

### 3-1-5 TNBS 誘発回腸炎における CPI-17 発現と運動機能障害

実際の *in vivo* の腸炎で CPI-17 発現量の低下と運動機能障害が観察されるかを検討するため、TNBS を回腸管腔内に投与し回腸炎を引き起こした。TNBS 処置後 7 日目までの CPI-17 発現量の変化を経時的に測定したところ、3 日目および 5 日目において発現量の低下が認められた (図 23)。その後炎症の回復にともなって、7 日目には元の発現レベルに復帰し、その差は有意なものではなくなった。そこで次に CPI-17 発現量の低下が認められた 3 日目における回腸縦走筋の収縮力を検討したところ、TNBS 誘発回腸炎により carbachol 刺激に対する収縮力が抑制された (図 24A, B)。また高濃度  $K^+$  刺激による収縮力を 100% として算出した carbachol 収縮の相対張力が TNBS によって抑制されたことから、carbachol 収縮に対してより強い抑制作用があることが確認された (図 24C)。また 3 日目の輪層筋方向の carbachol 収縮についても TNBS で抑制された (図 24D)。さらに CPI-17 発現の回復期である 7 日目の収縮力 (縦走筋方向) を検討したところ、収縮力の回復が観察された (図 25)。組織培養系で確認された Rho/ROCKs 系の不全が *in vivo* の腸炎でも観察されるか検討するため、 $\alpha$ -toxin 脱膜化標本作製した。GTP- $\gamma$ S による  $Ca^{2+}$  感受性増加に対する TNBS 誘発腸炎の影響を検討したところ TNBS 処置 3 日目の標本で  $Ca^{2+}$  感受性の増加が抑制されたことから、*in vivo* の腸炎でも Rho/ROCKs 系の不全が収縮力の低下に関与していることが示唆された (図 26)。

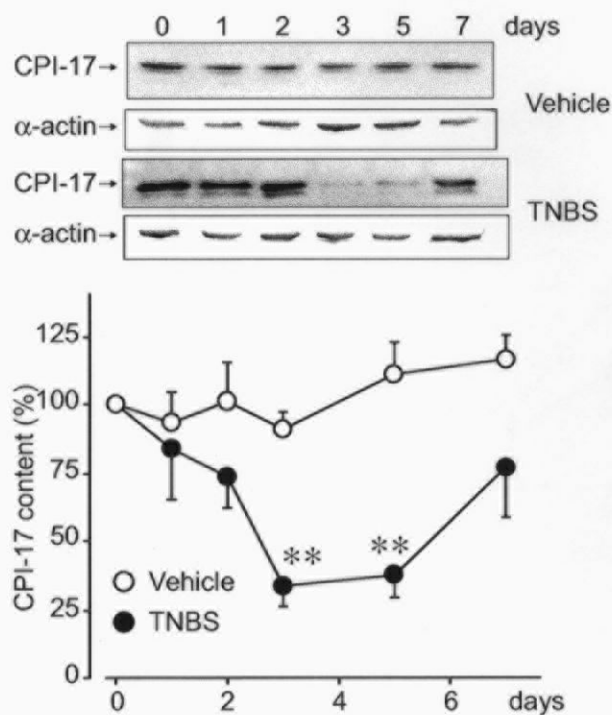


図23 TNBS誘発回腸炎においてもCPI-17発現量の低下が観察される。ラット回腸にTNBSを処置することで回腸炎を引き起こし、CPI-17タンパク質発現量をwestern blotting法で経時的に測定した。定量図は新鮮標本のバンド濃度を100%として、その相対値で表した。n=4-6。\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

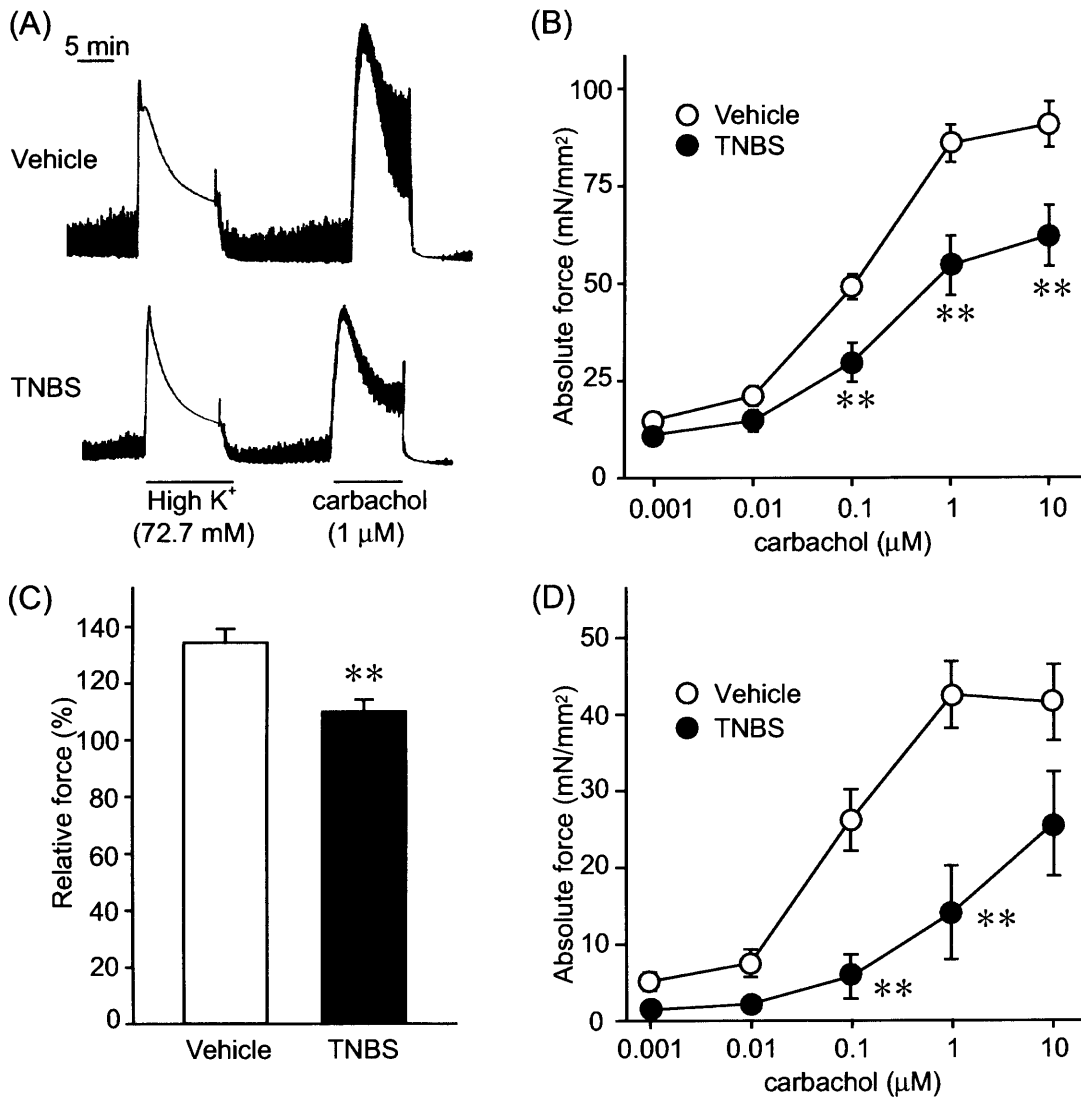


図24 TNBS誘発回腸炎3日目では縦走筋および輪走筋の収縮力が減弱する。ラット回腸にTNBSを処置することで回腸炎を引き起こし、3日目の縦走筋方向および輪走筋方向の収縮力を測定した。(A) High K<sup>+</sup> (72.7 mM) による脱分極収縮および carbachol (1 μM) による縦走筋方向のアゴニスト収縮の典型例。(B) Carbacholを累積投与し、縦走筋方向の絶対張力をmN/mm<sup>2</sup> (cross section area) で表した。(C) 脱分極刺激による収縮力を100%とし、carbachol (1 μM) 刺激による収縮力をその相対張力で表した。(D) TNBS処置後3日目の輪走筋方向の収縮力をcarbacholを累積投与することで測定し、絶対張力をmN/mm<sup>2</sup> (cross section area) で表した。n=6。\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

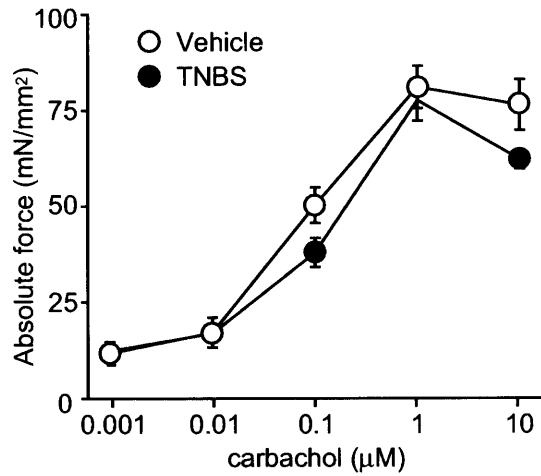


図25 TNBS誘発回腸炎7日目では縦走筋の収縮力が回復している。  
 ラット回腸にTNBSを処置することで回腸炎を引き起こし、7日目の縦層筋方向の収縮力を測定した。Carbacholを累積投与し、絶対張力を $\text{mN/mm}^2$  (cross section area)で表した。n=4。

