

主論文の要旨

Anti-C5a complementary peptide mitigates zymosan-induced severe peritonitis with fibrotic encapsulation in rats pretreated with methylglyoxal

C5a 阻害ペプチドはメチルグリオキサル前処置後の
ザイモザン刺激により惹起された線維性被嚢化を伴う
ラット重症腹膜炎を軽減する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

井口 大旗

【緒言】

腹膜透析（PD）は血液透析と比べ循環動態への影響や時間的制約が少なく、在宅で治療可能な優れた腎代替療法である。腹膜炎は PD の継続を妨げる代表的な要因であり、中でも真菌性腹膜炎は難治性で死亡率が高く、予後不良である。また PD の致命的な合併症である被嚢性腹膜硬化症（EPS）との関連が示唆されている。これまで我々はラットの壁側腹膜を擦過した後、真菌の細胞壁由来成分ザイモザン（Zy）を投与する Zy/擦過モデルにおいて、補体活性化を伴う著明な腹膜傷害が生じることを示した。また同モデルにおいて、膜補体制御因子（Creg）の機能を抑制することで、傷害が増強し、EPS の初期反応の一部とも考えられる腹膜表面へのフィブリン析出を確認した。これらの検討により、真菌性腹膜炎において、補体の活性化が腹膜傷害に関与し、更に EPS 発症の誘引となる可能性が示された。しかしながら、傷害が壁側腹膜に限局したモデルであったため、本研究では、臓側腹膜に真菌性腹膜炎を惹起させる新しい動物モデルの作成を試み、臓側腹膜を含めた腹膜傷害と EPS 様変化の有無、補体の関与を検証した。また同モデルにおける C5a 阻害ペプチド（AcPepA）の有効性を検討した。

【対象及び方法】

Sprague Dawley ラット（雄、～250g）を用いた。Zy の前処置として、メチルグリオキサール（MGO）の腹腔内投与を選択した。MGO の至適濃度を検討するため、予備実験として、ラットの腹腔内に MGO10、15、20mmol/L 含有腹膜透析液を投与し、その 24 時間後の壁側・臓側腹膜の変化を観察した。20mmol/L の MGO 群で部分的な中皮細胞の脱落、CD68 陽性細胞の浸潤と補体 C3 の沈着を認めた。15mmol/L 群では僅かな変化にとどまり、10mmol/L 群では明らかな変化を認めなかった。続いて、MGO10、15、20、40、80mmol/L の腹腔内投与を行い、その 24 時間後より Zy を 5 日間連続投与し、day5 で腹膜傷害を比較した。20、40、80mmol/L 群において、腸管などの腹腔内臓器の癒着を認め、組織では炎症細胞浸潤を伴う著明な腹膜傷害を確認した。一方 10、15mmol/L の MGO 投与群では、癒着、腹膜傷害は軽微であった。これらの結果を踏まえて、Zy の前処置としての MGO 濃度を 20mmol/L に決定した。

1) 20mmol/L の MGO 含有腹膜透析液をラットの腹腔内に投与し、その 24 時間後より Zy を 5 日間連続腹腔内投与した Zy/MGO 群 (*group 1*) と Zy 非投与の vehicle/MGO 群 (*group 2*) において、壁側・臓側腹膜の変化を肉眼的、組織的（腹膜肥厚、フィブリン析出、線維化、炎症細胞浸潤、補体沈着）に day1、3、5、14 で比較検討を行った。

2) Zy/MGO 腹膜炎での C5a の関与を検討するため、AcPepA を Zy と同時に投与開始し、その後 12 時間毎に 5 日間連続で投与した AcPepA 群 (*group 4*) と vehicle 群 (*group 3*) において、day5、14 でその腹膜所見を比較した。

3) AcPepA の治療効果を検討するため、AcPepA を Zy 初回投与から 0、1、3 時間後

にそれぞれ投与開始した群 (*group 6, 7, 8*) と *vehicle* 群 (*group 5*) において、*day5* で腹膜組織を評価した。更に *Zy* による腹膜炎惹起 12、24 時間後に *AcPepA* 投与を開始した群 (*group 10, 11*) と *vehicle* 群 (*group 9*) でも同様に比較検討を行った (Table 1)。

