

信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名 (所属教室)	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
中澤英之 (内科学(2))	乙第1184号	27. 8.26	Screening Tests Using Serum Tissue Transglutaminase IgA May Facilitate the Identification of Undiagnosed Celiac Disease among Japanese Population (血清抗組織トランスグルタミナーゼ IgA 抗体をスクリーニング検査に用いた日本におけるセリアック病の潜在患者同定の可能性)	田中榮司	中山 淳 宮川 眞一
張 野 (免疫・ 微生物学)	乙第1185号	27. 9. 9	Nox4-generated ROS regulate TGF- β 1-induced motility of colon cancer cells through the low molecular weight protein tyrosine phosphatase-Rho signaling pathway (LMW-PTP-Rho 経路を介して, Nox4に由来した ROS は TGF- β 1によって誘導される大腸ガン細胞の運動能を促進する)	竹下敏一	菅野祐幸 谷口俊一郎
滝澤佐季子 (組織発生学)	乙第1186号	27.11.11	A Novel Stepwise Differentiation of Functional Pancreatic Exocrine Cells from Embryonic Stem Cells (胚性幹細胞からの機能的な膵外分泌細胞の新たな段階的分化誘導)	中山 淳	池田宇一 駒津光久
半田秀一 (スポーツ 医科学)	乙第1187号	27.12. 9	Target intensity and interval walking training in water to enhance physical fitness in middle-aged and older women: a randomised controlled study (中高年女性における水中インターバル速歩トレーニングの体力向上効果とその目標運動強度: 無作為化比較試験)	加藤博之	本田孝行 今村 浩
原田道彦 (分子腫瘍学)	乙第1188号	28. 1.27	Obligate Anaerobic <i>Lactobacillus Casei</i> KJ686 Selectively Targets Solid Tumors and Exhibits an Antitumor Effect (偏性嫌気性菌 <i>Lactobacillus casei</i> KJ686 は固形癌を選択的に標的とし, 抗腫瘍効果を発揮する)	谷口俊一郎	伊藤研一 竹下敏一
鬼頭 恆 (精神医学)	乙第1189号	28. 2.23	Comparison of alterations in cerebral hemoglobin oxygenation in late life depression and Alzheimer's disease as assessed by near-infrared spectroscopy (近赤外線分光鏡を用いた老年期うつ病とアルツハイマー病の大脳皮質ヘモグロビン酸素化状態の変化についての比較検討)	池田修一	本郷一博 角谷 眞澄
山田重徳 (内科学(2))	乙第1190号	28. 3. 9	Reduced gland mucin-specific O-glycan in gastric atrophy: A possible risk factor for differentiated-type adenocarcinoma of the stomach (慢性萎縮性胃炎に於ける腺粘液特異的 O-グリカンの発現減弱: 分化型胃癌発生の危険因子)	菅野祐幸	佐々木克典 森泉 哲次

西村 貴文 (小児医学)	乙第1191号	28. 3. 9	Reduction in peripheral regulatory T cell population in childhood ocular type myasthenia gravis (小児眼筋型重症筋無力症における末梢血制御性T細胞の減少)	小池 健一	池田 修一 本田 孝行
原田由紀子 (小児医学)	乙第1192号	28. 3.23	PPAR α -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice (ライディッヒ細胞におけるPPAR α 依存的なコレステロール・テストステロンの枯渇が2,4-ジクロロフェノキシ酢酸暴露によるマウス精巣毒性を引き起こす)	石塚 修	駒津 光久 菅野 祐幸

Screening Tests Using Serum Tissue Transglutaminase IgA May Facilitate the Identification of Undiagnosed Celiac Disease among Japanese Population (血清抗組織トランスグルタミナーゼ IgA 抗体をスクリーニング検査に用いた日本におけるセリアック病の潜在患者同定の可能性)

中 澤 英 之

(論文の内容の要旨)

【背景】セリアック病は遺伝的素因を背景に小麦に含まれるグルテンの経口摂取を契機に発症する炎症性腸疾患である。小腸粘膜病変に伴って生じる慢性の下痢や吸収不良が主な消化管症状であるが、いずれもグルテン制限で改善する可逆的变化であることが特徴である。鉄欠乏性貧血や骨粗鬆症などの消化管外症状も知られる。さらに腸型T細胞リンパ腫 (EATL) 合併のリスクを高め、一旦リンパ腫を発症すると予後を規定する因子となる。グルテン制限でこれらの症状・合併症の発症リスクを軽減できるとする報告も多く、セリアック病は予防医学の観点からも重要である。近年、血清学的スクリーニング検査を用いた疫学調査が進み、欧米では罹患率が約1%であることが明らかになった。しかし本邦では、セリアック病の遺伝的素因として知られる HLA-DQ2/DQ8の頻度が低いことから疫学調査は実施されていない。今回我々は血清学的スクリーニング法を用いて、本邦におけるセリアック病の疫学調査を試みた。

【対象・方法】対象は1980年から2007年に信州大学病院血液内科、消化器内科、腎臓内科に受診歴がある患者710人と、新たに募集した健常者239人である。セリアック病の血清学的スクリーニングとして、凍結保存血清中の抗組織トランスグルタミナーゼ IgA 抗体 (tTG-IgA) の抗体価を測定した。測定には tTG-IgA ELISA キット (American Product 社) を用い、

製造元の推奨する10.0 U/ml をカットオフ値とした。tTG-IgA \geq 10.0 U/ml となった陽性患者については、十二指腸粘膜生検を実施した。粘膜生検ができない場合は過去の手術検体などを用いて病理学的検討を行った。粘膜病変の評価は、セリアック病の病理診断基準である Marsh-Oberhuber 分類に沿って、上皮内リンパ球浸潤、陰窩過形成、絨毛萎縮の有無を評価し、陽性所見が認められた患者をセリアック病の疑いがあると判断した。結果はカイ二乗検定と Mann-Whitney U 検定を用いて評価した。

【結果】健常者に tTG-IgA 陽性者を認めなかった。患者群710人中20人 (2.8%) で tTG-IgA が陽性となった。20人の基礎疾患の内訳は、悪性リンパ腫 (8人)、胃腸炎 (2人)、急性白血病 (以下1人)、多発性骨髄腫、肝硬変などだった。tTG-IgA 陽性20人のうち11人において小腸粘膜の病理検討が可能であり、そのうち7人において Marsh-Oberhuber type3相当の粘膜病変が認められ、セリアック病が疑われた (0.98%)。診療録を用いてセリアック病関連の症状の有無を確認したところ、4人に下痢症状があり、2人はグルテン制限食で下痢の改善を認めていた。鉄欠乏性貧血を1人に認めた。家族歴が疑われる患者も1人存在した。また、7人中5人は悪性リンパ腫患者で、いずれも消化管にリンパ腫病変を有していた。しかし EATL は認めなかった。悪性リンパ腫患者の割合は、tTG-IgA 陽性群と陰性群との間で統計学的有意差を認めなかつ

た ($p=0.055$)。悪性リンパ腫の5人のうち1人はグルテン制限食を継続して生存, 3人は悪性リンパ腫で腫瘍死, 1人はanasarcaで死亡した。

【考察】本研究は, 血清学的スクリーニングでセリアック病の疫学調査を試みた本邦初の報告で, セリアック病患者が稀ながらも存在する可能性を示した。しかし, 本研究にはHLA検索が含まれていない点や, セリアック病様の粘膜病理をきたす鑑別疾患である悪性リンパ腫が対象患者に多く含まれる点, 後ろ向き研究であるためグルテン制限の効果が十分評価できていない点など, この7例をセリアック病と確定診断するためには, さらなる検討が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

