

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

Detection of chronic inflammatory states in cancer patients
and screening for antioxidant activity of plant extracts

申請者

Yoko	SUZUKI
鈴木	洋子

共同先進健康科学専攻 応用免疫学研究指導

2012年12月

【緒言】

炎症の発生に寄与する主たるメディエーターとして「活性酸素（reactive oxygen species：ROS）があげられる。生体内における ROS の産生は、主に好中球によって行われていることはよく知られている。また、担癌状態においてヒトの生体内では軽度の慢性炎症が全身的に持続していることが指摘されているが、癌患者における好中球の ROS の臨床病態生理学的意義は不明な点が多い。臨床現場では一般に好中球の検査は細胞数のみが測定され、活性酸素産生能や遊走能の機能評価は行われていない。その理由として、好中球は単離する手間がかかり、寿命が短く、培養することもできず、臨床検査法として好中球の機能測定法が普及しなかったことがあげられる。

鈴木研では、これまで好中球を単離する手間を必要とせず、全血で、簡便な操作法で好中球の活性酸素産生能と遊走能を同時に測定できるゲル法を検討してきた。若い健常者を中心とした測定結果から、発光のピーク値は測定開始から 45 分後に現れ、値はおおよそ 1000~3000 で、90 分後には収束した。これらの基礎検討から、臨床検査法への応用として、ピーク値を測定するため測定時間を 1 時間として国立国際医療研究センターで臨床への応用を試みた。結果は、炎症性疾患のサンプルでは発光のピーク値は 1 時間測定しても得られず、時間を延長して測定した結果、炎症性疾患の発光のピーク値は 2 時間~3 時間後に現れ、慢性炎症ではピーク値の遷延化が起こる傾向を見いだした。

そのような背景を踏まえ、本研究は、担癌患者のサンプルで好中球機能の臨床病態生理学的意義について検討を行い（研究課題 1）、同時に、癌患者から採取した血液への緑茶抽出物添加による好中球 ROS 産生への影響を調べることを目的とした（研究課題 2）。

研究課題 1

【材料・方法 1】

・血液サンプル

4 週間以上の無治療期間を設定した、手術不能、抗癌剤治療および放射線治療に抵抗性の悪性腫瘍患者 21 名、および健常な提供者(39 才・男性)の肘静脈からヘパリン採血管により 2ml 採取した。

・好中球活性酸素産生量の測定

氷冷してゾル状にした足場付き熱可逆ハイドロゲル (S-TGP) を 2ml チューブに 50 μ l ずつ分注し、ブロックインキュベータで加温し、S-TGP が完全にゲル化したところで、ルミノール溶液 (2.5mM/HBSS) を等量加えた末梢血サンプルを 150 μ l ずつ重層し、血液から S-TGP に遊走した好中球が産生する ROS を、ルミノール依存性化学発光法により 0 分から 30 分間隔で計 6 回 2.5 時間までルミノメーター

(GeneLight 55)を用いて経時的に測定することで評価した。

・好中球遊走数の測定

S-TGP 内に遊走した好中球数の測定は、ROS を測定した後、1.5 時間、2.5 時間の時点で行った。2 ml チューブ内の血液を加温した PBS で 3 回以上洗浄し、血液成分を完全に除いたことを確認した後、チューブを氷冷し、S-TGP をゾル化した後、核染色試薬を加え、遊走した好中球数を細胞計数装置(NucleoCounter, chemometer 社、デンマーク) でカウントした。

・統計処理

患者群と健常者間の有意差の検定には、マン・ホイットニーの U 検定とクラスカル・ウォリス検定を用い、統計ソフト StatView 5.0 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA)で行い、有意水準は危険率 $p < 0.05$ を有意とした。

【結果 1】

S-TGP 内に遊走した好中球の活性酸素産生量は、経時的な各測定ポイントにおいて、健常者より悪性腫瘍患者が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。ピーク値及び総発光量においても悪性腫瘍患者が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。遊走数については、健常者よりも悪性腫瘍患者の好中球数が多いため、高値を示す傾向が見られたが ($p = 0.0619$)、遊走率では有意差は認められなかった。遊走好中球 1 個あたりの総発光量は、健常者より悪性腫瘍患者が有意に高値を示した ($p < 0.001$)。

