

2014. 4

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人
高知大学学報

高知大学学位授与記録第六十七号

法人企画課広報戦略室発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

*
*
*
*
*
*

高知大学学報

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第151号	畑田 早苗	Impaired musical ability in people with schizophrenia (統合失調症における音楽能力の障害)	1
甲医博第152号	長谷川 俊之	Evaluation of Ki-67 index in EUS-FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors (膵神経内分泌腫瘍に対する悪性度評価におけるEUS-FNAの有用性)	6
甲総医博第17号	内山 伊代	Evaluating efficacy of bacteriophage therapy against <i>Staphylococcus aureus</i> infections using a silkworm larval infection model (カイコモデルを用いた黄色ブドウ球菌感染症に対するバクテリオファージ療法の有効性検討)	11
甲総医博第18号	Tony Shing Chau Li	Efficient siRNA delivery and tumor accumulation mediated by ionically cross-linked folic acid-poly(ethylene glycol)-chitosan oligosaccharide lactate nanoparticles: For the potential targeted ovarian cancer gene therapy (イオン結合で架橋した葉酸-ポリエチレングリコール-乳酸キトサンオリゴ糖ナノ粒子を介する効率的なsiRNAの送達と腫瘍への集積：卵巣がんの標的遺伝子治療を目指して)	17
甲総医博第19号	Locatelli Fabricio Miguel	The isolation and molecular characterization of <i>Leishmania</i> spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina (アルゼンチン北西部の新大陸型皮膚リーシュマニア症患者から採取されたリーシュマニア原虫の単離と分子系統学的解析)	22

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲総医博第20号	野村 晴香	Validity and Reliability of the Japanese version of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire (日本語版Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire の妥当性と信頼性に関する検討)	27
甲総医博第21号	石原 正行	Sestrin2 and BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein3) regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury (Sestrin2とBNIP3は急性腎障害時の腎尿細管細胞においてオートファジーとミトファジーを調節する)	34
甲総医博第22号	阿漕 孝治	Nociceptive phenotype of dorsal root ganglia neurons innervating the subchondral bone in rat knee joints (ラット膝における軟骨下骨支配後根神経節ニューロンの侵害受容性フェノタイプ)	39
乙総医博第27号	北添 紀子	The Autism-Spectrum Quotient in university students: Pattern of changes in its scores and associated factors (大学生を対象としたthe Autism-Spectrum Quotient (AQ) : AQの変化の可能性と関連要因)	44
乙総医博第28号	Xiao JingYing	Molecular characterization and expression of cDNA-derived phosphagen kinase of <i>Clonorchis sinensis</i> from China, and development of a possible drug candidate against clonorchiasis. 1) Molecular Cloning and Characterization of Taurocyamine Kinase from <i>Clonorchis sinensis</i> : A Candidate Chemotherapeutic Target. 2) Genetic variation among <i>Clonorchis sinensis</i> isolates from different hosts and geographical locations revealed by sequence analysis of mitochondrial and ribosomal DNA regions. (中国における肝吸虫症の創薬開発にむけたフォスファゲンキナーゼの分子生物学的研究) 1) (肝吸虫のタウロシアミンキナーゼのクローニングと遺伝子構造解析 (化学療法ターゲットの候補)) 2) (ミトコンドリアDNAからみた中国大陸における肝吸虫の遺伝的変異)	51

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総医博第29号	Blanca Rosales Jarilla	<p>Molecular biological studies on taurocyamine kinase of <i>Paragonimus westermani</i>.</p> <p>1) Gene structure of the two-domain taurocyamine kinase from <i>Paragonimus westermani</i>: Evidence for a distinct lineage of trematode phosphagen kinases.</p> <p>2) The role of Y84 on domain 1 and Y87 on domain 2 of <i>Paragonimus westermani</i> taurocyamine kinase: Insights on the substrate binding (ウエステルマン肺吸虫タウロシアミンキナーゼ遺伝子の分子生物学的研究)</p> <p>1) (ウエステルマン肺吸虫の2ドメイン型タウロシアミンキナーゼの遺伝子構造 (吸虫類フォスファージンキナーゼの特異性))</p> <p>2) (ウエステルマン肺吸虫タウロシアミンキナーゼ酵素の84番 (ドメイン1) 並びに87番 (ドメイン2) のチロシンの役割 (吸虫類フォスファージンキナーゼの基質結合メカニズムの解析))</p>	56

氏名(本籍)	畑田 早苗 (岡山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第151号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年2月18日
学位論文題目	Impaired musical ability in people with schizophrenia (統合失調症における音楽能力の障害)
発表誌名	Journal of Psychiatry and Neuroscience(in press)
	審査委員
	主査 教授 梶 秀人
	副査 教授 古谷 博和
	副査 教授 上羽 哲也

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 畑田早苗

論文題目 Impaired musical ability in people with schizophrenia

(統合失調症における音楽能力の障害)

(論文要旨)

序論

音楽は、言語と同じく人間のすべての文化に普遍的に存在し、人に特徴的な能力のひとつである。また、言語、感情、認知機能やコミュニケーションと関連し、対人関係を形成するなど心理、社会的にも重要な役割を果たしている。統合失調症患者に音の認知や処理における機能障害が認められるとともに、音楽療法などの臨床場面での明らかな音楽能力の低下が認められていたが、音楽能力の評価はほとんど関心をもたれていなかった。本研究では、まず統合失調症の音楽能力の評価を行なった。さらに精神症状評価と認知機能検査を行ない、音楽、精神症状、認知機能の間の関連性を評価した。

方法

対象者は、性別、年齢をコントロールした30代～60代の58名の統合失調症患者、50名の健常者であり、それぞれに同意をして研究に参加した。統合失調症患者は、高知県内の3つの精神病院の外来もしくは入院患者であり、ICD-10で統合失調症、統合失調感情障害と診断された患者であった。音楽能力には Montreal Battery of Evaluation of Amusia (MBEA)、精神症状評価には Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS)、認知機能の評価には、Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia (BACS)を使用した。音楽能力の評価に用いた MBEA は、Scale、Contour、Interval、Rhythm、Meter、Memory の6つのサブスケールから成り、ピアノ音で作られたフレーズを提示し測定するものである。Scale は音階を、Contour は音調を、Interval は音程を Rhythm はリズムを検査するものであった。Meter は、音楽フレーズがマーチかワルツかを区別する検査である。Memory は、提示されたフレーズがすでに提示されたか記憶しているかを評価するサブスケールであった。人口統計学的変数の正規分布に従う変数は、Student-t 検定で、正規分布しない変数は Shapiro-Wilk テスト、

Mann-Whitney U 検定、Kendall' s tau 検定で評価された。精神症状の重症度と認知機能と音楽能力の関連には媒介分析を用いて分析した。



結果

統合失調症患者の MBEA グローバルスコア(71.1%)は、コントロール群 (88.4%) に比べて有意に低下を示した($p<0.001$)。コントロール群においては、58人のうちの3人 (5.2%)、統合失調症群では50人のうちの31人 (62%) は、失音楽症として評価された。次に女性の MBEA グローバルスコアは、統合失調症患者群、コントロール群ともに男性より高かった ($p<0.05$)。統合失調症患者群とコントロール群ともに、MBEA グローバルスコアは、教育年数、音楽教育期間に有意に相関していた($p<0.05$)。精神症状が安定していれば、MBEA スコアも高くなった。さらに MBEA の結果は、BACS コンポジットスコア($r=0.645$, $p<0.001$)、陰性症状スコア($r=-0.504$, $p<0.001$)と強く相関していた。MBEA のすべてのサブテストにおいて認知機能との有意な相関がみられた。媒介分析により、精神症状の重症度、認知機能と音楽能力障害の関係を評価した。PANSS 陽性症状スコアは、音楽能力に対して直接的にも間接的にも影響を及ぼさなかった。対照的に、PANSS 陰性症状スコアは、BACS コンポジットスコアによって媒介された音楽能力障害に、直接的にも間接的にも有意な影響を及ぼした。間接的な効果は、全効果の約43%を占めた。

考察および結論

MBEA の全てのサブテストにおいて統合失調症患者の音楽能力は有意に低下しており、統合失調症患者の音楽能力に障害があることが示された。音楽能力障害が認知機能障害や陰性症状とどのように関係しているかを分析するために行った媒介分析の結果、音楽能力障害は、陰性症状に直接的に影響されていることが明らかとなった。さらに音楽能力の低下は、陰性症状から認知機能障害を通じて間接的に影響されていることも明らかとなった。音楽能力の障害との関係性を調べることによって、統合失調症患者における陰性症状と認知機能障害は、音楽能力低下と共有した生物学的機序を有する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

	氏名	畑田 早苗
審査委員	主査氏名	梶 秀人 
	副査氏名	古谷 博和 
	副査氏名	上羽 哲也 印

題目

Impaired musical ability in people with schizophrenia

(統合失調症における音楽能力の障害)

著者

Sanae Hatada , Ken Sawada, Masanori Akamatsu, Erina Doi, Masayoshi Minese, Motoshi Yamashita, Allen E. Thornton, William G Honer, and Shimpei Inoue

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月

Journal of Psychiatry and Neuroscience
(in press)

要旨

音楽は、言語と同様に人間固有の高次脳機能であり、注意、学習、コミュニケーション、記憶など、様々な認知機能に影響を与える。かつて音楽能力があった者が疾病、外傷など何らかの原因によってその能力を失った場合を後天的失音楽症という。また近年になると、音楽能力の先天的な障害(いわゆる音痴)も失音楽症に含まれるようになり、先天性失音楽症という用語も提唱され、盛んに研究が行われている。これらの失音楽症は失音楽症の標準検査法である Montreal Battery of Evaluation of Amusia (MBEA) によって判定され得る。音楽能力と認知機能との関連性が神経疾患患者で検討されてきた。アルツハイマー病患者では音楽演奏は他の精神活動より高いレベルで保持されているとか、中脳動脈領域の梗塞が認知機能障害とともに後天的失音楽症を引き起こすとか、脳梗塞を発症して3ヶ月には、音楽能力障害の改善が言語学習、視空間知覚、注意の改善とともに認められるなど、後天的失音楽症患者の音楽能力が多彩な認知機能と関連していることが示唆されてきた。このように神経障害と音楽能力との関連性については知見が集積されているものの、重度の精神障害と音楽能力と

の関連性については未だ不明な点が多い。

統合失調症の陰性症状は認知機能障害との間に複雑な関連性を有しているが、陽性症状との間には関連性が乏しいとの報告がある。一方で、陰性症状が認められても認知機能は高いレベルで保持されているというケースも報告されている。統合失調症患者の音楽に対する脳反応において、P50、P300、ミスマッチ陰性成分などの聴覚事象関連電位のほか、聴覚情報処理や音高、強度の知覚にも異常が認められている。

申請者らは、統合失調症患者の音楽能力を解析することによって統合失調症の症状と脳機能の重要な局面を関連づけることができると考えた。そこで申請者らは、統合失調症患者の音楽能力をMBEAで評価し、その音楽能力と性、年齢、教育歴、音楽教育歴、統合失調症の症状との関連性を検討した。さらに、統合失調症の症状から音楽能力障害への経路、特に統合失調症の陰性症状から認知機能障害を介した音楽能力障害への因果経路に着目し媒介分析を行った。

対象者は、WHO国際疾病分類第10版(ICD-10)により統合失調症あるいは統合失調感情障害と診断された患者50名と健常者58名であった。精神症状の評価には陽性・陰性症状評価尺度であるPositive and Negative Syndrome Scale(PANSS)を用い、認知機能の評価にはBrief Assessment of Cognition in Schizophrenia(BACS)を用いた。音楽能力評価に用いたMBEAはScale、Contour、Interval、Rhythm、Meter、Memoryの6つのサブテストからなり、ピアノ音で作られたフレーズを提示し、各要素の能力を測定するものである。Scaleは音階を、Contourは音調を、Intervalは音程を、Rhythmはリズムの検査であり、各要素に特異的なフレーズを2回提示し、それらが同じか異なるかを問うものである。Meterはマーチかワルツかを識別するものである。Memoryは提示されたフレーズがすでに提示されていたかどうかという記憶を評価するものである。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 統合失調症患者群のMBEAグローバルスコアはコントロール群より低値を示した。
- 2) 両群ともに、MBEAグローバルスコアは、教育歴、音楽教育歴と相関し、また女性が男性より高値を示した。
- 3) MBEAグローバルスコアは、認知機能のBACSコンポジットスコア、PANSS陰性症状スコアと強く相関していた。MBEAグローバルスコアはまた、BACSのすべての認知機能とも相関していた。
- 4) 媒介分析により、統合失調症の陰性症状は音楽能力に直接的に影響するとともに、認知機能障害を介して間接的にも影響することが明らかとなった。間接的な効果は、全効果の約43%を占めた。一方、統合失調症の陽性症状は音楽能力に直接的にも間接的にも影響を及ぼさなかった。

以上の成績は、統合失調症患者の音楽能力に障害があること、この音楽能力障害の因果経路として陰性症状からの直接経路と認知機能障害を介した間接経路が存在することを明らかにしている。また、統合失調症の陰性症状、認知機能障害、音楽能力障害には、ドーパミン、神経可塑性の異常といった共通の生物学的機序が働いている可能性を示唆している。

以上のように、本論文は統合失調症の病態解明のみならず予防・治療の向上に大きく寄与することが期待される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士(医学)に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	長谷川 俊之 (岡山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第152号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年2月28日
学位論文題目	Evaluation of Ki-67 index in EUS-FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors (膵神経内分泌腫瘍に対する悪性度評価におけるEUS-FNAの有用性)
発表誌名	Endoscopy (in press)

審査委員	主査	教授	花崎	和弘
	副査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	小川	恭弘

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 長谷川俊之

論文題目

Usefulness of EUS-FNA for the assessment of malignancy of pancreatic neuroendocrine tumors (膵神経内分泌腫瘍に対する悪性度評価における EUS-FNA の有用性)

(論文要旨)

背景

膵神経内分泌腫瘍(PNETs)の悪性度評価は切除検体においてWHO2010によりKi67 index および核分裂数を測定することで規定されています。しかし、超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診(EUS-FNA)検体を用いた悪性度評価に関しては、いまだ十分な検討がなされておらず、その有用性は明らかではありません。

目的

本研究の目的は、EUS-FNA 検体と切除検体を用いた悪性度評価の結果を比較することにより、最適な EUS-FNA 検体の Ki67 index 測定法を明らかにすることです。なお、切除検体および EUS-FNA 検体の Ki67 index の測定には、デジタルスライドを作成し自動測定器を使用しました。

患者

この研究は、1998年3月~2011年5月までの期間に、PNETs と診断された連続した58例(切除40例、EUS-FNA41例)の患者を対象としました(28人男、30人女、年齢の中央値は54歳で範囲は23~81歳)。

主要測定 Main outcome measurements

1)切除検体38例(NEC2例を除く)での腫瘍内のKi67 indexのHeterogeneityの検討、2)切除検体とEUS-FNA検体の両者が得られた27例における、EUS-FNA検体と切除検体の悪性度評価一致率の比較検討、3)十分な検体が採取されたEUS-FNA検体30例における、WHO2010分類に基づいて分類したG1およびG2・NECの生存率の検討。

結果

1)切除検体でのKi67 indexの分散は、G1症例で 0.033 ± 0.036 であり、G2症例では 0.782 ± 0.623 であり、有意にG2症例の分散が高かった($p < 0.001$)。またG2症例において、腫瘍内でKi67 indexが2%以下の領域は $81.1\% \pm 16.9$ であった。2)EUS-FNA検体をMean Ki67 indexを用いて分類した場合、切除検体との悪性度評価の一致率は74.0%(20/27)、Highest Ki67 indexを用いて分類した場合は、一致率は77.7%(21/27)であった。不一致例は有意にFNA検体中の総腫瘍細胞数が少ない結果($p = 0.021$)であり、2000個未満の検体



