The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Increase of mast cells in the liver and lung may be associated with but not a cause of fibrosis : demonstration using mast cell-deficient Ws/Ws rats
Author(s)	岡崎, 利彦
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42860
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【122】

氏　　名	岡　崎　利　彦（おかざきとしひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16391　号
学位授与年月日	平成13年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	Increase of mast cells in the liver and lung may be associated with but not a cause of fibrosis:demonstration using mast cell-deficient *Ws*／*Ws* rats. （線維化臓器でみられるマスト細胞数の増加と線維化促進との関係：マスト細胞欠損突然変異ラット（*Ws*／*Ws*）を用いた線維化モデルでの検討）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　堀　　正二 （副査） 教　授　北村　幸彦　　教　授　青笹　克之

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

間質性肺炎、肝硬変、膠原病など様々な炎症性疾患の創傷治癒過程においてみられる臓器線維化はその病態に重要な影響を与えるが、そのメカニズムについては依然不明な点が多く残されている。従来より肺線維症や強皮症などの疾患では、その線維化病変部においてマスト細胞数の増加および組織中ヒスタミン量の増加が報告されており、また in vitro においてはヒスタミンにより肺の fibrobrast 培養細胞のコラーゲン産生が増加することが示されている。さらに近年各種原因による肝硬変、および慢性肝炎においても、線維化進展に伴いマスト細胞数の増加がみられ、肝内ヒスタミン量の増加が報告されている。これらのことより、マスト細胞は臓器線維化を促進させる因子として考えられている。マスト細胞は、tryptase、chymase などのプロテアーゼをはじめ、ヒスタミンやサイトカインなどの様々な chemical mediator を分泌しており、最近ではそれらが細胞外マトリックスに及ぼす影響について明らかにされつつある。

そこで本研究はマスト細胞が線維化を促進させるか否かを明らかにするため、*c-kit* レセプターのチロシンキナーゼ領域に12塩基対を欠失する *c-kit* 突然変異を有するマスト細胞欠損突然変異ラット（*Ws*／*Ws* ラット）を用い、実験的肝および肺線維化モデルにおいて正常＋／＋との間の線維化の程度について比較検討を行った。

【方法】

＜実験的肝線維化の作成＞

雄ラット＋／＋（n＝9）および *Ws*／*Ws*（n＝9）を用い、エーテル麻酔下に異種血清（pig serum）（0.5mℓ／kg）腹腔内週2回、7週連続投与し、最終投与日から7日後に肝摘出を行った。コントロールとして同様の方法にて生理食塩水を投与した（＋／＋；n＝5、*Ws*／*Ws*；n＝5）。

＜実験的肺線維化の作成＞

雄ラット＋／＋（n＝5）および *Ws*／*Ws*（n＝5）を用い、ペントバルビタール麻酔下に bleomycin（1.25mg／kg in 2 ml of saline）を経気管的に1回投与し、6週間後に肺摘出を行った。コントロールとして同様の方法にて生理食塩水を投与した（＋／＋；n＝5、*Ws*／*Ws*；n＝5）。

1．HE 染色および Azan-Mallory 染色標本を作成し病理組織学的に検討した。

2．単位組織中のハイドロキシプロリン量を Kivirikko らの方法に準拠して測定した。

3．肝線維化モデルにおいて Azan-Mallory 染色標本を用い、線維化領域の占拠面積百分率を Olympus color image analyzer（SP500F：8－bit、1.3×10^{6} μ㎡ for 512×512square pixel）にて画像解析し、各 6 視野の平均値として算出した。

4．Carnoy 液固定による Alcian-blue 染色標本を作成して組織中のマスト細胞の分布および数を測定した。

5．単位組織中のヒスタミン量を HPLC 法により測定した。

6．組織中ハイドロキシプロリン量とマスト細胞数の相関関係を検討した。

【成績】

肝線維化モデルにおいては、＋／＋および *Ws*／*Ws* で pig serum 処理後共に著明な線維化の増生が認められた。グリソン鞘の線維性拡大を示し、さらに門脈－門脈、門脈－中心静脈の bridging fibrosis、小葉構造の改築が見られた。

単位組織中のハイドロキシプロリン量による検討では、＋／＋および *Ws*／*Ws* に於いてそれぞれ処理後に有意の増加が見られ、また処理後の＋／＋に比し *Ws*／*Ws* において有意に高値を示した。さらに、画像解析を用いた線維化の検討においても、＋／＋および *Ws*／*Ws* に於て共に処理後有意な線維化の増大が見られ、また＋／＋に比し *Ws*／*Ws* に於てより高度の線維化が認められた。組織中ハイドロキシプロリン量および画像解析による組織学的検討結果には強い正の一次相関関係が認められた（$r=0.848$、$p<0.0001$）。

