB/c マウス肝において T-bet/GATA-3 比はハロタンの投与後 3 時間で対照群と比べ 0.4 倍、投与後 12 時間で対照群の 0.4 倍、投与後 24 時間

で対照群の 0.1 倍となり、いずれも有意な減少が認められた。ハロタンの投与後 6 時間においては対照群と比べ減少傾向にあったが有意な差は認められなかつ

た。C57BL/6 マウス肝において T-bet/GATA-3 比はハロタンの投与後 3 時間で対照群と比べ 0.5 倍、投与後 6 時間で対照群の 0.6 倍、投与後 24 時間で対照群の 1.5 倍となり有意な変動が認められた。ハロタンの投与後 12 時間においては対照群と比べ変動は認められなかった。

BALB/c マウス肝において IFN γ /IL-10 比はハロタンの投与後 3 時間で対照群と比べ 0.1 倍となり、有意な減少が認められた。ハロタンの投与後 6 時間、12 時間および 24 時間においては対照群と比べ減少傾向にあったが、有意な差は認められなかった。C57BL/6 マウス肝において IFN γ /IL-10 比はハロタンの投与後 3 時間で対照群と比べ 0.2 倍、投与後 6 時間で対照群の 0.2 倍となり、有意な減少が認められた。ハロタンの投与後 12 時間と 24 時間においては対照群と比べ増加傾向にあったが、有意な差は認められなかった。

BALB/c マウス肝において TNF α / β -actin 比は対照群に比べ、ハロタンの投与後 3 時間で減少傾向にあったが 6 時間から増加し始め、12 時間で最大となり、その後減少する傾向にあったが、いずれの時間においても有意な変動は認められなかった。C57BL/6 マウス肝において

TNF α / β -actin 比はハロタンの投与後 12 時間で対照群と比べ 2.9 倍となり、有意な増加が認められた。ハロタンの投与後 24 時間においても増加傾向にあったが有意な差は認められなかった。ハロタンの投与後 3 および 6 時間においては TNF α / β -actin 比の変動は認められなかった。

BALB/c マウス肝において MIP-2/ β -actin 比はハロタンの投与後 24 時間で対照群と比べ約 960 倍となり、有意な増加が認められた。ハロタンの投与後 3 時間で対照群と比べ 2.0 倍、6 時間で対照群と比べ 3.7 倍、12 時間で対照群と比べ 37.8 倍となり、増加傾向にあったが有意な差は認められなかった。C57BL/6 マウス肝において MIP-2/ β -actin 比はハロタンの投与後 12 時間で対照群と比べ 16.1 倍、投与後 24 時間で対照群と比べ 17.8 倍となり、有意な増加が認められた。ハロタンの投与後 3 時間で対照群と比べ 5.9 倍、6 時間で対照群と比べ 1.8 倍となり、増加傾向にあったが有意な差は認められなかった。

I-D 考察

ハロタンは吸入型全身麻酔薬として古くから用いられているがヒトにおいてまれな頻度であるが肝障害を引き起こすことが知られており、現在はより肝

障害性の少ないセボフルランが主流となっている。しかし現在でも設備や様々な法的な問題からハロタンの使用が余儀なくされる状況が存在している (Splinter, 2002)。*In vitro* においてハロタンは CYP2E1 および CYP2A6 によって酸化的に (Madan and Parkinson, 1996; Spracklin et al., 1997)、CYP3A4 および CYP2A6 によって還元的に (Spracklin et al., 1996) 代謝を受けると言われている。またヒトにおいて CYP2E1 がハロタンの主要な代謝酵素であること (Kharasch et al., 1996)、ハロタンによって肝炎を発症した患者の 45% は血漿から抗 CYP2E1 抗体が検出されること (Bourdi et al., 1996) が報告されており、ハロタンによる肝障害の発症には CYP2E1 による代謝的活性化が関与していると考えられる。多くの種においてハロタン誘導性肝障害は通常の条件では再現されないが、モルモットを用いた検討でハロタンが CYP2E1 によってトリフルオロ酢酸に代謝され、血漿中の ALT の増加と肝細胞のネクロシスが起ること、ハロタンの投与による肝臓のグルタチオンの減少と肝障害の増悪が関連することが報告されている (Lind and Gandolfi, 1997)。

