

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151号) 平成13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965号	博士(医学)	神原 千晶	山口	平 13.3.31	Vascular Cell Adhesion Molecule-1-Mediated Matrix Metalloproteinase-2 Induction in Peripheral Blood T Cells Is up-Regulated in Patients with HTLV-I-Associated Myelopathy (HTLV-I associated myelopathy (HAM) 患者 T リンパ球における VCAM-1 を介した matrix metalloproteinase-2 活性亢進)	11
" 第966号	"	郝 立君	中国	平 13.3.31	Phorbol Ester-Potentiated Liposomal Transfection to Monocytic PLB-985 Cells (単球系 PLB-985細胞へのホルボールエステルで増幅されたリポソームによる遺伝子導入)	12
" 第967号	"	廣田 康宏	長崎	平 13.3.31	Activation of Specific MEK-ERK Cascades is Necessary for TGF- β Signaling and Crosstalk with PKA and PKC Pathways in Cultured Rat Articular Chondrocytes Osteoarthritis and Cartilage(2000 Jul; 8(4): 241-7) (ラット関節軟骨細胞における TGF- β による特異的 MEK-ERK カスケードの活性化と PKA, PKC とのクロストーク)	13
" 第968号	"	山田 浩喜	長崎	平 13.3.31	An autosomal dominant posterior polar cataract locus maps to human chromosome 20p12-q12 (常染色体優性遺伝性後極白内障原因遺伝子の20番染色体への局在同定)	15
" 第969号	"	石原 博史	長崎	平 13.3.31	Keloid fibroblasts resist ceramide-induced apoptosis by overexpression of insulin-like growth factor I receptor (IGF-I レセプター過剰発現によるケロイド線維芽細胞のアポトーシス抵抗性の検討)	16

学位記番号	学位の 種 類	氏 名	本 籍	学位授与 年 月 日	学 位 論 文 題 目	頁
博士(医 学) 第970号	博士(医学)	永瀬 喜久	長 崎	平 13 .3 31	Propofol Inhibits Muscarinic Acetylcholine Receptor-Mediated Signal Transduction in <i>Xenopus</i> Oocytes Expressing the Rat M1 Receptor (プロポフォールはラット M1 受容体が発現したアフリカツメガエル卵母細胞において, ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する細胞内情報伝達系を抑制する)	18
" 第971号	"	スタニスラフ シュクラエフ	ロシア	平 13 .3 31	Sage Transcript Profiles in Cultured Human Fetal Fibroblasts, WI-38 (ヒト胎児線維芽細胞 WI-38の Sage 法による全転写産物の解析)	19
" 第972号	"	ベラ ブライデン	ロシア	平 13 .3 31	Eradication of Breast Cancer Xenografts by Hyperthermic Suicide Gene Therapy under the Control of the Heat Shock Protein Promoter (熱ショック蛋白遺伝子プロモーター制御を応用した乳癌に対する温熱分子標的化自殺遺伝子治療)	20
" 第973号	"	北島 知夫	長 崎	平 13 .3 31	Linkage of persistent cholangitis after bilioenterostomy with biliary carcinogenesis in hamsters (ハムスターにおける胆道再建後の遷延性胆管炎と胆道発癌との関連性の検討)	22
" 第974号	"	酒井 一介	長 崎	平 13 .3 31	Interaction of isoflurane and cromakalim, a K_{ATP} channel opener, on coronary and systemic haemodynamics in chronically instrumented dogs (イソフルランとカリウムチャンネル開口薬クロマカリムの冠循環および全身循環における相互作用)	23
" 第975号	"	津田 敦	長 崎	平 13 .3 31	A Dose-Response Study of Anticholinesterase Drugs on Contractile and Phosphatidylinositol Responses of Rat Trachea (ラット気管の収縮とイノシトールリン脂質代謝反応に対する抗コリンエステラーゼ薬の影響)	25
" 第976号	"	安部 恵代	福岡	平 13 .3 31	Etidronate inhibits human osteoblast apoptosis by inhibition of pro-apoptotic factor (s) produced by activated T cells (エチドロネートは活性化 T 細胞から産生されるアポトーシス誘導因子を抑制することでヒト骨芽細胞のアポトーシスを抑制する)	26

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977号	博士(医学)	岩下 徹二	長崎	平 13.3.31	Involvement of Collagen-Binding Heat Shock Protein 47 and Procollagen Type I Synthesis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Contribution of Type II Pneumocytes to Fibrosis (特発性肺線維症におけるコラーゲン結合性熱ショック蛋白47とⅠ型プロコラーゲン生成の関与 - 肺胞Ⅱ型上皮細胞の線維化への関与)	27
" 第978号	"	秋山 祐里	長崎	平 13.3.31	Involvement of receptor-type tyrosine kinase gene families in cardiac hypertrophy (心肥大における、受容体型チロシンキナーゼ遺伝子ファミリーの発現解析)	29
" 第979号	"	竹下 浩明	長崎	平 13.3.31	Expression of the <i>DMBT1</i> Gene Is Frequently Suppressed in Human Lung Cancer (<i>DMBT1</i> 遺伝子の発現はヒト肺癌で高頻度に抑制されている)	30
" 第980号	"	古賀 英子	佐賀	平 13.3.31	Presynaptic dopamine D ₂ -like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones (シナプス前性のドーパミン D ₂ 型受容体はラット腹側被蓋野のドーパミン細胞への興奮性神経伝達を抑制する)	31
" 第981号	"	今里 祐之	福岡	平 13.3.31	PSP94 EXPRESSION AFTER ANDROGEN DEPRIVATION THERAPY:A COMPARATIVE STUDY WITH PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN IN BENIGN PROSTATE AND PROSTATE CANCER (アンドロゲン除去療法後のPSP94の発現について: 正常前立腺及び前立腺癌におけるPSAとの比較)	33
" 第982号	"	石丸 英樹	長崎	平 13.3.31	Differentiation between High-grade Glioma and Metastatic Brain Tumor Using Single-voxel Proton MR Spectroscopy (シングルボクセルプロトンMRスペクトロスコピーを用いた悪性神経膠腫と転移性脳腫瘍の鑑別)	34
" 第983号	"	林 秀行	長崎	平 13.3.31	Penetrating Atherosclerotic Ulcer of the Aorta:Imaging Features and Disease concept (Penetrating Atherosclerotic Ulcer of the Aorta:画像所見と疾患概念について)	35

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984号	博士(医学)	山内 明	長 崎	平 13 . 3 31	Location of the epitope for 7D5, a monoclonal antibody raised against human flavocytochrome b ₅₅₈ , to the extracellular peptide portion of primate gp91 ^{phox} (抗ヒトフラボシトクロム b ₅₅₈ 単クローン抗体 7D5の抗原決定基は霊長類の91 ^{phox} 細胞外ペプチド部位に存在する)	37
" 第985号	"	真鍋 英二	大 阪	平 13 . 2 21	Relationship of Intra-Abdominal Adiposity and Peripheral Fat Distribution to Lipid Metabolism in an Island Population in Western Japan: Gender Differences and Effect of Menopause (西日本の島嶼住民における内臓脂肪および末梢脂肪分布と脂質代謝との関連: 性差と閉経の影響)	38
" 第986号	"	汪 衛紅	中 国	平 13 . 3 31	Colony forming unit-megakaryocyte (CFU-meg) numbers and serum thrombopoietin concentrations in thrombocytopenic disorders: an inverse correlation in myelodysplastic syndromes (各種血小板減少症における巨核球前駆細胞 (CFU-meg) 数とトロンプオエチン血中濃度: 骨髓異形成症候群における逆相関)	39
" 第987号	"	土居 香美	宮 崎	平 13 . 3 31	Alteration of Antioxidants During the Progression of Heart Disease in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats (ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける心病変進行に伴うアンチオキシダントの変化)	41
" 第988号	"	日高 重和	佐 賀	平 13 . 3 31	Differences in 20q13 2 Copy Number between Colorectal Cancers with and without Liver Metastasis (大腸癌の肝転移例および非肝転移例における染色体20q13 2コピー数の相違)	42
" 第989号	"	佐野 功	神奈川	平 13 . 3 31	PROLONGED SURVIVAL OF RAT CARDIAC ALLOGRAFT WITH PROINFLAMMATORY CYTOKINE INHIBITOR (炎症性サイトカイン阻害剤によるラット同種移植心の生着延長効果)	43
" 第990号	"	三木 文夫	長 崎	平 13 . 3 31	Development of HVJ-Liposome Mediated Gene Therapy Using HSV-Thymidine Kinase Gene for Hepatocellular Carcinoma (HVJ-Liposome 法を用いた肝癌分子標的化自殺遺伝子治療の開発)	44

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991号	博士(医学)	安部 幸弘	大分	平 13.3.31	CTLA4 gene polymorphism correlates with the mode of onset and presence of ICA512 Ab in Japanese type 1 diabetes (日本人1型糖尿病患者における発症形式およびICA512抗体とCTLA4遺伝子多型との関連)	45
" 第992号	"	尾崎 方子	大分	平 13.3.31	Enhanced Insulin Gene Expression by Reduced Intracellular Glutathione Level in Insulin Secreting Cells MIN 6 (インスリン分泌細胞 MIN 6 細胞株において細胞内 GSH 濃度の減少はインスリン遺伝子発現を増強させる)	47
" 第993号	"	南 恵樹	大分	平 13.3.31	Role of Carcinoembryonic Antigen in the Progression of Colon Cancer Cells which Express Carbohydrate Antigen (Carbohydrate 抗原を発現している大腸癌細胞の進展における CEA の役割)	48
" 第994号	"	多田 誠一	福岡	平 13.3.31	Energetic Advantage of Phosphodiesterase III inhibitors in the Failed Heart after Global Ischemia (全般的虚血後不全心における Phosphodiesterase III 阻害剤のエネルギー効率改善効果)	49
" 第995号	"	濱崎 宏明	長崎	平 13.3.7	The sympathetic nervous system promotes carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis by suppressing apoptosis and enhancing the growth kinetics of regenerating rat hepatocytes (四塩化炭素誘発肝障害において、交感神経系は肝細胞のアポトーシスを抑制し増殖を促進することで、肝硬変症への進展を促す)	50
" 第996号	"	富田 雅人	長崎	平 13.3.7	Modulation by dietary restriction in gene expression related to insulin-like growth factor-1 in rat muscle Aging: Clinical and Experimental Research(in press) (ラット骨格筋におけるインスリン様増殖因子関連遺伝子発現の食餌制限による修飾)	52
博士(医)乙 第1,603号	"	吉田 雅文	長崎	平 13.2.28	Urinary sodium/potassium ratio and prevalence of hypertension in two communities of different historical origin in Ohshima Island, Nagasaki, Japan (長崎県大島の歴史的経緯の異なる2つの集団における尿中 Na/K 比と高血圧症有病率)	53
" 第1,604号	"	田中 公朗	福岡	平 13.2.28	Role of arterial blood supply in orthotopic whole and partial liver transplantation in the rat (ラット同所性全肝及び部分肝移植における肝動脈血流の役割)	55

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1,605号	博士(医学)	阿部 航	大 分	平 13.3.31	Th 1 -Th 2 Cytokine Kinetics in the Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Infected with <i>Cryptococcus neoformans</i> of Different Virulences (実験的クリプトコッカス感染マウスの肺胞洗浄液中サイトカインの動態について)	56
" 第1,606号	"	淵上 健吾	佐 賀	平 13.3.31	Absolute Number of Circulating CD34 ⁺ Cells is Abnormally Low in Refractory Anemias and Extremely High in RAEB and RAEB-t; Novel Pathologic Features of Myelodysplastic Syndromes Identified by Highly Sensitive Flow Cytometry (末梢血液中のCD34陽性細胞数は不応性貧血(RA)において異常に低く, RAEBとRAEB-tでは著しく高値である; 骨髄異形成症候群において, 高感度フローサイトメトリー法により新たに判明した病態)	57
" 第1,607号	"	齋藤あゆみ	香 川	平 13.3.31	Two Nonsense Mutations of PAX6 in Two Japanese Aniridia Families: Case Report and Review of the Literature (日本人の先天無虹彩2家系におけるPAX6 遺伝子の2つのナンセンス突然変異: 症例報告と文献的考察)	59
" 第1,608号	"	渡辺 浩	福 岡	平 13.3.31	Molecular Analysis of Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> as a Causative Agent of Bronchopulmonary Infection: Relation to Colonization in the Upper Respiratory Tract. (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌[MRSA]下気道感染症の発症機序に関する分子疫学的研究 - 上気道への定着との関連について)	60
" 第1,609号	"	天野 秀明	広 島	平 13.3.31	Impairment of Endotoxin-Induced Macrophage Inflammatory Protein 2 Gene Expression in Alveolar Macrophages in Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice (ストレプトゾトシン惹起性糖尿病マウスの肺胞マクロファージにおいて, エンドトキシンによるMIP-2 遺伝子発現誘導が障害されている)	61
博士(歯)甲 第86号	博士(歯学)	リナ マリア カルデナス	コロンビア	平 13.3.31	Histological effects of the pulp exposure by air-abrasion on the dentin bridge formation	63
" 第87号	"	白石 千秋	宮 崎	平 13.3.31	A histopathological study of the role of periodontal ligament tissue in root resorption in the rat	64

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(歯)甲 第88号	博士(歯学)	西田 英治	長崎	平 13.3.31	Bone resorption and local interleukin-1 α and interleukin-1 β synthesis induced by <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> and <i>Porphyromonas gingivalis</i> lipopolysaccharide	66
" 第89号	"	田中 景子	長崎	平 13.3.31	NaHCO ₃ 応用後の再石灰化エナメル質の耐酸性	68
" 第90号	"	馬場 直樹	長崎	平 13.3.31	Effect of disinfectants containing glutaraldehyde on bonding of a tri- <i>n</i> -butylborane initiated resin to dentin	69
" 第91号	"	飛田 尚慶	神奈川	平 13.3.31	Immunohistochemical Study on Wound Healing of a Muscle Flap Transferred into the Oral Cavity of Rats	71
" 第92号	"	柳田 廣明	鹿児島	平 13.3.31	Bonding of prosthetic composite material to Ti-6Al-7Nb alloy with eight metal conditioners and a surface modification technique	73
" 第93号	"	吉田 至純	長崎	平 13.3.31	噴射切削による露髄に対する接着性レジン直接歯髄覆罩が歯髄に及ぼす影響	75
" 第94号	"	秋根 麻	福岡	平 13.3.31	Effects of ketamine and propofol on autonomic cardiovascular function in chronically instrumented rats	76
博士(歯)乙 第60号	"	古賀 義之	佐賀	平 13.3.7	Development of a three-dimensional jaw tracking system implanted in the freely moving mouse	78
" 第61号	"	鎌田 幸治	鹿児島	平 13.3.21	Early bond strength and durability of bond between a ceramic material and chemically-cured or dual-cured resin luting agent	79
" 第62号	"	久松 徳子	長崎	平 13.3.21	Effect of silane primers and unfilled resin bonding agents on repair bond strength of a prosthodontic microfilled composite	81
博士(薬)甲 第38号	博士(薬学)	中島 友紀	岡山	平 13.3.31	慢性関節リウマチの骨破壊における骨形成系機能不全と骨吸収系機能亢進の分子細胞生物学的研究	83
" 第39号	"	アルデハシ オサマ ユース	ヨルダン	平 13.3.31	Methamphetamine and its metabolites in biological samples; Determination by HPLC as derivatives of 4-(4,5-diphenyl-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl) benzoyl chloride, a new lophine-type fluorescent labeling reagent	85
" 第40号	"	黄 華山	中国	平 13.3.31	好熱菌由来の耐熱性グリセロールキナーゼの研究	87

学位記番号	学位の 種 類	氏 名	本 籍	学位授与 年 月 日	学 位 論 文 題 目	頁
博士(海)甲 第190号	博士(学術)	野上 真子	兵 庫	平 13 . 2 . 15	大村湾底層における貧酸素水塊の形成と消滅過程に関する研究	89
" 第191号	"	河村 俊哉	長 崎	平 13 . 2 . 15	海洋環形動物ジャムシ (<i>Neanthes virens</i>) 由来のアンギオテンシン I 変換酵素様ジペプチジルカルボキシペプチダーゼの性状と構造に関する研究	91
" 第192号	"	趙 賢珍	韓 国	平 13 . 3 . 31	Utility of Dinoflagellates in Studying the Marine Environment: the Case of the East China Sea and Adjacent Areas	93
" 第193号	"	韓 仁盛	韓 国	平 13 . 3 . 31	Short Time Scale Water Exchange Processes between the Kuroshio and the Shelf Water in the East China Sea	95
" 第194号	"	山本 尚俊	京 都	平 13 . 3 . 31	水産物卸売市場流通の変容・再編成と卸売業者の業務対応に関する研究	97
" 第195号	博士(工学)	手嶋 芳博	埼 玉	平 13 . 3 . 31	メカニカルシールにおけるディンプルしゅう動材のシール特性に関する研究	98
" 第196号	"	ジャマール タリク ミアン	パキスタン	平 13 . 3 . 31	3 -D Positioning System for Compact Autonomous Underwater Vehicle コンパクト自律型潜水艇のための3次元位置検出システム	100
" 第197号	"	山田 隼男	兵 庫	平 13 . 3 . 31	ゴム材料の高性能化とその特性	102
" 第198号	博士(学術)	張 潔	中 国	平 13 . 3 . 31	A Comparative Study on the Morphological Adaptations in Oxudercine Gobies to their Terrestrial Life	104
" 第199号	"	グエン ティン ヒュー	ベトナム	平 13 . 3 . 31	Study on the Infection Mechanism of <i>Streptococcus iniae</i> in Japanese Flounder(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	105
" 第200号	"	マビット アッサワ アリー	タ イ	平 13 . 3 . 31	Studies on the Low Temperature Preservation and Resting Egg Formation of the Euryhaline Rotifers <i>Brachionus plicatilis</i> Müller and <i>Brachionus rotundiformis</i> Tschugunoff 汽水産ツボワムシ類 <i>Brachionus plicatilis</i> Müller と <i>Brachionus rotundiformis</i> Tschugunoff の冷蔵保存と耐久卵形成に関する研究	108

学位記番号	学位の種類	氏名	本籍	学位授与年月日	学位論文題目	頁
博士(海)甲 第201号	博士(学術)	アドリアナ ベレンデ アラウジョ	ブラジル	平 13 . 3 31	Studies on the Development of Techniques for Culture Diagnosis of the Euryhaline Rotifers <i>Brachionus plicatilis</i> Müller and <i>Brachionus rotundiformis</i> Tschugunoff 汽水産ツボウムシ類 <i>Brachionus plicatilis</i> Müller と <i>Brachionus rotundiformis</i> Tschugunoff の培養診断技術の開発に関する研究	110
" 第202号	"	金正年	韓国	平 13 . 3 31	Systematic Study on the Family Crangonidae from East Asian Waters and Phylogenetic Analysis of the Crangonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea)	112
" 第203号	博士(水産学)	ジャヤント クマール ミシュラ	インド	平 13 . 3 31	Larval Settlement of the Barnacle <i>Balanus amphitrite</i> Induced by Amino Acid Related Pheromonal Substances	114
" 第204号	"	八木 基明	京都	平 13 . 3 31	β - カロテン大量投与がイシダイ種苗の生体防御機能に及ぼす影響	115
" 第205号	博士(学術)	王 勤	中国	平 13 . 3 31	Studies of Characteristics of Actomyosin on White, Pink, and Red Muscle Fiber Types Related to Rigor Mortis Progress in Fishes	117
" 第206号	"	川津健太郎	京都	平 13 . 3 31	マリントキシンの免疫学的分析法の開発に関する研究	119
" 第207号	博士(水産学)	モホセナ ベガム タヌ	バングラデシュ	平 13 . 3 31	Tetrodotoxin(TTX) in Frog and Some Marine Animals of Bangladesh, and Localization of TTX in Puffer by a New Enzyme Immunoassay Technique フグ毒(TTX) のバングラデシュ産カエル・海産魚介類における分布と新規免疫学的手法による TTX のフグ組織中の分布	120
" 第208号	博士(学術)	金 大景	韓国	平 13 . 3 31	赤潮原因プランクトン, <i>Chattonella marina</i> の活性酸素産生機構及び魚毒性発現機構の解明	122
" 第209号	"	小松 誠和	長崎	平 13 . 3 31	ヒマ種子毒蛋白質リシンのアポトーシス様細胞毒性発現機構の解明 Mechanism of Ricin-induced Apoptotic Cytotoxicity	124
" 第210号	博士(工学)	木村 美幸	長崎	平 13 . 3 31	<i>Helicobacter pylori</i> の産生する細胞空胞化毒素の致死作用解析	126
" 第211号	"	増沢 近統	大分	平 13 . 3 31	蒸気タービン低圧最終翼の三次元流動特性に関する研究	128

学位記番号	学位の 種 類	氏 名	本 籍	学位授与 年 月 日	学 位 論 文 題 目	頁
博士(海)甲 第212号	博士(工学)	時 衛東	中 国	平 13 . 3 . 31	A Fundamental Study on Development of a Model for Local Discharge Propagation on an Electrolytic Solution	130
" 第213号	"	清水 恵一	東 京	平 13 . 3 . 31	蛍光ランプ点灯装置の高調波抑制技術に関する 研究	132
" 第214号	"	坪井 克剛	静 岡	平 13 . 3 . 31	インバータ駆動システムの不安定現象とその改 善に関する研究 Study on Unstable Phenomena of Inverter Drive Systems and Their Solutions	133
" 第215号	"	黄 超	中 国	平 13 . 3 . 31	Development of the Boundary Element Method Utilizing the Discrete Integral Method	135
博士(海)乙 第37号	博士(学術)	李 京姫	韓 国	平 13 . 2 . 15	Studies of Biochemical Characteristics Related to Difference of Rigor Mortis Progress between Cul- tured Red Sea Bream and Japanese Flounder	137
" 第38号	"	矢野 治江	福 岡	平 13 . 2 . 15	養殖マダイにおける成長に伴う筋肉部、内臓部 及び全魚体中の脂肪量の動向とそれらを推定す る体格指数に関する研究	139
" 第39号	博士(水産学)	松原 保仁	香 川	平 13 . 2 . 15	細菌 <i>Corynebacterium</i> sp. ALY-1 株が産生する 菌体外ポリグルロン酸リアーゼに関する研究	141
" 第40号	博士(工学)	小林 武史	神奈川	平 13 . 2 . 15	自動車排ガス浄化触媒の脱硝性能改良に関する 研究	143

神 原 千 晶

(山口県) 昭和44年 9 月 6 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日**主 論 文** Vascular Cell Adhesion Molecule- 1 -Mediated Matrix Metalloproteinase- 2 Induction in Peripheral Blood T Cells Is Up-Regulated in Patients with HTLV-I-Associated Myelopathy(HTLV-I associated myelopathy(HAM) 患者 T リンパ球における VCAM- 1 を介した matrix metalloproteinase- 2 活性亢進)
Chiaki Kambara, Tatsufumi Nakamura, Takafumi Furuya, Kiyoshi Migita, Hiroaki Ida, Atsushi Kawakami, Susumu Shirabe, Shunya Nakane, Ikuo Kinoshita, Katsumi Eguchi

Journal of Neuroimmunology 99 : 242-247 , 1999

長崎大学内科学第一教室

(主任 : 江口勝美教授)

論文内容の要旨**緒 言**

HTLV-I-associated myelopathy(HAM) の病理像の主体は慢性脊髄炎である。我々はこれまでに HAM 患者末梢血 T リンパ球の血管内皮細胞に対する接着能の亢進を報告してきた。しかし、リンパ球の組織への transmigration には、血管内皮細胞接着後、次なるバリアーとして存在する血管基底膜の分解が必要である。近年炎症細胞の実質内への transmigration に関し、基底膜の主要構成成分である IV 型 collagen の分解酵素である matrix metalloproteinase- 2 及び 9(MMP- 2 及び MMP- 9) の関与が注目されている。リンパ球が組織へ transmigrate する際には細胞接着因子の関与が重要であるが、その中でもリンパ球上の very late activation antigen- 4(VLA- 4) と血管内皮上の vascular cell adhesion molecule- 1(VCAM- 1) が主要な役割を果たしており、T リンパ球においては VCAM- 1 が VLA- 4 に結合した後のシグナル伝達により MMP の発現が up-regulation されることが報告されている。我々は HAM 患者末梢血 T リンパ球の組織への浸潤能を検索するために、この系における T リンパ球での MMP- 2 発現の up-regulation について対照群の末梢血 T リンパ球と比較検討を行った。

方 法

HAM 患者13例、対照群として他の神経疾患患者21例 (anti-HTLV-I seropositive carrier 8 例を含む) を対象とした。

VCAM- 1 発現細胞として TNF- α で刺激した T98G

を用いた。(98% が VCAM-I 発現)

- 1) VCAM-I 発現細胞と T リンパ球を12時間 co-culture した後 T リンパ球のみ回収し , serum free medium で更に 6 時間 culture し上清を回収 , gelatine zymography にて MMP- 2 活性を測定した。
- 2) 1) で得られた上清に抗 MMP- 2 抗体を用いて immunoprecipitation を行い , westernblot 法にて MMP- 2 の発現を検討した。
- 3) VCAM- 1 発現細胞に対し , 抗 VCAM-I 抗体で blocking 処理をおこない , 同上の実験を行った。
- 4) 被験者末梢血 T リンパ球の VLA- 4 発現をフローサイトメトリーにて検討した。

結 果

- 1) VCAM- 1 発現細胞との接着により末梢血 T リンパ球の MMP- 2 活性亢進をみると、HAM 患者では対照群と比較し有意に高値の MMP- 2 活性上昇率をみとめた。
- 2) HAM 患者における MMP- 2 活性亢進は、その発現量の亢進にもとづいていることが Immunoblotting によって明らかにされた。
- 3) この MMP- 2 活性の亢進は抗 VCAM-I 抗体処理により抑制される事実より VLA- 4 / VCAM- 1 の系を介していることが明らかにされた。
- 4) 末梢血 T リンパ球における VLA- 4 発現細胞の頻度は HAM 患者と対照群とで有意差を認めなかった。

考 察

我々はこれまでに、HAM 患者末梢血 T リンパ球では血管内皮細胞に対する接着能が亢進していることを報告してきたが、さらに、今回の研究結果より、HAM 患者末梢血 T リンパ球は血管内皮細胞との接着後、MMP- 2 活性亢進により血管基底膜分解能が亢進し、組織に浸潤しやすい状態にあることが示唆された。HAM 患者脊髄の病理学的研究においても血管周囲に VLA- 4 を発現した単核球の浸潤と、血管内皮細胞における VCAM- 1 の発現亢進が報告されている。このような報告からも、CNS へのリンパ球の浸潤には VLA- 4 / VCAM- 1 の系が重要な役割を果たしていることが示唆される。一方、VLA- 4 発現細胞の頻度は HAM 患者と対照群の間で有意差は認められなかった。HAM 患者において、末梢血 T リンパ球の VLA- 4 の発現様式が異なっているか、あるいは VLA- 4 / VCAM- 1 接着後のシグナル伝達機構に差があるのか、現在のところ不明である。また、VLA- 4 / VCAM- 1 接着後、どのようなメカニズムで HAM 患者末梢血 T リンパ球の MMP- 2 の発現が up-regulate されるのかは明らかでない。この点の解明についてはさらなる研究の蓄積が待たれる。いずれにせよ、今回我々が示した結果は HAM 患者末梢血 T リンパ球は血管内皮細胞との接着

後, MMP-2 発現亢進により組織に浸潤しやすい状態にあることを示しているものと思われる。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は, HAM 患者リンパ球の病変組織浸潤に関わる血管内皮細胞への接着能と血管基底膜分解能の亢進の分子機構, とりわけ細胞接着因子 (VCAM-1) とインテグリン (VLA-4) 及び金属プロテアーゼ (MMP-2) の関与を明らかにしようとしたものであり, 目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

末梢血 T リンパ球の VLA-4 発現量, VCAM-1 刺激による MMP-2 発現量とその活性を HAM13 例と対照神経疾患 21 例 (HTLV-1 感染者 8 例を含む) の間で比較し, さらに特異抗体を用いて MMP-2 活性化が VCAM-1 刺激によるものであることの確認実験も行っており, 目的達成のための手法として妥当である。

3. 解析, 考察の評価

実験結果の解析から, HAM 患者末梢血 T リンパ球において VCAM-1 刺激による MMP-2 活性化の程度が明らかに亢進していることを明示した。HAM 患者末梢血 T リンパ球においては血管内皮細胞接着を介した血管基底膜分解能の亢進を来す質的变化が存在することを示唆した考察の過程も論理的で評価できる。今後の HAM の分子病態解明と治療法開発へ向けた研究の進展が大いに期待される。

以上のように本論文は HAM 病態の分子基盤の解明に貢献するところ大であり, 審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 片 峰 茂
副査 教授 朝 長 万左男
副査 教授 松 山 俊 文

郝 立 君

(中国) 1962年4月13日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Phorbol Ester-Potentiated Liposomal Transfection to Monocytic PLB-985 Cells

(単球系 PLB-985細胞へのホルボールエステルで増幅されたリポソームによる遺伝子導入)

郝立君, 楊 丹, 藤井仁人, 山内明, 鈴木則男, 菊池 寛, 金田安史, 中村三千男

Journal of Biochemistry 受理 (平成12年9月28日)

長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門炎症細胞機構分野

(主任: 中村三千男教授)

論文内容の要旨

緒 言

培養細胞への遺伝子の一時的導入にはさまざまな方法がなされてきたが, 造血系細胞へのそれは効率が特に低く, 多くの検体を同時に処理して総合的な結論を得るのは困難であった。PLB-985細胞は, 食細胞へ最終的に分化させることができるため, 活性酸素産生分子 gp91^{phox} 遺伝子のように食細胞の分化に伴って細胞種選択的な発現調節を受ける遺伝子発現機構の解析には, 極めて有用である。しかしながら, これまでの PLB-985細胞への一時的遺伝子導入は, 殆どが効率の悪いエレクトロポレーションでなされてきた。私は, 誰でも簡単にできるリポソームを用いた本細胞への一時的な高効率遺伝子導入法の開発に成功し, その機構の解析を通して効果的な遺伝子導入への示唆を得た。

材料及び方法

1. リポソーム (第一製薬の TFL-01~08) を検索して, TFL-01(O, O'-ditetradecanoyl-N-(α -trimethylammonioacetyl) diethanolamine Cl: cholesterol = 5 : 2) が最適であることを確認し用いた。
2. ホルボールエステルとして tetradecanoly-13-acetate(TPA), 4 α -TPA, および phorbol diacetate を, 他の PKC 活性化剤として dioctanoyl glycerol(DiC 8)を用いた。PKC 阻害剤(H 7, GF109203X, GO 6976, staurosporine), PKA 阻害剤(H 8), PKA 活性化剤(forskolin)も用いた。
3. ルシフェラーゼレポーター活性: 以下の配列を持つプラスミドを用いた; SV40プロモーター/ホタルルシフェラーゼ(pGVC 2), CMVプロモーター/レニラルシフェラーゼ, およびヒト gp91^{phox}プロモーター/ホタルルシフェラーゼ。
4. 最終的に確立した一時的遺伝子導入系: 160nM TPA で PLB-985細胞処理→(4 時間後 40nmol TFL-01 / プラスミド混液添加→(16~22 時間後)ルシフェラーゼ活性測定。
5. PKC, PKA 測定: 基本的には, それぞれ特異的なオリゴペプチド基質のリン酸化を RI で検出した。
6. プラスミドの取り込みモデルとして, FITC 標識ホスフォロチオオリゴヌクレオチド(S-オリゴ)を用いた。

結 果

1. TFL-01単独でもエレクトロポレーション法と同程度にレポータープラスミドを導入できたが, TPA (160nM) で細胞をあらかじめ処理しておく, 導入効率はエレクトロポレーション法の540倍以上になった。他のホルボールエステルは無効であった。
2. PKC を活性化する DiC 8 は, TPA に置き換える

ものでは無かったが、TPA の前に加えると TPA の効果を阻害した。

- 3 . リボソーム / プラスミド添加 8 時間後に H 7 , staurosporine, GO6976, または H 8 を加えるとリポーター活性は低下するが, GF109203X や forskolin を加えても低下しなかった。ただし, これら全ての試薬を個々に, TPA 処理以前に加えると活性は低下した。
- 4 . TPA 処理細胞では, PKC 活性の上昇と PKA 活性の低下が見られた。
- 5 . TPA 処理細胞では, S-オリゴの取り込みの上昇と, その滞留が顕著であった。
- 6 . 本方法で, 食細胞特異的 gp91^{phox} のプロモーター活性を測定したところ, 慢性肉芽腫症患者で見られた点変異 (-53C/T, -55T/C, -57A/C) を導入したプロモーターの活性は正常配列プロモーターの活性の約 8 % であり, 患者の末梢血単球の活性と同等であった。

結論及び考察

- 1 . TPA/TFL-01リボソーム法は, PLB-985細胞への一時的遺伝子導入に極めて有用である。
- 2 . 遺伝子導入効率の飛躍的な上昇には, TPA 処理によってもたらされる遺伝子導入初期における高 PKC (cPKC と nPKC) 活性および低い有意な PKA 活性と, 後期における選択的な nPKC 活性が必須であると考えられた。これらは, 初期の遺伝子取り込みの増加と, その後の安定化および, 細胞の転写活性の上昇を招くと考えられる。
- 3 . 本法は高感度であり, 手技が平易なため食細胞での転写因子解析に極めて有用である。

論文審査の結果の要旨

1 . 研究目的の評価

本研究は, 遺伝子の強制発現が困難な血球系の細胞に高率に遺伝子を導入する手法を開発したもので, その成果は多岐にわたる分子生物学的研究に応用することに繋がるものであり, 妥当である。

2 . 手段・方法に関する評価

リポフェクション法を改良し, これを様々な角度から解析して最適条件を設定し, 通常よく用いられているエレクトロポレーション法との比較研究を行った点は高く評価できる。

3 . 分析・考証の評価

改良したリポフェクション法 (TPA による細胞刺激を含む) の作用機序について, TPA がもたらす細胞へのシグナリングの影響を詳細に解析し, また遺伝子 (DNA) の取り込みの亢進を S-oligo を用いた実験によって明解に示した点は高く評価できる。

4 . 結果に関する評価

本研究が開発した手法は, 従来のトランスフェクション法と比較し, 数百倍の効率で遺伝子を血球細胞に導入する事ができ, 遺伝子発現の研究のテクノロジーの進歩に寄与しており, 高く評価できる。

以上のように, 本論文は遺伝子発現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 谷 山 紘 太郎
副 査 教 授 平 山 壽 哉

廣 田 康 宏

(長 崎 県) 昭 和 42 年 7 月 8 日 生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Activation of Specific MEK-ERK Cascades is Necessary for TGF- β Signaling and Crosstalk with PKA and PKC Pathways in Cultured Rat Articular Chondrocytes Osteoarthritis and Cartilage (2000 Jul ; 8 (4) : 241- 7)

(ラット関節軟骨細胞における TGF- β による特異的 MEK-ERK カスケードの活性化と PKA, PKC とのクロストーク)

廣田康宏, 塚崎智雄, 米倉暁彦, 宮崎洋一, 尾崎 誠, 進藤裕幸, 山下俊一
長崎大学医学部整形外科教室

(主任 : 進藤裕幸教授)

論文内容の要旨

緒 言

TGF- β 1 は個体の発生に必須のサイトカインであり, 関節軟骨細胞においては, 分化だけでなくその増殖も強力に促進する。しかし TGF- β 1 は多くの細胞に対してその増殖を抑制することから, 軟骨細胞に特異的な細胞内情報伝達経路の存在が示唆される。TGF- β 1 のシグナル伝達には Smad 及び MAPK の経路が関与することが知られているが, 我々は TGF- β 1 が培養ラット関節軟骨細胞 (CRAC) で Smad の経路を活性化させることや, MAPK ファミリーのひとつである ERK を活性化させることを明らかにした。本研究では CRAC における MAPK ファミリー活性化機構を TGF- β 1 が増殖を抑制する HepG 2 肝細胞と比較検討した。また MAPK の経路と PKA, PKC とのクロストークの存在を確認した。

材料及び方法

1) 細胞 : CRAC は 5 週齢雄 SD ラットの関節軟骨から細胞を分離し, 一代継代後各実験に使用した。対照に肝癌由来細胞株 HepG 2 を用いた。

2) In vitro キナーゼアッセイ : 細胞溶解液に抗リン

酸化 ERK 抗体を加え免疫沈降し, γ ATP 存在下に Elk 1 と in vitro で反応させた。これを SDS-PAGE にかき, リン酸化特異的 Elk 1 抗体でイムノブロッティングすることで ERK 活性を判定した。一方, JNK 活性は cJun 蛋白を基質にキナーゼ反応を起こさせ, 抗リン酸化 cJun 抗体で判定した。

3) AP 1 活性の測定: AP 1 結合部位を三個含む p 3 TP-luc レポーターベクターを一過性に細胞内へ導入し, ルシフェラーゼ活性を測定した。

4) in vivo Elk 1, cJun リン酸化能の測定 (trans-reporting system) GAL 4-DNA 結合ドメインと Elk 1 ないし cJun の融合蛋白の発現ベクター及び GAL 4 応答部位をもつルシフェラーゼのレポーター遺伝子を細胞内へ導入し, ルシフェラーゼ活性を測定した。

5) MAPK 上流調節因子の役割: MAPK ファミリーの上流に位置する MEKK, TAK1, SEK の活性化型や不活性化型の発現ベクターを各々 p 3 TP-luc ベクターと細胞内へ導入し, その共発現条件下において, ルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を検討した。

6) PKA, PKC の関与: PKA 活性化剤の 8-Br-cAMP や adenylyl cyclase stimulator である Forskolin, および PKC 阻害剤である CalphostinC を用いて, MAPK の活性化機構にクロストークが存在するかどうか検討した。

結 果

1) In vitro キナーゼアッセイにおいて, TGF- β 5 ng/ml は CRAC の ERK 活性を 5 分後より刺激したが, JNK の活性変化はなかった。一方 HepG 2 では ERK の活性は TGF- β により変化しなかったが, JNK に刺激 60 分後より活性上昇が見られた。

2) Elk 1 のリン酸化は TGF- β の刺激によって両細胞で促進されたが, cJun のリン酸化は HepG 2 でのみ見られ, CRAC では誘導されなかった。

3) 3 TP の転写活性は両細胞で TGF- β によって増加したが, これを特異的 MEK 阻害剤 PD98059 は CRAC でのみ濃度依存的に抑制した。

4) 3 TP の転写誘導に対して MEKK, SEK は CRAC では抑制的に作用したが, HepG 2 では促進した。また TAB-TAK の系は HepG 2 では促進因子としての関与が示唆されたが, CRAC では明らかな役割を見出せなかった。

5) CRAC を 8-Br-cAMP や Forskolin あるいは CalphostinC で処理すると TGF- β による 3 TP の転写促進作用や ERK の活性化は抑制された。

考 察

TGF- β はラット関節軟骨細胞の増殖を促進する一方で HepG 2 の増殖を抑制することから, 両細胞間には異なる細胞内応答機構が存在すると予想される。本

研究成果から, 少なくとも AP 1 の活性化機構における MAPK の関与に両者の相違があることが判明した。つまり関節軟骨細胞においては TGF- β は MAPK ファミリーの中で MEK-ERK カスケードを特異的に活性化するが, HepG 2 では MEKK, TAK-SEK-JNK カスケードを活性化した。関節軟骨細胞では ERK の活性化によって cfos 遺伝子の転写が誘導されるが, cjun 遺伝子は誘導されない。また cFos は単独では転写因子として DNA に結合できず, Smad 3 と複合体を形成し AP 1 反応塩基配列に結合することが判明している。軟骨細胞でも ERK を介した cFos の誘導と, それに引き続く Smad 3 との結合により様々な標的遺伝子の転写が調節され, 細胞増殖反応を起こしているものと示唆される。更に軟骨細胞でも PKA と PKC はそれぞれ ERK の活性化を負と正に調節していることが判った。

近年骨髓血中の間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化させ, 三次元的に関節軟骨を造ることが可能となった。この分化誘導に TGF- β が重要な役割を担っている。軟骨再生の手段として TGF- β が臨床応用されるには, 軟骨細胞特異的なシグナル伝達の更なる解明が必要と思われる。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

TGF- β 1 の作用は細胞によって増殖の促進と抑制の二面性がある。TGF- β 1 によって増殖を促進される細胞と抑制される細胞とを用いて, TGF- β 1 受容体を介した細胞内シグナル伝達の違いを, 比較検討し, さらに他の細胞内シグナル伝達系との関係を解明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

MAPK ファミリーカスケードを導入した 2 種類の細胞でのリン酸化反応や AP 1 活性の測定, さらにプロテインキナーゼ A (PKA) およびプロテインキナーゼ C (PKC) との関係をそれぞれの酵素活性化薬や阻害薬を用いて, 生化学的手法により解析したもので, 研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

TGF- β 1 によって引き起こされる細胞内シグナル伝達における MAPK ファミリーの活性化機構は, TGF- β 1 によって増殖を促進する軟骨細胞と抑制する肝細胞とで異なること, MAPK ファミリーの活性化機構に対して PKA は負に, PKC は正に調節すること, を明らかにしたもので, TGF- β の軟骨再生への臨床応用への進展が大いに期待される。

以上のように本論文は軟骨再生の分子基盤の解明に貢献するところ大であり, 審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主 査 教 授 谷 山 紘太郎

副 査 教 授 小 路 武 彦
副 査 教 授 毎 田 徹 夫

山 田 浩 喜

(長崎県) 昭和45年 4 月19日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 An autosomal dominant posterior polar cataract locus maps to human chromosome 20p12-q12

(常染色体優性遺伝性後極白内障原因遺伝子の20番染色体への局在同定)

山田浩喜, 富田博秋, 吉浦孝一郎, 近藤新二, 涌井敬子, 福嶋義光, 池川志郎, 中村祐輔, 雨宮次生, 新川詔夫

European Journal of Human Genetics 8 巻 7 号 : 535-539頁, 2000年

副 論 文 Genetically distinct autosomal dominant posterior polar cataract in a four-generation Japanese family

遺伝的に異質な4世代にわたる日本人家系の常染色体優性遺伝性後極白内障

山田浩喜, 富田博秋, 金沢佑隆, 米良明子, 雨宮次生, 新川詔夫

American Journal of Ophthalmology 129 巻 2 号 : 159-165頁, 2000年

長崎大学医学部眼科学教室

(主任 : 雨宮次生教授)

論文内容の要旨

緒 言

先天白内障は1 ~ 6 / 10,000人で発症し, その1 / 4 ~ 1 / 2 が遺伝性である。水晶体の後極部に混濁を認めるものが後極白内障であり, 混濁が光軸に位置することから視力低下を招く。後極部の白内障には先天性, 老人性, 糖尿病性, ステロイド性などがあり, 原因は臨床的にも遺伝学的にも異質性を示す。遺伝性のもは, 常染色体優性 (AD) が最も高頻度である。AD白内障では少なくとも10の遺伝子座が報告されていて, そのうち後極白内障1型 (CPP1) 座は16qに, 後極白内障2型 (CPP2) 座は1p36, 他の型は1p36, 1q, 2q, 12q, 13cen, 16q, 17p, 17q, 21q, 22qに局在する。申請者らは4世代にわたり後極白内障をもつ10名の罹患者がいる日本人家系を発見した。本研究は, その特異な表現型の臨床的解析, およびその原因遺伝子のゲノム上の局在を知るため連鎖解析を行ったものである。

対象と方法

臨床的解析: 発端者は, 両眼性の先天後極白内障をもつ45歳の男性で, 同一家系内の10名が同様な白内障

を示した。眼科的精査の結果, 白内障以外に異常はなかった。本家系の表現型は, 両眼性, 円盤状の後極白内障でびまん性の皮質混濁を伴い, 徐々に進行することが特徴であり, 従来未知の型のAD白内障で, 後極白内障3型 (CPP3) と命名した。手術時年齢は, 4 ~ 45歳までの差が見られた。術後の視力は良好で, 眼振も見られなかったことから, CPP3は, 十分な視機能獲得後に両眼対称に進展するものと思われた。

遺伝子型決定と連鎖解析: インフォームドコンセントを得た後, 罹患者7名, 非罹患者9名から採血し, 高分子DNAを抽出し, 以下の連鎖解析に供した。戦略は, 最初に既知白内障座を候補に, 次に全ゲノム領域の連鎖解析を行った。450種のマイクロサテライト多型 (MSM) マーカーを遺伝的距離で5 ~ 10cMとなるように選択して, マーカーに用いた。各MSMに対応するPCRプライマー対を作成し, センス側プライマーのみを蛍光色素でラベルし, PCR産物をオートシーケンサおよびcomputer softwareを用いて, 各被検者の遺伝子型を決定, さらにハプロタイプ解析を行った。連鎖の度合いを示す2点間ロッド得点は, 遺伝子頻度0.0001, 完全浸透, 解析座位のアレル頻度を同等と仮定し, MLINKprogramを用いて算出した。マーカー座間の距離はGénéthon連鎖地図に従った。

候補遺伝子における変異解析: 連鎖解析で証明した局在領域にある遺伝子 *BFSP1* (*filensin* をコードし, 20p11.23-p12.1にマップ) をCPP3の候補遺伝子として, 蛋白コード領域の変異の有無を解析した。*BFSP1*の詳細な局在確定のため, その3'非翻訳領域に対応するプライマーを用いてStanford G3 Radiation hybrid panelをスクリーニングした。未知であった*BFSP1*のエクソン1 ~ 3近傍のイントロン配列を決定するため, PACライブラリーをスクリーニングした。単離したPACクローンを鋳型にして塩基配列を決定した。次に*BFSP1*の全てのエクソンとスプライスシグナルを解析するためのプライマーを設計し, 罹患者2名でPCR直接塩基配列決定を行い, 結果を正常対照者および既報の塩基配列と比較した。

結 果

- (1) 既報の10領域の41個のMSMとCPP3との連鎖を否定し, CPP3は既知の遺伝性白内障と遺伝的に異質であることが明らかになった。
- (2) 連鎖解析の結果, 20番染色体上のマーカー座であるD20S917, D20S885, D20S874で有意に高いロッド得点 ($Z_{\max} = 3.61, \theta = 0.00$) を得た。さらに精密な疾患座局在決定のため, 同領域の30種のMSMを用いて解析し, この領域との連鎖を確認した。
- (3) ハプロタイプ解析で, 本家系罹患者に3つの染色体組換え (D20S851とD20S917間, D20S96とD20S

888間, D20S874とD20S96間)を観察し, 疾患遺伝子座を限定した。罹患者全員に共通した疾患関連ハプロタイプはD20S917~D20S899までであり, CPP3の原因遺伝子はD20S851~D20S96の間に局在することを証明した。

- (4) Radiation hybrid panel マッピングの結果, *BFSP 1* はD20S114に有意に連鎖しており, *BFSP 1* はD20S1015とD20S182間に存在していることを確認した。*BFSP 1*のエクソン1~3近傍のイントロン配列の結果はGenbankに登録した。次いで*BFSP 1*の蛋白コード領域について塩基配列決定を行ったが, 罹患者特異的な変異は同定されなかった。

考 察

- (1) 申請者らは新しい疾患単位である後極白内障3型(CPP3)座を20p12-q12にマップした。この領域は過去に白内障座位としては報告はなく, これが世界で初めての報告である。本家系における有意な染色体組換えはほとんど男性で見られたことから, 男性遺伝地図に基づく遺伝的距離を用いる方が妥当であり, その場合15.7-cMに相当する。
- (2) CPP3は両眼性, 円盤状の後極白内障で, 全白内障へと進行する特異な, 臨床的に新しい型のAD白内障である。既知のAD後極白内障であるCPP1とCPP2は, 原因遺伝子座位が16qと1p36に局在するので, CPP3は遺伝学的にも新しい型のものであった。
- (3) 本研究でマップした領域に存在する遺伝子の中で, *BFSP 1*はそのコードする蛋白 filensin が水晶体特異的中間径フィラメントであり, 水晶体線維細胞の分化と維持に重要であると考えられていたので強力な候補遺伝子と考えられた。しかし変異解析の結果, 今回の罹患者に*BFSP 1*の蛋白コード領域に塩基置換や欠失は見られなかった。プロモーター領域を含む非コード領域の解析が必要だが, *BFSP 1*はCPP3の原因遺伝子としては否定的である。
- (4) 今後, CPP3の原因遺伝子を明らかにすることで, 水晶体の機能およびその障害の理解につながると期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的

本研究は, 申請者らが世界で初めて見出した4世代にわたる後極白内障の特異な表現型の臨床的解析, およびその原因遺伝子のゲノム上の局在を知るために連鎖解析を行ったものであり, 目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

罹患者7名, 非罹患者9名の血液より高分子DNAを抽出し, 全ゲノム領域の連鎖解析を行い, 各被検者の遺伝子型を決定し, さらにハプロタイプ解析を行っ

ている。この解析で証明した局在領域にある*BFSP 1*を候補遺伝子として, 蛋白コード領域の変異の有無をも解析しており, 研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

申請者らの見出した後極白内障は, 既知の遺伝性白内障とは異なり, 遺伝子座が20p12-q12にマップされ, 臨床的に新しい型の常染色体優性遺伝性後極白内障であることを世界で初めて報告したものであり, 高く評価できる。

以上のように本論文は, 遺伝性後極白内障に新しい疾患単位を確立しており, さらにこの原因遺伝子を明らかにすることで, 水晶体の機能およびその障害の解明に大きく貢献するものであり, 審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主 査	教 授	中 園 一 郎
	副 査	教 授	小 路 武 彦
	副 査	教 授	松 山 俊 文

石 原 博 史

(長崎県)昭和42年11月16日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Keloid fibroblasts resist ceramide-induced apoptosis by overexpression of insulin-like growth factor I receptor
(IGF-Iレセプター過剰発現によるケロイド線維芽細胞のアポトーシス抵抗性の検討)

石原博史, 吉本 浩, 藤岡正樹, 村上隆一, 平野明喜, 藤井 徹, 大津留 晶, 難波裕幸, 山下俊一

The Journal of Investigative Dermatology (in press)

長崎大学医学部形成外科教室

(主任: 藤井 徹教授)

論文内容の要旨

緒 言

ケロイドはコラーゲンなどの細胞外マトリックスを過剰に産生し, 局所において増殖・隆起するとともに周囲の健常皮膚にも浸潤・拡大傾向をしめす良性腫瘍様疾患であるが, その原因は未だ不明であり外科領域においては治療に難渋する疾患の1つとなっている。今日までにケロイド由来線維芽細胞はいくつかのサイトカインに対する反応性の違いが報告されており, その病態にも種々のサイトカインシグナルの関与が示唆されている。

我々はこれまでにケロイド由来の線維芽細胞で Insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) の発現が増加し, これが周囲組織への細胞の浸潤に関与している

ことを報告した。

IGF-I レセプターのシグナルは細胞の増殖・分化・形質転換といった様々な作用をもたらすとともに多くの細胞においてアポトーシスに対して抑制的に作用することが知られている。一方、アポトーシスは細胞の生理的な能動死として定義されており、個体の発生や分化だけでなく創傷治癒の過程においても炎症期から増殖期あるいは増殖期から成熟期への移行に際して細胞成分の排除に重要な役割を果たしていることが知られている。

本研究ではケロイドにおいて過剰に発現している IGF-I レセプターのシグナルが線維芽細胞のアポトーシスに対してどのように作用しているか検討を行った。

材料と方法

- 1) 細胞培養：手術時にインフォームド Consent のもと得られたケロイドおよび正常皮膚各々 3 例の切除組織より線維芽細胞の初代培養を行い 10% FBS 添加 DMEM にて継代した後、3 - 7 代目の線維芽細胞を使用した。
- 2) IGF-I レセプターの発現：免疫染色および Western Blot で評価した。
- 3) アポトーシスの誘導：細胞透過性セラミドである C2 セラミドの添加により皮膚線維芽細胞のアポトーシスを誘導した。
- 4) アポトーシスの同定：位相差顕微鏡・蛍光核染色・TUNEL 染色・Flow cytometry・WST-1 assay により評価した。
- 5) IGF-I レセプターシグナルの関与：セラミドによるアポトーシス誘導系に対して IGF-I および IGF-I レセプターシグナルの下流に位置する Phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) の特異的阻害剤である wortmannin の添加実験により評価を行った。

結 果

- 1) 今回使用したケロイド由来線維芽細胞 3 系統においても蛋白レベルで IGF-I レセプターの発現が増加していることが確認された。
- 2) C2 セラミドは皮膚線維芽細胞に対して濃度および時間依存性にアポトーシスを誘導した。
- 3) ケロイド由来線維芽細胞では正常皮膚由来線維芽細胞と比較して C2 セラミドによるアポトーシス刺激に対して抵抗性が認められた。
- 4) IGF-I の添加によってケロイド由来線維芽細胞の活性は正常皮膚由来線維芽細胞と比較して有意に上昇した。
- 5) IGF-I の添加によって認められたケロイド由来線維芽細胞のアポトーシス抵抗性の上昇は wortmannin の添加により有意に抑制された。

考 察

創傷治癒の過程におけるアポトーシスの重要性については従来より知られているところであり、ケロイドの病態を創傷治癒過程の異常としてとらえた場合何らかのアポトーシス機序の変化がその一因として考えられる。現在までにケロイド由来線維芽細胞におけるアポトーシス機能の異常についてはいくつかの報告が散見されるが、未だ見解の一致は得られていない。今回我々は以前報告したケロイドで過剰に発現している IGF-I レセプターのシグナルが線維芽細胞のアポトーシス機能に及ぼす影響に着目し本研究を行った。今回の我々の実験では IGF-I レセプターのシグナルはケロイド線維芽細胞のアポトーシスに対して抑制的に作用しており正常皮膚由来線維芽細胞と比較しアポトーシス刺激に対して抵抗性を示すという結果が得られたが、ケロイドを創傷治癒過程が持続・遷延した状態とみなした場合その病態にも合致するものと思われた。そしてこのことがケロイドで特異的にみられる線維芽細胞の増殖と過剰な細胞外マトリックス蓄積の一因にもなっている可能性が示唆された。今後さらにケロイド由来線維芽細胞のアポトーシス抵抗性の分子メカニズムを解明することは新しいケロイドの治療法にもつながるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル：IGF-I レセプター過剰発現によるケロイド線維芽細胞のアポトーシス抵抗性の検討

1. 研究の目的の評価

本研究はケロイドの治療抵抗性を示す機序の解明による有効な治療法の開発を目的としたものであり、その成果はケロイドの新しい治療に繋がるのみでなくその成因の解明を通じて皮膚の結合組織の恒常性の維持機構の研究にも応用可能であり、妥当である。

2. 手段・方法に関する評価

アポトーシス抑制シグナル伝達に關与する Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) のケロイド由来線維芽細胞での発現パターン、セラミドによるアポトーシスの誘導に対する正常線維芽細胞との比較、および特異的阻害剤を用いたアポトーシス抑制への阻害効果を検討しており研究方法は妥当である。

3. 結果・考察の評価

ケロイド由来線維芽細胞に過剰発現している IGF-1R を介するシグナルがアポトーシスに抑制的に作用することがケロイドの治療抵抗性の大きな要因であることを初めて証明した研究であり、ケロイドを遷延化した創傷治癒過程とする考え方は高く評価出来る。

以上のように本論文はケロイド線維芽細胞のアポトーシス抵抗性の機序を明らかにし、新しい治療法の開発への道を拓いたことより、審査委員会は全員一致

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 片山 一朗
副査 教授 進藤 裕幸
副査 教授 関根 一郎

永瀬 喜久

(長崎県)昭和43年4月5日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Propofol Inhibits Muscarinic Acetylcholine Receptor-Mediated Signal Transduction in *Xenopus* Oocytes Expressing the Rat M1 Receptor

(プロポフォールはラットM1受容体が発現したアフリカツメガエル卵母細胞において、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する細胞内情報伝達系を制御する。)

Y Nagase, M Kaibara, Y Uezono, F Izumi, K Sumikawa, K Taniyama

Japanese Journal of Pharmacology・79巻
319-325頁 1999年

長崎大学医学部麻酔学教室

(主任教授：澄川耕二)

論文内容の要旨

緒言

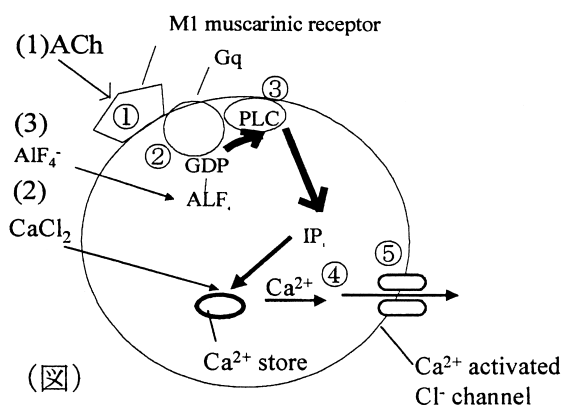
脳内ムスカリンM1受容体は意識、学習、記憶に大きく関与するとみられている。揮発性麻酔薬ハロタンやエンフルランが、ムスカリンM1受容体に抑制作用を示すということは報告されているが、静脈麻酔薬プロポフォール(2,6-diisopropylphenol)については、ムスカリンM1受容体にどのように関与しているのか、まだ明らかではない。そこでムスカリンM1受容体に対するプロポフォールの作用機序を明らかにするべく、電気生理学的手法を用いて検討した。

方法

- (1) 临床上実際に使用されているディプリバン製剤を使用した。この製剤には10mg/mlのプロポフォールが含まれている。
- (2) アフリカツメガエルの卵母細胞をコラゲナーゼで脱濾胞した後、ラットムスカリンM1受容体を発現させた卵母細胞と、発現させない卵母細胞を実験に用いた。
- (3) M1受容体を発現させるには、ラットM1受容体のcDNAから作製したcRNAを卵母細胞に注入し、3日間19℃で培養する。これらの細胞を使い、単一受容体を介した細胞内情報伝達系の解析に適した二電極膜电位固定法を用いて生じる電流を測定した。

結果および考察

- (1) プロポフォール前処置下に100nMのアセチルコリンを作用させて生じる電流の大きさと、前処置なしでアセチルコリンによって生じる電流の大きさとを比較検討した。10分間のプロポフォール前処置はアセチルコリンによって生じる電流を濃度依存的に可逆的に抑制し、その IC_{50} は5.6 μ Mであった。この抑制作用にはプロポフォールが溶解している脂肪乳剤、Intralipidは関与していなかった。
- (2) プロポフォールの抑制作用が細胞内情報伝達系のどのレベルで生じているのかを検討した(図)。M1受容体①が刺激されると、情報は受容体に共役しているGタンパク質②に伝わり、その刺激がphospholipase C(PLC)③を介して細胞内のカルシウム濃度を増加させる。この増加したカルシウム④が、カルシウムで活性化する卵母細胞由来の Cl^- チャンネル⑤を開くことにより内向きの Cl^- 電流が観察される。そこで受容体の発現していない卵母細胞にカルシウムを注入して生じる Cl^- 電流を調べたところ、プロポフォールで前処置してもしなくても、その大きさに差はなかった。
- (3) AlF_4^- を受容体のない卵母細胞に注入すると、受容体の刺激に関係なくGタンパク質②が活性化され、それ以降の情報伝達が発生し、最終的に細胞内で増加したカルシウムにより Cl^- 電流が発生した。10分間のプロポフォール前処置をしてもしなくても、発生する電流の大きさに差はなかった。



結論

以上のことから静脈麻酔薬プロポフォールはムスカリンM1受容体の発現したアフリカツメガエル卵母細胞で、アセチルコリンによって生じる情報伝達を濃度依存的に抑制するが、一方ではカルシウムで開口する Cl^- チャンネル自体には作用しないし、Gタンパク質以降の細胞内情報伝達系にも影響を及ぼさないことが判明した。よって静脈麻酔薬プロポフォールはラットM1受容体を介する細胞内情報伝達系を受容体レ

ベルか、或いは受容体から G タンパク質へ至る非常に狭い範囲の過程に作用していることが推測された。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的

静脈麻酔薬プロポフォール (2 , 6 - diisopropylphenol) の作用機序解明のために、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたアセチルコリン性ムスカリン M1 受容体に対する作用を、電気生理学的手法を用いて検討したもので科学的に妥当である。

2. 手段・方法に関する評価

アフリカツメガエル卵母細胞にラット M1 受容体 cRNA を注入して発現させる方法、および単一受容体を介した細胞内情報伝達系の解析に適した二電極膜電位固定法を用いており研究手法は妥当である。

3. 分析・考証の評価

薬理学的に極めて慎重・厳密に実験が行われ、得られた測定結果より論理的に分析・考証を行い、静脈麻酔薬プロポフォールは、ムスカリン M1 受容体を介する細胞内情報伝達系を受容体-G タンパク質レベルで抑制するという結論は科学的に妥当である。

4. 結果に関する評価

プロポフォールが、ムスカリン M1 性アセチルコリン作働性情報伝達系に特異的に作用することを明らかにし、麻酔作用解明のための新しい展望を示したものと高く評価できる。

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

審査担当者 主 査 教 授 丹 羽 正 美
 副 査 教 授 松 山 俊 文
 副 査 教 授 下 川 功

STANISLAV S SHKLYAEV

(ロシア) 1968年 8 月16日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Sage Transcript Profiles in Cultured Human Fetal Fibroblasts, WI-38

(ヒト胎児線維芽細胞 WI-38の Sage 法による全転写産物の解析)

Stanislav S Shklyayev, 難波裕幸, 原 健, 大津留 晶, 山下俊一

DNA Sequence (11 : 281 - 286 , 2000)

長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設分子医療部門分子診断研究分野

(主任 : 山下俊一教授)

論文内容の要旨

緒 言

細胞内には、およそ10万の遺伝子産物が存在する。

各細胞の特徴は、どのような遺伝子群が発現しているか、あるいは優位であるかにより決定される。更にある一定の遺伝子群の発現を持つ細胞が集合し器官を形成し、臓器としての機能を保持する。また、先天性疾患や、悪性腫瘍などでは、遺伝子変異により特定の遺伝子発現異常を起こし、細胞内情報伝達系の異常などが起こることが病気の一因となる。したがって、細胞内で発現している遺伝子のレパートリーを解析することは、発生学上のみならず疾患の研究に重要なことである。また、ある刺激により細胞内では経時的に遺伝子発現が変化する。こうした遺伝子全体の発現の変化を解析する方法として、1995年に KW.Kinzler 博士らにより Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) が報告された。従来用いられてきた Subtraction 法や Differential Display 法では、発現に差がある一部の遺伝子しか解析することができないという制約があった。その点、SAGE 法では、細胞内で転写されたすべての遺伝子の mRNA の構成比を変えずに、その発現量と増減の変化を解析することができる利点を有する。さらに細胞内で発現している未知の遺伝子の配列を特定することにより、新たな遺伝子をクローニングできるという特徴を有する。本方法を用いヒト胎児線維芽細胞株 WI-38の遺伝子発現プロファイルを解析した。

材料と方法

1) 細胞培養 : ヒト胎児線維芽細胞株 WI-38を10% FBS を含む α -MEM 培養液にて、37℃ , 5 %CO₂ インキュベーター内でシャーレを用い単層培養を行った。

2) cDNA 合成 : WI-38細胞10⁷個より acid guanidine isothiocyanate 法により Total RNA の抽出を行った。さらに mRNA の分離は Message Maker Reagent Assembly (Gibco BRL) を用いて行った。分離した mRNA 5 μ g から cDNA Synthesis System (Gibco BRL) を用い cDNA の合成を行った。プライマーとしてピオチン化したオリゴ dT を用いた。

3) 制限酵素による切断とリンカー結合 : 合成した cDNA を 4 bp カッターである制限酵素 NlaIII を用いて切断した後、ポリ A 部分を有する断片をストレプトアビジン・ビーズに結合させて回収した。それを半分に分け、塩基配列の異なる二つのリンカー A, B (約40bp) をそれぞれ cDNA 断片に結合させた。

4) Ditag の作製 : リンカー内に認識部位を有し、その下流で DNA 鎖を切断する制限酵素 BsmF 1 によりストレプトアビジン・ビーズ側を切り離した後、3' 末端を平滑化し1種類の cDNA に由来する11bp のオリゴヌクレオチド (Tag と称する) を得た。リンカー A と Tag の結合物とリンカー B と Tag の結合物をライゲーションさせた (Ditag) 後、リン

カー内に設定した二つのプライマーを用いて PCR 法にて増幅させた。目的とするサイズ (102bp) のバンドをゲルから切り出し精製し、それを新たな鋳型として PCR を再度行った。それにより単一でより多量の目的とする PCR 産物が得られた。次に NlaIII によってリンカー部分を切り離れた。

- 5) Concatamer の作製: Ditag に相当するバンドをゲルから抽出・精製し、それらを互いに結合させて Concatamer (Ditag が多数結合したもの) を作成した。
- 7) シークエンス解析: Concatamer を pGEM-Zf ベクターに組み込み、ダイプライマー法によりシークエンサーにより塩基配列を決定した。得られた Tag の塩基配列をジーンバンクを用い検索し mRNA の種類を同定した。

結 果

ヒト胎児線維芽細胞株 WI-38細胞内で転写された mRNA を9767個の Tag として解析した。その結果、1025種類の異なる遺伝子の転写産物を確認した。ジーンバンクに登録された遺伝子と照合しコンピューター解析したところ、42%が既知であるが、58%は未知の遺伝子であることが判明した。最も、発現が多く見られた転写物は、small cytoplasmic 7SL RNA 5'-Truncated gene であり、全体の10.2%をしめた。この遺伝子の発現増加は、RNA polymerase III の内因性プロモーターの作用の増強を反映していると考えられる。また、線維芽細胞の特徴として Vimentin, fibronectin, laminin などの細胞骨格や細胞外基質遺伝子群が0.1~0.2%の割合で発現していることが確認された。また、放射線照射 (10Gy) した場合、NFkB や EGFR の転写産物割合の増加が認められた。

考 察

SAGE 法を用いて WI-38細胞の転写産物の解析を行った。WI-38細胞は、Heiflick らによりヒトの老化の解析にもっとも頻用される細胞であり、染色体数も正常に保たれており本法の解析に適している。発現している遺伝子群により細胞の特徴ならびに機能が決定されるが、WI-38細胞の転写産物では、線維芽細胞の特徴である Vimentin などの骨格蛋白や、Collagen, Fibronectin などの細胞外基質の発現が多く見られた。また、老化した線維芽細胞では pro α 1 (type III) collagen C-propeptide の発現が欠如することが報告されているが、本実験で使用した WI-38細胞は5継代目であり、この遺伝子の発現が全体の転写産物の0.02%ほどの割合で見られ、本法により細胞内転写物のプロファイル解析が可能であることが示された。放射線照射4時間後の WI-38細胞では、コントロール細胞に比べ放射線応答遺伝子として認められている NFkB や EGFR の割合が増加していることより発現量の経時的変化を追

うことも可能であると推測された。本法の使用により正常細胞の刺激による発現遺伝子の変化や病態における遺伝子発現の異常について解析することが可能であり、今後広範にわたり新たな病態解明や治療法の開発につながるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、細胞内発現遺伝子 (mRNA) のレポーター解析のための最新的手法である Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) 法の、放射線障害を始めとする種々の病態分子機構解明研究における有用性を評価すること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

ヒト2倍体線維芽細胞 WI-38由来 mRNA を材料として SAGE の原法を忠実に再現し、WI-38における mRNA 種のプロファイリングを約1万個もの mRNA 由来 cDNA タグの塩基配列を決定することにより試みており、目的達成のための手法として妥当である。

3. 解析・考察の評価

mRNA プロファイリングの解析から、WI-38においては細胞骨格蛋白、細胞外マトリックス、サイトカインをコードする mRNA 優位の発現パターンが得られ既知の線維芽細胞の特質をよく反映すること、また既知の遺伝子に加えて未知遺伝子の発現も多く検出されることを明らかにした。これらの結果から SAGE 法が種々の細胞・組織における遺伝子発現プロファイルの解析法として優れること、未知遺伝子の機能解明にも繋がりを示唆した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種々の分子病態研究における SAGE 法の有用性を明示した点で医学研究の進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	新 川	詔 夫
	副 査	教 授	関 根	一 郎

VERA BRAIDEN

(ロシア) 1970年4月8日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Eradication of Breast Cancer Xenografts by Hyperthermic Suicide Gene Therapy under the Control of the Heat Shock Protein Promoter

(熱ショック蛋白遺伝子プロモーター制御を応用した乳癌に対する温熱分子標的化自殺遺伝子治療)

Vera BRAIDEN, 大津留 晶, 川下雄丈,

三木文夫, 澤田貴裕, 伊東正博, 曹 宇,
金田安史, 小路武彦, 山下俊一
Human Gene Therapy Vol .11, 2453-2463,
2000 .
長崎大学医学部原研分子医療部門
(主任: 山下俊一教授)

論文内容の要旨

緒 言

進行癌は QOL を考えた集学的治療の対象であるが, その中でも遺伝子治療は重要な選択肢の一つとなると考えられる。しかし, 米国などで現在行われている癌遺伝子治療の臨床治験 (phase I / II) では, 癌細胞に対する分子標的化は未だ成功していない。昨年フィラデルフィアのペンシルバニア大学病院においてアデノウイルスを用いた遺伝子治療治験において死亡事故が発生し, さらに最近の報告によりアデノウイルスを用いた自殺遺伝子治療において肝毒性や脱髄性変化が認められている。導入ベクターの改良がなされ, 高力価で遺伝子導入効率の高いベクターが全身的に用いられるにつれ, 副作用の発生する危険性も増すと危惧される。そこで癌遺伝子治療における分子標的は今後いっそう重要になることが予想される。

今回, 乳癌に対する腫瘍選択性を高める目的で, 熱ショック蛋白遺伝子 (HSP70) プロモーター制御による温熱自殺遺伝子治療を行い, さらにベクターによる毒性を回避する目的で遺伝子導入は HVJ リポゾーム法を用いた。これまでは腫瘍特異的プロモーターを用いた場合, 選択性は高まるものの転写活性が低いことなどにより抗腫瘍効果が低下し, 実際の遺伝子治療への応用には限界があった。本研究は, 温熱標的化癌自殺遺伝子治療と温熱療法の併用を試み, 優れた治療効果を実証し, その相乗効果のメカニズムの一部を解明したものである。

材料と方法

- 1) 細胞: マウス乳癌細胞株 FM3A (温熱抵抗性), FM3A の変異株 tsFT101 (温熱感受性)
- 2) プラスミド作製:
HSP70B 遺伝子プロモーター 2.3kb を firefly Luciferase Vector と HSV-TK (Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase) 遺伝子に連結したキメラ遺伝子 HSP-Luc 及び HSP-TK を作製した。温度非感受性の普遍的発現プロモーターのコントロールとして, CMV プロモーターに TK 遺伝子を結合した, CMV-TK 遺伝子を作製した。遺伝子導入効率の補正用に CMV-*renilla* Luciferase 遺伝子を用いた。
- 3) 殺細胞効果試験: WST assay, Colony formation assay, IC50
- 4) HSP プロモーター活性の測定: Dual Luciferase As-

say

- 5) 遺伝子導入法: in vitro レトロウイルスベクター法, in vivo HVJ-リポゾーム法
- 6) アポトーシスの検出: HE 染色, ヘキスト色素法, Tunnel 法
- 7) 免疫組織化学: Fas, Fas-L の免疫染色
- 8) 腫瘍モデル: FM3A ノードマウス皮下移植モデルにおける腫瘍増殖の比較, FM3A ノードマウス腹膜播種モデルにおける生存率解析

結 果

- 1) FM3A は tsFT101 に比して, 45℃30分の加温によるコロニー形成能の結果より明らかな温熱抵抗性を認める。また前加温処置すると FM3A は著名な温熱耐性が誘導されるのに対して, tsFT101 は全く温熱耐性が誘導されない。FM3A では熱誘導による hsp70 の発現が認められるのに対し, tsFT101 では hsp70 の誘導を認めなかった。
- 2) HSP プロモーター活性は FM3A では上記の加温条件で 6 時間後に約 200 倍の増加を示すのに対し, tsFT101 では活性の増加を殆ど認めない。FM3A の HSP プロモーター活性の増加は, 加温後 3 時間をピークに (400 倍), 12 時間まで持続した。また 41℃までの加温では殆ど変化ないが, 42℃-45℃では温度依存性に活性が上昇した。
- 3) ガンシクロビル (GCV) による殺細胞効果を IC50 で表すと, HSP-TK が遺伝子導入された細胞では加温により IC50 が 50000 倍以上増加したのに対し, コントロールの遺伝子導入されていない FM3A では加温によっても薬剤感受性の変化は認めなかった。
- 4) CMV-TK の遺伝子導入でも IC50 は加温により 15 倍増加した。
- 5) 担癌マウスを 43℃30分恒温槽にて加温すると, 腫瘍では HSP-Luc 活性が約 20 倍増加したが, 肺・肝・心・消化管・腎等の正常組織では増加は認めなかった。
- 6) FM3A のノードマウス皮下移植乳癌モデルでは, 温熱療法単独群, Mock Vector 遺伝子導入 + 温熱療法群はコントロール群と比較し, 腫瘍増殖抑制効果は認めなかったが, HSP-TK 遺伝子導入 + 温熱療法併用群では腫瘍は著明に縮小し, 瘢痕を残して消失した。また腹膜播種モデルにおいても併用群のみ著明な生存期間の延長を認めた。
- 7) 組織学的検索では, 併用群でのみ著明なアポトーシスを認め, Fas と Fas-L の発現を検出した。また Fas 中和抗体により治療効果は抑制された。

考 察

熱ショック蛋白遺伝子 (HSP70) プロモーターを利用した遺伝子治療は, 治療レベルの加温により腫瘍組

織に特異的な転写活性を誘導し、腫瘍選択的な分子標的治療の可能性を示した。一般的には腫瘍特異的あるいは誘導型プロモーターを用いた場合、腫瘍細胞もヘテロな集団と考えられるので、それらの活性が上昇しない腫瘍細胞には効果がないことが問題となる。しかし HSP70プロモーターを用いた場合は、プロモーター活性が上昇しない tsFT101 のような細胞では熱に対し感受性となり、温熱療法にて抗腫瘍効果が得られる。一方温熱抵抗性の FM3A のような悪性度の高い癌細胞では、HSP70プロモーター制御下に遺伝子治療による腫瘍特異的な殺細胞効果が得られる。この時、HSV-TK による遺伝子治療と温熱療法の併用は Fas 依存性のアポトーシスを誘導することにより、相乗的殺細胞効果が現れ、in vivo の遺伝子治療において遺伝子治療単独では認められないバイスタンダー効果を得ることが出来た。自殺遺伝子治療におけるバイスタンダー効果は、これまで gap junction を介したものと腫瘍免疫によるとされてきたが、我々の成績はアポトーシスによるバイスタンダー効果の重要性を示した。以上、温熱分子標的遺伝子治療と温熱療法の併用は、新たなヒト癌遺伝子治療の可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、実験腫瘍を用い、HSV チミジンキナーゼ / ガンシクロビル・システムを用いた熱ショック蛋白質遺伝子 (HSP) プロモーター制御による温熱分子標的化自殺遺伝子治療を試み、新しい癌の遺伝子治療法を確立しようとするものであり、研究目的は十分妥当である。

2. 研究手法に関する評価

HSP プロモーターの活性は、Luciferase 活性により測定し、自殺遺伝子による治療効果は、殺細胞効果 (in vitro) ならびに癌増殖抑制および生存期間 (癌移植マウス) にて解析した。また、治療効果のメカニズムを組織化学的に解析した。この研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記の方法で解析した結果、温熱療法と HSP プロモーター制御による遺伝子治療の併用は、Fas 依存性のアポトーシスを誘導するものであり、腫瘍に対して選択的な治療を可能にするものであることを実証した。

以上のように、本論文は新しい癌遺伝子治療法の適応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 奥村 寛
副査 教授 丹羽 正美
副査 教授 関根 一郎

北 島 知 夫

(長崎県) 昭和44年1月13日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Linkage of persistent cholangitis after bilio-enterostomy with biliary carcinogenesis in hamsters

(ハムスターにおける胆道再建後の遷延性胆管炎と胆道発癌との関連性の検討)
北島知夫, 田島義証, 鬼塚伸也, 松崎純宏, 松尾 圭, 兼松隆之

Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 19巻, 19(4) 453-458 2000
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

胆管腸吻合による胆道再建術は、肝胆膵外科領域で汎用されている術式である。しかし、術後は十二指腸・乳頭機能が廃絶されるため、胆管内への腸液の逆流が起こりやすく、しばしば逆流性胆管炎や肝膿瘍、肝内結石が惹起される。加えて、近年、肝内結石症や先天性胆道拡張症、総胆管結石症に対する胆道再建術後に胆道癌が発生した例が報告されている。そこで、今回、胆膵系解剖と胆汁および膵液組成がヒトと類似しているハムスターを用い、胆道再建モデルを作成し胆道再建に伴う胆管の形態的・生物学的変化や胆管炎の有無・程度を検索し、胆道発癌との関連を実験的に検討した。

方 法

1) 実験動物: 7週令雌性ハムスター68匹を用いた。

2) 群別: (1) 単開腹群 (SL; n = 20)

(2) 胆管十二指腸吻合群 (CD; n = 22)

(3) Roux-en-Y 式胆管空腸吻合群

(CJ; n = 26)

ハムスターを全麻下に開腹し、CD 群は胆管を幽門輪より1cm肛門側の十二指腸と端側吻合した。CJ 群は幽門輪より7cmの部位で切離した空腸を結腸前に拳上 (4cm) し、胆管と端側吻合した。CD, CJ 群とも胆嚢は摘除した。

3) 発癌実験: 発癌剤 N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) 10mg/kg を術後4週目から週1回皮下に9週間投与した。

4) 評価: 術後20週目に犠牲死させた。血清生化学検査成績、総胆管径、胆管炎スコア (病理組織像から、4段階にスコア化) および胆管癌の発生を調べ、群間の比較を行った。

結 果

1) 胆管癌の発生

肝外胆管癌は SL 群での発生はなく、CD 群で 1 匹、CJ 群で 2 匹に認めた。肝内胆管癌は 3 群すべてに発生を認め、その発生率は、SL 群 8 / 20 (40%)、CD 群 9 / 22 (41%)、CJ 群 13 / 26 (50%) で、群間に差を認めなかった。しかし、1 個体当たり平均癌発生個数は、SL 群 2.0 個、CD 群 6.2 個、CJ 群 14.5 個であり、胆道再建群、特に CJ 群で有意に多かった。

2) 総胆管径

SL 群に比べ、CD、CJ 両群では有意な拡張を示した。

3) 血清生化学的検査

総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、総胆汁酸は、CJ 群では他の 2 群に比べ有意に上昇していた。胆道再建を施行した CD 群と CJ 群とでは、胆汁中アミラーゼ、ホスホリパーゼ A2 の値に差はなかった。

4) 胆管炎と発癌の関連

胆管炎スコアは、SL 群 1.8、CD 群 3.2、CJ 群 3.9 であり、胆道再建群は SL 群に比べスコア値が高かった。胆管炎の有無および重症度と胆管癌発生状況との間には相関があり、胆管炎が重症化するのに従い癌発生個数も増加していた。

考 察

今回の研究では、再建術式の違いは胆管癌の発生そのものには影響しなかったが、胆管炎の有無・重症度が癌の発生・増殖に関与していた。胆管炎の原因として、胆道再建群では胆管の拡張と胆道系酵素の上昇を認めたことから、再建に伴う胆汁鬱滞と腸内溶液の胆道内逆流が考えられた。一方、胆道再建法による胆汁の胆管内逆流の程度に有意差はなかった。これは、胆道再建法とは無関係に、術後に胆汁鬱滞が生じ胆管炎が惹起されると、炎症の遷延化と重症化に伴い胆管癌の発生の危険性が高まるものと考えられた。この際、胆管炎に伴って誘導される炎症性サイトカインが癌の発生・増殖に関与している可能性が考えられた。

以上の実験結果から、臨床的には胆道再建術後の胆汁鬱滞、胆管炎の徴候の出現に注意を払い、病態に応じて利胆剤や腸蠕動促進剤による胆汁鬱滞の緩和や抗炎症剤などによる胆管炎への迅速な対策を講じることが、胆道再建後の胆道癌発生の予防に繋がるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

1. 研究の目的

本研究は胆道再建モデルを作成し、胆道再建に伴う胆管の形態的、生物学的変化や胆管炎の程度を検索し、胆道発癌との関連を明らかにしようとしたもので研究目的は妥当である。

2. 手段・方法に関する評価

胆膵系解剖と胆汁及び膵液組成がヒトに類似したハ

ムスターを用い、臨床に則した胆道再建モデルを作成し、発癌剤投与後20週目に犠牲死させ血清生化学的、病理学的手法を用いて解析したもので研究手段・方法ともに妥当である。

3. 分析・考証の評価

得られた結果より論理的に分析・考証を行い、その結論は科学的に妥当である。

4. 結果に関する評価

本研究は胆道再建術後の胆管炎の有無、重症度が胆管癌発生の危険因子になることを明らかにしたもので、臨床における胆道再建術の術式及び術後管理についての重要な示唆を与えるものとして高く評価できる。

以上のように本論文は、胆道再建術後の胆管癌の発生機序の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主 査	教 授	綾 部 公 懿
	副 査	教 授	田 口 尚
	副 査	教 授	松 山 俊 文

酒 井 一 介

(長崎県)昭和44年4月6日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Inteaaction of isoflurane and cromakalim, a K_{ATP} channel opener, on coronary and systemic haemodynamics in chronically instrumented dogs

(イソフルランとカリウムチャンネル開口薬クロマカリムの冠循環および全身循環における相互作用)

Kazuyuki Sakai, Shiping Zhang, Hiroyuki Ureshino, Shiro Tomiyasu, Koji Sumikawa.

Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 44, 1122-1127, 2000

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

ATP 感受性カリウムチャンネル(K_{ATP} チャンネル)開口薬は、血管拡張作用により臓器血流を保つとともに心筋の虚血プレコンディショニング効果を持つことが動物実験で報告されており、周術期臨床での有用性が期待されている。

吸入麻酔薬イソフルランは K_{ATP} チャンネルを開く作用を持つため冠血管および全身血管を拡張させると同時に、心筋の虚血プレコンディショニング効果も有する。イソフルラン麻酔中に K_{ATP} チャンネル開口薬を、冠血流量維持、心筋保護目的で使用するこ

が考えられるが、これらの相互作用については知られていない。本研究では、慢性装置埋込み犬を用いて、 K_{ATP} チャンネル開口薬であるクロマカリムの冠血管および全身血管に対する作用を覚醒状態とイソフルラン麻酔状態で比較した。

対象と方法

対象は雑種成犬14頭。全身麻酔下に慢性装置埋込み手術を行った。左開胸で冠血流量および心拍出量測定のため左冠動脈回旋枝および上行大動脈に超音波血流プローベを、心筋局所収縮率(%SS)測定のため左心室心内膜下に1対の超音波クリスタルを植え込んだ。左室圧最大上昇率(LVdP/dt_{max})、血圧測定および薬剤投与のため左心室、内頸動脈および外頸静脈にカテーテルを留置した。測定は手術後10日以上経過し犬が回復している事を確認してから行った。犬は、無作為に無麻酔群もしくはイソフルラン麻酔群にわけ、クロマカリムを4μg/kgもしくは10μg/kg静脈内投与した(n=7)。同一犬での測定間隔は2日以上とした。イソフルラン群での全身麻酔の導入はイソフルランの吸入で行い、気管内挿管後、酸素・イソフルランで麻酔を維持し、調節換気を行った。イソフルランの呼気終末濃度を2.1%で15分以上維持したのち、クロマカリムを投与し、循環動態を測定した。有意差の検定には分散分析を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

無麻酔群、イソフルラン群の両群において、クロマカリムは平均血圧および全身血管抵抗を減少させ、冠動脈血流量を増加させた。冠血流量は麻酔下では、ベースラインが $26 \pm 1 \text{ ml/min}$ 、クロマカリム4μM/kg投与時で $36 \pm 2 \text{ ml/min}$ 、クロマカリム10μg/kg投与時で $89 \pm 9 \text{ ml/min}$ まで上昇した。イソフルラン無麻酔下では、ベースラインが $40 \pm 2 \text{ ml/min}$ 、クロマカリム4μg/kg投与時で $55 \pm 3 \text{ ml/min}$ 、クロマカリム10μg/kg投与時で $8 \pm 5 \text{ ml/min}$ まで上昇した。イソフルランはクロマカリム4μg/kg投与による冠血流量上昇に対して相加的に作用したが、10μg/kgの作用に対しては影響しなかった。イソフルラン麻酔下では、クロマカリムの作用が半減するまでの時間は、無麻酔群で 270 ± 29 秒、イソフルラン群で 763 ± 185 秒であり、イソフルラン群で作用が延長していた。LVdP/dt_{max}, %SSは無麻酔状態では上昇したが、イソフルラン麻酔中は変化しなかった。

考察

イソフルランとクロマカリムはいずれも冠血管抵抗を減少させるが、この作用は相加作用と考えられる。クロマカリムを高用量投与した場合に相加作用が見られなかったのは、冠血管が最大に拡張すると同時に、血圧の低下により灌流圧が低下したためであると考え

られる。

K_{ATP} チャンネル開口薬は心筋の活動電位持続時間を短縮し心筋収縮力を減少させると報告されている。しかし、本実験では、無麻酔状態で、クロマカリムは心筋収縮力を増加させた。これは、血圧低下による代償性の圧受容体反射による交感神経系の活性化や、冠血流量の増加による心筋収縮力の上昇が原因と考えられる。イソフルランは交感神経系の活性化を抑制するとともに、陰性変力作用を持つため、クロマカリムによるこの作用を打ち消すと考えられる。

結論として、以下の事が示唆された。1) イソフルランとクロマカリムの冠血管拡張作用は相加的である。2) イソフルラン麻酔中は、クロマカリムによる心筋収縮力への影響は見られない。3) イソフルラン麻酔中は、クロマカリムの作用は延長する。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は冠循環および体循環に対するATP感受性チャンネル開口薬のクロマカリムと麻酔薬イソフルランの相互作用を明らかにするために、覚醒状態とイソフルラン麻酔状態においてクロマカリムを投与し、その効果を比較検討するものであり、その目的は妥当である。

2. 研究手法に関する評価

超音波血流プローベを大動脈および冠動脈に、超音波クリスタルを左室心内膜下に装着し、さらにカテーテルを左室、内頸動脈および外頸静脈内に留置した慢性装置埋込み犬を用いて、覚醒状態とイソフルラン麻酔状態でATP感受性 K チャンネル開口薬クロマカリムを投与し、冠循環および体循環の動態を同時に、かつ経時的に観察して分析するものであり、研究手法として妥当である。

3. 解析・考察の評価

イソフルランとクロマカリムの冠血管拡張作用は相加的で、イソフルラン麻酔中にはクロマカリムによる心収縮力への影響はみられず、クロマカリムの作用が延長することを明らかにしたもので、臨床応用への進展が大いに期待される。

以上のように本論文は、麻酔薬のイソフルランとATP感受性 K チャンネル開口薬クロマカリムの相互作用を明らかにして周術期臨床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	矢野捷介
	副査	教授	丹羽正美
	副査	教授	江石清行

津 田 敦

(長崎県) 昭和44年 1 月27日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 A Dose-Response Study of Anticholinesterase
Drugs on Contractile and Phosphatidylinosi-
tol Responses of Rat Trachea

(ラット気管の収縮とイノシトールリン
脂質代謝反応に対する抗コリンエステ
ラーゼ薬の影響)

津田 敦, 柴田 治, 斎藤将隆, 橋本
茂, 岩永 修, 横田徹次, 澄川耕二

Anesthesia & Analgesia, Volume 92, Num-
ber 1, 2001

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

低濃度のネオスチグミン (Neo) とピリドスチグミン (Pyr) が気管平滑筋ムスカリン M_3 受容体を刺激して, ラット気管平滑筋収縮とイノシトールリン脂質 (PI) 反応を亢進させるのに対し, エドロフォニウム (Edr) は影響しないことが報告されている。洞房結節において, 低濃度 Neo はムスカリン受容体を刺激し徐脈を引き起こすのに対して, 高濃度では抗ムスカリン作用を示す。気道平滑筋における高濃度 anti-ChE 薬の作用及び用量作用曲線はよく知られていない。そこでラットの気管を用い, 様々な濃度の anti-ChE 薬の気管収縮と PI 反応に対する影響を調べた。

対象と方法

雄ウイスター系ラット69匹 (250-350 g) をペントバルビタール麻酔下に気管を取り出し, 幅 3 mm の気管リングと幅 1 mm の気管切片を作成した。

(1) 気管リングを Krebs-Henselei (KH) 液を含むチャンパー内に固定し, 張力を測定した。1) anti-ChE 薬 (10-1000 μ M) を段階的に投与し, Neo 実験終了後, 新しいKH液で置換した。2) カルバコール (CCh, 5 5 μ M) で前収縮させた後, anti-ChE 薬 (10-1000 μ M) を段階的に投与した。3) L^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 μ M), インドメタシン (10 μ M), プロプラノロール (1 μ M), グリベンクラミド (10 μ M) を投与した後, Ne α 10-1000 μ M) を段階的に投与した。4) Ne α (10-1000 μ M) を投与した後, 4-DAMP (ムスカリン M_3 受容体アンタゴニスト, 10-1000 μ M) methoctramine (ムスカリン M_2 受容体アンタゴニスト, 0.01-10 μ M) を段階的に投与した。

(2) ムスカリン M_3 受容体を刺激すると PI 反応が亢進しイノシトール 3 リン酸 (IP₃) が産生され, 気管が

収縮する。IP₃の代謝産物であるイノシトール 1 リン酸 (IP₁) を測定した。1) 気管切片と [³H] myo-i-nositol, anti-ChE 薬 (10-1000 μ M) をインキュベートし, [³H] IP₁ を液体シンチレーションカウンターで測定した。2) anti-ChE 薬 (10-1000 μ M) をインキュベート後, さらに CCh (5 5 μ M) を加えインキュベートし [³H] IP₁ を測定した。

結 果

Neo (10 μ M) と Pyr (100 μ M) は気管収縮を示すのに対して, Edr は気管リングの静止張力に影響しなかった。収縮した気管は高濃度 Neo (1000 μ M), Pyr (1000 μ M) によって弛緩した。CCh 誘発性気管収縮は, Neo, Pyr, Edr (1000 μ M) によって弛緩した。L-NAME, インドメタシン, プロプラノロール, グリベンクラミドは, Neo 誘発性気管収縮 / 弛緩に影響しなかった。また, 4-DAMP, methoctramine は高濃度 Neo による気管弛緩に影響しなかった。高濃度 Neo (1000 μ M) によって弛緩した気管は KH 溶液を入れ替えることによって収縮した。Ne α (10 μ M), Pyr (100 μ M) は IP₁ を亢進させるのに対して, Edr は IP₁ レベルに影響しなかった。Ne α (1000 μ M), Pyr (1000 μ M) は各々の薬剤による IP₁ 亢進を抑制した。CCh 誘発性 IP₁ 亢進は, Neo (1000 μ M), Pyr (1000 μ M), Edr (100 μ M) によって抑制された。

考 察

低濃度 Neo と Pyr は気管収縮と PI 反応を亢進させるのに対して, 薬剤をさらに加えることによって収縮と PI 反応は抑制される。高濃度 Neo が気管収縮を抑制する原因として, 1) 高濃度 Neo が気管上皮からプロスタノイドや NO を放出させる, 気管平滑筋の β_2 アドレナリン受容体や K_{ATP} チャンネルを刺激する, また副交感神経からのアセチルコリン放出を抑制する。2) 気管平滑筋のムスカリン M_3 受容体を抑制するなどが考えられたが, 高濃度 Neo と Pyr が気管収縮と PI 反応を両方抑制することより, 2) が原因と考えられる。さらに高濃度 Neo を含む KH 液中で弛緩していた気管が, 新 KH 液で置換することにより収縮することから, 低濃度 Neo は M_3 受容体の高親和性の orthosteric site に結合して, 気管収縮と PI 反応亢進を示すのに対して, 高濃度では Neo が M_3 受容体の低親和性の allosteric site に結合して, Neo 誘発性 PI 反応亢進と気管収縮を抑制すると推測される。

結論として, Neo と Pyr は気管張力と PI 反応において用量作用曲線上二相性作用を示す。低濃度ではムスカリン M_3 受容体を介して用量依存性に気管を収縮させるが, 高濃度では気管を弛緩させる。その機序として高濃度では allosteric site へ作用して PI 反応が抑制されるためと推測される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

抗コリンエステラーゼ薬の中で、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した反応に対して低濃度で刺激、高濃度で抑制の二面性の作用を引き起こす薬物がある。気管平滑筋標本の収縮性を検討することにより、そのメカニズムを解明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

ラットの摘出気管標本を用いて、ネオスチグミン、ピリドスチグミン、エドロホニウム の3種類の抗コリンエステラーゼ薬の気管平滑筋収縮性およびイノシトールリン脂質代謝反応を測定し、各薬物の作用様式を解析したもので、研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

ネオスチグミン、ピリドスチグミンは気管平滑筋のムスカリン性アセチルコリン受容体に対して低濃度では刺激して収縮を、高濃度では抑制して弛緩を引き起こすが、エドロホニウムは抑制して弛緩を引き起こすのみで、そのメカニズムとしてイノシトールリン脂質代謝反応の促進あるいは抑制があることを明らかにしたもので、十分に評価できる。

以上のように、本論文は多くの臨床使用薬物には濃度によって本来の作用以外の作用が発現することを提示したもので、薬物治療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 近藤 宇史
副査 教授 河野 茂

安部 恵代

(福岡県) 昭和43年8月21日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Etidronate inhibits human osteoblast apoptosis by inhibition of pro-apoptotic factor(s) produced by activated T cells.

(エチドロネートは活性化T細胞から産生されるアポトーシス誘導因子を抑制することでヒト骨芽細胞のアポトーシスを抑制する)

Yasuyo Abe, Atsushi Kawakami, Tomoki Nakashima, Eri Ejima, Kaoru Fujiyama, Takeshi Kiriya, Akane Ide, Nobuko Sera, Toshiro Usa, Tan Tominaga, Kiyoto Ashizawa, Naokata Yokoyama, Katsumi Eguchi
Journal of Laboratory and Clinical Medicine
2000; 136: 344-354

長崎大学医学部内科学第一教室

(主任: 江口勝美教授)

論文内容の要旨

緒言

ビスフォスフォネートは慢性関節リウマチ(RA)に合併する骨粗鬆症など骨吸収増加を来す疾患の有効な治療薬である。作用機序として破骨細胞の動員・活性を抑制する等報告されているが骨芽細胞に関しては、ほとんど報告がない。一方RAにおける骨減少には、活性化T細胞が産生するサイトカイン等の液性因子が関与しているとされる。これまで我々は活性化T細胞培養上清が骨芽細胞にFasを介したアポトーシスを起こす事を報告してきた。さらにRA罹患関節で骨芽細胞アポトーシスの存在が証明されており、RAの骨減少への骨芽細胞アポトーシスの関与が示唆されている。そこで今回我々はビスフォスフォネートが活性化Tリンパ球培養上清による骨芽細胞アポトーシスに影響するかどうかを検討した。

方法

- (1) MG63およびヒト初代培養骨芽細胞を使用。また健康人末梢血より、T細胞を分離し活性化にはIL-2存在下で7日間培養した後、PMAとionomycinで24時間刺激、培養上清を実験に用いた。ビスフォスフォネートとしてはエチドロネート(EHDP)を用い骨芽細胞及び活性化T細胞を様々な濃度で24時間処理した。
- (2) 活性化T細胞培養上清の骨芽細胞への傷害性は⁵¹Cr-release assayで検討、アポトーシスはフローサイトメーターによるhypodiploid DNA細胞の検討及びHoechst 33258染色で確認した。
- (3) 骨芽細胞のFas発現をフローサイトメーターで、Bcl-2/Bcl-xL発現はWestern blottingで検討。また抗Fas-IgM抗体による細胞傷害性を⁵¹Cr-release assayで調べた。
- (4) 活性化T細胞培養上清中のsFasL, sFas, TNF-α濃度をELISA法で測定した。T細胞の増殖能は³H-thymidine incorporation assayで調べた。

結果

- (1) 無刺激T細胞培養上清は骨芽細胞を傷害しなかったが、活性化T細胞培養上清は骨芽細胞を傷害した。Hoechst33258染色にて細胞はアポトーシスに特徴的な形態を示した。またフローサイトメーターにてhypodiploid DNA細胞の増加が見られ、それは選択的caspase-3阻害剤であるDEVD-CHOを加える事でほぼ完全に抑制された。
- (2) 活性化T細胞培養上清による骨芽細胞への傷害性はEHDPでT細胞を処理する事で有意に抑制された。フローサイトメーター、Hoechst 33258染色にて、骨芽細胞のアポトーシスが抑制されている事

を確認した。

- (3) 骨芽細胞を EHDP で処理しても活性化 T 細胞培養上清によるアポトーシスは変化しなかった。
- (4) 骨芽細胞は Fas を発現し、抗 Fas-IgM 抗体によりアポトーシスがおこされたが、EHDP で骨芽細胞を処理してもそれらは変化しなかった。
- (5) 骨芽細胞は Bcl-2 を発現していたが、EHDP により変化しなかった。Bcl-xL の発現は見られず、EHDP によっても誘導されなかった。
- (6) 活性化 T 細胞培養上清中の sFasL 濃度は EHDP により上昇傾向を示した。sFas 濃度は変化しなかった。TNF- α の濃度は活性化 T 細胞培養上清中で上昇していたが、EHDP により変化しなかった。
- (7) EHDP 処理により T 細胞増殖能は変化しなかった。

考 察

今回我々は EHDP が骨芽細胞アポトーシスに対し抑制的に働く事を示した。その効果は骨芽細胞を直接処理した時にはみられず、活性化 T 細胞を処理した時のみ見られた。EHDP は活性化 T 細胞の増殖能・アポトーシスに影響しなかった事から、この結果は EHDP が活性化 T 細胞から産生される骨芽細胞アポトーシス誘導因子を抑制している事を示している。我々は以前活性化 T 細胞が産生する sFasL が骨芽細胞アポトーシスを起こす事を報告した。しかし今回活性化 T 細胞培養上清中の sFasL はむしろ上昇しており、sFas は変化しなかった。骨芽細胞の Fas 依存性アポトーシスを促進するといわれる TNF- α の濃度も調べたが、EHDP により変化しなかった。以上より sFasL/sFas 及び TNF- α 以外のアポトーシス誘導又は抑制に働く液性因子 (TRAIL, CD40L など) が本結果に関与していると思われた。一方今回骨芽細胞を直接 EHDP で処理しても活性化 T 細胞培養上清によるアポトーシスは抑制されなかった。最近ビスフォスフォネートがマウス骨芽細胞アポトーシスを ERK 活性化を介し直接抑制するとの報告がされている。今回の結果から EHDP がヒト骨芽細胞では ERK 活性化を起こさない、ERK 活性化は活性化 T 細胞培養上清による骨芽細胞アポトーシスに関与しない等の可能性が示唆される。EHDP の抗アポトーシス効果の機序はさらに検討が必要だが、RA での骨減少に対する治療効果を支持するものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、慢性関節リウマチに合併する骨吸収疾患の有効な治療薬であるビスフォスフォネートの作用機序解明を目的とし、特に活性化 T 細胞産物の骨芽細胞動態への影響に注目して検討を行ったもので、研究目的として妥当である。

2. 研究手法に関する評価

骨芽細胞としてはヒト骨芽細胞株である MG63 及びヒト骨組織より単離した初代培養骨芽細胞を用いた。活性化 T 細胞産物としては、健康人末梢血より採取した T 細胞を IL-2 存在下で培養後、PMA と ionomycin で刺激しその培養上清を用いた。ビスフォスフォネートとしてはエチドロネート (EHDP) を用い、種々の濃度で骨芽細胞並びに活性化 T 細胞を処理した。骨芽細胞の傷害程度は ^{51}Cr -release assay により、アポトーシスの誘導はフローサイトメーターによる hypodiploid DNA 細胞の解析及び Hoechst 33258 染色によって検討した。Fas 発現は骨芽細胞に関してはフローサイトメーターにより、また上清中の sFas, sFasL, TNF- α は ELISA 法にて検討しており、研究手段・方法共に妥当である。

3. 結果・考察の評価

活性化 T 細胞上清は、MG63 並びに初代培養骨芽細胞にアポトーシスを誘導するが、EHDP 存在下で得られた活性化 T 細胞培養上清の骨芽細胞アポトーシス誘導能は有意に抑制された。作用因子としては、培養上清中の sFas, sFasL, TNF- α 濃度は EHDP 処理により変化はなく、新たなアポトーシス制御因子の関与が示唆された。尚、EHDP の骨芽細胞直接処理では、抗 Fas-IgM 抗体や T 細胞培養上清によるアポトーシス誘導能に変化は認められなかった。以上の結果は、EHDP による慢性関節リウマチでの骨減少に対する治療効果を支持するものであり、これらの研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は EHDP による活性化 T 細胞による骨芽細胞アポトーシス誘導の抑制を明らかにしたものでビスフォスフォネートの作用機序の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主 査	教 授	小 路 武 彦
	副 査	教 授	進 藤 裕 幸
	副 査	教 授	山 下 俊 一

岩 下 徹 二

(長 崎 県) 昭和43年 6 月29日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Involvement of Collagen-Binding Heat Shock Protein 47 and Procollagen Type I Synthesis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Contribution of Type II Pneumocytes to Fibrosis
(特発性肺線維症におけるコラーゲン結合性熱ショック蛋白47とⅠ型プロコラーゲン生成の関与-肺胞Ⅱ型上皮細胞の線

維化への関与)

Tetsuji Iwashita, Junichi Kadota, Shinji Naito, Hideyuki Kaida, Yuji Ishimatsu, Masanobu Miyazaki, Yoshiyuki Ozono, and Shigeru Kohno

Human Pathology: 31(12): 1498-1505

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

特発性肺線維症は慢性に進行する原因不明の肺の線維化をきたす疾患である。近年肝臓や腎臓において、コラーゲン結合性熱ショック蛋白47(HSP47)の線維化への関与がいわれている。今回、肺におけるHSP47の関与を検討するために、臨床的に特発性肺線維症と診断され、病理学的に usual interstitial pneumonia (UIP) と診断された症例を対象として、免疫組織学的手法を用い検討した。

対象と方法

対象は長崎大学第二内科において、開胸及び胸腔鏡下肺生検によって組織学的に UIP と診断された12症例、疾患対象として bronchiolitis obliterans organizing pneumonia(BOOP) 3例と、13例の肺癌患者より得られた正常部分をコントロールとして用いた。免疫組織化学染色はパラフィン包埋切片を薄切し、脱パラフィンを行った後、一次抗体としてマウス抗 HSP47モノクローナル抗体、ラット抗 I 型プロコラーゲンモノクローナル抗体、ウサギ抗サーファクタントプロテイン A(SP-A) ポリクローナル抗体、マウス抗 α -平滑筋アクチン(α -SMA) 抗体を用いて Vector 社の Elite ABC kit を使用した。

結果

UIP においては HSP47 と I 型プロコラーゲンが上皮細胞と間質の細胞に染色された。SP-A と α -SMA の染色性から、その各々の細胞は II 型肺胞上皮細胞と筋線維芽細胞であることが推察された。BOOP と正常肺組織では HSP47 の発現は弱く、I 型プロコラーゲンも弱く発現をしていた。陽性細胞の割合の比較のため、5視野の合計を計数してみると、II 型肺胞上皮細胞数は UIP で157.5(110-230)、BOOP で160.0(147-171)、正常肺組織で48.5(39-62)であったが、そのうちの HSP47 陽性細胞数は UIP で151.5(107-229)、BOOP で13.0(13-14)、正常肺組織で4.0(2-7)と UIP で有意差をもって増加していた。さらに I 型プロコラーゲン陽性 II 型肺胞上皮細胞数は UIP で42.5(10-51)、BOOP で1.0(0-2)、正常肺組織で3.5(0-8)であり、これも有意差をもって増加していた。HSP47 陽性の筋線維芽細胞数は UIP で150.0(119-197)、

BOOP で114.0(110-116)、正常肺組織で21.5(13-29)であった。そのうち I 型プロコラーゲンが陽性であったものは、UIP で147.5(117-188)、BOOP で96.0(82-111)、19.0(11-27)であった。

結論

UIP においても BOOP においても II 型肺胞上皮細胞の増殖は確認された。が、HSP47 及び I 型プロコラーゲンの発現の割合が、この二疾患において著明な差を認めた。この発現の差が線維化をきたし進行していく UIP と、線維化を残さず治癒する BOOP の臨床像の差異に関与すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、特発性肺線維症に於ける線維化の機構解明を目的として、usual interstitial pneumonia(UIP)の症例を対象に、I 型プロコラーゲン並びにコラーゲン特異的分子シャペロンである熱ショック蛋白 HSP47 の発現状態を組織細胞化学的に検討したもので、研究目的として妥当である。

2. 研究手法に関する評価

UIP 12症例並びに疾患対照として bronchiolitis obliterans organizing pneumonia(BOOP) 3症例及び肺癌組織の正常部位13例のパラフィン切片に於いて、I 型プロコラーゲン並びに HSP47 に対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に発現を検討した。陽性細胞の細胞種同定には、II 型肺胞上皮細胞に特異的なサーファクタントプロテイン A(SP-A) に対する抗体と筋線維芽細胞のマーカーである α -平滑筋アクチン(α -SMA) に対する抗体を用いた。これらの結果は、最終的に細胞計数後統計処理されており、研究手段・方法共に妥当である。

3. 結果・考察の評価

UIP 及び BOOP で、正常部位に比較して II 型肺胞上皮細胞が認められ、特に UIP に於いてはそれら II 型肺胞上皮細胞の I 型プロコラーゲン及び HSP47 陽性率の顕著な増大が認められた。更に、筋線維芽細胞のこれら蛋白の発現に於いても有意な増大が認められた。以上の結果は、特発性肺線維症に於ける線維化への HSP47 発現の関与を強く示唆するものであり、HSP47 発現の人為制御による分子治療の可能性を開くものとして、これらの研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は特発性肺線維症に於ける線維化の分子機構の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	小路 武彦
	副査	教授	江口 勝美
	副査	教授	片峰 茂

秋 山 祐 里

(長崎県) 昭和46年 1 月31日生

授与年月日 平成13年 3 月31日**主 論 文** Involvement of receptor-type tyrosine kinase gene families in cardiac hypertrophy

(心肥大における, 受容体型チロシンキナーゼ遺伝子ファミリーの発現解析)

秋山祐里, 芦澤直人, 瀬戸信二, 大津留晶, 黒田宏昭, 伊東正博, 山下俊一, 矢野捷介

Journal of Hypertension 17 : 1329-1337 1999 .

長崎大学医学部内科学第三教室

(主任 : 矢野捷介教授)

論文内容の要旨**緒 言**

心臓の肥大を誘導するものとしては, Angiotensin II (Ang II), endothelin- 1 , α -adrenergic agonists などの神経・体液性因子が知られている。一方, 細胞増殖因子の fibroblast growth factor (FGF) insulin-like growth factor- 1 (IGF- 1), platelet-derived growth factor (PDGF) なども invitro において心筋細胞の肥大を引き起こす。これら増殖因子の受容体はチロシンキナーゼ型受容体である。受容体型チロシンキナーゼは非受容体型チロシンキナーゼとともに Protein tyrosine kinases (PTKs) であり, すでに100種類余りのチロシンキナーゼ遺伝子がクローニングされている。受容体型チロシンキナーゼおよび非受容体型チロシンキナーゼはいずれも細胞外からの増殖・分化等のシグナルを受けて活性化され, 種々の細胞内シグナル伝達分子へと情報を伝搬する。

今回, 正常心および高血圧性肥大心においてどのような PTKs 遺伝子が存在するか, PTKs 遺伝子が存在するとすれば肥大心に特異性のある発現を認めるかどうかを検討した。さらに, 成因の異なる高血圧性肥大心において PTKs 遺伝子発現の相違を認めるかどうかを検討した。

対象・方法

肥大心として2種類の高血圧ラットモデル, すなわち容量負荷のモデルとして deoxycorticosterone acetate (DOCA) -Salt と腎血管性高血圧のモデルとして2腎-1クリップ (2K-1C) を用いた。まず, 受容体型 PTKs の catalytic domain に高次保存されている領域からデザインした変性 primer を用いて RT-PCR を行った。次いで, PCR 産物をサブクローニングし, それらを各サンプルごとに27クローンずつシークエンスして, PTKs 発現のプロフィールを決定した。さらに, PTKs の mRNA および蛋白レベルの発現を正常心およ

び肥大心において比較するために semi-competitive RT-PCR, 免疫組織染色, Western Blot 解析を施行した。

結 果

- (1) 2種類の高血圧モデルは共に正常血圧ラットに比して有意な血圧の上昇および心重量 / 体重比の増加を認めたが, 2K-1C ラットと DOCA-Salt ラットとの間には有意な差を認めなかった。
- (2) サブクローニング; ラット心より得られた RT-PCR 産物のなかには, 10個の受容体型, 5個の非受容体型の PTKs, および2個の未知のクローンが認められた。受容体型 PTKs のなかでは Tie- 2 / Tek, Ryk/c-Met, IGF-1受容体がとくに多く発現していた。
- (3) semi-competitive RT-PCR; サブクローニングで発現を認めた受容体型 PTKs のうち, 発現が比較的少なかった PDGF- α 受容体, PDGF- β 受容体, FGF-3 受容体なども Tie- 2 / Tek, Ryk / c-Met, IGF- 1 受容体などと同様に正常心, 肥大心ともに発現していた。しかし, その発現の程度は, 正常心と肥大心とで有意な差異を認めなかった。
- (4) 免疫組織染色; 正常心および肥大心において発現の多かった Flt- 1, KDR/Flk- 1, Ryk / c-Met, およびそれらのリガンドである vascular endothelial growth factor (VEGF), Hepatocyte growth factor (HGF) などの蛋白レベルにおける発現を比較するために免疫組織染色を行った結果, Tie- 2 / Tek, Ryk / c-Met などは正常心よりも肥大心において強く発現していた。
- (5) Western Blot 解析; 肥大心の免疫組織染色において強く発現していた受容体のうち Ryk / c-Met とおよびそのリガンドである HGF は DOCA-Salt 肥大心よりも2K-1C 肥大心において, より強く発現していた。

考 察

KDR/Flk- 1, Tie 2 / Tek, PDGF 受容体, EGF 受容体などの受容体型 PTKs は, 主として血管内皮細胞で発現しており血管発生, 血管新生, 動静脈分化といった正常な血管系形成過程, および腫瘍血管新生や糖尿病性網膜症などの病的血管新生に深く関わっていることが明らかになっている。また, 心臓では虚血における血管新生因子や肥大促進因子として注目されてきた。今回の研究では, 肥大心において, 血管内皮細胞のみならず心筋細胞自体にも様々な PTKs が発現していることを初めて確認できた。

今回の検討では, HGF と Ryk / c-Met が肥大心で発現が増強していたが, これは肥大促進因子として働くのか, または抑制因子として作用しているかの明確な結論は出ていない。また, 2K-1C におけるこれらの発現が DOCA-Salt より増強していることについて

は、近年見出されている Ang II などの G 蛋白共役受容体とチロシンキナーゼ受容体とのクロストークや局所のレニン-アンジオテンシン系の活性との関与も示唆される。また、PDGF 受容体や VEGF の受容体あるいは Tie-2 / Tek が心筋細胞で発現していることは、受容体型のチロシンキナーゼが微小血管新生のみならず、心肥大やリモデリングに強く関与していることが示唆された。本研究は心肥大分子機構に関与する重要な遺伝子発現をスクリーニングする PCR-based cloning technique を応用しており、心肥大領域への新知見につながることを示唆された。今後、これらの PTKs が心臓の肥大やリモデリングにおいてどのような役割を果たしているか、また受容体のリン酸化レベルなどの反応も見えていく必要がある。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

高血圧性心肥大の発生機構解明の一環として、心肥大を惹起する種々の細胞増殖因子の受容体型チロシンキナーゼ遺伝子ファミリー (PTKs) の発現解析を行う、とする研究目的は明解であり、妥当と評価される。

2. 研究手段に関する評価

高血圧モデルとして、DOCA-salt ラットと腎血管性高血圧 (2腎-1クリップ) ラットを作成し、受容体型 PTKs 発現プロフィールに至る手技、正常心と肥大大心での PTKs 発現の差異の検討のために、semi-quantitative RT-PCR, 免疫染色, Western Blot 解析を行った手段・方法は妥当であり、高く評価できる。

3. 結果・考察の評価

種々の受容体型 PTKs の発現を認め、そのなかで、これまで血管壁での発現が知られている PTKs を初めて心筋組織で確認し、とくに肥大大心で HGF, Ryk / c-Met の発現の増強を認めている。また、腎血管性高血圧での発現が DOCA-salt ラットより強いとする結果は心肥大機構の解明の示唆に富むものである。

以上のように、本論文は高血圧性心肥大の発生機序解明に寄与するところ大であり、循環器学の発展に大きく貢献するものと判断、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 江石 清行
副査 教授 相川 忠臣

竹下 浩明

(長崎県) 昭和42年6月12日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Expression of the *DMBT1* Gene Is Frequently Suppressed in Human Lung Cancer (*DMBT1* 遺伝子の発現はヒト肺癌で高頻度に抑制されている)

Hiroaki Takeshita, Masami Sato, Hiromi O. Shiwaku, Shuho Semba, Akira Sakurada, Masatoshi Hoshi, Yutaka Hayashi, Yutaka Tagawa, Hiroyoshi Ayabe, Akira Horii

Japanese Journal of Cancer Research 1999 Sep; 90 (9); 903-8

長崎大学医学部外科学第一教室

(主任教授: 綾部公認)

論文内容の要旨

緒言

染色体欠失は癌抑制遺伝子の不活化の指標である。肺癌では、1p, 2q, 3p, 5q, 9p, 10q, 13q, 16q, 17p の染色体欠失が今日までに報告されている。しかしながら、ほとんどの部位で癌抑制遺伝子は未だ同定されていない。10q23.3には癌抑制遺伝子 *PTEN* が位置するが、この遺伝子は、子宮体癌などで変異が高率に認められるものの、日本人の肺癌では、変異の程度は低く、10qには別の癌抑制遺伝子が存在することが予想されている。最近、*DMBT1* が10q25.3-q26.1からクローニングされた。*DMBT1* は8つの SRCR domain が直列につながっており、それらは、非常に homology が高い。SRCR 蛋白ファミリーの中には、細胞の増殖や分化に関わっているものもある。また、*DMBT1* にみられる ZP domain は TGF- β receptor type III にもみられ、TGF- β の signaling receptor への結合を調節している。これらのことから、*DMBT1* が癌抑制遺伝子として働いている可能性があると考えられた。*DMBT1* は肺での発現が高く、この遺伝子の変異が肺での発癌に関わっている可能性について検討した。

方法

- (1) まず、*DMBT1* の locus の LOH (loss of heterozygosity) の頻度を66個の原発性肺癌切除標本で調べた。
- (2) BAC (bacterial artificial chromosome) を用いて、*DMBT1* の遺伝子構造を調べた。
- (3) 5'-RACE (rapid amplification of cDNA end) 法を行い、*DMBT1* の 5' end sequence を調べた。
- (4) RT-PCR 法により、22種の肺癌細胞株での *DMBT1* の発現を解析した。
- (5) homozygous deletion を23種の肺癌細胞株で、exon 1, 29, 35, 39, intron12を PCR で増幅することにより調べた。

- (6) *DMBT 1* 遺伝子の genetic alteration について23種の肺癌細胞株で coding exon 全部と遺伝子の周辺の部位について調べた。

結果および考察

- (1) 53%と高頻度に LOH がみられた。このため、*DMBT 1* が癌抑制遺伝子として機能している可能性は高いと考えられた。
- (2) exon-intron 境界を明らかにしたところ、この遺伝子は40の exon からなることが判明した。また、SRCR domain は exon のみならず、intron 内までも塩基配列が似通っていた。(DDBJ, GenBank, EMBL: accession numbers AB020812 through AB020851)
- (3) 公表されている cDNA 配列より、464-bp 上流の配列を得ることができた。この配列は genomic sequence と同じ配列であった。
- (4) 22種の細胞株のうち、20種 (91%) で、発現の減少がみられ、これらのうち、3種の細胞株では、発現の消失が観察された。
- (5) 2種の細胞株、LK-2 と RERF-LC-MS においては、intron12を増幅する g14f2 と g14r3 primer pair では PCR product は得られなかった。これらの結果は、homozygous deletion を強く示唆するが、insertion/deletion polymorphism である可能性は完全には否定できなかった。intron12周辺の genomic sequence は非常に高い homology があるため、homozygous deletion の正確な部位を同定することはできなかった。LK-2 は homozygous deletion をもつ細胞株の一つであるが、*DMBT 1* の発現もまた消失していた。
- (6) 2つの変異を発見した。A549では、codon52において、アミノ酸残基が Ser から Trp へ変化する TCG から TGG への heterozygous missense mutation が観察された。この変異は Wu et al. により、肺癌細胞株 Calu-1 でも報告された。HS-24では、allele のうち一つで exon 5 と exon 6 を巻き込んだ rearrangement を持っていることが明らかになった。exon 5 と exon 6 は非常に homology が高いがいくつかのアミノ酸の変化は *DMBT 1* 蛋白の機能に影響をもたらしかもしれない。PCR で確認した、この rearrangement は、50人の健康人からの DNA sample では見られなかった。

結 論

大多数の肺癌細胞株で *DMBT 1* の発現の減少または発現の消失がみられ、23種の細胞株中2種 (9%) で homozygous deletion がみられた。genetic alteration は2種の細胞株で観察された。これらの結果より、*DMBT 1* 遺伝子の不活化は肺での発癌に重要な役割を持つことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、肺癌の発症に関わる新しい癌抑制遺伝子を同定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

多くの肺癌組織における *DMBT 1*-LOH の頻度、さらに同遺伝子のゲノム構造を明らかにした上で、その肺癌細胞株での発現と遺伝子変異を調べたもので、研究手段も妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、*DMBT 1* 変異が肺癌の発生または進展に関与する可能性を明らかにし、今後の肺癌研究への進展が大いに期待される。

以上のように本論文はヒト肺癌における発生基盤の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主 査	教 授	新 川 詔 夫
	副 査	教 授	松 山 俊 文
	副 査	教 授	兼 松 隆 之

古 賀 英 子

(佐賀県) 昭和43年12月13日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Presynaptic dopamine D₂-like receptors inhibit excitatory transmission onto rat ventral tegmental dopaminergic neurones

(シナプス前性のドーパミン D₂型受容体はラット腹側被蓋野のドーパミン細胞への興奮性神経伝達を抑制する)

Eiko Koga and Toshihiko Momiyama Journal of Physiology 523 .1, 163-173, 2000
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

中脳辺縁系ドーパミン系は、腹側被蓋野 (VTA) から側坐核、前頭前皮質に投射する系で、情動、報酬、食欲等に関与し、また、精神分裂病や薬物濫用との関連が指摘されている。ドーパミン (DA) 受容体については、5種類以上の遺伝子が同定されているが、薬理的には D₁型受容体、D₂型受容体の2グループに分けられるのみである。これまでの電気生理学的研究で、VTA あるいは黒質緻密部の DA 細胞の D₂型受容体活性化により内向き整流性のカリウムコンダクタンスが増加して膜が過分極する、即ち抑制されることが明らかにされている。加えて、VTA や黒質緻密部の DA 細胞から GABA_A、GABA_B、及びグルタミン酸によるシナプス電位や電流が記録され、GABA_B 性抑制性シ

ナプス伝達に対しては、DAの増強作用が報告されている。これに対し、VTAのDA細胞のグルタミン酸性入力とは同部位のDA細胞の発火パターンを調整しているため、その重要性が指摘されているが、この興奮性シナプス伝達におけるDAの作用についてはほとんど情報がない。したがって、本研究では、DA細胞へのnon-NMDAグルタミン酸シナプス伝達に対するDAの効果を明らかにするために、ラット脳から作成した薄スライス標本にホールセル記録法を適応して実験を行った。

材料及び方法

1. 7-17日齢の幼若ラットからエーテル麻酔下で脳を取り出し、95%O₂ - 5%CO₂混合ガスをバブリングしながらクレブス溶液の中でマイクロスライサーでVTAを含む厚さ200μmの水平断スライス標本を作成して実験に用いた。
2. 顕微鏡下にVTAのDA細胞を同定し、ガラス管で作成した記録電極にてホールセルを達成した後、DA細胞の周囲を刺激電極で電気刺激して、シナプス電流を誘発した。
3. 記録中は混合ガスをバブリングしたクレブス溶液を灌流し、この外液中にピククリン、ストリキニン、AP-5を投与しそれぞれGABA_A性、グリシン性、NMDA性成分をブロックし、薬理的に、non-NMDA性興奮性シナプス電流(EPSCs)を単離した。また、さらに外液中にTTXを投与して興奮性微小シナプス後電流(mEPSCs)を記録した。
4. EPSCsを単離した後、外液中にDA、D₁型受容体、D₂型受容体のアゴニスト、アンタゴニストを投与し、EPSCsに対する作用を検討した。
5. 同様にしてmEPSCsに対するDAの影響を検討した。

結果

1. DA(30μM)はEPSCsの振幅を $65.1 \pm 9.52\%$ に抑制し、このEPSCs抑制作用は濃度依存性であった。
2. D₁型受容体アゴニストはEPSCs抑制作用を示さず、D₁型受容体アンタゴニスト存在下でもDAのEPSCs抑制作用はDA単独の場合と同様に認められた。
3. D₂型受容体アゴニストはDA同様のEPSCs抑制作用を示し、D₂型受容体アンタゴニスト存在下でDAによるEPSCs抑制の用量反応曲線は、右方移動した。
4. DAは自発性mEPSCsの頻度を減少したが、mEPSCsの振幅には影響せず、このDAの効果は外液のCa濃度に依存した。

考察

本研究で、VTAのDA細胞に入力するnon-NMDA

性興奮性シナプス電流(EPSCs)はDAにより、抑制されることが、また、そのメカニズムとして、シナプス前性のD₂型受容体を介してCaチャンネルに作用し、Caの流入をブロックしてグルタミン酸の放出を抑制することが明らかになった。

VTAやSNcへのグルタミン酸の投射はDA細胞のペースメーカー様発火からバースト発火へスイッチさせるのに重要な役割を果たしている。現在のところラットのDA細胞のどこで、グルタミン酸性終末がシナプスを作っているかに関する形態学的データはない。しかし、アカゲザルを用いた電顕の仕事では、グルタミン酸性の終末はDA細胞の樹状突起とシナプスを作っていた。加えて、DAを放出する部位はDA細胞の樹状突起である。したがって、生理的状态下では、VTAのDA細胞の樹状突起から放出されるDAは、グルタミン酸性線維の終末のD₂型受容体に作用し、VTAのDA細胞の発火パターンを、つまり、グルタミン酸によってバーストパターンになった発火をペースメーカー様パターンに変換している可能性が示唆される。VTAのDA細胞は精神病理学的に重要な役割を果たしていると考えられている。グルタミン酸性神経伝達の変化がドーパミン系と精神分裂病の臨床症状に関連している仮説が立てられている。VTAニューロンのAMPA受容体の反応の変化が精神刺激薬への慣れをもたらすと言われている。ここで述べたDAの作用はそのような変化に関連している可能性があり、これらの脳機能、あるいは病的状態に対しての薬物療法のメカニズムの基盤を明らかにするカギになることも期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、情動、報酬、食欲などに関与する中脳辺縁系ドーパミン系の働きを追求するものであり、目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

ラット脳から作成した薄スライス標本にホールセル記録法を適応して電気生理学および神経薬理学的に調べたもので、研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、ドーパミン細胞の樹状突起から放出されるドーパミンがグルタミン酸性線維の終末のD₂型受容体に作用し、ラット腹側被蓋野のドーパミン細胞の発火パターンをペースメーカー様パターンに変換する事が示され、今後の中脳辺縁系ドーパミン系の研究の発展に繋がる事が大いに期待される。

以上のように本論文は中脳辺縁系ドーパミン系の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 森 内 浩 幸
副 査 教 授 中 根 允 文
副 査 教 授 松 田 好 弘

今 里 祐 之

(福岡県) 昭和45年 6 月 4 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 PSP94 EXPRESSION AFTER ANDRO-
GEN DEPRIVATION THERAPY:A COM-
PARATIVE STUDY WITH PROSTATE
SPECIFIC ANTIGEN IN BENIGN PROS-
TATE AND PROSTATE CANCER

(アンドロゲン除去療法後の PSP94の発
現について : 正常前立腺及び前立腺癌に
おける PSA との比較)

YUSHI IMASATO, JIM W.XUAN, HIDEKI
SAKAI, JONATHAN I.IZAWA, YUTAKA
SAITO, JOSEPH L.CHIN, MADELEINE
MOUSSA

THE JOURNAL OF UROLOGY 2000 ;
164 : 1819-1824

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

Prostate secretory protein of 94 amino acids (以下 PSP94) は1980年津田らにより精漿中より初めて分離された蛋白であり , beta-microseminoprotein(β -MSP) , beta-inhibin と呼ばれている。また PSP94は PSA,PAP とともに前立腺から分泌される主要蛋白の一つである。PSP94はマウスからヒトに至るまで多くの哺乳類でその合成 , 分泌が確認されているが , この蛋白の生体内での役割は未だ不明である。また PSA や PAP と異なる点として , PSP94はアンドロゲン依存性臓器である前立腺由来の蛋白であるにもかかわらず , ラットや培養細胞を用いた実験でその合成がアンドロゲン非依存性であったと報告されている。

今回 , 我々はホルモン療法を受けた正常前立腺組織 , 前立腺癌組織における PSP94発現を免疫組織化学法により評価し , 無治療群との比較を行った。また代表的なアンドロゲン依存性前立腺腫瘍マーカー PSA の発現を PSP94の染色と連続した切片において検討する事により , アンドロゲン除去療法が PSP94発現に及ぼす変化について検討した。

対象と方法

臨床的限局癌に対し根治的前立腺全摘術を施行された163例を対象とし , retrospective に術前無治療群88例 , ホルモン療法群75例に分けて比較検討した。前立腺癌

に対し放射線療法等のその他の前治療を受けている症例はすべて除外した。術前ホルモン療法は , 平均 4.2 ± 2.4 ヶ月で , Total Androgen Blockade を受けた例が43例で , 内訳は leuprolide+flutamide42例 , goserelin+flutamide 1 例であった。monotherapyとして使われた薬剤は cyproterone acetate18例 , flutamide 8 例 , leuprolide 6 例であった。

また正常前立腺組織の検討は , 各切片において癌組織から十分離れた部位に , 正常前立腺組織を認める無治療群61例及びホルモン療法群38例において行った。摘出標本の免疫染色は PSP94 , PSA とともにポリクローナル抗体を用いて連続切片で行い同一病巣を観察した。前立腺癌の組織学的悪性度は病巣ごとに Gleason grade にて評価し , 個々の病巣について染色の強さ(intensity) と広がり(extent) を検討した。統計学的解析にはカイ 2 乗検定を用いた。

結 果

正常前立腺組織における PSP94と PSA の発現は , 無治療群ではともに高い intensity と extent を示しており 2 つの蛋白の発現に有意差を認めなかった。一方ホルモン療法後の前立腺組織においては , PSP94の発現が高い intensity と extent を示したのに対し , PSA は intensity, extent とともに有意に発現が低下していた ($p = 0.005$, $p = 0.034$)。

無治療前立腺癌88例の全摘標本に認められた136の癌病巣において , 全病巣における PSP94の陽性率は 63.2% , PSA は97.8%であった。また PSP94の発現は Gleason grade と有意な負の関連($p < 0.0001$) を示し , 組織学的悪性度の高い grade 5 では PSP94の発現が全くみられなかったのに対し , grade 2 の病巣では100%発現していた。一方 PSA は grade が上がるに従い発現が低下する傾向は認めたが , 有意な関連は見られなかった。

術前ホルモン療法を受けた前立腺全摘症例75例から得られた131の癌病巣において , 全病巣における PSP94の陽性率は49.6% , PSA は78.6%で , とともに無治療群に比べ低い陽性率であった。Gleason grade と PSP94 intensity と extent , 及び Gleason grade と PSA extent との間に弱い負の関連を認めた。

無治療群とホルモン療法群それぞれの陽性率を Gleason grade 別に分けて比較した結果 , PSA はすべての grade でホルモン療法後の組織が低い陽性率を示していた。一方 PSP94は grade 3 では PSA 同様ホルモン療法群の方が低い陽性率を示していたが , grade 4 , 5 の high grade tumor では逆に高い発現が見られた。つまり無治療群の grade 4 では陽性率18.5% (5 / 32) , ホルモン療法群の grade 4 では陽性率40.3% (27 / 67) , grade 5 の病巣では同様に 0% (0 / 8) , 25% (2 /

8)とPSP94の発現はホルモン療法後の癌組織に高いという結果であった。

考 察

無治療正常前立腺においてPSP94, PSAは強い発現を示していた。ホルモン療法群では, PSAに比べPSP94は有意に強い発現を示しており, この両者の比較が連続切片を用いて行われた事を考えれば, PSP94はPSAに比べ正常前立腺においてはアンドロゲン依存性が低い事が示唆された。

無治療癌組織においてPSP94の発現は組織学的悪性度の指標であるGleason gradeと強い負の関連を示しており, PSP94は前立腺癌の悪性度を反映する組織学的腫瘍マーカーとなりうる事が示唆された。

ホルモン療法後の前立腺癌では, PSAとは対照的にPSP94はhigh grade tumorにおいて高い陽性率を示した。今後これらの症例の癌再発や予後との関連を調べ, 前立腺癌のアンドロゲン依存性の喪失, 生物学的悪性度との関連を究明する事が課題である。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は, ヒト前立腺及び前立腺癌組織におけるPSP94発現とアンドロゲン除去療法が及ぼす影響を検討したもので, 目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

正常前立腺組織及び前立腺癌組織におけるPSP94の発現を代表的アンドロゲン依存性蛋白PSAの発現と連続切片を用いて比較しており, 研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果, 正常前立腺組織においてPSP94のアンドロゲン依存性は低い事を明らかにした。さらにhigh-grade tumorにおいてPSP94がアンドロゲン除去療法後にPSP94の発現が増加している例がある事を示し, 今後, 前立腺癌のアンドロゲン非依存性獲得に関する研究への進展が大いに期待される。

以上のように本論文はPSP94発現のアンドロゲン依存性を検討する事により, 前立腺癌のアンドロゲン非依存性獲得に関する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	金 武	洋
	副 査	教 授	小 路	武 彦
	副 査	教 授	中 園	一 郎

石 丸 英 樹

(長崎県)昭和45年11月16日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Differentiation between High-grade Glioma and Metastatic Brain Tumor Using Single-voxel Proton MR Spectroscopy

(シングルボクセルプロトン MR スペクトロスコピーを用いた悪性神経膠腫と転移性脳腫瘍の鑑別)

石丸英樹, 森川 実, 岩永壮二, 上之郷 眞木雄, 越智 誠, 林 邦昭

European Radiology

長崎大学医学部放射線医学教室

(主任: 林 邦昭教授)

論文内容の要旨

背景と目的

単発脳実質内腫瘍を認めた場合, 悪性神経膠腫か転移性脳腫瘍である頻度が高い。悪性神経膠腫であれば切除が優先されるのに対し, 転移性脳腫瘍の場合は放射線治療が選択されることもある。治療方針決定のためにも画像診断の役割は重要であるが, これらの腫瘍間では画像所見に共通点が多くしばしば鑑別は困難である。プロトン MR スペクトロスコピー(以下MRS)は非侵襲的に病変の代謝物の変化を観察することが可能であり, 本研究ではMRSで悪性神経膠腫と転移性脳腫瘍の鑑別が可能であるか否かを検討した。

対象と方法

悪性神経膠腫(退形成性神経膠腫11例と膠芽腫20例)31例と転移性脳腫瘍25例を対象とした。静磁場強度1.5テスラの臨床用MRI検査装置を用い, 各症例二種類のパラメーターのdata(TR/TE=2000msec/136, 30msec)を同時に収集した。正常脳でも観察されるN-acetyl-aspartate(NAA), creatine(Cr), choline-containing compound(Cho)についてはピーク強度比を計算し, 壊死を示唆するlipidについては非特異的嫌気性代謝を示唆するlactateと共鳴周波数にオーバーラップがあり量的評価が困難であるため, その有無について評価した。

結 果

すべての腫瘍はTE=136msecで細胞膜代謝亢進を反映するChoの強いpeakを示した。転移性脳腫瘍では25例中21例でCrやNAAが認められなかったのに対し, 神経膠腫では一例の膠芽腫を除いて全例でCrが認められた。神経膠腫では31例中15例で正常よりは明らかに低いNAAが認められた。Crの認められた転移性脳腫瘍はNAA/Cr比が神経膠腫のそれよりも明らかに高値であった。転移性脳腫瘍にはCrがみられないと仮定すると80%以上の転移性脳腫瘍は神経膠腫

と区別することが可能であった。

TE = 30msec では、転移性脳腫瘍と膠芽腫の全例で (TE = 136msec で lipid を示さなかった 5 例の転移性脳腫瘍と 9 例の膠芽腫を含めて) lipid もしくは lipid/lactate の混合ピークがみられたが、退形成性神経膠腫では明確な lipid は認めなかった。多くの腫瘍が lipid, lipid/lactate の混合ピークによって基線の上昇があり、TE = 136msec では明らかに Cr が認められた 4 例の膠芽腫で Cr を検出できず、4 例の転移性脳腫瘍では Cho も検出できなかった。

考 察

NAA は神経細胞固有の代謝物であり、中枢神経以外の腫瘍には存在しない。転移性脳腫瘍は膨張性の発育を示すため病変内に脳組織が含まれていることはない。諸家の in vivo あるいは in vitro MRS の報告でも転移性脳腫瘍には NAA (神経細胞特有の代謝物) はみられないとされている。従って本研究での NAA, Cr を含んでいた 4 例の転移性脳腫瘍についてはおそらく腫瘍径が小さかったため設定したボクセルが周辺の正常脳組織を含み、信号が混入していたものと考えられる。

一方、神経膠腫は脳組織内に浸潤性に発育し、病変内には脳組織が混在しうる。この混在する脳組織が神経膠腫において NAA を示した原因と考えられる。NAA の有無で神経膠腫と転移性脳腫瘍が鑑別できるようなものもあるが、本研究の半数以上の神経膠腫で NAA を認めず、これは有用でなかった。

周辺脳の信号混入があったと考えられる 4 例の転移性脳腫瘍を除くと、Cr を含んだ転移性脳腫瘍はなかったのに対し、神経膠腫では 1 例の嚢胞状膠芽腫を除く全例で Cr が認められ、Cr の有無が神経膠腫と転移性脳腫瘍の鑑別には有用であった。Cr は phosphocreatine とともに ATP 産生系を構成し、生体内では主として筋肉、神経細胞、血中に分布している。腫瘍の起源がグリア細胞であるため、神経膠腫が Cr を保つ傾向があるのか、転移性脳腫瘍では非常に速い細胞増殖に伴うエネルギーの枯渇のため Cr が認められないのであろうと推測される。

短い TE でのデータ収集では転移性脳腫瘍、膠芽腫の全例で壊死を示唆する高い lipid が認められたが、スペクトラムのダイナミックレンジが lipid に支配され、Cho, Cr, NAA の分離が不良であった。神経膠腫と転移性脳腫瘍の鑑別には長い TE を用いるのが望ましいと考えられるが、lipid は転移性脳腫瘍にはほぼ必発で、これが認められなければ退形成神経膠腫などのより grade の低い神経膠腫が示唆されるのかもしれない。これについてはさらなる症例の積み重ねによる検討が必要である。

今後我々の施設にもマルチボクセル MRS が導入さ

れれば、同時に多数のボクセルのデータを得ることが可能で、腫瘍の質的診断と同時に腫瘍の進展範囲を明らかにすることができるであろうと期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

悪性神経膠腫と転移性脳腫瘍は、画像所見のみではしばしば鑑別が困難である。本研究ではプロトン MR スペクトロスコピー (MRS) で鑑別が可能であるか否かを検討したもので、妥当である。

2. 研究手段に関する評価

悪性神経膠腫31例と転移性脳腫瘍25例で、1.5テスラの MRI 検査装置を用い、二種類のパラメーター (TE = 136, 30msec) のデータ (NAA, Cr, Cho, lipid, lactate) を収集して評価しており、妥当である。

3. 解析・考察の評価

詳細な解析から、Cr を含んだ転移性脳腫瘍はなかったのに対し、悪性神経膠腫では、全例で Cr が認められ、Cr の有無が鑑別に有用であることを明らかにし、十分評価できる。

以上のように本論文は悪性脳腫瘍の診断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	柴 田 尚 武
	副 査	教 授	中 根 允 文
	副 査	教 授	小 林 俊 光

林 秀 行

(長崎県) 昭和46年 4 月 1 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Penetrating Atherosclerotic Ulcer of the Aorta : Imaging Features and Disease concept (Penetrating Atherosclerotic Ulcer of the Aorta : 画像所見と疾患概念について) 林 秀行, 松岡陽治郎, 坂本一郎, 末吉英純, 沖本智昭, 林 邦昭, 松永尚文
RadioGraphics 2000 ; 20 : 995-1005
長崎大学医学部放射線医学教室
(主任 : 林 邦昭教授)

論文内容の要旨

背景と目的

penetrating atherosclerotic ulcer of the aorta (以下 PAU) とは1986年に Stanson らにより提唱された概念であり、大動脈の粥状硬化性の変化により内膜に生じた潰瘍が、内弾性板を穿破し中膜内に血腫を生じた状態である。以後その画像所見や予後についての検討がなされているが一定の見解は得られていない。本研究の目的は PAU の予後について画像を中心に検討し、可能な症例は病理学的な検討も加えるというものであ

る。また、本疾患は大動脈に生じるが大動脈解離との異同等疾患概念自体に混乱があるので、これまでの論文を整理し、疾患概念を確立することをも目的としている。

研究手段・方法

これまでに大動脈解離や大動脈瘤と診断されていた症例の画像を再検討し、PAUと考えられる症例は32症例あった。そのうち、発症時期を特定でき、その後十分に画像診断にてフォローアップされその転帰が確認されている12症例を対象に、発症時の病変部位・形態・動脈径及び病変の進行速度などと予後の関連について検討した。病理学的な裏付けがあるものに対してはそれについても考察を加えた。

結果

12例のうち破裂死亡例が2例あった。この2例はいずれも胸部下行大動脈に表面不整な潰瘍を形成しており、発症から1カ月以内に死亡している。この2例の他に4症例が病変の拡大や痛みの持続により手術が施行されているが、これらも全例発症から1カ月以内である。潰瘍辺縁については表面整なもの不整なものいずれも存在した。予後の良かった6症例については発症後1カ月は増大するものも見られたがその後は動脈径、潰瘍の深さに変化を認めなかった。潰瘍表面の形状及び大動脈径については予後不良群と予後良好群に有意な差はなかった。死亡した1症例について病理学的に大動脈全体に強い動脈硬化性変化を認め、表面にできた粥状硬化性潰瘍が穿破し、中膜内に血腫を生じたとして矛盾しない所見が得られた。

考察

PAUは大動脈解離よりも予後が悪く、特に発症後1カ月以内に破裂を来したり、病変の進展があり手術を必要とする可能性が高いことが分かった。逆にこの時期に明らかな病変の進展を来さなかった場合には比較的予後良好に経過する。PAUからの中膜内の血腫は1カ月を過ぎると器質化することが理由の一つと考えられる。本疾患では基礎疾患として動脈硬化性変化があるために高齢者で心疾患や腎機能不全を抱えていることも多いが、時期を逃さず手術をする必要がある。また現在大動脈に対するステントグラフトが臨床応用されてきており、手術リスクの高い患者に対しては有効な治療法となりうると考えられる。

PAUの予後については、疾患概念を提唱したStansonらは予後不良と述べているのに対し、逆に比較的予後良好とする論文も見られる。この相違は対象症例の違いによるところが大きい。我々の検討した症例はいずれも発症時点が分かっているもの、言い換えると有症状例であり、このような場合にはStansonらの報告と同様予後の悪い疾患群といえることができる。一方

で、参考症例として呈示している症例は胸部下行大動脈に生じた嚢状動脈瘤であるが、手術により動脈硬化性変化により内膜に欠損が生じ中膜内に血腫が生じたものである。このように無症状の嚢状動脈瘤の中にPAUから発症したと考えられる症例が含まれており、PAUは比較的予後良好とする論文にはこのような症例を対象に含んでいるものが多かった。

本疾患と大動脈解離、大動脈瘤との関係について：動脈硬化性変化はむしろ大動脈解離を妨げるとする見解もあり、動脈硬化が大動脈解離の原因となりうるかという点に立ち戻る必要のある難しい問題である。粥状硬化性潰瘍は、しばしば合併する高血圧も影響し、内弾性板を穿破すると中膜内に血腫を作る。中膜内に形成された血腫は動脈硬化性変化により長軸方向への解離の進展を妨げられ、進展する場合には外側に進展する傾向にある。このため、限局性解離を生じたり、嚢状動脈瘤となり急激に進行した場合には外膜を穿破することもありうる。但し、その上下の内膜の動脈硬化の程度にも左右され、場合によっては2腔解離型の動脈解離を生ずる可能性もある。Stansonらの提唱以来、本疾患は大動脈に生じる大動脈解離、大動脈瘤と並ぶ第3の疾患として扱われる傾向にあるが、PAUは大動脈解離や大動脈瘤の原因ともなり得る病態であり、これら3者を明確に区別することは困難であることも少なくない。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的対象の評価

Penetrating Atherosclerotic Ulcer of the Aorta (PAU) 症例の放射線画像的検討から、その予後、リスクファクターを導き、その本体に迫ろうというもので、研究目的は明快である。

2. 研究方法、検討項目の評価

PAU32症例をretrospectiveに、CT、MR、大動脈造影から検討した。また予後が追跡できた12症例について、画像的追跡も行い、予後、リスクファクターについて検討を追加した。また病理学的検討から、その本質に言及するものであり、検討方法についても問題はない。

3. 研究結果、考察の評価

PAU症例全体では、1/3の症例が1カ月以内に増悪を示し、大動脈解離に比較し予後不良の症例の多いことが判明した。粥状硬化性潰瘍は内弾性板を穿破し中膜に血腫を形成したあと、動脈硬化性変化のために解離の進展が妨げられ、外側に進展したものが本質と考えられた。PAUの治療方針の決定に極めて有用であり臨床的意義の高い論文となっている。

以上のようにPAUの放射線画像的検討から、その予後、リスクファクターを導き、その本体に言及した

論文であり、大動脈瘤の治療における功績は大である。よって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 石 清 行
副 査 教 授 矢 野 捷 介
副 査 教 授 下 川 功

山 内 明

（長崎県）昭和45年10月28日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Location of the epitope for 7D5, a monoclonal antibody raised against human flavocytochrome b₅₅₈, to the extracellular peptide portion of primate gp91^{phox}
（抗ヒトフラボシトクロム₅₅₈単クローン抗体 7D5 の抗原決定基は霊長類 gp91^{phox} 細胞外ペプチド部位に存在する）
山内 明, Lixin Yu, Andy J. G. Poetgens, 栗林 太, 布井博幸, 金ヶ寄史朗, Dirk Roos, Harry L. Malech, Mary C. Dinauer, 中村三千男
（Microbiology and Immunology）
（平成12年12月25日受理）
長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門炎症細胞機構分野
（主任：中村三千男教授）

論文内容の要旨

緒 言

フラボシトクロム b₅₅₈は、初期感染防御に重要な活性酸素を産生する食細胞 NADPH オキシダーゼの膜局在構成成分である。本シトクロムは大鎖（gp91^{phox}）と小鎖（p22^{phox}）からなり、前者が FAD とヘムを持ち、細胞内の NADPH から細胞外（食胞内）の酸素分子へ電子を直接渡す構成要素と考えられている。gp91^{phox} は、Xp21.1 にコードされており、その異常は、活性酸素を産生できないために重症感染を繰り返す慢性肉芽腫症症例のほぼ 8 割を占める。従って、その膜における存在様式と検出とは、基礎的および臨床的に極めて意義深い。Nakamura らは、シトクロム b₅₅₈ に細胞外から結合する唯一の単クローン抗体 7D5 を作製してそのエピトープを p22^{phox} 上に推定したが、今回改めて詳細に解析し、それが霊長類白血球の gp91^{phox} 上にあることを確定した。

材料と方法

抗体：ヒト顆粒球のシトクロム b₅₅₈ を多く含む膜およびその可溶化分画を抗原にして作った抗ヒトシトクロム b₅₅₈ 単クローン抗体である 7D5, 抗ヒト gp91^{phox} ペプチド単クローン抗体 mAb48, および抗 p22^{phox} ウサ

ギボリクローナル抗体を用いた。

細胞：末梢白血球は、デキストラン / 低張処理の組み合わせで、末梢血・腹腔滲出液より分離した。白血病細胞株 PLB-985 の系列として、その野性株 (WT PLB), gp91^{phox} 遺伝子ノックアウト株 (X-CGD PLB), それに改めてヒトまたはマウス由来 gp91^{phox} 遺伝子をレトロベクターで導入した株 (PLB n91 / h22, PLB m91 / h22) を用いた。マウス p22^{phox} mRNA 陽性 3T3 繊維芽細胞系列では、蛋白質レベルでは両鎖とも発現していない野性株 (WT-NIH 3T3), およびこれにレトロベクターを用いてヒト gp91^{phox} 遺伝子を宿主の染色体の中または上に組み込んでキメラフラボシトクロム b₅₅₈ (h91 / m22) を発現させた NIH 3T3 h91 を用いた。更に、サル COS 7 細胞系列では、内在性 gp91^{phox} および p22^{phox} を共に発現できない野生株 (COS7 WT), レトロベクターでヒト gp91^{phox} 遺伝子とヒト gp22^{phox} 遺伝子を別々にまたは同時に安定発現させた株 (COS7 gp91, COS7 p22, COS7 gp22) を用いた。

免疫染色及び免疫沈降：フローサイトメトリーは 7D5 による直接または間接蛍光ラベルで行い、ウエスタンブロットは、細胞膜画分を用い、mAb48 およびウサギ抗 p22^{phox} 抗体で、ドットブロットは、3M 尿素処理膜画分を用い、7D5 を 1 次抗体として用いた。免疫沈降は、糖鎖合成阻害剤ツニカマイシン存在・非存在下培養 PLB-985 系列細胞の Triton N101 による可溶化膜画分を、7D5 ピーズと混和後、ピーズを洗浄してウエスタンブロットした。

結 果

- 1) フローサイトメトリーや免疫細胞化学において、7D5 は霊長類由来の顆粒球の表面には結合するが霊長類以外の動物のそれには結合しない。
- 2) ジメチルホルムアミドで分化させ gp91^{phox} の発現を誘導し PMA 刺激でフラボシトクロム b₅₅₈ の細胞表面出現を確実にした PLB-985 細胞系列では、WT PLB と PLB h91 / h22 は 7D5 で染まるが、X-CGD PLB は染まらない。また PLB m91 / h22 は活性のあるキメラシトクロムを表出しているにもかかわらず染まらない。
- 3) 7D5 は、h91 / m22 キメラシトクロムを発現している NIH 3T3 h91 だけでなく、ヒト gp91^{phox} を単独に発現している COS 7 gp91 にも結合する。
- 4) 7D5 はツニカマイシン処理 WT PLB 及び PLB h91 / h22 の膜可溶画分から、糖鎖欠損 gp91^{phox} の質量数に一致する蛋白質を免疫沈降する。

結 論

7D5 のエピトープは、霊長類由来 gp91^{phox} の細胞外に向いたペプチド部分にあり、その構造の維持には通常 p22^{phox} が関わっているが、必須ではない。

考 察

7D5は、gp91^{phox}の細胞外のパプチド立体構造を認識する唯一の抗体であることが明らかとなった。本抗体を用いれば、慢性肉芽腫症の大半を占めるX-CGDを容易かつ確実に診断できるばかりでなく、その遺伝子治療の経過を定量的に追跡できる。更に、現在gp91^{phox}の膜における存在様式は不明な点が多いが、本抗体を用いたファージディスプレイを詳細に行えば、細胞外の立体構造の一部を明らかにでき、食細胞NADPHオキシダーゼの活性化機構および電子伝達機構を分子下レベルで知る手がかりが得られるであろう。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

単クローン抗体7D5は、細胞膜フラボシトクロムb₅₅₈の立体構造を認識する唯一の単クローン抗体である。本研究は、7D5エピトープの存在する分子を決定することにより、慢性肉芽腫症の診断とフラボシトクロムb₅₅₈の膜存在様式の解析に供することを目指したもので、目的は明確である。

2. 研究手法に関する評価

抗体7D5の種特異性を利用し、ヒトとマウス由来のシトクロムgp91^{phox}とp22^{phox}を各々細胞株に発現させること、また遺伝子ノックアウト細胞株をはじめ様々な細胞株を用いることにより、詳細にエピトープ存在部位の解析を行っており、高く評価できる。

3. 解析・考察の評価

詳細な解析から、7D5エピトープが霊長類フラボシトクロムb₅₅₈を構成するgp91^{phox}分子のパプチド骨格上に存在するを明解に示した。考察はこの抗体の臨床的意義及びフラボシトクロムb₅₅₈の分子構造解析における本研究の意義に及び、十分評価できる。

以上のように本論文は、活性酸素生成分子群の構造解析及び慢性肉芽腫症の診断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	永 武 毅
	副 査	教 授	河 野 茂

真 鍋 英 二

(大阪府)昭和36年4月22日生

授与年月日 平成13年2月21日

主 論 文 Relationship of Intra-Abdominal Adiposity and Peripheral Fat Distribution to Lipid Metabolism in an Island Population in Western Japan: Gender Differences and Effect of Menopause

(西日本の島嶼住民における内臓脂肪および末梢脂肪分布と脂質代謝との関連：性差と閉経の影響)

真鍋英二，青柳 潔，立花裕樹，竹本泰一郎

Tohoku Journal of Experimental Medicine
188: 189-202, 1999

長崎大学公衆衛生学教室

(主任：竹本泰一郎教授)

論文内容の要旨

緒 言

体脂肪蓄積は動脈硬化の危険因子である。特に内臓脂肪は脂肪分解能が高く、門脈循環へ高濃度の遊離脂肪酸を放出することから、脂質代謝への影響が大きいと考えられている。超音波断層装置は非侵襲的かつ容易に内臓脂肪蓄積量を評価出来るので、地域住民を対象とした調査に利用可能である。今回、我々は西日本の島嶼住民を対象に、身体計測による体脂肪分布とともに超音波断層装置による内臓脂肪量を測定し、血清脂質値との関連性について検討した。

対象と方法

1. 対象：長崎県上五島奈良尾町に居住する30歳以上70歳未満の住民のうち、健診を希望した425名に対して、生活歴、既往歴、現在の健康状態・服薬状況及び月経の有無、喫煙習慣について聞き取った。本報では脂質代謝に影響する薬剤内服者、内分泌・代謝疾患患者および腹部手術既往歴のある者は除外した、352名(男性98名、閉経前女性72名、閉経後女性182名)を対象とした。
2. 身体計測：身長・体重を計測し、Body Mass Index (BMI)を算出した。右側上腕三頭筋(上腕皮脂厚)、肩甲骨下部(肩甲下皮脂厚)の皮下脂肪厚、腰部・臀部の周径を計測した。
3. 超音波断層装置による腹部脂肪蓄積量評価：内臓脂肪蓄積(Maximal Thickness of the Preperitoneal Fat: Pmax)および腹部皮下脂肪蓄積(Minimal Thickness of the Subcutaneous Fat: Smin)を計測した。
4. 血清脂質値：早朝空腹時に採血し、血清total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerideを測定した。HDL/total cholesterol比を算出し、動脈硬化指数とした。

結 果

1. 男性では約 6 割, 女性では約 5 割の者が BMI, 20-25 の正常体重群であった。男女とも約 3 割の者が BMI, 25-30 の軽度肥満で, BMI, 30 以上の高度肥満は男性では 1 名 (1%), 女性では 11 名 (4%) だった。BMI, Pmax は男女間, 閉経前後間で有意差はなかったが, 上腕皮下厚と Smin は, 女性に比べ, 男性で小さかった。腰部周径は女性では, 閉経後に大きくなる傾向が認められた。
2. 男性は女性に比べ, total cholesterol 値と HDL-cholesterol 値は低値であったが, triglyceride 値は高値であった。
3. Pmax は男女とも, 身体計測による各部位の脂肪蓄積量と有意の相関が認められた。特に腰部周径と最も強い相関が認められた。
4. 皮脂厚値・周径及び Pmax, Smin と血清脂質値との間には, 男女とも有意な相関がみられた。年齢, BMI, および喫煙習慣で補正したところ, 男性では Pmax は triglyceride 値と正の相関を, HDL-cholesterol 及び動脈硬化指数と負の相関を示した。女性では, Pmax は閉経前群・後群とも, total cholesterol と triglyceride と正の相関を, 動脈硬化指数と負の相関を示した。さらに閉経前女性では, Pmax より Smin および肩甲下皮脂厚の方が, 動脈硬化指数と強い相関を示した。

考 察

1. これまで内臓脂肪と血清脂質との関連については肥満患者を対象とした臨床研究が主であり, 地域保健での有用性についての研究報告はほとんどみられない。本研究では, 日本人の一般的地域住民においても, 超音波断層装置を用いて測定した腹部内臓脂肪が皮下脂肪量や周径及び血清脂質値と高い関連性のあることが認められた。
2. 年齢, BMI, 喫煙習慣で補正した後, 内臓脂肪蓄積 (Pmax) は血清脂質異常 (高 total cholesterol 値, 低 HDL cholesterol 値, 高 triglyceride 値) と強く関連していたが, その関連性の強さは性や閉経の前後で異なっていた: 男性や閉経後女性では, 内臓脂肪蓄積が血清脂質値と高い相関を示したが, 閉経前女性では皮下脂肪蓄積が, 血清脂質と強い相関を示した。これらの差異の要因としてはカテコラミンによる脂肪分解能が腹部内臓脂肪と皮下脂肪とで異なること, また男性では門脈系脂肪組織の脂肪分解能が非門脈系のそれと比較して高く, 閉経前女性ではその逆の現象が認められることなどによると考えられたが, 今後の検討がさらに必要と考えられる。
3. 超音波装置は非侵襲的, 経済的で比較的容易に深部脂肪蓄積を評価できることから, 地域住民におけ

る内臓脂肪の評価に有用であると考えられた。欧米と比較して肥満者の少ない日本人地域住民においても, 従来の皮脂厚や周径の測定に加えて, 超音波装置による内臓脂肪の測定によって, 早期に脂質代謝異常を診断できることが明らかである。これまで主として消化器系の診断に用いられてきた超音波検査法を腹部脂肪の測定評価に用いることによって, 心血管疾患のリスクの判定とその予防がより有効になることが期待される。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は一般地域住民について超音波計測による内臓脂肪蓄積の評価を行い, これと血清脂質異常の関連性を性・閉経の有無別に検討したもので, 目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

超音波装置によって内臓脂肪を測定し, それらと身体計測による体脂肪分布, 血清脂質の関連性交絡因子である年齢・BMI・喫煙などの因子で補正分析したもので, 研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

地域住民において超音波装置による内臓脂肪評価の有用性を示すとともに, 血清脂質との関連を明らかにし, 心血管疾患リスクの判定とその予防の可能性を解析したもので高く評価できる。

以上のように本論文は地域住民における内臓脂肪と血清脂質の関連性及び内臓脂肪蓄積に起因する心血管疾患のリスクの評価法として貢献すること大であり, 審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位を授与するのに十分であると判断した。

審査担当者	主 査	教 授	大 園 恵 幸
	副 査	教 授	齋 藤 寛
	副 査	教 授	江 口 勝 美

汪 衛 紅

(中国) 1964年 9 月 4 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Colony forming unit-megakaryocyte (CFU-meg) numbers and serum thrombopoietin concentrations in thrombocytopenic disorders: an inverse correlation in myelodysplastic syndromes
(各種血小板減少症における巨核球前駆細胞 (CFU-meg) 数とトロンボポエチン血中濃度: 骨髓異形成症候群における逆相関)

汪 衛紅, 松尾辰樹, 吉田真一郎, 森弘行, 宮崎泰司, 栗山一孝, 朝長万左男

Leukemia 14: 1751-1756, 2000年
長崎大学医学部原研内科教室
(主任: 朝長万左男教授)

論文内容の要旨

目的

従来の巨核球系前駆細胞(CFU-megakaryocyte)アッセイ法は人血清などを用いていたため、数値の信頼性に乏しく、血小板減少疾患についての検討も不完全であった。しかし、最近、標準法となりうる無血清培養法が開発されたので、これを用いて骨髓異形成症候群を中心に血小板減少疾患の血小板造血の検討を行った。また、これらの病態に対するトロンボポエチン(TPO)製剤の臨床応用の有用性を探るために血清TPO濃度の測定も行った。

対象及び方法

再生不良性貧血(以下AA)14例、骨髓異形成症候群(以下MDS)37例、特発性血小板減少性紫斑病(以下ITP)23例、対照群として正常人10名を用いた。

1) CFU-meg コロニー形成法

Megacult-C キット(StemCell Technologies Inc)を用いた。骨髓 Light Density(BMLD) Cell を $1 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度で double chamber slide の無血清コラーゲン培地で5%CO₂下、37℃で10-12日間培養した。本培養ではコラーゲン最終濃度が1.1mg/mlであり、コロニー形成刺激因子として rh-thrombopoietin 50ng/ml, rh IL-6 10ng/ml, rh IL-3 10ng/ml を用いた。培養後にはメタノール/アセトンで20分間固定し、染色まで-20℃で保存した。固定より2週間以内に、一次抗体はマウス抗GPⅡb/Ⅲa抗体、二次抗体はBiotin-conjugated goat anti-mouse IgG antibody でアルカリフォスファターゼ抱合アビジンと反応させて染色を行った。さらに光顕顕微鏡下で細胞数が3-20の細胞集団を small, 細胞数が21-49の細胞集団を medium, 細胞数が50の細胞集団を large のコロニーとしてカウントした。

2) TPO 測定方法

血清は測定するまで-20℃に冷凍保存した。TPO 血中濃度測定は Human Tpo Immunoassay Kit(R&D Systems)を用いELISA法で行った。

結果

1) AA患者とMDS患者の平均CFU-meg数は 10.7 ± 11.4 および $42.3 \pm 58.5 / 10^5 \text{BMLD cells}$ であり、ともに正常人($103.1 \pm 57.3 / 10^5 \text{BMLD cells}$)に比べ低かった($p < 0.0001$ 及び $P = 0.0053$)。しかし、MDSでは一部は正常であり、分布の幅が大きかった。

2) ITP患者の平均CFU-meg数($223.2 \pm 143.5 / 10^5 \text{BMLD cells}$)は正常人より有意に高かった($p = 0.017$)。

3) AA患者とMDS患者の平均TPO濃度($986.8 \pm$

500.8pg/ml および $838.2 \pm 639.1 \text{pg/ml}$)はともに正常人($80.7 \pm 38.8 \text{pg/ml}$)より高かった。($p < 0.0001$)。ただし、MDSでは低値から高値まで分布していた。

4) ITP患者は軽度のTPO濃度上昇を示した。($123.1 \pm 55.3 \text{pg/ml}$ ($p = 0.0106$))。

5) AA患者においてはTPO濃度と血小板数あるいはCFU-meg数の間にはともに有意の逆相関が見られたが(correlative coefficient(CC): -0.719 および -0.682 , $p < 0.0001$)、ITPではこのような逆相関は見られなかった。

6) MDSではTPO濃度の逆相関は血小板数(CC: -0.538 , $p = 0.0014$)よりもCFU-meg数とより強く関連していた(CC: -0.678 , $p < 0.0001$)。

考察

MDSではTPO濃度は血小板数よりもCFU-megとより強く関連して変動している可能性が示された。MDS患者の多くではAA患者と同様に少数の巨核球前駆細胞に強いTPO刺激が加わっている病態であったが、一部にはCFU-meg数が十分保たれているにもかかわらず、TPO濃度の上昇が軽度で血小板が低値にとどまっている群があり、将来のTPO臨床応用のよい対象となりうることを示唆された。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、難治性血小板減少症の代表的疾患である再生不良性貧血や骨髓異形成症候群の病態を明らかにしようとするもので、その目的・意図は的確である。

2. 研究手法に関する評価

実際の患者検体を用いて、血小板産生に直接関与する巨核球をコロニー形成法(Meg-colony)にて、また、その造血因子であるトロンボポエチン(TPO)をELISA法にて同時に調べ臨床的意義付けを試みたものでその研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

正常骨髓を対照として、再生不良性貧血・骨髓異形成症候群ではMeg-colony数とTPOレベルは特有な関係にあり、特に骨髓異形成症候群ではその解析結果から3つの亜型に分類できることを提唱し、今後のrecombinant TPOを用いた新しいサイトカイン治療の理論的根拠を提示したもので高く評価される。

以上のように、本論文は難治性造血器疾患の解明と新しい治療の可能性を示唆したもので医学の進歩に貢献するところが大きく、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主査	教授	上平	憲
	副査	教授	関根	一郎
	副査	教授	近藤	宇史

土 居 香 美

(宮崎県) 昭和44年 2 月23日生

授与年月日 平成13年 3 月31日**主 論 文** Alteration of Antioxidants During the Progression of Heart Disease in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

(ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける心病変進行に伴うアンチオキシダントの変化)

KAGUMI DOI, FUMI SAWADA, GENJI TODA, SHIRO YAMACHIKA, SHINJI SETO, YOSHISHIGE URATA, YOSHITO IHARA, NORIYUKI SAKATA, NAOYUKI TANIGUCHI, TAKAHITO KONDO, KAT-SUSUKE YANO

Free Radical Research 2001 Mar; 34(3) 251-61

長崎大学内科学第三教室

(主任 : 矢野捷介教授)

論文内容の要旨**緒 言**

反応性酸素種 (ROS) の上昇および ROS / アンチオキシダントの平衡障害は、多くの疾患病態に深く関与していると考えられている。なかでも、未治療の糖尿病においては、組織内アンチオキシダント酵素活性の低下により、ROS の増加を来たことが報告されており、ROS ならびに組織アンチオキシダントの動態が、糖尿病とその合併症の成因に大きな役割を果たしている可能性が示唆されている。しかし、糖尿病における心機能障害に、このようなアンチオキシダントの変化がどのように影響しているかの詳細は明らかでない。そこで我々は、(1) 糖尿病ラット心において、アンチオキシダントの活性、蛋白量および遺伝子発現が変化しているかどうか、もし変化しているとすれば(2) それらの変化は糖尿病ラットの心機能の障害にどのように関わっているかについて検討した。

対象と方法

6 週令の雄性 Sprague-Dawley ラットにストレプトゾトシン 65mg / kg body weight の腹腔内投与を行い、4 週後の血糖値が 250mg / dl 以上のもを DM ラットとした。正常コントロールとして、生食水腹腔内投与ラットを用いた。DM、コントロール各 12 例ずつを対象とし、8 および 12 週間後に、in vivo での経胸壁心エコーおよび観血的血行動態測定を行った。次いで摘出心筋を用いて、アンチオキシダントとしてのスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性およびグルタチオン (GSH) 濃度の測定を行い、さらにノーザンブロット法による γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ -GCS)

Cu, Zn-SOD, Mn-SOD および Transforming growth factor (TGF)- β 1 の mRNA 発現、ウェスタンブロット法による Cu, Zn-SOD, Mn-SOD それぞれの蛋白量評価を行った。また、抗 IV 型コラーゲン抗体を用いた免疫組織化学的検討も行った。

結 果

- (1) 心エコー所見 : DM 群では、心室中隔厚、左室後壁厚および左室拡張末期径は高値を示した。左室駆出率は両群で差を認めなかったが、左室後壁後退速度は DM 群で低下していた。
- (2) 心血行動態 : DM 群では、心拍数の低下、左室拡張末期圧の上昇、左室内圧 dp/dt の低下が進行性に認められた。
- (3) アンチオキシダントの活性、蛋白量および遺伝子発現 : DM 群では、Mn-SOD 活性の低下を認めた。一方、Mn-SOD mRNA 発現および蛋白量は増加していた。GSH 濃度ならびに γ -GCS mRNA 発現は、DM 群で低下しており、TGF- β 1 mRNA の発現は DM 群で増加していた。
- (4) 免疫組織化学的検討 : DM 群では、IV 型コラーゲンの増加が認められた。

考 察

糖尿病発症 8 週後にはすでに、左心室の壁肥厚と内腔拡大、拡張期後壁速度と左心室圧の低下、左室拡張末期圧の上昇もみられ、明らかな心機能低下像を示していた。またそのような変化は 12 週の糖尿病ラットではさらに進行しており、免疫組織化学的検討では、IV 型コラーゲンの増加が認められた。一方、アンチオキシダント活性では、糖尿病発症 8 週後ラットで Mn-SOD 活性の減少がみられ、反応性酸素種のミトコンドリア代謝異常を示唆していると考えられた。また、 γ -GCS 発現の減少を伴う GSH の減少が認められ、さらに GSH 合成抑制因子として知られている TGF- β 1 の発現も上昇していた。したがって、DM で ROS が産生されることがミトコンドリア障害と TGF- β 1 の発現を引き起こし、その結果 GSH 合成の制御を誘導するとともに、心筋の線維化を誘発したものと考えられる。抗酸化能の低下と線維化が、糖尿病における心不全を引き起こす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**

本研究は糖尿病心機能低下に反応性酸素種 (ROS) ならびに組織アンチオキシダントが関与しているのか検討したもので、目的は十分に妥当である。

2 研究手段に関する評価

ストレプトゾトシンによる糖尿病ラットを作製し、心機能とアンチオキシダントを測定したものであり、研究手段も妥当である。

3 解析・考察の評価

糖尿病における心機能低下が抗酸化能の低下と線維化により引き起こされることを明らかにしたもので、結果は高く評価できる。

以上のように、本論文は糖尿病における心機能を解析し、その病態を解明したものである。審査委員は全員一致で博士(医学)の学位を授与するのに十分であると判断した。

審査担当者 主査 教授 江口勝美
副査 教授 澄川耕二
副査 教授 丹波正美

日高重和

(佐賀県)昭和43年7月20日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Differences in 20q13 2 Copy Number between Colorectal Cancers with and without Liver Metastasis

(大腸癌の肝転移例および非肝転移例における染色体20q13 2コピー数の相違)

日高重和, 安武 亨, 竹下浩明, 近藤正道, 辻 孝, 七島篤志, 澤井照光, 山口広之, 中越 享, 綾部公懿, 田川 泰
Clinical Cancer Research Vol.6, 2712-2717 2000年

長崎大学医学部第一外科教室

(主任: 綾部公懿教授)

論文内容の要旨

序言

これまでに大腸癌を含む多くの悪性腫瘍において染色体20番長腕の増加が報告されている。乳癌では20q13 2座位の増幅を認めた症例は予後不良であるという報告があり、この領域に未知の癌遺伝子が含まれている可能性を示している。Comparative genomic hybridization (CGH) 解析において、大腸癌肝転移例の85%に染色体20番長腕の増加を認めた報告があるが、この20q13 2座位の異常との関連の報告はまだない。そこで本研究では、大腸癌における20q13 2座位のコピー数異常と肝転移との関連を検討した。

対象

当科で外科切除された大腸癌非肝転移症例17例の原発巣、大腸癌肝転移症例18例の原発巣および肝転移巣を対象とした。

実験方法

新鮮凍結標本を用いてスライドグラスに捺印標本作成し、20番染色体αサテライトDNAプローブを対照として、20q13 2座位特異的DNAプローブを用いてTwo-color FISH(Fluorescence in situ hybridization)法

