

2009. 7

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三十三号

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96号	浦松 壮一郎	Characterization of prolidase I and II purified from normal human erythrocytes: comparison with prolidase in erythrocytes from a patient with prolidase deficiency (正常人赤血球から精製されたプロリダーゼ, PD I と PD II の性質: プロリダーゼ欠損症患者のプロリダーゼの性質との比較)	1

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総医博第6号	森澤 豊	Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins (熱処理と酵素による消化が牛乳蛋白のB細胞エピトープに与える影響に関する検討)	7
乙総医博第7号	岡田 耕輔	Performance of an interferon-gamma release assay for diagnosing latent tuberculosis infection in children (小児における結核菌感染診断のためのインターフェロン $\gamma$ 誘導検査の有用性の検討)	13
乙総医博第8号	東山 佳澄	Bumetanide-induced enlargement of the intercellular space in the stria vascularis critically depends on Na <sup>+</sup> transport (フメタニドによる血管条内細胞間隙の拡大にはナトリウムイオンの輸送機構が深く関与)	18

氏名(本籍)	浦松 壮一郎 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第96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4月30日
学位論文題目	Characterization of prolidase I and II purified from normal human erythrocytes: comparison with prolidase in erythrocytes from a patient with prolidase deficiency (正常人赤血球から精製されたプロリダーゼ, PDIとPDIIの性質: プロリダーゼ欠損症患者のプロリダーゼの性質との比較)
発表誌名	Amino Acids, (in press)

審査委員	主査	教授	佐野	栄紀
	副査	教授	横谷	邦彦
	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 浦松 壮一郎

## 論文題目

Characterization of prolidase I and II purified from normal human erythrocytes: comparison with prolidase in erythrocytes from a patient with prolidase deficiency

(正常人赤血球から精製されたプロリダーゼ, PD I と PD II の性質: プロリダーゼ欠損症患者のプロリダーゼの性質との比較)

(論文要旨)

### [目的]

プロリダーゼは X-Pro を加水分解する酵素であるが、プロリダーゼ欠損症患者ではこの酵素が欠損しているために、慢性下腿潰瘍、知能障害や尿中に多量のイミノジペプチドが排泄されていることが報告された。その後、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを用いて、正常人赤血球よりプロリダーゼのアイソザイム PD I と PD II が部分精製され、これらの酵素の  $MnCl_2$  に対する反応、基質特異性、熱に対する安定性、PD I と PD II の活性に対する種々のアミノ酸の効果等が調べられた。又プロリダーゼ欠損症患者の赤血球中にも基質特異性の異なるプロリダーゼが存在していることが明らかになり、患者プロリダーゼの性質についても研究が行われた。最近、正常人及びプロリダーゼ欠損症患者の赤血球の lysate のプロリダーゼ活性に対する含硫アミノ酸の効果について研究が行われていた。しかし精製された PD I、PD II 及びプロリダーゼ欠損症患者のプロリダーゼ活性に対する含硫アミノ酸の効果の比較については調べられていなかった。そこで申請者は本研究において、正常人赤血球から精製された PD I と PD II 及び患者の赤血球中のプロリダーゼ活性に対する種々の含硫アミノ酸の効果について詳細に研究した。

### [方法]

#### 1) 正常人赤血球中のプロリダーゼのアイソザイム PD I と PD II の精製

正常人血液 50ml から赤血球を分離し、0.9% NaCl で 3 回洗い、1000xg で 10 分間遠心し赤血球を得た。その赤血球を 3 倍量の純水を加えて溶血した。その溶血液を 10mM メルカプトエタノールを含む 50mM Tris-HCl (pH 7.4; Buffer A) で希釈し、15,000xg で 10 分間遠心した。その上清に Buffer A で前処理した DEAE-cellulose を加え、3 時間攪拌し、カラム (5×50 cm) につめ、Buffer A で洗った。(280nm の吸収が 0.2 以下になるまで)。そしてプロリダーゼを 150mM と 250mM Buffer A で抽出した。プロリダーゼを含むフラクションを集め、硫酸アンモニウムの 40%-70% で沈殿するフラクションが集められた。その沈殿物が 10mM メルカプトエタノールを含む 10mM Tris-HCl (pH 7.4; Buffer B)

に溶解し、その溶液を Buffer B で透析した。その透析液を Sephadex G150 (2×60 cm) のカラムにかけ、Buffer A で溶出し、PD I と PD II を含むフラクションを集め、70%硫酸アンモニウムを加え、その沈殿物を Buffer B で透析した。その透析液を hydroxyapatite (2×10 cm) のカラムにかけ、Buffer C (Buffer B と 2mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) の同量の混合液) で洗い、抽出した。PD I と PD II を含むフラクションがそれぞれ集められ、酵素活性の測定に用いられた。プロリダーゼ欠損症患者の血液はヘパリンのある試験管に採血し、遠心して赤血球を分離し、分離した赤血球を 0.9% NaCl で洗い、1000xg で 10 分間遠心し赤血球を得た。その赤血球を 3 倍量の純水を加えて溶血し、その溶血液を酵素活性の測定に用いた。

## 2) プロリダーゼ活性の測定

プロリダーゼ活性は種々のイミノジペプチドを用いて測定した。反応液には 10  $\mu$ l の 1 mM  $MnCl_2$  及び含硫アミノ酸を加え、37°C で 30 分間プレインキュベートし、10 mM 基質 100  $\mu$ l を加え、37°C で 30 分間反応した。その反応液に 10% TCA 200  $\mu$ l を加えて反応を止めた。遊離したプロリンを Chinard の方法を用いて分光光度計 (520nm) で測定した。正常人プロリダーゼ I と II 及び患者赤血球中のプロリダーゼの反応速度論はラインウエーバーパークの式を用いて測定した。

