

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
中倉兵庫	主査 教授 玉 井 浩 副査 教授 勝 岡 洋 治 副査 教授 北 浦 泰 章 副査 教授 清 水 章 副査 教授 宮 崎 端 夫
主論文題名  <b>Oxidative stress in a rat model of nephrosis can be quantified by electron spin resonance</b> (ネフローゼモデルラットにおける電子スピン共鳴法を用いた酸化ストレスの定量化)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》            ネフローゼ症候群は小児に好発する原発性糸球体疾患であり、高度蛋白尿、低アルブミン血症、浮腫をきたす疾患である。            本研究では、電子供与体として最も反応しうるアスコルビン酸(ASA)が生体内の活性酸素(ROS)と反応し生成されるアスコルビン酸ラジカル(ASA-radical)量を電子スピン共鳴法(ESR)にて測定することによって、<b>puromycin aminonucleoside (PAN)</b>腎症の発症メカニズムにおける酸化ストレスの関与を明らかにすることを目的としている。</p> <p>《方法》            (1) PAN 腎症ラットの作成およびα-toc 補充ラットの作成            Wistar 雄ラット(7-8 週令、体重 170-200g)をコントロール群(n=7)、PAN 投与群(n=8)、α-tocopherol (α-toc)補充群(n=3)、α-toc 補充かつ PAN 投与群(n=8)の 4 群に分けた。PAN の投与は 150mg/kg を尾静脈内に単回投与した。α-toc 補充は 2 日間 4mg/100g 体重の d,l-α-toc を腹腔内投与し、続いて飼料 100g 当たり 50mg の α-toc となるように調整した高α-toc 食餌で飼育した。PAN 注射 10 日目に麻酔下で腹部大動脈と下大静脈にカニューレを挿入し、刺入部より尾側で両動静脈を結紮、また肝静脈、腎静脈間で、下大静脈を結紮し閉鎖回路とした。ASA(最終濃度 1mM)を添加した Hanks 緩衝液で動脈側より腎灌流を行い、5分後の灌流液を採取した。灌流液は、凍結乾燥にて濃縮後 ESR 検体とした。灌流後、腎を摘出し篩法で糸球体を採取し、糸球体溶液を作成し thiobarbituric acid reactive substances (TBArS)、α-toc を測定した。</p> <p>(2) 化学分析            糸球体溶液、尿の蛋白定量は Bio-Rad の比色法を用いて測定した。糸球体中の TBArS は Aust 法で、α-toc は HPLC-ECD により測定した。</p> <p>(3) ASA-radical の測定            JEOL FA2000 を用いて ESR 法にて測定。ESR の条件は、moduration frequency 100 kHz, modulation amplitude 0.08mT, scanning field 335.5±0.5mT, response time 0.3s, sweep time 4 分, microwave power 1mW, microwave frequency 9.41GHz で行った。定量化はマンガン 800 マーカーの信号強度との比較で行った。</p> <p>《結果》            PAN 投与後 9 日目、PAN 単独投与群およびα-toc 補充下の PAN 投与群では、コントロール群に比し著明な尿蛋白の増加を認めた(p&lt;0.01)。しかし PAN 単独投与群に比しα-toc 補充下の PAN 投与群では有意に尿蛋白の上昇を抑制した。糸球体中の TBArS 値は PAN 単独投与群で有意に上昇した</p>	

が、 $\alpha$ -toc 補充により正常域にまで抑制された。糸球体中の $\alpha$ -toc は PAN 単独投与群でコントロール群に比し有意に低下し、 $\alpha$ -toc の強化食を行った 2 群でコントロール群の 2~3 倍程度に上昇( $p<0.05$ )した。

ASA-radical の信号強度は、PAN 単独投与群でコントロール群に比して有意に増加し、 $\alpha$ -toc 補充により正常域にまで抑制された。本結果は糸球体中の TBArS および尿中蛋白量の変動と非常に類似しており、ASA-radical 量に対する糸球体中の TBArS 値および尿中蛋白量との相関をみたところ、ASA-radical は TBArS ( $r=0.713$ ,  $p<0.01$ ),尿蛋白量( $r=0.603$ ,  $p<0.01$ )、ともに強い正の相関を認めた。

