

氏 名 (本籍)	あ べ とも や 阿 部 友 哉
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2 1 7 6 号
学位授与年月日	平 成 17 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) 医科学専攻
学 位 論 文 題 目	A new free radical scavenger, edaravone, ameliorates oxidative liver damage due to ischemia-reperfusion <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (新規活性酸素除去剤・エダラボンは虚血再灌流 障害による肝酸化障害を軽減する)

(主 査)

論 文 審 査 委 員	教授 松 野 正 紀	教授 里 見 進
	教授 田 林 暁 一	

論文内容要旨

エダラボンは free radical scavenger であり脳梗塞を適応とし臨床応用されている。肝切除では Pringle 法がしばしば行われ、虚血再灌流障害は避けられず、術後の肝再生遅延・肝不全を惹起しうる。エダラボンが free radical 消去により肝虚血再灌流障害を軽減できれば、臨床上非常に有用である。私は当教室で研究されている、脂質過酸化障害の鋭敏な指標である phosphatidylcholine hydroperoxide (以下 PCOOH) を重要なパラメーターの一つとし、エダラボンの肝虚血再灌流における効果を検討した。

エダラボンは細胞膜を通過し、hydroxylradical を特異的に消去するため、細胞培養系にもちいて低酸素・再酸素化モデルで細胞内の hydroxylradical 産生の関与を検討できる。私は、肝細胞の初代培養を行い、Kamiya らが開発した Anaeropack (酸素吸収剤) を用いて in vitro hypoxia-reoxygenation model を作製した。低酸素化時間は 3 時間群と、より severe な条件として 4 時間群を設定した。培養液中 AST, 肝細胞中 PCOOH, ATP の経時的な変化 (低酸素前, 低酸素直後 (0 時間後), 再酸素化 2, 4, 6, 12, 24 時間後) をエダラボン投与群 (10 μ M) と非投与群とで検討したところ、AST は 3 時間低酸素化群で 6 時間後から、4 時間低酸素化群で 12 時間後からエダラボンによる有意な上昇抑制を認めた。肝細胞中 ATP は 3 時間低酸素化群で 2 ~ 24 時間後、4 時間低酸素化群で 12, 24 時間後にエダラボンの有意な効果があった。PCOOH は両群ともに 4 時間後から上昇抑制を認めた。投与濃度を変えて (0~50 μ M) 4 時間後の肝細胞中 PCOOH 量で濃度依存性の検討を行ったところ、濃度依存性に上昇が抑制され、10 μ M から有意な抑制を認めた。さらに flowcytometry で subG1 を測定、エダラボン投与群で subG1 の割合が低く (40.4% vs. 25.1%), 実際に細胞死を抑制していることが示された。しかし TUNEL assay では両群に差はなく、このモデルでのエダラボンの効果は apoptosis の抑制ではなく、necrosis の抑制であると推測された。蛋白合成能は 24 時間再酸素化した肝細胞に ³H-Leucine を用いて 4 時間ラベリングし、細胞中への取り込みを測定したところ、エダラボン群で有意に合成能良好であった。このモデルでは非実質細胞は存在しないことから、エダラボンは肝細胞内の ROS を消去し、脂質過酸化障害を軽減することが確認された。

In vivo では雄性 S-D rat 肝部分虚血再灌流モデル (70% 部分肝阻血 45 分, 2 時間再灌流) を作成し、エダラボンを再灌流直前と 1 時間後に投与 (3 mg/kg, 10 mg/kg), 再灌流 2 時間後に血液と肝組織を採取し、血中 AST・MDA, 肝組織中 PCOOH・energy charge を測定、非投与群と比較した。血中 AST および肝組織中 PCOOH は 3 mg/kg から有意に抑制され、血中 MDA および肝組織 energy charge は 10 mg/kg で有意な効果を認めた。さらに肝組織の 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) による免疫染色ではエダラボン群で発色の減弱を認めた。In

vivoでの肝虚血再灌流障害には様々な要因（非実質細胞からのROS等）が絡んでくるため、詳細な機序についてはさらなる検討が必要であるが、エダラボンは肝臓の脂質過酸化やエネルギー産生低下を抑制しており、有用性が確認された。

