

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 林 莉萱

アスピリンは代表的な非ステロイド系抗炎症薬で、鎮痛薬として広く用いられてきたが、消化器に対する重篤な副作用が現在でも問題となっている。胃粘膜を保護するプロスタグランジン(PG)の産生が、シクロオキシゲナーゼ(COX)抑制を通じて減少することが、消化器障害の原因だと考えられてきたが、近年、直接刺激や炎症メディエーターの影響、微小循環の関連などの別経路も原因と考えられるようになった。

消化器障害を減少させるために、粘膜保護剤の併用や COX-2 選択的阻害 NSAIDs の開発などが行われてきたが、いまだ十分ではない。最近では、一酸化窒素や硫化水素などの低分子物質を NSAIDs に結合させて、粘膜保護効果を発揮させる方法が注目されている。

トレハロースは、天然の二糖類で食品添加物などに使用されているが、近年、抗炎症効果や細胞保護効果を持つことが見いだされた。すなわち細胞に対する酸化障害を防ぎ、炎症性サイトカインの産生を防止し、アポトーシスを抑制することが示され、さまざまな疾患の治療薬として期待されている。

今回の実験では、トレハロースとアスピリンの組み合わせにより、アスピリン誘発性胃潰瘍を減少できるかどうかを検討した。なおトレハロースとアスピリンは、単なる混合物と凍結乾燥品の二つを比較した。

第1章ではトレハロースとアスピリンが胃粘膜細胞に与える影響を *in vitro* で検討した。ヒト胃粘膜細胞株(AGS)にアスピリン(A)、凍結乾燥アスピリン(LyoA)、アスピリンとトレハロースの混合物(MixA/T)、アスピリンとトレハロースの凍結乾燥品(LyoA/T)の4種類の物質をアスピリン相当量 1~10mM の濃度にして加えた。24 時間の培養後に、MTT 法で評価したところ、LyoA/T は他の3物質に比べ、低い細胞毒性を示した。また DNA 断片化アッセイでは A、LyoA、MixA/T が 10mM 濃度で DNA 断片化を示したのに対し、LyoA/T では断片化は現れなかった。また TUNEL 法でも LyoA/T では他の3物質に比べ、アポトーシスが明らかに少なかった。以上の結果から、LyoA/T は *in vitro* では A、LyoA、MixA/T にくらべ、細胞毒性が少なく、アポトーシス誘導能も低いことが示された。

第2章ではアスピリンとトレハロースの効果を、ラットを用いた急性胃潰瘍モデルを用いて検証した。ラットを4群にわけ、対照群(カルボキシメチルセルロース投与)、A、MixA/T、LyoA/T (いずれもアスピリン相当量 200mg/kg) を設定した。各薬剤の投与5時間後に安楽殺し、胃を採取した。

肉眼的及び病理組織学的評価では LyoA/T での胃粘膜障害は明らかに他の3群よりも軽度であった。*in situ* TUNEL アッセイおよび cleaved capase-3 の免疫組織学的検索でも LyoA/T におけるアポトーシスは他の3群よりも有意に減少していた。一方、胃粘膜細胞の

PGE<sub>2</sub>濃度はA、MixA/T、LyoA/Tの3群すべてで、対照群に対して有意に抑制されており、LyoA/TでもアスピリンのCOX抑制効果は保たれているものと考えられた。しかしながら4種の炎症性サイトカイン（IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1)のmRNA発現量は、すべての群で有意な差は認められず、トレハロースが炎症性サイトカインを抑制している所見は得られなかった。

以上の結果より、ラット *in vivo* モデルにおいても、LyoA/T はアスピリン作用を維持しながら、胃粘膜障害を有意に減少させることが示され、またその理由としては、炎症性サイトカイン産生抑制よりもアポトーシス抑制が主たる経路であると推測された。

第3章ではより大型動物である犬を用い、4週間にわたる長期投与を行った。健康なビーグル犬を対照群、A群、LyoA/T群の3つにわけ、アスピリン25mg/kg相当量を1日2回、28日間連続で投与した。投与前、投与5、14、28日目に内視鏡検査を行い、胃粘膜障害の程度をLanzaスケールにて評価した。A群の胃粘膜障害スコアは、5日後には急激に増加し14日後も有意な増加を維持したのに対し、LyoA/T群では実験期間を通じてほとんど上昇は認められなかった。また薬剤投与後24時間にわたる経時的な採血を行い、血中サリチル酸濃度を液体クロマトグラフィーで測定したところ、A群、LyoA/T群ともにほぼ同様のカーブを示し、有効血中濃度に到達した。以上の結果より、犬を用いた *in vivo* の検討でも、LyoA/T はアスピリンとしての薬効を維持しながら、胃粘膜障害を大幅に抑制する可能性が示された。

これらの結果を総合すると、アスピリンとトレハロースの凍結乾燥品は、胃粘膜障害を大幅に減少させた新しいNSAIDsとして、有用である可能性が示唆された。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）論文として価値あるものと認めた。