

## ウシ肝臓に対するエンドトキシンの作用とインターロイキン6の役割に関する研究

吉岡 都

The effect of bovine interleukin-6 and endotoxin on the bovine liver

Miyako YOSHIOKA

ウシの飼育において、成長を促進させるための濃厚飼料の多給や飼養方法の変更は腸内フローラのグラム陰性菌の死滅を惹起し、ルーメン内にエンドトキシン(ET)の大量な遊離をもたらす。ウシでの内因性ETに対する生体反応、特に最初の標的臓器である肝臓に対するETの影響を明らかにすることは、畜産経営の損耗を防除し生産性の向上を図るうえで重要である。クッパー細胞は肝臓固有のマクロファージであり、消化管由来のETに最初に応答し、生理活性物質を介して肝細胞をはじめ全身に情報を伝達する。しかし、現在ウシのクッパー細胞の性状や機能はまったく明らかにされていない。

本研究は、ウシの肝臓に対するETの影響を理解するために、ウシ特異的インターロイキン6(IL-6)のアッセイ系を確立し、ウシクッパー細胞における炎症性サイトカインの産生特性を明らかにするとともに、ウシ肝細胞培養系で炎症性サイトカインによる急性期蛋白の誘導について検討した。さらにlipopolysaccharide(LPS)を投与したウシでのIL-6の血中動態や急性期蛋白の誘導の解析を試みた。

### 第1章 ウシクッパー細胞の初代培養法の確立

消化管由来ETに最初に応答するウシクッパー細胞の機能を調べるために、ウシクッパー細胞の初代培養法を開発した。ウシクッパー細胞はコラゲナーゼ/プロナーゼ灌流法により肝尾状葉より分離し、ナイコデンツ密度勾配と対流遠心エルトリエーション(CGE)法により純化した。これにより、肝臓1g当たり平均 $1.5 \times 10^6$ 個のクッパー細胞が98%の生存率で得られた。CGE分離後の細胞は、20%牛胎子血清(FCS)加RPMI1640培地中に $2 \times 10^6$  cells/mlに調整し、5%CO<sub>2</sub>下37℃で培養した。培養24時間後、非接着細胞をピペティングで取り除き、10% FCS加RPMI1640培地と交換後さらに48時間培養を

行った。接着細胞の95%以上は非特異的エステラーゼ陽性で、組織マクロファージのマーカであるCD68分子を発現し、貪食活性が認められた。この初代培養クッパー細胞は約1週間維持可能であった。

### 第2章 LPSによるウシクッパー細胞の炎症性サイトカイン産生動態

培養クッパー細胞におけるサイトカイン産生を検討した。ウシクッパー細胞を1 µg/mlのLPS(*Escherichia coli* O111:B4)で刺激、3、6、12および24時間目に採材し、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、IL-1、IL-6およびプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)の産生動態を測定した。mRNA発現は半定量的RT-PCR法で、タンパク質については生物活性を調べた。TNF- $\alpha$ とIL-1のmRNAはLPS刺激によって3時間から12時間まで発現し、IL-1 mRNAは、刺激3時間に発現、6時間には消失した。IL-6 mRNAは無刺激でもわずかに発現していたが、LPS刺激により発現量が増加し、6時間後をピークとして、12時間から24時間にかけて減少した。TNF- $\alpha$ 活性はLPS刺激後3時間で検出され、12時間にピークとなり、24時間でも維持されていた。IL-1活性はLPS刺激後3時間で検出され、6時間まで増加し、24時間までは少し増加した。IL-6様活性は無刺激でも微量に検出されたが、刺激後6時間でピークに達し、24時間まで維持された。PGE<sub>2</sub>は炎症性サイトカインの分泌が始まる刺激後3時間では産生されなかったが、刺激後6時間から24時間まで増加した。以上から、ウシクッパー細胞がLPS刺激により炎症性サイトカインやPGE<sub>2</sub>を産生すること、その産生動態はウシの肺マクロファージや単球での報告とは異なることが示された。

