日消外会誌　25（9）：2301～2307，1992年

エンドトキシン肝障害におけるKupffer細胞の関与の検討

福島県立医科大学第2外科
井上　典夫　　遠藤　清次　　阿部　力哉

エンドトキシン肝障害においてKupffer細胞の関与の有無を，ラットの初代培養系を用いて検討した．肝細胞をLPS（lipopolysaccharide）濃度0，25，50，100μg/mlで24時間培養してもviabilityに有意差はなく，LPSの直接障害性は認めなかった．Kupffer細胞をLPS濃度0，25，50，100μg/mlで24時間培養した培養上澄みで，別に分離した肝細胞を24時間培養してviabilityを測定すると25μg/ml以上で有意に障害性を認めた．また，LPSをラットの尾静脈より投与しエンドトキシン血症を作成し，24時間後に分離したKupffer細胞を用いて同様の検討をすると25μg/ml以上でさらに強い障害性が認められた．これをLPSの静脈投与しない場合と比較すると有意に強い肝細胞障害性を示した．in vitroではエンドトキシンに直接的な肝細胞障害作用はなくKupffer細胞を介して肝細胞障害性を示した．さらにエンドトキシン血症の病態ではKupffer細胞はより活性化されていることが示された．

Key words: Kupffer cell mediated hepatotoxicity, endotoxin induced hepatotoxicity, Kupffer cell, primarily cultured rat hepatocyte, MTT assay

はじめに

Multiple organ failure（MOF）はEiseman[1]が記載してから重症感染症の終末像としてとらえられるようになった．また，エンドトキシンの測定法が可能になってから術後の縫合不全など重症腹腔内感染においてエンドトキシン血症が証明されるようになり，さらにエンドトキシン血症時の肝障害も広く認識されるようになった．その病態の一部として，直接的な細菌進入のない肝障害では肝内胆汁うっ滞で，エンドトキシンによる胆汁排出路の障害が示唆されている[2)3)]．しかしながらエンドトキシン血症が肝障害を引き起こすのか，肝障害の結果エンドトキシン血症となるのか発症のメカニズムは複雑であり，いまだ十分に解明されていない．生体では複数の因子が複雑に関連して肝障害が起こるものと思われる．

最近，エンドトキシン血症時の肝障害に肝臓のresident macrophageであるKupffer細胞の関与が示唆されている．肝障害の複雑な発症のメカニズムを解明するためにはより単純な実験系を用いて検討することが有用であり，われわれはラットの肝細胞およびKupffer細胞の初代培養系を用い，より迅速簡便な細胞障害判定法と考えるMTT（3-〔4,5-dimethylthiazol-2-yl〕-2,5-diphenyltetrazolium bromide）を用いたMTT assayによりin vitroでのエンドトキシン肝障害におけるKupffer細胞の関与の有無を検討した．

＜1992年5月13日受理＞別刷請求先：井上　典夫
〒960-12　福島市光が丘1番地　福島県立医科大学第2外科

対象および方法

1．実験動物

Wistar系雄性ラット200～250gを用いた．

2．Kupffer細胞の分離・培養

肝細胞の分離は，pentbarbital腹腔内麻酔下に開腹し，門脈にカニューレを挿入し5mM EGTA $Ca^{2+}Mg^{2+}$ free（CMF）Hanks液で前灌流した後，0.05%collagenase Hanks液で灌流し，肝臓を摘出し細胞を分散後，0.2%pronase E RPMI1640培地で60分incubateしメッシュろ過し比重遠心法で非実質細胞（NPC）を分離した[4)]．これをプラスティクディッシュに播種し，ディッシュに付着した細胞をKupffer細胞とした．これはNPCの約40%であった．実験には分離後10% FBS（fetal bovin serum）RPMI1640培地で24時間培養したKupffer細胞を用いた（**Fig. 1A**）．分離したKupffer細胞に直径約4μmのヒツジ赤血球を投与すると，1時間後にはKupffer細胞によるphagocytosisが確認された（**Fig. 1B**）．

3．肝細胞の分離・培養およびMTT assay

肝細胞分離と同様にcollagenase灌流法で灌流し，細胞を分散後，50g 1分の低速遠心で沈殿した肝細胞

Fig. 1 Primarily cultured rat Kupffer cells (A). Phagocytosis after 60-minute incubation with sheep erythrocytes (B).

