

氏 名	は た の えつ ろう 波 多 野 悦 朗
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1872 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Induction of Endotoxin Tolerance in Transgenic Mouse Liver Expressing Creatine Kinase (クレアチンキナーゼを肝特異的に発現させたトランスジェニック マウスにおけるエンドトキシン耐性の誘導に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 村 正 之 教 授 中 西 重 忠 教 授 西 川 伸 一 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

[序論] 最近の分子生物学の進歩により, 生体への遺伝子導入が可能となり, 元来, 肝臓では低発現の遺伝子を遺伝子導入することにより, 肝臓の様々な機能を強化し, 外科における周術期の病態改善が, 期待できる。術後の敗血症, 多臓器不全は, 外科患者の主な死亡原因の一つで, 過剰なサイトカイン反応が起これ全身の臓器を障害するが, その中でも肝臓は第一標的臓器である。エンドトキシンショックにおいて肝細胞は, 肝ミトコンドリアの障害や微小循環障害を受け, 肝臓の ATP, energy charge (EC) が低下することが知られている。

肝臓以外の臓器(筋肉, 脳, 心臓)で ATP のリザーバーとして phosphocreatine (PFR) / creatine (Cr) 系を触媒する酵素であるクレアチンキナーゼを肝特異的に発現させたトランスジェニックマウス(CK-TGmice)は, phosphocreatine のリザーバーの作用により, エンドトキシンショックにおける ATP, EC の低下を軽減させることが期待出来るので, lipopolysaccharide (LPS) に対する CK-TGmice の耐性について検討した。

[方法] ① CK-TG mice は prealbumin の transthyretin gene の promotor を用い rat brain creatine kinase gene を肝特異的に発現させたもので, 通常食飼育 CK-TGmice を PCr (－) 群(コントロール)とし, LPS 投与前 5 日間 10% Cr 飼育群を PCr (＋) 群とした。CK-TGmice は, 通常食では肝臓に PCr の集積を認めないが, 5 日間 10% Cr 食投与で 10.63 ± 2.18 vs. $0.17 \pm 0.06 \mu\text{mol/g liver}$ (PCr (＋) 群 vs. PCr (－) 群と肝臓に PCr の集積を認めた。

②この CK-TGmice を用い, 敗血症のモデルとして(1) LPS: 0.5, 1, 5, 10, 25, 100 mg/kg を i. p. し生存率を比較した。また以下 LPS 10 mg/kg i. p. にて(2) Endospecy による血中エンドキシン濃度, (3) ELISA による $\text{TNF}\alpha$, IL-1 α , IL-6, (4) HPLC による肝組織中の Cr, PCr, ATP, ADP, AMP 及び EC,

(5)血糖値及び、(6)酸素電極による肝ミトコンドリアのリン酸化能の測定を行った。

[結果] (1)LPS10 mg/kg i. p. 後72 h の生存率は80% vs. 24%と PCr (+) 群で高く ($P<0.01$), LD₅₀ は 7.46 vs. 13.83 mg/kg と有意差を認めた ($P<0.05$)。 (2)血中エンドトキシン濃度に差はないものの、 (3) サイトカインは LPS i. p. 後の 4 h の IL-1 α 及び NTF α で PCr (+) 群が低値であった ($P<0.05$)。 (4) LPS 48 h 後の ATP, EC は 3.16 ± 0.21 vs. 2.76 ± 0.32 μ mol/g liver, 0.843 ± 0.010 vs. 0.745 ± 0.024 ($P<0.005$) と PCr (+) 群で ATP, EC は良好に保たれていた。 (5) LPS i. p. 後48 h において PCr (+) 群で血糖の低下は抑制されていた。 (6)肝ミトコンドリアのリン酸化能は PCr (+) 群で LPS i. p. 後もコントロールレベルに保たれていた。

[考察] PCr の存在によるミトコンドリア ATP 生成能の維持とサイトカイン反応の軽減効果の機序により、LPS による侵襲に対し肝細胞が保護された結果、生存率が改善したものと思われた。これらの結果より、クレアチンキナーゼの遺伝子導入は、周術期における肝臓強化の方法として有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

敗血症において肝細胞は、肝ミトコンドリアの障害や微小循環障害を受け、肝エネルギー代謝不全に陥る。筋肉等で ATP のリザーバーとして phosphocreatine (PCr)/ creatine (Cr) 系を触媒する creatine kinase (CK) を肝特異的に発現させたトランスジェニックマウス (CK-TGmice) は、PCr の作用により敗血症における肝 ATP level の維持が期待出来るので、lipopolysaccharide (LPS) に対する CK-TGmice の耐性について通常食飼育群と10% Cr 食飼育群に分け比較した。

LPS10 mg/kg i. p. 4h 後の TNF α 及び IL-1 α は、Cr 食飼育群が低値で、LPS 投与後の ATP, energy charge は Cr 食飼育群で良好に保たれていた。肝ミトコンドリアのリン酸化能の維持、低血糖の抑制が Cr 食飼育群でみられた。生存率は80% vs. 24% と Cr 食飼育群で高く、LD₅₀ においても有意差を認めた。

PCr の存在による肝臓の高エネルギー状態とサイトカイン反応の軽減効果により、LPS による侵襲に対し肝細胞が保護された結果、生存率が改善したものと思われた。

以上の研究は、エンドトキシンに対する肝臓のエネルギー代謝不全の解明に貢献し、敗血症の治療に寄与するところが多い。

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9年2月10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。