## [結果・考察]

これまでに、正常人及びプロリダーゼ欠損症患者の Gly-Pro に対する赤血球プロリダーゼ活性を  $MnCl_2$  の存在下で、グリシン、アラニンは強く上昇させた。一方その活性を分枝鎖アミノ酸の L-バリン、L-ロイシンは著しく抑制させた。しかし、D-分枝鎖アミノ酸はその活性を上昇させた。その後、正常人の赤血球よりプロリダーゼ I と II が分離されて、Gly-Pro に対する PD I 活性を  $MnCl_2$  の存在下でグリシンは著しく上昇させた。しかし、Gly-Pro に対する PD II と患者のプロリダーゼ活性を  $MnCl_2$  の存在下でグリシンは強く抑制させた。一方 Met-Pro に対する PD II と患者のプロリダーゼ活性をグリシンは 3 倍に上昇させたこと等を、我々は報告してきた。

最近、Gly-Pro, Met-Pro に対する PD I の活性をバリン、イソロイシンの D-異性体は上昇させたが、これらの L-異性体はその活性を阻害した。一方、PD II と患者のプロリダーゼ活性を D-と L-異性体のすべては上昇させた。また、正常人及び患者のプロリダーゼ活性を D-と L-異性体のすべては上昇させた。また、正常人及び患者赤血球中のプロリダーゼ活性を L-異性体の分枝鎖アミノ酸、L-メチオニンや D、L-ホモシステインのような含硫アミノ酸は阻害したことが報告された。

本研究は種々のイミノジペプチドを用いて、 $MnCl_2$  の存在下で PD I、PD II 及び患者赤血球中のプロリダーゼ活性に対する D-と L-異性体の種々の含硫アミノ酸の効果及びこれらの酵素の性質について研究した。Gly-Pro に対する PD I の活性を D-メチオニン、D,L-メチオニン、L-メチオニンの順で上昇させた。N-アセチル-L-メチオニンでは効果を認めなかった。

この結果は、メチオニンの  $\alpha$  炭素に遊離のアミノ基を持つ化合物が PD I の活性を上昇させるのに必須であることを示している。L-エチオニン、D-エチオニン、D, L-エチオニンは、PD I の活性を上昇させた。D, L-ホモシステインは低濃度では活性を上昇させたが、50mM では阻害した。一方、D, L-ホモシステイン-チオラクトンは濃度依存的に強く抑制した。Met-Pro に対する PD II の活性を D-メチオニン、D, L-メチオニン、L-メチオニンは上昇させた。しかし、N-アセチル-L-メチオニンは効果を認めなかった。D-エチオニンは PD II の活性を強く上昇させたが、L-エチオニンは少し上昇させた。D, L-ホモシステインもその活性を少し上昇させた。一方 D, L-ホモシステイン-チオラクトンは濃度依存的にその活性を阻害した。

D-メチオニン、D, L-メチオニン、L-メチオニンは Met-Pro に対する患者のプロリダーゼ活性を上昇させた。しかし、N-アセチル-L-メチオニンは活性を抑制した。D-エチオニン、D, L-エチオニン、L-エチオニンはその活性を上昇させた。D-型のメチオニンとエチオニンはL-型と比較してその活性を著しく上昇させた。D, L-ホモシステインは活性を少し上昇させた。しかし、D, L-ホモシステイン-チオラクトンは濃度依存的にその活性を抑制した。Met-Pro に対する PD I 活性と比較してシスタチオニンは PD II と患者のプロリダーゼ活性を優位に上昇させた。また、含硫アミノ酸化学構造とプロリダーゼの活性化との関係については、十分に解明されていないが、ホモシステインの硫黄元素につく置換基がこれらのプロリダーゼ活性に関与していることが考えられる。

PD I、PD II と患者のプロリダーゼ活性をコントロールと比較して 20mM D, L-ホモシステインは上昇させた。PD I の活性をコントロールと比較して 50mM D, L-ホモシステインは低下させた。一方 PD II と患者のプロリダーゼ活性を 50mM D, L-ホモシステインはあまり変化させず、コントロールと同等であった。PD I、PD II と患者のプロリダーゼ活性を 20mM D-メチオニンは上昇させたが、N-アセチル-L-メチオニンはあまり変化させなかった。20mM D-とL-エチオニンは PD I、PD II と患者のプロリダーゼ活性を上昇させた。D-エチオニンはL-エチオニンよりもそれらの活性を強く上昇させた。


これらの結果は種々のイミノジペプチドに対する PD I、PD II と患者のプロリダーゼ活性をメチオニンやエチオニンのL-型よりもD-型が著しく上昇させることを示している。患者のプロリダーゼの性質はPD IIの性質とよく一致していた。

正常人 PD I、PD II と患者のプロリダーゼに対する含硫アミノ酸の作用機構を調べるために、これらのプロリダーゼの Kinetics も調べた。

本研究によって正常人 PD I、PD II と患者のプロリダーゼに対する含硫アミノ酸の効果を調べ、PD II と患者のプロリダーゼに対する含硫アミノ酸の効果が殆ど同じであることが明らかとなったが、含硫アミノ酸の詳細な作用機構については明確でない。

しかし、PD II と患者のプロリダーゼの性質を更に研究することにより、患者におけるアミノ酸の再利用を改善し、慢性下腿潰瘍等の治療に役立つことが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	浦 松 壮 一 郎
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	執 印 太 郎 印

題 目 Characterization of prolidase I and II purified from normal human erythrocytes: comparison with prolidase in erythrocytes from a patient with prolidase deficiency  
 (正常人赤血球から精製されたプロリダーゼ, PDIとPDIIの性質: プロリダーゼ欠損症患者のプロリダーゼの性質との比較)