を行った。20q13 2座位のコピー数の絶対的、相対的コピー数を計測し検討した。

結果

- 1) 相対的コピー数の増加の頻度は、非肝転移症例で41%(7/17)に対して、肝転移症例原発巣で89%(16/18)、肝転移巣で94%(17/18)と肝転移症例に有意に高頻度であった($P < 0.05$, $P < 0.001$)。
- 2) 高増幅を肝転移症例原発巣に2/18(11%)、肝転移巣に7/18(39%)を認めたが、非肝転移症例には認めなかった。
- 3) 20q13 2座位の絶対的、相対的コピー数の平均値を比較すると、非肝転移症例に対して肝転移症例原発巣、および肝転移巣で有意に高かった。
- 4) 高増幅を示す腫瘍細胞の割合の平均は、非肝転移症例で6.1%、肝転移症例原発巣で21.2%、肝転移巣で38.6%と、肝転移症例原発巣と肝転移巣で有意に高かった($P < 0.05$, $P < 0.001$)。
- 5) 肝転移症例の原発巣と対応する肝転移巣をそれぞれ各症例を比較すると、2例を除いて原発巣よりも肝転移巣の方に高増幅を示す腫瘍細胞の割合が高かった。

考察

20番染色体長腕の増加は様々な腫瘍で認められ、最近では20q13 2の増幅がゲノムの不安定性や不死化に関わっているという報告がある。このことは20q13 2の増幅が腫瘍の悪性化、転移に関与している可能性を示唆している。大腸癌肝転移巣では20q13 2高増幅の頻度、および高増幅の細胞の割合が高率であることを認めた本研究の結果から、これら的大腸癌細胞がより強い肝転移能を有していることが推測される。この染色体領域に肝転移能に関与した未知の癌遺伝子が含まれている可能性が考えられ、今後、この20q13 2領域に関する詳細な解析が必要と思われる。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は、大腸癌の肝転移に関わる染色体異常を同定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

大腸癌非肝転移例の原発巣と大腸癌肝転移例の原発巣ならびに転移巣における20q13 2座位のコピー数の異常を調べ、肝転移との関連を検討したもので研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、20q13 2のコピー数の増幅した大腸癌では強い肝転移能を有している可能性を明らかにし、今後の大腸癌研究への進展が大いに期待される。

以上のように本論文はヒト大腸癌における肝転移発

生基盤の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主 査 教 授 兼 松 隆 之
副 査 教 授 山 下 俊 一
副 査 教 授 小 路 武 彦

佐 野 功

(神奈川県)昭和39年11月29日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 PROLONGED SURVIVAL OF RAT CARDIAC ALLOGRAFT WITH PROINFLAMMATORY CYTOKINE INHIBITOR

(炎症性サイトカイン阻害剤によるラット同種移植心の生着延長効果)

佐野 功, 高橋孝郎, 小路武彦, 鶴殿平一郎, 由井克之, 綾部公懿

Journal of Heart and Lung Transplantation
2001 May 20(5)583-9

長崎大学医学部第一外科学教室

(主任: 綾部公懿教授)

論文内容の要旨

緒 言

同種移植拒絶の機序として細胞性傷害の他, 炎症性サイトカインの関与も報告されている。実験的には IL-2R の発現増強, 細胞障害性 T 細胞の分化, MHC クラス I の発現の増強や血管内皮細胞の活性化を介して拒絶に関与するとされている。最近開発された FR167653 は p38MAPK の阻害剤であり TNF- α ・IL-1 の産生を抑制するが, LPS 刺激による DIC モデルや再灌流傷害の実験でその有用性が報告されている。今回, FR167653 を投与し TNF- α ・IL-1 などの炎症性サイトカインを抑制することにより同種移植心の拒絶反応を制御しうるか否かを検討した。

実験方法

(対象)ドナーには BN ラット (200-250 g), レシピエントには LEW ラット (280-300 g) を用いた。

(手法)One and Lindsey 法により腹腔内へ異所性心移植を行った。コントロール群 (group 1 : n = 6) は移植のみで, 実験群は次の 5 群にわけ FR167653 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) を手術直後より術後10日間レシピエントの腹腔内に投与した。group 2 (n = 2) : 150mg / kg 2 回 / day (計300mg / kg / day), group 3 (n = 3) : 75mg / kg 3 回 / day (計225mg / kg / day), group 4 (n = 9) : 75mg / kg 2 回 / day (計150mg / kg / day), group 5 (n = 3) : 75mg / kg / day, group 6 (n = 3) : 37.5mg / kg 2 回 / day (計75mg / kg / day)

拒絶は腹壁より移植心の拍動の触知によって判定した。各群で移植心の生着期間を測定し group 1 と最大

効果の得られた group 4 について術後 3, 5, 7 日目に ELISA 法による血清中の炎症性サイトカイン濃度の測定と, H.E. 染色及び免疫染色により移植心への細胞浸潤の評価を行った。また血清中の GOT, GPT, CPK, ALP, BUN, クレアチニンを測定し FR167653 の副作用を評価した。

結 果

(1) 移植心の生着期間

移植心はコントロール群 (group 1) では平均 6.8 ± 0.8 日で拒絶された。FR167653 投与群では, group 5 では 10.0 ± 1.2 days ($p = 0.028$, vs. group 1), group 4 では 12.1 ± 1.5 days ($p = 0.002$, vs. group 1) と生着期間が有意に延長した。

(2) 血清中炎症性サイトカイン濃度

コントロール群では, IL-1 β が術後より持続的に上昇し続けたが group 4 では術後 3 日目にやや上昇していたもののその後抑制傾向が認められ, また TNF- α はコントロール群が持続的上昇したのに対し group 4 では有為に抑制された。IL-2, IL-6 では group 4 に抑制傾向があったものの有為ではなく, IFN- γ に関しては差が見られなかった。

(3) H.E. 染色, 免疫染色

術後 5 日目で group 1 で単核球を主体とした細胞浸潤が強くなっているのに対し group 4 では軽度であった。術後 7 日目で group 1 では著明な細胞浸潤と間質性出血, 浮腫が認められるのに対し group 4 ではそれらは以前として抑制されていた。免疫染色では両群とも浸潤細胞は ED1 陽性細胞と CD8 陽性細胞が主体であり group 4 では両者とも有為に抑制されていた。

(4) FR167653 の副作用

1 週間以上投与された固体では体重減少と中等度の肝腫大, 腹水, 下痢が認められ, 血清中の GOT の上昇も認められた。

考 察

今回, FR167653 の投与により同種移植心の生着延長効果が認められた。これまで抗 TNF- α 抗体の投与により生着延長が得られたとの報告があるが, TNF- α は血管内皮細胞の接着分子や macrophage migration inhibitory factor (MIF) の発現に関与しているとの報告もあり, これらの抑制を介して ED1 陽性細胞や CD8 陽性細胞の浸潤を制御でき移植心の生着延長につながったものと思われる。

今回の実験では長期の生着延長は得られなかったがその一因としてまず IL-1 β の抑制が術後早期に不十分であったことがあげられる。これは腹腔内への投与による非特異的な刺激による可能性があるため投与法を検討する必要がある。また IL-2, IFN- γ も抑制が不十分であり細胞傷害性 T 細胞の分化・増殖を抑えら

れなかったと考えられる。最近 in vitro の実験で p38 MAPK signal pathway の阻害のみでは IL-2, IFN- γ の産生は十分抑制できないとの報告もあり, サイクロスポリンなどの他剤との併用効果などについても今後検討する必要がある。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は, 炎症性サイトカインの抑制により同種移植心の拒絶反応を抑制しようとするものであり, 目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

ラット異所性心移植モデルを用い, 炎症性サイトカイン阻害剤による拒絶反応の制御効果を調べたもので, 研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果, 炎症性サイトカインを抑制すれば同種移植心の拒絶反応を抑制できる可能性を明らかにし, 今後の臓器移植研究への進展が大いに期待される。

以上のように本論文は臓器移植における拒絶反応の機序の解明とその制御法の開発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 兼 松 隆 之
副査 教授 江 石 清 行
副査 教授 松 山 俊 文

三 木 文 夫

(長崎県) 昭和34年2月3日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Development of HVJ-Liposome Mediated Gene Therapy Using HSV-Thymidine Kinase Gene for Hepatocellular Carcinoma (HVJ-Liposome 法を用いた肝癌分子標的化自殺遺伝子治療の開発)
三木文夫, Vladimir SAENKO, 大津留 晶
Acta Medica Nagasakiensia (45: 21-26, 2000)
長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設分子医療部門分子診断研究分野
(主任: 山下俊一教授)

論文内容の要旨

緒 言

癌遺伝子治療は副作用の少ない将来的な治療の候補の一つであるが, 現在行われている臨床試験においては, 癌細胞に対する分子標的化はまだ十分には図られていない。一昨年, 先天性肝内酵素欠損症に対する遺伝子治療試験において遺伝子治療自体の副作用による初

めの死亡事故が, 米国ペンシルバニア大学病院で発生した。さらに最近の研究によりアデノウイルスを用いた自殺遺伝子治療において肝毒性や脱髄性変化が認められる報告がなされている。そこで癌遺伝子治療における分子標的は今後いっそう重要になることが予想されるが, その一つとしてプロモーター制御による腫瘍の標的化を検討した。対象とした転写制御領域は α -フェトプロテイン(AFP)エンハンサープロモーターおよび熱ショック蛋白遺伝子(HSP)プロモーターである。

一方, 上記の遺伝子治療による事故や副作用はアデノウイルスを用いたことによる可能性があるため, より安全なベクターと考えられている HVJ-liposome を用いて肝癌遺伝子治療における安全性の検討と分子標的化の有用性の検討を行った。

材料と方法

- 1) 細胞: AFP 産生能の異なる HuH 7 (AFP 高産生), HepG 2 (AFP 中等度産生), PLC / PRL / 5 (AFP 低産生), および AFP を産生しない非肝癌細胞 Lovo
- 2) プラスミド作成: AFP エンハンサー-0.8kb とプロモーター-0.3kb を firefly Luciferase Vector と HSV-TK (Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase) 遺伝子に連結したキメラ遺伝子 AFP-Luc 及び AFP-TK を作成した。遺伝子導入効率の補正用 CMV-renilla Luciferase 遺伝子を用いた。HSP-70B 遺伝子プロモーター-2.3kb を用い, 同様に HSP-Luc 及び HSP-TK を作成した。普遍的発現プロモーターとして CMV エンハンサープロモーターに TK 遺伝子を結合した, CMV-TK 遺伝子を作成した。
- 3) プロモーター活性の測定: Dual Luciferase Assay
- 4) 殺細胞効果試験: コントロールと比較した % survival を色素排除法により測定した細胞数より算出。
- 5) 遺伝子導入法: HVJ-liposome 法
- 6) 副作用の検討: 血清 GPT 測定 (POP・TOOS 法), BUN 測定 (ウレアーゼ・インドフェノール法), 白血球数, 組織学的解析 (HE 染色)

結 果

- 1) AFP 転写活性は AFP 産生能に応じて活性が上昇しており, AFP を産生しない細胞の転写活性と比較して, AFP 高産生肝癌で約860倍, AFP 低産生肝癌でも約80倍の転写活性の増加を認めた。HSP 転写活性を同様に比較すると AFP 産生能とは関係なく 43℃, 30分の温熱により約60倍から約660倍の転写活性の増加を認めた。
- 2) in vitro における一過性遺伝子導入による治療では, ganciclovir (GCV) 10 μ M の濃度で, 各々の細胞で転写活性に応じた殺細胞効果が得られた。
- 3) HVJ-liposome 法を用いた遺伝子導入は, 腫瘍内

局注でも腹腔内局注でも腫瘍組織のみでなく他の器官組織（肝，腎，消化管，脾）でも遺伝子の発現が認められた。

4) 43℃ , 30分の温熱により腫瘍細胞における HSP-Lue 活性が他の器官組織に比べ高くなっている。

5) 肝癌を移植されたヌードマウスを HVJ-liposome 法を用いた CMV-TK 遺伝子治療では治療開始 7 日目に GPT の上昇が確認された。

6) ヌードマウスを HVJ-liposome 法を用いた CMV-TK 遺伝子治療を行うと , 14日の観察期間中 , WBC, BUN,GPT に有意な変化は観察できなかった。

7) 肝癌を皮下移植されたヌードマウスに対する腫瘍抑制効果は CMV-TK,AFP-TK 共に認められたが , 両者に差は認めなかった。

考 察

AFP エンハンサープロモーター及び HSP プロモーターを利用した肝癌遺伝子治療は , 共に腫瘍特異的な転写活性を誘導し , 腫瘍選択的な分子標的治療の可能性を示した。また , HVJ-liposome 法は自殺遺伝子の頻回投与を行っても肝機能や腎機能に対する副作用はごく軽度にしき認めず , アデノウイルスと比較して安全ではあるが , CMV-TK 治療時に肝機能が軽度上昇したものや , 組織学的に軽度の炎症細胞浸潤を認めることより , やはりより安全性を高める上で分子標的は必要であると考えられた。さらに今回分子標的化した治療遺伝子と , 現在用いられている標的化されていない治療遺伝子を比較したが , 効果には差がなかった。よって HVJ-liposome 法は人がん遺伝子治療のベクターとして有用なベクターと思われた。また AFP-TK 及び HSP-TK を用いた分子標的化自殺遺伝子治療は肝癌に対し , 選択的でしかも効果的な治療法として今後の臨床応用が期待された。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル : Development of HVJ-Liposome Mediated Gene Therapy Using HSV-Thymidine Kinase Gene for Hepatocellular Carcinoma

1 . 研究目的の評価

本研究は肝癌遺伝子治療の安全性と分子標的化の有用性を検討しようとするもので , 目的は十分に妥当である。

2 . 研究手段に関する評価

AFP エンハンサー・プロモーターおよび HSP プロモーターを活用した肝癌分子標的化自殺遺伝子治療の in vitro, in vivo 研究手法は , 分子生物学的ならびに生物学的な手法によるもので妥当である。

3 . 解析・考察の評価

HVJ-Liposome 法を用いたがん遺伝子治療の分子標的化自殺遺伝子治療の有効性を解析し , 本方法が肝癌

に対して , 選択的かつ効果的治療法であり , 副作用も少ないことを明らかにし , 十分評価できる。

以上のように , 本論文は肝癌分子標的化自殺遺伝子治療の基盤整備に貢献するところ大であり , 審査委員は全員一致で博士 (医学) の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主 査	教 授	山 下 俊 一
	副 査	教 授	小 路 武 彦
	副 査	教 授	関 根 一 郎

安 部 幸 弘

(大分県) 昭和38年10月 2 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 CTLA4 gene polymorphism correlates with the mode of onset and presence of ICA512 Ab in Japanese type 1 diabetes.

(日本人 1 型糖尿病患者における発症形式および ICA512抗体と CTLA 4 遺伝子多型との関連)

Takahiro Abe, Hirofumi Takino, Hironori Yamasaki, Masako Ozaki, Yasunori Sera, Hideaki Kondo, Hiroyuki Sakamaki, Eiji Kawasaki, Takuya Awata, Yoshihiko Yamaguchi, Katsumi Eguchi

Diabetes Research and Clinical Practice46巻
2 号 169-175 , 1999年

長崎大学医学部内科学第一教室

(主任 : 江口勝美教授)

論文内容の要旨

緒 言

1 型糖尿病 (IDDM) は自己免疫性疾患であり , 膵自己抗体が陽性になることが多い。また多因子遺伝であることはよく知られている。その疾患感受性遺伝子として HLA(IDDM 1) , インスリン遺伝子上流域の Variable Number of Tandem Repeat:INS-VNTR(IDDM 2) 等があるが , 最近の研究で CTLA 4 遺伝子多型 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 : IDDM 12) と 1 型糖尿病との関連が報告された。CTLA 4 遺伝子は第 2 染色体短腕に存在し , 活性 T 細胞に発現する糖タンパク質で , T 細胞の活性化に対して負のシグナルを伝えることから , 自己免疫性疾患との関連が考えられている。CTLA 4 遺伝子エクソン 1 のコドン17Thr/Ala 多型は自己免疫性甲状腺疾患 (AITD) との関連も報告されている。そこで我々はこの CTLA 4 遺伝子多型と AITD 合併 1 型糖尿病および 1 型糖尿病の発症形式 , 膵自己抗体などの臨床的特徴との関連について検討した。

対象と方法

1) 対象は 1 型糖尿病患者111人で , そのうち63人は

AITD 合併しており, Graves 病 (バセドウ病) が22人, 橋本病が41例であった。また111人中69人については, 発症一年以内に血清中膵自己抗体を測定した。1型糖尿病の診断基準は, 臨床症状, 膵自己抗体およびインスリン分泌不全 (グルカゴン負荷試験において血清Cペプチド $<0.03\text{nmM}$) の有無にて行った。対照は日本人健常者445名である。またこの研究を行うにあたって長崎大学医学部倫理委員会の承認を受け, 適切なインフォームドコンセントを行い同意が得られた患者および対照に限り行った。

2) CTLA 4 遺伝子多型 (exon 1 position 49 A/G, codon 17 Thr/Ala) の解析は PCR-RFLP 法にて行った。PCR は既報のプライマーおよび条件にて行い, PCR 産物を制限酵素 Bbv-1 で切断の後, 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い解析した。

3) 膵自己抗体のうち, 抗 GAD 抗体は RIA 法, ICA 512 抗体は Radioligand binding 法にてそれぞれ測定した。

4) 統計解析は χ^2 検定又は Fisher の直接確率計算法を用いて行い, $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

1) AITD 合併 1 型糖尿病患者と日本人健常者間には CTLA 4 遺伝子多型に有意差は認められなかった (G allele 62%, A allele 38% vs. G allele 63%, A allele 37%)。また Graves 病, 橋本病どちらのグループも同様に有意差は認めなかった。

2) 膵自己抗体を測定した69例において, 糖尿病性ケトosisにて発症した群 (急性発症) とケトosisを呈さなかった群 (緩徐発症) の間には有意差が見られた (G allele 75%, A allele 25% vs. G allele 50%, A allele 50% : $p = 0.003$)。抗 GAD 抗体陽性者と陰性者の間には有意差は認めなかったが, ICA512 抗体陽性者と陰性者の間には有意差を認めた (G allele 83%, A allele 17% vs. G allele 59%, A allele 41% : $p = 0.004$)。

考 察

日本人では, CTLA 4 遺伝子多型と AITD および 1 型糖尿病との間にそれぞれに関連が認められる報告がある。我々は AITD 合併 1 型糖尿病においては各疾患単独の場合に比較してさらに強い関連があると推定したが認めなかった。しかし, フランスのグループではこれらにおいて相関が認められており, 人種間の遺伝背景の違いが考えられた。

日本人 1 型糖尿病患者において発症形式と CTLA 4 遺伝子多型の間には有意な差が認められた。発症時ケトosisにて発症した群では, ケトosisを認めなかった群に比して G allele へ傾いていた。

CTLA 4 遺伝子多型の役割はいまだ解っていない。

しかし CTLA 4 遺伝子のノックアウトマウスでは急速な全身臓器への T リンパ球の浸潤が見られている。またこの遺伝子多型が CTLA 4 の mRNA の安定性に影響しているとの報告もある。以上のことから, この遺伝子多型は, T 細胞による膵 β 細胞の急速な破壊に何らかの影響を与えているものと考えられる。

同様に ICA512 抗体の陽性群と陰性群の間に CTLA 4 遺伝子多型に有意な差が認められた。しかし, ベルギーの報告では膵自己抗体とこの遺伝子多型には相関を見出していない。この点についても人種間の遺伝的背景の相違が存在すると考えられる。

結 語

日本人 1 型糖尿病患者において発症形式および ICA 512 抗体と CTLA 4 遺伝子多型との関連が認められた。しかしながら 1 型糖尿病の病因におけるこの遺伝子多型の役割は解っていない。今後, 更なる解析が必要と考える。

論文診査の結果の要旨

学位論文のタイトル: CTLA4 gene polymorphism correlates with the mode of onset and presence of ICA512 Ab in Japanese type 1 diabetes.

1. 研究目的の評価

本研究は 1 型糖尿病における感受性遺伝子の 1 つである CTLA 4 遺伝子多型と臨床的特徴 (発症形式, 自己免疫性疾患ならびに膵自己抗体などの有無) との関連を解明しようとするもので, 目的は十分に妥当である。

2. 研究手段に関する評価

1 型糖尿病をケトosisの有・無 (急性発症型・緩徐発症型) 並びに自己免疫性甲状腺疾患合併の有・無に群別し, 各々の群と CTLA 4 遺伝子多型の関係を PCR-RFLP 法で求めた allele frequency を比較することにより検討したものであり, 研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果, 日本人の 1 型糖尿病において, その発症形式と遺伝子多型との間に関連がある事を明らかにしたものであり, その研究成果は高く評価できる。

以上のように, 本論文は日本人の 1 型糖尿病の遺伝的要因の関連を明らかにしたものであり, 本症の病態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	石 丸 忠 之
	副 査	教 授	近 藤 宇 史
	副 査	教 授	河 野 茂

尾 崎 方 子

(大分県) 昭和44年 4 月24日生

授与年月日 平成13年 3 月31日**主 論 文** Enhanced Insulin Gene Expression by Reduced Intracellular Glutathione Level in Insulin Secreting Cells MIN 6

(インスリン分泌細胞 MIN 6 細胞株において細胞内 GSH 濃度の減少はインスリン遺伝子発現を増強させる)

Masako Ozaki, Hironori Yamasaki, Yoshihiko Yamaguchi, Hideaki Kondo, Satoshi Yamasaki, Naruhiro Fujita, Mikako-Degawa-Yamauchi, Takahiro Abe, Kenichi Yamakawa, Yasunori Sera, Shigeo Uotani, Eiji Kawasaki, Hirofumi Takino, Hiroshi Kijima, Takahito Kondo, Katsumi Eguchi

Diabetes Nutrition and Metabolism (in press)

長崎大学医学部第一内科学教室

(主任 : 江口勝美教授)

論文内容の要旨**緒 言**

細胞機能障害および細胞死の原因となる酸化ストレスに拮抗しているのが抗酸化機構である。一方で抗酸化機構は転写因子を通じて遺伝子の発現を調節している可能性が示されており非常に興味深い。グルタチオン(GSH) は過酸化水素や有機酸化物の還元・消去を行い、抗酸化機構の中でも重要な役割を担う因子である。この GSH がインスリン遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、GSH 合成律速酵素である γ -glutamylcysteine synthetase(γ -GCS) のリボザイムベクターの安定遺伝子導入によって細胞内 GSH 含量を減少させたインスリン分泌細胞株 ribo-MIN 6 を用いて解析した。

方 法

ribo-MIN 6 : ribo-MIN 6 は野生型 MIN 6 に γ -GCS リボザイムベクターを安定遺伝子導入して作製した細胞株である。 γ -GCS リボザイムは γ -GCS mRNA を塩基442と443の間で切断、GSH の産生を抑制する機能をもつ。野生型 MIN 6 やベクターのみを導入した対照細胞(MOCK-MIN 6) と比して ribo-MIN 6 では γ -GCS mRNA の減少と細胞内 GSH 濃度の約50%の低下を示す(kondo H. BBRC278 : 236 , 2000)。

インスリン免疫染色 : 細胞を paraformaldehyde で固定、抗インスリン抗体と反応後 streptavidine-biotin 法にて染色。

ルシフェラーゼ発現ベクター : プレプロインスリン遺伝子の -1998から +237までの上流領域をルシフェ

ラーゼ(luc) 発現ベクターに挿入して pINS-1998/luc とした。これをもとに Erase-a-Base System kit を用いて deletion construct(pINS_319 , _273 , _228 , _219 , _183 , _127/luc) を作製。

一過性遺伝子導入 , luc 活性 : 細胞を1.7mM glucose 含有 DMEM で48時間培養後、作製したルシフェラーゼ発現ベクターおよび γ -GCS リボザイムベクターを一過性遺伝子導入。48時間後に細胞蛋白を抽出し luc 活性を測定した。Internal control として pRL-SV40 を用いた。

結 果

ribo-MIN 6 の形態変化インスリン含有 : 増殖性および形態性に差は認めなかった。しかし、ribo-MIN 6 において他の細胞と比較して細胞内のインスリン顆粒が濃染された。

ribo-MIN 6 におけるインスリン遺伝子発現増強 : 野生型- , MOCK- , ribo-MIN 6 に200ng/well の pINS-1998/luc を遺伝子導入し luc 活性を測定。ribo-MIN 6 における luc 活性は野生型-MIN 6 の約9.0倍、MOCK の約4.9倍と有意な上昇を示した。

γ -GCS リボザイムベクターの遺伝子導入 : γ -GCS リボザイムの導入とインスリン遺伝子発現亢進の間の量-反応関係を知るために、一定量(200ng/well) の pINS-1998/luc と0から1000ng/well の γ -GCS リボザイムベクターを野生型 MIN 6 に一過性遺伝子導入した。 γ -GCS リボザイムベクターの量依存性に luc 活性の上昇が認められた。

Deletion Study : 細胞内の GSH 濃度低下によるインスリン遺伝子発現増強がインスリン遺伝子上流部分のどの領域と関係するかを知るために、作成した数種の deletion construct を野生型-MIN 6 および ribo-MIN 6 に遺伝子導入しそれぞれの細胞における luc 活性の推移を比較した。pINS-319/luc と pINS-273/luc の間、pINS-183/luc と pINS-127/luc の間で luc 活性降下を両方の細胞種において認め、luc 活性の推移は類似していた。各々の deletion construct の luc の活性では ribo-MIN 6 の方が野生型-MIN 6 と比較して6.8倍から13.6倍高値を示した。

考 察

ribo-MIN 6 は γ -GCS リボザイムベクターの安定遺伝子導入によって樹立されたインスリン分泌細胞株で、細胞内 GSH 濃度が野生型に比して50%の低下を示す細胞である。本研究により ribo-MIN 6 においてはヒトインスリン遺伝子発現が増強していることが示された。リボザイムベクターを野生型-MIN 6 に一過性に遺伝子導入した場合でも量依存性にインスリン遺伝子発現増強が認められ、ribo-MIN 6 の結果を支持する。このメカニズムは不明であるが、転写因子 NF- κ B 活

性と抗酸化機構の関連を示唆する報告は多く、GSHが蛋白のS-S二重結合に影響を与えることより転写因子の三次構造を変化させたことが関係していると考えられる。上流領域の検討からは、ribo-MIN 6に特異的な転写増強に関連した領域を見出すことはできなかった。細胞内GSH濃度の変化はインスリン遺伝子上流領域に関連するいくつかの転写因子全体に影響を与えている可能性が示唆された。今後、酸化的ストレスとインスリン遺伝子発現調節の関連性を更に追求していく必要がある。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル：Enhanced Insulin Gene Expression by Reduced Intracellular Glutathione Level in Insulin Secreting Cells MIN 6

1. 研究目的の評価

本研究は抗酸化機構とインスリン遺伝子発現の関連性を明らかにしようとするもので、目的は妥当である。

2. 研究手段に関する評価

グルタチオン(GSH)合成の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素のリボザイムベクターを、インスリン産生細胞株に安定、あるいは一過性に導入し、その時のインスリン遺伝子発現をルシフェラーゼ発現ベクターを利用して解析したもので、研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

細胞内GSH濃度の減少によりインスリン遺伝子の発現が増強することを、上記の手法で明解に示しており、それについての考察も妥当である。

以上のように本論文はインスリン遺伝子発現の制御機構の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 毎田 徹 夫
副査 教授 上 平 恵
副査 教授 丹 羽 正 美

南 恵 樹

(大分県)昭和41年4月23日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Role of Carcinoembryonic Antigen in the Progression of Colon Cancer Cells which Express Carbohydrate Antigen
(Carbohydrate 抗原を発現している大腸癌細胞の進展におけるCEAの役割)
南 恵樹, 古井純一郎, 兼松隆之
Cancer Research(In press)
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

背 景

癌の転移形成において、癌細胞の血管内皮細胞への接着は重要な因子である。癌細胞が発現するsialyl Lewis 糖鎖は、血管内皮細胞が発現するE-selectinのligandであり、癌の血行性転移に関与していると考えられている。

一方、CEA産生癌は肝転移を来しやすいとする報告があるが、その機序は未だ明らかでない。我々はCEAの受容体が肝のkupffer細胞にあることから、CEAがKupffer細胞に作用することによりサイトカイン(IL-1 β , TNF- α)の産生を促し、これが血管内皮細胞を刺激し、E-selectinなどの接着分子を発現することにより、carbohydrate 抗原を発現しているような癌細胞の接着を容易にしているのではないかという仮説のもと、以下の検討を行った。

方 法

1. 細胞: ①BALB/cマウスの肝から、Kupffer細胞を採取。②ヒト臍帯静脈内皮細胞株(HUVEC)を血管内皮細胞として使用。③ヒト大腸癌細胞株2種(CaR-1: sialyl Lewis^a, COLO201: sialyl Lewis^xを発現)を使用した。

2. 薬剤: FR167653(IL-1 β , TNF- α の産生阻害剤)

3. 検討項目

①CEAを培養Kupffer細胞に添加し、CEA刺激によるIL-1 β , TNF- α の産生を検討(ELISA, RT-PCR)

②Kupffer細胞培養上清を培養HUVECに添加し、HUVECでのE-selectinの発現の解析(酵素抗体法)

③kupffer細胞培養上清で培養したHUVECと大腸癌細胞株の混合培養による接着率の測定(Plate法)

結 果

1. Kupffer細胞へのCEAの添加により、上清中のIL-1 β , TNF- α 濃度は5.5~8.1倍に増加した。また、FR167653の添加により、CEA刺激を行ってもこれらのサイトカインは産生が有意に抑制された($p < 0.01$)。RT-PCRによるIL-1 β , TNF- α のmRNA発現も同様の傾向を示した。

2. HUVECのE-selectinの発現はCEA添加群で認められ、さらにFR167653を添加することにより、その発現は抑制された。

3. ヒト大腸癌細胞株のHUVECへの接着率はCEA添加群で約4倍に上昇し、FR167653添加群で接着は有意に抑制された($p < 0.01$)。

考 察

今回の検討では、CEAの作用によるKupffer細胞からのサイトカイン産生が、血管内皮細胞の接着分子の発現を誘導し、結果として癌細胞と血管内皮細胞との接着が亢進した。

CEA ファミリー蛋白は糖含有量の多い糖蛋白で、その糖鎖には sialyl Lewis^x が存在する。CEA 産生大腸癌の肝転移形成のメカニズムとして、大腸癌細胞から分泌された CEA が肝の Kupffer 細胞を刺激することにより IL-1 β , TNF- α などの分泌を促し、これらのサイトカインが血管内皮細胞を刺激し、E-selectin を発現する過程が想定された。そこに sialyl Lewis^x などの carbohydrate 抗原を発現している大腸癌細胞が到達すれば、癌細胞が血管内皮細胞に接着しやすい微小環境が作り出されているものと考えられた。今回、対象とした接着因子は E-selectin のみであるが、他に ICAM-1 や VCAM-1 などの因子も知られており、これらの発現についての検討は今後の課題である。

本研究で、carbohydrate 発現大腸癌では CEA による Kupffer 細胞の刺激がサイトカインの分泌を促し、癌細胞の血管内皮細胞への着床を促進することが分かった。この事実を踏まえ、サイトカインの抑制などの工夫を行えば、大腸癌の肝転移防止の道も開ける可能性がある。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル：Role of Carcinoembryonic Antigen in the Progression of Colon Cancer Cells which Express Carbohydrate Antigen

1. 研究目的の評価

本研究は腫瘍マーカーとして知られてきた CEA が、転移の機序に直接関与すると考えられる E-selectin の発現に影響を及ぼす可能性を検討したものであり、研究の動機、目的、意図は明確である。

2. 研究手段に関する評価

CEA の標的細胞としてマウスの肝臓の Kupffer 細胞を選び、刺激後の培養上清サイトカイン活性を ELISA、RT-PCR で定量している。さらに E-selectin の発現誘導については HUVEC を用いて酵素抗体法で検出するとともに実際に接着能が亢進することを HUVEC を大腸癌と混合培養することで判定し、さらにその活性がサイトカイン産生阻害剤によって阻害されることを証明した。以上の研究手法は極めて妥当である。

3. 解析・考察・総合的な評価

本研究は、糖鎖発現大腸癌細胞が CEA を産生することで Kupffer 細胞から炎症性サイトカインの分泌を促し、そのサイトカインによる血管内皮細胞の E-selectin の誘導を介して、血管内皮への接着性を亢進させるという機構を初めて明らかにしたものである。研究の独創性、将来の臨床への応用の可能性の点から大いに評価できる。審査委員は全員一致で博士（医学）の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主 査 教 授 松 山 俊 文
副 査 教 授 綾 部 公 懿

副 査 教 授 近 藤 宇 史

多 田 誠 一

(福岡県)昭和42年 5 月17日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Energetic Advantage of Phosphodiesterase III inhibitors in the Failed Heart after Global Ischemia

(全般的虚血後不全心における Phosphodiesterase III 阻害剤のエネルギー効率改善効果)

多田誠一、江石清行、野口 学、迫 史朗、岩松みよ子、谷口真一郎

ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA

長崎大学医学部心臓血管外科教室

(主任：江石清行教授)

論文内容の要旨

緒 言

Phosphodiesterase III 阻害剤(PDE III I)に関して臨床上、local ischemia としての不全心での左室圧容積関係による分析は行われてきたが、global ischemia のもとの PDE III I の効果は実証されていない。今回、麻酔犬における心室細動誘発不全心にて milrinone と olprinone のエネルギー効率改善効果を左室圧容積関係から心室動脈整合条件より検討した。

材料及び方法

雑種成犬にて全身麻酔下に、心尖部より conductance カテーテル及び microtip 圧カテーテルを挿入、肺動脈にルートを確保し、使用する PDE III I により MIL(milrinone) 群(n=7)と OLP(olprinone) 群(n=7)に分類した。薬剤投与前に左室圧容積関係(PVR)を測定し、心室細動(VF)1分持続後、除細動し1分後及び30分後に PVR 測定、MIL 群は loading dose として 50 μ g/kg 10分注入し、0.25 μ g/kg/min 20分注入後 PVR 測定、続いて 0.5 μ g/kg/min 20分注入後 PVR 測定、同様に 0.75 μ g/kg/min 20分注入後 PVR を測定した。続いて高濃度注入下での VF 1分後除細動し1分後 PVR を測定した。OLP 群も同様に 10 μ g/kg 5分注入し、以後 0.1, 0.2, 0.3 μ g/kg/min の注入後及び高濃度注入 VF 1分後 PVR 測定した。PVR 分析にて E_{max}(収縮期末エラストナス), E_d(実効動脈エラストナス), E_a/E_{max}(心室動脈整合条件), PRSW(心仕事量拡張期末容積関係)から心筋エネルギー効率を検討した。群内での経時的変化は repeated measures ANOVA, 対応項目に関しては two tailed paired t test, 群間の平均値に関しては two tailed unpaired t test を用い、p<0.05を有意とした。

結 果

薬剤投与前 PVR 測定では全項目で両群間の有意差

はなかった。群内での repeated measures ANOVA による全経過での経時的解析では MIL 群の心拍数と収縮期末圧のみ有意差を認めなかった。群間比較では心拍数、収縮期末圧、Ea で有意差はなかった。Emax は群間比較では高濃度持続投与下の VF にて MIL 群が有意に高値を示した。Ea/Emax は群間の有意差はなく、コントロールの状態と VF30分後では群内の有意差はなかったが薬剤投与前 VF と高濃度投与下 VF では MIL 群は46.5%($p=0.01$)、OLP 群は45.3%($p=0.028$) 前値に比較して有意に低下した。Ea/Emax 平均値で見ると MIL 群は投与前で1.73、VF 後2.15へ悪化し投与で VF30分後に比較し濃度依存性に改善し高濃度投与下で0.73まで低下しその後の VF 後でも1.15を維持した。OLP 群では投与前で1.74、VF 後2.47へ悪化し投与で VF30分後に比較し濃度依存性に改善し高濃度投与下で0.71まで低下しその後の VF 後では1.36を維持出来た。

考 察

PDEⅢI は陽性変力作用及び血管拡張作用を有するが、この有効性を収縮期末エラストランスと実効動脈エラストランス即ち心臓と血管の両側より分析できる左室圧容積関係を使用したことは合理的といえる。また人工心肺下での VF では global ischemia は起こせないが冠血流を落とすことで可能となる。1分の VF を人工心肺未使用で行った場合除細動後、安定した一過性の global ischemia を誘発でき、実験方法として採用した。Emax は高濃度持続投与下での VF で OLP より MIL で有意に高値を示したが Ea では有意差を認めなかった。Ea/Emax は1で外的仕事は最大になり0.5で機械的効率が最大と考えられるが、結果より心室細動誘発不全心において心室動脈整合条件から検討すると、心筋エネルギー効率は薬剤投与前の心室細動誘発不全心に比べ OLP 或いは MIL 使用下いずれでも有意に改善された。従って、全般的虚血後不全心のもとでは心室動脈整合条件からみると、PDEⅢI は有意なエネルギー効率改善効果を有することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル: Energetic Advantage of Phosphodiesterase Ⅲ inhibitors in the Failed Heart after Global Ischemia

1. 研究目的の評価

本研究は、global ischemia 後の心不全に対する phosphodiesterase Ⅲ阻害薬の有効性を検討したもので、研究目的は臨床的視点に基づいた明確なものである。

2. 研究手段に関する評価

雑種成犬14頭を用いて、心室細動により心筋の global ischemia を作成し、虚血後不全心のエネルギー効率を心室動脈整合条件 Ea/Emax を用いて解析した

もので、実験モデルおよび解析方法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

得られた実験結果より、論理的に分析・考証を行っており、全般的虚血後不全心のもとでは心室動脈整合条件からみると、phosphodiesterase Ⅲ阻害薬は有意なエネルギー効率改善効果を有することが示され、その臨床的意義は高く評価できる。

以上のように、本論文は虚血後急性心不全における、phosphodiesterase Ⅲ阻害薬の有効性を明らかにしたものであり、心臓外科領域の治療開発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 澄 川 耕 二
副 査 教 授 矢 野 捷 介
副 査 教 授 相 川 忠 臣

濱 崎 宏 明

(長崎県)昭和30年4月16日生

授与年月日 平成13年3月7日

主 論 文 The sympathetic nervous system promotes carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis by suppressing apoptosis and enhancing the growth kinetics of regenerating rat hepatocytes.

(四塩化炭素誘発肝障害において、交感神経系は肝細胞のアポトーシスを抑制し増殖を促進することで、肝硬変症への進展を促す)

濱崎宏明、中島正洋、内藤慎二、秋山祐里、大津留 晶、濱中洋一、許朝添、伊東正博、関根一郎

Journal of Gastroenterology (in press)

長崎大学医学部原研病理

(主任: 関根一郎教授)

論文内容の要旨

緒 言

肝障害において、過剰・不要な肝細胞は apoptosis により排除される。多くの成長因子やホルモンは、apoptosis を抑制して肝細胞の増殖を促進することが示されている。中でも norepinephrine は強力な肝細胞増殖の促進因子であり、肝細胞の Fas 誘導性 apoptosis は $\beta 2$ -receptor を介して抑制されることが知られていて、肝障害における交感神経の関与が示唆される。我々は、交感神経亢進モデルの SHR に、対照の WKY に比し四塩化炭素(CC14)誘発肝障害で肝硬変への進展が促進されることを見出し、交感神経系が慢性肝障害の増悪因子であることを報告している。本研究では交感神経系が肝硬変への進展過程で細胞レベルでいか

に影響するかを評価するため、交感神経活性の異なる SHR, WKY, 交感神経遮断 WKY の3群に CC14誘発肝障害を作成し、肝細胞の空胞変性と線維化, apoptosis 数, 細胞増殖に着目し病理組織学的に検討した。さらに、培養系での TGF- β 1 誘導 apoptosis に対する norepinephrine 作用を評価した。

材料及び方法

- 1) 8週齢雄性 SHR, WKY を用いた。交感神経遮断 WKY(WKY-T) は 6-OHDA (40mg/kg) 投与により作成した。SHR($n = 12$), WKY($n = 12$), WKY-T ($n = 9$) に CC14 を 0.2ml / 100g 週 1 回皮下注後 24 (各群 $n = 3$), 48 (各群 $n = 3$) 時間の肝を急性障害として、4 (各群 $n = 3$), 8 (3 SHR, 3WKY, 0 WKY-T) 週投与後の肝を慢性障害として評価した。
- 2) CC14肝障害は小葉中心域 3 視野 (200倍) の空胞化細胞の占める面積を、NIHImage analysis system で解析し算出した。線維化を観察するため渡銀染色を行った。
- 3) apoptosis の定量：肝組織を ApopTag により標識, NIHImage analysis system で解析し、小葉中心域 4 視野 (400倍) の平均陽性細胞数を算出した。
- 4) 増殖細胞の定量：肝組織を PCNA 免疫染色し、NIHImage analysis system で解析し、小葉中心域 4 視野 (400倍) の平均陽性細胞数を算出した。
- 5) WST-1 cell counting assay：肝細胞癌株 HepG 2 の norepinephrine 10^{-5} mol / l 添加群, 非添加群に各々 TGF- β 1 を 0, 1, 10ng/ml 添加後培養, 1 ($n = 4$), 3 ($n = 4$), 5 日目 ($n = 4$) の細胞数を WST assay により定量した。

結 果

- 1) 病理組織学的変化：CC14投与後24時間で肝小葉中心性の空胞変性は SHR, WKY, WKY-T の順に強くみられた。小葉中心域の macrophage/Kupffer cell の集簇は WKY, WKY-T で大きく、SHR では小さかった。CC14を4週間投与した慢性障害で、SHR にのみ portal-central, central-central の線維化を認め、8週間投与では SHR にのみ肝硬変への進展が観察された。
- 2) apoptosis 数は CC14投与後24時間と4週投与において WKY-T, WKY, SHR の順に多く、空胞変性の程度とは逆の傾向を示していた。apoptosis 細胞の macrophage/Kupffer cell による貪食像が観察された。
- 3) PCNA 陽性細胞は小葉中心域の空胞変性、非変性肝細胞、集簇 macrophage/Kupffer cell に認めた。陽性細胞数は急性、慢性障害ともに、WKY より SHR で多く、WKY-T では少なかった。
- 4) 肝細胞癌培養系で norepinephrine 非添加群では 10 ng/ml TGF- β 1 処理3, 5日目において細胞数は apop-

to-sis により減少したが、添加群では細胞数の減少が抑制された。

考 察

急性、慢性肝障害において、交感神経系が増悪因子であることが示唆された。SHR を用いる利点は、対照動物である WKY との比較において、無処置で交感神経亢進モデルとなることであるが、さらに交感神経遮断 WKY を作成し3群の比較を行った。PCNA 陽性肝細胞数は再生の指標で、肝障害と同様、交感神経亢進で促進されることが示唆された。逆に apoptosis 数は交感神経亢進状態で少なく、交感神経は apoptosis を抑制し、肝障害を増悪させることが示唆された。

CC14肝障害において肝細胞の apoptosis が誘導されることが報告されているが、その機序については不明である。TGF- β 1 は肝細胞の増殖抑制 apoptosis 誘導因子で、CC14肝障害再生の重要な時期に Kupffer cell に発現されることが示されている。今回、我々は肝細胞癌株において TGF- β 1 誘導 apoptosis が norepinephrine 添加により抑制されることを示した。組織中においては肝小葉中心域の apoptosis に起こる部に Kupffer cell 集簇や貪食像が観察され、SHR では Kupffer cell とともに apoptosis 数は減少する。CC14肝障害における apoptosis 誘導に、Kupffer cell での TGF- β 1 発現が何らかの役割を有し、norepinephrine はこれを抑制することで apoptosis 誘導は抑制するのかもしれない。

apoptosis による細胞消失は非常に短時間でおこるため、結果として組織障害過程を短縮することが知られている。CC14の4週投与では SHR のみ線維化がみられ、8週投与では SHR のみに肝硬変への進展を認めた。交感神経系による apoptosis 誘導の抑制は、慢性肝障害において炎症を遷延化し線維化を促進するのかもしれない。交感神経系は増殖促進、apoptosis 抑制とともに肝硬変への進展を促進することを示唆している。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル：The sympathetic nervous system promotes carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis by suppressing apoptosis and enhancing the growth kinetics of regenerating rat hepatocytes.

1. 研究目的の評価

本研究は交感神経系が肝硬変への進展過程にどのように影響するかを、四塩化炭素(CC14) 誘発肝障害を用いて組織細胞レベルで検索したものである。特に apoptosis 抑制による肝細胞増殖と線維化機構の解明を目指した目的は明確、かつ妥当である。

2. 研究手法に関する評価

交感神経亢進モデルである SHR, その対照の WKY, および WKY に交感神経遮断を行った WKY-T の3群のラットを用いて、CC14による急性及び慢性肝障害

を作成し、組織障害の程度や線維化，あるいは apoptosis や細胞増殖能の経時的変化を各群間で比較検討した。また，norepinephrine の肝細胞の増殖に対する影響も肝細胞癌培養細胞を用いて行った。対照の設定も適切で，研究方法および解析方法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

本研究では SHR においてのみ線維化が見られ，肝硬変への進展を示した。また，この進展機序には apoptosis 誘導の抑制が関与していることを示唆する知見も含まれており，肝硬変進展への交感神経系の関与とその機序について重要な示唆を与えるものとして，研究内容は高く評価できる。

以上のように，本論文は肝障害の肝硬変への進展因子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 田口 尚
副査 教授 小路 武彦
副査 教授 兼松 隆之

富田 雅人

(長崎県)昭和39年6月11日生

授与年月日 平成13年3月7日

主論文 Modulation by dietary restriction in gene expression related to insulin-like growth factor - 1 in rat muscle

Aging: Clinical and Experimental Research (in press)

(ラット骨格筋におけるインスリン様増殖因子関連遺伝子発現の食餌制限による修飾)

富田雅人，下川 功，樋上賀一，柳原一，太田くるみ，川原俊夫，田中賢治，池田高良，進藤裕幸

長崎大学医学部整形外科教室

(主任：進藤裕幸教授)

論文内容の要旨

緒言

加齢に伴い骨や筋肉が減少し，脂肪が増加するなど生体の構造に変化が生じる。このような変化の原因として，成長ホルモン(GH)や，その作用を仲介するインスリン様増殖因子(IGF-1)の分泌の加齢に伴う変化が，重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。齧歯類に食餌制限を行うと，加齢に伴う生理機能の低下や，様々な疾患の発症が遅延または抑制され，寿命が延長することが知られている。このような，食餌制限の抗老化効果のメカニズムの一つとして，GH-IGF系の役割が注目されている。本研究では，IGF-1の標的臓器の一つである骨格筋における IGF-1 関連

遺伝子発現の食餌制限による修飾について検討した。

材料及び方法

- 1) 動物：生後4週齢の雄 F344ラットを購入し，生後6週より，自由摂食群(AL)と，AL群の約70%に摂食量を制限した食餌制限群(DR)の2群に分け飼育した。ラットを断頭屠殺し血液，大腿四頭筋(QFM)，横隔膜を採取し液体窒素で凍結し-30または-80℃で保存した。
- 2) 血清 IGF-1 濃度の測定：血清 IGF-1 濃度を radio-immunoassay 法で測定した。
- 3) type 1 IGF receptor(IGFR)，insulin receptor substrate -1 (IRS-1)，IGF-1 mRNA 発現の測定：QFM 及び横隔膜から全 RNA を抽出し，IGFR，IRS-1，IGF-1 mRNA 発現量を，RT-PCR 法で測定した。
- 4) IGFR の免疫組織：QFM，横隔膜のパラフィン切片を作成し，抗 IGFR- β -subunit 抗体を用い免疫組織染色を行い，画像解析により陽性領域を定量化し in vivo における peptide IGFR 発現の加齢と食餌制限に伴う変化を検討した。

結果

- 1) 血清 IGF-1 濃度：DR 群では AL 群に比し 6 ヶ月齢で 34%，24 ヶ月齢で 39% 低下していた。しかしながら，AL 群 DR 群共に，6 ヶ月齢に比し 24 ヶ月齢での血清 IGF-1 濃度低下は見られなかった。30 ヶ月齢は 24 ヶ月齢に比し，わずかに低下していた。
- 2) IGFR mRNA の発現：横隔膜では，6，16 ヶ月齢で DR 群は AL 群より IGFR mRNA の発現量が多かった。DR 群では，IGFR mRNA の発現量は 6-30 ヶ月齢でほぼ一定だったが，AL 群では，16 と 24 ヶ月齢の間で約 2.8 倍の増加が見られた。QFM では，IGFR mRNA の発現量は，6，16 ヶ月齢で DR 群は AL 群より高い傾向が見られた。AL 群では，16 と 24 ヶ月齢の間で有意に増加していた。DR 群では 6-24 ヶ月齢で IGFR mRNA の発現量は，ほぼ一定だったが，30 ヶ月齢では，増加傾向が見られた。
- 3) IRS-1 mRNA の発現：DR 群において，横隔膜に於ける IRS-1 mRNA 発現量は 6-24 ヶ月齢でほぼ一定だった。AL 群では，6-16 ヶ月齢間で有意に上昇し，16-24 ヶ月齢間で有意に低下した。QFM では，AL, DR 群共に 6-24 ヶ月齢間で有意ではなかったが，上昇していた。DR 群では，24 ヶ月齢と 30 ヶ月齢の間で有意な低下が見られた。
- 4) IGF-1 mRNA の発現：横隔膜，QFM において，加齢，食餌制限による IGF-1 mRNA 発現の有意な変化はなかった。
- 5) IGFR の免疫組織：陽性染色は，筋細胞の辺縁で見られた。横隔膜に於ける IGFR 染色陽性領域は，AL 群では，加齢による変化は見られなかった。DR

群では、6ヶ月齢でAL群より陽性領域は、大きかった。

考 察

我々は、食餌制限は6、16ヶ月齢でIGFR mRNA 発現量を増加することを示した。この結果は、他の研究者が報告したIGF-1 binding analysisの結果と一致していた。IGF-1は結合組織にも結合するため、この変化は筋肉組織内の、結合組織の増加による可能性がある。筋肉組織切片を用い、免疫染色画像解析にてIGFRの半定量化を行った。この結果も、筋細胞辺縁において食餌制限によるIGFR発現増加が見られた。加齢によって筋線維の組成が変化する可能性があり、この変化がIGFR mRNA発現の増加の原因かもしれない。食餌制限によって血清IGF-1濃度は低下するが、筋肉の組成と収縮能は、食餌制限によって変化しないと報告されている。我々は、食餌制限は、細胞表面に発現しているIGFRの数を増加させることによって、組織のIGF-1感受性を亢進させていると考えた。本研究で、24ヶ月齢のAL群で、IGFR mRNA発現が有意に増加していたが、免疫染色では、peptide IGFR発現は、加齢によって増加しなかった。この変化は、mRNAとpeptide IGFRのturnoverの加齢に伴う変化の結果と考えた。IGFRの細胞内刺激伝達において、重要なIRS-1 mRNA発現がDRによって保たれていた。加齢に伴い血清中のIGF-1は低下するものの、筋肉局所のIGF-1産生は維持されていた。このことは、細胞機能の維持に役立っている可能性がある。食餌制限は、IGF-1の全身性の効果を低下させるが、局所における産生を維持している。更なる研究が必要だが、食餌制限は、血清IGF-1濃度は低下させ発癌等のリスクを低下させるが、IGF-1の作用が不可欠な部位では、IGF-1に対する組織の反応性や、局所に於けるIGF-1産生を維持することによって、IGF-1の作用を維持している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル：Modulation by dietary restriction in gene expression related to insulin-like growth factor-1 in rat muscle

1．研究目的の評価

本研究は、食餌制限に伴う寿命延長に関与することが知られるインスリン様増殖因子(IGF-1)とその標的臓器の一つである骨格筋でのIGF-1関連遺伝子発現への食餌制限による効果を検討したもので研究目的として妥当である。

2．研究手法に関する評価

食餌制限モデルとしてF344ラットを用い、その自由摂食群と食餌制限群間で、大腿四頭筋(QFM)と横隔膜に注目して免疫組織化学的及び分子生物学的手法

にて解析したもので、研究手段・方法共に妥当である。

3．結果・考察の評価

寿命延長をもたらす食餌制限群での血清IGF-1濃度の低下と、骨格筋の機能維持に必要と思われるIGF-1への筋組織の感受性亢進が示され、IGF-1の必要局所での作用維持機構の存在を明らかにした点、これらの研究結果と考察内容は高く評価できる。

以上のように、本論文は食餌制限による寿命延長効果におけるIGF-1作用の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主 査	教 授	小 路 武 彦
	副 査	教 授	田 口 尚
	副 査	教 授	近 藤 宇 史

吉 田 雅 文

(長崎県)昭和38年9月26日生

授与年月日 平成13年2月28日

主 論 文 Urinary sodium/potassium ratio and prevalence of hypertension in two communities of different historical origin in Ohshima Island, Nagasaki, Japan.

(長崎県大島の歴史的経緯の異なる2つの集団における尿中Na/K比と高血圧症有病率)

吉田雅文、小山 洋、青柳 潔、門司和彦、竹本泰一郎

Ecology of Food and Nutrition 39巻 183-198 2000年

長崎大学医学部公衆衛生学教室

(主任：竹本泰一郎教授)

論文内容の要旨

緒 言

一般に、生鮮食品はナトリウム(Na)に比してカリウム(K)の含量が多く、そのNa/K比は1以下である。食品の加工・調理時及び摂取に際して食塩が添加されると、Na/K比は上昇する。地域人口における食塩摂取量や尿中Na/K比が地域社会の形成経緯や都市化の進展状況などによる食習慣の状態と関係していることが報告されている。また、食塩摂取量が多く尿中Na/K比が高くなると血圧は上昇することも報告されている。

本研究では、小さな島内で、同じ自然環境下で生活しているが、歴史的経緯の違いにより食習慣が異なる2つの集団について尿中Na/K比と高血圧症有病率を比較した。

対象と方法

対象地域は長崎県の東シナ海に位置する沿岸小島嶼

(長崎県大島町)である。この島の西側地区は、16世紀半ばに本土からの移住によって創設された居住地であり、伝統的な農漁業地域である。1936年、島の南東部に炭坑が開坑され、数千人の労働者が島外より移住し島の東側地区に炭坑労働者とその家族の居住地区を形成した。開坑前の人口は3,700人であったが、炭坑の最盛期には20,000人まで増加した。1970年、炭坑が閉山となると東側地区の住民の多くは島を去った。その後、造船所が誘致されたものの人口は減少を続け、調査時の人口は約7,000人であった。公衆衛生学教室が同島で継続的に行っている現地調査によると、島内出生者は西地区では約8割であったのに対し、東地区では約3割だった。西地区は農漁業を主体としているのに対し、東地区はほとんどが造船所の労働者及び炭坑離職者であった。食習慣調査でも西地区は自作の米を食べる回数が多く、魚の自給率も高かった。一方、東地区は主に現金により食品を入手していた。

対象者は1986年から1990年に実施した健康調査に参加した40歳以上の西地区の男性207名、女性345名、東地区の男性257名、女性396名の計1,205名である。健康調査は毎年6-7月に実施している。本研究では以下の項目について検討を行った。①身長、体重を測定し、BMI(kg/m^2)を算出した。②高血圧の受療状況を聞き取ると共に、水銀血圧計を用いて5分間の安静後、座位で標準法にて右腕の血圧を測定した。高血圧治療中の者と血圧値 $160/95\text{mmHg}$ の者を高血圧症と定義した。③早朝第一尿についてナトリウムとカリウム濃度を炎光光度計 (Model 480, Corning) で測定した。測定に際してはリチウム内部標準法を用い、10検体毎にキャリブレーションを行った。

結 果

1. 身長、体重、BMI は、東西地区間でほとんど差を認めなかった。
2. 西地区の男性35名 (16.9%)、女性85名 (24.6%)、東地区の男性49名 (19.1%)、女性75名 (12.1%) が高血圧治療中であった。また、血圧が $160/95\text{mmHg}$ の高血圧者は西地区の男性33名 (15.9%)、女性48名 (13.9%)、東地区の男性44名 (17.1%)、女性59名 (14.9%) であった。両地区とも高血圧症有病率は男女とも加齢によって高率化していたが、東西地区間での有意差は認められなかった (西地区36%、東地区35%)。
3. 尿中 Na/K 比は、50歳代の男性を除くほとんどの年齢層で東地区が西地区より高値だった。また、全体の平均値も男女とも、東地区の比 (男性5.2、女性4.8) が西地区の比 (男性4.2、女性4.4) より有意に高値だった。男女差は両地区とも認められなかった。

4. 高血圧治療中の者を除いて、尿中 Na/K 比と血圧間には収縮期血圧 ($r=0.11$, $p=0.0004$)、拡張期血圧 ($r=0.10$, $p=0.0014$) とともに有意な相関が認められた。

考 察

1. 早朝スポット尿中 Na/K 比は、24時間尿中 Na/K 比とよく相関することが報告されている。本研究では、尿中 Na/K 比は東地区で西地区に比して有意に高く、特に東地区の高齢者では高値だった。日本人の場合、漬物、味噌汁、醤油の使用によって食塩 (ナトリウム) 摂取が増加し、新鮮野菜の摂取によってカリウムの摂取が増加するといわれている。本研究での Na/K 比の地区差についても食習慣の差異がまず考えられる。特に東地区でカリウムの摂取が少なく、ナトリウムの摂取が多いことは都市的生活様式の進展を物語っている。更に、これらの地区の形成の歴史的経緯の相違によることも考えられる。すなわち東地区の炭坑労働者ではかつて、熱い労働環境での重労働が行われ発汗により起こる熱中症防止のため、水分と食塩の補充が指導され、味噌汁の摂取が推奨された。旧炭坑地である東地区の尿中 Na/K 比の高値は、この高食塩摂取習慣が関係していると考えられる。
2. 高血圧の有病率は西地区36%、東地区35%であった。血圧値 $140/90\text{mmHg}$ (境界域高血圧) も高血圧として分類すると高血圧有病率は西地区58%、東地区56%となり、報告されている広島、ハワイ、ロサンゼルス在住日本人の有病率を上回っていた。理由については現段階では不明であるが、高血圧症の誘因と考えられている喫煙、肥満、アルコール消費、身体活動等の因子について今後の検討が必要と考えられる。
3. 尿中 Na/K 比と高血圧症間の関連については、大規模な国際比較研究 (INTERSALT 研究) でも、相関性が集団によって異なる。本研究では尿中 Na/K 比は高血圧とは有意な相関が認められたが、尿中 Na/K 比が有意に異なる地区間に高血圧有病率に差異は認められなかった。尿中 Na/K 比と血圧との直線的な関連が、ある範囲内でしか成立していない可能性がある。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル：長崎県大島の歴史的経緯の異なる2つの集団における尿中 Na/K 比と高血圧症有病率

1. 研究目的の評価

本研究は、同じ自然環境下で生活しているが食習慣が異なる2つの地域集団について尿中 Na/K 比と高血圧症有病率を比較検討するもので、目的は十分に妥当である。

2. 研究手法に関する評価

地域住民1,205名を対象に、尿中 Na/K 濃度の測定による Na/K 比とともに、血圧、高血圧有病率を統計的手法により解析したもので、研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

食習慣が異なる2つの集団間に、尿中 Na/K 比に有意な差が認められた。しかし、高血圧症有病率には有意な地域差が認められず、尿中 Na/K 比との間にも有意な関連が認められなかった。これらの結果は、地域住民の平均血圧との比較など、地域における高血圧症予防のための尿中 Na/K 比の意義を新たに提言したもので高く評価できる。

以上のように本論文は地域における高血圧症有病率と食習慣、特に尿中 Na/K 比との関連の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主 査 教 授 齋 藤 寛
副 査 教 授 矢 野 捷 介
副 査 教 授 柴 田 義 貞

田 中 公 朗

(福岡県)昭和26年10月8日生

授与年月日 平成13年 2 月28日

主 論 文 Role of arterial blood supply in orthotopic whole and partial liver transplantation in the rat

(ラット同所性全肝及び部分肝移植における肝動脈血流の役割)

田中公朗, 兼松隆之

Acta Medica Nagasakiensia 45: 39-43, 2001

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

現在、肝移植は重症肝疾患に対する有効な治療法として広く世界に普及している。本邦ではドナー肝入手困難のため、生体部分肝移植や分割肝移植が肝移植治療の中心となっている。また肝臓移植成績の向上は効果的免疫抑制剤の登場と周術期合併症の低下に負うところが大きい。しかし早期合併症のなかでも肝動脈閉塞は肝移植の致命的合併症となる。従来、鎌田等の開発したラット肝移植実験モデルは動脈再建を行わないが、我々はスリーブ法による比較的容易かつ確実な肝動脈再建術を考案した。本術式をラット全肝移植及び部分肝移植に応用して、肝動脈血流のグラフト肝への役割を検討した。

材料と方法

体重250 g から300 g の純系ラットを用いて同所性肝臓移植を施行し、移植肝重量差と肝動脈再建の有無により以下の4群に分けた。Group I (n = 10): 全肝移植と肝動脈再建なし, Group II (n = 10): 30%部分肝移植と肝動脈再建なし, Group III (n = 10): 全肝移植と肝動脈再建あり, Group IV (n = 10): 30%部分肝移植と肝動脈再建ありとした。肝動脈再建群は術後14日と28日に各1頭ずつ、100日以上長期生存群は各3頭ずつを犠牲死させ、腹腔動脈よりの色素注入、あるいは血管造影により肝動脈開存の有無を検討した。また肝移植術後、尾静脈より経時的に採血を行い血清 GOT と T.Bil 測定により術後肝機能を評価した。いずれの群も合併症を注意深く観察し、剖検や犠牲死により肝臓を組織学的に検討した。

結 果

1. 40対のラット肝移植において、肝上部大静脈吻合部よりの出血死が全肝移植群で1例、部分肝移植群で4頭あったが、肝動脈吻合部よりの出血死はなかった。また Group II 群において2頭が術後4日と5日に胆汁性腹膜炎で死亡した。
2. スリーブ法による肝動脈再建後の動脈開存率は Group III, IV 群とも100%であった。
3. 肝機能は Group I, II 群では血清 GOT および T. Bil の異常値が4週間まで遷延するのに対して Group III, IV 群は早期から正常値に復帰した。特に術後2週目の T.Bil では Group II 群と IV 群間に有意な差を認めた。
4. Group I, II 群では10頭中9例と6例が100日以上生存した。しかし、これら長期生存例において、剖検時に胆管拡張や胆泥貯留などの胆道合併症が著明に認められ、Group I, II 群の胆道系合併率は60%と71%であった。対して Group III, IV 群の長期生存例の胆道合併症は極めて軽度であった。
5. 組織学的には Group I, II 群はグリソン鞘内の胆管増生が著明であり、グリソン鞘内の動脈開存は認められなかった。特に II 群では、術後一週間という早い時期より胆管増生が認められた。それに対して肝動脈再建群ではグリソン鞘内の肝動脈、門脈、胆管構造が術後早期、後期ともに正常に維持された。

考 察

脳死全肝移植開始以来、胆道合併症については多くの報告がなされ、対策もほぼ満足なものとなってきた。しかし近年、小児を対象とすることが多い生体部分肝移植では胆道合併症は再び重要と考えられている。今回のラット肝移植実験においても、全肝移植に比べて部分肝移植では移植後の血清 GOT および T.Bil の正常値への回復は遅く、胆道合併症の発生率も高かった。

従来ラット肝移植では肝動脈の再建は大網動脈より血管新生がおこるため不要とされてきた。しかし、我々の行ったラット全肝及び部分肝移植では、肝動脈再建により、肝臓の間質細胞のみならず肝細胞の機能がほぼ正常に維持されることが示された。全肝移植に比べ、サイズダウンされた部分肝移植では移植肝への侵襲も大きい。通常のラット70%肝切除では二週間後には切除肝は術前重量に復する。故にラット部分肝移植においても術後二週間の肝再生を促進させることは重要である。部分肝移植では旺盛な肝再生時期に胆道系の重篤な合併症を未然に予防すること、すなわち胆管系組織構築を維持するためには、肝移植術後早期の動脈血 flow の維持が不可欠と考えられた。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル：ラット同所性全肝及び部分肝移植における肝動脈血流の役割

1. 研究目的の評価

本研究は、肝移植に於ける肝動脈再建の重要性を明らかに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

純系ラットを用いて同所性の全肝または30%部分肝移植を行い、それぞれ肝動脈再建を行う群と行わない群を作成し、肝動脈の開存率、累積生存率、胆道合併症、肝機能の経時的推移、移植肝の組織学的検討を行ったもので、研究手法も妥当である。

3. 解析・考察の評価

上記手法で解析した結果、肝移植における肝動脈血流が胆管系組織構築の維持に重要であることを明らかにしたもので今後の肝移植研究への進展が大いに期待される。

以上のように本論文は肝移植における移植肝の組織構築、機能の維持の解明に貢献するところ大であり、審査委員は全員一致で博士（医学）の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 綾部 公認
副査 教授 関根 一郎
副査 教授 江石 清行

阿部 航

(大分県) 昭和41年11月14日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Th1-Th2 Cytokine Kinetics in the Bronchoalveolar Lavage Fluid of Mice Infected with *Cryptococcus neoformans* of Different Virulences
(実験的クリプトコッカス感染マウスの肺胞洗浄液中サイトカインの動態について)

Koh Abe, Jun-ichi Kadota, Yuji Ishimatsu, Tetsuji Iwashita, Kazunori Tomono, Kazuyoshi Kawakami, and Shigeru Kohno
Microbiology and Immunology
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

近年、免疫学の分野でサイトカインのバランスが種々の病態を惹起しているとの報告が相次いで報告されており、感染症の分野でも種々の報告がなされている。サイトカインは大別して2群に分けられ Th1 サイトカインといわれる IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18 などと、対して Th2 サイトカイングループといわれる IL-4, IL-5, IL-10 などがある。近年エイズの増加が全世界的問題となっており、エイズ患者の発病後の感染症のコントロールは課題である。なかでも肺結核、非定型抗酸菌症、リンパ増殖性疾患、カポジ肉腫などと並び真菌症も重要な課題となっており、その診断、治療もさることながら、発症予防の点からワクチンや免疫療法などの開発が急務である。我々はサイトカインの働きに着目してクリプトコッカスの感染経路の主要部分である肺局所における感染免疫機構を明らかにしようと試みた。

対象と方法

我々はマウスを対象とした肺クリプトコッカス感染症の実験系を作成し、クリプトコッカスの毒力の差異がマウスの免疫系に与える作用をサイトカインの面から検討した。実験モデルは BALB/c マウスに経気管支的にクリプトコッカス生菌を注入し、これを経時的に肺胞洗浄を施行し得られた肺胞洗浄液中サイトカインを Th1 である IFN- γ , Th2 である IL-4 についてそれぞれ測定した。測定方法は市販の Amersham 社製 ELISA kit を使用した。

結果と考察

強毒株をマウスに注入した後、経時的に観察を続けると大体感染後23日目からマウスは死亡し始め、最終的に28日目までには全例死亡した。対して弱毒株注入群は死亡することなくほぼ全例生存していた。この期間の肺胞洗浄液中クリプトコッカス菌数を計測すると強毒株、弱毒株ともに注入後から肺局所で増殖を始めるが、感染後14日目から強毒株群はさらに増加していくのに対して弱毒株群では菌数の減少が認められた。つまり感染後早期に、二群間に免疫応答の差異が生じたことが示唆された。同様に肺胞洗浄液中の細胞成分にもそれぞれ特徴が認められた。強毒株注入群で感染後7日目に好中球の著しい増加が認められた。対して弱毒株注入群は14, 21日目にリンパ球の増加が認めら

れた。また強毒株注入群でも感染後期になってリンパ球が増加しているのが観察された。以上からは免疫応答は感染早期から始まり7, 14日目にはある程度の方向を決定しているのではと考えられた。

ついでサイトカインについて検討を行った。強毒株注入群ではTh 2 サイトカインであるIL-4 が著しく増加していた。これは特に感染後7, 14日目にかけてが顕著であった。対して弱毒株注入群では感染後7, 14日目にTh 1 サイトカインであるIFN- γ が増加していた。この結果から菌の毒力の差によって宿主は異なる反応を示すことが理解された。さらに全例死亡している強毒株群で感染早期からTh 2 サイトカインであるIL-4 が著しく増加しており、細胞性免疫を司るリンパ球の増加が早期には認められなかったのに対して、全例生存する弱毒株群で感染早期からTh 1 サイトカインであるIFN- γ が増加しており、これと同時期にリンパ球も増加していた。以上から感染の重要な経路の一つである肺局所で、生体防御機構の初期に肺胞マクロファージが貪食作用を働かせ、抗原提示細胞として機能していくが、この感染免疫が成立していく中で菌側がなんらかの作用で宿主側の免疫応答をTh 2 サイトカインに誘導することが、生体防御機構を破綻させる重要な働きをしていると考えられた。

結 語

クリプトコッカス感染後に宿主の免疫応答がTh 2 に傾くことで致死的な結果を生じることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

1. 研究目的の評価

本研究は臨床で見られたクリプトコッカス症の感染免疫機構を解明する目的でその感染におけるサイトカインの動態を経時的に追跡したものでありその研究の動機、目的、意図は明確である。

2. 研究手段に関する評価

クリプトコッカス症のマウスモデルを作製し、毒性に差のあるクリプトコッカスの経気管支的な投与によって肺胞洗浄液中に出てくる細胞の解析、サイトカイン量の測定をおこなった研究手法は妥当である。

3. 解析、考察、総合的な評価

致死性の感染を引き起こすクリプトコッカス強毒株では肺胞洗浄液中に出てくるサイトカインがTh 2 型に誘導されていることを示し、菌が宿主免疫応答を破綻させる経緯を明らかにしたことは大いに評価できる。審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主 査 教 授 松 山 俊 文
副 査 教 授 永 武 毅
副 査 教 授 大 園 恵 幸

測 上 健 吾

(佐賀県) 昭和37年 4 月 2 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Absolute Number of Circulating CD34 + Cells is Abnormally Low in Refractory Anemias and Extremely High in RAEB and RAEB-t; Novel Pathologic Features of Myelodysplastic Syndromes Identified by Highly Sensitive Flow Cytometry

(末梢血液中のCD34陽性細胞数是不応性貧血(RA)において異常に低く、RAEBとRAEB-tでは著しく高値である；骨髓異形成症候群において、高感度フローサイトメトリー法により新たに判明した病態)

測上健吾, 森 弘行, 松尾辰樹, 岩永正子, 長井一浩, 栗山一孝, 朝長万左男
Leukemia Research 24巻, 163-174頁, 2000年

長崎大学医学部原研内科教室

(主任：朝長万左男教授)

論文内容の要旨

緒 言

CD34抗原は造血幹細胞・前駆細胞に発現しており、その有力なマーカーとされている一方、種々の白血病の病的芽球にも認められる。また、CD34陽性細胞は末梢血中にも存在するがその数は極めて少なく、従来は正確な測定は困難であったが、CD34, CD45とpropidium iodide (PI) による三重染色を行いフロー・サイトメトリー法で測定することにより、極少数のCD34陽性細胞を正確に測定することが可能となった。我々は、造血幹細胞疾患である骨髓異形成症候群(MDS)と再生不良性貧血(AA)における末梢血中のCD34陽性細胞数を測定し、正常コントロールと各疾病間、MDSの病型間による差異が認められるかを検討し、さらにCD34がMDSの予後因子となり得るかどうかを検討した。

対象と方法

MDS41例(RA27例, RARS 1 例, RAEB 6 例, RAEB-t 3 例, CMML 4 例), AA12例(重症11例, 中等症, 1 例) 正常コントロール36例を対象とした。末梢血液中のCD34陽性細胞数の測定は、フロー・サイトメトリー法(FACScan, ベクトン・ディッキンソン社製)により全血法にて測定した。極めて少数の末梢血中のCD34陽性細胞を正確に測定するためには、死細胞、デブリス等による非特異的陽性反応を取り除く必要がある。CD45は全白血球分画で陽性となり、propidium iodide (PI) は死細胞に染色される。また、CD34陽性

造血幹細胞, 前駆細胞は CD45 を弱く発現するとされている。そこで, PE 標識抗 CD34 抗体, FITC 標識抗 CD45 抗体, PI にて三重染色を行い, CD45(+)PI(-) 領域を分母 (白血球領域) とし, CD45(dim+)CD34(+)PI(-) 領域 (白血球中の真の CD34 陽性細胞) の比率を求めた。その結果に白血球数を掛け合わせ, 末梢血 11 中の CD34 陽性細胞数を算定した。

結 果

- (1) 正常人の末梢血 CD34 陽性細胞数は $0.81 \pm 0.35 \times 10^6 / 1$ (mean $\pm$ SD) であった。AA の CD34 陽性細胞数は $0.39 \pm 0.73 \times 10^6 / 1$ と正常人と比較して有意 ($P < 0.001$) に低値であったが, 治療に反応した例では一過性に高値 ($> 2 \times 10^6 / 1$) となる例もあった。MDS の末梢血中の CD34 陽性細胞数は病型により大きく異なった。RA では $0.21 \pm 0.29 \times 10^6 / 1$ と正常人に比してきわめて低値 ($P < 0.001$) であったのに対し, RAEB ($46.54 \pm 71.37 \times 10^6 / 1$) と RAEB-t ($57.00 \pm 52.36 \times 10^6 / 1$) では著明に高値であった ($P < 0.001$)。RA で CD34 が高値であった 1 例は後に RAEB に移行した。CMML の CD34 陽性細胞数は中等度の増加 ($3.69 \pm 4.64 \times 10^6 / 1$) を示した。
- (2) MDS 全体で, 骨髄および末梢血中の芽球パーセンテージと末梢血中の CD34 陽性細胞数との相関を検討した。骨髄では, 芽球 4% 以上と未満の群に分けると, 4% 以上の群は有意 ($P < 0.001$) に高値であった。末梢血では, 芽球を 1% 以上認めた例では CD34 陽性細胞数は極めて高値 ($> 10 \times 10^6 / 1$) であった。さらに, MDS では染色体異常のある例では, 高値 ($31.21 \pm 57.46 \times 10^6 / 1$) となり, international prognostic scoring system (IPSS) にあてはめると, 高悪性度群ほど高値を示した。
- (3) Cytogram 上で CD34 陽性細胞の出現領域を検討した。正常人と MDS の RA では CD34 陽性細胞は小型細胞領域 (リンパ球領域) に認められたのに対し, RAEB と RAEB-t では大型細胞領域 (芽球領域) に認められた。
- (4) MDS において, 末梢血 CD34 陽性細胞数が予後因子となるかを検討した。単変量解析では, CD34 高値 ($> 1 \times 10^6 / 1$) は予後不良因子であった ($P = 0.009$)。FAB 分類 ($P = 0.008$), 骨髄芽球パーセント ($P = 0.002$), IPSS 分類 ($P < 0.001$) にても有意差を認めた。染色体異常との関連では, 複雑な染色体異常を有する例が予後不良となる傾向を認めたが, 有意差は認められなかった。多変量解析では, CD34 陽性細胞数 ($P = 0.016$), 骨髄芽球パーセント ($P = 0.034$) のみが有意であった。

考 察

CD34, CD45 と PI による三重染色を行いフロー・

サイトメトリー法で測定することにより, 末梢血中の CD34 陽性細胞数を定量的に検討することが可能となった。AA では, 末梢血 CD34 陽性細胞数は末梢血所見が正常化した例も含め有意に低値であった。AA では, 病初期のみならず治療が奏功し末梢血所見が改善していても, 幹細胞レベルでの回復は充分でない可能性が示唆された。MDS では, 末梢血 CD34 陽性細胞数は病型により大きく異なっていた。RAEB/RAEB-t では全例高値であったのに対し, RA では正常人と比しても著明低値であった。骨髄中芽球比率が高い例, 末梢血に芽球が出現している例では末梢血 CD34 陽性細胞数が高値であったこと, Cytogram 上で RAEB/RAEB-t では芽球領域に CD34 陽性細胞が認められたこと等から, RAEB/RAEB-t では, 末梢血中に存在する病的芽球表面の CD34 を検出している可能性がある。RA において末梢血 CD34 陽性細胞が減少している機序は不明だが, 骨髄中の MDS クローンによる正常造血の抑制を反映していると考えられる。今回の結果より, RA は末梢血 CD34 陽性細胞数を測定することにより他の病型と区別できることが示唆された。また, 末梢血 CD34 高値例は予後不良であり, MDS では, 末梢血 CD34 をモニタリングすることが, 白血病への移行を早期に検知する上でも重要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

学位論文のタイトル: 末梢血液中の CD34 陽性細胞数は不応性貧血 (RA) において異常に低く, RAEB と RAEB-t では著しく高値である

1. 研究目的の評価

本研究は, 造血器疾患の中でも病態解明が遅れている骨髄異形成症候群 (MDS) の病態を末梢循環 CD34 陽性細胞数の動態から明らかにしようとするもので, 幹細胞疾患の研究として高く評価できる。

2. 研究手法に関する評価

モノクロとフロー系を応用した triple-color flow cytometry 法にて, CD34 陽性細胞を高感度かつ客観的に評価し, 同時に臨床のパラメーターとの関連性を検討した研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

FCM 法による CD34 陽性細胞数の高感度算定法を確立し, 本法によって得られた結果から MDS の新たな病態解釈の展開を可能にし, 同時に白血病転化のバイオマーカーになることを考察・提示したもので, 高く評価できる。

以上のように, 本論文は造血幹細胞疾患の代表的な MDS の病態の解明と MDS から白血病への進展の可能性を早期に予知できることを示したもので, 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 上 平 憲
副 査 教 授 綾 部 公 懿
副 査 教 授 近 藤 宇 史

齋 藤 あゆみ

(香川県) 昭和40年11月 5 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Two Nonsense Mutations of PAX 6 in Two Japanese Aniridia Families: Case Reports and Review of the Literature

(日本人の先天無虹彩 2 家系における PAX 6 遺伝子の 2 つのナンセンス突然変異 : 症例報告と文献的考察)

Ayumi Kondo-Saitoh, Naomichi Matsumoto, Tohru Sasaki, Masayuki Egashira, Akira Saitoh, Koki Yamada, Norio Niikawa, Tsugio Amemiya

Eur J Ophthalmol ; 10 : 167-72 , 2000

長崎大学医学部眼科学教室

(主任 : 雨宮次生教授)

論文内容の要旨

緒 言

先天無虹彩 (aniridia) は常染色体優性遺伝で、発症頻度は64,000-96,000人に一人とされる稀な疾患である。現在までに多数の家族例および孤発例の症例報告がある。本疾患は、虹彩のみならず、角膜、前房、隅角、水晶体、網膜、視神経等の異常も伴う。本症は染色体11p13に局在するヒト PAX 6 遺伝子の変異が原因であることを1992年に Glaser らが報告した。本研究は、先天無虹彩と診断された長崎大学病院眼科の 4 家系における PAX 6 遺伝子の解析に関するものである。この 4 家系中 2 家系に同遺伝子の 2 種類のナンセンス変異を同定し、これまでに報告されたヒト PAX 6 遺伝子の変異と比較検討した。

対象と方法

- 1) インフォームドコンセントを得たのち、先天無虹彩 4 家系 (Family 1 , 2 , 3 , 4) より、それぞれ先天無虹彩の患者計 5 名および Family 1 で先天無虹彩を認めない健常者 1 名の末梢血リンパ球より DNA を抽出した。
- 2) PAX 6 遺伝子蛋白翻訳領域を完全にカバーする全エクソン14個を、それぞれ PCR (polymerase chain reaction) 法にて増幅し、得られた DNA 断片を SSCP (single strand conformation polymorphism) 解析を用いてスクリーニングした。
- 3) SSCP にて変異の疑われたエクソンを、プラスミドベクターを用いてクローニングし、オートシーケンサーにてその塩基配列決定を行った。

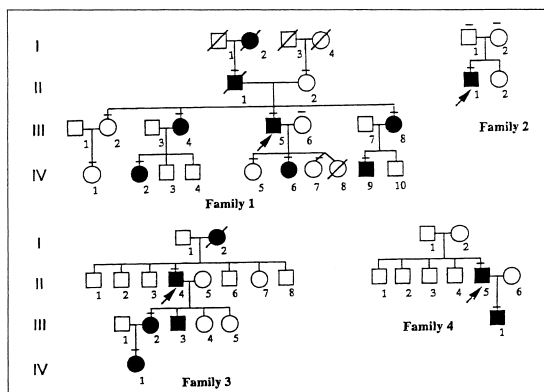
結 果

Family 1 : 患者 1 (III - 5 , Fig .1) と患者 2 (IV - 6 , Fig .1) において、PAX 6 第 8 エクソンで、SSCP 上 aberrant band が観察された。塩基配列決定の結果、点突然変異 C→T による、コドン203のナンセンス変異を認めた (アルギニン→終止コドン) 。この点突然変異で新たにできた制限酵素 Mae III 切断部位を利用し、本家系構成員の第 8 エクソンを PCR 増幅し、Mae III で切断したところ、先天無虹彩罹患者のみで第 8 エクソンが切断され、正常表現型の構成員の第 8 エクソンは切断されなかった。

Family 4 : 患者 5 (II - 5 , Fig .1) では、PAX 6 遺伝子第 9 エクソンに点突然変異 C→T による、コドン 240のナンセンス変異を認めた (アルギニン→終止コドン) 。この塩基置換で消滅する制限酵素 Aval を利用し、患者 5 の第 9 エクソンを消化し切断できないことを確認した。

Family 2 および 3 : それぞれの患者に遺伝子変異は同定できなかった。

Fig .1 - Pedigrees of Families 1 , 2 , 3 , and 4 . Short bars above individual symbols indicate those examined by us.