量が少ない症例を除外すると一致率は90%(18/20)となった。3)十分なEUS-FNA検体が得られた30例では、Kaplan-Meierを用いた生存曲線はG1、G2、NECの間で有意に層別化され、5年生存率はG1/G2/NECそれぞれ100%/58.3%/0%であった。

結論

EUS-FNA検体におけるHighest Ki67 indexを用いた悪性度評価は切除検体の結果と高率に一致していました。また、EUS-FNA検体を用いたWHO分類上の生存曲線は有意差をもって層別化されており、EUS-FNA検体を用いた予後予測は有用であることが示唆されました。

但し悪性度を評価する上で、カウントできる総腫瘍細胞数が少数(2000個以下)である場合や、G2症例でのKi67 indexの高い不均一性と2%以下の領域が多く含まれることは、留意する必要があります。

論文審査の結果の要旨

	氏名	長谷川 俊之
審査委員	主査氏名	花崎 和弘 
	副査氏名	降幡 睦夫 
	副査氏名	小川 恭弘 印

題 目 Evaluation of Ki-67 index in EUS-FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors

(膵神経内分泌腫瘍に対する悪性度評価におけるEUS-FNAの有用性)

著 者 T. Hasegawa, K. Yamao, S. Hijioka, V. Bhatia, MD, N. Mizuno, K. Hara, H. Imaoka, Y. Niwa, M. Tajika, S. Kondo, T. Tanaka, Y. Shimizu, T. Kinoshita, T. Kohsaki, I. Nishimori, S. Iwasaki, T. Saibara, W. Hosoda, Y. Yatabe

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月

Endoscopy (in press)

要 旨

[研究背景と目的]

膵神経内分泌腫瘍(PNET)の悪性度評価はWHO2010により切除標本を用いたKi67 indexおよび核分裂数を測定することによって行われている。しかし、超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診(EUS-FNA)検体を用いた悪性度評価法は未だ確立されていないだけでなく、その有用性も明らかでない。本研究はEUS-FNAを用いた悪性度評価の有用性を明らかにするために、切除検体を用いた現行法との比較検討が行われた。

[対象と方法]

1998年から2011年の間にPNETと診断された58例(男性28例、女性30例)を対象とした。年齢の中央値は54歳であった。主として以下の3項目が検討された。①切除検体(n=38)での腫瘍内のKi67 indexのheterogeneity、②切除検体とEUS-FNAの悪性度評価一致率(n=27)の比較、③EUS-FNA(n=30)におけるWHO分類のG1,G2およびNECの生存率。

[結果]

- ① 切除検体での腫瘍内Ki67 indexの分散は、G1症例 0.033 ± 0.036 、G2症例 0.782 ± 0.623 で、G2症例はG1症例に比べて有意に高値を示した。またG2症例における腫瘍内Ki67 indexが2%以下の領域は $81.1 \pm 16.9\%$ であった。

- ② 切除検体と EUS-FNA の悪性度評価一致率は Mean Ki67 index を用いた場合は 74.0%、Highest Ki67 index を用いた場合は 77.7%であった。また採取された総腫瘍細胞数が 2000 個以上の検体での一致率は 90%とより高率であった。
- ③ EUS-FNA 検体における G1, G2 および NEC の 5 年生存率は、各々 100%、58.3%および 0%であった。

【結論と本研究の意義】

PNET における EUS-FNA 検体を用いた悪性度評価は切除検体を用いた現行法と比べて高い一致率を示しており、有用であることが示唆された。また EUS-FNA 検体を用いた WHO 分類上の生存曲線も有意に層別化されており、予後予測においても有用であった。更に EUS-FNA 検体を用いた悪性度をより正確に評価するためには、2000 個以上の総腫瘍細胞数が得られることが重要であることも判明した。以上、本研究によって EUS-FNA 検体を用いた悪性度評価は有用であることが明確となった。したがって本論文は PNET の悪性度診断能向上に寄与する臨床的に意義の高い貴重な研究成果を報告しており、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しいものと判断した。

氏名(本籍)	内山 伊代 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第17号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年3月24日
学位論文題目	Evaluating efficacy of bacteriophage therapy against <i>Staphylococcus aureus</i> infections using a silkworm larval infection model (カイコモデルを用いた黄色ブドウ球菌感染症に対するバクテリオファージ療法の有効性検討)
発表誌名	FEMS Microbiology Letters, 347 (1), 52~60 2013年10月

審査委員	主査	教授	福島	敦樹
	副査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	齊藤	源頭

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名

内山 伊代

論文題目

Evaluating efficacy of bacteriophage therapy against *Staphylococcus aureus* infections using a silkworm larval infection model

(カイコモデルを用いた黄色ブドウ球菌感染症に対するバクテリオファージ療法の有効性検討)

(論文要旨)

目的：黄色ブドウ球菌は、グラム陽性の球菌で、ヒトや動物の常在菌である。また、本菌は、化膿性疾患、食中毒、日和見感染症等の起原菌でもあるため、医学上重要な細菌である。近年、メチシリン耐性を獲得した黄色ブドウ球菌 (MRSA)が蔓延し、本菌感染症に対する抗菌薬の治療効果が減弱するという状況が生じている。特に、MRSAは免疫不全患者に対して難治性感染や致死感染をおこすため、感染対策上、要注意の細菌とされている。このような状況下で、化学療法に依存しない治療法が求められている。その可能性の一つに、バクテリオファージ (ファージ) 療法がある。

ファージは細菌を破壊するウイルスである。ファージ療法とは、ファージの溶菌活性を利用する細菌感染症治療法である。近年、諸外国では、ファージ療法の臨床試験が行われ、有効性や安全性が証明されている。しかしながら、使用するファージの種類により治療効果が大きく異なることが明らかになっている。それ故、今後のファージ療法の発展のためには、多くの治療用ファージの分離・収集を行なうとともに、それらのウイルス分類学的検討を行なうことが必要不可欠である。

これまで、抗菌薬の安全性・有効性検討に使用する実験動物には、マウス、ウサギなどの小型哺乳動物が使用されてきた。それらに加えて、近年、カイコ等の無脊椎動物が実験動物として提案されている。無脊椎動物は、小型哺乳動物と比較した場合、コスト、動物倫理、施設等の問題がないため、薬剤の薬効評価や安全性試験等で広く使用され始めている。カイコは、我が国では養蚕業をはじめ、遺伝学的研究にも使用されてきた経緯を有する。そのため、その性状が詳しく理解されており、無脊椎動物の中でも特にモデル動物として優れていると考えられる。

本研究では、はじめに、新規に分離した黄色ブドウ球菌ファージ (S25-3とS13') について、それらの生物学的性状解析を行なった。次に、黄色ブドウ球菌感染カイコモデルを作製し、ファージ療法の安全性・有効性を検討した。さらに、敗血症マウスモデルでのファージ療法の治療効果との比較を行い、カイコ感染モデルの有用性を検討した。


方法：(1) ファージの分離：高知県内の下水処理場より黄色ブドウ球菌ファージの分離を行なった。ファージ大量培養後、CsClあるいはiodixanol密度勾配超遠心法により精製ファージを調製した。その後、透過型電子顕微鏡によるファージの形態観察、パルスフィールド電気泳動法

によるゲノムサイズの推定、N末端アミノ酸配列解読によるビリオンタンパク質の解析を行なった。(2) 黄色ブドウ球菌感染カイコモデルの作製：27°Cに温度調節した環境で、第5週齢2日目のカイコに、0.05mLの濃度調整した黄色ブドウ球菌SA27とSA14を背面接種した。(3) ファージ投与実験：致死量のSA27とSA14をカイコに接種し、その10分、6時間、12時間、24時間経過後に、multiplicity of infection (MOI)を1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-4} に調整したファージ溶液を背面投与し、その生存率を検討した。(4) 敗血症マウスに対するファージ投与実験：第4週齢マウスに致死菌量 2.0×10^9 cells / 0.2 mLを腹腔内接種後、MOI 100、10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} に調整したファージ溶液を腹腔内投与し、1週間観察した。

結果と考察：(1) 分離された29株のファージの内、広い宿主域・強い溶菌活性を有する2種類のファージS25-3およびS13'を治療用ファージ候補として選定した。宿主域は両者とも83.1% (74/89)であり、幅広く黄色ブドウ球菌(耐性菌を含む)を溶菌可能であった。また、電子顕微鏡観察およびビリオンタンパク質のN末端アミノ酸配列の解析から、S25-3、S13'はそれぞれ、ファージ療法に適しているとされる溶菌ファージグループのMyoviridae科 Twort-like viruses属、Podoviridae科 AHJD-like viruses属に分類された。(2) カイコに対する黄色ブドウ球菌(SA27、SA14)の致死菌量は、それぞれ 3.8×10^7 、 1.6×10^7 cells / 0.05 mLであった。(3) 致死菌量をカイコに接種後、10分、6時間、12時間、24時間でMOI 1に調整したファージS25-3、S13'を投与すると、いずれの場合も有意の延命効果が認められた。菌接種後10分でファージS25-3、S13'をMOI 0.01で投与し、6、24時間後の血液中のファージ濃度および菌濃度を検討すると、ファージ数は経時的に約100倍増加し、逆に宿主細菌の方は菌数減少あるいは増殖抑制が認められた。以上から、本ファージはカイコ体内で増殖し、黄色ブドウ球菌を破壊していると考えられた。(4) 黄色ブドウ球菌SA27の感染による敗血症マウスでは、2日後の生存率は0%であった。それに対し、ファージS25-3、S13' (MOI 1)を投与した2日目の生存率はそれぞれ100%、50%であり、カイコモデルでの生存率(80%、73%)に類似していた。

まとめ：以上からファージS25-3とS13'は、黄色ブドウ球菌感染症の治療用ファージとしての適性を有していると考えられた。また、カイコモデルは、マウスモデルと同様にファージ療法の評価に有効であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏名	内山 伊代
審査委員	主査氏名	福島 敦樹 
	副査氏名	杉浦 哲朗 印
	副査氏名	齊藤 源顕 印

題 目 Evaluating efficacy of bacteriophage therapy against *Staphylococcus aureus* infections using a silkworm larval infection model
 (カイコモデルを用いた黄色ブドウ球菌感染症に対するバクテリオファージ療法の有効性検討)

著 者 Iyo Takemura-Uchiyama, Jumpei Uchiyama, Shin-ichiro Kato, Tetsuyoshi Inoue, Takako Ujihara, Naoya Ohara, Masanori Daibata & Shigenobu Matsuzaki

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
 FEMS Microbiology Letters, 347 (1), 52~60
 2013年10月

要 旨

緒言：黄色ブドウ球菌は、グラム陽性の球菌で、ヒトや動物の常在菌である。しかし、本菌は、化膿性疾患、食中毒、日和見感染症等の起因菌でもあるため、医学上重要な細菌である。近年、メチシリン耐性を獲得した黄色ブドウ球菌 (MRSA) が蔓延し、本菌感染症に対しては抗菌薬の治療効果を認めない場合もある。特に、免疫不全患者においては、難治性感染や致死感染に至る。このような状況下で、化学療法に依存しない治療法が求められている。その可能性の一つに、バクテリオファージ (ファージ) 療法がある。

ファージは細菌を破壊するウイルスである。ファージ療法とは、ファージの溶菌活性を利用する細菌感染症治療法である。近年、諸外国では、ファージ療法の臨床試験が行われ、有

効性や安全性が証明されている。しかしながら、使用するファージの種類により治療効果が大きく異なる。したがって、今後のファージ療法の発展のためには、多くの治療用ファージの分離・収集を行なうとともに、それらのウイルス分類学的検討を行なうことが必要である。

これまで、抗菌薬の安全性・有効性検討に使用する実験動物には、マウスなどの小型哺乳動物が使用されてきたが、近年、カイコ等の無脊椎動物が実験動物として利用されるようになってきた。無脊椎動物は、小型哺乳動物と比較した場合、コスト、動物倫理、設備等の問題が少ないため、薬剤の薬効評価や安全性試験等で広く使用され始めている。カイコは、我が国では養蚕業をはじめ、遺伝学的研究にも使用されてきた。そのため、性状が詳しく理解されており、無脊椎動物の中でも特にモデル動物として優れていると考えられる。

本研究では、細菌感染症におけるファージ療法を評価する上で、カイコ感染モデルが有用かどうかを検討した。

方法：(1) ファージの分離：高知県内処理場の下水より黄色ブドウ球菌ファージの分離を行なった。ファージ大量培養後、CsCl あるいは iodixanol 密度勾配超遠心法によりファージを精製・調製した。その後、透過型電子顕微鏡によるファージの形態観察、パルスフィールド電気泳動法によるゲノムサイズの推定、N 末端アミノ酸配列解読によるビリオンタンパク質の解析を行なった。(2) 黄色ブドウ球菌感染カイコモデルの作製：27°C に温度調整した環境で、第 5 週齢 2 日目のカイコに、0.05 mL の濃度調整した黄色ブドウ球菌 SA27 と SA14 を背面接種した。(3) ファージ投与実験：致死量の SA27 と SA14 をカイコに接種した。その 10 分、6 時間、12 時間、24 時間経過後に、multiplicity of infection (MOI) を 1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-4} に調整したファージ溶液を背面投与し、カイコの生存率を検討した。(4) 敗血症マウスに対するファージ投与実験：第 4 週齢マウスに致死菌量 2.0×10^9 cells / 0.2 mL を腹腔内接種後、MOI 100、10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} に調整したファージ溶液を腹腔内投与し、1 週間観察した。

結果と考察：(1) 分離された 29 株のファージのうち、広い宿主域・強い溶菌活性を有する 2 種類のファージ S25-3 および S13' を治療用ファージ候補として選定した。宿主域は 83.1%

(74/89) であり、耐性菌を含めた各種の黄色ブドウ球菌を溶菌可能であった。また、電子顕微鏡観察およびビリオンタンパク質の N 末端アミノ酸配列の解析から、S25-3、S13' はそれぞれ、ファージ療法に適しているとされる溶菌ファージグループの *Myoviridae* 科 Twort-like viruses 属、*Podoviridae* 科 AHJD-like viruses 属に分類された。(2) カイコに対する SA27、SA14 の致死菌量は、それぞれ 3.8×10^7 、 1.6×10^7 cells / 0.05 mL であった。

(3) 致死菌量をカイコに接種後、10 分、6 時間、12 時間、24 時間で MOI 1 に調整したファージ S25-3、S13' を投与すると、いずれの場合も有意の延命効果が認められた。菌接種後 10 分でファージ S25-3、S13' を MOI 0.01 で投与し、6、24 時間後の血液中のファージ濃度および菌濃度を検討すると、ファージ数は経時的に約 100 倍増加し、逆に宿主細菌の方は菌数減少あるいは増殖抑制が認められた。以上から、本ファージはカイコ体内で増殖し、黄色

ブドウ球菌を破壊していると考えられた。(4) 黄色ブドウ球菌 SA27 の感染による敗血症マウスでは、2 日後の生存率は 0%であった。それに対し、ファージ S25-3、S13' (MOI 1) を投与した 2 日目の生存率はそれぞれ 100%、50%であり、カイコモデルでの生存率 (80%、73%) に類似していた。

まとめ：以上の結果より、ファージ S25-3 と S13' は、黄色ブドウ球菌感染症の治療用ファージとしての適性を有していると考えられた。また、カイコモデルは、マウスモデルと同様にファージ療法の評価に有効であることが示唆された。

氏名(本籍)	Tony Shing Chau Li (ニュージーランド)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第18号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年3月24日
学位論文題目	Efficient siRNA delivery and tumor accumulation mediated by ionically cross-linked folic acid-poly(ethylene glycol)-chitosan oligosaccharide lactate nanoparticles: For the potential targeted ovarian cancer gene therapy (イオン結合で架橋した葉酸-ポリエチレングリコール-乳酸キトサンオリゴ糖ナノ粒子を介する効率的なsiRNAの送達と腫瘍への集積: 卵巣がんの標的遺伝子治療を目指して)
発表誌名	European Journal of Pharmaceutical Sciences 52 (2014) 48-612014年1月予定

審査委員	主査	教授	宮村	充彦
	副査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	齊藤	源頭

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 Tony Shing Chau Li

論文題目

Efficient siRNA delivery and tumor accumulation mediated by ionically cross-linked folic acid-poly(ethylene glycol)-chitosan oligosaccharide lactate nanoparticles: For the potential targeted ovarian cancer gene therapy.