セリアック病は遺伝的素因を背景にグルテンの経口摂取を契機に発症する小腸の炎症性疾患で, 骨粗鬆症や悪性リンパ腫などを合併することが知られている。遺伝的背景の違いから国内には患者が存在しないとされ, 疫学調査も実施されていない。本研究では, 血清学的スクリーニング法を用いて本邦におけるセリアック病患者の疫学的検討を試みた。血液疾患や消化器病で当院受診歴のある患者710例と健常者239例を対象とし, 凍結保存血清中の抗組織トランスグルタミナーゼIgA抗体(tTG-IgA)をELISA法によって測定した。tTG-IgA陽性患者を対象として小腸粘膜の病理学的検討を行った。血清学的かつ病理学的にセリアック病が疑われた患者は診療録を用いてその臨床像を検討した。

その結果, 中澤英之は以下の結論を得た。

1. 健常者群239例にはtTG-IgA陽性者を認めなかった。患者群710例中20例(2.8%)で血清tTG-IgAが陽性だった。

Nox4-generated ROS regulate TGF- β 1-induced motility of colon cancer cells through the low molecular weight protein tyrosine phosphatase-Rho signaling pathway (LMW-PTP-Rho 経路を介して, Nox4に由来したROSはTGF- β 1によって誘導される大腸ガン細胞の運動能を促進する)

張 野

(論文内容の要旨)

【背景と目的】癌細胞では, 活性酸素の産生が高く発癌の原因になっていると考えられてきたが, その分子機構は十分に理解されていない。一方, NADPH oxidaseは, NADPHを基質として, 活性酸素(ROS)を産生する膜タンパク質で, 貪食細胞に存在して,

2. tTG-IgA陽性20例のうち8例は基礎疾患に悪性リンパ腫を有していた。そのうち6例はB細胞リンパ腫, 2例はT細胞リンパ腫だった。

3. tTG-IgA陽性20例中11例で小腸粘膜病理の検討が可能であった。そのうち7例(患者群710例中0.98%)に絨毛萎縮と粘膜内リンパ球浸潤を認め, セリアック病の病理診断基準であるMarsh-Oberhuber grade3相当の所見を認め, セリアック病である可能性が示唆された。

4. この7例は年齢中央値54歳(27-74歳)で, 6例が男性だった。5例が背景疾患として悪性リンパ腫を有していたが, セリアック病に多いとされる腸症型T細胞リンパ腫(EATL)は含まれなかった。他の2例はBudd-Chiari症候群と糖尿病性慢性腎不全の患者だった。

5. 7例中2例において, グルテン制限食で改善する下痢症状を認めていた。明らかな家族歴を有する患者は認めなかった。

今回の研究は, 血清学的スクリーニング検査によってセリアック病の疫学調査を試みた本邦で最初の研究である。欧米においてセリアック病の診断に用いられるtTG-IgAが陽性となる患者群が国内にも一定数存在することを明らかにし, さらに組織学的にもセリアック病が疑われる患者群の存在を発見した。今後の本邦における潜在的セリアック病患者の診断とその臨床像の解明につながると考えられる。さらに対象患者群710例中0.98%というデータは, セリアック病に関する国内の新たなエビデンスになり得る。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。

病原菌を殺し, 生体防御の役割をもつことが知られている。ところが, 1999年以来, その新しいファミリー遺伝子群(Nox1~5, Duox1, 2)が, 造血細胞以外の種々の組織で発見され, 自然免疫以外の生命現象における役割が示唆され, それを解明することが重要な問題となってきた。特に, Nox4はH₂O₂を産生し,

細胞の小胞体，ミトコンドリアなどの細胞内器官の膜に局在して，血管新生，糖代謝および発癌などの生理的・疾患過程における重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。しかし，大腸癌においては，Nox4がどのように発現し，発癌過程に関与するのかまだ明らかにされていない。それゆえ，本研究では，大腸癌の発癌過程におけるNox4によるレドックスシグナルの機能的役割を解明しようとした。

【方法】大腸癌組織切片においてNox1，Nox4およびTGF- β 1のタンパクの発現を免疫染色にて比較検討した。さらに，ヒト大腸癌由来細胞株（RKO，HCT-116）においてTGF- β 1に誘導されるNox4の発現とROSの産生をWestern blottingとROSの定量法等にて解析した。また，cell migration assay法を行ってTGF- β 1は大腸癌細胞の移動を誘導するか調べた。さらに，大腸癌細胞において，Nox4がTGF- β 1によって誘導される細胞運動を如何に媒介するのか，その調節機構を生化学的手法（Western blotting，Rho activity assay およびBIAM labeling等）を用いて検討した。

【結果と考査】Nox1と異なり，Nox4は正常の大腸組織には発現しないが，大腸癌組織に特異的に発現することを見出した。しかも，Nox4の発現パターンは，大腸癌の浸潤に関与するTGF- β 1の発現パターンと酷似していた。TGF- β 1は大腸癌細胞におけるNox4の転写発現を誘導し，細胞内のH₂O₂産生を高めた。さらに，Nox4に由来するROSは，プロテインタイロシンフォスファターズ（LMW-PTP）を酸化・不活化して，細胞運動に関与するRhoGAP-Rhoシグナル経路を制御した。また，Nox4を不活化すると，TGF- β 1による大腸癌細胞運動の誘導が抑制されることを見出した。

【結論】本研究により，Nox4レドックスシグナルはLMW-PTP-RhoGAP経路を介して，TGF- β 1に依

存した大腸癌細胞の遊走・浸潤能に寄与するという新知見が得られた。この結果から，Nox4は大腸癌治療の新しい分子標的となる可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

Nox4は正常な大腸組織に発現していないが，大腸癌組織に発現していることから，Nox4は大腸の癌化の原因の一つと考えることができる。そこで張はNox4がどのように大腸がん発生に関与するのかまたその調節機構を(1)大腸癌組織中のNox1，Nox4およびTGF- β 1を抗Nox1，Nox4およびTGF- β 1抗体を用いて免疫染色による検出と，(2)大腸癌由来細胞株HCT-116，RHOにおいてTGF- β 1による誘導される大腸癌運動への関与を生化学的手法（Western blotting，RT-PCR，BIAM-labeling，RHO assayなど）を用いて，両者により検討した。

その結果以下の結論を得た。

1. Nox1と異なり，Nox4は正常の大腸には発現していないが，大腸癌組織に発現している。
2. TGF- β 1は大腸癌細胞株におけるNox4の転写発現とROSの産生を誘導した。
3. TGF- β 1は大腸癌細胞株の運動を誘導した。
4. Nox4は，LMW-PTPを酸化・不活化してRhoGAP-Rhoシグナルを制御した。
5. Nox4は，LMW-PTP-Rhoシグナルを介して，TGF- β 1によって誘導される大腸癌細胞株の運動を媒介した。

以上より，Nox4レドックスシグナルはLMW-PTP-RhoGAP経路を介して，TGF- β 1に依存した大腸癌細胞株の遊走・浸潤能に寄与すると考えられた。

また，本研究によりNox4は大腸癌治療の新しい分子標的となる可能性がある。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。

