

氏 名（本籍） 伊 藤 浩 司

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 2741 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 7 年 3 月 8 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 63 年 3 月 12 日  
岩手医科大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 多核白血球を介したエンドトキシン肝障害発生機  
序に関する実験的検討  
－初代培養肝細胞の膜脂質過酸化反応－

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 松 野 正 紀 教 授 森 昌 造

教 授 名 倉 宏

# 論文内容要旨

## 【目 的】

細菌性腹膜炎や敗血症では、しばしばエンドトキシン（以下、Et）血症を併発し、肺や肝などに高度の組織障害を生じ、多臓器不全に至ることが知られている。さらに、エンドトキシン肝障害の発生機序として、Kupffer細胞や多核白血球など、いわゆる貧食系細胞の活性化により産生される free radical が、細胞膜における脂質過酸化を介して肝細胞障害を惹起することが明らかになりつつある。

本論文では、*in vitro* における Et 肝障害発生機序に関わる多核白血球の役割を解明する目的で、ラット初代培養肝細胞（HC）と末梢血多核白血球（PMNs）との混合培養系を確立し、Et 投与後の活性化された多核白血球に起因する肝細胞障害を肝細胞膜脂質過酸化反応に注目し検討した。併せて各種 scavenger 投与による肝障害抑制作用から Et 肝障害に関与する活性酸素種についても検討を加えた。

## 【材料及び方法】

体重 150g の S. D. 系雄性ラットを用い、collagenase 灌流法により分離した肝細胞（ $5 \times 10^5$  個）と rh-GCSF 投与後比重遠心法により得られた末梢血多核白血球（ $2 \times 10^6$  個）を用い、肝細胞単独培養群（HC 群）および肝細胞多核白血球混合培養群（HC+PMNs 群）を作製した（細胞比 1 : 4）。

培養開始時、HC 群または HC+PMNs 群に生理食塩水 20  $\mu$ l（control 群）、または LPS を 6.25  $\mu$ g/ml、12.5  $\mu$ g/ml、25.0  $\mu$ g/ml の濃度で各々添加し、さらに、scavenger 投与群として、LPS25.0  $\mu$ g/ml と Cu, Zn-SOD 3000U/ml、または  $\alpha$ -tocopherol 100  $\mu$ g/ml を同時に添加した。24 時間培養後に、CL-HPLC システムを用いて肝細胞膜の過酸化物である phosphatidylcholine hydroperoxide（PCOOH）濃度を測定して肝細胞膜脂質過酸化の評価を行い、同時に培養上清中の肝逸脱酵素（AST, ALT）、 $^3$ H-Leucine を用いた肝細胞蛋白合成能を測定した。

## 【結 果】

24 時間培養後 HC 群の AST 値は、LPS 添加の影響を受けず 12.2KU 前後で一定の値を示した。一方、HC+PMNs 群では LPS 無添加で  $16.0 \pm 1.6$ KU と HC 群とほぼ同様の値を示したが、LPS 添加後には有意の増加を認め、LPS 12.5  $\mu$ g/ml まで、添加した LPS 濃度依存性に上昇し、plateau に達した。ALT 値も AST 値と同様であり、HC 群では変化を認めず、HC+PMNs 群にお

いて LPS 濃度依存性の上昇を認めた。

肝細胞 PCOOH 濃度は、HC 群で LPS 添加の有無および濃度にかかわらず  $350\text{pmol}/10^7\text{cells}$  前後の値を示したが、HC+PMNs 群では LPS  $6.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$  添加にて前値の約 4.9 倍、 $12.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  では 5.1 倍、 $25.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  では約 9.2 倍と濃度依存性の増加を認めた。

蛋白合成能は、HC 群で LPS 添加において  $68000\text{cpm}$  前後の値を示し、有意の変化を認めなかったが、HC+PMNs 群では LPS  $6.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$  添加で HC 群の約 66% に低下し、添加する LPS の濃度に影響されなかった。

