

2009. 5

特集号



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第三十一号

総務課広報室発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

*
*
*
高知大学学報
*
*
*

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

| 学位記番号 | 氏 名 | 学 位 論 文 の 題 目 | ページ |
|---------|-------|--|-----|
| 甲医博第74号 | 山田 高義 | A Comparison of Magnifying Chromoendoscopy Versus Histopathology of Forceps Biopsy Specimen in the Diagnosis of Minute Flat Adenoma of the Colon (表面型微小大腸腺腫における拡大色素内視鏡診断の有用性の検討 - 生検標本の病理組織診断との比較において -) | 1 |
| 甲医博第75号 | 水田 洋 | Predictive factors for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal cancer (表在型食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術後の食道狭窄の予知因子) | 5 |
| 甲医博第76号 | 北川 博之 | Total laparoscopic gastric mobilization for esophagectomy (食道切除術における完全腹腔鏡下胃授動術) | 10 |
| 甲医博第77号 | 臼井 大介 | Differential roles of the sympathetic nervous system and adrenomedullary catecholamine-containing cells in bombesin- and CRF-induced central activation of the sympatho-adrenomedullary outflow in rats (ボンベシンによる中枢性交感神経 - 副腎髄質系賦活機序の解析 - コンチコトロピン放出因子との対比 -) [1] Selective activation of the sympathetic ganglia by centrally administered corticotropin-releasing factor in rats (ラット脳室内に投与したコンチコトロピン放出因子は交換神経節を選択的に活性化する) [2] Central bombesin activates adrenal adrenaline- and noradrenaline-containing cells via brain thromboxane A ₂ in rats (ラット脳室内に投与したボンベシンは脳内トンボキサンA ₂ を介して副腎髄質アドレナリン含有細胞およびノルアドレナリン含有細胞を活性化する) | 15 |

| 学位記番号 | 氏名 | 学位論文の題目 | ページ |
|-----------|--------|---|-----|
| 甲医博第 78 号 | 佐々木 剛 | Centrally administered neuromedin U elevates plasma adrenaline by brain prostanoid TP receptor-mediated mechanisms in rats (ラット脳室内に投与したニューロメジンUは脳内プロスタノイドTP受容体を介して血中アドレナリンを増加させる) | 20 |
| 甲医博第 79 号 | 永井 立平 | Melatonin preserves fetal growth in rats by protecting against ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative mitochondrial damage in the placenta (メラトニンは虚血・再環流による胎盤ミトコンドリアの酸化・窒素化障害からラット胎仔発育を保護する) | 25 |
| 甲医博第 80 号 | 濱田 知幸 | Clinical Features of Dilated Phase of Hypertrophic Cardiomyopathy in Comparison With Those of Dilated Cardiomyopathy (拡張相肥大型心筋症の臨床像と予後の検討; 拡張型心筋症との比較) | 30 |
| 甲医博第 81 号 | 小野川 雅英 | Animal studies supporting the inhibition of mast cell activation by <i>Eriobotrya Japonica</i> seed extract (アレルギー反応に伴う肥満細胞活性化に対する枇杷種子由来エキスの抑制効果) | 35 |
| 甲医博第 82 号 | 永尾 環 | Thymus-derived CD4+CD25+ T cells suppress the development of murine allergic conjunctivitis (胸腺由来 CD4/CD25 陽性 T 細胞はマウスアレルギー性結膜炎の発症を抑制する) | 41 |
| 甲医博第 83 号 | 孫 广臣 | Effect of orally administered <i>Eriobotrya Japonica</i> seed extract on allergic contact dermatitis in rats (枇杷種子由来エキスのラットアレルギー性接触皮膚炎に対する効果) | 47 |
| 甲医博第 84 号 | 高田 浩史 | High Glucose Induces Transactivation of the α 2-HS Glycoprotein Gene Through the ERK1/2 Signaling Pathway (高濃度グルコースは ERK1/2 シグナル経路を介して α 2-HS glycoprotein 遺伝子の転写を促進する) | 53 |
| 甲医博第 85 号 | 宅間 大祐 | Effect of <i>Eriobotrya japonica</i> Seed Extract on 5-Fluorouracil-Induced Mucositis in Hamsters (5-Fluorouracil 投与口内炎モデルハムスターに対する枇杷種子由来エキスの効果) | 58 |
| 甲医博第 86 号 | 谷口 亜裕子 | Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in association with adult T-cell leukemia (<i>BMP-6</i> 遺伝子プロモーター領域のメチル化と成人 T 細胞白血病との関連) | 63 |

| 学位記番号 | 氏 名 | 学 位 論 文 の 題 目 | ページ |
|-----------|---|---|-----|
| 甲医博第 87 号 | 山本 由美子 | Intraocular pressure elevation after intravitreal or posterior sub-Tenon triamcinolone acetate injection (triamcinolone acetate 硝子体内、またはテノン囊下投与後の眼圧上昇) | 68 |
| 甲医博第 88 号 | 宮本 謙三 | A New Simple Performance Test Focused on Agility in Elderly People: The Ten Step Test (高齢者に対する新しい敏捷性テスト: 10ステップテスト) | 73 |
| 甲医博第 89 号 | 卢 连依 | Brain neuronal/inducible nitric oxide synthases and cyclooxygenase-1 are involved in the bombesin-induced activation of central adrenergic outflow in rats (中枢性に投与されたボンベシンにより惹起される副腎髄質系賦活には脳内の神経型および誘導型の一酸化窒素合成酵素およびシクロオキシゲナーゼ-1 が関与する) | 78 |
| 甲医博第 90 号 | Yatawara MD Mudiyanselage Lalani Damayanthi Kumari (Lalani Yatawara) | Molecular epidemiology and molecular biology on leishmaniasis in Sri Lanka (スリランカにおけるリーシュマニア症に関する分子疫学ならびに分子生物学的研究) [1] Morphological and molecular studies on Sri Lankan <i>Leishmania</i> (スリランカにおけるリーシュマニア原虫の形態学的ならびに分子疫学的研究) [2] Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of <i>Leishmania major</i> . Gene content, arrangement and composition compared with <i>Leishmania tarentolae</i> (<i>Leishmania major</i> のマキシサークルゲノムの分子生物学的研究: 遺伝子組成、遺伝子配列、塩基組成における <i>L. tarentolae</i> との比較研究) | 83 |
| 甲医博第 91 号 | 池本 竜則 | Effect of experimental focal compression on excitability of human median motor axons (人の正中神経局所圧迫による運動軸索の興奮性への影響) | 88 |
| 甲医博第 92 号 | 清水 祐司 | B-type Natriuretic Peptide is Predictive of Hospitalization in Community-dwelling Elderly Without Heart Diseases (ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 値は、心疾患のない地域在住高齢者における入院を予測する) | 93 |
| 甲医博第 93 号 | 松下 憲司 | Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of <i>Serratia marcescens</i> isolated from environmental water (環境水から分離した <i>Serratia marcescens</i> に感染する 3 種のバクテリオファージの形態学的、遺伝学的解析) | 98 |

| 学位記番号 | 氏 名 | 学 位 論 文 の 題 目 | ページ |
|-----------|-------|---|-----|
| 甲医博第 94 号 | 山本 正樹 | Biphasic Elevation of Bilirubin Oxidation During Myocardial Ischemia Reperfusion (心筋虚血再灌流後の生体内ビリルビン酸化は二相性の上昇を示す) | 103 |
| 甲医博第 95 号 | 内山 淳平 | In Silico and In Vivo Evaluation of Bacteriophage ϕ EF24C, a Candidate for Treatment of <i>Enterococcus faecalis</i> Infections (コンピューター解析及び生体内実験による <i>Enterococcus faecalis</i> 感染症治療用候補バクテリオファージ ϕ EF24C の評価) | 108 |

| 学位記番号 | 氏 名 | 学 位 論 文 の 題 目 | ページ |
|---------|-------|--|-----|
| 乙総医博第4号 | 岡本 健 | Immunohistochemical and electron microscopic characterization of brush cells of the rat cecum (ラット盲腸の刷子細胞における免疫組織化学および電子顕微鏡的検討) | 113 |
| 乙総医博第5号 | 上岡 樹生 | Testican 3 expression in adult T-cell leukemia (成人T細胞白血病における Testican 3 の発現) | 118 |

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 山田 高義 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第74号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年2月27日 |
| 学位論文題目 | A Comparison of Magnifying Chromoendoscopy Versus Histopathology of Forceps Biopsy Specimen in the Diagnosis of Minute Flat Adenoma of the Colon (表面型微小大腸腺腫における拡大色素内視鏡診断の有用性の検討 —生検標本の病理組織診断との比較において—) |
| 発表誌名 | Digestive Diseases and Science, (in press) |
| | 審査委員 主査 教授 小林 道也 副査 教授 降幡 睦夫 副査 教授 花崎 和弘 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名

山田高義

論文題目

A Comparison of Magnifying Chromoendoscopy Versus Histopathology of Forceps Biopsy Specimen in the Diagnosis of Minute Flat Adenoma of the Colon

(表面型微小大腸腺腫における拡大色素内視鏡診断の有用性の検討
—生検標本の病理組織診断との比較において—)

(論文要旨)

【背景】

大腸病変における拡大内視鏡を用いた pit pattern 診断は、腫瘍と非腫瘍の鑑別に有用であり、病理診断と高い一致率を示すが 100%ではない。これまでの経験で、表面型微小大腸腺腫における内視鏡診断と病理診断の不一致例がある事実に着目し、拡大色素内視鏡診断および生検鉗子を用いて採取した病変の病理組織診断を比較し、前向き研究をおこなった。

【患者及び方法】

本研究は 2003 年 7 月から 2005 年 6 月まで当院で大腸内視鏡検査を施行した症例のうち、計 208 例 208 病変を対象とし、内視鏡診断は大腸拡大内視鏡を用いて行った。

表面型微小腺腫は生検鉗子で完全摘除できる 3mm 以下の病変と定義した。

対象病変は工藤分類の III 型 pit pattern を呈した病変を無作為に 2 群(A : n=104, B : n=104)に分類した。

A 群は切除標本を伸展させずにそのまま 20%ホルマリンで固定し、病理検査に提出した。

B 群は切除標本を固定前に鉗子で伸展させ、実体顕微鏡を用いて腺管構造を観察し病変部に割をいれたのちに 20%ホルマリンで固定し、病理検査に提出した。

【結果】

1. A 群と B 群の初回診断の比較

A 群では組織学的に管状腺腫と診断された病変が 84.6% (88/104) であったのに対し、B 群では 100% (104/104) であった ($P < 0.0001$)。

2. A 群と B 群の追加診断の比較

A 群において非腫瘍性病変と診断された 16 病変に対し、残存するパラフィンブロックの連続切片を 3 μ m 間隔で全組織を切り出して作製し、組織学的検討を追加した。

その結果組織学的に 16 病変中 14 病変で管状腺腫と診断された。




その結果 A 群において 98.1% (102/104) は組織学的に管状腺腫と診断された ($P = 0.4976$)。

【結論】

生検鉗子を用いて通常通り扱った検体では、標本作製する際に病変が切り出されていない可能性がある。

以上の結果より微小腺腫の診断には、病理組織診断より拡大内視鏡を用いた pit pattern 診断が適切であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | 山 田 高 義 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 小 林 道 也  |
| | 副 査 氏 名 | 降 幡 睦 夫  |
| | 副 査 氏 名 | 花 崎 和 弘 印  |

題 目 A Comparison of Magnifying Chromoendoscopy Versus Histopathology of Forceps Biopsy Specimen in the Diagnosis of Minute Flat Adenoma of the Colon

(表面型微小大腸腺腫における拡大色素内視鏡診断の有用性の検討
—生検標本の病理組織診断との比較において—)

著 者 Takayoshi Yamada, Satoru Tamura, Saburo Onishi, Makoto Hiroi

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
Digestive Diseases and Science, (in press)

要 旨

【背景】

大腸病変における拡大内視鏡を用いた pit pattern 診断は、腫瘍と非腫瘍の鑑別に有用であり、病理診断と高い一致率を示す。しかしながら正診率は必ずしも 100%ではない。申請者らはこれまでの経験から、表面型微小大腸腺腫における内視鏡診断と病理診断の不一致例がある事実に着目し、拡大色素内視鏡診断と生検鉗子を用いて採取した病変の病理組織診断を比較する前向き研究をおこなった。

【患者及び方法】

本研究は 2003 年 7 月から 2005 年 6 月まで当院で大腸内視鏡検査を施行した症例のうち、計 208 例 208 病変を対象とし、内視鏡診断は 0.2%インジゴカルミン染色の後、大腸拡大内視鏡を用いて行った。表面型微小腺腫は生検鉗子で完全摘除できる 3mm 以下の病変と定義した。

対象病変は工藤分類の IIIL 型 pit pattern を呈した病変を無作為に 2 群(A :

n=104, B : n=104)に分類した。

A群は切除標本を伸展させずにそのまま 20%ホルマリンで固定し、病理検査に提出した。

B群は切除標本を固定前に鉗子で伸展させ、実体顕微鏡を用いて腺管構造を観察し病変部に割をいれたのちに 20%ホルマリンで固定し、病理検査に提出した。

【結果】

1. A群とB群の初回診断の比較

A群では組織学的に管状腺腫と診断された病変が 84.6% (88/104) であったのに対し、B群では 100% (104/104) であった ($P < 0.0001$)。

2. A群とB群の追加診断の比較

A群において非腫瘍性病変と診断された 16 病変に対し、残存するパラフィンブロックの連続切片を $3\mu\text{m}$ 間隔で全組織を切り出して作製し、組織学的検討を追加した。その結果組織学的に 16 病変中 14 病変で管状腺腫と診断された。その結果A群において 98.1% (102/104) は組織学的に管状腺腫と診断された ($P=0.4976$)。

【結論】

生検鉗子を用いて通常通り扱った検体では、標本を作製する際に病変が切り出されていない可能性がある。また、最終的に非腫瘍と診断された 2 例では切除時に物理的に変化が加わった可能性があると推測している。

以上の結果より微小腺腫の診断には、病理組織診断より拡大内視鏡を用いた pit pattern 診断が適切であると考えられた。

申請者らは日常診療の小さな疑問を科学的に解明し、これにより近年増加している大腸腫瘍の診断と治療に大きく寄与すると考えられる点で学術的評価が高い。さらに本邦で開発された拡大大腸内視鏡の有用性を証明し、本論文は高知大学医学部博士(医学)に値すると評価した。

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 水田 洋(岡山県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第75号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年2月27日 |
| 学位論文題目 | Predictive factors for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal cancer (表在型食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術後の食道狭窄の予知因子) |
| 発表誌名 | Diseases of the Esophagus, (in press) |

| | | | | |
|-------------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 花崎 | 和弘 |
| | 副査 | 教授 | 小林 | 道也 |
| | 副査 | 教授 | 味村 | 俊樹 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 水 田 洋

論文題目 Predictive factors for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal cancer

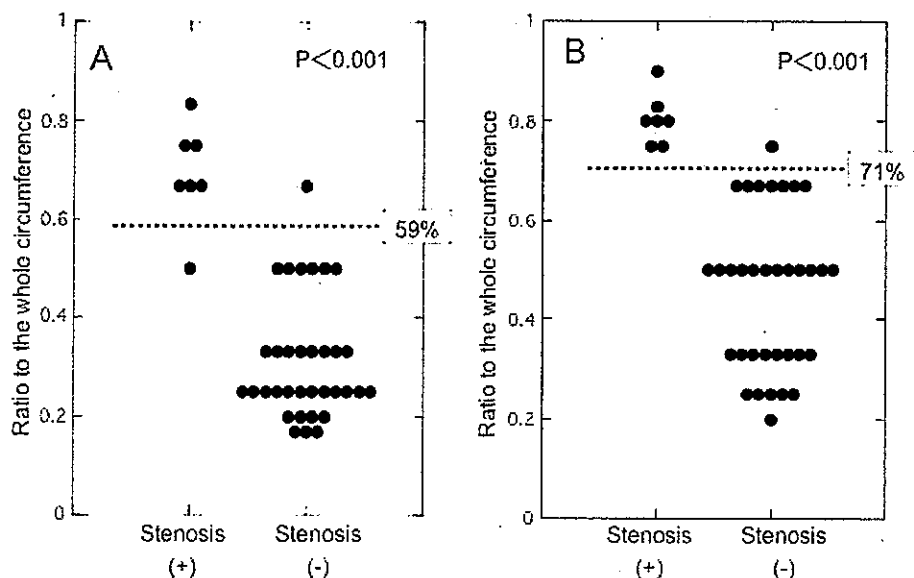
(表在型食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術後の食道狭窄の予知因子)

(論文要旨)

【背景】内視鏡的粘膜下層剥離術(endoscopic submucosal dissection; ESD)は胃の粘膜内癌の一括切除を目的に発達した治療手技である。近年、従来の内視鏡的粘膜切除術(endoscopic mucosal resection; EMR)に代わり、早期大腸癌や表在型食道癌の治療にも応用されつつある。しかし、これまで食道ESDの偶発症リスクについての検討はない。術前に偶発症の発生を予知することは、ESDの適応決定および偶発症の回避に重要である。本研究では食道ESDの偶発症を検討し、最も頻度の高い偶発症である食道狭窄について予知因子を解析した。

【方法】2003年4月から2008年3月の間に高知大学医学部附属病院でESDを施行された33人の表在型食道癌患者、計42病変を対象とした。平均年齢は67.5±9.9歳、男女比は28:5であった。ESD後に追加治療(アルゴンプラズマレーザー焼灼術、化学療法、放射線治療、外科的切除)を行った症例は除外した。組織型では扁平上皮癌症例のみを対象とし、パレット腺癌症例は除外した。これらの対象症例において、ESDに関する偶発症を後向きに検討した。さらに、ESD後の食道狭窄の有無で2群に大別し、(1)病変因子、(2)技術的因子(下記)との関連について統計学的に解析した。(1)病変因子:局在、肉眼形態、長軸方向の長さ(全周に占める割合)、深達度、脈管侵襲。(2)技術的因子:ESD後粘膜欠損の長軸方向の長さ(全周に占める割合)、固有筋層の露出、筋層への切れ込み、穿孔、一括/分割切除。食道の穿孔は術中に内視鏡下で穿孔を確認した場合をMajor、術後の胸部CTにてfree airを確認した場合をMinorとした。術後2-4週目に全例で上部消化管内視鏡検査を行い、上部用スコープ(径9.8mm)が通過できない場合を食道狭窄とした。


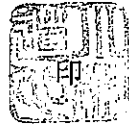

【結果】一括切除率は95.2%であった。偶発症として後出血は認めず、Minorな食道穿孔が3例(7.1%)、Majorな食道穿孔が2例(4.8%)、縦隔炎が2例(4.8%)、食道狭窄が7例(16.7%)であった。Majorな食道穿孔の2例はいずれも縦隔炎を合併し、このうち1人は食道狭窄を来した。食道狭窄を合併した7例全例に対しバルーン拡張術が有効であった。ESD後の食道狭窄は腫瘍およびESD後の粘膜欠損の長軸方向の長さおよび周在との有意な相関を認めた($p < 0.005$)。ROC解析によりカットオフ値を求め、ESD後食道狭窄の予知についての有用性を検討した結果、周在59%以上の病変が感度85.7%、特異度97.1%、周在71%以上の粘膜欠損が感度100%、特異度97.1%であった(図参照)。



【考察】表在型食道癌に対するESDにおいて最も多い偶発症は食道狭窄であった。病変の周在が59%以上でESD後の粘膜欠損の周在が71%以上となる、すなわち臨床的には病変の周在が半周をこえるような食道癌病変ではESD後の食道狭窄のリスクが高く、十分なインフォームドコンセントを得ることが必要である。一方、ESDでは半周を超えるような食道癌病変でも一括切除が可能であり、また併発した食道狭窄に対してもバルーン拡張術が奏効することより、ESDの適応拡大が期待された。

【結論】食道の半周を超える表在型食道癌病変ではESD後の食道狭窄のリスクが高く注意が必要である。

論文審査の結果の要旨

| | | | |
|---------|---------|---------|---|
| | 氏 名 | | 水 田 洋 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 花 崎 和 弘 |  |
| | 副 査 氏 名 | 小 林 道 也 |  |
| | 副 査 氏 名 | 味 村 俊 樹 |  |

題 目 Predictive factors for esophageal stenosis after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal cancer
(表在型食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術後の食道狭窄の予知因子)

著 者 Hiroshi Mizuta, Isao Nishimori, Yoshinori Kuratani,
Yoshifumi Higashidani, Takuhiro Kohsaki, Saburo Onishi

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Diseases of the Esophagus, (in press)

要 旨

【背景】内視鏡的粘膜下層剥離術 (endoscopic submucosal dissection; ESD) は、胃の粘膜内癌を一括切除することを目的に発達した内視鏡的治療法であるが、近年早期大腸癌や表在型食道癌にも適応されてきている。これまで食道のESDにおける偶発症のリスクについての検討はなされていない。本研究ではESDに関する偶発症を検討し、最も頻度の高い偶発症である食道狭窄について予知因子を解析した。

【方法】2003年4月から2008年3月の間に高知大学医学部附属病院で表在型食道癌に対し、ESDが施行された連続する33人の患者、計42病変を対象とし、偶発症の後向き検討を行った。また食道の穿孔は2群に分類し、術中に内視鏡下で穿孔を確認した場合をMajor、術後の胸部CTにてfree airを確認した場合をMinorとした。自覚症状の有無に関わらず、全例術後2-4週目に上部消化管内視鏡検査を行い、通常観察で用いる上部用スコープ(径9.8mm)が通過できない場合を食道狭窄と定義した。

【結果】偶発症として後出血は認めず、Minorな食道穿孔が3例(7.1%)、Majorな食道穿孔が2例(4.8%)、縦隔炎が2例(4.8%)、食道狭窄が7例(16.7%)であった。Majorな食道穿孔の2例はいずれも縦隔炎を合併し、このうち1人は食道狭窄を来した。食道狭窄を合併した7例全例に対しバルーン拡張術が有効であった。ESD後狭窄の有無で2群に分別し、単変量解析を用いて比較検討した結果、病変因子では長軸方向の腫瘍径と病変の周在において、技術的因子ではESD後粘膜欠損の長軸方向の長さと同在において有意差

を認めた ($p < 0.005$)。ESD 後狭窄の予知因子について検討した結果、病変の周在が 59%以上で感度 85.7%、特異度 97.1%、粘膜欠損の周在が 71%以上で感度 100%、特異度 97.1%であった。

【考察・結論】表在型食道癌に対する ESD の最も多い偶発症は食道狭窄であることが示された。また食道狭窄の予知因子として、71%以上の周在性粘膜欠損の大きさが最大の危険因子であり、このような食道癌病変では ESD 後の食道狭窄のリスクを充分考慮したインフォームドコンセントを行うことが必要である。一方食道狭窄に対してはバルーン拡張術による保存的治療が奏効するため今後 ESD の適応拡大が期待される。

申請者らは表在型食道癌に対する内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) 後の偶発症の種類・頻度・病態を解明しただけでなく、その対策も明らかにした。高齢化社会の到来と内視鏡的診断学の進歩により今後益々増加が予想される表在型食道癌の治療成績向上のために本研究の果たす学術的意義は高く、本論文は高知大学医学部博士(医学)に値すると評価した。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 北川 博之 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第76号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年2月27日 |
| 学位論文題目 | Total laparoscopic gastric mobilization for esophagectomy (食道切除術における完全腹腔鏡下胃授動術) |
| 発表誌名 | Langenbeck's archives of surgery, (in press) |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 降幡 | 睦夫 |
| | 副査 | 教授 | 大西 | 三朗 |
| | 副査 | 教授 | 味村 | 俊樹 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 北 川 博 之

論 文 題 目 Total laparoscopic gastric mobilization
for esophagectomy

(食道切除術における完全腹腔鏡下胃授動術)

(論文要旨)

【背景】 広範に手術操作が及ぶ食道切除術における術死や肺炎や縫合不全などの合併症は減少しているが、いまだ問題も多い。合併症が起こる要因として、侵襲自体が大きく、術後疼痛のため早期離床が困難であることが挙げられる。これらを改善する目的で、我々は完全腹腔鏡下胃授動術(TLGM)および小腸瘻造設術という低侵襲鏡視下食道癌手術を考案した。

【術式】

1. 腹部操作：再建臓器となる胃の授動およびリンパ節郭清と、術後早期経腸栄養のための小腸瘻造設を完全腹腔鏡下に行う。胃管再建後の血流は右胃大網動脈と右胃動脈の胃枝、および胃壁内血管網に依存するため、これらを確実に温存して胃壁を損傷しないように授動する。また胃小彎リンパ節、左胃動脈周囲リンパ節を腹腔鏡下に郭清する。フレキシブルスコープや Liga Sure という凝固切開装置を使用することで、出血が少なく安全かつ容易に手術ができる。食道裂孔を開大して下縦隔リンパ節も郭清する。幽門形成は胆汁逆流のリスクがあるため行っていない。続いてトライツ靭帯から約 30cm の小腸に小腸瘻を造設する。4本の吊り上げ糸をかけて緊張をかけ、その中心にカテーテルを刺入する。約 40cm 進めた位置で腹腔鏡下に結紮固定を行い、吊り上げ糸を挙上して体外で結紮し、腹壁と固定する。この時頸部で反回神経リンパ節の郭清とテーピングを行う。
2. 胸部操作：体位を左下側臥位に移して片肺換気とし、右第 5 肋間で開胸して食道切除と縦隔リンパ節郭清を行なう。食道を高位で仮切離し、胃を胸腔内へ挙上する。食道と胃の小彎部分を切離し、亜全胃管を形成する。閉胸後、再び仰臥位として頸部で食道を切離し、後縦隔経路で挙上した胃管と吻合を行なう。

術後は ICU に入室し、呼吸状態が安定していれば翌日気管内チューブを抜管する。術後翌日から小腸瘻から早期経腸栄養を開始する。



【対象】 食道癌に対して 2003 年 4 月から 2005 年 3 月までは従来の開胸開腹手術 (OPEN) を 20 例に行っており、2005 年 4 月から 2007 年 8 月までに TLGM を 16

例に施行した。両群において手術時間と出血量、また手術関連死亡および術後合併症（肺炎、縫合不全、反回神経麻痺、創感染）、そして術後挿管期間および術後 ICU 在室期間について比較検討した。

【結果】両群に年齢、性別の背景因子に差はなかった。手術時間は OPEN 群(506 ± 64 min) が TLGM 群(558 ± 67 min)よりも短時間であった($P = 0.023$)。しかし出血量は TLGM 群(496 ± 259 mL)が OPEN 群(1067 ± 566 mL)よりも有意に少量であった($P = 0.001$)。手術関連死亡は TLGM 群には認めず、OPEN 群に在院死を 1 例認めた。術後合併症は TLGM 群(37.6%)が OPEN 群(60.0%)よりも低率であった。術後挿管期間(TLGM: 1.6 ± 1.5 日、OPEN: 3.3 ± 1.7 日、 $P = 0.004$)および ICU 在室期間(TLGM: 1.8 ± 1.5 日、OPEN: 4.1 ± 1.9 日、 $P = 0.001$)において TLGM 群は有意に短期間であった。

【考察】腹腔鏡手術は開腹手術に比べて術後疼痛と呼吸機能を改善させるという報告があるが、肺切除術において鏡視下手術の開胸手術に対する優位性は明らかでないとの報告もあるため、我々は腹部を腹腔鏡で、胸部を小開胸直視で行った。その結果 TLGM の肺炎合併は 6.3%と低率で、抜管までの期間も短期間であった。手術時間が長いにも関わらず合併症が少ないことから、TLGM は出血量が少ないため感染性合併症が抑制される可能性が示唆された。我々が考案した TLGM は術後合併症を減少させることによって食道癌手術における短期成績を向上させる有効かつ安全な手術である。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | 北 川 博 之 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 降 幡 睦 夫  |
| | 副 査 氏 名 | 大 西 三 朗 印 |
| | 副 査 氏 名 | 味 村 俊 樹  |

題 目 Total laparoscopic gastric mobilization for esophagectomy
(食道切除術における完全腹腔鏡下胃授動術)

著 者 Hiroyuki Kitagawa, Toyokazu Akimori, Takehiro Okabayashi,
Tsutomu Namikawa, Takeki Sugimoto, Michiya Kobayashi,
Kazuhiro Hanazaki

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Langenbeck's archives of surgery, (in press)

要 旨

【背景】広範に手術操作が及ぶ食道切除術に於いては、術死や肺炎や縫合不全などの合併症は減少しているが未だ問題も多い。合併症が起こる要因として、侵襲自体が大きく、術後疼痛のため早期離床が困難であること等が挙げられる。

【目的】上述の問題点を改善する目的で、完全腹腔鏡下胃授動術(TLGM)および小腸瘻造設術という低侵襲鏡視下食道癌手術を考案し、従来の開胸開腹手術と手術関連死亡、手術時間、出血量、および術後合併症(肺炎、縫合不全、反回神経麻痺、創感染)、術後挿管期間および術後 ICU 在室期間について比較検討した。

【対象】食道癌に対して2003年4月から2005年3月までは従来の開胸開腹手術(OPEN)を20例に行っており、2005年4月から2007年8月までにTLGMおよび小腸瘻造設術を16例に施行した。

