

ニューキノロン系、マクロライド系、テトラサイクリン系の抗菌薬が有効である。しかし、網様体には効果があるが、基本小体には効かないので、治療には時日を要し、2～3ヵ月の治療が必要となる。

Ⅲ. 角膜の感染症

角膜は黒目の表面にある厚さ0.5mmの透明な膜であり、目のレンズとしての役割を担っている。そのため感染を生じた場合に視機能に対する影響が大きい。

1. 細菌性・真菌性角膜炎 bacterial keratitis, fungal keratitis

(1) 概要

以前は外傷などを契機として、細菌や真菌などの感染を生じることが多かったが、近年は汚染されたコンタクトレンズを原因とするものが増加してきており、特にコンタクトレンズ使用者の若年化に伴い、現在わが国の角膜感染症の好発年齢は10～20歳代になっている。真菌感染では植物による外傷やステロイド点眼使用などが発症に関与していることが多い。症状としては眼痛・充血・眼脂・視力低下などを訴える。真菌は細菌に比べて進行が緩徐であるが、逆に治療に対する反応が遅く、治癒するまでに時間がかかる。

(2) 原因菌

細菌性角膜炎の代表的な起炎菌としては、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌(カラー頁図3)、緑膿菌(カラー頁図4)などが代表的であるが、最近では結膜正常細菌叢の代表菌であるコアグラネゼ陰性ブドウ球菌(*coagulase-negative staphylococcus*: CNS)や、コリネバクテリウムのような病原性の低い細菌による感染も増加している。

角膜真菌症の代表的な起炎菌としては、酵母状真菌ではカンジダ、糸状真菌ではアスペルギルス(カラー頁図5)、フザリウム(カラー頁図6)などが挙げられる。

(3) 診断

軽症では角膜上皮欠損・浸潤・前房内炎症を認

め、重症例では角膜菲薄化・穿孔・前房蓄膿^{注4)}を認めることもある。真菌は少し盛り上がったかたい感染巣を生じ、辺縁は菌糸が伸びていくため境界が不整となるのが特徴である。感染であることを診断するのは比較的容易だが、適切な治療を行うための診断としては、角膜の感染病巣を擦過して鏡検(グラム染色)や培養にて起炎菌を同定することが重要である。真菌が疑われる場合は、ファンギフローラY^{注5)}染色のような真菌を特異的に染め出す染色法や、サブロー培地を使用した培養を考慮する必要がある。

(4) 治療

感染巣より分離された細菌・真菌に対して感受性を有する抗菌薬を投与するのが基本であるが、初診の時点ではこれは不明であるので、角膜擦過物の塗抹標本を鏡検して細菌性・真菌性か否かということ、およびそのおおまかな種類を判断し、お互いに抗菌スペクトラムが補完しあうような組み合わせの点眼(例:フルオロキノロン点眼+セフェム系点眼)の頻回点眼(1時間1回)で治療を開始し、それに対する反応や分離菌の薬剤感受性をみた上で、次の治療薬を選択していく。また重症例においては、点眼に加えて点滴静注を併用する。

角膜真菌症では抗真菌薬の投与が当然必要となる。眼科用剤としてピマリシン点眼・眼軟膏がある。アゾール系の薬剤(フルコナゾール、ミコナゾール、ポリコナゾール)、キャンディン系の薬剤(ミカファンギン)も用いられる。

2. 角膜ヘルペス herpetic keratitis

(1) 概要

角膜は表面側から上皮・実質・内皮の3層構造をとっており、無血管であるが神経が密に分布している。この神経は三叉神経の支配を受けており、角膜ヘルペスは三叉神経節に潜伏感染しているHSVが、この神経に沿って角膜に出てきて、種々の炎症を起こす病気である。HSVには1型と2型があり(HSV-1, HSV-2)、顔面の皮疹や口唇ヘルペスはHSV-1によるものが多く、性器ヘルペスはHSV-2によるものが多い。角膜ヘルペスはほとん

どHSV-1によるものであり、HSV-2によるものはきわめて珍しい。

角膜ヘルペスのもう一つの大きな特徴として、上皮でのウイルス増殖を主体とした病態(上皮型)と、実質でのウイルスに対する免疫反応を主体とした病態(実質型)があり、各々治療法が異なってくる事が挙げられる。

(2) 所見

1) 上皮型

特徴的な樹枝状角膜炎(dendritic keratitis)を呈し、角膜上皮が木の枝状の形態で脱落している像が認められ、辺縁に縁取りがある。典型例ではこの所見のみで診断がつく。ただ、遷延化すると上皮欠損が拡大し、地図状角膜炎(geographic keratitis)の形をとるが、その場合も全体が縁どられたような特徴は保たれている(カラー頁図7)。

2) 実質型

基本的な病型は円板状角膜炎であり、角膜中央部に白色の角膜後面沈着物¹⁶⁾を伴った境界不鮮明な角膜浮腫と実質混濁を生じる。周囲の結膜の充血も伴う。再発を繰り返すうちに血管侵入を生じた場合は、好中球の浸潤によりさらに強い混濁を生じるため、壊死性角膜炎といわれており、実質型の重症型といえる(カラー頁図8)。

これ以外に内皮を主体とした内皮型もあり、最近その病型を示す例が増えてきている。

(3) 診断

確定診断にはウイルス分離が必要だが、より簡便で感度のよい蛍光抗体法やPCRの方が最近是用いられることが多い。しかし、HSVは人体に潜伏しているため、PCR陽性だけでは診断できず、real-time PCRによる量的な評価が必要である。

角膜知覚低下は角膜ヘルペス診断を行う上で有力な検査で、特に何度も再発を繰り返している症例では、著明な角膜知覚の低下を認める。

(4) 治療

上皮型ではアシクロビル眼軟膏を使用するが、実質型ではそれに加えて免疫反応を制御するため副腎皮質ステロイド薬点眼の併用が必要である。薬物療法に反応しない強い瘢痕性の角膜混濁が残った場合は角膜移植術の適応となる。

3. アカントアメーバ角膜炎 acanthamoeba keratitis

アカントアメーバによる角膜感染症は、本来、外傷に伴うきわめて稀な疾患であったが、最近、コンタクトレンズ関連の感染が増加し、問題となっている。アカントアメーバは土壤中だけでなく、水道水中にも存在しており、コンタクトレンズ保存ケースがアカントアメーバに汚染されて感染を生じることが多い。アカントアメーバが感染する条件として、角膜上皮の欠損、アカントアメーバが増殖する際に栄養源として必要な細菌の存在、副腎皮質ステロイド薬などによるアカントアメーバ増殖を阻止する免疫反応の抑制などがあり、これらが重なってはじめて感染が成立する。アカントアメーバには栄養体(trophozoite)とシスト(cyst)の形態があり、生育条件が悪化するとシスト化し、種々の薬物治療に抵抗する。

初期には角膜中央部上皮に感染を生じ、上皮の点状・線状・斑状の混濁、偽樹枝状角膜炎¹⁷⁾を生じるが、特徴的な所見として放射状角膜神経炎(radial keratoneuritis)¹⁸⁾がある。初期から毛様充血・眼痛が強いのが特徴である。

角膜ヘルペスなどとはしばしば誤診されて、アメーバに対する治療がなされないまま経過すると、円板状浸潤(角膜中央に大きな横長楕円の浮腫と混濁を呈する)や輪状浸潤(角膜中央を中心とした同心円状の浸潤)を呈する完成期の状態となり、治療に抵抗する(カラー頁図9)。

治療としては抗アメーバ作用のある薬剤の点眼、抗真菌薬の投与を行うが、薬物治療の効果が低いため、この二つに加えて病巣搔爬を行うことが重要であり、3者併用療法とされている。治療には数ヶ月を要する。

IV. 涙道の感染症

1. 慢性涙囊炎 chronic dacryocystitis

鼻涙管閉塞症¹⁹⁾をベースに発症する。涙嚢内に貯留した涙液に細菌感染が生じ、膿が貯留した状態となっている。症状として流涙・眼脂を生じる。起炎菌としては肺炎球菌やブドウ球菌・レンサ球菌が多い。また、白内障などの眼内手術にあ

たつて、慢性涙嚢炎の存在を看過して手術にのぞくと、後述する術後眼内炎の発症につながる。

2. 急性涙嚢炎 acute dacryocystitis

慢性涙嚢炎が急性増悪した状態。炎症が涙嚢外に波及しており、涙嚢部周囲の発赤・疼痛、涙嚢部皮膚の発赤・腫脹を認める。抗菌薬の全身投与による治療が必要であり、重症例では皮膚側から穿刺排膿する。消炎後に原因となっている鼻涙管閉塞の治療を行う。



V. 眼球内の感染症

1. 細菌性・真菌性眼内炎 bacterial endophthalmitis, fungal endophthalmitis

(1) 概要

感染性眼内炎は細菌・真菌などによって生じる眼内の炎症であるが、放置すれば失明にいたる重篤な眼疾患である。体の他の部位からの転移で生じる転移性眼内炎(metastatic endophthalmitis)と、眼科手術によって生じる術後眼内炎(postoperative endophthalmitis)(カラー頁図10, 11)に大きく分けられる。

転移性眼内炎でもっとも多い起炎菌はカンジダ属であり、intravenous hyperalimentation (IVH) 留置者などで血行性に転移する。頻度は低いが細菌性のももあり、肺炎桿菌による肝膿瘍からの転移性眼内炎などが代表的である。

術後眼内炎は白内障などの内眼手術後に感染を生じるもので、現在の日本での頻度は0.05%あるいはそれ以下とされている。4大起炎菌としてCNS・MRSA・腸球菌・アクネ菌が知られている。特にMRSA・腸球菌は進行が早く、しかも薬剤の感受性が悪いため、硝子体手術^{注10)}の適応について早急に考慮する必要がある。

