

外科的侵襲の分子生物学的解析

岩垣 博巳, 守本 芳典, 日伝 晶夫, 田中 紀章

キーワード: surgical stress, bacterial insult, operative stress, cancer-burden state, cytokine

諸 言

外科的侵襲 (surgical stress) としては, 手術侵襲 (operative stress), 細菌感染 (bacterial insult) のほか, 癌悪液質状態 (cancer cachexia) に代表される担癌状態 (cancer-burden state) も含めて考えることが出来る。いずれの状態もそれぞれの侵襲により引き起こされる正常組織の損傷, 並びに正常構造の破綻と定義し得る。侵襲に対する生体反応の本態は炎症反応と免疫反応であり, その病態形成には活性化白血球 (activated leukocyte) のみならず, T cell, マクロファージ (macrophage) のほか, 種々の組織細胞によって産生される様々なサイトカイン (cytokine) が関与する。古くから, 術後, 重症感染, 癌悪液質, いずれの侵襲時においても, 細胞性免疫能は低下すると表現されてきた。しかしながら, 侵襲による細胞性免疫能の低下という古典的概念と, 近年明らかになりつつある, 侵襲による炎症性サイトカインの過剰産生という現象は, 今日に到るも, 必ずしも明確な論理体系によって関連づけて説明されてはいないのではなかろうか。ここ数年に亘る教室の外科的侵襲における分子生物学的手法を用いた基礎的臨床的検討をここに概説し, 古典的概念の現代的解析を試みるものである。

侵襲と分子パラメーター

古くから, 侵襲ホルモンとして知られているコルチゾール (cortisol) は, 重症感染, 担癌悪液質, 術後, いずれの外科的侵襲においても有意に上昇, 高値を示した^{1,2)}(図1, 図6)。コルチゾールには, 抗炎症, 免疫抑制作用があることは古くから既知のことであるが, 侵襲時における高コルチゾール血症は, 侵襲による細胞性免疫能低下という古典的概念に一致する。

一方, 活性化マクロファージが産生するプテリジン誘導体 (pteridine) であるネオプテリン (neopterin) は, 近年, ELISA kit が開発され, 簡単に測定可能で, 簡便な細胞性免疫能の指標として注目されつつある。T cell から産生される gamma-interferon (IFN- γ) によってマクロファージが活性化されネオプテリンが産生されることから, ネオプテリンは内因性 IFN- γ の産生量の指標ともされる。このネオプテリン値は, 重症感染患者, 担癌悪液質患者, いずれの状態においても健常成人に比し, 有意に高