### 第3章 組換えウシIL-6および抗ウシIL-6モノクローナル抗体の作製とELISA法によるウシIL-6特異的測定法の開発

バキュロウィルス系を用いて組換えウシIL-6の産生系を開発した。組換えバキュロウィルスに感染した昆虫細胞は、抗ヒツジIL-6抗体に反応する分子量約23.8 kDaのタンパク質、すなわちIL-6を分泌した。次にIL-6のアッセイ系を確立するために、組換えウシIL-6に対するウサギ抗血清及びモノクローナル抗体（10B7）を作製し、ELISA法の開発を試みた。IL-6のELISA法は50 pg/mlから20 ng/mlの範囲で測定可能であり、アッセイ内変動係数は8.6%であった。このELISA法は、ヒトおよびマウスIL-6、ウシTNF- $\alpha$ 、ウシIL-1 およびウシIFN- $\gamma$ とは交差反応を示さないことから、ウシIL-6を特異的に測定できることが明らかとなった。得られた組換えウシIL-6は7TD1細胞の増殖を刺激せず、マウスのIL-6依存性細胞に対する細胞増殖活性にはIL-6を産生する動物に種差があることが示唆された。

### 第4章 ウシIL-6および他の炎症性サイトカインによる初代培養肝細胞の急性期蛋白産生

前章までにLPSの培養ウシクッパー細胞の刺激により、ウシIL-6、IL-1、TNF- $\alpha$ が分泌されることを明らかにした。本章では、組換えウシIL-6、IL-1、TNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ が肝細胞の蛋白産生におよぼす作用をin vitroで検討した。ウシ肝細胞を各サイトカインを添加して培養24時間後の上清を回収し、ELISAとウェスタンブロットリングで上清中のアルブミンおよびハプトグロビンの濃度を測定した。ウシIL-6は、ウシ肝細胞のアルブミン産生を低下させ、逆にハプトグロビンの産生を濃度依存性に増加させた。ウシIL-1、TNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ もウシ肝細胞のアルブミンの産生を濃度依存性に低下させ、IL-1 およびTNF- $\alpha$ はハプトグロビンの産生を有意に上昇させた。ハプトグロビン産生作用はIL-6が他

のサイトカインに比べて顕著に高く、ウシ肝細胞でのハプトグロビンの誘導にはIL-6が最も重要であることが示唆された。

### 第5章 LPS投与牛における血中TNF- $\alpha$ 、IL-6、アスパルギン酸トランスアミナーゼ（AST）およびハプトグロビンの動態

前章までのin vitroの実験結果を踏まえ、ウシにLPS（5  $\mu$ g/kg体重）を頸静脈から投与し、経時的に採血を行って、血中サイトカイン、ASTおよびハプトグロビンの動態を解析した。LPS投与後血中TNF- $\alpha$ は一過性に上昇し1から2時間をピークとして、3時間には半減した。いっぽう、血中IL-6はLPS投与後6時間に上昇、9時間でピークに達し、24時間以降低下した。ハプトグロビンは、12から72時間にかけて増加し続け、4日目には低下した。血清ASTは投与後2時間から徐々に上昇し、24時間をピークとして、72時間後には低下した。IL-6の上昇に続いてハプトグロビンが上昇したことから、LPS投与により誘導産生されたIL-6が肝臓での蛋白合成を制御して、急性期反応に関与する可能性が示された。

本研究では、ウシの肝臓に対するETの影響を理解するために、in vitroでのウシクッパー細胞における炎症性サイトカインの産生特性を明らかにした。また、IL-6と病態の関連性や予後診断法としての可能性を検討するために、ウシ特異的IL-6のアッセイ系をELISA法によって確立した。さらに、ウシIL-6の肝臓に対する作用を理解するために、ウシ肝細胞培養系で炎症性サイトカインによる急性期蛋白の誘導について検討した。最後にLPSを投与したウシでのIL-6の血中動態や急性期蛋白の誘導についての解析を試み、ウシでは内因性ETの増加により血中TNF- $\alpha$ 、IL-6が上昇し、このうち一部のIL-6はクッパー細胞から分泌され、肝細胞に作用してハプトグロビン産生を誘導することを明らかにした。