

2008. 6

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二十五号

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 51 号	川島 将彰	HLA-G, a ligand for the NK receptor KIR2DL4, is expressed by eutopic endometrium only in the menstrual phase (NK細胞 KIR2DL4 のリガンドである HLA-G は正所性子宮内膜に月経期にのみ発現する)	1
甲医博第 52 号	川田 通広	Pontential foramen to allow communication between the pleural cavity and retroperitoneal space during laparoscopic surgery : a cadaver study of Bochdalek' s triangle (鏡視下手術操作における胸膜、後腹膜腔間に存在する潜在的な孔の関係について：ポホダレック三角の解剖学的検討)	6
甲医博第 53 号	羽屋戸 佳世	Hypertrophic cardiomyopathy with mild left ventricular remodeling : echocardiographic assessment using left ventricular wall motion score (肥大型心筋症における軽度の左室リモデリング：左室壁運動スコアを用いた検討)	11
甲医博第 54 号	弘田 隆省	Morphologic characteristics of hypertrophic cardiomyopathy of the elderly with cardiac myosin-binding protein c gene mutations (心筋ミオシン結合蛋白Cの遺伝子変異を伴う高齢者肥大型心筋症の形態的特徴)	16
甲医博第 55 号	福島 慶	Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally induced endolymphatic hydrops (リチウムが内リンパ恒常性と実験的内リンパ水腫に及ぼす影響)	21

甲医博第 56 号	Sachiko Noemy Yagi Chaves	Effect of five triterpenoid compounds isolated from root bark of <i>Aralia elata</i> on stimulus-induced superoxide generation, tyrosyl or serine/threonine phosphorylation and translocation of p47 <sup>phox</sup> , p67 <sup>phox</sup> , and <i>rac</i> to cell membrane in human neutrophils ( <i>Aralia elata</i> の根から単離した 5 種類の triterpenoids の人好中球の活性酸素産生に対する作用とその作用機構 : 蛋白質の tyrosine 及び serine/threonine のリン酸化と p47 <sup>phox</sup> , p67 <sup>phox</sup> と <i>rac</i> の膜への移行)	2 5
甲医博第 57 号	稲田 昌二郎	Glucose enhances protein tyrosine phosphatase 1B gene transcription in hepatocytes (グルコースは肝細胞においてプロテインチロシンフォスファターゼ 1B 遺伝子の転写を促進する)	3 0
甲医博第 58 号	島崎 修行	The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness (ヒト膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の分布様式は癌の間質浸潤に反映される)	3 5
甲医博第 59 号	中島 英貴	Low-density lipoprotein is oxidized by phospholipase A <sub>2</sub> and lipoxygenase in xanthoma lesions (低比重リポ蛋白は黄色腫病変部のフォスフォリパーゼ A <sub>2</sub> とリポキシゲナーゼにより酸化される)	4 0
甲医博第 60 号	清水 孝洋	Bidirectional roles of the brain 2-arachidonoyl-sn-glycerol in the centrally administered vasopressin-induced adrenomedullary outflow in rats (中枢性に投与されたバソプレシンにより惹起される副腎髄質系賦活における脳内 2-アラキドノイルグリセロールの二方向性の役割)	4 6
甲医博第 61 号	方 友云	Oxytocin facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb (オキシトシンは副嗅球における長期増強の誘導を促進する)	5 1
甲医博第 62 号	弘瀬 伸行	The local injection of peritoneal macrophages induces neovascularization in rat ischemic hind limb muscles (腹腔マクロファージ移植はラット後肢虚血筋における血管新生を誘導する)	5 6

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙医博第 38 号	高杉 尚志	Myocardial scintigraphy after pacemaker implantation for congenital complete atrioventricular block (ペースメーカー植え込み後の先天性完全房室ブロック患者の心筋シンチ)	6 1
乙医博第 39 号	森田 ゆかり	Transcranial magnetic stimulation for differential diagnostics in patients with parkinsonism (パーキンソン病・類縁疾患の鑑別診断における経頭蓋磁気刺激検査の有用性)	6 6
乙医博第 40 号	森澤 理恵	Neuronal conditions of spinal cord in dermatitis are improved by olopatadine (オロパタジンは接触皮膚炎により生じる脊髄神経の病的状態を改善させる)	7 1

氏名(本籍)	川島 将彰 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第51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20年3月24日
学位論文題目	HLA-G, a ligand for the NK receptor KIR2DL4, is expressed by eutopic endometrium only in the menstrual phase (NK細胞 KIR2DL4 のリガンドである HLA-G は正所性子宮内膜に月経期にのみ発現する)
発表誌名	Fertility and Sterility 2008年(予定)
	<b>審査委員</b> 主査 教授 李 康弘 副査 教授 脇口 宏 副査 教授 山本 哲也

## 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 川島 将彰

## 論文題目

HLA-G, a ligand for the NK receptor KIR2DL4, is expressed  
by eutopic endometrium only in the menstrual phase  
(NK細胞KIR2DL4のリガンドであるHLA-Gは正所性子宮内  
膜に月経期にのみ発現する)

(論文要旨)

【目的】子宮内膜症（以下内膜症）の発症原因として、Sampsonの提唱した逆流経血に伴う内膜移植説が有力である。有経婦人の腹腔内には逆流経血に対する排除機構が生理的に存在し、NK細胞とマクロファージがその中心的役割を担うと考えられている。内膜症婦人では、NK活性低下が報告され、内膜症発症要因の一つと考えられているが、その機序は十分に解明されておらず、またNK細胞が認識する抗原も未だ同定されていない。1995年以降、NK細胞に自己認識型レセプター (killer immunoglobulin-like receptor: KIR) が同定された。われわれは、抑制型のKIR2DL1<sup>+</sup> NK細胞が内膜症婦人で高値であることを明らかとし、内膜症のNK活性低下の機序の一端を明らかとした (Maeda 2002, Matsuoka 2005)。しかしこのリガンドはHLA-Cであり特異的な抗原ではない。そこで筆者らは、非古典的HLA-GをリガンドとするKIR2DL4に注目した。HLA-Gは絨毛や脱落膜に発現し妊娠に関わる抗原として同定されたが、非妊時の子宮内膜での発現は明らかとなっていない。正所性子宮内膜におけるHLA-Gの発現は、逆流経血によって腹腔曝露抗原となる可能性を示しており、内膜症発症にも関わるものと考えられる。本研究では子宮内膜組織における月経周期別のHLA-G発現を評価し、腹腔NK細胞の標的抗原となり得るかについて検討した。

【対象および方法】対象は当科において過去5年間に開腹または腹腔鏡下に子宮摘出を行い、かつ同意の得られた有経婦人（内膜症20例、非内膜症17例）とした。検討部位は摘出子宮の正所性子宮内膜および腹腔内貯留液とし、HLA-Gモノクローナル抗体および二次抗体を用いて免疫組織染色を行った。検討項目としては、1) フローサイトメトリーを用いて腹腔内のKIR2DL4 (CD158d) 陽性NK細胞の検出を行った。2) 正所性子宮内膜におけるHLA-Gの発現時期および発現部位を検討した。また、HLA-Gの発現強度を、NIH Imageを用いて定量化し比較検討した。3) 腹腔内貯留液においてHLA-G陽性細胞の発現率を検討した。

【結果】1) フローサイトメトリーでは、腹腔内にKIR2DL4 陽性細胞の存在を確認した。2) 正所性子宮内膜におけるHLA-G発現は、月経期にのみ子宮内膜腺上皮（とくに剥離している上皮）に認め、非月経期（増殖期および分泌期）には認めなかった。NIH Imageで定量化すると、HLA-G発現は、内膜症群および非内膜症群ともに非月経期と比較して月経期に有意に強かった。しかし月経期も非月経期も内膜症群、非内膜症群に群間差は認めなかった。3) 腹腔内貯留液におけるHLA-G陽性細胞発現率は両群ともに月経期に増加し、非月経期には著しく減少した。

【考察】腹腔内にはKIR2DL4<sup>+</sup> NK細胞が存在し、そのリガンドであるHLA-Gが、正所性子宮内膜に月経期にのみ発現することを明らかとした。さらに月経期には腹腔内に多数のHLA-G陽性細胞も確認した。つまり、月経期のHLA-G陽性内膜が逆流経血にともない腹腔内でKIR2DL4<sup>+</sup> NK細胞の標的細胞となっていると考えられる。月経期におけるHLA-G発現の機序は不明であるが、その発現と腹腔KIR2DL4<sup>+</sup> NK細胞の機能が腹腔内膜細胞の処理と内膜症の発症に関わっていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名		川 島 将 彰
審 査 委 員	主 査 氏 名	李 康 弘	
	副 査 氏 名	脇 口 宏	
	副 査 氏 名	山 本 哲 也	

題 目 HLA-G, a ligand for the NK receptor KIR2DL4, is expressed by eutopic endometrium only in the menstrual phase  
(NK細胞 KIR2DL4 のリガンドである HLA-G は正所性子宮内膜に月経期にのみ発現する)

著 者 Masaaki Kawashima, Nagamasa Maeda, Yoshihiro Adachi, Tamotsu Takeuchi, Yorito Yamamoto, Chiaki Izumiya, Kazutoshi Hayashi, Mutsuo Furihata, Keiko Udaka, Takao Fukaya

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Fertility and Sterility 2008年(予定)

### 要 旨

【背景・目的】子宮内膜症は、腹膜や子宮付属器等における異所性子宮内膜組織の形成と定義され、月経困難などの症状をもたらす。内膜症の発生過程を説明する学説として最も有力なのが内膜移植説であり、剥離内膜組織を含んだ経血が卵管から腹腔内へと逆流し、腹膜等に生着することが推定されている。経血逆流は有経婦人にとって生理的な現象であるが、通常はNK (natural killer) 細胞とマクロファージが中心的な役割を担う排除機構が働くため、内膜移植は起こらない。ところが、NK細胞の機能低下が背景にある場合、経血は排除を免れ、移植が許容される機会が生じる。事実、申請者らの研究室からの報告を含め、内膜症婦人におけるNK活性低下を指摘する研究が複数ある。

NK細胞による逆流経血の排除機構が明らかとなれば、内膜症発生機序のさらなる理解とその予防法確立への貢献が期待できる。本研究において、申請者は、NK細胞の自己認識型レセプター (killer immunoglobulin-like receptor: KIR) の一つとして知られる KIR2DL4 に注目し、そのリガンドである HLA-G の子宮内膜における発現を月経周期別に分析した。HLA-G は絨毛や脱落膜に発現し妊

娠に関わる抗原として同定されたが、非妊娠時の子宮内膜での発現は明らかになっていない。内膜組織で発現する HLA-G は、逆流経血内の腹腔曝露抗原として KIR2DL4 に結合し、NK 細胞の活性化と経血内内膜の排除に寄与することが推測される。

【対象および方法】対象は、高知大学医学部附属病院産婦人科において過去 5 年間に開腹または腹腔鏡下に子宮摘出が行われた有経婦人 37 例であり、その内訳は内膜症 20 例、非内膜症 17 例であった。正所性子宮内膜および腹腔内貯留液における HLA-G 陽性細胞の検出は、抗 HLA-G モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色により行った。HLA-G の発現強度は NIH *Image* ソフトウェアによる画像解析で定量化した。また、フローサイトメトリーによる腹腔内貯留液内の KIR2DL4 陽性 NK 細胞の同定には、抗 CD158d モノクローナル抗体を使用した。

【結果】フローサイトメトリーによって、腹腔内貯留液中に KIR2DL4 陽性 NK 細胞の存在が確認された。正所性子宮内膜における HLA-G の発現は、月経期にのみ子宮内膜腺上皮に検出され、剥離を示す上皮で特に強かった。一方、増殖期および分泌期からなる非月経期では、HLA-G の発現は認められなかった。NIH *Image* による定量化の結果、HLA-G 発現は非月経期と比較して月経期に有意に高いことが証明された。この傾向は、内膜症群および非内膜症群にかかわらず同様であった。また、HLA-G 発現の絶対量も、内膜症群と非内膜症群との間に差を認めなかった。腹腔内貯留液における HLA-G 陽性細胞発現率は両群ともに月経期に増加し、非月経期には著しく減少した。

【考察】腹腔内には KIR2DL4 陽性 NK 細胞が存在し、そのリガントである HLA-G が、正所性子宮内膜に月経期にのみ発現することが明らかとなった。さらに、月経期には腹腔内に多数の HLA-G 陽性細胞が出現することを観察した。よって、月経期の HLA-G 陽性内膜が経血逆流にともない腹腔内で KIR2DL4 陽性 NK 細胞の標的となっていると考えられる。月経期における HLA-G 発現の機序は不明であるが、その発現が腹腔 KIR2DL4 陽性 NK 細胞の機能活性化を惹起し、腹腔内膜細胞の処理と内膜症の予防に関わっていることが示唆された。KIR2DL4 遺伝子の突然変異などによって HLA-G を介する NK 機能活性化が阻害される場合、内膜症の発生が促進されることも想定し得る。

以上の如く、本研究は子宮内膜腺上皮における月経期特異的な HLA-G 発現を初めて明らかにしたものであり、逆流経血排除機構の理解に大きな貢献を果たした。今後は、HLA-G 発現と内膜症発生の関係解明へと研究が発展し、内膜症の予防法確立に至ることも期待される。

氏名(本籍)	川田 通広 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第52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20年3月24日
学位論文題目	Pontential foramen to allow communication between the pleural cavity and retroperitoneal space during laparoscopic surgery : a cadaver study of Bochdalek's triangle (鏡視下手術操作における胸膜、後腹膜腔間に存在する潜在的な孔の関係について：ボホダレック三角の解剖学的検討)
発表誌名	Surgical and Radiologic Anatomy 29, 105~113 16 February 2007

審査委員	主査	教授	由利	和也
	副査	教授	小林	道也
	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 川田 通広

## 論文題目

Potential foramen to allow communication between the pleural cavity and retroperitoneal space during laparoscopic surgery: a cadaver study of Bochdalek's triangle  
(鏡視下手術操作における胸膜、後腹膜腔間に存在する潜在的な孔の関係について：ボボダレック三角の解剖学的検討)

### (論文要旨)

腹腔操作のみならず、後腹膜を剥離し、気腹することで、新たな後腹膜腔を作成する。この新たな腔をworking spaceとして用いることで腹腔内臓器、とくに腸管が邪魔することなく後腹膜臓器への直接アプローチが可能となった。

いっぽう、後腹膜腔操作において横隔膜付着部付近では偶発的な臓器損傷と思われる術中気胸の発生例が若干ではあるが報告されており、後腹膜腔操作時における解剖学的指標の決定が重要視されている。

今回、鏡視下手術での後腹膜操作時に近接することが多い第12肋骨縁周辺について、本邦での解剖体111例を使用して検討したので報告する。

横隔膜筋肉欠損部もしくはBochdalek's三角（以下Triangle）を認めたものは111例中、100例（90.1%）、161ヶ所であった。Triangle平均高は47.9 mm、Triangle平均底辺は25.0 mm、平均面積は622.8 mm<sup>2</sup>であった。161ヶ所のTriangleのうち129ヶ所（80.1%）が第12肋骨内縁の上方に、また肋骨中央付近よりやや外側方向（肋骨全長の約2/3）に位置していた。

いっぽう、第12肋骨遠位端がTriangle内部に突出するように位置しているものが13.7%に認められた。言い換えると、横隔膜筋線維が13.7%の症例では、第12肋骨ではなく第11肋骨などほかの部位に付着していた。

Triangleの中で胸膜に裏打ちされている100 mm<sup>2</sup>以上のものをPF(potential foramen)と定義するとTriangle 161ヶ所中、125ヶ所（77.6%）がPFであった。

PFのうち腎臓の背側に位置していたものは93.3%であり、平均面積は318.9 mm<sup>2</sup>であった。

第12肋骨遠位端と胸膜までの平均距離は27.8mm、また第12肋骨遠位端とPFまでの距離は平均42.3mmであった。

大きなTriangleであればあるほどPFの面積も相対的に大きくなる傾向を認めた。

Triangleに対して50%以上の面積となるPFは全体の49.6%

(125ヶ所のうち62ヶ所)に認められてた。

横隔膜Triangleで胸膜に裏打ちされているPFは、強固な筋膜に覆われているものの、筋線維が欠損しているため、他の部位よりもうすく、実際の手術においては解剖学的に危険な部位であると考えられる。このPFと第12肋骨遠位端の位置関係を把握したうえで操作を慎重に行う必要がある。

以上より、鏡視下手術のうち後腹膜腔での操作を行う必要がある場合、中腋窩線上で第12肋骨遠位端および腸骨間で皮膚切開を行うことを基本とする。切開後、後腹膜腔での操作では、第12肋骨遠位端に13.7%PFが存在しており、胸膜が裏側に接しており、鋭的切開にて容易に開胸し得る横隔膜部位であることを念頭に慎重な操作が必要であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	川田 通広
審査委員	主査氏名	由利 和也 
	副査氏名	小林 道也 
	副査氏名	執印 太郎 