これらの結果をふまえ、臨床応用への可能性を考え、ブタ虚血再灌流モデルを作成し実験を行った。生後3ヶ月のYorkshire pigを用い、全肝虚血30分、再灌流120分を行った。エダラボン群では虚血中30分間にエダラボン30 mg/bodyを点滴静注し、コントロール群では生食を投与した。経時的（虚血前、再灌流30, 60, 90, 120分後）に血液を採取し、120分後に肝組織を採取し各パラメーターを測定した。血中AST・ALTは両群ともほとんど上昇せず差は認めなかったが、血中MDAは30, 60, 90分後でコントロール群が有意に上昇していた。肝組織中PCOOHは有意差はないもののエダラボン群が低値であった。4-HNE免疫染色ではエダラボン群で発色が減弱していた。MDA, PCOOH, 4-HNEはASTおよびALTよりも鋭敏な酸化ストレスの指標であり、逸脱酵素がほとんど上昇しないような軽度の虚血再灌流でも障害を指摘でき、エダラボンの効果が確認された。このような条件は実際の肝臓外科での臨床を模倣しており、これら一連の実験により、エダラボンが肝虚血再灌流障害を軽減しうること、実際の臨床応用の可能性が示された。

審査結果の要旨

エダラボンは free radical scavenger であり脳梗塞を適応とし臨床応用されている。エダラボンが肝虚血再灌流障害を軽減できれば、臨床上非常に有用である。当教室で研究されている脂質過酸化障害の鋭敏な指標である phosphatidylcholine hydroperoxide (以下 PCOOH) を重要なパラメーターの一つとし、エダラボンの肝虚血再灌流における効果を検討した。

肝細胞の初代培養を行い、酸素吸収剤を用いて in vitro hypoxia-reoxygenation model を作製した。低酸素化時間は 3 時間群と 4 時間群を設定し各パラメーターの経時的な変化をエダラボン投与群と非投与群とで検討したところ、血中 AST・肝細胞中 ATP・PCOOH は両群ともにエダラボンの有意な効果を認めた。4 時間後の肝細胞中 PCOOH 量は濃度依存性に上昇が抑制された。さらに flow cytometry で subG1 を測定、投与群で subG1 の割合が低く実際に細胞死を抑制していることが示された。蛋白合成能でもエダラボン群で有意に合成能良好であった。このモデルでは非実質細胞は存在しないことから、エダラボンは肝細胞内の ROS を消去し脂質過酸化障害を軽減することが確認された。In vivo ではラット肝部分虚血再灌流モデルを作成し各パラメーターを投与群・非投与群で比較した。血中 AST および肝組織中 PCOOH は 3 mg/kg から有意に抑制され、血中 MDA および肝組織 energy charge は 10 mg/kg で有意な効果を認めた。さらに肝組織の 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) 免疫染色は投与群で発色の減弱を認めた。In vivo での肝虚血再灌流障害には様々な要因が絡んでくるため、詳細な機序はさらなる検討が必要であるが、エダラボンは肝脂質過酸化やエネルギー産生低下を抑制しており、有用性が確認された。

これらの結果から臨床応用への可能性を考え、ブタ虚血再灌流モデルを作成し、経時的に各パラメーターを測定し比較した。血中 AST・ALT は両群とも上昇せず差は認めなかったが、血中 MDA は非投与群が有意に上昇していた。肝組織中 PCOOH は投与群が低値であり、4-HNE 免疫染色では投与群で発色が減弱していた。MDA, PCOOH, 4-HNE は鋭敏な酸化ストレスの指標であり、逸脱酵素がほとんど上昇しないような軽度の虚血再灌流でも障害を指摘でき、エダラボンの効果が確認された。このような条件は実際の肝臓外科での臨床を模倣しており、これら一連の実験により、エダラボンが肝虚血再灌流障害を軽減しうること、実際の臨床応用の可能性が示された。

本研究はエダラボンが肝細胞内の活性酸素を消去できるという新知見を明らかにし、肝虚血再灌流障害に有用であることを明らかにした点で非常に意義深い。よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。