



Internal biliary drainage improves decreased number of gut mucosal T lymphocytes and MAdCAM-1 expression in jaundiced rats

佐野, 智英

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3046

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003046>

※ 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。



【 1 4 4 】

氏 名・(本 籍) 佐野 智英 (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1604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16年3月31日

【 学位論文題目 】

Internal biliary drainage improves decreased number
of Gut mucosal T lymphocytes and MAdCAM-1
expression In jaundiced rats

(胆汁内瘻法は閉塞性黄疸ラットにおいて減少した
腸管粘膜内の Tリンパ球数と MAdCAM-1 発現を
改善する)

審 査 委 員

主 査 教 授 尾原 秀史

教 授 熊谷 俊一

教 授 横崎 宏

緒言

黄疸患者の術前胆道ドレナージについては議論のあるところであるが、bacterial translocation は黄疸患者手術時の重要な問題のひとつである。Bacterial translocation は細菌の増殖、腸管粘膜の生理学的な損傷、肝不全、宿主の免疫不全などの結果起こるが、閉塞性黄疸においては、腸管内に胆汁が存在しなくなることが bacterial translocation と密接な関係があると考えられている。実験モデルでは胆汁内瘻法によって腸管粘膜バリアや免疫機能が改善されることが報告されている。この粘膜防御機構に関して我々は閉塞性黄疸患者に外瘻法を施行した場合、腸管粘膜固有層の T リンパ球数とマクロファージ数が減少することをこれまでに報告した。これまでに bacterial translocation に対する宿主防御としての T リンパ球の関与は動物モデルで証明されてきたが、粘膜固有層の T リンパ球の bacterial translocation 防御のメカニズムは未だ明らかではない。これについては粘膜固有層の T リンパ球がマクロファージを活性化し結果的に食作用が強化される、T リンパ球が粘膜上皮の接着性を維持するのに役立つ、B リンパ球と協調して IgA 分泌を促し細菌の侵入を防ぐ、といったメカニズムが想定される。

リンパ球の全身循環から粘膜固有層への homing は腸管の局所免疫にとって不可欠のステップであり、このプロセスは血管に発現する接着分子 mucosal addressin cell molecule-1(MAdCAM-1)とその ligand であるリンパ球表面の integrin $\alpha 4 \beta 7$ の相互作用により調節されている。MAdCAM-1 は 60kD の immunoglobulin family の glycoprotein で vascular adhesion receptor にホモロジーをもつドメインを有している分子である。ヒトにおける MAdCAM-1 は炎症性腸疾患患者の腸管において強く発現すると報告されている。

我々は粘膜固有層での T リンパ球の分布が腸管内胆汁の有無に影響を受け、また腸管内胆汁の存在がリンパ球の粘膜固有層への homing に関与しているのではないかと仮説をたてた。そこでラット閉塞性黄疸モデルを用い外瘻、内瘻法を施行した場合の粘膜固有層における T リンパ球数および MAdCAM-1 発現の変化を調べた。

方法

実験動物

200 - 250g の雄性 Wistar ラットを用い、神戸大学動物実験施設において特異的病原菌のない状態で飼育し、全ての外科的処置はエーテル麻酔下で清潔操作にて行った。

閉塞性黄疸および胆汁ドレナージモデルの作成

以下の4つの群を作成した。

1) Sham operation(SHAM)群：上腹部に1.5cmの正中切開を加え、総胆管を周囲組織から剥離した。それ以上結紮や切離は加えなかった。2) 閉塞性黄疸(CBDL)群：総胆管を2箇所、ひとつは肝臓のできるだけ近くで、もうひとつは総胆管の末端で結紮した。

その後2つの結紮の間で総胆管を切離した。3) 胆汁外瘻(ED)群：総胆管を切離し、ポリエチレン製のカテーテルを総胆管の近位側に挿入、固定した。カテーテルの遠位端は結紮し皮下に3日間おいた。3日後ラットを同様の方法で麻酔し、同じ創で皮膚を切開、結紮点より近位でカテーテルを切断、閉塞を解除した。カテーテルから胆汁が流出してくることを確認後、カテーテルを側腹部から体外に誘導し皮膚に固定、胆汁がラットの背中に据え付けたバッグにたまるようにした。バッグがはずれて皮膚に感染を起こした場合そのデータは除外した。4) 胆汁内瘻(ID)群：総胆管結紮の3日後上記と同様に創を再切開し、その上再開腹、上記の如くカテーテルを切断、閉塞を解除した後カテーテルの遠位端の3cm分を十二指腸から回腸側へ挿入し巾着縫合にて固定した。各群は10匹ずつ作成し、最初の手術から1週間後に犠牲死させた。トライツ靱帯から5cm遠位の空腸とバウヒン弁より3cm近位の回腸を摘出し、直ちに OCT compound に包埋し凍結、免疫組織学的検索に用いるまで -80°C で保存した。

