

信州大学において審査された医学博士論文要旨

| 氏名 | 学位授与番号 | 授与年月日 | 博士論文名 | 学位審査委員 | |
|------|---------|-----------|--|--------|-----------------------|
| | | | | 主査 | 副査 |
| 吉山勇樹 | 乙第1250号 | R 3. 6.23 | Plantar incision with severe muscle injury can be a cause of long-lasting postsurgical pain in the skin (重度の筋損傷を伴う足底切開は、皮膚の術後痛が遷延する原因となりうる) | 高橋 淳 | 関島良樹 福島菜奈恵 山崎光章 |
| 市原靖子 | 乙第1251号 | R 3. 7.14 | Effects of 5-aminolevulinic acid with iron supplementation on respiratory responses to graded cycling and interval walking training achievement in older women over 75 yrs (後期高齢女性における5-アミノレブリン酸摂取が自転車による運動負荷漸増時の呼吸応答とインターバル速歩トレーニング量に与える影響) | 駒津光久 | 鷺塚伸介 小泉知展 鷹股 亮 |
| 小林惇一 | 乙第1252号 | R 3. 9.29 | Cholestenone functions as an antibiotic against Helicobacter pylori by inhibiting biosynthesis of the cell wall component CGL (コレステノンはピロリ菌の細胞壁成分であるCGLの生合成を阻害することにより抗菌活性を示す) | 梅村武司 | 竹下敏一 田中直樹 浅香正博 |
| 小林 聡 | 乙第1253号 | R 3.10.27 | Efficacy and safety of eradication therapy for elderly patients with helicobacter pylori infection (高齢者に対するヘリコバクター除菌療法の有効性と安全性について) | 竹下敏一 | 副島雄二 田中直樹 横山純二 |
| 渡邊隆之 | 乙第1254号 | R 3.11.12 | Tamoxifen resistance alters sensitivity to 5-fluorouracil in a subset of estrogen receptor-positive breast cancer (タモキシフェン耐性は一部のエストロゲン受容体陽性乳癌の5-フルオロウラシル感受性を変化させる) | 山田充彦 | 小泉知展 平塚佐千枝 石川 孝 |
| 松尾 純 | 乙第1255号 | R 4. 2.22 | Detecting drug-drug interactions that increase the incidence of long QT syndrome using a spontaneous reporting system (自発報告システムを用いた、QT延長の発現を助長する薬物相互作用の検出) | 野見山哲生 | 今村 浩 内藤隆文 村井ユリ子 |
| 住吉愛里 | 乙第1256号 | R 4. 3. 9 | Role of linkage between cerebral activity and baroreflex control of heart rate via central vasopressin V1a receptors in food-deprived mice (マウス絶食時における脳活動と血圧反射連関: 中枢性バゾプレッシン V1a 受容体の役割) | 川眞田樹人 | 駒津光久 山田充彦 鷹股 亮 |

Plantar incision with severe muscle injury can be a cause of long-lasting postsurgical pain in the skin (重度の筋損傷を伴う足底切開は、皮膚の術後痛が遷延する原因となりうる)

吉 山 勇 樹

(論文の内容の要旨)

【背景】術後の痛みは、皮膚、筋膜、筋肉、末梢神経などの組織損傷に起因する。足底切開による術後痛動物モデルでの痛みの機序は、組織損傷を誘発する物質を投与した動物モデルでの痛みの機序と異なることが報告されている。しかし、足底切開モデルは痛みの期間が短いなど、術後痛が遷延するヒトの特徴を完全には反映していない。近年、皮膚切開よりも筋肉切開が痛覚過敏の要因であることや、筋肉と神経の局所的な炎症が、慢性化する術後痛の原因の1つである可能性が示された。筋肉の強い損傷とその後の炎症は、皮膚の創治癒後も持続する可能性があり、術後痛の慢性化をもたらすかもしれない。本研究では、重度の筋損傷が長期にわたる局所炎症を引き起こし、足底切開治癒後の皮膚の痛みを遷延させるかどうかを調査した。

【方法】250-300 gの雄のSprague Dawleyラットを使用した。セボフルラン麻酔下で足底に皮膚切開を加え、足底筋切開(Plantar incision)群(以下P群)では、足底筋に1 cmの切開を加え閉創した。筋損傷(Muscle injury)群(以下M群)では同様に皮膚切開を行い、液体窒素(-190℃)で冷却した直径2 mmのスチールバーを足底筋に3分あてて凍結筋損傷を引き起こし、閉創した。Sham群は麻酔だけを施行した。行動学的解析として、後肢の自発痛関連行動、機械性痛覚過敏(フォンフライフィラメント刺激に対する逃避閾値)、熱性痛覚過敏(放射熱刺激による逃避潜時)を評価した。筋切開や筋損傷による浮腫や炎症の評価のため、術後4および7日目の足底筋を採取し、湿乾重量比(wet/dry ratio)やヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)による白血球数の計測、フローサイトメトリー分析による炎症細胞の分離を行った。筋切開や筋損傷が脊髄に及ぼす影響を解析するため、脊髄のL4/L5を採取して免疫組織化学的分析を行った。脊髄後角における侵害受容ニューロンの活性化マーカーとしてc-Fosを用い、神経炎症の評価として活性化ミクログリアのマーカーであるIonized calcium binding adapter protein 1(以下Iba-1)を用いて染色した。

【結果】自発痛関連行動は、P群、M群ともSham群より増加し、術後3~7日目においては、M群の方が

P群よりも有意に多かった。機械性刺激に対する逃避閾値はP群、M群ともに低下したが、特に術後5~8日目においてはM群の方がP群よりも有意に逃避閾値が低かった。熱刺激に対する逃避潜時は、P群とM群の群間差はなかった。足底筋のwet/dry ratioは、術後4日目で両群において有意に増加し、特にM群でより強い浮腫がみられ、その浮腫はM群でのみ術後7日目まで遷延した。HE染色では、両群で術後4日目に足底筋への炎症細胞浸潤がみられたが、M群の方がP群よりも浸潤細胞数は有意に多かった。7日目になると、M群の浸潤細胞数は大幅に減少し、両群間に有意差はなかった。

