

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
福家 愛 (外科学(2))	甲第1134号	30. 3. 31	Increased Expression of Y-Box-Binding Protein-1 in Hind-Limb Muscles During Regeneration from Ischemic Injury in Mice (マウス後肢の虚血性傷害からの再生過程で筋肉内の Y-Box-Binding Protein-1が増加する)	佐々木克典	杠 俊介 柴 祐司
境澤 隆夫 (加齢生物学)	甲第1135号	30. 3. 31	Potential Roles of ASC, a Proapoptotic Protein, for Determining the Cisplatin Susceptibility of Lung Cancer Cells (アポトーシス促進性蛋白質である ASC は肺癌細胞のシスプラチン感受性を決定する役割を担う)	樋口 京一	小泉 知展 塩 沢 丹里
胡 暁 (代謝制御学)	甲第1136号	30. 9. 30	PPAR α protects against trans-fatty-acid-containing diet-induced steatohepatitis (PPAR α はトランス脂肪酸含有食誘発性脂肪性肝炎に対し保護的に作用する)	樋口 京一	駒 津 光久 多 田 剛
松 葉 友幸 (運動機能学)	甲第1137号	30. 9. 30	Osteoarthritis Progression of the Shoulder: A Long-Term Follow-Up After Mini-Open Rotator Cuff Repair (ミニオープン法による腱板修復術後長期経過例における肩関節症性変化の特徴)	中山 淳	伊 藤 研一 塩 沢 丹里
一萬田正二郎 (病理組織学)	甲第1138号	30. 3. 31	Usefulness of gastroduodenal biopsy in the differential diagnosis of systemic AH amyloidosis from systemic AL amyloidosis (全身性 AH アミロイドーシスと全身性 AL アミロイドーシスの鑑別における胃十二指腸生検の有用性)	樋口 京一	中山 淳 関 島 良樹
霍 佳 (加齢生物学)	甲第1139号	30. 3. 31	Coenzyme Q10 Prevents Senescence and Dysfunction Caused by Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells (コエンザイム Q10 は血管内皮細胞の酸化ストレスに起因する老化や機能障害を抑制する)	山田 充彦	竹 下 敏一 柴 祐司
伊 東 哲宏 (内科学(2))	甲第1140号	31. 3. 31	Resection depth and layer of cold snare polypectomy versus endoscopic mucosal resection (コールドスネアポリペクトミーと内視鏡的粘膜切除術の切除深度と切除層の比較)	中山 淳	小泉 知展 塩 沢 丹里
鈴木 宏 (スポーツ 医学)	甲第1141号	30. 3. 31	Effects of 5-aminolevulinic acid supplementation on home-based walking training achievement in middle-aged depressive women: randomized, double-blind, crossover pilot study (5-アミノレブリン酸摂取の中年うつ女性患者における home-based ウォーキングトレーニング実施率に与える効果—無作為二重盲検クロスオーバーパイロットスタディー)	鷲 塚 伸介	関 島 良樹 樋 口 京一

審査学位論文要旨

李 穎輝 (歯科口腔 外科学)	甲第1142号	29. 9.30	Effects of a micro-thread at the implant neck on securing the quantity and quality of bone formation around implants (インプラント体の頸部マイクロスレッド形状は同部の新生骨量/骨質に影響を及ぼす)	佐々木克典	本郷一博 榎 俊介
加藤あかね (内科学(1))	甲第1143号	30. 3.31	Virtual bronchoscopic navigation as an aid to computed tomography-guided transbronchial biopsy improves the diagnostic yield for small peripheral pulmonary lesions (バーチャルナビゲーションによる、CTガイド下経気管支肺生検における末梢肺小病変の診断率の向上)	小泉知展	本郷一博 伊藤研一
和田洋典 (内科学(1))	甲第1144号	31. 3.31	Diversity of respiratory impedance based on quantitative computed tomography in patients with COPD (定量CTに基づくCOPD患者における呼吸インピーダンスの多様性)	駒津光久	本田孝行 中山 淳
道永祐希 (外科学(2))	甲第1145号	30. 9.30	Hemolytic Characteristics of Three Suctioning Systems for Use with a Newly Developed Cardiopulmonary Bypass System (新しく開発した人工心肺システムで使用する3つの吸引システムの溶血特性に関する研究)	川真田樹人	桑原宏一郎 柴 祐司
五味潤俊仁 (外科学(2))	甲第1146号	30. 9.30	Impact of Frailty on Outcomes in Acute Type A Aortic Dissection (A型急性大動脈解離におけるフレイルの影響)	今村 浩	桑原宏一郎 山田充彦
立石文子 (病理組織学)	甲第1147号	31. 3.31	Histopathological findings of pregnancy-induced hypertension: histopathology of early-onset type reflects two-stage disorder theory (妊娠高血圧症候群の病理組織学的所見は早発型において二段階発症説を反映している)	塩沢丹里	佐々木克典 中山 淳
郭 然 (代謝制御学)	甲第1148号	30. 9.30	Effects of hypertension and antihypertensive treatments on sulfatide levels in serum and its metabolism (高血圧や降圧治療は血清スルファチドレベルとその代謝に影響する)	沢村達也	菅野祐幸 平塚佐千枝
平林一貴 (循環病態学)	甲第1149号	31. 3.31	Development of a novel model of central retinal vascular occlusion and the therapeutic potential of the adrenomedullin-RAMP2 system (網膜中心血管閉塞モデルの新規開発とアドレノメデュリン-RAMP2系の治療応用への可能性)	菅野祐幸	多田 剛 田 潤克彦
大場悠己 (運動機能学)	甲第1150号	31. 3.31	Predictors of improvement in low back pain after lumbar decompression surgery: Prospective study of 140 patients (下肢神経症状に伴う腰痛の手術後変化～腰痛は除圧のみで改善するのか～)	川真田樹人	本郷一博 本田孝行
齊藤博美 (内科学(2))	甲第1151号	30. 3.31	KIR2DL2 combined with HLA-C1 confers risk of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in younger patients (KIR2DL2とHLA-C1の組み合わせはC型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の若年発症リスクと関連する)	古庄知己	小泉知展 伊藤研一

審査学位論文要旨

中村 晃 (内科学(2))	甲第1152号	31. 3.31	Predictive Factors for Autoimmune Pancreatitis Relapse After 3 Years of Maintenance Therapy (維持療法3年以降の自己免疫性膵炎再燃リスク因子)	花岡正幸	石塚 修 竹下敏一
山崎 智生 (内科学(2))	甲第1153号	31. 3.31	Association of Serum Autotaxin Levels with Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C (C型慢性肝炎患者における血清 Autotaxin の肝線維化マーカーとしての有用性)	関島良樹	花岡正幸 平塚佐千枝
ENAS AHMED FATHALLA KASEM (分子細胞 生理学)	甲第1154号	31. 3.31	Deficiency of calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) disrupts the excitatory-inhibitory balance of synapses by down-regulating GluN2B (CASK欠損でGluN2Bの発現低下による興奮性・抑制性シナプスのバランス異常をきたす)	古庄知己	沢村達也 関島良樹
江澤直樹 (加齢生物学)	甲第1155号	31. 3.31	Visualization of multiple organ amyloid involvement in systemic amyloidosis using ¹¹ C-PiB PET imaging (¹¹ C-PiB PETを用いた全身性アミロイドーシスにおける多臓器アミロイド沈着の評価)	樋口京一	桑原宏一郎 平塚佐千枝
小嶋俊介 (病態解析 診断学)	甲第1156号	31. 3.31	Comparison of administration of platelet concentrates suspended in M-sol or BRS-A for pediatric patients (小児患者におけるM-solまたはBRS-Aに浮遊させた血小板製剤投与の比較)	本田孝行	栗田 浩 関島良樹
大谷真紀 (病理組織学)	甲第1157号	30. 3.31	Lower number of 5-hydroxymethylcytosine-expressing cells in plasma cell myeloma than in reactive plasma cell hyperplasia: A useful immunohistochemical approach for identification of neoplastic plasma cells (多発性骨髄腫では反応性形質細胞過形成と比較して5-ヒドロキシメチルシトシン発現細胞の減少が見られる: 腫瘍性形質細胞の同定に有用な免疫組織化学的手法)	小泉知展	中山 淳 奥山隆平
長汐沙千穂 (歯科口腔 外科学)	甲第1158号	31. 3.31	Water intake increases mesenteric lymph flow and the total flux of albumin, long-chain fatty acids, and IL-22 in rats: New concept of absorption in jejunum (水の摂取によりラットの腸管膜リンパ流量とアルブミン, 長鎖脂肪酸, IL-22の総量が増加する; 空腸における吸収の生理機能の新概念)	栗田 浩	田中榮司 川真田樹人
蜂谷 明 (小児医学)	甲第1159号	31. 3.31	Analysis of biomarker serum levels in IVIG and infliximab refractory Kawasaki disease patients. (大量免疫グロブリン療法およびインフリキシマブ療法に不応である川崎病患者における血清バイオマーカーの解析)	中沢洋三	竹下敏一 桑原宏一郎