A Novel Stepwise Differentiation Of Functional Pancreatic Exocrine Cells From Embryonic Stem Cells (胚性幹細胞からの機能的な膵外分泌細胞への新たな段階的分化誘導)

滝澤 佐季子

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】膵外分泌細胞は食物の三大栄養素すべてを消化することができる消化酵素を分泌している。しかし，これまで単離して培養するなど*in vitro*での研究報告は少なく，発生メカニズムの解明についても

内分泌細胞に比べて研究が遅れている。哺乳動物由来の膵外分泌細胞は，*in vitro*において機能的に培養できる系が確立されておらず，また仮に単離できたとしても，成熟した外分泌細胞を長期的に培養することは困難であることから，我々は多分化能を有する多能性

幹細胞に注目した。本研究では、有用な消化酵素の産生、さらには膵臓疾患研究に役立てる目的で、マウス胚性幹 (ES) 細胞から膵外分泌細胞への分化誘導を試みた。

【方法】未分化マウス ES 細胞は0.1%トリプシンを用いて培養ディッシュから剥離した。胚様体 (EB) を形成するため、マウスES細胞の懸濁液をディッシュ蓋に50 μ L ずつドロップ状に置いた後反転させ、5日間静置浮遊培養を行った。作成したEBは、ゼラチンコートディッシュに接着、伸展させ、培地中に誘導因子を加えて分化誘導を行った。分化誘導は段階的に行い、形成したEBに対してまず activin A (Stage1)、次いで retinoic acid (Stage2) で処理をした。その後、FGF7で3日間処理 (Stage3) 後、FGF7, GLP-1, nicotinamide で処理 (Stage4) し、膵外分泌細胞への分化を促した。分化誘導した細胞は、各ステージにおいて RT-PCR 法, real-time PCR 法及び免疫組織化学法などを用いて評価を行った。

【結果と考察】Activin Aによる誘導により有意にFoxa2陽性細胞への誘導効率が高く、Foxa2及びSox17ダブルポジティブ陽性の細胞を多数確認したことから、胚体内胚葉へ誘導されていることが示された。次いでStage2では、レチノイン酸による誘導により腸管内胚葉マーカーであるHnf1b, Hlxb9の発現を高率に検出し、さらに膵前駆細胞マーカーPdx1についても発現が検出された。Stage3ではFGF7で誘導した細胞において、膵前駆細胞マーカーPdx1, Nkx6.1, Hnf6の発現を高率に検出し、Pdx1陽性細胞を多数確認した。これらのPdx1陽性細胞はFoxa2陽性細胞の集団の中に共局在しており内胚葉由来の細胞であることが示唆された。加えてカウント解析の結果から、FGF7を添加することにより有意にPdx1陽性細胞が誘導されることが確認され、FGF7による膵前駆細胞への誘導効果が確認された。Stage4では、controlに比べ、誘導因子FGF7, GLP-1, nicotinamideを添加した細胞で消化酵素をコードする遺伝子、*Amylase* (*AMY*), *Elastase* (*ELA*), *Carboxypeptidase A* (*CPA*), *Chymotrypsinogen* (*CTRB*) の発現を高率に検出し、*AMY* に関しては長期的に上方制御された。*AMY* と *CPA* もしくは *Chymotrypsin* とのダブル染色の結果、これらのタンパク質は顆粒状に染色され、同じ細胞内に共局在していた。また、誘導因子の組み合わせのうち、FGF7の有無による評価を行ったところ、遺伝子レベルでは外分泌細胞マーカー *AMY*, *ELA*,

CPA, *CTRB* の発現が上方制御される傾向にあり、また *amylase* 陽性細胞についても誘導効率が高い傾向が確認された。一方で、内分泌細胞については、*Insulin*, *Glucagon* の遺伝子発現レベルに違いが確認されなかったことから、FGF7は膵外分泌細胞の分化に寄与する可能性が示された。加えて、誘導した細胞の培養上清中においてアミラーゼの活性を検出したことから、アミラーゼ分泌機能を有する外分泌細胞であることが考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

膵外分泌細胞は食物の三大栄養素すべてを消化することができる消化酵素を分泌している。しかし、哺乳動物由来の膵外分泌細胞は、In vitro において機能的に培養できる系が確立されておらず、また仮に単離できたとしても、成熟した外分泌細胞を長期的に培養することは困難である。そこで、滝澤は有用な消化酵素の産生を目指し、マウス胚性幹 (ES) 細胞から膵外分泌細胞への分化誘導を試みた。膵臓は上皮間葉相互作用が形態形成を調節している典型的な臓器であり、そのシグナル伝達の分子としてFGF7に着目をした。FGF7は、膵臓上皮細胞に発現しているFGFR2bにのみ結合し、またマウス胎児の膵臓間葉系の細胞で発生後期に特に高く発現していることが報告されていることから、マウス ES 細胞から膵外分泌細胞への誘導因子として有力な候補分子として用いた。

その結果、滝澤は以下の成績を得た。

1. Activin Aとレチノイン酸によって誘導したマウス ES 細胞に対し、FGF7を作用させることでPdx1陽性細胞が有意に誘導されることが確認された。
2. Pdx1陽性細胞はFoxa2陽性細胞と共局在しており、内胚葉由来の膵前駆細胞であることが考えられた。
3. FGF7で誘導した細胞に対し、最終段階としてFGF7及びGLP-1, Nicotinamideを組み合わせて作用させることで、消化酵素をコードする遺伝子の発現が上方制御された。
4. 誘導最終段階において、誘導因子の組み合わせではFGF7を作用させることで外分泌マーカーの発現が上方制御され、Amylase 陽性細胞への誘導効率が向上する傾向が示された。
5. 最終的に誘導された細胞は、免疫組織化学の結果 Amylase と Carboxypeptidase A などの消化酵素を有し、これらの消化酵素は顆粒状に染色された。
6. 最終的に誘導された細胞は、Amylase の分泌能

を有していることが確認された。

以上の結果から、FGF7を用いた段階的分化誘導法により、マウス ES 細胞から膵外分泌細胞が分化誘導され、哺乳動物由来の有用な消化酵素を獲得すること

が可能であることが示唆された。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。

Target intensity and interval walking training in water to enhance physical fitness in middle-aged and older women : a randomised controlled study (中高年女性における水中インターバル速歩トレーニングの体力向上効果とその目標運動強度：無作為化比較試験)

半 田 秀 一

(論文の内容の要旨)

【背景】高強度の運動トレーニングは中高年者の体力低下を予防する。しかし、中高年女性は大腿部の筋力低下や膝関節痛などにより、陸上で高強度運動トレーニングをおこなうことが難しい場合がある。一方、水中歩行時には浮力により体重を減少させてこれらの問題を解決でき、さらに、心臓への静脈還流量が増加し、一回心拍出量が増加し、好氣的運動能が向上する可能性がある。その結果、水中では陸上に比べて高い運動強度で歩行でき、一定期間のトレーニング効果が亢進する可能性がある。しかし、それらを検証した研究はない。

【目的】水中歩行時には、陸上歩行時に比べ、乳酸産生の指標であるガス交換閾値 ($\dot{V}O_2GET$) が上昇し、一定の運動強度 ($\dot{V}O_2$) における心拍数 (HR) が低下するのではないか、さらに、水中では陸上に比べ、同程度の主観的運動強度でインターバル速歩を実施した時の運動強度が高く、その結果、一定期間でより高い持久力と筋力の増強効果が得られるのではないか、という仮説を検証した。

