

実験的小腸縦走潰瘍におけるマクロファージと催炎症性サイトカインの役割 —マクロファージ除去ラットを用いた検討—

垂水 研一

〔背景・目的〕ラットにインドメタシンを経肛門的に投与すると、Crohn病に類似した腸間膜付着側の小腸縦走潰瘍が発生する。近年、この小腸縦走潰瘍の発生に腸内細菌叢由来のリポ多糖が重要な役割を担っていることが報告された。そこで、本研究では小腸縦走潰瘍の発生におけるリポ多糖の標的細胞であるマクロファージの関与を検討した。

〔方法〕6週齢の雄性Wistar系ラットに、ジクロロメチレン・ビスフォスフォネートを含有するリポソームを腹腔内に投与しマクロファージ除去ラットの作製を試み、インドメタシン24 mg/kgを注腸した後の小腸潰瘍性病変を評価した。また、マクロファージ非除去ラットにtumor necrosis factor- α , interleukin-6, interleukin-1 β の中和抗体を単独または併用で腹腔内投与し、インドメタシン起因性小腸縦走潰瘍を評価した。さらに、マクロファージ除去ラットにリコンビナントtumor necrosis factor- α , interleukin-6, interleukin-1 β を単独または併用投与した時のインドメタシン起因性小腸縦走潰瘍への影響を観察した。小腸潰瘍の評価は、インドメタシン投与の24時間後に摘出した全小腸を観察し、小腸全長に占める縦走潰瘍総長の比率 (ulcer index), および組織学的傷害スコアで評価した。

〔結果〕ジクロロメチレン・ビスフォスフォネート含有リポソームを投与すると、小腸組織内マクロファージは有意に減少した。このマクロファージ除去ラットでは、小腸縦走潰瘍のulcer indexが無処置群の19.6%に抑制された。マクロファージ非除去ラットでも、抗tumor necrosis factor- α , interleukin-6, interleukin-1 β 中和抗体を投与するといずれも用量依存性に小腸縦走潰瘍の発生が抑制され、併用投与ではさらに抑制効果が増強し、3剤すべて併用すると87.5%の抑制率となった。さらに、マクロファージ除去ラットにリコンビナントtumor necrosis factor- α , interleukin-6, interleukin-1 β を投与することで小腸潰瘍が再現された。また、組織学的傷害スコアはすべてulcer indexと相関していた。

〔結論〕ラットのインドメタシン起因性小腸縦走潰瘍モデルでは、マクロファージの存在下で催炎症性サイトカインの産生を介して小腸縦走潰瘍が誘発されている。

(平成14年9月24日受理)

Essential Role of Macrophages and Macrophage-Related Proinflammatory Cytokines in Indomethacin-Induced Enteropathy in Rats

Ken-ichi TARUMI

〔Introduction〕 Intrarectal administration of indomethacin induces longitudinal ulcers of the small

intestine in rats similar to those in Crohn's disease. A recent study reported that lipopolysaccharide from intestinal flora played a central role in this experimental enteropathy.

[Aims & Methods] The aim of this study was to investigate the role of macrophages in indomethacin-induced enteropathy. In the first experiment, male Wistar rats were intraperitoneally given liposomes containing 50, 200 or 400 mg/kg of dichloromethylene-bisphosphonate (Cl_2MBP), which is known to injure macrophages. Four days after the Cl_2MBP -liposome administration, the number of macrophages in the small intestine was evaluated by the immunohistochemical method. In the second experiment, the rats administered 400 mg/kg of Cl_2MBP -liposomes were intrarectally given 24 mg/kg of indomethacin. In the third experiment, the conventional Wistar rats were intraperitoneally given anti-cytokine neutralizing antibodies against tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β) before indomethacin administration. In the fourth experiment, after administration of Cl_2MBP -liposomes, the macrophage-depleted rats were given recombinant rat TNF- α , IL-6 and IL-1 β before indomethacin administration. In all experiments except the first one, small intestinal damage was macroscopically and histologically assessed 24 hours after indomethacin administration.

[Results] In all the rats administered Cl_2MBP -liposomes, depletion of macrophages in the small intestine was observed. Indomethacin-induced small intestinal damage in these macrophage-depleted rats strikingly decreased to 19.6%. Administration of anti-TNF- α , IL-6 and IL-1 β neutralizing antibodies significantly ameliorated indomethacin enteropathy in a dose-dependent fashion. Inhibition of enteropathy by a combination of the three antibodies reached up to 87.5%, which was equal to that in the macrophage-depleted rats. Additional administration of recombinant rat proinflammatory cytokines restored indomethacin enteropathy in the macrophage-depleted rats.

[Conclusions] The results indicated that macrophages play an important role in indomethacin enteropathy in rats via the production of proinflammatory cytokines. (Accepted on October 24, 2002)

Kawasaki Igakkaishi 28(4) : 243-256, 2002

Key Words ① Indomethacin-induced enteropathy ② Proinflammatory cytokine
③ Macrophage ④ Macrophage-depleted rat
⑤ Dichloromethylene bisphosphonate

はじめに

インドメタシン (indomethacin, 以下 Indo) に代表される非ステロイド性抗炎症剤 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, 以下 NSAIDs) は消化管粘膜傷害を引き起こすことが知られている。Indo の経口もしくは皮下投与による実験的胃粘膜傷害に関しては、古くから数多くの検討が行われてきたが^{1)~3)}, Matsumoto ら⁴⁾ はラットへ経肛門的に投与することで小腸優位の粘膜傷害が誘発されることに注目した。すなわち、投

与 2 時間後から中部小腸の腸間膜付着側を中心にアフタ様の粘膜欠損が生じ、12~24 時間後に Crohn 病類似の縦走潰瘍へと進展する⁵⁾。この小腸病変は、経腸栄養剤を用いた栄養療法やステロイド剤をはじめとする免疫抑制剤投与で抑制され、肉眼形態とあわせて Crohn 病の動物実験モデルと考えられている^{6),7)}。よって、本モデルの発生機序の研究は、未だ不明とされる Crohn 病の病因論解明への手がかりとなる。近年、Koga ら⁸⁾ は、本モデルの小腸縦走潰瘍発生に腸内細菌叢由来のリポ多糖 (lipopolysaccharide, 以下 LPS) が深く関与していることを報告した。

LPS はグラム陰性菌の菌体成分であるが、内毒素とも呼ばれ生体に様々な障害を引き起こす強い生理活性物質である。マクロファージ (M ϕ) 上には LPS の受容体である CD14⁹⁾ や toll-like receptor¹⁰⁾ などが表出されている。また、種々の炎症性疾患において tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 beta (IL-1 β) 等のサイトカインが関与すると言われているが、M ϕ はこれらの催炎症性サイトカインの産生細胞でもある¹¹⁾。そこで、本モデルの小腸縦走潰瘍発生に M ϕ が関与しているという仮説に基づき、以下の検討を行った。

材料と方法

1. 使用動物

体重 190~220 g の 6 週齢雄性 Wistar 系ラット (チャールスリバー・ジャパン, 神奈川) を使用した。ラットは 5 週齢で購入, プラスチックゲージにて自由摂水および自由摂餌 (オリエンタル酵母, 大阪) の条件下に 1 週間かけて馴化 (室温 23 \pm 3 $^{\circ}$ C, 7 時から 21 時まで照明) した。

