

博士論文審査報告書

論文題目

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

癌患者における慢性炎症状態の検出および
植物抽出成分による抗酸化活性スクリーニング

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

2013年 2月

博士学位論文審査報告書

本博士学位論文は、好中球機能測定法を応用して癌患者における慢性炎症状態を検出し、さらに植物抽出成分による抗酸化活性のスクリーニングを試みたもので、既に発表済みの原著論文2報を中心に構成されている。

まず、本研究の背景となる基礎知識と臨床応用の必要性について説明している。すなわち、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、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を説明している。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性に持続していることが指摘されてきたが、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。実際に臨床現場では、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、寿命が短いため細胞培養もすることができず、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。

次に本研究で使用した方法論について、好中球を単離する手間を必要とせず、全血を用い簡便な操作法で好中球の ROS 産生能と遊走能を同時に測定できるハイドロゲルを用いた方法を適用したことについて説明している。まず若年健常者を中心とした基礎的検討から、ROS 産生反応のピーク値は測定開始から45分後に現れ、測定値はおよそ1000~3000 relative light unit (RLU) であった。これらの結果をふまえて、患者検体でも活性酸素産生反応のピーク値を測定するために当初は反応時間を1時間として臨床検査への応用を試みた。しかし炎症性疾患の患者検体では、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、炎症性疾患の患者検体では ROS 産生反応のピーク値は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生じる現象が観察された。

そこで本研究では、担癌患者の血液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(論文2)、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 産生反応への影響を調べることを目的とした(論文2)。論文1の対象は、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名と健常者(39才・男性)であり、肘静脈からヘパリン採血管により2ml採取した。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(Gene Light 55)を用いて経時的に測定することで評価した。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。2ml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。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、有意水準は危険率 $p < 0.05$ を有意とした。ルミノール依存性化学発光量によって測定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全てにおいて健常者より悪性腫瘍患者が高値を示した ($p < 0.05$)。遊走数については、健常者より悪性腫瘍患者が高値を示す傾向を認めたが、統計学的有意差は認められなかった。

論文 2 では、同様に悪性腫瘍患者 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 (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。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。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。2 ml 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。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。その結果、各測定時点における ROS 産生量は、緑茶抽出物を添加した群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 ($p < 0.001$)。

以上の結果を踏まえ、考察がなされている。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いるが、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。本研究では癌患者の好中球の機能についてさらに検討を行った。その結果、癌患者では好中球の活性酸素産生量が健常者と比較して有意に亢進していた。これは、好中球による活性酸素産生量が増加していることに加え、本来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も考えられる。事実、抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼは年齢とともに減少するとともに、担癌患者において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る。また、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。この結果から、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。

以上のように、本研究によって悪性腫瘍患者は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。これら新知見の提示は癌患者の慢性炎症状態の評価や介入に関する議論の活発化を促し、臨床検査医学や補完代替医療への応用性は高いと判断し、博士（生命科学）の学位を授与するに値するものと認める。

2013 年 2 月

論文審査員

主査 早稲田大学准教授 鈴木克彦 博士（医学）弘前大学
副査 東京農工大学教授 田中剛 博士（工学）東京農工大
副査 早稲田大学教授 柴田重信 薬学博士（九州大学）
副査 早稲田大学教授 竹山春子 博士（工学）東京農工大
副査 早稲田大学 研究院客員准教授 大野智 博士（医学）島根医科大学