

学位論文

Doctor's Thesis

侵襲後の IL-18 の動態と肝傷害発生への関与
(Dynamic aspects of IL-18 production and its role in
the development of hepatic injury during
planned and unplanned injuries)

柴田 宗征

Muneyuki Shibata

指導教官

小川 道雄 教授

熊本大学大学院医学研究科外科学第二

2002 年度

熊本大学博士（医学）論文

論文題名： 侵襲後の IL-18 の動態と肝傷害発生への関与

(Dynamic aspects of IL-18 production and its role in the development of hepatic injury during planned and unplanned injuries)

著者名： 柴田 宗征
Muneyuki Shibata

指導教官名： 外科学第二講座教授 小川 道雄

審査委員名： 1) 分子病理学担当教授 山本 哲郎
2) 内科学第三担当教授 富田 公夫
3) 救急医学担当教授 木下 順弘
4) 外科学第一担当教授 川筋 道雄

2002 年度

目次

目次	1
要旨	3
発表論文リスト	6
謝辞	8
略号	9
第1章 研究の背景と目的	10
1) IL-18 の概略	
2) IL-18 の産生細胞と生物学的活性	
3) IL-18 による肝傷害の発生機序	
4) 研究の目的	
第2章 肝切除術後肝不全発症例における IL-18 の生体内動態の解析	20
1) 背景	
2) 方法	
a) 肝切除術症例	
b) 検体、血中サイトカイン濃度の測定	
c) ラットにおけるヒト IL-18 の代謝動態の解析	
d) 統計学的解析	
3) 結果	
4) 考察	
第3章 IL-18 による肝細胞傷害の発生機構の解析	33
1) 背景	
2) 方法	
a) 閉塞性黄疸ラットの作成	

	b)	BDLによるプライミング状態の解析	
	c)	プライミング状態に対するIL-18の作用	
	d)	IL-18による肝傷害惹起作用についての解析	
	e)	統計学的解析	
	3)	結果	
	4)	考察	
第4章		重症急性膵炎症例におけるIL-18の血中動態の解析	41
	1)	背景	
	2)	方法	
	a)	急性膵炎症例	
	b)	検体、血中サイトカイン濃度の測定	
	c)	統計学的解析	
	3)	結果	
	4)	考察	
第5章		総括	59
参考文献			60

要 旨

背景と目的： IL-18 は、*Propionibacterium acnes* と *Escherichia coli* の lipopolysaccharide (LPS) によって処理されシュワルツマン反応を起こしたマウスの肝臓から抽出された新しいサイトカインで、マクロファージ系の細胞から主に産生される。また IL-18 はこれらの作用以外に GM-CSF、TNF- α 、IL-6、などのサイトカインや種々の急性期蛋白の産生の誘導にも関わる可能性が示唆されている。

IL-18 は肝傷害の発生に強く関連するとされている。そこで我々は、組織傷害の誘導因子としての IL-18 の役割に着目し、侵襲病態における IL-18 の生体内の動態について解析している。まず肝切除後の肝不全の発症に着目した。肝切除術は、原発性および転移性肝腫瘍に対する最も有効な治療手段の一つである。しかし、手術手技が進歩した現在でもなお、肝臓の広範囲切除後に、まれではあるが肝不全を発症することが知られている。この肝切除術後の肝不全の発症に、サイトカインの産生とそれに引き続く炎症反応が関与することが示唆されている。動物実験において、IL-18 の作用で大量の IFN- γ が産生されて強い肝傷害が惹起されることが報告されていることから、肝切除後の肝不全の発症に IL-18 の産生が関与することが強く示唆される。また、IL-18 が他のサイトカインの産生を誘導するメディエータである可能性が指摘されていることから、侵襲時に認められる高サイトカイン血症を引き起こす原因となっている可能性もある。高サイトカイン血症が惹起され、その結果遠隔臓器傷害を生じる代表的病態である急性膵炎時に、遠隔臓器である肝臓の傷害機構においても IL-18 の関与が考えられる。

今回の研究の目的は、侵襲後の IL-18 の動態と肝傷害発生への関与を明らかにすることである。侵襲として、①肝広範切除術後の肝不全、②ラットエンドトキシン肝傷害モデル、③ 急性膵炎、をとりあげ、IL-18 の体内動態を解析した。

方法： ①肝広範切除症例 13 例（肝不全発症群 3 例、非肝不全発症群 10 例）を対象として、血中の IL-18 と他のサイトカイン（IL-6、IL-10、IFN- γ 、soluble Fas-ligand; sFas-L）の血中動態を解析した。 ②閉塞性黄疸ラット及び無処置ラットを用いて IL-18 の生体内動態の解析及び IL-18 の肝傷害惹起作用についての解析を行った。③急性膵炎症例 23 例（肝不全発症群 12 例、非肝不全発症群 11 例）を対象として、血中の IL-18 と他のサイトカイン（TNF- α 、soluble TNF-receptor II; sTNF-RII、IL-12、IFN- γ 、sFas-L）の血中動態を解析した。

結果・考察： ①肝切除症例において、IL-6、IL-10、IFN- γ 、sFas-L は術後早期に上昇し、肝不全群でより高度に上昇した。一方、IL-18 は肝不全発症群において、他のサイトカインの血中動態とは異なり、一過性に低下した後ビリルビンの上昇とともに再上昇した。ビリルビンと IL-18 の血中濃度間に有意の相関を認めた。ラットを用いて IL-18 の代謝を解析したところ、IL-18 は尿中への排泄は認めず、肝臓で代謝され胆汁中へ排泄されることが確認された。従って IL-18 は、術後肝不全発症の原因となるより、むしろ肝広範切除術後の肝不全時の高 IL-18 血症は肝不全の結果を表すものと考えられた。②閉塞性黄疸ラットでは、TNF- α 、IL-12 が誘導されており、IL-18 の投与によって無処置ラットに比べ有意に高度な肝傷害が惹起された。③急性膵炎症例において、IL-18 は発症早期に非肝不全発症群に比べ、肝不全発症群で有意に上昇していた。また sTNF-RII も肝不全発症群で有意に上昇していた。IL-12、IFN- γ 、sFas-L は両群間で差は認めなかった。急性膵炎時における肝不全は、IL-18 が TNF- α の産生

を誘導し、様々なサイトカインを産生誘導することによって、引き起こされるものと考えられた。

結論： ①IL-18 は、肝細胞に取り込まれ、胆汁中へ排泄される。肝広範切除術後肝不全時には、血中 IL-18 濃度が高値を呈するが、これは IL-18 の肝代謝が低下したためである。 ②あらかじめ TNF- α 、IL-12 が産生され、プライミング状態にある状況下に IL-18 を投与すると、IFN- γ が誘導されて肝傷害が惹起される。 ③急性膵炎症例における肝不全の発生には、膵炎発症早期に産生される IL-18 による TNF- α をはじめとした他のサイトカインの産生の誘導が関与する。

IL-18 は、侵襲後の病態の形成、特に肝傷害と強く関係するが、肝不全の惹起因子となる場合もあれば、肝不全の結果として血中濃度が上昇する場合があります。病態の種類や程度により、その果たす役割は異なる。

題目

侵襲後の IL-18 の動態と肝傷害発生への関与

Dynamic aspects of IL-18 production and its role in the development of hepatic injury during planned and unplanned injuries

1. Muneyuki Shibata, Masahiko Hirota, Fumiaki Nozawa, Akihiro Okabe, Masashi Kurimoto, Michio Ogawa.
Increased concentrations of plasma IL-18 in patients with hepatic dysfunction after hepatectomy.
Cytokine 12; 1526-1530, 2000.
2. Muneyuki Shibata, Masahiko Hirota, Michio Ogawa.
Hepatic injury induced by interleukin-18 administration : Importance of preceding priming effect.
Journal of Immunotherapy 25; 72-74, 2002.

- 1) Shibata M, Hirota M, Okabe A, Ogawa M. High incidence of infectious complications in severe acute pancreatitis. *In*: Faist E, editor. 5th international congress on the immune consequences of trauma, shock and sepsis. Bologna, Monduzzi Editore, 589-592, 2000.
- 2) Hirota M, Shibata M, and Ogawa M. Increased concentrations of plasma interleukin-18 in patients with hepatic failure 1 week after surgery .
J Immunother 25 : 75-77, 2002.
- 3) Okabe A, Hirota M, Nozawa F, Shibata M, Nakano S, and Ogawa M. Altered cytokine response in rat severe acute pancreatitis complicated with endotoxemia.
Pancreas 22: 32-39, 2001.
- 4) Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Beppu T, Shimada S, Egami H, Yamaguchi Y, Ikei S, Okajima K, Okamoto K, and Ogawa M. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis.
Pancreas 21: 141-146, 2000.
- 5) 柴田宗征、広田昌彦、杉田裕樹、野澤文昭、岡部明宏、桑田絹子、小川道雄。急性膵炎の病態と好中球エラスターゼによるサイトカイン反応の増強機構。
侵襲と免疫 7: 111-116, 1998.

謝 辞

本研究は熊本大学大学院医学研究科外科学第二講座において小川道雄教授の御指導のもとに行われました。研究並びに多面の御指導を賜りました小川道雄教授に深甚なる謝意を捧げます。

また、研究並びに論文作成に直接御指導、御助言頂いた外科学第二講座講師広田昌彦博士に深く感謝いたします。

更に、研究に御協力下さった教室員諸兄に感謝の意を表します。

略 号

BDL : bile duct ligation

CINC : cytokine induced neutrophil chemoattractant

DIC : disseminated intravascular coagulation

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor

IL-18 : interleukin-18

IL-18 bp : interleukin-18 binding protein

IFN- γ : interferon- γ

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-1ra : IL-1 receptor antagonist

LPS : lipopolysaccharide

MOF : multiple organ failure

NO : nitric oxide

iNOS : inducible nitric oxide synthase

SIRS : systemic inflammatory response syndrome

sFas-L : soluble Fas-ligand

TNF- α : tumor necrosis factor- α

sTNF-R : soluble TNF-receptor

ROI : reactive oxygen intermediate

第 1 章

研究の背景と目的

1) IL-18 の概略

interleukin (IL) -18 は、1995 年、岡村らにより interferon (IFN) - γ 誘導因子として発見されたサイトカインであり、IFN- γ の産生を誘導する分子量 18 kDa の血清中の因子として、実験的肝炎モデルマウスの血清中にその蛋白が同定された (Okamura, et al., 1995a; Okamura, et al., 1995b; Ushio, et al., 1996)。IL-18 は IL-12 との相乗作用による強力な IFN- γ の産生誘導能 (Michalief, et al., 1996; Yoshimoto, et al., 1997) ならびに Th1 型ヘルパー T 細胞への分化誘導能を持つことから、主として細胞性免疫、炎症反応の誘導に重要なサイトカインとして捉えられてきた。しかし、一方で IL-18 は、IL-12 の非存在下では、Th2 型のサイトカインと考えられている IL-4、IL-10、IL-13 などの産生を刺激したり、軟骨細胞などによる PGE₂ 産生を誘導する作用もあるなど、ユニークなサイトカインであることが明らかとなりつつある。

クローニングされた IL-18 の cDNA は約 900 塩基からなり、24 kDa の分子量をもつタンパクとして翻訳される。しかし、この 24 kDa の IL-18 は、一般の分泌タンパクに存在するリーダーペプチドをもたず、IFN- γ の産生誘導能も有していなかった。一方、実験肝炎モデルマウスの血清中に誘導される IFN- γ 産生誘導因子としての IL-18 は、18 kDa の分子量をもつタンパクとして同定された。マクロファージや遺伝子欠損マウスを用いた研究から、生物活性をもつ IL-18 は、図 1 に示したように、この 24 kDa

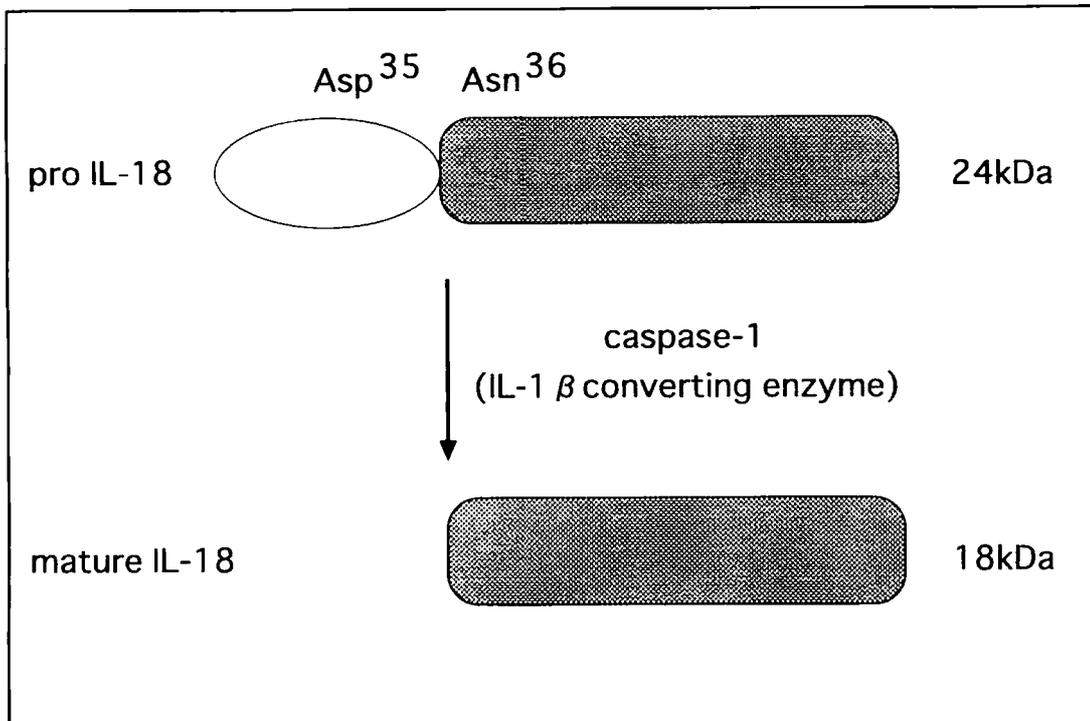


図 1. Caspase-1 による IL-18 のプロセッシング

IL-18 は 24 kDa の前駆体として産生され、細胞内蛋白分解酵素の caspase-1 によって Asp と Asn の間で切断されて、活性型となり分泌される。

の前駆体が caspase-1 (IL-1 β converting enzyme)によりプロセッシングを受けた 18 kDa の分子であることが明らかとなっている (Gu, et al., 1997)。さらに現在ではこの caspase-1 によるプロセッシング以外にも、Fas/Fas-ligand (Fas-L) を介したシグナルや、metalloproteinase や proteinase-3 などの他の蛋白分解酵素も IL-18 のプロセッシングや分泌に関与することが明らかとなっている (Tsutsui, et al., 1999)。

2) IL-18 の産生細胞と生物学的活性

IL-18 は最初、活性化されたマクロファージから分泌されることが報告されたが、その後の研究から、免疫染色法などにより、表 1 に示したように免疫系以外の様々な細胞や組織での IL-18 の産生が報告されている (Nakanishi, et al., 2001)。しかしながら、これらの組織における生理的な意義についてはまだ不明な点が多く、今後の研究を待つ状態である。IL-18 は発見当初、その生物活性は、Th1 ヘルパーT 細胞の分化誘導に重要な働きをもつ因子と考えられていたが、最近の研究結果から、この因子の働きはこれだけにはとどまらないことが明らかとなってきた。IL-18 は表 2 に示したように、IL-12 の存在下では Th1 ヘルパーT 細胞に相乗的に作用して IFN- γ の産生を誘導する。IFN- γ 遺伝子のプロモータ領域に、IL-18 刺激により誘導される転写因子、NF- κ B、AP-1 などの結合配列と、IL-12 刺激により誘導される転写因子、STAT-4 の結合配列が存在することが、これらの 2 つのサイトカインによる刺激で最も効率的な転写が誘導される理由と考えられている (Sica, et al., 1997; Magram, et al., 1996)。一方、IL-18 はその単独の作用として、tumor necrosis factor α (TNF- α)、IL-4、IL-5、IL-8、IL-10、IL-13、granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) などのサイトカインの産生を誘導することも最近の研究から明らかとなっている (Hoshino, et al., 1999; Nakanishi, et al., 2001)。さらに IL-18 は、これらのサイトカインの産生誘導以外にも、T 細胞や NK 細胞表面の Fas-L の発現を上昇させ、Fas 分子を発現している細胞にアポトーシスを誘導し除去するシステムの一部として作用している可能性が指摘されている (Tsutsui, et al., 1995)。このような働きは、異物を体内から排除する際に余剰となった活性化リンパ球を消去するために重要であると考えられる。

