

# ラット敗血症DICモデルに対するプレドニゾロン,オールトランスレチイン酸および活性化ビタミンD3の効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9410">http://hdl.handle.net/2297/9410</a>

## ラット敗血症DICモデルに対するプレドニゾロン、 オールトランスレチノイン酸および活性化ビタミンD<sub>3</sub>の効果

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

青 島 敬 二

単球、マクロファージにより放出される炎症性サイトカインは敗血症における播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 発症の機序の一つと考えられており、ステロイドは抗炎症作用を有することより、敗血症におけるサイトカインを抑制する可能性がある。また、急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) の分化誘導療法に使用されるオールトランスレチノイン酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) は、血管内皮細胞におけるトロンボモジュリンの発現を高め、組織因子の発現を抑制し、APLに合併したDICを改善することが知られている。その機序としては、トロンボモジュリン遺伝子のレチノイン酸反応領域 (retinoic acid response element, RARE) にATRAが作用して、トロンボモジュリンの発現に影響を与えるためと考えられている。また、ビタミンD<sub>3</sub>受容体とレチノイン酸受容体は遺伝子構造が類似しており、ATRAと同様にトロンボモジュリンに影響を与える可能性があり、さらに、ビタミンD<sub>3</sub>は各種サイトカインを抑制するという報告もみられる。そこで、ラット敗血症DICモデルを用いて、プレドニゾロン、ATRAおよび活性化ビタミンD<sub>3</sub>の抗凝固作用について検討した。DICモデルは、リポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) をラット尾静脈より4時間かけて持続点滴して作成した。プレドニゾロンはLPS投与直前に皮下投与し、ATRAは1週間前から、ビタミンD<sub>3</sub>は3日前から経口投与した。プレドニゾロンは血中インターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1)  $\beta$ 、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)  $\alpha$  の増加を抑制するとともに、凝血学的マーカーおよび臓器障害の改善をもたらした。ATRAは凝血学的マーカーおよび臓器障害の改善とともに、腎糸球体におけるフィブリン血栓形成を抑制し、トロンボモジュリンの発現を亢進した。また、ビタミンD<sub>3</sub>は凝血学的マーカーおよび臓器障害の改善とともに、腎糸球体でのフィブリン血栓形成を抑制し、血中IL-1  $\beta$ 、TNF  $\alpha$  の増加を抑制した。一方、ヘパリン投与においては、凝血学的マーカー、臓器障害の改善およびフィブリン血栓形成の抑制効果はみられたが、トロンボモジュリンおよびサイトカインへの影響はみられなかった。以上より、敗血症DICにおいて、プレドニゾロン、ATRA、およびビタミンD<sub>3</sub>は、ヘパリンとは異なった機序で抗凝固作用を有しており、DIC治療に有用ではないかと考えられた。

**Key words** disseminated intravascular coagulation, all-trans retinoic acid, 1 $\alpha$  25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>, cytokine, thrombomodulin

播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) は、基礎疾患の存在下に、極端な凝固活性化状態となり、血管内に微小血栓が多発する重篤な病態である。進行した場合には、微小血栓の材料としての血小板や凝固因子が低下したり (消費性凝固障害)、凝固活性化に伴う線溶活性化が原因となって、出血症状がみられることがある。一方、微小血栓のために重要臓器における微小循環障害をきたすと臓器症状がみられることがあり、複数の臓器に及べば多臓器不全の状態となる。DICの基礎疾患としては、急性白血病などの造血器悪性腫瘍、固形癌、敗血症、外傷、産婦人科疾患 (常位胎盤早期剥離など)、膠原病に伴う血管炎など多くのものが知られており<sup>1)</sup>、DICの発症には、組織因子や各種サイトカインが関与すると考えられているが、その関与の仕方は各疾患において

種々である<sup>2)</sup>。

DICは、極めて予後不良であることが、全国規模の疫学調査からも明らかであり<sup>3)</sup>、早急な診断と治療が必要である。DICの治療は基礎疾患の治療が最も重要であるが、このほかにヘパリンなどの抗凝固療法が行われており、必要に応じて、濃厚血小板や新鮮凍結血漿による血小板や凝固因子の補充が行われている。また、DICの発症にサイトカインや組織因子が関与している場合には、これらを抑制するような薬物によりDICを改善しうる可能性があるが、臨床応用への展望を含めて現時点では不明である。

DICの一部の症例においては、単球やマクロファージからインターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1)  $\beta$  や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)  $\alpha$  に代表される炎症性サイトカインが放

平成10年12月22日受付、平成11年2月19日受理

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; APL, acute promyelocytic leukemia; ARDS, acute respiratory distress syndrome; ATRA, all-trans retinoic acid; DIC, disseminated intravascular coagulation; GFD, glomeruli fibrin deposition; GTM, glomeruli with thrombomodulin staining; IL-1, interleukin-1; LPS, lipopolysaccharide;

出され、血管内皮障害を伴った凝固障害や臓器障害が発症すると考えられている<sup>20-21</sup>。一方、ステロイド剤は、自己免疫性疾患や敗血症性ショック、成人呼吸促進症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) に対して投与され、臨床症状の改善とともに、血中サイトカイン濃度の低下がみられたとする報告もある<sup>21</sup>。この点、サイトカインの関与が大きいDICに対しては、ステロイドが有効である可能性がある。

また、DICは造血器悪性腫瘍の経過中に合併しやすく、特に、急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) においては非常に高率に合併することが知られている<sup>22</sup>。また、第17染色体上のレチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor, RAR)  $\alpha$  遺伝子と第15染色体上のPML遺伝子は、ともに好中球系細胞を前骨髄球から分葉好中球へと分化させる機能をもつと考えられているが、APLにおいては第15-17染色体転座により形成されたPML-RAR  $\alpha$  融合遺伝子が両者のもつ分化誘導作用を阻害することにより、APL細胞が分化することを阻止していると考えられている。近年、PML-RAR  $\alpha$  に作用してAPL細胞の分化を誘導する薬剤として、オールトランスレチノイン酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) が臨床応用されてきている<sup>23-25</sup>。また、ATRAはAPL細胞に対する分化誘導作用のみでなく、APLに合併したDICをも改善し<sup>26-28</sup>、しばしば抗凝固療法を行うことなくDICをコントロールしうることが知られている。その機序としては、ATRAがAPL細胞のみならず血管内皮細胞においても抗凝固性蛋白であるトロンボモジュリンの発現を高め、組織因子の発現を抑制するためと考えられている<sup>13-16</sup>。この点、ATRAはAPLに合併したDICに対してのみでなく、血管内皮上のトロンボモジュリンの発現が抑制されやすい敗血症などの疾患に合併したDICに対しても有効である可能性がある。

一方、骨粗鬆症の治療薬である活性化ビタミンD<sub>3</sub> (1 $\alpha$ , 25ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>, 以下ビタミンD<sub>3</sub>とする) も、ATRAと

同様に分化誘導作用があることが注目され<sup>17-19</sup>、サイトカインに対しても、IL-1 $\beta$ やTNF  $\alpha$ を抑制するという報告がみられる<sup>20,21</sup>。また、ATRAのトロンボモジュリン発現における作用機序上、トロンボモジュリン遺伝子に存在するレチノイン酸反応領域 (retinoic acid response element, RARE) が注目されているが<sup>22,23</sup>、ビタミンD<sub>3</sub>受容体もRARに類似していることが知られており<sup>24</sup>、ビタミンD<sub>3</sub>もATRAと同様にトロンボモジュリン遺伝子に作用して抗凝固作用を発揮する可能性がある。

以上の点を明らかにするため、ラット敗血症DICモデルに対して、プレドニゾロン、ATRAおよびビタミンD<sub>3</sub>を投与し、凝血学的マーカー、臓器障害、血中サイトカイン濃度への影響、腎糸球体におけるトロンボモジュリンの発現への影響について検討し、各種薬剤のDICに対する有用性について、DIC発症におけるサイトカイン、トロンボモジュリン、および組織因子の関与と合わせて考察した。

## 対象および方法

### I. ラット敗血症DICモデルの作成

6-8週齢、体重160-180gの雄性Wistarラット (日本SLC, 浜松) を、一晚絶食後実験に供した。エンドトキシン惹起ラットDICモデルの作成は、ペントバルビタール (Nembutal<sup>®</sup>, 大日本製薬, 東京) 麻酔下にラット尾静脈に24Gの留置針を留置し、体重1kg当たり30mgの大腸菌由来リポ多糖体 (Escherichia coli 055:B5, lipopolysaccharide, LPS, Difco, Detroit, USA) を生理食塩水10mlに溶解して、4時間かけて持続点滴して行った<sup>29</sup>。

### II. 薬剤の投与 (表1)

#### 1. プレドニゾロンの投与

プレドニゾロン (Predonine<sup>®</sup>, 塩野義, 大阪) は、LPS投与30分前に生理食塩水0.5mlに溶解して、背部皮下に注射した。投与量は体重1kg当たり1mgまたは10mgの2群とした。

Table 1. Schedule of drug administration in an endotoxin-induced rat DIC model

Group	Number	Drug		Administration	
		Day-7 to 0	Day-3 to 0	Day 0 -30 min	Day 0 0-4 hr
Control	8	Vehicle	Vehicle	Saline	Saline
PSL (10)	8			PSL (10)	Saline
ATRA	8	ATRA		Saline	Saline
VD (0.4)	8		VD (0.4)	Saline	Saline
LPS	8	Vehicle	Vehicle	Saline	LPS
LPS+PSL (1)	8			PSL (1)	LPS
LPS+PSL (10)	8			PSL (10)	LPS
LPS+ATRA	8	ATRA		Saline	LPS
LPS+VD (0.04)	8		VD (0.04)	Saline	LPS
LPS+VD (0.4)	8		VD (0.4)	Saline	LPS
LPS+HP	8	Vehicle	Vehicle	Heparin	LPS

Vehicle, 0.3% ethanol and 0.05% Tween 80; PSL (10), prednisolone, 10 mg/kg, s.c.; ATRA, all-trans retinoic acid, 20 mg/day, p.o.; VD (0.4), 1 $\alpha$ , 25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>, 0.4  $\mu$ g/day, p.o.; LPS, lipopolysaccharide, 30 mg/kg/4 hr, div.; PSL (1), prednisolone, 1 mg/kg, s.c.; VD (0.04), 1 $\alpha$ , 25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>, 0.04  $\mu$ g/day, p.o.; Hp, heparin sodium, 500 IU/kg, s.c..

