LPS 刺激によるラット肺胞マクロファージからの TNF α 産生に対する NAC(N-acetylcysteine)の 阻害効果

川口一男・石井芳樹・北村 諭*

The inhibitory effect of N-acetylcysteine(NAC) on TNF α production from rat alveolar macrophages stimulated by lipopolysaccharide(LPS)

Since reactive oxygen intermediates are involved in the producing pathway of cytokines, NAC and glutathione(GSH), anti-oxidants, may inhibit the production of cytokines. We examined the TNF α production from rat alveolar macrophages stimulated by LPS and the effect of NAC and GSH on TNF α production. Alveolar macrophages in BAL fluid were separated from male SD rats and were stimulated with LPS at the concentration of 0.1 to 10 μ g/ml for 6 to 48 hours under the condition of 5% CO₂ at 37°C. TNF α concentration in the culture medium was measured using a mouse TNF α ELISA kit, which crossreacts with rat TNF α . LPS increased TNF α production from alveolar macrophages in dose- and time-dependent manners. NAC(5 mM to 30 mM) and GSH(10 mM to 30 mM) significantly inhibited the TNF α production induced by LPS. These findings suggest that reactive oxygen intermediates play an important role in the LPS-induced signal transduction pathway of cytokine production. NAC is considered to be useful as an anti-inflammatory drug.

Rec. 10/23/1998, Acc. 5/28/1999, pp 203~206

Kazuo Kawaguchi・Yoshiki Ishii・Satoshi Kitamura*

key words : LPS, N-acetylcysteine, glutathione,
reactive oxygen intermediates, TNF α

肺胞マクロファージはエンドトキシンをはじめとするさまざまな刺激によって tumor necrosis factor(TNF) α や interleukin(IL)-8 などのサイトカインを放出して血管透過性の亢進や炎症細胞浸潤などを惹起し、肺での炎症形成において司令塔的役割を演じている。最近、細胞におけるサイトカイン産生刺激伝達経路に転写因子である NF- κ B の活性化が介在し、受容体刺激のセカンドメッセンジャーとして活性酸素が働いていることが示されている^{1,2)}。

N-acetylcysteine(NAC)などの抗酸化剤は、この刺激伝達経路をブロックすることで、TNF α などの炎症性サイトカインの産生を抑制しうる可能性がある。NAC はその構造に SH 基を有し、以前より去痰剤として用いられてきた。近年、その anti-oxidant としての作用が着目され、急性肺損傷の治療薬として臨床的にあるいは実験的に有用性が指摘されているが^{3~5)}、サイトカイン産生抑制作用については十分知られていない。NAC が肺胞マクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制できるか否かを知る目的で lipopolysaccharide(LPS)刺激によるラット肺胞マクロファージからの TNF α 産生能に及ぼす NAC の効果を検討した。また、NAC は、GSH の前駆体として細胞内 GSH を増加させることが報告され

* Department of Pulmonary Medicine, Jichi Medical School 自治医科大学呼吸器内科学教室
Offprint requests to : Kazuo Kawaguchi, Department of Pulmonary Medicine, Jichi Medical School, 3311-1, Yakushiji Minamikawachi, Kawachi, Tochigi, 329-0498 Japan

ており⁶⁾, NAC の作用が細胞内 GSH を増加させ, グルタチオンレドックスサイクルを介して, アンチオキシダントとして働いていることも考えられるため, GSH の効果も検討した.

方 法

体重約 250 g の雄 SD ラットをペントバルビタール (25 mg/kg, ip) で麻酔し, 腹腔内を露出, 腎動脈を切離し十分に脱血後, 気管切開して挿管後に, 生理的食塩水で気管支肺泡洗浄 (BAL) を行った. BAL 液中の肺泡マクロファージを 1200 rpm で 10 分間, 遠心分離し, 沈渣を培養液 RPMI 1640 (streptomycin, penicillin 添加) に浮遊させ, 1×10^6 /ml/well に調整し, 24 穴のマルチプレートにて 5% CO₂, 37°C の条件で 1 時間, 培養を行った. その後, 培養液で 2 回洗浄し, 非付着細胞を除去した.