Alcian blue 染色によるマスト細胞の分布および数を検討すると、コントロールの＋／＋では主に門脈域周囲に少数のマスト細胞が見られ、小葉内には見られなかった。コントロールの *Ws*／*Ws* ではマスト細胞は認められなかった。処理後＋／＋においては、偽小葉周囲の線維隔壁に沿って多数のマスト細胞の集積が見られ、門脈域周囲および中心静脈域周囲にも集簇を認めた。*Ws*／*Ws* においては pig serum 処理後も少数のマスト細胞の出現しか見られずコントロールの＋／＋と同程度であった。

組織中ヒスタミン量は、＋／＋および *Ws*／*Ws* に於て共に処理後に有意の増加を認めたが、*Ws*／*Ws* の値は＋／＋の＜3％に留まった。

肺線維化モデルにおいては、＋／＋および Ws／Ws において共に広範な肺胞構造の改築を伴って間質の線維性肥厚が見られ、間質への炎症性細胞浸潤を認めた。

組織中ハイドロキシプロリン量は、＋／＋および *Ws*／*Ws* に於てそれぞれ処理後に有意の増加を認めた。また処理後の＋／＋に比し *Ws*／*Ws* において高い傾向がみられた。

コントロールの＋／＋では主に細気管支および血管周囲にマスト細胞が見られ、処理後は肥厚した線維性肺胞壁に有意なマスト細胞の増加が認められた。*Ws*／*Ws* においては bleomycin 処理後も明らかなマスト細胞の出現は見られなかった。

組織中ヒスタミン量は、＋／＋に於て処理後のマスト細胞の増加に比例して有意の増加を認めたが、*Ws*／*Ws* では bleomycin 処理後も僅かの値に留まった。

ハイドロキシプロリン量とマスト細胞の数の間の相関関係は、肝線維化モデルでは＋／＋および *Ws*／*Ws* において共に強い正の一次相関が認められたが（＋／＋：$r=0.821$、$p<0.0005$；*Ws*／*Ws*：$r=0.889$、$p<0.0001$）、肺線維化モデルでは＋／＋において正の一次相関が認められた（$r=0.856$、$p<0.005$）。

【総括】

マスト細胞数増加およびそれに伴うと考えられる histamine の増加は、臓器線維化の原因ではなく、線維化の結果としてみられる現象であると考えられた。マスト細胞が分泌する serine protease により不活性型の matrix metalloproteinase（MMP）が分解を受け活性型になり、またマウス培養マスト細胞自身も MMP を分泌することが in vitro において明らかにされつつある。こうした細胞外マトリックスの動態調節を行っている MMP およびその inhibitor である TIMP などの産生や活性化にマスト細胞がどのように関与しているのかを検討し、臓器線維化の生体制御機構の一端を明らかにしたいと考えている。

論文審査の結果の要旨

本研究論文は、臓器線維化とマスト細胞の関係につき、世界で始めてマスト細胞欠損突然変異ラット（以下 *Ws*／*Ws* ラット）を用いて、実験的に肝および肺線維化モデルを作成し検討したものである。従来より創傷治癒過程においてみられる臓器線維化の進展に伴いマスト細胞数の増加が報告され、マスト細胞が臓器線維化を促進させる因子ではないかと考えられてきたが、本研究はこれと異なる生体現象を実験動物において確認し報告した。異種血清を用いた肝線維化モデル、およびプレオマイシンによる肺繊維化モデルにおいてともに処理後、＋／＋ラットおよび *Ws*／*Ws* ラットで組織学的線維化を観察し、その上で、＋／＋ラットでは処理後有意なマスト細胞数の増加を認めたが、*Ws*／*Ws* ラットでは少数のマスト細胞の出現をみるにとどまったにもかかわらず、＋／＋ラットに比べ *Ws*／*Ws* ラットにおいて有意に高度な線維化が見られるという新知見を見い出した。線維化マーカーとマスト細胞数の間には、強い正の一次相関関係があることを示し、また組織中ヒスタミン量は、＋／＋ラットにおいて処置後、有意の増加を認めたが、*Ws*／*Ws* ラットでは処置後も僅かの値に留まる結果を示した。以上の結果をもとに、線維化臓器でみられるマスト細胞数の増加は、従来より考えられてきた線維化を促進させる原因ではなく、線維化の結果としてみられる現象であることを示した。これは、マスト細胞と臓器線維化のメカニズムに新たな概念をもたらしたという点で本研究は非常に意義深い。

今後の臓器線維化の治療に向けた重要な情報を与えるものであり、学位の授与に値すると考えられる。