考 察

先天無虹彩を伴う日本人 4 家系の PAX 6 遺伝子解析を行い、2 家系で 2 種類のナンセンス変異 (コドン203 とコドン240) を認めた。これまでに同様の mutation は、欧米においてコドン203で 5 家系、コドン240で 12 家系報告されている。日本人においても同様の変異が 1 家系ずつ同定されたことから、この 2 種類のナンセンス変異部位は hot spot といえる。PAX 6 遺伝子には、これまで151個の突然変異が知られているが、そのほとんどが PAX 6 蛋白の欠失が、中途切断 (truncation) を惹き起こす。151症例のうち16症例のみ、ミスセンス変異 (アミノ酸置換) であり、うち 4 例の表現型は Peters 奇形、先天性白内障、家族性黄斑低形成、前眼部奇形などの比較的軽度な表現型であった。一方先天無虹彩のほとんどは、正常な PAX 6 遺伝子産物の不足によるハプロ不全がその機序として最も疑われた。

論文審査の結果の要旨**1. 研究目的の評価**

本研究は、常染色体優性遺伝を示す先天無虹彩の日本人症例における PAX 6 遺伝子異常の解析を目指したものであり、目的は明確かつ妥当である。

2. 研究手法に関する評価

先天無虹彩の4家系において、PAX 6 遺伝子の全エクソンを PCR で増幅し、必要に応じて SSCP、制限酵素感受性テスト、および塩基配列も行っており、研究方法は適切である。

3. 分析・考証の評価

上記手法での解析の結果、4家系中2家系において PAX 6 遺伝子の異なる部位にシトシンからチミンへのトランジションを認め、それによる PAX 6 蛋白質のナンセンス変異を確定した。確かな手法に基づいており、分析・考証にあいまいな点は皆無である。

4. 結果に関する評価

この結果は、臨床的に本邦における貴重な臨床症例に基づいた先天無虹彩の病因を確定したものである。基礎的には眼球形成における PAX 6 遺伝子の重要性を示したものであるとして十分評価できる。

以上のように、本論文は先天無虹彩における原因遺伝子を同定しその異常部位を確定したものである。これは眼球形成における PAX 6 遺伝子の役割を明示すると共に、そのハプロ不全が無虹彩をもたらす主たる原因である事を示しており、今後の先天無虹彩の予防及び治療の進歩に貢献するところ大である。よって審査委員は全員一致で本論文が博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者 主査 教授 中村 三千男
副査 教授 小路 武彦
副査 教授 小林 俊光

渡 辺 浩

(福岡県) 昭和36年2月18日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Molecular Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Causative Agent of Bronchopulmonary Infection: Relation to Colonization in the Upper Respiratory Tract. (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌〔MRSA〕下気道感染症の発症機序に関する分子疫学的研究 - 上気道への定着との関連について)

Hiroshi Watanabe, Hironori Masaki, Norichika Asoh, Kiwao Watanabe, Kazunori Oishi, Shinobu Kobayashi, Akiyoshi Sato and Tsuyoshi Nagatake

Journal of Clinical Microbiology Vol 38

No. 10 p 3867-3869 2000

長崎大学熱帯医学研究所宿主病態解析部門感染症予防治療分野

(主任: 永武 毅教授)

論文内容の要旨**緒 言**

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌〔MRSA〕は院内感染の原因菌として重要であり、特に低免疫状態にある患者においては定着しやすく、時に様々な重度の感染症を引き起こす。そのなかでも MRSA による肺炎は手術後や人工呼吸器装着時などにしばしば発症し、その致死率は高い。これまで全身状態不良患者の上気道には MRSA が高い頻度で定着し、その様な症例において MRSA による下気道感染症が多くみられることが報告されているが、上気道に定着した MRSA が実際に下気道感染を引き起こすのかどうかについては検討されていない。そこで今回我々は MRSA による下気道感染症の発症機序を明らかにすることを目的とし、上気道に定着した MRSA と下気道より得られた MRSA の同一性について症例ごとに検討した。

材料および方法

同時期に鼻腔、咽頭、喀痰より同時に MRSA が検出された24症例を対象とし、72株の MRSA に対して、5つの疫学的マーカー(コアグラーゼ型、エンテロトキシン型、TSST-1産生、 β -ラクタマーゼ産生およびパルスフィールド電気泳動)を用いて症例ごとに菌の同一性について検討した。コアグラーゼ型は中和反応に基づいた、エンテロトキシン型、TSST-1産生は逆受身ラテックス凝集反応による、また β -ラクタマーゼ産生はパーパーディスクによるキットで検討した。パルスフィールド電気泳動は制限酵素に SmaI を使用し、CHEF Mapper パルスフィールド電気泳動システムにて行い、Tenoverらの分類(Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol., 33, 2233-2239, 1995)に従って解析した。

結 果

24例中21例(88%)では鼻腔由来と喀痰由来の MRSA の間でコアグラーゼ型、エンテロトキシン型、TSST-1産生、 β -ラクタマーゼ産生は完全に一致し、パルスフィールド電気泳動でも同一パターンがあるいは近似しており、ほぼ同一菌株と考えられたが、3例(12%)では鼻腔と喀痰間の MRSA の性状は異なり、咽頭と喀痰の間で MRSA の性状は全く同一であった。

考 察

我々の今回の検討より下気道の MRSA はその大部

分は鼻腔由来であり、一部が鼻腔を介しない咽頭由来であることが推察された。下気道に侵入した MRSA は、低免疫患者や全身状態不良の患者において時に肺炎等の下気道感染症を引き起こし、致命的となりうる。即ち、上気道への MRSA の定着はこれらの患者においては MRSA による下気道感染症の第 1 歩であり、MRSA 感染症発症の可能性のある手術後や低免疫状態にある患者においては、ムピロシン等上気道に定着した MRSA の除菌に有効な局所用薬剤を用いて早期に MRSA を除菌することが本菌の下気道への侵入、下気道感染症の発症予防に重要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

Molecular analysis of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a causative agent of bronchopulmonary infection: Relation to colonization in the upper respiratory tract. J. Clin. Microbiol 38, 3867-3869, 2000

1. 研究目的の評価

本研究は、上気道に定着した MRSA が下気道感染症の原因となることを検証するため、同一個体より得られた上気道および下気道由来 MRSA の同一性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

24症例の鼻腔、咽頭、喀痰由来の MRSA について従来の生物学的マーカーに加えてパルスフィールド電気泳動バンドパターンによる DNA 多型解析により同一性の検討を行っており、目的達成のための手法として妥当である。

3. 解析・考察の評価

24例中21例で鼻腔および喀痰由来 MRSA の生物学的マーカーは一致し DNA 多型も一致もしくは近似した。残る 3 例では咽頭と喀痰の間で MRSA の性状は一致した。このことから、下気道 MRSA の大部分は鼻腔由来であること、さらに上気道 MRSA 除菌が下気道感染症予防に有効であることを示唆した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 MRSA による下気道感染症の発症機序解明と発症予防法開発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	片 峰	茂
	副 査	教 授	平 山	壽 哉
	副 査	教 授	河 野	茂

天 野 秀 明

(広島県) 昭和38年12月27日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Impairment of Endotoxin-Induced Macrophage Inflammatory Protein 2 Gene Expression in Alveolar Macrophages in Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice

(ストレプトゾトシン惹起性糖尿病マウスの肺胞マクロファージにおいて、エンドトキシンによる MIP- 2 遺伝子発現誘導が障害されている)

天野秀明, 山元秀文, 千馬正敬, 大石和徳, 鈴木章一, 福島建一, 向田直史, 松島綱治, 江口勝美, 永武 毅

Infection and Immunity・68巻 5 号
p 2925-2929 2000年

長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療研究分野

(主任 : 永武 毅)

論文内容の要旨

緒 言

糖尿病が肺炎を始めとする下気道感染症の危険因子となっていることは以前から知られている。呼吸器感染症における有効な生体防御機序として気道から速やかに起炎菌がクリアランスされることが重要であるが、その除去システムに重要な役割を演じているのが好中球である。これまでの報告から糖尿病においては好中球の貪食・殺菌能、活性酸素産生能などの好中球機能自体が障害されていることが明らかとなっている。一方、好中球の集積に関して既に我々は、ヒト、ラットともに炎症局所への好中球の集積に IL- 8 を含む炎症性サイトカンが重要であることを報告した。糖尿病において IL- 8 産生が障害されているか否かについては未だ不明である。そこで、本研究では糖尿病マウスモデルを作成し経気道的に投与した LPS に対する MIP- 2 (マウスケモカイン) の産生について検討した。

材料と方法

1) 糖尿病マウスは既存の方法に準じてマウス腹腔内に STZ を投与して作成した。 2) 糖尿病マウス群および対照群に経気道的に LPS を 1 mg/kg のマウス体重換算で投与して下気道炎を誘導した。 3) LPS 投与前および投与後 3 , 6 , 12 , 24時間目にそれぞれ BAL を施行し総細胞数、細胞分類を調べるとともに BAL 液中の MIP- 2 を ELISA 法にて測定した。 4) LPS を投与して 3 時間目のマウスの肺を採取し MIP- 2 の免疫組織染色を行って産生細胞を確認した。 5) 糖尿病群と対照群の肺胞マクロファージを採取し LPS レセプターである CD14 の発現率に差があるかをフロー

サイトメーターで確認した。6) LPS を投与して1時間目のマウスの肺を採取しRNAを抽出。RT-PCR法にてMIP-2 mRNAの発現について両群間で差があるか比較検討した。

結 果

- 1) BAL液中の総細胞数および好中球数はLPS投与後3時間目以降、糖尿病群で有意差を持って少なかった。
- 2) BAL液中のMIP-2は対照群では3時間目にピークとなり24時間目までに速やかに減衰したが、糖尿病群では6時間目をピークとして24時間目までに速やかに減衰し、有意差をもってMIP-2の立ち上がりが遅れるとともにピーク値も対照群の58%にとどまった。従って糖尿病群ではMIP-2蛋白の産生が遅れると共に産生量も低いことが解った。
- 3) LPS投与後、3時間目のマウス肺を用いた抗MIP-2抗体による免疫組織染色ではMIP-2産生細胞は肺胞マクロファージであり対照群では明確な染色性を示したが糖尿病群では染色されなかった。
- 4) 以上のような結果がLPS刺激に対する受容体レベルで両群間に差が認められるために導かれた結果なのか否かを検討するために、両群の肺胞マクロファージにおけるCD14(LPS受容体)の発現を調べたところCD14の発現率に両群間で有意差を認めないことが解った。
- 5) MIP-2の産生低下が蛋白レベルだけではなくmRNAレベルにおいても認められるかどうかをRT-PCR法を用いて検討した結果、糖尿病群では対照群と比較して明らかにMIP-2 mRNAの発現が低下していることが確認された。

考 察

呼吸器系は外界に開かれた臓器であり、さまざまな病原体やオキシダントにさらされている。呼吸器感染症における生体防御システムで最も重要なものの一つが好中球による病原体の貪食殺菌除去である。糖尿病において呼吸器感染症が重症化する機序についてさまざまな免疫系の破綻が原因になっていることが知られているが、本研究では特に好中球の炎症局所への集積に関わる重要な因子であるケモカインに着目して検討した。その結果、糖尿病マウスではLPS刺激に対する肺胞マクロファージのMIP-2発現がmRNAおよび蛋白レベルで障害されていることが明らかとなった。これまでの研究から好中球集積にかかわるいくつかの因子(C5a, LTB4など)のなかでケモカインは、好中球集積に大きな比重を占めていることが解っている。すなわち、糖尿病においてはケモカインが抑制されていることにより好中球浸潤が抑制され感染症の重症化に関与すると推測される。この知見に基づき、我々は

糖尿病マウスに緑膿菌(血清抵抗性株)を経気道的に投与し肺炎を作成した結果、対照群と有意差をもって生存率が低いという結果を確認した。また、ケモカインのみならず炎症早期に産生され炎症の成立に重要な役割を演じるとともに好中球が細菌を貪食除去する過程をエンハンスすることが知られているTNF α についても糖尿病マウスのBAL液中では対照群に比較して有意に抑制されていることも確認した。

これらの一連の研究から、糖尿病における呼吸器感染症の重症化機序にこれまで知られていなかったケモカイン産生障害が関与しているのではないかということが推測できる。本研究は糖尿病における呼吸器感染症が重症化するメカニズムについて新たな視点から解明を試みた点で重要であり評価できる。今後、血糖コントロールによって今回確認した現象が可逆的なものであるかどうかの検討が臨床的にも重要であろうと考えられる。

論文審査の結果の要旨

Impairment of Endotoxin-Induced Macrophage Inflammatory Protein 2 Gene Expression in Alveolar Macrophages in Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice: Infection and Immunity; 68(5) 2925-2929, 2000

1. 研究目的の評価

本研究は糖尿病患者における易感染性の機序を解明する目的で、ストレプトゾトシン惹起性糖尿病マウスの呼吸器における生体防御機構のケモカイン動態を経時的に追跡したものであり、その研究の動機、目的、意図は明確である。

2. 研究手法に関する評価

ストレプトゾトシン惹起性糖尿病マウスを作成し、LPSを経気管的に投与し、肺胞洗浄液中に出てくる細胞の解析やケモカインの測定を行った研究手法は妥当である。

3. 解析・考察の評価

糖尿病マウスではLPS刺激後の好中球の増加の程度やMIP-2の産生量が有意に低くケモカインの抑制による好中球反応の低下が易感染性に関連していることが明らかになり大いに評価できる。

以上のように本論文は糖尿病における易感染性病態の解明とその対処法への示唆を与えるところ大であり、審査委員は全員一致で博士(医学)の学位に値するものと判断した。

審査担当者	主 査	教 授	河 野	茂
	副 査	教 授	中 村	三千男
	副 査	教 授	松 山	俊 文

Lina Maria Cardenas

(コロンビア) 1970年 1月 7日生

授与年月日 平成13年 3月31日

主 論 文 Histological effects of the pulp exposure by air-abrasion on the dentin bridge formation

論文内容の要旨

緒 言

騒音、発熱、振動、疼痛等を伴う従来の回転切削法に比較して、これらの発現が少なく、歯に無接触である噴射切削の方法は、特に小児歯科領域において有効な術式である。

本研究は噴射切削（エアアブレーション）装置による露髄後の歯髄組織の変化を観察する目的で、光学顕微鏡による病理組織学的観察と、走査型電子顕微鏡（以下 SEM と記す）を用いたデンティンブリッジの観察等を行ったものである。

8頭の成犬に対して全身麻酔を施した後、噴射切削装置 KCP Whisper Jet 1000型を用いて酸化アルミの微粒子の噴射によって歯に露髄面を形成した。露髄面を10%次亜鉛素酸、0.03%過酸化水素水、0.02%アクリノール溶液で洗浄した後、水酸化カルシウム製剤（カルピタル）を包摂し、酸化亜鉛ユージノールセメントで封鎖した。コントロールとして1/2ラウンドバーを装着したエアタービンで露髄面を形成し、同様の処置を施した。術後3, 7, 14, 30, 60日経過時にパラフィン切片とし、H.E染色を施し鏡検した。実験群50例、コントロール群50例である。この他37例の術後14, 30, 60日例の試料が、SEMによる観察に供された。

病理組織切片を炎症性変化等の判定基準によって評価すると、実験群もコントロール群も統計的に有意差は認められなかった。しかしデンティンブリッジの形成に関しては、コントロール群の方が速やかで、術後14日例で即にはその形成に有意差が認められた。

光顕によってもまた SEMによっても、新生したデンティンブリッジの中に酸化アルミの微粒子が観察された。

本研究は、エアアブレーションによる露髄後の病理組織学的影響と、同様の術式による露髄後に形成されたデンティンブリッジの SEM 観察に関する初めての報告と思われる。

術後短期間例で実験群の歯髄組織に認められた炎症は、エアアブレーションによる露髄が歯髄組織に高いインパクトを与えたことを示す。また実験群ではコントロール群より出血が長く持続したことは、噴射の空気圧による気腫が歯髄組織中に形成されたためと推察された。

実験群ではコントロール群に比較して、デンティンブリッジの形成がやや遅れる傾向が認められた理由と

して、回転切削では歯髄組織中に象牙質の削片が認められたが、他方噴射切削においては認められなかったことに由来すると考察された。歯髄組織中のデンティンチップが、自然のキャッピングエージェントとして有効に働くとの報告が見られるからである。

SEM 観察によると、新生したデンティンブリッジの中央部よりも象牙質壁との接合部に象牙細管が多く認められた。光顕ではこの部分に造歯細胞が集合していたことに関連あると思われる。

噴射切削に用いられた酸化アルミの微粒子は、歯髄組織中でその周囲に炎症性の変化を伴わないこと、歯髄の治癒やデンティンブリッジの形成が順調に営まれたこと、またその表面にコラーゲン線維が付着した SEM 観察からも、生体に対して親和性の高い材料と考えられた。

本実験の結果、噴射切削による露髄に際しても適切な処置を施すことによって、歯髄の治療はもとより、デンティンブリッジの形成も可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Lina Maria Cardenas は平成4年 C. E. S. Health Science Institute (Colombia) を卒業した後、平成9年4月長崎大学大学院歯学研究科に入学、現在に至っている。

平成12年2月9日、学位論文の基礎となる研究要旨及び経過を、歯学研究科が主催した研究経過報告会で発表した。また、語学試験（日本語）には、平成12年2月8日に合格した。

学位論文の主論文として、「Histological effects of the pulp exposure by air-abrasion on the dentin bridge formation」(Pediatric Dental Journal 第10巻1号 pp49-59 (2000)) を歯学研究科長に提出し、博士（歯学）の学位を申請した。歯学研究科教授会は、これを平成12年11月8日の定例教授会に付議し、論文の内容の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、3名の審査委員を選定した。審査委員は、共同で論文の内容を慎重に審査し、申請者から研究内容の報告を受けた後、試問を行い、論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成12年12月6日の歯学研究科教授会に報告した。本研究の内容は以下のとおりである。

騒音、発熱、振動、疼痛等を伴う従来の回転切削法に比較して、これらの発現が少なく、歯に無接触である噴射切削の方法は、特に小児歯科領域において有効な術式である。

本研究は噴射切削（エアアブレーション）装置による露髄後の歯髄組織の変化を観察する目的で、光学顕微鏡による病理組織学的観察と、走査型電子顕微鏡（以下 SEM と記す）を用いたデンティンブリッジの観

察等を行ったものである。

8頭の成犬に対して全身麻酔を施した後、噴射切削装置 KCP Whisper Jet 1000型を用いて酸化アルミの微粒子の噴射によって歯に露髄面を形成した。露髄面を10%次亜塩素酸, 0.03%過酸化水素水, 0.02%アクリノール溶液で洗浄した後、水酸化カルシウム製剤(カルピタル)を包摂し、酸化亜鉛ユージノールセメントで封鎖した。コントロールとして1/2ラウンドバーを装着したエアーターピンで露髄面を形成し、同様の処置を施した。術後3, 7, 14, 30, 60日経過時にパラフィン切片とし、H.E染色を施し鏡検した。実験群50例、コントロール群50例である。この他37例の術後14, 30, 60日例の試料が、SEMによる観察に供された。

病理組織切片を炎症性変化等の判定基準によって評価すると、実験群もコントロール群も統計的に有意差は認められなかった。しかしデンティンブリッジの形成に関してはコントロール群の方が速やかで、術後14日例で即その形成に有意差が認められた。光顕によってもまたSEMによっても、新生したデンティンブリッジの中に酸化アルミの微粒子が観察された。

本研究は、エアーブレーションによる露髄後の病理組織学的影響と、同様の術式による露髄後に形成されたデンティンブリッジのSEM観察に関する初めての報告と思われる。

術後短期間例で実験群の歯髄組織に認められた炎症は、エアーブレーションによる露髄が歯髄組織に高いインパクトを与えたことを示す。また実験群ではコントロール群より出血が長く持続したことは、噴射の空気圧による気腫が歯髄組織中に形成されたためと推察された。

実験群ではコントロール群に比較して、デンティンブリッジの形成がやや遅れる傾向が認められた理由として、回転切削では歯髄組織中に象牙質の削片が認められたが、他方噴射切削においては認められなかったことに由来すると考察された。歯髄組織中のデンティンチップが、自然のキャッピングエージェントとして有効に働くとの報告が見られるからである。

SEM観察によると、新生したデンティンブリッジの中央部よりも象牙質壁との接合部に象牙細管が多く認められた。光顕ではこの部分に造歯細胞が集合していたことに関連あると思われる。

噴射切削に用いられた酸化アルミの微粒子は、歯髄組織中でその周囲に炎症性的変化を伴わないこと、歯髄の治癒やデンティンブリッジの形成が順調に営まれたこと、またその表面にコラーゲン線維が附着したSEM観察からも、生体に対して親和性の高い材料と考えられた。

本実験の結果、噴射切削による露髄に際しても適切な処置を施すことによって、歯髄の治療はもとより、デンティンブリッジの形成も可能であることが示唆された。

下記審査委員会は本論文は、噴射切削装置による露髄後の歯髄組織の変化を解明したもので、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	後藤 譲治
	副査	教授	小林 和英
	副査	教授	山口 朗

白石 千秋

(宮崎県)昭和45年9月23日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 A histopathological study of the role of periodontal ligament tissue in root resorption in the rat

論文内容の要旨

緒言

歯周治療の主な目的の一つは歯周炎によって失われた歯周組織の再生を促進することである。歯根膜組織による新付着を得るためにGTR法が紹介され、また最近では無細胞性セメント質の形成に関与するエナメルマトリックスプロテインが結合組織性付着を誘導することが示唆されている。歯根膜組織は歯周組織の再生に重要な役割を果たしているため、歯根膜組織と歯根膜細胞の機能をより理解する必要がある。歯根膜組織には線維芽細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞およびこれらの細胞に分化し得る未分化間葉系細胞が含まれる。歯根膜細胞はアルカリフォスファターゼ活性やprostaglandin E₂ (PGE₂)の産生など様々な骨芽細胞様の性質を示す。骨吸収は破骨細胞によってなされるが、その誘導には骨芽細胞が関与するとされている。もしそうであれば、骨芽細胞様の性質を有する歯根膜細胞も硬組織吸収に関与している可能性がある。そこで本実験では、歯根膜組織の歯根吸収の誘導能を調べるため、ラットの歯根膜を保存した歯根と除去した歯根を骨系の細胞が存在しない背部皮下に移植し、歯根吸収の有無と歯根周囲の組織の状態を病理組織学的および免疫組織学的に観察した。

材料と方法

動物は、8週齢のルイス系雄性ラットを用いた。実験に用いたのは下顎左右第3臼歯の遠心根で、これを歯根膜組織保存群と歯根膜組織除去群に分け、両群ともHファイルを用いて根管内の歯髄を除去した。そしてあらかじめ剃毛しておいた別のラットの背部皮膚に切開線を入れ、皮下結合組織をポーチ状に剥離した。

ここに歯根を深く挿入して縫合し、1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28日後に移植歯根を周囲組織とともに摘出し、固定、脱灰後、AMeX法に準じてパラフィン包埋した。得られたブロックから歯根の長軸方向に約4 μ mの連続切片を作製し、H.E.染色による病理組織学的観察、prostaglandin合成酵素であるcyclooxygenase-2 (COX 2) についての免疫組織学的検索を行った。さらにTRAP染色による破歯細胞の組織計測を行った。すなわち歯根表面から400 μ mの範囲内に存在するTRAP陽性細胞を測定し、単位面積2000 $\times$ 400 μ m²あたりの細胞数を求め、各日数間の平均細胞数をone-way factorial ANOVA および Fisher's PLSD を用いて統計学的に分析した。

結 果

歯根膜組織除去群では、実験期間中に歯根吸収およびTRAP陽性細胞を観察しなかった。

移植後1, 3, 5日目の保存群では歯根吸収およびTRAP陽性細胞はみられなかったが、一部の歯根膜細胞とセメント細胞にCOX 2陽性反応が観察された。7日目以降にTRAP陽性細胞が出現し、歯根膜組織の線維走行が失われている部位で歯根吸収が観察された。COX 2は破歯細胞と一部のセメント細胞において陽性であった。21, 28日目では従来の歯根膜組織はほとんどみられず、間葉系の細胞に置き換わっており、歯根面に線維付着が観察される部位もあった。TRAP陽性細胞数は10日目で最多となり、その後減少して28日目ではわずかであった。

考 察

歯根吸収のメカニズムは解明されていないが、骨吸収に関しては多くの研究がなされている。In vitro においては骨吸収因子の存在下で骨芽細胞または骨間質細胞との共培養によって血球由来の細胞から破骨細胞様細胞が形成される。さらに骨芽細胞および骨間質細胞は破骨細胞性骨吸収を促進する因子に反応してPGE 2を産生し、破骨細胞分化因子を発現する。破歯細胞の起源は明らかではないが、アスピリン投与によって破歯細胞数が減少したという報告もあり、破骨細胞と同様と考えられている。破歯細胞による歯根吸収は歯根膜組織保存群でのみ観察されたことから、歯根膜組織が歯根吸収を誘導したと考えられる。PGE 2はcyclooxygenaseによってアラキドン酸から合成される強力な破骨細胞活性化因子である。cyclooxygenaseのアイソザイムのうちCOX 2は成長因子、サイトカインのような炎症性物質、LPSなどに対する反応として誘導される。本研究における移植歯根周囲組織内のCOX 2の発現は、移植後1, 3, 5日目の歯根膜細胞と一部のセメント細胞に認められた。一方、TRAP陽性細胞数は10日目にピークとなり、初期の段階で誘導

されたCOX 2が歯根吸収に関与している可能性がある。またCOX 2は両グループの皮下結合組織内の炎症性細胞や線維芽細胞でも陽性であった。しかし歯根吸収が歯根膜保存群でのみ観察されたことから歯根膜細胞によって産生されるPGE 2がTRAP陽性細胞の誘導に重要であると考えられた。

まとめ

歯根膜を除去した歯根では歯根吸収は観察されず、歯根膜を保存した歯根においてのみ破歯細胞による歯根吸収が観察されたことから、歯根膜組織が歯根吸収を誘導したことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

白石千秋は平成7年3月に長崎大学歯学部を卒業し、研修医として2年間勤務した後、平成9年4月同大学大学院歯学研究科に入学し、現在に至っている。

平成12年9月8日、学位論文の基礎となる研究要旨及び経過を歯学研究科が主催した研究経過報告会で発表した。また語学試験(ドイツ語)には、平成12年11月13日に合格した。

学位論文の主論文として「A histopathological study of the role of periodontal ligament tissue in root resorption in the rat」(Archives of Oral Biology, 2001; 46: 99-107)を歯学研究科長に提出し、博士(歯学)の学位を申請した。歯学研究科教授会は、これを平成12年12月6日の定例教授会に付議し、論文の内容の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、3名の審査委員を選定した。審査委員は、共同で論文の内容を慎重に審査し、申請者から研究内容の報告を受けた後、試問を行い、論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成13年1月10日の歯学研究科教授会に報告した。本研究の内容は以下の通りである。

歯周治療の主な目的の一つは歯周炎によって失われた歯周組織の再生を促進することであり、歯周組織の再生に重要な役割を果たしている歯根膜組織と歯根膜細胞の機能をより理解する必要がある。骨吸収は破骨細胞によってなされるが、その誘導には骨芽細胞が関与するとされている。歯根膜細胞が骨芽細胞様の性質を示すという報告は多くみられ、歯根膜細胞も硬組織吸収に関与している可能性がある。そこで本実験では、歯根膜組織とくに硬組織形成能を有する歯根膜細胞の機能を解明するための第一段階として、歯根膜組織が歯根吸収を誘導しうるかどうかにについて調べた。

実験動物は、8週齢のルイス系雄性ラットを用いた。下顎左右第3臼歯の遠心根を抜去して歯髄を除去し、メスで歯根膜を除去した歯根膜除去群と歯根膜保存群とに分けた。そして各歯根を別のラットの背部皮下に移植した。1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28日後、移植歯根

を周囲組織とともに摘出し、固定、脱灰後、AMeX法に準じてパラフィン包埋した。得られたブロックから歯根の長軸方向に約4 μ mの連続切片を作製し、HE染色、および cyclooxygenase (COX)-2 を検出するための免疫組織染色を行った。さらに酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色による破歯細胞数の計測を行った。

歯根膜除去群では、実験期間を通して歯根吸収および TRAP 陽性細胞を認めなかった。

歯根膜保存群では、移植後1, 3, 5日目では歯根吸収および TRAP 陽性細胞を認めなかったが、一部の歯根膜細胞とセメント細胞に COX 2 陽性反応が観察された。7日目以降に TRAP 陽性細胞の出現と歯根吸収が観察され、移植後21, 28日目には、歯根の吸収窩に間葉系の細胞が存在し、歯根面に向かう結合組織線維が観察される部位もあった。しかし新生セメント質は明らかではなかった。TRAP 陽性細胞数は10日目で最多となり、その後減少して28日目ではごくわずかであった。

歯根吸収のメカニズムは解明されていないが、骨吸収に関しては多くの研究がなされている。In vitro では、骨吸収因子の存在下で骨芽細胞または骨間質細胞との共培養により、血球由来の細胞から破骨細胞様細胞が形成される。さらに骨芽細胞および骨間質細胞は破骨細胞性骨吸収を促進する因子に反応して PGE 2 を産生し、破骨細胞分化因子を発現する。一方破歯細胞の起源は明らかではないが、破骨細胞と同様と考えられている。今回の実験では、破歯細胞による歯根吸収は歯根膜保存群にのみ観察されたことから、歯根膜組織が歯根吸収を誘導したと考えられる。PGE 2 は COX によってアラキドン酸から合成される強力な破骨細胞活性化因子である。COX のアイソザイムのうち COX 2 は成長因子、サイトカインのような炎症性物質、LPS などに対する反応として誘導される。本研究における移植歯根周囲組織内の COX 2 の発現は、移植後1, 3, 5日目の歯根膜細胞と一部のセメント細胞に認められた。一方 TRAP 陽性細胞数は10日目にピークを示し、初期の段階で誘導された COX 2 が歯根吸収に関与している可能性が示唆された。また COX 2 は両グループの皮下結合組織内の炎症性細胞や線維芽細胞でも陽性であったが、歯根吸収が歯根膜保存群でのみ観察されたことから、歯根膜細胞によって産生される PGE 2 が TRAP 陽性細胞の誘導に重要ではないかと考えられた。

本実験において、歯根膜を除去した歯根では歯根吸収は観察されず、歯根膜を保存した歯根においてのみ破歯細胞による歯根吸収が観察されたことから、歯根膜組織が歯根吸収を誘導していることが明らかになった。

下記審査委員会は、本研究で得られた知見は、歯根膜組織の機能を解明するうえで有用であり、今後の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	原	宜興
	副査	教授	林	善彦
	副査	教授	山	口朗

西田英治

(長崎県)昭和46年7月26日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Bone resorption and local interleukin-1 α and interleukin-1 β synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide

論文内容の要旨

緒言

歯周病原性細菌由来のリポ多糖 (LPS) は、in vitro での炎症性サイトカイン誘導能や骨吸収活性などの生物学的活性が菌種間で異なっていることが報告されている。しかしながらこれらの結果が in vivo においても反映されているのかについての報告はない。そこで今回我々は歯周病原性細菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a), *Porphyromonas gingivalis* (P.g) 由来 LPS をマウス歯肉に投与し、歯槽骨吸収と歯肉 interleukin-1 α , interleukin-1 β 濃度の変化について検索した。

材料と方法

供試菌株は、Pg381とA.aY4株を用いた。それぞれの増殖培地で嫌気培養後、phenol-water法に準じて粗LPSを作製、ヌクレアーゼ処理、プロナーゼ処理を行って精製LPSを得た。

実験には7週齢の雄性BALB/cマウスを用いた。精製各LPSを5 μ g/3 μ lの濃度でPBSに溶解し、マイクロシリンジでマウス下顎左側第一臼歯近心部歯肉に48時間ごとに3 μ l注入投与した。1, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 24回投与群の最終投与から6時間後に各群10匹ずつ屠殺し、顎骨10ブロックを得た。このうち半数の5ブロックからLPS投与部付近の歯肉を2 $\times$ 3mmの範囲で採取して歯肉IL-1濃度の定量を行い、また残りの5ブロックは脱灰処理後AMeX法に準じてパラフィン包埋し、下顎第一臼歯の近遠心断となる連続切片を作製、第一臼歯近心の歯肉および歯槽骨面の病理組織学的変化の観察と活性吸収面の計測を行った。なお、同量のPBSを投与したマウスを対照群とした。

歯肉IL-1 α , IL-1 β 濃度の統計学的比較にはone-factor ANOVA法を用い、Fisher's PLSDによる多重比

較検定を行った。一方、活性吸収面の割合の比較には Student's t-test を用いた。

結果と考察

活性吸収面の割合は、PBS 投与群では全実験期間を通じて 0 % であった。A.a LPS 投与群では 4 回投与以降、P.g LPS 投与群では 7 回投与以降から上昇した。10 回投与群までで菌種間の比較をした場合、P.g が A.a に比べて低い傾向にあったが、13 回投与時には共に最高値となり、16 回投与時には減少する傾向を示した。この結果より、A.a と P.g の LPS は in vivo における骨吸収活性を有していることが明らかとなった。また 10 回投与までの間では、A.a 投与群の方が P.g 投与群に比べ骨吸収活性が高いことが示唆された。しかし、活性吸収面の割合が最高値となった 13 回投与時から減少を示した 24 回投与時まででは、P.g LPS の骨吸収活性は A.a LPS に近似した値となっていた。Nair らの報告によると P.g LPS はその生物学的活性にくらべて骨吸収活性が高いことが報告されており、今回の 13 回以降の結果はこの in vitro の結果を反映しているのかもしれない。

歯肉 IL-1 α および β 濃度は、対照とした PBS 投与群ではごく低値であったが、実験群では 1 回投与後 7 回あるいは 10 回投与時まで緩やかに上昇し、13 回投与時には減少した。また、IL-1 α 、IL-1 β 共に 16 回投与時に再度上昇しその後は 24 回投与まで緩やかな減少傾向を示した。統計学的検索の結果、IL-1 α 濃度は、4、10 回投与群で、IL-1 β 濃度は 4、7、10、13、16、20 回投与群において、A.a LPS が P.g LPS に比べて有意に高かった。そしてこの in vivo の結果は in vitro での報告を反映していると考えられた。

これまで、IL-1 α および IL-1 β がともに破骨細胞性骨吸収において重要な役割を果たしていることが報告されている。そして今回の研究結果より、10 回投与時までの IL-1 産生の上昇は 13 回投与時までの活性吸収面の割合の上昇に影響しているものと考えられた。しかしながら 16 回投与群以降では、IL-1 産生は上昇していたが骨吸収は減少していた。この理由について現在のところ明確な見解は示せないが、たとえば、通常は骨吸収を促進するメディエーターとして知られるプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は、高濃度存在下に破骨細胞性の骨吸収を抑制することが Chambers らにより報告されており、IL-1 の持続的産生に伴い産生された PGE₂ の効果が通常の骨吸収活性に勝り、今回の骨吸収活性の減少につながったとも考えられた。

今回の実験で検出したサイトカインが IL-1 の 2 つのタイプだけであったことを考えると、他のサイトカインや PG が組織破壊や骨吸収に関与している可能性が指摘されるため、IL-1 以外のメディエーターにつ

いてもさらなる調査が必要であろう。

論文審査の結果の要旨

西田英治は、平成 8 年 3 月九州大学歯学部を卒業、同年 6 月より長崎大学歯学部附属病院にて研修後、平成 9 年 4 月長崎大学大学院歯学研究科に入学し現在に至っている。学位論文の基礎となる研究の要旨は、歯学研究科が平成 12 年 9 月 8 日に実施した研究経過報告会において発表した。また外国語試験（ドイツ語）は、平成 12 年 11 月 13 日に合格した。

学位論文の主論文として「Bone resorption and local interleukin-1 α and interleukin-1 β synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide」(Journal of Periodontal Research, 2001; 36: 1-8) を完成、歯学研究科長に提出し、歯学博士の学位を申請した。歯学研究科教授会は、これを平成 12 年 12 月 6 日の定例教授会に付議し、論文の内容の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、3 名の審査委員を選定した。審査委員は、共同で論文の内容を慎重に審査し、申請者から研究内容の報告を受けた後、試問を行い、論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成 13 年 1 月 10 日の歯学研究科教授会に報告した。本研究の内容は以下のとおりである。

歯周病原性細菌由来のリポ多糖 (LPS) について、in vitro での炎症性サイトカイン誘導能や骨吸収活性などの生物学的活性が菌種間で異なっていることが報告されている。しかしながら、これらの結果が in vivo においても反映されているのかについての報告はない。そこで歯周病原性細菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a)、*Porphyromonas gingivalis* (P.g) 由来 LPS をマウス歯肉に投与し、歯槽骨吸収と歯肉 interleukin-1 α 、interleukin-1 β 濃度の変化について検索した。

実験には 7 週齢の雄性 BALB/c マウスを用いた。各精製 LPS を 5 μ g / 3 μ l の濃度で PBS に溶解し、マイクロシリンジで下顎左側第一臼歯近心部歯肉に 48 時間ごとに 3 μ l 注入投与した。1、4、7、10、13、16、20、24 回投与群の最終投与 6 時間後に各群 10 匹ずつ屠殺し、顎骨 10 ブロックを得た。このうち半数の 5 ブロックから LPS 投与部歯肉を 2 $\times$ 3 mm の範囲で採取して歯肉 IL-1 濃度の定量を行い、残りの 5 ブロックは脱灰処理後 AMeX 法に準じてパラフィン包埋し、下顎第一臼歯の近遠心断となる連続切片を作製、第一臼歯近心の歯肉および歯槽骨面の病理組織学的変化の観察と活性吸収面の計測を行った。なお、同量の PBS を投与したマウスを対照群とした。

活性吸収面の割合は、PBS 投与群では全実験期間を通じて 0 % であった。これに対し A.a LPS 投与群で

は4回投与以降, *P.g*LPS投与群では7回投与以降から上昇した。10回投与群までで菌種間の比較をした場合, *A.a*LPS投与群の方が高い傾向を示し, *A.a*投与群の骨吸収活性の高さが示唆された。しかし, 13回投与時から24回投与時まででは, *P.g*LPSの骨吸収活性は*A.a*LPSに近似した値となっていた。

歯肉 IL-1 α および β 濃度は, 対照とした PBS 投与群では実験期間を通じてごく低値であったが, 実験群では1回投与後緩やかに上昇し, 13回投与時には減少した。また, IL-1 α , IL-1 β 共に16回投与時に再度上昇しその後は24回投与まで緩やかな減少傾向を示した。統計学的検索の結果, IL-1 α 濃度は4, 10回投与群で, IL-1 β 濃度は4, 7, 10, 13, 16, 20回投与群において, *A.a*LPSが*P.g*LPSに比べて有意に高く, *in vitro*での報告を反映していると考えられた。

今回の研究結果より, 10回投与時までの IL-1 産生の上昇は13回投与時までの活性吸収面の割合の上昇に影響しているものと考えられた。しかしながら16回投与群以降では, IL-1 産生は上昇していたが骨吸収は減少していた。この理由について現在のところ明確な見解は示せない。しかしたとえば, 通常は骨吸収を促進するメディエーターとしてしられるプロスタグランジン E2 (PGE2) は, 高濃度存在下で破骨細胞性の骨吸収を抑制することが Chambers らにより報告されており, IL-1 の持続的産生に伴い産生された PGE2 の効果が通常の骨吸収活性にまさり, 今回の骨吸収活性の減少につながったとも考えられる。

今回の実験で検出したサイトカインが IL-1 の2つのタイプだけであり, 他のサイトカインや PG が組織破壊や骨吸収に関与している可能性が指摘されていることもあるので, IL-1 以外のメディエーターについてもさらなる調査が必要であろう。

下記審査委員会は本論文が, 歯周病原性細菌由来 LPS の菌種間での生物学的活性の相違を *in vivo* で明らかにし, 今後, 歯学の進歩に貢献するものと評価し, 歯学博士の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者	主査	教授	原	宜興
	副査	教授	林	善彦
	副査	教授	山	口朗

田 中 景 子

(長崎県) 昭和47年7月8日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 NaHCO_3 応用後の再石灰化エナメル質の耐酸性

論文内容の要旨

齲蝕のリスク判定因子として, 口腔内の細菌数とともに, 唾液の流出量や緩衝能が注目される。特に緩衝作用は齲蝕増加と密接な関連があることが判明しており, 齲蝕予防に果たす役割は大きい。なかでも炭酸水素イオン (HCO_3^-) は口腔内における緩衝作用の大部分を担っており, 脱灰抑制および再石灰化の中心的な役割を果たしている。今回は, 表層下脱灰病変内の酸性環境を改善し, フッ素による再石灰化能を促進するために, 炭酸水素イオンを作用させながらエナメル質の再石灰化を行い, 再石灰化エナメル質の耐酸性について *in vitro* で検討した。

試料には矯正的理由で抜去された10歳代の小白歯健全エナメル質を使用した。表層下脱灰病変の形成は乳酸0.1mol/L, Ca 3.0mmol/L, P 1.8mmol/L を含有し, pH 5.0に調整した脱灰溶液で37℃で3日間行った。続いて9日間, 脱灰液と同様の Ca と P, さらに 2 ppm の F を含有した pH7.0, 37℃の再石灰化溶液に浸漬した。再石灰化開始直前と, その後再石灰化期間中は12時間間隔で1日に2回, 各種濃度の炭酸水素溶液 (0.5, 5.0, 50.0mmol/L) ヘエナメル質試料ブロックを浸漬した。コントロールとしては炭酸水素溶液の替わりに脱イオン水を作用させた。さらに, 溶液非作用群として再石灰化溶液に浸漬したままで再石灰化を行った群も設定した。再石灰化後, 37℃で pH5.0の脱灰溶液に3日間浸漬して耐酸性試験を行った。耐酸性試験後, 試料ブロックより薄切平行切片を作成し, マイクロラジオグラフィーを撮影した。これよりミネラルプロファイルを作成し, パラメータの計測を行った。

その結果, 再石灰化期間中に炭酸水素溶液を作用させた群では, 非作用群よりも耐酸性であることが判明した ($p < 0.05$)。しかしながら作用溶液の濃度の違いによる耐酸性の差は認められなかった。このように, 耐酸性の違いが発現した理由として, 再石灰化期間中に作用させた炭酸水素イオンが病変内の結晶表面に吸着していたことが考えられる。この炭酸水素イオンが再度の酸の浸入に対して緩衝作用物質として機能し, 病変内の水素イオンを消費することによって pH 低下が抑制されたと考える。このように表層下脱灰病変内で pH が改善された環境下で再石灰化が発現したことにより, マイクロラジオグラフィで耐酸性の所見が得られたと考えられる。また, 今回の実験では再石灰化の際にエナメル質中の炭酸の含有量が高くなっていた

可能性があり、耐酸性試験の酸への暴露の際に炭酸が溶出したことも考えられる。今回の結果では、作用させた炭酸水素溶液の濃度によって耐酸性に差は認められないことから、従来、提唱されてきたように、炭酸水素イオンを高濃度に含有する刺激唾液のみではなく、安静時唾液のように低濃度の炭酸水素イオンであっても、表層下脱灰病変内の pH 低下を抑制し、再石灰化によって、耐酸性歯質を獲得する機能を十分果していると考えられる。さらに、任意に群の併合が行える Scheffe 法を用いて、再石灰化期間中に作用させたフッ素と炭酸水素溶液に着目し再検討した結果、フッ素のみを作用させた群よりもフッ素と炭酸水素溶液の両方を作用させた群のほうが、より耐酸性の獲得には有利であることが判明した。また、洗浄作用効果という点から比較した炭酸水素溶液作用群と脱イオン水作用群の比較でも同様に、病変内部の酸性環境状態を改善し耐酸性のミネラルを獲得するには、炭酸水素溶液作用群の緩衝作用のほうが、より効果的であることが判明した。

以上のようなことから、臨床において認められる表層下脱灰病変、いわゆるエナメル白斑に対する再石灰化療法として、従来より行われているフッ素の積極的な応用に加えて、病変内部の pH を改善する目的で、炭酸水素イオンを応用することは有益であると示唆される。

論文審査の結果の要旨

田中景子は、平成 9 年 3 月長崎大学歯学部を卒業し、同年 4 月に長崎大学大学院歯学研究科に入学した。定められた期間に、地域歯科保健特論、副科目として機能口腔病理学特論を履修したほか、必修科目 1 科目、選択科目 5 科目を履修し、合計 32 単位を修得した。学位論文の基礎となる研究の要旨は、歯学研究科が平成 12 年 9 月 8 日に実施した研究経過報告会において発表した。また、歯学研究科が行う英語以外の外国語（ドイツ語）の試験には、平成 12 年 12 月 13 日に合格した。

学位論文「 NaHCO_3 応用後の再石灰化エナメル質の耐酸性」を主論文として、平成 12 年 12 月 25 日、歯学研究科に博士（歯学）の学位申請が行われた。定例の歯学研究科教授会は、これを平成 13 年 1 月 17 日の研究科教授会に付議し、論文の要旨を討論した後、受理して差し支えないものと認めたので、下記の審査委員を選定した。4 名の審査委員は共同で論文内容を慎重に審議し、平成 13 年 1 月 30 日申請者に対して試問を行い、下記の審査結果および最終試問の結果を平成 13 年 2 月 7 日の歯学研究科教授会に報告した。

本研究は、表層下脱灰病変内の酸性環境を改善し、フッ素による再石灰化能を促進するために、炭酸水素イオンを作用させながらエナメル質の再石灰化を行い、

再石灰化エナメル質の耐酸性について *in vitro* で検討している。*In vitro* で 3 日間の脱灰により形成したエナメル質表層下脱灰病変に、9 日間再石灰化（ Ca 3.0 mM, P 1.8 mM, F 2 ppm, pH 7.0）を行い、再石灰化開始直前と、その後、再石灰化期間中は 1 日に 2 回、炭酸水素溶液へ浸漬した。再石灰化後、耐酸性試験を行った。マイクロラジオグラフィーによって評価した結果、炭酸水素溶液を作用させた群では、非作用群よりも耐酸性であることが判明した。このような違いが発現した理由として、再石灰化期間中に作用させた炭酸水素イオンが病変内の結晶表面に吸着していたこと、再石灰化によって得られたミネラルには作用群と非作用群では組成に違いがあったことなどが考えられた。さらに、Scheffe 法を用いて、再石灰化期間中に作用させたフッ素と炭酸水素溶液に着目して再検討した結果、フッ素のみを作用させた群よりもフッ素と炭酸水素溶液の両方を作用させた群のほうが、より耐酸性の獲得には有利であることが判明した。また、洗浄作用効果という点から比較した炭酸水素溶液作用群と脱イオン水作用群の比較でも同様に、病変内部の酸性環境状態を改善し耐酸性のミネラルを獲得するには、炭酸水素溶液作用群の緩衝作用のほうが、より効果的であることが判明した。以上のようなことから、臨床において認められる表層下脱灰病変、いわゆるエナメル白斑に対する再石灰化療法として、従来より行われているフッ素の積極的な応用に加えて、病変内部の pH を改善する目的で、炭酸水素イオンを応用することは有益であると示唆される。

研究科教授会は審査委員会の報告に基づき、これを討論に付して審査した結果、本論文は歯学の進歩に貢献するところ大で博士（歯学）に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	加 藤 有 三
	副 査	教 授	林 善 彦
	副 査	教 授	久 恒 邦 博
	副 査	助教授	飯 島 洋 一

馬 場 直 樹

（長崎県）昭和 47 年 8 月 12 日生

授与年月日 平成 13 年 3 月 31 日

主 論 文 Effect of disinfectants containing glutaraldehyde on bonding of a tri-*n*-butylborane initiated resin to dentin

論文内容の要旨

歯冠の崩壊した歯を築造する場合、象牙質の接着は補綴装置の脱落、辺縁漏洩に続く二次う蝕、歯根破折などを防ぐために重要となる。支台歯の築造法のうち間接法の場合は、形成から接着までに通常 1 ～ 2 週間

の仮封期間があり、その間象牙質表面は仮封材と接触するか、または露出した状態となっている。しかし過去に、象牙質接着に対する仮封材の悪影響に関する研究や抜去した歯牙の象牙質を露出することなく保管した場合、保管条件が接着に及ぼす影響について調べた研究はあるが、露出した象牙質の保管条件と接着の関係を調べた報告はほとんどない。本研究では間接法による支台歯築造を想定し、Super-Bond C&Bの接着システムで接着性改善の効果が報告されているグルタルアルデヒド(GA)やホルムアルデヒド(FA)の応用を試み、切削した象牙質の保管条件がSuper-Bond C&Bとの接着強度に及ぼす影響と、GAやFAおよびGAを構成成分とするプライマー(GLUMA)が仮封期間中に用いる象牙質の前処理剤成分として使用可能か否かを調べる目的で実験を行った。

貼薬用として1, 3, 5, 10%FA水溶液, 1, 3, 5, 10%GA水溶液, 5%GAと36%メタクリ酸2-ヒドロキシエチル(HEMA)を含有するGLUMA CPS(GLUMA), 3, 5, 10, 30, 50%HEMA水溶液, 生理食塩水(IS), 蒸留水(DW)を使用した。冷凍保存した牛前歯を解凍後、流水下に象牙質面を露出させ、耐水研磨紙の400番と600番で注水下に研削した。被着面を含む象牙質表面層1mmをシャーレ中の各溶液に浸漬したものを貼薬処理とする一方、被着面を蒸留水に触れさせずにシャーレを密封し、湿度を保ったものをコントロールとした(HU)。37℃恒温槽中に48時間または168時間保管した後試験片をシャーレから取り出し、被着面を15秒間水洗し、軽く10秒間エアー乾燥した。Super-Bond C&B付属の表面処理剤グリーン(10-3溶液)を30秒間塗布し、30秒間水洗、15秒間エアー乾燥後、Super-Bond C&Bを用い象牙質とアクリル棒とを接着した。接着後30分間室温に放置し、37℃の水中に24時間浸漬した後、オートグラフを用いクロスヘッドスピード2mm/minで荷重を加え、破断時の値から引っ張り接着強さを求めた。試料数5個の平均値と標準偏差を求め、有意水準5%で分散分析した。また接着試験後、試験片の破断面を走査型電子顕微鏡を用いて500倍で観察した。

統計処理の結果、接着強さはGAおよびHEMAの濃度によって影響をうけたが、FAに関しては濃度による影響は認められなかった。貼薬期間による影響はGAとFAの場合は認められたが、HEMAでは認められなかった。

次に、FA, GA, HEMAについてはそれぞれ至適濃度を3, 5, 10%としコントロール(HU, DW, IS)及びGLUMAと比較を行った。貼薬することなく、象牙質切削直後の接着強さの平均値は17.8MPaであった。これに比べHU, DW, ISでは、貼薬時間が48時間、168

時間ともに接着強さは有意に低かった。象牙質を露出させることなく抜去歯牙を保管した場合、接着強さは同等あるいは上昇するとの報告がある。今回の実験では象牙質を露出したまま保管したことが接着強さの低下につながったと考えられ、口腔内の象牙質においても同様の現象がおこる可能性が高いと考えられる。

一方、5%GA, 10%HEMA, GLUMAに関しては168時間後も貼薬なしと同等の接着強さであり、3%FAよりも効果的であった。GAの作用機序に関しては、象牙質内のコラーゲンとの反応生成物に連鎖移動反応によるグラフト重合が起こるとする説、殺菌作用、象牙質のコラーゲン繊維を架橋して脱灰時コラーゲン繊維の変性を防ぐとする説があり、これらが合わさった形で接着強さの低下の抑制に効果があったのではないかと考えられる。HEMAの長期貼薬も接着強さの低下を抑えたが、10-3溶液を使用せずにHEMAで60分間処理したのちで接着を行った場合、接着強さは 5.6 ± 0.5 MPaとの報告があることから、10-3溶液が接着強さの向上に主な役割を果たし、HEMAは補助的な役目を果たしていると考えられる。

GLUMAの成分であるHEMAは遅延型アレルギーを引き起こすという報告がある。またGAは皮膚に炎症を起こすとの報告がある、このため使用する場合は口腔粘膜にできる限り触れることがないようにすべきと考えられる。

露出した象牙質に対する5%GAおよびGLUMAの貼薬は殺菌作用も期待でき本研究の上では最も有効であった。またGLUMAは知覚過敏処置剤として既に口腔内で使用されていることから、仮封期間に窩洞内に露出した象牙質に塗布しておくことが接着に役立つものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

馬場直樹は平成9年3月北海道大学歯学部を卒業、平成9年4月より長崎大学大学院歯学研究科に入学し、定められた期間に主科目として歯冠修復学特論、副科目として齲蝕治療学特論を履修したほか、必修科目として1科目、選択科目として7科目を履修し、合計36単位を修得した。学位論文の基礎となる研究の要旨は、歯学研究科が平成12年11月9日に実施した研究経過報告会において発表した。また、英語以外の外国語(ドイツ語)は平成12年11月27日に実施した筆記試験において合格した。学位論文の主論文として「Effect of disinfectants containing glutaraldehyde on bonding of a tri-*n*-butylborane initiated resin to dentin」(Journal of Oral Rehabilitation(in press))を付し、歯学研究科長に博士(歯学)の学位を申請した。定例の歯学研究科教授会は、これを平成13年1月17日に討議し論文の要旨を検討した後、これを受理して差し支えないと認め、3名の審

査委員を選定した。審査委員は共同で論文を慎重に審査した後、下記の審査結果及び最終試験の結果を平成13年2月7日の歯学研究科教授会で報告した。本論文の概要は以下の通りである。

象牙質の接着は、補綴物の脱落、辺縁漏洩に続く二次う蝕、歯根破折等の防止に重要である。本研究は切削した象牙質の保管条件が Super-Bond C&B との接着強度に及ぼす影響を調べ、さらにグルタルアルデヒド (GA) やホルムアルデヒド (FA) 及び GA を構成成分とするプライマー (GLUMA) を仮封期間中に使用する象牙質の前処理剤成分として応用できないか、その効果を確認するために行ったものである。

GA FA ,メタクリル酸2-ヒドロキシエチル(HEMA)を用いて牛象牙質の貼薬処理を48時間また168時間行った後、象牙質とアクリル棒を Super-Bond C&B を用いて接着し引っ張り試験を行った。引っ張り試験の結果より、それぞれ至適濃度を5%,3%,10%と規定した。次に蒸留水(DW),生理食塩水(IS),GLUMAで貼薬また湿度100%37℃で保管(HU)した場合と比較を行った。

切削直後に接着した場合、接着強さの平均値は17.8 MPaであった。これに比べHU,DW,ISでは、貼薬時間が48時間及び168時間で接着強さは有意に低かった。今回の実験では象牙質を露出したまま保管したことが接着強さの低下につながったと考えられ、口腔内の象牙質においても同様に接着強さの低下がおこる可能性が高いと考えられる。

一方、5%GA,10%HEMA,GLUMAに関しては168時間後も切削直後と同等の接着強さであり、3%FAよりも効果的であった。

露出した象牙質に対する5%GAおよびGLUMAの貼薬には殺菌作用も期待でき、本研究において最も有効であった。またGLUMAは知覚過敏処置剤として既に口腔内で使用されていることから、臨床において仮封期間に窩洞内に露出した象牙質に塗布しておくことが接着に役立つものと考えられる。

下記審査委員会は本研究で得られた知見が、今後の歯科臨床の進歩に貢献するものと評価し、博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者	主 査	教 授	熱 田	充
	副 査	教 授	林	善 彦
	副 査	教 授	久 恒 邦 博	

飛 田 尚 慶

(神奈川県)昭和45年7月15日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Immunohistochemical Study on Wound Healing
of a Muscle Flap Transferred into the Oral
Cavity of Rats

論文内容の要旨

口腔悪性腫瘍切除後の広範囲な欠損部再建には現在筋肉皮弁や遊離皮弁等が多く用いられている。近年、皮膚を付けない筋肉弁を使用して口腔粘膜様の2次的上皮化を計る再建法が行われているが、術後の強い線維性拘縮が生じてしまう欠点がある。この拘縮には線維芽細胞の最終分化型で、自己収縮能を持つ筋線維芽細胞の細胞死が関与している。また、細胞増殖因子の1つである線維芽細胞増殖因子2型(FGF2)がこの細胞の細胞死を促進していることが最近報告されている。

FGF2は細胞膜のFGF受容体に結合して標的細胞の様々な増殖分化を促進させる。この受容体の内、FGFR1は主に細胞の増殖能に関わり、FGFR2は細胞の分化発達に関係することが判ってきている。しかし、FGF2による筋線維芽細胞の細胞死誘発にはどのFGF受容体が関与しているかは未だ不明である。

本研究は、ラット口腔内へ移植した筋肉弁の創傷治癒過程における線維芽細胞増殖因子2型(FGF2)とその受容体であるFGFR1,FGFR2の発現が筋線維芽細胞の細胞死とどの様に関連しているかを免疫組織学的及びTUNEL法を用いて検討した。

実験には8~10週齢の雄SDラット31匹を用い、この内24匹を実験群、7匹を対照群とした。実験群では右側下顎骨無歯顎々提部に粘膜骨膜欠損を作成し、同側の胸骨乳突筋を用いて被覆した。その際、弁組織の拘縮の程度を観察する目的で、口腔前庭を人為的に作成した。対照群は実験群と同様の粘膜骨膜欠損を作成後、剥離した粘膜骨膜組織で欠損部を再度被覆した。

観察期間は術後2,7,10,14,18,21,28,40,60日で、4%パラフォルムアルデヒド-リン酸緩衝液にて灌流固定後、通法に従い厚さ4μmのパラフィン切片を作成した。この切片を用いてHE,AZAN染色、免疫染色(ウサギ抗FGF2,FGFR1,FGFR2及びマウス抗α-SMA抗体を使用)及びINTERGEN社のApopTagキットを用いたTUNEL染色を行った。統計解析は予備実験の結果より、術後10,14,18,21,28日(実験群:n=4,対照群:n=1)の標本を用いた。

実験の結果、術後7日目には、筋肉弁周囲より炎症細胞の浸潤と上皮の進展が観察された。術後10日目から14日目で上皮化はほぼ完了し、筋肉弁自体も肉芽組織へ置き換えられた。筋線維芽細胞の指標であるα-

SMA 陽性細胞は術後14日目に最も増加したが、18日目以降ではその数を減らしていった。組織中の FGF 2 陽性を示す範囲は術後18日目で最も広がりその後は減少した。FGFR 2 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞も術後18日目に最も増加し、これは筋線維芽細胞の減少期に当たっていた。FGFR 2、TUNEL 陽性を示した細胞は HE 染色標本と比較した結果、線維芽細胞様細胞と考えられ、その陽性率は術後18日目の筋線維芽細胞の陽性率とほぼ同率であった。また、ピアソンの相関係数を算出したところ、FGFR 2 と TUNEL 陽性細胞の発現時期には強い正の相関が見られた ($r=0.723$)。術後21日目では弁組織は肉芽組織から線維組織へ置き換えが始まり、同時に線維性拘縮も始まり出していた。術後28日目以降では弁組織は深部で一部筋組織の構造を保っていたものの、大半は線維組織へ置き換えされ、人為的に作成した口腔前庭は、拘縮により著しく浅くなっていた。また、 α -SMA 陽性像は血管のみに見られた。

一方 FGFR 1 は術後10日目より肉芽組織内の線維芽細胞に陽性のものが出現し、術後21日目まで持続する所見が示された。

対照群では、術後2日目に炎症細胞の浸潤が上皮下で見られたが、術後7日目以降では若干の線維性拘縮が切開部周囲で見られたものの、実験群のような著しい弁組織の変化は見られなかった。

以上より、本実験からは次のことが考えられた。

FGFR 1 は筋肉弁の創傷治癒における組織のリモデリングに関与しているものと思われた。一方、筋線維芽細胞の細胞死を促進させる FGF 2 の受容体は FGFR 2 である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

飛田尚慶は平成9年3月に長崎大学歯学部を卒業した後、歯科医師国家試験に合格し、同年4月に長崎大学大学院歯学研究科(口腔外科学第二講座)に入学後、現在に至っている。

在学中、選択必修科目の主科目(口腔腫瘍学特論)と副科目(機能口腔病理学特論)並びに選択科目5科目を履修し、合計32単位を修得した。所定単位修得後、学位論文の基礎となる研究要旨及び経過を平成12年9月8日に歯学研究科学位申請委員会が主催した研究経過報告会で「口腔内に移植した筋肉弁の治癒に関する免疫組織学的検討 - 筋線維芽細胞と塩基性線維芽細胞増殖因子及びその受容体の発現」の演題で発表を行った。また語学試験(ドイツ語)には平成12年12月28日に合格した。

学位論文の主論文として、“Immunohistochemical Study on Wound Healing of a Muscle Flap Transferred into the Oral Cavity of Rats (ラット口腔内に移植した筋肉

弁の治癒に関する免疫組織学的研究)”(Oral Medicine and Pathology, in press)を歯学研究科長に提出し、歯学研究科に博士(歯学)の学位申請を行った。歯学研究科教授会は、これを平成13年1月17日の定例委員会に付議し、論文の要旨ならびに申請の資格等を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、下記3名の審査委員を選定した。3名の審査委員は共同で論文の内容を慎重に審査し、平成13年1月31日申請者に対して試問を行い、下記の論文審査の結果ならびに最終試験の結果を平成13年2月7日の歯学研究科教授会に報告した。主論文の内容は以下の通りである。

本研究は、筋肉弁の創傷治癒過程における線維芽細胞増殖因子2型(FGF 2)とその受容体である FGFR 1、R 2 の発現が筋線維芽細胞の細胞死とどの様に関連しているかを免疫組織化学的及び TUNEL 法を用いて検討したものである。

口腔悪性腫瘍切除後の広範囲な欠損部再建には、近年筋肉弁を使用して口腔粘膜様の2次的上皮化を計る再建法が行われているが、術後の強い線維性拘縮が生じてしまう欠点がある。この拘縮には線維芽細胞の最終分化型で、自己収縮能を持つ筋線維芽細胞の細胞死が関与しており、細胞増殖因子の1つである線維芽細胞増殖因子2型(FGF 2)がこの細胞の細胞死を促進していることが最近報告されている。

又、FGF 2 は細胞膜の FGF 受容体に結合して標的細胞の様々な増殖分化を促進させるが、この受容体の内、FGFR 1 は主に細胞の増殖能に関わり、FGFR 2 は細胞の分化発達に関係すると言われている。しかし、FGF 2 による筋線維芽細胞の細胞死誘発にはどの FGF 受容体が関与しているかは未だ不明である。

実験動物には8~10週齢の雄SDラット31匹を用いた。この内24匹を実験群、7匹を対照群とした。実験群では右側下顎骨無歯顎々提部に粘膜骨膜欠損を作成し、同側の胸骨乳突筋で被覆した。その際、弁組織の拘縮の程度を観察する目的で、口腔前庭を人為的に作成した。対照群は実験群と同様の粘膜骨膜欠損を作成後、剥離した粘膜骨膜組織で欠損部を再度被覆した。観察期間は術後2, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 40, 60日で、4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定後、通法に従い厚さ4 μ mのパラフィン切片を作成し、HE, AZAN 染色、免疫染色(ウサギ抗 FGF 2, FGFR 1, FGFR 2 及びマウス抗 α -SMA 抗体を使用)及び TUNEL 染色を行った。統計解析には、術後10, 14, 18, 21, 28日(実験群: n = 4, 対照群: n = 1)の標本を用いた。

実験の結果、筋線維芽細胞の指標である α -SMA 陽性細胞は筋肉弁が肉芽組織に置換した術後14日目に最も増加したが、18日目以降ではその数を減らしていった。組織中の FGF 2 陽性を示す範囲と FGFR 2 陽性細胞

胞及び TUNEL 陽性細胞は筋線維芽細胞数が減少し始めた術後18日目まで最大の発現が見られた。FGFR 2 , TUNEL 陽性を示した細胞は HE 染色標本と比較した結果, 線維芽細胞様細胞と考えられた。また, ピアソンの相関係数を算出したところ, FGFR 2 と TUNEL 陽性細胞の発現時期には強い正の相関が見られた ($r = 0.723$)。以上の所見から筋線維芽細胞の細胞死は, FGF 2 が FGFR 2 と結合して惹き起こされた可能性が示唆された。一方 FGFR 1 は術後10日目より肉芽組織内の線維芽細胞に陽性のものが出現し, 術後21日目まで持続する所見が示された。この期間が筋肉弁の肉芽期から線維化期に相当していたことより, FGFR 1 は FGF 2 と結合して筋肉弁の治癒組織中に在る創傷線維芽細胞を活性化し, 組織のリモデリングを促したものと思われた。

本研究の結果より, FGFR 2 の発現を調整することで, 筋肉弁の線維性拘縮を抑えられる可能性が考えられた。また, 肥大型瘢痕やケロイド等の病理学的現象を解明する上でも有用と思われた。

研究科教授会は下記審査委員の報告に基づきこれを討議に付して審査した結果, 本研究で得られた知見が今後の口腔外科臨床の進歩に有用であると評価し, 本論文が博士 (歯学) の学位論文に値するものと認め, 合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	井 口 次 夫
	副 査	教 授	藤 井 弘 之
	副 査	教 授	山 口 朗

柳 田 廣 明

(鹿児島県) 昭和44年 9 月16日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Bonding of prosthetic composite material to Ti-6Al-7Nb alloy with eight metal conditioners and a surface modification technique

論文内容の要旨

目 的

チタンは生体親和性が高く, 耐食性も比較的良好であることから補綴装置への応用が拡大しているが, 症例によってはチタン単体では機械的強度が不十分であるといわれている。これを解決するため, 純チタンの耐食性と Ti-6Al-4V 合金の強度を兼ね備えた材料である Ti-6Al-7Nb 合金の応用が検討され, 現在鑄造用合金として臨床応用されている。しかしながら, この合金の接着挙動についての報告は少ない。そこで本研究では Ti-6Al-7Nb 合金を前装補綴装置に使用することを想定して, 前装用コンポジットとの接着力測定試験を行った。合金の各種表面処理法が接着耐久性におよぼす影響及び熱サイクルの影響を検討した。

材料と方法

光重合型前装用コンポジット (アートグラス), 鑄造用 Ti-6Al-7Nb 合金 (T-アロイタフ) および9種の接着システムを使用した。接着システムのうちオープンとシランカップリング剤を用いる表面改質法 (シロック法) 以外の8種はアイサイトオパークプライマー (EOP), アクリルボンド (ACB), アロイプライマー (ALP), セシードII オパークプライマー (COP), MR ボンド (MRB), オールボンド2 プライマー B (ABB), メタファストボンディングライナー (MFB), メタルプライマー II (MP II) で, 1 液性のプライマーである。合金はマグネシア系埋没材 (セレベスト CB) とアルゴンアーク遠心鑄造機 (タイキャストスーパー) を用いて直径10 mm, 厚さ2.5 mmの円板状試料とした。被着面を研磨紙で研削後, シロック法はメーカー指示にしたがって処理を行った。その他は粒径50 μm のアルミナでサンドブラスト処理 (15秒間) を行い, 有孔マスキングテープにて接着面積を規定してからプライマーを塗布した。その後オパークの塗布, 重合, ボディ色コンポジットの築盛重合を行って試験片とした。各表面処理に対して16個作製し, 37℃水中に24時間浸漬し, この状態を熱サイクル0回とみなして半数はせん断試験に供し, 残りは4℃と60℃各1分間の熱リサイクルを20,000回加えた後でせん断試験を行った。接着強さの平均値と標準偏差を算出し, 分散分析と多重比較を用いて統計処理を行った。

結 果

熱サイクル前後ともシロック法が最も高い値を示した ($p < 0.05$)。プライマーの中では COP と ALP による処理が有意差のない ($p > 0.05$) 高い値を示した。続いて MP II による処理群が高い値を示し, ABB, ACB, MFB, MRB, EOP による処理効果は劣っていた。熱サイクル前後の接着強さの減少率においてはシロック法が最も少なかった (16.3%)。

考 察

本実験においては化学的表面処理の効果を検討するために臨床で使用するリテンションビーズなどの機械的維持は排除して行った。検討を行った9種の表面処理中では表面改質をするシロック法が最も高い値を示した。これは第1層のコンポジット化が有効であったと思われる。プライマー処理の中では COP と ALP が高い値を示したがこれは両プライマーに含まれるリン酸エステル系モノマー MDP による効果と考えられる。同じリン酸エステル系モノマーを含む EOP はその効果は低かった。これは EOP のモノマーである MP には MDP の分子構造にある疎水性の構造が無いことが原因と推測される。MP II 中に含まれるチオリン酸エステル系モノマー MEPS は Ti-6Al-7Nb 合金に対して

はMDPより効果は低いことが示された。ABB、ACB、MFB、MRBのカルボン酸系モノマーを含むプライマーの効果は低かった。これは、純チタン、コバルトクロム、ステンレス鋼など非貴金属の接着においてMDPモノマーがカルボン酸系モノマーよりも効果が高いというこれまでの報告と一致している。

結 論

本実験の結果、Ti-6Al-7Nb合金と前装用コンポジットの接着において表面改質法（シロック）とリン酸エステル系モノマーMDPを含むプライマーによる表面処理が有効であることが示された。しかし熱サイクル耐久試験の結果、いずれの処理においても有意に接着強さが減少していることから、臨床においては機械的維持装置を併用する必要があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

柳田廣明は平成9年3月長崎大学歯学部を卒業、平成9年4月より長崎大学大学院歯学研究科に入学し、定められた期間に主科目として歯冠修復学特論、副科目として機能口腔病理学特論を履修したほか、必修科目1科目、選択科目として5科目を履修し、合計32単位を修得した。学位論文の基礎となる研究の要旨は、歯学研究科が平成12年11月9日に実施した研究経過報告会において発表した。また、英語以外の外国語（ドイツ語）は平成12年11月27日に実施した筆記試験において合格した。学位論文の主論文として「Bonding of prosthetic composite material to Ti-6Al-7Nb alloy with eight metal conditioners and a surface modification technique」(American Journal of Dentistry, in press)を付し、歯学研究科長に博士（歯学）の学位を申請した。

定例の歯学研究科教授会はこれを平成13年1月17日に討議し論文の要旨を検討した後、これを受理して差し支えないと認め、下記の審査委員を選定した。3名の審査委員は共同で論文を慎重に審査した後、平成13年1月29日申請者に対する試問を行い、下記の審査結果及び最終試問の結果を平成13年2月7日の歯学研究科教授会で報告した。

主論文は、純チタンの耐食性とTi-6Al-4V合金の強度を兼ね備えた材料であるTi-6Al-7Nb合金を前装補綴装置として臨床応用することを想定して、前装用コンポジットとの接着力測定試験を行い、合金の各種表面処理法が接着耐久性に及ぼす影響及び熱サイクルの影響を検討したものである。光重合型前装用コンポジット（アートグラス）、鑄造用Ti-6Al-7Nb合金及び9種の接着システムを使用した。接着システムのうちオープンとシランカップリング剤を用いる表面改質法（シロック法）以外の8種は1液性のプライマーである。

まず合金を直径10 mm、厚さ2.5 mmの円盤状に鑄造し

た。被着面を研磨紙にて研削後、シロック法はメーカー指示に従って処理を行った。その他は粒径50 µmのアルミナでサンドブラスト処理（15秒間）を行い、有孔マスキングテープにて接着面積を規定してからプライマーを塗布した。その後オベークの塗布、重合、ボディ色コンポジットの築盛重合を行って試験片とした。各表面処理条件に対して16個作成し、37℃水中に24時間浸漬し、この状態を熱サイクル0回とみなして半数はせん断試験に供し、残りは4℃と60℃各1分間の熱サイクルを20,000回加えた後でせん断試験を行った。接着強さの平均値と標準偏差を算出し、分散分析と多重比較を用いて統計処理を行った。

本実験は化学的表面処理の効果を検討するために臨床で使用するリテンションピースなどの機械的維持は排除して行った。検討を行った9種の表面処理中では表面改質をするシロック法が熱サイクル前後とも最も高い値を示した。これは第1層のコンポジット化が有効であったと思われる。プライマー処理の中ではリン酸エステル系モノマーMDPを含む2種が高い値を示した。同じリン酸エステル系モノマーMPを含むプライマーの効果は低かった。これはMPにはMDPの分子構造にある疎水性の基が無いことが原因と推測される。チオリン酸エステル系モノマーMEPSはTi-6Al-7Nb合金に対してはMDPより効果が低いことが示された。カルボン酸系モノマーを含むプライマーの効果は低かったが、これは純チタン、コバルトクロム、ステンレス鋼など非貴金属の接着においてMDPモノマーがカルボン酸系モノマーよりも効果が高いというこれまでの報告と一致している。

本実験の結果、Ti-6Al-7Nb合金と前装用コンポジットの接着において表面改質法（シロック）とリン酸エステル系モノマーMDPを含むプライマーによる表面処理が有効であることが示された。しかし熱サイクル耐久試験の結果、いずれの処置においても有意に接着強さが減少していることから、臨床においては機械的維持装置を併用する必要があることが示唆された。

審査担当者	主 査	教 授	熱 田	充
	副 査	教 授	久 恒	邦 博
	副 査	教 授	藤 井	弘 之

吉 田 至 純

(長崎県)昭和47年11月30日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 噴射切削による露髄に対する接着性レジ
ン直接歯髄覆罩が歯髄に及ぼす影響

論文内容の要旨

現在、歯科医療において頻繁に使用されている回転切削装置は、加圧、振動、騒音、発熱を生じ、さらに、これらにより疼痛を引き起こすため、低年齢児が歯科治療を忌避する理由の1つとなっている。こうした様々な不快事項や問題点を解決するため、回転切削以外の切削法が検討されてきた。その代表例として、レーザー)やエアアブレーション(噴射切削)が挙げられる。

本装置により形成した窩洞は、平面や隅角が明瞭でなく、その特徴から、コンポジットレジンによる接着修復が適しているとされている。しかしながら、本装置は切削能率が高く、窩洞形成中に偶発露髄あるいは不顕性露髄を惹起する恐れがあり、歯冠修復材として用いた接着性レジン材により歯髄が直接覆われる可能性が考えられる。また、本装置は、酸化アルミナ粒子を高圧で噴射することにより歯を切削するので、噴射された酸化アルミナ粒子が露髄面もしくは歯髄中に残留してしまう可能性が高い。しかし、噴射切削による露髄面に用いた接着性レジンによる歯髄反応ならびに酸化アルミナ粒子が歯髄へ及ぼす影響に関する報告は見当たらない。

そこで、噴射切削により窩洞を形成した場合に生じた不顕性露髄面に対し、歯冠修復材として用いられる接着性レジンにより直接歯髄を覆罩し、窩洞を修復した場合の歯髄の反応について、病理組織学的に検討することを目的に本研究を行った。また、歯髄に残留した酸化アルミナ粒子およびその周囲組織について、電子顕微鏡下で観察を行い、酸化アルミナ粒子の歯髄への影響について検討したので報告する。

雑種幼犬10頭の159歯を用い、噴射切削による露髄面に対して、接着性レジンシステムのライナーボンド()[®](LB()群)を用いて直接歯髄覆罩を行った場合の歯髄反応を、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて病理組織学的に観察した。対照群には水酸化カルシウム製剤のカルピタル[®](CV群)を用いた。観察期間は7, 14, 30, 60および90日とした。

光学顕微鏡観察による所見より、全観察期間を通してCV群では良好な結果が得られ、安定していた。一方、LB()群では治癒の遅延傾向が認められたが、重篤な変化を示す不良例は少なく、日時の経過とともに露髄部は暫時修復され、治癒を示した。

光学顕微鏡下でDentin bridgeの形成については、CV

群とLB()群を比較すると、LB()群の方が歯髄の炎症性反応は少ないものの、Dentin bridgeの形成は遅かった。しかし、60日を過ぎるとほとんどの症例で完全に近いDentin bridgeが形成された。

透過型電子顕微鏡学的観察においては、酸化アルミナ粒子が歯髄内に存在することによる顕著な炎症性変化は認められず、60日例で歯髄は線維芽細胞が発達し、旺盛な細胞活性が観察された。

以上の結果より、今回使用した噴射切削装置による露髄の際に、噴射された酸化アルミナ粒子による歯髄への影響は少ないことが判明した。また、噴射切削による偶発露髄、あるいは不顕性露髄に際し、接着性レジンシステムのライナーボンド()[®]を用いて直接歯髄覆罩を行っても、歯髄の保護は可能であることが示唆された。このことから本研究の成果は、噴射切削装置の臨床での有用性について重要であると思われる。

論文審査の結果の要旨

吉田至純は平成9年3月朝日大学歯学部を卒業し、同年4月長崎大学大学院歯学研究科(小児歯科学講座)に入学して、歯学を専攻し、同年4月歯科医師国家試験に合格した。在学中、選択必修科目の主科目(発育審美歯科学特論)、並びに副科目、選択科目を履修した。学位論文の基礎となる研究要旨及び経過は、歯学研究科が平成12年5月に主催した研究経過報告会において発表した。また、歯学研究科が行う英語以外の外国語試験(ドイツ語)には平成12年1月10日に合格した。

学位論文の主論文として「噴射切削による露髄に対する接着性レジン直接歯髄覆罩の影響」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。研究科教授会は、これを平成13年1月17日の定例委員会に付議し、論文の内容の要旨並びに申請の資格等を検討した結果、受理しても差し支えないものと認めたので、下記3名の審査委員を選定した。3名の審査委員は共同で論文内容を慎重に審議し、平成13年1月30日申請者に対して諮問を行い、下記の審査結果及び最終試験の結果を平成13年2月21日の研究科教授会に報告した。主論文の内容は以下のとおりである。

現在、歯科医療において頻繁に使用されている回転切削装置は、加圧、振動、騒音、発熱を生じ、さらに、これらにより疼痛を引き起こすため、低年齢児が歯科治療を忌避する理由の一つとなっている。こうした様々な不快事項や問題点を解決するため、回転切削以外の切削法が検討されているが、その代表例として、レーザーやエアアブレーション(噴射切削)が挙げられる。本研究では、噴射切削に着目した。噴射切削により形成した窩洞は、平面や隅角が明瞭でなく、その特徴から、コンポジットレジンなどの練成充填が適し

ているとされている。しかしながら、本装置は切削能率が高く、窩洞形成中に偶発露髄、不顕性露髄を惹起する恐れがある。そこで、噴射切削により形成した露髄面に対し、歯冠修復材として適しているとされる接着性レジンにより、直接歯髄を覆罩し、窩洞を修復した場合の歯髄の反応について、病理組織学的に検討することを目的として本研究を行った。また噴射され、歯髄に残留した酸化アルミナ粒子およびその周囲組織について、電子顕微鏡下で観察を行い、酸化アルミナ粒子の歯髄への影響について検討を行った。

雑種幼犬10頭の159歯を用い、噴射切削による露髄面に対し、接着性レジンシステムのライナーボンド()[®] (LB()群)を用いて直接歯髄覆罩を行った場合の歯髄反応を、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて病理組織学的に観察した。対照群には水酸化カルシウム製剤のカルピタル[®] (CV群)を用いた。観察期間は7, 14, 30, 60および90日とした。

光学顕微鏡観察による所見より、全観察期間を通してCV群では良好な結果が得られ、安定していた。一方、LB()群では治癒の遅延傾向が認められたが、重篤な変化を示す不良例は少なく、日時の経過とともに露髄部は暫時修復され、治癒を示した。Dentin bridgeの形成については、CV群とLB()群を比較すると、LB()群の方が歯髄の炎症性反応は少ないものの、Dentin bridgeの形成は遅かった。しかし、60日を過ぎるとほとんどの症例で完全に近いDentin bridgeが形成された。

透過型電子顕微鏡学的観察においては、酸化アルミナ粒子が歯髄内に存在することによる顕著な炎症性変化は認められず、60日例で歯髄は線維芽細胞が発達し、旺盛な細胞活性が観察された。

以上の結果より、今回使用した噴射切削装置による露髄の際に、噴射された酸化アルミナ粒子による歯髄への影響は少ないことが判明した。また、噴射切削による偶発露髄、あるいは不顕性露髄に際し、接着性レジンシステムのライナーボンド()[®]を用いて直接歯髄覆罩を行っても、歯髄の保護は可能であることが示唆された。

下記審査委員会は、本研究で得られた知見が、今後の小児歯科臨床の進歩に有用であると評価し、本論文が博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者 主査 教授 後藤 譲治
副査 教授 山口 朗
副査 教授 小林 和英

秋 根 麻

(福岡県)昭和46年11月15日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Effects of ketamine and propofol on autonomic cardiovascular function in chronically instrumented rats

論文内容の要旨

麻酔薬は意識の低下を生じさせるとともに自律神経系への影響もあることが一般的に知られている。臨床において麻酔の深度は血圧、心拍、呼吸や瞳孔の大きさなど様々な自律機能の変化によって評価されている。しかし全身麻酔薬の自律機能に対する影響を調べた研究の多くは前もって麻酔された動物を使用しているためにその結果は一致していない。これはベースの麻酔薬と検証する麻酔薬が相互作用を起こしていることが一因として考えられる。電極が埋め込まれた無麻酔状態のラットを使用することによって麻酔薬の直接の効果を検証することが可能となる。Ketamine および Propofol は麻酔の導入および維持に使われる短時間作用の全身麻酔薬である。我々は無麻酔状態のラットを用いて Ketamine および Propofol が自律神経および心血管系に及ぼす影響について調べることを目的とした。

方 法

雄性 Wistar 系ラット(体重350 g -500 g)を用いてまずネブタール麻酔下に(50mg/kg, i.p.)大腿動・静脈にカニユーレを挿入し、血圧測定と薬物注入を行った。さらに左側腹切開にて左腎動脈に伴走する腎交感神経に電極を装着し、神経と電極をシリコン樹脂にて固定し手術創を閉じた。カニユーレおよび電極は皮下を通して後頸部より体外に出し動物が自由に動けるように特製の回転子に繋いだ。実験は手術侵襲がなくなつたと思われる手術終了後24時間より行った。腎交感神経、血圧および心拍は増幅器を通して記録され同時にオンラインでコンピューター解析を行った。またこの2種類の麻酔薬が圧受容器反射に与える影響について phenylephrine および sodium nitroprusside で血圧を変化させ、それに対する心拍および腎交感神経活動の変化を logistic function curve に fit させ解析した。

結 果

Ketamine (10mg/kg) は血圧を $30.0 \pm 4.5\%$ 、心拍を $17.7 \pm 3.3\%$ 上昇させ、腎交感神経活動を $38.8 \pm 14.6\%$ 亢進させた。またその間の心拍のR-R変動のゆらぎは消失した。およそ10分後に体動と同時にゆらぎが再び現われて血圧、心拍、交感神経活動はコントロール値に戻った。これに対し Propofol (10mg/kg) は血圧を $18.9 \pm 3.5\%$ 、心拍を $5.5 \pm 2.5\%$ 低下させ腎交感神経活動を $7.5 \pm 2.1\%$ 抑制した。また心拍のR-R変動のゆらぎは消失した。およそ15分後に体動と同

時にゆらぎが再び現われ血圧，心拍，交感神経活動はコントロール値に戻った。これらの変化は麻酔薬の投与量の増加とともに変化量が増加した。血圧と心拍および血圧と腎交感神経活動の関係は Ketamine と Propofol ともに濃度依存性に変動域が狭まり，圧反射の感度を示す Max Gain も低下した。

考 察

Ketamine は自律神経および心血管系を亢進し，Propofol は減弱し互いに異なった影響を及ぼすが，圧受容器反射の感度はともに低下させることが明らかになった。またこれらの変化は濃度依存性に顕著になった。以上のことから圧受容器反射の感度が麻酔深度をより忠実に現わす可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

秋根 麻は，平成 9 年 3 月長崎大学歯学部を卒業，同年 4 月に長崎大学歯学研究科博士課程に入学して，歯学を専攻した。在学中，選択必修科目として，硬組織病態生理学特論と歯科麻酔学特論を履修したほか，必修科目 1 科目，選択科目 5 科目を履修し，合計 32 単位を修得した。平成 12 年 3 月 1 日から同 12 月 31 日迄産業医科大学大学院医学研究科応用生理学講座で特別研究生として実験手技の修得に励んだ。学位論文の基礎となる研究要旨及び経過は平成 12 年 9 月 8 日，歯学研究科が主催した研究経過報告会において発表した。また研究科が定める語学試験（ドイツ語）は平成 12 年 12 月 12 日に合格した。

主論文として，『Effects of ketamine and Propofol on Autonomic Cardiovascular Function in Chronically Instrumented Rats』（Autonomic Neuroscience-Basic and Clinical (in press)）を完成，歯学研究科長に提出し，博士（歯学）の学位を申請した。歯学研究科教授会は，これを平成 13 年 2 月 21 日の定例教授会に付議し，論文の内容の要旨ならびに申請の資格などを検討した結果，受理して差し支えないものと認めたので，3 名の審査委員を選定した。審査委員は，共同で論文の内容を慎重に審査し，申請者から研究内容の報告を受けた後，試問を行い，論文審査の結果ならびに最終試験の結果を歯学研究科教授会に報告した。本研究の内容は以下のとおりである。

麻酔薬は意識の低下を生じさせるとともに自律神経系への影響もあることが一般的に知られている。臨床において麻酔の深度は血圧，心拍，呼吸や瞳孔の大きさなど様々な自律機能の変化によって評価されている。しかし全身麻酔薬の自律機能に対する影響を調べた研究の多くは前もって麻酔された動物を使用しているためにその結果は一致していない。これはベースの麻酔薬と検証する麻酔薬が相互作用を起こしていることが一因として考えられる。電極が埋め込まれた無麻酔状

態のラットを使用することによって麻酔薬の直接の効果を検証することが可能となる。Ketamine および Propofol は麻酔の導入および維持に使われる短時間作用型の全身麻酔薬である。我々は無麻酔状態のラットを用いて Ketamine および Propofol が自律神経系および心血管系に及ぼす影響について調べることを目的として本実験を行った。

実験には雄性 Wistar 系ラット（体重 350 g - 500 g）を用いてまずネンプタル麻酔（50（ μ ）/ kg，i.p.）下に大腿動・静脈にカニューレを挿入し，それぞれで血圧測定と薬物注入を行った。さらに左側腹切開にて左腎動脈に伴走する腎交感神経に電極を装着し，神経と電極をシリコン樹脂にて固定し手術創を閉じた。カニューレおよび電極は皮下を通して後頸部より体外に出し動物が自由に動けるように特製の回転子に繋いだ。実験は手術侵襲がなくなったと思われる手術終了後 24 時間より行った。本実験においては動物実験モデルの作成に習熟する為に多くの時間が費やされた。腎交感神経，血圧および心拍は増幅器を通して記録され同時にオンラインでコンピュータ解析を行った。またこの 2 種類の麻酔薬が圧受容器反射に与える影響について phenylephrine および sodium nitroprusside で血圧を変化させ，それに対する心拍および腎交感神経活動の変化を logistic function curve に適合させ解析した。その結果 Ketamine（10（ μ ）/ kg）は血圧を $30.0 \pm 4.5\%$ ，心拍を $17.7 \pm 3.3\%$ 上昇させ，腎交感神経活動を $38.8 \pm 14.6\%$ 亢進させた。またその間の心拍の R-R 変動のゆらぎは消失した。およそ 10 分後に体動と同時にゆらぎが再び現われて血圧，心拍，交感神経活動はコントロール値に戻った。これに対し Propofol（10（ μ ）/ kg）は血圧を $18.9 \pm 3.5\%$ ，心拍を $5.5 \pm 2.5\%$ 低下させ腎交感神経活動を $7.5 \pm 2.1\%$ 抑制した。また心拍の R-R 変動のゆらぎは消失した。およそ 15 分後に体動と同時にゆらぎが再び現われ血圧，心拍，交感神経活動はコントロール値に戻った。麻酔薬の投与量の増加につれて，これらの変化量も増加した。血圧と心拍および血圧と腎交感神経活動の関係は Ketamine と Propofol ともに濃度依存性に変動域が狭まり，圧受容器反射の感度を示す Max Gain も低下した。