ハロタン誘導性肝障害のモデルマウスはこれまでハロタンの投与による呼

吸抑制でマウスが死亡してしまうため、投与量に限界があり作成が困難であった。本章では You ら (2006) の報告を参考にハロタンの投与方法を決定したが、この方法では多量のハロタンを投与してもハロタンが溶媒から徐々に放出されるため呼吸抑制によってマウスが死亡することなく、肝臓にハロタンを蓄積させることができる。本章においてハロタンの投与量を 100、300 または 600 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ とし検討を行ったが ALT の顕著な増加は You ら (2006) と同じ 600 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ においてのみ認められたため、その後の検討は全て投与量を 600 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ として行った。また You ら (2006) は今回と同様の投与方法において肝臓のトリフルオロアセチル化タンパク質の生成について BALB/c マウスと C57BL/6 マウスの間に系統差が存在しないことを報告している。

今回、BALB/c マウスにおいてハロタンの投与によって投与後 3 時間から AST が上昇し始め、24 時間において最も増加しており、いずれの時間においても対照群との間に有意な増加が認められた。またハロタンの投与によって投与後 3 時間から ALT が上昇し始め、24 時間において対照群と比べて有意な差となった。You ら (2006) の報告では同様

の投与方法でALTのピークは投与後24時間において1200 IU/L程度を示し、その後減少していることから今回の投与によっても投与後24時間以降でALTが減少していくと考えられる。しかしYouら(2006)の行った検討で投与後12時間においてALTが700 IU/L程度まで上昇していたのに対し、本章では投与後12時間におけるALTの上昇は非常に小さい値であった。実験条件が厳密に同様ではないためこのような違いが見られたと考えられるがBALB/cマウスにおけるハロタン誘導性肝障害動物モデルをある程度再現することができたと考えられる。C57BL/6マウスにおいて今回、投与後3時間からASTが上昇し始め、3、12および24時間において対照群と比べて有意な差となった。ハロタンの投与後6時間でASTは最大となったが3匹中1匹のマウスが比較的高いAST値を示したため平均値と標準偏差が増加し、このような結果になったと考えられる。ASTは肝臓以外にも心筋、骨格筋、腎臓および赤血球などにも含まれており、実験操作中の溶血によって値が上昇することがある。しかし今回同じマウスの血漿中のALTも比較的高い値を示していたため溶血による増加ではなくマウスの個体差によって、ASTおよびALTの増加

が起こったと考えられる。C57BL/6マウスにおいて、投与後3時間からALTが上昇し始め、3、12および24時間において対照群と比べて有意な差となった。Youら(2006)の報告では同様の投与方法でALTのピークは投与後12時間に現れており、今回の結果と一致していた。

肝組織像の評価については、BALB/cマウスおよびC57BL/6マウスにおけるハロタン投与による肝障害の程度と好中球の肝臓への浸潤をH&E染色および抗MPO抗体を用いた免疫染色によって行った。その結果として、ハロタンを投与されたBALB/cマウスにおいて中心静脈周囲の肝細胞の脱落が認められた。これは薬物誘導性肝障害の一般的な所見であり、Youら(2006)による検討と同様の結果となった。またモルモットにおいてもハロタンによる肝障害時には中心静脈周囲の肝細胞の脱落が見られることが報告されている(Lind and Gandolfi, 1997)。

H&E染色による肝障害の程度の評価に加えて、抗MPO抗体を用いた免疫染色によってMPO陽性細胞の肝臓への浸潤についての評価を行い、好中球の関与について検討した。ハロタンを投与されたBALB/cマウスの肝臓において多数のMPO陽性細胞の浸潤が認められており、

マウスにおいて好中球とハロタン誘導性肝障害の関与を示唆した報告 (You et al., 2006; Feng et al., 2009) を支持する結果となった。一方、対照群の BALB/c マウス、対照群の C57BL/6 マウスおよびハロタンを投与された C57BL/6 マウスにおいては肝細胞の脱落や MPO 陽性細胞の浸潤は認められなかった。

好中球の肝血管系への蓄積には TNF α 、IL-1、CXC ケモカイン (IL-8、MIP-2、KC、CINC-1)、PAF など様々な炎症調節因子が関与している。しかし類洞内への好中球の蓄積だけでは肝細胞を傷害するには不十分であり、好中球が血管外の肝実質細胞へ遊走されることが必要であると言われており、それには好中球の β_2 インテグリンと内皮細胞および肝実質細胞の ICAM-1 との接着が必要であると言われている。肝細胞の傷害には肝実質細胞内の好中球に由来する過酸化水素や次亜塩素酸による酸化ストレスが寄与していると言われており、次亜塩素酸は好中球のもつ MPO によって産生されている。虚血再灌流による肝障害、アルコール性肝炎、 α ナフチルイソチオシアネートによる肝障害およびアセトアミノフェンによる肝障害などが好中球の浸潤によって引き起こされる、または悪化することが報告されており