(イオン結合で架橋した葉酸-ポリエチレングリコール-乳酸キトサンオリゴ糖ナノ粒子を介する効率的な siRNA の送達と腫瘍への集積: 卵巣がんの標的遺伝子治療を目指して)

(論文要旨)

【緒言】

卵巣がんは早期発見が困難で手術適応にならないことが多く、また、卵巣がん細胞が化学療法に抵抗性であるために、死亡率が高い。卵巣がん細胞は他のがん細胞と同様に、低酸素誘導因子 (HIF-1 α) を過剰発現していることが多く、これが腫瘍細胞の増殖や生存、血管新生や薬物耐性などに関与している。そこで、siRNA による HIF-1 α のノックダウンによりヒト卵巣がん細胞の増殖が抑制されると予想した。しかし、siRNA は分解されやすいので、デリバリーシステムが必要である。近年、遺伝子治療のためのデリバリーシステムは、免疫原性と危険性の問題により、ウイルスベクターから陽イオン性ポリマーに移行しつつある。天然物質のキトサンオリゴ糖は陽イオン性ポリマーの代表的なものである。キトサンの陽性荷電は核酸の結合や細胞への取り込みに必要であるが、その反面、過剰な陽性荷電は赤血球との相互作用や免疫系の賦活化を惹起する。また、全身投与されたキトサンナノ粒子は腫瘍まで受動的に送達され、がん細胞には非特異的なエンドサイトーシスによって取り込まれるので、がん細胞内にはノックダウンに必要な十分量の siRNA が届かない。これらの問題を解決するために、ポリエチレングリコール (PEG) を付加して過剰な陽性荷電を減らすとともに、標的リガンドとして葉酸 (FA) を付与した。葉酸は、正常細胞に無害で、かつ、卵巣がん細胞は葉酸受容体を高発現しているので、ナノ粒子の受容体を介する効率的なエンドサイトーシスが期待できる。本論文は、葉酸-ポリエチレングリコール-乳酸キトサンオリゴ糖 (FA-PEG-COL) ナノ粒子が siRNA の卵巣がん細胞への送達に有効であることを示す。

【方法】

FA-PEG-COL 化合物の化学構造は、マトリックス支援レーザー脱理イオン化-飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS)、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR)、プロトン核磁気共鳴 (NMR) で分析した。siRNA/FA-PEG-COL ナノ粒子は、トリポリリン酸 (TPP)

を介するイオン結合によってゲル化して調製した。ナノ粒子の粒子径と粒子径分布を動的散乱法によって測定した。粒子表面のゼータ電位を電気泳動光散乱測定法で測定した。FITC-FA-PEG-COL ナノ粒子のヒト卵巣がん細胞 OVK18#2 への取り込みをフローサイトメトリーで測定した。インビトロでの HIF-1 α に対する siRNA の効果を、低酸素の代わりに塩化コバルトで誘導した HIF-1 α の mRNA およびタンパク質レベルへの影響と OVK18#2 細胞の増殖抑制効果について調べた。OVK18#2 細胞を移植した BALB/c マウスにおける FA-PEG-COL ナノ粒子の腫瘍への集積をインビボイメージングシステム (IVIS spectrum imaging system, Caliper LifeScience 社製) を用いて調べた。

【結果】




- 1) FA-PEG-COL の化学構造を確認した。
- 2) siRNA/FA-PEG-COL ナノ粒子の平均粒子径は約 200 nm で、ゼータ電位は+8.4 mV であった。FA-PEG を付加すると粒子径が大きくなりゼータ電位が小さくなった。siRNA をロードすると粒子径が大きくなりゼータ電位が小さくなった。
- 3) 血清中では遊離の siRNA は 1 時間以内に分解されてしまうが、ナノ粒子にロードした siRNA は 36 時間まで残存した。
- 4) FA-PEG-COL ナノ粒子は COL ナノ粒子よりも、赤血球凝集と溶血活性が弱く、マウスマクロファージ細胞 RAW 264.7 に対する細胞毒性も低かった。
- 5) FITC-FA-PEG-COL ナノ粒子の卵巣がん細胞 OVK18#2 への取り込みは 9 時間で最大であった。FITC-FA-PEG-COL ナノ粒子の取り込みは FITC-COL ナノ粒子よりも促進された。
- 6) HIF-1 α に対する siRNA の HIF-1 α 遺伝子ノックダウン効果は、FA-PEG-COL の方が COL ナノ粒子よりも優れていた。HIF-1 α 遺伝子のノックダウンにより卵巣がん細胞の細胞増殖が抑制された。
- 7) OVK18#2 細胞を移植した BALB/c マウスにおいて、FA-PEG-COL ナノ粒子は、COL ナノ粒子よりも有意に腫瘍へ集積していた。

【考察】

キトサンナノ粒子に PEG を付加することにより、正常細胞に対する毒性が軽減した。FA-PEG-COL ナノ粒子は、受容体を介するエンドサイトーシスによる取り込みが促進され、siRNA による HIF-1 α のノックダウン効果が高くなった。インビボで、能動的に標的される FA-PEG-COL ナノ粒子は、受動的に運ばれる COL ナノ粒子よりも効率的に腫瘍へ集積することが実証された。

以上より、FA-PEG-COL ナノ粒子は効率的な卵巣がんの遺伝子治療に有効であることが示された。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Tony Shing Chau Li
審 査 委 員	主 査 氏 名	宮村 充彦 
	副 査 氏 名	麻生 悌二郎 
	副 査 氏 名	齊藤 源顕 

題 目 Efficient siRNA delivery and tumor accumulation mediated by ionically cross-linked folic acid-poly(ethylene glycol)-chitosan oligosaccharide lactate nanoparticles: For the potential targeted ovarian cancer gene therapy

(イオン結合で架橋した葉酸-ポリエチレングリコール-乳酸キトサンオリゴ糖ナノ粒子を介する効率的な siRNA の送達と腫瘍への集積：卵巣がんの標的遺伝子治療を目指して)

著 者 Tony Shing Chau Li, Toshio Yawata, Koichi Honke

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
 European Journal of Pharmaceutical Sciences 52 (2014) 48-61
 2014年1月予定

【背景と目的】学位申請者等は、臨床上、診断・治療に苦慮し、特に化学療法抵抗性である卵巣がんに対する遺伝子治療を目指して、卵巣がん細胞における低酸素誘導因子 (HIF-1 α) の過剰発現に注目し、siRNAによるHIF-1 α の遺伝子ノックダウンにより、腫瘍細胞の増殖、血管新生や薬物耐性の獲得などを抑制することを志向し、siRNAを卵巣がん細胞に選択的に集積させるデリバリーシステムを開発した。製剤設計にあたり、siRNAの生体内易分解性を考慮し、高分子ポリマーにより構成されるナノ粒子による保護を検討した。siRNAのがん細胞へのデリバリーシステムは、免疫原性等の問題により、ウイルスベクターでは無く、陽イオン性ポリマーの代表的な素材分子であるキトサンオリゴ糖(COL)を選択した。また、COL分子の過剰な陽性荷電による赤血球との相互作用や免疫系賦活化の惹起等の対策として、COLにポリエチレングリコール(PEG)を付加して過剰な陽性荷電を減少させることとした。また、ナノ粒子の腫瘍細胞への選択的取り込み、がん細胞内のHIF-1 α 遺伝子ノックダウンに必要な充分量のsiRNAの送達、また、ナノ粒子の受容体を介する効率的なエンドサイトー

シス取り込みを期待し、正常細胞に無害で、且つ、卵巣がん細胞には受容体が高発現している葉酸 (FA) を標的リガンドとしてCOL-PEGに付加し、FA-PEG-COLナノ粒子を作製した。本論文において、学位申請者は、FA-PEG-COLナノ粒子の作製とその化学構造、安全性の確認、siRNAのナノ粒子への取り込みさらにはリリース、卵巣がん細胞への選択的送達・取り込み、HIF-1 α の遺伝子ノックダウン効果等の検討により、卵巣がん治療への有用性を検討した。

【方法】FA-PEG-COL化合物の化学構造は、MALDI-TOF-MS、FT-IR、¹H-NMRの機器分析により確認した。siRNA/FA-PEG-COLナノ粒子は、トリポリリン酸を介するイオン結合によってゲル化して調製した。ナノ粒子の粒子径と粒子径分布を動的光散乱法によって測定した。粒子表面のゼータ電位を電気泳動光散乱測定法で測定した。FITCを付加したFA-PEG-COLナノ粒子のヒト卵巣がん細胞OVK18#2への取り込みをフローサイトメトリーで測定した。*In vitro*でのHIF-1 α 遺伝子ノックダウンの効果は、塩化コバルトで誘導したHIF-1 α のmRNA及びタンパク質レベルへの影響とOVK18#2細胞に対する増殖抑制効果で検証した。OVK18#2細胞を移植したBALB/cマウスにおけるFA-PEG-COLナノ粒子の腫瘍への集積は、IVIS spectrum imaging systemを用いて検討した。

【結果と考察】FA-PEG-COLのMALDI-TOF-MS、FT-IR、¹H-NMRの各スペクトルは、目的とするナノ粒子の化学構造を反映していた。また、調製したsiRNA/FA-PEG-COLナノ粒子の平均粒子径は、約200 nmで、ゼータ電位は+8.4 mVであり、赤血球凝集と溶血活性の程度は低く、マウスマクロファージ細胞RAW 264.7に対する細胞毒性も低かった。このことより、COLナノ粒子にPEGを付加することは、COL分子の過剰な陽性荷電による赤血球との相互作用や免疫系賦活化の惹起に対して有効であり、正常細胞に対する毒性を軽減することが明らかとなった。また、FA-PEG-COLナノ粒子にロードしたsiRNAは50%血清含有培地中で36時間まで残存し、siRNAの易分解性は抑制されていた。さらに、FA-PEG-COLナノ粒子の卵巣がん細胞OVK18#2への取り込みは9時間で最大であり、COLナノ粒子よりも促進された。また、siRNAのHIF-1 α 遺伝子ノックダウン効果は、FA-PEG-COLの方がCOLナノ粒子よりも優れていた。OVK18#2細胞を移植したBALB/cマウスにおいて、FA-PEG-COLナノ粒子は、COLナノ粒子よりも有意に腫瘍へ集積していた。これらのことより、ナノ粒子の卵巣がん細胞への選択的取り込み、がん細胞内のHIF-1 α ノックダウンに必要充分量のsiRNAの送達はFAを標的リガンドとして付加することより大きく向上することが明らかとなった。

以上、siRNA /FA-PEG-COLナノ粒子を用いた卵巣がんへの遺伝子治療は、正常細胞への安全性の確保、FA受容体を介するエンドサイトーシスによる腫瘍細胞への選択的送達・細胞内取り込みの促進が認められ、HIF-1 α 遺伝子ノックダウン効果による卵巣がん治療への有用性が示された。

本学位論文は、遺伝子治療デリバリーシステムによる腫瘍細胞ターゲティングの効率化、生体内安全性の確保、さらにHIF-1 α 遺伝子ノックダウン効果、腫瘍増殖抑制効果等を指標とした有用性の確認等、将来の臨床応用を目指す基礎的検討として、医学的に非常に価値あるものと推察する。よって審査員一同は、申請論文が高知大学博士(医学)の学位授与に値するものと判断する。

氏名(本籍)	Locatelli Fabricio Miguel (アルゼンチン共和国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第19号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年3月24日
学位論文題目	The isolation and molecular characterization of <i>Leishmania</i> spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina (アルゼンチン北西部の新大陸型皮膚リーシュマニア症患者から採取されたリーシュマニア原虫の単離と分子系統学的解析)
発表誌名	Acta Tropica, 131, 16~21 2014年3月

審査委員	主査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	佐野	栄紀

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 Fabricio Miguel Locatelli

論文題目

The isolation and molecular characterization of *Leishmania* spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina

(アルゼンチン北西部の新大陸型皮膚リーシュマニア症患者から採取されたリーシュマニア原虫の単離と分子系統学的解析)

(論文要旨)

リーシュマニア症は新旧両大陸の熱帯・亜熱帯に広く分布する。患者数は約1,200万人で毎年100万人～200万人が新しく感染している。全世界では約3億5千万人が感染の危険にさらされている。リーシュマニア症は吸血性昆虫サシチョウバエが媒介する人獣共通感染症であり、流行地(国)の社会経済開発の大きな阻害要因となっている。病型は、病原虫種によっても異なるが、大別すると内臓型(Visceral Leishmaniasis, VL)、皮膚型(Cutaneous Leishmaniasis, CL)、汎発性皮膚型(Diffuse Cutaneous Leishmaniasis, DCL)、粘膜皮膚型(Mucocutaneous Leishmaniasis, MCL)に分けられる。新大陸におけるリーシュマニア症(American Tegumentary Leishmaniasis, ATL)は米国南部からアルゼンチン北部にかけて分布している。MCL型の90%は南米のポリビア、ブラジル、ペルーに存在するが、近年これらの国々と国境を接するアルゼンチン北部サルタ県においても数次にわたるアウトブレイクが起こり、公衆衛生学的に大きな問題となっている。また、VL型も同地域に侵入してきており、病原虫種の正確な同定や分子疫学的な解析などが喫緊の課題となっている。

現行の検査診断法は、塗抹標本や培養法による原虫検出と多遺伝子座酵素電気泳動法(Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE)がゴールドスタンダードである。最近、PCR法とキネトプラストのチトクロームb(*cyt b*)遺伝子解析を組み合わせた検査法が開発され、分子診断と同時に感染原虫種の同定が可能となった。同国サルタ県に分布する病原虫としては、*Leishmania (Viannia) braziliensis*がおもに関与しており、ほかに *L. (V.) guyanensis* や *L. (Leishmania) amazonensis* も報告されている。最近 *L. (V.) panamensis* や *L. (L.) infantum* による症例も新たに報告された。さらに *L. (V.) braziliensis* では2つの genotype (Ab-1, Ab-2) の存在が明らかになった。しかしながら、これらの genotype の詳細な分布や病型との関連などは不明な点が多い。流行地における患者由来原虫を単離・同定して正確な診断を下すことは、治療計画や予後予測のうえで重要なだけでなく、防圧計画を立案するためにも必要な情報である。

本研究は、培養原虫の *cyt b* 遺伝子解析法を用いて、患者から得られた原虫種の genotype 同定




を行い、その結果に基づいて分子系統樹の確立および分子疫学的解析を試み、本症の予防対策やサーベイランスに役立てることを目的とした。

2009年7月から2012年11月にかけて、新大陸型皮膚リーシュマニア症(ATL)と診断された66名の患者は、主にアルゼンチン北部のサルタ県オラン郡とサンマルティン郡の住民で、地域の開業医に受診の後、サルタ大学オランキャンパス内の熱帯病研究所にて精密検査を行った。ATLと診断された患者は各地域の開業医のもとで治療が行われた。本研究への参加は任意で、サルタ県保健当局の定める医倫理規約に基づいて行われた。寄生虫学的診断は、皮膚潰瘍部から得た材料をギムザ染色し鏡検するとともに、*L. (V.) braziliensis* プロマスティゴート抗原を用いた皮内反応試験、臨床診断を行い、さらに粘膜皮膚型リーシュマニア症の診断に際してはATL罹患歴を参考にした。寄生虫学的診断陽性例は、病変部から組織液を吸引し、原虫培養を行った。患者由来の原虫培養に加え、WHO レファレンス7株を培養し、それぞれからDNA抽出・遺伝子解析を行うためWhatman FTAカードに塗布した。Nested PCRにより増幅された *cyt b* 遺伝子産物は、電気泳動後、抽出・精製し、シーケンス解析された。得られたデータは、Tomasiniらの改良MLSTestによる近隣結合法(NJ法)を用いてWHO レファレンス株と比較解析した。原虫 genotype と患者データの関連性についてはGoodman, Kruskal, PearsonのChi-square test、およびFisher's exact testにより検討した。