【TLGMの術式および術後管理】腹部操作：再建臓器となる胃の授動およびリンパ節郭清と、術後早期経腸栄養のための小腸瘻造設を完全腹腔鏡下に行う。

胃管再建後の血流は右胃大網動脈と右胃動脈の胃枝、および胃壁内血管網に依存するため、これらを確実に温存して胃壁を損傷しないように授動する。また胃小彎リンパ節、左胃動脈周囲リンパ節を腹腔鏡下に郭清する。フレキシブルスコープや凝固切開装置を使用することで、出血が少なく安全かつ容易に手術ができる。食道裂孔を開大して下縦隔リンパ節も郭清する。幽門形成は胆汁逆流のリスクがあるため行っていない。続いてトライツ靭帯から約 30cm の小腸に小腸瘻を造設する。4本の吊り上げ糸をかけて緊張をかけ、その中心にカテーテルを刺入する。約 40cm 進めた位置で腹腔鏡下に結紮固定を行い、吊り上げ糸を挙上して体外で結紮し、腹壁と固定する。この時頸部で反回神経リンパ節の郭清とテーピングを行う。

胸部操作：体位を左下側臥位に移して片肺換気とし、右第 5 肋間で開胸して食道切除と縦隔リンパ節郭清を行なう。食道を高位で仮切離し、胃を胸腔内へ挙上する。食道と胃の小彎部分を切離し、亜全胃管を形成する。閉胸後、再び仰臥位として頸部で食道を切離し、後縦隔経路で挙上した胃管と吻合を行なう。術後は ICU に入室し、呼吸状態が安定していれば翌日気管内チューブを抜管する。術後翌日から小腸瘻から早期経腸栄養を開始する。

【結果】両群に年齢、性別の背景因子に差はなかった。手術時間は OPEN 群(506 ± 64 min)が TLGM 群(558 ± 67 min)よりも短時間であった($P = 0.023$)。しかし出血量は TLGM 群(496 ± 259 mL)が OPEN 群(1067 ± 566 mL)よりも有意に少量であった($P = 0.001$)。手術関連死亡は TLGM 群には認めず、OPEN 群に在院死を 1 例認めた。術後合併症は TLGM 群(37.6%)が OPEN 群(60.0%)よりも低率であった。術後挿管期間(TLGM: 1.6 ± 1.5 日、OPEN: 3.3 ± 1.7 日、 $P = 0.004$)および ICU 在室期間(TLGM: 1.8 ± 1.5 日、OPEN: 4.1 ± 1.9 日、 $P = 0.001$)において TLGM 群は有意に短期間であった。

【考察】腹腔鏡手術は開腹手術に比べて術後疼痛と呼吸機能を改善させるという報告があるが、肺切除術において鏡視下手術の開胸手術に対する優位性は明らかでないとの報告もあるため、発表者は腹部を腹腔鏡で、胸部を小開胸直視で行っている。その結果 TLGM および小腸瘻造設術における肺炎合併は 6.3% と低率で、抜管までの期間も短期間であった。手術時間が長いにも関わらず合併症が少ないことから、TLGM および小腸瘻造設術は出血量が少ないため感染性合併症が抑制される可能性が示唆された。

本論文は、従来の開胸回復術式に比較して、考案した TLGM および小腸瘻造設術が術後合併症を減少させることによって、食道癌手術における短期成績を向上させる有効かつ安全な手術であることを示したものであり、本学学位に値すると判断した。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 白井 大介(岡山県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第77号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Differential roles of the sympathetic nervous system and adrenomedullary catecholamine-containing cells in bombesin- and CRF-induced central activation of the sympatho-adrenomedullary outflow in rats (ボンベシンによる中枢性交感神経 - 副腎髄質系賦活機序の解析 - コンチコトロピン放出因子との対比 -) [1] Selective activation of the sympathetic ganglia by centrally administered corticotropin-releasing factor in rats (ラット脳室内に投与したコンチコトロピン放出因子は交換神経節を選択的に活性化する) [2] Central bombesin activates adrenal adrenaline- and noradrenaline-containing cells via brain thromboxane A ₂ in rats (ラット脳室内に投与したボンベシンは脳内トンボキサンA ₂ を介して副腎髄質アドレナリン含有細胞およびノルアドレナリン含有細胞を活性化する) |
| 発表誌名 | [1] Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, (in press) [2] Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, (in press) |

| | | | | |
|-------------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 高尾 | 俊弘 |
| | 副査 | 教授 | 由利 | 和也 |
| | 副査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 臼井 大介

論文題目

ボンベシンによる中枢性交感神経-副腎髄質系賦活機序の解析
-コルチコトロピン放出因子との対比-

Differential roles of the sympathetic nervous system and adrenomedullary catecholamine-containing cells in bombesin- and CRF-induced central activation of the sympatho-adrenomedullary outflow in rats

(論文要旨)

【目的】実験動物の脳室内に投与したコルチコトロピン放出因子 (CRF) およびボンベシンが血圧、脈拍、血中カテコールアミンを増加させることから、それらペプチドは中枢性に交感神経-副腎髄質系を賦活するとされている。交感神経節ノルアドレナリン (NA) 作動性ニューロンからは NA が遊離される。副腎髄質に存在するアドレナリン (AD) 含有細胞および NA 含有細胞から AD と NA がそれぞれ個別に分泌される。しかし、それらペプチドがどの系を介して作用を表すのかは明らかではない。最近、私たちは、最初期遺伝子である c-Fos の発現を指標に、ラット脳室内に投与した CRF が副腎 A 細胞および腹腔神経節 NA 作動性ニューロンを、脳内トロンボキサン A₂ およびトロンボキサン A₂ 以外のプロスタノイド (おそらくプロスタグランジン E₂) を介して、それぞれ活性化することを報告した (Eur. J. Pharmacol. 2007)。そこで今回、ボンベシンの作用を CRF の作用と対比しながら、各種交感神経節 (腹腔神経節に新たに上頸神経節および星状神経節を加えた) を、副腎髄質 (A 細胞と NA 細胞) と共に、c-Fos を指標とした免疫組織学的手法を用いて、脳内プロスタノイドとの関連により解析した。

【方法】本研究ではウレタン麻酔 (1.0 g/kg) した Wistar 系雄性ラット (体重約 300g) を用いた。脳定位固定下に、CRF およびボンベシンをそれぞれ右側脳室内に微量投与した。また遮断薬投与実験においては、前もって脳室内にインドメタシン (シクロオキシゲナーゼ阻害薬) またはフレグレイト (トロンボキサン合成酵素阻害薬) を前処置したのちに、それぞれのペプチドを同様に投与した。ペプチド投与前 (0 分)、投与後 60 分、120 分で灌流固定を行い、交感神経節 (上頸神経節、星状神経節および腹腔神経節) と副腎髄質を摘出した。副腎髄質ではクロマフィン染色を行った。交感神経節 NA 作動性ニューロンと副

腎髄質 AD 含有細胞との同定のため、ドパミン β -ヒドロキシラーゼ (DBH) およびフェニルエタノラミン N-メチルトランスフェラーゼ (PNMT) をそれぞれマーカーとして用い、神経活動亢進のマーカーとして c-Fos を用いて二重免疫染色を行った。副腎髄質では AD 含有細胞 (PNMT positive) または NA 含有細胞 (PNMT negative) における c-Fos 共発現細胞の割合を示した。また各交感神経節においては、NA 作動性ニューロン (DBH positive) 数を計測し、c-Fos 共発現ニューロンの割合を示した。

【結果】(1) CRF (1.5 および 3.0 nmol/animal, i.c.v.) により、星状神経節および腹腔神経節の NA 作動性ニューロンにおいて c-Fos 発現を増加させたが、上頸神経節においては c-Fos 発現を認めなかった (腹腔神経節 > 星状神経節 >>> 上頸神経節)。用量反応では CRF (1.5 nmol/animal) がより大きな反応を示した。




(2) ボンベシン (1.0 および 5.0 nmol/animal, i.c.v.) により、副腎髄質の AD 含有細胞および NA 含有細胞における c-Fos 発現が増加した。しかし、全ての交感神経節 (腹腔神経節、星状神経節、上頸神経節) の NA 作動性ニューロンにおいて c-Fos 発現は認めなかった。用量反応では 両用量において同程度の反応が認められた。

(3) インドメタシン (500 μ g/animal) の脳室内前処置により、ボンベシン (1.0 nmol/animal, i.c.v.) による全ての c-Fos 発現増加 (副腎髄質の AD 含有細胞および NA 含有細胞) は抑制された。

(4) フレグレイト (500 μ g/animal) の脳室内前処置により、ボンベシン (1.0 nmol/animal, i.c.v.) による全ての c-Fos 発現増加 (副腎髄質の AD 含有細胞および NA 含有細胞) は抑制された。

【考察】本研究結果より、CRF による交感神経節の活性化には選択制があることが明らかになった (腹腔神経節 >> 星状神経節 >>> 上頸神経節)。一方、ボンベシンはそれらの交感神経節には影響を及ぼすことなく副腎髄質の AD 含有細胞および NA 含有細胞のみを活性化すること、さらに、その作用には脳内トロンボキサン A_2 が関与していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | 白 井 大 介 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 高 尾 俊 弘  |
| | 副 査 氏 名 | 由 利 和 也  |
| | 副 査 氏 名 | 杉 浦 哲 朗  |

題 目 Differential roles of the sympathetic nervous system and adrenomedullary catecholamine-containing cells in bombesin- and CRF-induced central activation of the sympatho-adrenomedullary outflow in rats

(ボンベシンによる中枢性交感神経 - 副腎髄質系賦活機序の解析 - コンチコトロピン放出因子との対比 -)

[1] Selective activation of the sympathetic ganglia by centrally administered corticotropin-releasing factor in rats
(ラット脳室内に投与したコンチコトロピン放出因子は交換神経節を選択的に活性化する)

[2] Central bombesin activates adrenal adrenaline- and noradrenaline-containing cells via brain thromboxane A₂ in rats
(ラット脳室内に投与したボンベシンは脳内トンボキサンA₂を介して副腎髄質アドレナリン含有細胞およびノルアドレナリン含有細胞を活性化する)

著 者 [1] Daisuke Usui, Naoko Yamaguchi-Shima, Shoshiro Okada, Takahiro Shimizu, Hiroshi Wakiguchi, Kunihiro Yokotani
[2] Daisuke Usui, Naoko Yamaguchi-Shima, Shoshiro Okada, Takahiro Shimizu, Hiroshi Wakiguchi, Kunihiro Yokotani

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
[1] Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, (in press)
[2] Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical, (in press)

要 旨

【背景・目的】交感神経系はホメオスタシス維持に重要な役割を示している。交感神経系の賦活には様々な物質が関与しているが、実験動物の脳室内に投与したコルチコトロピン放出因子(CRF)およびボンベシンが血圧、脈拍、血中カテコールアミンを増加させるという報告から、これら2つのペプチドは中枢性に交感神経-副腎髄質系を賦活するとされている。交感神経節ノルアドレナリン(NA)作動性ニューロンからはNAが遊離される。一方、副腎髄質に存在するアド

レナリン(AD)含有細胞およびNA含有細胞からADとNAがそれぞれ個別に分泌される。しかし、それらペプチドがどの系を介して作用を表すのかは明らかではない。最近、申請者らは、最初期遺伝子であるc-Fosの発現を指標に、ラット脳室内に投与したCRFが副腎A細胞および腹腔神経節NA作動性ニューロンを、脳内トロンボキサン A_2 およびトロンボキサン A_2 以外のプロスタノイドを介して、それぞれ活性化することを報告した。そこで今回、申請者らはボンベシンの作用をCRFの作用と対比しながら、各種交感神経節(上頸神経節、星状神経節および腹腔神経節)を副腎髄質(A細胞とNA細胞)と共に、c-Fosを指標とした免疫組織学的手法を用いて、脳内プロスタノイドとの関連により解析した。

【方法】本研究ではウレタン麻酔(1.0 g/kg)したWistar系雄性ラット(体重約300g)を用いた。脳定位固定下に、CRFおよびボンベシンをそれぞれ右側脳室内に微量投与した。また遮断薬投与実験においては、前もって脳室内にシクロオキシゲナーゼ阻害薬であるインドメタシンまたはトロンボキサン合成酵素阻害薬のフレグレイトを前処置したのちに、それぞれのペプチドを同様に投与した。ペプチド投与前(0分)、投与後60分、120分で灌流固定を行い、交感神経節(上頸神経節、星状神経節および腹腔神経節)と副腎髄質を摘出した。交感神経節NA作動性ニューロンと副腎髄質AD含有細胞の同定のため、ドパミンからノルアドレナリンへの変換酵素であるドパミンβ-ヒドロキシラーゼ(DBH)およびノルアドレナリンからアドレナリンへの変換酵素であるフェニルエタノラミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)をそれぞれマーカーとして用い、神経活動亢進のマーカーとしてc-Fosを用いて二重免疫染色を行った。副腎髄質ではAD含有細胞(PNMT positive)またはNA含有細胞(PNMT negative)におけるc-Fos共発現細胞の割合を示した。また各交感神経節においては、NA作動性ニューロン(DBH positive)数を計測し、c-Fos共発現ニューロンの割合を示した。

【結果・考察】

(1) CRF(1.5および3.0 nmol/animal, i. c. v.)により、星状神経節および腹腔神経節のNA作動性ニューロンにおいてc-Fos発現を増加させたが、上頸神経節においてはc-Fos発現を認めなかった(腹腔神経節>星状神経節>>>上頸神経節)。用量反応ではCRF(1.5 nmol/animal)が3.0 nmol/animalに比し、より大きな反応を示した。

(2) ボンベシン(1.0および5.0 nmol/animal, i. c. v.)により、副腎髄質のAD含有細胞およびNA含有細胞におけるc-Fos発現が増加した。しかし、全ての交感神経節(腹腔神経節、星状神経節、上頸神経節)のNA作動性ニューロンにおいてc-Fos発現は認めなかった。用量反応では両用量において同程度の反応が認められた。

(3) インドメタシン(500 μg/animal)の脳室内前処置により、ボンベシン(1.0 nmol/animal, i. c. v.)による全てのc-Fos発現増加(副腎髄質のAD含有細胞およびNA含有細胞)は抑制された。

(4) フレグレイト(500 μg/animal)の脳室内前処置により、ボンベシン(1.0 nmol/animal, i. c. v.)による全てのc-Fos発現増加(副腎髄質のAD含有細胞およびNA含有細胞)は抑制された。

以上より、CRFによる交感神経節の活性化の程度は腹腔神経節が高く、上頸神経節が低いという選択制があることが明らかになった(腹腔神経節>>星状神経節>>>上頸神経節)。一方、ボンベシンはそれらの交感神経節には影響を及ぼすことなく副腎髄質のAD含有細胞およびNA含有細胞のみを活性化すること、さらに、その作用には脳内トロンボキサン A_2 が関与していることが明らかとなった。

本論文は、CRFとボンベシンの交感神経賦活には差があり、ストレス反応におけるこれらの物質の作用は単一ではないことが明らかとなったことより、ストレス関連疾病の発症メカニズムの解明に役立つ可能性を示した。よって、本論文は、高知大学博士(医学)に値すると判断した。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 佐々木 剛 (徳島県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第78号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Centrally administered neuromedin U elevates plasma adrenaline by brain prostanoid TP receptor-mediated mechanisms in rats (ラット脳室内に投与したニューロメジンUは脳内プロスタノイドTP受容体を介して血中アドレナリンを増加させる) |
| 発表誌名 | European Journal of Pharmacology, 592(1-3), (81~86), 2008年9月11日 |

| | | | | |
|-------------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 由利 | 和也 |
| | 副査 | 教授 | 本家 | 孝一 |
| | 副査 | 教授 | 高尾 | 俊弘 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 佐々木 剛

論文題目

Centrally administered neuromedin U elevates plasma adrenaline by brain prostanoid TP receptor-mediated mechanisms in rats

(ラット脳室内に投与したニューロメジンUは脳内プロスタノイドTP受容体を介して血中アドレナリンを増加させる)

(論文要旨)

【はじめに】生体が様々なストレスに暴露されると、その環境に適応するため様々なストレス反応が惹起される。この反応にかかわる中枢神経の出力系の1つに交感神経—副腎髄質系があり、この系の過剰な活性化は高血圧症、消化性潰瘍、免疫系機能の抑制と発癌など様々なストレス関連疾患を引き起こす。交感神経—副腎髄質系の中枢性賦活には視床下部が関与することが知られているが、その詳細な機序はいまだ明らかではない。

ニューロメジンU (NMU) はもともとブタの脊髄から単離された子宮収縮作用を持つペプチドであるが、中枢神経系にも存在する。特に視床下部においてNMUが豊富に存在することが免疫組織化学的手法により明らかにされている。中枢性に投与されたNMUにより、交感神経系の活性、自発運動活性および熱産生が上昇することが報告されている。視床下部は交感神経系賦活の制御中枢として機能することが知られており、脳内のNMUが交感神経系の中枢性賦活に関与していることが予想される。

従来から、交感神経系賦活の指標として血中のノルアドレナリン (NA) が、副腎髄質系賦活の指標として血中のアドレナリン (Ad) が用いられてきた。しかしながら、NAは交感神経終末のみならず、副腎髄質からも放出されることが知られている。これまで、私たちの研究室では、ストレスに関連する様々な脳内神経伝達物質(副腎皮質刺激ホルモン放出因子 [CRF]、バゾプレシン、ボンベシン、ヒスタミン、およびグルカゴン様ペプチド-1 [GLP-1])を麻酔したラット脳室内に投与することで血中NAおよびAdの増加が惹起されることを報告してきた。さらに、①脳室内投与したバゾプレシン、ボンベシンおよびヒスタミンが、脳内シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサンA₂合成酵素により生成したトロンボキサンA₂を介して、副腎髄質NA含有細胞およびAd含有細胞からそれぞれNAおよびAdを分泌すること、②脳室内投与CRFおよびGLP-1は脳内シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサンA₂を介してAd含有細胞からAd分泌を、脳内シクロオキシゲナーゼおよびプロスタグランジンE₂を介して交感神経終末からNA遊離をそれぞれ惹起すること、を明らかにした。そこで今回、NMU

による中枢性交感神経—副腎髄質系賦活機構を脳内プロスタノイドとの関連で解析した。

【方法】 ウレタン麻酔 (1.2 g/kg, i.p.) したラットを脳定位に固定し、脳室内に種々の薬物を投与した。あらかじめ留置した鼠径動脈カニューレから経時的に採血し、血漿中のカテコールアミンをアルミナ抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に測定した。

【結果】 ①NMU (0.1, 0.5 and 1 nmol/rat) の脳室内投与により血中 Ad は増加し、0.5 nmol/rat の用量で最大効果が得られた。一方、血中 NA に有意な増加は認められなかった。




②NMU (0.5 nmol/rat) の脳室内投与により惹起された血中 Ad の増加は、インドメタシン (シクロオキシゲナーゼ阻害薬) (0.6 and 1.2 μ mol/rat) の脳室内前処置により有意に抑制された。一方、血中 NA レベルに影響はみられなかった。

③NMU (0.5 nmol/rat) の脳室内投与により惹起された血中 Ad の増加は、フレグレイト (トロンボキサン A₂ 合成酵素阻害薬) (0.9 and 1.8 μ mol/rat) および(+)-S-145 (プロスタノイド TP 受容体遮断薬) (250 and 625 nmol/rat) 脳室内前処置によりそれぞれ有意に抑制された。一方、血中 NA レベルにはいずれも影響はみられなかった。

④NMU (0.5 nmol/rat) の脳室内投与により惹起された血中 Ad の増加は、急性両側副腎摘除により消失した。一方、血中 NA レベルに影響はみられなかった。

【結論】 ラット脳室内投与 NMU は脳内でトロンボキサン A₂ を生成し、脳内プロスタノイド TP 受容体を介して副腎髄質から Ad の分泌を選択的に喚起させることが示唆される。今後 NMU が交感神経—副腎髄質系のうち特に副腎髄質 Ad 含有細胞の中枢性賦活機構の解明に重要なツールとして応用できることが期待される。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|------|-----------|---|
| | 氏 名 | 佐々木 剛 |
| 審査委員 | 主査氏名 由利和也 |  |
| | 副査氏名 本家孝一 |  |
| | 副査氏名 高尾俊弘 |  |

題 目 Centrally administered neuromedin U elevates plasma adrenaline by brain prostanoid TP receptor-mediated mechanisms in rats
 (ラット脳室内に投与したニューロメジンUは脳内プロスタノイドTP受容体を介して血中アドレナリンを増加させる)

著 者 Tsuyoshi Sasaki, Takahiro Shimizu, Hiroshi Wakiguti, Kunihiko Yokotani

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 European Journal of Pharmacology, 592(1-3), (81~86),
 2008年9月11日

要 旨

ニューロメジンU (NMU) は、1985年に発見された脳腸管ペプチドで、平滑筋収縮作用および摂食調節に関与していることが知られている。近年、NMUはラットの脳においては視床下部や下垂体に豊富に存在しており、NMUを脳室内に投与すると交感神経系が活性化されることが報告された。交感神経系は副腎髄質を刺激し、アドレナリン (Ad) およびノルアドレナリン (NA) の分泌を促進する交感神経-副腎髄質系を構成しているとされる。申請者らの研究室では、これまでストレスに関連する生理活性物質 (副腎皮質刺激ホルモン放出因子、バゾプレシン、ボンベシン、ヒスタミン、グルカゴン様ペプチド-1) を麻酔したラット脳室内に投与することで血中NA およびAdの増加が惹起されることを報告し、脳内シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサンA₂合成酵素により生成したプロスタノイドであるトロンボキサンA₂を介して、副腎髄質よりAd およびNAが分泌されることを明らかにしてきた。今

回の研究では、NMUによる交感神経—副腎髄質系の賦活機構における脳内シクロオキシゲナーゼおよびプロスタノイド（トロンボキサン A₂）の関与について解析を行った。

体重 350 g の雄のウィスターラットをウレタン麻酔 (1.0 g/kg/ラット、i. p.) 後、脳定位装置に固定し、右脳室内に外径 0.3 mm のカニューレを挿入し、3 時間静置した後、脳室内に NMU または生理食塩水を投与し、10 分ごとに大腿動脈より採血を行い、HPLC を用いて血中 Ad および NA 濃度を測定した。ブロッキング実験としてシクロオキシゲナーゼ阻害薬にはインドメタシン (0.6 および 1.2 μmol/ラット)、トロンボキサン A₂ 合成酵素阻害薬にはフレグレイト (0.9 および 1.8 μmol/ラット) プロスタノイド TP 受容体遮断薬には (+) -S-145 (250 および 625 nmol/ラット) を NMU 投与の 30 分または 60 分前に脳室内に投与した。また、ウレタン麻酔科に両側副腎摘除を行い、その 3 時間後に NMU を脳室内に投与し、血中 Ad および NA 濃度を測定した。

その結果、NMU の脳室内投与により血中 Ad は増加したが、血中 NA に有意な変化は認められなかった。血中 Ad 濃度の増加は、インドメタシン (シクロオキシゲナーゼ阻害薬)、フレグレイト (トロンボキサン A₂ 合成酵素阻害薬)、(+)-S-145 (プロスタノイド TP 受容体遮断薬) または両側副腎摘除により有意に抑制されたが、血中 NA 濃度に影響はみられなかった。

ラット脳室内に投与された NMU による血中 Ad 濃度の増加は、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、バゾプレシン、ボンベシン、ヒスタミン、およびグルカゴン様ペプチド-1 による血中 Ad 濃度の増加と同様に脳内シクロオキシゲナーゼ、トロンボキサン A₂ およびプロスタノイド TP 受容体に関連すると考えられた。NMU は脳内シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサン A₂ 合成酵素活性を上昇させ、トロンボキサン A₂ のプロスタノイド TP 受容体を介するシグナル伝達が、副腎髄質より Ad を分泌することが示唆された。

以上のように、本研究は、NMU による交感神経—副腎髄質系の賦活機構において脳内シクロオキシゲナーゼ、トロンボキサン A₂ およびプロスタノイド TP 受容体の関与を解明し、ストレスに対する生体防御機構を薬理的に解析した点で高く評価され、高知大学博士 (医学) に相応しい研究内容であると評価した。

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 永井 立平(東京都) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第79号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Melatonin preserves fetal growth in rats by protecting against ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative mitochondrial damage in the placenta (メラトニンは虚血・再灌流による胎盤ミトコンドリアの酸化・窒素化障害からラット胎仔発育を保護する) |
| 発表誌名 | Journal of Pineal Research, 45(3), (271~276), 2008年10月 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 佐藤 | 隆幸 |
| | 副査 | 教授 | 脇口 | 宏 |
| | 副査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 永 井 立 平

論 文 題 目

Melatonin preserves fetal growth in rats by protecting against ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative mitochondrial damage in the placenta

(メラトニンは虚血・再灌流による胎盤ミトコンドリアの酸化・窒素化障害からラット胎仔発育を保護する)

(論文要旨)

【はじめに】

子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の病態については複雑であり、今日でも明らかでない部分が多い。子宮への血流の減少が原因の1つとして言われているが、実際に IUGR を呈した際の胎盤には梗塞をはじめとする虚血性変化を認めることが多い。また虚血・再灌流により酸化・抗酸化バランスの不均衡が生じ、二次的に IUGR を引き起こすと言われている。この不均衡は、主に胎盤での脂質過酸化によって増加し、妊娠高血圧症時にも mitochondria からの産生が増加する superoxide anion により引き起こされるのではないかとされている。

抗酸化物質やスカベンジャーなどによる酸化物質からの防御機構の低下は、酸化的 DNA 障害や細胞分裂制御の破綻を引き起こす。妊娠高血圧症や子宮内胎児発育遅延の妊婦では酸化的 DNA 障害の指標である 8-OHdG(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)が上昇することが知られている。一方、酸化還元因子として DNA の酸化的障害を修復する ref-1(repair DNA damage and act as a redox-modifying factor)などの DNA 修復酵素が虚血再灌流の際に高い活性を持つことが知られている。

我々は今まで強力な抗酸化作用を持つ Melatonin の経母体的投与が、虚血・再灌流によるラット脳 mitochondria の酸化的障害を抑制し、mitochondria 機能を改善することを報告してきた。本研究では、胎仔期の虚血・再灌流による酸化ストレスが、胎仔の体重、胎盤の重量と胎盤組織、および mitochondria 呼吸機能に与える影響、さらには経母体的予防投与した Melatonin の抗酸化効果を検討した。

【実験方法】

虚血・再灌流モデルを妊娠 16 日目の妊娠ラットを用いて作成した。子宮動静脈を鉗子で狭針し 30 分間虚血後、再灌流し酸化ストレスを加えた虚血・再灌流群(I/R)、妊娠期間中 20 μ g/ml の melatonin 水を自由飲水させ、虚血・再灌流した Melatonin 群(M)、sham operation のみを施行した control 群(C)の 3 群に分別した。①胎齢 20 の胎仔ラット体重、胎仔数と胎盤重量を測定した。②胎齢 20 の胎盤の mitochondria 呼吸活性(RCI)を酸素電極法で測定した。③胎盤組織を 8-OHdG と ref-1 について免疫組織染色し、組織障害の程度を比較検討した。


【成績】

①3 群間で胎仔数に有意差は認めなかった。ラット体重は C 群に比較し、I/R 群では有意に低値を示したが、M 群では I/R 群より有意に高値であった。胎盤重量は I/R 群では C 群に比較し有意に低値を示したが、M 群では I/R 群と有意差は認めなかった。②RCI は C 群に比較し、R 群では有意に低値を示したが、M 群では R 群より有意に高値であった。③酸化的核酸障害を示す 8-OhdG と、酸化的核酸障害の修復因子である ref-1 の免疫組織染色では、I/R 群で細胞核が濃染したのに対し、C 群、M 群では核は濃染されなかった。

【結論】

経母体的投与した melatonin は、我々が胎児脳 mitochondria で検討した結果と同様に、酸化ストレスによる胎盤 mitochondria 機能障害を減少させた。また、酸化ストレスは胎盤 trophoblast への DNA 障害を引き起こし、その修復機構を発現させていることが確認されたが、経母体的 melatonin 投与により細胞核における DNA 障害も減少することが分かった。その結果、胎盤重量減少を防ぐには至らなかったが、胎盤機能低下を防ぐことにより胎仔体重減少を予防する可能性が示唆された。現時点ではラットのみでの検討であり更なる研究が必要だが、melatonin は酸化ストレスが原因の IUGR や、妊娠高血圧症の際に認められる胎盤機能障害に対して抗酸化予防薬として有用である可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|-----------------|---|
| | 氏 名 | 永 井 立 平 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 佐 藤 隆 幸 |  |
| | 副 査 氏 名 脇 口 宏 | 印 |
| | 副 査 氏 名 杉 浦 哲 朗 | 印 |

題 目 Melatonin preserves fetal growth in rats by protecting against ischemia/reperfusion-induced oxidative/nitrosative mitochondrial damage in the placenta
 (メラトニンは虚血・再灌流による胎盤ミトコンドリアの酸化・窒素化障害からラット胎仔発育を保護する)

著 者 Ryuhei Nagai, Kazushi Watanabe, Akihiko Wakatsuki, Fumiaki Hamada, Koichi Shinohara, Yoshihiro Hayashi; Rina Imamura, Takao Fukaya

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Journal of Pineal Research, 45(3), (271~276), 2008年10月

要 旨

子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の原因として、子宮への血流減少によってひきおこされる胎盤組織の酸化ストレス障害が示唆されている。申請者は、松果体ホルモンであるメラトニンが抗酸化作用を有することに着目し、妊娠期のメラトニン投与によって、子宮の一過性虚血・再灌流によって誘発される胎盤組織内酸化ストレス反応や IUGR を抑制することができるか否かを動物モデル実験で検証した。

