慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Prevalence of inappropriate medication using Beers criteria in Japanese long-term care facilities
Sub Title	日本の介護保険施設におけるBeers criteriaに基づく薬剤不適切使用の割合
Author	庭田, 聖子
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.2 (2006. 6) ,p.16-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060602-0016

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Prevalence of inappropriate medication using Beers criteria in Japanese long-term care facilities

（日本の介護保険施設におけるBeers criteriaに基づく薬剤不適切使用の割合）

庭田　聖子

内容の要旨

高齢者に対して、不適切な処方となる可能性のある薬剤の使用実態を把握するための基準が複数開発されており、その中で最もよく用いられるのがBeers criteriaである。諸外国では、このBeers criteriaに基づき、在宅高齢者や施設入所者における実態が多数報告されてきた。しかしわが国の介護保険施設では、入所者の特性と処方に関するデータが制度的に収集されていないため、同様の報告は未だない。

そこで本研究では、研究事業の一環として、米国で開発された包括的アセスメント表MDS（Minimum Data Set）の日本版、MDS2.1施設ケアアセスメントマニュアルを通常の業務の中で利用し、データを収集していた介護保険施設を対象に調査を行った。MDSには入所者の健康状態などのほか、過去７日間の使用薬剤を記入する薬物治療調査票が含まれるので、介護保険施設における薬剤使用の実態を入所者特性と併せて初めて把握することが可能となった。

対象となった介護保険施設は17であり、1669名の入所者よりMDSアセスメントデータを収集し、Beers criteria 2003年版に基づいて「疾患・病態によらず不適切な薬剤」および「特定の疾患・病態において不適切な薬剤」の使用割合を求めた。さらに、前者に対して、不適切な使用に関わる要因について多変量ロジスティック回帰分析を行った。

その結果、「疾患・病態によらず不適切な薬剤」がいずれか一つ以上使用された入所者は356名（21.1%）であり、抗血栓薬チクロピジンの使用割合が最も高かった。一方「特定の疾患・病態において不適切な薬剤」が一つ以上使用された入所者は300名（18.0%）であり、便秘に対するカルシウム拮抗剤などの使用割合が最も高かった。「疾患・病態によらず不適切な薬剤」の有無を目的変数とした多変量ロジスティック回帰分析では、「向精神薬の使用」「一日あたり薬剤費の増加」「一日あたり使用薬剤数の増加」「年齢の低下」に伴って、それぞれcriteria該当薬剤の使用のリスクが上昇した。

本研究の結果を諸外国の既存研究と比較すると、個々のcriteria該当薬剤の使用割合については、チクロピジンの代替薬が未認可であったことによる不適切使用の高まり、逆に抗不整脈薬アミオダロンの処方規制があったための低下等による差異が認められた。しかしながら、全体としてのcriteria該当薬剤の使用割合、および「疾患・病態によらず不適切な薬剤」の使用に関連する要因については、諸外国における既存研究とほぼ同様な結果が示された。

今後は、より広範なデータベースを構築し、さらに不適切とされる薬剤を使用した場合のアウトカム等について探求する必要がある。

論文審査の要旨

高齢者に対して不適切な処方となる可能性のある薬剤について、使用実態を把握するための基準として最もよく用いられるのがBeers criteriaであり、諸外国では施設や在宅の高齢者における実態が多数報告されてきた。しかしわが国の介護保険施設では、入所者特性および処方に関するデータが制度的に収集されないため調べられていない。本研究では包括的アセスメント表MDS（Minimum Data Set）2.1を使用する介護保険施設を対象に調査を行った。MDSには入所者の状態のほか使用薬剤を記入する調査票が含まれるので、介護保険施設入所者の薬剤使用と入所者特性を併せて把握することが可能となる。

対象は17介護保険施設とし、入所者1669名についてアセスメントデータを収集して、Beers criteria 2003年版による「疾患・病態によらず不適切な薬剤」および「特定の疾患・病態において不適切な薬剤」の使用割合を求めた。さらに前者に関して、該当薬剤の使用に関連する要因を明らかにするため多変量ロジスティック回帰分析を行った。

その結果、個々の薬剤について既存研究と比較すると、代替薬が国内未発売であったことによる差異などが認められたが、該当薬剤全体の使用割合や、その使用に関連する要因は、諸外国とほぼ同様であった。

審査では、まず方法論として、Beers criteriaについて調査時より後に公表された版を用いた理由が質問された。これに対し、日本ではcriteriaの知名度が低いことから、最新の知見を反映させることを重視したと回答された。次に、本研究で適用された変数減少ステップワイズ法による多変量ロジスティック回帰分析以外に、説明変数間の共線性を考慮し、変数増減法の適用、単変量による施設種間比較等の追加解析が望ましいと助言された。また分析対象として頓用薬を含めた理由が質問された。これに対し、履修内容審査において、criteriaにある睡眠薬などは頓用でも多く用いられるため除外すべきでないとの指摘を受け、頓用薬を含めて分析を行ったと回答された。考察としては、諸外国における既存研究の結果はばらつきが大きいが、諸外国との比較を行った際、具体的にはどのような文献と比較したか質問された。これに対し、主に本研究と同じBeers criteria 2003年版による研究との比較を行った旨の回答があったが、医療制度や施設・在宅の差異などを考慮し、母集団が本研究と類似したものを選んで比較すべきであったと指摘された。最後に将来の研究の方向性として、施設種ごと、または疾患ごとに層別化し、より焦点を絞って分析を行うことが重要との助言があった。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、薬剤使用に関してBeers criteriaを用いた本邦初の実証的研究として有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　医療政策・管理学　池上　直己
薬剤学　谷川原祐介　衛生学公衆衛生学　大前　和幸
衛生学公衆衛生学　武林　亨
学力確認担当者：
審査委員長：谷川原　祐介

試問日：平成18年 1月11日

Angiopoietin-1 promotes LYVE-1－positive lymphatic vessel formation

（アンジオポエチン-1はLYVE-1陽性リンパ管の形成を促進する）

森　定　　徹

内容の要旨

悪性腫瘍のリンパ行性転移やリンパ浮腫などの病態の解明のためにリンパ管形成の分子機構を理解することは重要であるが、近年までリンパ管を同定する特異的な抗体などの研究材料が存在しなかったため、リンパ管形成については未知の部分が多かった。一方、血管形成においては、既にVEGFやAngiopoietin等の複数の血管新生関連分子が階層性、相互性を持って作用していることが詳細に解析されており、特にAngiopoietin-1（Ang-1）とその受容体Tie2のシグナルは、胎生期の血管構造の成熟過程に重要な機構であることがわかっている。しかしながら現在までのところ、リンパ管形成におけるAng-1シグナルに関する検討は充分になされていない。そこで本研究では、リンパ管の同定とリンパ管内皮細胞の単離のために新たにリンパ管内皮細胞に特異的に発現する分子LYVE-1（lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1）に対するモノクローナル抗体を作成し、この抗LYVE-1抗体を用いてAng-1のリンパ管形成における機能について検討を行った。

まず、マウスLYVE-1の細胞外ドメイン蛋白を抗原としてラットに免疫を行い、ハイブリドーマの選別から抗LYVE-1モノクローナル抗体を確立した。そしてこの抗体がリンパ管内皮細胞に対して免疫組織化学染色のみならずフローサイトメトリー（FACS）による解析にも有用であることを確認した。

次に、マウス胎児組織から得られた細胞を、作成した抗LYVE-1抗体と血管内皮・血液細胞の細胞表面分子に対する抗体で多重蛍光染色し、FACSを用いてリンパ管内皮細胞を単離、純化した。純化したリンパ管内皮細胞のRT-PCRによる遺伝子発現解析にて、リンパ管内皮細胞に受容体Tie2が発現していることを見出した。さらに、FACSによる経時的な解析により、リンパ管内皮細胞におけるTie2の発現強度が胎児発生段階により変化していることを見出した。

このリンパ管内皮細胞を支持細胞（OP9細胞）の存在下で共培養する系を確立し、外因性にAng-1を添加したところ、リンパ管内皮細胞のコロニー形成は有意に促進された。さらにマウス角膜を用いた*in vivo*の実験にて、角膜内に埋包したAng-1がLYVE-1陽性のリンパ管新生を誘導することを見出した。

以上より、今回作成した抗LYVE-1抗体を用いてリンパ管内皮細胞の単離に成功し、Tie2受容体が血管内皮細胞と同様にリンパ管内皮細胞にも発現し、Ang-1がリンパ管内皮細胞に作用してリンパ管形成を促進することが明らかとなった。リンパ管内皮細胞におけるTie2の発現は発生段階や臓器により異なることから、リンパ管形成におけるAng-1/Tie2シグナルは時間的・空間的に制御されていると考えられた。

論文審査の要旨

悪性腫瘍や慢性炎症などの病態に関与する血管新生ならびにリンパ管形成の分子機構を理解することは重要であるが、リンパ管の分子基盤についてはいまだ詳細に解明されていない。一方、血管新生のプロセスは複数の分子により制御されていることが知られており、その一つであるAngiopoietin（Ang）は受容体Tie2を介して発生期の血管再構築の過程に重要な働きを持つことが明らかにされている。そこで本研究ではまず、リンパ管内皮細胞に特異的な膜表面分子LYVE-1に対するモノクローナル抗体を作成し、免疫組織化学染色およびフローサイトメトリーにてこの抗体の特異性を確認した。次いでこの抗体を用いてマウス胎児組織からリンパ管内皮細胞を単離し、支持細胞（OP9細胞）との共培養の系を確立した。さらにこの系においてAng-1がリンパ管内皮細胞のコロニー形成を促進すること、またマウス角膜法の実験においてAng-1がリンパ管新生を惹起することを明らかにした。

審査ではまず、この抗LYVE-1抗体のリンパ管内皮細胞への特異性に関しての質問があった。これに対し、ウェスタンブロッティングによる特異性の確認は現在検討中であるが、今回の実験の組織化学的検討において、本抗体が血管とは明らかに異なるリンパ管に特異的に反応することを確認しているとの回答がなされた。次に共培養実験で用いている支持細胞のOP9細胞はどのような役割を持つのかという質問があり、OP9細胞自体が内因性にVEGF-Cなどのリンパ管新生因子を発現していることを確認しているため、それらとAng-1が協調的に作用した結果を評価しているのであろうとの回答がなされた。また、マウス角膜法の実験に関して、角膜のリンパ管新生には角膜内に存在する他の細胞成分の関与はないかとの質問があり、これに対し、実際、角膜のリンパ管新生にマクロファージなどの血球細胞が関与するという報告が散見されており、角膜内に介在する細胞の役割についても検討する必要があるとの回答がなされた。さらにリンパ管形成についてVEGF-CとAng-1はどの程度の相互性を持って寄与するのかという質問があり、それに対してはいまだ確たる論拠は無いこと、ただし、同じ脈管である血管の発生のメカニズムから類推してリンパ管形成にも複数の分子による階層的な制御機構が存在しうるとの回答がなされた。

以上のように、本研究はいくつかの検討課題を残しているものの、解析が不十分であったリンパ管形成の分子機構についてその一端を明らかにすることで、さらなるリンパ管形成のメカニズムの解明に繋がる可能性を示したという点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　産婦人科学　青木　大輔
　　産婦人科学　吉村　泰典　　病理学　岡田　保典
　　病理学　坂元　亨宇
学力確認担当者：
　　審査委員長：吉村　泰典

試問日：平成18年 1月14日

Association of Cryptorchidism with a Specific Haplotype of the Estrogen Receptor α Gene: Implication for the Susceptibility to Estrogenic Environmental Endocrine Disruptors

（停留精巣とエストロゲン受容体α遺伝子特定ハプロタイプの関連性：内分泌撹乱物質のエストロゲン作用に対する個体の遺伝的感受性の関与について）

吉　田　　理　恵

内容の要旨

停留精巣を含む雄性性機能障害発症率は近年増加し、その原因として大部分の内分泌撹乱物質が有するエストロゲン様作用の関与が推測されている。そして、これらのエストロゲン様内分泌撹乱物質がエストロゲン受容体を介して効果を発揮することから、同受容体遺伝子多型は、内分泌撹乱物質に対する遺伝的感受性に関与すると推測される。本研究では、この作業仮説を検証する第一歩として、停留精巣患者と対照男児を用いてエストロゲン受容体α遺伝子（*ESR1*）のハプロタイプ解析を行った。

患者（停留精巣を有する日本人男児）63例および対照（正常外陰部を有する思春期前男児）47例において、*ESR1*遺伝子全長（＞300kb）にわたり6-38kb間隔に存在し、マイナーアレル頻度15%以上のSNP15個（SNP1-SNP15）の遺伝子型を決定した。遺伝統計学的手法を用いて連鎖不平衡領域を同定し、この領域におけるハプロタイプ解析を行った。また、*ESR1*遺伝子の全エクソンおよび近傍のイントロンの配列をPCR－直接シークエンス法で決定した。

患者、対照ともに、SNP10から14を包含する約50kbの連鎖不平衡領域が同定された。この領域に存在するAGATAハプロタイプの推定頻度は、患者では34.0%、対照では21.3%と患者に多く認められた（P＝0.037）。そして、このハプロタイプは、劣性効果を有すると仮定した場合、有意に停留精巣発症と関連した（P=0.006）。さらに、AGATAハプロタイプホモ接合体頻度は、患者では10/63、対照では0/47と患者に多く認められた（P＝0.0042）。なお、AGATAハプロタイプホモ接合体患者10例において、*ESR1*遺伝子全エクソンおよび近傍のイントロン配列に構造変化は認められなかった。