【方法】中高年女性31名 (年齢: 59 ± 5 歳, 身長: 158 ± 4 cm, 体重: 59 ± 9 kg 平均値 \pm SD) を水中群 (WG) 16名, 陸上群 (LG) 15名に無作為に分けた。まず, WG 16名を対象として, 水中 (水深110 cm, 水温31°C, 25 m プール) および陸上 (15 m \times 15 m 体育館) において, 歩行による三段階負荷漸増法をおこない, その間の HR, $\dot{V}O_2GET$, 最高酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2peak}$) を測定した。LG は陸上でのみこれらの測定をおこなった。さらに, 両群で陸上において自転車による負荷漸増法で歩行時と同様の測定をおこなった。さらに, 別途, 等尺性膝伸展 (F_{EXT}), 屈曲 (F_{FLX}) 筋力を測定した。その後, WG はプールで, LG は体育館で, 歩行による三段階負荷漸増法によって測定した $\dot{V}O_2GET$ + 35% 以上の強度の速歩とそれ以下の緩歩を3分間

ずつ, 6 セット/日, > 4 日/週を目標に, 8 週間おこなわせた。なお, その際の速歩時の主観的運動強度はボルグ指数で16-18ポイント, 緩歩は10-12ポイントで実施するように指示した。実際の運動強度はそれぞれの環境で校正した三軸の加速度計で測定した。トレーニング後に前と同様に持久力と筋力測定をおこなった。【結果】トレーニング前, 水中において歩行による負荷漸増法で測定した $\dot{V}O_2GET$ は, 陸上より14%高く, 一定の運動負荷に対する HR は, 陸上より10 beats \cdot min $^{-1}$ 低かった ($P < 0.001$)。トレーニング日数および時間は両群間で差はなかったが ($P > 0.9$), トレーニング期間中の速歩時の平均運動強度は WG で $1.59 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, LG で $1.40 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ と, WG の方が13.6%高かった ($P < 0.05$)。すなわち, トレーニング開始時には速歩時の運動強度が WG で LG に比べすでに高く, さらに4週目以降, 運動強度が開始時に比べさらに上昇した ($P < 0.05$)。一方, LG では速歩時の運動強度はトレーニング期間初期レベルを維持した。その結果, トレーニング後, WG において自転車で求めた $\dot{V}O_{2peak}$ が18.0%, $\dot{V}O_2GET$ が14.7%, F_{EXT} が11.5%, F_{FLX} が11.6% 有意に増加し (すべて $P < 0.001$), それらの増加量はLG に比べ高かった (すべて $P < 0.05$)。【結論】中高年女性の水中歩行時には, $\dot{V}O_2GET$ の上昇 (乳酸産生抑制) と一定の運動強度に対する HR の低下がおき, 陸上より高い運動強度で歩行することを可能にした。その結果, 水中インターバル速歩は陸上と比べて, 8週間で, より高い持久力と筋力の増強効果を認めた。

(論文審査の結果の要旨)

水中では陸上に比べて高い運動強度で歩行でき、一定期間のトレーニング効果が亢進する可能性がある。しかし、それらを検証した研究はない。水中歩行時には、陸上歩行時に比べ、ガス交換閾値 ($\dot{V}O_2GET$) が上昇し、一定の運動強度 ($\dot{V}O_2$) における心拍数

(HR) が低下するのではないかと、さらに、水中では陸上に比べ、インターバル速歩を実施した時の運動強度が高く、その結果、一定期間でより高い持久力と筋力の増強効果が得られるのではないかと、という仮説を検証した。

中高年女性31名を水中群 (WG) 16名、陸上群 (LG) 15名に無作為に分けた。まず、WG 16名を対象として、水中および陸上において、歩行による三段階負荷漸増法をおこない、その間の HR、 $\dot{V}O_2GET$ 、最高酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2peak}$) を測定した。LG は陸上でのみこれらの測定をおこなった。さらに、両群で陸上において自転車による負荷漸増法で歩行時と同様の測定をおこなった。さらに、別途、等尺性膝伸展と屈曲筋力を測定した。その後、WG はプールで、LG は体育館で、歩行による三段階負荷漸増法によって測定した $\dot{V}O_2GET+35\%$ 以上の強度の速歩とそれ以下の緩歩を3分間ずつ、6セット/日、 >4 日/週を目標に、8週間おこなわせた。なお、その際の速歩時の主観的運動強度はボルグ指数で16-18ポイント、緩歩は10-12ポイントで実施するように指示した。実際の運動強度はそれぞれの環境で校正した三軸の加速度計で測定した。

トレーニング後に前と同様に持久力・筋力をおこなった。

その結果、半田は次の結果を得た。

1. 水中歩行は陸上と比べて、ガス交換閾値が14%高く、一定の運動負荷に対する心拍数が10拍低かった。
 2. トレーニング期間中の速歩時の平均運動強度は、WGの方が13.6%高かった。
 3. トレーニング後、WGにおいて自転車で求めた $\dot{V}O_{2peak}$ が18.0%、 $\dot{V}O_2GET$ が14.7%増加した。
- さらに、膝伸展筋力が11.5%、膝屈曲筋力が11.6%増加した。

これらの結果より、中高年女性の水中歩行は、陸上より高い運動強度で歩行でき、水中インターバル速歩トレーニングは陸上と比べて、8週間で、より高い持久力と筋力の増強効果があることが示唆された。

よって、水中インターバル速歩トレーニングは、中高年女性の運動処方として大きな意義をもつことを示しており、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。

Obligate Anaerobic *Lactobacillus Casei* KJ686 Selectively Targets Solid Tumors and Exhibits an Antitumor Effect (偏性嫌気性菌 *Lactobacillus casei* KJ686 は固形癌を選択的に標的とし、抗腫瘍効果を発揮する)

原 田 道 彦

(論文の内容の要旨)

【目的】今回、細胞壁の多糖類がビフィズス菌より少ないため、細胞壁が薄く、菌体内で産生されたタンパク質などがより分泌されやすいと推測されるカゼイ菌に注目した。カゼイ菌はその細胞質分画やタンパク質、ペプチドグリカンが培養細胞で腫瘍の増殖を抑えるとの報告がある。しかし生体内では宿主の免疫反応を介した間接的な抗腫瘍効果は認めるものの、直接的な抗腫瘍特性は指摘されていない。通性嫌気性から偏性嫌気性へ変異したカゼイ菌が、担癌マウスの腫瘍やその培養細胞に対する影響を検討した。

【方法】① C57BL/6 (生後8週, オス) に Lewis lung carcinoma (LLC) $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ ハンクス細胞浮遊液を皮下注射し、LLC 担癌マウスを作成した。通性嫌気性菌であるカゼイ菌 ATCC393 の変異菌にエリスロマイシン耐性遺伝子のみを組み込んだ偏性嫌気性菌カゼイ菌 KJ686 がある。これを37°Cで嫌気性条件下

