



## Sexual dimorphism in endotoxin susceptibility after partial hepatectomy in rats

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 稲葉, 圭介 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/288">http://hdl.handle.net/10271/288</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 5 8 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	稲 葉 圭 介		
論文題目	Sexual dimorphism in endotoxin susceptibility after partial hepatectomy in rats (ラットを用いた肝部分切除後のエンドトキシン感受性に関する性 差の検討)		

博士(医学) 稲 葉 圭 介

## 論文題目

Sexual dimorphism in endotoxin susceptibility after partial hepatectomy in rats

(ラットを用いた肝部分切除後のエンドトキシン感受性に関する性差の検討)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

周術期管理の進歩した現在でも、感染症に起因する肝切除術後早期の肝不全は重篤な致死合併症であり、治療に難渋することが多い。最近、様々な疾患における医学的な性差についての関心が高まっており、集中治療を要した敗血症症例では、男性患者に比べ女性患者において炎症性サイトカイン産生が軽微で、治療経過が良好であったと報告された。また、動物を用いた各種のショックモデルの結果でも、肝機能、心機能や免疫機能の評価で雌性動物の優位性が示されている。しかし、現在までに肝切除後のエンドトキシン血症による肝傷害進展の病態を性差に着目して行った研究はない。本研究では、肝切除後のエンドトキシン血症に起因する肝傷害の進展に性差による違いを明らかにするため、性ホルモン、特にエストロゲンの影響について動物モデルを用いて検討した。

### 〔材料ならびに方法〕

性成熟した14～15週齢、雄性および雌性のSprague-Dawleyラットを用いた。Higgins & Andersonの方法に準じて、全肝の70%にあたる肝部分切除を行い、48時間後にエンドトキシンとしてlipopolysaccharide (LPS) 1.5mg/kgを静脈内投与した。このLPS投与量は正常ラットにとっては非致死量である。性ホルモンの影響を裏づけるため、肝切除の2週間前に両側性腺を摘除した雄性、雌性ラットを準備した。LPS投与後の24時間生存率を調べた後、LPS投与前、投与1、3時間後に血液と肝・脾組織を採取し、生化学的、および病理組織学的検討を行った。

### 〔結果〕

- 1) LPS投与24時間後の生存率は雄性ラット(38%)に比し、雌性ラット(75%)で有意に良好であった( $P<0.05$ )。卵巣摘除により雌性ラットの生存率は44%と有意に低下した( $P<0.05$ )。精巣摘除は雄性ラットの生存率に影響しなかった。
- 2) LPS投与3時間での雄性ラット、および卵巣摘除ラットの血漿aspartate transaminase (AST)、alanine transaminase (ALT)、ビリルビン値は、雌性ラットでの結果に比べて有意に高値を示した( $P<0.01$ )。
- 3) LPS投与1時間での雄性ラットおよび卵巣摘除ラットの血漿tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )値は、雌性ラットでの結果に比べて有意に上昇していた( $P<0.05$ )。抗炎症性サイトカインのinterleukin (IL)-10値には差を認めなかった。
- 4) 雌性ラットでは、体内での一酸化窒素(NO)産生を反映するNO代謝産物の血漿中濃度が有意に低値を示し、肝臓および脾臓での誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の遺伝子発現が有意に抑制されていた( $P<0.05$ )。定常型の内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の遺伝子発現には変化を認めなかった。
- 5) 病理組織所見として、雄性ラット、および卵巣摘除ラットでは、LPS投与後の肝類洞のうっ血や肝細

胞壊死および脾濾胞構造の破壊が著しかったが、雌性ラットではこれらの変化は軽微であった。肝組織中への好中球浸潤も雌性ラットで有意に軽減していた( $P<0.01$ )。

#### 〔考察〕

本研究では、LPS投与後の雌性ラットの生存率は雄性ラットに比較して有意に高かったが、卵巣摘除により有意に低下することが確認できた。また、生存率の結果に一致して、雌性ラットでは、LPS投与3時間後の肝機能検査値(血漿AST、ALT、ビリルビン値)や血漿TNF- $\alpha$ 値の上昇、肝臓および脾臓の組織障害の程度が、雄性ラットや卵巣摘除ラットと比較して軽度であった。これらの結果から、肝切除後のエンドトキシン血症による肝傷害の進展に性差による違いがあることが証明された。性ホルモン、特にエストロゲンが生体侵襲時の過剰な炎症反応を抑制して、雌性動物の生存率の改善や臓器障害を軽減し、本病態の進展制御に関与したものと考えられる。

本病態下で産生されるTNF- $\alpha$ は主に肝臓のクッパー細胞と脾臓で産生される。LPS投与1時間後の血漿TNF- $\alpha$ の上昇は、雌性ラットで有意に抑制されていた。TNF- $\alpha$ は一連の炎症反応カスケードが進行する上で、早期の重要なメディエーターであり、このサイトカインの産生調節が本研究での性差を生じた要因の一つと考えられた。抗炎症性サイトカインであるIL-10が敗血症患者の臨床経過での性差に関係するとの報告があるが、本研究においては有意な結果は得られず、本病態での関わり合いは少ないと思われた。