フローサイトメトリーの分析で、足底筋への浸潤細胞のほとんどは好中球やマクロファージなどの骨髄系細胞(CD45+, CD11+細胞)であることが示された。術後4日目の骨髄系細胞および非骨髄系細胞の数はM群の方がP群よりも多かったが、7日目では骨髄系細胞と非骨髄系細胞の数が減少し、両群間に有意差はなかった。脊髄後角浅層および深層におけるc-Fos陽性ニューロンの数は、術後6時間で両群において増加した。術後24時間では、c-Fos陽性ニューロンは浅層においてほぼ消失したが、深層では両群ともSham群よりも多かった。しかし、術後6時間および24時間いずれにおいてもP群とM群の差はみられなかった。脊髄後角におけるIba-1の発現は、P群において術後4日目に増加し、7日目にSham群と同等に減少した。

M群では、P群よりも、術後4日目ならびに7日目のいずれにおいてもIba-1の発現が有意に増加し、術後7日目までミクログリアが活性化していた。

【考察】術後4日目に、炎症性の機械性痛覚過敏に強く関与する骨髄系細胞がP群よりもM群で多く浸潤したが、術後7日目の骨髄系細胞の数はP群とM群で同等であったことから、M群の持続的な痛み行動は、炎症の持続だけでは説明できないことが明らかとなった。一方で脊髄でのIba-1の発現は、M群の方がP群よりも有意に強く長く増加しており、自発痛関連行動および機械性痛覚過敏の推移と一致した。このことから、筋損傷後の持続的な痛みは、損傷部位の炎症の遷延ではなく、脊髄におけるミクログリアの活性化に起因す

ることが示唆された。筋損傷による局所の強い炎症が末梢神経の障害をもたらし、そこから分泌された炎症性メディエーターが末梢性感作を招き、脊髄神経の興奮性シナプス伝達が亢進し続けた結果、ミクログリアの活性化が長期化したと考えられた。マクロファージなどの骨髄系細胞や炎症性メディエーターを薬理的に阻害することは、術後痛の新たな治療戦略となりうると思われるが、これらの細胞は創傷治癒に重要な役割を果たすために注意が必要である。本研究は、さまざまな組織が損傷して術後痛が遷延するという臨床に即した動物モデル開発の第一段階であったため、末梢組織の損傷や脊髄における検討は単純化されていた。今後は、より臨床に即した動物モデルの開発を行い、術後痛における末梢の局所炎症と中枢の神経炎症の関係をより深く検討する必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

術後痛において、皮膚切開よりも筋肉切開が痛覚過敏の重要な因子であることが示されている。また、筋肉と神経の局所的な炎症が、慢性化する術後痛の原因の1つである可能性も示された。筋肉の強い損傷とその後の炎症は、皮膚の創治癒後も持続する可能性があり、術後痛の慢性化をもたらしているかもしれない。そこで吉山は、重度の筋損傷が長期にわたる局所炎症を引き起こすのか、さらに足底切開治癒後の皮膚の痛みを遷延させるかどうか調査した。

凍結による足底筋損傷モデル(M群)を、これまでの足底筋切開モデル(P群)と比較検討することを目的とした。行動学的解析(自発痛関連行動の観察、機械性および熱性痛覚過敏の計測)、浮腫・炎症の評価(湿乾重量比、HE染色、フローサイトメトリー)、脊髄免疫組織学的分析(脊髄後角のc-Fos陽性細胞および活性化ミクログリア)を行った。

その結果、吉山は以下の成績を得た。

1. 自発痛関連行動は、術後3～7日目において、M群の方がP群よりも有意に多かった。
2. 機械性痛覚過敏は、術後5～8日目において、M

群の方がP群よりも有意に強かった。

3. 熱性痛覚過敏は、M群とP群の群間差がなかった
4. 足底筋の湿乾重量比は、術後4日目においてM群でP群より大きく、その浮腫はM群でのみ術後7日目まで遷延した。
5. HE染色では、術後4日目において、M群の方がP群よりも足底筋へ浸潤する炎症細胞数が有意に多かったが、7日目になると、M群の浸潤細胞数は大幅に減少し、両群間に有意差はなかった。
6. フローサイトメトリーの分析では、術後4日目の骨髄系細胞および非骨髄系細胞の数はM群の方がP群よりも多かったが、7日目では骨髄系細胞と非骨髄系細胞の数が減少し、両群間に有意差はなかった。
7. 脊髄後角におけるc-Fos陽性ニューロンの数は、術後6時間および24時間いずれにおいても両群間に差はみられなかった。
8. 脊髄後角におけるIba-1の発現は、M群ではP群よりも、術後4日目ならびに7日目のいずれにおいてもIba-1の発現が有意に増加し、術後7日目までミクログリアの活性化がみられた。

以上より、M群の持続的な痛み行動は、筋損傷後の炎症の持続だけでは説明できないことが明らかとなった。一方で脊髄でのIba-1の発現は、M群の方がP群よりも有意に強く長く増加しており、自発痛関連行動および機械性痛覚過敏の推移と一致した。このことから、筋損傷後の持続的な痛みは、損傷部位の炎症の遷延ではなく、脊髄におけるミクログリアの活性化に起因することが示唆された。筋損傷による局所の強い炎症が末梢神経の障害をもたらし、そこから分泌された炎症性メディエーターが末梢性感作を招き、脊髄神経の興奮性シナプス伝達が亢進し続けた結果、ミクログリアの活性化が長期化したと考えられた。この知見は、術後痛の新たな治療戦略のターゲットとなりうる。

したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Effects of 5-aminolevulinic acid with iron supplementation on respiratory responses to graded cycling and interval walking training achievement in older women over 75 yrs (後期高齢女性における5-アミノレブリン酸摂取が自転車による運動負荷漸増時の呼吸応答とインターバル速歩トレーニング量に与える影響)

市原 靖子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】加齢に伴う身体機能の低下や病気を予防するためには、一定強度以上の運動トレーニングを実施する必要がある。しかし、加齢による体力の低下によって生じる身体的および心理的な障壁は、高齢者が日々の運動トレーニングを実施することを妨げている可能性がある。一方、ヘムの前駆体である5-アミノレブリン酸 (ALA) 摂取はミトコンドリア機能を改善することが報告されている。また当研究室では、運動トレーニングを継続している前期高齢女性において、ALA とその効果を増強させるクエン酸第一鉄ナトリウム (SFC) の摂取が、有酸素運動能を改善し、運動トレーニング量を増加させることを報告した。しかし、運動習慣のない後期高齢者における効果は不明である。そこで、今回、ALA+SFC の摂取は、運動習慣のない後期高齢女性においても有酸素運動能を改善し、自発的な運動トレーニング量を増加させるか否かを検証した。

