

2006. 4

特集号



国立大学法人 高知大学学報

(題字：相良祐輔学長)

高知大学学位授与記録第十号

評価広報課 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。

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第 18 号	山内 祥豪	Vulnerability of synaptic plasticity in the complexin II knockout mouse to maternal deprivation stress (コンプレキシン2 遺伝子欠損マウスの母子分離ストレスにおけるシナプス可塑性の脆弱性)	1
乙医博第 20 号	上村 和紀	A self-calibrating telemetry system for measurement of ventricular pressure-volume relations in conscious, freely moving rats (ラットにおいて心室圧-容積関係を、覚醒・非拘束状態で計測する、自己校正遠隔測定システム)	4
乙医博第 21 号	深田 聡	Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma (腎細胞癌の転移における血管新生の意義)	7
乙医博第 22 号	片岡 万里	Psychological well-being and associated factors among elderly Hansen's Disease patients in leprosaria (ハンセン病療養所入所高齢者の精神的健康とその関連要因)	10
乙医博第 23 号	速瀬 啓純	Similar anti-mitochondrial antibody reactivity profiles in familial primary biliary cirrhosis (家族内発症PBCにおける抗ミトコンドリア抗体プロファイルの同一性)	16
乙医博第 24 号	林 芳弘	Assessment of anti-estrogenic activity of tamoxifen in transgenic mice expressing an enhanced green fluorescent protein gene regulated by estrogen response element (エストロゲン応答配列によって制御される緑色蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだマウスを用いたタモキシフェンの抗エストロゲン作用の解析)	19

氏名(本籍)	山内 祥豪 (徳島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第18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17年12月28日
学位論文題目	Vulnerability of synaptic plasticity in the complexin II knockout mouse to maternal deprivation stress (コンプレキシン2遺伝子欠損マウスの母子分離ストレスにおけるシナプス可塑性の脆弱性)
発表誌名	Brain Research 1056(1), 59-67 2005年9月14日
	審査委員 主査 教授 椛 秀人 副査 教授 横谷 邦彦 副査 教授 八木 文雄

論文の内容の要旨

コンプレキシン(CPLX)は SNARE 複合体に結合するシナプス前蛋白であり、神経伝達物質の遊離に関与すると考えられているが、その生理学的な役割は定かでない。CPLX は二つの亜型があり(CPLX I、CPLX II)、それぞれ脳において異なる部位に発現している。CPLX II は海馬などで興奮性の神経細胞に選択的に発現しているが、統合失調症患者では海馬や小脳での CPLX II 発現の減少が報告されている。我々は CPLX II の働きを調べるために CPLX II 遺伝子欠損マウスの海馬におけるシナプス反応および空間学習能を調べ、野生型マウスと比較した。また、統合失調症をはじめとする精神疾患は、遺伝的要因などによるストレス脆弱性と幼少期の社会心理的ストレスなどの環境要因がその発症過程に関係している可能性があると言われる。我々は CPLX II 遺伝子欠損マウスに母子分離ストレスを与えた後、同様に海馬の機能を調べて、幼少期の心理ストレスがその後のこの遺伝子欠損マウスの脳機能に影響をおよぼすかどうかを調べた。

<方法>

- ①動物: CPLX II 遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いた。PCR にて遺伝子型の特定をした後、電気生理学的実験に生後 24-30 日の雌雄を、行動実験に生後 56-63 日の雄を用いた。
- ②母子分離ストレス: 仔マウスを生後 2 日目から 15 日目まで1日1回1時間、別のケージに分離した。
- ③電気生理学的実験: マウスの海馬スライスを作成し、シェーファー側枝を刺激して、海馬 CA1 領域錐体細胞層の興奮性シナプス後集合電位(fEPSP)を細胞外記録した。基本的なシナプス反応を調べるために、入力/出力の関係、2 発刺激増強(PPF)、テタヌス刺激後増強(PTP)を計測した。また長期のシナプス可塑性として長期増強(LTP)、長期抑圧(LTD)を調べた。

④行動実験:空間学習を調べるためモリス水迷路試験を行った。直径 80cm の円型のプールの水面下 15mm に一辺 10cm の正方形のプラットフォームを固定した。マウスを静かに水に入れ、60 秒間もしくはプラットフォームにたどりつくまで泳がせ、プラットフォームの場所を学習させた。これを 30 分間隔で 1日4トライアル、連続 5 日間行った。プラットフォームにたどりつくまでに要した時間、泳いだ距離などを解析した。5日目の最終トライアルの後には、プラットフォームを取り除き、60秒間自由に泳がせて遊泳状況を観察しプローブトライアルとした。

<結果>

母子分離ストレスを与えていないマウスでは、電気生理学的なシナプス伝達の反応とシナプス可塑性、およびモリス水迷路試験による空間記憶において、CPLXII 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの間に有意な差を認めなかった。対照的に、母子分離ストレスを与えると、CPLXII 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べ、PTP と LTP 誘導において有意な低下を示した。またモリス水迷路試験においてプラットフォームにたどりつくまでに要した時間に有意な遅延を認め、プローブトライアルではプラットフォームのあった場所に滞在する傾向が有意に少なかった。

<考察>

母子分離ストレス下で CPLXII 遺伝子欠損マウスに認められた海馬機能の障害は、高頻度刺激における神経伝達物質の放出が少ないことが原因と考えられた。今回の結果は、CPLXII がなくとも環境ストレスに対する脆弱性がより増すことを示唆するものであった。CPLXII 発現の障害が統合失調症をはじめとする精神疾患の発症に関与しているかもしれない。

論文審査の結果の要旨

シナプスにおける神経伝達物質の開口放出は、種々のシナプス前タンパク質が関わり複雑に制御されている。コンプレキシンは、開口放出制御に関わるシナプス前タンパク質の1つとして知られているが、その機能の詳細は不明である。コンプレキシンには I と II の二つの亜型が存在し、これらの脳における発現部位は異なっている。興味深いことに、統合失調症、双極性感情障害といった精神疾患患者の海馬で、コンプレキシン II の発現量が低下しているとの知見が報じられている。統合失調症をはじめとする精神疾患の発症には、遺伝的要因などによるストレス脆弱性と幼少期の社会心理的ストレスなどの環境要因が関わりと考えられている。しかし、コンプレキシン II 遺伝子の異常が遺伝的要因としてストレス脆弱性に関わるか否かについては、未だ不明な点が多い。