審査学位論文要旨

山ノ井万里子 (分子病理学)	甲第1160号	31. 3.31	Annexin A1 expression is correlated with malignant potential of renal cell carcinoma (腎細胞癌におけるアネキシン A1の発現は、悪性度と相関する)	石塚 修	小泉知展 伊藤研一
NAGM ALHUSAIN (脳神経 外科学)	甲第1161号	31. 3.31	Watertight Robust Osteoconductive Barrier For Complex Skull Base Reconstruction: An Expanded-Endoscopic Endonasal Experimental Study. (WRO バリヤー: 広範頭蓋底腫瘍に対する経鼻内視鏡手術における新たな頭蓋底再建法)	多田 剛	宇佐美真一 杠 俊介
山田 洋 輔 (代謝制御学)	甲第1162号	30. 3.31	Impact of Chronic Kidney Dysfunction on Serum Sulfatides and Its Metabolic Pathway in Mice (マウスにおける慢性腎機能障害が血清スルファチドとその代謝経路に与える影響)	石塚 修	桑原宏一郎 沢村 達也
張 昊 (麻酔蘇生学)	甲第1163号	30. 9.30	Prostanoid EP4 receptor-mediated augmentation of I _h currents in A β dorsal root ganglion neurons underlies neuropathic pain (プロスタノイド EP4受容体を介した A β 後根神経節細胞の I _h 電流増大が神経障害性疼痛を引き起こす)	加藤博之	本郷一博 樋口京一
吉村伸彦 (歯科口腔 外科学)	甲第1164号	30. 3.31	Glycogen metabolism in an oral dysplastic/cancerous (iodine-negative) epithelium: Glycogen was consumed in the pentose phosphate pathway, not in glycolysis (口腔異型上皮/扁平上皮癌(ヨード不染域)におけるグリコーゲン代謝に関する検討: グリコーゲンは解糖系ではなく、ペントースリン酸系経路において消費される)	小泉知展	中山 淳 宇佐美真一
浅井由佳 (精神医学)	甲第1165号	31. 3.31	Associations of Autism Spectrum Quotient and Personality Profiles with Eating Behaviors in Patients with Anorexia Nervosa and in a Non-clinical Population (神経性やせ症と健常群における摂食態度と自閉症スペクトラム指数およびパーソナリティプロフィールの関連)	中沢洋三	駒津光久 関島良樹
吉田和薫 (運動機能学)	甲第1166号	31. 3.31	Clinical outcome of osteosarcoma and its correlation with programmed death-ligand 1 and T-cell activation markers (骨肉腫の臨床成績および programmed death-ligand1, T細胞活性マーカーとの相関)	佐々木克典	瀧 伸介 駒津光久
櫻井伸一 (歯科口腔 外科学)	甲第1167号	31. 3.31	A longitudinal study on the relationship between dental health and metabolic syndrome in Japan (日本における歯科疾患とメタボリックシンドロームの関連性についての縦断的研究)	野見山哲生	本田孝行 駒津光久
大橋信彦 (内科学(3))	甲第1168号	31. 3.31	Electrophysiological demyelinating features in hereditary ATTR amyloidosis (遺伝性 ATTR アミロイドーシスにおける電気生理学的脱髄所見)	加藤博之	本田孝行 樋口京一

審査学位論文要旨

大久保洋輔 (内科学(4))	甲第1169号	30. 3.31	Loss of μ -crystallin causes PPAR γ activation and obesity in high-fat diet-fed mice (μ -crystallin (CRYM) の欠損が高脂肪食負荷マウスで PPAR γ の活性化と肥満を誘発する)	樋口京一	山田充彦 田渕克彦
唐澤今人 (歯科口腔 外科学)	甲第1170号	30. 3.31	A Cross-sectional Multivariate Analysis of the Relationship Between Dental Health and Metabolic Syndrome (横断的多変量解析による歯科疾患とメタボリックシンドロームの関連についての検討)	駒津光久	桑原宏一郎 浅村英樹
関戸貴志 (内科学(4))	甲第1171号	30. 3.31	Long-term Effects of Ipragliflozin on Adipose Tissue in Japanese Patients with Obese Type 2 Diabetes (肥満症合併日本人2型糖尿病患者におけるイプラグリフロジンによる長期的体脂肪減量効果)	桑原宏一郎	田中榮司 花岡正幸
小松雅俊 (運動機能学)	甲第1172号	30. 3.31	Increase in phospholamban content in mouse skeletal muscle after denervation (除神経モデルマウスの骨格筋におけるホスホランバンの発現量の増加)	柴祐司	瀧伸介 菅野祐幸
酒井洋徳 (歯科口腔 外科学)	甲第1173号	31. 3.31	A retrospective analysis of the prevalence of dental diseases in patients with digestive system cancers (消化器癌患者の歯科疾患有病率に関する回顧的分析)	平塚佐千枝	本郷一博 伊藤研一
小森一寿 (小児医学)	甲第1174号	30. 3.31	Ovarian function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and young adults given 8-Gy total body irradiation-based reduced-toxicity myeloablative conditioning (8-Gy 全身放射線照射をベースとした前処置後に同種造血幹細胞移植を実施した女兒における性腺機能の検討)	小泉知展	塩沢丹里 石塚修
大久保洋平 (免疫制御学)	甲第1175号	30. 3.31	Generation of a common innate lymphoid cell progenitor requires interferon regulatory factor 2 (自然リンパ球共通前駆細胞の分化成熟におけるインターフェロン制御因子-2の役割)	竹下敏一	菅野祐幸 平塚佐千枝
三浦健太郎 (外科学(2))	甲第1176号	31. 3.31	FGF2-FGFR1 pathway activation together with thymidylate synthase upregulation is induced in pemetrexed-resistant lung cancer cells (ペメトレキセド耐性肺癌細胞では FGF2-FGFR1 経路の活性化と thymidylate synthase の発現上昇が誘導される)	小泉知展	塩沢丹里 花岡正幸
中嶋智之 (病態解析 診断学)	甲第1177号	31. 3.31	Distribution of Lgr5-positive cancer cells in intramucosal gastric signet-ring cell carcinoma (胃粘膜内印環細胞癌における Lgr5陽性癌細胞の分布)	本田孝行	中山淳 多田剛

審査学位論文要旨

氏名 (所属)	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
徳武千足 (母子保健学)	甲第23号	30. 3.31	Infant Suffocation Incidents Related to Co-Sleeping or Breastfeeding in the Side-Lying Position in Japan (日本における添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験頻度と関連要因)	平林優子	伊澤 淳 金井 誠
芳賀亜紀子 (母子保健学)	甲第24号	30. 3.31	Autonomic Nervous System Changes in Term Infants during Early Skin-to-skin Contact (SSC): Examination of SSC Effectiveness and the Influence of Meconium-stained Amniotic Fluid (早期母子接触中の正期産新生児の自律神経機能の変化～早期母子接触の有効性と羊水混濁の影響に関する検討～)	平林優子	藤本圭作 金井 誠
浦 みどり (医療生命科学)	甲第25号	30. 3.31	Relationship between sleep-disordered breathing and sleeping position at the 37th week of pregnancy: an observational cross-sectional study (妊娠37週における睡眠呼吸障害と睡眠時姿勢との関係: 観察横断研究)	金井 誠	市川元基 藤本圭作
島田 岳 (成人保健学)	甲第26号	30. 3.31	A multicenter, randomized controlled trial of individualized occupational therapy for patients with schizophrenia in Japan (統合失調症に対する個別作業療法: 多施設共同ランダム化比較試験)	杉山暢宏	上村智子 小林正義
太田佳織 (成人保健学)	甲第27号	31. 3.20	Effects of sudden unexpected mechanical perturbation training aimed at the primary prevention of inversion ankle sprain on reactivity of ankle movement and cortical activity in normal young adults (若年健常成人における足関節内反捻挫の一次予防を目的とした不意で突発的な機械的外乱トレーニングが足関節運動の反応性と皮質活動に及ぼす影響)	百瀬公人	木村貞治 横川吉晴
長谷川 文 (老年保健学)	甲第28号	31. 3.20	Development of the Japanese version of the Westmead Home Safety Assessment for the elderly in Japan (日本の高齢者における Westmead Home Safety Assessment 日本語版の開発)	小林正義	務臺 均 上村智子
黒崎真樹 (成人保健学)	甲第29号	31. 3.20	Intertrial rest for maximum grip and key pinch strength in Japanese young adults (日本人若者を対象とした最大握力測定および鍵ピンチ力測定の試行間休憩時間)	横川吉晴	木村貞治 百瀬公人
前山佳彦 (医療生命科学)	甲第30号	31. 3.20	Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from canine and feline clinical specimens in Japan (国内のイヌ及びネコの臨床材料から分離された第三代セファロスポリン耐性 Enterobacteriaceae における ESBL/AmpC 遺伝子及び特定クローンの分布)	奥村伸生	長野則之 小穴こず枝