**題 目** Pontential foramen to allow communication between the pleural cavity and retroperitoneal space during laparoscopic surgery : a cadaver study of Bochdalek' s triangle  
 (鏡視下手術操作における胸膜、後腹膜腔間に存在する潜在的な孔の関係について：ポホダレック三角の解剖学的検討)

**著 者** Michihiro Kawada, Gen Murakami, Toshiyuki Yajima, Toshio J. Sato, Shunji Mizobuchi, Shiro Sasaguri

**発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月**  
 Surgical and Radiologic Anatomy 29, 105~113 16 February 2007

**要 旨**

Bochdalek 三角とは発生学的に胸腹膜と横中隔が癒合する際に、左右の胸腹膜孔の閉鎖不全によって横隔膜に生じた筋の欠損部位である。近年、外科領域において鏡視下手術の発達により、腎、副腎などの後腹膜臓器の手術が可能になった。その際に後腹膜腔を拡張して working space を作成して操作を行うのであるが、合併症として Bochdalek 三角の穿孔による気胸が報告されている。今回の研究では、Bochdalek 三角の位置およびその形態について検討を行った。

男性 63 体、女性 48 体、合計 111 体の解剖体の横隔膜（右側 96 例、左側 126 例）のうち Bochdalek 三角が認められたものは 100 体（90.1%）であった。その中

で 161 個の Bochdalek 三角が認められた。発生頻度は右側 70.6%、左側 75.0%で有意差は見られなかった。また、性差も認められなかった。Bochdalek 三角の大きさの平均は底辺 25.0mm、高さ 47.9mm であり、面積は 622.8mm<sup>2</sup>であった。Bochdalek 三角の内部に胸膜が面積 100mm<sup>2</sup>以上認められるものは鏡視下手術により胸膜の損傷の可能性があるものと考え potential foramen (PF) と定義した。PF の認められたものは、100 体のうち 87 体 (87.0%) であり、その平均面積は 318.9mm<sup>2</sup>であり、第 12 肋骨先端から PF までの距離の平均は 42.3mm であった。Bochdalek 三角が第 12 肋骨遠位端を越えて存在するものは 161 例中 22 例 (13.7%) であり、第 12 肋骨遠位端は含まないが体部を含むものは、139 例 (86.3%) であった。本研究結果より、現在世界的に施行されている第 12 肋骨を指標とする皮切およびトロカールの挿入は 13.7%の頻度で Bochdalek 三角内の PF を損傷する可能性があると考えられる。したがって、PF と第 12 肋骨遠位端の位置関係を把握したうえで操作を行う必要があるものと考えられた。鏡視下手術のうち後腹膜腔での操作は、中腋窩線上で第 12 肋骨遠位端と腸骨の間で皮切を行うことが安全に手術を行うために必要であると考えられた。

以上のように本研究は人体において Bochdalek 三角を解剖学的に解析し、後腹膜腔の鏡視下手術時の合併症である開胸を回避する術式を提唱した点で臨床医学上高く評価されるものと考えられ、審査員一同は本研究が高知大学博士 (医学) に相応しい内容であると判断した。

氏名(本籍)	羽屋戸 佳世(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第53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20年3月24日
学位論文題目	Hypertrophic cardiomyopathy with mild left ventricular remodeling : echocardiographic assessment using left ventricular wall motion score (肥大型心筋症における軽度の左室リモデリング:左室壁運動スコアを用いた検討)
発表誌名	Journal of Cardiology (2008) 51, 95-105

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 羽屋 佳世

## 論文題目

Hypertrophic Cardiomyopathy With Mild Left Ventricular Remodeling :  
Echocardiographic Assessment Using Left Ventricular Wall Motion Score  
(肥大型心筋症における軽度の左室リモデリング：左室壁運動スコアを用いた検討)

(論文要旨)

背景・目的：肥大型心筋症は左室壁の肥厚と正常な左室収縮能・狭小な左室内腔を特徴とする。しかし、一部に左室収縮能低下と左室内腔の拡大（左室リモデリング）を呈する例が存在し、拡張相肥大型心筋症として知られている。拡張相肥大型心筋症は、心不全をはじめ重篤な臨床症状を伴い、心移植や心不全死にいたるなど予後不良であり、その終末像の左室形態・機能は拡張型心筋症に類似すると報告されている。一方で、病理学的には特に心室中隔を中心とした高度の線維化を呈し、拡張型心筋症とは異なるという報告も認められる。しかしながら、典型的な肥大型心筋症から末期拡張相へと左室リモデリングが進展する初期（軽度左室収縮能低下を生じた段階）の特徴についてはこれまでに十分に検討されていない。この時期の特徴を明らかにすることは、末期心不全への進展を予防し肥大型心筋症の予後を改善する上で、臨床的に重要であると考えられる。そこで今回、軽度の左室収縮能低下をともなう肥大型心筋症の特徴を心エコー図所見、特に壁運動異常を詳細に評価して経時的に検討した。

方法：対象は当科における連続 137 例の肥大型心筋症患者のうち、軽度左室収縮能低下（左室駆出率 35-50%）を示した 13 例（年齢  $52 \pm 13$  歳）である。心エコー画像から壁運動を評価し、米国心エコー図学会推奨の左室 16 分画モデルにしたがって、壁運動スコア (wall motion score : WMS) によってスコアリングした。WMS は 1= normal; 2= hypokinetic; 3= akinetic; 4= dyskinetic とし、全 16 分画の WMS の平均を total WMSI (total wall motion score index)、同様に前壁中隔領域 4 分画、後側壁領域 4 分画、心尖部領域 4 分画それぞれの WMS 平均値を septal WMSI, posterior WMSI, apical WMSI として算出した。

結果：① 軽度左室収縮能低下を示す肥大型心筋症患者では、軽度の左室拡大、左房拡大を認めたと心室中隔肥厚は保持されており、中隔と心尖部に限局する左室壁運動異常を認めた(軽度左室リモデリング)(septal WMSI  $1.94 \pm 0.33$  vs. total WMSI  $1.51 \pm 0.25$  and posterior WMSI  $1.02 \pm 0.07$ ;  $p < 0.001$ )。このような中隔および心尖部の壁運動異常は、左室収縮能の保たれた肥大型心筋症連続 50 例ではほとんど認められなかった。②軽度左室リモデリングを呈した 13 例のうち 5 例は、平均  $5.4 \pm 2.3$  年の経過観察中に左室収縮能低下のさらなる進行(左室駆出率  $< 35\%$ )を示した。これらの進行例では非進行例と比べて、最初の心エコーでの肥大が軽度で、壁運動低下の程度が強かった。③ 進行例では左室拡大の進行、広範かつ高度の壁運動異常、中隔の無収縮と壁の菲薄化を示したが、左室収縮能障害が高度になった段階でも、後側壁の壁運動低下は比較的軽度であった (posterior WMSI  $1.80 \pm 0.27$  vs. septal WMSI  $2.95 \pm 0.11$ ;  $p < 0.001$ )。

結論：軽度左室リモデリングを示す肥大型心筋症では、まず心室中隔と心尖部において壁運動が低下していた。左室収縮能障害が進行する過程では、中隔壁厚が減少し壁運動が低下する一方、後側壁の壁運動低下は比較的軽度であった。

考察および展望：軽度左室リモデリングを示す肥大型心筋症の特徴を明らかにすることは、いくつかの臨床的展望を含んでいる。まず、拡張相への移行を初期の段階で診断し、左室リモデリング進行の抑制や心臓死の予防などを目標とした積極的な治療を早い段階で開始することが可能となる。さらに、心移植の適応症例を判断するために、軽度左室収縮能低下症例の中で、特に左室機能低下進行の早い症例を区別することができる可能性がある。また、本研究で観察された拡張相肥大型心筋症の壁運動異常の特徴は、拡張型心筋症とは異なるものであり、現在まで区別が困難であった両者の鑑別診断に有用となることが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	羽屋戸 佳世
審査委員	主査氏名	杉浦 哲朗 
	副査氏名	佐藤 隆幸 
	副査氏名	瀬尾 宏美 

**題 目** Hypertrophic cardiomyopathy with mild left ventricular remodeling : echocardiographic assessment using left ventricular wall motion score  
 (肥大型心筋症における軽度の左室リモデリング：左室壁運動スコアを用いた検討)

**著 者** Kayo Hayato, Makoto Okawa, Yoshihisa Matsumura, Hiroaki Kitaoka, Toru Kubo, Nobuhiko Hitomi, Naohito Yamasaki, Toshikazu Yabe, Takashi Furuno, Jun Takata, Masanori Nishinaga, Yoshinori L Doi

**発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月**  
 Journal of Cardiology 2008(in print)

### 要 旨

#### [背景及び目的]

肥大型心筋症は左室壁の肥厚を認めるが、左室収縮能は正常であるという特徴をもつ。しかし、一部に左室収縮能低下と左室内腔の拡大を呈する症例が存在し、拡張相肥大型心筋症として知られ、その終末像は拡張型心筋症に類似すると報告されている。しかし、肥大型心筋症から末期拡張相へと左室リモデリングが進展する初期の特徴についてはこれまでに十分検討されていない。そこで、申請者らは軽度の左室収縮能低下を伴う肥大型心筋症の特徴を心エコー図所見、特に壁運動異常を詳細に評価して、さらにその変化を経時的に観察した。

#### [方法]

対象は1983年1月から2001年6月までの間に高知大学医学部附属病院を受診した肥大型心筋症連続137例のうち、軽度左室収縮能低下(左室駆出率30-35%)を示した13例

(年齢 62±13 歳)である。心エコー画像から左室径、左房径、左室駆出率および左室壁運動を評価した。左室壁運動は左室を 16 分画に分け、壁運動スコア (wall motion score: WMS) によってスコアリングした (1= normal; 2= hypokinetic; 3= akinetic; 4= dyskinetic)。全 16 分画の WMS の平均を total WMSI (total wall motion score index) と、前壁中隔領域 4 分画、後側壁領域 4 分画、心尖部領域 4 分画それぞれの WMS 平均値を septal、posterior、apical WMSI として算出した。肥大型心筋症患者は 2006 年 12 月まで経過観察 (5.4±2.3 年) され、左室駆出率が 35% 以下に低下した症例 (5 例) を進行群とし、非進行群 (6 例) と比較検討した。また、心エコー図諸標は正常な左室収縮能をもつ肥大型心筋症連続 50 例 (年齢 61±16 歳) とも比較した。

#### [結果]

得られた結果は以下のように要約される。

- 1) 軽度左室収縮能低下を示す肥大型心筋症患者では、中隔と心尖部に限局する左室壁運動異常を認めたが、心室中隔肥厚 (14-25mm) は保持されていた。
- 2) 軽度左室収縮能低下症例のうち経過観察中に左室収縮能低下がさらに悪化した進行群は非進行群に比し、初回心エコーで肥大は軽度で total WMSI が大きかった。
- 3) 進行群では左室拡大の進行、特に心室中隔の無収縮と菲薄化を示したが、左室収縮能障害が高度になった段階でも後側壁の壁運動は比較的保たれていた。

申請者らは肥大型心筋症患者を経時的に観察し、軽度左室収縮能低下を示す肥大型心筋症では、まず心室中隔と心尖部において壁運動が低下していることを示した。さらに、左室機能低下が進行する過程では心室中隔の壁厚が減少し壁運動が低下するが、後側壁の壁運動低下は比較的軽度であることを初めて報告した。また、軽度左室収縮能低下症例の中で、左室機能低下の進行が速い症例を区別することができる可能性を示した。

申請者らの論文は、軽度左室収縮能低下を伴う肥大型心筋症の左室形態異常の進行過程を経時的に観察するとともに、拡張相肥大型心筋症の壁運動異常の特徴は拡張型心筋症とは異なるものであり、現在まで区別が困難であった両者の鑑別に有用な知見を提供するものである。また、肥大型心筋症の初期の左室リモデリングの特徴を明らかにすることは、末期心不全への進展を予防し肥大型心筋症の予後を改善する上で臨床的に重要であると考えられる。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)	弘田 隆省(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第54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20年3月24日
学位論文題目	Morphologic characteristics of hypertrophic cardiomyopathy of the elderly with cardiac myosin-binding protein c gene mutations (心筋ミオシン結合蛋白Cの遺伝子変異を伴う高齢者肥大型心筋症の形態的特徴)
発表誌名	Circulation Journal Vol.70 No.7:(875-879) 2006年7月

審査委員	主査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	笹栗	志朗
	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 弘 田 隆 省

## 論 文 題 目

Morphologic Characteristics of Hypertrophic Cardiomyopathy of the Elderly with Cardiac Myosin-Binding Protein C Gene Mutations

(心筋ミオシン結合蛋白 C の遺伝子変異を伴う高齢者肥大型心筋症の形態的特徴)

(論文要旨)

### (背景)

肥大型心筋症は 500 人に 1 人の頻度で認められるとされる肥大を主体とする心筋疾患であり、その原因遺伝子はカルモドリン蛋白異常に基づく。従来、高齢者の肥大型心筋症は若年者の肥大型心筋症と異なる形態的特徴があると報告されてきた。特に左室の形態については、若年者では左室内腔が中隔のねじれる Crescent 型であるが高齢者ではねじれない Ovoid 型を呈していると報告されている。しかし、それらの報告は遺伝子検査が行われる以前のものであり、高齢者においては肥大型心筋症と診断されているが軽度の高血圧心や加齢による形態変化など成因の異なる不均一な集団で検討された可能性がある。

### (目的)

心筋ミオシン結合蛋白 C の遺伝子異常に基づく肥大型心筋症患者において、高齢者肥大型心筋症の左室形態が従来の報告と同様に若年者と異なるかを明らかにすること。

### (方法)

高知大学医学部附属病院を受診した 109 人の肥大型心筋症患者のうち、左室形態の評価には不相当と考えられる拡張相肥大型心筋症、心尖部肥大型心筋症を除いた 65 人について検討した(遺伝子解析は、本院倫理委員会にて承認されており、すべての患者から文書で同意を得た上で実施している)。肥大型心筋症の診断は心臓超音波検査にて 15mm 以上の肥大が認められ二次性心肥大の可能性が否定されるものとした。心筋ミオシン結合蛋白 C の遺伝子異常の同定された 27 人を若年者群 (65 歳未満) の 19 人と高齢者群 (65 歳以上) の 8 人に分けて検討を行った。

心臓超音波検査は、通常の検査に加えて以下の形態的特徴について検討した。

- ① 左室中隔のねじれている Crescent 型か中隔が平行である Ovoid 型か
- ② 心室中隔基部の左室流出路への突出の有無
- ③ 僧帽弁輪の石灰化の有無
- ④ 右室肥大の有無

#### (結果)

患者背景については、若年者群の平均年齢は 45 歳、高齢者群の平均年齢は 73 歳で性差、NYHA class については両者で差は認めなかった。心電図所見では高齢者群では心房細動が多く、軽度の高血圧の合併症が多く認められた。

高齢者では左房径( $40 \pm 6 \text{mm}$  vs  $49 \pm 10 \text{mm}$   $P=0.008$ )が大きく左室最大壁厚が薄かった( $24 \pm 6$  vs  $18 \pm 2$   $P=0.008$ )

心臓超音波検査の左室の形態は、過去の報告とは異なり高齢者でも Crescent 型を呈していることが多く、両群間で有意差は認めなかった(若年者群 95%, 高齢者群 75% n.s)。

その他の心エコー上の特徴については、左室中隔のねじれや、中隔基部の突出も過去の報告と異なり両群間で差は認めなかった。高齢者では右室肥大が少ない事や僧帽弁輪の石灰化が多いことについては過去の報告と同様であった。

#### (考察)

今回の検討では心筋ミョシ結合蛋白 C の遺伝子変異を認める高齢者の多くでは、高齢者肥大型心筋症の特徴であると過去に報告された Ovoid 型の左室形態は呈さず若年者群と同様の Crescent 型左室形態を呈していた。この事より、過去の高齢者肥大型心筋症の報告はカルロリ遺伝子異常に基づく症例とその他の原因(高血圧など)の影響を受けた症例から成る不均一な集団を観察していた可能性がある。これらの結果より、高齢者の肥大型心筋症で、左室形態が Crescent 型を呈している症例では、カルロリ遺伝子異常の存在を強く疑う所見として有用である可能性がある。