(2) 診断

・典型例の症状は充血・眼痛を伴った急激な視力低下である。前房内に多数の細胞やフィブリンを認め、多くの例で眼底透見が困難となる。真菌性の転移性眼内炎は進行が緩徐で、眼底に滲出斑・出血・硝子体混濁が認められる。

眼内の炎症が強く、感染が疑われた場合は硝子体サンプルを採取して培養に供するとともに、抗菌薬の硝子体注射や硝子体手術などの手段を早急にとる必要がある。遅発性のもの(アクネ菌などが原因)は、手術後数ヶ月で生じてくるため、治療へ向けての余裕はあるが、診断はかえって難しい。

(3) 治療

治療は抗菌薬・抗真菌薬の投与ということになるが、抗菌力が強く抗菌スペクトラムの広い薬剤の使用が勧められる。術後眼内炎についてはバンコマイシンとセフトラジムの硝子体注射が推奨されている。進行が早い例、重症例では即日の硝子体手術を考える。

真菌性眼内炎では、多くはカンジダがその起炎菌であるため、ホスフルコナゾールなどの投与が治療の原則であるが、眼科初診時すでに眼底が透見不能な例や、薬物治療に反応しない例では硝子体手術の適応となる。

(4) 予防

転移性の眼内炎の場合、IVH留置・肝膿瘍などの転移性眼内炎を起こす可能性のある患者では、血液培養や血中 β -D-グルカン測定(真菌性疑いの場合)を行い、自覚症状がない場合でも眼科を受診させることが重要である。

術後の眼内炎については、医療サイドが過誤を問われるケースも出てきており、手術器具の完全な滅菌、術者の手洗い、手術場の清浄化などにとめることはもちろんだが、大きな問題は、術後眼内炎の起炎菌の多くが患者由来であることである(結膜嚢やマイボム腺に存在する)。そのため、術前に抗菌点眼薬の点眼を行って結膜嚢の滅菌化をはかったり、術直前に希釈したヨード製剤による洗眼を行ったりすることが一般的だが、残念ながら、完全な無菌化を行うことは困難である。

2. 急性網膜壊死 acute retinal necrosis

VZVやHSVの網膜での感染によって生じる。世界ではじめての報告が日本の浦山らの報告であることから、浦山の恩師の名前を冠した桐沢型ぶどう膜炎(Kirisawa uveitis)の呼称が日本では広

く使用されているが、病態の首座からいうと急性網膜壊死の方が名称として合致している。

周辺部の網膜血管炎が広範に生じ、網膜壊死から、網膜裂孔、網膜剥離と進展して失明する。次のサイトメガロウイルス網膜炎と異なり、正常免疫のヒトに起こるのが特徴である。そのため、病態にウイルス増殖と免疫反応による炎症の両方が関与しており、炎症が強く、前眼部炎症や硝子体混濁も伴う。通常片眼性である。以前は原因が不明であったこともあり、非常に失明率の高い予後の悪い疾患であったが、原因ウイルスが判明してからはアシクロビルやバラシクロビルなどの抗ヘルペス薬と副腎皮質ステロイド薬の全身投与で治療可能な疾患となってきた。ただ、現在でも最終的に硝子体手術を要する症例が多い。

HSVによる急性網膜壊死はHSV-1よりもHSV-2で起こることが多い。なぜ2型が多いかは、その感染ルートを含めて解明されていない。

3. サイトメガロウイルス網膜炎 cytomegalovirus retinitis(カラー頁図12)

サイトメガロウイルス(cytomegalovirus: CMV)が原因の網膜炎で、免疫不全の患者に起こるのが大きな特徴である。AIDSの重要な症状の一つであるが、それに関しては近年HAART療法¹¹⁾の導入により、その頻度は減少している。臨床所見としては後極部血管を中心とした出血・滲出斑を特徴としており、ビザバイ様眼底(cheese & ketchup)といわれている。病変は後極部から周辺部に拡大することが多い。免疫不全で生じるため、両眼性が多く、硝子体混濁や前眼部炎症は認められないか、あってもごく軽度である。診断においては問診での免疫不全状態(HIV感染、臓器移植後、癌化学療法など)の把握が、特徴的な臨床所見とともに重要であり、さらに血清の抗CMV抗体価の上昇、PCRによるウイルスDNA検出、血清のCMV抗原血症の証明などによって診断する。治療はガンシクロビルやそのプロドラッグであるバルガンシクロビルなどの抗CMV薬の全身投与と、原因となっている免疫不全の改善による。免疫不全が改善していないと、

抗CMV薬でたとえ沈静化しても、その中止によって高率に再発する。

文 献

- 1) 大野重昭, ほか: ウイルス性結膜炎のガイドライン. 日眼会誌, 2003; 107: 1-35
- 2) 大橋裕一, ほか: 感染性角膜炎診療ガイドライン. 日眼会誌, 2007; 111: 769-808
- 3) 井上幸次: 角結膜の微生物学. 「角膜クリニック(第2版)」, 井上幸次・渡辺仁・前田直之・西田幸二編, P315-321, 医学書院, 東京, 2003.
- 4) 井上幸次: 日本眼科学会専門医制度・生涯教育講座 [総説33] 角膜ヘルペスの診断と治療. 日眼会誌, 2008; 24: 83-94
- 5) Kakimaru-Hasegawa A, et al.: Clinical application of real-time polymerase chain reaction for diagnosis of herpetic diseases of the anterior segment of the eye. Jpn J Ophthalmol, 2008; 52: 24-31
- 6) 井上幸次: 感染性角結膜炎. 「今日の治療指針(2008年版)」, 山口徹, 北原光夫, 福井次矢総編集, p1067-1068, 医学書院, 東京, 2008.
- 7) 井上幸次: 感染性眼内炎. 「今日の治療指針(2003年)」, 山口徹, 北原光夫総編集, p964-965, 医学書院, 東京, 2003.
- 8) 石橋康久, ほか: アカントアメーバ角膜炎の臨床所見一初期から完成期まで一. 日本の眼科, 1991; 62: 893-896
- 9) 塩田洋, ほか: アカントアメーバ角膜炎の臨床経過の病期分類. 臨床眼科 1994; 48: 1149-1154
- 10) Inoue Y, et al.: Preoperative Disinfection of the Conjunctival Sac with Antibiotics and Iodine Compounds: A Prospective Randomized Multicenter Study. Jpn J Ophthalmol, 2008; 52: 180-190
- 11) 浦山晃, ほか: 網膜動脈周囲炎と網膜剥離を伴う特異な片眼性ぶどう膜炎について. 臨眼, 1971; 25: 697-619
- 12) Itoh N, et al.: High prevalence of herpes simplex virus type 2 in acute retinal necrosis syndrome associated with herpes simplex virus in Japan. Am J Ophthalmol, 2000; 129: 404-405

注 釈

- 1) マイボーム腺: 眼瞼にある大きな脂腺で眼瞼に垂直に配列している。その開口部は睫毛のすぐ内側に並んでいる。マイボーム腺から分泌され

- る脂肪は涙膜の脂肪層を形成し、涙液の蒸散を妨げる重要な役割を担っている。
- 2) 濾胞：眼瞼結膜に認められるドーム状の隆起で、中央にリンパ球が集積しており、周辺に血管が認められる。特にウイルス感染やクラミジア感染で生じやすい。
 - 3) 乳頭増殖：眼瞼結膜の特に瞼板に接している部位に認められる細かい乳頭状の隆起突出で、結膜の炎症に伴って増殖し、ピロッド状に見える。重症のアレルギー性結膜炎では多数の乳頭が融合して巨大乳頭を形成する。
 - 4) 前房蓄膿：角膜と虹彩の間にある前房に好中球を主体とした多数の炎症細胞が出現し、これが下方にニボーを形成してたまったもの、感染の重篤性を示す一つの指標となる。
 - 5) ファンギフローラY*染色：真菌やアカントアメーバ壁に存在するキチンやセルロースに染着して蛍光色を発するスチルベンジルスルホン酸系の染色液を用いた染色法。塗抹標本に認められるわずかの真菌やアカントアメーバを見出すのに有用である。
 - 6) 角膜後面沈着物：リンパ球などの炎症細胞が角膜の前房側(内皮側)に集積したものであり、多数になると内皮の機能が障害されて角膜浮腫を伴う。活動性のある時は白色だが、沈静化するとpigmentを伴って茶色になる。
 - 7) 偽樹枝状角膜炎：樹枝状角膜炎がHSVによる角膜上皮病変として特徴的だが、HSV以外で樹枝状角膜炎に類似した病変を生じた時に偽樹枝状角膜炎と呼ばれている。アカントアメーバ以外に、VZV感染、角膜上皮接着不良、点眼毒性などで生じる。
 - 8) 放射状角膜神経炎：角膜最周辺部から中央へ向かって放射状に神経に沿って認められる線状の浸潤。アカントアメーバ角膜炎に特徴的で、アカントアメーバ角膜炎で患者が強い痛みを訴えることと関連すると言われているが、その病態はよくわかっていない。
 - 9) 鼻涙管閉塞症：目頭の皮下にある涙嚢から鼻腔への涙の通り道である鼻涙管が閉塞する疾患であり、先天性と後天性がある。涙の流れが阻害されることから流涙を生じるとともに、涙嚢での感染を誘発する。
 - 10) 硝子体手術：眼内(水晶体と網膜の間)を充填している硝子体は光が屈折しないためレンズとしての働きを有しておらず、切除しても視機能に影響しない。そのため、出血や混濁を生じてきた場合はこれを切除して治療する。眼内炎では菌の培地と化している硝子体を全部とることが排膿するという意味合いから非常に重要である。硝子体手術はこのような硝子体切除だけでなく、網膜へのレーザーや増殖膜処理などのさまざまな処置をすべて包含した名称である。
 - 11) HAART療法：highly active anti-retroviral therapyの略。複数の抗HIV薬を組み合わせる投与方法で、これによってHIV感染者の予後が大きく改善した。ただ、副作用や薬剤耐性、高額の治療費などの問題は依然として残っている。

