




学位論文の審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第309号	氏名	大石一成
審査委員会委員	主査氏名	森 宣 	
	副査氏名	武山正治 	
	副査氏名	村上和成 	
<p>提出論文; The Vitamin E Derivative, EPC-K1, Suppresses Inflammation during Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Exhibits Hepatoprotective Effects in Rats. 掲載予定誌; Journal of Surgical Research</p> <p>Oxygen free radical(OFR) or hydroxyl radical(*OH)と neutrophils は虚血再灌流障害の主たる原因である。EPC-K1 (alpha-tocopheryl-L-ascorbate-2-O-phosphate diester) (l-ascorbic acid 2-[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran- 6-yl hydrogen phosphate] potassium salt) は、動物実験において多くの臓器の虚血再灌流障害の軽減作用が報告されている hydroxyl radical(*OH) scavenger のひとつである。本研究では、肝臓においても虚血再灌流障害の軽減作用があるかどうかを、ラットを用いて検討した。ラット(n=36)を虚血再灌流群(n=12)、虚血再灌流前に EPC-K1 100mg/kg 皮下注射した群(n=12)、コントロール群(n=12)の3群に分けた。虚血は門脈左枝と左肝動脈をクリップにて閉塞し、45分後に解除することで再灌流させ、再灌流後6時間(各3群ともn=6)および24時間(各3群ともn=6)にて犠死させ、採血してAST,ALT,LDHを測定し肝障害の程度、TNF-α, IL-6, HMGB1を測定し炎症の程度を検討し、肝臓左葉の組織学的変化と壊死の程度をHE染色、caspase3/7活性、TUNEL染色にて検討した。結果は、虚血再灌流群にて著明であった肝障害と炎症像を示す血液像は、虚血再灌流前に EPC-K1 100mg/kg 皮下注射した群においては有意に低値であった。組織学的にも、虚血再灌流群にて著明であった肝細胞膨化・空砲化、出血、白血球浸潤および壊死が、虚血再灌流前に EPC-K1 100mg/kg 皮下注射した群では抑制されていた。</p> <p>至適投与量と虚血再灌流後投与での効果をさらに検討する必要があるが、ラット肝臓虚血再灌流障害モデルにおいて EPC-K1 虚血再灌流前投与は、肝細胞逸脱酵素の上昇と炎症を抑え、肝細胞障害を軽減させることを示した本研究は、肝臓外科等の進歩にとって重要であり、本研究者は博士(医学)学位授与に値すると認められた。</p> <p>ただし、提出論文において「EPC-K1 10mg/kg 皮下注射」を「EPC-K1 100mg/kg 皮下注射」、コントロール群の「生理食塩水 1ml/kg 皮下注射」を「生理食塩水 10ml/kg 皮下注射」への訂正を始めとして多くの訂正事項が審査委員より指摘され、論文要旨(邦文)にも再灌流後24時間の項が記載されていない等の指摘がなされた。これらを明確に訂正して再提出したものを学位論文として差し替えることが了承された。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 大石一成

論 文 題 目

The Vitamin E Derivative, EPC-K1, Suppresses Inflammation during Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Exerts Hepatoprotective Effects in Rats. (ビタミンE誘導体EPC-K1は、ラット肝虚血再灌流障害において炎症を抑制し、肝保護作用を発揮する。)

要 旨

諸言

主に肝臓手術後などにおいて発生する肝虚血再灌流障害を軽減することは、術後管理において重要である。L-ascorbic acid 2-[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl-hydrogen phosphat] potassium salt(EPC-K1)は、hydroxyl radical scavengerであり、他の多くの臓器で虚血再灌流障害の軽減作用が報告されている。今回、肝虚血再灌流障害におけるEPC-K1の効果を検討した。

研究対象及び方法

体重 250~300g の雄性 Wistar ラットをランダムに 3つのグループに分けた。ischemia-reperfusion (I/R) group においては 0.9%生理食塩水(10ml/kg)を皮下注射した。皮下注射 30分後、4%セボフルラン麻酔下に開腹し、門脈左枝と肝動脈をクランプした。45分後にクランプ解除し再灌流を行った。EPC-K1+I/R group においては EPC-K1 を 100mg/kg 皮下注射し、虚血再灌流の処理を行った。sham group においては、0.9%生理食塩水(10ml/kg)を皮下注射し、sham 手術を行った。再灌流 6時間後および 24 時間後に犠死させ、右心房より採血した。肝障害の指標として AST、ALT、LDH を測定し、炎症の指標として TNF- α 、IL-6、HMGB1 を測定した。また肝左葉組織を採取し、HE 染色による組織学的評価を行い、アポトーシスの評価を caspase3/7 活性と TUNEL 染色にて行った。

結果

再灌流 6 時間後、AST、ALT、LDH すべてにおいて、I/R group は sham group と比べ有意に高値を示した。EPC-K1+I/R group は I/R group と比べ有意に低値を示した。24 時間後も同様の傾向がみられた。IL-6、TNF- α 、HMGB1 はいずれにおいても、I/R group において有意に sham group と比べ上昇した。一方、EPC-K1+I/R group は I/R group と比べ有意に低値を示した。24 時間後も同様の傾向がみられた。HE 染色組織所見では、I/R group において肝細胞は著しく膨張し、空胞化が目立ち、また出血と白血球の浸潤が認められたが、EPC-K1+I/R group では、正常な構造が比較的よく保たれていた。Caspase3/7 活性及び、TUNEL 染色では EPC-K1 group においてアポトーシスが抑制された。

考察

EPC-K1 の投与が虚血再灌流傷害により引き起こされる炎症反応を抑制した結果、肝細胞の傷害が軽減され、アポトーシスが抑制されたものと考えた。EPC-K1 は脂溶性の抗酸化物質である Vitamin E と水溶性の抗酸化物質である Vitamin C の phosphate diester であり、hydroxyl radical scavenger としての作用と過酸化脂質阻害作用を併せ持つ。VE と VC は生体内における主要な抗炎症物質であるが、EPC-K1 は LPS 誘導敗血症モデルで抗炎症作用が報告されている。虚血再灌流を契機に肝 kupffer 細胞等より様々な炎症性メディエーターが放出されるが、これらがミトコンドリアの膜の透過性を亢進させることによってアポトーシスなどの細胞障害が進行する。EPC-K1 は炎症性サイトカインを抑制させることによりミトコンドリアの機能障害を防止し、細胞障害を抑制するものと考えられた。

結語

ラット肝虚血再灌流モデルにおいて EPC-K1 の前投与は、肝組織像を正常に保ち、肝細胞逸脱酵素の上昇を抑え、肝細胞障害を軽減させた。EPC-K1 は抗炎症作用により、肝保護作用を発揮する可能性が示唆されたが、至適投与量や後投与での効果を今後さらに検討する必要がある。