

# 大畑修三 学位論文審査要旨

主 査 林 一 彦  
副主査 稲 垣 喜 三  
同 松 浦 達 也

## 主論文

Polaprezinc protects mice against endotoxin shock

(ポラプレジンクによるマウスエンドトキシンショックの保護効果)

(著者：大畑修三、森山千尋、山下敦、西田直史、楠本智章、持田晋輔、南ゆかり、  
仲田純也、庄盛浩平、稲垣喜三、太田好次、松浦達也)

平成22年 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 掲載予定

## 参考論文

1. Geranylgeranylacetone ameliorates inflammatory response to lipopolysaccharide

(LPS) in murine macrophages: inhibition of LPS binding to the cell surface

(ゲラニルゲラニルアセトンはマウスマクロファージにおけるリポポリサッカライド  
(LPS) に対する炎症反応を軽減する：細胞表面へのLPS結合の抑制)

(著者：持田晋輔、松浦達也、山下敦、堀江俊輔、大畑修三、楠本智章、西田直史、  
南ゆかり、稲垣喜三、石部裕一、仲田純也、太田好次、山田一夫)

平成19年 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 41巻 115頁～123 頁

2. Zinc supplementation with polaprezinc protects mouse hepatocytes against  
acetaminophen-induced toxicity via induction of heat shock protein 70

(ポラプレジンクによるマウス肝細胞への亜鉛供給は熱ショック蛋白70誘導を介して  
アセトアミノフェン肝細胞障害を抑制する)

(著者：西田直史、大畑修三、楠本智章、持田晋輔、仲田純也、稲垣喜三、太田好次)  
松浦達也)

平成22年 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 46巻 43頁～51頁

# 学 位 論 文 要 旨

## Polaprezinc protects mice against endotoxin shock

### (ポラプレジンクによるマウスエンドトキシンショックの保護効果)

リポポリサッカライド(LPS)はグラム陰性桿菌外膜の主要構成成分であり、強力なマクロファージ(M $\phi$ )活性化因子であるとともに動物をエンドトキシンショックから死に至らしめる原因物質である。

ポラプレジンク (PZ) は、熱ショック蛋白 (HSP) 誘導作用により胃および大腸粘膜障害やアセトアミノフェン肝細胞障害を防ぐことが報告されている。しかしながら、PZがエンドトキシンショックに対する保護効果を有するのかわ不明である。そこで本研究では、LPSによって誘導されるマウスエンドトキシンショックおよびM $\phi$ 活性化に対するPZの効果について検討した。

## 方 法

PZの血中有効濃度を調べる目的で、5週齢のddY系雄性マウスに、PZ (10, 50, 100 mg/kg) を経口投与し、血清亜鉛濃度を原子吸光分析により測定した。LPS (40 mg/kg)を腹腔内投与後、12時間ごとに96時間後までマウスの生死を確認した。PZ (100 mg/kg)はLPS投与2時間前に経口投与した。LPS投与後に血液と組織を採取し、血漿 nitric oxide (NO)濃度 (Griess法)、血漿 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 濃度 (ELISA法)、肺HSP70量 (ウエスタンブロット) を測定した。また肺組織の inducible NO synthase (iNOS)、メタロチオネイン (MT) -I、MT-II のmRNA発現量をリアルタイムPCRで測定した。肺組織は固定後ヘマトキシリン・エオジン染色し、顕微鏡下で観察した。

in vitro実験では、マウス単球由来M $\phi$ 様RAW 264細胞にLPS (100 ng/ml または 1  $\mu$ g/ml)を投与し、培地中の NO および TNF- $\alpha$ 濃度、NF- $\kappa$ B p65の核移行 (ウエスタンブロット) を測定した。PZ の構成成分である亜鉛、L-カルノシン (Car) および PZ (50または100  $\mu$ M)はLPS投与6時間または2時間前に添加し、それぞれの効果を検討した。

## 結 果

(1)LPS投与96時間後の生存率：LPS投与によりマウスの生存率は20%まで減少した。PZの1時間および2時間前投与は生存率をそれぞれ55%および80%と有意に改善した。

(2) 血漿NOおよびTNF- $\alpha$ 濃度:血漿NO濃度はLPS投与24時間後まで経時的に増加した。血漿TNF- $\alpha$ 濃度はLPS投与18時間後にピークを示した後、24時間後には低下した。PZ前投与により、それぞれの上昇が有意に抑制された。

(3) LPS誘導急性肺障害: LPS投与24時間後のマウス肺組織は、血管周囲浮腫と肺胞内出血像を示したが、PZ前投与によって肺障害は著明に改善された。

(4) 肺におけるHSP70発現: PZ投与によりLPS投与後の肺HSP70誘導の亢進は認められなかった。

(5) 肺におけるiNOS mRNA発現: LPS投与により正常肺の約20倍に増加したiNOS mRNA発現は、PZ前投与により約50%に減少した。MT-I, MT-II mRNA発現量はPZ前投与により影響されなかった。

(6) RAW 264細胞におけるNOおよびTNF- $\alpha$ 産生: LPS添加6時間前のPZ (100  $\mu$ M) 添加により、RAW 264細胞におけるLPS添加後のNOおよびTNF- $\alpha$ 産生量は有意に抑制された。

(7) RAW 264細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化: PZ前処理により、LPS添加24時間後におけるNF- $\kappa$ B p65核内移行は有意に抑制された。

(8) RAW 264細胞のNO産生に対する硫酸亜鉛、Carの効果: LPS添加24時間後のNO産生は、PZの構成成分のうちCarではなく、亜鉛によって有意に抑制された。

## 考 察

PZ前投与がLPSによる急性肺障害を抑制し、エンドトキシンショックマウスの生存率を劇的に改善することが判明した。これは、PZによる肺HSP70誘導によるものではなく、肺iNOS mRNAの発現抑制によるNO産生抑制およびTNF- $\alpha$ 産生抑制によってもたらされていた。in vitroの実験では、PZによるRAW 264細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化の抑制が示された。また、PZの構成成分のうちCarではなく亜鉛がRAW 264細胞のNO産生を抑制していた。これらの結果より、PZによるLPS投与後の生存率改善メカニズムとして、M $\phi$ におけるNF- $\kappa$ B活性化の抑制とその後の炎症性メディエーターの誘導抑制が関与している可能性が考えられた。

## 結 論

本研究において、PZがNF- $\kappa$ Bの活性化抑制とその後のNOやTNF- $\alpha$ などの炎症性メディエーター産生を抑制することにより、LPS誘導エンドトキシンショックを防御することが示唆された。