そこで申請者は、コンプレキシン II の機能およびストレス脆弱性との関連性を明らかにするために、コンプレキシン II 欠損マウスに母仔分離ストレスを与え、海馬におけるシナプス反応、シナプス可塑性および海馬の機能を反映した空間学習の変化を詳細に検討した。

具体的には、コンプレキシシ II 欠損マウスと野生型マウスを用い、電気生理学的実験には 24-30 日齢の雌雄を、行動実験には 56-63 日齢の雄を用いた。母仔分離ストレス負荷として、仔マウスを生後 2 日目から 15 日目まで毎日 1 回 1 時間、母親から離すという操作を行った。電気生理学的実験では、海馬スライスを作成し、シェーファー側枝を刺激して、海馬 CA1 領域錐体細胞層の興奮性シナプス後集合電位 (fEPSP) を記録し、その電位の短期可塑性の指標である 2 発刺激増強、テタヌス後増強や長期可塑性の指標である長期増強、長期抑圧などを計測した。行動実験では、モリス水迷路試験を行った。直径 80 cm の円形プールの水面下にプラットホームを固定し、マウスが泳いでプラットホームにたどりつくまでの時間、泳いだ距離などを解析した。30 分間隔で 1 日 4 回、連続 5 日間行った。5 日目の最後の試行の後には、プラットホームを取り除いた条件で、60 秒間自由に泳がせ、プラットホームが設置されていた場所の探索行動を計測した。

得られた成績のうち要点を纏めると次のようになる。

1) 母仔分離ストレスを与えない場合、電気生理学的に検討した短期および長期の可塑性、行動学的に検討したモリス水迷路試験による空間記憶ともにコンプレキシシ II 欠損マウスと野生型マウスとの間に有意差は認められなかった。

2) これに対して、母仔分離ストレスを与えた場合、野生型マウスに比較してコンプレキシシ II 欠損マウスでは、短期可塑性の指標であるテタヌス後増強と長期可塑性の指標である長期増強が有意に低下するに加えて、空間記憶機能も有意に低下していた。このような異常は、コンプレキシシ II の欠損によるストレス脆弱性の増大が脳の発達に影響し、ひいては高頻度刺激に対する神経伝達物質の放出の低下をもたらしたことによると申請者らは考察している。

以上の成績から、コンプレキシシ II はストレス脆弱性に抗する因子であることが判明した。また、コンプレキシシ II の低下はストレス脆弱性を示す精神疾患の発症に関わりうることが示唆された。

本論文は、神経伝達物質放出機構の解明のみならず、ストレス脆弱性を示す精神疾患の病態解明にも大きく寄与することが期待され、高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと認められる。

氏名(本籍)	上村 和紀(熊本県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第20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18年1月17日
学位論文題目	A self-calibrating telemetry system for measurement of ventricular pressure-volume relations in conscious, freely moving rats (ラットにおいて心室圧-容積関係を、覚醒・非拘束状態で計測する、自己較正遠隔測定システム)
発表誌名	American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 287巻6号 H2906-2913 2004年12月
	審査委員 主査 教授 笹栗 志朗 副査 教授 真鍋 雅信 副査 教授 杉浦 哲朗

論文の内容の要旨

〔背景〕ラットやマウスなどの小動物は様々な心血管疾患モデルを提供し疾患の分子生物学的知見を提供しうることから、心血管研究において必要不可欠な実験動物となっている。これらの動物において、分子生物学的知見と心室機能との連関を正確に検討することはきわめて重要である。負荷状態に影響されることが少なく、心室固有の収縮能・拡張能を表すことができる心室圧容積関係は、これまでもラットやマウスでコンダクタンスカテーテルや超音波クリスタルを用いて測定されてきた。しかしこれまでの方法では急性実験での測定のみが可能であり、麻酔や外科的侵襲による心機能への悪影響が避けられなかった。また薬物治療などが心室機能にきたす経時的変化を、長期に詳細に検討することは不可能であった。このため覚醒・非拘束状態という限りなく生理的条件に近い状態にて、慢性長期間にわたり、心室圧容積関係を取得することが望まれていた。

このような背景のもとに我々は、覚醒・非拘束ラットにおいて左心室圧容積関係を長期間連続計測することが可能な、完全植込み型遠隔測定コンダクタンスカテーテルシステムを開発した。

〔方法と結果〕このシステムは、体内に埋め込まれる心室圧コンダクタンス測定カテーテル(径0.6mm)と送信機(重量14g)、また体外の受信機とデータを解析保存するコンピュータからなる。ラット左心室に留置された心室圧コンダクタンス測定カテーテルにてラット心室のコンダクタンス信号・心室圧・心内心電図信号を採取する。これらの信号は送信機内にてアナログ-デジタル変換された後、Bluetooth無線技術により体外の受信機に送信される。得られたコンダクタンス信号は血液抵抗率・パラ

レルコンダクタンスにて較正され心室容積値が算出される。しかし従来法では、これらの較正には採血・食塩水静注という体外作業が必要であり覚醒・非拘束状態での計測には障害となっていた。本システムではそのような体外操作を排し、血液抵抗率・パラレルコンダクタンスをカテーテル自身で推定し、容積較正を行う。カテーテル部は容積コンダクタンス測定電極に加え、心室内にて血液抵抗率を計測するための極小電極（極間距離 0.1mm）を有する。これらの電極の極間距離は充分小さいため、電流はラット心室内血液のみに収束し、得られた信号は血液抵抗率のみを反映する。10匹のラットにて、このように推定された血液抵抗率は、採血後体外キュベットにて測定した血液抵抗率と良好に一致した（標準推定誤差=10.7Ω·cm、決定係数=0.88）。パラレルコンダクタンスは心筋と血液の伝導度周波数特性の違いを利用した二重周波数法(2kHz および 20 kHz)にて推定される。13匹のラットにてこのようにして推定されたパラレルコンダクタンスは、食塩水静注法にて推定された値と良好に相関した（標準推定誤差=0.33mS、決定係数=0.87）。

4匹のラットにて、このように推定された血液抵抗率・パラレルコンダクタンスから較正し算出した心室容積に基づく一回拍出量を、超音波血流計で測定した一回拍出量と比較し最終的な容積計測精度を検討した。計測精度は良好であった（標準推定誤差=6.6μl、決定係数=0.96）。6匹のラットにて平均3日間システムを植込み、心室圧容積関係計測の再現性を検討した。複数回の測定でも心室容積・心室圧の計測値は一定し、分散は小さく（拡張末期容積 13±8%、収縮末期容積 20±17%、拡張末期圧 28±16%、収縮末期圧 6±4%）、再現性は良好であった。

