

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	学位授与年月日	学位論文題目	学位審査委員	
				主査	副査
牧内明子	乙第1088号	20. 6.11	Hepatocyte Growth Factor Prevents Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in Mice (マウス肺虚血再灌流傷害モデルにおけるHGFの肺保護効果の検討)	久保恵嗣	岡元和文 池田宇一
清水昭子	乙第1089号	20. 7.23	Non-pathogenic bacterial flora may inhibit colonization by methicillin-resistant Staphylococcus aureus in extremely low birth weight infants (超低出生体重児において非病原性細菌叢はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA) 保菌を抑制する)	小池健一	岡元和文 竹下敏一
倉田研児	乙第1090号	20. 9.10	Stress Via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells (Doxorubicin 処理された神経芽腫細胞株では, ミトコンドリア内のNoxaを増加させることにより p53経路を介したアポトーシスが引き起こされる)	小池健一	谷口俊一郎 塩沢丹里
陳 薇	乙第1091号	20. 9.10	A possible biochemical link between NADPH oxidase (Nox) 1 redox-signaling and ERp72 (NADPH オキシダーゼ (Nox) 1 レドクスシグナリングと小胞体 ERp72蛋白質の生化学的つながり)	竹下敏一	山田充彦 樋口京一
浦澤延幸	乙第1092号	20. 9.10	Selective Vacuolar Degeneration in Dystrophin-Deficient Canine Purkinje Fibers Despite Preservation of Dystrophin-Associated Proteins With Overexpression of Dp71 (ジストロフィン欠損犬プルキンエ線維における選択的空胞変性—ジストロフィン結合蛋白質の保持およびDp71の過剰発現—)	池田修一	池田宇一 天野 純
濱中一敏	乙第1093号	20. 9.24	TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs (TRPV4は人工呼吸器関連肺障害において急性期のカルシウムに依存する血管透過性を亢進させる)	天野 純	久保恵嗣 岡元和文
矢作 徹	乙第1094号	20. 9.24	Baroreceptors mask sympathetic responses to high intraocular pressure in dogs (眼圧亢進時の交感神経反応を圧受容体がマスクする)	天野 純	池田宇一 山田充彦

審査学位論文要旨

小川輝之	乙第1095号	20. 9.24	Differential roles of peripheral and spinal endothelin receptors in the micturition reflex in rats (ラット排尿反射における末梢・脊髄のエンドセリン受容体の役割)	大橋俊夫	大森 栄 山田充彦
三木 純	乙第1096号	20. 9.24	Polycomb complexes regulate cellular senescence by repression of ARF in cooperation with E2F3 (ポリコム複合体はE2F3と協同してARFの転写調節により細胞老化を制御する)	小池健一	鎌田 徹 中山 淳
佐々木 茂	乙第1097号	20. 9.24	Relationship Between the Response to Treatment and the Prognosis of Patients with Aggressive Lymphomas Treated with Chemotherapy Followed by Involved-field Radiotherapy: Radiographic Assessment (中高悪性度非ホジキンリンパ腫に対する化学療法+追加放射線療法の治療効果と予後の関係: 画像学的検討)	田中榮司	中山 淳 宇佐美真一
塩原茂樹	乙第1098号	20.11.12	Expression of cyclins, p53, and Ki-67 in cervical squamous cell carcinomas: overexpression of cyclin A is a poor prognostic factor in stage Ib and II disease (子宮頸部扁平上皮癌におけるサイクリン, p53およびKi-67の発現: サイクリンAの過剰発現はIb期およびII期における予後不良因子である)	谷口俊一郎	加藤博之 西沢 理
金 東浩	乙第1099号	20.12.24	STAT6 signaling is important in CD8 ⁺ T-cell activation and defense against <i>Toxoplasma gondii</i> infection in the brain (STAT6シグナルはトキソプラズマ感染時のCD8 ⁺ T細胞の活性化と脳内における防御に重要である)	中山 淳	竹下敏一 樋口京一
畑山 織絵	乙第1100号	20.12.24	Utility of Single-slice High-resolution CT in Upper Lung Field Combined with Low-dose spiral CT for Lung-cancer Screening in the Detection of Emphysema (低線量肺癌CT検診において, 上肺野1スライスのHRCTを追加撮影することによる肺気腫検出の有用性)	角谷真澄	田中榮司 野見山哲生
神吉昭子	乙第1101号	21. 1.14	Endogenous α -calcitonin gene-related peptide mitigates liver fibrosis in chronic hepatitis induced by repeated administration of concanavalin A (内因性 α カルシトニン遺伝子関連ペプチドはコンカナバリンA連続投与による慢性肝炎における肝線維化を緩和する)	菅根一男	樋口京一 大森 栄
山崎 宏	乙第1102号	21. 1.14	Extensor Tendon Rupture Associated with Osteoarthritis of the Distal Radioulnar Joint (遠位橈尺関節症を伴った伸筋腱皮下断裂)	角谷真澄	松尾 清 森泉哲次

宮 嵩 敦	乙第1103号	21. 1.28	Anatomical and histopathological correlates of the dermoscopic patterns seen in melanocytic nevi on the sole: A retrospective study (足底色素細胞母斑におけるダーモスコピー所見とその解剖学的・病理組織学的要因についての後向き研究)	松尾 清	森泉哲次 中山 淳
長谷川淳一	乙第1104号	21. 1.28	Downregulated melanogenic paracrine cytokine linkages in hypopigmented palmo-plantar skin (メラニン化にかかわるサイトカインのパラクライン機構の抑制が掌蹠皮膚の低色素状態に関与する)	谷口俊一郎	鎌田 徹 村田敏規
中川力丸	乙第1105号	21. 1.28	Effect of high-frequency oscillatory ventilation on oleic acid-induced lung injury in sheep (綿羊におけるオレイン酸による肺障害に対する高頻度換気の効果)	川真田樹人	久保 惠 嗣 岡 元 和 文
古澤武彦	乙第1106号	21. 2.23	The effects of a neutrophil elastase inhibitor on the postoperative respiratory failure of acute aortic dissection (急性大動脈解離の術後呼吸不全に対する好中球エラスターゼ阻害剤の効果について)	岡 元 和 文	久保 惠 嗣 川真田樹人
高橋 徹	乙第1107号	21. 3.11	Correlation between glial fibrillary acidic protein-positive astrocytes and age in the human hippocampus (ヒト海馬におけるGFAP 陽性アストロサイトと年齢との相関)	森泉哲次	福嶋義光 本田孝行

Hepatocyte Growth Factor Prevents Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in Mice (マウス肺虚血再灌流傷害モデルにおける HGF の肺保護効果の検討)

牧 内 明 子

(論文の内容の要旨)

【背景】肺移植時の虚血再灌流傷害 (ischemia-reperfusion injury) は、移植の予後を左右する大きな障壁の一つである。周術期の虚血再灌流傷害は、早期の移植肺機能不全の原因となるばかりでなく、移植晩期の死亡の主因である閉塞性細気管支炎発症の危険因子でもあると報告されており、肺移植の成績を向上させるためには、周術期における肺虚血再灌流傷害の予防が重要と考えられている。多機能因子である hepatocyte growth factor (HGF) は、全身のさまざまな臓器において組織傷害時に、抗アポトーシス作用による組織保護や、組織再生を促進することが報告されてお

り、肺においても虚血再灌流傷害時に内因性の HGF が、傷害された肺の修復を促進することが示されている。これらのことから、HGF の移植領域における臨床応用が期待されている。今回我々は、マウス肺虚血再灌流傷害モデルにおいて human recombinant HGF (hrHGF) を投与し、HGF 投与による肺虚血再灌流傷害抑制効果について検討した。

【方法】マウス肺虚血再灌流傷害モデルは以下のように作成した。全身麻酔下に左肋間開胸を行い、左肺門を一括してクロスクランプ (虚血) し、30分後にクロスクランプを開放した (再灌流)。このモデルを、A: 再灌流直前に hrHGF500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を胸腔内投与し、以後6時間毎に同量を皮下投与する HGF 投与群、B: 生食を胸腔内投与し、以後6時間毎に同量を皮下投与する対照群、C: 開胸操作を行うだけの sham 群、の3群を作成した。再灌流直前、再灌流後3, 6, 12, 18, 24時間後に肺を摘出し、HE染色による肺組織像の評価と免疫染色によるアポトーシスおよびアポトーシス関連因子発現の解析を行うとともに、経時的に血

中の内因性HGFをELISA法で解析し、hrHGF投与による虚血再灌流後の肺傷害抑制効果の検討を行った。

【結果】(1)肺虚血再灌流傷害後24時間まで、肺傷害スコア(肺胞浮腫、炎症細胞浸潤、うっ血、肺出血で評価)は経時的に増悪した。hrHGF投与群では対照群に比し、肺傷害スコアの有意な低下が認められた。(2)hrHGF投与群では対照群に比し、虚血再灌流から3時間後に内因性HGFの血中濃度の有意な上昇が認められた。(3)TUNEL染色による解析で、虚血再灌流から18時間後の対照群での肺胞上皮細胞のアポトーシスは、sham群に比し有意な増加が認められたが、hrHGF投与により虚血再灌流後のアポトーシスは、sham群と同レベルまでの有意な抑制が認められた。(4)Bcl-xL発現は、虚血再灌流から3時間後に対照群で有意に増加していたが、hrHGF投与によりさらに上昇が認められた。これに対しBax発現は、虚血再灌流から3および18時間後の対照群で、sham群に比し有意な増加が認められたが、hrHGF投与により有意な抑制が認められた。

【考察】本研究により、(1)外因性HGFによる虚血再灌流後の肺傷害の抑制、(2)外因性HGFによる虚血再灌流後の肺胞上皮細胞のアポトーシス抑制、(3)外因性HGF投与による虚血再灌流後早期のBcl-xL発現の増加とBaxの発現の抑制、(4)外因性HGF投与による虚血再灌流後の血中内因性HGFの増加、が示された。これらの結果から、外因性HGFがこれにより誘導された内因性HGFと協調して、虚血再灌流後の肺組織でのBcl-2 familyの発現を変化させることで、肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制し、肺組織を虚血再灌流傷害から保護すると考えられた。

【まとめ】HGFの抗アポトーシス作用により、肺における虚血再灌流傷害の抑制が得られることを示した。

虚血再灌流傷害時の外因性HGFの肺保護効果については本報告が初めてであり、その作用機序の解明には更なる研究を要するが、周術期のHGF投与が肺移植の成績を向上させ得る可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

Hepatocyte growth factor (HGF)は、さまざまな臓器の組織傷害時に、抗アポトーシス作用による組織保護や、組織再生を促進することが報告されており、肺においても虚血再灌流傷害時に、内因性のHGFが傷害肺の修復を促進することが示されている。肺移植時の虚血再灌流傷害(ischemia-reperfusion injury)は、移植の予後を左右する大きな障壁の一つであり、

HGFの移植領域における臨床応用が期待されている。

本研究では、牧内は、マウス肺虚血再灌流傷害モデルにhuman recombinant HGF(hrHGF)を投与し、HGF投与の肺虚血再灌流傷害抑制効果について検討した。

マウス肺虚血再灌流傷害モデルは、全身麻酔下に左肋間開胸を行い、左肺門を30分間クロスクランプすることにより作成した。これを

- A:再灌流直前にhrHGF500 μ g/kgを胸腔内投与し、以後6時間毎に同量を皮下投与するHGF投与群
- B:生食を胸腔内投与し、以後6時間毎に同量を皮下投与する対照群
- C:開胸操作を行うだけのsham群

の3群を作成した。再灌流直前、再灌流後3, 6, 12, 18, 24時間後に肺を摘出し、HE染色による肺組織像の評価と免疫染色によるアポトーシスおよびアポトーシス関連因子発現の解析を行うとともに、経時的に血中の内因性HGFをELISA法で解析し、hrHGF投与による虚血再灌流後の肺傷害抑制効果の検討を行った。その結果、次の結論を得た。

- (1)外因性HGFにより、虚血再灌流後の肺傷害が抑制された。
- (2)外因性HGFにより、虚血再灌流後の肺胞上皮細胞のアポトーシスが抑制された。
- (3)外因性HGF投与により、虚血再灌流後早期のBcl-xL発現が増加し、Baxの発現が抑制された。
- (4)外因性HGF投与により、虚血再灌流後の血中内因性HGFが増加した。

以上のことから、外因性HGFがこれによって誘導された内因性HGFと協調して、虚血再灌流後の肺組織でのBcl-2 familyの発現を変化させることで、肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制し、肺組織を虚血再灌流傷害から保護することが示された。

本研究により、HGFは抗アポトーシス作用により肺虚血再灌流傷害を抑制することを示し、周術期のHGF投与が肺移植の成績を向上させ得る可能性が示唆された。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。

Non-pathogenic bacterial flora may inhibit colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in extremely low birth weight infants (超低出生体重児において非病原性細菌叢はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 保菌を抑制する)

清水 昭子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は院内感染を起こす代表的な細菌である。MRSA に感染した新生児は重症化しやすいため、新生児集中治療室 (NICU) において MRSA の保菌や感染症を減少させることは重要な課題である。本研究では、超低出生体重児において、非病原性細菌叢の MRSA 保菌に対する役割について後方視的に検討した。

【対象と方法】対象：1997年1月から2003年12月までに長野県立こども病院 NICU に入院した超低出生体重児164人のうち、出生後すぐに収容され、その後42日以上入院していた110人である。先天性大奇形、胎児水腫、遺伝性代謝性疾患および生後42日未満に逆搬送された児は除外した。入院時に、便培養、臍浸出液培養、口腔内培養を行った。口腔内培養は、その後も週に1回、生後42日まで施行した。すべての検体は、5%羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地、modified Drigarsky 寒天培地、OPA ブドウ球菌寒天培地に植えつけ、37度にて24時間培養した。細菌の同定や抗生物質に対する感受性試験も同時に行った。Oxacillin の MIC が $4 \mu\text{g/ml}$ 以上の黄色ブドウ球菌を MRSA と定義した。

【結果】(1)ほとんどすべての児において、入院時の口腔内培養からは細菌の有意な増殖はみられなかった。次いで、生後1週間以内に非病原性細菌叢が増殖した児を group1 (n=56) として、生後1週間以内に非病原性細菌叢が増殖しなかった児を group2 (n=54) として MRSA 保菌率を比較した。(2)非病原性細菌叢の増殖が始まる時期は生後7日が多く、生後14, 21日と比べて最も有意な違いが認められた。(3)Group1では、生後1週間以内に、*S. epidermidis* (80.3%), *Corynebacterium* (7.1%), *Lactobacillus* (7.1%), α -*Streptococcus* (5.4%) が同定された。一方、group2においては、39%の児がすでに MRSA を、11%が他の病原菌 (*S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia*

coli) を保菌しており、残りは有意な細菌の増殖を認めなかった。(4)Group1における敗血症の発症率は、group2よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。敗血症の主な原因菌は MRSA であった。両グループ間の臨床的所見を比較すると、敗血症の発症のみに有意差が認められ、それ以外の項目については有意差を認めなかった。(5)入院後から6週までの MRSA の保菌率を週毎に累積的に検討したところ、入院後6週までの MRSA 保菌率は、group1は56例中18例 (32.1%) であったのに対して、group2は54例中42例 (77.8%) であった ($p < 0.001$)。

【考察】現在の MRSA による感染対策として、患者と病原菌の接触の防止と保菌した菌の増殖を阻害することに主眼が置かれている。しかし、これらの方法では MRSA の広がりを完全に制御することはできない。本研究で、超低出生体重児における非病原性細菌叢の生後1週間以内の定着が MRSA 保菌を阻止する可能性を示した。出生直後の新生児では、ほとんど菌が認められず、母親などと接触することにより、菌を獲得していく。特に産道は新生児期における非病原性細菌叢の獲得にとって重要な役割を担っている。しかし、超低出生体重児は、帝王切開による出生、母親との分離、出生後のチューブ栄養などにより、生後早期に非病原性細菌叢の獲得が困難な状況にある。*Corynebacteria* やコアグラールゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative staphylococci; CNS), *Bacteroides fragilis* は生後数日以内に新生児の皮膚から検出されるが、帝王切開により出生した児にはこれらの細菌は認められなかった。今回の研究からも、超低出生体重児における MRSA 保菌阻止には、いかに生後早期に、咽頭、鼻腔、皮膚において非病原性細菌叢を獲得させるかが重要であると考えられた。

【結論】超低出生体重児における MRSA 感染対策として、非病原性細菌叢を早期に咽頭、鼻腔、皮膚などに獲得させることは有用な予防法の1つとなることが示唆された。今後、非病原性細菌叢の効果的な獲得方法や MRSA 感染制御における非病原性細菌叢の持つ潜在的な役割を明確にしていきたい。

