

審査の結果の要旨

氏 名 手 島 一 陽

本研究は、肝移植や肝切除時に生じる虚血再灌流障害への対策として注目されている ischemic preconditioning (IP)、すなわち『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』の作用発現機序を解明するため、ラット肝温虚血再灌流障害に対する IP において、肝細胞障害、類洞内皮細胞障害、および Kupffer 細胞活性化に着目し、cell specific な検討を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. SD 系雄性ラットを用い、*in vivo* において肝中葉・左葉への血流を 40 分間遮断後 60 分間再灌流することにより誘導した温虚血再灌流障害に対し、先行して同血流を 10 分間遮断 10 分間再灌流することで IP を施行したところ、温虚血再灌流後の肝細胞障害を示す血清 ALT 活性の上昇は有意に軽減したが、類洞内皮細胞障害を示す血清ヒアルロン酸濃度の上昇は軽減しないことが示された。同系で、塩化ガドリニウムにより Kupffer 細胞を抑制しても温虚血再灌流後の肝細胞障害に有意な変化は見られず、肝灌流系、すなわち肝を摘出し 37°C 緩衝液中で 40 分間保存後、閉鎖灌流系で 60 分間再灌流する肝特異的な系においても同様の結果が示された。
2. 一方で、Kupffer 細胞の活性化を抑制することによって、温虚血再灌流障害に対する IP の肝細胞保護作用が消失するということが示された。
3. IP における Kupffer 細胞の reactive oxygen species (ROS) 産生を、nitro blue tetrazolium (NBT) 含有緩衝液を用いた肝灌流により検討したところ、Kupffer 細胞が IP における短時間の虚血再灌流によって ROS を産生していることが示された。
4. N-acetyl-L-cysteine、superoxide dismutase、catalase の前投与によって、IP において発生する ROS を除去、または、diphenyleneiodonium chloride により IP 施行中の NADPH oxidase 活性化を阻害すると、いずれにおいても IP の肝細胞保護作用が消失することが示された。
5. 3、4 の結果を踏まえ、IP を施行する代わりに、経門脈的に種々濃度の過酸化水素 (H_2O_2) 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を検討したところ、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、より高濃度 H_2O_2 の前灌流では障害が増悪することが示された。
6. *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 後の肝細胞障害モデルを用いて、 H_2O_2 前投与による preconditioning が試みられたが、肝細胞障害の有意な軽減作用はないことが示された。

7. H_2O_2 preconditioning においても、NBT 灌流実験によって Kupffer 細胞の ROS 産生が認められ、Kupffer 細胞および NADPH oxidase の活性化を抑制すると、IP の場合と同様に、その温虚血再灌流障害軽減作用が消失することが示された。

以上、本論文は、ラットを用いた *in vivo*、肝灌流系、および *in vitro* での温虚血再灌流障害に対する IP の肝保護作用機序を cell specific に解析し、IP の肝細胞保護作用が、従来報告されている類洞内皮細胞障害と Kupffer 細胞活性化を抑制することで発現するという冷虚血再灌流障害における機序とは異なり、肝細胞へのより直接的な保護作用であることを明らかにした。更に、この IP の肝細胞保護作用は、Kupffer 細胞の NADPH oxidase 活性化により産生される sublethal な ROS を介して発現しているという新たな知見を見出した。本研究は、肝細胞の虚血再灌流障害に対する耐性誘導機序および酸化ストレスに対する生体防御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。