子宮の虚血再灌流モデルは、妊娠16日目のラット子宮動静脈を30分間のクランプした後に解除する方法により作製し、その後妊娠を継続させた。治療群では、妊娠初期より、メラトニン含有水 (20 μ /mL) を与えた。開腹手術のみを行ったコントロール群、虚血再灌流群、メラトニン投与虚血再灌流群の3群において、妊娠20日目に帝王切開により胎仔、胎盤を摘出した。胎仔体重、胎仔数、および胎盤重量を計測後、胎盤組織内ミトコンドリアの呼吸活性を酸素電極法により定量し、また、酸化ストレスによって引き起こされる DNA 傷害の指標 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) と DNA 修復酵素 (ref-1) の胎盤組織内における発現を免疫組織化学的に検討した。

3群間で胎仔数には有意差がなかったが、コントロール群に比較して、虚血再灌流群では、胎仔体重と胎盤重量が有意に小さかった。虚血再灌流群に比較して、メラトニン投与群では、胎仔体重は有意に大きかった。虚血再灌流群では、胎盤組織内ミト

ミトコンドリア呼吸活性が有意に低下していたが、メラトニン治療群では、低下が認められなかった。虚血再灌流群では、胎盤組織細胞において 8-OHdG と ref-1 の核内濃染が認められたが、メラトニン治療群では認められなかった。

以上の結果から、申請者は、妊娠期のメラトニン経口投与が子宮の虚血再灌流によってひき起こされる胎盤組織内の酸化ストレス反応を抑制し、IUGR を予防する可能性があるとして結論づけ、将来、臨床例での検証研究につなげていきたいとその展望を述べた。

以上のようなことから、審査員一同は、申請者の論文が、IUGR の予防に関する研究の発展に大きく貢献したと認め、高知大学博士（医学）の学位を授与するに値するものと判断した。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 濱田 知幸 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第80号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Clinical Features of Dilated Phase of Hypertrophic Cardiomyopathy in Comparison With Those of Dilated Cardiomyopathy (拡張相肥大型心筋症の臨床像と予後の検討; 拡張型心筋症との比較) |
| 発表誌名 | Clinical Cardiology, 2009年掲載予定 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |
| | 副査 | 教授 | 佐藤 | 隆幸 |
| | 副査 | 教授 | 瀬尾 | 宏美 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 濱田 知幸

論文題目

Clinical Features of Dilated Phase of Hypertrophic Cardiomyopathy in Comparison With Those of Dilated Cardiomyopathy
(拡張相肥大型心筋症の臨床像と予後の検討；拡張型心筋症との比較)

(論文要旨)

【背景】肥大型心筋症 (HCM) は非対称性心筋肥大を特徴とする心筋疾患であり比較的予後良好と報告されている。しかし、その臨床像は多彩であり、経過中に左室拡大および左室収縮障害を来たす例が 5 ~ 10% 程度あり拡張相肥大型心筋症 (D-HCM) と呼ばれ、その予後は極めて不良とされている。一方、拡張型心筋症 (DCM) は著しい左室拡大と左室壁の菲薄化、左室収縮不全を特徴とする心筋疾患であり、難治性心不全に至り予後不良である。近年、左室収縮障害例に対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI)、アンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB)、 β 遮断薬の予後改善効果が示された。これらの薬剤が標準的治療法となって以来、DCM の予後は著明に改善してきた。

本研究の目的は、左室収縮不全の観点から D-HCM と DCM の臨床像を比較し、その相違を明らかにし、上記標準的薬物療法が一般的となった 1990 年以降に診断された D-HCM および DCM の予後を比較することである。




【方法】1990 年から 2005 年までに高知大学医学部附属病院で診断された D-HCM 患者 20 例 (男性 11 例、女性 9 例、平均年齢 61 ± 12 歳) と DCM 患者 115 例 (男性 89 例、女性 26 例、平均年齢 59 ± 12 歳) について、診断時の臨床所見、経胸壁心エコー図、24 時間ホルター心電図所見と予後について比較検討した。HCM の診断基準は経胸壁心エコー図で最大左室壁厚が 15mm 以上の壁肥厚を認め、2 次性の左室肥大が除外された例とした。また、D-HCM の診断基準は左室駆出率 (LVEF) が 50% 未満であり、以下の 3 項目のいずれかを満たす例とした。①最大左室壁厚が 15mm 以上である例、②以前 HCM と確定診断されていた例、③ HCM の家族歴を有する例。一方、DCM の診断基準は左室拡張末期径が 55mm 以上かつ LVEF が 50% 未満で、左室収縮障害をきたす他の疾患が除外された例とした。また、予後の評価項目は、①全死亡および心移植、②心血管死 (突然死、心不全死、脳卒中関連死) および心移植とした。

【結果】(1) 診断時の New York Heart Association 心機能分類：Ⅲ度以上は D-HCM で 8 例 (40%)、DCM で 25 例 (22%) と D-HCM で高頻度。(2) 経胸壁心エコー図：左室拡張末期径は D-HCM 55 ± 7 mm、DCM 63 ± 7 mm と DCM で拡大し ($p < 0.0001$)、左室駆出率は D-HCM $43 \pm 6\%$ 、DCM $32 \pm 10\%$ と DCM でより低下 ($p < 0.0001$)。左房径は

D-HCM $50\pm 7\text{mm}$ 、DCM $43\pm 7\text{mm}$ とD-HCMで拡大 ($p=0.0004$)。 (3) 心房細動の頻度: D-HCM 10例 (50%)、DCM 31例 (27%)と有意にD-HCMで高頻度 ($p=0.039$)。 (4) 植え込み型除細動器、心臓再同期療法の導入例: D-HCM 6例 (30%)、DCM 5例 (5%)とD-HCMで高頻度。 (5) 5年生存率: 全死亡+心移植ではD-HCM 45.6%、DCM 81.6% ($p = 0.0001$)、心血管死+心移植ではD-HCM 48.7%、DCM 87.9% ($p < 0.0001$)とD-HCMで著明に予後不良であった。

【結論】左室拡大・収縮能低下はDCMで著明だが、D-HCMは診断時より心不全症状の重症度は高度である。また、D-HCMはDCMと同等の薬物療法が実施され、また非薬物療法も高頻度で導入されているにも関わらず予後は不良であった。D-HCMでは薬物療法による予後改善効果はDCMほど期待できず、診断時より非薬物療法も考慮し慎重な経過観察が必要である。

論文審査の結果の要旨

| | 氏 名 |
|---------|--|
| | 瀨 田 知 幸 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 杉 浦 哲 朗  |
| | 副 査 氏 名 佐 藤 隆 幸  |
| | 副 査 氏 名 瀨 尾 宏 美  |

題 目 Clinical Features of Dilated Phase of Hypertrophic Cardiomyopathy
in Comparison With Those of Dilated Cardiomyopathy
(拡張相肥大型心筋症の臨床像と予後の検討；拡張型心筋症との比較)

著 者 Tomoyuki Hamada, Toru Kubo, Hiroaki Kitaoka, Takayoshi Hirota,
Eri Hoshikawa, Kayo Hayato, Yuji Shimizu, Makoto Okawa,
Naohito Yamasaki, Yoshihisa Matsumura, Toshikazu Yabe, Jun Takata,
Yoshinori L. Doi

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Clinical Cardiology, 2009年掲載予定

要 旨

[背景及び目的]

肥大型心筋症(HCM)は左室壁の肥厚を認める心筋疾患であるが、比較的予後は良好と報告されている。しかし、経過中に左室拡大および左室収縮障害をきたす拡張相肥大型心筋症(D-HCM)の予後は極めて不良とされている。一方、拡張型心筋症(DCM)は著しい左室拡大と左室壁の菲薄化、左室収縮不全を特徴とする心筋疾患であり、難治性心不全に至り予後不良である。近年、左室収縮障害例に対するアンジオテンシン変換酵素阻害(ACEI)、アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)、 β 遮断薬などの薬剤が標準的治療法となって以来、DCMの予後は著明に改善してきた。そこで、申請者らは左室収縮不全の観点から D-HCM と DCM の臨床像を比較し、その相違を明らかにし、上記標準的薬物療法が一般的となった1990年以降に診断された D-HCM および DCM の予後を比較した。

[方法]

対象は1990年から2005年までに高知大学医学部附属病院で診断されたD-HCM患者20例(男性11例、女性9例、平均年齢 61 ± 12 歳)とDCM患者115例(男性89例、女性26例、平均年齢 59 ± 12 歳)である。診断時の臨床所見、経胸壁心エコー図、24時間ホルター心電図所見および予後について比較検討した。D-HCMの診断は左室駆出率(LVEF)が50%未満であり、①最大左室壁厚が15mm以上である例、②以前HCMと確定診断されていた例、③HCMの家族歴を有するのいずれかを満たす症例とした。一方、DCMの診断は左室拡張末期径が55mm以上かつLVEFが50%未満で、左室収縮障害をきたす他の疾患が除外された例とした。また、予後の評価項目は全死亡+心移植および心血管死(突然死、心不全死、脳卒中関連死)+心移植とした。

[結果]

得られた結果は以下のように要約される。

- 1) 診断時のNew York Heart Association心機能分類:III度以上はD-HCMで8例(40%)、DCMで25例(22%)とD-HCMで高頻度であった。
- 2) 左室拡張末期径はDCMでD-HCMに比し拡大しており(63 ± 7 mmと 55 ± 7 mm、 $p < 0.001$)、左室駆出率もDCMでより低値($32\pm 10\%$ と $43\pm 6\%$ 、 $p < 0.001$)を示した。一方、左房径はD-HCMでDCMに比し拡大していた。 $(50\pm 7$ mmと 43 ± 7 mm、 $p < 0.001$)。
- 3) 心房細動はD-HCM10例(50%)、DCM31例(27%)に認め、D-HCMで有意に高頻度であった($P=0.039$)。
- 4) D-HCMとDCM間には薬物療法(ACEI、ARB、 β 遮断薬、利尿剤、ジギタリス等)には有意差がなかったが、植込み型除細動器、心臓再同期療法の導入例はD-HCM(6例、30%)、DCM5例(5%)とD-HCMで高頻度であった。
- 5) 5年生存率をみると、全死亡+心移植はD-HCMでは45.6%、DCMでは81.6%、心血管死+心移植はD-HCMでは48.7%、DCMでは87.9%といずれもD-HCMがDCMに比し予後不良であった。

申請者らは左室収縮能低下を示す肥大型心筋症(D-HCM)の予後を観察し、DCMの予後と比較検討を行った。その結果、左室拡大・収縮能低下はDCMで著明だが、D-HCMは診断時より心不全症状の重症度は高度であった。また、D-HCMはDCMと同等の薬物療法が実施されているにも関わらず、非薬物療法は高頻度で導入されており、予後は不良であった。近年、薬物療法によりDCMの予後は改善してきているが、D-HCMとDCMの予後を比較検討した研究はなかった。申請者らはD-HCMでは薬物療法による予後改善効果はDCMほど期待できず、診断時より非薬物療法も考慮し慎重な経過観察が予後を改善する上で臨床的に重要であることを初めて報告した。したがって、本論文は高知大学博士(医学)に値すると評価された。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 小野川 雅英 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第81号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Animal studies supporting the inhibition of mast cell activation by <i>Eriobotrya Japonica</i> seed extract (アレルギー反応に伴う肥満細胞活性化に対する枇杷種子由来エキスの抑制効果) |
| 発表誌名 | Journal of pharmacy and pharmacology, 61, 237-242, 2009年2月 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 福島 | 敦樹 |
| | 副査 | 教授 | 佐野 | 栄紀 |
| | 副査 | 教授 | 谷口 | 武利 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 小野川 雅英

論文題目 Animal studies supporting the inhibition of mast cell activation by *Eriobotrya japonica* seed extract

(アレルギー反応に伴う肥満細胞活性化に対する
枇杷種子由来エキスの抑制効果)

(論文要旨)

【緒言】花粉症等のアレルギー疾患では、その発症・進展に多くの因子が複雑に関与しているため、難治性であることが多い。最近、アレルギー性疾患の進展過程においても体内で過剰に産生した活性酸素は過敏性の獲得、炎症の慢性化等に関与することが注目されている。そのためアレルギー疾患の予防・治療に対する抗酸化剤の有用性についての検討が重要と考える。

枇杷は、日本・中国などで広く植栽され、古くから薬用植物として利用されている。生薬としての薬用部位は主に葉であり、枇杷葉は枇杷葉湯などの漢方薬に配合され、皮膚疾患、消炎鎮痛、鎮咳・去痰などに用いられている。一方、種子は中国古典「四川中約志」に「痰を化し、止咳する、肝を疏らせ、気を理える」と記載されているが、その利用は同属植物の生薬である杏仁の代用として鎮咳・去痰に用いる程度で、その使用頻度は僅かであり、ほとんどが塵埃として破棄されていた。

当教室では、既に、枇杷の種子から70%エタノールを用いた独自の方法で抽出したエキス（枇杷種子由来エキス）が強い抗酸化活性を有し、肝・腎障害、がん治療時に副作用として発症する口内炎などの予防・治療に有用であることを、病態モデル動物を用いた実証実験および臨床試験等により明らかとした。また、その活性成分として、 β -シトステロール、リノール酸、リノレン酸などの不飽和脂肪酸や各種ポリフェノール等、種々の成分を含有することを確認している。このような背景から、学位申請者は、強い抗酸化活性を有する枇杷種子由来エキスのアレルギー性疾患に対する有用性について、ラット由来肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制効果、ラット背部皮膚における血管透過性抑制効果、花粉症モデルモルモットにおける鼻症状の抑制効果を検討することにより評価した。




【方法】①枇杷種子由来エキスの作製：枇杷種子 1kg から抽出したエキスを蒸発乾固し、精製水にて全量 200ml とし、濃縮液を製した。②ヒスタミン遊離抑制効果：Wister 系雄性ラット（7週齢）を放血致死後、腹腔内肥満細胞を採取した。順次希釈した種々の濃度の枇杷種子由来エキスを肥満細胞に添加後、Compound 48/80 を用いてヒスタミンを遊離させた。細胞内および遊離ヒスタミン量は蛍光法にて測定した。対照群には Tyrode 液を用い、枇杷種子由来エキス添加群と対照群の遊離ヒスタミン量の比より遊離抑制率を求めた。なお、枇杷種子由来エキスの細胞毒性は、枇杷種子由来エキスを肥満細胞に添加し、培養 2 日後における LDH 活性を WST-ホルマザン法により測定し、評価した。③血管透過性の抑制効果：Wister 系雄性ラット（7週齢）の背部皮膚における PCA (Passive Cutaneous Anaphylaxis) 反応により評価した。ラット背部に抗 Dinitrophenyl (DNP) 抗体を皮内投与し、48 時

間後、抗原として DNP-Albumin を含む Evans blue 溶液を静脈内投与した。枇杷種子由来エキスは抗原投与 2 時間前に経口投与した。対照群には水道水を投与した。静脈内投与 30 分後、放血致死させ、背部皮膚を採取、色素量を吸光度法により求めた。④花粉症に伴う鼻症状抑制効果：実験動物は Hartley 系雄性モルモット (3 週齢) を用いた。花粉症モデルは、スギ花粉抽出エキス・水酸化アンモニウム混液 ($0.1 \mu\text{g protein} \cdot 0.1\text{mgAL}(\text{OH})_3/1 \mu\text{L}$) を 1 回 $3 \mu\text{L}$ ずつ 1 日 2 回、両鼻腔内に点鼻し、感作させた後、1 週間毎にスギ花粉を 1.8mg ずつ両鼻に吸入させることにより作製した。感作後、モルモットを 2 群に別け、枇杷種子由来エキス投与群には 10 倍希釈したエキスを 1 日 100mL 投与した。対照群には、水道水を投与した。スギ花粉吸入後 10 分間の「くしゃみ」および「鼻かき」回数を計測した。⑤有効成分の検索：枇杷種子由来エキスに含有されているポリフェノール類を高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により測定した。

【結果・考察】ラット肥満細胞からの遊離ヒスタミン量は、枇杷種子由来エキスの添加の有無により異なった。対照群との比較によるヒスタミン遊離抑制は枇杷種子由来エキスの 5000 分の 1 の濃度より認められた。その効果は濃度依存的に増大し、200 分 1 の濃度で 75.8% の抑制効果を認めた。また、枇杷種子由来エキス添加肥満細胞の LDH 活性は、いずれの添加濃度においても対照群との差は認められず、細胞毒性は有しないものと考察した。ラットの背部皮膚における PCA 反応実験では、枇杷種子由来エキス投与群は、対照群に比べ有意な色素量の減少を認めた ($p < 0.01$)。これらのことから、抗原抗体反応の結果、遊離されるヒスタミンによる血管透過性亢進は、枇杷種子由来エキスの投与により抑制されることが示された。花粉症モデルモルモットを用いた鼻症状抑制効果に対する検討においては、モデルモルモットの「くしゃみ」および「鼻かき」の累積回数は枇杷種子由来エキス投与の有無により異なった。枇杷種子由来エキス投与群の「くしゃみ」回数は 4 週後より、「鼻かき」回数は 5 週後より、対照群に比べ有意に低値を示した ($p < 0.05$)。枇杷種子由来エキス群の「くしゃみ」および「鼻かき」累積回数は、10 週目において、対照群の約 50% の値を示した。

申請者の今回の検討により、枇杷種子由来エキスはヒスタミン遊離抑制作用を持ち、花粉症を初めとする各種アレルギー疾患に対してヒスタミンに起因するとされるくしゃみや鼻汁の抑制に効果的であることが示された。枇杷種子由来エキスは種々のポリフェノール (gallic acid、p-hydroxybenzoic acid、chlorogenic acid、caffeic acid、protocatechueic acid、ferulic acid) 等を含有していた。各種ポリフェノールにはヒスタミン遊離抑制効果が認められていることから、エキスに含まれるポリフェノールなどの抗酸化物質が有効成分であると考え。今後、免疫学的な作用を含め、枇杷種子由来エキスの持つ抗酸化作用との関連性について検討をしていきたいと考える。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | 小野川 雅 英 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 福 島 敦 樹  |
| | 副 査 氏 名 | 佐 野 栄 紀  |
| | 副 査 氏 名 | 谷 口 武 利  |

題 目 Animal studies supporting the inhibition of mast cell activation by
Eriobotrya Japonica seed extract
 (アレルギー反応に伴う肥満細胞活性化に対する枇杷種子由来エキスの抑制
 効果)

著 者 Masahide Onogawa, Guangchen Sun, Daisuke Takuma, Atsuhide Hamada,
 Junko Yokota, Saburo Yoshioka, Masahiko Kusunose, Mitsuhiko Miyamura,
 Shojiro Kyotai, and Yutaka Nishioka

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Journal of pharmacy and pharmacology, 61, 237-242, 2009年2月

要 旨

【緒言】花粉症等のアレルギー疾患では、その発症・進展に多くの因子が複雑に関与しているため、難治性であることが多い。最近の研究結果から、アレルギー性疾患の悪化において体内で過剰に産生した活性酸素が過敏性の獲得、炎症の慢性化等に関与することが注目されている。

枇杷は、日本・中国などで広く植栽され、古くから薬用植物として利用されている。生薬としての薬用部位は主に葉であり、皮膚疾患、消炎鎮痛、鎮咳・去痰などに用いられている。一方、種子の使用頻度は僅かであり、ほとんどが破棄されていた。申請者の所属する教室では、枇杷の種子から70%エタノールを用いた独自の方法で抽出したエキス(枇杷種子由来エキス)が強い抗酸化活性を有し、肝・腎障害、がん治療時に副作用として発症する口内炎などの予防・治療に有用であることを、病態モデル動物を用いた実験および臨床試験等により明らかとした。また、その活

性成分として、 β -シトステロールなどの不飽和脂肪酸や各種ポリフェノール等、種々の成分を含有することを確認している。そこで、申請者は、枇杷種子由来エキスのアレルギー性疾患に対する有用性について検討することを目的として研究を行った。

【方法】①枇杷種子由来エキスの作製：枇杷種子 1kg から抽出したエキスを蒸発乾固し、精製水にて全量 200ml とし、濃縮液を作製した。②ヒスタミン遊離抑制効果：Wister 系雄性ラット（7 週齢）から採取した腹腔内肥満細胞に種々の濃度の枇杷種子由来エキスを添加後、Compound48/80 を用いてヒスタミンを遊離させた。細胞内および遊離ヒスタミン量は蛍光法にて測定した。対照群には Tyrode 液を用い、枇杷種子由来エキス添加群と対照群の遊離ヒスタミン量の比より遊離抑制率を求めた。枇杷種子由来エキスの細胞毒性は、枇杷種子由来エキスを肥満細胞に添加し、培養 2 日後における LDH 活性を WST ホルマザン法により測定し評価した。③血管透過性の抑制効果：Wister 系雄性ラット（7 週齢）の背部皮膚における PCA (Passive Cutaneous Anaphylaxis) 反応により評価した。ラット背部に抗 Dinitrophenyl (DNP) 抗体を皮内投与し、48 時間後、抗原として DNP-Albumin を含む Evans blue 溶液を静脈内投与した。枇杷種子由来エキスは抗原投与 2 時間前に経口投与した。対照群には水道水を投与した。静脈内投与 30 分後、背部皮膚を採取、色素量を吸光度法により求めた。④花粉症に伴う鼻症状抑制効果：実験動物は Hartley 系雄性モルモット（3 週齢）を用いた。花粉症モデルは、スギ花粉抽出エキス・水酸化アンモニウム混液 ($0.1 \mu\text{g protein} \cdot 0.1\text{mgAL}(\text{OH})_3/1 \mu\text{L}$) を 1 回 $3 \mu\text{L}$ ずつ 1 日 2 回、両鼻腔内に点鼻し感作させた後、1 週間毎にスギ花粉を 1.8mg ずつ両鼻に吸入することにより作製した。感作後、モルモットを 2 群に別け、枇杷種子由来エキス投与群には 10 倍希釈したエキスを 1 日 100mL 投与した。対照群には、水道水を投与した。スギ花粉吸入後 10 分間の「くしゃみ」および「鼻かき」回数を計測した。⑤有効成分の検索：枇杷種子由来エキスに含有されているポリフェノール類を高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により測定した。

【結果・考察】ラット肥満細胞からの遊離ヒスタミン量に関して、対照群との比較によるヒスタミン遊離抑制は枇杷種子由来エキスの 5000 分の 1 の濃度より認められた。その効果は濃度依存的に増大し、200 分の 1 の濃度で 75.8% の抑制効果を認めた。また、枇杷種子由来エキス添加肥満細胞の LDH 活性は、いずれの添加濃度においても対照群との差は認められず、細胞毒性は有しないと考えられた。PCA 反応実験では、枇杷種子由来エキス投与群は、対照群に比べ有意な色素量の減少を認めた ($p < 0.01$)。これらのことから、抗原抗体反応の結果、遊離されるヒスタミンによる血管透過性亢進は、枇杷種子由来エキスの投与により抑制されることが示された。花粉症モデルモルモットを用いた鼻症状抑制効果に対する検討においては、枇杷種子由来エキス投与群の「くしゃみ」回数は 4 週後より、「鼻かき」回数は 5 週後より、対照群に比べ有意に低値を示した ($p < 0.05$)。枇杷種子由来エキス群の「くしゃみ」および

「鼻かき」累積回数は、10週目において、対照群の約50%の値を示した。以上の結果から、枇杷種子由来エキスはヒスタミン遊離抑制作用を持ち、花粉症を初めとする各種アレルギー疾患に対してヒスタミンに起因するとされるくしゃみや鼻汁の抑制に効果的であることが示された。また、枇杷種子由来エキスは種々のポリフェノールを含有していた。各種ポリフェノールにはヒスタミン遊離抑制効果が認められていることから、エキスに含まれるポリフェノールなどの抗酸化物質が有効成分であると考えられた。今後、免疫学的な作用を含め、枇杷種子由来エキスの持つ抗酸化作用との関連性について検討する必要がある。

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 永尾 環(京都府) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第82号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Thymus-derived CD4+CD25+ T cells suppress the development of murine allergic conjunctivitis (胸腺由来 CD4/CD25 陽性 T 細胞はマウスアレルギー性結膜炎の発症を抑制する) |
| 発表誌名 | International Archives of Allergy and Immunology, 143(4), 276-281, 2007年3月12日 |

| | | | | |
|-------------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 宇高 | 恵子 |
| | 副査 | 教授 | 横山 | 彰仁 |
| | 副査 | 教授 | 佐野 | 栄紀 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 永尾 環

論文題目

Thymus-derived CD4+CD25+ Tcells suppress the development of murine allergic conjunctivitis. (胸腺由来 CD4/CD25 陽性 T 細胞はマウスアレルギー性結膜炎の発症を抑制する)

(論文要旨)

<目的>

アレルギー性結膜疾患の重症型である春季カタルでは、結膜に巨大乳頭などの増殖性変化、角膜潰瘍や角膜プラークを形成し、時に視力障害を引き起こす。巨大乳頭には多数の好酸球が浸潤し、角膜障害の程度と好酸球浸潤の程度に関連性があることから、重症化に好酸球が重要な役割を果たしていると考えられている。アレルギー性結膜疾患は抗原特異的な疾患であるが、好酸球は抗原認識能を持たない。発表者の所属研究室ではマウス実験的アレルギー性結膜炎 (experimental allergic conjunctivitis, EC) を用い、抗原を認識した抗原特異的 T 細胞 (CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th2 細胞)) の移入により、結膜好酸球浸潤が誘導されることを証明した。しかし *in vivo* においては、結膜好酸球浸潤を誘導する Th2 細胞が単独で存在することはなく、Th2 細胞の活性化を制御する細胞集団も存在し、結膜好酸球浸潤に影響を与えると考えられる。本論文では既報の EC を用い、内在性の CD4/CD25 陽性制御性 T 細胞 (CD4/CD25 陽性 regulatory T cell (Treg)) が結膜好酸球浸潤にどの様に関与しているのかを検討した。

<方法>

① Tregの除去実験

胸腺由来の Treg を除去するために BALB/c マウスの胸腺を生後3日目に摘出した。胸腺摘出を行わなかったマウスを対照群とした。生後42日目にブタクサ (RW) と alum とのエマルジョンを免疫した。Treg をより効率的に除去するために生後4日目より、免疫までの間、CD25 に対する中和抗体 (PC61)、あるいは対照として正常ラット IgG (nrIgG) を腹腔内に3回投与した。すなわち合計4群を設けた。免疫後10日目に RW を点眼し EC を誘導した。RW 点眼24時間後に結膜、脾臓および血液を採取し、結膜浸潤好酸球数、脾細胞の RW 特異的サイトカイン産生、RW 特異的脾細胞増殖、血清免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) 値を測定した。

② Tregの移入実験

RW と alum とのエマルジョンを免疫し、その3日後に autoMACS[®] を用いて回収した CD4/CD25 陽性細胞 (無処置の同系マウス脾細胞より分離) を静脈注射した。免疫後10日目に RW を点眼し EC

を誘導し、24時間後に結膜を採取し、結膜浸潤好酸球を計数した。mediumを静脈注射したマウスを対照群とした。



<結果>

- 1) 脾細胞におけるCD4/CD25陽性Tregの比率は胸腺非摘出+nrIgG投与群：2.40±0.22%、胸腺摘出+nrIgG投与群：1.01±0.24%、胸腺摘出+PC61投与群：0.40±0.10%であった。胸腺摘出に加えPC61を投与することでCD4/CD25陽性Tregは有意に減少した(P<0.05)。
- 2) 胸腺摘出+PC61投与群では結膜浸潤好酸球数が有意に増加し、脾細胞のTh1サイトカイン(IFN- γ)産生の有意な減少、Th2サイトカイン(IL-5、IL-10、IL-13)産生の有意な増加を認めた。結膜浸潤好酸球数の結果と同様に、RW特異的脾細胞増殖、RW特異的血清IgE値、RW特異的血清IgG₁値も有意に上昇した。
- 3) autoMACS®を用いて回収した細胞はCD4/CD25陽性96%、CD25/Foxp3陽性85%であった。
- 4) Tregを移入した群は対照群と比較し結膜浸潤好酸球数は有意に少なかった。

<結論>

Tregの除去による結膜浸潤好酸球数の有意な増加は、Th1応答の抑制とTh2応答の増強のためであると考えられた。すなわちTregは結膜好酸球浸潤誘導能をもつTh2細胞を抑制していると考えられる。Tregを移入することにより結膜好酸球浸潤が抑制された結果は、この考えを支持するものである。これまで、TregはTh1が関与する自己免疫疾患の発症に抑制的に働くとの報告が多い。Th2が関与するアレルギー疾患に関しては、喘息動物モデルにおいてPC61の投与により喘息の悪化を認め、またTregを移入することで喘息が抑制されたと報告されており、我々の結果もこれに一致する。この様にアレルギー疾患や自己免疫疾患など種々の免疫が関与する疾患において、Tregはeffector細胞を抑制することにより疾患発症を抑制していると考えられる。最近、Tregを*in vitro*で増殖させることが可能であると報告された。これらの手法を用い、*in vitro*で増殖させたTregを炎症局所へ選択的に投与する新しい治療方法が期待される。

論文審査の結果の要旨

| | 氏 名 | 永 尾 環 |
|---------|---------|---|
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 宇 高 恵 子  |
| | 副 査 氏 名 | 横 山 彰 仁 印 |
| | 副 査 氏 名 | 佐 野 栄 紀  |

題 目 Thymus-derived CD4+CD25+ Tcells suppress the development of murine allergic conjunctivitis
 (胸腺由来 CD4/CD25 陽性 T 細胞はマウスアレルギー性結膜炎の発症を抑制する)

著 者 Tamaki Sumi, Atsuki Fukushima, Ken Fukuda, Naoki Kumagai,
 Teruo Nishida, Masaru Takeuchi, Osamu Taguchi, Hisayuki Ueno

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月 日
 International Archives of Allergy and Immunology, 143(4), 276-281,
 2007 年 3 月 12 日