Increased Expression of Y-Box-Binding Protein-1 in Hind-Limb Muscles During Regeneration from Ischemic Injury in Mice (マウス後肢の虚血性傷害からの再生過程で筋肉内の Y-Box-Binding Protein-1が増加する)

福 家 愛

(論文の内容の要旨)

【はじめに】末梢動脈疾患 (Peripheral arterial disease; PAD) は近年増加しているが、重症下肢虚血 (Critical limb ischemia; CLI) は、その中でも最も重篤な合併症であり、その予後は不良である。現在 PAD の進行を防ぐために、高血圧、糖尿病、高脂血症などの管理、抗血小板薬などの薬物治療や、虚血肢に対するバイパス手術や血管内治療が行われているが、CLI 後の組織修復の分子生物学的機序を解明することは、PAD の進行を防ぐために必須である。Y-box binding protein-1 (YB-1) は、様々な環境ストレスにตอบสนองして様々な遺伝子の発現を調節していることが知られている。今回、マウス虚血肢モデルを用い、YB-1が虚血からの筋組織再生過程に関与しているかを解析した。

【対象と方法】6-7w の BALB/c マウスの左後肢の大腿動脈、伏在動脈および膝窩動脈を結紮し、虚血肢モデルを作成 (虚血群) し、右後肢は皮膚切開のみをおき、対照群とした。両群において、0日目 (手術前) および手術後 1, 2, 7, 10, 14日目に後肢を採取し、大腿二頭筋、内転筋、大腿直筋、および薄筋の HE 染色での病理組織学的解析を行い、免疫組織染色で CD31, MyoD, YB-1, α -smooth muscle actin (α SMA), smooth muscle myosin heavy chain (SMemb) の発現を解析した。また RT-PCR 法で組織内の MyoD, YB-1, α SMA の mRNA 発現を解析した。

【結果】対照群では14日目までに組織学的な変化を認めなかったが、虚血群では手術後 1, 2日目に筋組織内に炎症性細胞の浸潤を認め、7日目には正常筋組織の減少と脂肪変性を認めた。7日目には筋管細胞の増加による筋再生が始まっており、その後再生された筋肉の体積は徐々に増加した。RT-PCR 法での解析では、虚血群で YB-1 の mRNA 発現は虚血性傷害後に増加し、2日目に最も高くなり、その後減少した。また MyoD と α SMA の mRNA 発現は7日目に最も高くなり、対照群に比べ有意に発現が増加していた。免疫組織染色での解析で、虚血群では7日目以後に CD31 と MyoD の発現が増加し、微小血管と筋管細胞の増加を認めた。YB-1, α SMA, SMemb は 7-10日

に一過性の発現上昇を認め、14日目には減少した。また、10日目の連続切片を用いた解析では、MyoD が発現する筋管細胞に YB-1, α SMA, SMemb が共発現していた。

【考察】マウス後肢の虚血性傷害からの修復過程で、YB-1が術後 2-10日の虚血後早期に発現が上昇し、筋管細胞に YB-1が発現していたことから、骨格筋筋芽細胞が筋管細胞、筋組織へと成熟する過程に YB-1が関与している可能性が示唆された。また筋管細胞に平滑筋マーカーである α SMA, SMemb の発現を認めたことから、骨格筋内の筋芽細胞が、平滑筋細胞に分化する可能性が推測された。

【結論】マウス後肢の筋組織の虚血性傷害からの再生過程に、YB-1が関与していると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

末梢動脈疾患 (Peripheral arterial disease; PAD) は近年増加しているが、重症下肢虚血 (Critical limb ischemia; CLI) は最も重篤な合併症で、その予後は不良である。現在 PAD の治療として、高血圧、糖尿病、高脂血症などの管理、抗血小板薬などの薬物治療、虚血肢に対するバイパス手術や血管内治療が行われている。CLI 後の組織修復の分子生物学的機序を解明することは PAD の進行を防ぐために必須である。Y-box binding protein-1 (YB-1) は、様々な環境ストレスにตอบสนองして様々な遺伝子の発現を調節している。今回マウス虚血肢モデルを用い、YB-1が虚血性傷害からの修復過程に関与しているかを解析した。

6-7w の BALB/c マウスの左後肢の大腿動脈、伏在動脈および膝窩動脈を結紮し、虚血肢モデルを作成 (虚血群) し、右後肢は皮膚切開のみをおき、対照群とした。両群とも 0日目 (手術前)、手術後 1, 2, 7, 10, 14日目に後肢を採取し、HE 染色で組織学的解析を行い、免疫組織染色で CD31, MyoD, YB-1, α -smooth muscle actin (α SMA), smooth muscle myosin heavy chain (SMemb) の発現を解析した。また RT-PCR 法で MyoD, YB-1, α SMA の mRNA 発現を解析した。

その結果、福家は次の結論を得た。

1. 対照群では14日目までに組織学的変化を認めなかったが、虚血群では手術後1, 2日目に炎症性細胞の浸潤を認め、7日目には正常筋組織の減少と脂肪変性を認めた。7日目には筋管細胞の増加による筋再生が始まっており、その後再生筋の体積は徐々に増加した。
2. 免疫組織染色では、虚血群は7日目以後にCD31とMyoDの発現が増加し、微小血管と筋管細胞の増加を認めた。YB-1, α SMA, SMembは7-10日に一過性の発現上昇を認め、14日目には減少した。また10日目の連続切片を用いた解析では、MyoDが発現する筋管細胞にYB-1, α SMA, SMembが共発現していた。
3. RT-PCR法で、虚血群でYB-1のmRNA発現は

虚血性傷害後に増加し、2日目に最も高くなり、その後減少した。またMyoDと α SMAのmRNA発現は7日目に最も高くなり、対照群に比べ有意に発現が増加していた。

これらの結果より、マウス後肢の虚血性傷害からの修復過程で、YB-1が術後2-10日の虚血後早期に発現が上昇し、筋管細胞に発現していることから、筋芽細胞が筋管細胞、筋組織へと成熟する過程にYB-1が関与している可能性が示唆された。また筋管細胞に平滑筋マーカーである α SMA, SMembの発現を認めたことから、骨格筋内の筋芽細胞が、平滑筋細胞に分化する可能性が推測された。

以上に対し、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。

Potential Roles of ASC, a Proapoptotic Protein, for Determining the Cisplatin Susceptibility of Lung Cancer Cells (アポトーシス促進性蛋白質であるASCは肺癌細胞のシスプラチン感受性を決定する役割を担う)

境 澤 隆 夫

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 肺癌は予後不良な癌腫の一つで、進行症例には薬物治療としてシスプラチンを基盤とした化学療法が考慮される。しかし、使用中に薬剤耐性を示すことが知られており、耐性化の克服が課題となっている。一方、Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC)は自然免疫におけるインフラマソームの構成蛋白質の一つとして知られている。また、ASCはアポトーシスシグナル系に関与し、細胞内で凝集する蛋白質として分子腫瘍学教室より報告された。肺癌をはじめ種々の悪性腫瘍細胞内では、メチル化によるASC遺伝子の発現低下が報告されているが、その生物学的意義については十分解明されていない。今回、我々は肺癌におけるASCの役割について詳細な解析を行った。

【対象と方法】 がん細胞株のデータベース検索 (Cancer Cell Line Encyclopedia)により、肺癌細胞株の中でA549細胞株のASC発現が比較的高いこと(186細胞株中15番目)が判明した。そこでA549細胞株においてレトロウイルスベクターを用いてshRNAを導入してASCをノックダウンし、増殖・遊走・浸潤能の解析を行った。更に、ASCノックダウン細胞の各種制癌剤に対する感受性を評価した。