本研究の成績は、*ESR1*遺伝子には連鎖不平衡領域が存在し、この領域内の特定ハプロタイプホモ接合性が停留精巣発症と相関することを示唆する。この特定ハプロタイプホモ接合体は、内分泌撹乱物質のエストロゲン様作用を増強することで停留精巣発症感受性を亢進すると推測される。文献的には、エストロゲン様作用が増強すると、ライディッヒ細胞における*INSL3*遺伝子発現抑制により精巣導体形成が障害されること、また、同細胞におけるアンドロゲン分泌低下により頭側懸垂靭帯遺残および外陰部発達障害が生じることが報告されている。特定ハプロタイプがエストロゲン様作用を増強する機序として、*ESR1*遺伝子翻訳領域の構造変化は否定的であり、その解明は、今後の研究課題である。また、現在、ミクロペニス、尿道下裂、精子形成障害などの雄性性機能障害において、*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプとの関連性が再現されるか否かを解析中である。

論文審査の要旨

停留精巣を含む雄性性機能障害発症率は近年増加し、その原因として大部分の内分泌撹乱物質が有するエストロゲン様作用の関与が推測されている。そして、エストロゲン様作用がエストロゲン受容体を介して発揮されることから、内分泌撹乱物質に対する個体の遺伝的感受性にはエストロゲン受容体α遺伝子（*ESR1*）多型が関与していると考えられる。本研究は、内分泌撹乱物質に対し高い遺伝的感受性を有する男児が雄性性機能障害を発症しやすいという作業仮説を検証する第一歩として、停留精巣患者および対照男児を用いて*ESR1*遺伝子ハプロタイプ解析を行い、*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合性が停留精巣発症と強く相関することを示した。

審査では、第一に、停留精巣患者と対照男児における環境因子の調査方法について質問された。停留精巣患者と対照男児両群において問診表への記載内容の確認および外来での十分な問診を行い、両群における環境因子をほぼ等しくしたと回答された。

第二に、内因性エストロゲンあるいはエストロゲン様作用を有する化学物質への暴露量の違いが停留精巣発症に関与している可能性について質問された。本研究結果からその可能性を完全に否定できないため、機能解析実験を行い、*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体がエストロゲン受容体を介する作用を増強することを確認する必要がある、と回答された。

第三に、男児または男性において、*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体を診断することの臨床的意義について質問された。*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体はエストロゲン様作用を有する化学物質への暴露による雄性性機能障害発症のリスクが高いと推測される。したがって、エストロゲン様作用を有する化学物質への暴露量を可能な限り少なくすることで雄性性機能障害発症を予防することが可能と考える、と回答された。

第四に、他の雄性性機能障害における*ESR1*遺伝子ハプロタイプ解析結果について質問された。現在までに小陰茎を対象として同様の解析を終了し、停留精巣発症と関連した*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプホモ接合体が小陰茎発症にも関与していることが見出された、と回答された。

また、本研究結果から停留精巣発症におけるエストロゲン様作用の関与は示唆されたが、停留精巣発症と内分泌撹乱物質の関連性を述べるためには内分泌撹乱物質を用いた直接的な検討が必要である、との指摘があった。

以上、本研究は停留精巣とエストロゲン様作用を有する内分泌撹乱物質の関連性について今後さらに検討すべき課題を残しているものの、停留精巣発症における*ESR1*遺伝子特定ハプロタイプの関連性を示した点で有意義な研究であり、エストロゲン様作用を有する内分泌撹乱物質への暴露による停留精巣発症機序の解明につながることが期待される、と評価された。

論文審査担当者　主査　小児科学　高橋　孝雄
　産婦人科学　青木　大輔　　医化学　末松　　誠
　産婦人科学　吉村　泰典
学力確認担当者：
　審査委員長：青木　大輔

試問日：平成17年12月26日

The Caudal Migratory Stream: A Novel Migratory Stream of Interneurons Derived from the Caudal Ganglionic Eminence in the Developing Mouse Forebrain

(尾側細胞移動経路：マウス発生期終脳における尾側基底核原基に由来する抑制性神経細胞の新しい細胞移動経路)

四　津　　真　人

内容の要旨

脳の神経細胞には、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞とがある。マウスの大脳の発生過程において、抑制性神経細胞は腹側の基底核原基ganglionic eminence（GE）で誕生して脳表面に平行に移動して大脳皮質、海馬、嗅球などに進入することが知られている。GEは解剖学的特徴と遺伝子発現パターンの特徴から３つの細胞産生領域［内側基底核原基medial ganglionic eminence（MGE），外側基底核原基lateral ganglionic eminence（LGE），尾側基底核原基caudal ganglionic eminence（CGE）］に分けることが出来る。MGEが主要な抑制性神経細胞の産生領域であるが、LGE、CGEも大脳皮質、海馬、嗅球の抑制性神経細胞を産生する。近年、GEに由来する抑制性神経細胞の細胞移動機構を明らかにする試みが盛んになされて来たが、その三次元的な移動プロファイルは明らかでなく、また、これらの研究がMGE/LGE由来の抑制性神経細胞を対象としていたため、CGEに由来する抑制性神経細胞の細胞移動機構は未だほとんど分かっていない。本研究ではマウス発生期終脳における各GEに由来する抑制性神経細胞の細胞移動経路、特にCGEに由来する抑制性神経細胞の細胞移動経路を明らかにするために以下の実験を行った結果、CGEから海馬へと続く抑制性神経細胞の新規の細胞移動経路を発見し、“尾側細胞移動経路Caudal Migratory Stream（CMS）”と命名した。

本研究で用いた手法としては、GEの各部分に由来する抑制性神経細胞の細胞移動経路を３次元的に解析することを可能にするために、大脳半球の小さな限られた部位に遺伝子を導入することが出来る“局所電気穿孔法”を新たに確立した。この技術を用いて胎生13.5日目のマウス大脳半球のMGEまたはCGEに赤色蛍光タンパク質を発現するプラスミドを導入し、全大脳半球培養法をもちいて40時間培養し解析した。さらに培養後の大脳半球のタイムラプス解析、*in vivo*における免疫組織学的解析、移植実験によりCMSを通る抑制性神経細胞の細胞移動の特徴を解析した。

実験結果としては、MGEに由来する抑制性神経細胞は外側方に移動し大脳皮質全体に広がって分布したのに対して、CGEに由来する抑制性神経細胞の大部分は大脳半球の最尾側端に向かって尾側に移動した。タイムラプス解析と*in vivo*における免疫組織学的解析により、CGEに由来する抑制性神経細胞の少なくとも一部が、CGEより尾側に移動し海馬にまで達する細胞移動経路に沿って移動することを見いだした。移植実験により、CGEに由来する抑制性神経細胞の尾側方向への細胞移動は胎生13.5日目までに細胞内在的に決定され、CGEという環境もこの尾側方向への細胞移動に必要であることが分かった。このCGE由来の抑制性神経細胞のGEから海馬へと続く細胞移動経路は、これまでよく知られていたMGE/LGEからの抑制性神経細胞の移動経路とは異なるため、この新規の細胞移動経路をCMSと名付けた。

本研究で確立した局所電気穿孔法は、既存の方法に比べて、①抑制性神経細胞等特定の細胞群への様々な遺伝子導入が可能であるため、強制発現法やRNA干渉法によりそれらの細胞の移動・分化に関わる分子メカニズムの解析が可能である、②脳の任意の局所への遺伝子導入が可能であるため特定の構造や細胞集団についての解析が可能である、③大脳等における細胞移動を三次元的に解析できる、などの特徴がある。

本研究ではCGE由来の抑制性神経細胞が実際に尾側に移動することを直接的に証明した。さらにCGE由来の抑制性神経細胞の少なくとも一部は海馬または尾側大脳皮質に向かって移動することを示した。このことは、海馬及び大脳皮質における抑制性神経細胞の起源について新しい知見を与えるものである。CMSの細胞移動の分子機構の解明が今後の課題である。

論文審査の要旨

脳の神経細胞には、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞とがある。マウス大脳の発生過程において、興奮性細胞は外套の脳室帯で誕生して放射状に脳表面へと移動し、皮質に進入するのに対して、抑制性神経細胞は腹側の基底核原基ganglionic eminence（GE）で誕生して脳表面に平行に移動して大脳皮質、海馬などに侵入することが知られている。本研究では、新たに“脳局所に対する電気穿孔による遺伝子導入法”を考案し、全大脳半球培養法と組み合わせる新しい実験系を確立した。それによって、GEに由来する抑制性神経細胞の三次元的細胞移動経路を明らかにするとともに、特に尾側基底核原基caudal ganglionic eminence（CGE）に由来する抑制性神経細胞の新しい細胞移動経路を発見した。すなわち、内側基底核原基medial ganglionic eminence（MGE）に由来する抑制性神経細胞は、外側方に移動し大脳皮質全体に広がって分布したのに対して、CGEに由来する抑制性神経細胞の大部分は大脳半球の最尾側端に向かって尾側に移動した。そこで、この尾側に向かう新規の細胞移動経路をcaudal migratory stream（CMS）と命名した。CMSはCGEから海馬へと続く細胞移動経路であり、このCMSの一部はcalbindin陽性細胞であること、CMSは胎生13.5日目までに細胞内在的に決定され、CGEという環境もCMSに必要であることを見いだした。

審査では、まず本研究で用いられた全大脳半球培養法では細胞移動に影響を与える可能性のある髄膜が保持されているのかどうか、また、従来知られていなかったCMSを発見できた理由について質問がなされた。それに対し、全大脳半球培養法では髄膜を保持したまま培養し、三次元観察できること、従来のスライス培養法では本来三次元的に移動する神経細胞の動きを限定してしまっている可能性が高く、本来の移動経路を見逃していたと考えられるとの回答がなされた。次に、CMSを制御する分子機構について、何が細胞の移動方向を決定しているのか、具体的にはエフリン-Eph系の関与の可能性、足場となる構造の有無について質問がなされ、これらは今後検討するべき課題として残っているとの回答がなされた。続いて、CGEとMGEの移動の違いはどの時期に決定され、最終的に機能まで異なる細胞になるのかどうか質問がなされた。それに対し、CGEとMGEは発現する転写因子が異なることから、細胞が誕生するかなり早期から異なる性質を獲得すべく運命付けされる可能性が考えられること、また最終的には機能の異なる細胞群になると考えられているが、成体のどの構造のどの細胞になるのかは今後検討すべき課題として残っているとの回答がなされた。また、新規の細胞移動経路であるCMSの意義について質問がなされ、海馬における細胞起源の検討、成体におけるニューロン新生との関わりなど、今後検討するべき課題であるとの回答がなされた。

以上のように、本研究ではさらに検討されるべき点を残しているものの、マウス大脳発生過程においてCGEから海馬へと続く新規の細胞移動経路caudal migratory stream（CMS）を見出し、海馬及び大脳皮質における抑制性神経細胞の起源について新しい知見を与えた点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　解剖学　仲嶋　一範
　　生理学　岡野　栄之　　内科学　鈴木　則宏
　　外科学　河瀬　　斌
学力確認担当者：
　審査委員長：岡野　栄之

試問日：平成18年 2月 2日

Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling

（培養を介さない分子生物学的プロファイリング法を用いた新規ヒト皮膚常在細菌の探索）

出 来 尾　　格

内容の要旨

【緒言】　皮膚の常在微生物は、*Staphylococcus epidermidis*などの好気性細菌、*Propionibacterium acnes*などの通性嫌気性細菌、*Malassezia furfur*などの真菌からなるが、それぞれがアトピー性皮膚炎、ざ瘡などの病態に関与しており臨床的に重要である。しかし従来の常在微生物の知見は培養法に基づいているため、これまで難培養難分離性の微生物については解析されておらず、その存在についてすら明らかではない。著者は、難培養難分離性の細菌を含む皮膚常在細菌の全体像を明らかにするため、培養を介さない細菌16S rRNA遺伝子の種間多様性を用いたプロファイリング解析を試み、培養法による解析と比較した。

【材料・方法】　５人の健常成人の前額部皮膚より、滅菌したプラスチック製の円筒と液体培地を含ませた滅菌綿棒を使用して、皮膚擦過サンプルを採取した。これをTS培地（好気）、EG培地（嫌気）、BL培地（嫌気）に接種して培養可能な細菌について解析する一方、サンプルから直接DNAを抽出し、細菌種ごとに異なる配列をもつ16S rRNA遺伝子のクローンライブラリを構築した。クローンごとに塩基配列を解析し、DDBJ遺伝子データベース上の既知種16S rRNA遺伝子との相同性検索により、サンプル中に含まれる細菌種を推定した。

【結果】　培養法による解析では、全サンプルから*P. acnes*と*Staphylococcus* sp.が培養同定された。菌数は１cm^2あたり$3.7x10^4$から$1.2x10^6$CFUで、過去の報告と同等であった。一方、クローンライブラリ法による解析では、培養法で検出された種に加えて、多彩な難培養難分離性の細菌が検出された。得られた計416個の16S rRNA遺伝子配列を解析したところ、これらは19の既知種と13の難培養難分離性の細菌群（phylotypes）由来であった。検出された19の既知種には、皮膚常在細菌として過去に報告がある10種のほか、皮膚常在細菌としての報告がない９種が含まれていた。一方で13のphylotypesが検出されたが、この中でもっとも多く検出されたphylotype Aは、３つのサンプルで検出され、特に１つのサンプルでは全菌種中もっとも多く検出された。得られた塩基配列の系統樹解析においては、検出された細菌はfirmicutes、actinobacteria、cyanobacteria、bacteroidetes、proteobacteriaの５つのcladeに属していた。

【考察】　本研究において、細菌16S rRNA遺伝子を用いたプロファイリング法により、ヒト皮膚常在細菌の全体像が難培養難分離性の細菌群を含む多彩なものであることが明らかになった。特にphylotype Aは５サンプル中３サンプルに検出され、クローン数と検出頻度のいずれもphylotypesの中で最も多く、重要な細菌と考えられた。これはヒトの皮膚に高頻度で存在する細菌である可能性があり、特異的プライマーを用いた分子生物学的な解析を含めた更なる検討が必要であろう。

