

RELEASE OF A BILE CANALICULAR MEMBRANE ANTIGEN INTO THE BLOOD IN EXTRAHEPATIC CHOLESTASIS OF RAT

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 良正 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/959

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 106号	学位授与年月日	平成 3年 3月26日
氏名	小林良正		
論文題目	RELEASE OF A BILE CANALICULAR MEMBRANE ANTIGEN INTO THE BLOOD IN EXTRAHEPATIC CHOLESTASIS OF RAT (ラット閉塞性黄疸モデルにおける細胆管側肝細胞膜抗原(HAM.4抗原)の血中への遊出)		

医学博士 小林良正

論文題目

RELEASE OF A BILE CANALICULAR MEMBRANE ANTIGEN INTO THE BLOOD IN EXTRAHEPATIC CHOLESTASIS OF RAT

(ラット閉塞性黄疸モデルにおける細胆管側肝細胞膜抗原(HAM. 4抗原)の血中への遊出)

論文の内容の要旨

(目的) 肝細胞膜の毛細胆管面に存在するアルカリフォスファターゼ (ALP)、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、ガンマーグルタミルトランスぺプチターゼ (γ -GTP)、IV型ジペプチジルペプチターゼ (DPP-IV) などの膜酵素は、胆汁うっ滞において血清中で増加することが知られている。我々の作製したラット肝細胞膜蛋白に対するモノクローナル抗体 (HAM. 4) の認識する抗原 (HAM. 4抗原) は、肝細胞膜の毛細胆管面に存在するため胆道系酵素と同様に胆汁うっ滞において血清中で増加することが考えられ、ラット胆管結紮モデルを用いて胆汁うっ滞におけるHAM. 4抗原の血中への遊出について検討した。

(方法) Sprague-Dowley雄ラットを用いて総胆管結紮モデルを作製し、sham手術群を対照群として、術後168時間まで経時的に採血と肝切片の採取を行った。血清中のHAM. 4抗原量は、細胞性ラジオイムノアッセイを用いて測定した。また血清中のALP、LAP、 γ -GTP、DPP-IV、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) 活性および総ビリルビン値も測定した。HAM. 4抗原はHAM. 4を結合させたアフィニティークロマトグラフィーにて可溶化肝細胞膜蛋白より精製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロッティングにて分子量を決定した。免疫組織学的検索は、PLP固定後パラフィン包埋した肝切片に対して間接酵素抗体法を用いてHAM. 4抗原の同定を行った。

(結果) 血清中のHAM. 4抗原量は、胆管結紮後3時間で最高値に達し、その後漸減し、48時間から168時間まで一定値を維持した。結紮後全経過を通じて胆管結紮群のHAM. 4抗原量は対照群より有意に高かった。一方、血清中のALP、LAP、DPP-IV、GPT活性および総ビリルビン値は、それぞれ結紮後24時間、72時間、12時間、24時間、96時間で最高値に達した。 γ -GTP活性は、観察期間中漸増した。肝細胞膜のHAM. 4抗原の分子量は、110,000であった。肝における組織学的検索では、血清中のHAM. 4抗原量が最高値に達した結紮後3時間におけるHAM. 4抗原の表現様式は、対照群と変わりなかった。また、胆管結紮後24時間より明らかとなった増生胆管の管腔面にもHAM. 4抗原が表出されたが、肝細胞におけるHAM. 4抗原の局在に変化はなかった。

(考察) 胆管結紮後、血清中のHAM. 4抗原量は、血清中のALP、LAP、 γ -GTP活性より早期に最高値に達した。また、HAM. 4抗原の分子量と組織分布が類似しているDPP-IVの活性変化とも異なっていた。したがって、HAM. 4抗原は胆汁うっ滞の早期に血清中で上昇する膜蛋白であると考えられた。HAM. 4抗原の血中への遊出機序は今回の免疫組織学的検索では明らかにされなかったが、以前の電顕による検討では正常の肝細胞膜の類洞面や細胞隣接面にもわずかにHAM. 4抗原が存在しているので、早期の血中への遊出には肝細胞膜の類洞面や細胞隣接面に存在するHAM. 4抗原が関与している可能性が考えられた。