#### (結論)

カルロリ遺伝子変異陽性的高齢者肥大型心筋症の多くは、従来の報告とは異なり若年者と同様の左室の形態的特徴を有していた。この事より、高齢者の肥大型心筋症で Crescent 型の左室形態を示す症例は、カルロリ遺伝子異常に基づく肥大型心筋症を示唆すると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	弘 田 隆 省
審 査 委 員	主 査 氏 名	佐 藤 隆 幸 
	副 査 氏 名	笹 栗 志 朗 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 

題 目 Morphologic characteristics of hypertrophic cardiomyopathy of the elderly with cardiac myosin-binding protein c gene mutations  
(心筋ミオシン結合蛋白Cの遺伝子変異を伴う高齢者肥大型心筋症の形態的特徴)

著 者 Takayoshi Hirota, Hiroaki Kitaoka, Toru Kubo, Makoto Okawa,  
Takashi Furuno, Yoshinori L Doi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Circulation Journal Vol.70 No.7:(875-879) 2006年7月

要 旨

肥大型心筋症は500人に一人の頻度で見られる心筋疾患で、最近では、収縮蛋白に関する遺伝子異常がその原因であると考えられるようになってきた。しかし、これまでの臨床研究では、遺伝子異常の類型毎にどのような臨床像の特徴を呈するかについての検討が十分にはなされていない。

申請者らは、これまでの遺伝子異常にもとづく類型化がなされずに行われた多くの報告において、左室形態が若年患者と高齢患者とで異なる特徴を有する、すなわち若年患者では左室内腔が三日月型であり、高齢患者では卵型である、とされている点に疑問をもった。そこで、遺伝子異常と左室形態の表現型との関連について詳細に検討した。

高知大学医学部附属病院を受診した109名の肥大型心筋症患者のうち、拡張相肥大型心筋症や心尖部肥大型心筋症を除いた65名について患者同意の下、遺伝子解析を行ったところ27名にミッシン結合蛋白C遺伝子にナンセンス変異あるいはミスセンス変異が見られた。これら27名を65歳未満の若年患者群19名と65歳以上の高齢患者群8名に分け、両群間で臨床的背景や超音波検査で評価した心機能および形態所見に差異があるか否かを検討した。

若年患者群に比べ、高齢患者群では、高血圧の合併率が高く、左房径・左室収縮末期径が大きく、肥大化指標が低いという特徴を有していた。しかし、心室中隔の形状は、両群ともに、左室内腔へ突出した形で肥厚していることが多く、左室内腔が三日月型と分類される頻度はともに75%以上で統計学的な有意差を認めなかった。

このような結果から、申請者らは、高齢患者群では、加齢にともなって高血圧などの合併症が増加し、二次的に心臓の形態変化が引き起こされ、左房径・左室収縮末期径の増加を認める可能性があるが、基本的な左室形態異常は、若年患者と同様であると結論付けた。従来の研究報告では、遺伝子異常に関する背景が不均一な集団を対象としていたため、加齢にともなう二次的な左室形態変化が主としてとらえられ、高齢患者において卵型の左室内腔を呈している症例が多く含まれた可能性がある」と推論した。申請者らは、今後さらに、他の収縮蛋白関連遺伝子の変異型について検討することにより、肥大型心筋症における左室形態と遺伝子変異についての類型化できると考察した。

申請者の論文は、肥大型心筋症の遺伝子診断が肥大にともなう左室形態異常をいかに引き起こし、どのような臨床像を呈するかを研究する出発点になり得る重要な知見を提供するものであり、審査員一同は、本論文を、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)	福島 慶(石川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第55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20年3月24日
学位論文題目	Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally induced endolymphatic hydrops (リチウムが内リンパ恒常性と実験的内リンパ水腫に及ぼす影響)
発表誌名	ORL-Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialities 67, 282~288 2005年12月

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	橋本	浩三
	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

福島 慶

## 論文題目 Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally induced endolymphatic hydrops

(リチウムが内リンパ恒常性と実験的内リンパ水腫に及ぼす影響)

(論文要旨)

(はじめに) Aquaporin 2 (AQP2) と vasopressin type 2 receptor (V2-R) の mRNA が蝸牛と内リンパ嚢に発現することは確認されている。さらに、定量 PCR で、arginine vasopressin (AVP) の負荷により、蝸牛、内リンパ嚢の AQP2 mRNA が up-regulate すること、一方、V2-R mRNA は down-regulate することより、内耳に発現する AQP2 と V2-R は何らかの生物学的役割を演じていることが予測される。実際、AVP 負荷は内リンパ水腫をもたらす、V2-antagonist は逆に内リンパ腔虚脱をもたらすことが確認されている。この機序の詳細は不明であるが、内耳の AVP-AQP2 システムが腎臓と同様に作用するとすれば、AVP と V2-R の結合は adenylyl cyclase を活性化し、細胞内に存在する AQP2 の細胞膜への trafficking を促すと同時に AQP2 の生成も促進させ、細胞膜での水の透過性が亢進すると考えられる。他方、V2-antagonist は V2-R に AVP と拮抗的に競合し、adenylyl cyclase の活性化を制限し、その結果、AQP2 の細胞膜での発現を抑制し、水の透過性が制限されると考えられる。この仮説に従うと、AVP と V2-antagonist 負荷による内リンパ腔の水の挙動が理解しやすい。本研究では、さらにこの仮説を検証するため、adenylyl cyclase の阻害剤であるリチウムによる内耳での AQP2 の動態を分子生物学的、組織科学的、及び形態学的に検討した。

(対象と方法) 【実験1】内耳における AQP2 蛋白と mRNA の発現に関して、lithium の影響を免疫組織学的、分子生物学的に検討した。BN ラット 10 匹を対象とし、通常飼料群とリチウム摂取群に分け、4 週間飼育した。各群 1 匹ずつ、蝸牛と内リンパ嚢を採取し AQP2 の発現を免疫組織学的に比較した。また、各群 4 匹ずつ、蝸牛、内リンパ嚢、腎臓の組織を採取し、AQP2 の mRNA の定量 PCR を行い比較した。【実験2】実験的内リンパ水腫動物を作成し、リチウムによる内リンパ腔の体積変化を形態学的に評価した。実験的内リンパ水腫を作成したモルモット 30 匹を対象とした。すべての動物の左側内リンパ嚢を閉塞後 4 週間通常飼料で飼育した後、さらに通常飼料で 4 週間飼育したコントロール群、6mmol/kg の LiCl 含有飼料で 4 週間飼育した 6mmol/kg 摂取群、60mmol/kg の LiCl 含有飼料で 4 週間飼育した 60mmol/kg 摂取群の 3 群に 10 匹ずつ分割した。その 3 群間で内リンパ腔の面積とライスネル膜長をコンピューターシステムで計測し、比較検討した。

(結果) 実験1の免疫組織学的、分子生物学的では、リチウムは蝸牛、内リンパ嚢での免疫反応を減少させ、また、定量 PCR にてリチウムは蝸牛、内リンパ嚢における AQP2 の mRNA の発現を減少させた。実験2の形態学的実験では、リチウム摂取にて容量依存性に内リンパ水腫を減少させた。

(結論) この実験により、内リンパの恒常性が部分的に AVP-AQP2 システムで制御されており、リチウムが内耳において腎臓と同様に VP-AQP2 システムを阻害し、結果的に内リンパの産生が低下し、内リンパ水腫が軽減したと考えられる。リチウムは、過去にメニエール病の治療薬として用いられ、有効であるとの評価を得られたことがあるが、本実験結果はこの事実を側面より支持する。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名
審 査 委 員	福 島 慶
	主 査 氏 名      椛      秀 人 
	副 査 氏 名      橋 本 浩 三 
	副 査 氏 名      執 印 太 郎 

題 目    Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally induced endolymphatic hydrops  
(リチウムが内リンパ恒常性と実験的内リンパ水腫に及ぼす影響)

著 者    K.Fukushima, T.Takeda, A.Kakigi, S.Takeda, S.Sawada, R.Nishioka, H.Azuma, T.Taguchi

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    ), 年    月  
 ORL-Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialities  
 67, 282~288    2005年12月

### 要 旨

内耳は、骨性の複雑な形の腔である骨迷路とその中にある膜性の膜迷路からなり、音とバランスの情報を脳へ送る。骨迷路と膜迷路の間は、一般の体液によく似たイオン組成を持つ外リンパ液で満たされ、膜迷路の内部は、高  $K^+$ 、低  $Na^+$ 、低  $Ca^{2+}$  濃度を基本とする内リンパ液で満たされている。内耳が正常な機能を営むには、これらの液成分の水・電解質代謝を通しての恒常性維持が必要不可欠である。メニエル病の本態である内リンパ水腫は、これらの恒常性維持機構の破綻、特に水代謝の破綻によって惹起されることが推測されている。近年、水チャネルであるアクアポリン (AQP) の発見により内耳水代謝機構の理解が飛躍的に進んだ。特に注目すべきは、バゾプレッシンによって制御される AQP2 が内耳に発現し、水腫形成に重要な役割を演じていることが判明したことである。

申請者は、内耳のバゾプレッシン-AQP2系が腎臓と同様に作用するとすれば、バゾプレッシンはバゾプレッシン受容体  $V2-R$  を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、その結果、AQP2の産生と細胞膜への移動を促し、細胞膜での水の透過性を高めるはずだと考えた。この作業仮説を検証するために、アデニル酸シクラーゼの阻害剤である

リチウムを動物に摂取させ、内耳での AQP2 タンパクと AQP2 mRNA の発現、ならびに内リンパ水腫に対する影響を検討した。

具体的には、実験 1 でラットを通常飼料群と 60 mmol/kg の LiCl 含有飼料摂取群に分け、4 週間飼育したのち、蝸牛と内リンパ嚢の AQP2 タンパクの発現を免疫組織化学的方法により、蝸牛と内リンパ嚢、腎臓の AQP2 mRNA の発現量を定量 PCR 法により比較した。実験 2 では、モルモットにおいて内リンパ嚢の電気焼灼により実験的内リンパ水腫を作成し、通常飼料群と 6 mmol/kg の LiCl 含有飼料摂取群、60 mmol/kg の LiCl 含有飼料摂取群の 3 群に分け、4 週間飼育したのち、内リンパ腔の面積とライスネル膜長を計測し、比較検討した。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) AQP2 タンパクは蝸牛血管条の基底外側部と内リンパ嚢の上皮層に強く発現していた。この AQP2 タンパクの発現はリチウム処置ラットにおいて明らかに減少していた。蝸牛と内リンパ嚢、腎臓の AQP2 mRNA の発現量もまた、リチウム処置ラットにおいて有意に減少していた。
- 2) ライスネル膜長の増加率を横軸に、内リンパ腔の面積の増加率を縦軸にとり、プロットした散布図から、これらの 2 つの変数の間に正の相関関係があり、かつ回帰直線はリチウムの濃度に依存して有意に下方に移動していることが判明した。この結果は、リチウム処置により内リンパ水腫が有意に軽減したことを示している。

以上の成績は、バゾプレッシン- AQP2 系が内リンパの恒常性維持機構に重要な役割を演じていることを新たな側面から支持するとともに、リチウムが内耳において腎臓と同様にバゾプレッシン- AQP2 系を阻害することにより、内リンパ産生を低下させ、内リンパ水腫を軽減させることを示唆している。リチウムは、メニエル病の治療薬として有効であるとの評価が得られたことがあるが、Thomsen らの否定的な見解以来、忘れ去られていた。今回の成績はリチウムの有効性を支持するものと解釈される。

以上より、申請者の論文は、内耳液の恒常性維持機構の解明のみならず、メニエル病の病態解明や治療法の開発、予防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。

氏名(本籍)	Sachiko Noemy Yagi Chaves (コスタリカ)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第56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20年3月24日
学位論文題目	Effect of five triterpenoid compounds isolated from root bark of <i>Aralia elata</i> on stimulus-induced superoxide generation, tyrosyl or serine/threonine phosphorylation and translocation of p47 <sup>phox</sup> , p67 <sup>phox</sup> , and <i>rac</i> to cell membrane in human neutrophils ( <i>Aralia elata</i> の根から単離した5種類の triterpenoids の人好中球の活性酸素産生に対する作用とその作用機構:蛋白質の tyrosine 及び serine/threonine のリン酸化と p47 <sup>phox</sup> , p67 <sup>phox</sup> と <i>rac</i> の膜への移行)
発表誌名	Archives of Biochemistry and Biophysics 446(1):84-90 2006年2月

審査委員	主査	教授	西岡	豊
	副査	教授	横谷	邦彦
	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

Sachiko Noemy Yagi Chaves

論文題目

Effect of five triterpenoid compounds isolated from root bark of *Aralia elata* on stimulus-induced superoxide generation, tyrosyl or serine/threonine phosphorylation and translocation of p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, and *rac* to cell membrane in human neutrophils

(論文要旨)

(*Aralia elata* の根から単離した 5 種類の triterpenoids の人好中球の活性酸素産生に対する作用とその作用機構：蛋白質の tyrosine 及び serine/threonine のリン酸化と p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と *rac* の膜への移行)

背景・目的：*Aralia elata* の根は古くから中国、韓国や日本で糖尿病、Rheumatoid Arthritis、腹痛などの治療に漢方薬として使われてきた。根から単離された化合物の中で triterpenoid saponins の作用との関連性がもっとも大きいことが明らかとなっている。これらは高脂血症、高コレステロール血症、活性酸素産生の抑制に働くことが rat の研究でも明らかになっている。Respiratory burst というプロセスでは多くの活性酸素が産生される。好中球に存在する NADPH oxidase (multi-component enzyme) はこのプロセスに欠かせない酵素である。この酵素は細胞質成分である p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, *rac* と細胞膜成分の p22<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup> から成り立ち、細胞が刺激されると p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> は *rac* と共に好中球細胞膜へ移行すると言われている。われわれはこれまで *Aralia elata* の様々な triterpenoids が活性酸素産生に及ぼす影響を研究してきた。しかし *Aralia elata* の triterpenoids が p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と *rac* の細胞膜への移行、そして好中球蛋白質の tyrosine 及び serine/threonine のリン酸化に及ぼす影響については研究されていなかった。今回の研究では *Aralia elata* から単離した 5 つの triterpenoids (Congmuyanoside V, X, XI, XII と XV) の活性酸素産生に対する作用とその作用機構 (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と *rac* の細胞膜への移行、そして蛋白質の tyrosine 及び serine/threonine のリン酸化に及ぼす影響) について研究を行った。

方法：刺激剤として fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), アラキドン酸を用いて人好中球を刺激し 5 つの triterpenoids の好中球の活性酸素産生への影響を二波長分光光度計 (shimadzu UV-3000) を用いて測定した。fMLP, PMA, アラキドン酸で刺激を加えた時に起こる p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と *rac* の好中球細胞膜への移行、各 triterpenoid の異なる濃度 (0, 10, 20, 30, 50 μM) で刺激を加えた時の反応その他 fMLP で刺激した人好中球、蛋白質の tyrosyl phosphorylation に対する

triterpenoidsの影響をWestern Blottingで調べた。

結果・結論：fMLPで刺激を行ったとき triterpenoid は濃度依存性に活性酸素産生を抑制した。その作用は化合物によって異なり Cong.V> Cong.X> Cong.XII> Cong.XI> Cong.XV の順で抑制が強かった。アラキドン酸で刺激を行った時には Cong.V, XII と XV のみが活性酸素産生を抑制した。PMAによる刺激に対しては triterpenoid の影響には大きい変化は認めなかった。fMLPで刺激を行った人好中球の蛋白質の tyrosine 及び serine/threonine のリン酸化を調べたところ、96.1 k Da と 79.9 k Da の蛋白質のリン酸化が濃度依存性に各 triterpenoid で抑制され、p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と *rac* の膜への移行も濃度依存性に抑制された。われわれの研究でこれらの triterpenoids は主に人好中球蛋白質の tyrosine 及び serine/threonine のリン酸化を経て、p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と *rac* の膜への移行を抑制することで活性酸素産生を抑制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	Sachiko Noemy Yagi Chaves
審 査 委 員	主 査 氏 名	西 岡 豊 
	副 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	大 西 三 朗 

題 目 Effect of five triterpenoid compounds isolated from root bark of *Aralia elata* on stimulus- induced superoxide generation, tyrosyl or serine/threonine phosphorylation and translocation of p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, and *rac* to cell membrane in human neutrophils  
(*Aralia elata* の根から単離した5種類の triterpenoids の人好中球の活性酸素 産生に対する作用とその作用機構：蛋白質の tyrosine 及び serine/threonine の リン酸化と p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> と *rac* の膜への移行)

著 者 Sachiko N. Yagi-Chaves, Gang Liu, Koichi Yamashita, Masanobu Manabe, Shao-Jiang Song, Hiroyuki Kodama

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Archives of Biochemistry and Biophysics 446(1):84-90 2006年2月