特集 耐性菌講座—外来で耐性菌と戦う—

標準的治療における抗菌薬の外来使用の適応

眼科感染症

井上幸次

鳥取大学医学部医学科視覚病態学 教授

治療(J.Thérap.)別刷

Vol.90, No.11 <2008.11>

株式会社 南山堂

標準的治療における抗菌薬の外来使用の適応

眼科感染症

井上幸次

鳥取大学医学部医学科視覚病態学 教授

SUMMARY

眼科では抗菌薬点眼が使用できるため、結膜炎では1種類、角膜炎では2種類の点眼を併用して治療を行うのが標準である。中等症以上の角膜炎では全身投与も併用する。眼内炎では硝子体手術とともに、抗菌薬硝子体注入が有効である。抗菌薬点眼の長期投与やニューキノロン系点眼への偏りが問題となっており、改善が必要である。MRSA感染に対してはクラムフェニコール点眼やバンコマイシン点眼・眼軟膏を使用する。

I. 眼科における感染治療の特殊性

眼科では他科領域と異なり、多様なルートでの局所抗菌薬投与が可能である(点眼・結膜下注射・涙嚢洗浄・硝子体注入など)。とくに点眼薬が使用できるということが大きな強みである。ただ、点眼薬の投与は医師にとっても患者にとっても容易に行えるために、逆に過剰に投与したり、必要もないのに漫然と投与したりすることが起こりがちである。極端な例をあげると、さすと気持ちがよいというだけで延々と抗菌点眼薬を使用している患者もいるぐらいである。抗菌点眼薬の濃度はminimum inhibitory concentration (MIC) や mutation prevention concentration (MPC) をはるかに上回る濃度であるため、耐性化は起こりにくいとの考えもあるが、実際にはその高い濃度がずっと保たれるわけではないので、ある時間帯に、どこかの部位(たとえば点眼された抗菌薬は

鼻涙管を介して鼻へ流れていき、しだいに薄まっていって、その経路の途中で) MIC と MPC の間の濃度 (mutation selection window : MSW) にはまってしまう可能性がある。

もう一つの眼科の特殊性として、いったん感染症が生じて悪化すると、うまく治療できたとしても、中間透光体の透明性の低下や網膜の機能低下を招き、肝心の視機能が損なわれてしまうことがあげられる。そのために、眼感染症に関しては予防投与や感染初期からの強力な抗菌薬投与が必要ながあり、他科の目から見ると、過剰投与といわれかねないケースも出てくる。耐性菌対策という観点からはこれは問題であるが、そのような眼科感染症の特殊性も考慮しつつ、過剰にならない適正な治療が必要であろう。

II. 眼科の主要感染症と標準的治療

① 細菌性結膜炎

細菌性結膜炎では、眼脂を伴った充血を生じる。理想的には結膜ぬぐい液あるいは眼脂を塗抹

検鏡・培養に供し、感受性を確認して治療を行うべきだが、実際には1種類の抗菌点眼薬で empiric に治療を開始することが多く、それで多くは軽快

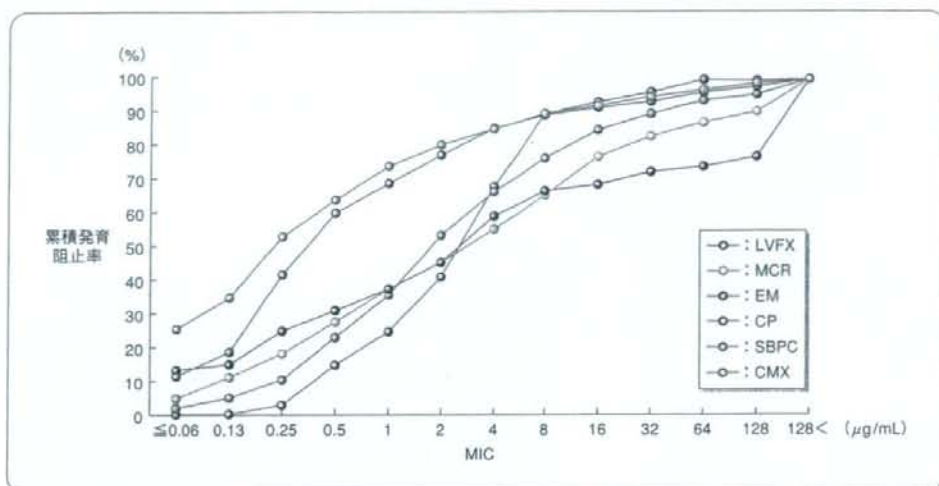


図1 細菌性結膜炎検出菌に対する累積発育阻止率曲線
全429株に関するデータである。

LVFX:レボフロキサシン, MCR:ミクロノマイシン, EM:エリスロマイシン, CP:クロラムフェニコール, SBPC:スルベニシリン, CMX:セフメノキシム (文献1)より)

する。現在の日本での細菌性結膜炎の検出菌に対して、点眼薬として利用できる各系統の抗菌薬の累積発育阻止率曲線を調べた結果から、ニューキノロン系点眼・セフェム系点眼が推奨される(図1)¹⁾。最初の治療に反応しない場合は起炎菌の感受性を見る原則に従って治療を行う。ただし、結膜には常在細菌叢があるので、結膜から検出された微生物が原因であるかどうかの判断については臨床所見や経過を合わせて総合的に診断することが重要である。

結膜炎では抗菌薬点眼による治療が主体となり、全身投与を考慮することはまずないが、淋菌による結膜炎は例外であり、多量の膿性眼脂を認め、急速に進行して角膜穿孔をきたすこともあるので、セフトキシム(ロセフィン[®])全身投与を併用する。

2) 角膜炎

角膜感染部位に好中球浸潤を伴った濃厚な混濁や浮腫を生じ、眼脂、眼痛と視力低下を伴う。重症例では治癒してもかなりの瘢痕性の混濁が残る。

角膜病巣を擦過し、塗抹検鏡・培養に供するが、最初は起炎菌とその感受性は不明であるので、臨床所見と塗抹検鏡から起炎菌をおおまかに想定して、empiricに治療を開始する。抗菌点眼薬は系統の異なるもの2種類を組み合わせるが、一般にニューキノロン系点眼とセフェム系点眼の組み合わせが多く使用されている。軽症例の起炎菌としては表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、モラクセラ(*Moraxella*)などが多く、抗菌点眼薬の頻回点眼で治る。中等症例では黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、 α 連鎖球菌(*α -streptococcus*)など、重症例では肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)などを想定して治療を開始する。中等症以上では点滴を併用したほうがよい。また、緑膿菌に特徴的な輪状膿瘍・前房蓄膿を認めるような例では、ニューキノロン系点眼とアミノグリコシド系の点眼を併用し、カルバペネム系の点滴静注を行う。

③ 眼内炎

感染性眼内炎は細菌・真菌などによって生じる眼内の炎症であるが、放置すれば失明に至る重篤な眼疾患である。体のほかの部位からの転移で生じる転移性眼内炎と、眼科手術によって生じる術後眼内炎に大きく分けられる。ここでは術後眼内炎について述べる。

術後眼内炎は白内障などの内眼手術後に感染を生じるもので、真菌性はまれで細菌性がほとんどである。わが国の術後眼内炎の4大起炎菌としてコアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative *Staphylococci*)・メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)・腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)・アクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) が知られている。治療としては抗菌薬の硝子体注入や抗菌薬灌流下の硝子体手術が主体となる。硝子体注入としては

バンコマイシン (1mg/0.1mL) とセフトジジム (モダジシム®: 2.25mg/0.1mL) を使用するのが標準である。通常感染症治療では、バンコマイシン使用はMRSAと判明した場合に限られているが、眼内炎の場合は時間単位で悪化し、完全失明も含めて大きな視力障害を残すため、術後眼内炎であればほぼ全例でバンコマイシンが使用されている。

このような眼内炎の起炎菌の多くは患者由来であるため、眼内炎の発症を予防するために、術前3日の抗菌薬点眼と術直前のヨード製剤による洗眼が推奨されている²⁾。ヨーロッパでは眼内炎の発症予防に術直後にセフロキシムを前房内投与する方法が行われており、眼内炎の発症頻度を低下させた確固たるevidenceがある³⁾が、わが国では、その手法の是非について、まだいろいろ議論が行われている段階である。

Ⅲ. 耐性化に配慮した治療

① ニューキノロン系点眼のみに頼らない治療

ニューキノロン系点眼薬が多用されているが、状況に応じてアミノグリコシド系やマクロライド系など系統の異なる点眼薬を使用した方がよい。とくにアミノグリコシド系は点眼のような高濃度では強いpostantibiotic bactericidal effectを示し、有用である⁴⁾。また、マクロライド系はアクネ菌などにきわめて有効であり¹⁾、バイオフィルムへの浸透性を高める作用などもある。

② 長期点眼投与の回避

漫然と抗菌薬点眼薬を使用することは避けるべき

である。たとえば現在わが国では、白内障手術後の抗菌薬点眼薬投与が2~3ヵ月、場合によってはそれ以上の期間行われているが、1ヵ月以内に短縮していくべきであろう。それ以外にも眼の違和感を訴える高齢者に長期の抗菌薬点眼薬投与が行われている実態があるが、必要最小限の使用を心がける必要がある。全身・局所の免疫抑制のため、どうしても長期投与が必要な場合は、抗菌薬の種類を順次変えていくcyclic therapyを行う。点眼薬のcyclic therapyの期間についてのevidenceはないが、3ヵ月ほどが目安であろうか。

IV. 耐性菌に対する治療

前述したように、抗菌点眼薬・眼軟膏の濃度は非常に高いため、MICで耐性と判定されても臨床的に効くこともよくあるので、実際に効果のある場合はその治療を継続してよい。