2. Indo 起因性小腸縦走潰瘍モデルの作製

Matsumoto ら⁴⁾ の報告に準じ, アモバルピタール 100 mg/kg の腹腔内投与による麻醉下で 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム液に懸濁した Indo (Sigma, St.Louis, USA) を 24 mg/kg の用量でゾンデを用い経肛門的に単回投与した。24 時間後にアモバルピタールの腹腔内過量投与で苦痛なく屠殺し, 全小腸を摘出したうえで小腸傷害を評価した。

3. M ϕ 除去ラットの作製

ジクロロメチレン・ビスフォスフォネート (Cl₂MBP) を多層性リポソーム内に封入してラットに投与することで M ϕ を選択的に除去する Rooijen ら^{12), 13)}, Hamano ら¹⁴⁾ の報告に準じた。すなわち,

ホスファチジルコリン (和光純薬, 大阪) 75 mg とコレステロール (和光純薬, 大阪) 19 mg をクロロホルム (和光純薬, 大阪) 10 ml に溶解し 1000 ml のナス型フラスコを用いロータリーエバポレーターによって薄い脂質フィルムを作製する。Cl₂MBP (キッセイ薬品, 長野) 2.5 g を含有する 10 ml の phosphate-buffered saline (PBS) 溶液を加えて振盪した後, 室温で 2 時間放置する。この懸濁液を超音波発生装置で 3 分間の音波破碎を行い, さらに室温で 2 時間放置した後, 30 分間 100,000 g で超遠心分離を行う。最後に PBS 4 ml で再懸濁し 10 mg/ml の Cl₂MBP 含有溶液を作製した。この溶液をラットの腹腔内に投与し, M ϕ 除去ラットの作製を試みた。

4. 小腸病変の評価

Indo 投与の 24 時間後に取り出した全小腸を肉眼的に観察し, Matsumoto ら⁴⁾ の方法に準じて評価した。すなわち, 長径 10 mm 以上の潰瘍を縦走潰瘍と定義した (Fig. 1A, B)。全小腸の縦走潰瘍の長径を全て計測し, 全小腸長径に占める縦走潰瘍総計の割合を ulcer index (%) とし, 小腸傷害の代表的指標とした。また, 長径 10 mm 未満の潰瘍を斑状潰瘍と定義し, 全小腸における数を集計した。さらに, Vilaseca ら¹⁵⁾ の方法を一部改定し, Table 1 に示す通りの組織学的傷害スコアを作成した。潰瘍が最も高度な部分を, この組織学的傷害スコアを用いて評価した。

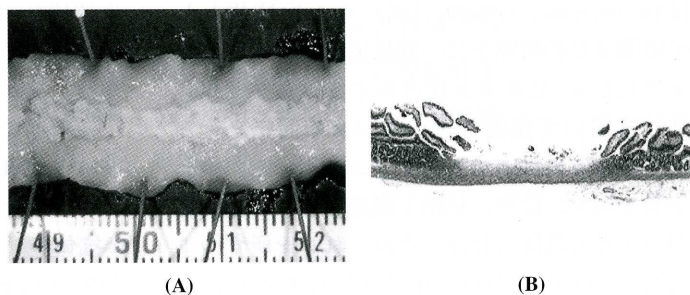


Fig. 1. Macroscopic view of a typical longitudinal ulcer of the small intestine in an indomethacin-treated rat (A). Microscopic view of the longitudinal ulcer of the rat small intestine in the indomethacin-treated rat (B). ($\times 40$, H & E)

Table 1. Histological damage score of the small intestine

Width of the ulceration	No ulcer	0
	Small ulcers < 3mm	1
	Large ulcers > 3mm	2
Depth of the ulceration	None	0
	Mucosa	1
	Submucosa	2
	Muscularis propria	3
	Serosa	4
Inflammation	None	0
	Mild	1
	Moderate	2
	Severe	3
Thrombi	No	0
	Yes	1
Maximum score		10

Modified criteria reported by Vilaseca et al¹⁵⁾

5. 小腸における Mφ の除去効果

Cl₂MBP 含有リポソームの投与量の設定と小腸 Mφ の除去を確認するため以下の検討を行った。Cl₂MBP 含有リポソームの投与量を 50 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg の 3 段階 (各 5 匹) に分け、ラットの腹腔内に投与した。Cl₂MBP 含有リポソーム投与から 4 日後にアモバルピタールを腹腔内に過量投与して屠殺した。全小腸を摘出して 10% 緩衝ホルマリンで即時固定して 24 時間後に中部小腸を横断面でパラフィン包埋し、厚さ 4 μm の切片を作製した。この標本を脱パラフィンした後、3% H₂O₂ 加メタノールにて室温 10 分で内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。十分な洗浄後、100 倍に希釈した抗 ED2 抗体 (Serotec, Oxford, UK) を 1 次抗体として室温 4℃ の暗室下に一晚反応させ、ストレプトアビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体法を用いて発色させ小腸 Mφ の同定を行った。核染色にはヘマトキシリンを用いた。中部小腸を絨毛、陰窩、粘膜下組織ならびに固有筋層の 4 つの部位に分け、それぞれ 3ヶ所ずつ 1 視野 0.2 mm² における陽性細胞を集計し、その総和を計算して、1 視野あたりの平均値を小腸組織内 Mφ 数として算出した。対照として、Cl₂MBP の代わりに PBS を含有するリポソーム

を作成しラットに腹腔内投与した群、ならびにリポソームを全く投与しない群を定め同様の検討を行った。

6. Mφ 除去ラットにおける Indo 起因性小腸縦走潰瘍抑制効果の検討

Cl₂MBP 含有リポソーム投与で作製した Mφ 除去ラット群、PBS 含有リポソームを投与した Mφ 非除去ラット群、リポソームを全く投与しない無処置ラット群の 3 群 (各 6 匹) に対し Indo を注腸投与し、小腸傷害の程度を比較検討した。なお、リポソーム投与群では、リポソーム腹腔内投与の 4 日後に Indo を注腸した。

7. 催炎症性サイトカイン中和抗体を用いた検討

リポソームを投与していないラットにサイトカインの中和抗体 3 種を単剤で投与し、それぞれ投与量を 3 群に分けて評価した。また中和抗体を 2 剤もしくは 3 剤併用してその効果をみた。Indo は抗体投与の 3 時間後に注腸投与した。中和抗体は抗 TNF-α 抗体 (R&D Systems, Minneapolis, USA) : 2 μg/kg, 20 μg/kg, 200 μg/kg, 抗 IL-6 抗体 (SynBio, Nijmegen, Netherlands) : 1 μg/kg, 50 μg/kg, 250 μg/kg, および抗 IL-1β 抗体 (Endogen, Woburn, USA) : 25 μg/kg, 100 μg/kg, 500 μg/kg を使用した。また、ラットは各群ごとに 6 匹用いた。

使用した抗 TNF-α 抗体はリコンビナント・ラット TNF-α をマウスに感作し精製された単クローン IgG 抗体で、10~40 μg/ml の抗 TNF-α 抗体が 0.025ng/ml のリコンビナント・ラット TNF-α の生物活性を 50% まで中和する。抗 IL-6 抗体はリコンビナント・マウス IL-6 をラットに感作させ精製した抗マウス単クローン IgG 抗体ではあるが、ラットにも交差性が認められて

