

# 学位論文審査

## 2次審査用書類

### 作成見本

#### (甲)

**〈注意事項〉**

見本のとおりに作成し、原稿2部とデータ（Word ファイル）を医学部大学院係まで提出願います。

論文の内容の要旨

明朝 14P

6 cm位

明朝 9P

明朝 14P

12 cm位

論文提出者氏名	松本太郎	1 cm位
論文審査担当者	主査 長野一郎 副査 豊科次郎・大町三郎・上田四郎	2スペース取る
論文題目	..... 欧文題目 ..... ( ..... 日本語訳 ..... )	3 cm位
(論文の内容の要旨) [背景と目的] .....  ※外国人留学生に限り英文で作成も可 ※2,000字以内		

明朝 9P  
行間一行

欧文 Times 11P  
訳文 (和文) 明朝 11P

18 cm位

論文審査の結果の要旨

明朝9P

明朝14P

6 cm位

明朝9P

4 cm位

明朝9P

2 cm位

6 cm位

報告番号	甲第号	氏名	松本太郎 <sup>1 cm位</sup>
論文審査担当者	主査 長野一郎 副査 豊科次郎・大町三郎	上田四郎 <sup>2 cm位</sup>	

明朝9P

明朝9P

1スペース取る

明朝14P

(論文審査の結果の要旨)

発癌に対する研究は.....  
.....

明朝9P  
行間1行

※外国人留学生に限り英文で作成も可

※1,000字以内

21 cm位

# 最終試験の結果の要旨

明朝9P 6 cm位 報 告 番 号	明朝9P 4 cm位 甲 第 号	明朝9P 2 cm位 氏 名	明朝14P 6 cm位 松 本 太 郎 <sup>1 cm位</sup>
学 力 の 確 認 担 当 者	主 査 長 野 一 郎 副 査 豊 科 次 郎・大 町 三 郎	明朝9P 2 cm位 田 四 郎	明朝14P 2 cm位
<p>(最終試験の結果の要旨)</p> <p>最初に主査は、「氏 名」に本研究の概略を述べさせた。次いで、主査・両副査と「氏 名」との間に次のような 質疑応答が行われた。</p> <p>問： 答：</p> <p>明朝9P 行間1行</p> <p>申請者の氏名</p> <p>1スペース取る</p> <p>21 cm位</p> <p>※ <u>質疑応答部分は、外国人留学生に限り英文で作成も可</u></p> <p>以上のように質問に対する応答は概ね適切であり、本研究の遂行に十分な学力を有しているものと認めた。</p>			

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	○ ○ ○ ○
論文審査担当者	主査 ○ ○ ○ ○ 副査 ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
論文題目	
Disturbed Spatial Learning of Rats after intraventricular administration of transforming growth factor- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1 の脳室内投与をおこなったラットの空間認識障害)	
(論文の内容の要旨)	
<p>【背景と目的】くも膜下出血に続発する正常圧水頭症では出血後、髄液 Transforming growth factor-<math>\beta</math>1(TGF-<math>\beta</math>1) 濃度が有意に高くなる。また、マウスの脳に human recombinant TGF-<math>\beta</math>1 (hr TGF-<math>\beta</math>1) を注入するとこれに類似した水頭症ができる。正常圧水頭症は可逆的な高次機能低下を呈する疾患として有名である。今回、ラットの脳に hr TGF-<math>\beta</math>1 を注入し、その空間認識能を測定した。</p> <p>【材料及び方法】ラットは18週齢のウィスター雄30匹を用いた。実験は一群を5匹とし、hr TGF-<math>\beta</math>1 0.4<math>\mu</math>g または 4.0 <math>\mu</math>g を6日の間隔を空けて2度、定局的に脳室に注入した群、また各々の対照群と未処置群を作成した。3ヵ月後にMorris水迷路試験を行った。水迷路ではプールの浅瀬の位置を覚えさせる水泳訓練を1日5回、4日間行った後に、浅瀬のないプールで1分間泳がせ、その軌跡を記録した (transfer test)。試験後、ラットを屠殺し、脳室径を測定した。また、くも膜下腔の構造を電子顕微鏡で観察した。さらに、酵素活性法にて、くも膜のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性を調べた。</p> <p>【結果】Morris水迷路試験では、訓練中の浅瀬への到達時間に群間で差は認めなかった。transfer test ではhr TGF-<math>\beta</math>1 は3群とも対照群と比較して空間認識能が有意に低下した。一方、脳室拡大はすべての群で認めなかった。電顕でのくも膜下腔の観察では、対照群に類洞様構造を認めたのに対して、hr TGF-<math>\beta</math>1 投与群では繊維化によって類洞様構造が消失していた。また、対照群のくも膜細胞胞体にはミトコンドリアが豊富で、強いNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性を認めるのに対して、hr TGF-<math>\beta</math>1 投与群ではミトコンドリアは減少し、その活性は低下していた。</p> <p>【結論】マウスの脳にTGF-<math>\beta</math>1 を注入すると、くも膜が繊維化され、これによる髄液の圧差から脳質拡大が生じる。今回、ラットの脳にTGF-<math>\beta</math>1 を注入したところ、脳室拡大がまったく認めないにもかかわらず、空間認識能が明らかに障害された。しかし、ラットのくも膜下腔を電顕で観察したところ、マウスにTGF-<math>\beta</math>1 を注入したときと同じ繊維変化が見られた。以上より、ラットの空間認識能低下は、くも膜下腔の繊維化やくも膜細胞胞体のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性低下と何らかの関連があると思われた。正常圧水頭症の剖検例ではくも膜下腔の繊維化が関与しており、脳室拡大が必ずしも必須のことではない可能性があることを示唆している。</p>	