(Ramaiah and Jaeschke, 2007)、本検討における MPO 陽性細胞の浸潤も肝細胞の傷害に寄与していると考えられる。しかしアセトアミノフェンは免疫担当細胞を含まない条件でマウス肝細胞を培養した場合においても、*in vivo* と同様のメカニズムで細胞を傷害することが報告されており (Bajt et al., 2004)、好中球などの非実質細胞が関与しない可能性が示唆されている。ハロタンについても *in vitro* における詳細な検討が、好中球の関与を明らかにするために必要であると考えられる。

T-bet は新たに発見された Th1 細胞に特異的な転写因子であり、Th1 細胞への分化を促進し、Th2 細胞への分化を抑制すると考えられている (Shier et al., 2000; Szabo et al., 2000)。逆に GATA-3 は Th2 細胞の発達において中心的な役割を果たす転写因子であり、Th1 細胞への分化を抑制すると言われている (Zhang et al., 1997; Ouyang et al., 1998)。Th 細胞に特異的なこれら 2 つの主要な転写因子が Th1 サイトカイン、Th2 サイトカインの発現を制御し、Th 細胞の分化において重要な役割を果たしていると考えられている。T-bet の発現は IFN γ の発現と相関しており、また IFN γ は転写因子 stat-1 を介して T-bet の発現を

誘導していることから、ポジティブフィードバックループが形成されていることが知られている (Agnello et al., 2003)。一方、IL-4 は転写因子 stat-6 を介して GATA-3 の発現を誘導しており、ポジティブフィードバックループの形成が報告されている (Agnello et al., 2003)。また IFN γ は Th2 サイトカインの、IL-4 は Th1 サイトカインの産生を抑制しており、Th1 と Th2 は互いに制御し合っていることが知られている (Rengarajan et al., 2000)。喘息患者の気道の T 細胞では T-bet の発現量が低下すること、T-bet ノックアウトマウスがヒトにおける喘息に類似した気道の過敏症を発症すること (Finotto et al., 2002) および GATA-3 の発現が上昇することが報告されており (Nakamura et al., 1999)、Th2 細胞の関与が示唆されている。また Con A を投与することで誘導した肝障害モデルにおいては野生型のマウスに比べ、stat-1 トランスジェニックマウスにおいて重症化し、stat-1、T-bet、IFN γ のいずれかをノックアウトしたマウスにおいては軽減されることが報告されており、肝障害に対する Th1 細胞の寄与が示唆されている (Siebler et al., 2003; Tagawa et al., 1997)。

Th1 と Th2 の分化において中心的な役

割を果たす転写因子である T-bet と GATA-3 の mRNA またはタンパク質の発現量の変化を疾患モデル動物を用いて評価した種々の報告 (Daniel et al., 2008; Kremer et al., 2006; Park et al., 2008) は T-bet や GATA-3 について評価することが Th1 や Th2 と様々な疾患との関連を明らかにする上で有用であることを示している。また T-bet および GATA-3 の mRNA の発現量の比は、それぞれを単独で評価した場合よりも Th1 サイトカインと Th2 サイトカインの実際の分泌量をより正しく反映することが報告されており (Chakir et al., 2003)、肝臓においても T-bet/GATA-3 の mRNA 比の変動は Th1 サイトカインと Th2 サイトカインの実際の分泌のバランスを反映していると考えられる。しかし組織におけるサイトカインを測定したという報告は非常に少なく、それは抽出に適切な界面活性剤を正しい濃度で用いなければ抽出効率が悪く、さらに検出の際の抗体の反応性を変えてしまうことが原因であると言われている (Matalka et al., 2005)。さらに界面活性剤がサイトカインの測定値に与える影響は測定するサイトカインの種類によって異なっており (Rosengren et al., 2003)、肝組織中のサイトカインの測定は困難であると考え、

本章では血漿中の IFN γ および IL-4 タンパク質の濃度を測定した。

IFN γ および IL-4 タンパク質の血漿中の濃度はハロタンの投与後 24 時間の BALB/c マウス以外は検出限界以下であり、これらの Th1 および Th2 サイトカインの発現量の変動を評価することはできなかった。しかしハロタンによる肝障害が誘導されたマウスの血漿中のみから検出されており、ハロタンによる肝障害に対して、これらサイトカインが何らかの影響を与えていると考えられる。そこで Th1 と Th2 の応答性の変動の評価には肝臓の mRNA を用いることにした。