眼科領域では幸い、多剤耐性緑膿菌 (MDRP: multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE: vancomycin-resistant *Enterococci*) による感染の報告はなく、ペニシリン中等度耐性肺炎球菌 (PISP: penicillin-intermediate *Streptococcus pneumoniae*) / ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP: penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*)、 β -ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌 (BLNAR: beta-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*) などは分離されているものの、治療上の大きな問題は生じていない。また、結膜囊常在菌のコリネバクテリウムのニューキノロン耐性化が問題となっているが、コリネバ

クテリウムの病原性が低いために、特殊な例を除いてこれもあまり大きな問題となっていない。

やはり一番の問題はMRSAによる結膜炎・角膜炎であるが、多くのMRSAは現在全科的にほとんど使用されていないクロラムフェニコールに対する感受性を有しており、市販点眼としてクロラムフェニコール点眼 (オフサロン®点眼, コリマイ®C点眼) が利用できる。アルベカシンやバンコマイシンを生理食塩水に溶解して点眼として使用することもある (0.5%)。また、バンコマイシンは時間依存性の薬剤であり、滞留性を長くすると効果があがるため、眼軟膏の形にすると有効性があがるのが期待できる。バンコマイシン眼軟膏はオフロキサシン (タリビッド®) 眼軟膏に静注用のバンコマイシンを混ぜて自家作製できる⁵⁾。さらにMRSA眼感染に対する orphan drug としてバンコマイシン眼軟膏の治療が終了し、現在申請中である。



参考文献

- 1) 松本治恵, 井上幸次, 大橋裕一, 臼井正彦, COI細菌性結膜炎検出菌スタディグループ: 多施設共同による細菌性結膜炎における検出菌動向調査. あたらしい眼科, 24: 647-654, 2007.
- 2) Inoue Y, Usui M, Ohashi Y, Shiota H, Yamazaki T for the Preoperative Disinfection Study Group: Preoperative disinfection of the conjunctival sac with antibiotics and iodine compounds: A prospective randomized multicenter study. Jpn J Ophthalmol, 52: 151-161, 2008.
- 3) Endophthalmitis Study Group: European Society of Cataract & Refractive Surgeons. Prophylaxis of postoperative endophthalmitis following cataract surgery: results of the ESCRS multicenter study and identification of risk factors. J Cataract Refract Surg, 33: 978-988, 2007.
- 4) 砂田淳子, 他: 感染性角膜炎全回サーベイランス分離菌における薬剤感受性と市販点眼薬の postantibiotic effect の比較. 日眼会誌, 110: 973-983, 2006.
- 5) 外園千恵: バンコマイシンの自家調整眼軟膏の調整法と使用方法について教えてください. あたらしい眼科, 17 (臨増): 46-48, 2000.

Demonstration of cooperative contribution of MET- and EGFR-mediated STAT3 phosphorylation to liver regeneration by exogenous suppressor of cytokine signalings^{q, q q}

Ekihiro Seki^{1,2,3}, Yuichi Kondo^{1,2}, Yuji Iimuro¹, Tetsuji Naka⁴, Gakuhei Son¹,
Tadamitsu Kishimoto⁵, Jiro Fujimoto¹, Hiroko Tsutsui⁶, Kenji Nakanishi^{2,*}

¹Department of Surgery, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan

²Department of Immunology and Medical Zoology, Hyogo College of Medicine, 1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya 663-8501, Japan

³Department of Medicine, University of California, San Diego, School of Medicine, CA 92093-0702, USA

⁴Department of Molecular Medicine, Osaka University Graduate School, Osaka, Japan

⁵Osaka University Graduate School, Osaka, Japan

⁶Department of Microbiology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan

Background/Aims: As conditional knockout mice for *stat3* are impaired in liver regeneration after partial hepatectomy while those for *gp130* have defects in early STAT3 phosphorylation but have normal DNA synthesis, late STAT3 phosphorylation induced independently of *gp130* seems to be essential for liver regeneration. Since HGF and EGF can activate STAT3 via *gp130*-independent MET and EGFR, respectively, we assumed that these factors account for STAT3-dependent liver regeneration. Here, we investigated this hypothesis by introducing suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS3, potent negative regulators of STAT3 signaling, selectively in hepatocytes.

Methods: We generated recombinant adenoviruses expressing *socs1* and *socs3*.

Results: Hepatocytes infected with *socs1*-virus lacked STAT3 phosphorylation in response to IL-6 and HGF, while cells infected with *socs3*-virus lacked the response to all of IL-6, HGF and EGF, indicating that those SOCS proteins differently regulate EGFR signaling. Mice infected with *socs3*-virus exhibited severe and persistent impairment while those with *socs1*-virus showed only delayed regeneration, indicating requirement of both MET and EGFR signalings.

Conclusions: These results clearly demonstrated that MET- and EGFR-mediated STAT3 signalings cooperatively contribute to liver regeneration and could provide new insights into tissue homeostasis.

© 2007 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: SOCS1; SOCS3; Adenovirus vector; ERK1/2; Hepatocyte

Received 7 June 2007; received in revised form 20 July 2007; accepted 9 August 2007; available online 5 November 2007

Associate Editor: P.-A. Clavien

^q The authors declare that they do not have anything to disclose regarding conflict of interest with respect to this manuscript.

^{q q} This work was supported in part by Grants and a Hitec Research Center Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and Collaborative Development of Innovation Seeds from Japan Science and Technology Agency in Japan.

* Corresponding author. Tel.: +81 798 45 6574; fax: +81 798 40 5423.

E-mail address: nakaken@hyo-med.ac.jp (K. Nakanishi).

Abbreviations: gp, glycoprotein; PHx, partial hepatectomy; SOCS, suppressor of cytokine signaling; JAK, Janus-activated kinase; moi, multiplicity of infection; Ab, antibody.

0168-8278/\$32.00 © 2007 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jhep.2007.08.020

1. Introduction

Orchestrated activation of a signal network connecting cytokines, cell cycle transition, and growth factors is essential for homeostatic liver regeneration after liver resection or injury [1–3]. Immediately after liver resection or massive liver damage, nonparenchymal cells produce IL-6-related cytokines [1–6], and quiescent liver parenchymal cells start to replicate in response to various growth factors, such as HGF and EGF, via activating MET and EGFR, respectively [1–7]. These events converge into homeostatic liver regeneration. Conditional knockout mice for gene encoding glycoprotein (gp) 130, the common signaling component of receptors for IL-6-related cytokines, have severe defects in the early activation of STAT3 but are intact for DNA synthesis after partial hepatectomy (PHx) [8], indicating that gp130-mediated early STAT3 phosphorylation is dispensable for DNA synthesis. In contrast, conditional knockout mice for *stat3* have severe impairment in DNA synthesis [9], demonstrating the importance of STAT3 in the replication of hepatocytes. These observations allow us to assume that the early and late STAT3 phosphorylations in hepatocytes are induced by the gp130-dependent and -independent signalings, respectively, and that factors other than IL-6-related cytokines are essential for liver regeneration by inducing late STAT3 phosphorylation independently of gp130.

Suppressor of cytokine signaling (SOCS) is a family of intracellular molecules that negatively regulates various signal pathways [10–12]. SOCS1 and SOCS3 play their own roles in different biological situations by negatively regulating partially overlapped signal pathways [13–15]. SOCS1 binds to Janus-activated kinase (JAK) family members to negatively regulate various cytokine signalings, such as IL-6-induced STAT3 phosphorylation [13–16], while SOCS3 strongly interacts with activated cytokine receptors, such as gp130, to negatively regulate STAT3 phosphorylation [14–18]. Because HGF and EGF induced post PHx activate STAT3 via gp130-independent receptors, MET and EGFR, respectively [19–21], we assumed that MET- and EGFR-mediated signalings might account for the gp130-independent STAT3 phosphorylation. Here, we assessed this assumption by hepatocyte-selective introduction of SOCS1 and SOCS3. Infection of hepatocytes with recombinant adenoviruses expressing *socs1* only inhibited HGF-induced STAT3 phosphorylation, while those infected with recombinant virus expressing *socs3* could inhibit both EGF- and HGF-induced STAT3 phosphorylation. After PHx mice with exogenous SOCS3 exhibited persistently abolished DNA synthesis and liver mass restoration, those with ectopic SOCS1 expression showed only delay of these responses. These results indicated that absence of both MET- and EGFR-mediated STAT3 signalings almost completely abrogated liver regeneration and that

absence of the MET-mediated STAT3 phosphorylation alone induces only slow-onset liver regeneration. These results demonstrated that the MET- and EGFR-mediated signalings cooperatively evoke liver regeneration process and shed light on the molecular mechanism for tissue homeostasis.

2. Experimental procedures

2.1. Mice

C57BL/6 mice were purchased from Clea Japan (Osaka, Japan). Six- to eight-week-old male mice were used. All mice were maintained under specific pathogen-free conditions, and received humane care as outlined in the Guide for the Care and Use of Experimental Animals in Hyogo College of Medicine.

2.2. Construction of recombinant adenovirus

Recombinant adenoviruses expressing genes encoding GFP (AxCA-GFP), murine SOCS1 (AxCA-SOCS1) and murine SOCS3 (AxCA-SOCS3), which contain a CAG promoter (chicken β -actin promoter with cytomegalovirus enhancer), were grown in 293 cells and prepared as shown previously [22]. AxCA-GFP was gifted from Dr. K. Ikeda at Osaka City University (Osaka, Japan). Viral titers were determined by optical densitometry (particles/ml) and by plaque-forming assay on HEK293 cells [22].

2.3. Adenovirus infection and operation procedure

Recombinant virus solution was injected ($5 \cdot 10^8$ pfu in 0.2 ml) into mice via a tail vein (Supplementary Fig. 1A). At 48 h after infection, mice underwent 70% hepatectomy [4]. At the indicated time points after operation, serum and liver specimens were sampled. In some experiments, we measured the liver weight and calculated liver/body weight ratio [4]. Five to seven mice were used for each experimental group.

