

学位論文抄録

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)

本田 正樹

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児外科学

指導教員

猪股 裕紀洋 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児外科学

学位論文抄録

【目的】肝・小腸移植をはじめ小児外科領域における虚血再灌流 (ischemia-reperfusion; I/R) 障害の病態解明は重要な課題である。機序として好中球は生理病理学的に主要な役割を果たすが、その生体内での動態に関しては不明な点が多い。我々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観察した。

【方法】LysM-eGFP マウス (好中球は eGFP^{hi} に標識) の 70%/45-60 分の肝 I/R モデルを作成。観察直前に TRITC-albumin を静注し血管を蛍光標識した。マウスは全身麻酔下に生かしたまま肝左葉を露出し固定した。2光子励起観察には BX61 と FV1000MPE を用いた。低倍率イメージング(×10)では同部位を連続的に観察し、再灌流後 0、1、2、3、4 時間時点でそれぞれ 20 分の動画を撮影した。また、各時間帯で血清、肝臓蛋白を採取し、ケモカイン (CXCL1、CXCL2) の測定を行った。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を 2光子励起顕微鏡にて評価した。

【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) と次第に増加していた。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 と最も速い傾向が認められた。血清中の CXCL1、CXCL2 は同様の濃度変化を呈し、共に再灌流 2 時間後に最高値に達した。一方、肝臓では再灌流 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が評価でき、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 2.87、I/R 群の血流持続部位 6.51、血流途絶部位 2.48 と I/R 群の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していく様子が観察され、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できた。Cyclosporin H 投与は特に血流途絶部位での好中球数、移動速度を抑制し、血清学・病理学的に肝 I/R 障害を軽減させた。

【考察】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、生体内での生理的な現象を直接捉えることができるという非常に大きなメリットを持つ。我々はこの技術を肝 I/R の研究に適用し、好中球動態、肝構造の変化を経時的にイメージングすることに成功した。今後さらに知見を積み重ねることで新たなメカニズム解析、治療方法の開発に繋がっていくものと期待する。

【結論】マウス肝 I/R モデルを作成し、2光子励起顕微鏡を用いて非侵襲的に長時間の観察を行った。好中球の動態、微小循環変化の過程が *in vivo*、*real time* に観察可能であった。