

氏 名 (本籍)	さ とう もり ひこ 佐 藤 守 彦
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1 3 5 3 号
学位授与年月日	平 成 9 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 内科学系専攻
学位論文題目	コンカナバリン A (Con A) 静注後の肝内の midzonal necrosis の研究

(主 査)

論文審査委員	教授 豊 田 隆 謙	教授 大 槻 昌 夫
	教授 高 橋 徹	

論文内容要旨

研究目的

T細胞依存性であるコンカナバリンA (Con A) 静注後の肝障害において、肝細胞障害の過程を検討することにより、免疫反応によって惹起される薬剤性肝障害の機序を明らかにする。

研究方法

Con A (Type VI, Sigma Chemical社, St. Louis, MO) は Tiegs らの方法に準じて、バルブ/c : 8週齢, 雄, 体重 25 g とバルブ/c nu/nu : 8週齢, 体重 20 g (東北大学医学部付属動物実験施設) にペントバルビタール (100mg/kg体重, 和光純薬, 大阪) で麻酔後に、尾静脈から投与した。予備実験から再現性が優れる type VI の Con A を使用した。同様に麻酔後、腋窩動脈を切断し流出した血液から、血清を分離後、DRI-CHEM (富士メディカル, 東京) で血清 alanine aminotransferase (ALT) 値と血清 aspartate aminotransferase (AST) 値を測定した。血液採取後、肝組織を取り出し、組織学的検討用に固定した (後述)。カラゲナン (40mg/kg体重, Sigma Chemical社) は Con A 投与 24 時間前と直前に腹腔内に投与した。ヌードマウスで Con A 肝炎を再現するために、Con A (20mg/kg体重) を静注 24 時間後に、バルブ/c の肝・脾から分離した単核球、すなわち、Con A (20mg/kg体重) を静注 24 時間後に肝または脾を細切し、ナイロン・フィルター (FALCON, Franklin Lakes, NJ) でろ過後、Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) で分離した細胞を、マウスの尾静脈より輸注した (2.5×10^7 細胞/マウス)。細胞生存率は常に 85% 以上であり、蛍光抗体法で、脾細胞は CD4 陽性細胞 (L3T4, フェーミンジェン社, San Diego, CA) ; $24.24 \pm 7.50\%$ (mean \pm S.D.), CD8 陽性細胞 (Cederlane, Ontario, Canada) ; $14.78 \pm 4.81\%$, Mac-1 陽性細胞 (Mac-1, ベーリンガー・マンハイム社, Mannheim, Germany) ; $14.75 \pm 6.40\%$ であり、肝内の浸潤単核球は CD4 陽性細胞 ; $37.57 \pm 15.34\%$ (mean \pm S.D.), CD8 陽性細胞 ; $16.74 \pm 5.87\%$, Mac-1 陽性細胞 ; $5.55 \pm 4.33\%$ であった。肝組織は(1) 10%ホルマリンで固定後、ヘマトキシリン・エオジンで染色、(2) 電顕用試料は、2.5%グルタルアルデヒド (0.1M カコジレート緩衝液) と 1% osmium tetroxide (0.1M カコジレート緩衝液) で固定後、uranyl acetate と lead citrate で染色し、Hitachi H-600 (日立, 東京) で観察、(3) PLP 固定後 OCT compound に凍結し、一次抗体 (ラット抗マウス CD4 抗体・L3T4, ラット抗マウス CD8 抗体・Ly-2, 抗マクロファージ抗体・Mac-1), 次にペリオキシダーゼ標識ヤギ抗ラット IgG (ダコ社, Tilburg, Netherlands) を添加し、3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride/過酸化水素を用いて発色した。実験結果は Wilcoxon 順位差検定法により、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

研究結果

(a) 濃度勾配実験 ; Con A を 5, 10, 15, 20mg/kg体重でバルブ/c マウスに投与したところ、24 時

間後で血清 GPT 値が 20mg/kg 体重投与時に最高値となった。Con A 20mg/kg 体重投与によって組織学的に肝小葉内に midzonal necrosis を認めた。(b) 時間経過 ; Con A 投与 0, 8, 24, 48 時間後の採血では, 血清 GPT 値は投与 24 時間後がピークであった。組織学的には 24 時間と 48 時間後に midzonal necrosis が観察された。(c) 免疫組織化学 ; Con A 投与後 48 時間の組織では, 門脈域に単核球の浸潤を認め, 多くは CD4 陽性または CD8 陽性細胞であったが, midzonal necrosis 域では CD4 陽性細胞が優位であった。(d) macrophage の関与 ; カラゲナン (40mg/kg 体重) を腹腔内に前投与し, macrophage を抑制したバルブ/c マウスに Con A (20mg/kg 体重) を静注しても血清 GPT 値の上昇はなく, 組織学的に midzonal necrosis は認めなかった。(e) adoptive transfer ; Con A (20mg/kg 体重) を 24 時間前に前投与したヌードマウスに, Con A 20mg/kg 体重投与によって肝障害をおこしたバルブ/c マウスから分離した脾細胞の輸注では血清 GPT 値の上昇や組織学的な変化は見られなかった。Con A (20mg/kg 体重) を投与したバルブ/c の肝組織から 24 時間後に分離した単核球を, Con A (20mg/kg 体重) を 24 時間前に前投与したヌードマウスに移入したところ 10 匹中 3 匹に有意の血清 GPT の上昇と midzonal necrosis を認めた。コントロール (Con A 前投与なしのヌードマウス) に肝内浸潤細胞を移入しても, 血清 GPT 値の上昇や組織学的変化を認めなかった。

