

氏名（本籍）	豊澤逸生（東京都）		
学位の種類	博士（獣医）		
学位記番号	獣医博乙第67号		
学位授与年月日	平成17年3月14日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	ビタミンB2による敗血症治療の基礎的研究		
審査委員	主査	東京農工大学 教授	小久江 栄 一
	副査	帯広畜産大学 教授	西村 昌 数
	副査	岩手大学 教授	内藤 善 久
	副査	東京農工大学 教授	田谷 一 善
	副査	岐阜大学 教授	小森 成 一

論文の内容の要旨

敗血症は、感染や外傷等が原因で細菌が宿主体内に侵入し、過剰な生体反応の結果種々の臨床症状が起こり高い死亡率を呈する重篤な疾病である。この疾病については抗生物質療法や集中治療医学の進歩にもかかわらず、未だ的確な治療法の確立されていない。申請者は、敗血症ショック時に生体内でのサイトカインなどの活動がビタミンB2により抑制されることに注目し、高純度ビタミンB2（以下VB2）の大量注射投与による敗血症治療法の開発を考え、種々の検討を加えた。

まずマウスを用い、細菌感染モデル及びトキシンショックモデルに対するVB2の効果を検討した。グラム陰性菌 (*Escherichia coli*) または、グラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus*) の敗血症モデルに対して検討した。感染1時間後からのビタミンB2を静脈内へ6時間持続注入した場合、コントロール（生理食塩液投与）群は全例死亡したが、VB2の20 mg/kg/6hrの投与により生存率55% (*E. coli*)、あるいは80 mg/kg/6hrの投与により生存率60% (*S. aureus*) と、いずれの菌においてもマウスの生存率は有意に増加した。トキシンショックモデルでは、致死量の大腸菌由来LPS、あるいは *S. aureus* 由来外毒素 (SEB) をマウスの静脈内に投与し、その6時間後にVB2を単回静脈内投与した。その結果、LPSによる致死モデルではコントロール群の生存率は10%であったが、VB2の20 mg/kg投与により95%の生存率を示した。SEBによる致死モデルではコントロール群は全例死亡したが、20 mg/kg/投与によりVB2投与群では43%の生存率を示し、いずれのトキシンモデルにおいてもマウスの生存率は有意に増加した。この細菌ショック、トキシンショックに対するVB2の生存率向上効果は、現在世界で唯一承認されているショック治療薬である h-APC (human activated protein C) の効果をはるかに上回るものであった。

申請者はまた、VB2の敗血症治療の作用機序について、①大腸菌感染モデルマウスを用い細菌感染時の血中菌数の推移で検討しVB2は動物の血中からの菌排除能力を高めること、②LPS

トキシンショックモデルを用いて炎症性サイトカイン(TNF α 、IL- β 、IL-6 など)、一酸化窒素、乳酸への作用を検討し、VB2 がこれらを有意に低下させることを実証した。③さらに *in vitro* において、マウス腹腔内マクロファージを LPS 暴露により刺激し培養液中に放出されるサイトカイン類と乳酸の量を測定したところ、LPS により過剰に生産されたこれらの物質が VB2 により減少すること、グルコース消費を現象させることを観察した。このことは VB2 がマクロファージを正常化する役割を果たしていることを意味すると考察した。

敗血症性ショックの多くは、グラム陰性菌内毒素あるいはグラム陽性菌外毒素によって惹起されるが、これらのショックに対して従来は有効な治療法は確立されていなかった。本研究で明らかになった VB2 のような、毒素によって誘起された種々の炎症性サイトカインを抑制し、同時に病原菌を生体から排除するといった考え方はこれまでになかった。以上のように本研究は敗血症治療に新たな戦略を提案したものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

敗血症は、細菌およびその有害成分が動物体内に侵入することにより起こる過剰な生体反応により起こる。死亡率は高く、その発症/進展はコントロールし難く、未だ的確な治療法の確立されていない病態である。申請者はビタミン B2 が敗血症時に出現する炎症性サイトカインなどの生体内活性物質を抑制する事実ヒントを得て、注射投与可能な高純度ビタミン B2 による敗血症治療についてマウス病態モデル動物を用いて検討した。その結果、作用機序についての基礎知見を得ることができ、新たな治療法を提言できる薬効を証明できたので、それらの一連の研究内容を学位論文としてまとめた。

まず、致死性の大腸菌、黄色ブドウ球菌をマウスに全身投与して敗血症病態モデルを作製し、このモデルに対する生存率上昇を指標に高純度ビタミン B2 の薬効を検討した。その結果、大腸菌モデルと黄色ブドウ球菌モデルについて、静脈内投与で有意な生存率増加効果を確認した。また、ショックの原因である大腸菌由来 LPS と黄色ブドウ球菌由来菌体外毒素を投与した場合のマウスの病態に対しても、ビタミン B2 の静脈内投与が高率な治療効果を発揮することを実証した。この薬効は現在唯一の敗血症治療薬としての承認が得られている h-APC (human activated protein C) と比較して、それを凌駕するものであった。

