

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 馬場 也須子

肝臓は多様な機能を有するため、肝障害は生体に重篤な影響を及ぼす。ブタ血清 (PS) 誘発肝線維化モデルは、肝疾患の治験モデルとして利用されているにもかかわらず、その病態の発現機構についてはほとんど知られていない。本研究では、Brown Norway (BN) ラットおよび Wistar ラットを用い、PS 誘発肝線維化の初期病態について病理組織学的検索を実施し、その結果に基づいて遺伝子発現の網羅的解析と炎症ならびに免疫細胞の関与について解析を行った。また、胸腺および脾臓の摘出術を実施し、肝線維化への影響を検討した。

雄の BN および Wistar ラットに PS を週 2 回、腹腔内投与し、肝臓を病理組織学的に検索し、ならびに炎症細胞および細胞外基質に関する免疫組織化学的検索を実施した。さらに、細胞外基質分解因子および分解阻害因子の変動を観察した。また、分解阻害因子に対する血清 ELISA 法を行った。その結果、BN ラットで投与 2 週後、Wistar ラットで投与 4 週後から、それぞれ炎症細胞が浸潤し、BN ラットで投与 4 週後から、および Wistar ラットで投与 8 週後から、それぞれ肝線維化病変が生じた。炎症細胞の動態をみると、マクロファージ、リンパ球および好酸球が炎症初期から浸潤し、その後、活性化星細胞の増数および肥満細胞の浸潤がみられた。線維中隔は主に type III collagen により構成されていた。細胞外基質分解阻害因子は、両系統で、RT-PCR での発現増加が確認された。Gel reverse zymography では、TIMP-1 および TIMP-2 が両系統の 8 週投与群でのみ有意な活性の増強を示した。また、血清中の TIMP-1 および TIMP-2 は肝臓より早期に有意に増加した。

2 および 4 週 PS 投与群の肝臓について、Affymetrix 社 GeneChip Microarray を用い、網羅的遺伝子発現解析を行った。また、その実験結果に基づき、RT-PCR および免疫組織化学的検索を実施した。その結果、BN ラットの 2 週投与群では、MHC class II 関連遺伝子、炎症関連遺伝子、ストレス / 細胞傷害関連遺伝子、分泌産物および増殖反応タンパク関連遺伝子の発現の増加が認められた。一方、Wistar ラットでは、4 週投与群で MHC class II 関連遺伝子および炎症関連遺伝子の発現が増加した。MHC class II 分子に関する RT-PCR を用いた検索では、遺伝子網羅的解析結果とほぼ同様の結果が得られた。さらに、免疫組織化学的検索では、BN ラットで 1 週あるいは 2 週投与群より、Wistar ラットでは 4 週投

与群より、PS、OX-6、CD4 および CD8 陽性細胞の増加が認められた。

ELISA 法を用い、ブタ血清特異的免疫グロブリンの動態について検討するとともに、肝臓、胸腺、脾臓および腎臓について病理組織学的および免疫組織化学的検索を実施した。その結果、血中のブタ血清特異的 IgG1、IgG2a および IgM の増加が両系統で認められた。両系統で脾臓では臓器相対重量の有意な増加、白脾髄の腫大が観察された。また、免疫組織化学的検索では、肝臓で肝炎発症時に一致して IgG1 および IgG2a 陽性細胞が有意に増加し、線維中隔に IgG1 および IgG2a の沈着が認められた。8 週投与群の脾臓では白脾髄の胚中心に PS、IgG1 および IgG2a 陽性細胞がみられ、また、腎臓でも糸球体メサンギウム領域に PS および IgG1 の沈着が認められた。

5 週齢雄の BN および Wistar ラットに胸腺あるいは脾臓摘出術を施し、PS を投与、主に肝臓について病理組織学的検索、免疫組織化学的検索、フローサイトメトリー解析および RT-PCR を用いて検索した。その結果、系統に拘らず、胸腺あるいは脾臓の摘出によって肝炎および肝線維化病変が著しく抑制された。脾臓摘出に比べ、胸腺摘出では抑制効果は弱かった。フローサイトメトリー解析では、胸腺、脾臓および末梢血から肝臓への細胞動員は、CD45RA および RT1.B 陽性細胞を除き、ほとんどみられなかった。ケモカインに関する RT-PCR を用いた検索では肝臓、胸腺および脾臓で MIP-1alpha および Eotaxin の発現の増加ならびに胸腺および脾臓で IP-10 の発現の増加が認められた。

本研究はこれまで不明な点が多かったラットでの PS 誘発肝線維化モデルの病態発現機構の大筋を分子生物学的レベルで明らかにし、本モデルが肝疾患治験モデルとして極めて有用であることを初めて示した。また、肝線維化機構の毒性病理学的研究に極めて重要な知見を提供した。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認めた。