## 論文審査の結果の要旨

報 告 番 号	甲 第 号	氏 名	○ ○ ○ ○
論文審査担当者	主 査	○ ○ ○ ○	
	副 査	○ ○ ○ ○ ・ ○ ○ ○ ○	

(論文審査の結果の要旨)

くも膜下出血に続発する正常圧水頭症では出血後、髄液 Transforming growth factor-β1(TGF-β1) 濃度が有意に高くなる。また、マウスの脳に human recombinant TGF-β1 (hr TGF-β1) を注入するとこれに類似した水頭症ができる。正常圧水頭症は可逆的な高次機能低下を呈する疾患として有名である。今回、ラットの脳に hr TGF-β1 を注入し、その空間認識能を測定した。

ラットは13週齢のウィスター雄30匹を用いた。実験は一群を5匹とし、hr TGF-β1 0.4μg または 4.0 μg を6日の間隔を空けて2度、定位的に脳室に注入した群、また各々の対照群と未処置群を作成した。3ヵ月後に Morris 水迷路試験を行った。水迷路ではプールの浅瀬の位置を覚えさせる水泳訓練を1日5回、4日間行った後に、浅瀬のないプールで1分間泳がせ、その軌跡を記録した (transfer test)。試験後、ラットを屠殺し、脳室径を測定した。また、くも膜下腔の構造を電子顕微鏡で観察した。さらに、酵素活性法にて、くも膜の Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性を調べた。

その結果、○○は次の結論を得た。

1. Morris 水迷路試験では、訓練中の浅瀬への到達時間に群間で差は認めなかったが、transfer test では hr TGF-β1 は3群とも対照群と比較して空間認識能が有意に低下した。
2. 脳室拡大はすべての群で認めなかった。
3. 電顕でのくも膜下腔の観察では、対照群に類洞様構造を認めたのに対して、hr TGF-β1 投与群では繊維化によって類洞様構造が消失していた。
4. 対照群のくも膜細胞胞体にはミトコンドリアが豊富で、強い Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性を認めるのに対して、hr TGF-β1 投与群ではミトコンドリアは減少し、その活性は低下していた。

これらの結果より、ラットの空間認識能低下は、くも膜下腔の繊維化やくも膜細胞胞体の Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性低下と何らかの関連があると思われた。ヒトの正常圧水頭症においても、剖検例ではくも膜下腔の繊維化がみられており、脳室拡大が必ずしも症状発現に必須のことではない可能性があることを示唆している。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。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	甲第 号	氏 名	○ ○ ○ ○
学力の確認担当者	主 査	○ ○ ○ ○	
	副 査	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	

(最終試験の結果の要旨)

最初に主査は、「○○○○」に本研究の概略を述べさせた。次いで、主査・両副査と「○○○○」との間に次のような質疑応答が行われた。

問:今回 TGF-β1 髄注ラットで Morris 水迷路試験を行っているが、マウスの水頭症モデルで Morris 水迷路試験は行ったか。

答:行っていません。

問:マウスでの実験は可能か。

答:可能です。正常圧水頭症モデルマウスでの実験はありませんが、記憶障害の実験として多数文献で報告されています。

問:今回の実験でラットの脳圧測定は行ったか。

答:脳室を穿刺することで脳圧の測定を行いました。しかし、測定値のばらつきが大きく手技上の問題があるものと考えたため、今回検討には到りませんでした。

問:ラットにおける脳圧の測定方法は確立されているか。

答:脳室に cannula を挿入し圧力センサーを用いて脳室圧を測定する方法が報告されています。

問:脳表面に眼圧計のようなものをあてて脳圧は測れないか。

答:脳圧は閉鎖腔である頭蓋内圧とほぼ同義と考えられ、開頭して脳表面を露出して頭蓋内圧を測定することは難しいと思われる。実際の臨床、ヒトにおいても開頭した上で脳圧が測定され続けられることはありません。

問:TGF-β1 髄注ラットにおける髄膜の Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATP ase 活性の低下に着目しているが、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATP ase の活性が低下すると髄液の産生、吸収はどうなるのか。

