

氏名(本籍)	たむら たかふみ 田村孝史(宮城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第6629号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Interaction between Kupffer cells and platelets in the early period of hepatic ischemia-reperfusion injury-An <i>in vivo</i> study (肝虚血再灌流障害の早期相における Kupffer 細胞と血小板の相互作用)
主査	筑波大学教授 医学博士 正田純一
副査	筑波大学准教授 博士(医学) 長谷川雄一
副査	筑波大学講師 博士(医学) 加野准子
副査	筑波大学助教 博士(医学) 上妻行則

論文の内容の要旨

(目的)

肝虚血再灌流障害の原因は、Kupffer 細胞の活性化、さらに、好中球と類洞内皮細胞の相互作用による微小循環の障害が考えられている。以前に田村氏の属する研究グループは、虚血再灌流後の早期では、Kupffer 細胞の存在のもとに血小板が類洞内皮へ膠着し、虚血再灌流障害の誘因となることを報告した。このように Kupffer 細胞が虚血再灌流障害において重要な役割を担っていると推測されるが、これまで *in vivo* の実験系において Kupffer 細胞の動態を捉えた研究はない。本研究では、生体蛍光顕微鏡システムを用いて肝類洞内における Kupffer 細胞の動態を観察し、虚血再灌流後早期の Kupffer 細胞と血小板の相互作用、また、その意義について検討した。

(対象と方法)

Sprague-Dawley 雄ラットを非虚血群と虚血群に分け、虚血群では、さらに、血小板の虚血再灌流障害への影響を検討するために anti-rat platelet serum を用いた血小板減少群を設定した。Kupffer 細胞は蛍光色素封入リポソームを虚血 60 分前に頸動脈カテーテルより投与することで蛍光標識し、また、血小板は Rhodamine6G を用いて蛍光標識した。20 分の全肝虚血を施行し、虚血前および再灌流後 30、60、120 分時に 1×10^8 個の蛍光標識血小板を投与し、その類洞内の動態を観察した。Kupffer 細胞と血小板の観察は、励起フィルターを手元で交換することで同一視野での観察を可能とした。非虚血群では肝虚血以外の操作を施行した。組織学的評価は HE 染色および TUNEL 染色で施行した。また、上記観察時間毎に肝障害の指標である肝酵素を測定した。さらに、再灌流後早期における Kupffer 細胞と血小板の類洞内動態を観察するために、再灌流後 30 分の肝組織の固定標本を透過電子顕微鏡にて観察した。

(結果)

Kupffer 細胞は両群において zone 1 (門脈領域) を中心に分布し、血流再開後 120 分間にわたり安定して観察することが可能であった。類洞内皮に膠着する血小板数は非虚血群では一定数であったが、虚血群では観察時間において有意に増加した。類洞内血小板の約 50% は Kupffer 細胞と付着するような部位において、

類洞内皮に膠着することが判明した。組織学的評価では虚血群では、Kupffer 細胞の多く分布する zone1 において組織障害が強く観察され、TUNEL 染色ではアポトーシスが強く誘導されていた。血小板減少群では組織障害は軽微であり、アポトーシスの誘導は認められなかった。さらに、血液生化学検査において、肝逸脱酵素である ALT 値は血小板減少群と比較し虚血群で有意に高い結果を示した。また、電子顕微鏡による観察像において再灌流後 30 分の早期に血小板と Kupffer 細胞が直接膠着している現象を画像にて確認することが出来た。

(考察)

これまで肝虚血再灌流障害は、再灌流後の早期相における Kupffer 細胞からのサイトカインの放出、後期相における好中球の類洞内皮への膠着現象による好中球エラスターゼの放出により誘導されると報告されていた。近年、肝虚血再灌流障害における Kupffer 細胞と血小板の関与が示唆され、所属研究室では、Kupffer 細胞の存在下、虚血再灌流後のごく早期に血小板が類洞内皮へ膠着し、虚血再灌流障害の誘因となることを報告した。しかし、Kupffer 細胞および血小板の類洞内動態を *real-time in vivo* で観察した報告はない。本研究では、これまで報告されていた再灌流後の経過時間よりさらに早期の段階において、血小板が Kupffer 細胞および類洞内皮細胞に直接膠着することを明らかにした。さらに、その肝障害には血小板の存在が不可欠であることも判明した。再灌流後のごく早期の Kupffer 細胞および類洞内皮細胞への血小板膠着現象が、肝虚血再灌流障害発症へ強く関与している可能性が示唆された。しかしながら、血小板自体による肝虚血再灌流障害への関与は不明な部分が多く、今後の検討課題である。

審査の結果の要旨

本論文の要点は、第一に Kupffer 細胞と血小板の肝類洞内動態を *real-time in vivo* で同時に観察することを可能とした。Ex vivo による実験系にて、2 種類の蛍光色素を用いることで、血小板や Kupffer 細胞を活性化することなく蛍光標識し、生体蛍光顕微鏡下の観察システムを観察した点は大いに評価出来る。第二に肝虚血再灌流後早期相の血小板の Kupffer 細胞および類洞内皮細胞への膠着が、その後の肝虚血再灌流障害に関連していることを突き止めたことも病態医学的意義は大きいと考える。

今後において、血小板と Kupffer 細胞の膠着が非特異的なメカニズムで生じるのか？あるいは、肝虚血再灌流障害の病態では、Kupffer 細胞に表面分子や接着因子などが表出して膠着が生じるのか？また、両者の膠着により誘導される肝組織障害の発生メカニズムの解明など、これらの周辺に関する研究成果に大いに期待を寄せたい。

平成 24 年 12 月 28 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。