著 者 Soichiro Uramatsu, Gang Liu, Qing Yang, Mutsumi Uramatsu, Haidong Chi, Jincal Lu, Koichi Yamashita, Hiroyuki Kodama

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

### 要 旨

プロリダーゼ欠損症はイミノジペプチド(X-Pro)を加水分解するジペプチダーゼ(プロリダーゼ)を欠損した常染色体劣性の遺伝性疾患であり、尿中へ多量のイミノジペプチドを排泄する。この患者では生体内のプロリンのリサイクルが障害されているため、プロリンを必要とするコラーゲン等の生成が障害され、難治性の下腿潰瘍、精神発達遅延をきたす。DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィを用いて正常人赤血球から2種類のプロリダーゼI、IIが分離、部分精製され、種々のイミノジペプチドに対する酵素活性が解析されてきた。また、プロリダーゼ欠損症患者では、主にプロリダーゼI活性が完全欠失しているものの基質特異性の異なるプロリダーゼ活性が存在することが明らかになった。最近申請者らの研究により、含硫アミノ酸がプロリダーゼ活性を修飾する事実が確認されている。今回、申請者は正常人より分離精製されたプロリダーゼI,II およびプロリダーゼ欠損症患者のプロリダーゼ活性に対する含硫アミノ酸の効果を詳細に比較検討した。



(方法)正常人赤血球中のプロリダーゼ I,II の分離、精製：血液 50ml を純水で溶解後遠心し、得られた溶血液を DEAE-cellulose カラムで蛋白分画を分離した。さらに硫酸アンモニウムで沈殿する分画を透析後 hydroxyapatite カラムで抽出し、プロリダーゼ I および II 分画を得た。プロリダーゼ欠損症の血液は溶血して酵素活性の測定に用いた。プロリダーゼ活性の測定：プロリダーゼ活性は、種々のイミノジペプチドを基質として  $MnCl_2$  存在下で酵素分画と反応後、Chinard の方法を用いて遊離プロリンを分光光度計にて測定した。

(結果)Gly-Pro に対するプロリダーゼ I (以下 PD I と略) の活性は、D-メチオニン、D,L-メチオニン、L-メチオニンの順で上昇した。N-アセチル-L-メチオニンでは効果を認めなかった。L-,D-, D,L-エチオニンは PD I の活性を上昇させた。D, L-ホモシステインは低濃度で活性を上昇させたが高濃度では低下させた。一方、D,L-ホモシステイン-チオラクトンは濃度依存的に強く抑制した。Met-Pro を基質とする PD II の活性は D-,D,L-,L-メチオニンは上昇させたが、N-アセチル-L-メチオニンでは効果を認めなかった。D-エチオニンは PD II の活性を強く上昇させたが、L-エチオニンによる上昇はわずかであった。D,L-ホモシステインもその活性をわずかに上昇させた。一方、D,L-ホモシステイン-チオラクトンは濃度依存的に強く抑制した。Met-Pro を基質とする患者プロリダーゼ活性は D-, D,L-, L-メチオニンにより上昇した。しかし、N-アセチル-メチオニンは抑制した。D-, D,L-, L-エチオニンはその活性を上昇させた。メチオニン、エチオニンともに D-型異性体が L-型に比して強く活性を上昇させた。D, L-ホモシステインは活性をすこし上昇させたが、D,L-ホモシステイン-チオラクトンは濃度依存的に強く抑制した。以上をまとめて、PD I, PD II, 患者 PD 活性は低濃度 L-ホモシステインで上昇、高濃度で PD I 活性は低下する。一方 PD II および患者プロリダーゼ活性は不変であった。D-メチオニンはこれらすべての活性を上昇させたが N-アセチル-L-メチオニンは効果がなかった。エチオニンもすべての活性を上昇させたが、D 異性体が L より強い作用を示した。これら含硫アミノ酸の影響、酵素学的な kinetics 解析の結果、患者のプロリダーゼ活性は正常人 PD II のそれとほぼ同等であることが明らかになった。

本論文は、プロリダーゼ欠損患者におけるプロリダーゼ活性に対する含硫アミノ酸の作用を正常人プロリダーゼ I, II との比較において明らかにした。プロリダーゼ欠損症患者に残存するプロリダーゼ活性は PD I 活性を完全に欠損するものの、PD II と同様の挙動を示すプロリダーゼ活性が残存していることが確かめられたことより、この活性を上昇させる含硫アミノ酸を用いた臨床応用、例えば軟膏化などが皮膚潰瘍の新たな治療となりうる可能性が示された。そこで、審査員一同は、本論文が高知大学博士 (医学) の学位の授与に値すると判断する。

氏名(本籍)	森澤 豊(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第6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4月7日
学位論文題目	Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins (熱処理と酵素による消化が牛乳蛋白のB細胞エピトープに与える影響に関する検討)
発表誌名	Clinical and Experimental Allergy, 2009年掲載予定

<b>審査委員</b>	主査	教授	宇高	恵子
	副査	教授	横山	彰仁
	副査	教授	福島	敦樹

## 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 森澤 豊

論文題目 **Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins**  
(熱処理と酵素による消化が牛乳蛋白のB細胞エピトープに与える影響に関する検討)

(論文要旨)

## 背景

食物アレルギーは、アレルゲンとなる食品摂取によってマスト細胞や好塩基球上の抗原特異IgE抗体が架橋されて症状が惹起される。アレルゲンを加熱処理することにより症状が軽減される現象がしばしば臨床的に認められるが、その機序は完全には解明されていない。IgE抗体が認識する抗原のエピトープ (B細胞エピトープ) にはアミノ酸配列に直接依存したlinearエピトープと、蛋白の立体構造に依存したconformationalエピトープがあることが知られており、Immunoblottingや、合成ペプチドを用いたELISAのinhibition assayなどでは前者しか検討できないが、IgE抗体で受動感作した好塩基球を用いることによって、これら両方のエピトープの存在を検討することができる。