いる。抗IL-1 β 抗体はリコンビナント・ラットIL-1 β をウサギに感作させ精製された多クローン抗体でラットに特異的な抗体である。

8. M ϕ 除去ラットに対するリコンビナントサイトカインの効果

M ϕ 除去ラットに対し、リコンビナント・ラット (rr) TNF- α (Pepro Tech EC, London, UK) 10 μ g/kg を腹腔内投与し、1 時間後に Indo を注腸投与して小腸傷害を評価した。同様に、rrIL-6 (Pepro Tech EC, London, UK) 10 μ g/kg, rrIL-1 β (Pepro Tech EC, London, UK) 10 μ g/kg を投与し Indo による小腸傷害を検討した。さらに、これらの rr サイトカインを 2 種類もしくは 3 種類併用投与し、小腸傷害に対する影響を評価した。

9. 統計解析

小腸傷害の肉眼的評価および組織学的傷害スコアは平均値 \pm 標準偏差で表した。各群における統計学的有意差は一元配置分散分析法ならびに多重比較検定を用い、危険率 $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありとした。解析は統計解析ソフト Macintosh 版 Stat View J-5.0 (SAS Institute, Cary, USA) を用いて行った。

なお、本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認 (No. 00-030) を受け川崎医科大学動物実験指針に基づき行った。

結 果

1. ラット小腸における Cl₂MBP 含有リポソームの M ϕ 除去効果

PBS 含有リポソームを投与した

ラットの腸 ED2 陽性細胞数は 10.8 ± 5.3 個/ mm^2 で、リポソームを投与しない通常ラットの陽性細胞数と差はなかった。Cl₂MBP 含有リポソームを腹腔内投与すると用量依存性に小腸 ED2 陽性細胞は減少し、400 mg/kg 投与では 1.6 ± 0.9 個/ mm^2 となり、PBS 含有リポソーム投与ラットの 14.8% にまで減少した (Fig. 2A, B, Fig. 3)。以上より、以後の実験の全ての M ϕ 除去ラットは Cl₂MBP 含有リポソーム 400 mg/

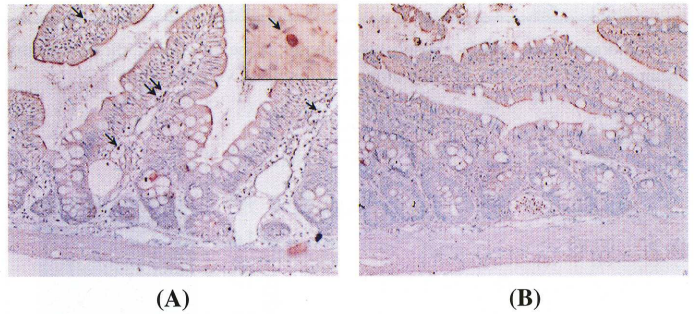


Fig. 2. Immunohistochemical staining for ED2 of the small intestine in rats administered PBS-(A) or dichloromethylene bisphosphonate (Cl₂MBP)-liposomes (B). Arrows show ED2 positive cells. ($\times 200$; inset $\times 400$)

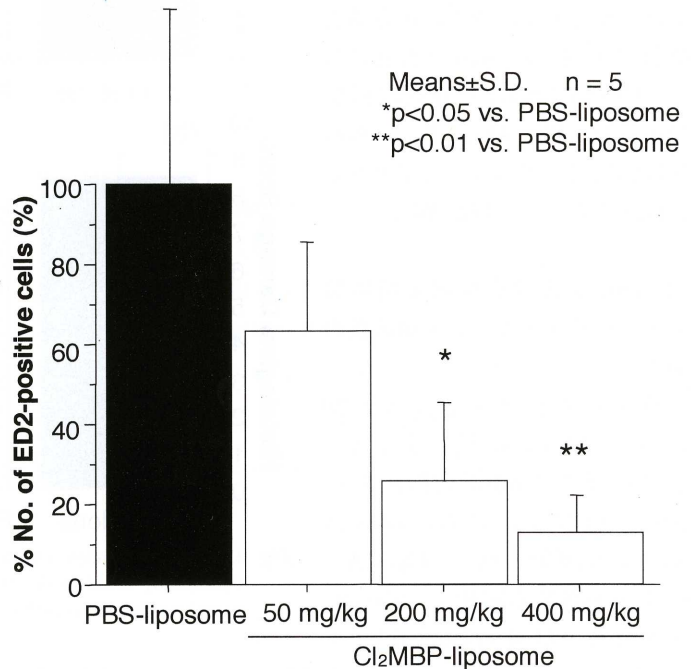


Fig. 3. In the rats treated with liposomes containing dichloromethylene bisphosphonate (Cl₂MBP), macrophage of the small intestine decreased in number in a dose-dependent fashion.

Table 2. Effect of Cl₂MBP-liposome on indomethacin-induced enteropathy in rats

Treatment	No. of Rats	Length of the Small Intestine (mm)	Total Length of Longitudinal Ulcers (mm)	No. of Spot Ulcers	Histological Damage Score
Indo alone	6	843.3 ± 101.0	127.2 ± 23.6	5.2 ± 2.8	8.3 ± 0.5
PBS-liposome + Indo	6	843.3 ± 36.7	121.6 ± 16.0	6.0 ± 4.1	7.6 ± 0.5
Cl ₂ MBP-liposome [#] + Indo	6	960.0 ± 90.1**	27.5 ± 39.6**	13.8 ± 7.6*	4.7 ± 2.8*

Indo, indomethacin ; PBS, phosphate buffered saline ; Cl₂MBP, dichloromethylene bisphosphonate [#]400 mg/kg ; Results are mean ± S.D. ; *p<0.05 vs. Indo alone ; **p<0.01 vs. Indo alone

kg を投与したラットを使用した。

2. Mφ 除去ラットにおける小腸傷害の程度

リポソーム非投与のコントロール群, Mφ 非除去群, Mφ 除去群における小腸傷害の程度を **Table 2** に示す。Mφ 除去群では, 他の2群に比べて小腸全長は 960.0 ± 90.1 mm と有意に長く, 縦走潰瘍総長は 27.5 ± 7.6 mm と有意に短く, UI は 3.1 ± 4.7 と有意に低値であった (**Fig. 4A**)。また, 組織学的傷害スコアも 4.7 ± 2.8 と有意に低値であった (**Fig. 4B**)。

3. Indo 起因性小腸縦走潰瘍に対する抗サイトカイン中和抗体の効果

抗 TNF-α 抗体を 2 μg/kg, 20 μg/kg, 200 μg/kg 投与すると, 用量依存的に小腸傷害は抑制され, 200 μg/kg 投与群で ulcer index は 9.0 ± 4.3 に抑制された (**Fig. 5A**)。抗 IL-6 抗体でも同様で, 250 μg/kg 投与群では ulcer index が 7.4 ± 4.9 に減少した (**Fig. 6A**)。抗 IL-1β 抗体でも前記 2 種と同様に用量依存的抑制効果を示し, 500 μg/kg 投与群で ulcer index は 5.8 ± 4.8 に抑