に MRS 液体培地にて培養し、増殖相にあるカゼイ菌 KJ686 5×10^8 c.f.u./100 μl PBS (-) を腫瘍径 5 mm となった LLC 担癌マウスに1日1回、2日間尾静注した。②カゼイ菌 KJ686 を 1×10^{10} c.f.u./ml DMEM に調整した生菌と、それを95°C90分間加熱処理した死菌を作成し、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ c.f.u./well の濃度で 96well plate の培養細胞 LLC 1×10^4 /well に加え24時間培養した。③カゼイ菌 KJ686 を DMEM 培地で24時間嫌気培養した後、培養液上清を分離した。培養上清は遠心分離フィルターにより100 kDa 以上、100-50 kDa, 50-10 kDa, 10 kDa 以下の分画に分離した。これらを元の培養上清と同じ濃度に希釈したのち6well plate の培養細胞 LLC 500/well に加え8日間培養細胞増殖への影響を調べた。さらに1 kDa 以下の分画を水層と有機層に分けて同様に培養細胞 LLC に加えて8日間培養した。

【結果】①カゼイ菌 KJ686 を尾静注後5日目以降に

において有意な腫瘍増殖抑制抗効果を認めた。投与17日目においても腫瘍組織にカゼイ菌 *KJ686* を認めたが、正常組織には認めなかった。グラム染色にてカゼイ菌 *KJ686* は腫瘍組織と壊死部との境界に小集塊状に認めたが、この境界部分でのサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-12p, IL-1 β , IFN- γ) の RNA の発現は認めなかった。また血清中のサイトカインについて投与3日目と9日目に評価したところ IL-1 β が投与3日目に増加していたのみで、腫瘍組織でのNK細胞数の増加など宿主免疫反応は認めなかった。② 生菌では $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ c.f.u./well の濃度で抗腫瘍効果を認めたのに対して死菌では 1×10^8 c.f.u./well でも抗腫瘍効果は認めなかった。グラム染色では生菌も死菌も同様の染色性を示した。このことはカゼイ菌 *KJ686* の生菌そのものや何らかの産生物が抗腫瘍効果をもたらすことを示唆すると思われた。また乳酸菌培養時の培地の pH は約4.0であるため、乳酸により pH4.0とした培地で LCC を培養したが、抗腫瘍効果は認めなかった。③ 培養上清の各分画のうち10 kDa以下の分画のみで元の培養上清と同等の抗腫瘍効果を示した。さらに1 kDa以下の分画の有機層では抗腫瘍効果は認めなかったものの、水層において1 kDa以下の分画と同等の抗腫瘍効果を認めた。またこの分画は100°C 1分加熱処理した後も同様の抗腫瘍効果を認めた。

【結論】 LCC 担癌マウス C57BL/6においてのカゼイ菌 *KJ686* の抗腫瘍効果は、宿主免疫を刺激する間接的な効果よりもカゼイ菌 *KJ686* が産生した1 kDa以下の水溶性物質による直接的な効果によるものの寄与が大きいと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

今回、原田道彦は細胞壁の多糖類がビフィズス菌より少ないため、細胞壁が薄く、菌体内で産生された物質がより分泌されやすいと推測されるカゼイ菌に注目した。カゼイ菌は抽出された菌体成分が培養細胞で腫瘍の増殖を抑えるとの報告がある。しかし生体内では宿主の免疫反応を介した間接的な抗腫瘍効果は認めるものの、直接的な抗腫瘍特性は指摘されていない。原田道彦は通性嫌気性から偏性嫌気性へ変異したカゼイ菌の Lewis 肺癌 (LLC) 細胞増殖に対する影響を *in vivo* (生体内) 及び *in vitro* (培養レベル) で検討した。

その結果より、以下の結論を得た。

1. カゼイ菌 *KJ686* を尾静注後5日目以降で有意な

腫瘍増殖抑制抗効果を認めた。

2. 投与9日目には腫瘍組織にカゼイ菌 *KJ686* を認めたが、正常組織には認めなかった。

3. グラム染色にてカゼイ菌 *KJ686* を腫瘍の生組織と壊死部との境界に小集塊として認めたが、この境界部分でのサイトカイン RNA の発現は認めなかった。また腫瘍組織でのNK細胞数の増加といった宿主免疫反応は認めなかった。

4. *In vitro* において生菌では 1×10^6 c.f.u./well 以上の濃度で LLC 細胞に対する増殖阻害効果を認めたが、死菌ではその効果は認められなかった。また乳酸菌培養時の培地 pH 低下を考慮し、乳酸で pH4.0とした培地で LCC 細胞を培養したが、細胞増殖阻害効果は認めなかった。

5. カゼイ菌 *KJ686* の培養上清の分画のうち1 kDa以下の分画のみで元の培養上清と同等の LLC 細胞増殖阻害効果を示した。さらに1 kDa以下の分画の有機層では LLC 細胞増殖阻害効果は認めず、水層において1 kDa以下の分画と同等の細胞増殖阻害効果を認めた。

6. 5. の水層を100°C 1分加熱処理した後も同様の細胞増殖阻害効果を認めた。

7. 5. の水層を疎水カラムで疎水性により分けると全ての分画で細胞増殖阻害効果は認めなかった。

以上より、LCC 担癌マウス C57BL/6におけるカゼイ菌 *KJ686* の抗腫瘍効果は、宿主免疫反応よりもむしろカゼイ菌 *KJ686* が産生した1 kDa以下の水溶性複合体物質による直接的な癌細胞増殖阻害効果によると考えられた。また、カゼイ菌 *KJ686* に抗腫瘍物質遺伝子等を導入することで相加・相乗効果による更なる抗腫瘍効果を示す可能性を示唆した。したがって主査、副査は一致して学位論文として価値があるものと認めた。

Comparison of alterations in cerebral hemoglobin oxygenation in late life depression and Alzheimer's disease as assessed by near-infrared spectroscopy (近赤外線スペクトロスコピーを用いた老年期うつ病とアルツハイマー病の大脳皮質ヘモグロビン酸素化状態の変化についての比較検討)

鬼 頭 恆

(論文の内容の要旨)

【背景】老年期うつ病と、アルツハイマー病の初期像は、鑑別が難しく最近のトピックとなっている。こうした状況で、近赤外線スペクトロスコピー (Near-InfraRed Spectroscopy : NIRS) を両者の鑑別補助目的に利用できないかと考えた。NIRS は、近赤外線を用いて、課題施行時の大脳皮質ヘモグロビン濃度変化を測定することで、脳賦活状態を簡便にとらえることができる脳機能画像法である。

【目的】NIRS を用いて、老年期うつ病とアルツハイマー病の大脳皮質賦活反応性に違いがあるか検討することが目的である。

【方法】60歳以上の右利きの男女で、うつ病30名 (平均年齢77歳)、アルツハイマー病28名 (平均年齢71歳)、健常者33名 (平均年齢70歳) を対象に NIRS を実施した。頭部 MRI を実施して、脳血流に影響を与える粗大な脳梗塞、動脈瘤のある症例は除外した。NIRS 測定の際の賦活課題は、語流暢課題と視空間認知課題 (Benton Judgment of Line Orientation) の二つを用いて、前頭葉と頭頂葉の酸素化ヘモグロビン濃度変化量を調べた。測定はブロックデザイン (レスト区間30秒—タスク区間60秒—レスト区間30秒) で行い、一人の被験者に3回繰り返した結果を加算平均し、レストの平均値とタスクの平均値の差を賦活反応量とした。前頭葉に22個のチャンネル、頭頂葉に22個のチャンネルができるようにプローブの配置をした。