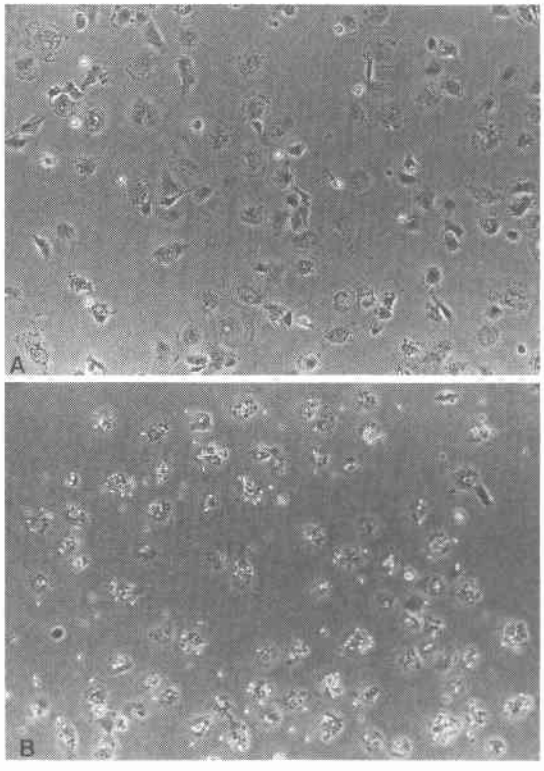
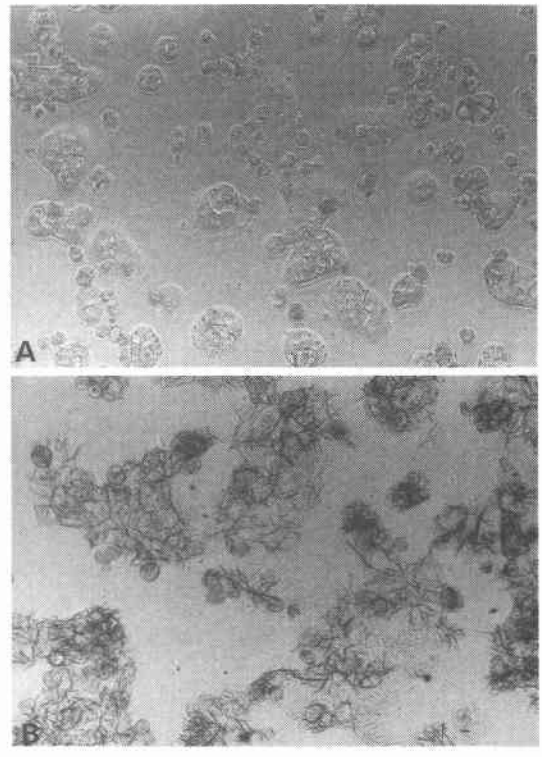


Fig. 2 Primarily cultured rat hepatocytes (A). MTT formazan after 4-hour incubation with MTT (B).



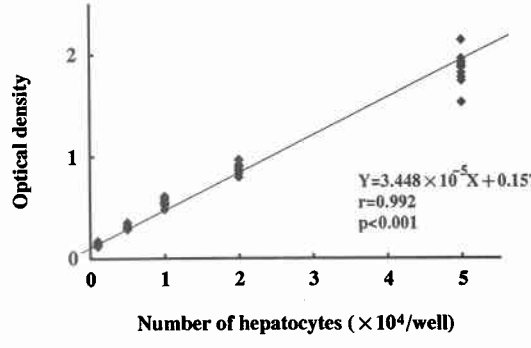
を96well microplate に5×10^4cells/well で播種し24時間培養した（**Fig. 2A**）.