(論文審査の結果の要旨)

院内感染の起因为として、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、最も重要な細菌の1つである。特に、MRSA に感染した新生児は重症化しやすいため、新生児集中治療室 (NICU) において MRSA の保菌や感染症を減少させることは重要な課題となって

いる。本研究では、超低出生体重児において、非病原性細菌叢のMRSA保菌に対する役割について後方視的に検討した。

1997年1月から2003年12月までに長野県立こども病院NICUに入院した超低出生体重児164人のうち、出生後すぐに収容され、その後42日以上入院していた110人を対象とし、先天性大奇形、胎児水腫、遺伝性代謝性疾患および生後42日未満に逆搬送された児は除外した。入院時には、便培養、臍浸出液培養、口腔内培養を行い、さらに口腔内培養のみは、その後も週1回、生後42日まで施行した。すべての検体は、5%羊血液寒天培地、チョコレート寒天培地、modified Drigarsky寒天培地、OPAブドウ球菌寒天培地に植えつけ、37度にて24時間培養した。細菌の同定や抗生物質に対する感受性試験も同時に行い、OxacillinのMICが4 μ g/ml以上の黄色ブドウ球菌をMRSAと定義した。

その結果、清水は次の結論を得た。

- 1) ほとんどすべての児において、入院時の口腔内培養からは細菌の有意な増殖はみられず、非病原性細菌叢の増殖が始まる時期は生後7日が有意に多かった。
- 2) 生後1週間以内に非病原性細菌叢が増殖した児 (group1) と生後1週間以内に非病原性細菌叢が増殖しなかった児 (group2) とを比較したところ、group1では、生後1週間以内に、*S. epidermidis* (80.3%), *Corynebacterium* (7.1%), *Lactobacillus* (7.1%), α -*Streptococcus* (5.4%) が同定され、group2では、39%の児がすでにMRSAを、11%が他の病原菌 (*S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*) を保菌しており、残りは有意な細菌の増殖を認めなかった。
- 3) Group1における敗血症の発症率は、group2よりも有意に低かった。敗血症の主な原因菌はMRSAであった。
- 4) 入院後から6週までのMRSAの保菌率を週毎に累積的に検討したところ、入院後6週までのMRSA保菌率について、group1はgroup2よりも有意に低かった。

以上より、MRSA保菌が制御不能なNICUの現状において、正常満期産児と比べ、非病原性細菌叢の獲得が困難な状況にある超低出生体重児に対する新たなMRSA感染対策として、非病原性細菌叢を生後早期に咽頭、鼻腔、皮膚などに獲得させることは有用な予

防法の1つとなることが示唆された。今後はNICUのMRSA感染対策につながる可能性があることは重要な知見と思われ、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。

Stress via p53 pathway causes apoptosis by mitochondrial Noxa upregulation in doxorubicin-treated neuroblastoma cells (Doxorubicin処理された神経芽腫細胞株では、ミトコンドリア内のNoxaを増加させることによりp53経路を介したアポトーシスが引き起こされる)

倉田研児

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】神経芽細胞腫 (NB) は交感神経系に由来する小児固形腫瘍である。集学的治療にもかかわらず、高リスク群のNBの5年生存率はいまだに約30%と予後不良である。薬剤耐性のメカニズムを明らかにすることが生存率を改善する治療法の開発に繋がることから、p53依存性経路を介して誘発されるアポトーシスの分子機構を、doxorubicin (以下Doxo) 感受性NB株と非感受性NB株を比較することにより解析した。

【方法】NB細胞株をDNA傷害ストレスであるDoxoで処理し、経時的に解析した。細胞死の判定はトリパンブルー取り込みにより、アポトーシスの判定はFACSによるsub G0/G1測定とDAPI染色により行った。タンパクの局在は免疫染色と細胞分画/ウェスタンブロットで検討した。ミトコンドリア (以下Mito) 内のNoxa (Bcl-2ファミリータンパクの1つ) のmRNAは、千葉県がんセンター研究所に集められたNB腫瘍検体を用いて、半定量的なRT-PCRと定量的リアルタイムPCRにより評価した。Doxo処理前にNoxa siRNAを導入し、Noxaのノックダウンによる細胞死の誘導を検討した。Mito膜電位の変化はミトトラッカー染色によって判定した。

【結果】Doxoに対して感受性を示すNB株と非感受性のNB株を同定した。Doxo感受性株 (SK-N-SH, SH-SY5Y, NB-9, NB-69) では、Doxo処理により、核内へのp53の集積とセリンのリン酸化が引き起こされ、MitoにおいてはNoxaのタンパク量が増加し、Noxa量/Bcl-2量比率が上昇した。シトクロムcの放出や膜電位の変化などのMitoの機能障害をきた

し、カスパーゼ9やカスパーゼ3/7が活性化された。DoxoによるMito依存性細胞死はNoxa siRNAによるノックダウンによりほぼ完全に解除された。また、p53依存性のDNA傷害を誘発するetoposide(以下VP-16)で処置すると、MitoのNoxa増加がVP-16感受性株(SK-N-SH, NB-9とNB-19)のみで観察された。一方、Doxo非感受性株(IMR32, NB-1, NB-19)ではDoxo処理前からMito内にNoxaが集積していたが、Doxo処理による増加はみられなかった。予後不良なNB検体の一部では大量のNoxa mRNAの発現が認められた。特に、高水準のNoxa mRNA発現は、生後12カ月未満の進行した病期(INSS3とINSS4)の検体に多く認められた。MYCN増幅はDoxo感受性と関連していたが、NoxaのmRNA発現とは有意な相関を示さなかった。

【考察】本研究から、DoxoおよびVP-16により誘導されたNB細胞のアポトーシスにおいてNoxaの増加が重要な役割を果たすことが示された。また、Noxa/Bcl-2のようなアポトーシス誘導分子量とアポトーシス阻害分子量の比率の増加が、Mito機能障害とカスパーゼの活性化につながり、アポトーシスを誘導すると考えられた。一方、Doxo非感受性NB株では、NoxaはDoxo処理前からMitoに非常に多く局在し、Doxo処理しても増加せず、アポトーシスは誘導不能であったことから、MitoでのNoxa不活性化がアントラサイクリン系に対する薬剤抵抗性機構の一因と考えられた。予後不良群のNB腫瘍検体の一部でみられる大量のNoxa mRNAは、非感受性株におけるNoxaの動態と類似していた。Doxo非感受性NB株に集積した大量の不活化Noxaを再活性化することは化学療法に抵抗性のNBに対する新しい治療法の開発に結びつくかもしれない。また、予後不良のNBにおける最も一般的な指標であるMYCNは、Doxo非感受性NB株で増幅していたのに対して、3種類の感受性株ではすべてシングルコピーであったことから、MYCN増幅が非感受性NB株におけるp53不活化に関係することを示唆し、この分子機構の解析が重要であると思われた。

(論文審査の結果の要旨)

高リスク群の神経芽細胞腫(NB)は集学的治療にもかかわらず予後不良である。薬剤耐性のメカニズムを明らかにすることが生存率を改善する治療法の開発に繋がることから、doxorubicin(以下Doxo)処理により起こるアポトーシスの分子機構を、Doxo感受

性NB株と非感受性NB株を比較することにより解析した。

細胞死の判定はトリパンブルー取り込みにより、アポトーシスの判定はFACSによるsub G0/G1測定とDAPI染色により行った。タンパクの局在は免疫染色と細胞分画/ウエスタンブロットで検討した。ミトコンドリア(以下Mito)内のNoxa(Bcl-2ファミリータンパクの1つ)のmRNAは、千葉県がんセンター研究所に集められたNB腫瘍検体を用いて、半定量的なRT-PCRと定量的リアルタイムPCRにより評価した。Doxo処理前にNoxa siRNAを導入し、Noxaのノックダウンによるアポトーシスの誘導を検討した。その結果、倉田は次の結論を得た。

- 1) Doxo感受性株では、Doxo処理により、核内へのp53の集積とセリンのリン酸化が引き起こされ、MitoにおいてはNoxaのタンパク量が増加し、Noxa量/Bcl-2量比率が上昇した。さらにシトクロムcの放出や膜電位の変化などのMitoの機能障害をきたし、カスパーゼ9, 3, 7が活性化された。
- 2) DoxoによるMito依存性アポトーシスはNoxa siRNAによるノックダウンによりほぼ完全に解除された。Doxoにより誘導されたNB細胞のアポトーシスにおいてNoxaの増加が重要な役割を果たすことが示された。
- 3) Doxo非感受性株ではDoxo処理前からMito内にNoxaが集積していたが、Doxo処理による増加はみられず、アポトーシスは誘導不能であったことから、MitoにおけるNoxaの不活性化がアントラサイクリン系に対する薬剤抵抗性機構の一因と考えられた。
- 4) 予後不良なNB検体の一部では大量のNoxa mRNAの発現が認められた。特に、高水準のNoxa mRNA発現は、生後12カ月未満の進行した病期(INSS3とINSS4)の検体に多く認められ、非感受性株におけるNoxaの動態と類似していた。
- 5) MYCN増幅はDoxo非感受性株で増加していたが、NoxaのmRNA発現とは有意な相関を示さなかった。MYCN増幅が非感受性NB株におけるp53不活化に関係することを示唆し、この分子機構の解析が重要であると思われた。

以上の結果から、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。

A possible biochemical link between NADPH oxidase (Nox)1 redox-signaling and ERp72 (NADPH オキシダーゼ (Nox) 1 レドックスシグナリングと小胞体 ERp72 蛋白質の生化学的つながり)

陳 薇

(論文の内容の要旨)

Emerging evidence indicates that NADPH oxidase (Nox)1-generated reactive oxygen species (ROS) play key regulatory roles in various cellular processes including inflammation and cell proliferation, yet little is known about the downstream targets of Nox1-generated ROS. In the present study, we show that one of proteins selectively oxidized in response to Nox1-generated ROS was ERp72, a member of protein disulfide isomerase (PDI) family, which catalyzes disulfide bonds formation, reduction or isomerization of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum (ER) lumen. Oxidation of ERp72 by Nox1 resulted in an inhibition of its reductase activity. EGF-treatment of cells stimulated the Nox1 activity and the activated Nox1 subsequently mediated EGF-induced suppression of the ERp72 reductase activity. Coimmunoprecipitation, GST pull-down assays and mutational analysis, indicated that Nox1 associates with ERp72, which involves its NH₂-terminus encompassing a Ca²⁺ binding site and the first thiorodoxin-like motif. Furthermore, confocal microscopy showed colocalization between Nox1 and ERp72 at the plasma membrane. These results suggest that Nox1-dependent redox signaling pathways biochemically link to ERp72. Our findings may provide significant implications in understanding of Nox1 signaling mechanisms involved in *in vivo* pathological processes including inflammation and tumorigenesis.

(論文審査の結果の要旨)

NADPH オキシダーゼ (Nox) 1 レドックス情報伝達は、種々の細胞活性に関わっていることが分かってきた。陳 薇らは、本研究で Nox1により産生される活性酸素の標的分子 ERp72蛋白質を同定し、Nox1レ

ドックス情報伝達のメカニズムについて検討した。

5- IAF レベル法と BIAM レベル法を用いて、Nox1から産生した活性酸素により酸化されるいくつかの蛋白を同定した。また、アフィニティークロマトグラフィーにより、蛋白を精製し、質量分析を行った。その結果、72kDa の蛋白は小胞体 ERp72蛋白であることが判明した。さらに、NEM-BIAM ラベル法で ERp72蛋白は、Nox1からの活性酸素に酸化されることを再確認した。次に、GST pulldown アッセイと免疫共沈降を用いて、*in vitro* と *in vivo* で、Nox1と ERp72蛋白が相互作用することを証明した。さらに、GST-ERp72 deletion mutants の融合蛋白を構築して、GST pulldown アッセイで、ERp72蛋白は N 末端にある Ca²⁺ binding ドメインと a°ドメインを含んだ領域を介して、Nox1と結合することが判明した。これらの生化学的な実験結果は、免疫蛍光染色で、Nox1と ERp72蛋白の細胞膜共局在を調べることによって確認された。また、insulin reduction アッセイで、ERp72蛋白は、Nox1からの活性酸素によって酸化されると reductase activity が減少することを証明した。

以上の結果から、ERp72蛋白は、細胞膜で Nox1と共局在し、Nox1からの活性酸素により酸化されると、reductase activity が抑制されることが結論された。

このことは、Nox1レドックス情報伝達経路に、小胞体 ERp72蛋白が関与するという新しい知見を得たものとして、高く評価される。主査、副査は、一致して本論文を学位論文として、十分価値があるものと認めた。

Selective Vacuolar Degeneration in Dystrophin - Deficient Canine Purkinje Fibers Despite Preservation of Dystrophin-Associated Proteins With Overexpression of Dp71 (ジストロフィン欠損犬プルキンエ線維における選択的空胞変性—ジストロフィン結合蛋白質の保持およびDp71の過剰発現—)

浦 澤 延 幸

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Duchenne型筋ジストロフィー (DMD) は筋形質膜下の細胞骨格蛋白質ジストロフィンが欠損し、進行性の筋萎縮を示すX連鎖性劣性の遺伝性疾患である。現在は呼吸筋障害に対する治療が進歩し心不全が死因の第一位である。DMD の心障害の特徴とし

て心電図上の異常Q波および左室後壁を中心とした心筋の線維化があり、また様々な不整脈、伝導障害が指摘される。我々はゴールデンレトリバー種に見出されたジストロフィン欠損犬の凍結精子を用いて人工授精を行い、ビーグル種筋ジストロフィー犬（筋ジス犬）コロニーを確立した。この大型モデル動物は *mdx* マウスなど従来のモデル動物に比べ、よりヒトのDMDに近い表現型を呈する。これまでの観察で若齢筋ジス犬では心筋障害が出現する以前から異常Q波を呈し、また運動誘発性に突然死した個体を認め、刺激伝導系障害に着目し検討した。

【方法】筋ジス犬10頭、正常犬7頭（1～13カ月齢）を対象に剖検した。洞結節を含む右心房、房室結節、His束を切り出し、Purkinje線維を含む左心室は基底部分、乳頭筋レベル、心尖部の三層に横断面で全割し、H&E染色で組織学的解析を行った。4カ月齢の筋ジス犬、正常犬各1頭で透過型電子顕微鏡を用いて超微構造を観察した。また左心室の一部から凍結標本作製し、筋型ジストロフィンの種々の epitope, β -ジストログリカン, α -, β -, γ -, δ -サルコグリカン, ユートロフィン, μ -カルパインに対する抗体を用いて免疫組織化学染色（免疫染色）を行い、これら蛋白質の発現状況を観察した。更にマイクロダイセクション法により作業心筋とPurkinje線維を分離収集しウエスタンブロット解析を行った。

【結果】(1) H&E染色による組織学的検討では、全ての筋ジス犬で作業心筋に変性を認めず、刺激伝導系では洞結節からHis束まで変性はなかった。一方Purkinje線維では4カ月齢以上の筋ジス犬で著明な空胞変性を認めた。超微構造の観察では空胞部に筋原線維の断裂、消失を認めた。(2) epitopeの異なる抗ジストロフィン抗体を用いた免疫染色では、筋ジス犬の作業心筋は染色されず、Purkinje線維ではC端を認識する抗体のみ染色された。ウエスタンブロット解析の結果、この分子はジストロフィンC端型アイソフォームのDp71であることが判明し過剰発現を認めた。(3) ジストロフィンホモログであるユートロフィンは、筋ジス犬Purkinje線維で作業心筋より強く発現していた。また筋ジス犬Purkinje線維では α -サルコグリカンなどジストロフィン結合蛋白質（DAP）の発現がDp71あるいはユートロフィンの存在に呼応し保持されていた。(4) Ca^{2+} 依存性プロテアーゼである μ -カルパインの免疫染色では、筋ジス犬Purkinje線維の空胞のない細胞で形質膜下に、空胞を伴う細胞で空胞辺

縁に発現の増強を認めた。ウエスタンブロット解析では筋ジス犬Purkinje線維で μ -カルパインの基質となり得るデスミン、心筋トロポニン-Tおよび-Iの分解を認めた。(5) 幼齢からの経時変化ではDp71および μ -カルパインの免疫染色で4カ月齢から発現が増強し、ウエスタンブロット解析ではDp71の発現増強は再現されたが、 μ -カルパインの蛋白量には経時変化がなく、免疫染色での発現増強はtranslocationであることが示唆された。ユートロフィンは正常犬においても成長に伴い発現が低下するが、筋ジス犬Purkinje線維では特に顕著だった。