【結論】　細菌16S r RNA遺伝子を用いた分子生物学的プロファイリング法により、ヒト皮膚常在細菌として19の既知種と13のphylotypesを検出した。うち９の既知種と13のphylotypesは新規の皮膚常在細菌の可能性がある。この培養を介さない手法は、今後皮膚常在細菌の解析に有用な技術となることが期待される。

論文審査の要旨

細菌16S rRNA遺伝子は全ての細菌に存在するが、系統発生を反映した多様性を持ち、種の同定に有用である。本研究において、５例の健常人の顔面皮膚サンプルより細菌16S rRNA遺伝子のクローンライブラリを作成した。得られた416個の遺伝子の塩基配列データを解読したところ、従来知られている皮膚常在細菌に加え、通常の方法では分離・培養が困難な細菌を含めた多様な細菌種が検出された。またその後、細菌16S rRNA遺伝子を用いたterminal RFLP法により健常人とアトピー性皮膚炎患者の皮膚細菌叢の解析が進められ、健常人・患者それぞれの細菌叢の構成の差が明らかにされつつあることが簡潔に示された。

審査ではまず、１クローンのみ検出された塩基配列が、分離・培養が困難な細菌種由来ではなくPCR増幅などの技術的なエラーに起因する可能性はないかとの質問がなされた。これに対し、２種のプライマーを用いて同じ部分の配列を二重に読んだことと、異なる16S rRNA遺伝子の塩基配列のキメラを検出するソフトを用いてキメラ配列を除外したことが、解読のエラーを最小限にするために行われていると説明された。しかし誤判断につながる解読エラーやキメラ配列が存在する可能性は残されており、実際は分離・培養が困難な細菌種が検出されたものより少ない可能性はあると回答された。

次に、サンプル採取の状況により、環境由来の微生物が混入している可能性がないかと質問があった。これに対し、皮膚細菌叢の解析には水道水や腿芥などに含まれる微生物の混入が避けられず、これは培養法を含む皮膚常在微生物の解析の不可避の問題点であるが、混入の影響を小さくするため菌数の多い顔面皮膚を用いたことが回答された。

さらに、抗生剤の内服等による細菌叢の個人内変動と個体間較差のどちらが大きいかについて質問がなされた。これに対し、過去の培養法による報告では、日内変動や抗菌ペプチドに起因すると思われる培養結果の不安定性のため、個人内変動と個体間較差の比較が不可能であったことが回答された。一方で論文作成後に施行された16S rRNA遺伝子を用いたterminal RFLP法を用いた解析により、日内変動に関わらず細菌種の数比は保たれており個人内変動は個体間較差に比べ小さいと判明したことが示された。

最後に、DNAチップを用いた解析キットの実用化の可能性について質問があった。これに対し、チップ作成の前提として菌種ごとの特異的プライマーを作成する必要があり、チップ作成に至るまでには時間がかかるものの、信号強度を段階的に検出できる検出系を用いれば実用的な解析ができる可能性は十分にあり、10種程度の細菌を検出するチップであれば臨床応用が可能であろうと回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、ヒト皮膚の細菌叢の解析に初めて分子生物学的な網羅的解析法を用い、新規な皮膚常在細菌の検出に成功した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　皮膚科学　天谷　雅行
　分子生物学　清水　信義　　微生物学・免疫学　小安　重夫
　臨床検査医学　村田　　滿
学力確認担当者：
　審査委員長：清水　信義

試問日：平成18年２月８日

Association of nicotinic acetylcholine receptors with central respiratory control in isolated brainstem -spinal cord preparation of neonatal rats

（新生ラット摘出脳幹脊髄標本におけるニコチン性アセチルコリン受容体の中枢性呼吸調節機構への関与）

羽　鳥　　英　樹

内容の要旨

（背景）ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）を介して呼吸神経回路網を含む中枢神経系活動に影響を及ぼし、様々な呼吸症状を引き起こす。nAChRには多くのサブタイプがあり、呼吸調節を司る延髄にはα4β2及びα7nAChRが存在していることが知られている。しかし、これらnAChRの中枢性呼吸調節機構における働きは充分に解明されていない。そこで本研究では、新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いて中枢性呼吸調節機構におけるnAChRサブタイプの機能的役割を検討した。

（方法と結果）新生ラット摘出脳幹脊髄標本を酸素化した人工脳脊髄液で灌流し、中枢性呼吸活動の指標として第４頸髄前根から神経活動を記録した。人工脳脊髄液にnAChR作動薬または拮抗薬を添加し、その影響を観察した。α4β2 nAChR選択性作動薬であるRJR-2403（0.1-10μM）を灌流すると呼吸数は濃度依存性に増加した。非選択性nAChR拮抗薬であるmecamylamine（0.1-100μM），α4β2nAChR選択性拮抗薬であるdihydro-β-erythroidine（0.1-100μM），α7nAChR選択性拮抗薬であるmethyllycaconitine（0.1-100μM）及びα-bungarotoxin（0.01-1.0μM）の灌流ではいずれも呼吸数は濃度依存性に減少した。次に、ブラインド穿孔パッチクランプ法による呼吸ニューロンの細胞内記録を行った。dihydro-β-erythroidine20μMの灌流により前吸息性及び吸息性ニューロンの呼息相における膜電位は過分極し、intraburst firing frequency（呼吸リズムに同期した活動電位発火頻度）は減少した。一方methyllycaconitine20μMの灌流効果は、前吸息性ニューロンにおいてはdihydro-β-erythroidineと同様であったが、吸息性ニューロンにおいてはintraburst firing frequencyの減少のみであった。

（考察と結論）本研究ではα4β2及びα7nAChRがともに中枢性呼吸調節機構に関与していることが示された。前吸息性ニューロン及び吸息性ニューロンの活動に対するα4β2nAChR拮抗薬の作用は同様であったのに対し、α7nAChR拮抗薬の作用に差が認められた。特に、前吸息性ニューロンの膜電位は過分極したが、吸息性ニューロンの膜電位は変化しなかった。このことから、前吸息性ニューロンにおいてはα4β2とα7の双方のnAChRが、また吸息性ニューロンにおいてはα4β2nAChRが存在し、呼吸神経回路網の活動を調節していると考えられた。

論文審査の要旨

本研究では、新生ラット摘出脳幹脊髄標本を用いて中枢性呼吸調節機構におけるニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）サブタイプの機能的役割を検討した。その結果、α4β2及びα7 AChRがともに中枢性呼吸調節機構に関与していることが示された。前吸息性ニューロン及び吸息性ニューロンの活動に対するα4β2 nAChR拮抗薬の作用は同様であったのに対し、α7 nAChR拮抗薬の作用に差が認められた。特に前吸息性ニューロンの膜電位は過分極側に変位したが、吸息性ニューロンの膜電位は変化しなかった。このことから、前吸息性ニューロンにおいてはα4β2とα7の両方のnAChRが、また吸息性ニューロンにおいてはα4β2 nAChRが呼吸神経回路網の活動を調節していると考えられた。

審査では、標本の周期的な発火現象が何により引き起こされるかが問われた。これに対して、この現象が灌流液中の二酸化炭素やpHにより影響を受けることから、これらが周期的な発火を引き起こしている可能性があると回答された。また、延髄より上位の脳幹が呼吸にどのように関与しているかとの質問に対しては、標本に橋を残存させると呼吸回数が減少することから延髄の呼吸ニューロンに対して抑制性伝達をしている可能性があると回答された。さらに脳幹部網様体は標本の呼吸活動に影響するかとの質問に対しては、この実験系の維持には薬剤を必要とせず、標本作成時に投与した薬剤の影響の有無に関わらず一定した呼吸回数を数時間わたり記録することができることから、その影響は少ないと予想されると回答された。中枢性呼吸調節機構においてnAChR以外の働きについての質問には、ムスカリン性AChRが呼吸調節に関与していることが明らかになっており、γ-アミノ酪酸については現在研究中であることが回答された。本研究により非脱分極性筋弛緩薬などのnAChR拮抗薬が中枢性呼吸抑制を来たしうることが明らかにされたが、これに対する治療手段について質問がなされた。これに対して、血液脳関門を通過して脳内アセチルコリン濃度を増加させるドネペジルなどの薬剤が治療手段となりうること、またその研究も現在進行中であると回答された。

本研究に対して、今後パッチクランプした状態の呼吸ニューロンに色素注入を行って形態学的な評価を加えたり、延髄より上位の脳幹部を残存させ、よりin vivoに近い状態での実験を行うなど発展性の余地がある研究との評価がなされた。また、呼吸ニューロンにおける発火現象がそれぞれ呼吸活動においてどのような意味を持つのかなどこの研究で明らかにされていない問題もあり、今後の課題とされた。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、中枢性呼吸調節機構におけるnAChRの関与を受容体サブタイプのレベルで明らかにした有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　麻酔学　武田　純三
生理学　岡野　栄之　　内科学　鈴木　則宏
解剖学　仲嶋　一範

学力確認担当者：
審査委員長：岡野　栄之

試問日：平成18年2月28日

Proinflammatory Cytokines Expression in Noise-Induced Damaged Cochlea

（音響外傷蝸牛における炎症性サイトカインの発現）

藤　岡　　正　人

内容の要旨

過大音曝露は蝸牛性の感音難聴の原因の一つとして古くから知られている。臨床上この難聴は音響外傷性難聴と診断され、治療にはステロイド大量療法が経験的に用いられる。しかしその効果は低い上に副作用が大きいため、病態生理に基づいた新規治療法が望まれている。ここ数年、音響外傷急性期における蝸牛局所への炎症細胞浸潤が動物実験レベルで報告され、急性期における抗炎症治療の重要性が再認識されるようになったが、その一方で治療標的となりうる炎症反応関連分子の発現に関する知見は未だ乏しい。今回我々は、音響外傷急性期における障害局所での炎症性サイトカイン発現を検討した。

4～6週齢のSprague-Dawleyラット雄に、無麻酔下で4 kHz中心124dBSPLの1オクターブ幅のバンドノイズを負荷した。負荷前および直後、3、6、12、24時間、3、5、7、14、28日後に断頭し蝸牛を摘出し、RT-PCR法により7種類の炎症関連物質の発現を検討したところ、TNF-α, IL-1ファミリー, IL-6に発現を認めた。IL-12 p40, GM-CSFの発現は認めなかった。TNF-α, IL-1β, IL-6の発現をTaqMan法で定量したところ、音響負荷後3時間でIL-1β, IL-6に有意なRNAの発現上昇を認めた。ウェスタンブロット法では、IL-6はやや遅れた6時間で有意な上昇を認めた。免疫組織染色では12時間未満で蝸牛外側壁の最外側にあたるtype Ⅳ, Ⅲ繊維細胞の細胞質にIL-6の発現を認め、その後外側壁に広域に分布した。この発現は活性型炎症細胞の表面抗原分子であるIba-1の発現と一致しなかった。らせん神経節でもNeuN陽性の神経細胞の細胞質に12時間～24時間後でIL-6の発現を認めた。

過去の報告から、音響外傷後の蝸牛ではマクロファージをはじめとした単球優位の炎症細胞浸潤が生じ、蝸牛内で障害を受けた細胞を貪食することが明らかにされている。他方、ノックアウトマウスの検討から、IL-6には障害局所へ炎症細胞浸潤を促進する役割があることが他臓器で知られている。急性感音難聴において広範な副作用を有するステロイド剤が大量投与される現状を考えると、発現分子特異的阻害剤による抗炎症治療には、より選択的で副作用の小さい新規治療法としての可能性がある。とくに昨今上梓されたIL-6阻害剤は、臨床治験において副作用が極めて少ないことが確認されており、今後IL-6シグナルの阻害による当モデルへの影響を検討することが急務と考えられた。

論文審査の要旨

炎症反応は組織障害に際して臓器・障害の種類を問わず、局所から生じる普遍的な生理反応である。炎症反応急性期に障害局所に生じる炎症性サイトカインに関する研究は、その阻害・抑制によって続発する一連の炎症反応を抑制し得るという意味で、臨床的観点から極めて重要である。他方、進行した感音難聴は不可逆であり、難聴や耳症状（耳鳴・耳閉塞感など）に生涯悩まされることとなるため、急性期における蝸牛障害の抑制は耳科学の重要なテーマである。昨今の音響外傷急性期における蝸牛局所での炎症細胞浸潤に関する報告に鑑み、今回、病態生理に基づいた副作用の少ない感音難聴に対する新規抗炎症治療標的を探索する目的で、音響外傷蝸牛急性期における炎症性サイトカインの発現を検討した。

審査では、まず本研究の前半部において、有意な発現上昇が定量RT-PCRで確認されているIL-1βのタンパク質レベルでの検討も進めるべきとの助言がなされた。次にIL-6の有意な発現上昇にRT-PCRでは音響負荷後3時間、ウェスタンブロットでは6時間と差があることに関して質問がなされ、何らかのtranslationalな調節がなされている可能性があるとの回答がなされた。続いて免疫組織染色では12時間で蝸牛外側壁に広域に発現した後24時間で減弱したことと関連し、IL-6タンパク質の安定性について質問がなされた。これに対し、蝸牛内での分解やタンパク自体の半減期は明らかではないが、蝸牛リンパ液は脳脊髄液へ還流されることから、今回検討したIL-6も同様の経路で排泄されている可能性があると回答がなされた。早期の発現部位であったⅣ型、Ⅲ型線維細胞の機能について、前者が蝸牛内でのカリウムイオンのリサイクルを担う細胞の一員であることが述べられると同時に、後者はaquaporinの発現が報告されているので、おそらく蝸牛内のリンパ液環境の恒常性維持に何らかの関与をしているであろうとの回答がなされた。初期において外側壁に限局した発現が見られることの機序や生理的意義についての質問には、自己免疫性難聴モデルでも蝸牛外側壁の線維細胞において炎症反応関連分子の発現上昇が報告されていることを挙げ、本来、蝸牛線維細胞そのものに細胞レベルで炎症を惹起する性質があるのだろうという推察がなされた。またコルチ器下面の線維細胞にもIL-6が強発現していたことが述べられ、音響負荷による振動刺激からIL-6発現が誘導される可能性が述べられた。これに対し、蝸牛外側壁は血管に富んでいることから、炎症関連物質の産生や炎症細胞浸潤には、血管攣縮や血流障害も関与しているのであろう、との助言がなされた。