## 目的

私たちは加熱処理がどのようにして食物抗原のB細胞エピトープに影響を与えるかを明らかにし、食物アレルギー患者の食事指導や新たな検査法を開発することを最終的な目的として、in vitroの検討を行った。

## 方法

牛乳を摂取後直ちに症状が発現し、牛乳特異的IgE抗体陽性の10例の患児血清を採取した。

1.  $\beta$ LGと $\alpha$ Sカゼインを各種温度で各種時間加熱処理し、ペプシンおよびトリプシン処理前後にSDS-PAGEを用いて蛋白の消化酵素に対する感受性を検討した。
2. B細胞エピトープに及ぼす影響は、臍帯血単核細胞をIL-3の存在下に3-4週間培養して作成したヒト好塩基球を対象患児の血清で48時間受動感作し、 $\beta$ LGと $\alpha$ Sカゼインを未処理・加熱処理・加熱処理後にペプシンとトリプシンで酵

素処理した抗原液で刺激し、1時間後の上清中ヒスタミン量をRIAで測定した。

## 結果

1. 加熱処理単独では $\beta$ LGと $\alpha$ Sカゼインの分子量はいずれも変化しなかった。加熱処理をしていない $\beta$ LGは90分間のペプシン処理にほとんど反応せず、加熱処理の温度と時間依存的にペプシンに対する感受性が増加した。一方、 $\alpha$ Sカゼインは加熱処理をしなくても約30分間でほとんど全ての蛋白がペプシン処理により分解され、加熱処理の温度や時間の影響は認められなかった。

2. 未処理 $\beta$ LGによってヒスタミン遊離が認められた患児7例中3例で加熱処理をした $\beta$ LGによるヒスタミン遊離が低下した。残る4例中3例は加熱処理後にペプシンおよびトリプシン処理した $\beta$ LGによるヒスタミン遊離が低下した。しかし残る1例は加熱処理後消化酵素処理した $\beta$ LGによってもヒスタミン遊離に変化は認められなかった。

一方、未処理 $\alpha$ Sカゼインでヒスタミン遊離が認められた患児6例は全例、加熱処理をした $\alpha$ Sカゼインによってもほぼ同等のヒスタミン遊離を認めた。また、6例中4例は加熱処理後消化酵素処理した $\alpha$ Sカゼインによるヒスタミン遊離が低下したが、残る2例ではヒスタミン遊離に変化は認められなかった。



## 考察

$\beta$ LGには2箇所のdisulfide結合部位があり、加熱処理によって立体構造に変化が誘導されることが知られている。 $\beta$ LGの加熱処理は立体構造を変化させ直接的にconformationalエピトープを認識するIgE抗体の反応性が低下させる機序と、消化酵素による分解を受けやすくすることによるlinearエピトープを認識するIgE反応性を低下させる機序を介して臨床症状を起こしにくくする可能性が示唆された。一方、disulfide結合がない $\alpha$ Sカゼインは加熱処理によっても立体構造は変化しないため、加熱によるIgE反応性の変化は認められず、消化酵素処理によってのみ、一部の患児のlinearエピトープの認識するIgE反応性が低下する可能性が示唆された。

## 結語

加熱処理がアレルギー食物の抗原性に変化を誘導する機序に、抗原分子中のdisulfide結合の有無や、患児のIgE抗体が認識する抗原のエピトープの違いが関与することが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	森 澤 豊
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 福 島 敦 樹	

題 目      Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins  
 (熱処理と酵素による消化が牛乳蛋白のB細胞エピトープに与える影響に関する検討)

著 者      Yutaka Morisawa, Ai Kitamura, Takako Ujihara, Noriko Zushi,  
 Kazuyo Kuzume, Yasuhiro Shimanouchi, Seiichiro Tamura,  
 Hiroshi Wakiguchi, Hirohisa Saito and Kenji Matsumoto

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

### 要 旨

森澤豊さんの学位審査は、平成21年3月26日に約1時間にわたって行った。  
 まず、公開で研究内容の発表を行った。

#### [目的]

牛乳アレルギーは食物アレルギーの中でも主要なひとつであるが、抗原の物質的性状が明らかになれば、病態の解明に役立つのはもとより、調理法や材料の選び方により発症を避ける工夫ができる可能性がある。また、抗体検査法の改良にもつながる可能性がある。そこで、主要な抗原として知られているβ-lactoglobulin (βLG)とαS-casein について、実際にアレルギーを有する患児の血清中に存在するIgEが認識する epitope が、熱変性や消化管酵素処理を経て出てくるものか、それらの蛋白質の本来の構造の上に出ているものかを調べた。特に、通常 ELISA で量的な活性しか調べられていない IgE 抗体の活性を、臍帯血から分離した新鮮な好塩基球を使って機能的に評価したところに、この研究の特徴がある。

#### [方法と材料]

牛乳を摂取後、直ちに症状が発現し、かつ血清に牛乳特異的 IgE 抗体を有する患児 10 例について、抗体が反応する抗原 epitope の解析を行った。

抗原側の処理としては、まず種々の温度における熱変性の後、消化酵素である pepsin および trypsin による部分消化を行った。

次に、臍帯血からヒト好塩基球を単離し、これに患児血清 IgE を反応させたのち、種々の操作を加えた抗原を加えて、ヒスタミン遊離を、RIA キットを用いて測定した。