【考察】(1) 本研究によりジストロフィン欠損の病初期でPurkinje線維の選択的空胞変性が見出された。(2) 筋ジス犬Purkinje線維におけるDp71の過剰発現は4カ月齢からの空胞変性に同期し関与が推察される。Dp71はジストロフィンC端型アイソフォームでありDAPは保持するが、N端およびrod domainを欠きアクチンと細胞外基質を結ぶ細胞骨格の役をなさない。既報ではDp71のトランスジェニック*mdx*マウスで筋変性が増強し、機序としてユートロフィンとの競合が考えられているが、筋ジス犬Purkinje線維でもユートロフィンの発現が4カ月齢で急速に低下していた。(3) μ -カルパインの形質膜下および空胞へのtranslocationが観察されたが、カルパインの活性化には形質膜下へのtranslocationが重要である。Purkinje線維と同様にT管を欠く心房筋では興奮初期に形質膜下から Ca^{2+} 濃度が上昇し心室筋とは生理的な差異が存在する他、ジストロフィン欠損に起因する Ca^{2+} チャンネルの機能障害が筋ジス犬Purkinje線維の形質膜下の Ca^{2+} 濃度に関与している可能性がある。(4) 筋ジス犬では心筋障害が出現する以前から異常Q波を呈するが、機序としてPurkinje線維の変性により興奮伝播の最も遠い左室後壁の脱分極が遅延し、初期QRSベクトルが心室中隔に向かうことを仮説として提唱する。またHis束下部および脚はPurkinje細胞で構成されており、DMDに合併する房室ブロックなど伝導障害との関連が推察される他、末梢Purkinje線維の伝導遅延は心室性不整脈をも惹起し得る。Purkinje線維の変性はDMDに合併する不整脈に対し新たな視点をもたらすと考える。

【結論】ジストロフィン欠損症の病初期ではDp71の過剰発現とともにPurkinje線維の選択的空胞変性が観察され、ジストロフィン欠損症の異常Q波および致死性不整脈への関与も考え得る。

(論文審査の結果の要旨)

Duchenne 型筋ジストロフィー (以下, DMD) は, 近年の呼吸筋障害に対する治療の進歩によって心不全が死因の第一位を占めるに至っており, ジストロフィン欠損における心筋障害の重要性が高まっている。DMD の心障害の特徴として心電図上の深く先鋭な異常 Q 波および左室後壁を中心とした心筋組織の変性, 線維化が挙げられる。DMD における異常 Q 波は1952年にRubinとBuchbergによって指摘され, その後の多くの研究者によって DMD 患者の65-80%に認められる普遍的な現象であることが確認されている。この異常 Q 波の正確な発現機序が明らかにされていない他, 様々な不整脈, 伝導障害が指摘され, 死因の12-60%は突然死であるとの報告がありながら, ジストロフィン欠損における刺激伝導系の病理学的な検討を行った報告は非常に少ない。DMD において Purkinje 線維の空胞変性を指摘した既報が2報存在するが, これらの報告は剖検例であることから, 特に病初期における刺激伝導系障害については全くの不明であった。

浦澤らは DMD に対する従来 of *mdx* マウスモデルと比較し, よりヒトに近い表現型を呈する筋ジストロフィー犬 (以下, 筋ジス犬) 10頭, 正常犬7頭 (1~13カ月齢) を用いて刺激伝導系の障害に注目し検討を行った。(1) H&E 染色による組織学的検討では, 全ての筋ジス犬で作業心筋に変性を認めなかった。刺激伝導系では洞結節から His 束まで変性はなかったが, Purkinje 線維では4カ月齢以上の筋ジス犬で著明な空胞変性が認められ, 病初期において Purkinje 線維の選択的変性が見出された。(2) 免疫組織化学染色およびウエスタンブロット解析の結果, 変性を生ずる4カ月齢から筋ジス犬 Purkinje 線維においてジストロフィン C 端型アイソフォームである Dp71 の過剰発現を認めた。既報では Dp71 のトランスジェニック *mdx* マウスでも筋変性が増強しており, 筋ジス犬 Purkinje 線維の変性においても Dp71 が大きな役割を果たしていると考えられる。(3) ジストロフィンホモログであるユートロフィンは, 筋ジス犬 Purkinje 線維で作業心筋より強く発現していたが, やはり変性と同期して急速に減少しており, Dp71 の過剰発現との競合が推察される。(4) ジストログリカン, サルコグリカンなどジストロフィン結合蛋白質の発現は Dp71 あるいはユートロフィンの存在に呼応し筋ジス犬 Purkinje 線維では保持されていた。これはジストロフィン欠損の骨格筋および作業心筋で認められるジストロフィン

結合蛋白質の消失が, Purkinje 線維の変性機序には関与していないことを示し興味深い。(5) Dp71 の過剰発現と同様, 筋ジス犬 Purkinje 線維の変性と同期して, Ca^{2+} 依存性プロテアーゼである μ -カルパインの形質膜下および空胞への translocation が観察された。カルパインの活性化には形質膜下への translocation が重要であることは良く知られており, *mdx* マウスの骨格筋変性においても同様の現象が報告されている。筋ジス犬 Purkinje 線維の変性機序として μ -カルパインの活性化が重要であることは間違いないと考えられる。 μ -カルパインの活性化には, ユートロフィンの減少による形質膜の機械的抵抗の障害も現段階では否定することはできないが, Dp71 の過剰発現に起因する Ca^{2+} チャンネルの機能障害あるいはシグナル伝達の異常など新たな cascade を検討する必要性が示された。

本論文は臨床的にはジストロフィン欠損症の病初期から刺激伝導系異常に対してこれまで以上に注意を払う必要があることを示唆している他, 機序が未だ明らかではない異常 Q 波あるいは筋ジストロフィーにおける筋変性自体の解明にも新たな視点を投げ得る内容であり, 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ことを認めた。

TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs (TRPV4は人工呼吸器関連肺障害において急性期のカルシウムに依存する血管透過性を亢進させる)

濱 中 一 敏

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 重症呼吸器疾患において人工呼吸管理は重要な治療のひとつである。これまでの臨床研究により過度の換気量の増加, 気道内圧の上昇による人工呼吸が肺障害 ventilator-induced lung injury (VILI) を引き起こし, 死亡率を上昇させることが示されているが, このVILIの分子生物学的メカニズムは未だ完全に解明されていない。高い気道内圧や肺胞の過膨張は肺毛細血管内皮細胞の血管透過性を亢進させることが明らかとなっており, これには機械刺激に対するイオンチャンネルの活性化と細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇が重要な因子であることが示唆されている。

我々はこれまでに stretch-activated cation channel (SACC) を介したカルシウム流入と high peak inflation pressure (PIP) ventilation に対する肺血管透過性亢進の関連を報告してきた。しかし、SACCの分子実体は未だ解明されていない。TRPV4は浸透圧や熱、機械刺激、 4α -PDD, epoxyeicosatrienoic acids (EETs) など多くの刺激によって活性化するカルシウム透過性チャンネルであり、肺を含む多くの組織、細胞で発現が認められる。本論文では TRPV4チャンネルと high PIP ventilation による急性の血管透過性亢進の関連について検討した。

【方法】 マウス摘出灌流肺モデルを用いた。30, 35, 40°Cの温度設定で9 cmH₂O (Low PIP) または25, 35 cmH₂O (High PIP) にて30分間の陽圧人工換気を行い、濾過係数 (Kf) およびwet to dry lung weight ratio (W/D ratio) を測定、血管透過性および肺障害を評価した。次にマウス摘出灌流肺を fluo-4, fura red で処理し intravital microscopy 法にて $[Ca^{2+}]_i$ の変化を観察した。また、glutaraldehyde 固定したマウス肺の肺胞浮腫 (Vaf/Vas) および血管周囲カフ形成 (Vc/Vw) を point counting 法にて検討した。またTRPV4のチロシンリン酸化についてwestern blot 法にて検討した。

【結果】 Wild type (TRPV4^{+/+}) マウス肺において high PIP ventilation はKfを35°Cで2.2倍、40°Cでは3.3倍に上昇させた。TRPV4 knock-out マウス (TRPV4^{-/-}) を用いた実験では35°C, 40°Cの両方で high PIP ventilation によるKfの上昇を認めなかった。TRPV4チャンネル阻害剤 (ruthenium red), およびTRPV4活性化経路を阻害するアラキドン酸合成阻害剤 (methanandamide), チトクローム P450エポキシ化阻害剤 (miconazole) はKfの上昇を著明に軽減した。Ratiometric fluorescence microscopy を用いた実験で、肺の膨張によりカルシウム流入が生じ、この反応がTRPV4^{-/-}マウス肺やruthenium red処理後の肺で消失した。Kf測定と同様の実験による人工呼吸器関連肺障害において、組織学的に point counting 法による定量化でhigh PIP ventilationでのVaf/Vas およびVc/VwはTRPV4^{-/-}マウス肺においてTRPV4^{+/+}マウス肺と比較し各々48.6%, 36.6%に減少した。TRPV4のチロシンリン酸化はlow PIP および high PIP ventilation で各々2.3倍, 2.0倍と有意に上昇したが換気圧による有意差は認めなかった。

【考察および結論】 Kfを用いた肺障害の検討で、TRP-

V4^{+/+}マウス肺における温度および圧によるKfの上昇はTRPV4^{-/-}マウス肺で著明に軽減し、TRPV4およびその活性化経路を阻害することでも有意に軽減した。Intravital microscopy 法による摘出灌流肺の観察にて肺膨張時の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を認め、TRPV4^{-/-}マウス肺およびTRPV4阻害薬で $[Ca^{2+}]_i$ の変化は消失したことから、肺胞の伸展によりTRPV4を介したCa²⁺流入が生じたと考えられた。Point counting 法による組織学的な肺胞浮腫および血管周囲浮腫の定量化で、TRPV4^{+/+}マウス肺のVILIがTRPV4^{-/-}マウス肺で有意に軽減したことが確認され、Kfの実験結果を裏づける結果であった。これらの結果からVILIにおける血管透過性亢進においてTRPV4を介した細胞内カルシウム流入による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が生じることから、TRPV4チャンネルを介したカルシウム流入はVILIにおける血管透過性亢進の主要な因子であることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

陽圧人工換気において過度の気道内圧の上昇、換気量の増加は肺障害を引き起こすことが報告されている。この人工呼吸器関連肺障害において、種々のシグナル伝達を担う細胞内カルシウムエントリーに寄与する伸展活性化型イオンチャンネルの分子実体がTRPV4であると仮定し、TRPV4がhigh pressure ventilation による血管透過性亢進や肺胞の伸展によるカルシウム流入に関与するかについて検討した。

その結果、濱中は次の結論を得た。

- 1) マウス摘出灌流肺において高い気道内圧、および高い温度により濾過係数 (Kf) が上昇し、肺障害が増悪した。
- 2) TRPV4ノックアウトマウス肺において、上記の肺障害が軽減した。
- 3) TRPV4およびその活性化経路の阻害薬を用いることで、同様に上記の肺障害が軽減した。
- 4) 病理組織学的に血管周囲のカフ形成および肺胞の肺水腫を評価し、温度と圧による肺障害がTRPV4ノックアウトマウス肺において著明に軽減した。
- 5) 肺胞の伸展によって細胞内カルシウム濃度の上昇が起こり、TRPV4ノックアウトマウス肺ではこの反応が消失した。

以上の結果より、TRPV4チャンネルを介した細胞内カルシウム流入が高気道内圧による人工呼吸器関連肺障害における重要な因子であり、人工呼吸器関連肺障害を引き起こす伸展活性化型チャンネルの分子実体であ

ると考えられた。

本研究は、TRPV4チャネルを介した細胞内カルシウム濃度上昇が人工呼吸器関連肺障害の重要な因子であることを示し、TRPV4チャネルおよびその活性化を阻害することが、治療の標的となりうる可能性を示したことから、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。

Baroreceptors mask sympathetic responses to high intraocular pressure in dogs (眼圧亢進時の交感神経反応を圧受容体がマスクする)

矢 作 徹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】緑内障は失明を起こす代表的疾患であり、リスク要因として加齢などが指摘されており、高齢化にともない今後ますますその頻度が増加するものと思われる。さらに緑内障の患者の中には、交感神経系の障害が合併することも報告されている。一方、加齢にともなう圧受容器反応の障害が、神経循環調節系の高血圧症の発症メカニズムの1つとして以前から知られている。しかしながら、眼圧上昇による神経循環調節系の影響については動物実験においてさえこれまで検討されていない。そこで、本研究では眼圧上昇に際して交感神経系がいかなる反応様式を示すかについて、圧受容器の関与とともに、麻酔したビーグル犬において検討した。

【方法】ビーグル犬(体重11~13 Kg)をペントバルビタール(25 mg/Kg, i. v.)で麻酔し、ポリエチレンカテーテルを大腿動脈から挿入して体血圧を測定し、心電図の第II誘導のR波をトリガーして心拍数を計測した。眼圧を測定するために、21Gのテフロンチューブを後角部分近くから眼内に挿入留置して、眼圧操作(30 mmHg, 2分間)による眼圧変化を計測した。また、交感神経活動の測定のために、左後腹膜経路で腎臓、脾臓や肝臓神経に到達し、測定用の炭素繊維双極電極を装着し、心臓交感神経については、左開胸して星状神経節を確認して頸部交感神経鎖から分枝して心臓に接近する神経を剥離し電極を装着した。それぞれの交感神経活動はバースト波形が存在することによって確認した。さらに、圧受容器の影響を除外するために、両側の総頸動脈分岐部および大動脈弓の線維性組織をすべて剥離・切離して除神経し、大動脈弓神経を

完全に切離するために、頸部迷走神経も切離した。これらの除神経が完全であることを確認するために、フェニレフリン(1-3 μg/Kg)やニトロプルシド(2-4 μg/Kg)による血圧変動に際して、反射性交感神経活動が変化しないことを確認した。神経活動の計測シグナルはオシロスコープ上でモニターするとともに、元波形とともに整流波形ならびに積分波形を記録計に保存した。すべての実験が終了した際に、交感神経活動のゼロレベルを求めるために、節遮断剤である臭化ヘキサメソニウムを投与して確認した。

【結果】眼圧を上昇させる前の対照群の平均血圧ならびに心拍数はそれぞれ117±14 mmHgおよび178±21回/分であり、除神経群では146±17 mmHgならびに183±21回/分で、眼圧上昇前の平均血圧は除神経群で有意に上昇していた。眼圧を30 mmHgに上昇させても、対照群においては、平均血圧ならびに心拍数、さらにはそれぞれの交感神経活動(心臓、肝臓、腎臓、脾臓)には有意な変化が認められなかった。しかしながら、除神経群においては、眼圧上昇に際して1分後に平均血圧は161±14 mmHgと有意に上昇したが、心拍数には有意差は認められなかった。交感神経活動においては、この除神経群において腎臓交感神経活動は眼圧上昇40秒後に169±14%と対照群に比べて有意に増加した。また、心臓交感神経活動においても眼圧上昇後1分では158±12%と対照群に比べて有意な増加を認めた。しかしながら、肝臓交感神経活動や脾臓交感神経活動には除神経群においても対照群と比較して有意差は認められなかった。

【考察およびまとめ】本研究では、眼圧亢進に際して全身に起こる交感神経活動が如何なる反応を示すかについて、麻酔したビーグル犬の眼圧を30 mmHg(2分間)に上昇させて検討した結果、圧受容体を温存した対照群では、それぞれの計測項目において、有意な変化を認めなかったが、神経循環調節に関与する圧受容体を完全に切離した除神経群においては、眼圧上昇に際して、体血圧さらに心臓交感神経活動、腎臓交感神経活動が有意に上昇し、肝臓交感神経活動や脾臓交感神経活動には有意な変化を認めなかった。このような結果から、正常では眼圧上昇時には、圧受容体によって心臓交感神経や腎臓交感神経活動の反射性亢進は抑制されていることが示唆され、圧受容体が機能しない状態では、心臓のポンプ作用の増強、腎臓などの抵抗血管の収縮によって、血圧が上昇するものと考えられた。以上より、高齢者で循環調節系異常をともなう緑

内障患者においては、治療として抗アドレナリン剤の点眼や、緑内障合併高血圧症に際して、抗アドレナリン剤などの抗高血圧薬の適応の妥当性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

緑内障は失明を起こす代表的疾患であり、リスク要因として加齢などが指摘され、高齢化にともなって今後ますますその発症頻度が高くなるものと思われる。さらに緑内障の患者の中には、交感神経系の障害が合併することも報告されている。しかし、これまで眼圧の上昇に際して引き起こされる神経循環調節系の役割については動物実験においてさえ検討されてきていない。