本検討では BALB/c マウスの肝臓の T-bet/GATA-3 の mRNA の比がハロタンの投与後 3、12 および 24 時間で有意に減少しており、6 時間においては有意ではないが減少する傾向があることを明らかにした。一方 C57BL/6 マウスの肝臓の mRNA において T-bet/GATA-3 比はハロタンの投与後 3 時間および 6 時間で有意に減少し、投与後 24 時間で有意に増加していた。

続いてハロタンの投与による肝臓の mRNA の T-bet/GATA-3 比の変動が、Th1 および Th2 サイトカインの発現を反映しているかどうかを Th1 サイトカイン

である IFN γ および Th2 サイトカインの IL-10 の mRNA の発現の変動を測定することで評価した。本検討における BALB/c マウスの肝臓の IFN γ /IL-10 の mRNA の比はハロタンの投与後 3 時間で有意に減少しており、ハロタンの投与後 6、12 および 24 時間においては減少する傾向があることを明らかにした。一方 C57BL/6 マウスの肝臓において IFN γ /IL-10 の mRNA の比はハロタンの投与後 3 および 6 時間で有意に減少し、投与後 12 および 24 時間においては増加する傾向にあることを明らかにした。BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスにおいてハロタン投与後の T-bet/GATA-3 の mRNA 比の変動は IFN γ /IL-10 の mRNA の比の変動と類似しており、BALB/c マウスにおける比が投与後、常に減少していたことと、重篤な肝障害を発症することの間には何らかの関連があるのではないかと考えられる。

次に好中球の活性化やアポトーシスの誘導に関わるサイトカインである TNF α についての評価を行った。本検討における BALB/c マウスの肝臓の TNF α / β -actin の mRNA の比は対照群に比べ、有意な変動は認められなかったがハロタンの投与後 12 および 24 時間において増加傾向にあった。これは You ら

(2006) の報告と類似した結果であったが、増加の程度や有意差が見られた点などは本検討とは異なっていた。C57BL/6 マウス肝臓において $TNF\alpha/\beta$ -actin 比はハロタンの投与後 12 時間で対照群と比べ 2.9 倍となり、有意な増加が認められた。ハロタンの投与後 24 時間においても増加傾向にあったが有意な差は認められなかった。ハロタンの投与後 3 および 6 時間においては $TNF\alpha/\beta$ -actin 比の変動は認められなかった。You ら (2006) の報告では 12 時間における $TNF\alpha$ は増加傾向にあったが有意差がつかない点が本検討と異なっていた。本検討においては mRNA の定量を real-time RT-PCR によって行い、補正には今回 GAPDH よりもバラつきが少なかった (data not shown) β -actin を用いたが You ら (2006) は RT-PCR を行い、バンド強度を測定することで mRNA の定量を行っており、また補正には GAPDH を用いている。このような実験条件の違いが本検討と You ら (2006) の報告の結果が違うことの一因として考えられる。

BALB/c マウスの肝臓の MIP-2/ β -actin の mRNA の比はハロタンの投与後、時間依存的に増加し 24 時間で顕著に増加することを明らかにした。一方 C57BL/6 マウスの肝臓の MIP-2/ β -actin

の mRNA の比はハロタンの投与後、有意に増加または増加傾向にあったが、いずれの時間においてもハロタンの投与後 24 時間の BALB/c マウス程の変動は認められなかった。MIP-2 は好中球の遊走に関わるケモカインであり、好中球の浸潤に起因する気道や肝臓の炎症は抗 MIP-2 抗体の処置で軽減されることが報告されている (Muruve et al., 1999; Laan et al., 1999)。肝臓における MIP-2 の発現にはクッパー細胞が関与すること (Hatano et al., 2008) およびハロタン誘導性肝障害モデル動物の肝臓のクッパー細胞からトリフルオロアセチル化タンパク質が検出されること (Furst et al., 1997) から、本検討におけるハロタンを投与された BALB/c マウスの肝臓への好中球の浸潤は MIP-2 による好中球の遊走に起因するのではないかと考えられる。

また本検討と同様の投与方法で炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6 や好中球の遊走に関わるケモカインである KC の mRNA の発現量が C57BL/6 マウスに比べ、BALB/c マウスの肝臓において有意に増加することが報告されており (You et al., 2006)、ハロタンによる肝障害の誘導には様々な因子が関与していることが示唆された。

