

## 博士学位論文

## 内容の要旨及び審査の結果の要旨

長崎大学総務部 発行

(号外 第155号) 平成14年3月31日

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(医)甲 第1,009号	博士(医学)	新 竜一郎	静岡	平 14.1.23	Abnormal activation of glial cells in the brains of prion protein-deficient mice ectopically expressing prion protein-like protein, PrPLP/Dpl (プリオン蛋白類似蛋白 PrPLP/Dpl を異所性に発現するプリオン蛋白欠損マウス脳におけるグリア細胞の異常活性化)	11
" 第1,010号	"	吉見 逸郎	広島	平 14.1.23	Stiffness Index of The Calcaneus Measured by Quantitative Ultrasound and Menopause among Japanese Women: The Hizen-Oshima Study 日本人女性における踵骨超音波法スティフネスと閉経との関連：肥前大島研究	12
" 第1,011号	"	三輪 晋智	鹿児島	平 14.2.6	Involvement of Claudin-1 in the $\beta$ -catenin/Tcf signaling pathway and its frequent up-regulation in human colorectal cancers $\beta$ -カテニン下流遺伝子 Claudin 1 の同定とその結腸腫瘍での発現上昇	13
" 第1,012号	"	林田 昌之	福岡	平 14.2.6	Prolonged Radiation Damage in Rat Colon and Urokinase Expression in Epithelium (ラット結腸における遷延する放射線障害と上皮の Urokinase 発現について)	15
" 第1,013号	"	杉山 望	長崎	平 14.2.6	Intraportal administration of low-dose recombinant human hepatocyte growth factor enhances effects of hepatocellular transplantation (肝内移植肝細胞に対する hepatocyte growth factor 門脈内少量投与の効果)	16
" 第1,014号	"	川原 俊夫	長崎	平 14.2.20	Effects of caloric restriction on development of the proximal growth plate and metaphysis of the caput femoris in spontaneously hypertensive rats: Microscopic and computer-assisted image analyses 高血圧自然発症ラット大腿骨頭の成長軟骨及び骨幹端の発達に対するカロリー制限の影響：顕微鏡視及び画像解析装置による画像解析	17

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(医)甲 第1,015号	博士(医学)	牟田 邦夫	長崎	平 14.2.20	Gene expression of nitric oxide synthase and heme oxygenase in placental villi during pregnancy with and without intrauterine growth restriction 胎盤絨毛での nitric oxide synthase および heme oxygenase 遺伝子発現と子宮内胎児発育遅延に関する研究	19
" 第1,016号	"	麻生 宏樹	長崎	平 14.2.20	Structure and Function of Myosin Isoforms in Adult Chicken Hindlimb Muscles (成鶏の後肢筋におけるミオシンアイソホームの構造と機能)	21
" 第1,017号	"	川下 雄丈	長崎	平 14.2.20	Safe and Efficient Gene Transfer into Porcine Hepatocytes Using Sendai Virus-Cationic Liposomes for Bioartificial Liver Support (正荷電型 HVJ リポソームを用いたブタ肝細胞への安全かつ効果的な遺伝子導入 - 人工肝臓への応用を目指して - )	22
" 第1,018号	"	前田 兼徳	長崎	平 14.2.20	ANGIOGENIN EXPRESSION IN SUPERFICIAL BLADDER CANCER (表在性膀胱腫瘍における Angiogenin の発現)	23
" 第1,019号	"	笹山 初代	長崎	平 14.2.20	The Effects of Volcanic Disaster on the Prevalence and Severity of Bronchial Asthma 火山災害による気管支喘息頻度と重症度への影響	24
" 第1,020号	"	尾崎 啓子	広島	平 14.3.6	30 Item General Health Questionnaire Scores in Male and Female University Freshmen 男女大学1年生の30項目一般健康調査の得点	26
" 第1,021号	"	林田惣一郎	長崎	平 14.3.31	Construction of a physical and transcript map flanking the imprinted MEST/PEG 1 region at 7q32 ヒト染色体7q32領域のMEST/PEG 1近傍の物理的・転写地図の構築	27
" 第1,022号	"	御手洗明香	宮崎	平 14.3.31	Two distinct inactivation processes related to phosphorylation in cardiac L-type Ca <sup>2+</sup> channel currents 心筋Lタイプカルシウムチャネルの不活性化過程における検討	29
" 第1,023号	"	モーセン ガダミ	イラン	平 14.3.31	Genetic Mapping of the Camurati-Engelmann Disease Locus to Chromosome 19q13.1 q13.3 (Camurati-Engelmann 病座の染色体19q13.1 q13.3への遺伝的マッピング)	30

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(医)甲 第1,024号	博士(医学)	芦 忠陽	中国	平 14.3.31	Aluminum Chloride Induces Retinal Changes in the Rat (塩酸アルミニウムはラット網膜に変化を起こす)	31
" 第1,025号	"	木下 晃	大分	平 14.3.31	Domain-specific mutations in <i>TGFB1</i> result in Camurati-Engelmann disease TGFB1 遺伝子のドメイン特異的変異が Camurati-Engelmann 病をおこす	32
" 第1,026号	"	高槻 光寿	大分	平 14.3.31	Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients (生体肝移植後のレシピエントにおける免疫抑制剤の減量・離脱に関する研究)	34
" 第1,027号	"	温 春陽	中国	平 14.3.31	Mechanism of the antiulcerogenic effect of IL-11 on acetic acid-induced gastric ulcer in rats (ラット酢酸胃潰瘍における IL-11 の抗潰瘍作用機序について)	35
" 第1,028号	"	吉田 由紀	東京	平 14.3.31	Radiation-inducible hSNK Gene is Transcriptionally Regulated by p53 Binding Homology Element in Human Thyroid Cells 放射線誘導遺伝子 hSNK はヒト甲状腺細胞において p53 結合相同領域で転写制御される	36
" 第1,029号	"	光武 範吏	長崎	平 14.3.31	PKC $\delta$ mediates ionizing radiation-induced activation of c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase through MKK 7 in human thyroid cells (PKC $\delta$ は甲状腺細胞において、放射線照射による細胞内シグナルを MKK 7 を介して JNK に伝える)	38
" 第1,030号	"	山崎 聡士	宮崎	平 14.3.31	Importance of NF- $\kappa$ B in rheumatoid synovial tissues: in situ NF- $\kappa$ B expression and in vitro study using cultured synovial cells 慢性関節リウマチ滑膜組織における NF- $\kappa$ B の重要性。滑膜局所における発現と培養滑膜細胞を用いた機能解析。	39
" 第1,031号	"	井手 茜	長崎	平 14.3.31	Elevation of Serum Pro-Gastrin-Releasing peptide in patients with medullary thyroid carcinoma as well as small cell carcinoma. 甲状腺髄様癌の患者血清 Pro-GRP は肺小細胞癌と同様に上昇する	40

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(医)甲 第1,032号	博士(医学)	川畑 茂	鹿児島	平 14.3.31	Breast Cancer Resistance Protein Directly Confers SN-38 Resistance of Lung Cancer Cells (乳癌耐性蛋白は、肺癌細胞のSN-38耐性に直接関与している)	42
" 第1,033号	"	八幡裕一郎	神奈川	平 14.3.31	Metacarpal Bone Mineral Density, Body Mass Index and Lifestyle among Postmenopausal Japanese Women: The Hizen-Oshima Study 日本人女性における中手骨骨量, Body Mass Index と生活習慣 肥前大島研究	43
" 第1,034号	"	ロナルド・モラレス	グアテマラ	平 14.3.31	Infection and dissemination of two dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severity in orally infected <i>Aedes aegypti</i> from different geographic origin 重篤度の異なる患者から分離されたデングウイルスに対する由来の異なるネッタイシマカ集団の感受性	44
" 第1,035号	"	大仁田 亨	長崎	平 14.3.31	Hypoxia Induced, Perinecrotic Expression of EPAS-1 / HIF-2 $\alpha$ Correlates with Tumor Progression, Vascularization and Focal Macrophage Infiltration in Bladder Cancer (膀胱癌においてEPAS-1/HIF-2 $\alpha$ は低酸素により傍壊死組織に発現し、腫瘍の進行、血管新生、マクロファージ浸潤と関連する)	46
" 第1,036号	"	津田 聡	長崎	平 14.3.31	Role of c-Fyn in FGF-2-mediated tube-like structure formation by murine brain capillary endothelial cells (マウス脳毛細血管細胞によるc-FynキナーゼのFGF-2依存性管腔形式における意義)	47
" 第1,037号	博士(医学)	矢野 寿一	広島	平 14.3.31	Plasmid-Encoded Metallo- $\beta$ -Lactamase (IMP-6) Conferring Resistance to Carbapenems, Especially Meropenem カルバペネム系薬, 特にメロペネムに耐性を示すメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(IMP-6)産生プラスミドについての検討	48
" 第1,038号	"	アーメルアジズ	パキスタン	平 14.3.31	Tc-99m-MIBI Scintimammography: SPECT versus Planar Imaging. (Tc-99m MIBIを用いたシンチマンモグラフィ: SPECTとプラナー像の比較)	50

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(医)甲 第1,039号	博士(医学)	中村 貴生	鹿児島	平 14.3.31	Increase in hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase activity in renal carcinoma cells is associated with increased motility partly through phosphoinositide 3-kinase activation (腎癌細胞における肝細胞増殖因子受容体チロシンキナーゼ活性の増加はPI3-kinaseの活性化を介して運動の促進に關与する)	51
" 第1,040号	"	出口 裕子	長崎	平 14.3.31	Corrosion cast demonstration of choroidal vasculature in normal Wistar Kyoto rat 鑄型標本による正常 Wistar Kyoto ラット脈絡膜血管の研究	53
" 第1,041号	"	原田 沖	長崎	平 14.3.31	Endothelin-1 Binding to Endothelin Receptors in the Rat Anterior Pituitary Gland: Formation of an ET <sub>A</sub> -ET <sub>B</sub> Receptor Heterodimer? エンドセリン-1のラット下垂体エンドセリン受容体への結合: ET <sub>A</sub> -ET <sub>B</sub> 受容体2量体の形成	54
" 第1,042号	"	劉 殿閣	中国	平 14.3.31	Role of heat shock protein 47 on tubulointerstitium in experimental radiation nephropathy (実験的放射線性腎症の間質尿細管病変におけるHSP47の役割)	55
" 第1,043号	"	エムディ ラフィクル イスラム	バングラ デシュ	平 14.3.31	PU.1 is Dominant and HAF-1 Supplementary for the Activation of gp91 <sup>phox</sup> Promoter in Human Monocytic PLB-985 Cells (ヒト単球系PLB-985細胞のgp91 <sup>phox</sup> プロモーターの活性化ではPU.1が主に働き、HAF-1は補助的に働く)	56
" 第1,044号	"	末永 貴久	長崎	平 14.3.31	中年男性の身体活動量から捉えた日常生活、有酸素能力、および健診成績	58
博士(医)乙 第1,631号	"	梶山 浩史	福岡	平 14.1.31	Micronutrient Status and Glutathione Peroxidase in Bedridden Patients on Tube Feeding (経管栄養を受けている長期臥床患者の微量元素とグルタチオンペルオキシダーゼの状態)	60
" 第1,632号	"	中村 貴	長崎	平 14.1.31	Direct Interaction between a Quinoline Derivative, MS-209, and Multidrug Resistance Protein (MRP) in Human Gastric Cancer Cells (ヒト胃癌培養細胞におけるキノリン誘導体MS-209と多剤耐性タンパクの直接的關連)	61

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(医学) 第1,633号	博士(医学)	松尾 信子	福岡	平 14.1.31	Tacrolimus Inhibits Cytokine Production and Chemical Mediator Release Following Antigen Stimulation of Passively Sensitized Human Lung Tissues (タクロリムスによる, 受動感作ヒト肺組織におけるサイトカイン産生の抑制, 及び化学伝達物質遊離の抑制)	63
" 第1,634号	"	松尾 清隆	長崎	平 14.1.31	The Prevalence, Incidence, and Prognostic Value of the Brugada-Type Electrocardiogram <i>A Population-Based Study of Four Decades</i> ブルガダ型心電図の有病率, 罹患率および予後40年間の集団調査	64
" 第1,635号	"	川原 康弘	長崎	平 14.1.31	MR Assessment of Meniscal Movement During Knee Flexion: Correlation with the Severity of Cartilage Abnormality in the Femorotibial Joint 膝関節屈曲における半月板の移動のMRIによる検討: 大腿脛骨関節の軟骨異常の重症度との関係について	65
" 第1,636号	"	荻島 政之	埼玉	平 14.1.31	Z-338 Facilitates Acetylcholine Release from Enteric Neurons Due to Blockade of Muscarinic Autoreceptors in Guinea Pig Stomach (Z-338はモルモット胃においてムスカリン自己受容体を阻害することにより腸管神経からのアセチルコリン遊離を促進する)	66
" 第1,637号	"	寺田 隆介	兵庫	平 14.1.31	Evaluation of Metastatic Potential of Gastric Tumors by Staining for Proliferating Cell Nuclear Antigen and Chromosome 17 Numerical Aberrations (PCNA と17番染色体数的異常同時染色による胃癌転移能の評価)	68
" 第1,638号	"	吉嶺 裕之	長崎	平 14.1.31	Community-Acquired Pneumonia in Ugandan Adults: Short-Term Parenteral Ampicillin Therapy for Bacterial Pneumonia (ウガンダにおける成人市中肺炎: 細菌性肺炎に対する短期アンピシリン静注療法の効果)	69
" 第1,639号	"	中野 裕之	北海道	平 14.1.31	Risk Factors for Fracture in Adult Patients with Cerebral Palsy 成人脳性麻痺患者における骨折のリスク要因	70

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(医)乙 第1,640号	博士(医学)	佐藤 哲史	長崎	平 14.2.28	Dexamethasone impairs pulmonary defence against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> through suppressing iNOS expression and peroxynitrite production in mice. (デキサメサゾンとはマウスの誘導型 NO 合成酵素の発現とパーオキシナイトライトの産生抑制を介して、緑膿菌に対する肺感染防御能を阻害する。)	72
" 第1,641号	"	石川 秀文	静岡	平 14.2.28	Effects of Pulmonary Rehabilitation for Patients with Chronic Pulmonary Diseases with Different Types of Ventilatory Defects: Relationships between Pulmonary Function Parameters and Exercise Tolerance (換気障害のタイプによる慢性呼吸器疾患患者に対する呼吸リハビリテーションの効果 - 呼吸機能検査と運動耐容能との関係についての検討)	73
" 第1,642号	"	山崎美津代	福岡	平 14.2.28	Changes of Food Preference in Children Aged 4 and 5 Years (4歳児と5歳児の食品嗜好の変化)	75
" 第1,643号	"	古市 哲	長崎	平 14.3.31	In Vivo Assessment of the Regulatory Mechanism of Cholinergic Neuronal Activity Associated With Motility in Dog Small Intestine (犬小腸における消化管運動に関連したコリン作動性神経活動調節機構の生体での評価)	76
" 第1,644号	"	大村 節子	静岡	平 14.3.31	Body Mass Index, Physical Activity, Dietary Intake, Serum Lipids and Blood Pressure of Middle-Aged Japanese Women Living in a Community in the Goto Archipelago 五島列島在住中年女性の Body Mass Index, 身体活動, 食物摂取, 血清脂質, 血圧	78
博士(歯)甲 第95号	博士(歯学)	刘 杰	中国	平 14.3.31	Joint strength of laser-welded titanium	79
" 第96号	"	小石 良和	京都	平 14.3.31	Influence of visible-light exposure on colour stability of current dual-curable luting composites	81
" 第97号	"	田中 悦子	長崎	平 14.3.31	Liberation of the intramolecular interaction as the mechanism of heat-induced activation of HSP90 molecular chaperone	82
" 第98号	"	森山 弘隆	佐賀	平 14.3.31	Interferon-gamma production changes in parallel with bacterial lipopolysaccharide induced bone resorption in mice: An immunohistometrical study	83

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(歯)甲 第99号	博士(歯学)	岩本 勉	長崎	平 14.3.31	Lactosylceramide is essential for the osteoclastogenesis mediated by the macrophage-colony-stimulating factor and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand. (M-CSFとRANKLによって誘導される破骨細胞分化にラクトシルセラミドは必要不可欠な分子である)	85
" 第100号	"	王 佐林	中国	平 14.3.31	Collagen-binding heat shock protein HSP47 expression during healing of fetal skin wounds	87
" 第101号	"	豊屋 睦人	長崎	平 14.3.20	Biophysical and Pharmacological Properties of Voltage-gated Calcium Channel in Osteoblastic MC 3 T 3 E-1 Cells (骨芽細胞 MC 3 T 3 E-1に存在する電位依存性カルシウムチャネルの生物物理学的及び薬理学的性質)	88
博士(薬)甲 第41号	博士(薬学)	敦見 将人	兵庫	平 14.3.31	シクロデキストリンの多官能化による酵素モデルの創製	90
" 第42号	"	張 穎君	中国	平 14.3.31	民間薬 <i>Phyllanthus emblica</i> の成分に関する化学的研究及び生物活性	92
" 第43号	"	都田 真奈	鳥取	平 14.3.31	温熱ストレスによる p53蛋白質の活性化とその生物学的意義	95
博士(薬)乙 第28号	"	中島 昭典	鹿児島	平 14.1.31	Fluvastatin とその代謝物の抗酸化作用に関する研究	97
" 第29号	"	永野 俊玲	鹿児島	平 14.3.31	薬物作用時における脳・腸管ペプチドの体液中挙動に関する臨床薬学的研究	100
" 第30号	"	岩崎 史哲	山口	平 14.3.31	珪素および錫原子の特性を利用した新有機合成反応の開拓	102
博士(海)甲 第219号	博士(工学)	内田 篤志	広島	平 14.2.21	フラクタル解析とゆらぎ解析を用いた多様な環境共存場の状態評価に関する研究	104
" 第220号	博士(学術)	近藤 睦浩	長崎	平 14.2.21	境界要素法による新型解析法の開発と逆問題への応用	106
" 第221号	"	安達 町子	長崎	平 14.2.21	煮干しイワシの品質とだしの風味に関する研究	108
" 第222号	"	吉田 大作	愛知	平 14.2.21	アユの性成熟および産卵に関する生理学的研究	110



学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(海)甲 第223号	博士(学術)	本村 宏	長崎	平 14 .2 21	魚類筋原繊維タンパク質の水の状態および変性に及ぼすアルギン酸ナトリウムの影響に関する研究	112
" 第224号	"	張 悦凡	中国	平 14 .3 31	イオン性ポリマーの傾斜相互侵入網目ポリウレタンの合成と物性に関する研究	114
" 第225号	博士(工学)	林 佳彦	京都	平 14 .3 31	皮膜散乱光法による3次元弾塑性ひずみ解析法に関する研究	116
" 第226号	"	鉄川 進	長崎	平 14 .3 31	溶接構造接合部の疲労損傷モニタリングに関する基礎的研究	118
" 第227号	"	永嶋 洋政	福岡	平 14 .3 31	ジオシンセティックス補強粘性土盛土の設計法確立に関する研究	120
" 第228号	博士(学術)	肖 俊	中国	平 14 .3 31	不連続性岩盤の工学的特性の評価と深部大規模地下空洞設計への適用	122
" 第229号	"	ユスリ ワルディアノ	インド ネシア	平 14 .3 31	Study on the Biology of the Ghost Shrimp , <i>Nihonotrypaea japonica</i> ( Ortmann 1891 ) ( Decapoda: Thalassinidea: Callinassidae ), Distributed on Intertidal Sandflats in Ariake Sound, Kyushu, Japan	124
" 第230号	"	張 農	中国	平 14 .3 31	魚類筋原繊維の変性と水の状態に及ぼすオキアミ酵素分解物の影響に関する研究	126
" 第231号	"	山下 康充	長崎	平 14 .3 31	脱水および凍結過程における魚類筋原繊維タンパク質の変性と水の存在状態に及ぼすキチン加水分解物の影響に関する研究	128
" 第232号	"	大迫 一史	広島	平 14 .3 31	マアジの水産加工原料適性に関する研究	130
" 第233号	"	荒川 和美	長崎	平 14 .3 31	ニホンイモリの毒性に関する研究	131
" 第234号	"	橋本多美子	徳島	平 14 .3 31	瀬戸内海産アサリの麻痺性貝毒に関する研究	133
" 第235号	博士(工学)	堀野 良和	鹿児島	平 14 .3 31	パラジウムによる触媒的なアリル, プロパルギル C-O 結合の新しい活性化法の開発と効率有機合成 Palladium Catalyzed Activation of Allyl and Propargyl C-O Bonds: New Entry to Efficient Organic Synthesis	135
" 第236号	"	前川 亨	長崎	平 14 .3 31	半導体ガスセンサアレイを用いたニオイ識別システムの開発	137

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(海)甲 第237号	博士(学術)	パドワージュ マニューシュ スレンドラ	インド	平 14 . 3 31	The Transferability of Drug Resistances in Fish Pathogenic Bacterium <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Isolated from Yellowtail	139
" 第238号	博士(工学)	渡辺 晴夫	福島	平 14 . 3 31	スイッチング方式電子通信用電源システムの高性能化に関する研究	141
博士(海)乙 第43号	"	山中 稔	高知	平 14 . 1 .17	自然及び一般廃棄物の建設材料への有効利用に関する基礎的研究	143
" 第44号	博士(水産学)	高谷 智裕	兵庫	平 14 . 2 21	九州沿岸海域における麻痺性貝毒に関する研究 ( Studies on Paralytic Shellfish Poison in Coastal Waters of Kyushu )	145
" 第45号	博士(学術)	矢田 修	長崎	平 14 . 2 21	Studies of Influence of Pink Muscle Fiber on Increasing Rate of K-value in Fishes	148
" 第46号	博士(工学)	坂口 大作	長崎	平 14 . 2 21	遠心送風機羽根なしディフューザにおける旋回失速の抑制に関する研究	150
" 第47号	"	原 善一郎	長崎	平 14 . 2 21	大型ディスプレイの開発と高画質化に関する研究	152

**新 竜一郎**

(静岡県) 昭和43年8月10日生

**授与年月日** 平成14年1月23日**主論文** Abnormal activation of glial cells in the brains of prion protein-deficient mice ectopically expressing prion protein-like protein, PrPLP/Dpl

(プリオン蛋白類似蛋白 PrPLP/Dpl を異所性に発現するプリオン蛋白欠損マウス脳におけるグリア細胞の異常活性化)

新 竜一郎, 坂口末廣, 重松和人, 有馬和彦, 沖村信彦, 山口尚宏, 李 愛民, ユーライ・コパチェック, 片峰 茂

Molecular Medicine (7(12):803 ~ 809, 2001)

長崎大学医学部細菌学教室

(主任: 片峰 茂教授)

**論文内容の要旨****緒言**

正常型プリオン蛋白 (PrP<sup>c</sup>) はプリオン病発症と感染因子であるプリオンの増殖に必須な宿主蛋白であるが, 生体内での機能についてはほとんど明らかになっていない。我々は以前, プリオン蛋白欠損マウス (Prnp<sup>0/0</sup>) を作製し, このマウスが老齢になるとプルキンエ細胞消失による失調症状が現れ, さらにこの表現型は野生型プリオン蛋白遺伝子のトランスジーン導入により回復することを報告した。しかし今までに当教室も含めてプリオン蛋白欠損マウスが数系統作製されたうち, プルキンエ細胞消失が見られない系統も存在し, その原因は謎であった。ところが最近, 我々はプルキンエ細胞消失を起こす系統のマウス脳のみでプリオン蛋白遺伝子の近傍にあるプリオン蛋白類似蛋白 (prion protein-like protein, PrPLP/Dpl) 遺伝子が発現増強していることを発見した。それはプルキンエ細胞消失を起こす系統では Prnp<sup>0/0</sup> マウスの PrP 遺伝子の破壊が最終エクソンのスプライシング・アクセプターにまで及んでおり, その結果下流の PrPLP/Dpl 遺伝子が PrP 遺伝子上流エクソンと結合したキメラ mRNA となって通常なら発現しない神経系に発現するようになるためである。つまり PrP<sup>c</sup> の機能消失と PrPLP/Dpl の異所性発現の両者によりプルキンエ細胞消失が導かれることが示唆された。今回我々は PrPLP/Dpl の異所性発現のある Prnp<sup>0/0</sup> マウスがプルキンエ細胞以外の病理学的異常, 特にグリオシスが起きていないかどうか解析を行った。

**材料及び方法**

1) 野生型マウス (Prnp<sup>+/+</sup>), プルキンエ細胞消失が観察される系統の長崎大学作製プリオン蛋白欠損マウス (Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup>), 観察されない系統であるチュー

リッヒ大学作製プリオン蛋白欠損マウス (Zurich-Prnp<sup>0/0</sup>), Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> マウス背景のプリオン蛋白トランスジェニックマウス (Tg(P)Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup>) の脳を用いて, アストロサイト特異的マーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP), ミクログリア特異的マーカーである lysozyme M (LM) をプローブに Northern Blot, in situ hybridization を行い, 抗 GFAP 抗体とミクログリア特異的抗 F4/80 抗体を用いて免疫染色を行った。

2) プルキンエ細胞特異的マーカーである IP 3-type1 receptor, シナプス特異的マーカーである synaptophysin, ミエリン特異的マーカーである myelin basic protein (MBP) と myelin proteolipid protein (PLP) を用いて Northern Blot, in situ hybridization を行いニューロン, ミエリンの障害度を判定した。

**結果**

1) Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> の脳では加齢に伴い, GFAP, LM の発現が増強し, それは主に脳の白質全体に渡って認められた。その発現増強は IP 3-type1 receptor の発現レベルの減少よりも早く認められた。

2) Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> の脳にプルキンエ細胞消失以外のニューロンの障害やミエリンの障害が見られないことを病理学的観察, Northern Blot, in situ hybridization により確認した。

3) 野生型プリオン蛋白遺伝子のトランスジーンによりこの表現型は回復することを Northern Blot, in situ hybridization, 免疫染色により明らかにした。

4) Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup>, Zurich-Prnp<sup>0/0</sup>, それに両者のかけ合わせである Ngsk/Zurich-Prnp<sup>0/0</sup> を比較し, グリア細胞の異常な活性化は PrPLP/Dpl の異所性発現のレベルと相関し, 発現の見られない系統である Zurich-Prnp<sup>0/0</sup> には認めないことを明らかにした。

**考察**

本研究により PrPLP/Dpl の異所性発現のある Prnp<sup>0/0</sup> マウスはプルキンエ細胞が障害されているだけでなく, 脳全体, 特に白質を主にグリア細胞が活性化していることが明らかとなった。このグリア細胞の活性化はニューロンやミエリンの障害に基づく二次的な反応性のグリオシスとは異なり, 一次的なものである可能性が高いことが示された。この表現型が野生型 PrP のトランスジーン導入により回復すること, PrPLP/Dpl の異所性発現のない系統である Zurich-Prnp<sup>0/0</sup> では認められないことから, この表現型には PrP<sup>c</sup> の機能消失と PrPLP/Dpl の異所性発現の両者が必要であることが示唆された。以上の知見はプリオン病においても PrP<sup>c</sup> の機能消失が病態形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。すなわちプリオン病では著名なグリオシス, 神経細胞死, 海綿状変性が特徴的病理像

であるが、この病態は異常型 PrP (PrP<sup>Sc</sup>) の蓄積が原因とする説と、それとも PrP<sup>C</sup> から PrP<sup>Sc</sup> への連続的な変換による PrP<sup>C</sup> の枯渇、あるいは PrP<sup>Sc</sup> による PrP<sup>C</sup> の機能障害が起こることが原因であるという二つの説が存在している。しかし以前の報告で Zurich-Prnp<sup>0/0</sup> では目立った病理像が観察されなかったことから前者、つまり PrP<sup>Sc</sup> の蓄積が原因であるという説が今のところ有力視されている。しかし病理像の激しさの程度は異なるが、PrPLP/Dpl の異所性発現が PrP<sup>Sc</sup> の蓄積と同様な効果を果たしていると考えれば、プリオン病の病態形成にも PrP<sup>Sc</sup> の蓄積と PrP<sup>C</sup> の機能消失の両者が必要であると考えられる。この新たな視点は本研究により初めて示されたものである。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的

プリオン蛋白遺伝子欠損マウス (Prnp<sup>0/0</sup>) を用いて、プリオン蛋白 (PrP) の機能消失とプリオン蛋白類似蛋白 (PrPLP/Dpl) の異所性発現が神経系に与える影響、特にグリオシスの有無を検討し、その両者の蛋白が神経系に与える影響を解析したもので、目的は十分に妥当である。

#### 2. 手段・方法に関する評価

グリア細胞の活性レベルを検討するため、野生型マウス、PrPLP/Dpl の異所性発現のある長崎大学作製プリオン蛋白欠損マウス (Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup>)、発現のないチューリッヒ大学作製プリオン蛋白欠損マウス (Zurich-Prnp<sup>0/0</sup>) などの脳を用いて、グリア細胞特異的遺伝子をプローブによる northern blot および in situ hybridization、さらにグリア細胞特異抗体、ニューロンやミエリンの特異的マーカーを使い組織遺伝子検出法で解析したもので、研究手法も妥当である。

#### 3. 解析、考察の評価

PrPLP/Dpl を神経系に異所性に発現した Ngsk-Prnp<sup>0/0</sup> に、ブルキンエ細胞死に先立つ、白質を中心に脳全体にわたるグリオシスを発見し、正常 PrP の消失と PrPLP/Dpl の異所性発現における特異的なグリア細胞の活性化を明らかにし、ブルキンエ細胞死の病因解明への進展が大いに期待される。

以上のように、本論文はプリオン病の神経細胞死の発症機序解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 丹波 正美  
副査 教授 下川 功  
副査 教授 由井 克之

### 吉見逸郎

(広島県) 昭和44年9月27日生

授与年月日 平成14年1月23日

主論文 Stiffness Index of The Calcaneus Measured by Quantitative Ultrasound and Menopause among Japanese Women: The Hizen-Oshima Study

日本人女性における踵骨超音波法スティフネスと閉経との関連

肥前大島研究

吉見逸郎, 青柳 潔, 岡野邦彦, 八幡裕一郎, 草野洋介, 門司和彦, 田原靖昭, 竹本泰一郎

Tohoku Journal of Experimental Medicine  
195: 93-99, 2001

長崎大学公衆衛生学教室

(主任: 竹本泰一郎教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

骨粗鬆症は、骨量の減少及び骨組織の微細構造の変化に伴う骨折のリスクの増大した状態と定義され、その進行や程度は、加齢・閉経等との関連が指摘されている。高齢者に頻発する骨粗鬆症に伴う骨折は、日常生活動作を制限するため、公衆衛生学的に重要な関心事である。

踵骨超音波法による骨量測定は放射線被曝がなく比較的容易に行うことができ、骨折リスクの評価に近年用いられてきている。さらに、骨量のみでなく、骨の微細構造を反映している可能性も報告されている。

閉経に伴うエストロゲン欠乏は、急激な骨量減少を来すと言われているが、踵骨超音波法による骨量と閉経との関連について、特に日本人を対象とした研究は少ない。我々は長崎県大島町在住の一般女性住民を対象に、踵骨超音波法により骨量を測定し、年齢、閉経、体格との関連を検討した。

#### 対象と方法

1. 対象: 長崎県大島町在住の40歳以上の女性で、人工閉経の既往のある者を除いた506名を対象とした。
2. 身体測定: 身長、体重を測定し、Body Mass Index (BMI) を算出した。
3. 踵骨超音波法による骨量測定: 原則として左足踵骨の骨量を測定した。2種の超音波指標である Speed of sound (SOS), および Broadband ultrasound attenuation (BUA) より算出されるスティフネス値を骨量指標とした。
4. 質問紙により閉経の有無を聞き取った。

#### 結果

1. 対象全体の平均年齢は64.7 (範囲: 40-89) 歳で

あった。月経の状況は、月経有りが47名(9.3%)、自然閉経が459名(90.7%)であった。自然閉経者の平均閉経年齢は49.4歳であった。

- 身長と体重は年齢が高くなるほど低下し、80-89歳では40-49歳に比べ、身長が9%、体重が17%低値だった。BMIは年齢群間での差は認められなかった。
- スティフネス値は年齢が高い群ほど低く、80-89歳では40-49歳に比べ、40%低値だった。スティフネス値の減少率が最も大きかったのは、40-49歳と50-59歳の間で、15%の減少が認められた。
- スティフネス値を従属変数、年齢、BMI、閉経の有無を独立変数にして重回帰分析を行った。高年齢は低スティフネス値と、高BMIは高スティフネス値と、閉経有りは低スティフネス値と、それぞれ独立した関連が認められた。閉経の有無の代わりに閉経後年数を用いても同様であった。また、スティフネス値の代わりに直接の超音波指標であるBUAとSOSについてそれぞれ検討すると、BUAは年齢、BMI、閉経と関連し、SOSは年齢、閉経と関連していた。

#### 考 察

- 超音波法による骨量測定は、簡便で侵襲性がなく、近年、骨粗鬆症研究に用いられている。超音波指標は骨量と関連があり、さらに骨量とは独立した骨粗鬆症に伴う骨折を強く予測できる可能性が報告されている。骨粗鬆症は骨量の減少と骨組織の微細構造の変化であるため、骨量とともに骨微細構造の変化をも評価できる超音波法指標は、骨折リスクの評価を向上させる可能性があると考えられた。
- 本研究で、高年齢ほどスティフネス値が低かったが、これは先行研究と同様の結果だった。
- 閉経は、年齢、BMIと独立して低スティフネス値と関連していた。この結果から、閉経は骨量減少と骨組織の微細構造の劣化に影響することが示唆された。
- 高BMIは、高スティフネス値と関連していた。肥満は骨量を増加させると報告されている。骨量減少を予防するメカニズムは、機械的な要因と脂肪組織中のエストロゲン合成が指摘されている。
- 超音波法による骨量測定は骨粗鬆症のスクリーニングおよび骨折予知のための有用かつ非侵襲的なツールになりうると考えられた。
- 痩せと閉経は骨量減少のリスクであるので、そのような女性における骨折リスクの評価に、骨量測定が重要であると考えられた。

#### 結 論

閉経は骨量の減少と共に、骨微細構造の劣化を来す

可能性がある。

#### 論文審査の結果の要旨

学位論文題名「日本人女性における踵骨超音波法スティフネスと閉経との関連」

##### 1. 研究目的の評価

本研究は加齢(40~89歳)に伴う生理的骨量減少の推移を検討するために、同一地区の住民の女性を対象に踵骨骨量を超音波法により測定したものであり、目的は十分に妥当である。

##### 2. 研究手法に関する評価

加齢による生理的骨量減少の状態を知るために、海綿骨の豊富な踵骨をtarget organとして簡便かつ低侵襲性の超音波法骨量測定スティフネスを用いて測定し、骨量減少に影響を及ぼすリスク因子である年齢、BMIおよび閉経の有無を独立変数にして重回帰分析を行ったものであり、研究手法も妥当である。

##### 3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、年齢、BMIおよび閉経の各因子はスティフネス値とそれぞれ独立した関連がある事を明らかにし、さらに脂肪減少とエストロゲン減少が骨量減少のリスクである事を明確にしたものであり、その研究成果は高く評価できる。

以上のように、本論文は加齢による骨量減少に閉経と体格という要因が極めて大きな影響を与えることを明らかにし、閉経期骨粗鬆症予防に1つの指針を与えるものであり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 石丸 忠之  
副査 教授 齋藤 寛  
副査 教授 柴田 義貞

#### 三 輪 晋 智

(鹿児島県)昭和40年10月9日生

授与年月日 平成14年2月6日

主論文 Involvement of Claudin-1 in the  $\beta$ -catenin/Tcf signaling pathway and its frequent up-regulation in human colorectal cancers  
 $\beta$  カテニン下流遺伝子 Claudin 1 の同定とその結腸腫瘍での発現上昇  
Nobutomo Miwa<sup>1,2</sup>, Mikio Furuse<sup>3</sup>,  
Shoichiro Tsukita<sup>3</sup>, Norio Niikawa<sup>2</sup>,  
Yusuke Nakamura<sup>1</sup> and Yoichi Furukawa<sup>1</sup>,  
Oncology Research (vol.12:469~476;2001)  
長崎大学大学院医学研究科人類遺伝学  
(主任:新川詔夫教授)

#### 論文内容の要旨

##### 緒 言

$\beta$  カテニンは細胞間接着分子であるばかりでなく、

Wnt/Wingless シグナル伝達系における転写因子として細胞の増殖分化に重要な役割をはたしている。多くの結腸癌、肝癌、子宮癌、脳腫瘍に Wnt/Wingless シグナル伝達系の異常が認められ、これらの腫瘍の発生進展と  $\beta$  カテニンとの関連が示唆されている。 $\beta$  カテニンは細胞質において APC, Axin, GSK-3 $\beta$  と結合してリン酸化を受け、ユビキチンプロテアソーム系で分解されるが、これらの遺伝子の変異によって分解されず細胞内に蓄積すると、核において Tcf/LEF タンパクと結合して下流の様々な遺伝子を活性化する。本研究は、大腸癌の約80%に關与しているといわれる  $\beta$  カテニンの下流遺伝子として Claudin-1 遺伝子を同定し、証明したものである。

#### 対象と方法

- (1) 組換えアデノウィルスの作製：APC の20アミノ酸リピート部分が細胞内  $\beta$  カテニンの分解に關与する (Polakis et al., 1997) ことから、RT-PCR 法により APC の20アミノ酸リピート部分を増幅し、これを用いて組換えアデノウィルス Ad-APC を作製した。また、コントロールとして LacZ 遺伝子を組み込んだ Ad-LacZ も作製した。
- (2) cDNA マイクロアレー解析：APC に変異があり、 $\beta$  カテニンの蓄積が認められる大腸癌細胞株 SW480 に Ad-APC を感染させて抽出した RNA と Ad-LacZ を感染させて抽出した RNA をそれぞれ Cy-5 および Cy-3 でラベルして9216遺伝子をスポットしたスライドガラス上でハイブリダイズした。各スポットの Cy-5 と Cy-3 のシグナルを検討し、Cy-5 / Cy-3 比が2.0以上であった遺伝子の中から Claudin-1 について検討することとした。
- (3) 半定量的 RT-PCR 法：大腸癌臨床検体16例の腫瘍部分と正常粘膜部分より RNA を抽出して半定量的 RT-PCR を行い、各症例の正常粘膜と腫瘍とで Claudin-1 の発現量を比較検討した。
- (4) レポーターアッセイ：Claudin-1 のプロモーター領域には2箇所の Tcf 4 結合モチーフが認められた。この領域をレポーターアッセイ用プラスミドにクローニングし、また Tcf 4 結合モチーフに2塩基置換をおいた変異クローンを作製してレポーターアッセイを行い、正常クローンと変異クローンの間のプロモーター活性を比較検討した。
- (5) ゲルシフトアッセイ：プロモーター領域の2箇所の Tcf 4 結合モチーフについてこのモチーフを含む21塩基のオリゴDNA をそれぞれ作製し、これをプローブとしたゲルシフトアッセイを行った。
- (6) 免疫染色：抗 *claudin-1* 抗体を用いて大腸癌臨床検体の免疫染色を行った。

#### 結果

- (1) cDNA マイクロアレー解析：cDNA マイクロアレー法を用いて大腸癌細胞株 SW480 に APC を導入することによって発現の減少する遺伝子 Claudin-1 を同定した。
- (2) 大腸癌における Claudin-1 の発現：大腸癌臨床検体16例において正常粘膜部分と腫瘍部分とで半定量的 RT-PCR を行い、全例において Claudin-1 の発現が腫瘍で亢進していた。
- (3) Claudin-1 プロモーター領域の解析：Claudin-1 プロモーター領域に認められる2箇所の Tcf 4 結合モチーフは、下流遺伝子の活性化に關与していることをレポーターアッセイにより証明した。また、この領域には  $\beta$ -catenin/Tcf complex が結合する事をゲルシフトアッセイにより証明した。
- (4) 免疫染色：抗 *claudin-1* 抗体を用いて大腸癌臨床検体の免疫染色を行い、*claudin-1* の発現が腫瘍部分で著明に上昇していることを蛋白レベルで確認した。

#### 考察

大腸癌においては約80%において  $\beta$  カテニンまたは APC の変異が認められており、Wnt シグナル伝達系との間には密接な関係があるといわれている。Claudin-1 は、 $\beta$  カテニンの蓄積の認められる大腸癌細胞株 SW480 に APC を導入することにより発現量が減少する遺伝子として cDNA マイクロアレー法により同定された。

大腸癌臨床検体を用いた半定量的 RT-PCR 法によって多くの大腸癌組織において正常粘膜部分よりも発現量が増加していることが示された。また、この遺伝子のプロモーター領域には Tcf 4 結合モチーフが認められ、 $\beta$ -catenin/Tcf complex がこのモチーフに結合して下流の Claudin-1 を活性化していることが示された。これらの結果は Claudin-1 遺伝子が Tcf 4 の下流遺伝子として大腸癌の発生、進展に關与していることを示唆するものである。*claudin-1* は細胞間密着結合帯を構成している膜タンパクとして知られている。抗 *claudin-1* 抗体を用いた免疫染色では正常大腸粘膜組織と比較して大腸癌組織で細胞膜に強く染色される所見が得られた。このことから *claudin-1* の癌における発現上昇はタンパクレベルでも確認された。しかしながらこのタンパク質が大腸癌の発癌プロセスにおいてどのような役割を果たしているかについては有力な情報を得ることができず、いまだ不明である。今後更なる精査が必要と思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 1. 研究目的の評価

$\beta$ -catenin のシグナル伝達経路はそれと細胞質内で複合体を形成して分解に働く APC, Axin, GSK-3 $\beta$  によって

抑制されている。約80%の大腸癌においてはこの複合体を構成する因子に異常があることが認められ、分解を免れた  $\beta$ -catenin によって種々の遺伝子が転写誘導されることが癌化につながると考えられている。この研究は  $\beta$ -catenin の下流遺伝子を同定し、その役割について検討したものでありその動機、目的、意図は明確である。

## 2. 研究手段に関する評価

この研究では  $\beta$ -catenin の下流遺伝子を同定するために  $\beta$ -catenin のシグナル伝達経路に異常が認められる大腸癌由来細胞株を用いた。そして、APC 由来のリンカーペプチドをコードするアデノウイルスの感染によりその異常が相補された細胞株と、コントロールウイルスを感染させた細胞株との間で発現に差が見られる遺伝子群を cDNA マイクロアレイ法で同定した。更にそれらのうちの一つの遺伝子 Claudin-1 が実際に  $\beta$ -catenin の下流遺伝子であることを DNA 結合能、プロモーターの解析から明らかにした。以上の手法は、ある転写因子の下流遺伝子を同定し解析する手法として最も妥当なものである。

## 3. 解析・考察・総合的な評価

本研究により  $\beta$ -catenin の下流遺伝子として Claudin-1 が同定された。Claudin-1 は大腸癌組織において強く発現した特異的な発現パターンを示すことから、ここでの知見は臨床診断に応用できると考えられ大いに評価できる。審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 松山 俊文  
副査 教授 綾部 公懿  
副査 教授 山下 俊一

## 林田 昌之

(福岡県) 昭和42年5月5日生

授与年月日 平成14年2月6日

主論文 Prolonged Radiation Damage in Rat Colon and Urokinase Expression in Epithelium.

(ラット結腸における遷延する放射線障害と上皮の Urokinase 発現について)

林田昌之, 七條和子, 松鶴睦美, 南和徳, 沖本智昭, 中山敏幸, 関根一郎

ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA 46  
巻 3 4号 p39 45 2001年12月

長崎大学医学部放射線医学教室

(主任: 林 邦昭教授)

## 論文内容の要旨

### 緒言

婦人科悪性腫瘍に対する骨盤への放射線療法は有用である一方で放射線腸炎という無視できない晩発性障

害を伴う。放射線腸炎は治癒遷延があることが特徴のひとつだが、これまでに報告された放射線腸炎の動物実験モデルでは長期経過と詳細な病理学的変化を検討した文献は少ない。上皮再生に寄与する因子のひとつとして近年話題となっている urokinase plasminogen activator (uPA) 発現とあわせて潰瘍の経時的病理学的変化を検討した。

## 対象と方法

雌性 Wistar rat 72匹を開腹し X線36Gy 照射を行ったのち経過中死亡を除いた51匹のラットを検討の対象とした。ラットは照射後20週以後10週おきに殺処分し、最長60週まで観察した。開腹のみ行ったコントロール群5匹も60週まで観察を行った。放射線障害の組織学的評価は潰瘍深達度と Radiation Injury Score (RIS) でおこない、障害上皮における uPA 発現を免疫組織染色にて評価した。

## 結果

放射線による深達度 U1 2以上の潰瘍は40/51例(78.4%)に出現した。照射後60週でも12/19例(63.0%)に活動性潰瘍が観察されたが、照射後週数と潰瘍深達度には関連はなかった。潰瘍の再生に伴い粘膜下層に残された埋没腺管は23/51例(45.1%)に観察され、また明らかな潰瘍のない症例でも3例にみられた。放射線による間質障害として粘膜下層および漿膜層の線維化と肥厚、小動脈血管壁肥厚や硝子化、リンパ管拡張が全例に認められ、特に線維化は潰瘍肉芽の存在とあわせて腸管狭窄の主な成因となっていた。小動脈血管内皮肥厚および壁の硝子化による血管腔の狭小化がみられたが、上皮や間質に出血や壊死性変化、偽膜形成などの虚血性変化の所見はなかった。

Urokinase (uPA および uPAR) 発現は潰瘍上皮内、埋没腺管上皮内および間質の肉芽組織内に観察された。潰瘍周囲上皮細胞内の uPA 発現は潰瘍深達度が高いほど多く、照射後の週数が進むにつれて低下した。再生上皮により癒着化潰瘍の上皮細胞には uPA 発現は低かったが、肉芽により粘膜下層に残存した埋没腺管上皮内の uPA 発現は長期にわたって高かった。

## 考察

放射線腸炎による潰瘍治癒の遷延化の要因について虚血性変化を第一に疑っていたが、今回の結果では虚血性腸炎の所見は認められず、また40週以後では深い潰瘍の率は低下していることから虚血による持続性潰瘍が長期にわたり存在していることは否定的である。虚血により持続する潰瘍の存在よりも、同一の個体で潰瘍の寛解と再燃を繰り返しているモデルが放射線腸炎として妥当と考えられる。

uPA は近年癌の浸潤性発育に関与する因子として注目されている蛋白分解酵素だが、同時にヒトの炎症性

腸疾患で上皮障害を促進する因子とする報告がある。その一方で細胞レベルの実験で uPA が障害された上皮細胞の再生誘導にも一定の役割を果たすとも報告されている。今回の結果では潰瘍周囲上皮細胞内の uPA 発現が増加している症例で深達度の深い潰瘍が観察されており、uPA 発現は上皮再生よりもむしろ潰瘍の増悪因子となっていることが示唆される。これは uPA の蛋白融解作用が上皮細胞再生誘導を上回って発現しているためと考えられる。さらには粘膜下層の埋没腺管細胞内に長期にわたり uPA 発現が増加している事実は、埋没腺管でも同様に周囲肉芽に対して常に蛋白融解作用が発現していることが十分考えられ、埋没腺管を中心とした上皮障害の母地が存在する可能性が考えられる。このような上皮細胞および埋没腺管への urokinase 発現が放射線腸炎における潰瘍増悪や持続の一因となっている可能性を本論文では結論とした。

**論文審査の結果の要旨**

学位論文名

Prolonged Radiation Damage in Rat Colon and Urokinase Expression in Epithelium.

1. 研究目的の評価

本研究は、放射線大腸炎の治癒遷延過程について病理学検討を行ったもので、研究の動機や目的は明確且つ妥当である。

2. 研究方法の評価

(1)ラットを用いた実験を行い、放射線大腸炎の組織学的評価は HE 染色で、(2)上皮腺管への uPA 発現評価は免疫組織染色で行われている。これらの手法は正統的な病理学的方法であり、妥当である。

3. 解析・考察の評価

得られた結果は正確であり、妥当である。uPA は蛋白融解作用を持つ線溶系酵素である一方で、障害上皮では上皮細胞の遊走を促進し、上皮再生に一定の役割を果たす。しかし放射線腸炎においては上皮細胞の遊走が阻害され、結果として潰瘍増悪に働くことが示唆された。今後の発展が期待される研究であり、大いに評価できる。

以上のように、本論文は潰瘍周囲上皮および埋没腺管での uPA 発現の増加が放射線大腸炎の治癒遷延の原因となっていることを示唆し、病理学の進歩に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 林 邦 昭  
 副査 教授 田 口 尚  
 副査 教授 下 川 功

杉 山 望

(長崎県)昭和41年10月24日生

授与年月日 平成14年2月6日

主論文 Intraportal administration of low dose recombinant human hepatocyte growth factor enhances effects of hepatocellular transplantation

(肝内移植肝細胞に対する hepatocyte growth factor 門脈内少量投与の効果)

杉山 望, 江口 晋, 川添 康, 宮本俊吾, 蒲原行雄, 藤岡ひかる, 古井純一郎, 佐藤真紀, 石井武久, 兼松隆之  
Hepato-Gastroenterology ; 47 : 1245 1249, 2000

長崎大学医学部第二外科学教室

(主任: 兼松隆之教授)

**論文内容の要旨**

緒 言

遺伝性代謝性肝疾患に対する治療として同所性肝移植が確立したが、ドナー不足の緩和、外科侵襲に軽減の為、分離肝細胞移植の研究が行われているが、その効果は十分であるとは言いがたい。合併症なく肝臓内に移植できる肝細胞の数は約 1 ~ 2 % と限られており、如何に移植した肝細胞を増殖させるかがひとつの焦点になっている。歴史的には、肝細胞増殖刺激目的で肝切除術や門脈結紮術などが行われてきたが臨床的見地からすると前記の方法では侵襲が大きい。一方、Hepatocyte growth factor (HGF) は強力な増殖因子であり現在までに HGF 経静脈投与での移植肝細胞に対する増殖効果が報告されているが、経門脈かつ少量持続投与による移植肝細胞の増殖効果の報告は見られていない。今回、無アルブミンラットを用い、肝内移植肝細胞に対して少量 HGF の門脈内持続投与を試み、移植肝細胞由来の血中アルブミンを測定することで、その増殖刺激効果を検討した。さらに、免疫染色にて移植肝細胞を同定した。

対象と方法

- 1) 対象: <ドナー> 雄性 F 344 ラット (150 ~ 200 g)  
<レシピエント> 雄性無アルブミンラット (250 ~ 300 g ; 各 n = 6)
- 2) 肝細胞移植モデル: 経門脈的肝内肝細胞移植 (2 × 10<sup>7</sup>個)
- 3) 実験計画: 肝細胞移植後 1, 3, 7, 10, 14, 21, 28日後にラット各 6 匹より採血, 28日後にラットを屠殺し肝組織を採取した。HGF は肝細胞移植 7日後より頸静脈内または門脈内に 50μg / kg / day で 3日間持続投与した。
- 4) 血中アルブミン測定: Enzyme-Linked ImmunoSorb-



ent Assay (ELISA) 法にて測定。

## 結果

- 1) 予備実験として浸透圧ポンプを用いて各濃度の HGF 持続投与時の血中濃度を測定したところ、 $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の投与で培養肝細胞に対する有効増殖刺激濃度となり  $500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を超えると飽和状態となった。この結果より有効最低投与量と思われる  $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を用いて実験を進めることとなった。
- 2) 全てのラットで肝細胞移植後1日目より血中アルブミン値の上昇を認め、移植後7日目の HGF 投与前までは各群同様の経過をたどった。
- 3) 肝細胞移植後7日目より HGF 持続投与した結果、移植後10日目から14日目にかけて血中アルブミン値は各群ともに最高値を示したが、頸静脈内投与群 ( $37.7 \pm 6.0\text{mg}/\text{dl}$ ) は非投与群 ( $37.2 \pm 3.4\text{mg}/\text{dl}$ ) に比べ有意な血中アルブミン値の上昇を認めなかったが、門脈内投与群 ( $48.2 \pm 6.4\text{mg}/\text{dl}$ ) では有意な上昇を認めた。
- 4) 免疫染色では肝細胞移植後28日目の肝臓内で各群とも門脈域を中心にアルブミン染色陽性細胞を認めた。ここでも HGF 頸静脈内投与群 ( $6.2 \pm 0.6\%$ ) と非投与群 ( $6.4 \pm 0.9\%$ ) の間ではアルブミン染色陽性細胞数に有意差は認められなかったが、門脈内投与群 ( $11.0 \pm 0.6\%$ ) に於いては有意な増加が認められた。

## 考察

これまで移植肝細胞に対する増殖刺激としての HGF 投与量は  $300$  から  $500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  が用いられてきたが、今回の結果から投与方法を検討することで、低投与量でも増殖刺激効果が得られることが明らかになった。これは門脈内に持続的に投与された HGF が血液循環の希釈を受ける前に標的となる肝内移植肝細胞に曝露したことに起因すると考えられる。実際に、 $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  で門脈内投与群、経静脈内投与群各36時間後の肝門部門脈血 HGF 濃度を測定したところ門脈内投与群で4倍高濃度であった。HGF の至適投与時期や外因性 HGF の投与量と副作用については今後引き続き検討を必要とするが、低濃度 HGF 門脈内持続投与の有用性を示すことができた。

本実験より今後、遺伝性代謝性肝疾患に対する治療として増殖刺激因子投与を伴う肝細胞移植の臨床応用に向けて、増殖刺激因子の未知の副作用発現予防軽減のため至適投与方法に関して一つの見解を示すことができたと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

学位論文題名

「肝内移植肝細胞に対する hepatocyte growth factor 門脈内少量投与の効果」

## 1. 研究目的の評価

本研究は、移植分離肝細胞の肝内生着に対する hepatocyte growth factor (HGF) の少量持続投与の効果を検討したもので、研究目的として妥当である。

## 2. 研究手法に関する評価

実験系として無アルブミンラットに対し、同系正常ラット肝細胞を移植し、アルブミン産生能から移植肝細胞生着への HGF の有効性を検討しており、研究手法も妥当である。

## 3. 解析・考察の評価

その結果、HGF の門脈内持続投与を行うことにより、低濃度で且つ有効に血中アルブミン値の上昇とアルブミン陽性細胞数の有意な増大を認めており、これらの研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は遺伝性代謝性肝疾患治療に向けた移植分離肝細胞の長期生着条件の確立に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	小路	武彦
	副査	教授	上平	憲
	副査	教授	綾部	公懿

## 川原俊夫

(長崎県)昭和40年9月11日生

授与年月日 平成14年2月20日

主論文 Effects of caloric restriction on development of the proximal growth plate and metaphysis of the caput femoris in spontaneously hypertensive rats: Microscopic and computer-assisted image analyses

高血圧自然発症ラット大腿骨頭の成長軟骨及び骨幹端の発達に対するカロリー制限の影響：顕微鏡視及び画像解析装置による画像解析

共著者：下川 功，富田雅人，平野 徹，進藤裕幸

掲載雑誌・Microscopy Research and Technique. in press

長崎大学医学部整形外科教室

(主任：進藤裕幸教授)

## 論文内容の要旨

### 緒言

高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive rat; SHR) は人間の本態性高血圧のモデル動物としてウイスター京都ラットより単離されたが、1988年岩崎、平野らはその成長期において大腿骨頭壊死が頻発する事を指摘した。その後の研究においても、大腿骨頭の扁平化や大腿骨頸部の短縮など人間のペルテス病との

類似性が指摘されている。

実験動物において栄養の偏りなく摂取熱量を制限すると (caloric restriction; CR), 老化を遅延させると同時に種特異的な疾患を予防する事が可能である。富田らはCRによりSHRに高頻度に見られる大腿骨頭壊死の頻度が減少し、骨端核の成熟遅延が改善する事を報告している。今回我々はSHRの大腿骨頭の成長軟骨帯及びその直下の骨幹端におけるCRの影響を調べ、SHRの大腿骨頭の異常に対するCRの効果の原因の一端を調べた。

#### 対象及び方法

生後6週よりSHRを自由摂取 (ad-libitum) 群 (SHR-AL群) と摂取量をSHR-AL群の65%に抑制した群 (SHR-CR群) に分離し、正常対照群としてのウイスター京都ラット群 (WKY群) と共に、生後10, 15, 20週において各群5匹10骨頭ずつを対象とした。パラホルムアルデヒド固定の後脱灰し、パラフィン包埋後、大腿骨頭部に平行で円靭帯を通る切片を作成し、そのマッソントリクローム染色切片を顕微鏡視下計測に、サフランin O染色切片を画像解析装置を用いた計測に使用した。

顕微鏡視下計測ではまず成長軟骨帯全体の粘液状変性部の個数を数えた。その後、成長軟骨帯の内外の凸部と中央の凹部を計測部位と設定し、その部位における成長軟骨細胞柱の配列の乱れをスコア化し、また成長軟骨細胞柱の厚さを細胞柱全体とそれを構成する非石灰化細胞柱や石灰化細胞柱に分けて計測した。

画像解析装置による計測では内外の成長軟骨帯凸部の計測部位における軟骨帯の厚さを計測し、その直下0.3mmの部分の骨幹端の骨梁の髄腔における占拠率 (骨梁濃度) と平均骨梁厚を計測した。

#### 結果

顕微鏡視下計測において、成長軟骨帯の粘液状変性部の数は週齢が進むにつれ3群とも増加していたが、特にSHR-AL群において10-15週間で顕著に増加しており、他の2群と有意差を認めた。WKY群とSHR-CR群の間に有意差は認めなかった。

成長軟骨細胞柱の配列の乱れにおいてSHR-AL群は15週齢時より20週齢時にかけて他の2群に対し高値を示していた。SHR-CR群は10-15週齢間で増加していたのに対し、WKY群では週齢による変化は認めなかったが、SHR-CR群とWKY群の間に有意差は見られなかった。

10週齢時、成長軟骨細胞柱の厚さは3群間で有意差を認めず、15週齢時には3群とも減少傾向が見られた。SHR-AL群、SHR-CR群ではその後20週齢でほぼ10週齢時の値に回復していたがWKY群では15-20週齢間での増加が見られず、20週齢では他の2群に比べ有意

に低値となっていた。

非石灰化細胞柱の厚さも同様に10週齢では3群間に有意差は認めなかった。15週齢までに3群共に減少していたが、WKY群が顕著に減少していたのに対し、SHR-AL群、SHR-CR群の減少はわずかで、SHR-AL群はその後20週までに10週齢時の値に回復していた。WKY群、SHR-CR群は15-20週齢間で有意な変化は見られず、SHR-CR群はSHR-AL群とWKY群との間にあり他の2群に対し有意差を認めた。

石灰化細胞柱の厚さは3群間に有意差を認めなかった。WKY群とSHR-CR群は15-20週齢間で有意に増加しており、20週齢においてSHR-CR群はSHR-AL群に対し大きな値をとっていた。

画像解析装置による計測において、WKY群の成長軟骨帯の厚さは10週齢より20週齢にかけ有意に減少していったのに対しSHR-AL群やSHR-CR群は15-20週齢間で有意な変化を認めず、20週齢ではWKY群に対し有意に大きな値をとっていた。

成長軟骨帯直下の骨梁濃度においてSHR-AL群が10週齢時より常に高値をとっていたのに対し、WKY群は15-20週間で著明な増加を示し、20週齢ではSHR-AL群と有意差を認めなかった。SHR-CR群は10週齢ではSHR-AL群とWKY群の中間の値を示していたがその後有意な増加はみられず20週齢では他の2群に比べ有意に低値となっていた。

SHR-AL群の平均骨梁厚は10週齢においてWKY群より有意に高値をとっており、10-15週齢間で著明な増加を示していた。それに対し、WKY群は15-20週齢で著明な増加を示しており、20週齢ではSHR-AL群とWKY群との間に有意な差を認めなかった。SHR-CR群は10週齢においてSHR-AL群より低値をとっており、成長による増加はほとんどみられず、20週齢では他の2群に対し、有意に低値となっていた。

#### 考察

今回の研究においてCRはSHRの成長軟骨帯の粘液状変性や成長軟骨細胞柱の配列の乱れ等の病的変化を抑制していることが示された。我々の過去の研究においてCRがSHRにおける大腿骨頭の骨化遅延を改善し、壊死の発生頻度を減少させる事を指摘しているが、今回の所見とあわせ、成長過程のSHRに対する比較的短期間のCRが大腿骨頭における特異的な異常の発生を抑制している事を推測させている。

成長軟骨帯の厚さはその時点での長管骨の成長の度合いや今後の成長量に参与している。今回の形態学的研究において、成長軟骨の厚さ、特に非石灰化細胞柱の厚さは生後10週齢より減少し、逆に石灰化細胞柱の厚さは増加している。これらは大腿骨の成長の減少を表しているが、SHRにおいてこれらの骨成長の生理

学的変化は異常をきたしており、大腿骨の成長の異常を推測させる。予想に反し、CRはこれらの変化に対し、軽度の影響しか与えなかった。

SHRの成長軟骨帯直下の骨幹端にも異常が見られ、SHRの骨梁濃度や平均骨梁厚は顕著に増加していた。大腿骨の構成の異常の一因は軟骨が吸収される骨幹端であることが推測されるが、CRはSHRにおける骨幹端の異形成的変化を改善していた。

実験的に片側下肢の麻痺を作成し大腿骨頭の機械的負荷を減少させる事によりSHRの大腿骨頭壊死の発生率が減少するという報告がなされている。CRにより体重減少がSHRの成長軟骨帯の病的変化や骨幹端の異形成の緩和に關与している可能性がある。しかし齧歯類においてCRが副甲状腺ホルモンやカルシトニン、ビタミンDの代謝を変更することにより経年的な骨量の低下を遅延させると同時に、骨の成長や成熟も遅延させるという報告があり、我々も、CRはF344ラットの血漿中IGF-1の濃度を減少させるが、筋肉中のIGF-1受容体のm-RNAとその蛋白を増加させることを報告している。以上より、我々はCRはSHRにおいて大腿骨頭の機械的負荷を減少させるだけでなく、ホルモンや成長因子を変化させることによりその病的変化の抑制や構造異常の矯正を生じていると推測する。

結論として、SHRは大腿骨近位成長軟骨帯及びその直下の骨幹端において多くの特徴を持ち、それが大腿骨頭の病的変化の原因であると推測される。CRはこれらの特徴的变化を緩和することが可能であり、大腿骨頭壊死と同様にSHRの大腿骨近位成長軟骨帯及びその直下骨幹端の異常発生機構を研究するにあたり有用な手段となり得ると考える。

#### 論文審査の結果の要旨

学位論文題名

高血圧自然発症ラット大腿骨頭の成長軟骨及び骨幹端の発達に対するカロリー制限の影響：顕微鏡視及び画像解析装置による画像解析

##### 1. 研究目的の評価

人ペルテス病の類似モデルとされる高血圧自然発症ラット(SHR)に於ける大腿骨頭壊死がカロリー制限(CR)によって、頻度が減少し、骨端核の成熟遅延が改善されるとの共同研究者の研究成果に立脚し、その成因解明の一助とするために、CR後の、SHRの骨頭の成長軟骨帯及びその下の骨幹端の組織像を組織計測学的に検討しようとした研究目的は明確である。

##### 2. 研究手段に関する評価

骨標本作製方法、また粘液状変性部、成長軟骨細胞柱の細胞数の配列と乱れのスコア化の計測、軟骨帯の計測、骨幹端の骨梁濃度の計測、及びそれらの結果の

統計的処理など、研究手段は妥当であった。

#### 3. 結果・考察の評価

CRはSHRにみられる成長軟骨帯の粘液状変性、成長軟骨細胞柱の配列の乱れや骨幹端での異形成的変化を改善したとの結果は明確であり、高く評価できた。

本論文は骨頭壊死の発症機序、さらにCRの改善機構の解明に寄与するところ大であり、さらに将来ペルテス病の補充療法への応用の可能性をも示唆しており、大いに評価できる。審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 関根 一郎  
副査 教授 河野 茂  
副査 教授 長島 聖司

牟田 邦夫

(長崎県)昭和39年6月22日生

授与年月日 平成14年2月20日

主論文 Gene expression of nitric oxide synthase and heme oxygenase in placental villi during pregnancy with and without intrauterine growth restriction

胎盤絨毛での nitric oxide synthase および heme oxygenase 遺伝子発現と子宮内胎児発育遅延に関する研究

Kunio Muta, Hideaki Masuzaki, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Tadayuki Ishimaru, and Takahito Kondo

(Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, in press)

長崎大学医学部産科婦人科学教室

(主任：石丸忠之教授)

#### 論文内容の要旨

##### 緒言

子宮内胎児発育遅延(IUGR)が子宮胎盤循環不全と関連していることは広く知られている。子宮胎盤循環はプロスタグランジンや種々のサイトカインで制御されており、一酸化窒素(NO)もその一つと考えられている。

NOは血管平滑筋を弛緩させ、血圧を下げることから、妊娠中毒症やIUGRでNO産生量を検討した報告は数多くある。しかし、NOとこれら疾患との関わりについて、一定の結論はまだ得られていない。

NOはcGMPを介して平滑筋を弛緩させる。同様の機序で働くラジカルとして、一酸化炭素(CO)が存在するが、妊娠中のCOの意味については不明な点が多い。

そこで今回我々は、IUGRや妊娠の維持にNOやCOの合成が果たしている役割を知る目的で、NOの合成

酵素である nitric oxide synthase (NOS) と CO の合成酵素である heme oxygenase (HO) の、胎盤絨毛における遺伝子発現を検討した。

#### 対象と方法

43例の単胎妊娠を対象にした。30例が満期分娩で、うち8例が IUGR であった。13例は流産例で、全て人工妊娠中絶術によるものであった。

全例において、胎盤娩出後、絨毛を採取し、total RNA を抽出した。その後、神経型 NOS (nNOS)、分泌型 NOS (iNOS)、血管内皮細胞型 NOS (eNOS)、HO-1 および HO-2 について、それぞれ特異的なプライマーを用いた RT-PCR を行い、mRNA 発現が認められたものについて、Northern Blot を行った。

#### 結果

RT-PCR で発現が認められたのは、eNOS および HO-1 であった。従って、以後の検討は eNOS および HO-1 についてのみ行った。

##### I eNOS mRNA の Northern Blot

IUGR 8 例を除いた 35 例について、妊娠時期による発現量の変化をみると、第 1 三半期での発現量が、第 2、第 3 三半期での発現量と比較して有意に高値であった ( $3.741 \pm 0.679$  および  $0.500 \pm 0.308$ , relative intensity,  $p < 0.0001$ )。

生児を得た 30 例の中で、IUGR 8 例と appropriate for gestational age (AGA) 22 例との間に発現量の差は認めなかった。また、30 例中、陣痛発来後の経膈分娩例は 25 例、陣痛発来以前の選択的帝王切開術例は 5 例であったが、陣痛の有無による発現量の差は認めなかった。

##### II HO-1 mRNA の Northern Blot

IUGR 8 例を除いた 35 例について、妊娠時期による発現量の変化をみると、第 3 三半期での発現量が第 1、第 2 三半期での発現量と比較して有意に高値であった ( $2.648 \pm 0.409$  および  $1.122 \pm 0.182$ , relative intensity,  $p < 0.005$ )。

生児を得た 30 例の中で、IUGR 8 例と AGA 22 例との間に発現量の差は認めなかった。また、陣痛の有無による発現量の差は認めなかった。

#### 考察

今回の検討では妊娠初期の絨毛に eNOS mRNA の発現が強く認められた。NO が血管新生に必要であるとの報告もあり、このことは NO が胎盤形成に重要な役割を担っている可能性を示唆するものである。

IUGR は周産期予後を左右する重要な因子の一つである。諸家の報告には、NO は IUGR を改善させる方向に働くという内容のものが多いが、今回の検討では有意な差は認められなかった。この一因として、我々の検討では IUGR 症例に妊娠中毒症合併例がなく、全

例原因不明の IUGR であったことが考えられる。

HO-1 mRNA は妊娠末期にその発現量が増加しており、この時期の妊娠維持に重要な働きをしている可能性が考えられる。今回の検討では陣痛の有無と HO-1 mRNA 発現量との間に相関は認められなかったが、高発現を認めた例は全て陣痛発来後であった。これは、陣痛時に子宮収縮を抑制するため、あるいは陣痛のストレスから胎児を防御するために代償的に発現が増強しているのかもしれない。HO-1 が炎症によって発現増強されることは周知の事実であるが、今回の検討では RT-PCR によって iNOS の発現が認められていないので、炎症による発現増強ではないと考える。

最近、羊での動物実験であるが、妊娠末期の高エストロゲン状態では子宮動脈の血管内皮で eNOS の発現が増強し、NO 産生も促進されているという報告がある。ヒトでも妊娠経過とともにエストロゲンは増加していくが、今回の検討では eNOS の発現は増強していない。これは種の特異性なのかもしれないし、検討した組織が絨毛と子宮動脈内皮であることから、組織特異性の差なのかもしれない。eNOS および HO-1 の発現調節にはまだ明らかになっていないことも多く、今後これらの発現調節因子の解明が、NO および CO と妊娠との関わりを明らかにすることにつながると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 学位論文題名

「胎盤絨毛での nitric oxide synthase および heme oxygenase 遺伝子発現と子宮内胎児発育遅延に関する研究」

##### 1. 研究目的の評価

本研究は、子宮内胎児発育遅延や妊娠維持への NO 及び CO の役割を検討することを目的としたもので、研究目的として妥当である。

##### 2. 研究手法に関する評価

炎症等を伴わない胎盤絨毛から抽出した RNA を用いて、NO 及び CO それぞれの合成酵素である nitric oxide synthase (NOS) mRNA 及び heme oxygenase (HO) mRNA の発現を RT-PCR と Northern blot 法により検討したもので、研究手法も妥当である。

##### 3. 解析・考察の評価

絨毛での発現が eNOS と HO-1 であることを確認した後、これらの発現について種々の妊娠時期で比較検討した結果、eNOS mRNA は妊娠初期に、一方 HO-1 mRNA は妊娠末期に強い発現を認め、それぞれの胎盤形成及び妊娠維持への関与を明らかにした点、世界初の知見としてこれらの研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は胎盤での NO 及び CO の機

能を理解する上で貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 小路 武彦  
副査 教授 江口 勝美  
副査 教授 金 武 洋

### 麻生 宏 樹

(長崎県)昭和44年10月28日生

授与年月日 平成14年2月20日

主論文 Structure and Function of Myosin Isoforms in Adult Chicken Hindlimb Muscles

(成鶏の後肢筋におけるミオシンアイソホームの構造と機能)

麻生宏樹, 宮西隆幸, 大木高志, 山口拓, 矢島エイ子, 東山康仁, 林原歳久, 中山 享, 毎田徹夫

Acta Medica Nagasakiensia

2002年6月掲載予定

長崎大学医学部生化学教室

(主任: 毎田徹夫教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒 言

骨格筋はその収縮速度により速筋と遅筋に大別されるが、速筋でもATP分解速度や張力等に微妙な違いがあり、それは筋原線維を構成しているミオシン分子の重鎖(MHC)のアイソホームの違いによると考えられている。MHCはmultigene familyによってコードされ、発達段階および筋組織特異的に転写レベルでその発現がコントロールされていると考えられている。成鶏の胸筋にはほぼ単一のミオシン分子が存在し、その構造と機能の関係がほぼ明らかにされつつある。

我々は骨格筋の筋種によるMHCアイソホームの分布の違いおよびそれらの構造と機能の関係を明らかにする目的で、成鶏の後肢の3種の筋肉および胸筋について、ミオシンの*in vitro* motility assayおよび筋原線維のATPアーゼ活性測定で機能の解析を行い、Northern解析により各筋におけるアイソホーム発現の差を検索し、さらに蛋白質レベルでそれらの構造解析を行った。

#### 材料と方法

- 1) 成鶏の後肢の3種の筋肉(腸脛骨筋, 腓腸筋, 大腿脛骨筋)および胸筋からミオシンを抽出し, Kojimaらの方法で*in vitro* motility assayを行った。
- 2) 各筋より筋原線維を調製し, Itayaらの方法でATPアーゼ活性を測定した。
- 3) 各筋よりtotal RNAを抽出し, G-type(腓腸筋型)とP-type(胸筋型)に対応するプローブを用いて常

法に従ってNorthern解析を行った。

- 4) 各筋より抽出したミオシンからS-1を調製し, それらの23kDa, 50kDaおよび20kDaの各フラグメントについて, リジルエンドペプチダーゼ, キモトリプシン, V8プロテアーゼ, 臭化シアンなどで分解して得られたペプチドのアミノ酸組成および配列を分析した。

#### 結 果

- 1) ミオシンの motility speed は胸筋(3.7m/s) > 腸脛骨筋(1.9m/s) 腓腸筋(1.9m/s) > 大腿脛骨筋(1.7m/s)であった。
- 2) 筋原線維のATPアーゼ活性も胸筋(466mol(Pi)/mol/min) > 腸脛骨筋(361mol(Pi)/mol/min) 腓腸筋(345mol(Pi)/mol/min) > 大腿脛骨筋(190mol(Pi)/mol/min)であった。
- 3) Northern解析の結果, 後肢筋にはG-typeが多く発現していることがわかった。
- 4) 腸脛骨筋の主成分アイソホーム(G-type)の23kDa, 50kDaおよび20kDaフラグメントの全アミノ酸配列を決定した。それらを胸筋のもの(P-type)と比較すると約4.3%のアミノ酸の変異が認められた。微量成分はペプチドの配列分析の結果からほとんどがP-typeであることが判明し, P-typeとG-typeの割合は約3:7であった。

腓腸筋にも同様に, P-typeとG-typeが存在し, その割合は約2:7で, またP-typeとG-typeのハイブリッド型と考えられるペプチドもわずかに認められた。

大腿脛骨筋には, P-type, G-typeの他に, F-typeが存在することが明らかとなり, それらの割合は約1:6:3であった。

#### 考 察

G-typeとP-typeのアミノ酸配列を比較するとATPアーゼ活性に関係のある部分(P-loopやSW-I, SWII-helix)よりむしろ, upper 50kDa actin binding loopやloop 2, converter domainにアミノ酸変異が多く認められることから, ミオシンとアクチンの結合のしかたやATP分解に伴うミオシン頭部の動きに微妙な違いがあると推測され, これによって, 胸筋と後肢筋のミオシンの motility speedや筋原線維のATPアーゼ活性の違いが生ずると考えられる。

後肢の筋肉のうち, 腸脛骨筋は下腿の表層, 腓腸筋は下腿の表層に存在する筋であるが, それに対し, 大腿脛骨筋は大腿の深部に位置する。腸脛骨筋および腓腸筋にはG-typeが多く含まれ, 大腿脛骨筋にはG-typeの含量が比較的少なく, それに代わりF-typeの割合が多かった。ミオシンの motility speed・筋原線維のATPアーゼ活性は, 腸脛骨筋および腓腸筋が大腿脛

骨筋より有意に高い値を示した。これらのことから、G-type はいわゆる速筋タイプの働きに適し、F-type は姿勢保持など遅筋に近い働きに適していることが示唆される。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

骨格筋には幾種類ものミオシン分子のアイソフォームが存在していることが知られている。本研究は、ミオシン重鎖(MHC)の構造解析から、筋種によるアイソフォーム分布の違いと筋収縮機能との関連性を明らかにすることを目的としたものであり、動機、目的、意図は明確である。

#### 2. 研究手段に関する評価

成鶏の後肢の3種の筋肉と胸筋を対象として、ミオシンの抽出、*in vitro* motility assay, ATPase 活性測定、MHC S-1フラグメントのアミノ酸配列の分析など生化学的手法を駆使したもので、最も妥当なものである。

#### 3. 解析・考察・総合的な評価

後肢筋中のミオシンのアイソフォームには G-type, P-type, F-type が存在しているという新知見を得た。筋の種類によってアイソフォームの分布が異なり、その分布とミオシンの motility speed や ATPase 活性との間に強い関連性があることを明らかにした。これらの知見は筋肉の機能を解析する上できわめて重要な情報を提供していると考えられ多に評価出来る。審査員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 近藤 宇史  
副査 教授 進藤 裕幸  
副査 教授 相川 忠臣

### 川下雄文

(長崎県)昭和41年5月10日生

授与年月日 平成14年2月20日

主論文 Safe and Efficient Gene Transfer into Porcine Hepatocytes Using Sendai Virus-Cationic Liposomes for Bioartificial Liver Support

(正荷電型 HVJ リポソームを用いたブタ肝細胞への安全かつ効果的な遺伝子導入 - 人工肝臓への応用を目指して - )

川下雄文, 大津留 晶, 藤岡ひかる, 蒲原行雄, 川添 康, 杉山 望, 江口 晋, 黒田宏昭, 古井純一郎, 山下俊一, 金田安史, 兼松隆之

Artificial Organs 24 : 932-938, 2000

長崎大学医学部第二外科学教室

(主任: 兼松隆之教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

約500種の機能をもつ肝臓の代替えを目的とする人工肝臓では、生体材料として肝細胞を応用したハイブリッド型のものが最も現実的である。このハイブリッド型人工肝臓で用いる培養肝細胞の問題点のひとつは時間経過と共に細胞が死滅し肝細胞機能の減少を来すことにある。そこで、これらの肝細胞の不死化を目指して本研究を行ってきた。また近年の分子生物学の発達により遺伝子導入に基づき細胞の機能を改変することが可能となってきた。そこで今回、遺伝子操作にて肝細胞の機能制御を試みるための基礎実験として HVJ-liposome 法を用いた遺伝子導入法の至適条件およびその有用性を検討した。

#### 材料と方法

実験動物; 体重 8 ~ 10kg の雌性食用ブタ

肝細胞分離; collagenase perfusion 法にて分離。

細胞培養; 10% FBS 添加 RPMI1640 にて Microcarrier beads (Cytodex 3) とともに 4 時間培養し接着させた。遺伝子導入; HVJ-liposome 法。逆相蒸発法にて liposome を作製した後に紫外線にて不活化した Sendai virus (Hemmagglutinating virus of Japan; HVJ) を融合させ HVJ-liposome を作製。

評価; a) 遺伝子導入効率の検討;  $\beta$ -gal 染色, FACScan, および Luciferase assay

b) 細胞障害性の検討; 培養上清中のアルブミン分泌量, リドカイン除去能(p 450機能), AST 値, LDH 値, および Dye exclusion test

#### 結果

遺伝子導入至適条件; 1) 培養時間; 90min, 2) DNA 濃度;  $4 \mu\text{g} / 2 \times 10^5 \text{cells}$

大量培養肝細胞への遺伝子導入効率;  $2.5 \times 10^6$  の肝細胞に対し導入効率を  $\beta$ -gal および FACScan にて検討すると 38% の肝細胞に遺伝子の発現が認められた。

遺伝子導入後の肝細胞機能評価; AST, LDH, Lidocain clearance test, アルブミン分泌量はそれぞれ  $22.5 \pm 0.7 \text{ IU/L}$  ( $20.3 \pm 0.9$ ),  $26.8 \pm 1.5 \text{ IU/L}$  ( $26.8 \pm 1.5$ ),  $2.6 \pm 0.9\%$  ( $2.7 \pm 2.0$ ),  $6.1 \pm 0.3 \text{ ng/mL}$  ( $7.2 \pm 0.7$ ) いずれもカッコ内は正常コントロール)と良好に保たれており遺伝子導入そのものによる障害性は軽微であった。

#### 考察

一般に初代培養肝細胞への遺伝子導入は比較的困難である。報告例によればアテノウイルスがもっとも高効率であると考えられるが同時に高い免疫原性に基づく副反応も報告されており臨床治験では死亡例も認められた。我々は将来のヒトに対する人工肝臓補助療法を念頭に置きブタ肝細胞への遺伝子導入法として非ウ

イルスペクターである HVJ-liposome 法を用いた。導入効率は培養の条件により大きな違いがあるが至適条件を検討するとわずか90分間という短時間で最高値に達した。そして実際に同条件下で通常我々が人工肝内肝細胞の preparation として用いている  $2.5 \times 10^6$  個の肝細胞へ38%の率で導入が可能であった。不死化実験の際には通常遺伝子導入後、薬剤選択により長期間の培養を行うためこれだけの効率で充分と思われる。

HVJ-liposome 法の問題点としてロット間のばらつきがあることや、ヒトに対する安全性が確立されていないことがあげられる。ロット差は工業的な大量生産が可能となれば解決されていくと思われる。また、安全性に関しては HVJ-liposome 法は主体はリポソームでありウイルスは紫外線で不活化されその融合能のみが保持されもはや感染力は失っている。したがって本ベクターは非ウイルスベクターに属するものでありその点において生体内に万が一混入した際にも生物由来の副反応は極めて低いものと考えられる。実際に、*in vitro* においては遺伝子導入後の肝細胞機能はよく保たれており、細胞傷害も認められなかった。さらに、特にこれまで動物実験レベルでの安全性試験では大きな問題は認められていない。尚、肝細胞分離直後に浮遊状態で感染させると全く遺伝子導入は認められなかった。このことは Microcarrier beads に接着することにより肝細胞特に細胞膜の構造が安定化するためではないかと考えられる。以上より本法は人工肝臓に用いる肝細胞への遺伝子導入法としてきわめて有望な遺伝子導入法と考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

ハイブリッド型人工肝臓で用いるブタの一次培養肝細胞の不死化を一時的遺伝子導入によって可能にし、その機能を長く維持することを目指した基礎研究であり、極めて明快であり有意義である。

#### 2. 研究手法に関する評価

人工肝臓装置のホローファイバーの直径0.2ミクロン濾過孔からはファイバー内血漿に入り得ない0.7ミクロンの HVJ リポソームを調整し、DNA キャリアーとして用いている。これは本来副作用が少なく反復使用も可能な HVJ の安全性をさらに高めている点で巧みである。また、細胞の傷害度を、肝特異的分泌蛋白質・逸脱酵素・モノオキシゲナーゼ系解毒酵素・色素排除能等の測定で、多面的にチェックしている。更に導入遺伝子モデルとして、細胞集団からの情報を蛍光シフェラーゼレポーターから、細胞個々からの情報を  $\beta$  ガラクトシダーゼレポーターから得ている点は、実験系の用意周到さを物語っている。

#### 3. 結果・考察の評価

一次培養ブタ肝細胞の約40%に、細胞傷害を加えることなく遺伝子導入できたことは極めて意義深い。更に HVJ リポソームの調製はやや煩雑であるが、細胞との混和時間がわずか90分で十分であることは、特に一次培養細胞系にとって大きなメリットとなっている。マイクロキャリアーズに接着させた時のみ遺伝子導入できたことなど、今後のハイブリッド型人工肝臓の条件を整える上での示唆を与えている。今後 Bcl-2 やテロメラーゼの遺伝子導入を目指している考察も十分なされており、評価できる。

以上から、本論文ではハイブリッド型人工肝臓の機能を遺伝子工学的に維持するための基礎的データを提供するものであり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 中村 三千男  
副査 教授 片峰 茂  
副査 教授 綾部 公懿

### 前田 兼徳

(長崎県)昭和45年3月10日生

授与年月日 平成14年2月20日

### 主論文 ANGIOGENIN EXPRESSION IN SUPERFICIAL BLADDER CANCER

(表在性膀胱腫瘍における Angiogenin の発現)

KANENORI MAEDA, KOICHIRO NOMATA, MITSURU NOGUCHI, HIROSHI KANETAKE

ACTA UROLOGICA JAPONICA 2001; 47: 547-552

長崎大学医学部泌尿器科学教室

(主任: 金武 洋教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

血管新生は腫瘍の発育、進展、転移に不可欠な役割を担っていると考えられており、特に腫瘍の発育には様々な血管新生因子が関与している。腫瘍の増大や転移、浸潤の獲得には内皮細胞の遊走、増殖、分化といったステップが必要であり、今日までに血管新生をコントロールする数々の血管新生因子が同定されている。血管新生因子の1つであるヒト angiogenin はヒトの大腸癌細胞株 HT29 の培養上清より分離同定された 14.2 kDa の蛋白であり、以後の研究により血清 angiogenin 濃度がヒトの大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、乳癌などの進行に関与することが知られている。しかしその病理組織学的な特徴についての報告は見ない。われわれは表在性膀胱腫瘍患者(移行上皮癌)を対象に angiogenin の組織内濃度についての検討を行った。

## 対象と方法

長崎大学医学部附属病院泌尿器科において表在性膀胱腫瘍と診断された20名を対象とし腫瘍組織内と正常組織内それぞれの angiogenin 濃度をサンドウィッチ ELISA 法 (以下 ELISA 法) を用い測定した。また膀胱組織内における angiogenin の局在を明らかにする目的で免疫染色を行った。検体の使用に関しては患者本人に十分なインフォームド・コンセントを行い、各人の同意を得た。20名の内訳は年齢 $64 \pm 11$  (33-84) 歳、性差は男性17名、女性3名であり、stage は Ta 3名、T1 17名で grade は G1 10名、G2 9名、G3 1名であった。初発と再発はそれぞれ10例ずつであった。cold cup biopsy で得られた組織の蛋白溶解産物を抽出し ELISA kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を用い組織内 angiogenin 濃度を定量化した。免疫染色はパラフィン切片を goat ポリクローナル抗 angiogenin 抗体 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を用い DAB 染色で行った。統計学的解析には unpaired student t test を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結果

ELISA 法による測定で angiogenin は患者の腫瘍組織および正常組織のすべてにおいて確認された。腫瘍組織内濃度は $6.4 \pm 4.5$  S.D. ng/mg protein ( $1.4-16.7$  ng/mg protein) であり、正常組織内濃度の $14.5 \pm 6.6$  S.D. ng/mg protein ( $4.5-27.0$  ng/mg protein) と比較して有意に低下していた ( $P < 0.001$ )。免疫染色においても angiogenin の発現は正常移行上皮に高く、腫瘍組織内で明らかに低下していた。組織内 angiogenin 濃度と患者の臨床病理学的特徴 (T stage, grade, main tumor size, primary or recurrence, solitary or multiple) についての相関を検討したところ、いずれにおいても統計学的有意差は認められなかった。

## 考察

腫瘍の発育には血管新生因子が強く関与しており、事実 vascular endothelial growth factor (VEGF) や platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) は膀胱腫瘍組織内において強く発現している。血清 angiogenin と悪性腫瘍との関連性は今日までに諸家により多数報告されており、様々な悪性腫瘍において血清 angiogenin 濃度は予後を反映する重要な因子とされている。膀胱腫瘍についての報告は少ないが、MIYAKE らは浸潤性尿路上皮腫瘍患者の血清 angiogenin 濃度と正常コントロール群および表在性尿路上皮腫瘍患者の血清 angiogenin 濃度を比較し、前者が有意に高値であったとし、また予後においても血清 angiogenin 高値群が正常群と比較して不良であったと報告している。われわれは ELISA 法を用いて組織内の angiogenin 濃

度を測定したが angiogenin は腫瘍組織および正常組織のすべてにおいて発現が確認され、腫瘍組織内濃度は正常組織内濃度と比較して有意に低下していた。これは諸家による血清 angiogenin 濃度についての報告とは異なる結果であった。これらの結果は表在性膀胱腫瘍においては angiogenin の血清濃度と組織内濃度がパラレルに相関しないことを示すものであり、膀胱腫瘍の発育過程では angiogenin は他の血管新生因子とは異なる役割を担っていることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 研究目的の評価

本研究は、種々の臓器において癌の進展に関与があると報告された血管因子のひとつである Angiogenin の発現について、表在性膀胱腫瘍において検討したもので、目的は十分に妥当である。

### 2. 研究手法に関する評価

表在性膀胱癌症例の選択については、臨床情報の収集、インフォームドコンセントなど十分に配慮されている。また、同一患者における腫瘍組織、正常組織中の Angiogenin の ELISA 法による比較、免疫染色による組織内局在の検討など、研究手法も妥当である。

### 3. 解析・考察の評価

表在性膀胱癌では、腫瘍組織において、Angiogenin の発現量が減少していることを明らかにした。表在癌と進行癌の比較による従来の報告に加え、初期膀胱腫瘍では、組織内では逆に減少していることを明らかにした点において、膀胱腫瘍の進展の分子基盤の解明に貢献するところが大きく、審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 下川 功  
副査 教授 大園 恵 幸  
副査 教授 綾部 公 懿

## 笹山初代

(長崎県) 昭和33年7月18日生

授与年月日 平成14年2月20日

主論文 The Effects of Volcanic Disaster on the Prevalence and Severity of Bronchial Asthma

火山災害による気管支喘息頻度と重症度への影響

笹山初代、青柳 潔、田川宜昌、田川雅子、門司和彦、本田純久、竹本泰一郎

Acta Medica Nagasakiencia 47: 2002 (掲載予定)

長崎大学社会医学講座 (公衆衛生学)

(主任: 竹本泰一郎教授)



