

Evidence for Ethanol Induced Superoxide Radical, O₂-Production in the Rat Liver by Sinusoidal Endothelial Cells: Relevance to Alcohol Intoxication and Liver Injury

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 菊山, 正隆 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1062

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 209号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏 名	菊 山 正 隆		
論文題目	Evidence for Ethanol Induced Superoxide Radical, O_2^--Production in the Rat Liver by Sinusoidal Endothelial Cells: Relevance to Alcohol Intoxication and Liver Injury (ラット肝においてエタノール投与による類洞内皮細胞からのスーパーオキサイド、O_2^--産生の証明：アルコール負荷と肝障害への関連)		

博士(医学) 菊 山 正 隆

論文題目

Evidence for Ethanol Induced Superoxide Radical, O_2^- Production in the Rat Liver by Sinusoidal Endothelial Cells: Relevance to Alcohol Intoxication and Liver Injury

(ラット肝においてエタノール投与による類洞内皮細胞からのスーパーオキシド、 O_2^- 産生の証明：アルコール負荷と肝障害への関連)

論文の内容の要旨

〈目的〉アルコール性肝障害に O_2^- の関与が示唆されてきたがエタノール投与時の肝での O_2^- 産生を確認した報告はなかった。最近我々はラット灌流肝でウミホタル・ルシフェリン誘導体の一つであるMCLAを用いた化学発光法(MCLA-依存性発光法)によりエタノール急性投与時の O_2^- 産生を確認し、さらに $GdCl_3$ 投与の発光に対する影響と灌流肝病理組織におけるフォルマザン染色から、 O_2^- 産生がクッパー細胞以外の肝類洞壁細胞による可能性を報告した。今回、エタノール投与による O_2^- 産生の機序と産生細胞を明らかにする目的で以下の実験を行った。

〈方法〉1. 灌流肝におけるMCLA-依存性発光の検討 体重250-300gのWistar系雄性ラットを用い門脈にカニキュレーションし非再灌流肝モデルを作成した。露出した肝臓が光電子増倍管の直下になるように測定装置の中に安置した。アルコール脱水素酵素及びアセトアルデヒド酸化酵素の阻害剤である4メチルピラゾール(4MP)及びシアナミドを前投与した後、MCLAを持続注入し発光が安定した時点でエタノールを40mMの濃度で投与し発光の変化を検討した。さらに阻害剤を用いず、エタノールに代わりアセトアルデヒドを4mM、8mM、40mMの濃度で投与した。それぞれにつきスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の感受性を検討した。2. 免疫組織化学的検討 上の方法で作成した灌流肝にエタノールあるいはホルボールミリスチートアセテート(PMA)と同時にニトロブルーテトラゾリウム(NBT)を投与しフォルマザン染色を行った。肝をホルマリン固定後、病理組織切片を作成しクッパー細胞の特異的マーカーであるED1で染色した。3. 単離肝組織細胞のMCLA-依存性発光肝をコラゲナーゼ灌流し、肝細胞、類洞内皮細胞、及びクッパー細胞を単離した。それぞれの細胞浮遊液、さらに肝細胞との混合浮遊液にMCLAを添加し発光が安定した後、エタノールを40mMの濃度で負荷した。それぞれについてSODの感受性を検討した。

〈結果〉1. 灌流肝を用いたエタノール投与によるSOD感受性のMCLA-依存性発光は4MPにより有意に抑制されたがシアナミドでは抑制はなかった。アセトアルデヒドはMCLAの発光を抑制するため投与終了と同時に量依存性のSOD感受性の発光の増強を確認した。発光の強度は同濃度のエタノールの8倍から10倍であった。2. フォルマザン染色はエタノール、PMAのいずれの投与によっても類洞壁細胞に陽性であった。PMA投与ではフォルマザン沈着細胞とED1陽性細胞は一致する。エタノール投与ではそれらは必ずしも一致せず、さらにフォルマザンが類洞壁に連続して沈着している所見が認められた。3. 単離肝組織細胞を用いてのエタノール負荷によるMCLA-依存性発光は類洞内皮細胞、クッパー細胞単独の浮遊液では発光の増強はなく、肝細胞との混合浮遊液で発光の増強が認められた。しかしクッパー細胞の混合浮遊液では発光の増強はSODに感受性がなかった。

〈結論〉前回の我々の報告では、エタノールによる O_2^- 産生がクッパー細胞以外の類洞壁細胞によることが示唆されていた。今回の免疫組織化学的検討で O_2^- 産生がクッパー細胞以外の類洞壁細胞によることが確認され、さらに単離した類洞内皮細胞が肝細胞との混合浮遊液の状態でエタノール負荷により、

