



## Balance of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in a buccal infection in a Streptozotocin-induced diabetic rat model

古土井，春吾

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2004-01-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2730

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002730>

※ 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。



【 169 】

氏 名・(本 籍) 古土井 春吾 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1900号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成16年1月14日

【 学位論文題目 】

Balance of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10  
in a buccal infection in a streptozotocin-induced diabetic  
rat model

(Streptozotocin 誘発糖尿病ラット頬部感染モデルにおける  
tumor necrosis factor- $\alpha$ とinterleukin-10の発現バランス  
について

審 査 委 員

主 査 教 授 古森 孝英

教 授 田原 真也

教 授 丹生 健一

TNF- $\alpha$ は、細菌が生体内に進入した際にマクロファージより産生される炎症性サイトカインで、マクロファージや好中球を活性化して病原体排除に作用するなど感染初期の免疫反応において重要な役割を果たしている。一方、Th2 細胞より産生される IL-10 は抗炎症性サイトカインのひとつで、炎症性サイトカインを産生する Th1 細胞の活性やマクロファージ、好中球の機能を直接抑制するなど多様な作用をもっている。これらのサイトカインは互いに制御し合いながら生体の防御機構を調節しているが、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインは持続的かつ過剰に産生されると細胞障害性に作用して生体に悪影響を及ぼし、逆に抗炎症性サイトカインの産生が優位な場合には、いわゆる compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) の状態を呈し、日和見感染を惹起しやすい背景が成立する。

糖尿病は易感性で炎症が重症化しやすいことはよく知られているが、糖尿病下の感染局所で炎症性サイトカインと抗炎症性サイトカインがどのように產生されているのかは不明である。そこで、今回は、感染局所における炎症性および抗炎症性サイトカインの発現バランスに与える糖尿病の影響を明らかにする目的で、Streptozotocin (STZ) 誘導糖尿病ラットを用いて頬部感染モデルを作製し、炎症巣内における TNF- $\alpha$  と IL-10 濃度を測定し対照群と比較検討した。

#### 実験材料および方法

##### 1. 使用動物

動物は 8 週齢、体重約 250g の Wistar 系雄性ラット（日本クレア）70 匹を使用し、自由摂餌、摂水下に実験を行った。

##### 2. 糖尿病ラットの作製

糖尿病の発症は、STZ100mg を 0.1M のクエン酸緩衝液 (pH4.5) 5ml に溶解し、60mg/Kg の用量でラットの尾静脈より 1 回静注した。STZ 投与 4 週間後で血糖値 300mg/dl 以上のラットを糖尿病群（以下 DM 群、35 匹、血糖値 : 460.6±10.9mg/dl、体重 : 257.8±6.3g）として使用した。また、STZ を含まない 0.1M クエン酸緩衝液のみを同量静注し DM 群と同様に 4 週間飼育したものを作製群（35 匹、血糖値 : 106.2±3.2 mg/dl、体重 : 383.6±2.8g）とした。

##### 3. 使用菌株

使用した菌株は、*S.pyogenes* S-8 で、Mueller-Hinton Broth にて  $10^8$ cfu/ml に調整した菌液を接種用に準備した。

#### 4. 頬部感染モデルの作製

まず、2% の  $\lambda$ -カラゲニンの生理食塩水懸濁液 0.5ml をラットの頬部皮下に注射して炎症を惹起した。カラゲニン注入後 5 日目になると漿液性の滲出液を貯留した膿瘍が形成されるが、この時点では、先に準備した *S.pyogenes* S-8 の菌液 0.2ml ( $2 \times 10^7$ cfu) を膿瘍内へ注入して頬部感染モデルを作製した。

#### 5. 滲出液中のサイトカイン濃度の測定

DM 群、対照群について菌接種前と菌接種後 12、24、48 時間（各時間 : n=5）における膿瘍内滲出液中の TNF- $\alpha$ 、IL-10 濃度を ELISA 法にて測定した。また、膿瘍内の生菌数と滲出液重量も測定した。

#### 6. 病理組織学的検討

DM 群と対照群について菌接種後 12、24、36、および 48 時間で周囲組織を含めて頬部膿瘍を摘出し（各時間 : n=2）、10% ホルマリンで固定後パラフィン包埋を行い、切片作成後に HE 染色により病理組織学的に検討した。