### 要 旨

*Aralia elata* (タラノキ) は、ウコギ科の落葉低木で、全国の山野に自生している。幹には棘があり、葉は大型で互生し、花は8月頃、幹の先に円錐花序の多数の白い小花をつける。若芽(タラノメ)は、食用に供され、糖尿病の予防効果があることが知られている。根皮や樹皮についても、中医学において糖尿病に有効とされ、その抽出エキスはラットを使った実験でブドウ糖の吸収を阻害し、食後の急激な血糖値の上昇を抑制する効果があると報告されている。根皮から抽出し、単離した化合物の中に triterpenoid saponins の作用を持った elatosaide G、H、I、J と K 等が知られている。これらの化合物は、糖尿病、高脂血症や高コレステロール血症の治療に有効であり、活性酸素産生抑制作用があることが報告されている。

生体内には積極的に ROS(reactive oxygen species)を生成する機構があり、NADPH oxidase はその一つである。好中球に存在する NADPH oxidase は、微生物などの侵入に際して活性化し、生成された ROS は侵入者に対して殺菌的に作用する。NADPH oxidase は

細胞質成分である p40<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、rac と細胞膜成分の p22<sup>phox</sup>、gp91<sup>phox</sup> から成りたち、細胞が刺激されると p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> は rac と共に好中球細胞膜へ移行すると言われている。

申請者は、*Aralia elata* の根から抽出して単離した triterpenoids (Congmuyanoside V、X、XI、XII と XV) の活性酸素産生に対する作用と p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> と rac の細胞膜への移行および蛋白質の tyrosine と serine/threonine のリン酸化に及ぼす影響について検討した。

fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) およびアラキドン酸を用いてヒト好中球を刺激し、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生に対する 5 種類の triterpenoids の影響を二波長分光光度計にて測定した。また、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生に関する作用機構を検討するため、fMLP、PMA およびアラキドン酸による刺激時に起こる細胞質成分 p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> と rac の細胞膜への移行、およびヒト好中球蛋白質の tyrosyl phosphorylation に対する triterpenoids の影響を Western Blotting 法にて検討した。

fMLP で刺激したとき triterpenoid は、濃度依存的に O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を抑制した。その抑制効果は、化合物により異なり、Cong V > Cong X > Cong XII > Cong XI > Cong XV の順であった。アラキドン酸で刺激したとき Cong V、Cong XII と Cong XV は O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を抑制した。PMA で刺激したとき triterpenoid の影響に有意の差は、認められなかった。また、fMLP で刺激したとき、蛋白質の 96.1KDa と 79.9KDa の tyrosine のリン酸化が認められた。しかし、serine/threonine のリン酸化は認められなかった。このことから蛋白質のリン酸化には、tyrosine kinase の関与が明らかであり、tyrosine のリン酸化は全ての triterpenoids により濃度依存的に抑制された。これらの結果は、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生抑制作用とよく一致していた。抗酸化作用を検討したところ、Cong V、Cong XI と Cong XII はヒドロキシラジカルによる脂質過酸化を抑制したが、PMS-NADH 法、DPPH ラジカル消去法ではどの化合物も抗酸化作用が認められなかった。

申請者らの研究で、*Aralia elata* の根から抽出して単離した 5 種類の triterpenoids は、抗酸化作用よりもヒト好中球タンパク質の tyrosine のリン酸化を経て、p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> と rac の膜への移行を抑制することで、O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生を抑制することが主要な薬理活性であることが明らかになった。そして、これら研究の進展により、*Aralia elata* の根から抽出して単離した triterpenoids は、関節リウマチをはじめ花粉症、自己免疫疾患など活性酸素が発症と進展に大きくかかわっている疾患への臨床応用が可能であることを示唆するものと推察する。

氏名(本籍)	稲田 昌二郎(山口県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第57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20年3月24日
学位論文題目	Glucose enhances protein tyrosine phosphatase 1B gene transcription in hepatocytes (グルコースは肝細胞においてプロテインチロシンフォスファターゼ1B遺伝子の転写を促進する)
発表誌名	Molecular and Cellular Endocrinology 271(1~2):64~70 2007年6月

<b>審査委員</b>	主査	教授	本家	孝一
	副査	教授	大西	三朗
	副査	教授	麻生	悌二郎

## 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 稲田 昌二郎

## 論文題目

Glucose Enhances Protein Tyrosine Phosphatase 1B Gene Transcription in Hepatocytes.

(グルコースは肝細胞においてプロテインチロシンフォスファターゼ 1B 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、インスリン受容体や受容体基質のリン酸化チロシンを脱リン酸化することによりインスリン作用を負に制御しているプロテインチロシンフォスファターゼ1B (PTP1B) に着目し、グルコースが本遺伝子の転写や発現に及ぼす影響を検討した。

【方法】PTP1B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Huh7細胞に発現させてレポーター遺伝子アッセイを行った。まず、グルコースがPTP1B遺伝子転写活性に及ぼす濃度・時間依存的な影響を検討し、PTP1B mRNA発現量をリアルタイムPCRで評価した。次に、同遺伝子上流の転写因子Sp1結合配列の関与を明らかにするために、Sp1発現ベクターの共発現やSp1結合阻害剤の影響を検討した。また、グルコースの作用に関与する領域を同定する為、本遺伝子5'上流側から順次欠失させたDNA配列を用い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)。さらに、プロテインキナーゼC (PKC) の関与を、その阻害/活性化剤を用いて検討した。

【結果】グルコースは、25mMまで濃度依存性に、24時間後まで時間依存性にPTP1Bプロモーター活性を上昇させたが、代謝活性の無い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、PTP1B mRNA発現も有意に増加させた。Sp1の共発現は、PTP1B転写活性を亢進させ、Sp1のDNAへの結合を阻害するmithramycinは、高濃度グルコースによる転写活性化を完全に抑制した。deletion analysisでは、-1913 bpから-183 bpまでPTP1Bの高濃度グルコースへの応答性はほぼ同程度であったが、2つのSp1結合配列を欠く-74 bpフラグメントでは転写活性は著しく低下し、高濃度グルコースに対する応答性もほぼ消失した。phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によるPKCの活性化は、転写活性を著明に上昇させ、PKC阻害剤であるbisindolylmaleimideやRo-31-8220は、高濃度グルコースによる転写活性化を有意に抑制した。また、PMAによる転写活性化も、mithramycinにより消失した。

【考察】 Huh7細胞において、高濃度グルコースがPTP1B遺伝子の転写や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、セリン/スレオニンキナーゼであるPKCによる転写因子Sp1の活性化とPTP1B遺伝子上流域のSp1配列への結合が重要であることを示した。

肝におけるPTP1Bの発現増強は、インスリンによるグリコーゲン分解や糖新生の抑制作用を減弱させ、glucose toxicityの一因となる可能性が高い。本研究で得られた結果より、PTP1BあるいはPKCに対する選択的阻害薬が、肝におけるglucose toxicityの軽減に有効な治療法となり得る可能性が考えられる。今後、これらの機序をさらに明確にし、臨床応用に繋げたい。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	稲田 昌二郎
審査委員	主査氏名	本家 孝一 
	副査氏名	大西 三朗 
	副査氏名	麻生 悌二郎 

**題 目**    Glucose enhances protein tyrosine phosphatase 1B gene transcription in hepatocytes  
 (グルコースは肝細胞においてプロテインチロシンフォスファターゼ1B遺伝子の転写を促進する)

**著 者**    Shojiro Inada, Yukio Ikeda, Tadashi Suehiro, Hiroshi Takata, Fumiaki Osaki, Kaoru Arie, Yoshitaka Kumon, Kozo Hashimoto

**発表誌名、巻(号)、ページ(～)、年 月**  
 Molecular and Cellular Endocrinology 271(1~2):64~70 2007年6月

### 要 旨

#### 【背景・目的】

2型糖尿病における高血糖は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性の結果であるばかりでなく、それらの原因ともなり glucose toxicity と呼ばれるが、この分子機序は複雑で不明な点が多い。プロテインチロシンフォスファターゼ1B (PTP1B) は、インスリン受容体や IRS のリン酸化チロシンを脱リン酸化することにより、インスリン作用を負に制御する。肝臓における PTP1B の発現増強は、インスリンによるグリコーゲン分解や糖新生の抑制作用を減弱させ、glucose toxicity の一因となる可能性が考えられる。そこで、本論文は、ヒト肝細胞培養株において、高濃度グルコースが PTP1B 遺伝子の転写と発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

PTP1B 遺伝子上流域配列 (-1913/+22 bp) をルシフェラーゼ遺伝子に繋いだレポーター遺伝子を作成し、ヒト肝癌由来 Huh7 細胞に発現させてプロモーターアッセイを行った。PTP1B mRNA 発現量の変化をリアルタイム PCR で解析した。PTP1B 遺伝子転写への Sp1

の関与を明らかにするために、Sp1 発現ベクターの共発現や Sp1 結合阻害剤の影響を検討した。PTP1B 遺伝子上流域配列の 5'上流側から順次欠失させた DNA 断片をレポーター遺伝子として、グルコース応答領域を調べた。プロテインキナーゼ C (PKC) の関与を阻害剤と賦活剤を用いて検討した。

#### 【結果・考察】

グルコースは、5 mM から 20 mM の範囲で濃度依存性に、24 時間まで時間依存性に PTP1B 遺伝子プロモーター活性を上昇させたが、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。高濃度グルコースは、PTP1B mRNA 発現を有意に増加させた。Sp1 を強制発現させると PTP1B 転写活性は促進し、Sp1 の DNA への結合を阻害する mithramycin は、高濃度グルコースによる転写促進作用を抑制した。deletion analysis において、Sp1 結合配列 3 箇所のうち 2 箇所を欠く -74/+22 bp 断片は、転写活性が著しく低下し、高濃度グルコースに対する応答性も消失した。phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) による PKC の活性化は、転写活性を 2-2.5 倍に上昇させ、PKC 阻害剤である bisindolylmaleimide や Ro-31-8220 は、高濃度グルコースによる転写促進作用を有意に抑制した。また、PMA による転写促進作用は、mithramycin により抑制された。

以上より、ヒト肝細胞培養株において、高濃度グルコースが PTP1B 遺伝子の転写を促進して発現を高めることが示された。この転写促進機序として、細胞内に取り込まれたグルコースからジアシルグリセロールが生成され、PKC を活性化し、PKC により活性化された Sp1 が、PTP1B 遺伝子プロモーター領域へ結合することにより転写が促進されると示唆された。

本論文は、PTP1B あるいは PKC に対する選択的阻害薬が、肝臓における glucose toxicity の軽減に有効な治療法となり得る可能性を提示した。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)	島崎 修行 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第58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20年3月24日
学位論文題目	The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness (ヒト膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の分布様式は癌の間質浸潤に反映される)
発表誌名	Histology and Histopathology 21(4):349-353 2006年4月

審査委員	主査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	橋本	良明
	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 島崎 修行

## 論文題目

The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness  
(ヒト膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の分布様式は癌の間質浸潤に反映される。)

(論文要旨)

今日まで口腔、咽頭、喉頭、乳腺、膵臓、肝臓、大腸を含むいくつかの臓器新生物の間質において、筋線維芽細胞の存在が証明されてきた。概して間質へ癌が浸潤している臓器の多くは多数の筋線維芽細胞の分布が観察されたが、間質への非浸潤癌の場合でも筋線維芽細胞は観察されている。当論文において、我々はヒト膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の分布、特性について、調査、検討を行った。対象は2000年から2004年までに高知大学医学部附属病院とその関連病院で手術（膀胱全摘出術あるいは経尿道的膀胱腫瘍切除術）が行われた膀胱癌症例25例（尿路上皮癌が21例、移行上皮癌と腺癌の混合癌が2例、肉腫様扁平上皮癌が1例、移行上皮癌と扁平上皮癌の混合癌が1例）で、方法は免疫組織化学、電子顕微鏡、免疫電子顕微鏡などの技法を使って、筋線維芽細胞の分布を評価した。結果は尿路上皮癌21例のうち、浸潤癌は4例、非浸潤癌は17例、尿路上皮癌と腺癌の混合癌2例のうち、浸潤癌、非浸潤癌はそれぞれ1例ずつ、肉腫様扁平上皮癌1例と尿路上皮癌と扁平上皮癌の混合癌1例はそれぞれ浸潤癌であった。免疫染色ではいずれの膀胱癌症例にも膀胱壁間質に筋線維芽細胞の分布が認められ、その分布様式は浸潤癌6例のうち、6例とも束状で、非浸潤癌19例のうち1例は束状、18例は網状であり、癌の間質浸潤の有無と筋線維芽細胞の分布様式との関係には統計学的に有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた。さらに電子顕微鏡、免疫電子顕微鏡によって、膀胱癌周囲の筋線維芽細胞の増生を確認した。膀胱癌の間質細胞の構成要素を観察した際認められる紡錘細胞は、長い間線維芽細胞とみなされてきた。我々の知る限り、ヒト膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の存在を描写した論文は今日までに発表されていない。我々は当研究において、ヒト膀胱癌の間質反応として筋線維芽細胞が出現することを初めて証明した。Chauhanらの報告では、非浸潤性乳癌において、癌細胞の核異型度と間質に分布する筋線維芽細胞の数に相関関係があった記述されている。我々の研究では膀胱癌症例数が少なく、癌細胞の核異型度と筋線維芽細胞数の相関関係を証明するは困難であった。しかし癌細胞の間質浸潤の有無と筋線維芽細胞の分布様式には相関関係が認められ、癌細胞の浸潤による筋線維芽細胞の増生促進あるいは間質細胞の圧縮が予想された。生検だけでも筋線維芽細胞の分布様式を評価することは、膀胱癌の間質浸潤の有無を判断するのに有用であるかもしれない。結論としては、ヒト膀胱癌の間質に

癌の間質浸潤に関わらず、筋線維芽細胞の分布が認められ、その分布様式は非浸潤癌と浸潤癌とでは相違があり、主に非浸潤癌では網状、浸潤癌では束状の分布様式であった。膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の分布様式を確認することは、癌の間質浸潤を判断する上で重要な情報を与えるかもしれない。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	島 崎 修 行
審 査 委 員	主 査 氏 名	降 幡 睦 夫 
	副 査 氏 名	橋 本 良 明 
	副 査 氏 名	花 崎 和 弘 

題 目 The distribution pattern of myofibroblasts in the stroma of human bladder carcinoma depends on their invasiveness  
(ヒト膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の分布様式は癌の間質浸潤に反映される)

著 者 N. Shimasaki, N. Kuroda, E. Miyazaki, Y. Hayashi, M. Toi, M. Hiroi, H. Enzan, T. Shuin

発表誌名、巻(号)、ページ( ～ ), 年 月  
Histology and Histopathology 21(4):349-353 2006年4月

### 要 旨

#### <背景・目的>

今日まで、口腔、咽頭、喉頭、乳腺、膵臓、肝臓、大腸などを含むいくつかの臓器新生物の間質において、筋線維芽細胞の存在および腫瘍動態との関連が報告されてきた。概して、間質へ癌が浸潤している臓器の多くは、多数の筋線維芽細胞の分布が癌巣部に観察されたが、非浸潤癌の場合でも筋線維芽細胞は観察されている。当論文は、ヒト膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の分布、特性について組織学的に検討し、筋線維芽細胞と癌細胞の浸潤動態との関連を明らかにすることを目的とした。

#### <材料と方法>

対象は、2000年から2004年までに高知大学医学部附属病院とその関連病院で手術(膀胱全摘出術あるいは経尿道的膀胱腫瘍切除術)が行われた膀胱癌症例25例(尿路上皮癌:21例、尿路上皮癌と腺癌の混合癌:2例、肉腫様扁平上皮癌:1例、尿路上皮癌と扁平上皮癌の混合癌:1例)である。方法は、病理組織学的に診断した上記症例に対して免疫組織化学染色を施行し、抗 $\alpha$ -smooth muscle

actin 抗体陽性で、抗 h-caldesmon 抗体陰性となる間質細胞を筋線維芽細胞と同定し、これらの腫瘍間質での分布を評価した。さらに電子顕微鏡、免疫電子顕微鏡などの技法を使って、筋線維芽細胞の微細構造を観察した。

#### <結果・考察>

尿路上皮癌 21 例のうち、浸潤癌は 3 例、非浸潤癌は 18 例、尿路上皮癌と腺癌の混合癌 2 例のうち、浸潤癌、非浸潤癌はそれぞれ 1 例ずつ、肉腫様扁平上皮癌 1 例と尿路上皮癌と扁平上皮癌の混合癌 1 例はそれぞれ浸潤癌であった。免疫染色では、いずれの膀胱癌症例にも膀胱壁間質に筋線維芽細胞の分布が認められ、その分布様式は浸潤癌 6 例いずれも束状で、非浸潤癌 19 例のうち 1 例は束状、18 例は網状であり、これら癌の間質浸潤の有無と筋線維芽細胞の分布様式との関係には統計学的有意差 ( $p<0.01$ ) を認めた。さらに電子顕微鏡、免疫電子顕微鏡によって微細構造を観察することで、膀胱癌周囲に増生しているこれら細胞に筋線維芽細胞としての特徴を認めることができた。