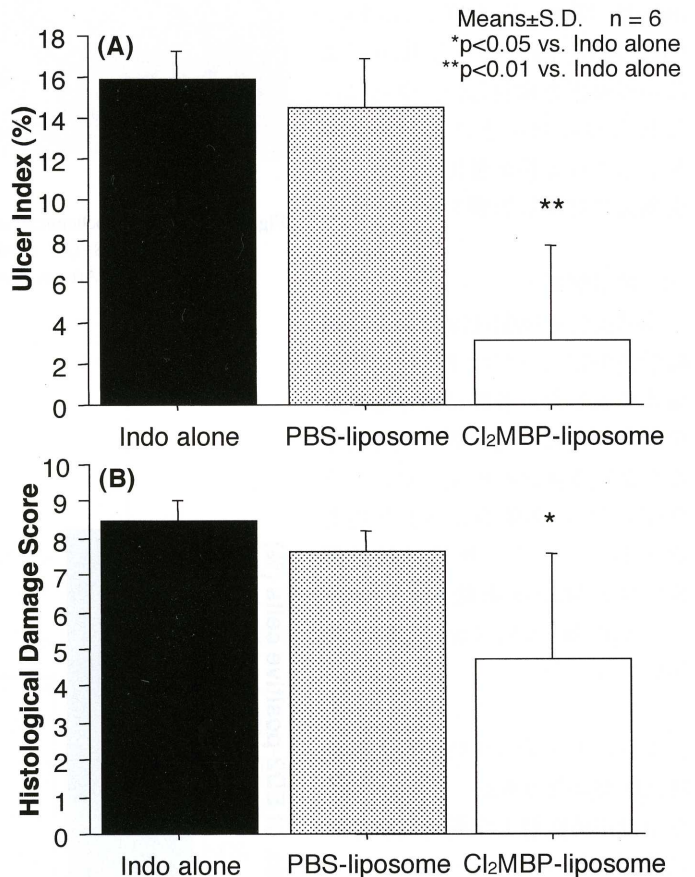


Fig. 4. The ulcer index (A) and the histological damage score (B) were significantly lower in the dichloromethylene bisphosphonate (Cl₂MBP)-treated rats than those in the nontreated or PBS-treated rats.

制された (**Fig. 7A**)。また, 組織学的にも, 全ての抗サイトカイン抗体は用量依存性に傷害スコアを減少させた (**Figs. 5B, 6B, 7B**)。

さらに抗 TNF- α 抗体 (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と抗 IL-6 抗体 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を併用投与すると ulcer index は 3.8 ± 6.0 に減少し, さらに抗 IL-1 β 抗体 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を加えることで 1.8 ± 4.5 となり, コントロールの 87.5% の抑制率が得られた (Table 3, Fig. 8).

4. M ϕ 除去ラットにおけるリコンビナントサイトカインによる小腸縦走潰瘍の再現

M ϕ 除去ラットに rrTNF- α (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を前投与すると ulcer index は 7.6 ± 4.7 となり, 小腸傷害の増悪が認められた. rrTNF- α (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と rrIL-6 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を併用投与すると, ulcer index は更に 11.0 ± 0.6 へと増加し, rrIL-1 β (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) も加えて 3 剤にすることで, ulcer index は 18.5 ± 3.9 になり, M ϕ 非除去ラットでの小腸傷害に匹敵する程度にまで再現された (Fig. 9). 組織学的傷害スコアも ulcer index の変化と同様であった (Fig. 10).

なお, 3 種の rr サイトカインを投与しても, Indo を投与しなければ小腸潰瘍は認められなかった.

考 察

NSAIDs の内服により消化管粘膜傷害が引き起こされることは古くから知られているが^{16), 17)}, その中心となるのは胃粘膜傷害である. 動物実験などによる基礎的研究も, 主眼は胃病変に置かれてきた. しかし, 近年では小腸粘膜傷害に対する臨床的興味も高まっている¹⁸⁾. ラットなどの実験動物に NSAIDs の一種である Indo を経口的もしくは経皮的投与を行うと,

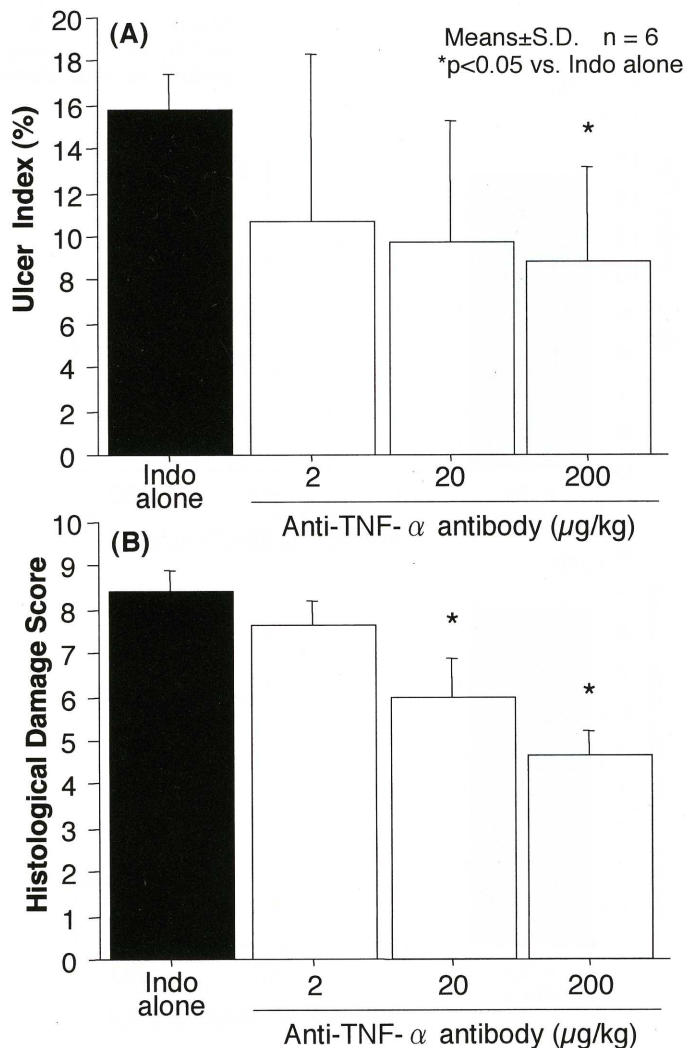


Fig. 5. Intraperitoneal administration of anti-TNF- α antibody inhibited indomethacin (Indo)-induced enteropathy in a dose-dependent fashion as assessed by the ulcer index (A) and the histological damage score (B).

小腸潰瘍も誘発されることが認識されていたが, 小腸傷害に関しての十分な解析は行われていなかった.

