

氏 名	よしむらたかし
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2425号
学位授与の日付	平成14年1月23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	A novel selectin blocker alleviates oxidative stress of lung reperfusion injury. (新しいセレクトインブロッカーが肺再灌流傷害の酸化ストレスを軽減する。)
論文調査委員	(主査) 教授 福田和彦 教授 三嶋理晃 教授 和田洋巳

論 文 内 容 の 要 旨

<背景>

肺虚血再灌流傷害は、肺移植のみならず人工心肺使用下の手術などでも生じ、その抑制は重要な課題である。

虚血再灌流傷害では、接着分子を介した白血球—血管内皮細胞の相互作用がその成因の一つとされる。セレクトインはその相互作用の初期に関わる接着分子で、シアリルルイス X などの糖鎖リガンドを認識する。そのため、抗原性の低い糖鎖を用いてセレクトインをブロックし、再灌流傷害を抑制しようとする試みが始められている。虚血再灌流時にはまた、大量の活性酸素が生じ、組織傷害、DNA 傷害をひきおこす。しかし、白血球—血管内皮細胞の相互作用を通じて放出される活性酸素の重要性は、いまだ完全には解明されていない。

最近、シアリルルイス X の類似化合物であるセレクトインブロッカー、OJ-R9188 が新しく開発された。そこで、本研究では体外循環式ラット肺灌流モデルを用いて、肺温虚血再灌流傷害に対する OJ-R9188 の効果を特に酸化ストレスの観点から検討した。

<対象と方法>

実験には体重約 300g の雄ルイスラットを使用。ex vivo ラット肺灌流モデルを用いて60分間再灌流し、再灌流早期の生理学的機能評価を行った。この灌流モデルでは、低酸素混合ガスで換気される脱酸素化肺で静脈血化された血液が、100%酸素で換気される試験肺を灌流し酸素化され、再び脱酸素化肺を灌流する閉鎖回路を形成している。

実験群は、3群(各群 n=10)を設定した。すなわち、Fresh 群では心肺ブロックの摘出後ただちに再灌流した。OJ-R(-) 群と OJ-R(+) 群では、37°C、90分の温虚血後に再灌流した。なお、OJ-R(+) 群では、虚血10分前に OJ-R9188 を 100μg/body 静脈内投与した

そして、再灌流後肺を用いて HE 染色と組織 Myeloperoxidase (MPO) 活性値の測定を行った。さらに、酸化ストレスによる DNA 傷害のマーカーの一つである 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) に対するモノクローナル抗体 N45.1 によって免疫染色し、これを定量化 (8-OHdG index) した。また、NO を介した酸化傷害を示す、3-nitro-L-tyrosine (3-NT) の免疫染色も施行した。

一方、OJ-R9188 の直接的なフリーラジカル消去作用を評価するために、電子スピン共鳴法を用いた。

<結果>

肺酸素化能の指標となる再灌流中のシャント率及び肺水腫の指標となる再灌流後の肺湿乾重量比において、OJ-R(+) 群が OJ-R(-) 群に比べて有意に低値であった。

再灌流後肺の HE 染色では3群とも白血球組織浸潤はわずかで、MPO 活性値でも OJ-R(+) 群と OJ-R(-) 群で差がみられなかった。

8-OHdG index での酸化ストレス評価では、OJ-R(+) 群では OJ-R(-) 群よりも有意に DNA 傷害が軽減されてい

た。また、3-NT の免疫染色でも OJ-R (－) 群が OJ-R (＋) 群よりもより強く染色された。

電子スピン共鳴法を用いた検討では、OJ-R9188 の直接的なフリーラジカル消去作用は認められなかった。

＜結論＞

新しいセレクトインブロッカー、OJ-R9188 は *ex vivo* ラット肺灌流モデルにおいて温虚血再灌流傷害を軽減した。OJ-R9188 は再灌流にともなう酸化ストレスを軽減したが、これは直接的なフリーラジカル消去作用によるものではなかった。OJ-R9188 により再灌流時の白血球－血管内皮細胞の相互作用をブロックすることで、白血球が組織浸潤する以前の再灌流早期においても、酸化ストレスが軽減されることが示された。

論文審査の結果の要旨

虚血再灌流傷害は、臓器移植のみならず、様々な臨床場面で発生し、その克服は重要な課題である。セレクトインは再灌流時の白血球－血管内皮細胞の相互作用の初期に関与する接着分子で、種々のセレクトイン阻害薬を用いて再灌流傷害を抑制する研究が始められているが、虚血再灌流時に発生する活性酸素との関係については詳細に検討されていない。

本申請者は新しいセレクトイン阻害薬 OJ-R9188 の肺温虚血再灌流傷害に対する抑制効果とその酸化ストレスとの関係を明らかにする目的でラット肺 *ex vivo* 灌流モデルを用いて、虚血前に OJ-R9188 を投与する群と非投与群で傷害の程度を比較した。その結果、OJ-R9188 の投与により再灌流後の肺機能改善が示された。そして、1、活性酸素による DNA 傷害の産物 8-OHdG に対する免疫組織学的定量で、白血球が血管外浸潤する以前の再灌流早期においてもセレクトインを阻害することで酸化ストレスが軽減されること、2、活性酸素によるタンパク傷害の産物 3-NT に対する免疫組織学的検討で、その酸化ストレス軽減機序に一酸化窒素を介する酸化傷害が関与していることが示された。すなわち、OJ-R9188 により肺虚血再灌流傷害が軽減され、その機序の一つとして酸化ストレスの抑制が示された。

以上の研究はこれまで不明であった肺虚血再灌流傷害早期におけるセレクトインと酸化ストレスの関係の解明に貢献し再灌流傷害予防の研究発展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13年12月27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。