

## 学位論文題名

ラット培養肝実質細胞からの Cu,  
Zn-SOD 逸脱についての検討

## 学位論文内容の要旨

臓器虚血・再灌流障害にフリーラジカルが関与することが、近年報告されている。肝臓外科領域でも拡大肝切除時や移植時には虚血・再灌流障害は避けることができず、このような病態下でのフリーラジカル産生やラジカルスカベンジャーの有用性が検討されている。クッパー細胞や血管内皮細胞、好中球は様々な刺激に対しスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) を細胞外に放出することが知られており、肝虚血・再灌流時にはこれらの細胞が  $O_2^-$  を放出するものと考えられる。一方、肝実質細胞は無酸素・再酸素化を行っても  $O_2^-$  を放出せず、従って上記の様な病態下では周囲の非実質細胞や浸潤した好中球の産生する  $O_2^-$  により攻撃されるものと考えられる。この観点から培養肝実質細胞に  $O_2^-$  を作用させ、細胞がどのように変化するかについていくつかの報告がなされている。しかし、作用させた  $O_2^-$  の変化、即ち肝実質細胞が細胞外  $O_2^-$  に対してどのように反応したかの報告はない。本研究では、まず肝実質細胞が細胞外  $O_2^-$  に対してどのような反応を示すかを検討した。その結果、肝実質細胞は  $O_2^-$  消去物質を放出することが判明した。そこで  $O_2^-$  消去物質の同定を行い、その経時的な放出パターンについて検討を加えた。

第一に細胞外  $O_2^-$  に対する肝実質細胞の反応について以下の実験をおこなった。Wistar 雄性ラットを用い、既報に従ってコラゲナーゼ灌流法にて肝実質細胞を分離した。肝実質細胞は L-15 medium を用い空気環境下で培養し 24-30 時間後に実験に供した。細胞を phosphate buffer saline (PBS) にて洗浄後、 $O_2^-$  産生速度が  $12 \mu M/min$  となるよう調節した xanthine oxidase, hypoxanthine および 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO, spin trap 剤) を 1 分間作用させ、その 2 分後より electron spin resonance 法を用いフリーラジカルを測定した。ESR 測定には JEOL 社製 RE1X spectrometer を使用、flat cell を用い、室温で行った。測定条件は、microwave power 10mW、field modulation 100kHz、amplitude 0.1mT、scan time 4 分、time constant 0.03 秒、magnetic field  $334.4 \pm 10mT$  で全分析を行い、同時に測定した MnO との間でシグナル強度を比較した。反応液のみを測定した場合、二つのシグナルが観察された。主たる成分は 1 : 1 : 1 : 1 の強度をもつ 12 本線のシグナルを有しており超微細構造から DMPO-OOH 即ち DMPO が  $O_2^-$  をトラップしたものであった。他のシグナルは DMPO-OH であったが強度は小さく、前者を  $O_2^-$  に対する反応として測定した。肝細胞に  $O_2^-$  を反応させた場合シグナルは著明に減少した。Cu,Zn-SOD 阻害剤である diethyldithiocarbamate (DDC) で肝細胞を前培養するとこの減少は抑えられ、また fibroblast ではシグナル減少は軽度であった。以上のことから肝実質細胞から  $O_2^-$  消去物質が逸脱することが判明した。この逸脱には  $O_2^-$  刺激の有無による差異はみられなかった。従って、 $O_2^-$  に対する特異的なものではなく、物理的なストレスが逸脱の要因であると考えられた。

第二に逸脱物質の同定を行い、逸脱のパターンについて検討した。 $O_2^-$  消去物質を同定するために反応液の一部を用い、White らの方法に準じ電気泳動を行った。その結果二本線のバンドが検出され、 $O_2^-$  消去物質は Cu,Zn-SOD であると考えられた。確認のため抗 SOD 抗体を用い Western

blot 分析を行った所、16kDa のバンドが検出され上記の結果が証明された。さらに、DDC ・ potassium cyanide (KCN)による抑制効果についても検討したが、O<sub>2</sub>消去能は両者により完全に抑えられ、本実験系で認められるO<sub>2</sub>消去物質は Cu,Zn-SOD 一種類であると判断された。従って、肝実質細胞から物理的ストレスにより、O<sub>2</sub>消去物質として Cu,Zn-SOD が逸脱することが判明した。

次に逸脱のパターンについて逸脱酵素として知られている lactate dehydrogenase (LDH)と比較し検討を加えた。肝実質細胞培養後 0-24、24-48、48-72 時間を各々、Day 1、2、3とした。各 Day において medium 中および細胞 lysate 中の SOD および LDH 活性を測定した。Medium 中の SOD 活性測定には電気泳動後、NIH image program を用いた。細胞 lysate 中の SOD 活性測定にはチトクローム c 還元法を用い、LDH 活性測定は、medium 中、細胞 lysate 中ともに Kyokuto MTX “LDH” Kit を用いた。まず、Day 1 において medium 中の SOD、LDH を経時的に測定した。24 時間後を 100%として比較検討すると、1、3、6、12 時間後の SOD 逸脱は各々 48.8±3.1、58.9±2.8、66.8±3.2、76.9±0.9%であった。一方 LDH のそれは 13.6±2.1、14.9±1.7、20.3±0.8、39.1±1.6%であり、いずれのポイントでも SOD の逸脱率が有意に高かった。従って、SOD 逸脱は早期に起こることが判明した。次に、各 Day での逸脱を比較した。各々の酵素の逸脱率を (Day n における medium 中の酵素活性) / (Day n における medium 中の酵素活性 + Day n における細胞 lysate 中の酵素活性) で計算した。Day 1、2、3 の逸脱率は SOD で 16.7±1.8、13.0±1.8、21.8±2.9%で、LDH で 27.8±3.6、21.3±6.7、40.3±5.8%であった。SOD、LDH ともに Day 1 から Day 2 にかけて減少し、Day 3 で上昇する同様のパターンを示した。即ち、SOD は日単位で見ると LDH と同様の逸脱傾向を示すが、時間単位では非常に早く逸脱することがわかった。また、各 Day において残存肝実質細胞の SOD 濃度を測定すると各々 17.6±1.7、16.9±1.2、18.5±1.5 U/mg protein であり、差はなかった。従って、SOD 逸脱は障害細胞からのものと考えられた。