培養肝細胞に MTT（フナコシ）を200μg/ml の濃度で含む FBS（−）WE 培地に交換して 4 時間培養後培地を除去し，生成した紫色の針状の MTT formazan を DMSO で溶解し，その吸光度を ELISA reader で測定した．Tetrazorium 塩である MTT は，肝細胞のミトコンドリア内膜の脱水素酵素などにより針状の formazan を形成し（**Fig. 2B**），紫色に発色する．生肝細胞数と MTT の吸光度とは相関係数0.992と良好な正の相関を示す直線関係が得られ，MTT assay により肝細胞の viability の評価が可能であった（**Fig. 3**）.

(1) LPS の肝細胞に対する直接作用

LPS の直接作用を検討する目的で，分離24時間後の培養肝細胞を LPS（E. coil 026：B6；Difco）の濃度 0，25，50，100μg/ml とした FBS（−）WE 培地で24時間培養して MTT assay で肝細胞の viability を測定した（**Fig. 4**）.

Fig. 3 Optical density of MTT and varying number of alive hepatocytes after 4-hour incubation in the medium containing 200μg/ml MTT. (n=12)



(2) LPS 肝障害に対する Kupffer 細胞の関与

分離後24時間の Kupffer 細胞を LPS の濃度0，25，50，100μg/ml とした FBS（−）RPMI1640培地で24時間培養した．分離後24時間の肝細胞をこの Kupffer 細

Fig. 4 Experimental design of LPS direct effect on hepatocytes.

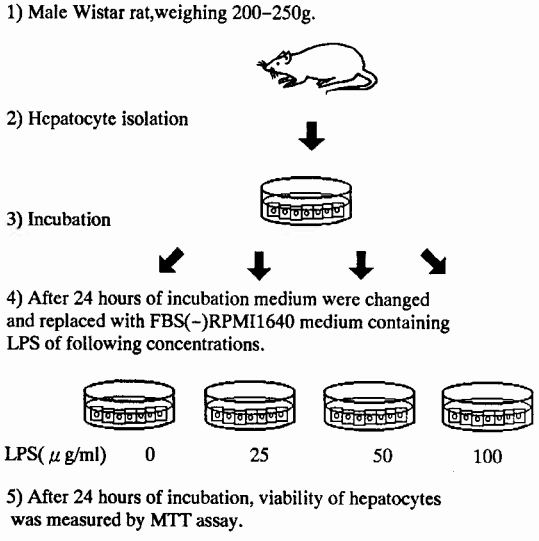
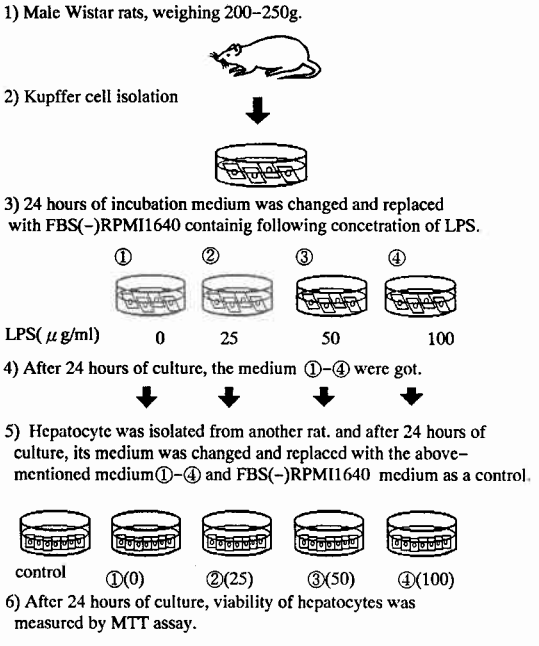


