

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156号) 平成14年6月30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1,045号	博士(医学)	小野 剛志	大分	平 14. 4. 3	Stimulation of peripheral nociceptor endings by low dose morphine and its signaling mechanism (低用量モルヒネの末梢侵害受容体刺激とそのメカニズム)	4
" 第1,046号	"	杉山 啓一	長崎	平 14. 5. 22	Aurora -B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation (Aurora -B は抑制因子である protein phosphatases によってカイネース活性を調節されている)	5
" 第1,047号	"	黒田 宏昭	長崎	平 14. 6. 19	Distinctive Gene Expression of Receptor - Type Tyrosine Kinase Families during Rat Hepatocarcinogenesis (ラット化学肝発癌過程における特異的な受容体型チロシンキナーゼの発現)	6
" 第1,048号	"	和田富美子	福岡	平 14. 6. 19	Polymorphism of CYP2C19 and gastric emptying in patients with gastric ulcers resistant to treatment with proton pump inhibitors (プロトンポンプ阻害剤抵抗性胃潰瘍患者の CYP2C19 遺伝子多型と胃排出能)	8
" 第1,049号	"	杉田 真一	長崎	平 14. 6. 19	Induction of Macrophage Inflammatory Protein -3 α gene expression by TNF -dependent NF - κ B activation (TNF 依存的 NF - κ B 活性化によるケモカイン MIP -3 α の発現誘導)	9
博士(医)乙 第1,645号	"	渡辺 淳一	長崎	平 14. 4. 30	All -trans Retinoic Acid Enhances Gap Junctional Intercellular Communication Among Renal Epithelial Cells In Vitro Treated with Renal Carcinogens 腎発癌物質で処理した腎尿細管細胞における All -trans レチノイン酸のギャップ結合増強効果に関する検討	11

長 崎 大 学 学 報

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1,646号	博士(医学)	大沢 一貴	長 野	平 14. 4. 30	Sequence and Genetic Arrangement of the U _s Region of the Monkey B Virus (Cercopithecine Herpesvirus 1) Genome and Comparison with the U _s Regions of Other Primate Herpesviruses B ウイルス U _s 領域の塩基・遺伝子配列の解析および他の霊長類ヘルペスウイルスとの比較検討	12
" 第1,647号	"	岩崎 一臣	長 崎	平 14. 4. 30	Human colon cancer produces a factor which induces the proliferation of venous endothelial cells (ヒト大腸癌は血管内皮細胞の増殖促進因子を産生する)	14
" 第1,648号	"	吉田真一郎	長 崎	平 14. 5. 31	De novo acute myeloid leukemia in the elderly; a consistent fraction of long-term survivors by standard -dose chemotherapy (高齢者における初発急性骨髄性白血病の臨床的解析；標準的化学療法による長期生存群の抽出)	15
" 第1,649号	"	渡邊 洋二	長 崎	平 14. 5. 31	Isolation of a Parainfluenza Virus Type 3-like Agent from Guinea Pigs モルモット由来パラインフルエンザ 3 型様ウイルスの分離	16
" 第1,650号	"	黒田 知子	東 京	平 14. 6. 30	The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men (Y 染色体上の AZFc 領域の palindrome 構造と男性不妊症におけるその画一的な欠失)	17
" 第1,651号	"	柴富 和貴	長 崎	平 14. 6. 30	A Novel Role for Interleukin -18 in Human Natural Killer Cell Death High Serum Levels and Low Natural Killer cell Numbers in Patients With Systemic Autoimmune Diseases ヒトのナチュラルキラー細胞死に対するインターロイキン-18の新たな役割 全身性自己免疫疾患患者の血清濃度上昇とナチュラルキラー細胞の減少)	19
" 第1,652号	"	山本 孝夫	長 崎	平 14. 6. 30	Anti -CD4 induced rat heart tolerance : no presence of primed T cells and regulatory mechanisms for cytotoxic T cells . (抗 CD4 モノクローナル抗体によるラット心移植片の生着：感作 T 細胞の不在と調節性機構)	20

長 崎 大 学 学 報

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1,653号	博士(医学)	松尾 圭	長 崎	平 14. 6. 30	Loss of Heterozygosity of Chromosome 16q in Gallbladder Carcinoma (胆嚢癌における16番染色体長腕欠失)	22
博士(歯)乙 第65号	博士(歯学)	田中 康弘	福 岡	平 14. 6. 19	透過型電子顕微鏡法による金属 陶材焼付界面 の原子構造観察とキャラクタリゼーション	23
〃 第66号	〃	釜崎 勢大	長 崎	平 14. 6. 19	Photodynamic Diagnosis of Squamous Cell Carcinoma in Mouse Tongue Using 5-amino - levulinic Acid (5 - アミノレブリン酸を用いたマウス舌扁平上 皮癌における光線力学的診断法) Fluorescence imaging of 5 - aminolevulinic acid -induced protoporphyrin IX in tissues and cells using confocal laser scanning microsc - opy (共焦点レーザー顕微鏡を用いた 5 - アミノレブ リン酸投与後のプロトポルフィリン IX の組織 , 細胞内蛍光像)	25

小野 剛 志

(大分県) 昭和45年8月16日生

授与年月日 平成14年4月3日

主 論 文 Stimulation of peripheral nociceptor endings by low dose morphine and its signaling mechanism

(低用量モルヒネの末梢侵害受容体刺激とそのメカニズム)

小野剛志, 井上 誠, Rashid M. II., 澄川耕二, 植田弘師

NEUROCHEMISTRY International

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

モルヒネは強力な抗侵害作用を示すが、同時に搔痒感をもたらすことが知られている。モルヒネの引き起こす搔痒感にはヒスタミン遊離によるものであるといわれているが、モルヒネによる搔痒感には抗ヒスタミン薬が効きにくく、また搔痒感によく拮抗するナロキソンはモルヒネの抗侵害作用を減弱させる。また、ナロキソンはモルヒネのヒスタミン遊離を抑えないことより、モルヒネによる搔痒感にはヒスタミンを介さない系が存在することが想像されるがこれまでその報告は無い。もしメカニズムが判明すればモルヒネの鎮痛効果を減弱させずに搔痒を抑制することが可能となり臨床的にも非常に有用であると考えられる。我々はマウスにおいて非常に低い用量のモルヒネ(0.1~1000amol)を足背部に投与することで、サブスタンスPの遊離を介した屈伸反応を起こすことを示し、このメカニズムとその意義について検討した。

対象と方法

雄性 ddY マウスを対象とした。左後肢以外の3肢を紐で固定し、残りの左後肢をトランスデューサーに接続し、左後肢足底部にソフトポリエチレンカニューラを留置した。カニューラの反対側には薬液で満たしたマイクロシリンジを接続し、カニューラを刺入するときの痛みを最大反応とし、それに対するモルヒネ反応の大きさをトランスデューサーにて記録した。用量曲線を得るためモルヒネを0.1, 1, 10, 100, 1000amolの範囲で5分間隔の投与を行い最大反応との比を計測、またモルヒネと同じミューオピオイドアゴニストのDAMGO においてもまた0.1, 1, 10, 100, 1000amolの範囲で5分間隔で投与し最大反応との比を計測した。モルヒネのコントロール反応(1 fmol)を2回記録し、試薬を注入した5分後、10分後、20分後、30分後のモルヒネ反応の変化を調べ試薬の効果を検討した。試薬はミューオピオイドレセプター拮抗薬のナロキソ

ンとCTOP, 抗ヒスタミン薬であるジフェンヒドラミン, Gi 蛋白を活性化させるPTX, フォスフォリパーゼCを抑制するU73122, カルシウムをキレートするEGTA, イノシトール3 燐酸受容体拮抗薬であるゼクストスポンジンC, C線維のサブスタンスPを枯渇させるカブサイシン, ニューロキニン1 受容体拮抗薬であるCP99994, 細胞内カルシウムを枯渇させるサブシガルジンを用いた。また試薬の効果をSaline と2つの用量間で% of control -AUC を用いて行った。また脊髓腔内にミューオピオイドレセプターのアンチセンスを投与し末梢神経におけるミューオピオイドレセプターの発現を抑制し反応の変化を検討した。

結 果

0.1から1000amol の間でモルヒネ反応は濃度依存的に増強した。また同様にミューオピオイドアゴニストのDAMGO においても0.01から1000amol の範囲で屈伸反応が濃度依存的に増強した。このモルヒネ反応はナロキソンとCTOP にて減弱したが、ジフェンヒドラミンには影響されなかった。またモルヒネ反応はPTX, U73122, EGTA, カブサイシン, CP99994 によって抑制されたが、サブシガルジンには影響されなかった。これら試薬の効果は全て用量依存的であった。また脊髓腔内にミューオピオイドレセプターのアンチセンスを投与し末梢神経におけるミューオピオイドレセプターの発現を抑制してもモルヒネ反応は抑えられた。

考 察

これらの結果より、このモルヒネ反応は、モルヒネが末梢神経のミューオピオイドレセプターに作用し、Gi 蛋白を介して、フォスフォリパーゼCを活性化し、イノシトール3 燐酸を産生させ、細胞外からのカルシウムの流入を引き起こし、カルシウムがサブスタンスPを神経細胞外に遊離させ、このサブスタンスPが再び末梢神経のニューロキニン1 受容体に作用することにより起きていると推測された。このモルヒネ反応と臨床的にモルヒネが引き起こす搔痒感との関係は分らないが今後更なる追試が必要と思われた。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

鎮痛効果を求めて使用されるモルヒネは、同時に搔痒感をもたらす。そこで、鎮痛効果を減弱させないで搔痒を抑制する方法や薬物開発のためにモルヒネの搔痒を引き起こすメカニズム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

マウスの後肢にモルヒネを投与することにより発現する後肢の動きを指標にして、種々の薬物の効果を判定する、薬理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

モルヒネの低用量はミューオピオイド受容体—Gi 蛋白質—ホスホリパーゼC—Ca 動員系を經由して放出させたサブスタンスPを介して、後肢の動きを引き起こすことを細胞内シグナル伝達系を基に明らかにしたもので、十分に評価できる。

以上のように、本論文は基礎研究によって、鎮痛薬の臨床応用に関して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 片 山 一 朗
副 査 教 授 丹 羽 正 美

杉 山 啓 一

(長崎県)昭和46年3月7日生

授与年月日 平成14年5月22日

主 論 文 Aurora -B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation

(Aurora -B は抑制因子である protein phosphatases によってカイネース活性を調節されている)

杉山啓一、杉浦一充、原 朋広、杉本憲治、島 礼、本多 桂、古川鋼一、山下俊一、浦野 健

Oucogeue 2002, May 9: 21(20) 3103-11

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

蛋白の可逆的なリン酸化は真核細胞の細胞周期の進行に重要な役割を担っている。すなわち、リン酸化脱リン酸化のメカニズムを解明することにより、正常細胞や癌細胞の細胞周期の機序の一端を解明することが可能であると推測される。ヒト セリン スレオニンカイネースである Aurora -B は、細胞分裂の調節因子である Ipl1p (酵母)や aurora (ショウジョウバエ)と、構造的に類似している。最近の研究で、Aurora -B は脱リン酸化酵素阻害剤であるオカダ酸により活性化され、1型プロテイン セリン スレオニン ホスファターゼ(PP1)やPP2と複合体を形成していることが明らかにされた。そこで、Aurora -B の調節機構を解明するためにこのプロテインホスファターゼに注目した。また、ヒストン H3 のリン酸化部位を基質に用いて、Aurora -B の特異的リン酸化アミノ酸配列の決定を試みた。その結果、Aurora -B が in vitro でヒストン H3 の10番目と28番目のセリンをリン酸化しうることから、

このカイネースは分裂期のヒストン H3 をリン酸化しうることが推測される。

材料と方法

- 1) プラスミド作成：Aurora -B ,Histone H3 .3 ,protein phosphatase の cDNA は大腸癌細胞株 DLD -1 の cDNA ライブラリーから RT -PCR を用いて作成した。また、これらの cDNA をヒトの発現ベクターである glu /PMT3 ,myc /pcDNA3 ,GST /4T -2 に挿入してプラスミドを作成した。
- 2) 大腸菌による蛋白の作成：GST 融合蛋白は BL21 を用いて作成し、GST ピーズで精製した。また、N 端に His -tag のついた蛋白は M15 を用いて作成し、ニッケルビーズで精製した。
- 3) 遺伝子導入による強発現：10%FBS /DMEM で維持した COS -7 細胞に、DEAE -Dextran 法を用いて各種 cDNA を強発現させた。
- 4) 細胞の融解、免疫沈降：各発現ベクターを導入した細胞は RIPA バッファーで融解した後、抗 Aurora -B 抗体と結合した protein G ビーズで免疫沈降させた。
- 5) In vitro キナーゼアッセイ：適当な基質と各酵素を混合し、[γ -³²P]ATP を加えて反応させることにより、各酵素のリン酸化能を調べた。検出は Mac BAS -1500 imazing analyzer を用いた。
- 6) 脱リン酸化処理：glu -tag のついた Aurora -B を強発現させた COS 細胞に0.4 μ M オカダ酸を30分加え、その後細胞を RIPA バッファーで融解した。この融解液を用いて、5)と同じようにキナーゼアッセイを行った。

結 果

- 1) 脱リン酸化酵素阻害剤であるオカダ酸により Aurora -B は活性化された。
- 2) Aurora -B は脱リン酸化酵素のうち PP1 ,PP2 と結合したが、PP5 とは結合しなかった。
- 3) Aurora -B は Histone H3 の8番目のアルギニンを認識することにより10番目のセリンをリン酸化する。
- 4) Histone H3 の28番目のセリンは vitro でAurora -B によってリン酸化される。

考 察

Aurora -B は酵母、ショウジョウバエにおいて同定された染色体分離に関与する重要なセリン スレオニンカイネースのヒト相同体であり、G2 /M 期にのみ mRNA および蛋白の特異的発現を認める。また、Centromere protein A (CENP -A) をリン酸化することにより、正常な細胞分裂を可能にしている。今回我々は、この Aurora -B が PP1 ,PP2 と結合し、オカダ酸によって活性化されることを明らかにした。他にも

Nek2 -PP1 , IV -PP2 など, カイネース-ホスファターゼ複合体は数種の報告がなされており, これらの複合体は, その構造から生体内で特定の基質に対して精緻なリン酸化-脱リン酸化を行いうると推測された。