血液分析及培養検索

5 ml の血液を犠牲時に下大静脈から無菌的に採取し、血清中の総タンパクと総ビリルビン、血中の白血球数とリンパ球数を測定した。これらのデータは相加平均と標準偏差で表した。それぞれのラットから一個の腸間膜リンパ節複合体 (MLNC) を無菌的に摘出し、滅菌チューブに入れホモジネートし生食で希釈、いくつかの希釈率のものを培地にまき 37°C で 48 時間培養、菌種の同定とコロニー培養数を測定した。

免疫組織化学染色

空腸と回腸の凍結標本を $4\mu\text{m}$ に薄切し、streptavidin-biotin 法にて染色した。一次抗体とその濃度は CD4 1:200、CD8 1:70、MAdCAM-1 1:200 で施行し、ヘマトキシリンで対照染色を行った。陰性 control として薄切標本を一次抗体を用いずに同様に染色した。

染色の評価

デジタルイメージ解析ソフトウェアを用いコンピューター上で粘膜固有層における CD4 陽性 T リンパ球数と CD8 陽性 T リンパ球数、MAdCAM-1 を発現している血管の数を 400 倍視野でカウントした。同一標本で粘膜固有層内のランダムに抽出した 0.063mm^2 の 5 視野を評価した。計測は二重盲検法により 2 名で評価したが、結果には一致性が認められた。

統計学的解析

血液データや免疫組織学的計測は Kruskal-Wallis test で検定した。順位に有意差がみられたときは2群間の差を Mann-Whitney U test で検定した。細菌培養の結果は χ^2 検

定、Fisher の直接法で評価した。p 値が 0.05 未満で統計学的に有意差ありとした。

結果

血液学的所見

総タンパクの濃度とラットの体重変化は 4 群間で有意差はなかった。血清ビリルビンは 4 群間において CBDL 群で有意に上昇していた。ED 群と ID 群において血清ビリルビン濃度は CBDL 群より有意に低下していた。ED 群と ID 群間に血清ビリルビン濃度は有意な差がなかった。末梢血中の白血球数とリンパ球数は SHAM 群において 4 群間で有意に低かったが、他の 3 群間 (CBDL, ED, ID) に有意差はなかった。

粘膜固有層における CD4、CD8 陽性 T リンパ球数と MAdCAM-1 の発現

粘膜固有層における CD4 陽性 T リンパ球数と CD8 陽性 T リンパ球数は CBDL 群において SHAM 群より有意に減少していた。それらは ED 群では増加しなかったが、ID 群ではほぼ正常レベルまで増加した。空腸でも回腸でも同様の傾向が認められた。CD4/CD8 比はすべての群の空腸においても回腸においてもおよそ 2.0 であった。次に、CBDL 群における MAdCAM-1 陽性の血管数は、SHAM 群と比し有意に減少していた。MAdCAM-1 陽性細胞数は ED 群では改善しなかったが、ID 群では SHAM 群のレベル近くまで改善した。MAdCAM-1 発現の変化のパターンは CD4 陽性および CD8 陽性 T リンパ球数の変化のパターンと類似していた。空腸でも回腸でもこれらの変化に違いはなかった。

Bacterial translocation

6 匹のラットのデータは表皮常在細菌の混入のため除外した。SHAM 群の MLNC の培養からは細菌は検出されなかったが、CBDL 群の 8 例中 7 例から細菌が検出された。ED 群からは細菌が 8 例中 5 例で検出されたが、ID 群ではわずか 9 例中 2 例のみであり、これは CBDL 群より有意に低率であった。ED 群と ID 群間には有意差はなかった。検出細菌としては、大腸菌が 14 例中 13 例で認められ、グラム陽性菌のプロテウス ミラビリスが 2 例に、クレブシエラが 1 例に検出された。