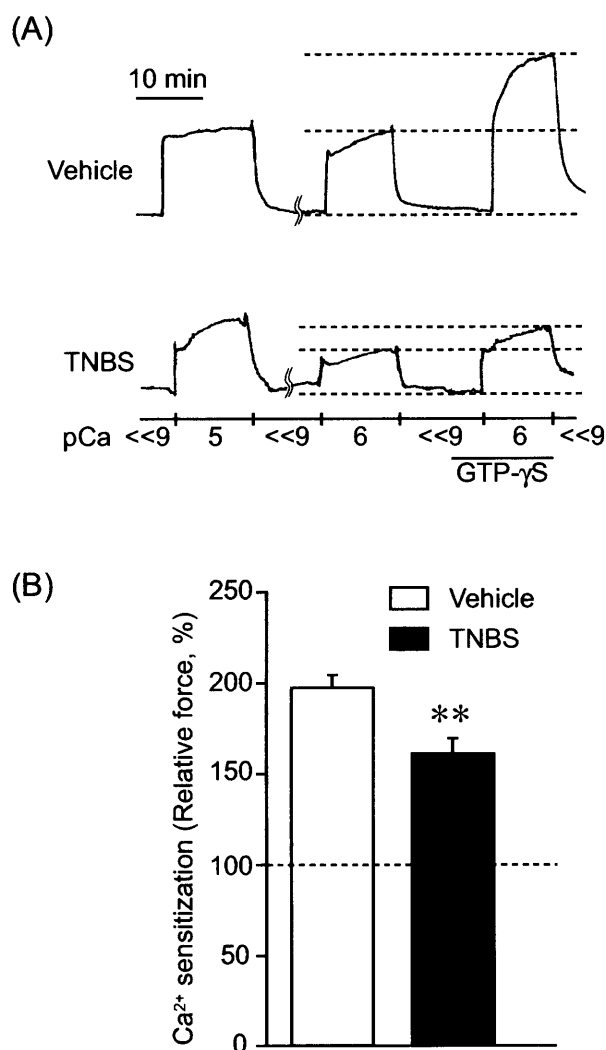


図26 TNBS誘発回腸炎ではRhoA活性化による $\text{Ca}^{2+}$ 感受性の増加が抑制される。ラット回腸にTNBSを処置することで回腸炎を引き起こし、3日目に回腸平滑筋を摘出して $\alpha$ -toxin脱膜化標本を作製した。(A)  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度固定下 (pCa 6) のGTP- $\gamma$ S (100  $\mu$ M) による $\text{Ca}^{2+}$ 感受性増加を測定した際の典型例。(B)  $\text{Ca}^{2+}$ 刺激 (pCa 6) による収縮を100%とし、GTP- $\gamma$ Sによる $\text{Ca}^{2+}$ 感受性増加をその相対張力で表した。n=7。\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

### 3-1-6 IL-1 $\beta$ は TNF- $\alpha$ を介して CPI-17 発現量を抑制する

図 12 に示したように実際の腸炎では IL-1 $\beta$ のほかに様々なサイトカインが産生される。そこで CPI-17 発現量の抑制に不可欠なサイトカインを明らかとするため、各種サイトカインの CPI-17 発現量および収縮力に対する平滑筋組織直接的な作用を検討した。ラット回腸平滑筋組織培養を IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 で 5 日間処置したところ、IL-1 $\beta$ または TNF- $\alpha$ を処置した標本で CPI-17 発現量の低下が認められた(図 27A)。一方で IL-6 または IL-10 を処置した標本では、CPI-17 発現量は変化しなかった。また carbachol (1  $\mu$ M) 刺激による収縮力も IL-1 $\beta$ または TNF- $\alpha$ を処置した標本では低下したが、IL-6 または IL-10 を処置した標本では変化しなかった(図 27B)。さらに IL-1 $\beta$ が IL-6 を介して収縮力を抑制している可能性を除外するため IL-1 $\beta$ と抗 IL-6 中和抗体を同時処置して carbachol (1  $\mu$ M) 刺激による収縮力を検討したところ、IL-1 $\beta$ の収縮作用は抗 IL-6 中和抗体で抑制されなかったことから、IL-1 $\beta$ の収縮抑制作用は IL-6 を介したものではないことが確認された(図 28)。

次に IL-1 $\beta$ と TNF- $\alpha$ のどちらがより CPI-17 発現量の抑制に重要であるか明らかにするため IL-1 $\alpha/\beta$  KO マウスおよび TNF- $\alpha$  KO マウスを用いて検討を行った。野生型の C57BL/6J マウス、IL-1 $\alpha/\beta$  KO マウスおよび TNF- $\alpha$  KO マウスの回腸を摘出し平滑筋組織を 3 日間培養した。C57BL/6J マウスから摘出した組織では IL-1 $\beta$ 処置、TNF- $\alpha$ 処置ともに CPI-17 発現量を低下させた(図 29A)。同様に IL-1 $\alpha/\beta$  KO マウスから摘出した組織でも IL-1 $\beta$ 処置、TNF- $\alpha$ 処置ともに CPI-17 発現量を低下させた。これに対して TNF- $\alpha$  KO マウスから摘出した組織では TNF- $\alpha$ 処置は CPI-17 発現量を低下させたが、IL-1 $\beta$ 処置はこれを変化させなかった。CPI-17 発現量の変化と良く相関して C57BL/6J マウスおよび IL-1 $\alpha/\beta$  KO マウスの組織では IL-1 $\beta$ 処置、TNF- $\alpha$ 処置ともに carbachol (1  $\mu$ M) 刺激による収縮力を低下させた。これに対して、TNF- $\alpha$  KO マウスから摘出した組織では、TNF- $\alpha$  処置は収縮を低下させたが IL-1 $\beta$ 処置はこれを抑制しなかった(図 29B)。さらに回腸平滑筋組織において IL-1 $\beta$ が TNF- $\alpha$ の産生を誘導することを確認するため、

IL-1 $\beta$ を回腸平滑筋組織に処置して培養液中のTNF- $\alpha$ 量をELISAで測定したところ、培養1日目および3日目において有意なTNF- $\alpha$ 産生量の増加が確認された(図30)。以上のことからCPI-17発現抑制において主要な働きをするサイトカインはTNF- $\alpha$ であり、IL-1 $\beta$ はTNF- $\alpha$ を介してCPI-17発現量を低下させていたことが明らかとなった。

次にIL-1 $\alpha/\beta$  KOマウスおよびTNF- $\alpha$  KOマウスに腸炎を引き起こすことで、*in vivo*の炎症におけるCPI-17発現量低下に対する両サイトカインの重要性を検討した。まずC57BL/6Jマウス、IL-1 $\alpha/\beta$  KOマウスおよびTNF- $\alpha$  KOマウスの回腸にTNBSを処置することで回腸炎を起こし、3日目の回腸平滑筋組織におけるIL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ のmRNA発現量の変化を検討した(図31)。炎症時にはIL-1 $\alpha/\beta$  KOマウスでTNF- $\alpha$  mRNA発現が、TNF- $\alpha$  KOマウスでIL-1 $\alpha$ およびIL-1 $\beta$  mRNA発現が上昇することが確認された。次にCPI-17発現量を検討したところ、C57BL/6JマウスおよびIL-1 $\alpha/\beta$  KOマウスにおいてTNBS誘発回腸炎によるCPI-17発現量の低下が観察されたのに対して、TNF- $\alpha$  KOマウスでは発現量は変化しなかった(図32)。この時CPI-17発現量の低下はC57BL/6JマウスよりもIL-1 $\alpha/\beta$  KOマウスにおいて強く現れた。さらにIL-1 $\alpha/\beta$  KOマウスおよびTNF- $\alpha$  KOマウスの回腸収縮力に対するTNBS誘発腸炎の影響を検討したところ、IL-1 $\alpha/\beta$  KOマウスではcarbachol収縮の顕著な低下が観察されたのに対して、TNF- $\alpha$  KOマウスでは腸炎を引き起こしてもcarbachol収縮は変化しなかった(図33)。以上のことから*in vivo*の腸炎においてもTNF- $\alpha$ は炎症時のCPI-17発現抑制に必須の因子であることが明らかとなった。またDSS誘発結腸炎モデルを用いた検討からIL-1 $\alpha/\beta$  KOマウスでは野生型のC57BL/6Jよりも腸炎による生存率が低く、より炎症の度合いが強いことが示唆された(図34)。

