

氏 名（本籍） かね だ ひろ ゆき
金 田 寛 之

学位の種類 博 士（医 学）

学位記番号 医 第 2528 号

学位授与年月日 平 成 5 年 2 月 24 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 58 年 3 月 25 日
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Myonephropathic Metabolic Syndrome 病態下
の顆粒球による血管内皮細胞傷害に関する研究

（主 査）

論文審査委員 教授 森 昌 造 教授 毛 利 平

教授 名 倉 宏

論 文 内 容 要 旨

【目 的】

Myonephropathic Metabolic Syndrome (MNMS) は急性虚血解除後に起こり、筋崩壊、腎傷害、代謝性アシドーシスなどが主たる変化となる病態の総称である。一旦発症すると極めて致命率の高い病態であるものの、確実に回避する方法が現在のところ下肢切断しかなく臨床上厳しい選択を迫られることが多い。それゆえその原因究明とともに発症の確実な予測と治療法の確立は早期に解決されなければならない問題である。本研究は MNMS の病態が全身の血管内皮細胞傷害によって始まると仮定し、またその傷害性は血漿中に含まれる可溶性成分にはなく顆粒球にあると考えこれらを *in vitro* で証明することを目的とした。

【方 法】

第 1 に雑種成犬にて MNMS モデルを作成し、生化学的検討と病理学的検討を行った。MNMS モデルは腎動脈以下大動脈を遮断して 6 時間の虚血を加え、その後遮断解除することにより作成した。

次にこのモデルから遮断前、遮断解除 20 分後、3 時間後、6 時間後に採血し、顆粒球を分離して活性の変動を検討した。顆粒球の活性は Myeloperoxidase 活性、走化性、血管内皮細胞に対する接着性の 3 点について検討した。顆粒球の分離は比重遠心分離法にて行った。Myeloperoxidase 活性は chemiluminescence で評価した。走化性は膜孔径 $5 \times 10^{-6} \text{ m}$ のケモタキシスチャンバーの上層に分離した顆粒球をいれ 2 時間培養して下層まで走化した顆粒球数を計測した。顆粒球の血管内皮細胞に対する接着性の検討のため予め犬外頸静脈より酵素法にて血管内皮細胞を採取し、コンフルエント状態まで培養した。この上に MNMS モデルより採取した顆粒球をのせ 2 時間培養した後洗浄し、接着している細胞数を計測した。

次に Fura-2 法を用いて血管内皮細胞の傷害を測定しようとした。Fura-2 法は細胞内に取り込ませた後の Fura-2 の放出を測定する方法である。正常時の放出として培養に用いた培地 RITC-807 中への放出を測定した。傷害のモデルとしては過酸化脂質である 15sHPETE を 1, 3, 5, 10, 15, $20 \times 10^{-6} \text{ g/ml}$ の濃度で加えて 90 分間の放出率を求めた。

最後に上記の Fura-2 法を用いて MNMS モデルより採取した顆粒球による血管内皮細胞傷害を測定した。作成した MNMS 犬より顆粒球を分離し、Fura-2 を取り込ませた血管内皮細胞に作成した顆粒球浮遊液 1 ml を加え 90 分間の放出率を測定した。

【結 果】

作成した MNMS モデルの生化学的検討では CPK, LDH, K^+ , BUN, Creatinine の変動を調べたが、いずれも遮断解除後漸増した。病理学的検討では筋細胞壊死, 尿細管上皮の変化, 血管内皮細胞に対する白血球の接着と血管内皮細胞の膨化, 剥離が認められた。

顆粒球の Myeloperoxidase 活性変動では, Zymosan 刺激時の化学発光量が遮断解除 3 時間後で最高となり遮断前値の約 2 倍となった。また下層まで走化した顆粒球数, 血管内皮細胞に対する接着細胞数も有意に 3 時間群で多かった。

正常時と傷害時の血管内皮細胞からの Fura-2 放出を検討すると, 細胞骨格がくずれ剥離するような傷害では放出率は高くなるが, それより軽い傷害では放出は逆に抑制される結果となった。