考 察

本研究は次の 2 点において, 過去の Con A 肝炎の報告と異なり, 新知見と考えられた。

第一点は, Con A 投与により肝実質に midzonal necrosis が惹起されることである。midzonal necrosis は薬剤性肝障害において出現頻度が低いものの, 薬剤性肝障害以外には報告はなく, midzonal necrosis の出現は病理学的に薬剤起因を示唆する。adoptive transfer では Con A を前投与したヌードマウスにのみ midzonal necrosis が見られたことから, 肝細胞の Con A の代謝が壊死の惹起に必要と思われる。また midzonal necrosis はサイトカインや大きな肝細胞壊死によって引き起こされる類洞の微小循環不全に起因すると報告されている。壊死部周辺にリンパ球浸潤が見られ中心部に乏しいことは, 活性化リンパ球からサイトカインが分泌されることにより循環不全が起きた可能性を示唆する。

第二点は, midzonal necrosis の発生に関連する細胞は, 肝内浸潤単核球であることである。Con A 投与後の肝障害には CD4 陽性細胞が大きな役割を果たしている可能性が考えられた。肝組織の経時的变化は, HBs 抗原を発現するトランスジェニック・マウスに HBs 抗原特異的細胞障害性 T 細胞を輸注した劇症肝炎モデルでの肝組織像の経時的变化と類似している。このモデルでは, 広汎な肝細胞壊死の原因にマクロファージと INF- γ が大きな役割を演ずることが示されている。同時に, カラゲナンの前投与により Con A 肝炎が抑制された事実から, マクロファージが発症に必要と考えられた。結論として, Con A に感作した肝内浸潤単核球とマクロファージが Con A 肝炎の発生に必要である。

本研究で, Con A 肝炎において免疫反応と微小循環不全が midzonal necrosis に重要であることを示した。

審査結果の要旨

この論文は、薬剤に伴う肝障害における免疫反応の関与を明らかにする目的で、行われた研究である。実験モデルとして、バルブcマウスにコンカナバリンA 静注後の肝炎を用いた。この肝炎に認められる肝組織変化の特徴として、ミッドゾーナル・ネクローシスに注目しているが、これは1つには薬剤性肝障害にのみ認められる変化であること、2つめには以前のコンカナバリンA 肝障害の報告にはなかった新事実と主張している。第一の点から、このモデルは薬剤性の肝障害のモデルと考えるとよいと思われる。また、第二点目からは、この研究が新事実の発見に基づいた、貴重な研究である。

まず、このミッドゾーナル・ネクローシスがコンカナバリンA 投与後に見られ、また、ヌード・マウスに、コンカナバリンA 投与後のバルブcマウスの肝臓由来の単核球を輸注したときに、観察されている。これは重要なポイントであり、ミッドゾーナル・ネクローシスの発生原因を考える上での基本的な事実であるので、強調してよいと思う。ただし、このミッドゾーナル・ネクローシスにおいて、輸注した単核球の何が一番の因子となっているのかという点までは明確になっていない。

次に、コンカナバリンA 投与後に観察されたミッドゾーナル・ネクローシスにおいて、アポトーシスを示唆する所見が見られた点についてである。C型肝炎をはじめとして、肝細胞障害時にアポトーシスが関わっている。肝臓内の単核球が肝細胞のアポトーシス発生に関与する事実として、評価したい。ただし、コンカナバリンA 投与後の肝障害モデルにおいて、このアポトーシスがミッドゾーナル・ネクローシス全体に、どのようにつながっていくのかは、この論文では、明らかにされてはいない。

この研究論文は、コンカナバリンA 投与後のバルブcマウスに見られたミッドゾーナル・ネクローシスを中心とした研究である。これは、従来のコンカナバリンA 肝障害の報告になかった点であり、新事実である。またこのミッドゾーナル・ネクローシスは、肝臓に浸潤した単核球が発生病理に関わっていることが示されているので、この論文は、十分に学位論文に値する。