#### 7. 統計学的処理

得られた結果は、平均士標準誤差で表し、群間比較による有意差の検定は Student's t-test を用いて行った。

#### 結果

##### 1. 頬部膿瘍内生菌数と滲出液重量

菌接種後 24 時間までは、DM 群と対照群における膿瘍内の生菌数に差はみられなかったが、DM 群では 36-48 時間で対照群よりも増加した。滲出液重量は、DM 群では経時的に増加する傾向がみられ、36-48 時間で DM 群が対照群よりも有意に高値を示した。

##### 2. 頬部膿瘍内滲出液中の TNF- $\alpha$ と IL-10 濃度

感染後の TNF- $\alpha$  濃度は、DM 群、対照群ともに経時的に上昇する傾向がみられたが、全般に DM 群の方が対照群よりも高く、48 時間で有意差が認められた。IL-10 濃度は、DM 群では感染後 12-48 時間まで感染前と同じレベルであったが、対照群では感染後 12-24 時間で DM 群よりも有意に上昇した。また、TNF- $\alpha$  と IL-10 濃度の比率 (TNF- $\alpha$ /IL-10) を各測定時間における平均値でみると、対照群では 0.26-0.69、DM 群では 1.17-1.67 であり、感染後 12-24 時間まで DM 群の方が対照群よりも有意に高かった。

##### 3. 病理組織学的所見

菌接種後、DM 群、対照群とともに膿瘍の内面に沿って好中球を中心とした炎症細胞浸潤がみられたが、12-24 時間では両群の細胞浸潤の程度に差はみられなかった。菌接種後 48 時間にになると、DM 群の方が対照群よりも炎症細胞浸潤は顕著に認められた。

考察

TNF- $\alpha$ は、好中球やマクロファージの細菌貪食作用を活性化させるが、過剰な生産は組織障害をもたらす。一方、IL-10はTNF- $\alpha$ などの発現を抑制し、さらに直接マクロファージや好中球の機能を抑制して組織障害を軽減するサイトカインとして注目されている。このように、局所でのサイトカイン発現のバランスの変化が組織障害に大きな影響をおよぼす。

敗血症や systemic inflammatory response syndrome (SIRS)において、炎症を促進させる TNF- $\alpha$ と抑制する IL-10 の関係についての報告は多くみられるが、糖尿病における感染局所での TNF- $\alpha$ と IL-10 の発現バランスについて検討した報告はみられない。そこで、STZ 誘発糖尿病ラット頬部感染モデルにおける TNF- $\alpha$ と IL-10 の発現バランスについて検討を行った。その結果、頬部膿瘍内滲出液中の TNF- $\alpha$ は全般に DM 群の方が高く、菌接種後 48 時間で有意差が認められ、IL-10 は菌接種後 12-24 時間で対照群の方が有意に高値を示した。TNF- $\alpha$ /IL-10 の平均値は、DM 群の方が対照群よりも高値を示し、菌接種後 12-24 時間で有意差を認めた。

最近の研究では、炎症が亢進している状態の adult respiratory distress syndrome (ARDS) 患者の気管支肺胞洗浄液や、慢性肺疾患を伴う cystic fibrosis (CF) 患者において IL-10 の有意な低下が報告されている。ARDS 患者、CF 患者とともに IL-10 産生低下の機序は不明であるが、IL-10 の低下が過剰な免疫応答と肺組織損傷に関与していると考えられている。本実験の糖尿病ラットにおいても、感染後は炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ が抗炎症性サイトカイン IL-10 よりも優位であり、IL-10 による炎症反応のコントロールが適切になされていない状態であったと推察できる。実際に、DM 群では対照群と比較して頬部膿瘍内滲出液重量が増加し、病理組織学的にも頬部膿瘍内の炎症細胞浸潤が著明であった。

今回の実験で、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ の上昇と抗炎症性サイトカイン IL-10 の低下が、STZ 誘発糖尿病ラット感染モデルにおける炎症の重症化と組織損傷の一因であることが確認された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 1903 号	氏名	古土井 春吾
論文題目	Balance of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in a buccal infection in a streptozotocin-induced diabetic rat model Streptozotocin 誘発糖尿病ラット頬部感染モデルにおける tumor necrosis factor- $\alpha$ と interleukin-10 の発現バランスについて		
審査委員	主 査 古森 孝英 副 査 田原 真也 副 査 井手 隆一		
審査終了日	平成 15 年 12 月 19 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