そこで本研究では、ビーグル犬をペントバルビタールで麻酔した後、体血圧ならびに心拍数を計測し、眼圧を30 mmHg、2分間上昇させ、腎臓交感神経、脾臓交感神経や肝臓交感神経さらに心臓交感神経活動を同時に測定し、さらに、圧受容器の影響を除外するために、両側の総頸動脈分岐部ならびに大動脈弓周辺の線維性組織をすべて剥離して切離し、大動脈の除神経を行うとともに、頸部で迷走神経も切断して、眼圧の上昇にともなう各神経活動の変化を検討した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 対照群において、眼圧を30 mmHg に上昇させても、平均血圧ならびに心拍数、さらにはそれぞれの交感神経活動には有意な変化が認められなかったが、除神経群では、眼圧上昇に際して平均血圧は有意に上昇したが、心拍数には有意差は認められなかった。
2. 除神経群において、RNA は眼圧上昇で対照群に比べて有意に増加した。また、CNA においても眼圧上昇後に対照群に比べて有意な増加を認めた。一方、HNA や SpNA には対照群と比較して有意な差は認められなかった。

本研究により、眼圧が上昇した場合、正常では圧受容体によって CNA や RNA の反射性亢進が抑制され、さらに、圧受容体が機能しない状態では、心臓のポンプ作用の増強、血管抵抗系から主に構成される腎臓などの抵抗血管の収縮を介して血圧が上昇するものと推測された。一方、眼圧上昇にともなう循環系応答には、容量血管系（肝臓、脾臓）などの収縮による血圧上昇に関与することは少ないものと考えられた。

以上のことから、緑内障の治療として抗アドレナリン剤の点眼や、緑内障合併高血圧症に際して、抗アドレナリン剤などの抗高血圧薬の適応の妥当性が示唆された。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。

Differential roles of peripheral and spinal endothelin receptors in the micturition reflex in rats (ラット排尿反射における末梢・脊髄のエンドセリン受容体の役割)

小川輝之

(論文の内容の要旨)

背景と目的: 脊髄損傷や膀胱出口閉塞などに伴う膀胱の不随意収縮や間質性膀胱炎に伴う膀胱痛は求心性神経の一つである C 線維の亢進が一部関与していると考えられている。これらの C 線維の亢進を抑制することが、難治性である膀胱の不随意収縮や膀胱痛の治療方法となる可能性が考えられる。内因性血管収縮物質であるエンドセリン-1 (ET-1) には ET_A と ET_B 二つの受容体がある。ウサギ膀胱平滑筋の等尺張力試験においては ET-1 投与により持続的収縮が認められ、また免疫染色でエンドセリン様活性は平滑筋や上皮細胞、血管内皮においても確認された。さらにラットの後根神経節や末梢神経においても C 線維の一部にエンドセリン受容体の発現が免疫染色で確認され、ET-1 と C 線維の関連が示唆されている。今回我々はラットの排尿反射において ET-1 の膀胱内投与および脊髄腔内投与に対する効果とその受容体の役割について検討した。

対象と方法: 対象は正常およびカプサイシンの前投与により C 線維を脱感作した Sprague-Dawley 雌ラットとした。ウレタン麻酔下に膀胱内圧測定を施行。正常群およびカプサイシン前処置を行ったラットに対し ET-1 を膀胱内注入しその効果を検討した。また正常ラットに対しては ET-1 の脊髄腔内投与に対する効果についても検討した。また、ET-1 の膀胱内または脊髄腔内投与による膀胱内圧の変化が、エンドセリン受容体拮抗薬およびオピオイド受容体拮抗薬により抑制されるか検討を行った。

結果: ET-1 の膀胱内投与は用量依存性に排尿反射を誘発し、10 μM 濃度の膀胱内投与で排尿間隔を有意に減少させた (コントロール値の 38%)。この排尿反射の誘発はカプサイシン前投与 (125 mg/kg, s.c.) あるいは ET_A 受容体拮抗薬である ABT-627 の投与 (0.1 mg/kg, i.v.) により有意に抑制された。しかしながら ET_B 受容体拮抗薬である A-192621 の投与 (1, 10 mg/kg, i.v.) では ET-1 誘発の排尿反射亢

進は抑制されなかった。一方、ET-1の脊髄腔内投与は排尿反射を抑制し、50 fmolの投与で有意に排尿反射を抑制した（コントロール値の219%）。このET-1による排尿反射の抑制は、ET_A受容体拮抗薬ABT-627の高濃度投与（10 mg/kg, i. v.）またはナロキソン10 μgの脊髄腔内投与により抑えられたが、ET_B受容体拮抗薬の投与（10, 30 mg/kg, i. v.）では抑えられなかった。

考察：ラット排尿反射において、膀胱レベルではET-1投与で排尿反射が誘発された。このメカニズムはカプサイシン感受性C線維内にあるET_A受容体を介しているものと考えられた。また、脊髄レベルにおいてはET-1投与により排尿反射は抑制された。このメカニズムはET_A受容体を介したものであり、またオピオイド経路の一部を介しているものと考えられた。

結論：エンドセリン受容体とくにET_A受容体は膀胱の求心性線維の亢進を調節する役割が認められた。従ってエンドセリンの膀胱内注入はC線維の亢進によって引き起こされる排尿反射誘発の有効なモデルと考えられた。また膀胱におけるET_A受容体の抑制は様々な病態によって引き起こされる排尿筋過反射や間質性膀胱炎などの膀胱痛に対して有効である可能性が考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

膀胱および一次ニューロンにおいてエンドセリンおよびエンドセリン受容体の発現が認められ、エンドセリン-1 (ET-1) は等尺張力試験でも膀胱平滑筋の収縮を認めた。排尿反射においてエンドセリンは何らかの役割があると考えられる。そこで小川らはエンドセリンの膀胱・脊髄に対する役割について、ウレタン麻酔下に膀胱内圧測定を施行し検討した。(1) 正常群およびカプサイシン前処置を行ったラットに対しET-1を膀胱内注入しその効果を検討した。(2) ET-1の脊髄腔内投与に対する膀胱内圧の効果を検討した。(3) ET-1の膀胱内または脊髄腔内投与による膀胱内圧の変化が、エンドセリン受容体拮抗薬およびオピオイド受容体拮抗薬により抑制されるか検討を行った。

その結果以下の成績を得た。

- 1) ET-1の膀胱内投与は用量依存性に排尿反射を誘発し、10 μM濃度の膀胱内投与で排尿間隔を有意に減少させた（コントロール値の38%）。
- 2) ET-1排尿反射の誘発はカプサイシン前投与（125 mg/kg, s. c.）あるいはET_A受容体拮抗薬であるABT-627の投与（0.1 mg/kg, i. v.）により有意に

抑制された。

- 3) ET-1排尿反射の誘発はET_B受容体拮抗薬であるA-192621の投与（1, 10 mg/kg, i. v.）では抑制されなかった。
- 4) ET-1の脊髄腔内投与は排尿反射を抑制し、50 fmolの投与で有意に排尿反射を抑制した（コントロール値の219%）。
- 5) ET-1脊髄腔内投与による排尿反射の抑制は、ET_A受容体拮抗薬ABT-627の高濃度投与（10 mg/kg, i. v.）またはナロキソン10 μgの脊髄腔内投与により抑えられた。
- 6) ET-1脊髄腔内投与による排尿反射の抑制はET_B受容体拮抗薬の高濃度投与（10, 30 mg/kg, i. v.）では抑えられなかった。

以上より、ラット排尿反射においてET-1膀胱内投与で排尿反射が誘発された。このメカニズムはカプサイシン感受性C線維内のET_A受容体を介しているものと考えられた。また、脊髄レベルにおいてはET-1投与により排尿反射は抑制された。このメカニズムはET_A受容体を介した反応であり、またオピオイド受容体の一部を介しているものと考えられた。

すなわちエンドセリンの膀胱内注入はC線維の亢進によって引き起こされる排尿反射誘発の有効な動物モデルであり、またET_A受容体拮抗薬は排尿筋過反射や間質性膀胱炎の治療薬として臨床応用される可能性がある。以上から、主査、副査は一致して本論文が学位論文として相応するものと認めた。

Polycomb complexes regulate cellular senescence by repression of ARF in cooperation with E2F3 (ポリコム複合体はE2F3と協同してARFの転写調節により細胞老化を制御する)

三 木 純

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】細胞老化は様々なストレスにさらされた正常細胞に引き起こされるプログラムである。ポリコム遺伝子産物 (PcG) は胎生期には器官形成に、成体期にはp19^{ARF}とp16^{INK4a}の発現調節を介して、細胞の定常性維持や発癌抑制に関与している。Class II PcG (Bmi1, M33, Rae28, Mel18) の欠損マウス由来の線維芽細胞 (MEFs) では、p19^{ARF}とp16^{INK4a}が増加し、細胞老化を起こすが、その分子機構は不明で

ある。本研究では、Mel18欠損 MEFs を用いてこの分子機構を解析した。

【方法】 Mel18欠損, Mel18/ARF 欠損, Mel18/p53欠損 MEFs を経代培養し、経時的に細胞数を算定した。細胞老化の判定は SA- β -Gal 染色により行った。低血清, UV照射, VP16投与により惹起されるアポトーシスの判定は flowcytometry による sub G0/G1測定により解析した。ARFやp53の遺伝子導入は, MSCV promoter レトロウイルスベクターにサブクローニングしたこれらの遺伝子をウイルス蛋白発現ベクターとともに293T 細胞内にリン酸カルシウム法を用いて導入した。培養上清内のレトロウイルスを回収し, ポリブレン存在下で MEFs に感染させた。タンパクの発現は免疫沈降とウエスタンブロットにより検討した。mRNA は半定量的な RT-PCR により評価した。ゲノム部位における蛋白結合はクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) で解析した。

【結果】 Mel18欠損 MEFs では、野生型 MEFs と比べ経代培養により増殖速度と細胞密度が低下した。野生型と比べ、明らかに SA- β -Gal が強く染色された。低血清, UV 照射, VP16投与などのアポトーシス誘導刺激では、Mel18欠損 MEFs と野生型の間に差異は認められなかった。経代培養により、Mel18欠損 MEFs の p19^{ARF}, p16^{INK4a}, p53, p21, MDM2の蛋白量は増加した。また、p19^{ARF} と p16^{INK4a} の mRNA の転写量も増加した。一方、他の Class II PcG (Bmi1, Ring1b) の蛋白量は減少していたが、転写量には差異は認められなかった。E2F3aとE2F3bの蛋白量はほとんど変化がなかった。Mel18欠損MEFsでみられた細胞老化の促進は Mel18/ARF 欠損 MEFs や Mel18/p53欠損 MEFs では阻止され、ARF と p53をレトロウイルスにより導入すると再び細胞老化は促進した。約20数 kb にわたる野生型マウス p15^{INK4b}/p19^{ARF}/p16^{INK4a} ゲノム部位にはclass II PcG (Ring1b, Mel18) が結合していた。ARF promoter においては Ring1b の結合が顕著であり、p16 promoter においては Ring1b と Mel18が同程度に結合していた。ARF promoter における Ring1b の結合は経代培養と Mel18欠損による相乗効果で減弱した。E2F結合部位が存在する ARF promoter における E2F3b結合も経代培養と Mel18欠損による相乗効果で減弱した。ARF promoter における E2F3a 結合はほとんど認められなかった。細胞内で Ring1b は E2F3 と複合体を形成していた。

【考察】 他のポリコム遺伝子産物と同様に Mel18が

欠損すると、ARF の発現抑制が解除され、p53が安定化し、細胞老化が促進されることが示された。この p16/ARF の転写抑制には、class II PcG (Ring1b, Mel18) のゲノム部位への直接的な結合が関与していた。Ring1b と E2F3が複合体を形成していることから、class II PcG タンパク質複合体と E2F3は協同して ARF の転写を調節し、細胞老化を制御していると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

ポリコム遺伝子産物 (PcG) は p19^{ARF} と p16^{INK4a} の発現調節を介して、細胞の定常性維持や発癌抑制に関与している。Class II PcG (Bmi1, M33, Rae28, Mel18) の欠損マウス由来の線維芽細胞 (MEFs) では、p19^{ARF} と p16^{INK4a} が増加し、細胞老化を起こすが、その分子機構は不明である。本研究では、Mel18欠損 MEFs を用いてこの分子機構を解析した。

Mel18欠損, Mel18/ARF 欠損, Mel18/p53欠損 MEFs を経代培養し経時的に細胞数を算定した。SA β -Gal 染色により細胞老化を判定した。経代培養ストレス下での細胞周期に関連したタンパク発現の変化を免疫沈降とウエスタンブロットにより、mRNA 発現を半定量的な RT-PCR により解析した。Mel18/ARF 欠損, Mel18/p53欠損 MEFs に ARF や p53遺伝子をレトロウイルスベクター用いて導入し ARF/p53経路の重要性を解析した。ゲノム部位における蛋白結合はクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) で解析した。

その結果、三木は次の結論を得た。

- 1) Mel18欠損 MEFs では、野生型 MEFs と比較し経代培養により早期に増殖速度と細胞密度が低下し、SA β -Gal が強く染色されたことより Mel18欠損 MEFs では細胞老化が促進していることが示唆された。
- 2) Mel18欠損 MEFs では野生型 MEFs と比べ培養早期より p19^{ARF}, p16^{INK4a}, p53, p21, MDM2の蛋白量が増加しており、経代によりこれらの発現量がさらに増加した。また、p19^{ARF} と p16^{INK4a} の mRNA の転写量も増加した。Mel18欠損 MEFs における細胞老化の促進に p19^{ARF}, p16^{INK4a} が関与していることが示唆された。
- 3) Mel18欠損 MEFs でみられた細胞老化の促進は Mel18/ARF 欠損 MEFs や Mel18/p53欠損 MEFs では阻止され、ARF と p53をレトロウイルスにより導入すると再び細胞老化は促進した。Mel18欠損

MEFs における ARF/p53経路の重要性が示唆された。

- 4) 約20数kbにわたる野生型マウスp15^{INK4b}/p19^{ARF}/p16^{INK4a}ゲノム部位にclass II PcG (Ring1b, Mel18)が結合していた。ARF promoterにおいてはRing1bの結合が顕著であり、p16 promoterにおいてはRing1bとMel18が同程度に結合していた。ARF promoterにおけるRing1bの結合は経代培養とMel18欠損による相乗効果で減弱した。
- 5) E2F結合部位が存在するARF promoterにおけるE2F3b結合も経代培養とMel18欠損による相乗効果で減弱した。
- 6) 細胞内でRing1bはE2F3と複合体を形成していたことから、class II PcGタンパク質複合体とE2F3が2元複合体を構成していることが示唆された。以上よりMel18が欠損すると、ARFの発現抑制が解除され、p53が安定化し、細胞老化が促進されることが示された。このp16/ARFの転写抑制には、class II PcG (Ring1b, Mel18)とE2F3が2元複合体を形成してゲノム部位へ直接的に結合し細胞老化を制御していると考えられた。重要な癌抑制機構であるp16/ARFの転写調節におけるポリコム遺伝子群の詳細な機能が解明されたことは重要な知見と思われ、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。

Relationship Between the Response to Treatment and the Prognosis of Patients with Aggressive Lymphomas Treated with Chemotherapy Followed by Involved-field Radiotherapy: Radiographic Assessment (中高悪性度非ホジキンリンパ腫に対する化学療法+追加放射線療法の治療効果と予後の関係: 画像学的検討)

佐々木 茂

(論文の内容の要旨)

悪性リンパ腫の予後予測因子の一つにInternational Prognostic Index (IPI) があり治療方針の決定にも参考にされるが、IPIによる予後予測には限界があり、画像診断による治療効果の判定結果も予後予測に重要である。悪性リンパ腫の画像学的治療効果判定には従来Computed Tomography (CT), Magnetic Resonance Imaging (MRI), Gallium Scintigraphy (Ga-67),