さらに、LPS を  $25.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  添加した HC+PMNs 群において、培養上清中 AST, ALT 値上昇は各種 scavenger の投与により有意に抑制された。同様に肝細胞 PCOOH 濃度上昇も、scavenger の添加により有意に抑制されたが、SOD で抑制効果が強い傾向を認めた。

### 【ま と め】

1. 肝細胞単独培養群においては、Et 負荷による肝細胞直接障害を認めなかった。2. 肝細胞と多核白血球の混合培養群では、Et 負荷により培養上清中肝逸脱酵素上昇、肝細胞膜脂質過酸化亢進、肝細胞蛋白合成能低下を認めた。3. SOD,  $\alpha$ -tocopherol 添加により Et 負荷混合培養群の肝逸脱酵素上昇と肝細胞膜脂質過酸化亢進が有意に抑制された。

### 【結 語】

Et 肝障害の発生機序として、活性化された多核白血球から放出される free radical が肝細胞膜脂質過酸化を惹起しており、scavenger 投与による肝障害抑制作用の検討から、 $\text{O}_2^-$  とそれに由来する活性酸素種の関与が示唆された。これらの活性酸素種を制御することが Et 肝障害の抑制に重要であると考えられた。

## 審査結果の要旨

細菌性腹膜炎や敗血症では、しばしばエンドトキシン（以下、Et）血症を併発し、肺や肝などに高度の組織障害を生じ、多臓器不全に至ることは周知の事実である。Et 肝障害発生機序としては、種々のサイトカインやプロテアーゼをはじめとするケミカルメディエーターの多彩な作用や類洞腔内の微小循環障害が重要な役割を担っていることが解明されつつある。一方、クッパー細胞や多核白血球などのいわゆる貪食系細胞の活性化により産生されるフリーラジカルが、細胞膜における脂質過酸化を介して細胞障害を惹起することも明らかになりつつある。しかしながら、Et 肝細胞障害を多核白血球に着目し、培養肝細胞の脂質過酸化物から詳細に把握した研究は皆無である。

本研究では、Et 肝障害発生機序に関わる多核白血球の役割を解明する目的で、ラット初代培養肝細胞と末梢血多核白血球との混合培養系を確立し、Et 投与後の活性化された多核白血球に起因する肝細胞障害を膜脂質過酸化反応に注目し検討した。併せて各種スカベンジャー投与による肝障害抑制作用から Et 肝障害の活性酸素種についても検討を加えた。

研究方法は、ラット分離肝細胞と末梢血多核白血球を用い、肝細胞単独培養群および肝細胞多核白血球混合培養群（細胞比 1 : 4）を作製し、培養開始時、生理食塩水（コントロール群）または各濃度の LPS を添加し、24 時間培養後に肝細胞膜脂質の過酸化物である phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) 濃度を測定して肝細胞膜障害の評価を行い、同時に培養上清中の肝逸脱酵素（AST, ALT）および  $^3\text{H}$ -Leucine を用いた肝細胞蛋白合成能を測定した。さらに、スカベンジャー（Cu, Zn-SOD または、 $\alpha$ -tocopherol）を LPS と同時に添加し、同様の測定を行った。

結果では、Et 添加後の肝細胞 PCOOH 濃度は、肝細胞単独培養群では上昇を認めず、混合培養群において濃度依存性に有意の上昇を認めた。混合培養群では、同時に培養上清中肝逸脱酵素の上昇と肝細胞蛋白合成能の低下を認めた。また、スカベンジャー添加は、混合培養群の膜脂質過酸化および肝逸脱酵素上昇を有意に抑制した。

以上より、Et 肝障害発生機序の一因として、活性化された多核白血球から放出されるフリーラジカルを介した肝細胞膜脂質過酸化が関与しており、スカベンジャー投与による肝障害抑制作用の検討から、 $\text{O}_2^-$  とそれに由来する各種フリーラジカルの作用が推測され、これらのフリーラジカルを制御することが、Et 肝障害の抑制に重要であると結論した。

本研究は、Et 肝障害を多核白血球に着目し、その細胞障害性を膜脂質過酸化反応から評価している点で、過去に例のない独創性に富んだ研究であり、よって本論文は学位に値するものである。