#### [結果と考察]

蛋白質としての物性の違いから、ジスルフィド結合を有する $\beta$ LG は熱変性後、はじめて酵素消化に対する感受性が出現したが、 $\alpha$ S-casein は、熱変性処理を加えなくても、すみやかに酵素消化された。

次に、患児血清 IgE で感作した好塩基球のヒスタミン遊離反応を調べたところ、未処理 $\beta$ LG に反応する 7 症例のうち、3 症例では熱変性による抗原の変化が、ヒスタミン遊離反応を低下させた。残り 4 症例中 3 例では、熱変性に加えて pepsin および trypsin で部分消化するとヒスタミン遊離が低下した。残る 1 症例では、熱変性後酵素消化した抗原によってもヒスタミン遊離が変化せず、蛋白質の構造に依存しない linear epitope であることが推測された。

一方、 $\alpha$ S-casein に対する 6 症例のヒスタミン遊離反応においては、熱変性による抗原性の変化は観察されず、 $\alpha$ S-casein に対する IgE 抗体の主たる epitope は、蛋白質の高次構造に依存しない linear epitope である場合が大半である、という報告を裏付けた。酵素消化によっては、6 例中 4 例において、反応性の低下がみられた。

これらの解析の結果、牛乳アレルギーの患児の血清 IgE が認識する抗原 epitopes は、ジスルフィド結合を有し、蛋白質としての構造の安定性がより高い $\beta$ LG に対しては、高次構造に反応するものと変性分解された断片に反応するものの両方が観察されたが、構造が壊れやすい $\alpha$ S-casein では、一般に変性や分解を受けた蛋白質断片が主たる抗原 epitopes となることがわかった。

審査員からは、テクニカルな図の説明や実験方法についての質問に続き、実際に食品の加工の仕方によってアレルギーが出たり出なかったりするような症例はあるのか、標準的な乳製品の加工法と今回の実験条件下での蛋白変性効果は、同等に扱ってよいものか、などの質問があった。また、特異的 IgE 検査の結果は、健常人対照グループでは、どの程度振れるものか、血清 IgE 抗体量と、発症の関係はどうであるか、などの質問もあった。さらに、酵素消化による抗原性の消失の原因として、epitope が分断される他に、epitope は保存されるが、免疫細胞にとって 1 価のハプテン抗原となるために反応性が落ちる可能性がないか質問があったが、ヒスタミン遊離実験の培養液中に存在す

る血清アルブミン分子に結合して多価の抗原になることが好塩基球の活性化に必要であることをあげて、明快に説明をした。今後、新たなアレルギーの検査方法への応用としては、具体的にどのような利用が可能か、既存の検査法との比較はしたことがあるか、などの質問もあった。これらの質問や問題提起に対して、森澤さんはデータや根拠となる文献情報などを紹介して、適切に議論や解説をした。

以上の研究成果をふまえ、審査員一同、森澤豊さんの研究内容は、高知大学博士（医学）の学位に十分な内容と質を備えたものであると判断しました。

氏名(本籍)	岡田 耕輔 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第7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4月21日
学位論文題目	Performance of an interferon-gamma release assay for diagnosing latent tuberculosis infection in children (小児における結核菌感染診断のためのインターフェロン $\gamma$ 誘導検査の有用性の検討)
発表誌名	Epidemiology and Infection, 136(9); 1179-1187, 2008年9月

審査委員	主査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	横山	彰仁
	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 岡田 耕輔

論文題目 Performance of an interferon-gamma release assay for  
diagnosing latent tuberculosis infection in children  
(小児における結核菌感染診断のためのインターフェロン  
 $\gamma$ 誘導検査の有用性の検討)

(論文要旨)

【目的】ツベルクリン反応検査 (TST) は Bacille Calmette-Guerin (BCG) ワクチン接種や非結核性抗酸菌感染による偽陽性が問題とされているにもかかわらず、結核菌感染を知るための唯一の診断方法としてこれまで広く用いられてきた。最近、結核菌感染を診断するための新たな技術としてインターフェロン (IFN)  $\gamma$  誘導試験が開発され、TST に代わり使用され始めた。しかしながら、この検査は成人ではその有用性が確認されているが、小児においては十分な科学的根拠が集積されていない。そこで、我々は IFN- $\gamma$  誘導試験の小児に対する有用性を検討するために、その一つである QuantiFERON-TB<sup>®</sup> Gold (QFT) とツベルクリン反応検査 (TST) との検査結果を比較検討した。

【対象と方法】カンボジアにおいて肺結核患者と同居する 5 歳以下の小児を対象に 2006 年 1 月、胸部 X 線検査、TST による接触者検診を実施し、同意の得られた児より QFT 用の末梢血 5ml を採取した。血液を所定の手続きによって処理した後、日本にて IFN- $\gamma$  を測定した。結果の判定には成人と同じ基準を用いた。72 時間後の TST 硬結径の計測は有資格者が行い、10mm 以上を陽性とした。




【結果】検診を受けた 217 名のうち両方の検査結果が得られた 195 名の小児では、QFT の陽性率 17% に比べて、TST 陽性率 24% は有意に高かった。47 名の TST 陽性児のうち 28 名 (60%) が QFT 陽性であったが、148 名の TST 陰性児では 5 名 (3.4%) が QFT 陽性であった。TST 硬結径 10-14mm を示した児では 47% が QFT 陽性であったが、15mm 以上の児では 82% が QFT 陽性と有意に高くなっていた。両検査結果の一致率は 88%、 $\kappa$  係数は 0.63 で、検査結果は比較的良好に一致していた。結核患者の感染力の目安となる喀痰塗抹検査のグレードに応じて、QFT でも TST でも陽性率は漸増した。性・年齢、BCG 接種歴、結核患者との最終接触からの検査までの期間、結核患者の喀痰塗抹検査のグレードを投入したロジスティック回帰分析では、結核患者の喀痰塗抹検査のグレードが QFT でも TST でも最も重要なリスク要因であった。

