

## 〔結果〕

HD 患者の単球において、TLR2, TLR4, CD14, interferon regulatory factor (IRF)-7 遺伝子の発現低下が確認された。また、HD 患者の単球での TLR2 と TLR4 陽性率は、健常者に比べて有意に低下していた。しかし、透析歴と TLR 発現率には有意な相関関係は認めず、末梢血中の単球数についても統計的有意差はなかった。さらに、HD 患者の LPS 刺激に対する TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  産生反応は、健常者に比して有意に低下しており、TLR4 陽性率の低下とこれらサイトカイン分泌反応の低下には有意な正の相関が認められた。

## 〔考察〕

HD 患者において TLR4 および TLR2 の発現が遺伝子、蛋白レベルで低下していること、TLR4 の機能発現に関わる CD14 遺伝子、INF 産生に関わる IRF-7 発現も低下していたことから、HD 患者が初期の感染防御機構において弱点を持つことを示唆する。TLR2 および TLR4 の発現が低下する原因は不明であるが、尿毒症状態での血中蓄積物質による単球成熟などへの影響などが考えられる。

## 〔結論〕

慢性 HD 患者では、病原体認識および自然免疫系発動に異常がある可能性が示唆された。

## 論 文 審 査 の 要 旨

本研究の目的は、血液透析 (HD) 患者における Toll-like 受容体 (TLR) の発現とシグナル伝達関連遺伝子異常を検討することである。21 例の HD 患者と 10 例の健常者を対象とした。全白血球から mRNA を抽出し、アレイキットで TLR およびそのシグナル伝達に関与する 113 遺伝子の発現を検索した。また、末梢血の単球に発現する TLR2 と TLR4 の陽性率をフローサイトメトリーで解析した。さらに、単球におけるリポポリサッカライド (LPS) 刺激に対する TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の産生反応を細胞内サイトカイン染色法で検討した。HD 患者の単球において、TLR2 および TLR4 の遺伝子発現が減弱しており、健常者に比し TLR2 と TLR4 の陽性率は有意に低下していた。また、健常者に比し、HD 患者の LPS 刺激に対する TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  の産生反応は低下しており、TLR4 陽性率の低下との間に正の相関が認められた。HD 患者の単球における TLR2 および TLR4 の発現が遺伝子および蛋白レベルで低下していることは、病原体の認識および自然免疫系の発動に異常があると考えられた。

16

氏 名	ナガ 長	サカ 坂	ヤス 安	コ 子
学位の種類	博士 (医学)			
学位授与の番号	乙第 2588 号			
学位授与の日付	平成 21 年 7 月 17 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当 (博士の学位論文提出者)			
学位論文題目	<b>Brief periods of nitric oxide inhalation protect against myocardial ischemia-reperfusion injury</b> (吸入一酸化窒素の短期投与による心筋虚血再還流障害に対する保護作用に関する研究)			
主論文公表誌	Anesthesiology 第 109 巻 第 4 号 675-682 頁 2008 年			
論文審査委員	(主査) 教授 尾崎 眞 (副査) 教授 萩原 誠久, 加藤 義治			

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 〔目的〕

吸入一酸化窒素 (NO) の長期投与は動物モデルで心筋虚血再還流障害を軽減するが、その詳しいメカニズムに

については不明な点が多い。今回我々は、NO 吸入による心筋保護作用機序を解明することを目的とし以下の実験を行った。

#### 〔対象および方法〕

C57BL/6 雄マウス(生後 2~4 ヶ月)を用いた。はじめにマウスをアクリル容器に入れ、ガスの流入口と流出口の NO の濃度差を交互に測定し、吸入 NO (80ppm) の 60 分間あたりの吸収量を算出した。続いてマウス体内に蓄積された NO 代謝産物(硝酸塩、亜硝酸塩、S-ニトロソチオール、N-ニトロソアミン、NO-ヘム)の量を測定した。次に NO 吸入(30 秒、5、15、60 分)後の、血漿、赤血球、心臓、肺、肝臓、脳、尿における NO 代謝産物の濃度を測定し、特に心臓は吸入酸素濃度 21% (正常酸素濃度) と 8% (低酸素濃度) の 2 群で行った。更にマウス心筋虚血再還流障害モデル(虚血時間 60 分、再還流時間 24 時間)を用い、NO を再還流直前に短時間(30 秒、5、60 分)吸入させ、NO 代謝産物の蓄積と心筋保護作用との関連を調べた。

