Zinc and magnesium ions synergistically inhibit superoxide generation by cultured human neutrophils?a promising candidate formulation for amnioinfusion fluid

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2011-08-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内田, 季之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2551

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第　４８５号	学位授与年月日	平成２３年　３月　９日
氏　　名	内　田　季　之		
論文題目	Zinc and magnesium ions synergistically inhibit superoxide generation by cultured human neutrophils－a promising candidate formulation for amnioinfusion fluid （亜鉛イオンとマグネシウムイオンは培養ヒト好中球のスーパーオキサイド産生を相乗的に抑制する －人工羊水組成の有望な候補）		

博士（医学）　　内 田 季 之

論文題目

Zinc and magnesium ions synergistically inhibit superoxide generation by cultured human neutrophils－a promising candidate formulation for amnioinfusion fluid（亜鉛イオンとマグネシウムイオンは培養ヒト好中球のスーパーオキサイド産生を相乗的に抑制する –人工羊水組成の有望な候補）

論文の内容の要旨

[はじめに]

妊娠子宮は天然の細胞増殖環境であり、その中で胎児は羊水に浮遊しながら発育、発達する。羊水は外部の衝撃から胎児を保護し、その抗炎症作用により子宮内感染を防いでいる。陣痛発来前に羊水を包む卵膜が破綻することを前期破水と呼ぶ。妊娠満期に達する以前の妊娠中期に前期破水を来し羊水が流出して羊水過少症となった場合、腟からの上行性感染による絨毛膜羊膜炎あるいは物理的な臍帯の圧迫などにより、出生後の児の予後に少なからず悪影響をおよぼすことが周産期臨床において重大な問題となっている。このような妊娠中期に前期破水を来した症例に対して生理食塩水を用いた人工羊水補充療法が行われてきた。しかし、その臨床的効果、とりわけ児の予後の改善に関して報告が分かれ未だコンセンサスが得られていない。

申請者は、前期破水後の羊水過少例において胎児臓器に障害を来す原因として絨毛膜羊膜炎による酸化ストレスが重要な役割を担うという諸家の報告に着目した。ヒトの羊水には、亜鉛、マグネシウム、鉄といった微量金属を含んでおりこれらは抗酸化ストレス作用があることが知られている。そこで、人工羊水補充療法の際に生理食塩水に微量金属である亜鉛とマグネシウムを含有させることで酸化ストレスを軽減させ、その結果、胎児臓器を保護して新生児予後を改善させうるという仮説を立てた。生理食塩水に添加する亜鉛及びマグネシウム至適濃度を検討すべく基礎的な研究を行った。

[対象と方法]

好中球からのスーパーオキサイド産生を抑制する効果により、抗酸化ストレス作用を評価した。また、同意の下、健常者から採血を行い、Ficoll-Hypaque 液を用いて、ヒト好中球を分離した。さらに、ヒト単球性白血病細胞株(THP-1)も用いた。formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)を投与しスーパーオキサイドを発生させ化学発光にて測定した。生理食塩水（N=3）、ヒト羊水（妊娠 37-41 週：N=8）、亜鉛(1-10 μM）、マグネシウム(1-10 mM）、亜鉛(1-10 μM）＋マグネシウム(5-20 mM）混合液を添加した生理食塩水にて incubation した際に発生したスーパーオキサイド総量（N=3）を測定した。細胞を用いない系としてヒポキサンチンにキサンチンオキシダーゼを加えてスーパーオキサイドを産生させ、亜鉛(1-10 μM)、マグネシウム(5-20 mM）溶液を添加し検討を行った。

7-8 週 Wistar/ST ラットに Lipopolysaccharide(LPS）を腹腔内投与(6.25 mg/kg、3 時間間隔で 2 回投与）した腹膜炎動物モデルを調製し、生理食塩水(N=20）、亜鉛(5 μM)＋マグネシウム(5 mM)混合液（N=15）、亜鉛（5 μM; N=11）、マグネシウム（5 mM; N=10）を腹腔内投与（3 時間間隔で 2 回投与）し、初回投与から 24 時間後の生存率を比較した。ヒト羊水、金属イオンの相対的スーパーオキサイド抑制能は Welch’s t-test、亜鉛＋マグネシウム混合液の相乗作用は post-hoc test、動物実験の各群との生存率比較は Fisher’s (2-tailed) exact test を用いて P-value にて 0.05 未満を有意差

