



(題字：相良祐輔学長)

# 国立大学法人 高知大学学報

## 高知大学学位授与記録第二十二号

評価広報課発行

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15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50号 | 山本 盛雄 | Bilirubin oxidation provoked by nitric oxide radicals predicts the progression of acute cardiac allograft rejection<br>(NOラジカルによって刺激されたビリルビン酸化は心移植後急性拒絶反応の進行を予測する)   | 1   |
| 乙医博第37号 | 藤澤 道子 | Effects of long-term exercise class on prevention of falls in community-dwelling elderly: Kahoku longitudinal aging study<br>(地域在住高齢者の転倒予防に対する長期運動教室の効果について：香北町縦断研究) | 6   |

|         |  |
|---------|--|
| 氏名(本籍)  | 山本 盛雄 (高知県)  |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |
| 学位記番号   | 甲医博第50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19年12月28日  |
| 学位論文題目  | Bilirubin oxidation provoked by nitric oxide radicals predicts the progression of acute cardiac allograft rejection<br>(NOラジカルによって刺激されたビリルビン酸化は心移植後急性拒絶反応の進行を予測する) |
| 発表誌名    | American Journal of Transplantation ;7:1-10 2007 June  |
|         | <b>審査委員</b> 主査 教授 宇高 恵子<br>副査 教授 本家 孝一<br>副査 教授 花崎 和弘  |

## 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 山本盛雄

## 論文題目

**Bilirubin Oxidation Provoked by Nitric Oxide Radicals Predicts the Progression of Acute Cardiac Allograft Rejection** (NO ラジカルによって刺激されたビリルビン酸化は心移植後急性拒絶反応の進行を予測する)

(論文要旨)

ビリルビンはこれまで有害な排泄されるべき物質として認識されていた。しかし最近になり、ビリルビンは生体内抗酸化物質として重要な生理活性を持ち、種々の病態で出現する活性酸素に対して消去作用を示すことが知られるようになった。ビリルビン生合成はヘモグロビン分解のほかに、酸化ストレスに対する応答として Heme oxygenase-1 (HO-1) が誘導されることによっても増強される。HO-1 はストレスタンパク質としても認識されており、ラット HO-1 は熱ショックタンパク質 (Hsp32) の別名でも知られている。ビリルビン酸化代謝産物であるバイオピリンは、HO-1/ビリルビン系の最終代謝産物であり、酸化ストレスマーカーとして現在用いられている。バイオピリンは抗ビリルビン抗体 (24G7) にて検出が可能で、ビリルビンが活性酸素やラジカルに対して消去作用を示した結果、反応物質であるバイオピリンが尿中より排泄される。急性拒絶反応は最も強い炎症反応のひとつであり、虚血・再灌流傷害や拒絶反応といった Nitric oxide (NO) ラジカルを含めた酸化ストレスの影響を強く受ける。バイオピリンが活性酸素種 (ROS) によって生じることは報告されているが、NO ラジカルによるビリルビン酸化から生じることは報告されていない。我々は、予備実験としてバイオピリンの産生に活性窒素種 (RNS) が関与することを示めた。しかし、RNS によるビリルビン酸化の生物学的意義は知られていない。そこで今回、我々はラット心移植後急性拒絶反応時のビリルビン酸化と NO ラジカルとの関連性を検討する目的で実験を行った。