さらに Th1 サイトカインとして肝臓における IL-2 の mRNA の発現量の変化を BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスについて評価し、ハロタンの投与後の発現量の変化に系統差があるか検討した。BALB/c マウスでは投与後 3 時間をピークに IL-2/ β -actin 比の誘導が見られ (data not shown)、12 時間で対照群程度にまで減少しており、C57BL/6 マウスにおいても同様の変化が見られたため系統差が少なくハロタンによる肝障害の発症との関連が低いと判断し、詳細な検討を行わなかった。またハロタンの投与後 3 時間において T-bet/ β -actin の mRNA の比 (data not shown) および本章において示した T-bet/GATA-3 の mRNA の比が減少しているにも関わらず IL-2/ β -actin の mRNA の比は増加していたため詳細な検討は、より典型的な Th1 サイトカインであり様々な研究がなされている IFN γ について行うことにした。またヒトにおける IL-2 はマウスほど厳密に Th1 が産生するわけではなく、種差が存在することが知られており (Mosmann and Sad, 1996) マウスからヒトへの外挿がより困難であると考えたことも検討を中止した要因の 1 つである。

Th2 サイトカインとして典型的な IL-4

および IL-5 についても肝臓の mRNA の検出を試みたが測定条件を確立することができず、本検討では IL-10 について評価することで代用した。IL-5 については T 細胞が豊富に存在する脾臓から抽出した mRNA を用いた場合には測定条件を確立できたことから、肝臓における発現量の低さが検出を困難にした原因の 1 つであると考えられる。しかし IL-10 についてもヒトとマウスの間に種差が存在することが知られており (Mosmann and Sad, 1996) ヒトにおいて本章で見られたような IFN γ /IL-10 比の変動が起こるとは限らないため、ヒトにおいて評価する場合には IL-4、IL-5 または IL-9 等を測定するなど、マウスとの種差を考慮する必要がある。

本章における検討はハロタンの投与によって肝障害が誘導され、血漿 AST、ALT および肝組織像から判断される肝障害の重篤さ、免疫・炎症に関連する様々な遺伝子の発現の変化に系統差があることを明らかにした。次に脾臓に由来するサイトカインがハロタンによる肝障害に関連するかどうか検討するために II 章ではハロタン投与後の脾臓のサイトカインの産生能の変化について検討した。

II 章 ハロタン投与による脾臓におけるサイトカイン産生能の変動解析

II-A. 緒言

I 章ではハロタン抵抗性モデルと感受性モデルの作成とハロタンの投与による炎症・免疫関連遺伝子の発現変動を解析した。本章ではハロタンの投与によって脾臓におけるサイトカインの産生能が変動し、その変動の系統差が肝障害に関連しているかについてハロタン投与マウスの初代培養脾臓細胞をマイトジェン存在下で培養し、産生するサイトカインの量を ELISA で測定することによって検討した。

II-B. 研究方法

II-B-1 マウス脾臓細胞の培養

BALB/c マウス (雌性、7 週齢; 日本 SLC) および C57BL/6 マウス (雌性、7 週齢; 日本 SLC) を馴化飼育した後、体重を測定し、群分けを行った。ハロタン投与群にはハロタン 600 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ を単回腹腔内投与した。対照群にはオリーブ油のみを 2 mL/mouse 投与した。投与から 24 時間後に脾臓を採取し、PBS (PC/ST) で洗浄後、RPMI1640 培地に細胞を懸濁した。ACTB 中に細胞を懸濁し、

室温で 5 分間静置後、800 g、4°C で 5 分間遠心分離を行うことで赤血球を除き、24 well plate に各 well あたり 1.0×10^6 個の細胞を蒔いた。Con A を最終濃度が 1、3 または 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加え、5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。24 時間後に上清を回収し、サンプルチューブに移し ELISA で測定を行うまで -80°C で保存した。

II-B-2 ELISA による上清中の IFN γ および IL-4 タンパク質量の変動解析

II-B-1 で得られた上清中の IFN γ 濃度および IL-4 濃度を I-B-4 の方法に従って測定した。

II-C. 研究結果

II-C-1 ハロタン投与 BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスの初代培養脾臓細胞の IFN γ および IL-4 の産生能の変動の解析

C57BL/6 マウスにオリーブ油またはハロタンを投与し、投与から 24 時間後に採取した脾臓細胞を Con A の最終濃度を 1、3 または 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として培養した。培養から 24 時間後に回収した上清中の IFN γ 濃度および IL-4 濃度を以下に示した (Fig. 10)。