【解析】44個のチャンネルごとに3群間で賦活反応量に有意差がみられるか調べた。

【結果】視空間認知課題において、うつ病群とアルツハイマー病群の賦活反応量の比較で有意な記録チャンネルが認められた。アルツハイマー病群の賦活反応量は、うつ病群より大きく、頭頂葉の上頭頂小葉や楔前部にあたる5個のチャンネルで有意差が認められた。有意差が検出されたチャンネルの一つでは、感度71.5%、特異度70.0%でうつ病とアルツハイマー病の鑑別が可能であった。視空間認知課題の成績については、両群に有意な差はみられなかった。また、語流暢課題においては、健常群とうつ病群の比較でのみ賦活反応

量に有意差が認められた。

【考察】アルツハイマー病群では、大脳皮質の賦活反応が比較的保たれており、うつ病群では賦活反応が低下している傾向がみられ、頭頂葉の領域で有意な差が認められた。頭頂葉の上頭頂小葉や楔前部は、視空間イメージ、エピソード記憶の再生、自己処理に関する操作の機能があり、この賦活反応の差は、これらの脳領域でのアルツハイマー病とうつ病の脳機能の違いを反映していると考えられた。アルツハイマー病群では認知機能の低下があり、うつ病群と同じパフォーマンスを発揮するのに、より大きな脳賦活が必要である可能性が推測された。

以上の結果から、NIRS が、老年期うつ病とアルツハイマー病を鑑別する有用な補助診断法となりうる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

老年期うつ病と、初期のアルツハイマー病は、鑑別が難しいのが現状である。うつ病の症状である意欲低下と認知症の症状であるアパシーは、簡単に見極められないケースが存在する。老年期うつ病は、うつ病による因子と加齢による因子が影響しあい認知機能障害を伴いやすく、このことも診断を難しくしている。こうした課題をかかえた高齢者の日常臨床において、近赤外線スペクトロスコピー (Near-InfraRed Spectroscopy : NIRS) を両者の鑑別補助目的に利用できないかと考え、NIRS を用いて、老年期うつ病とアルツハイマー病の大脳皮質賦活反応性に違いがあるか検討を行った。60歳以上の右利きの男女で、DSM-IVの基準により診断された、うつ病30名、アルツハイマー病28名、健常者33名を対象に NIRS を実施した。NIRS 測定の際の賦活課題は、語流暢課題と視空間認知課題 (Benton Judgment of Line Orientation) の二つを用いて、前頭葉と頭頂葉の酸素化ヘモグロビン濃度変化量を調べ、比較検討した。前頭葉に22個の記録チャンネル、頭頂葉に22個の記録チャンネルができるようにプローブの配置をし、被験者は椅子に座り、卓上のパソコン画面を見た状態で NIRS 測定した。

その結果、鬼頭は以下の成績を得た。

1. アルツハイマー病群では、大脳皮質の賦活反応が比較的保たれており、うつ病群では賦活反応が低下している傾向がみられ、頭頂葉の領域で有意な差が認められた。
2. 頭頂葉で有意差が検出されたチャンネルの一つでは、感度71.5%、特異度70.0%でうつ病とアルツハイマー病の鑑別が可能であった。
3. 頭頂葉の上頭頂小葉や楔前部は、視空間イメージ、エピソード記憶の再生、自己処理に関する操作の機能があり、この賦活反応の差は、これらの脳領域でのアルツハイマー病とうつ病の脳機能の違いを反映していると考えられた。

4. 語流暢課題においては、健常群とうつ病群の比較でのみ賦活反応量に有意差が認められた。

以上により、NIRSは、老年期うつ病とアルツハイマー病を鑑別するための有用な補助診断法であると考えられた。NIRSはfMRIなどに比べ、賦活課題をかけやすく、また侵襲性がなく、操作も簡便であるため、ベットサイドでも実施できるメリットがある。今後の研究の積み重ねにより、NIRSが臨床応用される可能性もあると考えられた。

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。

Reduced gland mucin-specific O-glycan in gastric atrophy: A possible risk factor for differentiated-type adenocarcinoma of the stomach (慢性萎縮性胃炎に於ける腺粘液特異的 O-グリカンの発現減弱: 分化型胃癌発生の危険因子)

山 田 重 徳

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】非還元末端に $\alpha 1, 4$ 結合型 *N*-アセチルグルコサミン (α GlcNAc) を有する O-グリカンは、幽門腺等の胃腺粘液細胞から分泌されるユニークな糖鎖で、 $\alpha 1, 4$ -*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 ($\alpha 4$ GnT) によって生合成される。我々はこれまでに α GlcNAc が *H. pylori* に対して抗菌的に作用すること (Kawakubo et al. Science. 2004; 305; 1003-1006) や、 α GlcNAc欠損マウスで分化型胃癌が発生することを示し (Karasawa et al. J. Clin. Invest. 2012; 122; 923-934)、 α GlcNAc は胃癌抑制因子である可能性を報告してきた。今回、我々は幽門腺における α GlcNAc の発現低下がヒト分化型胃癌発生のリスク因子となり得るか否を検討するため、正常胃幽門腺、慢性萎縮性胃炎を示した幽門腺、胃癌周囲に見られた非腫瘍性幽門腺における α GlcNAc の発現パターンを免疫組織学的に比較解析した。

【方法】2001年1月から2011年12月までの間に、信州大学および関連施設にて胃粘膜定点生検を施行した *H. pylori* 陰性正常胃粘膜67症例、*H. pylori* 陽性萎縮性胃炎70例、胃体下部に発生し内視鏡切除を施行した粘膜内に局限する分化型胃癌68例および未分化型胃癌11例を対象とした。 α GlcNAc とそのコア蛋白である MUC6の検出はそれぞれ HIK1083抗体と CLH5抗体を用い免疫染色を行った。各群の幽門腺で、 α GlcNAc および MUC6陽性腺管数を計測し、それぞれの発現

腺管数を各群間で比較した。また、 α GlcNAc/MUC6の比率を算出し、各群間での有意差検討を行った。最後に、慢性萎縮性胃炎で α GlcNAc の発現の無い症例と α GlcNAc が保たれている症例を抽出し Ki-67 labeling index を計算、 α GlcNAc の発現が保たれている *H. pylori* 陰正常胃粘膜の Ki-67 labeling index と比較した。統計処理は $P < 0.05$ を有意とした。

【結果】萎縮性胃炎と分化型胃癌近傍の幽門腺では MUC6陽性腺管数に比して α GlcNAc 陽性腺管数が有意に減少していた ($P < 0.001$)。一方、正常胃粘膜の幽門腺と未分化型胃癌の幽門腺では MUC6陽性腺管数と α GlcNAc 陽性腺管数はほぼ同数であり、両者に有意差を認めなかった。 α GlcNAc/MUC6比率の4群間比較では、正常胃粘膜と比較し、萎縮性胃炎と分化型胃癌で有意に低値であった ($P < 0.001$)。また、Ki-67陽性率は正常胃粘膜と比較し、 α GlcNAc が消失した慢性萎縮性胃炎で有意に高かった ($P < 0.05$)。

【考察】胃粘膜上皮の萎縮に伴い α GlcNAc の発現が減弱し、これに伴い胃粘膜上皮の増殖能が亢進、分化型腺癌発症のリスクとなっている可能性が示唆された。今回の研究の結果は α GlcNAc 欠損マウスが胃粘膜上皮の過形成を経て、分化型胃癌が発生した過程と合致する。また、同研究では炎症性ケモカインである CCL2や炎症性サイトカインである IL-1 β 、肝細胞増殖因子などの上昇を認めていた。このことから、

