

【94】

氏 名 (本 籍)	坂 ^{さか} 本 ^{もと} まさ子 ^こ (東 京 都)				
学 位 の 種 類	医 学 博 士				
学 位 記 番 号	博 甲 第 678 号				
学位授与年月日	平成元年 3 月 25 日				
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当				
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科				
学 位 論 文 題 目	ヒト好中球由来の活性酸素種による methylguanidine の産生について (dissertation 形式)				
主 査	筑波大学教授	医学博士	東	恵	彦
副 査	筑波大学教授	医学博士	小	磯	謙 吉
副 査	筑波大学教授	医学博士	眞	崎	知 生
副 査	筑波大学助教授	薬学博士	井	柳	堯
副 査	筑波大学助教授	医学博士	目	崎	登

論 文 の 要 旨

《目 的》

尿毒症患者の体内に蓄積して有害な作用を及ぼす uremic toxin のひとつと考えられている methylguanidine (MG) は、腎不全患者の血清中に増加するとともに尿中排泄も増加するので、腎からの排泄低下よりは体内での産生亢進によって蓄積すると考えられる。本学腎臓内科研究室では、MG が creatinine (Cr) から産生されることを示し、その生成過程に活性酸素の関与することを既にラット単離肝細胞の系と化学的活性酸素発生系について報告している。本研究においては好中球を用い、その発生する活性酸素によって Cr から MG が産生されるか否かを検討した。因みに好中球は生体内で活性酸素を発生する細胞として最も詳細に研究されているものであり、かつ最近では腎障害の発生に関与するのではないかと注目されている因子である。

《方 法》

好中球は健康成人より採血したヘパリン加静脈血に 6 % デキストラン生食を混合して赤血球を沈降させ、上清を Ficoll-Paque 上に重層して遠心し、リンパ球、単球、血小板を除き、沈渣中に残存する赤血球を除去して分離し、Hanks' balanced salt solution (HBSS) に浮遊させて用いた。好中球の刺激には、phorbol myristate acetate (PMA) を用いた。PMA 刺激で産生された superoxide anion (O_2^-) の測定は、cytochromeC 還元法によった。Cr からの MG 産生は、Cr を含む HBSS 1ml 中に好中球を浮遊させ、PMA を添加後 37℃ で incubation し、上清中の MG を測定して検討した。MG の分析は高速液体クロマトグラフィーで分離後、9, 10-phenanthrenequinone と反応させ、

蛍光を測定する方法で行った。

《結 果》

PMA 刺激により産生された O_2^- は室温で $1.10 \sim 1.32 \text{ nmol/min/} 10^6/\text{cells}$ であった。MG の産生は、好中球 ($1 \sim 8 \times 10^6/\text{ml}$)、PMA ($\sim 125 \text{ nM}$)、および Cr ($\sim 100 \text{ mg/dl}$) のそれぞれの内濃度範囲において、3 者に依存することが認められた。

また、MG 産生に対する各種活性酸素消去剤の効果を検討し、次のような成績を得た。

好中球由来の活性酸素は、NADPH-oxidase が刺激されてまず O_2^- が生じ、ついで H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 1O_2 や $HClO$ が生じると考えられているが、 O_2^- の消去剤である superoxide dismutase は 25 U/ml で 90% 抑制し、 H_2O_2 の消去剤である catalase は 125 U/ml で 45%、 500 U/ml で 80% の抑制を認めた。hydroxyl radical ($\cdot OH$) の消去剤である dimethyl sulfoxide は 10 mM では 6.5%、 100 mM では 56% の抑制率で、sorbitol は 100 mM でも 5.4% の抑制にとどまった。次亜塩素酸 ($HClO$) の消去剤である taurine、methionine では、それぞれ 10 mM で 87% と 92% の抑制を認めた。

さらに、catalase と myeloperoxidase の阻害剤であり、singlet oxygen (1O_2) の消去剤でもある sodium azide は $1 \text{ } \mu\text{M}$ の低濃度で 91% の抑制率であった。

以上の結果からは MG 産生には O_2^- や $HClO$ が重要で、 H_2O_2 の関与も示唆され、 $\cdot OH$ の関与も否定できないと考えられた。

なお、この系での MG 産生は、ラット単離肝細胞の系に比して約 10 倍の効率であった。

審 査 の 要 旨

好中球の産生する活性酸素によってクレアチニンからメチルグアニジンが産生され、尿毒症が発症する可能性を、本研究は実験的に示唆した点で評価される。uremic toxin の生成機構の解明は腎不全の病態解明にも大きく寄与するものであろう。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。