

原を発現していたが免疫寛容誘導能を失っていた。このことから、免疫寛容誘導には DSP に用いる細胞の増殖能が必要と考えられた。アロ抗原に対して寛容状態を誘導する細胞画分は、T cell でも non-T cell でもよかった。これは従来の veto 細胞説を否定するものであった。

氏 名	相 馬 智
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 8 3 9 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	続発性肝不全に対する核酸投与の抑制効果 ーラット肝切除後エンドトキシン血症モデルにおける検討ー
論文審査委員 (主 査)	教 授 大 柳 治 正
(副主査)	教 授 塩 崎 均
(副主査)	教 授 松 尾 理

論文内容の要旨

【目的】

肝臓外科領域において重要な課題である肝切除後に生じる続発性肝不全の発症機序、および続発性肝不全進展に対する核酸投与の効果についてラット肝切除後エンドキシン（ET）血症モデルを用いて検討する。

【方法】

8週齢 Wistar 系雄性ラットに70%肝切除を施行後、核酸成分液（OG-VI 15ml/kg）を肝切除直後、24時間後、48時間後の計3回腹腔内投与したOG群と同量の生理食塩水を投与した対照群に分けたのち、肝切除後48時間目に lipopolysaccharide（LPS）0.5mg/kg を静脈内投与し、生存率、LPS投与6、24時間後の肝病理組織像、血清 ET、TNF- α 、ヒアルロン酸、GOT、GPT 濃度を測定した。また別のラットで肝切除48時間後に頸静脈からOG-VI（15ml/kg）と FITC-LPS（0.5mg/kg）を投与後、総胆管から採取した胆汁中のLPS排泄量を蛍光分光光度計を用いて経時的に測定した。さらに正常ラットより肝実質細胞及び Kupffer 細胞を採取し、10%OG-VI 添加培地と非添加培地で40時間培養後、FITC-LPS 10 μ g/ml を培地中に添加して各細胞のET取り込み量とLPS刺激下のKupffer細胞からのTNF- α 分泌能をELISAで測定した。

【結果】

24時間後の生存率はOG群は87.0%、対照群は70.4%で差を認めた（ $p<0.05$ ）。また、GOT、GPT値、ヒアルロン酸値、TNF- α 値の6時間値はOG群で対照群に比べ有意に低く、24時間値ではエンドキシン値がOG群で低かった。肝組織像はOG群に比べて対照群で出血巣と壊死巣が散在していた。LPSの胆汁排泄量をみると、胆汁排泄量は両群に差はないものの、LPS投与量と胆汁排泄量の比でみたLPS排泄率は対照群では16.6 \pm 5.1%、OG群は30.2 \pm 14.0%とOG群では有意に高値を示した。さらに培養細胞を用いた検討では、Kupffer細胞のFITC-LPS取り込み率は両群間に差は無く、肝実質細胞では1時間値、2時間値、4時間値はそれぞれ、対照群は32.7 \pm 8.2%、39.9 \pm 7.9%、50.9 \pm 4.1%、OG群は40.9 \pm 13.0%、48.2 \pm 11.7%、59.5 \pm 10.0%とOG群で高かった。また、LPS刺激下Kupffer細胞からのTNF- α 分泌能は、刺激後4時間目で対照群4時間値335.3 \pm 132.8pg/ml、OG群4時間値169.7 \pm 44.4pg/mlと差を認めた。

【考察】

肝切除後ET血症モデルを用いた続発性肝不全進展の初期には、投与ET量よりもETにより誘発されるTNF- α 産生量が重症化を決定した。核酸成分液であるOG-VIは、in vitroでLPS刺激下Kupffer細胞からのTNF- α 分泌を抑制し、in vivoで肝実質細胞及び肝類洞壁細胞の障害を軽減した。また肝実質細胞のLPS取り込み促進効果と胆汁中への排泄賦活作用を認めた。すなわち、高ET血症の病態下において、OG-VIは肝実質細胞からのET排泄促進から血中ET濃度を低下させ、Kupffer細胞からのTNF- α 過剰産生抑制から高サイトカイン血症による肝障害を軽減するという薬理作用を有し、その結果として本モデルの生存率を改善することが示された。

【結論】

肝臓切除後の核酸投与はET血症により誘発される続発性肝不全進展を抑制し生存率を有意に改善した。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2003年12月日 公表予定	出版物名 外科と代謝・栄養
	公 表 内 容	
	全 文	2003年12月日 発行