要 旨

永尾 環さんの学位審査は、2009年2月23日17:00より、約1時間にわたって行いました。まず研究内容の公開審査を行いました。

[目的]

アレルギー性結膜疾患の重症型である春季カタルでは、病変結膜に巨大乳頭などの増殖性変化が見られ、そこには好酸球の浸潤が見られる。しかし、好酸球自身は、アレルゲンに対する特異的抗原認識分子を持たぬことから、好酸球の浸潤を促すいくつかの免疫細胞種の関与が考えられる。眼科学教室のこれまでの研究から、角膜への好酸球浸潤に CD4 陽性ヘルパー T 細胞(Th)が関与することが示唆された。そこで、本研究では、抗原特異的 Th の誘導に影響を及ぼす可能性のある CD4, CD25 陽性の制御性 T 細胞(Treg)を除去、あるいは移入することにより、これらの細胞の、マウス結膜への好酸球浸潤への関与を調べた。

これまでに眼科学教室では、RW 感作マウスに点眼により抗原チャレンジをするエフェクター相において、抗原チャレンジの2時間前に NKT 細胞のリガンドである α -GalCer を腹腔注射すると、結膜への好酸球浸潤が抑制されることを観察した。この反応に、CD4, CD25 陽性の制御性 T 細胞

(Treg)が関与するかどうかを調べた。

[方法と材料]

Treg除去BALB/cマウスは、生後3日目に胸腺摘出してTregの産生を抑え、さらにTregの除去を完全にするため、生後4日目より、抗CD25抗体を間歇的に投与して作製した。抗原による感作は、ブタクサ花粉(RW)をAlumに懸濁して足蹠および背部に皮下注射することで行い、結膜炎の誘導は、RW花粉の点眼により行った。RW点眼後24時間、結膜への好酸球浸潤の計数および免疫機能の定量解析を行った。

Tregの移入実験は、RW免疫3日後の脾細胞から、autoMACSを使ってCD4/CD25陽性細胞を分離し、静注により行った。

α -GalCerの影響は、RW感作マウスに、RW抗原チャレンジをする2時間前に α -GalCerを腹腔注射し、RW点眼後24時間における結膜好酸球を計数することによって調べた。

[結果]

1. RW 特異的な結膜への好酸球浸潤に対する、胸腺由来 Treg 細胞の抑制活性

BALB/c マウスにおいては、新生児期に胸腺摘出し、さらに抗体(PC61; rat IgG1)をin vivo投与して末梢のCD25陽性Tregを除去したマウスでは、RW抗原を点眼した結膜への好酸球浸潤が有意に増強した。この結果は、血清中のRW抽出液特異的IgE、IgG1量の増加および脾細胞のRW反応性のサイトカイン分泌(IL-5、IL-10、IL-13の増加および、IFN- γ の低下)や増殖反応と相関していた。興味深いことに、胸腺を除去しないマウスでは、末梢のTregを抗体で除去する操作のみでは抑制効果がみられなかった。したがって、結膜への好酸球浸潤には、主として、“胸腺由来の”Tregが関与していることが示唆された。

さらに、未免疫BALB/cマウスの脾臓から単離したCD25、CD4 T細胞を、上記の胸腺摘出RW感作マウスに養子移入したところ、RW点眼結膜への好酸球浸潤は、有意に抑制された。

2. RW 特異的な結膜への好酸球浸潤に対する、 α -GalCer の抑制活性の Treg 依存性

抗原チャレンジ2時間前に α -GalCerを腹腔投与することによって結膜好酸球浸潤が抑制される現象が、Tregを介した反応かどうか調べるため、上記の胸腺摘出+抗CD25抗体によりTregを除去したRW感作マウスに α -GalCerを投与して、好酸球の浸潤を調べた。その結果、Treg除去マウスでは、 α -GalCer投与による結膜好酸球浸潤の抑制が見られないことがわかった。

[考察]

RW 特異的な結膜好酸球浸潤を抑制する Treg の役割は、これまで抗 CD25 抗体(PC61; rat IgG1)をin vivo投与し、末梢のTregを除去するのみでは明らかにできていなかった。しかし、今回、胸腺摘出後、抗体処理を追加して、胸腺由来のTregを十分に除去したマウスモデルを使うことにより、Tregの役割を明らかにすることができた。その結果、結膜好酸球浸潤を抑える機能が、主として胸腺由来のFoxP3陽性Tregに担われていることが示唆された。さらに、これまでに観察されていた、effector相において α -GalCerを事前に腹腔に投与することにより結膜好酸球浸潤が抑制される反

応は、NKT 細胞のみならず、Treg を介して現れる可能性が示唆された。

[審査の状況]

審査員からは、以下のような質問や議論がなされた。

1. 胸腺除去、抗 CD25 抗体による CD25、CD4 T 細胞の除去は、いずれも、Treg のみならず、effector T 細胞の数やレパートリーに、無視できない変化が起こるため、結果を単純には解釈できない可能性がある。
2. 今回養子移入に使った Treg は、polyclonal な抗原非特異的な Treg 細胞である。それらは、どこで(角膜局所か、所属リンパ節か、それとも脾臓など、全身的に起こる反応か)、どのようなメカニズムで RW 抗原特異的な好酸球の角膜浸潤を抑制すると考えるのか？
3. IL-10 産生に対する Treg 除去の影響としては、発表の解釈でかまわないか？IL-10 KO 動物では、どのような反応が期待されるか。
4. 角膜への好酸球浸潤は、RW 抗原特異的な T 細胞の活性化により誘導される2次的な反応であると仮定して研究が進められているが、実際に、角膜への T 細胞の浸潤が、Treg の除去によって低下していることは観察しているか？
5. RW 特異的 IgE 抗体価や、RW 反応性 T 細胞の増殖試験の結果は値が小さく、通常の測定においてもデータの振れが有意差判定において問題になる領域の値である。実際、どの程度有意な結果であるか、保証はあるか？
6. 研究の背景の説明において、他の研究を引用し、マスト細胞を除去した動物でも、RW 特異的アレルギー性角膜炎は起こると紹介したが、それらは、マスト細胞の単独欠損か、それとも好塩基球も欠損した動物か？
7. 申請者はこれまでに、実験的アレルギー性結膜炎について膨大な数の参考論文も発表している。せめて、発表の終わりに、これらの研究の流れを総括して、個々の研究成果のつながりを解説すべきであった。
8. 常にさらされている自己抗原に対する免疫寛容の誘導機構と、今回発表したような、一時的に晒された外来抗原に特異的な免疫寛容のしくみは、同じでない可能性も高い。それを念頭に置きながら仕事を進めるべきではないか。

これらの質問や議論に対し、永尾さんは、おおむね適切な回答をし、実験時の詳細についても、具体的なデータをあげて説明することができた。このため、審査員一同、上記 研究成果は、参考論文として提出された多数の論文と共に、学位論文の研究内容として十分なものであると判断しました。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 孙 广臣(中国) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第83号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Effect of orally administered <i>Eriobotrya Japonica</i> seed extract on allergic contact dermatitis in rats (枇杷種子由来エキスのラットアレルギー性接触皮膚炎に対する効果) |
| 発表誌名 | Journal of pharmacy and pharmacology, 59(10), 1405-1412, 2007年10月 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 佐野 | 栄紀 |
| | 副査 | 教授 | 横谷 | 邦彦 |
| | 副査 | 教授 | 兵頭 | 政光 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 孫 廣 臣

論 文 題 目

Effect of orally administered *Eriobotrya japonica* seed extract on allergic contact dermatitis in rats

枇杷種子由来エキスのラットアレルギー性接触皮膚炎に対する効果

(論文要旨)

【目的】アレルギー疾患のなかでも、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性接触皮膚炎は年々増加しており、その症状である「浮腫」や「痒み」は、患者の QOL に大きな影響を及ぼす。アレルギー性接触皮膚炎は、多くの因子が発症に関わる複雑な疾患であるが、その発症・進展機構等は、免疫学的な観点などから徐々に解明されてきた。一方、临床上、アレルギー性接触皮膚炎に対しては、ステロイド剤、免疫抑制剤等が使用されているが、副作用等の問題から、さらに安全性、有効性の高い薬物の開発が切望されている。

一方、近代医学・医療の発展には、東洋における伝承医学の再検証が必要と考える。特に、漢方薬や天然物を利用した民間療法等は、古来より種々の疾患の治療に用いられ、その科学的検証が盛んに行われている。当教室では、既に、果樹として広く植栽されている枇杷の種子から抽出したエキス(枇杷種子由来エキス)は強い抗酸化活性を有し、肝・腎障害、花粉症などのアレルギー疾患などの多くの生活習慣病や難治性疾患の予防・治療に有用であることを、病態モデル動物を用いた実証実験及び臨床試験等により明らかとした。

アレルギー性接触皮膚炎に対する薬物の評価には、マウス或いはラット皮膚に抗原である刺激性物質を反復暴露して、表皮の肥厚、真皮の腫脹、リンパ球及び好酸球を中心とする炎症性細胞の浸潤等を誘発し、皮膚肥厚、腫脹及び搔痒等の症状を引き起こす病態モデルが用いられる。皮膚刺激性物質のなかでも、皮膚蛋白との結合により免疫応答を誘発する代表的なハプテンである 4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one (Oxazolone) 及び 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) が繁用される。

この様な背景から、学位申請者は、上記 2 種の皮膚刺激性物質を用いて、type IVアレルギー動物モデルのアレルギー性接触皮膚炎モデルラットを作成し、耳介浮腫及び各種炎症性マーカー等を指標として、枇杷種子由来エキスの経口投与によるアレルギー性接触皮膚炎に対する効果を検討した。

【方法】枇杷種子由来エキスは、よく乾燥した枇杷種子 1kg から 70% エタノールを用いて、既報に準じ抽出したエキスに精製水を加え、全量 1L としたものを製した。(最終的にヒト投与濃度の 5 倍濃度) 実験動物は、SD 系雄性ラット(6週齢)を用いた。アレルギー性接触皮膚炎モデルは、Oxazolone 惹起モデル、DNFB 惹起モデルの 2 種類作成した。Oxazolone 惹起モデルは、ラット腹部に 1% oxazolone エタノール溶液 100 μ l を 2 回塗布して感作し、感作 7 日後に 0.75% oxazolone エタノール溶液を耳介両面に 50 μ l 塗布し抗原刺激を行い、その後 3 日毎に合計 5 回刺激を反復し、作成した。一方、DNFB 惹起モデルは、ラット腹部に 1% DNFB (オリーブ油-アセトン 1:4) 溶液 100 μ l を 2 回塗布して感作し、感作 7 日後に 0.5% DNFB (オリーブ油-アセトン 1:4) 溶液を



耳介両面 50 μ l 塗布し抗原刺激を行い、その後 3 日毎に合計 5 回刺激を反復し、作成した。いずれのモデルの場合も、枇杷種子由来エキスは、感作後、枇杷種子由来エキスを 1 日 10mL ずつ 3 週間自由摂取させた。対照群には、水道水を摂取させた。感作後、経時的に耳介浮腫部位の肥厚を測定した。また、枇杷種子由来エキス投与終了後、耳介組織を採取、組織中 Histamine 量、好酸球由来の Eosinophil peroxidase (EPO) 活性値、好中球由来の Myeloperoxidase (MPO) 活性値及び Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 量を測定した。組織学的検討は、コンゴレッド染色による耳介組織中への好酸球の浸潤及びトルイジンブルー染色による耳介組織中への肥満細胞の浸潤を観察した。

【結果及び考察】Oxazolone 惹起及び DNFB 惹起のいずれのモデルラットの場合も、耳介肥厚は、正常ラットに比べ、有意に高値を示した($p < 0.01$)。一方、エキス摂取群は、対照群に比べ、その値は有意に低値を示した($p < 0.05$, $p < 0.01$)。また、いずれのモデルラットの場合も、耳介組織中 Histamine 量は、正常ラットに比べ、著しく増大した。一方、エキス摂取群は、対照群に比べ、その値は有意に低値を示した ($p < 0.05$)。いずれのモデルラットの場合も、耳介組織中 EPO 活性値及び MPO 活性値は、正常ラットに比べ、著しく増大した。一方、エキス摂取群では対照群に比べ、その値は有意に低値を示した($p < 0.05$)。さらに、DNFB 惹起モデルラットの場合、耳介組織中 TNF- α 量は、正常ラットに比べ、著しく増大した。一方、エキス摂取群では対照群と比べ、その値は有意に低値を示した($p < 0.05$)。さらに、組織学的検討では、いずれのモデルラットの場合も、エキス摂取群における耳介組織中の好酸球の浸潤及び肥満細胞の浸潤は、対照群に比べ、その程度は軽度であり、組織中 EPO 活性値及び MPO 活性値の結果を支持するものであった。

これらの結果より、枇杷種子由来エキスは、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性接触皮膚炎における耳介浮腫を軽減し、好中球、好酸球の浸潤及び肥満細胞の活性化等を軽減することが明らかとなった。また、その作用には、Histamine 遊離抑制作用、さらには好酸球由来 EPO、好中球由来 MPO 及び TNF- α 等の炎症性因子の活性抑制作用が大きく関与するものと考えられる。また、枇杷種子由来エキス中の有効成分として、既に、抗酸化作用、及び免疫調整作用等が報告されている β -シトステロールなどが大きく関与すると推察されるが、詳細は検討中である。

申請者の研究により、枇杷種子由来エキスは、アレルギー性接触皮膚炎への有効性が示唆された。今後、さらに他の抑制機構の解明を行い、これらの結果を元に、臨床試験等によりヒトに対する効果を検討したいと考える。

論文審査の結果の要旨

| | 氏 名 | 孫 廣 臣 |
|---------|-----------------|---|
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 佐 野 栄 紀 | 印 |
| | 副 査 氏 名 横 谷 邦 彦 |  |
| | 副 査 氏 名 兵 頭 政 光 |  |

題 目 Effect of orally administered *Eriobotrya Japonica* seed extract on allergic contact dermatitis in rats
(枇杷種子由来エキスのラットアレルギー性接触皮膚炎に対する効果)

著 者 Guangchen Sun, Yixiu Zhang, Daisuke Takuma, Masahide Onogawa, Junko Yokota, Atsuhide Hamada, Saburo Yoshioka, Masahiko Kusunose, Mitsuhiro Miyamura, Shojiro Kyotai, and Yutaka Nishioka

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
Journal of pharmacy and pharmacology, 59(10), 1405-1412,
2007年10月

要 旨

【背景・目的】

アレルギー性接触皮膚炎は種々の抗原によって発症するが、抗原に対する過敏性が継続し慢性化することもあり得る。一方、アトピー性皮膚炎は遺伝的な素因をもととして、ダニなど環境抗原が関与し発症・増悪するが、アレルギー性接触皮膚炎と免疫学的には発症機構が類似している。すなわちリンパ球、肥満細胞などの浸潤を伴った浮腫、血管増生を伴う皮膚炎であり、いずれもステロイド剤、免疫抑制剤、抗ヒスタミン剤等が治療に用いられる。しかしこれらの薬剤には副作用等の問題があるため、安全性、有効性の高い薬物の開発が切望されている。一方漢方薬や天然物を利用した民間療法等は古来より種々の疾患の治療に用いられ、昨今はその科学的検証がすすんできた。申請者らのグループは、広く植栽されている枇杷の種子から抽出したエキス(枇杷種子由来エキス)に含まれる抗酸化活性を利用して、肝・腎障害あるいは花粉症などのアレルギー疾患など多くの生活習慣病や難治性疾患の予防・治療に有用であることを、疾患モデル動物実

験、臨床試験等によって明らかにして来た。今回、申請者はラットを用いたハプテンによるアレルギー性接触皮膚炎モデルの系で枇杷種子由来エキスの抗アレルギー作用を検討した。

【対象と方法】

枇杷種子由来エキスは、よく乾燥した枇杷種子 1 kg から 70%エタノール抽出後、精製水にて全量 1L としたものをを用いた。実験動物は、SD 系雄性ラット（6 週齢）を用いた。アレルギー性接触皮膚炎として、oxazolone (4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one)あるいは DNFB (2,4-dinitro-1-fluorobenzene) による 2 種類のハプテンによる惹起モデルを作成した。oxazolone 惹起モデルは、ラット腹部皮膚に 1% oxazolone エタノール溶液 100 μ l を 2 回塗布して感作し、その 7 日後に 0.75% oxazolone エタノール溶液を耳介両面に 50 μ l 塗布することにより抗原刺激を行い、その後 3 日毎に同様の刺激を合計 5 回行った。一方、DNFB 惹起モデルは、ラット腹部皮膚に 1%DNFB (オリーブ油アセトン 1:4) 溶液 100 μ l を 2 回塗布して感作し、その 7 日後耳介に 0.5%溶液を 3 日毎合計 5 回塗布することで同様に作成した。いずれの惹起モデルにおいても枇杷種子由来エキスは 1 日 10mL ずつ感作 5 日後より実験終了まで自由摂取させた。水道水を与えたものを対照群とした。以下、エキス投与群と対照群の比較測定項目を挙げる。(1) 経時的な耳介腫脹の比較検定 (2) 耳介組織中の histamine 量、eosinophilic peroxidase (EPO)活性、myeloperoxidase (MPO)活性、tumor necrosis factor α (TNF α) 量の測定。(3) 耳介病理組織標本をコンゴレッド染色による好酸球浸潤、トルイジンブルー染色による肥満細胞浸潤の比較検定

【結果】

- (1) oxazolone および DNFB 惹起系のいずれの場合も、抗原刺激後にはハプテン無投与群に比べ有意に耳介腫脹を来すことを確認した。しかしこれらいずれの惹起系においても、エキス投与群は対照群に比して耳介肥厚は有意に抑制された。
- (2) いずれの惹起系においても耳介組織に含まれる histamine 量、EPO、MPO 活性、TNF α 量は、正常ラットに比べて感作・刺激群において有意に高値を示した。しかし、いずれの分子についてもエキス投与群は対照群に比して有意に抑制された。
- (3) 耳介病理組織において好酸球、肥満細胞の浸潤は、エキス投与群が対照群に比して軽度であった。

【まとめ】

枇杷種子由来エキスは、ラットモデル系においてアレルギー性接触皮膚炎発症を軽減させることが明らかになった。作用メカニズムとしては、肥満細胞からの histamine 遊

離抑制、好酸球の遊走阻止効果、EPO 抑制などによる好酸球の機能阻害、MPO 抑制を介した好中球機能抑制、TNF α 産生の抑制による炎症性因子の活性抑制が大きく関与するものと考えられる。また、枇杷種子由来エキス中の有効成分のひとつとして抗酸化作用および免疫調整作用等の報告されている β -シトステロールが関与すると推察される。今後はその作用機序の詳細な解析が必要と思われる。

本論文は、枇杷種子由来エキスの有する、ラットでのアレルギー性接触皮膚反応の抑制効果を明らかにしたものであり、その作用メカニズムの解析により炎症、免疫系を修飾することを示唆する結果を得た。これは枇杷種子由来エキスのアレルギー性皮膚疾患とりわけアトピー性皮膚炎などへの臨床応用が期待されるものであり医学的に高い価値を有すると認められた。したがって、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）の学位を授与に値するものと判断した。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 高田 浩史(高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第84号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | High Glucose Induces Transactivation of the α 2-HS Glycoprotein Gene Through the ERK1/2 Signaling Pathway (高濃度グルコースはERK1/2シグナル経路を介して α 2-HS glycoprotein 遺伝子の転写を促進する) |
| 発表誌名 | Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, (in press) |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 高尾 | 俊弘 |
| | 副査 | 教授 | 椛 | 秀人 |
| | 副査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 高田 浩史

論文題目

High Glucose Induces Transactivation of the α 2-HS Glycoprotein Gene Through the ERK1/2 Signaling Pathway
(高濃度グルコースは ERK1/2 シグナル経路を介して α 2-HS glycoprotein 遺伝子の転写を促進する)

(論文要旨)

【目的】2型糖尿病は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性により引き起こされる慢性的な高血糖状態であるが、最近、高血糖そのものがインスリン分泌不全やインスリン抵抗性を惹起することが明らかとなってきた。このような現象は glucose toxicity と呼ばれるが、その分子機序は不明な点が多い。われわれは、 α 2-Heremans Schmid glycoprotein (AHSG) がインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害することによりインスリン作用を負に制御していることに着目し、高濃度グルコースが本遺伝子の転写やタンパク発現に及ぼす影響を検討した。



【方法】AHSG 遺伝子上流域配列を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを作成し、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイを確立した。まず、グルコースが AHSG 遺伝子転写活性に及ぼす濃度・時間依存的な影響を本アッセイで検討し、続いて高濃度グルコースの AHSG タンパク発現に対する影響をウェスタンブロットティング法で評価した。次に、AHSG 遺伝子に対する高濃度グルコースの影響とプロテインキナーゼ C (PKC)、ヘキソサミン生合成経路 (HBP)、酸化ストレス、mitogen-activated protein kinase (MAPK) [extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38] の関与を、各々の阻害剤を用いて、レポーター遺伝子アッセイで検討した。さらに、グルコースが関与するプロモーター領域を同定するため、本遺伝子 5' 上流側から順次欠失させた DNA 配列に対して、高濃度グルコースによる転写活性化の有無を比較検討した (deletion analysis)。

【結果】グルコースは、25mM まで濃度依存性に AHSG 転写活性を上昇させ、12 時間後まで時間依存性に同活性を上昇させた。一方、代謝活性のない L-グルコースやマンニトールは本活性に影響しなかった。また、高濃度グルコースは、AHSG タンパク発現も有意に増加させた。PKC 阻害剤 (bisindolylmaleimide、Ro31-8220)、HBP 阻害剤 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、ラジカル消去剤 (tempol) は高濃度グルコースによる

AHSG 転写活性化に影響しなかった。さらに、MAPK のうち JNK 阻害剤 (SP600125)、p38 阻害剤 (SB203580) は同活性化に影響しなかったが、ERK キナーゼ阻害剤 (PD98059、U0126) は高濃度グルコースによる AHSG 転写活性化を有意に抑制した。Deletion analysis では、-1091/+22、-477/+22、-302/+22 の順に DNA 配列が短くなるに従い転写活性が増加し、-196/+22 で活性は消失した。活性を有する 3 つの DNA フラグメントでは高濃度グルコースや ERK キナーゼ阻害剤への応答性に差はみられなかった。

【考察】 HepG2 細胞において、高濃度グルコースが AHSG 遺伝子の転写活性やタンパク発現を亢進させることを初めて明らかにした。また、この転写活性化には、MAPK の一つである ERK シグナル伝達経路が関与していることを示した。高濃度グルコースによる肝での AHSG の発現増強は、インスリン標的組織においてインスリン作用を減弱させ、glucose toxicity の一因となっている可能性が高い。本研究で得られた結果は、AHSG 発現を抑制することが glucose toxicity の軽減に有効な治療法となり得る可能性を示している。今後、これらの機序をさらに明確にするとともに、AHSG 発現を抑制する物質のスクリーニングに取り組み、臨床応用に繋げたい。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|-----------------|---|
| | 氏 名 | 高 田 浩 史 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 高 尾 俊 弘 |  |
| | 副 査 氏 名 椛 秀 人 | 印 |
| | 副 査 氏 名 杉 浦 哲 朗 |  |

題 目 High Glucose Induces Transactivation of the α 2-HS Glycoprotein Gene Through the ERK1/2 Signaling Pathway
 (高濃度グルコースは ERK1/2 シグナル経路を介して α 2-HS glycoprotein 遺伝子の転写を促進する)

著 者 Hiroshi Takata, Yukio Ikeda, Tadashi Suehiro, Ayako Ishibashi, Mari Inoue, Yoshitaka Kumon, Yoshio Terada

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, (in press)

要 旨

【目的】 2型糖尿病は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性により引き起こされる慢性的な高血糖状態であるが、最近、高血糖そのものがインスリン分泌不全やインスリン抵抗性を惹起することが明らかとなってきた。このような現象は glucose toxicity と呼ばれるが、その分子機序は明らかではない。申請者らは肝臓で生成され、血漿中に豊富に存在するたんぱく質である α 2-Heremans Schmid glycoprotein (以下 AHSG と略す) に注目した。AHSG はインスリン受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害することによりインスリン作用を負に制御していることが知られている。申請者らは、もし高グルコース環境が AHSG 発現を増強させるなら、これがインスリン抵抗性惹起の一因になると考え、今回高濃度グルコースが AHSG 遺伝子の転写やタンパク発現に及ぼす影響を検討し、さらにシグナル伝達経路についても検討した。

【方法】 AHSG 遺伝子上流域配列を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを作成し、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイを確立した。まず、グルコースが AHSG 遺伝子転写活性に及ぼす濃度・時間依存的な影響を本アッセイで検討し、続

いて高濃度グルコースの AHSG タンパク発現に対する影響をウェスタンブロットティング法で評価した。次に、AHSG 遺伝子に対する高濃度グルコースの影響とプロテインキナーゼ C (PKC)、ヘキソサミン合成経路 (HBP)、酸化ストレス、mitogen-activated protein kinase (MAPK) [extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38] の関与を、各々の阻害剤を用いて、レポーター遺伝子アッセイで検討した。さらに、グルコースが関与するプロモーター領域を同定するため、本遺伝子 5' 上流側から順次欠失させた DNA 配列に対して、高濃度グルコースによる転写活性化の有無を deletion analysis にて比較検討した。

【結果】グルコースは、25mM まで濃度依存性に AHSG 転写活性を上昇させ、12 時間後まで時間依存性に同活性を上昇させた。一方、代謝活性のない L-グルコースやマンニトールは本活性に影響しなかった。また、高濃度グルコースは、AHSG タンパク発現も有意に増加させた。PKC 阻害剤 (bisindolylmaleimide; Ro31-8220)、HBP 阻害剤 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、ラジカル消去剤 (tempol) は高濃度グルコースによる AHSG 転写活性化に影響しなかった。さらに、MAPK のうち JNK 阻害剤 (SP600125)、p38 阻害剤 (SB203580) は同活性化に影響しなかったが、ERK キナーゼ阻害剤 (PD98059、U0126) は高濃度グルコースによる AHSG 転写活性化を有意に抑制した。Deletion analysis では、- 1091/+22、-477/+22、- 302/+22 の順に DNA 配列が短くなるに従い転写活性が増加し、- 196/+22 で活性は消失した。活性を有する 3 つの DNA フラグメントでは高濃度グルコースや ERK キナーゼ阻害剤への応答性に差はみられなかった。

以上より HepG2 細胞において、高濃度グルコースが AHSG 遺伝子の転写活性やタンパク発現を亢進させることが明らかになった。また、この転写活性化には、MAPK の一つである ERK シグナル伝達経路が関与していることが示された。その結果、高濃度グルコースによる肝での AHSG の発現増強は、インスリン標的組織においてインスリン作用を減弱させ、glucose toxicity の一因となっている可能性が高いことが明らかになった。

本論文は AHSG 発現を抑制することで、glucose toxicity の軽減に有効な治療法となり得る可能性が明らかになったことより、糖尿病治療薬開発に役立つ可能性を示した。よって、本論文は、高知大学博士 (医学) に値すると判断した。

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 宅間 大祐 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第85号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Effect of <i>Eriobotrya japonica</i> Seed Extract on 5-Fluorouracil-Induced Mucositis in Hamsters (5-Fluorouracil 投与口内炎モデルハムスターに対する枇杷種子由来エキスの効果) |
| 発表誌名 | Biological & Pharmaceutical Bulletin, 31(2), 250~254, 2008年2月 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 山本 | 哲也 |
| | 副査 | 教授 | 本家 | 孝一 |
| | 副査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 宅間 大祐

論文題目

Effect of *Eriobotrya japonica* Seed Extract on
5-Fluorouracil-induced Mucositis in Hamsters
(5-Fluorouracil 投与口内炎モデルハムスターに対する
枇杷種子由来エキスの効果)

(論文要旨)

【緒言】 がん化学療法時に副作用として発症する口内炎は、口腔内全体に発症する 경우가多く、疼痛及び出血などを伴い、患者の QOL を著しく低下させる。なかでも、各種固形癌の治療に常用される 5-Fluorouracil(5-FU)は、口内炎の発症頻度が高い薬剤であり、重症の場合には、治療計画の変更や中止など支障をきたす場合がある。

がん化学療法時の口内炎の発症・進展には、二つの要因が関与するとされている。抗がん剤により産生されるフリーラジカルが、口腔粘膜に酸化ストレスを及ぼし、粘膜組織が破壊されることにより、口内炎が発症するもの。さらに、抗がん剤の骨髄抑制作用により、口腔内が易感染状態となり、細菌等に感染することにより発症するものである。そのため、がん化学療法時の口内炎の予防及び治療には、抗がん剤による過剰な酸化ストレスの抑制及び口腔内の細菌感染の抑制が重要となる。

本実験に用いた枇杷種子由来エキス(*Eriobotrya japonica* seed extract; ESE)は、枇杷種子から 70%EtOH を用い、独自の方法にて抽出したエキスである。当研究室では、ESE は、各種ラジカルに対する強い抗酸化作用を有し、肝障害、腎障害、アレルギー性疾患、胃粘膜障害及び炎症等に対して有用であることを、動物実験及び臨床試験により明らかとしている。さらに、ESE は、カフェ酸、クロロゲン酸等のポリフェノール類、アミノ酸、不飽和脂肪酸等、様々な有効成分を含有することも報告している。