まずラット頸部異所性心移植を施行し、対照群 (LEW→LEW, n=5)、急性拒絶反応群 (DA→LEW, n=5)、シクロスポリン投与群 (DA→LEW, n=5)、NO 合成酵素 (NOS) 阻害剤である L-NMMA 投与群 (DA→LEW, n=5) に分類した。尿、血清サンプルより尿中バイオピリン、他の酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、心筋傷害特異的マーカーである血清トロポニン T、NO ラジカルの代謝産物のひとつである尿中ニトロチロシンを ELISA 法で測定した。急性拒絶反応群において、尿中バイオピリンは心移植後 3 日目後半より急激な上昇を認め、以降変動は認められるものの移植心停止まで高い値を示した。一方、血清トロポニン T は移植心停止 1 日前まで上昇を認めなかった。他の酸化ストレスマーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) は心移植後 3 日目後半より上昇を認めたが、その変化は緩徐であった。このことから、尿中バイオピリンは心移植後急性拒絶反応時の初期変化に鋭敏な反応を示し、心筋傷害マーカーと比べて早期モニタリングとして有用である可能性が示唆された。また尿中ニトロチロシンの変化は、尿中バイオピリンと同様に心移植後 3 日目後半より急激な変化を認め、NOS 阻害薬である L-NMMA の投与により急性拒絶反応時の尿中ニトロチロシンとバイオピリン値が減少した。この結果、

急性拒絶反応では、RNSによるビリルビン酸化の生物学的関与が示唆された。しかしL-NMMAの投与によりグラフト生存期間の延長は示さなかったことから、急性拒絶反応時のグラフト傷害は宿主側の免疫的な要因が大きな影響を及ぼすことが示唆された。

次に、*in vivo*における尿中バイオピリンの変化がグラフト局所でのバイオピリン産生により反映されたものかどうかを確認するために、移植心停止直後の組織中バイオピリン測定とHO-1発現を確認した。その結果、急性拒絶反応群の移植心では、他の群と比べてバイオピリンの量とHO-1の発現が明らかに亢進していた。さらに、移植心だけでなく他臓器（宿主心臓・肺臓・肝臓・脾臓・腎臓）の免疫組織学的検査の結果、移植心のみバイオピリンとHO-1の発現亢進が認められた。移植後3日目から上昇する尿中バイオピリンの変化を解析するため、急性拒絶反応群での移植後3日目と4日目のグラフト心を病理組織学的に比較検討した。その結果、3日目のグラフトでは急性拒絶反応の重症度分類 grade1A（局所的、血管周囲あるいは間質の大型リンパ球浸潤）に対して、4日目では grade3B（びまん性の炎症細胞浸潤巣と心筋細胞傷害）と拒絶反応の顕著な変化が認められ、特に浸潤細胞が著明に増加していた。免疫組織学的比較では、4日目のグラフト心では炎症細胞浸潤巣と傷害された心筋細胞にもニトロチロシンが発現しており、これと一致してバイオピリンやHO-1の発現も認められた。L-NMMAの投与によりニトロチロシンの発現が抑制され、同時にバイオピリンやHO-1発現の減少も認められたが、急性拒絶反応の重症度分類では急性拒絶反応群と比べてほとんど変化が認められなかった。移植後3日目から4日目のグラフトへの浸潤細胞は、ED-1免疫染色により主にマクロファージの関与が確認され、ED-1とバイオピリン(24G7)の二重染色にてED-1陽性細胞とバイオピリン発現部位の一致が確認された。これらの結果より、心移植後急性拒絶反応では、局所NOラジカル産生を介して局所HO-1発現亢進によりバイオピリンがグラフト内で産生していることが示唆された。さらに移植後3日目後半の尿中バイオピリンの急激な上昇には、主に浸潤細胞の増加が影響を及ぼしているものと考えられた。

今回、我々はグラフト内における細胞保護機能と宿主側の細胞傷害という独特な視点より心移植後急性拒絶反応を捉えた。尿中バイオピリン測定は、従来の方法よりも早期の変化を検出可能とし、急性拒絶反応の新たなモニタリング法として有用性を認めた。

## 論文審査の結果の要旨

|         | 氏 名  |
|---------|--|
|         | 山 本 盛 雄  |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名      宇 高 恵 子  |
|         | 副 査 氏 名      本 家 孝 一  |
|         | 副 査 氏 名      花 崎 和 弘  |

