

博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

平成26年3月

近畿大学大学院

医学研究科

大学院医学研究科博士課程修了者

博士学位論文審査結果の報告書

氏 名 (生年月日)	木 村 浩 基 (昭 55. 7. 27 生)
本 籍	大 阪 府
博士の専攻分野の名称	医 学
学 位 記 番 号	医 第 1153 号
学 位 授 与 の 日 付	平 成 26 年 3 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 程 第 5 条 第 1 項 該 当
学 位 論 文 題 目	ラット敗血症モデルにおける Citrulline-NO cycle とシトルリン補充療法の有用性の検討
論 文 審 査 委 員	主 査 = 竹 山 宜 典 教 授 副 主 査 = 中 尾 慎 一 教 授 副 主 査 = 宗 像 浩 教 授

【目的】

一酸化窒素 (NO) は endothelial nitric oxide synthase (eNOS) を触媒としてアルギニンからシトルリンとともに産生され、血管内皮の保護し微小循環保持に関与する。シトルリンは Citrulline-NO cycle (Cit-NO cycle) を経由して NO 産生に関わっている。敗血症時には血管内皮障害による臓器灌流障害が惹起されるが、その機序は現段階で明らかではない点が多い。そこで敗血症モデルラットにシトルリンを投与することで NO 産生による臓器灌流障害の改善があると仮説を立て Cit-NO cycle に関連した酵素を中心に検討した。

【方法】

雄性 Sprague-Dawley ラット 7～8 週齢 200～260 g に中心静脈カテーテルを留置し、盲腸結紮穿孔を行った。維持輸液 300ml/kg/day を投与し、輸液に添加するアミノ酸により、①Cit 群 (シトルリン添加)、②Arg 群 (アルギニン添加)、③Ala 群 (アラニン添加) の 3 群に分けた。実験 I では処置後 5 日間の生存率を検討し、実験 II では処置後 2 日目の血漿アミノ酸分析と、肝、腎、回腸でのシトルリン代謝関連酵素の発現および組織学的検討を行った。

【結果】

実験 I：生存率は Cit 群と Ala 群間では 3 日目以降、Cit 群と Arg 群間では 4 日目以降において有意に Cit 群が高かった。実験 II：血漿シトルリン値は Cit 群において他群と比較し有意に高値であり、血漿アルギニン値、アラニン値は 3 群間に差を認めなかった。肝組織において、Cit 群は Arg 群、Ala 群に比べて eNOS の mRNA の発現が有意に高値を示し、アルギニノコハク酸シンターゼ (ASS) とアルギニノコハク酸リアーゼ (ASL) では高い傾向を示した。腎組織では 3 群に差はなかった。回腸における phospho-eNOS の免疫染色では、Cit 群は Ala 群に比べ回腸粘膜固有層の血管での陽性細胞数が増加した。回腸の iNOS タンパク質合成は Cit 群で抑制され、また Cit 群は Ala 群に比べアポトーシス陽性細胞が有意に減少した。

【考察】

実験 I において、敗血症時のシトルリン投与は死亡率を低下させたが、その一因として、実験 II の結果より血管内皮などの eNOS 系における Cit-NO cycle にシトルリンが作用することで、敗血症時の微小循環障害の改善をもたらした可能性が考えられた。同じく Cit-NO cycle に関連するアルギニンの投与では、敗血症におけるアルギナーゼ活性や内因性 NOS 阻害物質の影響で十分な NO 産生がなされなかったと考えられた。





【結論】

CLP ラットモデルへのシトルリン投与は死亡率を低下させた。その一因として、Cit-NO cycle の酵素、特に eNOS の活性化の関与が考えられた。本研究の結果からシトルリンが敗血症の治療に有用であることが示唆された。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成26年 月 日 公表予定	出版物名 近畿大学医学誌 第39巻 第1号 平成26年 月 日 発行予定
	公 表 内 容	
	全 文	

博士学位論文審査結果の要旨

論文審査委員

主査	教授	竹山 宜典	
副主査	教授	宗像 浩	
副主査	教授	中尾 慎一	
副査	教授		
副査	教授		

学位申請者

氏名 木村 浩基

(医学研究科医学系臓器病態制御外科学Ⅱ)

博士の専攻分野 医学
の名称

学位授与の要件 学位規程第5条 第1項該当

学位論文題目

ラット敗血症モデルにおける Citrulline-NO cycle とシトルリン補充療法の有用性の検討

審査結果の要旨

一酸化窒素(NO)は endothelial nitric oxide synthase(eNOS)を触媒としてアルギニンからシトルリンとともに産生され、血管内皮の保護し微小循環保持に関与する。シトルリンはCitrulline-NO cycle(Cit-NO cycle)を経由してNO産生に関わっている。敗血症時には血管内皮障害による臓器灌流障害が惹起されるが、その機序は現段階で明らかではない点が多い。本論文では、敗血症モデルラットにシトルリンを投与すれば、NO産生が誘導・維持され、敗血症による臓器灌流障害の改善するとの仮説を立て、それを検証するとともに、Cit-NO cycleに関連した酵素の状態を解析した。

方法：

7~8週齢200~260gの雄性Sprague-Dawleyラットに中心静脈カテーテルを留置し、盲腸結紮穿刺を行った。維持輸液300ml/kg/dayを投与し、輸液に添加するアミノ酸により、①Cit群(シトルリン添加)、②Arg群(アルギニン添加)、③Ala群(アラニン添加)の3群を作成した。実験Ⅰでは処置後5日間の生存率を検討し、実験Ⅱでは処置後2日目の血漿アミノ酸分析と、肝、腎、回腸でのシトルリン代謝関連酵素の発現および組織学的検討を行った。

結果：

実験Ⅰ：生存率はCit群とAla群間では3日目以降、Cit群とArg

群間では4日目以降において有意にCit群が高かった。実験Ⅱ：血漿シトルリン値はCit群において他群と比較し有意に高値であり、血漿アルギニン値、アラニン値は3群間に差を認めなかった。肝組織において、Cit群はArg群、Ala群に比べてeNOSのmRNAの発現が有意に高値を示し、アルギニノコハク酸シターゼ(ASS)とアルギニノコハク酸リアーゼ(ASL)では高い傾向を示した。腎組織では3群に差はなかった。回腸におけるphospho-eNOSの免疫染色では、Cit群はAla群に比べ回腸粘膜固有層の血管での陽性細胞数が増加した。回腸のiNOSタンパク質合成はCit群で抑制され、またCit群はAla群に比べアポトーシス陽性細胞が有意に減少した。

考察：

実験Ⅰにおいて、敗血症時のシトルリン投与は死亡率を低下させたが、その一因として、実験Ⅱの結果より血管内皮などのeNOS系におけるCit-NO cycleにシトルリンが作用することで、敗血症時の微小循環障害の改善をもたらした可能性が考えられた。同じくCit-NO cycleに関連するアルギニンの投与では、敗血症におけるアルギナーゼ活性や内因性NOS阻害物質の影響で十分なNO産生がなされなかったと考えられた。

本研究によって、シトルリン投与が腹膜炎に起因する敗血症の有

効な治療法となり得る可能性が示された。さらに、その作用機序として Cit-NO cycle の酵素発現誘導を介した eNOS の活性化の関与が考えられ、敗血症治療における微小循環維持の有用性を示唆する結果を得た。以上のことより本論文は医学博士の学位に値する論文と判定した。