【方法】本研究は、プラセボ対照の二重盲検クロスオーバーデザインを用いて実施した。運動習慣のない平均年齢78歳の女性15人を無作為に2群に分け、それぞれ7日間、ALA+SFC (それぞれ100および115 mg/日) またはプラセボサプリメント (CNT) を摂取させた。各試験中、被験者は個人の最高酸素摂取量の70%以上に相当する速歩と40%の普通歩きを3分間ずつ交互に繰り返すインターバル速歩トレーニングを実施した。その後、12日間のウォッシュアウト期間を置き、摂取条件を入れ替え、同様の試験を行った。各試験の前後に自転車エルゴメータを用いて運動負荷漸増テストを行い、この際の酸素摂取量 (VO_2)、二酸化炭素排出量 (VCO_2)、血漿乳酸濃度 ($[Lac^-]_p$) を測定した。さらにサプリメント摂取期間中にインターバル速歩時の運動強度を携帯型加速度計で測定した。

【結果】ALA+SFC 条件では、自転車による運動負荷漸増時の VO_2 と VCO_2 の増加が抑制され (共に $P < 0.01$)、 $[Lac^-]_p$ が13%減少した ($P=0.012$)。一方、

CNT 条件ではこれらの応答の抑制を認めなかった (すべて $P > 0.46$)。さらに、ALA+SFC 条件では CNT 条件と比較して、インターバル速歩時の速歩エネルギー消費量と速歩時間がそれぞれ25% ($P=0.032$)、21% ($P=0.022$) 上昇した

【結論】以上より、ALA+SFC サプリメント摂取は75歳以上の高齢女性における有酸素運動能を改善すること、これにより速歩トレーニング量を増加させることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

加齢に伴う身体機能の低下や病気を予防するためには、一定強度以上の運動トレーニングを実施する必要がある。しかし、加齢による体力の低下によって生じる身体的および心理的な障壁は、高齢者が日々の運動トレーニングを実施することを妨げている可能性がある。一方、ヘムの前駆体である5-アミノレブリン酸 (ALA) 摂取はミトコンドリア機能を改善することが報告されている。また当研究室では、運動トレーニングを継続している前期高齢女性において、ALA とその効果を増強させるクエン酸第一鉄ナトリウム (SFC) の摂取が、有酸素運動能を改善し、運動トレーニング量を増加させることを報告した。しかし、運動習慣のない後期高齢者における効果は不明である。そこで、今回、ALA+SFC の摂取は、運動習慣のない後期高齢女性においても有酸素運動能を改善し、自発的な運動トレーニング量を増加させるか否かを検証した。

本研究は、プラセボ対照の二重盲検クロスオーバーデザインを用いて実施した。運動習慣のない平均年齢78歳の女性15人を無作為に2群に分け、それぞれ7日間、ALA+SFC またはプラセボサプリメント (CNT) を摂取させた。各試験中、被験者は個人の最高酸素摂取量の70%以上に相当する速歩と40%の普通歩きを3分間ずつ交互に繰り返すインターバル速歩トレーニングを実施した。その後、12日間のウォッシュアウト期間を置き、摂取条件を入れ替え、同様の試験を行った。各試験の前後に自転車エルゴメータを用いて運動負荷漸増テストを行い、この際の酸素摂取量 (VO_2)、

二酸化炭素排出量 (VCO₂), 血漿乳酸濃度 ([Lac⁻]_p) を測定した。さらにサプリメント摂取期間中にインターバル速歩時の運動強度を携帯型加速度計で測定した。

その結果, 次のような結論を得た。

1. ALA+SFC 条件では, 自転車による運動負荷漸増時の VO₂ と VCO₂ の増加が抑制され (共に P<0.01), [Lac⁻]_p が13%減少した (P=0.012)。
2. ALA+SFC 条件では CNT 条件と比較して, インターバル速歩時の速歩エネルギー消費量と速歩時

間がそれぞれ25% (P=0.032), 21% (P=0.022) 上昇した

これらの結果より, ALA+SFC サプリメント摂取は75歳以上の高齢女性における有酸素運動能を改善することが示唆された。本研究結果は運動習慣のない後期高齢者において, ALA+SFC 摂取が運動の導入に有効であることを示すものであり, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Cholestenone functions as an antibiotic against *Helicobacter pylori* by inhibiting biosynthesis of the cell wall component CGL (コレステノンはピロリ菌の細胞壁成分である CGL の生合成を阻害することにより抗菌活性を示す)

小林 惇 一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は胃癌の起因菌で, 世界人口の約半数が感染している。胃癌の予防を目的に除菌治療が行われており, 現在はプロトンポンプ阻害薬とクラリスロマイシンやアモキシシリンなどの抗生剤が使用されている。しかしながら, *H. pylori* の薬剤耐性, 特にクラリスロマイシンの耐性が問題となり, 今後は除菌治療の成功率は低下することが予想される。

H. pylori は細胞壁に cholesteryl- α -D-glucopyranoside (CGL) に代表される α -cholesteryl glucosides (α CGs) を含んでいる。CGL は *H. pylori* の生存に必須であり (Kawakubo et al, Science 305, 1003-1006, 2004), α -glucosyltransferase (α CgT) の作用により, コレステロールの3位の水酸基にグルコースが α 1,3結合することで生合成される。我々はコレステロールの3位にある水酸基は CGL の生合成に重要であると考え, 「コレステロールの3位の水酸基がケト基に置き換わったコレステロール類似物質であるコレステノンは α CgT の基質となれず, その結果 CGL の生合成が阻害されることで *H. pylori* に対して抗菌作用を示す」という仮説を立て, 下記の解析を行った。

【方法】 *H. pylori* として標準株である ATCC 43504, クラリスロマイシン耐性臨床分離株 “2460”, マウスに感染可能な SS1 株を用いた。菌の培養は10%不活化ウマ血清を添加した Brucella broth にて35°C, 15% CO₂ の条件下で24時間前培養を行った後, Mueller Hinton broth に各種添加物を混じた培地を用いて96