が用いられ、最近Positron-Emission Tomography (PET) も使用されるようになってきた。治療効果判定や予後予測における画像学的判定の有効性については悪性リンパ腫全体としてはいくつか報告されているが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫に分けた検討の報告は少ない。この論文では対象を化学療法と放射線治療を行った非ホジキンリンパ腫の中高悪性度リンパ腫症例に限定してCT/MRI/Ga-67による画像学的効果判定を行い、予後との関係を検討し、また効果判定時期についても考察した。対象は2000-2003年に化学療法と追加放射線治療を行った中高悪性度非ホジキンリンパ腫33例で、男性12例、女性21例、年齢は20-81歳(中央値64)であった。病理組織分類にはWorld Health Organization Classificationを用い、Diffuse large B-cell lymphoma: 26例、Peripheral T-cell lymphoma: 2例、Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: 2例、Extranodal T-/NK-cell lymphoma: 3例であった。Cotswolds修正Ann Arbor病期分類はI期: 12例、II期: 13例、III期: 6例、IV期: 2例、IPIはLow risk: 13例、Low-Intermediate risk: 15例、High-Intermediate risk: 2例、High risk: 3例、原発部位はワルダイヤ輪: 12例、リンパ節: 8例、鼻腔副鼻腔: 6例、甲状腺: 3例、骨: 3例、軟部: 1例、観察期間は4-46カ月(中央値21)であった。単純/造影CTはスライス厚5mmで撮影、MRIは1.5Tのspin-echo法でT1強調像、脂肪抑制T2強調像、造影T1強調像を撮影、Ga-67はクエン酸ガリウム185MBqを投与後48-72時間で撮影した。化学療法は病期やIPI、腫瘍サイズを考慮しCHOP療法を2-6サイクル施行した。年齢や全身状態を考慮しCHOP療法は50-100%量で行った。化学療法後に浸潤領域(involved-field)への放射線治療30-50Gy(1回線量1.5-2Gy)を行った。画像による効果判定は治療前、化学療法終了時および放射線治療終了時にCT、MRI、Ga-67を施行した。CT、MRIによる治療効果判定にはInternational Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomaを用いた。Ga-67では治療前の病変部の集積と治療後の集積を比較することにより治療効果を判定した。生存率の計算にはKaplan-Meier法を用い、生存率の有意差はWilcoxon法で検定した。総治療後の結果はComplete Response (CR): 21例(64%)、Complete Response unconfirmed (CRu): 7(21%)、Progressive Disease (PD): 5(15%)、2年累積生存は72%、

2年無増悪生存率は63%であった。化学療法後の効果判定と無増悪生存との相関はGa-67で認められ ($P = .009$), CT ($P = .75$) やMRI ($P = .19$) では見られなかった。総治療後の効果判定と無増悪生存との相関はCT ($P = .15$), MRI ($P = .77$), Ga-67 ($P = .23$) のいずれも見られなかった。中高悪性度非ホジキンリンパ腫に対して化学療法と追加放射線治療を行った場合、化学療法後にGa-67で集積が残存していると予後は不良である。

(論文審査の結果の要旨)

悪性リンパ腫の予後予測因子の一つにInternational Prognostic Index (IPI) があり治療方針の決定にも参考にされるが、IPIによる予後予測には限界があり、画像診断による治療効果の判定結果も予後予測に重要である。佐々木 茂は、化学療法と放射線治療を行った非ホジキンリンパ腫の中高悪性度リンパ腫症例でComputed Tomography (CT), Magnetic Resonance Imaging (MRI), Gallium Scintigraphy (Ga-67) による画像学的効果判定を行い、予後との関係を検討し、また効果判定時期についても考察した。対象は中高悪性度非ホジキンリンパ腫33例で、化学療法は病期やIPI, 腫瘍サイズ, 年齢, 全身状態を考慮し50-100%量のCHOP療法を2-6サイクル施行した。化学療法後に浸潤領域 (involved-field) への放射線治療30-50Gy (1回線量1.5-2Gy) を行った。画像による効果判定は治療前, 化学療法終了時および放射線治療終了時にCT, MRI, Ga-67を施行した。CT, MRIによる治療効果判定にはInternational Work-shop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomaを用いた。Ga-67では治療前の病変部の集積と治療後の集積を比較することにより治療効果を判定した。

その結果、以下の成績を得た。

- 1) 総治療後の結果はComplete Response : 21例 (64%), Complete Response unconfirmed : 7 (21%), Progressive Disease : 5 (15%) であった。
- 2) 2年累積生存は72%, 2年無増悪生存率は63%であった。
- 3) 化学療法後の効果判定と無増悪生存との相関はGa-67で認められ ($P = .009$), CT ($P = .75$) やMRI ($P = .19$) では見られなかった。
- 4) 総治療後の効果判定と無増悪生存との相関はCT ($P = .15$), MRI ($P = .77$), Ga-67 ($P = .23$) のいずれも見られなかった。

以上により、非ホジキンリンパ腫の治療後では、CTやMRIよりGa-67の方が効果判定に有用であり、また、化学療法と放射線治療を行った場合は、化学療法後のGa-67の効果判定の方が予後に相関していると考えられた。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。

Expression of cyclins, p53, and Ki-67 in cervical squamous cell carcinomas: over-expression of cyclin A is a poor prognostic factor in stage Ib and II disease (子宮頸部扁平上皮癌におけるサイクリン, p53およびKi-67の発現: サイクリンAの過剰発現はIb期およびII期における予後不良因子である)

塩原茂樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】細胞の増殖は細胞周期の進行によって達成される。細胞周期の進行はcyclin, cyclin-dependent kinase (cdk) および腫瘍抑制遺伝子産物などの細胞周期調節因子によって精密に制御されている。Cyclin D1, E, AおよびB1は細胞周期特異的に発現され、特定のcdkと複合体を形成し、これらがretinoblastoma gene productなどの基質をリン酸化することによって細胞周期が進行する。一方、p53やcdk inhibitorなどの腫瘍抑制遺伝子産物はcyclin/cdkの機能に拮抗して細胞周期進行を抑制する。多くの悪性腫瘍においてcyclin/cdkの過剰発現と腫瘍抑制機能の消失が報告されており、またこれらの異常の幾つかは予後に関連することも報告されている。子宮頸癌においては、進行期、リンパ節転移および基幹部浸潤などの臨床病理学的因子に加え成長因子やその受容体の過剰発現、human papilloma virus (HPV) のタイプなどの生化学的因子が予後因子として報告されている。当教室では子宮頸部扁平上皮病変において、細胞周期調節因子の過剰発現が性ステロイド受容体の欠如と関連することを報告したが、頸癌における細胞周期調節因子の予後因子としての意義は明らかではない。本研究では子宮頸部扁平上皮癌における細胞周期調節因子と臨床病理学的因子との関係を明らかにするため、cyclin (D1, E, A, B1), p53, 増殖マーカーとしてのKi-67の発現を免疫組織学的に検討した。さらに細胞周期調節因子の発現の予後因子としての意義を解析した。

【対象と方法】患者の同意のもとに得られた103例 (Ib

期56例, II期24例, III期18例, IV期5例)の子宮頸部扁平上皮癌組織におけるcyclin (D1, E, A, B1)およびp53の発現を免疫染色にて観察し, Ki-67と比較検討した。各症例の染色性は細胞500個あたりの陽性細胞率 (positivity index, PI) として記載し, 各染色と臨床病理学的因子の間の相関を Spearman の順位相関によって検討した。加えて臨床病理学的因子 (腫瘍径, 脈管侵襲, 間質浸潤の深さ, 基靭帯浸潤, リンパ節転移) とcyclin (D1, E, A, B1), p53, Ki-67の過剰発現の予後因子としての意義をCox検定を用いて検討した。

【結果】正常子宮頸部扁平上皮においてはcyclinの発現は傍基底細胞に散在性に観察され, cyclin D1, EおよびAのPI値は5以下でcyclin B1のPI値は10以下であった。p53の発現は観察されなかった。頸部扁平上皮癌においてはこれらの発現は正常扁平上皮に比べ増加し, Ib+II期(80例)ではcyclin D1, E, A, B1およびp53の過剰発現症例はそれぞれ13%, 18%, 15%, 10%および21%で, III+IV期(23例)ではそれぞれ13%, 39%, 57%, 44%および26%であった。Cyclin Aの全症例の平均PI値は16.0であり, またIb+II期では13.3, III+IV期では25.1と両者の間に有意差を認めたが, cyclin D1, E, B1およびp53のPI値においてはIb+II期とIII+IV期との間に有意差は認められなかった。各種因子とKi-67との相関では, Ib+II期でcyclin D1, E, Aおよびp53とKi-67との間に, またIII+IV期でもcyclin D1, E, A, B1およびp53とKi-67との間に正の相関を認めた。

Ib+II期の症例において各種細胞周期調節因子と臨床病理学的因子との相関の検討を行ったところ, 脈管侵襲とcyclin D1の間に正の相関を, また脈管侵襲とKi-67, 間質浸潤の深さとp53, リンパ節転移とKi-67, 腫瘍径とp53との間に負の相関を認めた。Ib+II期において細胞周期調節因子, Ki-67および臨床病理学的因子と予後の相関の検討を行ったところ, 単変量, 多変量解析ともにリンパ節転移陽性とcyclin Aの過剰発現が有意な予後不良因子であった。しかしながら, III+IV期症例ではサイクリンA発現と患者生存との間に有意な相関は観察されなかった。

【結論】子宮頸部扁平上皮癌ではcyclin D1, E, A, B1が過剰発現されており, さらにこれらがKi-67の発現と相関していたことから, サイクリンの過剰発現が子宮頸部扁平癌の活発な増殖能の獲得に深く関与している可能性が示唆された。さらにcyclin Aの過剰発

現はリンパ節転移と同様に, Ib+II期の症例における独立した予後因子である可能性が示唆されたことから, サイクリンAの臨床応用の可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

細胞増殖は細胞周期調節因子の相互作用によって調節されているが, 細胞周期進行を促進する中心的な分子がサイクリンである。本研究では子宮頸部上皮病変におけるサイクリンの発現とその臨床病理学的意義を明らかにするために, 以下の実験を施行した。

子宮頸部扁平上皮癌103例(Ib期56例, II期24例, III期18例, IV期5例)におけるサイクリンD1, E, A, B1およびp53の発現を免疫染色にて観察し, 増殖マーカーであるKi-67と比較検討した。各症例の染色性は細胞500個あたりの陽性細胞率 (positivity index, PI) として記載し, 各染色と臨床病理学的因子の間の相関をSpearmanの順位相関によって検討した。また臨床病理学的因子(腫瘍径, 脈管侵襲, 間質浸潤の深さ, 基靭帯浸潤, リンパ節転移)と上記因子の発現の予後因子としての意義をCox検定を用いて検討した。

その結果塩原は以下の成績を得た。

- 1) 正常子宮頸部の扁平上皮ではサイクリンD1, E, A, B1の発現は傍基底細胞に観察され, p53は陰性であった。
- 2) 子宮頸部扁平上皮癌においてはサイクリンD1, E, A, B1およびp53の過剰発現が観察された。
- 3) 頸癌の進行期別にみたサイクリン過剰発現症例の頻度および平均PI値は, いずれのサイクリンでもI+II期よりIII+IV期症例のほうが高い傾向にあり, その傾向は特にサイクリンAで顕著であった。
- 4) 子宮頸癌におけるサイクリンD1, E, A, B1およびp53の発現は増殖マーカーであるKi-67と正の相関を示した。
- 5) 各因子発現と臨床病理学的因子との相関を検討したところ, 脈管侵襲とサイクリンD1の間には正の相関が認められ, 脈管侵襲とKi-67, 間質浸潤とp53, リンパ節転移とKi-67, 腫瘍径とp53の間には負の相関が認められた。
- 6) I+II期症例でのリンパ節転移症例とサイクリンA過剰発現症例は多変量解析の結果ともに有意な予後不良因子であった。III+IV期症例ではいずれの因子でも有意差は観察されなかった。

これらの結果より, 子宮頸部扁平上皮癌では各種のサイクリンが過剰発現されており, これが子宮頸部扁

平上皮癌の活発な増殖に関与していると考えられた。また I + II 期症例におけるサイクリン A の過剰発現は独立した予後因子であったことから、サイクリン A の臨床応用の可能性が示唆された。

以上より主査、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。

STAT6 signaling is important in CD8⁺ T cell activation and defense against *Toxoplasma gondii* infection in the brain (STAT6シグナルはトキソプラズマ感染時の CD8⁺ T 細胞の活性化と脳内における防御に重要である)

金 東 浩

(論文の内容の要旨)

【目的】トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はヒトや動物に感染する細胞内寄生原虫で、妊娠初期～中期に初感染すると胎児に重大な障害を与えることがある。また、AIDS 患者など免疫力の低下したヒトでは脳髄膜炎などを発症し死にいたる場合もある。トキソプラズマの感染防御に IFN- γ が重要であることは多くの研究により明らかにされているが、インターロイキン 4 (IL-4) の役割についてはいまだ不明な点が多い。本研究では、IL-4シグナル伝達に関する転写因子である STAT6のトキソプラズマ感染後の免疫応答における役割について検討を行った。

【方法、結果】トキソプラズマ感染防御における STAT6シグナルの役割を STAT6ノックアウト (STAT6^{-/-}) マウスと野生型 (WT) マウスを用いて検討した。感染後28および56日目における脳内シスト数は WT マウスに比べ STAT6^{-/-}マウスで有意に多かった。トキソプラズマ抗原刺激による感染 STAT6^{-/-}マウス脳脊髄液および脾臓中の CD8⁺ T 細胞からの IFN- γ の産生は WT マウス CD8⁺ T 細胞より有意に低下していた。CD25発現や細胞傷害性について比較すると、STAT6^{-/-}マウスの CD8⁺ T 細胞は WT マウスに比べ機能が低下していた。感染した WT マウスの CD8⁺ T 細胞を STAT6^{-/-}マウスに移入することにより脳内のシスト数は減少した。しかし、非感染 WT マウスの CD8⁺ T 細胞を STAT6^{-/-}マウスに移入しても CD8⁺ T 細胞の活性化も脳内シスト数の減少も認められなかった。WT マウスより採取した脾 Adherent cell を STAT6^{-/-}マウスに移入すると CD8⁺ T 細胞が

活性化し、脳内シスト数も減少した。トキソプラズマ感染後の脾樹状細胞における CD86の発現や IL-12 p40産生は STAT6^{-/-}マウスに比べ WT マウスで有意に高かった。

【結論】以上の結果より、STAT6シグナルは抗原提示細胞の機能調節にもとづく CD8⁺ T 細胞の活性化に重要で、このことがトキソプラズマ感染後の脳内シスト形成の抑制に関与していると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

IL-12-STAT4シグナルや IFN- γ などが関与する Th1免疫応答はトキソプラズマ感染防御に重要な役割を果たしている。一方、Th2サイトカインである IL-4は Th1免疫応答を抑制するがトキソプラズマ感染防御におけるその役割は明らかでない。そこで金 東浩は IL-4受容体シグナル伝達に関与する分子である STAT6のノックアウト (STAT6^{-/-}) マウスを用いてトキソプラズマ感染防御における STAT6シグナルの役割を(1)トキソプラズマ感染の程度を脳内シスト数を数えることにより評価、(2)免疫防御反応を IFN- γ などサイトカインの測定、および CD8⁺ T 細胞の細胞毒性作用の測定、(3) T 細胞の活性化を Anti-CD25, -CD62L を用いた FACS による測定、(4) 抗原提示細胞による T 細胞の活性化を細胞移入実験、および Dendritic cell (DC) 成熟マーカーの検出により検討した。

その結果以下の成績を得た。

- (1) WT マウスに比べ、STAT6^{-/-}マウス脳内に形成されるシスト数は有意に多かった。
- (2) WT マウスに比べ、STAT6^{-/-}マウスの脳脊髄液中の IFN- γ 濃度および CD8⁺ T 細胞からの IFN- γ の産生は有意に少なかった。
- (3) WT マウスに比べ、STAT6^{-/-}マウスにおいて、活性化した CD8⁺ T 細胞の割合は有意に低かった。
- (4) WT マウスに比べ、STAT6^{-/-}マウス CD8⁺ T 細胞の細胞傷害性作用は有意に弱かった。
- (5) STAT6^{-/-}マウス脳内のシスト数は、感染 WT マウスより分離した CD8⁺ T 細胞の移入により有意に減少した。
- (6) WT マウスに比べ、STAT6^{-/-}マウス DC における CD86の発現は有意に弱かった。
- (7) WT マウスに比べ、STAT6^{-/-}マウス血清および、脾細胞培養上清中の IL-12の濃度は低下していた。

以上の結果より STAT6シグナルは抗原提示細胞の機能調節にもとづく CD8⁺ T 細胞の活性化に重要であ

り、このことがトキソプラズマ感染後の脳内シスト形成の抑制に関与していることが明らかとなった。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。

Utility of Single-slice High-resolution CT in Upper Lung Field Combined with Low-dose spiral CT for Lung-cancer Screening in the Detection of Emphysema (低線量肺癌CT検診において、上肺野1スライスのHRCTを追加撮影することによる肺気腫検出の有用性)

畑山 織 絵

(論文の内容の要旨)

