

学 位 論 文 題 名

肝温虚血再灌流障害における Mac-1,
内在性TNF- α , IFN- γ の役割

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

肝臓の温虚血再灌流障害は、肝移植において避けられない障害のひとつであり、移植肝早期機能不全の原因のひとつと考えられている。また肝切除では出血のコントロールのために肝門部での一時的血行遮断がしばしば行われ、これが術後肝機能障害の要因のひとつとされている。最近、肝温虚血再灌流障害の機序として、再灌流後の肝臓に炎症反応がおこり、これにより肝臓が障害を受けるとの仮説が考えられており、好中球やクッパー細胞、それらと関連する各種サイトカインの役割が注目されている。

今回、マウスの肝温虚血再灌流障害モデルを確立することにより、マウスの接着分子、サイトカインに対する単クローン抗体(MAb)の投与が可能となったので、好中球の接着分子であるMac-1, TNF- α , およびマクロファージ活性化因子であり、肝温虚血再灌流障害における役割が注目されているIFN- γ について検討した。

II. 実験材料および実験方法

1. 実験モデル

体重40g前後のddY雄性マウス使用した。ヘパリンを静注後、肝門部で肝正中葉、外側左葉に向かう門脈、動脈、胆管をクリップを用いて50分間遮断し、その後再灌流した。虚血された肝は全体の約7割を占めていた。

採血は、開腹前と再灌流30分, 1, 3, 6, 12, 24時間後に施行した。また採血は1個体より1回だけとし、一度採血した個体は虚血実験に用いなかった。再灌流24時間後には、採血後に虚血肝の一定部分を採取した。

2. MAb

抗マウスMac-1 MAb, 5C6 (rat IgG2b) と抗マウスTNF- α MAb, MP-6-XT22 (rat IgG1) および抗マウスIFN- γ MAb, R4-6A2 (rat IgG1) を阻血前に投与した。コントロール群には正常ラットグロブリンを投与した。

3. TNF- α , IFN- γ の測定

TNF- α , IFN- γ 値はdouble-sandwich ELISA 法を用いて測定した。

4. 肝障害の評価

血漿GPTと、阻血肝断面の組織像より算出した壊死面積割合を用いて行った。

5. ミエロペルオキシダーゼ (MP0) 陽性細胞数

Graham and Karnovskyの方法に準じて 阻血肝組織片のMP0を染色した。50強視野に含まれる陽性細胞数を測定した。

6. 統計処理

測定値はすべて平均値±標準誤差にて表記した。統計処理にはWilcoxon nonparametric rank sum testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

III. 結 果

1. 肝組織及び血中TNF- α , IFN- γ の推移

抗体未投与群で、再灌流後1時間より24時間の間、虚血肝組織でTNF- α の上昇を認めたが、IFN- γ は組織、血中とも測定感度以下であった。

2. 各種抗体の投与効果

1) 抗Mac-1抗体投与の効果

再灌流24時間後血漿GPT値および肝壊死面積は有意な減少を示した。MP0陽性細胞数も有意に減少した。

2) 抗TNF- α 抗体投与の効果

血漿GPT値および肝壊死面積は減少しなかった。MP0陽性細胞数にも有意な変化を認めなかった。

3) 抗IFN- γ 抗体投与の効果

血漿GPT値、肝壊死面積は有意な変動を示さなかった。MP0陽性細胞数にも有意の減少を認めなかった。

4) 抗Mac-1抗体および抗TNF- α 抗体同時投与の効果

血漿GPT値および肝壊死面積は有意な減少を示した。しかしMP0陽性細胞数の減少はなかった。

IV. 考 察

Mac-1(CD11b/18)は、主に顆粒球、単球に認められる重要な細胞間接着分子であり、抗Mac-1抗体の投与によりそれら細胞の接着が抑制され、その機能が抑制されることが予想された。またMP0は、顆粒球、単球に多量に存在するが、肝の虚血再灌流障害で肝に浸潤したMP0陽性細胞数は好中球数を反映するとされている。したがって本実験で抗Mac-1抗体投与後に肝温虚血再灌流障害が軽減したことから、Mac-1分子をブロックすることにより好中球の浸潤が抑えられ、肝温虚血再灌流障害が軽減したことが示唆された。したがって同障害においてMac-1が重要な役割を果たしていると考えられた。

一方虚血肝組織中にTNF- α の上昇を認めたが、抗TNF- α 抗体の投与は障害を軽減することはできず、好中球の浸潤も抑制されなかった。また、抗Mac-1抗体と抗TNF- α 抗体

の同時投与は障害を緩和したが、その程度は抗Mac-1抗体単独投与の場合とほぼ同様であった。以上よりTNF- α の肝温虚血再灌流障害における役割は中心的なものではないと考えられた。また本実験モデルでMac-1が重要な役割を果たしていることを考えると、TNF- α がMac-1活性化の中心的な因子とは考えられなかった。

INF- γ は虚血肝、血液共に検出されなかった。また抗INF- γ 抗体投与は障害を緩和せず、MPO細胞数にも変化を認めなかった。このことから、肝温虚血再灌流障害でINF- γ が発現しているとしてもその量は微量であり、TNF- α と同様にその役割は限られたものであることが考えられた。