以上により、HAM. 4抗原は早期の胆汁うっ滞を解析できる新しいマーカーになりうると考えられた。

論文審査の結果の要旨

種々の要因によって胆道閉塞が起こった場合、胆汁うっ滞のために肝実質や胆道系の変化が起こり、肝細胞や胆道由来の各種の酵素が循環血中に増加することが広く知られている。しかし肝細胞の膜抗原分子が血液へ遊出するか否かはこれまで明らかでない。そこで申請者は、ラットの肝細胞膜とくにその毛細胆管面の膜抗原を認識する単クローン抗体 (HAM. 4) を用い、血清中における対応抗原 (HAM. 4抗原) を細胞性ラジオイムノアッセイで検出することに成功し、ついで胆管結紮により胆汁うっ滞を惹起させたSD系雄ラットを用い、同抗原の血清中での変動を胆道系の4種類の酵素の変動と比較検討した。

得られた主な結果は下記のごとくである。

1. HAM. 4抗原をHAM. 4を結合させたアフィニティークロマトグラフィーにより可溶化肝細胞膜蛋白より精

製し、さらにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロッティング法により分子量を測定し、110kDaであることを示した。

2. 胆管結紮後3時間で血清中のHAM.4抗原量は最高値に達し、その後漸減した。その値は観察全経過を通じて対照のsham手術群と比べ有意に高かった。また、肝組織内でのHAM.4抗原の発現様式は対照群とほぼ同様であることを免疫組織化学染色で示した。
3. 一方、胆道系酵素であるアルカリフォスファターゼ (ALP), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP), γ -グルタミルトランスぺプチターゼ (γ -GTP), IV型ジペプチジルペプチダーゼ (DPP-IV), 総ビリルビンの血清中の活性を生化学的方法で測定したところ、胆管結紮後いずれも対照群と比べ高値を示したが、最高値に達する時期はHAM.4抗原の場合と比べ明らかに遅れていた。

この様な所見からHAM.4抗原は早期の胆汁うっ滞を予知できる指標になる可能性を主張した。

以上の結果は、HAM.4抗原は胆汁うっ滞後かなり早期(3時間後)に血清中に増加する分子量110kDaの肝細胞膜蛋白であるとともに、4種類の胆道系酵素とは分子量や血清中への出現様式の面から見て異なる分子であることを明らかにした点は、これまでに報告がなく評価すべきであるとみなされた。

なお、審査の過程において次の点について質疑がなされた。

1. 血清中のHAM.4抗原量は、飼料の摂取時期や量によって変動しないか。
2. 分子量がほぼ同一であるHAM.4抗原とDPP-IVとの異同を明確にするため、HAM.4抗原や抗DPP-IV抗体による吸収試験を試みたか。
3. HAM.4抗原のアミノ酸組成を解析したか。
4. 胆管結紮後、肝細胞膜のtight junctionにどのような変化が見られたか。
5. 小葉間胆管の形態学的変化と、HAM.4抗原の局在性の変化について
6. Na, K-ATPaseの肝内での局在について
7. 各種肝細胞の病態変化時におけるHAM.4抗原の発現の変化
8. HAM.4抗原が腎尿細管の管腔遊離面に存在するなら、尿管結紮時にはどのような変化が見られると思うか。
9. HAM.4抗原の機能と血清中への遊出機構について

以上の質問に対し申請者はほぼ適切な解答をおこない、HAM.4抗原の血清中への遊出機構など残された問題点については、引き続き検討して行くとの研究意欲が見られ、今後の発展の可能性が窺われた。

したがって、本審査委員会は本論文は学位授与にふさわしい内容を備えたものであると全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	山下	昭			
	副査	教授	金子	榮藏	副査	教授	藤田道也
	副査	助教授	小出	幸夫	副査	助教授	中村達