PTAH, phosphotungstic acid hematoxylin; RAR, retinoic acid receptor; TAT, thrombin-antithrombin complex; TNF  $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$

## 2. ATRAの投与

ATRA (Tretinoin®, Roche, Switzerland) は, LPS投与1週間前からLPS投与当日まで, 胃チューブを用いて経口投与した。投与量は一日当たり20mgとして, 0.3%エタノールおよび0.05% Tween80を含む溶媒1mlに溶解して投与した<sup>26)</sup>。

3. ビタミンD<sub>3</sub>の投与

ビタミンD<sub>3</sub> (帝人, 東京) は, LPS投与3日前からLPS投与当日まで, ATRAと同様に経口投与した。投与量は一日当たり0.04, 0.4 μgの2群として, 1%エタノールと0.1% Triton X-100を含む溶媒1mlに溶解して1日1回投与した<sup>27)</sup>。

## 4. ヘパリンの投与

上記3種類の薬剤とDICに対する抑制効果を比較検討するため, 対照として未分画ヘパリン (Novo Heparin<sup>®</sup>, ヘキスト, 東京, 以下ヘパリンとする) をLPS投与30分前に体重1kg当たり500 IUを背部皮下に注射し<sup>28)</sup>, LPSを同様に投与した (LPS+ヘパリン群)。なお, 対照群は, 各溶媒のみを経口投与し, 生理食塩水10mlを4時間かけて持続点滴した。また, LPS単独投与群, LPS+ヘパリン群にも, 各薬剤の溶媒を経口投与した。ATRA単独投与およびビタミンD<sub>3</sub>単独投与群には, 生理食塩水10mlの持続点滴を行った。

## III. 血液検査

採血は4時間のLPS投与終了直後に, エーテル麻酔下に開腹して, 腹部大動脈より行い, 検体は21G注射針付の5mlの注射器にチトラート液を1/10容入れて採取した。採血後1時間以内に動物用自動血算装置 (Celltac, MEK-5128, 日本光電, 東京) にて血小板数を測定し, プロトロンビン時間, 血中フィブリノゲン濃度を自動凝固検査装置 (CA-5000, 東亜医療電子, 東京) で, 血中DダイマーをDダイマー測定装置 (エルピアエースDDダイマー, ダイアトロン, 東京) で測定した<sup>29)</sup>。検体は-80℃で凍結保存し, トロンビン-アンチトロンビン複合体 (thrombin-antithrombin complex, TAT) をヒト用ELISAキット (Enzygnost TAT, Behring Werke, Germany) で測定した<sup>30)</sup>。なお, これまでの検討で, 本ELISAキットはラットの血中TATも測定可能であることが知られている<sup>31)</sup>。

また, 臓器障害のマーカーとして, 血中アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase, ALT) と血中クレアチニンをラット用ELISAキット (ALT, リキテック GPT IFCC, ベーリンガーマンハイム, 東京; クレアチニン, LタイプコーワクレアチニンF, 和光純薬, 大阪) で測定した<sup>32)</sup>。さらに, 各種薬剤の血中サイトカイン濃度への影響を検討するために, 血中IL-1βおよびTNFαをラット用ELISAキット (Cytoscreen rat

IL-1β, TNFα, Biosource, USA) にて測定した<sup>33)</sup>。

## IV. 病理学的検討

脱血死後, 速やかに解剖し腎臓を摘出して, 10%ホルマリンを用いて固定した。腎糸球体におけるフィブリン血栓形成の程度を検討するために, リンタングステン酸ヘマトキシリン (phosphotungstic acid hematoxylin, PTAH) 染色を行い, 100個の糸球体のうち, フィブリン血栓陽性の糸球体の個数を数え, 糸球体フィブリン沈着率 (% glomerular fibrin deposition, % GFD) として示した<sup>29)34)</sup>。また, 腎糸球体におけるトロンボモジュリンの発現について検討するために, ウサギ抗ラットトロンボモジュリンポリクローナル抗体 (三菱ガス化学, 新潟) とVectastain ABCキット (フナコシ, 東京) を用いてトロンボモジュリン免疫染色を行い, 糸球体での陽性率をPTAH染色と同様に検討して, 糸球体トロンボモジュリン染色率 (% glomerular thrombomodulin stain, % GTM) として示した<sup>35)</sup>。

## V. 統計学的検討

データは平均値±標準誤差 ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) にて表現し, Wilcoxon検定にてp<0.05を有意差ありとした。

## 成 績

## I. LPS投与によるラット敗血症DICモデル

LPS投与により, 有意な血小板数の減少 (対照群: 806 ± 25 × 10<sup>3</sup>/L 対 LPS群: 177 ± 11 × 10<sup>3</sup>/L, p<0.001, 以下同様) プロトロンビン時間の有意な延長 (12.8 ± 0.2秒 対 58.7 ± 3.2秒, p<0.001), 血中フィブリノゲン濃度の有意な減少 (263 ± 6.5 mg/dl 対 52 ± 3.2 mg/dl, p<0.001), 血中Dダイマー値の有意な増加 (0.60 ± 0.02 μg/ml 対 1.15 ± 0.09 μg/ml, p<0.005), 血中TAT値の増加 (1.0 ± 0.6 ng/ml 対 222 ± 26.5 ng/ml, p<0.001) がみられ, 本モデルにおいてDICが惹起されているものと考えられた (表2)。また, LPS投与により血中クレアチニン値 (0.13 ± 0.02 mg/dl 対 1.27 ± 0.05 mg/dl, p<0.001) および血中ALT値 (72 ± 4.7 U/L 対 221 ± 16.7 U/L, p<0.001) の増加がみられ, DICに伴う臓器障害が確認された (表2)。一方, 血中サイトカイン濃度は, 血中IL-1β値 (5.5 ± 1.1 pg/ml 対 802 ± 62 pg/ml, p<0.001) および血中TNFα値 (3.8 ± 0.9 pg/ml 対 1658 ± 193 pg/ml, p<0.001) はともにLPS投与により有意に増加していた (表2, 図1)。また, 血中TAT濃度と血中TNFα値および血中IL-1β値の間には, いずれも正相関がみられた (それぞれ, r=0.687, n=8, p<0.05; r=0.703, n=8, p<0.05)。

## II. プレドニゾロン投与のDICへの効果 (表2, 図1)

Table 2. Hemostatic parameters and organ dysfunction after LPS infusion and drug administration

Parameters	Control (n=8)	PSL (10) (n=8)	ATRA (n=8)	VD (0.4) (n=8)	LPS (n=8)	LPS+PSL (1) (n=8)	LPS+PSL (10) (n=8)	LPS+ATRA (n=8)	LPS+VD (0.04) (n=8)	LPS+VD (0.4) (n=8)	LPS+Hp (n=8)
Platelet (×10 <sup>3</sup> /μl)	806±25	784±32	772±25	762±38	177±11	377±54 *	565±34 **	185±13	187±16	294±19 **	245±17 *
PT (sec)	12.8±0.2	12.9±0.4	12.5±0.2	12.6±0.3	58.7±3.2	16.1±0.4 ***	15.1±0.4 ***	60.2±1.6	45.2±2.4 *	28.8±3.6 **	40.6±1.3 *
Fibrinogen (mg/dl)	263±6.5	265±9.4	250±4.1	255±15.6	52±3.2	150±16.6 **	194±14.6 ***	95±3.4 *	98±4.4 *	138±6.4 **	112±17.1 *
D-dimer (μg/ml)	0.60±0.02	0.57±0.03	0.71±0.03	0.53±0.04	1.15±0.09	0.67±0.08 **	0.52±0.03 **	1.04±0.07 *	1.02±0.09 *	0.83±0.04 *	0.80±0.08 *
TAT (ng/ml)	1.0±0.6	2.0±0.8	3.0±0.3	2.4±1.2	222±26.5	84±14.9 **	79±23.1 **	102±8.3 **	184±11.2 *	92.6±4.6 **	129±15.1 *
Creatinine (mg/dl)	0.13±0.02	0.14±0.03	0.15±0.02	0.17±0.04	1.27±0.05	0.19±0.03 ***	0.17±0.02 ***	0.85±0.07 *	0.91±0.06 *	0.54±0.03 **	0.38±0.02 **
ALT (U/L)	72±4.7	73±6.1	78±2.5	74±5.6	221±16.7	189±25.0 *	166±18.0 **	175±13.5 *	172±15.2 **	105±3.4 ***	169±12.3 **

LPS, lipopolysaccharide, 30 mg/kg/4 hr, div.; PSL (1) or (10), prednisolone, 1 mg/kg or 10 mg/kg, p.o.; ATRA, all-trans retinoic acid, 20 mg/day, p.o.; VD (0.04) or (0.4), 1 α, 25, dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>, 0.04 μg/day or 0.4 μg/day, p.o.; Hp, heparin sodium, 500 IU/kg, s.c.; PT, prothrombin time.; TAT, thrombin-antithrombin complex; ALT, alanine aminotransferase; Data are shown by  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.005 compared with LPS group.