SOD 感受性の MCLA-依存性発光の増強を示すことからエタノール投与時の肝での O_2^- 産生が類洞内皮細胞によることが確認された。類洞内皮細胞単独の浮遊液ではエタノール負荷により発光の増強が認められないことから O_2^- 産生には肝細胞でのエタノールの代謝が関与していることが示唆されたが、灌流肝を用いてのエタノールによる MCLA-依存性発光が 4 MP で抑制され、シアナミドで抑制されなかったこと、アセトアルデヒドで SOD 感受性の発光の増強を認めたことから、エタノールによる肝での O_2^- 産生はエタノールの代謝物質であるアセトアルデヒドあるいはアセトアルデヒドとの反応物質によることが示唆された。さらに、エタノール投与により得られる MCLA-依存性発光の増強は SOD 感受性であることから、エタノール投与による O_2^- は産生されるとともに細胞外へ放出されるものであるが示された。

論文審査の結果の要旨

申請者、菊山正隆氏はアルコールによる肝障害の発生機構に興味を持ち、肝臓にアルコールを負荷したときに活性酸素 (O_2^-) を産生する細胞を解析した。これまで、肝組織においてアルコールによって引き起こされる O_2^- 発生についての直接的な研究はなく、同氏を含むグループが、ウミホタル・ルシフェリン (MCLA) をプローブとして用いることによって初めてこれを研究する道を拓いた。しかし、いまだ、 O_2^- を産生する細胞を特定する段階には至らなかった。そこで本申請論文では、ラットの血管灌流肝標本と、肝臓の構成細胞を分離培養した標本にて、同じプローブを用いた研究をし、エタノール負荷に応じて O_2^- を放出する細胞を特定することに成功した。論文記載の研究結果は次のようである。

1. 灌流肝においては、エタノール負荷による O_2^- 発生は、アルコール脱水素酵素阻害剤である 4 メチルピラゾールの前投与で大きく抑制されたが、アセトアルデヒド酸化酵素の阻害剤であるシアナミドの前投与では変化がなかった。アセトアルデヒド負荷でも O_2^- の発生が見られた。その効果はエタノールの 8 倍以上強かった。

2. O_2^- 発生のマーカーとなるフォルマザン染色は、エタノール刺激後、類洞壁内に薄く広がっている細胞に現れた。この細胞は、クッパー細胞のマーカーとなる ED1 による免疫染色で陽性となる細胞と一致しないことが多かった。フォルボールエステル刺激では、両染色法で陽性となる細胞は一致していた。

3. 単離細胞を用いた実験では、クッパー細胞、類洞内皮細胞ともに、単独の浮遊液ではエタノール刺激による O_2^- 発生は認められなかった。また、クッパー細胞と肝細胞を混合した場合にも O_2^- の発生は検出できなかった。しかし、類洞内皮細胞と肝細胞との混合浮遊液では明瞭な O_2^- の発生が検出できた。この標本での MCLA の発光は、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) によって強く抑制された。

以上のことより申請者は、エタノールが肝細胞で代謝されてアセトアルデヒドとなり、それが類洞内皮細胞に作用することによって O_2^- が産生されるものと結論した。また、化学発光の SOD 感受性から、発生した O_2^- は細胞外に放出されてくるものであることを結論した。本研究は、エタノールの毒性がどのように肝炎や肝硬変などの肝障害を引き起こしていくかという病態を考える上で、基礎となる知識を与えるものとして高く評価された。

このような申請者の発表に対して、審査員からは次のような質疑がおこなわれた。

1) 血管灌流法を用いたときの肝臓および個体の生存時間について

- 2) 酸素の補給経路について
- 3) ペントバルビタール麻酔は O_2^- 産生能に対する影響をもたなかったか
- 4) O_2^- 発生量のエタノール濃度に対する依存性について
- 5) 門脈周囲の細胞からの O_2^- 産生の有無について
- 6) 類洞のデスミン染色の意義について
- 7) 単離細胞の実験における4メチルピラゾールやシアナミドの効果について
- 8) エタノール負荷に際するGPTなどの血液生化学的変化について
- 9) エタノール負荷で肝組織に形態的変化は起きないか
- 10) ガドリニウム処理後のクッパー細胞の変化について
- 11) クッパー細胞からのサイトカイン放出に対する O_2^- の効果について
- 12) クッパー細胞に対するフォルボールエステルの効果について
- 13) ヒトの飲酒時のアセトアルデヒド濃度の推定値について
- 14) ラットとヒトでは、肝臓のエタノールに対する耐性の差はあるか
- 15) マンノースSODなどを類洞内皮細胞に結合させて治療する可能性について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点の理解も十分であると判断し、本論文は博士（医学）の学位にふさわしいと審査員が全員一致して評価した。

論文審査担当者 主査 教授 寺 川 進

副査 教授 池 田 和 之 副査 教授 平 光 忠 久

副査 助教授 中 村 達 副査 助教授 室 博 之