【結果】 ASCをノックダウンしたA549細胞株は、そ

のコントロール細胞と比較して、細胞増殖能、コロニー形成能、遊走能、浸潤能が亢進していることが観察された。また、ASCノックダウン細胞を各種制癌剤で処理したところ、5-FUとタキサン系抗がん剤であるパクリタキセルに対しては作用に変化を認めなかったが、シスプラチンに対してASCノックダウン細胞が抵抗性を示すことが分かった。シスプラチン耐性化の機序について、過去に報告されている遺伝子群(NRF2, PPARGC1 β , ABCB1, ERCC1)についてリアルタイムPCR法でmRNAの発現を調べたところ、ASCノックダウン細胞とコントロール細胞の間に有意な差を認めなかった。次に、ASCがシスプラチンのアポトーシスシグナル伝達系のどの部位で作用しているのかを解析したところ、ウエスタンブロット法により抗アポトーシス機能を持つミトコンドリア蛋白質Bcl-2の発現が亢進していることが明らかになった。そこでBcl-2特異的阻害剤であるABT-199でA549細胞を処理したところ、ASCノックダウン細胞の増殖能が抑制された。更に、その他のシグナル伝達経路について解析した結果、ASCノックダウン細胞ではSrc蛋白質のリン酸化が亢進していることが確認された。そこでSrcリン酸化阻害剤であるダサチニブでA549細胞を処理すると、ASCノックダウン細胞の浸潤能が抑制された。またABT-199とダサチニブを併

用すると、各々の単独処理よりも更に ASC ノックダウン細胞の細胞増殖の抑制が可能であることが示された。

【考察】肺癌細胞株における ASC の発現低下は、悪性形質の獲得とシスプラチン耐性化をもたらし、Bcl-2の発現亢進と Src のリン酸化により引き起こされているものと考えられた。ASC ノックダウン細胞における Bcl-2阻害剤の増殖抑制効果と Src リン酸化阻害剤の浸潤抑制効果、更にそれらの併用による強い増殖抑制効果の事実は、シスプラチンに耐性化した肺癌細胞に対する新規治療法の可能性を示唆するものと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

種々の悪性腫瘍細胞内ではメチル化による ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) 発現低下が知られているが、特に肺癌細胞における ASC 遺伝子の発現低下の生物学的意義を検索することを目的として境澤は以下の実験を行った。

肺癌細胞株 A549においてレトロウイルスベクターを用いて ASC をノックダウンし、増殖・遊走・浸潤能を解析した。また、制癌剤に対する感受性を MTS 法を用いて評価した。ノックダウン効率はフローサイトメトリーで、各種遺伝子と蛋白質の発現はリアルタイム PCR とウエスタンブロッティングを用いて調べ

た。

その結果、境澤は次の結論を得た。

1. 肺癌細胞 A549では ASC ノックダウンにより細胞増殖能、遊走能、浸潤能が亢進していた。また各種制癌剤で刺激するとシスプラチンに対し耐性化を示した。
2. ASC ノックダウン細胞では Bcl-2発現が上昇し、更に Src のリン酸化が亢進していた。
3. ASC ノックダウン細胞では Bcl-2阻害剤 ABT-199が細胞増殖を抑制し、また Src 阻害剤ダサチニブは浸潤能抑制作用を示した。

これらの結果により、肺癌細胞株における ASC の発現低下は、悪性形質の獲得とシスプラチン耐性化をもたらすが、その原因として Bcl-2の発現上昇と Src のリン酸化亢進が関与しているものと考えられた。ASC ノックダウン細胞における Bcl-2阻害剤の増殖抑制効果と Src リン酸化阻害剤の浸潤抑制効果、更にそれらの併用による強い増殖抑制効果の事実は、シスプラチンに耐性化した肺癌細胞に対する新規治療法の可能性を示唆するものと考えられた。

以上に対し、本研究は基礎的解析を詳細に行い、臨床にも将来有用な情報を提供するものであり、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。

PPAR α protects against *trans*-fatty-acid-containing diet-induced steatohepatitis (PPAR α はトランス脂肪酸含有食誘発性脂肪性肝炎に対し保護的に作用する)

胡 暁

(論文の内容の要旨)

【Background and Aim】 *Trans*-fatty acids (TFA), unsaturated fatty acids (FA) containing *trans* double bonds, are reported to be more harmful to humans compared with other FA. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) is a ligand-activated nuclear receptor that regulates lipid homeostasis, inflammation, and immune responses, but the role of PPAR α in TFA-induced liver abnormalities remains unclear. The present study investigated the contribution of PPAR α to liver damage induced by TFA.

【Methods】 We gave two diets, a purified control diet and an isocaloric TFA-containing diet, to wild-type and *Ppara*-null mice for two months. After the treatment, the mice were killed and serum and liver

tissues were collected for biochemical analysis, histological analysis, quantitative polymerase chain reaction analysis, and immunoblot analysis. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA with Bonferroni's correction.

【Results】 *Ppara*-null mice fed a TFA-containing diet showed more severe hepatosteatosis and liver damage compared with similarly-treated wild-type mice, as revealed by increased hepatic triglyceride (TG) contents and serum alanine aminotransferase activities. While the TFA diet increased hepatic expression of enzymes involved in *de novo* FA synthesis and decreased TG-hydrolyzing enzymes in both genotypes, the expression of FA-catabolizing enzymes were decreased in *Ppara*-null mice only. Additionally,

the expression levels of key contributors to inflammation, such as osteopontin, were increased, and nuclear factor-kappa B was activated in TFA-containing diet-fed *Ppara*-null mice. Enhanced inflammatory signaling in these mice was presumably mediated by toll-like receptor 2, but not inflammasome activation. 【Conclusion】 PPAR α deficiency is more sensitive to TFA-induced steatohepatitis, indicating that PPAR α plays a protective role for dietary TFA-induced liver abnormalities.

(論文審査の結果の要旨)

Trans-fatty acids (TFA), unsaturated fatty acids (FA) containing *trans* double bonds, are reported to be more harmful to humans compared with other FA. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) is a ligand-activated nuclear receptor that regulates lipid homeostasis, inflammation, and immune responses, but the role of PPAR α in TFA-induced liver abnormalities remains unclear.

To examine the contribution of PPAR α to changes in liver phenotypes induced by TFA, two diets were used: a purified control diet and an isocaloric diet where most of the FA are replaced with TFA. The diets were fed to wild-type and *Ppara*-null mice for two months and liver phenotypes were examined.

その結果、「胡曉」は以下の結論を得た。

1. TFA-containing diet-fed *Ppara*-null mice developed more severe hepatic steatosis and inflamma-

tion compared with the similarly-treated wild-type mice.

2. The TFA-containing diet increased hepatic expression of enzymes involved in *de novo* FA synthesis and decreased TG-hydrolyzing enzymes in both genotypes, but the expression of FA-catabolizing enzymes were decreased in *Ppara*-null mice only.
3. More severe hepatitis observed in TFA-containing diet-treated *Ppara*-null mice was likely derived from increased toll-like receptor 2 expression and ensuing nuclear factor-kappa B activation.

The present results showed one of the mechanisms of steatogenesis caused by excessive TFA consumption and a protective role of PPAR α for TFA-induced liver abnormalities. Since hepatic expression of PPAR α is documented to be significantly reduced with fibrosis progression in the patients having non-alcoholic steatohepatitis, restriction of TFA intake might be useful for such patients. Additionally, therapeutic interventions to maintain PPAR α function might be beneficial to reduce TFA-induced hepatotoxicity.

これらの結果は、非アルコール性脂肪性肝炎の発症における食事中トランス脂肪酸や核内受容体 PPAR α の関与を理解するうえで、重要な知見であると考えられた。従って主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Osteoarthritis Progression of the Shoulder: A Long-Term Follow-Up After Mini-Open Rotator Cuff Repair (ミニオープン法による腱板修復術後長期経過例における肩関節症性変化の特徴)

松 葉 友 幸

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 腱板修復術後に変形性肩関節症 (OA) をしばしば経験するが、長期経過例における報告はない。OA に関連する因子として年齢、性別、人種、遺伝などの全身因子と荷重関節、外傷歴、肥満、関節構造の変化などの局所因子が挙げられる。広範囲腱板断裂では長期経過において OA が起こり、痛みが生じることになる腱板断裂症性関節症という病態があり、腱板断裂が OA の局所因子になりうる。また腱板断裂が修復されると OA にどのように影響するのか、腱

板修復後の再断裂の有無が OA に影響するかを検証した報告はない。

今回我々は、腱板修復術後の長期経過において OA が進行するか、腱板修復によって進行を防止できるか、術後の腱板の質が OA に影響するかを検討したため報告する。

【方法】 腱板断裂に対して同一術者によって mini-open repair 法施行後10年以上 (平均11.1年) を経過した141例144肩のうち両側罹患例、経過中に肩機能に影響を及ぼす疾患を発症した症例を除いた86例を対象とし

た。術前平均年齢60.4歳，男性46人，女性40人，右肩63例，左肩23例だった。術中断裂サイズは1 cm 未満が16例，1 cm 以上3 cm 未満が52例，3 cm 以上5 cm 未満が11例，5 cm 以上が7例だった。