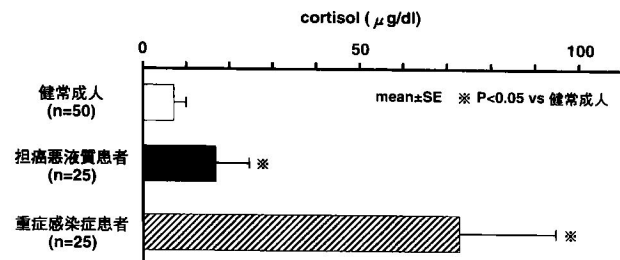


図1 血中コルチゾール値

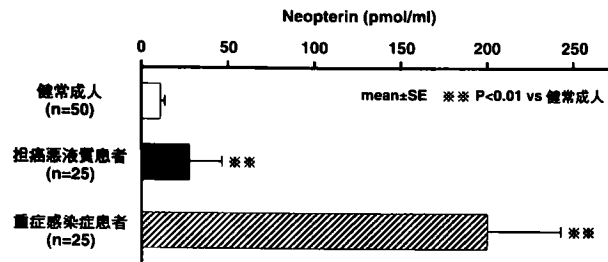


図2 血中ネオプテリン値

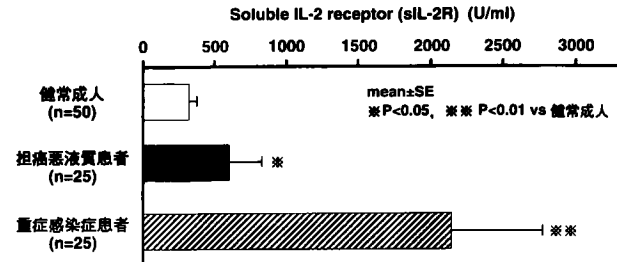


図3 血中 sIL-2 R 値

値であった³⁻⁷⁾(図2)。手術侵襲についても、血中ネオプテリン値は術後一日め有意に上昇することを、われわれは確認している。

可溶性サイトカインレセプターの一つである soluble IL-2 receptor (sIL-2 R) は、ネオプテリンと同様、重症感染、担癌悪液質、術後、いずれの侵襲においても有意な上昇を示した^{8,9)}(図3, 図7)。血中 sIL-2 R は、教科書的には T cell の活性化の指標とされている。T cell が活性化すれば、IL-2 R の細胞膜上の発現が上昇し、膜から遊離 (shed off) し、その結果 sIL-2 R 値が上昇する。ネオプテリンと sIL-2 R の変動には有意の正相関が認められることも、既にわれわれは実証している¹⁰⁾。

重症感染、担癌悪液質、術後において、細胞性免疫能の指標であるネオプテリン、sIL-2 R が上昇するという事実は、侵襲時における細胞性免疫能の低下という古典的概念に相反する。事実、担癌悪液質患者における NK 活性の低下、重症感染症患者の末梢血単核球の細胞障害活性の低下については、われわれも確認している。これらのこととネオプテリン、sIL-2 R 値の上昇にみられる細胞性免疫能の活性化という現象との関連は、どのように解釈すればいいのだろうか。

一つの解釈としては、『侵襲患者の血中レベルの分子マーカーを測定することによる直接的な免疫学的評価と、血球を取り出して *in vitro* で測定する間接的な免疫能の査定は相関しないものである』と考えることが出来る。他の解釈としては、『局所と全身の免疫学的評価は異なるものである』という考えがある。

侵襲局所においては、異常に細胞性免疫能が高まっているが、末梢血中の免疫担当細胞はいわゆる局所で戦ったあとで疲弊しており、それ故、*in vitro* で測定する免疫能は結果として低下すると考えることも可能ではある。いずれにしても、重症感染、術後、担癌状態において細胞性免疫能は低下する、という表現は、サイトカインを始めとする分子マーカーで侵襲を語る現代においては、説明不足で、適当ではないと思われる。

今回の検討で強調すべきことは、重症感染、担癌悪液質、手術という侵襲において、程度の差はあるものの、血中コルチゾール、ネオプテリン、sIL-2 R 値はいずれも上昇し、侵襲に対する生体反応に共通する系路が作動していることが明らかになったことである。

侵襲と SIRS/CARS

血中 sIL-2 R 値は細胞性免疫能の活性化の指標であると述べたが、sIL-2 R そのものは IL-2 と結合することによって、IL-2 の膜表面上の IL-2 R への結合を阻害することから、IL-2 阻害物質である。

したがって、血中における sIL-2 R 高値は、細胞性免疫能の亢進の結果であることは疑問の余地がないが、sIL-2 R 高値の状態は免疫抑制状態と言いつても必ずしも妥当ではない。むしろ、免疫抑制状態であると表現する方が、古典的な概念との間に一致性を見出すことが出来る。この免疫抑制状態には T cell の異常活性化が先行していることを考えると、これ

らの現象は、生体防御反応が有するネガティブフィードバックシステムであると考えられる。

アメリカ Critical Care Medicine 学会は、1991年に合同で敗血症とそれに伴う臓器不全の定義に関する Consensus Conference を開催し、SIRS (systemic inflammatory response syndrome: 全身性炎症反応症候群) という概念を提唱した。その後、1996年に Bone は、生体においてある作用が働くとき、同時に必ず反作用が働き、両者がバランスをとることで生体の恒常性が保たれる、と指摘した。

炎症性サイトカインが誘導される状態では、炎症性サイトカインの阻害物質や拮抗物質も同時に誘導され、抗炎症性サイトカイン優位の状態と呼び、これを CARS (compensatory anti-inflammatory) と定義している。重症感染、担癌悪液質状態における血中の可溶性サイトカインレセプターについては、sIL-2 R の他、tumor necrosis factor (TNF), IL-1, IL-6 などの炎症性サイトカインのレセプターについても上昇し、高値であることをわれわれも確認している^{8,9)}。