ヒト Aurora -B はM期において, 中期まではセントロメアに局在するが, 後期には微小管の中間帯に移行し, 最終的に後期~分裂期には紡錘体に集積する。今回我々は三種類の PP1c が Aurora -B と結合することを明らかにしたが, このうち PP1 δは分裂期に染色体に存在することから, 生体内で Aurora -B と結合していると考えられる。PP1 は Cdk1 や Nek2 のC端のセリン スレオニンを脱リン酸化することにより, 細胞周期を調節している。また PP2A も細胞周期に関与する数種のカイネースを脱リン酸化することにより, 細胞周期の進行を調節している。Aurora -B とPPs との詳細な関係は未だ不明であり, さらなる解析が必要である。

Histone H3 をモデル基質として行った変異導入解析により, Aurora -B はアルギニン依存性カイネースであることが明らかになった。このリン酸化モチーフはサイクリック AMP 依存性カイネース(cAPK)と類似している。これを裏付けるように, Aurora -B はカイネースドメインに cAPK と同様の構造を持っている。また, Aurora -B のファミリーである Aurora -A は各種癌細胞で高頻度に遺伝子の増幅と蛋白発現量の増加を認め, 細胞に強発現させることにより形質転換を誘導するという報告もある。以上から Aurora -B のリン酸化配列が決定されたことにより, 今後細胞周期を制御する新しい分子機構や癌化に至る機序の一端が解明されると期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は正常細胞や癌細胞の細胞周期の機序の一端を解明するために, ヒトセリン スレオニンカイネースである Aurora -B の発現調節機構を解明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

Aurora -B , Histone H3.3 , protein phosphatase の cDNA を発現ベクターである glu /PMT3 , myc /pcDNA3 , GST /4T -2 に挿入して, 各プラスミドを作成した。COS -7 細胞に, DEAE -Dextran 法を用いて各種の cDNA を強発現させ, オカダ酸で刺激し, 細胞融解してキナーゼアッセイを行って検討した。これらの研究手法は妥当なものである。

3. 解析・考察の評価

Histone H3 をモデル基質として行った変異導入解析より, Aurora -B は, アルギニン依存性カイネースであることを明らかにした。また, Aurora -B は脱リン酸

化酵素のうち, PP1 , PP2A と結合し, オカダ酸によって活性化されることを明らかにした。

以上のように, 本論文は細胞周期を制御する Aurora -B の分子機構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	江口勝美
	副査	教授	松山俊文
	副査	教授	兼松隆之

黒田 宏 昭

(長崎県)昭和42年12月15日生

授与年月日 平成14年6月19日

主論文 Distinctive Gene Expression of Receptor -Type Tyrosine Kinase Families during Rat Hepatocarcinogenesis
(ラット化学肝発癌過程における特異的な受容体型チロシンキナーゼの発現)
黒田宏昭, 大津留晶, 二口 充, 川下雄丈, 永山雄二, 福田英一郎, 難波裕幸, 白井智之, 兼松隆之, 山下俊一
International Journal of Molecular Medicine , 9: 473 -480 2002
長崎大学医学部第二外科教室
(主任: 兼松隆之教授)

論文内容の要旨

緒 言

チロシンキナーゼ蛋白は細胞の増殖, 分化について重要な役割を持っており, 受容体型と非受容体型に分類される。正常肝細胞分裂速度はきわめて遅いが, 様々な分裂刺激に反応し, 急速に複製を始める高い増殖ポテンシャルを有する特性がある。増殖因子とその受容体シグナルはその肝再生の細胞周期の制御に関係している。さらに, 肝特異的プロモーターを用いた HGF と TGF αトランスジェニックマウスでは肝癌の発生を認める。これは, 受容体型チロシンキナーゼシグナルが, 肝発癌にも関与していることを示唆する。そこで, 肝発癌への受容体型チロシンキナーゼの関与に注目し, ラットの化学発癌肝癌と正常肝における, 受容体チロシンキナーゼの発現プロファイルを, degenetated RT -PCR 法にて比較した。そしてそれらの発現量, 局在を経時的に見ることにより, 肝癌の発生や進展への関与を検討した。

材料と方法

1) 正常肝, 肝癌組織: F344 ラットに化学発癌剤 diethylnitrosamine (DEN) を8週間経口投与し作製。

細胞: FAA -HTC -1(化学発癌ラット肝癌細胞株)

- 2) 肝癌部と正常肝より RNA を抽出。受容体型チロシンキナーゼ遺伝子の共通配列のうち、キナーゼドメインからデザインした degenerated プライマーを用い、RT-PCR 法を用いサブクローニング。
- 3) シークエンスにより約200bp の部分塩基配列を決定し、ホモロジー検索。
- 4) 得られた受容体型チロシンキナーゼ遺伝子の肝癌と正常肝との発現量の差を、RT-PCR、ノーザンブロットングで検討し、更にその局在を免疫染色、in situ ハイブリダイゼーションにて比較した。

結 果

- 1) RT-PCR 産物のサブクローンシークエンスで得られた459個の遺伝子配列より、ホモロジー検索から既知の23種類の受容体型チロシンキナーゼを同定した。
- 2) そのうち血管新生に関係する Tie-2 (angiopoietin 受容体)、Flk-1 (VEGF 受容体) や、肝細胞の増殖分化に関与する c-Met (HGF 受容体) などが肝癌において優位であった。
- 3) RT-PCR にて肝癌細胞株 FAA-HTC-1 では、c-Met、VEGF、Flk-1、angiopoietin-1、Tie-2 の発現を認めたが、HGF と angiopoietin-2 の発現は認めなかった。VEGF と angiopoietin-1 発現は正常肝と肝癌組織では差を認めなかった。angiopoietin-2 は肝癌組織では認めたが、正常肝組織では認めなかった。
- 4) c-Met は、ノーザンブロットングにて癌部で有意な発現増加を認めた。
- 5) in situ ハイブリダイゼーションでは正常より前癌病変で c-Met と Flk-1 の発現が増加していた。免疫染色にて、Tie-2 は oval 細胞、胆管上皮細胞及び肝癌細胞にも認めた。

考 察

本研究成果から、受容体型チロシンキナーゼの中で、c-Met、Flk-1、Tie-2 が肝癌で最も多く見られ、c-Met と Flk-1 遺伝子の過剰発現が肝癌だけでなく前癌病変でも確認された。対照的に、Tie-2 は内皮細胞だけでなく oval 細胞に発現増加しており、それに比べて肝癌では比較的弱く発現した。

c-Met は HGF 受容体であり、正常肝および肝癌細胞にて HGF の発現は報告されておらず、この因子は肝非実質細胞を介するパラクライン機構により作用していることが示唆されている。我々のデータでは c-Met が肝癌だけでなく前癌病変で過剰発現していた。低用量 DEN で処置した HGF トランスジェニックマウスでは DEN 非処置群と比較し、c-Met の発現増加と HCC 進展の促進を示すことも報告されており、c-Met は肝発癌での早期に重要な役割を果たしている

と考えられる。

VEGF 受容体である Flk-1 は主に毛細血管内皮に発現し、腫瘍血管新生に関与している。この研究では、Flk-1 は肝発癌早期の前癌病変の肝細胞に認められた。サザンブロットングでは遺伝子増殖や再配列は見られなかったが、我々は DEN 誘導 F344 ラット肝癌由来の細胞株より Flk-1 を検出した。Flk-1 の発現はいくつかの癌で報告されており、VEGF が腫瘍血管新生だけでなくオートクライン的に腫瘍進展を促進する可能性が示唆された。

血管内皮特異的な Tie-2 は胎児期血管の発達に関わっている。この研究では、Tie-2 が内皮細胞だけでなく肝細胞の幹細胞と考えられている oval 細胞、胆管上皮細胞及び肝癌細胞に認められた。この oval 細胞は前癌病変マーカー GST-P も発現しており、oval 細胞が肝発癌に関与していることが示唆された。

我々のデータは、c-Met と Tie-2 の肝多段階発癌早期への関連と、VEGF/Flk-1 がオートクライン機構により癌細胞の増殖に有利に働く可能性を示した。さらに、今後肝特異的なプロモーターを使ったトランスジェニック動物モデルによる解析等により、肝細胞の前癌病変や癌細胞への形質転換に、Tie-2/angiopoietin や Flk-1/VEGF 系がどう関わるかの解明が期待される。また、それから将来の肝癌分子標的治療における標的分子候補であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

学位論文題名

Distinctive Gene Expression of Receptor-Type Tyrosine Kinase Families during Rat Hepatocarcinogenesis (International Journal of Molecular Medicine, 9: 473-480 2002)

1. 研究目的の評価

肝発癌への受容体型チロシンキナーゼの関与に注目し、ラットの化学発癌肝癌における、受容体型チロシンキナーゼの発現を正常肝と比較し、それらの発現量、局在の経時的観察により、肝癌の発生・進展への関与を検討するとした、研究目的は明確である。

2. 研究手段に関する評価

RT-PCR、ホモロジー検索からの受容体型チロシンキナーゼの同定、その中から、Tie-2、Flk-1、c-Met の選択、それらの肝癌細胞株、肝癌組織における発現の検討、さらにノーザンブロットング、ISH を用いての検討とその研究手段は妥当であった。

3. 結果・考察の評価

受容体型チロシンキナーゼの中で、Tie-2、Flk-1、c-Met が最も発現することを明らかにし、c-Met と Tie-2 が肝多段階発癌早期に関与していること、VEGF/Flk-1 がオートクライン的に癌細胞の増殖に

関与している可能性を示唆し、肝癌の発生・進展過程解明に寄与したと高く評価した。

本論文は、ラットの化学発癌肝癌における、受容体型チロシンキナーゼの関与について示唆に富む検討を行っている。化学発癌肝癌の研究の発展に大いに貢献したと評価できる。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 江口 勝美
副査 教授 綾部 公懿

和田 富美子

(福岡県)昭和38年9月28日生

授与年月日 平成14年6月19日

主論文 Polymorphism of CYP2C19 and gastric emptying in patients with gastric ulcers resistant to treatment with proton pump inhibitors

(プロトンポンプ阻害剤抵抗性胃潰瘍患者のCYP2C19遺伝子多型と胃排出能)

Fumiko Wada, Kunihiro Murase, Hajime Isomoto, Hiroshi Soda, Fuminao Takeshima, Katsuhisa Omagari, Yohei Mizuta, Kazuhiro Tsukamoto, Ikuo Murata, Shigeru Kohno

The Journal of INTERNATIONAL MEDICAL RESEARCH (in press)

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

プロトンポンプ阻害剤(PPI)は強力な胃酸分泌抑制作用を有し、この薬剤の登場により胃潰瘍の治癒率は向上した。しかしPPIでは治らないPPI抵抗性潰瘍が5~10%存在し、その主な病態は不十分な酸分泌抑制にあると言われている。即ちPPIの血中濃度上昇が不十分であることが推察される。その機序として腸溶剤であるPPIが胃酸に長く曝され吸収が低下することや、遺伝子多型性を有するCYP2C19により主に代謝されるため酵素活性の違いによる血中濃度の差が生じる事等が考えられる。この遺伝的違いは日本人ではexon5(CYP2C19m1)およびexon4(CYP2C19m2)の点突然変異の組み合わせで十分説明可能であり、poor metabolizer(PM)のPPI血中濃度はextensive metabolizer(EM)より高いと報告されている。そこで本研究ではPPI抵抗性胃潰瘍におけるPPI血中濃度上昇に関わる薬物代謝酵素と胃排出能に注目し難治性胃潰瘍患者(PPI-R)、易治性胃潰瘍患者(PPI-

S)、正常コントロール(control)の3群間でCYP2C19遺伝子多型性と¹³C-acetate呼吸試験による胃排出能を検討した。さらに難治性胃潰瘍患者についてはヘリコバクター・ピロリ(H. pylori)感染、喫煙、非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAIDs)服用の有無についても調査した。

対象と方法

対象:長崎大学医学部第二内科及びその関連施設で胃内視鏡検査を施行した難治性胃潰瘍患者7例、易治性胃潰瘍患者21例、潰瘍を認めない正常コントロール46例の合計74例で、難治性胃潰瘍はPPI 8週間投与しても癒痕に到らない潰瘍とした。

方法:CYP2C19遺伝子多型は末消血より採取したリンパ球よりDNAエキストラクターWBキット(和光純薬)でDNAを抽出しPCR-RFLP法でCYP2C19の野生株(wt)および2種類の突然変異株(m1:exon5, m2:exon4)の判定を行った。制限酵素はexon4:BamH I(宝酒造), exon5:SmaI(宝酒造)を用いた。表現型と遺伝子型の関係は下記の如くである。

poor metabolizer (PM): m1/m1, m2/m2, m1/m2
homozygous extensive metabolizer (hom EM): wt/wt
heterozygous extensive metabolizer (het EM): wt/m1, wt/m2

胃排出能は遺伝子型を調べ得た難治性胃潰瘍5例、易治性胃潰瘍5例、正常コントロール5例に¹³C-acetate呼吸試験で評価した。どの潰瘍もPPI投与8週以降に、胃腸の運動に関する薬は中止した状態で行った。早朝空腹時に¹³C-acetate 100mg(CIL Japan)を液体試験食OKUNOS-A 200mL(ホリカフーズ)に混じ服用しその後10分毎に120分まで呼吸を採取した。服用前の呼吸も採取しておき服用前と各服用後の呼吸中¹³CO₂濃度差を赤外分光分析器(UBIT-IR200, 大塚電子)で測定した。試験食負荷後の呼吸中¹³CO₂濃度のピーク時間で胃排出能を評価した。H. pylori感染の有無は抗H. pylori IgG抗体や生検組織のギムザ染色、ラピッドウレアーゼテストで確認し、喫煙やNSAIDs内服の有無は問診で確認した。

結果

難治性胃潰瘍患者7人のうち4人がH. pylori陽性で4名が喫煙者、1人がNSAIDs内服者であった。

各群のCYP2C19遺伝子型は下表の通りであった。

	PPI-R	PPI-S	control
homEM	2(28.6%)	5(23.8%)	19(41.3%)
hetEM	2(28.6%)	14(66.7%)	21(45.7%)
PM	3(42.8%)	2(9.5%)	6(13.0%)

3群間でPMの割合に有意な差はなかった。

各群の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 濃度の平均ピーク時間(分)は下表の通りであった。

	PPI -R	PPI -S	control
ピーク時間 mean $\pm$ SD (分)	82.0 $\pm$ 24.9	50.0 $\pm$ 7.1	58.0 $\pm$ 4.5