ありと判定した。
[結果]
ヒト羊水、亜鉛(1-10 μM)、マグネシウム(5-20 mM)は、ヒト好中球からのスーパーオキサイド産生を濃度依存的に有意に抑制した。亜鉛(1-10 μM)＋マグネシウム(5-20 mM)混合液は相乗的にスーパーオキサイド産生を抑制し、亜鉛(5 μM)とマグネシウム(5 mM)が至適であると結論した。THP-1 細胞においても同様の結果を得た。一方、キサンチンオキシダーゼによって発生したスーパーオキサイドは、亜鉛、マグネシウムによって抑制されなかった。
ラット腹膜炎モデルにおいて、生理食塩水投与群、亜鉛(5 μM)投与群、マグネシウム(5 mM)投与群、亜鉛(5 μM)＋マグネシウム(5 mM)投与群の生存率はそれぞれ 10%、27.3%、0%、46.7%であり亜鉛＋マグネシウム投与群は生理食塩水投与群と比較し有意に高い生存率を示した($P<0.05$)。
[考察]
前期破水において好中球が遊走、活性化され絨毛膜羊膜炎を引き起こす。活性化された好中球に由来する酸化ストレスにより胎児臓器が種々の障害を被ると考えられている。亜鉛(5 μM)、マグネシウム(5 mM)の混合液が相乗的に活性化好中球に対して抗酸化作用を示した。従来人工羊水補充療法に用いられてきた生理的食塩水は全く抗酸化ストレス作用を有しなかった。一方、キサンチンオキシダーゼによって発生したスーパーオキサイドは、亜鉛、マグネシウムでは抑制されなかった。このことは、亜鉛、マグネシウムが細胞膜あるいは細胞内情報伝達系に作用しスーパーオキサイドの産生を抑制していることが考えられた。実際、この亜鉛(5 μM)＋マグネシウム(5 mM)添加生理食塩水は生理食塩水と比較して有意にラット腹膜炎動物モデルの生存率を改善させた。
[結論]
人工羊水注入療法において亜鉛(5 μM)とマグネシウム(5 mM)を含んだ生理食塩水を用いることで胎児の酸化ストレスを軽減できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

妊娠中期に前期破水を来し羊水過少症となった場合、生理食塩水を用いた人工羊水注入療法を行なうが、絨毛膜羊膜炎を引き起こす可能性が高く、炎症に伴う酸化ストレスにより胎児臓器が種々の障害を被ると考えられている。
申請者は、亜鉛、マグネシウムといった微量金属に抗酸化ストレス作用のあることに気付き、生理食塩水に亜鉛とマグネシウムを含有させることで酸化ストレスを軽減させる効果を以下の二通りの方法で評価した。①健常成人女性から同意後採血し分離したヒト好中球、ヒト単球性白血病細胞株(THP-1)から Dibutyry1 adenosine cyclic monophosphate(Bt2-cAMP)を用い分化誘導させて作成した好中球様細胞、キサンチンオキシダーゼを用いて、それぞれから発生させたスーパーオキサイドの量で酸化ストレスの軽減率を測定。②リポ多糖(LPS) のラット腹腔内投与により作成した腹膜炎動物モデルでの生存率を測定。
本研究より申請者は以下の結果を得た。(1)亜鉛(1-10 μM)、マグネシウム(5-20 mM)は、2 種類のヒト好中球からのスーパーオキサイド産生を濃度依存的に有意に抑制した。(2)亜鉛(1-10 μM)+マグネシウム(5-20 mM)混合液は相乗的に 2 種類のヒト好中球からのスーパーオキサイド産

生を抑制し、亜鉛(5 μM)とマグネシウム(5mM)の混合液が至適であると結論した。(3)キサンチンオキシダーゼによって発生したスーパーオキサイドは、亜鉛、マグネシウムによって抑制されなかった。(4)ラット腹膜炎モデルにおいて、生理食塩水投与群、亜鉛 (5 μM)投与群、マグネシウム(5mM)投与群、亜鉛(5μM)＋マグネシウム(5mM)投与群の生存率はそれぞれ 10%、27.3%、0%、46.7%であり亜鉛＋マグネシウム投与群は生理食塩水投与群と比較し有意に高い生存率を示した($P< 0.05$)。

本研究で示された、亜鉛(5μM)とマグネシウム(5mM)を含んだ生理食塩水の抗酸化ストレス作用から、胎児の酸化ストレスを軽減できる新たな人工羊水注入療法として期待できることを審査委員会では高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位授与にふさわしいと、審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　　堀内　健太郎
副査　　大西　一功　　副査　　上里　忠良