プレドニゾン (10mg/kg) の単独投与においては, 凝血学的マーカー, 肝腎機能, および血中サイトカイン濃度は, 対照群と有意差はみられなかった (表2, 図1). プレドニゾン 1mg/kg または 10mg/kg の前投与により, LPS 投与による血小板数の減少は有意に抑制された (LPS+プレドニゾン 1mg/kg 群:  $377 \pm 54 \times 10^9/L$ ,  $p < 0.05$  対 LPS 群; LPS+プレドニゾン 10mg/kg 群:  $565 \pm 34 \times 10^9/L$ ,  $p < 0.005$  対 LPS 群, 以下同様) (表2). LPS 投与によるプロトロンビン時間の延長はプレドニゾン投与により有意に抑制された ( $16.1 \pm 0.4$  秒,  $p < 0.005$ ;  $15.1 \pm 0.4$  秒,  $p < 0.005$ ). LPS 投与による血中フィブリノゲン濃度の減少はプレドニゾン投与により有意に抑制された ( $150 \pm 16.6$  mg/dl,  $p < 0.01$ ;  $194 \pm 14.6$  mg/dl,  $p < 0.005$ ). LPS 投与による血中Dダイマー値の増加はPSL投与により有意に抑制された ( $0.67 \pm 0.08$   $\mu$ g/ml,  $p < 0.01$ ;  $0.52 \pm 0.03$   $\mu$ g/ml,  $p < 0.01$ ). LPS 投与による血中TAT値の増加はプレドニゾン投与により有意に抑制された ( $84.0 \pm 14.9$  ng/ml,  $p < 0.01$ ;  $79.4 \pm 23.1$  ng/ml,  $p < 0.01$ ). 以上の結果より, プレドニゾンの前投与は, LPS 投与による凝血学的マーカーの変動を有意に改善し, その効果は用量依存的であった.

プレドニゾン前投与による臓器障害への影響についてみると, LPS 投与により増加した血中クレアチニン値はプレドニゾン投与により有意に抑制された ( $0.19 \pm 0.03$  mg/dl,  $p < 0.005$ ;  $0.17 \pm 0.02$  mg/dl,  $p < 0.005$ ) (表2). また, LPS 投与により増加した血中ALT値はLPS+プレドニゾン 1mg/kg 群では有意差はみられなかった ( $189 \pm 25.0$  U/L) が, プレドニゾン 10mg/kg 群では有意に抑制された ( $166 \pm 18.0$  U/L,  $p < 0.05$ ).

プレドニゾン投与による血中サイトカイン濃度への影響についてみると, LPS 投与により増加した血中TNF  $\alpha$  値は, プレドニゾン投与により有意に抑制された ( $1020 \pm 193$  pg/ml,  $p < 0.01$ ;  $517 \pm 12$  pg/ml,  $p < 0.05$ ) (図1). また, LPS 投与により増加した血中IL-1  $\beta$  値は, PSL 投与により有意に抑制された ( $198.7 \pm 59$  pg/ml,  $p < 0.005$ ;  $74.1 \pm 20.9$  pg/ml,  $p < 0.005$ ).

以上より, LPS 投与による臓器障害および血中サイトカイン濃度の増加に対しても, プレドニゾンの前投与は有意な改善効果がみられ, その効果は用量依存的であった.

### Ⅲ. ATRAのDICへの効果 (表2, 図2-5)

ATRA 単独投与における凝血学的マーカーは, 対照群と比較して有意差はみられなかった (表2). また, 臓器障害のマーカーも ATRA 単独投与による有意な変動はみられなかった (表2). 腎糸球体におけるフィブリン血栓形成は, ATRA 群では対照群と同様に全くみられなかった (図2). しかし, 腎糸球体におけるトロンボモジュリン免疫染色についてみると, 対照群で  $35.2 \pm 4.2\%$  の陽性率であるのに対して, ATRA 群では  $44.6 \pm 5.4\%$  と, 対照群と比較して有意に増加していた (図3,  $p < 0.05$ ).

LPS+ATRA 投与における凝血学的マーカーの変動についてみると, LPS+ATRA 群においては, 血小板数 ( $185 \pm 13 \times 10^9/L$ ), プロトロンビン時間 ( $60.2 \pm 1.6$  秒) は LPS 群と比較して有意な変動はみられなかった (表2). 一方, 血中フィブリノゲン濃度の減少は, LPS+ATRA 群で  $95 \pm 3.4$  mg/dl と, LPS 群と比較して有意に抑制された (表2,  $p < 0.05$ ). また, 血中Dダイマー値および血中TAT値の増加も LPS+ATRA 群で LPS 群と比較し

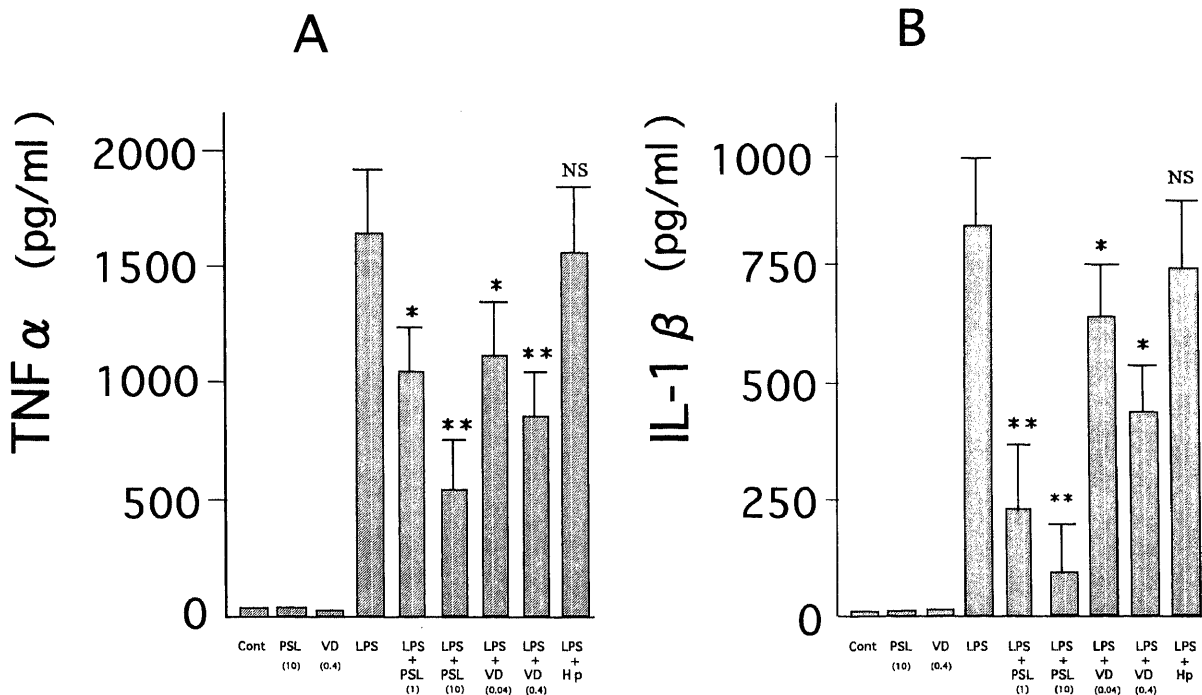


Fig. 1. Release of cytokines after LPS infusion and drug administration. (A) Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ). (B) Interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ). LPS, lipopolysaccharide 30 mg/kg/4 hr, div.; PSL (1), prednisolone 1 mg/kg, s.c.; PSL (10), prednisolone 1 mg/kg, s.c.; VD (0.4), 1  $\alpha$  25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (0.4  $\mu$ g/day, p.o.); VD (0.04), 1  $\alpha$  25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (0.04  $\mu$ g/day, p.o.); Hp, heparin sodium 500 IU/kg, s.c. Data are shown by  $\bar{x} \pm$  SEM. \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.005$  vs. LPS group. NS, not significant vs. LPS group.

て有意に抑制された (Dダイマー:  $1.04 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0.05$ ; TAT:  $102 \pm 8.3 \text{ ng/ml}$ ,  $p < 0.05$ ).

LPS+ATRA群における臓器障害についてみると、血中クレアチニン値 ( $0.85 \pm 0.07 \text{ mg/dl}$ ,  $p < 0.05$ ) および血中ALT値 ( $175 \pm 13.5 \text{ U/L}$ ,  $p < 0.05$ ) は、LPS群と比較して有意に改善していた (表2).

腎糸球体におけるフィブリン血栓形成は対照群では全くみられなかったが、LPS投与により、 $70.6 \pm 1.1\%$ の糸球体にフィブリン血栓がみられた (図2, 4). 一方、LPS+ATRA群では%GFDは  $6.2 \pm 1.0\%$ と、LPS群と比較して有意に抑制された ( $p < 0.01$ ). 一方、腎糸球体におけるトロンボモジュリン発現については、対照群で  $35.2 \pm 4.2\%$ であった%GTMが、LPS投与により  $1.0 \pm 0.8\%$ と有意に低下し ( $p < 0.001$ ), LPS+ATRA群で  $15.0 \pm 3.1\%$ と、LPS群と比較して有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (図3, 5). また、LPS群およびLPS+ATRA群においては、血中TAT濃度と%GTMの間に負の相関がみられた ( $r = -0.847$ ,  $n = 8$ ,  $p < 0.001$ ).