α GlcNAc の発現減弱を呈した萎縮性幽門腺粘膜では、発現を誘発する炎症が背景に存在している可能性が考えられた。慢性萎縮性胃炎の患者に対して胃粘膜生検を行い、 α GlcNAc と MUC6 染色を行うことは、将来的な発癌のリスクを検討するのに有用であると思われる。

(論文審査の結果の要旨)

胃癌は慢性萎縮性胃炎を背景に発生することが知られているが、発癌に至る詳細なメカニズムは不明な点が多い。非還元末端に α 1, 4 結合型 *N*-アセチルグルコサミン (α GlcNAc) を有する *O*-グリカンは、MUC6 をコア蛋白とし、胃腺粘液細胞から分泌される糖鎖であり α 1, 4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 (α 4GnT) により生合成される。我々はこれまでに *A4gnt* 欠損マウスで分化型胃癌が発生することを示し (Karasawa et al. J. Clin. Invest. 2012; 122; 923-934), α GlcNAc が胃癌抑制因子であることを報告した。

今回我々はヒト胃粘膜において α GlcNAc の発現低下が分化型胃癌発生のリスク因子となるかを検討した。

胃粘膜定点生検を施行した *H. pylori* 陰性正常胃粘膜67症例, *H. pylori* 陽性萎縮性胃炎70例, 胃体下部に発生し内視鏡切除を施行した粘膜内に限局する分化型胃癌68例及び未分化型胃癌11例に対しMUC6と

α GlcNAc の免疫染色を行い、染色性の違いを検討した。さらに慢性萎縮性胃炎で α GlcNAc の発現の無い症例と α GlcNAc が保たれている症例を抽出し Ki-67 labeling index を計算, α GlcNAc の発現が保たれている *H. pylori* 陰性正常胃粘膜の Ki-67 labeling index と比較した。

その結果、山田は次の結論を得た。

1. 慢性萎縮性胃炎では正常胃粘膜と比較してMUC6陽性腺管数が減少していた。
2. 慢性萎縮性胃炎と分化型胃癌周囲の非腫瘍性幽門腺においてはMUC6と比較して α GlcNAcの更なる発現減弱が認められた。
3. α GlcNAcの消失した慢性萎縮性胃炎のKi-67 labeling indexは正常胃粘膜と比較して有意に高かった。

これらの結果より、 α GlcNAc はヒト分化型胃癌発生に関与している可能性が示唆された。胃粘膜上皮の萎縮に伴い α GlcNAc の発現が減弱し、これに伴い胃粘膜上皮の増殖能が亢進, 分化型腺癌発症のリスクとなっている可能性が示唆された。今回の研究の結果は α GlcNAc 欠損マウスが胃粘膜上皮の過形成を経て, 分化型胃癌が発生した過程と合致する。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。

Reduction in peripheral regulatory T cell population in childhood ocular type myasthenia gravis (小児眼筋型重症筋無力症における末梢血制御性T細胞の減少)

西村 貴文

(論文の内容の要旨)

【はじめに】重症筋無力症 (MG) は自己免疫疾患の1つで, ステロイドやタクロリムス (Tac) 等の免疫抑制・調整薬による治療が主体となるが, 免疫学的病態については未だ不明な点が多い。近年の報告で, 成人MGの免疫学的異常として制御性T細胞 (以下Treg) の関与が示されている。しかし, 小児における報告はほとんどないため, 本研究で末梢血液中のTreg数とTh17数を測定し, 免疫学的特徴を明らかにすることを目的とした。またこれらが病勢の評価に有用であるかを検証した。

【対象と方法】対象は2009年から2013年までの4年間に当科および協力施設における小児眼筋型MG患者13例 (男児4名, 女児9名, 平均年齢8.2±4.7歳)。

年齢一致対照群として, 18例の免疫や炎症が関与していない発達遅滞やてんかん患者 (男児10名, 女児8名, 平均8.1±5.0歳) を用いた。Tregは, 末梢血から単核細胞を分離し, CD4, CD25抗体と反応させた後, 細胞固定・細胞膜透過を行い, Foxp3モノクローナル蛍光抗体を反応させ, フローサイトメトリーで測定した。Th17は末梢血単核細胞を培養液中でPMAやionomycinで4時間刺激し, 細胞固定・細胞膜透過後に抗CD4抗体と抗IL-17a抗体と反応させ, フローサイトメトリーで測定した。Tregは単核細胞におけるCD4+細胞中のCD25+Foxp3+分画の比率により, Th17についてはCD4+細胞中のIL-17A+の比率により測定した。

【結果】対照群におけるTreg/CD4 (%) (Treg値)

の平均は $5.0 \pm 0.6\%$ で、年齢による差は認められなかった。患者の病期毎（活動期、寛解期）における Treg 値を対照群と比較したところ、症状に伴って変動した。即ち、活動時 Treg 値 ($3.3 \pm 1.3\%$) は明らかに対照群と比較し有意に低値であったが、($p=0.04$)、寛解期は有意に増加した ($4.8 \pm 1.7\%$)。寛解期と対照群に差は認められなかった。〈症例提示〉1 例目は眼筋型 MG の 13 歳男児。初診時の Treg 値は 2.6% と低値であった。症状の改善とともに 5% 以上に増加した。1 回目の再発時の Treg 値は 1.1% 、寛解期には 5.3% まで上昇した。2 回目の再発時は 2.0% と有意に低値で、タクロリムス併用による症状改善とともに再び増加した。2 例目は 2 歳 7 か月発症の眼筋型 MG の女児。Prednisolone (PSL) とウブレチドで 2 年以上の寛解が保たれていた。寛解中は対照群と同等の値で推移していたが、再発時（6 歳時）における Treg 値は 1.8% と著しく低値となった。PSL の増量と症状改善とともに 6.4% に増加した。経時的に測定できた 6 例では、再発時は寛解時に比べ Treg 値は著しく低かった ($p=0.003$)。一方、Th17/CD4 (%) (Th17 値) は、活動期、寛解期、対照群との間で有意差を認めなかった。

【考察】CD4 陽性 T 細胞から産生されるサイトカインやケモカインを介して B 細胞の抗体産生を促すことが、MG の主要な免疫学的病態と考えられている。成人無治療 MG 症例では末梢血中の Treg 数が減少し、免疫抑制療法で増加するという報告を受け、小児眼筋型 MG 症例において Foxp3 発現により評価した。その結果、成人と同様の結果が得られ、末梢血中の免疫寛容の低下が示唆された。また、経時的な測定により、Treg 値は症状に伴い変動することが判明した。特に、再発時の Treg 値が有意に低下することが明らかとなったことは、Treg が治療経過における病勢の指標となる可能性を示すものであった。今回の検討では Th17 値の上昇を認めず本疾患への関与は明らかではなかった。小児 MG 患者では、数の異常はないものの、Th1/Th2 バランスに異常をきたし、自己抗体の産生に影響を及ぼしていることが示唆されるため、今後も他の免疫パラメーターと合わせ、多数例での検討が必要と思われる。