〔結論〕我々が開発したシステムは、採血や食塩水投与等の体外較正作業を要さず、覚醒非拘束ラットにおいて、心室の圧容積関係を正確に再現性よく計測することが可能であった。本システムは無線送信に Bluetooth 無線技術を用いており、同時に多数の個体（最大7匹）と1個の受信機の間でデータの送受信が可能である。治療実験において生存率などの検討に多数のラットが使用される。このような際に心機能を測定する上で、我々が開発したシステムは極めて有用と期待される。

論文審査の結果の要旨

心血管研究においてラット、マウスなど小動物を用いた疾患モデルは広く用いられる手法となっている。負荷状態に影響されない心室機能の評価法としての心室圧容積関係は、これまでラット、マウスにおいてもコンダクタンスカテーテルや超音波クリスタルを用いて測定されてきたが、急性実験のみでの測定が可能で、また、麻酔や手術侵襲の影響を排除できない欠点を有した。本研究は、覚醒・非拘束状態という生理的条件下で、かつ慢性長期間にわたる心室圧容積関係の計測可能なテレメトリシステムを開発したものである。

システムは体内に埋め込まれる心室圧コンダクタンス測定カテーテルと送信機、また、体外の受信機とデータ解析保存コンピュータからなり、左室内からのコンダクタンス信号をカテーテルそのものから

得られた血液抵抗率、パラレルコンダクタンスで自己較正し、デジタル信号として Bluetooth 無線技術で体外の受信機に送信して心室容積を算出するものである。

このシステムの精度を確認するために1)カテーテルで推定された血液抵抗率を10匹のラットを用い採血による体外キュベット法による血液抵抗率の実測値と比較検討し、標準推定誤差 $10.7 \Omega \cdot \text{cm}$ 、決定係数0.88で良好に一致することを確認した。2)同様に13匹のラットを用い、カテーテルで2重周波数法を用い測定されたパラレルコンダクタンスは、食塩水静注法で推定された値と相関することを確認した(標準推定誤差0.33mS,決定係数0.87)。3)4匹のラットを用い、血液抵抗率、パラレルコンダクタンスから算出された心室容積に基づく一回拍出量と超音波血流計で測定した値とを比較し、その精度を確認した。4)さらに6匹のラットを用い、平均3日間、システムの安定性を心室圧容積の計測で確認した。

以上より、本研究は心室コンダクタンス装置の超小型化とテレメトリ化を図ることで小動物の心室容積、心室機能を覚醒状態で、長期間計測可能とする画期的なシステムを開発したことで意義があり、心臓病の研究に大いに貢献するものと考えられる。よって、本論文は高知大学博士(医学)の学位授与に値するものと審査員一同は判断した。

氏名(本籍)	深田 聡 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第21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18年2月21日
学位論文題目	Levels of angiogenesis and expression of angiogenesis-related genes are prognostic for organ-specific metastasis of renal cell carcinoma (腎細胞癌の転移における血管新生の意義)
発表誌名	Cancer 2005 March 1;103(5):931-942 2005年3月

審査委員	主査 教授	山本 哲也
	副査 教授	杉浦 哲朗
	副査 教授	麻生 悌二郎

論文の内容の要旨

【目的】近年、癌転移における臓器親和性の分子生物学的裏付けが、標的臓器の微小環境における接着、細胞外基質分解、走化・運動、増殖、血管新生などに関わるいわゆる”微少環境因子”の発現の観点から検討されている。今回、腎細胞癌の転移に関して、限局性腎細胞癌原発巣、転移性腎細胞癌原発巣および各転移巣において、血管新生関連因子の発現を比較し、転移さらには臓器親和性に対する意義を検討した。

【対象と方法】限局性腎細胞癌 30 症例(原発巣:30 標本)、転移性腎細胞癌 24 症例(原発巣:24 標本、転移巣:38 標本)の計 54 症例 (92 標本)を対象とした。腫瘍内新生血管数(MVD)は、抗 CD34 抗体を用いた Immunohistochemistry にて、血管新生関連因子(bFGF (basic fibroblast growth factor)、VEGF (vascular endothelial cell growth factor)、IL-8 (interleukin-8)、matrix metalloproteinases (MMPs): MMP-9 (matrix metalloproteinase type 9)、MMP-2 (type 2)、E-cadherin)の発現は、各特異的 Probe を用いた mRNA *In Situ* Hybridization にて検討した。各因子の発現に加え、matrix metalloproteinases と E-cadherin の発現比である M/E ratio*も因子として解析した。

【結果】臨床病理学的因子では、pT-stage において metastasis-free survival rate の有意差を認めた(p=0.026)。原発巣において、転移性腎細胞癌は、限局性腎細胞癌と比較して、MVD と M/E ratio は高値で、metastasis-free survival rate の有意差を認めた(p=0.000025, 0.000041)。転移性腎細胞癌において、転移巣は原発巣と比較して、MVD は高値で、各血管新生関連因子も高発現であった。さらに転移臓器別の

因子発現に関して、特に肺転移巣において、MVD 高値、MMPs 高発現、M/E ratio 高値が顕著であった。

【まとめ】血管新生、MMPs 発現、M/E ratio が腎細胞癌の転移、特に肺転移に対する重要な規定因子であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】

近年、腎癌による死亡者数は年々増加の傾向にあり、なかでも、転移を伴う腎癌の予後は不良である。腎癌の治療成績を向上させるためには転移巣の制御が重要で、そのためには、転移を予測し、早期に発見することが求められる。腎細胞癌の転移の予測は臨床病理学的因子などより試みられてきたが、満足な結果が得られているとは言えない。癌の転移においては、血管新生ならびに血管新生関連因子が大きく関わっていることが明らかとなり、腎細胞癌の転移においてもこれらの因子が関わっていると想定される。そこで、著者らは転移を有さない腎癌の原発巣ならびに転移を有する腎癌の原発巣および転移巣における微小血管密度ならびに血管新生関連分子の発現を比較し、これらと転移の有無との関連を検討するとともに、腎癌の転移予測マーカーを明らかにすることとした。

【対象と方法】

対象は、転移の無い腎細胞癌 30 例（原発巣：30 病巣）および転移を有する腎細胞癌 24 例（原発巣：24 病巣、転移巣：38 病巣）で、これら 92 病巣において、腫瘍内の微小血管密度（MVD）を抗 CD34 抗体を用いた免疫組織染色法にて検討するとともに、Basic fibroblast growth factor (bFGF)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Interleukin-8 (IL-8)、Matrix metalloproteinase-2 および-9 (MMP-2 および-9)、E-cadherin の mRNA の発現を各分子に特異的なプローブを用いた In situ hybridization 法にて検討した。そして、これらの発現レベルさらには MMP (MMP-2 および-9 の発現レベルの平均値) と E-cadherin の発現比 (M/E 比) を、臨床病理学的因子、各原発巣および転移巣、さらには、無転移生存率との関連において比較検討した。