表 1. IL-18 を産生する主な細胞

-
- ・ マクロファージ
(腹腔内マクロファージ、肝クッパー細胞、肺胞マクロファージ)
 - ・ 表皮細胞
 - ・ 骨芽細胞
 - ・ 小腸上皮
 - ・ 関節腔内細胞
 - ・ 軟骨細胞
 - ・ 副腎皮質
-

表 2. IL-18 の主な生物学的活性

-
- ・ IFN- γ の産生誘導 (T 細胞と NK 細胞、IL-12 との相乗作用)
 - ・ Fas-L の発現上昇 (T 細胞と NK 細胞)
 - ・ NK 細胞の活性化
 - ・ 種々のサイトカインの産生誘導
(GM-CSF、TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、5、8、10、13 など)
 - ・ inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現誘導
(マクロファージ、軟骨細胞)
 - ・ 感染抵抗性の増強 (*Cryptococcus*、*Salmonella* など)
 - ・ 抗腫瘍作用
-

以上のように IL-18 は多様な生理的作用を有しているが、その主な作用としては感染防御因子としての働き、抗腫瘍因子としての働きがあげられる。感染防御因子としての働きについて、多くの研究により IL-18 が細菌や真菌、原虫といった微生物の感染に対して抵抗力を高めることが報告されている。特に IL-12 が共存している場合には、強力な細胞性免疫が誘導され、細胞内寄生性の微生物、たとえば *Cryptococcus neoformans*、*Mycobacterium avium*、*Salmonella typhimurium*、*Trypanosoma cruzi* などに対して強力な感染防御効果を誘導することが明らかとなっている (Zhang, et al., 1997)。これらの感染防御には、NK 細胞から産生される IFN- γ による刺激で活性化されたマクロファージの産生する nitric oxide (NO) が重要なメディエータとして作用していることが示唆されている。また最近の研究から、動物実験の系ではあるが、*Herpes simplex virus* (HSV)、*Influenza A virus* や *Vaccinia virus* に対しても感染防御効果があることが明らかとなってきている (Nakanishi, et al., 2001)。このメカニズムについては完全には明らかではないが、NK 細胞や CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性の誘導や、これらの細胞からの IFN- γ を介した NO の産生誘導がウイルスの増殖を阻害するものと考えられている。これらの結果から、IL-18 が感染防御を担う重要な因子であることが強く示唆されている。

抗腫瘍因子としての働きについては、IL-18 の発見当初から検討がなされており、これまでに、MethA 肉腫、神経芽細胞腫、黒色腫、神経膠腫、大腸癌、膀胱癌に対して抗腫瘍効果があることが報告されている (Nakanishi, et al., 2001)。この抗腫瘍効果の詳細なメカニズムについては今後の研究を待たなければならないが、おそらくは、IL-18 が CD4⁺ T 細胞や CD8⁺ T 細胞、NK 細胞を刺激してこれらの細胞表面の Fas-L の発現を上昇させ、細胞傷害活性が亢進することがその一因と考えられている。また、

これらの細胞が産生する NO や ROI (reactive oxygen intermediate ; 活性酸素分子種)の作用や、腫瘍細胞が誘導する血管新生に対する阻害作用などが、IL-18 が抗腫瘍活性を示す原因ではないかと考えられている (Nakanishi, et al., 2001)。

3) IL-18 による肝傷害の発生機序

我々は特に組織傷害の誘導因子としての IL-18 の役割に着目した。先に述べたように、IL-18 は IFN- γ の産生を通じて生体内に侵入した微生物や癌細胞などを破壊するために NO、ROI などの分子を誘導する。これらの分子は確かに異物の効率的な破壊と排除を可能にするが、高濃度で長期にわたって生体内に存在した場合には正常な組織に対しても傷害を誘導する。マウスを *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) の加熱死菌の腹腔内投与で感作し、投与 1 週間後に少量の LPS を投与すると劇症肝炎様の病態が引き起こされ、多量の IL-18 が血中に認められる。また、この IL-18 に対する中和抗体を LPS と同時期に投与するとこの劇症肝炎の誘導が抑制されることから、IL-18 は *P. acnes* と LPS 投与で誘導される炎症性サイトカインや Fas-L などの組織傷害性分子の産生の上流に位置するキーファクターであることが示唆されている (Okamura, et al., 1995a; Nakanishi, et al., 2001)。また、IL-18 は好中球の遊走因子である IL-8 の産生も誘導することが明らかとなっている。これらのことは、IL-18 が手術や急性膵炎などの侵襲時の病態形成に関与している可能性を示唆する。IL-18 の体内動態の解析は、しばしば外科領域で問題となる全身性炎症反応症候群 (SIRS : systemic inflammatory response syndrome) の病態を理解する上で役立つものではないかと我々は考えている。

一般に生体に侵襲が加わると、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、などの炎症性サイトカインが産生され、発熱、頻脈、過呼吸、白血球増多・減少などを呈する SIRS が起こることが知られている (Members of American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine consensus conference, 1992)。急性膵炎時にも、高サイトカイン血症の惹起に伴って SIRS 状態となる (Ogawa, et al., 1996; 小川, 他, 1997)。この際、高サイトカイン血症により全身の血管内皮細胞と好中球が活性化され、好中球の血管外への浸潤、遠隔臓器への集積が起こる (広田, 他, 2000) (図 2)。われわれは、この遠隔臓器に集積した活性化好中球が、強い侵襲反応時 (severe attack)、あるいは新たな侵襲によるサイトカインの再誘導時 (second attack) に、エラスターゼなどの中性プロテアーゼや ROI を産生放出し、遠隔重要臓器の傷害を引き起こすものと考えている (Ogawa, et al., 1996; Ogawa, 1996; Ogawa, 1998a; Ogawa, 1998b)。実際に、サイトカインの血中濃度は、急性膵炎の重症度を反映している (Ikei, et al., 1998; Hirota, et al., 2000)。また、我々は、ラット急性膵炎モデルにおいて肝臓においても、膵炎の惹起に伴いクッパー細胞が好中球に対するケモカインである cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) を産生して好中球を肝臓に集積させ (プライミング)、その状態でエンドトキシン血症を生じると好中球が活性化されて肝傷害が惹起されること (second attack) を報告している (Sameshima, et al., 1993; Hirano, et al., 1997)。小川は、この SIRS 状態に遠隔臓器に集積しプライミングされた好中球による臓器傷害機序を second attack theory と呼び、second attack の予防の重要性を強調している (図 3) (Ogawa, et al., 1996; Ogawa, 1996; Ogawa, 1998a; Ogawa, 1998b)。

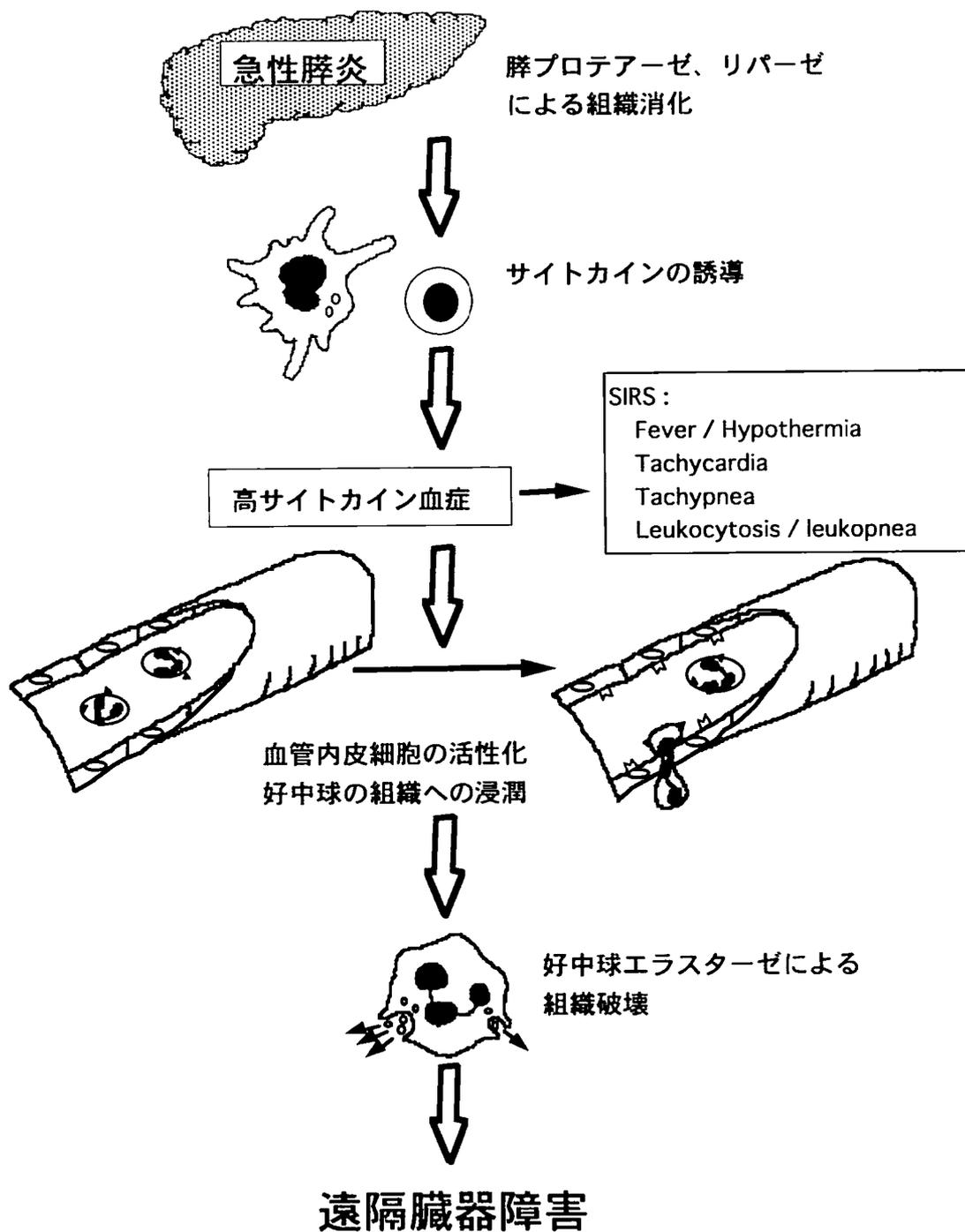


図 2. 急性膵炎における生体反応と重症化機序

広田, 他, 2000 より引用。

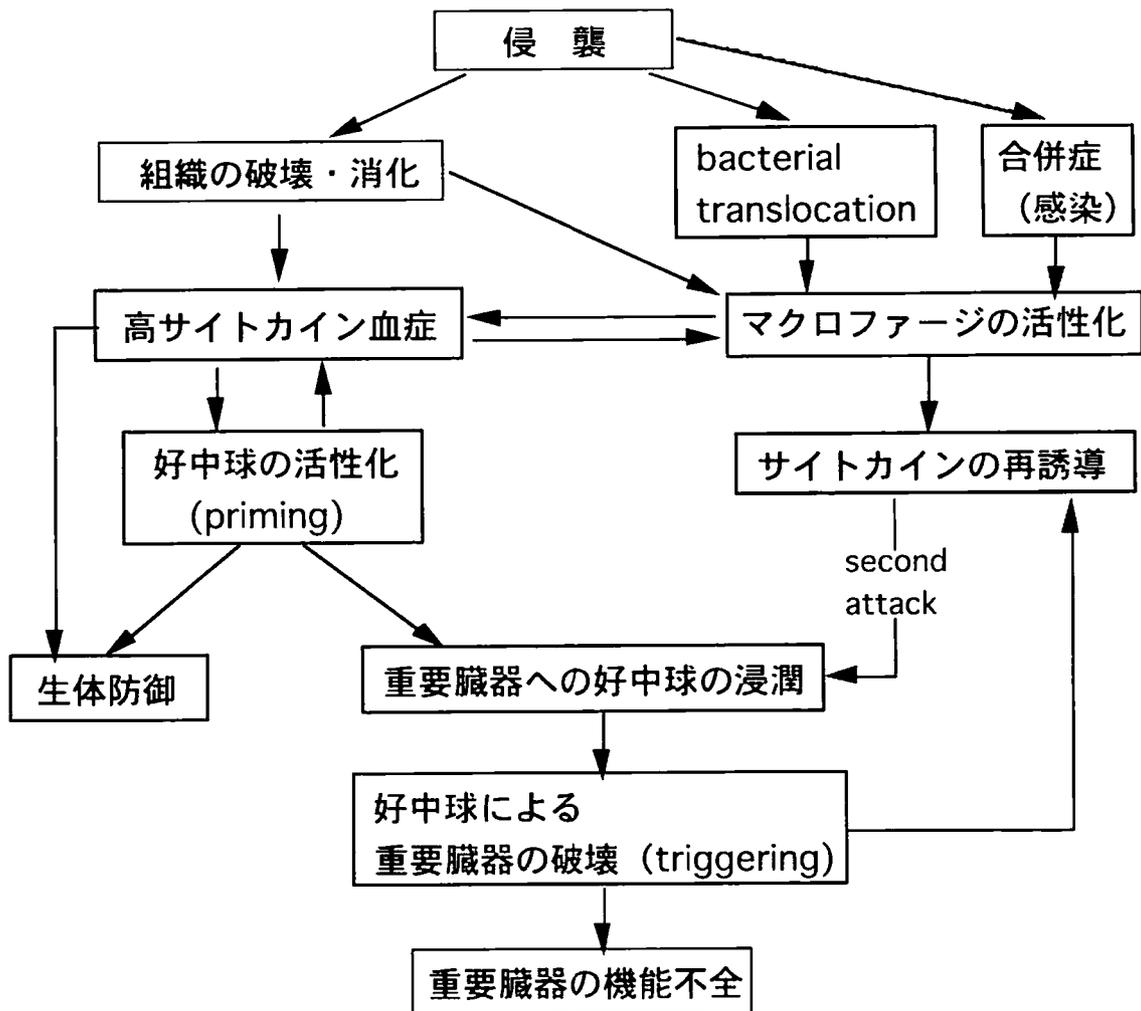


図 3. Second attack theory

急性膵炎時に誘導されたサイトカインは、好中球をプライミングし、遠隔の重要臓器にその好中球を集積させる。この段階で感染、エンドトキシン血症などを合併すると (second attack)、それがトリガリングとなり、集積したすでにプライミングを受けている好中球は活性化し、産生される中性プロテアーゼや活性酸素が構造蛋白の破壊を惹起し、その機能を低下させる。小川, 1994. より引用。

先に述べた、マウスを *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) の加熱死菌の腹腔内投与で感作し（プライミング）、投与 1 週間後に少量の LPS を投与する（second attack）と劇症肝炎様の病態が引き起こされるといふ病態も、この second attack theory を反映しているものと考えられる。

4) 研究の目的

肝切除術は、原発性および転移性肝腫瘍に対する最も有効な治療手段の一つである。しかし、手術手技が進歩した現在でもなお、肝臓の広範囲切除後に、まれではあるが肝不全を発症することが知られている（Grazi, et al., 1997; Matsumata, et al., 1995）。この肝切除術後の肝不全の発症に、サイトカインの産生とそれに引き続く炎症反応が関与することが示唆されている（Kita, et al., 1996; Clavien, et al., 1996; 野澤, 他, 1998）。動物実験において、IL-18 の作用で大量の IFN- γ が産生されて強い肝傷害が惹起されることが報告されていることから（Okamura, et al., 1995a; Tsutsui, et al., 1995）、肝切除後の肝不全の発症に IL-18 の産生が関与することが強く示唆される。また、IL-18 が他のサイトカインの産生を誘導するメディエータである可能性が指摘されていることから、侵襲後に認められる高サイトカイン血症を引き起こす原因となっている可能性も示唆される。高サイトカイン血症が惹起され、その結果肝傷害が引き起こされることが判明している急性膵炎の病態においても IL-18 の関与が考えられる。