得られた結果は次のように要約される。*Viannia* 亜属に起因するATL76症例のうち培養に成功した66症例について調べた。複数の潰瘍病変をもつ患者は少数で、大半は単独病変であった(78.1%)。62例(92.4%)はCL型で、4例(7.6%)がMCL型であった。男女比は5:1、患者はすべての年齢階層に分布したが(Mean ± SD: 38.2 ± 16.8)、15歳以下と60歳以上の年齢層は少なかった。*Cyt b* シーケンス解析の結果、*L. (V.) braziliensis* Ab-1型は24例、Ab-2型は41例、残り1例は*L. (V.) guyanensis* でブラジルからの旅行者であった。Ab-1とAb-2が混在する地域は主にZenta Valley地方で、Ab-1のみが検出された地域と地理的な隔りがあった。Genotypeと臨床症状、患者の性比などに連関はみられなかった。

アルゼンチン北部で拡大しているリーシュマニア症の病原虫種の同定は、これまでMLEEなど非常に煩雑な方法に頼っていたため、解析できる株数が限定されていた。本研究では培養により得た原虫を、DNAの保存と遠隔輸送に適したFTAカードに塗布し、PCR法とシーケンス解析により多数の検体を調べることができた。本論文は同地域での*L. (V.) braziliensis* genotypeの地理的分布、症状との関連、患者構成などを明らかにすることができた最初の報告である。今後、ヒト症例原虫のgenotype解析データを蓄積するとともに、保虫宿主・動物との関連も検討することにより、本症対策の立案に必要な分子レベルでの情報提供が可能になり、流行地の保健対策上貢献するところ大である。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Locatelli Fabricio Miguel
審 査 委 員	主 査 氏 名	菅沼 成文 
	副 査 氏 名	杉浦 哲朗 
	副 査 氏 名	佐野 栄紀 

題 目 The isolation and molecular characterization of *Leishmania* spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina
(アルゼンチン北西部の新大陸型皮膚リーシュマニア症患者から採取されたリーシュマニア原虫の単離と分子系統学的解析)

著 者 Fabricio M. Locatelli, S. Pamela Cajal, Paola A. Barroso, Juan J. Lauthier, María C. Mora, Marisa Juarez, Hiroto Kato, Julio R. Nasser, Yoshihisa Hashiguchi, Masataka Korenaga, and Jorge D. Marco

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
Acta Tropica、131、16~21、2014年3月

要 旨

リーシュマニア症は新旧両大陸の熱帯・亜熱帯に広く分布する。患者数は約1,200万人で毎年100万人~200万人が新しく感染している。全世界では約3億5千万人が感染の危険にさらされている。リーシュマニア症は吸血性昆虫サシチョウバエが媒介する人獣共通感染症であり、流行国の社会経済開発の大きな阻害要因となっている。病型は、病原虫種によっても異なるが、大別すると内臓型(Visceral Leishmaniasis, VL)、皮膚型(Cutaneous Leishmaniasis, CL)、汎発性皮膚型(Diffuse Cutaneous Leishmaniasis, DCL)、粘膜皮膚型(Mucocutaneous Leishmaniasis, MCL)に分けられる。新大陸におけるリーシュマニア症(American Tegumentary Leishmaniasis, ATL)は米国南部からアルゼンチン北部にかけて分布し、MCL型の90%は南米のボリビア、ブラジル、ペルーに存在する。近年これらの国々と国境を接するアルゼンチン北部サルタ県において数次にわたる集団発生があり、公衆衛生上問題となっている。また、VL型も同地域に侵入してきており、病原虫種の正確な同定や分子疫学的な解析などが喫緊の課題となっている。

現行の検査診断法は、塗抹標本や培養法による原虫検出と多遺伝子座酵素電気泳動法(Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE)がゴールドスタンダードである。最近、PCR法とキネトプラストのチトクロームb(*cyt b*)遺伝子解析を組み合わせた検査法が開発され、分子診断と同時に感染原虫種

の同定が可能となった。同国サルタ県に分布する病原虫としては、*Leishmania (Viannia) braziliensis*がおもに関与しており、ほかに *L. (V.) guyanensis* や *L. (Leishmania) amazonensis* も報告されている。最近 *L. (V.) panamensis* や *L. (L.) infantum* による症例も新たに報告された。さらに *L. (V.) braziliensis* には2つの genotype (Ab-1, Ab-2) の存在が明らかになった。これらの genotype の詳細な分布や病型との関連などは不明な点が多い。流行地における患者由来原虫を単離・同定することは、治療計画や予後予測は固より、防圧計画の立案のためにも重要である。

本研究は、培養原虫の *cyt b* 遺伝子解析法を用いて、患者から得られた原虫種の genotype を同定し、それに基づいて分子系統樹の確立および分子疫学的解析を試み、本症の予防対策やサーベイランスに役立てることを目的とした。

2009年7月から2012年11月にかけて、新大陸型皮膚リーシュマニア症(ATL)と診断された76症例のうち培養に成功した66症例について調べた。これらの患者は、主にアルゼンチン北部のサルタ県オラン郡とサンマルティン郡の住民で、地域の開業医に受診の後、サルタ大学オランキャンパス内の熱帯病研究所にて精密検査を行った。ATLと診断された患者は各地域の開業医のもとで治療が行われた。本研究への参加は任意で、サルタ県保健当局の定める医倫理規約に基づいて行われた。寄生虫学的診断は、皮膚潰瘍部から得た材料をギムザ染色し鏡検するとともに、*L. (V.) braziliensis* プロマスティゴート抗原を用いた皮内反応試験、臨床診断を行い、さらに粘膜皮膚型リーシュマニア症の診断に際してはATL罹患歴を参考にした。寄生虫学的診断陽性例は、病変部から組織液を吸引し、原虫培養を行った。患者由来の原虫培養に加え、WHO レファレンス7株を培養し、それぞれからDNA抽出・遺伝子解析を行うためWhatman FTAカードに塗布した。Nested PCRにより増幅された *cyt b* 遺伝子産物は、電気泳動後、抽出・精製し、シーケンス解析された。得られたデータは、Tomasiniらの改良MLSTestによる近隣結合法(NJ法)を用いてWHOレファレンス株と比較解析した。原虫 genotype と患者データの関連性についてはGoodman-Kruskallのgamma, PearsonのChi-square test、およびFisher's exact testにより有意水準5%で検定した。

Viannia 亜属に起因するATL症例66名のうち、複数の潰瘍病変をもつ患者は少数で、大半は単独病変であった(78.1%)。62例(92.4%)はCL型で、4例(7.6%)がMCL型であった。男女比は5:1、患者はすべての年齢階層に分布したが(Mean ± SD: 38.2 ± 16.8)、15歳以下と60歳以上の年齢層は少なかった。*Cyt b* シーケンス解析の結果、*L. (V.) braziliensis* Ab-1型は24例、Ab-2型は41例、残り1例は *L. (V.) guyanensis* でブラジルからの旅行者であった。Ab-1とAb-2が混在する地域は主にZenta Valley地方で、Ab-1のみが検出された地域と地理的な隔りがあった。Genotypeと臨床症状、患者の性比などに連関はみられなかった。

リーシュマニア症の病原虫種の同定は、これまでMLEEなど非常に煩雑な方法に頼っていたため、解析できる株数が限定されていた。本研究では培養により得た原虫を、DNAの保存と遠隔輸送に適したFTAカードに塗布し、PCR法とシーケンス解析により多数の検体を調べることができた。本論文は同地域での *L. (V.) braziliensis* genotype の地理的分布、症状との関連、患者構成などを示した最初の報告である。今後、ヒト症例原虫の genotype 解析データを蓄積するとともに、保虫宿主・動物との関連も検討することにより、本症対策の立案に必要な分子レベルでの情報提供が可能になり、さらなる流行地の保健対策上の貢献が期待される。

氏名(本籍)	野村 晴香 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第20号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年3月24日
学位論文題目	Validity and Reliability of the Japanese version of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire (日本語版Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire の妥当性と信頼性に関する検討)
発表誌名	Journal of Gastroenterology (DOI:10.1007/s00535-013-0825-y)2013年5月9日

審査委員	主査	教授	小林	道也
	副査	教授	花崎	和弘
	副査	教授	奥原	義保

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 野村 晴香

論文題目 Validity and Reliability of the Japanese version of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire
(日本語版 Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire の妥当性と信頼性に関する検討)

(論文要旨)

背景と目的

慢性便秘症は身体的および精神的苦痛の原因となり、生活の質 (Quality of Life、以下 QOL) を低下させることが多い。したがって、便秘に対する最適な治療選択や治療効果判定のためには、極めて主観的である便秘の症状や便秘が QOL に及ぼす影響を、可能な限り客観的に評価する必要がある。そこで Marquis ら¹⁾は、便秘患者の QOL を評価するために便秘特異的な QOL の評価尺度である Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire (以下、PAC-QOL) を開発し、その妥当性を証明した。現在では、この PAC-QOL は、便秘症状の重症度を評価する Constipation Scoring System (以下、CSS)²⁾と共に、慢性便秘症の診療や研究において汎用されている。しかし PAC-QOL は、フランス語やオランダ語に翻訳されて妥当性も評価されているが、日本語では検証されていない。

本研究の目的は、PAC-QOL の日本語版である Japanese version of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire (以下、JPAC-QOL) の妥当性と信頼性を評価することである。

方法

2008 年 9 月から 2010 年 12 月に、便秘症状を主訴に高知大学医学部附属病院骨盤機能センターを受診した 332 例を対象に、JPAC-QOL および CSS のデータを、初診時 (治療前)、無治療時 (検査等のための無治療での再受診時)、治療後の 3 時点で前向きに収集した。

PAC-QOL は、便秘が QOL に及ぼす影響を評価するための自己回答式質問表で、28 項目の質問で構成されている。各項目は 0 から 4 点の 5 段階で評価され、点数が低いほど QOL が良好となるよう作成されており、総スコアは 28 項目の平均点で表現される。無回答などの欠損項目がある場合は、有効回答項目の平均点を総スコアとし、有効回答項目が 14 個未満の場合は不完全回答とみなして評価対象から除外する。更にこの 28 項目は、身体的不快感 (physical discomfort) 4 項目、精神的不快感 (psychosocial discomfort) 8 項目、心配/関心 (worries / concern) 11 項目、満足度 (satisfaction) 5 項目の 4 つのサブスケールに分類される。各サブスケールのスコアは、総スコアと同様に有効回答項目の平均点で表わし、有効回答項目がそのサブスケールの項目数の半数未満の

場合は不完全回答とみなして評価対象から除外する。JPAC-QOLは、このPAC-QOLを高知大学医学部附属病院骨盤機能センターのセンター部長である味村俊樹が日本語に翻訳したものである。

CSSは、排便回数、排便困難、残便感、腹痛、排便に要する時間、排便の補助、排便しようとしても出なかった回数、便秘の病悩期間の8項目で構成されている。各項目は、0から4点（排便の補助は0から2点）の5段階で評価され、合計点数（0～30点）で便秘症状の重症度を評価し、点数が高い方が重症である。

JPAC-QOLの信頼性は、内的整合性(internal consistency)と再現性(reproducibility)を用いて評価し、妥当性は収束妥当性(concurrent validity)と治療に対する反応性(responsiveness)で評価した。内的整合性は、JPAC-QOLの初診時のデータに関してCronbach's α を算出して評価した。再現性はtest-retest法で、初診時と無治療時のデータ間の級内相関係数を算出して評価した。収束妥当性は、QOLの評価尺度であるJPAC-QOLが本当に便秘に関するQOLを評価しているかを検証するためのものであり、便秘の重症度スコアとして確立しているCSSスコアとJPAC-QOLスコア間のPearson相関係数を、初診時のデータを対象に算出して評価した。反応性は、治療によって症状が有意に改善した患者を対象に、治療前後のJPAC-QOLスコア改善度をpaired-t検定で評価した。症状が有意に改善した患者とは、CSSから病悩期間を除いたmodified CSS(mCSS)のスコアが、治療前と比較して治療後に50%以上改善した症例と定義した。またeffect sizeも、(治療後JPAC-QOLスコア - 治療前JPAC-QOLスコア) ÷ (治療前JPAC-QOLスコアの標準偏差)として算出し、effect sizeが0.2未満は「小さな」、0.2～0.8は「中等度の」、0.8以上は「大きい」変化量と判断した。

本研究は、高知大学医学部倫理委員会から倫理的な承認を得た。対象者からの同意は、総合同意書に書面をもって同意していることで確認した。

結果

解析可能対象者は、同意を得られないなど37名を除く295名（男性130名、女性165名、平均年齢67.0歳）であった。

内的整合性の対象者数は295名であり、Cronbach's α 係数は、心配/関心(0.93)、精神的不快感(0.82)、身体的不快感と満足度(0.75)、総スコア(0.94)で、全てに関して0.7以上であり、高い内的整合性が確認できた。再現性の対象者数は145名であり、1回目と2回目の期間は43.2±29.6日であった。級内相関係数は、精神的不快感(0.86)、身体的不快感(0.81)、心配/関心(0.80)、満足度(0.46)、総スコア(0.84)で、「満足度」以外のサブスケールと総スコアで0.8以上の相関係数が得られ、再現性が確認された。

収束妥当性の対象者数は284名であり、JPAC-QOLスコアとCSSスコア間のPearson相関係数は、身体的不快感(0.57)、心配/関心(0.48)、精神的不快感(0.47)、満足度(0.30)、総スコア(0.55)で、相関係数自体は必ずしも高くないが有意な相関を認めた(全てに関して $P<0.001$)。反応性の対象者数は72名であり、JPAC-QOL総スコアは、治療前の1.9から治療後に0.5と有意に改善し、4つのサブスケールに関しても同様に有意に改善した(全てに関して $P<0.001$)。Effect sizeは、満足度(2.24)、心配/関心(1.56)、身体的不快感(1.43)、精神的不快感(0.95)、総スコア(1.84)と全て0.8以上であり、十分な変化量と考えられた。

考察

本研究によって、便秘患者の QOL を評価するための尺度である JPAC-QOL の妥当性と信頼性を証明することが出来た。再現性に関して、サブスケールの「満足度」の級内相関係数のみ 0.46 と比較的 low 値であったが、オリジナルの Marquis ら¹⁾も 0.66 と全サブスケール中の最低値を報告している。その理由として、患者は初診時において便秘症状に関する不満感を医師に話すことによって何らかの満足感を得て、症状自体は変化しなくても満足度が改善する可能性が挙げられる。その一方、級内相関係数が低いとは言っても、「満足度」サブスケールの 1 回目と 2 回目のスコアの差は 0.4 で、臨床的に意味のある変化とされる 0.5 以下であり、この観点から「満足度」サブスケールに関しても再現性があると考えられる。収束妥当性では JPAC-QOL と CSS 間で有意な相関を認め、JPAC-QOL が便秘に関する QOL を評価していることが証明出来た。反応性に関して、総スコアと全サブスケールにおいて治療前後で有意な改善を認め、JPAC-QOL が治療による QOL の変化を反映することが確認出来た。その治療前後のスコアの差は、「満足度」が 2.0 点と最高で、「精神的不快感」が 0.8 と最低であったが、この所見は Marquis ら (各々、1.96 と 0.56) と同様であった。すなわち、治療によって患者の満足度は改善しやすく、精神的不快感は改善しにくいと思われる。

本研究の主な問題点は、以下の 3 点である。第 1 に、本研究ではデータを前向きに収集したとは言え、解析が後向きのためにデータの脱落があり、特に再現性の評価において脱落が多かった。第 2 に、オリジナルの英語版 PAC-QOL を日本語に翻訳する際に、文化的な相違や表現に十分配慮したとは言え、正式な翻訳委員会を設けたり、日本語訳の英語への再翻訳などの手続きを踏まなかった。しかし、本研究において JPAC-QOL の妥当性と信頼性が証明されたということは、その日本語訳に問題がなかったことの傍証とも言える。第 3 に、本研究は排便障害を診療する専門施設で実施したため、対象者に難治性の便秘患者が多く含まれている可能性があり、本研究の結果は、必ずしも一般人口における便秘患者に当てはまらないかも知れない。

PAC-QOL は、便秘特異的な QOL 評価尺度として国際的に広く用いられている。本研究によって JPAC-QOL の妥当性と信頼性が証明出来たため、日本人の便秘患者においても便秘特異的な QOL の評価が可能になるとともに、国際比較も可能となった。今後、JPAC-QOL が、日本における便秘診療・研究に広く利用されることを期待する。

文献

- (1) Marquis P, De La LC, Dubois D, *et al.* Development and validation of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 540-551.
- (2) Agachan F, Chen T, Pfeifer J, *et al.* A constipation scoring system to simplify evaluation and management of constipated patients. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 681-685.