【結果】

1) 臨床病理学的因子と無転移生存率との関連では、性別、年齢および病理組織学的悪性度と無転移生存率との間に関連は認められなかったが、pT2 以上の無転移生存率は pT1 のそれに比べ有意に低値であった ($p=0.026$)。2) 転移性腎細胞癌原発巣における MVD レベル、MMP-2 発現および M/E 比は、限局性腎細胞癌原発巣のものよりいずれも有意に高値であった (いずれも $p<0.05$)。3) 転移性腎細胞癌の転移巣は原

発巣に比べ、MVD が有意に高値で、MMP-2、MMP-9、bFGF、VEGF および IL-8 の発現レベルも有意に高く、さらには、M/E 比も有意に高値であった (いずれも $p < 0.05$)。4) MVD、VEGF、IL-8、MMP-2 および M/E 比がカットオフ値より高値であった症例は、これらがカットオフ値より低値であった症例に比べ有意に無転移生存率が劣っていた ($p=0.000025$ 、 $p=0.039$ 、 $p=0.048$ 、 $p=0.0009$ および $p=0.000041$)。5) 多変量解析の結果、MVD および M/E 比が腎細胞癌原発巣における独立した転移予測因子であった ($p=0.049$ および $p=0.001$)。6) 原発巣に比べ、肺転移巣では MVD、bFGF、MMP-9、MMP-2 および M/E 比が、リンパ節転移巣では IL-8、MMP-9 および M/E 比が有意に高値であり、多変量解析の結果、いずれの転移巣においても M/E 比が独立した転移予測因子であった ($p=0.01823$ および $p=0.03950$)。

【まとめ】

腎細胞癌においては MVD ならびに M/E 比が転移の特異的な予測因子で、なかでも肺およびリンパ節への転移の予測に有用であることが明らかとなった。これらの結果は、血管新生阻害剤が腎細胞癌の転移抑制や転移巣制御に有効であること、さらには、MMP-2、MMP-9 および E-cadherin が腎細胞癌の転移抑制ならびに制御における分子標的療法の標的になりうることを示唆しており、今後、これらのことを検討すべきであると考えられる。

氏名(本籍)	片岡 万里 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第22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18年3月6日
学位論文題目	Psychological well-being and associated factors among elderly Hansen's Disease patients in leprosaria (ハンセン病療養所入所高齢者の精神的健康とその関連要因)
発表誌名	Environmental Health and Preventive Medicine 10(4):201-207 2005年7月

審査委員	主査 教授	円山 英昭
	副査 教授	大原 啓志
	副査 教授	吾妻 健

論文の内容の要旨

わが国のハンセン病療養所入所者は、1996年のらい予防法廃止、1998年の隔離施策に対する政府への訴訟の勝訴などによって、社会復帰が促進されている。ところが全国15のハンセン病療養所入所者の平均年齢は76歳(2003)に達し、高齢化とハンセン病の後遺症による身体障害、長期間の療養所生活による社会的ネットワークの脆弱などによって、3,733名が療養所に留まっている。療養所では主観的な側面から健康状態を高め、豊かな余生を支援するためにさまざまな方策が実施されている。ハンセン病患者に関する先行研究は、ハンセン病の診断と治療に関するものが多く、心理・精神的側面に着目した報告は数少ない。そこで本研究はハンセン病療養所入所高齢者の精神的健康状態の関連を明らかにすることを目的に、1995年に国立ハンセン病療養所3箇所の入所者を対象者として、General Health Questionnaire(以下、GHQ-12)を用いて、生活と健康に関するアン

ケート調査を実施した。倫理的配慮として、実施に先立ち、入所者自治会、園長、看護部長に電話で調査の説明及び調査協力の依頼を行った後、調査票を郵送し、調査の承諾を得た。調査の前日に、一斉放送を利用して入所者全員に、調査の目的、方法、調査への参加は自由であること、調査票は無記名であること、データは個人を特定できない方法で処理されること、などの説明を行った。

調査票を回収した結果、回答率及び GHQ-12 の平均値は、男女とも 3 つの療養所は似ていたため、3 つの療養所のデータをまとめて解析を行った。その結果、性、年齢が明らかで、GHQ-12 の全ての項目に答えた 65 歳以上の男 459 名、女 295 名の計 754 名、回答率 80.9%、を解析対象者とした。関連要因として ADL の 6 項目、視力及び聴力の身体的側面、家族、友人、クラブ活動とそれらへの接触頻度に関する社会的側面について検討した。それぞれの項目について、t 検定を用いて 2 つのカテゴリーの間で GHQ-12 の平均値を比較した。また、ANCOVA で年齢を調整し、関連要因の各項目についてカテゴリー間の GHQ-12 値の差を検討した。

データを検討した結果、身体的側面では、男女とも歩行、食事、排泄に介助の必要なものは、必要でないものよりも GHQ-12 値は有意に高く、ANCOVA でも差は有意であった。男性では、入浴で介助が必要なもの、女性では視力の不自由、更衣及び整容において介助が必要なものは、介助の不要なものよりも GHQ-12 値は高く、その差は二つの解析方法で有意であった。社会的側面では、非活動的な一日を過ごしている男性と女性は、活動的な過ごし方をしているものよりも、GHQ-12 値は明らかに高かった。男性で親友のいないもの、近隣との接触頻度の少ないもの、クラブ活動への参加回数の少ないものは、そうでないものよりも GHQ-12 値は有意に高かった。以上の結果から、わが国のハンセン病療養所入所高齢者の精神的健康状態は、男女ともに、身体的な要因及び一日の過ごし方と関連していることが明らかになった。また、社会的な要因においては、男性と女性で違いがみられ、男性の精神的健康状態は女性よりも社会との人間関係及びそれらとの接触

頻度に関する要因と関連していた。今後、本研究で得られた精神的健康状態と関連要因の因果関係について、追跡研究を行い検討する必要がある。

論文審査の結果の要旨

研究の背景：「らい病」から「ハンセン病」へ

本研究論文の要旨および審査結果を記述する前に「らい病」に関する医学研究の歴史やわが国社会のこれまでの動向とわが国および世界の現状を整理しておく。

慢性の感染症であるらい病の病変は病変が進行すると外観を著しく損ね、悪臭を放つなどの症状を呈し、かつ長い間、原因が不明であったため、治療法の確立が遅れ、古来から、患者および近親者は不当な偏見と根強い差別を受けてきた。