【考察】結核菌感染を診断する絶対的基準が存在していないので、QFT の有用性を検討するには TST 結果との比較、感染危険度に応じた陽性率の検討などの方法がとられる。本研究は、喀痰塗抹陰性から陽性まで感染力の異なる肺結核患者と同居し、様々な感染リスクを負った 5 歳以下の小児を対象に、二つの検査結果を比較検討したものである。全体的には TST の陽性率が QFT のそれを上回っていたが、このことは QFT の偽陰性が多いか、または逆に TST に

偽陽性が多いこと、あるいはその両方を意味している。環境からの非結核性抗酸菌感染の可能性が高いと言われている TST 硬結径 10-14mm のグループでは QFT 陽性率が 47%で、感染がより確実な硬結径 15mm 以上のグループの QFT 陽性率 82%と比較して有意に高かったことから、前者には偽陽性がより多く含まれていると考えられる。本研究では総体的には両者の検査結果はある程度一致したが、これは研究対象を 5 歳以下としたために年齢とともに増加する非結核性抗酸菌感染の影響が少なかったことが一因と思われる。もう一つの要因としてカンボジアにおける BCG 接種の実施方法が挙げられる。カンボジアの様に新生児期に一度だけ BCG を接種した場合は BCG を繰り返して追加接種した場合とは異なり、その後の TST 硬結径への影響は限定的であると言われており、ロジスティック回帰分析でもその TST への影響は統計学的に有意ではなかったと考えられる。日本とは状況が全く異なる発展途上国で QFT を使うことに関しては費用的な問題と技術的な問題が存在するが、信頼性の高い感染危険率の推定や難しいとされる小児結核の診断には TST に勝る利点もあるので、その使用について検討する余地は十分にある。

【結論】QFT は成人同様に 5 歳以下の小児においても TST に替わる検査方法として有用であり、特に、偽陽性が問題とされる複数回の BCG 接種や環境からの非結核性抗酸菌感染の影響を排除できる点に特徴がある。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	岡 田 耕 輔
審 査 委 員	主 査 氏 名	菅 沼 成 文 
	副 査 氏 名	横 山 彰 仁 
	副 査 氏 名	瀬 尾 宏 美 

題 目 Performance of an interferon-gamma release assay for diagnosing latent tuberculosis infection in children  
(小児における結核菌感染診断のためのインターフェロン $\gamma$ 誘導検査の有用性の検討)

著 者 K. OKADA, T. E. MAO, T. MORI, T. MIURA, T. SUGIYAMA, T. YOSHIYAMA, S. MITARAI, I. ONOZAKI, N. HARADA, S. SAINT, K. S. KONG, Y. M. CHHOUR

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Epidemiology and Infection, 136(9), 1179-1187, 2008年9月

### 要 旨

【目的】ツベルクリン反応検査 (TST) は Bacille Calmette-Guerin (BCG) ワクチン接種や非結核性抗酸菌感染による偽陽性が問題であるにもかかわらず、結核菌感染を知るための唯一の診断方法としてこれまで広く用いられてきた。最近、結核菌感染を診断するための新たな技術としてインターフェロン (IFN)  $\gamma$  誘導試験が開発され、TST に代わり使用され始めた。しかしながら、この検査は成人ではその有用性が確認されているが、小児においては十分な科学的根拠が集積されていない。そこで、我々は IFN- $\gamma$  誘導試験の小児に対する有用性を検討するために、その一つである QuantiFERON-TB $\circledR$  Gold (QFT) とツベルクリン反応検査 (TST) との検査結果を比較検討した。

【対象と方法】カンボジアにおいて肺結核患者と同居する5歳以下の小児を対象に2006年1月、胸部X線検査、TSTによる接触者検診を実施し、同意の得られた児よりQFT用の末梢血5mlを採取した。血液を所定の手続きによって処理した後、日本にてIFN- $\gamma$ を測定した。結果の判定には成人と同じ基準を用いた。72時間後のTST硬結径の計測は有資格者が行い、10mm以上を陽性とした。

【結果】検診を受けた217名のうち両方の検査結果が得られた195名の小児では、QFTの陽性率17%に比べて、TST陽性率24%は有意に高かった。47名のTST陽性児のうち28名(60%)がQFT陽性であったが、148名のTST陰性児では5名(3.4%)がQFT陽性であった。TST硬結径10-14mm

を示した児では47%がQFT陽性であったが、15mm以上の児では82%がQFT陽性と有意に高くなっていた。両検査結果の一致率は88%、 $\kappa$ 係数は0.63で、検査結果は比較的よく一致していた。結核患者の感染力の目安となる喀痰塗抹検査のグレードに応じて、QFTでもTSTでも陽性率は漸増した。性・年齢、BCG接種歴、結核患者との最終接触からの検査までの期間、結核患者の喀痰塗抹検査のグレードを投入したロジスティック回帰分析では、結核患者の喀痰塗抹検査のグレードがQFTでもTSTでも最も重要なリスク要因であった。