論文審査の結果の要旨

	氏名	野村 晴香
審査委員	主査氏名	小林 道也 印
	副査氏名	花崎 和弘 印
	副査氏名	奥原 義保 印

題目 Validity and Reliability of the Japanese version of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire

(日本語版Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire の妥当性と信頼性に関する検討)

著者 Haruka Nomura, Takeshi Agatsuma, Toshiki Mimura

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
 Journal of Gastroenterology (DOI:10.1007/s00535-013-0825-y)
 2013年5月9日

要 旨

【背景と目的】

慢性便秘症は身体的および精神的苦痛の原因となり、生活の質 (Quality of Life、以下 QOL) を低下させることが多い。したがって、便秘に対する最適な治療選択や治療効果判定のためには、極めて主観的である便秘の症状や便秘が QOL に及ぼす影響を、可能な限り客観的に評価する必要があり、Marquisらは、便秘患者の QOL を評価するために便秘特異的な QOL の評価尺度である Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire(以下、PAC-QOL)を開発し、その妥当性を証明した。現在では、この PAC-QOL は、便秘症状の重症度を評価する Constipation Scoring System (以下、CSS)と共に、慢性便秘症の診療や研究において汎用されている。しかし PAC-QOL は、フランス語やオランダ語に翻訳されて妥当性も評価されているが、日本語では検証されていない。

本研究の目的は、PAC-QOL の日本語版である Japanese version of the Patient Assessment of Constipation Quality of Life questionnaire (以下、JPAC-QOL) の妥当性と信頼性を評価することである。

【方法】

2008年9月から2010年12月に、便秘症状を主訴に高知大学医学部附属病院骨盤機能センターを受診した332例を対象に、JPAC-QOLおよびCSSのデータを、初診時（治療前）、無治療時（検査等のための無治療での再受診時）、治療後の3時点で前向きに収集した。

PAC-QOLは、便秘がQOLに及ぼす影響を評価するための自己回答式質問表で、28項目の質問で構成されている。各項目は0から4点の5段階で評価され、点数が低いほどQOLが良好となるよう作成されており、総スコアは28項目の平均点で表現される。無回答などの欠損項目がある場合は、有効回答項目の平均点を総スコアとし、有効回答項目が14個未満の場合は不完全回答とみなして評価対象から除外した。更にこの28項目は、身体的不快感(physical discomfort)4項目、精神的不快感(psychosocial discomfort)8項目、心配/関心(worries / concern)11項目、満足度(satisfaction)5項目の4つのサブスケールに分類される。各サブスケールのスコアは、総スコアと同様に有効回答項目の平均点で表わし、有効回答項目がそのサブスケールの項目数の半数未満の場合は不完全回答とみなして評価対象から除外した。JPAC-QOLは、PAC-QOLを高知大学医学部附属病院骨盤機能センターのセンター部長である味村俊樹が日本語に翻訳したものである。

CSSは、排便回数、排便困難、残便感、腹痛、排便に要する時間、排便の補助、排便しようとしても出なかった回数、便秘の病悩期間の8項目で構成されている。各項目は、0から4点（排便の補助は0から2点）の5段階で評価され、合計点数（0～30点）で便秘症状の重症度を評価し、点数が高い方が重症である。

JPAC-QOLの信頼性は、内的整合性(internal consistency)と再現性(reproducibility)を用いて評価し、妥当性は収束妥当性(concurrent validity)と治療に対する反応性(responsiveness)で評価した。内的整合性は、JPAC-QOLの初診時のデータに関してCronbach's α を算出して評価した。再現性はtest-retest法で、初診時と無治療時のデータの間の級内相関係数を算出して評価した。収束妥当性は、QOLの評価尺度であるJPAC-QOLが本当に便秘に関するQOLを評価しているかを検証するためのものであり、便秘の重症度スコアとして確立しているCSSスコアとJPAC-QOLスコアとのPearson相関係数を、初診時のデータを対象に算出して評価した。反応性は、治療によって症状が有意に改善した患者を対象に、治療前後のJPAC-QOLスコア改善度をpaired-t検定で評価した。症状が有意に改善した患者とは、CSSから病悩期間を除いたmodified CSS(mCSS)のスコアが、治療前と比較して治療後に50%以上改善した症例と定義した。またeffect sizeを、(治療後JPAC-QOLスコア - 治療前JPAC-QOLスコア) ÷ (治療前JPAC-QOLスコアの標準偏差)として算出し、0.2未満は「小さな」、0.2～0.8は「中等度の」、0.8以上は「大きい」変化量と判断した。

本研究は、高知大学医学部倫理委員会から倫理的な承認を得た。対象者からの同意は、総合同意書に書面をもって同意していることで確認した。

【結果】

解析可能対象者は、同意を得られないなど37名を除く295名（男性130名、女性165名、平均年齢67.0歳）であった。

1) 信頼性

内的整合性の対象者数は295名であり、Cronbach's α 係数は、心配/関心(0.93)、精神的不快感(0.82)、身体的不快感と満足度(0.75)、総スコア(0.94)で、全てに関して0.7以上であり、高い内的整合性が確認できた。再現性の対象者数は145名であり、1回目と2回目の期間は43.2±29.6日であった。級内相関係数は、精神的不快感(0.86)、身体的不快感(0.81)、心配/関心(0.80)、満足度(0.46)、総スコア(0.84)で、「満足度」以外のサブスケールと総スコアで0.8以上の相関係数が得られ、再現性が確認された。

2) 妥当性の評価

収束妥当性の対象者数は 284 名であり、JPAC-QOL スコアと CSS スコア間の Pearson 相関係数は、身体的不快感(0.57)、心配/関心(0.48)、精神的な不快感(0.47)、満足度(0.30)、総スコア(0.55)で、相関係数自体は必ずしも高くないが有意な相関を認めた(全てに関して $P < 0.001$)。反応性の対象者数は 72 名であり、JPAC-QOL 総スコアは、治療前の 1.9 から治療後に 0.5 と有意に改善し、4つのサブスケールに関しても同様に有意に改善した(全てに関して $P < 0.001$)。Effect size は、満足度(2.24)、心配/関心(1.56)、身体的な不快感(1.43)、精神的な不快感(0.95)、総スコア(1.84)と全て 0.8 以上であり、十分な変化量と考えられた。

【考察】

本研究によって、便秘患者の QOL を評価するための尺度である JPAC-QOL の妥当性と信頼性を証明することが出来た。再現性に関して、サブスケールの「満足度」の級内相関係数のみ 0.46 と比較的 low 値であったが、オリジナルの Marquis らも 0.66 と全サブスケール中の最低値を報告している。その理由として、患者は初診時において便秘症状に関する不満感を医師に話すことによって何らかの満足感を得て、症状自体は変化しなくても満足度が改善する可能性が挙げられる。その一方、級内相関係数が低いとは言っても、「満足度」サブスケールの 1 回目と 2 回目のスコアの差は 0.4 で、臨床的に意味のある変化とされる 0.5 以下であり、この観点から「満足度」サブスケールに関しても再現性があると考えられる。収束妥当性では JPAC-QOL と CSS 間で有意な相関を認め、JPAC-QOL が便秘に関する QOL を評価していることが証明出来た。反応性に関しても、総スコアと全サブスケールにおいて治療前後で有意な改善を認め、JPAC-QOL が治療による QOL の変化を反映することが確認出来た。その治療前後のスコアの差は、「満足度」が 2.0 点と最高で、「精神的な不快感」が 0.8 と最低であったが、この所見は Marquis ら(各々、1.96 と 0.56)と同様であった。すなわち、治療によって患者の満足度は改善しやすく、精神的な不快感は改善しにくいと思われる。

本研究の主な問題点は、以下の 3 点である。第 1 に、本研究ではデータを前向きに収集したとは言え、解析が後向きのためにデータの脱落があり、特に再現性の評価において脱落が多かった。第 2 に、オリジナルの英語版 PAC-QOL を日本語に翻訳する際に、文化的な相違や表現に十分配慮したとは言え、正式な翻訳委員会を設けたり、日本語訳の英語への再翻訳などの手続きを踏まなかった。しかし、本研究において JPAC-QOL の妥当性と信頼性が証明されたということは、その日本語訳に問題がなかったことの傍証とも言える。第 3 に、本研究は排便障害を診療する専門施設で実施したため、対象者に難治性の便秘患者が多く含まれている可能性があり、本研究の結果は、必ずしも一般の便秘患者に当てはまらないかも知れない。

PAC-QOL は、便秘特異的な QOL 評価尺度として国際的に広く用いられている。本研究によって JPAC-QOL の妥当性と信頼性が証明出来たため、日本人の便秘患者においても便秘特異的な QOL の評価が可能になるとともに、国際比較も可能となった。今後、JPAC-QOL が、日本における便秘診療・研究に広く利用されることを期待する。

【審査結果】

申請者の研究成果は、便秘が QOL に及ぼす影響を客観的に評価する指標としての日本語版 PAC-QOL の妥当性と信頼性を証明した。これは慢性便秘症に対する最適な治療選択や治療効果判定をするうえで意義があり、今後の慢性便秘の診療と研究の発展に寄与するものである。

審査員一同は高知大学医学博士の称号に値する研究内容と判定した。

氏名(本籍)	石原 正行 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第21号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年3月24日
学位論文題目	Sestrin2 and BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein3) regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury (Sestrin2とBNIP3は急性腎障害時の腎尿細管細胞においてオートファジーとマイトファジーを調節する)
発表誌名	American Journal of Physiology Renal Physiology、305(4)、F495～5092013年8月

審査委員	主査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	横山	正尚
	副査	教授	執印	太郎

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名

石原 正行

論文題目

Sestrin2 and BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein3) regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury

(Sestrin2 と BNIP3 は急性腎障害時の腎尿細管細胞においてオートファジーとマイトファジーを調節する)

(論文要旨)

腎臓は虚血や低酸素、薬剤、さまざまな疾患により容易に障害を受ける。また、20種類以上にも及ぶそれぞれが機能分化した細胞集団から構成され、解剖学上も非常に複雑な臓器である。障害のメカニズムについても多くの不明な点が残されており、腎臓の再生医療についても現段階では実用段階には遠く及ばない現状がある。しかし、徐々にではあるが腎臓の障害時のメカニズムや尿細管再生に関わる細胞や因子が明らかになりつつある。

我が国の透析患者数は約30万人におよび、移植待機期間は15年と長きにわたる。腎臓の再生医療はこの問題を解決する手段の一つとして脚光を浴びている。その中でも尿細管再生の分子機構は徐々にではあるが解明されつつある。尿細管細胞には本来再生能力が備わっているが、種々の原因で生じる尿細管障害は生命維持に直結する問題であり、障害からの回復は生命予後をも改善し得る。

Autophagy は1960年代に既に発見されていた生体内、細胞内における現象である。その役割は長い間不明であったが、細胞内の物質をリクルートする働きやストレス下での細胞保護作用が徐々に明らかになるにつれて、急性腎障害時における働きも注目を集めるようになってきた。




我々は、ラットを用いて腎虚血再灌流による Acute Kidney Injury (AKI)モデルを作成し、Sestrin2 および Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3 (BNIP3) 蛋白が腎組織において経時的に増加することを Western Blot 法を用いて証明した。またこれらの蛋白が近位尿細管細胞において発現していることを腎組織を免疫染色することにより明らかにした。培養尿細管細胞を用いた実験では、Sestrin2 は主に酸化ストレス (過酸化水素) 刺激によって mRNA、蛋白の発現が亢進すること、BNIP3 は主に低酸素刺激によって mRNA、蛋白の発現が亢進することを示した。オートファジーのマーカーである LC3 蛋白に GFP を安定発現させる尿細管培養細胞を用い、オートファジーの発現増加を GFP の発現増加として共焦点顕微鏡で捉えることができるようなシステムを用いて尿細管培養細胞におけるオートファジーの評価を行った。Sestrin2 および BNIP3 の遺伝子発現 vector を培養細胞に導入し、これらを強制発現させると、オートファジーが誘導されることが示された。またこの働きは siRNA を用いて Sestrin2 および BNIP3 の発現を抑制すると抑えられた。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化やアポトーシスの調節などにも関与している細胞内小器官である。また酸化的リン酸化の課程で生じる活性酸素による障害を受けやすいことが知られている。Mitophagy はミトコンドリアの Autophagy であり、障害を受けたミトコンドリアを選択的に除去するシステムである。Mitophagy の調節機序については現在も不明な点が多いが、我々の AKI モデルおよび培養尿細管細胞を用いた実験からは、BNIP3 が Mitophagy の誘導に関わっていることが明らかとなった。

我々の培養尿細管細胞において、低酸素下で Mitophagy が共焦点顕微鏡で確認され、BNIP3 を siRNA を用いて発現を抑制すると、低酸素下においても Mitophagy の発現が減少した。

我々は急性腎障害モデルを用いた実験において近位尿細管細胞に Autophagy が誘導されることを示すと同時に、腎障害時に Autophagy が腎保護作用を有することを明らかにした。また、Autophagy を誘導する経路として、主に酸化ストレスによる p53 を介しての sestrin2 発現増加による Autophagy 誘導経路、主に低酸素による HIF-1 を介しての発現増加による経路があり、複数の Autophagy を誘導する経路があることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

	氏名	石原 正行
審査委員	主査氏名	降幡 睦夫 
	副査氏名	横山 正尚 
	副査氏名	執印 太郎 

題目 Sestrin2 and BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein3) regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury
(Sestrin2とBNIP3は急性腎障害時の腎尿細管細胞においてオートファジーとマイトファジーを調節する)

著者 Masayuki Ishihara, Madoka Urushido, Kazu Hamada, Tatsuki Matsumoto, Yoshiko Shimamura, Koji Ogata, Kosuke Inoue, Yoshinori Taniguchi, Taro Horino, Mikiya Fujieda, Shimpei Fujimoto, Yoshio Terada

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
American Journal of Physiology Renal Physiology, 305(4)、F495~509
2013年8月

要旨
【背景・目的】腎臓は虚血や低酸素、薬剤等により容易に障害を受け、その腎障害時のメカニズムや尿細管再生に関わる細胞因子が明らかになる中、急性腎障害 (Acute Kidney Injury; AKI) 時の腎尿細管細胞再生の分子機構も徐々に解明されつつある。尿細管細胞には本来再生能力が備わっているが、種々の原因で生じる尿細管障害は生命維持に直結し、障害からの回復は生命予後をも改善し得る。