本研究は、侵襲に対する IL-18 の動態とその病態形成への役割を明らかにすることを目的とし、①肝広範囲切除術後肝不全における IL-18 の体内動態の解析、②IL-18 による肝細胞傷害の発生機構の解析、③重症急性膵炎における IL-18 の血中動態の解析、を行った。

第2章

肝切除術後肝不全発症例における

IL-18 の体内動態の解析

1) 背景

肝切除術は、原発性および転移性肝腫瘍に対する最も有効な治療手段の一つである。しかし、手術手技が進歩した現在でもなお、肝臓の広範囲切除後に、まれではあるが肝不全を発症することが知られている (Grazi, et al., 1997; Matsumata, et al., 1995)。この肝切除術後の肝不全の発症に、サイトカインの産生とそれに引き続く炎症反応が関与することが示唆されている (Kita, et al., 1996; Clavien, et al., 1996; 野澤, 他, 1998)。肝傷害に関与するサイトカインとして、肝臓に誘導された大量の IFN- γ が肝不全を引き起こすこと (Toyonaga, et al., 1994) や、Fas/Fas-L の作用で肝傷害が引き起こされることが報告されている (Ogasawara, et al., 1993; Galle, et al., 1995)。IL-18 は T 細胞や NK 細胞からの IFN- γ の産生や、NK 細胞からの Fas-L の産生を誘導するサイトカインである。また IL-18 による IFN- γ の産生誘導には、IL-12 との強力な相乗作用が報告されており (Michalief, et al., 1996; Yoshimoto, et al., 1997)、IL-18 と IL-12 を産生するクッパー細胞が肝傷害に関与していることが示唆されている (Okamura, et al., 1995a; Tanaka, et al., 1996)。動物実験において、IL-18 の作用で大量の IFN- γ が産生されて強い肝傷害が惹起されることが報告されていることから (Okamura, et al., 1995a; Tsutsui, et al., 1995)、肝切除術後の肝不全の発症に IL-18 の産生が関与することが強く示唆される。

そこで、IL-18 が肝切除術後の発症に関与するか否かを検討するために、肝切除術後の患者における血中 IL-18 濃度の経時的変化を解析した。また IL-18 がその産生誘導に関連して肝細胞傷害を惹起するといわれている IFN- γ 、sFas-L、IL-12 や炎症性サイトカインである IL-6、および抗炎症性サイトカインである IL-10 の血中濃度についても、その経時的変化を解析した。さらにラット閉塞性黄疸モデルを用いて、IL-18 の代謝・排泄機構の解析をおこなった。

2) 方法

a) 肝切除術症例

当科における肝切除症例 13 例（術後肝不全発症 3 例、非肝不全発症 10 例）を対象とした。術後経過中、総ビリルビン値が 3 mg/dl を超えた症例を術後肝不全群とし、それ以外を非肝不全群とした（表 3）。

b) 検体、血中サイトカイン濃度の測定

経時的に血液を採取。血液から血漿を遠心分離し（3,000 rpm、5 分間）、測定時まで -80°C で保存した。IL-18 をはじめ各サイトカイン（IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ 、sFas-L）は、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)法を用いて測定した。ELISA キットは以下のものを使用した。IL-18、sFas-L: Medical and Biological Laboratories Co. Ltd. (Nagoya, Japan)。IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ : BioSource International (Camarillo, CA, USA)。

c) ラットにおけるヒト IL-18 の代謝動態の解析

200~250 g の雄性 Wistar ラット (Kyudo Experimental

Animal Center, Kumamoto, Japan) を用いた。全てのラットは、National Institutes of Health (NIH) animals care guidelines (National Institutes of Health, Public Health Service, 1985) にそって飼育された。

無処置ラットを用いて、IL-18 の代謝経路を解析した。開腹下に総胆管にチュービングし、固定後、陰茎静脈よりヒト IL-18 を 2,500 ng (生食 0.2 ml に溶解して) 静注し、10 分毎に 180 分まで胆汁を採取し、胆汁量および胆汁中のヒト IL-18 濃度を測定した。同時に膀胱より採取した尿中のヒト IL-18 濃度も測定した。

総胆管結紮 (bile duct ligation : BDL) により惹起した閉塞性黄疸ラット及び無処置ラット (コントロール) を用いて、IL-18 の血中動態を解析した。BDL 群は、ペントバルビタール麻酔下 (30 mg/kg) にて、開腹し胆管を肝門部より 5mm 遠位側にて結紮し、3 日後に実験をおこなった。これまでの実験でラットでは BDL 3 日後に最も強い閉塞性黄疸が惹起されることが確認されている (Hirota, et al., 1994)。ペントバルビタール麻酔下にて、陰茎静脈よりヒト IL-18 を 2,500 ng (生食 0.2 ml に溶解して) 静注し、経時的に (1、3、5、7、10、15 分後) 大腿静脈から採血した。血中の IL-18 濃度を測定し、両群間で比較検討した。

d) 統計学的解析

データの統計学的解析は、Student's t-test 及び Fisher's exact method を用いて行った。P value <0.05 を有意差ありとした。

表 3. 肝切除術後症例の内訳

No.	Age/ Gender	Preoperative ICG-R 15 (%)	Operation performed
A. Patients with post-operative hepatic dysfunction			
1	72/F	22	Extended right lobectomy
2	68/M	14	Extended right lobectomy
3	54/M	21	Anterior segmentectomy
B. Patients without hepatic dysfunction (control)			
1	77/M	12	Anterior segmentectomy
2	65/M	15	Anterior segmentectomy
3	42/M	8	Right lobectomy
4	55/M	12	Left lobectomy
5	60/F	12	Left lobectomy
6	77/M	5	Extended posterior segmentectomy
7	53/M	6	Posterior segmentectomy
8	68/F	27	Left lobectomy
9	57/M	7	Extended left lobectomy
10	51/M	4	Left lobectomy

3) 結果

肝切除症例を肝不全発症群と肝不全非発症群とに分けて両群間の血中サイトカインの動態を解析した。炎症性サイトカインである IL-6 と抗炎症性サイトカインである IL-10 は、肝不全発症群において、手術後数日間の血中濃度が高いことから、手術侵襲が大きいことが示唆される。IL-18 がその産生誘導に関連して肝細胞傷害に関与するといわれている IFN- γ 、sFas-L もまた肝不全発症群において、手術後早期に上昇した。IL-18 は、動物実験で肝傷害の惹起に関与することが示されており、また炎症性サイトカインのひとつに位置づけられているので、IL-18 も肝切除術後、

特に肝不全を発症した症例では、その血中濃度が上昇している可能性が考えられる。しかし、血中 IL-18 濃度は、肝切除術後直後には上昇せずに、逆に低下していた。また、興味あることに、肝不全発症群における血中 IL-18 濃度は術後一週間を過ぎてから上昇していた。すなわち、IL-18 は他のサイトカインの血中動態とは全く異なることが判明した (図 4)。IL-12 は、術直後から著明に低下しており、手術直後には IL-12 の産生は低下しているものと考えられた。非肝不全発症群では、術後一週間を過ぎてから上昇を認めたが、肝不全発症群では経過を通じて術前値よりも低下したままであった (図 5)。

肝不全発症群における IL-18 の血中濃度の変化は、術後の血中ビリルビン濃度の上昇にやや遅れていたが、その変化と酷似していた。また、血中ビリルビン値と IL-18 値との関係をグラフにプロットすると、ビリルビンと IL-18 の血中濃度の間には有意の相関を認めた (図 6)。したがって、肝切除術後肝不全発症例における血中 IL-18 濃度の上昇は、血中ビリルビン上昇のメカニズムと同じ、すなわち肝からの排泄不全によるものと考えられた。

次に、肝不全群における血中 IL-18 濃度の上昇が肝からの排泄不全であるか否かを検討するために、ラットにヒト IL-18 を静注して胆汁中へ排泄されるか否かをみた。ヒト IL-18 はラットの生体試料中においてもマウスモノクローナル抗体を使った ELISA 系で検出可能である。ラット総胆管にカニューレーションして胆汁を採取し、胆汁中の IL-18 濃度を測定したところ、IL-18 の静注直後から胆汁中への IL-18 の排泄が認められた (図 7)。この間、尿中への排泄はまったく認めなかった。

次に、IL-18 の血中動態を、胆管を結紮し胆汁分泌を阻害したラット (閉塞性黄疸ラット: BDL) と無処置ラットとの間で比較した。BDL 群では、IL-18 の血中半減期が、無処置ラットにおける 22 分から 360 分へと著明に延長した (図 8)。したがって、