申請者はさらに高純度ビタミン B2 の敗血症治療作用の機序について、大腸菌感染モデルマウスを用い細菌感染時の血中菌数の推移で検討しビタミン B2 は動物の血中からの菌排除能力を高めること、LPS トキシンショックモデルを用いて炎症性サイトカイン(TNF α 、IL- β 、IL-6 など)、一酸化窒素、乳酸への作用を検討しビタミン B2 がこれらを有意に低下させることを実証した。さらに *in vitro* において、マウス腹腔内マクロファージを LPS 暴露により刺激し培養液中に放出されるサイトカイン類と乳酸の量を測定したところ、LPS により過剰に生産されたこれらの物質がビタミン B2 により減少することを観察した。このことはビタミン B2 がマクロファージを正常化する役割を果たしていることを意味すると考察した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目: Highly purified vitamin B2 presents a promising therapeutic strategy for sepsis and septic shock
著 者 名 : Toyosawa, T., Suzuki, M., Kodama, K. and Araki, S.
学術雑誌名: Infection and Immunity
巻・号・頁・発行年: 72 (3): 1820-1823, 2004
- 2) 題 目: Effects of intravenous infusion of highly purified vitamin B2 on lipopolysaccharide-induced shock and bacterial infection in mice
著 者 名 : Toyosawa, T., Suzuki, M., Kodama, K. and Araki, S.
学術雑誌名: European Journal of Pharmacology
巻・号・頁・発行年: 492 (2-3): 273-280, 2004

3) 題 目: Potentiation by amino acid of the therapeutic effect of highly purified vitamin B2 in mice with lipopolysaccharide-induced shock
著者名: Toyosawa, T., Suzuki, M., Kodama, K. and Araki, S.
学術雑誌名: European Journal of Pharmacology
巻・号・頁・発行年: 493 (1-3): 177-182, 2004

既発表学術論文

- 1) 題 目: Azthreonam(SQ26,776)、新単環性 β -ラクタム抗生物質の *in vitro* および *in vivo* 抗菌作用について
著者名: 紀藤恭輔、勝鎌政、佐藤勝、杉原芳樹、渡辺直彰、豊沢逸生、森山めぐみ
学術雑誌名: 日本化学療法学会雑誌
巻・号・頁・発行年: 33(S-1) 87-114, 1985
- 2) 題 目: Prophylactic activity of dihydroheptaprenol, a synthetic polyprenol derivative, against Sendai virus infection in mice
著者名: Iida, J., Ishihara, C., Mizukoshi, N., Kitoh, K., Tsukidate, K., Katsu, K., Toyosawa, T. and Azuma, I.
学術雑誌名: Vaccine
巻・号・頁・発行年: 8 (4) 376-380, 1990
- 3) 題 目: ラットのアルコール代謝系に対する新規抗生物質 Cefclidin 及び E1077 の影響
著者名: 渡辺直彰、浅川直樹、豊澤逸生、比留間良一、畑桂、上野純子、勝鎌政、吉田豊
学術雑誌名: THE JAPANESE JOURNAL OF ANTIBIOTICS
巻・号・頁・発行年: 45 (4) 364-370, 1992
- 4) 題 目: 新規注射用セファロスポリン cefclidin の *in vivo* 抗菌作用
著者名: 豊澤逸生、佐藤勝、杉原芳樹、比留間良一、畑桂、森山めぐみ、勝鎌政、紀藤恭輔
学術雑誌名: 日本化学療法学会雑誌
巻・号・頁・発行年: 40 (S-4) 73-80, 1992
- 5) 題 目: *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of E1077, a novel parenteral cephalosporin
著者名: Toyosawa, T., Miyazaki, S., Tsuji, A., Yamaguchi, K. and Goto, S.
学術雑誌名: Antimicrobial Agents and Chemotherapy
巻・号・頁・発行年: 37 (1) 60-66, 1993
- 6) 題 目: 易感染マウスにおける緑膿菌経鼻感染モデルに対する cefclidin の防御効果
著者名: 豊澤逸生、畑桂、上野純子、森山めぐみ、勝鎌政
学術雑誌名: 日本化学療法学会雑誌
巻・号・頁・発行年: 42 (11) 1242-1246, 1994
- 7) 題 目: Efficacy of ER-30346, a novel oral triazole antifungal agent, in experimental models of aspergillosis, candidiasis, and cryptococcosis
著者名: Hata, K., Kimura, J., Miki, H., Toyosawa, T., Moriyama, M. and Katsu, K.
学術雑誌名: Antimicrobial Agents and Chemotherapy
巻・号・頁・発行年: 40 (10) 2243-2247, 1996
- 8) 題 目: *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of ER-30346, a novel oral triazole with a broad antifungal spectrum
著者名: Hata, K., Kimura, J., Miki, H., Toyosawa, T., Nakamura, T. and Katsu, K.
学術雑誌名: Antimicrobial Agents and Chemotherapy
巻・号・頁・発行年: 40 (10) 2237-2242, 1996