- ・ 1873年 **Armauer Hansen** が患者の皮疹かららい菌（病原体）を発見
- ・ 1907年（明治40年） 「らい予防に関する法律」の制定
- ・ 1931年（昭和6年） 「癩予防法」制定、全ての癩患者を強制的に癩療養所に収容
- ・ 1943年（昭和18年） 治療薬として、サルファ剤のプロミン開発、プロミンの単剤治療による画期的な成功例の報告
- ・ 1951年（昭和26年） 全国国立癩療養所患者協議会（全癩患協）発足
- ・ 1953年（昭和28年） 全癩患協は「全国国立療養所ハンセン氏病患者協議会」と名称を変更
- ・ 1953年（昭和28年） 「癩予防法」の廃止、「らい予防法」の制定
“らい予防法”：都道府県知事は患者に療養所への入所勧奨や入所命令を行う他に、入院させることが出来る。一方、患者や親族に対する差別的取扱いを禁止する
- ・ 1996年（平成8年） 「らい予防法」の廃止
- ・ 1998年（平成10年） ハンセン病療養所入所者が「らい予防法」による強制隔離政策による人権侵害に対して損害賠償訴訟を国を相手に起こす
- ・ 2001年（平成13年） 熊本地裁が上記の訴えに対し国に賠償を命じる判決を下す

世界およびわが国の現状：

世界ではハンセン病は現在もなお重要な感染症であり、患者総数は約1,200万人で、アジア、アフリカに多く、年間新規発生患者は約68万5,000人といわれる。一方、わが国におけるハンセン病患者の発生は少なく、患者は年々減少しており、新届出患者もここ数年、毎年約5名前後である。わが国では患者の強制隔離を目的とした「らい予防法」が廃止され、さらに化学療法剤、リファンピシン（rifampicin, RFP）、DDS（ダブソン）、B663（クロファジミン、clofazimine）などの多剤併用療法の普及により、菌の消失がおこり、病気の進行が抑えられ、在宅医療や外来医療など患者の社会復帰が可能となり、年間、約10.余人の若年罹患者が“軽快退院”している。しかし、現実には、入院加療を必要とする（菌陽性の患者はわずか2~3%にすぎない）、あるいは後遺症による視力や身体機能の障害などの医学的理由というより、さまざまな未解決の社会的要因のために大多数の患者は退所が困難であり、現在、約3,400人の患者が全国13ヶ所の国立ハンセン病療養所および2ヶ所の私立療養所に留まり、療養されている。

論文の要旨：

本研究の原型は、1991年（平成3年）大島青松園における申請者の調査に見ることが出来る。以後、学位論文申請者は、日衛誌（Jpn J Hyg）50（5）：939-946, 1995. および Bulletin of Allied Medical Sciences, Kobe（12：123-129, 1996；13：143-150, 1997；14：101-109, 1998）誌上で、あるいは国内、外の関連学会で「ハンセン病」について社会医学的研究の報告を続け、平成8（1996）～平成9（1997）年度科学研究費補助金基盤研究(C)に「ハンセン病療養所入所者の精神的健康状態とその関連要因（課題番号08670428）」が採択されている（研究代表者）。

今回の学位申請論文「ハンセン病療養所高齢患者の精神的健康とその関連要因」は上述した平成2年（1990）～平成7年（1995）の間、本学大学院博士課程に在学中の研究成果と、平成7年（1995）～平成11年（1999）に神戸大学医学部保健学科看護学専攻の助教授として、奉職中であった時代の研究内容に、さらに新しい視点からの解析結果を加えたものである。

研究目的：

ハンセン病療養所の高齢入所者の精神的健康に関連する身体的および社会的要因を明らかにする

対象者と調査方法：

国立ハンセン病療養所の3施設の入所者を対象として、個人情報保護や倫理面に十分に配慮して、調査票を作成し、徹底した informed consent を行い、さらに療養所患者自治会の協力などを得ながら、生活と健康に関するアンケート調査を実施した（1995.6.21～1995.7.23）。精神的健康については General Health Questionnaire（GHQ-12）の評価項目を使用した。3施設の入院、介護および一般棟の調査票をまとめ、性別、年齢が明瞭であり、GHQ-12の全項目について答えた65歳以上の男性459名、女性295名、計754名（回答率80.9%）を解析対象者とした。精神的健康に関連する要因として、①. 身体的要因では Activity daily living（ADL）の6項目（歩行、食事、入浴、排泄、更衣、整容）および視力や聴力の合計8項目、②. 社会的要因では配偶者、親戚、親友やクラブ活動への参加の有無およびそれらの接触頻度、そして1日の過ごし方について検討している。①. ②. とも GHQ-12 の得点の平均値を、①. では [不自由のある群とない群]、②. では [項目のある群とない群]、[接触の頻度の多い群と少ない群]、[活動的な群と非活動的な群] のそれぞれ2つのカテゴリーで、Student-t-test 法による検定を行った。一方では、年齢を調整し、各項目、各カテゴリーの GHQ-12 の得点の平均値の差について ANCOVA（analysis of covariance）で検討している。

結果：

① 身体的要素

男女とも介助の必要な者は必要でないものよりも GHQ-12 値は有意に高く、ANCOVA で調整してもその差は有意であった。各要素のうち、男性では入浴、

女性では視力が不自由、更衣および整容に介助が必要なものは不要なものよりも GHQ-12 値は高く、その差は2つの解析方法で有意であった。

② 社会的要素

男性では親友のいないもの、近隣との接触頻度の少ないものあるいはクラブ活動への参加が少ないものはそうでないものよりも GHQ-12 値は有意に高値であった。男女とも1日を非活動的に過ごしているものは、活動的な過ごし方をしているものより GHQ-12 値は高値であった。

考察および結論：

本研究結果はらい予防法廃止前の1995年に実施したアンケート調査に基づくものであるが、①. ハンセン病に新たに罹患した患者は少ない。②. 大多数の入所者は、未解決の社会的および心理的な事情などにより、療養所に長期間留まられ、療養されておられることなどの理由から、らい予防法廃止後の現在の状態をも反映していると考えられる。

