

博士學位論文

内容の要旨
および
審査の結果の要旨

薬学研究科

第39号

平成29年5月

徳島文理大学

は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

目 次

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
甲第47号	末 長 努	ビタミンD代謝物を基盤とした新しい分子創製に関する研究	1
甲第48号	清 家 総 史	C型ウエルシュ菌 β 毒素の毒性メカニズムの解析	8
甲第49号	森 本 真 仁	重症心身障害児・者における難治性てんかん発作に対する抗てんかん薬及び酸化ストレスの影響に関する研究	15

氏名	すえなが つとむ 未長 努
本籍	山口県
学位の種類	博士（薬学）
学位記号	甲 第47号
学位授与年月日	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規定第4条第1項該当（課程博士）
学位授与の題目	ビタミンD代謝物を基盤とした新しい分子創製に関する研究
指導教員	教授 藤島 利江
論文審査委員	（主査）教授 山口 健太郎 （副査）教授 東屋 功（東邦大学 薬学部） （副査）教授 代田 修 （副査）准教授 富永 昌英

ビタミン D₃ (1) は生体内で代謝され、1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ (2) である活性型ビタミン D₃ を生成する。(2) はカルシウム恒常性を担うのみならず、細胞分化や増殖に関わる *seco*-ステロイドホルモンであり、その主たる分子標的は特異的核内ビタミン D 受容体 (VDR) である。(2) は幅広い医薬品への応用が期待できることから、盛んに研究が行われてきた。その結果、骨粗鬆症などに対する医薬品開発が成功している。しかし、ビタミン D 製剤は共通してカルシウム作用に起因する副作用が存在する。有効性と安全性の面からビタミン D のカルシウム作用を制御した、疾患特異的なビタミン D 製剤の開発が望まれている。作用制御の鍵はさらなる活性発現機構の解明であると考えられる。ビタミン D 代謝物は (2) と物理化学的な面や生理的役割の面においても性質が異なる。つまり、新しい代謝物の役割を明らかとすることは新しい側面からの活性発現機構への理解に繋がると考えられる。そこで、本論文では大きく 2 つの代謝物を基盤として誘導体の設計・合成を行った。

スピロオキセタン構造を有するビタミン D₃ 誘導体の合成に関する研究

活性発現に重要な VDR は A 環部ヒドロキシ基を、立体化学を含め、水素結合にて厳密に認識する。特に 1 α 位ヒドロキシ基の立体化学が活性に及ぼす影響は大きい。一方、細胞特異的代謝物として知られる (2) の 3 位エピマーは VDR 親和性を保持していることから、3 位近傍には付加的空間が存在し、構造修飾が可能であると推定される。現在までに、これら重要なヒドロキシ基に関し、有効な官能基変換に成功した例はない。そこで、A 環 1 位、及び 3 位近傍の付加的空間を利用して、水素結合様式を変化させる構造修飾が生物活性に与える影響を調べるため、特徴的な官能基の導入を検討した。

四員環エーテルであるオキセタンは、カルボニル基の生物学的等価体として機能することが報告され、医薬品への応用が期待されている。しかし、ヒドロキシ基の代替として導入された例は報告されていない。本研究では、1 位または 3 位の立体化学に関する

問題を排除し、対称なスピロオキシタン構造を導入した誘導体を設計し、生理活性物質におけるヒドロキシ基代替としてのオキシタン構造の可能性を探ることにした。

収束的合成においては、3,3-bis(2-hydroxyethyl)oxetane (3) を出発原料とし、望みの位置にオキシタンを導入した3種の新規A環部前駆体の合成法を確立した。オキシタン環はほとんどの合成条件下において安定に取り扱うことができ、A環部1位2位3位にオキシタン構造を有する誘導体の合成法を確立することに成功した。この合成法により、用いるCD環部を変更することで様々なオキシタン誘導体の合成が可能となった。

新規誘導体のヒドロキシ基の立体化学は、励起子キラリティー法により決定した。親化合物の影響を除去するため差スペクトルをとる、あるいは、置換基を有するベンゾエートを用いることを検討した。その結果、6種のビタミンD₃誘導体すべてにおいて、*seco*-ステロイド骨格を利用する励起子キラリティー法による絶対配置決定に成功した。この方法は未知のビタミンD代謝物の立体化学決定において有用であり、今後のビタミンD類縁体の絶対配置決定に有用な知見が得られた。

VDR親和性試験の結果、3位ヒドロキシ基は水素結合供与体として重要であることが示唆された。さらに、オキシタン構造は水素結合受容体として機能するヒドロキシ基の代替となることが示された。この章では、オキシタン構造をヒドロキシ基の代替とするはじめての試みを行い、体系的に検討できる合成法およびビタミンDに有利な絶対配置決定法の確立に成功した。

