

主論文の要旨

**Inhibition of Toll-like receptor 4 suppresses liver injury
induced by biliary obstruction and subsequent
intraportal lipopolysaccharide injection**

〔 Toll-like receptor 4を阻害することは胆管閉塞および
それに続く経門脈的lipopolysaccharide投与による肝障害を抑制する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：榑野 正人 教授)

雄谷 慎吾

【諸言】

肝門部胆管癌の手術では、胆管が閉塞した状態での大量肝切除が必要な場合がある。また、大量肝切除術の侵襲に伴い bacterial translocation (BT) や菌血症が高率に発生することがわかっている。胆管閉塞状態に second hit として菌血症が加わると重篤な肝障害が生じることは以前の研究で知られているが、その詳細なメカニズムについてはいまだ十分にわかっていない。本研究では、胆管閉塞状態のラットに経門脈的 LPS 投与を行うモデルを用いて、閉塞性黄疸に BT が加わることにより誘発される肝障害の詳細なメカニズムを肝内の Toll-like receptor 4 (TLR4) 発現を中心に解明するとともに、新たな治療法の開発を行うことを目的とする。

【方法】

雄の Wister ラット (250-300g) を用い、開腹手術のみを行う Sham 群と胆管結紮 (bile duct ligation: BDL) を行う BDL 群に割り付けた。さらに、胆管結紮術後 7 日目にシリコンのカテーテルを用いて総胆管から十二指腸にドレナージ術 (内瘻化) を施行した Drainage 群も設けた。なお Drainage 群のドレナージ期間は 24 時間とした。遺伝子レベル、蛋白質レベルでの肝内 TLR4 発現をリアルタイム PCR、Western blot を用いて調べた。また、免疫染色により肝組織での TLR4 発現を調べた。さらにラットに latex beads を投与し、それを貪食するクッパー細胞数を生体顕微鏡を用いてカウントした。ホルマリン固定した肝組織を用いて、抗 TLR4 抗体と抗 ED-1 抗体 (クッパー細胞を染色する) を用いて蛍光 2 重免疫染色を施行した。次に、手術後 7 日目 (Drainage 群はドレナージ 24 時間後) にごく少量の lipopolysaccharide (LPS) (0.5 μ g) を回結腸静脈より投与して BT と同様の状態を模擬した。また、前治療として TLR4 シグナル阻害薬である TAK-242 を LPS 投与 1 時間前に 1 mg/kg 投与する TAK 群とクッパー細胞の不活性化剤であるガドリニウムクロライド ($GdCl_3$) を LPS 投与 24 時間前に 1 mg/kg 投与する $GdCl_3$ 群をそれぞれ作成した (Fig.1)。すべての群において血液および肝組織を LPS 投与後 4 時間後に採取した。

【結果】

LPS 投与前において、BDL 群では、肝内 TLR4 発現が遺伝子および蛋白質レベルで Sham 群に比べ有意に増加していた。これらの変化は Drainage 群では抑制され Sham 群と同等であった (Fig.2a, b, c)。LPS 投与前における肝組織の免疫染色では類洞に沿って TLR4 の発現を認め、BDL 群の発現は Sham 群に比べて増加しており、Drainage 群では増加が抑制されていた (Fig.2d)。生体顕微鏡で観察したところ、latex beads を貪食したクッパー細胞数は BDL 群で Sham 群に比べ有意に多く、Drainage 群では Sham 群と同等であった (Fig.3)。さらに蛍光 2 重免疫染色では、TLR4 が主にクッパー細胞上に発現していることが確認された (Fig.4)。LPS 投与後 4 時間までの血液、尿、肝臓、肺での LPS 濃度を調べると、尿と肺ではほとんど検出されないのに対し、血液と肝臓で高濃度に検出された (Fig.5)。肝組織で検出された LPS 濃度の

経時的变化は血液での変化と同様に漸減していた。したがって、経門脈的に投与した LPS の多くは肝臓で捉えられると考えられた。LPS 投与後の肝組織病理像では壊死巣が BDL 群と Drainage 群で数多く観察されたのに対し Sham 群では全く観察されなかった。BDL 群では経門脈的 LPS 投与後の血中肝逸脱酵素と炎症性サイトカイン濃度は Sham 群に比べ BDL 群で有意に高かった。しかし、TAK-242 や GdCl₃ による前治療を行うと、ドレナージ処置と同程度に肝障害が強く制御された (Fig.7)。LPS 投与後 24 時間の生存率は、BDL 群が 50% であるのに対し、Drainage 群、TAK 群、GdCl₃ 群ではそれぞれ、92%、100%、83% であった。

【考察】

胆管閉塞の患者に術前ドレナージが必要かどうかに関しては現在まで臨床試験やメタ分析が行われ議論されてきた。ドレナージ行為そのものの合併症のためドレナージ術は利益より不利益の方が上回るとの意見もある。しかし、われわれが以前報告したように、手術侵襲そのものが BT を誘引する可能性がある。今回の結果から胆管閉塞の状態では BT が加わると深刻な肝障害を引き起こすため、胆管閉塞の状態での手術は推奨されず、術前には可能な限り胆道ドレナージ術を行うことが望ましい。ドレナージ術がどうしてもできない場合には、術前に TAK-242 を投与することで BT に伴う肝障害を予防できるかもしれない。

【結論】

胆管閉塞後に経門脈的 LPS を投与したラットにおいて、TLR4 のシグナル伝達を遮断することは、減黄処置と同程度の肝障害制御効果を認めた。TAK-242 による治療は菌血症による肝障害に陥りやすい胆管閉塞状態の患者に有益である可能性が示唆された。