学位論文題名

A study of liver and corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme activities associated with glucocorticoid hepatopathy in the dog

(イヌのステロイド肝症における肝臓およびグルココルチコイド誘発性アルカリホスファターゼアイソザイムに関する研究)

学位論文内容の要旨

イヌやヒトなどの多くの動物種において、過剰な内因性および外因性グルココルチコイドによる様々な病態の発生が知られている。イヌのグルココルチコイド療法では、血清アルカリホスファターゼ (ALP) 活性値が上昇し、肝細胞の可逆的な空胞変性を伴う肝障害を起こすステロイド肝症を誘発することがある。グルココルチコイド投与による血清ALP活性値の上昇はステロイド肝症の発症よりも高頻度にみられる。一方、グルココルチコイド療法を受けた全てのイヌに生化学的あるいは病理組織学的変化がみられるとは限らない。ステロイド剤による肝障害は、投与されたステロイド剤の種類に関係なく引き起こされ、障害の程度は投与した薬物、用量、治療期間の違いおよび動物個体差などの種々の要因に影響される。イヌのALPアイソザイムには骨由来ALP (BALP)、肝臓由来ALP (LALP) およびグルココルチコイド誘発性ALP (CALP) が存在する。グルココルチコイド投与後の血清ALP活性値の上昇は主にCALPの上昇に起因するが、イヌではグルココルチコイド投与後のCALPの上昇は必ずしも認められないことがある。また、ALPアイソザイムの変動と肝細胞の空胞変性の程度との関連は明らかにされていない。本研究では、ステロイド肝症における肝細胞の空胞変性とALPアイソザイムの変動の関係を明らかにする目的で、実験的にイヌのステロイド肝症を作出し、ALPアイソザイムの測定、肝臓の超音波検査、病理組織学的検索および組織化学的検索を行った。

第1章ではレバミゾールを用いた酵素阻害法と小麦胚芽レクチン (WGL) による沈殿法を組み合わせ、各ALPアイソザイムの測定法を確立した。CALPの測定は、血清に4.2 mMになるようにレバミゾールを加え、BALPとLALPを抑制することにより測定した。また、50 mg/lのWGLを

血清に加えて遠心分離することによりBALPを沈殿除去し、その上清を測定することによりBALPを除いた血清ALP活性値を測定することができた。こうして測定された値を処理前の血清ALP活性値から減じることによりBALPが算出された。また、BALPを除いた血清ALP活性値からCALPを引いてLALPを算出した。ALPアイソザイムの標準血清として、BALPは幼若犬血清を、LALPは胆管結紮後の成犬血清を、CALPは4.4 mg/kgのブレドニソロンを30日間投与した成犬血清を用いた。各標準血清のアイソザイム組成をアフィニティー電気泳動法により確認した。この測定方法を用い、正常犬の加齢に伴うALPアイソザイムの変動や血清ALP活性値が高値を示した犬における各ALPアイソザイムを測定した。その結果、レバミゾールを用いた酵素阻害法とWGLによる沈殿法を組み合わせる方法は、イヌのALPアイソザイムの定量分析に適しており、日常の臨床検査に応用可能であることが示唆された。

第2章および第3章では、上述の測定方法を用いてALPアイソザイムとステロイド肝症における肝細胞の空胞変性の程度との関係について検討した。肝細胞の空胞変性の程度は、病変を点数化して評価した。超音波検査では、同一画像上の肝臓実質と右腎臓皮質のヒストグラム解析をそれぞれ行って肝腎コントラストを用いて評価した。肝臓の空胞変性の程度が有意に高い検体は、血清ALP活性値も有意に高い値を示した。この血清ALP活性値の上昇はLALPおよびCALPの上昇に起因したが、その大部分はCALPの上昇によるものであった。CALPは肝臓の空胞変性の程度と相関して上昇することが明らかになった。しかし、LALPはグルココルチコイドを投与した全てのイヌで活性値の上昇が認められたが、空胞変性の程度とは相関しなかった。これらのことから、CALPの変動はイヌのグルココルチコイド投与に伴う肝障害における肝細胞の空胞変性の程度を直接的に反映している可能性が示唆された。