20S-ヒドロキシビタミンD₃を基盤とした誘導体の合成に関する研究

近年、側鎖切断酵素 (P450_{scc}) として知られる CYP11A1 が (1) を基質とし、20S-ヒドロキシビタミンD₃ (5) を生成することが報告された。CYP11A1 はコレステロールを基質として側鎖切断することにより、ステロイドホルモン生合成に関わる重要な酵素である。VDR は1 α 位、及び25位ヒドロキシ基を厳密に認識しており、この2つのヒドロキシ基を欠く (5) の構造と特異な生理活性に注目した。22位に酸素原子を有するマキサカルシトール (6) は、ラットを用いた代謝実験で側鎖長が短い代謝物が報告

されている。(5)に関しても、代謝により側鎖部の切断反応が起きている可能性がある。側鎖部の切断はアルキル鎖によるファンデルワールス力や25位ヒドロキシ基の水素結合を失うことから不活性化と捉えられるため、誘導体研究に関して、全く吟味されていなかった。そこで、(5)の構造を基盤に、様々な側鎖長を有する誘導体の合成を行った。

ビタミン D₂ より五工程にて導いた20位ケトン体に、種々の Grignard 試薬を反応させ、20位ヒドロキシビタミン D のライブラリーを構築した。Grignard 試薬と20位ケトン体の反応は Felkin-Anh 則に従った主生成物を与え、立体化学は X 線結晶解析にて確認し、不飽和結合と20位ヒドロキシ基の組み合わせが側鎖部をこれまでにない配座にて安定化することを明らかにした。20位ヒドロキシ基の立体化学、側鎖長及び不飽和結合の有無が VDR 親和性に大きく影響を与え、これまでにない側鎖部モチーフを持つ高親和性誘導体を見いだした。次に、20位ヒドロキシ基の役割をさらに検討するため、20位ヒドロキシ体から脱却し、Grignard 試薬と Wittig 反応により種々の側鎖部導入を可能とする合成法を確立した。また、短い側鎖を持つ誘導体が VDR に対して活性型ビタミン D₃ (2) に匹敵する高親和性を示すというはじめての例が得られた。これら高活性物質と VDR との新たな相互作用には22位に導入した π 電子の関与が示唆された。

今後は確立した合成法を用いて新たな相互作用の役割を明らかとすることができると考えている。この章では20位ヒドロキシ基の役割を精査することができ、高親和性を示す誘導体の合成に成功した。さらに VDR とリガンドとの新たな相互作用の発見などビタミン D 研究において非常に重要な知見を得ることができた。

以上、本研究は、特徴的な構造素子であるオキセタンの可能性を探るため *seco*-ステロイド骨格に導入する合成法の開発、あるいは20位ヒドロキシビタミン D を基盤とした体系的な側鎖修飾 CD 環部の開発や、ビタミン D 化合物における新たな立体化学決定法を行ったものである。本研究により得られた知見は今後のビタミン D 研究に応用でき、新たなリガンド設計や活性発現機構解明に貢献できると考えている。

学位記号	甲 第 号	論文提出者	氏名 末長 努
学位論文題名 ビタミンD代謝物を基盤とした新しい分子創製に関する研究			
学位の種類 博士 (薬学)			
審査委員	専 攻 等	職 名	氏 名
	(主査) 薬学専攻	教 授	山口 健太郎
	(副査) 東邦大学大学院薬学研究科医療薬学専攻	教 授	東屋 功
	(副査) 薬学専攻	教 授	代田 修
	(副査) 薬学専攻	准教授	富永 昌英

学位論文内容および審査の要旨

ビタミンD₃ (1) は生体内で代謝され、1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (2) である活性型ビタミンD₃を生成する。2はカルシウム恒常性を担うのみならず、細胞分化や増殖に関わる *seco*-ステロイドホルモンであり、その主たる分子標的は特異的核内ビタミンD受容体 (VDR) である。2は幅広い医薬品への応用が期待できることから盛んに研究が行われてきた。その結果、骨粗鬆症などに対する医薬品開発が成功している。しかし、ビタミンD製剤は共通してカルシウム作用に起因する副作用が存在する。有効性と安全性の面からビタミンDのカルシウム作用を制御した疾患特異的なビタミンD製剤の開発が望まれている。作用制御の鍵はさらなる活性発現機構の解明であると考えられる。ビタミンD代謝物は2と物理化学的な面や生理的役割の面においても性質が異なる。つまり、新しい代謝物の役割を明らかとすることは新しい側面からの活性発現機構