2.4. Hepatocyte preparation

Cdls ($5 \cdot 10^6$ /ml) of hepatocytes were incubated with various adenoviruses at 50 of multiplicity of infection (moi) for 3 h [2]. The hepatocytes were incubated with recombinant murine IL-6 (20 ng/ml), EGF (20 ng/ml) or HGF (20 ng/ml) (R&D systems, Minneapolis, MN) for 15 min for detection of STAT3 phosphorylation. The culture medium generally used in this study is William E medium containing 15% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine [23].

2.5. [3 H]-TdR incorporation assay

The hepatocytes were incubated with EGF (20 ng/ml) and HGF (20 ng/ml) for 48 h, during last 16 h with [3 H]-TdR, and incorporated [3 H]-TdR was counted [24]. Stimulation index was calculated as follows: Stimulation index = [3 H]-TdR incorporated in sample cells (cpm)/[3 H]-TdR incorporated in control cells (cpm).

2.6. Western blot analysis

Protein electrophoresis, protein transfer, and detection by Western blot were performed [4]. The primary Abs used were: anti-phosphotyrosine STAT3 Ab, anti-STAT3 Ab, anti-phospho ERK and anti-ERK from Cell Signaling (Beverly, MA), anti-cyclin D1 Ab (sc-717) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and anti-SOCS1 Ab and anti-

SOCS3 Ab from IBL (Gumma, Japan). Secondary anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated Abs were used at dilution of 1:2000 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

2.7. Immunohistochemistry

BrdU analyses were performed as shown previously [4]. Liver specimens prepared from mice infected with AxCA-GFP 48 h before were fixed, frozen sections were incubated with rhodamine-conjugated anti-mouse F4/80 mAb (Biomedical AG, Augst, Switzerland), and immunofluorescence study was performed as shown previously [25].

2.8. Mitotic index

Liver sections were stained with hematoxylin and eosin, and mitotic hepatocytes in 30 high-power fields were counted. Average mitotic hepatocyte cell number in a high-power field was regarded as mitosis index [4].

2.9. Statistical analysis

All data are shown as means \pm SD. Significance between control and experimental groups was examined with the unpaired Student's *t* test. *p* values less than 0.05 were considered significant. The representative data are shown. The similar results were obtained in two to three separate experiments.

3. Results

3.1. Exogenous SOCS1 and SOCS3 differentially regulate responses to HGF and EGF in hepatocytes

We generated recombinant adenoviruses expressing *socs1* and *socs3* in order to introduce those genes selectively in liver parenchymal cells [26]. First, we confirmed that infection with AxCA-SOCS1 and AxCA-SOCS3 is able to induce production of SOCS1 and SOCS3 proteins, respectively, in primary cultured hepatocytes in a dose-dependent manner (Fig. 1A). Hepatocytes infected with mock virus, AxCA-GFP, showed STAT3 phosphorylation upon stimulation with IL-6, while those infected with AxCA-SOCS1 or AxCA-SOCS3 exhibited abrogated STAT3 phosphorylation (Fig. 1B), indicating that exogenous SOCS1 and SOCS3 inhibit the gp130-mediated STAT3 phosphorylation.

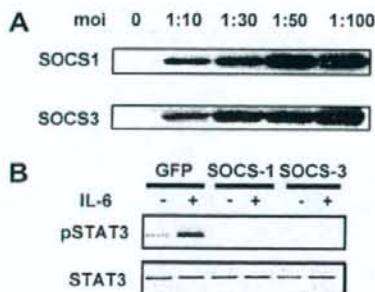


Fig. 1. Overexpressed *socs1* and *socs3* negatively regulate IL-6-induced STAT3 phosphorylation. (A) Primary cultured hepatocytes were incubated with AxCA-SOCS1 (SOCS1) or AxCA-SOCS3 (SOCS3). SOCS1 and SOCS3 protein levels were determined by immunoblotting. (B) Hepatocytes infected with AxCA-GFP (GFP), AxCA-SOCS1 or AxCA-SOCS3 were incubated with IL-6. Phosphorylated STAT3 (pSTAT3) or total STAT3 (STAT3) expressions were determined.

phorylation upon stimulation with IL-6, while those infected with AxCA-SOCS1 or AxCA-SOCS3 exhibited abrogated STAT3 phosphorylation (Fig. 1B), indicating that exogenous SOCS1 and SOCS3 inhibit the gp130-mediated STAT3 phosphorylation.

We wanted to know whether these exogenous SOCS proteins negatively regulate STAT3 phosphorylation in response to HGF or EGF. Hepatocytes infected with the mock virus showed STAT3 activation (Fig. 2A). By contrast, hepatocytes with ectopic expression of SOCS3 lacked STAT3 phosphorylation in response to both EGF and HGF (Fig. 2A), while those with ectopic *socs1* lacked it only in response to HGF but showed normal response to EGF (Fig. 2A), indicating that exogenous SOCS1 has narrowly limited target molecules as compared with SOCS3. Because both HGF and EGF can activate MAPK pathways [27,28], we analyzed ERK1/2 phosphorylation. HGF and EGF almost equi-

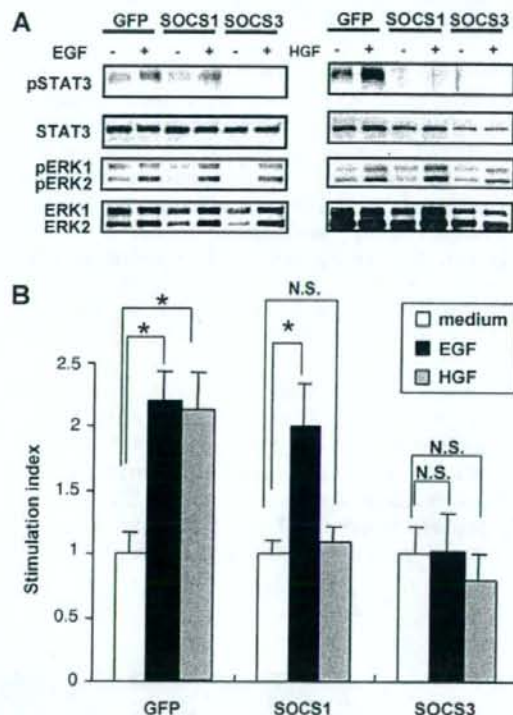


Fig. 2. Differentially impaired proliferative response to HGF and EGF in hepatocytes overexpressing SOCS1 and SOCS3. AxCA-GFP-, AxCA-SOCS1-, or AxCA-SOCS3-infected hepatocytes were incubated with HGF or EGF. Phosphorylated STAT3, total STAT3, phosphorylated (pERK1/2) and total ERK2 (ERK2) expressions were determined by immunoblotting (A). Primary cultured hepatocytes infected with AxCA-GFP, AxCA-SOCS1 or AxCA-SOCS3 were incubated with HGF or EGF and [³H]-TdR incorporation in each experimental group was measured (B). Asterisks indicate *p* < 0.05. N.S. indicates not significant.

alently activated ERK1/2 in hepatocytes infected with all types of viruses (Fig. 2A), indicating that SOCS1 and SOCS3 proteins do not profoundly regulate the ERK1/2 phosphorylation.

Next, we investigated proliferative response to HGF and EGF. As expected, the mock virus-infected hepatocytes proliferated in response to HGF and EGF (Fig. 2B). By contrast, hepatocytes with exogenous SOCS3 failed to proliferate to both HGF and EGF, while the cells with excessive SOCS1 did not proliferate to HGF but could proliferate in response to EGF (Fig. 2B). Thus, there seems to be a positive correlation between STAT3 phosphorylation and DNA synthesis. Collectively, these results suggested that both SOCS1 and SOCS3 proteins inhibit hepatocyte proliferation by hampering the MET-mediated STAT3 activation and that only SOCS3 inhibits it by simultaneous abrogation of the EGFR-mediated STAT3 phosphorylation.

3.2. Exogenous SOCS1 or SOCS3 inhibits STAT3 phosphorylation but not ERK1/2 activation after PHx

Introduction of SOCS3 inhibits both MET- and EGFR-mediated STAT3 phosphorylation, suggesting SOCS3 inhibition of liver regeneration. Accordingly, we investigated whether the recombinant adenovirus introduces recombinant protein selectively in liver parenchymal cells. Those vectors preferred the liver to heart, lung, kidney and spleen (Supplementary Fig. 1B). Morphologically most of all GFP-positive cells are liver parenchymal cells (Fig. 3A). Immunohistochemistry for F4/80, a macrophage marker, on liver sections of mice infected with AxCA-GFP revealed that GFP-positive cells were primarily negative for F4/80 (Fig. 3B and C), demonstrating selective infection of liver parenchymal cells, but rarely Kupfer cells. These results indicated that the adenovirus is suitable to induce SOCS1 and SOCS3 proteins selectively in hepatocytes.

Next, we investigated whether exogenous SOCS1 and SOCS3 proteins influence STAT3 phosphorylation in the remnant liver after PHx. Consistent with our previ-

ous report [4], STAT3 was phosphorylated with peak around 2–6 h in control mice (Fig. 4A and B). This is also the case for the liver of mice infected with the control vector (Fig. 4A and B). By contrast, the early STAT3 activation was absent in AxCA-SOCS1- and AxCA-SOCS3-infected mice (Fig. 4A and B). The SOCS proteins were only detectable in the remnant liver homogenates prepared from mice infected with the individual socs viruses (Fig. 4A and B), although Northern blot analysis revealed the increased mRNA expressions in control mice (Supplementary Fig. 2). As the early STAT3 phosphorylation depends on gp130 [8], absence of these STAT3 phosphorylations in mice with ectopic expressions of SOCS proteins seemed to be due to the abrogated gp130-mediated STAT3 phosphorylation in hepatocytes (Fig. 1B).