#### 《考察》

本研究は、ネフローゼ症候群動物モデルとされる PAN 投与ラット腎において従来困難とされた直接法である ESR を用いて腎における ROS を定量化し、ネフローゼ症候群における酸化ストレスの関与を解明した。ASA はその酸化還元電位の低さから生体内で生じる ROS に対して電子供与体として作用すると考えられ、生体内でのラジカル反応のマーカーとなるとの報告がある。本研究では、この点に着目し腎灌流液にラット血中に存在する 10-20 倍のアスコルビン酸を添加し、腎内で生じるすべての ROS が ASA と反応し ASA-radical として補足されるという仮定で実験を進め、その結果、PAN 単独投与ではコントロール群に比し腎灌流液中の ASA-radical 量の増加を認めた。その ASA-radical 量が尿中蛋白量と正の相関を示したことは、PAN 腎症の腎臓内で発生する ROS が蛋白尿の生成に関与することを示す。さらに ASA-radical 量が糸球体の TBArS とも正の相関を示すことから、腎内で生じる ROS には過酸化脂質が関与しており、糸球体細胞膜の脂質過酸化が PAN 腎症における蛋白尿出現の病因に重要な役割を演じていると推定される。

一方、各群における糸球体中の TBArS の増加、 $\alpha$ -toc の現象は、糸球体での脂質過酸化の亢進および、その進展を阻止するために $\alpha$ -toc が消費されたことを示唆するものであり、ESR で得られた結果と一致する。

今回得られた結果は、ネフローゼ症候群の蛋白尿発現機序に脂質過酸化を含めた酸化障害が強く関与し、 $\alpha$ -toc 投与による酸化障害および症状の改善を効果が示唆されており、頻回に再発するような難治性ネフローゼ症候群患児に対する安全な治療法になりえると考ええる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第682号	氏名	中倉 兵庫
論文審査担当者		主査 教授 玉 井 浩	
		副査 教授 勝 岡 洋 治	
		副査 教授 北 浦 泰 章	
		副査 教授 清 水 章	
		副査 教授 宮 崎 端 夫	
主論文題名			
Oxidative stress in a rat model of nephrosis can be quantified by electron spin resonance (ネフローゼモデルラットにおける電子スピン共鳴法を用いた酸化ストレスの定量化)			
論文審査結果の要旨			
<p>《審査結果》</p> <p>本研究は、ネフローゼ症候群のモデルラットとして確立された <b>puromycin aminonucleoside (PAN)</b> 投与ラットを用いて、アスコルビン酸ラジカル(<b>ASA-radical</b>)量を電子スピン共鳴法(<b>ESR</b>)にて測定することにより、<b>PAN</b> 腎症の発症メカニズムにおける酸化ストレスの関与を検討したものである。</p> <p><b>ESR</b> は各種ラジカルを直接検出する方法であるが、検出感度などの問題から生体内で発生する活性酸素(<b>ROS</b>)の検出、定量化は従来困難とされてきた。申請者はアスコルビン酸(<b>ASA</b>)の酸化還元電位の低さから <b>ROS</b> に対して電子供与体として作用すると考えられる点に着目した。すなわち、<b>PAN</b> 腎症ラット腎灌流に過量の <b>ASA</b> を添加し <b>ASA-radical</b> を定量化することで、灌流液の <b>ESR</b> を用いた <b>ROS</b> の定量法をはじめて確立し、以下の二点を明らかにしている。</p> <p>(1) <b>ASA-radical</b> が糸球体中のチオバルビタール酸反応物質(<b>TBArs</b>)および1日尿蛋白量と正の相関を示す。</p> <p>(2) 抗酸化ビタミンである<math>\alpha</math>-tocopherol (<math>\alpha</math>-Toc)の投与で1日尿蛋白量は減少し、糸球体 <b>TBArs</b> および腎灌流液中の <b>ASA-radical</b> が正常化する。</p> <p>以上、本研究はネフローゼ症候群の蛋白尿出現機序において腎内で生じる <b>ROS</b> が関与し、特に糸球体細胞膜の脂質過酸化が大きく影響することを <b>PAN</b> 腎症ラットモデルを用いて示唆したものである。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条の定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Pediatric Nephrology 19(3):266-270, 2004</p>			