# Enhanced hepatic lipid peroxidation in patients with primary biliary cirrhosis


| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-31<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 川村, 欣也<br>メールアドレス:<br>所属: |
|---|---|
| URL | http://hdl.handle.net/10271/1227 |

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　３７４号 | 学位授与年月日 | 平成１４年　３月２６日 |
| 氏　　名 | 川　村　欣　也 | | |
| 論文題目 | Enhanced hepatic lipid peroxidation in patients with primary biliary cirrhosis<br>(原発性胆汁性肝硬変の肝組織における脂質過酸化反応の亢進) | | |

博士(医学)　川 村 欣 也

**論文題目**

Enhanced hepatic lipid peroxidation in patients with primary biliary cirrhosis

(原発性胆汁性肝硬変の肝組織における脂質過酸化反応の亢進)

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

脂質過酸化反応は、酸化ストレスの存在下に生体膜で惹起され、生体膜の障害をもたらす。また、この反応の過程で生成された脂質過酸化物は分解され、最終的にアルデヒド類となり、生体内の蛋白を容易に修飾し、その蛋白の機能障害をひき起こす。4-hydroxy-2-nonenal(HNE)は、脂質過酸化反応において産生されたアルデヒド類の中で最も代表的な酸化ストレス産物であり、酸化ストレスの良いマーカーとなるため、その免疫化学的検出法は、種々の疾患の酸化ストレスの評価に有用とされている。原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、慢性非化膿性破壊性胆管炎を特徴とする主として直径100 μm 以下の中小胆管の破壊に基づく慢性胆汁うっ滞症であり、胆管の障害は主として免疫学的機序によると考えられている。しかしながら、胆汁うっ滞症においては、胆汁酸による脂質過酸化反応の亢進が細胞障害に関与していることが報告されている。そこで、HNE 修飾蛋白の免疫組織染色法を用いて PBC の肝組織障害における脂質過酸化反応の関与について検討した。

〔材料ならびに方法〕

当院および関連施設にて臨床病理学的に診断された PBC 患者20例(平均年齢57±2歳、男性1例、女性19例)を対象とした。経皮的針生検にて得られた肝組織を Ludwig の分類法に従って病期別に分類し HNE 修飾蛋白の免疫組織染色法(Uchida K et al. Proc Natl Acad Sci USA 1993 ; 90 : 8742-6)にて脂質過酸化反応の検出を行った。すなわち、ホルマリン固定、パラフィン包埋した肝生検組織3 μm 切片を、10%正常ヤギ血清にて30分室温で処理し非特異的反応を抑制したのち、ウサギ HNE 修飾蛋白抗体(0.5μg/ml)にて一晩4℃で反応させた。二次抗体として biotin 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて avidin-biotin-alkaline phosphatase 複合体法にて HNE 修飾蛋白を検出した。核染には、ヘマトキシリン染色を用いた。また、オルセインもしくはビクトリアンブルー染色にて肝組織における銅関連蛋白の検出も行った。

〔結果〕

病期はⅠ期12例(60%)、Ⅱ期3例(15%)、Ⅲ期5例(25%)で、ⅠおよびⅡ期の症例に比べⅢ期の症例では T-Bil 値が有意に高く(3.4±0.9 vs 0.7±0.1mg/dl、$p<0.001$)、ALT、ALP、γGTP 値には有意差を認めなかった。HNE 修飾蛋白は、主に直径100 μm 以下の胆管の細胞質にびまん性あるいは限局性に認められた。全症例における直径100 μm以下の胆管の76／85(89%)に HNE 修飾蛋白を認め、直径100 μm 以上の胆管では8／11(75%)に HNE 修飾蛋白を認めなかった。胆管上皮細胞の HNE 修飾蛋白は全症例に認められたが、特に HNE 修飾蛋白陽性胆管は陰性胆管に比べ有意に小さく(61.0±1.9μm vs 122.5±24.4 μm、$p<0.01$)、主として小中等大の胆管に HNE 修飾蛋白が認められた。肝細胞における HNE 修飾蛋白は、門脈域周囲の肝細胞の細胞質にびまん性に検出される傾向があり、Ⅱ期1例、Ⅲ期5例の6例(30%)に認