肝切除後の重篤な合併症である肝不全は、大量肝切除などの過大侵襲による原発性肝不全と感染症合併などを機に発生する続発性肝不全に分けられる。近年、原発性肝不全は術前肝機能評価や手術手技の進歩により減少したが、続発性肝不全についてはいまだ十分な対策が確立していないというのが現状である。学位申請者はこの続発性肝不全進展過程に関与する物質の解析に着目した。またその対策として共同研究者の大柳らが開発に関与した核酸成分液OGVIが肝不全進展抑制物質になるかについても検討した。

8週齢Wistar系雄性ラットに70%肝切除を施行後、核酸成分液(ヌクレオシドとヌクレオチドの混合製剤で、inosine, cytidine, 5'-guanosine-monophosphate, uridine, thymidineを4:4:4:3:1のモル比で構成, OGVI 15ml/kg)を肝切除直後、24時間後、48時間後の計3回腹腔内投与したOG群と同量の生理食塩水を投与した対照群に分けたのち、肝切除後48時間目にlipopolysaccharide (LPS) 0.5ml/kgを静脈内投与し、生存率、LPS投与6、24時間後の肝病理組織像、血清ET、TNF- α 、ヒアルロン酸、GOT、GPT濃度を測定した。また別のラットで肝切除48時間後に頸静脈からOGVI (15ml/kg)とfluorescein isothiocyanate lipopolysaccharide (FITC-LPS, 0.5ml/kg)を投与、その後20分毎に120分間総胆管から胆汁を採取し、胆汁排泄量を測定した後、胆汁中のFITC-LPS濃度を蛍光分光光度計を用いて測定した。さらに正常ラットより肝実質細胞及びKupffer細胞を採取し、10%OGVI

添加培地と非添加培地で40時間培養後、FITC-LPS 10 μ g/mlを培地中に添加して各細胞のET取り込みとLPS刺激下のKupffer細胞からのTNF- α 分泌能をELISAで測定した。

24時間後の生存率はOG群は87.0%、対照群は70.4%で差を認めた($p < 0.05$)。またGOT、GPT値、ヒアルロン酸値、TNF- α 値の6時間値はOG群で対照群に比べ有意に低く、24時間値ではエンドトキシン値がOG群で低かった。肝組織像はOG群に比べて対照群で出血巣と壊死巣が散在していた。LPSの排泄量をみると、胆汁排泄量は両群に差はないものの、LPS投与量と胆汁排泄量の比でみたLPS排泄率は対照群では $16.6 \pm 5.1\%$ 、OG群は $30.2 \pm 14.0\%$ とOG群では有意に高値を示した。さらに培養細胞を用いた検討では、Kupffer細胞のFITC-LPS取り込み率は両群に差は無く、肝実質細胞では1時間値、2時間値、4時間値はそれぞれ、対照群は $32.7 \pm 8.2\%$ 、 $39.9 \pm 7.9\%$ 、 $50.9 \pm 4.1\%$ 、OG群は $40.9 \pm 13.0\%$ 、 $48.2 \pm 11.7\%$ 、 $59.5 \pm 10.0\%$ 、とOG群で高かった。また、LPS刺激下Kupffer細胞からのTNF- α 分泌能は、刺激後4時間値で対照群4時間値 335.3 ± 132.8 pg/ml、OG群4時間値 $169.7 \pm 44.4\%$ と差を認めた。

肝切除後ET血症モデルを用いた続発性肝不全進展の初期には、投与ET量よりもETにより誘発されるTNF- α 産生量が重症化を決定した。核酸成分液であるOGVIは、In vitroでLPS刺激下Kupffer細胞からのTNF- α 分泌を抑制し、In vivoで肝実質細胞及び肝類洞壁細胞の障害を

軽減した。また肝実質細胞のLPS取り込み促進効果と胆汁中への排泄賦活作用を認めた。すなわち、高ET血症の病態において、OGVIは肝実質細胞からのET排泄促進から血中ET濃度を低下させ、TNF- α 量からのTNF- α 過剰産生抑制から高サイトカイン血症による肝障害を軽減するという薬理作用を有し、その結果として本モデルの生存率を改善することが示された。

感染合併による続発性肝不全進展過程で血中エンドトキシン量とTNF- α 量の頂値に時間的差のあることを明らかにし、重症化の最大因子がTNF- α 分泌量であることを証明した報告は全くなく、非常に学問的価値の高いものである。また核酸成分液がKupffer細胞のTNF- α 分泌能亢進を抑制し、また肝実質細胞からのエンドトキシン排泄能正亢進作用の有することを明らかにしたのは学問的価値とともに臨床的意義の高い成果である。

氏名	寺本佳史
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	医第858号
学位授与の日付	平成17年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	脳浮腫動態におけるAquaporinの役割に関する研究

論文審査委員(主査)	教授	種子田	護
(副主査)	教授	楠	進
(副主査)	教授	竹村	司