【考察 1】

全身性炎症状態が癌患者で確かめられることはよく知られており、これまでに担癌患者では末梢血中の白血球数と好中球数の増加、癌の進行に伴い白血球数に対する好中球の割合が大きくなることが報告されている。本研究で癌患者の好中球の機能について検討を行った結果、癌患者では好中球の活性酸素産生量が健常者に比して有意に亢進していた。これは、好中球数増加に伴う活性酸素産生量の増大とアポトーシスの遅延に加え、本来ならば、活性酸素から細胞を守るために備わっている抗酸化機構の破綻とによるものと推察される。抗酸化酵素は年齢とともに減少するが、癌の進行にともなってこれらの酵素が減少するという報告もあり、本研究で得られた結果を裏付けている。

研究課題 2

【材料・方法 2】

・血液サンプル

4 週間以上の無治療期間を設定した、手術不能、抗癌剤治療および放射線治療に抵抗性の悪性腫瘍患者 18 名の肘静脈からヘパリン採血管により 2ml 採取した。

・緑茶抽出物の調整

緑茶抽出物 (GREEN TEA PE, ビーエイチエヌ株式会社、東京) 粉末を最終濃度 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ (=HBSS) となるように、それぞれ HBSS で希釈した。

・好中球活性酸素産生量の測定

S-TGP を氷冷してゾル状にし、2ml チューブ (AXYGEN, フナコシ、東京) に $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 37°C に設定したブロックインキュベータで加温した。S-TGP が完全にゲル化した後、ルミノール液を等量加えた末梢血サンプルを $150 \mu\text{l}$ ずつ重層し、希釈した緑茶抽出物を濃度ごとに各チューブに $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し、0分から30分間隔で計6回2.5時間まで経時的にルミノール依存性化学発光の測定を行った。

・好中球遊走数の測定

S-TGP 内に遊走した好中球数の測定は、ROS 産生量を全て測定した後、2.5時間の時点で行った。2ml チューブ内の血液を、温めた PBS で3回以上洗浄し、血液成分を完全に除いたことを確認した後、チューブを氷冷し、S-TGP がゾル化したところで試薬を加え、遊走した好中球数を NucleoCounter で測定した。

・統計処理

各群間の有意差の検定はフリードマン検定を繰り返し、多重比較で行った。計算は統計ソフトウェア・パッケージ IBM SPSS Statistics ver. 19で行った。

【結果 2】

各測定時点における LmCL 値は、緑茶抽出物を添加した群 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$) において濃度依存的に抑制され、統計学的に有意であった ($p < 0.001$)。しかし、S-TGP に遊走した好中球数は、緑茶抽出物を加えることによって影響を受けることはなかった。また、好中球1個当たりの LmCL 値は濃度依存的に抑制され、統計学的に有意であった ($p < 0.001$)。

【考察 2】

癌患者より採取した血液に緑茶抽出物を添加したところ、ROS の産生を濃度依存的に有意に抑制する結果を得たことから、好中球の活性酸素産生量の増加もしくは抗酸化機構の破綻により、生体内に過剰に実在する ROS を消去するのに、緑茶抽出物が有用な可能性が示唆された。

【結論】

悪性腫瘍患者は、好中球の活性酸素産生機能の亢進とアポトーシスの遅延、抗酸化機構の破綻により、健常者と比較して好中球による酸化ストレスに曝されており、慢性炎症の状態にあることが示唆された。

