

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	福原 和秀
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Suplatast tosilate protects the lung against hyperoxic lung injury by scavenging hydroxyl radicals (スプラタストシレートはヒドロキシルラジカル消去作用により高酸素肺障害を抑制する)			
論文審査担当者			
主査	教授	武島 幸男	印
審査委員	教授	永田 靖	
審査委員	准教授	宮田 義浩	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【背景】高濃度酸素投与は，重症呼吸不全患者の救命治療に必要不可欠である。しかしながら，持続的な高濃度酸素吸入は活性酸素種（ROS; reactive oxygen species）過剰産生の原因となり高酸素肺障害を惹起する。ROSは細胞のDNA，蛋白，細胞膜などを直接的に酸化障害するだけでなく，炎症反応を惹起して好中球を中心とする炎症細胞浸潤を招く。活性化した炎症細胞は更なるROSを放出する。この悪循環形成により肺障害は増悪の一途を辿る。高酸素肺障害は最終的にびまん性肺胞障害を呈し acute respiratory distress syndrome (ARDS) と同様の病態に陥る。我々は過去の研究で，Th2 サイトカイン阻害薬として気管支喘息治療に臨床使用されている suplatast tosilate (ST) が bleomycin による急性肺障害及び肺線維化を抑制することを明らかにした。抗腫瘍薬である bleomycin は代表的な redox-active agent であり，生体内で ROS を産生し細胞障害作用を示す。Bleomycin 肺障害の主要形成因子も ROS であり，ST は Th2 サイトカイン抑制メカニズムと無関係に bleomycin 肺障害を抑制した。これらを踏まえ，ST は ROS 消去能を有し，高酸素肺障害抑制効果を有すると仮説をたて検証した。</p> <p>【方法】C57BL/6 マウスを ST 治療群（100mg/kg/day）と Control 群（DW 投与）の2群に分け，両群を FiO₂ 90%とした同一チャンバー内で高酸素曝露を行った。ST は飲水で投薬した。高酸素曝露開始前，開始後 24 時間，48 時間，72 時間，90 時間で継時的に気管支肺胞洗浄液（BALF; bronchoalveolar lavage fluid），肺組織及び血液を採取して各種解析を行った。Nrf-2 mRNA の発現レベルは，real-time quantitative RT-PCR 法で解析した。また生体障害性が最も高い ROS である hydroxyl radical の消去能について，Electron Paramagnetic Resonance Spin-trapping assay (EPR 法) を用いて検討した。25℃のリン酸緩衝生理食塩水中で実験した。Hydroxyl radical は，生体内での主たる発生メカニズムと同じ Fenton 反応で発生させた。Hydroxyl radical のスピントラッピング剤には，最</p>			

も代表的な 5,5-Dimethylpyrroline-*N*-oxide (DMPO) を使用した。ST の反応速度論的解析は、反応速度が既知である DMPO との競合反応を利用して行った。

