



EFFECT OF PROTEASE INHIBITOR ON ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY OF THE RAT LIVER

メタデータ	言語: Japanese 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: 李, 小康 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1016

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 163号	学位授与年月日	平成 6年 3月25日
氏 名	李 小 康		
論文題目	EFFECT OF PROTEASE INHIBITOR ON ISCHEMIA / REPERFUSION INJURY OF THE RAT LIVER (ラットの肝虚血再灌流障害におけるプロテアーゼ阻害剤の効果)		

医学博士 李 小 康

論文題目

EFFECT OF PROTEASE INHIBITOR ON ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY OF THE RAT LIVER

(ラットの肝虚血再灌流障害におけるプロテアーゼ阻害剤の効果)

論文の内容の要旨

目的:

肝臓移植の際、早期無機能移植肝の原因として、種々の要因が議論されているが、なかでも虚血に伴う肝障害は主な原因の一つとして考えられている。虚血に伴う臓器障害は、虚血中および血流再開時の再灌流障害が関係するとされ、そのメカニズムとして近年白血球、特に好中球の関与が指摘されている。好中球の生体防護としての機能は異物や細菌の非特異的な破壊機能であり、これは活性酸素とプロテアーゼの共同作業によって発揮される。これまで活性酸素と再灌流障害の関連については多くの検討がなされているが、プロテアーゼとの関連については、検討はいまだ少ない。今回我々は、プロテアーゼ阻害剤である urinary trypsin inhibitor (UTI) を用いることによって、虚血再灌流障害に対する肝保護効果を検討した。

方法:

肝虚血モデルは Bengmark らの慢性肝疾患研究用モデルを修正して作成した。8-10週齢のSD系雄性ラットを用いて、脾臓を皮下に固着し、4週間後、肝虚血実験に供した。ラットの麻酔はエーテル下で行ない、腹部正中切開にて開腹した。肝虚血は肝門部で肝動脈、門脈、胆管を血管用クリップにて遮断することにより行ない、全肝90分間虚血とした。ラット64匹を2群に分け、生食水投与群 (control 群) と UTI 投与群 (UTI 群) について検討した。UTI は、虚血30分前に尾静脈から30,000U/kg を投与した。虚血前 (n=8)、再灌流直前 (n=8)、再灌流後120分 (n=8) に肝組織 myeloperoxidase (MPO) 活性、adenine nucleotide (HPLC 法)、血液生化学指標の測定と、肝病理組織像をおのおの control 群と UTI 群について検討した。また、上記の検討とは別に、各群8匹ずつを用いて、10日の生存率を算出した。

結果:

1) control 群では、再灌流120分後に肝組織 MPO 活性が有意に高値を示したのに対して、UTI 群では、MPO 活性の増加が control 群に比して有意に抑制された ($P < 0.01$)。2) control 群の ATP と energy charge は虚血前に比して有意に激減したが、UTI 群では、その回復が有意に認められた ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。3) 血液生化学検査では、control 群の血清 AST、ALT、LDH 値が UTI 群に比して有意に高値を示した ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。4) 肝病理組織像では、control 群で肝細胞の広範な破壊と好中球の浸潤が認められたが、UTI 群では軽度の細胞間質うっ血と好中球浸潤のみが認められた。5) 90分間の肝虚血を行なった両群における10日間生存率は control 群13% (1/8)、UTI 群75% (6/8) であり、UTI 投与により有意に生存率が延期した ($P < 0.05$)。

考察:

再灌流障害については、活性酸素が単独で作用することは考えにくく、好中球プロテアーゼが再灌流障害に何らかの関与をしていることも考えられ、プロテアーゼに着目した。

好中球が活性化されると、活性酸素の生成とともに好中球プロテアーゼを放出する。好中球プロテ

アーゼのうち肝臓再灌流障害に最も関与すると思われるものは、好中球エラスターゼである。放出されたエラスターゼは組織障害を起こすだけでなく、血管より病変部への好中球の遊走をさらに増強する。MPO 活性は肝臓の病理組織像中にみられる好中球数に比例し、その侵潤の有効な指標と考えられている。好中球と細胞外基質に隣接する類洞内皮細胞との接着機構は再灌流障害の主な病態とされてきた。コラーゲン、プロテオグリカンなどの細胞外基質は単に組織の構築を保つだけでなく、細胞の形態、遊走、増殖、そして分化などを制御しているため、接着した好中球エラスターゼが細胞外基質を容易に分解しうることはきわめて重要である。プロテアーゼの阻害剤である UTI はライソゾーム膜の安定化に強く働き、好中球エラスターゼの放出を阻害する。