オートファジーは生体細胞内における現象で、細胞内物質をリクルートする働きやストレス下での細胞保護作用が徐々に明らかになるにつれて、急性腎障害における働きも注目を集めるようになってきた。

ミトコンドリアは酸化的リン酸化やアポトーシスの調節などにも関与している細胞内小器官で、酸化的リン酸化の課程で生じる活性酸素による障害を受けやすいことが知られている。マイトファジーとはミトコンドリアのオートファジーであり、障害を受けたミトコンドリアを選択的に除去するシステムである。

ミトファジーの調節機序については現在も不明な点が多いが、近年オートファジーが腎保護作用を有しているという報告が増加し、シスプラチン腎症においてオートファジーが誘導されること等が報告されているが、その腎保護作用におけるメカニズムについては今なお不明な点が多い。Sestrin2はp53の下流に存在し、主に genotoxic stress によって発現する蛋白で、オートファジーへの関与が示唆されている。一方 Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3 (BNIP3)はHIF-1の下流に存在し、主に低酸素により誘導される蛋白で、オートファジーやミトファジーと関連があることが知られている。

そこでAKIの腎尿細管細胞におけるsestrin2及びBNIP3発現とオートファジーやミトファジーとの関連について、分子生物学的に検討した。

【方法】*in vivo*の実験系では、ラット左腎動脈を1時間虚血後に再灌流し、AKIモデルを作成した。3~72時間後に組織回収しsestrin2およびBNIP3のmRNAおよび蛋白発現をreal-time PCR、Western Blot法を用いて検討した。また近位尿細管におけるこれら蛋白発現を免疫組織学的に検討した。

*in vitro*の実験系では、NRK-52E細胞(ラット近位尿細管細胞)を用いて酸化ストレス(過酸化水素)、低酸素刺激によるsestrin2およびBNIP3のpromotor活性、mRNA、蛋白の発現を評価した。LC3-GFP遺伝子を安定発現するNRK-52E細胞にsestrin2およびBNIP3発現プラスミドの導入による強制発現時と、sestrin2およびBNIP3のsiRNAを用いた発現抑制時のオートファジーやミトファジーの発現評価を共焦点顕微鏡にて行った。ミトファジーは共焦点顕微鏡を用いたミトコンドリアとオートファゴソームの局在確認、電子顕微鏡を用いた形態的観点から評価を行った。

【結果】虚血再灌流後のラット腎組織においてsestrin2およびBNIP3のmRNA、蛋白は経時的に増加し、またこれら蛋白は近位尿細管細胞において発現亢進を認めた。培養尿細管細胞ではsestrin2は主に酸化ストレス刺激によってpromotor活性、mRNA、蛋白の発現が亢進すること、BNIP3は主に低酸素刺激によってpromotor活性、mRNA、蛋白の発現が亢進することを確認した。Sestrin2の強制発現および酸化ストレスによりオートファジーが誘導され、siRNAによりその誘導抑制が示された。一方、BNIP3強制発現および低酸素刺激によりミトファジーが誘導され、siRNA抑制にてミトファジー誘導は抑制された。

【結論】本論文は*in vivo*及び*in vitro*でのAKIモデルを用いた実験において近位尿細管細胞にオートファジーが誘導されることを示し、腎障害時にオートファジーが腎保護作用に関与する可能性を示した。さらにオートファジーを誘導する経路として、主に酸化ストレスによるsestrin2発現増加によるオートファジー誘導経路、主に低酸素によるHIF-1を介した発現増加による経路の存在を示唆した。その上AKIモデルおよび培養尿細管細胞を用いた実験からは、BNIP3のミトファジー誘導への関与を証明した。

氏名(本籍)	阿漕 孝治 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第22号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年3月24日
学位論文題目	Nociceptive phenotype of dorsal root ganglia neurons innervating the subchondral bone in rat knee joints (ラット膝における軟骨下骨支配後根神経節ニューロンの侵害受容性フェノタイプ)
発表誌名	European Journal of Pain. (in press)

審査委員	主査	教授	由利	和也
	副査	教授	横山	正尚
	副査	教授	降幡	睦夫

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名 阿漕 孝治

論文題目

Nociceptive phenotype of dorsal root ganglia neurons innervating the subchondral bone in rat knee joints

(ラット膝における軟骨下骨支配後根神経節ニューロンの侵害受容性フェノタイプ)

(論文要旨)

研究の背景と目的

軟骨下骨は、変形性膝関節症(膝 OA)や大腿骨顆部骨壊死の疼痛源の一つである。近年、膝 OA の痛みと関連の深い変化の一つとして軟骨下骨の bone marrow lesions(BML)が報告されているなどの臨床的特徴は、軟骨下骨が侵害刺激に対して高い感受性があることを示唆するが、軟骨下骨を支配する求心性神経の化学的な特性は明らかとなっていない。

軟骨下骨を支配する求心性神経の細胞体は後根神経節(DRG)に存在し、その DRG 細胞は、細胞の大きさや神経化学的特性で分類できる。DRG 細胞の内、無髄線維で小型細胞の多くが侵害受容器としての役割を有する。その小型細胞は炎症性疼痛と関係する nerve growth factor(NGF)依存性の CGRP(calcitonin gene-related peptide)陽性細胞および神経因性疼痛と関係する IB4(isolectin B4)陽性細胞の 2 群に分類できる。また、有髄神経細胞は NF200(neurofilament200)にて標識でき、小型から中型の NF200 陽性細胞は鋭い痛みを伝達するのに対して、大型の NF200 細胞は固有感覚を伝達する。

本研究の目的は、軟骨下骨を支配する DRG 細胞を逆行性神経トレーサーを用いて標識し、その神経化学的特性(CGRP、NGF 受容体(TrkA)、NF200、IB4 の発現)や分布、DRG 細胞の大きさを明らかにすることである。さらに、軟骨下骨支配神経と膝関節内組織支配神経の違いを比較検討した。

方法

3週齢Sprague-Dawleyラットを用いて、大腿骨遠位骨端の外側に直径1mm骨孔を作成し、逆行性神経トレーサーFast Blue(FB) 1.5 μ lを、膝関節腔にDii 10 μ lを注入した。注入後14日目にL1からL6のDRGを摘出し、凍結切片を作製した。

大腿骨側の軟骨下骨および膝関節内組織を支配するDRG神経細胞がそれぞれFBおよびDiiによって標識されるため、蛍光顕微鏡を用いて観察した。各脊髄高位で、FBおよびDiiで標識される細胞数をカウントし、DRG細胞体断面積を計測した。さらに免疫組織化学染色を行い、FBおよびDiiで標識されるDRG細胞の内、CGRP、TrkA、NF200、IB4の陽性細胞の割合を計測した。

結果

FB標識細胞(軟骨下骨支配神経)の60%がL3DRGに局在し、L3はL1、L2、L4、L5、L6DRGと比較し

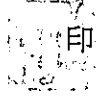


て有意に多くのFB標識細胞を認めた ($p < 0.05$)。DiI標識細胞(膝関節内組織支配神経)の67%がL3とL4DRGに分布しており、L3およびL4DRGは、L1およびL6DRGと比較して有意に多くのDiI標識細胞を認めた ($p < 0.05$)。また、FBとDiIの両方で二重標識される細胞が存在し、その割合はFB標識細胞の6.7%、DiI標識細胞の3.9%であった。DRG細胞断面積は、FB標識細胞、DiI標識細胞および二重標識細胞で同様の分布を示し、その多くが小型($< 600 \mu\text{m}^2$)または 中型($600-1200 \mu\text{m}^2$)の細胞であった。

DRG細胞の神経化学的特性では、CGRPおよびTrkA陽性はFB標識細胞で有意に多く、逆にNF200陽性はDiI標識細胞で有意に多かった ($p < 0.05$)。一方、IB4陽性はFBおよびDiI標識細胞でほとんど存在しなかった。さらに、二重標識細胞におけるCGRP陽性細胞は68.9%(19/28個)であった。CGRPおよびTrkA陽性細胞は、FB標識細胞とDiI標識細胞に細胞断面積分布の差を認めなかったのに対して、NF200陽性細胞では、分布の差を認め、大型細胞がDiI陽性細胞に多く認めた ($p < 0.05$)。

考察

我々は、ラット膝における軟骨下骨支配神経の神経化学的特性を初めて明らかにした。軟骨下骨を支配する神経細胞の多くは、膝関節内組織と同様に CGRP および TrkA 陽性細胞である一方、IB4 陽性細胞はほとんど存在しなかった。しかし、CGRP および TrkA 陽性細胞の割合では、軟骨下骨支配神経の方が膝関節内組織より有意に多かった。我々の結果から、膝関節の軟骨下骨由来の痛みに対し、CGRP および TrkA は治療のターゲットになり得ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

	氏名	阿漕 孝治
審査委員	主査氏名	由利 和也 
	副査氏名	横山 正尚 印 
	副査氏名	降幡 睦夫 

題 目 Nociceptive phenotype of dorsal root ganglia neurons innervating the subchondral bone in rat knee joints
 (ラット膝における軟骨下骨支配後根神経節ニューロンの侵害受容性フェノタイプ)

著 者 Koji Aso, Masahiko Ikeuchi, Masashi Izumi, Natuki Sugimura, Tomonari Kato, Takahiro Ushida, Toshikazu Tani

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、 年 月
 European Journal of Pain.
 (in press)

要 旨

骨の関節面には硝子軟骨が存在し軟骨下骨と強固に連結している。変形性膝関節症や大腿骨顆部骨壊死においては、この軟骨が摩耗して軟骨下骨の露出や骨の変形が起こり、強い疼痛が生じるようになる。従来、軟骨への神経分布は存在しないとされ、疼痛の原因として軟骨下骨に分布する求心性神経の侵害刺激への感受性の高さが指摘されてきたが、求心性神経の化学的特性についての詳細は不明であった。今回の研究では、逆行性神経トレーサーを大腿骨軟骨下骨および膝関節腔に注入し、求心性神経線維の細胞体である脊髄神経節ニューロンの化学的特性を蛍光免疫組

織化学法を用いて検討した。実験は骨端軟骨が閉鎖する前の3週齢雄ラットを用いて行われた。大腿骨遠位端に作成した骨孔および膝関節腔内にそれぞれ逆行性神経トレーサーであるFast Blue (FB) およびDiIを注入し、脊髄神経節 (L1~L6)を摘出後に固定し、凍結切片を作成した。一次抗体として侵害受容性疼痛に関連する calcitonin gene-related peptide (CGRP)、nerve growth factor (NGF) 受容体であるTrkA、neurofilament200 (NF200) および神経因性疼痛に関連するisolectin B4 (IB4) に対する抗体を用いて蛍光免疫組織化学法を施行し、標識された細胞数および細胞体断面積を計測した。その結果、FBおよびDiIで標識された細胞はL1からL6まで分布しておりFBはL3を、DiI標識細胞はL3およびL4を中心に分布していた。また、FBとDiIで二重標識される細胞が少数存在した。細胞体断面積の計測より、FBまたはDiI標識細胞は小型 ($<600 \mu\text{m}^2$) ないし中型 ($600 - 1200 \mu\text{m}^2$) の細胞であった。ニューロンの神経化学的特性では、FB標識細胞の中では、CGRPおよびTrkA陽性のものがDiI標識細胞におけるものよりも有意に多かった。DiI標識細胞ではNF200陽性の大型細胞が多く観察された。IB4陽性細胞はFBまたはDiI標識細胞内にほとんど認められなかった。

以上のように、ラット大腿骨の軟骨下骨を支配するニューロンは、CGRPおよびTrkA陽性細胞であり、IB4陽性細胞はほとんど存在しないこと、またCGRPおよびTrkA陽性細胞の割合が多いことが明らかとなった。CGRPおよびTrkA陽性細胞は、NGF依存性のCGRP陽性細胞であり、無髄神経線維を持つ小型細胞で侵害受容器としての役割を有し炎症性疼痛に関係する。今後、膝関節における軟骨下骨由来の疼痛に対し、CGRPおよびTrkA陽性ニューロンを制御することが重要であると考えられた。本論文は軟骨下骨に分布する神経系の化学的特性を明らかにし、軟骨下骨に由来する疼痛の治療の向上にも大きく寄与することが期待される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	北添 紀子 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第27号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成26年1月21日
学位論文題目	The Autism-Spectrum Quotient in university students: Pattern of changes in its scores and associated factors (大学生を対象としたthe Autism-Spectrum Quotient (AQ) : AQの変化の可能性と関連要因)
発表誌名	Asia-Pacific Psychiatry (Web doi: 10.1111/appy.12094) 2013年8月 (Web)

審査委員	主査	教授	森信	繁
	副査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	藤枝	幹也

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名

北添 紀子

The Autism-Spectrum Quotient in university students: Pattern of changes in its scores and associated factors

論文題目

(大学生を対象としたthe Autism-Spectrum Quotient (AQ) : AQの変化の可能性と関連要因)

(論文要旨)

【背景・目的】

自閉症スペクトラム (ASD) のある学生の大学進学率の増加に伴い、大学での支援の必要性が指摘されている。我々はそのような学生と入学後できるだけ早期にコンタクトをとり、学生生活に困難をきたしていないのかの確認、および支援を行いたいと考えている。

現時点で入学してくる ASD のある学生の中には、診断を受けていない学生も少なくない。学生とコンタクトをとるきっかけとして、the Autism-Spectrum Quotient (AQ) が用いられている。AQ は知的障害のない自閉症特性を評価する自己記入式の質問紙である。従来報告では、感度、特異度はそれぞれ 79.3%、97.7% と高い。しかし一方で、陽性的中率が低いという報告もある。また AQ は、性格特性やメンタルヘルス問題など、他の要素も測定する可能性が指摘されている。そこで今回は、AQ について横断的側面だけでなく縦断的側面からの調査を行うために、入学時と 1 年後に AQ を調査し、比較を行った。

【方法】

1. 参加者

入学時調査は 2006 年度から 2009 年度に高知大学の 4 学部 (医学部を除く) に入学した 3932 名、1 年後調査は 2007 年度から 2009 年度に 2 年生に在籍した 2903 名である。

2. 質問紙

質問紙は the University Personality Inventory (UPI)、AQ、面接希望の有無で構成した。UPI は日本の大学で多く使われている質問紙で、精神面・身体面の状態を評価するものである。

3. 調査手順

入学オリエンテーション時に調査の目的、方法、データの取り扱い等を明記した用紙を配布し、健康診断時に同意が得られた学生からデータを回収した。2 年生には AQ のみ調査を行い、入学時との比較をおこなった。

【結果】

1. 入学時の調査

新入生調査の有効回答者は 3427 名（回答率 87.2%）であった。AQ 得点には性差、学部間差が認められた。AQ 得点がカットオフ以上であったのは 113 名、3.3%であった。113 名の他に、UPI でスクリーニングされた学生、希望のあった学生 486 名に面接を行い、22 名に ASD が疑われた。AQ の感度、特異度はそれぞれ 81.8%、92.0%であった。AQ 得点は UPI 高得点群で有意に高値であった。ASD 特性のある学生は面接を希望した割合が有意に高かった。AQ 高得点群 113 名のうち面接が実施できた 55 名について、ASD 特性ありと ASD 特性なしの 2 群に分け、AQ 得点を比較した。AQ 合計点では有意差が認められなかった。しかし項目別で分析すると、「社交的な場面（機会）は楽しい」で非 ASD 群において「いいえ」（ASD 特性ありに加算）と回答した割合が有意に高かった。これは、AQ の偽陽性と関連する可能性がある。

2. 入学時調査と 2 年次調査の比較

入学時調査と 2 年次調査両方の有効回答者は 319 名（回答率 11.0%）であった。入学時と 2 年次の AQ 得点差を比較したところ、入学時調査の AQ 高得点群は、低得点群と比較して、AQ 得点の低下の程度が有意に高値であった。