また、緑茶は悪性腫瘍患者が曝されている慢性炎症状態を改善するのに有用である可能性が示唆された。

早稲田大学 博士 (生命科学) 学位申請 研究業績書

氏名 鈴木 洋子

(2013年2月現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
○ a 論文	Determination of Chronic Inflammatory States in Cancer Patients Using Assay of Reactive Oxygen Species Production by Neutrophils ANTICANCER RESEARCH 32: 565-570, 2012. YOKO SUZUKI, SATOSHI OHNO, RYUJI OKUYAMA, ATSUSHI ARUGA, MASAKAZU YAMAMOTO, SHIGEKI MIURA, HIROSHIYOSHIOKA, YUICHI MORI and KATSUHIKO SUZUKI
a. 論文	Effect of Green Tea Extract on Reactive Oxygen Species Produced by Neutrophils from Cancer Patients ANTICANCER RESEARCH 32: 2369-2376, 2012. KATSUHIKO SUZUKI, SATOSHI OHNO, YOKO SUZUKI, YUMIKO OHNO, RYUJI OKUYAMA, ATSUSHI ARUGA, MASAKAZU YAMAMOTO, KEN-O ISHIHARA, TSUTOMU NOZAKI, SHIGEKI MIURA, HIROSHI YOSHIOKA and YUICHI MORI
a. 論文	新規好中球機能検査法を応用した植物抽出物の機能性評価 Functional Assessment of Plant Extracts by Application of Novel Neutrophil Activity Measurement System 日本補完代替医療学会誌第9巻第2号 2012年9月 鈴木克彦、駒場裕太、泊美樹、鈴木洋子、菅間薫、高橋将記、三浦茂樹、吉岡 浩、森 有一
c. 学会発表	癌患者における好中球活性酸素種産生能に対する緑茶抽出物の影響 Effect of green tea extract on reactive oxygen species (ROS) produced by neutrophils in cancer patients 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月 Satoshi OHNO, Katsuhiko SUZUKI, Yoko SUZUKI, Yumiko OHNO, Ryuji OKUYAMA, Atsushi ARUGA, Masakazu YAMAMOTO, Ken-O ISHIHARA, Tsutomu NOZAKI, Shigeki MIURA, Hiroshi YOSHIOKA, Yuichi MORI
c. 学会発表	悪性腫瘍患者における酸化ストレスを指標とした慢性炎症の評価 第15回バイオ治療法研究会学術集会 2011年12月 鈴木洋子、大野智、奥山隆二、有賀淳、山本雅一、鈴木克彦
c. 学会発表	カイメン共生細菌由来メタゲノムライブラリーからの好中球活性化因子のスクリーニング 第64回日本生物工学会大会 2012年10月 岡村好子、鈴木克彦、鈴木洋子、竹山春子

早稲田大学 博士（生命科学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
c. 学会発表	<p>Screening for factors affecting the immune response from metagenome of sponge-associated bacteria International Union of Microbiological Societies 2011 Yoshiko Okamura, Katsuhiko Suzuki, Yoko Suzuki, Kiyotaka Hara, Haruko Takeyama</p>
c. 学会発表	<p>メタゲノムデータベースを利用した細菌性ペプチドのスクリーニング 第 63 回日本生物工学会大会 2011 年 9 月 岡村好子、鈴木克彦、鈴木洋子、原 清敬、竹山春子</p>
c. 学会発表	<p>ヒト白血球活性酸素種産生系を応用した各種植物抽出成分の作用解析・評価 Functional Analysis and Evaluation of Vegetables' Extracts by Application of Reactive Oxygen Species (ROS) Production by Human Leukocytes 第 11 回 日本補完代替医療学学術集会 2008 年 11 月 鈴木洋子、鈴木克彦、石原健夫、高下崇、佐藤裕子</p>
c. 学会発表	<p>ヒト白血球活性酸素種産生系を応用した各種物質作用のハイスループット解析・評価法 High-throughput Analysis System for Screening Materials' Actions by Application of Reactive Oxygen Species (ROS) production by Human Leukocytes 第 10 回 日本補完代替医療学学術集会 2007 年 11 月 鈴木洋子、鈴木克彦</p>
c. 学会発表	<p>Effect of Interferon beta on Survival for Murine Polymicrobial Sepsis American Thoracic Society International Conference, May, 2013 Yoshiomi Kusakabe, Kanji Uchida, Yoshiro Yamamura, Yoko Suzuki, Takahiro Hiruma, Yoshitsugu Yamada</p>
e. その他 (研究 報告書)	<p>好中球機能サイトカイン産生能からみた各種人工血小板素材の in vitro 評価. H12(ADP)リボゾームの人工血小板としての前臨床評価(効力と安全性). 平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業:政策創薬総合研究事業)分担研究報告書. 鈴木 克彦, 鈴木 洋子, 菅間 薫, 神田 和江, 沢田 秀司, 勝野 俊介, 武岡 真司</p>