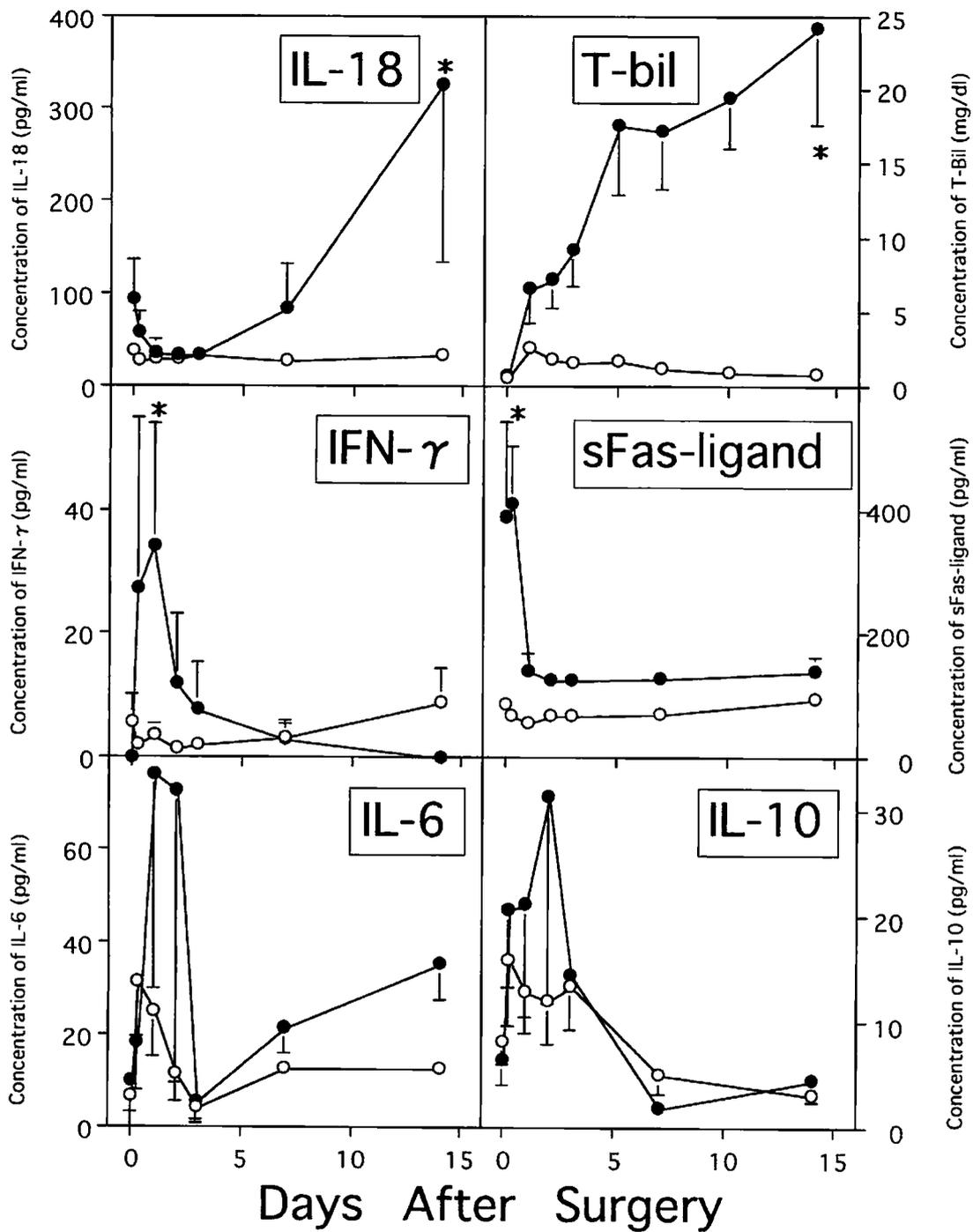


図4. 肝切除術後の血中サイトカイン動態の解析

肝切除術後の血中サイトカイン濃度の推移を、血中ビリルビン濃度のそれと比較した。

○：非肝不全発症群、 ●：肝不全発症群。 *P<0.05。

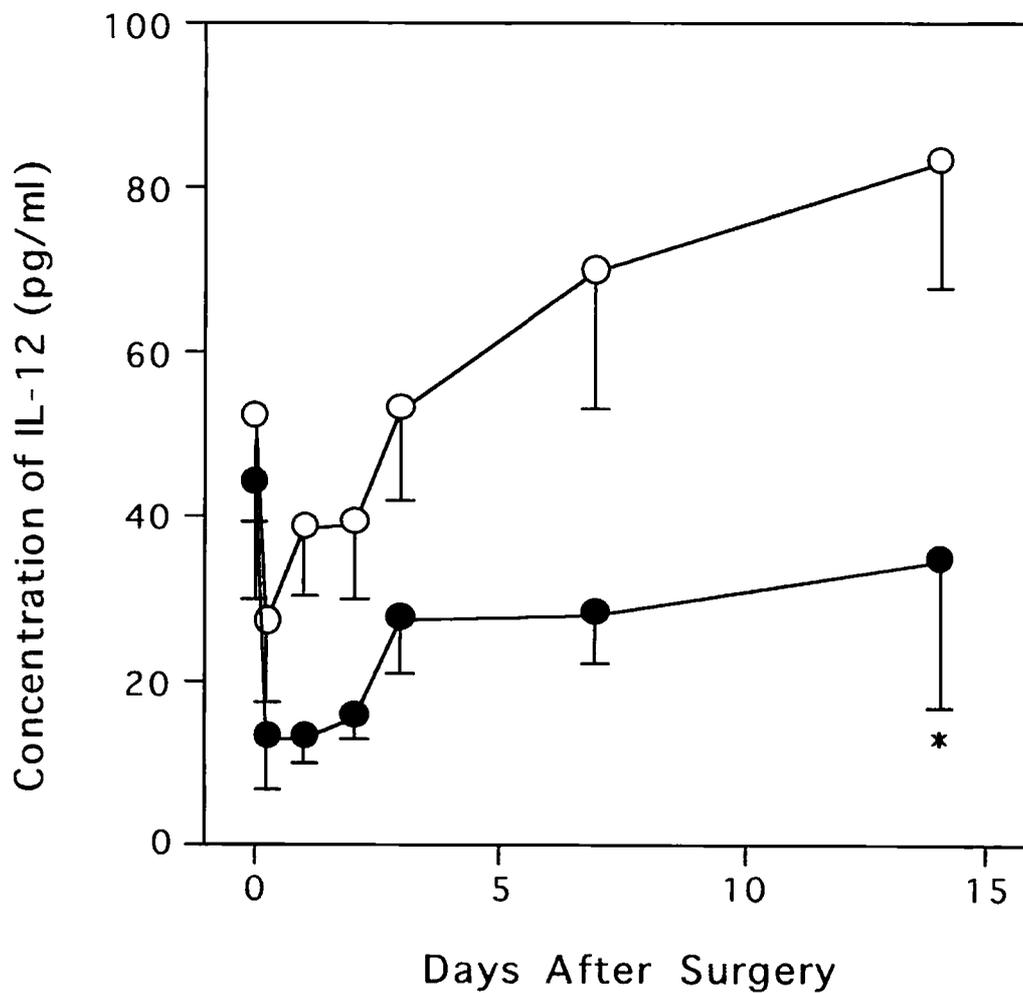


図5. 肝切除術後の血中IL-12濃度の推移

○：非肝不全発症群、 ●：肝不全発症群。 *P<0.05。

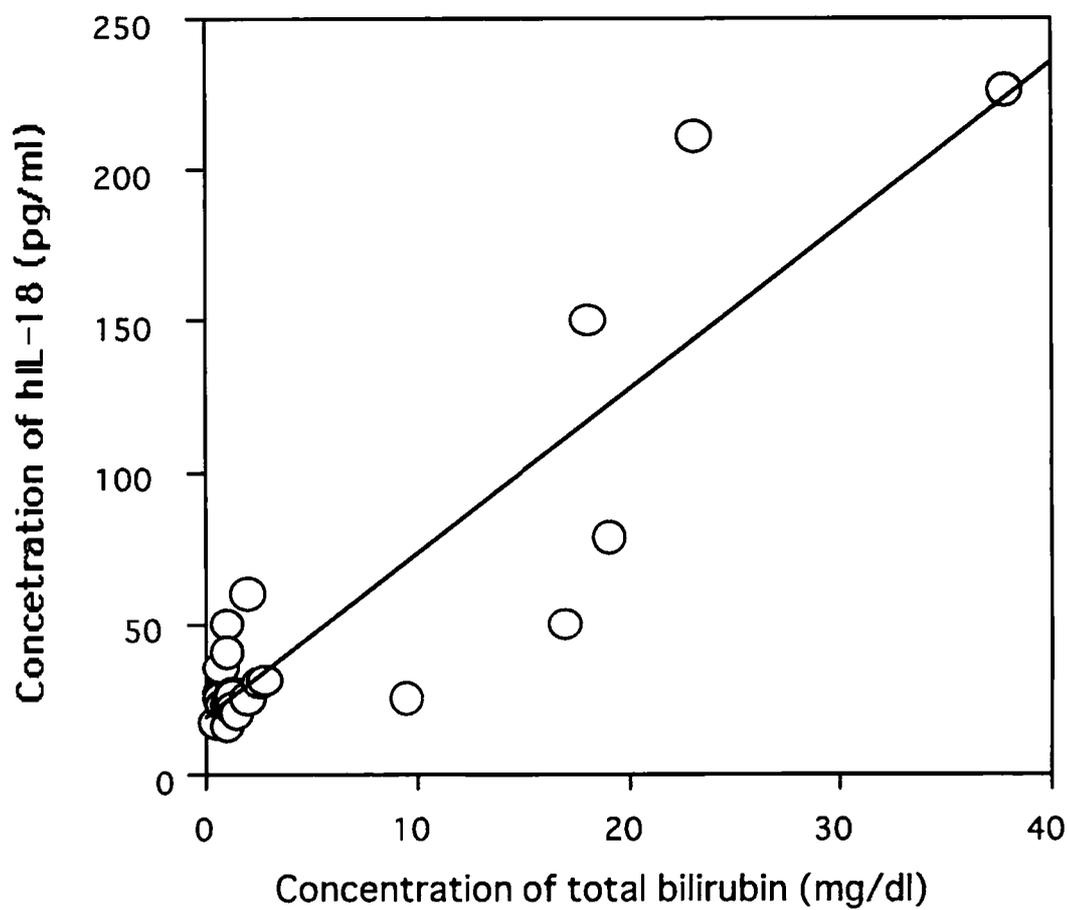


図 6. IL-18 と総ビリルビンの血中濃度の相関

肝切除術後 14 日目の血中 IL-18 濃度と血中総ビリルビン濃度をプロットし、linear regression grade を用いて解析した。

$P < 0.0001$ 、 $r^2 = 0.800$ 。

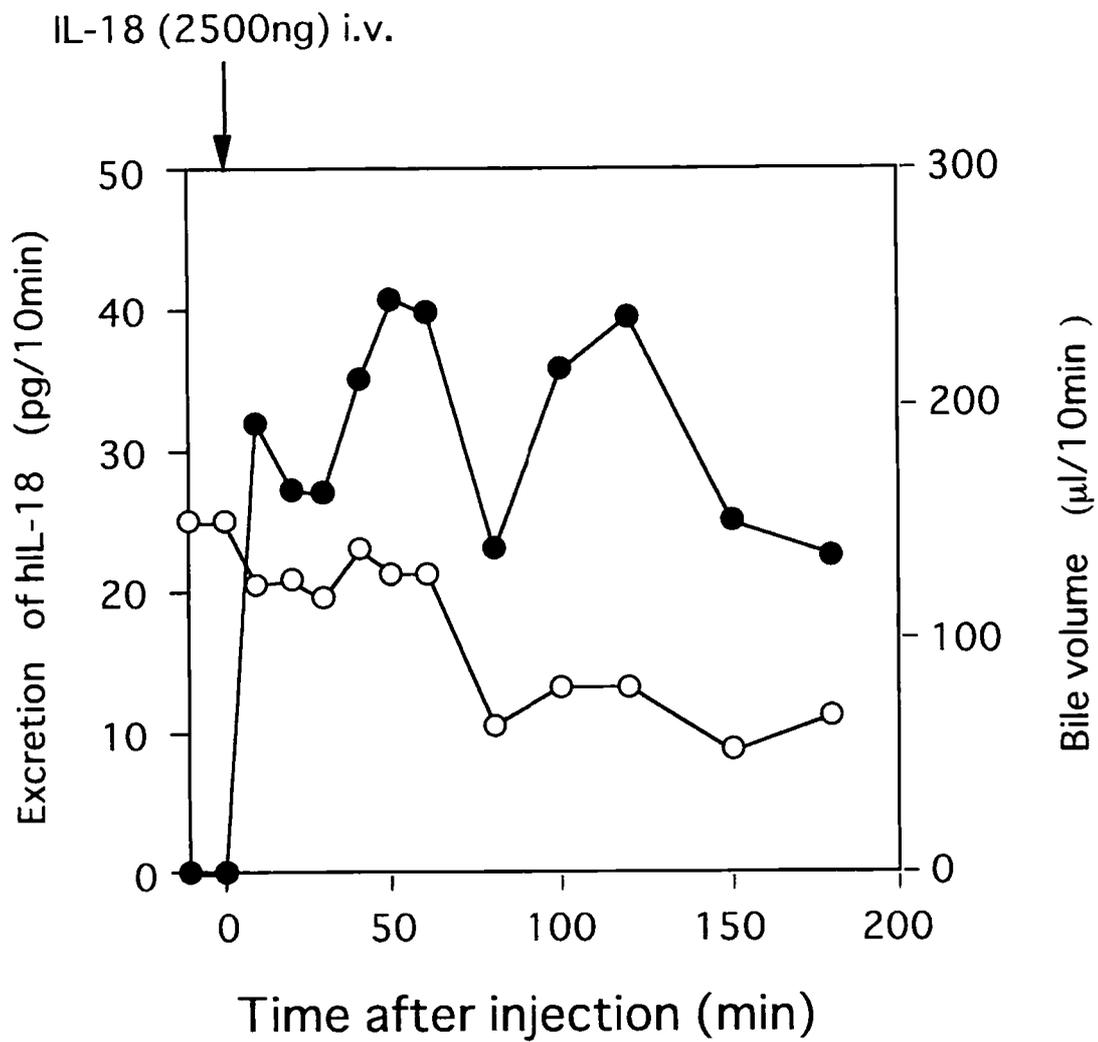


図7. IL-18の胆汁中への排泄

ヒト IL-18 (hIL-18) を 2,500 ng 静注後、胆汁を 10 分毎に 180 分まで採取し、IL-18 の量を測定した。

○：胆汁量、 ●：IL-18 の量。

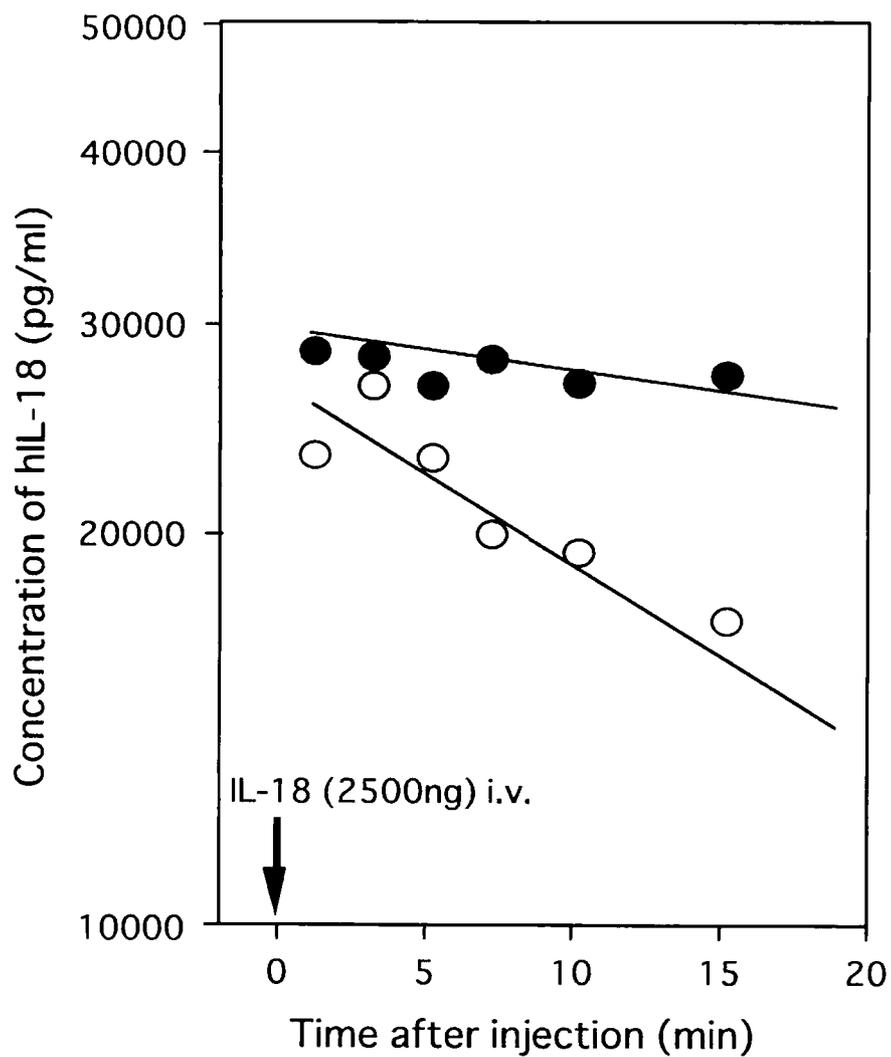


図8. 静注したヒト IL-18 の血中半減期

ヒト IL-18 (hIL-18) を 2,500 ng 静注後、経時的に 0.1 ml ずつ採血し、IL-18 濃度を測定した。

- : コントロール群、血中半減期 22 分、
- : BDL 群、血中半減期 360 分。

IL-18 は肝臓で代謝され、抗体と反応できる形で胆汁中へ排泄されることが推定される。

4) 考察

肝切除術後、通常の炎症性サイトカインの血中濃度は、術後数日間上昇した。その変化は肝不全群で高度であり、肝不全群では侵襲が過度であったことが示唆される。肝不全群における IL-18 の血中濃度は、黄疸が増強する一週間後以降に上昇し、肝切除術後の IL-18 とビリルビンの血中濃度には正の相関を認めた。また動物実験にて IL-18 は肝臓で代謝され胆汁中へ排泄されることが確認された。

IL-18 は、肝切除術後の肝不全の発症機構にはあまり関与せず、肝不全時の高 IL-18 血症は、IL-18 の肝からの排泄が低下して血中に蓄積されることが原因で、肝不全の原因ではなく肝不全の結果を表すものと考えられた。

肝広範切除術後の肝不全は、肝切除量の過剰が主な原因の自臓器不全がその本態である。IL-18 をはじめとしたサイトカインの産生は侵襲による二次的なものであって、肝不全の原因ではないといえる。後期（一週以後）の IL-18 の上昇は、IL-18 binding protein (IL-18 bp) と結合した形で上昇していると考えられ、肝傷害の増悪にはあまり関与していないと思われる。IL-18 bp と結合した IL-18 には肝傷害を惹起する作用は失われていることが報告されている (Ludwiczek, et al., 2002)。IL-18 が肝傷害作用を惹起するためには、肝局所で産生されて IL-18 bp と非結合の状態である必要があると考えられる。また、IL-18 による肝傷害のひとつとして、IL-12 との相乗作用があるが、肝不全群では IL-12 の血中濃度も低下しており、このことも IL-18 が術後肝不全の惹起にあまり関与していないことを示唆する。

IL-18 の肝臓への取り込みは、肝臓のアシアロ糖タンパクレセプターを介しておこなわれることが考えられる。糖タンパク質の血中での代謝は、糖タンパク質上に発現された糖鎖の構造によって制御されている。糖鎖の末端にガラクトース残基をもつ糖タンパク質は、肝細胞上のアシアロ糖タンパクレセプターによって認識され、肝細胞へ迅速に取り込まれる。そして胆汁中へと排泄される。そのため、肝機能が低下した肝硬変などの患者では、血中アルブミン濃度は低下しているにもかかわらず、高糖タンパク血症をきたすことが知られている (Ashwell G, et al; 1974, Stockert RJ, et al; 1982, Hirota M, et al; 1995)。

IL-18 は血中で IL-18 bp と結合して存在するため、IL-18 か、あるいは IL-18 binding protein が肝臓のアシアロ糖タンパクレセプターを介して取り込まれる機構が想定される。IL-18 には想定される糖鎖結合部位が存在しなかったが (Ushio S, et al; 1996)、IL-18 bp は糖タンパクであることが確認された (Aizawa Y, et al; 1999)。従って、IL-18 は血中で結合する IL-18 bp の糖タンパクとしての性質によって、肝から胆汁中へ排泄されるものと考えられた (図 9)。

本章の研究から、IL-18 は肝切除後の肝不全の発症機構にはあまり関与せず、肝不全時の高 IL-18 血症は肝不全の結果を表すと考えられた。しかし、肝傷害の発生に IL-18 が関与するという報告は多くあり、IL-18 の意義を考える場合にはやはり肝傷害の発生を考える必要がある。文献上はエンドトキシンの投与によって IL-18 が誘導されており、IL-18 はおそらく感染との関係が大きいものと考えられ、エンドトキシンで誘導される肝傷害は、肝臓で産生される IL-18 を含むサイトカインカスケードの活性化によるものと考えられている (Galle, et al., 1995)。したがって感染やエンドトキシン血症をきたすと IL-18 の産生に影響を与える可能性が考えられる。

しかしながら、我々の研究では感染やエンドトキシン血症と血中 IL-18 濃度との関連は認めなかった（未発表）。おそらくサイトカインの代謝は組織中と血中では異なっているのではないかと我々は考えている。今後、様々な肝不全の病態で解析をおこなうことにより、IL-18 の意義がより明らかになるものと期待される。

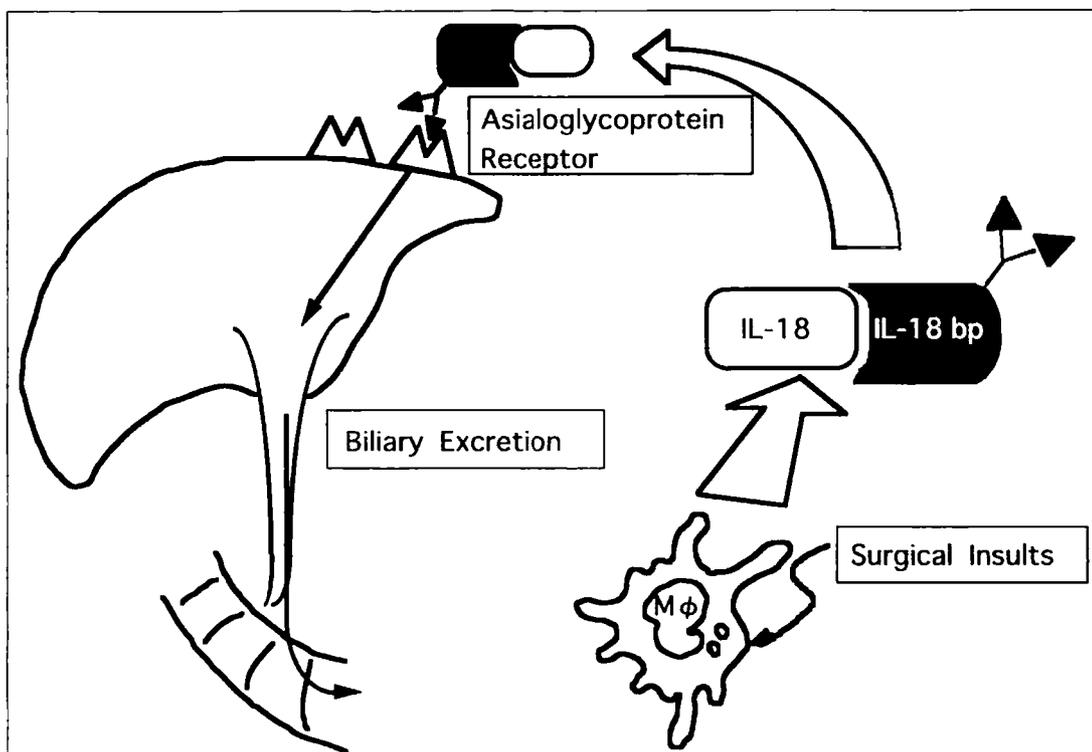


図 9. 想定される IL-18 の代謝経路

IL-18 は肝細胞に取り込まれ、胆汁中に排泄される。IL-18 の肝細胞への取り込みには、肝細胞上のアシアロ糖タンパクレセプターが関与することが示唆された。IL-18 は糖タンパクではないが、IL-18 bp は4つの N-glycosylation 部位をもつ。IL-18 は、血中で IL-18 bp と結合して存在することから、IL-18 と IL-18 bp の複合体がアシアロ糖タンパクレセプターを介して肝細胞へ取り込まれるものと考えられる。