- ① 身体的要因では、男女とも身体機能が障害されていると、精神的健康は低く、この事実は地域の高齢者の場合と同様であった。男性では入浴の不自由、女性では視力障害や整容と更衣の不自由な場合に精神的健康が十分ではないなど、性差により、関連する要因が異なった。
- ② 社会的要因では、男女とも活動的な過ごし方をしていることが、より高い精神的健康を生んでおり、これは地域および施設の高齢者の場合と同様であった。なお、男性は女性と比較して、社会的ネットワークの数とその頻度（密度）が精神的健康とより強く関連しており、女性の方が自己の周囲の社会的ネットワークの状態に対する適応力の高さがうかがわれる。

本研究の意義と展望：

1. わが国のハンセン病患者は前述のように高齢化が進み、社会的要因も加わり、療養所からの退所が極めて困難であるという現状があり、高齢入所者の豊かな QOL の確保と、その維持・増進は緊急の課題となっており、本研究はこれまでの診断と治療を中心としたハンセン病研究では見られない患者の心理・精神的側面に立脚し、高齢入所者の精神的健康に関連する身体的および社会的要因を解析したものであり、その研究結果は関係部署による今後の医療・福祉政策のための数少ない貴重な提言といえる。事実、この学位申請論文へと続く、申請者らの“参考論文”（1995）は、「らい予防法」の廃止（1996）前に掲載され、その雑誌編集者に大きな感慨を与えた。
2. 本研究はハンセン病療養所に入所している高齢入所者の精神的健康におよぼす身体的、社会的側面における関連要因を明らかにしているが、今後、両者の因果関係についても、さらに検討することが求められる。なお、本研究はプラバシィの保護および倫理的問題の大きな課題であったが、アン

ケートの実施には対象者に細心の配慮が払われており、この面における学位論文申請者の研究姿勢は入所者の理解などによる非常に高い回答率からうかがうことが出来る。

投稿誌 **Environmental Health and Preventive Medicine** は、日本衛生学会の機関誌 (official journal) で、The Japanese Society for Hygiene (日本衛生学会) が発行している。

雑誌の編集は、編集長 (Editor-in-Chief) が遠山千春先生 (東京大学大学院) で、他に 20 人の日本人編集委員 (Editors) と 48 名の国際査読者 (International reviewers) から構成され、1 論文は 2 名の査読者が校閲しており、査読体制は整っている。年に 4 回発行。

日本語版は「日本衛生学雑誌」で、平成 18 年 1 月号が 61 巻 1 号になる。

日本における疫学、公衆衛生学、衛生学の代表的な雑誌であり、Impact factor 獲得のため、現在、努力中である。

以上、本論文は申請者の永年にわたるハンセン病療養所入所者の精神的健康に関する研究の集大成であり、今回、特に 65 歳以上の高齢入所者へのアンケート調査から、所内生活で高い QOL を実現し、それを維持・増進する上で、極めて重要な示唆に富む社会医学的研究成果が得られており、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)	速瀬 啓純 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第23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18年3月20日
学位論文題目	Similar anti-mitochondrial antibody reactivity profiles in familial primary biliary cirrhosis (家族内発症PBCにおける抗ミトコンドリア抗体プロフィールの同一性)
発表誌名	Hepatology Research 33(2005) 33-38 2005年8月15日

審査委員	主査	教授	中村 裕之
	副査	教授	円山 英昭
	副査	教授	荒木 京二郎

論文の内容の要旨

A. 研究目的

原発性胆汁性肝硬変(PBC)の発症には、何らかの環境因子や免疫遺伝学的素因が関連すると想定されるが、本邦では家族内発症の報告は少なく、その発症頻度など詳細は明らかでない。今回、我々の経験したPBC家族内発症例について、臨床病理学および免疫遺伝学的に検討を行った。

B. 研究方法

1982年から2003年までの21年間に、当科を受診したPBC確診例85例のうち、家族内にPBCを発症した5家系と関連施設での1家系、計6家系を対象とし、一般肝機能検査、免疫学的検査、HLA、肝組織像等を検討した。また、抗ミトコンドリア抗体(AMA)の対応抗原のプロフィールをimmunoblotting法で検索する(74kD=PDC-E2、52kD=E3BP、50kD=BCOADC-E2、46kD=OGDC-E2)とともに、抗PDH-E2抗体のPDH酵素阻害活性(EIA)を検討した。

C. 研究結果

6家系の内訳は、姉妹例4家系、母娘例2家系で各家系に患者が2名の合計12名であった。母娘発症の2家系は、娘は母に比し、約20年若年で発症し、臨床症状

も重篤であった（家系 1：母＝無症候性 PBC、娘＝症候性 PBC（黄疸）、家系 2：母＝無症候性 PBC、娘＝静脈瘤破裂・肝不全）。姉妹発症の 4 家系では、ほぼ同じ年齢（±4 年）で発症あるいは診断がなされているが、診断時の Scheuer 分類で同一病期の家系は 1 家系のみであった。HLA（class I、II）は、2 家系で完全同一、4 家系はその半分が同一であった。AMA は 3 家系で同じ抗体価であり、immunoblotting 法（IgG）による検討では、1 家系を除く 5 家系で AMA は同一の抗原に対応した。家系 1：74kD / 52kD / 50kD、家系 2：74kD / 52kD / 50kD、家系 4：50kD、家系 5：50kD、家系 6：74kD / 50kD）。

D. 考察および結論

当科の PBC 家族内発症数は 85 例中 5 例（5.9%）で、その頻度は Tsuji らが広島で行った検討結果（5.1%）とほぼ同じであり、諸外国の結果（4-6%）と大きく変わらない。我が国において、PBC の発症頻度は対人口比で約 0.01% と推定されており、PBC の家族歴を有する場合は、それに比して 500 倍以上の発症の可能性があることとなり、家族歴は PBC 発症の危険因子といえる。

抗ミトコンドリア抗体のプロフィールが多くの家系発症で同一であることに関しては何らかの遺伝的要因あるいは病原微生物への暴露等を含めた環境因子の存在を強く想定させるが、今後、多数症例での検討が必要である。

論文審査の結果の要旨

原発性胆汁性肝硬変（PBC）の発症には、何らかの環境因子や免疫遺伝学的素因が関連すると想定されるが、本邦では家族内発症の報告は少なく、その発症頻度など詳細は明らかでない。今回、申請者は、PBC 家族内発症例について、臨床病理学および免疫遺伝学的に検討を行った。その対象は、1982 年から 2003 年までの 21 年間に、本学の第一内科を受診した PBC 確診例 85 例のうち、家族内に PBC を発症した 5 家系と関連施設での 1 家系、計 6 家系であった。一般肝機能検査、免疫学的検査、HLA、肝組織像等を検討した。また、抗ミトコンドリア抗体（AMA）の対応抗原のプロフィールを Immunoblotting 法で検索する（74kD, PDC-E2; 52kD, E3BP; 50kD, BCOADC-E2; 46kD, OGDC-E2）とともに、患者血清の PDC 酵素阻害活性（EIA）を検討した。6 家系の内訳は、姉妹例 4 家系、母娘例 2 家系で各家系に患者が 2 名の合計 12 名であった。母娘発

