京都大学	博士（　医学　）	氏名	宮 内 智 之
論文題目	Preventive Effect of Antioxidative Nutrient - Rich Enteral Diet Against Liver Ischemia and Reperfusion Injury （肝虚血再灌流障害に対する抗酸化栄養素強化食の保護効果）		

（論文内容の要旨）

背景

肝臓手術において、虚血再灌流障害（IRI）は術後肝不全や肝移植後拒絶反応のリスクとなるため克服すべき課題である。虚血後の臓器に血液が再灌流する際に、好中球やマクロファージが組織に浸潤し産生される活性酸素（ROS）や炎症性サイトカインによる障害がIRIの病態の一因とされる。今回、抗酸化栄養素の経口摂取によるマウス肝IRIへの保護効果について検証した。

方法

通常飼料（Control diet）と抗酸化栄養素（ビタミンC・E，ポリフェノール類［カテキン，プロアントシアニジン］）を強化した抗酸化栄養素強化飼料（Ao diet）を作成した。野生型C57BL/6マウスを用いて肝IRIモデルを作成し､IR前に各飼料を7日間与えた。肝 70%部分虚血 60 分を行い再灌流 6 時間後にサンプルを採取し、血清肝逸脱酵素（AST・ALT）の測定、病理学的評価・免疫染色、定量PCRによる炎症性サイトカイン・細胞接着因子・抗酸化酵素の測定、酸化ストレスとして脂質酸化を反映するマロンデアルデヒド（MDA）の測定を行ない、Ao diet群とControl diet群において比較検討した。

結果

7 日間の経口摂取により、Ao diet 群で血清ビタミン C・E の上昇を確認したが（$p < 0.001$）、肝組織中のポリフェノールに差を認めなかった。再灌流後 6 時間において、Ao diet 群で血清 AST・ALT 値の低下を認め（$p < 0.05$）、HE 染色にてネクローシスの抑制を認めた（$p < 0.05$）。また、 TUNEL 染色において陽性細胞数の減少（$p < 0.05$）、Western blot 法にて肝組織中 Cleaved caspase-3 の発現低下を Ao diet 群で認め、アポトーシスの抑制を確認した。Ao diet 群において、肝組織内の炎症性サイトカイン IL-6, ケモカイン CXCL1 遺伝子発現の低下を認め（$p < 0.05$）、抗酸化酵素である SOD1・2 の上昇を認めた（$p < 0.05$）。Control diet 群では、IRI に伴う酸化ストレスによる肝組織 MDA の上昇を認めたが、Ao diet 群では抑制された（$p < 0.05$）。Ao diet 群では細胞接着因子 ICAM-1 遺伝子発現が低下しており､免疫染色にて好中球とマクロファージの肝組織への浸潤の抑制を確認した（$p < 0.05$）。

考察

ビタミン C・E は代表的な抗酸化栄養素であるが、IR では体内で急速に消費される。ビタミン E は脂溶性であり、細胞膜のリン脂質中に存在し、ROS によって自身が還元型から酸化型へと変化し ROS を中和することで抗酸化能を発揮する。ビタミン C も抗酸化能を保持するが、酸化型ビタミン E を還元型へ復元する作用も有する。今回の IRI に対する Ao diet の肝保護効果は、ビタミン C・E の相乗効果によるものと考えられ、結果として、肝組織中の MDA 増加が抑制された。経口摂取による肝組織中ポリフェノールの増加を認めなかったことは、カテキン・プロアントシアニジンともに経口摂取での吸収率が非常に低いこと、生体内での半減期が短いことが一因であると考えられた。

Ao diet の摂取によって、ICAM-1 の低下と肝組織に浸潤した好中球・マクロファージの低下、IL-6・CXCL1 遺伝子発現の低下が認められ、ROS の産生低下が示唆された。また、抗酸化栄養素を付加した食事により、抗酸化物質（ビタミン C・E）と抗酸化酵素（SOD1・2）は増加し、ROS に対する抗酸化効果の増加が示唆され、肝 IRI に対する改善効果を示した。術前の抗酸化栄養素の十分な摂取は、肝臓外科特有の IRI を抑制し、術後成績向上につながる可能性がある。

（論文審査の結果の要旨）

肝虚血再灌流障害の軽減は肝臓切除、移植など肝臓外科医領域において重要な課題である。申請者は、抗酸化栄養素の経口摂取の前処置による肝虚血再灌流障害に対する効果を検討した。

術前 7 日間、抗酸化栄養素強化飼料（ビタミン C・E，ポリフェノールを大量に含む）を与えた群（Ao diet 群）と、標準飼料を与えた群（Control diet 群）の 2 群で、マウス肝虚血再灌流障害（60 分の 70%肝虚血後、6 時間の再灌流）の評価が行われた。Ao diet 群では Control diet 群に比して血清ビタミン C・E の有意な増加が確認され、虚血再灌流刺激後の血清肝逸脱酵素の低下、肝細胞壊死の抑制、アポトーシスの減少が示された。その機序として、Ao diet 群においては抗酸化酵素 superoxide dismutase 1･2 および抗酸化物質の増加と肝組織の脂質酸化の抑制、細胞接着因子 ICAM-1 の低下による白血球浸潤の抑制、炎症性サイトカインの抑制が確認された。以上より、抗酸化栄養素強化食(Ao diet)は抗酸化能の増加と白血球浸潤の抑制および炎症抑制により肝虚血再灌流障害の改善をもたらすことが示された。

以上の研究は、抗酸化栄養素の経口摂取による、肝虚血再灌流障害の軽減とその作用機序の解明に貢献し、臨床的に汎用されているビタミン C・E のさまざまな肝障害および肝移植術後の予後改善への基礎実験として位置づけられ、治療成績の向上に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 2 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。