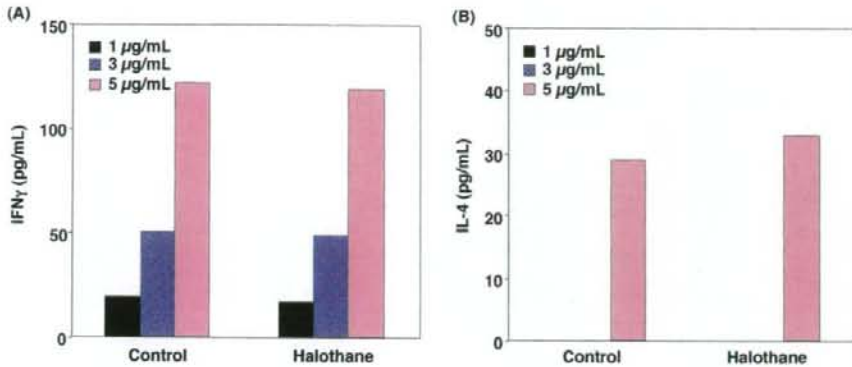


Fig. 10. Cytokine secretion from halothane-treated mice splenocytes. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). After 24 h, mice splenocytes were isolated from C57BL/6 mice and 1×10^6 cells/well were stimulated in vitro with 1, 3, or 5 μ g/mL Con A. the culture supernatants were collected at 24 h after Con A stimulation and IFN γ (A) and IL-4 (B) production was measured using ELISA.

上清中の IFN γ 濃度は Con A の濃度に依存して増加した。しかし上清中の IL-4 の濃度は Con A の濃度が 1 および 3 μ g/mL では検出できず、5 μ g/mL においてのみ検出された。Con A の濃度が 1 または 3 μ g/mL では IFN γ と IL-4 の両方を同時に検出することができないため、以下の検討は Con A の濃度を 5 μ g/mL として行った。次に C57BL/6 マウスにオリーブ油またはハロタンを投与し、投与から 24 時間後に採取した脾臓細胞を Con A の最終濃度を 5 μ g/mL として培養した。培養から 24、48、72 および 96 時間後に回収した上清中の IFN γ 濃度および IL-4 濃度以下に示した (Fig. 11)。

IFN γ 濃度は 24、48 および 72 時間の

いずれの培養時間においても大きな変動は見られなかった。しかし 96 時間において検出された IFN γ 濃度はそれ以前の時間と比べ、減少傾向にあった。一方 IL-4 濃度は 24 時間で最も高い値を示し、培養時間を長くするにつれて減少する傾向にあり、96 時間においては検出限界以下となった。本検討の目的はサイトカインの産生能の変化を評価することであり、IL-4 が培養時間に依存して上清中から消失することは結果の解釈を複雑にすると考えられる。よって以下の検討では培養時間を IL-4 の上清中からの消失が最も少ないと考えられる 24 時間に設定し行うことにした。

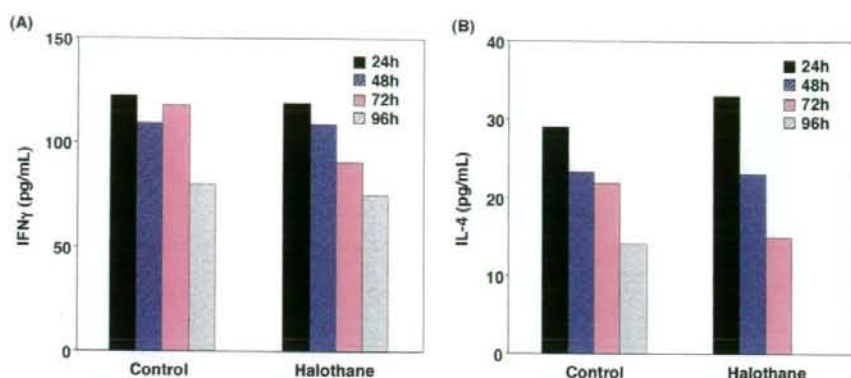


Fig. 11. Cytokine secretion from halothane-treated mice splenocytes. Mice were given halothane ($600 \mu\text{mol}/\text{mouse}$, i.p.). After 24 h, mice splenocytes were isolated from C57BL/6 mice and 1×10^6 cells/well were stimulated in vitro with $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ Con A. The culture supernatants were collected at 24, 48, 72, or 96 h after Con A stimulation and IFN γ (A) and IL-4 (B) production was measured using ELISA.