Matsumoto ら⁴⁾は, ラットに対し Indo を経肛門的に投与すると中部小腸に縦走潰瘍が生じることに注目し, 形態学的にこの病変がヒト Crohn 病の縦走潰瘍に類似していることを報告した. さらに, 経腸栄養療法で小腸縦走潰瘍が抑制されること, FK506 (タクロリムス) などの免疫抑制剤で縦走潰瘍が抑制されることなどを報告し, 病態的にも Crohn 病に類似している

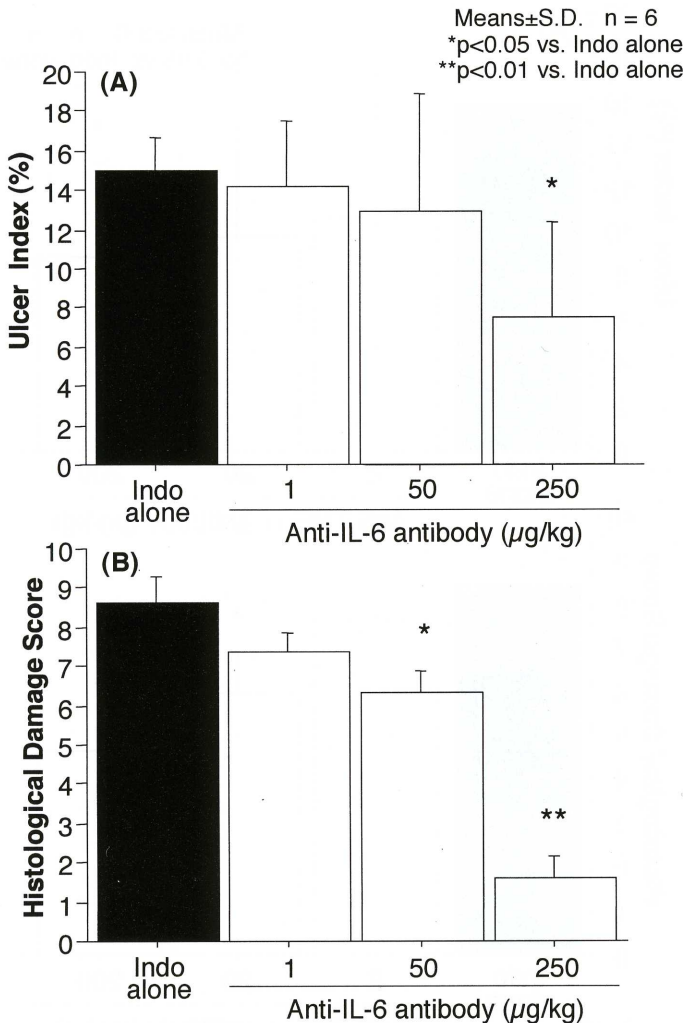


Fig. 6. According to the dose of anti-IL-6 antibody, the ulcer indices (A) and the histological damage scores (B) were gradually reduced in indomethacin (Indo)-induced enteropathy.

ことを証明した^{6),7)}. Anthony ら¹⁹⁾は同モデルの小腸縦走潰瘍を病理組織学的に検討し、非乾酪性類上皮細胞肉芽腫こそ認められないものの、ヒト Crohn 病の縦走潰瘍との類似性が認められることを報告している。このように、Indo によるラット小腸縦走潰瘍モデルはヒト Crohn 病の動物実験モデルの一つであると考えられる。すなわち、病因が未だに不明である Crohn 病の最も特徴的な病変である縦走潰瘍の発症過程を検討する上で、このモデルは極めて有用である。Indo による小腸縦走潰瘍の発生機序について

は、プロスタグランジンの抑制²⁰⁾、Indo の腸肝循環を介した小腸粘膜への直接傷害¹⁷⁾、translocation を含めた腸内細菌叢の関与^{8),21)}、消化管粘膜の透過性亢進²²⁾、小腸粘膜の血流循環障害^{23),24)}などが指摘されている。

その中で、Koga ら⁸⁾は specific pathogen free の環境下での飼育や抗生物質投与で小腸縦走潰瘍が有意に抑制され、LPS を投与することで縦走潰瘍が再現されることを見だし、小腸縦走潰瘍の発生過程に腸内細菌叢由来の LPS が深く関与することを報告した。LPS の代表的標的細胞が Mφ であることを考慮すると、本実験モデルの縦走潰瘍発生には Mφ が関与している可能性が考えられ、その実証のために本研究を行った。

Mφ の関与を証明するには、Mφ 除去による変化の有無を検討することが最も直接的な手法である。代謝性骨疾患や悪性腫瘍の骨転移の治療薬として注目されている薬剤としてビスフォスフォネートが挙げられるが、これには Mφ 系細胞である破骨細胞を阻害する作用がある。Rooijen ら^{12),13)}は、ビスフォスフォネートの第一

世代である Cl₂MBP を直径 0.8 μm の多層性リポソームに封入し実験動物に投与することで Mφ に貪食させ、Mφ を選択的に除去する方法を報告した。Mφ が除去される臓器としては肝²⁵⁾、脾¹²⁾、腎²⁶⁾、リンパ節²⁷⁾、腹腔内²⁸⁾の報告が散見されるが、小腸 Mφ の除去に関しての報告は極めて少なく、かつ実験動物も一定していない^{29),30)}。従って、本研究ではまず、Wistar 系ラットで同様の方法により Mφ 除去ラットの作製を試み、小腸 Mφ の除去効果を検討した。その結果、Mφ 数が通常の 15%未満

にまで低下することを免疫組織化学的に確認した。このMφ除去ラットにIndoを注腸投与すると小腸縦走潰瘍は有意に抑制され、Kogaら⁸⁾の報告に認められる抗生物質投与ラットでの著明に抑制された小腸傷害の程度に匹敵していた。この結果から本モデルでの縦走潰瘍発生にMφが強く関与することが直接的に示された。

生体においてMφは、異物や老廃物の処理、食食機能、抗原提示を中心とした免疫調節機構など様々な働きを司っているが、種々の刺激に伴いTNF-α、IL-6、IL-1βなどの催炎症性サイトカインの産生・放出を行う。その中で、既出のLPSはMφを活性化し、催炎症性サイトカインを誘導する強力な物質である¹¹⁾。Mφが関与する炎症性疾患では、これらの催炎症性サイトカインが直接的に炎症を惹起している可能性が高い。そこで、本研究では、催炎症性サイトカインを中和する抗体を投与して小腸傷害の変化を観察した。

すると、抗TNF-α抗体、抗IL-6抗体、抗IL-1β抗体の3種類すべてにおいて用量依存性に小腸潰瘍は抑制された。しかし、その最大抑制率は、それぞれ43.0%、49.6%、59.7%であり、単独のサイトカインのみの関与とは考え難く、複数のサイトカインが相互的に作用しているものと思われた。そこで、この中和抗体を併用投与すると、3種類すべての併用投与で87.5%の抑制率が得られ、Mφ除去時や抗生物質大量投与時と同程度にまで小腸傷害を抑制することができた。この結果は、Indoによる小腸縦走潰瘍の発生にMφに由来する複数の催炎症性サイトカインが関与していることを示すものと考えられた。Bertrandら³¹⁾やKonakaら³²⁾もTNF-αの拮抗剤