穴プレートで4日間, 35°C, 15% CO₂ の条件下で本培養を行った。菌量は600 nm における吸光度で測定した。また, 光学顕微鏡下における菌の形態観察も行った。次に CGL を含む脂質分画を評価するため, 薄層クロマトグラフィー並びに抗 CGL 抗体を用いた免疫染色を行った。最後にマウスを用いた感染実験として, 5週齢の C57BL/6マウス (n=54) に *H. pylori* SS1 株 (3×10⁷個×2回投与) を感染させ, コレステノン (0.5% w/w) を含む食餌を与えた群と含まない食餌を与えた群に分けて飼育した。4週間投与後, 胃粘膜を採取し, CGL 合成酵素をコードする α CgT 遺伝子の量を定量 PCR にて解析したと共に (n=48), HE 染色にて胃粘膜の形態を観察した (n=6)。

【結果】 蛍光コレステロールを添加した培養アッセイで, *H. pylori* (ATCC 43504) は外因性コレステロールを取り込んでいることが確認された。続いてコレステロール, コレスタノール, β -シトステロール, コレステノンを添加した培養アッセイではコレステノンでのみ明らかに *H. pylori* (ATCC 43504) の増殖が抑制された。この結果は, 臨床的に分離したクラリスロマイシン耐性株である “2460” でも同様であった。また, *H. pylori* の形態も螺旋状から球状に変化していた。150 μ M コレステロール濃度下でコレステノンが *H. pylori* の増殖を抑制できるか検討を行った。その結果, コレステノンは濃度依存的に *H. pylori* の増殖を抑制することが確認された。不活化ウマ血清, コレステロール, コレステノンを添加して培養した *H. pylori* (ATCC 43504) から脂質成分を抽出し, 薄層

クロマトグラフィーで分析した。ウマ血清の添加では CGL とその誘導体である CAG と CPG が、コレステロールと培養した菌体では CGL と CAG が確認された。一方、コレステノンと培養した菌体では CGL と CAG の減少が示され、さらに CGL の減少は抗 CGL 抗体を用いた免疫染色でも明らかであった。マウスを用いた感染実験で、コレステノン投与群はコレステノン非投与群と比較して有意に感染菌数が減少しており、コレステノンの経口投与による *H. pylori* の除菌効果が確認された。また、HE 染色では形態学的にいずれの群にも異常所見は認められなかった。

【結論】コレステノンはクラリスロマイシン耐性株も含めて *H. pylori* に対して抗菌活性を示すことが認められた。コレステノンは安全な物質と考えられ、CGL の生合成を阻害するという従来の抗菌剤とは異なる作用機序で抗菌作用を示すことから、ピロリ菌に対する新たな抗菌薬となる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は胃癌などの原因とされ、除菌療法が施行されている。一方で除菌療法は不完全であり、*H. pylori* の耐性化により更なる除菌率の低下が危惧される。*H. pylori* は細胞壁に cholesteryl- α -D-glucopyranoside (CGL) を含んでおり、CGL は *H. pylori* の生存に必須である。CGL はコレステロールの 3 位の水酸基にグルコースが α 1,3 結合することで生合成されるが、「コレステロールの 3 位の水酸基がケトン基に置き換わったコレステロール類似物質であるコレステノンは *aCgT* の基質となれず、その結果 CGL の生合成が阻害されることで *H. pylori* に対して抗菌作用を示す」という仮説を立て、実験を行った。

各種コレステロール類による *H. pylori* の培養アッセイを行い、*H. pylori* のコレステロール取り込みや

各種コレステロールによる *H. pylori* の増殖能、形態の変化を検討した。続いて、CGL を含む脂質分画を評価するため、薄層クロマトグラフィー並びに抗 CGL 抗体を用いた免疫染色を行った。最後にマウスを用いた感染実験として、5 週齢の C57BL/6 マウスに *H. pylori* を感染させ、コレステノンを含む食餌を与えた群と含まない食餌を与えた群に分けて飼育した。4 週間投与後に胃粘膜を採取し、CGL 合成酵素をコードする *aCgT* 遺伝子の量を定量 PCR にて解析したと共に、HE 染色にて胃粘膜の形態を観察した。

その結果、小林は次の結論を得た。

1. *H. pylori* は外因性のコレステロールを利用していることが確認された。
2. コレステロールの 3 位がケトン基に置き換わったコレステノンは、*H. pylori* の増殖を抑制し、形態も球状に変化させた。また、コレステロールの存在下でも、コレステノンは用量依存的に増殖を抑制した。
3. 2. の結果はクラリスロマイシン耐性株でも同様であった。
4. コレステノンで培養した *H. pylori* において、CGL の合成が低下していた。
5. コレステノンを経口投与されたマウスでは、*H. pylori* が除菌された。

これらの結果により、コレステノンはクラリスロマイシン耐性株も含めて *H. pylori* に対して抗菌活性を示すことが認められた。コレステノンは安全な物質と考えられており、CGL の生合成を阻害するという従来の抗菌剤とは異なる作用機序で抗菌作用を示すことから、*H. pylori* に対する新たな抗菌薬となる可能性がある。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Efficacy and safety of eradication therapy for elderly patients with helicobacter pylori infection (高齢者に対するヘリコバクター除菌療法の有効性と安全性について)

小林 聡

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) は慢性胃炎、胃十二指腸潰瘍、胃癌、MALT リンパ腫と関連する最も一般的な細菌であり、治療として除菌療法が広く行われている。成人では除菌療法の有害事象は軽度で頻度は少ないと報告されているが高齢者では検討

されていないため、今回、高齢者に対する *H. pylori* 除菌療法の有効性と安全性を検討した。

【方法】2013年1月から2017年12月に北信総合病院で *H. pylori* 除菌療法を施行した1,276名を対象として後方視的観察研究を実施した。データが不足している5名を除外した1,271名について65歳未満を若年群、65

歳から74歳を高年齢群、75歳以上を超高年齢群と3群に分けて検討を行った。血清抗体価、尿素呼気試験、便中抗原検査、病理組織学検査のいずれかで陽性と判定されたものを *H. pylori* 感染と診断した。全症例で除菌療法前に上部消化管内視鏡検査を行った。治療レジメンは3剤併用療法で、1次除菌を施行し4から8週間後に尿素呼気試験を行い、陽性と判定された場合は2次除菌を施行した。尿素呼気試験で治療効果を判定した。有害事象の有無、内容についてカルテベースで確認した。