次に、IL-6発現部位の周囲にIba-1陽性細胞が分布したことに関連して、この細胞の由来について質問がなされた。これに対し、過去の報告から外側壁に分布する同細胞はCD45陽性CD11b陽性であり、骨髄由来の浸潤細胞と考えられるとの回答がなされた。浸潤細胞の種類に関する質問には、過去の報告から単球優位で、リンパ球の浸潤に関する報告はないとの回答がなされ、その原因として、音響外傷蝸牛で発現上昇が報告されているMCP-1などの好中球遊走因子の関与の可能性が述べられた。

最後に、これらの現象は音圧によるコルチ器障害に続発するものであって、外側壁障害による直接の現象ではないのではないか、との質問がなされた。これに対し、今回検討したモデルでは音響負荷は2時間連続して負荷しているためおそらくはコルチ器の障害とは独立して外側壁に物理的侵襲が生じていると考えられるが、両者の関係を明らかにするためには、予め耳毒性薬物などでコルチ器を障害した個体で音響外傷モデルを作成して、IL-6発現に変化が生じるかを比較検討する必要があるだろうとの回答がなされた。

以上のように当研究には未だ検討すべき課題が残されているものの、音響外傷に際して蝸牛外側壁から炎症性サイトカインの発現を伴う炎症反応が生じるということを初めて示した研究として、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　耳鼻咽喉科学　小川　郁
　　外科学　河瀬　斌　　微生物学・免疫学　小安　重夫
　　解剖学　仲嶋　一範
学力確認担当者：
　審査委員長：河瀬　斌

試問日：平成18年2月15日

司法解剖例における心中の検討

保　科　　光　紀

内容の要旨

〈目的〉我が国では「心中」という言葉は古くは相思相愛の男女が相互の合意のもとに「自殺」するという意味で理解されてきた。最近ではむしろ母子心中という言葉が報道でよく聞かれるようになっている。一方、海外では心中事例そのものが少なく、法医学領域では加害者と被害者という視点からmurder followed by suicide、すなわち加害者が殺人の後に自殺する事例、精神医学領域ではsuicide pact、すなわち合意のある事例が中心であり、それぞれ関心のある事例が異なっている。本研究では、慶應義塾大学医学部法医学教室での司法解剖例における無理心中及び合意のある心中の事例を調べ、全体像やそれぞれの中での加害者と被害者の関係、殺人の手段、動機等を示すとともに、海外文献との比較を行うことや、現在のところ統一された心中の定義がないため、筆者としての定義を提案すること、更に心中の防止策を検討することを目的とした。

〈方法〉1945年９月から2003年12月までの期間に慶應義塾大学医学部法医学教室で施行された司法解剖（総数7276体）の解剖記録を調査し、心中事例を抽出した。これをもとに加害者と被害者の関係、動機、手段、年齢分布等について分析した。また、情報を補うため、1984年以降の事例は新聞のデータベースを検索し、該当事件について参照した。

〈結果〉298例の心中事例が抽出され、そのうち259例が無理心中であった。加害者と被害者の関係では、母子心中が110例と最も多く、恋愛関係の男女間の事例はわずか16例であった。動機は母子心中では育児ノイローゼが最も多く、高齢の夫婦の心中では健康問題、経済困難、一家心中では経済困難が最も多かった。殺人の手段は絞頸が最も多く、母子心中や合意のある者同士の心中では一酸化炭素中毒、睡眠薬中毒などの暴力的でない手段が多かった。海外では夫婦、恋人の間での無理心中が最も多く、動機の主たるものは関係の破綻であり、手段は銃が最も多いなど我が国とは大きな違いが見られた。

〈考察〉心中の定義が統一されていないため、研究によって無理心中として扱う事例の範囲が異なっていた。このため、無理心中の定義を「加害者が被害者を殺害した後に自殺する意志を持っていた事例」と明確にする必要があると考えられた。また、わが国では無理心中の中で最も多い母子心中を防止することが重要であり、母親の孤立を防ぐために看護的な介入が有効であると考えられた。

論文審査の要旨

本研究は慶應義塾大学医学部法医学教室で司法解剖となった事例のうち、心中事例を調査し、その特徴を明らかにし、さらに海外の事例との比較を試みたものである。1945年９月から2003年12月までの期間の7276例の司法解剖例のうち心中事例は298例見られ、内訳は無理心中が259例、合意のある心中が39例であった。無理心中の中では母子心中が110例と最も多く、従来我が国に特徴的と考えられていた恋人同士の事例は16例しか見られなかった。手段は絞頸の116例が最も多かった。母子心中や合意のある心中では一酸化炭素中毒や薬物中毒など暴力的でなく、両者が同時に企図出来る手段が多かった。しかし、手段には時代による変遷が見られ、近年では一酸化炭素中毒や薬物中毒は見られなくなっている。また、海外との比較では、心中自体が稀とされているが、配偶者や恋人同士の心中が最も多く、手段は銃器によるものが最も多いなど我が国の事例との相違が見られ、これには手段の入手の容易さや文化的な背景の違いが反映されていると考えられた。

審査ではまず、無理心中の定義を「加害者が自殺する意志をもって殺人を犯した事例」とした点について、どのように意志を確認するのかとの質問があった。これに対し、解剖記録の記載や新聞のデータベースを参照したものの、加害者が死亡していたり、記録の不備などから意志の確認が困難な事例もあり、事例抽出の限界であると回答された。また、母子心中の防止に看護師による訪問指導などの介入が有効であると考察した点に関して、本研究の結果と考察が一致していないのではないかとの指摘があった。この点については文献的な記述のみを根拠としているが、母子心中の背景の調査から母親の孤立を防ぐことが防止策として有効であると示唆されるとの説明がなされた。さらに、近年一酸化炭素中毒や薬物中毒による心中事例が見られなくなっているとの結果について、事件性のない事例は東京都の場合、監察医務院での行政解剖になっている可能性が高く、実際に減少しているとは言えないのではないかとの指摘があった。これに対し、司法関係者の判断により司法解剖に至らない心中事例がありうるという研究上の限界が存在すると回答された。今後の課題として監察医務院の事例を含めたより多数例での検討が必要であると指摘された。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、我が国での多数例における心中の特徴を明らかにし、海外の事例との比較を行い、将来の研究のために無理心中と合意のある心中の定義を提案し、有効と考えられる予防策を示唆したという点で有意義とされた。

論文審査担当者　主査　精神神経科学　鹿島　晴雄
法医学　藤田　眞幸　　医療政策・管理学　池上　直己
解剖学　相磯　貞和

学力確認担当者：
審査委員長：藤田　眞幸

試問日：平成18年1月27日

Prevention of Cancer Cachexia by a Novel Nuclear Factor κB Inhibitor in Prostate Cancer

（前立腺癌における新規NF-κB阻害剤による癌悪液質の抑制）

黒　田　　健　司

内容の要旨

癌悪液質は前立腺癌患者において、その治療を困難なものとし死因の一つとなり得るものであるが、最近の研究からinterleukin 6（IL-6）を初めとするサイトカインの異常産生及び放出が、悪液質の誘導に関与していると考えられている。本研究では前立腺癌患者におけるIL-6と悪液質との関連性について検討し、ホルモン抵抗性前立腺癌細胞株を用いた動物実験において新規NF-κB阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomicin（DHMEQ）のIL-6及び悪液質に対する抑制効果について検討した。

（材料・方法）患者群の前立腺癌患者98例において、IL-6値や悪液質のパラメーターを測定した。細胞株はホルモン抵抗性前立腺癌細胞株JCA-1細胞を用い、薬剤は新規NF-κB阻害剤DHMEQを使用した。

動物実験では、JCA-1細胞（1×10^7個）をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍径が10mmに到達した時点でマウスを無作為に３群に分類した。３群はそれぞれ薬剤DHMEQ投与群（８mg/kg、n＝12）、溶媒DMSO投与群（n＝16）、薬剤非投与群（n＝11）とした。DHMEQ、DMSOは25日間連日腹腔内投与した。また腫瘍を移植せず、また薬剤も投与しないコントロール群（n＝14）を設け、４グループのマウス群で実験を進めた。実験期間中、全てのマウスの体重を一日おきに測定した。また、屠殺時に全てのマウスの腫瘍、腓腹筋重量、精巣上体脂肪重量、ヘマトクリット値、トリグリセリド値、アルブミン値、IL-6値を測定した。

（結果）前立腺癌再燃患者群は、IL-6値、PSA値、アルブミン値、ヘマトクリット値、body mass index、performance statusの全てにおいて未治療群、寛解群に比し、有意な差を示した。

動物実験では、担癌薬剤非投与マウス群及び担癌DMSO投与マウス群の体重が経時的な減少を認めたのに対し、担癌DHMEQ投与マウス群の体重は有意な減少を示さなかった。実験第26日目の時点で、担癌DHMEQ投与マウス群の体重、腓腹筋重量、精巣上体脂肪重量は有意に他の担癌マウス２群よりも高値であり、ヘマトクリット値、トリグリセリド値も同様に他の担癌２群よりも有意に高値であった。またIL-6値は、他の担癌２群よりも有意に低値であった。アルブミン値は、担癌DHMEQ投与マウス群において担癌薬剤非投与マウス群より有意に高値であった。

（結論）進行性前立腺癌患者においてIL-6値と悪液質との関連性が示され、また基礎実験においてDHMEQがIL-6産生を抑制し、悪液質の進行を抑制することが示された。新規NF-κB阻害剤DHMEQは進行性前立腺癌における悪液質に対する新たな治療薬となり得ると考えられた。

論文審査の要旨

前立腺癌患者における血清IL-6値と悪液質との関連性について検討するとともに、ホルモン抵抗性前立腺癌細胞株を用い、新規NF-κB阻害剤dehydroxymethylepoxyquinomicin（DHMEQ）のIL-6産生及び悪液質に対する抑制効果について検討した。前立腺癌患者98例の検討において、再燃群ではIL-6値が高値であり、悪液質を示す検査値、ヘマトクリット（Hct）、アルブミン（Alb）の低値を認めた。またIL-6高値群では有意に予後不良であった。前立腺癌細胞JCA-1移植ヌードマウスにおいて、DHMEQ投与により体重、精巣上体脂肪重量、腓腹筋重量の減少が有意に抑制されるとともに、Hct値、Alb値、トリグリセリド値は有意に高値を示し、IL-6値は有意に低値を示した。以上より、進行性前立腺癌患者においてIL-6値と悪液質との関連性が示され、動物実験においてDHMEQがIL-6産生を抑制し悪液質を改善したことが示された。

審査では、本研究にホルモン抵抗性前立腺癌細胞株を使用する意義について問われ、アンドロゲン非依存性で増殖が速やかな、癌悪液質の動物実験に適した細胞株の必要性が説明された。また再燃癌患者におけるIL-6値が有意に高値である点については、癌細胞の性質がホルモン依存性から非依存性へと変化するのに伴い、IL-6産生能を有する癌細胞がオートクライン及びパラクライン的に増殖していくためと考えられると回答された。また他のサイトカイン抑制の有無を確認すべきではなかったかという指摘に対しては、既知の報告では前立腺癌におけるIL-1、TNF-α等と悪液質との関連性も示唆されるが、癌悪液質の動物実験においてはIL-6の重要性を示唆した報告例が多いとの回答がなされた。また実験期間中担癌マウス間の腫瘍体積に有意差がないにもかかわらずIL-6値に有意差が現れた結果について問われ、DHMEQにより腫瘍細胞のIL-6産生が有意に抑制されていたものと考えると回答された。実験期間途中、担癌マウスのうちDMSO投与群の体重と薬剤非投与群の体重間で有意差が認められた点については、実験終了までDMSO投与マウスの体重減少は抑制されず、最終的にDHMEQ投与群の体重との間に有意差が認められたことから、DMSOは悪液質に対し特別な効果はないと判断したと答えられた。本研究においてはマウス腫瘍細胞の病理組織学的検討も考慮すべきであったとの指摘がなされた。

以上、本研究ではさらに検討すべき課題を残しているものの、前立腺癌患者における悪液質とIL-6値との関連性を示し、動物実験においてDHMEQにより悪液質パラメーターの改善が認められたことで、進行性前立腺癌における悪液質に対する新たな方向性を示唆し得る有用な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　泌尿器科学　村井　勝
　　病理学　坂元　亨宇　　先端医科学　河上　　裕
　　外科学　北島　政樹
学力確認担当者：池田　康夫、坂元　亨宇
　　審査委員長：坂元　亨宇

試問日：平成18年2月9日

Clinical and Behavioral Impact of Implementing Community-Based Diabetes Disease Management in Japan

（日本での地域糖尿病管理の導入による臨床ならびに患者行動に及ぼす影響）

坂　巻　　弘　之

内容の要旨

目的：欧米で注目されている疾病管理の概念をもとに、島根県安来市における糖尿病管理プログラムの効果を臨床的指標ならびに患者行動、QOLの面から検討し、それらに影響を与える要因を検討することを目的とした。同プログラムは、地域での診療標準と共通教育ツールの作成、登録された患者について「糖尿病手帳」を用いた医療機関連携における患者情報の共有とモニタリングを中心としている。

方法：登録された２型糖尿病患者のうち、ベースライン（2002年１月～２月実施）と介入後（2003年１月～２月実施）の両アンケート調査に回答の得られた316例を対象とした。調査に先立ち、安来市立病院倫理委員会での審査を受けた。患者の日常生活管理をサポートするためのツールとして「ライフスタイルノート」（以下「ノート」という）とよぶ日記を作成し、患者の日常生活上のリスクに応じた到達目標の設定、達成状況の定期的チェックを中心とした介入を行った。介入効果は、臨床的指標（体重、BMI、血圧、HbAlc、血清脂質）を糖尿病手帳から、患者行動（食事・運動指導への順守、糖尿病に関する知識、食生活状況の自己評価）およびQOL尺度としてPAID（Problem Areas in Diabetes；疾病特異的尺度）ならびにEQ-5D（包括尺度）を、それぞれアンケート調査によってデータ収集し、分析した。