症の2家系は、娘は母に比し、約20年若年で発症し、臨床症状も重篤であった（家系1: 母、無症候性PBC; 娘、症候性PBC（黄疸）；家系2: 母、無症候性PBC; 娘、静脈瘤破裂・肝不全）。姉妹発症の4家系では、ほぼ同じ年齢（±4年）で発症あるいは診断がなされているが、診断時のScheuer分類で同一病期の家系は1家系のみであった。発症年齢が近似していることから、PBCの危険因子として、ある種のウイルス感染症や環境中の化学物質が指摘されており、本所見もこれを支持するものであった。

HLAハプロタイプは、2家系で完全同一、4家系はその半分が同一であった。AMAは3家系で同じ抗体価であり、Immunoblotting法（IgG）による検討では、1家系を除く5家系でAMAは同一の抗原に対応した（家系1: 74kD/52kD/50kD; 家系2: 74kD/52kD/50kD; 家系4: 50kD; 家系5: 50kD; 家系6: 74kD/50kD）。なお、74kDのバンドを検出した7家系は、すべてPDC酵素阻害活性が陽性であった。

申請者の所属する第一内科のPBC家族内発症数は85例中5例（5.9%）で、その頻度はTsujiらが広島で行った検討結果（5.1%）とほぼ同じであり、諸外国の結果（4-6%）と大きく変わらなかった。我が国において、PBCの発症頻度は対人口比で約0.01%と推定されており、PBCの家族歴を有する場合は、それに比して500倍以上の発症の可能性があり、家族歴はPBC発症の危険因子といえた。AMAのプロフィールが多くの家系発症で同一であることに関しては何らかの遺伝的要因あるいは病原微生物への暴露等を含めた環境因子の存在を強く想定させたので、今後、多数症例を用いて環境—遺伝の相互作用を検討する必要があると考えられた。

本論文は上記のごとく、日本人のPBC患者の家族内発症をHLA遺伝子だけでなく、AMAを中心とした詳細な免疫学的指標を用いて解析することによって、PBCの危険因子としての遺伝的要因と環境的要因を明らかにしただけでなく、諸臨床的所見との関係を示すことで、今後、ますます増加することが予想されるPBCの予防に対する遺伝環境医学的根拠を与えた点で大いに評価された。したがって、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）の学位授与に値するものと判断した。

氏名(本籍)	林 芳弘 (徳島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙医博第24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18年3月20日
学位論文題目	Assessment of anti-estrogenic activity of tamoxifen in transgenic mice expressing an enhanced green fluorescent protein gene regulated by estrogen response element (エストロゲン応答配列によって制御される緑色蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだマウスを用いたタモキシフェンの抗エストロゲン作用の解析)
発表誌名	Biochimica et Biophysica Acta 2006年(In press)

審査委員	主査	教授	本家	孝一
	副査	教授	大西	三朗
	副査	教授	小川	恭弘

論文の内容の要旨

【要約】

タモキシフェンは、乳ガンの治療の第一選択薬として施薬される抗エストロゲン製剤である。しかし、タモキシフェンには抗エストロゲン活性だけではなく、特に子宮では、エストロゲン活性があることが知られている。我々はエストロゲン応答配列を転写制御配列としてもつ緑色蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだマウスを作製し、種々の化合物のエストロゲン活性の評価に用いてきた。本研究の目的は、この遺伝子改変マウスを用いてタモキシフェンのエストロゲン活性と抗エストロゲン活性の特性を解析することである。タモキシフェンをマウスに投与して、その子宮の湿重量やエストロゲン標的遺伝子群の発現を指標とした解析では、明確なエストロゲン活性が検出できた。一方、緑色蛍光タンパク質遺伝子の発現を指標として解析すると、タモキシフェンの抗エストロゲン活性のみが検出された。この結果は、他の組織と同様に子宮においてもタモキシフェンは抗エストロゲン剤としても作用していることを示している。これらの解析から、タモキシフェンを含めて化合物のエストロゲン活性や抗エストロゲン活性を正確に評価するためには、様々な指標を用いた多面的な解析が必要であることが示唆された。

【材料および方法】

アロマターゼ遺伝子(CYP19)を破壊したマウス(Ar^{-/-})と野生型マウス(Ar^{+/+})に転写制御配列としてエストロゲン応答配列(ERE)を持つ緑色蛍光タンパク質(EGFP)遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウス(ERE-EGFPAr^{-/-}とERE-EGFPAr^{+/+})を用いた。植物エストロゲン低含有の食

餌と種々の濃度のエストロゲン、タモキシフェン、クロミフェン、ICI182,780 を混入した食餌で飼育し、薬剤のマウスに与える影響を解析した。卵巣、脳下垂体、子宮における EGFP の発現は、それぞれ蛍光実顕微鏡、蛍光顕微鏡で観察した。ライディッヒ細胞は、白膜を取り除いた精巣をコラゲナーゼで消化後、パーコール比重遠心法を用いて分離した。組織抽出液中に含まれる EGFP 量は、蛍光分光光度計（励起光 488 nm、放出光 510 nm）で定量した。エストロゲン標的遺伝子（lactoferrin、complement component C3、complement factor B、24p3/lipocalin、aquaporin5 の各遺伝子）の発現は Northern blot 法で解析した。