題 目    Bilirubin oxidation provoked by nitric oxide radicals predicts  
the progression of acute cardiac allograft rejection  
(NOラジカルによって刺激されたビリルビン酸化は心移植後急性拒絶  
反応の進行を予測する)

著 者    M. Yamamoto, H. Maeda, N. Hirose, G. Radhakrishnan, R. G. Katare,  
Y. Hayashi, P. Rao, G. -H. Lee, T. Yamaguchi, S. Sasaguri

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    ), 年 月  
American Journal of Transplantation; 7:1-10 2007 June

### 要 旨

申請者らは、移植心の急性拒絶反応の過程で、移植組織においてバイオピリンが産生されることを見つけ、上昇の機序や時間経過、拒絶反応との相関などについて、検討を行った。ビリルビンは従来、Heme の代謝産物として認識されていたが、最近、心筋梗塞や統合失調症など、細胞がストレスを受ける場で発生する活性酸素を不活化する生体成分のひとつとして注目されはじめている。申請者らは、心移植後のバイオピリンの変化を調べ、バイオピリンが心移植後の拒絶反応を反映する、信頼のおける指標として使えるかどうか、研究を始めた。

バイオピリンは、Heme oxygenase-1 (HO-1)/Bilirubin 系の最終代謝産物であり、酸化ストレス反応を反映する物質である。まず、酸化ビリルビンを認識するモノクローナル抗体 24G7 を使った ELISA キットを用いて、定量性を確認した。次にラットの急性移植片拒絶モデルとして、頸部に異所性に心移植をし、経時的に、移植心組織および尿中でのバイオピリン量を調べた。すると、これまでに心移植後の指標として使われていた血清中の troponin-T や尿中 8-OHdG 濃度に比べて、より早期の術後3日後に、すでに顕著な尿中バイオピリン濃度の上昇が観察された。この反応は、移植片の異物認識に対応しており、isograft を用いた対照群や、リンパ球を CsA で抑制した場合には観察されなかった。

バイオピリン産生は HO-1 によるものの他に、組織に侵入したマクロファージの nitric oxide synthase (NOS)による可能性も考えられたため、NOS inhibitor である L-NMMA を投与したところ、それらのラットにおいては、アロ移植心移植しても尿中バイオピリンの上昇は起こらなかった。NOS による組織障害の指標としては、尿中 nitro-tyr が使われているが、Nitro-Tyr の変化も有意に上昇が見られるのは4日目であり、バイオピリンの上昇の方が1日早いことがわかった。ただし、L-NMMA の投与をしても、移植片の平均生着日数を永らえる効果はなかった。

次に、移植心組織を調べたところ、上記の生化学的変化に対応して、アロ移植心の拒絶反応が起こる実験群においては、組織において nitro-Tyr や HO-1 の発現に一致して、バイオピリンの産生が強くみられた。さらに、これらの変化は、移植組織内へのマクロファージの浸潤と強く関連していた。

以上の結果、尿中バイオピリンの定量は、移植心に対する拒絶反応を早期かつ鋭敏に察知する指標として有用であることが示唆された。

審査員からは、組織染色についてのテクニカルな質問、およびバイオピリンの発生機序と関連した組織変化について質問があった。また、バイオピリンの測定に使った抗体の認識部位からして、ビリルビンと酸化ビリルビンに対する反応性の違いについて疑問が出たため、説明が求められた。さらに、心移植後の炎症性細胞浸潤について、マクロファージ系優位の反応と、リンパ球による反応の経日変化の違いについて、コメントがあった。バイオピリンは尿中に分泌され、その測定は、医療の専門知識がなくても、テストキットを用いてできる。将来、患者が自宅で拒絶反応をモニターするための尿検査スティックを開発することも可能であり、実際、申請者の研究室も参加して実用化に向けた研究が進行中である。