**論文内容の要旨****緒言**

気管支喘息(BA)の頻度は近年増加している。その理由として都市化・工業化に伴う大気汚染による影響が報告されている。一方、ストレスや不安などの精神的要因がBAの発生、悪化に関与していることも指摘されている。火山噴火は火山性ガスや火山灰などによる大気汚染によってBA頻度を高め症状悪化をもたらすことが考えられるが、これまでの報告で必ずしも一致した結果は得られていない。さらに、これら研究は、火山性ガスや粉塵の影響を中心に検討されており、避難などによる生活上の変化は考慮されていない。

本報告では1990年11月から1995年5月まで活発な噴火活動が続いた雲仙普賢岳噴火災害が小学校児童のBAにどのような影響を与えてきたかを噴火災害による生活環境や家族の変化、避難の経験など噴火災害に関わる要因とともに、アレルギー状態についての家族歴・既往歴などの要因とを併せ総合的に検討した。

**対象と方法**

1. 1994年秋、噴火下の島原市内6小学校全児童3,029名に対し、学校を通して児童の両親および保護者に対して質問紙を配布し、回答の得られた2,304名(76.1%)を解析対象とした。
2. 質問内容はBAを含めた健康状況とアレルギー疾患の既往・家族歴、噴火災害による生活上の変化である。
3. BAはアメリカ胸部疾患学会の小児喘息の診断基準(ATSDLD)に準じ①医師診断BAを②現症BA及び③寛解BAに分け、本調査独自の分類として噴火後頻度が増えたり、症状が悪化した④悪化BAを加えた4カテゴリーに分類した。
4. BAと既往症、家族歴、噴火災害による生活上の変化との関連をオッズ比及び多重ロジスティック回帰分析により検討した。

**結果**

1. 医師診断BAは12.9%(男児15.4%,女児10.6%),現症BAは8.9%(男児10.9%,女児6.9%)であった。現症BAの68.9%が噴火後に増悪していた。
2. 2歳以下での呼吸器疾患およびアレルギー疾患(鼻炎,皮膚炎,結膜炎)の既往,家族歴でのBAはBA現症やBA増悪と関連が認められた。
3. 火砕流,土石流による被害の大きかった南部地域は北部地域よりBA増悪の割合が高かった(OR; 1.63, 95%CI; 0.92-2.89)。
4. 噴火後の同居家族の変化はBA増悪と高い関連(OR; 3.20, 95%CI; 1.79-5.70)がみられた。

**考察**

1. 医師診断BA(12.9%),現症BA(8.9%)とも

にわが国におけるこれまでのBA頻度に比べ高率であり、火山噴火により現症BA頻度やBA増悪頻度は高率となることが示唆された。

2. 現症BAやBA増悪とアレルギー疾患の既往・家族歴との有意な関連性は、これまでの報告と同様にBAがアレルギー状態と強く関連していることが確認された。
3. 火山灰や火砕流の多い南部居住の児童で増悪BAが多かったことは、大気汚染の状態や仮設住宅居住など生活環境の変化によるものと考えられた。
4. 同居家族の変化が増悪BAの割合を高めていたことから、避難生活による不安、緊張等の精神的要因がBAの重症度に影響していることが考えられた。

**結論**

火山噴火災害時の児童における気管支喘息の頻度・重症度への影響は、火山性のガスや火山灰だけでなく、避難や混乱或いは家族の離散による精神心理的要因も大きく作用していることが明らかである。

**論文審査の結果の要旨****学位論文題名**

「火山災害による気管支喘息頻度と重症度への影響」

**1. 研究目的の評価**

本研究は雲仙普賢岳噴火災害が小学生児童の気管支喘息にどのような影響を与えてきたかを検討したもので、目的は十分に妥当である。

**2. 研究手法に関する評価**

アメリカ胸部疾患学会肺疾患(ATSDLD)に準じた質問紙調査にて気管支喘息の頻度を求め、個体別のアレルギー素因をはじめとするリスク要因とともに噴火災害による生活環境や家族の変化、避難の経験などの要因を総合的に検討したもので、研究手法も妥当である。

**3. 解析・考察の評価**

現症気管支喘息はこれまでの報告と比べ噴火下の島原市において高率で、火山噴火により現症気管支喘息や増悪気管支喘息頻度は高率となることが示された。噴火災害による同居家族の変化は増悪気管支喘息頻度アレルギー素因と同程度に関連することを明らかにしたもので、高く評価できる。

以上のように本論文は噴火災害における児童の気管支喘息のリスクの解明に貢献すること大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位を授与するのに十分であると判断した。

審査担当者 主査 教授 河野 茂  
副査 教授 中根 允文  
副査 教授 齋藤 寛

**尾崎啓子**

(広島県)昭和35年5月24日生

**授与年月日** 平成14年3月6日**主論文** 30-Item General Health Questionnaire Scores in Male and Female University Freshmen

男女大学1年生の30項目一般健康調査の得点

尾崎啓子, 永田耕司, 林田雅希, 太田保之, 石井伸子, 竹本泰一郎

Acta Medica Nagasakiensia 47; 2002 (掲載予定)

長崎大学公衆衛生学教室

(主任: 竹本泰一郎教授)

**論文内容の要旨****緒言**

日本では、大学受験が大きなストレスであり、受験を終えた大学生は高校生と比較すると精神的健康度が高い、と報告されている。しかし、大学入学早期には就学環境や生活環境などの大きな変化によって新たなストレスにさらされ、目標を失い緊張がとれた状態におちいり、いわゆる「5月病」になりやすいと言われている。

これまで新入生の心理的状态についての研究は多いが、確立した測定スケールを用いて入学からの時期による精神的健康度の変化を調べているものは少ない。本研究では、大学1年生の精神的健康度が入学からの時期の違いによって変わるかどうかを一般健康調査票 (General Health Questionnaire: GHQ30) を用いて入学後の学期別・男女別に調査した。

**対象と方法**

1. 調査時期: 1998年6月下旬(前期), 1999年1月下旬(後期)
2. 対象: 1998年4月にA大学8学部に入学生1643名のうち、講義に出席した1432名の中で一般属性調査票とGHQ調査票のすべての質問に回答した者1306名(全入学者の79.5%, 講義出席者の91.2%)を分析の対象とした。必修課目の講義の中で施行したために、受講者を当該教科のカリキュラムに従って前期・後期に半分ずつ分けたので、対象者は、6月、1月調査のいずれも、すべての学部の学生がクラスごとにほぼ同数に振り分けられている。
3. 日本語版GHQ30得点が高いほど精神的に不健康となるように症状の頻度を2段階評点法(0 0 1 1)で評点した。最高得点30点における8点以上を、メンタルヘルス面で問題を持つ高得点群とした。
4. 大学生活に関する一般属性調査事項: 所属学部, 年齢, 居住状態(自宅か自宅外か), 現役・浪人の

別, 大学入学満足度など13項目について, GHQ30と同時に調査した。

**結果**

1. GHQ得点分布は、調査時期と性別に関わらず、低得点の頻度が高く、高得点になるにつれてなだらかに減少する分布を示した。
2. GHQ平均得点は女子が前期7.77(±6.08, 中央値7)と後期7.77(±5.83, 中央値6)で、後期男子6.84(±5.70, 中央値5), 前期男子6.62(±5.45, 中央値5)より高値であった。
3. 高得点者の割合は前期女子45.3%, 後期女子41.6%と後期男子37.0%, 前期男子32.6%の順であった。時期別比較では、前期で女子の割合が男子より統計的に有意に高かった。
4. GHQ高得点と相関のあった項目は前期男子では「自覚した健康状態」「満足度」「学業への熱意」と負の相関、「居住状態・自宅外」と正の相関、後期男子では「自覚した健康状態」「満足度」と負の相関、前期女子では「自覚した健康状態」「満足度」「学業への熱意」と負の相関、後期女子では「自覚した健康状態」「学業への熱意」と負の相関、「居住状態・自宅外」と正の相関があった。「親密な友人の有無」はどのグループでも相関がみられなかった。
5. 因子分析の結果、全4グループともに2因子が抽出された。第1因子はすべて「無力感」であった。第2因子は男子では前期「人間関係と活動性の低下」、後期「活動性の低下」、女子では前期「親密性と緊張感」、後期「緊張感の低さ」であった。

**考察**

1. 高得点者割合が前期男子以外は4割前後も存在していたことから大学受験から解放されても新入生はストレスを感じている者が多いことが示された。特に女子では割合が男子より高く、特に前期では5割に近かった。若年女性が充足感欠如や緊張感、不安感などを感じやすい傾向があることから、女子学生のメンタルヘルスケアが重点的に行われる必要がある。
2. ロジスティック回帰分析で全てのグループで自覚的な健康度がGHQ得点と関連していたことから、大学新入生における健康管理の重要性を示している。また、満足度も関連が大きいことから、大学学部の選択が入学後の精神的健康度に影響していることが考えられる。高等学校における進路指導の重要性を示唆していると云えよう。
3. 学期による得点の顕著な差異がみられなかったことは、以前のように入学直後の急性的な「5月病」を呈するような学生が少なくなり、代わって入学から卒業にいたるまでの慢性的な精神的ストレスにさ

らされている可能性がある。GHQ 得点と親密な友人の有無に相関がなかったことも、友人関係の希薄化を通じて大学生活の精神的ストレスの存在を示唆しているのかもしれない。

### 結論

大学1年生の精神的健康度の高低は入学からの時期の別に左右されず、1年を通してストレス状態にある可能性がある。特に女子は精神的不調を抱える者が多い傾向が見られた。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

本研究は、大学新入生の心身の健康状態(とくに精神的健康状態)の時間的変化を明らかにしようとしたもので、目的は十分に妥当である。

#### 2. 研究手法に関する評価

大学1年生約1,300人について、その半数ずつに対して、それぞれ入学2か月後および9か月後に Goldberg の一般健康調査票30項目版 (General Health Questionnaire 30 items; GHQ30) を用いて心身の健康状態に関わる自記式評価測定を行い、同時に調査した、所属学部、年齢、家族との同居の有無、現役・浪人別、大学入学での満足度、自覚した身体的健康状態など13項目に対する回答と併せて、入学2か月後および9か月後の成績を比較しており、研究手法は妥当である。

#### 3. 結果・考察の評価

大学新入生の精神的状態に顕著な時間的変化はみられず、入学後もストレス状態が持続している蓋然性が高く、男子学生に比して女子学生の方が精神的健康状態の悪い者が多く、学部選択が入学後の精神的健康状態に影響していることを明らかにしており、研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は大学新入生における精神的健康状態に関して、その影響要因の解明および向上のための対策に貢献するところが大きく、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	柴田	義貞
	副査	教授	中根	允文
	副査	教授	綾部	公懿

### 林田 惣一郎

(長崎県)昭和33年4月27日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Construction of a physical and transcript map flanking the imprinted MEST/PEG 1 region at 7q32

ヒト染色体7q32領域のMEST/PEG 1近傍の物理的・転写地図の構築

林田惣一郎, 山崎健太郎, 浅田由樹, 添田栄一, 新川詔夫, 木住野達也

Genomics 66巻: 221-225頁, 2000年

長崎大学大学院医学研究科病理系人類遺伝学

(指導教官: 新川詔夫教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

ゲノム刷り込み(インプリンティング)は近年、メンデル法則の例外として確立された遺伝現象である。刷り込み遺伝子は片親由来染色体のみから発現(母性発現または父性発現)する。刷り込みは遺伝子変異とは異なり、次世代でリセットされ塩基変化を伴わない。ヒトでは20種内外の刷り込み遺伝子が同定・単離され、大部分は11p15および15q11-12でクラスターを形成している。刷り込み遺伝子は初期発生や成長に重要な役割をもち、その異常による先天異常症や腫瘍発生が知られている。MESTは父性発現遺伝子(PEG 1)として単離され、7q32領域に局在する。同領域には父性発現が示唆されている自閉症座を始め、いくつかの疾患座があると推定されている。ゲノムプロジェクトが発展している現在でも、7q32領域の局所的な配列や順位は決定されていない。本研究は、MESTも他の刷り込み遺伝子と共にクラスターを形成しているとの仮説の基に、同領域中の刷り込み遺伝子および疾患遺伝子の同定と単離を行うための基礎となるべく、同領域の物理的・転写地図の構築を目的とした。

#### 材料と方法

PAC/BAC クローンの単離とその両端部分塩基配列決定: 松本らの方法に従って、各ライブラリーからPCRを利用して単離し、DNAはQiagen Plasmid Midi kitを用いて精製した。インサート両端DNAの増幅のため、Cy5ラベルしたPCRプライマーをデザインした(T7, AATACGACTCACTCACTATAG; SP6, ATTTAGGTGACACTATAG; BACF, ATCCTCTAGAGTCGACCTGCAG; BACR, CGGATAACAATTTTCACACAG)。次いで、PAC/BAC DNA(2 µg)をCy5サイクルシーケンスキットを用いて、塩基配列を決定した。いくつかのクローンは、その後のスクリーニング用の特異的プライマーをデザインするために、pBluescript SK II (+)を用

いてサブクローニングした。

**新規 STS の単離とコンティグの構築：**上記塩基配列を基に新規 STS を構築し，PCR によって隣接した PAC/BAC クローン を単離した。この操作を繰り返し，コンティグを構築した。PCR は 2  $\mu$ l buffer II，200 mM dNTP，0.5 mM プライマー，0.5 単位 Amplitaq，50 ng DNA 中で，94°C 6 分，次いで 94°C 30 秒，50°C 30 秒，72°C 30 秒，最終 72°C 10 分の条件で行った。得たクローンの 7q32 への局在は FISH によって確認した。

**転写地図の構築：**既知の 60 種の EST を解析し，その局在を，構築したコンティグ由来 PAC/BAC クローンの PCR で確認した。

### 結果

D7S530 と D7S649 間に，39 個の PAC クローンと 8 個の BAC クローンから成る完全なコンティグを構築した。同コンティグは最少，18 個のクローンで繋がっている。PFGE の結果から各クローンのサイズを推定し，コンティグ全長は約 1 Mb と推定した。2ヶ所を除いて，コンティグ全長は少なくとも 2 重のクローンでカバーされた。1 個のみのカバー領域は，PAC クローン 144H10 中の *MEST* を含む 15 kb 部分と，294H7 クローン中の  $\gamma 2$  *COP* 遺伝子イントロン 20 が局在する 144H10 T7 と B184B14 T7 の間であった。

60 種の新規 STS を作成し，既知の sWSS を正確にマップした。同様に，既知の 64 種の EST および 6 種の遺伝子 (*NRF 1*，*UBE 2 H*，*CATR 1*，*CPA 1*，*CPA 2*，*MEST*， $\gamma 2$ -*COP*) の局在を正確にマップした。BLASTN STS のゲノム上の配列順序を決定したが，7 種の既知の STS/EST は決定できなかった。

### 考察

本研究で，刷り込み遺伝子 *MEST* を含む D7S530 D7S649 座間の完全な物理的・転写地図を構築した。両座間は推定 1 Mb で，Généthon ヒト連鎖地図における 1.6 cM と矛盾しない。構築したコンティグ中の UWGC : djs201 と FRA7H の 2 領域の塩基配列は GenBank にすでに登録されている。UWGC : djs201 は *MEST* と *CPA 1* を含み，FRA7H は 7q31 q32 中の脆弱部位にある。この脆弱部位は染色体の断裂と再結合を起こす座位として知られ，一方 FRA7H は SV40 のゲノム挿入部位である。

本研究の最終目標は 7q32 の刷り込み遺伝子の同定とその機構を解析することであるが，構築したコンティグは，目的を達成するために役立つと思われる。本地図は，現在ゲノムシーケンスに対する鋳型として使用されている。本コンティグ中に 50 種以上の遺伝子 (少なくとも 6 個の遺伝子) や EST がマップされたから，同領域は遺伝子豊富領域だと考えられる。6

種の遺伝子は *NRF 1*，*UBE 2 H*，*CATR 1*，*CPA 1*，*CPA 2*，および  $\gamma 2$ -*COP* である。*CPA 1/2* はカルボキシペプチダーゼをコードする遺伝子である。ヒト *CPA* 遺伝子は従来，7q31 qter にマップされていたが，本研究で動原体 100 kb の範囲に決定した。*CPA 1* と *CPA 2* は刷り込み遺伝子の候補となり得る。

### 結論

本研究によって，ヒト 7q32 領域の刷り込み領域と思われる約 1 Mb 部分の物理的地図を構築し，さらに 60 種の STS の作成，および 50 種以上の EST/遺伝子から成る発現・転写地図を構築した。本地図は，ヒトゲノム計画に寄与するだけでなく，新規の刷り込み遺伝子の同定とその機構解明に役立つと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

刷り込み遺伝子 *MEST* 領域の物理的・転写地図の構築を目的としたものであり，同領域の他の刷り込み遺伝子及び疾患遺伝子の単離・同定に繋がる観点から，目的には十分な妥当性がある。

#### 2. 研究手法に関する評価

ゲノム・データベースより出発し，PCR を用いた PAC 及び BAC ライブラリのスクリーニングのくり返しにより最終的に約 1 Mb にわたる *MEST* 領域の完全な物理的・転写地図を構築した手法は最新のゲノム解析手法であり，優れている。

#### 3. 解析・考察の評価

物理的・転写地図の構築の過程で，60 種の新たな STS が作成され，50 種以上の EST/遺伝子 (少なくとも 6 種の既知遺伝子) を正確に *MEST* 領域にマップした。本地図は，ヒトゲノム計画に寄与するに止まらず，新規刷り込み遺伝子の同定とその機能解明に大きく貢献するものと期待される。

以上，本論文はヒトゲノム計画と新規刷り込み遺伝子の同定及び機能解明に貢献するところ大であり，審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	片峰	茂
	副査	教授	松山	俊文
	副査	教授	奥村	寛

**御手洗 明 香**

(宮崎県)昭和37年12月19日生

**授与年月日** 平成14年3月31日**主論文** Two distinct inactivation processes related to phosphorylation in cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents

心筋Lタイプカルシウムチャンネルの不活性化過程における検討

御手洗明香, 貝原宗重, 矢野捷介, 谷山紘太郎

Am J Physiol Cell Physiol 279: C 603 C 610, 2000

長崎大学医学部第三内科

(主任: 矢野捷介教授)

**論文内容の要旨****緒言**

心筋Lタイプ  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  を調節し、心筋の収縮に重要な役割を果たしている。その不活性化過程では活動電位持続時間にも影響を及ぼし、不整脈の発生にも強く関与していると考えられる。この不活性化過程は主に3つの要因により調節されている。その要因は1) 膜電位, 2)  $\text{Ca}^{2+}$ , 3) チャンネルのリン酸化である。これまでの研究では, 2) の要因を除外するために  $\text{Ca}^{2+}$  以外の2価の陽イオンを用い検討されてきたが, シングルチャンネルレベルと細胞全体のチャンネルレベルにおいて矛盾した結果が生じることがわかってきた。今回我々は, 1価の陽イオンである  $\text{Na}^+$  を用いて, 膜電位とチャンネルのリン酸化の不活性化過程に及ぼす影響を詳細に検討することにより理論的な考察を得ることができた。

**材料と方法**

250g以下のモルモットから取り出した心臓をランゲンドルフ装置にて灌流後, 酵素的に分離し単離心筋細胞とし, 膜電位固定法を用い膜電流を測定した。膜電位は,  $\text{Na}^+$  チャンネル, Tタイプ  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを不活性化するために40mVに固定, また  $\text{K}^+$  チャンネルをブロックするため, 細胞外液の  $\text{K}^+$  は  $\text{Cs}^+$  に置換された。すべての電流はLタイプ  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流を分離するため, 2  $\mu\text{M}$  ニフェジピン, 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  時の電流を差し引いたものを使用した。Lタイプ  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの不活性化過程の時定数はPclamp 6及びKaleidagraphにより測定した。

**結果**

単離心筋細胞を膜電位固定し, まず  $\text{Ca}^{2+}$  を含む細胞外液で灌流した。Lタイプ  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの不活性化過程の時定数は2つの成分から成り立っていることが知られており, 速い時定数をもつ成分は  $\text{Ca}^{2+}$  の存在により作られ, 遅い時定数をもつ成分はそれ以外の

要因によるものと考えられてきた。この場合も時定数は2つの成分から成っていた。次に  $\text{Ca}^{2+}$  を含まない細胞外液で灌流した。この電流は  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを通過する  $\text{Na}^+$  による  $\text{Na}^+$  電流と考えられたが, この電流の不活性化は  $\text{Ca}^{2+}$  が存在しないにもかかわらず2つの成分から成り立っており, 速い成分が  $\text{Ca}^{2+}$  以外の要因に影響されている可能性が考えられた。次にリン酸化と時定数の関係を検討するためにLタイプ  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを通る  $\text{Na}^+$  電流にイソプロテレノールを投与した。その結果, リン酸化が進むにつれ速い成分が消失し, 遅い成分のみに変換していくことがわかった。これがチャンネルのリン酸化によるものかどうか確認するため, 次にcAMP 500  $\mu\text{M}$  を投与したところ, これでも同様の結果が得られた。次に, リン酸化を抑制するH89を投与し, 実験を行ったが速い成分は消失せず, 不活性化過程の時定数は2つの成分から成り立っており, チャンネルがリン酸化されなければ速い成分は消失しないことがわかった。

**考察**

Lタイプ  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルをリン酸化するとシングルチャンネルレベルでは開口時間が延長することが報告されている。これを全細胞のチャンネルレベルで見ると不活性化過程は遅くなることが考えられる。しかし, Lタイプ  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを通る  $\text{Ba}^{2+}$  電流を見ても不活性化がリン酸化により遅くなるという現象は見られず, 矛盾が生じていた。 $\text{Ba}^{2+}$  などの2価のイオンでは  $\text{Ca}^{2+}$  で見られるのと同様な電流依存性の不活性化が存在するため, 十分な検討ができなかったものと考えられる。

本研究では一価のイオンである  $\text{Na}^+$  を用いることにより, チャンネルのリン酸化により不活性化過程が遅くなることを証明し得た。リン酸化の程度が進むにつれて不活性化の遅い成分が増加していくことから, 遅い成分はリン酸化されたチャンネルを反映し, 速い成分はリン酸化されていないチャンネルを反映している可能性が示唆された。

**結論**

近年, 不整脈に関する疾患では, 心筋の  $\text{Na}^+$  チャンネル,  $\text{K}^+$  チャンネルの異常が数多く報告されている。 $\text{Na}^+$  チャンネルの不活性化過程の異常によるQT延長症候群も存在し, チャンネルの不活性化過程の評価は重要である。これまで  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの不活性化過程は複雑でその評価法も確立していなかった。本研究により,  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの不活性化過程が評価可能となり, 今後のチャンネル異常による疾患の解明に役立つものと思われる。

**論文審査の結果の要旨****1. 研究目的**

活動電位持続時間に影響をおよぼし不整脈発症機序

に關する心筋LタイプCa<sup>2+</sup>チャンネルの不活性過程におけるチャンネルリン酸化の意義を、単離モルモット心筋細胞と電気生理学的手法を用いて検討したもので科学的に妥当である。

## 2. 手段・方法に関する評価

モルモット心臓より注意深く心筋細胞を単離し、whole cell patch-clamp method (膜電位固定法)を用いて膜電位を測定しており研究手法は妥当である。

## 3. 分析・考証の評価

薬理学的に極めて慎重かつ厳密に実験が行われ、得られた測定結果より論理的に分析・考証を行い、不活性過程の電氣的に遅い時定数を持つ成分がリン酸化されたチャンネルで、リン酸化は心筋LタイプCa<sup>2+</sup>チャンネルの不活性過程を遅延させるという結論は科学的に妥当である。

## 4. 結果に関する評価

膜電位と心筋LタイプCa<sup>2+</sup>チャンネルのリン酸化の不活性過程におよぼす影響を明らかにすることで、Ca<sup>2+</sup>チャンネルの不活性過程の評価法を確立し、チャンネル異常による不整脈疾患の解明のための新しい展望を示したものとして高く評価できる。

以上のように、本論文は、心筋LタイプCa<sup>2+</sup>チャンネルの不整脈発症機序の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 丹羽正美  
副査 教授 澄川耕二  
副査 教授 江石清行

## モーセン・ガダミ

(イラン) 1964年8月23日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Genetic Mapping of the Camurati-Engelmann Disease Locus to Chromosome 19q13.1-q13.3 (Camurati-Engelmann病座の染色体19q13.1-q13.3への遺伝的マッピング) Mohsen Ghadami, 蒔田芳男, 吉田邦宏, 西村玄, 福嶋義光, 涌井敬子, 池川志郎, 山田浩喜, 近藤新二, 新川詔夫, 富田博秋  
*American Journal of Human Genetics* 66巻 143-147頁, 2000年  
長崎大学大学院医学研究科人類遺伝学 (指導教官: 新川詔夫教授)

## 論文内容の要旨

### 緒言

Camurati-Engelmann病(CED, MIM\*13100)は、進行性骨幹異形成とも呼ばれる骨硬化症の1つであり、

頭蓋骨や長管骨の過剰な骨膜性骨形成を特徴とする常染色体優性の遺伝性骨系統疾患である。従来、国内外で100例以上の報告があるが、原因は不明であった。本研究は、CEDの原因遺伝子のポジショナルクローニングに用いる位置情報(CED座のゲノム上の局在)を得るため、原因本邦の2家族における遺伝的連鎖解析を行ったものである。

## 材料と方法

連鎖解析の対象としたCED家系とその構成員は家族1と家族2の計27名であり、うち16名はCED罹患患者である。患者におけるCEDの診断は主治医によって、臨床症状および骨レントゲン所見からなされた。インフォームドコンセントを得た後、27名全員から血液を採取し、DNAを抽出した。連鎖解析におけるマーカーは、高い多型の程度を示し、且つ互いの遺伝的距離が~10cMになるように、400個のマイクロサテライト多型をGenethonデータベースから選び、それらに対応するPCRプライマーを設計した。プライマーの片鎖は蛍光色素Cy5でラベルして用いた。解析は2段階で行った。第一段階は400マーカーを用いるゲノムスキャンであり、第二段階は、もしデータが特定の染色体領域に連鎖が示唆されたときは、その領域をより短い遺伝的距離になるように、マーカーを追加して確認した。

家族構成員由来のDNAをPCR増幅し、増幅産物をPharmacia ALFexpressオートシーケンサを用いて、6%ポリアクリルアミドゲル上で泳動し、泳動パターンをソフトウェアFragment Manager™ (Pharmacia)で解析し、遺伝子型(アレロタイプ)を決定した。

疾患が常染色体優性遺伝であり、疾患遺伝子頻度は $1 \times 10^{-6}$ 、さらに各マーカーのアレル頻度は等しいとした仮定(Critical領域の5つのマーカーに関しては、一般集団80染色体におけるアレル頻度を算出した)のもとで、コンピュータプログラムMLINKを用いて、2点連鎖解析とロッドスコアの算出を行った。

## 結果

2家族のうち、最初に大きなサイズの家族1を解析した。その結果、マーカーD19S918において、浸透率が1.0のとき、高いロッドスコア( $Z_{\max} = 6.20$ ,  $\theta = 0.00$ )を得たので、同領域に23種のマーカーを追加して、さらに解析した。この家族のハプロタイプ解析では、罹患者はD19S881とD19S606間の計15種のマーカー座に共通のハプロタイプを有していた。3名の罹患者に4回の組換えが生じていて、1つはD19S422とD19S223間に、1つがD19S219とD19S606間に、2つがD19S414とD19S570間およびD19S881とD19S211間に存在した。したがって、最大連鎖領域はD19S881とD19S606間であると判定した。これらの結果

を受けて、家族2を解析した結果、同じ領域で連鎖を認めた。2つの家族における最大の2点ロッドスコアは、組換え値0.00(浸透率1.0)のとき、*D19S918*で7.41であった。各マーカー座間の遺伝的距離を考慮すると、CED座は19番染色体19q13.1 q13.3上の*D19S881*と*D19S606*間の15.1cMの範囲にあると結論した。

### 考察

19番染色体19q13.1 q13.3領域は、いわゆる遺伝子豊富領域であり、多数の遺伝子、EST、骨異形成に関係した疾患座がマップされている。このなかで、カルモデュリン3遺伝子、ZFP36遺伝子、トランスフォーミング成長因子β1遺伝子(TGFB1)は、各々骨形成や骨発育に關する可能性があり、CEDの最大の候補となるので、それらの解析が望まれる。

### 結論

遺伝的連鎖解析によって、Camurati-Engelmann病の疾患座を19番染色体19q13.1 q13.3領域の*D19S881*と*D19S606*間の15.1cMの範囲にマップした。この位置情報は、同遺伝子の単離・同定の鍵となるものである。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

常染色体優性の遺伝性骨系統疾患であるCamurati-Engelmann病(CED)の原因遺伝子の位置情報を得るための遺伝的連鎖解析を目的としたものであり、十分な妥当性がある。

#### 2. 研究手法に関する評価

CED2家系の構成員計27名の血液検体より抽出したDNAについてまず300個のマイクロサテライト多型によりスクリーニングし、連鎖が示唆された領域についてさらに細かい多型解析を行い、そのデータを最先端の連鎖解析プログラムにより解析しCED遺伝子座を推定した手法は目的達成及び先端性の観点から妥当であり優れている。

#### 3. 解析・考察の評価

連鎖解析の結果、CED遺伝子座を19番染色体19q13.1 q13.3上の15.1cMの範囲にマップし、候補遺伝子としてカルモデュリン3、ZEP36、TGFβの3遺伝子を考察した解析及び考察の過程も論理的であり妥当である。

以上、本論文は未知のCED原因遺伝子の同定に途を拓きヒトゲノム計画に貢献するところきわめて大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 片 峰 茂  
副査 教授 森 内 浩 幸  
副査 教授 進 藤 裕 幸

### 芦 忠 陽

(中国)1968年11月22日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Aluminum Chloride Induces Retinal Changes in the Rat

(塩酸アルミニウムはラット網膜に変化を起す)

Zhong-Yang Lu, Huaqing Gong and Tsugio Amemiya

TOXICOLOGICAL SCIENCES 66(2),253 ~ 260(2002)

長崎大学医学部眼科学教室

(主任:雨宮次生教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

アルミニウム(Al)は自然界に最も多く存在する元素の一つである。ヒトと動物がこの元素を摂取する機会は多いが、生体内分布と生理機能については明らかではない。一方、Alは人体に障害を起すことが知られており、腎臓透析の際、様々な組織に病理学的変化を起す。また、アルツハイマー病では脳にAlの蓄積が關与するか否かが関心を集めている。眼組織では、結膜、角膜、網膜にいわゆる結石が形成されると報告されている。本研究はAlによる網膜の中毒変化を研究することを目的とする。

#### 対象と方法

正常4週齢Wistar Kyotoラットに4%AlCl<sub>3</sub>0.3mlを連日腹腔内注射をした。8,12,16週後、ラットをネブタールで麻酔し、眼球を摘出した。4%グルタルアルデヒド固定、エボン包埋による試料を作成し、透過形電子顕微鏡(JEOL 1210 TEM)にて観察、エネルギー分散型X線分析器(EDXA DX-4)にて元素分析をした。一方、4%グルタルアルデヒド前固定、1%オスミウム酸後固定にて、エボン包埋による試料を作成し、TEM(Hitachi H 300 TEM)にて形態学的変化を観察した。対照群には生理的食塩水を投与した。

#### 結果

Al投与群の血清Al濃度は対照群より有意に高かった(P<0.0017)(表1)。電子顕微鏡による観察では、8,12週目のラット網膜外顆粒層のMüller細胞に、軽度空胞化と減少を認めた。16週目のラットは、身体を捻る動作を起し、網膜には著しい病理学的変化を示した。網膜色素上皮は薄くなり、外顆粒層、内顆粒層、視細胞は消失し、高電子密度の沈着物が多数見られた。EDXAによる観察では、色素上皮、内顆粒層の沈着物にAlの高いピークを検出した。

考察

本研究は AlCl<sub>3</sub> の長期腹腔内注射によって高い血清 AI 濃度を示した。また、身体を捻る動作を起こすようになり、EDXA により変性網膜に AI が検出された。

実験的 AI 中毒は血清 AI 値が高くなっても無症状に経過し、長期間かかって AI 中毒を引き起こす。AI 中毒の症状と組織病理的变化は AI 長期間投与後突然に発することが特徴である。現在までに、AI 中毒による網膜変化に関する報告はない。我々の研究における、4% AlCl<sub>3</sub> 0.3ml を連日腹腔内注射したラットは 8 週目と 12 週目に軽度の網膜変化を示し、16 週目に突然、身体を捻る動作と重篤な網膜変化が起った。EDXA によって、内顆粒層、内網状層、色素上皮細胞の沈着物に AI のピークが検出された。実際、ヒトでも長期間腎透析の患者に AI 中毒を起こす。AI は 16 週目のラット網膜に初めて検出されたが、これは EDXA の検出感度が低いため検出されなかった可能性もある。また、一般的にいて、細胞質中に溶出している微量元素は EDXA では検出困難で、電子密度の高い沈着物となって初めて検出されることが多いので、8 週、12 週目の網膜では AI を検出できなかった可能性がある。AI 投与 16 週目のラットの網膜変性は視細胞の強い変性、消失と核、内・外網状層の神経突起あるいは樹状突起と色素上皮細胞における AI の沈着であった。実験的 AI 脳症 (EAE) では、海馬のグリアと神経の核に AI の蓄積を引き起こす。

AI 中毒は、中枢神経障害を起こすことが多く、中枢神経系の網膜も AI の蓄積し易い組織であるかもしれない。

- 1. AI は網膜に元来存在するものか否か、存在するとすればその分布、量、生理作用、無い場合には AI の毒性など、解明されるべき問題は多い。

表 1. 血清 AI 濃度 (Mean ± SD, µg/l)

ラット	血清 AI 濃度 (µg/l)		
	8 週間	12 週間	16 週間
AI 投与群	54.0 ± 8.1* n = 5	60.3 ± 4.6* n = 5	245.2 ± 35.1* n = 5
対照群	検出不能 n = 10		

n = 動物の数

\* , P < 0.001 (Student's-test 有意差あり)

論文審査の結果の要旨

学位論文題名

「塩酸アルミニウムはラット網膜に変化を起こす」

- 1. 研究目的の評価

本研究は、アルミニウムが過剰に投与されると、ラット網膜に病変が惹起されるか否かを、電子顕微鏡なら

びにエネルギー分散型 X 線分析器 (EDXA) を用いて検討するもので、研究目的として妥当である。

- 2. 研究手法に関する評価

実験動物としてラットを使用し、ラットがアルミニウム過剰状態になっていることを、血清アルミニウム測定、神経症状の発症によって確認した。その上で、網膜病変を電子顕微鏡を用いて観察し、さらに病変部にアルミニウムの存在を EDXA で確認したもので、研究手段・方法共に妥当である。

- 3. 結果・考察の評価

本研究は、長期間の塩化アルミニウム投与によって、突然発症するヒトのアルミニウム中毒の特徴を、ラットによって証明し、網膜に不可逆的变化を発生せしめることを形態学的に世界最初に証明した点、その研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文はアルミニウム中毒症の研究、対策に貢献するところが大きく、審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 齋藤 寛  
副査 教授 竹本 泰一郎  
副査 教授 田口 尚

木下 晃

(大分県) 昭和 45 年 3 月 17 日生

授与年月日 平成 14 年 3 月 31 日

主論文 Domain specific mutations in *TGFB1* result in Camurati-Engelmann disease TGFB1 遺伝子のドメイン特異的変異が Camurati-Engelmann 病をおこす

木下 晃, 齋藤貴志, 富田博秋, 蒔田芳男, 吉田邦宏, Mohsen Ghadami, 山田浩喜, 近藤新二, 池川志郎, 西村 玄, 福嶋義光, 中込 直, 齋藤晴樹, 杉本建郎, 亀ヶ谷真琴, 比佐健二, Jeffrey Murray, 谷口直之, 新川詔夫, 吉浦孝一郎  
*Nature Genetics*, 2000 September; 26(1): 19-20

長崎大学大学院医学研究科人類遺伝学 (指導教官: 新川詔夫教授)

論文内容の要旨

緒言

Camurati-Engelmann 病 (CED, MIM\*13100) は頭蓋骨、上腕骨、前腕骨、大腿骨、頸骨、腓骨などの過剰な骨膜性骨形成のため、骨皮質肥厚と長管骨骨幹部の紡錘形肥大を特徴とする常染色体優性の遺伝性骨系統疾患である。Ghadami ら (2000) はマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析により、CED の責任遺伝子座が 19 番染色体長腕 19q13.1 q13.3 の 15cM の領



域にあることを示し、その後、アメリカとベルギーのグループからこれを支持する報告があった。19q13.1 q13.3領域にマップされている骨関連の遺伝子には、calmodulin 3 (CALM3), zinc-finger protein 36 (ZFP36), transforming growth factor  $\beta$  1 (TGFB1) が知られているが、TGF $\beta$  1 が骨組織に豊富なこと、TGF受容体のドミナントネガティブなトランスジェニックマウスがCEDの病態に似ていることからTGFB1がCEDの候補遺伝子と考えた。本研究は、これらの候補遺伝子における変異解析である。

### 材料と方法

変異解析の対象とした家系と患者は、Ghadamiらが連鎖解析に用いた日本人2家系と、血縁関係のない日本人5家系および白人2家系を加えた計9家系である。インフォームドコンセントを得て採取した患者(発端者)血液から核DNAを抽出し、材料とした。TGFB1のイントロン境界領域を含む7つのエクソン領域をPCR法で増幅し、PCR産物をABI377オートシーケンサを用いて直接塩基配列決定法でシーケンスを行い、またsingle strand conformation polymorphism (SSCP)解析を行った。7組の家族例では、同様の方法で、得られた変異が患者(複数)にのみみられることを確認した。また、正常日本人200名および正常白人100名における同様の解析を行った。得られた変異部位近傍のDNA多型(5'領域のBsu36I-RFLPやコドン10のロイシン/プロリン多型)に関しての両親および患者におけるハプロタイプを決定し、9名の患者間で比較検討した。

### 結果

9名のCED患者(発端者)に、3種の別種のミスセンス変異を同定した。家系1では、225番のシステインがアルギニンに置換した変異(C225R)を、家系2と家系9では218番目のアルギニンがヒスチジンに置換した変異(R218H)を同定し、残りの6家系では218番目のアルギニンがシステインに置換していた(R218C)。SSCP解析では、これら3種の変異は、正常対照者計300名には確認されなかった。このことから、3種のミスセンス変異がCED特異的な変異であると結論した。R218Cの変異に関して家系6と家系7の変異は、発端者のみにみられ、両親いずれにもなかった(sporadic case)。また家系3は他家系と異なるハプロタイプをもつことから、少なくとも4回の独立した変異が起っていた。

### 考察

TGF- $\beta$  1は、シグナルペプチドとLatency Associated peptide (LAP)、および成熟型TGF- $\beta$  1の3つのcomponentsからなる前駆体として合成され、シグナルペプチドが切断された後、LAPとTGF- $\beta$  1からなる潜

在型ホモ二量体が形成される。この二量体は低分子量潜在型TGF- $\beta$ 複合体とも呼ばれ、分子間のジスルフィド結合により結合している。潜在型TGF- $\beta$  1は切断されることによって成熟型(活性型)TGF $\beta$  1となる。本研究で同定した変異はすべてLAPのC末端側に存在し、変異のある225番目のシステインはジスルフィド結合に関わる重要なアミノ酸であり、残り2つの変異も7アミノ酸上流のアルギニンにあることからLAPの構造や機能に影響を与えるドメイン特異的な変異であると考えられる。従来のTgfb1遺伝子のLAPドメイン以外の変異をもつトランスジェニックマウスなどの研究では、その多くが致死あるいは新生児死亡をもたらすことは、上記の推論を支持するものである。TGF- $\beta$ の骨形成における役割は従来いくつかの報告がある。骨芽細胞と破骨細胞の培養細胞を用いたin vitroの系では、TGF- $\beta$  1は骨形成を促進し、破骨細胞の活性を抑制することで骨吸収を阻害することが知られている。またトランスジェニックマウスを用いたin vivoの系ではTGF- $\beta$  2を過剰発現するマウスでは骨吸収が更新されること、dominant-negative effectにより骨芽細胞のTGF- $\beta$  2型受容体の機能が喪失したマウスでは骨吸収が低下する。これらの報告は相反するものであり不明な点も多い。普遍的に生体内に存在するTGF- $\beta$  1中のドメイン特異的な変異が骨特異的な疾患を起こすことは非常に興味深く、骨粗鬆症のような骨リモデリング異常に関してもTGF- $\beta$  1およびそのシグナル系が重要な働きをもつことが予想される。

### 結論

Camurati-Engelmann病の原因がTGFB1遺伝子のLAP領域特異的な変異であることを証明した。この知見は、同疾患の発症機構や骨粗鬆症の発症機構の解明に寄与するものと思われる。

### 論文審査の結果の要旨

#### 学位論文題名

「TGFB1遺伝子のドメイン特異的な変異がCamurati-Engelmann病をおこす」

#### 1. 研究目的の評価

本研究は、常染色体優性の遺伝性骨系統疾患であるCamurati-Engelmann病(CED)の原因遺伝子を同定する目的で行われたものであり、研究目的として妥当である。

#### 2. 研究手法に関する評価

連鎖解析によって得られたCED責任遺伝子座領域にマップされている遺伝子の内、特に骨形成関連遺伝子として重要なTGFB1遺伝子に注目し、日本人及び白人計9家系の血液由来の核DNAを用いて直接塩基配列を決定すると共にsingle strand conformation polymorphism (SSCP)解析を行ったもので、研究手法も

妥当である。

### 3. 解析・考察の評価

上記の解析の結果、CED患者では *TGFB1* 遺伝子の LAP 領域 C 末端側に3種のミスセンス変異が同定され、それらが300名の正常対照者には見られないことから、CEDに特異的な遺伝子変異であることが証明された点、これらの研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文はCEDの発症機構のみならず骨代謝異常疾患の発症機構の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 小路 武彦  
副査 教授 松山 俊文  
副査 教授 進藤 裕幸

### 高槻光寿

(大分県)昭和43年4月11日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients  
(生体肝移植後のレシピエントにおける免疫抑制剤の減量・離脱に関する研究)  
(高槻光寿, 上本伸二, 猪股 裕紀洋, 江川裕人, 木内哲也, 藤田士朗, 林 道廣, 兼松隆之, 田中紘一)  
Transplantation .72巻3号449-54頁, 2001年  
長崎大学医学部第2外科学教室  
(主任: 兼松隆之教授)

### 論文内容の要旨

#### 目的

臓器移植後には常時免疫抑制剤の投与が必要である。しかし、免疫抑制剤を減量、さらに中止できれば副作用の回避、医療費の削減などの面で患者に大きな福音をもたらすことになる。我々は、生体肝移植後、免疫抑制剤で重篤な副作用を来したため、その投与を中止せざるを得なかったレシピエントにおいて経過をみたところ、その後拒絶反応を起こすことなく良好な肝機能を維持している症例を経験してきた。そこで今回、これらの症例の分析を行い、生体肝移植後のレシピエントに対する免疫抑制剤の減量・離脱の可否について検討した。

#### 方法

対象: 1999年10月までに京都大学医学部移植外科で施行された407例の生体肝移植症例中63例(15.5%)(計画的減量・離脱症例26例, 非計画的減量・離脱症例37例)。全例親から子への移植であった。移植時年齢の

中央値は1.1歳(0.1-15.2歳)であった。

減量方法: 1) 計画的減量症例については、移植後2年以上経過・肝機能正常で安定・過去1年以内に拒絶なし、の3条件を満たす症例に対し、3-6ヶ月の期間で段階的に減量し、最終的に中止。合併症を契機に減量を試みた症例(非計画的減量症例)に関しては、それぞれの臨床経過により投与量を調節した。特にEBウイルスによるリンパ増殖性疾患(PTLD)のような即生命を左右する合併症に対しては、即刻中止することとした。

2) 検討項目: 離脱成功例と不成功例とで、ABO血液型適合性、HLA適合性、拒絶歴、減量開始前後の肝機能の推移等を指標として比較した。

### 結果

1) 63例中完全離脱24例(38.1%)で、その内訳は、計画的離脱6例、非計画的離脱18例。1例を交通事故で失った以外良好な肝機能を維持し生存中。離脱期間の中央値は23.5ヶ月(3-69ヶ月)。非計画的離脱症例の中止の理由の大半はPTLDを含めた重症感染症であった。

タクロリムス再投与例(減量・離脱不成功例)16例(25.8%)で、その内訳は計画的減量4例、非計画的減量・離脱12例。減量・離脱開始後拒絶反応が生じるまでの期間の中央値は9.5ヶ月(1-63ヶ月)。いずれの症例も拒絶の治療は容易であった。残りの23例(35.5%)が様々な投与間隔で減量中(計画的減量16例、非計画的減量7例)。

2) 完全離脱例と離脱不成功の間で、ABO血液型適合性、HLA適合性、移植後早期の拒絶反応の回数、いずれも両者間に有意差なし。

完全離脱例にABO血液型一致、HLAゼロミスマッチの症例が多い傾向があった。

肝機能の推移に関しても、AST、ALT、GGTPいずれも両者間に有意差なし。GGTPは、離脱症例で減量開始後も正常値で安定している一方、不成功例では高値で不安定になる傾向があった。

3) 計画的減量症例においては、移植後早期よりタクロリムスの血中濃度が漸減し、移植後2年、つまり減量を開始する時点ですでに移植後1ヶ月よりも有意に低値を示していた。

### 考察

脳死肝移植後の免疫抑制剤の減量・離脱に関してはPittsburgh大学では19%(18/95)、King's Collegeでは28%(5/18)の成功率が報告されている。免疫寛容の獲得のメカニズムについてはスターツルらはマイクロキメリズムの関与を提唱しているが、未だ結論はでない。

生体肝移植に関しては今回の研究報告が最初のもの

であるが、免疫寛容の導入成功率は生体肝移植の方が高いようである。このことは、生体肝移植が血縁者からの臓器提供を受けていること、本研究の対象となったのが小児症例であったといった特殊性に基づくものかもしれない。いずれにしても、生体および脳死肝移植後の免疫抑制剤の離脱に関しては、臓器移植後の免疫反応あるいは免疫寛容のメカニズムを解明する糸口となる可能性があるものと考えられた。

生体肝移植後の免疫抑制剤の離脱成功あるいは不成功例を判別するパラメーターとして特異なものはなかった。この点に関する更なる研究が進み、成功・不成功の予測ができるようになれば、臨床的意義は大きいと思われる。

また、免疫抑制剤の減量後に拒絶反応が発生し、免疫抑制剤の再投与をせざるを得ない症例もあった。この拒絶反応出現を予知するための指標としてはGGTPが有用と思われた。減量後拒絶反応出現例の治療は比較的容易に施行でき、減量が安全に施行できることも示された。

今回の臨床症例の分析からは、生体肝移植後の免疫寛容についてのメカニズムは不明であり、その解明は今後の課題として残る。しかし、症例を選べば免疫抑制剤は安全かつ計画的に中止できることが明らかになったことは、新たな移植医療の展開に繋がるものとして期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 1. 研究目的に関する評価

本研究は、生体肝移植において、移植後に必須と考えられてきた免疫抑制療法からの離脱を可能とする免疫寛容状態が、実際の移植患者で生じる頻度と条件を多数例の解析によって明らかにしようとするものであり、妥当である。

##### 2. 研究手法に関する評価

生体肝移植例63例を用い、計画的減量・離脱症例と、非計画的・離脱症例に分けてのretrospective studyである。検討症例数は現在我が国で最大のものである。

##### 3. 解析・考察に関する評価

24例(38.1%)で完全離脱が可能であることを明らかにし、計画的、あるいは非計画的離脱が可能な頻度が決して低率ではないことを、はじめて明らかにした。離脱可能な患者の条件を明らかにすることはできなかったが、離脱中に拒絶を生じた場合のマーカーとしてガンマーGTPの有用性を示唆する結果が得られたことは、臨床現場へ大きな示唆を与える結果である。

以上のように本論文は生体肝移植における免疫寛容の現象に迫り、その実際的な臨床的意義としての免疫抑制剤からの離脱の頻度と、拒絶反応の臨床マーカーを明らかにした点で、医学に貢献するところ大であり、

審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判定した。

審査担当者 主査 教授 朝長 万左男  
副査 教授 由井 克之  
副査 教授 綾部 公懿

#### 温 春 阳

(中国)1962年5月18日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Mechanism of the antiulcerogenic effect of IL-11 on acetic acid-induced gastric ulcer in rats

(ラット酢酸胃潰瘍におけるIL 11の抗潰瘍作用機序について)

温 春阳, 伊東正博, 松鶴睦美, 福田英一郎, 七條和子, 中島正洋, 中山敏幸, 関根一郎

Life Sciences

2002; 70(25): 2997-3005

長崎大学医学部原研病理

(主任: 関根一郎教授)

#### 論文内容の要旨

##### 緒 言

IL 11は1990年、免疫系および造血系に作用する新しい液性因子としてクローニングされたサイトカインである。その後、IL 11は免疫、造血系に限らず、多彩な臓器に対して生理学的作用を持つことが明らかになっている。消化管においてはIL 11が実験的急性腸炎を抑えること、さらに人ではクローン病で改善効果があったこと等が報告されている。我々も既に実験的放射線腸炎におけるIL 11の効果について報告した。一方、実験胃潰瘍の修復におけるIL 11の効果については殆ど研究報告がない。そこで、今回、我々はラット酢酸胃潰瘍モデルの修復過程におけるIL 11の役割を検討した。

##### 材料と方法

32匹雄性7週齢Wistarラットを使用し、IL 11投与群は潰瘍作成2日前よりIL 11を200ug/kg/day皮下投与した。対照群は0.1%BSAを皮下投与した。IL 11投与群、対照群ともに投与後3日目にエーテル麻酔下に開腹し、リングピンセットで胃前・後壁を挟み、その間に22G注射針にて40%酢酸を注入、30秒間粘膜に接触させ胃体部に接吻潰瘍を作成した。IL 11の潰瘍治療に対する効果を見る目的で7日目にratを屠殺し潰瘍係数を測定した。左心室から4%パラフォルムアルデヒドで環流固定し、組織学的にIL 11 receptor  $\alpha$ の局在(免疫染色)、細胞増殖マーカー(PCNAの免疫染色)、apoptotic cell数(ApopTag法)等を検討

した。7日目に新鮮標本より潰瘍底および周辺粘膜を採取し、蛋白質を抽出し、Western blotting法を用い、PCNA蛋白質量を検討した。

結果

1) 定量的に潰瘍係数を比較するとIL 11投与群で潰瘍係数は有意に小さく、潰瘍治癒は促進していた。

2) IL 11 receptor  $\alpha$ は胃底腺のneck zoneに強く発現した。

3) Western blotting法にてIL 11投与群では明らかにPCNAの発現増加を認め、免疫染色にてPCNA陽性上皮細胞数はIL 11投与群は有意に増加していた。

4) 胃上皮におけるapoptotic cell数はIL 11投与群では対照群よりも有意に減少していた。

考察

IL 11投与により胃潰瘍修復が促進することが明らかとなった。IL 11 receptor  $\alpha$ はmRNA levelで胃腸管に発現することが報告されているが、局に関する報告はない。今回、我々は初めてIL 11 receptor  $\alpha$ が胃底腺のneck zoneに存在していることを明らかにした。IL 11の作用機序のひとつに細胞増殖能の亢進が知られているが、我々もまた細胞増殖マーカーとしてPCNAの発現が増加することを確認した。以上の結果より、IL 11の胃潰瘍修復促進の機序として1) IL 11 receptor  $\alpha$ を介し、上皮の増殖を促進すること、2) 胃上皮におけるapoptosisを抑制することが考えられた。さらにApoptosisを抑制する機序については現在検討中である。近年再生医学が話題になっているが、強力な再生治癒作用をもつIL 11の臨床的な応用が期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

免疫系および造血器系に作用するサイトカインのIL 11が消化管において実験的急性腸炎や人のクローン病に対して改善効果があることから、胃潰瘍の修復においても効果があることをラットを用いて検討し、そのメカニズムを解析しようとしたもので本研究の目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

酢酸による胃潰瘍モデルラットにおける潰瘍係数、IL 11受容体、細胞増殖、アポトーシス細胞数を組織化学的手法や生化学的手法により、IL 11投与ラットと非投与ラットで比較、解析したもので、研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

IL 11が胃潰瘍の修復を促進することを明らかにした。IL 11受容体の胃底腺における存在を見出し、修復促進のメカニズムとして、IL 11のIL 11受容体を介した上皮の増殖促進と、アポトーシスの抑制を提唱

したもので、十分に評価できる。

以上のように、本論文はIL 11の臨床応用の可能性を提示したもので、医学に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 谷山 紘太郎  
副査 教授 綾部 公懿  
副査 教授 田口 尚

吉田由紀

(東京都)昭和38年8月3日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Radiation-inducible hSNK Gene is Transcriptionally Regulated by p53 Binding Homology Element in Human Thyroid Cells  
放射線誘導遺伝子hSNKはヒト甲状腺細胞においてp53結合相同領域で転写制御される

吉田由紀, 杉山啓一, タチアナ・ログノビッチ, 大津留 晶, 難波裕幸, ウラジミール・サエンコ, 山下俊一

Biochem Biophys Res Commun, 289, 491-498 (2001)

長崎大学医学部原研細胞

(主任: 山下俊一教授)

論文内容の要旨

緒言

甲状腺は他臓器に比べ、放射線被曝後長期間にわたり晩発性がんが誘発されやすいことが、広島、長崎の被爆者を対象とした疫学調査などによって確認されている。我々はこれまで、甲状腺細胞は放射線誘発アポトーシスに対し抵抗性であり、放射線による細胞内情報伝達シグナル経路について、DNA損傷や、細胞膜の崩壊等からも活性化される事を示してきた。今回の研究ではヒト甲状腺細胞から、PCR-Select法を用いて、放射線応答遺伝子群のクローニングを試み、その遺伝子群の特徴から応答分子機構の解明を試みた。特にmouse serum-inducible kinase (mSNK)のヒトホモログ:hSNKを新規にクローニングし、その遺伝子構造並びに発現調節機構の解析を行った。

方法

1) 細胞: ヒト甲状腺初代培養細胞(PT)は、バセドウ病患者からインフォームド・コンセント入手後、手術により摘出されたものを既報の方法で単離培養し使用した。ヒト甲状腺ガン細胞由来の樹立細胞株としてWRO, ARO, FRO, NPA, TPC 1を用い、ヒト子宮頸癌由来の樹立細胞株のHeLa細胞を継体培養後使用した。

- 2) X線照射: X線照射装置(東芝 EXS 300)を用い,照射条件は200kv,15mA,0.939Gy/minとした。
- 3) cDNA subtraction とクローニング: 0.5Gy 2時間後の放射線照射ならびに,非照射PT細胞からcDNA サブトラクションを行った。放射線で転写の上昇する遺伝子をクローニングし,84クローンについてシーケンスを行い,挿入配列を決定した。
- 4) ノーザン解析: PT に放射線照射し total RNA を単離,ホルムアルデヒドゲル中で RNA を分離,ニトロセルロース・フィルターにプロット後,hSNK,GAPDH の標識プローブでハイブリダイズを行った。
- 5) ゲノム遺伝子のクローニング: ヒトゲノム PAC ライブラリーを PCR 法にてスクリーニングし,hSNK 遺伝子の挿入されているクローンを単離し,周辺配列とともにクローン化し,配列を決定した。
- 6) ルシフェラーゼアッセイ: 転写制御領域を解析するために,各種長さの異なるプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入し,ルシフェラーゼアッセイにて転写制御領域を解析した。同時に放射線照射応答領域を解析した。
- 7) ゲルシフトアッセイ: hSNK の放射線照射応答領域のオリゴDNA をプローブとし核抽出液と反応させ,結合タンパクの有無を調べ,想定される因子(p53,p73)の抗体との反応性を解析した。

## 結果

- 1) PCR-Select 法を用いて甲状腺細胞放射線応答候補遺伝子84クローンの配列を決定した。そのうち,hSNK 遺伝子に着目し解析を行った。hSNK は転写産物が約2.9kb,コード領域は685アミノ酸,配列の特徴としては,N末側にセリン・スレオニン・キナーゼをコードする領域を持ち,C末側に polo-like family の保存されたモチーフを有している。mSNK とは,アミノ酸レベルで96%の相同性が認められた。
- 2) ヒト正常甲状腺細胞において,hSNK の転写量が放射線照射量依存的に増加することを確認した。
- 3) hSNK プロモーター領域を含む約10kb の BamHI 断片を単離し,遺伝子配列を決定した。コード領域は,エクソン14個からなり,スプライスコンセンサスを保持していることを確認した。
- 4) ルシフェラーゼアッセイの結果から,hSNK プロモーター領域 -49から +125に基本的な転写活性が存在し,その上流 -144から -122の p53結合相同領域において,放射線照射による特異的な転写活性の上昇が認められた。
- 5) 上記 hSNK 遺伝子プロモーターの p53結合相同領域をプローブに,ゲルシフトを行い,結合する核内タンパクが存在することを示した。抗体の反応から,これは p53,p73などの既知因子ではなく,更に甲

状腺ガン各種細胞を用いて行ったゲルシフトの結果から,この p53結合相同領域へのタンパクの結合量が異なることを明らかにした。

## 考察

ヒト甲状腺細胞において,放射線照射後に上昇する mRNA のプロファイルの中から hSNK の遺伝子構造の決定を行い,その転写制御領域の解明と,p53結合相同領域による放射線応答性の存在を明らかにした。hSNK/mSNK は,酵母からヒトまで保存された polo-like family の一員であり,ほ乳類では3種類(SNK,PLK,CNK)存在することが知られている。hSNK/mSNK については初期応答遺伝子として,また増殖因子での発現誘導などの報告があり,G1/S期での細胞周期への関与が想定されているが,未だその真の機能は解明されていない。一方,PLKはG2/M期の細胞で一過性に転写誘導され,タンパク自身も細胞周期のM期の制御やDNA損傷時に働く重要なセリン・スレオニン・リン酸化キナーゼである。このキナーゼのリン酸化基質としては細胞周期関連タンパク,プロテオソームタンパクなどの報告があり,様々な細胞機能への関与が注目されている。hSNK 遺伝子が放射線というストレスにより発現誘導されることから,この活性の誘導と他のストレスでの発現制御や,リン酸化反応の確認,リン酸化基質の同定などが必要である。

以上,甲状腺がんの発症分子機構に p53以外の特定の放射線応答細胞内情報伝達経路の関与が強く示唆された。今後 hSNK の機能解析を進めることにより,甲状腺細胞の放射線感受性,抵抗性の機序や発がん機構への解明につながると期待される。

## 論文審査の結果の要旨

### 学位論文題名

Radiation-inducibile hSNK gene is transcriptionally regulated by p53binding homology element in human thyroid cells.

### 1. 研究目的の評価

本研究は,放射線誘発遺伝子の同定・単離,転写・機能解析を行ったもので,研究の動機や目的は明確且つ妥当である。

### 2. 研究方法の評価

(1)放射線照射で転写量が増加する mRNA (cDNA) の取得はサブトラクション法で,(2)遺伝子を同定は,決定した塩基配列とデータベースとの比較により,(3)遺伝子全長とプロモーター領域の取得はゲノム学的手法で,(4)転写活性部位および核内タンパク結合部位の同定はプロモーター解析で,さらに(5)結合タンパクの推定はゲルシフトアッセイで行った。これらの手法は正統的な分子細胞生物学的方法であり,妥当である。

### 3. 解析・考察の評価

得られた結果は正確であり、妥当である。hSNKは放射線で転写活性が上昇する遺伝子であり、既知の類似の構造をもつ遺伝子ファミリーの性格から、未知の結合蛋白を介して、細胞内蛋白のリン酸化反応や細胞周期への関与が示唆された。今後の発展が期待される研究であり、大いに評価できる。

以上のように、本論文は放射線初期応答遺伝子としてのhSNKを単離・同定し、転写活性および機能の解析から、甲状腺の放射線感受性・抵抗性や発癌機構への解明につながることを示したもので、医学・細胞生物学の進歩に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 新川 詔夫  
副査 教授 奥村 寛  
副査 教授 関根 一郎

## 光武範 史

(長崎県)昭和46年3月30日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 PKC $\delta$  mediates ionizing radiation-induced activation of c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinase through MKK 7 in human thyroid cells  
(PKC $\delta$ は甲状腺細胞において、放射線照射による細胞内シグナルをMKK 7を介してJNKに伝える)  
光武範史, 難波裕幸, Stanislav S Shklyayev, 塚崎智雄, 大津留 晶, 大場 基, 黒木 登志夫, 綾部公懿, 山下俊一  
*Oncogene* 20, 989-996, 2001  
長崎大学医学部原研細胞  
(主任: 山下俊一教授)

## 論文内容の要旨

### 緒言

放射線による発癌作用はよく知られているが、臓器によりその頻度は大きく異なっている。我々はこれまで、甲状腺細胞は放射線誘発アポトーシスに対し比較的耐性である事、また放射線による細胞内シグナルはDNA損傷からのみでなく、細胞膜の崩壊等からも伝わる事を示してきた。甲状腺細胞内では放射線による細胞膜崩壊の際に、一時的で弱いセラミドの遊離、一方では強力で持続するジアシルグリセロール(DAG)の遊離が起きるが、DAGは、プロテインキナーゼC(PKC)の幾つかのアイソフォームを活性化する。今回の研究では、PKCのアイソフォームからのシグナル伝達をより詳細に検討する事により、放射線照射後の甲状腺細胞の特異的反応経路の存在をより明らかにしようと試みた。

## 材料と方法

- 1) 細胞: ヒト甲状腺初代培養細胞は、バセドウ病患者さんから手術により摘出されたものを使用した。AROはヒト甲状腺未分化癌由来の細胞株である。
- 2) X線照射: 東芝X線照射装置EXS 300を用いた。照射条件は200kV, 15mA, 0.85Gy/minとした。
- 3) アデノウイルスベクター: 種々のPKCアイソフォームのドミナントネガティブタイプを発現するアデノウイルスベクターを用いた。
- 4) JNK *in vitro* キナーゼアッセイ: JNKをその基質c-Junと結合したビーズを用いて沈降させ、ATP存在下で反応させる。その後、リン酸化したc-Junに特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法にてJNKの活性を判定した。
- 5) AP-1活性の測定: AP-1結合部位を持つpAP-1-Lucを遺伝子導入した細胞においてルシフェラーゼアッセイを行った。
- 6) 免疫複合体を用いたキナーゼアッセイ: 目的の酵素に特異的な抗体を用いて免疫沈降法でこれを分離し、ATPと基質となる蛋白を加え反応させる。その後、リン酸化した基質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法にて活性を判定した。

## 結果

- 1) 種々のPKCアイソフォームのドミナントネガティブタイプを発現させた細胞の中で、 $\delta$ のドミナントネガティブだけが放射線照射後のストレスキナーゼといわれるJNKの活性上昇を抑制した。
- 2) PKC $\delta$ の特異的阻害剤Rottlerinを用いると、放射線によるJNK活性化は濃度依存性に阻害された。
- 3) PKC $\delta$ の活性化様式については、cleavageによる報告とチロシン残基のリン酸化による報告があるが、甲状腺細胞内ではチロシン残基のリン酸化は認められたものの、cleavageは起こらなかった。
- 4) 放射線はAP-1を活性化し、PKCドミナントネガティブ $\delta$ は、この反応を抑制した。
- 5) JNKの上流のキナーゼとしてはMKK4とMKK7が同定されているが、放射線によりMKK7は活性化されたものの、MKK4は反応しなかった。また、ドミナントネガティブMKK7は、JNKの活性上昇を阻害した。

## 考察

本研究結果から、PKC $\delta$ のみが放射線照射後のJNK活性を上昇させた。PKC $\delta$ の活性化機構としては、cleavageとチロシン残基のリン酸化の二つが報告され、cleavageを受けると、細胞はアポトーシスに向かう事を示唆する報告が多い。しかし一方では、幾つかのgrowth factorによる刺激やRasやv-Srcによるtransfor-

mationの際にはチロシン残基がリン酸化されるとい  
う報告が見られる。PKC $\delta$ には、異なった活性化様式  
があり、それぞれに異なった機能があることが推測さ  
れる。今回、我々の結果からはPKC $\delta$ はアポトーシス  
を起こすシグナルではなく、本経路の活性化により、  
下流域のAP-1活性化が証明され、細胞生存に関連  
している事が示唆された。一方、JNKの上流として  
はMKK4とMKK7が同定されているが、MKK4は  
主として環境ストレス、MKK7はサイトカインで活  
性化される。しかし、我々の結果はMKK4は反応せ  
ず、MKK7のみが活性化された。このことから、放  
射線は甲状腺細胞において他の環境ストレスと異なる  
シグナルを伝えている事が示唆された。

以上のように、我々は甲状腺細胞における放射線  
応答にPKC $\delta$  MKK7 JNK AP-1という一連のシグナ  
ル伝達の存在を初めて明らかにした。放射線は核DNA  
の損傷以外にも細胞の振る舞いを規定するシグナルを  
惹起している事が考えられ、今後の放射線誘発がん発  
症機構の解明や予防法の確立に新知見を提供したと考  
えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 1. 研究目的の評価

甲状腺細胞における放射線照射後の特異的反応経路  
の存在を明らかにするため、プロテインキナーゼC  
(PKC)を介する細胞内情報伝達経路の詳細な解析を  
目的としたものであり、目的には十分な妥当性がある。

##### 2. 研究手法に関する評価

様々の酵素(キナーゼ)活性測定法やドミナント・  
ネガティブ変異体を駆使して細胞内情報伝達経路を明  
らかにしようとした手法は先端的であり優れている。

##### 3. 解析・考察の評価

甲状腺細胞では放射線照射によるPKC isotypesの  
うちPKC $\delta$ が活性化されること、さらにMAP kinase-  
kinase 7 (MKK7)を介してc-Jun N-terminal kinase  
(JNK)が活性化されるという新知見を得た。この細  
胞内情報伝達系が甲状腺の放射線抵抗性と関連する可  
能性を指摘した考察の過程も論理的で評価できる。

以上、本論文は甲状腺の放射線抵抗性ひいては易発  
がん性の分子機構の一端を明らかにしたものであり、  
放射線障害医学の発展に貢献するところ大であり、審  
査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するもの  
と判断した。

審査担当者 主査 教授 片 峰 茂  
副査 教授 松 山 俊 文  
副査 教授 兼 松 隆 之

#### 山 崎 聡 士

(宮崎県)昭和44年7月24日生

授与年月日 平成14年3月31日

主 論 文 Importance of NF- $\kappa$ B in rheumatoid synovial  
tissues: in situ NF- $\kappa$ B expression and in vi-  
tro study using cultured synovial cells.

慢性関節リウマチ滑膜組織におけるNF-  
 $\kappa$ Bの重要性。滑膜局所における発現と  
培養滑膜細胞を用いた機能解析。

山崎聡士, 川上 純, 中島友紀, 中村英  
樹, 蒲池 誠, 本多靖洋, 平井康子, 飛  
田あゆみ, 井田弘明, 右田清志, 河部庸  
次郎, 小路武彦, 古市 格, 青柳孝彦,  
江口勝美

Annals of Rheumatic Diseases, 60巻, 7  
号, 678-684, 2001年.

長崎大学医学部内科学第一教室

(主任: 江口勝美教授)

#### 論文内容の要旨

##### 緒 言

慢性関節リウマチ(RA)における滑膜の増殖は、  
滑膜細胞の増殖がアポトーシスと比較して亢進してい  
ることが一因である。炎症性サイトカインは、転写因  
子NF- $\kappa$ Bの活性化を通じて炎症を促進するとともに、  
抗アポトーシス作用も発揮して、滑膜細胞の増殖に関  
与すると考えられる。これまでにRA滑膜組織におけ  
るNF- $\kappa$ Bの活性化や、動物モデルにおけるNF- $\kappa$ B阻  
害による滑膜細胞のアポトーシス亢進などの報告があ  
る。今回、我々は滑膜細胞のTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ やFas依  
存性アポトーシスにおけるNF- $\kappa$ Bの役割について検  
討した。

##### 対象と方法

1) RA及び変形性関節症(OA)患者の関節置換術  
時に得られた滑膜組織を固定し、組織学的検討を  
行った。また、滑膜組織を酵素処理して分離した滑  
膜細胞を*in vitro*実験に使用した。

2) RA及びOA滑膜における滑膜細胞の増殖とアポ  
トーシスを検討するため、増殖細胞核抗原(PCNA)  
及びNF- $\kappa$ Bの発現を免疫染色法にて、アポトーシ  
ス検出をTUNEL法にて行った。

3) TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ やプロテアゾーム阻害剤(Z-Leu-Leu-  
Leu-aldehyde: LLL-CHO)によるNF- $\kappa$ Bの挙動は、  
ゲルシフトアッセイで検出した。

4) 培養滑膜細胞アポトーシスはLLL-CHO処理滑膜  
細胞をTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 抗Fas抗体で刺激して誘導  
し、hypodiploid DNAとカスパーゼ活性をフローサ  
イトメーターで検出した。

5) IAP(inhibitor of apoptosis protein)関連蛋白はウエ

スタンプロットにより検出した。

**結果**

- 1) OAの滑膜組織では認められないアポトーシス像が、少数ではあるがRAの滑膜組織で確認された。一方、RA滑膜組織ではPCNA陽性細胞が豊富で、同時に転写因子NF-κBの核内陽性細胞(NF-κB活性化細胞)を多く認めた。
- 2) in vitroにおいて、TNF-αやIL 1βは転写因子NF-κBを活性化し、このNF-κBの活性化はLLL-CHOで抑制された。LLL-CHOによってNF-κBの活性化を阻害した滑膜細胞では、カスパーゼが活性化し、一部ではアポトーシスが誘導された。
- 3) TNF-αとIL 1βは、NF-κBの活性化を阻害した滑膜細胞でのみアポトーシスを促進した。
- 4) IAP関連蛋白の発現はLLL-CHOのみでは変化しなかったが、IL 1βによる発現亢進は抑制された。また、LLL-CHOはFas依存性アポトーシスを増強し、この際、IAP関連蛋白は消失した。

**考案**

組織検討から、NF-κBが活性化した滑膜細胞がアポトーシス抵抗性であるため、RA滑膜細胞はアポトーシスの程度を超えて増殖すると考えられた。それならば、NF-κBの活性化を阻害することで、滑膜細胞のアポトーシスが誘導されると示唆された。

LLL-CHOによってNF-κBの活性化が阻害された滑膜細胞では、カスパーゼカスケードを介したアポトーシスが誘導された。さらにTNF-αやIL 1βによる刺激のみでは誘導されない滑膜細胞のアポトーシスがNF-κB阻害により高率に誘導された。この結果は、RA炎症関節においてNF-κB阻害による滑膜の制御の可能性を支持する。NF-κBが抗アポトーシス効果を発揮する経路として、IAP関連蛋白の発現を検討した。IAPはLLL-CHOのみでは抑制されなかったが、IL 1βやFasを介した経路においては、NF-κBの活性化を阻害されることで低下したIAP発現が抑制された。このIAPの薬剤がカスパーゼの活性化を誘導し、IL 1βやFas依存性アポトーシス誘導効果を増強したと推測された。

有効なNF-κB阻害ができれば、サイトカインによって活性化した滑膜細胞を除去することで滑膜細胞を標的としたRA治療の可能性につながると考えられる。

**論文審査の結果の要旨**

**1. 研究目的の評価**

慢性関節リウマチでみられる滑膜の増殖は、滑膜細胞の増殖がアポトーシスを上回った結果であると考えられている。この研究は抗アポトーシス作用に関与する転写因子であるNF-κBの滑膜細胞における役割を中心に検討したものでありその動機、目的、意図は明

確である。

**2. 研究手段に関する評価**

この研究ではまず臨床検体を用いて慢性関節リウマチ患者由来の滑膜細胞の増殖像をPCNA染色で、アポトーシスをTUNEL染色で検出した。次に滑膜から分離した細胞を用いて病態に関与しているとされるサイトカイン、TNF、IL 1βによってNF-κBが活性化されるとともに、その活性化阻害によってはアポトーシスが誘導されることを示した。以上の手法は、臨床で得られた知見を分子生物学的側面から解析する方法として最も妥当なものである。

**3. 解析・考察・総合的な評価**

本研究により慢性関節リウマチ患者の滑膜においてはアポトーシスを上回る増殖がおこっていることが検出され、試験管内実験の結果から滑膜細胞はTNF、IL 1βによって活性化された転写因子NF-κBによって抗アポトーシス状態へ誘導されていることが示唆された。ここでの成果は慢性関節リウマチ発症の分子機構の理解と将来の分子標的治療の実施へ寄与するところが大きく、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	松山俊文
	副査	教授	朝長万左男
	副査	教授	進藤裕幸

**井手 茜**

(長崎県)昭和43年10月29日生

授与年月日 平成14年3月31日

**主論文** Elevation of serum Pro-Gastrin-Releasing peptide in patients with medullary thyroid carcinoma as well as small cell carcinoma.

甲状腺髄様癌の患者血清 Pro-GRPは肺小細胞癌と同様に上昇する

井手 茜, 芦澤潔人, 石川直文, 石井玲子, 安藤隆雄, 安部恵代, 世羅至子, 宇佐俊郎, 富永 丹, 江島英理, 中島正洋, 伊藤公一, 伊藤國彦, 江口勝美

Thyroid 11 (11), 1057-1063, 2001

長崎大学医学部内科学第一教室

(主任: 江口勝美教授)

**論文内容の要旨**

**緒言**

甲状腺髄様癌(以下、髄様癌)は全甲状腺癌の5-10%を占め、リンパ節転移しやすく、血行性に骨、肝臓や肺に転移することも知られている。髄様癌は甲状腺の傍濾胞細胞あるいはC細胞から生じ、カルシトニンやCEAを産生することからこれらは髄様癌の重要な腫瘍マーカーとして活用されている。C細胞が神経



内分泌由来であることから、様々な他の神経内分泌物質が髄様癌は産生する。たとえば、カルシトニン、NSE、クロモグラニンA、ソマトスタチンは髄様癌の免疫染色で確認される。

Gastrin-releasing-peptide (GRP) はブタの胃から得られる bombesin のC末端と相同性のある27のアミノ酸からなるペプチドである。GRP は髄様癌において免疫活性があり、髄様癌の腫瘍マーカーとして使用出来るのではないかと示唆する過去の文献がみられた。しかし、GRP は血液中で不安定であり臨床応用として用いるのには困難であった。Pro-gastrin-releasing-peptide (Pro-GRP) (31 98) は血中で安定しており、ELISA 法で高い感受性を持って簡便に測定することができる。肺小細胞癌の患者において Pro-GRP は病期分類、治療のモニタリング、再発の予測などの臨床における有益な腫瘍マーカーとして活用されている。

今回われわれは、髄様癌患者の血中 Pro-GRP を測定し腫瘍マーカーとして使用出来るか否か検討した。

#### 対象と方法

1. 当科と伊藤病院に通院している15名の髄様癌患者と14名の非髄様癌患者 (10例の甲状腺乳頭癌と4例の甲状腺濾胞癌) において血中 Pro-GRP, カルシトニン, CEA をそれぞれ ELISA 法, radioimmunoassay, enzymeimmunoassay で測定した。全ての患者は臨床的および画像的に肺癌は否定された患者である。
2. 髄様癌患者のうち1例は手術標本を用いて抗 Pro-GRP モノクローナル抗体 (3G2 と 2B10) で ABC 法による免疫染色を行った。また、その一例は術前術後の血中 Pro-GRP の経過を術後12ヶ月まで追うことが出来た。なお、本実験で使用した甲状腺組織は当院第二外科にて患者からのインフォームドコンセントを得られた組織である。
3. 統計解析は血中 Pro-GRP と CEA および Pro-GRP とカルシトニンの濃度相関関係をピアソンの相関係数を用いて検定した。また、髄様癌の腫瘍の大きさと血中 Pro-GRP の相関関係も同様に検定した。

#### 結果

1. 髄様癌患者15例中12例 (80%) が血中 Pro-GRP は上昇しており (カットオフ値40pg/ml), 平均血中濃度は240pg/ml であった。血中 CEA は15例中13例 (87%), カルシトニンは全例で上昇していた。非髄様癌患者は14例全例が血中 Pro-GRP は陰性であった。
2. 術後経過観察できた髄様癌患者で、血中 Pro-GRP と CEA は術後2ヶ月で正常化した。カルシトニンは低下したが、術後1年まで正常化しなかった。
3. 髄様癌患者1例の手術標本を抗 Pro-GRP 抗体で免疫染色すると、腫瘍細胞が染まった。

4. 血中 Pro-GRP と CEA, カルシトニンは相関関係があり、髄様癌の腫瘍の大きさと血中 Pro-GRP 間でも有意に関連した。

#### 考察

髄様癌の特徴の一つとしてカルシトニンや CEA をはじめとする神経内分泌物質を産生することがあげられ、血中カルシトニンと CEA は腫瘍マーカーとして活用されている。しかし、フランスにおける大規模な study では術後15年たった再発の確診が得られない患者の20%でカルシトニンが上昇していたという報告があり、CEA も喫煙や糖尿病患者で上昇することが知られている。

Pro-GRP は、肺野異常陰影を有する患者における肺小細胞癌の確定診断、治療効果の判定、再発の早期発見など、肺小細胞癌の診療に欠かせない検査である。Pro-GRP は、肺小細胞癌の細胞生物学特性に基づき、この癌に特異性が高く、かつ血液中に積極的に放出される物質として選択された。近年、髄様癌の免疫染色で GRP や Pro-GRP が確認されたことが報告された。我々は、肺野異常陰影と頸部腫瘍を両方持った患者さんの確定診断の一つとして血中 Pro-GRP を測定し組織学的にも免疫学的にも髄様癌と診断できた。他の髄様癌患者14名についても治療前の血中 Pro-GRP は11例で上昇していた。また、非髄様癌甲状腺分化癌では、血中 Pro-GRP は陰性であり免疫組織学的にも Pro-GRP の存在は否定できた。髄様癌患者の術後2ヶ月から12ヶ月まで Pro-GRP, CEA は正常であったが、カルシトニンは術前に比べて低下したものの正常化するまで至らなかった。また、その患者さんは術後12ヶ月まで臨床的、画像的にも再発は認められていない。したがって、血中 Pro-GRP は肺小細胞癌と同様に甲状腺髄様癌でも高値を示すことが本研究で明らかとなり、今後の髄様癌の診断、再発・増悪を早期発見に貢献することが期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 1. 研究の目的の評価

本研究は、甲状腺髄様癌の患者血清 Pro-GRP 濃度測定の意味を検討しようとするもので、目的は十分に妥当である。

##### 2. 研究手段に関する評価

髄様癌患者のデータ収集や対照群としての甲状腺乳頭癌患者の臨床像についての比較検討や、患者組織を用いた免疫組織化学的研究方法、種々腫瘍マーカーの測定と、得られた結果の統計解析など、研究手段は妥当である。

##### 3. 解析・考察の評価

髄様癌患者における血清 Pro-GRP 濃度測定の意味を解析し、他の腫瘍マーカーとの優劣を多角

的に検討し、髄様癌の早期発見、再発・増悪についての有用性を明らかにし、十分に評価できる。

以上のように、本論文は甲状腺髄様癌における Pro-GRP の臨床的意義の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 山下 俊一  
副査 教授 兼松 隆之  
副査 教授 河野 茂

川 畑 茂

(鹿児島県)昭和43年11月10日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Breast Cancer Resistance Protein Directly Confers SN-38 Resistance of Lung Cancer Cells

(乳癌耐性蛋白は、肺癌細胞の SN 38 耐性に直接関与している)

Shigeru Kawabata, Mikio Oka, Ken Shiozawa, Kazuhiro Tsukamoto, Katsumi Nakatomi, Hiroshi Soda, Minoru Fukuda, Yoji Ikegami, Kazuyuki Sugahara, Yasuaki Yamada, Shimeru Kamihira, L. Austin Doyle, Douglas D. Ross, and Shigeru Kohno

Biochemical and Biophysical Research Communications 280 : 1216-1223, 2001

長崎大学医学部内科学第二教室

(主任:河野 茂教授)

論文内容の要旨

緒言

本邦で開発された塩酸イリノテカン(CPT 11)は幅広い抗腫瘍活性を有し、特に小細胞肺癌では世界的標準薬になりつつある。CPT 11は主に肝で活性代謝物 SN 38に変換され、DNA トポイソメラーゼ I (トポ I) を阻害し抗腫瘍効果を発揮する。

癌化学療法において抗癌剤耐性は大きな障害であり、その主因は癌細胞自身の耐性獲得である。耐性機構には、薬剤排出蛋白による細胞内薬剤蓄積量の低下、細胞内解毒の亢進、標的分子の変化などがある。このうち細胞外への薬剤排出には、特に ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターと呼ばれる膜蛋白が関与している。最近、多剤耐性ヒト乳癌細胞株に ATP 結合カセットを一つ有する新規 half-transporter の過剰発現が報告され、Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) と名付けられ注目を浴びている。

SN 38耐性機構については、標的分子の変化を中心に少数の報告がある。しかしながら、ABC トランスポーターとの関連(特に BCRP)については不明な点

が多い。本研究では SN 38で選択した癌細胞株を用いて、SN 38耐性と BCRP の関連を検討した。

材料と方法

(1) 細胞は、小細胞肺癌細胞株 PC 6 (感受性株) に 4.8nM の SN 38を暴露し樹立した耐性株 PC 6/SN 2.5 と、より高度耐性株である PC 6/SN 2.5H を用いた。耐性度は MTT 法による薬剤感受性試験で評価した。

(2) 感受性株と耐性株に20μM の SN 38を暴露させた後、細胞内の SN 38と解毒過程で生じるグルクロン酸抱合体 SN 38G の濃度を HPLC 法で測定した。

(3) 抗癌剤耐性に関与する既知の ABC トランスポーターである MDR 1, MRP 1, MRP 2, MRP 3 mRNA と新規トランスポーターの BCRP mRNA の発現は、RT-PCR 法とノーザンブロット法で検討した。

(4) アンチセンス実験は、リボソームを用いて PC 6/SN 2.5 に BCRP アンチセンス(S オリゴ)を投与し、BCRP mRNA の発現を抑制させた後、SN 38に対する薬剤感受性変化を MTT 法にて測定した。

(5) SN 38の解毒酵素である UDP グルクロノシルトランスフェラーゼをコードする UGT 1A の発現は、RT-PCR 法とウエスタンブロット法で検討した。

(6) 標的分子であるトポ I 活性は、閉環状プラスミド DNA に抽出した核蛋白を加え、変換された弛緩型 DNA を電気泳動法で検討した。トポ I 遺伝子変異は、これまで報告されている変異部位(コドン361, 363, 533, 722, 729)のダイレクトシーケンスを行った。トポ I 発現量は、ウエスタンブロット法で検討した。

結果と考察

(1) SN 38耐性株の薬剤感受性

PC 6/SN 2.5 と PC 6/SN 2.5H は感受性株に比べ、それぞれ SN 38に18倍と34倍の耐性であった。また、他のトポ I 阻害剤であるトポテカンに対しても交叉耐性を認めた。

(2) 感受性株と耐性株における SN 38と SN 38G の細胞内濃度

感受性株に比べ耐性株では、有意に細胞内の SN 38と SN 38G の濃度が減少していた。また PC 6/SN 2.5H では PC 6/SN 2.5 に比べ、さらに SN 38の濃度が減少していた。以上より、細胞内の SN 38濃度が減少したために感受性が低下したと推察した。

(3) 感受性株と耐性株における ABC トランスポーターの発現

MRP 1 mRNA は感受性株に比べ耐性株では発現が低かったため、SN 38耐性には関与していないと推察した。MDR 1, MRP 2, MRP 3 mRNA は感受性株と耐性株ともに発現は認められなかった。BCRP mRNA は耐性株にのみ発現しており、感受性株では認められな

かった。以上より、耐性株では *BCRP* mRNA が高発現しているため、細胞内に流入した SN 38が細胞外に排出され、SN 38への感受性が低下したと推察した。

#### (4) *BCRP* アンチセンスによる *BCRP* mRNA 発現量の抑制

*BCRP* アンチセンス投与により、PC 6/SN 2 5で約50%の *BCRP* mRNA 発現量の低下が認められた。

さらに SN 38感受性試験では、アンチセンス投与群で感受性が約5倍増強していた。これらの結果から、*BCRP* が SN 38耐性に大きく関与していることが推察された。

#### (5) SN 38の解毒酵素である *UGT1A* の発現

SN 38は解毒過程でグルクロン酸抱合されるため、抱合活性の亢進が耐性因子となる。本研究では耐性株において *UGT1A* は高発現しておらず、解毒の亢進は SN 38耐性に関与していないと推察された。

#### (6) 標的分子であるトポ I の質的、量的な変化

トポ I の活性と発現量は、感受性株と耐性株の間で差を認めなかった。トポ I 遺伝子の変異は、感受性株と耐性株ともに認められなかった。以上の結果から、SN 38耐性に標的分子であるトポ I の変化は関与していないと推察された。

### 結語

我々が樹立した SN 38耐性肺癌細胞株の SN 38耐性に、*BCRP* が大きく関与していることを示した。現在の肺癌化学療法において CPT 11は中心的な抗癌剤であり、*BCRP* は重要な多剤耐性因子となる。今後、肺癌組織での *BCRP* の発現と薬剤耐性への関与を検討し、*BCRP* を標的とした耐性克服剤や *BCRP* を回避する新規抗癌剤の開発が望まれる。

### 論文審査の結果の要旨

#### 学位論文題名

Breast Cancer Resistance Protein Directly Confers SN 38 Resistance of Lung Cancer Cells

#### 1. 研究目的の評価

本研究は、小細胞肺癌細胞株 (PC 6) 由来の SN 38耐性株における薬剤耐性機序に関する研究であり、研究の動機や目的は明確且つ妥当である。

#### 2. 研究方法の評価

最初に SN 38耐性株の樹立した後、SN 38耐性に関与する可能性のある機構 (薬剤排出の亢進、細胞内解毒機構の亢進、標的分子の変化) を順次、最新の手法を用いて解析したもので、妥当である。

#### 3. 解析・考察の評価

ABC トランスポータの1つである乳癌耐性蛋白 (*BCRP*) が SN 38耐性機構に関与しているとする解析結果は、上記の種々の可能性のある耐性機構を1つずつ検証し否定した後に得られたものであり、妥当且

つ大いに評価できる。

以上のように、本論文は小細胞肺癌細胞株の SN 38耐性機構を明らかにしたもので、*BCRP* を標的とした新規抗癌剤の開発に直接つながる研究である。したがって本論文は腫瘍医学の進歩に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 新川 詔夫  
副査 教授 江口 勝美  
副査 教授 綾部 公懿

### 八幡 裕一郎

(神奈川県) 昭和44年12月25日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Metacarpal Bone Mineral Density, Body Mass Index and Lifestyle among Postmenopausal Japanese Women: The Hizen Oshima Study

日本人女性における中手骨骨量, Body Mass Index と生活習慣 肥前大島研究 八幡裕一郎, 青柳 潔, 岡野邦彦, 吉見逸郎, 草野洋介, 小林実夏, 門司和彦, 竹本泰一郎

Tohoku Journal of Experimental Medicine  
196: 123-129, 2002

長崎大学公衆衛生学教室

(主任: 竹本泰一郎教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

骨粗鬆症は高齢者に一般的に見られる慢性疾患のひとつである。骨粗鬆症に伴う骨折は ADL, QOL を制限するため、公衆衛生的に重要な問題となっている。骨量測定は骨粗鬆症の診断および骨折リスクの評価に対して最も良い指標とされ、種々の測定機種が開発されている。骨粗鬆症の危険因子の中で、改善可能な要因とされる体格、生活習慣の骨量に対する関与は、必ずしも一致した結果が得られているとは言えない。

本研究は中手骨骨量と年齢 (Body Mass Index (BMI)) 及び生活習慣との関連を地域在住閉経後女性で検討した。

#### 対象と方法

1. 対象は長崎県大島町在住の閉経後女性532人 (平均年齢66.1歳, 43-89歳) である。

2. 骨量測定は、単純X線写真を用い、Computed X-ray Densitometry (CXD) 法で右手第二中手骨骨量を測定した。

3. 身長及び体重を測定し、body mass index (BMI) を算出した。身体活動量は平均的な1日の「睡眠時

間」,「座位または立っている時間」,「軽度の活動時間」,「中程度の活動時間」,「重い活動時間」から,重み付けをして1日当たりの代謝量として算出した。カルシウム摂取量とアルコール摂取量は半定量式食品摂取頻度調査法によって推定した。現在の喫煙の有無を聞き取った。