PPI -R のピーク時間は PPI -S や control 群のピーク時間に比べ有意に遅かった。

考 察

PPI の血中濃度が上昇せず酸分泌の抑制が不十分になることが胃潰瘍の難治化の原因ではないかと仮定し PPI の血中濃度に関係する代謝酵素と胃排出能について検討した。PPI の薬物代謝酵素は主に CYP2C19 でこの酵素には遺伝的多型が存在する。日本人の CYP2C19 遺伝子多型性は exon5 (CYP2C19m1) 及び exon4 (CYP2C19m2) の点突然変異の組み合わせで決定でき、PM は EM に比べ PPI 血中濃度が高いといわれている。しかし本研究では難治性胃潰瘍群で PM の割合が高い傾向にあるものの3群間での有意差は見出されなかった。 $(p > 0.05, \chi^2$ 検定)。

PPI は腸溶剤であるため胃排出能が低下すると酸に曝露されて吸収が低下し、PPI の血中濃度が上昇せず、酸分泌の抑制が不十分になると考えられている。 ^{13}C -acetate 呼気試験は胃では吸収されず小腸に排出されてから吸収される acetate (酢酸)を利用した胃排出能評価法である。今回の結果では、難治性胃潰瘍群は他の2群に比べ有意にピーク時間が遅く $(p < 0.05, \text{Dunnett and Tukey test})$ 、胃排出能の低下を認めた。難治性胃潰瘍の成因は様々で、H. pylori 感染や喫煙、NSAIDs 内服などもその一つと言われている。しかし本調査の難治性胃潰瘍症例では喫煙、NSAIDs 内服の頻度は多くなかった。

以上の結果より潰瘍の治癒を遅らせる要因の一つとして胃排出能の低下が重要であると思われる。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究はプロトンポンプ阻害薬で治らないプロトンポンプ阻害薬抵抗性胃潰瘍の原因として本薬の血中濃度に着目して、薬物代謝酵素の遺伝子多型性と胃排出能の面から検討することを目的にしたもので、十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

長崎大学倫理委員会の承認のもとに、難治性と易治性の潰瘍患者および正常人を対象に CYP2C19 遺伝子多型と ^{13}C -acetate 呼気試験による胃排出能を解析、比較したことで、研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

研究結果から、潰瘍の治癒を遅らせる要因の一つと

して CYP2C19 遺伝子多型性よりは胃排出能の低下をあげている。それは胃排出能の低下によりプロトンポンプ阻害薬が酸に曝されて体内への吸収が低下するために本薬の血中濃度が上昇しないものと分析し、高く評価できる。

以上のように本論文は臨床研究により薬物治療法の更なる改善を提示したもので、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	谷 山 紘太郎
	副 査	教 授	朝 長 万左男
	副 査	教 授	佐々木 均

杉 田 真 一

(長崎県)昭和46年3月18日生

授与年月日 平成14年6月19日

主 論 文 Induction of Macrophage Inflammatory Protein - 3α gene expression by TNF -dependent NF - κ B activation (TNF 依存的 NF - κ B 活性化によるケモカイン MIP - 3α の発現誘導)
杉田真一、河野友子、山本一男、今泉芳孝、中島久良、石丸忠之、松山俊文
The Journal of Immunology , in press 2002
長崎大学医学部産婦人科教室
(主任：石丸忠之教授)

論文内容の要旨

緒 言

NF - κ B は、様々な遺伝子の発現誘導を介して、生体の炎症反応や免疫応答、細胞の増殖、接着、アポトーシスなど様々な生物学的反応において重要な役割をもつ。現在までに NF - κ B によって直接転写制御される多くの遺伝子が報告されているが、未だその発現において NF - κ B との関連が明らかでない重要遺伝子も多数あるものと推測される。そこで今回 subtractive hybridization 法を用い、NF - κ B によって転写制御される新規遺伝子の同定を試み、その結果得られた遺伝子のひとつ、ケモカイン MIP - 3α の発現に関して、その転写制御における NF - κ B の役割を in vitro と in vivo において検討した。

材料と方法と結果

- 1) NF - κ B 活性が抑制された細胞株を樹立する目的で、子宮頸癌由来培養細胞株 HeLa 細胞に I κ B α スーパーリプレッサー(I κ B α SR)の発現ベクターを導入し、I κ B α SR を恒常的に発現するものを薬剤により選択した。
- 2) NF - κ B を恒常的に活性化した細胞株をうるため

に HeLa 細胞に NF- κ B のサブユニットである p65 発現ベクターを導入して強制発現させた。

3) 1) と 2) の細胞から抽出した mRNA を用いて, cDNA subtractive hybridization によるクローニングにより, NF- κ B 活性化系だけに発現を認める 17個の遺伝子を同定した。そのうちの一つは CC ケモカイン MIP-3 α であった。MIP-3 α の発現誘導が NF- κ B 依存性であることはノーザンブロットで確認された。

4) MIP-3 α の転写制御機構を明らかにするためにヒト 2 番染色体上に存在する MIP-3 α の 5' 上流側の発現制御領域を単離しレポーターベクターに組み込んだ。さらに NF- κ B 結合候補領域に変異を挿入したレポーターも作成し TNF 刺激による機能解析を行った。その結果, TNF への応答性を担う領域は -82/-91 領域にあることが明らかとなった。

5) -82/-91 領域が実際に NF- κ B と結合することは TNF 刺激もしくは未刺激の HeLa 細胞より抽出した核タンパクでゲルシフトアッセイを行うことで確認された。

6) *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) で前処理したマウスに Lipopolysaccharide (LPS) を投与する肝障害モデルを正常マウスおよび TNF レセプター 1 (TNFR1) 欠損マウスに適用して, 肝における MIP-3 α の発現をノーザンブロットで検討した。その結果, 正常マウスでは MIP-3 α の顕著な発現誘導が惹起されるが TNFR1 欠損マウスでは全くおこらないことが明らかになった。また, MIP-3 α の発現誘導は NF- κ B の特異的 inhibitor である gliotoxin 投与によって抑制された。

7) マウス肝における NF- κ B 活性をゲルシフトアッセイで検討したところ, *P. aeruginosa* LPS 処理により正常マウス肝では NF- κ B 活性が誘導されるものの, gliotoxin を投与したマウスや TNFR1 欠損マウスでは誘導されないことが確認された。

考 察

この研究によりケモカイン MIP-3 α の発現は転写因子 NF- κ B により直接制御されることが *in vitro*, *in vivo* の両方から証明された。ヒト MIP-3 α プロモーター領域解析から, 転写開始点上流 -82/-91 にある NF- κ B 結合配列が MIP-3 α 遺伝子の発現誘導に責任をもつ領域であると考えられた。*P. acnes* で前処理したマウスに LPS を投与すると, TNF をはじめとする様々なサイトカインの産生と炎症細胞の浸潤を伴う広範な肝障害が引き起こされヒト劇症肝炎に類似する病理像をとることが知られているが, この際, 肝においては MIP-3 α が誘導されることが明らかとなった。加えてこの MIP-3 α の発現誘導には TNFR1 から

NF- κ B 活性化にいたる TNF のシグナル伝達経路が必要不可欠な役割を担うと考えられた。ケモカイン MIP-3 α は, ある種の幼若な樹状細胞や T 細胞に対して遊走能をもち, 生体の免疫反応の開始に重要な役割を持つと考えられているが, 今回の研究は, TNF の様々な生物学的な作用のうちの一部は, NF- κ B 活性化を介し発現した MIP-3 α によって行われる可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

1 研究目的の評価

本研究では, 様々な生物反応に重要な役割をもつ転写因子 NF- κ B に直接制御される新たな重要遺伝子を明らかにする目的で遺伝子の探索を行った。さらに, その中で得られた遺伝子のひとつ, ケモカイン MIP-3 α の発現制御について解析したもので, 目的は明瞭である。

2 研究手法に関する評価

NF- κ B を恒常的に活性化した細胞株と, その活性を抑制された細胞株とを作成し, 両者の mRNA を用いてサブトラクション法を行うことにより NF- κ B に制御される多くの新規遺伝子をクローニングした。高度な実験技術をもって膨大な量の仕事を正確に行っている。MIP-3 α の発現制御の解析についても *in vivo* と *in vitro* で緻密な実験がなされており, 高く評価できる。

3 解析・考察の評価

ケモカイン MIP-3 α の発現が, 転写因子 NF- κ B に制御されることを明確に証明した。さらに, 肝障害実験モデルを用いて TNF の発現, NF- κ B の活性化, MIP-3 α の発現に至る経路を示し, 炎症とそれに伴うケモカイン産生における NF- κ B の役割を明らかにした点, 高く評価できる。また, NF- κ B により制御される多くの遺伝子群を明らかにしており, 今後のさらなる発展が大いに期待できる。

以上のように, 本論文は炎症における転写因子 NF- κ B の役割についてその一端を明らかにし, 生体防御機構の解明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	由井克之
	副査	教授	片峰茂
	副査	教授	近藤宇史

渡 辺 淳 一

(長崎県) 昭和40年10月30日生

授与年月日 平成14年 4月30日

主 論 文 All -trans Retinoic Acid Enhances Gap Junctional Intercellular Communication Among Renal Epithelial Cells In Vitro Treated with Renal Carcinogens
腎発癌物質で処理した腎尿管細胞における All -trans レチノイン酸のギャップ結合増強効果に関する検討

渡辺淳一, 野俣浩一郎, 野口 満, 佐藤秀佑, 神田 滋, 金武 洋, 斉藤 泰
European Journal of Cancer ・35巻 6号
1003—1008 1999年

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

ギャップ結合は隣り合った細胞が形成する半チャンネル, すなわちコネクソンが一列に並んでできる細胞間チャンネルであり, 分子量約 1 kD までの物質を細胞から細胞へ移行する機能を持つ。コネクソンは, コネキシン(Cx)の集合体であり, Cx43 は人腎尿管細胞の主たるコネキシンである。ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーション(GJIC)は, 特に細胞間シグナル伝達物質を交換する役目を持っており, 細胞構築の維持や細胞の分化・増殖の調節といった多細胞生物のホメオスタシス維持に役立っていると考えられる。多くの発癌プロモーターがギャップ結合を切断することから, GJIC 制御異常が発癌過程におけるメカニズムのひとつと考えられている。この GJIC を細胞によっては増強すると言われているのが, レチノイン酸やβ-カロチンといった発癌予防物質であるが, 腎尿管細胞での効果は不明である。腎尿管細胞より発生する腎細胞癌の治療は外科的切除が主体であり, 転移を有する進行癌への有効な治療は無い。近年, 進行腎細胞癌に対するレチノイン酸と IFN 併用の臨床研究が始まっており有効性も報告されている。腎発癌におけるレチノイン酸の及ぼす影響についての分子生物学的なメカニズムは不明の部分が多く, 我々は腎発癌物質を暴露した腎尿管細胞である MDCK 細胞のギャップ結合へのレチノイン酸の影響を検討した。

方 法

[使用薬剤]

発癌物質として 12-O-tetradecanoyl -phorbol -13-acetate (TPA), Dimethylnitrosamine (DMN), potassium bromate (KBrO₃) を使用した。

[ATRA の MDCK 細胞増殖に及ぼす影響]

1 × 10⁴個の MDCK 細胞を培地にまき, 1 日後に 10⁻⁴M ~ 10⁻¹⁰M の ATRA を加えた新鮮な培養液へ交換し, 3 日後の細胞数を計測した。

[腎発癌物質の暴露方法]

1 × 10³ / cm² の MDCK 細胞を培地にまき 1 日後に, 0.1%DMSO (control) または 10⁻⁶M ATRA を加えた培養液へ交換し 3 日間培養した後, 1.6 μM TPA, 1 % DMN, 5 mM KBrO₃ をそれぞれ 15 分間暴露した。

[GJIC assay]

Scrape loading dye transfer 法にて Lucifer Yellow の細胞から細胞への拡がりを蛍光顕微鏡にて観察した。

[免疫染色]

一次抗体: 100 倍希釈の抗マウス Cx43 モノクローナル抗体を 60 分, 二次抗体: 500 倍希釈ビオチン-抗マウス IgG 抗体, FITC -ストレプトアビチンを反応させ蛍光顕微鏡にて観察した。

[Western blotting]

total cell lysate 10 μg を電気泳動後, PVDF 膜へ転写した。2500 倍ウサギ抗 Cx43 ポリクローナル抗体を反応させた後, ペルオキシダーゼ抗ウサギ IgG 抗体を反応させ, ECL キットにて泳動バンドを観察した。

[Northern blotting]

20 μg の total RNA を電気泳動し Hybond -N + ナイロン膜に転写後, digoxigenin -H -dUTP にてラベルした 1.4kb の人 Cx43 cDNA プローブとハイブリダイゼーションし, 抗 digoxigenin ALP と Lumi -Phos 530 を用い X 線フィルムへ露光した。

結 果

[ATRA の MDCK 細胞増殖に及ぼす影響]

10⁻⁴M ATRA において増殖抑制を認めたが 10⁻⁵M ~ 10⁻¹⁰M では増殖に影響を与えなかった。

[GJIC assay]

コントロールと 10⁻⁶M ATRA では, 細胞につけた傷より 5 層以上に色素の拡がりを認めた。発癌物質を暴露した細胞では色素の拡がりは 3 層未満に抑制されていたが, ATRA 前処置にて GJIC 機能の抑制が防御されていた。

[免疫染色]

コントロールと ATRA 処理のみの細胞では細胞膜に Cx43 の染色部位を認めた。発癌物質暴露群では細胞膜の染色斑は消失し細胞質部にいくらかの染色斑を認めたが, ATRA 前処置にて細胞膜の染色斑の消失が抑制されていた。

[Western blotting]

コントロールでは 43, 45, 47kD の三層の泳動バンドを認め, ATRA 処理にてその発現が増強していた。

TPA 暴露では過剰リン酸化が,DMN 暴露では脱リン酸化が,KBrO₃暴露ではリン酸化に変化は無かった。ATRA 前処置にてそれぞれの泳動バンドのシフトは認めず発現量の増加をみた。

[Northern blotting]

コントロールも発癌物質暴露群も3.1kb のバンドが露光され,Cx43mRNA の発現に差は認められなかったが,ATRA 前処置にてその発現が増強されていた。

考察

腎尿細管細胞において,TPA はCx43 蛋白の過剰リン酸化で,DMN は脱リン酸化で,KBrO₃は蛋白のリン酸化以外の何らかのメカニズムで,細胞膜から細胞質内へCx43 蛋白の局在を変化させ,GJIC を切断していた。ATRA はそのすべてにおいてGJIC 切断を防御しており,GJIC を制御する幅広い活性を持つと言える。これは,Cx43mRNA の転写レベルを増加させ,細胞膜に存在する正常Cx43 蛋白の発現を活性化してだけでなく,あるいはCx43 蛋白の局在を正常化する作用を合わせ持つのかかもしれない。ヒト腎癌細胞株ではCx43 蛋白の細胞質内への局在変化によってGJIC が切断されており,ATRA が腎細胞癌への発癌予防効果を持つ可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