の理解に繋がると考えられる。本論文では大きく2つの代謝物を基盤として誘導体の設計・合成を行った結果が記述されている(第一章)。

第二章において、スピロオキセタン構造を有するビタミンD₃誘導体の合成について述べており、オキセタン構造をヒドロキシ基の代替とするはじめての試みを行い、体系的に検討できる合成法およびビタミンDに有利な絶対配置決定法の確立に成功している。すなわち、VDR親和性試験の結果、3位ヒドロキシ基は水素結合供与体として重要であることが示唆された。さらに、オキセタン構造は水素結合受容体として機能するヒドロキシ基の代替となることが示された。この過程で著者は、新規誘導体のヒドロキシ基の立体化学を励起子キラリティー法により決定している。その結果、6種のビタミンD₃誘導体すべてにおいて、*seco*-ステロイド骨格を利用する励起子キラリティー法による絶対配置決定に成功している。この方法は未知のビタミンD代謝物の立体化学決定において有用であり、今後のビタミンD類縁体の絶対配置決定に有用な知見が得られたと考えられる。

第三章では、20S-ヒドロキシビタミンD₃を基盤とした誘導体の合成に関して詳述し、様々な側鎖長を有する誘導体の合成を行っている。また、ビタミンD₂より五工程にて導いた20位ケトン体に、種々のGrignard試薬を反応させ、20位ヒドロキシビタミンDのライブラリーを構築している。Grignard試薬と20位ケトン体の反応はFelkin-Anh則に従った主生成物を与え、立体化学はX線結晶解析にて確認し、不飽和結合と20位ヒドロキシ基の組み合わせが側鎖部をこれまでになく配座にて安定化することを明らかにした。この結果、20位ヒドロキシ基の立体化学、側鎖長及び不飽和結合の有無がVDR親和性に大きく影響を与え、これまでになく側鎖部モチーフを持つ高親和性誘導体を見いだしている。

第四章は、側鎖切断型ビタミンD誘導体の合成に関するものである。20位ヒドロキシ基の役割をさらに検討するため、20位ヒドロキシ体から脱却し、Grignard試薬とWittig反応により種々の側鎖部導入を可能とする合成法を確立した。また、短い側鎖を持つ誘導体がVDRに対して活性型ビタミンD₃(2)に匹敵する高親和性を示すというはじめての例を得ている。これら高活性物質とVDRとの新たな相互作用には22位に導入した π 電子の関与が示唆された。

1) 論文審査結果の要旨

本論文に記述された研究は、特徴的な構造素子であるオキセタンの可能性を探るため *seco*-ステロイド骨格に導入する合成法の開発、あるいは 20 位ヒドロキシビタミン D を基盤とした体系的な側鎖修飾 CD 環部の開発や、ビタミン D 化合物における新たな立体化学決定法を行ったものであり、本研究により得られた知見は今後のビタミン D 研究に応用でき、新たなリガンド設計や活性発現機構解明に貢献できると考えられる。これらの結論を導くためのデータは、質、量ともに十分であり、また、参考文献を適切に引用しており、理解しやすい論文といえる。

よって本論文は博士(薬学)の学位に相応しいものとする。

氏名	せいけ そうし 清家 総史
本籍	大分県
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	甲第 48 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当 (課程博士)
学位授与の題目	C 型ウエルシュ菌β毒素の毒性メカニズムの解析
指導教員	教授 永浜 政博
論文審査委員	(主査) 教授 姫野 誠一郎
	(副査) 教授 井上 正久
	(副査) 教授 赤木 正明
	(副査) 外部 山中 浩泰 (広島国際大学 薬学部)

ウエルシュ菌は、産生する毒素のタイプにより A から E の 5 型に分類されている。C 型ウエルシュ菌はヒトや動物における壊疽性腸炎の原因菌であると報告されており、本菌感染症においてβ毒素は主要な病原因子として考えられている。C 型菌感染症は、日本において、特に、ブタなどの家畜での集団感染が問題となっている。所属する研究室では、β毒素は、感受性細胞であるヒト血液系細胞株の HL-60 細胞において、脂質ラフトでオリゴマー化し、そして機能的なポアを形成して、水分の流出入により細胞を破壊し、細胞毒性を示すことを報告した。しかしながら、β毒素の詳細な作用機構は解明されていない。本研究では、β毒素の作用メカニズムを明らかにするため、本毒素の細胞膜レセプターの探索、細胞毒性に関わる分子、そして、感受性細胞の抵抗性に関与する分子を解明して、本毒素の本質を明らかにした。

