

主論文の要旨

**Phlebotomy as a preventive measure for
crocidolite-induced mesothelioma in male rats**

雄のラットにおけるクロシドライト誘発中皮腫に対して
瀉血は予防法となる

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病理病態学講座 生体反応病理学分野

(指導：豊國 伸哉 教授)

大原 悠紀

【緒言】

悪性中皮腫（以下中皮腫）はそのほとんどがアスベストにより発症する悪性度の高い腫瘍であるが，早期診断が難しいため進行した状態で発見されることがしばしばある．日本におけるアスベストによる中皮腫患者数は 2025 年にピークを迎えると言われており，過去のアスベスト曝露者に対する予防法の開発は喫緊の課題である．

吸入されたアスベストは生体内で処理できず，気道に沿って胸膜まで到達し，中皮細胞において発がん性を発揮する．アスベストによる中皮腫の発がん機序としては，アスベストが生体内の特定分子（例：ヘモグロビン，ヒストン）や生体外からの有害分子を吸着して発がんに寄与する分子吸着説，吸入されたアスベストを異物として貪食したマクロファージがそれを消化できないために **frustration** に陥り，継続的に活性酸素種を発生するという酸化ストレス説といった仮説がある．アスベストに含まれる鉄やアスベストが吸着したヘモグロビン鉄による局所鉄過剰は，活性酸素種を生成するフェントン反応を触媒するため，中皮腫の発生に中心的な役割を果たしていると考えられている．この局所鉄過剰を軽減する方法として私達は鉄キレート剤や瀉血療法を想定した．

以前，私達はアスベスト誘発ラット中皮腫モデルに経口鉄キレート剤（deferasirox）を投与すると，中皮腫の上皮間葉転換が抑制されることを報告した．しかし，鉄キレート剤は腎障害，嘔吐などの副作用も強いため，今回は瀉血療法について検討した．

【対象および方法】

Fischer-344 雌と Brown-Norway 雄を交配して得た F1 hybrid に 6, 7 週齢で 2.5 mg ずつ，総計 5 mg のアスベスト（クロシドライト）を腹腔内注射した．これを瀉血群と非瀉血群（以下，NT; non-therapeutic）に分け，瀉血群では 10 週齢から 60 週齢において，1 回当たり 6-8 ml/kg の瀉血を月 2 回（以下，Phleb-2）あるいは月 4 回（以下，Phleb-4）行った．瀉血量は瀉血時のヘマトクリット値によって調整した．対象群として，生理食塩水を腹腔内注射し，かつ瀉血を行わない群を作った（以下，Saline）．いずれの群も 120 週齢まで体重変化を観察し，10%以上の体重減少や腹水出現時は解剖し肉眼的検討，組織学的検討を行った．中皮腫以外での死亡例，120 週齢までの生存例は打ち切りとした．以下の結果では，NT と Phleb-2, Phleb-4 をそれぞれ比較した．

【結果】

適切な瀉血は副作用なく体内鉄量を減少する

瀉血による副作用は見られず，体重に有意差も見られなかった（Fig. 1a, 1b）．週毎のヘマトクリット値は雄 Phleb-4 では NT に比べていずれの週でも有意に低値を維持できた（Fig. 1c）．その他の瀉血群では低値で維持することが難しく，NT に比べて有意差の出ない週もあった（Fig. 1c, 1d）．一方，20 週から 60 週における血清鉄値は，雌雄において，Phleb-2, Phleb-4 とともに NT に比べて有意に低値で推移した（Fig. 1e, 1f）．

充分な瀉血は疾患特異的生存を延長する

生存について NT と比較すると、雄 Phleb-2 では有意差はなかったが、雄 Phleb-4 では生存が延長される傾向があった (Fig. 2a). 雌では有意差はなかった (Fig. 2b). 雌雄を併せて検定を行うと、Phleb-2 では生存が延長される傾向があり、Phleb-4 では有意に生存が延長された (Fig. 2c). 解剖時に腹水 5 g 以上を認めた個体を腹水陽性と判定し、腹水の有無で生存を検討した. 腹水陽性個体では、Phleb-4 で有意に生存が延長された (Fig. 3a). 腹水陰性個体では、有意差は見られなかった (Fig. 3b).

ラット解剖時には、中皮腫は大網、腸間膜、精巣上体といった脂肪組織などに観察された (Fig. 4a). 腫瘍重量は NT に比べ、雄 Phleb-4 で有意に減少した (Fig. 4b). 腹水重量は雄 Phleb-4 で減少傾向が見られた (Fig. 4c). 腹水重量 5 g 以上を腹水陽性とした場合、雄の瀉血群で腹水が出現しない傾向にあった (Fig. 4c).

組織像では、瀉血群で肉腫型の割合が減少傾向にあった (Fig. 5a, 5b). 組織学的な悪性度を示す Nuclear grade は雄 Phleb-2, 雄 Phleb-4 で減少した (Fig. 6a, 6b). 腫瘍重量と Nuclear grade は強い正の相関が見られた (Fig. 6c).

酸化ストレスのバイオマーカーである酸化代謝物を 50 週の血清で比較した. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) は、雌雄とも Phleb-2 で有意に低値、Phleb-4 では有意差がなかった (Fig. 7a). Malondialdehyde (MDA) は、雄の瀉血群で減少傾向であった (Fig. 7b).

【考察】

雄 Phleb-4 では NT に比べ、ヘマトクリット値を有意に低値で維持することができ、同群では、生存延長、腫瘍重量減少、腹水重量減少、肉腫型の減少の効果が見られた. これらの結果はラット中皮腫モデルに対する deferasirox 投与の実験結果に矛盾しないものであり、瀉血が活性酸素種産生を抑え、発がん (initiation/promotion) を抑制したことが示唆された. 腹水出現は播種を意味するが、瀉血群では腹水の出現が見られにくかったこと、腹水陽性個体の疾患特異的生存率が延長したこと、中皮腫の播種・血管新生といった progression も瀉血によって抑制されると考えられた.

50 週における酸化代謝物は Phleb-2 で低値であったことから、瀉血が活性酸素種産生を抑えることが示唆された. 一方、Phleb-4 では酸化代謝物が高値となった. これは瀉血を繰り返したことで急性炎症が惹起されてしまったためと考えられた. 発がんに関わるのは慢性炎症であるため、この急性炎症は病態悪化には関わっていないと考えられた.

雄 Phleb-2 と雌 Phleb-2, 雌 Phleb-4 では瀉血量の調整が難しく、ヘマトクリット値を低値とすることが難しかった. 一方、瀉血群における血清鉄値は、NT と比較して雌雄とも有意に低値であった. 瀉血の効果は雄 Phleb-4 で最も顕著であったことから、ヘマトクリット値はヘモグロビン吸着に伴う活性酸素種の生成を血清鉄値よりも精確に反映することが示唆された.

瀉血による予防効果は雄で観られたが、この結果がヒトの女性に適応外ということの意味するわけではない。というのも、女性では月経が存在するが、ラットでは月経がなく鉄代謝がヒトとは異なるためである。

【結語】

瀉血による鉄除去は、アスベストによる中皮腫の carcinogenesis (initiation/promotion) を予防した。更に、瀉血には中皮腫の progression を抑える効果があることも示唆された。瀉血療法は副作用の少ない方法であるため、アスベスト曝露経験のある高リスク者を対象とした臨床的介入が期待された。