

エダラボン (ラジカット®) は類洞内皮細胞を 保護することにより、酸化ストレスから肝臓を保護する

学位論文内容の要旨

(背景) 肝の移植や切除に伴う阻血再灌流傷害は解決すべき課題であり、その機序解明のための研究が行われてきたが、臨床で使用できる方法は確立されてない。酸化ストレスは阻血再灌流傷害の一因であり、移植片機能不全の原因となる。抗酸化治療は阻血再灌流による酸化傷害に対する治療法として期待されている。エダラボン (ラジカット®) は脳梗塞急性期の治療に臨床使用されているラジカルスカベンジャーである。エダラボンは心や腎の阻血再灌流障害を軽減する。また、冷保存再灌流、温阻血再灌流による肝実質の酸化障害を軽減する。しかし、エダラボンが肝を構成する各細胞種、特に非実質細胞に及ぼす効果は明らかではない。

(目的) 肝温阻血再灌流傷害におけるエダラボンの効果を個体、臓器レベルで明らかにする。また、肝を構成する各細胞種の酸化ストレス感受性、抗酸化能、およびエダラボンの細胞保護効果を明らかにする。

(材料と方法) *in vivo* 実験ではラットの 70%部分肝温阻血再灌流モデルを用い、90 分の温阻血を施し、再灌流した。治療群にはエダラボンを阻血開始前に 30 分間持続投与(3mg / kg / 30 分)し、再灌流の 30 分前から同量のエダラボン(3mg / kg / 60 分)を持続投与した。コントロール群には生理食塩水を同様に投与した。(評価項目) 一週生存、血清 ALT 活性、総胆汁酸濃度、過酸化脂質(MDA + 4-HNE)、抗酸化能(GSH / GSSH)。 *in vitro* 実験ではラット肝より肝細胞、類洞内皮、クッパー、および星細胞を単離培養し、各細胞に過酸化水素(10 および 100 μ M)を添加して酸化ストレスに曝露し、エダラボン(10, 50, 100 μ M)の傷害抑制効果を評価した。細胞傷害度を%LDH で、DNA の酸化傷害を 8-hydroxy-deoxyguanosine の免疫染色で、ミトコンドリア障害をローダミン 123 の蛍光強度で評価した。各細胞種の培養液に過酸化水素を添加し、過酸化水素濃度を経時的に測定し、その消去能を評価した。

(結果) *in vivo* 実験においてラット 70%部分肝温阻血再灌流後の一週生存率は、コントロール群で 37.5%、エダラボン投与群で 87.5%であった。再灌流後の ALT 活性および総胆汁酸濃度の上昇、阻血終了直後および再灌流後における GSH / GSSG の低下、過酸化脂質の増加はいずれもエダラボン投与によって軽減された。*in vitro* 実験において、100 μ M の過酸化水素を 120 分間負荷した際の%LDH は肝細胞、星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞でそれぞれ $6.2 \pm 2.7\%$ 、 $26.6 \pm 7.0\%$ 、 $87.9 \pm 3.0\%$ 、 $90.0 \pm 1.8\%$ であった。10 μ M の過酸化水素では類洞内皮細胞のみが傷害された。各細胞に 100 μ M の過酸化水素を添加し、60 分後の残存過酸化水素は類洞内皮細胞で高値であったのに対し、クッパー細胞、星細胞では低値であった。肝細胞では添加後 15 分より過酸化水素は検出できなかった。過酸化水素による類洞内皮細胞の酸化傷害に対し、エダラボンは用量依存的に傷害を抑制した。また類洞内皮細胞の DNA の酸化傷害、ミトコンド

リア障害もエダラボンで抑制された。カタラーゼ、デフェロキサミンはクッパー細胞、星細胞の酸化傷害を抑制したが、エダラボンは抑制しなかった。

（考察）肝構成細胞の過酸化水素消去能は細胞種によって異なり、肝細胞の抗酸化能は非実質細胞に比べて高かった。類洞内皮細胞は最も抗酸化能が低く、他の細胞種では傷害がおこらない程度の酸化ストレスでも傷害された。類洞内皮細胞は早期の、軽度の酸化ストレスによっても傷害され、肝の酸化傷害のトリガーになることを示唆していた。