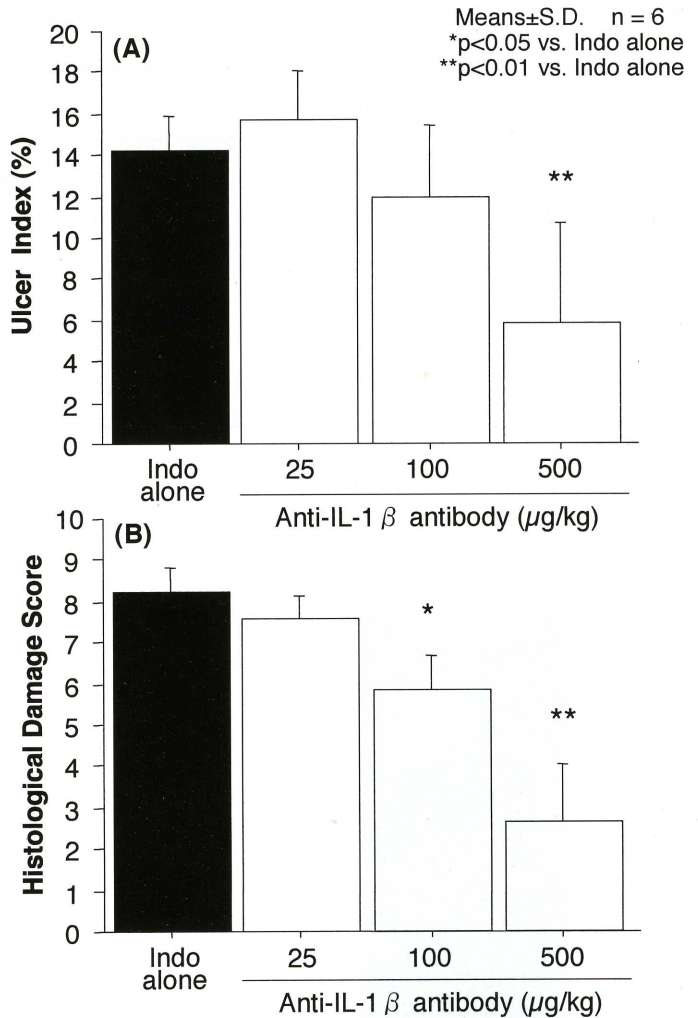


Fig. 7. Intraperitoneal administration of anti-IL-1β antibody inhibited indomethacin (Indo)-induced enteropathy macroscopically (A) and microscopically (B) in a dose-dependent fashion.

によりIndo起因性のラット小腸傷害が抑制されたことを報告しているが、本研究の結果はこれらの成績を支持するものである。ただし、本研究のように抗TNF-α抗体、抗IL-6抗体、抗IL-1β抗体と複数の中和抗体を併用し、その効果をみた報告は著者が検索した限りでは認められず、新たな知見と考えられた。

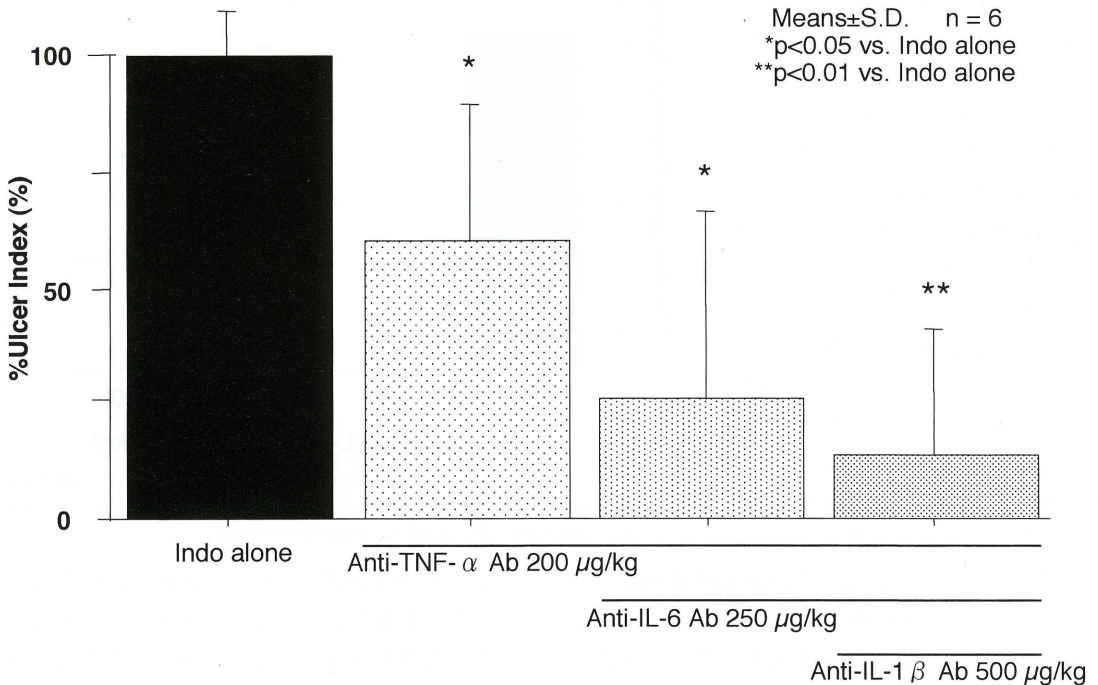
本研究では、抗サイトカイン抗体が小腸縦走潰瘍発生抑制に有効であった。その効果が本当にサイトカインの中和によるものであったかどうかを確かめるために、Mφ除去ラットに3種類のリコンビナントサイトカインを単独もしくは

Table 3. Reciprocal effect of anti-proinflammatory cytokine neutralizing antibodies on indomethacin-induced enteropathy in rats

Treatment	No. of Rats	Length of the Small Intestine (mm)	Total Length of Longitudinal Ulcers (mm)	No. of Spot Ulcers	Histological Damage Score
Indo alone	6	838.7 ± 106.9	112.2 ± 23.5	5.6 ± 2.7	8.3 ± 0.5
aTNF α #+Indo	6	868.3 ± 81.1	78.3 ± 35.4	7.3 ± 6.7	4.6 ± 0.5**
aTNF α #+aIL-6 [†] +Indo	6	966.6 ± 58.5*	36.7 ± 57.2**	7.6 ± 3.0	3.3 ± 1.3**
aTNF α #+aIL-6 [†] + aIL-1 β [¶] +Indo	6	1030.3 ± 73.4**	16.7 ± 40.8**	10.8 ± 4.9	2.3 ± 0.5**

Indo, indomethacin ; aTNF α , anti-tumor necrosis factor alpha antibody ; aIL-6, anti-interleukin 6 antibody aIL-1 β , anti-interleukin 1 beta antibody ; #200 μ g/kg ; [†]250 μ g/kg ; [¶]500 μ g/kg

Results are mean \pm S.D. ; *p<0.05 vs. Indo alone ; **p<0.01 vs. Indo alone

**Fig. 8.** A combination of neutralizing antibodies against the macrophage-related proinflammatory cytokines inhibited indomethacin (Indo)-induced enteropathy more strongly than administration of any single antibody did.