【目的】胸部低線量らせんCTに高分解能CT (HRCT) 1スライス追加撮影することによる気腫性病変の検出力と呼吸機能との対比を目的とする。

【対象と方法】肺癌検診にて鹿教湯三才山病院を受診し、本研究に同意が得られた664例を対象とした。対象者の平均年齢は51.3歳で、全例に自覚症状、既往歴、治療歴、喫煙歴、飲酒習慣等のアンケートに回答してもらい、全例に簡易呼吸機能検査を施行した。シングルらせんCT (Asteion DUAL, Toshiba) を用い、肺癌検出のための撮影条件にて全肺野を10 mm スライスで撮影した (tube current 20 mA, X-ray beam width 10 mm and helical pitch 3.5 (bed travel rate 35 mm/sec, radiation dose; 0.6~0.7 mSv))。さらに肺気腫の有無を検討するために、深吸気位で大動脈弓上縁付近のHRCTを追加撮影した (tube voltage 120 Kvp, tube current 200 mA, X-ray beam width 2 mm, window level -800 HU and window width 900 HU (radiation dose; 6.1 mSv))。画像の評価は、二人の呼吸器科医がそれぞれ別々に読影を行い、肺気腫の程度を視覚的に評価し、肺野の低吸収域が肺野に占める割合 (% LAA) によって $0\% < \% \text{LAA} \leq 5\%$ を Subtle PE, $5\% < \% \text{LAA} \leq 25\%$ を Mild PE, $25\% < \% \text{LAA}$ を Moderate to Severe PE と3つの肺気腫グループに分類した。簡易呼吸機能検査はアメリカ胸部疾患学会の基準で校正された機器を使用し、①非喫煙、所見なし (NS-N group) ②喫煙経験者、所見なし (SM-N group) ③ Subtle PE ④ Mild PE ⑤ Moderate~Severe PE の各群について喫煙指数、年齢、呼吸機能を統計用ソフト Stat Flex ver.5.0で

用いて解析した。

【結果】対象者657名の内、肺癌検診用の条件では6.4%にしか気腫性変化を認めなかったが、1スライスのHRCTを追加することによって23.3%に肺気腫を認めた。内 Subtle PE 12.2%, Mild PE 9.9%, Moderate to Severe PE 1.2%であった。肺気腫を認めた症例の喫煙歴は有意に高頻度であり (喫煙歴あり: 38.4%, 非喫煙者: 3.8%), 気腫性変化の重症度は、年齢、喫煙歴および Brinkman index の増加と関連を示した。簡易呼吸機能検査で閉塞性換気障害を認めた者は、気腫を認めない non-PE 群で0.19%に認められ、肺気腫群では3.92%に認められた。全例男性で、1例を除き喫煙歴を有していた。1秒率 (FEV1/FVC) および最大呼気中間流量 (MMEF) は、肺気腫を認めない群に比し、肺気腫を認める群において有意に低値であり、FEV1/FVC, MMEF および V25/HT は肺気腫の重症度に伴い低値を示した。すなわち、肺気腫の程度が進行するにつれて呼吸機能上、早期の閉塞性障害の指標や末梢気道の閉塞性障害を示す指標が低下を示したことになる。喫煙歴を有する群のみで解析でも、同様の結果であり、より結果が明確となった。

【結論】肺癌スクリーニング用低線量CT検査時に、上肺野の1スライスHRCTを加えることによって、大幅に被爆線量を増やすことなく、気腫病変の検出感度は高まり、早期肺気腫を含め気腫病変のスクリーニングに有効であると考えられ、この結果を禁煙指導に繋げることが可能となる。また、CTによって検出されたPEは、喫煙と密接な関係にあり、将来COPDに進展する可能性を示唆しており、早期発見、禁煙指導がCOPDの発症を抑制する可能性も示唆している。しかし、気腫病変を伴わないCOPDも存在するため、COPDのスクリーニングにはスパイロメトリーも同時に行う必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

COPD (慢性閉塞性肺疾患) は主に喫煙を原因とする肺の炎症反応に基づく進行性の疾患で、緩徐に労作性呼吸困難を生じる。肺気腫は慢性気管支炎とともにCOPDの原因疾患のひとつで、病理学的な概念で明らかな線維化を伴わず肺胞壁の破壊を伴ったものがある。2020年には全世界の死亡原因の第3位と予想される急激に増加している疾患で、日本人のCOPD有病率は8.6%、患者数は530万人と推定された。しかし2005年のCOPD患者数は約22万3千人、COPDであるの

に受診していない人は500万人以上いると推定される。多くの人が、COPDであることに気づいていない、または正しく診断されていないことになる。畑山は人間ドッグにおける肺癌検診目的の胸部低線量らせんCTに高分解能CT (HRCT) 1スライス追加撮影することによる肺気腫の検出力と呼吸機能検査結果との対比、検討を行った。

その結果、以下の成績を得た。

- 1) HRCTの上肺野への追加撮影による肺気腫検出率657例中153例, 23.3%と低線量のみ6.4%と比し, 優位に検出率が上昇した。肺気腫をCTにて検出するには, CTの撮影条件, 表示条件の設定変更を行う必要がある。
- 2) 肺気腫中93.5%は喫煙経験者(現喫煙者+既喫煙者)で, 喫煙と肺気腫発症の関連が証明できた。
- 3) COPD有病率は657例中7例, 1.07%と低く, 呼吸機能検査のみでの早期COPDのスクリーニングは困難と思われた。肺気腫がCOPDに進展するの今後検討が必要であるが, 禁煙によるCOPD進展への動機付けに有用であろう。
- 4) 喫煙歴, 肺気腫重症度に応じて呼吸機能検査では一秒率, 呼気最大中間流量で有意差があり, 末梢気道閉塞を示唆する指標が肺気腫重症度と相関し, 早期COPDを検出可能な指標として今後有用と考えられた。

以上より, 肺癌検診目的の胸部低線量CTに1スライスHRCTを上肺野に加えることで, 今後増加すると予測される早期COPDの原因のひとつである肺気腫を検出することが可能となった。また, ドッグ受診者には肺気腫画像を示すことによって, 視覚的にCOPDのリスクを訴え, 禁煙によるCOPD発症予防に寄与すると思われる。

これらの結果は臨床的に新知見であり, COPDおよび肺気腫の診療において有用と判断され, 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。

Endogenous α -calcitonin gene-related peptide mitigates liver fibrosis in chronic hepatitis induced by repeated administration of concanavalin A (内因性 α カルシトニン遺伝子関連ペプチドはコンカナバリンA連続投与による慢性肝炎における肝線維化を緩和する)

神 吉 昭 子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 α カルシトニン遺伝子関連ペプチド(α CGRP)は, カルシトニン遺伝子の alternative splicing によって作られる37個のアミノ酸からなるペプチドであり, 神経系や血管などに広く分布し, 血管拡張作用やカプサイシン感受性神経の神経伝達物質としての役割など, 多彩な生理作用を有するペプチドである。カプサイシン感受性神経が肝保護作用に関与すること, α CGRPが炎症性サイトカインの分泌に関与することなどが報告されているが, 肝臓における α CGRPの病態生理学的意義は明らかになっていない。我々は, カルシトニン- α CGRP 遺伝子配列のうち, α CGRP 特異的なエクソン5のみを欠損させることで, カルシトニンは正常に発現し, α CGRPのみ特異的に欠損するノックアウトマウスを樹立している。これまでに, α CGRP ノックアウト (α CGRP^{-/-}) マウスを用いた急性肝炎モデルの実験により, 内因性 α CGRPが, 抗アポトーシス作用や炎症反応の制御により肝保護作用を示すことを明らかにした。そこで, 慢性肝障害における内因性 α CGRPの肝保護作用のメカニズムを解明するため, コンカナバリンA (Con A) 連続投与による慢性肝障害モデルを作製し, α CGRPが肝疾患の新たな治療に有用な物質であるか検討した。

【方法】16週齢の雄 α CGRP^{-/-}マウスとその野生型マウスを用いた。Con Aを20 μ g/g-体重で週1回(計8回)尾静注し, 慢性肝障害モデルを作製した。Con A投与24時間後に採血して血清トランスアミナーゼを測定し, Con A投与1週間後に肝臓のサンプリングを行った。肝臓の線維化はマッソントリクローム染色, 肝星細胞の活性化を α -SMA免疫染色, アポトーシスをTUNEL染色により評価した。リアルタイムPCRにより, 肝臓での遺伝子発現を定量した。細胞実験は, 初代培養肝星細胞をtwo-step collagenase perfusion法により分離して用い, 細胞増殖をBrdU

assay で評価した。

【結果】肝障害の指標であるトランスアミナーゼは、野生型でCon A投与1, 2週目で上昇するが、3~8週目では上昇が見られなかった。それに対して α CGRP $^{-/-}$ マウスでは、1週目で野生型より高値であり、特に4週目で野生型では見られなかった有意な上昇が見られた。肝障害の経時変化を病理染色により観察したところ、 α CGRP $^{-/-}$ マウスでは、肝臓への炎症細胞浸潤と α -SMA陽性の活性化肝星細胞が、2週目で野生型より増加し、肝線維化は早期に生じ、悪化した。また、 α CGRP $^{-/-}$ マウスで、4週目において非実質細胞のアポトーシスの有意な増加が見られた。遺伝子発現を比較すると、 α CGRP $^{-/-}$ マウスでは、Con A投与1週目で炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α)、4, 8週目で線維化関連遺伝子 (TGF- β 1, collagen α 1, TIMP-1, MMP-2) や炎症性の接着分子 ICAM-1の発現が、野生型より高かった。Con A投与2週目のマウスより分離した初代培養肝星細胞は、 α CGRP $^{-/-}$ マウスで肝星細胞の活性化を示す ICAM-1の発現が上昇していた。また、CGRPの受容体である CRLR と RAMP1の発現を肝星細胞において確認した。ヒト活性化肝星細胞株 LI90は、外因性 α CGRP添加により細胞増殖が抑制された。

【考察】内因性 α CGRPは、炎症反応、肝星細胞の活性化と増殖、肝臓の線維化、非実質細胞のアポトーシスなど多様な反応を制御し、抑制することにより、慢性肝障害における肝線維化を緩和すると考えられた。 α CGRPは慢性肝障害の治療に有用な物質である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

α カルシトニン遺伝子関連ペプチド (α CGRP) は、多彩な生理活性を有するペプチドであり、肝臓においても CGRP 受容体の発現が認められているが、肝臓における α CGRP の病態生理学的意義は明らかでない。これまでに、 α CGRPノックアウト (α CGRP $^{-/-}$) マウスを用いたコンカナバリンA (Con A) 誘導急性肝炎モデルの実験より、内因性 α CGRPが、抗アポトーシス作用や炎症反応の制御により肝保護作用を示すことを明らかにしている。そこで、急性肝炎に加えて慢性肝障害における内因性 α CGRPの肝保護作用のメカニズムを解明するため、Con Aの連続投与による慢性肝障害モデルを作製し、 α CGRPが肝疾患の新たな治療に有用な物質であるか検討した。

その結果、神吉は以下の成績を得た。

- 1) 肝障害の指標である血清トランスアミナーゼは、Con A投与1週目で α CGRP $^{-/-}$ マウスで野生型より高値であり、4週目で野生型では見られなかった有意な上昇が見られた。
- 2) α CGRP $^{-/-}$ マウスでは、肝臓への炎症細胞浸潤と肝星細胞の活性化が、野生型より早期に生じた。肝臓の線維化も、野生型より悪化していた。
- 3) α CGRP $^{-/-}$ マウスで、Con A投与4週目で非実質細胞のアポトーシスの有意な増加が見られた。
- 4) Con A投与1週目で炎症性サイトカイン (IL-6とTNF- α)、4, 8週目で線維化関連遺伝子 (TGF- β 1, collagen α 1, TIMP-1, MMP-2) と接着分子 ICAM-1の発現が、 α CGRP $^{-/-}$ マウスにおいて、野生型より上昇していた。
- 5) Con A投与2週目のマウスより分離した初代培養肝星細胞は、肝星細胞の活性化を示す ICAM-1の発現が α CGRP $^{-/-}$ マウスで上昇していた。また、初代培養肝星細胞でCGRPの受容体であるCRLRとRAMP1の発現を確認した。
- 6) ヒト活性化肝星細胞株LI90は、外因性 α CGRP添加により細胞増殖が抑制された。LI90においても、CGRPの受容体であるCRLRとRAMP1の発現を確認した。

これらの結果より、 α CGRPは急性および慢性肝障害ともに、肝臓構成細胞(肝細胞、類洞内皮細胞、肝星細胞)それぞれに作用し、かつ炎症反応を制御することで、肝障害を抑制することを明らかとした。 α CGRPは肝障害の治療に有望な物質である可能性が示唆された。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。

Extensor Tendon Rupture Associated with Osteoarthritis of the Distal Radioulnar Joint (遠位橈尺関節症を伴った伸筋腱皮下断裂)

山 崎 宏

(論文の内容の要旨)

【緒言】遠位橈尺関節症では伸筋腱皮下断裂を発症することがある。本症の画像所見の報告として尺骨の遠位への突出、尺骨頭の背側脱臼、橈骨遠位の骨棘、関節造影での関節包断裂などがある。しかし伸筋腱皮下断裂を伴った遠位橈尺関節症の手関節のX線写真を定量的に評価した論文はない。41例のX線写真を調査し、

遠位橈尺関節症における伸筋腱皮下断裂の画像上の危険因子を明らかにした。

【対象】患者は1987～2005年に治療した伸筋腱皮下断裂を伴った遠位橈尺関節症の37例41手であった。これらの患者の手関節 X 線写真（正面像）を対象とした。

【方法】（関節症の程度）X 線写真での関節裂隙の狭小化，軟骨下骨の硬化，骨棘，小骨などを参考にnone (0), doubtful (1), minimal (2), moderate (3), severe (4)の5段階に分類した。

（手関節正面像での計測）X 線写真での各計測値を第3中手骨長で割って%で示した。計測は最小単位を1 mmとした。

（比較）伸筋腱断裂側のX 線写真を断裂群，反対側のX 線写真を非断裂群として，関節症の程度および計測値を比較した。

【統計学的手法】両群間の関節症の程度についてはchi-squared test を，計測値についてはMann-Whitney U test を用いた。

【結果】（関節症の程度）断裂群では1例以外全てにmoderate (3)以上の関節症を認めた。非断裂群に比べて，有意に関節症の程度は高かった。

（手関節正面像での計測）断裂群での画像上の特徴は広く深く背側傾斜した尺骨切痕，尺骨の橈側偏位であった。手根骨長の減少や手根骨の尺側偏位はなかった。尺骨頭の形状を表す値には有意差がなかった。

【考察】伸筋腱皮下断裂の危険因子は(1)関節症の程度の増悪，(2)広く深く背側傾斜した尺骨切痕，(3)尺骨の橈側偏位であった。このような変化は，遠位橈尺関節を構成する，尺骨頭の関節面と尺骨切痕の関節面背側が摩耗するからであると思われる。

関節リウマチにおける伸筋腱皮下断裂の危険因子に，広く深い尺骨切痕（Scallop sign）が知られている。本症においても Scallop sign が危険因子であった。断裂側の手関節に有意に関節症性変化が強いことから，Scallop sign は関節症性変化の程度を反映していると思われる。

断裂群では手根骨の配列異常はなかった。遠位橈尺関節症は他の手根関節の変形を伴わず独立して進行すると思われる。

この研究の限界として，側面像での尺骨頭脱臼の評価を行ってないことがある。我々の症例の約半数しか正確な側面像が撮影されておらず，後ろ向き研究の限界であった。

（論文審査の結果の要旨）

伸筋腱皮下断裂を伴った遠位橈尺関節症の手関節の X 線写真を，定量的に評価した論文はない。そこで著者は41例の X 線写真を調査した。関節症の程度の評価した。手関節正面像での計測を行い，画像上の特徴を定量的に評価した。反対側の手関節 X 線写真（非断裂群）と比較することで，腱断裂の危険因子を明らかにした。

その結果以下の結果を得た。

- 1) 関節症の程度は，断裂群で有意に高かった。
- 2) 断裂した腱の数と関節症の程度に相関はなかった。
- 3) 他の関節では，関節症の程度に有意差はなかった。
- 4) 手関節正面像での計測では，carpal-ulnar distance, radio-ulnar separation, minimum radius width が有意に小さく，anterior to posterior margin distance of the sigmoid notch, sigmoid notch width が有意に大きかった。

以上より，1) 関節症が重度だと腱断裂の危険が増すこと，2) 画像上の特徴は，広く深く背側傾斜した尺骨切痕と，尺骨の橈側偏位であること，が証明された。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。

Anatomical and histopathological correlates of the dermoscopic patterns seen in melanocytic nevi on the sole: A retrospective study (足底色素細胞母斑におけるダーモスコピー所見とその解剖学的・病理組織学的成因についての後向き研究)