MNMS 犬より採取した顆粒球による血管内皮細胞傷害を Fura-2 法を用いて検討すると遮断解除 3 時間後で最も傷害が強くなった。

【考 察】

以上のように MNMS モデルにおいて顆粒球活性は遮断解除 3 時間後で最も高くなり血管内皮細胞に対する傷害も最も強くなることが示された。これで MNMS の病態が全て説明される訳ではないが, 少なくとも MNMS の病態の一因になっていると思われた。

MNMS の予後改善にとって発症の確実な予測と予防法の確立が重要であることは以前から言われている。現在までの MNMS の発症予測や治療効果の評価には CPK や LDH など筋由来の酵素の血中濃度が使用されてきたが, 本研究で示したように還流血中の顆粒球の活性とその血管内皮細胞に対する傷害の程度を評価することは, 全身傷害を直接反映する可能性があり, 今後臨床的に研究されるべき点と考える。また現在までの MNMS の予防法は血漿成分中の毒性物の除去, 抑制が主体となっているが, 再還流後 6 時間まで顆粒球活性を抑えることは MNMS の発症予防にとって非常に重要な意味を持つと思われた。

審査結果の要旨

Myonephropathic Metabolic Syndrome (MNMS) は一旦発症すると極めて重篤な経過をとり、臨床的にも重要な病態の一つとして注目されているが、治療法の確立されていないものである。筋肉の急性虚血後の再還流傷害に起因する非虚血遠隔臓器傷害という病態で、その間には何かの物質ないし機序が想定されてきた。MNMS の、病態解明に関する研究の変遷は、まず病態を引き起こす原因物質を求めることに始まった。阻血後再還流された組織からの還流血の血漿成分中にその原因物質を求めたものであった。しかし物質の同定は未だに成功しておらず、また一方で原因物質が血漿中の可溶性の物質との前提から盲目的に透析などの手段で除去しようとの試みもされたが期待されたような効果もあげられなかった。本研究では、このような歴史を踏まえ血漿中の可溶性物質の関与は少ないものと考え、発症機転としては顆粒球の関与をその一つと前提とした研究を行っているもので、従来とは観点を変えた研究となっている。

MNMS による臓器傷害の評価は、臓器全体としての機能障害として評価するには鋭敏さに欠け病態の終末像を観察することとなるため混乱を招く欠点がある。しかしここで個々の臓器の観察から最初に傷害を受けるのは共通して血管内皮細胞であることに気付き、血管内皮細胞に対する傷害性をもって評価を試みたところに本研究の独創性がある。特に培養血管内皮細胞を用いた bioassay というべき方法で、定量性を持たせた評価法を確立した点では他に類をみない。評価方法も単一ではなく、顆粒球の活性を測定すると共に、培養血管内皮細胞に対する接着性を検討、更には Fura2 を用いた機能的な面からの評価にも工夫を凝らしてより鋭敏なものとしながら評価を行い評価方法相互の信頼性と整合性を高めながら実証している慎重な観察検討姿勢は評価に値するものである。

このような確実な実験系から明らかにされた事実は、犬を用いた MNMS 実験モデルでは、MNMS の病態の形成に再還流血液中の顆粒球が大きな関与をしており、その傷害は遮断解除後 3 時間で最大に達し、6 時間で低下することである。従来、MNMS の治療の上でなにをどの時点まで続ければ良いかすら不明であった治療法の確立に役立つものである。従って MNMS 発症予防としては顆粒球の抑制を約 6 時間行うべきものと結論づけている。これは臨床においても参考となる結論と考えられる。

以上のように本研究は MNMS の病態解明において新たな観点を持っている。臓器あるいは細胞に対する再還流血液中の顆粒球の傷害性を定量的に評価する方法として、培養血管内皮細胞を用い、なおかつ複数の方法にて評価の安定性・整合性を確保している。臨床診療上に貢献度の高い結論を導いているなどの点で優れており、学位に値するものである。