今回の実験によって Ketamine は自律神経系および心血管系を亢進し，Propofol は減弱し互いに異なった影響を及ぼすが，圧受容器反射の感度はともに低下させることが明らかになった。またこれらの変化は濃度依存性に顕著になった。以上のことから圧受容器反射の感度が麻酔深度をより忠実に現わす可能性が示唆された。

研究科教授会は審査委員会の報告に基づき，これを討論に付して審査した結果，本論文は歯学の進歩に貢

献するところ大で博士(歯学)に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主 査 教 授 加 藤 有 三
副 査 教 授 佐 藤 俊 英
副 査 教 授 藤 井 弘 之

古 賀 義 之

(佐賀県)昭和33年7月27日生

授与年月日 平成13年3月7日

主 論 文 Development of a three-dimensional jaw tracking system implanted in the freely moving mouse

論文内容の要旨

目 的

咀嚼をつかさどる、顎の開閉運動の基本的なプログラムは脳幹部に存在するが、この基本プログラムは末梢からの感覚フィードバックによって変化することが知られている。従来より、この末梢からの感覚フィードバックを明らかにする目的で、咀嚼運動の動物モデルとしてウサギ、ネコ等が用いられてきた。しかし、近年の分子生物学の発展によって、ノックアウトマウスや大理石病を伴う無歯顎ミュータントマウスが研究材料として利用され、顎口腔機能分野でもマウス顎運動計測の必要性が生じている。しかしながら、現在マウスの咀嚼運動を計測するシステムはなく、他の動物の計測システムを直接マウスに応用することは難しいと考えられる。さらに、これまで報告のある動物の顎運動計測システムのほとんどが、動物の頭部を固定して計測を行うため、自然な状態での咀嚼運動が記録されているとは言い難い。

そこで本研究では、動物の自然な状態での咀嚼運動を記録するために、磁気センサーを利用した高精度小動物3次元顎運動計測システムを開発した。さらに、本システムとマウスに応用することで、新たな咀嚼運動実験モデルの確立を目的とした。

システム構成

本計測装置は、4つのホール素子からなるセンサーユニットと磁石の相対的位置関係を算出するシステムであり、キャリブレーション時に決定したセンサー出力電圧-座標値変換重回帰式に従って、センサー出力信号から3次元座標を算出できる。センサーの出力は、計測用アンプによって500倍に増幅後、カットオフ周波数16Hzの2次ローパスフィルターで高域ノイズをカットしたあと、サンプリング周波数100HzのADコンバータでデジタル変換をし、パーソナルコンピュータに入力した。キャリブレーションポイントは、マウスの咀嚼運動の範囲を想定して、1辺が3()の立方体の範囲で、0.5()ステップの $7 \times 7 \times 7 = 343$ 点を設定

した。中央精密機械社製3Dパルスステージを用いて、キャリブレーションポイントと一致するように、センサーと磁石の相対的關係を変化させ、各ポイントにおける出力電圧値より出力電圧-座標値変換重回帰式を得た。

システムをマウスに装着する際には、キャリブレーション時のセンサーとマグネットの相対的位置を維持した状態で移植する必要があるため、今回新たにスライディングジグを作製した。このジグを用いることで相対的位置を維持したまま、標点としてのサマリウムコバルト磁石を下顎下縁部に、センサーユニット装着のためのコネクター(ICソケットのピンを利用)を鼻骨上部に接着可能とした。接着には、接着用レジン(スーパーボンド)を用いた。センサーユニットはこのコネクターを利用して着脱可能とし、通常は装着せず、計測時にこのコネクターを介して装着できるようにした。

システムの評価

マウス用に調整した顎運動範囲3()の立方体で、出力電圧-座標値変換式より計算された座標値と座標の実測値との平均誤差は側方が1.4%、前後方向が2.1%、垂直方向が0.5%であった。分解能は、前後方向および側方が0.02()以上、上下方向が0.01()以上であった。センサーユニットをマウスの頭部に装着して、従来からの研究のような麻酔、非動化した状態ではなく、自然咀嚼嚙下に近い無麻酔無拘束状態で顎運動を記録した。その結果リズムカルで特徴的な咀嚼運動が記録され、マウスの咀嚼運動は、開閉運動および側方運動に加え、前後方向に広い運動範囲を持つことが明らかとなった。ペレット咀嚼時の顎運動の範囲は、側方が約0.8()、垂直方向が約1()、前後方向が約1.2()であった。咀嚼時顎運動の矢状面投影図より、開口相では、マウスは顎を前方に動かし、約1/3開口位で最前方位をとったあとさらに開口を続け、顎を後方に動かしながら最大開口位をとった。閉口相では、約1/3閉口位で最後方位をとったあと、顎を前方に動かし最大閉口位をとった。

考 察

本システムの特徴は、マウスのような小さい動物から比較的大きな動物まで適応範囲が広く、動物を拘束しない状態で、顎運動の測定が可能である。また、正確な顎運動を測定するために、ノイズの低減やシステムの安定性に対して、十分な対策を施しているため、長時間にわたる信頼できるデータが得られる。本装置を使用すれば、マウスを使った動物モデルで詳細な顎運動解析が可能であり、非常に応用範囲の広いシステムが完成した。

論文審査の結果の要旨

古賀義之は、昭和59年 3 月九州大学歯学部を卒業し、同年 6 月長崎大学歯学部附属病院医員、同年10月同助手を経て、昭和60年 6 月歯学部助手となり、現在に至っている。卒業当初より、矯正歯科に所属し、診療および研究に従事してきた。

研究内容の要旨および研究の経過は、歯学研究科が平成13年 2 月 8 日に開催した研究経過報告会において、「小動物 3 次元顎運動計測システムの開発とマウスへの応用」の演題で発表した。同研究科が行った外国語（英語）の試験には平成12年10月 4 日、英語以外の外国語（ドイツ語）の試験には平成13年 2 月 7 日に合格した。

学位論文として、「Development of a three-dimensional jaw tracking system implanted in the freely moving mouse, 印刷中」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13年 2 月21日の定例の研究科教授会に付議し、申請の資格等を検討した。その結果、受理しても差し支えないものと認めたので、3名の審査委員を選定した。審査委員は共同で論文の内容を慎重に審査し、申請者に対して試問を行い、下記の審査結果を平成13年 3 月 7 日の研究科教授会に報告した。

本研究は、磁気センサーを利用した高精度小動物 3 次元顎運動計測システムを開発し、マウスに応用することで、新たな咀嚼運動実験モデルの確立を目的としている。研究の背景としては、以下のような事項が上げられる。(1)従来より、マウスを用いた咀嚼運動の研究はなく、咀嚼運動の動物モデルとしては、ウサギ、ネコ等が用いられてきた。(2)近年の分子生物学の発展によって、ノックアウトマウスやミュータントマウスが研究材料として利用され、顎口腔機能分野でもマウス顎運動計測の必要性が生じている。(3)マウスは非常に小さいため、他の動物の咀嚼運動計測システムを直接マウスに応用することは難しい。(4)計測時に動物の頭部を固定しない、高精度の 3 次元計測システムが望まれる。

計測装置の本体は、4つのホール素子からなるセンサーユニットと磁石の相対的位置関係を算出するシステムであり、キャリブレーション時に決定したセンサー出力電圧-座標値変換重回帰式に従って、センサー出力信号から 3 次元座標を算出できる。キャリブレーションポイントは、1辺が 3 mm の立方体の範囲で、0.5mm ステップの $7 \times 7 \times 7 = 343$ 点を設定した。中央精密機械社製 3D パルスステージを用いて、センサーと磁石の相対的関係を変化させ、各ポイントにおける出力電圧値より出力電圧-座標値変換重回帰式を得た。システムをマウスに装着する際には、キャリブ

レーション時のセンサーとマグネットの相対的位置を維持した状態で移植した。標点としてのサマリウムコバルト磁石を下顎下縁部に、センサーユニット装着のためのコネクター（IC ソケットのピンを利用）を鼻骨上部に接着可能とした。センサーユニットはこのコネクターを利用して着脱可能とし、通常は装着せず、計測時にこのコネクターを介して装着できるようにした。

システムの評価では、マウス用に調整した顎運動範囲で、出力電圧-座標値変換式より計算された座標値と座標の実測値との平均誤差は側方が 1.4%、前後方向が 2.1%、垂直方向が 0.5% であった。分解能は、前後方向および側方が 0.02mm 以上、上下方向が 0.01mm 以上であった。センサーユニットをマウスの頭部に装着して、従来からの研究のような麻酔、非動化した状態ではなく、自然咀嚼嚥下に近い無麻酔無拘束状態で顎運動を記録した。その結果リズムカルで特徴的な咀嚼運動が記録され、マウスの咀嚼運動は、開閉運動および側方運動に加え、前後方向に広い運動範囲を持つことが明らかとなった。

本計測システムの特徴は、マウスのような小さい動物から比較的大きな動物まで適応範囲が広く、動物を拘束しない状態で、顎運動の測定が可能である。また、正確な顎運動を測定するために、ノイズの低減やシステムの安定性に対して、十分な対策を施しているため、長時間にわたる信頼できるデータが得られる。本装置を使用すれば、マウスを使った動物モデルで詳細な顎運動解析が可能であり、非常に応用範囲の広いシステムとしての完成度は高いと考えられる。

研究科教授会は、審査委員会の報告に基づき、討論、審査をした結果、本論文は歯学全般の進歩に貢献するところ大で、博士（歯学）に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	小 林 和 英
	副 査	教 授	佐 藤 俊 英
	副 査	教 授	大 井 久 美 子

鎌 田 幸 治

(鹿児島県)昭和37年 6 月24日生

授与年月日 平成13年 3 月21日

主 論 文 Early bond strength and durability of bond between a ceramic material and chemically-cured or dual-cured resin luting agent

論文内容の要旨

緒 言

既製のブロックから修復物を削り出すミリング法を応用した、CAD/CAM によるセラミックシステムが近年開発市販された。

一方、製作された修復物が口腔内で長期間機能するためには、接着システムの高い接着耐久性が不可欠である。さらに、修復物装着直後に形態修正や咬合調整を行うことがあるので、接着初期時にも高い接着強さが要求される。

そこで本研究では、CAD/CAM用のセラミックスの接着に有効な方法を検討する目的で、2種類の化学重合型と3種類のデュアルキュア型という異なる重合様式を有するレジン接着剤の、Cerec 2 セラミックスに対する初期接着強さと接着耐久性を評価した。

材料と方法

レジン接着剤として、パナビア21 (P21, クラレ), スーパーボンド C&B (SB, サンメディカル), パナビアフルオロセメント (PFC, クラレ), クラパール DC (CLP, クラレ), ビタセックデュオセメント (VCDC, ビタ) の5種類を用いた。また、被着体としてはCAD/CAM用セラミックスブロック (Cerec 2 Vitablocs Mark II, ビタ) を $10 \times 8 \times 2.5(1)$ と $6(1) \phi \times 2.5(1)$ の2種類の形状に調整した。

セックポーセレンの表面はまず、#600のエメリー紙で研削後、アセトン溶液で5分間超音波洗浄し、37%リン酸溶液 (クラレ) で60秒間エッチング後、水洗・乾燥した。さらに、各レジン接着剤で接着する前にクリアフィルポーセレンボンド (クラレ) の3液を混和し、30秒間塗布後、エアブローで揮発成分を蒸散させた。

次に、接着面積を規定するために、直径 $4(1)$ の孔をあけたマスキングテープを $10 \times 8 \times 2.5(1)$ のポーセレンに貼付し、形状と大きさの異なるポーセレン同士を各種レジン接着剤で突き合わせ接着した。レジン接着剤のうち PFC と CLP, VCDC については、クイックライト (クラレ) を用いて上方より40秒間光照射を行った。接着10分後と20分後にオートグラフを用い、圧縮剪断荷重を加え圧縮剪断接着強さを求めた。さらに、37(2)水中に24時間浸漬 (T.C 0) した試験片及び37(2)水中に24時間浸漬後に $4(2)$ と $60(2)$ 水槽に交互に浸漬する熱サイクルを20,000回行った (T.C 20,000) 試験片を作製し同様に接着強さを求めた。各グループとも、得られた値から平均値と標準偏差を求めた後、統計処理を行った。

結果と考察

10分後と20分後では、2種類の化学重合タイプのレジン接着剤である P21 と SB は、3種類のデュアルキュアタイプのレジン接着剤に比べて有意に低い接着強さを示した。しかしながら、T.C 0 では、2種類の化学重合タイプのレジン接着剤の接着強さは、3種類のデュアルキュアタイプのレジン接着剤とほぼ同じ接着強さを示した。

3種類のデュアルキュアタイプのレジン接着剤でセラミックスを接着した場合、10分後、20分後、T.C 0, T.C 20,000のいずれのグループ間においても接着強さに有意差は認められなかった。一方、2種類の化学重合タイプのレジン接着剤でセラミックスを接着した場合、10分後および20分後と T.C 0 および T.C 20,000 の間で接着強さに有意差が認められた。

デュアルキュアタイプのレジン接着剤の接着強さは、10分後は化学重合タイプの約3.5倍、20分後は約2倍であった。デュアルキュアタイプのレジン接着剤は光照射直後に照射面から重合が開始され、次に化学重合が徐々に進んでいくためと考えられる。

修復物を窩洞に接着した後に咬合調整や形態修正を行う場合、咬合力によるストレスが修復物を通してレジン接着剤に伝わる。接着力が弱いと、セラミックスとレジン接着剤との接着に悪影響を及ぼすことが予測される。さらに、辺縁漏洩やセラミックスの破折の原因となる可能性もある。本研究において、デュアルキュアタイプのレジン接着剤は化学重合タイプよりも、CAD/CAM用セラミックスと高い初期接着強さを示しただけでなく、熱サイクル20,000回後も高い接着耐久性が維持された。

以上の結果より、シランカップリング剤を含んだプライマーでCAD/CAM用セラミックスを表面処理後、光と化学重合によるデュアルキュアタイプのレジン接着剤で合着した場合、接着初期時にも熱サイクル後も極めて高い接着強さを示すことが明らかになった。

したがって、本研究に用いたCAD/CAM用セラミックスによる修復物を装着直後に形態修正や咬合調整を行う場合には、化学重合タイプのレジン接着剤を用いるシステムよりも、光と化学重合のデュアルキュアタイプのレジン接着剤を用いるほうが有効であると結論づけられた。

論文審査の結果の要旨

鎌田幸治は、平成2年3月長崎大学歯学部を卒業し、同年4月に長崎大学歯学部附属病院見學員、同年7月より長崎大学歯学部附属病院医員 (歯科・研修医)、平成4年4月より長崎大学歯学部附属病院医員、平成6年2月より長崎大学歯学部附属病院助手、平成6年4月に長崎大学歯学部助手へ配置換えになり、現在に至っている。

学位論文の基礎となる研究要旨及び経過は、平成11年9月9日、歯学研究科学位申請者資格審査委員会が主催した研究経過報告会において、「レジンセメントのセックポーセレンとの接着性に関する研究」の演題で発表を行った。また語学試験 (英語) は平成10年2月18日に合格し、歯学研究科が行う英語以外の外国語 (ドイツ語) の試験には、平成13年11月27日に合格

した。

学位論文の主論文は「Early bond strength and durability of bond between a ceramic material and chemically-cured or dual-cured resin luting agent」American Journal of Dentistry (in press), 他に「Effect of ceramic surface treatments on the bond of four resin luting agents to a ceramic material」The Journal of Prosthetic Dentistry 79 (5), 1998を参考論文として付し、平成13年 2 月14日歯学研究科に博士(歯学) の学位申請が行われた。定例の歯学研究科教授会は、これを平成13年 2 月21日に付議し、これを受理して差し支えないものと認め、下記の審査委員を選定した。3 名の審査委員は共同で論文内容を慎重に審査し、平成13年 3 月 6 日、申請者に対する試問を行い、下記の審査結果及び試験の結果を平成13年 3 月21日の歯学研究科教授会で報告した。

主論文は、CAD/CAM 用のセラミックスの接着に有効な方法を検討する目的で、2 種類の化学重合型と3 種類のデュアルキュア型という異なる重合様式を有するレジン接着剤の、Cerec 2 セラミックスに対する初期接着強さと接着耐久性を評価したものである。

CAD/CAM 用セラミックスブロックを $10 \times 8 \times 2.5$ () と $6 (\phi) \times 2.5$ () の2 種類の形状に調整し、被着面を #600 のエメリー紙で研削後、アセトン溶液中で超音波洗浄し、その後にリン酸処理を行った。セラミック用プライマーを塗布後、形状と大きさの異なるポーセレンをベアにし、各種レジン接着剤で接着した。接着10分後と20分後に圧縮剪断接着強さを求めた。さらに、37℃水中に24時間浸漬した試験片、及び37℃水中に24時間浸漬後に 4℃と60℃水中に交互に 1 分間ずつ浸漬する熱サイクルを20,000回行った試験片についても、同様に接着強さを求めた。

その結果、熱サイクル後の接着強さは、化学重合型、デュアルキュア型のいずれのレジン接着剤でも40MPa 以上の高い接着強さを示したが、10分後ではデュアルキュア型のレジン接着剤の接着強さは化学重合型の約3.5倍、20分後では約2倍であった。

本研究において、デュアルキュア型のレジン接着剤は化学重合型よりも、CAD/CAM 用セラミックスと高い初期接着強さを示しただけでなく、熱サイクル20,000回後も高い接着耐久性が維持された。

以上の結果より、本研究に用いた CAD/CAM 用セラミックスによる修復物を、装着直後に形態修正や咬合調整を行う場合には、化学重合型のレジン接着剤を用いるシステムよりも、デュアルキュア型のレジン接着剤を用いるほうが有効であることが明かとなった。

下記審査委員会は、本研究によって得られた新しい知見は歯学の進歩に貢献するところ大であり、博士(歯学) の学位論文に値するものと判定した。

審査担当者	主 査	教 授	熱 田	充
	副 査	教 授	藤 井	弘 之
	副 査	教 授	久 恒	邦 博

久 松 徳 子

(長崎県) 昭和40年 1 月13日生

授与年月日 平成13年 3 月21日

主 論 文 Effect of silane primers and unfilled resin bonding agents on repair bond strength of a prosthodontic microfilled composite

論文内容の要旨

近年、光重合型コンポジット材料の物性や取り扱い方法の改善により、審美性に優れた補綴物の作製が可能となり、前装されたクラウンやブリッジの作製件数が増加した。しかしながら、形態的、審美的に、より天然歯に近づけるためには、技工操作時や完成後に一度固めた前装材料の削合を行い、その削合面の上に新たに前装材料を築盛するという操作が不可欠である。一般的に、コンポジットレジン同志を接着するには、表面に未重合層を残しておけば接着は可能である。ところが、この削合された前装材料の上に新たな前装材料を直に築盛しても十分な接着強度は得られず、何らかの前処理が必要である。そこで本研究は光重合型コンポジット材料を用いた前装冠作製時の追加築盛における、シラン処理剤とボンディング剤の接着促進効果について検討したものである。

使用した材料は、前装材料として Dentacolor DA-30 (デンティン色) と SA-30 (エナメル色) (Heraeus Kulzer), シラン処理剤として Porcelain Liner M (サンメディカル) と Silicer (Heraeus Kulzer), ボンディング剤として Dentacolor Opaker (Heraeus Kulzer) と New Metacolor Photo Opaque (サンメディカル) である。この前装材料のフィラーは有機質複合フィラーを含むマイクロフィラー型である。Porcelain Liner M は 2 液性で、2 液を混合することによりシランが活性化される。Silicer は 1 液性で、すでに活性化された状態でアンブルに入っている。Dentacolor Opaker は MMA を 55%、UDMA を 44% 含有し、New Metacolor Photo Opaque は MMA を 20%、UDMA を 80% 含有している。

試料作製方法は、円板状試料 (直径10 () , 高さ2.5 ()) を前装材 (デンティン色、Dentacolor DA-30) にて作製し、Dentacolor XS で180秒間光線照射し、表面をカーボランダムポイントで削合した。この削合面に2 種類のシラン処理剤 (Porcelain Liner M, Silicer) と2 種類のボンディング剤 (Dentacolor Opaker, New Metacolor Photo Opaque) を組み合わせて塗布し、被着面として使用した。コントロールとして、180秒間の光線照射のみで表面に未重合層を残したものと、カー

ボランダム研削のみのものを用いた。各処理後に、直径5mmの穴あき両面テープ（接着面積を規定）を貼付し、その上に真鍮リング（内径6mm、高さ2mm）を置き、同一メーカーであるがエナメル色の前装材を築盛し、光線照射を90秒間行った。30分室温に放置してから、37℃水中および空气中に24時間保管後、剪断接着試験を行った。コントロールとして未重合層を残したものとカーボランダム研削のみのものは、そのまま穴あき両面テープを貼付してから同様な操作を行った。また、実体顕微鏡（×10）にて破断面の観察を行った。

実験結果は、カーボランダムポイント削合のみの場合、未重合層残存の場合と比較して接着強さが低下し、シラン処理剤とボンディング剤を併用した場合は他の処理面と比較して、高い接着強さを示した。さらに破壊形態は、接着強さが向上するにつれ、デンティン色とエナメル色双方の前装材が凝集破壊を起こすタイプの破壊形態が増加する傾向にあった。強固な接着にはシラン処理剤が有効に効くように、削合面に無機質フィラーを十分に露出させることと、ボンディング剤により接着に寄与する未重合層を削合面上に形成させることが必要である。ボンディング剤のみ使用した場合は、Dentacolor Opaker 液を使用した方が New Metacolor Photo Opaque 液を使用したものよりも高い接着強さを示した。これは、UDMA モノマーが MMA モノマーよりも粘性が高く接着面への浸透性が劣ることと、重合性が劣る UDMA モノマーを New Metacolor Photo Opaque 液は Dentacolor Opaker 液よりも多く含むためと考えられる。2液性シラン処理剤を応用した場合は、コントロールの未重合層残存の場合よりも高い接着強さを示した。これは、ボンディング剤重合用の光線照射によりデンティン色前装材の強度が増し、接着強さの増加として現れたものと考えられる。1液性シラン処理剤を応用した場合は、コントロールの未重合層残存の場合よりも高い接着強さを示した。

以上のことより、コンポジット型前装材の築盛において、形態修正や色調調整の必要性から表面を削合した場合、2液性のシラン処理剤（Porcelain Liner M）を塗布し、さらにボンディング剤を併用することによって、追加前装材料の高い結合強度を確保できることを明らかにし、臨床応用も可能であると結論づけた。

論文審査の結果の要旨

久松徳子は、平成2年3月に長崎大学歯学部を卒業し、同年4月に歯科医師国家試験に合格した。同年7月1日より長崎大学歯学部附属病院医員（歯科・研修医）となり、平成4年3月に2年間の臨床研修を修了し、同年4月より長崎大学歯学部附属病院助手となり現在に至る。

平成13年2月8日に開催された第40回大学院歯学研

究科学位論文申請者研究経過報告会において、「歯科補綴用前装材料の築盛におけるシラン処理剤とボンディング剤の接着促進効果」の演題で発表を行った。また、歯学研究科が行う語学試験において、平成13年2月7日に実施された英語の筆記試験に合格し、英語以外の外国語（ドイツ語）は、平成13年2月22日に実施された筆記試験に合格した。

学位論文の主論文として「Effect of silane primers and unfilled resin bonding agents on repair bond strength of a prosthodontic microfilled composite」{Journal of Oral Rehabilitation (in press)}を歯学研究科に提出し、博士（歯学）の学位を申請した。歯学研究科教授会はこれを平成13年3月7日の定例委員会にて付議し、受理して差し支えないものと認め、3名の審査委員を選定した。この3名の審査委員は共同で論文の内容を審議し、平成13年3月12日に申請者に対し試問を行い、審査の結果並びに最終試験の結果を平成13年3月21日の歯学研究科教授会に報告した。

主論文は、前装冠作製時の前装材削合面への追加築盛における、シラン処理剤とボンディング剤との影響について検討したものである。Dentacolorにて作製された前装冠の削合面への追加築盛を想定して、削合面側を Dentacolor DA-30で作製し、追加側前装材には Dentacolor SA-30を用い試料を作製した。削合面の処理は、2種類のシラン処理剤（Porcelain Liner M, Silicer）と2種類のボンディング剤（Dentacolor Opaker, New Metacolor Photo Opaque）を組み合わせ塗布し、被着面として使用した。また、コントロールとして、180秒間の光線照射のみで未重合層を残存させたものと、カーボランダム研削のみのものを用いた。試料を作製し、24時間後に剪断試験を行い、剪断接着強さと破壊形態について検討した。その結果、カーボランダム研削のみの場合、未重合層残存の場合と比較して接着強さが低下し、シラン処理剤とボンディング剤を併用した場合は、他の処理面と比較して高い接着強さを示した。さらに破壊形態は、接着強さが向上するにつれ、デンティン色とエナメル色双方の前装材が凝集破壊を起こすタイプの破壊形態が増加する傾向にあった。また、強固な接着には、シラン処理剤が有効であるように、削合面にフィラーを十分に露出させることと、接着に寄与する未重合層を削合面上にボンディング剤により形成させることが必要である。そこで、シラン処理剤においては1液性と2液性シラン処理剤それぞれを塗布したときの接着強さについて検討し、ボンディング剤においてはボンディング剤のみを塗布したときの接着強さについて検討した。シラン処理剤を塗布した場合は、未重合層残存の場合よりも高い接着強さを示した。この高い接着強さはボンディング剤重合のた

めの光線照射により、デンティン色前装材の強度が増したものと考えられる。ボンディング剤のみ塗布した場合は、浸透性と重合性において、UDMA モノマーに勝る MMA モノマーを含む Dentacolor Opaker 液を塗布した方が、高い接着強さを示した。以上のことより、コンポジット型前装材築盛時の削合面への追加築盛において、2 液性のシラン処理剤 (Porcelain Liner M) の塗布後に、ボンディング剤を併用することにより、追加前装材の高い接着強度が確保でき、臨床応用も可能であると示唆された。

審査委員会は、本研究で得られた知見が臨床歯学において有用であると評価し、本論文が博士 (歯学) の学位論文に値するものと認めた。

審査担当者 主 査 教 授 熱 田 充
副 査 教 授 久 恒 邦 博
副 査 教 授 林 善 彦

中 島 友 紀

(岡山県) 昭和45年 2 月 3 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 慢性関節リウマチの骨破壊における骨形成系機能不全と骨吸収系機能亢進の分子細胞生物学的研究

論文内容の要旨

本研究では、慢性関節リウマチ (RA) に必発する骨破壊機序解明を目的に、まず RA 患者の骨組織学的解析に始まり、骨形成系の機能不全として、Fas を介した骨芽細胞のアポトーシス機構を解析し、次に骨吸収系の機能亢進として、破骨細胞形成促進因子 RANKL を介した破骨細胞の分化増殖について解析した。

1. 慢性関節リウマチの骨・関節破壊の臨床像

RA 患者における関節の骨微細構造を μ -CT で解析した。RA 患者では、変形性関節症 (OA) 患者に比べ、骨梁が細く連結性が乏しいことを明らかにした。また、RA 患者の骨組織を TUNEL 染色した結果、骨芽細胞にアポトーシスが観察され、骨形成系機能不全への関与が示された。

2. 骨形成系骨芽細胞のアポトーシス制御機構

骨芽細胞に活性化単核球を共存させた培養系を用い、骨芽細胞のアポトーシス機構を検討した。その結果、活性化単核球と培養上清が、Fas / FasL 経路で骨芽細胞のアポトーシスを誘導することを見出した。活性化単核球には FasL が発現し培養上清に遊離され、骨芽細胞には Fas が発現していることを見出した。さらに、RA 患者の関節病変の組織染色により、骨芽細胞に Fas が、浸潤活性化単核球に FasL の発現が確認された。その関節滑液には高値の可溶性 FasL も確認された。

次に抗 Fas IgM 抗体によって誘導される培養骨芽細胞

の Fas 依存性アポトーシスに対する炎症性サイトカインの影響を検討した。炎症性サイトカインの TNF- α が単独では骨芽細胞にアポトーシスを誘導しないが、Fas 発現頻度を増加させ、アポトーシスを増強することを明らかにした。細胞内のシグナル因子を測定した結果、アポトーシス実行因子 pro-caspase-3 を増加し、アポトーシス抑制因子 XIAP を抑制することが見出され、TNF- α が骨芽細胞をアポトーシスに陥り易い状態にしていると考えられた。

さらに RA 治療薬剤の影響を検討した結果、dexamethason (DEX) は、培養骨芽細胞の増殖能やアポトーシスに対して直接的な影響は認められなかったが、活性化単核球の FasL 発現を抑えることにより、骨芽細胞のアポトーシスを抑制することが新たに見出された。また、vitamin K₂ は、骨芽細胞の Fas 発現を低下させ、Fas 依存性アポトーシスを抑制することが明らかになった。細胞内のシグナル因子を測定した結果、アポトーシス実行因子を抑制し、アポトーシス抑制因子を増加することが見出され、骨芽細胞がアポトーシスに陥りにくい状態になっていると考えられた。

3. 骨吸収系破骨細胞の分化増殖の制御機構

破骨細胞制御因子 (形成抑制因子 OPG、形成促進因子 RANKL とその receptor である RANK) の挙動について検討した。まず、ligand と receptor の特異的結合を利用し、微量分子を濃縮して western 法を行う LRP western 法を新たに開発し、制御因子の蛋白レベルでの検出に成功した。その結果、ST2 細胞および骨芽・ストローマ細胞は、通常の状態では RANKL を発現しておらず OPG を持続的に産生分泌していることが明らかになった。さらに、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ / DEX または、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ / prostaglandine E₂ (PGE₂) を処理することにより、OPG が低下し、膜結合型 RANKL が発現し、前駆細胞を破骨細胞に分化できる状態にすることを見出した。

また骨芽・ストローマ細胞は RANKL を発現し、metalloprotease の shedding によって、可溶性分子へ変換されることを見出した。この shedding は代表的な炎症性サイトカインで増加することが明らかとなり、さらに OPG 分泌が抑制された。炎症性サイトカインは、可溶性 RANKL を遊離拡散し、広範囲で破骨細胞の形成と活性化を引き起こすと考えられた。

次に、破骨細胞の分化誘導と遊走能に対する RANKL の影響を解析した。その結果、RANKL により骨髄細胞が破骨細胞へ分化誘導されることが確認された。多量体の RANKL を作成し添加した結果、破骨細胞形成能が促進されることも明らかとなった。また、破骨細胞形成因子 PGE₂ が前駆細胞 RANK 発現量を増加することで、破骨細胞形成能を増強することも見出

された。さらに、RANKL が破骨細胞の遊走能を高めることも証明された。

以上、本研究により、RA に必発する骨破壊機序として、骨形成系骨芽細胞の Fas / FasL を介したアポトーシスによる機能不全と、骨吸収系破骨細胞の破骨細胞形成促進因子による機能亢進が重要であることを明らかにした。これらの知見は、今後の RA の骨破壊の治療において多くの示唆を与えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

中島友紀は、平成8年4月に長崎大学大学院薬学研究科博士前期課程へ入学し、同課程修了後、平成10年4月に同研究科博士後期課程に進学し、現在に至っている。これらの期間を通じて、慢性関節リウマチの骨破壊機序の解明を目的とし、一貫した研究を展開してきた。これらの研究成果を基に学位論文(主論文)「慢性関節リウマチの骨破壊における骨形成系機能不全と骨吸収系機能亢進の分子細胞生物学的研究」をまとめ、主論文の基礎となる原著論文(参考論文)6編と副論文18編を添付し、平成13年1月、博士(薬学)の学位を申請した。薬学研究科委員会は同年1月24日の定例会において論文内容の要旨、資格等を検討した結果、受理を決定し、下記の論文審査担当者を選出した。

審査担当者は、その内容を慎重かつ厳正に審議した上で、2月2日に開催された博士論文発表会において試問を行い、次いで2月13日最終審査を行った。そして、その論文内容の要旨と審査結果を平成13年3月5日の研究科委員会に報告した。

本論文は、自己免疫性疾患の一つである慢性関節リウマチ(rheumatoid arthritis: RA)に必発する骨破壊機序解明を目的に、まずRA患者の骨組織学的解析を行い、骨形成系の機能不全として骨芽細胞のアポトーシス機構を解析し、次に骨吸収系の機能亢進として破骨細胞形成制御因子を介した破骨細胞の分化増殖について解析している。

第1章では、RA患者と炎症のない変形性関節症(osteoarthritis: OA)患者の骨組織を3次元的 μ -CT法により比較解析し、RA患者で骨量や骨密度が乏しい事を確認している。さらに骨組織の解析結果から、RA患者の骨の骨芽細胞において、著明なアポトーシス像を見出し、RAの関節周囲の骨破壊におけるアポトーシスの関与を初めて明らかにした。

これらの新たな知見を基に、第2章では、培養骨芽細胞に炎症性細胞として活性化単核球を共存培養させた系を用い、活性化単核球による骨芽細胞のアポトーシス誘導の機構を検討した。第1節では、共存培養系を確立し、活性化単核球がFas / FasL経路で骨芽細胞にアポトーシスを誘導する事実を明らかにしている。RA関節病変の組織解析においても、骨芽細胞にFas

が、浸潤活性化単核球にFasLが発現し、関節滑液には可溶性FasLが上昇していることを確認しており、臨床的にも意義の高い知見と考えられる。第2節では、骨芽細胞のFasを介したアポトーシスに対する炎症性サイトカインの影響について解析し、TNF- α が、骨芽細胞のFas発現頻度を増加させ、細胞内のアポトーシス実行因子pro-caspase-3を増加し、その抑制因子XIAPを抑制して、アポトーシスに陥り易い状態にしていることを見出している。第3節では、骨芽細胞のFasを介したアポトーシスに対するRAの治療薬剤の影響を検討しており、dexamethasonが活性化単核球のFasL発現を抑制することによって骨芽細胞のアポトーシスを抑制しているという新たな知見を明らかにしている。また、vitamin K₂が、骨芽細胞のFas発現を低下させ、アポトーシス実行因子を抑制し、アポトーシス抑制因子を増加することで、Fas依存性アポトーシスを抑制することを明らかにしている。

第3章では、骨吸収系細胞である破骨細胞の分化制御を司る骨芽・ストローマ細胞に発現する破骨細胞形成制御因子の解析へと研究を展開している。第1節では、ligandとreceptorの特異的結合を利用して微量分子を濃縮し検出するligand-receptor precipitation (LRP) western法を用い、破骨細胞形成促進因子receptor activation of NF- κ B ligand(RANKL)および破骨細胞形成抑制因子osteoprotegerin(OPG)の検出に成功している。この検出法により、破骨細胞制御因子の蛋白レベルでの検出が初めて可能となり、その挙動を定量的に研究できる分野を開くことになった。これは特筆すべき成果である。その結果、骨芽・ストローマ細胞が通常の状態ではRANKLを発現しておらず、OPGを持続的に産生分泌していること、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /DEXまたはprostaglandin E₂(PGE₂)を処理することにより、OPGが低下し、膜結合型RANKLが発現し、前駆細胞を破骨細胞に分化できる状態にすることを新たに見出している。第2節では、RANKLを介した破骨細胞に対する炎症性サイトカインの影響、特にRANKLのshedding機構を中心に検討しており、RANKLが、metalloproteaseによって可溶性分子へ変換されること、さらに炎症性サイトカインでこのsheddingが増加することを明らかにしている。さらに第3節では、破骨細胞の分化誘導と遊走能に対するRANKLの影響を解析し、多量体化RANKLによる破骨細胞形成能の増強、PGE₂による前駆細胞のRANK発現量増加、RANKLによる破骨細胞遊走能の増加を明らかにしている。

この研究により、RAに必発する骨破壊機序として、骨形成系骨芽細胞のFas / FasLを介したアポトーシスによる機能不全と、骨吸収系破骨細胞の破骨細胞形成促進因子による機能亢進の重要性が示され、その制御

機構に関する新事実が数多く見出された。この研究は、多くの独創的な方法論も含み、今後の RA 骨破壊の治療のみならず、骨生化学分野の研究発展に多大の寄与を与えるものである。学会からの評価も高く、平成12年、第18回日本骨代謝学会奨励賞を受賞している。

薬学研究科教授会は下記審査委員会の報告に基づいて審査した結果、本論文を薬学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(薬学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	佐々木	均
	副 査	教 授	村 田	育 夫
	副 査	教 授	河 野	通 明
	副 査	教 授	江 口	勝 美

アルデハシ オサマ ユーニス

(ヨルダン) 1969年 5 月 9 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Methamphetamine and its metabolites in biological samples; Determination by HPLC as derivatives of 4-(4, 5-diphenyl-1 H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride, a new lo-phine-type fluorescent labeling reagent.

論文内容の要旨

覚せい剤の乱用は、青少年の犯罪とも連関して国際社会において重要な問題となっている。したがって、覚せい剤の簡便で高感度・高選択的な分析法の開発は覚せい剤犯罪の予知・予防にとって重要な課題の一つである。一方、医薬品、例えばパーキンソン病治療薬の1-デブレニール等、の中には生体内で覚せい剤に変換されるものがあり、生体試料から検出される覚せい剤の由来を明らかにする必要がある。このような背景にあって、本研究では、覚せい剤摂取被疑者の様々な試料中のメタンフェタミン及びその代謝物(MPs)の簡便で高感度かつ高選択的な分析法の開発とそれらの応用性を検討した。当研究室で開発した蛍光誘導体化試薬、4-(4, 5-ジフェニル-1 H-イミダゾル-2-イル)ベンゾイルクロリド(DIB-Cl)は第一級及び第二級アミン化合物と塩基性水溶液あるいは塩基触媒下のアセトニトリル中で反応し、励起波長330nm、蛍光波長440nmに強蛍光性の誘導体を高収率で生成する。DIB誘導体を逆相 HPLC で分離し、溶出液を蛍光検出することに基づいた分析法を構築した。MPs は光学活性化合物であるため、その DIB 誘導体をキラル固定相で分離することにより、光学異性体分析を可能とした。さらに生体試料からの MPs の抽出及び誘導体化反応条件の最適化についても詳細な検討を加えた。

(第一章)まず、覚せい剤摂取被疑者尿中の MPs の

定量法を開発した。内標準物質(I.S.)として1-フェニルエチルアミンを尿(10 μ l)に添加し、これを酸性溶液とした後、窒素気流下で減圧乾固する。誘導体化後、DIB-MPs は逆相系カラムで分離し蛍光検出した。検量線は、尿中濃度20 μ M まで直線性を示し、シグナル/ノイズ比(S/N)が3の場合、各化合物の検出下限は注入量で0.6~5.2fmol と超高感度であった。尿試料(n=5)を用いた場合の日内及び日間測定精度は相対標準偏差(R.S.D.)で8.9%以下であった。本法と既報の蛍光検出法を用いて得られた測定値の間には良好な相関が見られた。一方、尿中 MP 及びその主要代謝物、アンフェタミン(AP)及びp-ヒドロキシメタンフェタミン(p-HMP)の光学異性体を DIB 誘導体とし、キラルカラムとしてトリス(3,5-ジメチルフェニルカルバメート)セルロースで被覆したシリカゲルを充填した OD-R カラムを用いて定量する方法を開発した。本法により摂取被疑者尿中で検出された d-MPs とパーキンソン病患者尿中の1-デブレニール由来の1-MPs を良好に識別することができた。日本における覚せい剤の使用は99%以上が d-MP であり、MPs の d-体と1-体をキラル分離することで、生体試料中の MPs が医薬品由来であるか、覚せい剤由来であるかを推定することができる。

(第二章)次に、覚せい剤摂取被疑者の毛髪試料中の MP 及び AP とそれらの光学異性体の定量法について検討した。ここでは分析試料として毛髪を1cmの長さ切断したものを用い、それぞれの断片の濃度と毛根からの長さから被疑者の薬物服用歴の解明を試みた。MPs は酸性メタノールを用いて毛髪から抽出した。DIB-MPs は逆相 HPLC を用いて分離定量した。検出下限(S/N=3)はそれぞれ51.4(AP)及び74.6pg/mg(MP)と非常に高感度であり、sub-mg量の摂取被疑者の毛髪試料から MP 及び AP を0.5~170.7ng/mg hair の範囲で定量することができた。毛髪試料を用いて、光学異性体の分析を行ったところ、毛髪からは d-体のみが検出された。同一の毛髪試料について、本法と GC-NPD 法による測定結果間には良好な相関がみられ、本法の有用性が示された。

(第三章)分析法の一層の高感度化を図るために、ダウンサイジング化したシステムによる尿中 MPs のアキラル及びキラル分析法を検討した。分析カラムにはそれぞれ内径1.5あるいは2.0mmのセミマイクロカラムを用いた。アキラル及びキラル分析法における検出感度はamol~fmolレベルであり、分析時間の短縮、試薬と有機溶媒量を大幅に削減できるなど、実用的な方法を開発できた。また、両方法を用いた同一試料の定量値は非常によく相関しており、異性体の混在が予想される場合はキラル法を、予想されない場合はアキラル

法を用いるなどの選択が可能である。

(第四章) 先に開発したセミマイクロシステム HPLC - 蛍光定量法を覚せい剤摂取被疑者毛髪分析に適用しその有用性を調べた。AP 及び MP の光学異性体の DIB 誘導体は良好に分離され、各異性体の分離度はそれぞれ 3.4 及び 1.1 と満足いく値を示した。アキラル及びキラル両分析法の日内及び日間測定における精度 ($n=5$) は R. S. D. で 8.9% 以下であり、十分満足いく結果であった。次に同一被疑者から得られた黒色及び白色毛髪を用いて、毛髪への MPs の取込みに対するメラニン色素の影響及び、毛髪間による MPs 取込み量の相違を検討した。その結果、MPs の取込み量は黒色毛 > 白色毛であり、メラニン色素の関与が示唆された。また、同一頭部から得られた毛髪間においても含量に少なからず相違が見られることを明らかにした。

(第五章) 覚せい剤摂取被疑者が着用していた下着に付着していると考えられる汗から MPs を検出することは、裁判化学的にも非常に重要であることから、本試料を対象とする分析法を検討した。試料の下着を細かく裁断したもの (数十 mg 程度) に I. S. として 1-メチル-3-フェニルプロピルアミンを添加し、これをクロロホルム/プロパノール混液で抽出し、DIB 誘導体化後、逆相 HPLC で分離定量を行った。検出には UV (330nm) あるいは蛍光検出器 (λ_{ex} 330; λ_{em} 440 nm) を用いた。検出下限 ($S/N=3$) は UV 検出で注入量当たり 37.3 pg であり、蛍光検出の場合は更に 100 倍程度高感度であった。MPs 摂取被疑者が着用した 3 種の下着類を測定した結果、MP が 100~1000 ng / 0.1 g、AP が数~100 ng / 0.1 g と比較的高濃度に検出された。したがって、血液や尿試料の相補的な試料としてこれらの下着類 (汗) が利用できることが示された。

以上、覚せい剤摂取被疑者の尿、毛髪及び下着に含まれる MPs のアキラルあるいはキラル HPLC-蛍光定量法を開発した。ロフィン骨格を有する蛍光ラベル化剤 DIB-Cl は MPs との反応性が良く、しかも生成した誘導体は強い蛍光を有するとともに反応溶液中で安定である。本研究で開発した方法はいずれも簡便かつ高感度・高選択的であり、裁判化学、毒性学あるいは臨床化学の分野の発展に大いに寄与することができるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

アルデハシ オサマ ユーニスは平成 8 年 4 月、長崎大学大学院薬学研究科博士前期課程 (医療薬科学専攻) に入学した。平成 10 年 3 月同課程を修了し、薬学修士の学位を取得した。平成 10 年 4 月、長崎大学大学院薬学研究科博士後期課程に進学し、医療薬科学専攻

に在籍して所定の単位を修得した。また、博士後期課程における研究成果をまとめて学位論文 (主論文) 「Methamphetamine and its metabolites in biological samples; Determination by HPLC as derivatives of 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride, a new lophine-type fluorescent labeling reagent. (生体試料中のメタンフェタミンおよびその代謝物; 新規ロフィン型蛍光ラベル化剤, 4-(4,5-ジフェニル-1H-イミダゾール-2-イル) ベンゾイルクロリド誘導体としての高速液体クロマトグラフィーによる定量)」を完成し、主論文の基礎となる原著論文 (参考論文) 6 編と副論文 5 編を付して、平成 13 年 1 月、博士 (薬学) の学位を申請した。同研究科委員会は、同年 1 月 24 日の定例研究科委員会に付議し、論文内容の要旨、並びに資格等を審査した結果、受理して差し支えないものと認め、下記の審査担当者を選出した。

審査担当者は、その内容を慎重に審議した上で、2 月 2 日に開催された博士論文発表会において試問を行い、2 月 7 日最終審査を行った。ここに、論文内容の要旨と審査結果を報告する。

主論文は、新規に開発した蛍光誘導体化試薬、4-(4,5-ジフェニル-1H-イミダゾール-2-イル) ベンゾイルクロリド (DIB-Cl) を用いる覚せい剤の高感度で簡便な計測法の開発と、覚せい剤摂取被疑者の尿、毛髪および下着に付着した汗などに含まれる極微量のメタンフェタミンおよびその代謝物の定量への適用についてまとめたものである。HPLC-蛍光法を用いて、キラル分離、システムのダウンサイジング化などを試みると同時に、生体試料への適用を検討し、より実用性の高い方法へと発展させた結果について、5 章にわたって記載している。

第 1 章では、覚せい剤摂取被疑者尿中の MPs の定量法を開発した。内標準物質 (I. S.) として 1-フェニルエチルアミンを尿 (10 μ l) に添加し、これを酸性溶液とした後、窒素気流下で減圧乾固する。誘導体化後、DIB-MPs は逆相系カラムで分離し蛍光検出した。検量線は、尿中濃度 20 μ M まで直線性を示し、シグナル/ノイズ比 (S/N) が 3 の場合、各化合物の検出下限は注入量で 0.6~5 fmol と超高感度であった。尿試料 ($n=5$) を用いた場合の日内及び日間測定の精度は相対標準偏差 (R. S. D.) で 8.9% 以下であった。一方、尿中 MP 及びその主要代謝物、アンフェタミン (AP) 及び *p*-ヒドロキシメタンフェタミン (*p*-HMP) の光学異性体を DIB 誘導体とし、市販のキラルカラムを用いて定量する方法を開発した。パーキンソン病治療薬の L-デプレニールは生体内で覚せい剤に変換されるため、生体試料から検出される覚せい剤の由来を明らかにする必要があるが、本法により摂取被疑者

尿中で検出された *d*-MPs とパーキンソン病患者尿中の1-デブレニール由来の1-MPs を良好に識別することができた。日本における覚せい剤の使用は99%以上が *d*-MP であり、したがって、MPs の *d*-体と1-体をキラル分離することで、生体試料中の MPs が医薬品由来であるか、覚せい剤由来であるかを推定できることができる。

第2章では、覚せい剤摂取被疑者の毛髪試料中の MP 及び AP とそれらの光学異性体の定量法について検討した。ここでは分析試料として毛髪を 1 cm の長さに切断したものを用い、それぞれの断片の濃度と毛根からの長さから被疑者の薬物服用歴の解明を試みた。MPs は酸性メタノールを用いて毛髪から抽出した。DIB-MPs は逆相 HPLC を用いて分離定量した。検出下限 (S/N = 3) はそれぞれ 51.4 (AP) 及び 74.6 pg / mg (MP) と非常に高感度であり、sub-mg 量の摂取被疑者の毛髪試料から MP 及び AP を 0.5 ~ 170.7 ng / mg hair の範囲で定量することができた。毛髪試料を用いて、光学異性体の分析を行ったところ、毛髪からは *d*-体のみが検出された。同一の毛髪試料について、本法と GC-NPD 法による測定結果間には良好な相関がみられ、本法の有用性が示された。

第3章では、分析法の一層の高感度化を図るために、ダウンサイジング化したシステムによる尿中 MPs のアキラル及びキラル分析法を検討した。分析カラムにはそれぞれ内径 1.5 あるいは 2.0 mm のセミマイクロカラムを用いた。アキラル及びキラル分析法における検出感度は amol ~ fmol レベルであり、分析時間の短縮、試薬と有機溶媒量を大幅に削減できるなど、実用的な方法を開発できた。また、両方法を用いた同一試料の定量値は非常によく相関しており、異性体の混在が予想される場合はキラル法を、予想されない場合はアキラル法を用いるなどの選択が可能である。

第4章では、セミマイクロシステムの HPLC-蛍光定量法を覚せい剤摂取被疑者毛髪に適用しその有用性を調べた。AP 及び MP の光学異性体の DIB 誘導体は良好 8.9% 以下であり、十分満足のいく結果であった。次に同一被疑者から得られた黒色及び白色毛髪を用いて、毛髪への MP の取込みに対するメラニン色素の影響及び、毛髪間による MPs 取込み量の相違を検討した。その結果、MPs の取込み量は黒色毛 > 白色毛であり、メラニン色素の関与が示唆された。また、同一頭部から得られた毛髪間においても含量に少なからず相違が見られることを明らかにした。

第5章では、覚せい剤摂取被疑者が着用していた下着に付着していると考えられる汗から MPs を検出することは、裁判化学的にも非常に重要であることから、本試料を対象とする分析法を検討した。試料の下着を

細かく裁断したもの (数十 mg 程度) に I. S. として 1-メチル-3-フェニルプロピルアミンを添加し、これをクロロホルム / プロパノール混液で抽出し、DIB 誘導体化後、逆相 HPLC で分離定量を行った。MPs 摂取被疑者が着用した 3 種の下着類を測定した結果、MP が 100 ~ 1000 ng / 0.1 g, AP が 数 ~ 100 ng / 0.1 g と比較的高濃度に検出された。したがって、血液や尿試料の相補的な試料としてこれらの下着類 (汗) が利用できることが示された。

以上、本研究は MPs のアキラルあるいはキラル HPLC-蛍光定量法を開発し、それらを覚せい剤摂取被疑者の尿、毛髪及び下着に付着した汗に含まれる MPs の分析に適用して、毛髪色の違いによる薬物取込み量の相違、薬物摂取の履歴、医薬品由来の MPs (1-体) との光学分離による覚せい剤 (*d*-体) 摂取の根拠、などを明らかにすることができた。本研究で開発した方法はいずれも簡便かつ高感度・高選択的であり実用性が高く、裁判化学、毒性学あるいは臨床化学の分野の発展に大いに寄与することができるものとする。よって、下記審査委員は、博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認めた。

薬学研究科教授会は下記審査委員会の報告に基づいて審査した結果、本論文は薬学の進歩に貢献するものであることを認め、博士 (薬学) の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	中 島 憲一郎
	副 査	教 授	甲 斐 雅 亮
	副 査	教 授	黒 田 直 敬
	副 査	助教授	高 橋 正 克

黄 華 山

(中国) 1965年 8 月28日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 好熱菌由来の耐熱性グリセロールキナーゼの研究

論文内容の要旨

グリセロールキナーゼは細菌から高等生物まで広く存在する酵素であり、その反応生成物であるグリセロール-3-リン酸は、ジヒドロキシアセトンリン酸を経て解糖系に入った後代謝される。本酵素は中性脂肪測定用診断薬として利用されており、より安定な酵素が求められている。好熱菌 *Thermus flavus* からグリセロールキナーゼを精製し、酵素化学的性質を検討した、更に酵素遺伝子をクローニングし、大量発現に成功し、応用の道を開いた (第一章)。次いで酵素の構造と活性中心アミノ酸の役割の研究を始めた。しかし、*T. flavus* 由来酵素は結晶化が困難であったので、更に広く耐熱性グリセロールキナーゼを研究し、*Thermus*

aquaticus より得た酵素の結晶化に成功した。X線結晶解析法と部位特異的変異法を用いグリセロールキナーゼの構造研究を行った(第二章)。

1. 臨床検査試薬を目的とした耐熱性グリセロールキナーゼの研究:

種々の好熱菌をスクリーニングし *T. flavus* に耐熱性グリセロールキナーゼを見出し、野性株より酵素を精製した。精製酵素はグリセロールに良い親和性を示し、臨床検査試薬として有用と判断できたので、大腸菌での過剰発現を目的として酵素遺伝子のクローニングを行った。クローニングはPCR法によって行った。*T. flavus* 由来グリセロールキナーゼ遺伝子は1488bpのオープンリーディングフレームを持っていた。酵素蛋白質は496アミノ酸残基から成る。この酵素を発現させるため、リボソーム結合部位及びATG開始コドンを含むグリセロールキナーゼ遺伝子を発現ベクターに導入し、高発現プラスミドpGYK12構築を行った。プラスミドpGYK12で形質転換した大腸菌を37℃で一晩培養し、集菌後超音波で破碎し、破碎液は60℃で15分熱処理を行い、硫酸分画の後脱塩しDEAE-Toyoparlカラムクロマトグラフィーによって酵素を単一に精製した。発現プラスミドpGYK12を持つ大腸菌形質転換体は、野性好熱菌に比べ約24倍高いグリセロールキナーゼ活性を示した。精製した酵素を用いて熱安定性を調べたところ、65℃で15分間処理後でも活性が変わらず安定であった。現在この酵素は臨床検査試薬として市販されている。

2. 耐熱性グリセロールキナーゼの立体構造と触媒機構の研究:

好熱菌 *T. aquaticus* の酵素遺伝子をクローニングし、発現酵素について、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化に成功した。得られた立方型結晶をRigaku R-Axis IIc X線回折装置を用いて2.8Åの分解能のデータを収集した。この結晶の空間群は $I23$ で、その格子定数は $a=b=c=164.0\text{Å}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ であった。更に明らかとなった大腸菌由来酵素の立体構造をサーチ分子として、分子置換法により、電子密度図を得て、rigid body refinement 及び simulated annealing 法による分子モデルの精密化で構造を明らかにした。

明らかとなった本酵素の立体構造を基に、酵素活性に関与していると推定されるアミノ酸の役割を部位特異的変異法により検討を行った。変異酵素遺伝子をグリセロールキナーゼ欠損株大腸菌中で過剰発現させた酵素を用いて、動力学的パラメータの測定を行った。その結果、変異体D244Aは完全に活性が消失した。このことはAsp-244がATPの γ 位のリン酸をグリセロールへ移す重要な残基であることを示す。変異体R82A、E83Aは共に野性酵素に比べ k_{cat}/K_m の値が1/

180、1/40,000に減少した。Native PAGEの結果からE83AとD244Aの泳動速度が野性酵素より遅いことが分かった。Proteolysisの結果ではE83Aだけ α -キモトリプシンにより切断されるが、ATPを入れた場合切断の速度が低下する。これらのことからGlu-83をAlaに変異すると構造に変化が生じるが、E83Aの構造はATPを入れると野性酵素と近い構造に変わり、安定化することが分かった。一方、立体構造からGlu-83がArg-187と水素結合をとり、更にArg-187がGlu-302と水素結合をとっている。以上の結果Glu-83が基質結合や構造を保つのに重要な役割を持つことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

黄華山は、平成元年7月上海第二医科大学を卒業後、中国科学院の助手を経て、平成8年4月、長崎大学大学院薬学研究科博士前期課程に入学、医薬品資源学講座に在籍し、平成10年3月に博士前期課程修了後、博士後期課程に進学し所定の単位を修得した。これらの期間を通じて行った研究成果をまとめて学位論文(主論文)「好熱菌由来の耐熱性グリセロールキナーゼの研究」を完成し、その主論文の基礎となる原著論文(参考論文)4編と副論文1編を付して、平成13年1月博士(薬学)の学位を申請した。

薬学研究科委員会を同年1月24日の定例委員会において、論文内容の要旨、資格等を検討し、下記の論文審査担当者を選定した。

審査担当者は、その内容を慎重に審査した上で、2月2日に開催された博士論文発表会において試問を行い、次いで2月9日に最終審査を行った。

審査委員会は、下記の審査結果及び最終試験の結果を、平成13年3月5日の研究科委員会に報告した。

主論文は、耐熱性グリセロールキナーゼを新規に好熱菌に見出し、臨床検査試薬として応用を研究すると共に、酵素の触媒機構を研究した内容である。

まず第一章で臨床検査試薬を目的とした耐熱性グリセロールキナーゼの研究を行った。*T. flavus* に耐熱性グリセロールキナーゼを見出し、酵素化学的性質を調べた結果、65℃で15分間処理後でも活性が変わらず安定であること。グリセロールへの親和性が良く、中性脂肪の臨床検査試薬として適していることを明らかにした。次いで、酵素遺伝子のクローニングを行い、1488bpのオープンリーディングフレームを持ち、酵素タンパク質は496アミノ酸残基から成ることを明らかにした。更に、工業生産に向くよう、グリセロールキナーゼ遺伝子を発現ベクターに導入し、高発現プラスミドpGYK12の構築を行った。大腸菌で発現させたところ生産量は野性好熱菌に比べ約24倍高いグリセロールキナーゼ活性を示し、菌体破碎液から容易に精

製可能となり、熱に安定な酵素を安価に供給することが可能となった。現在、酵素は試薬として市販され中性脂肪の臨床検査に実際に使用されている。

第2章では耐熱性グリセロールキナーゼの立体構造と触媒機構の研究を行った。*T. flavus* 由来の酵素は結晶しがたく、新たに好熱菌 *T. aquaticus* から酵素を見出し、酵素遺伝子をクローニングし、発現酵素について、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化に成功した。得られた立方型結晶を用いX線結晶解析を行った結果、結晶の空間群は *I*23で、その格子定数は $a=b=c=164.0\text{\AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $2.8\text{\AA}$ の分解能のデータを収集した。次いで構造が既知の大腸菌由来酵素の立体構造をサーチ分子として、分子置換法により電子密度図を得て立体構造の解析を行った。酵素は2つの大きなドメインから成り、それを蝶番(ヒンジサイト)で繋ぐ構造をとっている。ドメイン間にクレフトが存在し、その部分に基質であるグリセロールとATPがはまり込み触媒反応が起こることが推定された。

明らかとなった本酵素の立体構造を基に、酵素活性に関与していると推定されるアミノ酸の役割を部位特異的変異法により検討を行った。その結果 Asp-244がATPの γ 位のリン酸をグリセロールへ移す重要な残基であることが明らかになった。また、変異体 R82A, E83A は共に野性酵素に比べ k_{cat}/K_m の値が $1/180$, $1/40,000$ に減少した。Native PAGE の結果から E83A と D244A の泳動速度が野性酵素より遅いことが分かった。Proteolysis の結果では E83A だけ α -キモトリプシンにより切断されるが、ATPを入れた場合切断の速度が低下する。これらのことから Glu-83をAlaに変異すると構造に変化が生じるが、E83Aの構造はATPを入れると野性酵素と近い構造に変わり、安定化することが分かった。一方、Glu-83は基質結合に関与すると共に、Arg-187と水素結合をとり、更に Arg-187は Glu-302と水素結合をとって2つのドメインをつなぐループ構造を保つのに重要な役割を持つことが明らかになった。

以上、グリセロールキナーゼとしては初めて耐熱性酵素を見出し、臨床検査試薬として実用化すると共に、酵素の構造と触媒機構の解明を行った成果は高く評価できる。

薬学研究科教授会は審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は薬学の進歩に貢献するものであることを認め、博士(薬学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	芳 本	忠
	副 査	教 授	河 野	通 明
	副 査	教 授	小 林	信 之
	副 査	助教授	伊 藤	潔

野 上 真 子

(兵庫県) 昭和48年 1 月15日生

授与年月日 平成13年 2 月15日

主 論 文 大村湾底層における貧酸素水塊の形成と消滅過程に関する研究

論文内容の要旨

本論文は、閉鎖的な内湾である大村湾底層の水質変動とその変動過程を明らかにすることを目的とした。まず水質変動を定量的に把握するため、現地観測から酸素消費速度、栄養塩の溶出速度を求めた。また、本湾の特徴的な構造に起因する流動特性が湾中央部底層の水質の決定にどのように寄与しているかを明らかにするため、湾の密度構造と底部躍層との関係および底層水の挙動を明らかにし、それに伴う貧酸素水塊の発生・消滅メカニズムについて考察を行った。

酸素消費速度は、水温と溶存酸素(DO)の関係から次のようにして求めた。1995年7月と1996年8月に湾中央部西側海域にて水温、塩分、DOの鉛直分布の観測を2日間隔で行った。全測点のT-Sダイアグラムより同一水塊と判断される期間中のT-DOの関係をみると、各測点でのT-DOの関係はほぼ同じであり、低温域では正の相関が見られた。その関係はほぼ直線状であり、その傾きは日が経つにつれて大きくなっていった。そこで水温とDOの性質の違いに注目して、T-DOの関係から移流・拡散の効果を推定し、正味の酸素消費速度を求めた。海底直上の酸素消費速度は1995年7月では $0.21\text{gm}^{-3}\text{day}^{-1}$, 1996年8月では $0.28\text{gm}^{-3}\text{day}^{-1}$ となり、底層躍層以深における正味の酸素消費速度は1995年7月では $0.61\text{gm}^{-2}\text{day}^{-1}$ ($0.55\text{--}0.66\text{gm}^{-2}\text{day}^{-1}$) , 1996年8月では $0.64\text{gm}^{-2}\text{day}^{-1}$ ($0.18\text{--}1.4\text{gm}^{-2}\text{day}^{-1}$) と見積もられた。これは瀬戸内海で測定された値の約 $1/2$ であった。

次に、栄養塩の溶出速度を求めるため、栄養塩の分布観測を行った。まず、1998年6月に湾内1点において、海底からの距離を固定したチューブおよびコアを用いた採水システムによる栄養塩・DOの鉛直分布の時間変化の測定を行った。その結果、底層における栄養塩の詳細な分布とその時間変化のデータが得られ、栄養塩分布の時間的变化が大きいことが明らかとなった。水温の鉛直分布の時間変化を拡散方程式に当てはめ、鉛直拡散係数を推定した。次に栄養塩も水温と同様に拡散すると仮定して、物理過程による栄養塩の鉛直分布の変化を求めた。次に観測された分布と計算によって求めた分布との差を、生物化学的要因によって変動した栄養塩の量として見積もった。この時推定された鉛直拡散係数は $0.09 \times 10^{-4}\text{m}^2\text{s}^{-1}$ であり、溶出量は、 $\text{PO}_4\text{-P}$ は $5.5 \times 10^{-3}\text{gm}^2\text{day}^{-1}$, $\text{NH}_4\text{-N}$ は $10.8 \times 10^{-3}\text{gm}^2\text{day}^{-1}$ と見積もられた。次に1998年8月に移流の評価を

行うため流速の測定および水平的に3点での栄養塩等の測定を行った。3点のデータから栄養塩の水平勾配を求め移流を評価した後、6月のデータと同様拡散による変化を求め、それとの差として生物化学的要因で変動した栄養塩の量を見積った。鉛直拡散係数は $0.03\text{--}0.4 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ であり、期間中の平均溶出速度は $\text{PO}_4\text{-P}$ では $0.14 \text{ gm}^2 \text{ day}^{-1}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ では $0.5 \text{ gm}^2 \text{ day}^{-1}$ 、 T-N では $0.49 \text{ gm}^2 \text{ day}^{-1}$ となり、6月の数10倍、山本ら(1998)が求めた瀬戸内海の値より1桁大きかった。

次に流動と環境に関する観測、実験を行った。閉鎖性内湾である大村湾は、年間を通じて鉛直混合が盛んな湾口部と、夏季成層化し底層付近に躍層が形成され貧酸素化が起こる湾中央部に分けられる。このような海洋構造に注目し、両海域の密度構造とそれに伴う流動が、湾内の底部躍層へ与える影響について調べた。1994年7、8月のσ_tの鉛直分布から、湾口部水は湾中央部底層水より軽いいため、湾中央部底層へ流入できず、湾西岸を通して中層へと流入することが示唆された。そして湾口部から流入した中層水と底層水の間に底層躍層が存在していた。9月になると湾口部水が湾中央部の中層のみではなく底層へも流入するようになり、底層躍層は消滅した。つまり、夏季には湾中央部底層で水平的なDO供給が抑制されることが貧酸素化に大きな影響を及ぼすと考えられる。

この結果をもとに流動と貧酸素化に関する数値モデル実験を行った。7月、8月の実験結果から大村湾は強混合域の海水が成層海域中層へ流入、湾中央部の海水は表・底層から流出する循環が存在し、流入する水と流出する水の境界に底層躍層を形成することが明らかとなった。この結果は底層には比較的滞留時間の長い水が存在することを示すものである。その循環速度は7月よりも8月の方が遅い。9月には流入層が深くなり、底層躍層は消滅する。大村湾では成層の強い7月よりもむしろ成層が弱まる8月に貧酸素化が進むという報告があるが、これは循環が弱まるのが影響した結果であると考えられる。季節が進みDOが減少していく効果は、拡散を考慮すると、あまり重要でない可能性が示唆されるため、今後定量的な評価が必要と考えられる。

論文審査の結果の要旨

野上真子氏は、平成7年3月に長崎大学水産学部を卒業し、平成9年3月に長崎大学大学院水産学研究科修士課程を修了した。引き続いて、平成9年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程海洋生産開発学専攻に入学し現在に至っている。

同氏は、所定の単位を取得すると共に、主論文「大村湾底層における貧酸素水塊の形成と消滅過程に関する研究」を完成させ、平成12年12月に本研究に関する

参考論文3報を添えて、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、予備審査委員会による予備審査結果及び論文内容の要旨の報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出資格を審査した。そして、本論文を受理しても差し支えないものと認め、下記の審査委員を選出した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文では、閉鎖的な内湾である大村湾底層の水質変動とその変動過程を明らかにすることを目的とし、季節変化と数日間の2つの時間スケールに注目した解析が行われている。

まず水柱の溶存酸素量が、物理的な移流・拡散と生物化学的な生産・消費のバランスによって決まることを考慮して、湾中央部底層の酸素消費速度と栄養塩溶出速度が求められた。これらの境界面における物質フラックスの推定は、流速への依存性を考慮して、現場の分布の変化から物理過程と生物・化学過程を分離する方法が用いられた。酸素消費速度は水温と溶存酸素の関係から求められ、平成7年7月と平成8年8月の酸素消費速度は各々 $0.21, 0.28 \text{ g / m}^3 \text{ / day}$ であり、この値は瀬戸内海における文献値の約1/2程度であった。また、栄養塩の溶出速度は観測時によって異なっていたが、富栄養化と有機汚泥の蓄積が問題となっている瀬戸内海や東京湾の値と同等、もしくはそれ以上であった。

次に、湾の特徴的な海洋構造と貧酸素化現象の関係を理解するために、湾全体の分布観測データから季節ごとの密度構造が検討された。湾口部と湾中央部では密度構造が大きく異なり、両者の関係も季節的に変化することが示された。そして、密度構造が異なる両海域間の流動について、季節的な密度構造の変化と湾の流動に関わるモデル実験が行われた。さらにモデルへ溶存酸素を導入することによって、溶存酸素の分布と湾の循環との関係が調べられた。これらの結果より、大村湾の貧酸素化現象には、湾口部と湾中央部の密度構造の差による水平的な流動が大きく関わっていることが明らかにされた。大村湾底層では成層が最も発達する7月よりも、むしろ成層が若干弱まる8月に溶存酸素が低くなるが、この要因として8月は水平循環が弱まることで中層への酸素の供給が少なくなることと底層での滞留時間が長くなることが示唆された。

以上のように、本研究で得られた知見は、沿岸域での溶存酸素や栄養塩の挙動の研究にきわめて重要であ

り、富栄養化機構の解明とその防止のための知見として有用である。長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、論文審査および最終試験の結果について審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は有益かつ新しい知見を含んでおり、沿岸海洋学の進展に貢献するものであることを認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判断した。

審査担当者	主 査	教 授	石 坂 丞 二
	副 査	教 授	富 樫 宏 由
	副 査	教 授	中 村 武 弘
	副 査	教 授	松 岡 數 充

河 村 俊 哉

(長崎県) 昭和38年11月 1 日生

授与年月日 平成13年 2 月15日

主 論 文 海洋環形動物ジャムシ(*Neanthes virens*)
由来のアンギオテンシン I 変換酵素様ジ
ペプチジルカルボキシペプチダーゼの性
状と構造に関する研究

論文内容の要旨

ジペプチジルカルボキシペプチダーゼ (DCP) は、オリゴペプチド基質の C 末端側からジペプチドを遊離する酵素である。特に哺乳類に存在する DCP はアンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) として広く知られており、その生理作用としては、アンギオテンシン I を血圧昇圧作用のあるアンギオテンシン II に変換し、血圧降圧作用を有するブラジキニンを不活性化する血圧調節作用や、また体液や電解質のホメオスタシスを担っている。ACE は哺乳類を中心に研究が進められ、ヒト、ウシ、ウサギ、ラット、マウスなどから幾つかの酵素が精製され、それらの酵素の生化学的性状や遺伝子レベルでの構造解析、生体に及ぼす生理的な意義が明らかにされている。さらには医薬的な側面から多くの ACE 阻害剤の創出を導くために、触媒活性のメカニズムなどが詳しく研究されている。一方、哺乳類以外の生物においては、イモリ、カエル、電気エイ、ハエ、ダニ、また数種の微生物から ACE の作用に類似した DCP の存在が確認され、酵素の精製やその性状が明らかにされている。しかし得られた DCP の生理的役割は明らかでない。特に海洋生物においては、ACE や DCP に関する研究報告は殆どなく、陸上の環境とは異なる海洋環境下での生物の血圧調節をはじめ、様々な生化学反応への関与には興味もたれる。また、DCP と哺乳類由来 ACE との構造機能発現の相関や海洋生物における DCP の生理機能の解明、さらには、未利用資源からの血圧調節系の創薬を目指すことは大変意義深いことである。本論文は DCP の酵素源を海洋生物に求め、酵素を精製し、その性状や構造的性質

についてまとめたものであり、以下の章からなる。第 1 章：DCP 産生生物のスクリーニングについて検討した。その結果、海洋環形動物であるジャムシ(*Neanthes virens*) に ACE と類似した作用を持つ高活性の DCP が確認され、試料も入手し易いことから *N. virens* を本研究の試料とした。第 2 章：酵素の精製を行った。*N. virens* が産生する DCP を硫酸分画、DEAE-Cellulofine A-500, XK50 / 30 Q-Sepharose FF, HiLoad 26 / 60 Superdex 200pg, TSKgel HA-1000により SDS 存在・非存在下において電気泳動的に均一な標品として精製した。第 3 章：DCP の酵素化学的性質について検討した。分子量は SDS-PAGE で約71,000、ゲル過で約69,000であり、哺乳類由来のものとは比べ低分子量の酸性タンパク質 (等電点は4.5) であった。作用至適 pH は8.0、安定 pH 領域は7.0-8.0、作用至適温度は45℃に見られ、温度安定性は50℃で残存活性が80%、60℃で0%となり完全に失活した。基質特異性は、アンギオテンシン I の C 末端側から 2 番目の His の N 末端側を特異的に切断し、アンギオテンシン II を生じた。しかし本酵素は、C 末端側から 2 番目に Pro を持つアンギオテンシン II を分解できなかったことから、Pro の N 末端側のイミド結合は分解できないことがわかった。本酵素は、o-Phenanthroline や EDTA で顕著に阻害され、他のプロテアーゼ阻害剤の影響は殆ど受けなかった。金属の影響では Co の添加で活性が約2倍に活性化され、Cu や高濃度の Zn の添加で活性は阻害された。また、EDTA で完全に失活させ、透析により EDTA を除去した後、低濃度の Zn や Mn の添加で元の状態に活性が回復した。Co の添加では活性が約2.5倍に活性化された。これらの結果から、本酵素は哺乳類由来 ACE と同じ金属プロテアーゼであることが示唆された。第 4 章：DCP の構造化学的諸性質について検討した。本酵素はウサギ ACE 同様、酸性アミノ酸と疎水性アミノ酸を多く含み、糖を重量の8%含む糖タンパク質であった。N-末端アミノ酸配列は、D-E-E-A-G-R-Q-W-L-A-E-Y-D-L-R-N-Q-T-V-L-であり、他の ACE や DCP と比較した結果全く相同性は見られなかった。また、リジルエンドペプチドマップは異なっていた。遠紫外部 CD の結果より、本酵素はウサギ肺由来 ACE 同様、二次構造において α -ヘリックス構造を持つ一方、近紫外部 CD の結果より、三次構造における芳香族アミノ酸残基の環境が、ウサギ肺由来 ACE とは異なることが推察された。アミノ酸残基の化学修飾の結果よりアルギニン、チロシン、グルタミン酸、或いはアスパラギン酸、ヒスチジン、トリプトファン、メチオニン残基が酵素作用に必須の官能基、もしくは活性な三次構造維持に関与する

アミノ酸である可能性が示唆された。グリコペプチダーゼ F により糖鎖を分解した結果、DCP の糖鎖は分解されず酵素活性も影響を受けなかったが、ウサギ肺由来 ACE の糖鎖は一部分解され酵素活性も失活した。このことより、両酵素の糖鎖の結合箇所や糖鎖の構造、或いは三次元的位置関係は互いに異なることが示唆された。第5章：DCP の反応速度論的性質及び阻害特性について検討した。本酵素の反応速度パラメーターは、 K_m が 0.56mM となり、他の ACE や DCP と比較すると最も低い値を示した。また k_{cat}/K_m は $618\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、他の ACE や DCP と比較すると最も高い値を示した。本酵素に対する阻害特性を調べた結果、哺乳類 ACE の特異的阻害剤である Captopril 及び Lisinopril の阻害形式は拮抗阻害であり、本酵素に対する各々の K_i 値は 1.38 と 2.07nM であった。一方、本酵素に対するジペプチドの阻害特性では、Val-Tyr の IC_{50} が $263\mu\text{M}$ と最も低かった。阻害形式は拮抗阻害であり、本酵素に対する Val-Tyr の K_i 値は $20\mu\text{M}$ とウサギ肺由来 ACE に対する K_i 値 $1.7\mu\text{M}$ より約12倍高い値を示した。この結果より、本酵素の活性中心を構成する疎水的環境は、ウサギ肺由来 ACE とは異なっていることが示唆された。第6章：*N. virens* よりアンギオテンシン II に作用し、血圧降下物質を生じるアンギオテンシナーゼ様酵素の精製と諸性質について検討した。その結果、*N. virens* よりアンギオテンシナーゼ様酵素を部分精製した。アンギオテンシン II に得られた酵素を作用させると、アルギニン、バリン間とチロシン、イソロイシン間を切断して生理活性を失わせ、ACE や DCP の阻害剤である Val-Tyr を生じることから、本酵素はアンギオテンシナーゼ様酵素であることが判明した。このように、*N. virens* 中には生体内での役割は不明だが、哺乳類で血圧調節に関わる ACE 様の DCP やアンギオテンシナーゼ様の酵素が含まれることが明らかになった。以上、海洋環形動物である *N. virens* より哺乳類の血圧昇圧系酵素である ACE と類似した作用を持つ DCP を精製し、その構造と機能相関についての新しい知見を得た。また、血圧降下作用を有する酵素の存在を確認した。これらの研究は、海洋生物中にも哺乳類と類似の血圧調節系に関与する酵素が存在し、その性状を詳細に初めて明らかにしたものであり、海洋環境下の生物の生化学的、生理学的意義を知る上で重要であると共に、血圧調節系の創薬に関する基礎的知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

河村俊哉氏は昭和61年3月琉球大学農学部農芸化学科を卒業し、昭和63年3月同大学大学院農学研究科修士課程農芸化学専攻を修了した。昭和63年4月より太陽化学株式会社総合研究所に勤務後、平成3年4月よ

り長崎県工業技術センター研究員となり、在籍のまま平成4年4月長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程に入学したが、業務の都合により休学期間を経て現在に至っている。同氏は平成12年12月に主論文「海洋環形動物ジャムシ (*Neanthes virens*) 由来のアンギオテンシン I 変換酵素様ジペプチジルカルボキシペプチダーゼの性状と構造に関する研究」を完成し、参考論文2編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、予備審査委員会による予備審査の結果及び論文内容の要旨を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の審査委員を選定した。学位審査委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は研究前例を見ない海洋生物の血圧調節系(レニン・アンギオテンシン系)酵素を精製し、酵素の構造的な知見を含めた諸種の性状をはじめ詳細に明らかにして、比較生化学的検討を行ったものである。

第1章では海洋生物58種についてジペプチジルカルボキシペプチダーゼ(DCP)のスクリーニングを行った結果、ジャムシにアンギオテンシン I 変換酵素(ACE)様酵素 DCP の高活性を検出したことを述べている。

第2章ではジャムシからの DCP の精製法を検討した。各種のイオン交換体、ゲルろ過剤などを駆使してジャムシ抽出液から電気泳動で均一な酵素標品を得ている。

第3章ではジャムシ DCP の酵素化学的性質を明らかにした。本酵素は分子量約70K で、ほ乳類精巢型に近い比較的低分子量の等電点4.5の酸性タンパク質であり、作用至適 pH8.0、安定 pH 領域7.0-8.0、60℃-15分の熱処理で完全失活を示した。アンギオテンシン I の C 末端側から2番目ヒスチジン N 末端側ペプチド結合を特異的に切断し、血圧昇圧物質であるアンギオテンシン II を生じた。また、各種の金属イオンに対する挙動から ACE と同様 Zn 金属プロテアーゼと考えられたが、 Co^{2+} による顕著な活性化を認めている。

第4章では本酵素の構造化学的性質を明らかにした。本酵素は8%の糖を含む糖タンパク質であり、N 末端側20残基のアミノ酸配列とペプチドマップからは、これまでに明らかにされた他生物由来の ACE、DCP との間に相同性はなく、新奇なものであった。円偏光二色性により得られた立体構造的知見でも、二次構造は類似したが、三次構造的には異なっており、糖鎖切断

酵素による実験から、糖鎖の結合部位にも相違があることが示唆された。酵素活性発現に関与すると考えられる官能基をアミノ酸の化学修飾により調べた。

第5章では本酵素の反応速度論的性質や反応阻害について詳細に研究し、ジャムシ DCP が反応効率の高い反応速度パラメーターを有すること、Val-Tyr その他による反応阻害様式などを検討した結果、本酵素の活性中心を構成する疎水的環境がウサギ由来のものと異なっていることを明らかにした。

第6章ではジャムシ中に、アンギオテンシンⅡに作用し、ACE 活性阻害物質を生成する酵素の存在を認め、同酵素の部分精製と性質を明らかにし、興味ある結果を得た。

以上の成果は海洋生物の ACE 様酵素の諸性状をはじめて詳細に明らかにしたもので、ACE (DCP) の構造・機能発現に関する知見を与えるのみならず、海洋環境下の生物の生化学的、生理学的意義を知る点で重要であると共に、血圧調節系の創薬研究分野に大きく貢献するものであることを認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	村 松	毅
	副 査	教 授	青 柳	東 彦
	副 査	教 授	野 崎	征 宣
	副 査	教 授	原	研 治

趙 賢 珍

(韓国) 1971年11月4日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Utility of Dinoflagellates in Studying the Marine Environment: the Case of the East China Sea and Adjacent Areas

論文内容の要旨

渦鞭毛藻は沿岸域での主要な一次生産者であるとともに赤潮原因生物としても注目されている。近年のこの生物の生活史解明や生理・生態学的研究の発展は、沿岸での海洋環境変遷や富栄養化過程の研究に顕著な進展をもたらした。本研究では東シナ海および隣接海域から得られた試料の分析とその結果の解析から沿岸海洋環境研究における渦鞭毛藻の有用性を実証した。すなわち、1) 東シナ海および黄海表層堆積物中の渦鞭毛藻シスト群集の水平分布を明らかにした。2) 東シナ海および周辺海域から採取した3本の柱状試料中の渦鞭毛藻シスト群集の変化から完新世(約10,000年前以降)の東シナ海の海洋環境変遷を推察した。3) 従属栄養渦鞭毛藻の一種である *Polykrikos kofoidii* Chatton の捕食行為や成長速度等の研究から植物プランクトン増殖に本種がその制限要因となる可能性を指摘した。

東シナ海と黄海の現海洋環境下に存在する渦鞭毛藻シスト群集特性を把握するために、これらの海域で48個の表層堆積物試料を採取・分析した。その結果、東シナ海では渦鞭毛藻シスト存在量は少なく、独立栄養種シストと従属栄養種シストがほぼ同様の相対頻度で産出した。黄海では渦鞭毛藻シスト存在量は多く、独立栄養種シスト *Spiniferites bulloideus* (Deflandre et Cookson) Sarjeant が優占し、従属栄養種シストは少なかった。温暖種である *Tuberculodinium vancampoe* (Rossignol) Wall は東シナ海により多く、黄海の試料からはほとんど産しなかった。また黄海ではマヒ性貝毒原因種である *Alexandrium catenella* もしくは *A. tamarense* と同定される楕円形シストが極めて多産した。この事は黄海がこれらのシストの集積域であり、ここが沿岸域での *A. catenella* もしくは *A. tamarense* の初期発生域である可能性が示唆された。

完新世の東シナ海の海洋環境変遷を解明する目的で、東シナ海中央部(31°44'54"N, 126°00'00"E; 水深76m)、同東部域の大村湾(32°59'34"N, 129°53'34"E; 水深18.5m)、同北部域の対馬・仁田湾(34°59'52"N, 129°20'15"E; 水深2.8m)から採取した柱状試料中の渦鞭毛藻シスト群集を明らかにした。柱状試料の堆積年代は¹⁴C年代測定及びそれらから得た平均堆積速度によって決定した。その結果、これら3本のコアは約10,000年以降の堆積記録を保持していた。東シナ海中央部コアでは約8,300年前(以下すべて既知の¹⁴C年代に基づく推定年代)からシスト個体数が急増し、約7,200年前では温暖性種の *T. vancampoe* が増加した。大村湾コアでは約9,000年前にシストが初めて出現し、約8,300年前以降に個体数が急増した。温暖性種の *T. vancampoe* も約8,300年前から増加した。対馬コアでは約9,000年前には既にシストが産していた。対馬コアでは個体数が約6,300年前から増加した。これらの結果から大村湾と対馬(シスト産出層準前は干潟環境が推定されている)では海水の侵入が約9,000年前にあったと考えた。またシストの増加に基づき、東シナ海での対馬暖流は約8,300年以降に発達したと推察した。

東シナ海と黄海の分析試料ではその産出量が少なかったものの、無殻渦鞭毛藻の1種で、ある種の植物プランクトンの増殖に影響を与えていると考えられる *Polykrikos kofoidii* について検討した。本種の分類には混乱があることと、また遊泳細胞の生態に不明な点が多いことが指摘されてきたので、本種について形態学的、生態学的検討を行った。これまでの研究では、表面に棒状突起物を備えたシストを *P. kofoidii* とし、網目模様を持つシストを *P. schwartzii* Büschli として識別してきた。*P. kofoidii* のシストと遊泳細胞との関係を、

培養実験と文献調査, さらに大村湾で採集したシストの形態観察に基づいて再検討した。その結果, 1) *P. kofoidii* は網目模様のシストを形成した。2) 不完全な網目模様のシストから, *P. kofoidii* と同定される遊泳細胞が発芽した。3) 大村湾から得た4タイプの表面装飾をもつ *Polykrikos* シスト(棒状突起物: type 1, 棚状突起物: type 2, 不完全な網目模様: type 3, 網目模様: type 4) は変異がほぼ連続していた。以上の事実から本シストの形態変異幅は大きく, これまでの形態に基づく分類基準は *Polykrikos* シスト分類に最適ではなく, 環境変化を推察するためにもシスト形態変異幅を把握しておくべきであると判断した。

