

学 位 論 文 題 名

Investigation on the anti-inflammatory effect of Ginkgo biloba extract and captopril on endotoxin-induced uveitis

(内毒素誘発ぶどう膜炎に対する
銀杏葉抽出物とカプトプリルの抗炎症作用の検討)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

Purpose. We investigated the efficacy of Ginkgo biloba extract (GBE) and captopril on endotoxin induced uveitis (EIU) in rats. The effect of these two agents was investigated upon cellular infiltration and protein leakage, as well as on the concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the anterior chamber. The anti-inflammatory potency of GBE in vivo was compared with that of prednisolone. We also investigated NO, PGE2, TNF- α and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in a mouse macrophage cell line (RAW 264.7) treated with GBE in vitro to clarify its anti-inflammatory effect. In addition, we checked captopril's effect on activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) in iris and ciliary body (ICB) cells in vivo.

Methods. EIU was induced in male Lewis rats by a footpad injection of lipopolysaccharide (LPS). GBE was injected intravenously immediately after the LPS inoculation, in either 4 mg/kg, 40 mg/kg or 400 mg/kg. Captopril in doses 1 mg/kg, 10 mg/kg or 100 mg/kg was injected intravenously one hour after the LPS inoculation. 24 hours later, the aqueous humor was collected from both eyes, and the number of infiltrating cells, protein concentration, TNF- α , PGE2, NO and MCP-1 levels in the aqueous humor were determined. RAW 264.7 cells were pretreated with various concentrations of GBE for 24 hours and subsequently incubated with LPS for 24 hours after which concentrations of NO, PGE2 and TNF- α were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of iNOS protein was analyzed by Western blotting method. On some captopril treated eyes, after enucleation, immunohistochemical staining with a monoclonal antibody against activated NF- κ B was performed.

Results. Treatment with both GBE and captopril significantly decreased the inflammatory cells infiltration, the level of protein and the concentrations of TNF- α , PGE2, NO and MCP-1. The anti-inflammatory effect of 4 mg/kg GBE was as strong as that of same dose prednisolone. It also significantly reduced the concentration of PGE2, TNF- α and NO production in the medium of RAW 264.7 cells compared to that of the LPS group *in vitro*. The expression of iNOS protein in the 1000 μ g/ml of GBE treated cells decreased

significantly. The number of activated NF- κ B-positive cells 3 hours after the LPS injection was lower in ICB of the rats treated with captopril.

Conclusion. The present results indicate that GBE and captopril suppress the inflammation of EIU. It was demonstrated that GBE blocks the iNOS protein expression and that captopril inhibits the NF- κ B-dependent pathway and the subsequent production of pro-inflammatory mediators.

学位論文審査の要旨

主査 教授 大野重昭
副査 教授 小野江和則
副査 教授 上出利光

学位論文題名

Investigation on the anti-inflammatory effect of Ginkgo biloba extract and captopril on endotoxin-induced uveitis

(内毒素誘発ぶどう膜炎に対する

銀杏葉抽出物とカプトプリルの抗炎症作用の検討)

内毒素誘発ぶどう膜炎 (EIU) に対する銀杏葉抽出物 (GBE) とカプトプリルの治療効果について検討した。この 2 つの化合物の抗炎症作用は前房水中の炎症細胞数、タンパク濃度、tumor necrosis factors (TNF) - α 濃度、一酸化窒素 (NO) 濃度、プロスタグランジン (PG) E2 濃度および monocyte chemoattractant protein (MCP) -1 濃度で評価した。GBE についてはプレドニゾンと比較検討した。また、in vitro においてマウスマクロファージ (RAW264.7) を用いて、TNF- α 濃度、PGE2 濃度、NO 濃度について検討するとともに、作用機序の解明のために NO 合成酵素 (iNOS) の発現についても検討した。一方、カプトプリルでは上記項目に加え、虹彩・毛様体での nuclear factors(NF) κ B の活性も検討した。方法は、雄性ルイスラットに内毒素を皮下投与し、EIU を作成した。GBE は内毒素投与後直ぐに 4、40、400mg/kg をそれぞれ静脈内投与した。カプトプリルは内毒素投与 1 時間後にそれぞれ 1、10、100mg/kg を静脈内投与した。24 時間後前房水を採取し、上記項目を ELISA 法で測定した。In vitro では GBE の終濃度が 10、100、1000 μ g/ml になるように 0.01%DMSO を含む維持培地で調整し、RAW264.7 細胞に添加し、24 時間予め培養した。次に、LPS を 1ng/ml 添加しさらに培養した。24 時間後に培地中の TNF- α 濃度、PGE2 濃度、NO 濃度を、細胞についてはウエスタンブロット法で iNOS 発現レベルを検討した。カプトプリルの虹彩・毛様体での NF- κ B の活性については免疫組織化学法を用いて検討した。その結果、GBE、カプトプリルとも EIU における炎症因子を有意に減少させ、その効果には濃度相関性がみられた。特に GBE の抗炎症効果は同濃度のプレドニゾンの効果と同等であった。また、マクロファージ細胞においても内毒素によって惹起された炎症因子および iNOS 発現を GBE は有意に抑制した。カプトプリルでは虹彩毛様体中の NF- κ B の活性化を抑制した。以上より、GBE とカプトプリルは EIU の炎症を有意に抑制することがわかった。そのメカニズムとして GBE は iNOS を抑制し、カプトプリルは炎症性サイトカインネットワークを支配している NF- κ B の活性化を抑制することを示唆した。

審査にあたっては、副査小野江和則教授から (1) EIU モデルにおける前房水中の炎症細胞の種類、(2) EIU での MCP-1 の役割、(3) GBE とカプトプリルの併用を検討したか、(4) NF-kappa B の活性化についてなぜ GBE では検討していないのか、という質問があり、(1) 主に多核白血球だが、リンパ球も観察された、(2) 炎症の増悪に関わるケモカインの誘導、(3) 近い将来両薬剤の併用実験を計画しており、相乗効果が期待できる、(4) GBE が NF kappa B の活性化を抑制することは期待していなかった、今後実験を計画していると回答した。また、副査上出利光教授から (1) GBE の経口投与は検討したか、また副作用はなかったか、(2) カプトプリルの効果のメカニズムは、(3) カプトプリルの接着分子への影響について検討したか、という質問があり、(1) 経口投与は行わず、また副作用はなかった、(2) カプトプリルは抗酸化作用が知られている。前房水中の NO 濃度を減少させ、iNOS 発現も抑制したのでは、(3) 検討はしていないが、Nagai らの報告ではレニンアンジオテンシン系経路阻害剤で網膜血管内での白血球の接着を抑制している報告があり、カプトプリルでも期待できると回答した。また、主査大野重昭教授から (1) GBE あるいはカプトプリルの副作用は、また、カプトプリルを健常者に用いた時、血圧低下等の副作用はみられるか、(2) 臨床家としてこれらの成果を今後どのように活用するか、という質問があり、(1) GBE は神経障害、カプトプリルは血管浮腫がある。カプトプリルは健常者では特に副作用の報告は特になく、(2) これらの実験動物の成果から臨床応用への可能性は高く、出来る限り早く臨床応用したいという回答があった。

この論文は、すでに他の疾患で長年使用され、副作用の少ない薬剤が EIU の炎症を抑制するという点が高く評価され、今後臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。