**結果**

- 1. 中手骨骨量は年齢が増すに従って有意に減少をした。80歳代では40歳代に比べ,32%減少していた。
- 2. 中手骨骨量とBMI及び身体活動量との間に,有意な単相関が認められた。
- 3. 喫煙の有無別の中手骨骨量には差はなかった(t検定)。
- 4. 中手骨骨量を結果変数,年齢,BMI,身体活動量,カルシウム摂取量,飲酒量及び喫煙の有無を説明変数として,重回帰分析を行ったところ,中手骨骨量の低下には,高年齢と低BMIが有意に関連していた。身体活動量,飲酒,喫煙は有意な関連を示さなかった。

**考察**

- 1. CXD法は単純X線写真を用いた骨量測定法であるが,標準的に用いられているDual energy X ray absorptiometry法に比べ,大がかりな設備を必要とせず,地域調査に有用であると考えられた。
- 2. これまでの報告同様,中手骨骨量は年齢が増すに従って低下した。
- 3. 高BMIは高中手骨骨量と関連していた。肥満は骨量を増加させると報告されている。骨量減少を予防するメカニズムは,機械的な要因と脂肪組織中のエストロゲン合成が指摘されている。しかし,肥満は心疾患及び糖尿病などの生活習慣病の重要なリスクファクターであるので,骨粗鬆症の予防のみを考えての肥満の推奨はできない。総合的な健康保持には,やせの防止など,適切な体重の維持が薦められる。
- 4. 身体活動及びカルシウム摂取は骨量の維持・増加に役立ち,特に,成長期においては最大骨量の獲得に重要であると言われている。しかしながら,本研究において,中手骨骨量は身体活動及びカルシウム摂取量と関連していなかった。この理由として成長期の身体活動・カルシウム摂取量を評価できなかったことによる可能性が考えられた。
- 5. 多量飲酒及び喫煙は骨量を減少させると報告されている。重回帰分析の結果,飲酒と喫煙は中手骨骨量に関連していなかった。本研究における飲酒者(20g以上/day)は1.1%,喫煙者は4.4%と低率であり,本対象においては,骨量に影響を及ぼす主要な要因ではないと考えられた。

**結論**

閉経後女性の骨粗鬆症の予防には,痩せの防止が重要である。

**論文審査の結果の要旨**

1. 研究目的の評価

地域定着住民を対象に骨塩量を測定し,生活習慣等の因子との相関を解明しようとする目的は明解かつ妥当である。

2. 研究手法に関する評価

中手骨骨塩量をComputed X Ray Densitometry(CXD)法により測定し,BMI,身体活動量ほかの生活習慣との相関を検討した本研究法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

中手骨骨塩量が年齢,BMIに有意に相関し,生活習慣とは明らかな相関をみとめなかったとする解析結果ならびに考察の評価は,当該地域住民の骨折の発生頻度を予測しうる貴重な業績となりうるもので,評価に値する。

以上のように,本論文は当該地区住民の骨塩量に相関する因子を明確にすることから,骨粗鬆症に起因する骨折の危険度予知の可能性の解明に貢献するところ大であり,審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	進藤	裕幸
	副査	教授	下川	功
	副査	教授	林	邦昭

**ロナルド・モラレス**

(グアテマラ)1962年4月17日生

授与年月日 平成14年3月31日

**主論文** Infection and dissemination of two dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severity in orally infected *Aedes aegypti* from different geographic origin

重篤度の異なる患者から分離された Dengue ウイルスに対する由来の異なる ネットイシマカ集団の感受性

Ronald Enrique Morales Vargas, Kouichi Morita, Yuki Eshita, Yoshio Tsuda, Toshihide Fukuma and Masahiro Takagi

Journal of Medical Entomology and Zoology, volume 53 no. 1掲載予定

長崎大学熱帯医学研究所生物環境分野  
(主任:高木正洋教授)

**論文内容の要旨**

**緒言**

4つの血清型からなる Dengue ウイルスは, Dengue 熱

(DF), デング出血熱 (DHF) およびデングショック症候群 (DSS) を引き起こす医学上重要な昆虫媒介性ウイルスである。

これまで、蚊のアルボウイルスに対する媒介能には集団間変異の観察されることが知られている。デングウイルスについては、4タイプのデングウイルスを経口感染させた場合、地理的に異なる場所で採集されたヒトスジシマカやネッタシマカの感受性に大きな変異があることが報告されている。

しかし重篤度の異なる患者から分離されたウイルス株に対するネッタシマカの感受性については未だ報告がない。本研究ではこの点に着目し、重篤度の異なる患者から分離されたデング熱ウイルスの2株 (ThNH 7 /93 : DSS および ThNHp11/93 : DF) を、タイ産および東南アジア由来の遺伝子型を持つデング2型ウイルスは未だ分布していないと思われるグアテマラ産の2系統のネッタシマカに経口感染させ、感受性の違いを評価した。

#### 材料および方法

供試蚊：タイ国 Nakhon Phanom 及びグアテマラ Escuintla で採集され、実験室で経代中のネッタシマカ2系統。供試ウイルス：1993年のデング熱流行時にタイ国 Nakhon Phanom の DSS 及び DF の患者からそれぞれ分離されたデング2型ウイルス2株。ウイルスアッセイ：BHK 21セルを用いた focus formation テストによるタイター測定。感染実験：各ウイルス株を C 6 /36セルで培養後、2 %FCS 溶液でウイルス懸濁液を調整し、脱繊維ウサギ血液、10% sucrose 溶液と等量混合し感染血液を作成した。24-36時間飢餓状態にしたネッタシマカに飼育容器のメッシュ上面に感染血液を滴下し1-2時間吸血させた。吸血した雌蚊は別の飼育容器に移し、ウイルスの潜伏期間とされている14日間飼育した。吸血14日後、ウイルスを検出するまで-80度のフリーザーで蚊を保存した。蚊からのウイルスの検出：蚊の腹部及び頭部を実体顕微鏡下で解剖、切断し、それぞれ180 $\mu$ l の2 %FCS とともにホモジェナイズした。遠心後、上清を C 6 /36セルで8日間培養した。培養液の上清を用いて ELISA 法によりウイルスの検出を行った。既知のウイルス濃度をもとに経口 ID50 を算出した。蚊のウイルスに対する感受性は、増殖したウイルスが腹部のみで検出された場合 (infection) と腹部及び頭部で検出された場合 (dissemination) を区別し、供試蚊数に対する前者の割合 (感染率) と後者の割合 (伝播率) を求めた。統計分析：カイ自乗検定により各ネッタシマカ系統間における感染率及び伝播率の有意差を検定した。

#### 結果

タイ国の患者から分離された2つのウイルス株のグ

アテマラ産ネッタシマカでの感染率は ThNH 7 /93 (DSS) に対しては12.9-34.0%、ThNHp11/93(DF) に対しては9.0-11.6%であった。ThNH 7 /93の蚊の頭部組織への伝播率はグアテマラ産よりタイ産のネッタシマカで有意に高かった。一方、ThNHp11/93ではネッタシマカの系統間で伝播率に有意差を認めなかった。ウイルスが分離された地域で採集されたタイ産ネッタシマカで、ThNHp11/93より ThNH 7 /93に対する感染率が有意に高かった。グアテマラ産ネッタシマカでは2つのウイルス株に対する感染率に有意な差はなかった。

#### 考察

デング熱またはデングショック症候群を呈する患者から分離された2株のデングウイルス ThNHp11/93及び ThNH 7 /93に関する本研究において、地理的に異なる地域から採集されたネッタシマカのウイルスに対する感受性に大きな違いがあることが明らかになった。グアテマラ産ネッタシマカの感染率は、現時点ではタイ産ネッタシマカに比べて低かった。この結果はデング2型ウイルスに対する感染率が3-57%というこれまでの報告とよく一致している。これらは、経口感染による感受性パターンが今回用いられた2つのウイルス株でよく似ており、蚊の感受性に影響を及ぼす要因が同じであることを示唆している。ウイルスが分離された地域のネッタシマカが ThNHp11/93より ThNH 7 /93で伝播率が高く、重篤度の高い患者から分離されたウイルスに対してタイの蚊がより感受性であることが示唆された。これらは、たとえ今回の結果のようにグアテマラ産ネッタシマカでは2つのウイルスに対する感受性に有意な差が見られなくても、感受性パターンがタイ産と同様であることを考えると、東南アジアの遺伝子型を持つデング2型ウイルス、特に DSS 患者由来のウイルスがグアテマラに侵入すれば、時の経過と共にグアテマラ産ネッタシマカにおける感受性が上昇する可能性を示唆するものであろう。

今回、グアテマラ産ネッタシマカの2つのウイルス株に対する感染率と伝播率に有意な差はなかったが、タイ産ネッタシマカでは感受性とウイルスが分離された患者の重症度に相関が見られた。これは分離されたウイルスの分子エレメントによるものと考えられた。

以上の結果より、ネッタシマカの感受性と患者の重篤度と相関のあるデング2型ウイルスがグアテマラに侵入してくるリスクを認識し、その可能性を十分に考慮する必要があると考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

Infection and dissemination of two dengue type-2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severity in orally infected *Aedes aegypti* from different geographic

origin. Medical Entomology & Zoology (印刷中)

### 1. 研究目的の評価

本研究は、デング熱とデング出血熱の患者それぞれより分離されたデングウイルス2型に対する、タイ由来とグアテマラ由来のネッタイシマカ感受性を解析し、デングウイルスの病原性と由来する地域のネッタイシマカ感受性の相関に決着をつけようとしたもので、目的は十分に妥当である。

### 2. 研究手法に関する評価

ウイルスを感染させるネッタイシマカの時期の選別、感染方法、感染後のウイルスの動態解析について、実験系が考案されており、研究方法も妥当である。

### 3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、ネッタイシマカの感受性と体内伝播が相関し、かつ、アジア由来と中米由来のネッタイシマカでは株の違いにより感受性が異なることを明らかにしている。生育地域の違う蚊が異なるデングウイルス株に対して感受性を示すことは、現在、十分に制御されていないデングウイルス感染症の今後の対策上重要な知見であり、今後のデング熱対策への応用ならびに研究発展が期待される。

以上のように本論文はデングウイルスを媒介するネッタイシマカの由来と病原性の異なるウイルスの関連性を解明しており、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 岩崎 琢也  
副査 教授 片峰 茂  
副査 教授 神原 廣二

### 大仁田 亨

(長崎県) 昭和46年12月28日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Hypoxia Induced, Perinecrotic Expression of EPAS-1/HIF-2 $\alpha$  Correlates with Tumor Progression, Vascularization and Focal Macrophage Infiltration in Bladder Cancer  
(膀胱癌においてEPAS 1/HIF 2 $\alpha$ は低酸素により傍壊死組織に発現し、腫瘍の進行、血管新生、マクロファージ浸潤と関連する)

Toru Onita, Ping Guang Ji, Jim W. Xuan, Hideki Sakai, Hiroshi Kanetake, Patrick H. Maxwell, Guo-Hua Fong, Manal Y. Gabriel, Madeleine Moussa, Joseph L. Chin  
Clinical Cancer Research 2002 Feb, 8(2) 471 ~ 480

長崎大学医学部泌尿器科学教室  
(主任: 金武 洋教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

Endothelial PAS domain protein 1 (以下EPAS 1) は、別名 hypoxia inducible factor 2 $\alpha$  (HIF 2 $\alpha$ ), HIF-like factor (HLF), HIF-related factor (HRF) と呼ばれ、hypoxiaによって活性化される転写調節因子であり、エリスロポエチン, vascular endothelial growth factor (VEGF) などその下流の遺伝子として知られている。1997年にTianらによって初めて報告されて以来、主に胎児のvascular developmentに関与する因子として研究され、血管内皮細胞に特異的に発現するとされていた。しかし、最近さまざまな培養細胞や癌組織などでの発現が検討され、必ずしも血管内皮細胞特異的ではなく、特に癌組織においては、腫瘍間質のtumor associated macrophage (TAM), 腫瘍細胞の核に発現していることがわかっている。今回我々は、EPAS 1が癌の血管新生、浸潤、増殖に関与する因子としての可能性を検討するため、膀胱癌組織におけるEPAS 1の発現を免疫組織化学的に評価し、EPAS 1の発現と膀胱癌の組織学的異型度、浸潤度、necrosis, VEGFの発現、腫瘍血管密度、マクロファージの浸潤との関連について検討した。

#### 対象と方法

浸潤性膀胱癌の診断で膀胱全摘をうけた37例および初発の表在性膀胱癌の診断で経尿道的膀胱腫瘍切除(TUR-Bt)をうけた30例、全67例の手術切除標本について、EPAS 1モノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。また、その連続切片を用いて、VEGF, CD31(血管内皮マーカー)およびCD68(マクロファージマーカー)の免疫染色を行った。EPAS 1の発現と組織学的異型度、pT stage, necrosisの有無との関連についてはカイ2乗検定を用い、EPAS 1の発現とVEGFの発現、腫瘍血管密度(microvessel density, MVD), マクロファージの浸潤(macrophage index, M $\phi$ I)との関連についてはStudent t testあるいはone way ANOVAを用いて検討した。

#### 結果

まず、EPAS 1モノクローナル抗体の特異性について、連続切片でEPAS 1ポリクローナル抗体による免疫染色、アイソトープ標識RNAプローブを用いた*in situ* hybridizationを行って、同じ発現パターンを示すことで確認した。EPAS 1の発現は、正常組織および腫瘍細胞自体にはみられず、腫瘍周囲、特にnecrosisの辺縁の間質にみられた。また、EPAS 1の発現は、組織学的異型度の高いものほど(p<0.001), pT stageの高いものほど(p<0.001), あるいはnecrosisが存在しているものほど(p<0.001)有意に強かった。VEGFの発現は、腫瘍細胞の細胞質にみられ、EPAS

1の発現部位とは異なるものの、EPAS 1の発現とVEGFの発現との間には関連がみられた ( $p=0.027$ )。全症例について比較した場合、EPAS 1の発現とMVDの間には有意差はみられなかったが、浸潤癌に限定すると、EPAS 1の発現が高いものほどMVDは低かった ( $p<0.001$ )。EPAS 1が発現している細胞は、主にTAMであり、また一部fibroblastにもみられた。EPAS 1の発現とMφIの間には有意な関連がみられた ( $p<0.001$ )。

### 考察

膀胱癌組織においてEPAS 1は、high grade, high stageで、特にnecrosisの存在する症例において、主に腫瘍あるいはnecrosis周囲のTAMに発現がみられた。このことから、腫瘍の増殖能が高く、低酸素領域ほどEPAS 1は強く発現することが考えられた。また、EPAS 1の発現が強いものほど有意に強いVEGFの発現および有意に低いMVDを示した。これらのことから、EPAS 1は、hypoxiaによって、マクロファージの浸潤を介して癌組織の間質に発現し、癌の血管新生、浸潤、増殖に関与している可能性が示唆された。このことを証明するにはEPAS 1のsignaling pathwayを明らかにすることが重要であり、今後の課題であると思われる。将来、EPAS 1の発現が浸潤性膀胱癌の増殖能の指標となり、このhypoxia response pathwayを阻害することによる癌の増殖抑制を狙った遺伝子治療の可能性が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

「Hypoxia induced, perinecrotic expression of EPAS-1/HIF-2 $\alpha$  correlates with tumor progression, vascularization and focal macrophage infiltration in bladder cancer」

#### 1. 研究目的の評価

本研究は、血管発生に関与することが知られる転写調節因子EPAS 1の膀胱癌組織での発現を検討し、血管新生や癌の浸潤あるいは増殖への関与を探ることを目的としたもので、研究目的として妥当である。

#### 2. 研究手法に関する評価

浸潤性膀胱癌及び表在性膀胱癌からなる全67例の手術切除標本を用い、in situ hybridizationと免疫組織化学を駆使してEPAS 1の発現を検討すると共に、種々の細胞マーカーの利用や病理組織学的検討を適切に施行しており、研究手法も妥当である。

#### 3. 解析・考察の評価

本研究により、EPAS 1は主としてマクロファージに発現しており、そのネクローシス周囲への集積と癌組織の組織学的異型度や浸潤度等との有意な関係を見出し、これらの研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は浸潤性膀胱癌に於ける

EPAS 1の役割を理解する上で貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 小路 武彦  
副査 教授 石丸 忠之  
副査 教授 関根 一郎

### 津田 聡

(長崎県)昭和46年3月10日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Role of c-Fyn in FGF-2-mediated tube-like structure formation by murine brain capillary endothelial cells

(マウス脳毛細血管細胞によるc-FynキナーゼのFGF 2依存性管腔形成における意義)

Satoshi Tsuda, Akira Ohtsuru,

Shunichi Yamashita, Hiroshi Kanetake,

Shigeru Kanda

Biochem Biophys Res Commun. 2002 (290: 1354 ~ 1360)

長崎大学医学部泌尿器科学教室

(主任: 金武 洋教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

血管新生は腫瘍の増殖に重要な役割を果たし、それを阻止することが進行癌治療の1つの戦略として期待されているが、十分な効果は認めてないのが現状である。その主役の血管内皮細胞の生物学的反応は、基底膜を消化し、間質へ遊走、そして増殖するという点で、癌の転移、浸潤によく似ている。しかし管腔形成は血管新生の最終ステップであり、なおかつ癌細胞では認めがたく、比較的細胞特異性の高い反応である。現在まで管腔形成を制御する分子レベルでのメカニズムはほとんど分かっておらず、この分子の同定は血管内皮細胞に特異性の高い治療法開発につながる可能性がある。今回我々は、標的分子の同定目的で内皮細胞の血管新生因子であるFibroblast growth factor 2 (FGF 2)依存性の管腔形成を指標に、その受容体のシグナル伝達分子の解析を行った。

#### 対象と方法

Cell line 温度感受性変異SV40 large トランスジェニックマウス脳毛細血管由来の株化された血管内皮細胞(IBE細胞)は、FGF 2刺激下にてフィブロネクチン上では増殖と遊走を、コラーゲンゲル上では管腔形成を行い、そのシグナルはFGF受容体1型の細胞内ドメインによって伝達される。

方法 IBE細胞を用い、様々なシグナル分子阻害剤

による管腔形成阻害をスクリーニングした。次に該当するシグナル伝達分子の dominant negative 体を遺伝子導入し、FGF 2 による管腔形成への影響を検討した。

### 結果

様々なシグナル伝達分子阻害剤の中で Src family キナーゼの特異的阻害剤である PP2 にて、FGF 2 刺激による IBE 細胞の管腔形成が抑制された。そこでキナーゼ活性のない c Src の過剰発現で c Src の dominant negative な株を2つ作り、FGF 2 による管腔形成を調べたが、dominant negative 効果は認めなかった。次に同じ family の c Fyn のキナーゼ活性を各培養条件にて検討したところ、管腔形成培養条件であるコラーゲン上でのみ、2時間後というかなり遅い時間帯に FGF 2 による一過性に活性化が認められた。次にキナーゼ活性のない c Fyn の過剰発現で c Fyn の dominant negative な株を3つ作り、dominant negative 効果を in vitro kinase assay にて確認し、FGF 2 による管腔形成を調べたところ、3つの細胞株すべてで FGF 2 依存性の管腔形成が抑制された。ところどころに細胞塊を認め、PP2 による抑制と類似していた。これらの細胞株は FGF 2 での増殖や遊走には影響していなかった。以上より c Fyn は血管内皮細胞の管腔形成特異的に重要な役割を果たしていることが示された。

### 考察

Src family キナーゼの1つである c Fyn は神経や血球系において分化に関与していることが知られていたが、血管内皮細胞の分化においても重要な分子の1つであり、FGF 2 依存性管腔形成において重要な下流シグナル分子であることを始めて見出した。

c Fyn のキナーゼ活性は培養条件の違いにより異なるが、それは c Fyn による細胞反応が培養条件に強く関係していることが考えられる。血管内皮細胞はコラーゲンやフィブロネクチンのような細胞外基質との接着が重要であるが、その中心である接着斑にはその受容体であるインテグリンや Src family キナーゼを含み様々なシグナル分子が分布し、細胞外基質によりその分布は変化し、シグナル伝達経路も変化する。FGF 受容体からのシグナル伝達経路もインテグリンからのシグナルにて大きく変化する。c Fyn の活性はフィブロネクチン上ではなんら変化を起さなかったが、コラーゲン上では c Fyn を調節するシグナル分子の分布の変化が起こり、FGF 2 が特定分子の局在を変化させ、c Fyn による分化を誘導していると考えられた。

管腔様構造形成は血管内皮細胞に比較的特異的な細胞反応であり、管腔形成を指標にしたシグナル伝達分子の解析は血管内皮細胞特異的な分子を同定する上で

重要である。今後血管内皮細胞において c Fyn の下流で、特異的に発現されたシグナル伝達分子が同定され、それを阻害する抗血管新生療法が見つければ、副作用のない強力な治療法の開発が期待される。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

本研究は癌の増殖機転に働く血管新生の機序を明らかにする目的で、血管新生因子のひとつである Fibroblast growth factor 2 (FGF 2) が受容体を介して管腔形成作用するシグナル伝達分子の解析を行ったものであり、動機、目的、意図は明確である。

#### 2. 研究手段に関する評価

マウス脳血管由来血管内皮細胞株、IBE 細胞を用いて FGF 2 刺激による管腔形成を指標として、細胞内シグナル阻害物質やシグナル伝達分子の dominant negative の遺伝子を挿入して解析したもので、最も妥当なものである。

#### 3. 解析・考察・総合的な評価

FGF 2 受容体を介して活性化されるシグナルのうちで、Src family の c Fyn が血管の管腔形成に重要であることを初めて明らかにし、十分評価出来る。

以上のように、本論文は癌細胞進展における血管新生の機構解明に寄与するとともに、新たな分子標的治療の可能性を示唆するところ大であり、審査員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	近藤	宇史
	副査	教授	片峰	茂
	副査	教授	江口	勝美

### 矢野 寿一

(広島県) 昭和42年9月10日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Plasmid-Encoded Metallo-β-Lactamase (IMP-6) Conferring Resistance to Carbapenems, Especially Meropenem  
カルバペネム系薬、特にメロペネムに耐性を示すメタロ β ラクタマーゼ (IMP 6) 産生プラスミドについての検討  
矢野寿一、久我明男、岡本了一、北里英郎、小林俊光、井上松久  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45 (5): 1343-1348, 2001  
長崎大学大学院医学研究科外科系耳鼻咽喉科学  
(主任: 小林俊光教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

細菌感染症の治療で用いられる抗菌薬の中で、β



ラクタム薬の占める割合は高く、特にカルバペネム系薬は、強力な殺菌力を主体とした抗菌作用を示すことから、臨床の場では切り札的存在として用いられている。しかし、1990年代より、カルバペネム系薬を良好な基質として加水分解するメタロβラクタマーゼ (IMP 1) を産生する株が、本邦を中心に分離されはじめ、その動向が注目されている。

以前我々は、臨床分離 *Serratia marcescens* KU3838 より、伝達性プラスミド pKU501 を分離し、TEM 1 型ペニシリナーゼとメタロβラクタマーゼを同時に産生する稀なプラスミドであることを報告した。今回、pKU501 の産生するメタロβラクタマーゼが、カルバペネム系薬に対しより広い基質特異性を示す、これまで報告例のない酵素であると考えられたため、この酵素の解析を行った。

#### 対象と方法

*S. marcescens* KU3838 は、プラスミド pKU501 を保有する株で、1996年に本邦で分離された。KU3999 は pKU501 を *E. coli* K12 由来 ML4901 株を受容菌として導入し得られた。pKU501 が有しているメタロβラクタマーゼ産生遺伝子を、PCR 法で増幅し、ベクタープラスミド pBluescript にクローニングを行い pKU502 とし、KU4866 は pKU502 を ML4901 株に導入し得られた。ベクタープラスミド pBluescript はアンピシリン耐性遺伝子を有しているため、この遺伝子を除去し pKU503 を作成した。この pKU503 を ML4901 に導入し、KU4867 を得た。対照として、IMP 1 産生プラスミド pMS361 を有する KU1917 を用いた。

KU3838, 3999, 4866, 4867, 1917 について各種βラクタム薬の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。pKU502 について、Sanger 法によりその塩基配列を決定した。また、KU4867 より、メタロβラクタマーゼを精製し、その酵素活性を測定した。

#### 結果

pKU502 より決定された塩基配列を IMP 1 と比較した。構造遺伝子 741bp のうち、mature enzyme で 640 番目の A が G に置換し、それに伴い 196 番目のアミノ酸が Ser から Gly に変わっていた。臨床分離のメタロβラクタマーゼでは、これまで報告にない新しいタイプであったので、IMP 6 と名付けた。

薬剤感受性については、*S. marcescens* KU3838 は、すべてのβラクタム薬に対して高度耐性を示した。受容菌である ML4901 と比較して、KU3999, 4866, 4867 のセフェム系薬、カルバペネム系薬に対する MIC は上昇していた。また、これらの株は imipenem の MIC より meropenem, panipenem 特に meropenem の MIC が高くなる傾向がみられた。一方、対照である KU1917 は meropenem に対する MIC は imipenem に比べて低

く、panipenem は imipenem と同じであった。KU4867 については、セフェム系薬、カルバペネム系薬に対して耐性を示したが、piperacillin に対して感性を示した。

KU4867 から IMP 6 を精製し、その酵素活性を調べた。これまでの報告では、IMP 1 の meropenem に対する  $k_{cat}/K_m$  は、imipenem とほぼ同じ値であるが、今回我々が分離した IMP 6 は meropenem に対する  $k_{cat}/K_m$  が、imipenem の約 7 倍という高い値を示した。さらに、IMP 6 は cephalothin, cefotaxime に対する  $k_{cat}/K_m$  は IMP 1 と比較して非常に高い値を示した。しかし、ペニシリン系薬に対する値は IMP 1 と比較して低値であった。

#### 考察

メタロβラクタマーゼはクラス B 型に属するカルバペネマーゼで、カルバペネム系薬を良好な基質として加水分解する。メタロβラクタマーゼはいくつかの種類が知られているが、最も主要な酵素は IMP 1 タイプの酵素で、その多くは日本で分離されている。近年、この IMP 1 の亜型が報告されはじめ、本邦では今回報告の IMP 6 以外に IMP 3 が報告されている。

IMP 6 はカルバペネム系薬に対し、より広い基質特異性を示す酵素であった。塩基配列を IMP 1 と比較すると、mature enzyme で 640 番目の A が G に変わり、それに伴い 196 番目のアミノ酸が Ser から Gly に置換されていた。このアミノ酸の置換が基質特異性を変化させたと考えられ、196 番目の Ser はβラクタム薬の加水分解に重要な役割を果たしていることが予想される。

IMP 6 は IMP 1 に比べ、ペニシリン系薬に対して感受性を示すようになっていた。しかし、pKU501 は元々 TEM 1 も保有しているため、IMP 6 がペニシリン耐性を失ってもカルバペネム系薬に対し広い基質特異性を獲得する方が、pKU501 自身はより広い基質特異性を有することとなり、このような耐性プラスミドが出現したと推測される。

近年、TEM や SHV 型ペニシリナーゼ産生遺伝子が一塩基から数塩基の置換により基質特異性を拡張させた ESBLs 産生菌の出現が問題となっているが、IMP 6 も一塩基置換でカルバペネム系薬に対し基質特異性を拡張している。一塩基置換による耐性株は、日常診療の抗菌薬の選択圧下に出現することは十分予想され、今後の動向が注目される。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 1. 研究目的の評価

細菌感染症の治療に用いられる抗菌薬の中でβラクタム系薬は重要であり、その中で、特に強力な殺菌力をもつものにカルバペネム系薬がある。しかし、カ

ルバペナム系薬を分解する酵素(メタロβラクタマーゼ)をもつ菌の存在が明らかになったことから、メタロβラクタマーゼについて解析しようとしたもので本研究の目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

メタロβラクタマーゼ産生遺伝子を導入した種々の菌株に対する数種のβラクタム系薬の最小発育阻止濃度の測定、メタロβラクタマーゼの構造解析、酵素活性の測定など、により解析したもので、研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

メタロβラクタマーゼの塩基配列の中で、僅かな塩基の違いによって多くの亜型が出現すること、また亜型によってβラクタム系薬を分解する能力の違いが生ずることを分析し、カルバペナム系薬に対する耐性菌の出現メカニズムを明らかにしたもので、十分に評価できる。

以上のように、本論文は医学に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 谷山 紘太郎  
副査 教授 永武 毅  
副査 教授 河野 茂

アーメル・アジス

(パキスタン) 1963年3月1日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Tc-99m-MIBI Scintimammography: SPECT versus Planar Imaging.

(Tc 99m MIBIを用いたシンチマンモグラフィ: SPECTとプラナー像の比較)

A. Aziz, R. Hashmi, Y. Ogawa, K. Hayashi  
Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals.

14巻6号 p495 - 500, 1999年12月

長崎大学放射線医学教室

(主任: 林 邦昭教授)

論文内容の要旨

緒言

乳癌は女性の主な死亡原因の一つであり、早期診断は生存率向上のために重要である。Tc 99m-methoxyisobutylisonitrile (MIBI) は心筋血流のイメージング製剤として開発されたが、1992年に乳癌への集積が報告された。腫瘍細胞へのMIBIの集積機序は不明だが、細胞質に結合すると考えられ、MIBIの電荷や脂溶性、腫瘍細胞のミトコンドリアなども集積に関係するといわれている。MIBIを用いたプラナーでのシンチマンモグラフィは乳癌の診断に有用であり、特にX線によるマンモグラフィにて陰性や判定困難な例において

診断能が向上する。しかしSPECTを用いた報告は少なく、SPECTが診断能向上に寄与するかどうかは報告により一致しない。今回の研究の目的は、MIBIを用いて乳房の良性腫瘍と悪性腫瘍の評価を行い、同一患者においてプラナー像とSPECTを比較することにある。

対象と方法

150例(正常16例, 良性病変54例, 悪性腫瘍80例)を対象とした。正常例以外のすべての症例で、シンチグラフィの1ヶ月以内に組織学的診断が得られている。

検査は700MBqのMIBIを静注し、2時間後から施行した。腹臥位で前面、左右側面像を撮像し、その後、背臥位でSPECTを撮像した。判定は視覚的に行い、0から3までの4段階のスコアをつけ、2, 3をMIBIの集積ありと評価した。それぞれのグループのスコアを合計し、プラナーとSPECTで比較した。

結果

正常例: いずれも異常集積は認められなかった(全例 true negative)。16例のスコアの合計はプラナー像で4, SPECTで2であった(両者に有意差なし)。

良性病変: プラナー像では、fibroadenoma16例中7例, fibrocystic disease 8例中3例でMIBIの集積を認めた(10例の false positive)。SPECTではこれら10例に加えて、fibrocystic diseaseの1例が描出された(11例の false positive)。スコアの合計は、プラナー像28, SPECT30であった(両者に有意差なし)。

悪性腫瘍: 悪性腫瘍のうち描出されなかったもの(false negative)は、プラナー像で10例, SPECTで4例であった。スコアの合計は、プラナー像177, SPECT 210で、両者に有意差を認めた(p<0.005)。

6例の悪性腫瘍と1例の良性病変がプラナー像で描出されず、SPECTのみで指摘された。プラナー像に対しSPECTでは、sensitivityが87.5%から95%に上昇し、false negative fractionは12.5%から5%に減少し、negative predictive valueは85.7%から93.7%に上昇した。Specificity, false positive fraction, positive predictive valueに関してはプラナー像とSPECTで有意な差はなかった。

考察

今回の結果は、MIBIによるシンチグラフィが乳腺病変の良悪性の鑑別に有用であるという過去のいくつかの報告に合致するものである。Sensitivityはプラナー像で87.5%, SPECTで95%, specificityはプラナー像85.7%, SPECT84.5%という結果は一般的な報告よりも若干高く、今回の対象の病変が比較的大きかったことが原因と考えられる。

悪性腫瘍におけるスコアの合計はプラナー像よりもSPECTの方が高かった。つまり、SPECTでは病変へ

のMIBI集積をより確信を持って診断できるのである。プラナー像で描出できなかった10病変は左乳房下部に位置しており、心臓の集積との重なりのために診断が困難であった。SPECTではこれらの病変の描出にも優れていた。Sensitivity, false negative fraction, negative predictive value はすべて false negative rate が関係しており、SPECTにおいてこれらの指標がプラナー像よりも優れていたことは病変の描出が向上したことを示している。

検査の方法としては、プラナー撮像をまず最初に行うべきと考えている。プラナー像は正常だが悪性の疑いがある場合にはSPECTが必要となる。一方、プラナー像にて集積が認められれば、SPECTを行っても診断能は向上しない。良性病変への集積に関しては更なる検討が必要である。

### 結論

乳腺病変の良悪性の鑑別におけるMIBIを用いたSPECTシンチマンモグラフィのsensitivityは95%と高く、false negativeはわずかである。プラナー像にて集積が認められなかった場合に、悪性病変を除外する上でSPECTシンチマンモグラフィは有用である。

### 論文審査の結果の要旨

Tc-99 m-MIBI Scintimammography: SPECT versus Planar Imaging AZIZ A, et al, Cancer Bioth, Radiopharm, 1999: 14: 495 - 500

#### 1. 研究の目的の評価

本研究は乳腺良性病変と悪性腫瘍の診断能についてTc 99mMIBIによるシンチマンモグラフィにおけるプラナー像とSPECTを比較したもので、その目的は妥当である。

#### 2. 研究手法に関する評価

正常乳房16例、組織学的に診断された乳腺良性病変54例と乳癌80例の計150例を対象にMIBI静注2時間後、プラナー像とSPECTを撮像し、その判定は4段階のスコアをつけ、それぞれのグループのスコアを合計し両撮像法を比較検討したもので研究手法も妥当である。

#### 3. 解析・考察の評価

MIBIによるシンチマンモグラフィが乳腺病変の良悪性の鑑別に有用であり、撮像法としてプラナー像よりSPECTの方が感度が高く偽陰性率が低いとする解析結果は高く評価できる。

以上のように本論文は乳癌の画像診断法としてMIBIシンチマンモグラフィの有用性を明らかにしたもので、今後乳癌診療の進歩に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 綾部 公 懿  
副査 教授 兼松 隆 之  
副査 教授 石丸 忠 之

### 中村 貴 生

(鹿児島県)昭和45年6月13日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Increase in hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase activity in renal carcinoma cells is associated with increased motility partly through phosphoinositide 3-kinase activation

(腎癌細胞における肝細胞増殖因子受容体チロシンキナーゼ活性の増加はPI 3 kinaseの活性化を介して運動の促進に参与する)

Takao Nakamura, Shigeru Kanda, Kazuo Yamamoto, Tomoko Kohno, Kanenori Maeda, Toshifumi Matsuyama and Hiroshi Kanetake

Oncogene (2001) 20, 7610 - 7623

長崎大学医学部泌尿器科学教室

(主任:金武 洋教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

肝細胞増殖因子(HGF)は肝細胞増殖因子受容体(HGFR)を介して様々な生物学的反応を引き起こす。中でも、細胞の運動能を促進する作用(Scattering)は特徴的である。近年、遺伝性乳頭状腎細胞癌の原因として、HGF受容体の活性を亢進させるアミノ酸変異が幾つか報告された。しかし、この受容体チロシンキナーゼ活性の増加が腎癌細胞に及ぼす影響について、分子レベルでの検討は行われていなかった。本研究では、二種のヒト腎癌細胞株(HGF依存性に運動能が亢進するACHN細胞とHGF非依存性に運動能が亢進するVMRC-RCW細胞)を用いて、HGF受容体の恒常的活性化の機構とその受容体下流でのシグナル伝達について検討を行った。

#### 方法

1. 細胞の運動能は、scatter assay, phalloidin染色, chemokinesis assayにて検討した。
2. 受容体の発現量とそのキナーゼ活性は、イムノブロットングにて検討した。
3. VMRC-RCW細胞に発現しているHGFRをクローニングし、シークエンスを行った。次に、野生型あるいは、アミノ酸変異を持つHGFRの発現ベクターを作製し、これを内因性HGFRの発現が著しく低いブタ大動脈内皮由来のPAE細胞に遺伝子導入し、

アミノ酸変異と受容体の活性化の関係を検討した。

4. Ras-MAPK シグナル伝達路の解析として, Ras 上流のアダプター蛋白である Shc のチロシン酸化, Shc に共沈される Grb 2 の量, MAPK の活性化をイムノプロットングにて検討した。この経路の阻害剤として MAPK 上流の MEK 阻害剤である PD 98059 を使用した。

5. PI 3 kinase を介するシグナル伝達路の解析には, in vitro PI 3 kinase assay にて検討した。

この経路の阻害剤として LY294002, wortmannin を使用した。

### 結果

1. ACHN 細胞は HGF 依存性に, VMRC-RCW 細胞は HGF 非依存性に運動能が亢進していた。

2. VMRC-RCW 細胞に発現している HGFR は HGF 刺激非依存性に活性化されており, 受容体の発現量も著しく増加していた。

3. VMRC-RCW 細胞に発現している HGFR は過去に報告のない三つのアミノ酸変異を持つことが明らかとなった。しかし, いずれの変異も受容体のキナーゼ活性亢進に関与していなかった。更に, 野生型 HGFR の発現量が異なる安定発現株 (PAE 細胞) を検討したところ, 受容体のキナーゼ活性の亢進とその発現量は相関していた。

4. VMRC-RCW 細胞では, HGF による Ras-MAPK の活性化は低下していた一方で, PI 3 kinase は, 恒常的に活性化されていた。

5. HGFR を遺伝子導入した安定発現株 (PAE 細胞) において, 受容体の発現量の増加によって引き起こされた受容体キナーゼ活性の亢進は, Ras-MAPK を介する経路に影響を与えなかったが, 非刺激状態での PI 3 kinase の活性増加を引き起こした。

6. HGFR を強く過剰発現させた PAE 細胞では VMRC-RCW 細胞とよく似た表現型, すなわち HGF 非依存性の運動能の亢進, 受容体チロシンキナーゼの活性増加, PI 3 kinase 活性亢進がみられた。

7. PD98059 はヒト腎癌細胞の運動能を抑制しなかったが, LY294002, wortmannin は HGF 依存性に亢進した ACHN 細胞の運動能や, HGF 非依存性に亢進している VMRC-RCW 細胞の運動能を強く抑制した。

8. HGFR 過剰発現 PAE 細胞株でも, PI 3 kinase の阻害剤によって HGF 非依存性に亢進した運動能が抑制された。

### 考察

本研究で, 腎癌細胞における HGFR の HGF 非依存性の活性化は運動能亢進に関与していることが示唆された。VMRC-RCW 細胞における HGFR の活性増加は

遺伝子異常によると推測し, その塩基配列を解析したが, 今回明らかとなったアミノ酸変異はいずれも HGFR の活性化に関与していなかった。そこで, 活性増加の原因として受容体の発現量に着目し検討したところ, 受容体は過剰発現によって容易に活性増加が起きることが明らかとなった。

VMRC-RCW 細胞における HGF 非依存性の運動能亢進は, 主として過剰発現による HGFR の活性化が原因と考えられ, 活性化受容体下流では PI 3 kinase の活性化が重要な役割を果たしていた。同様の現象は PAE 細胞に HGFR を過剰発現させた際にも確認され, HGFR の過剰発現, 受容体キナーゼの活性化, 受容体下流での PI 3 kinase の活性化, HGF 非依存性の運動能亢進という一連の機構が提示された。一方, 活性化受容体下流での Ras-MAPK 経路への影響は細胞種依存性であった。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

本研究は, 腎癌細胞を用いて HGF 受容体の恒常的活性化の機構とその受容体下流でのシグナル伝達の解明を試みたもので, 目的は十分に妥当である。

#### 2. 研究手段に関する評価

HGF 受容体発現細胞の運動能の評価, HGF 受容体発現量の定量, その遺伝子配列の決定や, 過剰 HGF 受容体発現細胞株の作成など, 実験系に用いられた生化学的手法ならびに分子生物学的な研究手段は妥当である。

#### 3. 解析・考察の評価

HGF 受容体過剰発現による細胞内情報伝達経路系の機能分離と, その下流標的分子を明らかにし, 解析と考察は十分に評価できる。

以上のように, 本論文は HGF 受容体の作用機序の解明に貢献するところ大であり, 審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	山下	俊一
	副査	教授	近藤	宇史
	副査	教授	江口	勝美

**出口 裕子**

(長崎県)昭和42年6月12日生

**授与年月日** 平成14年3月31日**主論文** Corrosion cast demonstration of choroidal vasculature in normal Wistar Kyoto rat  
鋳型標本による正常 Wistar Kyoto ラット脈絡膜血管の研究出口(栄田)裕子 I.A.Bhutto 雨宮次生  
IT.J.ANAT.EMBRYOL.106 (supplement 1):  
245-250 2001

長崎大学医学部眼科学教室

(主任:雨宮次生教授)

**論文内容の要旨****緒言**

インドシアニングリーン蛍光眼底造影法の開発と実用化により、脈絡膜血管の病態研究は最近めざましい進歩を遂げている。しかし、脈絡膜血管構築をはじめとして、形態学的、生理学的な基礎的知識が不十分なため、開発された検査法のもたらす所見の解釈にとまどうことが多い。その理由は、脈絡膜血管系は微少循環であること、組織としては網膜の後方にあるため、脈絡膜血管の形態を臨牀的に把握する事が困難である事による。脈絡膜血管構築についての研究は、ヒトを含めて多くの報告があるが、なお不明の点が多い。脈絡膜は主として血管より構成されており、脈絡膜疾患の解明には血管の形態学的研究は不可欠である。疾患モデルとして有用なラットの正常脈絡膜血管構築を明らかにすることは、脈絡膜疾患の病理、臨牀像を解釈する上で必要である。本研究の目的は、正常 Wistar Kyoto (WKy) ラットを用い、脈絡膜血管鋳型を走査電子顕微鏡 (SEM) にて、三次元的に観察し、ラットを用いた脈絡膜疾患モデルの研究や、臨牀的検査所見の解釈のための基礎的知識を得ることにある。

**材料と方法**

動物は6か月齢の正常 WKy ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下で2本の頸動脈を結紮し、22G カニューレを挿入した。プラスチックシリンジを用い、ヘパリンを含む生理食塩水で血管を灌流後、Mercox を注入した。次に眼球を摘出し、60℃温水中に4時間入れた後、室温で20%KOH にて5日間あるいはそれ以上、軟部組織を腐食させ除去した。試料は乾燥後、オスミウム蒸着、金・パラジウム蒸着を施した後、日立 S 2360N 形 SEM にて観察した。

**結果**

SEM を用いることにより、脈絡膜全体を立体的に観察することができた。脈絡膜への主な血液の供給源は眼動脈であり、眼動脈は鼻側毛様動脈と耳側毛様動脈の二本の毛様動脈に分岐した。耳側毛様動脈からは、

下方に走る下毛様動脈が分岐していた。下毛様動脈は途中から扇形に分岐し、下方脈絡膜に分布した。上方の脈絡膜には、鼻側毛様動脈と耳側毛様動脈からそれぞれ垂直に数本の血管が分岐し、上半分に分布した。静脈系では、二つの異なる血管系が認められた。脈絡膜前方では、小さい集合静脈は管径を増大させながら、各々の象限に存在する四つの渦静脈へと流入した。この集合血管には静脈-静脈間吻合が見られた。また、虹彩から来る大きな静脈は、直接渦静脈に流入した。

視神経乳頭周囲にはもう一つの静脈系が存在し、視神経乳頭周囲の静脈は、集合して静脈洞を形成し、脈絡膜静脈と考えられる血管へと流入した。眼静脈と脈絡膜静脈の間には、交通が見られた。

脈絡膜毛細血管には二型が見られた。一つは蜂巢型で、他は不規則型である。蜂巢型は毛細血管間の間隙が小さく、規則的に配列していた。一方、不規則型は、毛細血管間の間隙が大きく、一本一本の血管が明瞭で血管径は不規則であった。

**考察**

今回の結果から、ヒトと WKy ラットの脈絡膜血管にいくつかの類似点と相違点があることが判明し、ヒトにおいては、眼動脈は長後毛様動脈、短後毛様動脈、前毛様動脈に分かれ、静脈は虹彩からのものも含め、すべて渦静脈へと流入している。しかし、WKy ラットの場合、眼動脈は耳側毛様動脈と鼻側毛様動脈、下毛様動脈にそれぞれ分かれている。また、毛細血管はヒトでは後極部で房状型であるが、WKy ラットではこのような明らかな型は認められなかった。

静脈においては、WKy ラットでは4本の渦静脈に集まる静脈と乳頭周囲に集まる静脈の2つのルートが見られる。乳頭周囲に集まってきた静脈洞は一本の静脈へと注ぎ込むが、この乳頭周囲の血管系に関する報告は今までにない新知見である。我々はこれをヒト後毛様静脈に相当するものと考えた。この血管は眼静脈とも交通があることが認められた。ヒトの場合、視神経周囲では短後毛様動脈が Zinn-Haller 動脈輪を形成して強膜内視神経を栄養しており、WKy ラットとは異なるため、視神経乳頭周囲の静脈系の違いも、これと関係あるのかもしれない。今回の我々の研究で WKy ラットの脈絡膜血管の詳細を立体的に観察する事ができ、新知見が得られた。これらの所見は、視神経疾患(例えば視神経萎縮)や視神経周囲の循環障害(緑内障、虚血性視神経症)の研究、脈絡膜新生血管の研究において、病理学的所見、臨牀検査所見等の解釈上、有用な基礎的知識になると考えられる。

**論文審査の結果の要旨**

「Corrosion cast demonstration of choroidal vasculature in normal Wistar Kyoto rat」

1. 研究目的の評価

本研究は、脈絡膜疾患の解明に必須である、脈絡膜血管構築を明らかにするためにラット正常脈絡膜血管に対して鋳型標本を作製し解析したもので研究目的として妥当である。

2. 研究手法に関する評価

種々の疾患モデルラットの対照として有用な正常 Wistar Kyoto ラット脈絡膜血管に対して、適切な粘性をもつ Mercocox を用いた鋳型標本を作製し走査電子顕微鏡にて三次元的に解析したもので研究手法も妥当である。

3. 解析・考案の評価

本研究により、視神経乳頭周囲で新たな静脈系を見出しと共に、ラット脈絡膜血管系について詳細な立体構造を明らかにした点で、これらの研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は脈絡膜血管構築の理解と関連疾患の解析に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 小路 武彦  
副査 教授 岩堀 修明  
副査 教授 長島 聖司

原田 沖

(長崎県)昭和37年6月14日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Endothelin-1 Binding to Endothelin Receptors in the Rat Anterior Pituitary Gland: Formation of an ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub> Receptor Heterodimer?

エンドセリン-1のラット下垂体エンドセリン受容体への結合:

ET<sub>A</sub>-ET<sub>B</sub>受容体2量体の形成

原田 沖, 姫野明彦, 重松和人, 澄川耕二, 丹羽正美

Cellular and Molecular Neurobiology (in press) 2002

長崎大学医学部麻酔学教室

(主任: 澄川耕二教授)

論文内容の要旨

緒言

ペプチド性生理活性物質エンドセリンには2種類のG蛋白共役型受容体, ET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型が存在する。内因性エンドセリンであるエンドセリン3(ET3)は, ET<sub>B</sub>型受容体の選択的リガンドであるが, ET1は両受容体に非選択的で両者に結合する。ET1は分子内の機能的に異なる2つの領域(N末端側のアドレ

ス領域とC末端側のメッセージ領域)がET<sub>A</sub>受容体に立体的に認識される二価結合性リガンドである。我々は, ラット下垂体にET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型受容体の機能的発現を観察し, ET1の興味深いリガンド結合様式を発見した。詳細な薬理的解析を行うことで, G蛋白共役型受容体ET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型蛋白が結合して二量体を形成し, ET1を認識するという実験結果を得た。

材料と方法

1) 放射性リガンド<sup>125</sup>I ET1を用いた定量的受容体オートラジオグラフィ法, および<sup>35</sup>S二重標識cRNAプローベを用いた*in situ*ハイブリダイゼーション法で, ラット下垂体の凍結切片におけるET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型受容体発現の解剖学的検索を行った。

2) <sup>125</sup>I ET1(放射性非特異的リガンド), <sup>125</sup>I PD151242(放射性ET<sub>A</sub>リガンド), <sup>125</sup>I IRL1620(放射性ET<sub>B</sub>リガンド)を用いた定量的オートラジオグラフィ法で, エンドセリン受容体リガンド結合解析を行った。エンドセリン受容体関連物質として, ET1, ET3, BQ123(ET<sub>A</sub>拮抗薬), PD151242(ET<sub>A</sub>拮抗薬), BQ788(ET<sub>B</sub>拮抗薬), sarafotoxin S6c(ET<sub>B</sub>作動薬), およびIRL1620(ET<sub>B</sub>作動薬)を用いた。

結果

1) ラット下垂体前葉に, ET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型の2種類の受容体の発現を確認した。

2) BQ123(ET<sub>A</sub>拮抗薬)とsarafotoxin S6c(ET<sub>B</sub>作動薬)を用いた<sup>125</sup>I ET1飽和結合実験は, 低親和性sarafotoxin S6c非感受性ET<sub>A</sub>受容体結合と高親和性BQ123非感受性ET<sub>B</sub>受容体結合が, 93:7の割合であることを示した。しかし, BQ123とsarafotoxin S6c非存在下では<sup>125</sup>I ET1の飽和結合様式は単一性で, 2種類の受容体結合様式では無かった。

3) <sup>125</sup>I ET1結合阻害実験では, BQ123存在下でET<sub>B</sub>関連物質(ET3, BQ788, sarafotoxin S6c, IRL1620)によって<sup>125</sup>I ET1のET<sub>B</sub>結合が強力に阻害されたが, BQ123非存在下では<sup>125</sup>I ET1結合はこれらET<sub>B</sub>関連物質によって強い影響を受けなかった。

4) ET<sub>B</sub>放射性リガンド<sup>125</sup>I IRL1620結合は, BQ123存在下, 非存在下, いずれの条件下でも等しくET1によって競合的に阻害された。

5) ET<sub>B</sub>関連物質sarafotoxin S6c存在下での<sup>125</sup>I ET1結合阻害実験で, 一価結合性ET<sub>A</sub>リガンドであるBQ123とPD151242は, 競合的に<sup>125</sup>I ET1結合を阻害した。

考察

二価結合性リガンドであるET1の今回明らかになった特殊なリガンド結合機構は, ET1分子内のN

末端側アドレス領域とC末端側メッセージ領域が、それぞれET<sub>A</sub>受容体のアドレス認識ドメインとET<sub>B</sub>受容体のメッセージドメインに結合して、いわばET 1が架橋しET<sub>A</sub>受容体とET<sub>B</sub>受容体の2量体を形成したことを示している。即ち、ET<sub>A</sub>受容体とET<sub>B</sub>受容体が共存するラット下垂体前葉細胞では、ET 1はET<sub>A</sub>受容体に単独結合すると共に、ET<sub>A</sub> ET<sub>B</sub>受容体2量体にも結合する。ET<sub>B</sub>関連物質が存在するとそれらは優先的にET<sub>B</sub>受容体に結合し、ET<sub>A</sub> ET<sub>B</sub>受容体2量体からET<sub>B</sub>受容体が解離し、ET 1はET<sub>A</sub>受容体のみ単独結合する。ET<sub>A</sub>関連物質が存在すると、ET 1のC末端側メッセージ領域だけでET<sub>B</sub>受容体のメッセージドメインに一価性に結合する。

生体内で多彩な機能を担っているエンドセリン系の情報伝達機構も多様で、エンドセリンの機能は各々の受容体に対する個々のペプチドの親和性ばかりでなく、ET<sub>A</sub>受容体とET<sub>B</sub>受容体の相互作用にも依存している。また、今回のデータは非選択的ET受容体拮抗薬開発の優位性を裏付ける。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 1. 研究目的の評価

多様な生理作用を発現するエンドセリンの中で、ET 1はET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型の2種類のエンドセリン受容体に非選択的に結合することから、ET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型の両受容体が共存する場合のET 1の結合様式を解析しようとしたもので本研究の目的は十分に妥当である。

##### 2. 研究手法に関する評価

ET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型の両受容体が共存するラット下垂体を用いて、in situ ハイブリダイゼーション法と定量的受容体オートラジオグラフィ法に詳細な薬理学的解析法を適用したもので、研究手法は妥当である。

##### 3. 解析・考察の評価

エンドセリン受容体はG蛋白質共役型受容体のET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型蛋白質が結合して2量体を形成し、それがET 1を認識することを提唱し、エンドセリン受容体に結合する物質の作用はET<sub>A</sub>型とET<sub>B</sub>型の両受容体の相互作用にも依存することを明らかにしたもので、十分に評価できる。

以上のように、本論文は生理活性物質受容体に関する基礎研究に加えて、薬物開発に対しても重要な情報を提供したもので、医学に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 谷山 紘太郎  
副査 教授 柴田 尚武  
副査 教授 下川 功

#### 劉 殿 閣

(中国) 1964年1月12日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Role of heat shock protein 47 on tubulointerstitium in experimental radiation nephropathy

(実験的放射線性腎症の間質尿細管病変におけるHSP47の役割)

Diange Liu, Mohammed S. Razzaque, Arifa Nazneen, Takashi Naito and Takashi Taguchi Pathology International, in press

長崎大学医学部第二病理学教室

(主任: 田口 尚教授)

#### 論文内容の要旨

##### 緒言

放射線照射により腎は障害され、慢性期には細胞外基質の過剰産生により線維化を示す。放射線性腎症については、これまで急性期あるいは細胞障害に関する研究は多いが、細胞外基質発現と細胞障害との関連の報告は少なく、線維化機序については不明な点が多い。熱ショック蛋白47(HSP47)はコラーゲン産生に特異的な分子シャペロンで、諸臓器の線維化に関連して発現するが、放射線性線維化における報告はない。本研究では、ラット放射線性腎症の間質尿細管障害と線維化におけるHSP47の役割について検討した。

##### 対象と方法

1. 放射線照射実験: 雄のWistar 6週齢ラット(n=132)を用い、以下の3群とした。I群(n=12): 開腹のみの対照ラット。II群(n=60): 開腹して左腎を露出し、周囲臓器を鉛板で覆い、7, 15, 25Gyを照射した。III群(n=60): 右腎摘出後にII群と同様に照射した。照射後、1, 3, 6, 9ヶ月後に血清学的および組織学的に検索した。
2. 血清学的検索及び血圧の測定: 腎摘時に血清クレアチニン、BUNおよび血圧を測定した。
3. 組織学的検索: 放射線照射を行った左腎について、光顕的(HE, PAS, PAM, Masson trichrome染色)および免疫組織化学的(Collagen III, Collagen IV, alpha-smooth muscle actin(SMA), vimentin, HSP47)に検討した。また、免疫二重染色にて、HSP47とcollagen, SMAあるいはvimentinとの共局在についても検討した。

##### 結果

1. 血圧はIII群のみにおいて線量依存性に上昇し、6ヶ月と9ヶ月では他の群より有意に高値であった。
2. 血清クレアチニンとBUNはII群の25GyとIII群の15, 25Gyの9ヶ月目で有意に高値を示した。
3. 組織学的な間質尿細管障害は尿細管の拡張、萎縮

および円柱の出現，間質の細胞浸潤や線維化より成る。I群においては全経過見られない。II群において，15Gyの照射後9ヶ月および25Gy6ヶ月目から局所性に出現した。III群では7Gy照射後3ヶ月から出現し，線量増加と共に経時的に病変が強くなり，線維化はII群より高度となった。

4. 糸球体は硬化像を示し，血管は動脈の内膜肥厚と細動脈の硝子様肥厚を示すが，いずれも線量依存性に経過とともに病変が進行し，III群がII群より強い変化を示した。

5. 免疫組織化学的には間質の線維化部ではIII型，IV型 collagen の沈着が強く，HSP47の発現も強く認められた。免疫二重染色では，間質の SMA 陽性細胞や尿細管の vimentin 陽性細胞の分布と一致して HSP47が発現していた。

### 考察

放射線性腎症の慢性障害では糸球体硬化，尿細管萎縮，間質の細胞浸潤と線維化，血管病変を示す。今回の実験では，7 25Gy の1回の曝露で進行性的間質尿細管障害が起こり，特に片腎における25Gyの照射では，強い腎機能低下を伴う腎線維化へと進展した。本症における間質線維化の機序については不明な点が多いが，間質の myofibroblast の出現が基質産生に関連すると考えられている。また，放射線曝露により fibroblast cell system が collagen 合成を特徴とする postmitotic fibrocyte 側へシフトされるという説も示されており，形質転換した線維細胞系の間質細胞の関与が大きいと考えられる。一方，HSP47は腎臓や肺などの各種の線維性疾患において過剰発現し，collagen の産生と蓄積を促し線維化へと進展させる。今回の放射線性腎症の実験においても HSP47の過剰発現が，collagen の増生部に一致して認められ，本症においても同様の機序が関与していると考えられた。HSP47産生細胞については，二重染色の結果から，障害を受け形質転換を示した間質の筋線維芽細胞や尿細管上皮細胞が示唆された。

放射線性腎症における HSP47の発現に関する初めての報告であり，HSP47の制御機構の解明が，本症の進行抑制や治療法開発のアプローチになると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

本研究は，放射線性腎症の間質尿細管病変の進展における heat shock protein47 (HSP47) の発現を免疫組織学的に検討し，間質線維化機構における HSP47の役割を明らかにしようとしたものであり，研究の目的は明確，且つ妥当である。

#### 2. 研究手法に関する評価

Wistar ラットへの放射線照射方法，対照群や増悪群の設定など，放射線性腎症の作成に関しては十分な配慮がなされている。また，免疫組織学的にも二重染色法を実施して線維化組織での HSP47の発現とコラーゲン産生との関連，及びその合成細胞について検討したもので，研究手法は妥当である。

#### 3. 解析・考察の評価

上記の手法で解析した結果，放射線性腎症の間質尿細管病変への HSP47の関与やその役割に関する考察は適切，妥当なもので，放射線性腎症の線維化機序の解明への進展が大いに期待される。

以上のように本論文は放射線性線維化機構の解明に貢献するところ大であり，審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	関根	一郎
	副査	教授	近藤	宇史
	副査	教授	林	邦昭

### エムディ・ラフィクル・イスラム

(バングラデシュ) 1969年11月10日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 PU. 1 is Dominant and HAF-1 Supplementary for the Activation of gp91<sup>phox</sup> Promoter in Human Monocytic PLB-985 Cells<sup>1</sup>

(ヒト単球系 PLB 985 細胞の gp91<sup>phox</sup> プロモーターの活性化では PU .1が主に働き，HAF 1は補助的に働く)

Md.Rafiqul Islam\*, Fan Chun\*, Yoshito Fujii\*, Li Jun Hao\*, Shoichi Suzuki\*, Atsushi Kumatori\*, Dan Yang\*, Erzsebet Rusvai\*, Norio Suzuki\*, Hiroshi Kikuchi\*, and Michio Nakamura\*<sup>2</sup>

(Journal of Biochemistry (Tokyo), 131: 2002 (掲載予定))

長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門炎症細胞機構分野

(主任：中村三千男教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

gp91<sup>phox</sup> は，食細胞 NADPH oxidase の主構成要素であり，フラビンとヘムを含んでいることから細胞内の NADPH から電子を受け取りそれを細胞外の酸素分子に渡すと考えられている。gp91<sup>phox</sup> 遺伝子は Xp21 .1にあり，NADPH oxidase 活性の欠損に基づく先天異常である慢性肉芽腫症の約 3 / 4 はこの遺伝子の異常による(X-CGD)。更に抹梢血細胞でもサイトカインや LPS でその発現がダイナミックに変化することから，その転写機構を明らかにすることには意義があり，CGD



の遺伝子治療への指針をも与える。

X-CGDの一部にプロモーターのPu部位点変異に起因するgp91<sup>phox</sup>発現低下によるものがある。本部位へは転写因子PU.1とHAF 1の結合が知られているが、いずれの結合がgp91<sup>phox</sup>遺伝子発現に重要な明確な結論が示されていなかった。その理由は、1. 内在性転写因子の活性を精度良く定量出来る方法の欠如、2. 食細胞での活性を反映する系の欠如、のいずれかであった。本実験では、当研究部で確立した分化食細胞系で内在性転写因子の活性を定量的に測る系を用い、PU.1とHAF 1の意義を明らかにすることを目指した。

#### 対象と方法

**細胞と一時的遺伝子導入によるプロモーター活性の測定：**PLB 985単芽球性白血病細胞を用い、本研究室で既に確立したTPA処理/TFL 01リボソーム法を用い、gp91<sup>phox</sup>プロモーター結合蛍ルシフェラーゼプラスミドを導入した。この方法は、TPAがPLB 985を単球へ分化させると同時に遺伝子導入の効率を500倍以上あげる(Hao et al J Biochem 128: 989, 2000)。

**変異プロモーター配列の作成：**gp91<sup>phox</sup>プロモーター配列(-105 ~ +12bp)結合蛍ルシフェラーゼ遺伝子プラスミドpXP2Nを用いた。変異プラスミドは、まず野生型配列を含むpBluescript KSを鋳型にoverlapping PCRで変異プロモーターを作り、これをルシフェラーゼプラスミドに挿入した。

**転写因子のPu部位への結合親和性の測定：**TPA処理8時間後の核抽出液を用いた。野生型プロモーター断片(65-41bp)を<sup>32</sup>Pエンドラベルし、プローブとして競合ゲルシフトアッセイした。各種点変異断片の濃度を横軸にとり、PU.1またはHAF 1のバンドの相対濃度の指数を縦軸にとって近似直線の傾きを得た。野生型の傾きを1とした相対値で親和性を反映させた。これは50%阻害値の逆数に比例する。

**コトランスフェクション：**マウスの野生型または結合はするが転写を活性化できないドミナントネガティブ(DN)PU.1プラスミド(Klemsz 供与)を同時発現させた。

#### 結果

1. Pu部位に網羅的に点変異を導入すると、X CGDで見つかった全ての点変異でプロモーター活性が著明に減少した。これは、本実験系がin vivoを正しく反映していることを示唆している。またEtsコンセンサス配列に近くなると活性は上昇した。
2. 全てのX CGDの変異に対し、PU.1とHAF 1の親和性が低下したので、gp91<sup>phox</sup>の転写には少なくともいずれかは必須であることを示唆していた。
3. 野生型とX CGDに一致する変異以外の7種の点変異配列において、転写活性の増減はHAF 1より

もPU.1の結合親和性の増減に良く一致した。ただし、PU.1への親和性が低いにもかかわらず活性を有する例ではHAF 1への親和性が保たれていた。これらは、gp91<sup>phox</sup>遺伝子の転写においてPU.1が効果的であり優位な転写因子であること、またHAF 1が補助的であることを示唆していた。

4. Pu部位の3塩基対についてEtsコンセンサス配列に一致する変異(56C, 51G, 49T)の全ての組み合わせ( $2^3 = 8$ )において、プロモーター活性と結合親和性の相関を見たところ、PU.1において相関が顕著であった。したがって、PU.1が優位な転写因子であると考えられる。また、Etsコンセンサス配列のプロモーター活性は野生型プロモーター活性の最大約15倍にもなった。

5. 外から導入したDN PU.1は、Etsコンセンサス配列プロモーターの転写活性を阻害した。これは、PU.1が優位な転写因子であることを支持する。

#### 考察

従来、gp91<sup>phox</sup>プロモーターPu部位には、PU.1とHAF 1が結合すること、遺伝子導入によってこれらの発現を増強させるといずれの場合にもプロモーター活性が上がることから、その活性には共に同じように有効であると考えられた。また、赤白血病細胞HELの結果は、PU.1が必須な転写因子であることを示唆していた(Suzuki et al, Proc Natl Acad Sci USA 95: 6085, 1998)。本論文における実験系は、ヒト単球系細胞において(最後のコトランスフェクションの実験を除き)すべて内在性のPU.1とHAF 1の活性と結合親和性を見ており、従来の報告と違いin vivoのこれらの役割を正しく反映していると考えられる。これは、X CGDで見られた変異が転写活性を有意にしかも著明に低下していることから裏付けられた。

これまでgp91<sup>phox</sup>プロモーター部位における内在性転写因子の相対的寄与を測定する信頼のおける実験系が無く、野生型やDN因子の強発現系で推定されてきた。強発現系・デコイ・アンチセンス等で特定の転写因子量を外的に増減する方法は異なる部位に結合する異なる転写因子間の寄与を測るには有効であるが、同一部位に結合する異なる因子間の相対的活性を測るには不向きである。また、転写因子が着目している部位だけに働いている保証は無く、間接的な影響も必然的に含んだ系となっている。ここで用いた特定エレメントへの網羅的な点変異導入による解析こそが、in vivoを反映するデータを提供できる。この系では、問題としているエレメントにおける特定の因子の結合親和性を幅広く変化させることができるからである。この実験系を用い、本論文で初めてgp91<sup>phox</sup>プロモーターの活性化にはヒト単球系細胞においてPU.1が優位に働

き, HAF 1が補助的に働く事が示された。さらに PU 部位を Ets コンセンサス配列にするとプロモーター活性を十数倍に上げることから, これが将来の X CGD の遺伝子治療における生理的高発現系として応用できることを示唆している。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

本研究は, 食細胞の機能上重要な NADPH oxidase の主要構築成分である gp91<sup>phox</sup> のプロモーターで, 点変異が先天性慢性肉芽腫の一因となることが知られている Pu 部位の転写活性調節機構を明らかにする目的で, 転写因子 Pu .1と HAF 1の結合活性について解析を行ったものであり, 動機, 目的, 意図は明確である。

#### 2. 研究手段に関する評価

単芽球性白血病細胞株, PLB 985細胞に gp91<sup>phox</sup> プロモーターを結合させたルシフェラーゼベクターを挿入するとともに, ゲルシフトアッセイの新しい解析法を考案して解析したもので, 研究手法は妥当なものである。

#### 3. 解析・考察・総合的な評価

gp91<sup>phox</sup> プロモーターに結合する PU .1と HAF 1の親和性の違いを明らかにするとともに, 同プロモーター部位における Ets コンセンサスが重要であることを初めて明らかにし, 十分評価出来る。

以上のように, 本論文は gp91<sup>phox</sup> プロモーター活性調節機構解明に寄与するとともに, 新たな分子標的治療の可能性を示唆するところ大であり, 審査員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 近藤 宇史  
副査 教授 毎田 徹夫  
副査 教授 松山 俊文

### 末永貴久

(長崎県)昭和46年3月14日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 中年男性の身体活動量から捉えた日常生活, 有酸素能力, および健診成績  
末永貴久

日本衛生学会雑誌・五十七巻二号 2002年5月発行予定  
長崎大学医学部衛生学教室  
(主任: 齋藤 寛教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒言

現代社会がもたらす運動不足の解消や, 有酸素能力の向上を主眼とした保健指導においては, トレーニングによる体力増強という観点から, 近年では, 日常生

活に中強度の運動を取り込み, 全般的な身体活動量を増やすことが推奨されるようになった。

これまでの身体活動に関する研究は, その多くが余暇活動や運動実施状況について質問し, 消費エネルギー計算やスコア化する定量評価が主である。しかし, 日常生活を具体的な身体活動の時間ならびに強度により客観的・定量的に分類し, さらに, 体格や健診成績との関連を説明したものは見あたらない。

本研究では, 中年男性の身体活動について, 身体活動量を有酸素能力との関連から検討し, さらに, 活動的か, 座位中心か, 活動や運動を付加しているかといった観点からタイプ分類を行い, 有酸素能力, 栄養摂取状況, 体格, 健診成績(血圧, 血液データ)との関連について比較検討を行った。

#### 対象と方法

1) 対象は平成10年7月から平成12年1月までの間に, S病院の人間ドック(1泊および2泊コース)を受診した男性322名であり, 全ての結果を得ることができた288名を解析対象とした。

2) 対象者は人間ドック受診前に24時間の身体活動を記録し, 1日の活動を「睡眠・横たわり」「座位」「立ったり座ったり」「単純な移動」「負荷のかかる日常作業」「軽い運動」「高強度の作業」「高強度の運動」「重労働・激しい運動(競技的)」の9段階に分けた。記録は10分ごとに3日間(平日2日, 休日1日)行い, 1週間分に換算(平日を6日, 休日を1日)した値の平均値を1日当たりの総メッツ値とした。食事も同様に記録し, 1日当たりの摂取カロリーを得た。

3) 体格は, BMI, WHR (Waist Hip Ratio), %fat (体脂肪率)を計測した。また, 20歳時点の体重を思い出し法により記録した。血液検査としては, 総コレステロール, HDL コレステロール, 中性脂肪, GPT, 空腹時血糖値を用いた。最大酸素摂取量(以下 VO<sub>2</sub> max)は, 間接法により最大下負荷で測定した。

4) 日本人の栄養所要量(六訂)における生活活動動作の時間区分を参照し, 4段階の動作内容(「安静・立つ」「歩く」に該当するような立位移動の行動, 「速歩」に該当するような作業や軽い運動, 「筋運動」に該当するような重労働や中高強度の運動)の活動時間により, 6つの日常生活タイプ(A: 座位中心群, B: 座位+立位移動群, C: 座位+活動群, D: 座位+運動群, E: 活動中心群, F: 活動+運動群)に分類した。

5) 身体活動量の妥当性を検討し, 各変量との関連をみるために重回帰分析を行った。また, 分類した6つの日常生活タイプ別に, 一元配置分散分析および多重比較を行い比較検討した。

## 結果

- 1) 年齢は30歳 - 61歳 (平均45.7歳), 総メッツ値は平均42.7(±4.89), 摂取カロリーは平均2216 kcal(±351.9)であった。健診成績における各平均値は, いずれも基準範囲内であった。
- 2) 重回帰分析の結果,  $VO_2\max$  と総メッツ値には有意な正の偏回帰係数が認められた。また, 体格では %fat と WHR, 問診内容では20歳から現在までの体重の増加量と, 運動を休止してから5年以上経つことが,  $VO_2\max$  と有意な負の偏回帰係数を示した。
- 3) 一元配置分散分析 (ANOVA) では, 年齢, 摂取カロリーを除く項目でタイプによる有意な違いが認められた。健診成績では, 血圧, GPT, 中性脂肪で有意な違いが認められた。
- 4) 多重比較 (Tukey) では, 総メッツ値は, B群とC群との間と, D群とE群との間に違いが認められなかったが, その他の群では有意差を認めた。 $VO_2\max$  においては, F群が他群よりも有意な高値を示し, A群は, D群, F群, E群に対して有意な低値を示した。WHR においては, F群が他群よりも有意な低値を, B群とE群に有意な違いを認めた。健診成績においては, 運動の影響が, 収縮期血圧 (F群とA群), 拡張期血圧 (F群とA群, B群, E群), GPT (D群, F群とA群), 中性脂肪 (D群, F群とA群, およびF群とE群) に認められた。

## 考察

- 1) 重回帰分析において, 客観的な運動負荷試験の結果である  $VO_2\max$  と, 対象者の自主記載による総メッツ値に強い関連が認められたことは, 今回測定した総メッツ値による身体活動量の評価の妥当性を示すものであり, 保健指導の場面における両者の活用の有効性が示された。
- 2) %fat, WHR, ならびに20歳からの体重増加量と,  $VO_2\max$  との間に有意な負の関連を認めたことから, 体全体の脂肪や, 腹部脂肪の増加を防ぐことが, 有酸素能力の向上には重要であると考えられた。
- 3) 日常生活のタイプ分類では, 総メッツ値はD群とE群に違いが認められなかった。これは, 座位中心の生活環境において1日に合計1時間程度の運動を行うことと, 意識的な運動は行わないが活動的な生活とが, ほぼ同等の活動量であることを示している。また, C群では, D群やE群に比べ総メッツ値では有意な低値を示すにも関わらず,  $VO_2\max$  に差は認められず, かつA群, B群よりも高い傾向を示した。よって, C群, D群のように, 座位中心の生活であっても, 「速歩」に値する活動を2時間程度, あるいはまた1時間程度の「筋運動」を多く持つことが, 有酸素能力の向上に有効と考えられた。

4) 体格の指標は, いずれもF群が明らかな低値を示し, WHR においてE群がB群に比し有意な低値を示し, %fat, BMI においては, C群やE群がA群やB群よりも小さな平均値を示す傾向であったことから, 身体活動の体格に及ぼす好影響が示唆された。

5) 血圧については, 最も活動量の多いF群が有意な低値を示し, 血液データでは, D群, F群とA群において, GPT と中性脂肪に有意な違いが認められた。これらの値の改善には, 対象者の活動状況を把握し, 状況に応じた指導をすることが有効と考えられる。

## 結論

身体活動に着目した保健指導では, A群の人は「歩く」時間を2時間増やしB群に, B群は「速歩」に該当する時間を1時間増やしC群に, 日常生活において徐々に活動量を増やすことが強調されるべきであり, 本研究で示された成果は, 生活習慣病予防を目的とした生活指導において, きわめて有効な指標となるであろう。

## 論文審査結果の要旨

「中年男性の身体活動から捉えた日常生活, 有酸素能力, および健診成績」

### 1. 研究目的の評価

本研究は中年男性の日常生活の身体活動をタイプ別に6分類して, 身体活動と有酸素能力および健康水準 (健診成績など) との関連を明らかにしようとするものであり, 目的は十分に妥当である。

### 2. 研究手法に関する評価

この種の研究成果を左右すると考えられる種々の標本選択バイアスを可能なかぎり排除するようにデザインされており, また対象者数も288人と十分であり, さらに適切な統計学的解析法を用いており研究手法も妥当である。

### 3. 解析・考察の評価

日常生活における積極的な運動の導入は血圧, 中性脂肪, 肝機能, BMI などに明らかな好影響を与えていた。また, 積極的な運動を取り入れていなくても, 歩行, 階段の上り下りなどを心がけることが健康水準を高めていることを明らかにした。これは生活習慣病のハイリスクグループである座位中心で非活動的な中年男性の保健指導に貢献するところが大きい。

以上のように本論文は中年男性における生活習慣病の予防に貢献するところが大きく, 審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 齋藤 寛  
副査 教授 竹本 泰一郎  
副査 教授 相川 忠臣

梶山 浩史

(福岡県)昭和38年10月6日生

授与年月日 平成14年1月31日

主論文 Micronutrient Status and Glutathione Peroxidase in Bedridden Patients on Tube Feeding

(経管栄養を受けている長期臥床患者の微量元素とグルタチオンペルオキシダーゼの状態)

Hirofumi Kajiyama, Kunihiko Murase, Takashige Miyazaki, Hajime Isomoto, Yasuhiro Fukuda, Noriko Yamazawa, Hiroshi Soda, Fuminao Takeshima, Yohei Mizuta, Ikuo Murata, Shigeru Kohno

The Journal of International Medical Research 29: 181 - 188 (2001)

長崎大学医学部内科学第二教室

(主任:河野 茂教授)

論文内容の要旨

緒言

経鼻チューブや内視鏡的胃瘻等の経腸栄養は脳血管障害患者の栄養管理に大きく寄与しているが、エネルギー栄養欠乏と同様に種々の微量元素欠乏症の危険性がある。人ではセレン、亜鉛、銅、マンガンを含む微量元素が必要であり、これらの微量元素の不足は老化や心血管疾患発症や発癌の原因として注目されている。これら無機質防御効果のいくつかは抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼ活性に関連していると考えられる。経管栄養を受けている長期臥床患者の微量元素欠乏についての研究は少なく、経管栄養を受けている長期臥床患者で微量元素の1日摂取量と血中微量元素レベルとの関係も明らかにされていない。この研究の目的は経管栄養を受けている長期臥床患者の血清中の微量元素の欠乏とGSH Px活性の関連を検討することである。

対象と方法

対象者は長崎県内の5病院(三原台病院,小江原中央病院,千住病院,百合野病院,長崎大学医学部付属病院)で6ヶ月以上経管栄養を受けている30名(男性10名,女性20名,平均年令81.6才)の臥床患者と,コントロールとして経管栄養を受けていない21人(男性5名,女性16名,平均年令83.3才)の入院患者を対象とした。

1) 10種の市販の経腸栄養中の亜鉛,銅,マンガンの摂取量は公表資料に記載のある濃度と各患者の経管栄養の一日量から算出した。セレンについては東レリサーチセンター(滋賀)で原子吸光分析法で濃度を測定し算出した。

2) 血清のセレンはフレイムレス原子吸光分析法で,亜鉛,銅,マンガンはフレイム原子吸光分析法を用い測定した。血清GSH - Pxの酵素活性は血清GSH Px EIA Kit (OXIS International)で測定した。

3) 血清微量元素と対数化したGSH Px値は平均±標準偏差で表した。血清微量元素と対数化したGSH Pxの関係はピアソン解析を行った。

結果

1) セレン1日摂取量(14.0±4.4μg/day)と亜鉛1日摂取量(1.9±0.9mg/day)は食物栄養委員会の推奨する量の25%以下の量であった。銅1日摂取量(1.6±0.7mg/day),マンガン1日摂取量(1.5±0.6mg/day)は推奨量が投与されていた。

2) 経管栄養群の患者の血清セレン,銅,マンガン濃度はコントロール群に比較して有意に低下していた(セレン:4.85±1.38 vs 8.67±1.45μg/dl,銅:44.7±36.9 vs 92.1±21.2μg/dl,マンガン:0.59±0.41 vs 1.52±0.59μg/dl; P<0.0001)。亜鉛と血清GSH Px値はコントロール群と差は認められなかった(亜鉛:70.8±13.6 vs 71.00±13.6μg/dl,logGSH Px:0.71±0.21 vs 0.64±0.18ng/ml)。

3) 経管栄養の患者において血清セレン濃度は一日摂取量と相関関係が認められたが(r=0.502, P<0.01),亜鉛や銅,マンガンの濃度は相関が認められなかった。

4) GSH Pxはコントロール群の患者において血清セレン濃度と相関関係を認めたが(r=0.442, P<0.05),経管栄養の群では相関は認められなかった。

考察

今回の研究において経管栄養患者のセレン,亜鉛の一日摂取量は他の報告の推奨される量より少なく,またコントロール群の患者に比べ血清亜鉛を除くセレン,銅,マンガン量が有意に低値であることが示された。中国のセレン欠乏地域に多くみられる克山病の主要な原因はセレンの欠乏で,セレン補充で肥大型心筋症の予防が可能であると報告され,またYangとXiaは克山病の患者の平均セレンの摂取量は11μg/day以下であることを報告している。今回の研究で経管栄養を受けている患者の平均セレンの摂取量は14μg/dayで,アメリカ食物栄養委員会の推奨量の25%以下であり,フランスやニュージーランドの推奨量より明らかに低値であった。今回の対象患者では胸部X線写真や心電図では克山病の診断のつく患者は認められなかった。克山病は主にセレン欠乏地域の農村に生活する子供や若い女性に多い病気であり,従って低セレン血症の高齢者ではめったに発症しない可能性が示唆された。

セレンはGSH Pxに多く含まれる。我々の研究ではコントロール群の患者で血清GSH Px活性はセレ

ン濃度に正の相関を示したが、経管栄養の患者では相関関係は認められなかった。以前の報告では GSH Px 活性は血清セレン濃度と相関するとされてきたが、セレン濃度が高い健康ボランティアが対象であり、また Daniels 等は新生児期において血清 GSH Px 活性はセレンの信頼できるマーカーとなり得ないと報告している。我々の結果は同様に高度の低セレン血症の経管栄養患者において血清 GSH Px 活性はセレンの信頼できるマーカーとなり得ないことを示唆している。

結論として高齢の経腸栄養患者においてセレン欠乏はしばしば見られ、経腸栄養に含まれるセレン量では正常のセレンレベルを保つには不十分であると思われた。これらの結果により経管栄養患者の微量元素欠乏をさけるため微量栄養素のモニターが重要と考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

経管栄養を受けている長期臥床患者の血清中の微量元素とグルタチオンペルオキシダーゼ活性の関連を検討することにより経管栄養患者の微量元素欠乏状態の解析を目的としたものであり、十分な妥当性がある。

#### 2. 研究手法に関する評価

6ヶ月以上経管栄養を受けている30名の臥床患者と、コントロールとして経管栄養を受けていない21名の入院患者血清中の微量元素を原子吸光法で測定し、グルタチオンペルオキシダーゼ活性はEIA法で定量しており、これらのデータを統計学的解析したもので、研究手法も妥当である。

#### 3. 解析・考察の評価

高齢の経管栄養患者でセレン欠乏が多く認められ、これらの患者では血清セレン濃度とグルタチオンペルオキシダーゼ活性は相関しないことを見出しており、経管栄養患者の微量元素欠乏を予防するためにこれらの微量元素のモニタリングが重要であることを指摘しており、長期臥床患者の栄養管理に対して重要な提言をしたものと高く評価できる。

以上のように、本論文は、経管栄養を受けている長期臥床患者の栄養管理の向上に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 中園 一郎  
副査 教授 竹本 泰一郎  
副査 教授 兼松 隆之

### 中 村 貴

(長崎県)昭和41年10月6日生

授与年月日 平成14年1月31日

主論文 Direct Interaction between a Quinoline Derivative, MS-209, and Multidrug Resistance Protein (MRP) in Human Gastric Cancer Cells

(ヒト胃癌培養細胞におけるキノリン誘導体 MS 209 と多剤耐性タンパクの直接的関連)

Takashi Nakamura, Mikio Oka, Kikuo Aizawa, Hiroshi Soda, Minoru Fukuda, Kenji Terashi, Koki Ikeda, Yohei Mizuta, Yuji Noguchi, Yoshimitsu Kimura, Takashi Tsuruo, and Shigeru Kohno

Biochemical and Biophysical Research Communications 255: 618 - 624, 1999

長崎大学医学部内科学第二教室

(主任:河野 茂教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒 言

がん細胞はしばしば、構造や作用機序の異なる多くの薬剤に対して耐性となる。その多剤耐性機序の因として P 糖タンパク (Pgp, P glycoprotein) や多剤耐性タンパク (MRP, Multidrug Resistance Protein) が過剰発現し、細胞内に流入してきた抗がん剤を細胞外に能動輸送することによって耐性となる。これまで Pgp の関与する耐性を克服する薬剤が数多く報告されており、新規キノリン化合物である MS 209 は、副作用の出現しない濃度で Pgp による耐性を克服することが知られている。MRP では probececid などが MRP を介した薬物の輸送を阻害する。

本研究では、doxorubicin (DOX) で選択した MRP 過剰発現胃癌細胞を用いて、MS 209 と MRP の関連を調べ、MS 209 が MRP の関与する多剤耐性を克服しうるかを検討した。

#### 材料と方法

1) 細胞株:胃癌株の SCH, HGC27, KATOIII と MKN 45 を DOX によって選択した多剤耐性胃癌株 MKN 45R0.05, MKN45R0.8 を用いた。MRP と Pgp 陽性コントロールとして HL60R と MCF7/ADR を用いた。

2) RNA 抽出と半定量的 RT-PCR 法:すべての細胞株からの RNA 抽出は guanidine isothiocyanate 法で、RT-PCR 法は Narasaki らの方法で行い、陽性コントロール細胞の MDR1, MRP mRNA 発現との比を G3PDH にて補正した。

3) 抗癌剤感受性試験:MTT 法で行った。細胞数は

7.5×10<sup>3</sup>個/wellとして各種抗癌剤の濃度系列を作成した。MS 209は細胞毒性の生じない濃度で加えた。96時間抗癌剤と接触させ、50%細胞発育抑制濃度を比較した。

4) 膜小胞の作成と〔<sup>3</sup>H〕LTC<sub>4</sub>取り込み試験：膜小胞と〔<sup>3</sup>H〕LTC<sub>4</sub>の作成はChumanらの方法に従った(Biochem. Biophys. Res. Commun., 226: 158-165; 1996)。

5) Calcein 排出試験：0.25μMのCalceinを調整し30分間取り込ませ、さらに60分間排出させた。冷PBSで反応を停止させ、各々の細胞はFACScanにて測定した。

6) 細胞内〔<sup>3</sup>H〕VCR蓄積試験：30nMの〔<sup>3</sup>H〕VCRを加え培養を行った後に回収し、細胞内の〔<sup>3</sup>H〕VCRの取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。

### 結果と考察

1) ヒト胃癌株におけるMRP, MDR1遺伝子の発現と抗癌剤感受性

胃癌野生株でMRP mRNAはSCHに低発現, HGC 27に中発現, KATOIIIに高発現していた。多剤耐性株ではMKN45R0.05, MKN45R0.8にMRP mRNAが過剰発現していた。いずれの細胞株においてもMDR mRNAの発現を認めなかった。多剤耐性株はetoposide (VP 16), vincristine (VCR)に高い交叉耐性を示した。

2) 膜小胞を用いた〔<sup>3</sup>H〕LTC<sub>4</sub>取り込み試験

MS 209はprobenecidと同様に、膜小胞への〔<sup>3</sup>H〕LTC<sub>4</sub>取り込みを有意に阻害した。

3) Calcein 排出試験

MS 209は胃癌野生株および、多剤耐性株にて細胞のMRP mRNA発現の程度に相関して細胞内Calceinの排出抑制が認められた。

4) 細胞内〔<sup>3</sup>H〕VCR蓄積試験

MS 209は、MRP mRNA発現の程度に相関して細胞内〔<sup>3</sup>H〕VCRの蓄積を上昇させた。

5) 抗癌剤感受性増強試験

各細胞にてMRP mRNAの発現程度に応じDOX, VP-16, VCRに耐性が強まり、さらにMS 209はMRP mRNAの発現程度に応じて抗癌剤感受性を高めた。MRP過剰発現の多剤耐性株では、その耐性は完全に克服された。

### 結語

MS 209は臨床使用可能な濃度で、濃度依存性にLTC<sub>4</sub>やCalcein, VCRの細胞外輸送を阻害し、MRPの関与する抗癌剤耐性を克服する。すなわち、MRPとPgpの関与した耐性を克服する有効な薬剤である。現在、MS 209はヨーロッパを中心に臨床試験が開始さ

れ、抗癌剤との併用効果が検討されている。

### 論文審査結果の要旨

1. 研究目的の評価

がん細胞の多剤耐性獲得機構の一つとしてP糖タンパク(Pgp)や多剤耐性タンパク(MRP)による抗癌剤の細胞外への輸送機構が知られている。多剤耐性の克服のためにはこれらの機構の阻害が必須となるが、新規キノリン化合物MS 209の作用はPgpを介した薬物輸送阻害とされてきた。本研究はMS 209の、MRPによる多剤耐性獲得機構への阻害効果を検討したものであり、研究の動機、目的、意図は明確である。

2. 研究手段に関する評価

本研究ではPgpの発現(-), MRPの発現(+)である胃癌細胞株について調べられた。4種の胃癌細胞株に加えdoxorubicinで選択してきたMRP過剰発現細胞株2種を用いることでMRP発現量と抗癌剤感受性を検討し、次にMS 209の効果について、膜小胞内へのLeukotrien C<sub>4</sub>取り込み試験, Calcein排出試験, 細胞内抗癌剤蓄積試験から判定した。以上の方法は抗癌剤の効果やその分子機構を探るために最も妥当な手段であると評価できる。

3. 解析, 考察, 総合的な評価

本研究によりMS 209はPgpのみならずMRPの関与する薬剤耐性をも克服できることが示された。MS 209は副作用が少ないことから臨床応用が期待されている薬剤であるが、本研究は今後の臨床応用の基盤となる知見を与えるものとして大いに評価できる。審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	松山	俊文
	副査	教授	近藤	宇史
	副査	教授	関根	一郎

**松尾 信子**

(福岡県)昭和39年10月24日生

**授与年月日** 平成14年1月31日**主論文** Tacrolimus Inhibits Cytokine Production and Chemical Mediator Release Following Antigen Stimulation of Passively Sensitized Human Lung Tissues

(タクロリムスによる, 受動感作ヒト肺組織におけるサイトカイン産生の抑制, 及び化学伝達物質遊離の抑制)

Nobuko Matsuo, Terufumi Shimoda, Hiroto Matsuse, Chizu Fukushima, Kazuko Mitsuta, Yasushi Obase, Shigeru Kohno

Annals of Allergy, Asthma, & Immunology  
86巻6号671 - 678 2001年

長崎大学医学部内科学第二教室

(主任: 河野 茂教授)

**論文内容の要旨****緒言**

タクロリムスは炎症細胞からのサイトカイン産生を阻害することにより免疫抑制作用を発揮することが知られており, 各種実験動物モデルにおいても, 臓器移植後の拒絶反応抑制効果のみならず, 炎症性疾患, アレルギー性疾患に対しても効果があり, 臨床応用が期待されている薬剤である。この研究は, タクロリムスが, ヒト切除肺からの IL 5 と TNF  $\alpha$  の産生及び, 化学伝達物質の遊離を抑制するか否かを検討し, ステロイド薬の効果と比較検討することを目的として行った。

**方法**

ヒト肺組織はダニ RAST スコア 5 以上のアトピー患者血清で 2 時間受動感作後, タクロリムス, あるいはデキサメサゾンとともに 2 時間 preincubation し, 1.5  $\mu$ g/ml のダニ抗原を加えて 48 時間培養した。0.5, 1, 4, 8, 24, 48 時間後に培養上清を回収し, ELISA 法で IL 2, IL 4, IL 5, IL 6, IL 8, TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$  を測定した。また, IL 5 と TNF  $\alpha$  に関しては, m RNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。化学伝達物質に関しては, 0.5 時間後の培養上清でヒスタミンを, 1 時間後の培養上清でロイコトリエン E4 を測定した。

