

学位論文題名

肝障害時における自己抗体の生成とその意義について

学位論文内容の要旨

薬物による肝障害には、直接の代謝障害による肝障害と薬物アレルギー性反応による肝障害に大別される。前者の場合、実験動物モデルで同様の病態を作ることができ、その障害作用は投与量に依存し、投与から肝障害発現までの期間は一定である。後者の場合、用量非依存的に肝障害を起こし障害の発現は予測不可能とされる。実際の臨床面では薬物アレルギーに起因する肝障害の方がはるかに多く重要であると考えられている。薬物アレルギー性肝障害の最近の研究によれば、患者血清中に自己の細胞構成成分に対する自己抗体が生成し、肝障害との関連性が示唆されているが詳しくは明らかにされていない。これらの自己抗体と肝炎との関連を明らかにするためにはヒトと同様な症状を示す動物モデルの確立が必要とされている。Sasakiらは生後3~4ヶ月で劇症肝炎を自然発症するLong Evans Cinnamon (LEC) ラットを分離樹立した。著者はヒト劇症型肝炎と同様な臨床症状および病理組織像を呈するLECラットにおいて肝炎の発症に自己抗体の関与を考え、肝炎発症の過程で肝の細胞画分の蛋白に対する抗体が存在するか否かについて検討した。ラット肝のホモジネート、核、ミトコンドリア、リソゾーム、ミクロゾームおよび可溶性画分の各蛋白を抗原蛋白とし、15週令で肝炎を発症した20週令のLECラット血清を一次抗体としイムノブロット分析を行ったところ、ホモジネートとミクロゾーム画分で分子量56kDの移動度の所にポジティブな染色バンドが認められた。そこで雌雄LECラットの15週令から22週令まで週1回採血し、イムノブロット法による自己抗体の生成と動物の生死について調べた結果、雌性ラットでは24匹中10匹に肝炎が進展し23週までに死亡し、死亡した全個体の血清中に自己抗体が認められた。雄性LECラットでは13匹中2匹が死亡し、2匹共自己抗体が認められ、生存例で自己抗体は認められなかった。これらの結果から自己抗体の出現とLECラットの肝炎の進行による死亡に有意な相関が示された。この自己抗体はLECラット血清中に特異的に生成していると考えられた。43匹のLECラット血清についてイムノブロット分析を行った結果、分子量56kDの蛋白

に対する抗体を持つ動物が22匹認められ、分子量55kDの蛋白に対する抗体を持つ動物が2匹認められ、両方の蛋白に対する抗体を持つ動物が19匹認められた。そこでこれら2つの抗原蛋白の同定を試み、分子量56kDおよび55kDの蛋白をそれぞれプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)、カルレティクリンと同定した。PDIは肝ミクロゾーム蛋白の1から2%を占めることから、肝細胞が障害を受けPDIが循環系に放出された時、免疫系によって認識されやすいものと考えられた。そこで、本研究では自己抗体の出現頻度の高いPDIを中心に行なった。抗PDI抗体を生成するLECラットに免疫抑制薬のシクロスポリンAと、LECラットで既に知られている肝への銅の異常蓄積を抑制するD-ペニシラミンを投与し、コントロール群と比較し動物の生死、血液生化学的パラメーターおよび抗PDI抗体の抗体価について検討した。その結果、コントロール群では50%のラットが黄疸を呈して死亡したのに対し、シクロスポリンA投与群では7匹中1匹が死亡したのみでD-ペニシラミン投与群では全例生存した。コントロール群およびシクロスポリンA投与群では血液生化学的パラメーターは上昇しシクロスポリンA投与で肝炎の発症を抑制しなかった。D-ペニシラミン投与では血液生化学的パラメーターは正常値の範囲内にとどまり肝炎の発症を抑制した。抗PDI抗体価は死亡したLECラットで増加を示し、生存個体で増加は見られなかった。種々の肝障害薬をSD系ラットに投与し、肝障害を起こした時に抗PDI抗体が生成するか否かイムノブロット法およびRIA法で検討した。D-ガラクトサミン投与群、アセトアミノフェンとジエチルマレート併用投与群および四塩化炭素とジエチルマレート併用投与群に高い割合で抗PDI抗体が認められた。四塩化炭素単独、アセトアミノフェン、DL-エチオニン投与群で抗PDI抗体の出現率は低かった。ジエチルマレート単独群で抗PDI抗体は見られなかった。抗PDI抗体の出現率は血清中GPT活性と相関する傾向が見られた。Verganiらはハロタン肝炎患者血清中の抗PDI抗体が*in vitro*で細胞障害性を示すことを報告している。また最近MandelらはPDIが細胞の膜表面に存在し抗PDI抗体と反応し細胞障害を示すことを報告している。これらの報告と前述の結果より、抗PDI抗体の生成は肝炎の持続進展に重要な役割を演じていることを強く示唆するものと考えられた。そこでアルコール性肝障害、肝硬変、SLEおよび肝癌患者血清中に抗PDI抗体が認められるかどうか、精製PDIを抗原蛋白とし、各患者血清を一次抗体としたイムノブロット分析を行なった。その結果、健常人血清で抗PDI抗体はほとんど認められないのに対し、アルコール性肝障害、肝硬変、SLEおよび肝癌患者血清中に抗PDI抗体が認められた。RIA法で定量的に抗体価を測定すると、中等度アルコール性肝障害患者では24名中11名の48%の血清が陽性で、重症のアルコール性肝障害患者では13名中7名の54%の血