β毒素は、黄色ブドウ球菌 α 毒素とアミノ酸の一次配列が約 28%の相同性を示し、β-pore-forming toxin family (β-PFT family) に属する。α 毒素は ATP レセプターである P2X レセプター (P2XR) を介して生物活性を示すことが報告されている。また、本毒素が強い感受性を示す血液系細胞には P2XR が多く発現し、さらに、P2XR の活性化により、炎症等が誘導されることが報告されている。そこで、まず、本毒素のレセプターとして P2XR に着目し、種々の解析を行った。P2XR の非選択的阻害剤 (Suramin、PPADS)、または、P2X₇レセプター (P2X₇R) の選択的阻害剤 (o-ATP、o-ADP、Brilliant Blue G) を処理した THP-1 細胞に対するβ毒素の毒性を観察すると、いずれの阻害剤でも細胞毒性が抑制された。最も毒性抑制効果の強い o-ATP でβ毒素の結合に対する影響を検討すると、o-ATP 未処理細胞と比較して、本毒素の結合は阻害された。次に、siRNA で P2X₇R をノックダウン (KD) した細胞に対するβ毒素の作用を検討すると、Negative control siRNA トランスフェクト細胞と比較して、P2X₇R KD 細胞においてβ毒素の毒性と細胞への結合が著しく抑制された。また、P2X₇R を発現しない HEK293 細胞に P2X₇R プラスミドをトランスフェクト (HEK293-P2X₇R 細胞) し、β毒素の作用を検討したところ、HEK293-P2X₇R 細胞は、ベクタートランスフェクト HEK293 細胞と比較して、β毒素の強い結合と毒性が認められ

た。以上より、β毒素は P2X₇R を介して、細胞に結合すると考えられる。そこで、β毒素と P2X₇R との直接的な結合をドットプロット法で検討すると、P2X₇R とβ毒素の用量依存的な結合が認められ、この結合は P2X₇R 阻害剤で抑制された。これに対して、β毒素は同じ P2XR ファミリーの P2X₃R や P2X₅R とは本実験条件下で結合しなかった。さらに、THP-1 細胞膜に結合したβ毒素と P2X₇R の細胞膜上での局在を免疫蛍光染色法により共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、本毒素と P2X₇R は細胞膜上で約 40%の共局在を示した。次に、本毒素のマウス致死活性に対する P2X₇R 阻害剤の効果を検討した。その結果、β毒素単独処理で、10 時間以内に全マウスが死亡する条件で、P2X₇R 阻害剤を投与すると、本毒素投与 60 時間が経過してもマウスの生存率が 50%と、致死の抑制が認められた。以上の結果より、ウェルシュ菌β毒素の宿主レセプターとして P2X₇R が同定され、このレセプターへの結合が本毒素の毒性発現に強く関与することが明らかとなった。

次に、P2X₇R に本毒素が作用後の活性化経路について検討した。P2X₇R は、細胞内 ATP を細胞外へ遊離するチャネルである Pannexin1 (Panx1) と共役し、相互作用することが報告されている。また、Panx1 はβ毒素が作用する腸管の上皮細胞で発現し、炎症に関与することが知られている。そこで、本毒素の細胞毒性における Panx1 の役割を検討するため、Panx1 阻害剤である Carbenoxolone (CBX) と Probenicid (Pb) で処理した THP-1 細胞に、本毒素を作用させ、細胞毒性を検討した。その結果、いずれの阻害剤においても、本毒素の毒性は減少した。次に、Panx1 は細胞外へ ATP を遊離させるチャネルなので、β毒素処理時の細胞外への ATP 遊離を測定した。β毒素処理後 5~15 分で細胞から初期の一過性の ATP 遊離が認められ、その後、細胞毒性が認められる 60 分後では強い ATP 遊離が認められた。さらに、本毒素による初期の ATP 遊離は CBX 処理により強く抑制された。次に、β毒素オリゴマーで形成されたポアから ATP が遊離する可能性があるので、人工膜モデルであるリポソームを用いて検討した。ホスファチジルコリンとコレステロール (1:1) で構成されるリポソームに ATP、及び Carboxy fluorescein (CF) を封入し、β毒素による ATP 遊離を測定した。その結果、THP-1 細胞で認められた 5~15 分の初期の ATP 遊離は認められず、60 分後では ATP 及び CF の同時遊離が認められた。さらに、このリポソームに対するβ毒素の結合を解析すると、時間に依存して、オリゴマーの結合量が増加した。この結果より、ATP は CF と同時に遊離することから、β毒素のオリゴマーによる膜破壊

