

学位論文題名

Role of Sialyl Lewis^x in Total Hepatic Ischemia and Reperfusion

(全肝虚血再還流障害における Sialyl Lewis^x の役割)

学位論文内容の要旨

I. 緒 言

Selection familyは虚血再還流後障害に関与する細胞接着分子の一群に分類される。その一つであるP-selecionは血管内皮細胞上に発現し多核白血球(PML)の血管内皮細胞への接着に重要な役割を演じる。一方、Sialyl Lewis^x oligosaccharide (SL^{e^x})はP-selecionのligandでありPMLに存在することから、投与されたSL^{e^x}はPMN上のSL^{e^x}のP-selecionと結合を競合阻害し、それに引き続くPMNの組織への浸潤、障害を抑制すると考えられる。本研究では外因性SL^{e^x}のラット全肝虚血再還流障害での効果を検討した。

II. 材料及び方法

1. 実験モデル 実験動物として雄性Sprague-Dawleyラット(250-275g)を用いた。術前12hrは絶食としたが、飲水は自由摂取とした。ケタラル(100mg/Kg, jp)全身麻酔下に開腹後肝に流入出する側副血行路を全て結紮し、腸管うっ血を防止するため対門脈大循環シャントを設置した。即ち上腸管膜静脈の枝である盲腸静脈を輸血管とし右外動静脈を輸入血管として両者を内径0.86mmのポリエチレンチューブで連結した。ヘパリン(200 IU/Kg)を投与し肝門部において肝動脈、肝静脈、胆管を一括してマイクロクリップでclampし90分間の虚血を与えた。虚血終了後閉腹し6時間の再還流後に標本を採取した。

2. 実験群 再還流時に生食を投与したcontrol群、肝門部のclampのみを行わなかったsham群、SL^{e^x}(25mg/Kg)を再還流5分前に投与したSL(5)群、再還流と同時に投与したSL(0)群の4群に分類した。

3. 生化学的検査 血清AST、ALT、LDHを測定した。

4. 肝組織中Myeloperoxidase(MPO)の測定 Bradleyら、Mullaneらの方法に準じた。即ち、50mM potassium phosphate bufferをpH 6.0に調整した溶液に0.5% exadecyltrimethyl ammonium bromideと0.146% EDTAを加え、肝組織0.5gを4℃でhomogenizeした。これを液体窒素と37℃の温水槽に交互に3回ずつ侵入後、3℃において30分間、12,500gで遠心し上清を60℃で2時間保温した。このサンプルにpH6.0に調整した50mM phosphate bufferと0.167mg/ml 0-dianisidine dihydrochlorideと0.005% hydrogen peroxideを加え、分光光度計で460nmにおける吸光度の変化を測定しMPO活性を求めた。1 MPO Unitは25℃で1分間に1 μmolのperoxideを変性させる量とした。

5. 組織学的分析 HE染色により肝組織のnecrosisの程度を、0=none、1=single cell necrosis、2=30%以下necrosis、3=30~60%neceosis、4=60%超necrosisの5段階に分類した。またWoloneyらによるNaphthol AS-D-Chloroacetate asterase techniqueによりPMNを染色し陽性細胞を400倍にて50視野観察しPMN数をcountした。

6. 統計学的分析 測定値は全てMEAN $\pm$ SEMで示した。有意差検定にはANOVA(student-New man-Keuls)を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

III. 結 果

1. 生化学的検査 血清AST、ALT、LDH(IU/L)濃度はsham群でそれぞれ 208 ± 35 、 74 ± 13 、 453 ± 80 と低値であった。90分の虚血を加えたcontrol群では 5843 ± 316 、 5051 ± 600 、 4273 ± 4324 と著名に上昇したが、SL(5)群では 2700 ± 389 、 2711 ± 527 、 17680 ± 7183 に、またSL(0)群では 3167 ± 498 、 2982 ± 535 、 14120 ± 5013 にいずれも有意差を持って低下した。

