



# LOCAL EXPRESSION OF CYTOKINE MESSENGER RNA IN RAT MODEL OF ESCHERICHIA COLI EPIDIDYMITIS

田中, 一志

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1469

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001469>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	たなか かし 志 田 中 一 志	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1000号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	LOCAL EXPRESSION OF CYTOKINE MESSENGER RNA IN RAT MODEL OF ESCHERICHIA COLI EPIDIDYMITIS （ラットを用いた細菌性精巣上体炎モデルにおける感染局所でのサイトカインmRNAの発現）	
審査委員	主査 教授 守 殿 貞 夫 教授 望 月 眞 人      教授 岡 田 昌 義	

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

サイトカインは生体防御に深くかかわっており、重症感染時にはネットワークを構成し、感染防御に寄与している。その中でもIL-6は、炎症反応時に急性期タンパクの産生、pyrogen作用、免疫グロブリン産生の刺激など、生体に合目的な働きをしているものとされる。敗血症、髄膜炎、あるいは尿路感染症時におけるIL-6をはじめとする炎症性サイトカインの発現とその動態に関する報告は散見されるが、細菌性生殖器局所感染におけるサイトカインに関する報告は未だない。細菌性精巣上体炎は、精巣上体の腫脹を特徴とする局所感染ではあるが、高熱を呈する事も多く、何らかの全身性防御機構の関与が考えられる。著者は、生殖器局所感染における生体の感染防御機構を解明するため、ラット細菌性精巣上体炎モデルを用い、生殖器感染における局所でのIL-6をはじめとする炎症性サイトカインの発現を検討した。

### 【実験方法】

#### 細菌感染モデルの作成

尿路感染症患者から分離された大腸菌（E-19株）を用い、菌量を $10^8$  CFU/mlに調整した菌液100  $\mu$ lを、8週齢雄Wistar ratの精管より逆行性に注入し精巣上体炎を作成した。コントロール群には、大腸菌を含まない培地を用いsham operationを施した。菌接種前および菌接種後6, 12, 24, 48, 72時間後に精巣上体を無菌的に摘出した。摘出した精巣上体を、RNA抽出用にはsnap frozenにて、免疫染色用には縦切開したのちTissue Tekに包埋後それぞれ-80℃にて保存し、H-E染色用には、ホルマリン固定後パラフィンで包埋した。

#### Northern blot analysisによるIL-6 mRNAの測定

感染させた精巣上体、対側の精巣上体およびコントロール群の精巣上体より、guanidium thiocyanate法を用いtotal RNAを抽出した。各total RNA30  $\mu$ gずつを電気泳動で分離したのち、nitrocellulose membraneへブロットした。次に $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  CTPでラベルされたIL-6のcRNA

probesを作成し、ハイブリダイゼーションを行なった。フィルターを洗浄後オートラジオグラフィーにて放射活性を測定し、画像解析装置にて分析した。

#### RT-PCRによるサイトカインmRNAの解析

上述した方法で抽出されたtotal RNAから、逆転写反応によってcDNAを作成した。作成されたcDNAと各種サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2,  $\beta$ -actin) のprimerを用い、60°C 1分, 72°C 1分, 95°C 2分を1サイクルとするPCRを、35サイクル反応させた。これにより増幅されたPCR産物から、精巣上体局所でのサイトカインmRNAの発現を解析した。

#### 病理組織学的検討

パラフィン包埋した組織から4 $\mu$ mの切片を作製し、H-E染色を行ない精巣上体の細菌感染による組織学的変化を観察した。

#### 免疫組織染色

摘出した精巣上体から5 $\mu$ mの凍結切片を作製し、抗murine IL-6抗体を用い精巣上体炎組織の免疫染色を行い、鏡検により精巣上体局所でのIL-6の発現の有無を観察した。

### **【結果】**

#### 精巣上体局所におけるIL-6 mRNAの発現

Northern blot analysisの結果、感染後6時間でIL-6 mRNAの発現はピークに達し、以後時間の経過とともに減少していた。コントロール群および対側の精巣上体ではIL-6 mRNAの発現は認められなかった。RT-PCR法においても同様に、感染後6時間でIL-6 mRNAの発現が確認された。

#### 他の炎症性サイトカインmRNAの発現

RT-PCR法により、IL-1 $\beta$ もIL-6と同様に感染後6時間以降に発現を認めた。TNF- $\alpha$ は感染前にも発現を認め、感染後著明な増強を認めた。INF- $\gamma$ も感染前より発現を認めたが、感染後の増強は認めなかった。IL-2は感染前後とも発現していなかった。

#### 精巣上体の細菌感染による病理組織学的変化

感染後6時間では炎症細胞の浸潤を認めず、24時間後より炎症細胞の浸潤が始まり、72時間後には、精巣上体管腔内および上皮下に炎症細胞の著明な浸潤を認めた。

#### 免疫組織染色によるIL-6局在の検討

感染後6時間で、最も強く精巣上体においてIL-6が発現しており、またその発現は上皮細胞に局在していた。

### **【考案】**

細菌感染時の血液、髄液、胸水および尿中での炎症性サイトカインの動態についてさまざまな検討がなされている。Waageらは、細菌性髄膜炎の髄液中にIL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ が産生されていることを報告している。Barnesらは、結核性胸膜炎においてTNFおよびINF- $\gamma$ が胸水中に産生され、局所で重要な役割を果たしていることを報告している。また尿路感染においても、感染時に尿中IL-6の上昇が報告されており、腎の糸球体および膀胱上皮細胞がIL-6を産生しているといわれている。このように感染症に際して、生体内にはさまざまなサイトカイン産生系が賦括されるものと考えられる。