**結果**

培養上清中の TNF  $\alpha$  蛋白は特異的抗原刺激により, 刺激の 2 時間後より産生を認め, 遊離のピークは 4 時間後 (320.20  $\pm$  81.09 pg/ml) であった。デキサメサゾンで前処置したものは 46.60  $\pm$  8.60 pg/ml ( $p < 0.0001$ ),  $10^{-8}$  M のタクロリムスで前処置したものは, 90.60  $\pm$  11.99 pg/ml ( $p < 0.0001$ ) で, とともに抑制が見られた。

培養上清中の IL 5 は, 特異的抗原刺激により, 刺激の 4 時間後より産生を認め, 遊離のピークは 24 時間後 (87.40  $\pm$  0.06 pg/ml) であった。デキサメサゾンで前処置したものは 25.40  $\pm$  2.31 pg/ml ( $p < 0.0001$ ),  $10^{-8}$  M のタクロリムスで前処置したものは 25.00  $\pm$  2.26 pg/ml ( $p < 0.0001$ ) と, とともに抑制がみられた。肺組織で RT-PCR を行ったところ, TNF  $\alpha$  と IL 5 の mRNA の発現は, 特異的抗原刺激の 1 時間後から認められ 24 時間持続していた。 $10^{-8}$  M のタクロリムスとデキサメサゾンは, とともに IL 5, TNF  $\alpha$  を mRNA レベルで抑制していた。また, 刺激後 30 分のヒスタミン遊離 (410.00  $\pm$  44.61 nmol/L) を  $10^{-8}$  M のタクロリムスは有意に抑制した。(56.60  $\pm$  10.67 nmol/L), 刺激後 60 分のロイコトリエン遊離 (1852.00  $\pm$  341.58 pg/ml) についても  $10^{-8}$  M のタクロリムスは有意に抑制した。(800.20  $\pm$  65.26 pg/ml)。デキサメサゾンはヒスタミンやロイコトリエンの遊離に影響を与えなかった。

**結語**

タクロリムスはヒト肺組織からの IL 5, TNF  $\alpha$  産生を濃度依存性に抑制し, その効果は  $10^{-8}$  M ではデキサメサゾンとほぼ同等であった。また, タクロリムスには, デキサメサゾンにおいては見られなかったヒスタミンとロイコトリエンの遊離についても, 濃度依存性の抑制効果が見られた。これらの結果から, タクロリムスは気管支喘息の治療において, ステロイド剤以上に有用な薬剤になりうる可能性が示唆された。

**論文審査の結果の要旨****学位論文題名**

「タクロリムスによる受動感作ヒト肺組織におけるサイトカイン産生の抑制, 及び化学伝達物質遊離の抑制」

**1. 研究目的の評価**

本研究は, タクロリムスがアレルギー刺激によるヒト切除肺からの IL 5 と TNF  $\alpha$  の産生及び, 化学伝達物質の遊離を抑制するか否かを検討し, ステロイド薬の効果と比較しようとしたもので, その目的は十分に妥当である。

**2. 研究方法に関する評価**

ヒト肺組織をアトピー患者血清で受動感作後, 薬剤と共に培養し, ダニ抗原を添加し, 培養上清中のサイトカイン産生及び化学伝達物質の遊離を ELISA 法や RT-PCR 法を用いて測定したもので, その研究手段も妥当である。

**3. 解析・考察の評価**

タクロリムスはヒト肺組織からの IL 5, TNF  $\alpha$  産生とヒスタミン, ロイコトリエン遊離を濃度依存性に抑制することを明らかにしたもので, タクロリムスの新たな作用機構を明らかにし, 今後の臨床応用が大きい。

に期待される。

以上のように、本論文は免疫抑制剤タクロリムスのアレルギー疾患への作用機構の一端を明らかにしたもので、医学の進歩に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	江口勝美
	副査	教授	小路武彦
	副査	教授	綾部公懿

**松尾清隆**

(長崎県)昭和39年6月6日生

授与年月日 平成14年1月31日

**主論文** The Prevalence, Incidence, and Prognostic Value of the Brugada-Type Electrocardiogram A Population-Based Study of Four Decades

ブルガダ型心電図の有病率、罹患率および予後 40年間の集団調査

松尾清隆, 赤星正純, 中島栄二, 陶山昭彦, 瀬戸信二, 早野元信, 矢野捷介

Journal of American College of Cardiology, Volume 38, Issue No.3, Pages 765 - 770, 2001

長崎大学医学部第三内科教室

(主任: 矢野捷介教授)

**論文内容の要旨**

**緒言**

心臓に明らかな器質的異常のない心室細動(VF),いわゆる特発性VFは、病院外心停止から生還した患者の1%~9%を占める。1992年にBrugadaらは、12誘導心電図の「右脚ブロックおよび右側胸部誘導におけるST上昇」で特徴づけられる8例の特発性VF患者(ブルガダ症候群)を報告した。それ以来、この特有な心電図所見(ブルガダ型心電図)と突然死との関係がにわかに注目されるようになって来たが、ブルガダ型心電図の疫学的情報については不明な点が多い。今回、私たちは放射線影響研究所(長崎)における検診者の40年間の追跡調査に基づいて、ブルガダ型心電図の一般集団における有病率、罹患率および予後を調査した。

**対象と方法**

1958年以降、隔年の検診を受けてきた合計7,564人(男性3,374人,女性4,190人)のうち1958年に50歳未満であった4,788人(男性1,956人,女性2,832人)が調査対象となった。各検診において、問診(胸痛,失神の有無など),理学検査,標準12誘導心電図および胸部X線撮影が施行された。1958-1959年(初回検

診)から1998-1999年(第21回検診)までのデータが解析された。

ブルガダ型心電図は、1) V1誘導における右脚ブロックを表すQRS波終末部のr'波, 2) V1またはV2誘導における0.1mVの凸型ST上昇, 3) V2またはV3誘導における0.1mVの凹型ST上昇と定義した。

死因は死亡診断書から判断し、突然死は病院外で発生し急変から1時間以内の死と定義した。一方、VFによる失神が事故原因として推定される場合を原因不明の事故死とし、これら突然死と事故死を併せて不慮の死と定義した。

**結果**

合計32人のブルガダ型心電図例が観察期間中に見つかった。有病率は146人/10万人,罹患率は14人/10万人年であった。罹患率は男性が女性より9倍高く,平均罹患年齢は45±10.5歳であった。ブルガダ型心電図は多くの例で観察期間中に間欠的に出現していた。32人のブルガダ型心電図例のうち,突然死が5例,原因不明の事故死が2例で病死が14例であった。不慮の死による死亡率はブルガダ型心電図例(7人/32人)が対照者(20人/4,756人)より有意に高かった(p<0.01)。ブルガダ型心電図例の中では,不慮の死を起こした群に失神の既往が有意に多く認められた(p<0.05)。

ブルガダ型心電図は日本人成人の中ではそれほど稀な所見ではない。ブルガダ型心電図を有する人は不慮の死を引き起こすリスクが高いと考えられる。

**考察**

ブルガダ型心電図の有病率は1995年以降,いくつか報告されている(100人/10万人程度)が,それらと今回の結果はほぼ同等であった。一方,ブルガダ型心電図の罹患率の算出には長期観察に基づくデータが必要であるため,これまで他に報告がなく,ブルガダ症候群の診断・治療を行っていく上で私たちの結果は非常に重要なものと考えられる。ブルガダ型心電図は間欠的に出現していたため,その診断には繰り返し心電図を記録することが重要である。また,その発生率は心電図記録回数に依存することも推定されるため,今回算出された罹患率は2年ごと検診による心電図記録という条件に従った結果である。

ブルガダ型心電図の間欠的な出現様式,性差(男性に圧倒的に多い),および40歳代を中心とした発症年齢分布は,実際にVFから生還したブルガダ症候群患者の特徴と一致した。ブルガダ型心電図例には対照者に比し不慮の死が有意に多かったが,剖検情報がないため,不慮の死がすべて特発性VFによって起きたとは断定できない。なぜなら,死因として急性心筋梗塞



や大動脈瘤破裂などを否定することが不可能なためである。そこで私たちは、Cox proportional hazards modelを用いてブルガダ型心電図例には全対照者に比し不慮の死のリスクが統計的に高いことを証明した。

今回、長期追跡調査によって一般集団におけるブルガダ型心電図の有病率、罹患率を明らかにした。ブルガダ型心電図を有する人にはVFによる不慮の死のリスクが高いと推定されることから、今後、より精度の高い心電図診断基準を用いたブルガダ症候群のスクリーニングが必要と考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

#### 1. 研究目的の評価

本研究は、特発性心室細動による突然死との関係が最近にわかに注目されるようになってきたBrugada型心電図例の一般集団における有病率、発生率および予後を明らかにしようとしたもので、目的は十分に妥当である。

#### 2. 研究手法に関する評価

隔年検診の対象者約4,800人について、第1回検診時(1958-1959年)から40年間の追跡調査で得られた標準12誘導心電図の精査によって抽出したBrugada型心電図例および死亡診断書に基づいて適切に定義された不慮の死を基に、Brugada型心電図例の有病率および発生率の推定ならびに予後を検討しており、研究手法は妥当である。

#### 3. 結果・考察の評価

Brugada型心電図例は、発生率が10万人年当り14人と一般集団において決して稀ではなく、女性に比し男性に9倍多く発生し、男性の好発年齢は30-40歳台であった。その予後についても不慮の死のリスクが対照に比してきわめて高く、アジアに多いといわれるポツクリ病との関連も示唆された。さらに、Brugada型心電図例で不慮の死を遂げた者には失神の既往が多く認められたことも世界で初めて明らかにしており、研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は突然死の研究、対策に貢献するところが大きく、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 柴田 義貞  
副査 教授 齋藤 寛  
副査 教授 江石 清行

### 川原 康 弘

(長崎県)昭和39年10月21日生

授与年月日 平成14年1月31日

主論文 MR Assessment of Meniscal Movement During Knee Flexion: Correlation with the Severity of Cartilage Abnormality in the Femorotibial Joint

膝関節屈曲における半月板の移動のMRIによる検討：大腿脛骨関節の軟骨異常の重症度との関係について

川原康弘, 上谷雅孝, 淵 和範, 江口弘徳, Rashid Hashmi, 林 邦昭

Journal of Computer Assisted Tomography, 25巻, 683-690頁, 2001年

長崎大学医学部放射線科

(主任: 林 邦昭教授)

### 論文内容の要旨

#### 緒 言

膝関節屈曲時には半月板は後方へ移動するが、その距離は前角が後角より大きく、前後角間の距離は短縮すると報告されている。大腿骨顆の曲率半径は後方で小さく、屈曲における半月板前後角間の距離の短縮は、大腿骨顆-半月板の接触を常に保つための生体力学的反応と考えられる。本研究の目的は、屈曲時の半月板の前後角間距離の短縮と大腿脛骨関節の軟骨異常との関係をMRIを用いて明らかにすることである。

#### 対象と方法

対象は35例、35膝関節で、1 Tesla MR装置(Magnetom; Siemens Medical Systems), flexible surface coilを使用した。円板状外側半月板を有する1例と外側半月板前角が欠損する1例は内側半月板、内側大腿脛骨関節のみ対象とした。高速spin-echo(TSE)法で膝関節の伸展位と45度屈曲位の矢状断像を撮像し、伸展位での3D脂肪抑制SPGR矢状断像も撮像した。

TSE法で得られた像で脛骨内、外顆それぞれの中央を通る断面を選択し、伸展位-45度屈曲位での半月板の前後角間距離の短縮率(前後短縮率)を測定した。3D脂肪抑制SPGR像で大腿脛骨関節の4つの関節面(大腿骨内・外顆, 脛骨内・外顆)における軟骨のgrade分類(grade 0~3)を行った。内・外側大腿脛骨関節それぞれの軟骨正常群(grade 0)と異常群(grade 1~3)での半月板の前後短縮率を比較し、前後短縮率と軟骨異常のgradeとの相関関係を求めた。さらに、大腿骨顆の下面径2cm, その後方(後下面)の径2cmにおける軟骨のgrade分類を行い、その軟骨のgradeと半月板の前後短縮率の相関関係を求めた。

#### 結 果

内側大腿脛骨関節の軟骨異常は35例中20例, 外側大

腿脛骨関節の軟骨異常は33例中9例に認めた。内側半月板の前後短縮率は内側大腿脛骨関節の軟骨異常群が正常群に比し有意に小さかった ( $p < 0.0001$ )。外側半月板の前後短縮率は外側大腿脛骨関節の軟骨異常群が正常群に比し有意に小さかった ( $p = 0.0288$ )。

内側半月板の前後短縮率は大腿骨、脛骨の軟骨の grade と負の相関を示した ( $r = -0.779, p < 0.0001, r = -0.751, p < 0.0001$ )。内側半月板の前後短縮率は大腿骨顆の下面、後下面の軟骨の grade と負の相関を示したが、相関関係は後下面の軟骨の方が強かった ( $r = -0.646, p < 0.0002, r = -0.764, p < 0.0001$ )。外側大腿脛骨関節の軟骨異常群は症例数が少なく、この軟骨の grade と外側半月板の前後短縮率の相関関係は検討できなかった。

**考察**

膝関節屈曲における半月板の動きは正常例では比較的详细に検討されている。半月板は後方へ移動し、その距離は前角が後角より大きいとの見解は一致している。また、変形性膝関節症では半月板の側方への亜脱臼が見られることが報告されており、その程度は大腿脛骨関節の関節腔の狭小化と相関関係があるとされている。しかし、膝関節屈曲時における半月板の動きと関節軟骨異常との関係は検討されていない。

本検討では、半月板の前後短縮率は大腿脛骨関節の軟骨異常群で小さく、内側半月板の前後短縮率は内側大腿脛骨関節の軟骨異常の重症度と負の相関を示していた。大腿骨顆の曲率半径は後方で小さくなることから、屈曲位での半月板 - 大腿骨の接触面の減少が軟骨変性に関係していることが示唆される。半月板 - 大腿骨の接触面の減少は大腿骨 - 脛骨の接触面における荷重の増大や不安定性の増強をまねき、軟骨変性に關与しうると推測される。

内側半月板の前後短縮率は大腿骨顆下面の軟骨よりその後方の軟骨の異常と強い相関関係を示したが、大腿骨顆後下面が屈曲位での脛骨との接触部であることを考慮すると、我々の考えで説明できる。半月板の前後短縮率の減少は変形性膝関節症の発症、進行と関係しているのかもしれない。単純写真で変形性膝関節症での関節腔狭小化は伸展位より屈曲位で強く見られるとの報告があるが、このことは我々の考えを支持するものと思われる。

以上、膝関節屈曲における半月板の移動と大腿脛骨関節の軟骨異常との関係を検討した。屈曲時における半月板の前後短縮率の減少は軟骨変性と密接な関係があることが示された。

**論文審査の結果の要旨**

論文名：

膝関節屈曲における半月板の移動のMRIによる検

討：大腿脛骨関節の軟骨異常の重症度との関係について

1. 研究目的の評価

膝関節の伸展 - 屈曲の動態の中での膝半月の可動性を検討し、半月の機能と関節軟骨異常との関係を究明しようとする目的は明快かつ妥当である。

2. 研究手法に関する評価

MRI を用いて非侵襲的に、生体内において膝運動下での膝半月の動態と関節軟骨の形態異常の程度との関連を追究しようとの本研究法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

MRI 画像上において、関節軟骨の形態異常の程度と膝半月の動態的な移動量が負の相関を示した結果は、変形性膝関節症の病因ならびに病態を解明する上で、有益な情報の一つと評価できる。今後症例を普遍化して更なる評価意義の発展が期待される。

以上のように、本論文はMRIによる膝半月の新しい画像評価法の進歩に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	進藤	裕幸
	副査	教授	長島	聖司
	副査	教授	江口	勝美

**萩島 政之**

(埼玉県)昭和39年10月24日生

授与年月日 平成14年1月31日

主論文 Z-338 Facilitates Acetylcholine Release from Enteric Neurons Due to Blockade of Muscarinic Autoreceptors in Guinea Pig Stomach

(Z-338はモルモット胃においてムスカリン自己受容体を阻害することにより腸管神経からのアセチルコリン遊離を促進する)

(MASAYUKI OGISHIMA, MUNESHIGE KAIBARA, SHIGERU UEKI, TADASHI KURIMOTO and KOHTARO TANIYAMA)

(The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Vol. 294, No.1, 33 - 37, 2000)

長崎大学医学部薬理学第二教室

(主任：谷山紘太郎教授)

**論文内容の要旨**

**緒言**

新規化合物 Z 338は、覚醒下イヌにおいて胃前庭部運動および胃排出能の亢進作用、およびモルモット胃前庭部標本の収縮作用を発現する。また、アセチルコ

リンエステラーゼ阻害作用を有することが知られている。既存の消化管運動改善薬は腸管神経からのアセチルコリン (ACh) 遊離を調節することで効果を発揮しているものが多い。しかし、Z-338の消化管運動亢進作用の機序については明らかでない。本研究ではモルモット胃標本を用いてZ-338の作用機序を解析するために、本化合物のACh遊離に対する作用、ならびに作用点について検討した。

#### 対象と方法

- ① 張力測定実験：モルモット胃前庭部標本を、2本の白金電極間に懸垂し、灌流液にて標本表面を灌流した。標本に経壁電気刺激 (ES) (1 msec duration, 10V intensity) を加え、発生する張力を測定した。薬物はESの一定時間前に適用した。
- ② ACh遊離実験： $[^3\text{H}]$  choline を取り込ませたモルモット胃体部標本を灌流装置に固定した。標本にはES (1 msec duration, 15V intensity) を加え、一定間隔で回収した灌流液中の放射活性を測定した。薬物はESの一定時間前に適用した。
- ③ 受容体結合実験：ラットの大脳皮質、心臓および顎下腺より作製した膜標品に対する、ムスカリン  $M_1$ ,  $M_2$  および  $M_3$  受容体の放射性物質標識特異的拮抗薬の結合実験を行い、それぞれの受容体への結合に対するZ-338の置換能力を測定した。
- ④ 受容体再構成系を用いた実験：ムスカリン  $M_1$  および  $M_2$  受容体のcRNAを、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、卵母細胞に  $M_1$  または  $M_2$  受容体を発現させた。この卵母細胞を用いて、膜電位固定法による電気生理学的実験を行った。

#### 結果

- ① モルモット胃前庭部標本において、ESにより収縮が発生した。この収縮はムスカリン受容体拮抗薬であるatropine、あるいは $\text{Na}^+$  channel阻害薬であるtetrodotoxin (TTX) により消失した。Z-338 (3 ~ 100 $\mu\text{M}$ ) はES誘発収縮を濃度依存的に増加させた。
- ② モルモット胃体部標本において、灌流液中の $[^3\text{H}]$  量は、ESにより増加した。TTX処置および灌流液中の $\text{Ca}^{2+}$  除去は、ES誘発 $[^3\text{H}]$  量増加を抑制した。Z-338 (10 $\mu\text{M}$ ) はES誘発 $[^3\text{H}]$  量増加を促進した。一方、pirenzepine (ムスカリン  $M_1$  受容体拮抗薬) およびAF-DX116 (ムスカリン  $M_2$  受容体拮抗薬) もES誘発 $[^3\text{H}]$  量増加を促進した。
- ③ 受容体結合実験において、Z-338は大脳皮質への $[^3\text{H}]$  pirenzepineの特異的結合 ( $M_1$  受容体) および心臓への $[^3\text{H}]$  N methyl scopolamine (NMS) の特異的結合 ( $M_2$  受容体) を濃度依存的に阻害したが、顎下腺への $[^3\text{H}]$  NMSの特異的結合 ( $M_3$  受容体) に

は影響しなかった。

- ④ 卵母細胞に発現させた  $M_1$  受容体および  $M_2$  受容体において、AChはそれぞれ内向き電流を発生させた。Z-338 (1 ~ 100 $\mu\text{M}$ ) は電流を発生しなかったが、AChのそれぞれの受容体を介した反応を濃度依存的に抑制した。

#### 考察

ES誘発収縮はatropineおよびTTXにより抑制され、ES誘発 $[^3\text{H}]$ 遊離はTTXおよび外液 $\text{Ca}^{2+}$ 除去により抑制されたことから、本実験に用いた条件のESは神経を刺激する条件であり、ES誘発収縮はコリン作動性神経から遊離されたAChにより発現するものである。コリン作動性神経が刺激によって活動している状態で、Z-338はACh遊離量を増加させることによって収縮を増大した。受容体結合実験の結果は、Z-338がムスカリン  $M_1$  および  $M_2$  受容体に結合するが、 $M_3$  受容体に結合しないことを示した。一方、再構成系を用いた電気生理学的実験において、Z-338単独は電流を発生させなかったが、AChの  $M_1$  および  $M_2$  受容体を介した反応を抑制した。このことから、Z-338はムスカリン  $M_1$  および  $M_2$  受容体に拮抗薬として作用するものと考えられた。そこでムスカリン  $M_1$  および  $M_2$  受容体拮抗薬がACh遊離を増加するか否かを検討したところ、いずれの拮抗薬もACh遊離を増加したので、従来、腸組織で報告されていたのと同様に、モルモット胃においてもコリン作動性神経上に、ACh遊離に対するnegative feedback機構として働くムスカリン  $M_1$  および  $M_2$  自己受容体が存在することが明らかになった。

以上の結果から、Z-338はムスカリン  $M_1$  および  $M_2$  自己受容体に対する拮抗により、negative feedback機構を解除してACh遊離を増加させ、その結果胃運動を亢進することが明らかになった。本薬物は新しいメカニズムをもつ消化管運動改善薬になるものと期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 1. 研究目的

新規化合物Z-338の消化管運動亢進作用の機序を検討したもので、目的は十分に妥当である。

##### 2. 手段・方法に関する評価

モルモット胃標本による張力測定実験とアセチルコリン遊離実験、ラット大脳皮質、心臓および顎下腺より作製した膜標品を用いたムスカリン  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  リガンド受容体結合実験、およびアフリカツメガエル卵母細胞  $M_1$ ,  $M_2$  受容体再構築系を用いた膜電位固定による膜電位測定法を用いて解析したもので、研究手法も妥当である。

##### 3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、新規化合物Z-338は、ム

スカリン M<sub>1</sub>および M<sub>2</sub>自己受容体に拮抗することで、ネガティブフィードバック機構を解除してアセチルコリン遊離を増加させ胃運動を亢進させることを明らかにし、新しいメカニズムを持つ消化管運動改善薬の開発への進展が大いに期待される。

以上のように、本論文は消化管改善薬開発の進歩に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 丹羽 正 美  
副査 教授 河野 茂  
副査 教授 兼松 隆之

寺田 隆 介

(兵庫県)昭和39年4月3日生

授与年月日 平成14年1月31日

主論文 Evaluation of Metastatic Potential of Gastric Tumors by Staining for Proliferating Cell Nuclear Antigen and Chromosome 17 Numerical Aberrations

(PCNA と17番染色体数的異常同時染色による胃癌転移能の評価)

Ryusuke Terada, Toru Yasutake, Shirou Nakamura, Takashi Hisamatsu, Tohru Nakagoe, Hiroyoshi Ayabe, Yutaka Tagawa

Annals of Surgical Oncology 8 (6): 525 - 532, 2001

長崎大学医学部外科学第一教室

(主任:綾部公認教授)

論文内容の要旨

緒言

17番染色体数的異常は癌の進展に重要な役割をもつことが示唆されている。我々も以前に胃癌のリンパ節転移に17番染色体数的異常が大きく関与することを報告した(J Gastroenterol 1999 ; 34 : 11 - 17)。近年、個々の細胞に対して蛍光色素を利用して、蛋白の染色と fluorescence in situ hybridization (FISH) を同時に施行し、その特性を吟味する新しい技法が試みられている。そこで、今回、我々は、17番染色体数的異常をもつ胃癌細胞の生物学的特性をさらに検討するために Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) と17番染色体セントロメアを同時に染色し、臨床病理像と比較検討した。

対象と方法

- 1 . 当科において切除された胃癌 (105例) と転移リンパ節 (16例) を対象とした。
- 2 . Touch preparation にて細胞をスライドガラスに塗抹し、アセトン-メタノール固定後、PCNA に対する抗体である PC10 (FITC-conjugated, DAKO, Glos-

trup, Denmark) を反応させた。さらにパラホルムアルデヒドにて再固定し、17番染色体セントロメアに対する FISH を DNA probe として D17Z1 (biotin-labeled, alpha-satellite centromere probe) を用い、施行した。

- 3 . Dual bandpass filters を用いて、蛍光顕微鏡で観察し、200個の癌細胞について PCNA (+ または -) および17番染色体数的異常の有無を調べ、細胞を Group 1 : PCNA(+), 17番染色体数的異常(+), Group 2 : PCNA(-), 17番染色体数的異常(+), Group 3 : PCNA(+), 17番染色体数的異常(-), Group 4 : PCNA(-), 17番染色体数的異常(-) の4群に分類、病理組織像と比較した。

結果

- 1 . Group 1 , 2 , 3 , 4 の細胞比率はそれぞれ、13.5 ± 7.9% (0 - 44%, 中央値 : 12.0%), 19.3 ± 9.2% (4 - 45.5%, 中央値 : 17.0%), 17.5 ± 8.4% (4 - 54%, 中央値 : 16.5%), 49.7 ± 12.8% (16.5 - 77%, 中央値 : 49.0%) であった。
- 2 . Group 1 の細胞比率はリンパ管侵襲 (p < 0.0001), リンパ節転移 (p < 0.0001), 脈管侵襲 (p < 0.01) と強く相関した。
- 3 . 16例の胃癌症例において Group1 の細胞比率は原発巣に比べ、転移リンパ節において有意に増加していた。(p < 0.01)。
- 4 . 多変量解析では、Group1 の細胞比率は壁深達度に次ぐ、リンパ節転移、リンパ管侵襲に対する重要因子であった。
- 5 . Group 3 の細胞比率はリンパ管侵襲陽性症例において有意に高かった (p < 0.01)。
- 6 . Group 2 , Group 4 の細胞比率はリンパ管侵襲、リンパ節転移、脈管侵襲と相関しなかった。

考察

本研究の結果から Group 2 , 4 の細胞群はリンパ管侵襲、脈管侵襲をおこしにくく、Group1 の細胞群が、容易にリンパ管、脈管に侵入、転移リンパ節ではそのクローン増加が生じることが示唆された。また、Group 3 の細胞比率がリンパ管侵襲陽性症例において有意に高いが、リンパ管転移とは相関しないことから、PCNA 陽性であれば(17番染色体数的異常の有無に関係なく)、リンパ管に侵入しやすい生物学的特性をもっていることが示唆された。さらに今回12例の早期胃癌症例において生検鉗子を用いて採取した腫瘍切片から標本を作成した。このことから本法が胃癌進行度を術前に評価するうえで、有用な分子生物学的手法になり得ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

## 学位論文のタイトル：

Evaluation of Metastatic Potential of Gastric Tumors by Staining for Proliferating Cell Nuclear Antigen and chromosome 17 Numerical Aberrations

## 1. 研究目的の評価

胃癌の転移能を術前に評価できる指標を検討するため、胃癌組織の粘膜層の癌細胞の17番染色体数の異常と細胞増殖性 (Proliferating Cell Nuclear Antigen) を同時染色で観察、細胞特性を探ろうとした目的は明確である。

## 2. 手段方法に関する評価

胃癌切除新鮮標本の粘膜領域の細胞をスライドに塗布、PCNA 免疫染色、その後、7番染色体セントロメアに対する FISH を施行し、蛍光顕微鏡で測定に至る技法とその解析法は妥当である。

## 3. 結果・考察の評価

17番染色体数異常・細胞増殖性 (+) の細胞群は容易にリンパ管 脈管に侵入、転移リンパ節ではそのクローン増加が生じることが示唆され、この細胞の多寡は胃癌の転移能の評価に有用であることを明らかにした。

以上のように、本論文は胃癌の進行度や転移能の判定に有用な方法を提示し、胃癌の治療の発展に寄与するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 関根 一郎  
副査 教授 松山 俊文  
副査 教授 兼松 隆之

## 吉 嶺 裕 之

(長崎県)昭和40年12月6日生

授与年月日 平成14年1月31日

主論文 Community-Acquired Pneumonia in Ugandan Adults: Short-Term Parenteral Ampicillin Therapy for Bacterial Pneumonia

(ウガンダにおける成人市中肺炎：細菌性肺炎に対する短期アンピシリン静注療法の効果)

Hiroyuki Yoshimine, Kazunori Oishi, Francis Mubiru, Hawa Nalwoga, Hidehiko Takahashi, Hideaki Amano, Philip Ombasii, Kiwao Watanabe, Moses Joloba, Thomas Aisu, Kamruddin Ahmed, Masaaki Shimada, Roy Mugerwa, Tsuyoshi Nagataka

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Vol. 64 No. 3, 4 P 172 - 177 2001

長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門感染症予防治療研究分野

(主任：永松 毅教授)

## 論文内容の要旨

## 緒 言

世界の HIV 感染者の約75%がサハラ以南のアフリカに住んでいるが、その多くは先進国にて確立した抗 HIV 療法を受けられず急性呼吸器感染症をはじめとする日和見感染を発症し死亡する。しかしながら治療を行う上で欠かすことのできない起炎菌分布、抗菌力への耐性化の情報はなく、またコストや有効性をふまえた標準的治療として推奨されるものはない。東アフリカのウガンダ共和国では成人の約10%が HIV 感染者であるが、今回我々は同国のマケレレ大学医学部と成人市中肺炎の背景、起炎菌の耐性化の現状およびこれらの症例に対するアンピシリンの有用性についての共同研究を行った。

## 対象・方法

対象は1996年から1999年までにマケレレ大学ムラゴ病院に入院した18歳以上の急性肺炎患者とした。入院時に喀痰塗抹検査、喀痰定量培養、血液培養を行い起炎菌を決定し、CD4 陽性リンパ球数、HIV 抗体 (PA 法および WB 法)により免疫能を評価した。また、*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* 等の非定型肺炎病原体について急性期および回復期のペア血清にて抗体価を測定した。分離された起炎菌に対しては日本化学療法学会標準法に準じ薬剤感受性検査を行った。さらに、登録された細菌性肺炎全症例に対してアンピシリン 1 g 一日二回 3 日間静注投与とこれに続く経口アモキシシリン1500mg 4 日間投与へのスイッチ療法を行い、その有用性を評価した。

## 結 果

99症例が登録された。HIV 1抗体陽性者(以下陽性者)は74症例(75%)であった。陽性者と陰性者間には年齢、性別、臨床所見、白血球数、血清CRP値、経皮的動脈血酸素飽和度、肺炎の拡がり、起炎菌分布などには違いが認められなかった。平均CD4陽性リンパ球数について陽性者(329.8/μl)は陰性者(876.0/μl)と比較し有意に低値であった。起炎菌決定率は48.5%であった。起炎菌としては *Streptococcus pneumoniae* が25株(25.3%)、*Haemophilus influenzae* が10株(10.1%)、*Moraxella catarrhalis* が8株(8.0%)認められた。HIV感染別の起炎菌分布に有意差は認められなかった。なお非定型肺炎病原体に対する有意な抗体価上昇を認めた症例はなく、また臨床的にカリニ肺炎を示唆する症例は認められなかった。*Streptococcus pneumoniae* 19株のうち penicillin G に対する最小発育阻止濃度が0.1μg/ml以上の広義のペニシリン耐性肺炎球菌が18株(95%)と高率に認められ、*Haemophilus influenzae* 8株のうち6株(75%)がβラクタマー

ゼ産性菌であった。

上記の治療プロトコールの有用性が39症例において解析可能であった。有効症例は HIV 抗体陽性者32症例中26症例(81.3%)、陰性者7症例中6症例(85.7%)であり有意差は認められなかった。なお、1名の HIV 抗体陽性者が死亡した。

考察

今回の我々の検討では、成人の約10%が HIV 感染者であるウガンダ共和国において、HIV 感染が高率に細菌性肺炎のリスクとなることを示した。起炎菌分布は先進国と何ら変わらず、また HIV 感染の有無にても違いは認められなかったが、肺炎球菌やインフルエンザ菌のペニシリン系抗生物質に対する薬剤感受性は著明な耐性化を示していた。一方、日本で顕著なマクロライド耐性肺炎球菌はほとんど検出できず、病原細菌の耐性化には当地での抗菌薬使用状況が強く反映されたものであった。今回は現地でも投与可能な安価な薬剤を簡便な治療計画に則りその有用性について検討を行ったが、HIV 感染の有無に関係なく約8割の症例にて有効であった。ペニシリン耐性化率は高率であるが大半がペニシリン中等度耐性株であり、十分な血中濃度と組織移行が得られる静注投与を行うかぎり除菌は可能であることが示された。以上よりアンピシリン短期静注投与は HIV 感染者が多いアフリカの成人市中肺炎症例に対する標準的治療として推奨されると思われる。今後耐性化のさらなる進行が見られるようであればペニシリン系注射剤での無効例も増加してくると考えられ、さらなる耐性化のサーベイランスが重要となってくることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

Community-acquired pneumonia in Ugandan adults: Short-term parenteral ampicillin therapy for bacterial pneumonia: Am J Trop Med Hyg 64: 172 - 177, 2001

1. 研究目的の評価

本研究は成人の約10%が HIV 感染者であるウガンダ共和国において、合併日和見感染症として極めて重要な市中肺炎の治療法に関する検討であり、目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

1996年から1998年までにマケレレ大学病院に入院した18歳以上の市中肺炎99例に対して、喀痰や血液の細菌学的検査、血清学的検査、免疫能などの検査を行い、細菌性肺炎患者に対して、アンピシリン2g/日を3日間投与後引き続いてアモキシシリン1500mgを4日間投与し、これら患者における有用性を検討したものであり、研究手法も妥当である。

3. 解析, 考察の評価

上記手法で解析した結果、市中肺炎の75%が HIV

抗体陽性であり、陰性者が25%と少ないものの、起炎菌では HIV 感染の有無に関係なく肺炎球菌が最も多く、カリニーやマイコプラズマなどは見られなかった点が特徴的であった。肺炎球菌は現地で最もよく用いられる ST 合剤に高度耐性であり、ペニシリンにも中等度耐性であった。しかし、今回の治療法では80%強の有効率であり、現地での有効な治療になりうることを示唆され、ウガンダにおける市中肺炎の治療に大きく寄与するものであり、今後の研究の進展が大いに期待される。

以上のように本論文はウガンダにおける市中肺炎の治療法に示唆を与えるところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 河野 茂  
副査 教授 中村 三千男  
副査 教授 齋藤 寛

中野裕之

(北海道)昭和28年7月4日生

授与年月日 平成14年1月31日

主論文 Risk Factors for Fracture in Adult Patients with Cerebral Palsy  
成人脳性麻痺患者における骨折のリスク要因  
中野裕之, 青柳 潔 大城昌平, 樺山富太郎  
Acta Medica Ngasaki Vo 146: 11 - 14, 2001  
長崎大学社会医学講座公衆衛生学  
(主任: 竹本泰一郎教授)

論文内容の要旨

緒言

脳性麻痺(Cerebral Palsy: CP)者には、骨折の発生が多く、介護や生活を管理するうえで重要な問題となっている。その背景には、骨形成不全や骨脆弱性が存在し、その要因として一次的な運動麻痺や二次的な運動障害(関節拘縮や変形など)による運動量の低下、慢性的な栄養障害、抗痙攣剤の投与による副作用などが報告されている。しかし、これまでCPの骨脆弱性に関する報告は、骨の成長期にある20歳未満の検討が主で、成人CPを対象とした報告はない。今回我々は、20歳以上の成人CP者を対象として、骨折の既往とそれに関連する要因について検討した。

対象と方法

調査対象は、長崎県内の重症心身障害児・者施設に入所中のCP164人であった。このうち20歳未満の32人と、女性では月経の有無が骨密度に影響するため月経の無い8人を除いた。したがって、最終的な本研究の対象者は、男性52人(年齢21-56歳, 平均32.0±5.6歳),

女性72人(年齢24-47歳,平均33.3±4.8歳)であった。

Osteoporosisの評価は,大腿骨の正面X線像を撮影し, Singhの方法にしたがって grade 判定をし, Grade 1-4をosteoporosisありと定義した。また血清カルシウム値,リン値,アルカリフォスファターゼを測定し,血清カルシウム値 $<8.6\text{mg/dl}$ ,リン値 $<2.5\text{mg/dl}$ もしくはアルカリフォスファターゼ $>220\text{U/l}$ をosteomalaciaありと定義した。身長,体重を計測し,body mass index(BMI)を算出した。骨折の既往,移動能力(歩行可能もしくは不可),抗痙攣剤の使用の有無を,診療録より調査した。本研究は対象者もしくは対象者の家族または親権者に承諾を得て行った。

統計解析は,1)骨折既往とosteomalaciaの有無,osteoporosisの有無,移動能力レベルとの関連を $\chi^2$ 検定を用いて検討した。4)骨折既往のリスク要因を調べるためロジスティック回帰分析を行った。目的変数は骨折の既往とし,説明変数は年齢,BMI,性,osteomalaciaの有無,osteoporosisの有無,移動能力レベルとした。全ての統計解析は,統計解析用ソフトSASを用いた。

### 結果

1. 男性群の6人(11.5%),女性群の11人(15.3%)に,高度な外力によらない骨折既往があった。
2. Osteoporosisは男性50.0%(24/48人),女性29.2%(21/72人)でありと診断された。osteomalaciaは男性38.4%(20/52人),女性36.1%(26/72人)でありと診断された。
3.  $\chi^2$ 検定の結果,男性群では,骨折の既往の有無と,osteomalaciaの有無,osteoporosisの有無,移動能力レベルとでは,関連は認められなかった。女性群ではosteoporosisのある者で,有意に骨折の既往の割合が高かったが,osteomalaciaの有無,移動能力レベルとでは,骨折既往との関連は認められなかった。
4. ロジスティック回帰分析の結果,骨折既往はosteoporosisありと移動能力レベル(歩行可能)と有意に関連していた。オッズ比(95%信頼区間)は,それぞれ6.5(1.4-29.1),5.8(1.2-26.9)であった。骨折既往と年齢,BMI,性,osteomalaciaとの関連は認められなかった。

### 考察

1. 本研究の対象者における骨折既往の割合は一般集団より高いようだった。成人CPは骨折が発生しやすいと考えられた。
2. CPにおける骨折の要因の一つとして,Osteoporosisが関与する結果であった。CPでは骨形成不全に加えて,その後の加齢や慢性的な栄養障害,運動障害,抗痙攣剤の長期服用によるビタミンD不活化,

日光暴露不足のためのビタミンD代謝障害などによってOsteoporosisが生じやすいと考えられた。

3. 移動能力レベルについて,従来の報告ではCPの骨脆弱性の原因は特に運動制限との関連が強いことが指摘されているが,本研究では歩行可能者に骨折の既往が高かった。この理由として歩行可能者では転倒リスクが高いためではないかと考えられた。
4. 本研究の結果から,成人CPは,骨脆弱性があり,早期からの生活指導や運動療法などによって骨形成を促進しておくこと,栄養管理,薬物療法の併用などが重要であると思われた。また,成人していてもCP患者の場合は,日常介護の上でも骨の脆弱性があることを認識し,物理的環境整備や歩行自助具などを考慮して,骨折の予防に努める必要があると考えられた。

### 結論

成人CP患者において,osteoporosisの存在は骨折の重要な危険因子だった。歩行可能者では,osteoporosisの合併が少ないにも関わらず,骨折を起こしやすいようであり,易転倒性の可能性が考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

学位論文題名

「成人脳性麻痺患者における骨折のリスク要因」

#### 1. 研究目的の評価

本研究は,成人脳性麻痺患者を対象として,骨折の既往とそれに関する要因について検討するもので,目的は十分に妥当である。

#### 2. 研究手法に関する評価

成人脳性麻痺患者124名を対象に,骨折の既往と,年齢,性,BMI,osteomalaciaの有無,osteoporosisの有無,移動能力レベルとの関連を解析したもので,研究手法も妥当である。

#### 3. 解析・考察の評価

成人脳性麻痺患者において,osteoporosisの存在は骨折の重要な危険因子だった。歩行可能者ではosteoporosisの合併が少ないのも関わらず,骨折を起こす傾向にあり,易転倒性の可能性が考えられた。成人脳性麻痺患者の療養の意義を新たに提言したもので高く評価できる。

以上のように本論文は成人脳性麻痺患者における骨折に対するリスク要因の解明に貢献するところ大であり,審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 竹本 泰一郎  
副査 教授 進藤 裕幸  
副査 教授 丹羽 正美

**佐藤 哲史**

(長崎県)昭和27年7月29日生

**授与年月日** 平成14年2月28日**主論文** Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS expression and production in mice.

(デキサメサゾン(DEX)はマウスの誘導型NO合成酵素の発現とパーオキシナイトライドの産生抑制を介して、緑膿菌に対する肺感染防御能を阻害する。)

佐藤哲史, 大石和徳, 岩垣明隆, 千馬正敬, 赤池孝章, 秋山萬里子, 向田直史, 松島綱治, 永武 毅

Clinical Experimental Immunology 2001; 126: 266 - 273

長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療研究分野(熱研内科)

(主任:永武 毅教授)

**論文内容の要旨****緒言**

緑膿菌感染は、副腎皮質ステロイド長期投与中の慢性呼吸器疾患患者にしばしば認められる。これまでの研究では、ステロイド投与による単球の抗菌活性、好中球の活性酸素産生や走化性の低下が報告されている。また最近の研究では、緑膿菌性呼吸器感染症に対する重要な宿主遺伝子として、TNF $\alpha$ と共に誘導型NO合成酵素(iNOS)が指摘されているが、肺に抗菌分子として作用するNOの代謝産物については明らかでない。ステロイドは、in vitroにおいてTNF $\alpha$ 、iNOSやヒトのCXCケモカインであるIL-8の遺伝子の転写を制御するNF $\kappa$ Bの結合部位を阻害して、直接的に肺感染防御能を抑制すると考えられるが、生体における肺感染防御能低下の機序については十分な検討がない。そこで、我々は高用量のデキサメタゾン(DEX)を前投与したマウスで緑膿菌による致死性肺炎モデルを作成し、iNOSと反応性窒素酸化物が、肺感染防御能抑制の原因となるか否かについて検討し、さらに本モデルにおけるTNF $\alpha$ 、CXCケモカインの役割についても検討した。

**材料・方法**

1) CBA/Jマウスにデキサメタゾン(10mg/kg 1日2回5日間)を前投与したDEX群と同量の生食を投与した対照群を準備した。2)各濃度の緑膿菌(Fisher Immunotype 1)を経気管的に投与して肺炎を惹起し、両群間での生存率の相違が明らかとなる接種菌量を調べた。その結果、 $2.4 \times 10^6$ cfu/mouseの菌量でDEX群は48時間以内に100%死亡したが、対照群は全例生存

した。以下の実験はこの接種菌量を用いた。3)感染前および感染後に肺組織の摘出および採血を行い、定量培養にて肺内および血中菌数を調べた。4)感染前および感染後に気管支肺胞洗浄(BAL)を行い総細胞数、肺胞マクロファージ数、好中球数およびリンパ球数を調べ、好中球走化性サイトカインであるMIP-2、KCおよびTNF $\alpha$ をELISA法で測定した。5)NOの肺内殺菌への関与を明らかにする目的で、感染前および感染後に肺組織を摘出してRNAを抽出し、RT-PCR法にてiNOS遺伝子の発現について検討した。6)殺菌性窒素酸化物であるパーオキシナイトライドの組織学的検出を目的として感染前および感染後24時間目の肺組織における抗ニトロチロシン抗体による免疫組織染色を行った。7)NO産生が肺内殺菌に及ぼす影響を調べる目的で、感染前および感染後3.6時間目に選択的NO合成阻害剤であるSMT(S-メチル-イソウレア)1mg/mouseを腹腔内に投与して、マウスの生存率を調べ、感染24時間後の肺内および血中菌数を測定した。

**結果**

1)対照群では感染後6時間以降で肺内菌数は減少したが、DEX群では逆に増加し、感染12時間後には菌血症が認められた。2)BALF中の好中球の動態およびMIP-2、KCの動態には両群間に大きな相違は無く、DEX群において好中球の集積は抑制されていなかった。TNF $\alpha$ 産生はDEX群では感染早期に著明に抑制された。3)対照群では感染後、肺組織のiNOS遺伝子発現、ニトロチロシンの肺組織中の気管支上皮や肺胞マクロファージにおける発現が認められるのに対し、DEX群ではiNOSの発現が消失し、ニトロチロシンも検出されなかった。4)対照群ではSMT投与によりマウスの生存率は低下し、肺内菌数は有意に増加したが、DEX群では有意差は無かった。5)対照群におけるSMT投与により肺組織におけるニトロチロシンの染色性は低下したが、BALF中TNF $\alpha$ 産生への影響は認めなかった。

**考察**

この研究において、我々はマウスに5日間高用量のDEXを前投与することで緑膿菌による易肺炎発症を示した。このことはステロイドの高用量長期投与が肺の感染防御を抑制することを示唆している。また、今回の実験においてDEX前投与マウスでは、肺におけるiNOS mRNA発現が完全に抑制されていること、また感染早期にTNF $\alpha$ 産生が完全に抑制されていることがわかった。また、我々は感染後の対照マウスにおいて肺胞マクロファージのみならず気管支上皮細胞にニトロチロシンを検出したが、DEX前投与マウスでは染色性が欠如していた。この結果は肺感染において、



パーオキシナイトライトが抗菌分子として重要な役割を担っていることを示唆している。さらに、この成績は選択的 NO 合成酵素阻害剤である SMT の投与が、DEX 前投与マウスの生存率や肺内血中菌数には影響を及ぼさないが、対照群の生存率を低下させ、さらに肺内菌数を増加させた実験結果と合致している。

これまでの研究において、細菌性肺炎において TNF $\alpha$  肺内産生は感染防御的な役割を果たすことが報告されている。従って、今回の実験の DEX 前投与マウスにおいて、感染早期に肺内 TNF $\alpha$  産生が完全に抑制されていることは肺感染防御抑制におけるもう一つの要因となっていることが推定される。またこの研究において、DEX 投与と SMT 投与によるマウス生存率と肺内菌数の明らかな違いが見られたか、この結果は DEX 投与が感染早期にパーオキシナイトライトと TNF $\alpha$  産生の両方を完全に抑制するが、SMT 投与はパーオキシナイトライト産生のみを抑制し、TNF $\alpha$  産生は抑制しないという成績から説明できると考えられる。

MIP 2 および KC などの CXC ケモカインは、対照マウスと比較して DEX 前投与マウスの感染早期では軽度減少していたが、その後は細菌の増殖に平行して増加した。マウス MIP 2 は NF $\kappa$ B に制御されていることが報告されているが、我々の実験結果では MIP-2 遺伝子発現における NF $\kappa$ B 以外の転写因子の関与が推察された。

今回の研究において、高用量ステロイドを長期に投与されている宿主においては、肺炎の感染早期における TNF $\alpha$  産生の抑制と抗菌分子としてのパーオキシナイトライト産生の欠如が肺感染防御能低下の原因となることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peboxynitrite production in mice Sato K, *et al. Clin. Exp. Immunol.* 2001; 126: 266 - 273.

##### 1. 研究目的の評価

本研究は副腎皮質ステロイド長期投与中の患者にしばしば認められる緑膿菌性致死性肺炎の病態を、特に誘導型 NO (iNOS) に注目し、さらに TNF- $\alpha$  や CXC ケモカインの動態と合わせて解析したものであり、その研究の目的は十分に妥当である。

##### 2. 研究手法に関する評価

ステロイド前投与後に緑膿菌を感染させたマウスモデルを作製し、肺内での緑膿菌の菌量や好中球数、そしてサイトカインやケモカイン量とともに、iNOS やそれに関連する窒素酸化物 (ニトロチロシン) の発現を分子生物学的、免疫組織学的に解析し、さらにマウ

スに NO 合成阻害剤を投与して、NO 関与の証明を試みた研究手法も妥当である。

##### 3. 解析, 考察の評価

ステロイドの長期高用量投与による緑膿菌性肺炎の易発症性が、マウスを用いたモデルにより示唆された。このモデルにおいて iNOS やニトロチロシンの発現、また感染早期の TNF- $\alpha$  の産生が抑制されることが明らかとなり、さらに NO 合成阻害剤投与によるマウス生存率の低下や肺内菌数の増加をステロイド非投与下で認められたことから、これらが感染防御機構において重要な働きを示すことが証明された意義は大きい。結果に対する解析, 考察も妥当であり、今後の研究の進展が大いに期待される。

以上のように、本論文はステロイド投与による免疫不全患者の致死性細菌性肺炎の病態解析に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 河野 茂  
副査 教授 近藤 宇史  
副査 教授 平山 壽哉

#### 石川 秀文

(静岡県) 昭和29年1月9日生

授与年月日 平成14年2月28日

主論文 Effects of Pulmonary Rehabilitation for Patients with Chronic Pulmonary Diseases with Different Types of Ventilatory Defects: Relationships between Pulmonary Function Parameters and Exercise Tolerance

(換気障害のタイプによる慢性呼吸器疾患患者に対する呼吸リハビリテーションの効果 - 呼吸機能検査と運動耐容能との関係についての検討)

Hidefumi Ishikawa, Kazunori Oishi, Hideaki Senjyu, Masashi Yamamoto

Acta Medica Nagasakiensia Vol.46 No.1 - 2 p.49 - 53 2001

長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門感染症予防治療分野

(主任: 永武 毅教授)

#### 論文内容の要旨

##### 緒言

高齢化社会の進展に伴い慢性呼吸器疾患を有する患者は増加している。慢性呼吸器疾患に対する包括的呼吸リハビリテーションの臨床的評価は、運動耐容能の増加・日常生活動作の改善・労作性呼吸困難感の改善・入院期間の短縮・生存率の改善などの点において確立されつつある。

しかし、これまでの多くの研究報告は慢性閉塞性呼吸器疾患（COPD）を対象としており、COPDを除いた慢性呼吸器疾患（胸壁疾患・間質性肺疾患・のう胞線維症・肺癌・肺切除後など）に対する呼吸器リハビリテーションについては注目されず、十分な評価はなされていない。

一方、本邦における慢性呼吸器疾患については、肺気腫・慢性気管支炎などに加えて肺結核後遺症による呼吸機能障害を有する患者も多く、その病態は感染の様式により様々である。これまでに肺結核後遺症を含めた慢性呼吸器疾患患者に対する呼吸リハビリの効果を換気機能障害（閉塞性・拘束性・混合性）に基づいて比較検討した報告はない。また、呼吸リハビリの課題として個々の病態に適したプログラムの作成が必要であるが、こうした問題に関して明確な指針はなかった。

そこで、今回我々は肺結核後遺症を含めた慢性呼吸器疾患患者を換気機能障害のタイプ別に分類して呼吸リハビリの効果を検討し、さらに運動耐容能の指標である6分間歩行距離（6MD）および運動誘発性低酸素血症（EIH）と相関する呼吸機能検査の諸指標について検討した。

#### 対象および方法

対象はインフォームドコンセントを得た安定期にある慢性呼吸器疾患の患者51症例で、平均年齢は68歳、基礎疾患は慢性肺気腫・肺結核後遺症などが中心であった。このうち3例は換気機能障害はなく軽症例であり検討から除外した。リハビリは包括的呼吸器リハビリテーションのプログラムに基づいて行われ、慢性呼吸不全患者11例については酸素投与下に行われた。患者は換気機能障害に基づいて閉塞性（ $n=15$ ）・拘束性（ $n=11$ ）・混合性（ $n=22$ ）の3群に分類し、呼吸リハビリの効果を検討するために、前後で呼吸機能検査・6MD・ALDスコア・呼吸困難の程度の変化を検討した。また、リハビリ施工前の6MDおよびEIHと呼吸機能検査の各指標との相関についても検討した。

#### 結果

呼吸リハビリ前後における検査値の検討およびリハビリ開始前における呼吸機能検査の各指標と6MD・EIHの相関に関する検討から以下の結果を得た。

呼吸リハビリにより、3群全ての換気機能障害でADLおよび6MDは有意に改善した。

呼吸リハビリの結果、拘束性障害においてはVC・Plmax（吸気時最大口腔内圧）およびMVV（分時換気量）が改善し、混合性障害においてはVC・Plmaxのみが有意に改善した。しかるに、これらの指標の改善と運動耐容能の指標である6MDの改善との間には相関は認めなかった。

リハビリ開始前における呼吸機能検査の個々の指標と6MDとの相関に関する検討では、FEV1.0は3群全ての換気機能障害において正の相関を示した。VCおよびMVVは閉塞性換気障害と混合性換気障害で正の相関を示した。また、PaO<sub>2</sub>（安静時血中酸素分圧）は混合性換気障害において正の相関を示した。

リハビリ開始前における呼吸機能検査の個々の指標とEIHとの相関に関する検討では、VCは拘束性換気障害において正の相関を示し、FEV1.0およびMVVは閉塞性換気障害において正の相関を示した。混合性換気障害においては、相関する指標は認めなかった。

#### 考察

6MDは運動耐容能を測定する手段として定着しており、慢性閉塞性肺疾患においては最大酸素摂取量と相関することが報告されている。今回の我々の研究では、慢性呼吸器疾患を3群の換気機能障害に分類することにより、呼吸器リハビリがいずれのタイプの換気機能障害においても6MDおよびADLを改善し有用であることを初めて明らかにした。さらに、異なるタイプの換気機能障害で6MDおよびEIHと相関する独特の呼吸機能検査の指標を認めたことは、これらから運動耐容能や運動中の低酸素血症をある程度予測し得ることを示唆している。この事はそれぞれの換気機能障害において、運動耐容能の重症度に応じたりハビリの種類・頻度・強度などのプログラムの構成やリハビリの評価に有用と考えられる。またEIHとの関係では運動中の酸素投与の必要性について検討するために有用と考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

学位論文の題名：

換気障害のタイプによる慢性呼吸器疾患患者に対する呼吸リハビリテーションの効果・呼吸機能検査と運動耐容能との関係についての検討 -

##### 1. 研究目的の評価

慢性呼吸器疾患に対する包括的呼吸リハビリテーションの臨床評価をこれまで十分検討されてこなかった肺結核後遺症など今後の高齢化社会の中で増加が予測される疾患に拡大することを目的としたもので十分に妥当である。

##### 2. 研究手法に関する評価

呼吸機能障害の分類を日常臨床で用いやすい呼吸機能検査で、閉塞性、拘束性、混合性の3つに分類した上で、呼吸リハビリを実施し、運動耐容能や運動誘発性低酸素血症と相関する呼吸器機能検査の諸指標を解析したもので、研究手法は妥当である。

##### 3. 解析・考察の評価

上記手法での解析の結果、慢性呼吸器疾患での3つのタイプの呼吸機能障害のいずれのタイプにおいても6 MD および ADL 改善をみとめたが異なるタイプの呼吸器機能障害で6 MD および運動誘発性低酸素血症(EIH)と相関する特有の呼吸機能検査の指標を認めた。これらの研究成果は運動耐容能や運動中の低酸素血症があらかじめ予測可能であり、患者重症度に応じたりハビリテーションプログラム作成に有用な情報を与えるものである。

以上のように本論文は呼吸リハビリテーションの臨床評価法およびプログラム作成に新しい指標を与えるもので、この方面での学問の進歩に貢献するところが大きく、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 永 武 毅  
副査 教授 竹 本 泰一郎  
副査 教授 河 野 茂

#### 山 崎 美津代

(福岡県)昭和37年11月30日生

授与年月日 平成14年2月28日

主 論 文 Changes of Food Preference in Children  
Aged 4 and 5 Years  
(4歳児と5歳児の食品嗜好の変化)  
Mitsuyo Yamasaki, Tatsuya Takahashi, Atsuko Minohara, Hisashi Ishibashi and Hiroshi Saito  
Acta Medica Nagasakiensia 46: 47 - 54, 2001  
長崎大学医学部社会医学講座(衛生学教室)  
(主任:齋藤 寛教授)

#### 論文内容の要旨

##### 緒 言

現在の日本人の食生活は多種多様な食材の入手が可能であるが、主婦の就業率の向上、食品産業の発達などにより家庭外で調理された食品を摂取する機会が増加している。子どもの食生活においても家族そろっての食事機会が減少しており、子供独りで食べる「孤食」、家族一人一人が別のものを食べる「個食」が多くなっている。子供の「孤食」は本人の嗜好本位になりやすく、また家庭における手作り料理の減少や外食の増加は野菜の摂取量の減少にも繋がるとされている。このような食生活は子どもの将来の食品嗜好形成にも大きく関わってこよう。これまで、わが国の子どもの食品嗜好に関する研究は保護者に対する聞き取り調査を基にしたものが多く、子どもを直接の対象とした調査は少なかった。本研究においては子どもを直接の対象と

し、4歳から5歳にかけての食品嗜好の変化を食品特性ならびに母親との関連で検討した。

##### 対象と方法

対象は佐賀県神埼郡内の保育園に通園する4歳男児24人、4歳女子27人の計51人とその母親51人である。調査を平成9年6月と平成10年6月に行った。守山らの考案した2次元イメージ展開法に準じて実施した。調査対象食品は一般家庭で使用される食品21種類とした。調査回答用紙は食品の好き嫌いを「とっても好き」、「すこし好き」、「好きでも嫌いでもない」、「すこし嫌い」、「とっても嫌い」の5段階に、また、食品の食べる食べないを「たくさん食べる」、「すこし食べる」、「食べない」の3段階に分けた。子ども1人を調査員1人が担当した。

母親には調査用紙を配布し、子どもに用いたのと同じ21種類の食品についての好き嫌い5段階と摂取3段階を自己記入してもらった。

4歳の時と5歳の時の食品の好き嫌い5段階と食品摂取の3段階について順位相関による一致性を検討した。また、5歳児とその母親のペアについても同様の検討を行った。

##### 結 果

4歳児と5歳児の食品の好き嫌い5段階で一致性が認められた食品は1%水準でモヤシ、ネギ、トマトの3種、5%水準ではキャベツ、納豆、ヨーグルト、ほうれん草、キュウリ、チーズ、ピーマンの7種であった。男女児別に見ると、男児では納豆とモヤシの2種類であり、女児ではネギ、モヤシ、キャベツ、トマト、ヨーグルト、チーズの6種であった。4歳児、5歳児ともにピーマン、玉葱、大根などを嫌う子どもが多く、その傾向は5歳になるとさらに強くなった。

4歳児と5歳児の食品摂取3段階の順位相関では1%水準で納豆、キュウリ、キャベツ、ごぼうの4種類に、5%水準で牛乳に一致性が認められた。納豆の摂取状況は一致性がもっとも高く、かつ5歳になると4歳の時よりもさらに食べない傾向にあった。男児に一致性が認められた食品は納豆とネギの2種類であり、女児ではキュウリと納豆の2種であった。4歳児の時に食べないと回答した子どもの割合は21種のすべてにおいて20%以下であったが、5歳児になると納豆、ピーマン、ナス、シイタケ、ネギ、玉葱、大根を20%以上の子どもが「食べない」と回答した。

5歳児の食品の好き嫌い5段階と摂取3段階の順位相関では21食品すべてに1%水準で一致性が認められ、好きな食品はたくさん食べて、嫌いな食品は食べず、食品の好き嫌いとは摂取状況が一致していた。男女児別に見ると、男児は21食品中18食品、女児では、21食品すべてにおいて1%水準で一致性が認められた。

男児と母親の間に一致性が認められたのは5%水準で玉葱と納豆の2種であり、女児と母親間では5%水準でキャベツと茄子の2種であった。

考察と結語

子どもの食品嗜好調査は4歳のときよりも5歳のとき好きな食品はより好きに、嫌いな食品はより嫌いになる傾向が認められ、また嫌いな食品は成人のそれとよく似ていた。本調査は子どもの食品嗜好について重要な情報をもたらしたと考えられる。食べない、あるいは嫌いと答えた食品は納豆が最多で、ピーマンがこれに次いだ。この2種の食品は成人でも嫌う人が多いが、香り、味などが幼児にとっても好ましくないであろう。なお、子どもは「おいしくないから」と答えていた。

嫌いな食品は男児と母親間でよく似ていたが、女児と母親の間ではかならずしもそうでなかった。このように食品の好き嫌いと摂取状況が男女児でかなり異なっていた。この点については本研究の対象者が小学生、中学生になったとき、さらに追跡調査を行う予定である。

論文審査の結果の要旨

学位論文題名

「4歳児と5歳児の食品嗜好の変化」

1. 研究目的の評価

本研究は児童の食品嗜好と食品摂取状況の発達を検討するために、保育園児を対象に4歳児と5歳児の食品嗜好摂取頻度の変化及び5歳児と母親の嗜好・摂取との関連を検討したものであり、目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

51人の保育園児を対象に、21種類の食品について二次元イメージ展開法を用いて嗜好と摂取頻度について面接調査を行い、結果をスピーアーマンの順位相関法で解析を行っている。5歳児と母親の嗜好・摂取頻度についても同様な手法で検討しており、研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、子供の食品嗜好は4歳児から5歳児になるにしたがって、好きな食品はより好きに、嫌いな食品はより嫌いにと分化していくこと、食品の好き嫌いと摂取頻度との間に強い関連性があること、子供と母親の嗜好が似通っていること等が明確に示されており、その研究成果は十分評価できる。

以上のように、本論文は子供の食品嗜好と摂取頻度との強い関連があること、母親の嗜好が児のそれに影響している等、子供における食行動の発達について新しい知見が得られており、今後の栄養指導・栄養教育上の指針となるものであり、審査委員は全員一致で博

士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 竹本 泰一郎  
副査 教授 江口 勝美  
副査 教授 溝田 勉

古市 哲

(長崎県)昭和42年12月13日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 In Vivo Assessment of the Regulatory Mechanism of Cholinergic Neuronal Activity Associated With Motility in Dog Small Intestine

(犬小腸における消化管運動に関連したコリン作動性神経活動調節機構の生体での評価)

Akira Furuichi, Noriaki Makimoto, Masayuki Ogishima, Kanichirou Nakao, Mikio Tsukamoto, Takashi Kanematsu and Kohtaro Taniyama

The Japanese Journal of Pharmacology 86: 73 - 78, 2001

長崎大学第二外科学教室

(主任:兼松隆之教授)

論文内容の要旨

緒言

消化管運動においてアセチルコリン(ACh)は重要な神経伝達物質であるが、生体下での腸管壁内ACh遊離の測定は困難とされ、その測定は摘出標本を用いてin vitro下で行われているにすぎない。そこで我々はACh遊離の測定を生体下で行うことで、様々な状況下での神経伝達と消化管運動との関係、薬物効果の判定などが直接証明されるのではないかと考え、中枢神経系で用いられるマイクロダイアリス法を消化管に応用し、直接ACh遊離と消化管運動の関係解明を試みた。

方法

実験動物:体重8.0-15.0kgの雑種成犬5-10頭を用いた。

麻酔はペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の静注で行った。

1)全身麻酔下にて開腹し、小腸辺縁動脈のやや中枢に薬剤動注用カテーテルを挿入し動注モデルを製作した(図1)。

2)動注にて灌流される範囲の小腸壁にストレインゲージフォーストランスデューサー及び小腸壁内筋層に腸管の縦軸に沿って壁内灌流用カテーテル(臓器用透析プローブ)を固定し、ACh値と消化管運動の変化をそれぞれ高速液体クロマトグラ

フィー、ストレインゲージにて同時に測定した。  
(図2)

- 3) AChの基礎濃度を測定するため透析プローブ及びストレインゲージを固定後4時間、AChの濃度を測定した。
- 4) 生理食塩水を動注用カテーテルより0.5ml/minのスピードで投与し、AChの濃度を測定した。
- 5) テトロドトキシン(TTX), アトロピン, ノルエピネフリン, ヨヒンビン投与前, 後でのACh値の変化を高速液体クロマトグラフィーにて測定し、同時に腸管の運動の変化をストレインゲージを用いて測定した。  
0.5ml/minのスピードで、0.1μMのTTXが15分間、0.1μMのアトロピンが2分間、0.1μMのノルエピネフリンが30分間、0.1μMのヨヒンビンが5分間投与された。
- 6) 小腸壁内筋層間にプローブが挿入されていることを確認するため、実験の最後にプローブ挿入部の腸管を切断し、挿入位置を確認した。

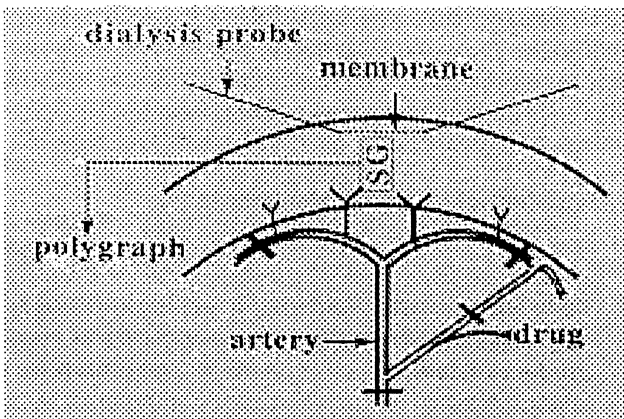


図1. 動注モデル

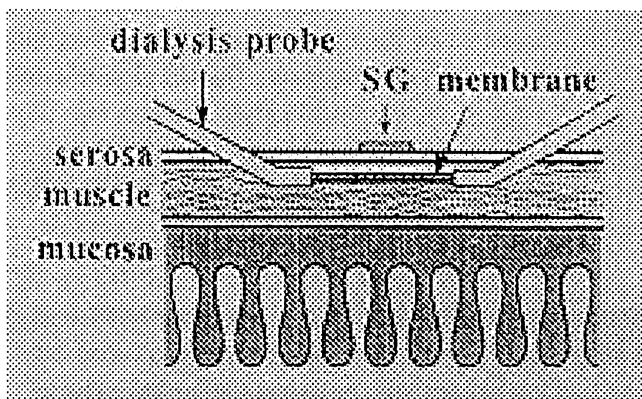


図2. 透析プローブ挿入部

検討項目:

- 1) マイクロダイアリシス法を用いた、犬小腸における腸管壁内ACh遊離量の濃度測定の可能性。

- 2) in vivoにおけるTTX, アトロピン, ノルエピネフリン, ヨヒンビンの生理作用。
- 3) 腸管壁内神経叢からのACh遊離の確認。
- 4) AChの生体における消化管運動への作用。

**結果**

- 1) 犬小腸における腸管壁内ACh遊離量の基礎濃度は $1.12 \pm 0.08 \text{ pmol}/15 \text{ min}$  ( $n=10$ )で、十分測定可能であった。
- 2) 生理食塩水の動注では、ACh遊離量及び消化管運動ともに変化を認めなかった。
- 3) TTXの動注では、ACh遊離量は減少した。一方、消化管運動は早期には亢進したがその後抑制された。
- 4) アトロピンの動注では、ACh遊離量は増加したが、消化管運動は抑制された。
- 5) ノルエピネフリンの動注では、ACh遊離量は減少し、消化管運動も抑制された。
- 6) ヨヒンビンの動注では、ACh遊離量は増加し、消化管運動も亢進した。
- 7) 病理組織学的に小腸壁内筋層間に透析プローブが挿入されていることを確認した。

**考察**

消化管運動の測定と神経伝達物質遊離量の同時測定法を生体内で初めて成功した。予想されたように、神経伝導をブロックするTTXはACh遊離量を減少することにより、消化管運動を減弱した。また、交感神経から遊離されるノルエピネフリンがACh遊離を抑制することにより、消化管運動を調節していることが明らかになった。アトロピンはコリン作動性神経上にあるムスカリン自己受容体をブロックすることにより、negative feedback機構を解除してACh遊離量を増加したが、平滑筋上のムスカリン受容体もブロックしたために、消化管運動が減弱したものと考えられる。以上のことから、生体では、消化管運動の調節は主に壁内コリン作動性神経であり、コリン作動性神経の活動は交感神経およびコリン作動性神経自体によって制御されていることが明らかになった。本法を生体下に行うことで消化管運動機能、薬物効果などが直接評価され、消化管の病態解明や消化管運動機能の評価、治療など臨床的に有用と考えられた。

**論文審査の結果の要旨**

学位論文の題名

犬小腸における消化管運動に関連したコリン作動性神経活動調節機構の生体での評価

1. 研究目的の評価

本研究は消化管運動における重要な神経伝達物質であるアセチルコリン(ACh)遊離の測定が生体下で可能であるか否かを検討したもので、その目的は明確、

妥当である。

2. 研究手法に関する評価

雑種成犬を用い全身麻酔後、開腹下に小腸に挿入した透析プローブを用い高速液体クロマトグラフィーにより ACh の遊離量を測定し、同時にストレインゲージを用いて消化管運動を測定し、ACh 基礎分泌量、各種薬剤の作用を解析したもので、研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

マイクロダイアリス法を用いることにより犬小腸壁における ACh 遊離量の測定が可能であり、生体下での消化管運動の調整は主に壁内コリン作動性神経によるものであり、コリン作動性神経の活動は交感神経およびコリン作動性神経自体によって制御されていることを明らかにしたもので、十分評価できる。

以上のように本論文は小腸壁の神経伝達物質遊離量と消化管運動の同時測定を生体内で可能であることを初めて証明したもので、消化管運動の研究の進歩に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 綾部 公懿  
副査 教授 関根 一郎  
副査 教授 河野 茂

大村 節子

(静岡県) 昭和24年10月5日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Body Mass Index, Physical Activity, Dietary Intake, Serum Lipids and Blood Pressure of Middle-Aged Japanese Women Living in a Community in the Goto Archipelago

五島列島在住中年女性の Body Mass Index, 身体活動, 食物摂取, 血清脂質, 血圧

大村節子, 門司和彦, 青柳 潔, 吉見逸郎, 八幡裕一郎, 竹本泰一郎, 岩井伸夫, 吉池信男, 伊達ちぐさ, 田中平三

Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science Vo 1(1): 21-28, 2002

長崎大学社会医学講座公衆衛生学

(主任: 竹本泰一郎教授)

論文内容の要旨

緒言

生活習慣が健康に与える影響についての全国調査(13ヶ所, 延べ対象人員2,126人, 全国値)の一環として長崎県五島列島の奈良尾町で食生活, 運動習慣などの生活習慣と血圧, 肥満, 血清脂質値など循環器疾

患リスクとの関連を調査検討した。奈良尾町の死因の第一位は癌であるが、循環器疾患死亡率、特に女性の脳血管疾患死亡率が高いのが特徴である。

対象と方法

1. 対象は上五島奈良尾町居住で1992年老人保健法による基本健康診査受診者のうち年齢層別に抽出された40歳~69歳の女性189名である。
2. 1) 身長, 体重を計測し, body mass index (BMI,  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) を算出し, 血圧, 血清総 cholesterol, HDL cholesterol 等を測定した。2) 1日の食事内容を聞き取り, 栄養素等摂取量と食品群別摂取量を算出した。3) ミネソタ活動調査に準じて1年間の運動習慣と職業上の身体活動から, 1日当たりの身体活動量を算出した。4) これらの項目を, 「日本生活習慣モニタリング調査」の全国値と比較した。
3. BMI によって対象を肥満群 (BMI  $\geq 25$ ) と非肥満群 (BMI  $< 25$ ) とに分け, 血圧, 血清脂質, 栄養素等摂取量および食品群別摂取量等を比較した。
4. 血圧, 血清総 cholesterol を従属変数とし, 年齢, BMI, 身体活動を独立変数とした重回帰分析によって循環器疾患に対するリスクの寄与を検討した。

結果

1. 全国調査値と比較すると:
  - 1) BMI ( $24.1$  vs  $23.2$ ,  $p < 0.01$ )・総 cholesterol ( $5.70\text{mmol/l}$  vs  $5.52\text{mmol/l}$ ,  $p < 0.05$ )・拡張期血圧 ( $78.9\text{mmHg}$  vs  $76.9\text{mmHg}$ ,  $p < 0.05$ ) の平均値は有意に高かった。
  - 2) 栄養素等摂取量では鉄, Ca, 食塩, ビタミン A, ビタミン C, 動物性脂質の摂取量が有意に少なかった。一日当たり摂取食品数も少なく ( $25.7$ 食品 vs  $27.5$ 食品,  $p < 0.001$ ), 食品群別摂取量では芋類, 種実類, 油脂類, 豆・豆製品, 果実類, きのこと類, 海草類, 肉類の摂取量が少なく, 乳・乳製品の摂取量が多かった ( $140.2\text{g}$  vs  $117.5\text{g}$ ,  $p < 0.05$ )。身体活動量は全国値との違いを認めなかった。
2. 肥満群と非肥満群を比較すると:
  - 1) 肥満群では非肥満群よりも収縮期血圧 ( $138.4\text{mmHg}$  vs  $123.7\text{mmHg}$ ,  $p < 0.001$ )・拡張期血圧 ( $83.6\text{mmHg}$  vs  $76.0\text{mmHg}$ ,  $p < 0.001$ ) 及び総 cholesterol 値 ( $5.89\text{mmol/l}$  vs  $5.57\text{mmol/l}$ ,  $P < 0.05$ ) が高く, HDL cholesterol 値 ( $1.39\text{mmol/l}$  vs  $1.63\text{mmol/l}$ ,  $p < 0.001$ ) が低かった。
  - 2) 栄養素等摂取量および食品群別摂取量に有意な差異は認められなかった。

- 3) 身体活動量の有意な差異は認められなかった。
3. 相関分析ではBMIと各栄養素等摂取量との間には有意な関連は認められなかった。食品群別摂取量でも果実類摂取量のみが有意な関連を示したのみであった ( $R=0.157, p<0.05$ )。
4. 拡張期・収縮期血圧または総 cholesterol を従属変数として、年齢、BMI、身体活動を独立変数とした重回帰分析では、血圧、総 cholesterol と BMI との間に有意な関連が認められたのみであった。

### 考 察

1. 拡張期・収縮期血圧または総 cholesterol が BMI と有意に関連していること及び収縮期・拡張期血圧値と総 cholesterol 値の平均が高いことから、肥満は対象地域の循環器疾患リスクを上昇させている要因と判断される。
2. いも類、種実類、豆・豆製品など植物性食品の摂取量が少ないことが、総 cholesterol 高値、高血圧及び肥満に関連している可能性が示唆される。
3. 身体活動と循環器疾患リスク要因や BMI 高値(肥満)との明確な関連性は認められなかった。生活行動の測定と評価については今後の更なる研究が必要と考えられる。

### 結 論

肥満は奈良尾の循環器疾患リスクを上昇させている要因であることが確認された。循環器疾患の多い地域での肥満の予防と対策が重要であることが改めて明確に示された。

### 論文審査の結果の要旨

学位論文題名 「五島列島在住中年女性の Body Mass Index, 身体活動, 食物摂取, 血清脂質, 血圧」

#### 1. 研究目的の評価

本研究は長崎県南松浦郡奈良尾町において、循環器疾患の予防を目的に全国調査の一環として行われた(日本生活習慣モニタリング調査)栄養素等摂取量、食品群別摂取量、身体活動量を BMI, 血圧, 血清脂質と関連させ比較検討したもので、目的は十分に妥当である。

#### 2. 研究手法に関する評価

40歳～69歳の女性189名を対象者に、身長、体重、BMI、血圧、血清脂質、栄養素等摂取量、食品群別摂取量、身体活動量を測定し、これらの項目を全国値及び奈良尾町の肥満群と非肥満群で統計学的解析法によって解析したものである。更に BMI と血圧、血清脂質の関係についても解析したもので、研究手法も妥当である。

#### 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、肥満(BMI高値)は奈良尾の循環器疾患リスクを上昇させている要因と判断

される。また、奈良尾の総コレステロール高値、高血圧及び肥満は植物性食品(食物繊維)の摂取量が少ないことに関連している可能性が考えられる。身体活動量と循環器疾患リスク要因や BMI 高値(肥満)との明確な関連性は認められなかったが、身体活動を重視するミネソタ活動調査の方法は奈良尾での活動量評価に不適切であった可能性が考えられて今後の研究が必要と考えられる。

以上のように本論文は肥満が奈良尾の循環器疾患リスクを増大させている要因であることを確認し、循環器疾患の多い地域での肥満の予防と対策が重要であることが明確となり、地域保健活動に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 齋藤 寛  
副査 教授 柴田 義貞  
副査 教授 大園 恵幸

刘 杰

(中国)1963年12月31日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Joint strength of laser-welded titanium

### 論文内容の要旨

チタンは耐食性、生体親和性に優れ、歯科用材料として多くの利点を備えている。しかしながら、チタンは融点が高く、高温での活性が高いため、従来歯科で用いられてきたろう付け法をそのまま用いることが出来ない。

近年、チタンの接合にレーザーが使用され、瞬時の接合が可能となった。レーザーによる接合は母材同士をろう材なしで接合でき、また、母材をろう材として使用することができるので、異種金属のろう材を使用するろう付けに比較して、機械的強度、耐食性に関して有利であると考えられる。レーザー溶接の接合強度を左右する要素にレーザー出力の電流量(A)、パルス幅(ms)、スポット径(mm)がある。これらの組み合わせによってレーザーによる母材の溶解深度が変わり、接合強度が変化する。本研究では各設定条件の組み合わせによるレーザーのチタンに対する溶解深度の関係について検討を行い、レーザーの出力の変化がチタンの接合強度に及ぼす影響を調べた。

電流量、パルス幅、スポット径の、各設定条件を変化させた場合の溶解深度を測定するために、チタンの鑄造ブロック(5.0×3.0×30mm<sup>3</sup>)を準備した。鑄造体表面を600番のエメリー紙で研磨した後、2個のブロックを5.0×3.0mm<sup>2</sup>の面で付き合わせ金型で固定し、レーザーの焦点を2個の鑄造体の付き合わせた線上に合わせ、照射条件を、それぞれ電流量160-300A、パ

ルス幅 13 ms, スポット径 0.4~1.8 mm に変化させ、レーザー溶接 (TANAKA LASER TLL 7000; Nd: YAG Laser) を行った。溶接後、ブロックを分離し破断面の画像をコンピューターに取り込み、溶解深度を測定した。

接合強度測定のために、2種類の板状アクリルパターン (0.5×3.0×40 mm<sup>3</sup>, 1.0×3.0×40 mm<sup>3</sup>) を準備した。パターンは、マグネシア系埋没材 (Selevest CB, Selec Co.) で埋没し、純チタン (JIS Type II, Selec Co.) を用い Ar アーク溶解遠心鋳造機 (Ti cast Super R, Selec Co.) で鋳造を行った。鋳造後、X線検査により内部欠陥のある鋳造体を除外した。鋳造体表面を 50 μm のアルミナでサンドブラスト処理し、アセトンで5分間の超音波洗浄を行った。板状鋳造体は中央部で切断し、切断面 (0.5×3.0 mm<sup>2</sup>, 1.0×3.0 mm<sup>2</sup>) を600番のエメリー紙で研磨した後、切断面で付き合わせ、金型で固定し、レーザー溶接を行った。照射条件はスポット径 1.0 mm, パルス幅 10 ms に固定し、レーザーの電流量を 180~300 A まで変化させた。レーザーは片面から垂直になるように照射し、3 mm 幅の溶接部の中心線上に、レーザーによるスポットが重ならないように3回の照射を行った。それぞれ条件につき5個の試験片を作製するとともに、コントロールとして溶接していない試験片も準備した。接合強度測定は万能試験機を用い引張試験により行った。ゲージ長さ 20 mm, クロスヘッドスピード 2 mm/min の条件で、破壊時の Breaking force (N) を求めた。引張試験後、破断面を SEM にて観察した。

パルス幅を 10 ms に固定して電流量およびスポット径を変化させた場合、電流量の増加に伴い溶解深度が深くなった。特に、スポット径が 1.2 mm 以下では急激に溶解深度が深くなる傾向を示した。電流量を 220 A に固定した場合、パルス幅 1 ms を除いて他のパルス幅では有意差は認められなかった。他の電流量で測定した場合も同様の傾向を示した。

接合強度に関して、0.5 mm の厚さの試験片では電流量が 240 A 以上で、溶接していないコントロールの試験片と同程度の接合強さを示した。破断面の観察より、210 A でレーザー溶接を行った場合、レーザー溶接された部分と、されていない研磨面とが観察された。これは 210 A では溶解深度が十分ではないため、溶接面をすべて溶接することができなかつたためと考えられる。厚さ 1.0 mm の試験片では 270 A 以上で、コントロールと同程度の接合強さを示した。引張試験後の破断面 SEM 観察によりレーザー溶接部の破壊様式は River pattern を示し、溶接部の強靱性が同われた。このため、レーザー溶接により溶接部位の断面積は減少するものの、適切な条件下で溶接された場合は、コントロールと同等の接合強さを示したと考えられる。

よって、適切な条件下で溶接されたチタン修復物は口腔内環境下でも破折することなく機能すると思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

劉杰は昭和62年7月に中国の佳木斯医学院歯学部を卒業した。平成9年7月日本に留学し、平成10年4月より長崎大学大学院歯学研究科に入学し、定められた期間に主科目として歯冠修復学特論、副科目として歯科材料工学特論を履修したほか、必修科目として1科目、選択科目6科目を履修し、合計34単位を修得した。学位論文の基礎となる研究要旨及び経過は、歯学研究科が平成13年5月11日に主催した研究経過報告会で発表した。また、歯学研究科が行う外国語(日本語)の試験には、平成13年5月18日に実施した筆記試験で合格した。学位論文の主論文として、“Joint Strength of Laser-Welded Titanium” (Dental Materials in press) を完成し、歯学研究科長に提出し、博士(歯学)の学位を申請した。定例の歯学研究科教授会はこれを平成13年11月21日に討議し、提出論文等を検討した後、これを受理して差し支えないと認め、3名の審査委員を選定した。審査委員は共同で論文の内容を慎重に審査し、申請者に対する試問を行い、下記の審査結果並びに最終試験の結果を平成13年12月19日の歯学研究科教授会で報告した。

本論文の概要は以下の通りである。

本研究はレーザーのチタンに対する溶解深度を調べ、レーザーの出力とその溶解深度が厚さの異なるチタンの接合強度に及ぼす影響について比較検討を行うことを目的とした。

#### 材料と方法

接合強度測定用にチタン板状鋳造体 (0.5×3×40 mm<sup>3</sup>, 1.0×3×40 mm<sup>3</sup>) を用意し、鋳造体中央部を切断した。切断面の研磨後に鋳造体を切断面で付き合わせ、金型で固定し、レーザー溶接を施した。また、コントロールとして単体のチタン板状鋳造体も用意した。レーザー出力の条件を電流 160~300 A, パルス幅 1~13 ms, スポット径 0.4~1.8 mm まで変化させチタンに対する溶解深度を測定した。次にレーザー溶接をスポット径 1.0 mm, 照射時間 10 ms に設定し、レーザーの出力を 180 A から 300 A まで変化させて以下の接合強度の測定を行った。接合強度の測定には万能試験機を用い、ゲージ長さ 20 mm (接合部より 10 mm を把持)、クロスヘッドスピード 2 mm/min の条件下で行い、破壊時の Fracture force (N) を求めた。

#### 結果と考察

パルス幅を 10 ms に固定して電流量及びスポット径を変化させた場合、電流量の増加に伴い溶解深度が深くなった。特にスポット径が 1.2 mm 以下では急激に溶



解深度が深くなる傾向を示した。電流量を220Aに固定した場合、パルス幅1.0msを除いて他のパルス幅で照射した溶解深度の間には有意差( $P > 0.05$ )は認められなかった。

接合強度に関して、0.5mmの厚さの試験片では電流240A以上で、コントロールの試験片と同程度の接合強度を示し、厚さ1.0mmの試験片では電流270A以上で、その接合強度はコントロール試験片と匹敵する接合強度( $P > 0.05$ で有意差なし)を示した。引張試験後の破断面SEM観察によりレーザー溶接部の破壊様式はRiver patternを示し、溶接部の強靱性が伺われた。

以上の結果から、適切な条件下で溶接されたチタン修復物は口腔内環境下でも破折することなく機能すると思われる。

下記審査委員会は本研究で得られた知見が、今後の歯科臨床の進歩に貢献するものと評価し、博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者 主査 教授 熱田 充  
副査 教授 藤井 弘之  
副査 教授 久恒 邦博

小石 良和

(京都府)昭和46年12月22日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Influence of visible-light exposure on colour stability of current dual-curable luting composites

論文内容の要旨

緒言

セラミックスや前装用コンポジットのように半透明な歯科材料を用いた補綴装置では、支台歯などの背景色に影響を受け易いため、レジンセメントを色調補正目的で用いる機会が多い。そのため、レジンセメントの色調変化は補綴装置の審美性に大きく影響を与えると思われる。レジンセメントは重合方法の違いにより、化学重合型、光重合型および双方の重合様式を有するデュアルキュア型の3種類に分類されるが、臨床では化学重合と光重合の長所を併せ持つデュアルキュア型レジンセメントの使用頻度が多い、しかしながら、デュアルキュア型レジンセメントの色調安定性については報告が少ない。そこで本研究は、光照射の有無がデュアルキュア型レジンセメントの色調安定性に及ぼす影響について検討を行った。

材料および方法

実験にはビタシェードA2相当色の6種類のデュアルキュア型レジンセメント(ビスタイトII, クラパールDC, ダイコアLAセメント, ジーセラコスモテックII, ルートイット, バイオリックII)を使用した。

光照射有りの試料は口腔内用光照射器(Translux CL)による120秒間の光照射を行い硬化させた。光照射無しは遮光下にて化学重合のみで硬化させたものを試料とした。全ての試料は温度37℃湿度100%の恒温槽に24時間保管後、37℃蒸留水中に24週まで浸漬を行った。試料の測色は歯科用測色計(Shade Eye)を用いて行い、表色系にはCIE1976L\*a\*b\*表色系を用いた。試料の測色は24時間後の値を基準値とし、その後、1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24週ごとに行った。経時的な色調変化の分析には基準値と各浸漬期間の測色値から色差 $\Delta E^*$ 値を算出して比較した。また、 $\Delta E^*$ 値は重複測定分散分析法にて分析後、光照射有りと光照射無しの24週後の $\Delta E^*$ 値について一元配置分散分析法にて各セメントごとに検定し、対比を用いて比較した。

結果と考察

24時間後のL\*, a\*, b\*値は全てのレジンセメントがA2相当色であったにも関わらず、材料によって異なり、臨床応用する場合には製品の色調の特徴を考慮した色調選択を行う必要があると考えられた。

重複測定分散分析法の結果、 $\Delta E^*$ 値はレジンセメントの種類、重合方法、各浸漬期間の3要因に有意に影響を受けた。 $\Delta E^*$ 値を構成する $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ 値をみると、24週後の $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ 値では全てのレジンセメントで光照射有りが光照射無しより小さい値を示した。また、光照射の有無に関わらずビスタイトIIの変化量が最大であった。24週後の $\Delta E^*$ 値はパリオリンクIIを除く全てのレジンセメントで光照射有りが光照射無しより有意に低い値を示した。デュアルキュア型レジンセメントは光重合と化学重合を併用した場合のほうが化学重合のみよりも残留モノマー量が少ないため光照射有りが光照射無しより色調変化を起こしにくいと推測された。また、フィラー量が最大であるビスタイトIIは光照射の有無に関わらず、24週後の $\Delta E^*$ 値は6種類中で最大であり、レジンセメントの色調変化はフィラー量よりもマトリックスレジンの組成などフィラー量以外の因子が関係していると推測された。

以上の結果より、光照射の有無がデュアルキュア型レジンセメントの色調安定性に影響を及ぼすことが明らかになった。臨床において、セラミックスや前装用コンポジットのような半透明な歯冠修復材料を用いた場合の色調再現性にはある程度の材料の厚さが必要である。しかしながら、厚さの得られなかった修復物に対しては色調補正し得るデュアルキュア型レジンセメントを用いて最終的な色調調整を行うことが望ましく、また、長期的な色調安定性を得るためには光照射が必須である。

論文審査の結果の要旨

小石良和は平成10年3月長崎大学歯学部を卒業、平

成10年4月より長崎大学大学院歯学研究科に入学し、定められた期間に主科目として歯冠修復学特論、副科目として咬合運動学特論を履修したほか、必修科目として1科目、選択科目として5科目を履修し、合計32単位を修得した。学位論文の基礎となる研究の要旨は、歯学研究科が平成13年11月8日に実施した研究経過報告会において発表した。また、英語以外の外国語(ドイツ語)は平成13年11月13日に実施した筆記試験において合格した。学位論文の主論文として「Influence of visible-light exposure on colour stability of current dual-curable luting composites」を付し、歯学研究科長に博士(歯学)の学位を申請した。定例の歯学研究科教授会は、これを平成13年12月5日に討議し論文の要旨を検討した後、これを受理して差し支えないと認め、3名の審査委員を選定した。審査委員は共同で論文を慎重に審査した後、下記の審査結果及び最終試験の結果を平成14年1月9日の歯学研究科教授会で報告した。

