



閉塞性黄疸時のエンドトキシン血症における肝病態 生理と抗血小板活性化因子anti-platelet activating factorの関与の実験的研究

水野, 秀隆

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-04-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1729

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001729>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	みず の ひで たか 水 野 秀 隆	（新潟県）
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）	
学位記番号	博ろ第1352号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成5年4月7日	
学位論文題目	閉塞性黄疸時のエンドトキシン血症における肝病態生理と 抗血小板活性化因子 anti-platelet activating factor の関与の実験的研究	
審 査 委 員	主査 教授 斎 藤 洋 一 教授 岡 田 昌 義	教授 尾 原 秀 史

旨 論 文 内 容 の 要 旨

はじめに

閉塞性黄疸時に endotoxin (E T) 血症が合併した際の循環不全や肝障害への platelet activating factor (P A F) の関与を検討した報告は稀である。そこで、閉塞性黄疸ラットに E T を投与し、循環動態、肝血流量および肝組織エネルギー代謝の面からその病態を検討し、P A F に特異的な拮抗薬である C V - 3988 (anti - P A F) の効果を検討した。また、E T の Kupffer cell 機能に及ぼす anti - P A F の効果を in vitro の実験系で検討した。

実験方法

1) in vivo 実験 ; Wistar 系雄性ラットを用い、全麻下に総胆管の末端を結紮切除し、黄疸モデルとし（黄疸群）、同週齢の正常ラットを対照とした（正常群）。肝血流量を水素ガス・クリアランス法で、肝ミトコンドリアの呼吸能 (R C R) および酸化的リン酸化能 (A D P / O 比) を萩原らの方法で、肝ミクロソーム活性を Ullrich and Weber の方法で測定し、生存時間を算出した。E T として lipopolysaccharide (L P S) (E.coli 055:B5) 2 ~ 30mg / kg を i.v. 投与し、anti - P A F は 10mg / kg の C V - 3988 (武田薬品工業より供与) を L P S 投与一分前に i.v. 投与した。

2) in vitro の実験 ; Kupffer cell を分離し、24 時間前培養後に 20% F C S を含む Medium199 中で 1×10^6 cell / ml に調整し、培血に ^3H -glucosamine を加え細胞内放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、Kupffer cell 活性 activity index (% A I) とした。実験群は、L P S 10 ~ 30 μg / ml および anti - P A F 40 μg / ml 添加し % A I を比較した。

結 果

正常ラットではLPS投与量に応じて肝血流量は有意に低下したので ($P<0.01$)、変動が少ない 30mg/kg を実験に用いた。

LPS投与後の生存時間は、正常ラットの 5.4 ± 1.3 時間に対し黄疸ラットでは 2.1 ± 1.2 時間と低値であった ($P<0.01$)。anti-PAFにより正常群では 9.6 ± 2.6 時間、黄疸群では 6.7 ± 3.8 時間と生存期間が延長した ($P<0.001$)。また、正常ラットの肝血流量は、anti-PAF投与によって高く維持できた ($P<0.05$)。一方、黄疸ラットの肝血流量は正常ラットに比較して低いが、LPS投与後さらに低下した。しかし、anti-PAF投与時には、肝血流量の上昇がみられた ($P<0.05$)。

肝ミトコンドリア機能は、正常群ではLPS投与によりRCR、ADP/O比、 S III O_2 のいずれも低下した。黄疸群では前値が正常群より低く ($P<0.01$)、LPS投与に伴いさらに低下した ($P<0.05\sim 0.01$)。anti-PAFは、正常群のRCR、ADP/O比、 S III O_2 を改善した ($P<0.05\sim 0.01$) が、黄疸群ではRCR、ADP/O比の改善傾向を認めたものの ($P<0.05$)、その程度は少なく S III O_2 での差を認めなかった。肝ミクロソーム機能は、正常群では明らかな変化を認めず、黄疸群においても抑制は認められなかった。黄疸群では、LPS投与にてethoxy-, propoxy-, methoxycoumarinの3種の7-alkoxycoumarin O-dealkylase活性の低下を認め ($P<0.01$)、特に7-propoxycoumarinを基質とする場合に最も低下し、正常ラットとの間に差を認めた。しかし、黄疸群では、anti-PAF前投与に伴う改善を認めなかった。

Kupffer cell活性は、peak値を示す36時間培養で検討した。LPS $160\mu\text{g/ml}$ 添加し、anti-PAF濃度を変化させると、 $40\sim 80\mu\text{g/ml}$ で%AIは頂値となった。LPS濃度を変えると、 $10\mu\text{g/ml}$ では%AIは高く ($P<0.01$)、 $20\mu\text{g/ml}$ 以上では濃度にしたがって活性は低下した ($P<0.01$)。そこでanti-PAFを $40\mu\text{g/ml}$ 添加すると、Kupffer cell活性は有意に上昇した ($P<0.01$)。

考 察

閉塞性黄疸時には高率にET血症が生じ、また循環不全や肝障害が生じるが、その機序に関しては不明な点が多い。そこで、閉塞性黄疸時の外因性ET血症の病態におけるPAFの関与と、anti-PAFの治療上の有意性を検討した。

PAFは、リン脂質誘導体で、血液細胞、内皮細胞、腎臓、心臓、脳などで生成され、血小板活性化作用以外に、 $1\mu\text{g/kg}$ の低濃度で強い降圧作用を持ち、また、炎症性細胞からも産生されて、免疫応答や炎症反応を修飾する。エンドトキシンショックの病態においても、各種のchemical mediatorとの相互作用の中で、上記の作用を発現すると考えられる。anti-PAFは、PAF受容体に特異的に結合することでPAFの作用と拮抗する。