膀胱癌の間質細胞の構成要素を観察した際認められる紡錘細胞は、長い間線維芽細胞とみなされてきた。ヒト膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の存在を、癌浸潤形態との関連に於いて描写した論文は今日までに発表されておらず、今回ヒト膀胱癌の間質反応として筋線維芽細胞が出現することを初めて証明することができた。Chauhan らの報告では、非浸潤性乳癌において、癌細胞の核異型度と間質に分布する筋線維芽細胞の数に相関関係があったと記述されている。今回の研究では膀胱癌症例数が少なく、癌細胞の核異型度と筋線維芽細胞数の相関関係を証明するのは困難であった。しかし癌細胞の間質浸潤の有無と筋線維芽細胞の分布様式には相関関係が認められ、癌細胞浸潤により、筋線維芽細胞の増生及び分布状況が影響をうけることが示された。更には、このように筋線維芽細胞の分布様式を評価することで、手術材料のみならず、生検材料に於いても、膀胱癌の間質浸潤の有無を判断することの可能性を示唆できた。

以上のように、ヒト膀胱癌の間質には癌の間質浸潤に関わらず、筋線維芽細胞の分布が認められ、その分布様式は非浸潤癌と浸潤癌とでは相違があり、主に非浸潤癌では網状、浸潤癌では束状の分布様式であった。膀胱癌の間質における筋線維芽細胞の分布様式を確認することは、癌の間質浸潤を判断する上で重要な情報を与えうる可能性が示唆された。

本論文は、膀胱癌の浸潤における筋線維芽細胞の分布を組織学的に評価したもので、癌浸潤における間質反応機序の一端を明らかにし、癌浸潤の有無を判定する為の病理診断へ貢献できる可能性を示した。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)	中島 英貴(高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第59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20年3月24日
学位論文題目	Low-density lipoprotein is oxidized by phospholipase A <sub>2</sub> and lipoygenase in xanthoma lesions (低比重リポ蛋白は黄色腫病変部のフォスホリパーゼA <sub>2</sub> とリポキシゲナーゼにより酸化される)
発表誌名	European Journal of Lipid Science and Technology 109(11):1053-1059 2007年11月

審査委員	主査	教授	横谷 邦彦
	副査	教授	橋本 浩三
	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 中島英貴

## 論文題目

Low-density lipoprotein is oxidized by phospholipase A<sub>2</sub> and lipoxygenase in xanthoma lesions

(低比重リポ蛋白は黄色腫病変部のフォスホリパーゼ A<sub>2</sub> とリポキシゲナーゼにより酸化される)

(論文要旨)

### <目的>

ウサギ黄色腫組織により酸化された LDL は、ヒト黄色腫病変における LDL の酸化モデルであり、銅イオンにより酸化された LDL とは機能的に異なっていることが分かっている。本研究は、酵素阻害剤と抗酸化剤を用いて、ウサギ黄色腫組織により修飾した LDL と銅イオンによる酸化 LDL への影響を検討し、生体内における LDL の酸化機構を考察する。

### <方法>

#### 1. ウサギ黄色腫組織により酸化的修飾を受けた LDL の作成

食餌性高コレステロール血症ウサギ背部に高分子デキストラン硫酸溶液を皮内注射することによって実験的黄色腫を作成した。健常ヒト空腹時血漿より超遠沈分離（比重 1.019-1.063）した LDL を、実験的黄色腫組織とともに孵置した後に、LDL を超遠沈法にて再抽出し、黄色腫病変に漏出して修飾を受けた LDL (xanthoma tissue-modified LDL; x-LDL) のモデルとした。

#### 2. 銅イオンによる酸化 LDL の作成

健常ヒト空腹時血漿より超遠沈分離（比重 1.019-1.063）した LDL を、5 μM 硫酸銅とともに孵置し、銅イオンのレドックス反応により酸化された LDL (copper ions-oxidized LDL; Cu-LDL) とした。

#### 3. 酵素阻害剤と抗酸化剤による LDL の酸化抑制

リポキシゲナーゼ阻害剤として nordihydroguaiaretic acid (NDGA)、フォスホリパーゼ A<sub>2</sub> 阻害剤として 2,4-dibromoacetophenone (DBAP)、シクロオキシゲナーゼ阻害剤として acetylsalicylic acid (ASA)、活性酸素抑制剤として superoxide dismutase (SOD)、フリーラジカル抑制剤として butylated hydroxytoluen (BHT) を 1 と 2 の過程に加えて、酸化反応を抑制した。

#### 4. チオバルビタール酸反応物質 (thiobarbituric acid-reactive substances; TBARS) の測定

1、2 と 3 で得られた LDL 溶液とチオバルビタール酸を反応させ、発色反応を測定し、LDL 中の酸化物質の定量をした。

## 5. アガロース電気泳動

1、2と3で得られた LDL を電気泳動させ、リポ蛋白の陰性荷電の状態を測定した。

## 6. 分光光度計による吸光度のパターン分析

1、2と3で得られた LDL を 200-250nm の波長でスキャンし、吸光度パターンを比較して 240nm での吸光度の上昇が示すジエン共結合を持つ過酸化物質の存在を検討した。

### <結果および考察>

抗酸化剤は x-LDL と Cu-LDL 両者の TBARS 値を抑制した。酵素阻害剤は x-LDL の TBARS 値を抑制したが、Cu-LDL では抑制しなかった。

フォスホリパーゼ A<sub>2</sub> 阻害剤が、x-LDL の陽極への移動を最も抑制し、リポキシゲナーゼ阻害剤がそれに次ぐ抑制を示した。シクロオキシゲナーゼ阻害剤は、x-LDL の電気泳動度を抑制しなかった。抗酸化剤のみが Cu-LDL の電気泳動度を抑制した。

分光光度計によるパターン分析では、240nm での吸光度の上昇は Cu-LDL のみに認められた。

これらの結果から、x-LDL は細胞からのフォスホリパーゼ A<sub>2</sub> により最初に修飾され、その後生じた不飽和脂肪酸がフリーラジカルによる酸化反応を促進すると考えられる。それに対して Cu-LDL は、非酵素的に生じる活性酸素やフリーラジカルにより酸化されると考えられる。また、x-LDL においては、Cu-LDL でみられるジエン共結合を持つ過酸化物質は、生成されていないと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	中 島 英 貴
審 査 委 員	主 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	橋 本 浩 三 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 

題 目 Low-density lipoprotein is oxidized by phospholipase A<sub>2</sub> and lipoxygenase in xanthoma lesions  
(低比重リポ蛋白は黄色腫病変部のフォスホリパーゼA<sub>2</sub>とリポキシゲナーゼにより酸化される)

著 者 Hideki Nakajima, Mitsunori Ikeda, Yasuhiko Hirata, Masaaki Matsumoto, Masahiro Seike, Hajime Kodama

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
European Journal of Lipid Science and Technology 109(11):1053-1059  
2007年11月

### 要 旨

黄色腫は低比重リポ蛋白(LDL)を大量に貪食したマクロファージの浸潤による隆起性皮膚病変であり、その発生機序は動脈硬化性病変のそれに類似している。マクロファージに取り込まれたLDLは酸化され、さらに酸化LDLは各種細胞を刺激してサイトカインを産生し、単球等を遊走させる。しかし、その酸化機序の詳細はなお明らかではない。従来から銅イオンにより酸化されたLDLが研究対象として用いられてきたが、黄色腫組織により修飾されたLDLは、銅イオンによる酸化LDLとは性格が異なるとされている。そこで申請者はヒト黄色腫のモデルとしてウサギ黄色腫を用い、黄色腫組織によるLDL修飾と銅イオンによるLDL酸化に対する各種酵素阻害薬及び抗酸化薬等の影響を解析し、生体におけるLDLの酸化機構を考察した。

ウサギ黄色腫は、食餌性高コレステロール血症ウサギの背部に高分子デキス

トラン硫酸溶液を皮内注射して作成した。ウサギ黄色腫組織と共に健常ヒト空腹時血漿より超遠心分離した LDL を 37°C にて 24 時間孵置した後に、LDL を再抽出して黄色腫病変により修飾を受けた LDL (x-LDL) とした。一方、銅イオンによる酸化 LDL は、健常ヒト空腹時血漿より分離した LDL を 5  $\mu$ M 硫酸銅とともに同様に孵置して作成した (Cu-LDL)。

はじめに、x-LDL および Cu-LDL 酸化への、各種酵素阻害薬 (リポキシゲナーゼ阻害薬、フォスホオリパーゼ A<sub>2</sub> 阻害薬、シクロオキシゲナーゼ阻害薬)、さらに、活性酸素スカベンジャー、フリーラジカルスカベンジャーの影響を解析した。リポキシゲナーゼ阻害薬として nordihydroguaiaretic acid、フォスホオリパーゼ A<sub>2</sub> 阻害薬として 2,4-dibromoacetophenone、シクロオキシゲナーゼ阻害薬として acetylsalicylic acid、活性酸素スカベンジャーとして superoxide dismutase、フリーラジカルスカベンジャーとして butylated hydroxytoluene を用いた。次に、x-LDL および Cu-LDL 中の酸化物質の測定のために、チオバルビタール酸反応物質 (thiobarbituric acid-reactive substances: TBARS) の定量をおこなった。さらに、x-LDL および Cu-LDL の酸化によるリポ蛋白変性により引き起こされる陰性荷電の増強を電気泳動法により解析した。最後に、x-LDL および Cu-LDL 中の酸化物質の存在を、ジエン共結合による 240 nm での吸光度の増加により解析した。

得られた成績を纏めると、

- (1) 抗酸化薬は x-LDL と Cu-LDL 両者の TBARS 生成を抑制した。各種酵素阻害薬は x-LDL のみの TBARS 生成を抑制した。その抑制はフォスホオリパーゼ A<sub>2</sub> 阻害薬が最も強力で、リポキシゲナーゼ阻害薬がそれに次ぐ強度であった。
- (2) 抗酸化薬のみが Cu-LDL のリポ蛋白の陰性荷電増強を抑制した。シクロオキシゲナーゼ阻害薬は x-LDL の電気泳動度を抑制しなかった。抗酸化薬のみが Cu-LDL の電気泳動度の増強を抑制した。
- (3) 240 nm での吸光度の上昇は Cu-LDL のみに認められた。

従って、x-LDL は黄色腫のフォスホオリパーゼ A<sub>2</sub> により最初に修飾され、その後生じた不飽和脂肪酸がフリーラジカルによる酸化反応を促進すると考えられる。一方、Cu-LDL は、非酵素的に生じる活性酸素やフリーラジカルにより酸化されると考えられる。また、Cu-LDL でみられるジエン共結合を持つ酸化物質は x-LDL においては生成されていないと考えられる。

審査員一同は、黄色腫組織による LDL 修飾機序の解析が動脈硬化性病変の発症機序の解明と治療法の確立にも寄与する優れた研究であると評価し、高知大学博士（医学）に相応しいものと判断した。

氏名(本籍)	清水 孝洋(北海道)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第60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20年3月24日
学位論文題目	Bidirectional roles of the brain 2-arachidonoyl-sn-glycerol in the centrally administered vasopressin-induced adrenomedullary outflow in rats (中枢性に投与されたバソプレシンにより惹起される副腎髄質系賦活における脳内2-アラキドノイルグリセロールの二方向性の役割)
発表誌名	European Journal of Pharmacology Vol.582 62-69 2008年3月

審査委員	主査	教授	本家	孝一
	副査	教授	由利	和也
	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 清水 孝洋

## 論文題目

Bidirectional roles of the brain 2-arachidonoyl-*sn*-glycerol in the centrally administered vasopressin-induced adrenomedullary outflow in rats.

(中枢性に投与されたバソプレシンにより惹起される副腎髄質系賦活における脳内2-アラキドノイルグリセロールの二方向性の役割)

(論文要旨)

【はじめに】生体が種々の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。この反応に関わる中枢神経系の出力系の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の種々のストレス関連疾患を引き起こす。従って、交感神経・副腎髄質系の中枢性賦活機序を脳内神経伝達物質との関連で明らかにすることは、ストレスに起因する各種疾病の治療と発症予防の観点から重要な課題である。

交感神経・副腎髄質系の中枢性賦活には、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、アルギニン-バソプレシン (バソプレシンと略す)、ポンベシン、ヒスタミン等の各種神経伝達物質が関与し、それらの実験動物脳室内への投与により血液中のカテコールアミンが増加することが報告されている。しかし、それら神経伝達物質による交感神経・副腎髄質系の中枢性賦活機序の詳細はいまだ明らかではない。従来、血液中のノルアドレナリン (NA) は交感神経終末からの NA 遊離が、一方、アドレナリン (Ad) は副腎髄質からの Ad 分泌が反映するとされてきた。しかし、近年、私達の研究室では、①麻酔したラット脳室内に投与したバソプレシンが、脳内シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサン A<sub>2</sub> 合成酵素により生成したトロンボキサン A<sub>2</sub> 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、さらに、②シクロオキシゲナーゼの基質となるアラキドン酸は、従来広く知られているホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 経路ではなく、ホスホリパーゼ C 経路により生成されることを明らかにした (Eur. J. Pharmacol., 2003; 2004; 2005; 2007)。

このホスホリパーゼ C 経路では、ホスホリパーゼ C により生成したジアシルグリセロール (DAG) から DAG リパーゼによりモノアシルグリセロール (MAG) が生じ、これがさらに MAG リパーゼにより加水分解を受けてアラキドン酸が生成されると考えられる。興味あることに、この過程で生成される MAG は、内因性カンナビノイドの1つである 2-arachidonoyl-*sn*-glycerol

(2-AG) である。近年、この 2-AG が中枢神経系において興奮した神経の後シナプスにおいて生体膜リン脂質から生成され、シナプス間隙に放出された 2-AG が前シナプスに発現している CB<sub>1</sub> 受容体に作用して神経伝達物質の放出を抑制するという、ネガティブ・フィードバック様の神経興奮抑制機構が提唱されている。そこで今回、バソプレシンのホスホリパーゼ C 経路を介した中枢性副腎髄質系賦活機序を、血漿中カテコールアミンを指標に、脳内カンナビ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】①バソプレシン (0.2 nmol/rat) の脳室内投与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 RHC-80267 (DAG リパーゼ阻害薬) (1.3 and 2.6 μmol/rat)、さらに MAFP (MAG リパーゼ阻害薬) (0.7 and 1.4 μmol/rat) により用量依存的に抑制された。

②2-AG (0.5 μmol/rat) の脳室内投与は血中 NA および Ad を増加させた。さらに、これら増加反応は MAFP (1.4 μmol/rat) の脳室内前処置により有意に抑制された。

③バソプレシンの脳室内投与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 AM 251 (カンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体選択的遮断薬) (90 and 180 nmol/rat) により用量依存的に増強された。しかし、AM 630 (CB<sub>2</sub> 受容体選択的遮断薬) (198 and 793 nmol/rat) の脳室内前処置では影響されなかった。

④バソプレシンの脳室内投与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 WIN 55212-2 (CB 受容体刺激薬) (188 and 470 nmol/rat) により用量依存的に抑制された。

【結論】ラット脳室内投与バソプレシンは、ホスホリパーゼ C 賦活により DAG を生成し、DAG から DAG リパーゼにより MAG (= 2-AG) を生成、さらに 2-AG から MAG リパーゼによりアラキドン酸を生成して、中枢性に副腎髄質系を賦活させることが示唆される。さらに、このホスホリパーゼ C 経路の過程で生成される 2-AG は、内因性カンナビノイドとして CB<sub>1</sub> 受容体を介してバソプレシンにより惹起された反応を負に制御していると推測される。今後、中枢性副腎髄質系賦活を抑制的に制御する薬物としてのカンナビノイド CB<sub>1</sub> 受容体刺激薬が、種々のストレスにより発症する疾病の治療と発症予防に役立つ可能性が考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	清水孝洋
審査委員	主査氏名	本家孝一 
	副査氏名	由利和也 
	副査氏名	高尾俊弘 

**題目** Bidirectional roles of the brain 2-arachidonoyl-sn-glycerol in the centrally administered vasopressin-induced adrenomedullary outflow in rats  
 (中枢性に投与されたバソプレシンにより惹起される副腎髄質系賦活における脳内2-アラキドノイルグリセロールの二方向性の役割)

