



Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion

メタデータ	言語: Japanese 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: 芹澤, 淳 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1054

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 201号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏名	芹澤 淳		
論文題目	<p>Involvement of platelet - activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia - reperfusion (肝虚血再灌流障害における血小板活性化因子のサイトカイン産生と好中球活性化に及ぼす影響)</p>		

博士(医学) 芹 澤 淳

論文題目

Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion

(肝虚血再灌流障害における血小板活性化因子のサイトカイン産生と好中球活性化に及ぼす影響)

論文の内容の要旨

【はじめに】我々は、血小板活性化因子 (PAF) の拮抗剤が肝虚血再灌流障害の進展を抑制することを示し、再灌流障害に対し有効であることを報告してきた。しかし、低血圧、血管透過性の亢進、好中球の活性化、サイトカイン産生の誘導など様々な生物学的活性を持つ PAF がどのように本病態に関与しているかは十分に解明されていない。近年、虚血再灌流障害は一種の炎症反応ととらえられており、この面から炎症性サイトカインや好中球の関与に研究の焦点が置かれ、また、虚血臓器からの遠隔臓器である肺の障害の発生も注目されている。

本研究の目的は、肝虚血再灌流障害において、サイトカイン・カスケードの中心的役割を演じる tumor necrosis factor α (TNF α) と、好中球遊走因子である interleukin-8 (IL-8)/cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) の発生や、好中球の活性化及び肝、肺への浸潤に対する PAF 拮抗剤の効果を観察することにより、本病態における PAF の役割を検討することである。

【方法】体重250~300 g の Wistar 系雄性ラットを用いて、内径1.2mmのポリエチレンチューブで門脈-頸静脈シャントを作成し、肝門部で門脈、肝動脈、胆管を血管クリップで120分間遮断後解除することで全肝虚血再灌流を行った。実験群は虚血30分前に PAF 拮抗剤 (TCV309, 3 μ g/kg) を静注する TCV 群と、対照として生理食塩水を静注する NS 群の2群を作成し、以下の項目を測定した。①30日間生存率。虚血前及び再灌流後30分、1、3、6時間に、②肝静脈血中の AST 値、TNF α 及びIL-8 のラットにおける counterpart である CINC の濃度 (ELISA 法)、③肝、肺への好中球集積 (肺は化学発光法により myeloperoxidase (MPO) 活性を測定し、単位重量当たりの好中球数に換算した。肝は naphthol AS-D chloroacetate esterase 染色を行い、光顕的に好中球数をカウントし評価した。)、④肝、肺の組織学的所見。また、再灌流後3時間で、⑤末梢血好中球の PMA 刺激による superoxide 産生能を化学発光法により測定した。

【結果】①30日間生存率: NS 群 (n=13) は8日以内に全例死亡したのに対し、TCV群 (n=11) では4例は再灌流後早期の2日以内に死亡したが、7例 (64%) は30日以上生存し生存率は著明に改善された ($p < 0.01$)。②血漿 AST 値: 再灌流後6時間で NS 群が $9,920 \pm 797$ (IU/l) に対し TCV 群は $6,012 \pm 514$ (IU/l) で、PAF 拮抗剤投与により肝障害は有意に軽減された ($p < 0.001$)。血漿 TNF α 濃度: NS 群は再灌流後1時間で頂値 (487 ± 112 pg/ml) を示したが、TCV 群では TNF α の増加は見られなかった (93 ± 13 pg/ml, $p < 0.01$)。血漿 CINC 濃度: NS 群では再灌流後1時間より急増し、3時間以後高値が持続した。TCV 群でも3時間以後は虚血前値に対し増加したが、NS 群に比べ有意に抑制された ($p < 0.05$)。③肝、肺の好中球集積: 肝の好中球集積は両群とも経時的に増加したが、TCV 群では有意な抑制効果がみられた ($p < 0.05$)。肺の好中球の集積も肝と同様な経過で増加し、TCV 群では有意に抑制された ($p < 0.05$)。④組織学的所見: 再灌流後6時間で、NS 群の肝組織では中間帯を中心とした肝細胞の壊死像が著明であったが、TCV 群では軽減されていた。肺組織は NS 群で肺胞壁への好中球浸潤が著明であり肺胞内出血も見られたが、TCV 群ではこれらの所見が軽減され

た。⑤末梢血好中球の superoxide 産生能: NS 群の 118 ± 25 kcpm に対し、TCV 群では 64 ± 10 kcpm で有意に抑制された ($p < 0.05$)。