Because MAPK pathway is also important for liver regeneration and is potently activated by both MET- and EGFR-mediated signals [27,29] we investigated whether exogenous SOCS1 and SOCS3 regulate this signal pathway. After PHx ERK1/2 phosphorylation was induced almost equivalently in mice with ectopic expression of socs1 or socs3 as in uninfected or the mock virus-infected control mice (Fig. 4C). Collectively, these results indicated that the introduction of SOCS1 or SOCS3 inhibits STAT3 activation, but not ERK phosphorylation, both in vitro (Fig. 2) and in vivo (Fig. 4).

Although IL-6 promptly induced after PHx is involved in the early STAT3 phosphorylation [1–3], there were no significant differences of increase in serum IL-6 among variously treated mice (Supplementary Fig. 3), indicating normal activation of the TLR/MyD88-signaling.

3.3. Impaired DNA synthesis in hepatocytes

Next, we investigated whether the enforced expression of SOCS1 or SOCS3 in hepatocytes inhibits their replication after PHx. To test this we counted BrdU-incorporated hepatocytes. Consistent with our previous reports [4], both uninfected and the mock virus-infected

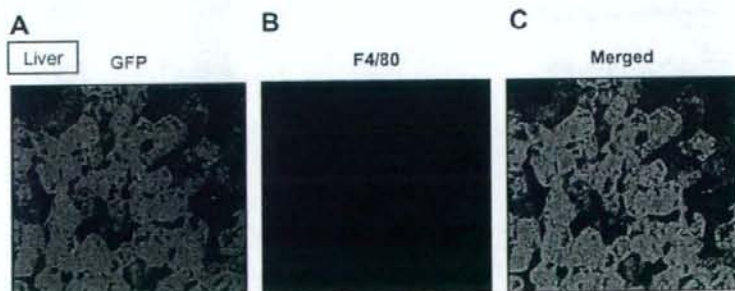


Fig. 3. Preferential infection of liver parenchymal cells with the vector virus. Mice were inoculated with $5 \cdot 10^8$ pfu of AxCA-GFP. Liver sections were incubated with rhodamine-labeled anti-F4/80. AxCA-GFP-infected cells are in green (A) and Kupfer cells are in red (B). (C) is a merged image of (A) and (B).

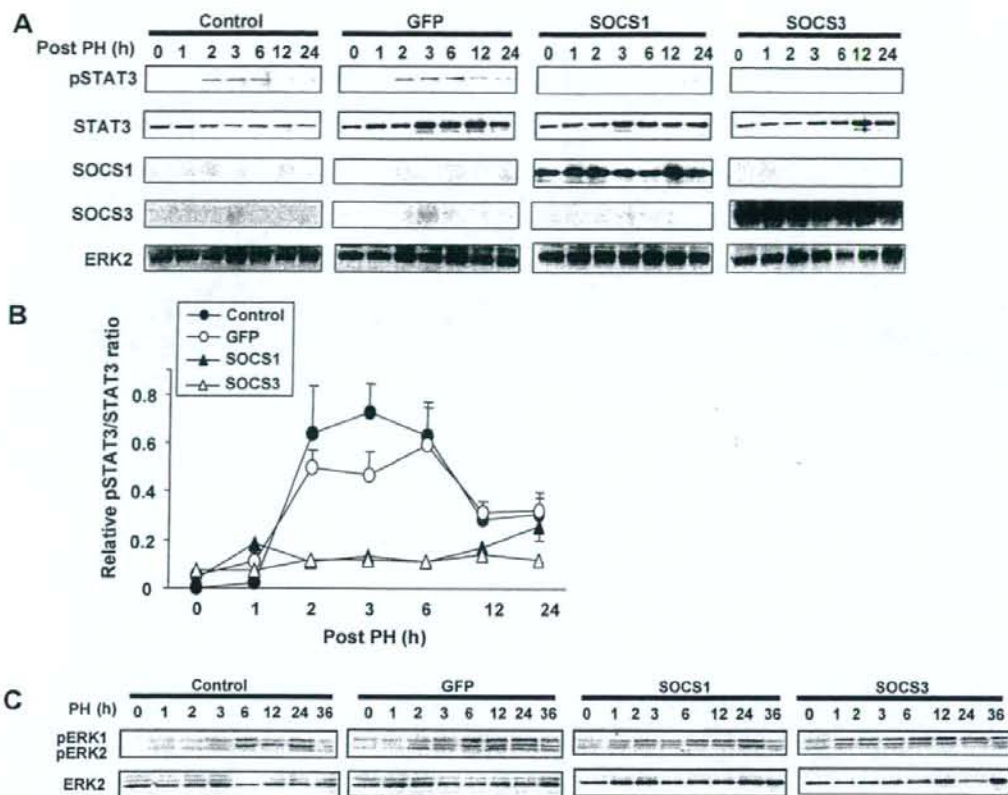


Fig. 4. Impaired STAT3 phosphorylation in mice overexpressing SOCS1 or SOCS3 after PHx. Mice were infected without (closed circles) or with AxCA-GFP (open circles), AxCA-SOCS1 (closed triangles) or AxCA-SOCS3 (dotted triangles). (A and B) At the indicated time points after PHx, the remnant livers were removed. Phosphorylated, total STAT3, SOCS1 and SOCS3 were determined by immunoblotting (A). The individual image intensities were measured, and each relative pSTAT3/total STAT3 ratio was calculated (B). (C) At the indicated time points after PHx the remnant livers were removed. Phosphorylated and total ERK2 were determined by immunoblotting.

control mice showed increase in BrdU index (Fig. 5A and B). By contrast, AxCA-SOCS1- and AxCA-SOCS3-infected mice showed severe and complete impairment in increase of BrdU index, respectively (Fig. 5A and B), indicating that the hepatic introduction of *socs1* and *socs3* impairs DNA synthesis.

We also counted mitotic hepatocytes. The control mice showed an increase in mitosis index with a peak at 48 h (Fig. 5C–E). However, AxCA-SOCS1-infected mice exhibited severe impairment in mitotic index at 48 h but comparable index at 72 h as in control mice at 48 h (Fig. 5C–E), indicating that exogenous SOCS1 causes delay in hepatocyte mitosis. In agreement with the data of BrdU index (Fig. 5A and B), AxCA-SOCS3-infected mice had continuous abrogation of the hepatocyte mitotic responses (Fig. 5A–C), indicating that exogenous SOCS3 represses the hepatocyte mitosis. These results indicated that exogenous SOCS1 and SOCS3 cause the delay and the absence of DNA synthesis, respectively. Collectively, these results suggested that

the recovery of DNA synthesis in AxCA-SOCS1-infected mice at a late phase is, at least partly, attributable to the normal EGFR-mediated signalings and that absence of both MET- and EGFR-mediated STAT3 signalings completely abrogates DNA synthesis.

3.4. Impaired cell cycle entrance

Since cell cycle progression is important for hepatocyte replication [1–3], we investigated the cell cycle entrance in the remnant liver of variously treated mice. We performed immunoblotting analyses for cyclin D1 that regulates the transition from G0/G1 to S phase [3]. Control or the mock virus-infected mice showed normal increase in cyclin D1 expression (Fig. 5E). However, cyclin D1 induction was seriously impaired in AxCA-SOCS1- and AxCA-SOCS3-infected mice at least until 72 h (Fig. 5E). These results indicated that the SOCS1 and SOCS3 proteins introduced inhibit cell cycle entrance after PHx.