腎尿細管細胞発がんにおけるギャップ結合の役割を,発がんプロモーターの影響とそれに対するレチノイン酸の抑制効果の観点から明らかにしようとしたものであり,目的は妥当である。

2. 研究手法に関する評価

当該研究室で開発され蓄積・改良されてきた技法であるギャップ結合機能試験とギャップ結合構成蛋白コネキシンの免疫学的検出を組み合わせる研究目的を達成したものであり,評価できる。とくにウエスタンブロットによるリン酸化コネキシンの描出はきわめて明瞭で,技法的に傑出している。

3. 解析・考察の評価

3種の異なる発がんプロモーターにより腎尿細管細胞ギャップ結合機能が障害され,その障害がレチノイン酸により回復すること,この過程にはコネキシンのリン酸化より細胞膜局在が重要な意味を持つことを初めて示した。レチノイン酸の臨床応用にまで言及した考察も評価できる。

以上,本論文は腎発がん研究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 朝 長 万左男
副査 教授 兼 松 隆 之

大 沢 一 貴

(長野県)昭和37年1月11日生

授与年月日 平成14年4月30日

主 論 文 Sequence and Genetic Arrangement of the U_s Region of the Monkey B Virus (Cercopithecine Herpesvirus 1) Genome and Comparison with the U_s Regions of Other Primate Herpesviruses
B ウイルス U_s領域の塩基・遺伝子配列の解析および他の霊長類ヘルペスウイルスとの比較検討

Kazutaka Ohsawa, Black H. Darla, Hiroshi Sato, and Richard Eberle. Journal of Virology 76(3), 1516-1520 (2002)

長崎大学医学部附属動物実験施設

(主任:佐藤 浩教授)

論文内容の要旨

緒 言

ヘルペスBウイルス(BV, Cercopithecine herpesvirus 1)は,アルファヘルペスウイルス亜科に属し,アカゲザルやニホンザルなどのマカカ属サルに固有のウイルスである。ヒトの単純ヘルペスウイルスに類似し,マカクの30-90%の個体で抗体陽性との報告が多い。ヒトがこのウイルスに感染すると重症化し,致死率も高いとされている。

このウイルスのゲノム解析は,ウイルスがバイオセーフティレベル4の病原体であることおよびGC%が70%以上と高いことなどから体系的に進んでおらず,US4~6(gG, gJ, gD)やUL27(gB), UL44(gC)などの抗原性をもつと期待される領域について偏向して研究が進められている。本論文では,BVrh E2490株のU_s領域のほぼ全塩基配列(14,447bp)を決定し,近縁の霊長類由来のヘルペスウイルスと比較検討した。

材料と方法

BVrh E2490株をVero細胞に感染させ,36~48時間後に感染細胞を回収し,ゲノムDNAを調整した。制限酵素Kpn, Pvu II, Hinc IIを用いてゲノムを切断し,pUC19ないし平滑末端用のクローニングベクター(pCR-Blunt TOPO)を用いて計6クローンを得た。3個所のギャップをPCRで埋めることで,US12の10数塩基を残してU_s領域の全塩基配列を決定した(DDBJ/EMBL/GenBank accession #: AB074432)。

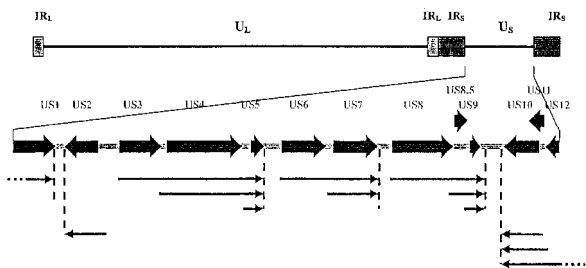


図 1 . BVRh E2490 株 U_s領域の遺伝子配置

表 1 . BVRh E2490株 U_s領域の ORFs

ORF	BVRhE2490 AASize	MW	FunctionoftheEncodedProtein	% Identity /% SimilarityofBVProteins withHomologousProteinsof		
				HSV1	HSV2	SA8 ²
US1	373	40,700	Immediate -EarlyProteinCP22	32/42(420)	34/45(413)	NA
US2	302	32,900	Unknown	52/58(291)	48/57(281)	NA
US3	379	41,600	Serine /ThreonineProteinKinase	51/59(481)	52/59(481)	83/86(377)
US4	673	67,900	GlycoproteinG	9/12(238)	34/44(689)	53/61(602)
US5	121	12,100	GlycoproteinJ	26/36(92)	18/30(92)	51/58(106)
US6	395	42,600	GlycoproteinD	56/67(394)	55/68(393)	80/84(395)
US7	401	42,000	GlycoproteinI	43/51(390)	46/54(372)	66/69(399)
US8	539	58,000	GlycoproteinE	44/55(550)	44/55(545)	72/78(540)
US8.5	122	12,600	Unknown	28/40(159)	31/43(146)	60/61(102)
US9	90	9,900	EnvelopePhosphoprotein	57/69(90)	57/69(89)	75/84(91)
US10	311	34,000	TegumentProtein	36/46(312)	42/50(302)	84/91(93) ³
US11	145	16,300	RNABindingProtein	41/45(161)	38/40(151)	NA
US12	>78	—	Immediate -EarlyProteinCP47	21/33(88)	20/30(86)	NA

1) Values are percentages of amino acid identity and similarity in pairwise alignment with BV homologus .
2) NA , sequence not available .
3) Only partial sequence available .

結果と考察

BVRh E2490 株の U_s領域の塩基数 (14,447bp) は , HSV1 (12,980b) よりやや長く , HSV2 (14,329b) とほぼ同じ結果となった。GC % は 73.2% と予想どおり高かった。第 3 コドンの GC バイアスなどは , HSV よりは強く , SA8 (アフリカミドリザルより分離のアルファヘルペスウイルス) よりはやや低かった。ポリ (A) などの各種シグナルから推測される ORF は , US1 ~ 12 と US8.5 の計 13 個を認め (図 1) , 各遺伝子は SA8 とはまったく同じ配置と考えられた (ただし , SA8 は US1 , 2 , 11 , 12 の報告はない) 。 HSV とは , mRNA 転写セットがひとつ異なるものの (HSV : US3 / 4 と US5 / 6 / 7 , BV : US3 / 4 / 5 と US6 / 7) , よく類似していた。HSV 1 でその存在の可能性が予測された US1.5 については , その開始コドンが見つからなかった。また , SA8 でも US8.5 の存在が確認され , HSV / SA8 / BV おそらく霊長類の単純ヘルペスウイルスグループに共通の特性と考えられた。

アミノ酸レベルでも (表 1) , SA8 との相同性が最も高く (51% [US5] ~ 83% [US3]) , ついで HSV2 (18% [US5] ~ 57% [US9]) , HSV1 (9% [US4] ~ 57% [US9]) となった。概ね , US4 (gG) , US5 (gJ) , US8.5 , US12 (ICP47) で低く , US2 , US3 (セリンスレオニンキナーゼ) , US6 (gD) , US9 (エンベロープ構成リン酸化タンパク) で高い結果となった。

最も多くのウイルス種の塩基配列が報告されている

US4 (gG) を基に分子系統樹を作成したところ (図 2) , アカゲザルには BVRh , カニクイザルには BVcy , シシオザルには BVlt , プタオザルには BVpt という BV のグループ分けが可能であるという結論に達した。すなわち , 「マカク種各々に固有の BV が存在する」ということを意味している。日本産ニホンザルからの BV 分離報告例はないが , 本論文は「日本固有のニホンザルにも固有の BVfu なるウイルスが感染している」ことを強く示唆する結果となった。

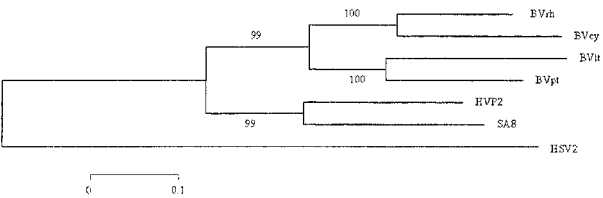


図 2 . US4 (gG) 領域の塩基配列に基づいて作成された分子系統樹

論文審査の結果の要旨

1 . 研究目的の評価

本研究は , ヘルペス B ウイルスについて , U_s領域の塩基配列を決定し近縁の霊長類のヘルペスウイルスと比較する事によって , その病原性の違いを分子レベルで解明する事を目指したものであり , 妥当である。

2 . 手段・方法に関する評価

GC % が極めて高いゲノムに対してこれまでで最長の領域の塩基配列を決定しており , さらにそれに基づく分子系統樹が確実に解析されており , 高く評価できる。

3 . 分析・考証の評価

U_s領域に含まれる種々の open reading frames についての相同性や遺伝子転写の特性について詳細な解析が加えられており , 高く評価できる。

4 . 結果に関する評価

本研究の結果は , マカク種のサルはそれぞれのサルに固有な B ウイルスを保持している可能性を明らかにし , ニホンザルにも固有の B ウイルスが感染している事を強く示唆する結果となり , 学問的にも社会に与える影響の上でも重要な知見として高く評価できる。

以上のように , 本論文は霊長類のヘルペスウイルスの研究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 森 内 浩 幸
副 査 教 授 片 峰 茂
副 査 教 授 岩 崎 琢 也

岩崎一臣

(長崎県)昭和38年2月14日生

授与年月日 平成14年4月30日

主論文 Human colon cancer produces a factor which induces the proliferation of venous endothelial cells
(ヒト大腸癌は血管内皮細胞の増殖促進因子を産生する)

岩崎一臣, 山本正幸, 南 恵樹, 小無田 興, 山口淳三, 古井純一郎, 兼松隆之
ONCOLOGY REPORTS 8: 1057-1061, 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

腫瘍の増殖において血管新生は重要な役割を担っており、近年様々な腫瘍血管新生因子が報告されている。血管新生には多くの新生因子と抑制因子が複雑に関与しており、通常はバランスがとれているが、癌の存在は新生因子優位の環境を形成する。血管新生は大きく血管内皮細胞による細胞外マトリックスの消化、血管内皮細胞の増殖と遊走、管腔構造の形成から成り立っており、その過程において血管内皮細胞の増殖は不可欠の要素である。今回大腸癌が血管内皮細胞を増殖させる因子を産生しているか、その増殖能に代表的な血管新生因子である basic fibroblast growth factor (basic FGF) と venous endothelial cell growth factor (VEGF) が関与しているか、また臨床病理学的因子との相関を手術的に摘出したヒト大腸癌を用いて検討した。

方法

17例のヒト大腸癌切除標本から採取した腫瘍を2日間培養し、その上清を冷凍保存した。

ヒト血管内皮細胞株(EA-hy926)に上記の上清を加え、24時間培養しMTT assayで活性を測定した。コントロールに対する比を増殖率とした。

17例の上清中から7例のそれを無作為に選択しbasic FGFとVEGFの濃度を測定した。これらとEA-hy926の増殖率との相関を検討した。

EA-hy926の増殖率と臨床病理学的因子との相関を腫瘍サイズ、壁深達度、リンパ節転移の有無、Stage(TNM分類)で検討した。

17例の上清の中から2例のそれを用いてhuman umbilical venous endothelial cell (HUVEC)を培養しMTT assayと細胞への ^3H の取込みの測定で細胞増殖を調べた。

結果

EA-hy926の増殖率は平均142%(107~187%)であった。

増殖率はbasic FGFとは関連はみられなかったが、VEGFとは有意に正の相関を示した。

増殖率と臨床病理学的因子との検討では、腫瘍サイズとリンパ節転移に関しては相関はなかった。壁深達度ではT3よりもT4で有意に増殖率が高かった。StageについてはIIとIII、IIIとIVでは相関はみられなかったが、IVではIIに対し有意に高い増殖率を示した。

HUVECにおいてもEA-hy926と同等の増殖率を示すことが確認された。

考察

今回の研究において、大腸癌からは血管内皮細胞の増殖を促進する因子が産生されており、進行度が高度な癌でその促進作用が強くなり、血管内皮の増殖と大腸癌の増大進展との関与が示された。

VEGFとbasic FGFは代表的な血管新生因子として種々の癌においてその発現が促され、血管新生をもたらすことが知られている。しかし今回の実験では大腸癌組織から産生される血管新生因子としてはVEGFがより強く血管内皮増殖に関与していることが示唆された。VEGFとbasic FGFはいずれも多様な作用をもっているがそのなかで血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成といった共通の作用がある。同様の作用はinterleukin-8やhepatocyte growth factor等でも促進されこれらの因子は相乗、相補的に働いていると考えられるが、血管新生のある過程では主体となる因子が癌によって異なり大腸癌における血管内皮細胞の増殖ではVEGFに強く依存しbasic FGFの役割は少ないのではないかと考えられる。

血管新生の解明が進むとともに血管新生阻害剤の研究が活発に行われている。血管新生の重要な過程のひとつである血管内皮細胞の増殖・遊走を阻害する物質の開発も行われているが、種々の癌にあって中心的な役割を果たしている因子を選択して阻害することが肝要となる。今回の結果からVEGF発現の抑制が大腸癌においてその増殖進展を阻害する有力な要素となりうるということが考えられる。現在VEGF中和抗体や抗VEGF抗体などが血管新生阻害剤として開発されつつあり、将来手術後の化学療法との併用での効果が期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

腫瘍の増殖において血管新生は重要な役割をもっている。本研究は大腸癌組織に由来する血管増殖促進因子について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

大腸癌切除標本から得られた17例の腫瘍組織を2日間培養し、その上清に含まれる血管増殖促進因子量をヒト血管内皮細胞由来株(EA-hy926)およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をもちいて機能的アッセイによって検討した。さらに臨床病理学的因子との相関を腫瘍サイズ、壁深達度、リンパ節転移から検討した。これらの手法は癌床検体を用いて解析する研究する手法として妥当なものである。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、大腸癌組織から血管内皮細胞の増殖を促進する因子が産生されそれは進行度と相関することが明らかになった。これは今後の大腸癌の治療法の開発の上で基礎資料となるものであり今後の進展が大いに期待される。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 綾 部 公 懿