は併用し前処理した後に Indo を投与した。その結果、リコンビナントサイトカインで縦走潰瘍は再現され、3種類全てを併用投与すると、M ϕ 非除去ラットの状態にはほぼ回復した。この結果から Indo による小腸縦走潰瘍の発生には催炎症性サイトカインが強く関与することが示

された。興味深いことに、リコンビナント催炎症性サイトカインを投与しても Indo を投与しなければ小腸潰瘍は誘発されなかった。その理由や機序は不明であるが、Indo と M ϕ 由来の催炎症性サイトカインの相乗作用が存在し、縦走潰瘍誘発の重要な役割を担うことが考えら

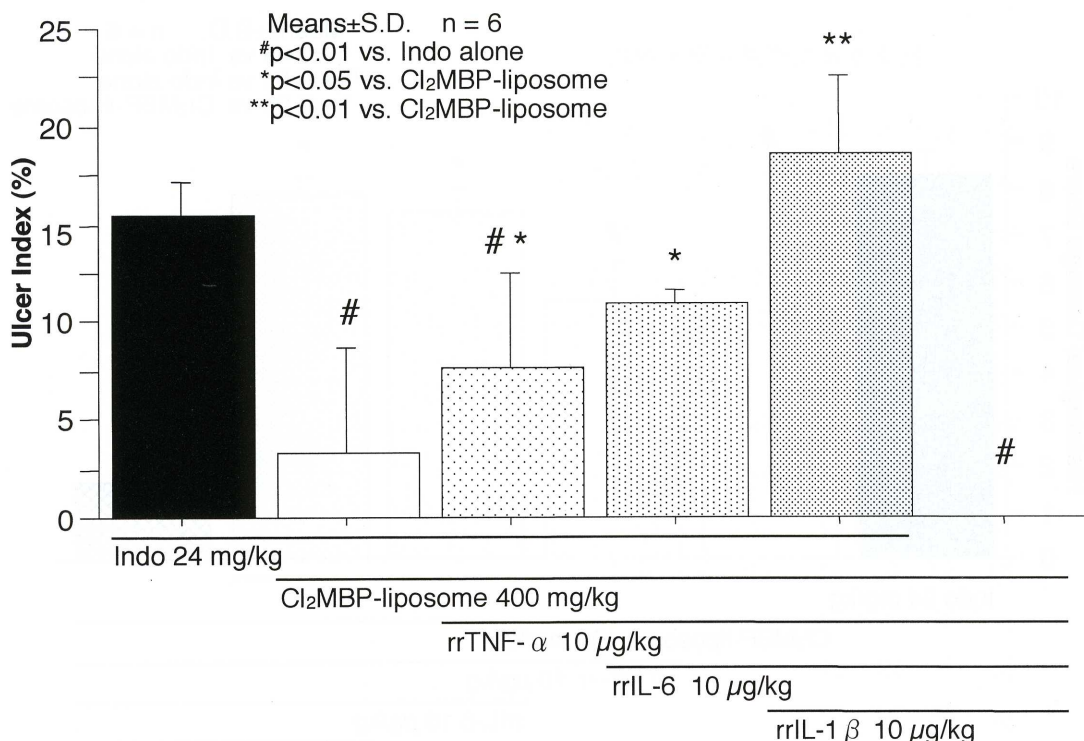


Fig. 9. Administration of recombinant rat (rr) proinflammatory cytokines restored indomethacin (Indo)-induced enteropathy in the dichloromethylene bisphosphonate (Cl₂MBP)-treated rats. The ulcer index in the Cl₂MBP-treated rats given a combination of the three cytokines was the same as that in the macrophage-preserved rats. However, these proinflammatory cytokines did not induce small intestinal ulceration prior to Indo administration.

れた。

経肛門的に投与した Indo が小腸を傷害するメカニズムについては、直腸から吸収された Indo が腸肝循環を経て胆汁中で濃縮され小腸粘膜へ繰り返し直接暴露するためである¹⁷⁾。さらに、Indo は粘膜透過性亢進などのバリア機能低下を引き起こし、腸内細菌叢由来の LPS が小腸組織内へ侵入する^{21), 22)}。その後、本研究の結果から、組織 Mφ の活性化、引き続いて催炎症性サイトカインの放出が誘発され、さらに Indo との相乗効果で縦走潰瘍が発生すると考えられた。

結 語

ラットの Indo 起因性小腸縦走潰瘍モデルにおける Mφ の役割と機序について検討した。

1) Cl₂MBP 含有リポソームをラットの腹腔内

に投与すると、用量依存性に小腸内 Mφ が除去された。

2) この Mφ 除去ラットに Indo を注腸投与すると小腸縦走潰瘍は著明に抑制された。

3) 無処置のラットに抗 TNF-α 抗体、抗 IL-6 抗体、抗 IL-1β 抗体をそれぞれ単独で投与すると、用量依存性に小腸縦走潰瘍はコントロールに比べ有意に抑制され、3 種類を併用投与することで Mφ 除去に匹敵する潰瘍抑制効果が得られた。

4) Mφ 除去ラットにリコンビナント TNF-α、IL-6、IL-1β を投与すると、サイトカイン単独では潰瘍の形成はなかったが、Indo 注腸後に Mφ 除去前と同程度の縦走潰瘍が再現された。

以上より、Indo 起因性小腸縦走潰瘍の発生には組織 Mφ の存在が重要で、Mφ より産生される複数の催炎症性サイトカインが作用し、さ

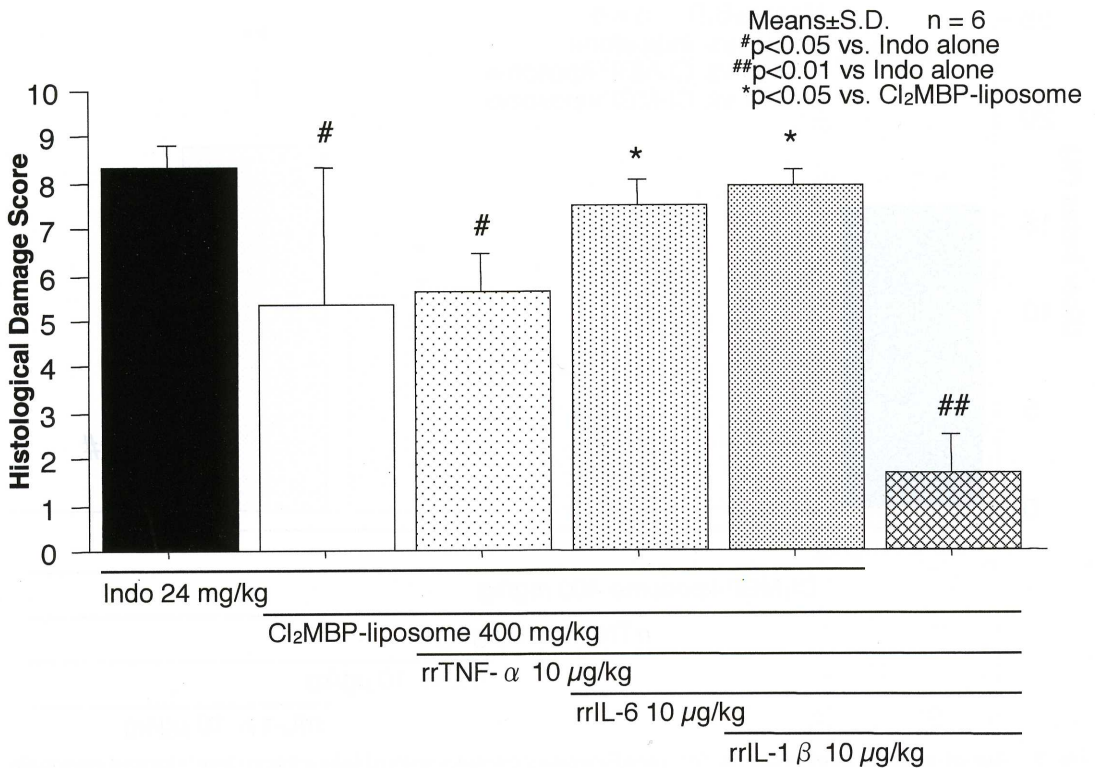


Fig. 10. Histological damage scores in indomethacin (Indo)-induced enteropathy significantly increased following single or a combined administration of recombinant rat (rr) proinflammatory cytokines even in the dichloromethylene bisphosphonate (Cl₂MBP)-treated rats. Even when rr proinflammatory cytokines were administered, enteropathy was limited to mildly microscopic inflammation if Indo was not given.