【結果】

1) 肉眼的所見にて、*vehicle/MGO* 群では明らかな変化を認めなかったのに対し、*Zy/MGO* 群では *day3* より腸管癒着を認め、癒着は経時的に強まり、*day14* ではヒト EPS で観察される繭状の被嚢様変化を呈した (Figure 1)。組織学的所見では *Zy/MGO* 群において、壁側・臓側腹膜共に、*day5* で腹膜肥厚 (Figure 2)、フィブリン析出 (Figure 3)、炎症細胞浸潤、補体 (C3b、C5b-9) 沈着を有意に認めた。*day14* の観察ではフィブリンが消退し、著明な線維化を認めた (Figure 3)。また同群では、腹膜中皮細胞の脱落が持続し、*Creg* の発現がより低下していた。

2) *day5* の観察において、*AcPepA* 群では癒着が軽減され、腹膜肥厚や好中球・CD68 陽性マクロファージの浸潤、フィブリン析出、補体沈着が壁側・臓側腹膜ともに有意に抑制された (Figure 4)。更に *day14* では、*AcPepA* 投与により EPS 様被嚢性変化が抑制され、臓側腹膜の炎症細胞浸潤や線維化に有意な軽減効果を認めた (Figure 5)。

3) *Zy/MGO* モデルにおいて、*Zy* による炎症惹起から 1、3 時間後に *AcPepA* を開始した群 (*group 7, 8*) で有意な腹膜傷害軽減効果を認めた。また *AcPepA* の治療効果は腹膜炎惹起から 12 時間後、24 時間後に *AcPepA* を投与した群 (*group 10, 11*) においても一部有意に認められた (Figure 6)。

【考察】

EPS の発症機序として、*two hit theory* が提唱されている。*first hit* として長期間の腹膜透析液暴露やカテーテル刺激による腹膜の劣化が生じ、そこに腹膜炎などによる *second hit* が加わることで EPS を発症するというものである。我々の報告した *Zy/擦過* モデルはカテーテルによる物理的刺激を腹膜擦過に置き換え、その後に *Zy* による真菌性腹膜炎を誘導するもので、EPS の初期病理像に類似した変化を実証したが、擦過困難な臓側腹膜の評価には適していなかった。また、これまで報告されてきた動物 EPS モデルは、クロルヘキシジンやホルムアルデヒド、ブリーチなどを連日暴露させる非臨床的な機序によるモデルが多く、加えて、そのほとんどで評価は壁側腹膜に限定されていた。本研究では腹膜透析液に含有され、中皮細胞毒性を有する MGO を *first hit* として用い、続いて *Zy* による *second hit* を生じさせることで、高度な腹膜傷害を臨床重要臓側腹膜にも惹起させ、更には EPS 様の被嚢性変化を引き起こすことに成功した。腹膜炎は EPS の重要なリスクファクターであり、中でも真菌性腹膜炎との関連が強いとする報告があるが、本研究もそれを支持する結果であり、*Zy/MGO* モデルは真菌性腹膜炎による EPS 発症機序の解明に有用な動物モデルである。

Zy/MGO モデルでは中皮細胞の脱落、Creg の減少を認め、著明な補体沈着を伴っていた。C5a 阻害薬の投与で腹膜傷害が軽減され、加えて day14 においては腸管癒着、線維化の軽減を示したことから、補体活性化、特に C5a が腹膜傷害の進展及び、被嚢性腸管癒着に関与している可能性が示された。更に、Zy による腹膜炎誘導後に C5a 阻害薬を投与した場合でも、傷害軽減効果を認めたことから、C5a 阻害を含む抗補体療法が真菌性腹膜炎や EPS への進展に有効な可能性があると考えられた。

【結論】

真菌性腹膜炎とそれに伴う補体の活性化が EPS 発症に関与する可能性、真菌性腹膜炎による腹膜傷害や EPS への進展に抗補体療法が有効な可能性がある。