吉 田 真一郎

(長崎県)昭和40年1月2日生

授与年月日 平成14年5月31日

主 論 文 De novo acute myeloid leukemia in the elderly ; a consistent fraction of long-term survivors by standard -dose chemotherapy

(高齢者における初発急性骨髄性白血病の臨床的解析; 標準的化学療法による長期生存群の抽出)

吉田真一郎, 栗山一孝, 宮崎泰司, 田口潤, 福島卓也, 本多 幸, 林原歳久, 長井一浩, 跡上 直, 鳥谷和洋, 早田 央, 野中博章, 樫田三郎, 陣内逸郎, 雨森龍彦, 草野みゆき, 吉田善春, 池田柊一, 松尾辰樹, 朝長万左男

Leukemia Research ・25巻 33-38頁
2001年

長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設
分子医療部門分子治療研究分野

(主任: 朝長万左男教授)

論文内容の要旨

緒 言

高齢者人口の増加に伴い高齢者の急性骨髄性白血病(AML)も増加し、その数は成人AMLの半数以上に達する。しかしその臨床解析は不十分である。高齢者は標準的化学療法の適応とされないことが多く、治療

も一般病院で行われることが多い。また骨髄異形成症候群より移行したAMLや二次性白血病が多く含まれるため、解析にも困難を伴う。今回我々は高齢者de novo AMLの臨床的特徴を明らかにするために全県的規模で調査を行った。

対象と方法

1. 1987年9月より1994年9月までに県内の当科、並びに13の関連病院に入院した60歳以上の白血病200例について初診時標本の再診断、カルテ調査を行い、112症例をde novo AMLと診断した。
2. 骨髄標本よりFAB分類, 芽球比率, 三系統の異形成(TLD)の有無, 芽球のMyeloperoxidase (MPO)陽性率を再評価した。
3. 年齢, 性別, Performance status (PS), 血球数, 染色体分析結果, 治療内容, 治療結果を調査した。112症例を標準的化学療法が行われたグループA, 薬剤の減量が行われたグループB, 支持療法のためのグループCに分類した。
4. 2群間の比較は χ^2 乗検定, 生存率解析はKaplan-Meier法, 生存率の比較はlog-rank testで行った。予後因子の多変量解析にはCoxの比例ハザードモデルを用いた。

結 果

1. 112例の年齢中央値は72歳, 男性67名, 女性45名であった。FAB分類はM0 4例, M1 13例, M2 48例, M3 7例, M4 19例, M5 6例, M6 12例, M7 1例であった。TLDの所見を41名(36.6%)に認めた。
2. 染色体は69例で解析され, 予後良好群7例, 中間群51例, 予後不良群11例であった(Grimwadeらの分類)。
3. 寛解率: グループA 29例(年齢中央値65歳), グループB 58例(73歳), グループC 19例(77歳)の寛解率は, それぞれ69%, 22.4%, 0%であった。A, B両グループ間でPS, 白血球数, 芽球MPO陽性率, TLDに差はなかった。
4. 5年生存率: 全体10.3%, PS 2以下群11.8%, 3以上群8.3%($p=0.0007$)。特にPSの悪い例で早期死亡が多かった。染色体予後良好群51.4%, 中間群11.9%, 予後不良群0%($p=0.0016$)と有意差があった。治療グループ間ではA 29.3%, B 3.9%, C 0%($p=0.0002$)と有意差があった。
5. 予後良好因子についての単変量解析では標準的化学療法, 白血球数 $10000/\mu\text{l}$ 以下, 予後良好染色体, MPO陽性率50%以上, FAB分類M2, M3, TLDがないこと, PS 2以下, 年齢70歳未満が有意であった。同じく多変量解析ではPS, 白血球数, 治療, TLDの4つの因子が有意であった。

考 察

高齢者 de novo AML では予後良好とされる病型 (M2, M3) は少なく, 逆に予後不良因子の TLD が多いことが判明した。同様に染色体予後良好群は少なく, これらが高齢者 de novo AML の生物学的特徴であり, 生存期間が短い原因となっていた。

今回の高齢者 de novo AML のシリーズにおいては約10%の長期生存者がみられたが, その大部分は標準量の化学療法を受けた患者であった。予後良好因子として, 2以下のPS, 白血球数10000/ μ l以下, 標準量の化学療法, 予後良好の染色体, TLD がないことが有意であった。このような特徴をもつ高齢者 de novo AML 患者は, 標準的化学療法で予後が改善される可能性が十分にあることが明らかとなった。今後の高齢者 de novo AML の治療戦略は予後因子による層別化治療法を開発する必要がある。

論文審査の結果の要旨

学位論文題名

「高齢者における初発急性骨髄性白血病の臨床的解析; 標準的化学療法による長期生存群の抽出」

1. 研究目的の評価

本研究は, 臨床的・細胞生物学的解析が欠落している初発高齢者白血病の臨床的特徴を明らかにし, 治療成績の向上に寄与しようとするもので, 目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

高齢者白血病の社会的・血液学的背景の差を十分に考慮した上で検討項目を設定し, 各々について適正な統計学的手法で解析しており研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記の手法で解析した結果, 5個の予後良好因子が抽出され, 標準的化学療法を層別化して実施することの重要性が科学的に明らかにされ, 今後, 増加しつづける高齢者白血病の治療戦略の立案に本研究の成果が大いに寄与することが期待される。

以上のように, 本論文は高齢者初発白血病の今後の治療戦略の方向性を示したもので, 今後の白血病治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 上 平 憲
副 査 教 授 河 野 茂
副 査 教 授 江 口 勝 美

渡 邊 洋 二

(長崎県) 昭和30年8月27日生

授与年月日 平成14年5月31日

主 論 文 Isolation of a Parainfluenza Virus Type 3-like Agent from Guinea Pigs
モルモット由来パラインフルエンザ3型様ウイルスの分離

Yoji Watanabe, Hiroshi Sato, Hironori Miyata and Kazutaka Ohsawa

ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA

46巻 15-18 2001年

長崎大学医学部附属動物実験施設

(主任: 佐藤 浩教授)

論文内容の要旨

緒 言

パラミクソウイルス属のパラインフルエンザウイルス(PIV)群は, 呼吸器疾患を起こす病原体の一種であり1型~4型に分類される。実験小動物に病原性を顕し, 実験成績に影響を与えるウイルスとしては1型のセンダイウイルス(SeV: mouse PIV-1)が知られるのみであった。一方, モルモットにおける3型様PIVの感染存在は血清学的研究に基づいて従来から推測されてきたが, 世界的にそのウイルス分離は成功していない。医学研究分野, 特に, 呼吸器系過敏症反応等免疫学分野におけるモルモットの実験動物としての利用価値を考慮すると, 実験成績に悪影響をおよぼしかねないウイルス感染の実態解明は早急に解決すべき点の一つである。

今回, モルモットから初めて3型様ウイルスの分離に成功し, 分離ウイルス(PIV-3gp)の生物学的・遺伝子学的性状ならびに人獣共通感染症の側面から解析を行い, 「ヒト→動物」の伝播パターンである Reverse Zoonosis の可能性を強く示唆する結果となった。

材料および方法

1. パラインフルエンザ3型様ウイルス定着モルモットコロニーを特定し, そのコロニーに感染伝播用センチネル動物としてSPFモルモットを導入した。
2. センチネルモルモットから経時的に肺を摘出し, ウイルス分離材料とした。
3. 10%肺乳剤遠心上清を各種細胞に接種し, その後, 間接蛍光抗体法(IFA), 細胞変性効果(CPE), あるいは赤血球吸着反応(HAD)の検出を行い, PIV-3gpの分離を確認した。
4. 超遠心法により精製ウイルスを調製して構造蛋白質の解析を行うとともに, SDS-PAGEならびにWestern Blotting法など定法に従い構造蛋白質の分子量ならびに抗原性を比較した。またゲノム解析も行った。対照には, 同群の近縁ウイルス(ヒトパ

ラインフルエンザ 3 型ウイルス：HPIV -3，ウシパ
ラインフルエンザ 3 型ウイルス：BPIV -3，1 型ウ
イルスの SeV ，2 型 Rubulavirus の SV -5)を使用
した。

結 果

SDS -PAGE による結果から，分離 PIV -3gp の HN
蛋白質は HPIV -3 と同一分子量と判定され，BPIV -3
ならびに SeV の HN 蛋白質とは明らかに異なってい
た。Western -Blotting 法によると，分離 PIV -3gp の抗
原性ならびに分子量は，HN 蛋白質，FO 蛋白質ならび
に M 蛋白質において HPIV -3 との相同性が認められ
た。BPIV -3 とは HN 蛋白質ならびに FO 蛋白質にの
み抗原性の交差を認めるにすぎなかった。また SeV な
らびに SV -5 との抗原性の交差はほとんど認められな
かった。

以上の結果，分離 PIV -3gp の構造蛋白質は近縁のウ
イルスとの比較において HPIV -3 のものとの相同性
が最も強いと判定された。

一方，ゲノム解析においても同様の結果となり，HN
蛋白領域の塩基配列に基づいて分子系統樹を作成する
と，図 1 のようになり，分離ウイルスは BPIV -3 から
遠く離れ，HPIV -3 11株のグループに完全に包含され
ていた。この結果は，PIV -3gp がモルモットパライン
フルエンザ 3 型ウイルスといえる程の変異を未だ示して
おらず，HPIV -3 の範疇に属することを示唆していた。

考 察

本研究により分離された PIV -3gp がヒト由来の
HPIV -3 に近似していることは，ヒト由来の HPIV -3
がモルモットに感染し，コロニーに定着していた可能
性を示唆するものである。この関係は一般的な人獣共
通感染症のベクトルである「動物→ヒト」とは逆の「ヒ
ト→動物」であり，Reverse Zoonosis のパターンと考
えられる。今後，感染実験により本分離ウイルスの病
原性や動物実験における影響などについても解析を続
けていく予定である。

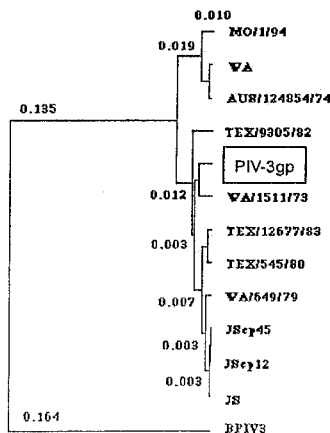


図 1 . PIV -3 HN 領域に基づく分子系統樹

論文審査の結果の要旨

1 . 研究目的の評価

実験動物の検疫上重要なセンダイウイルスと免疫学
的交叉反応性を示す新規パラインフルエンザウイルス
のモルモットよりの分離・同定を企図したものであり，
目的は妥当である。

2 . 研究手法に関する評価

種々の培養細胞にモルモット肺乳剤を接種し，蛍光
抗体法，細胞変性効果，赤血球吸着反応を指標にして
目的のウイルスの分離に成功した手法は卓越しており
評価できる。

3 . 解析・考察の評価

ウイルス蛋白の抗原性の交叉試験およびその後のゲ
ノム構造解析の結果から，分離ウイルスはヒトパライ
ンフルエンザウイルス 3 型と極めてよく近似すること
を明らかにし，分離ウイルスが「ヒト→動物」の
Reverse Zoonosis (逆向きの人獣共通感染症) に由来
する可能性を強く示唆した解析・考察の過程も論理的
で評価できる。

以上，本論文は実験動物ウイルス学の発展に貢献す
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	上 平	憲
	副 査	教 授	岩 崎	琢 也

黒 田 知 子

(東京都) 昭和37年 3 月25日生

授与年月日 平成14年 6 月30日

主 論 文 The AZFc region of the Y chromo -
some features massive palindromes
and uniform recurrent deletions in in -
fertile men
(Y 染色体上の AZFc 領域の palindrome
構造と男性不妊症におけるその画一的な
欠失)

Tomoko Kuroda -Kawaguchi , Helen
Skaletsky , Laura G. Brown , Patrick J.
Minx , Holland S. Cordum , Robert H.
Waterston , Richard K. Wilson , Sher -
man Silber , Robert Oates , Steve Rozen
and David C. Page
Nature Genetics , volume 29, 279 -286,
November 2001

長崎大学医学部小児科学教室
(主任：森内浩幸教授)

論文内容の要旨

緒言

不妊症は約10%の夫婦に認められ、男性不妊症と女性不妊症に大別される。男性不妊症は精子形成不全症によるものが最も多く、その原因としてY染色体長腕部分欠失(AZF_a, AZF_b, AZF_c)が知られている。その中でも、AZF_c領域の欠失は最も頻度が高く、azoospermia患者の12%, oligozoospermia患者の6%に認められる。しかしAZF_c領域は非常に高い相同性を持つ反復配列に富むため、その生物学的重要性にもかかわらず、これまでその正確な大きさや構造、遺伝子の数やその位置などは解明されていなかった。今回我々はヒトY染色体ゲノム解析の一環としてAZF_c領域の塩基配列完全解読並びにその解析を行ったのでその概要を述べる。

対象と方法

AZF_c領域内には互いに非常に高い相同性を持つ反復配列があることから、我々は、通常のSTSやフィンガープリントによる解析に加えて、配列ファミリー多様性解析を用いてBACによる高精度物理地図の作成を行った。即ち、まず、polymorphismを避けるために単一のY染色体から構成されたBACのライブラリーを用いて、反復配列領域におけるSTSとフィンガープリントによる仮のコンティグを作成し、塩基配列の一部解読を行った。次に、この段階で重なりあうとみられたBACの塩基配列から単一塩基置換等を検出し、これらを用いて、仮のコンティグから実際は異なった反復配列に属するBACを分別し、コンティグを再構築した。この方法によって最終的にAZF_c領域全体の高精度物理地図の作成と塩基配列完全解読を施行した。

結果

今回の塩基配列解読によって、本領域には、長さ115 kbから678 kbの6つの異なる反復配列が各々2から4コピーずつモザイク状に存在することが明らかになった。これらの反復配列は、本領域の4.5 Mbのうちの93%を占め、各コピー間で99.82~99.98%といった非常に高い相同性を持っていた。また、これらの反復配列は3つのpalindromeを含む6つのinverted repeatsと3つのdirect repeatsを形成しており、最大のpalindromeは3 Mbに及び、各腕は99.97%という驚異的な相同性を持っていた。

次に、我々は精子形成不全症男性におけるAZF_c領域の欠失の大きさと切断点を検索した。欠失がこの領域のみに限定される精子形成不全症男性48人中47人が欠失近位側の切断点を同じ領域内に持ち、48人全員が遠位側の切断点を別の同じ領域内に持っていた。その結果生じた欠失の大きさは約3.5 Mbであった。