事実、外科的侵襲によって、SIRSの臨床診断基準(体温： $<36^{\circ}\text{C}$, $>38^{\circ}\text{C}$ ，脈拍： $>90/\text{min}$ ，呼吸数： $>20/\text{min}$)を満たす状態にあっても、血中のTNF, IL-1を始めとする炎症性サイトカインの陽性率は低く、むしろ炎症性サイトカインの阻害物質や拮抗物質の陽性率が高いCARSの状態にあることが臨床的には常態である¹⁾。

このように、SIRSの診断基準は臨床的徴候であるのに対し、CARSの診断基準は血中の抗炎症性サイトカインレベルによるものであり、次元が異なる。近年、外科的侵襲をSIRS/CARSという相対立する概念で語ることが多いが、却って、外科的侵襲の病態を把握するのに混乱を招いている側面があることは否定し得ないであろう。

末梢血中に炎症性サイトカイン阻害物質が大量に存在していることは、局所において炎症性サイトカインが大量に産生されたか、されているかのいずれかであると考えられることができる。従って、臨床的にはSIRSであるが、血中レベルではCARSである

という状態は、侵襲局所では過剰な炎症反応が惹起されている一方、全身ではネガティブフィードバックシステムが作動し、抗炎症反応が惹起されている状態、あるいは、侵襲局所では細胞性免疫の亢進、全身では免疫抑制状態にあると表現するのが、適切であると思われる。

前述したが、侵襲時における高コルチゾール血症も、局所における過剰な炎症反応と免疫反応を抑制するフィードバックシステムの一つであると考えることが出来る。

担癌侵襲における IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) の挙動

重症感染症例における血中 IL-1 ra 値は異常高値を示した。術後も、sIL-2 R や sTNF-R とともに、IL-1 ra 値は上昇する。一方、担癌悪液質患者の血中 IL-1 ra 値は、健常成人に比し、有意に低値を示した^{1,8,9,11,12)} (図4)。

前述したが、重症感染、担癌悪液質、手術という外科的侵襲において、程度の差はあるものの、cortisol, neopterin, sIL-2 R はいずれも上昇傾向を示し、三つの侵襲による生体反応には共通の経路が作動していることが示唆された。炎症性サイトカインの一つである IL-1 の拮抗物質である IL-1 ra の挙動は、侵襲により異なり、担癌侵襲においては、感染、手術とは異なる生体反応系が作動していることが示唆された。

担癌患者の血中の IL-1 ra, sIL-2 R, soluble CD 30 (sCD 30) の相関関係を検討すると、sCD 30 は IL-1 ra とは負の相関関係、sIL-2 R とは正の相