【結果】高濃度酸素曝露下での全生存時間を比較検討した。ST 治療群では全生存時間が有意に延長した ($p < 0.01$)。また、80 時間の高酸素曝露を実施した後 room air に戻す実験を行った。Control 群は room air に戻して 60 時間以内に 80% が死亡したのに対し、ST 治療群の死亡例は皆無であった ($p < 0.05$)。この結果から本実験モデルでは無治療の場合、高酸素曝露開始から 80 時間のうちに、room air では生存不可能な重症肺障害を形成することが明らかとなった。Hematoxylin-Eosin 染色で継時的な病理組織学的検討を行った。継時的に増悪する肺胞隔壁の浮腫性肥厚と炎症細胞浸潤を認めた。高酸素開始 90 時間後、Control 群マウスの肺胞構造は大半が破壊されていた。しかし、ST 治療群ではこれら肺組織の障害性変化が顕著に抑制されていた。肺障害で肺胞隔壁透過性は亢進し肺胞腔への蛋白漏出が増加するため、BALF 中の総蛋白濃度は肺障害の程度を反映する。高酸素開始 72 時間後以降、BALF 中総蛋白濃度は著しく上昇し始めたが、ST 治療群では有意に低値であり ($p < 0.01$) 肺障害抑制効果を裏付けた。BALF 中の炎症細胞 (マクロファージ、好中球) 数と炎症性サイトカイン (IL-6, MCP-1) 値を検討した。高酸素開始 72 時間以降、これら 4 つの炎症マーカーは著しく上昇したが、ST 治療群ではいずれの上昇も有意に抑制された。下大静脈から得た血液の白血球数を解析した。Control 群では高酸素開始 48 時間後までに血液中の白血球数は急激に減少し、開始前より有意に低値となった。一転して 72 時間以降は著しく上昇し、この急激な白血球数上昇は好中球数の急激な上昇によるものであった。ST 治療群でこのような白血球数の異常な変動は認められなかった。代表的な酸化ストレスバイオマーカーである 8-OHdG と 8-isoprostane を用いて肺の酸化障害を継時的に検討した。8-OHdG は DNA の酸化障害、8-isoprostane は脂質過酸化のバイオマーカーである。興味深いことに、炎症や組織学的変化が未だ認められない高酸素開始 24 時間という非常に早期から両酸化ストレスマーカーは著しく上昇し、既にこの時点で ST 治療による酸化ストレス低減が統計学的有意差をもって示された ($p < 0.05$)。以後継時的に、8-OHdG、8-isoprostane の更なる急激な上昇を認めたが、ST 治療は強力に酸化ストレス上昇を抑制し続けた ($p < 0.01$)。酸化ストレスに対する代表的細胞保護システムに Nrf-2 pathway がある。この関与の有無を検討するため高酸素開始 72 時間後の肺内における Nrf-2 発現レベルを解析したが両群に有意な差を認めなかった。EPR 法による ST の hydroxyl radical 消去能の検討を行った。ST は濃度依存的に hydroxyl radical を消去し、直接的消去能が示された。また反応速度は拡散律速とほぼ一致し ($2.6 \times 10^{11} \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$)、既知の代表的な抗酸化剤より消去活性は高かった。

【まとめ】高酸素肺障害モデル (in vivo) で、ST 治療により生存時間が有意に延長した。ST 治療は早期から肺の酸化ストレスを有意に抑制し、炎症と肺障害の発生を強力に抑制した。EPR 法 (in vitro) で、hydroxyl radical に対する ST の直接的な消去能と高い反応性が示された。ST は高い hydroxyl radical 消去能を介して、高酸素肺障害を抑制することが示唆された。

以上の結果から、本論文は Suplatast tosilate が強力な抗酸化能を介して高酸素肺障害を抑制することを明らかにした点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が福原和秀に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	福原 和秀
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Suplatast tosilate protects the lung against hyperoxic lung injury by scavenging hydroxyl radicals (スプラタストトシレートはヒドロキシルラジカル消去作用により高酸素肺障害を抑制する)			
最終試験担当者			
主査	教授 武島 幸男	印	
審査委員	教授 永田 靖		
審査委員	准教授 宮田 義浩		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定		合格	
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年5月8日の第69回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年5月10日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・酸化ストレスに対する Nrf-2 pathway および他の酸化ストレス反応性 pathway 関与の可能性について ・高濃度酸素曝露に対するヒトとマウスの反応の相違点について ・Suplatast tosilate の投与方法と pre-treatment の意義について ・Suplatast tosilate 治療群と Control 群の死因の相違点の有無について ・継時的な病理組織学的肺所見の検討方法について ・現在 Th2 サイトカイン阻害剤として臨床使用されている suplatast tosilate の過去の研究報告と本研究結果との相関および整合性について ・Suplatast tosilate のヒトに対する投与量について ・曝露酸素濃度を本研究より下げた場合の現象について <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			