以上の結果、審査員一同、申請者は学術的に注目すべき研究課題に取り組み、客観評価に耐える研究成果をあげた、と判断しました。

|         |  |
|---------|--|
| 氏名(本籍)  | 藤澤 道子(三重県)   |
| 学位の種類   | 博士(医学)   |
| 学位記番号   | 乙医博第37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19年11月20日  |
| 学位論文題目  | Effects of long-term exercise class on prevention of falls in community-dwelling elderly: Kahoku longitudinal aging study<br>(地域在住高齢者の転倒予防に対する長期運動教室の効果について：香北町縦断研究) |
| 発表誌名    | Geriatrics and Gerontology International 2007年(in press)   |

|             |    |    |    |    |
|-------------|----|----|----|----|
| <b>審査委員</b> | 主査 | 教授 | 安田 | 誠史 |
|             | 副査 | 教授 | 谷  | 俊一 |
|             | 副査 | 教授 | 瀬尾 | 宏美 |

## 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 藤澤 道子

論文題目 Effects of Long-Term Exercise Class on Prevention of Falls in  
Community-Dwelling Elderly: Kahoku Longitudinal Aging Study.  
(地域在住高齢者の転倒予防に対する長期運動教室の効果について:香北町  
縦断研究)

(論文要旨)

1991年以降、高知県香北町で地域在住高齢者の疾患予防のみでなく、包括的な日常生活機能を維持する目的で高齢者に対する介入をおこなってきた。その結果、地域在住高齢者の生活の自立を改善または維持する効果をあげることができた。介入の一つとして1993年から運動教室を開催した。本研究では、1993年から2001年の8年間の運動教室への参加と転倒予防との関連について検討した。

対象は、1993年から2001年の8年間で運動教室に登録した119人(男性51、女性68、平均72.5歳)と登録しなかった878人(男性243人、女性635人、平均73.4歳)である。運動内容は各週1時間の床運動と水中運動を行った。床運動はインストラクターの指導のもと、①エアロビクス②嫌氣的運動③柔軟体操④神経筋協調運動⑤自宅での任意運動を行った。水中運動は温水プールで、水中歩行、水泳、柔軟体操、グループ体操を行った。1993年と2001年に質問票により、転倒の既往、日常生活動作(ADL)、うつ傾向、脳卒中・心疾患の既往、内服薬・降圧剤服用の有無、尿失禁、認知機能障害によるADL低下について調査した。転倒は、①ほとんど転倒しない、②時々転倒する、③しばしば転倒し、日常生活上支障がある、④転倒による骨折または重傷を負った、の4段階からの選択形式とした。ADLは歩行、階段昇降、食事、更衣、排泄、入浴、整容の7項目について、全て介助を要しない場合を自立とし、1項目でも介助が必要な場合を非自立とした。

1993年に65歳以上の香北町在住の在宅高齢者1774人のうち1601人(90.2%)から回答を得た。2001年までに死亡、施設入所した者等を除き、1993年と2001年の両年で997人から回答を得た。このうちの119人が1993年から2001年に運動教室に参加し、878人は参加しなかった。




運動開始前調査では、運動教室に参加した運動群と参加しなかった非運動群では、運動群で男性の割合が高く、脳卒中の既往が低かったが、転倒の既往、ADL自立度、うつ傾向、内服薬・降圧剤服用の有無、尿失禁、認知機能障害によるADL低下には両群間で有意差を認めなかった。しかし、2001年には運動群で非運動群よりも転倒の既往が低く、ADLも高かった。

運動群を1993年から1995年のみ参加した前半運動群19人と1993年から2001年に参加した8年運動群71人、1996年から2001年のみ参加した後半運動群29人に分類し、転倒と関連ある因子についてオッズ比を求めた。転倒は8年運動群で強く抑制(オッズ比0.20、 $p=0.008$ )され、前半運動群と後半運動群では抑制されなかった(単変量解析)。転倒発生と、年齢、性別、ADL自立度、うつ傾向、内服の