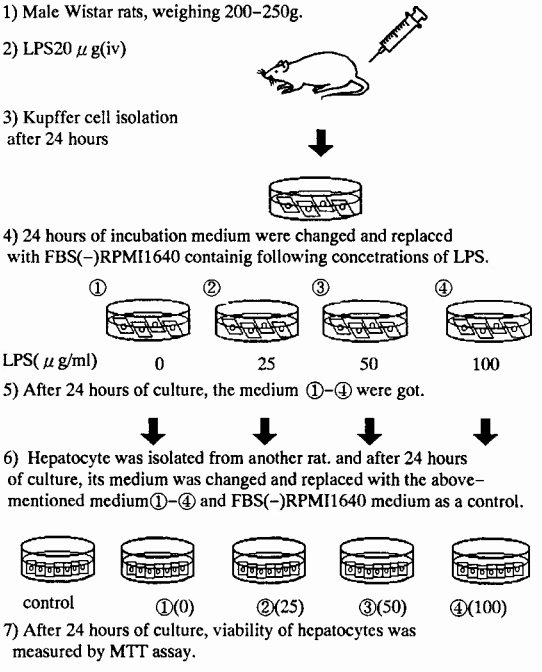
Fig. 5 Experimental design of Kupffer cell mediated LPS hepatotoxicity.



胞培養上澄みおよびcontrolとしてFBS（−）RPMI1640培地でそれぞれ24時間培養し，MTT assayにより肝細胞のviabilityを測定しcontrolに対する割合を求めた（**Fig. 5**）.

（3）Kupffer細胞数と障害性

Fig. 6 Experimental design of Kupffer cell mediated LPS hepatotoxicity.



分離後24時間のKupffer細胞を0.5, 1.0, 1.5, 2.0×10^6cells/mlに調整してLPS 50μg/mlを含むFBS（−）RPMI1640培地で24時間培養した．それぞれの培養上澄みを用いて肝細胞を24時間培養し肝細胞のviabilityを測定した．測定値は(2)と同様にcontrolに対する割合で計算した．

（4）エンドトキシン血症ラットKupffer細胞の肝障害への関与

LPS 20μg尾静脈投与24時間後のラットからKupffer細胞を分離し，(2)同様にLPS存在下で24時間培養した培養上澄みで肝細胞を24時間培養しviabilityを測定した（**Fig. 6**）.

有意差の検定はStudentのT検定で行った．

結　果

肝細胞をLPS濃度25, 50, 100μg/mlのFBS（−）WE培地で24時間培養した肝細胞のviabilityはLPSを含まない場合（100.7±15.7%）に対して，それぞれ91.7±16.0, 105.5±15.0, 108.5±16.0%であり（**Fig. 7**），LPS各濃度間に有意差は認めなかった．

LPS肝障害に対するKupffer細胞の関与について，Kupffer細胞をLPS存在下に培養した培養上澄みで肝細胞を24時間培養することにより肝細胞の生存率を

Fig. 7 Direct effect of LPS on hepatocytes. (mean±SD, n=12, NS : not significant)

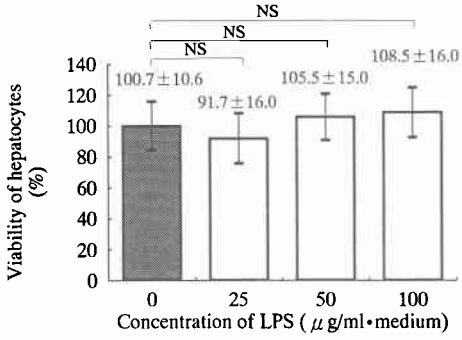
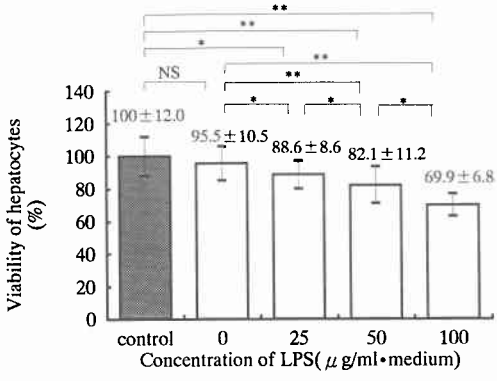


Fig. 8 The role of Kupffer cells in hepatotoxicity of LPS. (mean±SD, n=12, NS : not significant, * p<0.05, **p<0.01)



測定した．肝細胞生存率は LPS 濃度0, 25, 50, 100μg/ml でそれぞれ90.5±10.5, 88.6±8.6, 82.1±11.2, 69.9±6.8%（**Fig. 8**）であった．LPS を含む培地で培養した Kupffer 細胞の培養上澄みで培養した肝細胞の viability は LPS 濃度依存性に有意に低下した．