宮 寄 敦

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】光の乱反射を防止したうえで，皮膚病変を拡大して観察するダーモスコピー dermoscopy (以下 DMS と略記) は皮膚科領域に近年，導入された非侵襲的な新たな診断法であり，とくに色素性皮膚病変の診断確定における有用性が明らかにされている。日本人における悪性黒色腫の好発部位は掌蹠であり，その中でも足底が好発部位であって，全悪性黒色腫の30%程度がここに生じる。しかし，掌蹠には良性病変の色素細胞母斑も頻繁にみられ，悪性黒色腫の早期病変との鑑別でしばしば問題を生じる。信州大学皮膚科の研究グループは掌蹠の悪性黒色腫と色素細胞母斑が，それぞれ特徴的なDMS所見を呈し，両者の

鑑別にきわめて有用なことを見出した。掌蹠では皮野（皮溝、皮丘）が平行線状に走行するが、悪性黒色腫は早期病変の段階から、この皮丘部に一致する帯状の色素沈着を呈することを明らかにし、この所見を parallel ridge pattern (PRP) と名付けた。これに対し、掌蹠の母斑の基本的なDMS所見は、皮溝に一致する平行線状の色素沈着であることを見出し、parallel furrow pattern (PFP) と名付けた。さらに、病理組織学的検索により、PRP と PFP が表皮内におけるメラノサイト（母斑細胞）の増殖部位の違いを反映することも見出した。掌蹠の母斑はDMSにてPFP以外に、格子状の色素沈着を呈する lattice-like pattern (LLP)、あるいは皮溝・皮丘を斜めに横切る方向に微細な線状色素沈着を呈する fibrillar pattern (FP) もかなり高率に呈するが、これらのDMSパターン of 成因は不明であった。今回の研究目的は、これらのDMSパターンの成因を解明することである。

【方法】 1) 1995年から2001年までに信州大学皮膚科を受診した上述の定型的なDMSパターンを呈した足底の色素細胞母斑298病巣 (FP131例, PFP103例, LLP64例) についてその発生部位をプロットし、解剖学的分布を検討した。2) 各DMSパターンを呈する色素細胞母斑35病巣 (FP18例, PFP14例, LLP3例) について切除生検を施行し、皮溝・皮丘に垂直方向に切り出して作製した病理組織標本にて病理組織学的検討を加えた。

【結果と考察】 LLP を呈する母斑の大多数は土踏まず部に存在し、残りは足底の辺縁部に存在することが明らかにされた。これらの部位では皮野が格子状を呈するので、LLPはこの皮溝部に一致する色素沈着として理解することができる。他方、PFPとFPを呈する母斑のほとんどは、皮野が平行線状を呈する部位に存在していたが、両者の分布には差異がみられた。すなわち、FPを呈する母斑の大多数（131病巣中94病巣）は足底のうちで体重負荷を直に受ける部分に存在するのに対し、PFPを呈する母斑の多くは（103病巣中63病巣）体重負荷が比較的にかからない部位に位置することが明らかにされた。これら各DMSパターンを呈する母斑の足底における存在部位には有意差が認められた。また、各DMSパターンを呈する色素細胞母斑35病巣の病理組織学的検討にて、PFPを呈する母斑14病巣中14病巣、LLPを呈する母斑3病巣中2病巣、FPを呈する母斑18病巣中15病巣において、母斑細胞の胞巣が主として皮溝下部に位置する表皮突起部

に認められた。すなわちDMSパターンの如何を問わず、表皮内における母斑細胞の存在部位は皮溝下部の表皮突起部である点で同一であることが示された。興味深いことに、皮野に垂直方向に切り出した組織標本において、FPを呈した全ての母斑病巣で角層が斜め方向へのズレを示す所見が見出された。この角層のズレはPFPやLLPを呈する母斑ではほとんど認められなかった。この角層のズレは主として体重負荷によって生じるものと考えられ、このズレによってFPの所見が説明できることを明らかにした。以上、本研究によって足底の色素細胞母斑の主要なDMS所見の成因は病変の存在部位の解剖学的特徴と2次的な角層のズレによって説明できることが明らかにされた。

(論文審査の結果の要旨)

ダーモスコピー (dermoscopy: 以下DMSと略) とは、光の乱反射を防止したうえで、皮膚病変を拡大して観察する非侵襲的な診断法であり、色素性病変の診断決定、鑑別に有用であり、とくに掌蹠の色素細胞母斑と悪性黒色腫の鑑別にはとくに有用なことが明らかにされている。掌蹠の色素細胞母斑の基本的なDMS所見は、皮溝に一致する平行線状の色素沈着であり、parallel furrow pattern (PFP) と呼ばれる。この他に、格子状の色素沈着を呈する lattice-like pattern (LLP)、あるいは皮溝・皮丘を斜めに横切る方向に微細な線状色素沈着である fibrillar pattern (FP) も認められる。宮嵜らは、これらのDMSパターンの成因を解剖学的・病理組織学的に解明することを目的に(1)FP, PFP, LLPの3パターンを呈する色素細胞母斑の解剖学的分布を検討するとともに、(2)各DMSパターンの色素細胞母斑を病理組織学的に検討した。

その結果以下の成績を得た。

- 1) 足底の母斑298病巣の解剖学的分布を検討したところ、PFPとFPを呈する母斑のほとんどは、皮野が平行線状に走行する部位に存在していた。一方、LLPを呈する母斑の大多数は土踏まず部に存在し、残りは足底の辺縁部にみられた。
- 2) FPを呈する母斑の大多数（131病巣中94病巣）は足底のうちで体重負荷を直に受ける部分に存在するのに対し、PFPを呈する母斑の多くは（103病巣中63病巣）体重負荷のかからない部位に位置していた。
- 3) 各DMSパターンを呈する色素細胞母斑35病巣の病理組織学的検討では、PFPを呈する母斑14病巣中14病巣、LLPを呈する母斑3病巣中2病巣、FP

を呈する母斑18病巣中15病巣において、母斑細胞の胞巣が主として皮溝下部に位置する表皮突起部に存在することが明らかにされた。

- 4) 皮野の方向に垂直に切り出した組織標本において、FPを呈した全ての母斑病巣で角層が斜め方向へのズレを示す所見が見出された。

以上より DMS パターンの如何を問わず、病理組織学的に表皮内における母斑細胞の存在部位は皮溝下部の表皮突起という点で同一であることが示された。FPでは病理組織学的に角層のズレが認められ、これは PFP や LLP を呈する母斑では認められなかった。この角層のズレは主として体重負荷によって生じるものと考えられ、このズレによって FP の所見が説明できることを明らかにした。LLP を呈する母斑は皮野が格子状を呈する部分に多く、その皮溝部に一致する色素沈着として理解することができる。以上、足底の色素細胞母斑の主要な DMS 所見の成因は病変の存在部位の解剖学的特徴と2次的な角層のズレによって説明できることが示された。本研究は以上のような新知見を明らかにしたものであり、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。

Downregulated melanogenic paracrine cytokine linkages in hypopigmented palmpo-plantar skin (メラニン化にかかわるサイトカインのパラクライン機構の抑制が掌蹠皮膚の低色素状態に関与する)

長谷川 淳 一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】人間の掌蹠(手掌と足底)の皮膚が他の部位と比べて低色素であるのは上皮間葉系相互作用によるもので、真皮線維芽細胞由来の、Wnt シグナル経路を抑制する dickkopf1 の作用による、という研究論文が近年、発表された。一方で最近、表皮ケラチノサイトなどがメラニン生成に関与するサイトカインを産生し、これが皮膚色の決定に重要な役割をしていることが報告されている。そこで、我々は dickkopf1 による表皮メラノサイトのメラニン産生機能の抑制作用に加えて、ケラチノサイトもしくは線維芽細胞由来のメラニン生成にかかわるサイトカインとそれらの受容体の発現状態が掌蹠メラノサイトの機能低下に関わっている可能性を考え、これらの各種因子とその受容体の in vivo における発現状態を real time PCR 法、

Western blotting 法、免疫染色法などによって検討した。

【方法と結果】掌蹠部と非掌蹠部の皮膚病変の手術・生検による摘出材料周囲の正常皮膚を用いて実験を行った。最初に表皮剥離dopa (dihydroxyphenylalanine) 法と電子顕微鏡を用いて、掌蹠部と非掌蹠部のメラノサイトの数と形態について観察した。表皮剥離dopa染色像では、メラノサイトの密度は非掌蹠部に比べて掌蹠部表皮ではわずかに低下していた。電子顕微鏡による観察では、非掌蹠部皮膚に比べて掌蹠部皮膚のメラノサイトの細胞質にはメラニン化した成熟メラノソームはほとんど認められないが、in vitroでdopa反応処理を加えるとdopa陽性の未成熟なメラノソームが検出できた。このことは掌蹠のメラノサイトはチロシナーゼ活性を有しているものの、in vivoでは何らかの理由でメラノソームのメラニン化が阻止されていることを示唆する。以上のことから、掌蹠部皮膚が低色素である理由はメラノサイトの細胞密度の差異ではなく、個々のメラノサイト内でのメラニン化したメラノソームの産生減少によるものと考えられた。掌蹠部表皮のメラノサイトの機能が低下しているかを調べるためにメラニン色素生成の鍵酵素である tyrosinase の免疫染色法を行ったところ、tyrosinase 陽性のメラノサイトの数は、非掌蹠部に比べて掌蹠部表皮では明らかに減少していた。さらにメラニン生成の調節に中心的な働きをしている、ケラチノサイトもしくは線維芽細胞由来のサイトカインとその受容体である ET-1/ETBR linkage および SCF/c-KIT linkage について、掌蹠部と非掌蹠部皮膚における発現量を real time RT-PCR 法、Western blotting 法および免疫染色法を用いて比較検討した。ET-1 の発現は免疫染色法と real time RT-PCR 法では、掌蹠部皮膚(表皮と真皮)は非掌蹠部皮膚に比べて明らかに低下していた。ETBR の発現は real time RT-PCR 法では ET-1 の結果と同様に掌蹠部で発現が低下しており、免疫染色法における ETBR 陽性メラノサイトの数は非掌蹠部に比べて掌蹠部で有意に減少していた。掌蹠部皮膚(表皮と真皮)での SCF の発現は免疫染色法、real time RT-PCR 法、Western blotting 法のいずれにおいても非掌蹠部皮膚に比べて低下していた。c-KIT の発現については免疫染色法において、掌蹠部表皮での c-KIT 陽性のメラノサイトの数は非掌蹠部表皮に比べて減少しており、Western blotting 法においても掌蹠部表皮が有意に低下していた。最後にメラニン活性

化転写因子である MITF と SOX10 についても同様に、掌蹠部と非掌蹠部皮膚において発現量の比較検討を行った。免疫染色法では MITF と SOX10 が陽性のメラノサイトの数は掌蹠部表皮では非掌蹠部表皮に比べて明らかに減少していた。MITF については real time RT-PCR 法と Western blotting 法のいずれにおいても掌蹠部表皮は非掌蹠部に比べて発現が低下していた。【考察】本研究により、掌蹠部皮膚が低色素である理由は、メラノサイトの細胞密度の差異ではなく、個々のメラノサイトのメラニン化したメラノソームの産生減少によるものであると明らかにされた。我々の *in vivo* の研究ではメラニン生成サイトカインである ET-1 と SCF、およびそれらの受容体である ETBR と c-KIT、ならびにメラニン転写因子である SOX10 と MITF が掌蹠部皮膚では明らかに低下していた。これらの結果から、メラニン生成サイトカインとその受容体のダウンレギュレーションが MITF の転写活性を抑え、メラノソームの matrix protein である Pmel17 silver protein の欠乏を生じ、掌蹠部メラノサイトにおけるメラノソームのメラニン化が阻止されているものと考えられた。

以上、掌蹠部表皮のメラノサイトの機能低下のメカニズムとしては、dickkopf1 による Wnt シグナル経路の抑制に加えて、掌蹠部皮膚の ET-1/ETBR linkage および SCF/c-KIT linkage の発現低下も深く関与していることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

周知のように、人間の掌蹠(手掌と足底)は、メラニン量が非掌蹠部皮膚と比べて極端に低下し、色素形成をほとんど欠落している。この理由として掌蹠真皮線維芽細胞由来の、Wnt シグナルアンタゴニストである dickkopf1 が表皮メラノサイトのメラニン産生機能を抑制することが最近、明らかにされた。一方でケラチノサイトなどが産生するサイトカイン類が皮膚の色を決定するうえで重要な役割を果たしているとの報告もある。長谷川らはケラチノサイトもしくは線維芽細胞由来でメラニン生成に中心的な役割を持つとされるサイトカインとそれらの受容体、および関連した転写因子の発現状態が掌蹠のメラノサイトの機能低下に関わっている可能性を考えた。そこで、これら各種因子の *in vivo* における発現状態の比較を掌蹠部と非掌蹠部皮膚の生検組織を材料にして検討した。

その結果、長谷川は次の結果を得た。

1) メラノサイトの密度を表皮剝離 dopa 法で調べる

と掌蹠部では非掌蹠部比べて低下していたが、その差異は後者が1.3倍という僅差であった。

2) 電子顕微鏡にてメラノサイトの形態を観察すると、非掌蹠部皮膚に比べて掌蹠部皮膚のメラノサイトの細胞質にはメラニン化した成熟メラノソームはほとんど認められないが、*in vitro* で dopa 反応処理を加えると dopa 陽性の未成熟なメラノソームが検出できた。

3) 免疫染色法にて tyrosinase, S-100 α , c-KIT, endothelin B receptor (ETBR), SOX10, microphthalmia-associated transcription factor (MITF) について比較したところ、これらの染色が陽性のメラノサイトの数は、掌蹠部表皮では非掌蹠部表皮に比べて明らかに減少していた

4) ET-1/ETBR linkage について検討したところ、免疫染色法では掌蹠部皮膚での ET-1 の発現は非掌蹠部皮膚に比べて明らかに低下しており、ET-1 と ETBR の real time RT-PCR 法の結果も同様であった。

5) SCF/c-KIT linkage では、掌蹠部皮膚での SCF 発現は免疫染色法、real time RT-PCR 法、Western blotting 法のいずれにおいても非掌蹠部皮膚に比べて低下していた。c-KIT の Western blotting 法でも掌蹠部皮膚で発現が低下していた。

6) MITF について検討したところ、real time RT-PCR 法と Western blotting 法のいずれにおいても掌蹠部では非掌蹠部に比べて発現が低下していた。

掌蹠部皮膚ではメラニン産生に重要な ET-1/ETBR linkage と SCF/c-KIT linkages の発現が顕著に低下しており、メラノサイトのマスター遺伝子である MITF の転写活性も低下していることが明らかにされた。以上の結果から、掌蹠部皮膚が低色素である理由は、メラノサイトの細胞密度の差異ではなく、個々のメラノサイトでのメラニン化したメラノソームの減少によるものであり、そのことにサイトカインのパラクライン機構の抑制が深く関与していることが示唆された。

本研究は他部位とは異なった掌蹠部皮膚の生物学的特徴を明らかにしたもので、今後の美白剤開発への応用や、有色人種で掌蹠部にメラノーマが好発する機序の解明において、新たな研究展開の契機となりうるものであり、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。

Effects of high-frequency oscillatory ventilation on oleic acid-induced lung injury in sheep (綿羊における、オレイン酸による肺障害に対する高頻度換気の効果)

中 川 力 丸

(論文の内容の要旨)

背景；急性肺損傷や急性呼吸窮迫症候群の患者に対する治療では、呼吸管理が重要である。しかし、傷害肺に対する一回換気量の増加や気道内圧の上昇は、人工呼吸による二次的肺損傷を引き起こす。そこで、この肺損傷を抑えるための換気方法として、高頻度換気法 (High frequency oscillation ventilation HFOV) が挙げられるが、その評価は定まっていない。そこで今回我々は綿羊を用い、麻酔下で、オレイン酸により惹起された急性肺損傷に対して HFOV の効果を、肺血管外水分量を反映する肺リンパ流量に注目し検討した。**方法および実験**；綿羊 (体重35-44 kg) をハロタン麻酔下で70%酸素吸入下に人工呼吸器管理し、右開胸下に肺リンパ瘻を作成した。右内頸動・静脈からそれぞれカテーテルとスワン・ガンツカテーテルを挿入した。綿羊を仰臥位に固定し、conventional mechanical ventilation (CMV) (一回換気量10 ml/kg, 呼吸回数20/min, 呼気終末陽圧 (PEEP) 6 cmH₂O) 維持下にて安定した baseline を30分以上観察した後、オレイン酸0.08 ml/kg を内頸静脈より投与した。実験は、以下の2群を行い比較した。CMV 群 (n=6) ではオレイン酸投与後同じ呼吸条件のまま4時間観察した。HFOV 群 (n=7) ではオレイン酸投与後30分同じ条件のCMV維持後、HFOV (平均気道内圧15 cmH₂O, SV150 ml, 頻度15 Hz) に切り替え3.5時間観察した。測定項目は、30分毎に体血圧、肺動脈圧、肺動脈閉塞圧、心拍出量、動脈血酸素分圧/吸入酸素濃度 (P/F ratio), 肺リンパ流量を測定し、終了後に右肺にて気管支肺胞洗浄を行い、さらに左下葉より肺組織を摘出し肺湿乾重量比 (wet and dry ratio; W/D ratio) を計測した。また、1時間毎に採取した血漿と肺リンパ液の蛋白濃度を測定し、肺リンパ液中蛋白濃度/血漿蛋白濃度 (L/P ratio) および肺リンパ蛋白クリアランス (Clym; L/P x 肺リンパ流量) を計測した。