N. ビタミンD<sub>3</sub>のDICへの効果 (表2, 図1, 2, 4)

ビタミンD<sub>3</sub> 0.4  $\mu\text{g/日}$ の単独投与における凝血学的マーカーは、対照群と比較して有意差はみられなかった (表2). また、臓器障害のマーカーもビタミンD<sub>3</sub>投与による有意な変動はみられなかった (表2). さらに、血中サイトカイン濃度に対する影響もビタミンD<sub>3</sub>単独投与ではみられなかった (図1). また、腎糸球体におけるフィブリン血栓形成は、ビタミンD<sub>3</sub>投与においては対照群と同様に全くみられなかった (図2).

LPS+ビタミンD<sub>3</sub>投与における凝血学的マーカーについてみると、血小板数の低下に対しては低濃度ビタミンD<sub>3</sub>投与 (LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.04  $\mu\text{g/日}$ 群) では  $187 \pm 16 \times 10^9/\text{L}$ と、LPS群と比較して有意な変動はみられなかったが、高濃度ビタミンD<sub>3</sub>投与 (LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.4  $\mu\text{g/日}$ 群) では、 $294 \pm 17 \times 10^9/\text{L}$ と

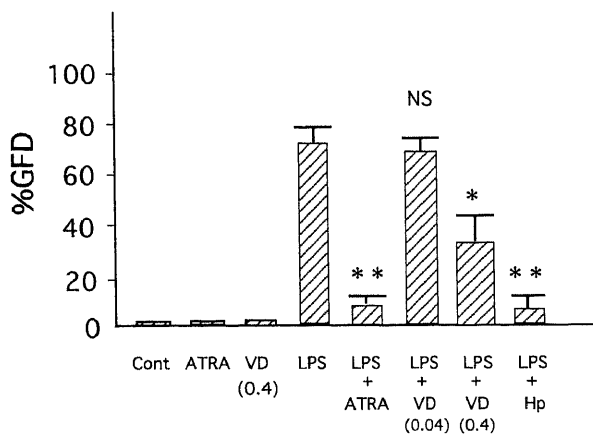


Fig. 2. The intensity of phosphotungstic-hematoxylin (PTHA) staining (fibrin deposition) in renal glomeruli after LPS infusion and drug administration. %GFD, The percentage of glomeruli with fibrin deposition; ATRA, all-trans retinoic acid (20 mg/day) p.o.; VD (0.4), 1  $\alpha$  25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (0.4  $\mu\text{g/day}$ , p.o.); VD (0.04), 1  $\alpha$  25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (0.04  $\mu\text{g/day}$ , p.o.); Hp, heparin sodium 500IU/kg, s.c. Data are shown by  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.005$  vs. LPS group. NS, not significant vs. LPS group.

有意に抑制された ( $p < 0.05$ , 表2). LPS投与によるプロトロンビン時間の延長は、LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.04  $\mu\text{g/日}$ 群で  $45.2 \pm 2.4$ 秒, LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.4  $\mu\text{g/日}$ 群で  $28.8 \pm 3.6$ 秒と、LPS群と比較して有意に抑制された (それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). また、LPS投与による血中フィブリン濃度の減少も、 $98 \pm 4.4 \text{ mg/dl}$ および  $138 \pm 6.4 \text{ mg/dl}$ と有意に抑制された (それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). さらに、LPS投与による血中Dダイマー値の増加は、LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.04  $\mu\text{g/日}$ 群で  $1.02 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ , LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.4  $\mu\text{g/日}$ 群で  $0.83 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ と有意に抑制された (それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). また、血中TAT値の増加も  $184 \pm 11.2 \text{ ng/ml}$ および  $92.6 \pm 4.6 \text{ ng/ml}$ と有意に抑制された (それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (表2).

LPS投与による臓器障害に対するビタミンD<sub>3</sub>の効果についてみると、LPS投与により増加した血中クレアチニン値はLPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.04  $\mu\text{g/日}$ 群で  $0.91 \pm 0.06 \text{ mg/dl}$ , LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.4  $\mu\text{g/日}$ 群で  $0.54 \pm 0.03 \text{ mg/dl}$ と、LPS群と比較して有意に抑制された (それぞれ  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). また、LPS投与にて増加した血中ALT値も、 $172 \pm 15.2 \text{ U/L}$ および  $105 \pm 3.4 \text{ U/L}$

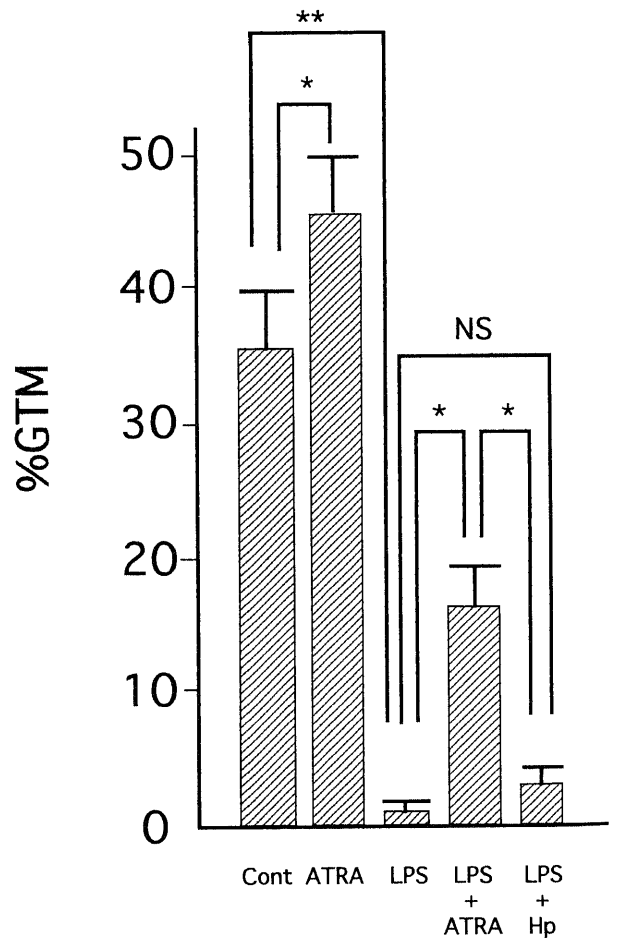


Fig. 3. The intensity of thrombomodulin (TM) immunostaining in renal glomeruli after LPS infusion and drug administration. %GTM, The percentage of glomeruli with thrombomodulin immunostaining; ATRA, all-trans retinoic acid (20 mg/day) p.o.; Hp, heparin (500IU/kg) s.c. Data are shown by  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  compared between each group. NS, not significant.

