

氏名 (本籍) 高 橋 利 彰 (岐阜県)
 学位の種類 博 士 (医学)
 学位授与番号 乙第 1110 号
 学位授与日付 平成 9 年 3 月 25 日
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
 学位論文題目 急性肝不全に対するProstaglandin E_1 および I_2 の有用性に関する実験的研究
 —血中tumor necrosis factor- α の動態に及ぼす影響を中心に—
 審 査 委 員 (主査) 教授 武 藤 泰 敏
 (副査) 教授 佐 治 重 豊 教授 野 間 昭 夫

論 文 内 容 の 要 旨

近年、急性肝不全の発症ならびに病態の進行における炎症性サイトカインならびにケミカルメディエーターの役割が注目されている。なかでもtumor necrosis factor (TNF)- α が主要な因子の1つと考えられており、重症肝炎の治療において、TNF- α の産生をコントロールすることが重要であると志向される。

一方、prostaglandin E_1 (PGE_1) は四塩化炭素やガラクトサミンによる実験的肝障害モデルにおいて肝細胞壊死の阻止効果が認められており、近年臨床的にも重症肝炎に対する有用性が報告されている。しかし、その作用機序についてはいまだ明らかではない。

そこで申請者は、 PGE_1 のTNF- α 産生に及ぼす影響を *in vivo*において明らかにするために、ガラクトサミンとLPS併用投与による広範肝壊死モデルを用いて、 PGE_1 の効果を血清生化学的、病理組織学的検査および血清TNF- α 濃度を指標にして検討した。また新規合成されたprostaglandin I_2 (PGL_2) 誘導体についても、同じ動物モデルを用いて比較検討した。

対象および方法

1. 薬物； PGE_1 は α -cyclodextrin (CD) で包接し安定化させた化合物 ($PGE_1 \cdot CD$) を生理食塩水に溶解して使用した。また、 PGL_2 は PGL_2 誘導体 (OP-2507) を使用した。
2. 肝障害の惹起および $PGE_1 \cdot CD$ の投与；雄性Balb/cマウスにD-galactosamine (GalN) 800mg/kgを1回腹腔内投与し、その直後にlipopolysaccharide (LPS) 10 μ g/kgを尾静脈内投与し肝障害を惹起した（急性肝不全マウス）。 $PGE_1 \cdot CD$ は肝障害惹起30分前に0.3, 1.0および3.0mg/kgを1回皮下投与した。なお、対照群には同量の生理食塩水を1回皮下投与した。また、無処置群も設定した。
3. 肝障害の惹起および PGL_2 誘導体の投与；1) Donryu系雄性ラットにGalN 800mg/kgとLPS 60 μ g/kgを同時に腹腔内投与し肝障害を惹起した（急性肝不全ラット）。また、同時に PGL_2 誘導体を0.1, 0.3および1.0mg/kgを1回皮下投与した。なお、対照群には同量の生理食塩水を1回皮下投与した。2) 急性肝不全マウスに、 PGL_2 誘導体を0.3, 1.0および3.0mg/kgを1回皮下投与した。なお、対照群には同量の生理食塩水を1回皮下投与した。3) Donryu系雄性ラットにGalN 800mg/kgとTNF- α 0.8 $\times 10^5$ Uを同時に腹腔内投与し肝障害を惹起した。また、同時に PGL_2 誘導体を0.1, 0.3および1.0mg/kgを1回皮下投与した。なお、対照群には同量の生理食塩水を1回皮下投与した。
4. 血清生化学的検査および病理組織学的観察；肝障害惹起後7ないし9時間目に、腹部大静脈より採血した後、肝を摘出した。摘出肝のHE染色標本を作製し、光学顕微鏡にて病理組織学的観察を行った。肝細胞壊死および出血について、それぞれ5段階に分け評価を行った。
5. 血清TNF- α 濃度測定；肝障害惹起前および惹起後0.5, 1, 2, 3および7時間目に、腹部大静脈より採血を行い、遠心分離し、血清を採取した。血清中のTNF- α 濃度はマウスTNF- α ELISA Kitを用いて測定した。
6. 急性肝不全マウス由来脾マクロファージ産生性TNF- α の PGL_2 誘導体による抑制；Balb/cマウスにGalN 800mg/kgを1回腹腔内投与し、1時間後に無菌的に摘脾し、脾細胞浮遊液を作製しMSPプレート上で37 $^{\circ}$ C, 1時間インキュベートした。その後、トリプシンEDTAにて付着細胞を回収し、細胞濃度を 1.0×10^5 /mlに調製し、マルチウェルプレートに分注した。これらに各々LPS 10 μ g/ml, インドメサシン1 μ gを添加し、さらに 1.0×10^{-8} ~ 10^{-5} Mの各濃度に調製した PGL_2 を添加し、37 $^{\circ}$ C, 3時間インキュベートした。また PGL_2 を添加しないものを対照とした。この後、これらの培養上清中のTNF- α 濃度をマウスTNF- α ELISA Kitを用いて測定した。

結 果

1. PGE_1 の成績

1) 急性肝不全マウスのGalN+LPS投与後7時間目のGOT, GPT, T-Bil値は無処置群と比較して著しい上昇が認められたのに対して、 $PGE_1 \cdot CD$ の皮下投与は0.3mg/kgから用量依存的な抑制を示し、1.0および3.0mg/kg投与群では有意な抑制作用を示した ($P < 0.05$)。