結果；両群ともにオレイン酸投与後、酸投与前に比べ、体血圧、心拍出量の有意な低下および肺動脈圧の有意

な上昇が認められたが、両群間で有意差は認められなかった。しかし、肺動脈閉塞圧はHFOVに切り替えた後HFOV群で有意に上昇した (P<0.05)。リンパ流量はオレイン酸投与後より両群共に有意に上昇し、その後 HFOV 群で低下傾向にあったが、両群間で有意差は認められなかった。しかし、4時間目の HFOV 群の Clym は、CMV 群に比べ有意に低値であった (P<0.05)。P/F ratio は、オレイン酸投与後両群とも投与前に比べ有意に低下した (P<0.01)。しかし、CMV 群に比べ HFOV 群では有意にその低下が小さく (P<0.01)、酸素化能の改善が認められた。W/D ratio および気管支肺胞洗浄中の細胞数は、CMV 群に比べ HFOV 群で有意に低値であった (P<0.01)。**結語**；以上より、綿羊のオレイン酸による肺損傷に対し、HFOV を用いた呼吸管理法は CMV に比べ、肺血管外水分の低下をきたし、酸素化能を改善するため、急性肺損傷や急性呼吸窮迫症候群に有用な換気方法であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

急性肺損傷や急性呼吸窮迫症候群の治療では、人工呼吸管理が不可欠である。しかし、傷害肺に対して、人工呼吸による一回換気量の増加や気道内圧の上昇は、二次性の肺損傷を引き起こすとされる。中川らは、急性肺傷害時の呼吸管理として高頻度換気法 (HFOV) は、二次性の肺損傷を予防するという仮説をもとに、麻酔下綿羊を用いて、オレイン酸によって惹起される肺損傷、肺水腫に対し HFOV の効果について検討した。

ハロタン麻酔下綿羊を70%酸素吸入下に人工呼吸器管理し肺リンパ瘻を作製し、各種循環諸量を測定のための措置を行った。Base line を測定後オレイン酸を投与し、conventional mechanical ventilation (以下 CMV) (一回換気量10 ml/kg, 呼吸回数20/min, 呼気終末陽圧 (PEEP) 6 cmH₂O) で維持する CMV 群 (n=6) と、HFOV (平均気道内圧15 cmH₂O, SV150 ml, 頻度15 Hz) で維持する HFOV 群 (n=7) に分け3.5時間観察を行った。30分毎に体血圧、肺動脈圧、肺動脈閉塞圧、心拍出量、動脈血酸素分圧/吸入酸素濃度 (P/F ratio), 肺リンパ流量を測定し、終了後に右肺にて気管支肺胞洗浄を行い、さらに左下葉より肺組織を摘出し肺湿乾重量比 (wet and dry ratio; W/D ratio) を計測し検討した。また、1時間毎に採取した血漿と肺リンパ液の蛋白濃度を測定し、肺リンパ液中蛋白濃度/血漿蛋白濃度 (L/P ratio) お

よび肺リンパ蛋白クリアランス (Clym; L/P x 肺リンパ流量) を計測した。肺動脈閉塞圧は HFOV に切り替えた後 HFOV 群で有意に上昇した。P/F ratio の低下は HFOV 群で有意に少なく、PaCO₂ は HFOV 群で有意に低下した。リンパ流量は HFOV 群で低下傾向にあったが、有意差は認められなかった。4 時間目の HFOV 群の Clym は、CMV 群に比べ有意に低値であった。W/D ratio および気管支肺胞洗浄中の細胞数は、CMV 群に比べ HFOV 群で有意に低値であった。

以上の結果から、HFOV は麻酔下緬羊のオレイン酸により惹起された急性肺損傷、肺水腫の人工呼吸器管理に対し、酸素化能の改善、および血管透過性亢進を抑制し、人工呼吸による二次性の肺損傷を軽減させることが示唆された。

本論文は、HFOV はオレイン酸によって惹起された急性肺損傷、肺水腫の人工呼吸器管理に有効であることを示し、人工呼吸器関連の肺損傷に対して有利に働くことを示唆したものであり、学位論文として十分価値のあることを主査・副査は一致して認めた。

The effects of a neutrophil elastase inhibitor on the postoperative respiratory failure of acute aortic dissection (急性大動脈解離の術後呼吸不全に対する好中球エラスターゼ阻害剤の効果について)

古澤 武彦

(論文の内容の要旨)

【目的】急性大動脈解離 (acute aortic dissection: AAD) は、緊急手術が必要な疾患で、近年手術成績が向上しつつあるが、術後しばしば重篤な呼吸不全を合併し手術成績に影響を及ぼすことが報告されている。

本研究では、シベレスタットナトリウム水和物 (シベレスタット) が好中球エラスターゼの選択的阻害剤であることから、AAD 術後におけるシベレスタット投与の呼吸不全に対する治療効果について臨床的に検討した。

【方法】2000年1月から2005年4月までの期間、信州大学医学部附属病院心臓血管外科でAADに対する手術を受けた30症例をレトロスペクティブに検討した。17症例 (58.7%) が男性で、13症例 (41.3%) が女性であった。術後30病日の死亡率は4例 (13.3%) であった。これらの症例で術後最初に計測されたPaO₂/

FiO₂が300 mmHg 以下の20症例を本研究の対象とした。症例を以下の2群に分けて比較検討した。I群 (男性5例 (55.6%), 女性4例 (44.4%)) : 術後にシベレスタットの持続的静脈内投与 (0.2 mg/kg/hr) を受けた症例。II群 (男性9例 (77.8%), 女性2例 (22.2%)) : 術後シベレスタットの投与を受けなかった症例。

術後の呼吸管理と肺機能の評価: ICU入室後すぐにFiO₂ 1.0で人工呼吸器による換気が開始され、PO₂レベルが70 mmHgを超えるように調整した。肺動脈血酸素分圧較差 (Alveolar-arterial oxygen difference: A-aDO₂), 呼吸指数 (Respiratory index: RI) を評価の指標とした。統計解析にはunpaired t-testとANOVAを用い、P<0.05を有意とした。

【結果】患者の背景因子には統計的有意差はなかった。手術成績は、I群で死亡例はなく、II群で1例が第12病日に近位下行大動脈の残存解離腔の破裂により死亡した。人工呼吸器時間とICU滞在時間には有意差は認められなかった。

ICU入室時の血液ガス分析で、PaO₂/FiO₂, A-aDO₂, RIには2群間で有意差はなかった。第3病日までの比較ではPaO₂/FiO₂においてI群の方がII群よりも改善傾向を認めたが、有意差は認められなかった。A-aDO₂の比較でも有意差を認めなかった。RIはI群で減少傾向を認めたが有意差は認められなかった。しかし、RIの改善率が、I群で有意に良好であった (61.6±44.2% vs. 111.9±40.9%; 11.86%, P=0.02)。

【考察】AADは、それ自体が重篤な疾患であることに加えて、手術時に長時間の人工心肺 (Cardiopulmonary bypass: CPB) を必要とするため、人工呼吸器によるサポートやICU滞在期間が長期間となる。CPBによって補体や好中球の活性化を引き起こすと報告されており、好中球エラスターゼは結合組織に対する加水分解能が高く、組織障害性が高いものの一つといわれている。シベレスタットは好中球エラスターゼの選択的阻害剤であり、その投与によって肺胞上皮細胞の障害が減少されることが期待される。

本研究では、シベレスタット投与によってPaO₂/FiO₂, A-aDO₂, RIの有意な改善は認められなかったものの、RIの改善率が有意に良好であり、好中球エラスターゼを阻害することによって、AAD患者の術後呼吸不全を減少させることが可能であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

急性大動脈解離 (type A) に対する外科治療は、人工心肺や周術期管理の改善を含む治療手段の向上により死亡率や術後の合併症は改善しているが、術後しばしば経験される呼吸不全は、未だ改善の余地が残されている重要な課題である。術中あるいは手術後の肺循環において活性化された好中球が血管内皮を障害し、毛細血管の透過性を亢進させ、この過程で好中球エラストラーゼが組織障害を引き起こすのに重要な役割を担っていることが明らかにされている。さらに血中エラストラーゼのピークレベルが、呼吸係数の増加や肺内シャントを伴う術後呼吸不全と関係があることが報告されている。シベレスタットナトリウム水和物 (シベレスタット) は好中球エラストラーゼの選択的阻害剤であり、急性呼吸促進症候群を実験的にも臨床的にも改善することが報告されている。

そこで本研究では、急性大動脈解離の術後にシベレスタットを投与した群としなかった群との比較をすることにより、術後呼吸不全に対する好中球エラストラーゼの選択的阻害剤の効果を臨床的に評価することを目的とした。

その結果、古澤は以下の結論を得た。

- 1) 第3病日までの比較では、P/F ratio においてはシベレスタット投与群において改善傾向を認めたが、統計学的有意差は認められなかった。
- 2) 第3病日までの比較では、A-a DO₂ においてはシベレスタット投与群において改善傾向を認めたが、統計学的有意差は認められなかった。
- 3) 第3病日までの比較では、Respiratory index (RI) においてはシベレスタット投与群において改善傾向を認めたが、統計学的有意差は認められなかった。
- 4) 第3病日において、RI の改善率がシベレスタット投与群において有意に良好となった。

以上の結果より、AAD 術後における呼吸不全に対し、シベレスタット投与の効果は好中球エラストラーゼの組織障害を抑制し、臨床的に有用であると考えられた。また、シベレスタットの投与量を増量することによって、より良好な効果が得られる可能性も課題とされた。

本研究は、AAD 術後におけるシベレスタットの投与が術後呼吸不全の改善に寄与する可能性を示したことにより、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値あるものと認めた。

Correlation between glial fibrillary acidic protein-positive astrocytes and age in the human hippocampus (ヒト海馬における GFAP 陽性アストロサイトと年齢との相関)

高橋 徹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】海馬は、脳の中で最も組織病理学的な研究が行われてきた部位の一つである。海馬の詳細な神経病理学的検索を行うことは、法医学、精神医学において有用な情報を得られる可能性がある。我々は海馬標本を観察する中で、CA4領域とhippocampal sulcus (HS) 領域で、GFAP 陽性グリア細胞が特異的に多く染色されることに気がついた。このため海馬における GFAP 陽性グリア細胞の定量的な評価を行い、年齢、死後経過時間、死因との関連性について解析した。

【方法】信州大学医学部法医学教室における剖検例の脳を用いて、海馬の免疫染色を行った (n=54)。免疫染色は glial fibrillary acidic protein (GFAP) 染色を施行した。検索方法は、光学顕微鏡により、CA4領域内における歯状回顆粒細胞層の近傍と、hippocampal sulcus (HS) を200倍で写真撮影し、染色されたグリア細胞数をカウントした。症例は54人 (男32人、女22人)、年齢は2カ月-87歳 (平均39.61±27.65歳)、死後経過時間 (推定死亡時刻から解剖までの時間) は8-72時間 (平均26.30±16.33時間)。グリア細胞数と、年齢、死後経過時間、死因との関連を調べた。

【結果】CA4領域の GFAP 陽性細胞数は平均74.84±39.24。HS領域のGFAP陽性細胞数は、平均28.35±21.51。2領域とも症例ごとのばらつきはあるが、年齢とともに細胞数が増加する傾向を認めた。細胞数と死後経過時間、死因との関連性は認めなかった。CA4領域のGFAP陽性細胞数と年齢との相関係数は0.439 (P<0.01) で、統計学的に有意な正の相関がみられた。HS領域のGFAP陽性細胞数と年齢との相関係数は0.479 (P<0.01) で、統計学的に有意な正の相関がみられた。またCA4領域の細胞数とHS領域の細胞数との相関係数は0.721 (P<0.01) で、両領域の細胞出現の傾向はほぼ一致していた。

【考察】海馬は、大脳辺縁系の一部に属し、その特徴的な形状、遅発性神経細胞死、長期増強現象、細胞新生といった興味深い所見が数多くみられ、活発に研究がなされてきた部位である。動物実験のみならず、ヒ

ト脳においても海馬研究は盛んであり、近年では精神科領域の画像研究において、外傷後ストレス障害 (PTSD) と海馬萎縮との関連性が注目されている。

法医学分野においても、剖検脳を用いた海馬の組織病理学的研究がなされ、脳虚血後の生存時間が短い症例において GFAP 陽性アストロサイトの膨化所見が認められること、また生存時間が長い症例ではアストロサイトの増生が著明にみられることなどが報告されてきた。ただし、これらの論文で、長時間の生存時間とされているのは、生存時間が18日と120日といった症例であり、高度なアストロサイトの増生が起こるには、虚血や低酸素状態が数日以上は続く必要があると考えられる。

我々の症例は、ほとんどが短時間で死亡した症例であり、本研究で観察した GFAP 陽性グリア細胞を、生存時間の長さによって増生した反応性の異常アストロサイトとして理解することは難しい。一方、動物実験では、歯状回顆粒細胞層とその内側に、生来、グリア細胞が生理的に存在し、このグリア細胞が胎生期から生後初期の時期の顆粒細胞層の発達に関与していると考えられている。そしてこのグリア細胞は、成体になっても消失せずに残存しつづける。我々は歯状回内側部を CA4 領域とみなして評価を行ったため、この CA4 領域の GFAP 陽性グリア細胞は、この領域に生理的に存在するグリア細胞である可能性がある。

本研究において GFAP 陽性グリア細胞数は、年齢に相関して増加する傾向を示し、また死因や死後経過時間との関連性を認めなかった。よってこの年齢とともに増加する GFAP 陽性グリア細胞は、元来、生理的に存在している CA4 領域のグリア細胞が、加齢にともなう慢性的な海馬の組織変化により、徐々に反応性の異常グリア細胞へと変化していったものではないかと考えられた。

Hippocampal sulcus (HS) は、海馬の stratum moleculare を分断する溝である。この領域に、なぜ特異的に GFAP 陽性グリア細胞が存在するのかわからないが、静脈の走行経路となっていることが関係しているかもしれない。

本研究の結果は、年齢推定法とするには個体差が大きく精度が低い。しかし一方で、死因や死後経過時間

とも明らかな関連を認めておらず、加齢による要因が大きく関与していると予想される。今後、他の年齢推定法との併用や、精度をあげる工夫をしていけば、海馬における GFAP 染色を年齢推定法として活用できる可能性があると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

ヒト脳海馬の詳細な神経病理学的検索を行うことは、法医学、精神医学において有用な情報を得られる可能性がある。高橋は海馬の CA4 領域と hippocampal sulcus (HS) 領域で、GFAP 陽性グリア細胞が特異的に多く染色されることに気がつき、法医剖検脳 (n=54) を対象に、この領域の GFAP 陽性グリア細胞数を調べ、年齢、死後経過時間、死因との関連性について解析した。

その結果、以下の成績を得た。

- 1) CA4 領域の GFAP 陽性細胞数は平均 74.84 ± 39.24 。(光学顕微鏡200倍率での一視野内の細胞数)。
- 2) HS 領域の GFAP 陽性細胞数は、平均 28.35 ± 21.51 。(光学顕微鏡200倍率での一視野内の細胞数)。
- 3) 2 領域とも症例ごとのばらつきはあるが、年齢とともに細胞数が増加する傾向を認めた。
- 4) 細胞数と死後経過時間との相関、死因との関連性は認めなかった。
- 5) CA4 領域の GFAP 陽性細胞数と年齢との相関係数は 0.439 ($P < 0.01$) で、統計学的に有意な正の相関がみられた。
- 6) HS 領域の GFAP 陽性細胞数と年齢との相関係数は 0.479 ($P < 0.01$) で、統計学的に有意な正の相関がみられた。
- 7) CA4 領域の細胞数と HS 領域の細胞数との相関係数は 0.721 ($P < 0.01$) で、両領域の細胞出現の傾向はほぼ一致していた。

以上より、ヒト海馬の CA4 領域と HS 領域の GFAP 陽性グリア細胞数は、年齢との相関を認め、死因や死後経過時間とは明らかな関連を認めず、加齢による要因が大きく関与していると予想された。海馬における GFAP 染色を年齢推定法として活用できる可能性があるものと考えられた。

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した。