術前と最終診察時に患側と健側の単純X線を肩内旋位，外旋位，挙上位にて撮影した。Samilson & Priet 分類を用いてOAの程度を評価し，両側間と術前後で比較した。最終診察時までにはOAが進行あり群と進行なし群に分けて2群間で患者背景，肩関節機能を比較した。さらに最終診察時のMRIで修復腱板の連続性が良好な群と不良な群にわけて2群間でOAの程度を比較した。

【結果】 術前後において高度なOAの症例はなかった。術前のOAは患側と健側の間で有意差を認めなかった。最終診察時までにはOAは患側で55%（変化なし39例，1ステージ進行41例，2ステージ進行6例），健側で19%（変化なし70例，1ステージ進行16例，2ステージ進行0例）が進行しており，両側共に術前より有意に進行していた。最終診察時のOAは患側が健側より有意に高度だった。

OAの進行あり群と進行なし群の比較では，患者背景に2群間で有意差がなかった。術前の肩関節機能が進行あり群において進行なし群と比較して有意に悪かった。術後の肩関節機能は進行あり群と進行なし群で有意差がなかった。

次に最終診察時の修復腱板の連続性が良好な群と不良な群を比較すると，術中の断裂サイズが不良な群の方が良好な群に比べて有意に大きかった。最終診察時において健側のOAは2群間で有意差を認めなかったが，患側の修復腱板の連続性が不良な群は良好な群より有意にOAが進行していた。

【考察】 肩関節のOAは健側，患側において進行するが，腱板修復側の方がより進行することが分かった。術前の肩関節機能が悪いと肩動作時に異常な動きが生じOAの危険因子となっている可能性があった。OAが進行しても術後の肩関節機能は変わらなかった。さらに腱板修復術後の良否によってOAの進行は影響を受けるので，OAの進行を抑えるためには腱板修復によって腱板の連続性を維持することが重要であると思われた。

(論文審査の結果の要旨)

腱板修復術後に変形性肩関節症(OA)をしばしば経験するが，長期経過例における報告はない。OAに関連する因子として全身因子と局所因子が挙げられる。

広範囲腱板断裂では長期経過においてOAが起こり，痛みが生じることになる腱板断裂症性関節症という病態があり，腱板断裂がOAの局所因子になりうる。また腱板断裂が修復されるとOAにどのように影響するか，腱板修復後の再断裂の有無がOAに影響するかを検証した報告はない。

今回我々は，mini-open repair法にて腱板修復術後に10年以上(平均11.1年)を経過した86例を調査した。術前と最終診察時に患側と健側の単純X線を肩内旋位，外旋位，挙上位にて撮影した。Samilson & Prietの分類を用いてOAの程度を評価して両側間と術前後で比較した。最終診察時までにはOAが進行あり群と進行なし群に分けて2群間で患者背景，肩関節機能を比較した。さらに最終診察時のMRIで修復腱板の連続性が良好な群と不良な群にわけて2群間でOAの程度を比較した。

その結果，松葉は次の結論を得た。

1. 肩関節のOAは腱板修復術を施行した患側と健側の両側において進行したが，腱板修復側の方がより進行した。
2. 術前の肩関節機能低下がOAの危険因子だった。
3. OAが進行しても術後の肩関節機能は変わらなかった。
4. 腱板修復術後の修復腱板の状態が良好であれば不良な症例よりOAの進行が少なかった。

今回の結果から，腱板修復術後の良否によってOAの進行は影響を受けるので，OAの進行を抑えるためには腱板修復によって腱板の連続性を維持することが重要であると思われた。

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。

Usefulness of gastroduodenal biopsy in the differential diagnosis of systemic AH amyloidosis from systemic AL amyloidosis (全身性 AH アミロイドーシスと全身性 AL アミロイドーシスの鑑別における胃十二指腸生検の有用性)

一萬田 正二郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】免疫グロブリン性アミロイドーシスには軽鎖由来の AL アミロイドーシスと重鎖由来の AH アミロイドーシスが含まれており、両者は予後が異なるため、治療方針の決定には鑑別が必要である。しかし、免疫組織化学的手法では両者の鑑別は非常に難しく、最終診断には生化学的な解析が必要となる場合が多い。だが、それらの解析は専門施設以外での施行は難しいため、解析が必要な症例の選択が重要である。我々は以前、診断後17年間無治療で経過した全身性 AH アミロイドーシスの剖検例を経験し、全身性 AH アミロイドーシスは全身性 AL アミロイドーシスと異なる沈着様式を示すことを見出した。この沈着様式の違いが、アミロイドーシスの診断でよく用いられる胃十二指腸生検材料で観察されるか検討した。加えて、その沈着様式により、AL と AH アミロイドーシスの鑑別が可能であるかの検討も行った。

【方法】当院で胃十二指腸生検を施行された症例で、アミノ酸解析などにより確定診断された全身性 AH アミロイドーシス 3 症例と、免疫組織化学的に確定診断された全身性 AL アミロイドーシス (κ : 8 症例, λ : 13 症例) 対象とし、アミロイド沈着のパターンを検討した。アミロイドの沈着は、組織学的な部位(粘膜固有層・粘膜筋板・粘膜下層, 十二指腸では粘膜固有層をさらに絨毛部とそれ以外に区分)毎に、認識可能となる対物レンズの倍率によってスコアリングし、通常観察および偏光観察での比較を行った。また、Congo red 染色と免疫染色の二重染色を行い、AH アミロイドの沈着部位の検討を行った。

【結果】AH アミロイドは胃および十二指腸生検材料で検出可能であった。特に十二指腸では、絨毛の小血管の分布と一致する領域に微細ドット状の沈着がみられた (dotted line-like deposition)。これは全身性 AH アミロイドーシスに特徴的であり、全身性 AL アミロイドーシスではみられなかった。また、Congo red 染色および免疫染色 (血管内皮, 基底膜) の二重染色から、この沈着は絨毛の小血管と一致することが示された。

【結論】全身性 AH アミロイドーシスは、①胃十二指腸生検で検出可能であること、②十二指腸の小血管壁に特徴的な沈着を示し、この沈着様式は全身性 AL アミロイドーシスではみられないことが明らかになった。加えて、剖検材料で沈着が目立った臓器との関連から、全身性 AH アミロイドーシスは有窓型毛細血管を主体に沈着を示すことが推測された。この病理組織学的特徴は、全身性 AL アミロイドーシスと全身性 AH アミロイドーシスの鑑別に有用であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

アミロイドーシスは原因となる蛋白質により病型が分類される。免疫グロブリン (Ig) 軽鎖由来の AL アミロイドーシスは最も代表的な病型であるが、同じく Ig 関連アミロイドーシスに分類される Ig 重鎖由来の AH アミロイドーシスは稀な症例とされている。心アミロイドーシスの合併率の違いから後者のほうが予後がよいとされており、両者の鑑別は治療方針の決定に重要である。しかし、両者の免疫組織化学的な鑑別は難しく、一部の AH アミロイドーシスは AL アミロイドーシスと診断されていることが推察される。我々は以前、AH アミロイドーシスの剖検例を経験し、両者ではアミロイド沈着の様式が異なることを見出した。本研究では、アミロイド沈着を証明する目的で広く行われている消化管生検材料で両者の鑑別が可能であるかの検討を行った。

信州大学医学部附属病院で胃十二指腸生検を施行された症例で、アミノ酸解析などにより確定診断された全身性 AH アミロイドーシス 3 症例と、免疫組織化学的に確定診断された全身性 AL アミロイドーシス 21 症例 (κ : 8 症例, λ : 13 症例) を対象とし、アミロイド沈着のパターンを検討した。アミロイドの沈着は、組織学的な部位(粘膜固有層・粘膜筋板・粘膜下層, 十二指腸では粘膜固有層をさらに絨毛部とそれ以外に区分)毎に、認識可能となる対物レンズの倍率によってスコアリングし、通常観察および偏光観察での比較を行った。また、Congo red 染色と免疫染色の二重染色を行い、AH アミロイドの沈着部位の検討を行った。

その結果、一萬田正二郎は次の結論を得た。

1. AH アミロイドは十二指腸生検材料で検出可能であった。特に十二指腸では、絨毛の小血管の分布と一致する領域に微細ドット状の沈着がみられた (dotted line-like deposition)。これは全身性 AH アミロイドーシスに特徴的であり、全身性 AL アミロイドーシスではみられなかった。
2. Congo red 染色および免疫染色 (血管内皮, 基底膜) の二重染色から、この沈着は絨毛の小血管と一致することが示された。
3. AH アミロイドは胃生検材料でも検出可能であったが、十二指腸でみられたような特異的な沈着様式