有無は関連するが、脳卒中の既往、降圧剤の内服、尿失禁、認知機能障害は関連を認めなかったため、年齢、性別、ADL、うつ傾向、内服の有無を含めた多変量解析をおこなったところ、8年運動群のみ転倒が抑制された（オッズ比 0.20、 $p=0.007$ ）。

高齢者の転倒予防運動プログラムが多数報告されているが、地域全体の長期にわたる運動介入効果についての報告はほとんどない。我々は、町全体の地域在住高齢者で、8年間の長期にわたる運動の転倒予防に対する効果を調べた。本研究は対照研究ではないが、1993年にこの運動教室参加群について6ヶ月間の対照研究を行っており、運動は神経行動機能、特にUp & Go testに有効であったことを示した。また、Up & Go testが横断的にも縦断的研究にも独立した転倒の予測因子であることも示している。最初の1993年の対照研究終了後、運動教室は地域在住高齢者に開放され、各年多くの住民が参加している。対照研究ではないという限界はあるが、運動教室を持続させることは地域全体に長期的に有効であることを示した重要な研究といえる。地域在住高齢者で転倒の危険の高い者は、包括的機能の維持・向上のために、管理下の運動グループセッションに参加することが勧められる。

## 論文審査の結果の要旨

|         |         |         |   |
|---------|---------|---------|---|
|         | 氏 名     |         | 藤 澤 道 子   |
| 審 査 委 員 | 主 査 氏 名 | 安 田 誠 史 |  |
|         | 副 査 氏 名 | 谷 俊 一   |  |
|         | 副 査 氏 名 | 瀬 尾 宏 美 |  |

題 目    Effects of long-term exercise class on prevention of falls in community-dwelling elderly: Kahoku longitudinal aging study  
 (地域在住高齢者の転倒予防に対する長期運動教室の効果について  
 : 香北町縦断研究)

著 者    Michiko Fujisawa, Masayuki Ishine, Kiyohito Okumiya, Masanori Nishinaga,  
 Yoshinori Doi, Toshio Ozawa, Kozo Matsubayashi

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    ),    年    月  
 Geriatrics and Gerontology International    2007年(in press)

### 要 旨

高齢者の転倒は、大腿骨頸部などでの骨折のきっかけとなり、また、生活機能低下の危険因子としても重要であるが、予防可能な因子であるため、運動介入の対象事象として注目されてきた。しかし、先行研究では、運動介入による体力や身体機能の測定値の改善が検討されたものが多く、転倒それ自身の発生予防効果を検討した研究は少ない。また、先行研究では、運動介入期間が短く、運動介入を長期間実施した場合の効果は報告されていない。

申請者は、8年間という長期間に渡って在宅高齢者に対して運動介入プログラムが提供された地域で、運動介入に参加した高齢者と、参加しなかった高齢者の間で、8年間経過後の転倒経験を比較して、地域での長期間に渡る運動介入が、転倒経験を予防することに関連しているかを検証した。

研究対象は、1993年に高知県香北町に在住していた65歳以上者で、健康状態と転倒経験に関するベースライン質問紙調査に回答した1601人(町在住65歳以上者の90.2%)のうち、2001年に、ベースライン調査と同一の質問紙調査に回答した997人であった。2001年調査に回答が得られなかった604人の内訳は、死亡者が358人、施設入所者が178人、未回答理由不明者が

68 人であった。質問紙調査では、ふだんの転倒経験が、「ほとんど転倒しない」、「時々転倒する」、「しばしば転倒し、日常生活上支障がある」、「転倒による骨折または重傷を負った」の 4 ランクからなる選択肢で評価された。健康状態については、歩行、階段昇降、食事、更衣、排泄、入浴、整容の 7 項目で評価された日常生活動作の自立度、Geriatric Depression Scale 簡易版で評価されたうつ傾向、脳卒中と心疾患の既往、内服薬、尿失禁、厚生労働省作成のスケールで評価された認知症老人の日常生活自立度が調査された。