で、ATP と CF が遊離すると考えられ、 β 毒素オリゴマーのポアから ATP は遊離しないと考えられる。以上の結果より、 β 毒素は、Panx1 を活性化して初期の ATP 遊離を誘導し、後期の ATP 遊離は、 β 毒素のポア形成による膜破壊によって遊離することが明らかとなった。次に、本毒素により、細胞外に遊離した ATP と細胞毒性の関係を明らかにするため、ATP を分解するヘキソキナーゼ、または、アピラーゼを毒素添加 10 分前に添加し、 β 毒素の細胞毒性を測定した。その結果、いずれの ATP 分解酵素で処理した場合も β 毒素の毒性が抑制され、本毒素による、初期の Panx1 からの ATP 遊離が毒性発現に関与することが判明した。さらに、遊離した ATP の役割を検討するため、外因的に ATP を添加し、 β 毒素の結合、及び細胞毒性を検討した。その結果、ATP の添加により、 β 毒素の結合と細胞毒性が増強された。以上より、 β 毒素は、Panx1 からの ATP 遊離を促進し、遊離した ATP は本毒素の細胞毒性に強く関与することが明らかとなった。

β 毒素と同じファミリーの β -PFT は、細胞膜上において、オリゴマー、そしてポアを形成し、細胞内 K^+ を遊離させるが、 K^+ 遊離がトリガーとなり、細胞の生存を増強する宿主の p38 MAPK などを活性化し、毒素の細胞毒性に対抗することが報告されている。そこで、 β 毒素作用時の宿主の抵抗因子について、p38 MAPK と JNK に着目し、解析を行った。まず、本毒素は、THP-1 細胞から、毒素濃度と処理時間に依存した細胞内 K^+ 遊離作用を示した。次に、本毒素による p38 MAPK と JNK のリン酸化を測定すると、いずれもリン酸化は K^+ 遊離が始まる 15 分から認められ、60 分で最大となった。 β 毒素による p38 MAPK のリン酸化は MAPK 阻害剤である SB203580 によって抑制され、本毒素の細胞毒性は、SB203580 処理で、有意に増強された。さらに、JNK 阻害剤である SP600125 は本毒素による JNK のリン酸化を阻害し、また、細胞毒性を増強した。次に、高 K^+ 外液の場合、本毒素の結合は変化しないが、p38 MAPK のリン酸化と細胞毒性は抑制されたため、高 K^+ 外液では、 β 毒素による K^+ 遊離が抑制され、毒性が発現しないと考えられる。以上の結果より、ウエルシュ菌 β 毒素は、細胞膜に結合後、オリゴマーを形成し、ポアから K^+ を遊離させ、これがトリガーとなり、宿主細胞の生存シグナルとして p38 MAPK や JNK シグナル伝達経路が活性化され、 β 毒素の毒性に対して抵抗していることが明らかとなった。

本研究において、ウエルシュ菌 β 毒素は、感受性細胞の P2X₇R に結合後、オリゴマー、そしてポアを形成し、細胞毒性を誘導することが判明した。 β 毒素が、P2X₇R に結合すると

共役分子である Panx1 が活性化され、細胞内 ATP が細胞外へ遊離する。遊離した ATP はβ毒素の細胞への結合や、オリゴマー形成を促進し、β毒素の細胞毒性を増強することが明らかとなった。一方、宿主は、β毒素処理による K⁺遊離がトリガーとなり、p38 MAPK や JNK をリン酸化し、β毒素の細胞毒性に対して抵抗していることが明らかとなった。本研究により、P2X₇R や Panx1 を標的とした治療法の開発が、β毒素産生菌による感染症治療に有効であることが考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は、C 型ウエルシュ菌 (C 型菌) による壊疽性腸炎に対する治療の糸口を見つけることを目的として行われた研究について論じている。すなわち、C 型菌が産生する主要な病原因子であるβ毒素が作用する受容体やシグナル伝達の活性化、そして、β毒素の細胞毒性に抵抗する宿主の防御シグナルの解析など総合的な解析を行い、C 型菌感染症の治療に対する新規な知見を含めた論文構成となっている。

まず初めに、C 型菌感染症の治療ターゲットとなるβ毒素の特異的な細胞膜受容体の探索を行っている。毒素の受容体の候補として、β毒素に高い感受性を示す免疫系細胞に多く発現し、腸炎の増悪因子として知られる ATP レセプターの P2X レセプター (R) に着目し検討した。β毒素の感受性細胞や、クローニングした遺伝子、そして、リコンビナント P2XR 等を用いた多面的な解析により、β毒素が P2X₇R に特異的に結合していることが明らかになった。しかし、細胞膜上でのβ毒素と P2X₇R の共局在は 40%程度であるにもかかわらず、共に脂質ラフトに局在することから、β毒素は P2X₇R に結合後、細胞膜に結合している可能性が示唆された。これら知見により、β毒素の感受性細胞膜上における分子作用メカニズムが明らかになった。さらに、β毒素のマウス致死作用においても P2X₇R 阻害剤の有効性が認められた。今後、β毒素による壊疽性腸炎の治療ターゲットとして P2X₇R が期待される。