考察

腸管粘膜リンパ組織 (GALT) は常在細菌や感染性病原体に対する宿主の粘膜防御メカニズムにおいて非常に重要な働きをされていると考えられている。例えば絶食で中心静脈栄養を実施すると GALT 細胞数が減少し、腸管内 IgA レベルが低下し bacterial translocation が増加する。この GALT 細胞は二つに分類される。すなわちパイエル板のような構築されたリンパ組織と、粘膜固有層リンパ球 (LPL) や上皮間リンパ球 (IEL) のように粘膜にびまん性に存在しているリンパ球である。今回の実験で閉塞性黄疸ラ

ットでは control 群と比べて末血中のリンパ球数は増えているにもかかわらず、腸管粘膜固有層の CD4 陽性および CD8 陽性 T リンパ球数は減少していた。さらに外瘻法では減少した粘膜固有層での T 細胞数は増加しないが、内瘻法では control 群のレベル近くまで改善することが分かった。それゆえ T 細胞数のこれらの変化が腸管内胆汁の存在に強く関連していると考えられた。又、MAdCAM-1 の発現の変化も腸管内胆汁の有無に相関しており、T リンパ球数の変化と同様であった。MAdCAM-1 は恒常的にパイエル板の毛細静脈や粘膜固有層に発現し、炎症の存在時に恒常的なレベルより高く発現するとされる。本モデルでも末血中の白血球数やリンパ球数は増加しているので炎症の存在も疑われるが、外瘻群では粘膜固有層での MAdCAM-1 の発現は減少しており内瘻群ではほぼ control のレベルまで改善していた。これにより胆汁が直接的に腸管粘膜固有層における MAdCAM-1 の発現を調節している可能性が示唆された。

閉塞性黄疸における粘膜固有層での T リンパ球数と MAdCAM-1 発現の変化はいくつかの仮説で説明できる。第一に、胆汁が直接的に腸管上皮細胞におけるケモカインの産生に影響を与えることによって、リンパ球の粘膜内への homing を調節している可能性が考えられる。実際 CCL25 は空腸や回腸の上皮細胞に選択的に高濃度に発現し、そのレセプターである CCR9 は腸管指向性の $\alpha 4 \beta 7$ 陽性の T 細胞に発現する。このケモカインの発現の変化は粘膜固有層の T 細胞数の変化と関連している可能性がある。次に胆汁に含まれるサイトカインが粘膜固有層の血管内皮の MAdCAM-1 の発現に影響を与えていることが考えられる。ラットの胆汁には低レベルの tumor necrosis factor (TNF) が含まれており、TNF- α は血管内皮の MAdCAM-1 の発現を濃度依存性に促進することが明らかになっている。しかしこの可能性は否定的であり、その理由は胆汁中のサイトカインが粘膜バリアを超えて粘膜固有層の血管に作用できる可能性は低く、さらに血清中の TNF- α は黄疸の際に増加し、胆道ドレナージのあとは減少するので、MAdCAM-1 の発現は末血中のリンパ球が最も増加する CBDL 群において最高となるべきであるからで、我々のデータはこの説を支持しない。最後に、T リンパ球表面の $\alpha 4 \beta 7$ integrin は、末梢血中の T リンパ球が MAdCAM-1 との接着を通して粘膜固有層に homing するのに必要であるが、この $\alpha 4 \beta 7$ integrin 発現は胆汁が直接的あるいは間接的に影響を与えている可能性がある。しかし $\alpha 4 \beta 7$ integrin 発現はリンパ球の活性化段階で調節されており、腸管粘膜に向かう抗原指向性の T リンパ球はすでに高レベルな $\alpha 4 \beta 7$ integrin を発現しているため、胆汁の有無がこの T リンパ球上表面の MAdCAM-1 の ligand の発現に影響を及ぼしているとは考えにくい。以上から、直接的ではないにせよ、ケモカインの関与の可能性を含め粘膜上皮細胞との何らかの相互作用を通して腸管内胆汁が粘膜固有層の MAdCAM-1 発現に影響を与えている可能性が高いと考えられた。