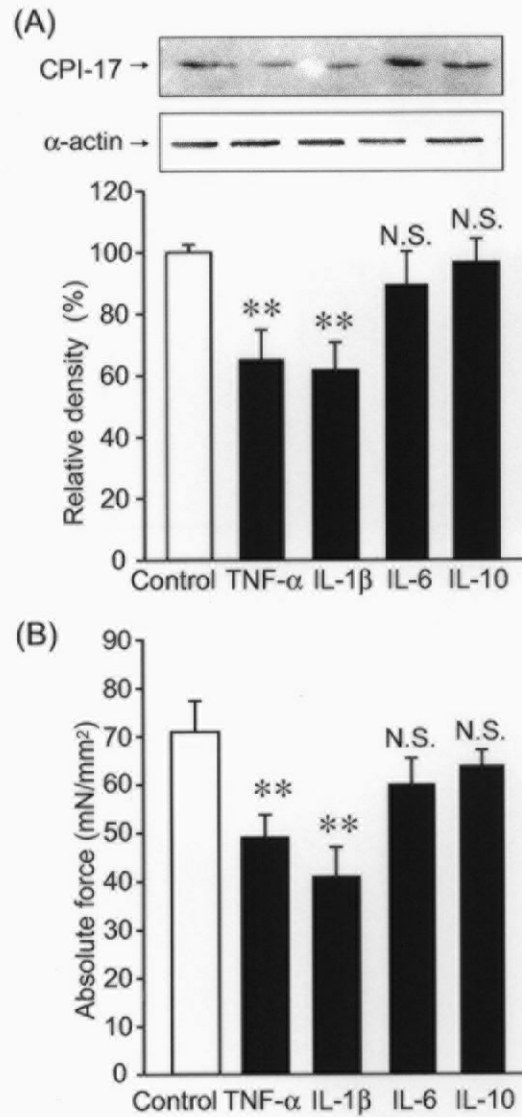


図27 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ は回腸平滑筋のCPI-17タンパク質発現および収縮力を抑制する。ラット回腸平滑筋組織を非処置またはTNF- $\alpha$  (20 ng/ml)、IL-1 $\beta$  (10 ng/ml)、IL-6 (10 ng/ml)、IL-10 (10 ng/ml) 処置で5日間培養したのち、(A) CPI-17発現量および(B) carbachol (1  $\mu$ M) 刺激による収縮力を測定した。n=5。\*\*: p<0.01、N.S.: 有意差なし (対照との比較)。



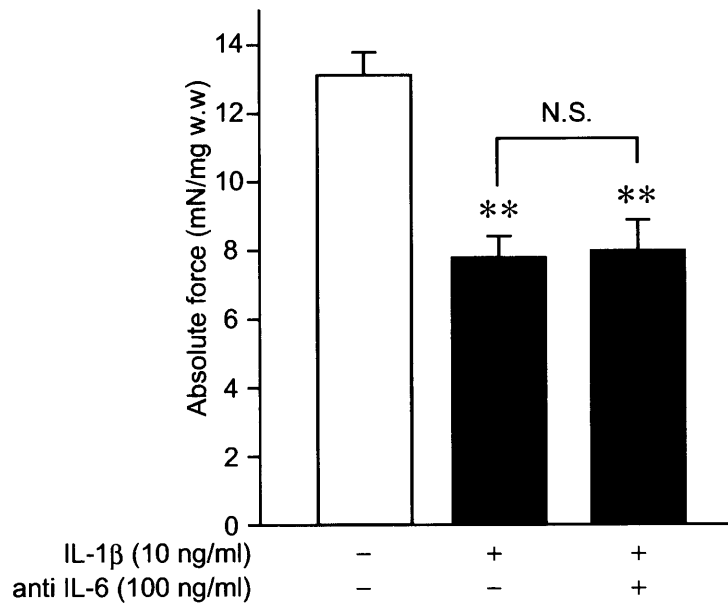


図28 IL-6の中和抗体はIL-1 $\beta$ による回腸平滑筋の収縮力抑制に影響しない。ラット回腸平滑筋組織を非処置またはIL-1 $\beta$  (10 ng/ml)、IL-1 $\beta$ と抗IL-6抗体 (100 ng/ml)の同時処置で5日間培養したのち、carbachol (1  $\mu$ M) 刺激による収縮力を測定した。n=7-24。\*\*: p<0.01 (対照との比較)、N.S.: 有意差なし。

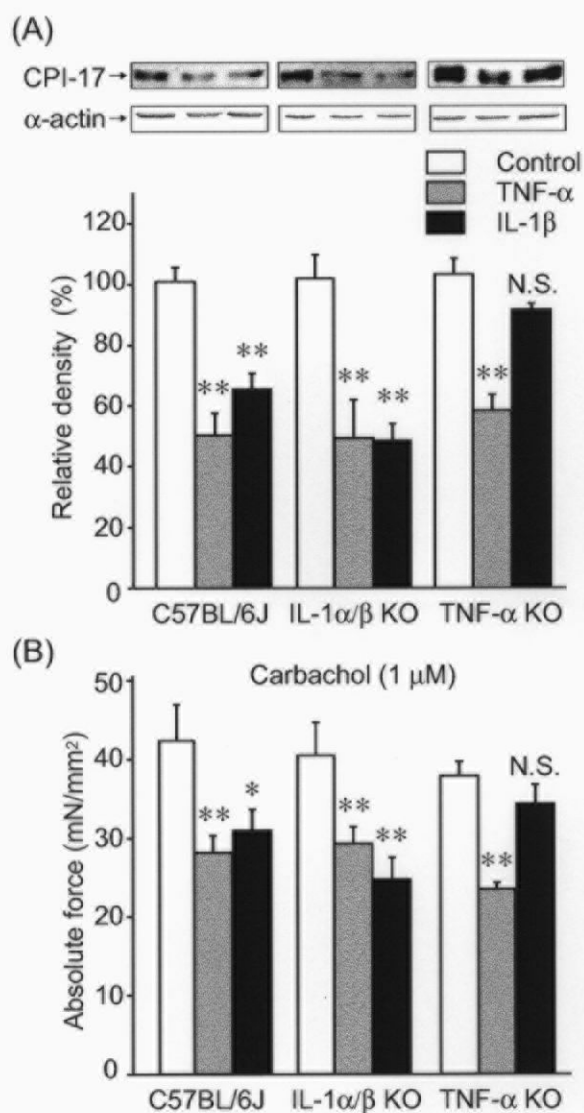


図29 IL-1 $\beta$ はTNF- $\alpha$ を介してCPI-17発現および収縮力を抑制する。  
 野生型のC57BL/6J、IL-1 $\alpha/\beta$  KO、TNF- $\alpha$  KOマウスの回腸平滑筋組織をTNF- $\alpha$  (20 ng/ml) またはIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 処置・非処置で3日間培養し、(A) CPI-17タンパク質発現量および (B) carbachol (1  $\mu$ M) 刺激による収縮力を測定した。  
 n=4-10。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01、N.S.: 有意差なし (対照との比較)。

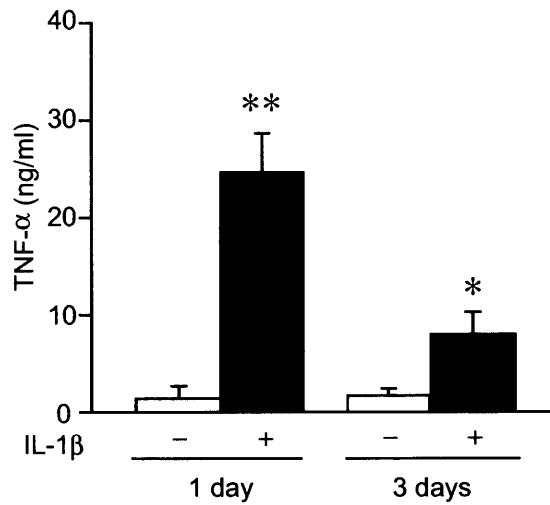


図30 回腸平滑筋組織にIL-1 $\beta$ を処置するとTNF- $\alpha$ の産生が誘導される。マウス回腸平滑筋組織をIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 処置・非処置で1日または3日間培養し、培養上清中のTNF- $\alpha$ 量をELISA法で測定した。n=4。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