LPS 濃度を50μg/ml とし Kupffer 細胞数を変えて培養した場合の肝細胞障害性を検討した結果，Kupffer 細胞数0.5, 1.0, 1.5, 2.0×10⁶cells/ml のときの肝細胞の viability は88.6±24.9, 84.8±10.6, 80.5±8.7, 78.4±12.0%（**Fig. 9**）であった．いずれも control に対して有意差が認められた．Kupffer 細胞数が増加するにしたがい障害性は増す傾向にあるがそれぞれの間には有意差はなかった．

LPS 20μg 尾静脈投与しエンドトキシン血症ラットから分離した Kupffer 細胞をさらに LPS 存在下で培養した培養上澄みで肝細胞を24時間培養すると，生存率は LPS 濃度0, 25, 50, 100μg/ml でそれぞれ92.3±

Fig. 9 Hepatotoxicity of the medium of LPS stimulated Kupffer cells: Effect of varying Kupffer cell number. (mean±SD, n=12, NS : not significant, *p<0.05, **p<0.01)

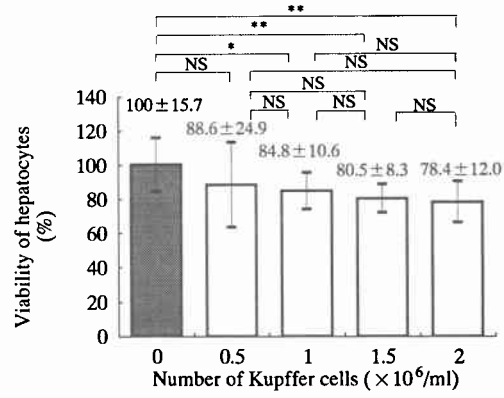


Fig. 10 Hepatotoxicity of the medium of LPS-stimulated Kupffer cells from rat in endotoxinemia. (mean±SD, n=12, NS : not significant, * p<0.05, **p<0.01)

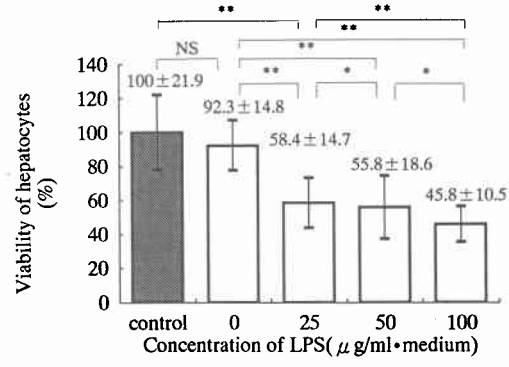
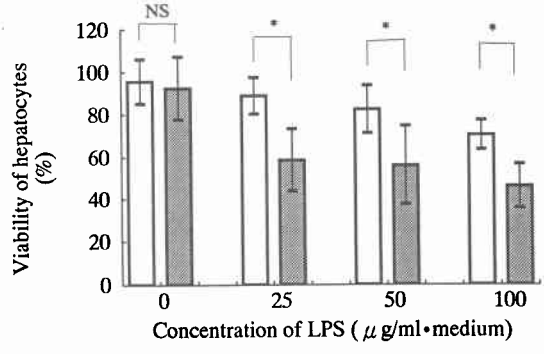


Fig. 11 Comparison between hepatotoxicities of the medium of the Kupffer cells from normal rat □, and from preinjected rat ■. (NS: not significant, *p<0.01)



14.8, 58.4±14.7, 55.8±18.6, 45.8±10.5%であった(**Fig. 10**). 生体でLPSを投与し, Kupffer細胞にLPSを含まない群では肝細胞の生存率の低下は得られなかった. これに対して, LPSを含む培地で培養したKupffer細胞の上澄みの場合には, (2)同様にLPS濃度依存性に有意に生存率が低下した. Kupffer細胞分離前のLPS尾静脈投与をした場合の(4)と投与しなかった場合の(2)の実験結果を比較すると, それぞれの濃度でいずれも有意に強い肝細胞障害性を示した(**Fig. 11**).