結果：対象患者の男女比は男50.6%、登録時年齢59.6±8.1歳、経口剤治療32.0%、インスリン治療14.9%であった。介入前後の各指標をみると、拡張期血圧（P<0.001）、HbAlc（P<0.001）、中性脂肪（P=0.038）、食生活スコア（P<0.001）、糖尿病に対する知識（P=0.012）において有意な改善が認められた。QOLについては、PAIDは有意に改善（P<0.001）したが、EQ-5Dは有意に悪化した（P=0.026）。介入後の臨床的指標、患者行動との関係をみると、指導への順守状況のよいものではHbAlc（P=0.022）、食生活スコア（P<0.001）、知識スコア（P<0.001）のいずれも有意に良好な値であった。またノート使用有無でみると、介入後の食生活スコアでノート使用群が非使用群に比べ有意に優れていた（P=0.002）。

考察と結論：ライフスタイルノートによる生活習慣指導を中心とした介入によって検査値と食生活、知識について有意な改善が認められた。しかしながら、QOLについてはPAIDについては改善がみられたのに対し、EQ-5Dについては悪化しており、QOLについての解釈の難しさが明らかになった。本地域での糖尿病管理プログラムは、医師主導型で医療機関を中核とした地域での疾病管理モデルとして簡便で現実的な方法と考えられるが、今後、医療費等への影響も含めたより長期にわたる検討が必要である。

論文審査の要旨

島根県安来市における地域での糖尿病に対する疾病管理の効果を臨床的指標ならびに患者行動、QOLの面から検討し、それらに影響を与える要因を検討することを目的とした。対象患者は、登録された２型糖尿病患者のうち、介入前後２回のアンケート調査に回答の得られた316例である。患者の日常生活管理をサポートするために、生活上の改善目標を設定し管理を行うためのツールとして「ライフスタイルノート」（以下「ノート」という）を用いた介入を行った。効果の評価尺度は、臨床的指標（BMI、臨床検査値）、患者行動・糖尿病に対する知識、およびQOLを用いた。その結果、HbAlc、拡張期血圧等の検査値と食生活スコア、知識スコアにおいて有意な改善が認められた。しかしながら、QOLについては、糖尿病疾病特異的尺度であるPAIDは改善がみられたのに対し、包括尺度であるEQ-5Dは悪化しており、QOL尺度の解釈の難しさが明らかになった。さらに、ノート使用有無でみると、介入後の食生活スコアでノート使用群が非使用群に比べ有意に優れており、食生活習慣改善に対して本介入方法が有効であることが示唆された。

審査では、第１に、２回のアンケートに回答した集団の代表性について質問があった。これに対し、性・年齢、検査値等はデータが得られるものの、患者の行動、知識、QOLはアンケートでしか把握できないため、代表性の検証を十分できないので行わなかったと説明された。第２に、ノート配布方法について質問され、ノート配布は当該地域の糖尿病患者ほぼ全員に配布されていることが説明された。第３に、介入を標準化するための方法とその検証をどのように行ったかについて質問があった。これに対して、医師・看護師に対してノート使用における患者の目標設定や指導方法に関して事前説明会を実施しているものの、匿名化されているために、医療機関毎の指導内容について確認を行うことができなかったと説明された。第４に、QOLについて、PAIDの改善とEQ-5Dの悪化という、相反する結果が得られたことの解釈について質問された。これに対して、PAIDは心理的負荷面を計測しているので、生活指導により心理的負担感の改善がもたらされたと推測されるのに対し、EQ-5Dでは５質問中１項目でも悪化するとスコアが大きく減少することの影響の可能性があると回答された。最後に、本手法の有効性を客観的に示すためには他地域で再現性を検証すべきであったとの指摘があったが、患者データを継続して収集できる地域が他になく、新たなデータ収集の協力体制を得ることが困難であったため、１地域に止まざるをえなかったと説明された。

以上のように、本研究にはさらに検討されるべき課題を残しているものの、わが国初の地域での疾病管理の効果を検証した研究として評価された。

論文審査担当者　主査　医療政策・管理学　池上　直己
衛生学公衆衛生学　大前　和幸　衛生学公衆衛生学　武林　　亨
精神神経科学　鹿島　晴雄
学力確認担当者：池田　康夫、大前　和幸
審査委員長：大前　和幸

試問日：平成18年3月3日

Spinal Kyphosis Causes Demyelination and Neuronal Loss in the Spinal Cord
A New Model of Kyphotic Deformity Using Juvenile Japanese Small Game Fowls
(脊柱後弯変形は脱髄と脊髄神経細胞の脱落を生じさせる：小軍鶏を用いた新しい後弯変形の動物モデル)

清　水　　健　太　郎

内容の要旨

脊柱変形による遅発性脊髄麻痺は臨床上しばしば経験する病態である。麻痺発生のメカニズムはなお不明な点が多いが、その一因は今まで適切な動物モデルがなかったために基礎的研究ができなかったことが挙げられる。本研究では、幼若動物を用いて手術的に頚椎の局所後弯変形を発生させる新しい動物モデルを確立し、このモデルを用いて後弯変形に伴う脊髄の組織学的変化を検討した。

研究には、生後５週齢（約200～300g）の小軍鶏75羽を用いた。全身麻酔下に、C4-5高位の傍脊柱筋を剥離横切したのち当該高位の椎弓切除及び椎間関節破壊を行った。術後、経時的に４％パラホルムアルデヒドを用いた経心臓的灌流固定を行い、脊椎と脊髄を一塊として摘出した。画像評価として、頚椎部の側面単純X線を撮影した。後弯の頂点をはさむ椎体長軸のなす角度を計測し後弯角とした。病理組織学的評価として、脊髄のみを取り出し、最大圧迫部の横断切片を作製しHE染色、Toluidine blue染色を行った。さらに電子顕微鏡による観察を行った。画像解析としては、コンピュータ画像解析装置（WinRoof）を用い、前角細胞、髄鞘を定量化した。後弯角と脊髄扁平率（前後径／横径）、脱髄の程度（髄鞘面積率）ならびに前角細胞数の相関を検討した。また微細血管の検討のために、手術８週後に、10％ゼラチン加墨汁（0.5ml/g体重）を造影剤として用いた経心臓的全身血管造影を行った。

術後、全例で頚椎に進行性の後弯変形が生じた。後弯変形は術後３週まで進行し、その後は固定した角度のまま安定化した。脊髄は後弯の頂点で最も高度に扁平化し、腹側より圧迫されていた。後弯角と脊髄扁平率に強い相関（r＝-0.91）が認められた。灰白質の前角細胞は萎縮、脱落し、前索部に軸索の脱髄と空胞変性が認められた。脱髄は、後弯がより高度になるにつれて、前索、側索、後索の順に進行した。後索部では後弯変形が顕著で脊髄が扁平化しても髄鞘は温存されていた。血管造影では扁平した脊髄の血管網の途絶、血管数の減少、脈管の縮小などの変化を認めた。これらの所見は脊髄の腹側に顕著で、後弯が高度になるほど顕著であった。

慢性脊髄圧迫の動物モデルとしてtwyマウスがよく知られているが、自然発症モデルであるため、圧迫方向や再現性に問題がある。また過去に報告された動物実験における脊髄麻痺はほとんどが急性圧迫によるものであった。本モデルは二足動物である幼若鳥類を用いて、頚椎に手術的操作を加えることにより成長と共に再現性のある進行性の後弯変形を生じるもので、後弯に伴う脊髄の病態を解明する上で極めて有用なモデルといえる。本研究では、頚椎後弯変形の進行に伴い脊髄の扁平化が顕著になり、灰白質では前角細胞の脱落、白質では脱髄、空胞変性が生じ、脱髄変化は前索→側索→後索へと進行することを明らかにした。これらの脊髄内の組織学的変化は腹側からの持続的な機械的圧迫に加え血流障害によるものと考えられた。

本研究の結果は、カリエス、骨粗鬆症などに臨床上みられる遅発性脊髄麻痺の病態解明に大きな一助となるものと考えている。

論文審査の要旨

脊髄は一般に慢性圧迫に対して強い抵抗性を示すが、脊椎カリエスや骨粗鬆症性脊椎圧迫骨折後などに生じる遅発性脊髄麻痺は、臨床上しばしば経験する病態である。しかし、このメカニズムを解明するための適切な動物モデルはこれまで存在しなかった。過去の研究は、急性の脊髄圧迫による動物モデルがほとんどであり、twyマウスなど他の慢性圧迫モデルも圧迫の再現性、臨床例との類似性などで問題点を有していた。本研究では、幼若鳥類の頚椎に手術的に進行性の局所後弯変形を発生させる新しい動物モデルを作製し、このモデルを用い、変形による脊髄圧迫障害の病態を検討した。実験には生後５週齢の小軍鶏75羽を使用した。全身麻酔下にC4～C5高位の頚椎に椎弓切除及び椎間関節破壊を行うと、術後、同部に再現性のある進行性の後弯変形が生じ、脊髄圧迫を来した。脊髄は頚椎後弯の頂点で腹側より圧迫され扁平化し、後弯変形の進行にともない脊髄の扁平化も顕著になり、それに伴い前角細胞の脱落、脱髄、空胞変性などの組織変化が生じ、その変化が前索→側索→後索の順に進行することが明らかになった。また微小血管造影では、扁平化した脊髄の血管数の減少、脈管径の縮小などの変化を認め、圧迫を受けた脊髄の組織学的変化には、持続的な機械的圧迫に加え、血流障害も関与している可能性が示唆された。

審査では、まず小軍鶏の脊髄の解剖について質問がなされた。これに対して、基本的にはヒトと同じであり、血流も前脊髄動脈、分節動脈が脊髄に還流していると回答された。このモデルの将来の応用についての質問には、慢性圧迫には急性圧迫と異なる代償作用が存在する筈で、今後はヒトの脊髄障害における病態、たとえば高度な圧迫や後弯を呈しMRIでT2高輝度変化を認めてもしばしば無症状の症例が存在する原因の解明等につなげたいと回答された。実験方法と再現性についての質問には、後方の支持組織のみを破壊し脊髄に侵襲を加えない点が原則であり、手術操作により後弯変形は容易に再現できると回答された。また運動麻痺の起きなかった理由について質問がなされた。これに対して、鳥類の運動伝導路の局在が不明で圧迫部位と異なる可能性、圧迫のみならず不安定性やtetheringが関与する可能性が考えられること、また小軍鶏が羽根（上肢）を動かさない鳥であることが運動評価を困難にしていると回答された。臨床上、脱髄の修復や治療効果の評価などにもこのモデルは有用と考えられ、今後の発展として、MRIの画像などを取り入れた評価や、最大圧迫部より上下での組織血流評価も行うべきだとの指摘がなされた。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、二足動物である鳥類を実験動物に選び、後弯変形による緩徐な脊髄圧迫を来す有意義なモデルを開発し、今後の臨床例の病態解明につながる研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
　　内科学　鈴木　則宏　　解剖学　仲嶋　一範
　　外科学　河瀬　　斌
学力確認担当者：池田　康夫、鈴木　則宏
　　審査委員長：鈴木　則宏

試問日：平成18年２月７日

Effects of morphine and its metabolites on immune function in advanced cancer patients

(末期がん患者におけるモルヒネとその代謝産物の免疫機能に及ぼす影響)

橋口　さおり

内容の要旨

モルヒネはがんに代表される激しい疼痛の治療に広く使用される一方で、その副作用として免疫抑制作用があることが注目されている。しかし、これまでの研究のほとんどは基礎的な生体外分析や動物実験のデータであり、ヒトの末期がん患者を対象に、その免疫機構に対してモルヒネ及びその活性代謝産物がどのような影響を及ぼすかは不明であった。そこで本研究では末期がん患者を対象とし、モルヒネとその活性代謝産物であるMorphine-3-glucuronide（M-3-G）及びMorphine-6-glucronide（M-6-G）が免疫機構に及ぼす影響について検討した。

【対象】慶應義塾大学病院ペインクリニックを受診した癌性疼痛を有する末期がん患者15名。

【方法】初回受診時またはモルヒネ投与量、投与経路など治療方針変更前、変更１週間後、変更３週間後に静脈血採血を行った。血漿モルヒネ濃度、血漿M-3-G濃度、血漿M-6-G濃度と、細胞性免疫の指標としてCD4$^+$、CD8$^+$、NK細胞活性、PHA刺激リンパ球幼若化試験、液性免疫の指標としてIgG、IgMを測定した。

【結果】本研究への参加の時点で、それまでモルヒネを投与された既往がない患者６名をⅠ群とし、既に１ヶ月以上モルヒネを投与されていた患者９名をⅡ群とし、両群の血漿モルヒネ及び活性代謝産物濃度と免疫機能の関連を比較した。研究期間中、両群ともに疼痛は平均4/10（visual analogue scale）であったものが2/10にコントロールされていた。Ⅰ群はⅡ群と比較してM-3-GおよびM-6-Gは有意に低値であったが、免疫学的指標は両群とも有意な差が認められなかった。Ⅰ群においては活性代謝産物と免疫グロブリンおよびPHA刺激リンパ球幼若化試験において負の相関関係が認められたが、Ⅱ群では認められなかった。

【考察】末期がん患者において、モルヒネ投与初期にモルヒネの活性代謝産物によって液性免疫、細胞性免疫の両方に抑制作用を持つ可能性が示唆されたが、一ヶ月以上の長期にわたってモルヒネを投与された患者では免疫抑制作用は認められなかった。これは、慢性的にモルヒネを投与された場合、免疫抑制作用に対しても耐性が形成されるという動物実験による結果を支持するものである。本研究において負の相関を示したいずれの免疫指標もほぼ正常値の範囲内での変動となっており、疼痛を適切に治療することによる免疫抑制の回避と、モルヒネやその活性代謝産物による免疫抑制作用のバランスにおいて、末期がん患者へのモルヒネの投与は許容され得るものと考えられる。