Diff-Quick 法にて付着細胞を染色し, 肺泡マクロファージが付着細胞の 95% 以上であることを確認した. また, tripanblue dye exclusion 法にて viability が 95% あることを確認した. LPS (E. coli Serotype 0111: Sigma 社) による肺泡マクロファージの TNF α 産生を LPS の濃度 (0.1, 1, 5, 10 μ g/ml) および刺激時間 (6, 12, 24, 48 時間) を変化させ, 検討した.

つぎに種々の濃度の NAC (0.1, 1, 5, 10, 20, 30 mM) または GSH (0.01, 0.1, 1, 10, 20 mM) を pH 7.4 に調節したのち培養液に加え, LPS 1 μ g/ml で刺激し, 5% CO₂, 37°C の条件で 24 時間, 培養したのち, 培養上清をサンプリングし -80°C に凍結保存し, 一括して TNF α を Genzyme 社のマウス ELISA kit で測定した.

NAC による肺泡マクロファージの cytotoxicity の有無を評価するため, LDH の放出を測定した. 各濃度の NAC 溶液中のラット肺泡マクロファージを 24 時間培養し, 上清中の LDH を細胞外 LDH, 上清採取後の各 well に 1% Triton X を加え, 4°C で 1 時間放置したあとの Triton X 溶液中の LDH を細胞内 LDH として, %LDH = 細胞外 LDH / (細胞内 LDH + 細胞外 LDH) $\times$ 100 を計算した.

図 1 LPS 刺激によるラット肺泡マクロファージからの TNF α 産生 LPS の濃度依存性に TNF α 産生の増加を認めた. (* $p < 0.05$ vs. control, $n = 5$)

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表し, 統計的検討は分散分析を行い, 各群間の検定には Fisher の方法または t 検定を用い, $p < 0.05$ を有意とした.

結 果

ラット肺泡マクロファージ 1×10^6 /well を 0.1 から 10 μ g/ml の LPS 濃度で刺激し, 24 時間培養後の TNF α 産生を測定したところ, LPS の濃度依存性に TNF α が増加した (図 1). つぎに LPS 1 μ g/ml でラット肺泡マクロファージを刺激し, 48 時間後まで経時的に TNF α 産生を測定したところ, 24 時間までは, time-dependent に TNF α の増加を認めたが, 24 時間を peak として 48 時間後は TNF α の減少を認めた (図 2).

LPS 単独の TNF α 産生量に対して, NAC は 5 mM から有意に TNF α 産生量を抑制し, 20 mM および 30 mM では著明に抑制した (図 3). 同様に GSH は 10 mM, 20 mM で TNF α 産生を著明に抑制した (図 4).

ラット肺泡マクロファージに対する NAC の細胞毒性の有無を LDH の % release で検討した (図 5). 30 mM までの NAC は LDH の放出を有意に増加させなかったことから, NAC による TNF α 産生抑制は cytotoxicity によるものではないと考えられた.

図2 LPS刺激によるラット肺胞マクロファージからのTNF α 産生の経時的変化
実線: LPS 1 μ g/ml 破線: control (* $p < 0.0001$ vs. control, $n = 5$)

図4 LPS刺激によるラット肺胞マクロファージのTNF α 産生に対するGSHの効果
10 mM以上のGSHはTNF α 産生を有意に減少させた. (* $p < 0.05$ vs. GSH 0 mM, $n = 5$)

図3 LPS刺激によるラット肺胞マクロファージのTNF α 産生に対するNACの効果
5 mM以上のNACはTNF α 産生を有意に減少させた. (* $p < 0.05$ vs. NAC 0 mM, $n = 5$)

図5 NACのラット肺胞マクロファージに対する細胞毒性の有無を検討
30 mMまでのNACは%LDHにおいて、コントロールと有意差を認めなかった. ($n = 5$)

考 察

NACは二硫化物を解離し、喀痰の粘性を下げるとされ、去痰剤として使われてきた。しかし、主な活性は抗酸化作用にあり⁷⁾、含有するSH基による直接作用および、細胞内の強力な抗酸化剤であるGSHの細胞内濃度を増加させることで抗酸化作用を発揮する⁸⁾。

*In vivo*で投与されたNACは細胞内GSHの増加をもたらし、LPSを静脈内投与されたマウスの血清TNF α および脾細胞からのTNF α 産生を抑制した²⁾。筆者らの検討においても、ラット肺