今回の実験では bacterial translocation の陽性率は CBDL 群において最も高かった。これは閉塞性黄疸で高い陽性率を示した過去の報告と合致した。腸管内胆汁と bacterial

translocation の関係であるが、ラットにおいて胆汁は IgA の主要な供給源であり上部消化管の IgA の 90% 近くを供給しているため閉塞性黄疸や外瘻施行ラットでは腸管内の IgA レベルが著しく低下し、bacteria が粘膜上皮に接着しやすくなると考えられる。この接着は bacterial translocation の極めて重要な第一段階であると考えられる。さらに腸管蠕動は胆汁依存性があり腸管内に胆汁が欠乏すると腸管運動不全となり translocation が起こりやすくなると考えられる。又胆汁酸はその detergent 作用によって腸管内細菌の増殖を抑制していることが実験的にも臨床的にも証明されている。

我々は bacterial translocation 防御における腸管内胆汁の役割について新たな側面を見出した。これまでに胸腺の欠如した T リンパ球欠損マウスや、CD4、CD8 陽性 T リンパ球が少ないマウスに bacterial translocation が多く起こった報告があるが、今回の結果から、腸管内胆汁が MAdCAM-1 の発現を通して T リンパ球数に影響を与え、さらに bacterial translocation に関与する可能性が考えられた。今回粘膜固有層の T リンパ球が細菌の増殖やそれらの粘膜バリアの通過に影響を及ぼした証拠はないが、T リンパ球が bacterial translocation に影響を及ぼすメカニズムについてはいくつか類推できる。例えば T リンパ球により活性化されるマクロファージの食作用に変化があった、もしくは粘膜固有層での T リンパ球と B リンパ球の相互作用に変化があり IgA の産生に影響が及んだ、T リンパ球数の減少により上皮間の接着性に変化があったなどである。我々は以前外瘻患者の腸管標本において粘膜固有層で CD68 陽性マクロファージが減少することを報告しており、T リンパ球数の急な減少により粘膜固有層のマクロファージの食作用が低下することが、外瘻群において bacterial translocation が増加している原因である可能性を臨床的にも見出している。

我々の選択した胆管閉塞の期間から胆汁ドレナージまで 3 日間という今回のモデルは急性胆汁うっ滞のモデルであるといえる。黄疸に関連する全身の細胞性免疫の回復の程度は胆管閉塞の期間に依存するので、慢性胆汁うっ滞における胆汁の T 細胞機能や MAdCAM-1 発現に対する影響を評価するにはさらなる実験が必要である。

結論として T リンパ球数や MAdCAM-1 発現は腸管内の胆汁の有無に影響を受け、bacterial translocation とは逆相関が見られた。以上の結果から腸管内の胆汁の存在は免疫学的な利点があり、内瘻法は外瘻法より閉塞性黄疸の治療において有利であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第 1605 号	氏名	佐野智英
論文題目	Internal biliary drainage improves decreased number of Gut mucosal T lymphocytes and MAdCAM-1 expression In jaundiced rats. 胆汁内瘻法は閉塞性黄疸ラットにおいて減少した腸管粘膜内の T リンパ球数と MAdCAM-1 発現を改善する。		
審査委員	主 査 尾崎秀史 副 査 熊谷俊一 副 査 横崎 亮		
審査終了日	平成 16 年 3 月 10 日		

(要旨は 1, 000 字～2, 000 字程度)

黄疸患者手術時の重要な問題のひとつに bacterial translocation がある。Bacterial translocation は細菌の増殖、腸管粘膜の生理学的な損傷、肝不全、宿主の免疫不全などの結果起こるが、閉塞性黄疸時には、腸管内に胆汁が存在しなくなることが bacterial translocation と密接な関連があると考えられている。我々は、閉塞性黄疸患者に外瘻法を施行した場合、腸管粘膜固有層の T リンパ球数とマクロファージ数が減少することをこれまで報告したが、この粘膜固有層 T リンパ球の bacterial translocation 防御のメカニズムは未だ明らかとはなっていない。この問題については、粘膜固有層の T リンパ球がマクロファージを活性化し結果的に食作用が強化される、T リンパ球が粘膜上皮の接着性を維持するのに役立つ、B リンパ球と協調して IgA 分泌を促し細菌の侵入を防ぐ、といったメカニズムが想定される。

リンパ球の全身循環から粘膜固有層への homing は腸管の局所免疫にとって不可欠のステップであり、このプロセスは血管に発現する接着分子 mucosal addressin cell molecule-1(MAdCAM-1)とその ligand であるリンパ球表面の integrin $\alpha 4 \beta 7$ の相互作用により調節されている。MAdCAM-1 は 60kD の immunoglobulin family の glycoprotein で vascular adhesion receptor にホモロジーをもつドメインを有している分子である。今回ラット閉塞性黄疸モデルを用い外瘻、内瘻法を施行した場合の粘膜固有層における T リンパ球数および MAdCAM-1 発現の変化を調べた。