論文審査の要旨

末期癌患者を対象とし、モルヒネとその活性代謝産物であるorphine-3-glucuronide（M-3-G）及びmorphine-6-glucuronide（M-6-G）が免疫機構に及ぼす影響について検討した。初回受診時、モルヒネ投与量変更１週間後、変更２週間後に採血を行い、モルヒネ、M-3-G、M-6-Gの血中濃度と、CD4+、CD8+、IL産生能、NK細胞活性、phytohemagglutinin（PHA）リンパ球幼若化反応、IgG、IgMを測定した。モルヒネ投与の既往がない患者をⅠ群、モルヒネを投与されていた患者をⅡ群とし、モルヒネ及び活性代謝産物濃度と免疫機能の関連を比較した。Ⅰ群では活性代謝産物とIgMおよびPHA刺激リンパ球幼若化反応に負の相関関係が認められたがⅡ群では認められなかった。末期癌患者においてモルヒネ投与初期に活性代謝産物によって液性免疫、細胞性免疫の両方に抑制作用を持つ可能性が示唆されたが、免疫指標は正常値の範囲内での変動となっており、末期癌患者へのモルヒネの投与は許容され得ると考えられた。

審査ではまず脱落症例の理由と結論への影響について明確にされるべきとの指摘があった。また放射線療法や化学療法を受けた患者が含まれており影響を検討すべきとの指摘があり、症例数が少なく多変量解析が困難であったと回答された。採血は服薬後一定の時間にすべきとの指摘があった。免疫指標の変化が正常範囲内であったことについての解釈が問われ、数値は下がっているが臨床的に問題のない変動であり、患者の背景は様々であるが免疫抑制作用は大きく影響を与えない旨の回答であった。次に代謝産物の血中濃度のばらつきについて、肝転移による代謝への影響が出ているのではないかとの指摘があった。肝機能障害指標が軽度上昇し肝機能が転化した症例もあり、代謝に影響した可能性がある旨の回答があった。進行癌患者の免疫状態について、個々の癌については検討されているので、考察に加えるべきであったとの指摘があった。また坐薬の投与法について、挿入の深さによって薬物の吸収に差が出るので、今後は投与方法を十分指導すべきとの助言があった。モルヒネが判別分析で有意ではなくなった点についての解釈について質問には、生体ではモルヒネとその代謝産物が単独で存在することはなく、其々の影響の程度を解析する必要があるために判別分析を行い、モルヒネより代謝産物の影響が大きいと解釈できると回答された。また、IgMは抑制されたがIgGは抑制されなかったことについて、IgMに続きIgGが誘導される過程でT細胞の関与があり興味深いとのコメントがあった。

以上、本研究は様々な課題を残しているが、これまで主に基礎研究で指摘されていたモルヒネの免疫抑制作用について、臨床的に最も使用されている末期癌患者で検討されたものであり、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　麻酔学　武田　純三
微生物学・免疫学　小安　重夫　　薬剤学　谷川原　祐介
外科学　北島　政樹
学力確認担当者：池田　康夫、小安　重夫
審査委員長：小安　重夫

試問日：平成18年2月27日

Relation between Chromosomal Aberrations and Radiation Dose during the Process of TBI

（白血病骨髄移植時全身照射施行時の染色体変異と照射線量との関係）

沓　木　　章　二

内容の要旨

今日の癌診療ではあらゆる場面で放射線が関わっている。希ではあるが全身被曝事故が起こる事もあり、その際の被曝線量の推定は治療方針の決定に欠くことは出来ない。今回我々は①これまでは報告の無い高線量域（5～10Gy）での染色体変異の出現頻度を明らかにする事と②白血病患者さんに全身照射（TBI）を行った場合（*in vivo*照射）と、全身照射に先立って同一患者さんより提供された血液を体外で照射した場合（*in vitro*照射）での染色体変異の出現頻度を比較しその相違を明らかにすることを目的として、検討を行った。

骨髄移植前に全身照射（TBI）を施行することとなった白血病患者８名に協力頂いた。TBI（*in vivo*照射）は12Gy/6Fr/3Daysのスケジュールにて行った。TBI施行前および毎回の照射直後に採血してこれを検体とし、プロトコールに従って処理（培養・固定・染色）して標本とした。各々の観察点（線量）から作成した標本を検鏡し、末梢血リンパ球染色体に生じた二動原体と断片を観察・計測して、その観察点での全てのリンパ球数で除して染色体異常の出現頻度とした。TBI前の採血で得た検体を用いて、TBIと同じスケジュールの照射を試験管内でも行い（*in vitro*照射）、TBIの際に行ったのと同様の方法にて染色体異常の出現頻度を算出して比較した。染色体変異の出現頻度の算出には約2000個のリンパ球を用いたが、今回の検討にあたって観察したリンパ球の総数は10000個前後に及んだ。

照射線量の増加に伴い十分な数の分裂期リンパ球の観察が困難となった３名を除いた５名について検討した。①５～10Gyまでの線量域において、照射線量が増加するに従い二動原体と断片の出現頻度も増加していた。②*in vivo*照射と*in vitro*照射の何れにおいても、照射線量が増加するにつれて二動原体と断片の出現頻度は増加していたが、*in vitro*照射での出現頻度の方が高かった。

従来は検討が困難とされていた高線量域においても、末梢血リンパ球に生じる不安定型染色体変異が照射線量と供に増加していることを明らかにした。更に*in vitro*照射にては*in vivo*照射よりも染色体変異の出現頻度が高く、この傾向は断片にて強く見られた。この事は、*in vivo*照射と*in vitro*照射では染色体変異の出現頻度に差異があることを支持する所見と考えられた。

①高線量域（5～10Gy）にても、照射線量の増加と供に不安定型染色体変異も増加していることを明らかにする事が出来た。

②一方で、*in vitro*照射での染色体変異の出現頻度は*in vivo*照射のそれに比して高い傾向が認められたことから、従来の*in vitro*照射を標準曲線とした被曝線量の推定では過小評価となる可能性があり、*in vivo*照射での標準曲線の確立が必要と考えられた。

論文審査の要旨

従来より、放射線被曝事故の際の線量評価には、*in vitro*実験系で求められた線量反応関係が利用されている。しかし*in vitro*試験管内照射での線量反応関係が生体内での線量反応関係を忠実に再現出来ているのか、疑問が残る。本研究では診療で行なわれる全身照射の機会を利用して①これまでは報告の無い5Gy以上の高線量域にて、放射線照射線量の増加に伴い末梢血リンパ球染色体変異出現も増加していることを、*in vivo*で初めて明らかにし②*in vivo*照射と*in vitro*照射では線量反応関係に差異がある可能性を示した。このことから、従来行なわれている*in vitro*実験系を基にした被曝線量の評価では、生体の実際の被曝線量が誤評価される恐れが考えられる。

審査ではまず、高線量域にて評価対象となる末梢血リンパ球分裂像が十分得られなかったことに対して質問がなされた。これに対して、高線量域では標本作成数を増したが、放射線の照射線量増加に伴う急激なリンパ球数の減少により、PHAを用いた分裂刺激では十分な数の染色体分裂像を得られなかったと回答されたが、さらに標本数を増したり培養方法を工夫するなどして、十分な数の評価対象となる染色体分裂像を得る必要があるとの指摘がなされた。また今回はMay-Giemsa染色にての評価であるが、FISH法を用いれば、高線量域でも十分な数のリンパ球染色体変異を検討出来るのではないか、との質問がなされた。これに対して、最近はFISH法による染色体変異の評価が一般的となっており、現在では我々もFISH法を試みているが、FISH法は専門的な技術や機材・スタッフ配置が必要となるため、広く症例数を蓄積して臨床応用を目指すにはMay-Giemsa染色などの平易な手法の方が向いていると考え、本研究が遂行されたと説明された。次に、症例数が８例と少なく統計解析の正確性に問題があるのではとの指摘がなされたが、年間を通じての全身照射症例が20例前後であり適格条件を満たす症例が集まりにくいことからやむを得ないが、今後症例を追加しての本研究の継続が期待された。また、*in vivo*照射と*in vitro*照射での染色体変異出現頻度に関する有意差について質問がなされた。これに対して、症例数が少なく統計学的有意差は論じられないが、これまで行なわれていた*in vitro*実験系では生体内での反応を再現できていない可能性を示唆した意義は大きいと考えられるとの説明がなされた。最後に、本研究と二次発癌をはじめとする晩期合併症の予測法の関連についての質問がなされた。これに対して、発癌は癌関連遺伝子の転座や欠失と関連していることから、転座や欠失と同様の機序で生じる二動原体染色体変異発現頻度も発癌頻度に相関することが予測される一方、放射線による晩期合併症の基礎にある正常組織の線維化も、照射による染色体変異と相関していると考えられ、放射線晩期合併症を予測することの可能性が示唆される旨の説明が、追加報告としてなされた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、これまでは報告の無い高線量域での放射線照射線量と染色体変異出現頻度の関係について*in vivo*で初めて明らかにし、これが*in vitro*実験系とは差異があることを示唆した点で、放射線生物学上、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　放射線医学　久保　敦司
　　放射線医学　栗林　幸夫　　内科学　池田　康夫
　　病理学　坂元　亨宇
学力確認担当者：池田　康夫、栗林　幸夫
　　審査委員長：栗林　幸夫

試問日：平成18年３月９日

Thymidylate Synthetase（TS）Genotype and TS/dihydropyrimidine Dehydrogenase mRNA Level as an Indicator in Determining Chemosensitivity to 5-Fluorouracil in Advanced Gastric Carcinoma

－（進行胃癌における5-フルオロウラシル感受性決定因子としてのチミジル酸合成酵素（TS）遺伝子多型とTS／ジヒドロピリミジン・デヒドロゲナーゼメッセージRNAレベル）－

鳥　海　　史　樹

内容の要旨

5-fluorouracil（5-FU）の代謝・分解関連酵素およびその遺伝子多型が、5-FU感受性を分子生物学的に予測する可能性について検討した。Thymidylate synthetase（TS）は5-FUの標的酵素の一つであり、dihydropyrimidine dehydrogenase（DPD）は分解律速酵素として5-FUの耐性に関与することが知られている。TS遺伝子のpromoter領域には28塩基対を基本構造とする繰り返し配列（tandem repeat）が２個または３個存在し、TS genotypeとしては、2R（double repeat）と3R（triple repeat）の組み合わせにより、3R/3R, 2R/3R, 2R/2Rの３種類が知られている。これまで3R/3RがTS mRNAおよびTS酵素活性の発現量が高く、5-FU感受性が低いことが報告されてきた。進行胃癌を対象とし、tandem repeatの多型性と、腫瘍内TS/DPD mRNA発現レベルと5-FU感受性との相関性を解析した。2001年９月より、当院外科において切除術が施行された進行胃癌症例22例を対象とした。遺伝子解析については当学倫理委員会承認（12-33）による文書による同意を得て行った。末梢血から単核球を分画しDNAを抽出し、PCRによって得られた増幅産物を用いてTS遺伝子プロモーター領域の繰り返し配列のgenotypingを行った。また癌部と非癌部のTS/DPD mRNA発現量をreal time PCR法により測定し、TS genotypeとTS mRNAの関連を検討した。さらに腫瘍検体の一部を使用して抗癌剤感受性試験（MTT assay）を行い、癌部mRNAと5-FU感受性の相関性を検討した。TS-1による補助化学療法を受けた症例の無再発生存期間を観察し、各種遺伝子パラメーターと生存転帰の関連を検討した。TS genotypeは3R/3Rが19例、2R/3Rが３例であり、3R/3R症例の癌部・非癌部におけるTS mRNA発現は、2R/3R症例に比して推計学的に有意に高値であった。5-FU感受性との相関では、TS mRNAは推計学的に有意な相関を示さなかったが、DPD mRNA高値群には5-FU感受性症例は認められなかった。癌部と非癌部のTS mRNAは推計学的に有意に相関したが、DPD mRNAは相関しなかった。またTS mRNAとDPD mRNAの間には相関関係は認められなかった。無再発生存期間に影響を及ぼしたのはDPD mRNAであり、高DPD mRNA症例は短期に再発する傾向が認められた。胃癌および非癌部のTS mRNAはTS tandem repeatの多型性に制御されていたが、5-FUの感受性には相関しなかった。DPD mRNA高値は5-FU低感受性に帰結し、高再発危険群と考えられた。

論文審査の要旨

著者らは5-fluorouracil（5-FU）の標的酵素thymidylate synthetase（TS）の遺伝子多型および分解律速酵素dihydropyrimidine dehydrogenase（DPD）の遺伝子解析により、5-FU感受性を予測する可能性について検討した。5-FU標的酵素であるTS genotypeには3R/3R, 2R/3R, 2R/2Rの３種類のtandem repeat多型性が知られている。進行胃癌症例を対象とし、末梢血TS genotype、腫瘍内TS/DPD mRNA発現レベルと5-FU感受性、術後無再発生存期間との関連を検討した。TS genotypeは3R/3Rが19例、2R/3Rが３例であり、3R/3R症例の癌部・非癌部におけるTS mRNA（TR）発現は2R/3R症例に比して有意に高値であった。DPD mRNA（DR）高値群には5-FU感受性症例は認められなかった。癌部と非癌部のTRは推計学的に有意に相関したが、DRは相関しなかった。胃癌および非癌部のTRはTS tandem repeatの多型性に制御されていたが、5-FUの感受性には相関しなかった。DR高値は5-FU低感受性に帰結し、早期に再発する傾向が認められた。