第3章

IL-18 による肝細胞傷害の発生機構の解析

1) 背景

感染や外科的手術、外傷などの侵襲が生体に加わるとサイトカインを含む様々な炎症性のメディエーターが産生される。生体の防御反応として、神経内分泌反応や急性相反応蛋白の誘導、抗体の産生、血球の分化を通じてダメージを修復しようとする働きが生じ、その結果高サイトカイン血症の状態になる (Ogawa, 1998b)。それと同時に好中球やリンパ球、マクロファージなどの炎症性細胞が活性化され、さらなる侵襲に備えてプライミングされた状態になる。このように侵襲を受けた生体 (first attack) に感染などの新たな侵襲が加わった場合 (second attack)、サイトカインの再誘導がおこり、プライミングされた炎症性細胞が周辺臓器に傷害を与える。その結果臓器傷害が引き起こされ、小川はこの臓器傷害機序を second attack theory と呼び、second attack の予防の重要性を強調している (Ogawa, 1998b)。

second attack theory は以下の肝傷害モデルにおいても明らかにされている。Okamura らは、マウスを *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) の加熱死菌の腹腔内投与で感作し、投与 1 週間後に少量の LPS を投与すると劇症肝炎様の病態が引き起こされることを報告しており (Okamura, et al., 1995a)、Galanos らも、D-galactosamine で感作後 LPS を投与すると肝傷害が引き起こされることを報告している (Galanos, et al., 1979)。また Sameshima らはセルレインにて惹起した軽症膵炎モデルに LPS を投与することによって著しい肝傷害が認められたことを報告し

ている (Sameshima, et al., 1993)。

IL-18 はヘルパーT 細胞や単核球細胞、NK 細胞からの IFN- γ の産生を誘導する炎症性サイトカインの一つである (Okamura, et al., 1995a; Ushio et al., 1996)。さらに、TNF- α や IL-1 β 、IL-8 の産生や、ICAM-1 などの接着分子の発現も誘導することが明らかとなっている (Okamura, et al., 1995a; Puren, et al., 1998)。また IL-18 による IFN- γ の産生誘導には、IL-12 との強力な相乗作用が報告されており (Michalief, et al., 1996; Yoshimoto, et al., 1997)、IL-18 と IL-12 を産生するクッパー細胞が肝傷害に関与していることが示唆されている (Okamura, et al., 1995a; Tanaka, et al., 1996)。

そこで我々は second attack 肝傷害モデルとして、ラット閉塞性黄疸モデルを作成し、プライミングされた状態におけるサイトカインの産生動態および IL-18 による肝細胞傷害の発生機構の解析をおこなった。

2) 方法

a) 閉塞性黄疸ラットの作成

200~250 g の雄性 Wistar ラット (Kyudo Experimental Animal Center, Kumamoto, Japan) を用いた。全てのラットは、National Institutes of Health (NIH) animals care guidelines (National Institutes of Health, Public Health Service, 1985) にそって飼育された。16 時間絶食の後、ペントバルビタール麻酔下 (30 mg/kg)にて、開腹し胆管を肝門部より 5 mm 遠位側にて結紮 (BDL) して作成した。

b) BDL によるプライミング状態の解析

BDL によるプライミング状態を解析するため、コントロール

群と BDL 群で血中のサイトカイン濃度 (TNF- α 、IL-12、IFN- γ) を測定し、両群間の差を比較検討した。BDL 群は BDL を施行して3日後に実験をおこなった。

c) プライミング状態に対する IL-18 の作用

ヒト IL-18 を 2,500 ng (生食 0.2 ml に溶解して) 静注し、経時的 (pre、4、12 時間後) に血中のサイトカイン濃度 (TNF- α 、IL-12、IFN- γ) を測定し、コントロール群と BDL 群間で、比較検討した。BDL 群は BDL を施行して3日後に実験をおこなった。

d) IL-18 による肝傷害惹起作用についての解析

ヒト IL-18 を 2,500 ng (生食 0.2 ml に溶解して) 静注し、12 時間後の血中の GPT 値、総ビリルビン値、直接ビリルビン値を測定し、コントロール群と BDL 群間で、比較検討した。BDL 群は BDL を施行して3日後に実験をおこなった。GPT は、Wroblewski-Karmen (UV rate)法にて測定し、ビリルビンは Jendrasik-Grof 法にて測定した (Wroblewski, et al., 1995; Jendrasik, et al., 1937)。

e) 統計学的解析

データの統計学的解析は、Student's t-test 及び Fisher's exact method を用いて行った。P value <0.05 を有意差ありとした。

3) 結果

BDL (first attack) によるプライミングされた状態を作成し、コントロール群と BDL 群で血中のサイトカイン濃度を解析した。

TNF- α 、IL-12 の血中濃度は、BDL 群においてコントロール群に比較し高値を示したが、IFN- γ は両群間で大きな差は認めなかった (図 10)。侵襲時におけるサイトカインの産生が確認された。次にヒト IL-18 を静注し、血中のサイトカイン動態を解析した。IL-18 を投与することによって、BDL 群における IFN- γ は有意に上昇したが、プライミングされていないコントロール群においては、その変動は認めなかった。TNF- α 、IL-12 も BDL 群において、コントロール群に比較し高値を示したが、IL-12 は IL-18 静注後減少傾向を示した (図 11)。プライミングされた状態に IL-18 を投与することによって、サイトカイン反応の増強が認められた。

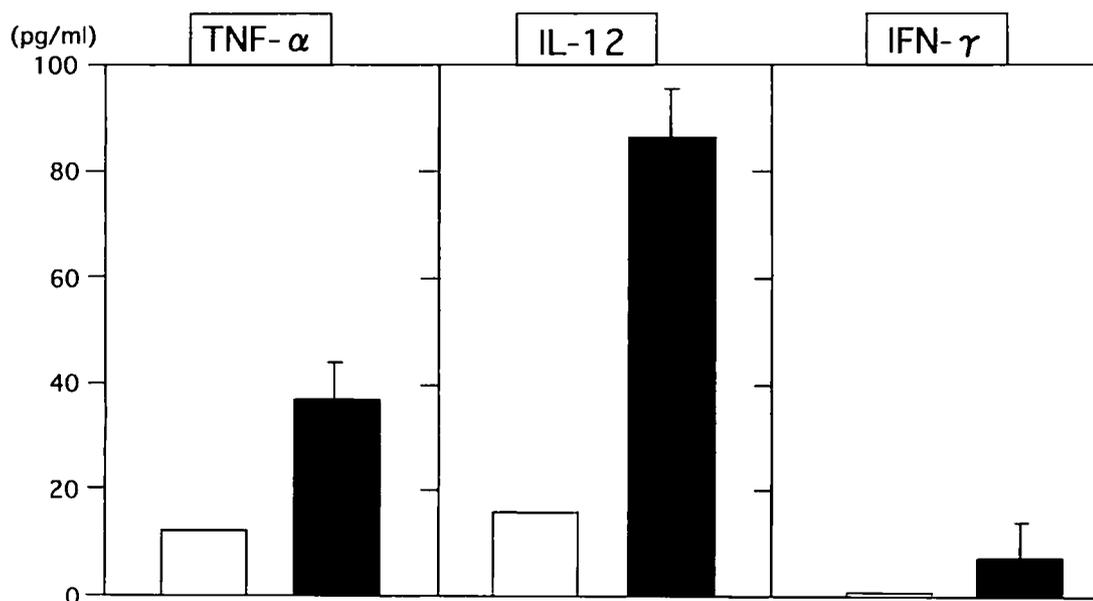


図 10. BDL によるプライミング状態の解析

BDL を施行して 3 日間後のラットとコントロール群で血中サイトカイン濃度を比較した。

□ : コントロール群、 ■ : BDL 群。

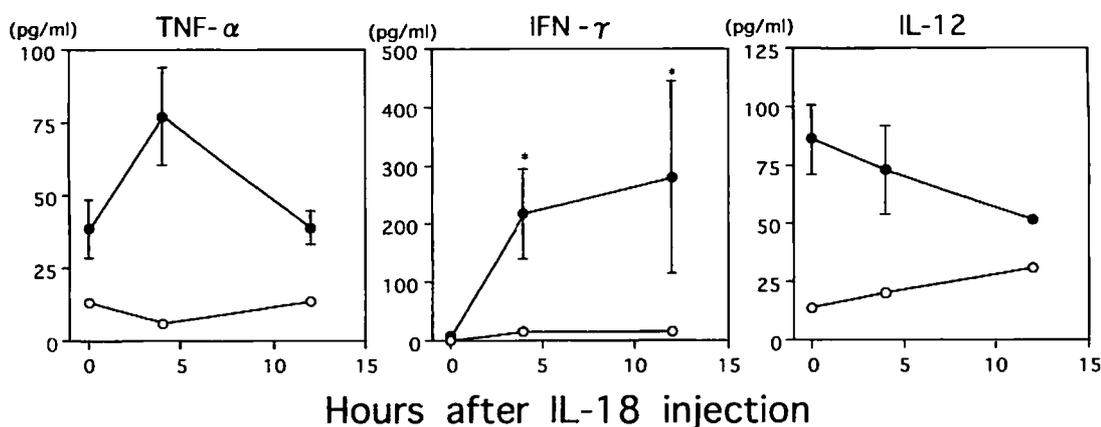


図 11. プライミング状態に対する IL-18 の作用

ヒト IL-18 を 2,500 ng 静注し、経時的 (pre、4、12 時間後) に血中のサイトカイン濃度 (TNF- α 、IL-12、IFN- γ) を測定した。

○ : コントロール群、● : BDL 群 (3 日間)。

*P<0.05 : IL-18 投与前と比較して。

最後にヒト IL-18 を静注し肝傷害が惹起されるか否かをみた。コントロール群においては肝傷害を認めなかったが、BDL 群で IL-18 を投与した群において、生食を投与した群と比較して有意な GPT 値の上昇、すなわち肝細胞傷害を認めた (図 12)。しかし血中のビリルビン値は両群において差は認めなかった (図 13)。プライミングされた状態に IL-18 を投与することによって肝傷害が惹起されたことが確認された。

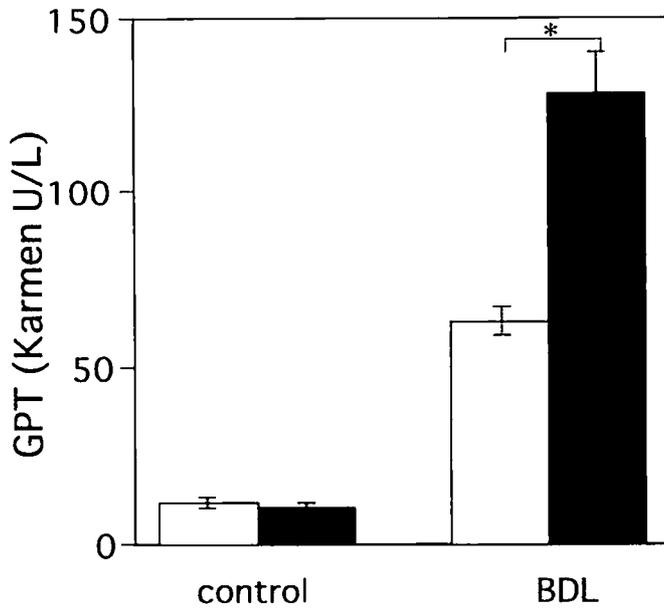


図 12. 血中 GPT 値の解析

コントロール群と BDL 群にヒト IL-18 を 2,500 ng 静注し、生食を投与した群とで血中 GPT 値を比較検討した。

□ : 生食投与群、 ■ : IL-18 投与群。 *P<0.05。

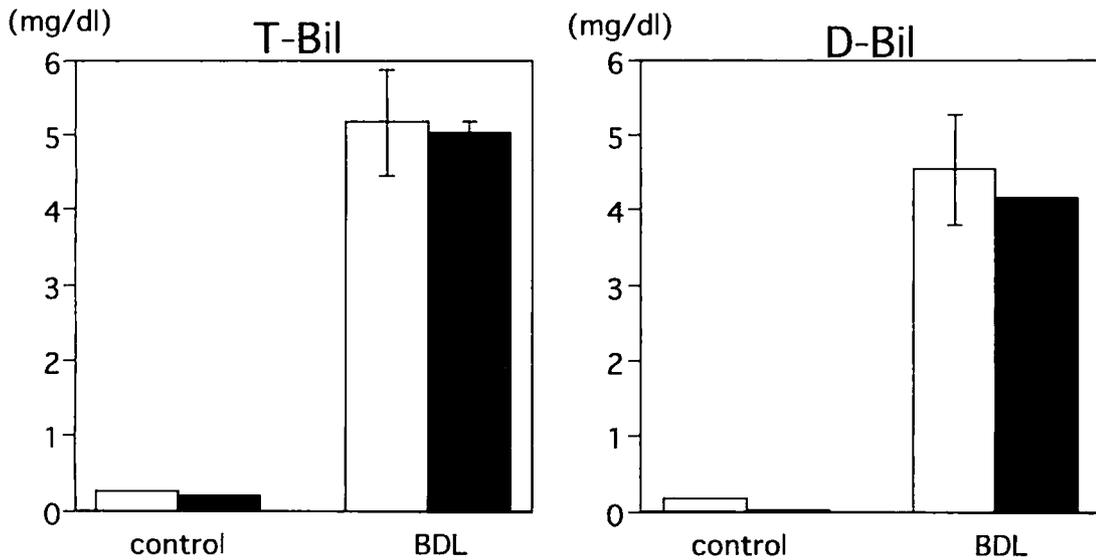


図 13. 血中ビリルビン値の解析

同様に血中の総ビリルビン値と直接ビリルビンを測定した。

□ : 生食投与群、 ■ : IL-18 投与群。

4) 考察

ラット閉塞性黄疸モデルの実験において、サイトカインの産生の増強、特に IL-12 の産生の増強を認めた。さらにそのような状態に IL-18 を投与することによって IFN- γ の産生がさらに増強され肝傷害が惹起された。これらのことは IL-18 と IL-12 の相乗作用で増強された IFN- γ の産生が、肝傷害を引き起こしたことを示唆し、これまでの報告と一致する (Michalief, et al., 1996; Yoshimoto, et al., 1997; Lauwerys, et al., 2000)。また最近の研究でもこの二つのサイトカインが病原体に対して感染防御効果を示すことが報告されている (Zhang, et al., 1997)。

遠隔臓器傷害の発生機構は、プライミングされた後に遠隔臓器に集積した好中球による組織破壊が主体である。D-galactosamine で感作後、LPS の投与によっておこる肝傷害やエンドトキシン血症合併膵炎による肝傷害の動物実験モデルにおいても、その発生機序はプライミングされた好中球を介しておこると報告されている (Sameshima, et al., 1993; Hewett, et al., 1993)。IL-18 もまた同様の LPS による肝傷害モデルで誘導されることから (Okamura, et al., 1995a)、IL-18 はプライミングされた好中球を活性化し、肝傷害の発生機構に関与している可能性が示唆される。

侵襲 (first attack) を受けた生体に感染などの新たな侵襲 (second attack) が加わった場合、サイトカインの再誘導がおこり、プライミングされた炎症性細胞が周辺臓器に傷害を与える。その結果臓器傷害が引き起こされる。小川はこの臓器傷害機序を second attack theory と呼び、second attack の予防の重要性を強調している (Ogawa, 1998b)。なぜなら最初に起こる、または行われる侵襲である first attack に対しては、医師は何もできないからである。first attack のうち、外傷や急性膵炎、感染症