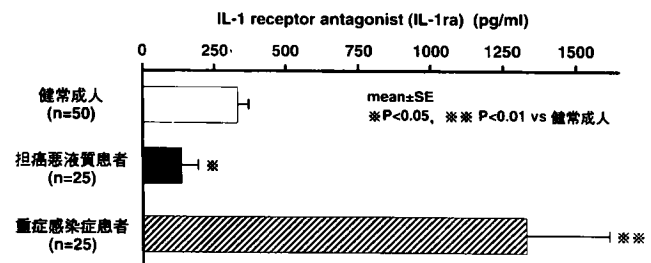


図4 血中 IL-1 ra 値

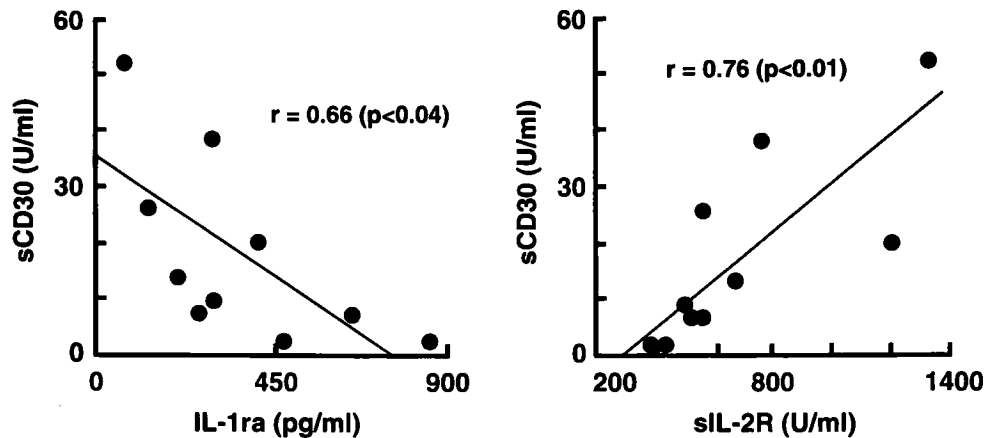


図5 担癌悪液患者における sCD 30, sIL-2 R, IL-1ra の相関関係

関関係にあることが明らかとなった^{13,14)}(図5)。血中 sCD 30 値の上昇は, type 2 T cell が持続的に活性化されていることを示唆し, これまで自己免疫疾患や AIDS などのウイルス疾患で報告されている。

従って, sCD 30 が T cell の活性化の結果として遊離される sIL-2 R と正相関にあることは論理的に諒解される。一方, sCD 30 と IL-1ra が逆相関にあるのは, 担癌悪液質において sCD 30 が高値, IL-1ra が低値であることの反映であると考えられる。

担癌患者における血中 IL-1ra 低値は, IL-1ra の産生低下と消費亢進の可能性が考えられる。IL-1ra は IL-1 の産生に依存して単球系細胞から産生される。事実, 担癌患者の単球系細胞の *in vitro* における IL-1 産生能は低下していることから¹⁵⁾, 結果として, IL-1ra の産生も低下しているものと推定される。

先にも述べたが, 担癌状態においては, 種々の可溶性サイトカインレセプターの血中レベルが増加している。soluble IL-1 receptor (sIL-1 R) が増加しているとすれば, IL-1ra は sIL-1 R と結合することによって消費され, 結果として IL-1ra 値は低下するものと推定される。事実, 担癌患者の末梢血単核球の *in vitro* における IL-1ra 産生は, 担癌血漿を除去することによって高まることを, われわれは確認している¹⁵⁾。

担癌患者に対する適切な IL-1ra 投与は, sIL-

1 R を捕捉することによって IL-1 阻害物質を減少させ, 相対的に IL-1 産生を高めることになる。その結果, 担癌状態における免疫異常が是正され, IL-1 によって駆動されるサイトカインカスケードが機能し, 癌悪液質患者の感染に対する生体防御能が高まる一つの治療法になり得るものと, 考えられる⁷⁾。

IL-1 は生体防御機構において重要な役割を有しているが, 同時にその過剰産生が原因となる病態が存在する。これらの病態のなかで, 敗血症性ショック, 炎症性腸疾患, リューマチ性関節炎などに対する IL-1ra 投与の臨床試験の有効性を示唆する報告も散見されるが^{16,17)}, 担癌状態における IL-1ra 投与とは意義が異なる。

敗血症や炎症性腸疾患においては, 血中 IL-1ra は高値である。更なる IL-1ra 投与が有効であるという試験成績は, 通常より高い IL-1ra レベルをもってしても局所の過剰な炎症反応を抑制できない状態にあるものと, 解釈出来る。外因性 IL-1ra 投与が不足分の IL-1ra を補い, 過剰な局所の炎症反応を制御する結果, 病態が是正されたと考え得る。

これと同様のことは, 高ステロイド血症を示す重症感染に対するステロイド投与療法にみる事が出来る。敗血症に対するステロイド投与は, その有効性については賛否両論あるが, 時として病態の症状を緩和することが知られ, 臨床において頻用される治療法である。本治療は, 不足しているステロイド