考　察

In vivoでエンドトキシン肝障害における中心的な生物学的活性はShwartzman反応であり, 本質的にはエンドトキシンによる局所の血液凝固亢進反応によってもたらされる局所[5]および全身諸臓器[6]の出血性壊死である. Tumor necrotizing facter (TNF) に弱いShwartzman活性を認めるが, Shwartzman反応におけるmediatorについては不明である[7].

このようなエンドトキシンによるin vivoの肝障害を解明するために, 実験的な動物モデルや培養細胞を用いたin vitroでも検討されるようになった. 肝細胞の障害度の判定にはGOT, GPT, LDHなどの酵素活性測定法, 蛋白合成能などの機能判定法などが用いられている. MTT assayは生細胞のミトコンドリアのエネルギーレベルを反映する測定法で, DNAの合成能に比例するとされ[8], より迅速かつ的確な肝細胞のviabilityの評価法である[9].

エンドトキシンの肝細胞に対する障害作用については, ウイルス肝炎や劇症肝炎のモデルとして広く用いられているD-ガラクトサミン(GalN)を用いた実験的肝障害で検討されているものが多い. Resenackら[10]は分離肝をGalNで前灌流しLPSを灌流液に加えても肝障害は増強されないと報告しており, 同様にエンドトキシンに直接的肝障害作用がないとする報告が多い[11][12]. 一方, Paganiら[13]はラットの分離肝細胞の培養液に^{14}C-LPSを加え, LPSが肝細胞膜に結合することを明らかにし, 中村ら[14]はラットの初代培養肝細胞に無血清下でGalNの前処置後にLPSを添加してGOT, LDHの酵素測定法で検討し, 機序は不明ながらエンドトキシンの直接作用による肝細胞の障害作用が認められ, LPSは肝細胞に直接作用がないとするものは培養液中のFCSやアルブミンなどにより, LPSが蛋白やリポ蛋白と結合し肝細胞に対する作用がブロックされたり不活化されたのではないかと推測している.

われわれの実験は肝細胞, Kupffer細胞ともに分離から実験に使用するまでの24時間はFBSを用い, その後は洗浄し無血清下に培養した. LPSの濃度をかえて肝細胞を培養してもviabilityに有意差は生ぜず, エンドトキシンには肝細胞に対して直接的障害性はないとの結論を得た.

マクロファージなどの単球系貪食細胞は種々の生理活性物質を放出することが明らかにされ[15], エンドトキシンはマクロファージを活性化しエンドトキシンの致死作用に関与することも明らかにされた[16].

肝臓においてもresident macrophageであるKupffer細胞がサイトカインなどの活性物質を放出することが報告され[17], 肝細胞に対してKupffer細胞を介する作用も報告されている. Kellerら[18]はKupffer細胞と肝細胞のco-cultureにLPSを加え, ^{3}H-leucineを指標とした肝細胞の蛋白合成能が抑制されることを報告している.

われわれの実験では, Kupffer細胞を介した肝細胞障害性をMTT assayにより確認することができた. Kupffer細胞をLPSを含んだ培地で培養した上澄みは肝細胞に対し明らかに障害性を示した. これはLPSを含んだ培地中で活性化されたKupffer細胞が培養液中に障害性物質を産生し, この上澄みで培養した肝細胞のviabilityが低下すると考えられる. LPSを含まないで培養したKupffer細胞の培養上澄みには肝細胞障害性に有意差はないものの多少の変動があり, 障害性の存在があることが示唆される. ラットによる個体差はないが分離培養操作によるKupffer細胞自体の活性の変化や24時間Kupffer細胞を培養したことによる培養液の性状の変化に起因するものと推測している. 培地中のLPS濃度を50μg/mlと一定にして, 培養Kupffer細胞数を変えた場合の肝細胞障害性は, 細胞数1.0～2.0×10^{6}/mlの範囲で障害性を示した.