この様な背景から、学位申請者は、5-FU の大量投与を行い免疫抑制状態下で口内炎を発症させたモデル動物を用いて、ESE の有用性の検討を行なった。




【方法】 ESE は枇杷種子 1kg から抽出したエキスを精製水で 20L に希釈したものをを用いた。雄性 Sylian Golden ハムスターを正常群と口内炎モデル群に分類した後、口内炎モデル群は水道水投与群と ESE 投与群に分類した。また、1 群は 12 例とした。口内炎モデルは、実験開始 1 日目に 5-FU を 90mg/kg body Weight 腹腔内投与した後、2、3、4 日目に電動ローター付金ブラシにより左頬袋粘膜を一定範囲擦過、さらに 5 日目に 5-FU を 60mg/kg body weight 腹腔内投与することにより作成した。また、正常群には、生理食塩液の腹腔内投与のみを行った。ESE の投与は、1 日 10mL を実験開始の 7 日前より実験終了時まで給水瓶にて自由摂取により行った。口内炎の

評価は、6、8、10日目にデジタルカメラで損傷部位の撮影を行い、V.Limaらの方法を用いて一重盲検法により口内炎のスコア化を行なった。6、10日目に採血を行い、血漿中過酸化脂質量を測定した。さらに、10日目に頬袋粘膜肥厚の測定及びHE染色法による組織学的検討を行なった。

【結果・考察】口内炎の肉眼的所見は、6日目に、口内炎モデル群で頬袋粘膜の損傷及び出血が認められた。10日目には、水道水投与群で膿様状態が認められたが、ESE投与群では認められなかった。口内炎スコアは、6、8日目は、水道水投与群、ESE投与群共に同等のスコアであったが、10日目は、ESE投与群が水道水投与群に比べ、有意に低値を示した。 $(p<0.05)$ 頬袋粘膜の肥厚は、口内炎モデル群で明らかな肥厚が認められた。一方、ESE投与群は水道水投与群と比較して、その程度は小であった。組織学的所見では、6日目に、口内炎モデル群で頬粘膜の上皮組織及び筋層の欠損が認められた。10日目は、水道水投与群で、上皮組織の欠損及び口内炎局所における細菌感染が確認されたが、ESE投与群は、上皮組織の欠損及び細菌感染共に認められなかった。血漿中過酸化脂質量は、6日目に、水道水投与群が、正常群に比べ、有意に高値を示した。 $(p<0.05)$ また、ESE投与群は水道水投与群より有意に低値を示した。 $(p<0.05)$ 10日目は、全ての群で同等であった。以上の結果より、ESEは5-FU投与口内炎モデルにおいて口内炎治癒促進効果を有することが認められた。その作用には、抗癌剤投与直後における生体内での過剰な酸化ストレスの抑制及び口内炎局所での細菌感染の抑制が重要な要因であると考えられる。

本実験における細菌感染の抑制は、エキス中に含まれるポリフェノール類等の有効成分の殺菌作用によるものと考えられる。抗酸化作用については、 β -シトステロール等の関与が考えられるが、今後の検討課題である。以上のように、抗酸化作用及び細菌感染の抑制を有するESEを化学療法前から摂取することは、化学療法により発症する口内炎に対して有用な手段となり得るものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

| | 氏 名 |
|---------|--|
| | 宅 間 大 祐 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 山 本 哲 也  |
| | 副 査 氏 名 本 家 孝 一  |
| | 副 査 氏 名 杉 浦 哲 朗  |

題 目 Effect of *Eriobotrya japonica* Seed Extract on 5-Fluorouracil-Induced Mucositis in Hamsters
 (5-Fluorouracil 投与口内炎モデルハムスターに対する枇杷種子由来エキスの効果)

著 者 Daisuke Takuma, Sun Guangchen, Junko Yokota, Atsuhide Hamada, Masahide Onogawa, Saburo Yoshioka, Masahiko Kusunose, Mitsuhiro Miyamura, Shojiro Kyotai, and Yutaka Nishioka

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 Biological & Pharmaceutical Bulletin, 31(2), 250~254,
 2008年2月

要 旨

【背景・目的】

癌化学療法有害事象の1つである口内炎は疼痛や経口摂取困難を来し、患者のQOLを著しく低下させるが、なかでも各種固形癌に対してよく用いられるピリミジン代謝拮抗薬は口内炎が Dose-limiting factor となっている。抗癌剤による口内炎の発症・進展には、抗癌剤によって誘導されるフリーラジカルがもたらす口腔粘膜の酸化ストレス傷害や抗癌剤による骨髄抑制を背景とした口腔内細菌の感染が関与している。したがって、抗癌剤による口内炎の予防および治療には、過剰な酸化ストレスの抑制ならびに口腔内細菌感染の制御が重要である。

申請者らのグループは、独自の方法にて抽出した枇杷種子由来エキスを用いて種々の検討を行い、このエキスは各種のラジカルに対する強い抗酸化作用ならびに抗菌作用を有していることなどを明らかにしている。そこで、申請者はハムスターにおいて作製したピリミジン代謝拮抗薬である 5-fluorouracil (5-FU) による口内炎モデルを用いて、枇杷種子由来エキスの抗癌剤による口内炎に対する有用性を検討した。

【方法】

雄性 Sylian Golden ハムスターを、1) 水道水を摂取させたコントロール群、2) 水道水を投与した口内炎モデル群、3) 枇杷種子由来エキスを投与した口内炎モデル群の3群(各12例)に分類した。その後、口内炎モデル群では実験開始1日目に5-FU(90mg/kg body weight)を腹腔内投与した後、2、3、4日目に電動ローター付き金ブラシにより左頬袋を擦過し、さらに5日目に再度5-FU(60mg/kg body weight)を腹腔内投与して口内炎を生じせしめ、コントロール群では生理食塩水を口内炎モデル群と同様に腹腔内投与した。枇杷種子由来エキスの投与は、枇杷種子1kgから抽出したエキスを20Lの精製水で希釈したものを、実験開始の7日前より実験終了時まで1日10mLを給水瓶にて自由摂取させることにより行った。そして、実験開始6、8、10日目に口内炎の状態を観察するとともにLimaらの方法を用いて口内炎をスコア化した。さらに、6および10日目に血漿中の過酸化脂質量を測定するとともに、10日目に頬袋粘膜の肥厚の測定ならびにH&E染色による組織学的検討を行った。

【結果および考察】

水道水投与およびエキス投与いずれの口内炎モデル群においても6日目に頬袋粘膜の損傷および出血が認められたが、10日目には両群間に差が認められ、水道水投与群では膿瘍形成が認められたのに対しエキス投与群では治癒傾向を示した。口内炎スコアも6および8日目は水道水投与群とエキス投与群との間に差は認められなかったが、10日目はエキス投与群が水道水投与群に比べ有意に低値であった($p<0.05$)。口内炎モデル群における頬袋粘膜はいずれもコントロール群に比べ有意に肥厚していたが、エキス投与群の肥厚の程度は水道水投与群のものに比べ有意に軽度であった($p<0.05$)。組織学的にはいずれの口内炎モデル群においても6日目に頬粘膜の上皮組織および筋層の欠損が認められたが、10日目では水道水投与群では上皮組織の欠損に加え細菌感染が観察されたものの、エキス投与群では上皮組織欠損は治癒し、細菌感染も認められなかった。水道水投与口内炎モデル群の6日目における血漿中の過酸化脂質量はコントロール群に比べ有意に上昇していたが($p<0.05$)、エキス投与口内炎モデル群とコントロール群との間には有意差は認められなかった。これに対し、10日目における水道水投与口内炎モデル群の過酸化脂質量は低下し、3群間に有意差は認められなかった。

以上より、枇杷種子由来エキスは5-FUによる口内炎に対し治癒促進作用を有していることが示され、その機序として過剰な酸化ストレスの抑制ならびに細菌感染の抑制が考えられた。

本論文は、枇杷種子由来エキスの持つ抗酸化作用および抗菌作用に着目し、抗癌剤による口内炎に対する有用性を示し、その後に行われた枇杷種子由来エキスによる口内炎予防の臨床試験への足掛かりを与えた。よって、本論文は本学の学位に値すると判断した。

| | |
|-------------|--|
| 氏名(本籍) | 谷口 亜裕子 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第86号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in association with adult T-cell leukemia (<i>BMP-6</i> 遺伝子プロモーター領域のメチル化と成人T細胞白血病との関連) |
| 発表誌名 | International Journal of Cancer, 123(8), 1824-1831, 2008年10月15日 |
| 審査委員 | |
| | 主査 教授 降幡 睦夫 |
| | 副査 教授 小林 道也 |
| | 副査 教授 杉浦 哲朗 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名

谷口 亜裕子

Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6
gene in association with adult T-cell leukemia

論 文 題 目

(*BMP-6* 遺伝子プロモーター領域のメチル化と成人 T 細胞
白血病との関連)

(論文要旨)

TGF- β スーパーファミリーに属する Bone morphogenetic protein(BMP)は、種々の腫瘍細胞においてその増殖・分化・アポトーシスなど多岐にわたり制御の役割を有する。

最近、*BMP-6* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化によるエピジェネティックな不活化が、しばしば高悪性度リンパ腫においてみられることが報告された。このことから同様の現象が各種白血病でも認められるかについて今回検討した。

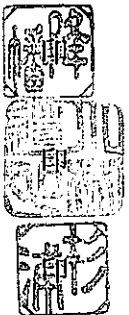
方法は、治療前白血病 186 例の末梢血や骨髓液から抽出した DNA、RNA を用いて行った。Bisulfite 処理後の DNA を PCR で増幅し、*BMP-6* プロモーター領域を包含する 387bp の PCR 産物で Combined bisulfite restriction analysis(COBRA)法を行った。さらに Bisulfite sequencing 法にて塩基配列を確認することで、DNA メチル化部位の解析を行った。また *BMP-6* プロモーター領域のメチル化と *BMP-6* 発現抑制の関連を評価するため、reverse transcription-PCR とウェスタンブロット解析により mRNA、蛋白レベルで発現の確認を行った。

結果は、*BMP-6* プロモーター領域のメチル化は他の白血病 (126 例) と比較して成人 T 細胞白血病 (ATL、60 例) で統計学的優位差をもって認められた ($p < 0.001$)。その内訳は ATL は 82% (60 例中 49 例) であるのに対し、AML 5% (67 例中 3 例)、ALL 16% (38 例中 6 例)、CLL 5% (21 例中 1 例) であった。また ATL の病型分類においては、進行型である急性型 ATL 96%、リンパ腫型 94% に対し、進行の緩徐な型である慢性型 44%、くすぶり型 20% と、より進行型の症例で *BMP-6* 遺伝子のメチル化が認められた。また健常人の末梢血単核球や、反応性リンパ節炎などの非悪性リンパ節病変に関しても *BMP-6* 遺伝子のメチル化状態を調べたが、検索した限りでは全ての症例において *BMP-6* のメチル化は認められなかった。*BMP-6* 遺伝子のメチル化が mRNA 転写抑制と蛋白発現低下をきたすことも確認し、更には脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine を加えることで *BMP-6* 転写物の発現が回復することから、*BMP-6* プロモーター領域のメチル化が転写サイレンスに関連していると考えられた。

ATLの臨床経過として、慢性型 ATL 症例の一部で、後に急性型 ATL に進行していくものがある。経時的にメチル化解析が可能であった症例研究において、慢性型 ATL 期にすでに *BMP-6* 遺伝子に部分的なメチル化をきたしていたものでは、メチル化のない症例と比較して、高率に数年以内に急性型 ATL に進展していることが確認された。このことから *BMP-6* プロモーター領域のメチル化状態が、慢性型 ATL 症例における急性転化のリスクを予知するための新たなバイオマーカーになりうる可能性があると考えられた。

これら一連の経時的解析結果は *BMP-6* プロモーターの CpG 部位のメチル化の増加が、結果として ATL 進展期にみられるような *BMP-6* 発現抑制を惹起していることを示唆している。つまり *BMP-6* プロモーター領域のメチル化は ATL 進行例において一般的なエピジェネティックな出来事であることを示している。また ATL では *BMP-6* 遺伝子以外に DNA メチル化が報告されており、癌抑制遺伝子の *CDKN2A* 遺伝子や、細胞周期制御因子である *Kruppel-like factor4* 遺伝子、転写因子である *early growth response3* 遺伝子などでも ATL の病期進展に伴いメチル化が増加することが報告されている。したがって、*BMP-6* 遺伝子を含むこれら遺伝子の総合的なメチル化解析は、症例毎の ATL 進展のリスク評価や ATL の病期分類にも有用であると考えられる。また臨床的応用として、慢性型 ATL の急性型 ATL への進展予防としての、脱メチル化剤の使用についての検討が今後期待される。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|--|---|
| | 氏 名 | 谷 口 亜裕子 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 降 幡 睦 夫 副 査 氏 名 小 林 道 也 副 査 氏 名 杉 浦 哲 朗 |  |

題 目 Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in association with adult T-cell leukemia
 (BMP-6遺伝子プロモーター領域のメチル化と成人T細胞白血病との関連)

著 者 Ayuko Taniguchi, Yuiko Nemoto, Akihito Yokoyama, Norihiro Kotani, Shosuke Imai, Taro Shuin, Masanori Daibata

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 International Journal of Cancer, 123(8), 1824-1831,
 2008年10月15日

要 旨

(背景と目的)

TGF-βスーパーファミリーに属する Bone morphogenetic protein(BMP)は、種々の腫瘍細胞においてその増殖・分化・アポトーシスなど多岐にわたり制御の役割を有する。最近、BMP-6遺伝子のプロモーター領域のメチル化によるエピジェネティックな不活化が、しばしば高悪性度リンパ腫においてみられることが報告され、同様の現象が各種白血病でも認められるかについて今回検討した。

(材料と方法)

治療前白血病 186 例の末梢血や骨髄液から抽出した DNA を、Bisulfite 処理後 PCR で増幅し、BMP-6 プロモーター領域を包含する 387bp の PCR 産物で Combined bisulfite restriction analysis(COBRA)法を行った。さらに Bisulfite sequencing 法にて塩基配列を確認することで、DNA メチル化部位の解析を行った。また BMP-6プロモーター領域のメチル化と BMP-6 発現抑制の関連を評価するため、reverse transcription-PCR とウェスタンブロット解析により mRNA、蛋白レベルで発現の確認を行った。

(結果)

*BMP-6*プロモーター領域のメチル化は他の白血病(126例)と比較して成人T細胞白血病(ATL, 60例)で統計学的優位差をもって認められた($p < 0.001$)。その内訳はATL82%(60例中49例)であるのに対し、AML 5%(67例中3例)、ALL 16%(38例中6例)、CLL 5%(21例中1例)であった。またATLの病型分類においては、進行型である急性型ATL 96%、リンパ腫型94%に対し、進行の緩徐な型である慢性型44%、くすぶり型20%と、より進行型の症例で*BMP-6*遺伝子のメチル化が認められた。また健常人の末梢血単核球や、反応性リンパ節炎などの非悪性リンパ節病変に関しても*BMP-6*遺伝子のメチル化状態を調べたが、検索した全ての症例において*BMP-6*のメチル化は認められなかった。*BMP-6*遺伝子のメチル化がmRNA転写抑制と蛋白発現低下をきたすことも確認し、更には脱メチル化剤である5-aza-2'-deoxycytidineを加えることで*BMP-6*転写物の発現が回復することから、*BMP-6*プロモーター領域のメチル化が転写サイレンスに関連していると考えられた。ATLの臨床経過として、慢性型ATL症例の一部で、後に急性型ATLに進行するものがあるが、今回経時的にメチル化解析が可能であった症例研究において、慢性型ATL期に*BMP-6*遺伝子に部分的なメチル化をきたしていたものでは、メチル化のない症例と比較して、高率に数年以内に急性型ATLに進展していることが確認された。このことから*BMP-6*プロモーター領域のメチル化状態が、慢性型ATL症例における急性転化のリスクを予知するための新たなバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

(考察)

*BMP-6*プロモーターのCpG部位のメチル化の増加が、結果としてATL進展期にみられるような*BMP-6*発現抑制を惹起していることを示唆している。またATLでは*BMP-6*遺伝子以外に*CDKN2A*、*Kruppel-like-factor4*、*early growth response3*遺伝子などでもATLの病期進展に伴いメチル化が増加することが報告されている。したがって、*BMP-6*遺伝子を含むこれら遺伝子の総合的なメチル化解析は、症例毎のATL進展のリスク評価やATLの病期分類にも有用であり、また臨床的応用として、慢性型ATLの急性型ATLへの進展予防としての、脱メチル化剤の使用についての検討が今後期待される。

本論文は、白血病の中でも特にATLにおいて*BMP-6*遺伝子プロモーター領域のメチル化による遺伝子発現異常が高率に認められること、それがATLの腫瘍動態に関与することを示し、また臨床的応用としてATL症例における脱メチル化剤使用の有効性を示唆したものであり、高知大学博士(医学)に値すると判断した。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 山本 由美子(高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第87号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Intraocular pressure elevation after intravitreal or posterior sub-Tenon triamcinolone acetonide injection (triamcinolone acetonide硝子体内、またはテノン嚢下投与後の眼圧上昇) |
| 発表誌名 | Canadian Journal of Ophthalmology, 43(1), 42-47, 2008年1月18日 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 西岡 | 豊 |
| | 副査 | 教授 | 寺田 | 典生 |
| | 副査 | 教授 | 高尾 | 俊弘 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 山本 由美子

論文題目

Intraocular pressure elevation after intravitreal or posterior sub-Tenon triamcinolone acetonide injection (Triamcinolone Acetonide 硝子体内、またはテノン嚢下投与後の眼圧上昇)

(論文要旨)

1. 目的

ぶどう膜炎は、虹彩・毛様体・脈絡膜に生じる炎症の総称で、患眼に重篤な視力障害をもたらす可能性のある疾患である。本邦における 3 大ぶどう膜炎は、ベーチェット病・サルコイドーシス・原田病である。私は、診療において、多くのぶどう膜炎患者の症例を経験する中で、世界でも稀な高齢者に発症した原田病の 4 症例について報告した (Japanese Journal of Ophthalmology 51(1) : 60-63, 2007)。また、ぶどう膜炎の重要な鑑別疾患として、生命をも脅かす眼原発の悪性リンパ腫がある。私は、ぶどう膜炎疑いで当科に紹介され、初発症状より 15 か月で全身転移により死亡した眼原発悪性リンパ腫の 1 症例についても報告した (全身転移を認めた眼内悪性リンパ腫の 1 例, 眼科臨床医報 101(7) : 771-774, 2007)。

一方、ぶどう膜炎の治療の第一選択は、ステロイドである。しかし、ステロイドには多くの副作用があり、その眼内投与における一番の問題点は、眼圧上昇による緑内障の発症である。本研究では、ステロイド薬であるトリアムシノロンアセトニド (TA) の硝子体内 (IV) 又はテノン嚢下 (ST) 投与後の眼圧変化と、眼圧上昇に影響する因子を検討することを目的とした。

2. 対象と方法

後ろ向き症例対象研究。対象は、TA の IV (4mg/0.1ml; 16 眼) 又は ST (20mg/0.5ml; 66 眼) 投与が施行され、投与後 1、3、6 か月に経過観察が可能であった 69 例 82 眼。投与前の眼圧、投与前と投与後の眼圧の変化と、年齢、性別、水晶体の有無、投与方法、硝子体手術の有無、TA 投与歴、原因疾患との関連を統計学的に比較検討した。

3. 結果

全症例の眼圧上昇の最大値の平均は 4.0mmHg で、5.0mmHg 以上の上昇が 28 眼 (34.1%) に発生し、その発生率は 60 歳未満の群で有意に高く ($p < 0.01$)、女性で比較

的高い傾向 ($p=0.051$) が見られた。更に 60 歳未満と 60 歳以上の 2 群を性別で分けた 4 群の比較では、60 歳未満女性群で、その他の 3 群と比較して、眼圧上昇の発生率は有意に高かった ($p<0.01$)。投与方法による比較では、ST 群で、投与後 1、3、6 か月に、投与前と比較して有意な眼圧上昇が認められたが、IV 群では、投与後 1 か月にのみ有意な上昇を認めた。眼圧上昇を認めた症例は、2 例を除き、眼圧下降点眼薬、又は炭酸脱水酵素阻害剤の内服投与により、眼圧下降が得られた。緑内障手術を要した 2 例は、いずれも 60 歳未満女性への ST 投与であった。




4. 結論

TA の IV 又は ST 投与により、約 1/3 の症例で眼圧上昇を認めた。TA 投与後は、定期的な眼圧検査が必要である。特に若年女性では、より注意深い経過観察が必要である。

5. 今後の課題

ステロイドは、今後も眼炎症治療の首座を占める重要な薬剤であるが、その副作用による眼圧上昇は全ての患眼に起こる訳ではない。「若年者」「女性」という因子以外に、何らかの遺伝的因子が関与していると考えられる。ステロイド・リスポンダーの原因遺伝子解明により、投与前にそのリスポンダーを同定することが出来れば、臨床的により安全な治療が可能となる。また、創薬の観点からはステロイド薬と同等の抗炎症効果を持ち、眼圧上昇を来さない薬物の開発が望まれる。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | 山 本 由 美 子 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 西 岡 豊  |
| | 副 査 氏 名 | 寺 田 典 生  |
| | 副 査 氏 名 | 高 尾 俊 弘  |

題 目 Intraocular pressure elevation after intravitreal or posterior
sub-Tenon triamcinolone acetate injection
(triamcinolone acetate 硝子体内、またはテノン嚢下投与後の眼圧上昇)

著 者 Yumiko Yamamoto, Tsutomu Komatsu, Yuji Koura, Koji Nishino,
Atsuki Fukushima, Hisayuki Ueno

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
Canadian Journal of Ophthalmology, 43(1), 42-47, 2008年1月18日

要 旨 ぶどう膜炎は、虹彩・毛様体・脈絡膜に生じる炎症の総称であり、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび原田病は、本邦における3大ぶどう膜炎として知られている。このぶどう膜炎は、全身疾患によっておこることが非常に多く、全身精査が必要なこともある。また、患眼に重篤な視力障害をもたらす可能性をもっている。治療の第一選択として、ステロイド剤であるトリアムシノロン(TA)の眼内投与を挙げることができる。TAの眼内投与は、二つのルートがあり、硝子体への投与ルートとテノン嚢下への投与ルートである。

日本眼科学会トリアムシノロン調査委員会の発表では、TAの眼内投与は二つのルート共に、ぶどう膜炎、糖尿病網膜症および網膜静脈閉塞症に対しては、8~9割の症例で有効であると報告されている。しかし、TA眼内投与による副作用として、眼圧上昇が第一位に挙げられる。この眼圧上昇による緑内障の発症は、TA眼内投与の大きな問題点である。2006年以降、血管内皮増殖因子に対するモノクローナル抗体製剤が登場し、ベーチェット病による難治性ぶどう膜炎に対して臨床使用が可能となった。しかし、ステロイド剤の投与は、今後とも炎症を中心とする眼疾患治療の主流を占めることには変わりがなく、副作用

としての眼圧上昇に対する何らかの対策が必要である。

そこで、申請者 山本由美子 は、ステロイド剤のTAを硝子体内又はテノン嚢下に投与後の眼圧変化と眼圧上昇に影響する因子を検討することを目的として、後ろ向き症例研究を行った。TAを硝子体(4mg/0.1ml:16眼)又はテノン嚢下(20mg/0.5ml:66眼)に投与され、投与後1、3、6ヶ月に経過観察が可能であった69例82眼を研究対象として、投与前の眼圧、投与前と投与後の眼圧の変化と年齢、性別、水晶体の有無、投与方法、硝子体手術の有無、TA投与歴、原因疾患との関連について統計学的に比較検討した。

全症例における眼圧上昇の最大値の平均は、4.0mmHgであり、5.0mmHg以上の上昇が28眼(34.1%)に認められた。その発生率は、60歳未満の群で有意に高く($p < 0.01$)、女性に高い傾向($p = 0.051$)が認められた。更に、60歳未満と60歳以上の2群を性別で分けた4群の比較では、60歳未満女性群で、その他の3群と比較して、眼圧上昇の発生率は有意に高かった($p < 0.01$)。投与方法による比較では、テノン嚢下投与群で投与後1、3、6ヶ月に投与前と比較して有意な眼圧上昇が認められたが、硝子体内投与群では、投与後1か月にのみ有意な上昇が認められた。眼圧上昇が認められた症例は、2例を除き、眼圧降下点眼薬、又は炭酸脱水素酵素阻害剤の内服投与により、眼圧が下降していた。緑内障手術が施行されていた2例は、いずれも60歳未満の女性でTAのテノン嚢下への投与であった。

TAの硝子体への投与又はテノン嚢下への投与により、約1/3の症例で眼圧上昇を認めたことより、TA投与の際には、投与後の定期的な眼圧検査が必要であると考察する。また、若年者・女性、テノン嚢下投与では、眼圧上昇の確立が高く、より注意深い経過観察が必要であると考察する。ステロイド剤の投与は、炎症を中心とする眼疾患治療の主流であり、今後も多用されていくものと推察され、緑内障などの重篤な障害を起こす可能性があることを念頭に置いておく必要がある。

本研究により、ステロイド剤を投与する時に留意すべき危険因子「若年者・女性」と「テノン嚢下投与」以外に、申請者らの教室の遺伝子情報等に関する研究についても考察を加えることにより、臨床上、より安全で、質の高い眼疾患治療が進展していくものと推察する。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 宮本 謙三 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第88号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | A New Simple Performance Test Focused on Agility in Elderly People: The Ten Step Test (高齢者に対する新しい敏捷性テスト: 10ステップテスト) |
| 発表誌名 | Gerontology, 54, (365-372), 2008年11月 |

| | | | | |
|-------------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 谷 | 俊一 |
| | 副査 | 教授 | 椛 | 秀人 |
| | 副査 | 教授 | 加藤 | 邦夫 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 宮本謙三

論文題目 A New Simple Performance Test Focused on Agility
in Elderly People: The Ten Step Test

(高齢者に対する新しい敏捷性テスト：10ステップテスト)

(論文要旨)

【目的】高齢者の体力測定に際し、敏捷性機能を簡便に測定することのできるテスト法は現在のところ確立されていない。体力増進を目的とする高齢者の運動教室では、筋力やバランスと並び敏捷性機能の評価も重要であり、そのテスト法の開発はより客観的な評価と効果的な運動介入を可能にすると思われる。本研究の目的は新しい敏捷性テスト法を提案し、その信頼性と妥当性を検証した上で、敏捷性機能の加齢的变化過程を確認することである。

【対象】地域に居住する20歳から99歳までの健康成人828名（男性266名：平均年齢56.0±21.8歳、女性562名：平均年齢65.0±19.6歳）。年代別内訳は20歳代89名、30歳代76名、40歳代73名、50歳代78名、60歳代110名、70歳代213名、80歳代169名、90歳代20名である。

【方法】Ten Step Test（以下TST）は、立位姿勢で高さ10cmの台に片脚足部を上げ、下す。続いて反対側の足部を上げ、下す。一側の上げ下ろしを1回のステップとして、連続10回のステップに要する時間を測定するものである。TSTは練習の後、2回測定し所要時間の短い方を採用した。TST以外の測定項目としては、バランス機能の指標として開眼片脚立ち保持時間、筋力の指標として膝伸展筋の等尺性筋力、敏捷性機能の外的基準として運動反応時間（MRT; Motor Reaction Time）および床からの立ち上がり時間を測定した。さらにTSTと転倒との関連を検討するため、70歳以上の女性112名を対象に過去1年間の転倒経験の有無を確認した。



【分析】TSTの信頼性評価には2回の測定値の級内相関係数（Intra-class Correlation Coefficient; ICC）、基準関連妥当性の評価にはMRTおよび床からの立ち上がり時間との単相関、内容妥当性の評価には膝伸展筋筋力および片脚立ち時間との偏相関を用いた。また、敏捷性の加齢過程の把握には加齢によるTST変化過程の回帰曲線（直線、2次曲線、3次曲線）

への適合性（決定係数）から判断した。同時に敏捷性の低下開始年齢を把握するため、TSTと年齢の相関図を作成し、母集団を各年齢で2分割した際に生じる2つの直線のなす角度が最も急峻になる年齢を求め、敏捷性機能低下の転換点とした。そしてTSTのテスト標準値として、20歳代から90歳代までの男女別の平均値を示した。最後に、転倒との関連については判別分析を用い、TST、片脚立ち保持時間、膝伸展筋力の各々を指標とした際の誤判別率を比較し有用性を検討した。

【結果】TSTによる敏捷性機能については、いずれの年代においても男女差は認められなかった。TSTの信頼性については $ICC=0.96$ 、1週間後の再テスト信頼性は $ICC=0.86$ と十分な信頼性が確認された。内容妥当性に関しては筋力やバランスとの偏相間は -0.36 、 -0.35 と低く、外的基準としたMRTや床からの立ち上がり時間とは、 -0.59 と -0.68 という有意な負の単相関を示した。これらはTSTが筋力やバランスとは異なる運動要素として敏捷性機能を測定していることを示している。敏捷性の加齢過程に関しては、3次曲線での決定係数が最も高い(0.605)結果となったが、健康な高齢者を対象としていることから生じたフロアー効果と考えられ、本来は2次曲線に類似した加速度的な低下を示す変化過程と推察された。そして敏捷性機能が低下し始める年齢としては52歳が転換点として示された。TSTと転倒との関連性では、筋力やバランスを指標とするよりTSTの誤判別率は低く(35.2%)、転倒リスクを推測する上で、より良い指標となる可能性が示唆された。