【結果】

ERE-EGFP Ar^{-/-}マウスをエストロゲンやタモキシフェンで処理すると、著しく萎縮している本遺伝子改変マウスの子宮重量が有意に増加した。形態学的観察では、エストロゲン処理 ERE-EGFP Ar^{-/-}マウスは、内膜上皮、間質細胞の顕著な増殖が誘導された。タモキシフェン処理マウスでは、著しい内膜上皮細胞の増殖は見られなかったが、子宮腺の顕著な増加が認められた。子宮のエストロゲン標的遺伝子として知られている lactoferrin、complement component C3、complement factor B、24p3/lipocalin、aquaporin5 遺伝子の発現は、タモキシフェン処理によって、エストロゲン処理と同様に有意に増加した。一方、ERE-EGFP 遺伝子を有する野性型マウス（ERE-EGFP Ar^{+/+}マウス）をタモキシフェンで処理すると、子宮重量は未処理マウスの子宮重量の 70%に減少したものの、上述のエストロゲン標的遺伝子群の発現は著しく増加した。即ち、子宮重量やエストロゲン標的遺伝子を指標にすると、タモキシフェンのエストロゲン活性が検出されることを示している。次に、タモキシフェンの生理作用を EGFP の発現量を指標にした解析では、ERE-EGFP Ar^{-/-}マウスをエストロゲンで処理すると EGFP の有意な発現の増強が見られたが、タモキシフェンでは観察されなかった。また、ERE-EGFP Ar^{+/+}マウスをタモキシフェンで処理すると、EGFP を強く発現している脳下垂体や子宮において、用量依存性で且つ処理時間依存性の抑制効果が観察された。EGFP の抑制がタモキシフェンの抗エストロゲン活性に起因することを確認するために、抗エストロゲン化合物であるクロミフェンや ICI182,780 でマウスを処理した結果、タモキシフェンと同様に抑制されることがわかった。即ち、EGFP の発現量を指標にして解析するとタモキシフェンの抗エストロゲン活性のみが検出されることを示している。

【考察】

我々は、三つの違った指標（子宮重量、エストロゲン標的遺伝子の発現量、EGFP 遺伝子の発現量）に基づいてタモキシフェンのエストロゲン、抗エストロゲン活性を解析した。その結果、子宮重量変化や子宮のエストロゲン標的遺伝子群（lactoferrin、complement component C3、complement factor B、24p3/lipocalin、aquaporin5）の発現量の増減はタモキシフェンのエストロゲン活性を反映し、ERE-EGFP 遺伝子の発現量の変化は抗エストロゲン活性を反映していると考えられる。ERE-EGFP Ar^{+/+}と ERE-EGFP Ar^{-/-}マウスを用いることにより、タモキシフェンのエストロゲン作用と抗エストロゲン作用が別々に評価できるわけである。さらに、タモキシフェンの生理活性の解析だけではなく、新しく合成した化合物や天然に存在する化合物のエストロゲンや抗エストロゲン活性を解析するためには、これらのモデル動物は非常に優れた生物センサーとして応用できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

【背景および目的】

タモキシフェンは、抗エストロゲン製剤として乳ガンの治療薬に使われている。しかし、タモキシフェンは、乳腺において抗エストロゲン作用を発揮する反面、子宮などの他の器官ではエストロゲン様作用を発揮することが知られている。共著者の戸田らは、レポーター遺伝子としてエストロゲン応答配列 (ERE) を上流に繋いだ緑色蛍光タンパク (EGFP) 遺伝子を組み込んだマウスを作出し、各種臓器における EGFP の発現を指標に種々の化合物のエストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用を評価できる系を樹立した。本研究は、この遺伝子組み換えマウスを用いて、タモキシフェンのエストロゲン様作用と抗エストロゲン作用を評価することを目的とした。

【方法】

アロマトラーゼ遺伝子破壊マウス (Ar^{-/-}) と野生型マウス (Ar^{+/+}) のそれぞれに、エストロゲン応答配列を上流に繋いだ緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (ERE-EGFP Ar^{-/-} と ERE-EGFP Ar^{+/+}) を作製した。植物エストロゲン低含有のエサに種々の濃度のエストロゲン、タモキシフェン、クロミフェン、ICI 182,780 を混入したエサで飼育した。卵巣、脳下垂体、子宮における EGFP の発現は、それぞれ蛍光実顕微鏡、蛍光顕微鏡で観察した。エストロゲン標的遺伝子 (lactoferrin, complement component C3, complement factor B, 24p3/lipocalin, aquaporin 5 の各遺伝子) の発現はノザンプロット法で解析した。

【結果および考察】

アンドロゲンからエストロゲンへの変換を触媒する酵素であるアロマトラーゼの遺伝子破壊マウスに、エストロゲンやタモキシフェンを投与すると、著しく萎縮している子宮重量が有意に増加した。エストロゲン投与では、内膜上皮、間質細胞の顕著な増殖が誘導された。タモキシフェン投与した場合、内膜の肥厚はエストロゲンに比べて少なかったが、内膜腺数の顕著な増加がみられた。タモキシフェン処理によって、子宮のエストロゲン標的遺伝子として知られている lactoferrin, complement component C3, complement factor B, 24p3/lipocalin, aquaporin 5 遺伝子の発現は、エストロゲン処理と同様に、有意に増加した。以上の知見より、内膜腺数の増加を伴う子宮重量の増量や子宮におけるエストロゲン標的遺伝子の発現に関しては、タモキシフェンはエストロゲン用作用を発揮することが示された。同様の所見は、アロマトラーゼを発現する野生型マウスでもみられた。

ERE-EGFP Ar^{-/-}マウスをエストロゲンで処理すると、EGFP の有意な発現増強がみられたが、タモキシフェンではみられなかった。逆に、ERE-EGFP Ar^{+/+}マウスをタモキシフェンで処理すると、脳下垂体や子宮において強発現している EGFP の発現が抑制された。抗エストロゲン化合物として知られるクロミフェンや ICI 182,780 でも、EGFP の発現が抑制されたことから、ERE-EGFP 遺伝子の発現を指標にすると、タモキシフェンは抗エストロゲン活性を有することが示された。

ERE-EGFP を導入した雄マウスでは、アロマトラーゼの発現の有無に関わりなく、精巢のライディッチ細胞に EGFP が高発現していた。この EGFP の発現は、タモキシフェンで抑制された。

以上をまとめると、子宮内膜の増殖、子宮におけるエストロゲン標的遺伝子の発現、ERE の転写促進効果を指標として、タモキシフェンのエストロゲン様作用と抗エストロゲン作用を調べた。その結果、タモキシフェンは、子宮内膜の増殖や子宮のエストロゲン標的遺伝子群の発現にはエストロゲン様作用を示す反面、ERE の転写促進効果には抗エストロゲン作用を示した。

本論文は、タモキシフェンの作用は単純ではなく、エストロゲン様作用や抗エストロゲン作用を正確に評価するためには、様々な指標を用いた多面的な解析が必要であることを示すとともに、ERE-EGFPAr^{+/+}と ERE-EGFPAr^{-/-}マウスは、種々の化合物のエストロゲン様作用と抗エストロゲン作用を調べるための生物センサーとして有用であることを示した。よって、本論文は臨床的に治療有効性が実証されているタモキシフェンの薬理作用と副作用の解明に貴重な手がかりを与えるものであり、本学の学位に値すると判断した。