答:1993 年の Segal らの報告によると、脈絡上皮細胞には sodium pump が存在し Na<sup>+</sup>を分泌することで髄液の産生に関与しており、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATP ase 阻害剤である ouabain の投与によって髄液産生は低下します。従って、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATP ase 活性が低下した状態では髄液の産生が低下していると考えられます。吸収に関して、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATP ase 活性を論じた報告は見られませんが、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATP ase は水の輸送に関わるため髄膜における Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATP ase 活性の低下は髄膜における髄液の吸収障害を示唆する可能性があるものと考えています。

問:ヒトにおける交通性水頭症で dementia, urinary incontinence, gait disturbance がおこる機序は何か。

答:脳室に隣接した白質を通る軸索が脳室の拡大によって進展されるためと、圧迫による大脳皮質の二次的障害が挙げられます。

問:それでは交通性水頭症では脳室は必ず拡大しているか。

答:脳室拡大は臨床上重要な診断基準になっていますが、開頭術後などに見られる硬膜下水腫やくも膜下水腫も外水頭症と呼ばれ、脳室拡大は見られませんが交通性水頭症の一形態と考えられます。

問:TGF-β1 の注入によりくも膜下腔の繊維化が著明にみられているが、collagen の産生、分解はどうなっているのか? collagenase の活性については。

答:collagen の産生、分解について今回検討していませんが、以前我々は、マウス交通性水頭症モデルにおいて、TGF-β1 の脳室内投与 2 週目より fibroblast の増殖が見られ 3 週目よりくも膜下腔の繊維化が生じていることを免疫染色と電子顕微鏡の所見を用いて検討し、報告致しました。くも膜の繊維化までの検討であったため、collagen の分解、また

collagenase の活性については検討しておりません。また今回の実験でも検討しておりません。

問：TGF- $\beta$ 1 の脳室内注入 3 ヶ月後に評価しているが、時期の意味は？

答：マウスでは TGF- $\beta$ 1 の脳室内注入 6 週間後以降にコントロール群に比べて有意な脳室拡大が見られました。またヒトのくも膜下出血後交通性水頭症では 1 から 3 ヶ月で症状が見られるとされています。従ってラットにおいても、脳室が拡大し、また水頭症の症状が生じると思われる時期として、実験の時期を TGF- $\beta$ 1 の脳室内注入から 8 ヶ月としました。

問：脳室径はどの部位で計測したか？

答：モンロー孔の位置で冠状断にし、脳室と脳実質それぞれの最大横径を計測し、その比で評価しました。

問：figure 3 (B) の脳室内注入後の写真で Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase の活性が negative とあるが、positive な spot がびっしりみられるのは、標本の洗浄が足りないのではないか？

答：Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase は赤血球などにも存在するため、洗浄の不足による artifact と考えられます。今後、洗浄・染色法を検討します。

問：figure 1 では一見 TGF- $\beta$ 1 投与群と control 群では差があるように見えるが？

答：統計処理を行いました、有意な差は見られませんでした。

問：Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase の染色では positive control と negative control を用いて染色したか？

答：positive control として腎臓を、negative control として染色の際、浸漬液に ouabain を加えて反応を消失させた標本を用いました。

問：discussion でカエルの脳脊髄液の組成について触れているが、ラットではどうか？

答：渉猟した限り文献は得られませんでした。今後、ラット髄液中の Na<sup>+</sup>濃度を測定し、Na<sup>+</sup>と K<sup>+</sup>移動について研究したいと考えています。

問：Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase 活性の低下で空間認識能が低下するといえるか？

答：1978 年に Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase 阻害薬である ouabain の脳室内投与で異常行動がおけると報告されています。その際ラットでは海馬で norepinephrine の有意な低下が見られます。Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase 活性の低下により記憶にかかわる海馬の機能低下が起こるものと考えています。従って今回の Water maze の実験結果を記憶障害に基づく空間認識能の低下として捉えました。

問：Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase 活性の低下とあるが、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase というのは生命の維持に不可欠な酵素であって、それが完全にブロックされて生存していることはありえない。くも膜にある Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase をふくめた酵素系がダメージを受けてそれが空間認識能の低下につながっている可能性はあるが、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP ase 活性の低下と空間認識能低下の関係を断定しているのは無理がある。ヒトの髄液の産生・吸収はどうなっているか？

答：髄液産生は脳室の脈絡叢、脳室壁の上皮細胞や脳表の軟膜下組織より産生されていると考えられます。人の髄液の吸収には静脈洞に見られるくも膜顆粒、arachnoid villi が関与するとされています。くも膜下出血後の水頭症においてこの arachnoid villi が血液成分によって髄液の吸収がブロックされ水頭症が生じるとされています。

以上のように質問に対する応答は概ね適切であり、本研究の遂行に十分な学力を有しているものと認めた。