

論文の内容の要旨

論文題目 Ischemic preconditioning による肝虚血再灌流障害軽減作用の機序に関する研究

氏名 手島 一陽

【背景】肝移植や肝切除時に生じる虚血再灌流障害は、予後・術後経過に大きく影響を及ぼし、時に致命的合併症の原因となる。虚血再灌流障害への対策として近年注目されている ischemic preconditioning (IP)とは『短時間の虚血と再灌流が先行すると、その後の長時間の虚血再灌流障害が軽減するという現象』である。これまでに、ラットにおいて IP が冷虚血再灌流後の類洞内皮細胞障害と Kupffer 細胞活性化を抑制し、肝移植後レシピエントの生存率を改善することが報告されている。一方、IP の効果は肝温虚血再灌流障害に対しても確認されているが、cell specific な検討はなされておらず、その作用発現機序の詳細は未だ不明である。

【目的】IP の肝温虚血再灌流障害軽減作用における標的細胞および効果発現機序を明らかにするための検討を行った。

【方法】SD 系雄性ラットを用い、IP は肝の中葉・左葉への血流を 10 分間遮断 10 分間再灌流することで施行した。引き続き、*in vivo* においては同血流を 40 分間遮断後 60 分間再灌流することで、また肝灌流系においては IP 施行後肝を摘出し 37°C 緩衝液中で 40 分間保存、閉鎖灌流系で 60 分間再灌流することで温虚血再灌流障害に供した。肝細胞障害は ALT 活性にて、類洞内皮細胞障害は血清ヒアルロン酸濃度ないし灌流液に添加したヒアルロン酸の取り込み量にて評価した。Kupffer 細胞抑制のため塩化ガドリニウム、reactive oxygen species (ROS)の除去のため N-acetyl-L-cysteine、superoxide dismutase、catalase の 3 種類の除去剤、また、NADPH oxidase 阻害のため diphenyleneiodonium chloride をそれぞれ前投与し、IP の温虚血再灌流障害軽減作用について検討した。IP を行わずに、経門脈的に種々濃度の過酸化水素(H₂O₂)含有緩衝液にて 10 分間の前灌流を行い、その後続く温虚血再灌流障害が軽減されるか否か検討した。IP ないし H₂O₂ 前投与における Kupffer 細胞の ROS 産生を、nitro blue tetrazolium (NBT)含有緩衝液を用いた肝灌流を行い、肝組織への不溶性色素沈着の有無により検討した。*In vitro* において、ラット初代培養肝細胞の虚血再灌流障害モデルとして 5 時間 anoxia/2 時間 reoxygenation 後の肝細胞障害に対して、H₂O₂ 前投与による

肝細胞への直接作用を検討した。

【結果】*In vivo* および肝灌流系での検討ともに、IP は温虚血再灌流後の肝細胞障害を有意に軽減したが、類洞内皮細胞障害は軽減しなかった。Kupffer 細胞を抑制しても温虚血再灌流後の肝細胞障害の程度は変わらず、したがって IP の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用は、冷虚血再灌流障害における機序とは異なり、類洞内皮細胞障害の軽減や Kupffer 細胞活性化の抑制を介さない、肝細胞へのより直接的な保護作用であると考えられた。一方で、Kupffer 細胞の抑制によって、IP の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用が消失した。NBT 灌流法で、IP すなわち 10 分間の虚血後再灌流における *in situ* での Kupffer 細胞の ROS 産生が確認された。IP において発生する ROS を除去することによっても、その後の温虚血再灌流障害に対する IP による肝細胞保護作用が消失した。さらに、IP 施行中の NADPH oxidase 阻害によっても、IP の温虚血再灌流障害軽減作用が消失した。IP に代えて、 H_2O_2 含有緩衝液にて 10 分間の前灌流を行ったところ、1 mmol/L の少量 H_2O_2 の前灌流によって、IP と同様に温虚血再灌流後の肝細胞障害が有意に軽減された。より高濃度 H_2O_2 の前灌流ではその後の温虚血再灌流障害が増悪した。そこで、*in vitro* において肝細胞の虚血再灌流障害に対して、 H_2O_2 前投与による preconditioning を試みたが、0~0.3 mmol/L H_2O_2 では肝細胞障害の有意な悪化・軽減とも認めず、1 mmol/L では肝細胞障害の悪化を認めた。NBT 灌流法では、10 分間の H_2O_2 灌流においても *in situ* での ROS 産生が認められ、Kupffer 細胞の抑制および NADPH oxidase の阻害によって、この ROS 産生が消失した。再度、肝灌流系において、Kupffer 細胞、NADPH oxidase それぞれの抑制下に H_2O_2 preconditioning の作用を検討したところ、いずれにおいても IP の場合と同様に温虚血再灌流後の肝細胞障害軽減作用が消失した。

【結論】IP は、短時間の虚血再灌流において Kupffer 細胞の NADPH oxidase 活性化により産生される一定範囲の ROS を介して、その後の温虚血再灌流障害に対する肝細胞保護作用を発現していることが明らかとなった。少量短時間の H_2O_2 前投与によっても、同じ機序で肝細胞保護作用が誘導され、Kupffer 細胞の産生した sublethal な細胞外 ROS が温虚血再灌流障害軽減作用の発現において不可欠な役割を担っていることが示唆された。