

FUNCTIONAL ABNORMALITIES OF SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS IN RATS WITH ACUTE LIVER REJECTION

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横井, 佳博 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1032

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 179号	学位授与年月日	平成 7年 3月27日
氏名	横井佳博		
論文題目	FUNCTIONAL ABNORMALITIES OF SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS IN RATS WITH ACUTE LIVER REJECTION (ラット急性肝拒絶反応時における類洞内皮細胞機能の検討)		

博士(医学) 横井佳博

論文題目

FUNCTIONAL ABNORMALITIES OF SINUSOIDAL ENDOTHELIAL CELLS IN RATS WITH ACUTE LIVER REJECTION

(ラット急性肝拒絶反応時における類洞内皮細胞機能の検討)

論文の内容の要旨

【はじめに】類洞内皮細胞(洞内皮)は多種にわたる物質の receptor-mediated endocytosis に関与し、物質によっては Kupffer 細胞を凌ぐ代謝容量を有することから、肝の血液クリアランスに重要な細胞である。臓器移植においては、血管内皮細胞が急性拒絶反応の target であり、病理組織上、血管内皮炎が急性肝拒絶反応の最も特異的な所見とされるが、このような変化は洞内皮にも高頻度に認められ、類洞内皮炎と称されている。これら形態的变化から洞内皮の機能的変化が推測されるが、急性肝拒絶反応時におけるその機能について解析した研究はない。そこで、肝拒絶反応時における洞内皮の機能変化について、receptor-mediated endocytosis の観点から解析した。

【方法】DA (RT1⁺) 系ラットをドナー、Lewis (RT1⁻) 系ラットをレシピエントとした組み合わせは、術後10日目で急性肝拒絶反応のため死亡することから、この組み合わせを拒絶群とし、また Lewis 系同士の組み合わせを対照群として同所性肝移植を行った。術後1、3、5、7及び10日目に以下の検討を行った。洞内皮機能として、血中可溶性 IgG 型免疫複合体の代謝に重要な役割を演じる類洞内皮 Fc レセプター (FcR) を凍結肝切片上に、peroxidase-antiperoxidase IgG immunocomplex をリガンドとして40分間反応させ、ベンチジンにて7分間発色させた。また正常肝を1分毎のベンチジン発色時間で FcR を染色したものを標準染色組織とし、実験群の FcR 染色と対比し、ちょうど染色性が同一となる標準染色組織のベンチジン反応時間をもって、実験群の FcR 活性とした。また一部の移植肝では、抗マクロファージ単クローン抗体 (ED1) を重染させ、洞内皮を同定した。洞内皮はヒアルロン酸 (HA) レセプターを介して選択的に血中の HA を摂取することから、血中 HA 濃度を測定した。さらに臨床上、拒絶反応の鋭敏なマーカーとされる血中総ビリルビン値を測定した。

【結果】(1)移植肝の組織学的変化：拒絶群では術後3日目より、血管内皮炎の所見が散見された。以後、細胞浸潤はさらに進行し、門脈の閉塞及び広範な肝壊死に陥り、 10.4 ± 0.28 日で死亡した。一方、対照群では、全経過を通じて肝構築は良好に保たれていた。(2)類洞内皮細胞機能の変化：拒絶群の FcR 染色性は術後3日目に対照群に比し、明らかに低下し、5日目以降には洞内皮の FcR 染色は認められなかった。拒絶群の FcR 活性は術後3日目より対照群に比し、有意に低下し ($p < 0.05$)、5日目以降消失した ($p < 0.01$)。対照群では術後1日目に軽度、FcR 活性は低下したが、5日目には正常値に回復した。血中 HA 濃度は拒絶群では術後3日目より対照群に比し、有意に高値を示し ($p < 0.05$)、7日目には最高値に達した ($p < 0.01$)。対照群では術後1日目に血中 HA 濃度は最高値に達したが、以後漸減した。さらに FcR 活性及び血中 HA 濃度は強い負の相関を示した ($r = 0.77$, $p < 0.001$)。(3)総ビリルビン値の変動：総ビリルビン値は拒絶群では術後5日目より、有意に上昇し ($p < 0.01$)、10日目には最高値を示した ($p < 0.01$)。対照群では全経過中、正常範囲内に留まった。

【考察】肝類洞内皮機能について、肝組織を用いて FcR 活性を直接的に評価し、また血中ヒアルロン酸濃度から洞内皮 HA レセプター活性を間接的に評価したところ、両指標は拒絶反応の鋭敏なマ-