清が陽性であり、健常人血清の平均値の10倍以上の値を示した。肝癌患者血清では6名中4名の血清で陽性であったのに対し、肝以外の癌患者では7名中抗PDI抗体陽性血清は認められなかった。肝硬変とSLE患者では、それぞれ14名中9名、10名中4名の血清が抗PDI抗体陽性であった。アルコール性肝障害患者の血清中 GOT, GPT値はほとんど平常値を示し、血清中の抗PDI抗体を測定することにより患者の肝障害の既往歴を推定することが可能と考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鎌 滝 哲 也
副査	教授	長 沢 滋 治
副査	助教授	高 橋 和 彦
副査	助教授	横 井 毅

学 位 論 文 題 名

肝障害時における自己抗体の生成とその意義について

薬物投与に起因するアレルギー性肝炎についての臨床的な研究は多くなされているがその意義やメカニズムなど詳細な研究は成されていない。特に、自己抗体と肝炎の進展に関する研究はブラックボックスのままとなっている。その理由の一つとして、患者がアレルギー性の肝炎と診断されても過去にさかのぼって肝炎発症の推移を自己抗体と関連づけて追えないことが挙げられる。一方、ヒトにおける薬物性肝炎やアルコール性肝炎など、自己抗体が関与すると考えられる疾患を実験動物モデルで再現した研究はこれまでほとんど報告されていない。

申請者は肝炎を自然発症するラットの血清中に肝炎の進展に相関して肝ミクロゾーム蛋白を抗原とする自己抗体が存在することを発見した。この発見を基盤として、自己抗体の肝炎発症における意義、さらに同じ自己抗体が肝炎患者の血清中、それも治療後の患者血清中に存在することなど一連の研究を行い大きな研究成果を得た。本研究は自己抗体の肝炎発症における意義、ならびにその臨床的応用に有用な概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

1) Long Evans Cinnamon (LEC)ラットにおける自己抗体の出現と肝炎との関連

北海道大学において分離樹立されたLECラットは重篤な肝炎症状を起こし、黄疸になったラットの約40%が発症1週間以内に死亡する。肝炎で死亡しなかったラットは生後1年から1年半で肝がんを発症す

る。申請者はLECラットの血清中に肝の細胞画分の蛋白質に対する自己抗体が存在するか否かを検討し、肝ミクロゾーム画分の56 kDの蛋白質と55 kDの蛋白質に対する自己抗体が存在することを発見した。この56 kDの蛋白質に対する自己抗体は肝炎で死亡した全てのラットに存在していたことから、自己抗体の発現と致死性の肝炎の間に因果関係があることが示唆された。

2) LECラットに出現する自己抗体の抗原の同定

ラット肝ミクロゾーム蛋白を2次元電気泳動し、そのイムノブロット分析を行った。また、2次元電気泳動したのち、該当する蛋白のスポットを切り出し、N-末端アミノ酸配列を決定した。これらの方法により、56 kDと55 kDの蛋白質はそれぞれプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)とカルレチクリンであることを証明した。

3) 免疫抑制剤を投与した時の自己抗体生成と肝炎

上述したように肝炎で死亡したLECラットの個体は全例PDIやカルレチクリンに対する自己抗体を持っていたことから、これら自己抗体が何らかの形で致死性の肝炎に結び付くと考えられた。そこで、免疫抑制剤を投与し、自己抗体の出現を抑えたとときの肝炎の進展に及ぼす効果について検討した。免疫抑制剤であるシクロスポリンAを投与するとLECラットの死亡数が減少し、生存個体では抗PDI抗体の抗体価が低かったことから、抗PDI抗体の出現は肝炎の進展や肝炎による死亡と相関することが明かとなった。

4) 薬物性肝炎時における抗PDI抗体

本研究ではLECラットにおいて肝炎の進展と相関して抗PDI抗体が出現することを見いだしたが、この自己抗体がより一般的な肝障害時にも出現するか否かについて検討した。その結果、種々の薬物で肝障害を起こしたSprague Dawley系ラットの血清中に抗PDI抗体が出現した。したがって、抗PDI抗体は薬物性、非薬物性を問わず、肝炎発症に共通して出現すると考えられた。

5) アルコール性肝障害患者などの血清中抗PDI抗体

アルコール性肝障害、肝硬変、SLE、および肝癌患者血清中に健常人より高い割合で抗PDI抗体が認められ、抗PDI抗体を測定することにより肝障害の既往歴を推定できることが示唆された。

以上、本研究はLECラットの血清中に抗PDI抗体が存在することを発

見したことに端を発し、抗PDI抗体の肝炎発症における意義、患者血清中における抗PDI抗体とその評価など世界的にも独創性の高い研究を展開した。本論文「肝障害時における自己抗体の生成とその意義について」に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。