この黄疸モデルは、機能的、器質的に可逆的な範囲であり、またLPS投与量はcold shockを生じうる 30mg/kg とした。黄疸モデルでは肝血流量の前値は正常モデルに比較して既に低下し、正常群のLPS投与後120分値に近似し、LPS投与後はさらに低下し120分で死亡した。すなわち本モ

デルはショック準備状態にあり、外因性ET血症により容易に重篤化することが明らかになった。肝ミトコンドリア機能の低下は、黄疸肝でのエネルギー産出能の低下を表している。LPS投与後の低値は、種々の mediator 分泌を介する肝細胞障害とともに、肝血流量の減少によりエネルギー代謝の障害を生じたものと考えられる。

この病態に対し、未だ報告を見ない anti-PAF を投与しその効果を検討すると、正常、黄疸群ともに肝組織血流の改善と生存時間の延長を認め、また、ミトコンドリアの呼吸能は前値まで改善した。これは、anti-PAF による肝循環の改善がミトコンドリアのエネルギー産生能の回復に寄与し、エネルギーレベルの維持に有効であることを示し、その結果として生存時間が有意に延長したと思われる。PAF receptor に特異的に結合するが、エンドトキシンショックに対する直接作用を持たない anti-PAF の有効性は、閉塞性黄疸時のエンドトキシンショックの主たる病態が PAF を介するものであることを示唆している。しかし、酸化リン酸化能の回復不良は肝血流障害を介さないミトコンドリア障害を示唆するものと考えられる。

また、黄疸によるミクロソーム機能の低下は認めなかったが、LPS による活性の低下およびその際の分子種による差を認め、チトクローム P-450 の分子種の差異に関しては今後さらなる検討が必要と思われる。anti-PAF がミクロソーム機能を改善しなかったことは、肝循環やミトコンドリアの障害とは異なる障害機序によることを示唆している。

次に、閉塞性黄疸やエンドトキシン血症での機能低下が報告されている網内系、特に肝 Kupffer 細胞機能と PAF との関連は全く報告されておらず、in vitro の実験で検討を行った。その結果、anti-PAF は Kupffer 細胞に直接作用することで LPS 作用を抑制する可能性が示唆された。さらに、LPS と anti-PAF の同時投与では Kupffer 細胞活性が維持されており、閉塞性黄疸時のエンドトキシン血症時の PAF 作用に Kupffer 細胞活性が関与することを示唆するものと考えられる。

結 論

閉塞性黄疸時の外因性エンドトキシン血症下の病態の検討を行い、次の結論を得た。

1. 閉塞性黄疸時には、肝血流が低下し、肝ミトコンドリア機能も低下したが、肝ミクロソーム機能は障害されていなかった。
2. LPS 投与による血流低下は、黄疸群で著しく肝ミトコンドリア機能を障害し、肝ミクロソーム機能を著しく障害した。O-dealkylase 活性は、7-propoxycoumarin > 7-methoxycoumarin $\approx$ 7-ethoxycoumarin の基質の順に分子種に差を認めた。
3. PAF の特異的拮抗薬である CV-3988 の投与は、外因性エンドトキシン血症に伴う肝血流低下を改善し、生存期間を延長し、肝ミトコンドリア機能を改善した。他方、肝ミクロソーム機能の改善は認めなかった。
4. anti-PAF は、LPS による肝 Kupffer 細胞機能抑制に防御的に作用することが推測されたが、明らかな改善を証明することはできなかった。

論文審査の結果の要旨

閉塞性黄疸時に endotoxin (E T) 血症が合併した際の循環不全や肝障害への platelet activating factor (P A F) の関与が臨床上問題になっている。そこで、閉塞性黄疸ラットに E T を投与し、循環動態、肝血流量および肝組織エネルギー代謝の面からその病態を検討し、P A F に特異な拮抗薬である C V - 3988 (anti - P A F) の投与効果を検討した。また、E T の Kupffer cell 機能に及ぼす anti - P A F の効果を in vivo の実験系で検討し、in vivo の成績でこれを裏付けた。

(1) in vivo 実験 ; Wistar 系雄性ラットを用い、総胆管の末端を結紮した黄疸群と同周齢の正常ラットを対比し、肝血流量、肝ミトコンドリアの呼吸能および酸化的リン酸化能、肝ミクロソーム活性、生存時間を算出した。

(2) in vivo の実験 ; Kupffer cell を分離し、これを用い Kupffer cell 活性 activity index を測定し、いずれも E T として lipopolysaccharide と anti - P A F を投与し対比した。

それらの実験から次の様な成績を得た。すなわち、

(1) 閉塞性黄疸時には、肝血流が低下し、肝ミトコンドリア機能も低下したが、肝ミクロソーム機能は障害されていなかった。

(2) L P S 投与による血流低下は、黄疸群で著しく、肝ミトコンドリア機能を障害し、肝ミクロソーム機能を著しく障害した。O-dealkylase 活性は、7-propoxycoumarin > 7-methoxycoumarin $\approx$ 7-ethoxycoumarin の基質の順に分子種に差を認めた。

(3) P A F の特異的拮抗薬である C V - 3988 の投与は、外因性エンドトキシン血症に伴う肝血流低下を改善し、生存期間を延長し、肝ミトコンドリア機能を改善した。他方、肝ミクロソーム機能の改善は認めなかった。

(4) anti - P A F は、L P S による肝 Kupffer 細胞機能抑制に防御的に作用することが認められた。

本研究は、閉塞性黄疸時のエンドトキシン血症についてその肝病態生理を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった抗血小板活性化因子の関与について、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。