は、医療機関を受診する前に既に起こっている (unplanned injury)。また planned injury である手術にしても、侵襲の程度を小さくすることはできても、これを避けて通ることはできない。first attack は不可避であるが、一方 second attack は不可避ではない。したがって second attack に注目し、その芽をつみとることが臓器不全を防ぐ最も重要な処置であり、これが second attack の予防を強調する理由である。

本章の検討から、IL-18 は first attack (BDL) によりプライミングされ、IL-12 の産生系が刺激された状態下で、IFN- γ の産生増強を介して肝傷害を惹起すると結論できる。

第4章

重症急性膵炎症例における IL-18 の血中動態の解析

1) 背景

急性膵炎は種々の異なった原因によって膵臓に発症した急性炎症性病変の総称である。そのため、急性膵炎は一過性の腹部症状のみで軽快する軽症急性膵炎から、生命維持が困難な重症急性膵炎まで、様々な臨床像を呈する。種々の原因があるが、いずれも膵臓に過剰な刺激が加わり、膵臓の消化酵素を活性化することが原因である。そして、本来ならば食物として摂取した肉や脂肪を消化するはずの膵臓の消化酵素が、自分自身の組織を消化し始める（自己消化）のが、急性膵炎の病態である。炎症の波及が膵局所、あるいは膵周囲組織にとどまるものが軽症急性膵炎、サイトカイン反応の結果、全身に炎症反応が広がり、好中球の活性化を伴う中性プロテアーゼや活性酸素の放出の結果、重要臓器傷害を合併し、集中治療を必要とする病態が重症急性膵炎である (Ogawa, 1998a; Ogawa, 1998b; Hirota, et al., 2000; 広田、他、2000) (図 2)。

1999 年の全国疫学調査 (1998 年の発症症例を対象) によれば、急性膵炎全体の年間受療者数は 19,500 (95%信頼区間 9,500 ~19,500) 人、その内、重症急性膵炎の年間受療者数 4,900 人と推計された (玉腰、他、2000)。1987 年の調査 (1982~1986 年の発症症例を対象) では、それぞれ 14,500 (95%信頼区間 9,500 ~19,500) 人、1,500 人と推計されており (山本、他、1988)、実患者数では増加しているものと考えられる。男女比は約 2 対 1 で、男性に多い病気である。小児から高齢者まですべての年齢層に発

症するが、40 歳台から 60 歳台にピークがある。

飲酒がきっかけとなるアルコール性膵炎、及び胆道結石が総胆管末端部に嵌頓して起こる胆石性膵炎が、それぞれ 37%、20% と多い。その他、内視鏡的逆行性膵管胆道造影（endoscopic retrograde cholangiopancreatography: ERCP）や内視鏡的乳頭切開（endoscopic sphincterotomy: EST）など内視鏡的乳頭操作後の膵炎、手術が原因の術後膵炎、薬剤投与が原因の薬剤性膵炎、高脂血症が原因の膵炎、膵管胆道合流異常や膵管非癒合などの膵管の構造異常に基づく膵炎などがある。原因がはっきりしないことも多い（特発性膵炎：22%）（表 4）。

表 4. 重症急性膵炎の成因

成 因	男	女	計
アルコール	138 (49%)	14 (11%)	152 (37%)
胆石	44 (16%)	37 (30%)	81 (20%)
内視鏡的乳頭操作 (ERCP, EST, etc.)	11 (4%)	14 (7%)	25 (6%)
慢性膵炎急性増悪	6 (2%)	2 (2%)	8 (2%)
薬剤性	4 (1%)	4 (3%)	8 (2%)
手術	4 (1%)	3 (2%)	7 (2%)
高脂血症	4 (1%)	3 (2%)	7 (2%)
その他の成因	21 (7%)	10 (8%)	31 (8%)
特発性	51 (18%)	38 (30%)	89 (22%)
合 計	283(100%)	125(100%)	408(100%)

玉腰, 他, 2000. より引用。

重症急性膵炎は良性疾患であるにもかかわらず、その予後は不良であり、その致死率は 1997 年の厚生省難治性膵疾患調査研究班の調査では 27%にも達している（小川，他，1998）。同調査における重症急性膵炎の死因は、心・循環不全、腎不全、呼吸不全、disseminated intravascular coagulation (DIC)、消化管出血、肝不全など、膵以外の遠隔主要臓器の機能不全によるものがほとんどで、膵局所の病変が死因となることは少ない。しかも多くは複数の臓器が傷害される多臓器不全（multiple organ failure: MOF）による死亡である（表 5）。

表 5. 重症急性膵炎の死因

死 因	症例数（割合）
多臓器不全	36 (71%)
敗血症	11 (22%)
呼吸不全	5 (10%)
腹腔内出血	4 (8%)
消化管出血	2 (4%)
その他	7 (14%)
不明	2 (4%)

小川，他，1998. より引用。

従来は、活性化されたプロテアーゼやホスホリパーゼ A₂ などの膵酵素が全身を循環して、遠隔臓器の機能不全を惹起すると考えられていた。しかし、膵酵素は血液中の pH では活性が著明に減ずること、血中には多量のプロテアーゼインヒビターが存在すること、また血中膵酵素値は重症度とは相関しないこと (図 14) などより、急性膵炎の重症化因子は膵酵素以外のものであると考えられている。

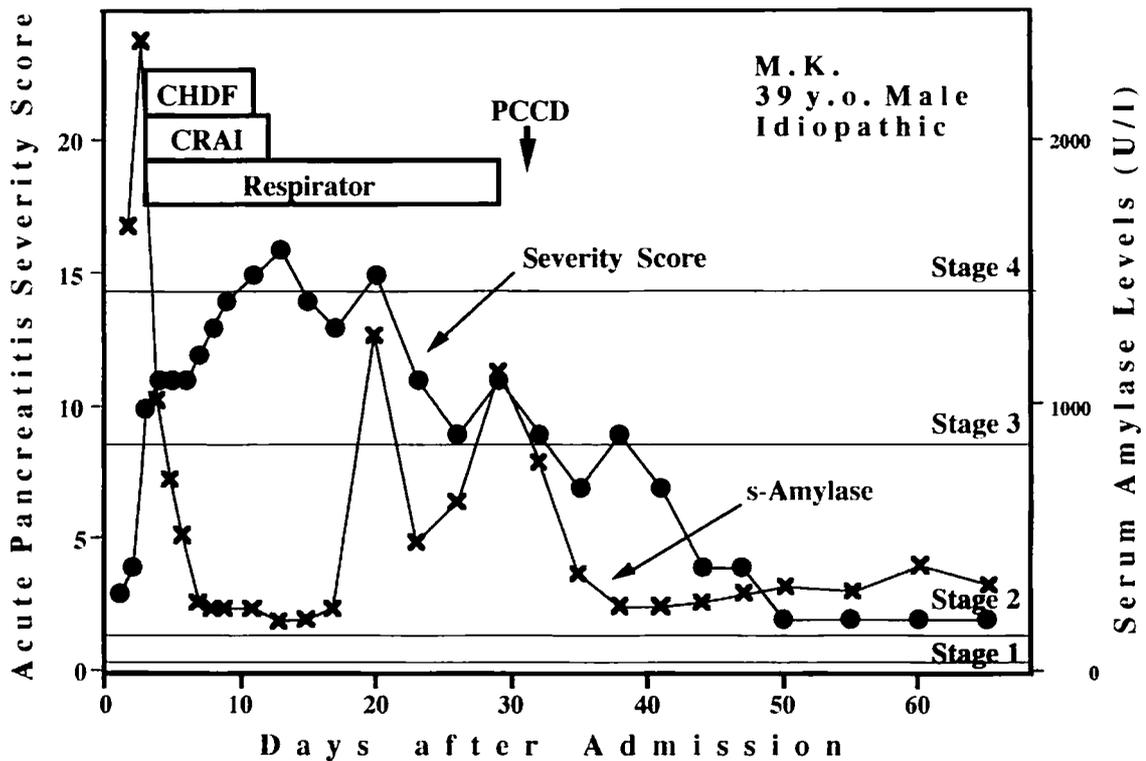


図 14. 急性膵炎の重症度と血中アミラーゼ濃度の推移

39 歳、男性の特発性壊死性膵炎における重症度スコアと血中アミラーゼ濃度の変化を示した。血中アミラーゼ濃度は、Stage 4 で、レスピレーターや持続血液濾過透析療法 (CHDF: continuous hemodiafiltration) を必要とする多臓器不全の状態においても、すでに下降しており、膵炎の重症度を表してはいない。CRAI: continuous regional arterial infusion、PCCD: percutaneous cyst drainage。広田, 他, 1998. より引用。

一般に生体に侵襲が加わると、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、などの炎症性サイトカインが産生され、発熱、頻脈、過呼吸、白血球増多・減少などを呈する SIRS が起こることが知られている (Members of American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine consensus conference, 1992)。急性膵炎時にも、高サイトカイン血症の惹起に伴って SIRS 状態となる (Ogawa, et al., 1996; 小川, 他, 1997)。この際、高サイトカイン血症により全身の血管内皮細胞と好中球が活性化され、好中球の血管外への浸潤、遠隔臓器への集積が起こる (広田, 他, 2000) (図 2)。われわれは、この遠隔臓器に集積した活性化好中球が、強い侵襲反応時 (severe attack)、あるいは新たな侵襲によるサイトカインの再誘導時 (second attack) に、エラスターゼなどの中性プロテアーゼや活性酸素を産生放出し、遠隔重要臓器の傷害を引き起こすものと考えている (Ogawa, et al., 1996; Ogawa, 1996; Ogawa, 1998a; Ogawa, 1998b)。実際に、サイトカインの血中濃度は、急性膵炎の重症度を反映している (Ikei, et al., 1998; Hirota, et al., 2000)。また、われわれは、ラット急性膵炎モデルにおいて肝臓においても、クッパー細胞が好中球に対するケモカインである CINC を産生して好中球を肝臓に集積させ、その状態でエンドトキシン血症を生じると好中球が活性化されて肝傷害が惹起されることを報告している (Sameshima, et al., 1993; Hirano, et al., 1997)。小川は、この SIRS 状態における遠隔臓器に集積しプライミングされた好中球による臓器傷害機序を second attack theory と呼び、second attack の予防の重要性を強調している (図 3)。

一方、1996 年に Bone が SIRS に関連して興味深い論文を発表した (Bone, 1996)。炎症性サイトカインが産生され SIRS になると、同時に SIRS を遷延させないように SIRS 鎮静化サイトカイン、すなわち抗炎症性サイトカインやレセプターアンタゴニス

トなどのサイトカイン拮抗物質が誘導されて、両者のバランスで恒常性が保たれるという指摘である。生体においては、ある“作用”が働くときには必ず同時に“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いう考えに基づいている。その際、Bone は炎症性サイトカイン優位の状態の SIRS に対して、サイトカイン拮抗物質優位の CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) と呼ばれる病態を提唱している。この病態においては、免疫能低下により易感染状態が惹起されると考えられている (図 15)。

当科で診療した急性膵炎 18 例 (重症 14 例、中等症 2 例、軽症 2 例) における、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8)、抗炎症性サイトカイン (IL-10)、及びサイトカイン拮抗物質 (soluble TNF-receptor I: sTNF-RI、sTNF-RII、IL-1 receptor antagonist: IL-1ra) の血中濃度を解析したところ、サイトカイン及びその拮抗物質の血中濃度は、傷害臓器数が多い症例、すなわち重症例ほど高値であったが、中でも炎症性サイトカインの阻害物質である sTNF-RI、sTNF-RII の血中濃度が特に傷害臓器数と有意に関連していた。また sTNF-RI、sTNF-RII の血中濃度のピークは、対応するサイトカインである TNF- α のピークに数日遅れていた (Hirota, et al., 2000) (図 16)。sTNF-RI、sTNF-RII は、一次性サイトカイン (triggering cytokine) である TNF- α の刺激により誘導され、その血中濃度は、最初の侵襲の大きさを示すものと考えられる。これらは、他のサイトカインに比して、おそらく、血中半減期が比較的長く、また産生量が安定しているために、血中での侵襲度のマーカーとして捉えることができるのではないかと考えられる。また、一方、急性膵炎におけるサイトカイン阻害物質の著明な誘導は、強い炎症反応をやわらげ、ホメオスタシスを保とうとする制御機構の一つかもしれない。

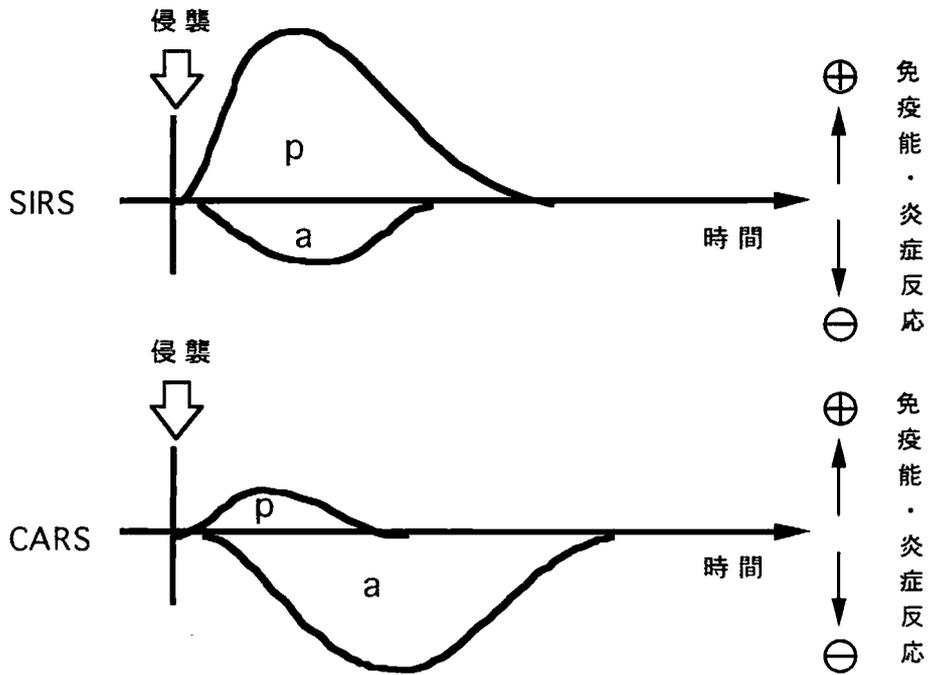


図 15. 侵襲後の免疫能・炎症反応の変動と SIRS、CARS

p: pro-inflammatory cytokines (炎症性サイトカイン)、
 a: anti-inflammatory cytokines (抗炎症性サイトカイン)。
 小川, 1999. より改変引用。

