

氏 名（本籍） 李 正 雨

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2 2 4 5 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 年 9 月 12 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 56 年 3 月 25 日  
帝 京 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 急 性 胃 粘 膜 病 変 発 生 に お け る Extracellular Superoxide Dismutase の 意 義 に 関 す る 実 験 的 検 討

（主 査）  
論 文 審 査 委 員 教 授 豊 田 隆 謙 教 授 涌 井 昭  
教 授 石 森 章

# 論文内容要旨

本研究は、実験的ストレス潰瘍モデルにおいて、急性胃粘膜病変発生の際、血中に上昇するSOD様活性物質に着目し、これを生化学的に解析して、この物質がextracellular superoxide dismutase (EC-SOD)と同じものかどうか検討した。そして、この物質の生化学的性質や生物学的存在様式を検討することで、炎症初期のメカニズムをさぐり、さらに、この物質の病態生理学的作用についても検討することを目的として行なった。

## 対象及び方法

実験動物として、Hartley雄性モルモット(400g)を使用した。I. 血漿SOD様活性物質の生化学的解析。水浸拘束、エタノール、熱傷の各ストレス潰瘍モデルで、血漿中に上昇するSOD様活性物質の分子量を、限外濾過、Sephacryl S-200を用いたゲル濾過で求めた。そして、活性のピークを示す分画を、トリプシン、EDTA、diethyldithiocarbamate(DDC)で処理し、この物質の生物活性の変化について検討した。II. ヘパリン誘導性EC-SODの局在部位の検討。4個のCu-Znを持つ135KDの糖タン白質と報告されているEC-SODは、そのアミノ酸配列からヘパリン親和性が高く、ヘパリンの投与で血中に遊離してくる。そこで、ヘパリンの投与で血漿中に上昇するSOD様活性物質がEC-SODと同じかどうかを、ストレス潰瘍モデルで分子量推定に用いた同じカラムを用いてゲル濾過を施行し検討した。次に、この物質のヘパリンに対する反応やヘパリンの血球及び血漿に対する作用を検討することで、その局在部位を検討した。III. EC-SODの精製。heparin-Sepharoseを用いてaffinity chromatographyを施行した。分離した各分画についてSOD活性を測定し、ヘパリンの投与で特異的に上昇した分画をpolyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)で解析した。Davis変法で泳動後、ゲルを2分割して一方をCoomassie brilliant blueでタン白染色し、もう一方をNBT還元を利用してSOD活性部分を染色した。IV. EC-SODの病態生理学的意義及び作用について。炎症反応の引き金となる好中球の内皮細胞への膠着機構を、ヒト臍帯静脈内皮培養系の報告をもとに、モルモット実験潰瘍モデルで、Platelet activating factor(PAF)拮抗剤(CV3988)、Sulfideptide leukotrienes(SP-LTs)拮抗剤(ONO1078)、アラキドン酸カスケード5-lipoxygenase系阻害剤(AA861)やヘパリンなどを前投与して、胃粘膜内皮細胞一定面積当りに膠着する好中球の数をcountして検討した。ストレスによるトロンビン生成、好中球遊走因子についてもBoyden法で検討した。次に血管内皮障害におけるEC-SODの動態を検討するため、ストレスによるEvans-blueの胃粘膜への漏出時期や胃粘膜脂質過酸化生成物(LPO)やUlcer Index(UI)もEC-SODと伴に経時的に測定した。また内皮障害惹起物質の拮

抗剤, 阻害剤を投与した時のEC-SODの変化も検討した。そしてEC-SODの病態生理作用を検討するため, ヘパリンでEC-SODを血中に誘導した群, EC-SODを誘導後DOCでその生物活性を失活させた群とControl群に分けて, 夫々ストレス実験を行ない, 胃粘膜障害の指標としてUIと胃粘膜LPOを測定した。