められ、病期の進行したⅡ期の症例が多かった(100% vs 7%、$p<0.05$)。また、肝細胞における HNE 修飾蛋白陽性群は陰性群に比べて T-Bil 値が有意に高く(2.9±0.9 vs 0.7±0.1mg/dl、$p<0.01$)、ALT、ALP、γGTP 値には有意差を認めなかった。肝細胞における銅関連蛋白は、HNE 修飾蛋白と同様に門脈域の周辺に認められ、Ⅱ期5例(100%)にのみ認められた。

〔結論〕

全例の PBC の肝組織において HNE 修飾蛋白が検出され、脂質過酸化反応の亢進が認められた。HNE 修飾蛋白は、主に100 μm 以下の胆管に存在していたが、光顕上障害のない胆管にも認められていたことから脂質過酸化反応が PBC の胆管障害において比較的早期の段階から関与している可能性が考えられた。また、ステージの進行した PBC においては肝細胞にも HNE 修飾蛋白が認められた。これらの症例は、Ⅰ期、Ⅱ期の症例に比べると胆汁うっ滞が強く、全例で肝細胞に銅関連蛋白が認められており、蓄積した胆汁酸や銅による脂質過酸化反応の亢進が肝細胞障害機序に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、直径100 μm 以下の小葉間胆管の慢性胆汁性うっ滞を特徴とする比較的まれな疾患であり、その障害は主として免疫学的機序によると考えられている。しかし、胆汁酸による脂質過酸化反応の亢進が胆管の細胞障害に関与している可能性があり、この病理発生に非免疫学的機序も考慮する必要がある。脂質酸化物が分解されて生ずるアルデヒド類が生体内の蛋白を修飾することによって障害を引き起こすことが知られている。申請者はその代表的な酸化ストレスマーカーである4-hydroxy-2-nonenal(HNE)の修飾蛋白に対する抗体を用いた免疫組織染色法を用いて PBC の肝組織障害における脂質酸化反応の関与について検討した。

浜松医科大学病院および関連施設で臨床病理学的に PBC と診断された患者20名(男性1名、女性19名)を対象とした。経皮的針生検で得られた肝組織は Ludwig の4段階の病期の分類において、Ⅰ期12例、Ⅱ期3例、Ⅲ期5例であった。HNE 修飾蛋白に対する免疫組織染色法で脂質酸化反応産物を検出した。また、オルセインあるいはビクトリアブルー染色で肝組織における銅関連蛋白の検出も行った。

HNE 修飾蛋白は100 μm 以下の胆管では陽性率が低く、100 μm 以下の胆管では全例が陽性であった。部位によっては100 μm 以下の胆管でも陰性の胆管も認められたが、HNE 陽性胆管は陰性胆管に比してその径が有意に小さかった。肝細胞においては門脈域周囲の肝細胞にびまん性に検出され、病期の進行とともに陽性細胞が増加する傾向を示した。肝細胞における銅関連蛋白は、HNE 修飾蛋白と同様門脈域周辺に認められ、病期が進んだⅢ期の症例のみに認められた。

以上の結果より PBC の胆管上皮に脂質過酸化反応の亢進が認められ、脂質過酸化反応がその病理発生に関与している可能性が示唆された。直径100 μm 以下の胆管が障害の標的である可能性高く、門脈域周辺にも HNE 修飾蛋白陽性肝細胞が出現し、同じ領域に銅関連蛋白が認められたことは両者に何らかの関係があることが示唆された。

審査委員会では、申請者が PBC 症例において特定の胆管上皮および肝細胞における細胞障害に脂質酸化反応の亢進が関与している可能性をはじめて示したことは、PBCの発生機序を解明していく上で重要であると評価した。

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. HNE 陽性細胞の陽性パターンは胆管上皮と肝細胞で如何に異なるか
2. HNE 修飾蛋白の染色性と細胞障害の程度について
3. 対照および他の肝障害における HNE 修飾蛋白の染色性について
4. HNE 陽性胆管では陰性胆管に比較してなぜ径が小さくなるのか
5. なぜ特定の胆管(直径100 μm 以下)が障害を受けるのか
6. PBC 患者におけるサイトカインプロファイルの変化について
7. 他の過酸化物である MDA、アクロレインの PBC における変化について
8. PBC において血清 IgM はなぜ高くなるのか
9. PBC の遺伝的背景について
10. PBC 発生における免疫機序と酸化ストレスとの関連について

これらの質問に対して申請者の解答はほぼ適切であり、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委員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　筒井祥博
副査　前川真人　副査　花井洋行