【結果】 対象患者1,271名の年齢中央値は61歳、男性が730名であった。除菌療法を施行した背景疾患として慢性胃炎77.0%、胃十二指腸潰瘍16.4%、胃癌治療後5.4%であった。1次除菌施行1133名中、除菌成功率は92.1%、有害事象発現率は9.1%、2次除菌施行146名中、除菌成功率は84.2%、有害事象発現率は8.9%であった。有害事象の内訳としては下痢が51.7%、皮疹12.9%、便秘7.8%を認めた。14名は皮疹のため治療を中断した。若年群(791名)、高年齢群(347名)、超高年齢群(133名)の3群における除菌療法について検討すると超高年齢群は他の2群と比較して慢性胃炎に対する施行率が有意に低く、胃十二指腸潰瘍と胃癌治療後に対する施行率が高かった。除菌成功率、有害事象発現率に違いは認めなかった。

【考察】 超高年齢者は若年者と比較して除菌成功率、有害事象発現率に有意差が無いことから高齢者に対する *H. pylori* 除菌療法は有効で安全であることが示唆された。一方、超高年齢者では慢性胃炎に対する除菌療法の施行率が少ないことから有害事象の危険性を懸念して除菌療法を導入されていない可能性が明らかとなった。また、*H. pylori* の感染経路はまだ完全には分かっていないが家族内感染の報告もある。拡大家族では超高年齢者にも除菌療法を行うことで、小児への感染を防止できる可能性がある。

【結論】 *H. pylori* 感染症に対する3剤併用療法は高齢者にも有効で安全である。

(論文審査の結果の要旨)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) は慢性胃炎、胃十二指腸潰瘍、胃癌、MALTリンパ腫と関連する最も一般的な細菌であり、治療として除菌療法が広く行われている。成人では除菌療法の有害事象は軽度で頻度

は少ないと報告されているが高齢者では検討されていないため、今回、高齢者に対する *H. pylori* 除菌療法の有効性と安全性を検討した。2013年1月から2017年12月に北信総合病院で *H. pylori* 除菌療法を施行した1,271名を後ろ向きに解析した。65歳未満を若年群、65歳から74歳を高年齢群、75歳以上を超高年齢群と3群に分けて検討を行った。血清抗体価、尿素呼気試験、便中抗原検査、病理組織学検査のいずれかで陽性と判定されたものを *H. pylori* 感染と診断した。全症例で除菌療法前に上部消化管内視鏡検査を行った。治療レジメンは3剤併用療法で、1次除菌を施行し4から8週間後に尿素呼気試験を行い、陽性と判定された場合は2次除菌を施行した。尿素呼気試験で治療効果を判定した。有害事象の有無、内容をカルテベースで確認した。

その結果、小林は次の結論を得た。

1. 除菌理由は慢性胃炎77.0%、胃十二指腸潰瘍16.4%、胃癌治療後5.4%であった。
2. 1次除菌を施行した1,133名中、除菌成功率は92.1%、有害事象発現率は9.1%であった。
3. 2次除菌を施行した146名中、除菌成功率は84.2%、有害事象発現率は8.9%であった。
4. 有害事象は下痢51.7%、皮疹12.9%、便秘7.8%であった。14名は皮疹のため治療を中断した。
5. 超高年齢群は他の2群と比較して慢性胃炎に対する施行率が有意に低く、胃十二指腸潰瘍と胃癌治療後に対する施行率が高かった。
6. 3群間で治療レジメンや有害事象発現率、除菌成功率には有意差を認めなかった。

以上より、*H. pylori* 感染症に対する3剤併用療法は高齢者にも有効で安全であることが判明した。超高年齢者に対しては、臨床医が有害事象の危険性が高いと判断して処方躊躇している可能性が考えられるが、本研究の結果は75歳以上でも治療を差し控える必要はないことを示唆している。*H. pylori* の感染経路はまだ完全には分かっていないが、家族内感染の報告もある。拡大家族では超高年齢者にも除菌療法を行うことで、小児への感染を防止できる可能性がある。

よって、主査、副査は一致して、本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Tamoxifen resistance alters sensitivity to 5-fluorouracil in a subset of estrogen receptor-positive breast cancer (タモキシフェン耐性は一部のエストロゲン受容体陽性乳癌の5-フルオロウラシル感受性を変化させる)

渡 邊 隆 之

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 エストロゲン受容体 (ER) 陽性再発乳癌の治療では、内分泌療法または化学療法による逐次治療が行われる。しかし、ER 陽性乳癌に対する長期間の内分泌療法が、その後に用いられる化学療法剤に対する感受性にどの様に影響するかを調べた研究は少ない。先行して行った内分泌療法が化学療法剤に対する感受性を変化させるかを解析し、内分泌療法抵抗性乳癌の個別化治療に有用なバイオマーカーを探索するために、3種類のER陽性乳癌細胞株 (T47D, MCF7, BT474) でタモキシフェン (TAM) 耐性株 (T47D/T, MCF7/T, BT474/T) を樹立し、化学療法剤に対する感受性を *in vitro* および *in vivo* で解析した。

【方法と結果】 ER陽性乳癌細胞株 (T47D, MCF7, BT474) から TAM 耐性株 (T47D/T, MCF7/T, BT474/T) を樹立し、これらの細胞の5-フルオロウラシル (5-FU), パクリタキセル, ドキソルビシンに対する感受性を WST アッセイを用いて解析した。また、薬剤により誘導されるアポトーシスの定量的解析を Cell Death Detection ELISA plus を用いて行った。これらの解析で、親株に比べ MCF7/T では5-FU 感受性の15倍の増加を認めた。そこで、5-FU の代謝経路に関与する酵素に着目し、それぞれの細胞株のチミジンシンターゼ (thymidine synthase, TS), チミジンホスホリラーゼ (thymidine phosphorylase, TP), およびジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD/*DPYD* gene) の mRNA 発現を RT-PCR 法で解析したところ、各細胞株の TAM 耐性株では親株に比し TS mRNA 発現の有意な上昇を認め、また MCF7 では TAM 耐性株で *DPYD* mRNA 発現の有意な低下を認めた。

MCF7の5-FU 感受性に TS および DPD が関与していることを確認するために、MCF7の TS と *DPYD* を siRNA でノックダウンすると、*DPYD* のノックダウンにより MCF7の5-FU 感受性は増加した。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) を用いて TS の代謝産物を定量したところ、MCF7/T では親株に比し

5-FU の活性代謝物であるフルオロデオキシウリジン (FdUrd) が増加し、DPD により産生される2-フルオロ-β-アラニン (FBAL) が減少しており、TS の代謝経路が活性化されていることが確認できた。