【考察】PAF 拮抗剤の投与により NS 群における TNF α の増加が完全に抑制されたことより、肝虚血再灌流後の TNF α 産生に PAF は強く関与すると考えられる。再灌流後の CINC の増加も PAF 拮抗剤により有意に抑制されたが、虚血前値に対しては増加しており、PAF や TNF α を介さない産生経路も存在する可能性が考えられる。CINC 濃度の推移と肝、肺への好中球集積には相関が見られた。肝静脈血中の CINC の増加は、肝における産生増加が反映されたと考えられるが、肺への好中球集積への CINC の関与については、さらに検討を要すると思われる。

【結論】PAF は肝虚血再灌流後に TNF α や CINC の産生を促進し、直接的あるいはこれらを介して肝、肺への好中球集積や末梢血好中球の superoxide 産生能にも影響を及ぼし、肝及び肺の障害に関与すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者、芹澤淳氏は虚血再灌流時の肝障害の発生機構に興味を持ち、その研究をおこなった。これまで、肝虚血再灌流時に見られるサイトカインの上昇などがどのような信号系を介しているかについての解析的な研究はなかった。そこで本申請論文では、門脈-頸静脈シャント手術をしたラットの虚血再灌流肝モデルに見られる肝組織変化、サイトカイン出現、肝と肺における好中球集積、末梢血好中球の O_2^- 産生能などを指標に、血小板活性化因子 (PAF) の拮抗剤の効果を解析することによって、PAF 信号系の経路を明らかにした。論文記載の研究結果と審査員の評価は次のようである。

1. ウィスター系成熟雄ラットを用い、門脈、肝動脈、胆管をクリップで120分閉塞した後にこれを解除し、虚血再灌流モデルをつくった。対照群には虚血開始30分前に生理食塩水を、実験群には PAF 拮抗剤 (TCV-309) を静注投与した。対照群では8日以内に全例死亡したが、実験群では30日生存率が64%であった。審査委員は、この実験的虚血の方法に対して肝以外の臓器への影響を検討し、概ね妥当であると見なした。
2. 肝静脈血中のトランスアミナーゼ値、TNF α 値、IL-8 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant) のいずれも実験群で有意の低値となった。審査委員は、用いられた統計的手法を吟味し、この結果を信頼性のあるものと判定した。
3. 肝および肺への好中球集積は、実験群ではいずれも有意に抑制された。対照群で見られる肝細胞の変性や壊死の程度は実験群では著しく減少していた。対照群では肺胞壁への好中球の集積と肺胞への出血があったが、実験群では軽減していた。審査委員は、光学顕微鏡による組織像の判定から、好中球の「浸潤」でなく「集積」という言葉が妥当であることを確認し、この結果を受け入れた。
4. 末梢血好中球の O_2^- 産生能は実験群では有意に抑制された。審査委員は、この結果については特に問題を提起しなかった。

以上のことより申請者は、肝虚血再灌流によって、肝組織から放出された PAF がサイトカインの遊離を促進し、それが好中球集積を惹起することによって肝と肺の組織の炎症反応が促進されるものと結論した。本研究は、虚血再灌流時の肝組織において PAF が炎症惹起へ関与していることを明らかにし、肝における細胞間メディエーターの状態を理解する上で基礎となる知識を与え、肝移植や肝部分切除の手術成績向上に貢献でき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) 肝で PAF が作られる部位と経路について
- 2) PAF 拮抗剤の投与方法、生体内濃度、代謝、ラットへの直接効果について
- 3) PAF 拮抗剤の特異性について
- 4) 再灌流時の血流量や酸素濃度などの条件と PAF の放出量との相関について
- 5) 血管灌流洗浄後の血液の残存の程度と灌流圧について
- 6) 肝と肺での好中球集積を異なる方法で測定した理由
- 7) ウミホタルルシフェリンの化学発光で検出できるラジカル種について
- 8) 好中球の集積度とミエロペルオキシダーゼ活性の相関について
- 9) ラット抗好中球特異的単クローン抗体 (p67) 等による好中球同定について
- 10) 肝と肺での好中球の出現部位について
- 11) 肝と肺への好中球集積は、間質への動員の増加によるのか、血管内皮への接着能の増加によるのか
- 12) 肝への好中球の早期出現は内皮細胞の接着分子 (GMP-140、ICAM 等) の発現を伴うか
- 13) 肝虚血の腎への影響について
- 14) 虚血再灌流直後、および 1 週間後における死因の差について

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	山下	昭	副査	教授	吉見輝也
	副査	助教授	室	博之	副査	講師	中辻理子