【考察】結核菌感染を診断する絶対的基準が存在していないので、QFTの有用性を検討するにはTST結果との比較、感染危険度に応じた陽性率の検討などの方法がとられる。本研究は、喀痰塗抹陰性から陽性まで感染力の異なる肺結核患者と同居し、様々な感染リスクを負った5歳以下の小児を対象に、二つの検査結果を比較検討したものである。全体的にはTSTの陽性率がQFTのそれを上回っていたが、このことはQFTの偽陰性が多いか、または逆にTSTに偽陽性が多いこと、あるいはその両方を意味している。環境からの非結核性抗酸菌感染の可能性が高いと言われているTST硬結径10-14mmのグループではQFT陽性率が47%で、感染がより確実な硬結径15mm以上のグループのQFT陽性率82%と比較して有意に高かったことから、前者には偽陽性がより多く含まれていると考えられる。本研究では総体的には両者の検査結果はある程度一致したが、これは研究対象を5歳以下としたために年齢とともに増加する非結核性抗酸菌感染の影響が少なかったことが一因と思われる。もう一つの要因としてカンボジアにおけるBCG接種の実施方法が挙げられる。カンボジアの様に新生児期に一度だけBCGを接種した場合はBCGを繰り返し追加接種した場合とは異なり、その後のTST硬結径への影響は限定的であると言われており、ロジスティック回帰分析でもそのTSTへの影響は統計学的に有意ではなかったと考えられる。日本とは状況が全く異なる発展途上国でQFTを使うことに関しては費用的な問題と技術的な問題が存在するが、信頼性の高い感染危険率の推定や難しいとされる小児結核の診断にはTSTに勝る利点もあるので、その使用について検討する余地は十分にある。

【結論】QFTは成人同様に5歳以下の小児においてもTSTに替わる検査方法として有用であり、特に、偽陽性が問題とされる複数回のBCG接種や環境からの非結核性抗酸菌感染の影響を排除できる点に特徴がある。

申請者らは、国内外の結核対策に携わった経験から、途上国での国際協力プロジェクトの遂行時に科学的研究を実施し、論文発表当時は十分解明されていなかった小児結核の診断におけるINF- $\gamma$ の有用性を世界に先駆けて示した点で学術的意義があり、本論分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)	東山 佳澄(神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第8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5月19日
学位論文題目	Bumetanide-induced enlargement of the intercellular space in the stria vascularis critically depends on Na <sup>+</sup> transport (ブメタニドによる血管条内細胞間隙の拡大にはナトリウムイオンの輸送機構が深く関与)
発表誌名	Hearing Research, 186(2003): 1-9, 2003年12月

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	寺田	典生

## 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 東山 佳澄

論 文 題 目 Bumetanide-induced enlargement of the intercellular space in the stria vascularis critically depends on  $\text{Na}^+$  transport  
(ブメタニドによる血管条内細胞間隙の拡大にはナトリウムイオンの輸送機構が深く関与)

(論文要旨)




蝸牛内血管条には辺縁細胞によって形成される層と、中間細胞や基底細胞・血管内皮・らせん靱帯内線維細胞によって形成される層との間に非常に狭い細胞間隙が認められる。通常この細胞間隙は低  $\text{Na}^+$ ・高  $\text{K}^+$ である内リンパ液や高  $\text{Na}^+$ ・低  $\text{K}^+$ である外リンパ液から隔てられている。ブメタニドやフロセミドといったループ利尿薬の投与により、内リンパ直流電位 (EP) の低下とともに、この細胞間隙の拡大が生じることが知られている。ブメタニドは  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$  共輸送体を阻害するが、この輸送体は辺縁細胞基底側膜に多く発現している。

我々は、このブメタニドによる細胞間隙拡大におけるイオン輸送メカニズムについて検討するため、モルモットにおいて外リンパ灌流法を用いた実験を行った。実験は蝸牛第2回転より EP を計測しながら、基底回転の蝸牛階より人工外リンパ液を注入し、前庭階を通して卵円窓より排出させて灌流を行い、薬液の灌流後直ちに血管条を固定し血管条組織を採取、電子顕微鏡を用いて組織変化を観察した。ブメタニド  $100\ \mu\text{M}$  を加えた人工外リンパ液の灌流により EP の低下と細胞間隙の著明な拡大を認めた。 $\text{K}^+$ を除いた人工外リンパ液にブメタニドを加えたものを灌流すると、先の実験と同様な著明な細胞間隙拡大を認めたが、 $\text{Na}^+$ を除いた人工外リンパ液の灌流ではブメタニドによる細胞間隙拡大は認められなかった。 $\text{Na}^+$ チャンネル阻害薬であるアミロリド  $1\text{mM}$  を加えた人工外リンパ液の灌流ではブメタニドによる細胞間隙拡大を認めなかった。

このことから、ブメタニドによる細胞間隙拡大には外リンパ液中の  $\text{Na}^+$  が不可欠であり、またアミロリド感受性の輸送機構が関わっていると考えられた。つまりブメタニドにより外リンパ液中の  $\text{Na}^+$  が細胞間隙内に貯留するため、細胞間隙が拡大するものと考えられた。辺縁細胞基底側膜にはまた、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  が多く発現している。これらは細胞間隙の  $\text{K}^+$  を辺縁細胞内に取り込むと同時に、細胞内の  $\text{Na}^+$  濃度を低く保つことにより、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$  共輸送体の駆動力を作り出していると考えられている。ブメタニドにより辺縁細胞基底側膜の  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}$  共輸送体による細胞間隙内  $\text{Na}^+$  の辺縁細胞内への取り込みが阻害されるため、辺縁細胞基底側膜の  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  の働きにより細胞間隙内に  $\text{Na}^+$  が貯留すると考えられた。我々は以前、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  阻害剤であるウワバインを加えた同様の人工外リンパ液の灌流により、ブメタニドによる細胞間隙拡大が抑制されることから、ブメタニドによる組織変化には  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  が関与していることを報告したが、今回の結果はそれを支持するものであった。細胞間隙への  $\text{Na}^+$  輸送は中間細胞や基底細胞上の  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  によっても行われているが、その活性は辺縁細胞のものに比べ低いと考えられ、ブメタニドによる細胞間隙拡大には辺縁細胞基底側膜の  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  が深く関わっていると考えられる。