本研究は、光照射の有無がデュアルキュア型レジンセメントの色調安定性に及ぼす影響について検討を行ったものである。

実験にはビタシェード A2 相当色の6種類のデュアルキュア型レジンセメント(ビスタイトII, クラパールDC, ダイコアLAセメント, ジーセラコスモテックII, ルートイット, パリオリンクII)を使用した。光照射有りの試料は口腔内用光照射器(Translux CL)による120秒間の光照射を行い硬化させた。光照射無しは遮光下にて化学重合のみで硬化させたものを試料とした。全ての試料は温度37°C湿度100%の恒温槽に24時間保管後、37°C蒸留水中に24週まで浸漬を行った。試料の測色は歯科用測色計(Shade Eye)を用いて行い、表色系にはCIE1976L\*a\*b\*表色系を用いた。試料の測色は24時間後の値を基準値とし、その後、1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24週ごとに行った。経時的な色調変化の分析には基準値と各浸漬期間の測色値から色差 $\Delta E^*$ 値を算出して比較した。また、 $\Delta E^*$ 値は重複測定分散分析法にて分析後、光照射有りと光照射無しの24週後の $\Delta E^*$ 値について一元配置分散分析法にて各セメントごとに検定し、対比を用いて比較した。

重複測定分散分析法の結果、 $\Delta E^*$ 値はレジンセメントの種類、重合方法、各浸漬期間の3要因に有意に影響を受けた。 $\Delta E^*$ 値を構成する $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ 値をみると、24週後の $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ 値では全てのレジンセメントで光照射有りが光照射無しより小さい値を示した。また、光照射の有無に関わらずビスタイトIIの変化量が最大であった。24週後の $\Delta E^*$ 値はパリオリンクIIを除く全てのレジンセメントで光照射有りが光照射無しより有意に低い値を示した。このことはデュアルキュア型レジンセメントは光重合と化学重合を併用

した場合のほうが化学重合のみよりも残留モノマー量が少ないため光照射有りが光照射無しより色調変化を起こしにくいと推測された。また、フィラー量が最大であるビスタイトIIは光照射の有無に関わらず、24週後の $\Delta E^*$ 値は6種類中で最大であり、レジンセメントの色調変化はフィラー量よりもマトリックスレジンの組成などフィラー量以外の因子が関係していることが示唆された。

以上の結果より、光照射の有無がデュアルキュア型レジンセメントの色調安定性に影響を及ぼすことが明らかになった。臨床において、セラミックスや前装用コンポジットのような半透明な歯冠修復材料を用いた場合の色調再現性にはある程度の材料の厚さが必要である。しかしながら、厚さの得られなかった修復物に対しては色調補正の可能なデュアルキュア型レジンセメントを用いて最終的な色調調整を行うことが望ましい。また、長期的な色調安定性には光照射が必須である。

下記審査委員会は本研究で得られた知見が、今後の歯科臨床の進歩に貢献するものと評価し、博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者	主査	教授	熱田	充
	副査	教授	林	善彦
	副査	教授	久恒	邦博

田中悦子

(長崎県)昭和48年5月11日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Libaration of the intramolecular interaction as the mechanism of heat-induced activation of HSP 90 molecular chaperone

論文内容の要旨

Hsp90のシャペロン機能は熱ショック下で活性化される。今回私たちはHsp90熱依存性活性化機構と、ドメイン間相互作用について検討した。

まずヒトHsp90と大腸菌のHsp90ホモログであるHtpGの3つのドメイン(N末から順にドメインA, B, C)について、バクテリアのツーハイブリッドシステムを用いて相互作用を検討した。その結果HtpG, Hsp90間、さらにそのハイブリッドにおいてもドメインAとドメインBで相互作用が確認でき、Hsp90ファミリーで保存されている結合であった。一方Hsp90ファミリータンパクのダイマー形成に関するドメインBとドメインCの相互作用は、HtpG, Hsp90それぞれで認められたが、そのハイブリッドでは確認できなかった。つまりこの結合は同一分子内では保たれているものの、その形式はそれぞれの分子でバラエティーがあると推測された。

次に Native PAGE でそれぞれのドメイン間複合体の熱安定性を調べたところ、ドメイン A とドメイン B では55°Cまで安定で、それより高温では複合体が消失した。一方ドメイン B とドメイン C では70°Cでも安定であった。

さらに各ドメインと基質結合性を検討するために、クエン酸合成酵素の凝集抑制活性を調べた結果、HtpG ではドメイン A に基質結合部位が存在すること、さらにはこの基質結合は、ドメイン B によって打ち消されることが分かった。

これらの結果より通常はドメイン A の基質結合部位にドメイン B が結合してシャペロン機能を抑制しているが、熱ショック下ではドメイン A がドメイン B より解放されることにより、シャペロン機能が活性化され、これが Hsp90 の熱依存性活性化機構であるというモデルを提出した。

### 論文審査の結果の要旨

田中悦子は平成10年3月に長崎大学歯学部を卒業した。同年4月より長崎大学歯学部研究科に入学して、定められた期間に必要な単位を取得した。

学位論文の基礎となる研究要旨および経過は、歯学研究科が平成13年11月8日に主催した研究経過報告会で発表した。また歯学研究科が行う外国語(ドイツ語)の試験には、平成13年11月19日に実施した筆記試験で合格した。

学位論文の主論文として Liberation of the intramolecular interaction as the mechanism of heat-induced activation of HSP 90 molecular chaperone (Eur. J. Biochem. 268 (20), 5270 - 5277, 2001) を歯学研究科長に提出し、歯学研究科に博士(歯学)の学位申請を行った。歯学研究科教授会はこれを平成13年11月30日に討議し、提出論文等を検討したあと、これを受理して差し支えないと認め、3名の審査委員を選定した。審査委員は共同で論文の内容を慎重に審査し、平成13年12月25日、申請者に対して試問を行い、下記の論文審査の結果並びに最終試験の結果を平成14年1月9日の歯学研究科教授会で報告した。

本研究は Hsp90 の熱依存性の活性化機構と、ドメイン間相互作用の関係について検討したものである。

#### 1. 研究目的の評価

本研究はストレスタンパク質/分子シャペロンのなかでも、とりわけ真核生物でその発現量がきわめて多く、また真核細胞生存に必須の因子でありながら、その機能と構造についていまだに不明の点が多い Hsp90 について検討したものであり、その研究の意義は高い。

#### 2. 研究手法に関する評価

リコンビナントタンパク質の大腸菌発現系を用いた解析は、今日ではすでに一般的な解析法であるが、本

研究ではまだまだ一般的ではないバクテリア 2 - ハイブリッド系という、より *in vivo* に近い系での相互作用も検討している。また各種分子シャペロンが、バクテリアからヒトに至るまで共通に存在し、かつ種間のアミノ酸配列も非常に保存されていることを考慮すれば、ヒト Hsp90 にこだわることなく、大腸菌 Hsp90 である HtpG について解析するのは的を得た判断である。

#### 3. 解析・考察の方法

本研究では *in vitro* の系を用いているが、大腸菌体内での相互作用、精製分子での解析、化学量論的な解析など、種々の面からアプローチしており評価できる。また最終的に得られた結論は Hsp90 の作用機構を理解するうえで、重要な進展をもたらすもので画期的である。

下記審査委員会は本研究で得られた知見が、歯科を含む基礎医学の進歩に貢献するものと評価し、博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者	主査	教授	根本	孝幸
	副査	教授	原	宜興
	副査	教授	中山	浩次

### 森山弘隆

(佐賀県)昭和48年1月26日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Interferon-gamma production changes in parallel with bacterial lipopolysaccharide induced bone resorption in mice: An immunohistometrical study

### 論文内容の要旨

#### 緒言

グラム陰性細菌の細胞壁に存在する LPS は、免疫系細胞の活性化作用を有し、骨吸収を誘導する。一方、活性化 T 細胞から分泌される IFN- $\gamma$  は *in vitro*, *in vivo* 両方において骨吸収を抑制するが、LPS により骨吸収が誘導されたときの IFN- $\gamma$  の動態は知られていない。本実験では LPS をマウス歯肉に連続投与して形成された慢性炎症巣に、高濃度の LPS を投与した際の骨吸収と、IFN- $\gamma$  及び IL-1 $\beta$  保有細胞数の変化を観察した。

#### 材料と方法

実験には7週齢の BALB/C マウスを使用した。まず *E. coli* 由来の LPS を PBS に 5  $\mu$ g/3  $\mu$ l の濃度で溶解し、マウス臼歯歯肉に 1, 4, 7, 10, 13, 16, 17, 20, 23, 26回、48時間毎に投与した(予備投与群)。さらに16回投与48時間後に LPS 濃度を 25  $\mu$ g/3  $\mu$ l に増加して投与した群(高濃度群)と LPS を含まない PBS のみを投与した群(PBS 群)を新たに作成し各々 1, 4, 7, 10回投与した。これらはそれぞれ予備投与群の17, 20,

23, 26回群に相当する。各々の実験群を最終投与より24時間後に屠殺し, AMeX法でパラフィン包埋した。これらのブロックから下顎第一臼歯の近遠心的縦断面と近心部歯槽骨が観察できるような4 $\mu$ mの連続切片を作成して, H.E.染色を施し, 歯肉および歯槽骨の病理組織学的観察を行った。また破骨細胞同定のためTRAP染色も併せて行い, 組織学的な骨面計測によって各群の骨吸収の程度を比較した。さらに, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ の免疫染色を行って, LPS投与時のマウス歯肉におけるサイトカイン発現も計測するとともに, IFN- $\gamma$ とIL-1 $\beta$ 保有細胞の同定のため, 抗CD3と抗IFN- $\gamma$ ならびに抗マクロファージと抗IL-1 $\beta$ の二重染色を行った。

### 結果

予備投与で破骨細胞は投与回数とともに増加していき, 投与13回目で破骨細胞が接した骨面(Bone surface in contact with Osteoclast: BSO)の割合は最大となり, それ以降ではBSOは減少してほぼプラトーとなっていた。高濃度1回群では急性炎症が著しく増強し, 骨面上には破骨細胞が深い呼吸窩を形成していたが, その後急激に減少して, 予備投与群と同程度の割合になった。一方, PBS群では1回投与後, 炎症性細胞浸潤は減少し, 破骨細胞はほとんど観察されなくなった。

IFN- $\gamma$ 保有細胞数は予備投与群では4回投与から増加し, 7回投与で最大となり, その後減少した。高濃度群では1回投与でIFN- $\gamma$ 保有細胞数が有意に増加し, 7回投与以降は減少した。PBS群は, 1回投与で急激に減少し, 以降はほとんど保有細胞はみられなくなった。

IL-1 $\beta$ 保有細胞数は予備投与4回より増加していた。高濃度群ではIFN- $\gamma$ に類似した傾向を示し, 1回投与で有意に増加し, その後予備投与群と同程度まで減少した。PBS群も1回投与で急激に減少し, 保有細胞はほとんど観察されなくなった。二重染色の結果, ほとんどのIFN- $\gamma$ またはIL-1 $\beta$ 陽性細胞は, それぞれT細胞またはマクロファージであった。

### 考察

今回の実験で, 慢性炎症巣におけるLPSの侵襲と宿主の防御反応にはバランスが保たれており, それを破壊するような高濃度のLPSが投与されると, 骨吸収が急速に増加することが示された。さらにそのような環境下ではIFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ 保有細胞数が両者ともに増加することも明らかとなった。IL-1 $\beta$ は破骨細胞を強力に活性化することが知られており, 本実験における骨吸収にはIL-1 $\beta$ の関与が推測された。一方, BSOが有意に増加したとき, 骨吸収を抑制するIFN- $\gamma$ 保有細胞も有意に増加しており, 過度の骨吸収に対して

IFN- $\gamma$ がnegative feedbackの働きをしていることが推測された。

### 論文審査の結果の要旨

森山弘隆は, 平成10年3月長崎大学歯学部を卒業後, 同年4月長崎大学大学院歯学研究科に入学し現在に至っている。学位論文の基礎となる研究の要旨は, 歯学研究科が平成13年9月7日に実施した研究経過報告会において発表した。また, 外国語試験(ドイツ語)は, 平成13年11月16日に合格した。

学位論文の主論文として「Interferon-gamma production changes in parallel with bacterial lipopolysaccharide induced bone resorption in mice: An immunohistometrical study (*Calcified Tissue International* (in press))」を完成して歯学研究科長に提出し, 歯学博士の学位を申請した。歯学研究科教授会は, これを平成13年12月5日の定例教授会に付議し, 論文の内容の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果, 受理して差し支えないものと認めたので, 3名の審査委員を選定した。審査委員は, 共同で論文の内容を慎重に審査し, 申請者から研究内容の報告を受けた後, 試問を行い, 論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成14年1月16日の歯学研究科教授会に報告した。本研究の内容は以下のとおりである。

グラム陰性細菌の細胞壁に存在するLPSは, 免疫系細胞の活性化作用を有し, 骨吸収を誘導する。一方, 活性化T細胞から分泌されるIFN- $\gamma$ は*in vitro*, *in vivo*両方において骨吸収を抑制するが, LPSにより骨吸収が誘導されたときのIFN- $\gamma$ の動態は知られていない。本実験ではLPSをマウス歯肉に連続投与して形成された慢性炎症巣に, 高濃度のLPSを投与した際の骨吸収と, IFN- $\gamma$ 及びIL-1 $\beta$ 保有細胞数の変化を観察した。

実験には7週齢のBALB/Cマウスを使用した。まず*E.coli*由来のLPSをPBSに5 $\mu$ g/3 $\mu$ lの濃度で溶解し, マウス臼歯歯肉に1, 4, 7, 10, 13, 16, 17, 20, 23, 26回, 48時間毎に投与した(予備投与群)。さらに16回投与48時間後にLPS濃度を25 $\mu$ g/3 $\mu$ lに増加して投与した群(高濃度群)とLPSを含まないPBSのみを投与した群(PBS群)を新たに作成し各々1, 4, 7, 10回投与した。これらはそれぞれ予備投与群の17, 20, 23, 26回群に相当する。各々の実験群を最終投与より24時間後に屠殺し, AMeX法でパラフィン包埋した。これらのブロックから下顎第一臼歯の近遠心的縦断面と近心部歯槽骨が観察できるような4 $\mu$ mの連続切片を作成してH.E.染色を施し, 歯肉および歯槽骨の病理組織学的観察を行った。また破骨細胞同定のためTRAP染色も併せて行い, 組織学的な骨面計測によって各群の骨吸収の程度を比較した。さらに, IFN- $\gamma$ , IL

-1 $\beta$  の免疫染色を行って、LPS 投与時のマウス歯肉におけるサイトカイン発現も計測するとともに、IFN- $\gamma$  と IL-1 $\beta$  保有細胞の同定のため、抗 CD3 と抗 IFN- $\gamma$  ならびに抗マクロファージと抗 IL-1 $\beta$  の二重染色を行った。

予備投与で破骨細胞は投与回数とともに増加していき、投与13回目で破骨細胞が接した骨面( Bone Surface in contact with Osteoclast: BSO )の割合は最大となり、それ以降では BSO は減少してほぼプラトーとなっていた。高濃度 1 回群では急性炎症が著しく増強し、骨面上には破骨細胞が深い呼吸窩を形成していたが、その後急激に減少して、予備投与群と同程度の割合になった。一方、PBS 群では 1 回投与後、炎症性細胞浸潤は減少し、破骨細胞はほとんど観察されなくなった。

IFN- $\gamma$  保有細胞数は予備投与群では 4 回投与から増加し、7 回投与で最大となり、その後減少した。高濃度群では 1 回投与で IFN- $\gamma$  保有細胞数が有意に増加し、7 回投与以降は減少した。PBS 群は 1 回投与で急激に減少し、以降はほとんど保有細胞はみられなくなった。IL-1 $\beta$  保有細胞数は予備投与 4 回より増加していた。高濃度群では IFN- $\gamma$  に類似した傾向を示し、1 回投与で有意に増加し、その後予備投与群と同程度まで減少した。PBS 群も 1 回投与で急激に減少し、保有細胞はほとんど観察されなくなった。二重染色の結果、ほとんどの IFN- $\gamma$  または IL-1 $\beta$  陽性細胞は、それぞれ T 細胞またはマクロファージであった。

今回の実験で、慢性炎症巣における LPS の侵襲と宿主の防御反応にはバランスが保たれており、それを破壊するような高濃度の LPS が投与されると、骨吸収が急速に増加することが示された。さらにそのような環境下では IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  保有細胞数が両者ともに増加することも明らかとなった。IL-1 $\beta$  は破骨細胞を強力に活性化することが知られており、本実験における骨吸収には IL-1 $\beta$  の関与が推測された。一方、BSO が有意に増加したとき、骨吸収を抑制する IFN- $\gamma$  保有細胞も有意に増加しており、過度の骨吸収に対して IFN- $\gamma$  が negative feedback の働きをしていることが推測された。

下記審査委員会は本論文が、歯周疾患によって誘導された歯槽骨吸収における IFN- $\gamma$  の関与を *in vivo* で明らかにし、今後、歯学の進歩に貢献するものと評価し、歯学博士の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者 主査 教授 原 宜 興  
副査 教授 山 口 朗  
副査 教授 林 善 彦

岩 本 勉

(長崎県) 昭和49年 5 月14日生

授与年月日 平成14年 3 月31日

主論文 Lactosylceramide is essential for the osteoclastogenesis mediated by the macrophage-colony stimulating factor and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand.

(M-CSF と RANKL によって誘導される破骨細胞分化にラクトシルセラミドは必要不可欠な分子である)

#### 論文内容の要旨

スフィンゴ糖脂質はほとんどすべての細胞の細胞膜上に発現している。糖鎖の構造は多様で、その発現パターンは細胞種によって異なり、さらには個々の細胞においても細胞の分化・成熟度や活性化状態の有無によってダイナミックに変化することが多くの細胞で報告されている。このスフィンゴ糖脂質は細胞膜上でラフト(または Glycolipids enriched microdomains)と呼ばれるクラスターを形成し、種々のシグナル伝達物質を集積しており、シグナル伝達における重要性も注目をあびている。さらに、そのラフト上に存在する様々な成長因子レセプター(血小板由来成長因子レセプター、線維芽細胞成長因子レセプター、インシュリンレセプターなど)の制御にも重要であるといわれている。そこで今回破骨細胞の分化過程におけるスフィンゴ糖脂質の役割について検討することにした。

まず、M-CSF と RANKL によって誘導した単核破骨細胞の集団を用いてスフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質の発現を薄層クロマトグラフィを用いて解析した。RANKL によって GM3、GM1 が非常に多く誘導されることがわかった。この結果からスフィンゴ糖脂質が明らかに破骨細胞の分化において何らかの役割があることが示唆された。

そこで M-CSF( macrophage-colony stimulating factor ) と RANKL ( receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand ) によって誘導される破骨細胞の培養系にスフィンゴ糖脂質合成阻害剤である D-PDMP を用いた。すると D-PDMP 濃度依存的に単核、多核破骨細胞の形成が阻害されることがわかった。しかし、D-PDMP を加えることによって、細胞内のセラミド濃度が上昇することがわかった。そこで、その影響を調べるために、破骨細胞培養系にスフィンゴ脂質であるセラミドまたはスフィンゴシンを加えてみたが、破骨細胞の分化には全く影響がないことがわかり、破骨細胞の分化にはスフィンゴ糖脂質が必要不可欠な分子であることを導き出した。

次に、破骨細胞の分化にどのスフィンゴ糖脂質が重要であるか検討を行った。そこでまず GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いることにした。

このマウスは GM2/GD2以下の糖脂質の合成が遮断され、すべての複合型ガングリオシドが個体中から消失したマウスである。このマウスの骨髄細胞を用い、M-CSF と RANKL にて破骨細胞を誘導した。野生型と比較しても差は認めなかった。それゆえ、GM2/GD2以下の糖脂質は破骨細胞の分化に必ずしも必要でないことが示されると同時に、このノックアウトマウス上に発現している GlcCer, LacCer, GM3, GD3のいずれかが破骨細胞の分化に重要であると推測された。

そこで、D-PDMP で抑制をかけた状態の破骨細胞の培養系に外来性に GlcCer, LacCer, GM3, GD3をそれぞれ加えてみたところ、LacCer が優位に単核の破骨細胞を誘導することがわかった。それゆえ単核の破骨細胞形成に LacCer が重要なスフィンゴ糖脂質であることを示した。しかしながら、この細胞は多核化することはなかった。

次に細胞内シグナル伝達についてウエスタンブロットング法を用いて解析した。M-CSF の下流では ERK 1/2がリン酸化され、RANKL の下流では I $\kappa$ B および ERK1/2がリン酸化される。このリン酸化レベルが D-PDMP によって抑制され、LacCer を添加することによってコントロールに近いレベルまで回復することを明らかにした。

さらに、M-CSF のシグナルによって誘導される RANKL のレセプター RANK の発現について RT-PCR 法を用いて解析した。ここでも同様に D-PDMP で RANK の発現が抑制され、LacCer によって RANK の発現レベルが回復することを示した。

このようにスフィンゴ糖脂質、とくに LacCer が単核の破骨細胞形成や破骨細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしていることを明らかにした本研究は、今後、骨吸収性疾患の治療に結びつく、骨吸収メカニズム解明に向けた重要な研究であると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

岩本勉は、平成11年3月長崎大学歯学部を卒業した後、同年4月より長崎大学大学院歯学研究科博士課程に入学して、歯学を専攻した。同年5月には歯科医師国家試験に合格した。定められた期間に主科目として顎・顔面・口腔外科学特論、副科目として硬組織病態生理学特論を履修したほか、必修科目として1科目、選択科目5科目を履修し、合計32単位を取得した。所定の単位取得後、平成13年11月9日、学位論文の基礎となる研究要旨及び経過を、歯学研究科が主催した研究経過報告会で発表した。また、歯学研究科が行う語学試験(ドイツ語)には、平成13年11月22日に実施した筆記試験で合格した。

学位論文の主論文として、「Lactosylceramide is essential for the osteoclastogenesis mediated by macrophage-

colony stimulating factor and receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand」(The Journal of Biological Chemistry, 276 (49), 46031 - 46038 (2001))を、さらに参考論文2編を添えて歯学研究科長に提出し、博士(歯学)の学位を申請した。歯学研究科教授会は、これを平成13年12月5日の定例委員会に付議し、論文の内容の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、3名の審査委員を選定した。審査委員は、共同で論文の内容を慎重に審査し、申請者から研究内容の報告を受けた後、試問を行い、論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成14年2月6日の歯学研究科教授会に報告した。

本論文の概要は以下の通りである。

本研究は、スフィンゴ糖脂質による破骨細胞分化過程の制御機構の解明を目指し、研究を行ったものである。まず、M-CSF と RANKL によって誘導される単核破骨細胞にスフィンゴ糖脂質の GM3および GM1の発現が上昇することを薄層クロマトグラフィを用いて解析した。さらに、スフィンゴ糖脂質生合成阻害剤である D-PDMP を破骨細胞培養系に添加すると破骨細胞の形成が濃度依存的に抑制されることがわかった。すなわち、破骨細胞の分化に、スフィンゴ糖脂質が必要不可欠な分子であることを示したのである。続いて、破骨細胞の分化に、一体どのスフィンゴ糖脂質が重要か導き出すために、まず GM2/GD2合成酵素遺伝子ノックアウトマウス骨髄細胞を用いて、その野生型マウス骨髄細胞と比較し、破骨細胞形成に差は認めなかったことより GM2/GD2以下の長い糖脂質は、破骨細胞の形成に必ずしも必要ではないことを示した。そこで、D-PDMP で抑制をかけた骨髄細胞に外来性に糖脂質を加える実験を行い、単核の破骨細胞の形成にラクトシルセラミドが重要である、ということを示した。さらに、D-PDMP で抑制される M-CSF および RANKL の細胞内シグナルが、ラクトシルセラミドを加えることによって回復することをウエスタンブロットング法を用いて解析した。また、RT-PCR 法を用いて、D-PDMP で抑制される RANK の発現が同様に、ラクトシルセラミドを加えることによって回復することも明らかにした。

以上の結果から、破骨細胞の分化にスフィンゴ糖脂質、特にラクトシルセラミドが重要で、M-CSF および RANKL の細胞内シグナル伝達においても重要な役割があることが示唆された。

下記審査委員会は、本研究で得られた知見が、今後、歯学の進歩に貢献するものと評価し、博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者 主査 教授 水野明夫  
副査 教授 加藤有三  
副査 教授 根本孝幸

王 佐 林

(中国)1963年4月10日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Collagen-binding heat shock protein HSP 47  
expression during healing of fetal skin wounds

### 論文内容の要旨

口唇裂や口蓋裂手術後に生じる癒痕は口腔外科では大きな問題である。これらの手術を胎児のうちに行くと癒痕が形成されないという結果が多くの子宮内手術実験により報告されている。いろいろな哺乳類動物モデル実験でも胎児の創傷治癒後には癒痕を残さない。この事実は胎児と生後では皮膚の創傷治癒過程には質的な違いのあることを示唆している。胎児の創傷治癒過程の特徴は急速な治癒、炎症の欠如、血管新生の欠如、高ヒアルロン酸値などである。これらの胎児と成人との治癒過程の違いはコラーゲンの産生と沈着の相違に起因している可能性がある。小胞体に局在する47 kDa 熱ショックタンパク質 (HSP47) は、コラーゲンのプロセッシング、品質管理を担当するコラーゲン特異的分子シャペロンである。そのため、癒痕形成あるいは逆に癒痕を生じない治癒過程において HSP47 が関与している可能性がある。そこで本研究ではラット創傷治癒モデルを用いて、癒痕の形成と HSP47 発現の関係について検討した。

### 実験方法

妊娠16日の胎生および生後7日のSDラットを実験に供した。ペントバルビタール麻酔下に妊娠ラットの子宮内で胎児ラットの背部皮膚を円形(直径約5mm)に切除した。つづいて胎児を子宮内にした。生後7日の新生児も麻酔下で背部皮膚を円形(直径約1cm)に切除した。手術後、17日後に麻酔下に屠殺した。創傷部分の皮膚組織について免疫組織化学的解析(HSP47)、イムノブロット [HSP47, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)], RT-PCR (タイプIコラーゲン mRNA) を行なった。

### 結果

無処置対照の胎生16日目および生後7日目の新生児では HSP47 陽性細胞は上皮基底細胞層にのみ認められた。手術後の創傷治癒過程において、胎児ラットでは HSP47 は同じく上皮基底細胞層にのみ認められ他の部位にはほとんど認めなかった。一方、生後7日目の新生児の場合は HSP47 陽性細胞は数多く検出され、特に皮下組織に多く出現していた。Labeling index で見るとその違いはさらに明らかで、胎児ではほとんど

変化がないのに比べ、新生児ではその値は手術後7日まで連続的に上昇した。PCNA 陽性細胞は胎児、新生児の上皮基底細胞層、真皮、皮下組織に存在した。胎児の手術後5日目では変化がなかったが、新生児では7日目で増加した。

イムノブロットにより HSP47 の術後の変化を検討した。HSP47 に特異的な47kDa のバンドは胎児の場合、術前と術後5日目では量的な変化はなかった。一方、新生児では、術後7日目で増加した。RT-PCR によりタイプIコラーゲンの mRNA の発現量を比較したところ、胎児では手術前後でその量は変化しなかったが、生後のラットでは手術後7日で増加した。

### 考察

今回の研究結果は生後のラットの創傷治癒においては癒痕を形成し、HSP47 の発現上昇を伴うこと、一方、胎児ラットの場合には癒痕を生じず、HSP47 の発現上昇も伴わないことを明瞭に示している。この結果と、すでに明らかにされている癒痕形成がタイプIやタイプIIIコラーゲンの異常合成と沈着を伴うこと、コラーゲンの細胞内プロセッシングが HSP47 によって管理されている事実とを考え合わせると、胎児ラットの創傷治癒において癒痕を生じない主要な原因は HSP47 の発現が抑制されるためであるという結論を導くことが可能であろう。

### 論文審査の結果の要旨

王 佐林は1985年7月に中国、佳木斯医学院口腔医学部を卒業した後、1987年9月、中国医科大学口腔医学部大学院に入学した。1990年7月、同大学院を終了して、医学修士号を取得した。つづいて、1990年9月、中国医科大学医学部大学院に入学した。1993年12月、同大学院を終了し医学博士号を取得した。1985年7月より中国医科大学第一臨床学院口腔外科教室助手として勤務し1992年12月に講師に昇任、1996年9月に助教授に昇任した。平成9年10月より文部省国費研究生として長崎大学歯学部口腔外科第二講座に入学、平成10年4月、長崎大学大学院歯学研究科に入学、現在に至っている。

在学中、選択必修科目の主科目(口腔腫瘍治療学特論)と副科目(機能口腔病理学特論)ならびに選択科目5科目を履修し、合計32単位を修得した。所定単位修得後、学位論文の基礎となる研究要旨及び経過を平成13年5月11日、歯学研究科学位申請委員会が主催した研究経過報告会で「ラット胎児の皮膚創傷治癒過程におけるコラーゲン結合性ストレス蛋白 HSP47 の発現」の演題で発表した。また語学試験(日本語)は平成13年12月14日に合格した。

学位論文の主論文として、「Collagen-binding heat shock protein HSP47 expression during healing of fetal skin

wounds (ラット胎児の皮膚創傷治癒過程におけるコラーゲン結合性ストレス蛋白 HSP47の発現)”(International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, in press) を歯学研究科長に提出し、歯学研究科に博士(歯学)の学位申請を行った。歯学研究科教授会は、平成14年1月9日、論文の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、下記3名の審査委員を選定した。3名の審査委員は共同で論文の内容を慎重に審査し、平成14年1月23日、申請者に対して口頭試問を行い、下記の論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成14年2月6日の歯学研究科教授会に報告した。

主論文の内容は以下の通りである。

口唇裂や口蓋裂手術後に生じる癒痕など、癒痕拘縮による変形や機能障害は深刻な問題である。胎児の皮膚創傷は成人と異なり、癒痕化せずに治癒することが知られている。胎児と成人との治癒過程の違いはコラーゲンの産生と沈着の相違に起因している可能性がある。小胞体に局在する47 kDa熱ショック蛋白質(HSP47)は、コラーゲンの合成や分泌など関与する特異的分子シャペロンである。このことから、癒痕形成あるいは逆に癒痕を生じない治癒過程においてHSP47が関与している可能性がある。本研究はラット胎児の皮膚創傷治癒過程におけるコラーゲン結合性ストレス蛋白 HSP47発現について検討している。

実験動物には妊娠16日の胎生および生後7日のSDラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下に妊娠ラットの子宮内で胎児ラットの背部皮膚を円形(直径約5mm)に切除した。生後7日の新生児も麻酔下で背部皮膚を円形(直径1cm)に切除した。創傷部分の皮膚組織について、免疫組織化学的解析(HSP47)、イムノプロット[HSP47, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)], RT-PCR(タイプIコラーゲン mRNA)を行なった。

無処置対照の胎生16日目の胎児および生後7日目の新生児ではHSP47陽性細胞は上皮基底細胞層にのみ認められた。手術群の胎児ではHSP47は同じく上皮基底細胞層にのみ認められ他の部位にはほとんど認められなかった。一方、生後7日目の新生児の場合ではHSP47陽性細胞は数多く検出され、特に皮下組織に多く出現していた。Labeling indexで見るとその違いはさらに明らかで、胎児ではほとんど変化がないのに比べ、新生児ではその値は手術後7日まで連続的に上昇した。PCNA陽性細胞は胎児、新生児の上皮基底細胞層、真皮、皮下組織に認められた。胎児の手術後5日目では変化がなかったが、新生児では7日目で増加した。

イムノプロットによる検討で、HSP47に特異的な47

kDaのバンドは胎児の場合、術前と術後5日目で量的な変化はなかった。一方、新生児では、術後7日目で増加した。RT-PCRによりタイプIコラーゲンのmRNAの発現量を比較したところ、胎児では手術前後でその量は変化しなかったが、生後のラットでは手術後7日目で増加した。

本研究の結果と、すでに明らかにされている癒痕形成がタイプIやタイプIIIコラーゲンの異常合成と沈着を伴うこと、及びコラーゲンの細胞内プロセッシングがHSP47によって管理されている事実とを考えると、胎児ラットの創傷治癒において癒痕を生じない主要な理由はHSP47の発現が抑制されるためであるという結論を導くことが可能であろう。

研究科教授会は下記審査委員の報告に基づきこれを討議に付して審査した結果、本研究で得られた知見が今後の口腔外科臨床の進歩に有用であると評価し、本論文が博士(歯学)の学位論文に値するものと認め合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 井口次夫  
副査 教授 高野邦雄  
副査 教授 根本孝幸

**豊屋睦人**

(長崎県)昭和44年4月2日生

授与年月日 平成14年3月20日

主論文 Biophysical and Pharmacological Properties of Voltage-gated Calcium Channel in Osteoblastic MC3T3E-1 Cells  
(骨芽細胞 MC3T3E-1 に存在する電位依存性カルシウムチャネルの生物物理学的及び薬理的性質)

**論文内容の要旨**

骨芽細胞は、骨組織において骨基質の産生、石灰化、破骨細胞機能の調節など骨のリモデリングに重要な役割を演じている。多くの研究により、細胞内Ca<sup>2+</sup>は、細胞の生理機能の発現においてセカンドメッセンジャーとしてはたらいていることが知られている。骨芽細胞においても、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルを通してCa<sup>2+</sup>が細胞内へ流入しており、また何らかの刺激により細胞内貯蔵部位からCa<sup>2+</sup>が放出される結果、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し生理機能に深く関与していると考えられている。

そこで、我々は、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞株であるMC3T3E1に存在する電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルの生物物理学的及び薬理的性質について、パッチクランプ法を用いて詳しく解析した。

継代培養後3日目以降の細胞において、電極内K<sup>+</sup>をCs<sup>+</sup>で置換することによりK<sup>+</sup>電流をブロックし、



細胞外液を10 mMBa<sup>2+</sup>溶液とした後、-104 mVの保持電位から10 mVステップの脱分極刺激を36 mVまで与えて得られた内向き電流の電気生理学的性質について詳細に解析した。その後、各種のCa<sup>2+</sup>チャネルブロッカーによりチャネルのサブタイプの同定を試みた。この内向き電流は、一過性の時間経過を示し、5 μM nifedipineによりブロックされなかった。このチャネルを流れるCa<sup>2+</sup>電流のhalf-maximum activationとhalf-maximum inactivationの電位の値は、T型の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルのサブタイプであるα<sub>1H</sub>に近いことが分かった。しかしながら、100 μM Ni<sup>2+</sup>では、全く抑制されず、T型(α<sub>1H</sub>)の薬理的性質と相異していた。さらに0.5 μM BAYK 8644(L型Ca<sup>2+</sup>チャネルのagonist)により増強されないこと、3 μM ω-Conotoxin(N型Ca<sup>2+</sup>チャネルのblocker)、0.2 μM ω-Agatoxin(P/Q型Ca<sup>2+</sup>チャネルのblocker)及び5 μM nifedipine(L型Ca<sup>2+</sup>チャネルのblocker)によりブロックされないことから、L、N、P/Q-typeのCa<sup>2+</sup>チャネルではなく、薬理的に新しい性質のCa<sup>2+</sup>チャネルであることが分かった。また、非選択的Ca<sup>2+</sup>チャネルブロッカーである0.1 mM Cd<sup>2+</sup>により、大きく抑制された。さらに、電気生理学的性質の解析により、このチャネルは定常状態でも開閉していることが示唆された。

骨芽細胞に存在するCa<sup>2+</sup>チャネルは、細胞の増殖、分化、骨基質の産生、ホルモン等に対する応答の際に、セカンドメッセンジャーとしての細胞外Ca<sup>2+</sup>イオンを細胞内へ取り込む重要な機能を有するという多くの報告がある。今回の実験で得られた結果より、骨芽細胞株MC3T3E-1も、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルを有し、定常状態でもチャネルの開閉が行われており、細胞機能に重要な役割をもつと考えられる。各種の研究において、骨芽細胞株MC3T3E-1は広く用いられており、本研究の成果は骨組織の研究において重要であると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

豊屋睦人は平成8年3月鹿児島大学歯学部を卒業した後、歯科医師国家試験に合格し、同年4月より長崎大学大学院歯学研究科に入学、現在に至っている。

平成12年9月8日、学位論文の基礎となる研究要旨及び経過を、歯学研究科が主催した研究経過報告会で発表した。また、語学試験(ドイツ語)には、平成14年2月1日に合格した。

学位論文の主論文として、「Biophysical and Pharmacological Properties of Voltage-gated Calcium Channel in Osteoblastic MC3T3E-1 Cells」(歯科基礎医学会雑誌第44巻第2号:2002.4.20日発行予定)を、歯学研究科長に提出し、博士(歯学)の学位を申請した。歯学研究科委員会は、これを平成14年2月20日の定例委員

会に付議し、論文の内容の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、3名の審査委員を選定した。審査委員は、共同で論文の内容を慎重に審査し、申請者から研究内容の報告を受けた後、試問を行い、論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成14年3月20日の歯学研究科教授会に報告した。

本研究は骨芽細胞様細胞MC3T3E-1に存在する電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルの生物物理学的及び薬理的性質をパッチクランプ法を用いて詳しく解析したものである。電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルは、多くの種類の細胞に存在しその細胞機能と深く関わっており、骨芽細胞においても、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルに関する多くの報告があり、細胞の増殖・分化、骨基質蛋白の産生等に関与し、骨代謝において重要な役割を演じていると考えられている。電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルには、6つのサブタイプが存在し、それぞれ電気生理学的・薬理的に異なる性質を有している。骨芽細胞では、T型とL型のサブタイプの存在が報告されている。この研究で用いたMC3T3E-1は、多くの実験系で用いられているが、Ca<sup>2+</sup>チャネルのサブタイプは明確に同定されておらず、細胞機能との関連性を知るうえで重要であると考えられた。そこで、学位申請者は、電気生理学的実験手法であるパッチクランプ法を用いて、この細胞のCa<sup>2+</sup>チャネルを詳しく解析した。10 mM Ba<sup>2+</sup>溶液中で電位レベルを-104 mVの保持電位からステップパルスにより脱分極させると、一過性の内向き電流を示した。この内向きBa<sup>2+</sup>電流の活性化の閾値は、約-60 mVであり、ピーク値は、-40 mVと-20 mVの間に存在した。

内向きBa<sup>2+</sup>電流の正常時の活性化と不活性化の曲線から-70 mVと-40 mVの範囲においてウィンドー電流が観察された。Cd<sup>2+</sup>(0.1 mM)は、内向きBa<sup>2+</sup>電流を約60%抑制した。Ni<sup>2+</sup>(0.1 mM, T型とR型Ca<sup>2+</sup>チャネルの阻害剤)、ニフェジピン(5 μM, L型Ca<sup>2+</sup>チャネルの阻害剤)、オメガコノトキシン(3 μM, N型Ca<sup>2+</sup>チャネルの阻害剤)及びオメガアガトキシン(200 nM, P/Q型Ca<sup>2+</sup>チャネルの阻害剤)は、この電流を抑制しなかった。Bay K 8644(0.5 μM, L型Ca<sup>2+</sup>チャネルのジハイドロピリジン型促進剤)もBa<sup>2+</sup>電流に影響しなかった。以上の結果より、MC3T3E-1細胞には、新しい種類のCa<sup>2+</sup>チャネルが発現し、定常状態でも開閉が行われており骨代謝に深く関与していることが示唆された。

本研究は骨芽細胞様細胞MC3T3E-1に新しい種類の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルが存在することを初めて示唆したものである。これにより、この細胞を用いた骨芽細胞機能及び骨代謝の解明に大きく貢献するものと

考えられる。

下記審査委員会は本論文は、骨芽細胞の生理機能に深くかかわっており、今後、歯学の進歩に貢献するものと評価し、博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者	主査	教授	吉田	教明
	副査	教授	戸田	一雄
	副査	教授	山口	朗

敦見将人

(兵庫県)昭和45年2月9日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 シクロデキストリンの多官能化による酵素モデルの創製

論文内容の要旨

天然酵素が持つ反応特性の利用と応用が様々な分野で行われている。しかしながら、酵素を利用する際、その欠点、即ち、熱安定性、至適pH範囲、有機溶媒への溶解性等の問題があり、それらの問題点を克服したり、天然酵素以上の触媒能、分子認識を有する人工酵素の設計に関する研究は意義深いものである。

著者は、シクロデキストリン(以下CD)の多官能化による酵素モデルの創製を目的として研究を行った。

1. CD双核錯体によるアミド及びエステル加水分解

近年、加水分解触媒能を有する様々な双核金属錯体が報告されている。しかし、それらのほとんどは基質捕捉部位を有していない。著者は、β-CDを基質捕捉部位として用い、それに金属[Cu(II), Zn(II)]錯体中心を2つ導入した3種(AB, AC, AD)のCD双核金属錯体を合成し、活性型アミド及びエステル加水分解反応における触媒能について検討を行った。

アミドは、pH8.4、25℃の無触媒条件下で1年以上の半減期を有する。CDの単核Cu(II)錯体及びZn(II)錯体は、いずれもアミド加水分解反応を10倍程度しか加速しなかった。しかし、双核Cu(II)錯体(AC体)を用いるとアミドの加水分解反応を大きく促進し、607倍の加速がみられた。これは、単核Cu(II)錯体に対し57倍の加速である。双核Cu(II)錯体の反応速度は、pH8.4で最大に達し、pHがそれより上下することによって減少する特徴的なベル型曲線を示した。これは、アミド加水分解において2つのCu(II)錯体中心が一般酸塩基として機能し、効果的な協同作用を果たしている事を強く示唆している。

また、エステル加水分解反応における検討でも2つの金属中心が協同的に作用する事、及び金属中心の配置がエステル加水分解反応における触媒能に影響を及ぼす事が明らかとなった。

2. EDTA-Ce(IV)錯体で架橋したCD二量体による

リン酸ジエステルの加水分解

天然加水分解酵素の多くは、その活性部位に金属イオンが存在し、機能発現の際、中心的な役割を担っている。ランタノイド系金属イオンは、アミド及びリン酸ジエステルの加水分解反応に対し高い触媒能を有することが知られており、なかでもCe(IV)が大きな注目を集めている。著者は、2つのシクロデキストリンをEDTAで架橋した4種の二量体を合成し、Ce(IV)錯体としてリン酸ジエステル(BNPP)の加水分解反応に対する触媒能の検討を行った。その結果、CD二量体のCe(IV)錯体はpH7.0、25℃条件下、BNPPの加水分解反応を大きく加速(5600万倍)した。その際、シクロデキストリンとEDTA-Ce(IV)錯体による協同作用の効果は、疎水結合部位を持たない対照化合物のCe(IV)錯体を用いた実験から500倍以上であることが分かった。さらに、シクロデキストリン二量体の修飾糖のタイプ(グルコシドタイプまたはアルトロシドタイプ)や架橋位置(C6, C3, C2)が2つのCD疎水空洞と活性中心(Ce(IV))間の協同作用によって生み出される触媒能に大きく関与することが明らかとなった。

3. CD二量体 Ce(IV)錯体によるルミノール化学発光反応の諸要素の組織化

化学発光(Chemiluminescence)は、物質の変化に伴って生成した励起分子が基底状態に戻る際に光が放出される現象をいう。ルミノールは、アルカリ溶液中、過酸化水素によって酸化され最終生成物として窒素と3アミノフタル酸を与える。その際、3アミノフタル酸の励起1重項状態が生じ、これが放出する蛍光が化学発光である。

著者は、CD1級面同士で連結した二量体のCe(IV)錯体をルミノール化学発光反応の触媒として用い、発光量を大きく増加させることに成功した。これは、Ce(IV)錯体中心に過酸化水素が配位し、ルミノールがシクロデキストリン空洞に捕捉されることによって基質(ルミノール)-反応試薬(過酸化水素)の近接効果が生れ、速やかに酸化反応が進行した結果と考えられる。一方、2級面同士で連結した二量体を用いても発光量は、大きく増加しなかった。その理由としてCD2級水酸基(pKa=12)の一部が、反応条件下(pH11.6)で解離し、2級面の疎水性を低下させた為、ルミノールがCe(IV)錯体中心から離れた位置に配置されたことによると推察した。これらの現象は、酵素の分子配向制御機能(酵素基質複合体のなかでは基質反応点と酵素の触媒官能基群が近接して正確に配置される)と同様に見出すことが出来る。

4. 6<sup>A</sup>, 6<sup>C</sup>, 6<sup>E</sup> トリ(0スルホニル)βCDの新規合成法の開発

天然酵素は、その一次、二次及び三次構造によって複数の触媒基が特定の位置に配置されている。CDを用いて酵素モデルを構築する際、複数の触媒基を適切な位置に導入する事が求められる。そこで、シクロデキストリン位置選択的3官能化のアプローチとしてモノ置換シクロデキストリンに適当な芳香族ジスルホニルジクロリドで渡環ジスルホニル化する(キャップを施す)手法を考案し、モノ置換シクロデキストリンと芳香族ジスルホニルジクロリドの組み合わせについて検討を行った。その結果、6<sup>O</sup>トシルβ-シクロデキストリンをジベンゾフラン2,8ジスルホニルジクロリドで渡環ジスルホニル化することにより6<sup>A</sup>, 6<sup>C</sup>, 6<sup>E</sup>トリ(0スルホニル)βシクロデキストリンを位置選択的かつ高収率で与える手法を見出した。

#### 論文審査の結果の要旨

敦見将人は、平成11年4月長崎大学大学院薬学研究科博士後期課程に入学し、所定の単位を修得した。この期間を通して、環状糖シクロデキストリン(以下CDと略する)を分子認識素子として、その化学修飾に基づく人工酵素の構築に関する研究を行ってきたが、これらの研究成果を基に学位論文(主論文)「シクロデキストリンの多官能化による酵素モデルの創製」を完成し、主論文の基礎となる原著論文(参考論文)2編と副論文2編を付して、平成14年1月博士(薬学)の学位を申請した。薬学研究科教授会は同年1月23日の定例会において論文内容の要旨、資格等を検討した結果、受理を決定し、下記の論文審査担当者を選出した。審査担当者は、その内容を慎重に審議した上で、2月1日の博士論文発表会において試問を行い、次いで2月12日最終審査を行った。

審査委員会は、下記の審査結果及び最終試験の結果を、平成14年3月6日の研究科教授会に報告した。

天然酵素が持つ反応特性の利用と応用が様々な分野で行なわれている。しかしながら、酵素を利用する際、その欠点、即ち、熱安定性、至適pH範囲、有機溶媒への溶解性等の問題があり、それらの問題点を克服したり、天然酵素以上の触媒能、分子認識を有する人工酵素の設計に関する研究は意義深いものである。CDは、その空孔に他の分子(ゲスト分子)を包接できることから、人工酵素・レセプターを創製するための素子として注目されてきた。申請者は、CDの多官能化による酵素モデルの創製を目的として研究を行った。申請論文は4章より成り立っている。

第1章では、合成したCD双核錯体によるアミド及びエステル加水分解を記している。近年、加水分解触媒能を有する様々な双核金属錯体が報告されている。しかし、それらのほとんどは基質捕捉部位を有していない。申請者はβ-CDを基質捕捉部位として用い、そ

れに金属[Cu(II), Zn(II)]錯体中心を2つ導入した3種(AB, AC, AD)のCD双核金属錯体を合成し、活性型アミド及びエステル加水分解反応における触媒能について検討を行った。アミドは、pH8.4、25℃の無触媒条件下で1年以上の半減期を有する。CDの単核Cu(II)錯体及びZn(II)錯体は、いずれもアミド加水分解反応を10倍程度しか加速しないが、双核Cu(II)錯体(AC体)を用いるとアミドの加水分解反応を大きく促進し、607倍の加速を認めた。これは、単核Cu(II)錯体に対し57倍の加速である。双核Cu(II)錯体の反応速度は、pH8.4で最大に達し、pHがそれより上下することによって減少する特徴的なベル型曲線を示した。これは、アミド加水分解において2つのCu(II)錯体中心が触媒として機能し、効果的な協同作用を果たしている事を示唆するものである。また、エステル加水分解反応における検討でも2つの金属中心が協同的に作用する事、及び金属中心の配置がエステル加水分解反応における触媒能に影響を及ぼす事を明らかにした。

第2章では、EDTA-Ce(IV)錯体で架橋したCD二量体によるリン酸ジエステルの加水分解について述べている。ランタノイド系金属イオンは、アミド及びリン酸ジエステルの加水分解反応に対し高い触媒能を有することが知られており、なかでもCe(IV)が大きな注目を集めている。申請者は、2つのCDをEDTAで架橋した4種の二量体を合成し、Ce(IV)錯体としてリン酸ジエステル(BNPP)の加水分解反応に対する触媒能の検討を行った。その結果、CD二量体のCe(IV)錯体がpH7.0、25℃条件下、BNPPの加水分解反応を大きく加速すること(5600万倍)を認めた。その際、CDとEDTA-Ce(IV)錯体による協同作用の効果は、疎水結合部位を持たない対照化合物のCe(IV)錯体を用いた実験から500倍以上であることを明らかにした。さらに、CD二量体の修飾糖のタイプ(グルコシドタイプまたはアルトロシドタイプ)や架橋位置(C6, C3, C2)が2つのCD疎水空洞と活性中心(Ce(IV))間の協同作用によって生み出される触媒能に大きく関与することも明らかにした。

第3章では、EDTA-Ce(IV)錯体で架橋したCD二量体によるルミノール化学発光反応の諸要素の組織化について論述している。ルミノールは、アルカリ溶液中、過酸化水素によって酸化され最終生成物として窒素と3アミノフタル酸を与える。その際、3アミノフタル酸の励起1重項状態が生じ、これが放出する蛍光が化学発光である。申請者は、第2章で記述したCD1級面同士で連結した二量体のCe(IV)錯体を、ルミノール化学発光の触媒として用い、発光量を大きく増加させることに成功した。これは、Ce(IV)錯体

中心に過酸化水素が配位し、ルミノールが CD 空洞に捕捉されることによって基質(ルミノール) - 反応試薬(過酸化水素)の近接効果が生れ、速やかに酸化反応が進行した結果と考察している。一方、2級面同士で連結した二量体を用いても発光量は、大きく増加しなかったが、その理由として CD 2 級水酸基 (pKa = 12) の一部が、反応条件下 (pH11.6) で解離し、2級面の疎水性を低下させた為、ルミノールが Ce(IV) 錯体中心から離れた位置に配置されたことによると推察している。これらの現象は、酵素の分子配向制御機能(酵素基質複体のなかでは基質反応点と酵素の触媒官能基群が近接して正確に配置される)と同様に見なすことができ、興味深い。

第4章では、6A, 6C, 6E トリ(オスルホニル)β CD の新規合成法の開発について論述している。天然酵素は、その一次、二次及び三次構造によって複数の触媒基が特定の位置に配置されている。CD を用いて酵素モデルを構築する際、複数の触媒基を適切な位置に導入する事が求められる。そこで、申請者は、CD の位置選択的3官能化のアプローチとしてモノ置換 CD に適当な芳香族ジスルホニルジクロリドで渡環ジスルホニル化する(キャップを施す)手法を考案し、二者の種々の組み合わせについて検討を行った。その結果、6 O トシル β CD をジベンゾフラン-2,8-ジスルホニルジクロリドで渡環ジスルホニル化することにより 6A, 6C, 6E トリ(オスルホニル)β CD を位置選択的かつ高収率で与える手法を見出した。

以上をまとめると、申請者の研究は CD を基質の認識部位とし、CD を位置特異的に多官能化することによって人工酵素を創出する研究であり、それに成功を収めた。この人工酵素は効率的に作用するだけでなく、酵素の持つ種々の特徴を持っており、学術的価値は極めて高い。また、これらの研究の基礎となる CD の位置特異的三官能化への道を開拓したことは、さらに高次の人工酵素創製へつながるものであり、この分野の研究の発展に大きく寄与するものである。

薬学研究科教授会は審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は薬学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(薬学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 藤田 佳平衛  
副査 教授 松村 功啓  
副査 教授 甲斐 雅亮

張 穎 君

(中国) 1968年9月27日生

授与年月日 平成14年3月31日

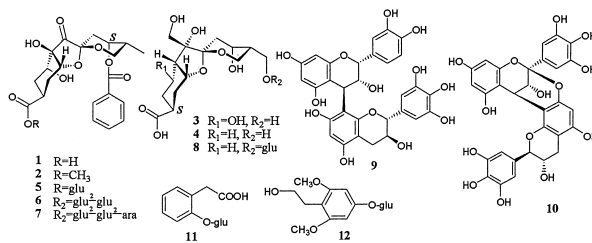
主論文 民間薬 *Phyllanthus emblica* の成分に関する化学的研究及び生物活性

論文内容の要旨

*Phyllanthus emblica* (余甘) は中国西部の雲南省やチベットの少数民族が抗炎症薬として利用し、果実は薬用及び食用にされるトウダイグサ科の木本植物である。また、インドの伝統医学アユルベータでも使用されており、<sup>1)</sup>最近では果実が日本にも健康食品として輸入されている。本研究はこの植物の機能性を化学的に裏付けることを目的として、*P. emblica* の成分に関する化学的研究及び生物活性について検討を行った。

1. 根の成分<sup>2)</sup>

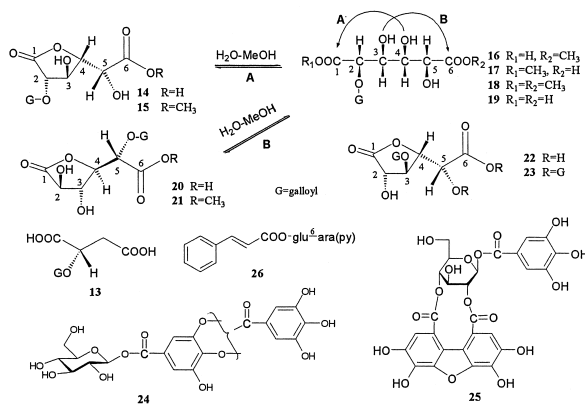
余甘の根の60%アセトン抽出エキスを水に懸濁し、酢酸エチル及び1-ブタノールで順次分配した。得られた各層を各種カラムクロマトで分離精製し、既知化合物(芳香族化合物4種、縮合型タンニン8種、加水分解型タンニン5種)に加えて、8種の新規セスキテルペン及び配糖体(1-8)、2種の新しい proanthocyanidin (9,10)、及び2種のフェノール配糖体(11,12)を単離した。構造は、2次元 NMR を含む各種スペクトルデータの詳細な解析及び化学的手法の結果に基づいて決定した。1,2,5,7は高度に酸化された norbisabolane 型骨格を有する新規ノルセスキテルペンとそのエステル配糖体であり、3,4,8は bisabolane 型骨格を有する新規なテルペノイドとその glucoside であることが明らかになった。絶対配置については、1を酸化的に分解して得られた2級アルコールに改良 Mosher 法を適用することによって決定した。また、3と4は PGME 法<sup>3)</sup>を適用することによって絶対配置を決定した。



2. 果汁の成分<sup>4)</sup>

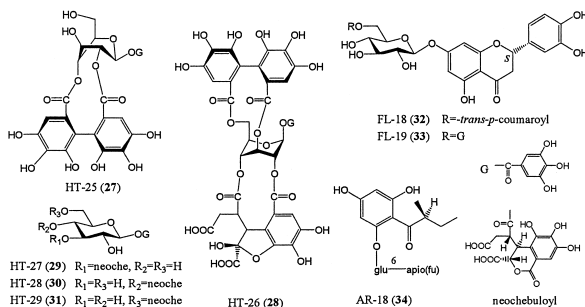
余甘の果汁粉末について、根と同様に抽出、分離精製し、既知フェノール化合物(加水分解型タンニン11種、芳香族化合物6種、フラボノイド類5種)に加えて、新規化合物として(-)-malic acid 2-O-gallate (13)と mucic acid methyl ester 及び lactone の gallate 類(14-23)、さらに新加水分解型タンニン24と25、及びケイヒ酸エステル配糖体26を分離した。13-26は1

D, 2D NMR 実験及び化学的方法により下記の如く構造を決定した。これらのうち, 14 21は果汁の主ポリフェノール成分であるが, 水 - メタノール混液中で互いに平衡関係にあるため, 分離が極めて困難であった。興味深いことに19のラクトン体である14と20はラクトン部分に関して互いに鏡像体の関係にある。以上の結果から, mucic acid gallate (19) は, 鏡像の関係にある2つの lactone 体 (14 20) との間の平衡混合物として存在していると推定される。化合物25の構造は, NMR データの解析及び既知化合物から化学的に合成することによって確認した。



### 3. 枝葉の成分<sup>5)</sup>

余甘の新鮮な枝葉について, そのエタノールエキスを根と同様に分離精製し, 既知化合物〔芳香族化合物8種, フラボノイド17種, 有機酸配糖体1種, 縮合型タンニン8種, 加水分解型タンニン16種〕に加えて, 5種の新規エラジタンニン (27 31), 2種のアシル化フラバノン配糖体 (32 33), 及び1種のフェノール配糖体 (34) を分離した。それらの構造は, 1D, 2D NMR 実験及び化学的方法により下記の如く決定した。化合物27は天然から初めて得られた2, 4 HHDP glucoseであり, 28は glucose の C 2 / C 4 位に新たなアシル基が結合している。また, 29~31は neochebuloyl 1(β) O galloylglucose の位置異性体である。



### 4. 生物活性

本研究で得られた主要な化合物について, DPPH ラジカル消去活性, methyl linoleate 過酸化抑制作用, hyaluronidase (Hase) 阻害作用, 及び腫瘍細胞の増殖

抑制活性を検討した (Table 1)。

Table 1. Bioactivities of some selected constituents from *P. emblica*

D: DPPH radical scavenging activity; M: inhibitory activity on methyl linoleate peroxidation; H: inhibitory activity on hyaluronidase; T: inhibitory activity on the growth of tumor cells

Compounds	D	M	H	[GI <sub>50</sub> (μg/ml)]		
	SC <sub>50</sub> (μM)	Inhi.Act.(%)	IC <sub>50</sub> (mM)	B16F10	HeLa	MK 1
1	-	34.5	-	-	-	-
5	-	0.9	-	-	-	-
6	-	8.5	-	2	3	7
7	21.11	1.8	1.90	3.5	12	7
13	1.98	7.8	6.40	12	20	35
19	2.17	7.6	7.12	15	24	41
28	0.25	29.1	8.71	6	12	20
32	1.87	36.3	0.28	16	30	68
33	1.01	43.4	0.09			
corilagin	0.70	19.2	0.36	3	19	8
geraniin	0.58	25.5	0.17	2	11	9
chebulagic acid	0.51	19.7	0.08	8	15	21
EGCG	0.81	47.3	0.12	5	17	4
dl α tocopherol	3.86					
L ascorbic acid	4.46					
Trolox		36.5				
DSCG			6.99			

多くのフェノール性化合物は強い DHHP ラジカル消去活性, 及び Hase に対する阻害作用を示し, これらの作用について, 構造と活性との関係を検討した結果, フェノール性水酸基の数が活性発現に重要であることがわかった。また, 縮合型タンニンとフラボノイド類では, 分子内 ortho- (di tri) フェノール性水酸基の有無が重要である。セスキテルペン類は, 抗酸化活性及び Hase 阻害作用をほとんど示さなかったが, トリグリコシドエステル配糖体である 7 だけは Hase 阻害作用を示した。これらの活性に比べて, methyl linoleate の過酸化に対する抑制作用は positive control として用いた Trolox より弱く, 構造と活性の相関も弱かった。腫瘍細胞の増殖に対する抑制活性については, 検定した19種の化合物のうち, 大部分は増殖抑制活性を示した。特に, ノルセスキテルペン配糖体である 6 及び 7 は強い活性を示した。しかし, それらのアグリコンである 1 及びモノグリコシド 5 では, ほとんど活性がなかった。このことから, これらの化合物の細胞毒性には, 糖の数が重要であることが分った。

以上, 本研究で著者は民間薬余甘の根より29種, 果汁より36種, 枝葉より58種の化合物を分離し構造を決定した。それらはセスキテルペン, 芳香族化合物, 有機酸配糖体及び gallate 類, タンニン及びフラボノイ

ドに属する多様なものであり、計100種の化合物のうち、34種が新規化合物であった。また、得られた主要な化合物について DPPH ラジカル消去活性, methyl linoleate 過酸化抑制作用, hyaluronidase 阻害作用, 及び腫瘍細胞の増殖抑制活性の検討を行った。その結果、余甘の抗酸化作用, 抗炎症作用, 及び一部の民族の使用目的である抗腫瘍作用を化学的に裏づけることができた。本研究の結果は、今後余甘を新たな健康食品や天然医薬品として利用する上で貢献するものであると考える。

### 【文献】

- 1) Xia, Q.; Xiao, P. -G.; Wang, L. -W.; Kong, J., *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **22**, 515 - 518 (1997)
- 2) a. Zhang, Y.-J.; Tanaka, T.; Iwamoto, Y.; Yang, C. R.; Kouno, I.; *Tetrahedron Lett.*, **41**, 1781 - 1784 (2000);  
b. Zhang, Y. J.; Tanaka, T.; Iwamoto, Y.; Yang, C. R.; Kouno, I., *J. Nat. Prod.* **63**, 1507 - 1510 (2000); c. Zhang, Y. J.; Tanaka, T.; Iwamoto, Y.; Yang, C.R.; Kouno, I., *J. Nat. Prod.* **64**, 870 - 873 (2001).
- 3) Yabuuchi, T., Kusumi, T. *J. Org. Chem.* **65**, 397 - 404 (2000).
- 4) Zhang, Y. -J.; Tanaka, T.; Yang, C. R.; Kouno, I., *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 537 - 540 (2001).
- 5) Zhang, Y. -J.; Abe, T.; Tanaka, T.; Yang, C. R.; Kouno, I., *J. Nat. Prod.* **64**, 1527 - 1532 (2001).

### 論文審査の結果の要旨

張 穎君は、平成2年9月中国科学院昆明植物研究所修士課程へ入学し、平成5年7月同課程終了後、直ちに同研究所に Assistant Professor として勤務した。平成10年10月に文部省国費留学生として来日し、長崎大学留学生センターでの6カ月間にわたる日本語研修の後、平成11年4月長崎大学大学院薬学研究科博士後期課程に入学して、現在に至っている。申請者は、昆明植物研究所で研究を開始して以来、一貫して中国雲南省産薬用植物に関する化学的研究を展開しているが、長崎大学大学院薬学研究科博士後期課程入学後開始した、*Phyllanthus emblica* に関する研究成果をもとに学位論文(主論文)「民間薬 *Phyllanthus emblica* の成分に関する化学的研究及び生物活性」をまとめ、主論文の基礎となる原著論文(参考論文)6編と副論文3編を添付し、平成14年1月、博士(薬学)の学位を申請した。薬学研究科教授会は同年1月23日の定例会において論文内容の要旨、資格等を検討した結果、受理を決定し、下記の論文審査担当者を選出した。

審査担当者は、その内容を慎重かつ厳正に審議した上で、2月1日に開催された博士論文発表会において試問を行い、次いで2月12日に最終審査を行った。そして、その論文内容の要旨と審査結果を平成14年3月

6日の研究科教授会に報告した。

本論文は、中国、インド、エジプトなど広い地域の多数の民族によって抗炎症薬、抗腫瘍薬、あるいは食品などとして伝承されてきた民間薬 *Phyllanthus emblica* (中国名「余甘」)の有効性を化学的に確立し、機能性食品や医薬品として応用するために必要な基礎的知見を得ることを目的として、根、果汁、枝葉の成分を徹底的に分離して得られた100種の化合物について構造解析を行うと共に、得られた成分について生物活性評価を行った結果について述べたものである。

第1章では、*P. emblica* の根、果汁、及び枝葉からの成分分離について詳細を述べている。この植物が重要な民間薬でありながら、これまで成分について未解明のまま残されていたのは、その成分構成が極めて複雑で分離が困難であったためであるが、ここでは多種のクロマト担体と溶媒系の組み合わせを駆使して、新化合物34種を含む、計100種の成分分離に成功している。

第2章では、根から得られた8種の新規テルペノイド及びその配糖体の化学構造の解明について述べている。これらは植物界に非常に稀な高度に酸化された骨格を持ち、特に phyllaemblic acid と命名した化合物は、bisabolane 骨格の中央部の炭素が欠落している点で全く新規な骨格を有する。これらの構造決定において、分解反応と誘導体化を駆使して改良 Mosher 法及び PGME 法を適用し、極めて明快に絶対構造を明らかにしている点が評価される。

第3章では、果汁、根及び枝葉から分離した30種の有機酸 gallate などの構造について述べている。中でも、新化合物として果汁から分離した mucic acid 及びその 1,4-lactone 体の gallate 類は、果汁の主フェノール成分であって、民間薬として最も広く利用されている果実の機能性を議論する上で最も重要な化合物に位置づけられる。母核である mucic acid は光学不活性なメソ化合物であるが、植物体ではエナンチオ選択的に galloyl 基が C-2 位に結合し、光学活性の mucic acid gallate 類が生合成されたことを明らかにした。しかも、ラクトン体においてはそれらの骨格部分が互いに鏡像体の関係にあることも明らかにしている。これらの多くは互いに平衡状態にあることから、通常の方法では極めて精製困難である。したがって、申請者が各成分の純粋分離に成功し、しかもその立体構造と平衡関係を明らかにしたことは、高く評価すべきものである。

第4章では、53種のタンニン及びフラボノイド化合物の構造について述べている。ここでは枝葉からの phyllanemblinins B~F と命名した5種の新規エラジタンニンが重要で、中でも phyllanemblinin B は hexahy-

droxydiphenyl 基が glucose の C - 2 / C - 4 位に結合した初めてのタンニンであり, phyllanemblinin C は hexahydroxydiphenyl 基が酸化的に代謝された新規アシル基を持つタンニンである。これらはタンニンの構造化学及び代謝を考える上で重要な化合物として位置付けられるものである。

第5章では, *P. emblica* から分離した化合物について, 抗酸化活性の評価として DPPH ラジカル消去活性と methyl linoleate 過酸化抑制作用を, 抗炎症作用の評価として hyaluronidase 阻害作用を比較し, さらに, チベットやエジプトなど, 一部の民族の治療目的である抗癌作用を裏づけるために, 主要な成分について腫瘍細胞の増殖抑制活性の検討を行った。DPPH ラジカル消去活性については, 多くのフェノール性化合物が positive control として用いた tocopherol や ascorbic acid より強い消去活性を示し, その活性が分子中のフェノール水酸基の数に相関することを示した。また, 果汁の主成分である mucic acid 2-O-gallate や, 枝葉の主ポリフェノールである chebulagic acid と geraniin の強いラジカル消去活性を示すことで, 本植物の果実や葉が優れた抗酸化機能性素材であることを裏付けている。次に, ラジカル発生剤 AMVN による methyl linoleate の過酸化に対する抑制作用を比較した結果, epigallocatechin 3-O-gallate, 及び2種のフラボノイド配糖体が Trolox より強い活性を有することを明らかにした。また, 抗炎症作用の指標としての hyaluronidase に対する阻害作用については, ほとんどのフェノール性化合物の阻害作用が positive control の DSCG より強いことを明らかにした。中でも加水分解型タンニンである 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose の活性が強いことを示し, ここでもフェノール性水酸基の数が活性発現に重要であることを明らかにしている。最後に, 3種の腫瘍細胞に対する増殖抑制活性を測定し, 本植物の主要成分の多くが増殖抑制活性を有することを述べている。特に, ノルセスキテルペンの細胞毒性に糖の数が重要であることを明らかにした点が注目される。

この研究で申請者は, 民間薬 *P. emblica* の根より29種, 果汁より36種, 枝葉より58種の化合物を単離し, 構造を決定した。それらはセスキテルペン, 芳香族化合物, 有機酸配糖体及び gallate 類, タンニン及びフラボノイドに属する多様なものであり, 計100種の化合物のうち, 34種が新規化合物であった。また, 得られた主要な化合物について DPPH ラジカル消去活性, methyl linoleate 過酸化抑制作用, hyaluronidase 阻害作用, 及び腫瘍細胞の増殖抑制活性の検討を行って, 本植物の抗酸化作用, 抗炎症作用, 及び一部の民族の使用目的である抗腫瘍作用を化学的に裏付けることに成

功した。本研究は, 極めて困難な成分分離を達成し, 構造決定においても的確かつ独創的な点が認められ, 得られた結果は, 天然物有機化学の分野で重要な知見であることにどとまらず, *P. emblica* の機能性を科学的に示すことで伝承医薬の再評価を行い, 本植物を今後機能性食品や医薬品として応用する上で極めて貴重な化学的知見を示したもので, 予防医学や代替医療の視点からも高く評価されるべきものである。

平成14年3月6日に開催された薬学研究科教授会は, 下記審査委員会の報告に基づいて審査した結果, 本論文を薬学の進歩に貢献するものであることを認め, 博士(薬学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	河野	功
	副査	教授	畑山	範
	副査	助教授	袁	徳其
	副査	助教授	田中	隆

#### 都田真奈

(鳥取県) 昭和49年5月18日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 温熱ストレスによる p53蛋白質の活性化とその生物学的意義

#### 論文内容の要旨

我々は放射線ストレス, 紫外線ストレス, 酸素ストレスなどさまざまな環境ストレス下で生活している。我々の体を構成する一個一個の細胞のレベルで考えると, このような状況下では絶えず DNA が傷つけられたり, 蛋白質が変性させられている。それにもかかわらず, 我々の体が恒常性を維持しているのは, 組織あるいは臓器を形成している細胞がストレスに应答して損傷をもつ細胞を死に至らしめたり, 損傷を修復しているからである。このような細胞の应答をストレス応答反応と呼ぶ。

放射線ストレスの場合は主に DNA 二重鎖切断が生じ, 細胞死が誘導される。それに対し細胞は生存するために DNA 二重鎖切断を修復する。しかし間違った修復は遺伝子変化を引き起こし, ゲノムの不安定化を誘導する。これを抑制するのが p53蛋白質である。p53蛋白質は DNA 二重鎖切断を開始点とする ATM をはじめとするさまざまな経路によりリン酸化あるいはアセチル化される。その結果蓄積及び活性化した p53蛋白質は p21 や BAX などの下流の遺伝子の転写を介して老化様増殖停止やアポトーシスなどの細胞死を誘導する。

一方, 温熱ストレスは蛋白質の変性を主に引き起こし細胞死が起きる。しかしながら直接には DNA 損傷を誘導しないといわれている温熱ストレスにより p53蛋白質が活性化することが近年明らかになってきたこ

とから、放射線の場合と同様に温熱ストレスもゲノムの不安定化を引き起こす可能性が予想された。そこで本研究では温熱ストレスによる p53 蛋白質活性化とその生物学的意義を明らかにしようと試みた。

温熱処理された正常細胞において蓄積に関与しているといわれている複数の修飾部位の中で唯一 Ser15 のリン酸化が顕著に起こることを明らかにした。また Ser15 のリン酸化は AT (Ataxia Telangiectasia) の原因遺伝子産物である ATM が行っていることを *in vitro* 及び *in vivo* で証明した。さらに AT 細胞では p53 蛋白質は Ser15 のリン酸化がなくても蓄積したことから、カインース阻害剤であるウォルトマンニンにより p53 の蓄積が抑制されたことから、温熱ストレスによる p53 の蓄積に Ser15 のリン酸化は必須ではなく別のリン酸化経路が存在することを示唆した。また別のカインース阻害剤であるカルフォスチン C は p21 蛋白質の誘導を抑制した。このことは、p53 の活性化もリン酸化により制御されることを示している。

次に p53 の修飾に関わる情報伝達経路をさらに明らかにするため、温熱処理により主に生じる変性蛋白質が p53 の活性化を誘導すると考え、変性  $\beta$ -gal 蛋白質導入系を確立した。しかしながら p53 蛋白質及び p21 蛋白質の発現量に変化はなかったことから、本来細胞内に発現している蛋白質で、しかもゲノムの不安定化に影響を及ぼす可能性のある蛋白質の変性が原因ではないかと考えた。そこで、蛋白質の中で唯一自己複製する中心体に着目した。未処理細胞でも中心体には ATM や Ku86 などのリン酸化に関与する酵素が共存し、温熱処理後には中心体と p53 の相互作用が強まることを見出した。この結果から温熱処理された中心体を起因とする新規の p53 蛋白質活性化経路が存在する可能性が示された。さらに放射線照射後 DNA 損傷部位でリン酸化されるヒストン H2AX のリン酸化が温熱処理により誘導されることを発見した。リン酸化 H2AX の存在形態が放射線の場合と全く異なっていたことから、温熱処理が放射線とは違う変化をクロマチン構造に引き起こし、これが引き金となって p53 蛋白質を活性化する経路が存在する可能性を提示した。

温熱処理により活性化した p53 は p21 蛋白質を誘導し、それに引き続き S 期の細胞の割合が減少して、12 時間以内に G1 期停止が起こることが明らかになった。さらに処理後 5 日目では SA- $\beta$ -gal を発現する細胞が観察されたことから、温熱処理による G1 期停止は老化様増殖停止であることからわかった。RB 蛋白質の脱リン酸化は S 期の細胞の割合が減少した後に起こったことから、温熱処理後 p53 が引き起こす老化様増殖停止の開始に RB は必要でないことが明らかになった。

ゲノムの守護神である p53 が温熱処理により活性化したことは、温熱処理がゲノムの不安定化を誘導していることを示している。温熱処理により中心体の数が増加することを発見した。温熱処理後中心体数の増加した細胞の増殖は p53 により抑制された。さらに温熱処理後 120 時間で染色体の構造異常が増加することも見出した。以上の結果から、温熱処理は中心体異常により染色体数不安定化をまたクロマチン構造の変化により染色体構造異常を引き起こすことが明らかになった。さらに p53 はこれらの異常をもつ細胞の増殖を停止させることにより温熱処理後もゲノムの守護神として機能することが明らかになった。

以上の結果より温熱ストレス応答反応をまとめた。温熱処理により中心体あるいはヒストンが変性する。この変性はゆくゆくはゲノムの不安定化を誘導する可能性がある。そのため、これらの変性を起因として活性化したリン酸化経路が p53 蛋白質を活性化し p21 蛋白質に依存的で RB に非依存的な老化様増殖停止を引き起こしゲノムの不安定化を抑制すると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

都田真奈は、長崎大学薬学部修士課程を終了後、平成11年4月に長崎大学大学院薬学研究科博士後期課程に入学し、保健衛生薬学講座放射線生命科学研究室において博士研究を実施した。その間、実施した研究成果を纏め学位論文(主論文)「温熱ストレスによる p53 蛋白質の活性化とその生物学的意義」を完成し、主論文の基礎となる原著論文2編と副論文2編を付して平成14年1月17日に、博士(薬学)の学位を申請した。さらに、平成14年1月23日開催の研究科教授会において博士後期課程に課せられた所定の単位の修得が認定された。これを受けて、研究科教授会で論文内容の要旨等を審査し、論文を受理して差し支えないものと認められたので、下記の審査担当者を選定し審査を開始した。審査担当者は、提出された主論文の内容を十分に熟読した後、個別に申請者と面接し提出論文の内容とともに関連する専門分野の専門知識について口頭試問を行った。さらに、同年2月1日に開催された薬学研究科博士論文発表会において同論文を発表させ、研究科教員による質疑応答を行った。一連の審査と博士論文発表会の質疑応答を踏まえて、同年2月13日に論文審査担当者による最終的な審査委員会を開催し、論文審査および最終試験の内容を検討した。その結果、審査委員会は、下記の審査結果及び最終試験の結果を、平成14年3月6日の研究科教授会に報告した。

論文の内容は、以下のように要約される。

生物は、放射線ストレス、紫外線ストレス、酸素ストレスなどさまざまな環境ストレス中で生活することにより、致命的な損傷や遺伝情報の変化などの危険に



さらされている。生体は、これらのストレスに対して、細胞レベルで様々な応答反応を起こすことにより、その恒常性を維持している。これまで、放射線や活性酸素などDNA損傷を誘発するストレスに関する研究が活発に行われ、ストレス応答反応がDNA損傷の修復やゲノムの不安定化の抑制などに重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。そして、癌抑制遺伝子産物 p53 蛋白質 (p53) がストレス応答の重要なキー分子であることが発見されるなど分子レベルの解析が進みつつある。しかし、身近なストレスの一つである温熱ストレスに関する研究は少なく、温熱ストレス応答の本体は未だ明らかにされていない。そこで、申請者は、(1) 温熱ストレスによる p53 の蓄積及び活性化機構、(2) 温熱ストレスによる細胞応答反応における p53 の役割、(3) 温熱ストレスによるゲノムの不安定化と p53 との関係等について研究を行い、その成果を本博士論文に纏めた。

まず、申請者は、温熱による p53 の蓄積には、p53 分子にある複数のリン酸化部位のうち、セリン15のリン酸化が密接に関わることを明らかにした。複数のリン酸化阻害剤を使った実験より、この p53 の蓄積の原因となる Ser15 のリン酸化は、主にウオルトマンニン処理で容易に活性が阻害されるカイネースが関与することを発見した。一方、毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia Telangiectasia; AT) の原因遺伝子産物である ATM 蛋白質 (ATM) を介したリン酸化経路も p53 の Ser15 部位のリン酸化を起こすが、このリン酸化は PKC 経路によるリン酸化とともに p53 の活性化に関与していることを発見した。こうした p53 の蓄積と活性化の機構は、放射線照射時のそれと微妙に異なるようである。例をあげれば、温熱処理によって活性化した p53 は放射線被曝時と同様に下流の p21 蛋白質を誘導し細胞周期の進行を停止させるが、放射線被曝時と異なりその過程には網膜芽細胞腫原因遺伝子産物 (Retinoblastoma; RB) 機能は不要であった。その後、細胞周期の進行が再開されず細胞増殖抑制状態が持続されると、温熱処理後5日目以降から老化細胞に特有の SA-β-gal (Senescence-associated β-galactosidase) が発現され細胞は非可逆的な増殖停止状態に陥り死を迎える。この過程でアポトーシスは全く観察されず、温熱による細胞死は、アポトーシスではなく老化様増殖停止の結果であるといえる。これら一連の発見は、温熱による細胞死のメカニズムに関する新しい発見であるとともに、温熱に対する応答反応の全容を理解するために重要な知見である。

申請者は、次に、温熱による p53 の機能発現と細胞死を引き起こす原因損傷の特定を試みた。8種のヒト由来正常および癌細胞を使い、γ-チューブリン(中心

体の構成成分の一つ)抗体を用いた免疫染色法を用いて温熱処理後の中心体構造変化を解析した。その結果、温熱処理後12時間程度で中心体が一時的に消失するが、その後、再生されることを発見した。その際、通常複数の中心体が発現するが、そのような場合、正常細胞は増殖できず死に至る。しかし、p53機能を欠失している癌細胞は増殖を続け、多くの染色体構造異常を生み出すことがわかった。中心体の変性が細胞周期制御に深く関わっていることは、(1) 中心体に ATM や HSP72 が共存する、および (2) 温熱処理によって γ-チューブリンと p53 の相互作用が増強されるなどの本研究の結果からも強く示唆される。加えて、ヒストン H2AX のリン酸化が促進されることによってクロマチン構造変化が生ずることと相俟って遺伝的不安定性が誘導されると思われる。しかし、温熱による遺伝的不安定性は、放射線の場合と異なり p53機能が正常な正常細胞ではほとんど誘導されないが、p53機能が異常な癌細胞において顕著という特徴があることがわかった。

これらの結果を総合的に解析し、申請者は、(1) 中心体およびクロマチンの変性が温熱ストレス応答を引き起こす主因であり、(2) 中心体およびクロマチン変性時に p53機能が正常に働かないとゲノム不安定化が誘導されると結論している。加えて、(3) p53機能が正常に働く場合には、p21蛋白質の転写誘導を介して永久的な増殖停止が引き起こされゲノム不安定化が抑制されていると推論している。こうした推論は、最近の他研究者の温熱ストレス発現機構に関する成果に照らして妥当なものと判断できる。また、本研究の成果は、随所に新知見が含まれ、本博士論文は、新規性の高い内容を含んでいる。

よって、薬学研究科教授会は審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は薬学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(薬学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	渡邊正己
	副査	教授	芳本忠
	副査	教授	中山守雄
	副査	助教授	児玉靖司

中島昭典

(鹿児島県)昭和39年7月31日生

授与年月日 平成14年1月31日

主論文 Fluvastatin とその代謝物の抗酸化作用に関する研究

論文内容の要旨

動脈硬化の病変形成において、LDLの酸化変性は重要な役割を果たしている。高コレステロール血症は動脈硬化に対する重要な危険因子である。HMG-CoA

還元酵素阻害薬 (statin) は、強力なコレステロール低下作用により、動脈硬化の予防と治療に貢献してきた。現在、その次のステップとして抗酸化剤による治療法が期待されている。

Fluvastatin (FV) は、インドール環を基本骨格として世界で最初に全化学合成された高コレステロール血症治療薬で、強力なコレステロール低下作用に加え、抗酸化作用も併せ持つことが知られている。FV をヒトに投与後の吸収率は90%と良好であるが、バイオアベイラビリティは約30%と広範な代謝を受けること、FV 及びその代謝物は肝臓中に高濃度に分布することが報告されている。したがって、FV 経口投与後の抗酸化作用を把握するには、FV だけでなくその代謝物の寄与も考慮し、動脈硬化病変部位だけでなく、肝臓中での抗酸化作用についても検討する必要がある。

第1章では、ヒト血漿中 FV とその代謝物の HPLC による定量法を開発し、バリデーションを行った。定量限界はいずれも10ng/mL で、検量線は10~1000ng/mL の範囲で良好な直線性を示した。日内、日間変動も良好な値が得られた。2回の凍結融解後の安定性、-30℃、一カ月間の保存安定性も確認された。本測定法は、肝マイクロソーム等、他のマトリックスへの適用も可能であり、汎用性の高い、簡便な方法である。本測定法を確立することで、FV とその代謝物の寄与について、それぞれ分けて検討することで、より精密な解析が可能となった。

第2章では、FV の細胞内への取り込み機構について検討した。標的臓器であり、高濃度の分布が報告されている肝への取り込みについては、ラット肝初代培養細胞を用いた。病変部位である血管内膜における取り込みについては、ヒト大動脈血管内皮細胞を用いた。肝細胞では、FV は濃度及び温度に依存した取り込みが認められ、特異的な取り込み機構が示唆された。また、輸送系の一部は Na<sup>+</sup> 依存及び ATP 依存であり、さらに胆汁酸の取り込みに関与する輸送系及び有機アニオン輸送系とも重複している部分があると考えられた。FV はとくに低濃度において特異的な取り込み機構により、肝細胞に選択的に取り込まれたことで、肝臓中に高濃度に分布すると考えられた。一方、血管内皮細胞では、肝細胞で認められた飽和性の取り込みは認められず、主として特異的な単純拡散によって細胞内に取り込まれると考えられた。このことから、FV は血管内皮細胞を介して血管内膜へ侵入することにより、抗酸化作用を示すものと考えられた。

第3章では、肝臓中の FV 及びその代謝物の抗酸化作用について評価するために、ラット肝マイクロソームに NADPH 添加することで惹起される過酸化脂質の生成に対する抑制効果を検討した。FV の抑制効果はミ

クロソーム濃度に依存し、0.1mg/mL において最も高い値を示した。一方、代謝物 M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>5</sub>, probucol の抑制効果は、FV と同等か、より高い値を示した。今回検討したいずれの濃度においても、pravastatin 及び simvastatin の抑制作用は殆ど認められず、FV のもつ抗酸化作用は HMG CoA 還元酵素阻害作用に依存しないと考えられた。

第4章では、FV の各光学異性体((+)FV, (-)FV) の抗酸化作用について、ラット肝マイクロソームだけでなく、ヒト肝マイクロソームを用いて、抑制効果を検討した。コレステロール低下作用が約30倍異なるにもかかわらず、各光学異性体の抑制効果は同等であり、肝マイクロソームによる種差も認められなかった。したがって、FV の抗酸化作用について立体選択性はないものと考えられた。

第5章では、5種類の活性酸素分子種(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•</sup>, <sup>•</sup>OH, OCl<sup>-</sup>, LOO<sup>•</sup>) 生成に対する FV 及びその代謝物の抑制効果を検討した。M<sub>2</sub> 及び M<sub>3</sub> は、LOO<sup>•</sup> 生成を除く、いずれの活性酸素分子種生成においても、最も強力な抑制効果を示した。M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub>, (+)FV, (-)FV は、とくに<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 生成に対して、強い抑制効果を示した。今回検討したいずれの活性酸素分子種生成においても (+)FV 及び (-)FV の抑制効果に差は認められず、抗酸化作用に立体選択的な差は認められないと考えられた。

今回の一連の検討において、FV とその代謝物は、血管内及び肝臓に広く分布すること、そして、とくに水溶性活性酸素分子種の生成を抑制することで、動脈硬化の進展抑制に寄与するものと考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

中島昭典は、昭和63年3月、鹿児島大学理学部生物学科を卒業後、同年4月鹿児島大学大学院理学研究科に入学、平成2年3月同研究科を修了した。平成2年4月、サンド薬品株式会社に入社、研究開発部生物薬剤課において5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗型吐吐剤および食欲抑制剤の臨床試験や体内動態に関する研究に従事した。平成6年10月、同社筑波総合研究所薬物動態研究部に異動後。引き続き、薬物動態に関する研究に従事した。平成9年4月からは、社名変更後のナルティスファーマ株式会社筑波研究所において、高脂血症治療薬の抗酸化作用に関する研究を行い、現在に至っている。平成13年11月、「Fluvastatin とその代謝物の抗酸化作用に関する研究」を主論文とし、その基礎となる原著論文(参考論文)5編を付して、長崎大学大学院薬学研究科教授会に博士(薬学)の学位を申請した。

提出された論文内容の要旨、参考論文、研究歴、業績目録などを、平成13年11月13日の学位申請者資格審査委員会で審査した結果、論文提出者が学位審査資格を

有することが確認され、同年12月5日の定例研究科教授会で受理を承認の上、下記の審査担当者を選定した。

審査担当者は、論文内容を慎重に審査するとともに、平成13年12月12日基礎語学力を審査するための英語の試験を行った。同日行われた博士論文発表会において、試問を行うとともに、終了後、最終審査を行った。

審査委員会は、下記の審査結果及び最終試験の結果を、平成14年1月9日の研究科教授会に報告した。

主論文は、高脂血症治療薬の Fluvastatin (FV) の抗酸化作用に関してまとめたものであり、5章からなっている。FV は世界初の完全合成された HMG-CoA 還元酵素阻害剤であり、強力なコレステロール低下作用に加え、抗酸化作用も併せ持つことが知られている。本研究では、動脈硬化治療に対する新たな薬理作用としての抗酸化作用に着目し、FV とその代謝物の抗酸化作用に関して検討している。

第1章はFV及びその代謝物の定量法の開発について論じたものである。従来法であるHPLC法は高感度ではあるがFVのみが分析対象であること、また代謝物定量用のHPLC法は操作が煩雑で、放射性同位体を使用するため汎用性が低いこと、等から簡便で汎用性の高い方法が要望されていた。そこで、ヒト血漿中のFV及び5種の代謝物の定量法として、簡便なHPLC-UV検出法を開発し、そのバリデーションを行った。本法による定量下限はヒト血漿中FV及び代謝物5種全てにおいて10ng/mLと高感度であった。検量線は10~1000ng/mLの範囲で良好な直線性( $r=0.995$ )を示し、日内、日間変動も、真度、精度ともに $\pm 15\%$ 以内と良好な値が得られた。すなわち、ヒト血漿中のFV及び5種の代謝物の測定において信頼性の高い有用な方法が開発されている。

第2章はFVの細胞内取り込み機構について論じている。FVの標的臓器であり、高濃度の分布が報告されている肝への取り込みについてはラット肝初代培養細胞を、病変部位である血管内膜における取り込みについてはヒト大動脈血管内皮細胞を用いて検討した。まず、ラット肝初代培養細胞に $[^{14}\text{C}]$ FVを添加し、37及び4で30分間インキュベート後の細胞内への取り込み量を測定した。その結果、肝細胞への取り込みには温度に依存した飽和性の取り込みが認められるとともに輸送系の一部はナトリウムイオン及びATP依存であることを示した。また、胆汁酸及び有機アニオン輸送系とも重複している部分があることを示唆した。FVは特に低濃度において特異的な取り込み機構により、肝細胞に取り込まれたことで、肝細胞中に高濃度に分布すると考えている。一方、ヒト大動脈血管内皮細胞では $[^{14}\text{C}]$ FVの温度に飽和性の取り込みは認められず、主として単純拡散により細胞内に取り込