は観察されなかった。

これらの結果から、AH アミロイドーシスは消化管生検で検出が可能であり、特に十二支腸生検材料はAL アミロイドーシスとAH アミロイドーシスの鑑別に有用であることが明らかとなった。加えて、剖検材料で沈着が目立った臓器との関連から、全身性AH アミロイドーシスは有窓型毛細血管を主体に沈着を示すことが推察された。この病理組織学的特徴は、全身性AL アミロイドーシスと全身性AH アミロイドーシスの鑑別に有用であると考えられた。

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。

Coenzyme Q10 prevents senescence and dysfunction caused by oxidative stress in vascular endothelial cells (コエンザイム Q10は血管内皮細胞の酸化ストレスに起因する老化や機能障害を抑制する)

霍 佳

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】血管内皮細胞への酸化ストレスは内皮細胞の機能障害や動脈硬化において重要な役割を果たしているとされている。我々は、これまでに、還元型コエンザイム Q10 (CoQ₁₀H₂) の補給が老化促進モデルマウス (SAMP1) の促進老化を抑制すること (Yan J et al. Exp Gerontol 2006)、老化抑制効果には Sirt1 や Pgc-1α を介したミトコンドリア機能の改善が重要であること (Tian G et al. Antioxid Redox Signal 2014) を示唆してきた。さらに CoQ₁₀H₂ は肝細胞においてホスホジエステラーゼ (PDE) の発現を抑制して細胞内の cAMP の増加や AMPK の活性化を促進し、肥満に伴う脂質代謝を改善することも示唆した (Xu Z, et al. Sci Rep 2017)。本研究では、H₂O₂ による酸化ストレス負荷によって細胞老化を誘導した培養血管内皮細胞に対する、CoQ₁₀H₂ の酸化ストレス、アポトーシスおよび内皮細胞機能障害への保護作用を検証し、そのメカニズムの解明を行った。

【材料と方法】10 μM CoQ₁₀H₂ で24時間前処置したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs: human umbilical vascular endothelial cells) に100 μM H₂O₂ を添加して酸化ストレスを与え、細胞老化を誘導した。細胞老化 (SA-β-Gal 染色や SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype, 老化関連分泌表現型)、関連遺伝子群 (P14, P16, P53, P21, IL-1β, IL-6, TNF-α, MMP-1 および MMP-3) の転写発現の Real-time RT-PCR 解

析)、アポトーシス (Annexin V 測定)、ミトコンドリア機能 (JC-1 測定)、内皮細胞機能 (一酸化窒素: NO 産生量測定, 細胞移動能測定, チューブ形成能測定) を実施して、CoQ₁₀H₂ の血管内皮細胞保護効果を解析した。

【結果と考察】CoQ₁₀H₂ 前処置は、H₂O₂ による SA-β-Gal 陽性細胞数の増加を著しく減少させた。また、SASP 関連遺伝子の転写発現量の増加を抑制した。これらは、酸化ストレスによる細胞老化誘導に対する CoQ₁₀H₂ の保護作用を示すものである。さらに CoQ₁₀H₂ 前処置は高濃度グルコースによる細胞老化誘導にも保護作用を示した。CoQ₁₀H₂ 前処置は以下のような、H₂O₂ 添加による HUVECs の機能障害、1) アポトーシス陽性細胞数や pro-apoptosis 遺伝子発現 (BAX/BCL-2) の増加、2) 細胞内活性酸素種 (ROS) の増加や SOD2 発現量の低下、3) NO や NO 産生酵素遺伝子 (eNOS) の発現量減少、4) ミトコンドリア膜電位の低下や SIRT1, SIRT3, PGC-1α のミトコンドリア機能調整遺伝子発現量の減少、5) HUVECs の細胞移動能とチューブ形成能の減少、を抑制し、内皮細胞保護作用を示した。CoQ₁₀H₂ 前処置は、細胞内の CoQ₁₀H₂ 濃度や総 CoQ₁₀ に対する CoQ₁₀H₂ の比率の激的な増加をもたらした。対照的に、H₂O₂ 処理は細胞内の酸化型 CoQ₁₀ 濃度を激的に増加させたが、CoQ₁₀H₂ の前処置は酸化型 CoQ₁₀ の増加を抑制した。

【結論】以上の結果から、 H_2O_2 によって惹起される酸化ストレスに対し、 $CoQ_{10}H_2$ の投与が、血管内皮細胞の抗酸化能力を促進し、ミトコンドリア機能を増強することによって、細胞老化を抑制し、アポトーシスや血管内皮細胞の機能障害から保護することが示された。したがって、 $CoQ_{10}H_2$ 補給が、血管の老化や機能減退を遅延させる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

血管内皮細胞への酸化ストレスは内皮細胞の機能障害や動脈硬化において重要な役割を果たしていると考えられている。これまでに、還元型コエンザイム Q10 ($CoQ_{10}H_2$) の補給が老化促進モデルマウス (SAMP1) の促進老化を抑制すること、老化抑制効果には Sirt1 や Pgc-1 α を介したミトコンドリア機能の改善が重要であること、 $CoQ_{10}H_2$ は肝細胞においてホスホジエステラーゼ (PDE) の発現を抑制して細胞内の cAMP の増加や AMPK の活性化を促進し、脂質代謝を改善することが報告されている。本研究では、 H_2O_2 による酸化ストレス負荷によって細胞老化を誘導した培養血管内皮細胞に対する、 $CoQ_{10}H_2$ の酸化ストレス、アポトーシス、および内皮細胞機能障害への保護作用を検証し、そのメカニズムの解明を行った。

10 μ M $CoQ_{10}H_2$ で24時間前処置したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs: human umbilical vascular endothelial cells) に100 μ M H_2O_2 を添加して酸化ストレスを与え、細胞老化を誘導した。12時間後に細胞老化 (SA- β -Gal 染色や SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype, 老化関連分泌表現型)、関連遺伝子群の発現)、アポトーシス (Annexin V 測定)、ミトコンドリア機能 (JC-1測定)、内皮細胞機能 (一酸化窒素: NO 産生量、細胞移動能測定、チューブ系性能測定) に関する解析を実施して、 $CoQ_{10}H_2$ の内皮

細胞保護効果を解析した。

その結果、霍 佳は以下の結果、および結論を得た。

1. $CoQ_{10}H_2$ は酸化ストレスによる SA- β -Gal 陽性細胞数の増加や SASP 関連遺伝子群の発現量の増加を抑制し、細胞老化誘導に対する保護作用を示した。
2. $CoQ_{10}H_2$ は高濃度グルコースによる細胞老化誘導にも保護作用を示した。
3. $CoQ_{10}H_2$ は酸化ストレスによるアポトーシスを抑制した。
4. $CoQ_{10}H_2$ は酸化ストレスによる細胞内の活性酸素種 (ROS) の増加を抑制した。
5. $CoQ_{10}H_2$ は酸化ストレスによる細胞内の NO 量や NO 産生酵素遺伝子 (eNOS) 転写発現量の減少を抑制した。
6. $CoQ_{10}H_2$ は酸化ストレスによる細胞のミトコンドリア機能の低下を抑制した。
7. $CoQ_{10}H_2$ は酸化ストレスによる細胞移動能とチューブ形成能の低下を抑制した。
8. $CoQ_{10}H_2$ による前処置は、細胞内の $CoQ_{10}H_2$ 濃度を増加させ、 H_2O_2 添加は酸化型 CoQ_{10} (ox CoQ_{10}) 濃度を激的に増加させたが、 $CoQ_{10}H_2$ の前処置は ox CoQ_{10} の増加を抑制した。

以上の結果から、 H_2O_2 によって惹起される酸化ストレスに対し、 $CoQ_{10}H_2$ の投与が、内皮細胞の抗酸化能力を高め、ミトコンドリア機能を増強することによって細胞老化を抑制し、アポトーシスや内皮細胞の機能障害から保護することが示された。したがって、 $CoQ_{10}H_2$ 補給が、血管の老化や機能減退を遅延させ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。

Resection depth and layer of cold snare polypectomy versus endoscopic mucosal resection
(コールドスネアポリペクトミーと内視鏡的粘膜切除術の切除深度と切除層の比較)

伊 東 哲 宏

(論文の内容の要旨)

【背景】日本では大腸ポリープの内視鏡治療として内視鏡的粘膜切除術 (EMR) が広く普及している。近年、10 mm 未満の非有茎性の隆起性ポリープに対する内視鏡治療として、コールドスネアポリペクトミー (CSP) が普及しつつある。CSP は粘膜下局注および電気焼灼を伴わないため、EMR と比較して後出血や