2. 肝組織中MPO活性 sham群のMPO活性(U/100mg tissue)は 0.74 ± 0.34 であったが、control群に比べ有意差をもって低下した。

3. 組織学的分析 HE染色：sham群では肝sinusoid内のうっ血と広範囲な肝葉壊死が認められ、neceosisの程度は 3.2 ± 0.2 であった。SL eXの投与によりうっ血は軽減しnecrosisはperiportal、pericental域に局限した。necrosisの程度はいずれも 2.3 ± 0.2 でcontrol群と比べ有意に低下した。Naphthol染色：sham群におけるPMN数は 88 ± 12 であったがcontrol群では 543 ± 54 と増加した。SL(5)群では 373 ± 57 、SL(0)群では 308 ± 39 とcontrol群と比べいずれも有意差を持って減少した。

IV. 考 察

本研究ではsialyl LewisX(25mg/Kg)の投与がラットの重篤な全肝虚血再還流モデルにおいて肝機能、多核白血球浸潤、肝組織所見でいずれも改善したということを示した。SL eXのin vivoでの炎症、虚血再還流障害での研究はわずかにコブラ毒による肺炎症モデル、ラット下肢虚血モデルでの遠心肺組織障害、猫及び犬の心筋虚血再還流障害モデルで行われているにすぎないが、いずれの研究においても炎症あるいは障害の軽減が確認されている。この薬剤の投与時期に関しては、これらの研究のうち心筋虚血モデルではSL eXは再還流の5分か10分前に、遠隔組織障害モデルでは1~3hr後に投与されている。またこれらの研究ではSL eXの類似体であるnon fucoslatedあるいはnon sialylated oligosaccharideがcontrol薬剤として投与されているが、改善効果は認められていない。外因性のSL eXの障害抑制作用のメカニズムは明確には述べられていないが、外因性のSL eXはPMN上に存在するSL eXが血管内皮や血小板に発現されたselectionと結合するのを競合阻害し、それに引き続くPMNの細胞接着や浸潤を押さえると考えられる。

V. 結 語

1. Sialyl LewisX(25mg/Kg)の再還流5分前あるいは同時投与はPMNの肝組織浸潤並びに肝虚血再還流障害を改善させた。

2. sialyl LewisXの肝虚血再還流障害の初期における役割が考えられ臨床応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 北 畠 顯

学 位 論 文 題 名

Role of Sialyl Lewis^x in Total Hepatic Ischemia and Reperfusion

(全肝虚血再還流障害における Sialyl Lewis^x の役割)

Selectin familyは虚血再還流障害に関与する細胞接着分子の一群に分類される。その一つであるP-selectinは血管内皮細胞上に発現し、多核白血球(PMN)の血管内皮細胞への接着に重要な役割を演じる。一方Sialyl Lewis^x(SLe^x)はP-selectinのligandでありPMN上に存在することから、外的に投与されたSLe^xはPMN上にある既存のSLe^xのP-selectinとの結合を競合阻害し、それに引き続くPMNの組織への浸潤を抑制すると考えられる。本研究では外因性SLe^xのrat全肝虚血再還流障害モデルでの効果を検討した。

