

氏名（本籍）	會沢 哲士（千葉県）		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博乙第	2967	号
学位授与年月	令和 2 年 5 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	EGb 761 の凍傷に対する組織保護効果の検討		
主査	筑波大学教授	医学博士	山崎 正志
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	藤澤 康弘
副査	筑波大学講師	博士（医学）	西村 文吾
副査	筑波大学講師	博士（農学）	蕨 栄治

## 論文の内容の要旨

會沢哲士氏の博士学位論文は、凍傷治療におけるイチヨウ葉抽出物 EGb 761 の効果を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

### 【目的】

凍傷は、受傷部位が解凍された後に生じる虚血後の血流再開時に、血管内皮細胞や好中球などから発生するフリーラジカルが組織を障害することにより生じることが知られている（虚血再灌流障害）。様々な抗酸化物質が医薬品内外に存在するが、そのうちいくつかは凍傷への治療効果が報告されている。著者は、イチヨウ葉抽出物 EGb 761 の抗酸化作用に着目し、凍傷後の虚血再灌流障害に対する治療効果を動物実験にて検討している。

### 【方法】

著者は、8週齢の雄性 Fischer 344 ラット（体重 200～250 g）を用い、以下のような実験を行っている。すなわち、ラットを全身麻酔下に右後肢足背をポリウレタンフォームの土台に固定する。ポリウレタンフォームには予め直径 13 mm、厚さ 2 mm、重量 1.8 g の正円形のネオジウム製磁石（2400 G、常温）を埋め込んでおき、右足背の直下に位置するように調整する。そして、ドライアイスに 15 分間接触させ、-78.5℃に冷却した同じサイズのネオジウム磁石を右足背へ計 2 分間設置することにより凍傷を作成している。磁石の除去後創部は室温で放置し解凍している。

著者は、受傷直後に、EGb 761 製剤の懸濁液（20 mg/ml）を腹腔内投与している（初回投与）。そ

の後は凍傷作成 24 時間後、48 時間後に腹腔内投与し、計 3 回の投与を行っている。以上の処置を行ったラットを治療群とし、1 ml の生理食塩水を同様の投与間隔で腹腔内投与したラットを対照群としている。

そして、受傷直後および受傷後 1、3、5、7、10、14、18、21 日目に、定規を傍らに置いたラット受傷肢の写真をデジタルカメラで撮影し、画像解析ソフトの計測ツールを用いて創傷面積 (mm<sup>2</sup>) を計測している。また、受傷後 1、3、5 日目に創部組織を採取し、TUNEL 染色および cleaved caspase-3 免疫染色によるアポトーシスの評価および 4-ヒドロキシ-2-ノネナル (4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE)、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OHdG) 免疫染色による組織酸化障害の評価を行っている。酸化ストレスの評価としては受傷後 1、3、5 日目に採血し血清高感度 8-OHdG 濃度の評価も行っている。

### 【結果】

著者は、肉眼的評価において、受傷後 1 日目から創傷が出現し、受傷後 3~5 日目に面積が最大となり、その後は次第に縮小し、受傷後 21 日目までには全個体で治癒が完了することを確認している。また、受傷後 1、3 日目での創傷面積は、対照群に比べて治療群 (200 mg/kg EGb 761 投与群、100 mg/kg EGb 761 投与群) では有意に小さく、受傷後 7 日目以降では各群間に有意差は認められないことを示している。

著者は、次に組織学的評価において、両群ともに受傷後 1 日目に TUNEL、caspase-3 陽性細胞数が最も多く、受傷後 3 日目、5 日目と進むにしたがってそれらが減少することを明らかにしている。また、受傷後 1 日目および 3 日目において、生理食塩水投与群の caspase-3 陽性細胞数は EGb 761 投与群よりも多く、4-HNE 陽性細胞数および 8-OHdG 陽性細胞については受傷後 1 日目の検体にて治療群は対照群と比較し少ない傾向を示すことを明らかにしている。一方、受傷後 3 日目と 5 日目の組織からはどの群においても 4-HNE 陽性細胞、8-OHdG 陽性細胞ともに観察されないことを示している。血清 8-OHdG 濃度はいずれの群においても検出下限以下であることも示している。

### 【考察】

凍傷の特徴として、受傷直後よりも時間が経過するにつれ創傷範囲が拡大する傾向が挙げられる。著者の実験では受傷後 3~5 日目に創傷面積が最大となり、実臨床と矛盾しない結果となっている。また、創縁付近の一見損傷が無いように見える組織を病理学的に精査すると、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 の存在が確認できている。即ち、凍結による一次的な損傷を免れた部分であっても、虚血再灌流障害による二次的な損傷を負っており、この部分で数時間~数日後に細胞死を生じて創傷が拡大することが示唆されている。

血清 8-OHdG 濃度はいずれの群においても検出下限以下で、凍傷による虚血再灌流障害は創部に限局したものであると著者は考察している。組織学的な評価では、受傷後 1 日目で EGb 761 投与群にて組織の酸化抑制が示唆されている。受傷後 3、5 日目の組織からは酸化状態は検出されていないが、これは障害された細胞が細胞死に至り、その後免疫細胞による貪食を受けて消失するためであると著者は推察している。

EGb 761 の 1 日投与量としては 50 mg/kg では創傷軽減効果を認めず、300 mg/kg では半数致死量を超える。したがって凍傷治療として使用する場合の有効域はこれらの値の間に存在すると著者は考察している。

## 【結論】

著者の研究により、イチヨウ葉抽出物 EGb 761 の投与によって、受傷後初期の創傷面積が改善することが示された。凍傷においては組織解凍時に生じる組織再灌流障害が組織損傷を増悪させるが、EGb 761 はこれを軽減すると考えられた。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

著者は、凍結磁石をラット後肢に接触させる凍傷モデルを作成して実験を行い、イチヨウ葉抽出物 EGb 761 の投与によって、受傷後初期の創傷面積が改善することを明らかにした。EGb 761 は Keap1/Nrf2/ARE 経路を活性化して転写因子 Nrf2 の核移行を促進することで遺伝子に働きかけ、様々な抗酸化物質の産生を促すことが知られている。著者の実験における組織保護作用もこの抗酸化シグナル伝達系が主要な役割を担っていると考えられる。今後は関連物質の定量解析を行い、凍傷においても EGb 761 による Keap1/Nrf2/ARE 経路の活性作用が治療効果をもたらしていることを確認することが課題である。本研究の成果は、凍傷に対する新たな治療法を開発する上で重要な知見として高く評価される。

令和 2 年 3 月 30 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。