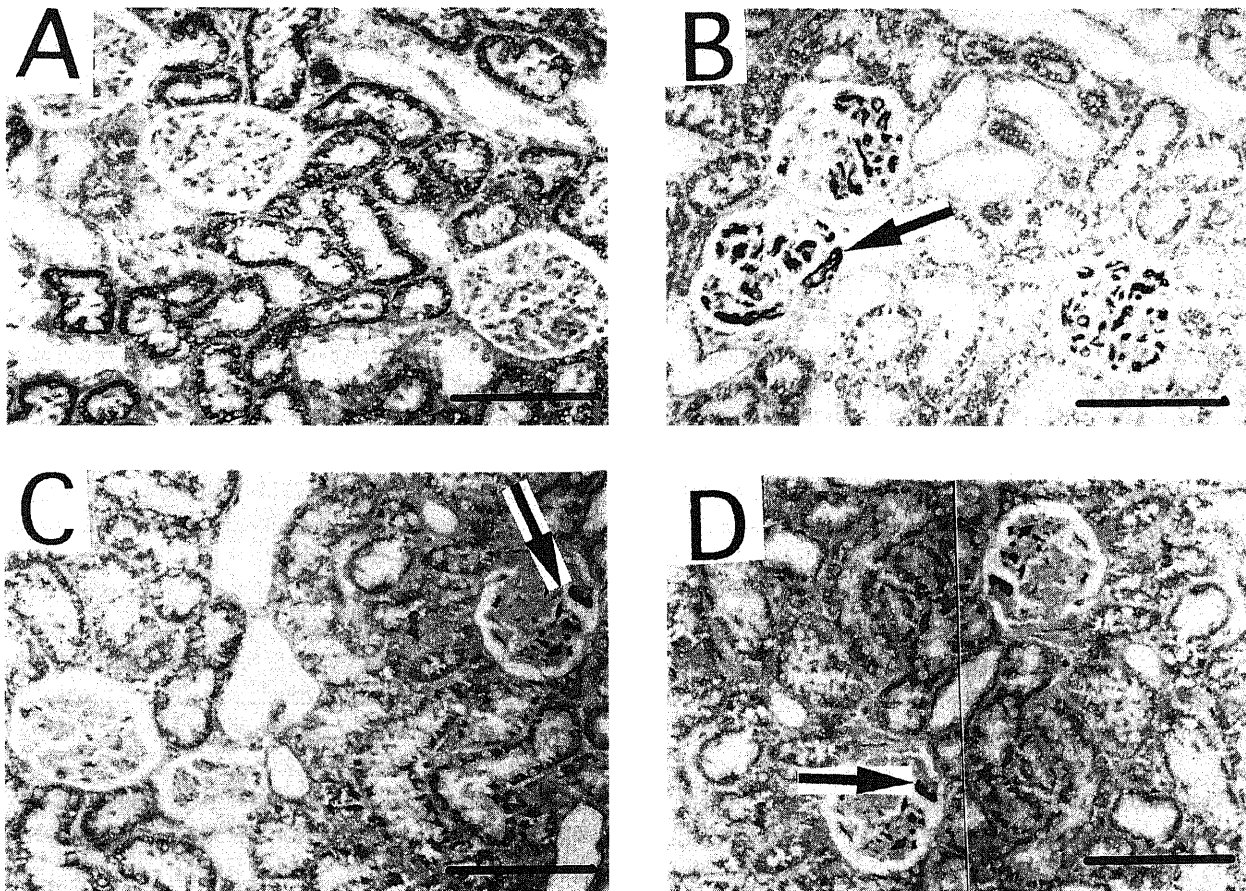


Fig. 4. PTAH staining demonstrating the fibrin deposition in renal glomeruli after LPS infusion and drug administration. (A) Control group. (B) LPS group. (C) LPS + ATRA group. (D) LPS + VD (0.4) group. ( $\times 200$ ) LPS, lipopolysaccharide 30 mg/kg, div.; ATRA, all-trans retinoic acid 20 mg/day, p.o., VD (0.4), 1  $\alpha$ , 25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> 0.4  $\mu$ g/day, p.o. Fibrin deposition are shown by arrow. Scale bar indicates 200  $\mu$ m.

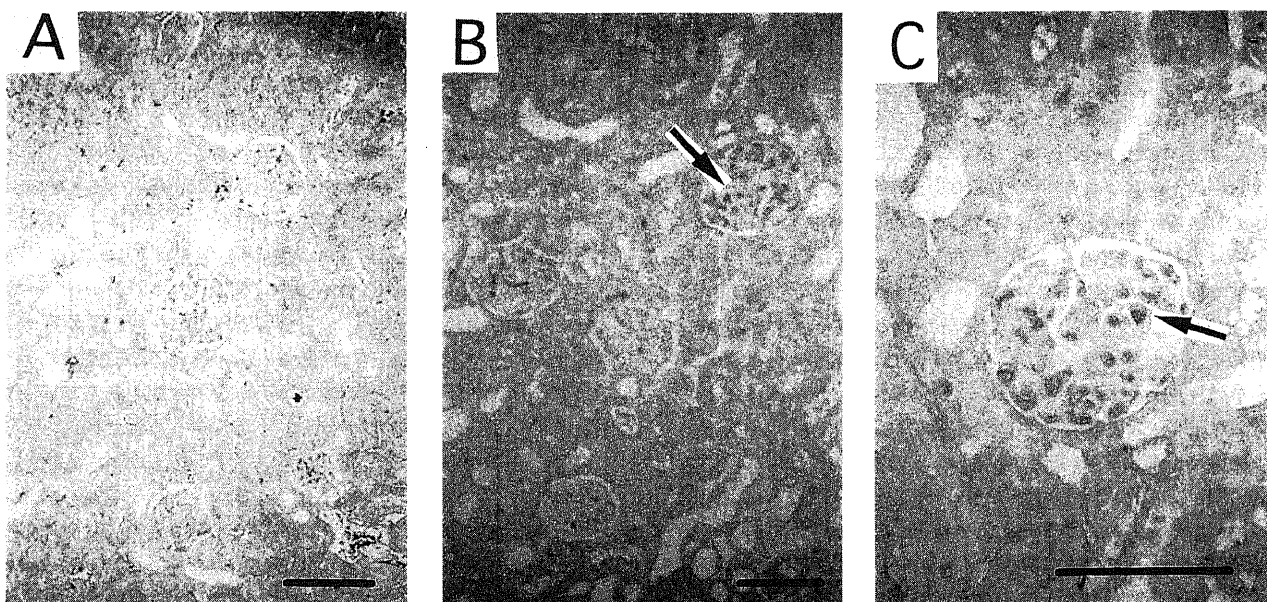


Fig. 5. Thrombomodulin immunostaining with rabbit anti-rat thrombomodulin antibody in renal glomeruli after LPS infusion and ATRA administration. (A) LPS group ( $\times 200$ ). (B) LPS + ATRA group ( $\times 200$ ). (C) LPS + ATRA group ( $\times 400$ ). LPS, lipopolysaccharide 30 mg/kg, div.; ATRA, all-trans retinoic acid 20 mg/day, p.o. Thrombomodulin expression are shown by arrow. Scale bar indicates 200  $\mu$ m.

と有意に抑制された(それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (表2).

LPS投与による血中サイトカイン濃度の増加に対するビタミンD<sub>3</sub>の効果についてみると, 血中IL-1 $\beta$ 値はLPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.04  $\mu$ g/日 群で698  $\pm$  36 pg/ml, LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.4  $\mu$ g/日 群で455  $\pm$  92 pg/mlと, LPS群と比較して有意に抑制された(それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). また, 血中TNF $\alpha$ 値も, 1062  $\pm$  144 pg/mlおよび916  $\pm$  69 pg/mlと有意に抑制された(それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) (図1). なお, ビタミンD<sub>3</sub>のサイトカインに対する効果は用量依存的であった.

腎糸球体における%GFDは, LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.04  $\mu$ g/日 群で63.2  $\pm$  2.4%, LPS+ビタミンD<sub>3</sub> 0.4  $\mu$ g/日 群で34.6  $\pm$  2.5%と, LPS群と比較して有意に抑制されており(それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ), フィブリン血栓形成に対するビタミンD<sub>3</sub>の抑制効果は用量依存的であった(図2).

#### V. ヘパリンのDICへの効果

LPS+ヘパリン群では, LPS投与による凝血学的マーカーの変動に対する有意な抑制効果(血小板数, 245  $\pm$  17  $\times 10^9$ /L; プロトロンビン時間, 40.6  $\pm$  1.3秒; 血中フィブリノゲン濃度, 112  $\pm$  17.1 mg/dl; Dダイマー, 0.80  $\pm$  0.08  $\mu$ g/ml; TAT, 129  $\pm$  15.1 ng/ml, いずれも対LPS群,  $P < 0.05$ ) がみられた(表2). また, 臓器障害の改善効果もみられた(クレアチニン, 0.38  $\pm$  0.02 mg/dl,  $p < 0.05$ ; ALT, 169  $\pm$  12.3 U/L,  $p < 0.05$ , 表2). さらに, 腎糸球体におけるフィブリン血栓形成も抑制した(%GFD, 4.4  $\pm$  0.9%,  $p < 0.001$ , 図2). しかし, 血中サイトカイン濃度および腎糸球体におけるトロンボモジュリン発現はLPS群と比較して有意差はみられなかった(図1, 3).

### 考 察

DICは, 敗血症や造血器悪性腫瘍, 固形癌などを基礎疾患として発症する重篤な合併症であり<sup>1)</sup>, その本態は, 全身性持続性の凝固活性化により, 主として細小血管に微小血栓が多発することである. DICの予後は極めて不良であり, 予後の改善のためには早期診断と迅速な治療が必要とされる. DICの治療は, 原疾患の治療が最優先であるが, 通常は血管内凝固を阻止するためのヘパリンなどによる抗凝固療法が必要である. しかし, DICの病態は様々であり<sup>2)</sup>, 症例の病態に応じた治療法の選択が重要と思われる. また, DICに対して抗凝固療法を行ってもコントロールしえない症例も少なくなく, 抗凝固療法以外の観点からの治療法の改善も望まれている. そこで, 本研究では, 元来, 抗凝固療法以外の目的で使用されているものの, 近年, サイトカインへの影響や凝固線溶系への影響が注目されている薬剤である, ステロイド剤, ビタミンA誘導体および活性化ビタミンD<sub>3</sub>をラット敗血症DICモデルに投与し, その抗凝固作用について検討した. 敗血症においては, 細菌からのエンドトキシン遊離により, 単球やマクロファージからIL-1やTNFなどのサイトカインが産生され<sup>3)</sup>, 血管内皮における一酸化窒素などの産生を誘導し<sup>4)</sup>, 血管内皮障害などが惹起されると考えられている. また, DICにおいては, サイトカインなどにより血管内皮が易血栓性に傾き, 微小血栓が多発し, 臓器での微小循環不全が生じ, 多臓器不全を発症するといわれている. 本モデルにおいて, 凝血学的マーカーの変動と肝, 腎機能障害, 腎臓におけるフィブリン血栓の存在から(表2, 図2), LPS投与によりDICが惹起され, これによる臓器障害が生じているものと考えられた. また, 本モデルにおいて, 血中IL-1 $\beta$ およびTNF

$\alpha$ の増加がみられ(図1), さらに, 血中TAT濃度とこれらのサイトカイン濃度の間には, いずれも正相関がみられたことより, 本モデルにおけるDIC発症にこれらの炎症性サイトカインの上昇が関連しているものと考えられた.