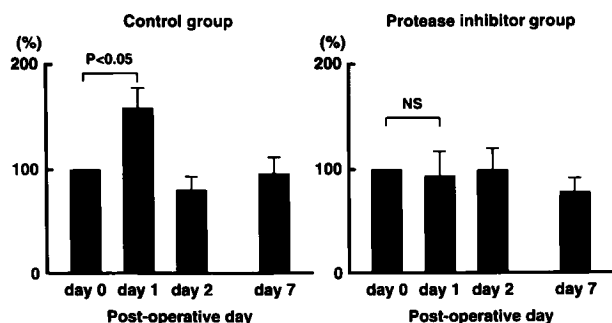


図6 術後患者における血中コルチゾール値の変化

を補う結果、臨床症状が改善すると考えられ、ステロイドカバーと呼ばれている。

手術侵襲による免疫抑制状態と プロテアーゼインヒビター

周術期にプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor: Futhan) を投与したときの血中コルチゾールと sIL-2 R の術後変動を、Futhan 非投与群と比較検討した (図 6, 図 7)。麻酔導入直前から Futhan を 0.1mg/kg/h の速さで 24 時間投与したものを protease inhibitor 投与群とした。前述したように、control 群においては、day 1 において血中コルチゾールと sIL-2 R は有意に上昇したが、protease inhibitor 投与群においては、有意の上昇は認められなかった。このことは、周術期における protease inhibitor 投与が手術侵襲を軽減することを示唆する。いま一つ注目すべきことは、serine protease inhibitor である Futhan を周術期に投与することによって、可溶性サイトカインレセプターである sIL-2 R の上昇が抑制されたことである¹⁸⁾。

前述したように、sIL-2 R は T cell の活性化に伴い産生され、それ自体は IL-2 inhibitor として免疫抑制的に機能する。いずれのサイトカインレセプターも基本的には膜結合性の metalloprotease (MMP) による proteolytic cleavage によって膜より遊離し (shed off)、可溶性サイトカインレセプターとなる。MMP の活性化には serine protease が関与する経路もあることが知られている。

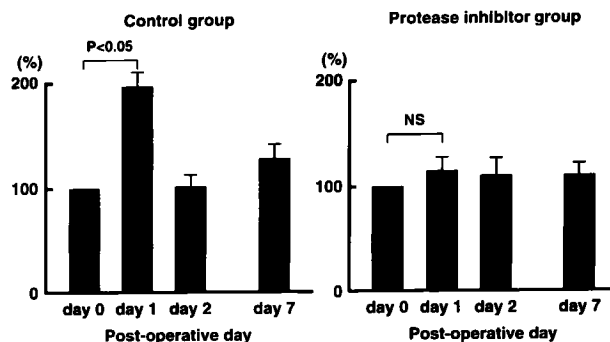


図7 術後患者における血中 sIL-2 R 値の変化

今回の臨床検討で認められた Futhan 投与による術後の sIL-2 R 上昇の抑制は、serine protease 活性の抑制を介する MMP 活性の阻害、その結果としての IL-2 R の膜表面からの遊離抑制による可能性が示唆される。このように、抗凝固作用を目的として使用されるプロテアーゼインヒビターは、生体反応系としての免疫反応に密接に関与することについては、今後、更に検討すべき課題であると考えられる。

周術期に protease inhibitor を投与すると、IL-6 の他に、CRP (C-reactive protein) や PSTI (pancreatic secretory trypsin inhibitor) などの急性相蛋白 (acute phase protein)、好中球エラスターゼ (leukocyte elastase) の活性などの術後の上昇が制御され、結果として早期に術後の SIRS からの臨床症状から離脱するという報告がある。外科的侵襲による生体反応におけるプロテアーゼの関与は想像以上の広範囲に及ぶものと推定される。

重症感染症における免疫抑制と

T cell apoptosis

重症感染症における T cell の動態に関しては未だよく解明されてはいない。しかし、重症感染症患者においては、主として T cell によるリンパ球減少による細胞性免疫能の低下が惹起されていることについては古くから知られている。

これらの T cell の細胞死が、病原菌によって抗原刺激が加えられたことによる activation-induced cell

death (AICD) によるアポトーシス (apoptosis) であることを、われわれは実証した。重症感染症患者と健常成人それぞれから新鮮分離された T cell に anti-CD 3 を添加培養 (16 h) し、フローサイトメトリ (FACSCAN) を用い、sub-G 1 group : M1 領域を検出することで T cell apoptosis の比率を測定した。

その結果、患者の T cell は anti-CD 3 添加によって有意に apoptosis が増加したのに対し、健常成人の T cell apoptosis は anti-CD 3 添加によっても増加傾向は示さなかった^{19,20)} (図 8)。このことは、重