続いて、*DPYD* mRNA 発現低下の機序を解析するため、*DPYD* 遺伝子のプロモーター活性を luciferase reporter assay を用いて解析したところ、*DPYD* mRNA のプロモーター活性は、MCF7に比べ MCF7/T で有意に上昇していた。そこで、*DPYD* mRNA のプロモーター活性の調節にメチル化が関与している可能性を考え、脱メチル化剤5-アザシチジンで MCF7 と MCF7/T を処理した後、*DPYD* mRNA 発現を解析したところ、MCF7では1.2倍、MCF7/T では8.6倍の *DPYD* mRNA 発現の増加が認められた。さらに、5-アザシチジン処理により MCF7/T の5-FU 感受性の低下が認められたことから、MCF7/T では *DPYD* mRNA のプロモーター領域のメチル化が亢進しており、これが5-FU 感受性増加に部分的に関与していると考えられた。また、3'-UTR luciferase assay を用いた解析で、MCF7/T では親株に比し *DPYD* 3'-UTR luciferase 活性が有意に低下しており、miRNA による転写後調節も MCF7/T の *DPYD* mRNA 発現の低下に関与している可能性が示唆された。

さらに、MCF7と MCF7/T を17β-エストラジオールを投与したヌードマウスの皮下に移植し xenograft model を作成し、5-FU のプロドラッグであるカペシタピンの経口投与を行ったところ、MCF7/T では MCF7親株に比べ有意な腫瘍縮小が認められ、5-FU 感受性上昇が *in vivo* でも認められた。また、マウス皮下で形成された腫瘍の免疫組織染色で、MCF7腫瘍に比べ MCF7/T 腫瘍での DPD 発現の低下が確認できた。

【考察】 今回の結果から、一部の ER 陽性乳癌細胞株では、内分泌療法により化学療法剤感受性が変化する可能性と、TAM 耐性になった乳癌に対して5-FU が有効である可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

エストロゲン受容体 (ER) 陽性再発乳癌の治療で

は、内分泌療法または化学療法による逐次治療が行われる。しかし、ER陽性乳癌に対する長期間の内分泌療法が、その後に用いられる化学療法剤に対する感受性にどの様に影響するかを調べた研究は少ない。先行して行なった内分泌療法が化学療法剤に対する感受性を変化させるかを解析し、内分泌療法抵抗性乳癌の個別化治療に有用なバイオマーカーを探索するために、3種類のER陽性乳癌細胞株（T47D, MCF7, BT474）でタモキシフェン（TAM）耐性株（T47D/T, MCF7/T, BT474/T）を樹立し、化学療法剤に対する感受性を *in vitro* および *in vivo* で解析した。

その結果、渡邊は次の結論を得た。

1. WST法での解析で、親株に比べMCF7/Tでは5-FU感受性の15倍の増加を認めた。
2. Cell Death Detection ELISA plusを用いてアポトーシスの定量的解析を行い、親株に比べMCF7/Tでアポトーシスの増加を認めた。
3. 5-FUの代謝酵素のmRNA発現をRT-PCR法で解析し、各細胞株のTAM耐性株では親株に比し thymidylate synthase (TS) mRNA発現の有意な上昇を認め、またMCF7ではTAM耐性株で dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) mRNA発現の有意な低下を認めた。
4. MCF7のTSとDPYDのmRNA発現をsiRNAでノックダウンすると、DPYDのノックダウンによりMCF7の5-FU感受性は増加した。
5. マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) を用いて5-FUの代謝産物を定量し、MCF7/Tでは親株に比し5-FUの活性化代謝物であるフルオロデオキシウリジン (FdUrd) の増加と、DPDにより産生される2-フルオロ- β -アラニン (FBAL) の減少を認め、5-FUの代謝経路が活性化されていることを確認した。
6. DPYD遺伝子のプロモーター活性を luciferase

reporter assay を用いて解析したところ、MCF7/TでDPYD mRNAプロモーター活性がMCF7に比べ有意に上昇していることを認めた。DPYD mRNAのプロモーター活性の調節にメチル化が関与している可能性を考え、脱メチル化剤5-アザシチジンでMCF7とMCF7/Tを処理した後、DPYD mRNA発現を解析したところ、MCF7では1.2倍、MCF7/Tでは8.6倍のDPYD mRNA発現の増加を認めた。さらに、5-アザシチジン処理によりMCF7/Tの5-FU感受性の低下を認めたことから、MCF7/TではDPYD mRNAのプロモーター領域のメチル化の亢進がDPYD mRNA発現低下と5-FU感受性増加に部分的に関与していると考えられた。続いてmiRNAが関与している可能性を考え、3'-UTR luciferase assayを用いた解析を行い、MCF7/Tでは親株に比しDPYD 3'-UTR luciferase活性が有意に低下しており、この結果からmiRNAによる転写後調節もMCF7/TのDPYD mRNA発現の低下に関与している可能性が示唆された。

7. MCF7とMCF7/Tを17 β -エストラジオールを投与したヌードマウスの皮下に移植し xenograft modelを作成し、5-FUのプロドラッグであるカベシタピンの経口投与を行ったところ、MCF7/TではMCF7親株に比べ有意な腫瘍縮小が認められ、5-FUに対する感受性上昇が *in vivo* でも認められた。また、マウス皮下で形成された腫瘍の免疫組織染色で、MCF7腫瘍に比べMCF7/T腫瘍でのDPD発現が低下していることが確認できた。

これらの結果から、一部のER陽性乳癌細胞では、内分泌療法により化学療法剤感受性が変化する可能性と、TAM耐性になった乳癌に対して5-FUが有効である可能性が示された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Detecting drug-drug interactions that increase the incidence of long QT syndrome using a spontaneous reporting system (自発報告システムを用いた、QT延長の発現を助長する薬物相互作用の検出)

松 尾 純

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】薬剤性QT延長 (diLQTS) は稀であるが、Torsade de pointes (TdP) と呼ばれる心室性不整脈を引き起こす重大な副作用である。その発生機

序は、心室再分極に関わる human ether-a-go-go-related gene (hERG) チャネルを阻害することによって考えられている。薬物相互作用がdiLQTSのリスク因子であることが報告されており、薬物動態学的