**著者** Takahiro Shimizu, Kunihiko Yokotani

**発表誌名、巻(号)、ページ(～)、年 月**  
 European Journal of Pharmacology Vol.582 62-69 2008年3月

**要旨**

**【背景・目的】**外的ストレスに対して、生体内では様々なストレス反応が惹起されるが、中枢神経系応答の出力系の一つに交感神経・副腎髄質系がある。この系の過剰反応は、高血圧症、消化性潰瘍、免疫系機能の抑制や発癌などの種々のストレス関連疾患を引き起こす。従って、交感神経・副腎髄質系の中枢性賦活機序を脳内神経伝達物質との関連で明らかにすることは、ストレスに起因する各種疾病の治療・発症予防の観点から重要と考えられる。

交感神経・副腎髄質系の中枢性賦活因子として、副腎皮質刺激ホルモン放出因子、アルギニン-バソプレシン(以下バソプレシンと略)、ボンベシン、ヒスタミン等が知られ、これらを実験動物脳室内へ投与すると、血中カテコールアミン濃度が増加することが報告されている。しかし、その詳細な機序は不明な点が多い。従来、血中ノルアドレナリン(NA)は交感神経終末から、アドレナリン(Ad)は副腎髄質から分泌されるとされてきた。しかし、申請者の研究室では、ラット脳室内に投与したバソプレシンが、トロンボキサンA<sub>2</sub>産生を介して、副腎髄質からNAとAdの両者を分泌すること、さらに、トロンボキサン前駆体のアラキドン酸は、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>経路ではなく、ホスホリパ

パーゼC経路により生成されることを明らかにしてきた。このホスホリパーゼC経路では、ホスホリパーゼCにより生成されたジアシルグリセロール(DAG)からDAGリパーゼによりモノアシルグリセロール(MAG)が、さらにMAGリパーゼによりアラキドン酸が生成されると考えられる。この過程で生成されるMAGは、エンドカンナビノイドの一つである2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)である。興奮性神経の後シナプスにおいて生成される2-AGは、前シナプスに発現しているカンナビノイドCB<sub>1</sub>受容体に結合して神経伝達物質の放出を抑制するネガティブ・フィードバックメカニズムが提唱されている。

本論文は、バソプレシンの中枢性副腎髄質系賦活メカニズムにおける2-AGの作用を、アラキドン酸前駆体の側面と、エンドカンナビノイドの側面から明らかにすることを目的とした。

**【方法】** ウレタン麻酔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。予め留置した大腿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測定した。

**【結果・考察】** ①バソプレシンの脳室内投与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DAGリパーゼ阻害薬とMAGリパーゼ阻害薬により用量依存的に抑制された。

②2-AGの脳室内投与は、血中NAおよびAdを増加した。この増加反応は、MAGリパーゼ阻害薬の脳室内前処置により有意に抑制された。

③バソプレシンで誘導される血中NAおよびAdの増加は、脳室内前処置したカンナビノイドCB<sub>1</sub>受容体選択的遮断薬により用量依存的に増強されたが、カンナビノイドCB<sub>2</sub>受容体選択的遮断薬の脳室内前処置では影響されなかった。

④バソプレシンで誘導される血中NAおよびAdの増加は、脳室内前処置したカンナビノイド受容体刺激薬により用量依存的に抑制された。

以上より、バソプレシンのホスホリパーゼC経路を介した中枢性副腎髄質系賦活メカニズムには、2-AGからアラキドン酸が遊離されることが重要であることが示された。一方、2-AGは、カンナビノイドCB<sub>1</sub>受容体を介して、バソプレシンによる中枢性副腎髄質系賦活作用を負に制御することが示された。

本論文は、カンナビノイドCB<sub>1</sub>受容体刺激薬が、ストレスにより惹起される中枢性副腎髄質系賦活を抑制することにより、ストレス関連疾病の治療と発症予防に役立つ可能性を示した。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)	方 友云 (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第61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20年3月24日
学位論文題目	Oxytocin facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb (オキシトシンは副嗅球における長期増強の誘導を促進する)
発表誌名	Neuroscience Letters (in press)

審査委員	主査	教授	加藤	邦夫
	副査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	八木	文雄

## 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 方 龍 云

## 論文題目

Oxytocin facilitates the induction of long-term potentiation  
in the accessory olfactory bulb

(オキシトシンは副嗅球における長期増強の誘導を促進する)

(論文要旨)

### 【背景および目的】

個体を取り巻く環境との相互作用のなかで神経系がどのように変化するかという問題に取り組むための諸々の方法があるが、その一つに行動の神経基盤の解明に大きく貢献してきた記憶・学習メカニズムの研究がある。哺乳動物で解析が進んでいる記憶・学習モデルの一つに交尾刺激を引き金として雌マウスに形成される交配雄フェロモンの記憶がある。この記憶は、妊娠の維持に不可欠であり、鋤鼻系の最初の中継部位である副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達の可塑的变化によって支えられている。このシナプスの可塑的变化をもたらす記憶情報分子としてすでに、交尾刺激により副嗅球に放出されるノルアドレナリンが同定されている。交尾刺激はノルアドレナリンのほか、オキシトシン (OT) も中枢神経系内で放出させる。中枢神経系内で放出される OT は、主として視床下部室傍核の OT ニューロンに由来するが、記憶過程や生殖行動、親行動、絆形成、ストレス経験の対処、人の信頼関係などの社会的過程に関わることが知られている。また、OT 受容体が副嗅球に発現しているとの知見が報告されている。したがって、OT も副嗅球のシナプス可塑性に関わる可能性が浮上してきた。そこで、本研究の目的は、1) 学習・記憶の基礎過程として知られているシナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation: LTP) が矢状断副嗅球スライス標本において僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプスに惹起されうるか、2) もしそうであれば、LTP 誘導に至適な刺激頻度というものがあるか、3) OT は LTP 誘導を制御するか、といった疑問に答えることであつた。

### 【方法】

生後 21~42 日の Balb/c マウスをエーテルで麻酔し、断頭後、副嗅球を含む脳を氷冷した人工脳脊髄液 (ACSF) の中にいれ、厚さ 350  $\mu\text{m}$  の矢状断副嗅球スライス標本を作製した。切り出した副嗅球スライスを記録槽に入れ室温下 (22~26°C) で、95%  $\text{O}_2$  +5%  $\text{CO}_2$  混合ガスを飽和させた ACSF で灌流した。細胞外記録用電極には ACSF

を充填した。刺激電極にはマイクロ同心円電極を用いた。テスト刺激は定電流パルス (50  $\mu$ s) を 0.033 Hz で出力させた。刺激強度は各スライスにおいて最大応答の 50-60% をもたらず強度にセットした。LTP を誘導するための条件刺激は、テスト刺激と同じ強さで 100 Hz 刺激の場合は 100 パルス、3 分間隔で 2 あるいは 4 回、10、20 および 50 Hz 刺激の場合は 20 パルス、3 分間隔でそれぞれ 10 あるいは 20 回与えた。副嗅球の僧帽細胞の軸索が走行する外側嗅索を電気刺激し、顆粒細胞樹状突起に発生する興奮性シナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential: fEPSP) を外叢状層で記録した。fEPSP の記録は微小電極増幅器を用いて 30 秒毎に行い、2 回の反応を加算平均した。シナプス伝達の増強度は条件刺激終了 150 分後から 10 分間の fEPSP 勾配を条件刺激直前 10 分間の fEPSP 勾配の平均に対して % で表した。

#### 【結果および考察】

10 Hz、20 Hz、50 Hz、100 Hz の刺激のうち、20 Hz、50 Hz、100 Hz 刺激 (各条件とも合計刺激パルス数は 400) で LTP が誘導されたが、100 Hz 刺激が最も安定かつ強固な LTP を誘導した。LTP 誘導に関して閾値下刺激 (200 パルス) のところに、OT (0.2 および 2  $\mu$ M) を添加すると、濃度に依存して強固な LTP が誘導され、OT の LTP 誘導促進作用が認められた。OT の LTP 促進作用は NMDA 受容体アンタゴニスト AP5 でも OT アンタゴニスト desGly-NH<sub>2</sub>, d(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>[Tyr(Me)<sup>2</sup>, Thr<sup>4</sup>]ornithine vasotocin (2  $\mu$ M) でも遮断された。以上の結果は、OT が副嗅球の NMDA 受容体依存性 LTP の誘導を促進することを示している。

本研究により、OT が副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス伝達に可塑性を誘導することが明らかになった。新たな課題として、OT が実際、フェロモンの記憶にどの程度関わるのか、視床下部室傍核 OT ニューロンから放出された OT はどのルートで副嗅球に至り、僧帽細胞-顆粒細胞間シナプスの前部、後部、両者のいずれに作用するのかなどが検討されなければならない。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	方 友 云
審 査 委 員	主 査 氏 名      加 藤 邦 夫	
	副 査 氏 名      佐 藤 隆 幸	
	副 査 氏 名      八 木 文 雄	

題 目    Oxytocin facilitates the induction of long-term potentiation in the accessory olfactory bulb  
 (オキシトシンは副嗅球における長期増強の誘導を促進する)

著 者    Long-Yun Fang, Rong-Dan Quan, Hideto Kaba

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

### 要 旨

雄マウスの尿中フェロモンは、雌のフェロモン情報処理系（鋤鼻系）を刺激して血中プロゲステロン濃度を低下させて発情をもたらす作用がある。雌マウスが交尾刺激を引き金として交配雄のフェロモンを記憶すると、その後はこのフェロモンによる発情（流産）が起こらなくなり、妊娠が保障される。このフェロモン記憶は、鋤鼻系の最初の中継部位である副嗅球に生ずるシナプスの可塑的变化によって支えられている。以前の研究によれば、交尾刺激により賦活されたノルアドレナリン (NA) 神経の働きを引き金として、種々の情報分子が関わり、僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスに可塑的变化が生ずることが知られている。交尾刺激ではノルアドレナリンの他にオキシトシン (OT) が中枢神経内で放出される。一般的に OT は主として視床下部室傍核の OT ニューロンに由来するが、記憶過程や生殖行動、親行動、絆形成、ストレス体験の処理、信頼関係などの社会的過程に関わることが知られている。近年 OT 受容体が副嗅球に発現しているとの知見が報告されているので、OT が副嗅球のシナプス可塑性に関与しているかどうかを電気生理学的に検討することが、本研究の主題である。

実験方法としては、生後 3 週から 6 週までのマウスの副嗅球の矢状断スライス標本（厚さ 350  $\mu$ m）を製作し、外側嗅球を電気刺激し、顆粒細胞樹状突起に発生する興奮性シナプス後電位を外叢状層で記録した。シナプス可塑性は高頻度刺激を入力線維に与えて誘導

した。この実験によってわかったことは以下のとおりである。① 興奮性シナプス後電位は AMPA 受容体依存性である。② 100Hz の高頻度刺激を与えることによって少なくとも 3 時間持続するシナプス可塑性（長期増強：LTP）が観察される。③ 100Hz の入力刺激によって誘導される LTP は NMDA 受容体の阻害薬である AP5 によって阻害される。④ OT 単独の投与ではシナプス反応に影響を与えない。⑤ 誘導閾値以下の刺激でも  $2\mu\text{M}$  の OT 存在下で LTP が誘導される。⑥ 100Hz の入力刺激によって誘導される LTP は OT 受容体阻害薬である desOVT 存在下では誘導されない。以上の結果により OT が僧帽細胞から顆粒細胞へのシナプス可塑性に促進的な働きをすると同時に、100Hz 入力刺激で誘導される LTP が OT 依存性であることがわかった。また OT によって誘導される LTP はノルアドレナリンによって誘導される LTP と同様に、NMDA 依存性であることがわかった。

これらの実験結果から、本研究では副嗅球での LTP 誘導には OT が重要な働きをしているという結論を証明した。OT は脳室に投与されると、母性行動が誘起されることで知られている唯一の物質である。分娩時の産道刺激によって脳室に OT が放出され、この OT が嗅球に達して子の匂い信号を嗅球のレベルで抑制し、引いては母性行動の速やかな開始へと導くということが報告されている。OT が母性行動以外に、妊娠を保證するための学習効果に関与していることが本研究によって初めて明らかにされた。またその生理学的メカニズムとして、OT が僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスのシナプス可塑性に促進的に働いていることが生理学的手段によって明らかにされた。

記憶・学習の基礎的メカニズムは海馬において研究がすすんでいるが、副嗅球の僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起同士の間形成されている相反性相互シナプスにおいても海馬と同様の現象がみられることは興味深いことである。副嗅球は学習とシナプス可塑性の関係が明瞭であり、行動学習と電気生理学的実験を対比させやすいことから、学習モデルとしての価値が高い。今後細胞内メカニズムなどの研究がすすむことによって医学的に有用な所見が得られることが期待される。

動物における愛着行動は種の保存と維持に関わる基本的なものであることから、人間及び他の動物は、互いに共通した行動パターンを進化させてきたと考えられる。OT はその愛着行動の中心となるホルモンと考えられている。匂いを手がかりとして形成される母と子の絆、夫婦の絆のメカニズムを分子や細胞、システムレベルで解明することは、豊かな人間性を育む方策の科学的根拠を提供することになる。本研究は、動物の社会性に大きく影響する匂いに着目することによって絆形成に不可欠な役割を果たす脳部位を特定し、絆形成のためのシナプス可塑性の誘導メカニズムとして OT が関与することを初めて明らかにした。実験のデザインや手法は適切であり、神経科学分野で評価の高い雑誌に本論文が掲載されている。本研究のユニークな知見は将来的に基礎研究だけではなく、臨床医学的にも有意義な研究へと発展する可能性があり、研究の意義は高く評価できるものである。本論文は高知大学医学部大学院博士課程の学位論文として適切であることが審査員全員によって認められた。

氏名(本籍)	弘瀬 伸行 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第62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20年3月31日
学位論文題目	The local injection of peritoneal macrophages induces neovascularization in rat ischemic hind limb muscles (腹腔マクロファージ移植はラット後肢虚血筋における血管新生を誘導する)
発表誌名	Cell Transplantation 2008(in press)

<b>審査委員</b>	主査	教授	佐藤	隆幸
	副査	教授	深谷	孝夫
	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 弘瀬 伸行

## 論文題目

### The Local Injection of Peritoneal Macrophages Induces Neovascularization in Rat Ischemic Hind Limb Muscles

(腹腔マクロファージ移植はラット後肢虚血筋における血管新生を誘導する)

(論文要旨)

近年、動脈硬化性疾患である虚血性心疾患、末梢血管疾患が増加しており、薬物治療、カテーテル治療、外科的バイパス術がその主な治療法であった。しかし、血行再建が困難な重症例においては内科的、外科的治療では解決できず、新しい治療戦略として血管新生療法の開発が進められている。現在、自己細胞を用いた細胞移植血管新生療法では、骨髄単核球と末梢血単核球が主に用いられているが、これらの細胞以外にも血管新生作用を有する細胞群を見出すことができれば、より幅広い治療法の選択が期待できる。我々は創傷治癒や虚血組織において、血管増殖因子の産生を介して血管新生過程を促進するマクロファージ、特に腹腔内の感染防御、組織修復機能を担う腹腔マクロファージの血管新生作用に着目し、細胞移植療法における新たな治療用細胞群としての可能性を検討した。

In vitro 実験として、虚血組織の環境因子である低酸素、Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) によるマクロファージの血管増殖因子産生能への影響を検討した。ラット腹腔洗浄液より比重遠心法にて単核球分画を分離し、比較対象として長管骨骨髄より抽出した骨髄単核球分画細胞を用いた。腹腔内から得られた細胞は約95%の単核球分画を含み、その中でも85%以上がマクロファージであった。両細胞群を正常酸素分圧、低酸素分圧下で培養を行い、Total RNAを抽出し、RT-PCR法にて、Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF)、Fibroblast Growth Factor (bFGF) mRNAの発現量を検討した。次にIL-1 $\beta$  刺激、低酸素刺激にて48hr培養を行い、培養上清を採取し、VEGF蛋白量をELISA法にて計測した。またこの培養上清を用いてヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を24時間培養し、MTT assayにて血管内皮細胞増殖能に対する影響を検討した。In vivo 実験ではラット後肢虚血モデルを作成し、腹腔単核球分画細胞  $1 \times 10^7$  個を虚血下肢筋肉に注入した。細胞移植4週間後Colored Microsphere法を用いて大腿筋血流を測定した。また、免疫組織染色にて4週間後の大腿筋組織の毛細血管数と側副動脈数の変化を検討した。蛍光標識した腹腔細胞を虚血下肢筋に注入し、移植後のその局在と免疫染色による注入細胞のVEGF発現を観察した。