BALB/c マウスおよびC57BL/6 マウスにオリーブ油またはハロタンを投与し、投与から 24 時間後に採取した脾臓細胞を Con A の最終濃度を $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ として培養した。培養から 24 時間後に回収した上清中の IFN γ 濃度および IL-4 濃度の平均値に標準偏差を付した結果を以下に示した (Fig. 12)。

ハロタン投与BALB/cマウスの初代培

養脾臓細胞の IFN γ の産生量は対照群に比べ 0.6 倍に変動しており、有意な差が認められた。一方ハロタン投与C57BL/6 マウスの初代培養脾臓細胞の IFN γ の産生量に変動は認められなかった。また IFN γ の産生量はハロタンの投与に依らず C57BL/6 マウスに比べ、BALB/c マウスにおいて高い値を示していた。

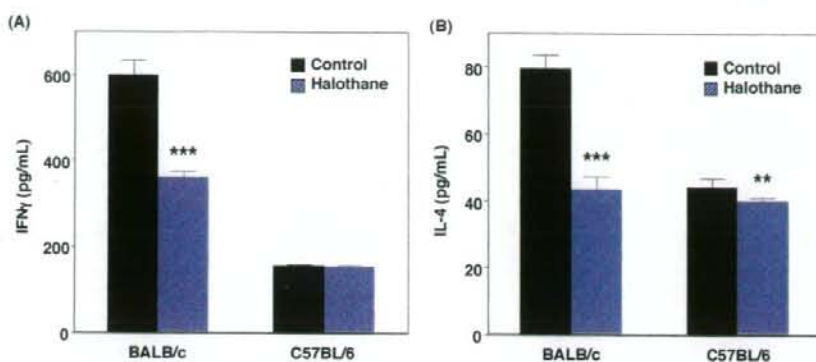


Fig. 12. Cytokine secretion from halothane-treated mice splenocytes. Mice were given halothane (600 μ mol/mouse, i.p.). After 24 h, mice splenocytes were isolated from mice and 1×10^6 cells/well were stimulated in vitro with 5 μ g/mL Con A. The culture supernatants were collected at 24 h after Con A stimulation and IFN γ (A) and IL-4 (B) production was measured using ELISA. The data are means \pm S.D. of three mice. Significantly different from control group (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

ハロタン投与 BALB/c マウスの初代培養脾臓細胞の IL-4 の産生量は対照群に比べ 0.6 倍に変動しており、有意な差が認められた。一方ハロタン投与 C57BL/6 マウスの初代培養脾臓細胞の IL-4 の産生量は対照群に比べ 0.9 倍に変動しており、有意な差が認められた。また対照群における IL-4 の産生量は C57BL/6 マウスに比べ、BALB/c マウスにおいて高い値を示していたが、ハロタン投与群においては BALB/c マウスと C57BL/6 マウスにおける IL-4 の産生量は同程度であった。

II-D 考察

I 章ではハロタンによる肝障害の程度とその際の様々な遺伝子の発現量の変

動に系統差が存在することを明らかにした。そこで本章においては脾臓に由来するサイトカインとハロタン誘導性肝障害との関連について検討を行った。

脾臓は厚い被膜で覆われた組織であり、赤い組織の赤脾髄と白い斑状の組織である白脾髄によって構成されている。赤脾髄は赤血球に富んだ組織であるのに対し、白脾髄は T 細胞および B 細胞の集積した組織であり、生体の免疫機能を担っている。

閉塞性黄疸の実験動物モデルマウスにおいて、脾臓に由来するサイトカインが肝障害の重篤さに関連していること (Hong et al., 2007)、ラット肝臓の虚血再灌流障害による肝臓組織の障害、血清の AST と ALT、アポトーシス、MPO 活性、

TNF α の発現および好中球の浸潤は脾臓の摘出によって軽減されること (Jiang et al., 2007)、T細胞によるラクトシル化ウシ血清アルブミンに対する免疫反応を介したマウスにおける肝障害が脾臓の摘出によって軽減されること (Xu et al., 2006) が報告されており、また1章においてハロタンによる肝障害の発症時に炎症や免疫に関連した遺伝子の変動や好中球の浸潤が認められたことからハロタンによる肝障害の発症に対して脾臓が何らかの関与をしていると考えられた。

肝臓、脾臓およびリンパ節などの組織から得たリンパ球やマクロファージなどの免疫担当細胞を Con A などのマイトジェンの存在下で培養することで様々なサイトカインが上清中に放出されることが知られている (Yang and Cook, 2003; Hallquist et al., 2000)。細胞をマイトジェン存在下で培養し、上清中のタンパク質を定量するこのような手法はリンパ球のサイトカイン産生能の変動を評価する場合などに一般的に用いられている。Th1 によって産生される IFN γ は Th1 細胞上の IFN γ 受容体に結合することで転写因子 stat-1 および T-bet を介して Th1 を活性化するポジティブフィードバックループの存在が知