まれることを示した。したがって、FVは血管内皮細胞を介して血管内皮へ侵入することにより、抗酸化作用を示すものと推定している。

第3章は肝臓中のFV及びその代謝物の抗酸化作用の評価を論じている。ラット肝ミクロソームにNADHを添加すること惹起される過酸化脂質の生成に対する抑制効果をTBA法で検討した結果、FVの抑制効果はミクロソーム濃度に依存し、0.1mg/mLにおいて最高値を示した。代謝物M2、M3、M5の抑制効果はFVと同等か、より高値を示し、PRも同等の抗酸化作用を示した。一方、代謝物M4とM7の阻害率はFVよりかなり低値を示し、PVはさらに低値を示した。このように、各化合物の抑制効果に差が認められたことから、抗酸化作用のメカニズムはそれぞれ異なるものと結論している。

第4章はラット肝ミクロソーム及びヒト肝ミクロソームを用いるFV、FVの光学異性体及びその代謝物の抗酸化作用について論述している。PR、ビタミン剤( $\alpha$  tocopherol, TOC)、HMG CoA還元酵素阻害剤であるPV及びsimvastatin (SV)と比較検討した結果、M2、M3、M5、PR、TOCはFVと同等かより高値の抗酸化作用を示すことを明らかにした。しかし、PV及びSVの抑制作用は殆ど認められず、FVの持つ抗酸化作用はHMG CoA還元酵素阻害作用に依存しないことを示した。また、FVの光学異性体では(+ )FVのコレステロール低下作用が(- )FVより約30倍も強いにもかかわらず、抗酸化効果は同等であり、肝ミクロソームによる種差もないことを見出して、FVの抗酸化作用に立体選択性がないことを明らかにした。

第5章は各種活性酸素分子種に対するFV、(+ )FV、(- )FV、代謝物M2~M7、PV、SV、PR及びTOCの抑制効果を論じている。M2及びM3はsinglet oxygen, superoxide anion, hydroxy radical及びhypochlorite ion生成に対し、とくに強い抑制効果を有することを見出した。Singlet oxygen生成に対する抑制効果はM4、M5、(+ )FV及び(- )FVにも認められ、(+ )FV、(- )FVの抑制効果は同等であることを示した。一方、linolenic acid peroxide生成に対する抑制効果はTOCにのみ認められたが、各種活性酸素分子種生成に対する、M7、PV、SV及びPRの抑制効果は殆どないことを明らかとした。したがって、FVとその代謝物(M2、M3、M4及びM5)は主として水溶性活性酸素分子種を抑制するものと結論している。

以上、本研究ではFVとその代謝物が血管内及び肝臓に広く分布することを明らかにした。また、代謝物M2及びM3が、水溶性活性酸素分子種による酸化ストレス保護作用を有し、脂質過酸化反応の開始を

抑制することを明らかとした。更に、TOC, PR, FV 及びその代謝物の抗酸化作用のメカニズムはいずれも異なることを示した。したがって、これらを併用することで、動脈硬化に対するより有効な治療効果が得られると考えられることから、本研究で得られた知見は薬学の発展に大いに貢献できるものと期待される。

薬学研究科教授会は審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は薬学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(薬学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 中島 憲一郎  
副査 教授 中村 純三  
副査 教授 中山 守雄  
副査 教授 黒田 直敬

## 永野 俊 玲

(鹿児島県)昭和45年4月4日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 薬物作用時における脳・腸管ペプチドの  
体液中挙動に関する臨床薬学的研究

## 論文内容の要旨

高齢者においては、特有の生理機能の低下が認められる。なかでも、唾液分泌や消化管運動などの食物摂取に関わる生理機能の低下は、quality of life を著しく妨げる要因である。こうした食物摂取に関わる高齢者の問題点に関し、さまざまな薬物治療が行われている。

一方、近年食物摂取に関わる生理機能が脳・腸管ペプチドを介して制御されることが明らかにされているが、ヒトにおける臨床薬学的研究はほとんど行われていない。そこで著者は、唾液分泌と消化管運動に着目し、関連する脳・腸管ペプチドの微量定量法を確立した後、健常人の脳・腸管ペプチドの体液中挙動を指標として、生理機能の低下を改善する薬剤の作用機構に関する臨床薬学的研究を行った。

第 章では、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide; CGRP) の EIA 法を新たに確立した。CGRP の標準曲線は  $2.1 \sim 180 \text{ fmol/ml}$  の範囲内で直線を示し、また交差反応試験と HPLC による検討から本測定系の特異性が支持された。本 EIA 法による健常人の唾液中および血漿中の CGRP 濃度を測定した結果、測定値は各々  $3.2 \pm 1.9 \text{ fmol/ml}$  および  $0.9 \pm 0.7 \text{ fmol/ml}$  (mean  $\pm$  s.d.) であった。また、substance P, motilin, 血管作動性腸管ペプチド(vasoactive intestinal peptide; VIP), gastrin および somatostatin の EIA 法の特異性を確認した。以上、臨床薬学的研究を行う上で有用な微量定量法を開発した。

第 章では、唾液分泌促進薬として臨床的に繁用される anethole trithione を健常人に単回および連続投与

後、唾液分泌作用を持つ substance P および CGRP の体液中濃度の変化を測定し、薬理作用との関連を調べるとともに、唾液分泌促進薬として治験が進んでいる pilocarpine を投与して、脳・腸管ペプチドと唾液分泌量の関係を考察した。Anethole trithione の単回投与後、唾液中 substance P と CGRP 濃度が有意に上昇し、唾液分泌量は増大傾向を示したことから、唾液分泌には唾液中 substance P と CGRP 濃度が重要であることが示された。そこで連続投与を行った結果、唾液中 substance P と CGRP 濃度および唾液分泌量に、有意な上昇が認められた。さらに、投与日数の経過に伴う唾液中脳・腸管ペプチド濃度と唾液分泌量との間に良好な正の相関が認められ、anethole trithione は唾液腺における substance P と CGRP 含有神経を刺激することにより、その唾液分泌を亢進することが新たに示された。Pilocarpine 投与後、唾液中 substance P と CGRP 濃度は有意に上昇し、唾液分泌量も有意に増大した。したがって、唾液分泌には唾液中の substance P および CGRP 濃度が重要であることが示された。

第 章では、大建中湯の経口服用後における血漿中脳・腸管ペプチド(motilin, VIP, gastrin および somatostatin) の血漿中濃度を測定し、さらに VIP 放出の調節因子とされる serotonin 濃度との関連性を調べた。また、大建中湯の薬理作用における acetylcholine の関与を精査するため、副交感神経節遮断作用を有する scopolamine 投与後の、脳・腸管ペプチド濃度に対する影響を検討した。その結果、大建中湯が末梢血中の motilin 濃度を有意に増加し、motilin を介して消化管運動を亢進することが示された。さらに、大建中湯は血漿中 VIP 濃度を有意に増加させ、いずれの被験者も腹部に若干の熱感を感じたことから、大建中湯は腸神経系の VIP 含有神経を刺激し、腹部冷感の改善作用を発現する可能性が強く示された。また、大建中湯投与後、血漿中 serotonin 濃度が有意に上昇しており、VIP 濃度の上昇は serotonin を介したものと考えられた。この大建中湯による血漿中 motilin, VIP および serotonin 濃度の上昇は、scopolamine の前投与により有意に抑制されることが明らかとなった。すなわち、大建中湯は一部 muscarinic receptor を介し、motilin, VIP および serotonin の分泌を亢進していることが新たに示された。

以上著者は、脳・腸管ペプチドの EIA による微量定量法を確立し、健常人の脳・腸管ペプチド体液中挙動を指標として、臨床で用いられる薬剤のヒトにおける作用機構の一端を明らかにすることができた。これらの臨床薬学的研究結果は、臨床における薬剤の評価や作用機構の解明に有用であり、新薬の開発にも応用可能である。

### 論文審査の結果の要旨

永野俊玲は、平成5年3月に長崎大学薬学部を卒業後、同年4月に長崎大学大学院薬学研究科博士前期課程へ入学した。平成7年3月同課程修了後、平成7年4月に大分医科大学医学部附属病院薬剤部に就職し、現在に至っている。大分医科大学医学部附属病院薬剤部において、薬物作用時における脳・腸管ペプチドの体液中挙動に関する研究に従事し、一貫した研究を展開してきた。これらの研究結果を基に学位論文(主論文)「薬物作用時における脳・腸管ペプチドの体液中挙動に関する臨床薬学的研究」をまとめ、主論文の基礎となる原著論文(参考論文)7編と副論文1編を添付し、平成14年1月、博士(薬学)の学位を申請した。薬学研究科委員会は同年1月23日の定例会において論文内容の要旨、資格等を検討した結果、受理を決定し、下記の論文審査担当者を選出した。

審査担当者は、その内容を慎重かつ厳正に審議するとともに、平成14年2月13日基礎語学力を審査するための英語の試験を行った。また、平成14年2月14日に開催された博士論文発表会において試問を行い、終了後、最終審査を行った。

審査委員会は、下記の審査結果及び最終試験の結果を、平成14年3月6日の研究科教授会に報告した。

主論文は、薬剤の作用機構における脳・腸管ペプチドの関与を調べた臨床薬学的研究で、3章からなっている。近年、食物摂取に関わる生理機能が、脳・腸管ペプチドを介して制御されることが明らかになってきた。しかし、この分野のヒトにおける臨床薬学的研究に関する報告はほとんど見当たらない。本論文は、唾液分泌と消化管運動の2つの食物摂取に関わる生理機能に着目し、それらへの関与が示唆されている脳・腸管ペプチドの薬物作用時における体液中挙動を、ヒトで明らかにすることから、唾液分泌と消化管運動の低下を改善する目的で臨床使用されている薬剤の作用機構を研究した内容である。

まず第1章では、唾液分泌と消化管運動に関連する6つの脳・腸管ペプチドのEIA法による微量定量法の確立を行った。カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide; CGRP)については、二抗体固相法によるEIA法を新たに開発した。本定量法におけるCGRPの標準曲線は2.1~180 fmol/mlの範囲内で直線性を示し、交叉反応試験とHPLC法による検討から、本法がヒト体液中のCGRP濃度測定において十分な感度と特異性を示すことを明らかにした。さらに、substance P, motilin, 血管作動性腸管ペプチド(vasoactive intestinal peptide; VIP), gastrin及びsomatostatinについては、EIA法による定量法の特異性を確認し、ヒト体液中濃度測定への応用を可能とし

た。以上、6つの脳・腸管ペプチドについて、本研究における臨床薬学的検討を行う上で有用な微量定量法を確立した。

次に第2章では、唾液分泌促進薬として臨床で常用されている anethole trithione と現在治験中の pilocarpine について、薬物作用時の唾液分泌量の変化と唾液分泌に関与する2つの脳・腸管ペプチド(substance P及びCGRP)の体液中挙動を明らかにすることにより、薬理作用との関連性を考察した。Anethole trithione を健常人に単回経口投与した時、唾液分泌量の増大傾向が示されるとともに、placebo 投与群と比べて唾液中の substance P 及び CGRP 濃度の有意な上昇が新たに認められた。このことから、唾液分泌には唾液中の substance P と CGRP 濃度の上昇が重要であることが示唆された。そこで反復経口投与を行った結果、投与日数の経過に伴う有意な唾液分泌量の増大と唾液中の substance P 及び CGRP 濃度の上昇が観察され、これらの間には良好な正の相関が認められた。さらに、pilocarpine を健常人に単回経口投与した時にも、唾液分泌量の有意な増大と、唾液中の substance P 及び CGRP 濃度の有意な上昇が認められた。これらの結果から、anethole trithione と pilocarpine は、唾液腺における substance P 及び CGRP 含有神経系を刺激し、これらを放出することにより、血流増加作用や血管拡張作用が発現され、唾液分泌量を増大させることが新たに示唆された。

最後に第3章では、消化管運動改善薬として臨床で常用されている漢方薬の大建中湯投与時において、消化管運動に関与する4つの脳・腸管ペプチド(motilin, VIP, gastrin 及び somatostatin)とVIP放出の調節因子である生体内アミン serotonin の体液中挙動を明らかにすることにより、薬理作用との関連性を考察した。さらに、大建中湯の薬理作用における acetylcholine の関与を精査するため、副交感神経節遮断作用を有する scopolamine を前投与した時の脳・腸管ペプチド及び serotonin 濃度に対する影響を検討した。大建中湯を健常人に単回経口投与した時、placebo 投与群と比べて有意な血漿中 motilin 濃度の上昇が認められた。この結果から、大建中湯の消化管運動亢進作用に motilin が関与する可能性が強く示唆された。また、血漿中 serotonin 濃度の有意な上昇に符合し、血漿中のVIP濃度が有意に上昇することが明らかになった。この時、いずれの被験者においても腹部に熱感を感じたことから、大建中湯は腸神経系のVIP含有神経を刺激し、腹部冷感改善作用を発現することが示唆された。一方、血漿中の gastrin 及び somatostatin 濃度については変化は認められなかった。そこで、scopolamine の前投与を行った結果、大建中湯投与時に見られた血漿中 mo-

tilin, VIP 及び serotonin 濃度の上昇は有意に抑制された。これらの結果より、大建中湯投与時の血漿中 motilin, VIP 及び serotonin 濃度の有意な上昇に、一部 acetylcholine が関与していることが新たに明らかになった。

以上、本研究では、脳・腸管ペプチドの EIA 法による微量定量法を確立し、健常人において薬物作用時における脳・腸管ペプチドの体液中挙動を解析することにより、臨床で用いられる薬剤のヒトにおける作用機構の一端を明らかにした。唾液分泌促進薬については、substance P 及び CGRP の唾液中濃度の重要性を新たに示し、漢方薬の作用時においても数種の脳・腸管ペプチドが関与することを明らかにしている。これらの知見は、臨床における薬剤の評価や作用機構の解明に有用であり、新薬の開発にも応用可能であるものとする。

薬学研究科教授会は下記審査委員会の報告に基づいて審査した結果、本論文を薬学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(薬学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	佐々木	均
	副査	教授	中島	憲一郎
	副査	教授	中村	純三
	副査	教授	黒田	直敬

## 岩崎史哲

(山口県) 昭和35年6月21日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 珪素および錫原子の特性を利用した新有機合成反応の開拓

### 論文内容の要旨

錫原子は第 Ⅳ 族に属し、最外郭に 4d 軌道を持つ元素であり、酸素、窒素、硫黄に対して強い親和力を示す。このため、有機錫化合物は、しばしば強い生理活性を示す場合があり、この特徴を利用した木材保存剤、農薬さらには船底塗料への応用は有機錫化合物の大きな用途の一つである。

しかし、生理活性の強い錫の利用は、結果として自然界に大きな負担を強いることとなり、特にトリブチル錫メタアクリレートに代表される有機錫モノマーを主モノマーとして使用した船底塗料は、海洋生物に対して多大な負荷を与える結果となってしまった。

このことを契機に、有機錫化合物を回避する傾向が世の中の一般論となってしまったが、有機錫化合物が有機化学の世界で果たしている役割は決して小さいものではなく、この局面を打開する方法論の開発が望まれている。

その打開策としては、

1. 有機錫化合物が持つ特異な反応を他の化合物で行

わせる手法を開発する。

2. 量論反応でしか進行しなかった有機錫化合物を用いた反応を、触媒量で進行させる手法を開発することで、有機錫の使用量を削減することが考えられる。

著者らはまず、1の具体的な例として有機錫ハイドライドの使用制限について考えてみた。有機錫ハイドライドは、有機合成上極めて重要な役割を果たしている反応剤であるが、還元剤として使用する場合は量論反応とならざるを得ないため、代替反応を開発するのが最も明快的な解決策である。

その解決策の一つとして、珪素原子に着目した。珪素は、錫と同じ第 Ⅳ 族に属する元素であり、錫と同様に酸素、窒素、硫黄に親和力がある上に、有機珪素ハイドライドは還元剤としての新しい用途開発が期待されている。

このような背景の下、著者らはトリクロロシランに着目した。トリクロロシランは、経済的に安価に入手できる還元性を有した化合物である上に、アルカリ性水溶液で容易に加水分解を受け、環境に対して無毒な、二酸化珪素と塩化ナトリウムへと交換される。

もし、トリクロロシランの還元ポテンシャルを最大限に引き出し、有機錫ハイドライドの代替ができる方法が開発できれば、有機合成上極めて有意義と言える。

一方、有機錫の使用量を軽減させるもう一つの方法として、量論反応の触媒化という手法がある。従来、量論反応でしか進行しなかった有機錫の反応例として著者らは、スタニレンアセタール錯体を経由する 1,2-ジオールのモノアシル化反応に着目した。糖に代表されるポリオールは、医薬品の原料として、極めて重要な化合物であり、この水酸基を選択的に保護する反応は、多くの研究者によって行われている。スタニレンアセタール経由の 1,2-ジオールの選択的アシル化反応を触媒化することができれば、ポリオールの実用的な選択的保護基導入反応の開発につながるのではないかと考えた。

本研究は、珪素及び錫原子の特性を生かすとともに、環境へ調和した新有機合成反応の開発を目的として行った。

第 1 章では、トリクロロシランを有用な還元剤として用いることを目的として様々な活性種を検討した。その結果、ピロリジンに代表される環状アミンのホルミル化合物が有効な活性種であることを見だし、この活性種を用いることで、ケトン及びイミンを効率的に還元できることを明らかにした。

また、活性種に不斉源を導入することで、ケトン及びイミンのトリクロロシランを用いた不斉還元に初めて成功したので、その結果を論述するとともに、反応

機構に対しても考察を加えた。さらに、トリクロロシランは、イミンとケトンの共存下では、従来の還元剤にはないイミン選択性を有することも明らかとなったので、イミノエステル及びヒドラゾンの還元結果とともに併せて報告する。

第2章では、ジブチル錫オキサイドを用いた、1,2-ジオール化合物の選択的モノアシル化反応における有機錫化合物の触媒化について検討した。その結果、ジメチル錫ジクロライドと固体無機塩基を用いれば、従来当量必要であった有機錫化合物を100分の1まで軽減できる上に、高い位置選択性を持って1,2-ジオールがモノアシル化されることを見いだしたので、その詳細について論述する。また、本反応が、ジオールの内、特に1,2-ジオールのモノベンゾイル化に有効な手法であることを明らかにするとともに、その選択性が水酸基の酸性度或いは用いる塩基の種類によって大きく左右されることを見いだした。さらに、光学活性な有機錫化合物を触媒に用いることで、1,2-ジオールのエナンチオ選択的モノベンゾイル化反応にも成功したので、その結果について反応機構と併せて論述する。

#### 論文審査の要旨

岩崎史哲は、昭和59年3月、京都大学工学部合成化学科を卒業後、同年4月京都大学大学院工学研究科に入学、昭和61年3月同研究科を修了した。同年4月、徳山曹達（現株式会社トクヤマ）に入社、技術研究所（現徳山総合研究所）において骨格筋弛緩剤の新規製造ルートの開発やアミノ酸保護剤の工業的製造方法の開発に関する研究に従事した。平成6年4月、同社化学技術研究所（現徳山総合研究所）主任研究員としてセファロsporin系抗生物質の側鎖化合物の合成研究、新規カルバペネム系抗生物質中間体の合成等の研究に従事した。平成10年に同社つくば研究所に移りポリオールの選択的保護基導入反応の開発、新規抗ウイルス剤中間体の合成研究等に従事した。平成13年より同研究所研究開発センター主席として次世代レジストモノマーの開発、アダマンタンへの置換基挿入反応の研究を行い、現在に至っている。平成14年1月、「珪素および錫原子の特性を利用した新有機合成反応の開拓」を主論文として、その基礎となる原著論文（参考論文）5編を付して、長崎大学大学院薬学研究科教授会に博士（薬学）の学位を申請した。提出された論文内容の要旨、参考論文、研究歴、業績目録などを、平成14年1月29日の学位申請者資格審査委員会で審査した結果、論文提出者が学位審査資格を有することが確認され、同年2月6日の定例研究科教授会で受理を承認の上、下記の審査担当者を選定した。

審査担当者は、論文内容を慎重に審査するとともに、

同年2月13日基礎語学力を審査するための英語の試験を行った。次いで、同年2月14日に行われた博士論文発表会において、試問を行うとともに、終了後、最終審査を行った。

審査委員会は、下記の審査結果及び最終試験の結果を、平成14年3月6日の研究科教授会に報告した。

#### 論文審査の結果の要旨

主論文は、珪素および錫原子の特性を利用した新有機合成反応に関してまとめたものであり、2章からなっている。

有機錫化合物は、錫原子が最外郭に4d軌道を持つ元素であることから、酸素、窒素、硫黄に対して強い親和力を持っている。このため、有機錫化合物は、しばしば強い生理活性を示す場合があり、この特徴を利用した木材保存剤、農薬さらには船底塗料などへ利用されているが、錫原子の特異な反応性が逆に働き、自然界に於ける環境ホルモンの代表化合物の一つとして、近年、大きな問題となっている。しかし、有機錫化合物は、有機合成化学において還元剤、ラジカルトラップ剤などの非常に有用な試剤として多用されており、有機化学の世界で果たしている役割は大変大きなものであった。このような背景の下に、環境との調和をはかり、且つ、錫原子の特徴を有機合成反応に生かすことを目的に本研究は行われている。

第1章では、ケイ素化合物を用いたケトン、イミンの選択的還元を論述している。本章の研究は、錫と同じ第Ⅳ族原子で錫に代わるものはないかという着想の下に行われた。まず、従来、還元剤として量論量で使われていた有機錫ヒドリドによる還元反応の代替反応として、同じ第Ⅳ族元素である珪素原子、特にトリクロロシランによる還元に着目した。トリクロロシランは安価に入手でき、また、反応後、苛性ソーダ水溶液で処理すると容易に加水分解を受け、環境に対して無毒な、二酸化珪素と塩化ナトリウムへと変換される。しかしこれまでトリクロロシランはほとんど有機合成には利用されていなかった。申請者は、トリクロロシランの還元ポテンシャルを最大限に引き出し、有機錫ヒドリドの代替としての方法を開発できれば、有機合成上極めて有意義であるとの考えに基づき研究を行い、その結果、ピロリジンに代表される環状アミンのN-ホルミル化合物を活性化剤として用いればケトン及びイミンを効率的に還元できることを示した。トリクロロシランだけではケトンは還元されなかった。ケトンの還元においては、環状ケトン、非環状ケトン、芳香族ケトンの間での競争反応の結果から、この順で反応性が低下すること、 $\alpha$ 位アルキル置換基の有無によりケトンの還元性が大きな影響を受けることを明らかにした。また、このトリクロロシラン還元法は、非

常に高いイミン選択性を有することをイミンとケトンの競争反応から示した。さらに、光学活性 $\alpha$ アミノ酸から誘導した*N*ホルミルアミノ化合物を不斉な活性化剤として用いることにより、ケトン及びイミンの不斉還元成功している。このトリクロロシラン還元法は、非常に高いイミン選択性を有することを、イミンをケトンの競争反応から明らかとした。次いで、これら還元の反応機構を珪素 NMR により検討し、その結果、4, 5, 及び6配位の珪素化合物の存在を示唆し、その存在比が*N*ホルミル化合物とトリクロロシランの比に依存するデータを得ている。これらデータから、還元働く活性種が5配位珪素化合物であると推測している。

第2章では有機錫触媒によるジオールの選択的モノベンゾイル化反応を論述している。本章の研究は、これまで量論量で用いられてきた有機錫化合物によるモノベンゾイル化反応を触媒反応にし、不斉触媒反応へと展開することを目的に行ったものである。糖に代表されるポリオールのアシル化を高い選択性で一段階で達成することは医薬品合成に極めて重要である。この考えの下に研究を行い、その結果、ジメチル錫ジクロリドと固体無機塩基を用いれば、従来当量必要であった有機錫化合物を100分の1まで軽減できること、また、高い位置選択性を持って1,2-ジオールをモノベンゾイル化できることを明らかにした。また、ジオールには1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-ジオール等多種類あるが、その中でも、特に1,2-ジオールのモノベンゾイル化に触媒量のジメチル錫ジクロリドが有効であることを示すととも、その選択性が水酸基の酸性度或いは用いる塩基の種類によって大きく依存することを見いだした。さらに、光学活性な有機錫化合物を合成し、これを触媒として用いることにより、*dl* 1,2-ジオールのエナンチオ選択的モノベンゾイル化反応にも成功している。

以上、本研究で得られた知見は、環境に調和した選択的有機合成を可能とするものであり、また、これまで多段階を必要とした合成反応を大きく効率化、単純化したことにより医薬品等の合成に広く利用されると考えられることから、薬学の発展に大いに貢献できるものと期待される。

薬学研究科教授会は審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は薬学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(薬学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 松村 功 啓  
副査 教授 藤田 佳平衛  
副査 教授 畑山 範

内田 篤志

(広島県)昭和27年8月25日生

授与年月日 平成14年2月21日

主論文 フラクタル解析とゆらぎ解析を用いた多様な環境共存場の状態評価に関する研究

#### 論文内容の要旨

明治以降の急速な欧米化・高度成長と無秩序に展開されてきた建設事業により、国内の多くの自然が失われ、残された負の遺産のため現在、様々な障害が顕在化しつつある。その様な背景から近年、建設事業の実施に合わせて自然環境を保全・創出することが求められているが、それに関する技術は確立しているとはいえない。個々の施工技術には優れたものもあるが、総合的に事業を進める上ではまだ不十分である。

環境問題への対策の一つとして、自然環境を考慮した事業展開も重要な位置を占めるようになってきた。自然環境というものは、長い歴史の積み重ねで形成されるものであり、その中に動植物相互の微妙なバランスが保たれている。これまで永い年月を経て様々な形で変遷を遂げ、今後も変化していくのが自然な流れである。しかし、その変化というものは徐々に進むのが通常であり、急激な変化というのは突発的な災害など希なケースである。

自然環境は一旦改変されると、復元することは容易なことではない。戦後の急成長に代表されるように、疲弊した経済復興からあつという間に世界第二位の経済大国に成った道程を振り返ると、自然摂理の速度を無視した経済速度のために自然環境が急激に失われてきたことが分かる。

今後の建設事業において自然環境を保全・創出していくという考えは、こうした“ゆっくりとした時の流れ”を前提とした考え方が必要となっている。これまでの建設手法は、即効性と効率性を重視し、自然が徐々に作り上げていく“周辺に適合した環境”を配慮することなく、またこうした観点での施工技術は開発されてこなかったのが現状である。これからの建設事業の役割は、目標とする環境状況に持っていくためのきっかけを作ることであると考えられる。事業を推進する立場としては、施工段階により、その段階毎により良い自然環境がその後の時の流れを通して形成されるような方向に導くことが、最良であると考えられる。昨今の建設活動では、道路におけるエコロードの採用やのり面緑化工法、河川においては多自然型河川工法等、自然保護や生態系保全を視野に入れた工法採用が行われているが、まだ緒についたばかりであり、試行錯誤を繰り返しながら進められているのが現状である。

以上を鑑み本研究は、  
“人々が生活する社会環境や自然環境などの環境場を



対象として、フラクタル理論やゆらぎ理論を用いて、多様な空間環境が開発に伴いどの様に変化を受けているかを分析して、環境改善の指数評価を試みた”

ものである。

研究テーマとしては、地形・交通事故・公園整備・河川形状変化の評価等を定量的に行うことを取り上げ、複雑系の中でも多くの研究が行われているフラクタル理論や空間周波数による解析を行い、分析・評価したものである。

以下、各章についての内容を示す。

第1章では、本論文の社会的背景及び目的、並びにフラクタル理論や空間周波数を用いた様々な研究例を示した。また、本論文の内容と構成を簡単に述べ、各章の相互の関係を示した。

第2章では、本研究で大きな役割を担うフラクタル理論やゆらぎ理論について整理するとともに、衛星リモートセンシングデータを用いたフラクタル次元解析に適用するための手法を述べた。

第3章では、河川線形並びに海岸線形のフラクタル次元解析を実施した。紙の地図情報に換えて衛星数値データや衛星画像データを用いてフラクタル次元を求め、河川形状と海岸形状の変化や特徴の評価を行った。その結果、①衛星数値データは河岸線や海岸線のフラクタル次元を容易に求められる。②異なる衛星数値データを複数組み合わせても、河川のフラクタル次元を測定することができる。③川幅が広いほど、川全体のフラクタル次元は河岸線との差が大きくなる。④衛星数値データの解像度の優劣が解析結果に現れるため、より高精度のデータの利用が望ましい。⑤リアルタイムに近い時間差で地形変化が評価できる、ことが判明した。

第4章では、空間周波数解析により、長崎県内の離島について地形の分析を行い、ゆらぎ指数による違いから各島特有の評価を行った。その結果、①地質状況の異なる島々のゆらぎ指数を見ると、地質の差が地形の特徴に影響する事が認められた。②各島の形状についてフラクタル次元を求めた結果、島特有の地形の複雑さが定量的に表現できた。

以上の点から、地形の異なる地域において空間周波数解析による定量化により、地質を反映した地形の差別化が可能であることが判明した。

第5章では、高速道路上で発生している小動物の被害であるロードキルについて、空間周波数解析によるゆらぎ指数を用いて、発生場所の特徴分析を実施した。その結果、空間全体のゆらぎ指数を見ると、①ロードキルが多発する地点はゆらぎ指数の幅が広く、複雑もしくは単調といった、周囲に比べて極端に異なる空間情報を有していると考えられる。②ゆらぎ指数の幅は、

広いほうがゆらぎの種類やさまざまな要素を多く持つており、様々な動物が生息し、それによってロードキルの事故が多いと考えられることが判明した。

第6章では、中規模の地方都市を対象に交差点での交通事故について、空間周波数解析によるゆらぎ指数を用い、交通事故発生要因の特徴を分析・評価した。その結果、ゆらぎ指数の分布範囲を整理すると、①交通事故が多発している交差点においてゆらぎ指数の最大値と最小値の差が小さく、反対に交通事故が割合少ない箇所として取り上げた交差点の方は、ゆらぎ指数の最大値と最小値の差が大きくなっていることが分かった。②周波数分析により求めた各周波数におけるゆらぎ指数の範囲幅が大きいほど、事故発生頻度は少なく、ゆらぎ指数の範囲幅が狭く、偏っているような空間ほど事故発生頻度は高いことが伺えた。

第7章では、都市公園の景観について、ゆらぎ指数を用いた景観の評価を実施するとともに、アンケート調査結果からの利用者の感覚に関する分析値と対比・評価した。再整備によってゆらぎ指数の幅は広くなり、様々な要素を持つ公園景観となったといえる。幅広いゆらぎ指数を持つ景観ほど、人に心地よい公園景観であること。すなわち、単調さや複雑さを多様に持っている景観ほど、人間は心地よさを感じると結論づけることができた。

最後に第8章では、各章で得られた結果をまとめ、本研究の成果と今後の展望を述べた。

#### 論文審査の結果の要旨

内田篤志氏は、昭和50年3月、東海大学海洋学部海洋土木工学科を卒業、同年4月同大学大学院修士課程に入学し、昭和52年3月同課程を修了した。同年4月、基礎地盤コンサルタンツ株式会社に入社した。平成9年4月、同社在籍のまま長崎大学大学院海洋生産科学研究科（海洋生産開発学専攻）に入学、平成11年10月から平成12年9月および平成13年4月から平成13年9月まで、業務の都合で休学期間があり、現在に至っている。

同氏は、平成13年12月、「フラクタル解析とゆらぎ解析を用いた多様な環境共存場の状態評価に関する研究」と題する論文を完成し、参考論文5編（内、査読付学術雑誌3編、査読付国内会議プロシーディング論文1編、学内紀要1編）を添えて、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、予備審査委員会による予備審査の結果報告に基づいて、これを平成13年12月20日の定例委員会に付議し、論文内容の要旨を検討した結果、本論文が学位申請の資格ありと判定し、下記の委員会を選定した。学位審査委員会は、主査を中心としてその論文内容を慎重に審査の

上、公開論文発表会での発表を行わせるとともに、口頭による最終試験を実施し、審査結果及び最終試験結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出された論文は、人々が生活する社会環境や自然環境が開発などにより様々に変化を遂げている点を指摘し、このような環境場を対象として、フラクタル解析とゆらぎ解析を用いて、地形変化や対策工法が適用された地域等を評価するモニタリング手法や、身近な生活空間で発生するロードキルや交通事故、また身近な公園景観などの多様な空間に含まれる固有の特徴を分析し、より安全で良好な空間創造を行うための指標化の検討を行ったものである。

第1章では、本論文の社会的背景及び研究目的を示すとともに、本論文の内容と構成を簡単に述べ、各章の相互の関係を示している。

第2章では、本研究を進める上で採用したフラクタル解析とゆらぎ解析について、基本的概念を整理するとともに、衛星リモートセンシングデータをフラクタル次元解析に適用するための手法を述べている。

第3章では、人工衛星データの容易な入手性と正方形メッシュデータの特徴からフラクタル次元測定の迅速性に着目し、国内外の多くの河川線形ならびに海岸線形についてフラクタル次元解析を行っている。その結果、衛星リモートセンシングデータから求めたフラクタル次元により河川形状や海岸形状の特徴把握が妥当かつ適正であることを検証している。また、人工衛星データの利用は、河川形状や海岸地形をありのままに捉え、従来手法である地図情報と異なりリアルタイムに情報を得ることが可能で、かつ広範囲を対象に迅速に解析でき、定期的に解析できることを示している。

第4章では、地形固有の特徴を定量化するため、長崎県内の対馬、壱岐、福江島を対象として、各島の地形断面について空間周波数解析を実施し、その断面形状がもつゆらぎ指数の違いから、地形を特徴づける地域性の有無を検証している。その結果、地質を反映した地形の差別化が可能であることが明らかとなり、遠景域や生活に密着した身近な景観をゆらぎ指数により定量化することで、景観評価の指標に利用できることを示している。

第5章では、高速道路上のロードキルに着目し、事故の多発地点と少ない地点の空間的特徴の違いが有るのではないかと考え、空間周波数解析により発生地点固有の特徴をゆらぎ指数を用いて検証している。その結果、ロードキル発生場所の空間的特徴が、ゆらぎ指数の幅をもって定量化できることを明らかにし、生態系保全や保護などの対策工を実施する場合の指標としての利用を示している。

第6章では、交通事故発生要因を検証する目的で交

差点に着目し、交通事故が多発する地点とそうでない地点で、運転時の視野に入る景観が運転者に与える影響について、それぞれの空間的特徴をゆらぎ指数を用いて検証している。その結果、ゆらぎ指数の範囲幅が大きいほど、事故発生頻度は少なく、ゆらぎ指数の範囲幅が狭く、偏っているような空間ほど事故発生頻度は高いことから、それぞれの交差点がゆらぎ指数の幅で特徴付けられることを明らかにしている。

第7章では、人々に安らぎを与える公園景観の特徴把握を目的として、都市公園と児童公園についてゆらぎ指数を用いた景観評価を実施すると共に、アンケート調査結果から利用者意識について解析値との対比を行い、ゆらぎ指数を用いて公園景観の違いを検証している。その結果、景観変化を定量的に評価する上で、空間周波数解析が適用できることを見出している。公園全体が持つゆらぎ指数の幅を把握することが景観評価に有効であるという結果を明らかにし、都市公園の新設時や再整備時にゾーニングや配置計画の検討において、画一的でない公園設計に反映させる一指標になることを示している。

最後に、第8章では、各章で得られた成果をまとめて総括としている。

以上のように、本論文は、社会環境や自然環境など様々な環境場の開発において、従来の設計では考慮されていなかった開発場の環境状態を定量化することで、より良く快適で安全な空間を創造する手法を示したものであり、土木工学の分野における新しい概念の導入に貢献するものであることを認め、博士(工学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	後藤	恵之輔
	副査	教授	田中	和雅
	副査	教授	野口	正人
	副査	教授	岡林	隆敏

近藤 睦 浩

(長崎県)昭和48年6月11日生

授与年月日 平成14年2月21日

主論文 境界要素法による新型解析法の開発と逆問題への応用

論文内容の要旨

第1章は、この論文の緒言で、本論文における研究全体を通しての研究の意義、および位置づけ、そしてこれ以降の、研究の内容について書かれている章の簡単な説明と紹介を行った。

第2章は、非常に薄い板が積層状に重なった対象を境界要素法で解析する際の研究についての記述である。その場合、問題は接合領域問題となるのだが、対象の領域ごとの境界を分割せねばならず、その結果、計算

量が増大してしまう。しかも板厚が薄いので非常に狭い範囲に点が向き合うこととなり、計算精度上の不都合も生じる。そこで、領域の境界ではなく長手方向の中央線上に幾つかの点を取り、さらに、板厚が薄いことを利用してその方向の変化を簡単な式(ここでは2次式)で近似して計算量の増大と精度の悪化を抑える効率化を図った。それを行った結果、2次元問題、3次元問題ともに、計算時間が従来の手法を用いた場合に比べ半減し、また、長さに対し厚みが極端に薄い領域を設定した場合でも、本方法による解析法は高精度で解析が可能であることを確認することができた。

第3章は、デルタ関数を利用した離散積分法なるものを開発し、その研究についての記述である。その離散積分法によれば、ある関数の分布が、境界の情報およびデルタ関数の強度のパラメータと既知関数の積和で表現され、その関数がもともと数式表現可能であるかどうかにかかわらずその分布を常に同様の手法で精度よく近似表現されることを示した。また、内部発熱のある熱伝導問題を従来の方法で解くと、式に領域積分が現れ、そのために解析対象の領域内部を分割せねばならず、境界要素法における領域境界のみの分割で解析が可能という利点が損なわれてしまうことになる。しかしながら、本離散積分法をこのような熱伝導問題に適用した場合、領域積分が境界積分と近似に用いるデルタ関数の強度に関する項に置き換わることで効率化され、領域積分のための領域内部の分割を行うことなく領域積分の計算が行え、しかも、その解が精度よく求まる。そのことをいくつかの解析例とともに示した。

第4章と第5章は、上記のデルタ関数を利用した離散積分法の理論を1次元と2次元の逆問題の解析に応用した場合の記述である。本研究における逆問題の定義は、第4章の1次元では、はりの曲げ問題を取り上げ、それにおけるたわみと両端の境界条件の情報からはりに作用する外荷重分布を推定する問題、第5章の2次元では、内部発熱のある熱伝導問題を取り上げ、温度分布と境界条件の情報から解析領域内部に存在する熱源の分布を推定する問題である。逆問題の解析は、最近よく行われているが、問題も多くある。その一つが推定に関する問題であり、それは、これから推定しようとする対象に対する幾つかの仮定を設けなければ逆問題として解くことが困難な場合があるという問題で、そのために推定対象を不自然な式で近似したりして、十分な精度で解析が行えなくなることも少なくない。しかし、本研究における新しい離散積分法を導入すると、推定対象の仮定の設定の全くいらぬ逆問題の新型解法を確立できる。そこで、第4章で1次元問題(はり)、第5章で2次元問題(熱伝導)に本解析

法の適用を試みた。本解析手法によれば、従来はたとえば2次要素などで近似される、推定対象(本論文の場合は1次元であればはりに作用する外荷重分布、2次元であれば領域内部の熱源分布)の関数が、デルタ関数とその強度のパラメータを用いた表現で近似される。それを使って所定の式の変形をし、定式化を行えば、1次元問題では積分が単なる代数式とデルタ関数の強度に関する項に変換されることにより積分計算が不要となり、2次元問題では領域積分が境界積分とデルタ関数の強度に関する項に置き換わってしまうことにより領域積分、すなわち、領域内部の分割が不要になる。そしてその定式化された式を用いることにより、デルタ関数の強度のパラメータに関する連立方程式を何の不自然もなく構成でき、それを解いてデルタ関数の強度のパラメータが求めれば、推定対象の仮定情報なしに推定対象を自然に精度よく推定できるようになる。これにより、逆問題に対する新しい解析手法が確立できたことを解析例とともに示した。

第6章は本論文の結言である。この章で、本研究の内容部分である第2章から第5章について、それぞれの研究成果を簡単に述べた。

#### 論文審査の結果の要旨

近藤睦浩氏は、1996年3月、長崎大学工学部機械システム工学科を卒業、1998年3月、長崎大学大学院工学研究科機械システム工学専攻修士課程を修了、同年4月直ちに長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。

同氏は工学部における卒業研究の時代から一貫して境界要素法を用いた数値解析法の高度化に関する研究に携わって来た。特に、境界要素法における領域積分が不要な新型解法に関する研究を進めていた処、デルタ関数の性質を利用した離散積分法の開発と、それを利用した逆問題の境界要素解析法の確立に成功し、2001年11月に『境界要素法による新型解析法の開発と逆問題への応用』と題する論文をまとめ、参考論文5編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科に博士(学術)の学位を申請した。長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、まず学位論文として審査するに値するか否かについて予備審査委員会に諮り、予備審査を行った。予備審査では、論文内容や構成について特に問題はないとして本論文の提出資格ありとの判定を下した。その結果報告に基づいて審議の結果、海洋生産科学研究科委員会は2001年12月20日の定例委員会において本論文を受理し、下記の通り学位審査委員会を結成した。学位審査委員会は主査を中心として慎重に審議し、公開論文発表を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文審査及び最終試験の結果を、2002年2月21日の定例研究科委員会に報告した。

提出された論文は、汎用数値解析シミュレーションの有力な解法の一つである境界要素法のさらなる発展をめざすものである。すなわち、境界要素法は、シミュレーションコストの大部分をしめる要素離散化が境界のみでよい、という大きなメリットを有するという評価が定着しているが、従来のやり方では非常に精度が悪くなったり領域積分が必要な場合があったりして、その優れた解析法の発展が阻まれている。さらに、境界要素法は逆問題の解析法として非常に有望であり、そのためにも従来の欠点を克服する研究は重要な意義を持っている。提出された論文はこのような観点からなされた精力的な研究をまとめたものであり、重要な成果がおさめられている。

まず第1章において、境界要素法における発展の経緯をまとめ、領域積分が必要となるデメリットの問題、あるいはきわめて薄く広がりを持った解析対象における擬特異積分の問題などが残されている状況を明らかにしている。第2章ではきわめて薄い解析対象の新型解析法についてまとめている。このような領域は強度や変形に対して重要な影響を持っており、たとえ薄くても無視するわけにはいかない。従来、このような対象は積分方程式の擬特異性のため精度が極端に低下していた。本研究では要素配置に工夫を凝らし、擬特異性の問題が本質的に回避できる新型解法を確立している。そして実際の問題を解いて、その有効性を実証している。第3章では、デルタ関数の分布を利用した関数近似を導入し、さらにその関数を含む積分はデルタ関数の性質を利用することにより単なる離散点における積和となることを見出して、従来の要素が不要な積分法（離散積分法）と関数内挿法を構築している。そして、実際の関数近似や数値積分について従来の方法と比較し、その有効性を実証している。第4章では、3章で構成した方法を1次元逆問題の解析法へと発展させ、一般的な定式化と共に、具体的に、はりの曲げ問題における外荷重の推定問題に適用している。そしてこの方法によれば、境界条件や荷重形態に全く依存せずに精度良い推定が得られたこと、および従来の解法の問題点であった、先験的な仮定情報が必要、という点を克服できたことが述べられている。さらに、1次推定を元に2次推定を行えばさらに精度良い推定が可能であることを見出している。第5章では、3章で構成した方法を2次元ポテンシャル問題の逆問題解析法へと発展させている。すなわち、一般的な定式化と共に、具体的に2次元発熱分布の同定問題に適用し、境界条件やソース分布の形態（集中ソース、ラインソース、分布形ソース等）に全く依存せずに精度良い推定が得られたこと、および従来の解法の問題点であった、先験的な仮定情報が必要、という点を克服できたこと

が述べられている。

以上のように、本研究は境界要素法の新型解法を確立すると共に、従来の問題点を克服した逆問題の新たな解析法を確立しており、実用上、重要な逆問題の解決に大きな寄与を果たすものと期待される。以上により、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	木須博行
	副査	教授	西田知照
	副査	教授	金丸邦康
	副査	教授	修行稔

#### 安達町子

（長崎県）昭和24年4月5日生

授与年月日 平成14年2月21日

主論文 煮干しイワシの品質とだしの風味に関する研究

#### 論文内容の要旨

煮干しイワシは、昆布、かつお節に並ぶだし素材として古くから利用されてきた日本の伝統食品である。煮干しイワシおよび煮干しだしに関する研究は、それぞれ従来から広く行われてきたが、煮干しイワシの品質がだしの風味に及ぼす影響について研究した例は少ない。本論文は、好ましい煮干しだしをとるための煮干しイワシの品質とだしの風味の関係について研究した結果を、「長崎県産煮干しイワシの大きさと化学的性状」、「煮干しイワシの品質保持に及ぼす貯蔵温度と大きさの影響」、「煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼす煮干しイワシの大きさの影響」、「煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼす煮干しイワシの保存温度の影響」および「粉末煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼすだし袋の影響」の5章にまとめたものである。

第1章では、煮干しイワシおよび煮干しだしに関する研究状況を概説し、本研究の目的、意義を明らかにした。

第2章では長崎県産煮干しイワシの大きさと化学的性状の関係を調べた。1998年12月に長崎県沿岸海域で水揚げされ製造されたカタクチイワシの煮干し23種類の成分分析を行った結果、煮干しの水分含量は約11～40%を示し、水分活性との間に高い相関が認められた。煮干しの脂質の酸化は、煮干しが小さいほど低い傾向が見られ、これは脂質含量の多寡が影響していると考えられた。煮干しの主要なうま味成分である5'-IMPやGluは煮干しが大きくなるほど多く含まれる傾向が見られた。

第3章では、煮干しの品質に及ぼす貯蔵温度と大きさの影響を調べた。25℃貯蔵では大きさの異なる3種類の煮干し（小羽、中羽、大羽）は、貯蔵10日目まで

官能評価は良好であったが、褐変が進行し、貯蔵30日以後品質はやや低下し、90日以後著しく低下した。5℃、-25℃貯蔵では、煮干しの褐変は徐々に進行し、25℃に比べると品質低下が抑制された。煮干しの大きさによる品質変化は、貯蔵30日目まで差異は認められないが、貯蔵60日以後脂質の酸化や褐変の程度が比較的低かったため、小羽の評価が高かった。これは煮干しの脂質含量が少なかったことに起因していると考えられたが、煮干しの大きさの品質変化への関与は不明である。

第4章では煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼす煮干しイワシの大きさの影響を調べた。カタクチイワシの成長過程における4種類の煮干し(カエリ, 小羽, 中羽, 大羽)のだし成分を比較した結果、水の3%の煮干しを30分間浸漬後3分間沸騰加熱しただし汁の官能検査の評価はカエリが最も高く、溶出成分も多かったが、小羽, 中羽, 大羽は差が明らかでなかった。これは煮干しの形状の大きい中羽や大羽はこの抽出法では、だし成分が十分溶出していないと思われたため、煮干しのサイズ別に煮出し法の違いによるだし成分を比較した。その結果、小羽が中羽や大羽に比べ成分の溶出が速い傾向が認められ、煮干しの大きさに応じて適正な煮出し法を用いることが必要であることを明らかにした。

第5章では煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼす煮干しイワシの保存温度の影響について検討した。煮干しは25℃, 5℃, -25℃で90日間保存し、3%の煮干しだし汁を調製し調べた結果、保存10日後までは保存温度の影響はほとんどなく、30日後は、25℃で保存した煮干しのだし汁は香りの評価が低かった。60日以後は保存温度が高いほど煮干しの脂質酸化による褐変が進行し、だし汁に苦み, 生臭みが加わり官能評価は低下した。だしの風味を保持するためには、煮干しを常温で保存する場合は購入後10日前後で消費することが望ましく、長期間の保存には低温保存がより効果的であることを明らかにした。

第6章では粉末煮干しだしの抽出に及ぼすだし袋の影響を調べた。官能検査の結果、ポリエステルおよびキュブラだし袋を用いただし汁は、袋を用いないものに比べて香りが良く、生臭みも弱く、苦味・渋味も少なかったため、うま味には差がなかったが総合的に好ましいと評価された。5'IMP, 5'AMP, 遊離アミノ酸の溶出はだし袋を用いると、沸騰後2分間の加熱でほぼ平衡状態となった。その溶出量は袋を用いない場合に比べてポリエステルだし袋はほぼ同じレベルになったが、キュブラだし袋は少なかった。これは親水性のキュブラ繊維にこれらが吸収されたためと考えられた。だし袋を用いると、香りが良く生臭みが抑えら

れるのは煮干しの脂質がだし袋に吸収され、脂質の酸化分解による好ましくないにおいの発生も抑制されるためと考えられた。

第7章では本研究を総括した。すなわち煮干しイワシの品質保持やだしの風味に及ぼす貯蔵温度と大きさの影響およびだし袋の効果を明らかにし、良質の煮干しだしをとるための煮干しの保存温度と煮干しの大きさに応じた適切な煮だし法を具体的に示した。さらに今後の課題や展望について述べた。

#### 論文審査の結果の要旨

安達町子氏は、昭和47年3月、日本女子大学家政学部を卒業後、同年4月日本女子大学大学院家政学研究所食物栄養学専攻修士課程へ進学した。昭和49年3月同研究科を修了後、同年4月長崎女子短期大学に勤務後、昭和61年5月長崎県立女子短期大学を経て、平成11年4月長崎県立長崎シーボルト大学の新設に伴い、同大学看護栄養学部助教として従事している。この間、平成10年4月長崎大学大学院海洋生産科学研究科海洋資源学専攻博士課程に入学した後、現在に至っている。同氏は、本研究科に入学以降、水産食品の加工および調理の研究に従事している。その成果を、平成13年12月に主論文「煮干しイワシの品質とだしの風味に関する研究」を完成させ、参考論文4編(査読付き3編)を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、学位申請の提出資格ありと判定し、下記の委員会を選定した。委員は主査を中心としてその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による専門分野に関する最終試験を実施し、審査結果および最終試験結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出された論文は、好ましい煮干しだしをとるための煮干しイワシの品質とだしの風味の関係を、長崎県産煮干しイワシの加工特性、煮干しイワシの品質保持に及ぼす貯蔵温度と大きさの影響、煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼす煮干しイワシの大きさの影響、煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼす煮干しイワシの保存温度の影響および粉末煮干しだし汁に及ぼすだし袋の影響の面から検討を行ったものである。

まず第1章では、煮干しイワシおよび煮干しだしに関する研究状況を概説し、本研究の目的、意義を明らかにしている。

次に第2章では、長崎県産煮干しイワシの大きさ性状の関係を調べて、明らかにしている。即ち、長崎県産カタクチイワシの煮干し23種類の成分分析を行った結果、煮干しの水分含量と水分活性との間に高い相

関が認められた。煮干しの脂質の酸化は、煮干しのサイズ、脂質含量の多寡が影響していること、主要なうま味成分含量は煮干しのサイズに関係しているを明らかにしている。

第3章では、煮干しの品質に及ぼす貯蔵温度と大きさの影響を調べ、明らかにしている。即ち、貯蔵中の煮干しの品質は、低温になるほど保持されること、煮干しの脂質含量の多寡が影響すること、煮干しのサイズの品質変化への関与は不明であることなどを明らかにしている。

第4章では、煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼす煮干しイワシの大きさの影響を調べ、明らかにしている。即ち、小羽が中羽や大羽に比べ成分の溶出が早い傾向が認められ、煮干しの大きさに応じて適正な煮出し法を用いることが必要であることを明らかにした。

第5章では、煮干しだしの風味や溶出成分に及ぼす煮干しイワシの保存温度の影響について検討し、明らかにしている。即ち、だしの風味を保持するためには、煮干しを常温で保存する場合は購入後10日前後で消費することが望ましく、長期間の保存には低温保存がより効果的であることを明らかにした。

第6章では、粉末煮干しだしの抽出に及ぼすだし袋の影響を調べ、明らかにしている。即ち、煮干しだしの風味に及ぼすだし袋の影響およびだし袋の素材（ポリエステルおよびキュブラ）の効果を、香り、生臭み、苦味、渋味、うま味、総合評価から検討したところ、前者ではだし袋を用いた方が良好な効果が認められたが、後者では差異が認められなかった。だし袋は、核酸関連物質、遊離アミノ酸の溶出を遅延したり、それらの溶出量に影響を及ぼした。だし袋の使用により、香りが良く生臭みが抑えられるのは煮干しの脂質がだし袋に吸収され、脂質の酸化分解による好ましくないにおいの発生も抑制されたためと推測している。

最後に第7章では、本研究を総括すると同時に今後の課題や展望について述べている。

以上のように、本論文は、海洋生物資源由来水産加工品の品質および貯蔵特性の解明を目的とする食品学分野の進歩に貢献するものであることを認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 野崎 征宣  
副査 教授 野口 玉雄  
副査 教授 青柳 東彦  
副査 教授 原 研治

吉田 大作

(愛知県)昭和42年11月22日生

授与年月日 平成14年2月21日

主論文 アユの性成熟および産卵に関する生理学的研究

論文内容の要旨

アユ (*Plecoglossus altivelis*) は、日本中に生息する両側回遊魚で、その生活史を一年で完結する「年魚」である。これまで、本種を対象とした研究は幅広く行われており、その結果本種の生態は、かなり明らかにされている。しかし、性成熟に関する情報は意外にも少なく、特に生理学的な研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、性成熟に伴う生殖腺の発達及び血中性ステロイドホルモン濃度の変化を詳細に調べアユの性成熟過程を明らかにすることを試みた。また、アユの産卵には産卵に好適な環境(適度な水流と小砂利により構成される産卵床)が必要であるが、この産卵環境の持つ生理的な意義は不明である。そこで、この環境への移行に伴う生殖細胞の変化と性ステロイドホルモンの血中濃度の変化を調べ、産卵環境の果たす生理学的役割について解明を試みた。さらに、アユの成熟・産卵の調節機構を明らかにしたいと考えた。そのためには生殖腺の発達及び成熟を統御している生殖腺刺激ホルモン(GtH)の動態を明らかにする必要がある。そこでGtHをコードしている遺伝子の配列を決定し、これをもとにGtH遺伝子の性成熟・産卵に伴う発現変化を調べた。

1) アユの性成熟に伴う内分泌変化

アユの生殖腺の発達とそれに伴う内分泌変化を明らかにするために、成熟開始前の6月下旬から産卵期の10月中旬まで約2週間おきに、人工飼育されたアユより生殖腺及び血液を採取し、生殖腺の組織学的観察と血中ステロイドホルモン(雌では estradiol 17 $\beta$ :E<sub>2</sub>, 17 $\alpha$ , 20 $\beta$  dihydroxy 4 pregnen 3 one: DHP 雄では testosterone: T, 11 ketotestosterone: 11 KT, DHP)濃度の測定を行った。また、光周期をコントロール(長日処理)し成熟を抑制した魚を用いて、電照解除後1週間毎の生殖腺形態及び血中ステロイドホルモン濃度の変化を調べた。その結果、雌雄いずれも日長の短日化(または長日の解除)とともに成熟を開始し、雌ではE<sub>2</sub>、雄では11 KTが生殖腺の発達と同調した変化を示した。(第2章)

2) アユの産卵に伴う内分泌変化

アユの産卵には産卵床が不可欠である。従って本種の産卵を理解するためには、産卵環境の生理的・内分泌学的役割を知ることが必要である。そこで、産卵環境を人為的に再現した実験水槽(底に小砂利を敷きポンプで水流を起こした水槽)を用意し、これを用いて

実験を行った。産卵期のアユを、産卵環境を設置した水槽に移行させた後、それらの個体から血液及び卵巣を採取し、これらを用いてホルモンの合成能や成熟能力の変化を調べた。その結果、環境へ移行した雌では、卵母細胞の卵原形質膜上において最終成熟誘起ステロイドである DHP のレセプター数が増加し、最終成熟能が獲得されることが判った。また、環境へ移行した雄では、血中におけるステロイドホルモン (11 KT, DHP) の濃度に変化が起こることがわかった。(第3章)

### 3) アユ GtH 遺伝子の単離

本種の性成熟及び産卵のメカニズムを明らかにするためには、視床下部-脳下垂体-生殖腺系を中心とした情報伝達機構を理解する必要がある。そこで、脳下垂体で合成・分泌される生殖腺の発達・成熟をもたらす生殖腺刺激ホルモン (GtH) の動態を調べるため、分子生物学的手法を用いてアユ GtH を構成する3つのサブユニット (follicle stimulating hormone (FSH)  $\beta$ , luteinizing hormone (LH)  $\beta$ , glycoprotein hormone (GPH)  $\alpha$ ) をコードする遺伝子配列の決定を行った。その結果、それぞれ全長が 556, 588, 621塩基対 (bp), 翻訳領域は 384, 432, 357bp である各サブユニット遺伝子配列が明らかとなった。これらの演繹アミノ酸配列は、それぞれシグナルペプチドが 15, 23, 23個で成熟ペプチドが 113, 121, 96個であった。成熟ペプチドのアミノ酸配列を数種類の硬骨魚類のそれと比較検索したところ、3つのサブユニットともにシロサケのそれと最も高い相同性 (46, 69, 73%) を示した。(第4章)

### 4) アユの性成熟に伴う GtH 遺伝子の発現変化

単離したアユ GtH 遺伝子配列を用いたノザン解析によって性成熟に伴う脳下垂体内での GtH 遺伝子の発現変化を調べた。その結果、FSH  $\beta$  遺伝子は、生殖腺発達の初期に、LH  $\beta$  はその後期に発現し始め、それぞれが独立した挙動を示した。電照魚は2つの発現時期がほとんど重複していた。また、雌雄間での発現パターンに違いはなかったが、発現開始時期は雄が雌よりも早い傾向を示した。 $\alpha$  サブユニットは雌雄ともに性成熟過程を通して常に発現していた。アユの FSH および LH 遺伝子の性成熟に伴う挙動は、サケ科のそれと極めて類似していることが判った。(第5章)

### 5) アユの産卵に伴う GtH 発現変化

十分に成熟した雌雄を産卵環境に移行させ、産卵まで定期的に脳下垂体採取し GtH 各サブユニット遺伝子の発現を調べた。その結果、環境及び異性の有無によって発現が変化するのは LH  $\beta$  のみであった。さらに、雌における LH の放出の必要条件として、雄の存在が重要であるのに対し、雄では、産卵のための環

境と雌の存在が、LH 放出の必要条件であることが判った。(第6章)

生殖腺の発達時期における血中ステロイドホルモン ( $E_2$ , 11 KT) 濃度ならびに GSI の挙動と GtH の発現変化から、FSH は卵黄形成や精子形成などの開始あるいは発達に関連が深く、LH は生殖腺の成熟と関連していることが示唆された。また、産卵における GtH の発現変化と血中ステロイド濃度の変化から、GtH の発現と最終成熟誘起ステロイドホルモン (DHP) の血中放出とは必ずしも結びつくものではないことがわかった。産卵における産卵環境は、最終成熟および産卵のタイミングを雌雄で同期させるために必要であり、GtH の発現が性ホルモンの分泌と機能発現に関わることが明らかとなった。

今後は性成熟の開始や産卵における GtH の役割をより詳しく解析をするために、血中 GtH 濃度の挙動を調べる必要がある。また、GtH より上位の情報伝達物質 (GnRH, neuropeptide Y, GABA など) の挙動を調べることにより、内分泌と外部環境との繋がりをさらに詳しく解明する必要がある。

### 論文審査の結果の要旨

吉田大作氏は、平成7年3月長崎大学水産学部を卒業し、同年4月長崎大学大学院水産学研究所修士課程水産学専攻に入学、平成9年3月に同課程を修了した。引き続き、同年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程海洋資源学専攻に入学し現在に至っている。

同氏は、所定の単位を取得するとともに、平成13年11月に主論文「アユの性成熟および産卵に関する生理学的研究」を完成させ、平成13年12月に本研究に関連する参考論文2編を添えて、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において、予備審査委員会による予備審査結果及び論文内容の要旨を検討し、課程修了のための学位論文提出資格があると判断して、下記の審査委員を選出した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出された学位申請論文は、アユの性成熟および産卵のメカニズムを明らかにすることを目的として行われた生理学的・内分泌学的研究である。

アユは日本各地の河川・湖沼に生息し、両側回遊やなわばりの形成など特徴的な生態を持つ。そのため、古くから生態学の研究対象とされてきた。しかし、その性成熟に関する生理学的情報は以外に少ない。そこ

で本研究では、性成熟に伴う生殖腺の変化を組織学的に観察するとともに、生殖腺発達を促す各種性ステロイドの挙動を内分泌学的手法を用いて明らかにすることを試みた。また、これらの性ステロイドの合成分泌を統御する2種類の生殖腺刺激ホルモン(FSHとLH)の挙動を明らかにするために、これらホルモンの遺伝子を単離しその配列の解析を行った。さらに、アユは産卵に砂利や水流などの物理的環境を必要とすることから、この環境の刺激が配偶子の成熟やFSH及びLH遺伝子の発現にどのような影響を与えるのかを調べた。特筆すべき研究成果としては、1)アユ雄の生殖腺発達とそれに伴う性ホルモンの挙動を初めて明らかにしたこと(2章と3章、国際誌への投稿を準備中)2)アユのFSH及びLH遺伝子配列の解明とその発現解析を初めて行ったこと(4章・5章・6章、レフェリー付き欧文国際学術雑誌に掲載)3)産卵環境を認識したアユでは配偶子のホルモン感受性や性ホルモンの合成能が大きく変化するなど、産卵環境の生理的役割を初めて明らかにしたこと(3章、レフェリー付き欧文国際プロシーディングに掲載)である。本研究は、生殖腺発達を制御するホルモンであるFSHとLHの発現変化を性成熟の進行にそって捕らえた数少ない研究である。またこれは、アユの成熟や産卵に必要なとされる環境要因(日長や産卵場など)に着目し、それがどのような生理変化を引き起こすのかをFSHやLH遺伝子の発現と関連づけて研究した先駆的な研究でもある。この研究により得られた成果は、魚類の成熟メカニズムや外部環境と魚類の成熟との関連を理解する上で極めて有効な知見である。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会の報告に基づいて審査した結果、本論文は魚類生殖生理学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判断した。

審査担当者	主査	教授	石松	惇
	副査	教授	田北	徹
	副査	教授	萩原	篤志
	副査	教授	原	研治
	副査	助教授	征矢野	清

**本村 宏**  
(長崎県)昭和38年5月1日生

**授与年月日** 平成14年2月21日

**主論文** 魚類筋原繊維タンパク質の水の状態および変性に及ぼすアルギン酸ナトリウムの影響に関する研究

**論文内容の要旨**  
アルギン酸(以下、本文中Algと略記)はヒジキ、

ワカメ、コンブなどの褐藻類より抽出される細胞間粘質多糖類であり、保水性、増粘性、ゲル化性などの特性を持つことが知られている。さらに、Algは種々の機能性を有すること、すなわち、整腸作用や血清コレステロール低下作用、あるいは高血圧症の予防に關与することが見いだされている。このことは、海藻に含まれる水溶性食物繊維の栄養生理学的研究により、血圧上昇抑制作用、コレステロール低下作用や制ガン作用等の効果が期待されている。

一方、従来から魚肉の加工貯蔵として乾燥(脱水)や冷凍が行われている。魚肉中の水は魚肉タンパク質の構造維持と機能の発現に密接に関係しているが、脱水や冷凍により肉質は著しく変化し、保水性の低下やタンパク質の不溶化などが引き起こされる。このことから、タンパク質の変性抑制には糖類、アミノ酸、有機酸、リン酸塩などが利用されている。近年、種々の添加物は、自然志向の高まりから天然物由来物質の探索が行われ検討されている。

本研究では、褐藻類のうちヒジキ、ワカメ、コンブよりアルギン酸ナトリウム(以下、本文中Na-Algと略)を調製して、これらの食品への利用(脱水および冷凍変性抑制物質として利用)を目的とした。すなわち食品のモデルとした魚肉筋原繊維(以下、本文中Mfと略)にNa-Algを添加し、脱水および冷凍における水の状態を解析し、さらにMf Ca-ATPase活性を指標としたタンパク質変性との関連を検討した。研究結果は、以下のように要約される。

第1章では、Na-Algの特性と利用、魚肉タンパク質周囲の水の状態、タンパク質変性抑制物質に関する既往の研究状況を概説し、本研究の目的、意義を明らかにした。

第2章では、Na-Algの調製を行い、物理化学的特性を明らかにした。その結果、Na-Algの純度は、ヒジキNa-Alg 99.39%、ワカメNa-Alg 98.53%、コンブNa-Alg 98.98%であった。そのほかそれらには、粗タンパク質、粗脂肪および灰分が少量含まれていた。また、平均分子量、平均重合量およびM/G比は、それぞれヒジキNa-Algでは20,342、103および1.68、ワカメNa-Algでは44,834、226および2.19、コンブNa-Algでは44,363、224および2.05であった。このことから、ヒジキNa-Algの平均分子量、平均重合度およびM/G比は、ワカメNa-AlgおよびコンブNa-Algよりいずれも小さいことがわかった。

第3章では、Na-AlgをエソMfに添加し(6g/100gMf)、脱水に伴うMf中の水の存在状態を脱水収着等温線から調べた。また、その変化をMf Ca-ATPase活性を指標としたMfの変性との関わりから検討した。その結果、脱水収着等温線の解析から、いずれもAw0.95



以下で  $A_w$  の顕著な低下が認められた。また、ヒジキ Na-Alg 添加区の  $A_w$  は、0.7以上の領域でワカメおよびコンブ Na-Alg に比べて高かったが、0.7以下では逆の結果が得られた。Na-Alg の変性抑制効果は、ヒジキ Na-Alg が最も大きく、次いでワカメ Na-Alg、コンブ Na-Alg がこれに次ぐというように類別できた。次に Na-Alg の濃度 (2 ~ 12g/100gMf) の影響を調べた。脱水収着等温線から水の状態および変性抑制効果を検討した結果、前述の6%添加と同様の結果を得たが、明確な濃度の影響を明らかとすることができなかった。以上のことから、Na-Alg の脱水変性抑制効果は、Na-Alg が Mf 周囲の水を構造化することにより発現し、さらにこのことは、Na-Alg の化学的特性の差異に起因するものと考えられる。

第4章では、Na-Alg をエソ Mf に添加し (5g/100gMf)、冷凍貯蔵中における Mf の変性と水の状態を調べた。水の状態は、示差走査熱分析で Mf 中の不凍水量の変化を調べた。同時に Mf の変性は Mf Ca-ATPase 活性を測定し、両者の関係を検討した。その結果、Na-Alg は明らかに Mf 中の不凍水量を増加させていた。また、凍結貯蔵中の Mf は Na-Alg 添加により冷凍変性が抑制された。また、種類別効果をみると、コンブ Na-Alg が最も大きく、ワカメ Na-Alg とヒジキ Na-Alg は同程度であった。Na-Alg 添加 Mf の Mf Ca-ATPase 活性低下は凍蔵初期に早く、凍蔵後期に遅いという変性様式を示した。Mf Ca-ATPase の失活は、いずれも Na-Alg 濃度の高いほど遅く進行した。このことから、Na-Alg はいずれも冷凍変性抑制効果を有するが、各添加濃度によりその効果は若干相違した。また、両者の関連性をみると、不凍水が多くなると、凍蔵中の Mf Ca-ATPase の失活が抑制され、そして凍蔵中の両者の減少傾向には関係があるように見えた。両者の相関を調べたところ、高い相関が認められた。以上のことから、Na-Alg は Mf 中の未凍結水を多くする作用を有しており、このことが Mf の冷凍変性抑制の一因となっていることが示唆された。

第5章では、脱水に伴う Na-Alg 添加 Mf 中の不凍水に及ぼす影響を調べた。その結果、不凍水量は Na-Alg 添加量の上昇に伴い、不凍水量も徐々に増加した。不凍水増加効果は、ヒジキ Na-Alg が最も大きく、次いでワカメ Na-Alg、コンブ Na-Alg の順になった。また、Na-Alg 添加 Mf 中の不凍水と脱水収着線から求めた結合水 (単分子および多分子層収着水量) の関係について調べた。その結果、両者の間には、ヒジキ、ワカメおよびコンブ Na-Alg 添加のいずれにおいても、単分子層収着水量よりも多分子層収着水量との相関が比較的高いことが認められた。

第6章では、本研究を総括すると同時に本研究で得

られた成果について今後の課題や展望について述べた。

#### 論文審査の結果の要旨

本村 宏氏は、昭和61年3月、琉球大学農学部を卒業後、同年4月琉球大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程へ進学した。昭和63年3月同研究科を修了後、同年4月長崎県立松浦園芸高等学校教諭に勤務後、平成4年4月長崎県立諫早農業高等学校を経て、平成12年4月から長崎県立大村城南高等学校教諭として従事している。この間、平成5年4月長崎大学大学院海洋生産科学研究科海洋資源学専攻博士課程に入学した後、現在に至っている。同氏は、本研究科に入学以降、褐藻類の高度有効利用を目的として、主成分アルギン酸のナトリウム塩の機能特性の研究に従事している。その成果を、平成13年12月に主論文「魚類筋原繊維タンパク質の水の状態および変性に及ぼすアルギン酸ナトリウムの影響に関する研究」を完成させ、参考論文2編 (査読付き) を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士 (学術) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、学位申請の提出資格ありと判定し、下記の委員会を選定した。委員は主査を中心としてその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による専門分野に関する最終試験を実施し、審査結果および最終試験結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出された論文は、長崎県産褐藻類のうちヒジキ、ワカメ、コンブよりアルギン酸ナトリウム (Na-Alg) を調製して、これらの食品への利用 (脱水および冷凍変性抑制物質としての利用) を目的とし、食品のモデルとした魚肉筋原繊維タンパク質 (Mf) に Na-Alg を添加し、脱水および冷凍における水の状態を解析し、さらに Mf Ca-ATPase 活性を指標とした Mf の変性との関連を検討したものである。

まず第1章では、Na-Alg の特性と利用、魚肉タンパク質周囲の水の状態、タンパク質変性抑制物質に関する既注の研究状況を概説し、本研究の目的、意義を明らかにしている。

次に第2章では、Na-Alg の調製を行い、物理化学的特性を明らかにしている。即ち、Na-Alg は、いずれも純度98%以上であること、Na-Alg の平均分子量、平均重合度および M/G 比は褐藻類の種類で異なることを明らかにしている。

第3章では、Na-Alg をエソ Mf に6%添加し、脱水に伴う Mf 中の水の状態を脱水収着等温線から調べ、その変化を Mf Ca-ATPase 活性を指標とした Mf の変性との関わりから検討し、明らかにしている。即ち、脱水収着等温線の解析から、いずれも水分活性 ( $A_w$ )

の顕著な低下効果および変性抑制効果を有し、それらの効果は、褐藻類の種類で異なることを明らかにしている。次に Na-Alg の濃度 (2 ~ 12%) の影響を調べた結果、前述の 6 % 添加とほぼ同様の結果を得たが、明確な濃度の影響を明らかにすることができなかった。以上のことから、Na-Alg の脱水変性抑制効果は、Na-Alg が Mf 周囲の水を構造化することにより発現し、さらにこのことは、Na-Alg の化学的特性の差異に起因することを推定している。

第 4 章では、Na-Alg をエソ Mf に 5 % 添加し、冷凍貯蔵中における Mf の変性 (Mf Ca-ATPase 活性) と水の状態 (不凍水量) を検討し、両者の関係を明らかにしている。即ち、Na-Alg は Mf 中の不凍水量増加効果および冷凍変性抑制効果を有した。また、種類別効果を見ると、コンブ Na-Alg が最も大きく、ワカメ Na-Alg とヒジキ Na-Alg は同程度であった。不凍水量と Mf Ca-ATPase 活性の相関を調べたところ、高い相関が認められた。以上のことから、Na-Alg は Mf 中の未凍結水を多くする作用を有しており、このことが Mf の冷凍変性抑制の一因となっていることを示唆している。

第 5 章では、脱水に伴う Na-Alg 添加 Mf 中の不凍水と結合水との関わりを明らかにしている。即ち、Na-Alg 添加 Mf 中の不凍水と脱水収着線から求めた結合水 (単分子および多分子層収着水量) の関係について検討した結果、両者の間には、いずれも単分子層収着水量よりも多分子層収着水量との相関が比較的高いことを明らかにしている。

最後に第 6 章では、本研究を総括すると同時に本研究で得られた成果について今後の課題や展望について述べている。

以上のように、本論文は、海洋生物資源の有効利用を目的とする食品学分野の進歩に貢献するものであることを認め、博士 (学術) の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 野崎 征宣  
副査 教授 村松 毅  
副査 教授 古川 睦久  
副査 教授 原 研治

**張 悦 凡**

(中国) 1969年3月25日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 イオン性ポリマーの傾斜相互侵入網目ポリウレタンの合成と物性に関する研究

**論文内容の要旨**

ポリウレタンエラストマー (PUE) は天然ゴム、SBR などの汎用エラストマー材料と比較して優れた抗張力、耐油性、耐摩耗性等の力学物性を示すため、工業用部

品、土木建築資材、OA 機器部品、医療関連製品など多岐に亘って使用されている。本研究では、高齢化社会や厳しくなる環境・エネルギー問題に対応できる新しいアメニティなソフトマテリアルの開発を目指した。具体的にはイオン性ポリマーとのコンポジット化により既存の PUE の有する優れた力学物性を低下させることなく高耐摩耗性、刺激応答、エネルギー変換、高抗血栓性などの新たな機能をもつ傾斜機能相互侵入網目ポリウレタン (GIPN-PUE) を得ることを目的とした。本研究ではモノマーの導入法として従来の自然拡散法を改良した電気泳動法を用い、アニオン性モノマーであるメタクリル酸 (MA) とビニルスルホン酸ナトリウム塩 (VS) を、カチオン性モノマーである四級化ジメチルアミノエチルアクリレート (DMAEA) と 4 ビニルピリジン塩酸塩 (VP) を傾斜的に PUE 中に導入した。GIPN-PUE の熱的性質、力学性質、モルホロジーなどへの電気泳動時間と電気泳動電圧の影響及び得られた GIPN-PUE のメカノケミカル物性、抗血栓性などの機能性の発現を明らかにした。

第 1 章では、緒論として傾斜ポリマーに関する既往の研究を調べ、既往の研究の問題点を指摘した後、本研究の背景と目的を明らかにするとともに、本研究の概要について記述した。

第 2 章では、モノマーがその溶液から基材へ移動する駆動力である化学ポテンシャルへの電場の影響について考察し、新たなイオン性モノマーの輸送手段である電気泳動法を、従来傾斜機能相互侵入網目を合成するために用いられているモノマーの自然拡散法と比較した。また、用いたイオン性モノマーの分子構造、基材 PUE の組成と電気泳動電圧および電流との関係を検討した結果、イオン性モノマーの側鎖基が小さいほど、モノマーがより速く PUE 中に泳動すること、泳動電流が急激に増加することや、基材中の親水性成分ポリエチレングリコールの含有量および印加電圧を増加すると泳動電流が増加することを明らかにした。

第 3 章では、一定の電気泳動時間で、二種類のアニオン性モノマーを用いて、GIPN-PUE を合成した。基材 PUE の原料にはジイソシアナートに 4,4'-ジフェニルメタンジイソシアナート (MDI)、ポリマーグリコールに数平均分子量 2000 のポリ (オキシテトラメチレン) グリコール (PTMG) と数平均分子量 2000 のポリ (オキシエチレン) グリコール (PEG)、鎖延長剤には二官能性の 1,4-ブタンジオール (BD) と三官能性のトリメチロールプロパン (TMP) の混合物を用い、基材 PUE はブレポリマー法で合成した。アニオン性モノマーである MA, VS を用いて、電気泳動法および自然拡散法により、GIPN-PUE を合成した。GIPN-PUE

についてゲル分率, 膨潤度, 硬度, 吸水性, 熱的性質, 力学性質, モルホロジーの評価を行い, 電気泳動時間の諸性質への影響を検討した。

この結果, いずれの GIPN-PUE (PMA GIPN-PUE, PVS GIPN-PUE) においても, 自然拡散法より電気泳動法で多くのモノマーがより速く基材 PUE 中に導入された。泳動時間の増加とともに, 第二成分の含有量が増加し基材内部まで浸入する一方, 自然拡散法においては第二成分が表面のみに存在することが分かった。PMA GIPN-PUE 系と PVS GIPN-PUE 系は異なった第二成分の傾斜分布を示した。PMA GIPN-PUE は表面層から反対層にかけて第二成分が傾斜的に減少した。一方, PVS GIPN-PUE 系は, 泳動時間の増加とともに反対層に第二成分が大量に存在することが分かった。PMA GIPN-PUE 系のガラス転移温度は高温側にシフトし, PMA が補強効果を示すため PMA GIPN-PUE の力学物性も増加した。一方, PVS GIPN-PUE 試料では残存 VS モノマーと吸湿した水分による可塑化のため, ガラス転移温度は低温側にシフトし, 弾性率, 硬度が減少した。また第二成分の含有量の増加とともに, 相分離が生じた。

第4章では, 二種類のカチオン性モノマー(DMAEA, VP)を用いて, 電気泳動時間また電気泳動電圧を調整し, GIPN-PUE (PDMAEA GIPN-PUE, PVP GIPN-PUE) を合成した。GIPN-PUE について膨潤度, 硬度, 吸水性, 熱的性質, 力学性質, モルホロジーの評価を行い, 諸性質への電気泳動時間, 電気泳動電圧の影響を検討した。

この結果, いずれの GIPN-PUE は表面層から反対層にかけて第二成分の含有量が減少することが分かった。PDMAEA GIPN-PUE 系において, 泳動時間の増加とともに, 反対層に第二成分含有量が大幅に増加した。一方, PVP GIPN-PUE 系では, 電圧の増加につれ, 表面層の PVP の含有量が大幅に増加することが分かった。いずれの GIPN-PUE の密度, 硬度, 吸水率, 貯蔵弾性率などの物性も表面層から反対層にかけて傾斜的に変化していることを明らかにした。PDMAEA GIPN-PUE 系, PVP GIPN-PUE 系ともミクロ不均一構造を示し, ガラス転移温度は高温側にシフトした。

第5章では, 得られた GIPN-PUE の機能性について検討した。

この結果, PMA GIPN-PUE 系は優れた耐摩耗性と低い摩擦係数を示し, 中でも5分間泳動した試料は最も高い耐摩耗性を示した。PVP GIPN-PUE 系試料, PDMAEA GIPN-PUE 系試料は pH, イオン強度, 電気刺激などの外部環境に応じて体積変化を起こし, 可逆的屈曲・収縮挙動を示すことを見出した。これらの PUE は化学あるいは電気エネルギーを機械エネル

ギーに容易に変換し, ケモメカニカル材料としての応用の可能性を示している。PVS GIPN-PUE 系試料は基材より, 低い赤血球吸着と血小板吸着を示し, 特に, 5分間泳動の PVS GIPN-PUE は本来の PUE の力学物性を保ちながら, 優れた抗血栓性を示した。PVP GIPN-PUE 系試料は基材より赤血球, 血小板の吸着量は少なく, 特に, 15V の電圧で得られた PVP GIPN-PUE は低い蛋白質吸着を示し, 良好な抗血栓性を示すことが分かった。

第6章では, 第2章から第5章で記述した結果に基づいて結論を総括した。

#### 論文審査の結果の要旨

張悦凡君は, 1991年7月中国上海科学技術大学を卒業し, 同年8月中国科学院有機化学研究所に入所し, 1993年10月まで在籍した。1993年11月から1994年10月までは上海 RAAS 血製品公司以分析業務に従事している。1994年11月に渡日し, 長崎有益語学学院で日本語を学び, 1996年4月長崎大学工学部に研究生として入学, 1997年4月に同大学院工学研究科修士課程材料工学専攻に入学, 1999年3月修了し, 同4月同大学大学院海洋生産科学研究科海洋生産開発学専攻海洋機器・材料学講座に進学し現在に至っている。

同氏は長崎大学に入学以降「傾斜高分子材料の合成に関する研究」に従事し, その成果を2001年12月に主論文『イオン性ポリマーの傾斜相互侵入網目ポリウレタンの合成と物性に関する研究』として完成させ, 審査付き4編を含む参考論文6編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は, 2001年12月20日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し, 本論文を受理して差し支えないものと認め, 下記の通り審査委員を選定した。委員会は主査を中心に論文の内容について慎重に審議し, 公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い, 論文の審査及び最終試験の結果を2002年2月21日の研究科委員会に報告した。

本論文は, 高齢化社会や厳しくなる環境・エネルギー問題に対応できる新しいアメニティなソフトマテリアルの開発を目的として行われた研究に関する論文である。すなわち, 第2成分としてイオン性ポリマーを濃度勾配をつけて導入することにより, 抗張力, 耐油性, 耐摩耗性などの優れた力学物性や抗血栓性を示すポリウレタンエラストマー(PUE)をより高性能・高機能化することを狙いとされている。

第1章では緒論として傾斜機能ポリマーに関する既往の研究を調べ, 既往の合成法とその問題点を概観した後本研究の背景と目的を明らかにするとともに, 本

研究の概要を述べている。

第2章では、従来の自然拡散法を改良した傾斜機能高分子材料の合成である電気泳動法を提案し説明するとともに、用いるイオン性モノマーの分子構造、基材PUEの組成と電気泳動における電圧および電流との関係を調べている。その結果、イオン性ビニルモノマーの側鎖基が小さいほど、基材PUEがより親水性であるほど、電気泳動における印可電圧は低くて良いことを見出している。

第3章では、アニオン性モノマーであるメタクリル酸(MA)とビニルスルホン酸ナトリウム塩(VS)を用いてアニオン性ポリマーの傾斜機能PUEの合成と構造・物性について検討している。合成した傾斜機能PUEの傾斜構造と力学物性を測定し、狙いどおりにアニオン性ポリマーが傾斜して導入されていることを確認し、密度、硬度、吸水率、貯蔵弾性率などの力学物性が傾斜していることを明らかにしている。さらに得られた傾斜機能PUEの高次構造について検討を加え、諸物性と電気泳動時間との関係から設計指針を導いている。

第4章では、カチオン性モノマーである四級化ジメチルアミノエチルアクリレート(DMAEA)とビニルピリジン塩酸塩(VP)を用いて、カチオン性ポリマーを傾斜導入した傾斜機能PUEを合成し、傾斜機能PUEの諸物性とモルホロジーを評価するとともに、電気泳動の電圧、時間の性質への影響を検討している。いずれのPUEも表面層から反対層にかけて第二成分の含有量が減少し高次構造も傾斜的に変化すること、泳動時間の増加とともに反対層の第二成分含有量が大幅に増加することを明らかにしている。3章と同様に諸物性と電気泳動時間との関係から設計指針を導いている。

第5章では、得られた傾斜機能PUEの機能性について検討している。PMAを傾斜させたPUEは優れた耐摩耗性と低い摩擦係数を示すが、最適の泳動時間・電圧があることを見出している。PVPやPDMAEAを傾斜させたPUEはpH、イオン強度、電場刺激などの外部環境に応じて体積変化を起こし可逆的の屈曲・収縮挙動を示すことを見出し、合成した傾斜機能PUEのケモメカニカル材料としての応用の可能性を指摘している。さらに、PVSやPVPを傾斜させたPUEは基材より低い赤血球吸着、血小板吸着、タンパク質吸着を示し、本来のPUEの力学物性を保ちながら、優れた抗血栓性を示すことを明らかにしている。

第6章では、第2章から第5章で記述した結果に基づいて結論を総括し、新しいアメニティなソフトマテリアルの合成を提案している。

海洋生産科学研究科は審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は高分子材料科学の進歩に貢献す

るものであると認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	古川 睦久
	副査	教授	中嶋 直敏
	副査	教授	羽坂 雅之
	副査	教授	内山 休男
	副査	教授	香川 明男

林 住彦

(京都府)昭和33年11月3日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 皮膜散乱光法による3次元弾塑性ひずみ解析法に関する研究

論文内容の要旨

2次元応力場での試験片表面の弾塑性ひずみを解析する方法として、反射型装置を用いた光弾性皮膜法がある。この方法では、皮膜表面に現れる干渉縞から試験片表面の主ひずみ差を直接測定できるが、干渉縞観察のみではひずみ成分を分離することができない。また、この方法の3次元応力場への適用は、干渉縞の観察方法およびひずみ成分の分離方法が確立されていないのでほとんど研究されていない。さらに、従来の反射型皮膜法では、皮膜厚さ内でのひずみの積分値に相当する干渉縞しか観察ができないので、得られた干渉縞には試験片表面のひずみが忠実に伝達されていない部分を含んでしまう問題点がある。したがって、これらの問題点を解決した皮膜法による3次元弾塑性ひずみ解析法の開発が望まれている。

本研究では、3次元および2次元応力場での試験片表面の弾塑性ひずみを皮膜法によって解析する方法を開発するため、これまでに行ってきた散乱光法による3次元光粘塑性解析法を皮膜法に応用した皮膜散乱光法を用いて、3次元弾塑性体のひずみ解析法について検討した。散乱光法とは、光弾性モデルや光塑性モデルに偏光の薄いスリット光を入射することでモデル内の応力・ひずみを解析する方法である。特に皮膜解析に散乱光法を適用する最大の特徴は、従来の反射型皮膜法では観察できなかった皮膜内部の複屈折による干渉縞の観察が可能で、しかも、皮膜接着面近傍の干渉縞が直接観察できる点である。皮膜法のこれまでの報告の中では、本研究のように散乱光法を用いて解析を行った例は見当たらない。以後、この解析方法を皮膜散乱光法と名付けることにした。

本論文は、7章から構成され、その内容を要約すると次の通りである。

第1章では、光弾性皮膜法の現状と本研究に至る背景および本研究の有用性と目的について述べた。

第2章では、従来の反射型皮膜法と新しく開発した

皮膜散乱光法によるそれぞれの試験片表面のひずみ解析原理さらに皮膜散乱光法の特徴について述べた。

第3章は、本研究に使用したポリエステル皮膜の材料特性について取扱った。このポリエステル皮膜の応力・ひずみを解析するためには、その縞こう配 - ひずみ関係および応力 - ひずみ関係が必要である。特に、縞こう配 - ひずみ関係の主ひずみ差感度は、ひずみおよびひずみ速度に依存するので、ひずみ速度の影響について考慮する必要がある。そこで、異なる数種類の变形速度でねじり試験を行い、縞こう配 - ひずみ関係および応力 - ひずみ関係に及ぼすひずみ速度の影響について調べ、皮膜の光粘塑性解析に必要な実験解析式を導出した。その結果、時間的に変化する散乱光縞の連続観察のみからポリエステル皮膜の2次相当ひずみを推定することができ、また、皮膜散乱光実験の皮膜材料として十分適用できることを明らかにした。さらに、異なる実験温度において数種類のひずみ速度で引張試験を行い、縞こう配 - ひずみ関係を調べた結果、縞こう配と降伏縞こう配が変化するので、実験温度が異なる場合も同じ方法で皮膜の2次相当ひずみが推定できることを明らかにした。

第4章では、試験片表面のひずみ成分を皮膜散乱光法を用いて解析する例として、軸対称体のねじりにおける3次元弾塑性ひずみ解析法について述べた。ねじりを受ける丸棒試験片表面のせん断ひずみ成分を、皮膜に2方向からの偏光入射により得られる2種類の散乱光縞より解析する方法を提案した。提案した解析法を用いて、ねじりを受けるアルミニウム合金の平滑および円弧環状切欠き丸棒試験片表面のせん断ひずみ成分を解析した。平滑丸棒試験片ではねじれ角の実測値より求めた試験片表面のせん断ひずみの値と、円弧環状切欠き丸棒試験片では、有限要素解析による結果とよい一致を示し、本解析法の有効性について明らかにした。

第5章では、第4章で提案した解析法を2次元問題に応用し、従来の皮膜法では困難であった負荷中におけるひずみ成分を分離する新しい方法について述べた。異なる3方向より偏光を入射して得られる3種類のそれぞれの散乱光縞のみから試験片表面の垂直ひずみ成分を測定する方法を提案した。提案した解析法を用いて、引張りを受けるアルミニウム合金の帯板および切欠き帯板試験片が塑性域にある場合の最小断面上の垂直ひずみ成分を解析した。帯板試験片では、試験片平行部の標点距離より求めた軸方向ひずみと、切欠き帯板試験片では、有限要素解析による結果とよい一致を示し、本解析法の有効性について明らかにした。

第6章では、第5章で提案した解析方法を引張りを受ける軸対称問題に拡張し、軸対称応力場での丸棒試

験片表面のひずみ成分を解析する方法について提案した。また、提案した解析法を用いて、アルミニウム合金の平滑および切欠き丸棒試験片で引張試験を行い、試験片表面の垂直ひずみ成分とせん断ひずみ成分を解析し、平滑丸棒試験片では、試験片平行部の標点距離より求めた軸方向ひずみと、切欠き丸棒試験片では、有限要素解析による結果とよく一致し、その有効性について明らかにした。

第7章では、以上の研究内容を総括して述べた。

#### 論文審査の結果の要旨

林 佳彦氏は、昭和56年3月久留米工業大学工学部を卒業後、直ちに久留米工業大学に教務職員として採用され、昭和58年4月からは同大学助手として勤務しているが、平成11年4月、久留米工業大学に在籍のまま、長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。