敗血症に伴うDIC発症の機序として, IL-1 $\beta$ やTNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインの関与が指摘され<sup>2)~4)</sup>, 実際にこれらのサイトカインをヒトに投与することによりDICを発症したとする報告もみられる<sup>3)7)38)</sup>. このため, いくつかの実験モデルにおいて, 抗IL-1抗体やIL-1受容体拮抗剤, およびIL-10のような抗炎症性サイトカインを投与することにより, 敗血症DICにおける臓器障害の改善やDIC発症の抑制に有用であるとする報告もみられる<sup>39)~44)</sup>. 一方, コルチコステロイドは単球におけるIL-1 $\beta$ やTNF $\alpha$ のmRNAの転写および転置を抑制することにより, これらのサイトカイン活性を低下させるといわれている<sup>45)~49)</sup>. そこで, プレドニゾロンを投与して, ラット敗血症DICに対する抗凝固作用および血中サイトカイン濃度への影響について検討した.

プレドニゾロンをLPS投与前に皮下投与することにより, 凝血学的マーカーの変動は有意に抑制され, 臓器障害も有意に改善した(表2). また, LPS投与により増加した血中サイトカイン濃度は, プレドニゾロン投与により有意に抑制され(図1), プレドニゾロンのサイトカイン抑制作用が本モデルにおけるDICを改善した可能性が考えられた. また, これらの改善効果は用量依存的であり, 臨床で使用される1mg/kgのプレドニゾロン投与でも有効であったことは興味深いことであると考えられた. プレドニゾロン投与により臓器障害の改善もみられたことから, ステロイド剤はサイトカインが関与するDICにより生じた臓器障害にも有効ではないかと考えられた. 臨床的にも, 敗血症性ショックが考えられる際やARDSに対してメチルプレドニゾロン大量療法が行われたり, 100-300mg程度のヒドロコルチゾンが投与され, 救命に寄与したとする報告もみられ<sup>50)~52)</sup>, 今後, 敗血症に合併したDICに対するステロイド剤の投与量および投与時期についても臨床的に検討する意義があるものと考えられた. 一方, ステロイド剤は感染症や消化性潰瘍の増悪因子と考えられており, その適応は慎重に考慮する必要がある. しかし, 本研究において, ヘパリン投与においてはサイトカインへの影響がみられなかったことから, ヘパリンとステロイド剤を併用することにより, DICの進展および臓器障害をより効果的に抑制しうる可能性があり, 敗血症DICにおける新たな治療法として検討する余地があると思われる.

ATRAはAPLにおいて, APL細胞を分化誘導するのみでなく, APL細胞や血管内皮細胞において, トロンボモジュリンの発現を高め, 組織因子の発現を抑制することが報告されている<sup>1) 13)~19)53)</sup>. 一方, 敗血症においては, TNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインの影響などで, 血管内皮細胞におけるトロンボモジュリンの発現が低下し, 血管内皮や単球における組織因子の発現が増加することにより<sup>45)46)54)</sup>, 凝固亢進状態, 易血栓性に傾き, DICを発症するものと考えられている. そこで, ラット敗血症DICモデルにATRAを投与し, その抗凝固作用とトロンボモジュリン発現への影響について検討した. LPSによる血小板数の減少およびプロトロンビン時間の延長に対しては, ATRA投与による有意な改善はみられなかったが, 血中フィブリノゲン濃度の減少, DダイマーおよびTATの増加に対しては有意に改善した(表2). また, LPS投与による臓器障害は,



ATRA投与により有意に改善し、腎糸球体におけるフィブリン血栓の形成も有意に抑制された(図2)。以上より、ATRAは敗血症DICに対して、凝固亢進状態および臓器障害の改善に有効であると考えられた。さらに、腎糸球体におけるトロンボモジュリンの発現に対する影響を免疫組織染色により検討したところ、ATRA前投与にてトロンボモジュリンの発現が対照群と比較して有意に増加しており、また、LPS群と比較してLPS+ATRA群でもトロンボモジュリンの発現増加がみられた(図3, 5)。さらに、%GTMと血中TAT値には負の相関がみられたことより、ATRAによる抗凝固作用はトロンボモジュリンの発現を亢進させて、易血栓性から抗血栓性にシフトさせることにより生じるものと考えられた。ただし、本研究においてATRAの抗凝固作用やトロンボモジュリンの発現増加がみられるのは、臨床用量の数十倍から百倍程度であり、ラットとヒトとの間の種差など、臨床応用するためには、さらに検討を加える必要があると考えられた。なお、ATRAによるトロンボモジュリンや組織因子の発現に対する作用機序としては、次のようなことが考えられる。トロンボモジュリン遺伝子上流にあるRAREにレチノイン酸が結合したRAR $\alpha$ とレチノイドX受容体(retinoid X receptor, RXR)のヘテロダイマーRAR $\alpha$ /RXRが結合し、トロンボモジュリンのmRNAを誘導し、トロンボモジュリンの発現を高める。組織因子の遺伝子の5'側上流にJunとFosからなる転写因子AP-1の結合部位があるが、レチノイン酸が結合したRARはJunと結合することでAP-1の結合を阻害し、レチノイン酸投与により組織因子のmRNAを抑制し組織因子の発現が抑制される<sup>22) 23) 55) 56)</sup>。

活性化ビタミンD<sub>3</sub>は、骨粗鬆症の治療などに臨床応用されているが、近年、ATRAと同様に分化誘導作用を有し<sup>17) 19)</sup>、サイトカインへの影響に関する報告もみられる<sup>20) 21) 57) 62)</sup>。また、ビタミンD<sub>3</sub>の受容体とRARはその繰り返し配列による類似性が知られており<sup>24) 57)</sup>、ビタミンD<sub>3</sub>に対してもATRAと同様の効果があるかどうか検討するために、ビタミンD<sub>3</sub>をラット敗血症DICモデルに経口投与した。ビタミンD<sub>3</sub>の前投与により、LPSによる凝血的マーカーの変動は有意に改善した(表2)。また、LPS投与による臓器障害や腎糸球体におけるフィブリン血栓の形成も有意に抑制した(図2)。以上より、ビタミンD<sub>3</sub>は敗血症DICおよびその臓器障害に対して有効であると考えられた。また、LPS投与による血中サイトカイン濃度の増加はビタミンD<sub>3</sub>投与により有意に改善し(図1)、ビタミンD<sub>3</sub>の抗凝固作用は、サイトカインの抑制により発揮される可能性があると思われた。一方、ビタミンD<sub>3</sub>投与によりTMの発現は増加する傾向がみられたが、有意差はなかった。この理由として、ビタミンD<sub>3</sub>受容体とRARの類似性により、ある程度、トロンボモジュリンの発現に影響は与えるものの、RAREに対する結合力はビタミンD<sub>3</sub>受容体ではRARよりも弱いため<sup>18)</sup>と考えられた。また、試験管内での実験では、ビタミンD<sub>3</sub>のトロンボモジュリンや組織因子への作用は、単球系細胞ではみられたが、血管内皮細胞ではみられなかったとする報告もあり<sup>53) 60) 64)</sup>、トロンボモジュリンへの影響はATRAとビタミンD<sub>3</sub>では多少異なるものと思われた。

また、ビタミンD<sub>3</sub>は、APL細胞や骨髄腫細胞の分化誘導作用がある<sup>17)</sup>と報告され、さらに、血中サイトカイン濃度にも影響を与えともいわれている<sup>19) 21)</sup>。ビタミンD<sub>3</sub>は単球、白血病細胞、および線維芽細胞の細胞株において、IL-1 $\alpha$ およびIL-

1 $\beta$ <sup>20) 58) 59)</sup>や、TNF $\alpha$ <sup>21) 59)</sup>を抑制すると報告されている。その機序の一つとして、ビタミンD<sub>3</sub>がIL-1 $\beta$ 変換酵素(IL-1 $\beta$ -converting enzyme)のmRNAを低下させることが考えられている<sup>58)</sup>。また、LPSで誘導されたTNF $\alpha$ の産生をビタミンD<sub>3</sub>が抑制するとの報告もみられる<sup>21)</sup>。その機序として、IL-1 $\beta$ やTNF $\alpha$ のプロモーター領域には、活性化T細胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)遺伝子があり、ビタミンD<sub>3</sub>が結合したビタミンD<sub>3</sub>受容体がNFAT/AP-1の複合体生成を阻害し、これらのサイトカインの産生を抑制することが考えられている<sup>60)</sup>。また、ビタミンD<sub>3</sub>は、 $\kappa$ B細胞核因子(nuclear factor  $\kappa$ B cell, NF $\kappa$ B)蛋白の活性化や核内への移行を抑制し、マクロファージや樹状突起細胞におけるサイトカインの産生を転写レベルで抑制するとの報告もある<sup>61)</sup>。さらに、試験管内において、IL-6やIL-8の増加も抑制するとの報告もあり<sup>62)</sup>、今後、DICにおけるサイトカイン増加に対するビタミンD<sub>3</sub>の作用についてさらに検討すべきと考えられた。