V. 結 語

肝温虚血再灌流障害において

- 1) 抗Mac-1抗体投与が障害を軽減したことからMac-1は同障害に重要な役割を果たしていることが示された。
- 2) 抗TNF- α 抗体の投与は障害を軽減しなかったことからTNF- α の同障害に与える影響は小さく、また、Mac-1の活性化にも中枢となる役割は果たしていないと考えられた。
- 3) 抗INF- γ 抗体投与が障害を緩和することができなかったことからINF- γ の役割は限定されたものであると推測された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 上 出 利 光

学 位 論 文 題 名

肝温虚血再灌流障害における Mac-1, 内在性TNF- α , IFN- γ の役割

肝臓の温虚血再灌流障害は、肝移植には避けられない障害のひとつであり、移植肝早期機能不全の原因のひとつと考えられている。肝切除では出血のコントロールのために肝門部での一時的血行遮断がしばしば行われ、術後肝機能の回復を阻害する要因のひとつとなっている。最近、同障害の機序として、再灌流後の肝臓に炎症反応がおこり、これにより肝臓が障害されるとの仮説が考えられており、好中球やクッパー細胞、それらと関連する各種サイトカインの役割が注目されている。

今回、マウスの同障害モデルが確立され、また、マウスの接着分子、サイトカインに対する単クローン抗体 (MAb) の投与が可能になった。そこで申請者は好中球の接着分子である Mac-1、TNF- α 、IFN- γ の同障害における役割について検討した。IFN- γ はマクロファージ活性化因子であり、肝温虚血再灌流障害における役割が注目されている。

研究方法

1. 実験モデル

体重40g前後の ddY 雄性マウスを使用した。ヘパリンを静注後、肝門部で肝正中葉、外側左葉に向かう門脈、動脈、胆管をクリップを用いて50分間遮断し、その後再灌流した。虚血された肝は

全体の約7割を占めた。採血は、開腹前と再灌流30分、1、3、6、12、24時間後に犠牲死させて施行した。再灌流24時間後には、採血後に虚血肝の一定部分を採取した。

2. MAb

抗マウスMac-1 MAb、5C6 (rat IgG2b) と抗マウスTNF- α MAb、MP-6-XT22 (rat IgG1) および抗マウスIFN- γ MAb、R4-6A2 (rat IgG1) を阻血前に投与した。コントロール群には正常ラットグロブリンを投与した。

3. TNF- α 、IFN- γ の測定

TNF- α 、IFN- γ の測定には double-sandwich ELISA法を用いた。

4. 肝障害の評価

血漿GPTおよび阻血肝断面の組織像より算出した壊死面積の割合を用いて行った。

5. ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 陽性細胞数

Graham and Karnovskyの方法に準じて阻血肝組織片のMPOを染色し、50強視野に含まれる陽性細胞数を測定した。

6. 統計処理

測定値はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差にて表記した。統計処理には Wilcoxon nonparametric rank sum testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

研究結果

1. 肝組織及び血中TNF- α 、IFN- γ の推移

抗体未投与群で、再灌流後1時間より24時間の間、虚血肝組織でTNF- α の上昇を認めたが、血液中の濃度は測定感度以下であった。IFN- γ は組織、血中とも測定感度以下であった。

2. 再灌流24時間後の虚血肝切断面のHE染色像

抗体非投与群では、切断面の周辺部を除いて塊状の壊死巣が認められた。壊死部は生存部と比較してヘマトキシリンに染まりにくいことで区別された。壊死巣の最外側部には高度の鬱血帯を認め、その内側に細胞浸潤を帯状に認めた。

3. 各種抗体の投与効果

1) 抗M a c - 1抗体投与の効果

再灌流24時間後血漿G P T値および肝壊死面積は有意に減少した。M P O陽性細胞数も有意に減少した。

2) 抗T N F - α 抗体投与の効果

血漿G P T値および肝壊死面積の減少はなかった。M P O陽性細胞数にも有意な変化を認めなかった。

3) 抗I F N - γ 抗体投与の効果

血漿G P T値、肝壊死面積は有意な変動を示さなかった。M P O陽性細胞数も有意な減少はなかった。

4) 抗M a c - 1抗体および抗T N F - α 抗体同時投与の効果

血漿G P T値および肝壊死面積は有意に減少した。しかしM P O陽性細胞数の減少はなかった。

以上まとめると、

1) 抗M a c - 1抗体投与により障害が軽減したことからM a c - 1は同障害に重要な役割を果していると考えられた。

2) 抗T N F - α 抗体の投与は障害を軽減できなかったことよりT N F - α の同障害に与える直接的な影響は小さく、また、M a c - 1の活性化にも中枢となる役割は果たしていないと考えられた。

3) 抗I F N - γ 抗体投与は障害を緩和できなかったことからI F N - γ の役割は限定されたものと考えられた。

審査にあたって、安田教授よりM a c - 1の種特異性について、加藤教授より抗サイトカイン抗体が無効であったが、抗M a c - 1抗体が有効であった理由、上出教授より抗体投与のタイミングについてなどの質疑があったが、申請者は概ね妥当な回答を行った。

本研究は、肝温阻血再灌流障害におけるM a c - 1、内在性T N F - α 、I F N - γ の役割を示した点で意義があり、学位授与に値するものとする。