この範囲内で, 細胞数が増加するにつれ障害性も強くなる傾向にはあるが細胞数の違いに有意差は認めなかった. Kupffer細胞数が0.5×10^{6}cells/ml以下になるとplateに付着する細胞がまばらであり, 測定値にもばらつきが生じた. また, 2.0×10^{6}以上になると培養plate上の細胞は飽和状態となりそれ以上の検討はできなかった. なお, (2)(4)のKupffer細胞を介した障害実験ではKupffer細胞数を1.5～2.0×10^{6}で行っており, (2)のLPSを含まない場合に有意の障害性を示さなかった. したがって培養液中にLPSを含まない場

合ではKupffer細胞数の違いによる有意差はないといえる.

活性化されたKupffer細胞から放出される障害物質に関しては不明であるが種々のchemical mediatorなどが複雑にnetworkを形成して起こるものと推測される. in vivoでは特に, 既存のサイトカインnetworkにしても作用するルートが複数存在し, 複雑で巧妙であるがゆえに解明するための困難さが有り, 方法や実験モデルの単純化が必要であり, 今後の課題であると考えている.

In vivoで観察されるShwartzman[5]反応はエンドトキシンが2回注入されて起こる現象であり何らかの段階的活性化が推測される[7]. 血液凝固系を介さない培養系を用いた本実験でもKupffer細胞が分離前にエンドトキシンにさらされた状態ではさらに強い障害性が起こると予測し, LPSの経静脈投与後24時間のラットから分離したKupffer細胞について検討した. 正常ラットから分離したKupffer細胞と比較して有意に強い障害性が確認され, 血液凝固系を介さない肝障害も段階的活性化が有ることが示唆された. 溝口ら[19)~22)]は, ラットやマウスにP. acnes加熱死菌を投与した後7日目にエンドトキシンを静脈内投与すると広範な肝細胞壊死を生ずるという実験モデルで, 粘着性細胞(Kupffer細胞およびマクロファージ系細胞)が2段階に活性化され肝細胞障害因子を産生することを示し, さらにこの障害因子がTNFなど既存のmediatorでないと述べており興味深い.

以上, in vitroの検討では, 肝細胞に対してエンドトキシンが直接的に障害作用は示さず, Kupffer細胞が介在して肝の障害性の影響を与えることが実験的に確認された.

エンドトキシンによる肝障害の病態を解明するために, Kupffer細胞から放出される既存の, または今後発見されると予測される多くのmediatorについて複雑なnetworkを解明しなければならない.

本論文の要旨は第39回日本消化器外科学会総会(1992年2月神戸)にて発表した.

文　献

1) Eiseman B, Beart R, Norton L et al: Multiple organ failure. Surg Gynecol Obstet 144: 323—326, 1977
2) Dunn MA, Brewer TG: Non-viral liver infections. Edited by Arias IM, Frenkel M, Wilson JHP: The liver annual 1 1981. Ecerpta Medica, 1981, p183—197
3) Utili R, Abernathy CO, Zimmerman HJ: Studies on the effects of E. Coli endotoxin on canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver. J Lab Clin Med 89: 471—483, 1977
4) Munthe-Kaas AC, Berg T, Seglen PO et al: Mass isolation and culture of rat Kupffer cells. J Exp Med 141: 1—10, 1975
5) Shwartzman G: A new phenomenon of local skin reactivity to B. typhosus culture filtrate. Proc Soc Exp Biol Med 25: 560—569, 1928
6) Apitz K: A study of the generalized Schwartzman phenomenon. J Immunol 29: 255—266, 1935
7) 志賀淳治, 大野康治: エンドトキシンと肝障害. 肝・胆・膵 19: 201—205, 1989
8) Carmichael J, William GD, Adi FG et al: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of radiosensitivity. Cancer Res 47: 936—942, 1987
9) 遠藤清次, 井上典夫, 君島伊造ほか: ラット初代培養肝細胞を用いた胆汁酸の障害性に関する検討. Progress Med 11: 3158—3160, 1991
10) Rasenack J, Koch HK, Nowack J et al: Hepatotoxicity of D-galactosamine in the isoalted perfused rat liver. Exp Mol Pathol 32: 264—275, 1980
11) Tran-Thi TA, Phillips J, Falk H et al: Toxicity of D-galactosamine for rat hepatocytes in monolayer culture. Exp Mol Patol 42: 89—116, 1985
12) 岩城義博, 野口和典, 安倍弘彦ほか: D-ガラクトサミン肝障害の発生機序に関する研究. 肝臓 29: 1043—1050, 1988
13) Pagani R, Portoles MT, Municio AM: The binding of Eschericia coli Endotoxin to isolated rat hepatocytes. FEBS Lett 131: 103—107, 1981
14) 中村東樹, 林　克裕, 岩城義博ほか: 初代培養ラット肝細胞に対するエンドトキシンの直接作用. 谷川久一 編. 肝類洞壁細胞研究の進歩. 第2版. 国際医書出版, 東京, 1989, p248—252
15) Takemura R, Werb Z: Secretory products of macrophages and their physiological function and. Am J Physiol 246: c1—c9, 1984
16) Glode LM, Mergenhagen SE, Rosnstreich DL: Significant contribution of spleen cells in mediating the lethal effects of endotoxin in vivo. Infect Immunit 14: 626—630, 1976
17) Andus T, Bauer J, Gerok W: Effects of cytokines on the liver. Hepatology 13: 364—375, 1991