【考察】高齢者の運動機能評価に際しては簡便性ととも安全性が前提とされるため、立位バランス保持や坐位での膝伸展筋力など静的な状態での測定方法が用いられてきた。しかし高齢者の運動特性とされる動作速度の低下については、これらのテストでは反映されることはなく、スピード要素を含んだ安全なテストバッテリーの開発は意義がある。また、本研究では敏捷性機能には男女差が認められず、50歳代以降に急激に低下してくるという特徴が示された。この変化過程は比較的直線的な低下を示す筋力の加齢変化とはやや異なり、平衡機能のような神経系の影響が大きい運動要素の変化過程に類似している。加齢に伴う神経伝導速度の低下、神経筋支配比の増大、白筋線維の選択的萎縮といった生理学的変化とも符合しており、今後はTSTによる動作レベルでの変化過程と神経生理学的変化を重ね合わす必要がある。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | 官 本 謙 三 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 谷 俊 一  |
| | 副 査 氏 名 | 梶 秀 人 印 |
| | 副 査 氏 名 | 加 藤 邦 夫  |

題 目 A New Simple Performance Test Focused on Agility in Elderly
 People: The Ten Step Test
 (高齢者に対する新しい敏捷性テスト： 10ステップテスト)

著 者 Kenzo Miyamoto, Hideaki Takebayashi, Koji Takimoto,
 Shoko Miyamoto, Shu Morioka, Fumio Yagi

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Gerontology, 54, (365-372), 2008年11月

要 旨

高齢者の転倒リスクの評価には下肢筋力やバランス機能が重視されていますが、敏捷性も重要な要素と考えられます。しかし高齢者の敏捷性を評価する安全かつ簡便なテストがないため、申請者らは10ステップテスト(以下TST)を考案しその信頼性、妥当性、転倒予測能および敏捷性の加齢変化について検討しました。TSTとは、被験者が高さ10 cmのブロックの前に立ち、左右の足を交互にそのブロックに載せては下ろす動作を10回するのに何秒かかるかを評価するものです。20歳から99歳までの健康人828人に対してTSTが2回ずつ行なわれ2回の結果の相関係数は0.96、20名に対して1週間後に同じテストを行ないその結果と初回テストとの相関係数は0.86で、いずれも有意な高い相関がありテストの再現性が確認されました。次に、敏捷性評価法としての基準関連妥当性を検証するためにTSTと既存の敏捷性評価法との相関性を検討しました。152名に運動反応時間として足の内くるぶしへの触覚刺激を合図に前脛骨筋の収縮を生じさせるまでの時間を計測し、さらに49名にはsupine positionから立ち上がるまでの時間を計測しこれら2つのテストとTSTとの相関係数を調べるとそれぞれ0.59と0.68で、中等度の有意な相関でありました。より高い相関が得られなかった理由は、TST以外の2つのテストでは結果のvariabilityが大きいためと考えました。次に、70歳以上の女性112名を対象に、膝伸展力と片脚起立時間を測定しTSTとの相関係数を調べますと、それぞれ0.36と0.35であり、有意な弱い相関を示しました。すなわち、TSTは下肢筋力やバランス機能を多少反映するもののそれらとは独立した敏捷性に対する評価法としての内容妥当性が確認されました。また、過去1年間の転倒歴から判別分析を用いて誤判定率を比較すると、TSTは膝伸展力や片脚起立時間よりも低いerror rateであり、より優れた転倒予測テストである可能性が示唆されました。TSTの加齢変化については男女による有意差はなく、one stepに要する時間は加齢により延長しましたがその変化は非直線的で、52歳が敏捷性低

下の始まる転換点として示され、全体の変化は本来、2次曲線に類似した加速度的な敏捷性低下が予測されますが、健康な高齢者のみを対象としているためのfloor effectにより3次曲線で最も高い決定係数を示しました。このようなTSTデータの加齢変化は、これまで報告されている神経筋の生理的変化、たとえば神経伝導速度の低下や筋のinnervation ratioの増加、fast twitch muscle fiberの萎縮などが60歳以降に生じることと矛盾せず、TSTが敏捷性の加齢変化を簡便かつ安全な方法で捉えていることを示唆するものと結論されました。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 卢 连依 (中国) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第89号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Brain neuronal/inducible nitric oxide synthases and cyclooxygenase-1 are involved in the bombesin-induced activation of central adrenomedullary outflow in rats (中枢性に投与されたボンベシンにより惹起される副腎髄質系賦活には脳内の神経型および誘導型の一酸化窒素合成酵素およびシクロオキシゲナーゼ-1が関与する) |
| 発表誌名 | European Journal of Pharmacology, 590(1-3), (177~184), 2008年8月20日 |
| | 審査委員 主査 教授 本家 孝一 副査 教授 由利 和也 副査 教授 椛 秀人 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学 位 論 文 要 旨

氏 名 卢连依
Lu Lianyi

論 文 題 目 中枢性に投与されたボンベシンにより惹起される副腎髄質系
賦活には脳内の神経型および誘導型の一酸化窒素合成酵素お
よびシクロオキシゲナーゼ-1 が関与する

(論文要旨)

【はじめに】生体が様々のストレスに暴露されると、脳内における種々の神経伝達物質の遊離により、適応のためのストレス反応が惹起される。この反応における中枢性出力系の1つに交感神経—副腎髄質系があり、この系の過剰反応は高血圧症、消化性潰瘍、免疫系機能抑制による発癌などのストレス関連疾患を引き起こす。従って、それらの予防と治療の観点から、交感神経—副腎髄質系の中枢性賦活機序を明らかにすることは重要な課題である。しかし、その詳細は今なお明らかではない。

従来、血液中のノルアドレナリン (NA) は交感神経賦活の指標、アドレナリン (Ad) は副腎髄質賦活の指標として用いられ、種々のストレス関連ペプチドのラット等の脳室内投与実験から交感神経系と副腎髄質系はそれぞれ個別に中枢性に制御されていることが報告されてきた。さらに近年、私たちは、血液中 Ad は副腎髄質の Ad 含有細胞から分泌されるが、血液中 NA は交感神経終末から遊離されるのみならず副腎髄質の NA 含有細胞からも遊離されること、さらに、これらの反応に脳内プロスタノイド[特に、プロスタグランジン E₂ (PGE₂)およびトロンボキササン A₂ (TxA₂)]が関与することを明らかにした。すなわち、ラット脳室内に投与した副腎皮質刺激ホルモン放出因子、Glucagon-like peptide 1 は脳内 PGE₂ 生成を介して交感神経系を、脳内 TxA₂ 生成を介して副腎髄質 (Ad 含有細胞) をそれぞれ賦活すること、一方、ボンベシン、ヒスタミンの脳室内投与は脳内 TxA₂ 生成を介して副腎髄質の Ad 含有細胞と NA 含有細胞を賦活することを明らかにした。さらに、PGE₂ および TxA₂ は生体膜リン脂質由来のアラキドン酸から脳内シクロオキシゲナーゼ (COX) により生成されるが、脳内 COX は脳内一酸化窒素(NO)により賦活されることも報告している。

脳内 NOS は神経型 NOS (nNOS) が主要なアイソザイムであるが、サイトカイン刺激などによりニューロンやグリア細胞において誘導型 NOS (iNOS) 発現が誘導される。一方、脳内 COX はこれまで2種類のアイソザイム (COX-1 および COX-2) が同定され、

両者とも構成的に発現している。そこで今回、ボンベシンにより惹起される中枢性副腎髄質系 (Ad 含有細胞と NA 含有細胞) の賦活に、いずれの脳内 NOS および COX アイソザイムが関与しているのかを薬理的に解析した。




【方法】ウレタン麻酔 (1.0 g/kg, i.p.) したラットを脳定位に固定し、脳室内に種々の薬物を投与した。あらかじめ留置した鼠径動脈カニューレから経時的に採血し、血漿中の NA および Ad をアルミナ抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に測定した。

【結果】①ボンベシン (1 nmol/rat) 脳室内投与(i.c.v.)により惹起された血中 NA および Ad の増加は脳室内前処置した L-NAME (非選択的 NOS 阻害薬) (0.37 and 1.11 μ mol/rat) によりそれぞれ有意に抑制された。② 7-nitroindazole (nNOS 阻害薬) (0.03 and 0.12 μ mol/rat) の脳室内前処置により、ボンベシン (1 nmol/rat, i.c.v.) による血中 NA の増加は有意に抑制されたが、血中 Ad の増加反応には有意な影響は見られなかった。③ S-ethylisothiourrea (iNOS 阻害薬) (2.7 and 27 nmol/rat) の脳室内前処置により、ボンベシン (1 nmol/rat, i.c.v.) による血中 Ad の増加は有意に抑制されたが、血中 NA の増加反応には有意な影響は見られなかった。④シクロヘキシミド(タンパク質合成阻害薬) (0.1 and 0.2 μ mol/rat) の脳室内前処置により、ボンベシン (1 nmol/rat, i.c.v.) による血中 Ad の増加は有意に抑制されたが、血中 NA の増加反応には有意な影響は見られなかった。⑤ケトプロフェン (選択的 COX-1 阻害薬) (1 and 2 μ mol/rat) の脳室内前処置により、ボンベシン (1 nmol/rat, i.c.v.) による血中 NA および Ad の増加がそれぞれ有意に抑制された。一方、NS-398 (選択的 COX-2 阻害薬) (0.8 and 1.6 μ mol/rat) の脳室内前処置ではほとんど影響が見られなかった。

【結論および考察】ラット脳室内投与ボンベシンによる副腎髄質からの NA 分泌には脳内の nNOS および COX-1 が、Ad 分泌には脳内の iNOS および COX-1 がそれぞれ関与することが明らかとなった。

私達はすでに、一酸化窒素 (NO) 供与薬 SIN-1 のラット脳室内投与により血液中の NA および Ad が増加し、その反応が COX 阻害薬インドメタシンの脳室内前処置により抑制されたことを報告している。さらに最近、脳内において、NOS と COX とが結合し、NOS から生成された NO の COX シスチンチオール基への配位 (ニトロシル化) により COX が活性化されることが報告されている。今後、中枢性交感神経—副腎髄質系の賦活に、NOS により産生された NO による脳内 COX のニトロシル化が関与するか否かを解析する。

論文審査の結果の要旨

| | 氏 名 | 戸 連 依 |
|---------|-----------------|---|
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 本 家 孝 一 |  |
| | 副 査 氏 名 由 利 和 也 |  |
| | 副 査 氏 名 椛 秀 人 |  |

題 目 Brain neuronal/inducible nitric oxide synthases and cyclooxygenase-1 are involved in the bombesin-induced activation of central adrenomedullary outflow in rats
 (中枢性に投与されたボンベシンにより惹起される副腎髄質系賦活には脳内の神経型および誘導型の一酸化窒素合成酵素およびシクロオキシゲナーゼ-1 が関与する)

著 者 Lianyi Lu, Takahiro Shimizu, Kumiko Nakamura, Kunihiro Yokotani

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 European Journal of Pharmacology, 590(1-3), (177~184),
 2008年8月20日

要 旨

【目的】生体が様々なストレスに暴露されると、脳内でストレス反応が惹起され交感神経-副腎髄質系に出力される。この系の過剰反応は高血圧症、消化性潰瘍、免疫系機能抑制による発癌などのストレス関連疾患を引き起こす。

このストレス反応系のメカニズムにおいて、血液中アドレナリン(Ad)は副腎髄質Ad含有細胞から分泌され、ノルアドレナリン(NA)は交感神経終末と副腎髄質NA含有細胞の両者から遊離されること、これらの遊離に脳内プロスタノイドの刺激が関与すること、プロスタノイドの産生に一酸化窒素合成酵素(NOS)によるシクロオキシゲナーゼ(COX)の活性化が関わっていることが知られている。

脳内の一酸化窒素合成酵素(NOS)は神経型NOS(nNOS)が主要なアイソザイムであるが、サイトカイン刺激等によりニューロンやグリア細胞において誘導型NOS(iNOS)が誘導される。一方、脳内COXは2種類のアイソザイム(COX-1およびCOX-2)が構成的に発現している。本研究は、ストレスモデルとしてのボンベシン脳内投与により惹起され

る副腎髄質からのAdあるいはNAの分泌に、どのNOSおよびCOXアイソザイムが関与しているかを薬理的に解明することを目的とした。

【方法】ウレタン麻酔 (1.0 g/kg, i. p.) したラットを脳定位に固定し、脳室内に種々の薬物を投与した。あらかじめ留置した鼠径動脈カニューレから経時的に採血し、血漿中のNAおよびAdをアルミナ抽出した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて電気化学的に測定した。

【結果】①非選択的NOS阻害薬のL-NAMEは、ボンベシンによる血中NAとAdの増加の両者とも抑制した。

②nNOS 阻害薬の 7-nitroindazole は、ボンベシンによる血中 NA の増加を抑制したが、血中 Ad の増加には有意な影響しなかった。

③iNOS 阻害薬の S-ethylisothiourea は、ボンベシンによる血中 Ad の増加を抑制したが、血中 NA の増加には影響しなかった。

④iNOS の誘導を抑制するシクロヘキシミドは、ボンベシンによる血中 Ad の増加を抑制したが、血中 NA の増加には影響しなかった。

⑤COX-1 阻害薬のケトプロフェンは、ボンベシンによる血中 NA および Ad の増加の両者を抑制した。一方、COX-2 阻害薬の NS-398 はどちらも抑制しなかった。

【考察】以上の結果より、ラット脳内投与ボンベシンによる副腎髄質からのNA分泌にはnNOSとCOX-1が、Ad分泌にはiNOSとCOX-1がそれぞれ関与することが明らかとなった。脳内の部位は不明であるが、特定の細胞内でNOSとCOXとが結合し、NOSにより生成されたNOがCOXのシステイン残基をS-ニトロシル化して活性化してプロスタノイドの産生を促進する可能性が考えられた。

以上のように、本論文は脳内ストレス反応における中枢性交感神経-副腎髄質系の賦活に関わるNOSとCOXのアイソザイムを明らかにした点で高く評価される。審査員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい優れた内容であると判断した。

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | Yatawara MD Mudiyansele Lalani Damayanthi Kumari (スリランカ) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第90号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月23日 |
| 学位論文題目 | Molecular epidemiology and molecular biology on leishmaniasis in Sri Lanka (スリランカにおけるリーシュマニア症に関する分子疫学ならびに分子生物学的研究) [1] Morphological and molecular studies on Sri Lankan <i>Leishmania</i> (スリランカにおけるリーシュマニア原虫の形態学的ならびに分子疫学的研究) [2] Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of <i>Leishmania major</i> . Gene content, arrangement and composition compared with <i>Leishmania tarentolae</i> (<i>Leishmania major</i> のマキシサークルゲノムの分子生物学的研究: 遺伝子組成、遺伝子配列、塩基組成における <i>L. tarentolae</i> との比較研究) |
| 発表誌名 | [1] Tropical Medicine and Health, 36(4), 179-187, 2008年12月 [2] Gene, 424(1-2), 80-86, 2008年11月 |
| | 審査委員 主査 教授 杉浦 哲朗 副査 教授 麻生 悌二郎 副査 教授 菅沼 成文 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 LALANI YATAWARA

論文題目

Molecular epidemiology and molecular biology on leishmaniasis in Sri Lanka

(スリランカにおけるリーシュマニア症に関する分子疫学ならびに分子生物学的研究)

(論文要旨)

リーシュマニア症は、サシチョウバエという昆虫により媒介される人獣共通感染症の一つであるが、アジア大陸、アメリカ大陸、中近東、アフリカ大陸に分布し、毎年2百万人が新しく感染し、現在1200万～1,500万人の感染者がいると推定されている。人に感染するリーシュマニア原虫は20種知られているが、その症状は、大きく3つの型(内臓型、皮膚型、皮膚粘膜型)に分類される。一つは、内臓型で肝臓、脾臓、骨髄で増殖し、致命的経過をたどる最も重要なタイプである。二つ目は、皮膚型で、潰瘍を伴う慢性の皮膚症状を示すタイプである。三つ目は、粘膜皮膚型で、皮膚型の5%以下の症例から移行するタイプであるが、バクテリアなどによる二次感染などから致命的になるケースも見られる。本感染症に対する効果的なワクチンは、まだなく、薬剤も少ない。最近リーシュマニア症は、再興感染症の一つとして、新しい地域におけるアウトブレイクのため再び注目を集めている。その一つにスリランカのリーシュマニア症がある。これまで2001年以来400人の皮膚型の新罹患者が報告されてきた。しかし、これまで、集中した研究があまりなく、スリランカのリーシュマニア原虫の形態的研究や分子レベルの研究が待たれていた。本研究では、これまでほとんど知られていなかったスリランカのリーシュマニア症の疫学的調査、ならびにリーシュマニア原虫の光学並びに電子顕微鏡などによる形態学的観察さらに分子レベルからの研究を行った。また、リーシュマニア原虫の鞭毛の基幹にあるキネトプラストには、ミトコンドリアDNA(マキシサークルと呼ばれる)が存在し、その産生するタンパク質は薬剤ターゲットの一つと候補と考えられているが、これまでヒト感染性のリーシュマニア原虫では、その実態は、ほとんど知られていなかった。本研究では、同じ皮膚型を示す*L.major*を用いて、その塩基配列を世界ではじめて明らかにした。得られた結果を要約すると、まずスリランカにおけるこれらの400人の新罹患者は、すべて皮膚症状を示す皮膚型であった。患者の皮膚から原虫を分離し、培養を試みたが、増殖力が弱く極めて困難であった。しかし、かろうじて分離できたのが、Welioya及びAnuradhapura地区から8患者からの8株で、電子顕微鏡などによる形態学的観察の結果、マクロファージの中にamastigoteが確認された。



また、promastigoteについても培養した原虫に確認され、リーシュマニア症であることが、形態レベルで確認することができた。さらに、cytochrome b 遺伝子とミニサークルDNAの解析をした結果、驚くべきことに内臓型の原虫である*L. donovani*に近縁であることが明らかとなった。

一方、皮膚型原虫として世界で感染者の多い*L. major*を用いてそのマキシサークルの8,420bpの塩基配列のPCR増幅に成功した。その結果、6つのタンパク質遺伝子（COII、COIII、ND1、ND7、Cytb）、2つのリボソームRNAサブユニット遺伝子（12S、9S）、3つの未同定遺伝子（MURF1、MURF4、MURF5）が明らかにされ、この遺伝子配置の構造は、トカゲのリーシュマニア原虫*L. tarentolae*と同一であることも、明らかとなった。

トリパノソーマ原虫やリーシュマニア原虫では、マキシサークル内の多数のpre-mRNAsにウリジンが挿入したり、欠損させたりするユニークなRNA編集を行っていることが知られている。特に*L. tarentolae*ではGC rich領域において、広範囲にわたるeditingが知られている。本研究により*L. major*において同様の遺伝子領域が確認され、*L. major*のRNA editingは、*L. tarentolae*と同様のパターンで行われていることが示唆された。

以上のように、本論文では、1) スリランカではじめて皮膚型のリーシュマニア症が認められ、確実に感染領域が広がっていること、2) 好適な培養条件を開発し、培養に成功して得られた原虫の顕微鏡観察やDNA分析により、予想とは異なった、内臓型のリーシュマニアではないかという結果が得られたこと、3) ヒト感染性の*L. major*のマキシサークルの塩基配列を世界ではじめて明らかにしたこと、4) *L. major*のRNA editingは、*L. tarentolae*と同様のパターンで行われていることが示唆されたこと、などが明らかとなった。本論文はしたがって、今後のスリランカにおけるリーシュマニア症のコントロールにおいて重要な示唆、すなわち現在感染している人々のなかで皮膚型から致命的な内臓型に変化する可能性を示唆したこと、さらに薬剤ターゲットの候補であるマキシサークルのサブユニットタンパク質の塩基配列をヒト感染性のリーシュマニア原虫で初めて明らかにしたことは、今後のスリランカにおけるリーシュマニア症のコントロールにおいて重要な示唆を与えた点で貢献するところ大であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | Lalani Yatawara |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 杉 浦 哲 朗  |
| | 副 査 氏 名 | 麻 生 悌 二 郎 印 |
| | 副 査 氏 名 | 菅 沼 成 文  |

題 目 Molecular epidemiology and molecular biology on leishmaniasis in Sri Lanka
 (スリランカにおけるリーシュマニア症に関する分子疫学ならびに分子生物学的研究)

- [1] Morphological and molecular studies on Sri Lankan *Leishmania*
 (スリランカにおけるリーシュマニア原虫の形態学的ならびに分子疫学的研究)
- [2] Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*. Gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*
 (*Leishmania major*のマキシサークルゲノムの分子生物学的研究：遺伝子組成、遺伝子配列、塩基組成における *L. tarentolae* との比較研究)

著 者 [1] Lalani Yatawara, Susiji Wickramasinghe, R.P.V. Jayantha Rajapakse, R.R.M. Laxman R. Siyambalagoda, Thanh Hoa Le, Yoshiya Watanabe, Takeshi Agatsuma
 [2] Lalani Yatawara, Thanh Hoa Le, Susiji Wickramasinghe, Takeshi Agatsuma

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 [1] Tropical Medicine and Health, 36(4), 179-187, 2008年12月
 [2] Gene, 424(1-2), 80-86, 2008年11月

【 要 旨 背景】

リーシュマニア症は、サシチョウバエにより媒介される人獣共通感染症の一つであるが、アジア大陸、アメリカ大陸、中近東、アフリカ大陸に分布し、毎年2百万人が新しく感染し、現在1200万～1,500万人の感染者がいると推定されている。人に感染するリーシュマニア原虫は20種知られているが、その症状は、内臓型、皮膚型、皮膚粘膜型に分類される。本感染症に対する効果的なワクチンはまだなく、薬剤も少ない。

スリランカではリーシュマニア症は 2001 年に報告され、本格的な調査が開始された。最近の報告では、スリランカの流行地では、400 人余りの皮膚型の新罹患者が報告されてきたが、これまで集中した研究がなく、スリランカのリーシュマニア原虫の形態的研究や分子レベルの研究が待たれていた。一方、リーシュマニア原虫の鞭毛の基幹にあるキネトプラストには、ミトコンドリア DNA(マキシサークルと呼ばれる)が存在し、その産生するタンパク質は薬剤ターゲットの一つの候補と考えられているが、これまでヒト感染性のリーシュマニア原虫では、その実態はほとんど知られていない。

そこで申請者らは、これまでほとんど知られていなかったスリランカのリーシュマニア症の疫学的調査を行い、リーシュマニア原虫の光学および電子顕微鏡による形態学的観察、そして分子レベルからの解明を行い、さらに同じ皮膚型を示す *L. major* を用いて、その塩基配列を明らかにすることを目的とした。

【結果】

得られた結果を要約する。

- 1) スリランカにおける新罹患者は、すべて皮膚症状を呈する皮膚型であった。
- 2) 患者の皮膚から原虫の分離・培養を試み、Welioya 及び Anuradhapura 地区の 8 患者から 8 株の培養に成功した。
- 3) 電子顕微鏡などによる形態学的観察の結果、マクロファージ中に amastigote が確認された。また、培養した原虫に promastigote が確認され、リーシュマニア症であることが形態レベルで確認した。
- 4) cytochrome b 遺伝子とミニサークル DNA の解析結果では内臓型の原虫である *L. donovani* グループの一つであることが明らかとなった。
- 5) 皮膚型原虫として世界で感染者の多い *L. major* を用いてそのマキシサークルにおける 8,420bp の塩基配列の PCR 増幅に成功し、6 つのタンパク質遺伝子 (COII, COIII, ND1, ND7, Cytb)、2 つのリボソーム RNA サブユニット遺伝子 (12S, 9S)、3 つの未同定遺伝子 (MURF1, MURF4, MURF5) が明らかにされた。この遺伝子配置の構造は、トカゲのリーシュマニア原虫 *L. tarentolae* と同一であった。

以上のように、申請者らはスリランカで初めて皮膚型のリーシュマニア症を確認し、その感染領域が広がっていることを明らかにした。また、リーシュマニアに対する好適な培養条件を開発し、培養に成功して得られた原虫の顕微鏡観察や DNA 分析により、内臓型のリーシュマニアであることを証明した。そして、ヒト感染性の皮膚型症状を示す *L. major* のマキシサークルの塩基配列を世界で初めて明らかにし、*L. major* の RNA editing は、*L. tarentolae* と同様のパターンで行われていることを明らかにした。本論文は、スリランカにおけるリーシュマニア症に感染している人々のなかで今後、皮膚型から重篤な内臓型に変化する危険性が示唆され、さらに薬剤ターゲットの候補であるマキシサークルのサブユニットタンパク質の塩基配列をヒト感染性リーシュマニア原虫で初めて明らかにしたことは、スリランカにおけるリーシュマニア症のコントロールにおいて重要な示唆を与えた点で貢献するところ大であると考えられ、本論文は高知大学博士(医学)に値すると評価された。

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 池本 竜則 (高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第91号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月31日 |
| 学位論文題目 | Effect of experimental focal compression on excitability of human median motor axons (人の正中神経局所圧迫による運動軸索の興奮性への影響) |
| 発表誌名 | Clinical Neurophysiology, (in press) |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 椛 | 秀人 |
| | 副査 | 教授 | 加藤 | 邦夫 |
| | 副査 | 教授 | 清水 | 恵司 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 池本 竜則

論文題目 Effects of experimental focal compression on excitability
of human median motor axons
(人の正中神経局所圧迫による運動軸索の興奮性への影響)

(論文要旨)

[目的] 絞扼性神経障害の病態生理を明らかにするために、人の正中神経に対し実験的に局所的圧迫を加え、圧迫に伴う運動軸索の静止膜電位変化を、閾値追跡法を用いて評価した。

[方法] 健康人24名を対象とし、表面電極（陰極）により左手関節部正中神経に対して条件刺激と試験刺激を加え（陽極は陰極より10 cm近位の前腕皮膚上）、それらにより誘発される短母指外転のCMAP (compound muscle action potential)を表面電極により記録し評価した。ソフトウェアはQTRAC version4/TRONDXM2プログラム (Kiernan et al., 2000) を用い、(1) 電流-閾値曲線、(2) SD時定数 (Strength-duration time constant)、(3) 閾値電気緊張法 (TE法: Threshold electrotonus)、(4) 回復曲線、を検査した。まず、圧迫を加えない状態で上記の4つを検査した (n=24)。その後、グループ① (n=10) では手関節部の刺激電極（陰極）に対して特製の圧迫装置を用いて持続圧迫を加え、10分経過後に圧迫したまま上記4種類の検査を行い、グループ② (n=7) では、同じ圧迫を20分間持続したのちに圧迫を解除してその直後から4種類の検査を行った。グループ③ (n=7) では①②と同じ部位に持続圧迫を加えた状態で、10分経過後に圧迫部から2cm遠位部に置いた電極（陰極）により正中神経を刺激して4種類の検査を行った。

[結果] グループ①では(1)電流-閾値曲線は有意に急峻化し、(2) SD時定数は有意に増加し、(3) TE法で有意なfanning-in現象が生じ、(4)回復曲線で相対不応期の有意な延長とsupernormalityの有意な低下が認められ、late subexcitabilityには有意な変化がなかった。一方、グループ②では(1) ~ (4)すべての検査において①とほぼ逆の現象が見られ、(1) 電流-閾値曲線は有意に傾斜が緩やかになり、(2) SD時定数は有意に減少し、(3) TE法で有意なfanning-out現象が生じ、(4)回復曲線で相対不応期の有意な短縮とsupernormalityの有意な増加が認められ、late subexcitabilityは有意に減少した。また、グループ③ではすべての検査で圧迫前と比較して有意な変化は認められなかった。

[考察] グループ①で見られた圧迫部位の神経興奮性変化はすべて膜電位が脱分極状態であることを示す所見である。しかも、late subexcitabilityに変化が生じなかったことから本実験における脱分極のメカニズムは「虚血」とであると推測される。late subexcitabilityは本来slow K⁺ channelを介した外向き電流によりに生じるが、虚血状態ではNa⁺ポンプが不活化されるための

脱分極効果 (K^+ 流出) と K^+ イオンが細胞外に蓄積するための効果 (K^+ 流入) が相殺される結果 late subexcitability は変化しなかったと考えられる。グループ②で見られた神経興奮性変化はすべて膜電位が過分極状態であることを示す所見であり、過去に駆血帯を用いた阻血実験で示された駆血開放に伴う膜電位の過分極に一致する。さらに、グループ③の結果は本実験における膜電位変化が圧迫部にきわめて限局していることを示すものである。これら所見を総合すると、臨床上、絞扼性神経障害や圧迫性脊髄症において示される圧迫部に限局した神経伝導障害の病態の少なくとも一部や、これら疾患に対する除圧手術後早期に回復する神経障害のメカニズムは圧迫部に限局した神経内の局所的虚血である可能性が高い。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|--|
| | 氏 名 | 池 本 竜 則 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 椛 秀 人 印 |
| | 副 査 氏 名 | 加 藤 邦 彦 印 |
| | 副 査 氏 名 | 清 水 恵 司 印 |

題 目 Effect of experimental focal compression on excitability of human median motor axons
 (人の正中神経局所圧迫による運動軸索の興奮性への影響)

著 者 Tatsunori Ikemoto, Toshikazu Tani, Shinichiro Taniguchi,
 Masahiko Ikeuchi, Jun Kimura

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Clinical Neurophysiology, (in press)

要 旨

従来の電気生理学的神経機能検査は有髄線維の数や伝導速度に関するもので、髄鞘の障害の検出には適しているものの、軸索の膜電位やその変化の検出には有効ではない。一方、閾値追跡法は刺激部における軸索の膜特性に依存した神経の興奮性、すなわち軸索の膜電位及びイオンチャネルの活性化やイオンポンプによって惹起される膜電位の変化を検出することができる。