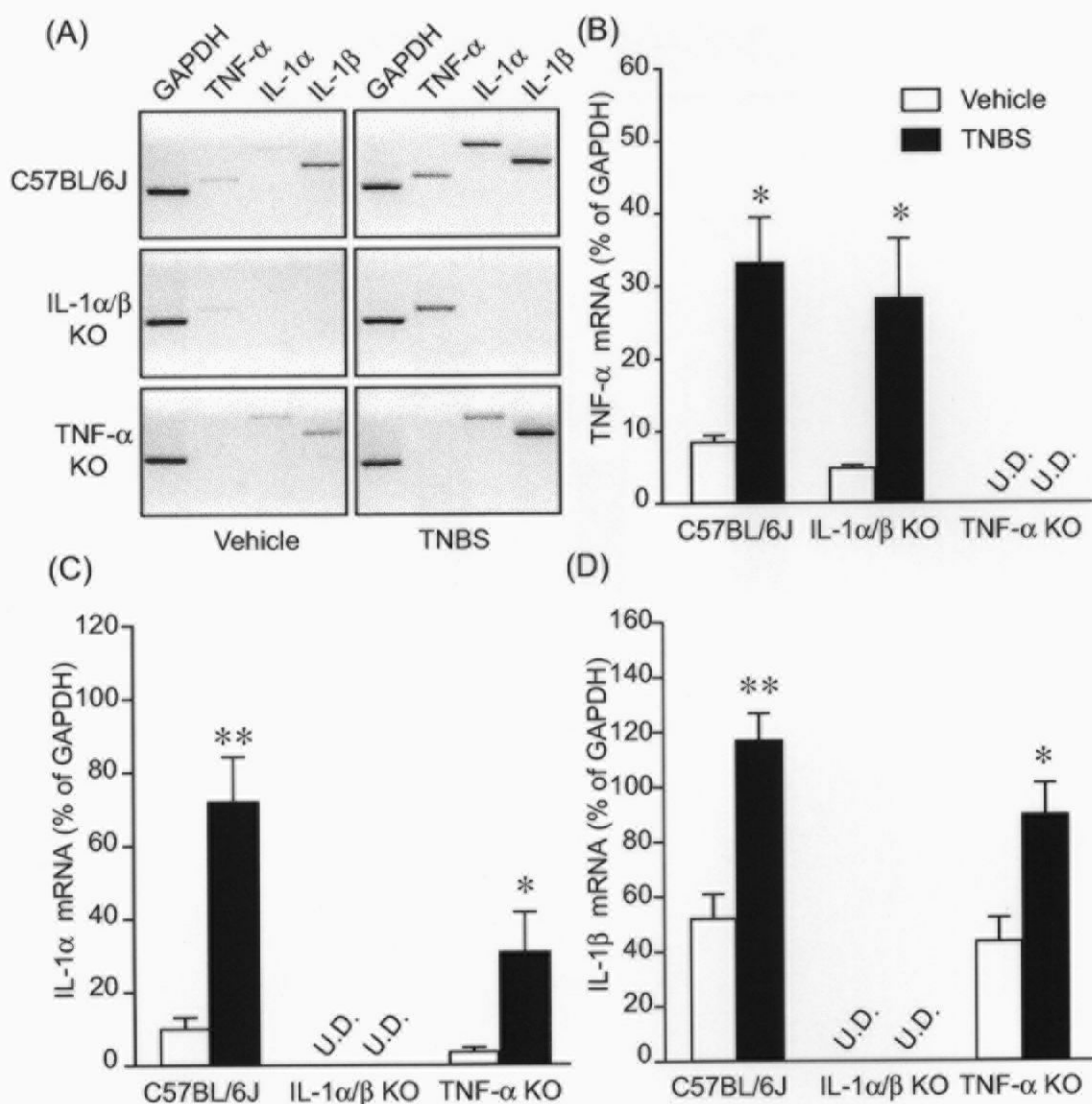


図31 IL-1α/β KOマウスではTNBS誘発回腸炎の回腸平滑筋組織においてTNF-α mRNA発現量が上昇する。

野生型のC57BL/6J、IL-1α/β KO、TNF-α KOマウスの回腸にTNBSを処置し回腸炎を引き起こした。2日目に回腸平滑筋組織を摘出し、RT-PCR法でmRNA発現量を測定した。(A)各種サイトカインmRNAバンドの典型例。GAPDHのバンド濃度を100%として(B)TNF-α、(C)IL-1α、(D)IL-1βのバンド濃度をその相対値で表した。

n=10。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01(対照との比較)、U.D.: 検出不能。

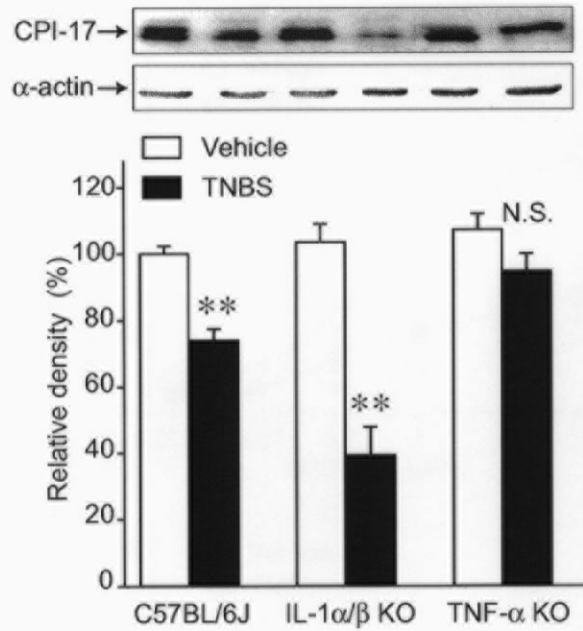


図32 TNF- $\alpha$  KOマウスではTNBS誘発回腸炎によるCPI-17発現量低下が生じない。野生型のC57BL/6J、IL-1 $\alpha$ / $\beta$  KO、TNF- $\alpha$  KOマウスの回腸にTNBSを処置し回腸炎を引き起こした。3日目に回腸平滑筋組織を摘出し、CPI-17タンパク質発現量をwestern blotting法で測定した。n=4-8。\*\*: p<0.01、N.S.: 有意差なし (対照との比較)。

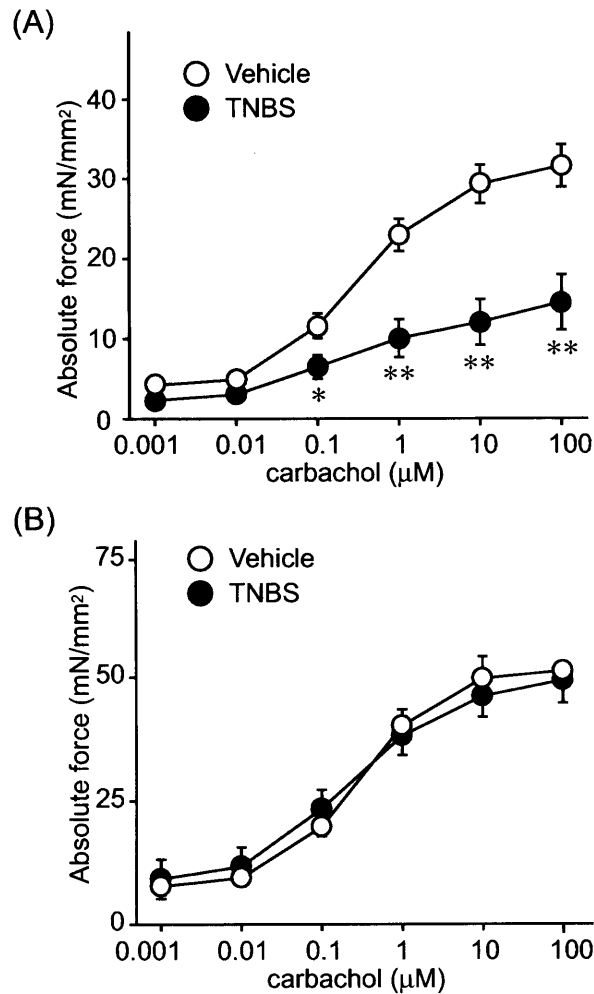


図33 TNF- $\alpha$  KOマウスではTNBS誘発回腸炎による収縮力低下が生じない。  
 (A) IL-1 $\alpha$ / $\beta$  KOおよび (B) TNF- $\alpha$  KOマウスの回腸にTNBSを処置し、回腸炎を引き起こした。3日目に回腸平滑筋組織を摘出し、carbachol累積投与による縦走筋方向の収縮力を測定した。n=4。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

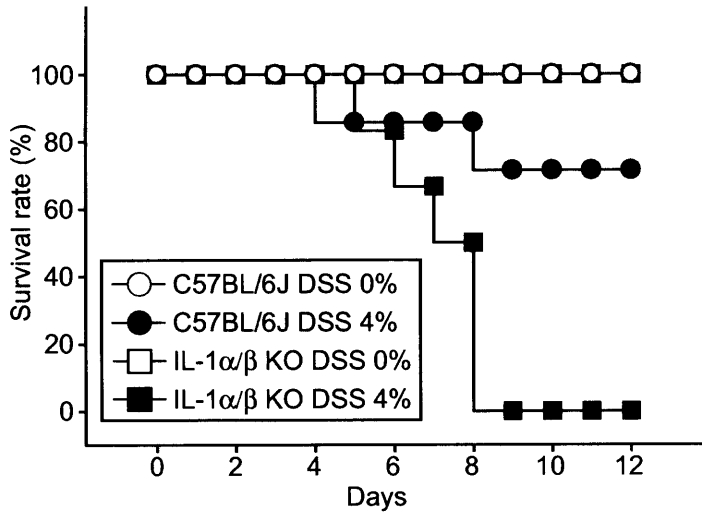


図34 IL-1α/β KOマウスではDSS誘発結腸炎による生存率が低下する。  
 野生型のC57BL/6JとIL-1α/β KOマウスにDWもしくは4% DSSを混合したDWを5日間自由飲水で与えた後、7日間DWを飲水させることで結腸炎を引き起こし、その間の生存率を測定した。n=4-10。

#### 3-1-7 慢性腸炎モデルにおける CPI-17 発現抑制と運動機能障害

慢性腸炎時に CPI-17 発現量および収縮力の低下が観察されるか検討するため、自然発症結腸炎モデル動物である IL-10 KO マウスを使用した。IL-10 KO マウスでは 12 週齢前後から徐々に結腸炎を発症し、図 35 に示すように粘膜層および平滑筋層の肥厚、炎症性細胞の浸潤などが観察される。20 週齢前後で結腸を摘出し、単位長さあたりの重量を検討したところ、図 35 のように IL-10 KO マウスで重量の増加が観察された。次に結腸平滑筋組織における CPI-17 発現量を検討したところ、IL-10 KO マウスの炎症部で顕著な発現低下が観察された(図 36)。さらに carbachol 刺激に対する収縮力の低下と、高濃度  $K^+$  収縮にくらべて carbachol 収縮が強く抑制されることが確認された(図 36B, C)。最後に carbachol (1  $\mu$ M) を 30 秒間刺激することによる MLC リン酸化量を検討したところ、IL-10 KO マウスでは対照の Balb/c マウスに比べて MLC リン酸化量の増加が抑制されていた(図 37)。以上の成績から慢性腸炎においても CPI-17 発現量の低下が引き起こされ、これが運動機能障害に寄与している可能性が示唆された。