また、我々はAZF_c領域の遺伝子カタログの作成を行った。既知のY染色体上の遺伝子については、その詳細な位置を塩基配列上で確認し、RT-PCRを用いて種々の組織における発現の有無を検討した。さらに、GenScanプログラムを用いた塩基配列の解析から推定された遺伝子、及び、既知のESTと塩基配列が一致する配列について、RT-PCR並びにcDNAクローンの塩基配列解読を行い、種々の組織での発現の有無を検討した。この結果、11種類のtranscription unitsが本領域内に座位しており、そのすべてが精巣で優位にまたは特異的に発現していた。このうち5種類は、RBM_Y1, PRY, BPY2, DAZ, CDY1の既知遺伝子であり、残りのCSPG4LY, GOLGA2LY, TTTY3, TTTY4, TTTY5, TTTY6の6種類は新たなtranscription unitsであった。

考察

今回の塩基配列解読によって、AZF_c領域は、非常に高い相同性を持つ6つの反復配列群によって精巧なモザイク状に構成された3つのpalindrome複合体であることが明らかになった。また、精子形成不全症男性にみられるAZF_c領域の欠失は本領域4.5 Mbのうちの3.5 Mbの領域にほぼ限定されることが判明した。このAZF_c領域の欠失が高頻度にかつ画一化されて生じる理由は、両切断点が互いに99.9%という高い相同性を持つ2つのdirect repeats内に存在することから、これら2つのdirect repeatsの間で相同組み換えが生じているためと推測された。

機能的には、AZF_c領域に欠失を持つ男性が精子形成不全のみで他の異常を認めないことから、本領域には精子形成にのみ関与する遺伝子群だけが選択的に座位しているものと推測されている。今回同定した精子形成不全症男性のAZF_c欠失領域には、BPY2, DAZ, CDY1, CSPG4LY, GOLGA2LY, TTTY3, TTTY4の7種類のtranscription unitsが座位しており、精子形成不全症はこれらのいずれかの欠損によるものと考えられ、今後の研究でそれらの役割がさらに明確になると期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、精子形成不全症の責任領域であるY染色体上のAZF_c領域の塩基配列を基にした遺伝子ならびに構造解析を行ったもので、目的は明確かつ妥当である。

2. 研究手法に関する評価

塩基配列解読のための高精度物理地図は、非常に高い相同性を持つ反復配列群を分別するため、STSによる解析に加えて配列ファミリー多様性解析という手法を用いて作成した。これらの研究手法は、独創的かつ

妥当である。

3 . 解析・考察の評価

上記手法により、AZFc 領域の塩基配列完全解読を施行し、6 つの反復配列、3 つの Palindrome からなる本領域の特異的な構造を明らかにした。また、本領域の遺伝子カタログを作成し、精子形成不全症の責任候補遺伝子を同定した。さらに、これらの結果から、Y 染色体の進化過程を推測しており、今後、生物学的にも発展が大いに期待される。

以上のように本論文は精子形成不全症男性における遺伝子解析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 森 内 浩 幸
副 査 教 授 新 川 詔 夫
副 査 教 授 山 下 俊 一

柴 富 和 貴

(長崎県) 昭和38年 9 月16日生

授与年月日 平成14年 6 月30日

主 論 文 A Novel Role for Interleukin -18 in Human Natural Killer Cell Death High Serum Levels and Low Natural Killer cell Numbers in Patients With Systemic Autoimmune Diseases

ヒトのナチュラルキラー細胞死に対するインターロイキン-18の新たな役割(全身性自己免疫疾患患者の血清濃度上昇とナチュラルキラー細胞の減少)

柴富和貴、井田弘明、山崎聡士、中島友紀、折口智樹、川上 純、右田清志、河部庸次郎、辻畑光宏、Paul Anderson、江口勝美

Arthritis & Rheumatism 44: 884-892, 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

目 的

全身性自己免疫疾患患者は健常者より末梢血中ナチュラルキラー(NK)細胞数が減少していることが報告されている。一部のサイトカインがNK細胞死を誘導することがわかっているため、各種の自己免疫疾患患者を対象に末梢血中サイトカイン濃度とNK細胞数を比較した。

材料と方法

患者群と対照群 患者群は58人(皮膚筋炎・多発性筋炎17人、慢性関節リウマチ12人、全身性エリテ

マトーデス9人、原発性シェーグレン症候群8人、オーバーラップ症候群6人、ベーチェット病2人、全身性硬化症2人、成人発症スチル病1人、結節性多発動脈炎1人)、対照群は33人の健康人ボランティアから同時に末梢血(リンパ球)と血清を採取した。

血清中の各種サイトカイン(IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN γ , TNF α)をELISA法で測定した。

表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いて末梢血 CD3 陽性細胞, CD4 陽性細胞, CD8 陽性細胞, CD16 陽性 CD56 陽性細胞, CD161 陽性 CD3 陽性細胞をフローサイトメーターで検出した。

健常者末梢血リンパ球から、NK細胞を抗CD3, CD4, CD19, CD33 抗体によるネガティブセレクションで分離後、各種サイトカイン(IL-2, IL-12, IL-15, IL-18)を加え培養、3日後3, 3-ジヘキシロキサカルボシアニンヨード染色(DiOC6 (3))とプロピジウムヨード染色(PI)を用いてアポトーシスを確認した。さらにPhiPhiLuxG1D2kitを用いてNK細胞中のCaspase3の細胞内酵素活性をフローサイトメーターで測定した。

結 果

全身性自己免疫疾患患者では健常者に比べて血清中のIL-18, IL-15, IFN γ , TNF α の濃度が有意に高値であった。

全身性自己免疫疾患患者では健常者に比べて末梢血中のNK細胞数, NKT細胞数, およびその全リンパ球に対する割合が有意に低下していた。

全身性自己免疫疾患患者末梢血中NK細胞数と血清中IL-18, IL-15, TNF α 濃度には有意な負の相関が見られた。

in vitro においてNK細胞のアポトーシスはIL-12 + IL-15, IL-15 + IL-18 添加で強く誘導された。

アポトーシスが誘導された培養上清中にはIFN γ , TNF α の産生が強くみられた。

アポトーシスが誘導されたNK細胞では、細胞内Caspase3 活性の上昇がみられた。

抗TNF- α 抗体添加によりアポトーシスを部分的に抑制できた。抗FasL抗体では抑制できなかった。

考 案

私たちは全身性自己免疫疾患患者末梢血中でIL-18, IL-15, IFN γ , TNF α の濃度とNK細胞数, NKT細胞数との間に強い負の相関があることを示し、これらのサイトカインがNK細胞数減少に関与していることが示唆された。私たちはまたIL-18がIL-15, IL-12によるNK細胞のアポトーシスを増強することを示

した。特に IL -18 と IL -15 の組み合わせは健康成人の末梢血 NK 細胞のアポトーシスを強く誘導した。

私たちはこれまで CD94 , CD2 , CD16 によりおこる activation induced NK cell death は経過が非常に速いことを報告してきた。これに対してサイトカインによる NK 細胞死はとても遅く、ミトコンドリア膜電位の低下は約72時間で起こり、DNA の変性は96時間で起こった。このようなゆっくりとした経過はサイトカインに刺激された NK 細胞が Fas ligand や TNF α をオートクラインに産生するためではないかと考え Fas ligand , TNF α の中和抗体を用いた。結果としては TNF α の中和抗体では一部 NK 細胞死が阻害されたが Fas ligand の中和抗体では全く阻害されなかった。TNF α によりその濃度が濃くなるほど NK 細胞のアポトーシスは誘導されたが、IL -18 と IL -15 の組み合わせで二次的に産生される TNF α の80倍以上の濃度が必要であり、また、TNF α の中和抗体で部分的にしか抑制できなかったことから考え、サイトカインによる NK 細胞のアポトーシスのメカニズムとして TNF α 以外の分子の存在が考えられた。

全身性自己免疫疾患患者では末梢血 NK 細胞数は減っておりその機能も低下していることが知られている。私たちの研究はこの現象の原因の一端を示すものであろう。NK 細胞や NKT 細胞の減少が膠原病の病態や合併症である腫瘍の発生に関わっている可能性がある。慢性関節リウマチ患者では変形性関節症の患者に比べて滑膜組織での IL -18 の濃度が高く mRNA も増加していることが報告されている。また IL -15 もリウマチ患者滑液で高濃度に見られることが報告されている。血清中のサイトカイン濃度は私たちの実験系で用いられた濃度よりかなり低い。しかし、局所では、マクロファージから産生され高濃度となった IL -18 , IL -15 が浸潤してきた NK 細胞のアポトーシスを引き起こしていることが示唆された。

結 論

高濃度の IL -18 と IL -15 は、全身性自己免疫疾患患者に認められる NK 細胞数の減少に関連していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

1 . 研究目的の評価

本研究は全身性自己免疫疾患患者の NK 細胞数の減少の原因について検討を加えたものであり、目的は妥当である。

2 . 研究手法に関する評価

患者群と対照群の血清サイトカイン濃度測定、末梢血 NK 細胞数測定ならびに in vitro においてサイトカインによる NK 細胞死の測定を行っており、目的達成のための研究手法として妥当である。

3 . 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、IL -18 をはじめとする血清中サイトカインは NK 細胞数と逆相関し、in vitro で IL -18 , IL -15 が NK 細胞数の減少に関連することを示唆した解析・考察の過程も論理的で評価できる。

以上のように本論文は全身性自己免疫疾患の発症機序・病態の解明に資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	金 武 洋
	副 査	教 授	朝 長 万左男
	副 査	教 授	由 井 克 之

山 本 孝 夫

(長崎県)昭和37年9月1日生

授与年月日 平成14年6月30日

主 論 文 Anti -CD4 induced rat heart tolerance : no presence of primed T cells and regulatory mechanisms for cytotoxic T cells .

(抗 CD4 モノクローナル抗体によるラット心移植片の生着：感作T細胞の不在と調節性機構)

山本孝夫、山口淳三、中山睿一、兼松隆之

Transplant Immunology 8 (2000) 101-107

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

臓器移植において、最大の問題の一つは拒絶反応である。現在、非特異的にレシピエントの免疫を抑制する薬剤が使用されており、免疫能の低下による感染症や、薬剤の長期服用によるコストが問題となっている。移植された臓器を自己の組織と同様に受け入れ、他の抗原に対する免疫能が保たれるドナー特異的な免疫寛容の実現は、移植免疫学の究極の目標である。抗 CD4 モノクローナル抗体は動物モデルで免疫寛容を誘導することが知られており、臨床応用への期待もある。その目的に資するためには免疫寛容のメカニズムの解明が重要となる。

今回、我々は、心移植ラットモデルで抗 CD4 モノクローナル抗体による免疫寛容成立の機構を解明するため皮膚移植モデルと対比し検討した。

方 法

1 . 動物

ドナーに Wistar Furth (WF^u) を、レシピエントに

LEW (LEW¹) を用いた。

2. 処置

腹部異所性心移植もしくは皮膚移植を行い、移植後 Day0 ,1 に抗 CD4 モノクローナル抗体を0.5ml 静脈内投与した。

3. 評価

移植片の生着期間

感作細胞の有無 (in vitro) : レシピエント脾細胞を反応細胞, paraformaldehyde (PFA) 処理したドナー脾細胞を刺激細胞とするリンパ球混合培養を行い、得られた効果細胞のドナー由来標的細胞に対する細胞傷害活性を測定した。

感作細胞の有無 (in vivo) : 心生着ラットに 2 回目のドナー由来心および皮膚移植を行った。

心生着ラットにドナー由来の心移植を行うと同時に、無治療皮膚拒絶ラット、無治療心拒絶ラットの脾細胞を移入し、最初の心移植片および 2 回目の心移植片の生着期間を観察した。

結 果

1. 無治療群では心移植片は 8 日以内、皮膚移植片は 9 日以内に拒絶されるのに対して、抗 CD4 モノクローナル抗体治療群では、皮膚移植片は平均13日と生着延長が認められ、心移植片は24例中22例で200日以上の長期生着が得られた。
2. 皮膚移植ラットでは、抗体投与の有無に関わらず、感作細胞が検出されたが、心生着ラットでは感作細胞は術後一貫して認められなかった。
3. 心生着ラットでは、2 回目の心移植片は生着し、皮膚移植片も生着延長が認められた。
4. 心拒絶ラット脾細胞を心生着ラットに移入した場合でも 2 回目の心移植片は生着した。皮膚移植片を拒絶したラットの脾細胞を移入した心生着ラットでは、2 回目の心移植片とほぼ同時に最初の心移植片も拒絶された。このことは、心生着ラットの中に、心組織特異的に反応する免疫細胞を調節する機構が存在することを示している。

考 察

今までに抗 CD4 モノクローナル抗体を使用し、fully allogenic combination で免疫寛容を誘導するモデルがいくつか報告されている。その免疫寛容のメカニズムとして、これまでにクローン麻痺、残存 CD4T 細胞の抑制性機構などが報告されている。今回の研究では、免疫学的寛容状態にある心生着ラットには皮膚移植の場合と異なり、ドナー抗原によって誘導される感作 T 細胞は存在しないことが明らかとなった。その機構として、皮膚移植と心移植でグラフト内の抗原提示細胞や、抗原のレシピエントリンパ組織への到達経路の相違、すなわち皮膚移植の場合はその所属リンパ

節にドナー抗原が到達し抗原提示されるのに対して、血管付きの移植片の場合は、血流によって抗原が脾臓に到達しそこで抗原提示されることにより、比較的拒絶反応が弱いということが報告されている。また、肝移植における自然生着モデルと同様に、一旦生成された感作細胞や効果細胞が消去される可能性も否定できない。

心生着ラットに感作細胞が存在しないにしても、心生着ラットには心移植片で感作された細胞を特異的に抑制しうる調節機構が存在していることが明らかになった。この調節性因子はサイトカインを含めた液性のものか、細胞性のものか、あるいは両者の相互作用によるものか今後の検討が必要と思われる。

今後、実際の臓器移植前にドナー抗原 (細胞, あるいはペプチド) と抗 CD4 モノクローナル抗体による前感作が移植免疫における調節性機構の誘導を可能にするかもしれない。以上の知見は臓器移植において、臨床応用につながる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