らに Indo との相乗効果で潰瘍形成が誘導されていることが示された。

また、Cl₂MBP 含有リポソームを用いた M ϕ 除去ラットの作製は、消化管における M ϕ の関与を検討する上で有用である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました川崎医科大学内科学消化器Ⅱ教室 春間 賢教授なら

びに九州大学大学院病態機能内科学教室 飯田三雄教授に深謝いたします。また、研究に多大なる御協力を頂きました川崎医科大学内科学消化器Ⅱ教室 古賀秀樹講師ならびに同教室の諸兄に深く感謝いたします。なお、本研究の一部は、川崎医科大学プロジェクト研究費(12-409)の援助により行われたものである。

本論文の要旨は、第38回小腸研究会(2001年2月、岡山)、第85回日本消化器学会総会(2001年4月、東京)および10th United European Gastroenterology Week 2002(2002年10月、Geneva)で発表した。

文 献

- 1) Brodie DA, Cook PG, Bauer BJ, Dagle GE: Indomethacin-induced intestinal lesions in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 17: 615-624, 1970
- 2) Fang WF, Broughton A, Jacobson ED: Indomethacin-induced intestinal inflammation. *Am J Dig Dis* 22: 749-760, 1977

- 3) Satoh H, Inada I, Hirata T, Maki Y : Indomethacin produces gastric antral ulcers in the refed rats. *Gastroenterology* 81 : 719–725, 1981
- 4) Matsumoto T, Iida M, Nakamura S, Kuroki F, Hizawa K, Fujishima M : An animal model of longitudinal ulcers in the small intestine induced by intracolonic administered indomethacin in rats. *Gastroenterol Jpn* 28 : 10–17, 1993
- 5) Honda K : A scanning electron microscopic study of the morphological changes in rat small intestinal mucosa treated by intracolonic indomethacin. *Med Electron Microsc* 30 : 138–147, 1997
- 6) Matsumoto T, Iida M, Kuroki F, Hizawa K, Koga H, Fujishima M : Effects of diet on experimentally induced intestinal ulcers in rats. *Gut* 35 : 1058–1063, 1994
- 7) Matsumoto T, Iida M, Nakamura S, Hizawa K, Kuroki F, Fujishima M : Preventive effect of immunosuppressive agents against indomethacin-induced small intestinal ulcers in rats. *Dig Dis Sci* 39 : 787–795, 1994
- 8) Koga H, Aoyagi K, Matsumoto T, Iida M, Fujishima M : Experimental enteropathy in athymic and euthymic rats : synergistic role of lipopolysaccharide and indomethacin. *Am J Physiol* 276 : G576–G582, 1999
- 9) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC : CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249 : 1431–1433, 1990
- 10) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S : Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide : evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162 : 3749–3752, 1999
- 11) Cavaillon JM : Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother* 48 : 445–453, 1994
- 12) van Rooijen N, Kors N, Kraal G : Macrophage subset repopulation in the spleen : Differential kinetics after liposome-mediated elimination. *J Leukoc Biol* 45 : 97–104, 1989
- 13) van Rooijen N, Sanders A : Liposome mediated depletion of Macrophages : mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 174 : 83–93, 1994
- 14) Hamano S, Yoshida H, Takimoto H, Sonoda K, Osada K, He X, Minamishima Y, Kimura G, Nomoto K : Role of Macrophage in acute murine cytomegalovirus infection. *Microbiol Immunol* 42 : 607–616, 1998
- 15) Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Malagelada J R : Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis. *Gastroenterology* 98 : 269–277, 1990
- 16) Whittle BJR : Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology* 80 : 94–98, 1981
- 17) Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB : Mechanism of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 17 : 641–662, 1993
- 18) Bjarnason I, Hayllar J, MacPherson AJ, Russell AS : Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* 104 : 1832–1847, 1993
- 19) Anthony A, Pounder RE, Dhillon AP, Wakefield AJ : Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 14 : 241–245, 2000
- 20) Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Bjarnason I : Comparison of the intestinal toxicity of Celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, and indomethacin in the experimental rat. *Scand J Gastroenterol* 35 : 802–807, 2000
- 21) Mizoguchi H, Hase S, Tanaka A, Takeuchi K : Lack of small intestinal ulcerogenicity of nitric oxide-releasing indomethacin, NCX-530, in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 15 : 257–267, 2001
- 22) Chmisse HM, Antoon JS, Kviety PR, Grisham MB, Perry MA : Role of leukocytes in indomethacin-induced small bowel injury in the rat. *Am J Physiol* 266 : G239–246, 1994
- 23) Kelly DA, Piasecki C, Anthony A, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ : Focal reduction of villous blood flow in early indomethacin enteropathy : a dynamic vascular study in the rat. *Gut* 42 : 366–373, 1998
- 24) Yamamoto C, Kawakubo K, Aoyagi K, Matsumoto T, Iida M, Ibayashi S, Kitazono T, Doi K, Kanamoto K, Fujishima M : Effect of diet on changes in small intestinal blood flow following intracolonic administration of indomethacin to rats. *Dig Dis Sci* 46 : 200–207, 2001

- 25) Boulton RA, Alison MR, Golding M, Selden C, Hodgson HJ : Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion. *J Hepatol* 29 : 271–280, 1998
- 26) D'Souza MJ, Oettinger CW, Shah A, Tipping PG, Huang XR, Milton GV : Macrophage depletion by albumin microencapsulated clodronate : attenuation of cytokine release in macrophage-dependent glomerulonephritis. *Drug Dev Ind Pharm* 25 : 591–596, 1999
- 27) Oussoren C, Velinova M, Scherphof G, van der Want JJ, van Rooijen N, Storm G : Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. IV. Fate of liposomes in regional lymph nodes. *Biochim Biophys Acta* 1370 : 259–272, 1998
- 28) Biewenga J, van der Ende MB, Krist LF, Borst A, Ghufon M, van Rooijen N : Macrophage depletion in the rat after intraperitoneal administration of liposome-encapsulated clodronate : depletion kinetics and accelerated repopulation of peritoneal and omental macrophages by administration of Freund's adjuvant. *Cell Tissue* 280 : 189–196, 1995
- 29) Fryer J, Grant D, Jiang J, Metrakos P, Ozcay N, Ford C, Garcia B, Behme R, Zhong R : Influence of macrophage depletion on bacterial translocation and rejection in small bowel transplantation. *Transplantation* 62 : 553–559, 1996
- 30) Galeazzi F, Haapala EM, van Rooijen N, Vallance BA, Collins SM : Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent. *Am J Physiol* 278 : G259–G265, 2000
- 31) Bertrand V, Guimbaud R, Tulliez M, Mauprivez C, Sogni P, Couturier D, Giroud JP, Chaussade S, Chauvelot-Moachon L : Increase in tumor necrosis factor- α production linked to the toxicity of indomethacin for the rat small intestine. *Br J Pharmacol* 124 : 1385–1394, 1998
- 32) Konaka A, Kato S, Tanaka A, Kunikata T, Korolkiewicz R, Takeuchi K : Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol Res* 40 : 517–524, 1999