同氏は、久留米工業大学では光粘塑性体であるポリエステル樹脂を実物モデルとした3次元光粘塑性ひずみ解析法の研究に従事していたが、長崎大学大学院に入学以降は、ポリエステル樹脂を皮膜として用い3次元物体表面の弾塑性ひずみを測定する方法に関する研究に焦点を絞り、これに関して現在までに3編の論文を発表している。その成果を、平成13年12月に主論文「皮膜散乱光法による3次元弾塑性ひずみ解析法に関する研究」として完成させ、参考論文3編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(工学)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、本論文を受理して差支えないものと認め、下記の通り審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

本論文は、レーザ光を用いて3次元物体表面の弾塑性ひずみを測定する方法を研究したものである。3次元物体表面に接着したポリエステル樹脂の皮膜にレーザ偏光を入射し、皮膜のひずみによる複屈折効果が散乱光に現れることを利用して皮膜内のひずみ解析を行っているが、複数の入射方向を採用することにより、従来の反射型皮膜光弾性法では困難であった主ひずみの分離が、一連の干渉縞観察のみから可能になっている。さらに、偏光を物体表面に垂直に入射する場合は皮膜内のひずみの外挿から、また、物体表面に平行に入射する場合は皮膜内の入射位置を選ぶことにより、皮膜接着境界すなわち物体表面のひずみを測定することができ、反射型皮膜法での皮膜厚さ内での積分値の

測定という欠点が克服されている。

まず、皮膜として用いるポリエステル樹脂の光粘塑性の性質を述べたのち、偏光の入射角と主ひずみ差の関係を理論的に示し、入射角を複数採用することによるひずみ成分分離の方法を明らかにしている。この解析法の適用例として、アルミ合金の平滑及び円弧切欠き丸棒を用いてねじり試験、引張試験を実施し、皮膜散乱光法によるひずみ分布を求めている。平滑試験片では測定されたせん断ひずみ、伸びひずみとも変形から算出されたひずみと5%以内の誤差で一致している。また、切欠き試験片では切欠き円周に沿う垂直ひずみ成分、せん断ひずみ成分の分布を粘弾塑性有限要素法による解析結果のひずみ成分分布と比較しているが、いずれの分布もよく一致し、ひずみ成分の分離が確実にに行われていることが確認できる。さらに、平滑帯板を用いた引張試験では、皮膜内のひずみ分布計測から、皮膜表面でひずみの減少があることを明らかにし、円弧切欠き帯板試験片では試験片最小断面でのひずみ分布を解析しているが、通常では測定が困難な、表面に垂直方向の垂直ひずみ成分が測定できることを示すなど、皮膜散乱光法の有効性を明らかにしている。

以上のように、本論文は3次元物体表面の弾塑性ひずみを測定する新しい方法を研究・開発したものであり、材料力学、材料強度学、設計工学分野の進歩に貢献するものであることを認め、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 今井康文  
副査 教授 浦 晟  
副査 教授 瀬戸口 克哉  
副査 教授 吉武 裕

鉄川 進

(長崎県)昭和31年9月18日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 溶接構造接合部の疲労損傷モニタリングに関する基礎的研究

#### 論文内容の要旨

社会資本の老朽化や時代の要求性能の変化によって、ヘルスマニタリングという概念が使われるようになり、様々な構造物の分野で、健全性を監視するために多くの研究がなされてきた。しかし、これらのモニタリングシステムは、作業員の目視による検査、あるいは構造物の挙動の計測による損傷の検知を基本としている。

鋼構造物の溶接接合部の経年変化による損傷のうち、初期段階で発生する疲労損傷は、構造的不連続部、溶接止端部の局部的応力集中、および溶接残留応力が重畳した力学的環境にある溶接接合部に、繰り返し作用する応力が設計時に条件とした範囲内であっても、想

定されるよりも早く発生することがある。その後、疲労き裂が進展して最終的な脆性破壊に至ること、または過大な外力が作用することによって、内在するき裂を起点とする脆性破壊に至る可能性がある。

このような問題点を解決するためには、無損傷の状態から、鋼構造物の溶接接合部の局部的挙動を考慮したモニタリングを常時行う必要がある。このモニタリングによって、これまでの検査では無損傷と判断されていたような、目視で確認可能な損傷、あるいは構造物の挙動が変化するほどの損傷に進展するまでの、極く微小なき裂を検知することが可能となる。

今回研究した疲労損傷モニタリングシステムは、構造物の更新、あるいは大規模補修を伴わず、軽微な補修のみで健全な状態を回復するために、極く微小な疲労損傷を検知する技術を開発し、損傷の評価や、補修時期の判断を可能とすることを目的とした。モニタリングについては、発生直後の極く微小な表面き裂として進展する場合の疲労き裂の有無に主眼を置いた検知システムの開発と、ある程度成長して貫通き裂として進展する場合について、疲労き裂伝播の加速、減速、または停留も考慮した伝播挙動評価法の検討に分けて実施した。

以下、各章についての内容を示す。

第1章では、本論文における研究の背景と目的について述べた。

第2章では、鋼構造物の保守・点検に用いられている、現行の規則や方法と運用状況について述べた。また、耐震設計の変遷と地震被害から得られた設計や保守の問題点、および鋼構造物を取り巻く社会情勢などからの考察により、極く初期の疲労損傷モニタリングの必要性と、その開発の方向性についてまとめた。

第3章では、鋼構造物の溶接接合部において、補強材として取り付けられるブラケットやスティフナの角巻き溶接部を対象として、角部からの疲労き裂の発生や、初期の極く微小なき裂の進展を検知するシステムを開発した。この角巻き溶接部は、鋼構造物の接合部において、最も疲労損傷を受け易い箇所のひとつである。モニタリングは、角部溶接止端近傍での表面ひずみを対象に行い、き裂の発生による表面ひずみの変化率と、き裂寸法の関係について明らかにした。さらに、荷重振幅が変化する場合のき裂進展のモニタリング方法についても検討した。

第4章では、鉄骨構造物の梁-柱接合部を対象として、溶接止端部からの疲労き裂の発生、および梁板厚方向へのき裂進展を検知するシステムを開発した。梁-柱接合部の開先形状は、裏当て金付きレ形開先、裏当て材なしルートフェイス付きレ形開先、および固形フラックス裏当て材付きレ形開先とした。これらの接

合部を用いて、1箇所の接合部に複数の疲労き裂が発生する可能性がある場合の、疲労損傷の検知精度を確認した。

第5章では、第3章および第4章で開発した検知システムを、溶接構造物の接合部における疲労損傷モニタリングに適用する場合について、モニタリングシステムの各段階での損傷検知の評価や、補修時期の判断の方法を検討した。

第6章では、第3章、第4章、および第5章において提案した、極く微小な疲労き裂の検知システムとその評価法を発展させて、未補修のまま、損傷モニタリングを行うことを想定した、疲労き裂の定常状態の伝播をモニタリングし評価する方法について検討した。この場合では、疲労き裂の伝播中に、加速、減速、または停留することも考慮して、残存強度だけでなく、余寿命も推定するための情報が得られることを示した。

第7章では、前章までに疲労き裂の検知に用いたひずみゲージに代えて、圧電セラミック素子を取り上げ、その特性と疲労損傷に対する出力の変化について検証した。なお、圧電セラミック素子は、高感度、高精度で、耐久性に優れ、かつ貼付作業も簡便なセンサであり、鋼構造物において、モニタリング箇所が膨大になることを考慮して、1つのセンサで複数箇所のモニタリングの可能性を探った。

第8章では、前章までに得られた主要な結論を述べ、本研究の結論としている。

#### 論文審査の結果の要旨

鉄川 進氏は、昭和54年3月に長崎大学工学部構造工学科を卒業後、昭和54年4月に(株)銭高組に入社し、建築工事施工管理および建築積算システムの開発に従事した。昭和59年6月から長崎市内の(株)鉄川工務店に勤務し、昭和61年11月から代表取締役として建築施工および技術管理全般を統括している。平成11年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程に入学し、現在に至っている。

海洋生産科学研究科においては、海洋環境建設学を専攻して、所定の単位を修得するとともに「溶接鋼構造物のヘルスマニタリングに関する基礎的研究」と題する論文をまとめ、平成13年10月に参考文献2編を付けて海洋生産科学研究科委員会に提出し、博士(工学)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の委員会において予備審査委員会による予備審査結果および論文内容の要旨の報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の審査委員を選出した。審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重に審議した結果、より適切に論文内容を表

現するために、論文題目を「溶接構造接合部の疲労損傷モニタリングに関する基礎的研究」に変更することを求めた。さらに、審査委員会は公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による最終審査を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

鋼構造物の溶接継手部では、想定されたよりも早い段階で疲労き裂が発生することが、船舶をはじめとする多くの分野で知られている。溶接継手部は、構造的に不連続、局部的応力集中、および溶接残留応力が重畳するという力学的環境にあることから、溶接施工時に厳格な品質管理を導入しても、疲労き裂発生を避けることができず、想定外の過大荷重が作用すると、この微小な疲労き裂を起点とする大規模な脆性破壊に至ることもある。

本論文は、構造物の更新や、大規模補修を行うことなく、軽微な補修のみで健全な状態を回復させるために、溶接継手部における微小な疲労き裂の検知法を開発し、これを用いた保守点検の方法を構築しようとするものである。

本論文では、まず、現行規則や運用状況を調査して、設計および保守の問題点を考察し、極く初期の疲労損傷モニタリングの必要性とシステム開発の方向性について述べた。

次に、溶接継手部の中でも最も疲労き裂が発生し易い角巻き溶接部を模擬した試験片と、疲労き裂発生の可能性が複数存在する梁-柱接合部を模擬した試験体を用いて、疲労試験を実施した。疲労き裂が発生した溶接止端部近傍のひずみ減少に注目して、無損傷時のひずみとの比をモニタリングすることにより、極く微小な疲労き裂が検知できることを明らかにした。また、複数の疲労き裂が発生する可能性がある梁-柱試験体では、最初に発生する箇所や複数の疲労き裂が発生して追い越し状況が生じることも正確に確認することができた。なお、これらの疲労き裂は、試験終了直前まで目視では確認できないき裂であった。さらに、繰返し作用する荷重の振幅が変化する場合を想定した疲労試験の結果、溶接止端部の弾性ひずみ集中率に注目して、この変化をモニタリングすることで、極く微小な疲労き裂の発生と進展を検知することが可能であることを確認した。

このようなモニタリングシステムを用いて、溶接接合部のモニタリングを実施する場合の損傷検知結果の評価法、およびそこからの脆性破壊の可能性判定法、および疲労き裂の伝播寿命推定法について検討した。また、常時モニタリングだけではなく、定期的な損傷検知や既存構造物の損傷モニタリングに適用する場合についても検討した。

さらに、定常状態で伝播する目視可能な疲労き裂において、加速、減速、および停留の状況を考慮して余寿命を推定する評価方法について検討し、き裂先端の閉口する荷重が重要であり、それ以下の荷重は疲労伝播に寄与しないことを明らかにした。

ひずみゲージに替わる高精度、高感度で耐久性に優れたセンサとして、圧電セラミック素子を用い、圧電素子の特性と疲労損傷に対する圧電素子の出力変化について調査して、センサとして使用できる可能性があることを検証した。

以上の結果から、本提出論文は、現在行われている目視検査では無損傷と判断されている程度の極く微小な段階からの疲労損傷を検知することができる方法を提案したことは、極めて意義深いものと考えられる。

海洋生産科学研究科委員会は、論文審査、および最終試験の結果について審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は、鋼構造物の溶接接合部に発生する初期疲労損傷に対する保守・点検技術の発展に大きく貢献するものであることを認め、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	高橋和雄
	副査	教授	末岡禎佑
	副査	教授	崎山毅
	副査	教授	岡林隆敏
	副査	助教授	勝田順一

永嶋洋政

(福岡県)昭和27年2月4日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 ジオシンセティックス補強粘性土盛土の設計法確立に関する研究

論文内容の要旨

近年都市開発の活発化や地下利用の増大等に伴って、建設発生土の増加が問題になっており、特に土工や浚渫工事などの建設現場から発生する低品質な軟弱土や粘性土は増加の一途をたどっている。このため、このような建設発生土は処分する適地を確保することが困難な状況にあり、また処分費用も急騰しているため、社会的要請として建設発生土のリサイクルの促進を図ることが強く求められている。発生土利用促進のネックとなっている低品質な発生土を有効利用する技術の開発が不可欠であるが、具体的な利用技術工法の一つに補強盛土工法が挙げられる。石油化学製品であるジオシンセティックスを用いた補強盛土工法は、盛土形状や使用する盛土材の性質により、土のみでは安定を保ち得ない場合や必要とする安全率を満足できない場合の対策工法の一つである。

盛土材料としてはこれまで砂質系の比較的せん断強

度の大きい良質な材料が用いられてきたが、循環型社会の構築を一層促進させるため、本研究は低品質とりわけ粘性土を盛土材として有効利用する場合における盛土挙動を把握し、これまで実用的な設計法が確立されていなかった排水、引張り両補強機能を有するジオコンポジット盛土工法の設計法を確立することを最終目的とした。まず盛土下の地盤が軟弱な場合、最も効果的な補強方法を模型実験により検討し、次いで、補強材を併用したサンドイッチ盛土工法の模型実験を行った。その結果、複合補強構造(補強材を併用したサンドイッチ盛土工法)を有する盛土は、たとえ中間砂層が薄くてもその中に補強材を敷設することにより変形抑制効果が大きいとの知見を得た。さらに排水・引張り両補強機能を有するジオコンポジットを用いた盛土模型実験により排水・引張り補強効果の定量的把握を行った。最後に、ジオコンポジットの両機能を同時に考慮した設計法の確立が望まれていることから、ジオコンポジット補強盛土の実務レベルで使用できる合理的設計法を提案した。主論文は大きく以下の4つの部分からなる。

①粘性土地盤上に盛土を構築する場合の基礎地盤の安定・変形に関する研究

「盛土及び地盤補強の効果判定のための模型実験とその解析(第4章)」

②粘性土を盛土材料とする場合の盛土本体の安定・変形に関する研究

a) 複合補強構造を有する盛土

「補強材を併用したサンドイッチ工法の模型実験(第5章)」

b) 複合機能を有する補強材を使用した盛土

i) 「ジオコンポジットを用いた補強盛土模型実験による排水、引張り補強効果の把握(第6章)」

ii) 「ジオコンポジット補強粘性土盛土の設計法試案(第7章)」

第1章では序論として緒言、本研究の背景、目的を述べ、本論文の構成を概説した。

第2章では盛土材として使用されることの多い火山灰質粘性土とその工学的性質について、関東ロームと灰土の性質について述べた。

第3章ではジオテキスタイルに代表されるジオシンセティックスの種類と適用性について述べた。

第4章では、盛土底面下の地盤が軟弱な場合、どのような補強方法が最も効果が発揮されるかを検証するため、盛土及び地盤補強の効果判定のための模型実験とその解析を行った。その結果、軟弱な粘性土上に盛土を築造する場合、盛土補強に比べ地盤補強の方が盛土の安定や変形抑制に著しく効果が高いことを明示した。



第5章では、サンドイッチ工法が有するせん断強度及び排水機能に加え、補強材張力により、長期的安定補強効果を発揮することが予想されるため、補強材を併用したサンドイッチ工法を提案し、その模型実験を行った。

その結果、複合補強構造（補強材を併用したサンドイッチ工法）を有する盛土は、たとえ中間砂層が薄くてもその中に補強材を敷設すれば、変形抑制効果が大きいことを明らかにした。

第6章では、排水・引張り補強両機能を併せ持つ補強材（ジオコンポジット）が現在開発されているが、この補強材料を用いることより、圧密促進を図りながら、急勾配な盛土を築造することができ、合理的かつ経済的な施工が可能になることが予想されるため、ジオコンポジットを用いた補強盛土模型実験による排水・引張り補強効果の把握を行った。その結果、複合機能（排水、引張り補強）を有するジオコンポジットを使用した盛土について、模型実験により排水、引張り補強両効果の有効性を定量的に確認することに成功した。

第7章では、ジオコンポジットを用いた設計法は研究段階であり、ジオコンポジットの両機能を同時に考慮した設計法の確立が望まれていることから、ジオコンポジットを使用した補強粘性土盛土の設計法を提案した。安定解析を行った結果、無補強で築造不可能と判断された盛土でもジオコンポジットの排水効果によって粘性土の強度増加が確認できた。また、引張り補強効果によってより安定的に高盛土の施工が可能であること、さらに最適敷設長、敷設間隔を設計可能であることを示した。

第8章では各章の成果を総括して結論とした。

一連の研究成果から、軟弱地盤上の盛土の補強にも粘性土を盛土材料に使用した場合にもジオシンセティック材料や工法上の工夫により、より高度、急勾配の盛土が可能であることを示した。さらに排水、引張り補強の両機能を考慮した合理的な設計法を提示した。これらの研究成果から、より低コストで耐久性のある盛土を構築するために、補強盛土工法は最も有力な工法であること、また、粘性土などの低品質発生土の有効利用促進が可能であることを明示した。

#### 論文審査の結果の要旨

永嶋洋政氏は、昭和51年3月長崎大学工学部を卒業後、昭和51年4月直ちに日本地研(株)に入社し、同社に在籍のまま、平成11年4月長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。

入学以降、主として粘性土補強盛土工法の模型実験による効果判定および設計法の確立に関する研究に従事し、現在まで10編の論文を発表している。その成果

を基に平成13年12月20日に主論文「ジオシンセティック補強粘性土盛土の設計法確立に関する研究」を完成させ、参考論文10編（審査付き論文5編、内公表した論文3編、掲載決定1編、審査中1編）を添え長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（工学）の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、予備審査委員会による予備審査の結果報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記のとおり審査委員を選定した。審査委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文審査及び最終試験の結果を、平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、新たに開発された地盤補強用高分子材料ジオコンポジット（高剛性、高強度の織布を2枚の不織布で挟み一体化させた材料）の有する排水・引張り補強両機能を評価した設計法が存在しない現状を鑑み、精緻な模型実験結果の考察と従来考慮されることが無かった粘性土の圧密に伴う強度増加等を考慮し、実務で使用可能な合理的設計法を確立したものである。提出論文は全8章から成っている。本論文の構成は以下のようになっている。

まず、本研究の社会的背景と既往の研究を概観し、本研究の目的と、既往の研究との位置付けを明確にした。すなわち、近年都市開発の活発化や地下利用の増大等に伴って、建設発生土の増加が問題になっており、特に土工や浚渫工事などの建設現場から発生する低品質な軟弱土や粘性土は増加の一途をたどっている。このため、このような建設発生土は処分する適地を確保することが困難な状況にあり、また処分費用も急騰しているため、社会的要請として建設発生土のリサイクルの促進を図ることが強く求められている。石油化学製品であるジオシンセティックを用いた補強盛土工法は、資源循環型社会の構築を一層促進させるために有効と考えられるが、本研究は低品質な粘性土を盛土材として利用する場合における盛土挙動を把握し、実用的な設計法が確立されていない排水・引張り補強両機能を有するジオコンポジット盛土工法の設計法を確立することを最終目的とした。まず最初に、盛土下の地盤が軟弱な場合、最も効果的な補強方法を模型実験により検討した。補強材を盛土内に敷設するより、盛土下部をマットレス補強することにより、無補強盛土の約4倍の安定化と約25%に変形を抑制できることを明示した。さらに、補強材を併用したサンドイッチ盛土工法の模型実験を行い、複合補強構造を有する盛土は、たとえ中間砂層が薄くてもその中に補強材を敷設

することにより盛土の安定性と変形抑制の効果が極めて大きいとの知見を得た。さらに、複合機能（排水，引張り補強）を有するジオコンポジットを使用した一連の屋外盛土模型実験結果から，排水・引張り補強両機能の盛土安定増加および盛土の沈下・のり面水平変位抑制への寄与度を定量的に確認することに成功した。最後にジオコンポジットの両機能を同時に考慮した設計法の確立が望まれていることから，ジオコンポジット補強盛土の実務レベルで使用できる合理的設計法を提案した。提案した設計法は，使用盛土材料，計画盛土高さ，工期，所要安全率等の与件下で，最適ジオシンセティックスの選定のみならず，選定されたジオシンセティックの敷設ピッチ，総敷設長，盛土の盛り立て速度等の施工条件が解として与えられ，優れた実用性を備えており，今後急増すると予想される低品質発生土（粘性土）を用いた補強盛土工法に合理的な設計，施工を保障する工学的意義は極めて大きく，既に実用にも供されている。

海洋生産科学研究科委員会は，論文審査及び最終試験の結果についての審査委員の報告に基づき審査した結果，本論文は，地盤工学分野の発展に貢献するところが大きく，博士（工学）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	棚橋由彦
	副査	教授	吉武裕
	副査	教授	後藤恵之輔
	副査	教授	古本勝弘

**肖 俊**

(中国)1968年9月7日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 不連続性岩盤の工学的特性の評価と深部大規模地下空洞設計への適用

**論文内容の要旨**

近年，土地の有効利用や環境問題あるいは安全性，経済性の確保などの視点から地下利用が積極的に進められている。それに伴いニーズが多様化し，大規模な地下発電所からライフラインの管路に至るまで様々な地下構造物が作られている。大規模地下空洞は断面が大きくなるため，空洞の安全性が低下し，また，大断面であるため支保構造が著しく大規模となる。空洞の安定はより周辺地山に依存せざるを得なくなり，設計・施工は厳しくなる。したがって，地山の力学的挙動を観察・計測し，その結果を分析して設計・施工に反映させるいわゆる情報化施工が重要な役割を担うことになる。これにより必要に応じて適切な対策を講じ，安全性，経済性の確保に務めることが可能になる。岩盤構造物の安定性を検討する場合には，岩盤中に存在

する節理や断層などの大小様々な不連続面の挙動をどのように評価するか，また評価手法の確立自体が，重要な課題となる。

本研究では，建設中のある揚水発電所大規模地下空洞を対象とし，掘削に伴う周辺地山の力学的挙動を的確に把握し，安全性，経済性を確保し得る合理的設計法を検討することを目的としている。

第1章では，緒論として本研究の背景，目的を述べ，本研究の意義を明確にするとともに，研究の概要を記述した。

第2章では，岩盤不連続面の力学的特性を正しく求めることを目的とし，様々な境界条件を再現できる高性能一面せん断試験装置と制御システムを試作した。試験装置の主な特徴としては，周辺地山の变形特性を反映するために，垂直剛性を仮想計測器ソフトウェアLabVIEWを用いた自動計測・制御システムによって設定できること，また，試験途中の制御条件の切替，多段階垂直剛性制御試験を可能にしたことが挙げられる。また，軟岩，中硬岩，硬岩相当の模擬材料を開発し，異なる表面形状を有する人工模擬不連続面を作成した。これらの模擬供試体を用いて，垂直応力一定（CNL）と垂直剛性一定（CNS）における一面せん断実験の実施により，開発したせん断試験機の制御精度，模擬供試体の適用性を検証できたとともに，不連続面のせん断挙動が境界拘束条件の影響を大きく受けることを解明した。

第3章では，不連続面の幾何的分布特性について，方向性，空間位置，分布密度等で特徴づけるアプローチを示した。不連続面の分布密度に関しては，2次元不連続面ネットマップによるフラクタル次元の算出・評価法を提案した。また，不連続面のフラクタル次元，方向性と大規模地下空洞の变形挙動との関係は個別要素法を用いた空洞掘削解析により詳細に考察した。

第4章では，不連続面を直接モデル化することが可能で取り扱いも容易な個別要素法（DEM）を拡張し，不連続性岩盤の局所破壊もシミュレーションできる手法を提案した。また，提案手法の妥当性を検証するために，深部地盤にも対応できる底面摩擦模型実験装置および画像解析装置を用いた地下空洞の掘削模型実験を実施し，模型実験と数値解析との比較により，提案手法における新規亀裂の発生・進展の再現に妥当性を有することが確認できた。次に，提案手法を用いて，大規模地下空洞の掘削に伴う周辺地山の变形挙動と不安定機構を解明した。

第5章では，揚水発電所大規模地下空洞を対象に，不連続面を忠実に再現した二次元不連続体解析モデルと，解析領域で等価な破壊強度を持つ等価連続体解析モデルを用いて，掘削シミュレーションの比較検討を

実施することにより岩盤構造物の安定性に対する不連続面の局所的な影響を検証した。なお、不連続体モデルの作成については、現場調査結果から構造物スケールに合わせて明らかに影響を及ぼす不連続面（層理、節理など）のネットマップの作成法を示した。また、周辺地山の変形と局所破壊による不安定化に対するロックボルトとPSアンカーの補強効果を詳細に考察した。

第6章では、揚水発電所大規模地下空洞の掘削に伴う周辺地山の力学的挙動を的確に把握するために、実現場の地山特性および施工過程を考慮できる三次元掘削解析モデルを開発した。ベンチ掘削過程を忠実に再現することにより、空洞および周辺地山の変形挙動（内空変位の分布特徴と進展履歴）を三次元的に把握することができた。また、PSアンカーやロックボルトによる内空変位の抑制効果と、延長方向に沿う周辺地山に対する支持効果を総合的に検討することにより、合理的な支保パターンを提案することができた。

第7章では、第2章から第6章で記述した結果に基づいて結論を総括した。また、今後の研究展望も行った。

#### 論文審査の結果の要旨

肖俊氏は、平成2年7月中国の西南交通大学土木工学科を卒業し、広州鉄道集団会社に入社、平成5年8月まで勤務した。平成5年9月に来日し、同年10月に研究生として愛媛大学工学部に入学、平成6年4月に愛媛大学大学院修士課程土木海洋工学専攻に入学し、平成8年3月に修了した。平成8年4月から東興建設（株）に入社し、平成11年3月に退職した。同年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。

入学以降、主として大規模地下空洞の力学的挙動の評価と合理的支保設計について模型実験および数値解析による研究に従事し、現在まで7編の論文を発表している。その成果を基に平成13年12月20日に主論文「Study on Mechanical Behavior of Jointed Rock Masses and Application to Deep Underground Structures Design」を完成させ、参考論文7編（審査付き論文3編、内公表した論文2編、投稿中1編）を添え長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（学術）の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、予備審査委員会による予備審査の結果報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記のとおり審査委員を選定した。審査委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文審査及

び最終試験の結果を、平成14年2月21日の研究委員会に報告した。

提出論文は、建設中のある揚水発電所大規模地下空洞を研究対象とし、大深度にも適用する岩盤不連続面の高性能一面せん断試験装置の試作、新規亀裂の発生と進展が解析可能な拡張個別要素法の開発とともに、解析及び模型実験の両面から掘削に伴う空洞周辺地山の力学的挙動を的確に把握し、総合技術とした情報化施工の一環として、その予測精度向上を図ることができた。提出論文は、全7章から成っている。

まず、本研究の社会的背景と既往の研究を概観し、本研究の目的と、既往の研究との位置付けを明確にした。すなわち、近年、土地の有効利用や環境問題あるいは安全性、経済性の確保などの視点から地下利用が積極的に進められているが、大規模地下空洞は断面が大きくなると、空洞の安定性がより周辺地山に依存せざるを得なくなるため、本研究は掘削に伴う周辺地山の力学的挙動を的確に把握して、安全性、経済性を確保し得る合理的支保設計法を確立することを最終目的とした。まず最初に、岩盤不連続面の力学的特性を正しく求めるために、様々な境界条件を再現できる高性能一面せん断試験装置と制御システムを試作し、模擬供試体を用いる一面せん断実験を実施することにより、制御精度を検証できたとともに、不連続面のせん断挙動が境界拘束条件の影響を大きく受けることを解明した。不連続面の幾何的分布について、フラクタル次元による算出・評価法を提案し、不連続面のフラクタル次元、方向性と大規模地下空洞の変形挙動との関係について詳細な考察を行った。

次に、不連続性岩盤の局所破壊をシミュレーションできる拡張個別要素法を提案した。深部地下空洞掘削の底面摩擦模型実験を実施し、模型実験と数値解析との比較により、提案手法における新規亀裂の発生・進展の再現に妥当性を有することが確認できた。

さらに、揚水発電所大規模地下空洞の掘削に伴う周辺地山の力学的挙動を的確に把握するために、実現場の地山特性および施工過程を考慮できる三次元等価連続体掘削解析モデルを開発して、周辺地山の変形挙動と安定に対するロックボルトなどの支保効果を詳細に検討した。研究成果の一部は既に施工中の揚水発電所大規模地下空洞の情報化施工に供されている。

海洋生産科学研究科委員会は、論文審査及び最終試験の結果についての審査委員の報告に基づき審査した結果、本論文は、岩盤工学分野の発展に貢献するところが大きく、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 棚橋由彦  
 副査 教授 吉武裕  
 副査 教授 古本勝弘  
 副査 教授 岡林隆敏

Yusli Wardiatno

(インドネシア) 1966年7月28日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 Study on the Biology of the Ghost Shrimp,  
*Nihonotrypaea japonica* (Ortmann 1891)  
 (Decapoda: Thalassinidea: Callinassidae),  
 Distributed on Intertidal Sandflats in Ariake  
 Sound, Kyushu, Japan

論文内容の要旨

ニホンスナモグリは日本各地の砂質干潟で普通に見られる大型の十脚甲殻類であり、地下深くに達する巣穴を造って生活している。有明海から橘湾を経て東シナ海に至る西九州沿岸水系では、有明海だけに分布している。一方、橘湾とその外側の砂質干潟には同属のハルマンスナモグリが分布している。その生物学的知見は長年にわたって蓄えられてきたが、ニホンスナモグリについてはほとんど明らかにされていない。近年、本種はクルマエビ養殖池に侵入し、その強力な基質攪拌作用によってエビの生産高を減少させていることが強く疑われている。本研究は、ニホンスナモグリの分類・干潟内での分布・生活史などの生物学的特性を明らかにすることにより、今後の生態学的研究の基礎的知見を得ることを目的とした。とくに、ハルマンスナモグリとの比較生物学的見地に立って、上記3項目を序章に続く各章に分けて追究した。

第2章(ニホンスナモグリの分類学的混乱の解決)。Sakai (1969) に従い、長年ハルマンスナモグリはニホンスナモグリのシノニムとされてきた。しかし、Manning & Tamaki (1998) はこれらが別種であることを示し、形態上の識別点を与えた。すなわち眼柄幅に対する眼の幅の比が、ハルマンスナモグリでは1/2以上、ニホンスナモグリでは1/5~1/3であると記載した。しかし本研究で、それぞれ数百個体の標本に当たった結果、この比の値の範囲外にある個体が17~27%程度あることが判明した。さらに、目の幅が頭胸甲長と相対成長することが明らかになり、また、2変数判別解析を施すことによって、誤同定率0.1%で2種に分けられることが示された。

第3章(ニホンスナモグリとハルマンスナモグリが共出現する干潟における、両種の分布隔離)。有明海の湾口部側1/3の水域にある砂質干潟では、2種がともに出現する。そのような干潟を4ヶ所(天草下島東海岸の茂木根と本渡、大矢野島の宮津、宇土半島の御

興来) 選び、そのなかでの2種の分布と密度を環境条件と関連させて調査した。また、ハルマンスナモグリ・ニホンスナモグリが単独で出現する場所として、それぞれ天草下島の富岡・熊本市の白川河口の干潟を選んでその環境条件の変化を周年にわたって調査した。共出現干潟では、基本的にハルマンスナモグリが低潮帯側半分、ニホンスナモグリが高潮帯側半分に分かれて分布していた。それぞれの種が生息する潮位の大潮時平均干出時間の中央値は1.5~3.1時間、2.0~5.6時間であった。またこれと並行して、堆積物の中央粒径・淘汰度・シルト-粘土分、砂質の厚さと堅さ、地下水の溶存酸素濃度と酸化還元電位についても、2種の分布と密接な対応関係が見られ、各パラメータにおいてニホンスナモグリのほうが幅広い基本ニッチを有することが明らかになった。とくに長時間の低酸素濃度継続に対する耐性が異なることが強く示唆された。このような特性の違いは、外海水・内湾水の影響下にあるそれぞれの単独出現干潟の環境パラメータの時間変動パターン(前者がより安定)と関連づけることができた。しかし、2種の分布は無機的环境条件だけによって決まるのではなく、種間競争も関わっていることも示唆された。例えば、ハルマンスナモグリがいない白川河口干潟では、全域にわたってニホンスナモグリが分布していた。

第4章(ニホンスナモグリの生活史)。熊本市白川河口干潟(距岸2000m干出)におけるニホンスナモグリの生活史を明らかにするため、1999年4月から2000年4月まで大潮干潮時ごとに、岸から沖に等間隔に配した4地点で合計約400~700個体ずつ採集した。個体群の体長頻度分布解析を含む定法にしたがい、解析を進めた。雌の抱卵期は2月から11月までであった。個体あたりの平均孵出卵数は1800個、卵径は500×730μmであった。個体群に、3月と7~9月にそれぞれ抱卵率の極大値をもつ2つの抱卵グループが存在していた。それぞれから2ヶ月、1.5ヶ月遅れて新規加入コホートが認められた。これら2つのコホートは、それぞれ1年後に個体平均全長40mmにまで成長すると繁殖に参加し、9月末までには融合して1つの複合コホートになると推定された。さらに、これは2年目の2~6月に1~2回の産卵をした後、7月中旬までに死滅すると推定された。平均全長は2年目の春までほぼ直線的に増加し、その後65mmで頭打ちになる。雄も同様の生活史を送ると推定された。ただし、最大平均全長は70mmであった。新規加入後の性比は1:1であったが、成熟後には1.2:1の比で雌に偏っていた。これは、雄個体間の闘争による高死亡率に帰せしめられると考えられた。ハルマンスナモグリの生活史に関する先行研究と比較し、ニホンスナモグリ個体群の最も顕著な

特徴して、(1) 繁殖期がより長いこと(前者は6~10月)、(2) 平均全長がより大きいこと、(3) 大卵少産型であること、が挙げられる。その他の生活史パターンは基本的に同じであった。

#### 論文審査の結果の要旨

Yusli Wardiatno氏は、1990年9月、インドネシアのBogor Agricultural University, Department of Living Aquatic Resources Managementを卒業後、1996年1月、デンマークのAarhus University, Department of Ecology and Genetics大学院修士課程を修了し、現在に至っている。

同氏は、1999年4月、長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学以降、有明海の砂質干潟に分布するニホンスナモグリ(甲殻十脚目スナモグリ科)の生物学的研究に従事し、現在まで1編の論文を印刷公表している。その成果を、平成13年12月に主論文「Study on the Biology of the Ghost Shrimp, *Nihonotrypa japonica* (Ortmann 1891) (Decapoda: Thalassinidea: Callinassidae), Distributed on Intertidal Sandflats in Ariake Sound, Kyushu, Japan」として完成させ、参考論文1編を添え、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位の申請をした。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において予備審査委員会による予備審査結果及び論文内容の要旨の報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審査し、平成14年1月25日に公開論文発表会を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

ニホンスナモグリは日本各地の砂質干潟で普通に見られる大型の十脚甲殻類であり、地下深くに達する巣穴に棲んでいる。有明海から橘湾を経て東シナ海に至る西九州沿岸水系では、有明海だけに分布している。一方、橘湾とその外側の砂質干潟には同属のハルマンスナモグリが分布している。その生物学的知見は長年にわたって蓄えられてきたが、ニホンスナモグリについてはほとんど明らかにされていない。とくに近年、当該海域では貝類やクルマエビに対する本種の加害作用が問題になっている。世界的にも共通の現象が起こっていて、原因究明が急務となっている。また、スナモグリ類はその強力な基質攪拌作用によって海底-水界の物質循環に大きな影響を及ぼすので、近年最も注目されている底生動物のひとつである。Wardiatno氏の研究は、ニホンスナモグリの分類・干潟内での分布・生活史などの生物学的特性を明らかにすることに

より、今後の生態学的研究の基礎的知見を得ることを目的として行われた。

まず、これまで長年、ハルマンスナモグリがニホンスナモグリのシノニムとされてきた点につき、追究した。Manning & Tamaki (1998)により与えられていた2種の形態上の識別点(目と眼柄幅の比)を再検討するため、それぞれ数百個体の標本に当たった結果、識別点計測数値の範囲外にある個体が最大27%程度存在することが明らかにされた。さらに、頭胸甲長と上記比の値を用いた2変数判別解析を施すことにより、誤同定率0.1%で2種に分けられることが示された。2種の分類学的混乱を多変数解析によって解決した内容であり、高く評価できる。

つぎに、ニホンスナモグリとハルマンスナモグリが共出現する干潟(有明海の湾口部)において、両種の帯状分布構造を環境条件と関連させて追究した。また、ハルマンスナモグリ・ニホンスナモグリが単独で出現する場所として、それぞれ天草下島の富岡・熊本市の白川河口の干潟を選んでその環境条件の変化を周年にわたって調査した。共出現干潟では、ハルマンスナモグリ・ニホンスナモグリが低潮帯側半分・高潮帯側半分に分かれて生息していた。それぞれの種が生息する潮位の大潮時干出時間、堆積物の中央粒径・淘汰度・シルト-粘土分、砂層の厚さと堅さ、地下水の溶存酸素濃度と酸化還元電位について、2種の分布と密接な対応関係が見られ、各パラメータにおいてニホンスナモグリのほうが幅広い基本ニッチを有することが明らかにされた。このような特性の違いは、外海水・内湾水の影響下にあるそれぞれの単独出現干潟の環境パラメータの時間変動パターン(前者がより安定)と関連づけられた。しかし、2種の分布決定には、種間競争(ハルマンスナモグリが優位)が関わっていることも示唆された。この現象は生態学的に非常に興味深い。非対称的な競争関係にある同属2種が、環境条件に対する生理学的耐性の違いによって同所的に共存可能となる事例として、今後の実験的検証の端緒を開いた点で、高く評価できる。

最後に、ニホンスナモグリの生活史を追究した。熊本市白川河口干潟におけるニホンスナモグリの生活史を明らかにするため、1999年4月から1年間、大潮干潮時ごとに採集を行い、合計約10,300個体を得た。個体群の体長頻度分布解析を含む定法にしたがって解析を進めた。雌の抱卵期は2月から11月までであった。これに由来する新規加入コホートが大きく2つ認められた。これら2つのコホートは、それぞれ1年後に繁殖に参加し、9月末までには融合して1つの複合コホートになると推定された。これは2年目の2~6月に1~2回の産卵をした後、7月中旬までに死滅する

と推定された。雄も同様の生活史を送ると推定された。ハルマンスナモグリの生活史に関する先行研究と比較し、ニホンスナモグリ個体群の最も顕著な特徴として、(1)繁殖期がより長いこと(前者は6~10月)と(2)大卵少産型であること、が見いだされた。このような大量の標本に基づいた個体群解析は、スナモグリ類についてはほとんど例が無く、あいまいな個体群パラメータを出していた多くの先行研究に比べて画期的な成果を挙げたといえる。今後の生活史研究の模範例となることが期待される。

以上のように、本論文はニホンスナモグリの分類、分布、生活史に関する基礎的知見を初めて明らかにした。これらは、ハルマンスナモグリとの比較生態学的研究や貝類増殖事業・クルマエビ養殖業の改善に資するだけでなく、近年、沿岸生態系の key species として世界的に注目されているスナモグリ類一般の生物学、生態学の進展に対しても貢献するところが大であると認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	田北	徹
	副査	教授	竹村	暁
	副査	教授	夏苺	豊
	副査	教授	石松	惇
	副査	教授	玉置	昭夫

## 張 農

(中国)1968年7月28日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 魚類筋原繊維の変性と水の状態に及ぼすオキアミ酵素分解物の影響に関する研究

### 論文内容の要旨

南極オキアミ(Antarctic krill) *Euphausia superba* は、体長6センチにも達する遊泳性の甲殻類で、南極海におけるその生物量は莫大(10~20億トン)であると推定されている。FAOは漁獲可能量を12,000万トンと推算している。現在、釣り用あるいは養殖用の餌、カロチノイド色素の抽出材料などに利用されているに過ぎない。近年、海洋生物資源の枯渇あるいは漁獲量の減少傾向が逼迫しているものもあり、未・低利用海洋生物資源の有効利用や開発が将来的課題となってきた。

本研究では、オキアミから酵素分解物を調製し、それを食品への利用を目的とした。食品のモデルとした魚類筋原繊維(Mfと略)に酵素分解物を添加し、脱水、凍結における水の状態を解析し、さらにMf Ca-ATPase 活性を指標としてタンパク質変性との関連を、他の2種類エビ肉(クルマエビおよびトラエビ)から調製した酵素分解物と比較検討した。研究結果は、以

下のように要約される。

第1章では、タンパク質周囲の水の状態、タンパク質変性抑制物に関する既往の研究、オキアミ利用の現状を概説し、本研究の目的、意義を明らかにした。

第2章では、オキアミ酵素分解物を調製し、その化学的特性を明らかにした。その結果、3種の酵素分解物の主要成分は分子量12,000以下のペプチドであり、オキアミおよびトラエビ酵素分解物では約82%、クルマエビ酵素分解物では89%であった。粗脂肪はいずれの酵素分解物も0.06%以下であった。粗灰分はクルマエビ酵素分解物2.23%、その他の2種の酵素分解物は約5~6%であった。糖質はオキアミ酵素分解物8.14%、クルマエビ酵素分解物4.69%、トラエビ酵素分解物9.27%であった。酵素分解物のアミノ酸組成は、いずれもGlx, Asx, Arg, Gly, AlaおよびLeuなどのアミノ酸を多く含有している。

第3章では、オキアミおよび他の2種類酵素分解物をエソMfに添加(5g/100gMf)、あるいは添加量を変えて添加し(2.5~12.5g/100gMf)、脱水に伴うMf中の水の存在状態を脱水収着等温線から調べ、その変化をMf Ca-ATPase 活性を指標としたMfの変性との関わりを検討した。その結果、オキアミ酵素分解物は、脱水に伴うMfのAw低下効果を有するのみならず、変性抑制効果を有し、しかもそれらの効果はクルマエビやトラエビと同程度であった。しかし、オキアミ酵素分解物のそれらの効果は、従来から知られた変性抑制剤のグルコースおよびNa-Gluと比べて低かった。

第4章では、脱水に伴う酵素分解物添加Mf中の不凍水量を示差走査熱分析で調べ、脱水収着等温線から得られた水の状態との関わりを検討した。その結果、酵素分解物添加Mf中の不凍水量は、いずれもコントロール(0.41gH<sub>2</sub>O/g dried matter)よりも増加した。不凍水量は、オキアミ酵素分解物では7.5%添加、クルマエビ酵素分解物では5.0%添加、トラエビ酵素分解物では5.0~7.5%添加で最大値を示した。得られた不凍水量と結合水との間に相関性は低いことが分かった。すなわち、このことは脱水収着等温線より理論的に解析された結合水量と示差走査熱分析より直接測定した不凍水量が、それぞれの分析法で測定された情報(水の状態の特徴)を示すことに起因していると考えられた。

第5章では、オキアミおよび他の2種類酵素分解物をエソMfに添加(5g/100gMf)、あるいは添加量を変えて添加し(2.5~12.5g/100gMf)、示差走査熱分析で凍結に伴うMf中の不凍水量の変化を調べた。同時にATPase活性を測定し、両者の関係を検討した。その結果、酵素分解物添加により凍蔵中におけ

る Mf 中の不凍水量は増加した状態が維持され、凍結変性抑制効果も認められた。Mf の失活は酵素分解物 5.0% 添加まで 2 段階変性様式で 7.5% 以上の添加 Mf では凍蔵 120 日目まで 1 段階の変性様式で進行した。凍蔵中の ATPase 活性と不凍水量の減少との間には高い相関性が見られた。このことから酵素分解物は Mf 中の水を構造化して不凍水量を増大させ、結果として Mf の変性を抑制していることが示唆された。

第 6 章では、本研究を総括すると同時に、本研究で得られた成果について今後の課題、展望について述べた。

#### 論文審査の結果の要旨

張 農氏は、平成 3 年 7 月、中国上海水産大学食品科学技術学部を卒業後、同年 8 月中国廈門水産研究所に採用され、主として食品加工の研究に従事した。平成 8 年 11 月同研究所を退職後、来日、平成 9 年 4 月長崎大学大学院水産学専攻修士課程に入学し、平成 11 年 3 月同研究科を修了した。同年 4 月長崎大学大学院海洋生産科学研究科海洋資源学専攻博士課程に入学した後、現在に至っている。同氏は、本研究科に入学以降、オキアミの高度有効利用を目的として、酵素分解物の機能特性の研究に従事している。その成果を、平成 13 年 12 月に主論文「魚類筋原繊維の変性と水の状態に及ぼすオキアミ酵素分解物の影響に関する研究」を完成させ、参考論文 3 編（査読付き）を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（学術）の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成 13 年 12 月 20 日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、学位申請の提出資格ありと判定し、下記の委員会を選定した。委員は主査を中心としてその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による専門分野に関する最終試験を実施し、審査結果および最終試験結果を平成 14 年 2 月 21 日の研究科委員会に報告した。

提出された論文は、多獲されているオキアミ（Antarctic krill）*Euphausia superba* は、現在、釣り用あるいは養殖用の餌、カロチノイド色素の抽出材料などに利用されているに過ぎないことから、オキアミから酵素分解物を調製し、食品への高度有効利用（食品の保湿剤、タンパク質変性抑制剤）を目的として、食品のモデルとした魚類筋原繊維（Mf と略）に酵素分解物を添加し、脱水や凍結における水の状態を解析し、さらに Mf Ca-ATPase 活性を指標としてタンパク質の変性との関連を、他の 2 種類エビ肉（クルマエビおよびトラエビ）から調製した酵素分解物と比較検討を行ったものである。

まず第 1 章では、タンパク質周囲の水の状態、タン

パク質変性抑制物に関する既往の研究、オキアミ利用の現状を概説し、本研究の目的、意義を明らかにしている。

次に第 2 章では、オキアミ酵素分解物を調製し、その化学的特性を明らかにしている。即ち、3 種の酵素分解物の主要成分は分子量 12,000 以下のペプチドであり、82%～89% 含まれていた。酵素分解物のアミノ酸組成は、いずれも Glx, Asx, Arg, Gly, Ala などをも多く含有している。

第 3 章では、オキアミおよび他の 2 種類酵素分解物をエソ Mf に添加し、脱水に伴う Mf 中の水の存在状態を脱水収着等温線から調べ、その変化を Mf Ca-ATPase 活性を指標とした Mf の変性との関わりを明らかにしている。即ち、オキアミ酵素分解物は、脱水に伴う Mf の水分活性（Aw）低下効果を有するのみならず、変性抑制効果を有し、しかもそれらの効果はクルマエビやトラエビと同程度であった。

第 4 章では、脱水に伴う酵素分解物添加 Mf 中の不凍水量を示差走査熱分析で調べ、脱水収着等温線から得られた水の状態との関わりを明らかにしている。即ち、酵素分解物添加 Mf の不凍水量は、いずれもコントロールよりも増加し、最大値は示す添加濃度が認められた。得られた不凍水量と結合水量との相関性は低く、このことは分析法の違いに起因していると考えられた。

第 5 章では、オキアミおよび他の 2 種類酵素分解物をエソ Mf に添加し、示差走査熱量分析で凍結に伴う Mf 中の不凍水量の変化を調べると同時に、ATPase 活性を測定し、両者の関係を明らかにしている。即ち、酵素分解物添加により凍蔵中における Mf 中の不凍水量は増加した状態が維持され、凍結変性抑制効果も認められた。凍蔵中の ATPase 活性と不凍水量の間には高い相関性が見られた。このことから酵素分解物は Mf 中の水を構造化して不凍水量を増大させ、結果として Mf の変性を抑制していることが示唆された。

最後に、第 6 章では、本研究を総括すると同時に、本研究で得られた成果について今後の課題、展望について述べている。

以上のように、本論文は、海洋生物資源の有効利用を目的とする食品学分野の進歩に貢献するものであることを認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	野崎	征宣
	副査	教授	石原	忠
	副査	教授	槌本	六良
	副査	教授	古川	睦久

## 山下 康 充

(長崎県)昭和49年4月25日生

授与年月日 平成14年3月31日

主 論 文 脱水および凍結過程における魚類筋原繊維タンパク質の変性と水の存在状態に及ぼすキチン加水分解物の影響に関する研究

## 論文内容の要旨

キチン質はN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ 1-4結合した多糖類で広く自然界に分布しており、年間推定1,000億トンにも及ぶ再生産性を示す、枯渇の可能性が非常に低いバイオマスである。近年、キチン質に様々な機能性が見いだされ、その付加価値を高める研究が各分野において行われている。また、魚肉は各種貯蔵条件下における品質の低下が非常に激しいため、アミノ酸、有機酸、糖類を用いてそれを抑制する場合があるが、その優れた実用例は冷凍すり身の製造にみられる。本研究では、天然物由来添加物として甲殻類および頭足類由来キチンよりキチン加水分解物を調製し、魚類筋原繊維タンパク質 (Mf) に対する変性防止剤としての有効性ならびに水の存在状態に及ぼす影響を、示差走査熱量分析、水分活性 ( $A_w$ ) 測定ならびに Ca-ATPase 活性測定を行うことにより検討した。

第1章では、本研究の概要および背景について述べた。

第2章では、長崎県内の水産加工場で廃棄されたタラバガニ (King crab, *Paralithodes camtschatica*)、ウチワエビ (Japanese fan lobster, *Ibacus ciliatus*) の甲羅およびヤリイカ (Spear squid, *Doryteuthis bleekeri*) の軟骨を用い、キチンならびにキチン加水分解物を調製し、それらの一般成分組成、物理化学的特性を検討した。その結果、キチンは、そのほとんどが糖質で占められており、分子量  $1.9 \sim 2.0 \times 10^6$ 、脱アセチル化度 13.2 ~ 15.9% の典型的なキチンであった。それらキチンより塩酸加水分解によって調製されたキチン加水分解物は、そのほとんどが糖質で占められており、GlcNAc のモノマーからペンタマーまでを主成分とする混合物であることが明らかになった。また、重合度組成は、モノマーが約50%を占め最も多く、重合度の上昇とともにその組成比は低下した。なお、平均分子量は約449 ~ 458であった。

第3章では、Mf の脱水変性と水の状態に及ぼすキチン加水分解物の影響を、 $A_w$  (20°C)、不凍水量ならびに Mf Ca-ATPase 活性を指標として検討した。脱水収着等温線は、いずれも  $A_w$  0.01 ~ 0.082 と  $A_w$  0.57 ~ 0.611 に変曲点をもつ逆S字型を示した。また、キチン加水分解物添加 Mf の  $A_w$  は、無添加 Mf のそれと

比較して同一水分含量においていずれも低下し、特に中間水分域から低水分域にかけて顕著であった。脱水収着等温線より、単分子層収着水量 ( $M_1$ ) ならびに多分子層収着水量 ( $M_2$ ) を解析した結果、キチン加水分解物添加 Mf のそれらは無添加 Mf のそれらと比較していずれも増加した。次に、キチン加水分解物添加および無添加 Mf の脱水過程中的不凍水量の変化を検討した結果、キチン加水分解物添加 Mf の不凍水量は、無添加 Mf のそれと比較して増加傾向を示した。さらに、キチン加水分解物添加および無添加 Mf の脱水過程中的変性を検討した結果、無添加 Mf の活性は、 $A_w$  0.6 までにその約90%が失活したが、キチン加水分解物添加 Mf の活性は、全  $A_w$  域で無添加 Mf のそれよりも高かった。以上の結果より、キチン加水分解物は水の存在状態を変化させると同時に、脱水変性抑制効果を有することが明らかとなった。

第4章では、Mf の凍結変性と水の存在状態に及ぼすキチン加水分解物の影響を、不凍水量ならびに Ca-ATPase 活性を指標として検討した。キチン加水分解物添加 Mf の不凍水量は、無添加 Mf と比較していずれも増加した。また、凍蔵中、無添加 Mf の不凍水量は、凍蔵20日目には約76%にまで減少し、その後漸次減少したのに対し、キチン加水分解物添加 Mf 中の不凍水量は凍蔵中常に無添加 Mf よりも多く、緩慢に減少した。次に、キチン加水分解物添加 Mf の凍結貯蔵中の変性を検討した。無添加 Mf の活性は凍蔵30日までに約40%と急激に低下し、その後徐々に低下する2段階の変性様式を示した。一方、キチン加水分解物添加 Mf の活性は、凍蔵中常に無添加 Mf よりも高く、緩やかに低下し、ウチワエビおよびヤリイカキチン加水分解物の2.5%添加以外では1段階であった。次に、冷凍変性速度恒数  $K_D$  ( $\times 10^{-3}$  day) を求めた結果、無添加 Mf は変性初期の1段階  $K_{D1}$  27.90、変性後期の2段階  $K_{D2}$  5.20であったのに対し、キチン加水分解物添加 Mf の  $K_D$  は、無添加 Mf のそれと比較して総じて低かった。また特に、5.075%添加での  $K_D$  が非常に小さかったことから、この濃度域において Mf の変性をほぼ完全に抑制していることが明らかとなった。次に、保護効果 (E 値) を算出した結果、それぞれ、タラバガニキチン加水分解物 (10.7)、ウチワエビキチン加水分解物 (9.3) およびヤリイカキチン加水分解物 (11.7) であった。以上の結果より、キチン加水分解物は不凍水増加効果、冷凍変性抑制効果を有し、特に冷凍変性抑制効果は、従来から冷凍変性抑制効果を有するとされている糖類と比較しても、遜色がないことが明らかとなった。

第5章では、以上の結果を統括し考察した。その結果、キチン加水分解物の変性抑制機構は、Mf に直接



働きかけるのではなく、Mf 周囲の水の構造を安定化させることによって、Mf の変性を抑制しているものと推察された。また、本研究によりキチン加水分解物の新たな機能が明らかとなり、新たなキチン質利用の一助となり得ると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

山下康充氏は、平成9年3月、長崎大学水産学部を卒業後、同年4月長崎大学大学院水産学研究科水産学専攻修士課程に入学、平成11年3月同研究科を修了した。同年4月長崎大学大学院海洋生産科学研究科海洋資源学専攻博士課程に入学した後、現在に至っている。同氏は、本研究科に入学以降、甲殻類および頭足類由来キチンの天然物由来添加物としての高度有効利用を目的として、キチン加水分解物の機能特性の研究に従事している。同氏は、その成果を、平成13年12月に主論文「脱水および凍結過程における魚類筋原繊維タンパク質の変性と水の存在状態に及ぼすキチン加水分解物の影響に関する研究」を完成させ、参考論文2編(査読付き)を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、学位申請の提出資格ありと判定し、下記の委員会を選定した。委員は主査を中心としてその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による専門分野に関する最終試験を実施し、審査結果および最終を試験結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出された論文は、海洋生物資源の甲殻類の殻および頭足類の軟骨の天然物由来添加物としての高度有効利用を目的として、それらのキチンよりキチン加水分解物を調製し、魚類筋原繊維(Mf)に対する変性防止剤としての有効性ならびに水の存在状態に及ぼす影響を、示差走査熱量分析ならびに水分活性( $A_w$ )およびMf Ca-ATPase 活性の測定から検討したものである。

まず第1章では、本研究の概要および背景について述べている。

次に第2章では、長崎県内の水産加工場で廃棄されたタラバガニ(King crab, *Paralithodes camtschatica*), ウチワエビ(Japanese fan lobster, *Ibacus ciliatus*)の甲羅およびヤリイカ(Spear squid, *Doryteuthis bleekeri*)の軟骨を用い、キチンならびにキチン加水分解物を調製し、それらの一般成分組成、物理化学的特性を明らかにしている。即ち、キチン(分子量 $1.86 \sim 2.01 \times 10^6$ , 脱アセチル化度 $13.22 \sim 15.94\%$ )より塩酸加水分解によって調製されたキチン加水分解物は、そのほとんどが糖質で占められており、(GlcNAc)のモノマーから

ペンタマーまでの混合物であり、重合度組成はモノマーが約50%を占めて最も多く、平均分子量は約449~458であった。

第3章では、Mfの脱水変性と水の状態に及ぼすキチン加水分解物の影響を、 $A_w$ ( $20^\circ\text{C}$ ), 不凍水量およびMf Ca-ATPase 活性を指標として検討し、明らかにしている。即ち、キチン加水分解物はMfの $A_w$ 低下効果、単分子層収着水量および多分子層収着水量の増加効果を有した。また、キチン加水分解物はMf中の不凍水量の増加効果を示した。さらに、キチン加水分解物は脱水過程中のMf Ca-ATPase 活性の低下を抑制した。以上の結果より、キチン加水分解物は水の存在状態を変化させると同時に、脱水変性抑制効果を有することが明らかとなった。

第4章では、Mfの凍結変性と水の存在状態に及ぼすキチン加水分解物の影響を、不凍水量ならびにCa-ATPase 活性を指標として検討し、明らかにしている。即ち、キチン加水分解物添加Mfの不凍水量は、無添加Mfと比較していずれも増加した。また、凍蔵中、キチン加水分解物添加Mf中の不凍水量は無添加Mfよりも多く、緩慢に減少した。次に、キチン加水分解物添加Mfの凍蔵中の変性を検討した。キチン加水分解物添加Mfの活性は、凍蔵中無添加Mfよりも高く、緩やかに低下し、特に、5.075%添加での変性速度恒数が非常に小さかったことから、この濃度域においてMfの変性をほぼ完全に抑制していることを明らかにしている。このことから、キチン加水分解物は不凍水増加効果、冷凍変性抑制効果を有し、特に冷凍変性抑制効果は、従来から冷凍変性抑制効果を有するとされている糖類と比較しても、遜色がないことを明らかにしている。

最後に第5章では、以上の結果を総合考察し、本研究で得られた成果についての今後の課題や展望について述べている。

以上のように、本論文は、海洋生物資源の有効利用を目的とする食品学分野の進歩に貢献するものであることを認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	野崎	征宣
	副査	教授	野口	玉雄
	副査	教授	村松	毅
	副査	教授	青柳	東彦

**大迫一史**

(広島県)昭和43年6月26日生

授与年月日 平成14年3月31日

**主論文** マアジの水産加工原料適性に関する研究  
**論文内容の要旨**

マアジは、わが国の重要な水産資源であり、このうち約20%は長崎地方で水揚げされる。多くは長崎沿岸海域および東シナ海で漁獲され、これに若干量の対馬沿岸海域で漁獲されたものが加わる。これらは、水揚げ時に主に漁場に基づいて「シロアジ」、「クロアジ」および「キアジ」に分別され、それに応じた価格形成がなされる。このうち、練り製品の原料となるのは長崎沿岸海域および東シナ海で漁獲されたものであり、対馬沿岸海域で漁獲されたものは高級塩干品の原料として主に静岡や唐津地方に送られる。

このようにマアジの流通形態は形成されているものの、原料の特性に応じた加工品の合理的な選択をする上での重要な基礎知見となる一般成分およびかまぼこ原料適性についての知見がない。

よって、本研究では、マアジについて漁場別の一般成分の周年変動、ゲル形成能の周年変動についての知見を得るとともに、すり身を凍蔵したときのゲル形成能の経日的変動、および水産加工業のゼロエミッション化への取り組みの一助となるべく、水晒処理時に排出される粗脂肪中の脂肪酸組成の周年変動を漁場別に明らかにすることを目的とした。研究結果は以下のように要約される。

第1章では、長崎地方に水揚げされるマアジについての市場での評価、魚類のゲル形成能、魚肉タンパク質の冷凍耐性および魚類の脂肪酸組成に関する既往の研究状況を概説し、本研究の目的および意義を明らかにした。

第2章では、長崎に水揚げされるマアジ、すなわち、長崎および対馬沿岸海域、東シナ海で漁獲されたマアジの魚体成分の周年変動を明らかにした。その結果、漁場に関わらず、粗脂肪含量は5～7月に高い値を示し、粗タンパク質、灰分およびエキス態窒素含量は周年ほぼ一定であった。漁場別にみると、粗脂肪含量は対馬沿岸域で漁獲されたものが最も高い値を示し、その他の漁場のものは差がなく、また、エキス態窒素含量は東シナ海で以西底曳網漁業により漁獲されたものが低い値を示し、その他のものは差がなかった。さらに、以西底曳網漁業で漁獲されたものはサイズが小さいものほどエキス態窒素含量が少ない傾向がみられた。

第3章では、マアジのゲル形成能の周年変動を明らかにするため、マアジの落とし身、清水晒肉およびアルカリ塩水晒肉からゲルを調製し、比較検討した。その結果、40℃、20分加熱の坐りゲルのゼリー強度、坐り

指数は夏季に低く、冬季に高い値を示し、さらに、戻り指数は夏季に高く、冬季に低い傾向を示したことから、マアジは冬季にはかまぼこ原料として適するが、夏季は適さないことが明らかになった。

第4章では、凍結貯蔵時におけるマアジすり身のゲル形成能の変化を明らかにするため、マアジアルカリ塩水晒肉に、トレハロース、スクロース、ソルビトールおよびグルコースをそれぞれ2.5、5.0、7.5および10.0%添加し、-25℃で凍蔵してゲル形成能、筋原繊維タンパク質 Ca-ATPase 活性および不凍水量の経日的変化を検討した。その結果、糖添加により不凍水量は増大し、糖の種類に関わらず、添加により耐凍性が得られたが、5.0および7.5%添加のものが最も効果が高かった。一方、変性抑制効果を糖の種類で比較すると、トレハロースの効果が他に比較して若干高かった。また、糖添加により不凍水量は増大し、ゲル形成能、筋原繊維タンパク質 Ca-ATPase 活性および不凍水量の間に密接な関係があることが窺われた。

第5章では、第2章と同じ供試魚の粗脂肪中の脂肪酸組成について検討した。飽和酸、モノエン酸、ポリエン酸およびポリエン酸中のDHAの組成比は、漁場間では顕著な差はなかった。また、DHAの組成比には各漁場とも互いに同様な周年変動がみられ、冬季には高く、夏季には低い傾向を示した。また、この傾向は大型のマアジに比較して、小型のものに明瞭に認められた。一方、胃内容物、すなわち餌生物中の脂肪酸組成は漁場間で差が認められ、一定の季節変動は認められなかった。

第6章では本研究結果を水産物の利用加工の現状と併せて総括的に考察するとともに、今後の研究展開について述べた。

**論文審査の結果の要旨**

大迫一史氏は、平成4年3月、九州大学農学部を卒業後、同年4月九州大学大学院農学研究科水産学専攻修士課程へ進学した。平成6年3月同研究科を修了後、同年4月九州大学農学部水産学科研究生として水産学の研究に従事した。平成7年4月長崎県島原水産業改良普及所に勤務後、平成9年4月から長崎県総合水産試験場水産加工開発指導センター加工科研究員として従事している。この間、平成11年4月長崎大学大学院海洋生産科学研究科海洋資源学専攻博士課程に入学した後、現在に至っている。同氏は、本研究科に入学以降、海洋生物資源の多獲魚であるマアジの水産加工原料適性に関する研究に従事している。その成果を、平成13年12月に主論文「マアジの水産加工原料適性に関する研究」を完成させ、参考論文2編(査読付き)を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、学位申請の提出資格ありと判定し、下記の委員会を選定した。委員は主査を中心としてその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による専門分野に関する最終試験を実施し、審査結果および最終試験結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出された論文は、マアジについて漁場別の一般成分の周年変動、ゲル形成能の周年変動についての知見を得るとともに、すり身を凍蔵したときのゲル形成能の経日的変動および水産加工業のゼロエミッション化への取り組みの一助となるべく、水晒処理時に排出される粗脂肪中の脂肪酸組成の周年変動を漁場別に明らかにすることを目的として検討を行ったものである。

まず第1章では、長崎地方に水揚げされるマアジに関する既往の研究状況を概説し、本研究の目的および意義を明らかにしている。

次に第2章では、マアジ魚体成分の漁獲海域別の周年変動を明らかにしている。即ち、マアジ肉の粗脂肪含量、粗タンパク質、灰分およびエキス態窒素含量は、季節、漁場、サイズにより差異があることを明らかにしている。

第3章では、マアジのゲル形成能の周年変動を明らかにしている。即ち、ゲル形成能および坐り指数は夏季に低く、冬季に高い値を示し、さらに、戻り指数は夏季に高く、冬季に低い傾向を示したことから、マアジは冬季には練り製品原料として適するが、夏季は適さないことが明らかになった。

第4章では、凍結貯蔵時におけるマアジすり身の練り製品適性を明らかにするため、マアジアルカリ塩水晒肉に、トレハロース、スクロース、ソルビトールおよびグルコースをそれぞれ2.5、5.0、7.5、10.0%添加し、-25℃で凍蔵してゲル形成能、筋原繊維タンパク質 Ca-ATPase 活性および不凍水量の経日的変化を検討している。即ち、糖添加により不凍水量は増大し、糖の種類に関わらず、添加により耐凍性が得られたが、5.0および7.5%添加のもが最も効果が高かった。一方、変性抑制効果を糖の種類で比較すると、トレハロースの効果が他に比較して若干高かった。また、糖添加により不凍水量は増大し、ゲル形成能、筋原繊維タンパク質 Ca-ATPase 活性および不凍水量の間に密接な関係があることが窺われた。このことから、マアジすり身の練り製品原料としての適性、変性抑制剤としての糖の至適添加濃度、糖の変性抑制機構が明らかになった。

第5章では、第2章と同じ供試魚の粗脂肪中の脂肪酸組成について検討している。即ち、飽和酸、モノエン酸、ポリエン酸およびポリエン酸中の組成比は、漁

場間では顕著な差はなかった。また、脂肪酸の組成比には各漁場とも互いに同様な周年変動がみられ、冬季には高く、夏季には低い傾向を示した。また、この傾向は大型のマアジに比較して、小型のものに明瞭に認められた。一方、胃内容物、すなわち餌生物中の脂肪酸組成は漁場間で差が認められ、一定の季節変動は認められなかった。

最後に第6章では、本研究結果を水産物の利用加工の現状と併せて総括的に考察するとともに、今後の研究展開について述べている。

以上のように、本論文は、海洋生物資源の水産加工原料を目的とする食品学分野の進歩に貢献するものであることを認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	野崎	征宣
	副査	教授	石原	忠
	副査	教授	西ノ首	英之
	副査	教授	古川	睦久

荒川和美

(長崎県)昭和49年4月10日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 ニホンイモリの毒性に関する研究

論文内容の要旨

動物界におけるフグ毒テトロドトキシン(TTX)の分布は意外に広く、これまでフグに加え、イモリ、ツムギハゼ、ある種のカエル、ヒョウモンダコ、肉食性巻貝、ヒトデ、毒ガニ、ヒラムシ、ヒモムシ等多様な生物にこの毒が見出されてきた。

本研究ではTTX保有生物の一員であるニホンイモリ *Cynops pyrrhogaster* の毒性や毒組成に関して、主として西日本産本種を対象として調査するとともに、毒化機構についても検討を加えた。また、TTXの皮膚組織内の分布については、抗TTXモノクローナル抗体を用いる免疫組織染色法により、TTX分泌腺の存在をはじめ明らかにした。その概要は以下のとおりである。

まず、1996年から1999年にかけて西日本の各地で採集したニホンイモリ計290個体につき、「食品衛生検査指針Ⅱ」のフグ毒検査法に基づいて個体別もしくは部位別毒性を調査したところ、個体別では84%が有毒(5 MU/g以上)と判定された。毒性値は5.370 MU/gで、大きな個体差、性差、ないし地域差がみられたが、明確な季節変動は認められなかった。部位別では、皮膚と筋肉の平均毒性値がそれぞれ56および57 MU/gと、他の部位(肝臓、胃、腸および生殖巣; 2.8 MU/g)に比べ著しく高かった。

次に、1999年に諫早市で採集したニホンイモリ91個

体(総重量:302g)から毒を抽出後、活性炭、Bio-Gel P 2, ならびに Bio Rex70の各カラムを用いて精製し、最終的に3つの有毒画分 Fr I (27,000MU), Fr II (12,000MU) および Fr III (240MU) を得た。各画分につき、プロトン核磁気共鳴 ( $^1\text{H-NMR}$ ) スペクトルを測定・解析した結果、Fr I は TTX, Fr II は 6 *epi*TTX, Fr III は 4,9 anhydroTTX および 4,9 anhydro 6 *epi*TTX から成ることが明らかとなった。毒性調査に用いた各地産イモリ抽出液の残余を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) - 蛍光分析に付したところ、いずれも TTX と 6 *epi*TTX を主成分、4 *epi*TTX, 4,9 anhydroTTX および 4,9 anhydro 6 *epi*TTX を副成分とすることがわかった。TTX と 6 *epi*TTX の比率には若干の地域差がみられた。

次に、ニホンイモリの毒化機構を解明する目的で、二、三の実験を試みた。まず、成長段階別毒性と毒組成について検討した。1999年に諫早市で採集したイモリの卵、幼生 A (体長 2 cm 未満), 幼生 B (体長 2 - 3 cm 未満), 幼生 C (体長 3 cm 以上), ならびに変態後の子イモリについて毒性を調べたところ、それぞれ、11.4, 4.5, 2.4, <2.0, 7.6 MU/g (0.26, 0.17, 0.21, <0.4, 2.6 MU/個体) と測定され、変態後に毒力が顕著に増加することがわかった。卵の毒は、親同様 TTX と 6 *epi*TTX を主成分とし、その組成比は子イモリに至るまでほぼ一定であった。一方、卵を孵化させ、無毒の餌で約 5 年間人工飼育したイモリはすべて無毒 (<2.0 MU/g) であったが、無毒の子イモリに TTX もしくは 6 *epi*TTX を経口投与する毒化モデル実験では、いずれも投与毒量の 50% 程度を蓄積した。これらの結果から、ニホンイモリは幼生の段階までは親から受け継いだ毒のみを保持しており、変態後に食物を起源として毒の蓄積を開始することが示唆されたため、子イモリの胃内容物を検索したところ、トビムシ、ダニ等多数の中型土壌生物がみられた。他方、ニホンイモリは TTX および麻痺性貝毒に対して顕著な抵抗性を示し、前者では 2,000 MU/20 g 体重、後者では 150 MU/20 g 体重の毒量の腹腔内投与で死亡しなかった。

最後に、抗 TTX モノクローナル抗体を用いる免疫組織染色法により、ニホンイモリにおける TTX の組織内分布について検討した。2000年に諫早市で採集した幼生、変態直後、および成体のイモリにつき、皮膚と筋肉の組織切片を作成後、免疫染色した。幼生の切片には抗体との陽性反応(褐色)を示す特定の部位は認められなかったが、変態直後の子イモリでは、皮膚に同反応を呈する未分化の腺組織がみられた。成体イモリの場合には、分化した毒腺(顆粒腺)、粘液腺、およびそれらの混合腺がみられ、TTX は顆粒腺と混

合腺に分布し、腺組織から体表に向かって延びる導管から分泌されることが示唆された。他方、体表をガーゼで拭く操作(ハンドリング刺激)により、イモリは皮膚から保有する毒の約 2 割を分泌した。分泌毒の成分は TTX および 6 *epi*TTX がほとんどであったが、体内残存毒からはそれらの anhydro 体や 4 *epi*TTX も検出された。

以上、本研究により、西日本産ニホンイモリの毒性には大きな個体差、性差、ないし地域差があること、毒は主に皮膚と筋肉に分布し、TTX と 6 *epi*TTX を主成分とすることなど、毒性ならびに毒成分の性状を明らかにした。ニホンイモリは TTX に対して高い抵抗性をもつこと、また成長段階別毒性試験などから、変態後に土壌中の餌生物を起源として毒化することを推察し、毒化機構解明への道を拓くとともに、TTX の組織内分布を示し、外的な刺激によりこの毒を分泌する分泌機構が存在すること等を明らかにすることができた。

#### 論文審査の結果の要旨

荒川和美氏は平成 9 年 3 月に長崎大学水産学部を卒業し、同年 4 月に長崎大学大学院水産学研究所(修士課程)に入学後、平成 11 年 3 月に同研究所を修了して、水産学修士を修得した。同年 4 月長崎大学大学院海洋生産科学研究科(後期 3 年博士課程)に入学し、現在に至っている。同氏は海洋生産科学研究科において海洋資源学を専攻して所定の単位を修得し、主論文「ニホンイモリの毒性に関する研究」を完成させ、本研究に関連する参考論文 5 編(査読付き 3 編:掲載済み)を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

同委員会はこれを平成 13 年 12 月 20 日の定例研究科委員会に付議し、論文審査結果に基づいて課程修了のための学位論文の資格を審査し、本論文の受理を決定後、下記の審査委員会を選定した。審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成 14 年 2 月 21 日の定例研究科委員会に報告した。

提出論文は主に西日本産ニホンイモリの毒性や毒組成の調査を中心とし、イモリの毒化機構およびフグ毒テトロドトキシンの皮膚組織内の微細分布に関するものである。

1996 - 1999 年にかけて西日本の各地で採集したニホンイモリ計 290 個体につき、常法に従い個体別もしくは部位別に毒性を調査したところ、個体別では 84% が有毒で毒性値は 5 - 370 MU/g で、大きな個体差、性差ないし地域差が見られたが、明確な季節変動は認められなかった。部位別では、皮膚と筋肉がそれぞれ 56

および57MU/gと高かった。

諫早産二ホンイモリから毒を抽出して、活性炭、Bio-Gel P-2ならびにBio-Rex70の各カラムにより精製し、3つの有毒画分Fr-I, Fr- およびFr-IIIを得、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルからそれぞれTTX, 6-*epi*TTX, 4,9-anhydroTTXと4,9-anhydro 6-*epi*TTXから成ることが分かった。各地産イモリについても同様に調査した結果、成分比が多少異なるがほぼ同様であった。

二ホンイモリの毒化機構については、まず諫早産二ホンイモリの成長段階別毒性と毒組成を調べた結果、毒力は卵11.4, 幼生A(体長2cm未満)4.5, 幼生B(体長2-3cm未満)2.4, 幼生C(体長3cm以上)<2, 変態後の子イモリ7.6MU/gと測定され、変態後に毒力が顕著に増加した。卵の毒は、親同様にTTXと6-*epi*TTXを主成分とし、その組成比は子イモリに至るまで変わらなかった。他方、卵を孵化させ、無毒の餌で約5年間人工飼育したイモリはすべて無毒(<2.0MU/g)であったが、無毒の子イモリにTTXもしくは6-*epi*TTXを経口投与する毒化モデル実験では、いずれも投与毒量の約50%を蓄積した。これらの結果から、二ホンイモリは幼生の段階までは親から受け継いだ毒のみ保持し、変態後に食物を起源とした毒を蓄積することが示唆された。子イモリの胃内容物からはトビムシ、ダニなどの中型土壌生物が見られたが、これらが毒化との関連があるかどうかは現在のところ明らかではない。二ホンイモリはTTXおよび麻痺性貝毒に対して顕著な抵抗性を示した。

抗TTXモノクローナル抗体を用いる免疫組織染色法により、諫早産二ホンイモリの幼生、変態直後および成体の皮膚と筋肉におけるTTXの組織内分布を調べた。幼生の切片は抗体との陽性反応(褐色)を示さなかったが、変態直後の子イモリでは、皮膚に同反応を呈する未分化の腺組織が見られた。成体イモリでは、分化した毒腺(顆粒腺)、粘液腺およびそれらの混合腺が見られ、TTXは顆粒腺と混合腺に分布し、腺組織から体表に向かって延びる導管から分泌されることが示唆された。他方、体表をガーゼで拭く操作(ハンドリング刺激)により、イモリは皮膚から保有する毒の約2割を分泌した。その組成は前記と同様であった。

本研究の内容には、二ホンイモリの毒性や毒成分を明らかにするとともにイモリの毒化機構の解明や皮膚組織内にTTX分泌腺を確認するなどいくつかの新しい発見ならびに有意義な知見が含まれ、関連分野に大きく寄与するものと考えられ、高く評価できる。

以上により、海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会に基づき審査した結果、本研究は公衆衛生ならびに生理学の発展に貢献するところが大きいと判断し、学位に値するものとして合格とした。

審査担当者	主査	教授	野口玉雄
	副査	教授	村松毅
	副査	教授	野崎征宣
	副査	教授	岩尾正倫
	副査	助教授	荒川修

橋本多美子

(徳島県)昭和44年5月10日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 瀬戸内海産アサリの麻痺性貝毒に関する研究

論文内容の要旨

瀬戸内海を中心とした海域に発生する有毒渦鞭毛藻は、主に *Alexandrium catenella*, *A. tamarense*, *A. tamiyavanichii* および *Gymnodinium catenatum* である。これらのプランクトンによりムラサキガイ、ホタテガイ、アカガイやアサリといった二枚貝が頻繁に毒化し、水産並びに食品衛生上大きな問題となっている。近年有毒プランクトンが広範囲に発生するようになり、二枚貝類の毒化予防や毒化二枚貝の効果的な除毒研究が重要な課題となっている。毒化二枚貝の中で、アサリは、麻痺性貝毒(以下PSPと略記)蓄積力が一般に低く、しかも有毒プランクトンの消失に従い短期間で無毒化する。このことから、アサリに高いPSP解毒代謝能力が備わっていることが予測される。本研究は、アサリの毒化原因となるプランクトンの毒産生能を調べるとともに、アサリのPSP代謝経路を他の二枚貝と比較し、さらに、アサリに見られるPSP解毒促進因子について検討したものである。

*A. tamarense* クローン株の麻痺性貝毒産生能: 広島湾より分離した *A. tamarense* クローン培養22株の毒産生能を調べた。改変ES培地、培養温度20℃で培養したところ、細胞当たりの毒量(2.6~349.7 fmol/cell)および毒組成に大きな相違が見られたので、増殖力が著しい5株について培地と培養温度の影響を詳細に調べた。培地については改変ESとSWM 3とは毒産生能に相違が見られなかったが、培養温度15℃と20℃では前者より後者が高いPSP産生能を示し、相違が見られた。シストより発芽させた *A. tamarense* 培養株の細胞内に蓄積された毒の組成は、主にPX2, GTX4であり、培養12日目に毒生産量が最大となった。一方、プランクトンが飼育海水へ排出した毒は、PX1とPX2の成分から成り、またその量は培養後期に増大した。

*A. tamiyavanichii* による二枚貝の毒化: 瀬戸内海南東部海域で *A. tamiyavanichii* により二枚貝が毒化した。同種は、40m深度まで均一に垂直分布し、1~2 cells/mlのプランクトン密度で二枚貝類を規制値(4 MU/g)以上まで毒化させた。同種プランクトンにより表

層のムラサキガイと30~40m海底の養殖アカガイが同時に毒化した。この種による二枚貝の毒化は、世界で初めての報告であった。

**GTX群の分析条件の検討**：これまで、PSPで毒化したアサリ抽出液のGTX画分の成分分析は、妨害成分の存在により各成分の分離が困難であったが、C<sub>30</sub>カラムおよび移動相に揮発性の5mMヘプタフルオロ酪酸を用いることで、妨害成分が除去され、GTX成分の分析が可能となった。さらに、このLC条件は、LC/SSI-MSにも適用できた。

**天然有毒二枚貝の麻痺性貝毒代謝**：*A. tamarense*で毒化したムラサキガイの個体別、組織別の毒の蓄積状況を調べ、同じロットでも毒化レベルに個体差があること、組織間でGTX群とPX群の組成比が異なることを示した。次に、*A. tamarense*で毒化したアサリをろ過海水中で飼育した。実験開始時に最大のPSPを蓄積していたのは中腸腺で、次いで鰓>外套膜>貝柱>その他の順であった。また、各組織に蓄積されていた毒の成分は、多くがGTX1またはGTX4であったが、時間の経過によりGTX2、GTX3、PX1、PX2等の割合が増加した。蓄積した毒量は、組織間で相違が見られ、中腸腺においては飼育72時間後に一時期増大した。排出した毒の成分は、時間経過で比率に変化がみられたが、PX1を主としてその他PX2およびGTX1-4が見られた。他方、*G. catenatum*により毒化したアサリから排出された毒は、95%以上がPX1とPX2であった。

**人工飼育により毒化させた二枚貝の麻痺性貝毒代謝**：*A. catenella*で毒化させたホタテガイは、主に中腸腺に毒を蓄積し、毒の大半はPX1とPX2であったが、時間経過によりPX量が減少しGTX群は期間を通して蓄積された。中腸腺以外の組織では主にGTX群として存在した。細胞外には、PX1とGTX1+GTX4をほぼ1:1で排出し、排出量は時間経過で増加した。*A. tamarense*で毒化させたアサリは、天然毒化アサリと同様な毒組成を示すとともに減毒期の後期に一時期中腸腺で高い毒量を示した。また、細胞外へはPX1、2の形で排出した。次に、アサリを明・暗条件下で飼育し、光刺激が毒代謝に及ぼす影響を調べた。暗条件は、明条件より毒がアサリに蓄積されにくく、排出されるPX群も増大した。

以上の結果より、アサリには毒化の過程で主にGTX群として蓄積し、時間の経過とともにないGTX群やその間生じたSTX群をPX群へと変化させる、生じたPXを主として排出する毒の代謝機構が存在すること、また、暗条件がPSPの減毒を促進することが示された。

## 論文審査の結果の要旨

橋本多美子氏は平成4年3月に四国女子大学家政学部を卒業し、同年4月に四国大学短期大学部助手として採用され、今日に至っている。その間、平成6年4月に徳島大学大学院人間・自然環境研究科(修士)自然環境専攻を修了し、学術修士を取得した。平成11年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科(後期3年博士課程)に入学し、現在に至っている。同氏は海洋生産科学研究科において、海洋資源学を専攻して所定の単位を修得し、主論文「瀬戸内海産アサリの麻痺性貝毒に関する研究」を完成させ、本研究に関連する参考論文3編(査読付き2編:印刷中および掲載可)を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

同委員会はこれを平成13年12月20日の定例研究科委員会に付議し、論文審査結果に基づいて課程修了のための学位論文の資格を審査し、本論文の受理を決定後、下記の審査委員会を選定した。審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文審査および最終試験の結果を平成14年2月21日に定例研究科委員会に報告した。

提出論文は瀬戸内海産毒化原因プランクトンの毒産生能やアサリの麻痺性貝毒解毒促進因子および精密な麻痺性貝毒(PSP)分析法確立に関するものである。

広島湾から分離した*Alexandrium tamarense* クローン株につき、各種培養温度で培養して、毒の産生能や成分などについて検討したところ、培養温度が高い方(20℃)が低い方(15℃)よりPSP産生能が高く、蓄積毒は、低毒性成分PX2と高毒性成分GTX4で、排出毒は低毒性のPX1とPX2であった。

これまで毒産生能が明らかでなかった*A. tamariyavanichii*が瀬戸内海南東部海域に1-2 cells/mlの密度で発生し、同海域表層のムラサキガイと深さ30-40mの海底の養殖アカガイが毒化した。この種による二枚貝の毒化は世界で初めての報告である。

アサリPSPのうちGTX1については、妨害物質の存在で定量が出来なかったが、新たに導入したLC/SSI-MS法により、GTX群の精密分析が可能になった。

天然有毒二枚貝の麻痺性貝毒代謝については、*A. tamarense*で毒化したアサリの中腸腺の毒成分で検討したところ、摂取後はGTX1またはGTX4であったが、時間の経過とともにGTX2、GTX3、PX1、PX2などの割合が増加した。蓄積した毒量は組織間で相違が見られ、中腸腺では72時間後に一時増加した。排出毒の成分は、PX1を主としてその他PX2およびGTX1-4が見られた。他方、培養した有毒プランクトンで貝を毒化させた場合、*G. catenatum*により毒化

したアサリでは排出毒の95%以上がPX 1とPX 2であった。ついで *A. catenella* により毒化させたホタテガイでは、中腸腺の毒はPX 1とPX 2で、時間の経過とともに GTX 群が蓄積された。細胞外にはPX 1と GTX 1 + GTX 4 を約 1 : 1 で排出した。*A. tamar-ense* で毒化させたアサリの毒成分は天然の場合と同じであったが、排出毒はPX 1およびPX 2であった。

光の明暗によってアサリを飼育してアサリの毒代謝を見たが、暗条件は明条件より毒が蓄積されにくい、排出されるPX 群は増大することが分かった。

以上の結果より、アサリには毒化の過程で主に GTX 群として蓄積し、時間の経過に伴い GTX 群やその間生じた STX 群をPX 群へと変化させ、生じたPX 群を主として排出させる機構と暗条件下ではPSPの減毒を促進させる機構の存在を明らかにするとともに、これらの GTX 群の分析に際して導入された LC/SSI-MS が精密な GTX 群の定量法であることが認められた。

本研究の内容には、有毒プランクトンによる貝のPSP毒化に際して貝における新しい毒の代謝機構経路の発見や貝類を毒化させる新たなPSP産生プランクトンの発見、また新しい精密なPSP分析法の確立などが含まれ、関連分野に大きく寄与するものと考えられ、高く評価できる。

以上により海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会に基づき審査した結果、本研究は食品衛生ならびに水産学の発展に貢献するところが大きいと判断し、学位に値するものとして合格とした。

審査担当者	主査	教授	野口玉雄
	副査	教授	野崎征宣
	副査	教授	松岡数充
	副査	教授	岩尾正倫
	副査	助教授	荒川修

## 堀野良和

(鹿児島県)昭和49年12月19日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 パラジウムによる触媒的なアリル、プロパルギル C-O 結合の新しい活性化法の開発と効率有機合成

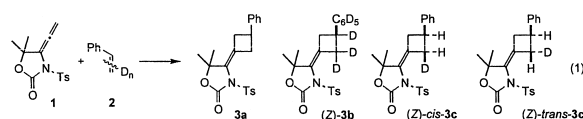
Palladium Catalyzed Activation of Allyl and Propargyl C-O Bonds: New Entry to Efficient Organic Synthesis

## 論文内容の要旨

1. 4 Vinyllidene 2-oxazolidinone の合成と新規複素環骨格形成反応の開発

アレンとアルケンの [2 + 2] 環化付加反応は、メチレンシクロブタン骨格構築法として有用である。しかしながら、[2 + 2] 環化付加反応は熱的に禁制で

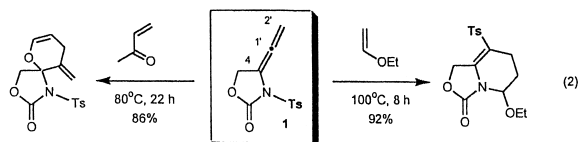
あるために、もっぱら光化学反応やルイス酸または遷移金属を触媒とする反応がなされてきた。私はアレンとアルケン類との環化付加反応を研究するために 4 - ビニリデン - 2 - オキサゾリジノン 1 を設計、合成し、各種アルケン類との反応を検討した。1 の X 線構造解析を行ったところ興味深いことに、通常アレン結合角は 180° であるのに対し、1 のアレン結合はねじれており、アレンの中心 *sp* 炭素とスルフォニル基の酸素原子間に弱い結合性相互作用が存在していることが分かった。それゆえ、1 は以下に述べる特異的な環化付加反応を起こすことが明らかとなった。



スチレンと 1 の反応を 80°C 程度に加熱するだけで 1 の C<sub>1</sub> C<sub>2</sub> 二重結合部位で容易に [2 + 2] 環化反応し、メチレンシクロブタン 3a を高収率かつ単一性生物として与えることを見出した。*d<sub>8</sub>* スチレンとでは Z 3b を選択的に与える。さらには、*cis-d<sub>4</sub>* スチレンとの反応では立体保持生成物 (Z) -*cis*- 3c が 97% の選択性 (収率 90%) で得られた。式 1 の反応が示す (Z) - 立体選択性および立体保持の挙動は、この反応が協奏的であることを示している。この協奏的反応機構は RHF/3-21G\* 遷移状態構造 (図 2, 佐賀大, 岡島俊哉助教授との共同研究) から支持された。以上のようにアレン 1 とアルケンとの熱的 [2 + 2] 環化付加反応が協奏的に進行するというを反応結果および理論計算から実証することに世界で初めて成功した。

アレン化合物 1 は、 $\alpha, \beta$  不飽和アルデヒドまたは、ケトンとの反応において、1 のエナミン部分でヘテロディールズ - アルダー反応が進行したジヒドロピラン誘導体を与えた。これに対し、電子過剰オレフィン類との反応では、1 の窒素上のトシル基がアレン中心 *sp* 炭素に 1,3 転位し環化付加したと考えられる、テトラヒドロピリジン誘導体を与える新規反応を発見した (式 2)。この反応は、非常に強固な結合であるスルフォンアミド結合の切断を伴って進行している点で興味深い反応である。

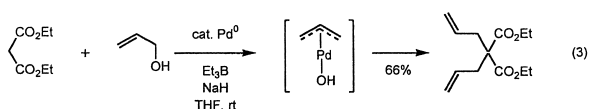
このようにこのアレン化合物 1 は 180° の結合角を有するアレン化合物とは異なり、オレフィンの種類によって種々の興味深い反応性を示すことが明らかとなった。