本研究では、現在は抗凝固作用以外で臨床応用されている薬剤について、ラット敗血症DICモデルに対する効果について検討した。ステロイドは、慢性関節リウマチなどの慢性炎症性疾患のみならず、ARDS、敗血症性ショックといった重篤な症例にも使用され、サイトカインの抑制効果などにより、予後を改善するといわれている。本研究において、プレドニゾロンおよびビタミンD<sub>3</sub>は、DICモデルにおけるサイトカイン上昇を抑制し、凝固活性化の指標である血中TAT値の上昇を同時に抑制したことより、抗サイトカイン作用により抗凝固作用を有していると考えられた。一方で、ヘパリン投与においてはサイトカイン濃度に影響がみられず、プレドニゾロンおよびビタミンD<sub>3</sub>は、抗サイトカイン作用による抗凝固作用を有する点で、ヘパリンとは異なる機序でDICに有効ではないかと考えられた。また、ATRAは、ラットの腎糸球体におけるトロンボモジュリンの発現を亢進し、凝血的マーカーの改善や臓器障害の軽減につながったと考えられた。一方で、ヘパリン投与においてはトロンボモジュリンの発現への影響はみられず、ATRAはトロンボモジュリンの発現増強による抗凝固作用を有する点で、ヘパリンとは異なる機序でDICに有効ではないかと考えられた。また、今回の研究とは別に、本教室において、ラットへの組織因子投与によるDICモデルについても検討しているが、ヘパリンは、組織因子によるDICモデルの対しても有効であったのに対し、ATRAは組織因子によるDICモデルにおいては無効であった。このことから、組織因子が直接DICを惹起し、トロンボモジュリンの発現低下が少ないDICモデルに対しては、抗凝固作用を有さないものと考えられた。

今回、用いた薬剤は、いずれも抗DIC作用を有していると考えられるが、臨床応用する上で、プレドニゾロンは易感染性、ATRAはレチノイン酸症候群や催奇形性、ビタミンD<sub>3</sub>はCa上昇作用などの副作用などが問題であり、副作用の少ない類似体の開発、投与量、投与時期などについて更に検討する必要があると考えられた。また、今回用いた薬剤は、ラット敗血症DICモデルに対する抗凝固作用における共通点もあるもの、それぞれ特徴があり、プレドニゾロンは強力な抗サイトカイン作用、ATRAはトロンボモジュリンの発現増強作用、ビタミンD<sub>3</sub>は抗サイトカイン作用により、トロンボモジュリンやサイトカインが関与するDICに対して有効である可能性があると考えられた。

## 結 論

LPS惹起ラット敗血症DICモデルにおいて、プレドニゾロン、ATRAおよび活性化ビタミンD<sub>3</sub>の抗凝固作用、臓器障害、腎糸球体におけるフィブリン血栓形成および免疫組織染色によるトロンボモジュリン発現、および血中サイトカイン濃度への影響について検討し、以下の結論を得た。

1. プレドニゾロンは、サイトカインの増加を抑制することにより、DICにおける凝固異常および臓器障害を改善し、その効果は用量依存的であった。

2. ATRAは、トロンボモジュリンの発現を高めることにより、DICにおける凝固異常、臓器障害およびフィブリン血栓形成を改善した。

3. ビタミンD<sub>3</sub>は、サイトカインの抑制により、DICにおける凝固異常、臓器障害およびフィブリン血栓形成を改善し、その効果は用量依存的であった。

4. ヘパリンは、DICによる凝固異常および臓器障害を改善したが、トロンボモジュリンの発現およびサイトカイン濃度には影響は与えなかった。

以上より、プレドニゾロン、ATRAおよびビタミンD<sub>3</sub>は、ヘパリンとは異なった機序で敗血症DICを改善し、それぞれの抗凝固作用は、抗サイトカイン作用およびトロンボモジュリンの発現増加において、異なった効果を有すると考えられ、敗血症DICに有効である可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました、金沢大学医学部内科学第三講座松田 保教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究遂行に際し、御指導頂きました朝倉英策高密度無菌治療部助教授、ならびに内科学第三講座山崎雅英助手に心から謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、御協力頂きました、金沢大学内科学第三講座第4研究室の諸先生、金沢大学臨床検査室吉田知孝技師、川岸徳子技師、金沢大学第三内科穴田隆子研究助手、および金沢大学薬学部医療薬理学市野典薬学士に心から感謝いたします。

本論文の一部は、第21、22回日本血栓止血学会および平成8、9年度厚生省血液系疾患調査研究班血液凝固異常症分科会にて発表した。

## 文 献

- 1) 松田 保, 朝倉英策, 山崎雅英, 森下英理子, 斉藤正典. DICの原因疾患に関するアンケート調査の結果について. 平成4年度厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班報告書: 17-23, 1993
- 2) Levi M, Ten CH, Van der Poll T, Van Deventer SJH. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 270: 975-979, 1993
- 3) Van der Poll T, Buller HR, ten Cate H. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* 322: 1622-1627, 1990
- 4) Bauer KA, ten Cate H, Barzegar S. Tumor necrosis factor infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans. *Blood* 74: 165-172, 1989
- 5) 若林 剛, 北島秀樹. 抗サイトカイン療法-IL-1とTNFのモデュレーションによる全身性炎症反応抑制の試み. 医学のあゆみ 169: 850-855, 1994
- 6) Dombert H, Scrobohaci ML, Ghorra P, Zini JM, Daniel MT. Coagulation disorders associated with acute promyelocytic

leukemia: Corrective effect of all-trans retinoic acid treatment. *Leukemia* 7: 2-9, 1993

- 7) Huang ME, Ye YC, Chen SR. Use of All-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72: 567-572, 1988
- 8) Raymond PW, Stanley RF, Wilson HM. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans retinoic acid). *N Engl J Med* 324: 1385-1393, 1991
- 9) Zi XC, Yong QX, Ri Z, Rei FT, Xue MX. A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 78: 1413-1419, 1991
- 10) Falanga A, Lacoviello L, Evangelista V. Loss of blast cell procoagulant activity and improvement of hemostatic variables in patients with acute promyelocytic leukemia administered all-trans retinoic acid. *Blood* 86: 1072-1081, 1995
- 11) Hervo D, Marie LS, Marie TD, Jean MM, Sylvie C. In vivo thrombin and plasmin activities in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): Effect of all-trans retinoic acid (ATRA) therapy. *Leukemia* 9: 19-24, 1996
- 12) Kanamaru A. All-trans retinoic acid for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 85: 1202-1206, 1995
- 13) Horie S, Kizaki K, Ishii H, Kazama M. Retinoic acid stimulates expression of thrombomodulin, a cell surface anticoagulant glycoprotein, on human endothelial cells. *Biochem J* 81: 149-154, 1992
- 14) Ishii H, Horie S, Kizaki K, Kazama M. Retinoic acid counteracts both the down regulation of thrombomodulin and the induction of tissue factor in cultured human endothelial cells exposed to tumor necrosis factor. *Blood* 80: 2556-2562, 1992
- 15) Saito T, Koyama T, Nagata K, Kamiyama R, Hirosawa S. Anticoagulant effects of retinoic acids on leukemic cells. *Blood* 87: 657-665, 1996
- 16) Koyama T, Hirosawa S, Kawamata N, Tohda S, Aoki N. All-trans retinoic acid upregulates thrombomodulin and downregulates tissue-tactor expression in acute promyelocytic leukemia cells: Distinct expression of thrombomodulin and tissue factor in human leukemic cells. *Blood* 84: 3001-3009, 1994
- 17) Pols HAP, Birkenhager JC, Foekens JA, van Leeuwen JPTM. Vitamin D: A modulator of cell proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48: 873-876, 1990
- 18) Defacque H, Commes T, Sevilla C, Rochette-Egly C, Mrti J. Synergistic differentiation of U937 cells by all-trans retinoic acid and 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is associated with the expression of retinoid X receptor  $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* 203, 272-280, 1994
- 19) Puthier D, Bataille R, Barille S. Myeloma cell growth arrest, apoptosis, and interleukin-6 receptor modulation induced by EB1089, a vitamin D<sub>3</sub> derivative, alone or in association with dexamethasone. *Blood* 88: 4659-4666, 1996
- 20) Constantine DT, Debbie W, Sabie SE. Inhibition of interleukin-1 production by 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 127-133, 1989
- 21) Fujibayashi S, Suzuki S, Okano K. The weak calcemic