カーとされる血中総ビリルビン値の上昇に先立って変化した。このことから洞内皮の endocytic function が拒絶反応の早期段階から低下することが示された。また形態学上、急性肝拒絶反応の mild な段階より類洞内皮炎を高頻度に認めたとするこれまでの報告も本研究結果を支持すると考えられた。

【結論】類洞内皮細胞機能は急性肝拒絶反応の早期段階より変化する。急性肝拒絶反応の診断には、血液生化学ではヒアルロン酸濃度が、肝組織学では類洞内皮 FcR 活性が鋭敏な指標となりうる。

論文審査の結果の要旨

肝臓の同種移植においてしばしば起こる急性肝拒絶反応の最も特徴的な病態変化の一つは、同種抗原を提示するとともに key target となる類洞内皮細胞（洞内皮）に起こる類洞内皮炎である。洞内皮は拒絶反応の進行にともない、形態的变化も起こすとともに機能的変化を起こすと考えられているが、その詳細は明らかでない。そこで、申請者は近交系ラットを用いて同種肝移植実験モデルを確立し、肝拒絶反応時における洞内皮の機能的な変化を、receptor mediated endocytosis の面から免疫組織化学的、並びに生化学的手法によって検索した。

審査の結果、評価された点は次のとおりである。

(1) 用いた材料、方法、および実験系は、本研究目的を追求する上において適切であると判断された。まず、同所性同種肝移植法として、ドナーの DA (RT1^a) 系ラットの肝をレシピエントの Lewis (RT1^l) 系ラットに同所性に移植し、経時的に観察している。つぎに、洞内皮の Fc レセプター (FcR) をペルオキシダーゼ-抗ペルオキシダーゼ IgG 免疫複合体をリガンドとするベンチジン発色による免疫染色法によって検出し、一定染色性を示す正常肝の発色時間と実験群のそれを対比することによって FcR 活性を半定量的に測定している。この方法は定量性において改良すべき点はあるものの、本研究目的にはほぼ適切であると判断された。また、洞内皮機能の血清学的モニター方法として、血中ヒアルロン酸 (HA) 濃度を測定しており、洞内皮の HA レセプターによる血中 HA 摂取能を間接的に解析しているが、これも適切であると判断された。

(2) 同種移植の拒絶群では、血中総ビリルビン値が7~10日後に増加し、急性拒絶反応が惹起されていることが確認された。術後3日目より血管内皮炎がみられ、洞内皮の FcR 染色性が低下し、5日目には染色性が全くみられなくなった。

FcR 活性も染色性とほぼ同様の傾向を示し、血中ビリルビン値の増加よりも早期に低下した。一方、対照群（同系移植群）では、1日目に FcR 活性の軽度低下がみられたが、以後回復した。血中 HA 濃度の変化は、拒絶群では術後有意に増加し7日目にピークに達したが、対照群では1日目に軽度上昇するものの、以後漸減した。また、この FcR 活性と血中 HA 濃度の変化は強い負の相関を示すことを確認している。

申請者は、移植肝拒絶反応の鋭敏なマーカーといわれる血中総ビリルビン値の上昇がみられる7日以前（3日目）に、洞内皮の FcR 活性の低下と血中 HA 値の上昇がみられる事実に着目し、両指標の測定が急性肝拒絶反応の早期診断法となり得ることを主張した。審査委員会において、この見解は、ヒト肝拒絶反応の早期診断法を確立する上できわめて示唆に富むものであると評価され、今後の更なる発展が期待された。

なお、審査の過程において、本研究に対し次のような質疑がなされた。

- 1) FcR 活性の半定量法の精度と再現性について
- 2) 肝内で endocytic function を発揮する細胞として、クッパー細胞とマクロファージを考慮して検

索したか

- 3) クッパー細胞とマクロファージをいかにして同定したか
- 4) クッパー細胞の FcR 染色性と活性の変化を検索したか
- 5) 洞内皮の FcR の生物学的意義と、拒絶において低下する機序は
- 6) 洞内皮の C₃R の変化を検索したか
- 7) 胆管の増殖はどのような機序で起こるか
- 8) 拒絶肝組織へ宿主の同種抗原反応性 T 細胞が早期に浸潤する機序は
- 9) 血清 HA 値上昇の機序と洞内皮の関与について

以上の質問に対する申請者の解答は、おおむね適切であり、問題点も充分把握しており、本論文は博士（医学）の学位論文に相応しい内容を持つことを審査員全員が一致して評価した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭
副査 教授 筒井 祥博 副査 教授 藤田 公生
副査 助教授 木村 泰三 副査 助教授 小出 幸夫