今回の研究で、ラット精巣上体炎局所においてIL-6 mRNAが発現し、その発現は、炎症細胞の浸潤前にピークに達することが示された。さらに免疫組織染色によって、IL-6は上皮細胞で発現して

いることが明らかになった。加えて、他の炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) mRNAも精巣上体炎局所において発現していることが確認された。

感染局所で産生されるIL-6の役割は未だ明確に解明されていないが、局所で産生されたIL-6が血中へ移行することにより、感染に対する生体防御機構の一翼担っていると考えられる。尿路感染の場合、たとえば急性腎盂腎炎では尿中IL-6の上昇を認めるが、これら有熱性の腎盂腎炎でも血液培養で細菌が分離されるのは30%以下である。このことから発熱などの全身症状は、細菌の血中への侵入のみに依存するのではなく、血中に遊離したIL-6がpyrogenとして作用することによると推測されている。精巣上体炎でも同様で、生殖器局所感染でありながら高熱を来す場合があるのは、IL-6がpyrogenとして働くことによるものと思われる。今回の研究で示したように、炎症細胞の浸潤前にすでに局所でIL-6が産生されていることは、サイトカインの血中への移行が、生体防御反応を惹起しているという仮説を支持するものである。細菌感染におけるIL-6の役割についてBartonらは、マウス敗血症モデルを用い、IL-6による感染防御効果を報告している。またIL-6が、実験的細菌感染で、初期の感染防御反応において重要な役割をはたしているとの報告もある。これらのことから、IL-6は局所細菌感染の広がり防止する上で重要な役割を果たしていることが推測される。

免疫染色の結果より、IL-6は精巣上体の上皮細胞から産生されていることが示された。精巣上体管の管腔表面に位置する上皮細胞が、細菌の侵入により速やかに局所でIL-6を産生し、その後、顆粒球および単球の感染局所への浸潤が起こっていると思われる。このことから、上皮免疫系において上皮細胞はサイトカイン産生細胞として、従来考えられていた以上に重要な役割を担っていることが推測される。ここから血中へ移行したサイトカインが生体の防御機構を賦活し、白血球およびサイトカインネットワークを活性化しているものと考えられる。

以上、細菌性精巣上体炎局所において精巣上体管上皮細胞がIL-6を発現していることが初めて明らかになった。また他の炎症性サイトカイン遺伝子が炎症細胞の浸潤前に精巣上体炎局所で発現していることも報告した。本研究により、感染局所における生体防御機構および上皮細胞の感染防御への関与を解明する上で重要な知見が得られた。

## 論文審査の結果の要旨

サイトカインは細菌感染の生体防御反応において重要な役割を果たしている。その中でもIL-6は、炎症反応時に急性期タンパクの産生、pyrogen作用、免疫グロブリン産生刺激など、生体にとり合目的な働きをしている。敗血症のような重症全身感染時における血中の炎症性サイトカインの上昇、髄膜炎および尿路感染における感染局所（髄液、尿）での炎症性サイトカインの上昇およびその動態はすでに報告されており、これらの細菌感染においてサイトカインは感染防御に深く関係しているとされている。精巣上体炎は、精巣上体の腫脹をきたす生殖器局所感染ではあるが、高熱を呈する事も多く、何らかの生体防御機構の関与が考えられるが、現在のところ明らかでない。そこで申請者は生殖器局所感染時における感染防御機構を解明するため、ラット精巣上体炎モデルを用い、生殖器感染時における局所でのIL-6をはじめとする炎症性サイトカインの発現とその動態に関する検討を行った。

まずラット精管より大腸菌を逆行性に注入し精巣上体炎を作成し、感染前および感染後6, 12, 24, 48, 72時間後に精巣上体を無菌的に摘出した。その精巣上体からtotal RNAを抽出した後、Northern blotting法にてIL-6 mRNAの発現を、ならびにRT-PCR法にて各種炎症性サイトカインの発現を検討した。さらに、精巣上体の経時的な病理組織学的変化と免疫組織染色法によるIL-6の

局在を検討した。

その結果、精巣上体炎局所においてもIL-6 mRNAが発現しており、またその発現は感染後6時間でピークに達し、以後時間の経過とともに減少していることが確認された。さらに他の各種炎症性サイトカイン（IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ）mRNAも精巣上体炎局所で発現していた。病理組織学的検討では、感染後6時間では炎症細胞の浸潤を認めなかったが、72時間後に炎症細胞の著明な浸潤を認めた。免疫組織染色による検討では、精巣上体の上皮細胞において、感染後6時間で最も強くIL-6が発現していることが確認された。現在、細菌性髄膜炎での髄液中の炎症性サイトカインの上昇、尿路感染における尿中IL-6の上昇など、細菌感染に際して生体内にはさまざまなサイトカイン産生系が賦括されるものと考えられているが、今回の成績より、精巣上体炎においても同様に、感染局所で生体防御機構としてサイトカイン産生系が賦括されていることが初めて明らかになった。また精巣上体の上皮細胞が感染後速やかにIL-6を産生した後、顆粒球および単球の感染局所への浸潤が起こっていることから、上皮細胞もサイトカイン産生細胞として従来考えられていた以上に重要な役割を担っていることが明らかになった。

以上、本研究は生殖器感染局所における生体防御機構について、生殖器感染でのIL-6の発現とその動態を研究したものであるが、従来ほとんど行なわれなかった生殖器感染とIL-6の関係について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。

よって本研究者は博士（医学）学位を得る資格があると認める。