319 名について、入学時と 2 年次の AQ 得点を比較したところ、5 項目（「何かをするときには、一人でするよりも他の人といっしょにするほうが好きだ」、「モノよりも人間の方に魅力を感じる」、「社交的である」、「会話をどのように進めたらいいのかわからなくなってしまうことがよくある」、「日付についてのこだわりがある」）で有意差が認められた。

【考察】

1. 先行研究との比較

AQ 得点の性差、学部間差に関しては、先行研究を支持する結果であった。

2. ASD 特性がある学生の面接希望

ASD 特性のある学生が面接を希望している割合が、非 ASD 群と比較して有意に高かった。本調査は「はい」か「いいえ」で答えを求めたために、「はい」と回答する割合が高かったのかもしれない。しかし大学での相談体制は自主性が求められているため、「はい」と回答した学生も自主的には相談に来ないことが予想される。このため、定期面接のような、ASD 特性のある学生に配慮した支援体制が必要かもしれない。




3. AQ に関連する要因

AQ 得点は、性別や学部別よりも UPI と関連が認められた。また、入学時に AQ 高得点群は AQ 低得点群に比べて、2 年次の AQ 得点は有意に低下していた。その原因として 1) AQ 得点は ASD 特性以外の精神症状とも関連した可能性、2) AQ は自己記入式の質問紙なので、特性は変化しなくても自己のとらえ方が変化した可能性、3) 平均に回帰した可能性が考えられる。入学時と 2 年次で AQ の項目のうち社会的スキルやコミュニケーションの項目に有意差が認められたものがあり、精神症状が AQ 得点に影響を及ぼした可能性があると考えられた。

【付記】

本研究は JSPS 科研費 1853757 の助成を受けたものである。

論文審査の結果の要旨

	氏名	北添 紀子
審査委員	主査氏名	森信 繁 
	副査氏名	菅沼 成文 
	副査氏名	藤枝 幹也 

題 目 The Autism-Spectrum Quotient in university students: Pattern of changes in its scores and associated factors

(大学生を対象としたthe Autism-Spectrum Quotient (AQ) : AQの変化の可能性と関連要因)

著 者

Noriko Kitazoe, Shimpei Inoue, Yuji Izumoto, Naoko Kumagai & Yasumasa Iwasaki

発表誌名、巻(号)、ページ()、年 月

Asia-Pacific Psychiatry (Web doi: 10.1111/appy.12094)
2013年8月 (Web)

要 旨

言語遅滞が目立たず、知的障害のない高機能の自閉症スペクトラム障害(Autistic spectrum disorder: ASD)は、我が国の健診制度の中で早期の適切な診断が行われず、成人後に適応障害などの精神障害を来して精神科医療機関を受診しはじめて診断されるケースも稀ではない。昨今の我が国での大学生を対象としたASDの研究から、本障害の有病率は2-3人/1000人と報告されている。本障害に対して2005年から発達障害者支援法が施行され、高等教育機関での教育的配慮が義務づけられたが、満足すべき効果は得られていない。このような現状に我が国では2016年から、障害者差別解消法が施行されて大学などに対して合理的配慮の不提供の禁止が義務つけられる。この差別解消法の施行に備えて、大学でも学生内でのASD者の把握は重要な課題であり、大学保健管理センターの業務の中でも、本障害の新入生を対象としたスクリーニングやその後の継続的な支援が必須と考えられる。

そこで本申請者らは、上記のような保健管理センターに課された役割をより正確に効率よく実践することを目的に、高知大学新生を対象に ASD のスクリーニング検査である the Autism-Spectrum Quotient (AQ) と、大学生の精神面・身体面の障害に対するスクリーニング検査である the University Personality Inventory (UPI) を同時に施行する、新たな取り組みを試みた。その上で本スクリーニング検査にて抽出された ASD 疑い群の中の希望者を対象に診断のための面接を行い、本障害と診断された学生については継続的な介入を行い、AQ 検査成績の変動を追跡した。

本研究への参加者は、入学時調査が 2006 年度から 2009 年度に高知大学の 4 学部(医学部を除く)に入学した 3932 名であり、1 年後調査は 2007 年度から 2009 年度に 2 年生に在籍した 2903 名である。実施した質問紙は、上述した AQ 及び UPI である。行った調査手順は以下のようになり、入学オリエンテーション時に調査の目的、方法、データの取り扱い等を明記した用紙を配布し、健康診断時に同意が得られた学生からデータを回収した。2 年生には AQ のみ調査を行い、入学時との比較を行った。

今回の研究から得られた主な成果を、以下にまとめる。

1. 入学時の調査

新生調査の有効回答者は 3427 名 (回答率 87.2%) であった。AQ 得点がカットオフ以上であったのは 113 名、3.3% であった。486 名の学生に面接を行い、22 名に ASD が疑われた。感度、特異度はそれぞれ 81.8%、92.0% であった。AQ 得点は UPI 高得点群で有意に高値であった。ASD 特性のある学生は、面接を希望した割合が有意に高かった。AQ 高得点群 113 名のうち面接が実施できた 55 名について解析した結果、18 名 (男子学生 18 名、女子学生 5 名) が ASD 特性ありと診断された。この ASD 高得点で面接が施行できた学生を対象に ASD 特性のあり/なしの 2 群に分け、AQ 得点を比較した。AQ 合計点では有意差が認められなかったが、「社会的な場面 (機会) は楽しい」という項目で ASD 特性なし群において「いいえ」(ASD 特性ありに加算) と回答した割合が有意に高かった。

2. 入学時調査と 2 年次調査の比較

入学時調査と 2 年次調査両方の有効回答者は 319 名 (回答率 11.0%) であった。入学時と 2 年次の AQ 得点差を比較したところ、入学時調査に AQ 得点が高かった群は、低かった群に比較して 2 年次の AQ 得点が有意に低下していた。

319 名について、入学時と 2 年次の AQ の下位項目について得点を比較したところ、社会的な技術・コミュニケーション・細部への注意力など 5 項目で有意差が認められた。

本研究で得られた大学生間での ASD の有病率については、AQ 得点の性差、学部間差が認められ、本研究での AQ 単独による ASD のスクリーニング結果は、同様の先行研究結果を支持する結果であった。

本研究では世界ではじめて AQ と UPI を用いて、大学生の ASD スクリーニングを行った。AQ 得点は性別や学部別よりも UPI と密接な関連が認められ、ASD 特性をもつ学生は入学直後という新規環境では、精神的・身体的不調を呈しやすいことを示し

ており、ASD のスクリーニングには AQ のみでなく UPI も併用することの有用性が示されたと考えられる。

入学時に AQ 高得点群は AQ 低得点群に比べて、2 年次の AQ 得点は有意に低下していた。このような変化をもたらした要因としては、AQ 高得点群が 2 年次の調査を受けていない可能性が考えられる。第二に AQ は自己記入式の質問紙なので、特性は変化しなくても自己のとらえ方が変化した可能性がある。特に AQ 高得点者に対する継続的な支援が、自己評価の改善に関与していた可能性が考えられる。

以上のように、本論文は入学当初の大学生を対象とした ASD 特性のスクリーニングの向上に、AQ と UPI の実施が有用であること示している。

氏名(本籍)	Xiao JingYing (中国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第28号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成26年2月10日
学位論文題目	Molecular characterization and expression of cDNA-derived phosphagen kinase of <i>Clonorchis sinensis</i> from China, and development of a possible drug candidate against clonorchiasis. 1) Molecular Cloning and Characterization of Taurocyamine Kinase from <i>Clonorchis sinensis</i> : A Candidate Chemotherapeutic Target. 2) Genetic variation among <i>Clonorchis sinensis</i> isolates from different hosts and geographical locations revealed by sequence analysis of mitochondrial and ribosomal DNA regions. (中国における肝吸虫症の創薬開発にむけたフォスファージェンキナーゼの分子生物学的研究) 1) (肝吸虫のタウロシアミンキナーゼのクローニングと遺伝子構造解析(化学療法ターゲットの候補)) 2) (ミトコンドリアDNAからみた中国大陸における肝吸虫の遺伝的変異)
発表誌名	1) PLOS Neglected Tropical Diseases : 7 (11) 1~122013年11月 2) Mitochondrial DNA : Early online 1~62013年10月
	審査委員 主査 教授 菅沼 成文 副査 教授 椛 秀人 副査 教授 杉浦 哲朗

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

XIAO JingYing

氏名

Molecular characterization and expression of cDNA-derived phosphagen kinase of *Clonorchis sinensis* from China, and development

論文題目

of a possible drug candidate against clonorchiasis.

(中国における肝吸虫症の創薬開発にむけた
フォスファージェンキナーゼの分子生物学的研究)

(論文要旨)

フォスファージェンキナーゼ (PK) は細胞内での ATP の貯蔵と利用のために重要な働きをする酵素である。宿主である人では、このフォスファージェンキナーゼはクレアチンキナーゼであるが、寄生虫類などの無脊椎動物では、この他に 6 種類 (アルギニンキナーゼ、グリコシアミンキナーゼ、タウロシアミンキナーゼ、ロンブリシンキナーゼ、ヒポタウロシアミンキナーゼ、オフェリンキナーゼ) あり、多様性を有する。寄生虫類の PK の研究は当初シャーガス病の原因原虫であるトリパノソーマクルーゼの AK が研究され、新規のシャーガス病の創薬開発のためのターゲットとして考えられてきた。本研究では、肝吸虫 *Clonorchis sinensis* のフォスファージェンキナーゼ遺伝子並びに組替えタンパク酵素の基質特異性ならびに活性などの研究を行った。

Clonorchis sinensis はヒトの胆管に寄生する食品媒介寄生蠕虫で、現在、中国・韓国・台湾・ベトナムに流行しており、感染者は 3500 万人、そのうち 1500 万人が中国で感染している。人に感染すると胆管が重症な病変を起こし最終的には胆管癌の原因となることが知られており、公衆衛生的に極めて重要である。現在ワクチンの開発や創薬が急がれている。本研究では、肝吸虫の PK の cDNA をクローニングした後、その構造を解析し、さらに組換え酵素タンパクの活性を測定した。また、抗血清を作製し、幼虫と成虫ステージにおける酵素発現の相違さらに肝吸虫組織内分布を調べた。さらに突然変異導入実験を行い、本酵素活性に重要なアミノ酸の位置と種類の特定を行なった。その結果、本酵素は、類似したアミノ酸配列をもつペプチドが 2 つ連結したものであり、遺伝子重合により生じた 2 ドメイン構造を有することが分かった。すなわち、cDNA の全長は 2154bp であり、717 個のアミノ酸よりなっていたが、ドメイン 1 は 360 個のアミノ酸、ドメイン 2 は 357 個のアミノ酸からなる。この 2 ドメイン型遺伝子の構造をさらに解析してみると 13 個のエクソンと 12 個のイントロンからなっていることがわかった。イントロンは全て gt-ag パターンであった。イントロンの大きさは極めて変異性に富んでおり、115Bp から約 4,000bp までのものがみられた。リコンビナント Pk の酵素活性を調べたところ、D1、D2、D1+D2 すべて

のドメインで、タウロシアミンに活性を示し、その他の5つの基質には反応しなかったことから、本酵素は、タウロシアミンキナーゼであることが分かった。

次に、ドメイン1の58番目においてイソロイシンをアラニン (I58A) に置換、またアルギニンをアラニン (R60A) に置換する突然変異導入を行った。また、ドメイン1+ドメイン2全長において、ドメイン1における同一置換及びドメイン2における61番目のヒスチジンからアラニンへの置換、63番目のイソロイシンからアラニンへの置換体は、すべて、活性が減少した。しかしながら、D2のみのドメインでの突然変異体ヒスチジンからアラニン (H61A)、イソロイシンからアラニンへの置換体は、(I63A) は活性が上昇することがわかった。このように、酵素活性並びに基質結合力に重要な役割をする、アミノ酸の位置も特定された。




また本酵素の組織局在をしらべたところ、特に精巣、精子、卵、腸管などに局在することが分かった。このことは、フォスファージェンキナーゼは、特に生殖器官に局在し、卵子や精子の産生に多くのエネルギーを供給することによって、寄生虫繁殖に大いに貢献していることを示している。一方、幼虫 (メタセルカリア) と成虫の mRNA の量を比べたところ、両ステージでほぼ同等の発現をしていることが分かった。

さらに ELISA 法による診断を以下の患者血清を比較して行なった (肝吸虫症患者 47 名、タイ肝吸虫患者 20 名、シスチセルコーシス患者 14 名、sparganosis 孤虫症患者 14 名、肺吸虫症患者 14 名、非感染者のコントロール血清 28 名)。その結果、コントロールの 7.1% に対して肝吸虫症患者では 29.7% であり、際立った特異性はなかった。

疫学的調査として、中国の黒龍江省 2 地域 (Guangzhou, Nanning)、広東省 2 地域 (Jiamusi, Daqing) の 4 地区で自然感染したヒト、イヌ、ネコ、ウサギから採集した *Clonorchis sinensis* について、リボソーム RNA 遺伝子 ITS1 (643bp) 及びミトコンドリア DNA 遺伝子 NAD2 (666bp)、NAD5 (771bp) の 2 領域の塩基配列を解析した。まず、各遺伝子領域の遺伝的変異は、それぞれ、1.7% (ITS1)、1.4% (NAD2)、0.9% (NAD5) であった。また、系統樹解析の結果、ヒト感染タイプと動物感染タイプが極めて類似したクラスターを形成し、人獣共通感染症であることを確認した。

本研究の将来的期待として、本酵素は、タウロシアミンに基質特異性を示し、宿主である人のフォスファージェンキナーゼと特異性が全く異なるため、新しい創薬の開発のターゲットになるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Xiao JingYing
審 査 委 員	主 査 氏 名	菅 沼 成 文 
	副 査 氏 名	椎 秀 人 
	副 査 氏 名	杉 浦 哲 朗 

題 目 Molecular characterization and expression of cDNA-derived phosphagen kinase of *Clonorchis sinensis* from China, and development of a possible drug candidate against clonorchiasis.
 (中国における肝吸虫症の創薬開発にむけたフォスファージェンキナーゼの分子生物学的研究)

- 1) Molecular Cloning and Characterization of Taurocyamine Kinase from *Clonorchis sinensis*: A Candidate Chemotherapeutic Target.
 (肝吸虫のタウロシアミンキナーゼのクローニングと遺伝子構造解析 (化学療法ターゲットの候補))
- 2) Genetic variation among *Clonorchis sinensis* isolates from different hosts and geographical locations revealed by sequence analysis of mitochondrial and ribosomal DNA regions.
 (ミトコンドリア DNA からみた中国大陸における肝吸虫の遺伝的変異)

著 者 1) Jing-ying Xiao, Ji-Yun Lee, Shinji Tokuhira, Mitsuru Nagataki, Blanca R. Jarilla, Haruka Nomura, Tae Im Kim, Sung-Jong Hong, Takeshi Agatsuma
 2) Jing-ying Xiao, Gao JF, Cai LS, Dai Y, Yang CJ, Luo L, Agatsuma T, Wang CR

発表誌名、巻(号)、ページ(～)、年 月

- 1) PLOS Neglected Tropical Diseases : 7 (11) 1~12、2013年11月
- 2) Mitochondrial DNA : Early online 1~6、2013年10月

要 旨

フォスファージェンキナーゼ (PK) は細胞内での ATP の貯蔵と利用のために重要な働きをする酵素である。宿主である人では、このフォスファージェンキナーゼはクレアチンキナーゼであるが、寄生虫類などの無脊椎動物では、この他に6種類 (アルギニンキナーゼ、グリコシアミンキナーゼ、タウロシアミンキナーゼ、ロンブリシンキナーゼ、ヒポタウロシアミンキナーゼ、オフエリンキナーゼ) あり、多様性を有する。寄生虫類の PK の研究は当初シャーガス病の原因原虫であるトリパノソーマクルージーの AK が研究され、新規のシャーガス病の創薬開発のためのターゲットとして考えられてきた。本研究では、肝吸虫 *Clonorchis sinensis* のフォスファージェンキナーゼ遺伝子並びに組替えタンパク酵素の基質特異性ならびに活性などの研究を行った。