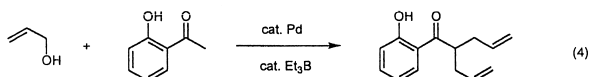
## 2. アリルアルコールからの触媒的アリルカチオンの発生法の開発と応用

遷移金属触媒を用いるアリル化反応は、炭素-炭素結合反応の重要な反応の一つである。しかし、その際、アリルアルコールを原料とし、その適切な活性誘導体への前処理がこれまでは必要とされてきた。アリルアルコールを直接アリル化剤として用いることが可能となれば、炭素-炭素結合反応において合成ルートが短縮されるばかりでなく、非常に強力な合成手法となりうるものと期待できる。これらの観点から、本研究ではアリルアルコールからの直接的アリルカチオンの発生法についての研究を行った。

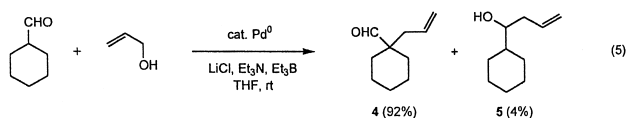
パラジウム触媒、トリエチルボラン存在下でアリルアルコールと活性メチレン化合物との反応を行うと、アリルアルコールがアリルカチオン種として働く、いわゆる親電子的アリル化反応が進行することを見出した(式3)。この反応では、アリルアルコールから直接 $\pi$ -アリルパラジウムが形成される点が非常に興味深い。本反応には、トリエチルボランと塩基が必須であり、いずれかが欠けると反応は進行しない。



この反応は $\beta$ -ヒドロキシケトン類にも適用可能であり、例えば $\alpha$ -ヒドロキシアセトフェノンとの反応ではケトンの $\alpha$ 位で炭素-炭素結合反応が収率良く進行した(式4)。興味深いことに、この反応では塩基は必要なく、トリエチルボランは触媒量でも収率良く生成物を与えることが分かった。



また、系中に塩化リチウム、トリエチルアミンを添加することで、アルデヒドの $\alpha$ 位が選択的にアリル化される親電子的アリル化反応も新たに見出した(式5)。本反応においては、塩基と塩化リチウムが必須であり、塩化リチウムが存在しない場合には求核的なアリル化反応が進行した5との混合物となる。



このように、パラジウムを触媒、トリエチルボランを促進剤として用いることにより、アリルアルコールから直接アリルカチオンを発生させることに成功した。これらの反応は、アリルアルコールを直接用いること

ができる点、また反応活性な官能基であるアルデヒドを保護する必要がない点、さらには工業的に重要で、しかも環境に負荷の少ない触媒反応を基軸としていることから、グリーンケミストリーといった観点から、環境に負荷の少ない環境調和型の有機合成への展開、応用が期待できる反応である。また、天然物合成ならびに有機合成反応の炭素-炭素結合反応においても極めて強力な手法になると期待される反応である。

### 論文審査の結果の要旨

堀野良和氏は、平成9年3月長崎大学工学部を卒業し、同年4月に長崎大学大学院修士課程応用化学専攻に入学、平成11年3月に修了、同年4月長崎大学海洋生産科学研究科に進学し現在に至っている。

同氏は、その間、有機化学、有機遷移金属触媒化学の研究に従事し、現在まで9編の論文を発表している。その成果を、平成13年12月に主論文「パラジウムによる触媒的アリル、プロパルギルC-O結合の新しい活性化法の開発と効率有機合成」として完成させ、参考論文7編を添え長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(工学)の学位の申請をした。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、学位審査委員会を組織、その内容を検討した。平成14年1月25日に公開論文発表会を開催、論文内容は画期的なものを含み、質疑応答も要領を得て、正確であった。その結果、学位審査委員会構成員全員が合格と判定し、平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

同論文は序章と以下の4章から構成されている。

第1章では入手容易な2-ブチン1,4-ジオールから相当するビスカーバメートを合成し、これを触媒量のパラジウム、塩基存在下反応させるとN-トシル-4-ピニリデンオキサゾリジン-2-オン1が高収率で得られることを発見した。1の各種置換誘導体も同様に合成可能である。アレンは一般に直線構造をしている。しかし、このようにして得られた1の誘導体のアレン結合がX線構造解析の結果、直線(180 $^{\circ}$ )から折れ曲がり、極端な場合172 $^{\circ}$ という大きな折れを示した。この折れ曲がり構造はS $\sigma$ 結合とアレンC2-C3 $\pi^*$ 結合の軌道相互作用によると予想され、事実スルフォニル基の酸素原子はアレン中心炭素と相互作用し、平面五員環構造を採っていることも発見した。この電子構造、幾何構造の異常性は、反応挙動の異常性に反映されるであろうとの予測をもとに行った実験結果を第2, 3章にまとめている。

第2章では1のアレンの外部C2-C3二重結合が各種アルケン、共役アルケン、アルキンと単に80-100 $^{\circ}$ Cに加熱するだけで[2+2]環化付加を位置、立体



特異的に起こし、メチレンシクロブタンを高収率で与えることを発見した。一般に [ 2 + 2 ] 環化付加は熱的には禁制の反応で進まないとされている。かりに進んだとしても、それは非協奏的な反応でラジカル機構で進むとされている。しかし、1 の場合は、その重水素標識実験などで明らかにした立体特異的な反応挙動を基に熱的に許容な [ 2  $\pi$ s + 2  $\pi$ s + 2  $\pi$ s ] の協奏機構で進行することを明らかにした。また、この結果は量子化学理論計算からも支持された。この結果は [ 2 + 2 ] 環化付加が熱条件下でも協奏的に進むことを示した最初の例である。

更に、アクリル酸メチルが [ 2 + 2 ] 環化付加をするのに対し、メチルビニルケトンには1のアレンの内部 C1 - C2 結合を 2 $\pi$ 成分とし [ 4 + 2 ] 環化付加することも発見した。この両者の反応性の違いも量子化学理論計算により合理的に説明できることを示した。

第3章ではビニルエーテルやビニルシラン、アリルシラン、フラン、ケテンアセタールなどの電子過剰アルケンと1との80 - 100°Cの熱的な反応でトシル基がNからC2炭素に転位したのち上記アルケンと [ 4 + 2 ] 環化付加して生成したと考えられるテトラヒドロピリジン誘導体が高収率で得られた。一般にN - SO2結合は結合が強く、その切断(加水分解)には過激な反応条件が必要とされている。本研究で認めた容易なN - SO2結合の切断、1,3-転位は極めて興味深い挙動である。なお、生成物は海洋天然物に屢々見られるヘミアミナル、ヘミアミノールの結合様式をもち、かつ、ピリジン環を有しているため、その生理活性に期待がもたれる。

第4章では有機合成で最も重要な反応の一つであるカルボニル化合物の $\alpha$ 位アリル化反応に対する画期的な改良法の創出について述べている。従来アリル化にはアリルハライドが用いられてきた。パラジウム触媒を使うようになって(辻 - Trost 反応)、酢酸アリル、炭酸アリルなど、より安定で害のすくないアリル化反応が可能となった。本研究ではより安定で毒性の少ないアリルアルコールを用いて、パラジウム触媒により活性メチレン化合物やケトンの $\alpha$ 位アリル化に成功した。鍵となるのは、トリエチルホウ素を当量、ないしは触媒量もちいるというアイデアである。トリエチルホウ素はアリルアルコールのみならず、ケトンの活性化にも寄与している。この研究で最も重要な点はアルデヒドの $\alpha$ 位アリル化反応に成功したことである。従来法ではアルデヒドはエナミンやシリルビニルエーテルに変換し、またアリル源として酢酸アリル等をもちいる必要があった。本研究で開発した方法では両者とも全く保護、活性化することなく室温で定量的に $\alpha$ アリルアルデヒドを与えることができる。

なお、第1章の内容については *Tetrahedron Let.* (impact factor 2.588)、第2章の内容については *J. Am. Chem. Soc.* (impact factor 6.025)、第3章の内容については *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (impact factor 8.547) および *Tetrahedron Let.* (impact factor 2.588)、第4章の内容については *Tetrahedron Let.* (impact factor 2.588) へ2編、*J. Am. Chem. Soc.* (impact factor 6.025) に発表済みである。

以上のように本論文は遷移金属触媒化学、ヘテロ環化学、物理有機化学の進歩に大きく貢献するものであると認め、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	田丸良直
	副査	教授	青柳東彦
	副査	教授	大西正義
	副査	教授	岩尾正倫

前川 亨

(長崎県)昭和46年4月27日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 半導体ガスセンサアレイを用いたニオイ識別システムの開発

論文内容の要旨

半導体ガスセンサ技術の発展とそれを用いたガス漏れ警報器の普及は、現在の安全かつ快適な生活環境の構築に大きく貢献している。一方において、よりよい生活環境あるいは大気環境モニタのための各種ニオイセンサに対するニーズが近年とみに高まってきている。ニオイ成分の多くは可燃性ガスの一種であるので、従来の半導体ガスセンサで検知可能であるが、感度や選択性の点で甚だ不十分である。したがって、高感度選択検知のための何らかの方策が不可欠となっている。その一つとして、特性の異なる複数個のセンサを組み合わせたセンサアレイを構築し、各センサからの信号をコンピュータ処理することによってニオイを識別しようとする研究がある。しかし、多くの場合、信号処理に重点がおかれ、使用するセンサの性能向上については十分に検討されていないのが現状である。そこで、本研究では、ニオイ識別に適したセンサを複数個開発するとともに、ワンチップ化センサアレイの試作やニオイ成分の効果的サンプリング法の検討等を通して、実用化可能なニオイ識別システムを確立することを目的とした。

第1章では、ヒトの臭覚や有香成分の性質、半導体ガスセンサの基本的検知原理について概説するとともに、センサアレイを用いたニオイ識別法の現状と本研究の目的を述べた。

第2章では、ニオイ識別のためのセンサの性能向上

について検討した。具体的には、酸化スズ厚膜をセンサ材料とし、その上に各種金属酸化物触媒を積層させることによって感度・選択性の向上を図った。

まず、純粋な酸化スズ厚膜について、スクリーン印刷用原料ペーストの調製条件と焼成条件を検討した。その結果、エチレングリコールとグリセリンの等量混合物がペースト用溶剤として最適であった。この厚膜を1200℃焼成後500℃で作動させた場合に、代表的なニオイ成分としてのエタノールに対して最も良好な検出特性が得られた。一般には、センサの低温作動が望まれるところであるが、比較的分子量が大きい有香ガス分子検知の場合は、応答・回復時間及び雰囲気温湿度の影響の点で500℃作動が最適であった。さらに、酸化鉛を添加した酸化スズを厚膜型センサ材料に用いると、有香ガス分子に対するガス感度を維持したまま、無臭の可燃性ガス分子に対する感度を著しく低減し得ることがわかった。

次に、酸化鉛添加酸化スズ厚膜の上部に積層する各種金属酸化物触媒について検討した。49種類の有香成分（有機化合物）に対するガス検出特性を調べた結果、触媒の違いによって高感度となるガス種が異なること、感度はニオイ分子中の官能基に依存することなどを見出した。さらに、ガス感度のデータを統計解析の手法の一つである主成分分析法により解析したところ、官能基の種類によりニオイの種類を明確に分類できることがわかった。すなわち、ヒトの臭覚に近いニオイの識別を実現するセンサアレイ用の複数個のセンサを開発することができた。

第3章では、前章で開発したセンサの中から8種類を選択してセンサアレイを作製し、これを用いたニオイ識別システムについて検討した。識別システムは、制御回路および測定回路、ガス流通系、ソフトウェア等の構成とした。さまざまな植物精油からのニオイに対して本システムを適用し、主成分分析法により解析を行った結果、主成分得点図上で、性質が異なるニオイは異なる位置に、構成成分が近いニオイは近い位置にプロットされ、容易に識別が可能であった。さらに、構成成分が極めて近い柑橘系植物精油5種についても良好な再現性で識別可能であることを示し、試作システムが高い識別精度を有していることを確認した。

第4章では、社会的ニーズが大きい「食品のニオイの識別」及び「悪臭計測」を行った。従来、固体や液体状態である食品からのニオイのサンプリングにおいては、ニオイの発生状態が不安定な場合が多く、結果的に再現性が低下することが問題であった。そこで、良好な再現性を実現させるために、新規なサンプリング方法として、モニタ用センサを利用した自動希釈装置を開発した。本装置を用いることにより、ニオイの

発生状態が極めて不安定でかつニオイ構成成分が類似している柑橘系果物の皮からのニオイを良好な再現性で確実に識別できることを示した。一方、悪臭の計測については、悪臭防止法で臭気指数の公定法が定められているが、コストや測定時間の点で問題があり、センサを用いた簡易測定技術の開発が切望されている。そこで、開発したサンプリング装置を用いて、実際に悪臭が問題となっている7ヶ所からニオイを採取し、悪臭の簡易測定を試みた。その際、公定法で求められた臭気指数との相関は、統計解析の手法の一つである重回帰分析法に基づいて調べた。その結果、7ヶ所から採取したニオイの成分はそれぞれ異なるにもかかわらず、きわめて高い相関性で臭気指数を予測できることを示した。

第5章では、本論文の総括を行った。

#### 論文審査の結果の要旨

前川 亨氏は、平成7年3月に長崎大学工学部材料工学科を卒業し、平成9年3月には長崎大学大学院工学研究科修士課程を修了した。同課程を修了後、直ちに新コスモス電機(株)に入社し、各種ニオイセンサの研究開発に携わってきたが、平成11年4月には同社在籍のまま、長崎大学海洋生産科学研究科博士課程に入学し、現在に至っている。

同氏は、海洋生産科学研究科においては海洋資源学を専攻して所定の単位を修得するとともに、ニオイ識別センサシステムの研究開発に従事し、その成果を平成13年12月に主論文「半導体ガスセンサアレイを用いたニオイ識別システムの開発」として完成させ、参考論文6編（うち審査付き論文2編）を添え長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（工学）の学位を申請した。

同研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において、予備審査委員会による予備審査結果報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の通り審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

近年、よりよい生活環境あるいは大気環境モニタのための各種ニオイセンサのニーズがとみに高まってきている。この課題に対して、本論文は、ニオイ識別に適したセンサ開発を行うとともに、ワンチップ化センサアレイの試作やニオイ成分の効果的サンプリング法の検討等を通して、実用化可能なニオイ識別システムを確立したものである。

同氏は、まず、ヒトの臭覚に近いニオイ識別を実現

するためのセンサレイ用に適した複数個の厚膜型センサの開発を手掛けた。すなわち、ガスセンサに広く利用されている酸化スズをセンシング材料に選定して、厚膜作製条件を最適化するとともに、酸化鉛を添加することによって有香ガス分子に対するガス感度を維持したまま無臭の可燃性ガス分子に対する感度を著しく低減させることに成功した。さらに、酸化鉛添加酸化スズ厚膜の上部に各種の金属酸化物触媒層を積層させることによって、各種のニオイ成分に対する応答感度パターンを変調させることにも成功し、センサレイ用に適した複数個のセンサを開発した。

つぎに、開発したセンサの中から8種類を選択してセンサレイを試作し、これを用いたニオイ識別システム(制御回路,測定回路,ガス流通系,ソフトウェア等の構成)について検討した。そして、本システムを用いた主成分分析の手法により、構成成分が類似している柑橘系植物精油を良好な再現性で識別可能であることを実証した。また、社会的ニーズが大きい食品のニオイの識別にも成功している。一般に、固体や液体状態である食品からのニオイ識別においては、検体の量や温度によってニオイの発生状態すなわちニオイ成分の濃度が大きく異なり、そのため再現性を得ることが非常に難しいが、本論文では、モニター用センサを装着した自動希釈装置を開発することによってこの問題を解決している。さらに、ニオイ濃度の自動希釈装置を組み込んだ本システムは、悪臭防止法で臭気指数の公定法が定められている悪臭の簡易測定に対しても非常に有効であることを実証している。なお、本論文で開発されたニオイ識別システムは、実際に製品化され市場に出回り始めている。

以上、要するに、本論文は、ニオイ識別に適した複数個のセンサ開発、センサレイの試作、自動希釈機構を備えたニオイ成分のサンプリング装置の開発等を通して、ニオイ識別システムを開発・実用化したものであり、極めて意義深い。海洋生産科学研究科委員会、審査委員会の報告に基づき審議した結果、本論文は斯界の技術発展に貢献するところが大きく、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 江頭 誠  
副査 教授 岩永 浩  
副査 教授 羽坂 雅之  
副査 教授 中嶋 直敏

Bharadwaj Manish Surendra

(インド) 1970年6月2日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 The Transferability of Drug Resistances in Fish Pathogenic Bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* Isolated from Yellowtail

#### 論文内容の要旨

近年、日本沿岸の養殖漁場では老化が進み、種々の微生物による魚病が多発している。このため、特に細菌性疾病ではその予防と治療のために、種々の化学療法剤が養殖漁場に大量に投与されている。この結果、魚病原細菌の薬剤耐性化が進みその予防と治療を困難とし、魚養殖に多くの問題を引き起こしている。今回行った魚病原細菌の薬剤耐性化と薬剤耐性の伝達性に関する研究は、魚病の予防と治療のために極めて重要である。

*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*(旧 *Pasteurella piscicida*) はブリの類結節症の病原細菌としてよく知られている。*P. damsela* ssp. *piscicida* の薬剤耐性はその大半が多剤耐性であり、これら耐性は菌株により、またその伝達性は耐性因子で異なることが報告されている。しかしながら、報告されている薬剤耐性因子の伝達性は自然界における *P. damsela* ssp. *piscicida* の薬剤耐性化と異なる点が多く見受けられた。またこれら薬剤耐性因子の伝達頻度や伝達機構に関しても、報告されている結果に多くの疑問があった。そこで今回は、これらの点を明らかにするために、採集した年代・地域の異なるブリから分離した *P. damsela* ssp. *piscicida* 菌株の薬剤耐性、薬剤耐性の伝達性、R-プラスミド DNA の伝達様式、薬剤耐性因子(とくに Ap 耐性因子)の塩基配列並びに魚類消化管内における薬剤耐性の伝達性をしらべた。

(第2章) 採集した年代と地域が異なるブリから分離した *P. damsela* ssp. *piscicida* 183菌株の14薬剤に対する耐性とその伝達性をしらべた。その結果、本菌は最少発育阻止濃度からアンピシリン(Ap), クロラムフェニコール(Cp), エリスロマイシン(Em), カナマイシン(Km), ナリジクス酸(Na), サルファモノメトキシシン(Sa), テトラサイクリン(Tc) およびトリメトプリム(Tmp) に対して耐性を示し、Em に対しては感受性とした従来の報告とは異なった。これら薬剤のうち Ap, Cp, Em, Km, Sa, Tc および Tmp 耐性が *Escherichia coli* K 12  $\chi$ 1037 rif-r に伝達され、Ap および Tmp 耐性は非伝達性との従来の報告と異なった。しかしながら、これらの耐性の伝達性は耐性のパターンやレベルで異なり、とくに Tmp 耐性は高度耐性菌だけが伝達した。これら耐性の伝達頻度は Ap

耐性を伝達しない菌株ではすべての耐性が約 $10^{-4}$ の頻度で、また Ap 耐性を伝達した菌株では Km および Sa また場合により Tc 耐性は $10^{-4}$ 、Ap、Cp および Em また場合により Tc 耐性は $10^{-6}$ の頻度で伝達され、Ap 耐性を伝達することで薬剤耐性の伝達頻度が異なるという新しい知見を得た。ところで、薬剤耐性は主に R プラスミド DNA により伝達される。

(第3章)そこで次に、R プラスミド DNA の伝達様式を明らかにするため、供与菌 *P. damsela* ssp. *piscicida* と受容菌 *E. coli* K 12  $\chi$ 1037 rif-r との接合により得られた接合伝達体の R プラスミド DNA と薬剤耐性との関連性をしらべた。その結果、Ap 耐性を伝達しない供与菌では、伝達性薬剤耐性のすべてが約125kbのプラスミド一つにコードされて伝達された。他方、Ap 耐性を伝達した供与菌では、Km および Sa また場合により Tc 耐性は約125kbのプラスミドに、また Ap、Cp および Em また場合により Tc 耐性は約65kbのプラスミドにコード伝達され、その伝達頻度は前者で $10^{-4}$ 、後者で $10^{-6}$ であった。またこれら両プラスミドは接合伝達後に融合することが示唆された。以上のように、Ap 耐性は R プラスミドの伝達のしくみに重要な関わりがあることが明らかとなった。このように Ap 耐性は R プラスミドにより伝達され、しかも伝達のしくみに重要な関わりがあるにも拘らず、これまで Ap 耐性は非伝達性で染色体 DNA 上にコードされていると報告されていた。

(第4章)そこで次に、Ap、Cp、Km、Na、Sa および Tc 耐性因子を保持した *P. damsela* ssp. *piscicida* 菌株から *E. coli* K 12  $\chi$ 1037 rif-r に伝達された R プラスミド DNA 約65kb にコードされている Ap 耐性因子のクローニングとその塩基配列の分析を試みた。その結果、Ap 耐性因子は1.8 Kb *Hinc* II 消化断片にコードされていた。塩基配列分析の結果、本断片は1,736bpであった。この断片の Ap 耐性因子 ( $\beta$ -ラクタマーゼ)のオープン・リーディング・フレーム (ORF) は846塩基で、282のアミノ酸から構成され、分子質量は31,292 Da であった。これまでに知られているグラム陰性および陽性細菌の  $\beta$ -ラクタマーゼの塩基配列との相同性は最大で58%、また同アミノ酸配列との相同性は最大で56%であった。また、本菌の  $\beta$ -ラクタマーゼはクラス A に属する新しい酵素と考えられた。なお、ヒドロパシー・プロットより本酵素は球状可溶性タンパク質と判断された。

(第5章)次に、魚類消化管内での薬剤耐性の伝達性を検討するため、プリへ各種薬剤 (Ap、Em、オキシリン酸 Oa、オキシテトラサイクリン Otc) を添加した餌料を経口投与し、腸内の生菌数と細菌フローラおよび同フローラの薬剤耐性をしらべた。その結果、

腸内の生菌数はいずれの薬剤の投与でも著しく減少し、また細菌フローラは薬剤投与に関係なく主にコリネ型細菌、*Staphylococcus* および *Bacillus* で構成された。これらフローラの大部分は種々の薬剤 (Ap、Cp、Em、Km、Oa、Otc、Sm) に対し単剤および多剤耐性を示し、また *Staphylococcus* では菌株の大半がプラスミド DNA を保持したが、これらフローラの各薬剤に対する耐性化の割合は薬剤投与および無投与試料間で意味ある違いは見られず、腸内での薬剤耐性化はほぼないと判断された。

(第6章)以上の結果を総括した。

#### 論文審査の結果の要旨

Bharadwaj Manish Surendra 氏は、1990年7月にボンベイ大学のソマヤ科学部微生物学科を卒業し、1992年7月にゴア大学の生命科学部海洋生命工学研究科を修了後、1997年9月までゴア大学の研究員として勤務した。1997年10月から1999年3月まで長崎大学大学院海洋生産科学研究科に研究生として在籍した後、1999年4月に同研究科に入学し、現在に至っている。

同氏は、海洋生産科学研究科においては海洋資源学を専攻し、所定の単位を取得するとともに、魚病原細菌の薬剤耐性とその伝達性に関する研究に従事してきた。その成果に基づいて、平成13年12月に主論文「The Transferability of Drug Resistances in Fish Pathogenic Bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Isolated from Yellowtail」を完成させ、参考論文4編 (公表した論文1編、投稿中の論文1編、投稿準備中の論文2編) を添えて、同研究科委員会に博士 (学術) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において、予備審査委員会による予備審査の結果の報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理しても差し支えないものと認め、下記の学位審査委員を選定した。学位審査委員会は主査を中心に論文内容を慎重に審議し、公開論文発表会における発表と口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、プリ類結節症の病原菌としてよく知られている *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* の薬剤耐性とその伝達性に関して研究したもので、プリの養殖に甚大な被害を及ぼす本疾病の予防と治療には欠かせない研究である。

(第1章)これまでに分離された *P. damsela* subsp. *Piscicida* はその大半が多剤耐性であり、これら薬剤耐性は菌株により、またその伝達性は耐性因子で異なることが報告されていること、しかし報告されている耐性因子の伝達性には自然界における同菌の耐性化と

異なる点が多く見受けられ、また多くの疑問があったことから、本研究が行われるに至ったことなどが述べられている。

(第2章)類結節症のブリから分離した *P. damsela* subsp. *piscicida* は、アンピシリン(Ap), クロラムフェニコール(Cp), エリスロマイシン(Em), カナマイシン(Km), ナリジクス酸(Na), サルファモノメトキシ(Sa), テトラサイクリン(Tc)およびトリメトプリム(Tmp)に対し耐性を示し、これらのうちNaを除く耐性が伝達された。しかし、これら耐性の伝達性は耐性のパターンやレベルで異なり、とくにTmp耐性は高度耐性菌だけが伝達した。これら耐性の伝達頻度はAp耐性を伝達しない菌株ではすべての耐性が $10^{-4}$ の頻度で、またAp耐性を伝達した菌株ではKmおよびSaまた場合によりTc耐性は $10^{-4}$ , Ap, CpおよびEmまた場合によりTc耐性は $10^{-6}$ の頻度でR-プラスミドにより伝達されたとしている。

(第3章)Ap耐性を伝達しない供与菌では、各供与菌が保持する薬剤耐性のすべてが約125kbのR-プラスミド一つにコードされて伝達された。他方、Ap耐性を伝達した供与菌では、KmおよびSaまた場合によりTc耐性は約125kbのR-プラスミドに、またAp, CpおよびEmまた場合によりTc耐性は約65kbのR-プラスミドにコード伝達され、しかもこれら両プラスミドの伝達後の融合が示唆された。以上のように、Ap耐性はR-プラスミドにより伝達され、しかも伝達のしくみに重要な関わりがあるにも拘らず、これまでAp耐性は非伝達とされていたとしている。

(第4章)伝達されたR-プラスミド上のAp耐性因子( $\beta$ -ラクタマーゼ)は1.8-kb *Hin* c II消化断片にコードされ、その塩基配列は1,736bpであった。この断片のAp耐性因子のオープン・リーディング・フレームは846塩基で、282のアミノ酸から構成され、分子質量は31,292Daであった。しかもアミノ酸配列の相同性から本酵素はクラスAに属する、新規な球状可溶性タンパク質と判断している。

(第5章)ブリへ各種薬剤を添加した餌料を経口投与した結果、腸内の生菌数は著しく減少し、薬剤投与にともなう生育阻害が示唆された。また、腸内からは餌料由来と考えられるコリネ型細菌、*Staphylococcus* および *Bacillus* が分離され、これらフローラの大部分は種々の薬剤に対し単剤および多剤耐性を示したが、これらフローラの各種薬剤に対する耐性化の割合は薬剤投与および無投与試料間で意味ある違いは見られず、腸内での薬剤耐性化はほぼないと判断している。

以上の成果は、魚病原細菌 *P. damsela* subsp. *piscicida* に留まらず、魚病原細菌全般の薬剤耐性化に関する数多くの疑問点を解決するとともに、魚病の予防と治療

に貢献するところが極めて大きいと考えられ、高く評価される。

海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会の報告に基づいて審査した結果、本論文は魚病学および魚類の養殖技術の発展に大きく貢献するものであることを認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	森井	秀昭
	副査	教授	村松	毅
	副査	教授	吉越	一馬
	副査	教授	原	研治

渡辺晴夫

(福島県)昭和26年2月26日生

授与年月日 平成14年3月31日

主論文 スイッチング方式電子通信用電源システムの高性能化に関する研究

論文内容の要旨

今日の高度情報化社会において、その発展の担い手である電子機器、特に情報伝達のための電子通信機器は、情報通信システムの中核として大きな役割を担っている。本論文は、これらの電子通信機器が、その役割りを果たすために最も基本となる電気エネルギーの供給という重要な仕事を受け持つスイッチング電源についての研究を纏めたものである。

第1章では、まず、スイッチング電源の基本機能について述べる。次に、本研究の主題である電子通信用電源システムの構成について説明する。さらに通信用を初めとする各種電源装置の過去の研究の概略を振り返り、それらを元に、本研究の必要性和目的を明らかにする。

第2章では、低電圧大電流のオンボード電源として、高効率を実現できる新しい回路方式を提案する。従来の回路では、出力が低電圧化するに従い、二次側の整流素子での電力損失の影響が大きくなり、電源の電力効率が低下していくため、整流素子として、同期整流FETを使用することが必須条件となってきた。しかし、フォワード方式のような従来の回路方式では、同期整流FETを十分に良好な駆動をすることができず、効率の改善にも限界があった。それに対し、提案回路の回路構成は、昇圧回路と、非対称ハーフブリッジ回路を一体化した回路で、BHB(Boost Half Bridge)方式と称し、同期整流FETを駆動するのに適した回路構成となっている。また、回路の動作解析を行い、その基本動作を明らかにし、試作実験によって、広い入力電圧範囲で、高効率を実現することを確認している。

第3章では、新しく提案したBHB方式の設計のための解析と回路の特徴についての説明を行った。特に、

高効率化のために、スイッチ素子のオンオフの切り替えの過渡状態における、主スイッチ FET のゼロ電圧スイッチング (ZVS) 動作と SR-FET の転流動作を明らかにしている。上側の主スイッチ FET の ZVS 動作は容易に達成されるが、下側の主スイッチ FET の ZVS 動作を充分に行うためには、トランスの漏れインダクタンスを大きくする必要がある。一方、この過渡状態の期間は、トランスの二つの二次巻線の間で、出力チョーク電流の転流動作が徐々に行われ、この期間に同期整流 FET は二つともオフするため、出力チョーク電流は同期整流 FET のボディダイオードを流れて電力損失を増やしてしまう。そのため、電源の高効率化のためには、これらを考慮した最適設計が必要であることを示す。また、主回路部品に印加される最大電圧や、そこに流れる最大電流を求め、それを元に最適設計を行い、外形が 70.75mm × 50.5mm × 8.5mm の大きさで、定格 (入力 DC48V, 出力 DC 2V/20A) にて、91.8% の高効率を実現できることを示す。

第4章では、BHB方式を用いて、出力電圧を1.0Vまで低下させ、20Aのオンボード電源を試作する。効率の負荷特性及び入力電圧特性を解析することにより、入力電圧の変化による効率の低下の原因が、時比率50%からのずれにあることを明らかにし、定格での時比率の調整によって改善が可能であることを提示する。また、損失分析をすることによって、二つの同期整流FETとトランスのコイルでの損失が大きく、それらの合計が、全体の損失の約70%を占めていることを示す。また、出力電圧が3.3V、2.0V及び1.0Vの電源の損失分布を比較することによって、今後、より一層出力の低電圧化が進むオンボード電源に関する高効率化のための手法を纏める。合わせて、出力低電圧化によって、新たに発生する問題や、負荷側からの要求について述べる。

第5章では、BHB方式を、商用交流入力電源から直流に交換する場合の高調波低減回路として応用する問題について検討する。BHB方式電源は、入力側にチョークコイルがあるので、入力チョークコイルの前に、商用電圧の整流回路を用いることにより、そのまま、ワンコンバータ方式で、入力高調波電流を抑制する電源となる。そこで、トランスの励磁インダクタンスを流れる商用の2倍の周波数の電流成分について明らかにし、高効率化のために、出力54Vの電源における同期整流FETの適用、トランスの非対称二次巻線による出力チョークコイルの小型化、入力整流回路への商用周波数同期整流FETの適用などについて述べる。さらに、これらの結果を元に、入力AC100V、出力54V/2Aの電源を試作し、90.9%の高効率で、高周波電流の規格であるIEC61000-3-2 Class Dを満足

する電源が実現できたことを示す。

第6章では、本研究の内容を纏め、又、本研究の意義と今後の課題について述べる。

#### 論文審査の結果の要旨

渡辺晴夫氏は、昭和51年3月に東北大学工学部電子工学科を卒業した。同年4月に新電元工業(株)に入社し、電源制御用半導体集積回路、電子通信用スイッチング電源等の研究開発に従事した。平成11年4月に新電元工業(株)に在職のまま、長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程に入学し、現在に至っている。

同氏は大学院博士課程においては、海洋資源学を専攻し、所定の単位を修得するとともに、主としてスイッチング方式電子通信用電源に関して多くの業績を上げた後、平成13年12月に学位論文「スイッチング方式電子通信用電源システムの高性能化に関する研究」を完成し、参考論文3編を添えて、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(工学)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、これを平成13年12月20日の定例委員会に付議し、受理を決定後下記の審査委員を選定した。審査委員は、主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

近年、電子通信機器においては機能の高度化のために高密度実装の半導体集積回路が用いられ、又、信号処理の高速化と電力消費の低減のためにその動作電圧は5Vから3.3V、2V、1Vへと低下の傾向にある。電子通信機器に対して、このような低電圧の電気エネルギーを供給するための電子通信用のスイッチング方式電源システムでは、出力電圧の低電圧化にともない電力効率が低下し、その改善が強く求められている。

提出論文は、電子通信用低電圧大電流のスイッチング方式電源システムを高い電力効率で実現するために、新しいDC-DCコンバータの回路方式の提案、回路動作及び特性の解析とこれに基づいた回路設計法の確立、更に新しい回路方式の他の応用として商用交流電源を入力とする高効率AC-DCコンバータの設計法の確立について述べてものである。

第1章では、まず、スイッチング電源の基本構成と機能を説明し、又、電子通信用電源システムの従来の研究の概要を振り返り、これをもとに、本研究の目的と意義を明らかにした。

第2章では、低電圧大電流のスイッチング電源システムの高効率化を実現するためのBoost Half Bridge(略してBHB)方式と称する新しいDC-DCコンバータの提案と回路の基本的な動作、特性について述べた。

第3章では、BHB方式DC-DCコンバータの設計の

ための解析と回路の特徴についての説明を行った。特に、高効率化のために、スイッチ素子のオンとオフの切り替えの過渡状態における主スイッチ FET のゼロ電圧スイッチング動作とダイオードの代わりに用いる同期整流用 FET の転流動作を明らかにした。解析に基づく最適設定を行い、外形が70.75mm×50.5mm×8.5mmの大きさで、定格(入力直流電圧48V, 直流出力2V/20A)にて、91.8%の高効率が実現された。

第4章では、出力電圧が、3.3V及び2.0VのBHB方式DC-DCコンバータの最適設計をもとに、主たる電力損失を生じる素子がトランスの一次巻線と同期整流用FETであることを明らかにした。これにより、直流出力1V/20AのDC-DCコンバータを設計、試作し、定格にて88.2%の高い電力効率が得られることを示した。

第5章ではBHB方式を商用交流電源入力のAC-DCコンバータに適用し、トランスの2つの出力巻線を非対象とすることにより、電力効率90.9%で、入力電流高調波抑制に関してIEC61000-3-2 Class Dの規格を満足できることを明らかにした。

以上のように、本論文は高性能な電子通信用スイッチング電源システムの設計、回路技術の進歩、発展に貢献するところ極めて大であり、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	松尾博文
	副査	教授	松尾寿夫
	副査	教授	小山純
	副査	教授	福永博俊
	副査	助教授	黒川不二雄

山中 稔

(高知県)昭和42年5月4日生

授与年月日 平成14年1月17日

主論文 自然及び一般廃棄物の建設材料への有効利用に関する基礎的研究

#### 論文内容の要旨

近年わが国は、社会経済活動が拡大し国民生活が物質的に豊かになる一方で、廃棄物排出量の増大、廃棄物の多様化、最終処分場の残余容量の逼迫、焼却及び最終処分場における環境汚染の恐れの高まり、不法投棄の増大等、廃棄物に関わる深刻な社会問題が発生している。このような状況の下、わが国の環境政策としては「環境基本法」(1993年制定)の理念を踏まえ、「環境政策大綱」(1994年制定)がとりまとめられたが、この大綱のなかで、省資源・省エネルギー・資源のリサイクルを推進することが、明確に述べられている。さらに、廃棄物・リサイクル対策の基本となる「循環型社会形成推進基本法」(2000年制定)では、廃棄物

の定義を実状に合わせるとともに、大量生産、大量消費、大量廃棄型の経済社会からの脱却、循環型社会の実現に向けた各種制度を設けている。

このように、わが国の廃棄物に関するリサイクルについては、世界的な環境問題への取り組みのなか各種法制度が制定され、一般及び産業廃棄物のいずれにおいても着実にリサイクル率が向上していると言える。しかし、廃棄物の量が膨大かつ多様であることから、再生資源としての有用性が見いだされないままに、そのまま放置、あるいは埋立最終処分される現状にある。すなわち多くの貴重な資源が有効利用されないままとなっている。それら資源は、生活や産業活動で排出されるものだけでなく、自然の営力によって産出されたものも当然含まれている。

本論文は、上記の背景を踏まえ、新たに有効利用を図るべき廃棄物(資源)として、自然の営力によって産出されその後の人間活動上不要物とされている「火山性堆積物」及び「海成粘土」を自然廃棄物とし、さらに、未だ散乱の目立つ「空き缶」及び年々増大している「都市ごみ焼却灰」を一般廃棄物として、計4種類の廃棄物を取り上げ、それぞれにおける建設材料への有効利用の方策を検討することを目的としている。

これら4種類の廃棄物を、まず材料的視点に立脚すると、自然度の最も高い材料としては「火山性堆積物」が、逆に人工度の最も高い材料が都市ごみ焼却灰であると言える。また、社会的要請度の見地からは、「火山性堆積物」や「海成粘土」の有効利用は地域性を有し、「都市ごみ焼却灰」や「空き缶」については全国的課題であると言える。すなわち、本論文で取り挙げた4種類の廃棄物は、いずれにおいても有効利用の必要性を十分有するとともに、有効利用方法の確立が急務の課題であると言えるものである。

以下、各章についての内容を示す。

第1章では、本論文の社会的背景及び、取り上げた計4種類の廃棄物(火山性堆積物、海成粘土、空き缶、都市ごみ焼却灰)の廃棄物としての法的位置付けや利用の現状、さらに国内外における既往の研究について示した。また、本論文の内容と構成を簡単に述べ、各章の相互の関係を示した。

第2章では、火山性堆積物の地盤材料への有効利用について検討している。対象とした火山性堆積物は、主に雲仙普賢岳の火山活動により発生した雲仙土石流堆積物である。雲仙土石流堆積物の微細な凹凸を特徴とする粒子形状から、水浸時におけるせん断強度の低下及び沈下量の増大が懸念された。検討の結果、水浸により強度定数は大きく低下すること、また、載荷応力が通常の応力レベルにおいても大きな水浸沈下が発生することから、大規模な構造物の基礎地盤とする場

合には、水浸時の強度低下及び水浸沈下の予想以上の発生を予め考慮しておく必要があることを明らかにした。

第3章では、火山性堆積物の水中構造物への有効利用について述べたものである。普通ポルトランドセメントあるいは炭酸アルミネート系塩材料(CAS材)を火山性堆積物の一つである雲仙土石堆積物に添加し、気中及び水浸養生後の固化強度について検討を行っている。得られた固化強度は、水浸養生供試体の方が気中養生よりも高い値を示すことから、固化体の水中構造物への適用の優位性が判明した。固化強度の大きさからは、立方ブロック状やテトラポット状のいわゆる塊状の魚礁への適用が考えられ、さらには、多少変形や局所破壊が生じても本来の目的から逸脱することのない人工海底山脈への適用性を有していることを明らかにした。

第4章は、海成粘土と火山性堆積物からなる混合固化体の水中構造物及び緑化基盤への適用性を検討した。大村湾海成粘土の物理・化学特性を実験により求めた結果、フミン酸の含有量は強度低下を引き起こすほどの値ではないことが判明した。魚礁材料としての検討項目である固化強度に関しては、材令28日強度において約9MPaを呈し、部材長1.6mの格子状魚礁が製作可能であることを見出した。一方、人工浮島の構成材料である緑化基盤としての検討結果からは、固化強度に関しては河川護岸等に適用できる程の固化強度は得られなかったが、緑化基盤に高い強度を必要としない方法として人工浮島への適用が可能であることを述べている。

第5章は、生活系一般廃棄物に分類される飲料用空き缶の軽量盛土材料への適用性について述べたものである。空き缶を軽量盛土材料として有効利用する場合に、解決されなければならない問題のうち、強度及び腐食性の問題に関して、旧タイプ及び新タイプの空き缶について、一軸圧縮試験、空き缶ユニットの大型圧縮試験及び、空き缶ユニットからなる道路模型にフォークリフト(2.1t)を載荷する実荷重載荷実験を実施した。さらに、空き缶の腐食性による強度低下の検討を行った。これらの各検討結果をもとに、空き缶を用いた新しい軽量盛土工法として、プレファブ道路盛土、小中規模構造物基礎地盤や擁壁背面裏込め材への適用を提案した。

第6章では、都市ごみ焼却灰の地盤工学的特性について述べると共に、地盤材料としての適用性について述べている。圧密沈下特性試験の結果からは、供試体密度と圧縮指数の関係を定量化することができ、静止土圧係数は時間と共に減少していくことを明らかにした。さらに、遠心力載荷実験及び数値解析の両検討結

果から判断すると、都市ごみ焼却灰の地盤材料への利用という見地からは、高い支持力が期待できるが、動的変形特性が若干延性的であるために、振動荷重を受けずある程度の変形許容がある土構造物ならば力学的には十分適用可能であることを確認した。

最後に、第7章は、各章で得られた結果をまとめ、本論文の結論としている。

#### 論文審査の結果の要旨

山中 稔氏は、平成4年3月、長崎大学大学院工学研究科土木工学専攻修士課程を修了し、同年4月応用地質株式会社東京事業本部土質技術二部に採用され、主に土質調査業務に従事した。平成5年10月同社を退職後、同年11月長崎大学工学部社会開発工学科助手として採用され、平成12年4月同学科講師となり、現在に至っている。長崎大学採用後これまで、空き缶、火山性堆積物、海成粘土、都市ごみ焼却灰の建設材料への有効利用に関する研究に従事しており、申請者の修士課程修了後の研究歴は8年に及んでいる。同氏は研究の成果を、平成13年8月に主論文「自然及び一般廃棄物の建設材料への有効利用に関する基礎的研究」として完成させ、参考論文14編(うち査読付学術雑誌論文3編、国際会議プロシーディング論文(査読付)5編、国内会議プロシーディング論文2編(内1編は査読付)、資料・解説(査読付)1編、著書1編、学内紀要2編)を添え、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(工学)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年11月22日の定例委員会において、論文提出による学位申請の提出資格ありと判定し、下記の委員会を選定した。委員は主査を中心としてその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに、口頭による基礎及び専門分野に関する最終試験と外国語(英語、ドイツ語)の能力判定試験を実施し、審査結果及び最終試験結果を平成14年1月17日の研究科委員会に報告した。

提出された論文は、自然廃棄物として火山性堆積物及び海成粘土を、一般廃棄物として空き缶及び都市ごみ焼却灰を取り上げ、各種廃棄物の建設材料への有効利用について検討を行ったものである。

まず第1章では、本論文の国内外における社会的背景、取り上げた計4種類の廃棄物(火山性堆積物、海成粘土、空き缶、都市ごみ焼却灰)の廃棄物としての法的位置付けや利用の現状、さらに国内外の既往の研究について述べている。また、本論文の内容と構成を簡単に述べ、各章の相互の関係を示している。

第2章では、火山性堆積物の地盤材料への有効利用について検討している。火山性堆積物としては雲仙普賢岳の火山活動により発生した雲仙土石流堆積物を取



り上げている。雲仙土石流堆積物の粒子形状は顕微鏡観察で微細な凹凸を特徴とすることが判明したため、通常の土質材料とは異なる力学特性を有することが予想された。そこで、一般的試験項目の他に水浸時におけるせん断強度及び沈下量の変化についても検討した。検討の結果、水浸により強度定数は大きく低下すること、また、載荷応力が通常の応力レベルである場合においても大きな水浸沈下が発生することから、大規模な構造物の基礎地盤とする場合には、水浸時の強度低下及び水浸沈下の予想以上の発生を予め考慮しておく必要があること等を明らかにしている。

第3章では、火山性堆積物の水中構造物への有効利用について述べている。火山性堆積物に固化材を添加して、固化供試体の気中及び水浸養生後の固化強度について検討を行っている。得られた固化強度は、水浸養生の方が気中養生よりも高い値を示すことから、固化体の水中構造物への適用の優位性が判明した。しかし、固化強度の大きさは所要の強度に達しなかったために、大きな強度を必要としない用途として、立方ブロック状やテトラポット状のいわゆる塊状の魚礁への適用や、多少変形や局所破壊が生じても本来の機能を損なうことのない人工海底山脈への適用について言及している。

第4章では、海成粘土と火山性堆積物からなる混合固化体の水中構造物及び緑化基盤への適用性を検討している。大村湾に堆積している海成粘土のフミン酸の含有量は強度低下を引き起こす程度の値ではないことを明らかにしたが、固化強度には養生温度の影響が大きいことを見出した。得られた混合固化体の固化強度の大きさから魚礁材料への適用を検討した結果、材令28日強度において約9 MPaを呈し、部材長1.6mの格子状魚礁が製作可能であることを見出した。一方、人工浮島の構造材料である緑化基盤としての適用性を検討した結果、固化強度に関しては河川護岸等に適用できる程の固化強度は得られなかった。しかし、芝草を播種した生育実験の結果から、高い強度を必要としない緑化基盤への適用法として人工浮島材料への利用が可能であることを明らかにしている。

第5章は、空き缶を利用した軽量盛土材料への適用性について述べたものである。空き缶は新タイプ及び旧タイプのものを対象とし、軽量盛土材料として有効利用する場合に解決する必要がある、圧縮強度及び耐久性の問題に着目して検討を行った。両タイプ空き缶の、一軸圧縮試験、所要の空き缶本数からなる空き缶ユニットの大型圧縮試験、さらに空き缶ユニットからなる道路模型に実荷重(2.1t)を載荷する実荷重載荷実験を実施した。これらの実験結果から、空き缶を用いた、従来のEPS工法に代わる新しい軽量盛土工法

として、ユニット形式で空き缶を使用することにより、鉛直壁とすることが可能なプレファブ道路盛土や、小規模構造物基礎地盤及び擁壁背面裏込め材への適用を提案している。

第6章では、都市ごみ焼却灰の地盤工学的特性と共に、地盤材料としての適用性について述べている。圧密沈下特性試験の結果からは、供試体密度と圧縮指数の関係を定量化することができ、静止土圧係数は時間と共に減少していくことを明らかにした。さらに、液状化強度は、間隙比が大きく締め固め度が高くないにも関わらず中位の液状化強度を示すことを見出した。静的せん断強度は一般的な砂質土と比較して高い値を示すことから、都市ごみ焼却灰の地盤材料への利用という見地からは、高い支持力が期待できることを明らかにすると共に、都市ごみ焼却灰の有害性の問題についても言及している。

最後に、第7章は、各章で得られた結果をまとめ、本論文の結論としている。

以上のように、本論文は、廃棄物の建設分野への有効利用を目的とする地盤工学及び廃棄物工学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(工学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	後藤 惠之輔
	副査	教授	高橋 和雄
	副査	教授	棚橋 由彦
	副査	教授	松岡 数充

#### 高谷 智裕

(兵庫県)昭和45年5月26日生

授与年月日 平成14年2月21日

主論文 九州沿岸海域における麻痺性貝毒に関する研究

(Studies on Paralytic Shellfish Poison in Coastal Waters of Kyushu)

#### 論文内容の要旨

九州沿岸海域では、これまで *Alexandrium catenella* (以下 A.c.) による二枚貝の麻痺性貝毒(paralytic shellfish poison, PSP) 毒化が報告されてきた。しかし、近年は *Gymnodinium catenatum* (以下 G.c.) による二枚貝の毒化例が多くなってきている。九州沿岸海域におけるこのような変化に鑑み、1996年より毒化原因プランクトンと貝類毒化との関連および貝体内でのPSPの代謝について検討した。

まず長崎県五島列島福江島では、1995年にイタヤガイ *Pecten albicans* やアズマニシキガイ *Chlamys farreri* を含む6種類の二枚貝にPSP毒性が認められた。貝の毒成分はC1 2 (PX1 2) や GTX 5, GTX 6 などの低毒性成分が多く、GTX 1 ~ 4 や STX 群の高毒性成

分の含有量は少なかった。福江島戸岐湾では、アズマニシキガイが毒化した際、貝殻や周辺の岩に付着したコケムシ類からも PSP が検出された。

大分県蒲江町では、1996年4月に G.c.による二枚貝の毒化が確認された。この時、大分県で大規模に養殖されていたヒオウギガイ *Chlamys nobilis* や天然のムラサキガイ、アサリなどが毒化した。G.c.は同年4月下旬に最大細胞数 1,367 cells/L となり、二枚貝の毒力は、5月初旬に中腸腺 1 g あたり 80 MU を超えた。貝の毒成分と G.c.のそれは低毒性成分を主成分としており、両者の毒成分はほぼ一致した。

熊本県天草宮野河内湾においては、1998年1月に G.c.が大量発生し、マガキ、アサリなどが毒化した。1月下旬に最大細胞数 627,000 cells/L となり、その1週間後にマガキの毒力が 438 MU/g となり、その後減少に転じた。しかし、マガキの毒化は長期化し、G.c.が消失した後も毒性が残存し、4月ようやく出荷規制値 (4 MU/g) 以下の毒性になった。同年6月初旬には再び G.c.が発生し、7月初めに最大細胞数 248,100 cells/L となり、マガキの毒力が 60 MU/g まで上昇した。G.c.の発生時期による毒産生量は、1月株では 209.8 fmol/cell、7月株では 28.2 ~ 45.9 fmol/cell と後者は前者の 1/4 ~ 1/8 程度の毒産生量であった。(第1章)

1997年3月下旬、長崎県五島列島福江島の玉之浦湾で採取した天然のマガキの喫食による麻痺性貝中毒が起こった。患者は、口、手足のしびれ、吐き気、嘔吐、体の浮遊感、脱力感などの症状を起こした。中毒患者の累計は26名にのぼり、内9名が入院したがまもなく全員が回復した。同時期のマガキを毒性試験したところ、7.1 ~ 135 MU/g と規制値を超えた。特に、中毒患者の多くが採取した名切口周辺のマガキからは 100 MU/g 以上の毒性値が認められた。HPLC による毒成分分析の結果、C (PX) 群を中心とする低毒性成分が主成分で、同時期に採取した海水中のプランクトン試料の毒成分とほぼ一致した。しかし、同海域採取のプランクトンの同定を試みたが、既知の有毒種とは特定できなかった。(第2章)

熊本県宮野河内湾採取の G.c.株を用いて、同株の毒産生能を調べた。G.c.の培養には SWM III 培地を用い、培養条件は、培養温度 12 ~ 21°C に、日照時間を 4 段階に設定した。

各条件下で培養したプランクトンは定常期に達した時に毒の抽出を行い、毒産生量および毒成分を HPLC 分析した結果、日照条件の違いによる G.c.の増殖速度への影響はほとんど見られず、その毒産生量は、74.4 ~ 104.4 fmol/cell であった。毒成分組成は、低毒性成分 C1 2 (PX1 2)、GTX5 β を主体とし、各条件間で

の大きな違いは見られなかった。培養温度別では、毒産生量は培養温度が低いほど高く、12°C > 15°C > 18°C > 21°C となり、その毒産生量は 77.6 ~ 282.8 fmol/cell であった。(第3章)

1999年1月下旬から約1ヶ月間宮野河内湾においてヒオウギガイ試料を水深 3 m、6 m、9 m 層に堤灯籠で垂下し、隔週毎に 25 個体を採取したのにつき毒性試験を行い、水深別の貝の毒化推移を検討した。試験期間を通じて毒のほとんどが中腸腺に局在 (全毒量の 95% 前後) し、その他の部位では生殖腺にのみ全体の 5% 前後の毒量が確認され、それ以外の部位からは全く毒性は認められなかった。毒性を水深別に見ると、9 m > 6 m > 3 m の順に中腸腺毒性が高い傾向が見られた。これは同時期に発生していた毒化原因プランクトンである G.c.の出現傾向とほぼ相関していた。毒成分組成は G.c.の影響と思われる低毒性成分を主体とし、垂下実験開始時に見られていた A.c.の影響はほとんど確認できなかった。また、水深別の毒成分組成の相違はほとんど認められなかった。(第4章)

無毒アサリを新鮮な濾過海水で順化後、10個体ずつ 24区に分け、それぞれ 1 L の濾過海水を満たした飼育水槽に収容し、熊本県宮野河内湾採取の G.c.および A.c.について、単一クローン株を分離後、大量培養し、それぞれ定常期に達した時点で濾過により藻体を集め、各区のアサリ飼育水槽に給餌した。給餌 0.5 時間から 168 時間 (7 日) 後にかけて経時的に各 1 区ずつアサリを取り上げるとともに、飼育水槽中の藻体残渣、フンおよび海水を採取し、HPLC 分析で毒量と毒組成を調べた。A.c.給餌、G.c.給餌ともに、アサリは給餌 12 時間後までにほぼすべての藻体を摂食した。それに平行してアサリの中の PSP 量も 12 時間後まで上昇したが、その後下降に転じ、72 時間後には最大蓄積時の 15 ~ 30%、168 時間後には 3% 未満にまで減少した。給餌 12 時間後の PSP 蓄積量は、A.c.給餌 26%、G.c.給餌 16% で、前者の方が若干高かった。藻体残渣とフンの毒量は、給餌 0.5 時間後に A.c.給餌で給餌毒量の 92%、G.c.給餌で同 51% を占めたが、その後前者では徐々に、後者では急激に減少した。これに対し、海水の PSP 含量はいずれも 0.5 時間後から 120 ないし 144 時間後にかけて漸増し、A.c.給餌で給餌毒量の 90%、G.c.給餌で 70% 程度に達した。一方、アサリが蓄積した PSP の組成は、給餌した渦鞭毛藻の組成を反映し、当初、A.c.給餌の場合低毒性の C1 4 (PX1 4)、GTX5 β および高毒性の GTX1 4 を、G.c.給餌の場合 C1 2 (PX1 2) と GTX5 β のみを含んでいたが、いずれも 1 ~ 3 時間後には低毒性成分から変換したと思われる STX、GTX2 3 やそれらのデカルバモイル体が出現し、経時的にその割合が増加した。藻体残渣とフンの毒組成も、

アサリと同様の傾向を示したが、海水の毒成分では、他の成分に比べC1 2 (PX1 2)の割合が極端に高かった。アサリは渦鞭毛藻から得たPSP、特にC1 2 (PX1 2)の大部分を速やかに海水中に排泄していると推察された。(第5章)

近年九州沿岸における貝類毒化がG.c.によることと、このプランクトンが産生する主な毒成分が低毒性成分であることを明らかにした。また、G.c.の毒産生能は水温等の環境要因により大きく変化することが認められた。アサリ体内に蓄積される毒は、摂食による蓄積率が低く、蓄積毒のうち低毒性成分が速く代謝される傾向が見られた。

#### 論文審査の結果の要旨

高谷智裕氏は平成6年3月に長崎大学水産学部を卒業後、同年4月に長崎大学大学院水産学研究科(修士課程)に入学して、平成8年3月に同研究科を修了し、水産学修士を修得した。同年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学後、平成10年6月に同研究科を退学した。同年7月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科助手に任官、平成12年4月1日に研究科改組により長崎大学大学院生産科学研究科助手となり、今日に至っている。同氏は主論文「九州沿岸海域における麻痺性貝毒に関する研究」を完成させ、本研究に関する参考論文5編(査読付き4編:掲載済み)を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(水産学)の学位を申請した。

同委員会はこれを平成13年12月20日の定例研究科委員会に付議し、論文審査結果に基づいて学位論文の資格を審査し、本論文の受理を決定後、下記の審査委員会を選定した。審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による基礎および専門分野に關与する最終試験と外国語(英語、ドイツ語)の能力判定試験を実施し、論文の審査および最終試験の結果を平成14年2月21日に定例研究科委員会に報告した。

提出論文は、最近九州沿岸で頻発している渦鞭毛藻による二枚貝の麻痺性貝毒(PSP)毒化につき、原因プランクトンによる産生毒と貝の体内における毒の代謝からの検討ならびに玉之浦で発生したPSPによるマガキ中毒の疫学調査に関するものである。

長崎県福江島では、1995年にイタヤガイなど6種類の二枚貝にPSP毒性が認められ、その毒成分はC1 2 (PX1 2)やGTX5 βなどの低毒性成分が多く、GTX 1 4やSTX群の高毒性成分は少なかった。大分県蒲江町では、1996年4月に*Gymnodinium* (*G.*) *catenatum*によりヒオウギなどの二枚貝が毒化した。*G.catenatum*は同年4月下旬に最大1,367 cells/Lとなり、二枚貝の毒力は、5月初旬に中腸腺で80 MUを超えた。貝と

プランクトンの毒は低毒性成分を主成分とし、両者の成分組成はほぼ一致した。熊本県宮野河内湾では、1998年1月に*G. catenatum*が大量発生し、マガキなどが毒化した。同月下旬に最大密度627,000 cells/Lとなり、1週間後にマガキの毒力が438 MU/gとなり、その後プランクトンは減少したが、マガキの毒力は4月になるまで規制値以下にならなかった。6月には再び発生し、7月初旬に最大密度248,100 cells/Lとなり、マガキの毒力は60 MU/gまで上昇した。*G. catenatum* 1月株および7月株の毒産生力はそれぞれ209.8 fmol/cellおよび28.2459 fmol/cellであった。

長崎県福江島玉之浦湾で1997年3月に発生した天然マガキの喫食により26名が中毒した。症状は典型的なPSP中毒のそれに一致した。同時期のマガキの毒力は7.135 MU/gと規制値を超えた。毒成分はC (PX)群を中心とする低毒性成分が主成分で、同時期の海水中プランクトンのそれにほぼ一致した。しかし、同海域からは既知の有毒種を発見できなかった。

熊本県宮野河内湾採取の*G. catenatum*株の毒産生能を、培養温度12-21°Cで、日照時間を4段階で調べた結果、日照条件の違いによる増殖速度、毒産生量および毒成分には、大きな相違がなかった。培養温度別では、毒産生量は培養温度が低いほど高く、12°C > 15°C > 18°C-21°Cとなり、その毒産生量は77.6-282.8 fmol/cellであった。

宮野河内湾において1999年1月下旬から約1ヶ月ヒオウギを堤灯籠に入れ水深3, 6, 9 m層に垂下し、水深別の貝の毒化状況を調査した結果、9 m > 6 m > 3 mの順に中腸腺毒力が高い傾向が見られた。貝の毒性および毒成分は出現していた*G. catenatum*の消長ならびに毒組成に相関した。水深別の毒組成の相違は見られなかった。

無毒アサリに*G. catenatum*と*Alexandrium catenella*の単一クローン株で大量培養した藻体を給餌し、貝、藻体残渣を含むフンおよび海水の毒量および毒組成をHPLCにより分析した。アサリはいずれのプランクトン給餌においても初めの12時間までは摂食し、それに伴い貝のPSP量が上昇したが、その後下降に転じた。藻体残渣を含むフンの毒量は、給餌0.5時間後にいずれの給餌でも高かったが、その後は減少した。これに対し海水のPSP量は0.5時間後から120-144時間にかけて漸増した。一方、アサリが蓄積したPSP組成は、給餌プランクトンを反映し、当初、*A.catenella*投与では、C1 4 (PX1 4)、GTX5 βおよび高毒性のGTX 1 4が、*G. catenatum*投与ではC1 2 (PX1 2)とGTX5, 6のみが、1-3時間後にはいずれも低毒性成分からの変換と思われるSTX, GTX 2, 3やそれらのデカルバモイル体が出現し、経時的にそれらの割合が増加し

た。藻体残渣を含むフンの毒組成もアサリと同様であったが、海水では、C1 2 (PX1 2) の割合が極端に高かった。これらのことからアサリはプランクトンから得た PSP, 特に C1 2 (PX1 2) の大部分を早期に海水中に排泄すると推定された。

本研究の内容には、水産上および食品衛生上大きな問題である PSP による貝類毒化への対策に大いに資するデータが含まれており、関連分野に大きく寄与するものと考えられ、高く評価できる。

以上により海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会に基づき審査した結果、本研究は水産学ならびに食品衛生学の発展に貢献するところが大きいと判断し、学位に値するものとして合格とした。

審査担当者 主査 教授 野口玉雄  
副査 教授 野崎征宣  
副査 教授 松岡数充  
副査 教授 岩尾正倫  
副査 助教授 荒川修

矢田 修

(長崎県) 昭和36年4月23日生

授与年月日 平成14年2月21日

主論文 Studies of Influence of Pink Muscle Fiber on Increasing Rate of K-value in Fishes

#### 論文内容の要旨

魚類の死後における K 値 (鮮度恒数) の経時変化は魚種によって異なり、その違いには棲息水温が影響することが知られている。しかしながら、同じ水温に棲息する魚種であっても、その速度は魚種間でかなり異なっていた。この原因に関して、これまでに IMP から HxR を生成する IMP 分解酵素の性質や機能に関する研究がなされ、その活性の多寡が K 値上昇速度の魚種間における差に及ぼすことがわかってきた。しかし、同じ水温に棲息する魚種であるにもかかわらず、魚種間で IMP 分解酵素活性レベルが異なっており、その理由については未だ十分に解明されていない。

他方、魚類の背部骨格筋は、血合筋、中間筋、普通筋の異なる3つの層から構成され、それぞれ赤筋、ピンク筋、白筋からなるとされてきた。しかし、ごく最近の研究によれば、背部普通筋は白筋のみで構成されているのではなく、ピンク筋が白筋の中にモザイク状に介在し、多くの魚種で認められることがわかってきた。

そこで、本研究では、同一水温に棲息する魚種の K 値上昇速度の違いを明らかにするために、背部普通筋における筋タイプの違い、特にピンク筋の介在が K 値上昇速度の差に及ぼす影響について検討を行った。

第1章では、本研究の目的、本研究に関連した従来の研究および本研究の概要について記述した。

第2章では、大型の養殖コイを試料魚として用い、背部筋から血合筋部、中間筋部、普通筋の最深部を肉眼で採取し、各部位の筋タイプの識別と K 値変化について検討した。その結果、各部位の筋タイプの構成は、血合筋部が赤筋のみ、中間筋部が薄い層のピンク筋のみの部分と、ピンク筋だけでなく白筋 (サブタイプ: タイプ IIa とタイプ IIb) でモザイク状を示した。また普通筋の最深部は、白筋のみ (サブタイプ: タイプ IIa とタイプ IIb) からなっていた。各筋タイプの K 値の経時変化は、赤筋、ピンク筋、白筋の順で速かった。以上の結果より、背部普通筋へのピンク筋の介在は、K 値上昇速度を速めるのではないかと推察された。

第3章では、水温28℃と17℃の海域に棲息する種々の海産魚を用いて、背部普通筋へのピンク筋の介在割合 (数、面積) について比較検討した。その結果、背部普通筋へのピンク筋の介在割合は魚種によってかなり異なっており、K 値変化の遅速に影響することが考えられた。ピンク筋の介在面積割合と数割合との間には、有意に高い正の相関関係が認められた。また、各魚種におけるピンク筋のサイズは、白筋のそれよりも相対的に小さかった。

第4章では、背部普通筋部にピンク筋が介在している養殖コイを試料魚に選び、血合筋部、中間筋部、普通筋部 (中間筋近傍部、中央部、最深部) の K 値の経時変化について検討した。なお、採肉部位の筋タイプは、血合筋部が赤筋のみ、中間筋部がピンク筋のみからなっていた。また普通筋は最深部まで白筋 (サブタイプ: タイプ IIa 或いはタイプ IIb) 中にピンク筋が介在していた。K 値の経時変化は血合筋が最も速く、中間筋、普通筋の順であった。また普通筋の3部位間では顕著な違いは認められなかった。第2章で述べたピンク筋、白筋の K 値変化から判断して、背部普通筋へのピンク筋の介在は K 値変化を速めると結論した。

第5章では、第3章と同じ魚種について、背部普通筋中へのピンク筋の介在割合が、32℃保存下の K 値上昇速度 ( $\Delta K_{32}$ ) に及ぼす影響について検討した。その結果、 $\Delta K_{32}$  は棲息水温17℃の魚種が28℃の魚種よりもいくらか速い傾向にあった。また、各海域の魚種ともピンク筋の介在割合 (数、面積) と  $\Delta K_{32}$  との間には、正の相関傾向が認められた。そこで、 $\Delta K_{32}$  への棲息水温の因子を除くために、各魚種のデータを各海域毎に求めた平均値からの各魚種の値のばらつき割合とピンク筋の介在割合との間の関係を検討した。両者の間には有意な正の相関関係が認められ、背部普通筋へのピンク筋の介在は、各魚種の K 値上昇速度

を速めると結論した。

第6章では、背部普通筋へのピンク筋の介在の違いが5'IMP分解活性に及ぼす影響について検討した。その結果、5'IMPとp-NPP分解活性はそれぞれpH8.0付近とpH5.0付近にピークを示し、その活性レベルは魚種によって異なっていた。背部普通筋へのピンク筋の介在割合(数,面積)とpH8.0における5'IMP分解活性との間には、有意な相関性は認められなかった。そこで、魚の死後における魚肉pHの変化を考慮して、pH7.0での5'IMP分解活性について検討した結果、有意な正の相関関係が認められた。またpH7.0における5'IMP分解活性と $\Delta K_{32}$ の間には、有意に高い正の相関関係が認められた。

従って、背部普通筋におけるピンク筋の介在の違いは、5'IMP分解活性の多寡に影響を及ぼし、同じ水温に棲息する魚種間におけるK値上昇速度の違いを生じさせていると結論した。

第7章では、本研究で得られた結果をまとめて総括した。

#### 論文審査の結果の要旨

矢田 修氏は、昭和61年3月、長崎大学大学院水産学研究科修士課程を修了し、同年4月、日立冷熱株式会社に採用され、同年10月より技術部研究開発部に配属されてから現在まで、主に魚類の陸上養殖における水浄化システムの開発と魚類の環境水温順応や死後の鮮度変化に関する研究に従事している。その間、平成3年4月、長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学(社会人特別選抜)し、同10年3月に単位取得退学した。申請者の修士修了後の研究歴は、15年に及んでいる。同氏は、長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学後からこれまで、魚類における死後の鮮度変化に関する研究に従事し、その成果を、平成13年10月に主論文「魚類の普通筋におけるピンク筋の介在がK値上昇速度に及ぼす影響に関する研究」を完成させ、参考論文の公表した論文4編(内査読付学術雑誌論文3編、学内紀要論文1編)と公表予定論文2編(査読付学術雑誌投稿中論文2編)の合計6編を添え、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において、論文提出による学位申請の提出資格ありと判定し、下記の学位審査委員会を選定した。委員は、主査を中心としてその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会で発表を行わせるとともに、口頭による基礎および専門分野に関する試験と外国語(英語とドイツ語)の能力判定試験を実施し、論文審査結果及び最終試験結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出された論文は、同一水温下に棲息する魚類の死後のK値上昇速度(生鮮度変化の指標)が魚種によって異なる点についてその原因を明らかにするために検討を行ったものである。

まず第1章では、本研究の目的、本研究に関連した国内外の既報の研究知見および本研究の内容と構成を記述している。

第2章では、魚種によるK値上昇速度の違いが背部普通筋を構成する筋タイプの違いに起因しているのではないかと仮説のもと、コイの背部普通筋の筋タイプ構成を検討するとともに、コイより筋タイプの異なる赤筋・タイプI、ピンク筋、白筋・タイプIIをそれぞれ分別分取し、各筋タイプ間で32℃保存下におけるATP関連化合物およびK値の経時変化を比較している。その結果、背部普通筋が白筋・タイプIIのみで構成されているのではなくピンク筋がモザイク状に介在していることを明らかにしている。また、それらのK値の経時変化は、赤筋・タイプI > ピンク筋、白筋・タイプIIの順位であることを明らかにしている。

第3章では、水温28℃と17℃の海域に棲息する種々の海産魚を用いて、背部普通筋へのピンク筋の介在割合(数,面積)について比較検討している。その結果、背部普通筋にピンク筋がモザイク状に介在している魚種が多く見られ、その介在割合は魚種によってかなり異なっていることを明らかにしている。ピンク筋の介在面積割合と数割合との間に有意に高い正の相関関係を認め、介在するピンク筋のサイズは白筋のそれよりも相対的に小さいことを明らかにしている。

第4章では、背部普通筋部にピンク筋が介在している養殖コイを用い、背部普通筋へのピンク筋の介在がK値の経時変化に及ぼす影響について検討している。その結果、背部普通筋へのピンク筋の介在は、白筋のみで構成されているそれよりもK値変化が速くなり、ピンク筋のそれに近くなることを明らかにしている。

第5章では、第3章と同じ魚種を用い、異魚種間で認められた背部普通筋へのピンク筋の介在割合の違いがその魚種のK値上昇速度の遅速に及ぼす影響について検討している。その結果、魚種間で認められたピンク筋の介在割合(数,面積)の違いがそれらのK値上昇速度の違いと有意な正の相関性を呈することを明らかにしている。以上の結果から、同一水温下に棲息する魚種間に認められたK値上昇速度の違いは、背部普通筋へのピンク筋の介在程度の違いに起因していると結論している。

第6章では、第3章と同一魚種を用いてそれらの背部普通筋の5'IMPとp-NPP分解活性について検討している。その結果、いずれの魚種も5'IMPとp-NPP分解活性はそれぞれpH8.0付近とpH5.0付近に

ピークを示し、その活性レベルは魚種によって異なり、背部普通筋へのピンク筋の介在割合（数、面積）の違いは pH7.0 における 5' IMP 分解活性の違いと有意な正の相関性を呈することを明らかにしている。また、pH7.0 における 5' IMP 分解活性は K 値上昇速度とも有意に高い正の相関性を呈することを認めている。

以上のことより、同一水温下に棲息する魚種による K 値上昇速度の違いは背部普通筋におけるピンク筋の介在程度に起因し、その介在程度は pH7.0 における 5' IMP 分解活性の高低を誘導したことによると結論している。

以上のように、本論文はこれまで魚類の背部普通筋が白筋のみで構成されていると考えられていたが、ピンク筋がモザイク状に介在するという新知見を明らかにする共に、同一水温下における種々の魚種間の K 値上昇の違いにこのピンク筋の介在程度が関係することを明らかにしている。本論文は、水産食品学の研究分野における貴重な知見を得ている。海洋生産科学研究科委員会は、本論文が海洋生産科学の進歩に大きく貢献するものと認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	梶本六良
	副査	教授	石原忠
	副査	教授	古川睦久
	副査	教授	原研治
	副査	助教授	橘勝康

## 坂口大作

（長崎県）昭和42年4月24日生

授与年月日 平成14年2月21日

主論文 遠心送風機羽根なしディフューザにおける旋回失速の抑制に関する研究

### 論文内容の要旨

いろいろな分野で利用されている遠心送風機・圧縮機は、低流量域で旋回失速やサージなどの不安定流動が発生するため運転流量範囲が制限されている。最近、ガスタービンやターボ過給機等において高圧化の傾向があるが、高圧力比ほど不安定流動の流量範囲が広くなり、また変動流体力に基づく振動トラブルが深刻化している。遠心圧縮機の羽根車出口下流には、運動エネルギーを圧力に変換するディフューザが必要であり、単純な構造の羽根なしディフューザは、羽根付きディフューザに比べ広い流量範囲に適用できる特徴を有するが、羽根なしディフューザにおける逆流が原因で大きな振幅の周期的圧力変動を伴う旋回失速が発生することが多い。ディフューザに流入する流れは幅方向にもまた周方向にも変化し、かつディフューザ壁面上に成長する境界層は3次元的に挟れるなど、極めて複雑

な流れであることが原因で、旋回失速の発生機構が十分に解明されたとは言い難く、また、その抑制原理および抑制策も確立されていない。

本論文は、遠心送風機の低流量域で発生する不安定流動を抑制して運転流量範囲を拡大するために行った研究であり、羽根なしディフューザ内で発生する逆流に及ぼす流入速度分布および壁面摩擦の影響、羽根車出口における周方向に不均一な流れと逆流の相互干渉、および旋回失速抑制方法について、理論解析および実証試験の両面から論じたものである。

第1章では、本研究の背景、研究目的および本論文の全体構成について述べた。

第2章では、旋回失速現象を検証するための低比速度型遠心送風機試験装置および計測方法について述べた。旋回失速が発生する低流量域において、羽根車出口前後の速度ベクトルを非接触で計測するために開発した半導体レーザ2焦点流速計および計測された速度データの統計的処理手法について記述した。さらに、羽根車出口におけるジェット・ウェーク流れに基づく変動と、ディフューザ内で発生する逆流に基づく変動とを定量的に区別できる速度変動相関係数の算出法について述べた。

第3章では、運動量積分法および数値解析法を適用して、ディフューザ入口流入条件および壁面摩擦が逆流の発生に及ぼす影響を明確にした。ハブ・シュラウド間で非対称に生じる逆流域の大きさは、周分速度のシュラウド・ハブ間分布に強く依存すること、および壁面摩擦の増加により逆流域が顕著に抑制されることなどを明確にした。

次いで、3次元乱流粘性数値解析法を展開し、運動量積分法に基づく結果と対比した結果、3次元境界層内速度分布が両者でほぼ一致することを、また、羽根車出口のジェット・ウェーク流れが逆流に及ぼす影響を流入する流れの乱れ強さの影響に置換して評価した結果、乱れの増加によって逆流域が抑制されることなどを明らかにした。

第4章では、羽根車内部およびディフューザ部における速度変動を半導体レーザ2焦点流速計により計測し、新しく導入した速度変動相関係数を評価することによって、逆流と羽根車出口流れとの相互干渉が定量的に明らかにされた。すなわち、旋回失速発生直前には、羽根車出口羽根間中央部で相互干渉が顕著になり、また、相互干渉に基づく旋回失速の前兆現象は、壁面静圧変動の自己相関係数を評価することによって検知できることなどを明らかにした。なお、旋回失速初生因子は、逆流と羽根車出口流れとの相互干渉に基づくじょう乱であるという新しい知見を得た。

第5章では、旋回失速の発生に対するハブ・シュラ

ウド間速度分布の影響、および部分的粗面化による旋回失速制御法の実験的検証結果について述べた。

羽根車出口シュラウド側の一部を塞ぐことによってディフューザ入口速度分布を変化させたところ、ハブ側の逆流が抑制されて旋回失速初生流量が低流量側へ移行した。すなわち、シュラウド側ではなくハブ側の逆流を抑制することが、低比速度型後傾羽根遠心羽根車の旋回失速の抑制に肝要であるという新しい知見を得た。

次いで、速度が大きくかつジェット・ウェーク流れに基づく速度変動が存在するディフューザ入口部、すなわち半径比1.2までの壁面は滑らかな面とし、それより下流で大きな逆流域が発生するハブ側壁面だけを粗面とする部分的粗面化策による旋回失速抑制効果を実験的に検証した結果、僅か1%の性能低下を伴うだけで、旋回失速初生流量を42%も低流量側へ移行できることを示した。

なお、部分的粗面化による逆流抑制効果を運動量積分法により調べた結果、(1)壁面摩擦力の主流に垂直方向成分が増加して境界層の剥れが顕著に減少し逆流が抑制されること、(2)逆流が抑制されたことにより、半径分速度の減速に基づく圧力上昇が増加し、滑らかな壁面の場合に近い半径方向圧力上昇を支えていること、(3)逆流が発生している場合は壁面摩擦力の半径方向成分が外向きで、この力が半径方向圧力勾配を支えていることなどが明確にされ、圧力上昇率をほとんど低下させることなく旋回失速が抑制されるメカニズムを明らかにした。

第6章の総括では、第2章から第5章において得られた主な知見をまとめた。

本研究で提案した速度変動相関係数は旋回失速の発生を定量的に評価できる工学的に貴重な評価尺度であり、また、部分的粗面化による旋回失速抑制策は、性能を悪化することなくまたコストもかからない方法として工業的にも極めて有用である。

#### 論文審査の結果の要旨

坂口大作氏は、平成4年3月、長崎大学大学院工学研究科修士課程機械工学第二専攻を修了し、同年4月、長崎大学工学部機械システム工学科に文部教官助手として採用され、現在に至っている。また、平成11年4月から現在に至るまで長崎大学教育学部に講師として併任されている。修士課程以降現在まで継続して遠心送風機低流量域不安定流動に関する研究に従事し、修士課程修了後の研究歴は9年10カ月に及んでいる。平成13年12月、主論文「遠心送風機羽根なしディフューザにおける旋回失速の抑制に関する研究」を完成させ、参考論文17編(内6編は査読付学術雑誌論文、8編は国際会議のプロシーディング)を付して、長崎大学大

学院海洋生産科学研究科に博士(工学)の学位を申請した。同研究科委員会は、平成13年12月20日の定例委員会において論文提出による学位申請の資格ありと判定し、受理を決定後、下記の審査委員を選定した。委員は主査を中心にその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による基礎および専門分野の関する最終試験と外国語(英語、ドイツ語)の能力判定試験を実施し、審査結果および最終試験結果を平成14年2月21日の研究委員会に報告した。

提出された論文は、ガスタービンやターボ過給機等に用いられている遠心送風機・圧縮機の低流量域で発生する旋回失速やサージなどの不安定流動を抑制するためになされた研究で、特に遠心羽根車の下流に設置される羽根なしディフューザにおいて発生する旋回失速について、その発生原因および抑制原理を理論と実験の両面から追究し、旋回失速の検知・予知方法を確立するとともに、工業的にも有用性の高い旋回失速抑制策を提案している。

まず、独自に開発した半導体レーザ2焦点流速計を用いて羽根なしディフューザ入口部分の速度変動を計測し、変動する速度ベクトルの先端軌跡が描く流れ変動楕円および速度変動相関係数を新たに提案するとともに、低流量域不安定変動流動現象を特定する定量的評価尺度として有用であることを示した。不安定流動初生段階では、羽根車出口からのジェット・ウェーク流れと羽根車出口近くまで到達した逆流の相互干渉が速度変動相関係数によって示されるとともに、圧力変動の自己相関係数解析によって間欠失速状態が同時に存在することから、ジェット・ウェーク流れと逆流との相互干渉が不安定流動発生のトリガーであると結論づけた。すなわち、旋回失速の発生原因は、羽根なしディフューザ内の逆流と羽根車出口流れとの相互干渉に基づくじょう乱であるという新しい知見を得ている。また、相互干渉に基づく旋回失速の前兆現象は、壁面静圧変動の自己相関係数を評価することによって予知できることを示した。

次いで、ディフューザ壁面の粗面化による逆流域抑制効果を運動量積分法並びに3次元乱流粘性数値解析により調べ、壁面摩擦力の主流に垂直方向成分が増加して境界層の剥れが顕著に減少し逆流が抑制されること、逆流域の減少が半径分速度の減速率を増加し半径方向圧力上昇を支えていることなどを明確に示し、圧力上昇率をほとんど低下させることなく旋回失速が抑制されるメカニズムを理論的に明らかにしている。

さらに、羽根なしディフューザのシュラウド側ではなくハブ側の逆流を抑制することが、低比速度型後傾羽根遠心羽根車の旋回失速の抑制に肝要であることを

実験的に見出すとともに、粗面化に基づく圧力損失の増加を最小に抑えるためジェット・ウェーク流れに基づく速度変動が存在するディフューザ入口部すなわち半径比1.2までの壁面は滑らかな面とし、それより下流で大きな逆流域が発生するハブ側壁面だけを粗面とする部分的粗面化策により、僅か1%の送風機性能低下を伴うだけで、旋回失速初生流量を42%も低流量側へ移行できることを実証した。

本論文で示された新しい知見は工学的に極めて有用であるとともに、運転流量範囲の拡大ならびに省エネルギー化を目指す遠心送風機の羽根なしディフューザの設計において、基本的指針のみならず実用的資料を提供するものである。海洋生産科学研究科委員会は、論文審査及び最終試験の結果についての審査委員の報告に基づき審査した結果、これらの成果は海洋生産科学の基礎部門である工学の進歩に寄与するところ大であり、博士(工学)の学位に値すると認め、合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	石田正弘
	副査	教授	浦 晟
	副査	教授	児玉好雄
	副査	教授	茂地 徹
	副査	助教授	植木弘信

## 原 善一郎

(長崎県)昭和31年4月8日生

授与年月日 平成14年2月21日

主論文 大型ディスプレイの開発と高画質化に関する研究

## 論文内容の要旨

表示デバイスを多数配列して構成する大型ディスプレイは、1980年に3原色に対応する3種類のCRTを配列する方式が初めて実用化された。その後、応用範囲を拡大するために、高画素密度の表示デバイスと高精細画像を表示する信号処理技術が研究されている。表示の高精細化、高画質化は、各種ディスプレイの共通の課題であり、壁掛けTVの実用化を目指して、PDP、LCDなど平面ディスプレイにおいて研究が活発化している。

平面ディスプレイの開発では、高画素密度化、高輝度化などの画像に影響する量的要因の検討が優先され、画素配列および画素の駆動方法などの質的要因については十分に検討されていない。大型ディスプレイは、一般に高輝度である。しかも様々な視距離で観視されることから、画素配列および画素の駆動方法などに起因する画質上の潜在的課題が顕在化しやすい。また、屋外の過酷な環境で使用されることから、表示デバイスの性能上の課題が顕在化しやすい。

本研究は、画素配列および画素の駆動方法に起因して画像を特徴付ける要因および妨害感について理論的に検討し、さらに大型ディスプレイの高画質化および高画素密度表示素子の基礎技術について研究している。この成果は、各種平面ディスプレイの開発において、画質あるいは性能改善のための知見を与えるものである。

1章は、本論文の序章である。大型ディスプレイの位置付けを明確化し、カラー映像表示用途として大型ディスプレイが誕生する背景と本研究の目的および概要を解説した。

2章は、主観評価実験を中心とした従来の画素配列に関する研究に画像情報論を応用し、各画素配列の特徴を理論的に解明している。まず、画像を画素配列に対応する標準化関数に基づいてモデル化し、画像を特徴付ける本質的要因がナイキスト領域であることを明らかにした。ここで画素配列を、3原色を画像の1標本点に割り当てるトリオ配列と、各色の配置に対応する各標本点に割り当てるモザイク配列に大別し、ナイキスト領域を導出して各画素配列の特徴を説明した。さらに代表的画素配列であるトリオ配列とRGGBモザイク配列を比較し、後者は、隣接画素が重複して実質的画素数が約2倍に増加して見かけの解像度が高くなることを見出した。

3章では、特定の速度で平行移動する画像は、見かけ上、表示システムにおける画像スペクトルの通過帯域が拡大することに注目している。帯域の拡大は、トリオ配列では画質に寄与しないが、モザイク配列では細部の変色を解消して画質を改善する場合があり、動画を含む画素配列と画質の関係は視覚特性を考慮した3次元ナイキスト領域によって説明される。ここで主観評価実験により3次元ナイキスト領域の構造から予測される速度で画像の細部の変色が解消されることを検証した。また簡易TFZP(To-and-Fro Zone Plate)法により各画素配列の3次元ナイキスト領域の断面を直視できることを明らかにし、画像の動きと変色解消の関係を確認した。これらの検討結果から、モザイク配列は、画質を維持しつつ画素数を削減する空間的な帯域圧縮に対応する。

4章は、画素配列あるいは画素の駆動方法に基づいて画質に妨害を与える空間的要因と時間的要因を共通の画像の時空間モデルで表わし、各画質妨害の特徴と画質改善対策を明らかにしている。まず、2画素ごとに画素間のギャップを短縮して画素配列を不等ピッチ化し、画素面積を拡大あるいは画素ピッチを短縮する大型ディスプレイの新しい画素配列を提案した。ここで画像のモデルと主観評価実験に基づいて、画質が改善される条件を明らかにした。次に駆動パルスの時間



的配列と画質の関係について検討し、駆動パルスを時間軸上で均等に分散して見かけの表示周波数を高めるフィールド分散法を提案した。この方式は、高輝度大面積のディスプレイにおいて視覚特性上目立ちやすくなるフリッカが解消され、TVカメラで撮影されるイベント会場などの用途において良好な撮影が可能となるなどの実用的な効果が生まれる。

5章では、各章の検討結果に基づいて開発した大型ディスプレイについて述べている。まず、表示の制御機能を配列された個々の表示ユニット内に分散し、表示ユニットごとに独立して表示を制御する分散処理方式を提案した。ここで蛍光表示管を配列した高解像度大型ディスプレイを試作し、画像の表示方式を検証するとともに表示デバイスの課題を明らかにした。次にCRTの原理と蛍光表示管の製造技術を応用した新しい表示デバイス Flat Matrix CRT を提案し、その構造と動作原理を明らかにした。さらに新提案の高画質化技術と、高輝度用途および高解像度用途の各 Flat Matrix CRT について、電極構造の簡素化、高性能化のための基礎技術を明らかにした。

6章では、本研究の成果を総括し、今後の課題に言及している。

#### 論文審査の結果の要旨

原善一郎氏は、1981年3月に九州大学大学院電気工学専攻修了後、三菱電機株式会社に採用され、長崎製作所、応用機器研究所、映像情報システムセンターを経て、現在電力・産業システム事業所に所属し、2001年10月に首席技師長となり、現在に至っている。

同氏は、三菱電機株式会社に入社以降、主として大型ディスプレイの研究開発に従事し、研究成果を、平成13年12月に主論文「大型ディスプレイの開発と高画質化に関する研究」にまとめ、参考論文7編（審査付き学術雑誌に掲載された論文5編、国際会議の Proceedings に掲載された論文1編、社内報1編）を添え、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（工学）の学位を申請した。

長崎大学海洋生産科学研究科委員会は、平成13年12月20日の委員会において、同氏の研究歴と論文内容の要旨についての資格審査委員会の報告を受け、論文提出による学位申請の資格ありと判定し、下記の審査委員会委員を選定した。

審査委員会は、主査を中心に、その論文内容を慎重に審議し、公開論文発表会で発表を行わせるとともに、専門分野に関する口頭による最終試験および外国語（英語、ドイツ語）の能力判定試験を実施し、それらの結果を平成14年2月21日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、画素配列および画素の駆動方法に起因して画像を特徴付ける要因および妨害感について理論

的に検討し、さらに大型ディスプレイの高画質化および高画素密度表示素子の基礎技術について研究したもので、6章から構成されている。

1章では、まず、大型ディスプレイの位置付けを明確化し、カラー映像表示用途として大型ディスプレイが誕生する背景と、本研究の目的と概要を解説している。

2章では、大型ディスプレイにおける画素配列と画質の關係に着目し、画像を画素配列に対応する標準化関数に基づいてモデル化して、RGB トリオ配列、RGB デルタ配列、RGGB モザイク配列および RGB モザイク配列について、各画素配列の特徴を理論的に解明し、画像を特徴付ける本質的要因がナイキスト領域であることを明らかにしている。さらに、代表的画素配列であるトリオ配列と RGGB モザイク配列を比較し、後者は、隣接画素が重複して実質的画素数が約2倍に増加して見かけの解像度が高くなることを明らかにしている。

3章では、画像の動きによる平面ディスプレイの画質改善効果に関して、3次元に拡張されたナイキスト領域と人間の視覚特性に基づいて、平面ディスプレイの各画素配列における画像の動きと見かけの解像度の關係を明らかにしている。まず、特定の速度で平行移動する画像は、見かけ上、表示システムにおける画像スペクトルの通過帯域が拡大することを示している。次に、帯域の拡大は、トリオ配列では画質に寄与しないが、モザイク配列では、視覚特性上、細部の変色が解消されるなど、画質を改善する可能性があることを示している。

4章では、画素配列あるいは画素の駆動方法に基づいて、画質に妨害を与える空間的要因と時間的要因を共通の画像の空間的モデルで表し、各画質妨害の特徴と画質改善対策を明らかにしている。特に駆動パルスの時間的配列と画質の關係について検討し、駆動パルスを時間軸上で均等に分散して見かけの表示周波数を高めるフィールド分散法を提案している。この方式は高輝度大面積のディスプレイにおいて視覚的特性上目立ちやすくなるフリッカが解消されるとともに、NTSC 方式のみでなく、PAL 方式などにも応用可能な方式である。

5章では、各章の検討結果に基づいて開発した大型ディスプレイについて述べ、表示の制御機能を、配列された個々の表示ユニット内に分散し、表示ユニットごとに独立して表示を制御する分散処理方式を提案している。

6章では、研究成果を要約し、今後の研究課題について述べている。

以上のように、本論文は、大型ディスプレイの高画

質化および高画素密度表示素子の基礎技術について、画素配列および画素の駆動方法に起因して画像を特徴付ける要因および妨害感について理論的に検討し、大型ディスプレイを開発したものであり、その成果は工学の進歩に大きく貢献するものと認められる。よって博士(工学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	黒田	英夫
	副査	教授	福永	博俊
	副査	教授	宮原	末治
	副査	教授	吉田	紀彦