症感染症例の T cell においては apoptosis の感受性 (susceptibility) が高まっていることを示唆する。

健常成人と重症患者の CD 3⁺ T cell の Fas 発現を FACSCAN で解析すると、健常成人においては約 40%，患者においては約 90% であり、患者において有意に高発現であり、病原菌の抗原刺激により患者 T cell は活性化された状態にあることが示唆される^{19,20)} (図 9)。患者 T cell が既に活性化された状態にあることが、anti-CD 3 添加培養にて有意に apoptosis による細胞死が増加する原因と考えられるとともに、この T cell apoptosis には Fas-Fas ligand

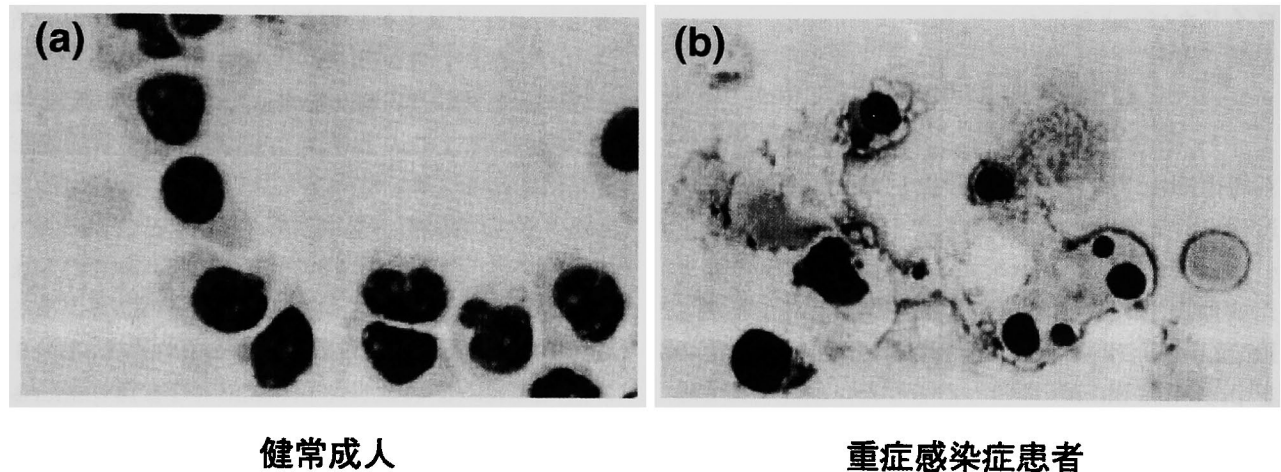


図 8 Anti-CD 3 添加培養 16 h 後の T Cell

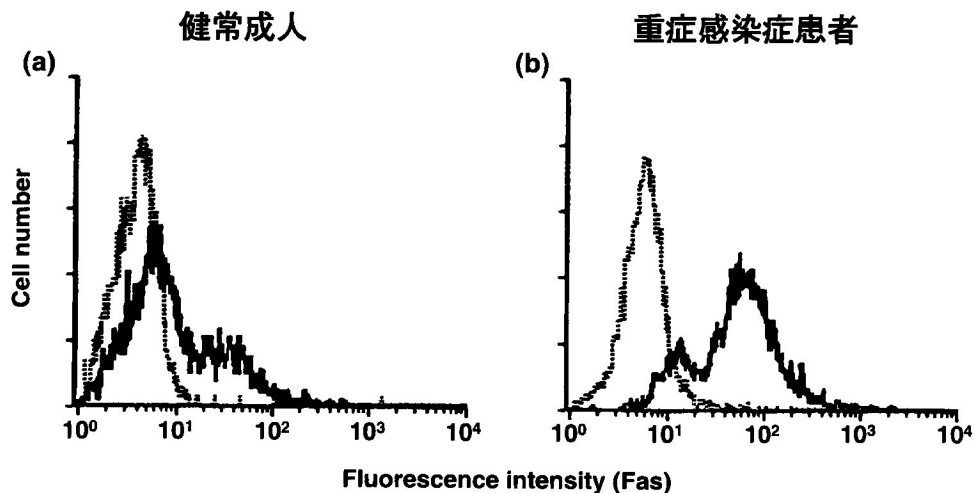


図 9 CD 3⁺ T Cell の Fas 発現強度

system が関与していることが示唆された。

ところで、重症感染症患者の培養系における apoptosis は IL-2 の添加培養によって apoptosis による死は有意に減少する。前述したように、重症感染症患者の血中 sIL-2 R 値は健常成人に比し有意に高く、結果として重症感染症患者においては、相対的に IL-2 欠乏状態にあると推定される。重症感染症例においては前述したように、病原菌の抗原刺激によって T cell は活性化状態にあり、AICD による apoptosis の感受性が高まっている。このような状態に新たな外科的侵襲が加われば、T cell apoptosis による細胞死が更に惹起され、細胞性免疫能の抑制が助長され、感染は更に遷延するものと推定される。

