

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐藤寛子

PHZ は、医薬品、農薬等の化学的中間体として世界中で使用されている有機化合物で、ヒトを含む動物において赤血球を酸化的に傷害することに起因した溶血を引き起こすことが知られている。PHZ の毒性としては、この溶血に付随する種々の血液学的・組織学的変化が報告されている。例えば、赤血球数やヘモグロビンの低値、脾臓の腫大、諸臓器における赤血球貪食像や褐色色素沈着などの所見である。一方、血栓症の発生については、赤血球増多症治療の目的で投与されたヒトの副作用としてわずかに報告があるのみで、実験データとして利用できる情報は少なくその発生機序については不明である。

申請者は、PHZ をラットに短期間投与することにより、肺に急性の血栓症が誘発されることを発見した。この肺血栓症の病理発生メカニズムを明らかにするため、PHZ 投与ラットの血液学的・組織学的変化を検索するとともに、遺伝子発現解析を用いて生物学的機能への影響について研究を行った。

本論文は序文を第 1 章とし、得られた成績は以下の 3 章にまとめたものである。

1. Phenylhydrazine 投与ラットに認められた急性肺血栓症および主要臓器の病変（第 2 章）

血液・造血毒性の組織学的変化を整理する目的で、若齢の雄の SD ラットに PHZ を短期反復腹腔内投与し、主要臓器の病理解剖学的検査、病理組織学的検査を実施した。病理解剖学的検査において、肺は全葉が赤色～暗調を呈し、白色斑が散在していた。組織検査においては白色斑と一致してフィブリン血栓が肺胞毛細血管内に形成されていた。

その他に検査を実施した肝臓、腎臓、心臓、脾臓では溶血に関連すると考えられる赤血球貪食像、髄外造血亢進、褐色色素沈着が認められた。また、死亡例を中心に、心臓の左心耳内に血栓が認められた。しかしながら、微小血栓の形成は肺以外の臓器には認められず、PHZ が肺毛細血管に特異的に急性血栓症を引き起こすことがわかった。

2. Phenylhydrazine 投与ラットの経時的な血液学的・病理組織学的変化（第 3 章）

PHZ 腹腔内投与ラットに認められた急性肺血栓症の病態発生メカニズムを解析するため、経時的に血液学的検査、病理組織学的検査を実施した。その結果、貧血以外に最も早期かつ血栓形成に先んじて認められたのは肺胞毛細血管内のうっ血（変形赤血球の集積）であった。また、組織学的に血栓が広範囲に

認められた時点において、血液凝固系パラメータの異常、限局的な血管内皮細胞の傷害が確認された。これらを一般的な血栓形成の要因とされる 1)血管内皮傷害、2)血流障害（うっ血、乱流）、3)血液の凝固性亢進に照らし合わせると、2)の血流障害が病態発生に重要な役割を果たしているほか、1)の血管内皮傷害、3)の血液凝固亢進が病態の悪化に関わっていると考えられた。

3. Phenylhydrazine 投与ラットの肺における経時的な遺伝子発現解析(第4章)

前章では PHZ 腹腔内投与ラットにおける急性肺血栓症の病態悪化に血管内皮細胞の傷害が関与していることが明らかとなったが、血管内皮細胞の機能障害については未明である。そこで申請者は、PHZ 投与ラットの肺において、血管内皮細胞に発現する既知の血栓症関連遺伝子の発現変動を確認した。また、網羅的遺伝子解析および Gene ontology 解析により、血栓症の病態発生をより詳細に理解することを試みた。その結果、我々が解析したうちのいくつかの血栓症関連遺伝子が、主に血栓形成期において顕著に変動しており、凝固・線溶のバランスが凝固促進に傾いていると考えられた。また、網羅的遺伝子発現解析により、PHZ 投与ラットの肺では炎症・免疫反応が早期から顕著かつ継続的に誘発されていることが示された。炎症性反応は血管内皮細胞の機能的変化を誘発することや、血液凝固と深い相互関係が報告されており、PHZ 投与ラットにおいても炎症状態が血栓症の病態発生・悪化に関与していることが示唆され

た。

本研究の結果と他の関連文献から、PHZ 投与ラットにおける急性肺血栓症のメカニズムは次のように推察される。最初に、PHZ は赤血球を傷害し、赤血球の変形能喪失と形態異常をもたらし、それが局所血流の障害、全身性の血液凝固性の亢進、血管内皮細胞の機能障害を引き起こす。肺において早期から惹起される炎症性の反応が血管内皮細胞の機能障害に影響を及ぼしている可能性がある。これらの要因のインパクトや発生時点を鑑みるに、PHZ 投与ラットにおいては、初期の肺毛細血管内の血流障害がトリガーとなり、引き続く血管内皮細胞の機能異常（凝固促進状態）、血液の凝固亢進が血栓症の病態を悪化させていると考えられた。

以上のように、本論文は PHZ をラットに腹腔内投与を行うことにより肺に特異的に急性血栓症を生ずることを発見し、その発生機序として形態異常を示す赤血球集積による血流障害が誘因であることを明らかにした。これらは新たな肺血栓症モデルを提唱するものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。