これまでに肝実質細胞からの SOD 逸脱を測定、検討した報告はない。本研究により肝実質細胞から物理的ストレスにより早期に SOD が逸脱することが判明した。肝移植時や肝切除時に起こる虚血・再灌流の病態下では虚血時に生じた肝実質細胞障害に加え、再灌流の物理的ストレスにより Cu,Zn-SOD が bolious に逸脱すると思われる。これは周囲非実質細胞や浸潤好中球によりO<sub>2</sub>が産生されるのとはほぼ同時と考えられ、O<sub>2</sub>は消去される。これにより一酸化窒素等を介するヒドロキシラジカル生成経路がブロックされるものと考えられ、Cu,Zn-SOD 逸脱は受動的であっても細胞保護的に作用し合目的なものと考えられた。

さらに、この Cu,Zn-SOD 測定を様々な病態下で用いることにより、フリーラジカルの役割をさらに解明することができると思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省  
副 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

## ラット培養肝実質細胞からの Cu, Zn-SOD 逸脱についての検討

臓器虚血・再灌流障害にフリーラジカルが関与し、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) やこれを起点とする活性酸素種に関し多くの研究がなされている。クッパー細胞や血管内皮細胞は無酸素・再酸素化時に  $O_2^-$  を放出することが知られており、このような病態では SOD が重要な役割を果たすものと考えられる。申請者は培養肝実質細胞が無酸素・再酸素化を行っても  $O_2^-$  を放出しないことから各種の細胞が放出する  $O_2^-$  により攻撃されるものと考え、「肝実質細胞は細胞外  $O_2^-$  を消去する」という仮説を検証した。実験はラット培養肝細胞を用い、 $O_2^-$  を作用させた時の変化、 $O_2^-$  消去物質の変化が  $O_2^-$  に特異的なものか否か、さら消去物質の同定を行い、その逸脱のパターンについて LDH と比較検討した。その結果 ESR 法による検討で肝実質細胞は細胞外  $O_2^-$  をすばやく消去した。この消去は  $O_2^-$  に特異的なものではなく、物理的な要因が大きいことが判明した。電気泳動および Western blot 分析からこの物質は Cu, Zn-SOD 一種類であることが判明した。LDH との比較で早期に bolus に逸脱することが判明した。これらの実験事実は虚血・再灌流時等の病態下で逸脱した Cu, Zn-SOD が他の細胞の産生する  $O_2^-$  を消去し、他の有害なラジカルの産生を抑える可能性を示唆し、さらに検討を加える意義があるものと考えられた。

審査にあたって、浅香教授から研究の目的、他の細胞種での検討、Cu, Zn-SOD の局在、DDC の薬理作用、逸脱が受動的なものかどうか、NO の関連について質問があった。申請者は虚血・再灌流に関する文献、 $O_2^-$  や Cu, Zn-SOD に関する文献、申請者自身の実験データを用いて、虚血・再灌流障害に関しては議論も多いが肝実質細胞に関してはフリーラジカルを放出するという報告がほとんど無いことから細胞外  $O_2^-$  に攻撃される可能性が高いこと、他の細胞種については今後の検討が必要なこと、Cu, Zn-SOD は主として細胞質に存在すること、DDC は酵素の活性中心である Cu, Zn を抑えること、逸脱は本実験系からは受動的であるが意義を持つ可能性があること、NO については今後の検討が必要なこ

とを回答した。次いで、加藤教授より *in vivo* の実験結果を *in vitro* にどう結びつけて考えるのか、また臨床応用の可能性についてはどうか質問があった。申請者は肝虚血・再灌流に関する文献、申請者自身の実験データを用いて、臓器虚血・再灌流障害では再灌流時に血液が流入するため好中球などの細胞が関与し、また各々の細胞で cell contact の障害や膜障害の程度が異なるため今後さらに検討が必要なこと、Cu,Zn-SOD 逸脱は肝障害を早期にとらえる指標となる可能性があること、ある種の病態下では適切な Cu,Zn-SOD 投与により臓器保護の可能性のあることを回答した。最後に、藤堂教授から本実験の今後の発展性についての質問があった。申請者は肝虚血・再灌流に関する文献、各種培養細胞を用いた  $O_2^-$ 、NO 産生に関する文献、自身の実験データから肝虚血・再灌流時における門脈中や肝静脈中の Cu,Zn-SOD の活性の変化やラジカルの検出、さらに Cu,Zn-SOD 投与による臓器保護の可能性、 $O_2^-$  や NO を産生すると考えられているクッパー細胞や血管内皮細胞と肝実質細胞との co-culture による病態の解明の可能性などを明快に答えた。

審査員一同はこれらの成績を高く評価し、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。