穿孔のリスクが少ないとされている。安全性や簡便性についての報告は多いが、切除検体の病理学的評価に関する報告は十分にされていない。我々の臨床経験において、EMR 検体と比較し CSP 検体では、病理学的根治性が評価できる検体が少なかった。これは CSP の切除深度が EMR の切除深度と比較し浅く、粘膜筋板での切除となっているからと推定した。本研究の目

的は、CSP と EMR の切除標本を比較することで、CSP の病理学的特徴を明らかにし、CSP の組織学的な適応について検討した。

【方法】 10 mm 未満の0-Is 型、0-Isp 型と0-IIa 型の1072ポリープ（CSP 373ポリープ vs. EMR 699ポリープ）から、プロペンシテイスコアマッチングを用い184ペアを後ろ向きに解析した。病理学的断端評価を完全切除と評価困難/陽性（X/+）に分類し、X/+を要因〔検体損傷、切り出しの問題、深部断端X/+（VMX/+）、側方断端X/+（HMX/+）〕ごとに細分した。完全切除例で切除深度と切除層を評価した。多変量解析によりX/+のリスク因子を評価した。

【結果】 CSP 群 vs. EMR 群で提示する。X/+は105/184（57%）vs. 70/184（38%）（ $p < 0.001$ ）にみられ、X/+のうち、標本損傷が53/184（29%）vs. 30/184（16%）（ $p < 0.01$ ）で、垂直断端（VM）X/+が11/184（6%）vs. 2/184（1%）（ $p < 0.05$ ）であった。完全切除の193例で切除深度を評価したところ76 vs. 338 μm （ $p < 0.001$ ）であり、切除層が粘膜下層であったポリープは7/79（9%）vs. 105/114（92%）（ $p < 0.001$ ）であった。両群を多変量解析したところCSP [odds ratio (OR) 6.80, 95% confidence interval (CI) 1.33-34.69, $p < 0.05$] がVMX/+の有意なリスク因子であり、CSP 群においてはSessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) (OR 58.36, 95% CI 7.45-456.96, $p < 0.001$) がVMX/+の有意なリスク因子であった。

【結論】 CSP は EMR と比較し切除深度が浅く、粘膜筋板の切除が多いため標本損傷やVMX/+を有意に多く認めたと考える。CSP ではSSA/Pが深部断端評価困難のリスク因子となること、また、癌では病理学的根治性の評価が重要であることから、SSA/Pや癌を疑う病変に対しては慎重に適応を考慮する必要がある。

（論文審査の結果の要旨）

日本では大腸ポリープの内視鏡治療として内視鏡的粘膜切除術（EMR）が広く普及している。近年、10 mm 未満の非有茎性の隆起性ポリープに対する内視鏡治療として、コールドスネアポリペクトミー（CSP）が普及しつつある。CSP は粘膜下局注および電気焼灼を伴わないため、EMR と比較して後出血や穿孔のリスクが少ないとされている。安全性や簡便性についての報告は多いが、切除検体の病理学的評価に関する報告は十分にされていない。我々の臨床経験において、EMR 検体と比較しCSP 検体では、病理学的

根治性が評価できる検体が少なかった。これはCSPの切除深度がEMRの切除深度と比較し浅く、粘膜筋板での切除となっているからと推定した。本研究の目的は、CSP と EMR の切除標本を比較することで、CSP の病理学的特徴を明らかにし、CSP の組織学的な適応について検討した。

10 mm 未満の0-Is 型、0-Isp 型と0-IIa 型の1072ポリープ（CSP 373ポリープ vs. EMR 699ポリープ）から、プロペンシテイスコアマッチングを用い184ペアを後ろ向きに解析した。病理学的断端評価を完全切除と評価困難/陽性（X/+）に分類し、X/+を要因〔検体損傷、切り出しの問題、深部断端X/+（VMX/+）、側方断端X/+（HMX/+）〕ごとに細分した。完全切除例で切除深度と切除層を評価した。多変量解析によりX/+のリスク因子を評価した。

その結果、伊東は次の結論を得た。

1. CSP 検体は EMR 検体と比較してX/+の割合が有意に高かった。
2. X/+の中で、検体損傷とVMX/+の割合が有意に高かった。
3. CSP 検体の切除深度はEMR 検体と比較し有意に浅く、主な切除層は粘膜筋板であった。
4. 手技としてCSPが検体損傷とVMX/+の独立したリスク因子であった。
5. CSP ではSerrated sessile adenoma/polyp (SSA/P) がVMX/+の独立したリスク因子であった。

これらの結果により、CSP 検体はEMR 検体と比較し、切除層が浅く、粘膜筋板での切除が多く認められることから、検体損傷とVMX/+が多いことが判明した。VMX/+と根治性評価の観点から、CSPの適応にSSA/Pや癌を含むべきではないと示唆している。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値のあるものと認めた。

Effects of 5-aminolevulinic acid supplementation on home-based walking training achievement in middle-aged depressive women : randomized, double-blind, crossover pilot study
(5-アミノレブリン酸摂取の中年うつ女性患者における home-based ウォーキングトレーニング実施率に与える効果—無作為二重盲検クロスオーバーパイロットスタディー—)

鈴木 宏

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 中等度以上の強度の運動がうつ症状を改善する一方、うつ病患者が運動するのは困難であることが知られている。その理由は、気分や意欲の低下などの精神症状によって運動に対する心理的障壁が高いことに加えて、運動不足による体力低下や疲労などの身体的障壁があるためである。我々は、5-アミノレブリン酸 (ALA) というアミノ酸に着目した。ALA は、生体内で鉄と結合してミトコンドリア電子伝達系の Complex IV として作用し、ATP 産生に重要な役割を担っている。健常高齢者においては、ALA とクエン酸第一鉄ナトリウム (SFC) の摂取が、中等度以上の強度の運動であるインターバル速歩トレーニング (IWT) の実施率を増やすことが報告されている。以上から、今回、中年うつ女性患者における ALA+SFC 摂取の IWT 実施に対する効果を検証した。

【方法】 DSM-IV という診断基準で大うつ病性障害の診断基準を満たし、精神科外来で治療中の患者 9 名 (53±8 歳) を対象に、ALA+SFC 摂取、プラセボ摂取の 2 条件に二重盲検法で無作為に分け、クロスオーバー方式で実験した。被験者は、7 日間、ALA+SFC、またはプラセボを摂取し、それぞれ 6 日間の IWT を実施し、その期間のトレーニング量を携帯型カロリー計で測定した。その後 10 日間以上の無介入 (ウォッシュアウト) 期間を置いて、摂取条件を入れ替え、同様に IWT を実施した。試験サプリメント摂取期間前後の日に、自転車運動負荷漸増試験を行い、血漿中乳酸濃度 ($[La^-]_p$)、酸素摂取量 (VO_2)、二酸化炭素排泄量 (VCO_2) を測定した。また、同日に、MADRS といううつ病の重症度評価尺度測定も行った。

【結果】 ALA+SFC 摂取条件でのみ、自転車運動時の運動強度の増加に伴う $[La^-]_p$ 、 VO_2 、 VCO_2 の上昇の抑制 (【摂取前 対 摂取後】×時間の交互作用, all $P < 0.001$) を認め、ALA+SFC 条件ではプラセボ条件と比べ、トレーニング日数、速歩トレーニング総力積と総時間の増加 (各 33%, 46%, 46%, all $P < 0.05$),

MADRS の改善 ($P = 0.001$) を認めた。

【結論】 ALA+SFC の摂取は、運動強度に対する呼吸・乳酸応答を改善し、運動への身体的障壁を低下させた。つまり、きつい運動を楽しみ、IWT 実施率を高め、うつ症状を改善することが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

中等度以上の強度の運動がうつ症状を改善する一方、うつ病患者が運動するのは、運動に対する心理的および身体的障壁のために困難であることが知られている。我々は、中年うつ女性患者における 5-アミノレブリン酸とクエン酸第一鉄ナトリウム (ALA+SFC) 摂取のインターバル速歩トレーニング (IWT) 実施率、および ALA+SFC を併用した IWT のうつ症状に対する効果を検証した。

DSM-IV による大うつ病性障害の診断基準を満たし、精神科外来で治療中の患者 9 名 (53±8 歳) を対象に、ALA+SFC 摂取、プラセボ摂取の 2 条件に二重盲検法で無作為に分け、クロスオーバー方式で実験した。被験者は、7 日間、ALA+SFC、またはプラセボを摂取し、それぞれ 6 日間の IWT を実施し、その期間のトレーニング量を携帯型カロリー計で測定した。その後 10 日間以上の無介入 (ウォッシュアウト) 期間を置いて、摂取条件を入れ替え、同様に IWT を実施した。試験サプリメント摂取期間前後の日に、自転車運動負荷漸増試験を行い、血漿中乳酸濃度 ($[La^-]_p$)、酸素摂取量 (VO_2)、二酸化炭素排泄量 (VCO_2) を測定した。また、同日に、うつ病の重症度評価尺度測定 (MADRS) も行った。