材料と方法：実験動物として雄性のSprague Dawley系rat(250-275g)を用い、鈴木らによる門脈大循環シャントを併用した全肝虚血再還流障害モデルを作成した。ケタラル(100 mg/Kg、ip)全身麻酔下に右外頸静脈に内径0.86mmのポリエチレンチューブを挿入し、ヘパリン200IU/Kgを投与後開腹し肝の側副血行を結紮、ポリエチレンチューブの他端を門脈の末梢である盲腸枝に挿入しシャントを完成した。肝門部で肝動脈、門脈、胆管を一括してマイクロクリップでclampし、90分間の虚血を与え、6時間の再還流後標本を採取した。SLe^xはCytel Corp.(San Diego)よりSLe^xのanalogであるCY-1503を得た。実験群は再還流時に生理食塩水を投与したcontrol群、肝門部clampだけを行わなかったsham群、CY-1503(25mg/Kg)を再還流の5分前あるいは再還流と同時に投与したものの4群に分類した。肝障害の評価として血漿中AST、ALT、LDHを測定した。PMN浸潤の指標として肝組織中のMyeloperoxidase(MPO)の測定はBradleyら、Mullaneらの方法に準じた。組織学的分析としてHE染色で肝壊死の程度を、0=none、1=single cell necrosis、2=30%以下necrosis、3=30-60%necrosis、4=60%超necrosisと分類し評価した。またMoloneyらのNaphthol AS-D chloroacetate techniqueによりPMNを染色し、陽性細胞を400倍で50視野観察してPMN数をcountした。統計学的分析はAnalysis of variance(Student Newman Keuls)で行い、危険率 $p<0.05$ を有意差ありとした。測定値はすべてMean $\pm$ SEMで示した。

結果：血漿中AST、ALT、LDHはSham群でそれぞれ 208 ± 35 (IU/L)、 74 ± 13 (IU/L)、 453 ± 80 (IU/L)と低値であった。90分の虚血を与えたcontrol群では $5,843\pm 316$ 、 $5,051\pm 600$ 、 $42,373\pm 4,324$ と著明に上昇したが、CY-1503投与群では再還流の5分前に投与したものは 2700 ± 38 、 $2,711\pm 527$ 、 $17,680\pm 7,183$ に、また再還流と同時に投与したものでは $3,167\pm 498$ 、 $2,982\pm 535$ 、 $14,120\pm 5,013$ といずれも有意差をもって低下した。肝組織中のMPO活性量はsham群では 0.74 ± 0.34 (U/100mg tissue)であったが、control群では 3.58 ± 0.28 と増加した。CY-1503投与群では再還流の5分前に投与したものでは 2.46 ± 0.28 、再還流と同時に投与したも

のでは 2.15 ± 0.28 とcontrol群に比べ有意差をもって低下した。HE染色によるnecrosisの程度はsham群ではnecrosisは認められなかったが、control群ではnecrosis scoreは 3.2 ± 0.2 であるのに対し、CY-1503投与群ではともに 2.3 ± 0.2 と有意に低値を示した。Naphthol染色によるPMN数はsham群では 88 ± 12 であったが、control群では 543 ± 54 と増加した。CY-1503投与群では再還流の5分前に投与したものでは 373 ± 57 、また再還流と同時に投与したものでは 308 ± 39 とcontrol群に比べいづれも有意差をもって低下していた。

以上よりSLe^xのanalogであるCY-1503(25mg/Kg)を再還流の5分前あるいは同時に投与することによりラットの全肝虚血再還流障害モデルにおいて肝障害および肝の多核白血球浸潤が軽減されたことが示された。CY-1503の肝虚血再還流障害の初期における効果よりこの化学物質の臨床応用の可能性が示唆された。

副査の北畠教授からcontrol drugであるシアリル化あるいはフコシル化されていないOligosaccharideの効果、他の抗細胞接着分子抗体の効果、薬剤投与時期、side effect等について、また石橋教授から臨床での薬剤投与時期、CY-1503の化学構造、生物学的な有効性に関しての質問があった。申請者は文献的にシアリル化あるいはフコシル化されていないOligosaccharideでは効果が認められないこと、抗ICAM-1抗体、抗P-selectin抗体、抗SLe^x抗体などの抗細胞接着分子抗体では有効性が認められていること、SLe^xの半減期とP-selectinの発現時期から薬剤投与時期を決めたこと、局所投与によるside effect軽減の可能性などを回答した。また臨床での薬剤投与の時期、CY-1503の化学構造、肝組織所見からみた生物学的な効果についても回答した。

審査員一同は、これら研究の成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。