NOはエンドトキシン血症での重要なメディエーターの一つであり、エンドトキシンに反応して発現が亢進する肝臓、脾臓などの網内系組織でiNOSによって産生される。本研究では、肝臓および脾臓でのiNOS mRNA発現が、雌性ラットで有意に抑制されていた。血中のNO代謝産物濃度も、雌性ラットで有意に低値であった。過剰に産生されたNOは肝臓微小循環障害や肝細胞機能低下を惹起させることから、本研究でのiNOS遺伝子発現ならびに血中NO代謝産物濃度の増加が肝傷害に影響したものと考えられた。

本研究の結果から、肝切除後のエンドトキシン誘発肝傷害には性差による違いがあり、エストロゲンによるTNF- $\alpha$ とNO産生の抑制が本病態の進展を制御することが証明できた。エストロゲンには転写因子nuclear factor kappa Bの活性化抑制作用があることが知られており、本研究における炎症性メディエーターの産生抑制にも関与した可能性がある。しかし、この病態でのエストロゲンの作用機序には他のシグナル伝達経路の関与も考慮する必要があり、今後も検討を要する。

#### 〔結論〕

肝切除後のエンドトキシン誘発肝傷害の進展に性差が存在することを明らかにした。本病態の進展の抑制には、エストロゲンによる炎症性サイトカインとiNOS遺伝子発現を介したNOの産生調節が関与する。エストロゲンの抗炎症作用が本病態に対する有効な治療法として期待できる可能性がある。

### 論文審査の結果の要旨

動物を用いた各種のショックモデルにおいて、肝機能、心機能や免疫機能で雌性動物の優位性が示されており、また集中治療を要した敗血症症例では、男性患者に比べ女性患者において炎症性サイトカイン産生が軽微で、治療経過が良好であることが報告されている。しかし、現在までに肝切除後のエンドトキシン血症による肝傷害進展の病態を性差に着目して行った研究はない。そこで、申請者は肝切除後のエンドトキシン血症に起因する肝傷害の進展に対する性差の違いを検討した。

性成熟した14～15週齢、雄性および雌性のSprague-Dawleyラットを用いた。Higgins & Andersonの方法に準じて、全肝の70%にあたる肝部分切除を行い、48時間後にエンドトキシンとしてlipopolysaccharide (LPS) 1.5mg/kgを静脈内投与した。性ホルモンの影響を検討するために、肝切除の2週間前に両側性腺を摘除した雄性、雌性ラットを用いて、LPS投与後の24時間生存率を調べた。さらに、LPS投与前、投与1、3時間後に血液と肝・脾組織を採取し、生化学的、および病理組織学的検討を行った。

- 1) LPS投与24時間後の生存率は雄性ラット(38%)に比し、雌性ラット(75%)で有意に良好であった( $P<0.05$ )。卵巣摘除により雌性ラットの生存率は44%と有意に低下した( $P<0.05$ )。精巣摘除は雄性ラットの生存率に影響しなかった。
- 2) LPS投与3時間での雄性ラット、および卵巣摘除ラットの血漿aspartate transaminase (AST)、alanine transaminase (ALT)、ビリルビン値は、雌性ラットのそれらと比べて有意に高値を示した( $P<0.01$ )。
- 3) LPS投与1時間での雄性ラットおよび卵巣摘除ラットの血漿tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )値は、雌性ラットのそれに比べて有意に上昇していた( $P<0.05$ )。炎症性サイトカインのinterleukin (IL)-10値には差を認めなかった。
- 4) 雌性ラットでは、体内での一酸化窒素(NO)産生を反映するNO代謝産物の血漿中濃度が有意に低値を示し、肝臓および脾臓での誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)の遺伝子発現が有意に抑制されていた( $P<0.05$ )。内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の遺伝子発現には変化を認めなかった。
- 5) 病理組織所見として、雄性ラット、および卵巣摘除ラットでは、LPS投与後の肝類洞のうっ血や肝細胞壊死および脾濾胞構造の消失が著しかったが、雌性ラットではこれらの変化は軽微であった。肝組織中への好中球浸潤も雌性ラットで有意に軽減していた( $P<0.01$ )。

申請者は、本研究の結果から肝切除後のエンドトキシン誘発肝傷害には性差による違いが認められ、その差にはエストロゲンによるTNF- $\alpha$ とNO産生が関与していることを示した。

審査委員会では、肝切除後のエンドトキシン誘発肝傷害をエストロゲンにより軽減できる可能性を示したことを高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

- 1) モデルの適応性について
- 2) 実験群の設定根拠について
- 3) LPSの投与量の設定根拠について
- 4) 卵巣摘出後のエストラジオール値について
- 5) iNOSの発現部位について
- 6) エストロゲンとNOSとの関連について
- 7) NOによる細胞障害について
- 8) TNF- $\alpha$ とNO増加の関係について
- 9) LPSとTLR4について
- 10) NOS阻害薬による影響について
- 11) 肝と肺の病理学的変化について
- 12) エストロゲン拮抗薬を用いた検討について
- 13) 今回の研究の臨床応用について
- 14) エストロゲン投与による生存率上昇について

- 15) アンドロゲンの関与について
- 16) TNF- $\alpha$ の血中濃度の推移について
- 17) TNF- $\alpha$ の産生部位について

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梅	村	和	夫	
	副査	福	田	敦	夫	副査 三 浦 克 敏