

本田正樹氏の学位論文審査の要旨

2 光子励起顕微鏡を用いた肝虚血再灌流障害時における好中球動態の解析 (Analysis of neutrophil recruitment in hepatic ischemia-reperfusion injury using TPLSM)

肝・小腸移植をはじめ小児外科領域において、虚血再灌流 (ischemia-reperfusion; I/R) 障害は临床上重要な問題である。その病態には好中球の関与が大きいとされてきたが、生体内での動態に関しては不明な点が多い。

そこで申請者は新たな蛍光イメージングモダリティである 2 光子励起顕微鏡を用いて、肝虚血再灌流障害時の好中球動態を *in situ* で観察した。具体的には、まず LysM-eGFP マウス(好中球は eGFP^{hi} に標識される)を用い、肝臓の約 70%の領域を占める median lobe + left lateral lobe への門脈・肝動脈血流を 45-60 分間クランプした後に開放する肝 I/R モデルを作成した。観察直前に TRITC-albumin を静注し血管を蛍光標識した上で、全身麻酔下に固定し、肝左葉を露出した。2 光子励起観察には BX61 と FV1000MPE を用い、低倍率イメージング(×10)では肝左葉を連続的に観察し、再灌流直前、後 1、2、3、4 時間の時点でそれぞれ 20 分の動画を撮影した。また経時的に血清、肝臓内のケモカイン(CXCL1、CXCL2)濃度を測定した。高倍率イメージング(×25)では再灌流 6 時間後に 20 分の動画を撮影した。また、好中球遊走に関わる formyl peptide receptor1 のアー*ンタゴニスト cyclosporin H が、肝 I/R 時の好中球動態に及ぼす効果も検討した。その結果、低倍率イメージングでは 1 視野当り 4-6 の肝小葉が描出された。I/R 群における 1 視野当りの平均接着好中球数はそれぞれ 207.8 (0h)、393.2 (1h)、534.2 (2h)、657.0 (3h)、699.2 (4h)と時間経過と共に次第に増加した。また、接着好中球の平均移動速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$) は再灌流 2 時間後に 7.46 と最も速かった。血清中の CXCL1、CXCL2 は同様に濃度が上昇し、共に再灌流 2 時間後に最高値に達した。一方、肝臓内濃度は再灌流 3 時間後に最高値に達した。高倍率イメージングでは類洞血流の有無の評価が可能であり、I/R 群では好中球浸潤を伴う血流途絶部位が散見された。好中球の平均移動速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$) は、Control 群 2.87、I/R 群の血流持続部位 6.51、血流途絶部位 2.48 と血流持続部位で最も速かった。I/R 群では蛍光強度の上昇を示す肝細胞に向かって好中球が集簇する様子が観察され、鬱血、血栓形成の誘発、肝実質構造の破壊を経時的に捉えることが可能であった。cyclosporin H 投与は特に血流途絶部位での好中球の集簇や移動速度を抑制し、血清学的・病理学的に肝 I/R 障害を軽減させた。

生体内蛍光イメージングは比較的新しい研究分野であり、生体内での生理的現象を直接捉えるために、申請者は本技術を肝 I/R の病態解析に応用し、好中球動態と肝微小循環の変化、ならびにそれに伴う肝小葉内の病理学的変化を経時的にイメージングすることに成功した。加えて好中球の遊走能を制御することで肝 I/R 障害の軽減しうることを示した。

審査では、肝 I/R 障害と活性酸素との関与、好中球集簇の生理的意義、I/R 後のケモカイン濃度上昇の機序、LysM-eGFP マウスの特徴、観察時間を含めた実験条件、血流途絶部位における病理学的変化、肝小葉内での好中球数、移動速度の偏倚性、formyl peptide の生理的役割とケモカインとの作用面での異同、臨床応用などについて質疑応答がなされ、申請者より概ね適切な回答と考察が得られた。本研究は肝 I/R 障害における好中球の関与と機能制御による障害予防の可能性を示し、I/R 障害予防法の開発へ結び付くものとして高く評価された。

審査委員長 消化器内科学