第4章では、肝臓組織内のALPアイソザイムの分布を調べる目的で肝臓の組織化学的検索を行った。LALPとCALPを染色した標本を、レバミゾールで処理することによりCALPのみを特異的に識別することができた。正常肝臓では、LALPは門脈周囲の肝細胞に認められたが、CALPは認められなかった。グルココルチコイド投与により、LALPは肝小葉全体にび漫性に認められたが、CALPは小葉中心性に認められ、そのほとんどが空胞変性した肝細胞に存在していた。したがって、肝細胞の空胞変性が重度になるに伴いCALPの分泌が増加し、CALPが上昇すると考えられた。このことから、CALPはステロイド肝症における肝細胞の空胞変性の程度の臨床的指標として有用であることが示唆された。一方、グルココルチコイドを投与した全てのイヌでは空胞変性の程度に関係なくLALPが上昇したことから、LALPは肝臓の空胞変性の進行に特異的ではないことが明らかになった。

以上の成績から、イヌのALPアイソザイムの定量分析はレバミゾールを用いた酵素阻害法とWGLによる沈殿法を組み合わせることで十分可能であること、ステロイド肝症ではLALPとCALPの両方の活性値が上昇するが、CALPのみが肝細胞の空胞変性の程度と良好な相関を示すことが明らかとなった。

本研究によって、CALP上昇の機序を解明したことにより、内因性および外因性ステロイド肝症におけるCALP測定の意義が明らかとなり、臨床酵素診断におけるその有用性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 本 晃
副 査 教 授 前 出 吉 光
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 助 教 授 安 田 準

学 位 論 文 題 名

A study of liver and corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme activities associated with glucocorticoid hepatopathy in the dog

(イヌのステロイド肝症における肝臓およびグルココルチコイド誘発性アルカリホスファターゼアイソザイムに関する研究)

イヌでは内因性あるいは外因性の過剰のグルココルチコイド (GC) に起因する肝細胞の可逆的な空胞変性を伴うステロイド (S) 肝症の発生が臨床的にしばしば問題になる。本論文では、S肝症における肝細胞の空胞変性とアルカリホスファターゼ (ALP) アイソザイムの変動との関係を明らかにする目的で、実験的にS肝症を作出し、検索を行って以下の成果を得た。

最初に、レバミゾールを用いた酵素阻害法 (阻害法) と小麦胚芽レクチンによる沈殿法 (沈殿法) を組合わせて、骨由来ALP、肝臓由来ALP (LALP) およびGC誘発性ALP (CALP) の測定法を確立した。阻害法と沈殿法を組み合わせた測定方法は、LALPおよびCALPの定量分析に適しており、日常の臨床検査に応用できることを明らかにした。

次に、肝細胞の空胞変性の程度を病理組織学のおよび超音波を用いたヒストグラム解析によって評価し、ALPアイソザイムとの相関性を検討した。その結果CALPが肝細胞の空胞変性の程度とよく相関して上昇することが明らかとなり、CALPの変動はGC投与に伴う肝障害で、肝細胞の空胞変性の程度を直接的に反映している可能性が示された。

さらに、GC投与に伴うALPの変動に関与するLALPとCALPの肝臓組織内における分布を調べるため、組織化学的検索を行った。GC投与により、LALPは肝小葉全体にび慢性に認められたが、CALPは小葉中心性に認められ、そのほとんどが空胞化した肝細胞に存在することが明らかとなった。このことから

CALPは肝細胞の空胞変性の程度の臨床的指標として有用であると思われた。

以上のように、申請者はCALP上昇の機序を解明したことにより、S肝症におけるCALP測定の意義を明らかにし、臨床酵素診断学における有用性を示した。これらの成績は獣医学の進展に大きく貢献する。よって審査員一同はミチェロ・S. シャカリマ氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると認めた。