ついで, 有毒赤潮原因種である *Gymnodinium catenatum* Graham を餌料として, *P. kofoidii* の捕食行為を詳細に観察した。さらに他の21種の渦鞭毛藻を餌料とし, その時の本種の成長速度や細胞破壊の経過について観察した。*P. kofoidii* は刺胞(nematocyst)を後端細胞の縦溝(sulcus)から射出して餌を捕捉した後, それを引き寄せ, 縦溝から体中に取り込むこと(engulfment)が判明した。また, 本種の成長速度は, *G. catenatum* を餌とした時, 最高値($\mu = 0.96$)を示した。これらの結果から, 自然環境では *G. catenatum* 赤潮の消滅過程で *P. kofoidii* が捕食者として働く可能性が考えられた。しかし, すべての捕食行為が *P. kofoidii* の生存に有利に作用したのではなかった。室内実験では *A. tamarense* (ATHS-92 strain) を捕食した *P. kofoidii* は培養容器の下に沈降後, そこでしばらく回転運動を行い, やがて取り込んだ *A. tamarense* 細胞を吐き出した。ついで, 楕円形の *P. kofoidii* が徐々に丸くなった後, 細胞が破壊された。このような *P. kofoidii* の細胞破壊はある海域で急に *P. kofoidii* が消滅する現象を説明する一つの手掛りになると解釈した。このような観察結果は, 赤潮発生から消滅に至る生物過程に, 従属栄養性プランクトンが赤潮原因種に対する捕食者として深く関与していることを示唆しており, この観点からの研究が必要であることが判明した。

論文審査の結果の要旨

趙 賢珍氏は, 1994年8月韓国釜山水産大学校(現釜慶大学校)海洋学科を卒業し, 1995年3月同大学院海洋学科修士課程に入学, 1997年2月に修了した。1997年3月から1998年3月まで長崎大学に研究生として在籍した後, 1998年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科海洋生産開発学専攻に入学し, 現在に至っている。同氏は, 1994年3月以降の長崎大学研究生在籍中さらに大学院海洋生産科学研究科入学以降現在まで, 原生生物の一員であり, 多数の有害・有毒原因種を含む渦鞭毛藻の研究を行い, その成果として現在までに4編の論文を発表している。それらをまとめ 2000

年12月に主論文「Utility of Dinoflagellates in Studying the Marine Environment: the Case of the East China Sea and Adjacent Areas」を完成させ, 参考論文4編を添え, 長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は平成12年12月21日の定例研究科委員会において, 論文内容の要旨を検討し, 課程修了による学位申請の資格ありと判定し, 下記の審査委員を選定した。委員は主査を中心にその論文内容を慎重に審議し, 公開論文発表会(1月25日)を行わせるとともに, 口頭による基礎及び専門分野に関する最終試験を実施し, それらの結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は, 近年の沿岸海域における海洋環境科学の主要な研究課題である環境変遷や水質変化過程の解明に原生生物の一員である渦鞭毛藻がいかに活用できるのかを, 東シナ海とその隣接海域を調査域とした研究に基づいて論じている。内容は以下の3章に分けられる。第1章では東シナ海及び黄海表層堆積物中の渦鞭毛藻シスト群集の地理的分布とその特性を論じている。東シナ海では渦鞭毛藻シストの存在量は少なく, 独立栄養種群と従属栄養種群の出現比率がほぼ同じであったが, 黄海ではシストの存在量が多く, 独立栄養種群が優占することを明らかにし, その主たる要因はシストの生産量, 堆積物供給量とその粒度であることを示した。また, 有毒種である *Alexandrium catenella* もしくは *A. tamarense* シストの初期発生源と推察される海域が黄海中央部に存在することを示唆した。第2章では東シナ海中央部, 同北東部大村湾, 同北部仁田湾から採取した3本の柱状試料中の渦鞭毛藻シスト群集変化から約1万年前以降の東シナ海の環境変遷を論じた。分析対象となった堆積物の年代は ^{14}C 測定と, それに基づいて算出した平均堆積速度に依拠した。東シナ海中央部試料では約8,300年前にシスト個体数が急増し, 約7,200年前には温暖指標種の *Tuberculodinium vancampoae* が増加した。大村湾試料では約8,300年前にシスト個体数が急増した。仁田湾ではシスト個体数の増加は前2者よりはやや遅れ, 約6,300年前であった。以上の結果から, 東シナ海での対馬暖流の出現はおよそ8,300年前に遡ることを証明した。また, 大村湾では約9,000年前の試料から海産渦鞭毛藻シストが出現し始めることから, この時期に海水が侵入したと結論した。第3章では沿岸域での赤潮に伴ってしばしば出現する従属栄養種の *Polykrikos kofoidii* の分類や捕食行動について観察と考察を行った。本種のシストは類似種である *P. schwartzii* シストとの間で形態分類上の混乱があった。この問題の解決に向けて, シスト形成実験と発芽実験を行った。その結果, 従来 *P.*

shcwartzii とされたシストから *P. kofoidii* と同定できる遊泳細胞が発芽したこと, *P. kofoidii* と同定される栄養細胞が *P. shcwartzii* と同定できるシストを形成することを突き止め, 従来のシストの分類を修正するとともに, 栄養細胞の分類にも混乱があることを指摘した。また, 本種の捕食行動を有毒赤潮原因種である *Gymnodinium catenatum* を餌料として詳細に観察した。その結果, 本種が非捕食者を確保する際に刺胞を射出して引き寄せ, 縦溝から取り込むという行動を初めて明らかにした。ついで他の21種の渦鞭毛藻を餌料生物として本種の成長速度を検討した結果, *G. catenatum* の場合では最高値 ($\mu = 0.96$) となることを示した。しかし, 有毒原因種である *Alexandrium tamarense* (ATHS-92株) を餌料生物とした場合には, 本種は一旦それを細胞内に取り込んだ後に体外に吐き出し, それとともに細胞が変形して球形になり, 最後には自ら破壊して死滅する事を観察した。この一連の捕食行動の観察から, 本種が赤潮発生から消滅に至る過程で, 原因生物の捕食者として深くかかわっている可能性を指摘した。

以上の3課題の研究を通して, 沿岸海域での赤潮発生や消滅機構の解明には渦鞭毛藻の遊泳細胞や休眠孢子(シスト)の基礎的研究が重要であること, さらにその背景となる環境変遷解明の研究には化石渦鞭毛藻シストおよびその群集変化の把握と解析が有効であることを明確に示した。

海洋生産科学研究科委員会は審査委員会の報告に基づき審査した結果, 本研究は, 沿岸海域における海洋環境科学の主要な研究課題である環境変遷や水質変化過程の解明に原生生物の一員である渦鞭毛藻が重要かつ有効であることを実証し, 今後の進歩に貢献するものであることを認め, 博士(学術)に値するとし, 合格と判断した。

審査担当者	主 査	教 授	松 岡 数 充
	副 査	教 授	夏 苺 豊
	副 査	教 授	石 松 惇
	副 査	教 授	石 坂 丞 二

韓 仁 盛

(韓国) 1970年 1 月 1 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Short Time Scale Water Exchange Processes between the Kuroshio and the Shelf Water in the East China Sea

論文内容の要旨

東シナ海の大陸棚縁部は黒潮水と陸棚水が出会うところであり, 性質が違う両者の間に, 様々な混合過程によって, 海水交換が起きていると考えられる。また, このような海水交換過程は中国大陸から流入する

大陸起源物質を北西太平洋に輸送する上で重要な役割をしていると考えられる。一方, 東シナ海の大陸棚端付近は, 地形効果, 密度分布, 潮汐の影響によって内部波が起きやすい所であり, 内部波の頻繁な発達ですでに報告されている。短周期内部波あるいは乱流の発達による鉛直混合は大陸棚から黒潮域への物質輸送に大きな役割をしていると考えられる。本研究では, 東シナ海の陸棚端付近で行われた係留観測とCTD, ADCPによる鉛直断面観測の資料を用いて, 短周期流速変動に伴う物質輸送過程のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

本研究で用いた資料は, 1995年から2000年まで6年間に計7回, 長崎大学水産学部附属練習船, 長崎丸及び鶴洋丸によって行われた係留観測と鉛直断面観測から得られたものである。係留観測から, 流速をはじめ, 水温, 濁度の時間的な変動が, また鉛直断面観測から, 等深線を横切る観測ライン上の水温, 密度, 流速と濁度の鉛直分布が得られた。

係留系による観測からはこの海域で周期30分から5分までの短い周期を持つ内部波が頻繁に起きていることが観測され, CTDによる観測からは水深150m付近で明瞭な下部密度躍層が頻繁に形成されることが明らかになった。また, 両観測結果の比較から, 下部密度躍層が明瞭に現れる時期と短周期内部波が発達する時期がほぼ一致し, 短周期内部波の発達と下部密度躍層の形成との密接な関係が明らかになった。

また, この海域の中層以深では海水の密度は概ね水温に依存することから, より詳細な成層構造の変化を把握するため, 密度の代わりに測定が比較的容易な水温の時間変動を調べた。頻繁に形成される下部水温躍層は主に半日周期で鉛直運動をしており, 水温躍層付近で観測された流速資料と下部水温躍層の鉛直運動の関連を詳細に調べた結果, 下部水温躍層の下部と上部に顕著な短周期内部波の運動が観測された。また, 係留ADCPと多数の水温計から得られた鉛直的に詳細な流速と水温構造から, 顕著な短周期内部波の運動が見られる層が下部水温躍層の鉛直運動と対応しており, 下部水温躍層の周辺で継続的に短周期内部波が発達していることが認められた。また, 下部水温躍層の周辺では大きな鉛直シアーが見られ, 躍層周辺で発達している短周期内部波は顕著な鉛直シアーによるものと推測された。

ADCPによる鉛直断面観測からは, 密度躍層の付近で沖向きの流れが形成され, 短周期内部波が発達した水深と対応することが示された。鉛直的に詳細な流速および水温の係留観測が行われた2000年の観測結果からは, 顕著な短周期内部波の運動は下部水温躍層が上昇するとき, あるいは最高位置に到達したときに現れ

る傾向にあることが観測され、一方下部水温躍層が上昇運動する時より、下降運動をする時に躍層付近の勾配が弱くなる傾向にあったことから、短周期内部波によって下部水温躍層付近で鉛直混合がおきた可能性が示唆された。また、等深線を横切る流速の記録から潮汐成分を除いた残差流の分布より、冲向きの流れが下部水温躍層の鉛直運動と対応していること、更にこの冲向きの流れは躍層が下降運動をする時、躍層付近を中心に現れることから、短周期的流速変動に起因する鉛直混合によって、非地衡流成分の流速（密度流）が形成された可能性が示唆された。

最後に、下部水温躍層付近での濁度の時間変動と濁度の鉛直断面分布から、躍層付近で明瞭な濁度の極大値が現れ、鉛直混合によって形成された下部水温躍層付近の冲向きの流れによって、高濁度水が陸棚域から黒潮域へ水平貫入することが観測された。

論文審査の結果の要旨

韓 仁盛君は、平成7年2月に釜山水産大学海洋学科を卒業し、平成7年3月に同大学大学院修士課程入学後、平成8年1月から同9年1月まで長崎大学大学院水産学研究科に研究生として在籍した。平成10年2月に釜慶大学校（旧釜山水産大学）海洋学科修士課程を修了した。平成10年に長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程海洋生産開発学専攻に入学し現在に至っている。

同君は、所定の単位を取得すると共に、主論文「Short Time Scale Water Exchange Processes between the Kuroshio and the Shelf Water in the East China Sea」を完成させ、平成12年12月に本研究に関する参考論文2報を添えて、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（学術）の学位を申請した。長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、予備審査委員会による予備審査結果及び論文内容の要旨の報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出資格を審査した。そして、本論文を受理しても差し支えないものと認め、下記の審査委員を選出した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文では、東シナ海陸棚縁辺部における短周期的流速変動に伴う物質輸送過程のメカニズムを明らかにすることを目的とし、陸棚端付近で行われた係留観測とCTD、ADCPによる鉛直断面観測の資料を用いて、詳細な解析を行っている。用いられた資料は、1995年から2000年まで6年間に計7回、長崎大学水産学部附属練習船、長崎丸及び鶴洋丸によって行われた係留観測と鉛直断面観測から得られたものである。

係留系とCTDから得られたデータは、様々な時間スケールの現象を含んだものであるが、本論文ではそのなかから下部密度躍層付近における比較的短い時間スケールの変動が抽出され、潮汐周期の変動と対応させながらその特性が論じられた。その結果以下のような現象が明らかとなった。まず、陸棚縁辺部の水深150m付近では、ブルントパイサラ周期に近い時間スケールを持った短周期内部波がしばしば発達し、その短周期内部波の発達は下部密度躍層の形成と密接な関係があることが示された。次に、この短周期内部波に伴う運動は下部水温躍層（密度躍層にほぼ対応）の下部または上部に限定して観測されることが多く、その運動が卓越する層も下部水温躍層の潮汐周期の鉛直運動に伴って上下していることが示された。さらに詳細な解析から顕著な短周期内部波は、下部水温躍層が上昇するとき、あるいは最高位置に到達したときに現れる傾向にあり、その後下部水温躍層が下降運動をする時には躍層付近の水温鉛直勾配が弱くなっている傾向にあることから、短周期内部波によって下部水温躍層付近で鉛直混合がおきた可能性が示された。この躍層付近の成層構造の変化は岸沖方向の流れを誘起することが推測され、実際に曳航式ADCPおよび係留系による観測結果から、下部水温躍層付近に極大値を持った冲向きの流れの存在が示された。この冲向きの流れは陸棚側から様々な物質を輸送することが考えられ、本論文ではひとつの例として、高濁度水が陸棚域底層から黒潮域へ水平貫入している証拠が示された。

本研究で得られた知見は、東シナ海陸棚縁辺部における海水混合と物質の輸送に関わる研究にきわめて重要であり、陸棚域と外洋域との相互作用を理解するための知見として有用である。長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、論文審査および最終試験の結果について審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は縁辺海での物質輸送研究において有益かつ新しい知見を含んでおり、海洋学の進展に貢献するものであることを認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判断した。

審査担当者	主査	教授	石坂 丞二
	副査	教授	塩谷 茂明
	副査	教授	中村 武弘
	副査	教授	野口 正人

山 本 尚 俊

(京都府)昭和48年 2 月 6 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日**主 論 文** 水産物卸売市場流通の変容・再編成と卸売業者の業務対応に関する研究**論文内容の要旨**

卸売市場流通は、昭和46年の卸売市場法施行を機に体系的整備が進み、50年代半ばには水産物の約9割が卸売市場を介して流通した。ところが、200カイリ体制への移行や円高による輸入増大、流通規制緩和の進展と小売業の再編、外食・中食市場の拡大や情報システム化の進展等によって水産物流通の再編が急速に進み、平成11年7月には卸売市場法が改正された。

本研究は、水産物卸売市場流通の変容を卸売業者の業務対応との関連で捉え、また法改正の要点とそのインパクトを整理しながら、再編方向を検討することを目的とする。広域レベルで再編が進むことを想定し、中央と地方、消費地と産地の各卸売市場段階を対象とした。

本論文は9章からなる。序章では、水産物を中心に卸売市場流通研究をレビューし、本研究の背景と目的、課題を示した。卸売市場流通の変容・再編成を市場業者の企業行動との関連で捉えたこと、産地および消費地市場の両面からアプローチした点に独創性がある。

第1～3章は水産物卸売市場流通をめぐる全体動向で、第1章では卸売市場制度の特徴、法改正の経過、開設整備の動向を考察した。法制度下で卸売市場の開設・営業許可、業務、運営等が公的規制・管理の対象に組み込まれたこと、中央卸売市場の開設整備は昭和50年代で一段落し、以後、既設市場の修復・移転に主軸が移っていること、などを述べた。

第2章では、卸売市場をめぐる流通与件の変化として、水産物の消費・小売構造、供給構造、物流条件の整備と流通チャネルの多元化を考察した。零細多数の生産者と小売業者との結合といった流通条件が、生産・買受双方の大型化によって崩れ、とくに量販店が主導する川下規定型流通への移行が急進していることを述べた。

第3章では、中央・地方卸売市場の構造変化を取扱高、集荷・取引、市場業者の動向から考察した。卸売市場経由率の低下、取扱高の減少、集分荷力格差の拡大、転送依存の強まりと市場間の関係変化、取引原則の形骸化、卸売業者の収益構造の変質、卸売業者と仲卸業者とのボーダレス化、市場圏競合の深化と開設区域制度の形骸化、市場業者の経営破綻、卸売市場の機能不全と信用低下など、水産物卸売市場流通問題の現段階的特質を明らかにした。

第4～7章は実態分析で、第4章では北部九州の大

中型旋網産地である松浦、福岡、長崎、唐津を事例に、生産・買受双方による出荷・仕入行動の見直しから産地市場再編を捉え、卸売業者が社内部門や関連企業を窓口に買い支えや第三者販売への展開を強めている動きを述べた。これは出荷者側の指し値や買受側の在庫負担要請への対応だけでなく、価格や在庫調整、金融機能の拡大、全国的な需給調整といった卸売業者の経営戦略でもある。

第5章では、以西物の水揚げ地である長崎を中心に、水揚げ縮小下での産地市場の再編動向を卸売業者の集荷対応の変化から述べた。漁獲主体の国際的交替を背景に、卸売業者が集荷圏を中国に拡げ、商品化技術の移転等によって品揃えを補完・代替していること、受託・セリに基づく受入対応が産地機能の維持に結びついていること、改革開放以降の中国での貿易制度改革が輸出能力の向上に結びついたこと、を指摘した。

第6章では、大阪を中心に、大都市とその周辺都市の市場間の関係変化を卸売業者の業務展開と関連づけながら検討した。大都市卸売業者は本業取扱高が減少するなかで、場外業務の拡充によって商社的な性格を強めており、近隣市場との市場圏競合を誘発している。また、卸売業者間では、資本関係を問わず、品揃えのための取引があるが、同一卸の本支社または系列卸間であっても業務の連携が弱いことを明らかにした。

第7章では、福岡を事例に、消費地地方卸売市場の再編動向を卸売業者の経営展開や内部再編成、近隣市場との競争関係から捉えた。複数の市場を運営する当該卸売業者は、市場配置や組織編成を見直すことで経営をスリム化し、社内部門やグループ企業の整備を通じて業務範囲を市場外に拡げているが、組織内部の連携は弱く、その強化が課題となることを指摘した。

終章では、現行法改正のインパクトと各章の論点を整理しながら、水産物卸売市場流通の再編方向を検討した。再編過程で、卸売業者の機能分化、経営格差の拡大、統廃合が進むことを指摘し、品揃えの不備は販売力や競争力の低下に結びつくことから、共同仕入れの必要性和その限界を説いた。また、今後、転送が再び増加することを述べ、品揃えの独自性確保と卸売業者の戦略性を含む現段階的な転送関係を「サテライト型の物流関係」として規定し、再編軸の一端を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

山本尚俊氏は、平成7年3月に近畿大学農学部を卒業し、同年4月に長崎大学大学院水産学研究科修士課程に入学、平成9年3月に同課程を修了した。一旦、水産団体に就職したが、平成10年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程に入学し、現在に至っている。

同氏は、博士課程に入学して以降、水産物の卸売市場流通に関する研究を行い、現在までに6編の論文を発表している(うち査読付き論文4編)。その成果を、平成12年10月に「水産物卸売市場流通の変容・再編成と卸売業者の業務対応に関する研究」として完成させ、参考論文6編を添え、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、本論文を受理しても差し支えないものと認め、下記の通り、審査委員会を選定した。審査委員は、主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、水産物の卸売市場流通の構造変化を、産地市場と消費地市場の両面から、そして卸売業者の経営戦略という視点から解析したものである。

本論文の特徴は、何よりも卸売業者の主体的対応を基軸に据えたことである。市場流通の変動は流通の主体である卸売業者の経営、組織編成に反映し、逆に卸売業者の経営戦略が水産物流通の動向を規定すると考えてのことである。卸売業者の業務は、制度的な枠組みを超えて展開している。その実態を明らかにするために、卸売業者の兼業部門やグループ企業、出荷者、買受業者、他卸売市場との人的・資本的ネットワークを視野に入れた方法論が必要であった。これまで卸売市場流通研究において企業行動からアプローチした例はなかったといつてよい。企業行動論を視点にすえたことで、卸売市場での取扱、取引動向はもとより、市場外流通への進出、隣接市場との市場圏競合、市場制度に対する内部からの浸食過程が浮かび上がってきた。

本論文の特徴は、また、産地市場と消費地市場の両者、消費地市場については中央卸売市場と地方卸売市場の事例分析をしたことで、市場相互の関係、卸売経営における産地と消費地の異同を明らかにしたことである。すなわち、産地市場は生産者に対するサービス、加工団地や全国販売ネットワークの形成を通じた価格支持体制の整備や競争力の強化を指向し、消費地市場は量販店対応を中心としたグループ企業の育成、共同仕入れ、加工機能の内部化、市場外流通拠点の整備などによって近隣市場との差別化を図っている実態が明らかになった。中央卸売市場と地方卸売市場とは、主に集荷を巡って系列化と自立性の確保がせめぎあっていることも明らかになった。

本論文は、卸売市場法の改正によって自由化が進む流通界の再編方向を見通した点でも特徴がある。その方向は、中小規模市場間の統廃合、大都市市場と中小都市市場との系列化が進行するとしながらも、転送関

係を強めながら戦略性を持ったサテライト型市場構成を予見する。企業の主体性を踏まえた論議といえよう。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、論文審査および最終試験の結果についての審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は、卸売市場論に新たな方法論を提示し、多くの有益で新しい知見を見いだしたことにより当該分野の進歩に大きく貢献するものであることを認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	片岡千賀之
	副査	教授	野崎征宣
	副査	教授	竹村 暘
	副査	教授	塩谷茂明
	副査	助教授	亀田和彦

手嶋芳博

(埼玉県)昭和37年6月8日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 メカニカルシールにおけるディンプル
しゅう動材のシール特性に関する研究

論文内容の要旨

メカニカルシールの歴史からシール端面におけるしゅう動材の変遷がその性能向上に大きな影響を及ぼすことが知られてきており、メカニカルシールの性能の向上はしゅう動材の開発に依存しているといっても過言ではない。最近しゅう動材に独立した気孔を分散保有させることで潤滑性が付与され、さらに高負荷への適用が可能になることが報告された。しかし、独立気孔を含有した気孔分散材の研究は実用的用途への適用検討が主体となっており、理論的な検討例、系統立った実験例は少なく、気孔の形状、配列、比率、方向性などの潤滑性、密封性に対する影響は不明である。これは、従来の研究で主に使用された気孔分散材ではしゅう動面と交差した気孔によるくぼみの形状は不均一でその形状制御は困難なことに起因していると思われる。

そこで本研究の目的は形状を制御したくぼみ(ディンプル)の形状、配列、比率、方向性などによる密封性、潤滑性を含んだシール特性への影響、なかでもディンプルによる流体潤滑膜の発生とその厚みへの影響をしゅう動試験、数値解析により明らかにすることとした。そして、既存の気孔分散材よりも高負荷対応のディンプルしゅう動材の設計手法を確立すること、その潤滑性向上のメカニズムを明らかにすることなどを目指した。

本論文は8章からなりその内容を要約すると次の通りとなる。

第1章では本研究対象であるディンプルしゅう動材

の有用性，研究の背景と問題点を明らかにし，本研究の目的を述べた。

第2章では本研究に用いた試験片，試験流体，試験条件，試験機，計測器，ディンプルのシール流体への影響をシミュレーションする数値解析方法について説明した。

第3章ではディンプルによる潤滑性などのメカニズム解明のため，ディンプル周辺のシール流体の挙動を透明なしゅう動材を介して観察し，この観察結果と数値解析結果を比較した。汎用潤滑油，市水にて行った流体潤滑膜観察試験の結果，潤滑性に多大な影響を及ぼすことが知られるキャビテーションがディンプル中の流体に発生することが確認できた。また，有限要素法の解析結果により，ディンプル部には正圧と負圧が発生しその分布が対称形状を示すこと，負圧の発生位置は試験におけるキャビテーションの発生位置と一致することが判った。これらの結果はディンプルが軸受けの溝のようにしゅう動により動圧を発生し，その負圧がキャビテーションによりキャンセルされることが負荷容量発生（潤滑性向上）の要因となることを示している。

第4章では等方性（円形）ディンプルの形状・配列などによる潤滑性への影響の解明のため，油潤滑下のしゅう動試験を行い，この結果と数値解析結果を比較した。これらの結果，等方性ディンプルの場合，ディンプルの配列よりも形状の方が摩擦係数の低減など潤滑性向上に対して大きな影響を及ぼすことが判った。そして，ディンプルの形状と摩擦係数との関係はレイノルズの無限幅軸受け理論と定性的傾向が一致した。

第5章では異方性ディンプルの形状・方向性などによる潤滑性への影響の解明のため，油潤滑下のしゅう動試験を行い，この結果と数値解析結果を比較した。過去のしゅう動材における表面粗さの方向性に関する研究により，矩形ディンプルに方向性を持たせることで円形ディンプル，気孔分散材よりも低摩擦化の可能性があると考えた。従来の気孔分散材では気孔形状・方向性の制御が困難でこれらの影響を検討した例はない。このしゅう動試験の結果，ディンプル形状の方向性を制御した異方性ディンプルの摩擦係数は等方性ディンプルの値の50%程度まで低減可能であった。有限要素法による3次元粘性流体の数値解析の結果から，異方性ディンプルの低摩擦化の原因がその動圧発生の面積が等方性ディンプルよりも広くなることであることが判った。また，異方性ディンプルについてもレイノルズの無限幅軸受け理論と定性的傾向が一致した。

第6章ではメカニカルシール試験機を用い，ディンプルによる密封性への影響，ディンプル実機条件への適用について検討した。密封性への影響に関しては，

ディンプルしゅう動材の漏洩量はJIS規格の1/50以下の微量であり，ポアズイユの理論との一致が認められた。また，低粘度流体の使用などにより流体潤滑膜が形成されにくい実機条件下においてディンプルしゅう動材は密封性と従来材よりも低摩擦を示した。

第7章ではディンプル形状によりメカニカルシールの重要な機能である漏れ量・潤滑状態の制御を行うことを骨子としたディンプルシールの設計手法を提案した。具体的にはポアズイユの理論，膜厚比の理論より最小油膜厚み条件を算出し，この最小油膜厚みをディンプル形状により制御した。ディンプル形状による最小油膜厚みの制御はレイノルズの無限幅軸受け理論によった。

第8章では，本研究を総括した。

論文審査の結果の要旨

手嶋芳博氏は，昭和61年3月北海道大学工学部資源開発工学科を卒業し，同年4月に北海道大学工学研究科に入学，昭和63年3月同研究科を修了した。

修了後，直ちにイーグル工業に入社し，同社に在籍のまま，長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し，現在に至っている。

海洋生産科学研究科においては，海洋生産開発学を専攻し，所定の単位を修得するとともに，メカニカルシールのしゅう動面の機能設計に関する基礎研究に従事してきた。その成果に基づいて，同君は平成12年12月に主論文「メカニカルシールにおけるディンプルしゅう動材のシール特性に関する研究」をまとめ，参考論文2編を添えて，長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（工学）の学位申請を行った。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は，予備審査委員会による予備審査の結果の報告に基づいて，修了のための学位論文提出の可否を審査し，本論文の受理を認め，下記の審査委員会を選定した。同委員会は，主査を中心に論文内容について慎重に審議し，公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い，論文審査および最終試験の結果を，平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は，メカニカルシール端面に用いられるしゅう動材に効果的な加工を施すことにより高い密封性能を得るための研究結果を纏めたものである。特に潤滑性の観点からしゅう動面に設けたくぼみ（ディンプル）の形状，配列等を制御することにより，実機による実験と数値解析から最適密封条件を系統的に求めている。本論文は従来からの未解決の部分を明らかにしてディンプルシールの設計手法について貴重な提案をしているもので，全8章よりなっている。

論文の構成は以下のようになっている。まず，本研究対象であるディンプルしゅう動材の有用性，研究の

背景と問題点を示し、研究の目的を述べている。

次ぎに等方性（円形）ディンプルの形状・配列などによる潤滑性への影響の解明のため、油潤滑下のしゅう動試験を行い、その結果と数値解析結果とを比較することにより、ディンプルの配列よりも形状のほうが、摩擦係数の低減など潤滑性向上に対して大きな影響を持つことを明らかにしている。異方性ディンプルの形状・方向性についても数値解析との比較を交えながら検証し、等方性ディンプル、気孔分散材よりも異方性ディンプルのほうが低摩擦化の可能性が高いことを示唆している。従来の気孔分散材では気孔形状・方向性の制御が極めて困難であることから、これまで放置されていた部分を詳細に検討している点において、この知見は貴重な結果といえる。その理由として、3次元粘性流体の数値解析結果から、異方性ディンプルの低摩擦化の原因がその動圧発生面積が等方性ディンプルよりも広がるためとしている。さらに、ディンプルによる密封性への影響については、ディンプルしゅう動材の漏洩量はJIS規格に定められている値以下の極微量で、実験と数値解析の結果はボアズイユの理論との一致をみている。

最後に、ボアズイユの理論、膜厚比の理論より最小油膜厚み条件を算出することにより、メカニカルシールの重要な機能である漏れ量・潤滑状態の制御を行うことの可能性を指摘して、ディンプルシールの設計手法を提案している。

これらの研究成果は、メカニカルシールの端面しゅう動材の最適設計法を大幅に進展させるものである。その内容の大部は、日本トライボロジー学会誌に2編の論文として掲載されている。

海洋生産科学研究科委員会は、論文審査及び最終試験の結果についての審査委員の報告に基づき審査した結果、本論文は機械工学の分野の発展に貢献するところが大きく、海洋生産科学の基礎部門である工学に寄与するところが大きく、博士（工学）の学位に値するものと判定した。

審査担当者	主査	教授	浦	晟
	副査	教授	西田	知照
	副査	教授	瀬戸口	克哉
	副査	教授	今井	康文
	副査	助教授	川添	強

ジャマール タリク ミアン

（パキスタン）1967年5月26日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 3-D Positioning System for Compact Autonomous Underwater Vehicle
コンパクト自律型潜水艇のための3次元位置検出システム

論文内容の要旨

これまで海洋資源調査や環境汚染調査等には、有人潜水艇や通信ケーブルで繋がれた母船のオペレータが遠隔操作する無人潜水艇が使われていたが、近年のコンピュータやエレクトロニクスさらに電力制御分野での目覚ましい技術発達に支えられて無索式の自律型潜水艇が着目され、一部で実用化されるまでになっている。そのような潜水艇が自律的に運動できるためには自艇の位置を常に同定できることが不可欠であるが、海中ではGPSのような3次元位置の測定手段は利用できず、ジャイロを用いた受動的な3次元位置推定が超音波を用いる能動的な3次元位置推定に頼らざるを得ない。超音波を用いる能動的な3次元位置推定の基本原理はすでに提案され、軍事目的等の特殊用途の測定装置は使われているが、一般の漁業活動や調査活動等に利用される小型潜水艇の自律化に利用できる実用的（小型・安価）な3次元位置測定装置は見受けられない。

本研究では、大村湾のような比較的浅い海中を移動するコンパクトな自律型潜水艇の3次元位置を、海面にある母船で精度良く測定できる実用的な装置の開発を目的とする。本測定装置は、バリアブルベクトル推進機構を採用してコンパクトに実現された自律型潜水艇に取り付けられ、操作・機動性に富む海中の調査装置としての利用を予定されている。

本論文の第1章では、これまでに報告されている自律型潜水艇について概観し、本研究の目的を述べている。従来の自律型潜水艇は、大型で重量もあることから操作性・保守性に難があり、軽量コンパクトな潜水艇が要求されていた。深度30mまでの浅海水域での利用を前提にすると、自由に推進力の方向を制御できる推進機構（バリアブルベクタプロペラ）を搭載することで、上下方向や左右方向の推進力を得るための複数個のスラストを必要としないコンパクト潜水艇が実現できることを示し、その潜水艇を自律的に移動させるためには水中超音波を用いるコンパクトな3次元位置測定システムが不可欠であることを述べている。

第2章では、水中にいる小型潜水艇の3次元位置を、水中超音波を用いて測定するシステムの原理とその実現方法について述べている。海面にある母船からは、パルス状の超音波が海中に放射され、その超音波を受

けた小型潜水艇は、一定の時間の後に、パルス状の超音波を母船方向に向けて放射する。母船では、小型潜水艇から返ってきた超音波がどの方向から放射されたかを3個の超音波受信機で求めると同時に、母船と小型潜水艇までの距離を超音波が返ってくるまでの所要時間で求め、3次元位置を検出する。本システムは、母船に載せるパルス状の超音波放射モジュールと3個の超音波受信機で受ける超音波の位相差を高精度で検出するモジュール、さらに距離を検出する時間差検出モジュール、さらに小型潜水艇に載せる超音波受信検出モジュールとパルス状超音波放射モジュールから構成される。それらのモジュールはプログラマブル IC (FPGA) を用いてコンパクトに実現されている。

第3章では、3次元位置測定システムを、母船と自律型潜水艇の通信システムに組み込むことが提案されている。超音波を用いる通信は、送りたい信号を周波数変調して超音波信号として送信するが、その通信システムへ、本論文で提案する3次元位置測定システムを組み込むには、超音波受信機の増設と、信号処理部の機能追加が必要となるが、FPGA を用いることで容易に実現できることが示されている。

第4章では、提案する3次元位置計測システムを搭載して、自律潜航を行うことができる小型潜水艇の試作機が示されている。推進機構にはバリエアブルベクトルプロペラが採用され、駆動部の実現にはラジコン部品とワンボードコンピュータを用いて機械的に大幅なコンパクト化が図られている。

第5章では、3次元位置測定システムの有効性が、実験により示されている。3次元位置の測定誤差は距離10メートルまでは、約10cmであることが確認され、浅海域での利用を目指すコンパクトな小型潜水艇の自律化には十分な性能を有していることを確認している。

さらに、提案したシステムを用いて海中における通信実験を行い、200mの距離でも有効な通信が可能であることを確認している。

第6章では、本論文をまとめ結びとしている。

論文審査の結果の要旨

ジャマール タリク ミアン氏は、平成3年3月にパキスタンのラホール工業大学機械工学部を卒業し、すぐに GIK 科学技術アカデミー (パキスタン) に就職の後、平成5年4月より東京 YMCA 日本語学校で1年間日本語を学び、平成6年4月から東京大学工学部精密機械工学科の研究生となり、平成8年4月に長崎大学大学院修士課程機械システム工学専攻に入学し、平成10年3月に同大学院を修了、すぐに長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程に入学し、現在に至っている。

同氏は、修士課程に入学以降、海洋調査目的の小型

潜水艇の研究に従事し、現在まで3編の論文を発表している。その成果を、平成12年12月に主論文「3-D Positioning System for Compact Autonomous Underwater Vehicle」としてまとめ、公表した論文3編、主論文の基礎となる論文2編を添え長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士 (工学) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は予備審査委員会による予備審査の結果の報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の通り審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文審査の結果と最終試験の結果を、平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

本論文は、手軽に操作できるコンパクトな自律型潜水艇に不可欠な、水中超音波を用いる3次元位置測定システムを提案し、実際に試作したシステムを用いた測定実験によりその有効性を確認している。海洋の調査現場においてニーズが高い簡単に持ち運び保守が簡単な自律型潜水艇を開発する上で、問題となるのが自律潜水艇本体と3次元位置測定装置をいかにコンパクトに実現するかである。潜水艇本体のコンパクト化は、バリエアブルベクトル推進機構を採用した潜水艇の研究によりすでに目途がたっており、その潜水艇に搭載できるコンパクトな3次元位置測定装置が望まれていた。

本論文では、まず水中にいる小型潜水艇の3次元位置を、水中超音波により測定する方法とその実現方法が提案されている。母船からは、パルス状の超音波が自律型潜水艇に向けて放射され、その超音波を受けた自律潜水艇は、所定の時間 (約100ms) の後に、パルス状の超音波を母船方向に向けて放射する。母船では、この返ってきた超音波がどの方向から放射されたかを3個の受信機で検出する超音波の位相関係から求める。また小型潜水艇までの距離は、超音波が返ってくるまでの時間で求めることで、最終的に3次元位置を検出する。本方式は、低出力の超音波と小型の超音波受信装置で実現できる特長を有している。

続いて提案する3次元位置検出システムの具体的な実現方法を提案し、試作したシステムを示している。コンパクトに実現されたシステムは、母船に搭載する装置部分として、指定の超音波バーストを放射するモジュールと、小型潜水艇から返ってくる超音波信号を処理するモジュールから構成され、信号のノイズ除去、超音波信号の検知、超音波信号間の位相差の検出の大部分が、一個のプログラマブルな IC (FPGA) の内部で行われている。また、小型潜水艇には、母船から放射された超音波バーストを検知し所定の時間後に超音

波バーストを放射するモジュールが搭載されている。さらに、本システムに一部機能を追加することで、母船と自律型潜水艇が、周波数変調を用いた情報通信システムが容易に実現できることを示している。

提案するシステムを用いた3次元位置測定実験を無響水槽で行い、10メートルまでの距離では、約10cmの測定誤差で測定できることを確認している。また、海洋における通信実験を行い200mの距離でも、良好な通信が実現できることを確認している。

これらの研究成果は、今後、海洋における活発な取り組みが期待されている我が国の海洋開発および水産分野での有効な調査・研究手段とされている無人小型潜水艇に関するものであり、海洋・水産分野の発展に寄与する所が大である。

海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会より論文審査および最終試験の結果についての報告を受け、慎重に審査した結果、本論文は海洋工学の分野の発展に貢献するところが大きく、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	石松隆和
	副査	教授	児玉好雄
	副査	教授	茂地徹
	副査	教授	原田哲夫

山田 隼男

(兵庫県) 昭和22年2月4日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 ゴム材料の高性能化とその特性

論文内容の要旨

ゴム材料は現代社会において不可欠な材料であり、種々の特性を持った各種ゴム材料が上市されている。しかし、情報化社会の進展や厳しくなる環境・エネルギー問題に対応するために、ゴム材料の高性能化・高機能化が強く望まれている。

本論文ではゴム材料について種々の高性能化の方法と問題点を概観した後、エネルギー・環境問題にゴム材料の面から寄与するため、主として塩素系ゴム材料の高性能化を目的とし、1) 制振性の付与、2) 新規架橋系の開発、3) 高分子反応による複合化、4) ゴム用シランカップリング剤の新規合成法の開発に関する研究を行った。

第1章では、始めに本研究の目的を明らかにし、ゴム材料の高性能化の一般的方法を概観した。すなわち、まずゴム材料を高性能化するためには、個々のゴム材料の特性を知る必要があり、その特性をまとめた。次にゴム材料の特性と材料の溶解度パラメータとの関係を述べ、高性能化の有力な手段であるポリマーブレンドについて溶解度パラメータおよび動的粘弾性におけ

る貯蔵弾性率、損失正接を混和性と制振性の指標としてまとめた。さらに制振性の付与の観点から分子設計、充填剤の形状因子による相違、充填剤の相互作用について述べた。次に塩素系ポリマーのトリアジンポリチオール架橋の特徴と問題点、塩素系ポリマーの高分子反応による改質の問題点等、さらに高性能省エネルギータイヤに不可欠なポリスルフィド系カップリング剤の特徴と問題点を明らかにした。この章の最後に本研究の概要を述べた。

第2章では塩素化ポリエチレン(CPE)を制振材料に応用するためにポリ塩化ビニル(PVC)とエポキシ化天然ゴム(ENR)とのブレンド性を検討した。制振性をさらに高めるために種々の形状の充填剤を検討した。また、CPE、PVC および ENR と軟化剤の相溶性も検討した。CPE を用い0℃から100℃の広い温度範囲で高い制振性を得るためには非相溶ブレンドである CPE/PVC 系に両者に相溶性のある ENR およびクマロン系軟化剤をブレンドし平板構造を持つマイカのような充填剤を配合すれば良いことを明らかにした。また CPE に相溶性のある不均化ロジンエステルを80~90重量部配合することにより、-10℃から40℃の特定温度範囲で損失正接が2と高い制振性を得ることができた。

第3章ではポリチオールとの反応による塩素系ポリマーの高性能化として CPE の架橋剤の開発およびポリチオール架橋に適した構造を持つエピクロルヒドリン系ゴム(ECO)の開発を行った。CPE 用架橋剤の開発目的は架橋性の向上、コスト削減および加工安全性に優れた架橋系の開発にある。CPE のトリアジンポリチオール架橋における促進剤としてのアミン化合物、極性溶媒の効果を詳細に検討し、安価で取扱い容易な架橋特性の優れたトリメルカプトトリアジン(TTCA) / 2-メルカプトベンゾチアゾールのジシクロヘキシルアミン(DCHA)塩および加工安全性に優れた2,4-ジメルカプト-6-アニリノトリアジンの DCHA 塩の2つの架橋剤を開発した。また、この TTCA の架橋メカニズムの考察より、この架橋系に適したエチレンオキサイド長を導入したエピクロルヒドリンゴムを開発した。

第4章では、エピクロルヒドリン-エチレンオキサイド共重合体ゴム(ECO)とシアン酸金属塩との高分子反応により ECO 側鎖にイソシアナート基を導入し、ポリオールとの反応により ECO とポリウレタンのハイブリッド体を合成した。得られたハイブリッド体は ECO より剛性率が高く、電気導電率が1桁下がった。本反応メカニズムを低分子含塩素モデル化合物との反応により基礎的に検討し解析した。シアン酸金属塩はポリエチレングリコールやクラウンエーテルなどのエーテル酸素の存在下にその解離が活性化されハロゲ

ン化合物との反応性が増加することが分かった。シアン酸金属塩の一部はイソシアナートに解離し3量化し、イソシアヌレートに変換することが確認された。このことにより塩素系ポリマーはシアン酸金属塩との反応によりイソシアナート基の導入割合、ポリオールの種類セグメント長を調整することにより種々の分子設計が可能となることが分かった。

第5章では、高性能タイヤに不可欠なポリスルフィド系シランカップリング剤(CA)の新規合成法の開発と得られたCAの硫黄連鎖、遊離硫黄および熱分解性の測定方法を開発し、更にCAのゴム特性への影響を明らかにした。ポリスルフィド系CAはトリエトキシシリルプロピルクロライドと無水多硫化ナトリウムとの反応により得られるが、無水多硫化ナトリウムの製造には多大のエネルギーや数多くの工程が必要であり経済的な製法が望まれていた。本研究ではジメトキシエタンのような特殊エーテル系溶媒中で硫黄と金属ナトリウムを固体同士で反応することにより直接、無水多硫化ナトリウムが容易に得られることを明らかにした。本手法によれば、従来、困難とされていた純度の高いジスルフィド化合物も容易に得られ、硫黄含有量を変えることにより遊離硫黄が少ない種々の硫黄連鎖の異なるスルフィド系CAが高収率で得られ、このCAは加工安全性に優れ、その架橋特性も実用に耐えることを明らかにした。

第6章では本研究のまとめを述べた。

論文審査の結果の要旨

山田隼男君は、昭和44年3月大阪市立大学工学部応用化学科を卒業し、同年4月大阪曹達(株)現:ダイソー(株)に入社し、研究所に配属された。同所にて昭和45年9月まで塩素化ポリエチレンの合成と加工の研究に、昭和45年9月から平成7年4月までエピクロルヒドリンゴムの合成・加工と応用の研究に、その後、熱可塑性エラストマーおよび制振材の開発研究に従事している。この間、昭和58年5月には「高活性開環重合触媒とエピクロルヒドリンゴムの工業化」の業績により高分子学会賞を受賞している。平成10年4月ダイソー株式会社にて在職のまま、長崎大学大学院海洋生産科学研究科海洋生産開発学専攻に入学し現在に至っている。

同氏は長崎大学に入学以降「ゴム材料の高性能化に関する研究」に従事し、その成果を平成12年12月に主論文『ゴム材料の高性能化とその特性』として完成させ、参考論文4編(うち2編審査付き)を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(工学)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、

下記の通り審査委員を選定した。委員会は主査を中心に論文の内容について慎重に審議し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を、平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

本論文は、情報化社会の進展や厳しくなる環境・エネルギー問題に対応するためのゴム材料の高性能化・高機能化に関する研究である。本論文はゴム材料について既存の種々の高性能化の手法と問題点を概観した後、主として塩素系ゴム材料の高性能化を目的として、1)制振性の付与、2)新規架橋系試薬とそれに適したゴム材料の探索、3)高分子反応による複合化、4)ゴム用シランカップリング剤の新規合成法の開発の観点から研究を行った結果を述べ考察している。以下にその内容と新規性を述べる。

1)幅広い温度域で制振性を持つ安価なゴム材料を得るため種々検討し、塩素化ポリエチレン(CPE)-ポリ塩化ビニル(PVC)-エポキシ化天然ゴム(ENR)との3成分系が優れていることを見出している。さらに制振性を高めるために種々の形状の充填剤、軟化剤について検討し、CPE/PVC/ENR系にクマロン系軟化剤と平板構造を持つマイカのような充填剤を配合した系は0℃から100℃の幅広い温度範囲で高い制振性を持つことを明らかにしている。また80~90PHRの不均化ロジンエステル配合系は-10℃から40℃の特定温度範囲で損失正接が2の優れた制振材となることを見出している。

2)CPEと架橋剤であるポリチオール構造および促進剤としてのアミン化合物、極性溶媒、極性溶媒の反応機構への効果を詳細に検討し、安価で取扱いが容易な架橋特性の優れたトリメルカプトトリアジン(TTCA)/2-メルカプトベンゾチアゾールのジシクロヘキシルアミン(DCHA)塩および2,4-ジメルカプト-6-アニリノトリアジンのDCHA塩の2つの架橋系を開発している。さらにその架橋反応機構からエーテル結合が重要な役割を果たしていることを見出し、ポリチオール架橋に適したエチレンオキサイド-エピクロルヒドリンゴム(ECO)の最適構造を明らかにしている。

3)ECOのポリマーアロイ化による高性能化を検討し、ECO側鎖塩素基とシアン酸金属塩との高分子反応によりイソシアナート基を導入した後、ポリオールとの反応により剛性率、電気伝導率に優れたECO-ポリウレタンのハイブリッド体を得ている。併せて、低分子含塩素化合物とのモデル反応により本反応の反応機構を明らかにしている。

4)エーテル系溶媒中で硫黄と金属ナトリウムを固体反応することにより、直接無水多硫化ナトリウムを

得る新規な合成法を開発し、高性能タイヤに不可欠なポリスルフィド系シランカップリング剤(CA)を得て、CAの硫黄連鎖、遊離硫黄および熱分解性、CAのゴム特性への影響を明らかにしている。得られたCAは遊離硫黄が少ないため加工性及び安全性に優れ、その架橋特性も実用に耐えることを明らかにしている。

海洋生産科学研究科は審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文はゴム科学の進歩に貢献するものであると認め、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	古川 睦久
	副査	教授	江頭 誠
	副査	教授	羽坂 雅之
	副査	教授	内山 休男

張 潔

(中国)1968年1月24日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 A Comparative Study on the Morphological Adaptations in Oxudercine Gobies to their Terrestrial Life

論文内容の要旨

ムツゴロウ・トビハゼ類は、干潟上で、少なくとも体の一部を露出させて生活する点で共通するが、干潟上生活者から水中生活者まで、体表組織の露出程度は多様である。また、食性も、藻食から動物食まで多様である。本研究は、このように多様な Oxudercinae 亜科魚類の生活様式に対応した形態的適応を明らかにすることを目的とし、12魚種の生活様式を観察すると共に、それらの皮膚、鰓蓋内面及び消化管の形態観察を行ったものである。

各魚種の生活様式：水中生活者である *Apocryptodon*, *Oxuderces* と *Pseudapocryptes* の魚類のうち *A. punctatus* は主に水中で活動し、他種のように鰓腔を空気で膨らませることがない。*Boleophthalmus* と *Scartelaos* の魚類は、高潮時に生息孔で体全体を水中に浸すが、低潮時は体を露出させて行動する。後者は特に長時間、水中に体を浸して過ごす。*Periophthalmodon* (*Pn*) と *Periophthalmus* (*Ps*) の魚種は、高潮時も水中に体全体を浸すことはない。これら2属の中で、*Pn. septemradiatus* と *Periophthalmus* 属魚類は干潟面で長時間に亘り行動し、陸上生活によく適応している。

体部の皮膚構造：本亜科の魚類は、皮膚組織に dermal bulge が存在する魚類とそれ以外の魚類に大別される。前者のうち、干潟に体を露出させる *Boleophthalmus* と *Scartelaos* は、露出頻度が高い頭部と体背面で dermal bulge が発達して膨出部(papilla)を形成する。*Periophthalmodon* と *Periophthalmus* 魚類は、表皮の中

層細胞が肥大し、常に空気中に晒される頭部と体背面の中層細胞層が分厚く発達する。この2属の魚類では、毛細血管が頭部と体背面の表皮全面に分布するが、dermal bulge が発達する *Boleophthalmus* と *Scartelaos* では、毛細血管は papillae を覆う表皮上のみ密に分布する。水中生活者は、表皮に毛細血管は分布しない。粘液細胞の分布にも分類群により明瞭な違いがある。

鰭上の皮膚については、*Boleophthalmus* 魚類は胸鰭背面、*Scartelaos* 魚類では胸鰭背面と背鰭に dermal bulge、毛細血管と粘液細胞が発達する。*Periophthalmodon* 魚類では、胸鰭と腹鰭の表皮に毛細血管が発達する。*Periophthalmus* 魚類では、臀鰭を除く各鰭に毛細血管が発達し、尾鰭以外の鰭に、空気呼吸機能の存在を示唆している。

鰓蓋内面は、*A. punctatus* では平坦で、毛細血管はほとんど発達していない。*O. dentatus*, *Pss. elongatus* と *S. histophorus* では、内面がやや起伏している。*Boleophthalmus* 魚類と *Ps. chrysospilos* では、内面に大きな起伏が形成され、*Pn. schlosseri* では、内面が複雑で大きい起伏を形成する。*Ps. modestus* と *Pn. septemradiatus* の起伏は *Pn. schlosseri* ほどではない。*A. punctatus* 以外のいずれにも、内面表面に毛細血管が密に分布する。

消化管の形態：咽頭歯の形態には、動物食・植物食・雑食と多様な食性との明瞭な対応が認められたが、顎歯の形態は、闘争性など、食性以外の要素への対応により、その形態発達も複雑である。食道では、粘液細胞が *Ps. modestus* では一様に多数存在するが、*Pn. schlosseri* と *S. histophorus* では少なく、偏在している。すべての種の胃の外観は、単純な直線型で、胃腺が噴門部のみ偏在し、幽門部になくことが本亜科魚類の特徴であるが、胃の内部の組織学的構造は全種ともよく似ており、食性との対応は認められない。藻食の3属の魚類は腸が非常に長く、腹腔の前方で螺旋状に回転している。動物食の2属の魚類は腸が非常に短く、2カ所で屈折して肛門に達している。雑食性の魚類は藻食と動物食の中間の形態をしている。腸粘膜のひだの高さには、一定の傾向が認められない。また、腸上皮の形態には、少なくとも外見的には、種または食性にもとづく違いは認められない。

まとめ：表皮では、中層細胞が肥大している点が全生活様式の魚類に共通しているが、露出程度が強い魚類は、dermal bulge を発達させるか、中層細胞を多層にすることで乾燥に耐え、常に露出している体背面や胸鰭背面の表皮表面に毛細血管を密に分布させて、効果的な皮膚呼吸を可能にしている。また、露出の程度が高い魚類では鰓蓋内面に複雑な褶曲を発達させ、そこに毛細血管を発達させて鰓腔内での空気呼吸を可能にしている。腸は、動物食魚では極端に短く植物食魚

では極端に長い、その上皮組織に食性との対応は認められなかった。本亜科魚類の形態的特化は、水中への依存が強いほど軽微で、特に *A. punctatus* は、形態的特化がもっとも乏しいことが分かった。

論文審査の結果の要旨

張潔は、1990年に中華農業大学水産学部を卒業し、その年より5年間、北京市水産研究所研究員として、シラウオ類とチョウザメ類の増殖に関する研究に従事した。1995年6月に、上記研究所を退任して私費就学生として来日し、1年間に亘り福岡市の日本語学校において日本語教育を受けた。

1996年4月に長崎大学大学院水産学研究科に入学し、有明海で、重要な漁業資源であるヒラ（大型ニシン科魚類）の生活史研究を行い、修士論文にまとめた。

1998年4月に、長崎大学海洋生産科学研究科に進学し、修士論文研究で培った経験と知識を生かし、ムツゴロウ・トビハゼ類の形態学的研究を行った。本研究では、資料を有明海または日本国内に限定せず、本亜科魚類の中心的な分布域である東南アジアにも求め、研究を進めてきた。これまでに4魚種の皮膚の形態的適応を1編の論文として公表し、他の1編を近く投稿予定である。さらに多くの魚種についても広範囲に検討を進め、主論文「A comparative study on the morphological adaptations in oxudercine gobies to their terrestrial life」を平成12年12月に完成し、長崎大学海洋生産科学研究科委員会に博士（学術）の学位を申請した。本研究科委員会はこれを平成12年12月21日の定例委員会に付議し、研究歴と論文内容の要旨を検討した結果、受理して差し支えないものと認めたので、下記の審査委員を選定した。委員は主査を中心として慎重に審議の上、平成13年2月15日の研究科委員会でその結果を報告した。

主論文は、熱帯アジアを中心に分布するムツゴロウ・トビハゼ類（Oxudercinae 亜科魚類）の形態的適応の解明を試みたものである。本亜科魚類は、その生活様式の特異性から注目され、多くの生物学的研究が行われている。特に呼吸機能の面では、独特な空気呼吸の発達を扱った研究が多い。しかし、本亜科魚類の生息地へのアクセスの困難さから、研究は僅かな魚種に限定され、生活様式に関する知見も乏しく、その生活様式から乖離した形態学、生理学や系統分類学的な研究に偏っており、この魚類グループの適応を論じるには至っていない。本研究では、申請者みずから有明海とマレーシアの干潟で、特に空気中への体の露出と食性に焦点を当てて生活様式を確認し、皮膚と摂餌・消化器官を組織学的に観察して、形態と生活様式との関係から適応とその多様性を明らかにした。主論文の主な内容は、第3章の皮膚構造と生活様式との関係と、

第4章の摂餌・消化器官と食性との関係で構成されている。

3章：7属12種を研究対象とし、第1項では生活様式を、特に空気中への体の露出の点から明らかにした。第2項では、体表面と各鰭の表皮構造と鰓蓋内面の上皮構造を組織学的に検討した。その結果、陸上生活種には一様に中層細胞が発達しており、空気中に露出する部分の表皮と鰓蓋内面に毛細血管が密に分布すること、水中生活種は1種を除き中層細胞が発達し、鰓蓋内面に毛細血管が密に分布するが、表皮に毛細血管は発達していないこと、水中生活種のタビラクチでは中層細胞も鰓蓋内面の呼吸機能も未発達なことを明らかにした。

4章：全種を対象に、第1項では摂餌様式と食餌内容を明らかにし、第2項では歯と消化管の外部形態を示すと共に消化管の各部位の上皮構造を組織学的に検討した。その結果、食性は植物食、動物食、雑食と多岐に亘り、歯の形態と消化管の外部形態の特徴が食性と良く対応することを明らかにした。しかし、消化管の上皮構造には食性に対応した変化は見られず、より高度な研究方法が必要なことを示唆した。

ムツゴロウ・トビハゼ類は人類が直接利用する漁獲対象魚ではないが、荒廃が世界的に憂慮されている海浜湿地帯の主要な構成要素であり、干潟域の生物生産及び環境保護の面から注目される魚類グループである。本研究は、この特殊な環境に棲む魚類グループの適応に光を当てた初めての総合的な研究であり、魚類学的に、また干潟環境の保護の面から高く評価される。

海洋生産科学研究科委員会は審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文には海洋動物学・魚類生態学・干潟生物学の分野で重要な多くの新知見が盛られており、海洋生産科学の研究の発展に貢献するところ大と認め、学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	田北	徹
	副査	教授	竹村	暁
	副査	教授	吉越	一馬
	副査	教授	石松	惇

Nguyen Thinh Huu

(ベトナム) 1965年11月24日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Study on the Infection Mechanism of *Streptococcus iniae* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

論文内容の要旨

グラム陽性菌 *Streptococcus iniae* を原因菌とするヒラメのレンサ球菌症は、高水温期に毎年各地のヒラメ養殖場で発生して被害を与えている。抗生物質による

治療が一般的に行われているが、治療薬の残留や耐性菌発生等の問題からこれに代わる対策が求められている。予防ワクチンに関する研究も行われているが、実用化には至っていない。本症の感染発病機構を解明することは有効な防除法を確立する上で必要な研究と考えられる。本研究では、ヒラメ養殖場による *S. iniae* の生態、自然感染魚の体内における *S. iniae* の分布ならびに人為感染実験による *S. iniae* のヒラメへの侵入・定着・増殖の機序を調べ、原因菌 *S. iniae* のヒラメへの感染のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず、ヒラメ養殖場の養魚環境から *S. iniae* を分離するための選択培地の開発を試みた。各種選択剤を加えた試作培地における *S. iniae* の発育性を検討した結果、ハートインヒュージョン寒天に酢酸タリウムとオキシリン酸（それぞれ、 1 g/l および 5 mg/l ）を添加した培地（TAOA 寒天）、およびハートインヒュージョン寒天に硫酸コリスチンとオキシリン酸（それぞれ、 10 mg/l および 5 mg/l ）を添加した培地（CSOA 寒天）が選択培地として優れていることが判明した。また、実際に養殖場で使用したところ、その有用性が確認された。（第1章）

養殖場における *S. iniae* の分布およびその季節変化を調べるために、ヒラメ0歳魚および1歳魚の流水式陸上飼育を行う長崎県下の1養殖場において、1998年6月から2000年5月まで、毎月1、2回、飼育水（水槽水および注水）、水槽中の糞等沈殿物および飼育中のヒラメの魚体各部位から *S. iniae* の検出を試みた。*S. iniae* の分離には、先に開発したTAOA寒天にウマ血液を3%添加した培地（TAOAB寒天）と新たに開発した増菌培地（酢酸タリウム [0.5 g/l]、硫酸コリスチン [10 mg/l] およびオキシリン酸 [5 mg/l] を添加したトッドヒューイットブイヨン）を併用した。その結果、1歳魚の飼育水槽水および糞等沈殿物からは低水温期を除いて周年 *S. iniae* が高率に検出された。一方、0歳魚の水槽の検出率は種苗として飼育を始めた12月からレンサ球菌症の流行期である夏までは低く、本症流行後は高くなった。高水温期には水槽注入水からも検出された。魚体では、体表粘液および鰓からの検出率が調査期間を通じて比較的高かった。以上の結果から、*S. iniae* は養殖場に常在しており、病魚あるいは保菌魚から排出された菌が養魚環境や魚体表面から検出されるものと推察した。飼育水は水槽と海を循環しており、0歳魚は当初 *S. iniae* に汚染されていないが、水を介して1歳魚から感染すると思われた。（第2章）

上記養殖場で夏季の流行期に採集したレンサ球菌症罹病魚（自然感染魚）の魚体内における *S. iniae* の分布

を抗 *S. iniae* ウサギ抗血清を用いた免疫組織化学的方法によって調べた。その結果、腎臓の尿細管周囲、脾臓、心外膜、脳髄膜および脳室、眼球角膜および脈絡膜において *S. iniae* が食細胞内で増殖する様子が観察された。さらに、鰓、肝臓、胃、腸、鼻腔の小血管内にも食細胞に取り込まれた *S. iniae* が散見された。（第3章）

つぎに、人為感染実験により *S. iniae* のヒラメへの感染機序を検討した。攻撃方法として菌浴および経口感染法を用い、菌株による差を調べるためにコロニー形態の異なる2株（*S. iniae* NUF631およびNUF815）を使用した。実験1：高い菌数で攻撃後、経時的に魚体各部位の生菌数の測定と免疫組織化学的観察を行った。経口法では、感染し死亡する個体もみられたが、魚体各部位の生菌数の個体差が大きく、感染していない個体もあった。それに対して、菌浴法では攻撃6時間後から全ての個体に *S. iniae* が検出され、時間経過とともに *S. iniae* の生菌数が増加する様子が観察された。感染初期ではとくに腎臓と脾臓の生菌数が高く、尿細管周囲の細静脈および脾臓茨組織で食細胞に取り込まれた *S. iniae* が観察された。消化管、肝臓、鰓、鼻腔粘膜などにも *S. iniae* を貪食した食細胞が小血管内に認められた。しかし、消化管、鰓あるいは鼻腔に外部から直接 *S. iniae* が侵入して増殖したとみられる病理学的変化は観察されなかった。一方、体表および鰭には出血性患部が認められ、そこに *S. iniae* の細胞外における著しい増殖が観察された。各部位の *S. iniae* の増殖状況に攻撃法による差異はみられず、菌株についてもNUF815攻撃魚の病状の進行がNUF631に比べて速かった以外には差異はみられなかった。実験2：攻撃菌数を3段階（菌浴法、 $10^7 \cdot 10^5 \cdot 10^3 / \text{ml}$ ；経口法、 $10^8 \cdot 10^6 \cdot 10^4 / 100\text{ g}$ 魚体重）設定し、攻撃方法と死亡率との関係を調べた。経口法では 10^8 区の死亡率は50%であったが、それ以下の攻撃菌数では死亡がみられなかった。菌浴法の死亡率は、NUF631が100%（ 10^7 区）、75%（ 10^5 区）、75%（ 10^3 区）、NUF815が95%（ 10^7 区）、60%（ 10^5 区）、60%（ 10^3 区）となった。以上の結果から、*S. iniae* は消化管よりも体表から侵入しやすいと考えられた。また、*S. iniae* の感染機序は次のように推察された。体表から侵入した *S. iniae* は、侵入部位で増殖するとともに、血流によって腎臓や脾臓に運ばれ、そこで食細胞に貪食される。食細胞内の *S. iniae* の一部は殺菌されずに増殖し、*S. iniae* を保有した食細胞は血流によって他の部位に運ばれ、毛細血管内に定着し、そこで *S. iniae* はさらに増殖する。（第4章）

最後に、以上の結果を総括し、ヒラメレンサ球菌症の感染発病機構を考察した。（第5章）

論文審査の結果の要旨

Nguyen Thinh Huu 氏は、昭和63年 7 月にベトナム農林大学獣医学部を卒業し、同年10月より同大学水産学部の講師に採用された。平成 6 年10月に文部省国費留学生として来日し、平成 7 年 4 月長崎大学水産学部に研究生として入学した。平成 8 年 4 月に同大学大学院水産学研究科、平成10年 4 月に海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。

同氏は、長崎大学大学院水産学研究科に入学以来ヒラメのレンサ球菌症に関する研究に従事し、海洋生産科学研究科では本症原因菌 *Streptococcus iniae* の養魚場における生態およびヒラメへの感染機序について研究した。平成12年12月に主論文「Study on the Infection Mechanism of *Streptococcus iniae* in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)」を完成させ、参考論文 4 編（公表した論文 1 編、投稿中の論文 2 編、投稿準備中の論文 1 編）を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科に博士（学術）の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、予備審査委員会の審査結果に基づき、本論文を受理しても差し支えないと認め、下記の学位審査委員を選定した。学位審査委員会は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会で発表させるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成13年 2 月15日の研究科委員会に報告した。

レンサ球菌症は夏季に流行する養殖ヒラメの重要な細菌病である。本論文は、養魚環境における原因菌 *S. iniae* の生態の解明および人為感染による *S. iniae* の魚体への侵入と魚体内での増殖過程の観察からレンサ球菌症の発生のメカニズムを明らかにしようとしたものである。

本論文では、まず、*S. iniae* の選択培地について述べられている。養魚環境には多種類の細菌が存在しており、そこから目的の *S. iniae* を検出しようとする際に選択培地は非常に有用である。本研究では、CSOA（Colistin sulfate+Oxolinic acid）寒天および TAOA（Thalium acetate+Oxolinic acid）寒天、またそれらに馬血液を添加した CSOAB および TAOAB 寒天を開発した。さらに、*S. iniae* の検出率を高めるために増菌培地を開発した。

これらの選択培地のうち TAOAB 寒天および増菌培地を用い、2 年間に亘って長崎県下のヒラメ養殖場において養魚環境における *S. iniae* の生態を調査した。その結果、0 歳魚と 1 歳魚を飼育する当養魚場では、1 歳魚の水槽からはレンサ球菌症の流行期以外でも低水温期を除いて周年 *S. iniae* が検出されること、0 歳魚の水槽では稚魚を飼育し始める冬季から夏季の流行

期までは検出率が低く、流行期を過ぎてから高くなること、鰓や体表粘液など魚体表面からも検出されることを明らかにした。本論文では、流行を耐過した飼育魚の一部が *S. iniae* を保有しており、それらから放出される *S. iniae* が 0 歳魚における流行の感染源となるのではないかと考察しているが、養魚場における *S. iniae* の生態を明らかにした研究はヒラメ以外の魚種を含めても初めてであり、レンサ球菌症の流行のメカニズムを解明する上で有益な研究といえる。

つぎに、人為感染実験を行って、*S. iniae* の魚体への侵入ルートと魚体内での増殖過程の解明を試みた。ヒラメを収容した水槽に培養菌を添加する菌浴法および培養菌を餌に添加して胃内投与する経口法によって攻撃した結果、菌浴法の方が感染させやすいこと、多くの発病魚の鰭や体表に出血性患部がみられ、組織学的観察からその部位に *S. iniae* の増殖が認められたことなどから、*S. iniae* の主たる侵入門戸は鰭や体表と推定した。また、抗 *S. iniae* ウサギ抗血清を用いた免疫組織化学によって魚体内における *S. iniae* の伝播および増殖の過程を追跡し、本菌が脾臓および腎臓においてマクロファージに取り込まれた後、その食胞内で増殖する様子を確認し、他の臓器や組織への伝播は *S. iniae* を取り込んだ食細胞が血流によって運ばれて起こると推定している。自然感染魚の組織学的観察においても、魚体各部位において *S. iniae* が食細胞内で増殖する様子を確認した。

以上のように、本論文はヒラメレンサ球菌症の感染発病機構の解明と本症の防除法の開発に役立つ多くの重要な知見を含んでおり高く評価できる。

海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会の報告に基づいて審査した結果、本論文は魚病学ならびに養殖漁業の発展に大きく貢献するものであることを認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	吉 越 一 馬
	副 査	教 授	藤 田 雄 二
	副 査	教 授	森 井 秀 昭
	副 査	教 授	萩 原 篤 志
	副 査	助教授	金 井 欣 也

Mavit Assavaaree

(タイ) 1961年2月10日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Studies on the Low Temperature Preservation and Resting Egg Formation of the Euryhaline Rotifers *Brachionus plicatilis* Müller and *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff
汽水産ツボワムシ類 *Brachionus plicatilis* Müller と *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff の冷蔵保存と耐久卵形成に関する研究

論文内容の要旨

汽水産ツボワムシ類(以下ワムシと略)は、有用海産魚の種苗生産に対する初期餌料として不可欠な動物プランクトンである。ワムシには、L型ワムシと呼ばれる大型の冷水性種 *Brachionus plicatilis* と小型種の *B. rotundiformis* が知られる。*B. rotundiformis* は、さらに、温帯に分布するもの(いわゆるS型ワムシ)と、熱帯産のSS型ワムシと呼ばれるものを含んでいる。近年のワムシ培養技術は著しく進歩しているが、ワムシの大量保存技術の開発が遅れており、計画的な種苗生産を遂行する上で懸案となっている。

ワムシの大量保存形態としては、1)ワムシを培養海水中で生かしたまま、-2から+12℃程度の低温で保存する方法と、2)生活環の中で出現する耐久卵の状態での保存する方法が考えられる。前者では、ワムシの低温下での寿命に相当する15-30日間に保存期間は限定されるが、比較的低いコストでの大量保存が可能となる。後者は、生産のコストは高くなるが、保存中の管理は不要で、10年以上の長期間にわたった保存が可能である。これらの保存技法が実現できれば、ワムシ培養不良のとき、保存ワムシを直接仔魚に供給できるようになるほか、周年にわたってワムシ培養を維持する労力が省ける。また、設備やマンパワーの少ない種苗生産施設でも、他機関から保存ワムシを終始確保できれば、ワムシの培養スペースの削減、種苗生産のシステム化と効率化が実現できるなど、多くの効能がもたらされる。以上の観点に基づき、本研究ではワムシ保存技術の開発を最終目的とした基礎研究を実施した。

ワムシの低温耐性と冷蔵保存

まず、低温耐性が比較的強い、*B. plicatilis* の4℃下での低温保存を実験室内で試みた。このとき、1)5日に1回、全飼育水を交換、2)適株の選択、3)4℃移行前に15℃で4日間馴致、4)2日に1回、微細藻類の *Nannochloropsis oculata* を給餌、の各操作が低温保存に対して、高い生残効果をもたらし、これらの操作を組み合わせることによって、30日間の保存後、最

高34%の生残を得た。保存後のワムシを25℃下で10日間培養したところ、ワムシ密度は3-4倍になり、良好な増殖を示すことも分かった。以上の基礎知見をもとに、種苗生産現場で30リットル水槽を用いた保存試験を実施した。ワムシを20,000個体/mlで収容し、4℃下で2週間保存したところ、約50%の生残が得られ、25℃に移行後、4日目に個体数は約2倍に増えたことから、数億オーダーでのワムシ低温保存が生産現場でも可能であることが明らかとなった。一方 *B. rotundiformis* の低温耐性は比較的強く、S型ワムシの4℃下での保存可能期間は5-15日間にとどまった。熱帯産のSS型ワムシの低温耐性は極端に低く、4℃下での保存は最長5日間(生残率4%)であった(第2章)。

次に、S型ワムシを10℃、SS型ワムシを12℃下におき、10日間の保存を試みたところ、それぞれ94%、89%の生残が得られた。このとき、飼育水塩分を35ppt(S型ワムシ)、17ppt(SS型ワムシ)に設定したところ、保存時の飼育水交換を実施しない場合に、生残率は最も高くなった。28℃で培養したSS型ワムシを、直接12℃に移す前に、20℃下に24時間おく馴致操作を行うことによって、12℃に移行後、14日目の生残を49.4%にすることができた。一方、S型ワムシに対し、同様に行った馴致は効果を全くもたらさなかった(第3章)。

ワムシ冷蔵保存に対するホルモン添加の効果

ワムシの増殖を促進することが知られているγアミノ酪酸とブタ成長ホルモンを、それぞれ50μg/ml及び0.025 I.U./mlになるようワムシ飼育水に添加し、低温保存時の生残と、保存終了後、25℃下での再増殖に与える影響を求めた。低温下に移行する6時間前にγアミノ酪酸を添加したとき、L型ワムシとSS型ワムシに対する効果はなかったが、10℃下でS型ワムシを14日間保存したときの生残を、無添加の時に比べて約1.2倍高くできた。低温移行後にGABAを添加したときには、どの型のワムシに対しても効果はなく、逆に生残を低下させる場合(S型ワムシ)もみられた。GH添加はL型ワムシに対してのみ、低温保存時の生残を増大させる働きがみられた。次に、低温保存後のワムシ培養にGABAとGHを添加して、25℃移行後の増殖を調べたところ、L型ワムシに対する効果はなかったが、GABA添加はS型ワムシの増殖を、GH添加はSS型ワムシの増殖をそれぞれ促進した(第4章)。

SS型ワムシの耐久卵形成

熱帯産のSS型ワムシは、30-35℃の高温下で両性生殖が発現・進行し、最終産物として耐久卵を形成する。しかし、人為的なワムシ培養を高温下で行うと、限られた空間内で個体群の急速な成長に伴う餌料不足と水質の悪化が起こりやすく、両性生殖が耐久卵を多

数形成する前に培養が崩壊する例が多い。このため、比較的低温域に両性生殖誘導の至適温度がある L, S 型ワムシに比べ、SS 型ワムシの耐久卵量産は実現できなかった経緯があった。本研究では、あらかじめ 35℃ 下で 4 日間培養して、両性生殖を十分発現させた後、25℃ に水温を低下させ、以後 7 日間、比較的安定した環境下で両性生殖を進行させることによって、耐久卵を量産できないか検討した。その結果、500ml 水槽を用い、*Nannochloropsis oculata* を餌料とした 11 日間の培養実験では、水温低下処理によって対照の 2.1 倍高い効率 (3870 個 / mg 乾重給餌) で耐久卵を形成できた。この結果は、500 リットル水槽 (水量 400 リットル) に培養を拡大した場合にも、同じ効率で耐久卵を量産できた。9 日間の培養後、形成された耐久卵数は平均 2600 万に達した (第 5 章)。

以上より、冷蔵によるワムシの短期保存技法についての基礎知見を求めると共に、応用へ向けたマニュアル化を完成させることができた。また、大型水槽を用いた、本技法の適用を通じて、GABA と GH の添加効果も確認できた。ワムシの長期保存に対しては、耐久卵による保存が理想的で、L, S 型ワムシでは既に耐久卵の量産が試みられている。本研究では、困難であるとされてきた SS 型ワムシ耐久卵の量産に取り組み、これに成功したことから、種苗生産の目的に応じた多様な形態のワムシ株を保存し、随時、餌料として供給することが技術的に可能となった。

論文審査の結果の要旨

Mavit Assavaaree 氏は 1984 年 10 月にカセサート大学水産学部 (タイ) を卒業し、同年 11 月から 1987 年 6 月までタイ国立内水面漁業開発センターに勤務、1987 年 7 月からは国立沿岸養殖研究所・研究員として勤務している。その間、1992 年 8 月から 4 か月間、国際協力事業団・研修生として、長崎大学水産学部滞任経験がある。1995 年 10 月、文部省国費留学生 (大学推薦) として来日し、同年 10 月から長崎大学水産学部研究生、翌年 4 月に同大学水産学研究科に入学した。「海産ワムシ類の 4℃ での低温保存」の研究で修士号を取得し、1998 年 4 月に同大学院海洋生産科学研究科海洋資源学専攻に入学、現在に至っている。

博士課程では所定の単位を修得すると共に、修士課程で行った研究を発展させ、海産仔魚の初期餌料プランクトンとして汎用されるシオミズツボワムシ (以下ワムシと略) を材料として、培養ワムシの保存技法の開発について取り組んだ。それらの結果をもとに、平成 12 年 12 月に主論文「Studies on the Low Temperature Preservation and Resting Egg Formation of the Euryhaline Rotifers *Brachionus plicatilis* Müller and *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff」を完成させ、参考論文 2 編を添

えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士 (学術) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成 12 年 12 月 21 日の定例委員会において、予備審査委員会の結果に基づいて、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の通り審査委員会を選定した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会で発表させると共に口頭による最終試験の結果を平成 13 年 2 月 15 日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、培養ワムシの短期冷蔵保存と、生活室内で形成される耐久卵に着目した長期保存について、保存技法の開発を行うと共に、種苗生産現場での応用について検討したものである。

まず、低温耐性が比較的強い *B. plicatilis* の 4℃ 下での保存を実験室内で試みた結果、1) 5 日に 1 回、全飼育水を交換、2) 適株の選択、3) 4℃ 移行前に 15℃ で 4 日間馴致、4) 2 日に 1 回、微細藻類の *Nannochloropsis oculata* を給餌、の各操作が高い生残効果をもたらすことを見出した。保存後のワムシの増殖も良好だった。以上の基礎知見をもとに、大型水槽を用いた保存試験を実施した結果、数億オーダーでのワムシ低温保存が生産現場でも可能であることを示した (第 2 章)。

次に、4℃ での保存が困難な *B. rotundiformis* (温帯性の S 型と熱帯性の SS 型とが知られる) の大量保存条件の最適化を試みた。S 型ワムシを 10℃、SS 型ワムシを 12℃ 下におき、10 日間の保存を試みたところ、それぞれ 90% 以上の生残が得られた。このとき、飼育水塩分を調整し、保存時に飼育水交換を実施しない場合に、生残率は最も高くなった。28℃ で培養した SS 型ワムシを、直接 12℃ に移す前に、20℃ 下に 24 時間おく馴致操作を行うことによって、12℃ に移行後の生残を有意に向上できた (第 3 章)。

また、ワムシの増殖を促進することが知られている γ アミノ酪酸 (GABA) とブタ成長ホルモン (GH) をワムシ飼育水に添加したところ、低温移行の 6 時間前に、 γ アミノ酪酸を添加したとき、S 型ワムシの生残を、無添加時に比べて約 1.2 倍高くできた。GH 添加は L 型ワムシの低温保存時の生残を上昇させた。GABA と GH 添加は、低温保存後のワムシ培養にも有効で、25℃ 移行後、GABA 添加は S 型ワムシの増殖を、GH 添加は SS 型ワムシの増殖を促進した (第 4 章)。

さらに、耐久卵による長期保存について、SS 型ワムシを材料にした研究を実施した。熱帯産の SS 型ワムシは、高温下で両性生殖を発現・進行して耐久卵を形成する。しかし、人為的な培養下では、個体群の急速な成長に伴う餌料不足と水質悪化が起こりやすい。本研究では、35℃ 下で短期間 (4 日) 培養して、両性

生殖を十分発現させた後、25℃に水温を低下させ、以後7日間、比較的安定した環境下で両性生殖を進行させることによって、耐久卵を量産できることを見出した。*Nannochloropsis oculata* を餌料とした11日間の培養実験では、対照より2.1倍高い効率（3870個/mg乾重給餌）で耐久卵を形成できた。生産現場の大型水槽内でも、同じ効率で耐久卵を量産でき、平均2600万の耐久卵量産に成功した（第5章）。

本研究の意義は、冷蔵によるワムシの短期保存技法についての基礎知見を求めると共に、応用へ向けたマニュアル化を完成させた点にある。また、大型水槽を用いた、本技法の適用を通じて、GABAとGHの添加効果も確認できた。ワムシの長期保存に対しては、耐久卵による保存が理想的である。本研究では、従来不可能であるとされてきたSS型ワムシ耐久卵の量産に取り組み、これに成功したことから、種苗生産の目的に応じた多様な形態のワムシ株を保存し、随時、餌料として供給することを技術的に可能とした点も、高く評価できる。

以上より、海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会の報告に基づき審査した結果、本研究は、下等動物の低温耐性変化に対する詳細な知見を提供したのみならず、種苗生産技術開発研究としても高い価値をもつと判断し、学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主査 教授 萩原 篤志
副査 教授 藤田 雄二
副査 教授 松岡 数充
副査 教授 石松 惇

Adriana Belem de Araujo

(ブラジル) 1970年2月14日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Studies on the Development of Techniques for Culture Diagnosis of the Euryhaline Rotifers *Brachionus plicatilis* Müller and *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff
汽水産ツボワムシ類 *Brachionus plicatilis* Müller と *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff の培養診断技術の開発に関する研究

論文内容の要旨

汽水産ツボワムシ類（以下ワムシと略）には、冷水性で大型種の *Brachionus plicatilis* と温水性で小型種の *B. rotundiformis* が知られる。*B. rotundiformis* には中緯度域に分布しS型ワムシと称されるグループと、熱帯域に分布するSS型ワムシと呼ばれる超小型サイズのグループを含んでいる。これらはいずれも有用海産魚の種苗生産に対する初期餌料として不可欠な動物プ

ランクトンである。大量培養によるワムシの供給は種苗生産の根幹となる部分であるが、ワムシの培養不良のために、計画的な種苗生産の遂行に対して支障をきたす例が多い。本研究では、ワムシ培養の異常を迅速に検出するための技術確立を最終目的とし、日常、迅速に実施できる培養診断の技術開発に対する基礎知見を求めた。ワムシ培養が不調に陥ると、各個体の寿命が短くなると共に、産卵数が低下する。一方、これらの生殖特性値の測定には7-10日の長時間を要することから、ワムシの生殖特性値と相関して変化し、かつリアルタイムで測定可能な、感度の高い指標を見出すことができれば、ワムシ培養の状況把握に極めて有用となる。ここでは、短時間で簡便に実施できる *in vivo* での酵素活性測定技法を適用し、各種のストレス環境におかれたワムシの生殖特性との相関を把握し、体系化することによって、ワムシ大量培養の培養診断を個体レベルで実現しようとした。さらに、ワムシ培養不良の回避策や海産仔魚飼育への適用についても検討を加えた。

各種の環境ストレスがワムシの生殖特性と酵素活性に与える影響

ワムシ培養不良をもたらすストレス因子となることが知られている、飼育水中の非解離アンモニア濃度の上昇、溶存態有機物の蓄積による飼育水粘性の増大、および原生動物のコンタミが *B. plicatilis* の生殖特性（寿命、産仔数）と酵素活性に与える影響を個体レベルで検討した。このとき、耐久卵から孵化後6時間以内のワムシを実験に用いることによって、実験個体の生理状態を均一にした。飼育水中の非解離アンモニア濃度と粘性の上昇、及び原生動物 *Euplotes* sp. の密度増大は、いずれもワムシの寿命を短くすると共に、産仔数を減少させた。次に、同様の環境下に耐久卵孵化ワムシを2時間曝した後に、エステラーゼ、グルコシダーゼ、ホスホリパーゼの蛍光性基質（各々 cFDAm, PLA2, FDGlu）を加え、ワムシの酵素活性を画像解析（NIH image）と蛍光光度計によって測定した。その結果、前述した三つの環境ストレス因子の変動下で、ワムシ消化管内のグルコシダーゼ活性が、ワムシの寿命、産仔数変化と極めて有意な相関を示し、ワムシの生理状態の鋭敏な指標となり得ることが明らかとなった。一方、実際のワムシ培養環境下では複数のストレス因子が環境中に存在する。そこで、前述の三因子をそれぞれ単独で与えた場合と、二因子または三因子を組み合わせて与えた場合の計7通りの条件を設定して、同様の実験を繰り返した。その結果、ストレス因子を重複させていくことによって、ワムシの増殖がより顕著に抑制され、これに応じて、ワムシのグルコシダーゼ活性が明瞭に低下した（第3章）。

次に、同様の以上の実験を、*B. rotundiformis* の2株 (S,SS 型) に対しても実施した。その結果、*B. plicatilis* の場合と全く同様、環境中のストレス要因の増大に対し、グルコシダーゼ活性が最も鋭敏に変化し、ワムシの寿命、産仔数と高い相関を示すことが明らかになった (第4章)。

ワムシ大量培養の診断への応用

種苗生産現場のワムシ大量培養槽 (水量 1 kL) 内のワムシ密度を一日一回計数して増殖状況を把握すると共に、培養濾液に耐久卵孵化ワムシを曝露して、酵素活性変化を求めた。その結果、ワムシ密度の増減に呼応して、グルコシダーゼのみならず、エステラーゼ、ホスホリパーゼの活性も変化することが確認され、実用的な技法となり得ることが示された (第5章)。

ワムシの培養不調に対して効果を与える要因

各種のストレス因子にワムシを曝露したところ、ストレスに対する耐性は、遺伝的に異なるワムシの株間で大きな変化がみられた。したがって適株を選択することによって培養不調を事前に防ぐことができる場合も多いものと推察された。また、ストレスを与えて増殖が不調になったワムシの飼育水中に γ アミノ酪酸を 50ppm 添加したり、飼育水の塩分を 22ppt から 8-16ppt に低下させたりすることによって、ワムシの産仔数を増大させることができた。以上の処理によって、グルコシダーゼ活性も上昇したことから、ワムシの生理状態を好転させることができたものと判断された (第6章)。

海産仔魚の飼育診断への応用の試み

ワムシに対して確立した技法をヒラメ仔魚飼育 (水量 100L) に対して適用したところ、孵化後15日間の飼育を通じて、成長が遅く、生残率が低い飼育水槽内の仔魚では消化管内のエステラーゼ活性が低くなっていることが示された (第7章)。

以上より、1) ワムシのグルコシダーゼ活性は、多様な環境下で培養されているワムシの生理状態の良好な指標となり、種苗生産現場での培養診断に対しても応用可能であること、2) 培養不調の防止策として、適株の選択、 γ アミノ酪酸の飼育水添加、塩分制御が有効になることが明らかになり、さらに、3) 本技法の海産仔魚飼育への適用の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

Adriana Belem de Araujo 氏は1994年1月にパラナ・カトリック大学理学部 (ブラジル) を卒業し、同年4月から1995年9月までパラナ州立大学海洋研究センター・研究員として研究活動に従事した。1995年10月に文部省国費留学生として来日し、九州大学留学生センターでの日本語研修の後、翌年4月に同大学水産学研究科に入学した。「酵素活性を指標とした海産仔魚