相互作用 (PK) と薬力学的相互作用 (PD) の両者が関与すると考えられている。

副作用自発報告システムは、市販後に発生した薬剤の副作用報告が集積されるデータベースで、製造販売後の安全性を評価するための情報源である。2剤以上の薬剤が副作用の被疑薬として報告されることもあるため、薬物相互作用により発生した副作用についても評価することが可能である。本邦においては、医薬品医療機器総合機構が the Japanese Adverse Drug Event Report (JADER) を公開している。JADER を用いた我々の先行研究において、フルオロキノロン系抗菌薬による diLQTS のリスクを上昇させる薬物相互作用に着目し、ガレノキサシンとジソピラミドの併用が、それぞれを単独で使用する場合と比べて diLQTS の発生リスクを上昇させる可能性を見出した。本邦の添付文書において、一部のフルオロキノロン系抗菌薬はジソピラミドと併用禁忌に設定されているが、ガレノキサシンについての記載はなく、添付文書で注意喚起されていない薬剤の組合せについても注意が必要であることが示唆された。そしてこれは、フルオロキノロン系抗菌薬以外の薬剤についても同様である可能性が考えられる。

本研究は、自発報告システムを用いて、diLQTS のリスクを上昇させる可能性のある薬物相互作用を見出すことを目的とした。

【方法】 2004年4月～2020年4月の間に JADER に報告された有害事象を解析対象とした。対象とする有害事象は、MedDRA 標準検索式「トルサード ドポアント/QT 延長 (狭域)」に属する基本語6語とした。安全性評価はシグナル指標である報告オッズ比 (ROR) を用いた。2剤を同時に被疑薬として報告している場合とそうでない場合、それぞれの ROR を算出し、併用時の ROR の95%信頼区間 (CI) の下限値が、併用しない場合の ROR の95%CI の上限値を上回った場合、シグナルありと判断した。シグナルが検出された組合せについて相互作用の発生機序を評価した。また、各組合せが添付文書および Lexicomp® においてどのように注意喚起されているか確認した。

【結果】 31組がシグナルありと判断された。抗精神病薬と抗うつ薬の組合せが5組と最も多かった。PD による相互作用が8組、PKPD によるものが14組であった。各国の添付文書において、併用禁忌または注意として注意喚起されていたのは日本、米国、英国でそれぞれ16、17、21組であった。ハロペリドールとク

ロルプロマジンの組合せは英国において併用禁忌に設定されていた。Lexicomp® の分類においてはベプリジルとクラリスロマイシンの組合せが併用禁忌に相当する“X (avoid combination)”に分類されていた。“D (modify regimen)”に2通り、“C (monitor therapy)”に3通り、“B (no action needed)”に4通りが該当した。

【考察】 最も多くシグナル検出されたのは抗精神病薬と抗うつ薬の併用であった。両者はいずれも hERG 阻害作用を有する一方、一部の抗うつ薬は抗精神病薬の代謝を阻害することが報告されている。5組のうち、オランザピンとフルボキサミンの組合せは PKPD 両方の機序で diLQTS に関与していると考えられた。アルツハイマー型認知症治療薬のドネペジルは hERG を阻害することが示されており、4通りでシグナルが検出された。重大な副作用として diLQTS や TdP が分かっているものの、他剤との併用による diLQTS への注意喚起は記載がなく、相互作用による diLQTS にも注意が必要と考えられた。マクロライド系抗菌薬のクラリスロマイシンは hERG 阻害作用に加えて CYP3A4 と p-糖タンパク質 (p-gp) 阻害作用も有しており、シグナル検出された3組はいずれも PK, PD が関与した相互作用と考えられた。このうちベプリジルとの併用は、Lexicomp® において“X (avoid combination)”に分類されていたが、本邦の添付文書における注意喚起は併用注意に留まっていた。本組合せによる diLQTS は17例とシグナルが検出された31通りの中で最も多く報告されていたことも配慮し、より注意が必要な組合せである可能性が示された。ジゴキシンやメチルジゴキシンは p-gp を介した尿細管分泌により排泄されるため、p-gp 阻害作用を有する薬剤との併用には注意が必要であるが、本研究で検出された相互作用のうちアミオダロン、クラリスロマイシンがそれに該当していた。ジゴキシンの添付文書にはアミオダロン、クラリスロマイシンは併用注意に記載されていたが、メチルジゴキシンの添付文書には記載がなかった。メチルジゴキシンもジゴキシンと同様の薬理学的作用を有することから、同等の注意が必要と考えられた。

【結論】 JADER を用いて、diLQTS のリスクを上昇させる可能性のある薬剤の組合せ31組を抽出することができた。今後の評価によっては、今後より注意深い使用が求められる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

薬剤性 QT 延長 (diLQTS) は稀であるが, Torsade de pointes (TdP) と呼ばれる心室性不整脈を引き起こす重大な副作用である。human Ether-a-go-go Related Gene (hERG) チャネルを阻害する薬剤が, diLQTS に関与すると考えられている。薬物相互作用が diLQTS のリスク因子であることは報告されているが, 具体的にどの薬剤の併用がリスクを増大させるかは不明である。そこで松尾は, 副作用自発報告システムである the Japanese Adverse Drug Event Report (JADER) を用いて, diLQTS のリスクを上昇させる可能性のある薬物相互作用を見出すことを目的に検討を行った。

その結果以下の成績を得た。

1. 31組の併用において diLQTS のシグナルが検出された。
2. 抗精神病薬と抗うつ薬の併用が5組検出された。このうちオランザピンとフルボキサミンの併用は, 両者の添付文書にて併用注意に設定されていたが, 残り4組はどちらか一方の薬剤の添付文書でしか注意喚起されていなかった。
3. ハロペリドールとクロロプロマジンの併用による diLQTS は17件と, 症例数が最も多かった。この組合せは英国の添付文書にて併用禁忌に設定されていたが, 本邦では併用注意に留まっていた。
4. クラリスロマイシンは hERG 阻害作用や CYP3A,

p-糖タンパク質 (p-gp) 阻害作用を介した相互作用が危惧されるが, 本研究では4組に含まれていた。一方, これらの阻害作用がないか弱いとされているアジスロマイシンも2組に含まれていた。アジスロマイシンと QT 延長作用を有する薬剤の併用は, 米国, 英国の添付文書では注意喚起されていたが, 本邦の添付文書には記載がなかった。

5. クラリスロマイシンとベプリジルの併用による17件と, 上記3同様最も症例数が多かった。本組合せは, 相互作用評価ツールである Lexicomp[®] において, 併用禁忌に相当する risk rating X に分類されていた。

6. ジゴキシンおよびメチルジゴキシンが3通りの組合せに含まれていた。ジゴキシンの添付文書にて hERG チャネル阻害作用, p-gp 阻害作用を有するアミオダロン, クラリスロマイシンは併用注意に設定されていたが, メチルジゴキシンの添付文書には記載がなかった。