研究地域では、1993 年から 2001 年の 8 年間に渡り、町の健康増進施設で、メディカルチェックによって運動実施に支障がないと診断された高齢者を対象に、インストラクターの指導下で、有酸素運動、筋力向上運動、柔軟体操、神経筋協調運動からなる床運動と、温水プールでの水中歩行、水泳、柔軟体操からなる水中運動が、それぞれ週 1 時間ずつ行われた。この運動教室に、8 年間で 1 度でも参加した 119 人（以下、参加群）と、1 度も参加しなかった 878 人（以下、非参加群）の間で、2001 年調査でのふだんの転倒経験が、「時々転倒する」以上のランクであったか、1993 年に比べて転倒経験のランクが悪化した者（以下、転倒経験ありまたは悪化者）の割合を比較した。

参加群と非参加群の平均年齢は 72.5 歳対 73.4 歳で、参加群の方が男性の割合が高く、脳卒中既往者の割合が低かったが、1993 年の運動教室開始前の時点では、2 群の間に、ふだんの転倒経験について有意な差は認められなかった。2001 年の追跡調査実施時点では、参加群で非参加群に比べて、転倒経験ありまたは悪化者の割合が有意に低かった。多重ロジスティック回帰モデルを当てはめて、運動教室開始前に参加群と非参加群で分布が異なっていた因子（性別、脳卒中既往）と、転倒リスクを高める既知の危険因子（年齢、日常生活動作自立度、うつ傾向、内服薬服用、尿失禁、認知障害）を調整すると、参加群の非参加群に対する、転倒経験ありまたは悪化のオッズ比は 0.44（95%信頼区間 0.23-0.90）となり、参加群での転倒経験悪化リスクは、非参加群の半分以下であった。さらに、参加群を、運動教室への参加勧誘が小規模だった 1993 年から 1995 年の間だけ参加した前半運動群 19 人、参加勧誘が大規模に行われた 1996 年から 2001 年の間だけ参加した後半運動群 29 人、そして、1993 年から 2001 年までの 8 年間を通して参加した全期間運動群 71 人に分類して、各群の転倒経験悪化リスクを非参加群 878 人と比較した。転倒経験ありまたは悪化のオッズ比は、全期間運動群だけで有意に減少（点推定値 0.20、95%信頼区間 0.06-0.65）しており、運動介入の効果は、教室に継続的に参加した場合にのみ認められた。

本研究では、運動教室参加が本人の希望に基づいているため、無作為に割り付けられた対照群が設定されておらず、運動介入の転倒予防効果を過大評価させる交絡因子を調整しきれていない可能性がある。特に、自主的運動教室参加と密接に関連する社会的活動性が測定されておらず、それによる交絡には注意が必要である。また、そのような交絡因子の影響が小さかったとしても、本研究で評価した運動プログラムは、水中運動施設と運動指導者を必要とするため、どの地域でも容易に実施できるものにはなっていない。さらに、追跡調査時点で骨折経験を有していた者が少なく、転倒がもたらす最も重要な問題である骨折について、運動介入の有効性

を評価できなかったことも課題として残る。

このように今後の研究展開を待たなければならない課題はあるが、本研究成果は、介入期間が短期間にとどまる先行研究で示されてきた、高齢者に対する運動介入の転倒発生予防効果が、長期間に渡って運動介入を行った場合にも認められることを示唆する、初めての根拠とみなせるものである。また、2006年の介護保険法改正後、地域では、一般高齢者が要介護状態となることを予防するためのプログラムに関心が高まっているが、本研究の運動介入プログラムは、転倒予防を介して介護予防にも有効であると期待され、地域社会のニーズに応えられる研究成果でもある。従って、審査員全員が、本研究は、高知大学博士（医学）の学位授与に値するものであると判断した。