およびワムシの健康診断」の研究で修士号を取得し、1998年4月に同大学院海洋生産科学研究科海洋資源学専攻に入学、現在に至っている。

博士課程では所定の単位を修得すると共に、修士課程で行った研究を発展させ、海産仔魚の初期餌料プランクトンとして汎用されるシオミズツボワムシ (以下ワムシと略) を材料として、ワムシの培養診断技術の開発について取り組んだ。その成果をもとに、平成12年12月に主論文「Studies on the Development of Techniques for Culture Diagnosis of the Euryhaline Rotifers *Brachionus plicatilis* Müller and *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff」を完成させ、参考論文3編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士 (学術) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、予備審査委員会の結果に基づいて、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の通り審査委員会を選定した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会で発表させると共に口頭による最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出された学位論文は、海産魚類の種苗生産用初期餌料として不可欠な動物プランクトンである海産ツボワムシ類に対し、環境中のストレス因子の影響を求め、これに基づいたワムシ培養診断の技術開発を研究目的としたものである。

まず、各種の環境ストレスがワムシの生殖特性と酵素活性に与える影響を求めた。飼育水の非解離アンモニウム濃度と粘性の上昇、及び原生動物 *Euplotes* sp. の密度増大は、いずれもワムシの寿命を短くすると共に、産仔数を減少させた。同様の環境下で、耐久卵孵化ワムシを2時間曝した後に、エステラーゼ、グルコシダーゼ、ホスホリパーゼの蛍光性基質 (各々 cFDAm, PLA2, FDGlu) を加え、ワムシの酵素活性を測定したところ、前述した三つの環境ストレス因子の変動下で、ワムシ消化管内のグルコシダーゼ活性が、ワムシの寿命、産仔数変化と極めて有意な相関を示し、ワムシの生理状態の鋭敏な指標となり得ることが明らかとなった。また、3つのストレス因子を重複させていくことによって、ワムシの増殖がより顕著に抑制され、これに応じて、ワムシのグルコシダーゼ活性が明瞭に低下した。これらの傾向は *B. plicatilis* (いわゆる L 型ワムシ) と *B. rotundiformis* の2株 (S,SS 型) に共通にみられた (第3章)。

この知見をもとに、ワムシ大量培養診断への応用を試みた。種苗生産現場のワムシ大量培養槽 (水量 1 kL) 内のワムシ密度の増減に呼応して、グルコシダーゼ、エステラーゼ、ホスホリパーゼの活性も変化する

ことが確認され、実用的な技法となり得ることが示された(第5章)。

次に、不調なワムシ培養を改善できないか検討した。各種のストレス因子に対する耐性が、遺伝的に異なるワムシの株間で大きな変化がみられ、適株を選択することによって培養不調を事前に防ぐことができる場合も多いものと推察された。また、人為的にストレスを与えて、増殖が不調になったワムシの飼育水中に、 γ アミノ酪酸を添加したり、飼育水塩分を低下させたりすることによって、ワムシの個体当たりの産仔数が増大することが分かった。以上の処理によって、グルコシダーゼ活性も上昇したことから、ワムシの生理状態を好転させることができたものと判断された(第6章)。

さらに、ワムシに対して確立した本技法をヒラメ仔魚飼育に対して適用したところ、孵化後15日間の飼育を通じて、成長が遅く、生残率が低い飼育水槽内の仔魚では消化管内のエステラーゼ活性が低くなっていることが示された(第7章)。

以上より、1)ワムシのグルコシダーゼ活性は、多様な環境下で培養されているワムシの生理状態の良好な指標となり、種苗生産現場での培養診断に対しても応用可能であること、2)培養不調の防止策として、適株の選択、 γ アミノ酪酸の飼育水添加、塩分制御が有効になることが明らかになり、さらに、3)本技法の海産仔魚飼育への適用の可能性が示唆された。

本研究の意義は、環境ストレスがワムシの生殖特性に与える影響について基礎知見を求めると共に、ワムシの生理状態の指標として、酵素活性に着目し、これを用いた培養診断技術へ発展させた点にある。また、不調に陥ったワムシ培養を改善するための基礎知見として、ワムシ株間のストレス耐性の強弱、化学物質添加による生理状態の昂進機能を見出した点や、海産仔魚の健康度診断に発展させた点も、高く評価できる。

以上より、海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会の報告に基づき審査した結果、本研究は、検討例の少ない下等動物の環境耐性に対する詳細な知見を提供したのみならず、種苗生産技術開発研究としても高い価値をもつと判断し、学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	萩原篤志
	副査	教授	夏苅豊
	副査	教授	原研治
	副査	教授	石坂丞二

金正年

(韓国)1967年10月29日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Systematic Study on the Family Crangonidae from East Asian Waters and Phylogenetic Analysis of the Crangonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea)

論文内容の要旨

エビジャコ科のエビはコエビ下目に属する底生性のエビで、これまでに世界から20属約160種、日本近海から13属約42種が知られている。これらは北半球の温帯域および寒帯域を中心として、潮間帯から深海まで広く分布している。浅海種は、ヒラメなどの放流種苗を食害することが知られている反面、ヒラメなどが成体になれば重要な天然餌料として利用されるなど、沿岸性重要魚類と相互に密接な関係を持っている。また、大陸斜面上に分布する大型種は、乱獲により減少した浅海有用種の代替として、近年漁獲対象にされている。しかし、本科はコエビ下目の中でも分類学的研究が最も遅れているグループで、産業重要種や普通種についても分類学的な混乱があり、ごく普通に出現するものでも種レベルの同定ができない場合がある。さらに、属間の類縁関係についても諸説があり明確な結論が出されていないのが現状である。

これらのことから、東アジア各地から採集された多数の標本、および国内外の博物館や研究機関に保管されている関連種を調べ、エビジャコ科の形態学的分類の再検討を行った。その結果、1未記載属(*Metacrangon* "angusticauda group")、3新種(*Crangon uritai*, *Philocheras gemmaceus*, *P. fujinoi*)、4未記載種(*Paracrangon* sp., *Philocheras* sp., *Metacrangon* sp. A, *M. sp. B*)および東アジア海域から報告がなかった2属(*Parapontocaris*, *Lissosabinea*)、6種(*Philocheras pilosus*, *P. plebs*, *P. planoculminis*, *Parapontocaris levigata*, *Rhynocrangon sharpi*, *Lissosabinea indica*)を確認することができた。本研究では、これらの新たに認められた分類群を含む東アジアから報告されているエビジャコ科の16属64種と1亜種すべてについて、形態の記載を行った。さらに東アジアに分布しない属についても標本を調べ、属の特徴に基づいて、エビジャコ科全体の系統分類学的研究を進めた。その結果、従来の系統樹とは *Lissosabinea* の位置が異なっているなど、自然分類をよりよく反映していると思われる系統樹を得ることができた。

具体的には、長い間混乱が続いていたエビジャコ属(*Crangon*)の分類学的再検討を行って、いわゆるエビジャコ *Crangon affinis* De Haan, 1849の新模式標本を設定し、これまでに東アジアから報告された12公称

タクサを, 1 新種を含む 7 種として見直した。沿岸性種の混乱の一部はこれで解消され则认为。

また, 世界から約 50 種が記述されているが, 東アジアからはわずか 9 種しか報告されていなかったシンカイエビジャコ属 (*Philocheras*) について, 2 新種, 1 未記載種, 3 未記録種を新たに認め, 2 種の分類学的位置を見直した。その結果, 東アジア海域にはシンカイエビジャコ属が 13 種分布することが分かった。

従来トゲエビジャコ属 (*Metacrangon*) に配属されていた 2 種 “*Metacrangon angusticauda*” と “*Metacrangon dentata*” のために新属を設けるべきであることが分かった。前者のトゲエビジャコは日本沿岸の温帯域の水深 40m 以浅, 特に藻場や磯の砂だまりに普通に見られる小型の種類である。後者はトゲエビジャコの変種 *Crangon (Sclerocrangon) angusticauda* var. *dentata* として記載されたもので, 原記載以降の報告が全くなかった。

この未記載属を含むエビジャコ科の 20 属 (*Lissocrangon* は *Crangon* のシノニムとする) について外群比較による系統縁関係推定を行った。外群として, 同じ上科に属するトゲヒラタエビ科トゲヒラタエビ属 (*Glyphocrangon*) を選び, 推定した 40 個の変換系列の 100 個の形質を使って系統分類学的分析を行った。その結果, 樹長 (tree length) が 147 および一致指数 (CI) が 0.483 の 27 の系統樹を得た。これらのうち, F 比 (F-ratio) が 0.3840 と一番大きい 6 個の系統樹を選び, これらの厳密合意樹 (strict consensus tree) を作成した (樹長: 148, CI: 0.480)。この系統樹は大きく四つの分岐群 (clade) に分けられ (clade 1, Pontocaridinae: *Aegaeon* + *Pontocaris* + *Parapontocaris* + *Sabinea*; Clade 2, Crangoninae: 10 genera, *Argis* - *Philocheras*; Clade 3, Paracrangoninae: *Prionocrangon* + *Vercoia* + *Paracrangon*; Clade 4, Pontophilinae: *Lissosabinea* + *Parapontophilus* + *Pontophilus*), 従来のものと比較すると次の二点が改善されており, 自然分類により近いものになった。第 1 は, 従来 Paracrangoninae の第 1 分岐群であった *Lissosabinea* が, 第 3 顎脚の鰓の数の違い等により Pontophilinae の第 1 分岐群になっている点である。第 2 は, 今回新属を設けるべきであるとした “*Metacrangon angusticauda* group” が, “*Metacrangon*” と同じ分岐群 (第 2 分岐群) に属するものの, “*Metacrangon*” よりも *Rhynocrangon* + *Sclerocrangon* 群に近い点である。

論文審査の結果の要旨

金 正年は 1993 年 2 月に大韓民国・釜山水産大学海洋科学大学を卒業し, 1995 年 2 月に同大学大学院を修了した。96 年に来日し, 同年 4 月農林水産省水産大学校水産学研究所に入学した。98 年 3 月に同研究所を修了し, 同年 4 月に長崎大学大学院海洋生産科学研

究科 (後期 3 年博士課程) に入学, 現在に至っている。また, 海洋生産科学研究科在学中の 98 年 9 月には農林水産省水産大学校での研究成果によって学位授与機構から修士の学位を授与された。

同氏は来日以来, 甲殻類コエビ下目エビジャコ科の分類学的研究を主に行い, これまでに 7 編の学術論文を印刷公表している。海洋生産科学研究科では海洋資源学を専攻し, 所定の単位を修得するとともに, 主論文 “Systematic Study on the Family Crangonidae from East Asian Waters and Phylogenetic Analysis of the Crangonidae (Crustacea, Decapoda, Caridea)” を完成させ, 平成 12 年 12 月に参考論文 5 編 (内 1 編は印刷中) を添えて, 同研究科委員会に博士 (学術) の学位を申請した。同研究科委員会は, 同年 12 月 21 日の定例委員会において, 予備審査委員会の審査結果を承認し, 本論文を受理して差し支えないものと認め, 下記の学位審査委員を選定した。審査委員会は主査を中心に論文の内容について慎重に審査し, その結果を平成 13 年 2 月 15 日の定例研究科委員会に報告した。

本研究が対象としたエビジャコ科は甲殻十脚類に属する底生性, 中～小型のエビで, これまでに世界から 20 属約 160 種が知られている。両極海域を含む全世界の潮間帯から深海にまで分布し, 浅海種は個体数が多いので生態系に占める地位は決して低くはない。しかし浅海に普通に見られる種にも分類学的混乱が見られ, 本科が属するコエビ下目の中では分類学的研究が最も遅れているグループである。

提出論文は, 模式標本 265 個体を含む計 1,778 個体のエビジャコ科のエビを用い, 東アジア産同科のエビの分類学的再検討を行うとともに, 同科全属の系統分類学的研究を行ったものである。

まず, 東アジア各地から新たに採集された標本, 国内外の博物館や研究機関に保存されている標本計 1,662 個体 (256 個体の模式標本を含む) を精査し, 東アジア産エビジャコ類を, 未記載属 1, 未記録属 2, 新種 3, 未記載種 4, 未記録種 6 を含む 16 属 64 種 1 亜種に纏め, 各分類群について詳細な記載を行っている。このなかで, 長年に亘って分類学的混乱が続いていた, 浅海性の普通種が多く含まれるエビジャコ属 *Crangon* について, 最も普通に見られるエビジャコ *Crangon affinis* に新模式標本を設定し, これまで報告されていた 12 公称タクサを 1 新種を含む 7 種に整理している。また, 東アジア海域からの報告が少なかったシンカイエビジャコ属 *Philocheras* に新種 2, 未記載種 1, 未記録種 3 を認め, 東アジアには同属が 13 種分布することを明らかにしている。さらにトゲエビジャコ属 *Metacrangon* のエビについて形態を精査し, 現在同属に属している 2 種のために, 新属を設けることを提唱し

ている。

次に、エビジャコ科に最も近縁と見られるトゲヒラタエビ科トゲヒラタエビ属を外群に設定し、40変換系列の100形質を用いて外群比較による系統分類関係分析を行っている。分析によって得られた27の系統樹の内からF比の大きい6系統樹を選び、これらの厳密合意樹を作成し、この合意系統樹は従来のものに比べて自然群により近いと結論している。

以上のように、本研究は、これまで研究が遅れていたために生物科学の最も基礎となる分類に混乱が生じていたエビジャコ類について多くの新知見を得るとともに、長年の分類学的混乱に終止符を打っている。海洋生産科学研究科委員会は、論文審査および最終審査の結果についての審査委員会の報告に基づいて審査した結果、本論文は海洋生産科学の進展に大きく貢献すると判断し、博士（学術）の学位に値するものとして、合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	夏 苺	豊
	副査	教授	田 北	徹
	副査	教授	竹 村	暁
	副査	教授	松 岡	数 充

ジャヤント クマール ミシュラ

(インド) 1964年5月7日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Larval Settlement of the Barnacle *Balanus amphitrite* Induced by Amino Acid Related Pheromonal Substances

論文内容の要旨

フジツボ類は船底や海洋構造物に付着し、これらに多大な被害を及ぼす汚損生物の代表である。現在日本を除く各国では、汚損生物の付着を防ぐ目的で有機スズ系の塗料を使用している。しかし、有機スズ塗料は海洋生物に強い毒性があるため、重大な環境問題となっている。そこで、環境に安全な付着防止法を早急に開発する必要がある。これまで物理、化学及び生物学的見地より付着防止法が研究されてきたが、優良な方法は見出されていない。新たな付着防止法を開発するためには、汚損動物幼生の付着機構を理解することが重要である。本研究では、タテジマフジツボ (*Balanus amphitrite*) の付着機構の解明の一步として、幼生に対する付着シグナルの研究を行った。

第1章では本種幼生の付着シグナルの研究状況などをまとめるとともに、本研究で対象としたアミノ酸関連のフェロモン、モノアミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、さらには成体から抽出した揮発性の付着シグナルについて言及した。

第2章では付着誘起フェロモンの研究について述べ

た。タテジマフジツボの成体の飼育水は同種の幼生の付着を誘起した。しかし同属別種のサンカクフジツボ (*B. trigonus*)、サラサフジツボ (*B. reticulatus*)、ドロフジツボ (*B. kondakovi*) 及びヨーロッパフジツボ (*B. improvisus*) の成体の飼育水では、本種幼生の付着は誘起されなかった。これらの結果は、タテジマフジツボが環境水中にフェロモン様物質を放出していることを示している。この物質は、熱に安定で、揮発性ではなく、また分子量は100~500Daと推定された。さらに化学分析によってアミノ酸を含んでいることが分かった。フェロモンの本体を同定することは出来なかったが、低分子量のアミノ酸関連化合物と推察できた。

本物質の種特異性を調べる過程でサンカクフジツボの幼生飼育及び付着実験方法を確立した。浮游珪藻の *Chaetoceros gracilis* を餌料とし、25℃で飼育した。サンカクフジツボの幼生はタテジマフジツボよりサイズが大きい、餌料濃度を $5 \times 10^5 \text{ cells / ml}$ とした場合、6日間でキブリス幼生にまで飼育可能であった。サンカクフジツボのキブリス幼生は、同種成体の粗抽出液に高い付着率を示した。

第3章では、モノアミノ酸、ジペプチド及びトリペプチドのタテジマフジツボに対する付着誘起効果について述べた。酸性、塩基性、非荷電極性又は非極性側鎖を持つ16種類の蛋白構成アミノ酸のうち、非荷電極性又は非極性側鎖を持つ9種類に付着誘起効果が認められた。このうち活性が高かったのは Ser-Leu 及び Ileu であり、 $1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ の濃度で活性を示した。Leu-Arg、His-Lys、Ser-Leu 及び Leu-Ileu のジペプチド、またトリペプチドの Leu-Gly-Arg が付着を誘起し、特に Ser-Leu と Leu-Ileu は $1.0 \times 10^{-12} \text{ M} \sim 1.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ で活性を示した。付着誘起活性には、特にヒドロキシル基やメチル基が重要な役割を果たしていると考えられた。

第4章では成体抽出液から得られた揮発性の付着誘起物質の研究について述べた。タテジマフジツボの成体から抽出した揮発性物質は本種の幼生の付着を誘起した。その活性物質は *n*-ペンタンで抽出可能であり、GC-MS 分析により 1,2,3-trimethylbenzene と同定された。市販試薬による実験では $0.5 \times 10^{-12} \text{ M} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ の範囲で付着誘起効果が認められた。

第5章では、以上の成果を要約し、これらを基に今後期待される研究の展望について述べ、総括した。(1) タテジマフジツボの放出する付着誘起フェロモンは、熱に安定で、揮発性ではなく、また分子量は100~500 Da のアミノ酸関連物質と考えられた。フジツボの付着フェロモンとしては最初の記録である。(2) モノアミノ酸 Ser-Leu 及び Ileu は付着を誘起し、側鎖などが付着誘起活性に重要な役割を果たしていると考えられた。

またジペプチドの Ser-Leu 及び Leu-Ileu にも活性が認められた。(3)タテジマフジツボより抽出された 1, 2, 3-trimethylbenzene が付着を誘起した。

新しい付着防止法の開発のためには、フェロモン本体を明らかにすること、また化学構造と活性との関係を追求することなどを通して、幼生の付着機構を解明することが必要である。

論文審査の結果の要旨

Jayant Kumar Mishra 氏は1987年7月にインドのパラハムプール大学海洋科学部を卒業後、1988年から1995年までの間、国立海洋研究所に Senior Research Fellow として勤務した。この間、上述の海洋科学部大学院生として所属した。1995年10月に文部省国費留学生として来日し、1996年に長崎大学水産学部修士、1998年4月より海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。

同氏は長崎大学大学院（海洋水産資源学専攻）に入学以来、主にフジツボ幼生の付着誘起物質に関する研究に取り組んでいる。その結果をまとめ平成12年12月に主論文「Larval Settlement of the Barnacle *Balanus amphitrite* Induced by Amino Acid Related Pheromonal Substances」を完成し、参考論文4編（公表した論文3編、投稿準備中の論文1編）を添えて、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（水産学）の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は平成12年12月21日の定例委員会において、予備審査委員会の予備審査結果を承認、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記審査委員を選定した。その後、審査委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会における発表と口頭試問による最終試験を実施し、論文の審査および最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、船底や海洋構造物に対する代表的な汚損動物であるタテジマフジツボ幼生の付着機構解明の第一歩として、幼生に対する付着誘起物質の解析を主な目的としている。

まず、付着誘起フェロモンの研究について、タテジマフジツボ成体の飼育水は同種幼生の付着を誘起した。しかし同属別種のサンカクフジツボなど4種の飼育水では、本種幼生の付着は誘起されなかった。これらの結果は、本種が環境水中にフェロモンを放出していることを明らかにしている。この活性物質は熱に安定、揮発性ではなく、また分子量は100～500Daと推定された。化学分析によってアミノ酸関連化合物と結論できた。

このフェロモンの種特異性を調べる過程でサンカクフジツボの幼生飼育及び付着実験方法を確立した。浮

游珪藻を餌料とし、25℃で飼育した。サンカクフジツボの幼生はタテジマフジツボよりサイズが大きい、餌料濃度を $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ とした結果、6日間でキブリス幼生にまで飼育可能であった。

先のごとくアミノ酸関連物質が付着誘起物質として考えられたため、次には市販試薬のモノアミノ酸、ジ・トリペプチドの本種幼生に対する付着誘起効果について調べた。蛋白構成アミノ酸のうち、非荷電極性又は非極性側鎖を持つ9種類に付着誘起効果が認められた。このうち活性が高かったのは serine, leucine 及び isoleucine であり、ヒドロキシメチル基などが付着誘起活性に重要と考察している。ペプチドについても数種類に活性が認められ、活性には化学構造が密接に関連することを明らかにしている。

さらに研究の過程で新たな付着誘起物質を発見することができた。成体抽出液から得られた揮発性の付着誘起物質であり、GC-MSなどの機器分析の結果、1, 2, 3-trimethylbenzene が得られた。この物質は $0.6 \times 10^{-12} \text{ M}$ 相当の濃度として検出され、また市販試薬による実験でも活性が再現できた。既報との関連で、ベンゼン構造が本種の付着に関連することを明らかにしている。

以上のように、本論文では、タテジマフジツボ幼生の付着誘起物質として、成体が放出する低分子のアミノ酸関連フェロモン、モノアミノ酸、ペプチドさらにはメチル基を持つベンゼン化合物などが重要であり、化学構造が付着誘起活性に重要な役割を果たすものと考察した。幼生の付着機構解明に向けて重要な知見が得られた。海洋生産科学研究科委員会は、論文審査および最終審査の結果についての審査委員の報告に基づいて審査した結果、本論文は海洋生産科学の進展に大きく貢献すると判断し、博士（水産）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	北村	等
	副査	教授	藤田	雄二
	副査	教授	吉越	一馬
	副査	教授	原	研治

八 木 基 明

（京都府）昭和23年6月8日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 β -カロテン大量投与がイシダイ種苗の生体防御機能に及ぼす影響

論文内容の要旨

これまで各地の種苗生産施設で原因不明のイシダイ大量斃死が頻発し、この原因が研究された結果、本疾病が発症した種苗では電子顕微鏡レベルの病変が脊髄、脊髄神経節及び脳に認められ、ウイルス性の疾病（Vi-

ral Nervous Necrosis:VNN)であると判明した。この疾病は、その後キジハタ、シマアジ、クエ、トラフグ、ヒラメ等多くの魚種で発症が報告され、現在魚類種苗生産現場で最も注意を要する疾病となった。

このようなウイルスに起因する疾病を予防する方法はヒトでもワクチン以外にきわめて報告例が少なく、有効な薬剤も発見されていない。そこでこの疾病対策として、ウイルス感染に対して免疫防御能の高い魚を生産することを考えた。しかし、魚類にも哺乳類と同様な免疫防御機能が存在するか否か十分解明されていない。そこでこの機能を検討するとともにこの機能を向上させるため、哺乳類等で免疫機能を亢進させるとされる β -カロテンの大量投与を検討した。さらにそれが種苗生産の現場で利用できるか検討した。

第2章では、魚類のイシダイで γ -インターフェロン(γ -INF)を介した免疫機能が存在するか検討した。方法は、養殖イシダイの脾臓細胞をコンカナバリンA(Con.A)セファローロス4Bと共に培養し、その上清による腹腔マクロファージ(Pm ϕ)活性化を検討した。その結果、イシダイ脾臓細胞はCon.Aセファローロス4Bの上で幼若化した。さらに、この培養上清で刺激したイシダイPm ϕ の貪食能と細胞内のペルオキシダーゼ活性は共に亢進した。この脾臓細胞培養上清を哺乳類で γ -INF失活処理とされている熱(56℃)或いは、酸(pH2)処理を行ったところ、Pm ϕ の活性化能が消失した。また、イシダイCon.A培養上清のPm ϕ 活性化の種特異性をマウスを用いて検討したところ、マウスPm ϕ 活性化能を持たず、イシダイCon.A培養上清の種特異性が認められた。

以上より、イシダイ脾臓細胞は、Con.Aで培養すると γ -INFを産生することが示唆された。

第3章では、魚類の免疫機構が、 β -カロテン大量投与で亢進出来るか否か検証するため、イシダイ1年魚を二つの餌料区(対照と β -カロテン大量投与)に分け飼育した。12ヶ月後両区のイシダイの脾臓細胞からCon.A培養上清を作成し、この γ -INF力価をPm ϕ 機能である貪食能とペルオキシダーゼ活性から比較検討した。その結果、 β -カロテン大量投与群のCon.A培養上清はPm ϕ の貪食能、ペルオキシダーゼ活性、共に対照群と比較して高かった。

以上より、イシダイに対する β -カロテンの大量投与が脾臓細胞の高い γ -INF産生能を誘導したと考えられた。すなわち、餌料に β -カロテンを大量に添加することで免疫防御能の高い種苗や養殖魚の産生が可能になると推察された。

第4章では、仔魚期の種苗(全長8mm前後)の免疫防御機能の測定方法を脾臓細胞の幼弱化反応を用いて行えるか、細胞増殖測定薬であるアラマブルーを培

養液に添加し吸光度を測定するだけという簡便な方法が応用可能かについて検討した。その結果、稚魚の脾臓細胞はCon.Aとともに培養することで幼若化を起し、本法が十分応用可能である知見を得た。

第5章では、 β -カロテン大量投与による免疫防御能の亢進が種苗生産レベルの仔魚でも再現可能かの検討を行った。まず、仔魚の餌料であるシオミズツボムシ(:ワムシ)を β -カロテンで強化し、イシダイ、イシガキダイの種苗生産で生残率や免疫機能に及ぼす影響について検討した。その結果、仔魚の生残率では β -カロテン添加区が対照区と比較して高い値を示した。脾臓細胞の幼弱化反応からみた免疫防御能でも、 β -カロテン添加区が対照区と比較して高い値を示した。すなわちイシダイ、イシガキダイの種苗生産でも、生物餌料を β -カロテンで栄養強化することにより免疫力の強い仔魚生産の可能性が示唆できた。

次に、他の魚種でも同様の効果が得られるかマダイ、トラフグの種苗生産で検討した。その結果、マダイやトラフグでも β -カロテン添加区は対照区に比較して高い生残率を示し、脾臓細胞の幼若化からみた免疫機能亢進が認められた。

これらのことより、 β -カロテンで強化した生物餌料を用いて種苗生産を行うことでウイルス感染をはじめとする疾病に対して耐病性の高い種苗生産の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

八木基明氏は昭和48年3月に近畿大学農学部を卒業し、昭和50年3月に長崎大学大学院水産学研究科を修了後、昭和50年5月より長崎市水産農林部に勤務し、昭和53年からは同市種苗センター(現在は同市水産センター)に所属し、現在は同センターの養殖係長としてその任に当たっている。平成10年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。

海洋生産科学研究科においては、海洋水産資源学を専攻し、所定の単位を修得すると共に、主論文「 β -カロテン大量投与がイシダイ種苗の生体防御機能に及ぼす影響」を完成させ、平成12年12月に参考論文4編(1編は掲載済審査付、1編は掲載待審査終了、1編は掲載済審査無、1編は受付審査中)を添えて、同研究科委員会に博士(水産学)の学位を申請した。長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、予備審査委員会による予備審査の結果の報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の通り審査委員を選定した。審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重な審議を行うと共に、公開論文発表会における発表と口頭による最終試験を行い、論文審査および最終試験の結果を、平成13年2月15日の研究科委員会

に報告した。

提出論文は、これまで VNN ウイルス感染症によって種苗生産が困難であったイシダイに栄養素である β -カロテンを大量投与することによって、イシダイ種苗の免疫機能を亢進させ、ウイルスをはじめとする種々の感染症に抵抗力のある健康な種苗を安定生産しようと試みたものである。

主論文ではまず、イシダイ一年魚を用いて、イシダイが哺乳動物と同様の抗ウイルス因子であるインターフェロンを介した免疫防御機構を持っていることを細胞性免疫の測定手法を用いて証明している。

続いて、イシダイの飼育餌料に β -カロテンを大量添加して投与することによって、インターフェロン産生、マクロファージの貪食能、抗体産生等が亢進することを海面養殖によって明らかにしている。次に、これまで極めて難しいとされていた仔稚魚期における魚類の細胞性免疫機能の測定方法を検討し、仔稚魚期においても脾臓細胞の幼若化を細胞増殖試薬を用いることで可能とする簡便な測定手法を開発し、その方法の妥当性を検証している。以上の結果をもとに、イシダイとその近縁種であるイシガキダイ種苗に対する β -カロテンの大量投与を生物餌料であるワムシに大量の β -カロテンを取り込ませて種苗生産を試みると共に、生産された仔稚魚期における種苗の免疫防御能を本論文で開発した脾臓細胞幼若化測定方法で測定し、種苗生残率の向上と宿主の免疫機能が上昇していたことから感染症に強いイシダイの種苗生産が可能であると述べている。

さらに、 β -カロテン強化ワムシを用いて、マダイ、トラフグの種苗生産を行い上記の種苗における免疫防御能を測定し、免疫防御能の亢進と種苗生残率の向上から、本論文で試みたワムシを用いた種苗への β -カロテン大量投与が他魚種の種苗生産にも応用可能であることを実証している。

以上のように、本論文はイシダイにおける免疫機構を明らかにすると共に、それらが栄養素である β -カロテンで亢進することを証明しており、種苗生産における貴重な知見を得ている。このことは海洋生産科学の進歩に大きく貢献するものと認め、博士（水産学）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主 査 教 授 槌 本 六 良
副 査 教 授 石 原 忠
副 査 教 授 吉 越 一 馬
副 査 教 授 青 柳 東 彦
副 査 教 授 橘 勝 康

王 勤

(中国) 1969年 8 月28日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 Studies of Characteristics of Actomyosin on White, Pink, and Red Muscle Fiber Types Related to Rigor Mortis Progress in Fishes

論文内容の要旨

魚類の死後硬直の進行速度や強度は、魚種や保存温度、また同一魚種であっても致死条件や養殖魚と天然魚の間で、さらには棲息水温などで異なることが知られている。これらの原因に関して、これまで、エネルギー産生物質の動向 (ATP 関連化合物, Creatin phosphate, Lactic acid), 筋原線維 (Mf) Mg^{2+} -ATPase 活性、筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み能などの点から検討がなされてきたが、未だ十分に解明するまでに至っていない。魚類の骨格筋は、一般に血合筋部と普通筋部が比較的明瞭に分かれて存在し、前者の血合筋部は赤筋の筋タイプ I のみからなり、後者の普通筋部には魚類特有のピンク筋があり、その下層は白筋の筋タイプ II a と II b があるとされている。しかし、最近の知見では、普通筋部は白筋のタイプ II a と II b のみで構成されているのではなく、ピンク筋が白筋の中にモザイク状に介在している魚種が非常に多いことがわかってきた。従って、普通筋部を構成する筋タイプは魚種によって著しく異なることもわかってきた。本研究でアクトミオシン (AM) の死後硬直に関連した諸性質から、同一魚種である養殖と天然マダイの死後硬直進行の差違について、またさらに、AM の性質と種々の海産魚種の普通筋部を構成する筋タイプとの関連性について検討した。

本研究は以下の実験項目より構成されている。(1)養殖マダイと天然マダイの AM の諸性質が両者の死後硬直進行の差違に及ぼす影響の検討。(2)養殖コイから分取した白筋、ピンク筋、赤筋の AM について、死後硬直に関連した AM の性質の比較。(3)種々の海産魚種を用いた普通筋の AM の性質と構成筋タイプとの間の関連性についての検討。

(1): 養殖と天然のマダイを試料魚とし、即殺直後の背部普通筋より調製した AM の諸性質について比較検討した。その結果、筋収縮モデルである超沈澱反応は養殖が天然より低かったが、 Mg^{2+} -ATPase の活性は逆に養殖が高かった。超沈澱反応と Mg^{2+} -ATPase 活性との間に、両群とも有意に高い正の相関性が認められたが、その分布位置は両群で異なり、その傾き (回帰係数) は養殖が天然よりも小さかった。即ち、同じ活性に対する超沈澱反応は養殖が天然よりも低かった。以上の結果より、養殖と天然の死後硬直の差違は両群の筋肉を構成する AM の性質の違いに起因すると考

察された。また、このAMの性質の差違が両群の筋タイプの違いにより誘因されているのではないかと考えられた。

(2): 養殖コイを用い、体側背部筋から白筋(W), ピンク筋(P), 赤筋(R)の各筋タイプを識別分取し、各筋タイプのAMの性質を比較検討した。その結果、超沈澱反応のレベルは $W < P < R$ で、 Mg^{2+} -ATPase活性は逆に $W > P > R$ であった。また、両値の間には有意に高い正の相関関係が認められたが、その回帰係数は筋タイプで異なり、 $W < P < R$ であった。即ち、同一 Mg^{2+} -ATPase活性に対する超沈澱反応のレベルは $W < P < R$ であった。以上の結果より、養殖と天然のマダイにおける死後硬直の差違は、普通筋部を構成する両群の筋タイプの違いによるAMの性質の違いに起因すると結論した。

(3): 種々の海産魚種を用い、普通筋のAMの性質と構成する筋タイプとの関連性について検討した。その結果、各魚種各魚体ともAMの超沈澱反応と Mg^{2+} -ATPase活性との間に正の相関関係を認めた。しかし、両値の間の回帰係数は、魚種や魚体によって異なり、ピンク筋の介在割合が高いほど大きかった。また、白筋のみで構成されていた魚体では、白筋のⅡaの割合が高いほど大きい傾向が認められた。従って、魚種や魚体によるピンク筋の介在面積割合や白筋のⅡaとⅡbの割合の違いは、AMの超沈澱反応や Mg^{2+} -ATPase活性に影響を及ぼし、死後硬直進行の魚種や魚体による違いを生じさせていると結論された。

論文審査の結果の要旨

王 勤氏は1991年7月に中国上海水産大学を卒業し、その後、1991年8月から1996年1月まで中国福建省水産研究所技師として勤務し、長崎大学水産学部研究生を経て、1998年3月長崎大学大学院水産学研究科を修了し、引き続いて、1998年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。

海洋生産科学研究科においては、海洋水産資源学を専攻し、所定の単位を修得すると共に、主論文「Studies of Characteristics of Actomyosin on White, Pink, and Red Muscle Fiber Types Related to Rigor Mortis Progress in Fishes」を完成させ、平成12年12月に参考論文2編(1編は掲載済審査付、1編は審査付受理印刷中)を添えて、同研究科委員会に博士(学術)の学位を申請した。長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、予備審査委員会による予備審査の結果の報告に基づいて、課程修了のための学位論文提出の資格を審査し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の通り審査委員を選定した。審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重な審議を行うと共に、公開論文発表会における発表と口頭による最終試験を行い、論文

審査および最終試験の結果を、平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、アクトミオシンの死後硬直に関連した諸性質から、種々の海産魚種の普通筋部を構成する筋タイプとの関連性を検討している。

主論文ではまず、養殖マダイと天然マダイのアクトミオシンの諸性質(超沈澱反応と Mg^{2+} -ATPase活性)が両者の死後硬直進行の差違に及ぼす影響を検討し、超沈澱反応は養殖が天然より低かったが、 Mg^{2+} -ATPase活性はその逆であったと述べている。さらに、両測定値間には有意な正の相関関係が認められたが、両群で分布位置が異なり、それらの回帰係数が天然より養殖が低かったことから、養殖と天然の死後硬直の差違には両群の筋タイプの違いに起因するアクトミオシンの性質の違いが関与していると推定している。

次に、マダイにおける養殖と天然の筋タイプの違いに起因するアクトミオシンの性質の違いを検討するために、筋タイプの分取が可能な養殖コイを用いて背部体側筋から白筋(W), ピンク筋(P), 赤筋(R)を分取し、各筋タイプのアクトミオシンの超沈澱反応と Mg^{2+} -ATPase活性を比較検討している。その結果、超沈澱反応のレベルは $W < P < R$ で、 Mg^{2+} -ATPase活性は逆に $W > P > R$ であったと述べるとともに、同一 Mg^{2+} -ATPase活性に対する超沈澱の反応レベルは $W < P < R$ であったとし、先の養殖マダイと天然マダイの死後硬直の差違には両群の筋タイプの違いに起因するアクトミオシンの性質の違いが原因であると考察している。

さらに、種々の海産魚種を用いた普通筋のアクトミオシンの性質と普通筋を構成する筋タイプとの関連性について検討し、各魚種各魚体ともにアクトミオシンの超沈澱反応と Mg^{2+} -ATPase活性には有意な正の相関関係があり、両値の間の回帰係数は魚種や魚体で異なり、普通筋部へのピンク筋の介在割合の高い魚体ほど大きいことをみだしている。また、白筋のみで構成されている魚体では白筋のサブタイプⅡaの割合がⅡbより高いものほど大きい傾向が認められたと述べている。これらより、魚種や魚体によるピンク筋の介在面積割合や白筋のサブタイプのⅡaとⅡb割合がアクトミオシンの超沈澱反応や Mg^{2+} -ATPase活性に影響を及ぼし、ひいては魚種や魚体による死後硬直進行の違いを生じさせると結論している。

以上のように、本論文はアクトミオシンの死後硬直に関連した諸性質から、魚種や魚体による死後硬直進行の違いを検討し、アクトミオシンの性質と種々の海産魚種の普通筋部を構成する筋タイプとの関連性を明らかにしており、海洋水産資源学の分野に貴重な知見を得ている。このことは海洋生産科学の進歩に大きく

貢献するものと認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	槌 本 六 良
	副 査	教 授	石 原 忠
	副 査	教 授	野 崎 征 宣
	副 査	教 授	古 川 睦 久
	副 査	教 授	橘 勝 康

川 津 健太郎

(京都府)昭和39年12月11日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 マリントキシンの免疫学的分析法の開発に関する研究

論文内容の要旨

フグ毒テトロドトキシン(tetrodotoxin, TTX)による食中毒事件の早期解明ならびにその予防また貝類における記憶喪失性貝毒ドウモイ酸(domoic acid, DA)の汚染実態の解明には、それぞれ微量の TTX や DA を、迅速かつ簡便で特異性と鋭敏な感度で検出できる分析法が要求される。そこで、これらの目的を目指して、モノクローナル抗 TTX 抗体(T1-1抗体)およびモノクローナル抗 DA 抗体(DA-3抗体)をそれぞれ新たに作製し、これらによる酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)による TTX 分析系(TTX-ELISA)および DA 分析系(DA-ELISA)をそれぞれ検討した。さらに、フグ中毒の際の中毒原因物質の迅速な同定には患者の尿中 TTX を高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography, HPLC)で分析する前に、予備処理として、T1-1抗体を固定化した免疫吸着体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィー(immunoaffinity chromatography, IAC)による TTX 精製法(TTX-IAC)の検討を行った。

TTX-ELISA では、TTX の定量感度は $2\text{ ng} / \text{mL}$ であり、公定法であるマウス毒性試験法より100倍高い。本法を用いて、TTX を含まないフグの筋肉および健康人の尿に対する TTX の添加回収実験を行ったところ、フグの筋肉では回収率 $97.0 \sim 102.5\%$ (変動率 $< 15.9\%$)、健康人の尿では回収率 $91.0 \sim 103.7\%$ (変動率 $< 6.1\%$) という結果が得られ、本法の定量性が実証された。また、有毒のフグ組織に含まれる TTX 量を本法とマウス試験法により分析し比較したところ、その相関係数は 0.99 ($n=21$) と両者の値はよく一致した。本法の実施例として 2000年に大阪府で発生したヒガンフグ卵巣の摂食による中毒事件の原因究明を本法で行ったところ、患者の吐物および尿から TTX が検出されたので、本件は TTX による食中毒事件であると断定された。以上の結果から、開発された本法

は微量の TTX を、迅速かつ特異的にまた高感度で分析でき、フグ中毒事件の発生に際して調理残品や摂食残品あるいは患者の尿に含まれる微量の TTX を迅速かつ確実に検出する方法であることが明らかとなった。

一方、DA-ELISA では、その定量範囲は、 $0.15 \sim 10\text{ ng} / \text{mL}$ であった。本法では、ムラサキイガイ、マガキおよびダンジネスクラブに対する DA の添加回収実験を行ったところ、回収率は $94 \sim 113\%$ (変動率 $< 6.7\%$) で、本法の定量性が明らかとなった。また、本添加回収実験では、本法が、過去に報告された DA の HPLC や ELISA では分析不可能であった低濃度の DA を正確に分析できることも明らかとなった。さらに、本法の実施例として、国産ムラサキイガイについて DA を分析した結果、検査したすべての国産ムラサキイガイから DA が微量検出され、国産貝類にも DA が含まれていることが初めて明らかとなった。以上の結果から、本法は微量の DA を簡便かつ特異的にまた高感度で分析できる方法で、毒化した魚介類に含まれる微量の DA を分析するのに有用な方法であることが分かった。

最後に、TTX-IAC では、本法により多くの夾雑物質を含む尿試料から TTX を精製でき、尿 1 mL あたり 2 ng の微量の TTX を HPLC で検出できた。フグ中毒事件の患者から採取した尿13検体について、本法を尿試料からの TTX の精製に使用して尿中の TTX を HPLC 分析したところ、すべての検体から微量の TTX (尿 1 mL 当り $6 \sim 102\text{ ng}$) を検出できた。以上の結果から、本法は、尿試料から微量に含まれる TTX を単離できる優れた精製法であり、フグ中毒患者の尿中 TTX を HPLC 分析する際に有用であることが分かった。

以上、本研究はフグ中毒事件の早期究明や国産貝類における DA の汚染実態の解明などに効果的な免疫学的分析法の開発を目的とした。その結果、迅速かつ簡便で、特異性のある高感度で分析できる ELISA を、TTX および DA のあらたな分析法としてそれぞれ開発できた。また、尿中 TTX を HPLC 分析する際に、前処理で開発した TTX-IAC により尿試料から TTX を効果的に精製でき、その有用性を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

川津健太郎氏は平成 2 年 3 月に鳥取大学農学部獣医学科を卒業し、同年 4 月に(株)微生物化学研究所に入所して、3年間勤務後、平成 5 年 4 月には大阪府立公衆衛生研究所に入所し、平成10年 4 月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、現在に至っている。同氏は海洋生産科学研究科において海洋資源学を専攻して所定の単位を修得し、主論文「マリントキシンの免疫学的分析法の開発に関する研究」を完成させ、本研究に関連する参考論文 4 編(査読付き学会誌 4 編中 3 編は掲載済み、1編印刷中)を添えて長崎大学大学院

海洋生産科学研究科委員会に博士（学術）の学位を申請した。

同委員会はこれを平成12年12月21日の定例研究科委員会に付議し、論文審査結果に基づいて課程修了のための学位論文の資格を審査し、本論文の受理を決定後、下記の審査委員会を選定した。審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成13年2月15日の定例研究科委員会に報告した。提出論文はマリントキシン、特にフグ毒やドウモイ酸による食中毒に際して、ごく微量の毒を新しい免疫学的手法を用いて分析を可能にするマリントキシンの免疫学的分析法の開発に関する研究で、その内容は以下のようである。

フグ毒（TTX）に関しては、TTXの酵素免疫測定法（ELISA）の開発を行った。TTXをウシ血清アルブミン（BSA）にホルマリン処理により複合体を作製し、これを使ってモノクローナル抗TTX抗体を作製した。この複合体を複数のマウスに免疫化し、最も優れた抗TTX抗体産生を選抜し、そのマウスから脾臓細胞を取り出して、骨髓腫細胞を細胞融合させ、ハイブリドーマ細胞集団を形成した。このハイブリドーマ細胞集団を産生抗体のスクリーニングして、得られた細胞をクローニングして抗TTX抗体産生ハイブリドーマ細胞T1-1株を樹立し、モノクローナル抗TTX抗体（T1-1）を得た。

T1-1抗体のTTX誘導体や麻痺性貝毒に対する交叉反応はTTXを100%とすれば8.3%以下でTTXのみと選択的に反応する。

次にTTX-ELISAにより試料中のTTXを定量した結果、TTX-ELISAではTTXの定量感度は $2\text{ ng} / \text{ml}$ であり、公定法であるマウス毒性試験法より100倍高い。本法を用いて、TTXを含まないフグの筋肉および健康人の尿に対するTTXの添加回収率は97.0-102.5%（変動率<15.9%）、91.0-103.7%（変動率<6.1%）と定量性が示されるとともにマウス試験法との相関係数は0.99（ $n=21$ ）と両者の値はよく一致した。

実施例として、2000年に大阪府でのヒガンフグ卵巣による中毒では、患者の吐物から、本法によりTTXが検出されるとともに迅速かつ特異的にまた高感度で検出された。

ドウモイ酸（DA）についてはTTXと同様にDA-タンパク質複合体も3種のタンパク質を用い、結合にはカルボジミドとスクシンミドを用いて活性化エステルにして調製した。この中から最も優れた抗DA抗体産生マウスを選別し、モノクローナル抗DA抗体を産生するハイブリドーマ細胞DA-3株を樹立し、同様にモノクローナル抗DA抗体DA-3を作製した。この

抗体についてDA、その異性体や興奮性アミノ酸に対する交叉性は、DAに対する特異性（100%）が高く、isodomoic acid A（71.4%）以外のDA誘導体や興奮性アミノ酸に対しては1.4%以下で、isodomoic acid Aは、魚介類から検出されないことからELISAによる魚介類中のDA分析に有用であることが示された。DA-ELISAではその定量範囲は $0.15\text{--}10\text{ ng} / \text{ml}$ で、従来のDA分析法の感度に比して10倍以上であった。この方法によって国産ムラサキガイから初めてDAが検出された。

TTX-ELISA開発に、作製したT1-1抗体を用いて、immunoaffinity chromatographyによるTTX精製法を開発した。T1-1抗体を固定化した免疫吸着体を作製し、尿試料を添加し、含有中のTTXは固定化T1-1抗体と結合し、これを0.1%酢酸にて溶出させる。簡単に尿試料からTTXを単離し、HPLC分析とを連結し、中毒患者の尿試料 1 ml あたり 2 ng の微量のTTXまた微量のDAを分析可能にする画期的な分析法の開発にかかわるもので、その内容には食品衛生ならびに関連分野において有意義で新しい知見が含まれており、これらの分野に大いに寄与するものと考えられ、高く評価できる。

以上により海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会に基づき、審査した結果、本研究は食品衛生学の発展に貢献するところが大きいと判断し、学位に値するものとして合格とした。

審査担当者	主査	教授	野口玉雄
	副査	教授	村松毅
	副査	教授	原研治
	副査	教授	岩尾正倫
	副査	助教授	荒川修

Mohosena Begum Tanu

（バングラデシュ）1967年1月15日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 Tetradotoxin (TTX) in Frog and Some Marine Animals of Bangladesh, And Localization of TTX in Puffer by a New Enzyme Immunoassay Technique
フグ毒（TTX）のバングラデシュ産カエル・海産魚介類における分布と新規免疫学的手法によるTTXのフグ組織中の分布

論文内容の要旨

本研究はBangladeshのジャングルに生息するカエルに咬まれると死亡すると言われているシロアゴガエル近縁種の毒ならびに同国でこれまで食べる習慣がなかったカプトガニや海産のフグ類の毒の性状を明らか

にして公衆衛生上の問題解決に資するとともに新しい免疫学的手法によりこれまで明らかにされていない TTX の組織中の分布状況を明らかにしようとしている。

フグ毒の両生類における分布はこれまでイモリとカエルのいくつかの属で知られている。カエルについては、熱帯地域産 *Atelopus*, *Colosthetus* および *Brachycephalus* 3 属から TTX が分離または検出されている。

有毒といわれているバングラデシュ産カエル *Polypedates* sp. を Mymensingh および Barisal から23個体採集して組織別毒性を測定した結果、前者の皮膚にのみ、31-920MU / g の毒性が認められた。毒力は、体の大きいものほど高く、また著しい地域差が認められた。有毒個体の皮13 g の抽出液を Diaflo membrane YM- 1 で限外濾過 (< 1000 Da) し、活性炭, Bio-Gel P- 2 および Bio-Rex70 (H⁺) カラムに付して、比毒性4400MU / mgの精製毒約0.6mgを得、HPLC および TLC 分析した結果、標品の TTX と同じ挙動を示し、毒は TTX であることが分かった。また毒を ESI-TOF/MS 分析した結果、(M+H)⁺ = 320.1103が測定され、その分子量は319.1025と決定され、TTX (C₁₁H₁₇N₃O₈) 分子量319.1016に一致した。他方、毒を¹H-NMR 分析した結果、プロトンのケミカルシフト (値) が TTX の場合に一致し、また C 4 a-H と C 4 -H とのカップリングコンスタント (J) も両者は一致した。

これらの分析結果から、バングラデシュの *Polypedates* sp. カエルの皮の毒を TTX と結論した。これまで TTX の分布が知られているカエルはすべて熱帯産3属であるが、ここに初めて亜熱帯産カエル *Polypedates* sp. が加わった。

つぎに、カプトガニでは *Carcinoscorpius rotundicauda* が世界的に有毒とされているが、バングラデシュ産についてはその毒性ならびに毒の性状が明らかでない。1998-1999年にかけて Cox Bazar で採取した *C. rotundicauda* 39検体につき、組織別 (卵、精巣、内臓) に分けて毒性を試験した。39検体のうち6検体はすべての部位が無毒 (< 2 MU / g) であった。組織のうち、卵が最大の毒性を示し、1998年ではその毒性は、5-7 MU / g で、精巣では3-5 MU / g、内臓では2-4 MU / g であった。1999年では卵の毒力は2-4 MU / g、精巣では< 2-4 MU / g であった。内臓は< 2 MU / g であった。*Tachypleus gigas* は無毒であった。卵を常法に従って抽出後、限外濾過 (< 1000 Da) し、これを Bio-Gel P- 2, Bio-Rex 70 (H⁺) カラムに付して、部分精製し、HPLC, TLC, 電気泳動および¹H-NMR 分析するとともに、そのアルカリ分解物につき UV 吸収スペクトルを測定した。

HPLC, TLC および電気泳動分析の結果、部分精製毒

は、標品の TTX のそれにそれぞれ一致した。毒の¹H-NMR スペクトルにおいてもプロトンのケミカルシフト (値) ならびに C 4 a-H および C 4 -H のカップリングコンスタント (J) も標品 TTX に一致した。他方、部分精製毒のアルカリ分解物の UV は TTX のアルカリ分解物 C₉ 塩基の特徴的な276nm 吸収を示した。これらの結果からバングラデシュ産 *C. rotundicauda* は TTX であることが明らかにされた。

バングラデシュ産タキフグを1999年に採取して、皮、筋肉、肝臓、生殖巣およびその他の内臓に腑分け後、マウス試験したところ、皮と筋肉は2-4 MU / g、肝臓は< 2-6 MU / g、生殖巣は< 2-3 MU / g でその他の内臓は< 2-3 MU / g で、個体差はほとんど認められなかった。しかし、時期的な毒性の相違がみられた。他方ドクサバフグも、タキフグとほぼ同様な組織別ならびに個体別毒性を示した。内臓の毒性が最も高く、2-32MU / g、ついで生殖巣が2-7 MU / g で、皮、筋肉および肝臓は< 6 MU / g であった。

毒の同定には、両魚の残滓をそれぞれ用いて、部分精製し、HPLC 分析した。タキフグでは主要なピークは、TTX、小さなピークが anhydro TTX と同定された。ドクサバフグも、同様なパターンを示した。

TTX のモノクローナル抗 TTX 抗体を用いて皮膚に多量の TTX を蓄積しているハチノジフグの皮膚における TTX 分布を調べた結果、表皮に存在する細胞 (basal cell) とこれが分化して生成した分泌細胞 (succiform cell) およびこれに類似のやや小型の細胞 (secretory cell = succiform-like cell) に TTX が分布することがわかり、通常の上皮細胞 (filament-containing or malpighian cell) には分布しないことがわかった。このことからフグ類皮膚における TTX の分布を初めて明らかにしたものである。ハチノジフグでは TTX が刺激により分泌される機構がいわゆる毒腺まで発達していない分泌細胞により分泌されることがわかり、毒の蓄積や排泄機構の解明に資する発見と思われる。

論文審査の結果の要旨

Mohosena Begum Tanu 氏は昭和63年5月にバングラデシュ水産研究所に勤務し、平成10年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、現在にいたっている。同氏は海洋生産科学研究科において海洋資源学を専攻して所定の単位を修得し、主論文「Tetrodotoxin (TTX) in frog and some marine animals of Bangladesh, and localization of TTX in puffer by a new enzyme immunoassay technique」(フグ毒 (TTX) のバングラデシュ産カエル・海産魚介類における分布と新規免疫学的手法による TTX のフグ組織中の分布) を完成させ、本研究に関連する参考論文4編 (査読付き学会論文誌4編中3編掲載済み、1編印刷中) を添えて長崎大学海

洋生産科学研究科委員会に博士（水産学）の学位を申請した。

同委員会はこれを平成12年12月21日の定例研究科委員会に付議し、論文審査結果に基づいて課程修了のための学位論文の資格を審査し、論文の受理を決定後、下記の審査委員会を選定した。審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成13年2月15日の定例研究科委員会に報告した。提出論文はBangladeshのジャングルに生息するカエルにかまれると死亡するといわれているシロアゴガエル近縁種の毒ならびに同国でこれまで食べる習慣がなかったカプトガニや海産のフグ類の毒の性状を明らかにして公衆衛生上の問題解決に資するとともに新しい免疫学的手法によりこれまで不明のTTXの組織中の分布状況を明らかにしようとしている。その内容は以下のようである。

有毒といわれているカエル *Polypedates* sp. を Mymensingh および Barisal から23個体採集して組織別毒性を見たところ、前者の皮膚にのみ31-920MU/gの毒性が認められた。毒力は、大きいものほど高く、また著しい地域差が認められた。皮13gをDiaflo membrane YM-1で限外ろ過（<1000 Da）し、活性炭、Bio-Gel P-2 および Bio-Rex 70（H⁺）カラムに付して、比毒性4400MU/mgの精製毒約0.6mgを得、HPLC および TLC 分析した結果、標品のTTXと同じ挙動を示した。毒をESI-TOF/MS分析した結果、分子量は319.1025と決定され、TTX（C₁₁H₁₇N₃O₈）分子量319.1016に一致した。¹H-NMRのプロトンのケミカルシフト値、またC-4a-HとC-4-Hとのカップリングコンスタント（J）もTTXと一致した。これらの分析結果から、このカエルの皮の毒をTTXと結論した。

つぎに、1998-99年にかけて Cox Bazar で採取した *Carcinoscorpius rotundicauda* 39検体につき、組織別毒性試験した。そのうち6検体はすべての部位が無毒（<2MU/g）であった。毒性は組織のうち卵が最大、次いで精巢、内臓の順であった。いずれも毒性は10MU/g未満であった。卵の毒を常法により精製し、各種分析に付したところ、TTXであることがわかった。

つぎに、Cox Bazar で採取したタキフグおよびドクサバフグについて、組織別毒性を調べたところ、いずれも皮、筋肉、肝臓、生殖巣、その他の内臓に僅かに毒性が認められた。毒の同定には、両魚の残さいをそれぞれ用いて、部分精製し、HPLC分析した。タキフグ、ドクサバフグいずれも主要なピークは、TTXで、小さなピークが anhydro TTX であることが明らかになった。

つぎに、皮膚に多量のTTXを蓄積しているハチノジフグの皮膚におけるTTX分布をモノクローナル抗TTX抗体をもちいて調べた結果、表皮に存在する細胞（basal cell）とこれが分化して生成した分泌細胞（secretory cell=succiform-like cell）にTTXが分布することがわかった。フグ類の皮膚におけるTTXの分布を初めて明らかにしたものである。

以上本研究により、ここにはじめて亜熱帯産カエルにTTXの分布を、ついで、明らかにされていなかったバングラデシュ産カプトガニ、海産フグの毒がTTXであることを、またフグの皮膚に存在するTTX分布図を、それぞれはじめて明らかにしたことは、食品衛生上有意義で新しい知見が含まれており、関連分野に大いに寄与するものと考えられ、高く評価できる。

以上により海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会に基づき、審査した結果、本研究は食品衛生学の発展に貢献するところが大きいと判断し、学位に値するものとして合格とした。

審査担当者	主査	教授	野口玉雄
	副査	教授	村松毅
	副査	教授	吉越一馬
	副査	教授	岩尾正倫
	副査	助教授	荒川修

金 大 景

（韓国）1968年10月27日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 赤潮原因プランクトン、*Chattonella marina* の活性酸素産生機構及び魚毒性発現機構の解明

Mechanism of Superoxide Anion Generation and Ichthyotoxicity of Red Tide Phytoplankton *Chattonella marina*

論文内容の要旨

C.marina は通常培養条件下でROS（reactive oxygen species）を常に産生している。一方、好中球や macrophage など生体防御に関与するこれらの細胞の場合、細菌感染などの刺激に対応して初めて活性酸素を産生放出することが知られている。これまでの研究により、*C.marina* が海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* に対して活性酸素を介した毒性を発現する事が明らかにされている。しかしながら、その活性酸素産生機構については不明であり、また、*C.marina* の活性酸素産生の生物学的意義についても明らかにされていない。これらの点に関する手がかりを得る目的で、本研究ではまず、化学変異誘導剤である ethyl methane sulfonate（EMS）を用い、*C.marina* の変異株の作製を試みた。その結果、

三種の変異株 A, B, C が得られた。変異株 A と B は活性酸素産生能力は親株 *C.marina* と変わりがなかった。これに対して、変異株 C は O_2^- 産生量が親株に比べ明らかに低下していることがわかった。また、変異株 C は O_2^- 産生量が通常より低い特性を反映して *Vibrio* 菌に対する増殖抑制作用も親株に比べ弱いことがわかった。変異株 C と親株 *C.marina* の H_2O_2 産生量に差が見られないことから O_2^- と H_2O_2 産生系は異なっていると推定された。以上より、変異株 C は *C.marina* の活性酸素機構を解明する上で有用であると考えられる。

C.marina の細胞表層構造に関しては、植物プランクトンに類するにもかかわらず、細胞壁を有さず、水温、塩濃度などの環境変化によって容易に細胞の形態が変化すること、及び細胞表層は glycocalyx と呼ばれる糖被膜で覆われていることが明らかにされている。本研究により、この glycocalyx が物理的及び化学的刺激により、容易に脱落することを見出した。さらに、興味ある発見はこの glycocalyx 画分には NADPH に応答して O_2^- を産生する酵素系が存在することを見出した点である。NADH 添加においても、glycocalyx 画分はある程度の O_2^- を産生したが、NADPH の方がより効果的であった。さらに、好中球の NADPH oxidase の阻害剤である DPI が glycocalyx 画分の O_2^- 産生を濃度依存的に阻害するとの実験結果も得られた。一方、ヒト好中球の cytochrome b558 の gp91phox を特異的に認識する抗体を用いたウエスタンブロッティングによる解析により、glycocalyx 画分に本抗体と反応する主バンド (110 kDa) 一本が検出された。さらに、この gp91phox 類似タンパク質が *C.marina* 細胞表層に存在することが間接蛍光抗体法によって確認された。一方、サザンブロットによる解析結果からも gp91phox 類似タンパク質をコードする遺伝子が *C.marina* に存在することを示す結果が得られた。以上、本研究により、*C.marina* の活性酸素産生を司る酵素系は *C.marina* 細胞表層の glycocalyx に存在する NADPH oxidase 様酵素であることが明らかとなった。

glycocalyx 画分をラットに免疫し、glycocalyx を認識する抗血清を調製し、この抗血清を用い、*C.marina* 曝露後のブリ鰓組織の免疫化学的手法による解析を行った。固定化した *C.marina* 細胞の間接蛍光抗体法による解析を行った結果、本抗血清が *C.marina* 細胞表層を特異的に認識し、結合することが確認された。本抗血清は *C.marina* 曝露後のブリ鰓組織、特に鰓弁間に陽性反応を示した。また、このような反応は正常ブリ由来鰓弁では全く認められなかった。なお、*C.marina* 曝露後のブリ鰓に認められた *C.marina* 細胞は glycocalyx 抗体との陽性反応は認められなかったことから、これらはすでに glycocalyx を脱落した細胞であると推

定された。以上の結果から *C.marina* の魚毒性発現機構は、*C.marina* 細胞がブリ鰓を通過する際、一部の *C.marina* 細胞の glycocalyx が脱落し鰓表面に付着し、glycocalyx に存在する活性酸素産生系の持続的な活性酸素産生放出により、鰓組織が傷害を受け、最終的に窒息すると考えられる。また、*C.marina* や *H.akashiwo* の O_2^- 産生に対して Galacturonic acid の刺激作用で伴うシグナル伝達機構の存在も確認した。

一方、*C.marina* と同様、ラフィド藻に属する *Olisthodiscus luteus* (*O.luteus*) による赤潮はこれまで報告例がなく、本種が毒性を有するか否か不明であった。本研究により、*O.luteus* は *C.marina* や *H.akashiwo* と同じく通常の培養条件下で活性酸素 O_2^- 及び H_2O_2 を産生していることが分かった。

C.marina は活性酸素を介した魚毒性を発現する一方、自らが産生する活性酸素に対して独特の耐性機構を有していると考えられる。そこで、*C.marina* 細胞内における活性酸素消去活性物質の存在の有無について検討した。*C.marina* 細胞内に比較的低分子量で、 O_2^- に特異性が高い消去物質が存在することが分かった。

以上、本研究により、赤潮プランクトン *C.marina* について以下の (i) - (v) について明らかとなった。(i) *C.marina* の活性酸素産生を司る酵素系は *C.marina* 細胞表層の glycocalyx に存在すること、(ii) さらにその酵素系はヒト好中球の NADPH oxidase に類似しており、少なくとも、その主要構成タンパク質である gp91phox 相同性を有するタンパク質が *C.marina* に存在すること、(iii) *C.marina* 曝露時に、鰓を通過する一部の *C.marina* 細胞の glycocalyx が脱落し鰓表面に付着し、持続的に活性酸素が産生放出され、鰓組織が傷害を受ける可能性があること、(iv) *O.luteus* も活性酸素産生放出し、周囲の生物に対して毒性を発現する可能性があること、(v) *C.marina* 細胞内には低分子量活性酸素消去物質が存在する。

論文審査の結果の要旨

金 大景氏は平成 6 年 2 月大韓民国釜山水産大学校海洋水産科学部生物工学科を卒業し、平成 9 年 2 月同大学大学院修士課程海洋微生物遺伝子工学専攻を修了した。平成 9 年 1 月私費研究留学生として来日し、長崎大学水産学部の研究生となり、平成 10 年 4 月長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程に入学し現在に至っている。同氏は海洋生産科学研究科において海洋資源学を専攻し、所定の単位を修得した後、平成 12 年 12 月に主論文「赤潮プランクトン、*Chattonella marina* の活性酸素産生機構及び魚毒性発現機構の解明」を完成し、参考論文 5 編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士 (学術) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成

12年12月21日の定例委員会において、予備審査委員会による予備審査の結果及び論文内容の要旨を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の審査委員を選定した。学位審査委員は主査を中心に論文内容について慎重審議し、公開論文発表会を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、赤潮プランクトン、*Chattonella marina* が活性酸素を介して毒性を発現する機構を生化学的に明らかにしたものである。

第1章では活性酸素種産生のメカニズムを知る目的で、化学変異誘導剤で *Chattonella marina* の変異種を作成し、 O_2 と H_2O_2 産生系が異なることを示し、活性酸素産生機構を解明するうえで有用な得た。

第2章では本種の細胞表層糖被膜であるグリコキアリックスは物理的に脱落し易い膜であり、この膜中に NADPH 依存性の O_2 産生酵素やヒト好中球チトクローム b558 類似タンパク質の存在を認め、また、同タンパク質をコードする遺伝子もこのプランクトン中にあることを確認した。これらの事実より、グリコキアリックス中に活性酸素をつくる NADPH 酸化酵素様の酵素があることを明らかにした。

第3章ではグリコキアリックス抗血清を用いた *Chattonella marina* 暴露後のブリ鰓組織の免疫化学的解析により、ブリ鰓組織に本血清の陽性反応を認めた。鰓表面における *Chattonella marina* 細胞から脱落したグリコキアリックスに存在する活性酸素産生系の持続的な活性酸素産生放出により、鰓組織が変化損傷を受け、魚が窒息死に至る機構を提出した。

第4章では *Chattonella marina* の活性酸素産生能がレクチンにより亢進することが解っているが、外部の刺激物質（糖質）による産生能変化の有無を検討した。つまり、細胞表層に糖質に応答する受容体があり、これにより O_2 産生系の活性化が生起するかを調べた結果、ガラクトロン酸にその刺激活性を見出したが、受容体他詳細は明確でない。

第5章では活性酸素産生による赤潮プランクトンの毒性の普遍性を知るため、同じラフィド藻に属する *Olithodiscus luteus* について活性酸素産生とレクチンによる亢進を調べた結果、*Chattonella marina* と同様に細胞表層の活性酸素産生と毒性が確認され、これらが少なくともラフィド藻に属する赤潮プランクトンに普遍的な性質であることを明らかにした。

第6章では *Chattonella marina* の自らの活性酸素による耐性機構の有無をしらべた。細胞内には低分子量の活性酸素消去物質が存在することが解り、活性酸素による毒作用消去への活用が示唆された。

以上の研究成果は、赤潮生物の生物学的及び生化学的疑問点を数多く解明し、水産生物特に魚類養殖事業の赤潮による被害を防除するうえで有用な知見をもたらすものであり、赤潮生物の基礎的および応用的研究分野に大きく貢献するものであることを認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	村松	毅
	副査	教授	野口	玉雄
	副査	教授	松岡	数充
	副査	教授	石松	惇
	副査	助教授	小田	達也

小松 誠 和

（長崎県）昭和49年2月10日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 ヒマ種子毒蛋白質リシンのアポトーシス様細胞毒性発現機構の解明

Mechanism of Ricin-induced Apoptotic Cytotoxicity

論文内容の要旨

ヒマ種子由来毒蛋白質リシン（分子量約6.3万）は、分子量約3.1万のA鎖（真核細胞のリボゾーム60Sサブユニットを酵素的に不活化）と分子量約3.2万のB鎖（細胞表層の糖鎖レセプターに結合）が一つのジスルフィド結合で結ばれたAB毒素の一つである。リシンのほか、植物由来のアブリン、モデシリン、細菌由来のジフテリア毒素、シュードモナス毒素、コレラ毒素等もAB毒素として知られており、その毒性は(i) B鎖を介した細胞レセプターとの結合、(ii) エンドサイトーシスによる細胞内取り込み、(iii) A鎖の細胞質への移行、(iv) A鎖による細胞内標的分子の不活化、の過程を経て発現される。最近の研究から、リシンが蛋白質合成阻害活性のみならず、DNAの断片化、核の特異的形態変化、カスパーゼ活性の上昇、最終段階には細胞溶解といったアポトーシス様の細胞死を誘発することが見出された。本研究は、リシンの誘発するアポトーシス発現機構の解明を目的として行ったもので、その内容を第2章以下に記述する。

第2章において、ヒマ種子由来リシンの相同蛋白質、リシンD及びリシンEの、細胞毒性の比較を行った。蛋白質合成阻害活性において、CHO、XC、HeLa、MDCK細胞に対して、リシンDがリシンEの3-14倍強い毒性を示したが、Vero、PtK₁細胞に対しては、ほとんど差異は見られなかった。従って、細胞の種類によりその程度は異なるものの、いずれの場合もリシンDはリシンEに比べて強い毒性を発現することがわかった。両リシンの毒性の差異の原因を調べるために、蛍光標識したリシンを用いて、細胞表層への結合量及

び細胞内侵入量を測定し、スカッチャードプロットの解析を行った。両リシンの細胞一個あたりの結合部位数は、各細胞でほぼ同数なのに対し、リシン D の結合定数はリシン E のものよりも高いことが見出された。また、両リシンともに DNA の断片化を伴ったアポトーシス様の細胞死を誘発することが確認された。サイクロヘキシミド存在下で両リシンの蛋白質合成阻害活性は増強されたのに対して、アポトーシス様活性は阻害された。これらの結果より、リシンによるアポトーシス誘導が必ずしも蛋白質合成阻害のみでは説明できないと推察された。更に、ゴルジ体に作用することが知られているプレフェルジン A は、両リシンの蛋白質合成阻害活性及びアポトーシス誘導を強く抑制した。従って、アポトーシスの過程にゴルジ体が関与していることが推察された。

コンカナバリン A や小麦胚芽レクチンがアポトーシスを誘発するという報告があることから、第3章において、リシンのアポトーシス誘導活性が B 鎖のレクチン様活性に由来するかを検討した。リシン単離 B 鎖により、DNA 断片化及び細胞溶解が誘発された。しかしながら、リシンの有効濃度に比べ B 鎖の有効濃度は約1,000倍高いものであった。また、B 鎖の DNA 断片化及び細胞溶解の誘発時間的経過もリシンとは異なった。このことから、リシンのアポトーシス発現は、主に A 鎖のリボゾーム不活化が関係していると推察された。

第4章、及び第5章において、リシンのアポトーシスに関与するプロテアーゼ群の解析を行った。種々のプロテアーゼ阻害剤のリシンの誘発する細胞溶解への影響を調べた結果、ジイソプロピルフルオロリン酸 (DFP)、TLCK、アンチパイン、ジクロロイソコウマリン (DCI) といったセリンプロテアーゼ阻害剤が阻害効果を有していた。また、DFP 及び DCI については、リシンの他モデッシン、シュードモナス毒素、ジフテリア毒素が誘発する DNA 断片化も阻害した。このことから、リシン及びその他の毒蛋白質が誘発するアポトーシスにセリンプロテアーゼが関与していることが推察された。また、多くのアポトーシス系において重要であると言われるカスパーゼ活性についても測定した。特に重要であると言われるカスパーゼ - 3 の活性の上昇は確認されたが、その特異的阻害剤はリシンのアポトーシスを阻害しなかった。このことより、リシンのアポトーシスが、カスパーゼ - 3 非依存的な特徴を有していることを見出した。

第6章においてカスパーゼ - 3 の細胞内基質といわれ、DNA 損傷の修復機構に関与すると言われているポリ (ADP リボース) - ポリメラーゼ (PARP) のリシン処理細胞内の挙動について検討した。リシン処理

数時間後に細胞内 PARP の活性化が認められた。また、PARP の基質である細胞内 NAD^+ がリシン処理により著しく減少し、それに伴い ATP の減少も確認された。一般に言われるカスパーゼ - 3 活性化と PARP 切断の同時進行は、リシンにおいては当てはまらず、PARP 切断はかなり遅れて進行することがわかった。また、PARP の阻害剤である 3 - アミノベンザミド (3 - ABA) はリシン処理による NAD^+ 及び ATP の減少、更に細胞溶解を抑制したが、DNA 断片化は影響を受けなかった。従って、PARP 活性化に伴う NAD^+ 及び ATP の減少が細胞溶解の原因と考えられるが、DNA 断片化に至る経路は、別に存在すると考えられた。

以上より、リシンによるアポトーシス発現機構に関して次の特徴を有していることが見出された。

- (i) A 鎖の特異的酵素反応によるリボゾーム不活化が強いアポトーシスの引き金になっている。
- (ii) カスパーゼ系に加え、セリンプロテアーゼ系が重要な役割を果たしている。
- (iii) 多くのアポトーシス系で必須であるカスパーゼ - 3 活性は、リシンにおいては活性化は認められるが非依存的である。
- (iv) ポリ (ADP リボース) - ポリメラーゼの分解が遅れ、細胞内 NAD^+ 及び ATP が著しく減少し、細胞溶解が誘発される。

本研究により得られたこれらの成果は、海洋生物由来の毒蛋白質を含めた毒蛋白質の作用機構に対して新しい知見を与える。また、癌治療をはじめとする医学分野に対しても新しい知見を与えるのみならず、新規の生理活性物質の作用機構の解明に大きく貢献できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

小松誠和氏は平成8年3月長崎大学水産学部を卒業し、平成10年3月同大学大学院水産学研究科修士課程水産学専攻を修了した。平成10年4月長崎大学大学院海洋生産科学研究科博士課程に入学し現在に至っている。同氏は海洋生産科学研究科において海洋資源学を専攻し、所定の単位を修得した後、平成12年12月に主論文「ヒマ種子毒蛋白質リシンのアポトーシス様細胞毒性発現機構の解明」を完成し、参考論文5編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士 (学術) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、予備審査委員会による予備審査の結果及び論文内容の要旨を検討し、本論文を受理して差し支えないものと認め、下記の審査委員を選定した。学位審査委員は主査を中心に論文内容について慎重審議し、公開論文発表会を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査及び

最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文はヒマ種子毒蛋白質リシンが、蛋白質合成阻害の他に、細胞核の特異的变化、カスパーゼ活性の上昇、DNAの断片化、細胞溶解などを誘発するリシンによるアポトーシス様細胞死の発現機構の解明を行ったものである。

第1章では他の植物や細菌由来のAB毒素と称される同類毒蛋白質の研究の歴史的背景、本研究の目的、意義などをのべている。

第2章ではまず初めにリシンの相同蛋白質DとEの細胞毒性の比較を行った。リシンDはリシンEに比し強い毒性を示したが、その理由はリシンDの細胞表層への結合定数が多いことに起因し、また両リシンはアポトーシス様細胞死を誘発したが、リシンによるアポトーシス様活性は蛋白質合成阻害では説明できないことを見出した。ゴルジ体に作用する試薬によるアポトーシスへの影響を検討した結果、ゴルジ体の関与も示唆された。

第3章ではリシンはA鎖、B鎖と称する2種のペプチド鎖より成るが、そのいずれがアポトーシスに関与するかを調べた。その結果、B鎖にも微弱なアポトーシス誘発活性は認められたが、A鎖のリボゾーム不活化が主な原因となっていることが解った。

第4章、第5章ではリシンによるアポトーシス誘発の過程で関与するプロテアーゼ群の解析を行った。各種のプロテアーゼ活性阻害剤を用いた場合のリシン細胞毒性はセリンプロテアーゼ阻害剤とくにジイソプロピルフルオロリン酸により顕著に軽減した。その他のAB型毒素によるDNA断片化も阻害した。これらの事実からリシンその他の毒蛋白質が誘発するアポトーシスにはセリンプロテアーゼが関与していることを明らかにした。カスパーゼ-3は活性化されたが、カスパーゼ-3特異的阻害剤はアポトーシスを阻害しなかったことから、一般的に云われているようにカスパーゼ-3の関与は認められず、カスパーゼ-3非依存的な特徴を見出した。

第6章ではDNA損傷を修復に関与すると考えられているポリ(ADPリボース)ポリメラーゼ(PARP)のリシン処理細胞内の挙動について検討した。リシン処理数時間後、PARPの活性化が認められ、 NAD^+ やATPの減少を伴った。カスパーゼ-3活性化とその基質であるPARP切断の同時進行は見られなかった。またPARP阻害剤を用いてリシン処理細胞を調べた結果から、PARP活性化による NAD^+ やATPの減少が細胞溶解の原因とは考えられても、DNA断片化には別の経路が存在するものと考えられた。

本研究で得られたこれらの成果は、海洋生物由来の

毒蛋白質を含めた毒蛋白質の作用機構に対して新たな知見を与えるのみならず、ガン治療をはじめとする医学分野に対しても新しい知見を与えるものである。また新規の生理活性物質の作用機構の解明にも大きく貢献できるものであることを認め、博士(学術)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	村松	毅
	副査	教授	野口	玉雄
	副査	教授	青柳	東彦
	副査	教授	石原	忠
	副査	助教授	小田	達也

木村美幸

(長崎県)昭和48年8月30日生

授与年月日 平成13年3月31日

主論文 *Helicobacter pylori* の産生する細胞空胞化毒素の致死作用解析

Study on Cytotoxic Mechanism of Vacuolating Toxin Produced by *Helicobacter pylori*

論文内容の要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は、グラム陰性桿菌で、胃炎や消化性潰瘍との関連性が指摘されている。本菌感染における病原因子については様々な報告がなされており、本菌が菌体外へ分泌する空胞化致死毒素 VacA はその一つである。VacA は、粘膜上皮細胞に空胞を形成させ、死滅させる。VacA は、約 90 kDa のタンパク性毒素で、毒性発現に関与する N 末端側 34 kDa と宿主細胞への結合に関与する C 末端側 58 kDa のフラグメントからなり、A-B タイプの毒素として考えられている。VacA による空胞形成は、small G タンパク質である rab 7 が関与した細胞内小胞輸送の異常によるものであることが報告されている。一方、最近、VacA は細胞膜にチャンネルを形成することやその細胞表面の受容体の一つが受容体型チロシンホスファターゼ β であることも明らかになった。このように、VacA による空胞形成やその細胞内への侵入過程については明らかになりつつあるが、VacA がいかにして細胞死を引き起こす過程の詳細は不明である。本論文は、VacA の細胞致死作用についてそのメカニズムを解明することを目的とし、VacA がミトコンドリアに障害を引き起こすことを明らかにした。一方、炎症細胞由来の活性酸素種による胃粘膜傷害も *H. pylori* 感染における病原因子の一つである。これは本菌の構成成分により刺激を受けた胃粘膜細胞やマクロファージから、IL-8 や IL-1, TNF- α などのサイトカインの分泌が促進された結果、免疫細胞の活性化が促され、過剰の活性酸素が生じて粘膜傷害を引き起こすというものである。このような酸化的ストレスに対する抗酸

化物質としてグルタチオンが重要な役割を果たしている。そこで、活性酸素種による細胞傷害における VacA の病原性について着目し、特にグルタチオン代謝に及ぼす VacA の作用を解析した。その結果、VacA はグルタチオン代謝の低下を引き起こすことが分かった。

第1章では、*H. pylori* に関するこれまでの研究の背景を概説した。第2章では、VacA による細胞の形態学的変化を電子顕微鏡観察により評価し、ミトコンドリアの膨化が確認された。ついで第3章では、ミトコンドリアの機能に着目した。その結果、VacA が細胞内 ATP レベルを低下させることが分かった。そこで、ATP 合成の駆動力であるミトコンドリア膜電位に対する VacA の作用について評価したところ、VacA は膜電位を低下させ、それは空胞形成非依存的であった。また、VacA は細胞の酸素消費を阻害することも分かった。以上の結果は、VacA はミトコンドリア膜電位や ATP 量を低下させ酸素消費を阻害した結果、エネルギー代謝の低下を引き起こし、細胞は死に向かうことを示唆していた。

第4章では、細胞内の抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) の代謝に及ぼす VacA の作用を解析した。GSH は、活性酸素種により酸化され、酸化型 GSH (GSSG) となることによりその消去を行う。GSSG は ATP 依存的な系で細胞外へ放出される。そこで、VacA により ATP 量が低下した結果、GSSG の細胞外輸送能もその影響を受けるかを調べた。その結果、VacA はおよそ50%の GSSG 輸送阻害を示した。次に、細胞内の全 GSH (GSH+GSSG) 量に対する VacA の影響について調べた。その結果、全 GSH 量は VacA による変化が認められず、また、GSH 還元酵素の活性は25%低下した。これらの結果は、細胞内には酸化型である GSSG が蓄積していることを示唆していた。一方、GSH のターンオーバーに対する VacA の影響について、 ^3H -Gly から ^3H -GSH を合成させることにより調べた。その結果、VacA は GSH 合成能を低下させ、また、GSH の半減期を延長させて GSH 代謝を低下させることが分かった。これらの結果から、VacA により細胞内の酸化的ストレスに対する防御能が低下していることが考えられた。さらに、VacA を作用させた細胞は、過酸化水素の添加によりその生存率が減少した。以上の結果は、VacA はグルタチオン代謝を低下させ、細胞は酸化的ダメージを受けやすくなることを示唆していた。

本研究によって、VacA が細胞死を引き起こす過程でミトコンドリアに障害を及ぼすことが分かった。また、それは空胞形成に非依存的であったことから、VacA は空胞形成能とは別のルートの細胞障害性を有することが示唆された。一方、VacA は酸化的ストレ

スに対する防御因子の一つであるグルタチオンの代謝を低下させた。以上の結果は、VacA が引き起こす細胞死の過程を説明するものであり、VacA が胃粘膜障害において重要な因子になることが考えられる。

論文審査の結果の要旨

木村美幸氏は、平成8年3月に長崎大学工学部応用化学学科を卒業し、平成10年3月には長崎大学大学院工学研究科 (修士課程) 応用化学専攻を修了した。続いて、平成10年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科 (後期博士課程) に入学し、現在に至っている。

同氏は、この間 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の産生する細胞空胞化致死毒素 VacA による細胞障害及び細胞死に至るメカニズム解明研究に取り組んでいる。その結果をまとめ平成12年12月に主論文「*Helicobacter pylori* の産生する細胞空胞化毒素の致死作用解析」を完成させ、参考論文3編 (公表した論文2編、投稿中の論文1編) を添え、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士 (工学) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において論文内容を検討し、本論文を受理しても差し支えないものと認め、下記の審査委員を選出した。委員は主査を中心に論文内容を慎重に審議し、公開論文発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、グラム陰性菌 *H. pylori* の産生する毒素 VacA の細胞致死メカニズムを解明することを目的とし、毒素のミトコンドリアの機能並びにグルタチオン代謝に与える影響を詳細に検討したものである。ミトコンドリア膜電位や ATP 量の低下によるエネルギー代謝の阻害、またグルタチオン代謝低下による細胞の酸化的損傷の誘起など、有用な知見を得ている。

本研究では、まず毒素 VacA による細胞の形態学的変化を電子顕微鏡で観察し評価した。ネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡観察では、ミトコンドリアのマトリックス密度の増加、クリステの不明瞭化及び膨化が認められたが、免疫電子顕微鏡観察では VacA のミトコンドリアへの局在は認められなかった。また走査型電子顕微鏡により、VacA を作用させた細胞の細胞膜表面にくぼみ構造が観察され、その部分への VacA 局在が認められた。

そこで、ミトコンドリアの機能に着目し、ATP 合成の駆動力であるミトコンドリア膜電位に対する VacA の作用について検討した。胃上皮由来の AZ-521細胞に VacA を作用させると、時間依存的に細胞内 ATP 量が減少したが、VacA の空胞化形成能には非依存的だった。ミトコンドリア膜電位に対する VacA の影響をフローサイトメトリー法で測定し、膜電位の

低下を認めた。更に VacA を作用させた細胞の酸素消費量も低下することを、培地中の酸素分圧の変化測定より明らかとした。これらの結果より、VacA はミトコンドリア膜電位や ATP 量を低下させ酸素消費を阻害し、それがエネルギー代謝の低下をもたらす細胞死に至ると推定している。細胞増殖に対する VacA の影響について、細胞周期の変化を指標として調べたところ、VacA を作用させた細胞では G0 / G1 期における細胞がおよそ10%増加した。これは ATP 低下に基づく細胞内代影の低下が影響していると考えられ、上記推定を支持する結果である。

VacA が細胞への大きなストレスを惹起していることから、細胞内酸化還元性制御に重要であるグルタチオン(GSH)への影響が考えられる。検討の結果、ATP 依存の酸化型グルタチオン(GSSG)の細胞外輸送が VacA で阻害されるが、ATP 非依存のシスチンの細胞内取り込みには変化がないことが分かった。また、細胞内の全 GSH(GSH+GSSG)量の変化も認められなかった。GSH 代謝関連酵素グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)及びグルタチオンレグクターゼ(GR)活性に及ぼす VacA の影響を見ると、GPX 活性は変わらず、GR 活性は25%程度低下した。一方、GSH のターンオーバー速度は減少した。これらより、VacA は GSH 合成能を低下させ、また GSH の半減期を延長させて、GSH 代謝を低下させることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、VacA のみならず同様な毒素蛋白質の細胞障害並びに細胞死に至るメカニズム解明、即ち病原菌毒素の細胞内動態研究に基礎的情報を提供する点で極めて有用である。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、論文審査及び最終試験の結果について審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文は毒素蛋白質の細胞致死メカニズム解明において有益かつ新しい知見を含んでおり、病態生化学の進展に貢献するものであることを認め、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	青柳東彦
	副査	教授	村松毅
	副査	教授	森井秀昭
	副査	教授	中嶋直敏
	副査	助教授	畠山智充

増 沢 近 統

(大分県)昭和20年1月11日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 蒸気タービン低圧最終翼の三次元流動特性に関する研究