1 研究目的の評価

本研究は、心移植に対する免疫寛容成立・維持機構を解明しようとするものである。特に感作 T 細胞の存在に着目しており、目的は明瞭である。

2 研究手法に関する評価

実験モデルとして、ラットの心移植および皮膚移植モデルを用いて比較検討した。感作細胞の有無は、バラホルムアルデヒドで固定した脾細胞による細胞傷害性 T 細胞の誘導能 (in vitro) と 2 回目のドナー由来の臓器移植 (in vivo) の両者を検討しており、妥当である。

3 解析・考察の評価

免疫寛容状態の心生着ラットではドナー抗原特異的な感作細胞は存在しないことを明確にした。さらに、心移植片特異的 T 細胞の活性化を調節する機構が心生着ラットに存在することを示唆した。臓器移植の拒絶と免疫寛容の誘導とを決定する因子の一端を解明した点評価できる。

以上のように、本論文は臓器移植における免疫寛容の誘導・維持機構の解明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	由 井 克 之
	副 査	教 授	江 石 清 行
	副 査	教 授	綾 部 公 懿

松尾 圭

(長崎県)昭和44年1月1日生

授与年月日 平成14年6月30日

主論文 Loss of Heterozygosity of Chromosome 16q in Gallbladder Carcinoma

(胆嚢癌における16番染色体長腕欠失)

松尾 圭, 黒木 保, 北岡文生, 田島義証, 兼松隆之

Journal of Surgical Research 102, 133-136, 2002

長崎大学医学部外科学第二教室

(主任: 兼松隆之教授)

論文内容の要旨

緒言

胆嚢癌は消化器癌の中でも未だ最も予後不良な癌の一つであり、欧米に比し日本人に多くみられる癌である。胆嚢癌は多様な進展様式を示すのがその特徴であるが、胆嚢癌においても「adenoma-carcinoma sequence」の概念の基に遺伝子学的研究が現在までに報告されている。癌の発生・進展に関連する遺伝子変異機構を解明することができれば、症例個々の特性の把握が可能となり、オーダーメイド治療へ繋がると考えられる。遺伝子変異の一つである染色体欠失 Loss of heterozygosity (LOH) は様々な癌で特異的な染色体上で起こっていることが報告されてきた。今回、我々は癌関連遺伝子の中で癌抑制遺伝子に着目し、遺伝子変異の蓄積が胆嚢癌の発生・進展にどのように関与するかを LOH 解析と病理学的因子を関連づけて検討した。

対象と方法

microsatellite marker を用いて胆嚢癌における染色体欠失 (LOH) の出現を検索し、さらに LOH と臨床病理学的因子との関連性を検討した。

1) 対象は当科における過去21年間の胆嚢癌切除症例 56例。

2) Micro-dissection 法を用いて各症例のパラフィン包埋標本より癌部と非癌部各々の組織を回収し、DNA を抽出した。

各症例 (癌部と非癌部) のパラフィン包埋標本より厚さ10 μ mの切片を作成し、各々5枚の切片から組織を回収。

DNA 抽出は Kit (DEXPAT, Takara) を使用し、各症例1対ずつ (癌部と非癌部) の DNA テンプレートを作成。

3) 5つの microsatellite 領域 (1p36, 9p21, 13q14 [RB], 16q24, 17p13 [p53]) の primer を RI ([γ -³²P] ATP) にて標識し、この5つの領域について各 DNA サンプルを PCR にて増幅した。

4) 6%ポリアクリルアミドゲルを用いて各 cDNA

を電気泳動し、各々の症例について各マーカー領域の LOH を autoradiography にて判定した。

結果

1) 各マーカー別の LOH 出現頻度は 1p36 は53% (19/36), 9p21 は38% (12/32), 13q14 は56% (20/36), 16q24 は61% (31/54), 17p13 は42% (15/36) であった。

2) LOH と TNM 病期分類との相関をみると、粘膜内癌 (T1a) の段階では 1p, 9p, 17p において LOH はみられなかったが、16q24 においてのみ高率 (5/6: 83%) に LOH がみられた ($p < 0.01$: Kruskal-Wallis 検定)。

3) 癌の壁深達度が固有筋層 (T1b) またはそれ以上に進行した癌では複数のマーカー領域で LOH が高率に出現する傾向がみられた。

考察

胆嚢癌の LOH の検索は 3p, 5q, 8p, 9p, 13q, 17p, 18q についての報告は散見される。今回の我々の研究では、胆嚢癌において、さらに 1p, 16q という領域で高頻度に LOH がみられることが明らかになった。また、各マーカー領域での LOH の頻度と病理学的因子 (特に深達度) との関連性を検討したところ、16q は T1a (粘膜内癌) というごく早期の段階で高率に LOH を示していた。16q における LOH は早期の肝細胞癌や乳癌で高頻度にみられることが報告されており、発癌の初期段階に関与している可能性が示唆されている。胆嚢癌においても 16q の LOH は正常粘膜上皮が癌に変異していく癌発生の初期段階に強く関連していると考えられた。

また、癌の進展が固有筋層 (T1b) またはそれ以上に深達した進行胆嚢癌においては複数の領域で高率に LOH が認められた。つまり、粘膜内癌が固有筋層に進展する過程で複数の染色体欠失が発生していることが明らかになった。早期胆嚢癌は「癌の浸潤が粘膜内ないし固有筋層内に留まるもの」と定義されているが、T1b の胆嚢癌が T1a に比して高いリンパ節転移率を示すことが臨床病理学的に知られている。今回の我々の研究結果は、胆嚢癌は分子生物学的には癌の浸潤が固有筋層に達した時点ですでに高い malignant potential を獲得していることを示唆するものと思われる。

今回の我々の研究結果が今後の癌抑制遺伝子の詳細な同定、シークエンス、遺伝子の機能解析、さらには多段階発癌のモデル図作成へとつながることを期待したい。

論文審査結果の要旨

1. 研究目的の評価

胆嚢癌は消化器癌の中で予後不良の癌であるが、胆

嚢癌の発生，進展にかかわる遺伝子変異機構は解明されていない。本研究は遺伝子変異の一つである染色体の欠失（Loss of Heterozygosity : LOH）を指標にして胆嚢癌における遺伝子変異の蓄積と病理学的因子とのかかわりについて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

胆嚢癌切除症例56例のパラフィン包埋標本より健常部・腫瘍部に分けてDNAを回収し，あらかじめ設定した5つのマイクロサテライト領域の部分の増幅を行いLOHの有無を検討した手法は癌の遺伝子変異を染色体レベルからとらえる手法として最も妥当なものである。

3．解析・考察の評価

上記手法で解析，検討した結果，胆嚢癌では染色体1p，16qの領域において高頻度のLOHが見られることが明らかになった。また癌の進展から見ると，癌が固有筋層またはそれ以上に深達した例では複数の領域でのLOHが見られることが明らかとなった。これらは胆嚢癌の発生，進展機構を探る上での重要な知見であり，今後の発展が期待できる。

以上のように本論文は胆嚢癌の発生，進展の解明に寄与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	松 山 俊 文
	副 査	教 授	上 平 憲
	副 査	教 授	綾 部 公 懿

田 中 康 弘

（福岡県）昭和40年2月2日生

授与年月日 平成14年6月19日

主 論 文 透過型電子顕微鏡法による金属 陶材焼付界面の原子構造観察とキャラクターゼーション

論文内容の要旨

緒 言

陶材の審美性と金属の靱性を兼ね備え，適合精度も優れた，メタルボンドポーセレンは歯科補綴物の中で重要な位置を占めている。陶材と金属という全く性質が異なる材料の結合機構に関して数多くの研究がなされてきた。その結果

1．機械的結合力

2．化学的結合力

3．熱膨張係数差に起因する陶材の圧縮力

が重要な因子として働いていることが明らかにされてきた。従来の研究はミクロンレベルの組織観察に基づいているが，化学的結合力は原子レベルの相互作用であり，これを確かめるためには原子スケールでの組織

観察が必要である。そこで本研究では金合金系，チタン系の陶材焼付界面断面構造を透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて原子レベルで明らかにし，金属のnobilityと界面構造の関係についても考察した。

実験方法

金合金系として KIK hard II（石福金属）とオパークポーセレン（VITA VMK 68），チタン系として JIS 2種純チタン（Selec）とチタン用ボンディングポーセレン（Super Porcelain TITAN，ノリタケ）を用いた。直径2.5mmの円柱形金属試料を歯科鑄造で作製し，半円柱形に切断した。切断面を鏡面研磨後，説明書に従いデギャッシング処理を行い，研磨面に厚さ0.1mmの陶材を盛り焼成した。二片を貼り合わせ，最終的にアルゴンイオン研磨を行い，断面 TEM 観察用試料を作製した。

結果及び考察

チタン系では，デギャッシング処理後，チタン表面にサブ μm 厚の rutile 構造 TiO_2 表面酸化物層が形成された。チタンと TiO_2 酸化物界面に数 nm 厚の TiO 相が現れ，チタンと TiO 相， TiO 相と TiO_2 相間で格子整合性を持つ界面が形成された。また界面近傍のチタン中には多数の転位が見られたが，酸素が約30mol % 固溶し，格子定数が変化したためと考えられる。陶材焼成後，チタン側には多数の転位や亜粒界が見られ，陶材側には $1\mu\text{m}$ 弱の厚さの反応層が生成した。その間 $1\mu\text{m}$ 強の厚さの中間層が現れた。中間層は酸素を約30 mol % 固溶したチタンとその間の空隙層からなるラメラ組織となった。空隙層は非晶質酸化チタンで占められており，酸素を固溶して脆化したチタンや非晶質酸化チタンがチタン側での破壊の原因となり得る。陶材側の反応層は TiO 相や Ti_2O_3 相酸化物が大部分を占め， TiO_2 相は陶材と接する極狭い範囲でのみ存在が確認出来た。デギャッシング処理によって生じた rutile 構造 TiO_2 相表面酸化物層は陶材焼成後消失していた。このメカニズムに関しては解明出来ていないが，チタン系の陶材焼付界面では，チタン酸化物のカチオン価数が，陶材焼成の前後，界面に対する位置などで変化しており，化学反応が強く寄与していると思われた。

一方金合金系ではデギャッシング処理によって金合金表面が酸化物層で覆われる様子は見られなかった。卑金属添加元素であるスズやインジウムの酸化物は粒界酸化物として不連続析出していた。同時に表面 Beilby 層の再結晶も起き，粒界移動を酸化物が pin 止めするので， $1\mu\text{m}$ 程度の微結晶粒粒界に酸化物結晶粒が不連続析出することが分かった。陶材焼成後も金合金と陶材との間で化学結合を取り持つような酸化物層は生じていなかった。金合金の結晶格子は陶材との界面まで乱れることなく伸びており，原子レベルで金

合金と陶材とが直接結合出来ていることが判明した。卑金属を添加しない金合金を作製し断面観察を行うと、多くの場合、金合金と陶材の界面で破壊していたが、金合金と陶材は原子レベルで直接結合している場合もあった。金合金表面近傍に析出する卑金属酸化物が陶材と強く結合して機械的投錨効果を発揮することが、卑金属元素添加の効果と考えられる。

化学結合の寄与が大きいと考えられるチタン系の陶材焼付界面において、局所的な化学結合状態を評価するため、電子エネルギー損失分光(EELS)法を用いて局所電子状態を検討した。チタンL線吸収端の微細構造(ELNES)を解析した結果、界面の陶材側はチタン側より約1 eV内殻準位が深くなっており、陶材側でチタンのカチオン価数が高くなっている状態が認められた。

結 言

金合金系、チタン系における陶材焼付界面の原子構造を初めて明らかにできた。チタン系では化学結合の寄与が大きいことが分かった。陶材中にチタンが拡散し反応層を作るが、そのためチタン側に空隙層が出来ること、チタンに酸素が固溶して脆化することなど、マイナス面が現れた。金合金系では従来考えられていた化学結合を取り持つ中間層が存在していないことが判明した。従来のミクロンレベルでの観察に基づく結合理論に対して、原子レベル観察は全く新しい視点をもたらした。

論文審査の結果の要旨

田中康弘は昭和62年3月に九州大学理学部物理学科を卒業した後、同年4月に九州大学大学院総合理工学研究科材料開発工学専攻修士課程に入学した。平成元年3月に修士課程を修了し工学修士を取得後、同年4月1日より長崎大学歯学部歯科理工学講座に助手として勤務し、現在に至っている。

平成13年9月7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「透過型電子顕微鏡法によるチタン 陶材焼付界面微細構造のキャラクタリゼーション」の演題を発表した。語学試験(英語)は、平成11年2月9日に実施された筆記試験に合格し、また同研究科が行う英語以外の語学試験(ドイツ語)には、平成14年2月28日に合格した。学位論文の主論文としてテーシス形式の「透過型電子顕微鏡法による金属 陶材焼付界面の原子構造観察とキャラクタリゼーション」、副論文として「Nano-structure Analysis on the Metal-Bond-Porcelain Using Titanium by TEM and EELS」(Proc. Fourth Pacific Rim Int. Conf. on Advanced Materials and Processing (PRICM4), Ed. by S. Hanada, Z. Zhong, A.W. Nam, R.N. Right, The Japan Institute of

Metals, 265-268, 2001)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3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、4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14年5月27日、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6月19日の歯学研究科教授会に報告した。

本研究は歯科用メタルボンダーポーセレンにおける金属と陶材の焼付界面構造を高分解能電子顕微鏡法を用いて原子レベルで解明することを目的としたものである。

陶材の審美性と金属の靱性を兼ね備え適合精度も優れた、メタルボンダーポーセレンは歯科補綴物の中で重要な位置を占めている。陶材と金属という全く性質が異なる材料の結合機構に関して、1.機械的結合力、2.化学的結合力、3.熱膨張係数差に起因する陶材の圧縮力の三点が重要な因子として働いていることが明らかにされてきた。従来の研究はEPMA, SEM-EDX等ミクロンレベルの組織観察に基づいているが、化学的結合力は原子レベルの相互作用であり、これを確かめるためには原子スケールでの組織観察が必要である。そこで本研究では金合金系、チタン系の陶材焼付界面断面構造を透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて原子レベルで明らかにし、金属のnobilityと界面構造の関係についても考察した。

金合金系としてKIK hard(石福金属)とオペークポーセレン(VITA VMK 68)、チタン系としてJIS 2種純チタン(Selec)とチタン用ボンディングポーセレン(Super Porcelain TITAN, ノリタケ)を用いた。直径2.5mmの円柱形金属試料を歯科鑄造で作製し、半円柱形に切断した。切断面を鏡面研磨後、説明書に従いデギャッシング処理を行い、研磨面に厚さ0.1mmの陶材を盛り焼成した。二片を貼り合わせ、最終的にアルゴンイオン研磨を行い、断面TEM観察用試料を作製した。

