

氏名(本籍)	近藤 匡 (埼玉県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1572号
学位授与年月日	平成11年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Prevention of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury by SOD-DIVEMA Conjugate (SOD-DIVEMA 結合体による肝虚血再灌流障害の予防)
主査	筑波大学教授 医学博士 田中直見
副査	筑波大学教授 理学博士 坂内四郎
副査	筑波大学教授 医学博士 板井悠二
副査	筑波大学教授 工学博士 大島宣雄
副査	筑波大学助教授 医学博士 鬼塚正孝

論文の内容の要旨

(目的)

肝臓手術および肝移植では血流を一時停止させて出血を抑えることが不可欠である。ところが血流再開後に生ずる虚血再灌流障害により引き起こされる肝細胞障害が術後肝不全の原因となり、安全な肝臓外科手術の妨げとなっている。このような虚血再灌流障害の成因として活性酸素が大きな役割を果たすことが知られている。活性酸素は血流再開後の酸素濃度の上昇により類洞内に発生し、類洞内皮や白血球を活性化し炎症メディエーターの放出を促す。そして微小循環障害を引き起こし肝細胞障害の原因となる。このため活性酸素を不活化する superoxide dismutase (SOD) を用いることにより微小循環障害の一連の反応を抑えて虚血再灌流障害を防止できる可能性がある。ところが血中投与されたSODの半減期が5分と短いためその予防効果は未だ確立していない。そこでSODに合成高分子化合物であるDIVEMA (divinyl ether and maleic anhydride) を共有結合させてSOD-DIVEMA 結合体を合成し、SOD 酸素活性の半減期を延長させた。

このSOD-DIVEMA は効果的に肝虚血再灌流障害を予防できることが期待される。そこで、本研究では、SOD-DIVEMA を用いた肝虚血再灌流障害の防止効果を評価することを目的とした。

(実験方法)

Sprague-Dawley 雄ラットを (1) 非虚血, (2) SOD 投与, (3) SOD-DIVEMA 投与, (4) 生食投与の4群に分けた (n = 6)。麻酔後気管切開を行い、調節呼吸を行った。横切開で開腹し、肝左葉に傷を付けないように観察ステージ上に載せ、カバーグラスで覆った。虚血開始前に、生体顕微鏡による肝微小循環の観察を行った。門脈、肝動脈、胆管を血管クリップ (Aesculap) で一括してクランプすることにより20分間の肝虚血を行った (Pringle法)。虚血解除5分前に、(2) SOD (10000U/kg), (3) SOD-DIVEMA (10000U/kg), (4) 生食 (1.0ml) を各群別に全身投与した。クランプ解除直後、30分後、60分後、120分後に生体顕微鏡観察を行った。(1) 非虚血群のラットに対して虚血以外の手術操作を同様の時間間隔で行った。再灌流2時間後に採取した血液より血清中のGOT, GPT, LDH および α -GST 活性を測定した。また血清中SOD 活性も同時に測定した。観察終了後に右葉肝組織を採取しH-E染色を行い組織学的検査を行った。

肝微小循環の観察には Rhodamine6G 10^{-7} M/kg および sodium fluorescein 10^{-6} M/kg を全身投与し、肝腺房および中心静脈内の白血球動態 (Rhodamine 6G) および血流 (sodium fluorescein) をそれぞれ観察した。各観察時間に腺房を 10カ所、中心静脈を 10カ所それぞれ 30秒ずつ録画した。録画された画像より、以下のパラメーターについて解析を行った。(1) 類洞灌流率 (%) : 1つの腺房内で血流観察することのできる類洞数/当該腺房内に観察される類洞の数。(2) 流洞膠着白血球数 (cells) : 類洞内で停止し 20秒以上動きのない、腺房あたりの白血球数。(3) 中心静脈膠着白血球数 (cells/mm²) : 中心静脈壁に付着して 20秒以上動くことのない単位面積当たりの白血球数。

(結果と考察)

SOD-DIVEMA 群は SOD 群に比し再灌流時間の経過とともに有意に虚血後類洞灌流率が改善した (腺房内において血流を伴わない類洞の割合が減少した)。また SOD-DIVEMA 群は類洞膠着白血球数および中心静脈膠着白血球数を減少させた。

再灌流 2 時間後に測定した逸脱酵素活性で SOD-DIVEMA は SOD に比べ有意に低値を示した (GOT, α -GST)。同時に測定した血清 SOD 活性では SOD-DIVEMA 群は SOD 群の約 3 倍の高値を保っていることが判明した。再灌流 2 時間後の組織像では、SOD-DIVEMA 群では細胞浮腫、うっ血像が少なく、肝細胞索配列が明瞭であった。

本研究では SOD-DIVEMA を虚血再灌流障害の予防に適用したところ SOD-DIVEMA は肝虚血後の類洞灌流率を維持し、白血球膠着現象を抑制することが判明した。一方で SOD 単独投与では、類洞灌流率を十分に回復することが出来ずまた白血球膠着現象を SOD-DIVEMA ほどに抑制することが出来なかった。このような SOD-DIVEMA と SOD 群との差は再灌流時間の経過とともに明確となった。また、SOD-DIVEMA は微小循環動態を改善するだけでなく、肝実質細胞障害を抑制した。特に肝細胞障害の急性期に特異的な、 α -GST の血中レベルで SOD 単独投与との差は明らかであった。このような SOD-DIVEMA の効果は、SOD と比べて投与 2 時間後においても高値を維持した SOD 血中濃度活性を反映したものと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

肝移植術の普及に伴い肝虚血再灌流障害の防止は臨床的にも注目されてきているが、現在までにその予防方法は確立されていない。本研究では従来の研究では効果を十分に評価されることのなかった superoxide dismutase (SOD) を、高分子ポリマーである DIVEMA (divinyl ether and maleic anhydride) と結合させることにより安定化し、ラット肝虚血モデルにおいて適用し予防効果があることを明らかにした。さらに本研究の特色として、虚血後の微小循環障害を評価するために生体蛍光顕微鏡を用いた経時的観察システムを構築したことが挙げられる。

本研究の成果は、高分子ポリマーの生体応用への展開および、今後の肝臓外科手術治療の発展に大きく貢献することが期待される。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。