審査においては無再発生存期間とDNA合成酵素遺伝子であるTR発現は相関しないのかという質問に対し、TRと予後に関しては統一した見解はなく症例数が少ないということからも有意な相関は認められなかったと回答された。DRが低いにもかかわらず低感受性である症例の機序に関し、5-FU耐性についてはDPDのみならずTSの発現量や他の代謝酵素の発現量も関与している可能性が示された。2Rと3Rの機能的相違については、3Rは2Rに比べTS遺伝子の翻訳効率が２～３倍高いことが提示された。組織採取は全層で行っているが各層別検討の必要性が指摘され、粘膜・粘膜下層・筋層・漿膜など各層における酵素・遺伝子発現の検討が今後の課題として示唆された。DRの発現量は癌部、非癌部ではどちらが高いのかという質問があり、当研究室での以前のデータではDRは非癌部で高いという結果であったと回答された。Tandem repeatには人種間格差があり3R/3Rの多い日本人には5－FUが効きにくいのか、また副作用の発現に差はあるのかのという質問に対し、5-FUの抗腫瘍性・副作用における人種差は明確ではなく、これについてもTSのみでは説明できない因子があることが回答された。

以上のように本研究は症例数が少なく2R群が少ないために有意差が出にくいという問題点は残しつつも、汎用される抗癌剤である5-FUを用いて遺伝子多型や遺伝子発現から癌治療をオーダーメイド化する基礎的研究として、今後臨床腫瘍学の発展に寄与する有用な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　外科学　北島　政樹
　　産婦人科学　青木　大輔　　病理学　坂元　亨宇
　　内科学　日比　紀文
学力確認担当者：池田　康夫、青木　大輔
　　審査委員長：青木　大輔

試問日：平成18年2月13日

Colorectal Motility Induction by Sacral Nerve Electrostimulation in a Canine Model

(仙骨神経電気刺激による結腸・直腸運動の誘発)

平　林　　健

内容の要旨

便排泄機構ならびにそれにおける仙骨神経系の役割の解明、および便失禁・強度の便秘等の排便障害に対する結腸ペースメーカー治療機器について、雑種成犬を用いて、検討を行なった。

体重約10kgの雑種成犬８匹（雌５匹、雄３匹）を実験に用いた。全身麻酔下に、フォースストレインゲージを、近位結腸、遠位結腸、S状結腸、直腸、内肛門括約筋に横軸方向に縫着し、自然排便時および仙骨神経電気刺激時の腸管運動を計測・記録・解析した。仙骨神経電気刺激は全身麻酔下に椎弓切除を加え、直視下にて行った。

術後３週間後より自然排便の観察を行った。４匹の犬で、26回の自然排便を観察し、24回の排便で巨大収縮運動（GMC：Giant Migrating Contraction）の分析が可能であり、３種類の特徴的な運動パターンが観察された。①遠位結腸より口側に生じたGMCが肛側に伝播し、便が排泄された。②便意を催すと同時に、直腸は緩徐に弛緩しはじめ、GMCに先行して大きく弛緩した。③内肛門括約筋の弛緩がGMC伝播する間に認められた。

108回の仙骨神経電気刺激により、３種類の反応パターンが得られた。①直腸方向へ伝播する結腸の収縮反応と肛門管の弛緩反応が20回観察された。②結腸の伝播を伴わない収縮反応と肛門管の弛緩反応が11回観察された。③直腸方向へ伝播する結腸の収縮反応と、それに先行する直腸・肛門管の弛緩反応が認められた。収縮反応の持続時間・伝播速度ならびに弛緩反応の持続時間は自然排便で観察されたものに近似していたが、収縮・弛緩の振幅は小さかった。

今回の実験の結果、自然排便は、結腸・直腸・内肛門括約筋の協調運動によって形成されていることが明らかとなった。このような組織された消化管運動は腸管神経系によってプログラムされたものと推察される。自然排便時の結腸・直腸・内肛門括約筋の運動パターンと類似した反応が仙骨神経電気刺激によって再現された。以上から、自然排便時には、仙骨神経を介して結腸腸管神経系に存在する排便運動のプログラムが起動されると考えられ、仙骨神経系は、自然排便において、中枢神経と結腸腸管神経系を繋ぐ重要な回路の一つと考えられた。今回は、臨床的な埋め込み実験ではなく、急性実験であったが、実際に排便が見られたこともあり、排便ペースメーカー作成の可能性がより強く示唆された。

以上により、仙骨神経系は自然排便において、中枢神経と結腸腸管神経系を繋ぐ重要な回路の一つと考えられた。

論文審査の要旨

申請者は、従来より、排便時の消化管運動・仙骨神経と直腸肛門反射の関係の研究をおこなってきた。今回審査対象となった論文は、雑種成犬を用いストレインゲージトランスデューサー（以下SG）を結腸・直腸・内肛門括約筋に縫着することによって、生理的な状態で自然排便時の結腸・直腸・肛門管運動の観察を行なったものである。本研究の結果、自然排便は結腸に生じる肛門方向へ伝播する巨大収縮運動（以下GMC）と、それに連動する直腸・肛門管の弛緩運動によって形成されることが明らかとなり、このような一連の消化管運動は腸管神経系によってプログラムされたものと推察されることを示した。さらに、仙骨神経に電気刺激を加えることにより、この協調運動と類似した運動パターンを再現した。以上から、自然排便は、仙骨神経を介して結腸腸管神経系に存在する排便運動のプログラムが起動されることにより結腸・直腸・肛門管の協調運動が惹起され行なわれると考えられた。また、本研究に基づき便失禁・強度の便秘等の排便障害に対する治療機器として仙骨神経刺激を用いた結腸ペースメーカー作成の可能性が強く示唆された。

審査ではまず、排便時のGMCの開始部位について質問された。今回の実験においては、上行結腸と下行結腸の間にはSGを装着しなかったが、最近の知見を併せると、主として仙骨神経支配領域範囲の結腸においてGMCは開始すると考えられるが、個体間さらには同一個体間にも違いがあり、今後さらなる研究を要すると回答された。続いて、仙骨神経電気刺激時に見られた反応が、いくつかのパターンに分かれた点、排便時のGMCに比較して、刺激で得られた結腸の収縮運動の振幅が小さかった点、刺激時の排便の有無についても質問された。本実験は、生体内でなされたため、全身麻酔、併せて結腸内容の有無にも影響を受け、いくつかのパターンに分かれ、振幅も小さかったと推測されると説明し、実際に排便も見られた例もあったことも示した。また、自然排便時に観察された緩徐な直腸の弛緩運動が、仙骨刺激によって再現されなかったことが質問された。この排便時の緩徐な直腸の弛緩運動は、便が直腸に貯留することによって生じた受容性弛緩と推察され、直腸壁が伸展され、その刺激が中枢神経において便意と認識されたと考えられると説明された。それに対し、刺激の求心路についても質問され、直腸からの自律神経系の求心路に併せて、腹壁などからの体性神経からの求心路も考えられると説明された。

続いて、本研究の臨床応用（結腸ペースメーカー作成の可能性）について質問された。本実験においては、仙骨神経に直接刺激を与えたが、今後は磁気刺激・経皮電極などを用いた方法に研究を進めていきたいと説明された。また、薬剤による排便誘導と比較して何らかの利点はあるかと質問されたが、薬剤と比較して、より効率的に結腸・直腸内容の排泄が行なわれると考えられると回答された。さらに、より効果的に刺激を加えるためには、直腸内容を計測する必要があり、インピーダンス等を用いた直腸容量測定器などの周辺機器の開発も進めていく必要性の指摘があった。

以上、本研究は今後検討されるべき課題、特に臨床的治療機器の開発においていくつかの問題点を残しているが、排便時の消化管運動を生理的状況下で観察し、それに対する仙骨神経系の役割を研究し、さらに臨床的な治療機器である結腸ペースメーカー作成の可能性を強く示唆した点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　外科学　北島　政樹
内科学　日比　紀文　　生理学　柚崎　通介
解剖学　相磯　貞和
学力確認担当者：池田　康夫、日比　紀文
審査委員長：日比　紀文

試問日：平成18年３月７日

Chondroitinase ABC combined with neural stem/progenitor cell transplantation enhances graft cell migration and outgrowth of growth-associated protein-43-postivie fibers after rat spinal cord injury

（ラット脊髄損傷に対するChondroitinase ABC投与と神経幹／前駆細胞移植の併用は移植細胞の移動とgrowth-associated protein-43陽性線維の伸長を促進する）

池　上　　健

内容の要旨

我々は現在まで、成体ラットとサルの脊髄損傷モデルを用いて神経幹／前駆細胞（以下NSPC）の移植が損傷脊髄の修復に寄与することを報告してきた。しかし個体によっては、多くの細胞が空洞壁に貼りつくのみで母床脊髄内に移動しないことがある。本研究では、脊髄損傷後に強く発現するグリア瘢痕を構成する成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（以下CSPG）が、*in vivo*でNSPCの移動を阻害する可能性に注目した。そこで、脊髄損傷後にchondroitinase ABC（以下C-ABC）を投与しCSPGを分解することにより、移植細胞の移動と神経突起伸展が促されるのではないかと仮定し、以下の実験を行った。まず*in vitro*でNSPCの移動性解析を行った。CSPGをコートされたwell上ではNSPCの移動性は阻害されたが、その阻害効果はwellを予めC-ABCによって処理することによって減じられ、細胞の移動性は回復した。次に*in vivo*で成体ラット損傷脊髄に対するC-ABC投与とNSPC移植の併用療法を行い、免疫組織化学的に検討した。不活化C-ABC投与では、CSPG免疫陽性の瘢痕によって移植細胞の母床脊髄への移動が妨げられていたが、C-ABC投与によって移植細胞の移動が促され、この結果は*in vitro*の移動性解析の結果と一致していた。CSPGが豊富な部位を避けつつ損傷脊髄の白質に移動した細胞の一部は、母床脊髄とよく融合して突起を伸ばし、これらの移動した細胞は損傷を免れた母床脊髄白質のneurofilament陽性線維に沿って配列し、それらの線維と接触していた。さらにこの併用療法では、NSPC移植単独療法に比べて、損傷中心部でのgrowth-associated protein-43陽性線維の伸長が促進され、有意に多くの線維が観察された。これらの結果から、C-ABC投与がグリア瘢痕の軸索伸展および細胞移動に対する抑制効果を減じることによって、損傷脊髄に対するNSPC移植の効果を高める可能性が示唆された。このC-ABC投与とNSPC移植の併用療法は、損傷脊髄の再生において、将来重要な治療戦略の一つになりうると考えられた。

論文審査の要旨

現在まで、成体ラットとサルの脊髄損傷モデルを用いて神経幹/前駆細胞（NSPC）の移植が損傷脊髄の修復に寄与することを報告してきた。今回我々は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）の分解を介した軸索伸展促進効果を有するchondroitinase ABC（C-ABC）を併用することにより、脊髄損傷に対するNSPC移植効果の向上を試みた。

まずin vitroでNSPCの移動性解析を行った。CSPGをコートされたwell上ではNSPCの移動性は阻害されたが、その阻害効果はwellを予めC-ABCによって処理することによって減じられ、細胞の移動性は回復した。次に成体ラット脊髄損傷に対するC-ABC投与とNSPC移植の併用療法を行い、免疫組織化学的に検討した。不活化C-ABC投与では、CSPG免疫陽性の瘢痕によって移植細胞の母床脊髄への移動が妨げられていたが、C-ABC投与によって移植細胞の移動が促され、この結果はin vitroの移動性解析の結果と一致していた。移動した細胞は突起を伸ばし、母床脊髄白質の神経線維に沿って配列していた。さらにこの併用療法では、NSPC移植単独療法に比べ、損傷中心部で有意に多くの再生軸索が観察された。これらの結果から、C-ABC投与がグリア瘢痕の軸索伸展および細胞移動に対する抑制効果を減じることによって、損傷脊髄に対するNSPC移植の効果を高める可能性が示唆された。

審査では、まず脊髄損傷後に強く発現するCSPGの生理的意義について質問がなされた。これに対して、CSPGはグリア瘢痕の１成分であり、２次損傷をpackingする可能性があると回答された。またC-ABCにはCSPGの分解というメカニズム以外に直接軸索伸展を促す作用はないのかと質問がなされ、本実験において、また過去の文献においても確かめられておらず、検証を要すと回答された。C-ABC投与と内在性神経幹細胞の賦活化のみでは十分な併用療法効果は期待できないかという質問に対しては、内在性の神経幹細胞のみでは量的に不足であり、またその多くは生理的条件下ではアストログリアに分化誘導されてしまうため、十分な治療効果は期待できないだろうと回答された。また今後の課題として、この併用療法がlong tractの線維に対しても軸索伸展効果があるか検証する必要があるとの指摘がなされた。さらに脊髄損傷治療への臨床応用に向けた発展として、運動機能評価を行うべきだとの指摘がなされた。

以上のように、本研究はなお検討すべき課題を残しているものの、グリア瘢痕を克服することにより移植細胞の生着を向上させ、脊損に対する神経幹細胞移植療法を改良しえた点、数多く提唱されている脊髄損傷治療法のうち２つの治療法の併用効果を証明することによって、臨床応用に一歩近づけたという点で評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
解剖学　仲嶋　一範　　内科学　鈴木　則宏
外科学　河瀬　斌
学力確認担当者：池田　康夫、仲嶋　一範
審査委員長：仲嶋　一範

試問日：平成18年4月5日

Reduced Expression of Thrombospondins and Craniofacial Dysmorphism in Mice Overexpressing Fra1

(Fra1高発現マウスにおけるThrombospondin減少と頭蓋形成異常)

西　脇　　徹

内容の要旨

転写因子AP-1ファミリーの１つであるFra1を全身で高発現させたトランスジェニックマウスは、骨形成能が骨芽細胞において亢進していることにより骨硬化症を発症する。さらにこのマウスでは骨基質タンパクであるmatrix gla protein（Mgp）の産生増加が知られている。そこで、Fra1トランスジェニックマウスの骨芽細胞において発現異常をきたしている遺伝子を同定し、本マウスの骨形成能との関連を解析した。

