

氏 名（本籍）	すぎ 杉	うら 浦	ひさ 久	とし 敏
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 6 2 7 号			
学位授与年月日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 日			
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）内科学系専攻			
学 位 論 文 題 目	遅発型アレルギー反応時の気道微小血管透過性亢進に対する活性酸素関連物質の関与に関する研究			

（主 査）

論文審査委員 教授 白 土 邦 男 教授 佐々木 英 忠

教授 貫 和 敏 博

## 論文内容要旨

動物モデルでの抗原吸入後の遅発型アレルギー反応（LAR）時の気道炎症は、喘息の病態と類似しているといわれている。一方、一酸化窒素（NO）やスーパーオキシド（ $O_2^-$ ）が喘息の気道炎症に関与していることも知られている。さらにNOと $O_2^-$ は速やかに反応しパーオキシナイトライト（ $ONOO^-$ ）が産生されることが最近報告された。しかしLAR時の気道炎症に対するこれら活性酸素関連物質の関与は明らかではない。今回、私はLAR時の微小血管透過性亢進における活性酸素関連物質の関与について検討した。

雄のハートレー系モルモットに卵白アルブミン（OVA）と水酸化アルミニウムを皮下注射し、1週間後にOVAを吸入投与し感作した。3週間後に活性酸素関連物質の関与を評価するために、NO合成酵素（NOS）阻害剤L-NAME（100mg/kg）を前投与し、別の系では $O_2^-$ の産生酵素であるキサンチンオキシデース（XO）阻害剤AHPP（50mg/kg）を前投与し実験を行った。別の系では $ONOO^-$ のスキャベンジャーであるebselen（30mg/kg）を同様に抗原吸入前に投与した。30分後に1%OVAまたは生理食塩水をチャレンジした。麻酔後、胸腔内圧をモニタリングし初期値から2倍以上増加した時点で評価した。LARを引き起こした時点でモナストラルブルー色素（30mg/kg）を静注し、1分後に灌流固定し、whole mount標本を作製した。血管透過性亢進の程度は、色素により標識された血管の面積を、単位面積当たりの割合（%）で評価した。さらに上皮、粘膜下層における好酸球浸潤数を測定し、免疫染色も施行した。別の系ではLAR時の呼気ガス中NO濃度を測定し、 $O_2^-$ の産生酵素であるXO+キサンチンデヒドロゲナーゼ（XD）活性も測定した。

OVAを吸入したモルモットは、即時型アレルギー反応を引き起こし、4.5-6時間後に胸腔内圧が2倍に上昇しLARを引き起こした。LAR時の呼気ガスNO濃度は、OVA吸入群が生食吸入群に比べて有意な上昇を引き起こした（ $p<0.05$ ）。LAR時の微小血管透過性は、OVA吸入群が $5.5\pm 1.2\%$ と、生食吸入群 $0.13\pm 0.07\%$ と比べて有意に亢進していた（ $p<0.01$ ）。またOVAの吸入によってLAR時に上皮（ $p<0.01$ ）、粘膜下層（ $p<0.01$ ）の両方で有意な好酸球浸潤を引き起こした。NOS阻害剤の影響を検討したところ、L-NAMEの前投与によってLAR時の微小血管透過性は有意に抑制された（ $1.5\pm 0.54\%$ 、 $p<0.05$ ）。好酸球浸潤も上皮内、粘膜下ともに有意に抑制された（ $p<0.05$ ）。またLAR時のXO+XD活性はOVA吸入群では生食吸入群に比べて有意に上昇しており（ $p<0.01$ ）、LAR時の $O_2^-$ 産生が増加していることが推測された。またAHPPの前投与によってLAR時の微小血管透過性亢進は有意に抑制された（ $p<0.05$ ）が、好酸球浸潤は抑制されなかった。次にebselenを前投与したところ、微小血管透過性亢進を有意

に抑制した ( $p < 0.05$ ) が、好酸球浸潤は抑制しなかった。LAR 時の  $\text{ONOO}^-$  の産生について検討するためにそのマーカーであるニトロチロシンに対する免疫染色を施行したところ、LAR 時にはその産生が透過性の亢進した微小血管の内皮細胞と浸潤した炎症細胞において増大していた。L-NAME と ebselen の前投与によって両部位のニトロチロシンの産生が消失し、AHPP の前投与によって血管内皮細胞のニトロチロシンの産生のみ消失した。