今回の実験では、UTI は肝臓再灌流後の好中球蓄積を防ぎ、好中球のエラスターゼ放出を制御させることができた。また、虚血による肝細胞エネルギー代謝障害を防ぐことによって、UTI が何らかの機構でミトコンドリア膜を安定化することが考えられた。さらに、再灌流後120分での血清 AST、ALT、LDH 値が顕著に減少し、UTI は虚血再灌流障害を抑えることが明らかとなった。

以上より、UTI による再灌流障害の軽減作用は好中球エラスターゼの作用を直接抑制し、さらに、UTI がライソゾーム膜を安定化させることにより、好中球エラスターゼの放出を間接的に抑制することが示唆された。

結論：

虚血再灌流障害は単純な反応によって引き起こされるのではなく、様々な要因が関連して起こっているのは明らかであり、今回の実験で好中球プロテアーゼは大きな要因のひとつであることが示唆された。そして、好中球プロテアーゼの阻害作用を持つ UTI は肝臓再灌流障害を抑制し、肝移植の成績を向上させる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

肝移植では虚血後再灌流に起因する臓器障害が重要な組織障害因子の一つと考えられ、再灌流障害には好中球の役割が注目されている。好中球の活性酸素をその主要な機構とする研究が多く、好中球のプロテアーゼの組織障害作用に着目した研究は少ない。本論文はこのような観点からプロテアーゼ阻害剤の肝再灌流障害に対する抑制効果をラット (Sprague-Dawley 系) において検討した研究であり、主要な研究方法・結果・特徴は下記の通りである。

1. プロテアーゼ阻害剤として阻害効果が他の阻害剤より強力である urinary trypsin inhibitor (UTI) を用い、門脈系の側副路作製は脾の皮下転位法を採用し安定した成績をえた。肝組織中の好中球数は myeloperoxidase (MPO) 活性を指標として病理組織所見と対比し、肝細胞障害の程度には逸脱酵素を指標とした。さらに組織の energy charge (EC) を ATP、ADP、AMP 量から求めた。
2. 虚血90分により、(1)低下した ATP、EC は再循環120分において、ともに虚血前 UTI 投与群 (UTI 群) において有意に改善した。(2)UTI は再灌流後の肝逸脱酵素の上昇を抑制し、生存率の改善に有意な効果を示した。病理組織学的にも肝細胞変性・壊死の抑制効果が明瞭であった。
3. 再灌流後対照肝にみられた著明な MPO 活性の上昇・好中球増加は UTI により有意に抑制された。
4. 以上の結果に基づき、申請者は UTI 前処置の再灌流組織障害抑制効果は UTI が好中球プロテ

アーゼ（主としてエラスターゼ）の作用を阻害し、好中球の局所への集合とプロテアーゼによる組織障害を軽減させることにあると考えた。

審査委員会は、本論文は虚血再灌流による肝障害には、従来注目されてきた好中球の活性化にともなう活性酸素だけでなく、好中球のプロテアーゼも重要な因子である可能性を示したものと評価した。

なお本論文の審査の過程において論文内容に関連し、下記のような事項につき質疑応答により検討した。

1. 門脈側副路形成が充分であることを確認できたか
2. 腸管粘膜に虚血性病変のないことを確認したか
3. 組織中の好中球エラスターゼ活性を直接測定できなかったか
4. 組織化学的あるいは免疫組織学化学的に好中球を染色できなかったか
5. 類洞内皮の病変および類洞内皮と好中球の関係を観察したか
6. 肝組織中 MPO 活性と肝内好中球数は相関するか
7. ミトコンドリアの redox とケント体比につき検討したか

これらに対する申請者の応答はおおむね満足できるものであり、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容をそなえているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 白 澤 春 之

副査 教授 寺 尾 俊 彦 副査 教授 馬 場 正 三

副査 助教授 木 村 泰 三 副査 助教授 宮 本 愛