実験方法であるが、神戸大学動物実験施設にて管理された Wistar ラットを用い、閉塞性黄疸および胆汁ドレナージモデルとして 1) Sham operation(SHAM)群、2) 閉塞性黄疸(CBDL)群、3) 胆汁外瘻(ED)群、4) 胆汁内瘻(ID)群、の 4 群を作成した。各群は 10 匹ずつ作成し、最初の手術から 1 週間後に犠牲死させ、トライツ靱帯から 5 cm 遠位の空腸とパウヒン弁より 3cm 近位の回腸を摘出し、直ちに凍結、免疫組織学的検索に用いるまで -80°C で保存した。犠牲死時に、血液を下大静脈から無菌的に採取し、血清中の総タンパクと総ビリルビン、血中の白血球数とリンパ球数を測定した。また、それぞれのラットから一個の腸間膜リンパ節複合体 (MLNC) を無菌的に摘出、ホモジネートし生食で

希釈、いくつかの希釈率のものを培地にまき 37°C で 48 時間培養、菌種の同定とコロニー培養数を測定した。

次に、一次抗体として、CD4、CD8、MAdCAM-1 を用いて、空腸と回腸の凍結標本を streptavidin-biotin 法にて免疫組織学的に染色した。この染色の評価はデジタルイメージ解析ソフトウェアを用いコンピューター上で粘膜固有層における CD4 陽性 T リンパ球数と CD8 陽性 T リンパ球数、MAdCAM-1 を発現している血管の数を、同一標本で粘膜固有層内のランダムに抽出した 0.063mm^2 の 5 視野でカウントした。

実験結果であるが、血液学的所見では、総タンパクの濃度は 4 群間で有意差はなく、血清ビリルビンは 4 群間において CBDL 群で有意に上昇していた。ED 群と ID 群において血清ビリルビン濃度は CBDL 群より有意に低下していたが、ED 群と ID 群間に血清ビリルビン濃度は有意な差がなかった。末梢血中の白血球数とリンパ球数は SHAM 群において 4 群間で有意に低かったが、他の 3 群間に有意差はなかった。

腸管粘膜固有層における CD4、CD8 陽性 T リンパ球数と MAdCAM-1 の発現であるが、CD4 陽性 T リンパ球数と CD8 陽性 T リンパ球数は、CBDL 群において SHAM 群より有意に減少し、それらは ED 群では増加しなかったが、ID 群ではほぼ正常レベルまで増加しており、これらは空腸でも回腸でも同様の傾向が認められた。次に、CBDL 群における MAdCAM-1 陽性の血管数は、SHAM 群と比し有意に減少し、これは ED 群では改善しなかったが、ID 群では SHAM 群のレベル近くまで改善した。MAdCAM-1 発現の変化のパターンは CD4 陽性および CD8 陽性 T リンパ球数の変化のパターンと類似し、空腸でも回腸でもこれらの変化に違いはなかった。

Bacterial translocation 検出の結果であるが、SHAM 群の MLNC の培養からは細菌は検出されなかったが、CBDL 群の 8 例中 7 例から、ED 群からは 8 例中 5 例から細菌が検出されたが、一方 ID 群ではわずか 9 例中 2 例に細菌が検出されたのみであり、これは CBDL 群より有意に低率であった。ED 群と ID 群間の検出率には有意差はなかった。検出細菌としては大腸菌が 14 例中 13 例で認められ、グラム陽性菌のプロテウス ミラビリスが

2例に、クレブシエラが1例に検出された。

以上の本研究における結果から、腸管内の胆汁の存在が腸管粘膜固有層の T リンパ球数と MAdCAM-1 発現を調節しており、これは bacterial translocation とも関連していることが明らかとなった。免疫学的な利点からみると、内瘻法は外瘻法より閉塞性黄疸の治療において優位性があると考えられた。

本研究は、胆道ドレナージ法別の腸管局所免疫とそのメカニズムについて検討したものであるが、従来ほとんど解明されていない閉塞性黄疸に対する胆道ドレナージ施行時の腸管免疫に関し重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。