次に、著者は P2X₇R の共役分子として知られる ATP 遊離チャネルの Pannexin1 (Panx1) に着目し、β毒素の詳細な毒性シグナルについて検討を行っている。β毒素が感受性細胞に作用後、5 分から 15 分で一過性の ATP 遊離を示した。この ATP 遊離は、β毒素のオリゴマー (ポア) による遊離ではなく、Panx1 の活性化による遊離であることを見出した。Panx1 から遊離した初期の一過性の ATP 遊離は、β毒素の細胞毒性や細胞への結合を増加させることが明らかとなり、Panx1 や ATP がβ毒素の細胞毒性の増悪因子であることが判明した。以上より、β毒素は P2X₇R や Panx1 といった ATP シグナル関連分子を介して、細胞毒性を発現していることが明らかとなった。

次に、著者はβ毒素を作用させた細胞における宿主の防御シグナルについて検討を行っている。β毒素は感受性細胞において、細胞膜上でオリゴマー (ポア) を形成し、細胞

内 K^+ を遊離させ、p38 MAPK や JNK シグナルを活性化し、 β 毒素の細胞毒性に抵抗していることが明らかとなった。以上より、P2X₇R や Panx1 といった β 毒素の細胞毒性に関与する分子を阻害する治療戦略だけでなく、宿主の防御シグナルを増強することで C 型菌感染症に対して対抗できる可能性を持った重要な知見が得られた。

以上、これらの研究結果は、C 型菌感染症における新たな病態発症メカニズムの解明に繋がり、今後、本菌感染症に対する治療薬開発への応用が非常に期待できる。本研究は、今後の微生物学の研究分野において大いに貢献できると考えられる。よって、本論文は博士(薬学)の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査 (教授)	姫野 誠一郎	印
	副査 (教授)	赤木 正明	印
	副査 (教授)	井上 正久	印
	副査 (外部)	山中 浩泰	印

(広島国際大学 薬学部)

氏名	森本 眞仁
本籍	徳島県
学位の種類	博士（薬学）
学位記号	甲第49号（課程博士）
授与年月日	平成29年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）
学位論文の題目	重症心身障害児・者における難治性てんかん発作に対する 抗てんかん薬及び酸化ストレスの影響に関する研究
指導教員	教授 京谷庄二郎
論文審査委員	（主査）教授 赤木正明 （副査）教授 井上正久 （副査）教授 伊藤康一 （副査）教授 土屋浩一郎 （徳島大学 薬学部）

重症心身障害児・者 (Severe Motor and Intellectual Disabilities : SMID) とは、児童福祉法第 7 条第 2 項において『重度の知的障害及び重度の肢体不自由が重複している児童』と定義されている。SMID は日本国内で 4 - 5 万人ほど存在するとされている。SMID は周産期や乳幼児期の発達段階で中枢神経に障害を受けたものであり、年齢とともに症状が軽減したり回復したりするものではない。そのため Quality of life(QOL)を保ち、生命を維持する医療が行われている。

SMID は、全身性に多岐に渡る合併疾患を有するが、特に難治性てんかんを多く合併しており、抗てんかん薬(antiepileptic drug : AED)の多剤併用を行っても、てんかん発作をコントロールすることは難しい。また、SMID は自己の意思表示が困難であるため、てんかん治療において重要な主観的情報を得ることができない。現状の AED を用いての薬物治療は、脳波検査や画像検査などのいくつかの指標を用いて評価しているが、相対的に経験則に基づいた薬物治療に頼っており、SMID における難治性てんかん発作における、EBM (evidence-based medicine) の確立が求められている。そこで、てんかん薬物療法やてんかん発作の予後予測に用いることのできる、新しい評価指標の探索を目的に本研究を行った。

第一章では、SMID の特徴に関与する相互関連因子を明らかにするため、徳島赤十字ひのみね総合療育センターに長期入院していた SMID135 人の患者背景をもとに、疫学調査研究を行った。SMID に関わる 13 の因子 (①性別 : 男、②肥満度 : 痩せ、③主病名 : 脳性麻痺、④重症度分類 : 横地分類 A1 - C3、⑤超重症児スコア : 超・準超重症児、⑥早期産、⑦低出生体重児、⑧新生児仮死あり、⑨新生児黄疸あり、⑩てんかんの合併、⑪1 年以内のてんかん発作あり、⑫発作抑制薬の使用あり、⑬抗てんかん薬の使用剤数) の相互関連を解析したところ、17 とおりの因子間に相互関連性が認められた。特にてんかん有病率は、77%と一