チタン系では、デギャッシング処理後、チタン表面にサブ μm 厚のrutile構造 TiO_2 表面酸化物層が形成された。チタンと TiO_2 酸化物界面に数nm厚の TiO 相が現れ、チタンと TiO 相、 TiO 相と TiO_2 相間で格子整合性を持つ界面が形成された。また界面近傍のチタン中には多数の転位が見られたが、酸素が約30mol%固溶し、格子定数が変化したためと考えられる。陶材焼成後、チタン側には多数の転位や亜粒界が見られ、陶材側には1 μm 弱の厚さの反応層が生成した。その間に1 μm 強の厚さの中間層が現れた。中間層は酸素を約

30mol % 固溶したチタンとその間の空隙層からなるラメラ組織となった。空隙層は非晶質酸化チタンで占められており、酸素を固溶して脆化したチタンや非晶質酸化チタンがチタン側での破壊の原因となり得る。陶材側の反応層は TiO_2 相や Ti_2O_3 相酸化物が大部分を占め、 TiO_2 相は陶材と接する極狭い範囲でのみ存在が確認出来た。デギャッシング処理によって生じた rutile 構造 TiO_2 相表面酸化物層は陶材焼成後消失していた。このメカニズムに関しては解明出来ていないが、チタン系の陶材焼付界面では、チタン酸化物のカチオン価数が、陶材焼成の前後、界面に対する位置などで変化しており、化学反応が強く寄与していると思われる。

一方金合金系ではデギャッシング処理によって金合金表面が酸化物層で覆われる様子は見られなかった。卑金属添加元素であるスズやインジウムの酸化物は粒界酸化物として不連続析出していた。同時に表面 Beilby 層の再結晶も起き、粒界移動を酸化物が pin 止めするので、 $1\mu\text{m}$ 程度の微結晶粒粒界に酸化物結晶粒が不連続析出することが分かった。陶材焼成後も金合金と陶材との間で化学結合を取り持つような酸化物層は生じていなかった。金合金の結晶格子は陶材との界面まで乱れることなく伸びており、原子レベルで金合金と陶材とが直接結合出来ていることが判明した。卑金属を添加しない金合金を作製し断面観察を行うと、多くの場合、金合金と陶材の界面で破壊していたが、金合金と陶材は原子レベルで直接結合している場合もあった。金合金表面近傍に析出する卑金属酸化物が陶材と強く結合して機械的投錨効果を発揮することが、卑金属元素添加の効果と考えられた。

化学結合の寄与が大きいと考えられるチタン系の陶材焼付界面において、局所的な化学結合状態を評価するため、電子エネルギー損失分光法を用いて局所電子状態を検討した。チタン L 線吸収端の微細構造を解析した結果、界面の陶材側はチタン側より約 1 eV 内殻準位が深くなっており、陶材側でチタンのカチオン価数が高くなっている状態が認められた。

金合金系、チタン系における陶材焼付界面の原子構造を世界で初めて明らかにできた。チタン系では化学結合の寄与が大きいことが分かった。陶材中にチタンが拡散し反応層を作るが、そのためチタン側に空隙層が出来ること、チタンに酸素が固溶して脆化することなど、マイナス面が現れた。金合金系では従来考えられていた化学結合を取り持つ中間層が存在していないことが判明した。

従来のミクロンレベルでの観察に基づく結合理論に対して、本研究の原子レベル観察は全く新しい視点をもたらした。

下記審査委員会は本論文がメタルボンドポーセレンの界面構造を原子レベルで明らかにし、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	久 恒 邦 博
	副 査	教 授	熱 田 充
	副 査	教 授	羽 坂 雅 之
	副 査	助教授	白 石 孝 信

釜 崎 勢 大

(長崎県) 昭和43年 4 月27日生

授与年月日 平成14年 6 月19日

主 論 文 Photodynamic Diagnosis of Squamous Cell Carcinoma in Mouse Tongue Using 5-aminolevulinic Acid
(5 -アミノレブリン酸を用いたマウス舌扁平上皮癌における光線力学的診断法)
Fluorescence imaging of 5-amino - levulinic acid -induced protoporphyrin IX in tissues and cells using confocal laser scanning microscopy
(共焦点レーザー顕微鏡を用いた5 -アミノレブリン酸投与後のプロトポルフィリンIXの組織、細胞内蛍光像)

緒 言

光線力学的診断 (Photodynamic Diagnosis ,PDD) は、癌細胞に集積する光感受性物質を投与後、ある特定の波長を有する光を照射して行う癌の診断法である。従来、光感受性物質としてはヘマトポルフィリン誘導体を使用されてきたが、体内での代謝が遅いため、長期にわたって光過敏症が持続するという副作用の問題を残した。

近年、感光色素としてヘムの前駆物質である 5 - アミノレブリン酸 (ALA) が腫瘍選択性に富み、比較的排泄も早いとされる点で注目されている。ALA は投与後生体内でプロトポルフィリン IX (PpIX) へ代謝され、これを光励起することによって波長約635nm 付近でピークを有する赤色蛍光を発生することが知られている。本研究ではALA を用いたPDD を実験的にを行い、口腔癌におけるALA を用いた光線力学的診断法の有用性を検討し、ALA の異なった投与法にてどのような影響があるか、さらにALA 投与後PpIX が組織、細胞レベルでどのように集積しているかを検討した。

実験 1

材料及び方法

実験動物モデルとして、C3H /HeNCrj マウスを用い、舌縁部に NR -S1 マウス扁平上皮癌を移植し、舌癌

モデルを作製した。ALA は200mg/kgで腹腔内注射、また、400mg/kgで経口投与した。投与後、経時的に舌を摘出し、その断面の腫瘍部と健常部に対してパルス発振 Nd-YAG レーザー（励起波長532nm）を照射し、組織より発生する蛍光スペクトルを SMA 測光システムにて測定した。蛍光スペクトルの測定は、移植した腫瘍の中心部、腫瘍と健常組織の境界部、境界よりそれぞれ3mm、5mm離れた地点で行った。さらに、紫外線（波長400～440nm）照射し、フィルターにて波長480nm以下をカットし肉眼的に観察した。

結 果

ALA 投与後、腫瘍組織より PpIX の蛍光スペクトルが確認され、肉眼的には腫瘍部に局限して赤色蛍光が観察され、腫瘍部と周囲の健常組織の識別が可能だった。腫瘍における PpIX の蛍光強度は、腹腔内投与では1時間後に、経口投与では2時間後に最大となり、その後は速やかに低下して24時間後には投与無しのレベルまで消失していた。経口投与では腹腔内投与に比べ PpIX 蛍光は長く持続した。

考 察

いずれの投与法においても ALA 投与後、1～2時間で診断可能であり、また ALA は24時間以内に代謝されており、ALA を感光色素として用いることで、口腔悪性腫瘍の光線力学的診断を迅速かつ安全に行う可能性が示唆された。ALA は経口にて投与した方が腫瘍での停滞時間が長く、より診断に適しているように思われた。

実験 2

材料及び方法

実験1と同様に作製した担癌マウス（舌扁平上皮癌）へALAを400mg/kgで経口投与し、投与後2時間で舌を摘出した。また、同マウスの頬粘膜、口蓋粘膜、鼻粘膜、食道、気管、皮膚、胃、脳、咬筋を摘出してこれらの凍結切片（10 μ m）を作製した。

さらに、培養癌細胞として SQ1979 細胞（マウス扁平上皮癌）、HeLa 細胞（ヒト子宮癌）、NB-1、NT-1 細胞（ヒト口腔癌）を、培養正常細胞として、ラット線維芽細胞を3種（舌、口蓋、皮膚由来）使用した。これらの細胞にALAを300 μ g/mlの濃度で接触させ4時間培養した後、その塗抹標本を共焦点レーザー顕微鏡（励起波長488nm）にて PpIX の蛍光の局在を観察した。

結 果

舌癌の標本にては、PpIX の蛍光は腫瘍部に強く認められ、周囲の筋組織には殆ど観察されず、腫瘍の局在の検出が可能であった。正常組織では、主に上皮組織に PpIX の集積を認め、基底細胞層への集積がより著明であった。脳や、咬筋など筋組織では PpIX の蛍光

は全く観察されなかった。

培養癌細胞では、PpIX の蛍光が細胞質内に顆粒状に観察され、核には観察されなかった。一方、培養正常細胞ではほとんど観察されなかった。

考 察

腫瘍の凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察することにより、染色を行うことなく迅速に腫瘍の診断が可能であると思われた。ALA 投与後の PpIX は、癌組織及び、正常組織では上皮組織に集積するといわれているが、上皮組織の主に基底細胞層に集積しており、これは細胞の増殖活性に関係している可能性が示唆された。また、脳や筋組織での集積が殆ど観察されないことから、舌癌や脳腫瘍は蛍光診断に適した腫瘍であると思われた。細胞レベルでは癌細胞に特異的に PpIX の蛍光が観察され、その局在は細胞質に局限しており、核には認められなかった。これはALAからPpIXへの代謝が細胞内のミトコンドリアで行われているのではないかという現在の定説に矛盾しないものであった。

論文審査の結果の要旨

釜崎勢大は平成5年3月に長崎大学歯学部を卒業した後、同年4月に歯科医師国家試験に合格し、同年4月1日より長崎大学歯学部口腔外科学第2講座に助手として勤務し、平成7年4月より長崎大学歯学部附属病院医員、平成8年1月より同病院助手として勤務した。その間、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は、「5-アミノレブリン酸（ALA）による口腔癌の光線力学的診断に関する基礎的研究」の演題で発表した。語学試験（英語）は、平成11年2月9日に実施された筆記試験に合格し、また同研究科が行う英語以外の語学試験（ドイツ語）には、平成14年2月22日に合格した。学位論文の主論文として「Photodynamic Diagnosis of Squamous Cell Carcinoma in Mouse Tongue Using 5-aminolevulinic Acid」（日本レーザー医学会誌、22(4)、255-262(2001)）、および「Fluorescence imaging of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in tissues and cells using confocal laser scanning microscopy」（日本レーザー医学会誌、23(1)、(2002)）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。歯学研究科委員会は、これを平成14年4月17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、平成14年5月22日、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6月19日の歯学研

究科委員会に報告した。

本研究は、新しい光感受性物質である5-アミノレブリン酸(ALA)を用いた光線力学的診断を実験的に行い口腔癌におけるALAを用いた光線力学的診断法の有用性を検討し、ALAの異なった投与法にてどのような影響があるかを比較検討した。光線力学的診断(Photodynamic Diagnosis, PDD)は、癌細胞に集積する光感受性物質を投与後、ある特定の波長を有する光を照射して行う癌の診断法である。従来、光感受性物質としてはヘマトポルフィリン誘導体が使用されており、中でもフォトフリンが臨床応用も認められ、広く使用されてきました。しかしながら、ヘマトポルフィリン誘導体は腫瘍選択性が低く、また、体内での代謝が遅いため、長期にわたって光過敏症が持続するという欠点を有する。近年、感光色素としてヘムの前駆物質である5-アミノレブリン酸(ALA)が腫瘍選択性に富み、比較的排泄も早いとされる点で注目されている。ALAは投与後生体内でプロトポルフィリンIX(PpIX)へ代謝され、これを励起することによって波長約635nm付近でピークを有する赤色蛍光を発生することが知られている。

まず、4～6週齢、雄のC3H/Heマウスを用い、舌縁部にマウス可移植性NR-S1扁平上皮癌を移植した。移植後約6日目、腫瘍径が約5mmになった時点でALAを投与し、経時的に舌を摘出後、2分割し蛍光スペクトルの測定を行った。励起光源としては、Nd-YAGレーザー(励起波長532nm)を照射し、舌より発生する蛍光をSMA測光システムにて測定した。蛍光スペクトル測定後、同標本に紫外線(波長400-440nm)にて励起し肉眼的にも観察した。その結果、腫瘍部分よりALA投与によるPpIXの蛍光を確認し、肉眼的にもPpIXの赤色蛍光を腫瘍部より観察し口腔癌(舌癌)においてもALAを用いた光線力学的診断が応用可能であることを明らかにした。ALAの投与方法については、全身投与(注射、経口)、局所投与が報告されているが、それらを比較したような報告は殆どみられない。そこで学位申請者は、ALAを腹腔内注射と経口投与の実験群に分けて経時的に蛍光強度の測定を行った。その結果、いずれの投与法においてもALAは24時間以内に体内より排泄されており、光過敏症等の副作用を最低限に制御することが可能であることが確認された。また、経口投与により、蛍光診断への応用時間が持続されることを明らかにした。

次に摘出した標本の10 μ mの凍結切片を作成し共焦点レーザー顕微鏡にて同標本を観察した。蛍光スペクトルの測定結果を裏付けるように腫瘍部よりALA投与によるPpIXの蛍光を観察し、周囲の健常組織からは観察されず、腫瘍の蛍光像として得ることができた。

同顕微鏡を用いる即時的な蛍光診断が可能であることを明らかにした。ALA投与によるPpIXは腫瘍組織のみならず、正常な上皮にも集積するといわれている。そこで申請者は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ALA投与後に種々の健常組織を観察して比較検討した。その結果、口腔粘膜上皮、上部消化管の上皮、鼻腔など呼吸器の上皮にもPpIXの蛍光は確認したが、肝、腎、肺などの組織では観察されなかった。特に筋組織では全く集積しておらず、舌癌など筋組織へ浸潤していく腫瘍では、その特異性は高いものであることが示唆された。更に、細胞レベルではALAは細胞のミトコンドリアで代謝され、PpIXが生成するといわれており、申請者は癌細胞(マウス、ヒト口腔癌細胞株)、正常細胞(ラット線維芽細胞)にALAを投与し共焦点レーザー顕微鏡にて3次元的に観察した。その結果、PpIXの蛍光は癌細胞の細胞質にのみ顆粒状に観察され、諸説に矛盾しない結果だった。

本研究はマウスにてALAを用いた口腔癌の蛍光診断を実験的に行いその有用性を明らかにし、注射による投与よりも経口にて投与したほうがその特異性が長く保たれることを明らかにしたものである。さらに、ヒト口腔癌細胞株にても同様の所見を確認することによりヒト口腔癌における蛍光診断の臨床応用の可能性を示唆し、今後の臨床応用へ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が、口腔癌の診断技術の向上に深くかかわっており、今後、歯学の進歩に大きく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	井口次夫
	副査	教授	高野邦雄
	副査	教授	根本孝幸