

氏 名（本籍）	よし だ かず や 吉 田 和 哉
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 第 2943 号
学位授与年月日	平成 9 年 3 月 5 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
最終学歴	昭和 63 年 3 月 22 日 秋田大学医学部医学科卒業
学位論文題目	手術侵襲によるサイトカイン産生反応の制御に関する実験的研究

（主 査）

論文審査委員 教授 里 見 進 教授 大 井 龍 司

教授 松 野 正 紀

論文内容要旨

研究目的

最近、術後の過剰な生体反応を軽減し、外科手術の安全性の向上を目的とし、種々の薬剤の投与効果が検討されている。当教室では合成ステロイド剤である Methylprednisolone の食道癌手術の術前少量投与により、循環呼吸系の安定化することを報告し、また、マウス手術侵襲モデルでサイトカイン産生抑制作用を解析している。

本研究では、術後のサイトカイン産生を中心とした生体反応の制御について、臨床応用の観点から、Methylprednisolone の同族体であり、過酸化脂質やアラキドン酸産生抑制作用を持つとされる 21-aminosteroid (U74389G) の投与効果を検討し、さらにその機序を明らかにすることを目的とした。

研究方法

5 週齢の BALB/c 系雄性マウスに肝部分切除（左葉腹膜葉切除）を行う手術侵襲モデルを用いた。術後経時的に脱血犠牲死させ、すみやかに 0.1%EDTA 添加 PBS を用い、腹腔内洗浄液および気管支肺胞洗浄液を採取した。各群は、最低 5 匹とした。腹腔滲出細胞および細胞マクロファージを回収し、nonspecific esterase 染色にて 90%以上がマクロファージであることを、tripan blue exclusion test にて生細胞数を算定し、cell viability が 95%以上であることを確認し、10%FCS 添加 RPMI-1640 培地で 1×10^6 個/ml の細胞浮遊液に調整した。これらは、LPS（終濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ ）を加え、5%CO₂ の incubator で 24 時間培養を行った。それぞれのサイトカイン濃度は ELISA 法で triplicate で測定した。*in vitro* での作用の検討には、無侵襲マウスの腹腔滲出付着性細胞を用いた。また、血糖値の測定には、無侵襲マウスを用い、尾静脈より経時的に採血し測定した。統計学的有意差検定には T-test を用い、危険率 5%以下を有意とした。腹腔および肺胞マクロファージを用いる実験は 1 匹当たりの採取細胞数が少ない為、各群 5~7 匹のマウスの検体をひとまとめにして実験した。従って、有意差検定が出来ないため、同一条件の実験を独立に複数回行い、再現性を確認した。

研究結果

21-aminosteroid (U74389G) の投与により、手術侵襲で上昇する血中と腹腔洗浄液中の interleukin-6（以下 IL-6 と略す）および気管支肺胞洗浄液中 tumor necrosis factor α （以下 TNF α と略す）の産生が有意に抑制された ($p < 0.01$)。血中および腹腔洗浄液中の IL-6 値の抑

制に関し、マウス手術侵襲モデルにおける至適投与量は 3 mg/kg であり ($p < 0.01$, $p < 0.05$), 至適投与時期は手術の 1~0.5 時間前であった ($p < 0.01$)。術後 4 時間に採取した肺胞マクロファージの LPS 刺激培養による TNF α , IL-1 α の産生は, 手術単独群で亢進しているが, 21-aminosteroid 投与群では対照群と同程度またはそれ以下に抑制していた。Methylprednisolone 投与により明らかに上昇する血糖値は, 至適投与量の約 7 倍の 20mg/kg の U74389G の単回投与でも上昇しなかった。また, glucocorticoid 受容体拮抗剤 (RU38486) の投与により, *in vivo* および *in vitro* における U74389G による IL-6 産生抑制効果は消失した。U74389G が glucocorticoid receptor を介しサイトカイン産生抑制に作用することが示唆された。

結 論

12-aminosteroid は, 糖代謝への影響を認めず, 手術侵襲に伴う炎症性サイトカイン産生亢進に対する抑制作用が認められた。これらは, 既に当教室で臨床応用している Methylprednisolone と同等の抑制効果であった。21-aminosteroid は手術侵襲に対する過剰生体反応の制御という目的において, その臨床応用が十分に期待できると思われる。

また, 21-aminosteroid は, 糖代謝に影響しないにも関わらず, そのサイトカイン産生抑制作用には glucocorticoid receptor の関与が示唆された。これは, 予測に反するものであり, 現時点において glucocorticoid receptor に subtype は認められておらず, その作用を分離することが出来ないという大前提に矛盾するものであった。glucocorticoid の作用機序の解明も含め, この 21-アミノステロイドについての今後の研究の進展が期待される。

審査結果の要旨

本研究では、術後のサイトカイン産生を中心とした生体反応の制御について、臨床応用の観点から、methylprednisolone の analog である 21-aminosteroid (U74389G) のマウス手術侵襲モデルへの投与効果を検討し、さらにその機序を明らかにしている。

まず、21-aminosteroid の投与により手術侵襲で上昇する血中と腹腔洗浄液中の interleukin-6 (IL-6) および気管支肺胞洗浄液中の tumor necrosis factor α (TNF α) の産生が有意に抑制されることが示された。このとき、血中および腹腔洗浄液中の IL-6 値の抑制に関し、至適投与量および至適投与時期のあることを明らかにしている。さらに、術後に採取した肺胞マクロファージの LPS 刺激培養による TNF α , interleukin-1 (IL-1) の産生は、手術単独群で亢進するものの、21-aminosteroid 投与により、対照群と同程度またはそれ以下に抑制していることが示された。これらのサイトカイン産生抑制作用は、既に臨床応用されている methylprednisolone と同等の抑制効果であることは興味深いことである。また、methylprednisolone 投与により明らかに上昇する血糖値は、21-aminosteroid 投与では認められず、合成 steroid 剤の使用時の副作用のひとつである糖代謝への影響が認められない点からも、その臨床応用が十分に期待できると思われる。

次に、21-aminosteroid の作用機序を検討するため、glucocorticoid receptor 拮抗剤 (RU38486) を投与したところ、21-aminosteroid の in vivo および in vitro における IL-6 産生抑制効果は消失した。このことより、U74389G が、glucocorticoid receptor を介してサイトカイン産生抑制に作用することが示唆されている。

本研究は、21-aminosteroid のひとつである U74389G のサイトカイン産生抑制作用および手術侵襲後のサイトカイン産生に対する作用を検討した最初のものである。また、糖代謝に影響しないにも関わらず、そのサイトカイン産生抑制作用に glucocorticoid receptor が関与することが示されたことは画期的なことであり、glucocorticoid の作用機序の今後の解明の一助になりうると考えられる。以上から、本研究は学位授与に十分値するものと考えられる。