Study on Three-Dimensional Flow Behavior
in a Last Blade Row of Low-Pressure Steam
Turbines

論文内容の要旨

我が国の事業用電力の約90%を超える電力が火力・原子力蒸気タービンによって発電されている現在、蒸気タービンが発電設備の基幹機器として占める役割はますます重要になってきている。その中で低圧最終翼は、プラントの高効率化や単機出力の増大、過酷運転に対する運転性の改善などを図る上で極めて重要な役割を担っている。特に低圧最終翼はその性能がタービン全体に及ぼす影響が大きく、かつその長大化が遠心強度や耐振強度の低下を招くので、開発設計に際してはその三次元流動特性を的確に把握、評価することが不可欠である。

本論文は、低圧最終翼の更なる高性能化および信頼性向上を図るために行った研究であり、パウ静翼の高効率化効果、失速フラッタなど翼振動発生要因となる低負荷運転時の逆流現象など三次元流動特性を数値解析およびタービン試験の両面から論じたものである。

第1章では、研究の背景、研究の目的および本論文の全体構成について述べた。

第2章では、実験的検証装置として、実機を模擬した低圧蒸気タービン試験装置および短翼で構成した空気タービン試験装置について述べ、更に、低圧最終翼特有の湿り蒸気挙動に関する計測技術について記述した。

第3章では、三次元流動特性を予測するために適用した数値解析法について述べた。

3・1では、実設計において数値解析法が具備すべき条件について記述した。

3・2では、逆流現象を伴う三次元流動を比較的簡便に予測するため、変形 FLIC (Fluid In Cell) 法に三次元翼形状に適合した翼力を導入する準三次元非粘性流れ解析法を提案した。

3・3では、まず、三次元遷音速流を精度良く推定するために適用した Denton 法による完全三次元非粘性流れ解析法について述べた。

次に、逆流や剥離を伴う動翼内部流れを解析するために適用した完全三次元粘性流れ解析法について述べた。

第4章では、本研究の主目的であるパウ静翼の高効率化効果および低負荷運転時の逆流現象などの三次元

流動特性について、数値解析結果とタービン試験結果の両面から明らかにした。

4・1では、ストレート静翼およびバウ静翼から構成される空気タービンについて、Denton法を用いた数値解析結果と実験結果を比較し、数値解析法の適応性、妥当性を明らかにすると共に、バウ静翼の三次元流動特性、高効率化への効果を明らかにした。すなわち、バウ静翼では、ストレート形に比較して、流出角は翼根元および先端で大きく翼中央部では小さくなること、翼根元と先端で負荷を減少させ翼高さ中央部で負荷を増大させる効果があること、これらの結果として翼根元および先端で二次流れ損失が減少することなどを明らかにした。

なお、この三次元翼形状の効果は空気タービン試験によっても検証され、この結果に基づきバウ静翼を低圧最終翼にも適用し、その高効率化効果を実証した。

4・2では、完全三次元粘性流れ解析法を適用して準三次元解析やタービン試験では捉え難い低負荷運転時の動翼内部の逆流を伴った三次元流動の詳細な構造を明らかにした。すなわち、動翼根元側には動翼内部へ逆流が侵入することに伴って旋渦が発生すること、および大きな迎え角に伴って動翼前縁腹面側に剥離渦が発生することなどを明らかにした。また、蒸気タービン試験結果と比較し、動翼流入角、流出角、質量流量分布などについて、両者が良く一致することも示した。

4・3では、準三次元解析法を適用して、逆流が発生するマッハ数、逆流域の高さ、動翼流入角および流出角の翼高さ方向分布などを定量的に予測し、タービン試験結果と比較検証した結果、両者が良く一致することを示した。この準三次元解析法は、簡便であるにもかかわらず逆流現象を的確に予測し、かつ定量的な精度も良いことが判明したので、低圧最終翼開発設計の有用な手法として実用できることを明らかにした。

なお、低負荷運転時における低圧最終翼の三次元流動特性を数値解析およびタービン試験の両面から比較検証した例はほとんどなく、得られたデータは極めて貴重なものである。

第5章は結論であり、本研究の目的である⁽¹⁾バウ静翼の効果、⁽²⁾低負荷運転時の逆流現象など低圧最終翼の三次元流動特性に関して、特に蒸気タービンの開発・設計という実用面に主眼を置き、新たな知見を得たことを述べた。

本研究の成果は、低圧最終翼の高効率化と信頼性向上に関して、基礎的および実用的資料を提供するものであり、今後ますます厳しい条件下で運用される蒸気タービンの高性能化と信頼性向上に寄与するものである。

論文審査の結果の要旨

増沢近統氏は、昭和42年3月九州大学工学部航空工学科を卒業、昭和44年3月同大学院工学研究科修士課程を修了、直ちに三菱重工業株式会社に入社、以降同社技術本部長崎研究所にて蒸気タービンの開発研究に従事し、平成10年4月、同社に在籍のまま長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学、現在に至っている。同氏は、海洋生産科学研究科において引き続き蒸気タービンに関する研究を継続し、多くの成果を上げるとともに、所定の単位を修得した。平成12年12月、主論文「蒸気タービン低圧最終翼の三次元流動特性に関する研究」を完成させ、参考論文7編（内1編は投稿中）を付して、長崎大学大学院海洋生産科学研究科に博士（工学）の学位を申請した。同研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、受理を決定後、下記の審査委員を選定した。委員は主査を中心にその論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を、平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

我が国の電力の約90%以上が火力・原子力蒸気タービンによって発電されている現在、蒸気タービンの低圧最終翼は、プラントの高効率化や単機出力の増大を図る上で極めて重要な役割を担っており、また過酷運転に対する運転性の改善が必要であり、開発設計に際してはその三次元流動特性を的確に把握、評価することが要求されている。提出論文は、蒸気タービンの低圧最終翼の高性能化および信頼性向上を図るために行われた研究であり、バウ静翼の採用による高効率化効果および低負荷運転時の長大翼内部の逆流現象を解明するため、適切な数値解析方法を提案するとともに、数値解析結果およびモデルタービン試験結果の両面から三次元流動特性を詳細に追究したものである。

まず、バウ静翼の効果については、ストレート形翼との比較において、Denton法を用いた非粘性三次元数値解析および空気タービン試験の両面から追究した。すなわち、バウ静翼では、流出角が翼根元および先端で大きく翼中央部では小さくなること、翼根元と先端で負荷を減少させ翼高さ中央部で負荷を増大させる効果があること、さらに、これらの結果として翼根元および先端で二次流れ損失が減少することなどを明らかにした。また、この結果を応用したバウ静翼を低圧最終翼に適用し、その高効率化効果を実証した。

次いで、三次元粘性流れ解析法を適用して低負荷運転時の動翼内部の逆流を伴った三次元流動の詳細な構造を明らかにした。準三次元解析やタービン試験では捉え難い極めて複雑な三次元流動現象、すなわち、翼根元側には動翼内部へ逆流が侵入することに伴って

ら旋渦が発生すること、および大きな迎え角に伴って動翼前縁腹面側に剥離渦が発生することなどを明らかにした。また、蒸気タービン試験結果と比較して、動翼流入角、流出角、質量流量分布などについて、数値解析結果と実測結果が良く一致することも示した。

さらに、逆流発生マッハ数、逆流域の高さ、動翼流入角および流出角の翼高さ方向分布などについて、これらの負荷依存性を簡便に予測するため変形フリック法に三次元翼形状に適合した翼力を導入する準三次元非粘性流れ解析法を提案した。この準三次元解析法は、簡便であるにもかかわらず逆流現象の定量的な予測を可能にし、その予測精度も高いことから、低圧最終翼開発設計の有用な手法として実用できることを明らかにした。なお、蒸気タービンの低負荷運転時における低圧最終翼の三次元流動特性を数値解析およびタービン試験の両面から比較検証した例はこれまでほとんどなく、得られた結果は極めて貴重である。

海洋生産科学研究科委員会は、論文審査及び最終試験の結果についての審査委員の報告に基づき審査した結果、本論文は高性能化および信頼性向上を目指す蒸気タービン低圧最終翼の開発設計において、基礎的および実用的資料を提供するものであり、極めて有益かつ新しい知見を含んでいる。これらの成果は海洋生産科学の基礎部門である工学の進歩に寄与するところ大であり、博士（工学）の学位に値すると認め、合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	石田正弘
	副査	教授	児玉好雄
	副査	教授	今井康文
	副査	教授	茂地徹

時 衛 東

(中国) 1966年5月14日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 A Fundamental Study on Development of a Model for Local Discharge Propagation on an Electrolytic Solution
電解質水溶液面における局部放電の進展モデルの開発に関する基礎的研究

論文内容の要旨

本論文は、実験及び理論的解析を通して、インパルス電圧印加によって電解質水溶液面に発生する局部放電の進展モデルの開発に関する基礎的研究をまとめたものである。

送電線のがいしは、海岸線に近い所では海からの塩分で、工場地帯では工場からの煙塵で汚損される。汚損物が乾燥している間はいし表面の絶縁特性も清浄な場合とほとんど変わらないが、霧、小雨等によりがいし

表面の汚損物中の電解質が溶けて導電性の皮膜が形成されると、がいし表面の漏れ抵抗は著しく低下する。その結果、比較的低い印加電圧でもがいし表面に放電が発生するようになり、がいしの沿面フラッシュオーバー電圧は急激に低下してくる。このような汚損がいしの沿面フラッシュオーバーの問題は、古くから多くの研究者によって取り扱われてきているが、研究者によって一致しない点あるいは不明な点が多く残されている。

近年の電力需要の増大とともに送電電圧が上昇し、電力設備においては高い耐電圧が要求されるようになってきている。このような状況のもと、電力設備の絶縁設計においては従来の過絶縁の方法が技術的および経済的な面から困難になってきており、絶縁性能および経済性の両面を考慮した絶縁設計が要求されている。このような絶縁設計を可能にするためには、汚損がいし表面での物理現象を適確に把握する必要がある。

このような背景のもと、各種の汚損環境へのがいしの適用と評価方法の開発に貢献することを目的として、汚損湿潤がいし表面を模擬した電解質水溶液面に発生する局部放電の進展のモデル化に関する研究を行った。

以下に、本論文の構成に従って、内容を要約する。

第1章では、本研究の背景と現在までの汚損沿面放電に関する研究の状況、および本研究の目的と意義について述べた。

第2章では、局部放電が静止している時の局部放電先端と電解質水溶液面との接触面積および局部放電から電解質水溶液面へ流れ込む電流の密度を調べた。接触面積は、電極間の印加電圧、局部放電の電極降下、局部放電と平板電極間の電解質水溶液部分の抵抗から計算される。電解質水溶液部分の抵抗は、映像法を用いて求められる。広い範囲の汚損度について計算するために、電流密度の汚損度依存性について検討した。その結果、電解質水溶液の一定の抵抗率に対する電流密度は電流値にかかわらず一定になることがわかった。

第3章では、ストリーマ理論を用いて、電解質水溶液面に接触した針電極近傍での放電の開始条件について検討した。さらに、その結果が一般に適用できるように、電解質水溶液の深さ、針電極の直径および電極間距離を変化させて、実験条件と局部放電開始条件の関係を調べた。その結果、実験条件を変えても放電開始電流は、電解質水溶液の抵抗率にほぼ反比例し、その実験値は計算値ともよく一致することがわかった。

第4章では、タングステンプローブを使用して、電解質水溶液中の電位分布から、局部放電から電解質水溶液面へ流れ込む放電電流の分布を求めた。その電流分布に対する電解質水溶液の抵抗率、印加電圧波形、局部放電の進展距離などの影響について検討した。その結果、放電電流の大部分は局部放電先端部分から電

解質水溶液へ流入し、局部放電幹部分から電解質水溶液への流入は小さいこと、その電流分布に電解質水溶液の抵抗率、印加電圧波高値および印加電圧波形はほとんど影響しないことがわかった。

第5章では、高所を通る送電線の汚損がいしを模擬して、低気圧空气中に置かれた電解質水溶液面に、インパルス電圧印加によって発生する局部放電先端部分から放射される光のスペクトル発光強度と進展速度との関係に対する気圧、電解質水溶液の抵抗率、印加電圧波形、局部放電の進展距離などの影響について検討した。その結果、局部放電の進展速度はスペクトル発光強度および電解質水溶液の抵抗率の増加とともに増大すること、局部放電の進展速度とスペクトル発光強度との関係に対する気圧および印加電圧波形の影響は著しく小さいことがわかった。

最後に、第6章では、本研究で得られた結果について総括を行い、得られた結果をもとに、今後の課題を述べた。

論文審査の結果の要旨

時 衛東氏は、1988年7月西安交通大学電気工学科を卒業し、1991年6月に西安交通大学大学院電気工学専攻を修了した後、中国燕山大学の助手、講師として勤務していたが、平成9年10月に長崎大学海洋生産科学研究科の客員研究員となり、平成10年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科（海洋資源学専攻）に入学し、現在に至っている。

同氏は、平成12年12月に「A Fundamental Study on Development of a Model for Local Discharge Propagation on an Electrolytic Solution」と題する論文を完成し、参考論文4編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（工学）の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、予備審査の結果の報告に基づいて学位論文提出の資格を審査し、本論文の受理を決定後、下記の審査委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を、平成13年2月の研究科委員会に報告した。以下に論文審査の結果について述べる。

電力需要の増大につれて、送電系統のがいしの汚損は益々重要な問題となってきている。また、最近では、配電系統においても台風襲来時などに、がいし汚損によって、広範囲に亘る停電事故が発生している。本論文は、がいし表面に発生する局部放電の進展のモデル化に関する研究である。局部放電進展のモデル化は、汚損がいしの絶縁耐力の評価およびがいしの最適設計のために極めて重要である。実がいしの形状や汚損層

の不均一性などの影響を取り除き、汚損沿面放電現象の基本的な特性を調べやすくするため、電解質水溶液をベークライト製の箱に入れて、汚損がいし表面を模擬している。また、印加電圧として、雷サージから開閉サージまでの電圧を模擬した3種類のインパルス電圧が使用されている。

本論文の第1章では、本研究の背景と現在までの汚損沿面放電に関する研究の状況、および本研究の目的と意義について述べている。

第2章では、局部放電が静止しているときの局部放電先端と電解質水溶液との接触面積およびその接触面での電流密度を調べ、電解質水溶液の抵抗率が一定の場合、その電流密度は局部放電から溶液への電流値にかかわらず一定となることを見出ししている。

第3章では、電子なだれがストリーマに転換するための条件を用いて、電解質水溶液面に接触した針電極近傍での放電の開始条件について検討している。開始条件に対する実験条件（電解質水溶液の深さ、針電極の直径および電極間距離）の影響を調べ、放電開始電流は実験条件にかかわらず電解質水溶液の抵抗率にほぼ反比例し、その測定値は計算値とよく一致することを明らかにしている。

第4章では、タングステンプローブを用いて電解質水溶液中の電位分布を測定し、局部放電から電解質水溶液へ流れる放電電流の分布を求めている。放電電流の大部分は局部放電先端部分から電解質水溶液へ流入し、局部放電幹部分から電解質水溶液への電流の流入は小さいこと、その電流分布に電解質水溶液の抵抗率、印加電圧波高値および印加電圧波形はほとんど影響しないことを明らかにしている。

第5章では、高所を通る送電線の汚損がいしを模擬して、低気圧空气中に置かれた電解質水溶液面に、インパルス電圧印加によって発生する局部放電の先端部分から放射される光のスペクトル発光強度と局部放電の進展速度の関係について調べている。局部放電の進展速度は局部放電先端部分のスペクトル発光強度および電解質水溶液の抵抗率の増加とともに増大すること、およびスペクトル発光強度と進展速度の関係に対する電解質水溶液の抵抗率、気圧、印加電圧波形の影響について明らかにしている。

本論文で得られた結果は、今後局部放電の進展モデルを構築していく上で極めて有用なものであり、その研究成果は4編の論文として発表済みである。

以上により、海洋生産科学研究科委員会は、審査委員会の報告に基づき審査した結果、本論文はこの分野の今後の進歩に貢献するものであることを認め、博士（工学）の学位に値するものとして合格と判定した。審査担当者 主 査 教 授 松 尾 寿 夫

副 査 教 授 山 田 英 二
副 査 教 授 小 山 純
副 査 教 授 松 尾 博 文
副 査 助 教 授 山 下 敬 彦

清水 恵一

(東京都) 昭和31年12月23日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 蛍光ランプ点灯装置の高調波抑制技術に関する研究

Harmonics Suppression Techniques for
Fluorescent Lamp Systems

論文内容の要旨

エネルギー消費に関わる環境問題が世界的に注目されており、1997年に京都で開催された地球温暖化防止条約締結国際会議(COP3)で、温室効果ガスの排出量削減目標が採択され、各国の達成目標が定められた。照明用として消費される電力は、全電力消費の約16%を占めており、技術開発により省エネルギーに貢献することが強く要請されている。我が国においては、発光効率が白熱電球の5倍以上もある蛍光ランプを使った照明システムが事務所照明、店舗用照明をはじめ家庭用としても広く普及しており、蛍光ランプを点灯するシステムの効率を改善することにより環境問題に対して大きく貢献することが可能である。蛍光ランプシステムの効率改善は、蛍光ランプの発明以来多くの研究が続けられているが、インバータ技術を利用した高周波点灯方式はランプの電気・光変換効率を高められることから本質的に有効な手段である。

一方、パワーエレクトロニクスを応用した電気・電子機器の普及に伴い、商用交流電力系統の高調波による障害が認識されるようになり、電気エネルギー利用の立場から低周波 EMC (Electro-Magnetic Compatibility, 電磁気両立性) の問題として早急に解決すべき社会的課題となっている。効率の優れた高周波点灯方式の蛍光ランプ照明システムを普及させるとともに、入力電流高調波を低減することは社会的要請に応えるものであり、蛍光ランプ点灯装置に適した高調波抑制技術が重要な位置づけをもつものである。

本論文は6章からなり、その内容は次の通りである。

第1章は序論として、本研究の工学的立脚点である蛍光ランプの高周波点灯の意義、商用交流電源における力率改善・高調波抑制の重要性を示した。蛍光ランプの高周波点灯について過去の研究を展望し、本研究の方向付けを行うとともに、高調波電流抑制のための規制、トップランナー方式によるエネルギー消費効率の達成目標など関係する社会的要請事項をまとめた。

第2章では、既往の文献をもとに蛍光ランプの高周

波点灯の特長を明確にするとともに、点灯装置の具備すべき基本的要件を示し、その基本回路構成と点灯回路として用いられてきたインバータ方式について概説した。また、実用電子安定器として達成すべき課題について列挙し整理した。スイッチング電力変換回路本体がアクティブフィルタの動作を兼ね備えた複合回路方式が多数研究開発されているが、各種回路方式について動作原理に基づく回路方式の分類を試み、3章以降で取り扱う回路方式の位置づけを明確にした。さらに、研究や回路設計において重要性を増しつつある回路シミュレーションについて概説し、利用上の留意点を明確にした。シミュレーションの有用性を示すとともに本論文中での適用例を示した。

第3章では、複合回路方式である変形ハーフブリッジ形インバータ回路を提案し、動作状態分析に基づき動作解析を行い回路の設計指針を示した。提案した回路は3つの動作状態をとり、これらの組み合わせによって2つの動作モードが現れる。また、出力トランスの漏れインダクタンス及び励磁インダクタンスが入出力特性に及ぼす影響を明らかにし、入力電流総合歪率 THD を低下させるための設計指針を与えた。

第4章では、提案した回路の入力電流を単一の式で表現するための解析を行った。ハーフブリッジ部の機能を、高周波電流源と降圧形チョッパとに分離して考える簡易モデルを提案した。このモデルを用いて、変形ハーフブリッジ形インバータ回路の入力電流を表す式を導いた。この式を用いて計算した結果と実測結果を比較検討し、スイッチ素子のデューティが商用電源位相に応じて変調を受けることが、素子に加わるストレスを低減し、入力電流の高調波歪みを低下させることに有効に作用していることを示し、駆動回路設計に対する指針を与えた。また、簡易モデルが入力電流解析に適切であることを示した。

第5章では、高耐圧でオン電圧が低いというバイポーラ型トランジスタの特長を活かすことができる可飽和カレントトランスを用いた駆動回路について解析した。可飽和カレントトランスに使用した磁心を理想飽和特性、トランジスタとダイオードの順方向電圧をゼロと仮定した簡易モデルを用いて、スイッチ電流のピークとスイッチのオン時間の関係を導いた。トランジスタとダイオードの順方向電圧などについて考慮し補正を施した結果、実測値と計算値はほぼ完全に一致した。この結果から、変形ハーフブリッジ形インバータにおいて、自励発振回路の採用が高調波歪みを低下させる効果があることに、理論的裏付けが得られた。

第6章は以上を総括した結論である。

論文審査の結果の要旨

清水恵一氏は、昭和57年3月に東京理科大学理工学

部を卒業した。同年 4 月に東芝電材(株) (平成元年東芝ライテック(株)に社名変更)に入社し、蛍光ランプ、HID ランプ等の照明用電子安定器の研究開発に従事した。平成10年 4 月に東芝ライテック(株)に在職のまま、大学院海洋生産科学研究科博士課程に入学し、現在に至っている。

海洋生産科学研究科においては、海洋資源学を専攻し、所定の単位を修得するとともに、蛍光ランプの点灯装置の研究に従事して多くの業績を上げた後、平成12年12月に学位論文「蛍光ランプ点灯装置の高調波抑制技術に関する研究」を完成し、6 編の参考論文を添えて、長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(工学)の学位を申請した。同研究科委員会は、これを平成12年12月21日の定例委員会に付議し、受理を決定後、下記審査委員を選定した。

委員は、主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成13年 2 月15日の研究委員会に報告した。

近年、電子機器、照明機器等の電源としてスイッチング方式のインバータやコンバータが数多く用いられるようになってきた。これらのスイッチング方式の電源は非線形の特性を持つため、商用交流電源をエネルギー源とする場合、電気機器、照明機器等から商用交流電源系統へ高調波電源が流出することになる。この高調波電流は電流用キャパシタ、リアクトル、トランスなどの加熱、焼損、異常音の発生、各種制御機器やブレーカ誤動作などの障害を引き起こすことがある。特に、照明機器の使用台数は多く、これによる総量としての高調波電流の影響が大きいので、照明機器の高調波電流の規制としては、IEC61000 - 3 - 2 のクラス C という最も厳しいものが適用されている。

提出論文は、照明機器の中で、最も普及している蛍光ランプの点灯装置に対する高調波抑制技術に関して、新しいインバータ回路方式の提案、回路動作及び特性の解析、入力電流高調波低減のメカニズムとこれらに基づいたインバータ回路の設計基準を明らかにしたものである。

まず、蛍光ランプの点灯回路の具備すべき基本的要件、従来の点灯回路として用いられてきたインバータ回路方式の分類とそれらの長所、欠点について述べ、従来の点灯回路における出力電流のクレストファクタが大きいこと、電源投入時の突入電流が大きいこと、電力効率が比較的低いこと、部品点数の増加によるコストアップなどの問題点を明確にした。次に、これらの問題を解決するために、高調波抑制と高周波インバータの 2 つの異なった機能を複合的に実現した変形ハーフブリッジ形インバータと称する新しい複合回路

方式インバータ回路を提案し、回路の動作および特性について等価回路モデルを用いて解析した。また、入力電流波形に着目して、提案した変形ハーフブリッジ形インバータを入力電流波側に高周波電流を流し出す電流源と平滑キャパシタ側にエネルギーを送り込む高圧形コンバータで等価的に置き換えたモデルにより解析し、提案したインバータにおける高調波低減のメカニズムを理論的に解析した。さらに、提案したインバータの主スイッチとしてのバイポーラトランジスタを駆動するための可飽和カレントトランスを用いた自励発振回路の動作の解析を行い、主スイッチのデューティ比の制御のメカニズム及び電源投入時の突入電流の抑制効果を検討した。以上の解析により、提案した変形ハーフブリッジ形インバータの設計基準の確立が図られた。

本研究は蛍光ランプ点灯装置のインバータ電源回路において、近年社会的に問題になっている高調波電流の低減、電力効率の改善を図るための新しい回路方式の提案とその設計基準の確立を図ったもので、蛍光ランプ点灯装置の高性能化に役立つ新しい知見を与え、照明工学、電子制御工学の進歩発展に貢献するところが大きく、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	松 尾 博 文
	副 査	教 授	山 田 英 二
	副 査	教 授	松 尾 寿 夫
	副 査	教 授	小 山 純
	副 査	助教授	黒 川 不二男

坪 井 克 剛

(静岡県) 昭和19年 7 月 6 日生

授与年月日 平成13年 3 月31日

主 論 文 インバータ駆動システムの不安定現象とその改善に関する研究

Study on Unstable Phenomena of Inverter Drive Systems and Their Solutions

論文内容の要旨

本論文では、パワーエレクトロニクス機器の進歩の過程で障害となってきた諸問題のうち、特に不安定問題の解決に関する研究成果を報告している。研究内容は大きく 4 つに分類でき、これらは、インバータの DC リンクにおける異常共振現象、LC フィルタを有する定電力性機器の発振現象、デジタルベクトル制御における離散時間系の発振現象、および、PWM インバータの上下アーム短絡防止時間によるハンチング現象である。これらの研究内容のそれぞれに 1 つの章を割り当て、さらに、これらの前後に諸論と結論の章を加え、全 6 章の構成となっている。各章の内容は以下の通り

である。

第1章では、本論文の諸論として、パワーエレクトロニクスの進歩を概観し、その進歩のためには多くの問題解決が必要であったことを示している。これらの解決すべき諸問題の中から、特に不安定問題をピックアップして検討することを述べ、これらの具体的な背景と解決の必要性を詳しく示している。また、本論文の構成を説明している。

第2章「インバータDCリンクの寄生共振の解析」では、ブスバーインダクタンスの簡易計算法の提案とその解析例、および寄生共振現象の解析への応用について述べている。まず第2.1節で、ブスバーインダクタンス計算の準備として、ブスバーの基本構成要素としての細線のインダクタンスの計算法を示し、近似誤差も明確にしている。次に第2.2節では、1本のブスバーや、2本ないし3本の平行ブスバーのインダクタンスの計算法と解析例を示している。ここで、特に2本のブスバーの相互現象を基本特性として重点的に考察し、これらのデータから実際の機器に応用できるインダクタンス計算法への指針を得ている。そして第2.3節で、実用レベルの複雑な構造のブスバーインダクタンスの計算法と解析結果を述べ、さらにこれを応用した3レベルインバータの寄生共振現象の解析を行い、実験結果との比較検討から共振点の正確な予測が可能であることを示している。

第3章「入力LCフィルタ付きチョッパ系の不安定現象とその対策」では、チョッパインバータ・システムにおいて、インバータ負荷としてモータや抵抗器も含め、全てのブロックを同時に考慮した安定性について、負性抵抗特性との関係を明瞭にしながら、根軌跡法を用いて考察する。その際、システムを安定化するための3つの対策を考え、詳細なシミュレーション解析との比較検討を踏まえて、安定な制御系設計のための新しい指針を得る。まず第3.1節で不安定の原因について簡潔に述べ、第3.2節で実際のシステムの構成の説明と対策方法の提案を行ったうえで、系の状態方程式を導出する。この式をもとに第3.3節ではメッシュ状の2パラメータによる根軌跡を示し、各種対策案の安定化効果を吟味する。最後に第3.4節で非線形シミュレーションの結果を示し、根軌跡による安定判別の結果と良く一致することを示す。

第4章「誘導電動機のデジタルベクトル制御の安定性」では、電圧形インバータで駆動される誘導電動機のデジタルベクトル制御システムについて3つの数学的モデルを提案し、各モデル相互間で安定性の比較を行っている。これらのモデルは状態方程式の形で表現されているので、安定性解析だけでなく、過渡応答の計算にも利用が可能である。第4.1節では、最も

簡単に利用が容易なデジタルRLモデル、第4.2節では、より詳細ではあるが、座標軸の回転だけは連続系のまま扱っているデジタルd-qモデル、第4.3節では、座標軸の回転にも離散化を考慮したデジタル α - β モデルをそれぞれ提案し状態方程式を導出している。第4.4節では、これらの式をもとにz平面上で根軌跡を求め、各モデルの特性を吟味するとともに、PWMのスイッチングを詳細に考慮した厳密解析との比較についても論じている。

第5章「インバータの短絡防止時間による誘導電動機の不安定現象」では、インバータの短絡防止時間の影響を総合的に検討するために、関連するモータやコンバータの単体特性の再検討を行ったうえ、従来はあまり考慮されることがなかったモータ電流のリプルやパワー素子の順電圧降下の影響まで考慮したインバータ駆動誘導電動機の状態方程式を導出し、それぞれの要因の安定性への影響について理論的に予測した。まず、第5.1節では、モータ単体でも不安定となるモータ定数の組み合わせを定量的に明示し、インバータドライブに起因する不安定現象との区別を可能にする。次に、第5.2節では、従来、扱いが曖昧だったコンバータの特性を明確にし、コンバータも含んだインバータ全システムとしての安定性評価の信頼性を上げる。さらに、第5.3節では、従来は複雑化する傾向にあった検討モデルを、ここでは、理想直流電源+ T_d 付インバータ+理想誘導電動機という最小単位に選び、 T_d の影響をより純粋に評価する。

第6章では、本論文の結論として、各種不安定現象についての研究の成果を簡潔に述べ、残された課題について触れるとともに今後の展望についても言及する。

論文審査の結果の要旨

坪井克剛氏は、昭和42年3月早稲田大学第一理工学部電気工学科を卒業し、同年4月三菱電機株式会社に入社した。以来、平成12年9月に退職するまで、平成9年6月から同11年3月の三菱電機エンジニアリング株式会社への出向期間も含め、一貫してパワーエレクトロニクス機器の開発・設計・試験に従事した。平成9年4月に、三菱電機株式会社に在籍のまま、長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学、現在に至っている。

同氏は、大学院においては海洋資源学を専攻し、所定の単位を修得すると共に、主として業務上で生じたパワーエレクトロニクス機器の各種問題点に関して、その原因究明と解決のための研究を行った。その成果を平成12年12月に主論文「インバータ駆動システムの不安定現象とその改善に関する研究」にまとめ、参考論文4編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士(工学)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において論文内容の要旨を検討し、受理を決定の後、下記審査委員を選定した。審査委員は主査を中心に論文内容について慎重に審査し、公開論文発表会での発表を行わせるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査及び最終試験の結果を平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は、インバータ駆動システムの不安定現象として、GTO 3 レベルインバータの DC リンク寄生共振現象、鉄道車両空調用チョッパシステムのハンチング現象、デジタルベクトル制御のサンプリング時間に起因する発振現象、およびインバータの正負アーム短絡防止時間による軽負荷時ハンチング現象の4テーマを採り上げ、それぞれについて研究した成果を記述したものである。

まず、DC リンクの寄生共振現象に重要な影響を及ぼすブスパインダクタンスの簡易計算法の提案を行い、その計算式を導出した。これを利用した解析結果から、一般には、システム全体を2本のブスパ対の組み合わせと考えるとインダクタンスを合成計算することが可能であることを示したうえで、システムの構造データから寄生共振特性を理論計算した。この結果を実験値と対比させ、非常に精度の良い予測ができることを実証した。

次に、鉄道車両空調用チョッパシステムの低電圧・重負荷時の不安定現象について、システム全体を詳細にモデル化して状態方程式を導き、その根軌跡から安定性を検討して、詳細な回路シミュレーションと比較した。この結果、従来から多用されている周波数特性をベースにした省略の多い近似解析法に比べ、非常に精度が良くしかも効率的な安定性の評価が可能であることを実証した。また、複数の安定化対策を提案し、この中からダンピング回路の付加による方法が最も効果的で、定電圧特性の劣化も少ないことを明らかにした。

更に、電圧形インバータで駆動される誘導電動機のデジタルベクトル制御システムについて3つの数学的モデルを提案し、特にサンプリング時間と電流制御ゲインの影響に注目して、根軌跡法による安定性判別結果の比較を行った。この結果、座標軸を段階状に回転させたモデルと、連続的に回転させたモデルでは結果に大きな差は現れず、一般には後者のモデルを利用すれば十分であることを明らかにした。また、電動機を抵抗と漏れインダクタンスの直列回路で近似した簡単なモデルも、概略検討には十分に実用的であることを示した。

最後に、インバータの短絡防止時間の影響を総合的に検討するために、関連する誘導電動機やコンバータ

の単体特性の再検討を行ったうえ、従来はあまり考慮されることがなかったモータ電流のリプルやパワー素子の順電圧降下の影響まで考慮したインバータ駆動誘導電動機の状態方程式を導出し、各パラメータが安定性に与える影響について明確にした。

以上のように、本論文は電気駆動システムの設計・制御技術の進歩に貢献するものであることを認め、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	山 田 英 二
	副 査	教 授	松 尾 寿 夫
	副 査	教 授	小 山 純
	副 査	教 授	松 尾 博 文
	副 査	助教授	辻 峰 男

黄 超

(中国) 1960年9月6日生

授与年月日 平成13年3月31日

主 論 文 Development of the Boundary Element Method Utilizing the Discrete Interegral Method.

離散積分法を利用した境界要素法の新展開

論文内容の要旨

境界要素法における領域積分は物体力や内部熱源がある場合などに必要となるが、内部の要素分割を伴うという点で境界要素法の利点を非常に損ねている。その領域積分を避けるために、二重相反法や境界型セルの方法などが工夫・開発されているようである。しかし、これらもそれなりの使い勝手の悪さがあり、なお一層の高精度で効率の良い解析法を開発することが不可欠であると考えられる。

不均質はりに対する従来の境界要素法としては、大きく分け三つの方法が考えられる。しかし、第一の方法は、唯一厳密な取扱いができる方法である。いろいろな曲げ剛性の分布について基本解を求めることは一般に容易ではなく、一般性に欠ける。また、第二の方法は未知数が大幅に増えるのはいうまでもないが、さらに境界型解法の優れた利点が消失している。第三の方法は複雑である。

また、熱伝導率が温度依存する非線形の熱伝導問題の境界要素法による解析では、Kirchhoff 変換を適用することにより支配微分方程式が線形、境界条件のみ非線形の問題に変換して解くことができる。これは領域内に非線形問題の伴う未知数設置が不要となる。しかし、この方法は実際の物理量と変数変換量との逆変換がきわめて困難になる場合がある。ある特別なケースでは、複雑な逆変換が不要な方法を示したが、これは数種の温度依存性に限られ、一般性に問題がある。

本研究では、デルタ関数を利用した関数近似と離散積分法を開発し、領域積分のある問題の新型解析法とその有効性について検証している。

第1章では、はじめに、境界要素法の種類と特長、および有限要素法の比較について述べている。次に、境界要素法における領域積分の不利点、現在の研究状況、特に非線形問題に対して領域積分の難関について検討している。最後に、デルタ関数を利用した関数近似と離散積分という新型解析例が提出された背景およびこの新型解析法の一般適用性について述べている。

第2章では、境界要素法の基礎理論について述べている。境界要素法は、微分方程式の境界値問題を境界積分方程式に変換し、その離散化解析により解を求める。本章では、境界要素法の基礎および考え方を理解するため、ポテンシャル問題として良く取り扱われる Laplace 方程式および Poisson 方程式に関して、その境界要素解析の概要を説明する。

第3章では、領域積分を避けるために、デルタ関数の性質を利用した関数近似法および離散積分法を開発する。この離散積分法はデルタ関数の性質により積分が代数和になることを利用するもので、内部要素の設定が不要になる。(ただし、内部の離散点の設定は必要)。デルタ関数の分布 (Laplace 二乗) と線ソースの分布を利用した離散積分法を提案している。1次元問題、2次元問題の解析例を通じて内部要素分割なしで精度よく領域積分項の評価が行えることを示す。

第4章では、はりの曲げ問題の境界要素法による新型解析法とその有効性について検証している。はじめに、たわみ、たわみ角、曲げモーメント、せん断力、のそれぞれの式に対して、離散積分法を使用し、重み関数を独立に設定する考え方を導入する。領域積分が不要である。これに基づき、連立方程式に従来用いていたせん断力と曲げモーメントの式も用いるようにし、連立方程式の構成を簡素化する。次に、非分割解法を確立する。以上のことは計算時間とマトリックスサイズを減少させ、従来の解法に比べ格段に効率的な解法となっている。新型解法のアルゴリズムは簡単な数値解析例で正当性が検証されている。また、従来の解法に比べ計算時間が大幅に減少することを計算例で示している。最後に、未熟なままで放置されていた非均質はりの曲げ問題の境界要素解析法に関して、以上で示した新たな連立方程式の構成法と重み関数を独立に定める方法を適用することにより、一般性のある解法を確立している。本解法は曲げ剛性分布が任意の関数にも事実上問題なく対応でき、非均質はりの解法が確立できると考えられる。

第5章では、支配微分方程式を一般的な過程を経て都合のよい形に変換し、それを解くことに帰着させる。

その際、デルタ関数を用いた離散積分法を使って、その変形された支配微分方程式に適用する。離散積分法の適用が容易となる新たな形式の微分方程式に帰着させる。1次元問題として、この新型解法と既往の理論値との比較によって正当性が検証されている。既存の方法が適用できない場合でも効率的な解析法を提供する。

第6章では、以上の研究内容を総括して述べている。**論文審査の結果の要旨**

黄 超氏は、1982年8月、中国の吉林大学物理学系を卒業、1993年8月、西安建築科技大学環境工程研究科修士課程を修了、その後、同大学講師となり、1997年4月来日、長崎大学大学院海洋生産科学研究科客員研究員を経て、1998年4月、同研究科に入学、現在に至っている。

同氏は西安建築科技大学では主に電気集塵機に関する研究・開発を手がけていたが、海洋生産科学研究科客員研究員時代から、境界要素法による解析シミュレーション法の開発に関する研究に携わってきた。特に、境界要素法による非線形問題の新解法に関する研究を進めていた処、デルタ関数の性質を利用した離散積分法の開発と、それを組込んだ境界要素解析法の確立に成功し、2000年11月に『Functional Approximation and Discrete Integral Method Utilizing Distribution of the Delta Function』と題する論文をまとめ、参考論文3編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科に博士(工学)の学位を申請した。長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、まず学位論文として審査するに値するか否かについて予備審査委員会に諮り、予備審査を行った。予備審査では、論文構成と英文表現が不十分であり、修正を要することが指摘されたが、本審査までに十分修正可能であるとして本論文の提出資格ありとの判定を下した。その結果報告に基づいて審議の結果、海洋生産科学研究科委員会は2000年12月21日の定例委員会において本論文を受理し、下記の通り学位審査委員会を結成した。しかし、予定された本審査までに修正が間に合わず、学位審査委員会は本審査を約1カ月延期するとともに、題目を変更するよう求めた。その後、『Development of the Boundary Element Method Utilizing the Discrete Integral Method』と題目を変更して提出された学位申請論文について、学位審査委員会は主査を中心として慎重に審議し、公開論文発表を行わせるとともに、口頭による最終試験を行い、論文審査及び最終試験の結果を2001年3月15日の定例研究科委員会に報告した。

提出された論文は、デルタ関数の分布を利用するという新たな観点から関数近似法と積分法(離散積分法と名付けた)を構築したものである。これは主として、

汎用数値解析シミュレーションの有力な解法の一つである境界要素法に应用することを念頭に置いたものであり、従来の境界要素法にそれらの方法を組み込んで境界要素法の新たな展開を目指している。すなわち、境界要素法は、シミュレーションコストの大部分をしめる要素離散化が境界のみでよい、という大きなメリットを有するという評価が定着しているが、非線形問題、非均質項のある問題、などでは領域内部の離散化が避けられず、その優れた解析法の発展が阻まれている。それを解決する方法に関する研究も精力的に行われているが、特に非線形問題においてその解決にはほど遠い現状である。本論文では、上記の方法を導入してこれらを解決しようとする意欲的な研究がまとめられており、重要な成果をおさめている。

まず第1章において、境界要素法における発展の経緯をまとめ、領域積分が残るネックとなっている状況を明らかにしている。第2章では境界要素法において出現する領域積分を、境界積分に変換するための従来の研究成果がまとめられており、それらの問題点と本研究の位置づけ、及び意義を記述している。そして、第3章に至り、本研究の基礎となる関数近似法と離散積分法の基礎理論を導入している。すなわち、まずデルタ関数の分布を利用した関数近似を導入し、さらにその関数を含む積分はデルタ関数の性質を利用することにより単なる離散点における積和となることを見出して、従来の要素が不要な効率的な積分法を構成している。これにはいくつかのバリエーションがあり、それぞれについて関数近似度と積分精度の比較を行っている。第4章では、3章で構成した方法を1次元境界要素解析法、すなわち、はりの曲げ問題における外荷重の評価、および曲げ剛性分布を推定する逆問題解法への適用をまとめている。第5章ではポテンシャル問題の境界要素解析法において、熱伝導率が温度依存する非線形問題に適用している。ここでは従来の非線形微分方程式を巧妙に変数変換し、3章で展開した関数近似法と離散積分法が適用可能なように等価な微分方程式に置き換えて解く方法を提案している。これにより領域内部の離散化が必要であったこの問題が離散点における積和のみで表されることになり、非線形問題も効率的に解ける過程が示された。

以上のように、本研究は境界要素法における領域積分を離散点における積和に置き換える方法を確立し、境界要素法に新たな発展をもたらすものと期待され、数値解析シミュレーションのさらなる発展に寄与するところ大であると認められる。以上により、博士(工学)の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者 主 査 教 授 木 須 博 行
副 査 教 授 西 田 知 照

副 査 教 授 金 丸 邦 康
副 査 教 授 修 行 稔

李 京 姫

(韓国) 1956年 3 月25日生

授与年月日 平成13年 2 月15日

主 論 文 Studies of Biochemical Characteristics Related to Difference of Rigor Mortis Progress between Cultured Red Sea Bream and Japanese Flounder

養殖マダイと養殖ヒラメの死後硬直進行の差違に関連した生化学的特性に関する研究

論文内容の要旨

魚類における死後硬直進行の速度や強度は、魚種間や同一魚種でも養殖と天然魚で、また保存温度などで異なることが知られている。その原因について、これまで筋原線維 (Mf) Mg^{2+} - ATPase 活性やエネルギー貯蔵物質、筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 取り込み能および放出能などの点から検討されてきた。しかし、魚種間の死後硬直進行の差違の原因については未だ解明されていない。そこで、本研究では、この点を明らかにするため、死後硬直進行が顕著に異なる養殖のマダイとヒラメについて検討を行った。

第1章では、本研究の目的と意義、本研究に関連した従来の研究および本研究の概要について記述した。

第2章では、死後硬直進行の速度や強度を柱状筋肉の筋収縮率で測定する新しい実験装置を開発し、それらの結果が Tension を反映しているかを検討した。また、それらが筋収縮モデルである Actomyosin の超沈殿反応における種々の Ca^{2+} 濃度での変化に対応するか否かについて検討した。本実験装置を用いて測定した筋収縮率の経時変化は Tension の経時変化とよく一致し、Actomyosin の超沈殿反応の Ca^{2+} 濃度の変化にもよく対応していた。従って、この装置を用いた筋収縮率の測定は死後硬直進行の速度や強度の測定に Tension が反映する極めて有用な方法であると考えられた。

第3章では、棲息水温25℃の養殖のマダイとヒラメにおける筋収縮率の経時変化を種々の保存温度で測定し比較した。その結果、筋収縮率の進行速度および最大到達レベルは、いずれの保存温度においても養殖マダイが養殖ヒラメよりも大であった。また、両魚種とも低温硬直現象が見られ、その発現保存温度は10℃付近であった。これらの結果より、養殖マダイの死後硬直進行の速度と強度は、いずれの保存温度においても、養殖ヒラメよりも速くて大きいと結論された。

第4章では、両魚種間の死後硬直進行の違いを背部

普通筋中のエネルギー物質と Mg^{2+} - ATPase 活性の点から比較検討した。その結果、エネルギー物質の ATP, CrP, グリコーゲンの低減と乳酸の蓄積および ATP の分解総量の経時変化は、両魚種間で顕著な差を呈さなかった。また、ATP 分解に關与する Mg^{2+} - ATPase 活性においても両魚種間で差がなかった。従って、両魚種間の死後硬直進行の顕著な違いは、筋肉中のエネルギー物質の経時変化や Mg^{2+} - ATPase 活性の違いに起因していないと考えられた。

第5章では、 Mg^{2+} - ATPase 活性に關与する Ca^{2+} 濃度に着目し、背部普通筋 SR の Ca^{2+} 調節能力および Sarcomere に対する SR の形態的差違について、両魚種間で比較検討した。その結果、SR の Ca^{2+} 取り込み能と放出能および SR Ca^{2+} - ATPase 活性は、いずれも養殖マダイが養殖ヒラメよりも高かった。また、SR の Sarcomere に対する面積および体積比率はいずれも養殖マダイが高かった。以上のことより、SR の Ca^{2+} 調節能力と形態的差違は、いずれも養殖マダイが養殖ヒラメよりも高く、両魚種間の死後硬直進行の違いの一原因になっていると考えられた。

第6章では、柱状筋(背部筋)の筋収縮率と Tension の間の關係および背部普通筋 Actomyosin の種々の ATP および Ca^{2+} 濃度下での超沈殿反応を両魚種間で比較検討した。その結果、筋収縮率と Tension の両値の経時変化は養殖マダイが両値共大きく変化したものの、その軌跡は両魚種で一致していた。従って、養殖マダイは養殖ヒラメに比べて筋収縮率および Tension のいずれにおいても経時変化が大きいと結論された。また、Actomyosin の超沈殿反応は種々の ATP および Ca^{2+} 濃度下において、養殖マダイが養殖ヒラメよりも大きかった。この結果は、両魚種間の Actomyosin の生化学的性質の違いを示唆している。言い替えると、両魚種間の死後硬直進行の違いは、Actomyosin の生化学的な性質の違いが一因であると考えられた。

第7章では、両魚種の背部普通筋の Actomyosin について、超沈殿反応および Mg^{2+} - ATPase の活性と Ca^{2+} 感受性を種々の Ca^{2+} と ATP 濃度下で測定し、両魚種間で比較検討した。その結果、超沈殿反応は、いずれの Ca^{2+} 濃度においても、またいずれの ATP 濃度においても、そのレベルは養殖マダイが養殖ヒラメよりも顕著に高かった。また、 Mg^{2+} - ATPase 活性は、 Ca^{2+} と ATP 濃度のいずれの場合も先と類似した変化の様相を呈し、それらのレベルも養殖マダイが顕著に高かった。 Ca^{2+} 感受性も(1 mM ATP 下)養殖マダイが養殖ヒラメよりも高かった。これらの結果は、いずれも養殖マダイの死後硬直進行の速度や強度が養殖ヒラメよりも速くて高いという知見を裏付けていた。また、 Mg^{2+} - ATPase 活性と超沈殿反応との間にはどち

らの魚種においても有意に高い正の相関關係が認められた。しかし、両魚種の両値の分布位置は、著しく異なり、養殖マダイが養殖ヒラメに比べて Mg^{2+} - ATPase 活性が同レベルであっても超沈殿反応が低いレベルに分布した。この結果は、筋収縮に關連する Actomyosin の性質が両魚種間で異なることを示唆していた。Actomyosin の性質が両魚種間でなぜこの様に異なるかについては、養殖マダイと養殖ヒラメの背部普通筋の筋タイプが異なる知見より、両魚種の背部普通筋を構成している筋タイプの違いに起因しているのではないかと考察した。

第8章では、本研究で得られた結果をまとめて総括した。

論文審査の結果の要旨

李 京姫氏は1979年2月に大韓民国嶺南大学家政大学食品栄養学科を卒業し、1982年2月に同大学大学院を卒業後、1990年4月に長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学し、1996年3月単位修得の上退学した。その後、1997年4月より大韓民国嶺南理工大学食品栄養学科非常勤講師、1998年9月より大韓民国東州大学食品栄養科非常勤講師、2000年3月より大韓民国嶺南大学校食品栄養学科非常勤講師を勤め、現在に至っている。

同氏は長崎大学大学院海洋生産科学研究科に入学してから今日まで、魚類の死後硬直に關連する生化学の研究に従事し、その成果を、平成12年11月に、主論文「Studies of Biochemical Characteristics Related to Difference of Rigor Mortis Progress between Cultured Red Sea Bream and Japanese Flounder」と題する論文にまとめ、参考論文6編(内4編審査付き)を添え長崎大学大学院海洋生産科学研究科に博士(学術)の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は平成12年12月の定例委員会にこれを付議し、同氏の研究歴と論文内容についての資格審査委員会の報告を受け、論文提出の資格ありと認め、下記のとおり審査委員会委員を選定した。

資格審査委員会は主査を中心に、論文内容について慎重な審議を行うと共に、公開論文発表会における発表と英語、日本語の能力判定試験と専門分野に関する口頭による最終試験を行い、論文審査および最終試験の結果を、平成13年2月15日の研究科委員会に報告した。提出論文は、魚類における魚種や天然と養殖の死後硬直進行速度や強度の違いの原因を明らかにするため、死後硬直進行の異なる養殖マダイと養殖ヒラメを用いて筋肉の生化学的性質の点から検討を行っている。

主論文ではまず、これまで魚体全体を用いなければ測定できなかった死後硬直の測定を、魚体の一部の柱

状筋を用いた測定方法について検討し、柱状筋で測定した死後硬直進行の測定結果が筋肉の死後における Tension 変化の結果を反映し、魚筋肉より調整したアクトミオシンの超沈殿反応における Ca^{2+} 濃度の変化ともよく呼応することを実証し、柱状筋を用いた筋収縮が魚類の死後硬直進行測定に有用な方法であると述べている。

次に、上記方法を用いて養殖マダイと養殖ヒラメの死後硬直進行を種々の保存温度で測定し、養殖マダイの死後硬直進行の速度と強度はいずれの温度でも養殖ヒラメのそれより速くて大きいことを実証している。また、両魚種間の死後硬直進行の違いを背部普通筋のエネルギー物質 (ATP 関連化合物、クレアチンリン酸、グリコーゲン、乳酸) と Mf Mg^{2+} - ATPase 活性の点から検討を行い、両魚種におけるエネルギー物質と Mf Mg^{2+} - ATPase 活性には顕著な違いがなかったことから、両魚種における死後硬直の違いはこれらが起因するものでないと推論している。さらに、両魚種の筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力と筋細胞内における面積と体積比率を電子顕微鏡を用いて形態計測し、養殖マダイが養殖ヒラメに比較して筋小胞体の Ca^{2+} 調節能力が高いことが死後硬直進行の違いの一因と考察している。

引き続いて、両魚種の筋収縮率と Tension との間の関係およびアクトミオシンの種々の ATP 濃度と Ca^{2+} 濃度下での超沈殿反応を比較検討し、養殖マダイは養殖ヒラメに比較して筋収縮率および Tension のいずれにおいても経時変化が大きく超沈殿反応も大きかったと述べている。また、両魚種のアクトミオシンについて、超沈殿反応および Mg^{2+} - ATPase 活性と Ca^{2+} 感受性を種々の ATP 濃度と Ca^{2+} 濃度下で比較し、いずれの結果も養殖マダイが養殖ヒラメよりも高かったことより、両魚種間の死後硬直進行の違いには、アクトミオシンの生化学的な性質の違いが一因であると述べている。さらに、上記の超沈殿反応と Mg^{2+} - ATPase 活性との関係を解析した結果、両値間には有意な正の相関関係があり、両魚種における両値の分布は養殖マダイが養殖ヒラメに比較して Mg^{2+} - ATPase 活性が同レベルであっても超沈殿反応が低いレベルに分布すると述べている。

また、両魚種の背部普通筋の筋タイプが異なる知見から、両魚種の死後硬直の進行の違いの原因となるアクトミオシンの生化学的な性質の違いには、養殖マダイと養殖ヒラメの筋タイプの違いが原因であろうと考察している。

以上のように、本論文は魚類における死後硬直進行速度や強度の違いの原因を筋肉の生化学的な性質の点から明らかにしており、海洋水産資源学の方野で新しい

知見を与えており極めて意義深いものである。これらのことより、海洋生産科学研究科委員会は、本論文が海洋生産科学の進歩に大きく貢献するものと認め、博士 (学術) の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	槌 本 六 良
	副 査	教 授	石 原 忠
	副 査	教 授	古 川 睦 久
	副 査	教 授	原 研 治
	副 査	助教授	橘 勝 康

矢 野 治 江

(福岡県) 昭和14年 2 月14日生

授与年月日 平成13年 2 月15日

主 論 文 養殖マダイにおける成長に伴う筋肉部、内臓部及び全魚体中の脂肪量の動向とそれらを推定する体格指数に関する研究
Changes of Fat in Various Parts of Fish Body
Accompanying Growth and Physique Index
Estimating Them on Cultured Red Sea Bream

論文内容の要旨

本研究は、養殖マダイにおける肉質改善の一環として、脂が乗り過ぎる点に着目して、養殖マダイの成長に伴う魚体内各部および魚体全体の脂肪量の動向を明らかにし、それらを活魚の状態で推定できる体格指数について検討を行った。

第一章では、本研究の目的と意義および本研究に関連する従来の研究、本研究の概要について述べた。

第二章では、従来より汎用されている体格指数である肥満度 (体重 / 標準体長³) $\times 10^3$ の大小が養殖マダイのどの体構成成分を反映するかについて検討した。肥満度は内臓部と筋肉部、筋実質の重量および内臓部脂肪量のいずれとも有意に正相関した。しかし、食味に影響が強い筋肉部脂肪量および魚体全体の脂肪量の多寡とは有意な相関性を呈さなかった。

第三章では、養殖マダイの成長 (0 - 2 年魚) に伴う魚体内各部脂肪量の変化を、筋肉部、内臓部、背部普通筋、肝臓、全魚体について検討した。各部脂肪量の経月変化は、内臓部を除きいずれも 0 年魚では漸減し、1 年魚では秋にピークを持つ急激な増加、2 年魚では若干下降の様相を呈した。また、それらのレベルはいずれの部位のいずれの成長段階においても天然マダイのそれらに比べて顕著に高かった。各部脂肪量は相互に有意に正相関し、脂肪の蓄積と消費はいずれの部位にも正呼応して反映していた。しかし、内臓部への脂肪の蓄積は 40 g / 100 g が最大限界であり、それを越える魚体内への脂肪の蓄積は筋肉部へ行われた。従って、筋肉部に一旦過剰の脂肪が蓄積されるとその

低減は極めて困難であると考えられた。

第四章では、養殖マダイの成長に伴う魚体内のタンパク質、脂肪、水分、灰分の各体構成成分の量的相互変化を、特にタンパク質に注目し、それらの含有量と総量の両面から検討した。各体構成成分の含有量 ($g/100g$) では、1年魚は0年魚や2年魚に比べて体脂肪量+体水分量が若干高く、体タンパク質量には差異がなく、体灰分量が若干低い傾向を示した。これに対して、体長の長短の要因を除去した相対的総量 (即ち体長と各体構成成分の総量との間の回帰直線からの残差値) は、1年魚では0年魚や2年魚に比べて体脂肪量、体水分量、体タンパク質量が共に高く、体灰分量には差異を認めなかった。また、天然マダイは養殖マダイのそれに比べて体脂肪量は著明に低く、体水分量と体タンパク質量の両値は顕著に高く、体灰分量には差異を認めなかった。即ち、含有量と総量の知見は著しく異なり、養殖マダイ1年魚は0年魚や2年魚に比べて筋肉総量が多く、また天然マダイはそれよりもさらに筋肉総量が多かった。さらに、養殖マダイでは筋肉総量が増加する際に、体脂肪総量の増加を伴ったが、天然マダイではその様相はみられなかった。

第五章では、養殖マダイの体脂肪量の多寡を活魚の状態から推定する体格指数として、魚体密度に着目し、体脂肪量と魚体密度の関係について検討した。魚体密度 (BD) は体脂肪量 (BF) と $r = -0.824$ ($p < 0.001$), $BD = -0.00176BF + 1.0997$ で有意に高い負の相関関係を呈した。しかし、体脂肪量レベルが同じであっても魚体間で魚体密度にばらつきが認められた。このばらつき (即ち体脂肪量と魚体密度との間の回帰直線からの魚体密度の残差値) は、体構成成分から脂肪と水分を除いた除脂肪・除水分残余の密度と有意に ($p < 0.001$) 高い正の相関関係を呈した。

第六章では、先の魚体密度のばらつきに影響を及ぼす因子について検討した。除脂肪・除水分残余の密度は、体灰分量とは有意な相関性を示さなかったが、体タンパク質量と有意に ($p < 0.001$) 高い負の相関性を呈した。従って、魚体密度による体脂肪量の推定には体タンパク質量の多少が影響すると結論した。

第七章では、養殖マダイの体脂肪量を推定する体格指数として、体長と体重から検討した。体長 (BL) と体重 (BW) との間に $(BW/BL^{2.840}) \times 10^3 = 52.65$, $r = 0.998$ ($p < 0.001$) が、また体長と活性組織量 (LBM) との間に $(LBM/BL^{2.819}) \times 10^3 = 49.74$, $r = 0.999$ ($p < 0.001$) が求められた。この2つの回帰線の重量の隔たりは体脂肪量を表しており、またべき乗値が活性組織量の場合よりも体重の場合に大であったことは体脂肪量の蓄積が成長に伴って増大することを示唆していた。体長と体重との間の回帰式を

$(BW/BL^{\alpha}) \times 10^3 = \text{constant value}$ と置き、べき乗値 α を変化させ、体脂肪量や魚体内各部脂肪量と相関性が極大を呈するべき乗値を検索した。その結果は、体脂肪量2.823, 筋肉部脂肪量2.548, 内臓部脂肪量2.775, 背部普通筋脂肪量2.916であった。体脂肪量の2.823は体長と活性組織量との間のべき乗値2.819に極めて近似し、筋肉部、内臓部、背部普通筋の脂肪量のいずれの場合も $p < 0.001$ で有意に高い相関性を示した。従って、この $(BW/BL^{2.823}) \times 10^3$ の体格指数は、体脂肪量をもとより魚体内各部の脂肪量の多寡をも極めてよく反映していると結論し、この体格指数を T. M. Index と命名した。そして、この体格指数から体脂肪量を推定する式 $\text{Body fat content (g/100g)} = 0.581 \times \text{T. M. Index} - 22.03$ を提示し、さらに体長と体重から体脂肪量が推定できる図も提示した。

以上より、養殖マダイにおける成長に伴う脂肪の蓄積や消費の動向が魚体全体はもとより魚体内各部で明らかにされ、またその脂肪の動向を推定できる2種の体格指数、即ち魚体密度および T. M. Index も提示した。これらの活用によって、養殖マダイの成長に伴う脂肪の栄養生理学的な研究において同一魚体で追跡することが可能となり、また養殖業者において改善が急務である養殖マダイの脂の乗り過ぎの課題の解決にも資する点多大であると考えらる。

論文審査の結果の要旨

矢野治江氏は活水女子短期大学家政科食物課程を昭和34年3月、同短期大学専攻科を昭和35年3月に卒業後、昭和35年4月より栄養士として勤務、昭和46年4月より香蘭女子短期大学家政科講師、昭和56年4月同短期大学助教授、平成2年4月より同短期大学教授として現在に至っている。

同氏はその間、昭和63年4月長崎大学水産学部研究生として入学、平成6年3月に同大学水産学部研究生を修了している。同上研究生として入学以降これまで、養殖マダイの肉質改善に関する研究に従事し、その成果を、平成12年11月に、主論文「養殖マダイにおける成長に伴う筋肉部、内臓部及び全魚体中の脂肪量の動向とそれらを推定する体格指数に関する研究」と題する論文にまとめ、参考論文6編 (すべて審査付き) を添え長崎大学大学院海洋生産科学研究科に博士 (学術) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は平成12年12月の定例委員会にこれを付議し、同氏の研究歴と論文内容についての資格審査委員会の報告を受け、論文提出の資格ありと認め、下記のとおり審査委員会委員を選定した。

審査委員会は主査を中心に、論文内容について慎重な審議を行うと共に、公開論文発表会における発表と

英語，ドイツ語の能力判定試験と専門分野に関する口頭による最終試験を行い，論文審査および最終試験の結果を，平成13年 2 月15日の研究科委員会に報告した。

提出論文は，養殖マダイが天然マダイに比較して脂が乗り過ぎる点に着目し，養殖マダイの成長に伴う魚体内各部及び魚体全体の脂肪量の動向を栄養生理学的に明らかにし，マダイの体脂肪量を活魚の状態で推定可能な体格指数を提唱している。

主論文ではまず，養殖マダイでこれまで汎用されてきた体格指数である肥満度の大小が養殖マダイの体構成成分のいずれの多寡を反映するかについて検討し，肥満度は内臓部と筋肉部，筋実質重量及び内臓部脂肪量とは相関を示すが，マダイの食味に影響の強い筋肉部脂肪および魚体全体の脂肪量のいずれをも反映しないことを明らかにしている。

次に，養殖マダイの海面養殖時の成長に伴う魚体内各部脂肪量の変化を経月的に測定し，養殖マダイにおける体脂肪蓄積の挙動を季節的に明らかにするとともに体構成成分間の関係を検討し，内臓部への脂肪蓄積の最大限界値を推定し，その限界値以上の体脂肪の蓄積は筋肉部に行われると述べ，筋肉部へ一旦蓄積された脂肪を低減することは困難であることを述べている。

引き続いて，養殖マダイの体脂肪量多寡を活魚の状態で推定する体格指数について検討を行っている。この中で，魚体密度の測定と各体構成成分を測定し，魚体密度と体脂肪量とは有意な負の相関関係を呈し，その相関関係のばらつきには体構成成分から脂肪と水分を除いた除脂肪・除水分残余の密度が関係することを明らかにし，魚体密度による体脂肪量の推定には体タンパク質量の多少が影響すると述べている。

上記の研究結果をもとに，養殖マダイの体脂肪量を推定する体格指数の検討を行い，養殖マダイの標準体長（BL）と体重（BW）からみた体格と体脂肪量や魚体内各部脂肪量の測定値との関係を数値で解析し，求められた体格指数 $T. M. Index(BW/BL^{2.823}) \times 10^3$ は体脂肪量をはじめとし魚体内各部の脂肪量の多寡をよく反映すると結論している。さらに，マダイの体長と体重から体脂肪量を推定する計算式： $Body\ fat\ content(g/100g) = 0.581 \times T. M. Index - 22.03$ 及び養殖現場で漁業者がマダイの体格を測定するだけで簡便に体脂肪を推定可能な図を提示している。

以上のように，本論文は養殖マダイの成長に伴う体脂肪や各栄養素成分の挙動を栄養生理学的に明らかにするとともに，この研究分野における貴重な知見を得ている。さらに，提示した体格指数（T. M. Index）は水産養殖の分野で有用で極めて意義深いものである。これらのことより，海洋生産科学研究科委員会は，本論文が海洋生産科学の進歩に大きく貢献するものと認

め，博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	槌 本 六 良
	副 査	教 授	野 口 玉 雄
	副 査	教 授	吉 越 一 馬
	副 査	教 授	岩 尾 正 倫
	副 査	助教授	橘 勝 康

松 原 保 仁

（香川県）昭和41年11月 7 日生

授与年月日 平成13年 2 月15日

主 論 文 細菌 *Corynebacterium* sp. ALY - 1 株が産生する菌体外ポリグルロン酸リアーゼに関する研究

Studies on Extracellular Polygluronate Lyase from *Corynebacterium* sp. ALY - 1 Strain

論文内容の要旨

背景と目的

アルギン酸は褐藻類に広く分布する高分子の多糖である。アルギン酸水溶液が高い粘性を示すこと，カルシウムの添加によりゲル化する性質から食品，繊維，印刷，医療・歯科材料および化粧品などの分野で広く利用されている。一方，アルギン酸を酵素により分解して低分子化することにより，新たな食品素材としての用途開発や生理機能を解明する試みがされている。本研究では，アルギン酸リアーゼ産生能を有する細菌を分離し，その酵素の性質，遺伝子の取得等について検討し，アルギン酸オリゴ糖の製造に利用するとともにアルギン酸オリゴ糖の植物に対する生理機能を解明することを目的とした。

第 2 章では，酵素の性質について明らかにした。すなわち，佃煮工場の排水処理施設より菌体外にアルギン酸分解活性を有する細菌を分離した。本菌は同定の結果，*Corynebacterium* 属に分類され，*Corynebacterium* sp. ALY - 1 株と命名した。ALY - 1 株の培養上清液から各種のクロマト処理を行い，電気泳動的に単一にまで酵素を精製し，その諸性質を明らかにした。本酵素の分子量はゲル濾過および SDS-PAGE から 27,000 の単量体蛋白質と推定され，アミノ酸分析による分子量は 28,644 と推定された。また，等電点は 7.3 であった。本酵素の最適反応条件は pH7.0 55℃ であった。MnCl₂ や NiCl₂ の様な二価の金属イオンの共存下で酵素活性が上昇する傾向を示し，EDTA の共存下で活性が著しく阻害された。本酵素をアルギン酸に作用させると溶液の急激な粘度低下をもたらし，同時に還元糖が遊離した。さらに，アルギン酸から調製したポリグルロン酸を特異的に分解することから，本酵素はエンド

型のポリグルロン酸リアーゼ (EC 4 .2 .2 .11) であることが明らかとなった。次に円偏光二色性を指標として本酵素の二次構造を推定した結果、本酵素の主体は β -sheet 構造であることが明らかとなった。また、本酵素は 6 M 尿素の存在下で二次構造の変化にともない活性を失うが、透析により変性剤を除去することにより本来の二次構造が回復し、活性の回復することが明らかとなった。

第3章では本酵素のサブサイト構造について明らかにした。すなわち、*Corynebacterium* sp. ALY - 1 株由来のポリグルロン酸リアーゼのグルロン酸オリゴ糖に対する作用を速度論的に解析するために、グルロン酸オリゴマーの調製を行った。アルギン酸から調製したポリグルロン酸を塩酸で加水分解し Bio-Gel P - 6 カラムにより 1 糖から 12 糖まで重合度別に分画し、脱塩処理したものを凍結乾燥し、酵素の基質試料とした。本酵素は見かけ上 3 糖および 4 糖のグルロン酸オリゴ糖に作用せず、5 糖以上のオリゴ糖に対して分解作用を示した。6 糖以上の基質に対する反応速度は重合度に関わらず一定であった。つまり、反応速度が基質の重合度に依存した。そこで、本酵素の基質に対する反応速度を詳細に検討し、サブサイト理論にて解析を行った。本酵素の分子活性 ($k_{cat}=V_{max}/E_0$) は 6 糖以上の基質において一定の値を示した。従って、本酵素のサブサイト構造はグルロン酸残基 6 個に相当するものと推定された。さらにグルロン酸オリゴ糖の酵素分解物を HPLC 分析することにより、本酵素の触媒部位は非還元末端側より 2 番目と 3 番目の間に存在するものと推定された。また、高濃度の酵素を用いて 3 および 4 糖のグルロン酸オリゴ糖に作用させた場合、4 糖は分解されたが 3 糖は分解されなかった。また、本酵素による転移反応は認められなかった。

第4章では、本酵素の活性に関与するアミノ酸を明らかにした。そこで、本酵素のグルロン酸リアーゼ活性に関与するアミノ酸を特定するために、化学修飾法により検討した。本酵素は 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸、N-プロモサクシニミド、ジエチルピロカーボネートにより活性が 50% 以下に低下した。よって、リジン、トリプトファン、ヒスチジンが活性に関与していることが推察された。リジンの 2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸処理では、活性に関与するリジンの残基数を特定できなかった。一方、トリプトファン、ヒスチジンを N-プロモサクシニミド、ジエチルピロカーボネートで処理し、分光的手法で測定した結果、本酵素中の 1 残基のトリプトファン、2 残基のヒスチジンがそれぞれ失われたときに失活することが、明らかとなった。リジン、トリプトファン、ヒスチジンが活性に関与することは、既知のアル

ギン酸リアーゼと類似の傾向を示した。また、トリプトファン、ヒスチジンが本酵素の基質結合部位に存在しているかを推定するため、0.2% の基質と予め酵素-基質複合体を形成させた後に N-プロモサクシニミド、ジエチルピロカーボネートとの反応を行った。その結果、活性に必須なトリプトファンは本酵素の基質結合部位付近に存在し、ヒスチジンは基質が結合しても覆われない位置に存在していることが示唆された。

第5章では、本酵素の一次構造の解明と酵素の大量調製を試みるために、ポリグルロン酸リアーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌による発現を検討した。*Corynebacterium* sp. ALY - 1 株由来のポリグルロン酸リアーゼ遺伝子 (aly PG) のクローニングを行った。aly PG は 768 塩基対よりなり、32 アミノ酸からなるシグナルペプチドと 224 アミノ酸からなる成熟タンパク質をコードしていた。本酵素 1 モルあたり、4 個の Cys 残基が存在し、Cys - 4 と Cys - 51, Cys - 200 と Cys - 206 が SS 結合を形成していた。アミノ酸配列に関してホモロジー検索を行った結果、唯一 *Klebsiella pneumoniae*, subsp. *aerogenes* 由来のポリグルロン酸リアーゼと 29% の相同性が認められた。また、それらのアミノ酸配列中に保存性の高い配列が 2 箇所認められた。さらに、aly PG を発現ベクター pET11a に連結し、大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換したところ、大腸菌においてポリグルロン酸リアーゼ活性を有するタンパク質が生産された。

第6章では、本酵素を用いてアルギン酸オリゴ糖を調製し、アルギン酸オリゴ糖の植物に対する生理活性作用について明らかにし、本酵素の応用について述べた。すなわち、*Corynebacterium* sp. ALY - 1 株由来のポリグルロン酸リアーゼを用いて、アルギン酸オリゴ糖の製造とアルギン酸オリゴ糖の植物に対する生理活性を検討した。アルギン酸ナトリウムの酵素分解物から限外ろ過膜を用いてアルギン酸オリゴ糖を分離精製した。分離実験は、膜間差圧 0.15 MPa、流速 0.6 m/s の条件でクロスフロー方式により行い、未分解アルギン酸はほぼ完全に分離できた。得られたアルギン酸オリゴ糖は 2 ~ 8 糖の混合物であり、200 ~ 3000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲でレタス幼根に対して生育促進作用 (約 2 倍) を有することが認められた。オリゴ糖混合物をゲルろ過法によって重合度ごとに分画し、生育促進に対する重合度の効果を検討したところ、3, 4, 5 および 6 糖に活性が認められた。以上のことから、*Corynebacterium* sp. ALY - 1 株由来のポリグルロン酸リアーゼがアルギン酸オリゴ糖の製造に利用可能であり、酵素反応によって得られたアルギン酸オリゴ糖がレタス幼根を伸長させる効果を有していることを明らかにした。

これらの研究成果は、特異な活性を有するアルギン酸分解酵素の構造および酵素機能発現ならびに水中細菌による海藻成分の生理活性物質への変換に新たな知見を与えるものであり、海洋生物の生化学的研究分野に貢献できるものである。

論文審査の結果の要旨

松原保仁氏は平成元年3月香川大学農学部食品学科を卒業後、香川県庁に入庁し、香川県発酵食品試験場を経て香川県食品試験場に勤務、平成12年4月より同試験場は香川県産業技術センター食品研究所と名称変更し、同時に主任研究員となり、現在に至っている。同氏は香川県に入庁以降、加工食品の品質、活用に関する研究に従事した。この間の研究成果を基に主論文「細菌 *Corynebacterium* sp. ALY - 1 株が産生する菌体外ポリグルコネートリアーゼに関する研究」として参考論文4編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に博士（水産学）の学位の申請をした。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は平成12年12月21日の定例委員会において、申請者の研究歴、論文内容の要旨についての資格審査委員会の報告を受け、論文提出の資格ありと判定し、下記の審査委員会委員を選定した。

審査委員会は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を行うとともに、口頭による最終試験と英語、ドイツ語の能力判定試験を実施し、それらの結果を平成13年2月15日の定例研究科委員会に報告した。

提出論文は、知見の少ない本酵素の諸性状を明らかにすることを主眼とするもののコンブ加工副産物として得られるアルギン酸の酵素分解産物の活用をはかるため、同酵素分解産物の生理活性をも一部明らかにしたものである。

第1章ではアルギン酸及び同分解酵素研究の歴史的背景、本研究の目的、意義、等を述べている。

第2章では酵素産生細菌の同定や酵素の精製を含む一般的性質を明らかにした。コンブ加工工場排水中からのアルギン酸分解酵素産生細菌のスクリーニングと菌株の同定を行い、この細菌を、アルギン酸存在下でのみアルギン酸分解酵素を産生する新奇なアルギン酸分解菌 *Corynebacterium* sp. ALY - 1 株とした。次いで細菌の培養と酵素の産生条件を種々検討し、酵素産生の多量培養に成功した。細菌培養液から他段階精製で分子量約27K、等電点73、最適反応 pH7.0を持つ純粋酵素を得た。本酵素は $MnCl_2$ や $NiCl_2$ が活性化され、線状アルギン酸分子内部のグルロン酸部位を脱離分解するエンド型グルロン酸リアーゼであり、タンパク質の二次構造は β 構造であることを明らかにした。また、タンパク質変性剤による分子構造の変性回復も容

易であった。

第3章は本酵素の活性中心の大きさ、つまり、活性中心サブサイト構造について述べている。この知見を得るために、重合度の異なるグルロン酸オリゴマーを調製し、これらを基質とした酵素反応のキネチックス解析を行い、本酵素がグルロン酸6残基に相当する活性中心の大きさを持つことを明らかにした。これは他の細菌由来の酵素との比較から、細菌酵素に特徴的と考えられる。

第4章では酵素反応に必要な活性アミノ酸側鎖を化学修飾により判別したが、リジン、トリプトファン、ヒスチジンが活性発現に重要であることを見出した。これらのアミノ酸側鎖は反応機構を把握するうえで妥当なものである。

第5章では本酵素のアミノ酸配列の解明と酵素の多量生産を行うため、本菌のポリグルロン酸リアーゼ遺伝子のクローニングと核酸塩基の配列解析及び発現ベクターとして大腸菌 BL21 (DE3) を用いた形質転換を行った。これらより、本酵素の構造遺伝子と224個からなるアミノ酸配列（シスチン結合を含む）が解り、また、大腸菌での生産の可能性が得られた。

第6章では本酵素を利用したアルギン酸オリゴ糖製造法の検討を行い、製造法を確立するとともにオリゴ糖の生理活性を調べ、レタス幼根伸長促進作用を認めた。これは香川県の主要農産物増産に路を拓くものである。

以上の研究成果は、特異な活性を有するアルギン酸分解酵素の構造・機能発現の解明や水中細菌による海藻成分の生理活性物質への変換に新たな知見をもたらした、海洋生物の生化学的研究分野の進歩に貢献できるものであることを認め、博士（水産学）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主査	教授	村松	毅
	副査	教授	森井	秀昭
	副査	教授	藤田	雄二
	副査	教授	原	研治

小 林 武 史

(神奈川県) 昭和43年3月1日生

授与年月日 平成13年2月15日

主 論 文 自動車排ガス浄化触媒の脱硝性能改良に関する研究

Improvement of de-NO_x Performance of Auto-exhaust Catalysts

論文内容の要旨

自動車排ガスによる環境汚染は深刻化しており、その浄化は緊急かつ重要な課題である。また、それを受けて排出量の規制が将来計画も含めて強化されており、

それに対応できる後処理触媒技術の開発が必須である。さらに、地球温暖化の原因物質である二酸化炭素の排出量を低減する、即ち燃費を向上させるために導入が始まっている空気過剰領域で運転するリーンバーン車の排ガス浄化に対しては、既存の後処理触媒技術では対応に限界があり、新しい方法論と材料の開発が求められている。このような状況下において、本論文は、自動車から排出される排気ガスの浄化、特に近年の規制強化の中心となっている窒素酸化物 (NO_x) の排出を低減することを目的として、それぞれ異なった条件で用いられる三元触媒、選択還元型 NO_x 浄化触媒、吸収還元型 NO_x 浄化触媒の性能を改良するとともに、性能発現や活性向上のメカニズム、反応経路について検討したものである。

第1章「緒言」では、本研究の背景として、ガソリンを燃料とするエンジンからの排気ガス中に含まれる有害物質の排出規制と、その規制の理由となっている汚染物質の人体・環境への影響についてまとめ、自動車排気ガス浄化用触媒の性能向上の必要性について述べた。特に、本研究の対象である NO_x の排出量規制が中心的に強化されている理由を明確に示し、本研究の意義、目的を述べた。

第2章「三元触媒における脱硝性能の改良」では、従来の三元触媒において、稀少資源、高価でありながらその高い脱硝性能のために必須に用いられてきた Rh の使用量の削減について検討した。Pd を主活性成分とした触媒において、アルカリ土類金属などの塩基性物質を助触媒成分として添加すると、触媒の脱硝性能が著しく向上すること、担体であるアルミナに La を事前に添加して安定化させることによりさらに性能が向上することを見出し、Rh を含まない三元触媒の可能性を明らかにした。助触媒成分の効果は電気陰性度の高いものほど大きいことを見出し、助触媒成分から Pd への電子供与の結果として活性 Pd 種の凝集を抑制すること、および活性 Pd 種が Rh に類似した触媒特性を示すことが促進効果発現の理由と推測した。また、Rh 含有触媒においては、組成を最適化させた $\text{CeO}_2 / \text{ZrO}_2$ 複合系酸素貯蔵物質を添加することで Rh 種の酸化による失活を抑制でき、結果として Rh 使用量の低減が可能であることを明らかにした。

第3章「Ir 系選択還元触媒における脱硝性能の改善」では、酸素を多量に含む希薄燃焼エンジン排気ガス中の NO_x を還元、浄化する選択還元触媒について検討した。活性金属や担体の種類について検討し、リーンバーン排ガス処理に要求される $350 \sim 500^\circ\text{C}$ の温度で Ir を比表面積の小さい SiC に担持した触媒 (Ir/SiC) が高い脱硝性能を示し、その活性は水素で予備還元することにより大幅に向上することを見出した。金属状

態の Ir が反応活性点であること、反応に関与する NO_x 種は NO_2 であること、共存酸素は NO を NO_2 に酸化することにより反応を促進すること、耐久処理による劣化は Ir 粒子表面が酸化状態になること、低比表面積担体上では Ir の粒子径が大きく、それが還元状態の安定化をもたらしていることを明らかにした。さらに、反応機構としては、 NO_2 と Ir 金属との反応による NO_x の還元と Ir の酸化のステップと、酸化された Ir を炭化水素、CO、 H_2 が還元するステップからなる酸化 - 還元サイクル機構の可能性が高いことを示した。

第4章「 NO_x 吸収還元型触媒の NO_x 吸収過程の解明と性能改善」では、リーンエンジン排ガス用の NO_x 吸収還元型触媒について検討した。 NO_x 吸収反応過程を熱力学計算により検討し、 NO_x 吸収性能は吸収材の塩基性が強いほど高いこと、吸収材は燃料過剰 (リッチ) 領域では排気ガス中の二酸化炭素と反応して炭酸塩を形成すること、燃料希薄 (リーン) 領域では貴金属の酸化触媒作用により生成した NO_2 と反応して硝酸塩として NO_x を吸収すること、反応過程を構成する各素反応はほぼ平衡に達しているとして取り扱えることを示し、それらを実験的に確認した。また、優れた NO_x 吸収還元型触媒には、高い吸収容量を持つ NO_x 吸収材と高い NO 酸化活性をもつ貴金属の組み合わせが必須であるが、それらの量と配置のバランスが重要であることを明らかにし、触媒設計指針を確立した。さらに劣化要因について検討し、貴金属は熱的に、 NO_x 吸収材は SO_2 により劣化することを明らかにし、これら相反する劣化要因を回避するために酸素貯蔵材を組み込んだ三機能性触媒を考案し、統計的手法を用いて構造の最適化に成功した。

第5章「本研究の総括」では、各章で得られた結果をまとめた。

論文審査の結果の要旨

小林武史氏は、平成4年3月東京理科大学理学部第一部応用化学科を卒業し、同年4月エヌ・イー・ケムキャット株式会社に入社し、現在に至っている。

同氏は、エヌ・イー・ケムキャット株式会社に入社後、一貫して自動車排気ガス浄化用触媒の研究開発業務に従事し、現在までに8編の論文を発表している。その中から、窒素酸化物の除去性能の改良に関する部分を、主論文「自動車排気ガス浄化触媒の脱硝性能改良に関する研究」として完成させ、参考論文7編を添えて長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会に論文提出による博士 (工学) の学位を申請した。

長崎大学大学院海洋生産科学研究科委員会は、平成12年12月21日の定例委員会において、資格審査委員会から報告された申請者の経歴、論文内容等に関する検討・審議結果および論文内容の要旨を検討し、本論文

を受理して差し支えないと認め、下記の審査委員会委員を選定した。委員は主査を中心に論文内容について慎重に審議し、公開論文発表会を行わせるとともに口頭による関連学術分野の試験と外国語（英語、ドイツ語）の能力判定を行い、それらの結果を平成13年 2 月 15日の研究科委員会に報告した。

自動車排ガスによる環境汚染は深刻化しており、その浄化は緊急かつ重要な社会的課題である。主論文は、自動車から排出される排気ガスの浄化、特に近年の規制強化の中心となっている窒素酸化物（ NO_x ）の排出を低減することを目的として、それぞれ異なった条件で用いられかつ原理の異なる三元触媒、選択還元型 NO_x 浄化触媒、吸収還元型 NO_x 浄化触媒の性能を改良するとともに、性能発現や活性向上のメカニズム、反応経路などについて検討したものである。

三元触媒については、Pd を主活性成分とした触媒において、アルカリ土類金属などの塩基性物質を助触媒成分として添加すると触媒の脱硝性能が著しく向上すること、担体であるアルミナに La を事前に添加して安定化させることによりさらに性能が向上することを見出し、新規な非 Rh 三元触媒の可能性を明らかにした。また、促進効果は助触媒成分から Pd への電子供与の結果として活性 Pd 種の電子状態が変化することと凝集が抑制されることに起因することを示した。さらに、Rh 含有触媒においては、組成を最適化させた $\text{CeO}_2 / \text{ZrO}_2$ 複合系酸素貯蔵物質を添加することで Rh 種の酸化による失活を抑制でき、結果として稀少資源、高価である Rh の使用量の低減が可能であることを明らかにした。

選択還元型 NO_x 浄化触媒の検討においては、リーンバーン排ガス処理に要求される $350 \sim 500^\circ\text{C}$ の温度で高活性な SiC 担持 Ir 触媒を開発し、金属状態の Ir が活性点であること、耐久処理による劣化は Ir 粒子表面が酸化状態になること、低比表面積の SiC 担体上では Ir の粒子径が大きく、それが還元状態の安定化をもたらしていることを明らかにした。また、NO の酸化により生成する NO_2 が反応に関与することなどを示し、酸化 - 還元サイクル反応機構を提案した。

吸収還元型 NO_x 浄化触媒では、 NO_x 吸収性能は吸収材の塩基性が強いほど高いこと、吸収材は燃料過剰領域では二酸化炭素と反応して炭酸塩を形成すること、燃料希薄領域では貴金属の酸化触媒作用により生成した NO_2 と反応して硝酸塩として NO_x を吸収することなどを熱力学計算により示し、それらを実験的に確認した。高性能な吸収還元型 NO_x 浄化触媒には、高い吸収容量を持つ NO_x 吸収材と高い NO 酸化活性をもつ貴金属触媒の量と配置のバランスが重要であること、劣化の抑制のためには酸素貯蔵材の混合が不可欠であ

ることを明らかにした。さらに、統計的手法を用いて酸素貯蔵材の性能と配置を最適化し、活性と安定性を兼ね備えた吸収還元型 NO_x 浄化触媒の設計指針を確立した。

以上のように、本論文では実用化を志向した自動車用高性能脱硝触媒の開発・改良を行うとともに、性能発現や活性向上の原因究明、反応機構の解明等を通して高性能触媒の設計指針を提示した。海洋生産科学研究科委員会は、本論文は触媒化学ならびに環境保全技術の進展に貢献するものと認め、博士（工学）の学位に値するものとして合格と判定した。

審査担当者	主 査	教 授	寺 岡 靖 剛
	副 査	教 授	石 田 正 弘
	副 査	教 授	江 頭 誠
	副 査	教 授	松 本 泰 重