2) GalN+LPS投与後7時間目の肝の病理組織学的検討では、GalN+LPS投与により区域性的ない肝細胞壊死と壊死領域での出血、ならびにわずかな好中球浸潤が観察され、びまん性の肝細胞壊死は8例中3例に認められた。これに対し、 PGE_1 ・CDの皮下投与は、1.0および3.0mg/kg投与群では肝細胞壊死と出血は減弱し、びまん性の肝細胞壊死は観察されなかった。

3) GalN+LPS投与により血清TNF- α 濃度は30分後から上昇し、1時間で最大濃度 $571.4 \pm 91.2 \text{ ng/ml}$ を示した。その後TNF- α 濃度は減少し、3時間以降 100 ng/ml 以下の低濃度で推移した。 PGE_1 ・CDの皮下投与は0.3mg/kgから用量依存的なTNF- α 産生抑制作用を示した ($P < 0.05$)。

2. PGI_2 誘導体の成績

1) GalN+LPS投与後42時間後の急性肝不全ラットは対照群の生存率が20%まで低下したのに対し、 PGI_2 誘導体1.0mg/kg皮下投与群では、死亡例の発現が著明に低下し、生存率は100%であり ($N = 10$)、急性肝不全モデルに対する PGI_2 誘導体の有用性が認められた。

2) GalN+LPS投与後9時間目の急性肝不全ラットにおけるT-Bil, GPT値は著しい上昇が認められたのに対して、 PGI_2 誘導体の皮下投与は0.1mg/kgから有意な抑制作用を示した ($P < 0.05$)。

3) GalN+LPS投与後9時間目の急性肝不全ラットの病理組織学的検討では、6例中5例に巣状壊死以上の壊死所見を認めたのに対し、 PGI_2 誘導体投与群では5例全例が単細胞壊死にとどまり、びまん性の肝細胞壊死は観察されず、 PGI_2 誘導体に肝細胞壊死抑制効果が有意に認められた。

4) GalN+LPS投与後1時間の急性肝不全マウスにおける血清TNF- α 濃度は、無処置群では $1042 \pm 348 \text{ ng/ml}$ と高値を示したのに対し、 PGI_2 誘導体1.0および3.0mg/kg投与群は各々 306 ± 20.4 , $276 \pm 72.6 \text{ ng/ml}$ と有意に抑制された ($P < 0.05$)。

5) GalNとTNF- α を併用投与した急性肝不全ラットにおける血清GPT, T-Bil値の変動をみると、GalN+TNF- α 投与後9時間目のT-Bil, GPT値は著しい上昇が認められたが、 PGI_2 誘導体の皮下投与によっても全く抑制作用を示さなかった。

6) *in vitro*の実験で得られたマウスの脾由来マクロファージの培養上清中のTNF- α 濃度と添加した PGI_2 誘導体の濃度との関係では、 PGI_2 誘導体の濃度が $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ 以上でTNF- α の産生が抑制傾向にあった。

考 察

PGE_1 が活性化マクロファージからのTNF- α 産生を抑制するという *in vitro*での報告はみられるものの、急性肝不全モデルに PGE_1 を投与し、血中TNF- α 濃度の動態を *in vivo*で検討した成績はない。今回、血中TNF- α 濃度の著増を示したGalN+LPS投与マウスに PGE_1 を前投与したところ、トランスアミナーゼ値、総ビリルビン値の有意な低下、明らかな組織学的改善とともに、 PGE_1 の濃度に依存して血中TNF- α 濃度の低下がみられた。したがって、GalN+LPS投与マウスでの PGE_1 前投与による肝細胞壊死の抑制効果は、広範肝壊死に深く関与する血中TNF- α 濃度の低下に起因する可能性が考えられた。これは、重症肝炎患者においても PGE_1 が肝壊死の発生ならびに進展に対して、阻止効果を有する可能性を支持している。

一方、 PGI_2 および PGI_2 誘導体も実験的肝障害に対して有効とする報告もされているが、 PGI_2 は強力な血小板凝集阻害作用を有し、その反面で全身の出血傾向を助長する可能性もあり、臨床応用が困難とされてきた。今回、実験に用いた PGI_2 誘導体は、その血小板凝集阻害作用は PGI_2 の $1/14 \sim 1/180$ に減弱しており、他の副作用も軽減されている薬剤である。今回、 PGI_2 誘導体をGalNとLPS投与時に1回皮下投与することにより、GPT値、総ビリルビン値の有意な低下がみられ、組織学的にも肝壊死をほぼ完全に抑制し、生存率の向上が認められた。さらに、その作用機序に関する検討では、 PGI_2 誘導体はGalN+TNF- α 併用投与による肝壊死に対しては全く抑制効果が認められず、 PGI_2 誘導体の肝障害抑制がTNF- α に対する直接作用ではなく、活性化マクロファージにおけるTNF- α の産生抑制によることが *in vitro*の実験からも強く示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者高橋利彰は、急性肝不全に対する PGE_1 および PGI_2 誘導体の有用性を特に血中TNF- α の動態から検討した結果、*in vivo*で濃度依存性に血中TNF- α 濃度を低下させ肝壊死を抑制すること、また、その作用点が *in vitro*で活性化マクロファージからのTNF- α 産生抑制にあることを明らかにした。これらの新知見は、肝臓病学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

急性肝不全に対するProstaglandin E_1 および I_2 の有用性に関する実験的研究

—血中tumor necrosis factor- α の動態に及ぼす影響を中心に—

岐阜大医紀 平成9年3月発行予定