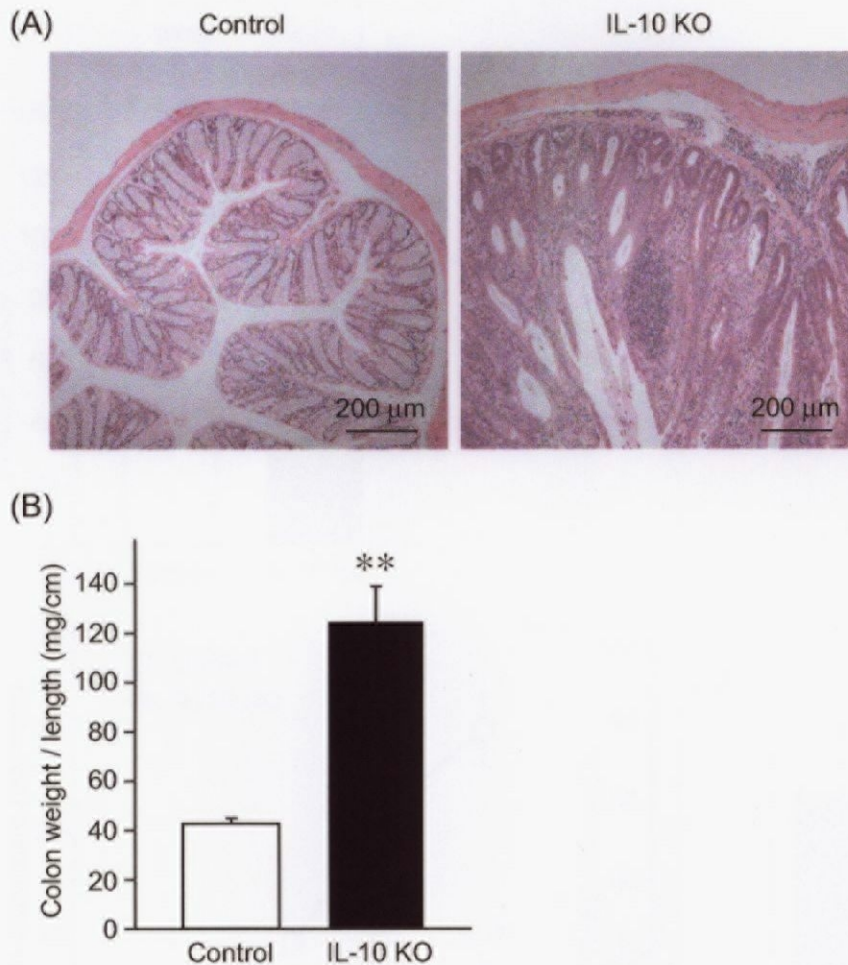


図35 自然発症慢性結腸炎モデルIL-10 KOマウスの結腸炎症部では顕著な炎症像が認められる。

(A) 自然発症慢性結腸炎モデルIL-10 KOマウスおよび対照としてのBalb/cマウスの組織像。(B) 単位長さあたりの結腸重量。n=4-7。\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

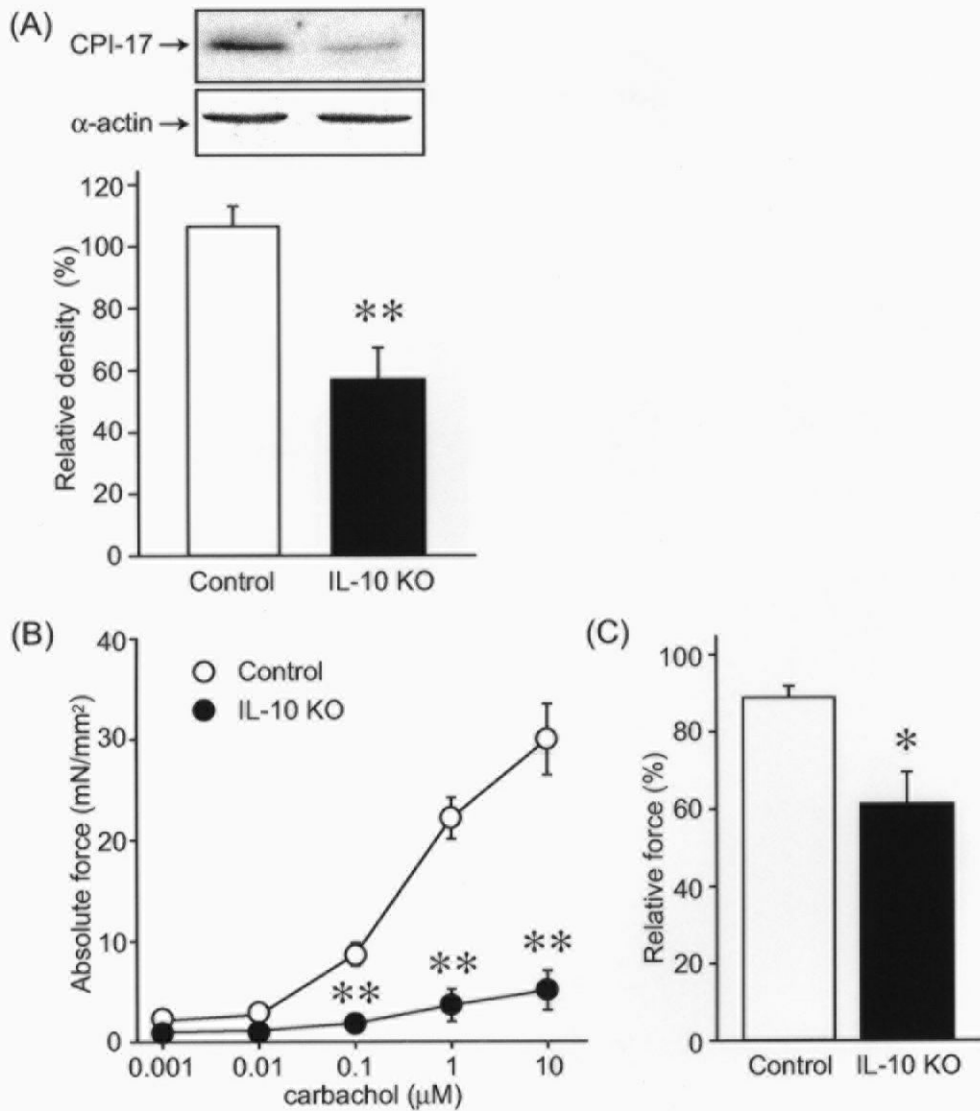


図36 慢性結腸炎モデルIL-10 KOマウスの結腸炎症部ではCPI-17発現量および収縮力の低下が生じる。

慢性結腸炎自然発症モデルのIL-10 KOマウスおよび対照としてのBalb/cマウスの結腸平滑筋組織を摘出した。(A) CPI-17タンパク質発現量および (B) carbachol累積投与による収縮力を測定した。(C) High K<sup>+</sup> (72.7 mM) 刺激による収縮力を100%とし、carbachol (1  $\mu$ M) 刺激による収縮量をその相対値で表した。n=6。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

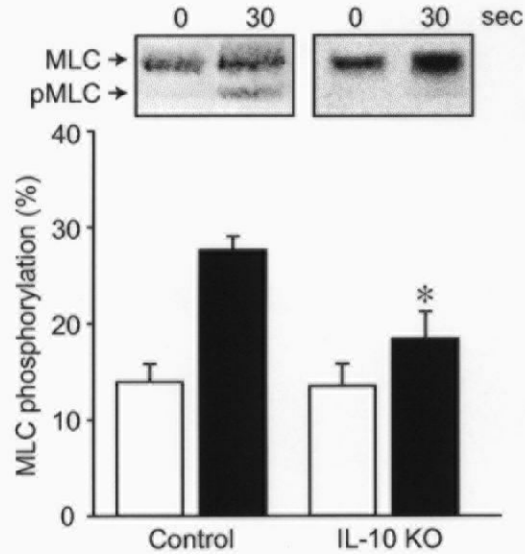


図37 自然発症慢性結腸炎モデルIL-10 KOマウスの結腸炎症部ではcarbachol刺激によるMLCのリン酸化レベルが低下している。  
 自然発症慢性結腸炎モデルのIL-10 KOマウスおよび対照としてのBalb/cマウスの結腸平滑筋組織を摘出し、carbachol (1  $\mu$ M) で30秒間刺激した際のMLCリン酸化レベルを測定した。MLCリン酸化量は全体のMLCのバンド濃度を100%として、リン酸化バンド濃度をその相対値で表した。n=6-7。\*: p<0.05 (対照のcarbachol 30秒間刺激との比較)。

### 3-2 IL-1 $\beta$ の平滑筋増殖に対する作用

#### 3-2-1 *in vivo* の腸炎モデルにおける平滑筋細胞の増殖

腸炎時にはしばしば平滑筋層の肥厚が観察され、運動機能障害の一因となっている。そこでまず腸炎時に平滑筋細胞が増殖することを確認するため、TNBS誘発回腸炎においてPCNA免疫染色を行った。図38に示したとおりVehicle処置の対照標本では平滑筋層のPCNA陽性細胞はほとんど観察されなかったのに対して、TNBS処置2日目の標本では多くの細胞がPCNA陽性であったことから、腸炎によって平滑筋細胞の増殖が引き起こされることが確認された。