#### 〔結果〕

NO は時間に比例して吸収され ( $0.19 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\text{体重}(\text{g}) \cdot \text{時間}$ )、その 97% が硝酸塩として体内に蓄積されていた。血液中と各臓器の NO 代謝産物の濃度は投与開始直後から急速に上昇し、硝酸塩を除き投与 15 分以内にプラトーに達し、特に赤血球内では投与開始後わずか 30 秒で著明な増加がみられた。心臓では亜硝酸塩を除くすべての NO 代謝産物の上昇がみられ(非吸入時と比べ硝酸塩 8 倍、S-ニトロソチオール 9 倍、N-ニトロソアミン 4 倍、NO-ヘム 7 倍)、低酸素濃度下では更に増加した。肺では S-ニトロソチオール、肝臓では N-ニトロソアミン、脳では NO-ヘムの蓄積が目立った。マウスの心筋虚血再還流障害のモデルを用い、NO の短期吸入による心筋梗塞領域の縮小効果を検討したところ、NO を再還流直前の 5 分間と 60 分間投与した 2 群においてそれぞれ 31% と 32% の梗塞領域縮小がみられた。

#### 〔考察〕

今回我々は、吸入 NO の代謝産物の体内における経時的、定量的な測定を行い、血液と各臓器における蓄積を確認した。マウス心筋虚血再還流障害のモデルでは、最短 5 分間の NO 吸入で心筋保護作用を認めた。生体内における NO の半減期は数秒とされる一方で、NO 代謝産物の半減期は数分から数時間におよび、NO の遊離や二次伝達物質である環状グアノシン 1 リン酸を上昇させることが今までに報告されている。本研究では更に、吸入された NO が血液中の NO 代謝産物を介し遠隔臓器へ運搬される経路が明らかとなった。心筋虚血再還流障害に対する心筋保護作用に関しては、NO のみならず NO 代謝産物も重要な役割を果たす可能性が示唆された。

#### 〔結論〕

NO の吸入により血液と臓器でその代謝産物の濃度が急速に上昇することが判明した。マウス心筋虚血再還流障害モデルでは、短時間の NO 吸入による心筋保護作用が確認された。今後、NO 吸入療法の急性心筋梗塞への臨床応用が期待される。

## 論文審査の要旨

NO 吸入による心筋保護作用機序を明らかにするため、本研究では、マウスに NO(80ppm)を吸入酸素濃度 21% と 8% の 2 群で吸入させ、更にマウス心筋虚血再還流障害モデル(虚血時間 60 分、再還流時間 24 時間)を用い、NO を再還流直前に短時間(30 秒、5、60 分)吸入させ、心筋保護作用と体内における NO の代謝産物の蓄積との関連を調べた。その結果、血液中と各臓器の NO 代謝産物の濃度は投与開始直後から急速に上昇し、低酸素濃度下では更に増加した。マウスの心筋虚血再還流障害のモデルでは、NO を再還流直前の 5 分間と 60 分間投与した 2 群においてそれぞれ 31% と 32% の梗塞領域縮小がみられた。

心筋虚血再還流障害に対する心筋保護作用に関しては、NO 吸入により血液と臓器でその代謝産物の濃度が急速に上昇することが短時間の NO 吸入による心筋保護作用の機序の一つである可能性を明らかにした点で、価値ある論文である。