以上より, 自発報告システムを用いて QT 延長のリスクを増大させる可能性のある薬物相互作用を31組抽出することができた。これらの相互作用について, 今後の検討によってはより注意深い使用が求められる可能性があること示された。したがって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Role of linkage between cerebral activity and baroreflex control of heart rate via central vasopressin V1a receptors in food-deprived mice (マウス絶食時における脳活動と血圧反射 連関: 中枢性バゾプレッシン V1a 受容体の役割)

住 吉 愛 里

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】我々は, マウスにおいて大脳皮質活動の上昇が血圧反射を抑制すると, それをトリガーとして動脈圧が上昇し, 自発運動を開始することを報告した。さらに, この大脳皮質活動上昇後の一連の反応に中枢のバゾプレッシン V1a 受容体が関与することを報告した。しかし, これらは数十秒単位の短期間の自発運動時におけるもので, 体内の恒常性維持のためのより持続的な行動である動機づけ行動時の脳活動と血圧反射の関係については不明であった。そこで, 本研究では, 動機づけ行動時に脳活動上昇と血圧反射抑制の連関は充進するのか, もし充進するならば, その反応に循環中枢 (延髄孤束核) のバゾプレッシン V1a

受容体が関与しているのかについて検討した。

【方法】本研究では, 動機づけ行動の一つである餌の探索行動を引き起こす介入として絶食負荷を用いた。すなわち, 自由摂食, 絶食, 回復の条件それぞれを連続する3日間, 暗/明サイクル (19時/7時) の下で負荷した。餌は2日目の暗期開始1時間前の18時に取り除き, 3日目18時に再給餌した。このプロトコルを自由行動下の正常マウス (WT, n=10), V1a 受容体遺伝子欠損マウス (KO, n=9), 正常マウスの孤束核に V1a 受容体阻害剤を局所投与したマウス (BLK, n=10) に対して行い, その間の脳活動 (脳波電極), 動脈血圧 (動脈カテーテル), 心拍数 (動脈圧波形より) を連続測定し, さらにマウスの行動 (CCD カメ

ラ)を記録した。脳活動は、脳波の θ 波と δ 波のパワー比 (θ/δ) から4秒ごとに算出した。圧反射性血圧調節は、血圧の自発性変化に対する心拍数変化の相互相関関数 ($R(t)$) から4秒ごとに評価した。さらに、脳活動と血圧反射の連関を、 θ/δ と $R(t)$ の間の相互相関関数から評価した。

【結果】WTマウスにおいて、脳活動と血圧反射の連関は、絶食日の暗期に亢進し ($P=0.006$)、回復日に自由摂食日のレベルに戻った ($P=0.68$)。同様に、WTマウスにおいて、餌の探索行動は、絶食日の暗期に自由摂食日と比較して2倍高いレベルに増加し ($P=0.0008$)、回復日に自由摂食日のレベルに戻った ($P=0.54$)。しかし、絶食日におけるこれらの亢進はKOまたはBLKマウスのいずれにおいても認められなかった ($P>0.11$)。

【結論】絶食時の動機づけ行動である餌の探索行動の増加に伴って脳活動上昇と血圧反射抑制の連関が亢進することが示唆された。さらに、孤束核のバズプレッシン V1a 受容体は、この中枢性血圧反射抑制を促進することで、動機づけ行動の開始に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

これまで大脳皮質活動の増加が血圧反射を抑制すると、それをトリガーとして昇圧反応が起こり、マウスは自発運動を開始することが報告されていた。さらにこの大脳皮質活動上昇後の一連の反応に中枢のバズプレッシン V1a 受容体が関与していることが報告されていた。しかしながら、これらの報告は数十秒単位の短期間の自発運動におけるもので、体内の恒常性維持のためのより持続的な行動である動機づけ行動時の脳活動と血圧反射の関係については明らかになっていなかった。

そこで、住吉は動機づけ行動時に脳活動上昇と血圧反射抑制の連関は亢進するのか、もし亢進するならば、その反応に循環中枢(延髄孤束核)のバズプレッシン V1a 受容体が関与しているのか、について検討した。

自由行動下の正常マウス (WT, $n=10$)、V1a 受容

体遺伝子欠損マウス (KO, $n=9$)、正常マウスの孤束核に V1a 受容体阻害剤を局所投与したマウス (BLK, $n=10$) を用いて検証を行った。本研究では、動機づけ行動を高める方法として、最も一般的でかつ簡単な絶食負荷を用いた。すなわち、自由摂食、絶食、回復のそれぞれの条件を負荷した連続3日間、明暗サイクル (19時/7時) 下で測定を行った。その間の脳活動(脳波電極)、動脈血圧(動脈カテーテル)、心拍数(動脈圧波形より)を連続測定し、さらにマウスの行動(CCDカメラ)を記録した。脳活動は、脳波の θ 波と δ 波のパワー比 (θ/δ) から4秒ごとに算出した。圧反射性血圧調節は、血圧の自発性変化に対する心拍数変化の相互相関関数 ($R(t)$) から4秒ごとに評価した。さらに、脳活動と血圧反射の連関を、 θ/δ と $R(t)$ の間の相互相関関数から評価した。

そして、次のような結果を得た。

1. WTマウスにおいて、脳活動と血圧反射の連関は、自由摂食日と比べて絶食日暗期に亢進し ($P=0.006$)、回復日に自由摂食日のレベルに戻った ($P=0.68$)。一方、V1a KOマウスにおいては、この反応が阻害されていた ($P=0.58$)。
2. WTマウスにおいて、餌の探索行動は、絶食日の暗期に自由摂食日と比較して2倍高いレベルに増加し ($P=0.0008$)、回復日に自由摂食日のレベルに戻った ($P=0.54$)。一方、V1a KOマウスにおいてはこの反応が阻害されていた ($P=0.29$)。
3. 正常マウスの延髄孤束核に V1a 受容体阻害剤を局所投与した際 V1aBLKマウスでは、V1a KOマウスの反応が再現できた ($P>0.11$)。

これらの結果より、絶食時の動機づけ行動である餌の探索行動の増加に伴って脳活動上昇と血圧反射抑制の連関が亢進することが示唆された。さらに延髄孤束核の V1a 受容体は、この中枢性血圧反射抑制を促進することで、動機づけ行動の開始に重要な役割を果たしていることが示唆された。

従って、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。