Clonorchis sinensis はヒトの胆管に寄生する食品媒介寄生蠕虫で、現在、中国・韓国・台湾・ベトナムに流行しており、感染者は 3500 万人、そのうち 1500 万人が中国で感染している。人に感染すると胆管が重症な病変を起こし最終的には胆管癌の原因となることが知られており、公衆衛生的に極めて重要である。現在ワクチンの開発や創薬が急がれている。本研究では、肝吸虫の PK の cDNA をクローニングした後、その構造を解析し、さらに組換え酵素タンパクの活性を測定した。また、抗血清を作製し、幼虫と成虫ステージにおける酵素発現の相違さらに肝吸虫組織内分布を調べた。さらに突然変異導入実験を行い、本酵素活性に重要なアミノ酸の位置と種類の特定を行なった。その結果、本酵素は、類似したアミノ酸配列をもつペプチドが 2 つ連結したものであり、遺伝子重合により生じた 2 ドメイン構造を有することが分かった。すなわち、cDNA の全長は 2154bp であり、717 個のアミノ酸よりなっていたが、ドメイン 1 は 360 個のアミノ酸、ドメイン 2 は 357 個のアミノ酸からなる。この 2 ドメイン型遺伝子の構造をさらに解析してみると 13 個のエクソンと 12 個のイントロンからなっていることがわかった。イントロンは全て gt-ag パターンであった。イントロンの大きさは極めて変異性に富んでおり、115Bp から約 4,000bp までのものがみられた。リコンビナント Pk の酵素活性を調べたところ、D1、D2、D1+D2 すべてのドメインで、タウロシアミンに活性を示し、その他の 5 つの基質には反応しなかったことから、本酵素は、タウロシアミンキナーゼであることが分かった。

次に、ドメイン 1 の 58 番目においてイソロイシンをアラニン (I58A) に置換、またアルギニンをアラニン (R60A) に置換する突然変異導入を行った。また、ドメイン 1+ドメイン 2 全長において、ドメイン 1 における同一置換及びドメイン 2 における 61 番目のヒスチジンからアラニンへの置換、63 番目のイソロイシンからアラニンへの置換体は、すべて、活性が減少した。しかしながら、D2 のみのドメインでの突然変異体ヒスチジンからアラニン (H61A)、イソロイシンからアラニンへの置換体は、(I63A) は活性が上昇することがわかった。このように、酵素活性並びに基質結合力に重要な役割をする、アミノ酸の位置も特定された。

また本酵素の組織局在をしらべたところ、特に精巣、精子、卵、腸管などに局在することが分かった。このことは、フォスファージェンキナーゼは、特に生殖器官に局在し、卵子や精子の産生に多くのエネルギーを供給することによって、寄生虫繁殖に大いに貢献していることを示している。一方、幼虫 (メタセルカリア) と成虫の mRNA の量を比べたところ、両ステージでほぼ同等の発現をしていることが分かった。

さらに ELISA 法による診断を以下の患者血清を比較して行なった (肝吸虫症患者 47 名、タイ肝吸虫患者 20 名、シスチセルコーシス患者 14 名、sparganosis 孤虫症患者 14 名、肺吸虫症患者 14 名、非感染者のコントロール血清 28 名)。その結果、コントロールの 7.1% に対して肝吸虫症患者では 29.7% であり、際立った特異性はなかった。

疫学的調査として、中国の黒龍江省 2 地域 (Guangzhou, Nanning)、広東省 2 地域 (Jiamusi, Daqing) の 4 地区で自然感染したヒト、イヌ、ネコ、ウサギから採集した *Clonorchis sinensis* について、リボソーム RNA 遺伝子 ITS1 (643bp) 及びミトコンドリア DNA 遺伝子 NAD2 (666bp)、NAD5 (771bp) の 2 領域の塩基配列を解析した。まず、各遺伝子領域の遺伝的変異は、それぞれ、1.7% (ITS1)、1.4% (NAD2)、0.9% (NAD5) であった。また、系統樹解析の結果、ヒト感染タイプと動物感染タイプが極めて類似したクラスターを形成し、人獣共通感染症であることを確認した。

本研究の将来的期待として、本酵素は、タウロシアミンに基質特異性を示し、宿主である人のフォスファージェンキナーゼと特異性が全く異なるため、新しい創薬の開発のターゲットになるものと期待される。

氏名(本籍)	Blanca Rosales Jarilla (フィリピン共和国)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第29号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成26年2月18日
学位論文題目	Molecular biological studies on taurocyamine kinase of <i>Paragonimus westermani</i> . 1) Gene structure of the two-domain taurocyamine kinase from <i>Paragonimus westermani</i> : Evidence for a distinct lineage of trematode phosphagen kinases. 2) The role of Y84 on domain 1 and Y87 on domain 2 of <i>Paragonimus westermani</i> taurocyamine kinase: Insights on the substrate binding mechanism of a trematode phosphagen kinase. (ウエステルマン肺吸虫タウロシミンキナーゼ遺伝子の分子生物学的研究) 1) (ウエステルマン肺吸虫の2ドメイン型タウロシミンキナーゼの遺伝子構造(吸虫類フォスファージェンキナーゼの特異性)) 2) (ウエステルマン肺吸虫タウロシミンキナーゼ酵素の84番(ドメイン1)並びに87番(ドメイン2)のチロシンの役割(吸虫類フォスファージェンキナーゼの基質結合メカニズムの解析))
発表誌名	1) FEBS Letters : 587 (2278~2283) 2013年6月 2) Experimental Parasitology : 135 (695~700) 2013年12月

審査委員	主査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	杉浦	哲朗
	副査	教授	岩崎	泰正

論文の内容の要旨

論文審査の結果の要旨

学位論文要旨

氏名

Blanca Rosales Jarilla

Molecular biological studies on taurocyamine kinase
of *Paragonimus westermani*.

論文題目

(ウエステルマン肺吸虫タウロシアミンキナーゼ遺伝子の
分子生物学的研究)

(論文要旨)

肺吸虫症は、食品媒介性人獣共通感染症であり、現在約 20 カ国の 2 億 9300 万人の人々に感染のリスクを与えている。特にウエステルマン肺吸虫症の流行地は東アジア、東南アジア、南アジアにおいてよくみられ、カニやエビなどの生食、あるいは、イノシシなどのパラテニックホストの生肉を食することによって感染することが知られている。現在肺吸虫症は、食品供給のグローバリゼーション、食品嗜好の変化、人々の移動の高速化などによって再興感染症として本感染症が危惧されている。さらに肺結核との誤診の軽減のためにより有効な診断ツールの発展が望まれている。

一方、フォスファージェンキナーゼ遺伝子は ATP ターンオーバーの速度をコントロールする、いわゆるエネルギーホメオスタシスコントロールに重要な役割を有するホスフォトランスフェラーゼである、高度に保存された遺伝子ファミリーの遺伝子である。フォスファージェンキナーゼには、クレアチンキナーゼ、アルギニンキナーゼ、タウロシアミンキナーゼ、ハイポタウロシアミンキナーゼ、ロンブリシンキナーゼ、オフエリンキナーゼ、グリコシアミンキナーゼの 7 つの種類が知られているが、脊椎動物であるヒトのフォスファージェンキナーゼは、クレアチンキナーゼのみである。一方、寄生虫などの無脊椎動物においてはアルギニンキナーゼをはじめ他の 7 種類がその酵素として利用されている。現在タウロシアミンキナーゼは主に環形動物において報告されているが、住血吸虫のような扁形動物にも知られるようになった。一方、タウロシアミンキナーゼの基質結合メカニズムなどはまだよく理解されていない。

本研究ではウエステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* (Pw) フォスファージェンキナーゼ遺伝子の cDNA をクローニングし、遺伝子構造、酵素活性、突然変異導入による特定アミノ酸の役割について分析を試みた。

その結果、ドメイン 1 (D1) は 360 個のアミノ酸、ドメイン 2 (D2) は 350 個のアミノ酸、全長 713 個 (2,142bp) のアミノ酸からなる酵素であることが分かった。5 つの基質 (クレアチン、アルギニン、タウロシアミン、ハイポタウロシアミン、ロンブリシン) を




調べたところ、タウロシアミンのみ活性を示したことにより、タウロシアミンキナーゼであることが確認された。Kinetics を調べたところ、D2 と D1+D2 (全長) がより強い基質結合力を示すことが分かった。また基質結合メカニズムにおいてシナジズムがあることも明らかとなった。全長のタウロシアミンキナーゼは D1 及び D2 それぞれ別々の酵素活性よりも高いことも示された。

また、Pw フォスファージェンキナーゼの基質結合様式に関与する仮想的なアミノ酸の突然変異導入により、D1 の 84 番目のチロシン及び D2 の 87 番目のチロシンの役割を調べるため、そのチロシンをアルギニンで置換するとその活性が著しく減少した。また、D1 の 84 番目をグルタミン酸で置換した場合も、タウロシアミンにたいする親和性と活性は、劇的に減少し、D2 の 87 番目をグルタミン酸で置換した場合は、活性は、完全に失った。このことから、この 2 つのサイトのチロシンは、基質特異性には、関係しないが、タウロシアミン結合力を強める働きがあるものと推測された。さらに各ドメインの GS 領域 (基質特異的ループ) にある 59 番目のアラニンの置換も活性を失うことが分かった。

cDNA と genomicDNA の分析により、D1 には、4 つのエキソンと 4 つのイントロン (うち一つはブリッジイントロン呼ばれ、D1 と D2 のドメインを分けているイントロン)、D2 には 6 つのエキソンと 5 つのイントロンが存在し、trematoda では、かなり高度に保存されていることが分かった。しかし、D1 の一番目のイントロンがまだ検出が陰性で、欠失していることも考えられるが、さらに検討を要する。

このフォスファージェンキナーゼの 2 ドメイン性は、遺伝子が重複し、その後さらに融合することによって生じたものと考えられ、両ドメインの間にあるブリッジイントロンの存在によって暗示される。trematoda のこの 2 ドメイン型のフォスファージェンキナーゼは系統樹解析によって環形動物のフォスファージェンキナーゼとは全く独立して進化してきたが分かった。この考えは、イントロンの位置が環形動物のそれとは、ほとんど共通性が見られないことから、タウロシアミンキナーゼが trematoda で全く独立して生じたことを示しており、フォスファージェンキナーゼ遺伝子進化の可塑性を窺わせる。

論文審査の結果の要旨

	氏 名	Blanca Rosales. Jarilla
審 査 委 員	主 査 氏 名	麻生 悌二郎 
	副 査 氏 名	杉浦 哲朗 
	副 査 氏 名	岩崎 泰正 

題 目 Molecular biological studies on taurocyamine kinase of *Paragonimus westermani*.
 (ウエステルマン肺吸虫タウロシミンキナーゼ遺伝子の分子生物学的研究)

1) Gene structure of the two-domain taurocyamine kinase from *Paragonimus westermani*: Evidence for a distinct lineage of trematode phosphagen kinases.
 (ウエステルマン肺吸虫の2ドメイン型タウロシミンキナーゼの遺伝子構造 (吸虫類フォスファーゲンキナーゼの特異性))

2) The role of Y84 on domain 1 and Y87 on domain 2 of *Paragonimus westermani* taurocyamine kinase: Insights on the substrate binding mechanism of a trematode phosphagen kinase.
 (ウエステルマン肺吸虫タウロシミンキナーゼ酵素の84番 (ドメイン1) 並びに87番 (ドメイン2) のチロシンの役割 (吸虫類フォスファーゲンキナーゼの基質結合メカニズムの解析))

著 者 1) Blanca R. Jarilla, Shinji Tokuhira, Mitsuru Nagataki, Kouji Uda, Tomohiko Suzuki, Luz P. Acosta, Takeshi Agatsuma
 2) Blanca R. Jarilla, Shinji Tokuhira, Mitsuru Nagataki, Kouji Uda, Tomohiko Suzuki, Luz P. Acosta, Takeshi Agatsuma

発表誌名、巻 (号)、ページ (~)、年 月
 1) FEBS Letters : 587 (2278~2283)、2013年6月
 2) Experimental Parasitology : 135 (695~700)、2013年12月

要 旨
 フォスファーゲンキナーゼ(PK)は細胞内でATPの高エネルギーリン酸基をグアジニノ化合物に転位させADPとフォスファーゲンを生成する反応を可逆的に触媒する酵素群の総称であり、生体内のエネルギー代謝において主要な役割を演じている。PKは利用するグアジニノ化合物によって8種類に分類されるが、ヒトを含む脊椎動物にはPKとしてクレアチンキナーゼのみが存在するのに対して、寄生虫等の無脊椎動物にはタウロシミンキナーゼ、アルギニンキナーゼ、ロンブリシンキナーゼ等、多種類の

PK が存在している。

一方、肺吸虫症は、食品媒介性の人獣共通感染症であり、現在約 20 カ国、3 億余の人々に感染のリスクを与えている。中でもウエステルマン肺吸虫症の流行は東アジア、東南アジア、南アジアにおいて認められ、カニやエビの生食、あるいは、イノシシなどの生肉を摂取することにより感染することが知られている。肺吸虫症は、肺結核症と症状が類似しているため従来より誤診が問題となっており、また、最近では食品供給のグローバル化、ヒトの移動の高速化などにより再興感染症の1つとしても注目されてきている。

本研究ではウエステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani*(Pw) の PK であるタウロシミンキナーゼのゲノム DNA をクローニングしてエキソン/イントロン構造を解析し、さらには、部位特異的突然変異導入により同酵素内の特定のアミノ酸残基の役割について分析を試みた。

ウエステルマン肺吸虫のタウロシミンキナーゼは、D1 と D2 の2つのドメインが連結した全長 713 個のアミノ酸からなる。ゲノム DNA の解析の結果、D1 領域には4個のエキソンと4個のイントロンが、D2 領域には6個のエキソンと5個のイントロンが存在し、また、D1 領域の最後のイントロンは D1 と D2 領域とを分けるブリッジイントロンであることが判明した。これらの構造は、肺吸虫が属する扁形動物門の PK 遺伝子間で高度に保存されており、この D1、D2 の2ドメイン性が、共通の祖先遺伝子の重複とその後の融合により生じてきたことを示唆するものである。また、系統樹解析の結果、扁形動物の2ドメイン型 PK は環形動物の PK とは全く独立に進化してきたものであることが明らかとなった。

次いで、ウエステルマン肺吸虫タウロシミンキナーゼの基質への結合と酵素活性に必要な配列を明らかにするため、基質結合に重要と推定される D1 の 84 番目あるいは D2 の 87 番目のアミノ酸残基であるチロシンをアルギニンあるいはグルタミン酸に置換した変異タンパクおよびグアジニノ化合物認識 (GS) 領域内の残基である D1 の 59 番目あるいは D2 の 62 番目のアラニンをグリシンに置換した変異タンパクを発現、精製して、Km、Vmax 等のパラメーターを計測した。その結果、何れの変異タンパクにおいてもタウロシミンへの結合性と酵素活性が正常型 D1、D2 と比べて顕著に減少することが明らかとなり、これら残基が酵素-基質間の結合の安定化に寄与していることが示唆された。

現在、PK の基質特異性の高さを利用して、ヒトのクレアチンキナーゼ以外の寄生虫の PK を特異的に阻害する新薬の開発が期待されている。本論文は、ウエステルマ

ン肺吸虫 PK の遺伝子構造を解明したのみならず、同酵素の活性ならびに基質との結合に重要な配列を同定したものであり、将来的に本酵素を標的とした薬剤の開発に寄与することが期待される。よって審査員一同は、本論文が高知大学博士(医学)の学位授与に値するものと判断した。