般のてんかん有病率（1%弱）よりも有意に高く、SMID の各関連因子と「てんかん」に関わる因子との相互関連が多いことが、明らかになった。本解析は、在宅 SMID は対象外であり、当院に入院した SMID のみを対象としたため、示された相互関連性が全ての SMID に当てはまるわけではない。しかし疫学背景から得られた関連因子は、SMID の特徴を示す参考指標となると思われる。

第二章では、SMID のてんかん特性を明らかにするため、SMID てんかん患者の背景を調査した。てんかん病名を有する SMID 115 人のうち、調査期間内に AED の継続投与を行った 81 人を対象とした。てんかん分類では、「症候性-局在性」が 58.0%、「症候性-全般」が 35.8%であり、「特発性てんかん」の患者はいなかった。平均発作回数は 3.7 ± 7.9 回/月 (mean \pm SD) であった。6 年間発作なしが 39.5%と最も多かったが、発作ありは 60.5%で発作コントロールは良好ではなかった。難治性てんかんの日本基準（主な AED 2-3 種類以上の単剤あるいは多剤併用で、かつ十分量で、2 年以上治療しても発作が 1 年以上抑制されず日常生活に支障をきたす状態）に照らし合わせてみると、SMID てんかんは難治性であることが確認された。また、「SMID の重症度」および「使用している AED の種類」について、「てんかん発作回数」や「AED の使用剤数」がどのように変化するかを検討した。その結果、重症度が高い群、Newer AED（2006 年以降に日本で承認された Gabapentin, Topiramate, Lamotrigine, Levetiracetam）を追加している群ほど、てんかん発作回数が多く、使用 AED 数も多かった ($P < 0.05$)。さらに、Newer AED が SMID てんかん患者に有効であるかを検討したところ、Newer AED を追加投与することで有意にてんかん発作回数が減少した ($P < 0.01$)。このことより、Newer AED が SMID てんかんに対して有効であることが明らかになった。

第三章では、てんかん発作に生体内の酸化ストレスが関与していることが示唆されていることより、SMID 難治性てんかんにも酸化ストレスが関与していると推察される。そこで、血中の酸化ストレスマーカーである d-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites) 値、BAP (Biological Antioxidant Potential) 値、アルブミン値とてんかん発作回数に関連するか測定・検討した。AED 内服中の SMID 43 人について、血漿 d-ROMs 値、BAP 値を測定・解析を行ったところ、てんかん発

作回数が多いほど d-ROMs 値が有意に高かった ($P < 0.01$)。血漿 BAP 値とてんかん発作回数の間に関連は認められなかった ($P = 0.21$)。血漿アルブミン値は、d-ROMs 値 ($P = 0.52$)、BAP 値 ($P = 0.85$) の間に関連は認められなかった。このことより、SMID のてんかん発作回数が多いほど、血漿 d-ROMs 値が高くなることが認められ、SMID 難治性てんかんの予後予測指標として、生体内酸化ストレスマーカーの血漿 d-ROMs 値が臨床応用できる可能性が示唆された。

第四章では、Newer AED のなかでも SMID 難治性てんかん患者に頻用されている Lamotrigine (LTG)、Levetiracetam (LEV) を追加投与した 27 名において、安全性・有効性と血漿 d-ROMs 値の関係を解析・検討した。安全性について、LTG、LEV が何らかの理由で中止となった全ての SMID 患者が、d-ROMs 値 ≥ 321 U. CARR の異常値を示した。副作用の発現を認めた全ての SMID も、d-ROMs 値 ≥ 321 U. CARR の異常値を示した。特に、LTG、LEV を追加投与後、発作増悪または不変と判断され LTG、LEV が中止になった 3 人は、いずれも追加投与前の d-ROMs 値が 500 U. CARR を超える、Very high-level oxidative stress であった。d-ROMs 値 ≤ 320 の正常値域の SMID 患者では薬剤中止例や副作用発現例は認められなかった。有効性について LTG、LEV の全般改善度は、「著明改善」と「改善」を「有効」とすると、83.3%が「有効」と判定され、SMID 難治性てんかん患者に対し、LTG、LEV が有用であることが改めて示された。一方、d-ROMs 値が高値になるほど有意に奏功率が減少する傾向が認められた ($r = -0.558, P < 0.01$)。特に d-ROMs 値が 500 U. CARR を超える、Very high-level oxidative stress では、発作が増悪する例も認められた。