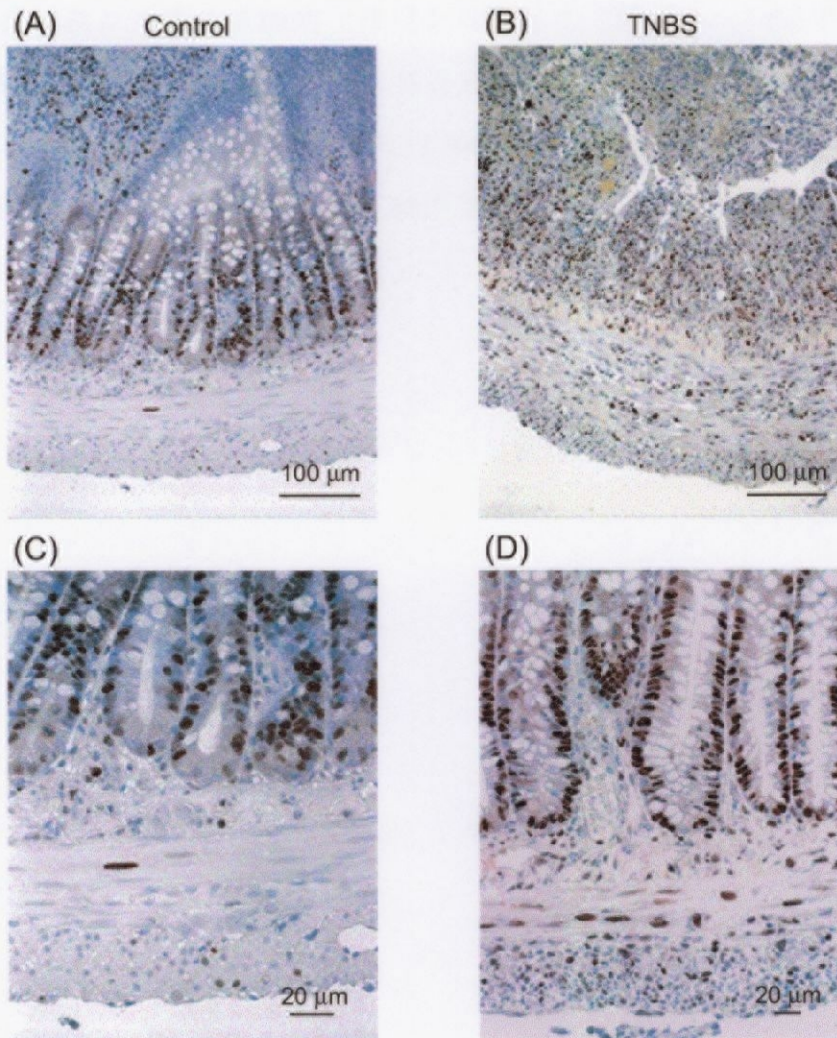


図38 TNBS誘発回腸炎の平滑筋層では平滑筋細胞の増殖が認められる。ラット回腸にTNBSを処置することで回腸炎を引き起こし、PCNA免疫染色法により平滑筋細胞の増殖を検討した。茶色の核がPCNA陽性を示す。(A, C) Vehicleおよび(B, D) TNBS処置標本。n=3。

#### 3-2-2 回腸平滑筋細胞に対する IL-1 $\beta$ の増殖促進作用

緒言で記したとおり IL-1 $\beta$ は平滑筋細胞を含む様々な細胞に対して増殖活性作用を示す。そこでまずラット回腸平滑筋細胞単離培養系を用いて、IL-1 $\beta$ の消化管平滑筋細胞に対する直接的な作用を検討した(図 39)。回腸平滑筋細胞を1% FBS 含有 DMEM で培養すると5日目までに約50%の増殖率を示した。一方IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) を加えて培養すると約300%の増殖率を示したことから、IL-1 $\beta$  はラット回腸平滑筋細胞に対して直接作用し、その細胞増殖を促すことが明らかとなった。

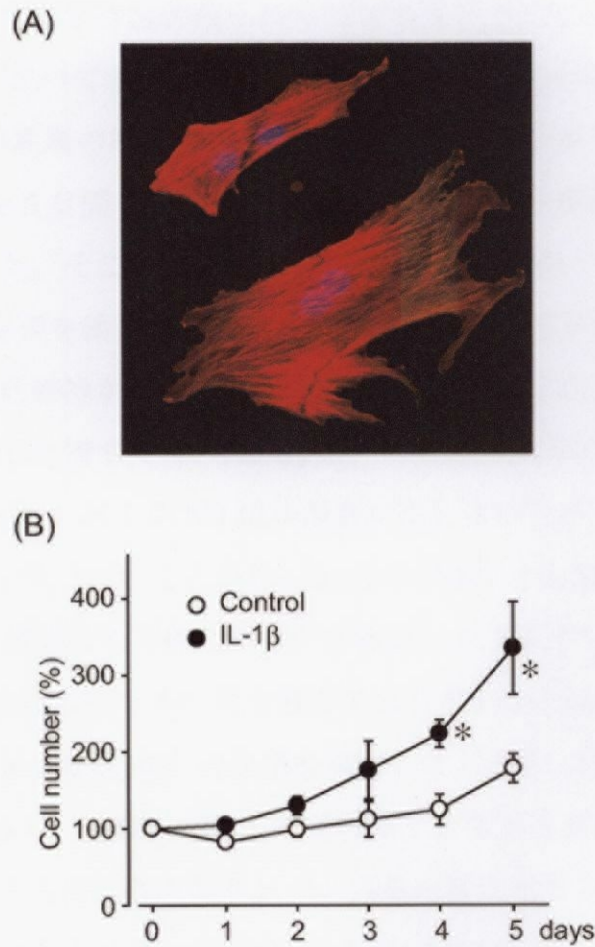


図39 IL-1 $\beta$ はラット回腸平滑筋単離培養細胞の増殖を誘導する。  
ラット回腸平滑筋単離培養細胞を作製し、1% FBS存在下でIL-1 $\beta$  (1 ng/ml) 処置および非処置で培養を行った。(A)  $\alpha$ -actin免疫染色法によって平滑筋細胞の単離を確認した。(B) 継代を行った時点(0日目)の細胞数を100%として、培養5日目までの細胞数をその相対値で表した。n=3。\*: p<0.05 (対照との比較)。

3-2-3 回腸平滑筋組織に対する IL-1 $\beta$ の増殖抑制作用

次に、より生体に近い環境下での IL-1 $\beta$ の回腸平滑筋細胞に対する作用を明らかにするため、ラット回腸平滑筋組織培養系を用いた検討を行った。炎症時の細胞増殖を再現するため平滑筋組織を 10% FBS 処置下で 3 日間培養したところ、FBS 非処置の組織に比べて単位面積あたりの平滑筋細胞数の増加が観察された (図 40)。一方で平滑筋層の厚さには FBS 処置・非処置で差が見られなかった。予想に反して IL-1 $\beta$ を 3 日間 FBS と同時に処置すると、単位面積辺りの平滑筋細胞数の増加を抑制した。そこで次に PCNA 免疫染色法を用いて、平滑筋細胞増殖に対する IL-1 $\beta$ の作用を検討した (図 41)。10% FBS 処置下で 3 日間培養した標本では多くの平滑筋細胞が PCNA 陽性となったのに対して、IL-1 $\beta$ と FBS を同時処置し 3 日間培養した標本では、PCNA 陽性細胞数が顕著に抑制されていた。

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) および NO は平滑筋細胞を含めた多くの細胞で増殖抑制作用を示す (143, 170, 262) ことから、IL-1 $\beta$ が回腸平滑筋組織において PGE<sub>2</sub> および NO の産生を誘導する可能性について検討した。まず PGs 産生酵素である cyclooxygenase-2 (COX-2) と NO 産生酵素である NO synthase (NOS) の mRNA 発現量に対する IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) の作用を検討したところ、COX-2 mRNA の発現は IL-1 $\beta$ 処置 1 日目で、iNOS mRNA の発現は 1 日目と 3 日目において増加した (図 42A, B)。そこで次に各々のタンパク質発現量に対する IL-1 $\beta$ の作用を検討したところ、培養 3 日目において COX-2 および iNOS タンパク質発現量の上昇が確認された (図 42C, D)。さらにラット回腸平滑筋組織を IL-1 $\beta$ で 3 日間処置した際の培養液中の PGE<sub>2</sub> および NO 量を測定したところ、PGE<sub>2</sub> および NO 産生量の顕著な増加が確認された (図 43)。そこで IL-1 $\beta$ 、PGE<sub>2</sub>、NO が回腸平滑筋組織において平滑筋細胞の増殖を抑制することを確認するため、BrdU 免疫染色を行った (図 44)。10% FBS 処置下で回腸平滑筋組織を 3 日間培養したところ、無血清培地で培養した標本に比べて顕著に BrdU 陽性細胞数が増加した。IL-1 $\beta$ 、PGE<sub>2</sub> および NO ドナーはこの FBS による平滑筋細胞増殖作用を抑制した。また無血清培地で培養した標本よりも IL-1 $\beta$ 単独処置で培養した標本で BrdU 陽性細



胞数が少なかった。LPS を消化管平滑筋層に処置すると常在型マクロファージにおいて COX-2 および iNOS の発現を誘導する (87) ことから、最後に PGE<sub>2</sub> および NO の産生部位を検討するため常在型マクロファージのマーカーである ED2 と COX-2 および iNOS の二重免疫染色を行った (図 45)。10% FBS で 1 日間培養した標本では、COX-2 および iNOS の発現はほとんど認められなかったが、10% FBS に IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) を加えた標本では主に ED2 陽性の常在型マクロファージにおいて COX-2 および iNOS の発現が確認された。以上のことから IL-1 $\beta$  は消化管平滑筋細胞に直接作用して増殖を促進するが、組織レベルでは常在型マクロファージの COX-2 および iNOS 発現誘導を介して PGE<sub>2</sub> および NO の産生を誘導し、これによって平滑筋細胞の増殖が抑制されることが示された。