外リンパ液中の  $\text{Na}^+$  の血管条内細胞間隙への輸送経路は2つ考えられる。ひとつはライスナー膜や、コルチ器を含む基底膜を通して外リンパ液から内リンパ液に向けて  $\text{Na}^+$  が入り、辺縁細胞頂側膜から取り込まれるもので、この経路では辺縁細胞頂側膜の  $\text{Na}^+$  輸送機構が正常内リンパ液中の  $\text{Na}^+$  濃度を低く保つのに重要な役割を果たしていると考えられる。血管条内にアミロリド感受性  $\text{Na}^+$  チャンネルが発現しているという報告や、辺縁細胞頂側膜に  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体が存在するという報告もある。我々の実験結果から、アミロリドが辺縁細胞頂側膜のアミロリド感受性  $\text{Na}^+$  チャンネルまたは  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換輸送体を阻害したため、ブメタニドによる細胞間隙拡大が抑制された可能性が考えられた。もう一つは、外リンパ液中の  $\text{Na}^+$  が基底細胞やらせん靭帯内線維細胞により取り込まれ、ギャップ結合を通して中間細胞に輸送され、中間細胞  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase により細胞間隙内に輸送される経路が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名
	東 山 佳 澄
審 査 委 員	主 査 氏 名    梶    秀 人 <span style="float: right;"></span>
	副 査 氏 名    降 幡 睦 夫 <span style="float: right;"></span>
	副 査 氏 名    寺 田 典 生 <span style="float: right;"></span>

題 目    Bumetanide-induced enlargement of the intercellular space in the stria vascularis critically depends on Na<sup>+</sup> transport  
 (ブメタニドによる血管条内細胞間隙の拡大にはナトリウムイオンの輸送機構が深く関与)

著 者    Kasumi Higashiyama, Shunji Takeuchi, Hiroshi Azuma, Shoichi Sawada, Kazuhiro Yamakawa, Akinobu Kakigi, Taizo Takeda

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
 Hearing Research, 186(2003): 1-9, 2003年12月

### 要 旨

蝸牛有毛細胞の音受容には中心階を満たす高 K<sup>+</sup>、低 Na<sup>+</sup>濃度の内リンパ液および +80 mV の内リンパ直流電位 (EP) が重要な役割を演じている。中心階の外側面を構成する血管条は EP の生成および内リンパ液の産生に重要な組織であり、辺縁細胞によって形成される層と、中間細胞・基底細胞・血管内皮・らせん靭帯内線維細胞がギャップ結合により機能的合胞体を形成している層からなる。また、これらの二層の間には非常に狭い細胞間隙が認められる。ブメタニドやフロセミドなどのループ利尿薬は EP を低下させるとともに、細胞間隙の拡大をもたらす。辺縁細胞の基底側膜には Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体が発現していることが知られている。ブメタニドは Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体を阻害するが、ブメタニドによる細胞間隙拡大のイオン輸送機構については未だ充分には解明されていない。

そこで申請者らは、ブメタニドによる細胞間隙拡大のイオン輸送機構を明らかにするために、外リンパ灌流法を用いてモルモットの EP および細胞間隙に対する K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>の除去および Na<sup>+</sup>チャネル阻害薬であるアミロライドの効果を検討した。具体的



には、蝸牛第2回転より EP を計測しながら、基底回転の蝸牛鼓室階より人工外リンパ液を注入し、前庭階を通して卵円窓より排出させて灌流を行い、薬液の灌流後直ちに血管条を固定し血管条組織を採取、電子顕微鏡を用いて組織変化を観察した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 人工外リンパ液にブメタニド ( $100\ \mu\text{M}$ ) を加えて灌流すると、EP の低下と細胞間隙の著明な拡大が認められた。
- 2) ブメタニドを含む人工外リンパ液から  $\text{K}^+$ を除いてもブメタニドによる細胞間隙の拡大は認められたが、 $\text{Na}^+$ を除くとブメタニドによる細胞間隙の拡大は認められなくなった。
- 3) 人工外リンパ液に  $\text{Na}^+$ チャネル阻害薬であるアミロライド ( $1\ \text{mM}$ ) を加えて灌流すると、ブメタニドによる細胞間隙の拡大は認められなくなった。

以上の成績は、ブメタニドによる細胞間隙拡大には外リンパ液中の  $\text{Na}^+$ が不可欠で、かつアミロライド感受性の  $\text{Na}^+$ 輸送機構が関わることを示唆している。

正常内耳では、辺縁細胞の基底側膜に発現している  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体および  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  が働き、細胞内に高濃度の  $\text{K}^+$ が蓄積される。この  $\text{K}^+$ が中心階へ  $\text{K}^+$ 透過性チャネルを通して分泌されることによって内リンパ液の高い  $\text{K}^+$ 濃度が実現される。 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ の共輸送過程によって辺縁細胞内に取り込まれた  $\text{Na}^+$ はさらに  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$  で細胞外に汲み出され、 $\text{Cl}^-$ は基底側膜に存在する  $\text{Cl}^-$ チャネルを通して細胞外に出る。結果として、 $\text{K}^+$ が細胞間隙から内リンパ腔へと輸送される。ブメタニドは、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体による  $\text{Na}^+$ の辺縁細胞内への取り込みを阻害するため、 $\text{Na}^+$ が細胞間隙内に貯留し細胞間隙の拡大をもたらすものと考えられる。

以上より、申請者らの論文は、内耳液の恒常性維持機構の解明のみならず、内耳性難聴の予防・治療法の確立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。





