

学位論文要旨

チロソールのぶどう膜炎発症眼における血液房水関門に対する
保護作用

Protective effect of Tyrosol on breakdown of blood-aqueous
barrier in uveitic eyes

北里大学大学院獣医学系研究科
獣医学専攻 博士課程

佐藤 和昭

Kazuaki SATO

指導教授 金井 一享

ぶどう膜炎は眼内組織における炎症性疾患の総称であり、ヒトを含む様々な動物種において視覚喪失の原因の上位に入る重要な眼科疾患である。ぶどう膜炎の原因は、感染性、免疫介在性、外傷性、腫瘍関連、特発性など多岐にわたるが、いずれの原因にも共通する病態として、血液房水関門（BAB）の破綻が挙げられる。BABの崩壊に伴い眼房水中への蛋白質漏出や炎症細胞の浸潤が起こることで、眼内での炎症反応が誘起される。

現在のぶどう膜炎治療としては、一般的な抗炎症薬（コルチコステロイド、非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs））や免疫抑制剤、一部の分子標的薬が利用可能となっている。しかし、これらの治療法には副作用や治療適応の制限などの問題が存在し、治療を断念するケースが少なくない。そこで、これらに代わる安全かつ広範なぶどう膜炎に有効な新規治療薬の開発が求められている。近年、天然由来の抗酸化物質による様々な生物学的活性が注目を集めており、その一部で抗炎症効果を示すものも報告されている。著者は、植物性食品に多く含有されるチロソールを候補物質とし、BAB破綻の要因となる炎症性メディエーターに焦点を当て、ぶどう膜炎に対する有効性評価を行った。

第1章 チロソールのマウスマクロファージ細胞株における 抗炎症効果および機序の検証

リポ多糖類（LPS）刺激マウス由来株化マクロファージ RAW264.7 細胞における、チロソールの抗炎症作用を検証した。チロソール処置（10、50、100 μ M）は、LPS感作24時間前から開始した。チロソール前処置は、LPS感作24時間後における培

養液中の腫瘍壊死因子 (TNF)- α 、プロスタグランジン (PG)E₂、一酸化窒素 (NO) の顕著な産生を濃度依存的に抑制した。またチロソールは、PGE₂ および NO の生合成に関与する酵素、シクロオキシゲナーゼ (COX)-2 および誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の細胞内発現量を濃度依存的に減少させた。これらの炎症関連蛋白質の遺伝子発現には転写因子の活性化が必須であり、その中心的役割を担う転写因子の一つが Nuclear factor (NF)- κ B である。LPS 感作 30 分後の RAW264.7 細胞において、チロソール前処置は活性化 NF- κ B 活性化の細胞質内から核内への局在変化を抑制した。本研究より、チロソールは BAB 破綻の要因となるメディエーターの産生を減少させたことから、ぶどう膜炎抑制効果を有する可能性が考えられた。また、その機序には NF- κ B の活性阻害が関与することが示唆された。

第 2 章 チロソールのラットエンドトキシン誘発性ぶどう膜炎モデルにおける BAB 保護作用および機序の検証

Lewis ラット (オス、7 週齢、170-180 g) への LPS 皮下接種により重度の急性前部ぶどう膜炎 (Endotoxin-induced uveitis; EIU) を誘起し、チロソールのぶどう膜炎抑制効果を検証した。チロソール投与 (10、50、100 mg/kg) は、LPS 接種 2 時間前、接種直後、接種 2 時間後の計 3 回、静脈内投与とした。チロソール前投与は、LPS 接種 24 時間後における EIU の臨床症状、眼房水中の蛋白質濃度と浸潤細胞数の増加、および前眼部の病理所見のスコアをいずれも用量依存的に改善し、100 mg/kg の用量では陽性コントロールとして使用したプレドニゾロン (1 mg/kg) と

同等の有意な効果を示した。また、チロソールは眼房水中の各種炎症性メディエーター濃度を用量依存的に減少させ、100 mg/kgの用量では COX-2 および iNOS の虹彩毛様体 (ICB) における発現を減少させた。LPS 接種 3 時間後の ICB において、チロソール前投与は NF- κ B の核内移行およびその制御因子である Inhibitor of κ B- α の分解を抑制した。本研究より、チロソールは各種メディエーターの産生抑制により BAB 破綻を大きく軽減させ、非特異的な重度ぶどう膜炎である EIU を抑制することが示された。そしてその機序には、ICB における NF- κ B の活性阻害が関与している可能性が示唆された。

第 3 章 チロソールのイヌ前房穿刺誘発性ぶどう膜炎モデル における BAB 保護作用の検証

本章では EIU モデルとは異なる外科的手技 (前房穿刺: ACP) により一過性のぶどう膜炎を誘導し、チロソールによる抑制効果を検証した。本研究では、チロソールによる BAB 破綻抑制効果の検証に先立ち、本モデルの基礎的データの収集を行った。BAB 破綻は、ビーグル犬 (オスおよびメス、4-6 歳齢、8.5-11.7 kg) に対して 27G 注射針を用いた ACP (採取眼房水量 0.5 mL) により誘起された。チロソール投与 (100、200、400 mg/kg) は、ACP の 2 日前から開始し、1 日 2 回 (計 5 回) の経口投与とした。本モデルにおける BAB 破綻および臨床症状の経時的変化を検証したところ、BAB 破綻は 60 分でピークを示し、臨床症状も 60 分あるいはより早期に著しい変化が観察された。この結果を踏まえ、ACP 後 60 分における眼房水中の各種炎症性メディエーターを測

定したところ、PGE₂のみが著しい上昇を示し、他の炎症性メディエーターは産生増加がみられないことが明らかとなった。200 mg/kg および 400 mg/kg のチロソール前投与は、ACP 後 60 分における眼房水中の蛋白質濃度および PGE₂ 濃度を有意に減少させ、これらの効果はカルプロフェン (2.2 mg/kg) と同等であった。また、最大用量である 400 mg/kg のチロソールは、PGE₂ 関連と考えられるぶどう膜炎症状をカルプロフェンと同程度に軽減させた。本研究より、ACP による早期の BAB 破綻は常在型の PGE₂ 合成酵素群が関与する即時的な PGE₂ 産生に起因することが推察され、チロソールによる本モデルにおける BAB 破綻軽減はこの系の抑制によるものと考えられた。

第 1 章および第 2 章より、天然由来抗酸化物質の一種であるチロソールは、眼局所における各種炎症性メディエーターの過剰産生を抑制することで、BAB 破綻を軽減したと考えられた。そしてその機序は、ICB における NF- κ B の活性阻害が強く関与した可能性が示唆された。第 3 章では、初めて天然由来成分によるイヌの前部ぶどう膜炎に対する有効性が示された。また、チロソールは細胞質常在型 PGE₂ 合成酵素群の阻害効果も有することが示唆され、この機序が ACP 誘発性 BAB 破綻の軽減に寄与したと考えられた。本研究全体を通して、チロソールによる副作用は観察されなかった。以上より、チロソールはぶどう膜炎の共通病態である BAB 破綻に対して保護効果を示すことが明らかとなり、ぶどう膜炎治療において既存薬剤に代わる、あるいは補助的な治療戦略として有望であると考えられた。