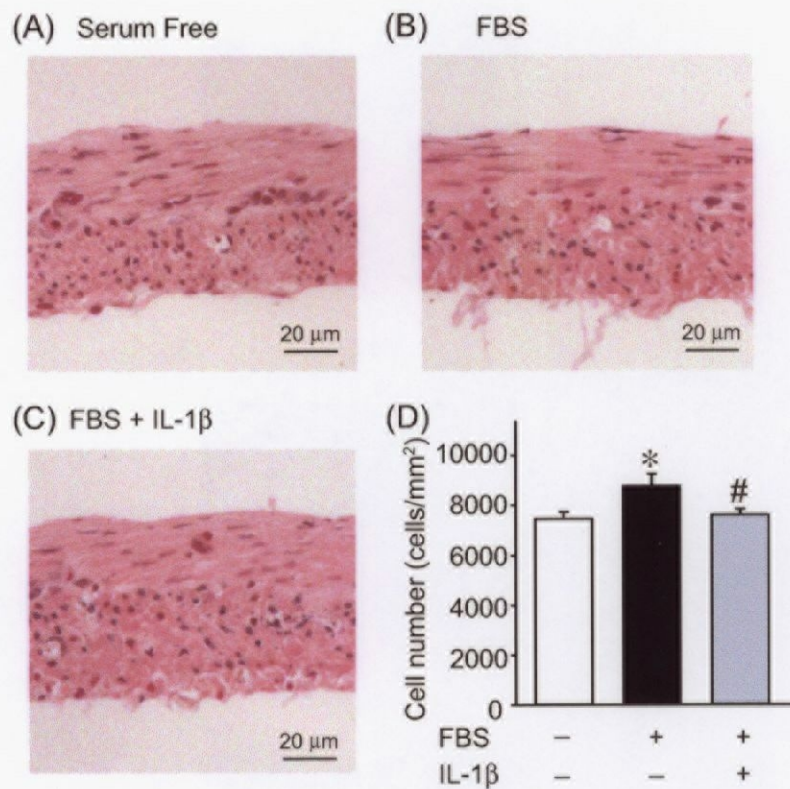


図40 組織培養においてIL-1βはFBSによる平滑筋細胞数増加を抑制する。  
 ラット回腸平滑筋組織培養において (A) 無血清、(B) 10% FBS、(C) 10% FBSとIL-1β  
 (10 ng/ml) の同時処置で3日間培養したのち、HE染色を行った。(D) 単位面積あたりの  
 平滑筋細胞数を表した。n=6-8。\*: p<0.05 (無血清との比較)、#: p<0.05 (10% FBSとの  
 比較)。

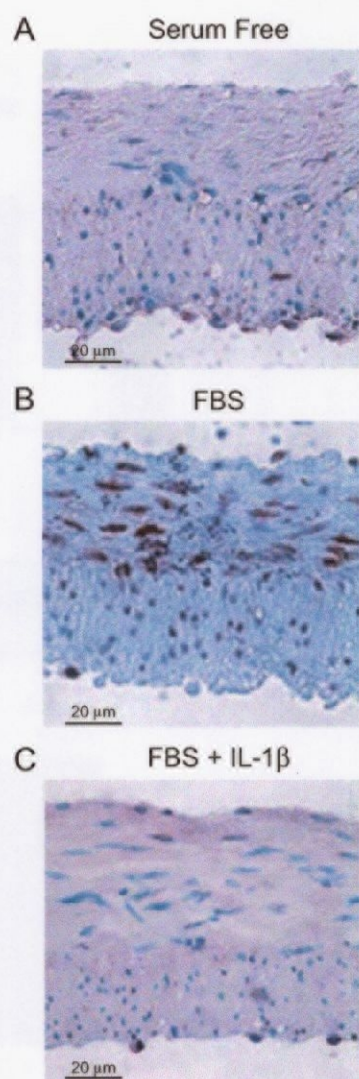


図41 FBS処置によるPCNA陽性細胞の増加はIL-1 $\beta$ によって抑制される。  
ラット回腸平滑筋組織培養において (A) 無血清、(B) 10% FBS、(C) 10% FBSとIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) の同時処置で3日間培養後、PCNA免疫染色を行った。茶色の核がPCNA陽性を示す。n=4-6。

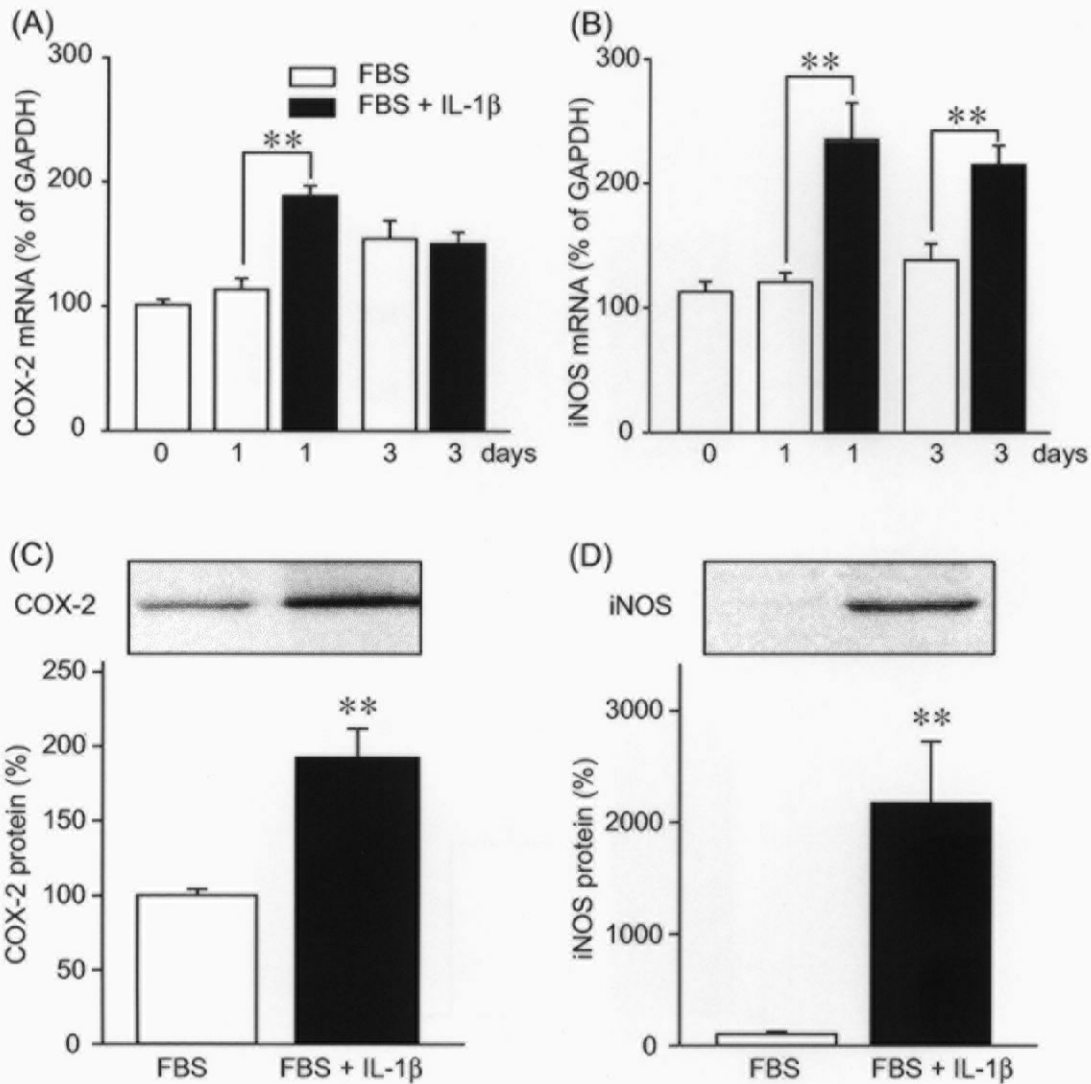


図42 IL-1βはCOX-2およびiNOSの発現を誘導する。  
 ラット回腸平滑筋組織培養において10% FBS存在下でIL-1β (10 ng/ml) 処置・非処置で培養を行った。培養0、1、3日目の (A) COX-2および(B) iNOSのmRNA発現量をRT-PCR法で測定した。定量図はGAPDHのバンド濃度を100%として、その相対値で表した。培養3日目の (C) COX-2、(D) iNOSのタンパク質発現量をwestern blotting法で測定した。定量図は10% FBS処置標本のバンド濃度を100%として、その相対値で表した。n=4-5。\*\*: p<0.01 (対照との比較)。