胞マクロファージにおいて5 mM以上のNACおよび10 mM以上のGSHはLPS刺激による肺胞マクロファージからのTNF α 産生を有意に抑制した。

LPS刺激による細胞からのTNF α 産生は転写因子であるNF- κ Bの活性化を介して、核内のTNF α mRNAの発現を惹起することによる⁸⁾。NF- κ Bの構造はI κ B, p50, p65の三つのsubunitから構成され、DNAとの結合を阻止するI κ Bが離脱することで、NF- κ Bは活性化される⁹⁾。過酸化水素、スーパーオキシドなどの活性

酸素は細胞内でNF- κ Bの構造からI κ Bの解放を促すsecond messengerとされ¹⁾, NACのTNF α 産生を抑制する機序は活性酸素によるI κ Bの解放を抑制するためと考えられる。

ラットの肺泡マクロファージにおいて抗酸化剤であるNACおよびGSHはLPSによるTNF α の産生を抑制したことにより, TNF α の産生経路に活性酸素が関与していることが示唆された。NACは細胞内のGSHを増加させることが報告されており, 今回NACにより細胞内GSHが増加したか否かを直接測定していないが, GSHを用いても同様なサイトカイン抑制効果を認めたことから, NACの効果の一部は細胞内GSHの増加によるものと考えられた。

以上の結果より, NACは, アンチオキシダントとして組織障害を軽減するのみでなく, サイトカイン産生抑制作用によって炎症の進行を抑制する可能性が示唆された。

今回の実験ではNACによるサイトカイン産生抑制は5 mM以上を必要としたが, NACの吸入投与であれば到達可能な濃度と思われる。肺胞上皮被覆液は, 高濃度のGSHを含み, 健常人では400~800 μ Mとされ¹⁰⁾, NACの吸入がさらにこの濃度を上昇させることにより, mMのレベルには十分に達すると考えられる。

しかし, 最近サイトカイン産生を抑制しうる濃度のNACは, むしろpro-oxidantとして作用しhydroxyl radicalの産生を増加させ, 細胞内GSHを減少させるとの報告¹¹⁾もあり, 今回用いた実験系においても, 今後これらの点を検討する必要があると思われた。

すでに臨床の場合において, acute lung injury (ALI)の患者にNACを投与し, 罹病期間の短縮³⁾や人工呼吸器の装着期間の減少⁴⁾を認め, 臨床的にも有用性が報告されている。ALIをはじめとする種々の呼吸器疾患において肺泡マクロファージはサイトカイン放出を介して中心的な役割を演じ

ており, NACの吸入投与により, 肺泡マクロファージからのサイトカイン放出を抑制することは有用な治療法となりうるものと考えられる。

文 献

- 1) Schreck R, Rieber P, Baeuerle P: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10: 2247-2258, 1991.
- 2) Peristers P, Clark B, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orecole S, Sironi M, Ghezzi P: N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol* 140: 390-399, 1992.
- 3) Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM, Morris PE, Paz HL, Russel JA, Wright PE: A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in ARDS Study Group. *Chest* 112: 164-172, 1997.
- 4) Suter PM, Domenighetti G, Schaller MD, Laverriere MC, Ritz R, Perret C: N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Chest* 105: 190-194, 1994.
- 5) 石井芳樹, 山沢英明, 北村 諭: 接着分子発現およびサイトカイン産生におけるオキシダントの役割. *日本胸部疾患雑誌* 34(Suppl.): 126-130, 1996.
- 6) Drest E, Lannan S, Bridgeman MM, Brown D, Selby C, Donaidson K, MacNee W: Lack of effect of N-acetylcysteine on the release of oxygen radicals from neutrophils and alveolar macrophages. *Eur Respir J*: 723-729, 1991.
- 7) Moldeus P, Cotgreave IA, Bergren M: Lung protection by a thiol containing antioxidant; N-acetylcysteine: *Respiration* 50: 31-42, 1986.
- 8) Baeuerle PA, Baltimore D, Cohen P, Foulkes JG: Molecular aspects of cellular regulation, hormonal control regulation of gene transcription. Elsevier/North Holland Biomedical Press Amsterdam: 409-432, 1991.
- 9) Baeuerle PA, Baltimore D: I κ B; A specific Inhibitor of the NF- κ B Transcription Factor. *Science* 242: 540-546, 1988.
- 10) Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG: Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 63(1): 152-157, 1987.
- 11) Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AML, Aarsman CJM, Oirschot JFLM, Bruggen T, Asbeck BS: Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1283-1293, 1998.