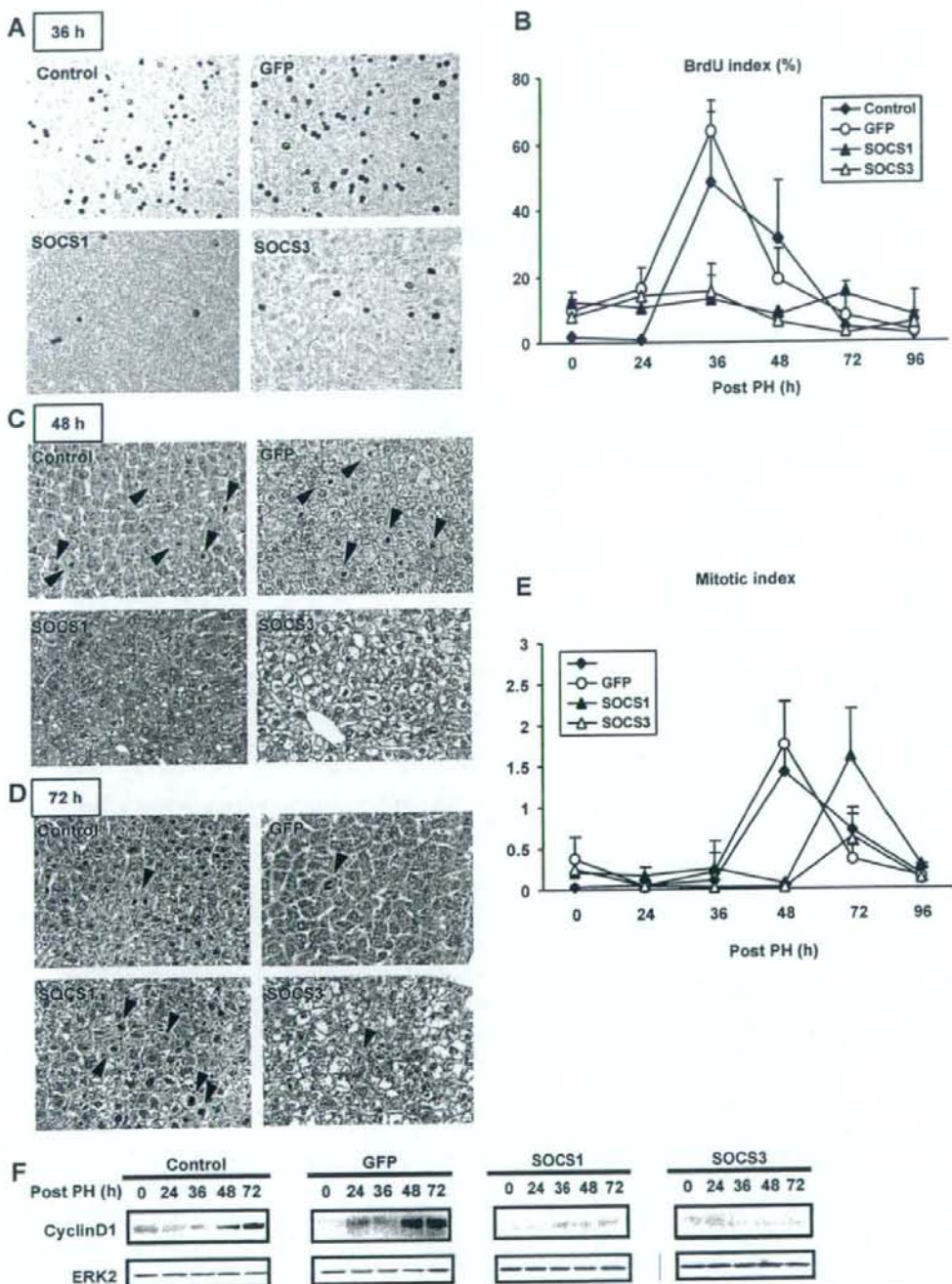


Fig. 5. Impaired DNA synthesis in SOCS1- or SOCS3-overexpressed mice. (A) BrdU was injected at 34 h after PHx, and liver specimens were sampled at 2 h later. BrdU-incorporated nuclei were stained in dark brown. Original magnification is 200 \times . (B) BrdU indices (percentage of BrdU-positive hepatocyte number to total hepatocyte number) were calculated in uninfected mice (closed diamonds; Control) or mice infected with AxCA-GFP (open circles), AxCA-SOCS1 (closed triangles) or AxCA-SOCS3 (open triangles) at the indicated time points after PHx. (C and D) Liver specimens were sampled at 48 h (C) or 72 h (D) after PHx. Original magnification is 200 \times . (E) Mitotic hepatocytes were numerically counted in uninfected mice (closed diamonds) or mice infected with AxCA-GFP (open circles), AxCA-SOCS1 (closed triangles) or AxCA-SOCS3 (open triangles) at the indicated time points after PHx, and mitotic indices were calculated. (F) The cyclin D1 and total ERK2 expressions, as a control protein, were determined by immunoblotting.

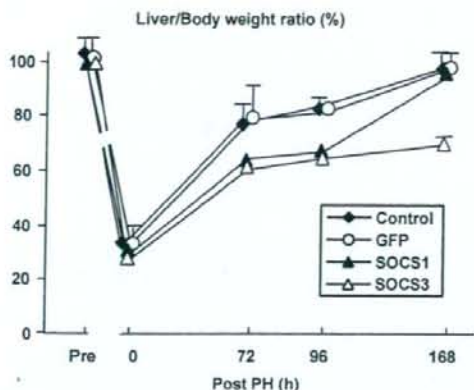


Fig. 6. Impaired liver mass restoration in SOCS1- or SOCS3-overexpressed mice. Livers were removed from uninfected (closed diamonds), or AxCA-GFP (open circles), -SOCS1 (closed triangles), -SOCS3 (open triangles)-infected mice at various time points after PHx, and percent liver/body weight ratio was calculated.

3.5. Impaired liver mass restoration

Finally, we examined whether these exogenous SOCS1 and SOCS3 in hepatocytes cause impairment in the liver mass restoration following PHx. Consistent with our previous work [4], the control mice recovered liver mass by day 7 (Fig. 6). Mice infected with AxCA-SOCS1 showed poor liver mass restoration until day 4 (Fig. 6). However, consistent with the result of DNA synthesis (Fig. 5A–E), full-blown liver mass restoration was observed at day 7 (Fig. 6). In agreement with the data of DNA synthesis (Fig. 5B and E), liver mass restoration was persistently impaired in AxCA-SOCS3-infected mice throughout the experimental course (Fig. 6). These results indicated that absence of the MET-mediated STAT3 signaling causes slow-onset liver mass restoration and that lack of both MET- and EGFR-mediated STAT3 signalings completely abolishes liver mass restoration.

4. Discussion

This is the first paper which clearly demonstrates that the MET- and EGFR-mediated STAT3 signalings cooperatively contribute to homeostatic liver regeneration. Exogenous SOCS3 negatively regulate both MET- and EGFR-mediated STAT3 phosphorylation and hepatocyte proliferation, while exogenous SOCS1 inhibited only MET- but not EGFR-mediated those responses (Fig. 2). As they selectively infect liver parenchymal cells (Fig. 3), these recombinant adenoviruses provide us with a powerful tool that can distinguish *in vivo* roles between MET- and EGFR-mediated signalings in liver regeneration. Consistent with the data of *in vitro* study (Fig. 1B),

both mice overexpressing SOCS1 and those overexpressing SOCS3 failed to induce the early, gp130-mediated STAT3 phosphorylation (Figs. 4A and B and 7). However, both types of mice showed different outcomes in DNA synthesis and liver mass restoration. Mice with exogenous SOCS1 showed only delay in those responses, while those with exogenous SOCS3 exhibited complete impairments (Figs. 5A–E, 6 and 7). Hepatocytes of mice with exogenous SOCS3 showed different histology compared to control and SOCS1-overexpressing mice (Fig. 5), although the mechanism underlying is unclear. These results indicate that the absence of gp130- and MET-mediated STAT3 phosphorylation causes slow-onset DNA synthesis and that the late recovery of DNA synthesis in the former mice is, at least partly, due to their normal response to endogenous ligands for EGFR. By contrast, mice with exogenous SOCS3 showed continuous impairment in those responses due to their inability to activate all the gp130-, MET- and EGFR-mediated STAT3 signalings. These results, together with the article demonstrating

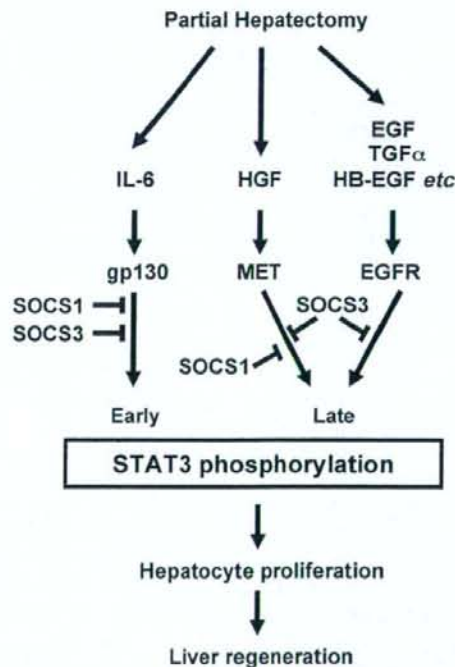


Fig. 7. Scheme for negative regulation of liver regeneration by ectopically expressed SOCS1 and SOCS3. Upon PHx, STAT3 is phosphorylated via gp130, MET, and EGFR by activation by the corresponding factors, such as IL-6-related cytokine, HGF, and EGF, TGF- α and HB-EGF, respectively, leading to liver regeneration. Exogenous SOCS1 negatively regulates gp130- and MET-mediated STAT3 phosphorylation but not EGFR signaling, resulting in delayed liver regeneration. By contrast, SOCS3 inhibited all of the signalings, leading to severely impaired liver regeneration.

the coordinated activation of EGFR and MET after PHx [7], indicated cooperative contribution of the gp130-, MET- and EGFR-mediated STAT3 signalings to normal liver regeneration.

Conditional knockout mice for *met* were reported to exhibit severe impairment in the liver regeneration following PHx or chemical liver injuries [30,31]. Intriguingly, *met*^{-/-} mice showed persistently impaired liver mass restoration post PHx. In contrast, mice with ectopic expression of SOCS1 exhibited only delay in liver regeneration (Figs. 5 and 6). This discrepancy might be explained by the difference in activation of the MAPK signal pathways. *met*^{-/-} mice showed persistent impairment in ERK1/2 phosphorylation [8], while mice infected with the *socs1* vector were intact for the ERK1/2 phosphorylation (Figs. 2A and 4C). These observations indicate that the complete absence of the MET-mediated signal pathways causes collapse of liver regeneration, while loss of single STAT3 activation produces only delay of it.

EGFR can recognize diverse growth factors for liver regeneration, including EGF, TGF- α , HB-EGF, and FGF family members [32,33]. It is conceivable that SOCS3 protein negatively regulates liver regeneration more powerfully than SOCS1 *in vivo* as well (Figs. 5 and 6).

A recent report showed that ectopic expressions of SOCS1 and SOCS3 inhibit STAT3 phosphorylation and migration of keratinocytes in response to HGF [34], supporting our present results (Fig. 2). It was reported that exogenous SOCS1 and SOCS3 bind to EGFR and negatively regulate EGFR/STAT3 signaling presumably by inducing ubiquitination-dependent EGFR degradation [35]. Indeed, introduction of *socs1* as well as *socs3* negatively regulates EGFR-mediated keratinocyte migration induced by antimicrobial peptide [36]. However, our present study revealed that exogenous SOCS3, but not SOCS1, negatively regulates the EGFR-mediated signaling (Fig. 2). These differences might be due to the cell types manipulated and to the EGFR ligands used.

It was reported that conditional knockout mice for STAT3 are impaired in DNA synthesis but have normal recovery of liver mass by compensatory hepatocellular hypertrophy [37]. Like the STAT3-deficient mice, mice overexpressing *socs1* and *socs3* showed impaired STAT3 activation (Fig. 4) and poor BrdU incorporation and mitoses (Fig. 5), but exhibited somewhat restoration of liver mass (Fig. 6). This might be due to the hypertrophy of liver parenchymal cells as well. Indeed, mice with *socs1* and *socs3* had the increase in size of hepatocytes compared to control mice (data not shown).