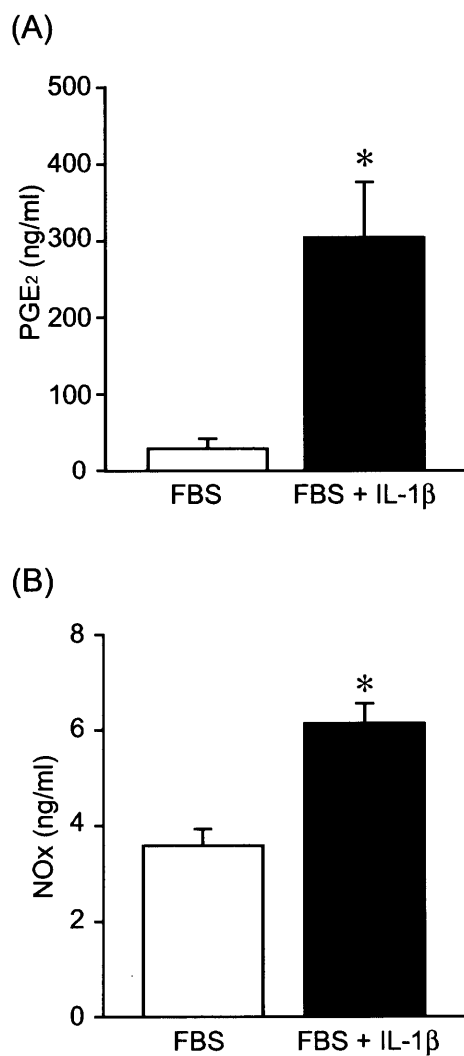


図43 IL-1 $\beta$ はPGE<sub>2</sub>、NOの産生を誘導する。

ラット回腸平滑筋組織培養において10% FBS存在下でIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 処置・非処置で3日間培養を行った。上清中の (A) PGE<sub>2</sub>をELISA法で、(B) NOx量をGriess法で測定した。n=4。\*: p<0.05 (対照との比較)。

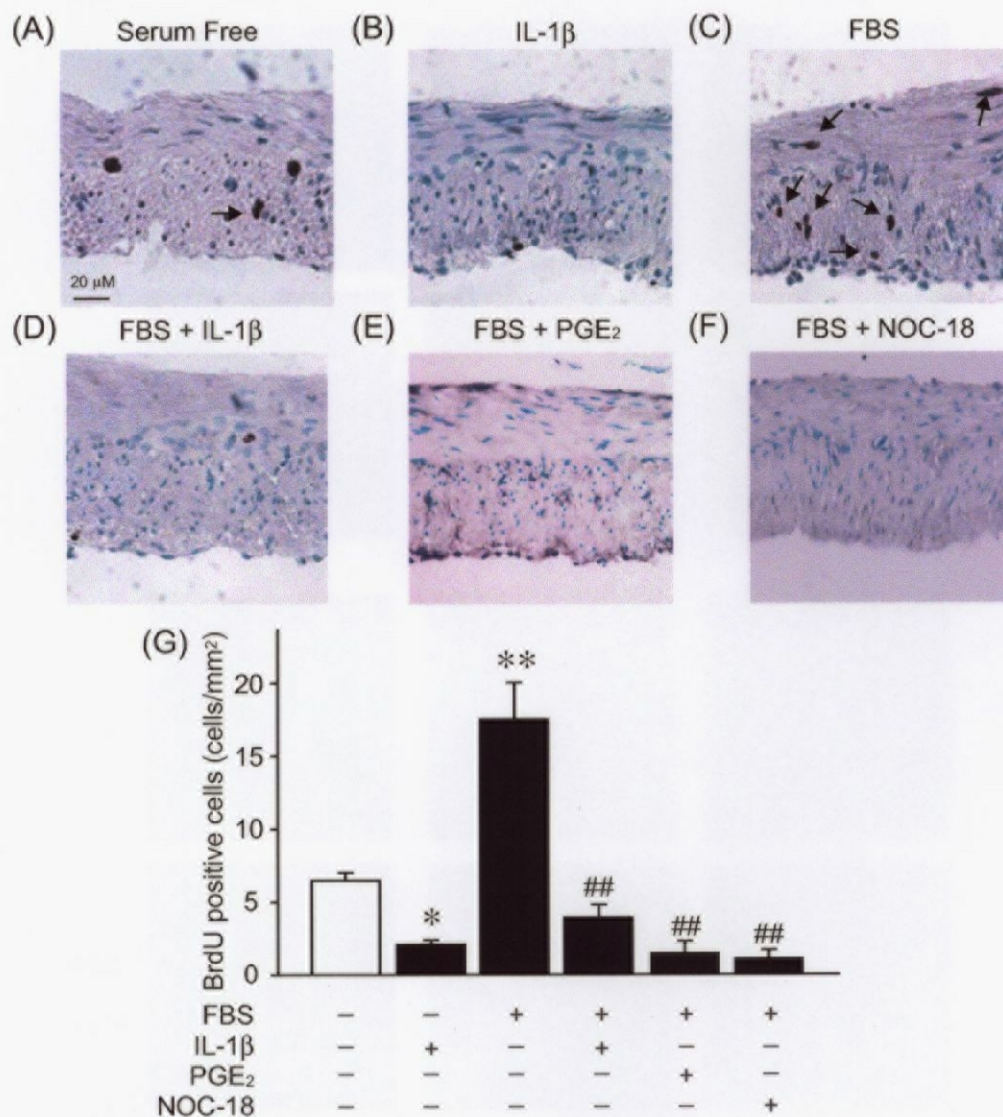


図44 PGE<sub>2</sub>およびNOはラット回腸平滑筋細胞の増殖を誘導する。ラット回腸平滑筋組織を10% FBS処置・非処置下でIL-1β (10 ng/ml)、PGE<sub>2</sub> (1 μM) およびNOC-18 (1 mM) を処置して培養を行った。(A-F) BrdU免疫染色の典型例。茶色の核がPCNA陽性を示す。(G) 単位面積辺りのBrdU陽性細胞数。n=4-6。\*: p<0.05、\*\*: p<0.01 (対照との比較)、##: p<0.01 (10% FBS処置との比較)。

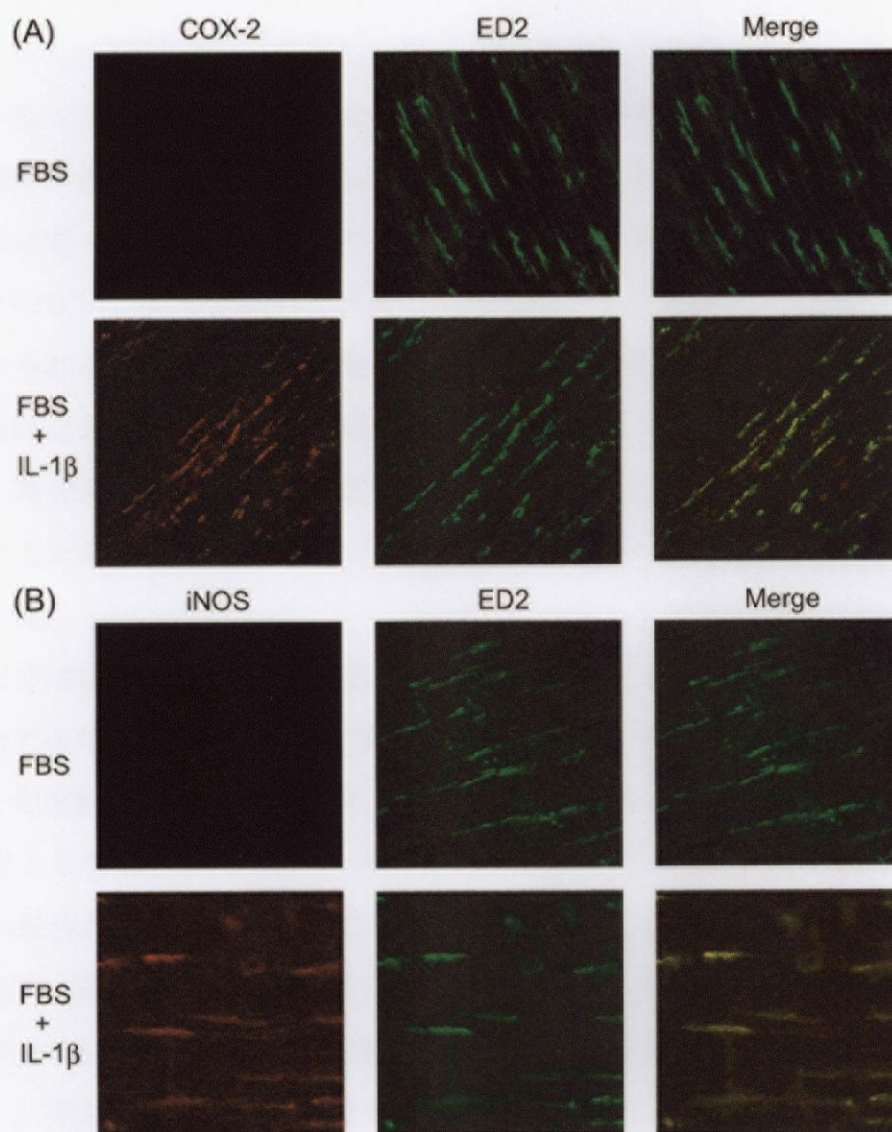


図45 IL-1 $\beta$ は常在型マクロファージのCOX-2、iNOS発現を誘導する。  
 ラット回腸平滑筋組織培養において10% FBS存在下でIL-1 $\beta$  (10 ng/ml) 処置・非処置  
 で24時間培養を行った。ホルマリン標本を作製し、ED2 (常在型マクロファージ)  
 と (A) COX-2、(B) iNOSの二重免疫染色を行った。n=4。