In vitro 実験において腹腔内単核球分画細胞の低酸素刺激における VEGF、bFGF

mRNA の発現増強が認められた。また ELISA 法では正常酸素に比べ、低酸素、IL-1 $\beta$  刺激によって培養上清中の VEGF 濃度が有意に上昇し、VEGF 産生の増加が示唆された。MTT assay においては低酸素、IL-1 $\beta$  刺激下での腹腔細胞培養上清による HUVEC の増殖促進効果が認められた。In vivo 実験では腹腔細胞移植群において非移植群に比べ虚血大腿筋血流の有意な改善効果が見られた。また虚血筋組織中の毛細血管数、細動脈数ともに、腹腔細胞移植群では虚血群に比べ有意な増加を認め、新たな血管床の形成を担う毛細血管と機能血管である細動脈、双方の増加促進効果を有していることが示唆された。注入された移植細胞の組織中での局在と寿命を観察したところ、蛍光標式された注入細胞は移植後 28 日後まで虚血組織中の間質に存在していることが確認され、移植 3 日後の時点で組織中での VEGF 発現が確認された。

本研究においてマクロファージの虚血環境での血管増殖因子産生能の増強と血管新生効果が確認され、細胞移植血管新生療法における新たな治療用細胞群としての可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	弘瀬伸行
審査委員	主査氏名	佐藤隆幸 
	副査氏名	深谷孝夫 
	副査氏名	杉浦哲朗 

題目 The local injection of peritoneal macrophages induces neovascularization in rat ischemic hind limb muscles  
(腹腔マクロファージ移植はラット後肢虚血筋における血管新生を誘導する)

著者 Nobuyuki Hirose, Hironori Maeda, Morio Yamamoto, Yoshihiro Hayashi, Gang-Hong Lee, Liyan Chen, Geethalakshmi Radhakrishnan, Parijatha Rao, Shiro Sasaguri

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Cell Transplantation 2008(in press)

要旨

近年増加の一途をたどる動脈硬化性疾患に対して、さまざまな薬物療法、カテーテル療法、およびバイパス手術法が開発されある程度の成果を上げている。しかし、これら内科的・外科的治療法の適応のない難治性重症例も多く、最近では、血管再生療法への期待が高まっている。そこで申請者は、新しい血管再生療法として、腹腔内マクロファージの虚血部への注入療法を提案し、その有効性を動物実験で検証した。なお、これまでの研究により、マクロファージが、虚血部位で増加する Interleukin-1 $\beta$  (以下、IL-1 $\beta$ ) の刺激により、Vascular Endothelial Growth Factor (以下、VEGF) や basic Fibroblast Growth Factor (以下、bFGF) などの血管新生刺激作用を有するサイトカインを放出するようになることが報告されている。

まず、ラットの腹腔内洗浄液に含まれる単核球分画細胞の特徴について調べた。回収された洗浄液内の細胞の 95% は単核球で、85% 以上がマクロファージのマーカー (ED1 または ED2) を有していた。腹腔内単核球分画の細胞は、低酸素刺激や IL-1 $\beta$  刺激に反応して、VEGF や bFGF を産生することが確認された。そこで、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (以下、HUVEC) 培養系を用いて、腹腔内単核球分画の細胞が、低酸素環境や IL-1 $\beta$  刺激条件下で HUVEC 増殖能にどのような影響を与えるかを調べた。低酸素負荷あるいは IL-1 $\beta$  投与はともに、HUVEC の増殖を有意に刺激した。また、低酸素環境下や IL-1 $\beta$  存在下で HUVEC と腹腔内単核球分画細胞を 48 時間共培養した後に得られる上清を別の HUVEC に投与すると増殖能が有意に増大した。これらの結果は、腹腔内単核球分画の細胞が虚血部位で血管新生を促進する可能性があることを示唆するものと考えられた。

ついで、ラット後肢虚血モデルを用いて、腹腔内単核球分画の細胞 ( $10^7$  個) の筋肉内への注入移植が血流に与える影響を検討した。移植 4 週後の虚血部位の組織標本で蛍光標識された注入細胞の生着が確認され、有意な血流改善がマイクロスフェア評価法で確認された。これらの結果から、申請者は、腹腔内単核球分画の細胞、特に、マクロファージが血管再生療法のための移植細胞として期待されると結論付けた。

血管再生療法における移植細胞の供給源として、従来、骨髄や末梢血が知られているが、申請者の研究成果は、さらに腹腔内洗浄液が有力な候補になることを示す重要なものである。それぞれの供給源から移植細胞を採取する過程における侵襲性、細胞分離の手技、得られる細胞の数・質には短所・長所があるが、供給源の選択が広がることは臨床的に意義深い。したがって、審査員一同は、申請者の論文を、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)	高杉 尚志(岡山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第38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20年 1月15日
学位論文題目	Myocardial scintigraphy after pacemaker implantation for congenital complete atrioventricular block (ペースメーカー植え込み後の先天性完全房室ブロック患者の心筋シンチ)
発表誌名	European Journal of Pediatrics 2007;Mar8: [Epub ahead of print] 2007年3月

審査委員	主査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	土居	義典
	副査	教授	笹栗	志朗

## 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 高杉 尚志

## 論文題目

Myocardial scintigraphy after pacemaker implantation for congenital complete atrioventricular block

(ペースメーカー植え込み後の先天性完全房室ブロック患者の心筋シンチ)

(論文要旨)

(はじめに)

合併心奇形や胎児水腫を伴わない先天性完全房室ブロック(CCAVB)のほとんどの患者は、ペースメーカー植え込みが必要であるが、比較的予後良好であると考えられてきた。しかし、近年、一部の例では、早期のペースメーカー植え込みにもかかわらず、拡張型心筋症(DCM)を発症することが指摘されている。

(目的) 私たちは、CCA VB患者におけるDCM発症機序を検討する目的で、心筋シンチ所見について検討した。

(対象・方法)

1995年1月から2004年3月までに、国立循環器病センター小児科において、合併心奇形のないCCA VB患者25例(男15例、女10例)に対して、<sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin心筋シンチを施行した。25例中5例は、ペースメーカー植え込み前後で心筋シンチが施行され、計30画像が得られた。これらを以下の3つに分類した。グループ1:ペースメーカー植え込み前(n=11)、グループ2:ペースメーカー植え込み後DCM未発症(n=13)、グループ3:ペースメーカー植え込み後DCM発症(n=6)。投与量を体重で補正した<sup>99m</sup>Tc-Tetrofosminを、静脈内投与し、45分後にsingle-photon-emission computed tomography(SPECT)画像を得た。さらに、グループ1の4例、グループ2の11例、グループ3の5例は、gated SPECTを施行し、左室駆出率と左室拡張末期容積を算出した。心臓核医学検査に精通した二人の医師が、全ての画像を分析した。心筋シンチの集積低下は、polar mapの各セグメントの最大集積に対する% uptakeで評価した。データは、平均値±標準偏差で表し、2群間比較は、unpaired student's t-testを用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

(結果)

患者の特徴

3グループ間で、平均年齢、性別、ペースメーカー植え込み年齢、ペーシングモードに有意差はなかったが、グループ3のペーシング期間は、グループ2のペーシング期間よりも有意に短期間であった。心筋シンチSPECT像における集積低下は、グループ1では認められなかったが、グループ2では11例(85%)、グループ3では6例(100%)で認められた。グループ2での、集積低下は、右室心外膜ペーシング9例中8例、左室心外膜ペーシング3例中2例、右室心内膜ペーシング1例中1例に認められた。グル

ープ3では、6例全例が右室心外膜ペースングであった。

#### 心筋シンチSPECT像における集積低下の特徴

グループ2では、中隔の集積が低下していた例でも、左室の拡大を伴っていなかった。右室ペースング10例中9例に、中隔または心尖から中隔を中心に集積低下を認めた。グループ3では、中隔から心尖、下壁にかけて広範な集積低下を認め、左室の拡大を伴っていた。全例、右室心外膜ペースングであった。

#### Gated SPECTとpolar mapの各セグメントの% uptake

グループ3の左室駆出率は、 $18.0 \pm 5.5$ であり、グループ1( $58.0 \pm 11.7$ )、グループ2( $66.3 \pm 9.8$ )よりも有意に低値であった。グループ3のpolar mapにおける心尖、中隔、下壁の% uptakeは、グループ1よりも有意に低値であり、心尖と下壁においては、グループ2よりも有意に低値であった。中隔の% uptakeも、グループ2よりグループ3で低値の傾向があった。グループ3における% uptake 60%未満のセグメント数は、グループ1、グループ2よりも有意に多かった。グループ2とグループ3のpolar mapの% uptakeの分布は類似していたが、グループ3において、% uptakeはより低値で、より広範であった。

#### (考察)

CCAVBは、母体由来のIgG抗体(抗SSA/Ro, 抗SSB/La抗体)による胎児刺激伝導系の自己免疫的損傷により発症するとされている。さらに、これらの抗体は、胎児心筋組織とも反応することが示されているが、遠隔期にDCMを発症する原因は不明である。私たちの研究において、グループ2とグループ3のペースメーカー植え込み年齢には差がないにもかかわらず、グループ3のペースング期間が、有意に短いことは、グループ3の胎児心筋組織の障害がより強いことを示している。左脚ブロック(LBBB)では左室の興奮が一度に開始されず、非効率的な収縮となり、心筋シンチでは、冠動脈病変がないにもかかわらず、中隔に集積低下が出現することが示されている。これは、LBBBによる心室非同期が、心筋内血液還流を低下させ糖代謝を低下させる結果だと推測されている。また、右室ペースングの症例においても、LBBBと同様に中隔の集積低下が出現することが報告されている。私たちは、右室ペースングされているCCAVB患者の心筋シンチで、心尖と中隔に高率に集積低下が存在し、DCMを伴った症例では、さらに広範な集積低下となることを示した。私たちは、右室ペースングの人工的LBBBによって、心尖と中隔で心筋血液還流が低下し、CCAVB患者の一部で、抗SSA/Ro, 抗SSB/La抗体で障害を受けた心筋組織の機能的障害が進展すると推測している。右室ペースングされているCCAVB患者で、心機能低下や心筋シンチでの集積低下を認める場合は、ペースング部位変更の適応である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	高 杉 尚 志
審 査 委 員	主 査 氏 名    杉 浦 哲 朗	
	副 査 氏 名    土 居 義 典	
	副 査 氏 名    笹 栗 志 朗	

題 目    Myocardial scintigraphy after pacemaker implantation for congenital complete atrioventricular block.  
 (ペースメーカー植え込み後の先天性完全房室ブロック患者の心筋シンチ)

著 者    Hisashi Takasugi, Ken Watanabe, Yasuo Ono, Heima Sakaguchi,  
 Noriko Motoki, Yoko Yoshida, Shigeyuki Echigo, Kazuki Fukuchi,  
 Yoshio Ishida.

発表誌名、巻 (号)、ページ (    ~    ),    年    月  
 European Journal of Pediatrics 2007;Mar8: [Epub ahead of print]  
 2007年3月

### 要 旨

#### 【背景および目的】

先天性完全房室ブロック (CCAVB) のほとんどの症例では、ペースメーカー植え込みが必要であるが、合併心奇形を伴わない例では比較的予後良好であると考えられてきた。しかし、近年、一部の症例では早期のペースメーカー植え込みにもかかわらず、拡張型心筋症 (DCM) 様の心拡大・心機能低下を発症することが指摘され、CCAVB の長期予後はいまだ明らかにされていない。そこで、申請者らは、CCAVB 患者に心筋シンチを施行し心機能低下の発症機序を検討した。

#### 【方法】

1995年1月から2004年3月までに国立循環器病センター小児科において、合併心奇形のない CCAVB 患者 25 例 (男 15 例、女 10 例) に対して <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin 心筋シンチを施行した。CCAVB 25 例中 5 例はペースメーカー植え込み前後で心筋シンチが施行され、

計 30 画像が得られた。これらの画像を以下の 3 つに分類した；グループ 1：ペースメーカー植え込み前 (n=11)、グループ 2：ペースメーカー植え込み後 DCM 未発症 (n=13) グループ 3：ペースメーカー植え込み後 DCM 発症 (n=6) である。<sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin を静脈内投与し、45 分後に single-photon-emission computed tomography (SPECT) 画像を得た。さらに、20 例 (グループ 1：4 例、グループ 2：11 例、グループ 3：5 例) には gated SPECT を施行し、左室駆出率と左室拡張末期容積を算出した。心筋シンチの集積低下は polar map の各セグメントの最大集積に対する % uptake で評価した。

#### 【結果】

得られた結果は以下のように要約される。

- 1) 心筋シンチ SPECT 像における集積率低下はグループ 1 では認めなかったが、グループ 2 では 11 例 (85%)、グループ 3 では 6 例 (100%) で認めた。グループ 2 では右室ペーシング 10 例中 9 例に中隔または心尖から中隔を中心に集積低下を認めた。グループ 3 では中隔から心尖、下壁にかけて広範な集積低下を認めた。
- 2) グループ 3 は左室の拡大を伴い左室駆出率は  $18.0 \pm 5.5$  でグループ 1 ( $58.0 \pm 11.7$ ) とグループ 2 ( $66.3 \pm 9.8$ ) に比し有意に低値であった。
- 3) グループ 3 の polar map における心尖、中隔、下壁の % uptake はグループ 1 よりも有意に低値であり、心尖と下壁においてはグループ 2 に比し有意に低値であった。中隔の % uptake はグループ 3 でグループ 2 に比し低値傾向であった。
- 4) グループ 3 における % uptake が 60% 未満のセグメント数はグループ 1、グループ 2 よりも有意に多かった。

CCAVB は母体由来の IgG 抗体 (抗 SSA/Ro、抗 SSB/La 抗体) による胎児刺激伝導系の自己免疫的損傷により発症するとされている。さらに、これらの抗体は胎児心筋組織とも反応することが示されているが、遠隔期に DCM を発症する原因は不明である。そこで、申請者らは CCAVB 患者を対象に心筋シンチを施行し心尖と中隔に高率に集積低下が存在することを明らかにし、DCM を伴った症例では、さらに広範な集積低下となることを示した。すなわち、右室ペーシングの症例においても左脚ブロックと同様冠動脈病変がないにもかかわらず心筋シンチで中隔に集積低下が出現した。これは心室非同期が心筋内血液灌流を低下させるとともに左室は非効率的な収縮となり心機能を低下させると考えられた。心筋シンチを用いた本研究で得られた新たな知見は、CCAVB 患者の一部で刺激伝導系のみならず心筋組織の機能的障害が進展することが示唆され学術的にも興味深い。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)	森田 ゆかり (愛媛県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第39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20年2月19日
学位論文題目	Transcranial magnetic stimulation for differential diagnostics in patients with parkinsonism (パーキンソン病・類縁疾患の鑑別診断における経頭蓋磁気刺激検査の有用性)
発表誌名	Acta Neurologica Scandinavica 2008(in press)

審査委員	主査	教授	加藤	邦夫
	副査	教授	谷	俊一
	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 森田 ゆかり

## 論文題目

Transcranial magnetic stimulation for differential diagnostics in patients with parkinsonism  
(パーキンソン病・類縁疾患の鑑別診断における経頭蓋磁気刺激検査の有用性)

### (論文要旨)

背景: パーキンソン病(PD)は無動、固縮、振戦および姿勢反射障害の錐体外路症状を主徴とする神経変性疾患である。一般に片側から発症し、L-ドーパによく反応するが、これらは診断に際して重要な特徴である。これに対して、進行性核上性麻痺(PSP)や多系統萎縮症(MSA)に代表されるパーキンソン病類縁疾患は、L-ドーパに対する反応が不良で、体軸につよい固縮、無動を主症状とし、病初期から自律神経障害や小脳失調が見られるという特徴がある。このようにパーキンソン病(PD)との相違点があるにもかかわらず、病初期には診断に苦慮し、PDとの鑑別が困難な場合が少なくない。

今回用いた経頭蓋磁気刺激検査(TMS)は、各種神経疾患の背景にある神経系の病態生理学的な変化をとらえることが可能な検査法として注目されており、診断が難しい神経変性疾患における検査法の1つとして期待されている。

目的: そこで我々は、PD、PSP、MSAの患者を対象にTMSを行い、3群間で比較し、鑑別診断におけるTMSの有用性について検討した。さらに罹病期間3年以下の発症早期の患者に限った検討も加えた。

方法: PD25名、PSP10名、MSA13名の計48名を対象とした。診断に際しては、過去の診療録を参考にし、さらに必要に応じて頭部MRI、<sup>123</sup>I-metaiodobenzylguanidine 心筋シンチグラフィ、脳血流SPECT、head-up tiltテスト、膀胱機能検査などを追加し、参考とした。また各疾患の診断基準には以下のものを用いた。

PD: 英国パーキンソン病協会 Brain Bank の診断基準および Larsen らの提唱した診断基準

PSP: National Institute of Neurological Disorders and the Society for Progressive Supranuclear Palsy の診断基準