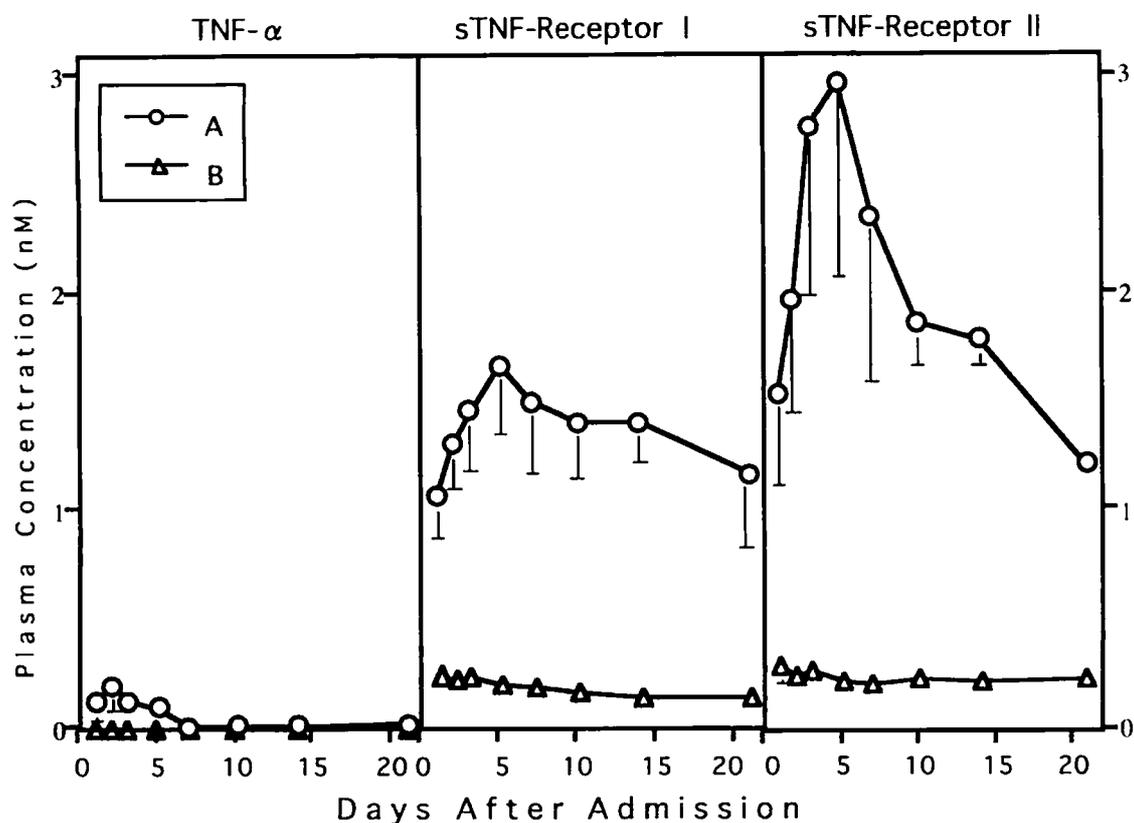


図 16. 急性膵炎における血中 TNF- α 、sTNF-R 濃度の推移

A: MOF 群、B: 非 MOF 群。Hirota, et al., 2000. より引用。

IL-18 は、炎症性サイトカインの誘導因子としての作用を有し、組織傷害のメディエータとなっている可能性が指摘されている。IL-18 は IL-12 と共同することによって、より強力に IFN- γ の産生を誘導することが明らかになっている (Michalief, et al., 1996; Yoshimoto, et al., 1997; Lauwerys, et al., 2000)。その機序は IL-12 による IL-18 レセプターの up-regulation による可能性が指摘されており (Ahn, et al., 1997)、また IL-18 自身が IL-12 によるヘルパー T 細胞からの IFN- γ の産生誘導を増強

しているためと考えられている (Michalief, et al., 1996; Kohno, et al., 1997)。さらに IL-18 は IFN- γ だけでなく、他の炎症性サイトカインである TNF- α の産生も誘導し、TNF- α を介して IL-1 β 、IL-8 の産生も誘導することが明らかとなっている。しかも IFN- γ の産生誘導とは異なり、IL-18 単独で強力な TNF- α 産生誘導能を有している (Puren, et al., 1998)。

このように IL-18 が炎症性サイトカインの誘導因子としての作用を有し、SIRS に認められる高サイトカイン血症を引き起こす原因となっている可能性が示唆される。重症急性膵炎時にも高サイトカイン血症の惹起に伴って SIRS 状態となり (Ogawa, et al., 1996; 小川, 他, 1997)、過剰なサイトカイン反応が MOF の原因となっている。

第 2 章では肝切除後の肝不全という自臓器傷害における IL-18 の代謝動態をみたわけだが、遠隔臓器傷害 (他臓器傷害) として、IL-18 が肝傷害の惹起に関与しているか否か、重症急性膵炎に着目し、重症急性膵炎における IL-18 の血中動態の解析をおこなった。

2) 方法

a) 急性膵炎症例

急性膵炎症例 23 例 (肝不全発症群 12 例、非肝不全発症群 11 例) を対象とした。入院経過中、総ビリルビン値が 3 mg/dl を超えた症例を肝不全発症群とし、それ以外を非肝不全発症群とした。膵炎の診断は、厚生労働省の診断基準に基づいておこなった。膵炎の起因として胆石などの胆道系によるものは、それ自体が肝傷害を引き起こす要因となるため除外した。なぜなら、今回の研究の目的は膵炎時のサイトカイン動態が及ぼす肝傷害について解析したかったためである。

b) 検体、血中サイトカイン濃度の測定

経時的に血液を採取。血液から血漿を遠心分離し (3,000 rpm、5 分間)、測定時まで -80°C で保存した。IL-18をはじめ各サイトカイン (TNF- α 、IL-12、IFN- γ 、sFas-L) および sTNF-RII は、ELISA 法を用いて測定した。ELISA キットは以下のものを使用した。IL-18、sFas-L : Medical and Biological Laboratories Co. Ltd. (Nagoya, Japan)。TNF- α 、sTNF-RII、IL-12、IFN- γ : BioSource International (Camarillo, CA, USA)。

c) 統計学的解析

データの統計学的解析は、Student's t-test 及び Fisher's exact method を用いて行った。P value <0.05 を有意差ありとした。

3) 結果

急性膵炎症例を肝不全発症群と非肝不全発症群とに分けて両群間の血中サイトカインの産生動態、総ビリルビン値および GPT 値を解析した。ビリルビンの血中濃度は、肝不全発症群において入院経過中上昇し続けた。これに対して血中 GPT 濃度は総ビリルビン値の上昇に先立ち、入院後数日間のみ高値を示しその後低下していった (図 17)。これは膵炎発症早期に肝細胞傷害が起きて、その結果肝機能が低下した可能性が示唆される。非肝不全発症群では両値とも上昇を認めなかった。

肝細胞傷害から肝不全にまで発展した機序として、サイトカインの産生動態が関与している可能性が考えられる。そこで、両群間での血中サイトカイン濃度を解析した。血中 IL-18 濃度は、非肝不全発症群ではほぼ正常範囲内であったが、肝不全発症群において入院早期より高値を示し、一旦減少後上昇傾向を示した。

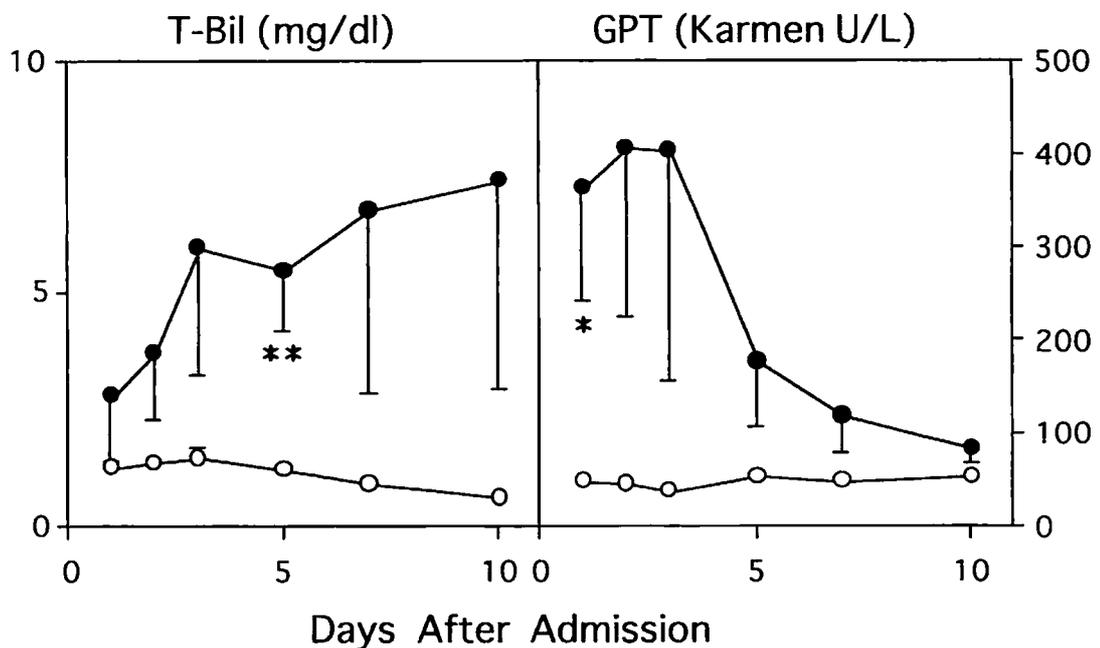


図 17. 急性膵炎における総ビリルビンと GPT の血中濃度の推移

○：非肝不全発症群 ●：肝不全発症群。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

IFN- γ 、sFas-L の血中濃度は両群とも明らかな変動は示さなかった。IL-18 と共同して強力に IFN- γ の産生を誘導する IL-12 の血中濃度は入院後数日減少し、その後上昇した。両群間で差は認めなかった。炎症性サイトカインである TNF- α の血中濃度は肝不全発症群で入院経過中高値を示し、入院当日に最高値を示した。それに対して TNF- α のレセプターである sTNF-RII の血中濃度は肝不全発症群で、TNF- α の最高値を示した日より遅れて 3 日目に最高値を示した。この両サイトカインともに非肝不全発症群では低下したままであった (図 18)。肝不全発症群に

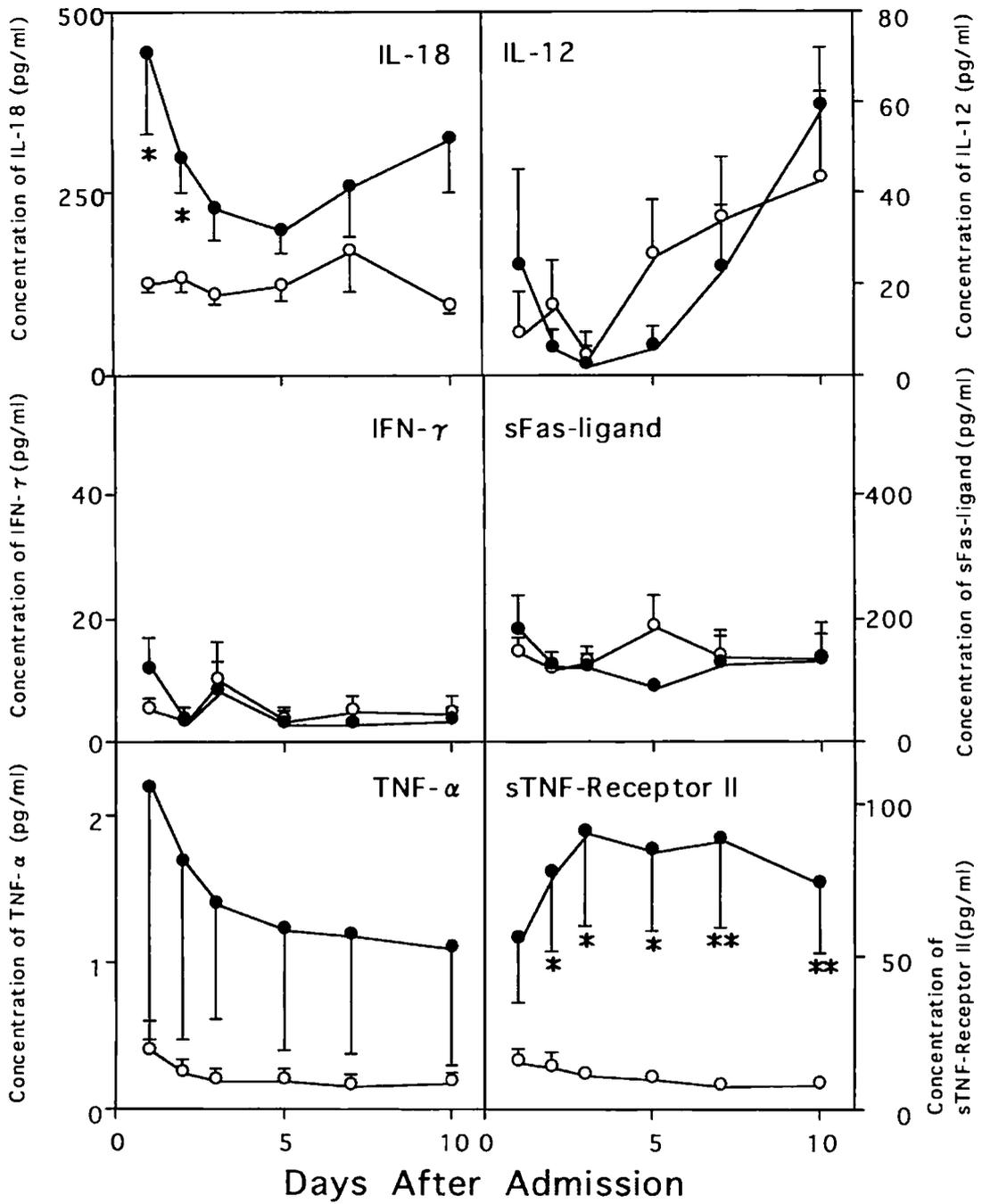


図 18. 急性膵炎における血中サイトカイン動態の解析

○：非肝不全発症群 ●：肝不全発症群。

*P<0.05, **P<0.01。

において IL-18、TNF- α および sTNF-RII が有意に上昇した。しかし、IL-12、IFN- γ 、sFas-L は両群間にて差は認めなかった。また重症度を反映する Ranson score も両群間で差は認めなかった (表 6)。すなわち IL-18 が IL-12 と共同して IFN- γ の産生を誘導することによって肝傷害を引き起こしたのではなく、また sFas-L を介したアポトーシスによるものでもなく、IL-18 が TNF- α を介して肝傷害を引き起こしている可能性が示唆される。IL-18 が単独で TNF- α を産生誘導することは報告されており (Puren AJ, et al; 1998、Torigoe K, et al; 1997、Matsumoto S, et al; 1997)、早期の IL-18 の上昇が TNF- α の産生を誘導し、その産生に刺激されて引き続き sTNF-RII の産生がおこったものと考えられる。IL-18 が肝傷害発生のキーファクターになっているものと考えられ、急性膵炎発症時に IL-18 が高濃度に存在することが肝傷害をひきおこす原因になっている可能性が示唆される。また IL-18 が早期と後期に高値を示しているが、早期の上昇は肝傷害に関与し、後期の上昇は広範肝切除術後肝不全例で認められるような IL-18 の排泄不全によるものと考えられる。

表6. 各因子の最高値の比較

	Patients with hepatic failure	Patients without hepatic failure
T- Bil (mg/dL)	<u>10.1±3.1</u>	<u>1.8±0.3</u> *
GPT (U/L)	601±254	77±10
IL-18 (pg/mL)	<u>574±113</u>	<u>234±56</u> *
IL-12 (pg/mL)	71±13	56±5
IFN- γ (pg/mL)	15±4	13±5
sFas-L (pg/mL)	210±40	230±30
TNF- α (pg/mL)	2.5±1.3	0.5±0.2
sTNF-RII (pg/mL)	<u>117±22</u>	<u>18±5</u> **
Ranson score	5.7±0.9	3.7±0.8

*P<0.05、**P<0.01。

4) 考察

急性膵炎における IL-18 の血中濃度は、肝切除術後の血中動態とは異なり、ビリルビンや他のサイトカインの上昇に先立ち、早期に上昇していた。この早期の上昇は、肝切除術後肝不全時の代謝不全によるメカニズムとは異なると考えられる。IL-18 が炎症性サイトカインとして働き、引き続きおこる一連のサイトカイン反応を誘導して、結果として肝傷害を引き起こしているものと考えられる。

一方、血中の IL-12 濃度は入院後早期に減少している。同様の血中 IL-12 濃度の減少は、肝切除術後の患者にも認められ、しかも肝不全発症群において非発症群に比較して、その産生は抑制されていた (図 19)。IL-12 は過大な侵襲をうけるとその産生が抑制される可能性が考えられる。急性膵炎においても、感染などを合併して重症化する機構があるが、IL-12 の産生が抑制されることもその一因ではないかと考えられる。IL-18 の主な作用の一つとして感染防御能がある。特に IL-12 が共存している場合には、強力な細胞性免疫が誘導され、細菌などの微生物に対して強力な感染防御効果を誘導することが明らかとなっている (Zhang, et al., 1997)。しかし、このような働きは、侵襲をうけて組織にダメージがある場合はこのかぎりではないのかもしれない。

急性膵炎症例において、ビリルビンの血中濃度は肝不全発症群において入院経過中上昇し続けた。これに対して血中 GPT 濃度は総ビリルビン値の上昇に先立ち、入院後数日間のみ高値を示しその後低下していった。これは膵炎発症早期に肝細胞傷害が起きて、その結果肝不全が惹起された可能性が示唆された。

Concentration of IL-12 (pg/ml)