本実験ではエダラボンが肝温阻血再灌流傷害を軽減し、生存率を改善した。またエダラボンが類洞内皮細胞の酸化傷害を軽減した。カタラーゼやデフェロキサミンはクッパー細胞、星細胞の酸化傷害を軽減したが、エダラボンは傷害を軽減しなかった。過酸化水素がラジカル種に変化しておこる直接傷害はエダラボンによって軽減できるが、過酸化水素による細胞内情報伝達の変化(NF- κ B の活性化など)はエダラボンでは阻害できないと考えられた。抗酸化療法以外の治療の併用効果を検証することも今後の重要な検討課題である。

（結語）エダラボンは肝温阻血再灌流障害を軽減した。またエダラボンは肝構成細胞の中で最も酸化ストレス感受性が高い類洞内皮細胞を保護し、肝の酸化傷害を軽減することが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

エダラボン（ラジカット®）は類洞内皮細胞を 保護することにより、酸化ストレスから肝臓を保護する

肝阻血再灌流障害は解決すべき重要な課題であるが臨床で使用可能な制御法は確立されていない。酸化ストレスは阻血再灌流障害の一因であり、抗酸化治療は阻血再灌流障害の治療法として期待されている。エダラボン（ラジカット®）は脳梗塞急性期の治療に臨床使用されているラジカルスカベンジャーである。申請者はラットの70%部分肝温阻血再灌流モデルを用い、エダラボンが肝温阻血再灌流後の生存率を改善させること、阻血再灌流による血清 ALT や総胆汁酸濃度の上昇、肝組織脂質過酸化の増加および抗酸化能（GSH/GSSG 比）の低下を抑制することを示した。申請者はまた、肝構成細胞である実質細胞、星細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞をラット肝よりそれぞれ単離し、細胞種によって抗酸化能が異なることを示した上で、類洞内皮細胞が最も酸化ストレス感受性が高い細胞種であり、他の細胞種が障害を受けない低濃度の H_2O_2 で障害を受けること、エダラボンが容量依存的に類洞内皮細胞の酸化障害を軽減することを明らかにした。

公開發表後、副査 筒井教授より 1) *in vivo* における肝実質細胞障害の原因 2) 阻血再灌流障害における類洞内皮細胞障害の形態 3) 肝移植治療においてエダラボンをどのように臨床応用するか、の質問があった。それに対して、1) 肝阻血再灌流では初めに最も酸化ストレス感受性の高い類洞内皮細胞に障害が生じ、微小循環障害から肝実質細胞障害が生じる 2) 肝阻血再灌流によって類洞内皮細胞は apoptosis に至ることが報告されている。今回の実験では単離培養した類洞内皮細胞に H_2O_2 で酸化障害を誘導したが予備実験で行った TUNEL 染色では陰性であり、necrosis に至ったと思われる 3) エダラボンを臓器保存液に添加することが考えられるが投与するタイミングについては更なる検討を要する、などの回答があった。次いで、主査 浅香教授から 1) *in vivo* の実験モデルにおける死因 2) 細胞種ごとに障害程度が異なる理由 3) *in vivo* と *in vitro* において肝実質細胞障害の程度が異なる理由

4) エダラボンのラジカル消去作用以外の効果、についての質問があった。それに対して、1) 腹水を伴う肝不全で組織学的には実質細胞は necrosis であった 2) 肝構成細胞は細胞種ごとに抗酸化能が異なることが障害程度の違いを引き起こしたと考えられる 3) in vitro では個々の細胞種に対する障害の要因を酸化ストレスのみに単純化しているが、in vivo では血液成分の関与や細胞間の相互作用があり、様々な chemical mediator が複雑に働いて細胞障害を修飾している 4) エダラボンが TNF- α や IL-1 などの炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されており、細胞障害抑制機序の一つとして考えられる、などの回答があった。なお、副査 藤堂教授からは、本実験が肝阻血再灌流障害の機序と制御法を明らかにする第一歩となるものである、との発言があった。

本研究は、エダラボンが類洞内皮細胞を保護し、肝の酸化障害を軽減することを示した報告であり、エダラボンの肝移植医療における臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（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。