そこで申請者は、絞扼性神経障害の病態生理を明らかにするために、健常人の正中神経に局所的圧迫を加え、圧迫に伴う運動軸索の静止膜電位変化を、閾値追跡法を用いて評価した。具体的には、手関節部の正中神経に条件刺激と試験刺激を与え、それらにより誘発される短母指外転筋の複合筋活動電位を記録することにより、(1) 電流-閾値曲線、(2) 強さ-期間 Strength-duration (SD) 時定数、(3) 閾値電気緊張波形、(4) 回復曲線を得た。まず、圧迫を加えない状態でこの4種類のテストを行い、その後、グループ①では神経圧迫部での膜電位変化を、グループ②では神経圧迫解除部の膜電位変化を、グループ③では神経圧迫部から2 cm 遠位部の膜電位変化を解析した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) グループ①では、神経圧迫により電流-閾値曲線は急峻化し、SD 時定数は増加し、閾値電気緊張波形は扇子をたたむかのように fanning-in 現象を起し、回復曲線においては相対不応期の延長と supernormality の低下が認められ、late subexcitability には変化が認められなかった。
- 2) グループ②では、神経圧迫解除によりグループ①とはほぼ逆の現象、すなわち電流-閾値曲線の傾きの鈍化、閾値電気緊張波形の fanning-out 現象、SD 時定数の減少、回復曲線における相対不応期の短縮と supernormality の増加、late subexcitability の減少が認められた。
- 3) グループ③では、神経圧迫部から 2 cm 遠位部ではすべてのテストで圧迫の前後で差は認められなかった。

以上の成績は、正中神経の局所圧迫によりその軸索が脱分極し、圧迫解除により過分極することを示すとともに、この膜電位変化が圧迫部に局限していることも示している。マンシエットによる圧迫で虚血状態になった神経軸索は脱分極状態となり、駆血開放により過分極状態となることから、申請者は正中神経の局所圧迫による軸索の脱分極は虚血によると推察している。申請者はまた、絞扼性神経障害や圧迫性脊髄症において示される圧迫部に局限した神経伝導障害の病態の少なくとも一部、及びこれらの疾患に対する除圧手術後早期に回復する神経障害のメカニズムに虚血に関わる可能性が高いと推察している。

以上より、申請者の論文は、絞扼性神経障害や圧迫性脊髄症の病態生理学的解明のみならず、これらの疾患における手術治療の見極めなどにも寄与することが期待される。よって審査員一同は、本論文を高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと認定した。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 清水 祐司(高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第92号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月31日 |
| 学位論文題目 | B-type Natriuretic Peptide is Predictive of Hospitalization in Community-dwelling Elderly Without Heart Diseases (ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)値は、心疾患のない地域在住 高齢者における入院を予測する) |
| 発表誌名 | Geriatrics and Gerontology International, (in press) |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |
| | 副査 | 教授 | 菅沼 | 成文 |
| | 副査 | 教授 | 瀬尾 | 宏美 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 清水 祐司

論文題目 **B-type Natriuretic Peptide is Predictive of Hospitalization in Community-dwelling Elderly Without Heart Diseases.**
(ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)値は、心疾患のない地域在住高齢者における入院を予測する。)

(論文要旨)

【背景】超高齢社会を迎え、入退院を繰り返す「虚弱」高齢者が著しく増加しており、「虚弱」高齢者の入院を予測する簡便なマーカーが必要とされている。一方、これまで心不全状態を反映して上昇するとされてきた、血漿ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)値に関して、近年、脳血管疾患や腎機能障害との関連も報告されている。

【目的】心疾患、脳血管疾患、腎機能障害など、多くの問題を潜在的に抱える地域在住高齢者において、BNP 値が入院を予測できるか否か検討する。

【方法・対象】2000年から2004年まで、K町において、明らかな脳血管疾患の既往のない65歳以上の地域在住高齢者644人に対して、血液生化学・心電図・心エコー検査を施行した。また、降圧薬内服の有無、過去1年間の入院の有無、脳ドックなどによる無症候性脳血管疾患の有無についてもアンケートを行い、血圧、認知機能検査、Mini-Mental State Examination(MMSE)および日常生活活動度(ADL)を健診で評価した。まず、陳旧性心筋梗塞、心機能低下、弁膜症、心房細動、腎機能低下(血清クレアチニン 2.0mg/dL以上)が明らかな42例を除外した。残りの602例の健常高齢者(男性226例、女性376例、平均年齢 80.2 ± 6.2 歳)を対象として解析を行い、さらにその後、毎年、担当保健師が対象者の入院とその原因を、アンケート結果をもとに追跡・確認した。

【結果】1) 追跡期間の中央値は37ヶ月(2-48ヶ月)で、追跡中に112例が入院した。
2) 初回健診時の各指標について、入院群(112例)と非入院群(490例)で比較した。入院群では、年齢、血清クレアチニン値、血漿BNP値が有意に高く、逆に血清アルブミン値、総コレステロール値、MMSE得点、ADLスコア得点が有意に低かった。さらに、入院群では、男性および無症候性脳血管障害のある割合が有意に高かった。
3) 入院発生までの期間についてCoxハザードモデルで検討した。2群間で異なる前記の指標で補正しても、血漿BNP値、ADLスコア得点、無症候性脳血管疾患の有無が独立した入院の決定因子であった。
4) 血漿BNP値の入院ハザード比は、1標準偏差上昇で1.36(95%CI=1.05-1.75、 $p=0.02$)であった。




5) 入院の原因は、悪性新生物 18 例(16.1%)、ADL 低下などによる独居困難 13 例(11.6%)、脳血管疾患 12 例(10.7%)、心疾患 11 例 (9.8%)、整形外科疾患 10 例 (8.9%)、認知症 9 例(8.0%)、肺炎 6 例(5.4%)、腎不全 4 例(3.6%)、 その他の原因 16 例(14.3%)、原因不明 13 例(11.6%)であった。

6) ADL 低下による独居不能、脳血管疾患、心疾患、認知症、および肺炎による入院群では、血漿 BNP 値がより高値であった。

【考察】血漿 BNP 高値例が入院に至る機序は明らかではないが、血漿 BNP 高値例の中には、心エコー検査で除外できない程度の心不全が潜在性に存在し、追跡中に発症して入院したと考えられる例、同様に、潜在性脳血管障害があり、追跡中に新たに脳血管障害を発症したり、肺炎・ADL 低下・認知機能低下が進行したりして入院したと考えられる例がみられた。また、初診時軽症の腎機能障害であっても、経過中に腎不全となり、入院に至る例も一部みられた。以上のように、血漿 BNP 値は、将来の入院につながり、かつ多くの地域在住高齢者が潜在的に抱えている、様々な病態を検知できるという点で、入院を伴う高齢者の総合的な「虚弱」状態の指標となると考えられた。

【結語】地域在住高齢者において、血漿 BNP 値は、無症候性心疾患、脳血管疾患、慢性腎機能障害などに伴う入院を予測するうえで、有用な生化学マーカーである。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|------|------|---|
| | 氏名 | 清水 祐司 |
| 審査委員 | 主査氏名 | 杉浦 哲朗  |
| | 副査氏名 | 菅沼 成文  |
| | 副査氏名 | 瀬尾 宏美  |

題目 B-type Natriuretic Peptide is Predictive of Hospitalization in
Community-dwelling Elderly Without Heart Diseases
(ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 値は、心疾患のない地域在住
高齢者における入院を予測する)

著者 Yuji Shimizu, Masanori Nishinaga, Jun Takata, Ichiro Miyano,
Kiyohito Okumiya, Kozo Matsubayashi, Toshio Ozawa, Nobufumi Yasuda,
Yoshinori Doi

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Geriatrics and Gerontology International, (in press)

要 旨

【背景】

高齢化社会を迎え、入退院を繰り返す高齢者が著しく増加しており、これら「虚弱」高齢者の入院を予測する簡便なマーカーが必要とされている。一方、血漿ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)値はこれまで心機能低下を反映して上昇するとされてきたが、近年、脳血管疾患や腎機能障害との関連も報告されている。そこで、申請者らは心疾患、脳血管疾患、腎機能障害など多くの問題を潜在的に抱える地域在住の高齢者においてBNP値が入院を予測できるか否かを検討した。

【方法】

2000年から2003年間でK町における住民健診受診者で65歳以上の地域在住高齢者644人を対象に血液生化学・心電図・心エコー検査を施行した。また、高血圧薬内服の有無、過去1年間の入院の有無、脳ドックなどによる無症候性脳血管疾患の有無、そして血圧、認知機能検査、Mini-Mental State Examination(MMSE)および日

常生活活動(ADL)を評価した。陳旧性心筋梗塞、腎機能低下(血清クレアチニン 2.0mg/dL 以上)の明らかな 42 例を除外し、残りの 602 例の健常高齢者(男性 226 例、女性 376 例、平均年齢 80.2±6.2 歳)を対象とした。エントリー後、毎年対象者の入院とその原因(悪性新生物・独居困難・脳血管疾患・心疾患・認知症・肺炎・腎不全・整形外科疾患など)を追跡調査した(中央値:37 ヶ月)。

【結果】

得られた結果は以下のように要約される。

- 1) 追跡期間(2-48 ヶ月)中に 112 例が入院した。
- 2) 初回健診時の各指標を入院群(112 例)と非入院群(490 例)に分けると、入院群は非入院群に比し、年齢、血清クレアチン値、血漿 BNP 値が有意に高く、逆に血清アルブミン値、総コレステロール値、MMSE 得点、ADL スコア得点が有意に低かった。さらに、入院群では、男性および無症候性脳血管障害のある割合が有意に高かった。
- 3) ADL 低下による独居不能、脳血管疾患、心疾患、認知症および肺炎による入院群では血漿 BNP 値がより高値であった。
- 4) 入院発生までの期間を Cox ハザードモデルで検討したところ、血漿 BNP 値、ADL スコア、無症候性脳血管疾患の有無が独立した入院の決定因子であった。
- 5) 血漿 BNP 値の入院ハザード比は 1 標準偏差上昇で 1.36(95% CI=1.02-1.75、P=0.02)であった。

申請者らは、重篤な心血管疾患の既往が無く自立した地域在住の高齢者を対象に、血液生化学指標、生理学指標、認知機能および日常生活活動度を評価し、地域在住高齢者において、血漿 BNP 値は心疾患、脳血管疾患、慢性腎機能障害などに伴う入院を予測する上で有用な生化学的マーカーであることを報告した。

血漿 BNP 高値例には、心エコー検査で診断できない潜在性の心不全が存在し、追跡中に心不全を発症して入院した例、潜在性脳血管障害があり新たに脳血管疾患を発症した例、肺炎、ADL 低下、認知機能低下が進行し入院した例、そして軽症腎機能障害が経過中に腎不全となり入院に至った例が含まれている。すなわち、血漿 BNP 値は地域在住高齢者が潜在的に抱えている様々な病態を検知でき、将来の入院を必要とする高齢者の総合的な「虚弱」状態の指標になると考えられた。申請者らは、我が国において初めて地域在住高齢者における血漿 BNP の臨床的意義について検討し、高齢者の「虚弱」状態と血漿 BNP との関連を明らかにしたことは今後の地域在住高齢者の生活習慣指導や健診のあり方に貢献するところ大であり、本論文は高知大学博士(医学)に値すると評価された。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 松下 憲司(鹿児島県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第93号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月31日 |
| 学位論文題目 | Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of <i>Serratia marcescens</i> isolated from environmental water (環境水から分離した <i>Serratia marcescens</i> に感染する3種のバクテリオファージの形態学的、遺伝学的解析) |
| 発表誌名 | FEMS Microbiology Letters, (in press) |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 横山 | 彰仁 |
| | 副査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |
| | 副査 | 教授 | 執印 | 太郎 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 松下 憲司

論文題目

Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of *Serratia marcescens* isolated from environmental water
(環境水から分離した *Serratia marcescens* に感染する 3 種のバクテリオファージの形態学的、遺伝学的解析)

(論文要旨)

(はじめに)

Serratia marcescens は、腸内細菌科に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌である。種々の環境、特に水や湿った土壤に生息しているが、院内感染や日和見感染の重要な原因菌の一つでもある。

S. marcescens 感染症は、新生児、特に免疫学的弱者である低出生体重児において注意を必要とする。そして、新生児集中治療室 (NICU) 内でグラム陰性菌によって引き起こされる血流感染の 11.2% を *S. marcescens* が占めると報告されている。加えて、*S. marcescens* は、中枢神経に親和性を持ち、髄膜炎や脳膿瘍などの病原菌となり、重篤な神経学的予後をもたらす。

このような *S. marcescens* の多剤耐性菌株の増加は、小児科、特に NICU における大きな関心事である。最近、NICU における多剤耐性 *S. marcescens* の outbreak が報告されたが、これらの疾患に対し、従来の化学療法で治療を行うことは困難であった。

このような状況を打開するためには、近年強調されている抗菌剤の適性使用の徹底に加え、抗菌剤に依存しない細菌感染症の治療法の導入が有効であると考えられる。そのような抗菌剤非依存的な細菌感染症制御法の可能性の 1 つに、バクテリオファージ (ファージ) の溶菌活性を利用する、いわゆるファージ療法がある。これまでに我々は、感染症動物モデルを使用し、黄色ブドウ球菌、腸球菌、緑膿菌、大腸菌に起因する感染症に対するファージ療法の有効性を示してきた。

(目的と方法)

本研究では、多剤耐性 *S. marcescens* 感染症に対するファージ療法開発を目的として、高知大学医学部附属病院の患者検体から得られた *S. marcescens* の菌株を宿主として使用し、高知県の環境水 (河川と下水汚水) から 3 種の新規ファージ (KSP20, KSP90, KSP100) を分離し、それらの形態学的・遺伝学的解析を行うことにより、治療用ファージとしての適格性を検討した。

(結果)

KSP20 は、正二十面体の頭部 (直径 57 nm) と収縮性尾部 (145 nm) を有し、family *Myoviridae*, morphotype A1 に属するファージであり、大腸菌の溶原ファージ P2 に類似していた。KSP20 のビリオンタンパク質は、大腸菌ファージ P2 の頭部および尾部関連タンパク質とアミノ酸配列において 33-49% の相同性を示した。以上から KSP20 は、P2 に近縁の溶原ファージであると考えられた。

KSP90 は、正二十面体の頭部 (直径 82 nm) および収縮性の尾部 (118 nm) を有し、family

Myoviridae, morphotype A1 に属するファージであった。KSP90 のビリオンタンパク質のアミノ酸配列は、*Stenotrophomonas maltophilia* の溶菌ファージ Smp14 (T4タイプファージ) のビリオンタンパク質とアミノ酸配列において27-43% の相同性を示した。また、KSP90 の主要頭部タンパク質は、T4ファージと同様に、頭部構築においてN末端の51アミノ酸残基が除去されて成熟型になると予想され、さらにその切断部位には T4 prohead protease の認識配列と同一の配列 (Leu-X-Glu) が認められた。また、T4ファージの後期遺伝子プロモーター配列 (5'-TATAAATA-3') に類似する配列 (5'-ACTAAATA-3') が、少なくとも5遺伝子の前に存在していた。これらのことは、KSP90 が、T4タイプファージに近縁の溶菌ファージであることを強く示唆している。

KSP100 は、伸長した頭部 (長さ 90 nm、幅 31 nm) と極端に短い尾部を持ち family *Podoviridae*, morphotype C3 に分類され、大腸菌の溶菌ファージ phiEco32 に類似していた。KSP100 のビリオンタンパク質のアミノ酸配列も、phiEco32 のビリオンタンパク質と 31-41%のアミノ酸配列相同性を示し、両ファージが近縁関係にあると考えられた。

宿主菌への吸着率、潜伏期間、バーストサイズの検討により、KSP90 と KSP100 は効率よく宿主菌で増殖できることが示された。また両者を使用すると、検討した *S. marcescens* 株の 65%を溶菌可能であった。




(考察)

分離した 3 種の新規ファージの内、KSP90 と KSP100 は、溶菌ファージであると推定され、かつ宿主への効率的な感染能が示された。

一般的に、溶菌ファージの方が、溶原性に伴うファージ療法に不利な性状 (類似ファージに対する非感受性化、病原遺伝子の保有等) を有しないため、溶原ファージよりも治療用ファージとして適当であると考えられている。実際、Smp14 (T4 タイプファージ) と phiEco32 は、それぞれ *S. maltophilia* 感染症と大腸菌による牛の乳腺炎に対する治療に使用することが可能と考えられている。

以上から、KSP90 と KSP100 は、*S. marcescens* 感染症の治療用ファージとしての適格性を有すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | 松 下 憲 司 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 横 山 彰 仁  |
| | 副 査 氏 名 | 杉 浦 哲 朗  |
| | 副 査 氏 名 | 執 印 太 郎  |

題 目 Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of *Serratia marcescens* isolated from environmental water
 (環境水から分離した *Serratia marcescens* に感染する 3 種のバクテリオファージの形態学的、遺伝学的解析)

著 者 Kenshi Matsusita, Jumpei Uchiyama, Shin-ichiro Kato,
 Takako Ujihara, Hiroshi Hoshiba, Shigeyoshi Sugihara,
 Asako Muraoka, Hiroshi Wakiguchi & Shigenobu Matsuzaki

発表誌名、巻 (号)、ページ (~), 年 月
 FEMS Microbiology Letters, (in press)

要 旨

松下憲司氏の公開学位審査は、平成21年2月24日16 時より、約1時間にわたって行った。まず、研究内容の発表を行った。

背景

口腔や糞便からしばしば分離される常在菌である *Serratia marcescens* は、腸内細菌科に属するグラム陰性通性嫌気性桿菌であるが、申請者の診療対象である新生児や低出生体重児を含め、日和見感染症の重要な原因菌の一つである。加えて、*S. marcescens* は、中枢神経に親和性を持ち、髄膜脳炎や脳膿瘍などの病原菌となり、重篤な神経学的な後遺症をもたらすことがある。また、最近、カルバペネムを含む多剤耐性 *S. marcescens* が臨床分離菌の数パーセントに認められており、このような場合、従来の化学療法を用いての治療は難渋している。

この状況を打開するためには、抗菌剤に依存しない細菌感染症の治療法の導入が有効であると考えられる。その可能性の1つに、バクテリオファージ(ファージ)の溶菌活性を利用する、いわゆるファージ療法がある。

目的と方法

申請者らは、多剤耐性 *S. marcescens* 感染症に対するファージ療法開発を目的として、本学附属病院の患者検体から得られた *S. marcescens* の菌株を宿主として使用し、高知県の環境水(河川と下水から採取)から3種の新規ファージ(KSP20, KSP90, KSP100)を分離し、それらの形態学的・遺伝学的解析を行うことにより、治療用ファージとしての適格性を検討した。

結果と考察

KSP20 は、正二十面体の頭部(直径 57 nm)と収縮性尾部(145 nm)を有し、大腸菌ファージ P2 の頭部および尾部関連タンパク質とアミノ酸配列において 33-49% の相同性を示し、P2 に近縁の溶原ファージであると考えられた。

KSP90 は、正二十面体の頭部(直径 82 nm)および収縮性の尾部(118 nm)を有し、*Stenotrophomonas maltophilia* の T4 タイプ溶菌ファージである Smp14 のビリオンタンパク質とアミノ酸配列において 27-43% の相同性を示した。また、KSP90 は、T4 prohead protease の認識配列と同一の配列を認めるなど、KSP90 が、T4 タイプファージに近縁の溶菌ファージであることが強く示唆された。

KSP100 は、伸長した頭部(長さ 90 nm、幅 31 nm)と極端に短い尾部を持ち、大腸菌の溶菌ファージ phiEco32 に類似していた。アミノ酸配列も、phiEco32 のビリオンタンパク質と 31-41% のアミノ酸配列相同性を示し、両ファージが近縁関係にあると考えられた。

KSP90 と KSP100 は、溶菌ファージであると推定され、宿主菌への吸着率、潜伏期間、バーストサイズの検討により、KSP90 と KSP100 は効率よく宿主菌で増殖できることが示された。また両者を使用すると、検討した *S. marcescens* 株の 65% を溶菌可能であった。

結論

以上から、申請者らが分離した KSP90 と KSP100 は、*S. marcescens* 感染症の治療用ファージとしての適格性を有すると考えられた。

審査員からは、ファージの特異性、吸着率、latent time、今後の動物実験などについて質問および議論があった。これらに対し、申請者は、おおむね適切に回答および説明を行った。申請者は研究を主体的に進めており、研究に関する技術や考察力も高い能力を持っているものと判断された。このため、審査員一同、申請者の研究は、高知大学大学院医学系研究科(博士)に値するものと判断した。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 山本 正樹(高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第94号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月31日 |
| 学位論文題目 | Biphasic Elevation of Bilirubin Oxidation Durring Myocardial Ischemia Reperfusion (心筋虚血再灌流後の生体内ビリルビン酸化は二相性の上昇を示す) |
| 発表誌名 | Circulation Journal, 72(9), (1520~1527), 2008年9月 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |
| | 副査 | 教授 | 大西 | 三朗 |
| | 副査 | 教授 | 西岡 | 豊 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 山本 正樹

論文題目 Biphasic Elevation of Bilirubin Oxidation
During Myocardial Ischemia Reperfusion
(心筋虚血再灌流後の生体内ビリルビン酸化は二相性の上昇を示す)

(論文要旨)



心筋虚血再灌流傷害は虚血性心疾患、心移植時のドナー心の保存、心臓外科手術による大動脈遮断後において臨床的に心機能予後を規定する重要な因子の一つと考えられている。これは、一過性心筋虚血後の心筋血流再開により、さらなる心筋細胞障害や心筋収縮力低下が生じるもので、酸化ストレス、細胞内Ca過負荷や免疫細胞の組織浸潤が原因とされる。さらに、心筋虚血再灌流後に大量にnitric oxide(NO)が産生された場合、活性酸素種と反応してさらに強力な心筋障害作用を示す事が報告されている。しかし、再灌流直後から産生される酸化ストレスを経時的に評価する有効な酸化ストレスマーカーは少なく、その生体内変動は未だ不明な点が残る。我々はこれまでビリルビンの持つ抗酸化作用に注目し、その代謝産物であるバイオピリンを用い、酸化ストレスを評価してきた。ビリルビン生合成は酸化ストレスに対する応答としてその合成が上昇するものとも考えられ、律速酵素であるHeme oxygenase-1 (HO-1)が酸化ストレスによって誘導され、ビリルビン生合成が起こる。ビリルビンはラジカル種に対し、自殺的抗酸化物質として作用した後に、最終代謝産物としてバイオピリンが生じる。酸化ビリルビンであるバイオピリンは親水性であり、尿中に速やかに排泄される。このことから、尿中バイオピリン濃度の測定により生体内での酸化ストレス動態を評価する事ができる。しかも、血清サンプル採取や、電子スピン共鳴装置を用いることなく、ELISA法により簡便かつ迅速に酸化ストレスを測定することが可能である。また、尿中バイオピリンはNOラジカル産生をも反映する事も最近報告されている。

今回、バイオピリン測定により心筋虚血再灌流後の酸化ストレス動態の経時的評価を行い、さらにその局在を確認することを目的として実験を行った。まず、ラット心筋虚血再灌流モデルを作成し、虚血再灌流群、L-NMMA群(NO合成酵素阻害薬L-NMMAを投与)および対照群(開胸手術)に分類した。まず、虚血再灌流後2時間毎に48時間までの尿中バイオピリンを測定したところ、再灌流後8時間、24時間をピークに二相性の上昇を認めた。さらにバイオピリン産生臓器を確認すべく、虚血再灌流8、24時間後の心臓、肺、脳、肝臓、脾臓、

腎臓および大腿筋の免疫組織学的検討を行った結果、心臓および肺でのバイオピリン、HO-1陽性細胞の発現が増強していた。一方、L-NMMA群では尿中バイオピリン濃度が有意に減少しており、さらに、左室機能の改善効果、梗塞域縮小効果が見られた。このことより心筋虚血再灌流後にはNO産生によりNOラジカルが生じ、バイオピリン上昇として確認されたものと考えられる。次に各組織中のバイオピリン(ELISA法)およびHO-1(Western blot 法)を定量的に評価した結果、虚血再灌流24時間後は心臓および肺組織中バイオピリン、HO-1の発現亢進を認めた。虚血再灌流8時間後は肺でのみ組織中バイオピリン、HO-1の発現亢進を認めた。今回の実験結果からは心筋および肺以外でのバイオピリン産生の可能性は残すも、心筋虚血再灌流後の肺に酸化ストレスが生じ、尿中バイオピリン変動は心臓および肺でのバイオピリン産生を反映すると考えられる結果であった。また、肺組織に対する病理学的検討では肺胞隔壁肥厚、単核球浸潤が確認され、単核球でのバイオピリン、HO-1が発現していた。さらに、再灌流後の肺組織のwet-dry weight ratioは上昇し、肺水腫所見を示した。左室拡張末期圧上昇もあり、急性左心不全による肺うっ血が酸化ストレス産生に関与していることが示唆された。

今回、尿中バイオピリン濃度測定により心筋虚血再灌流後の生体内酸化ストレス動態を捉えた。その結果、心筋虚血再灌流後の生体内酸化ストレス動態は二相性の変動を示し、心筋のみならず肺でも酸化ストレスが生じ、尿中バイオピリン変動はそれらを反映するものと考えられた。尿中バイオピリンは心筋虚血再灌流後の全身性酸化ストレス動態を反映し、心臓外科手術や心筋梗塞等、一時的な心筋虚血後の全身性酸化ストレス動態のモニタリング法として今後の臨床応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|---|
| | 氏 名 | 山 本 正 樹 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 杉 浦 哲 朗  |
| | 副 査 氏 名 | 大 西 三 朗 印 |
| | 副 査 氏 名 | 西 岡 豊  |

題 目 Biphasic Elevation of Bilirubin Oxidation Durring Myocardial Ischemia Reperfusion
 (心筋虚血再灌流後の生体内ビリルビン酸化は二相性の上昇を示す)

著 者 Masaki Yamamoto, Hironori Maeda, Nobuyuki Hirose, Morio Yamamoto, Aimi Nakagawa, Geethalakshmi Radhakrishnan, Rajesh Katare Gopalrao, Takayuki Sato, Tokio Yamaguchi, Shiro Sasaguri

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 Circulation Journal, 72(9), (1520~1527), 2008年9月

要 旨

[背景及び目的]

心筋虚血再灌流傷害は一過性心筋虚血後の心筋血流再開により、さらなる心筋細胞障害や心筋収縮力低下が生じるもので、急性冠症候群や心臓外科手術による大動脈遮断後にみられ、心機能予後を規定する重要な因子の1つと考えられている。その成因の1つに心筋虚血再灌流後に大量に産生される nitric oxide(NO)があり、NOは活性酸素種と反応してさらに強力な心筋障害作用をもたらすと考えられているが、再灌流直後から産生される酸化ストレスを経時的に評価する有効な酸化ストレスマーカーは少なく、その生体内変動は未だ不明である。一方、ビリルビンは酸化ストレスに対する応答としてその生合成が上昇し、抗酸化物質として作用した後に、最終代謝産物である親水性のバイオピリンが産生され尿中に排泄される。このことから、尿中バイオピリン濃度の測定により生体内での酸化ストレス動態を評価することができる。そこで、申請者らはバイオピリン測定により心筋虚血再灌流後の酸化ストレス動態の経時的評価を行い、さらにその局在を確認することを目的とし

て実験を行った。

[方法]

ラット心筋虚血再灌流モデルを作成し、虚血再灌流群(n=5)、L-NMMA 群(n=5、NO 合成酵素阻害薬 L-NMMA を投与) および対照群(n=5、開胸手術) に分類した。虚血再灌流後 2 時間毎に 48 時間まで尿中バイオピリンを ELISA 法により測定した。また、バイオピリン産生臓器を確認すべく、虚血再灌流 8、24 時間後の心臓、肺、脳、肝臓、脾臓、腎臓および大腿筋の免疫組織学的検討を行った。さらに、各組織中の NO 酸化物、バイオピリンおよびビリルビンの律速酵素である Heme oxygenase-1(HO-1)を定量的に評価するため、それぞれ Griess 法、ELISA 法と Western blot 法を用いて測定した。虚血再灌流後 8 時間と 24 時間に心行動態およびリスクエリア、梗塞量、肺重量の測定も行った。

[結果]

得られた結果は以下のように要約される。

1. 虚血再灌流後 2 時間毎に尿中バイオピリンを測定したところ再灌流後 8 時間と 24 時間にピークを認め 2 相性の上昇を示した。
2. バイオピリン産生臓器の検討では、虚血再灌流 24 時間後では心臓および肺組織中バイオピリンと HO-1 の発現亢進を認めたが、虚血再灌流 8 時間後は肺のみでバイオピリン、HO-1 の発現亢進を認めた。
3. 心臓における NO レベルは虚血再灌流群は、コントロール群に比し 8 時間、24 時間共に増加し、肺においては 24 時間後に増加していた。しかし、L-NMMA 投与群では心・肺組織共に NO レベルは虚血再灌流群に比し減少していた。
4. 肺組織に対する病理学的検討では細胞隔壁肥厚、単核球浸潤を認め、単核球にバイオピリン、HO-1 が発現していた。さらに、再灌流後の肺重量は上昇し、肺水腫所見を示した。
5. 虚血再灌流群では他群に比し、虚血再灌流後 8 時間・24 時間ともに左室拡張末期圧の上昇と左室収縮力の低下を認めた。
6. L-NMMA 投与群では尿中バイオピリン濃度が有意に減少しており、さらに、左室機能の改善効果、梗塞域縮小効果が認められた。

申請者らはラット心筋虚血再灌流モデルを作成し、経時的に尿中バイオピリン濃度を測定することにより心筋虚血再灌流後の生体内酸化ストレス動態を評価した。その結果、心筋虚血再灌流後の生体内酸化ストレス動態は 2 相性の変動を示し、心筋のみならず肺でも酸化ストレスが生じ、尿中バイオピリン変動はそれらを反映するものと考えられた。尿中バイオピリンの経時的測定は心筋虚血再灌流後の酸化ストレス動態を反映し、一時的な心筋虚血後の全身的酸化ストレス動態の指標として今後臨床応用が期待される。したがって、本論文は高知大学博士 (医学) に値すると評価された。