18) Keller GA, West MA, Cerra FB et al: Multiple systems organ failure; Modulation of hepatocyte protein synthesis by endotoxin activated Kupffer cells. Ann Surg 101: 87—95, 1985
19) 筒井ひろ子, 宮島慶治, 溝口靖紘ほか：実験的に誘導した急性肝不全マウスに認められる肝細胞障害因子の性状について. 日消病会誌 83: 1161—1167, 1986
20) 溝口靖紘, 久保井広志, 小林絢三ほか：実験的肝不全モデルの研究—Propionibacterium Acnesの臓器分布と単核細胞浸潤能. 日臨免疫会誌 12: 71—79, 1989
21) 溝口靖紘, 河田則文, 久保井広志ほか：免疫学的肝細胞障害（Propionibacterium acnesおよびLPSによるモデル系について). 肝・胆・膵 19: 259—268, 1989
22) 溝口靖紘, 阪上吉秀, 関 守一：実験的に誘導した急性肝不全マウスに認められる肝細胞障害因子の性状について. 織田敏次監修, エンドトキシン臨床研究の新しい展開. 羊土社, 東京, 1987, p211—220

Effect of Endotoxin on Primarily Cultured Rat Hepatocyte and Kupffer Cell Mediated Hepatotoxicity

Norio Inoue, Seiji Endo and Rikiya Abe
The Second Department of Surgery, Fukushima Medical School

We studied the role of Kupffer cells in the endotoxin-induced liver injury. Rat hepatocytes and Kupffer cells were primarily cultured, and viability of the hepatocytes were evaluated by MTT assay in vitro. Isolated hepatocytes were cultured in a medium containing different concentrations of lipopolysaccharide (LPS) (0, 25, 50, 100 μg/ml) for 24 hours. Viability of hepatocytes was not affected by LPS at any concentration. Isolated Kupffer cells were cultured for 24 hours in medium containing the same concentrations of LPS and no fetal bovine serum, and the medium was harvested. Isolated hepatocytes were added to these media replaced with these medium and cultured for 24 hours. Viability of the hepatocytes cultured in the medium in whick Kupffer cells had been cultured for 24 hours with LPS decreased significantly with increasing LPS concentration. We then performed the same experiment using Kupffer cells isolated from endotoxinemic rats which had been injected LPS (20 μg) 24 hours earlier. The same Kupffer cell-mediated hepatotoxicity was obtained and the toxicity was much stronger than in the case of Kupffer cells isolated from normal rats. Hepatotoxicity of endotoxin in not a direct effect of endotoxin on hepatocytes, but is a Kupffer cell-mediated effect. It is suggested that Kupffer cells might be activated in endotoxinemia.

Reprint requests: Norio Inoue The Second Department of Surgery, Fukushima Medical School
1 Hikarigaoka, Fukushima, 960-12 JAPAN