まずFra1を強制発現させた骨芽細胞培養系でその骨形成能に対する影響を観察した。その結果、石灰沈着様式が対照群と比較してより均一化することが分かり、骨基質組成の変化が示唆された。そこで骨基質の組成を定量PCR法、ウエスタンブロット法で解析した。Fra1トランスジェニックマウス由来の骨および骨芽細胞では骨基質タンパクであるthrombospondin-1（Thbs1）、thrombospondin-2（Thbs2）の発現が著明に減少していた。

Thbs1およびThbs2遺伝子のプロモーター領域にはAP-1結合配列があることからレポーターアッセイを行ったところ、Fra1遺伝子導入によりThbs2のプロモーター活性は変化しなかったがThbs1プロモーター活性は抑制された。

以上の結果より、Fra1トランスジェニックマウスの石灰沈着および骨基質タンパクの組成は野生型マウスと異なることが分かった。そこで骨基質の被吸収能を調べるため、卵巣摘出術を施行し骨形態計測を行ったところ、卵巣摘出群では骨基質の組成が変化しているにもかかわらず野生型マウスと同様に骨形成・骨吸収が亢進することが明らかになった。

Thbs2ノックアウトマウスは骨形成が増加することが知られているため、Fra1トランスジェニックマウスとThbs1/Thbs2ダブルノックアウトマウスにおいて共通の表現型を検索した。このマウスでは骨密度の有意な上昇は見られなかったものの、両者に咬合異常が見い出された。さらに頭蓋冠および下顎の前後径・横径を計測したところ、頭蓋形成異常が見い出された。以上より、Fra1トランスジェニックマウスにおけるThbs1およびThbs2の発現低下がその頭蓋形成異常の原因となることが示唆された。すなわち、本研究によりはじめて非コラーゲン性骨基質タンパクであるthrombospondinの発現異常が骨形態形成の異常につながる可能性が示された。

論文審査の要旨

転写因子Fra1を全身で高発現させたトランスジェニック（Tg）マウスは、骨芽細胞の骨形成能が亢進し骨硬化症を発症する。そこで、骨芽細胞で発現異常をきたしている遺伝子を同定し、本マウスの表現型との関連を解析した。

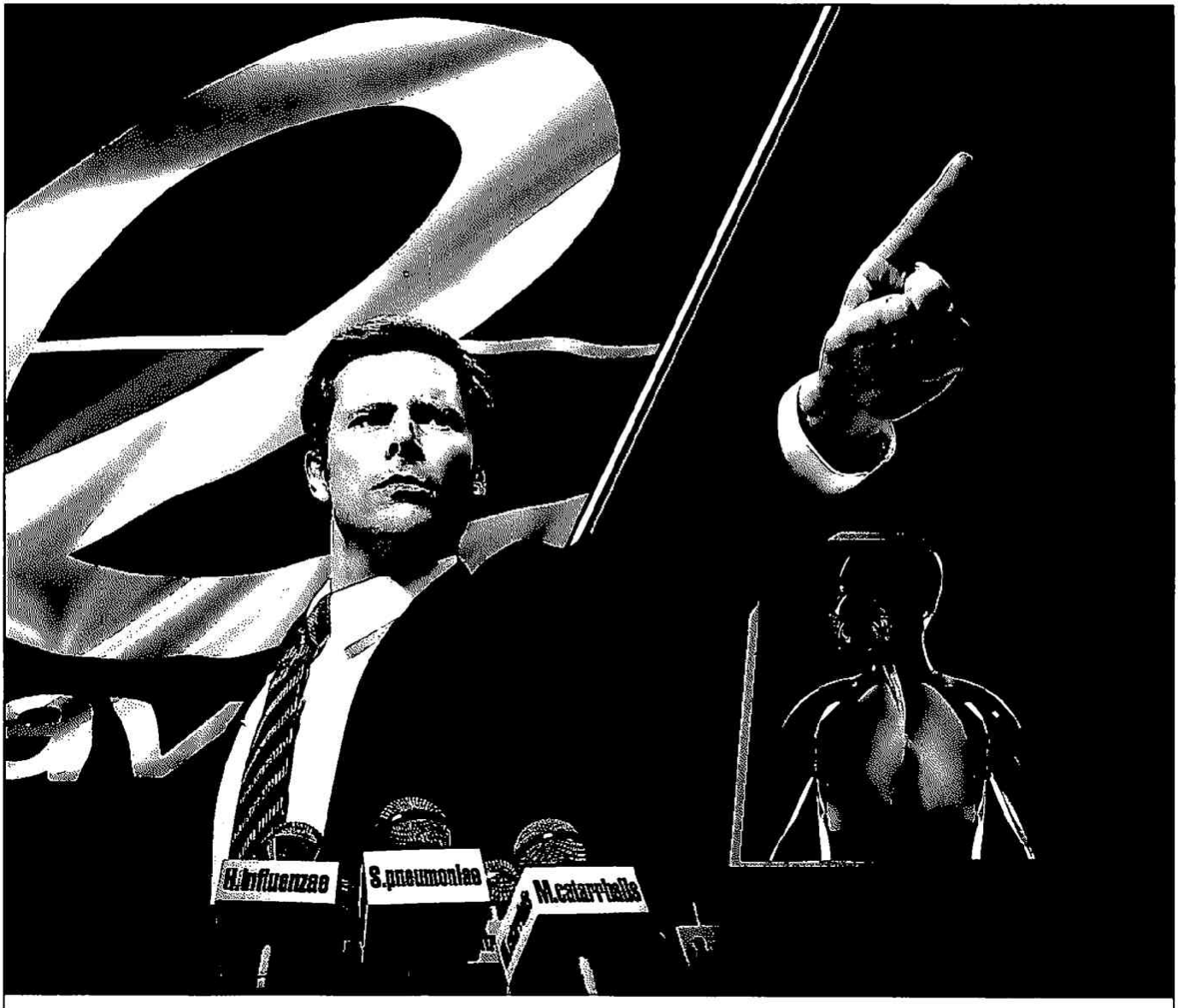
Fra1を強制発現させた骨芽細胞培養系では石灰沈着様式が対照群と比較してより均一化することが分かり、骨基質組成の変化が示唆された。骨基質組成の変化は、培養系でもマウス個体レベルでもFra1 Tgマウス由来の骨が易吸収性であることからも示唆された。そこで骨基質の組成を定量PCR法、ウエスタンブロット法で解析した。Fra1 Tgマウス由来の骨・骨芽細胞では骨基質蛋白thrombospondin-1（Thbs1）、thrombospondin-2（Thbs2）の発現が著明に減少していることが分かった。さらに骨基質組成の変化とマウスの表現型の関連を探るためにFra1 TgマウスとThbs1/Thbs2ダブルノックアウトマウスにおいて共通の表現型を検索した。Thbs2ノックアウトマウスは骨形成が増加することが報告されているが、Thbs1/Thbs2ダブルノックアウトマウスでは骨密度の有意な上昇は見られなかった。しかしFra1 Tgマウスでみられる頭蓋形態異常がThbs1/Thbs2ダブルノックアウトマウスでも見いだされたことから、Thbs1とThbs2の減少が頭蓋形成異常の原因であることが示唆された。

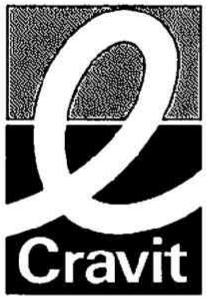
審査では、まず培養系での石灰沈着様式の変化とマウスの表現型の関係に関する質問がなされた。Fra1 Tgマウスの石灰沈着はナノ構造レベルでは低いと報告されており培養系での石灰濃度の低下と一致しているが骨量の増加、頭蓋形成異常との関わりは不明であると回答された。また、Fra1 Tgマウスの骨硬化症に対する破骨細胞の影響について質問がなされ、Fra1 Tgマウス由来の破骨細胞は培養系で分化亢進が見られるが、間葉系細胞の移植実験で過剰な骨形成が再現されることから骨芽細胞の異常が主たる原因と考えられると回答された。骨基質が易吸収性である理由について質問がなされ、骨基質組成が変化したことにより被吸収性が変化したと、種々の骨基質成分の遺伝子改変マウスの例から考えられると回答された。さらに、頭蓋形成異常がおこる機序について質問がなされ、膜性骨化で形成される頭蓋冠と内軟骨性骨化で形成される頭蓋底・下顎骨間でゆがみが生じていることからFra1により膜性骨化あるいは内軟骨性骨化になんらかの影響がある可能性が示唆されると回答された。

以上のように、本研究は未だ検討されるべき点を残しているものの、Fra1 Tgマウスにおいて骨基質組成が変化しており、Thbs1とThbs2の発現低下が頭蓋形態異常の原因となることを示唆した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
発生・分化生物学　須田　年生　　病理学　岡田　保典
形成外科学　中島　龍夫
学力確認担当者：池田　康夫、須田　年生
審査委員長：須田　年生

試問日：平成18年4月4日





広範囲経口抗菌製剤

指定医薬品、処方せん医薬品※

クラビット® 錠・細粒

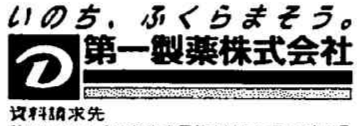
Cravit®（レボフロキサシン製剤）

薬価基準収載

※注意－医師等の処方せんにより使用すること

★効能・効果、用法・用量、禁忌および使用上の注意等につきましては、
製品添付文書をご参照ください。

いのち，ふくらませう。



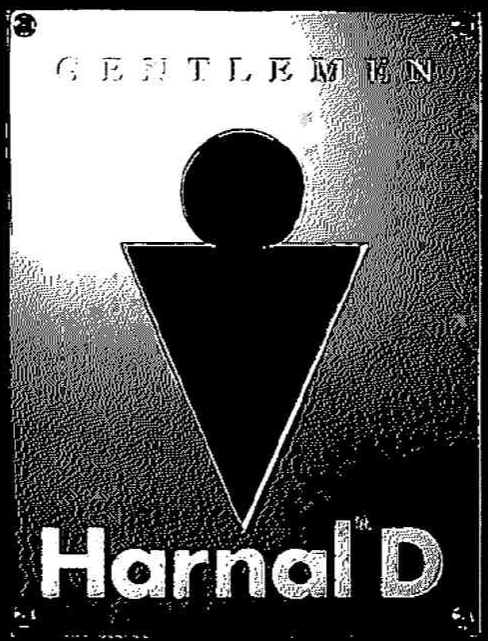
資料請求先
〒103-8234 東京都中央区日本橋三丁目14番10号
ホームページアドレス
http://www.daiichipharm.co.jp/

255×180 I05

astellas

前立腺肥大症に伴う

尿勢低下にも、夜間頻尿にも。



◎のみやすい口腔内崩壊錠なので、これまで以上の服薬コンプライアンスが期待できます。

◎水なしでも服用できるので、お年寄りで嚥下困難な患者さんや、水分制限のある患者さんにも適しています。

◎微小な徐放性粒子の開発で、サラッとした服用感を実現しました。

◎ハルナールカプセルと生物学的に同等で、有効性・安全性は同じです。

[禁忌(次の患者には投与しないこと)]
(1)本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者
(2)塩酸バルデナフィル水和物を投与中の患者

【効能・効果】前立腺肥大症に伴う排尿障害
【用法・用量】通常、成人には塩酸タムスロシンとして0.2mgを1日1回食後に経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減する。
【使用上の注意】(抜粋)
1.慎重投与(次の患者には慎重に投与すること) (1)起立性低血圧のある患者[症状が悪化するおそれがある。] (2)重篤な肝機能障害のある患者[血漿中濃度が上昇するおそれがある。] (3)重篤な腎機能障害のある患者[血漿中濃度が上昇するおそれがある。「薬物動態」の項参照] (4)高齢者[「高齢者への投与」の項参照]
2.重要な基本的注意 (1)本剤が口腔内で崩壊するが、口腔の粘膜から吸収されることはないため、母液又は水で飲み込ませること。(2)本剤の過剰投与により血圧低下が予想されるので、投与量には注意すること。(3)立位血圧が低下することがあるので、体位変換による血圧変化に注意すること。(4)本剤による治療は原因療法ではなく、対症療法であることに留意し、本剤投与により期待する効果が得られない場合は、手術療法等、他の適切な処置を考慮すること。(5)めまい等があらわれることがあるので、高所作業、自動車の運転等危険を伴う作業に従事する場合には注意させること。(6)本剤投与開始時に降圧剤投与の有無について問診を行い、降圧剤が投与されている場合には血圧変化に注意し、血圧低下がみられたときには、減量又は中止するなど適切な処置を行うこと。
3.相互作用 [併用禁忌](併用しないこと)塩酸バルデナフィル水和物(レビトラ)
[併用注意](併用に注意すること)降圧剤、クエン酸シルデナフィル
4.副作用 ハルナールカプセル承認時及び市販後の使用成績調査における調査症例4,724例中、ハルナールカプセルとの関連が疑われる副作用(臨床検査値異常を含む)は104例(2.2%)に発現し、主なものはめまい、胃不快感等であった。(ハルナールカプセル再審査終了時) (1)重大な副作用 1)失神・意識喪失(頻度不明):血圧低下に伴う一過性の意識喪失等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止し適切な処置を行うこと。2)肝機能障害、黄疸(頻度不明):AST(GOT)上昇、ALT(GPT)上昇、黄疸等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。

■その他の使用上の注意等につきましては、製品添付文書をご参照ください。

前立腺肥大症の排尿障害改善剤(塩酸タムスロシン口腔内崩壊錠) 薬価基準収載

ハルナール®D錠 0.1mg 0.2mg

指定医薬品、処方せん医薬品(注意-医師等の処方せんにより使用すること) Harnal®D

製造販売 アステラス製薬株式会社
東京都板橋区蓮根3-17-1
[資料請求先]本社/東京都中央区日本橋本町2-3-11

05.12作成 A4 C 01