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 内山 淳平 (神奈川県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 甲医博第95号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年3月31日 |
| 学位論文題目 | In Silico and In Vivo Evaluation of Bacteriophage ϕ EF24C, a Candidate for Treatment of <i>Enterococcus faecalis</i> Infections (コンピューター解析及び生体内実験による <i>Enterococcus faecalis</i> 感染症治療用候補バクテリオファージ ϕ EF24C の評価) |
| 発表誌名 | Applied and Environmental Microbiology, 74(13): 4149~4163 2008年7月 |

| | | | | |
|------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 横山 | 彰仁 |
| | 副査 | 教授 | 杉浦 | 哲朗 |
| | 副査 | 教授 | 執印 | 太郎 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 内山 淳平

論文題目

In silico and in vivo evaluation of bacteriophage ϕ EF24C,
a candidate for treatment of *Enterococcus faecalis* infections
(コンピューター解析及び生体内実験による腸球菌感染症
治療用候補バクテリオファージ ϕ EF24C の評価)

(論文要旨)

近年、抗生物質の乱用・誤用により、薬剤耐性菌の蔓延が大きな問題となっている。特に、病院内における薬剤耐性菌による日和見感染症の蔓延は、免疫不全患者の治療を著しく困難にするばかりでなく、致命的であることもまれではない。これらの原因菌の中で、腸球菌 (*Enterococcus spp.*) は、現在の耐性菌分離頻度は高くないものの、その潜在的な薬剤耐性獲得能力は他の病原微生物比べて極めて高いと考えられる。特に、*E. faecalis* は、最も頻繁に臨床分離される腸球菌で、バンコマイシン耐性を獲得した腸球菌 (VRE) が既に臨床現場で大きな脅威となっている。現在、現状はもちろん、特に、将来の予想されるアウトブレイクに対し、早急な対応が求められている。

バクテリオファージ (ファージ) は、細菌特異的に感染するウイルスの総称である。そのファージの溶菌活性を利用した細菌感染症の予防治療法がファージ療法である。ファージ療法は、欧米諸国で現在、抗生物質の代替治療として最も実用化に近い治療法の一つとして注目されている。しかしながら、過去にファージの性状解析の不備によると考えられる失敗例があることから、実用化のためには、治療用ファージ自体の研究が鍵となると考えられる。しかし、これまでの腸球菌治療用ファージの開発においては、各治療用ファージ候補についてゲノム解析、及び、動物実験の両者による安全性・有効性検討が殆ど行なわれてこなかった。

申請者は、以前、腸球菌難治性感染症に対する治療用候補ファージ ϕ EF24C を環境水より分離し、生物学的性状解析を行なった (参考論文 参照)。それにより、 ϕ EF24C は、広宿主域を有し、VRE を含む約 90% の *E. faecalis* を溶菌可能であった。更に、ファージ ϕ EF24C の構造タンパク質解析、形態観察、ゲノムサイズ定量、感染潜伏時間の検討を行った結果、 ϕ EF24C は腸球菌を非常に効率よく溶菌できるファージであると予想され、これを治療用ファージ候補として提唱した。

本報では、 ϕ EF24C の治療用ファージとしての適格性を検討するため、全ゲノム配列解読解析、及び、マウスを使用し安全性試験・治療効果の評価を行なった。全ゲノム解読の結果、ファージ ϕ EF24C は、全長 142,072 bp の円順列塩基配列ゲノムで、221 個の遺伝子と 5 個の tRNA 遺伝子の存在が予測された。推定遺伝子の中には、ファージ療法に不利に働く既知の遺伝子 (病原遺伝子やインテグレーズ遺伝子等) は見つからなかった。また、頭部タンパク質アミノ酸配列による系統解析、及び、ゲノム遺伝子配列比較を行なった結果、欧米諸国でリステリア感染症予防用として実用化されているファージ P100 と宿主の種を越えて近縁であることが明らかとなった。更に、コドン使用頻度は、宿主のそれに類似する一方、不足すると予想される tRNA はファージ自体が保有する tRNA で補うと予想された。ゲノム GC skew 解析では、ゲノム複製方向と mRNA 翻訳方向とが同一と予測された。

これらの結果から、 ϕ EF24C は、宿主内で効率よく増殖すると考えられた。

更に、マウスを使用した動物実験で、安全性試験 (大量投与、反復投与)において、重篤な副作用は引き起こさず、さらに、腸球菌性敗血症マウスに対して低濃度 (腸球菌株 EF24 及び VRE2 においてファージ数が菌数の 1/100) のファージ ϕ EF24C 投与でも救命効果が認められた。

以上のゲノム解析、及び、動物実験の結果により ϕ EF24C は、難治性 *E. faecalis* 感染症に対する治療用ファージ候補として、安全性が高く、かつ生体内での効果的治療が期待できるファージであることが示された。

(参考論文)

Uchiyama J, Rashel M, Maeda Y, Takemura I, Sugihara S, Akechi K, Muraoka A, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕ EF24C as a therapeutic candidate. *FEMS Microbiology Letters*, 278(2), 200-206, 2008.

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|----------------|
| | 氏 名 | 内 山 淳 平 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 横 山 彰 仁 印 |
| | 副 査 氏 名 | 杉 浦 哲 朗 印 |
| | 副 査 氏 名 | 執 印 太 郎 印 |

題 目 In Silico and In Vivo Evaluation of Bacteriophage ϕ EF24C, a Candidate for Treatment of *Enterococcus faecalis* Infections
 (コンピューター解析及び生体内実験による *Enterococcus faecalis* 感染症治療用候補バクテリオファージ ϕ EF24C の評価)

著 者 Jumpei Uchiyama, Mohammad Rashel, Iyo Takemura, Hiroshi Wakiguchi, and Shigenobu Matsuzaki

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Applied and Environmental Microbiology, 74(13): 4149~4163
 2008年7月

要 旨

内山淳平氏の公開学位審査は、平成20年12月10日17時より、約1時間にわたって行った。まず、研究内容の発表を行った。

背景

薬剤耐性菌の中で、腸球菌 (*Enterococcus spp.*) は、現在の分離頻度は高くないが、潜在的な薬剤耐性獲得能力は極めて高いと考えられる。特に、*E. faecalis* は、最も頻繁に臨床分離される腸球菌で、バンコマイシン耐性を獲得した腸球菌 (VRE) が既に臨床現場で大きな脅威となっている。

一方、ファージ療法は、抗生物質の代替治療として最も実用化に近い治療法の一つとして注目されている。しかしながら、過去にファージの性状解析の不備によって考えられる失敗例もあり、実用化のためには、治療用ファージ自体の研究が鍵となる。しかし、これまでのVREに対する治療用ファージの開発においては、ゲノム解析、および動物実験による安全性・有効性検討が殆ど行なわれてこなかった。

目的と方法

そこで申請者らは、以前の報告で、腸球菌難治性感染症に対する治療用候補ファージを検索し生物学的性状解析を行なった。すなわち、環境水(高知の河川の水)より分離した ϕ EF24C は、広宿主域を有し、VRE を含む約 90%の *E. faecalis* を溶菌可能であり、種々の検討を行った結果、 ϕ EF24C を治療用ファージ候補とした。

本研究では、これまでの研究を踏まえて、 ϕ EF24C の治療用ファージとしての適格性を検討することを目的として、全ゲノム配列解析を行い、BALB/c マウスを用い大量あるいは反復投与による安全性試験、さらには同マウスの腹腔に腸球菌を投与することで敗血症モデルを作成し、本ファージの治療効果を検討した。

結果と考察

全ゲノム解読の結果、ファージ ϕ EF24C は、全長 142,072bp の円順列塩基配列ゲノムで、221 個の遺伝子と 5 個の tRNA 遺伝子の存在が予測された。推定遺伝子の中には、ファージ療法に不利に働く既知の病原遺伝子等は見つからなかった。また、頭部タンパク質アミノ酸配列による系統解析、及び、ゲノム遺伝子配列比較を行なった結果、欧米諸国で、すでにリステリア感染症予防用として実用化されているファージ P100 と宿主の種を越えて近縁であることが明らかとなった。ゲノム GC skew 解析では、ゲノム複製方向と mRNA 翻訳方向とが同一と予測された。これらの結果から、 ϕ EF24C は、宿主内で効率よく増殖すると考えられた。

更に、マウスを使用した安全性試験(大量投与、反復投与)において、重篤な副作用は引き起こさず、さらに、腸球菌性敗血症マウスに対して低濃度(ファージ数が腸球菌株 EF24 及び VRE2 菌数の 1/100)の ϕ EF24C 投与でも救命効果が認められた。

結論

以上のゲノム解析、及び、動物実験の結果により ϕ EF24C は、VRE を含めた難治性 *E. faecalis* 感染症に対する治療用ファージ候補として、安全性・有効性が高く、有望である。

審査員からは、実際に働いている遺伝子数、各遺伝子の由来に関する考え、GC skew 解析の解釈、さらにはファージの保存、腹腔内投与後の血中への移行や臓器分布、また敗血症モデルに関しては、推測される臓器障害やファージ療法の治療効果に関する data 解釈などについて、質問や議論があった。これらに対し、申請者は、おおむね適切かつ明快に説明を行った。申請者は研究を主体的に進めており、研究にかかる技術や考察力も高い能力を持っているものと判断された。このため、審査員一同、申請者の研究は、高知大学大学院医学系研究科(博士)に値するものと判断しました。

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | 岡本 健(高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 乙総医博第4号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年1月20日 |
| 学位論文題目 | Immunohistochemical and electron microscopic characterization of brush cells of the rat cecum (ラット盲腸の刷子細胞における免疫組織化学および電子顕微鏡的検討) |
| 発表誌名 | Medical Molecular Morphology, 41(3), (145~150), 2008年9月 |

| | | | | |
|-------------|----|----|----|----|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 李 | 康弘 |
| | 副査 | 教授 | 降幡 | 睦夫 |
| | 副査 | 教授 | 大西 | 三朗 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 岡本 健

論文題目

Immunohistochemical and electron microscopic
characterization of brush cells of the rat cecum
(ラット盲腸の刷子細胞における免疫組織化学および電子顕微鏡的検討)

(論文要旨)

【背景】刷子細胞・Brush cell (BC) は細胞先端の長い繊毛によって特徴づけられる。機能として吸収や分泌、化学受容体などが提唱されているが未だ確定されていない。我々はラット総胆管の BC において HCO_3^- 、 Cl^- 、 Na^+ がセクレチンや食事の刺激によって増加する事や HCO_3^- 分泌に重要な 6 つのタンパク—cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (AE2)、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBC)、carbonic anhydrase II (CA II)、 Na^+/H^+ exchanger1 (NHE1)、 Na^+/H^+ exchanger3 (NHE3)—の局在を証明し、ラット総胆管の BC は NaHCO_3 分泌に重要な役割をしていると報告した。

【目的】ラット盲腸の BC が総胆管の BC と同様に HCO_3^- 分泌に関与する 6 つのタンパクを有しているかどうかと BC の超微形態的特徴を明らかにする事を目的とした。

【材料と方法】ラットの盲腸を 7mm 切片とし 2.0%ホルムアルデヒドの PLP 固定液で 4°C、4 時間固定後、6 μm の厚さでスライスした。5%ヤギ血清と 1%牛アルブミンを 60 分間浸して非特異的の反応を抑えた後、BC の特異的のマーカ—であるサイトケラチン (CK) 18 と 6 つタンパク (CFTR、AE2、NBC、CA II、NHE1、NHE3) で二重免疫染色をした。切片を抗体に 4°C、12 時間浸した後、二次抗体に室温で 1 時間反応させレーザー顕微鏡で観察した。TEM の観察のために、標本を 2%ホルムアルデヒドと 2%グルタルアルデヒドで 2 時間固定後、1%オスミウムで 1 時間固定。エタノールで脱水しエポンで包埋後、超薄切片を作成した。SEM の観察のためには、2%ホルムアルデヒドと 2%グルタルアルデヒドで 2 時間固定し、エタノールで脱水乾燥後、金 palladium で表面を被覆した。



【結果】免疫組織化学的検討では、CFTR は BC で染まったが上皮吸収細胞には染まらなかった。AE2 の反応は BC と上皮吸収細胞の両方にみられた。NBC でも BC と上皮吸収細胞の両方の側基底膜に認めた。CA II は BC のみに反応し上皮吸収細胞には反応しなかった。NHE1 は BC と上皮吸収細胞の両方に認めたが、NHE3 は BC のみに反応を認めた。TEM では、BC は洋梨状の形を呈しており、表面に先端が鈍麻な微絨毛を認めた。細胞骨格がよく発達し、形質内に小腔を多数認めた。SEM では、BC は盲腸の表面に密集した微絨毛として認められ、強拡大では微絨毛は太い指状を呈していた。

【考察】 HCO_3^- は AE2 によって Cl^- と交換され管内に排出される。 Cl^- は Cl^- チャンネルである CFTR を介して移動する。CFTR と AE2 の反応結果より、BC の $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換への関与が示唆される。

HCO₃⁻生成においては、NBC によって血液から直接 HCO₃⁻を取り込む過程と CAII によって水と二酸化炭素から H⁺と HCO₃⁻を生成する過程がある。NBC と CAII の反応結果より、BC は HCO₃⁻生成においても関与が示唆される。H⁺の細胞内濃度を減らすメカニズムとして、NHE を通しての Na⁺/H⁺交換がある。BC の H⁺排出において NHE1 と NHE3 は重要である。消化管におけるラット BC の構築はすでに報告されており、長い微絨毛や発達した細胞骨格などを特徴としている。本研究で BC とした細胞は、これらの特徴と一致していた。

【結論】胆管の BC と同様にラット盲腸の BC においても NaHCO₃ 分泌に関する 6 つのタンパク質 - CFTR、AE2、NBC、CAII、NHE1、NHE3 - が発現していることを示した。胆管だけでなく消化管の BC も NaHCO₃ 分泌を制御していると推測される。

論文審査の結果の要旨

| | 氏 名 | 岡 本 健 |
|---------|-----------------|---|
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 李 康 弘 |  |
| | 副 査 氏 名 降 幡 睦 夫 |  |
| | 副 査 氏 名 大 西 三 朗 | 印 |

題 目 Immunohistochemical and electron microscopic characterization of brush cells of the rat cecum
 (ラット盲腸の刷子細胞における免疫組織化学および電子顕微鏡的検討)

著 者 Ken Okamoto, Kazuhiro Hanazaki, Toyokazu Akimoti, Takehiro Okabayashi, Teruhiko Okada, Michiya Kobayashi, Takuro Ogata

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Medical Molecular Morphology, 41(3), (145~150), 2008年9月

要 旨

【背景と目的】刷子細胞はその先端に長い絨毛を持つ特殊な上皮細胞であり、気管をはじめとする複数の組織に分布している。その機能に関しては不明な点が多いが、物質の吸収、分泌、化学受容などの説が提案されている。

申請者らの研究グループは、ラット総胆管に刷子細胞が存在することを見出した。同細胞では HCO_3^- 、 Cl^- 、 Na^+ イオンがセクレチンおよび食事の刺激によって増加するとともに、 NaHCO_3 分泌に関わるタンパクである cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (AE2)、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBC)、carbonic anhydrase II (CA II)、 Na^+/H^+ exchanger 1 (NHE1)、 Na^+/H^+ exchanger 3 (NHE3) が発現していた。これらの事実から、ラット総胆管刷子細胞は NaHCO_3 分泌に重要な役割を果たすものと考えられた。

一方、申請者らは消化管が NaHCO_3 分泌機能を有することに注目し、消化管刷子細胞の同定を試みてきた。本研究は、ラット盲腸粘膜における刷子細胞の存在を証明するとともに、同細胞の NaHCO_3 分泌関連タンパク発現と超微形態を精査する目的で行われた。

【材料と方法】免疫組織化学的解析の際は、摘出ラット盲腸組織を 2.0%ホルムアルデヒドを含む PLP 固定液で固定の後、厚さ 6 μm の切片とした。切片を 5%ヤギ血清および 1%牛アルブミンで処理して非特異的反応を抑制し、刷子細胞の特異的マーカーであるサイトケラチン 18 に対する抗体と 6 種類の NaHCO_3 分泌関連タンパク、すなわち CFTR、AE2、NBC、CAII、NHE1、NHE3 に対する抗体との組み合わせで二重蛍光免疫染色を行った。蛍光の観察にはレーザー顕微鏡を用いた。

透過電子顕微鏡による超微形態観察においては、組織を 2%ホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒドで固定後、1%オスミウムによる固定を加えた。固定組織をエタノール脱水後、エポン樹脂で包埋し、超薄切片を作成した。また、走査電子顕微鏡観察では、2%ホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒドで固定の後、エタノール脱水を経て、金 palladium による表面被覆を行った。

【結果】免疫組織化学的解析により、サイトケラチン 18 陽性の刷子細胞が上皮吸収細胞に混じって盲腸粘膜上皮内に散在することが明らかとなった。刷子細胞は粘膜表面に多く分布し、陰窩部には少なかった。 NaHCO_3 分泌関連タンパクとの二重蛍光染色では、CFTR、CAII、NHE3 の 3 種類が刷子細胞特異的な陽性所見を示した。これに対し、AE2、NBC、NHE1 の 3 種類は刷子細胞と上皮吸収細胞の両者に陽性であった。

透過電子顕微鏡観察では、刷子細胞は洋梨状ないし紡錘状の形態を示し、表面に先端が鈍で太い微絨毛を有していた。また、細胞質は骨格構造に富み、小腔を多数含んでいた。走査電子顕微鏡下では、刷子細胞は盲腸の内腔表面に密集した微絨毛を有する細胞として認識され、強拡大では微絨毛は太い指状を呈していた。以上の所見は、刷子細胞の形態的特徴に一致している。

【考察】 HCO_3^- は Cl^- との交換によって管腔内に排出されるが、その過程においては AE2 および CFTR タンパクが重要な働きをする。本研究で同定されたラット盲腸刷子細胞は AE2、CFTR の両者を発現することから、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換への関与が想定される。また、細胞内 HCO_3^- の生成機序としては、CAII タンパクによる HCO_3^- 合成と NBC タンパクによる血中 HCO_3^- の取り込みが考えられる。ラット盲腸刷子細胞はこれらのタンパクも発現することから、 HCO_3^- 生成機能をも有することが推測される。一方、CAII タンパクによる HCO_3^- 合成の際は細胞内 H^+ 濃度の増加がもたらされるが、NHE タンパクは Na^+/H^+ 交換により H^+ 排出を行う。盲腸刷子細胞では NHE1 と NHE3 の発現が見られ、 H^+ 排出に貢献しているものと思われる。

以上、ラット盲腸刷子細胞は総胆管刷子細胞と同様、 NaHCO_3 分泌制御機能を持つことが示唆された。 NaHCO_3 分泌は糞便 pH の中和等に働き、生体の恒常性維持に関与する可能性がある。本研究によって存在の明らかになったラット盲腸刷子細胞は、消化管刷子細胞の機能をさらに追究する上で、有用な実験モデルを提供するものと考えられる。

<審査結果>

本研究はラット盲腸に刷子細胞の存在を証明し、その NaHCO_3 分泌機能に関わるタンパクの発現を明らかにした。ラット盲腸は今後の刷子細胞研究の材料として極めて有用であると判断される。これらを総合して、審査員一同は本論文が高知大学の学位(医学博士)に値するものと結論した。

| | |
|---------|---|
| 氏名(本籍) | 上岡 樹生(高知県) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 乙総医博第5号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位授与年月日 | 平成21年2月9日 |
| 学位論文題目 | Testican 3 expression in adult T-cell leukemia (成人T細胞白血病におけるTestican 3の発現) |
| 発表誌名 | Leukemia Research, (in press) |

| | | | |
|------|----|----|-------|
| 審査委員 | 主査 | 教授 | 麻生悌二郎 |
| | 副査 | 教授 | 脇口 宏 |
| | 副査 | 教授 | 横山 彰仁 |

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 上岡 樹生

論文題目

Testican 3 expression in adult T-cell leukemia
(成人 T 細胞白血病における Testican 3 の発現)

(論文要旨)

背景・目的

成人 T 細胞白血病(ATL)は human T-lymphotropic virus I (HTLV-I)感染を原因とするリンパ系悪性疾患である。ATL では血管浸潤の際、血管内皮細胞と接触することで血管内皮細胞の matrix metalloproteinase (MMP)-2・MMP-9 活性を増強する。また ATL 細胞表面に発現している extracellular matrix metalloproteinase inducer (Emmprin) 蛋白は MMP-2・MMP-9 を活性化にする膜型 MMP である MMP-14 を活性化させることで、血管内皮細胞での MMP-2 活性を増強させている。このように ATL における血管浸潤と局所増殖は、MMP を活性化させる Emmprin と MMP を抑制する Tissue inhibitor of MMP (TIMP) のバランスにより調節されていると考えられている。HTLV-I 感染細胞由来細胞株である MT-2 は Emmprin を強く発現しており、内皮系細胞との接触で MMP-2 活性を増強させるモデルとして *in vitro* の実験系で使用されている。ところが、MT-2 との混合培養で MT-2 の比率を増加させると、かえって MMP-2 活性は減弱するという現象がこれまでに報告されている。この時、MT-2 での Emmprin と TIMP 発現には変化は見られないことが確認され、TIMP 以外の MMP 活性を抑制する物質の存在が推測された。本研究では、MT-2 と血管内皮細胞の混合培養において、MMP-2 活性を抑制する Testican 3 蛋白の存在を初めて明らかにし、その発現制御への activating transcriptional factor 3 (ATF3) の関与を検討することで ATL の浸潤性の調節についての新しい側面を明らかにする。

方法・対象

2つの HTLV-I 関連細胞株 MT-1 と MT-2 間で発現差のある mRNA を cDNA subtraction 法によりプロファイルした。MT-2 に ATF3 と Testican 3 の mRNA の発現増強が認められることが証明されたため、続いて血液悪性腫瘍の臨床検体および細胞株を用い ATF3 と Testican 3 の発現について検討した。さらに MT-2 における ATF3 及び Testican 3 の発現を siRNA により抑制し、血管内皮細胞との混合培養における MMP 活性の変化を zymogram にて検討した。また、HTLV-I 関連細胞株(MT-1, MT-2, ATL-1K, MT-4)において Anisomycin を用い ATF3 を強く誘導させることで Testican 3 の発現変化を検討した。

結果

血液悪性腫瘍の臨床検体・細胞株における ATF3・Testican 3 の発現を RT-PCR により検討したところ、MT-2 と ATL 臨床検体では ATF3・Testican 3 とも発現が強く認められたが、その他の臨床検体や細胞株では Testican 3 の発現は認められなかった。western blotting においても MT-2 と ATL clinical sample での Testican 3 発現が顕著であり、その ATF3 の発現は Testican 3 の発現と平行であったため、ATF3 発現と Testican 3 の誘導に関連性があることが推測された。この点を明らかにするために siRNA による ATF3 の silencing を行ったところ、ATF3 を silencing することで Testican 3 の発現も抑制されることが証明された。しかし、Testican 3 silencing による ATF3 発現低下は認められなかった。さらに、ATF3 silencing をすると MT-2 の比率が多い混合培養においても、Testican 3 silencing を施した MT-2 と同様に、血管内皮細胞との混合培養での MMP 活性の減少が認められなくなることが zymography により確認できた。また、ATF3 の強い発現誘導物質である Anisomycin を加えることで MT-2 での Testican 3 発現増加がみられただけでなく、RT-PCR にて発現の認められなかった MT-1・MT-4 においても Testican 3 の発現誘導が起こった。

考察

Testican 3 は主に中枢神経系で発現している分泌蛋白であり、glioma では MMP-14 が MMP-2 を活性化させる段階を抑制することで、腫瘍細胞の転移を抑制していると考えられている。本研究において MT-2 と血管内皮細胞の混合培養下で MT-2 の比率が多いとき、MMP 活性が低下する現象には MT-2 の Testican 3 発現が原因となっているのではないかと考えられた。また、Testican 3 の発現誘導と関連した ATF3 の発現が ATL では高率に認められることから、ATF3 には stress responsible gene としての機能だけではなく ATL における局所での増殖と浸潤・転移の調節に深くかかわっている可能性があるのではないかと考えられた。

結語

血液悪性腫瘍の中で、ATL には ATF3 および Testican 3 蛋白の発現が高率に認められた。HTLV-I 関連細胞株 MT-2 と血管内皮細胞の混合培養における MMP-2 活性の調節には、ATF3 発現と関連した Testican 3 蛋白の発現が深く関与していることがわかった。

論文審査の結果の要旨

| | | |
|---------|---------|-------------------|
| | 氏 名 | 上 岡 樹 生 |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 麻 生 悌 二 郎 印 |
| | 副 査 氏 名 | 脇 口 宏 印 |
| | 副 査 氏 名 | 横 山 彰 仁 印 |

題 目 Testican 3 expression in adult T-cell leukemia
 (成人T細胞白血病における Testican 3 の発現)

著 者 Mikio Kamioka, Jun Imamura, Naoki Komatsu, Masanori Daibata,
 Tetsuro Sugiura

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 Leukemia Research, (in press)

要 旨

腫瘍細胞の血管浸潤は悪性腫瘍の組織浸潤、転移の重要なステップであるが、この際、血管内皮細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の産生が増加することが知られている。申請者らのグループはこれまで HTLV-I 感染を原因とするリンパ系悪性疾患である成人 T 細胞白血病 (ATL) について解析を行ってきたが、ATL の場合、腫瘍細胞が MMP 活性化因子である Emmprin を細胞表面に発現し、活性化された MMP-2 による細胞外基質の分解が同疾患の血管浸潤、進展に重要な役割を果たしていると考えられている。ところで、HTLV-I 関連細胞株である MT-2 は Emmprin を強く発現しており、内皮系細胞と細胞数 1:10 の割合で混合培養すると、内皮系細胞由来の MMP-2 活性を増強する。ところが、MT-2 細胞の数を増して MT-2 と内皮系細胞の比を 1:1 にすると、Emmprin の増加のために MMP-2 活性の増強が期待されるところであるが、実際には逆に減弱することが明らかになっている。以上の事実から、申請者らは MT-2 細胞が Emmprin の他に MMP-2 活性を抑制する因子をも産生しているのではないかという仮説を立て、その検証のため以下の解析を行った。

(1) 先ずはじめに、2つの HTLV-I 関連細胞株 MT-1 と MT-2 をヒトの動脈内

皮細胞と混合培養し MMP-2 活性に及ぼす影響を比較検討した。その結果、MT2 細胞では MT2/内皮細胞の比率を 0.1 から 1.0 に上げると MMP-2 活性が低下したのに対して、MT1 細胞では比率を 1.0 まで上げてても低下傾向が認められなかった。この際、MMP-2 や MMP-2 の活性化因子である MMP-14 の RNA レベルでの発現低下は認めなかった。

(2) MT-2 細胞が MT-1 細胞にはない抑制性の因子を発現していることが示唆されたので、両細胞由来の mRNA を用いて cDNA サブトラクションを行った結果、MT-2 において有意に発現が上昇している分子として、細胞外基質に存在する分泌タンパク Testican 3 と転写因子 ATF3 とを同定した。

(3) 続いて、Testican 3 と ATF3 の血液悪性腫瘍の細胞株および臨床検体における発現を RT-PCR と Western blotting により検討した。解析した細胞株 17 種類の内、4 株は HTLV-I 関連の細胞株 (ATL-derived cell line: MT-1, ATL-1K、HTLV-I transformed cell line: MT-2, MT-4) であったが、4 例全てが ATF3 の高発現を示し、内 MT-2 のみは Testican 3 も発現した。また、臨床検体 15 例の内、5 例は ATL のリンパ腫型であったが、何れの症例も Testican 3、ATF3 とともに高発現を示した。しかし、他の臨床症例では両分子とも検出感度以下であった。

(4) Testican 3 の発現を示すものは全例 ATF3 の高発現を認め、Testican 3 の発現誘導に転写因子 ATF3 が関与していることが示唆されたので、siRNA により両分子を個別に knockdown し発現への影響を検討した。その結果、MT-2 細胞で ATF3 を knockdown すると Testican 3 の発現が低下することが判明した。さらに、動脈内皮細胞との混合培養の系においても、MT-2 細胞の ATF3 を knockdown すると、Testican 3 を knockdown した場合と同様に、内皮細胞の MMP-2 活性の低下が解除されることが判明した。

(5) 最後に、各種細胞を ATF3 の強力な発現誘導物質であるアニソマイシンで処理して、Testican 3 発現誘導の有無を調べた。その結果、MT-2 細胞に加えて HTLV-I 関連細胞株である MT-1 および MT-4 細胞においても Testican 3 の発現が誘導されることが判明した。

以上のように、本論文において申請者らは、これまで主に中枢神経系で発現すると考えられていた Testican 3 が HTLV-I 関連細胞株である MT-2 や ATL リンパ腫型のリンパ節においても高発現することを発見し、同蛋白が MT-2 と血管内皮細胞との混合培養における MMP-2 活性抑制の責任因子である可能性を示した。さらには、HTLV-I 関連細胞における Testican 3 の発現誘導に転写因子 ATF3 が密接に関与していることを明らかにした。

本論文は、脳腫瘍の転移との関連が指摘されている Testican 3 やストレス応答転写因子である ATF3 が ATL の病態と密接に関連している可能性を世界で初め

て提示したものであり、医学的に高い価値を有すると認められた。したがって、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）の学位を授与するに値するものと判断した。