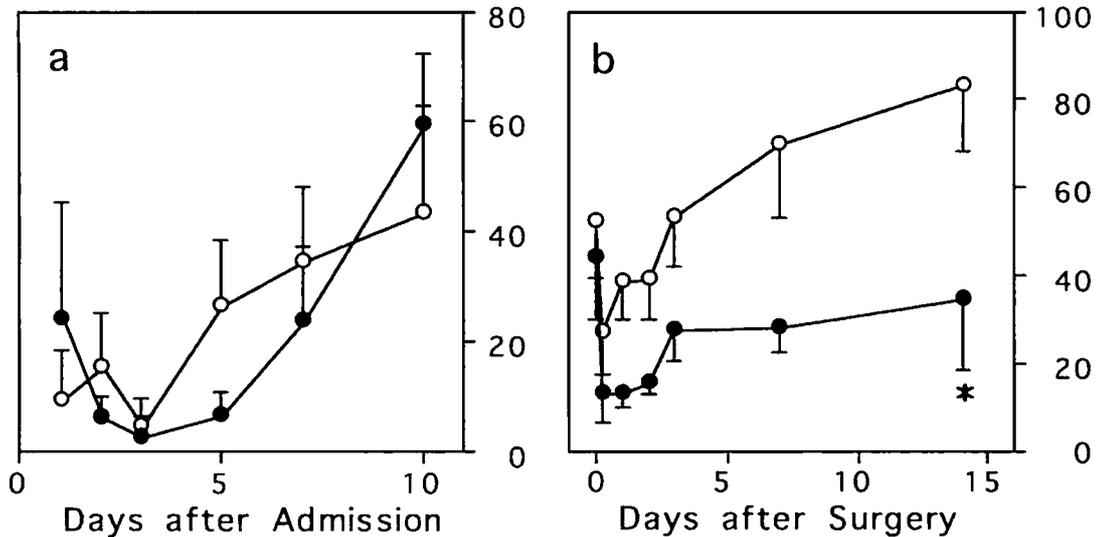


図 19. 急性膵炎および肝切除術後の IL-12 の血中濃度の推移

a : 急性膵炎症例、b : 肝切除術後症例。

○ : 非肝不全発症群、 ● : 肝不全発症群。

* $P < 0.05$ 。

肝細胞傷害から肝不全にまで発展した機序としてサイトカインの産生動態が関与している可能性が考えられる。肝不全発症群において IL-18、TNF- α および sTNF-RII が有意に上昇していた。しかし、IL-12、IFN- γ 、sFas-L は肝不全との関連は認めなかった。また重症度を反映する Ranson score も両群間で差は認めなかった。これらのことより IL-18 は膵炎の重症度よりも肝傷害と密接に関係していることが示唆された。

また重症急性膵炎における肝傷害の発生機序として、TNF- α を介した機構によるものの可能性も示唆された。IL-18 が肝傷害を引き起こすパターンとして三つのケースが考えられる。それら

は、①IL-12 と共同して IFN- γ の産生誘導することによって肝障害を引き起こすケース、②sFas-L を介したアポトーシスによるケース、③TNF- α の誘導を介して肝障害を引き起こすケース、である。今回、IL-12、IFN- γ 、sFas-L は肝傷害との関連は認めず、IL-18、TNF- α および sTNF-RII の血中動態が肝機能との関連を認めた。IL-18 が単独で TNF- α を産生誘導することは報告されており (Puren, et al., 1998)、IL-18 が他の刺激なしで単独で、NF- κ B の転写を直接活性化することにより、TNF- α を産生誘導していると考えられている (Torigoe, et al., 1997; Matsumoto, et al., 1997; Jongeneel, et al., 1994)。早期の IL-18 の上昇が TNF- α の産生を誘導し、その産生に刺激され、TNF- α の拮抗物質である sTNF-RII の産生がおこった可能性が考えられる。

IL-18 は他のサイトカインに比べその血中濃度は高く、sTNF-RII の血中濃度の約 5 倍であった。IL-18 が肝傷害のキーファクターになっているものと考えられ、急性膵炎発症時に IL-18 が高濃度に存在することが肝傷害をひきおこす原因になっている可能性が示唆された。また IL-18 が早期と後期に高値を示しているが、早期の上昇は肝傷害の誘導に関与し、後期の上昇は、肝切除術後肝不全の場合と同様にビリルビンの上昇に引き続いて IL-18 が上昇したことから、肝不全の結果生じた IL-18 の排泄不全によるものと考えられた。

IL-18 は IFN- γ の産生を誘導し、炎症性サイトカインのひとつに位置づけられている。また侵襲時に認められる TNF- α 、IL-1 β 、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生も誘導している。急性膵炎時にこれらの炎症性サイトカインが臓器傷害のメディエータとなり、急性膵炎の重症化や MOF への進展に関与していることを我々は報告している (Ogawa, 1998a)。IL-18 はこれら一連のサイトカイン反応の上流に位置するサイトカインであり、特に肝

傷害に関与する重要なサイトカインであると我々は考えている。

本研究から、急性膵炎発症早期の IL-18 の産生が、肝不全発症の原因と考えられた。また、その機構には TNF- α の誘導を介することが示唆された。

第5章

総 括

侵襲後の IL-18 の動態と肝傷害発生への関与を明らかにするために、本研究を行った。侵襲として、肝広範切除術後の肝不全、ラットエンドトキシン肝傷害モデル、急性膵炎をとりあげ、IL-18 の体内動態を解析し、以下の知見を得た。

1) IL-18 は、肝細胞に取り込まれ、胆汁中へ排泄される。肝広範切除術後肝不全時には、血中 IL-18 濃度が高値を呈するが、これは IL-18 の肝代謝が低下したためである。

2) あらかじめ TNF- α 、IL-12 が産生され、プライミング状態にある状況下に IL-18 を投与すると、IFN- γ が誘導されて肝傷害が惹起される。

3) 急性膵炎症例における肝不全の発生には、膵炎発症早期に産生される IL-18 による TNF- α をはじめとした他のサイトカインの産生の誘導が関与する。

以上のように IL-18 は、侵襲後の病態の形成、特に肝傷害と強く関係するが、肝不全の惹起因子となる場合もあれば、肝不全の結果として血中濃度が上昇する場合があります。病態の種類や程度により、その果たす役割は異なる。

参考文献

Ahn HJ, Maruo S, Tomura M, Mu J, Hamaoka H, Fujiwara H. A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN- γ -inducing factor in enhanced production of IFN- γ .

J Immunol 159: 2125-2131, 1997.

Aizawa Y, Akita K, Tanai Y, Torigoe K, Mori T, Nishida Y, Ushio S, Nukada Y, Tanimoto T, Ikegami H, Ikeda M, Kurimoto M. Cloning and expression of interleukin-18 binding protein.

FEBS Lett 445: 338-342, 1999.

Ashwell G, Morell AG. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins.

Adv Enzymol 41: 99-128, 1974.

Bone RC. Sir Issac Newton, sepsis, SIRS, and CARS.

Crit Care Med 24 : 1125-1128, 1996.

Clavien PA, Camargo CA Jr, Gorczynski R, Washington MK, Levy GA, Langer B, Greig PD. Acute reactant cytokines and neutrophil adhesion after warm ischemia in cirrhotic and noncirrhotic human livers.

Hepatology 23: 1456-1463, 1996.

Galanos C, Freudenberg MA, Reutter E. Galactosamine-

induced sensitization to the lethal effects of endotoxin.
Proc Natl Acad Sci USA 76: 5939–5943, 1979.

Galle PR, Hofmann WJ. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage.
J Exp Med 182: 1223–1230, 1995.

Grazi GL, Mazziotti A, Jovine E, Pierangeli F, Ercolani G, Gallucci A, Cavallari A. Total vascular exclusion of the liver during hepatic surgery.
Arch Surg 132: 1104–1109, 1997.

Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K. Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme.
Science 275: 206–209, 1997.

Hewett JA, Jean PA, Kunkel SL, Roth RA. Relationship between tumor necrosis factor and neutrophils in endotoxin-induced liver injury.
Am J Physiol 265: G1011–G1015, 1993.

Hirano Y, Sakamoto K, Mita S, Kuwahara N, Suzuki S, Ogawa M. CINC mRNA is expressed in remote organs of rats with cerulein-induced pancreatitis. *In*; Faist E, editor. 4th international congress on the immune consequences of trauma, shock and sepsis. Bologna, Monduzzi Editore, 835–838, 1997.

Hirota M, Sugi K, Inoue M. Dynamic aspects of glutathione metabolism in obstructive jaundice.

J Gastroenterol 29: 588–592, 1994.

Hirota M, Sugi K, Inoue M. Asialofetuin metabolism in animals with obstructive jaundice.

Int Hepatol Commun 3: 184–189, 1995.

Hirota M, Nozawa F, Okabe A. Determination of serum levels of circulating soluble E-selectin in patients after major surgery and in those with acute pancreatitis. *In*: Faist E, editor. 4th international congress on the immune consequences of trauma, shock and sepsis. Bologna, Monduzzi Editore, 431–434, 1997.

Hirota M, Nozawa F, Okabe A. Relationship between plasma cytokine concentration and organ dysfunction in patients with acute pancreatitis.

Pancreas 21 : 141–146, 2000.

Hoshino T, Wiltrott RH, Young HA. IL-18 is a potent inducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response.

J Immunol 162: 5070–5077, 1999.

Ikei S, Ogawa M, Yamaguchi Y. Blood concentrations of polymorphonuclear leucocyte elastase and interleukin-6 are indicators for the occurrence of multiple organ failures at the early stage of acute pancreatitis.

J Gastroenterol Hepatol 13 : 1274–1283, 1998.

Jendrasik L, Grof P. Verfahren zur photometrischen Bestimmung des Bilirubins im Harn. Biochem Ztschr 296: 71–79, 1937.

Jongeneel CV. Regulation of the TNF alpha gene. Prog Clin Biol Res 388: 367–381, 1994.

Kita Y, Sakon M, Yoshida T, Gotoh M, Monden M. Pringle maneuver during hepatic resection induces inflammatory cytokines. Dig Dis Sci 41: 2459–2460, 1996.

Kohno K, Kataoka J, Ohtsuki T, Suemoto Y, Okamoto I, Usui M, Ikeda M, Kurimoto M. IFN- γ inducing factor (IGIF) is a co stimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. J Immunol 158: 1541–1550, 1997.

Lauwerys BR, Garot N, Renauld JC, Houssiau FA. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. J Immunol 165: 1847–1853, 2000.

Ludwiczek O, Kaser A, Novick D, Dinarello CA, Rubinstein M, Vogel W, Tilg H. Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-18 binding protein are elevated in patients with chronic liver disease.

J Clin Immunol 22: 331-337, 2002.

Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN- γ production and type 1 cytokine responses.

Immunity 4: 471-481, 1996.

Matsumata T, Taketomi A, Kawahara H, Higashi K, Shirabe K, Takenaka T. Mortality and morbidity after hepatic resection in the modern era.

Hepatogastroenterology 42: 456-460, 1995.

Matsumoto S, Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Koide K, Takeuchi M, Ohta T, Kurimoto M. Interleukin-18 activates NF- κ B in murine T helper cells.

Biochem Biophys Res Commun 234: 454-457, 1997.

Members of American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine consensus conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.

Crit Care Med 20 : 864-874, 1992.

Michalief MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, Tanimoto T, Torigoe K, Fujii M, Ikeda M, Fukuda S, Kurimoto M. Interferon- γ -inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon- γ production.

Eur J Immunol 26: 1647-51, 1996.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. Ann Rev Immunol 19: 423-474, 2001.

National Institutes of Health, Public Health Service. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH publication No.86-23. Bethesda, MD : NIH, 1985.

Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature 364: 806-809, 1993.

Ogawa M, Ikei S, Sameshima H. Increased cytokine release in severe acute pancreatitis is closely related to the development of organ failure. In; Faist E, Baue AE, Schildberg FW, editors. The immune consequences of trauma, shock and sepsis. Vol. II. Bologna, Monduzzi Editore, 332-337, 1996.

Ogawa M. Mechanisms of the development of organ failure following surgical insult : the 'second attack' theory. Clin Intensive Care 7 : 34-38, 1996.

Ogawa M. Acute pancreatitis and cytokines: "second attack" by septic complication leads to organ failure. Pancreas 16 : 312-315, 1998a.

Ogawa M. Systemic inflammatory response syndrome—a concept of avoiding organ dysfunction induced by a “second attack” .

Surg Today 28 : 679–681, 1998b.

Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells.

Nature 378: 88–91, 1995a.

Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the liver of mice causes endotoxin shock.

Infect Immun 63: 3966–3972, 1995b.

Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MSS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14+ human blood mononuclear cells.

J Clin Invest 101: 711–721, 1998.

Sameshima H, Ikei S, Mori K, Yamaguchi Y, Egami H, Misumi M, Moriyasu M, Ogawa M. The role of tumor necrosis factor- α in the aggravation of cerulein-induced pancreatitis in rats.

Int J Pancreatol 14: 107–115, 1993.

Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA. Interaction of NF- κ B and NFAT with the interferon- γ promoter.
J Biol Chem 272: 30412-30420, 1997.

Stockert RJ, Morell AG. Endocytosis of glycoproteins. *In*: Arias IM, Popper H, Schachter D, editors. The liver: biology and pathobiology. New York: Raven Press, 205-217, 1982.

Tanaka Y, Takahashi A, Watanabe K, Takayama K, Yahata T, Habu S, Nishimura T. A pivotal role IL-12 in Th-1 dependent mouse liver injury.
Int Immunol 8: 569-574, 1996.

Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikate T, Murakami T, Sanou O, Kojima H, Fujii M, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor.
J Biol Chem 272: 25737-25742, 1997.

Toyonaga T, Hino O. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon- γ in the liver.
Proc Natl Acad Sci USA 91: 614-618, 1994.

Tsutsui H, Matui K. IL-18 accounts for both TNF- α and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice.
J Immunol 159: 3961-7, 1995.

Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, Matsui K, Kashiwamura SI, Hada T, Akira S, Yagita H, Okamura H, Nakanishi K. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice.

Immunity 11: 359-367, 1999.

Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M. Cloning of the cDNA for human IFN- γ inducing factor, expression in *Escheichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein.

J Immunol 156: 4274-4279, 1996.

Wroblewski F, La Due JS. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity as an index of liver cell injury.

Ann Intern Med 43: 245-247, 1955.

Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa Y, Iwakura Y, Nakanishi K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- γ production from activated B cells.

Proc Natl Acad Sci USA 94: 3948-3953, 1997.

Zhang T, Kawakami K, Qureshi MH, Okamura H, Kurimoto M, Saito A. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudates cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells.

Infect Immun 65: 3594-3599, 1997.

小川道雄. サイトカインによる好中球の活性化と臓器障害.
医学のあゆみ 169 : 845-849, 1994.

小川道雄、広田昌彦. 急性膵炎における SIRS 発症についての調査.

厚生省特定疾患消化器系疾患調査研究班難治性膵疾患分科会平成
8年度研究報告書. 10-12, 1997.

小川道雄, 広田昌彦, 早川哲夫, 松野正紀, 渡辺伸一郎, 跡見 裕,
加嶋 敬, 山本正博. 重症急性膵炎全国調査.

厚生省特定疾患消化器系疾患調査研究班難治性膵疾患分科会平成
9年度研究報告書. 9-23, 1998.

小川道雄. 新・侵襲とサイトカイン-生体防御と生体破壊という諸
刃の剣-.

東京, メジカルセンス. 1-153, 1999.

玉腰暁子, 林 櫻松, 大野良之, 川村 孝, 小川道雄, 広田昌彦.
急性膵炎の全国疫学調査成績.

厚生省特定疾患対策研究事業難治性膵疾患に関する調査研究班平
成 11 年度研究報告書. 36-41, 2000.

野澤文昭、広田昌彦、島田信也、大原千年、小川道雄. 術後サイ
トカイン反応の面からみた残肝血行非遮断肝切除術の意義.

Biotherapy 12: 611-613, 1998.

広田昌彦, 杉田裕樹, 野澤文昭, 岡部明宏, 柴田宗征, 小川道雄.
急性膵炎の重症度評価.
救急医学 22 : 1858-1863, 1998.

広田昌彦, 別府 透, 小川道雄. 重症急性膵炎に対するトリプル
ケア.
胆と膵 21 : 37-42, 2000.

山本正博, 斉藤洋一. 全国集計の面よりみた重症急性膵炎.
胆と膵 9 : 1669-1683, 1988.