従って、このような免疫抑制状態に IL-2 を投与することは、T cell apoptosis の回避を介し、感染遷延状態から離脱し得るものと推定され、結果として多臓器不全状態が是正される可能性が示唆される。

結語：侵襲に対する生体反応系としての neuro-endocrine-hepatic axis

感染、担癌、手術という外科的侵襲に対する生体反応についての分子生物学的解析を概説した。その結果、コルチゾール、ネオプテリン、sIL-2 R の変化に認められるように、共通する反応系があることが明らかになった。一方、IL-1ra の挙動に見られるように、当然のことではあるが、異なる反応系もあることが示唆された。これまで、外科的侵襲時には細胞性免疫能は低下すると簡潔に表現されてきたが、その本態は複雑である。

感染症患者の T cell の Fas 発現率は高く、むしろ T cell に代表される細胞性免疫能は活性化していると考えられる。sIL-2 R も細胞性免疫能の指標とされるが、いずれの外科的侵襲においても上昇している。sIL-2 R 自身は IL-2 阻害物質として機能することから、sIL-2 R 高値の状態そのものは細胞性免疫能が抑制されている状態である。従って、外科的侵襲による生体反応は、細胞性免疫能の異常亢進とそれに伴う免疫抑制状態『over immune activation and compensatory immune suppression』と

表現するのがより適切であると思われる。

担癌状態、重症感染、手術後には細胞性免疫能は低下し、低下している細胞性免疫能を上げることによって外科的侵襲による病態が是正されるという古典的概念は、変容を余儀なくされる。外科的侵襲によって細胞性免疫能は低下すると表現するよりは、外科的侵襲によって惹起された免疫異常が生体の恒常性を喪失すると表現した方が、より適切であろう。自己免疫疾患や、炎症性腸疾患の病態は、細胞性免疫の異常亢進が組織破壊に連なることは周知のことである。細胞性免疫能を上げることが生体にとって常に有益であるというのは、われわれ外科医がこれまで抱いてきた幻想ではなからうか。

生体反応には生体の恒常性を維持するためのフィードバックシステムがあることは、今回の検討においても明らかである。細胞性免疫能を上げるシステムと下げるシステム、SIRS を引き起こすシステムと CARS を引き起こすシステムのように、相反するシステムが生体の恒常性を制御し、維持しているのである。

免疫賦活や炎症反応を惹起するシステムと同程度に、免疫抑制と抗炎症のシステムは生体防御と生体の恒常性の維持に重要な機能を果たしているものと考えられる。むしろ、過剰な炎症反応による組織障害を制御するという意味においては、免疫抑制と抗炎症のシステムの方が、より生体防御に重要なシステムとも考えられる。

侵襲に対する生体の恒常性は免疫系のみで維持されているわけではない。外科的侵襲によって単球系細胞から炎症性サイトカインが産生され、生体防御に向けた炎症反応のカスケードが作動する。炎症性サイトカインは脳内に到り、hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA axis) を活性化、その結果、副腎よりステロイドが産生される。ステロイドは炎症性サイトカインの産生を抑制する一方、肝に作用し、抗炎症性サイトカイン IL-10 の誘導産生を介し抗炎症反応の系が作動する。炎症反応のカスケードの中で産生される IL-6 は肝に作用し、様々な急性相蛋白 (acute phase protein : APP) の生成に関与する