（論文審査の結果の要旨）

重症筋無力症 (MG) は自己免疫疾患の 1 つで、ステロイドやタクロリムス (Tac) 等の免疫抑制・調整薬による治療が主体となるが、免疫学的病態について

は未だ不明な点が多い。近年の報告で、成人 MG の免疫学的異常として制御性 T 細胞 (以下 Treg) の関与が示されている。しかし、小児における報告はほとんどないため、本研究で末梢血液中の Treg 数と Th17 数を測定し、免疫学的特徴を明らかにした。また、これらが病勢の評価に有用であるかを検証した。

その結果、西村らは次の結論を得た。

1. 対照群における Treg/CD4 (%) (Treg 値) の平均は $5.0 \pm 0.6\%$ で、年齢による差は認められなかった。
2. 患者の病期毎（活動期、寛解期）における Treg/CD4 (%) 値は症状に伴って変動した。即ち、活動時 ($3.3 \pm 1.3\%$) は明らかに対照群 ($5.0 \pm 0.6\%$) と比較し有意に低値であったが ($p=0.04$)、寛解期は有意に増加した ($4.8 \pm 1.7\%$)。寛解期と対照群に差は認められなかった。
3. 症例提示：1 例目は 13 歳男児で、初診時の Treg 値は 2.6% 、症状の改善とともに 5% 以上に増加した。1 回目の再発時の Treg 値は 1.1% 、寛解期には 5.3% まで上昇した。2 回目の再発時は 2.0% と有意に低値で、タクロリムス併用による症状の改善とともに再び増加した。2 例目は 2 歳 7 か月の女児で、prednisolone (PSL) とウブレチドで 2 年以上の寛解が保たれ、寛解中は対照群と同等の値で推移していたが、再発時（6 歳時）における Treg 値は 1.8% と著しく低値であった。PSL の増量と症状改善とともに 6.4% に増加した。
4. 経時的に測定できた 6 例では、再発時は寛解時に比べ Treg 値は著しく低かった ($p=0.003$)。
5. 今回の検討では、Th17/CD4 (%) (Th17 値) の上昇を認めず本疾患への関与は明らかではなかった。

CD4 陽性 T 細胞から産生されるサイトカインやケモカインを介して B 細胞の抗体産生を促すことが、MG の主要な免疫学的病態と考えられている。成人無治療 MG 例では末梢血中の Treg 数が減少し、免疫抑制療法で増加するという報告を受け、小児眼筋型 MG 症例において Foxp3 発現により Treg 値を評価した。その結果、成人と同様の結果が得られ、末梢血中の免疫寛容の低下が示唆された。また、経時的な測定により、Treg 値は症状に伴い変動することが明らかになったことは、小児眼筋型 MG 患者の病態および治療経過における病勢の指標に繋がる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。

PPAR α -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice (ライディッヒ細胞における PPAR α 依存的なコレステロール・テストステロンの枯渇が2,4-ジクロロフェノキシ酢酸暴露によるマウス精巣毒性を引き起こす)

原 田 由 紀 子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) は水田や芝の除草に広く用いられている除草剤であるが、内分泌攪乱物質の可能性が指摘されている。過去の疫学調査では、除草剤散布者に男性不妊や精子異常の頻度が高いことが報告されているが、これらの直接的因果関係と分子機構に言及した研究は皆無である。2,4-D は肝細胞においてペルオキシソームを増殖させること、それを主に仲介する α 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR α) が精巣ではライディッヒ細胞に多く発現することから、我々は2,4-Dによる精巣毒性が PPAR α を介して生じるのではないかとの仮説を立てた。本研究は、作業仮説の検証とその分子機構の解明を目的とした。

【方法】 野生型・PPAR α ノックアウトマウス (16-20週齢, Sv/129系統) に2,4-D (130 mg/kg/day) あるいはvehicleを2週間経口投与し (各群8匹), 精巣の変化を病理組織学的に解析した。また2,4-D投与マウスからライディッヒ細胞を単離し, コレステロール含有量や定量 PCR 法によるコレステロール・テストステロン代謝関連遺伝子の発現を計測した。最後にオス野生型・PPAR α ノックアウトマウスに2,4-Dを投与しつつメス野生型マウスと交配させ, 妊娠率や総出生児数を調べた。

【結果】 2週間の2,4-D投与により, 野生型マウスだけに精巣内テストステロンの著明な減少, 精子細胞やセルトリ細胞の変性が見られた。同時にライディッヒ細胞ではテストステロンの前駆物質であるコレステロール滴の消失が認められ, これはコレステロール合成酵素である HMG-CoA synthase 1と HMG-CoA reductase の発現低下に起因していた。一方, コレステロールからテストステロンに変換する酵素群の発現量には顕著な変化が見られなかったため, ライディッヒ細胞における PPAR α 依存的なコレステロール合成障害・枯渇がテストステロン減少や精細胞傷害に関連していると考えられた。妊娠率や出生児数は2,4-D投与下の野生型マウスで低下した。上述の一連の変化

は, 2,4-Dを投与した PPAR α ノックアウトマウスでは観察されなかった。

【結論】 PPAR α が2,4-Dによる精巣毒性に関与しており, その分子機構としてライディッヒ細胞でのコレステロール・テストステロン恒常性の破綻が考えられた。本研究は, 代表的除草剤である2,4-Dによる精巣毒性や男性不妊の発生機構を解釈する上で, 新たな知見を提示している。

(論文審査の結果の要旨)

2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) は水田や芝に広く用いられている除草剤である。2,4-D散布者に精子異常症の頻度が高いことが報告されているが、これらの因果関係と分子機構を調べた研究は皆無である。2,4-D は肝細胞においてペルオキシソームを増殖させること、それを仲介する α 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR α) が精巣ではライディッヒ細胞に多く発現することから、原田は2,4-Dによる精巣毒性が PPAR α を介して生じるのではないかとの仮説を立てた。そこで、野生型・PPAR α ノックアウトマウス (16-20週齢, Sv/129系統) に2,4-D (130 mg/kg/day) あるいは vehicle を2週間経口投与し (各群8匹), 精巣の変化を解析した。また2,4-D投与マウスからライディッヒ細胞を単離し, コレステロール含有量や定量 PCR 法によるコレステロール・テストステロン代謝関連遺伝子の発現を計測した。最後にオス野生型・PPAR α ノックアウトマウスに2,4-Dを投与しつつメス野生型マウスと交配させ, 妊娠率や総出生児数を調べた。

その結果、以下の成績を得た。

1. 2,4-D投与により, 野生型マウスだけに精巣内テストステロンの著明な減少, 精子細胞やセルトリ細胞の変性が見られた。
2. ライディッヒ細胞ではテストステロンの前駆物質であるコレステロール滴の消失が認められ, これはコレステロール合成酵素である HMG-CoA synthase 1と HMG-CoA reductase の発現低下に起因していた。

3. 一方, コレステロールからテストステロンに変換する酵素群の発現量には顕著な変化が見られなかった。
 4. 妊娠率や出生児数は2,4-D投与下の野生型マウスで低下した。
 5. 上述の変化は, 2,4-Dを投与した PPAR α ノックアウトマウスでは観察されなかった。
- 以上より, PPAR α が2,4-Dによる精巣毒性に関与

しており, その分子機構としてライディッヒ細胞でのコレステロール・テストステロン恒常性の破綻が考えられた。本研究は, 代表的除草剤である2,4-Dによる精巣毒性や男性不妊の発生機構を解釈する上で, 新たな知見を提示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。