Our present results clearly demonstrate that both HGF- and EGF-induced STAT3 signalings are critical for the normal liver regeneration. Furthermore, these observations strongly indicate that hepatic SOCS1 and

SOCS3 expressions are clinically beneficial criterion for liver resection with normal liver regeneration and may provide the possible precautionary and therapeutic regimen targeting SOCS1 and SOCS 3 [38–40] for the successful liver regeneration after liver resection.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jhep.2007.08.020.

References

- Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:836–847.
- Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005;2:181–189.
- Michalopoulos GK, Khan Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* 2005;128:503–506.
- Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, Naka T, Son G, Akira S, et al. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 2005;41:443–450.
- Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine—40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1–21.
- Stretz KL, Luedde T, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* 2000;47:309–312.
- Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim T-H, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in rat. *Cancer Res* 1999;59:3954–3960.
- Wuestefeld T, Klein C, Stretz KL, Bertz U, Lauber J, Buer J, et al. Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* 2003;278:11281–11288.
- Li W, Liang X, Kellendonk C, Poli V, Taub R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem* 2002;277:28411–28417.
- Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997;387:924–929.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature* 1997;387:917–921.
- Endo TA, Masahara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997;387:921–924.
- Kubo M, Hanada T, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat Immunol* 2003;4:1169–1176.
- Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol* 2004;22:503–529.
- Naka T, Fujimoto M, Tsutsui H, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine and TLR signalings by SOCS and others. *Adv Immunol* 2005;87:61–122.
- Yoshimura A, Nishinakamura H, Matsumura Y, Hanada T. Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Res Ther* 2005;7:100–110.
- Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 2003;4:551–556.

- [18] Croker BA, Krebs DL, Zhang J-G, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, et al. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 2003;4:540–545.
- [19] Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991;251:802–804.
- [20] Zhong Z, Wen Z, Darnell JEJ. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 1994;264:95–98.
- [21] Baccaccio C, Andò M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, et al. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 1998;391M:285–288.
- [22] Iimuro Y, Nishihara T, Hellerbrand C, Behrens KE, Schoonhoven R, Grisham JW, et al. NF- κ B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* 1998;101:802–811.
- [23] Adachi K, Tsutsui H, Kashiwamura S, Seki E, Nakano H, Takeuchi O, et al. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol* 2001;167:5928–5934.
- [24] Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R, et al. c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2003;37:824–832.
- [25] Ogushi I, Iimuro Y, Seki E, Son G, Hirano T, Hada T, et al. Nuclear factor κ B decoy oligodeoxynucleotides prevent endotoxin-induced fatal liver failure in a murine model. *Hepatology* 2003;38:335–344.
- [26] Lollo CP, Banaszczyk MG, Riill C, Con CC, Lucas MA, Chiou HC. Gene therapy strategies for the treatment of chronic viral hepatitis. *Exp Opin Biol Ther* 2001;1:629–639.
- [27] Kermorgant S, Parker PJ. c-Met signalling. *Cell Cycle* 2005;4:352–355.
- [28] Tarnowski AS. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 2005;50:S24–S33.
- [29] Pierce KL, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 2001;20:1532–1539.
- [30] Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4477–4482.
- [31] Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10608–10613.
- [32] Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006;25:3787–3800.
- [33] Paranjpe S, Bowen WC, Bell AW, Nejak-Bowen K, Luo J-H, Michalopoulos GK. Cell cycle defects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference. *Hepatology* 2007;45:1471–1477.
- [34] Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata T, Hanakawa Y, Yahata Y, et al. SOCS3/Cis3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:100–105.
- [35] Xia L, Wang L, Chung AS, Ivanov SS, Ling MY, Dragoi AM, et al. Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation. *J Biol Chem* 2002;277:30716–30723.
- [36] Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y, et al. Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J Immunol* 2005;175:4662–4668.
- [37] Haga S, Ogawa W, Inoue H, Terui K, Ogino T, Igarashi R, et al. Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice. *J Hepatol* 2005;43:799–807.
- [38] Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, et al. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001;108:1781–1788.
- [39] Yasukawa H, Yajima T, Duplain H, Iwatate M, Kido M, Hoshijima M, et al. The suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) is a novel therapeutic target for enterovirus-induced cardiac injury. *J Clin Invest* 2003;111:469–478.
- [40] Jo D, Liu D, Yao S, Collins RD, Hawiger J. Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis. *Nat Immunol* 2005;8:892–898.

Protective Effect of IL-18 on Kainate- and IL-1 -Induced Cerebellar Ataxia in Mice¹

Tsugunobu Andoh,* Hiroyuki Kishi,^{2†} Kazumi Motoki,[†] Kenji Nakanishi,[‡] Yasushi Kuraishi,* and Atsushi Muraguchi[†]

The pathogenesis of sporadic cerebellar ataxia remains unknown. In this study, we demonstrate that proinflammatory cytokines, IL-18 and IL-1, reciprocally regulate kainate-induced cerebellar ataxia in mice. We show that systemic administration of kainate activated IL-1 and IL-18 predominantly in the cerebellum of mice, which was accompanied by ataxia. Mice deficient in caspase-1, IL-1R type I, or MyD88 were resistant to kainate-induced ataxia, while IL-18- or IL-18R^{-/-} mice displayed significant delay of recovery from ataxia. A direct intracerebellar injection of IL-1 -induced ataxia and intracerebellar coinjection of IL-18 counteracted the effect of IL-1. Our data firstly show that IL-18 and IL-1 display differential direct regulation in kainate-induced ataxia in mice. Our results might contribute toward the development of a new therapeutic strategy for cerebellar ataxia in humans. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 2322–2328.

Kainate, an excitatory amino acid extracted from seaweed, has significantly contributed to understanding epileptogenesis (1). Previously, the effects of kainate on hippocampal neurons have been studied for delineating the mechanism of kainate-induced ataxia (1, 2). It is reported that L-glutamate, the major excitatory neurotransmitter in the brain, acts on three classes of ionotropic glutamate receptors: N-methyl-D-aspartate, α -amino-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid, and kainate receptors (3, 4). Kainate receptors consist of a set of genes (GluR5–7, KA-1, and KA-2), are widely distributed throughout the brain (5–10), and are implicated in epileptogenesis and neuronal cell death (11).

IL-1 and IL-18 are proinflammatory cytokines that are produced as a precursor form and proteolytically activated by caspase-1 (12). They are expressed in various tissues including the CNS (13–15). IL-1 is shown to exert neuroendocrine as well as neurodegenerative effects on animals (14, 15). It has been reported that convulsant stimuli increase the production of IL-1 and its receptor in rodent CNS within hours of seizure induction (16–18). Recently, Vezzani et al. reported that IL-1 prolongs hippocampal seizures in a N-methyl-D-aspartate receptor-dependent manner, and the action was inhibited by IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)³ (19, 20). Concerning IL-18, a crucial role for IL-18 in mediating

neuroinflammation and neurodegeneration in the CNS under pathological conditions has been indicated (21).

Cerebellar ataxia, dysfunction of the cerebellum, causes problems such as loss of balance and motor coordination. Some types of cerebellar ataxia can be caused by several genetic mutations, including a group of autosomal dominant spinocerebellar ataxias (22) and autosomal recessive Ataxia telangiectasia (23); however, a large number of patients remain undiagnosed (sporadic cerebellar ataxias). In this study, we examined the roles of IL-1 and IL-18 in kainate-induced ataxia in mice. We demonstrated that IL-1 is activated specifically in the cerebellum by the systemic administration of kainate and is involved in kainate-induced ataxia in mice. Furthermore, we show that IL-18 in the cerebellum is involved in the recovery phase of kainate-induced ataxia by counteracting the function of IL-1 in the cerebellum. Our results show the possible anti-ataxic effect of IL-18 and may suggest new therapeutic strategies for cerebellar ataxia in humans.

Materials and Methods

Antibodies

Abs to GluR-5, GluR-6, IL-1, IL-18, IL-1RI, calbindin, and glial fibrillary acidic protein were purchased from Santa Cruz Biotech; Abs to IL-18R and ST2L were purchased from R&D Systems; and an Ab to IL-33 were purchased from Alexa Biochem. Alexa488- or Alexa564-conjugated anti-IgG were purchased from Molecular Probes.

Mice

Six- to 10-wk-old male mice were used in this study. BALB/c mice and C57BL/6 mice were purchased from Sankyo Laboratories. IL-1RI^{-/-} mice with a C57BL/6 129 background and IL-18^{-/-} mice with a C57BL/6 background were purchased from The Jackson Laboratory, and caspase-1^{-/-} mice (24) with a BALB/c background, IL-18R^{-/-} mice (25) with a C57BL/6 background, and MyD88^{-/-} mice with a C57BL/6 background were provided by Dr. K. Kuida (Vertex Pharmaceuticals, Cambridge, MA) (24), Dr. T. Hoshino (Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan) (25), and S. Akira (WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka, Japan), respectively. These mice were maintained in our animal facility. Mice were housed under controlled temperature (23–25°C) and light (lights on from 08:00 h to 20:00 h) conditions. Food and water were freely available. The procedures for these animal experiments were reviewed and approved by the Committee for Animal Experiments at the University of Toyama.

*Department of Applied Pharmacology and [†]Department of Immunology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama, Japan; and [‡]Department of Immunology and Medical Zoology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan

Received for publication September 11, 2007. Accepted for publication December 4, 2007.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grants in Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Hiroyuki Kishi, Department of Immunology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630, Sugitani, Toyama, 930-0194 Japan. E-mail address: immkishi@med.u-toyama.ac.jp

³ Abbreviations used in this paper: IL-1ra, IL-1 receptor antagonist; IL-1RI, IL-1 receptor type I.

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/\$20.00