喘息の気道において活性酸素関連物質が炎症を悪化させることは以前より報告されているが、微小血管透過性亢進に関与しているかどうかは不明であった。また最近、炎症部位では  $\text{ONOO}^-$  が産生されることが報告されたことから  $\text{ONOO}^-$  が血管透過性亢進に関与している可能性も推測された。今回の検討では、NOS 阻害剤、XO 阻害剤はそれぞれ単独で、LAR 時の微小血管透過性亢進を有意に抑制し、 $\text{ONOO}^-$  スカベンジャーも同程度まで有意に抑制した。以上より NO と  $\text{O}_2^-$  は主として  $\text{ONOO}^-$  産生を介して微小血管透過性亢進を引き起こしていると考えられた。

本研究により、喘息における気道微小血管透過性亢進に対する活性酸素関連物質の関与が初めて示された。活性酸素関連物質の産生阻害剤またはスカベンジャーは、それぞれ血管透過性亢進を有意に抑制したことから、喘息治療薬としての今後の検討が待たれるところである。

## 審査結果の要旨

感作動物を用いた抗原吸入後の遅発型アレルギー反応 (late allergic response, LAR) モデルは、喘息の気道炎症の病態を検討する上で極めて有用である。一方、過剰に産生された一酸化窒素 (NO)、スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) は炎症を引き起こすことが知られており、さらに NO と  $O_2^-$  は速やかに反応し強力な組織傷害性をもつパーオキシナイトライト ( $ONOO^-$ ) を生成することも報告されている。著者は本研究において、LAR 時の気道炎症の指標として微小血管透過性亢進を血管内皮間隙への色素のとらえ込みとして解析することにより定量評価し、この反応に対する活性酸素関連物質 (NO,  $O_2^-$ ,  $ONOO^-$ ) の関与について検討を行っている。

研究内容は大きく 3 つに分けられる。第 1 に、NO が LAR 時の呼気ガス中で増加していたこと、NO 合成酵素阻害剤により LAR 時の微小血管透過性亢進が有意に抑制されたことから LAR 時の微小血管透過性亢進に NO が関与していることを明らかにした。第 2 に、 $O_2^-$  の産生酵素であるキサンチンオキシダーゼ (XO) の酵素活性が LAR 時の気道組織で増加していたこと、XO 阻害剤によって LAR 時の微小血管透過性亢進が有意に抑制されたことから LAR 時の微小血管透過性亢進に  $O_2^-$  もまた関与していることを明らかにした。第 3 に、 $ONOO^-$  の産生が LAR 時の微小血管の内皮細胞で増加していたこと、 $ONOO^-$  の消去剤の投与によって微小血管透過性亢進が NO 合成酵素阻害剤と同程度まで抑制されたことから、NO と  $O_2^-$  が過剰に産生され  $ONOO^-$  となり、LAR 時の微小血管透過性亢進に関与していることを明らかにした。以上の結果から著者は、産生された  $ONOO^-$  が血管内皮細胞を収縮させることが、モルモットの LAR 時の気道微小血管透過性亢進の最終段階であると結論づけている。

今回の検討は、LAR 時の気道炎症において重要な因子である微小血管透過性亢進に、活性酸素関連物質が深く関連していることを初めて示した点で高く評価できる。またこれまでの LAR モデルでの報告では、気道抵抗や細胞浸潤を指標として用いているものが殆どで、微小血管透過性亢進を直接定量化して、気道炎症の程度を検討したものは本研究が初めてであり、この点からも著者の報告は重要と考えられる。さらに活性酸素関連物質の合成酵素阻害剤や消去剤はそれぞれが喘息気道の炎症抑制に有効である可能性も示唆され、本報告は喘息治療の今後の展開に重要な位置を占めると考えられる。喘息の病態、治療の両分野に有用な知見を示した点で、著者の論文は学位に値するものと認められる。