## 結果及び考察

ストレスで血中に上昇するSOD様活性物質は, 約130KDの物質で, その生物活性を与えるものはCuやZnといった金属が考えられ, ヘパリンで血中に誘導される物質とも同一で, EC-SODと同じ物質と考えられた。EC-SODは, ヘパリンの投与で瞬時に血中に上昇し, 血球・血漿をヘパリンで刺激してもEC-SODは遊離しなかった。この事よりEC-SODは, 内皮細胞表面に局在している可能性が強く示唆された。血漿SOD様活性物質をヘパリンカラムで解析すると3分画(親和性⊖A, 親和性⊕B, C)に分れ, ヘパリンの投与で特異的に分画Cの上昇を認めた。分画CはEC-SODと同一の物質と考えられ, PAGEの解析でも細胞内Cu-Zn SODと全く別の部分に活性のバンドを有した。好中球の遊走因子としてLPO, 内皮膠着には内皮由来PAFが重要な働きをされると考えられた。PAF産生のagonistとしては, ストレス早期に生成されるトロンビンが重要である。各ストレスモデルにおいてEC-SODは, UIや胃粘膜LPOが著明に上昇する以前に, 既の上昇しており, そのピークはEvans-blueの漏出時期とほぼ一致した。EC-SODの上昇はCV3988, AA 861, ONO1078やAlloprinolの投与で抑制された。この事よりストレスモデルにおいてEC-SODの血中への上昇は, 血管内皮障害の指標になりうると考えられた。血中に遊離したEC-SODの生物活性は長時間維持され, その病態生理作用を検討するために施行した実験で, 細胞外にEC-SODを誘導した群では, 他の2群に比べ有意にUI, 胃粘膜LPOの上昇が抑制された。細胞外においてEC-SODは防御系因子として働いている可能性が示唆された。

## 結 論

ストレスモデルで血中に上昇する物質はEC-SODと同一で, 一連の炎症反応において, 炎症初期のこの物質の血中への上昇は, 血管内皮障害の指標となると考えられた。EC-SODは細胞外マトリックスにおいてoxidantに対して, 防御系因子として働いている可能性が考えられた。

## 審査結果の要旨

本論文は、実験的ストレス潰瘍モデルにおいて、急性胃粘膜病変発生の際に上昇する血漿SOD様活性物質に着目して、この物質を生化学的に解析し、extracellular superoxide dismutase (EC-SOD)との異同を同定した。そして、この物質の生化学的性質、生物学的存在様式、病態生理学的作用について検討することを目的としたものである。実験動物として、Hartley雄性モルモット(400-450g)を用い、水浸拘束、エタノール、熱傷の各ストレス潰瘍モデルで血中に上昇するSOD様活性物質の分子量をSephacryl S-200を用いてゲル濾過して求めた。そして、この物質の生物活性を与えるものが何かについて検討した。

また、この物質がEC-SODと同様にヘパリン親和性を有することや、ヘパリンに対する反応からこの物質の局在部位を検討し、この物質を精製する目的でheparin-Sepharoseを用いてaffinity chromatographyを施行した。

そして、affinity chromatographyで特異的に上昇した分画をpolyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)で解析した。この物質の内皮障害をめぐる動態を検討するため、ストレスによるEvans-blueの胃粘膜内への漏出時期や、胃粘膜脂質過酸化生成物(胃粘膜LPO)やulcer index(UI)とともに、この物質の経時的变化を検討した。さらに、platelet activating factor (PAF), leukotrienes(LTs)などの内皮障害惹起性物質の拮抗剤、阻害剤を投与した時のこの物質の変化も検討した。

この物質の病態生理作用については、ヘパリンで血中にこの物質を誘導して各ストレスを負荷して検討した。結果として、この物質は、4個のCu-Znを有する135KDの糖タンパク質であるEC-SODと同一で、生化学的に血管内皮細胞に局存し、ストレスなどによる内皮細胞障害の指標となりうるという知見を得た。

これは、従来その存在について疑問視されていたEC-SODの存在を、本実験モデルで証明し、その病態生理学的意義についても新しい解釈をしている。内皮障害指標としてのEC-SOD動態は、好中球の内皮膠着をめぐる炎症初期のメカニズムを探る重要な意味をもつものと考えられる。さらに、血中にEC-SODを誘導した実験からEC-SODは、細胞外においてoxidantに対してcytoprotective factorとして働いている可能性が示唆された。このことは、新しいfree radical消去系として治療への新たな展開につながると考えられる。

以上、急性胃粘膜病変発生におけるEC-SODの意義および病態生理作用について、生化学的に検討して上述の新しい知見を得ており、本論文は学位論文に値すると評価した。