これらの研究結果より、血漿 d-ROMs の測定は SMID 難治性てんかん薬物療法における AED の有効性や安全性、さらにてんかん発作回数の予後予測指標として有用であることが明らかとなった。また、低侵襲で迅速かつ臨床現場で酸化ストレスが測定可能であることより、d-ROMs が臨床応用できる酸化ストレスマーカーであることが示された。このことより血漿 d-ROMs 値を用いての酸化ストレス測定は、SMID 難治性てんかん患者の薬物療法の評価について有用であると考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は、重症心身障害児・者(SMID)の難治性てんかんに対する予後予測や薬物療法における客観的指標を探索することを目的として行われた研究について論じている。SMIDは、全身性に多岐に渡る合併疾患を有するが、特に難治性てんかンを多く合併しており、抗てんかん薬(AED)の多剤併用を行っても、てんかん発作をコントロールすることは難しい。また、SMIDは自己の意思表示が困難であるため、てんかん治療において重要な主観的情報を得ることができない。現状のAEDを用いての薬物治療は、脳波検査や画像検査などのいくつかの指標を用いて評価しているが、相対的に経験則に基づいた薬物治療に頼っており、SMIDにおける難治性てんかん発作における、evidence-based medicine (EBM) の確立が求められている。

まず初めに、SMIDの特徴に關与する相互關連因子を明らかにするため、SMIDに關わる13の因子(①性別：男、②肥満度：痩せ、③主病名：脳性麻痺、④重症度分類：横地分類 A1 - C3、⑤超重症児スコア：超・準超重症児、⑥早期産、⑦低出生体重児、⑧新生児仮死あり、⑨新生児黄疸あり、⑩てんかんの合併、⑪1年以内のてんかん発作あり、⑫発作抑制薬の使用あり、⑬抗てんかん薬の使用剤数)の相互關連を解析したところ、17とおりの因子間に相互關連性が認められた。特にてんかん有病率は、77%と一般のてんかん有病率(1%弱)よりも有意に高く、SMIDの各關連因子と「てんかん」に關わる因子との相互關連が多いことが、明らかになった。

次に、著者はSMIDのてんかん特性を明らかにするため、SMIDてんかん患者の背景を調査したところ、SMIDてんかんは難治性であることが確認された。しかし、2006年以降に承認されたNewer AED (Gabapentin, Topiramate, Lamotrigine, Levetiracetam)を追加投与することで有意にてんかん発作回数が減少したことより、Newer AEDがSMIDてんかんに対して有効であることが明らかになった。

続いて、てんかん発作に生体内の酸化ストレスが關与していることが示唆されていることより、SMID難治性てんかんにも酸化ストレスが關与していると推察し、血中の酸化ストレスマーカーであるd-ROMs(Reactive Oxygen Metabolites)値、BAP(Biological Antioxidant Potential)値、アルブミン値とてんかん発作回数が關

連するか測定・検討した。その結果、SMID のてんかん発作回数が多いほど、血漿 d-ROMs 値が高くなることが認められ、SMID 難治性てんかんの予後予測指標として生体内酸化ストレスマーカーの血漿 d-ROMs 値が臨床応用できる可能性が示唆された。

さらに、Newer AED のなかでも SMID 難治性てんかん患者に頻用されている Lamotrigine (LTG)、Levetiracetam (LEV) を追加投与した患者において、安全性・有効性と血漿 d-ROMs 値の関係を解析・検討した。安全性について、LTG、LEV が何らかの理由で中止となった全ての SMID 患者が d-ROMs 値 \geq 321 U. CARR の異常値を示した。副作用の発現を認めた全ての SMID も d-ROMs 値 \geq 321 U. CARR の異常値を示した。特に、LTG、LEV を追加投与後、発作増悪または不変と判断され LTG、LEV が中止になった患者は、いずれも追加投与前の d-ROMs 値が 500 U. CARR を超える、Very high-level oxidative stress であった。d-ROMs 値 \leq 320 の正常値域の SMID 患者では薬剤中止例や副作用発現例は認められなかった。有効性について、d-ROMs 値が高値になるほど有意に奏功率が減少する傾向が認められ、特に d-ROMs 値が 500 U. CARR を超える Very high-level oxidative stress では、発作が増悪する例も認められた。

以上、これらの研究結果より、血漿 d-ROMs の測定は SMID 難治性てんかん薬物療法における AED の有効性や安全性、さらにてんかん発作回数の予後予測指標として有用であることが明らかとなった。また、低侵襲で迅速かつ臨床現場で酸化ストレスが測定可能であることより、d-ROMs が臨床応用できる酸化ストレスマーカーであることが示された。このことより血漿 d-ROMs 値を用いての酸化ストレス測定は、SMID 難治性てんかん患者の薬物療法の評価について有用であると考えられる。著者の研究は、今後の SMID てんかん薬物治療において大いに貢献できると考えられる。よって、本論文は博士(薬学)の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査 (教授)	赤木 正明	印
	副査 (教授)	伊藤 康一	印
	副査 (教授)	井上 正久	印
	副査 (教授)	土屋 浩一郎	印

(徳島大学 薬学部)