MSA: Consensus criteria

これらを総合的に判断して臨床診断を行った。

PD25名のうち、6名には垂直性眼球運動障害や自律神経障害などPDには非典型的とされる徴候が認められた。Larsenらの基準にあてはめるとPDのうち19名はdefinite PDに、6名はprobable PDに該当した。25名中3名は認知症を合併していた。PSP10名のうち、7名はprobable PSPに分類され、3名はpossible PSPであった。さらにMSAに関しては、12名がprobable MSAに、のこり1名がpossible MSAに分類された。

上記の48名全例に対して、TMSを施行した。磁気刺激装置はDantec社のMagLite®を使用し、刺激コイル

は円形コイル(半径6cm)を用いて上肢関連運動野の刺激をおこなった。まず、閾値(MT)、潜時(L)、運動誘発電位(MEPA)、中枢神経伝導時間(CMCT)を小指外転筋より記録し、次に cortical silent period(CSP)を第一背側骨間筋より記録した。CSPは弱収縮を加えた状態で閾値の150%の強度で運動野刺激を行い、刺激開始から筋電図波形がいったん消失し、再度出現するまでの時間を計測した。検査は薬物の効果がみられる状態(practically ON)で行い、臨床的により症状の強い側のデータを解析した。これらのパラメータを①48名全体で比較、検討し、さらに②罹病期間3年以下の27名に限って検討した。

結果：①全体での検討では、CMCT、MT、L、CSPにおいて3群間で統計学的に有意差が認められた( $p < 0.01$ )。post hoc analysisでは、MTはPD群に比べてMSA群で有意に高値を示し( $p < 0.01$ )、またCMCTとCSPに関しては、PD群でPSP、MSA各群に比し有意に短いという結果であった(PD vs PSP:  $p < 0.01$ , PD vs MSA:  $p < 0.05$ )。また、②罹病期間3年以内の27名(PD9名、PSP7名、MSA11名)の検討では、MT、MEPA、Lについては3群間で差は見られず、CMCT、CSPで有意差が認められた( $p < 0.05$ )。posthoc analysisでは、CMCTはPSP、MSAの各群に比べPD群で有意に短いという結果であったが(PD vs PSP:  $p < 0.05$ , PD vs MSA:  $p < 0.05$ )、CSPでは有意差は認められなかった。

結論：臨床診断PD、PSP、MSAの3群でTMSの各パラメータについて比較検討を行った結果、全体の検討ではMT、CMCTおよびCSPでPD群と他の2群との間に有意差が認められた。さらに、罹病期間が3年以内に限った検討でもCMCTはPD群と他の2群間で有意差が認められた。TMSパラメータのうち、CMCT、MT、MEPAおよびLは上位運動ニューロンの障害を反映していると考えられている。これまでの病理学的検討から、PSP、MSAでは錐体路の障害がおこることが知られており、一般に錐体路に障害を来さないPDとの違いを反映したと考えられる。一方、CSPは種々の要素で変動を来すが、PDのように線条体におけるドパミン欠乏状態下ではmotor thalamusの過剰な抑制が生じ、結果的に皮質運動野、運動連合野の抑制をきたし、CSPが短縮すると考えられる。同じパーキンソンニズムを来す疾患でも、PDと類縁疾患ではこの点の機序が異なっていると推定され、この違いがCSPの差につながっていると考えられる。以上より、TMSにおける各パラメータはPDと類縁疾患の病理学的な差異を病初期から反映した結果を示すと考えられ、鑑別診断の一助として有用であると思われた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名		森 田 ゆかり
審 査 委 員	主 査 氏 名	加 藤 邦 夫	
	副 査 氏 名	谷 俊 一	
	副 査 氏 名	清 水 恵 司	

題 目 Transcranial magnetic stimulation for differential diagnostics in patients with parkinsonism  
(パーキンソン病・類縁疾患の鑑別診断における経頭蓋磁気刺激検査の有用性)

著 者 Yukari Morita, Yasushi Osaki, Yoshinori Doi

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
Acta Neurologica Scandinavica 2008(in press)

### 要 旨

パーキンソン病 (PD) は無動・固縮・振戦および姿勢反射障害の錐体外路症状を主徴とする神経変性疾患で、神経内科領域では発病頻度の比較的高い、临床上重要な疾患である。PD の治療には適正な治療計画をたて、予後を知ることが临床上重要であるが、神経学的に類似したパーキンソン病類縁疾患が複数存在する。パーキンソン病類縁疾患としては進行性核上性麻痺 (PSP) や他系統萎縮症 (MSA) などが知られ、体軸に強い固縮・無動を主症状とし、病初期から自律神経障害や小脳失調がみられるという特徴がみられる。これらの類縁疾患はパーキンソン病と症状の相違点があるにもかかわらず、パーキンソン病との鑑別が困難な場合が多く、特に病初期には診断に苦慮する。临床上では、レボドーパへの治療反応性、起立性低血圧などの自律神経症状、小脳症状の有無、**extensor planter response** などの有無で鑑別するが、これらは必ずしも特異的な徴候とは言えないので、他の神経学的臨床検査と合わせて診断する必要がある。本研究はこのような補助的診断技術の必要性に着目して、運動誘発電位 (MEP) の特徴を抽出し利用しようとするところみである。中枢神経の刺激方法として、近年各種神経系の病態生理学的な変化をもとにした検査方法として注目されている経頭蓋磁気刺激 (TMS) を用い、これらパーキンソン病類縁疾患の診断への TMS の実用性を検討した。

対象となった患者は高知大学附属病院の神経内科を受診した PD25 名、PSP10 名、MSA13 名、計 48 名の患者で、TMS には円形コイルをプローブとして用い、利き手側の運動野を刺激して MEP の各種パラメーターが測定された。診断には過去の診療録を参考にし、さらに必要に応じて頭部 MRI、心筋シンチグラフィ、脳血流 SPECT、head-up tilt test、膀胱機能検査などが追加された。TMS によって得られた MEP の測定項目では、閾値 (MT)、潜時 (L)、運動誘発電位振幅 (MEPA)、中枢神経伝導時間 (CMCT) を小指外転筋より記録し、次に cortical silent period(CSP)を第一背側骨幹筋より記録した。罹病期間に無関係にこれらのパラメーターを測定し、各疾患群で比較した、また罹病期間 3 年以内の群でも比較してみた、というのが本研究の研究デザインである。

結果は以下のように要約される。① CMCT、MT、L、CSP は三群の疾患の間で統計学的に有意に異なり、MT は PD 群に比べて MSA 群で有意に高値を示し、また CMCT と CSP は、PD 群において PSP、MSA 各群と比べて有意に短かった。測定されたパラメーターで有意差のみられた CMCT、MT、L は上位運動ニューロンの障害を反映していると考えられており、錐体路障害の起きることが病理学的検査から知られている PSP、や MSA と、一般に錐体路症状を来さない PD との違いが反映された結果と考えられる。② PD では線条体のドーパミン欠乏状態による motor thalamus の過剰な抑制のため皮質運動野、運動連合野の抑制がおこり、他の類縁疾患に比べて CSP の短縮が認められた。③ 罹病期間が 3 年以内の群でも CMCT と CSP は PD において他の群よりも有意に短縮していた。これらの結果により、診断早期の臨床症状からは鑑別診断がつきにくいパーキンソン病と他の類縁疾患において、TMS が診断補助手段として有用であることが示された。

本研究は神経疾患のなかでも症例数の多いパーキンソン病と他の類縁疾患を取り上げており、比較的病歴の浅い患者においても TMS による MEP のパラメーターの測定が鑑別診断に有効であることを示している。これらの所見は臨床的に有用であるばかりでなく、病態生理にも関したパラメーターを計測、比較していることから、今後のこれら疾患の病態生理学的研究に役立つデータが得られたと考えることができる。TMS は SPECT などに比べて簡便な侵襲の少ない測定機器による検査であり、今後他の神経疾患への応用も期待されるなど、臨床上有用性が高まる可能性のある機器である。本研究では発病頻度の低い貴重な症例を長期間にわたって経過を追い、その神経学的な特徴を詳細に調べているので、得られたデータは臨床研究上高い価値をもっていることが推察される。

本論文では必要十分な症例数をもとに適切な統計解析が行われており、また一流の権威ある雑誌に掲載されている。本論文の結果が今後臨床応用されれば、比較的初期に PD の確定診断が可能となることから、PD 患者の治療に対する貢献度の高い結果と評価することができる。したがって、本論文は高知大学医学部大学院博士課程の学位論文として適切であることが審査員全員によって認められた。

氏名(本籍)	森澤 理恵 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第40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20年3月5日
学位論文題目	Neuronal conditions of spinal cord in dermatitis are improved by olopatadine (オロパタジン は接触皮膚炎により生じる脊髄神経の病的状態を改善させる)
発表誌名	European Journal of Pharmacology 547(1-3):45-51 2006年10月

審査委員	主査	教授	由利	和也
	副査	教授	横谷	邦彦
	副査	教授	上野	脩幸

## 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 理恵

## 論文題目

Neuronal conditions of spinal cord in dermatitis are improved by olopatadine (オロパタジンは接触皮膚炎により生じる脊髄神経の病的状態を改善させる。)

(論文要旨)

### <目的>

掻痒やそれに伴って生じる搔破行動が湿疹・皮膚炎病変の形成に大きく関わっている。皮膚病変から生じたヒスタミンは皮膚の知覚神経を刺激し、脊髄後角において substance P や神経細胞の活動性を示す c-Fos の発現を増加させることが分かっている。現在、アレルギー性鼻炎、蕁麻疹、種々の掻痒を伴う皮膚疾患の治療に種々の抗ヒスタミン剤が用いられているが、脊髄の知覚神経への作用に関する研究はほとんどない。本研究では、アレルギー性接触皮膚炎マウスの搔破行動、脊髄後角における c-Fos と substance P の発現、皮膚炎病変部における炎症細胞浸潤やサイトカイン産生を測定して、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 antagonist であるオロパタジンのアレルギー性皮膚炎における神経および皮膚に対する作用を検討した。

### <方法>

#### 1. 接触皮膚炎モデルマウスの作成

BALB/c マウスの背部に diphenylcyclopropenone (DCP) を塗布し感作成立後、DCP を右足底もしくは背部に連日塗布しアレルギー性接触皮膚炎を発症させた。オロパタジンの内服は DCP 塗布の 1 時間前におこなった。搔破行動や脊髄後角の神経細胞の観察には足底に塗布したマウス、皮膚炎の皮膚病理組織学的評価やサイトカイン測定には背部に塗布したマウスを用いた。搔破行動、脊髄後角の観察は、同様に抗ヒスタミン作用を有するクロルフェニラミン、セチリジン、フェキソフェナジンを内服させたマウスについても行った。

#### 2. 搔破行動の観察

DCP 塗布の 5 分後より 10 分間、ビデオテープに録画し搔破行動の回数を求めた。

#### 3. 脊髄後角の観察

足底に DCP を塗布したマウスの腰椎レベルでの脊髄組織切片を作製し、c-Fos、 substance P の発現を蛍光顕微鏡で観察した。c-Fos 陽性細胞については細胞数を測定した。脊髄の substance P は腰椎レベルの脊髄組織をホモジナイズし、遠心分離後の上清を試料として、Enzyme immunoassay 法で定量した。

#### 4. 皮膚炎局所の観察

マウス背部の皮膚炎部の皮膚を採取し、病理組織学的評価として表皮の厚さ、真皮の炎症細胞数および肥満細胞数を測定した。また、皮膚炎部の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、MIP-2 量を Enzyme Linked Immunosolvent Assay 法にて定量した。

##### <結果および考察>

DCP 塗布により生じた接触皮膚炎のモデルマウスにおいて、オロパタジンは有意に搔破行動を抑制し、脊髄後角での c-Fos 陽性細胞数を減少させ、substance P の発現を抑制した。これらの作用は、クロルフェニラミン、セチリジン、フェキソフェナジンよりも強く認められた。皮膚病変においては、オロパタジン投与群は非投与群と比較して浸潤している肥満細胞や炎症細胞数が少なく、サイトカイン量の分析では IFN- $\gamma$ 、IL-4、MIP-2 が有意に抑制され、IL-6 はわずかに減少した。これらの結果から、オロパタジンは接触皮膚炎において、itch-scratch の連鎖に強く作用して、皮膚病変だけでなく脊髄における知覚神経の病的状態をも改善させることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	森 澤 理 恵
審 査 委 員	主 査 氏 名	由 利 和 也 
	副 査 氏 名	横 谷 邦 彦 
	副 査 氏 名	上 野 脩 幸 

題 目    Neuronal conditions of spinal cord in dermatitis are improved  
by olopatadine  
(オロパタジンは接触皮膚炎により生じる脊髄神経の病的状態を改善させる)

著 者    Rie Hamada, Masahiro Seike, Reiko Kamijima, Mitsunori Ikeda,  
Hajime Kodama, Hiroshi Ohtsu

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    ),    年    月  
European Journal of Pharmacology    547(1-3):45-51    2006年10月

### 要 旨

アレルギー性接触性皮膚炎は、原因物質との接触により皮膚の炎症細胞が感作された後、再度その原因物質に接触することによって、皮膚の炎症細胞の活動性が上昇し湿疹を誘発するものであり、掻痒やそれに伴って生じる搔破行動が病変の形成に関与する。アレルギー性接触性皮膚炎における代表的な炎症細胞は肥満細胞であり、肥満細胞からは局所にヒスタミンが放出される。ヒスタミンは皮膚に分布する知覚神経を刺激し、脊髄視床路を介して脳に掻痒感を引き起こすものと考えられる。すでに申請者らは、アレルギー性接触性皮膚炎の脊髄後角において知覚の神経伝達物質である substance P やニューロンの活動性を示す c-Fos の発現が増加することを報告したが、抗ヒスタミン剤投与後の脊髄の変化については不明である。近年、抗ヒスタミン剤としてアレルギー性鼻炎、蕁麻疹、種々の掻痒を伴う皮膚疾患の治療にヒスタミンH<sub>1</sub>

受容体 antagonist であるオロパタジンが使用されている。今回の研究では、アレルギー性接触性皮膚炎における脊髄後角および皮膚に対するオロパタジンの作用を詳細に検討した。

BALB/c マウスの背部に diphenylcyclopropenone (DCP) を塗布し感作成立後、DCP を右足底または背部に連日塗布してアレルギー性接触性皮膚炎を発症させた。行動解析は、5 週目まで毎週、DCP 塗布後 10 分間の搔破回数を計測した。組織学的には脊髄後角における substance P および c-Fos の発現を免疫組織化学法にて観察した。substance P の定量には enzyme immunoassay 法を用いた。行動および脊髄後角の観察は、抗ヒスタミン作用を有するクロルフェニラミン、セチリジン、フェキソフェナジンを内服させたマウスについても行った。また、背部に DCP を塗布して作成したアレルギー性接触性皮膚炎より皮膚を採取し、肥満細胞数の計測を行った。皮膚炎部の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) 量を enzyme immunoassay 法にて定量した。

その結果、DCP 塗布後 3 週間、右足底の搔破回数は増加したが、オロパタジン内服により搔破回数は有意に減少を認めた。DCP 塗布マウスでは、脊髄後角における substance P 免疫反応陽性線維および c-Fos 陽性細胞数の増加を認めたが、オロパタジン内服によりこれらの陽性反応は減少を示した。また、脊髄後角の substance P 量は、DCP 塗布マウスにおいて増加したが、オロパタジン内服により低下した。これらの搔破回数の減少、c-Fos 陽性細胞数の減少、substance P 量の低下は、クロルフェニラミン、セチリジン、フェキソフェナジンでは観察されなかった。皮膚炎部で増加した肥満細胞はオロパタジン内服により有意に減少した。皮膚炎部の IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-6、MIP-2 量は DCP 塗布マウスにおいて増加したが、オロパタジン内服により IFN- $\gamma$ 、IL-4、MIP-2 量は有意な減少を示した。

DCP 塗布により作製されたアレルギー性接触性皮膚炎マウスにおいて、オロパタジンは有意に搔破回数、脊髄後角での c-Fos 陽性細胞数および substance P 量を低下させた。これらの作用は、クロルフェニラミン、セチリジン、フェキソフェナジンでは観察されなかった。これらのオロパタジンの作用はヒスタミン $H_1$  受容体 antagonist としてだけでなく IFN- $\gamma$ 、IL-4、MIP-2 といったサイトカインの抑制が関与する可能

性がある。オロパタジンはアレルギー性接触性皮膚炎において、掻痒と掻破の連鎖を強く抑制することで、皮膚炎を改善して脊髄後角への知覚入力を減少させるものと考えられた。

審査員一同は、アレルギー性接触性皮膚炎の治療には掻痒と掻破を抑制することが重要であることが示された点で優れた研究であると評価し、高知大学博士（医学）に相応しいものと判断した。