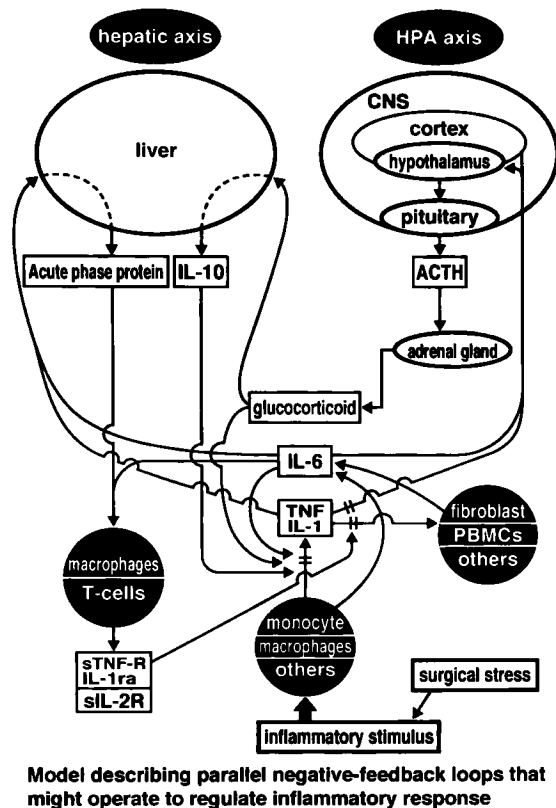


図10 生体防御機構としての neuro-endocrine-hepatic axis

(図10).

急性相蛋白の一つである CRP (C-reactive protein) は、マクロファージに作用し、sTNF-R、IL-1ra などの炎症性サイトカインの拮抗物質の誘導に関与することが、*in vitro* の実験系で実証されている²¹⁾²²⁾。すなわち、APP は炎症性サイトカインの拮抗物質の産生を介し、抗炎症、免疫抑制的に機能する。生体は侵襲を受けたとき炎症反応のカスケードを開始するが、この炎症反応を制御するのは、ステロイドを産生する HPA axis と、APP と IL-10 を産生する免疫抑制臓器としての肝臓である。われわれは、この抗炎症反応システムを neuro-endocrine-hepatic axis と名付け、更なる解析を進行中である。

いずれにしても、外科的侵襲に対する生体反応は

複雑多岐に亘り、それぞれの侵襲には共通する系もあれば、当然のことながら、異なる反応系もある。いずれにしても、侵襲に対する生体反応は、細胞性免疫のみならず、神経内分泌免疫系 (neuro-endocrine-immune system) すべてを含んだ生体防御機構として把握し、語るべき問題であり、今後の更なる包括的な研究の進展が望まれるものである。

文 献

- 1) 岩垣博巳, 他: 集中治療 (1998) **10**, 823—832.
- 2) Iwagaki H, et al: Acta Med Okayama (1997) **51**, 233—236.
- 3) Iwagaki H, et al: Immunol Invest (1995) **24**, 479—487.
- 4) Iwagaki H, et al: Immunol Invest (1995) **24**, 467—478.
- 5) Iwagaki H, et al: Pteridines (1998) **9**, 29—32.
- 6) Iwagaki H, et al: Pteridines (1999) **10**, 20—23.
- 7) 岩垣博巳, 他: 日消外会誌 (1993) **26**, 2433—2438.
- 8) Iwagaki H, et al: Res Commun Mol Path (1997) **96**, 25—34.
- 9) 岩垣博巳, 他: 外科治療 (1998) **79**, 118—119.
- 10) Iwagaki H, et al: Acta Med Okayama (1994) **48**, 225—226.
- 11) Iwagaki H, et al: Scand J Gastroenterol (1997) **32**, 577—581.
- 12) 岩垣博巳, 他: Biotherapy (1997) **11**, 375—377.
- 13) 岩垣博巳, 他: Biotherapy (1998) **12**, 245—247.
- 14) Iwagaki H, et al: J Med (1999) **30**, 111—121.
- 15) Shimamura H, et al: J Int Med Res (2000) **28**, 277—287.
- 16) Alexander HR, et al: Surgery (1992) **112**, 188—194.
- 17) Cominelli F, et al: Gastroenterology (1992) **103**, 5—71.
- 18) Iwagaki H, et al: Acta Med Okayama (1999) **53**, 239—244.
- 19) Kodera M, et al: Res Commun Mol Path (1999) **104**, 205—218.
- 20) 岩垣博巳, 他: 臨床病理 (2000) **48**, 505—509.
- 21) Tilg H, et al: J Exp Med (1993) **178**, 1629—1636.
- 22) Pue CA, et al: J Immunol (1996) **156**, 1594—1600.