られており、最も典型的な Th1 サイトカインとして研究がなされている。また IL-4 は Th2 によって産生され、Th2 細胞上の IL-4 受容体に結合することで転写因子 stat-6 および GATA-3 を介して Th2 を活性化するポジティブフィードバックループが知られている (Agnello et al., 2003)。これら 2 つのサイトカインの産生能の変動を測定し、Th1 と Th2 の応答性を評価した数多くの研究がこれまでに報告されている (Kang et al., 1999; Mokuno et al., 1999)。

本章での検討においても Th1 サイトカインとして上清中の IFN γ タンパク質量を Th2 サイトカインとして上清中の IL-4 タンパク質量を定量することで、ハロタンの投与の有無および系統間の Th1 と Th2 の応答性の違いについて評価を行った。

本章において、ハロタンの投与が BALB/c マウスの初代培養脾臓細胞における IFN γ の産生能を有意に低下させることが明らかとなった。一方 C57BL/6 マウスにハロタンを投与した場合は初代培養脾臓細胞の IFN γ の産生能に変動は認められなかった。また IFN γ の産生量はハロタンの投与に依らず C57BL/6 マウスに比べ、BALB/c マウスにおいて高い値を示しており BALB/c マ

ウスの脾臓細胞は C57BL/6 マウスの脾臓細胞よりも Con A 処置に対して IFN γ を産生しやすいのではないかと考えられる。BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスに Con A を投与し血清中の IFN γ を測定すると BALB/c マウスにおいて C57BL/6 マウスよりも高値を示すことが報告されている (Mizuhara et al., 1998)。しかし Con A によって誘導される肝障害は C57BL/6 マウスにおいて BALB/c マウスよりも重篤であり、C57BL/6 マウスは BALB/c マウスに比べ IFN γ による iNOS の発現の誘導が起こりやすいことが Con A による肝障害の系統差の原因であると言われている (Mizuhara et al., 1998)。従って本検討において C57BL/6 マウスに比べ、BALB/c マウスが IFN γ をより多く産生したことが、BALB/c マウスの方が C57BL/6 マウスに比べ Th1 反応を起こしやすいことを意味しているとは限らず、またハロタンの投与によって BALB/c マウスにおける IFN γ の発現量が減少していること、今回と同様の投与によって iNOS の mRNA の発現量には BALB/c マウスと C57BL/6 マウスとの間に有意差がないこと (You, 2006) から脾臓に由来する IFN γ はハロタンによる肝障害の誘導に関与しないと考えられる。

本章において、ハロタンの投与が BALB/c マウスの初代培養脾臓細胞における IL-4 の産生能を有意に低下させることが明らかとなった。また C57BL/6 マウスにおいてもハロタンの投与が初代培養脾臓細胞の IL-4 の産生能を僅かではあるが有意に低下させた。I 章において BALB/c マウスに対するハロタンの投与によって肝臓の T-bet/GATA-3 および IFN γ /IL-10 の mRNA の比が減少したことから本章において検討した脾臓の IL-4 の産生能は増加すると考えていたが、予想に反した結果となった。しかし BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスにおける IFN γ と IL-4 の産生量の比はハロタンの投与によって変化しておらず (data not shown)、ラットにおいてハロタンは T 細胞のマイトジェンに対する応答性を低下させること (Hamra and Yaksh, 1996) から、ハロタンの投与は脾臓における Th1 サイトカインと Th2 サイトカインのバランスに影響を与えないこと、Con A に対する応答性が減少し、IFN γ および IL-4 の産生量が低下することが明らかとなった。

肝毒性化合物を処置したマウスの脾臓細胞を無処置のマウスの肝実質細胞を共培養すると肝実質細胞から ALT が漏出するが、膜を隔てて培養することで

ALT の漏出が有意に減少することから、脾臓のT細胞が肝障害を誘導するにはT細胞と肝実質細胞の接着が必要であるといわれている (Xu et al., 2006)。本章における検討では脾臓の T 細胞が肝臓へ遊走され、肝実質細胞に接着し肝障害の発症に寄与する可能性を否定することはできないが、脾臓細胞における IFN γ と IL-4 の産生能はハロタンの投与によって減少しており、肝障害の誘導には脾臓が分泌するこれらサイトカインは関連しないのではないかと考えられる。

本章における検討はハロタンによって誘導される肝障害の感受性の高い BALB/c マウスにおいて脾臓細胞の IFN γ および IL-4 の産生能が低下することを明らかにした。次に I 章で変動の見られた遺伝子の発現の変動がハロタンによって誘導される肝障害に影響しているかどうか評価するために、III 章ではサイトカインの産生を PGE₁ の投与によって変動させ、肝障害の程度と遺伝子の発現変動について解析した。