TNF- $\alpha$ は、細菌が生体内に進入した際にマクロファージより産生される炎症性サイトカインで、マクロファージや好中球を活性化して病原体排除に作用するなど感染初期の免疫反応において重要な役割を果たしている。一方、Th2 細胞より産生される IL-10 は抗炎症性サイトカインのひとつで、炎症性サイトカインを産生する Th1 細胞の活性やマクロファージ、好中球の機能を直接抑制する作用をもっている。これらのサイトカインは互いに制御し合いながら生体の防御機構を調節している。

糖尿病は易感染性で炎症が重症化しやすいことはよく知られているが、糖尿病下の感染局所で炎症性および抗炎症性サイトカインがどのように産生されているのかは不明である。そこで、本研究では感染局所における炎症性および抗炎症性サイトカインの発現バランスに与える糖尿病の影響を明らかにする目的で、Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットを用いて頬部感染モデルを作製し、炎症巣内における TNF- $\alpha$  と IL-10 濃度を測定し対照群と比較検討した。

動物は 8 週齢、体重約 250g の Wistar 系雄性ラット 70 匹を使用した。

糖尿病の発症は、STZ 100mg を 0.1M のクエン酸緩衝液 (pH4.5) 5ml に溶解し、60mg/Kg の用量でラットの尾静脈より 1 回静注した。STZ 投与 4 週間後で血糖値 300mg/dl 以上のラットを糖尿病群、STZ を含まない 0.1M クエン酸緩衝液のみを同量静注したものを対照群とした。

頬部感染モデルは、2% の  $\lambda$ -カラゲニンの生理食塩水懸濁液 0.5ml をラットの頬部皮下に注射し、5 日後に *S.pyogenes* S-8 の菌液 0.2ml ( $2 \times 10^7$  cfu) を膿瘍内へ注入して作製した。

DM 群、対照群について菌接種前と菌接種後 12、24、48 時間（各時間 : n=5）における膿瘍内滲出液中の TNF- $\alpha$ 、IL-10 濃度を ELISA 法にて測定した。また、膿瘍内の生菌数と滲出液重量も測定した。

本研究において、以下の結果を得た。

1. 菌接種後 24 時間までは、DM 群と対照群における膿瘍内の生菌数に差はみられなかったが、DM 群では 36-48 時間で対照群よりも増加した。滲出液重量は、DM 群では経時的に増加する傾向がみられ、36-48 時間で DM 群が対照群よりも有意に高値を示した。
2. 感染後の TNF- $\alpha$  濃度は、DM 群、対照群ともに経時的に上昇する傾向がみられたが、全般に DM 群の方が対照群よりも高く、48 時間で有意差が認められた。IL-10 濃度は、DM 群では感染後 12-48 時間まで感染前と同じレベルであったが、対照群では感染後 12-24 時間で DM 群よりも有意に上昇した。また、TNF- $\alpha$  と IL-10 濃度の比率 (TNF- $\alpha$  / IL-10) を各測定時間における平均

値でみると、感染後 12-24 時間まで DM 群の方が対照群よりも有意に高かった。

最近の研究では、炎症が亢進している状態の ARDS 患者の気管支肺胞洗浄液や、慢性肺疾患を伴う CF 患者において IL-10 の有意な低下が報告され、IL-10 の低下が過剰な免疫応答と肺組織損傷に関与していると考えられている。本実験の糖尿病ラットにおいても、感染後は TNF- $\alpha$  が IL-10 よりも優位であり、IL-10 による炎症反応のコントロールが適切になされていない状態であったと推察できる。実際に、DM 群では対照群と比較して頬部膿瘍内滲出液重量が増加し、病理組織学的にも頬部膿瘍内の炎症細胞浸潤が著明であった。

今回の実験で、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の上昇と抗炎症性サイトカイン IL-10 の低下が、STZ 誘発糖尿病ラット感染モデルにおける炎症の重症化と組織損傷の一因であることが確認された。

本研究は、STZ 誘発糖尿病ラット頬部感染モデルにおける TNF- $\alpha$  と IL-10 の発現バランスについて検討したものであるが、従来ほとんど行われなかつた顎顔面部の感染局所で産生されるサイトカインに与える糖尿病の影響を調査し、糖尿病ラットにおける炎症の重症化と組織損傷の一因について重要な知見を示したものとして価値ある集積であると考える。よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。