- vitamin D<sub>3</sub> analogue 22-oxacalcitriol suppresses the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  by peripheral mononuclear cells. *Immunol* 30: 307-312, 1991
- 22) Dittman WA, Nelson SC, Greer PK. Characterization of thrombomodulin expression in response to retinoic acid and identification of a retinoic acid response element in the human thrombomodulin gene. *J Biol Chem* 269: 16925-16932, 1994
- 23) Wan Y-JY. Retinoic acid and its receptors. *Am J Surg* 166: 50-53, 1993
- 24) Umesono K, Murakami K, Thompson CC. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D<sub>3</sub> receptors. *Cell* 65: 1255-1266, 1991
- 25) Yamazaki M, Asakura H, Aoshima K, Saito M, Jokaji H, Uotani C, Kumabashiri I, Morishita E, Ikeda T, Matsuda T. Effects of DX-9065a, an orally active, newly synthesized and specific inhibitor of factor Xa, against experimental disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb Haemost* 72: 393-396, 1994
- 26) Kalin JR, Well MJ, Hill DL. Effects of phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and retinoid pretreatment on disposition of orally administered retinoids in mice. *Am Soc Pharm Exper Therap* 12: 63-67, 1984
- 27) 富澤宏樹, 佐藤 香, 斉藤広子, 市原成泰, 立石 満. ラットにおける Calcitriol の体内動態に関する研究 (第一報): 経口投与後の吸収, 血中濃度推移, 体内分布および尿, 糞, 胆汁排泄. *応用薬理* 27: 737-753, 1984
- 28) 上林純一, 張士文, 神前五郎, 川井昌子, 妙中信之, 島田康弘. ヘパリン皮下投与. *臨床血液* 23: 121-128, 1982
- 29) Ferreira HC, Murat LG. Immunological method for demonstrating fibrin degradation products in serum and its use in the diagnosis of fibrinolytic states. *Br J Haemat* 9: 299-310, 1963
- 30) Pelzer H, Schwarz A, Heimburger N. Determination of human thrombin-antithrombin III complex in human plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Thromb Haemost* 59: 101-106, 1988
- 31) Yamazaki M, Asakura H, Aoshima K, Matsuda T. Protective effects of DX-9065a, an orally active, novel synthesized and selective inhibitor of factor Xa, against thromboplastin-induced experimental disseminated intravascular coagulation in rats. *Semin Thromb Hemost* 22: 255-259, 1996
- 32) Komatsu Y, Saika K, Ogura K, Yamanaka S, Sasaki M. Evaluation of ready-to-use, liquid type reagent for creatinine assay "L-type Wako Creatinine F". *J Clin Lab Inst Reag* 19: 58-73, 1996
- 33) 松田 保, 山崎雅英, 朝倉英策, 斉藤正典, 森下英理子, 青島敬二. ラット敗血症 DIC モデルにおける凝固, 線溶, サイトカインの変動とステロイド投与の影響. 平成8年度厚生省血液系疾患調査研究班血液凝固異常症分科会研究業績報告書: 44-44, 1997
- 34) Weigert C. Über eine neue Methode zur Färbung von Fibrin und von Mikroorganismen. *Fortschr Med* 5: 228-237, 1987
- 35) Maruyama I, Bell CE, Majerus PW. Thrombomodulin is found on arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol* 101: 363-371, 1985
- 36) Nussler AK, Disilvio M, Billiar TR. Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 76: 261-264, 1992
- 37) Jansen PM, Boermeester MA, Fischer E, De Jong IW, Van der Poll T, Moldawer LL, Hack CE, Lowry SF. Contribution of interleukin-1 to activation of coagulation and fibrinolysis, neutrophil degranulation, and the release of secretory-type phospholipase A<sub>2</sub> in sepsis: Studies in nonhuman primates after interleukin-1 $\alpha$  administration and during lethal bacteremia. *Blood* 86: 1027-1034, 1995
- 38) Van der Poll T, Buller HR, ten Cate H. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *N Engl J Med* 322: 1622-1627, 1990
- 39) Jacqueline M, Stouthard L, Levi M, Hack CE, Van der Poll T. Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in human. *Thromb Haemost* 76: 738-742, 1996
- 40) Wakabayashi T, Kitajima M. Anti-cytokine strategies-Modulation of systemic inflammatory response syndrome by IL-1 receptor antagonist and soluble TNF receptor. *J Clin Exp Med* 169: 850-855, 1994
- 41) Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 330: 662-664, 1987
- 42) Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 antagonist. *Nature* 343: 341-346, 1990
- 43) Fisher E, Marano MA, Van Zee KJ, Rock CS, Hawes AS, Thompson WA, DeForge L, Kenney JS, Remick DG, Bloedow DC. Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in Escherichia coli septic shock, but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia. *J Clin Invest* 89: 1551-1557, 1992
- 44) Mancilia J, Garcia P, Dinarello CA. The interleukin-1 receptor antagonist can either reduce or enhance the lethality of Klebsiella pneumoniae sepsis in newborn rats. *Infect Immun* 61: 926-932, 1993
- 45) Remick DG, Strieter RM, LYNCH JP. In vivo dynamics of murine tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression. kinetics of induced suppression. *Lab Invest* 60: 766-771, 1989
- 46) Beutler B, Krochin N, Milsark IW. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanism of endotoxin resistance. *Science* 232: 977-980, 1986
- 47) Han J, Thompson P, Beutler B. Dexamethasone and pentoxifyline inhibit endotoxin-induced cachectin / tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J Exp Med* 172: 391-394, 1990
- 48) Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232: 977-980, 1986
- 49) Kundsen PJ, Dinarello CA, Strom TB. Glucocorticoids

- inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin-1 in U937 cells. *J Immunol* 139: 4129-4134, 1987
- 50) Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 317: 653-658, 1987
- 51) Luce JM, Montgomery AB, Marks JD. Ineffectiveness of high-dose methyl prednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am Rev Respir Dis* 138: 62-68, 1988
- 52) Sprung CL, Caralis PV, Marcial EH. The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. A prospective, controlled study. *N Engl J Med* 311: 1137-1143, 1984
- 53) Koyama T, Hirosawa S. Anticoagulant effects of synthetic retinoids and activated vitamin D<sub>3</sub>. *Semin Thromb Hemost* 24: 217-226, 1998
- 54) Colucci M, Balconi R, Lorenzet R, Pietra A, Locati D, Donati MB, Semarato N. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest* 71: 1893-1899, 1983
- 55) Moll T, Czyz M, Holzmuller H. Regulation of the tissue factor promoter in endothelial cells: binding of NF- $\kappa$ B, AP-1, and Spl-like transcription factors. *J Biol Chem* 270: 3849-3857, 1995
- 56) Schule R, Rangarajan P, Yang N. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6092-6096, 1988
- 57) Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier E, Sturzenbecker LJ, Grippo JF, Hunziker W. Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature* 361, 657-660, 1993
- 58) Peleg S. 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogue inhibit acute myelogenous leukemia progenitor proliferation by suppressing interleukin-1 $\beta$  production. *J Clin Invest* 100: 1716-1724, 1997
- 59) Kanatani M, Sugimoto T, Fukase M, Chihara K. Effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells by modulating the release of local regulators from monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 529-535, 1993
- 60) Alroy I, Towers TL, Freedman LP. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D<sub>3</sub>: Direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 15: 5789-5799, 1995
- 61) D'Ambrosio. Inhibition of IL-12 production by 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: involvement of NF- $\kappa$ B down-regulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest* 101: 252-262, 1998
- 62) Srivastava MD, Deluca H, Ambrus JL. Inhibition of IL-6 and IL-8 production in human fibroblast cell lines by 1, 25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> and two of its analogs with lower calcemic activity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 83: 145-150, 1994
- 63) 広沢信作, 小山高敏, 柴倉美砂子. 活性型ビタミンD<sub>3</sub>の抗凝固効果. 平成8年度厚生省特定疾患血液系疾患調査研究班血液凝固異常症分科会報告書: 47-49, 1997
- 64) Koyama T, Shibakura M, Ohsawa M, Kamiyama R, Hirosawa S. Anticoagulant Effects of 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on Human Myelogenous Leukemia Cells and Monocytes. *Blood* 92: 160-167, 1998

**The Anticoagulant Effects of Prednisolone, All-Trans Retinoic Acid, and 1 $\alpha$  25 Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> in the Endotoxin-Induced Septic Disseminated Intravascular Coagulation Model of Rats** Keiji Aoshima, Department of Internal Medicine (3), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **108**, 176 – 187 (1999)

**Key words** disseminated intravascular coagulation, prednisolone, all-trans retinoic acid, 1 $\alpha$  25 dihydroxy vitamin D<sub>3</sub>, cytokine, thrombomodulin

#### Abstract

Inflammatory cytokines released from monocytes and macrophages are considered to play a role in septicemia-related disseminated intravascular coagulation (DIC). Since steroids are known to inhibit release of these cytokines, it was hypothesized that they might allieve the symptoms of septicemia-related DIC. All-trans retinoic acid (ATRA), which is used to differentiate acute promyelocytic leukemia (APL) cells, is also known to increase the expression of thrombomodulin (TM) and decreases that of tissue factor in the endothelial cells as well as in APL cells. ATRA also improves DIC in patients with APL. The interaction between ATRA and the retinoic acid response element (RARE) of the TM gene is suspected to increase the expression of TM. On the other hand, it is also known that the gene for the Vitamin D<sub>3</sub> receptor is similar in structure to that of the retinoic acid receptor. For this reason, it is conceivable that vitamin D<sub>3</sub> might also increase the expression of TM. Moreover, some researchers have reported that Vitamin D<sub>3</sub> reduces the plasma levels of inflammatory cytokines. In this study, we investigated the anticoagulant effects of prednisolone, ATRA, and Vitamin D<sub>3</sub> on the septicemia-related DIC models in rats. Experimental DIC was induced by the administration of lipopolysaccharide (LPS) for 4 hours through the tail vein. Prednisolone was injected subcutaneously immediately before the LPS infusion. ATRA and Vitamin D<sub>3</sub> were orally administered, respectively 7 and 3 days before the LPS infusion. Prednisolone administration allieved the LPS-induced changes in the parameters of hemostasis and organ damage, as well as the increase in plasma IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  levels normally induced by the LPS infusion. Pretreatment with ATRA also allieved the parameters of hemostasis and organ damage. In addition, DIC-associated formation of fibrin thrombi in the renal glomeruli was inhibited, and the intensity of immunoreactive TM in the glomeruli was increased by the administration of ATRA. Administration of vitamin D<sub>3</sub> had similar effects on the parameters of hemostasis, and organ damage, and inhibited the renal thrombi, just as ATRA did. Moreover, the administration of Vitamin D<sub>3</sub> inhibited the increase in plasma levels of inflammatory cytokines induced by the LPS infusion. By contrast, heparin administration showed improvement in the hemostatic changes, organ damage, and renal thrombi, but did not affect TM expression or cytokine release. These observations suggested that the anticoagulant effects of prednisolone, ATRA, and Vitamin D<sub>3</sub> in the experimental DIC model are caused by different mechanisms from the effect of heparin, and that these drugs may be useful in the clinical treatment of DIC.