その結果、鈴木宏は次の結論を得た。

1. ALA+SFC 摂取群でのみ、自転車運動時の運動強度増加に伴う $[La^-]_p$ 、 VO_2 、 VCO_2 の上昇が摂取後に有意に抑制された。(【摂取前 対 摂取後】×時間の交互作用, all $P < 0.001$)
2. トレーニング日数、速歩トレーニング総力積と総時間が、プラセボ条件と比較して ALA+SFC 条件で有意な増加を認めた。(各 33%, 46%, 46%, all $P < 0.05$)

3. ALA+SFC 摂取群でのみ, MADRS の有意な改善を認めた。(P=0.001)

これらの結果より, ALA+SFC の摂取は, 運動の身体的障壁を低下させ, IWT 実施率を高め, うつ症

状を改善することが示唆された。本研究は ALA+SFC 摂取とインターバル速歩の併用のうつ病治療における有効性を示すものであり, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Effects of a micro-thread at the implant neck on securing the quantity and quality of bone formation around implants (インプラント体の頸部マイクロスレッド形状は同部の新生骨量/骨質に影響を及ぼす)

李 穎 輝

(論文の内容の要旨)

【Background and Objective】 Implant therapy is regarded as a safe and reliable method for patients with complete or partial edentulism. While current survival rates of modern titanium implants exceed 95 % during a period of 5 years, the success in elderly and compromised patients is significantly lower. The main causes of implant failure have two main reasons, biological and mechanical failure. Quantity and quality of bone supporting dental implant is one of key factors which influence implant success. Many studies have shown that the surface geometry and surface roughness could influence implant success rate. However, there has been few studies that evaluate the effect of different implant neck designs on bone formation. Therefore, the aim of this study was to examine the effect of different implant neck design on securing quantity and quality of peri-implant hard tissue after implant placement by histomorphometric analysis.

【Material and Methods】 Three types of endosseous titanium implants with different neck morphologies but the same blast surface (no thread, macro-thread, and micro-thread) were used in this study. Implants were placed in the femur and tibia of the rabbits; one implant in the distal femoral condyle and two implants in the proximal tibial metaphysis alternatively. Thirty-six implants were placed in 6 rabbits. Under general anesthesia induced by 3 % pentobarbital (30 mg/kg/i.v.; Somnopentyl; Kyoritsu Seiyaku, Japan) and 2 % lidocaine (1 ml i.m.; AstraZeneca, Osaka, Japan), all implants were placed at 35 Ncm following the manufacturer's guidelines with a 2.5-mm final drill and primary close sutures.

After 3 and 8 weeks, animals were sacrificed and subjected to Imaging study and histological study. For the imaging study, on micro CT images, trabecular number, trabecular thickness, and trabecular separation were evaluated by the image pro software. For the histological study, the samples were divided into undecalcified samples and decalcified samples. undecalcified samples come from tibia and decalcified samples come from femur. For undecalcified sections, stained by Toluidine blue, the percentage of bone to implant contact (%BIC) and the percentage of new bone area (%NBA) were evaluated. For decalcified sections, anti-osteopontin antibody and anti-osteocalcin antibody staining was executed, osteoblast count was evaluated.

【Results】 1. Radiological analysis

Three weeks after implantation, type C had significantly higher mean values for TBN and TBT than type A or B. Regarding TBS, type C had a significantly lower mean value than type A or B. After 8 weeks, type C showed higher mean values for TBN and TBT as well as a lower mean value for TBS than type A or B, and the differences in TBN and TBT between types B and C and in TBS between types A and C were significant.

2. Histological analysis

Three weeks after implantation, Type C showed significantly higher mean %BIC as well as %NBA than type A or B. At 8 weeks, type C showed higher mean values for %BIC and %NBA than type A or B, and the difference in %NBA between types A and type C was significant.

3. Immunohistochemical analysis

Three weeks after implantation, type C had more

positive cells for osteopontin and osteocalcin than type A or B. Eight weeks after implantation, type C still had more positive cells for osteocalcin than the other two types. However, the number of samples for immunohistochemical staining (n=2) was too small for a statistical analysis between the types.

【Conclusion】 The results of the present study suggest that an implant with a micro-thread at the implant neck promotes faster osteogenesis and a greater amount of new cortical bone around the implant. A microthread at the implant neck contributes not only to reducing peri-implant bone loss, but also promoting osteogenesis around the implant.

(論文審査の結果の要旨)

歯の欠損を補う方法として歯科インプラント治療が行われている。歯科インプラント治療成功の目安として、生着率、残存率（5および10年間使用できるか）、辺縁歯槽骨吸収の有無および量（インプラント周囲炎）が評価されている。インプラント治療の成功（上記の評価項目）を左右する要因はいくつかあり、その中でもインプラントの素材、全体の形状、表面処理方法、表面のテクスチャーなどに関する研究が行われているが、インプラント頸部の形状に関する研究は少ない。インプラント頸部はインプラントの生着や辺縁歯槽骨の吸収に重要な部位である。そこで李らは、3種類の異なる頸部の形状（スレッドのないもの、マクロスレッドをもつもの、マイクロスレッドをもつもの）

をもったインプラントを試作し、ウサギ大腿骨および脛骨への埋入実験を行い、頸部形状の違いがインプラント埋入後の骨形成に与える影響に関して、形態学的、組織学的、細胞組織学的に検討し以下の結果を得た。

1. X線 CT スキャン画像による形態学的検討

マイクロスレッドは他の形状（スレッド無し、マクロスレッド）に比べて、インプラント表面に付着する骨梁の数は有意に多く、幅も有意に広がった。この所見はインプラント埋入早期（3週間後）から観察された。

2. 組織学的検討

マイクロスレッドは他の形状（スレッド無し、マクロスレッド）に比べて、インプラント表面に付着する骨面積、および、新生骨の形成量ともに有意に多かった。この所見はインプラント埋入早期（3週間後）から観察された。

3. 細胞組織学的検討

マイクロスレッドは他の形状（スレッド無し、マクロスレッド）に比べて、インプラント周囲におけるオステオポンチンおよびオステオカルシン陽性の細胞が多く認められた。

以上の結果から、インプラント頸部にマイクロスレッドの形状を付与することにより、早期の骨形成と広い骨接触面積をもたらす可能性が示唆された。

以上より、本研究は有用な情報をもたらす研究であり、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。

Virtual bronchoscopic navigation as an aid to computed tomography-guided transbronchial biopsy improves the diagnostic yield for small peripheral pulmonary lesions (バーチャルナビゲーションによる、CT ガイド下経気管支肺生検における末梢肺小病変の診断率の向上)

加 藤 あかね

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 CT 検診の普及により胸部X線で視認不可能な末梢肺野の小病変（以下 small PPLs）が早期に発見され、肺癌の死亡率減少に寄与している。直径20 mm 以下の small PPLs は、従来のX線透視下気管支鏡では診断率が30%程度であり、診断率向上のためにガイドシース併用超音波気管支鏡（以下 EBUS-GS）、CT ガイド下経気管支肺生検（以下 CT-TBB）、経皮的CTガイド下針生検（以下 TTNA）が開発された。TTNA の診断率は良好であるが、致死合併症も経験される。CT-TBB を含む経気管支肺

生検は合併症は少ないが、TTNA と比べ診断率は劣っている。バーチャル気管支鏡ナビゲーション（以下 VBN）併用はEBUS-GS の診断率をさらに向上させるという研究はあるが、VBN 併用のCT-TBB に関する研究はなく、我々はCT-TBB におけるVBN の診断率への寄与について検討した。

【方法】 本研究は信州大学医学部倫理委員会により承認を得た（認可番号2170）。2011年11月から2014年11月に、胸部CT 検査で発見され、書面による同意が得られた径20 mm 以下のPPL を持つ患者100名を対象とした。偽ランダムマイゼーションであるが、VBN 併

用群（以下 VBN+）と非併用群（以下 VBN-）に50名ずつ交互に割り振り，CT-TBB を施行した。

CT-bronchus sign（以下 CT-BS）は PPL とそれに近接する気管支の位置的な関係を述べる用語で，CT-TBB に先立ち評価された。CT-BS 2は病変を貫通する気管支がある状態，CT-BS 1は病変を貫通する気管支はないが，病変に接する気管支がある状態，CT-BS 0は病変を貫通したり病変に接したりする気管支がない状態で，CT-BS 0の場合の診断率は極めて低く，過去の我々の報告から本検査の適応外としているため，本研究では CT-BS 1, 2の症例のみを対象とした。

検査医は，高分解能 CT をもとに作成された VBN（LungPoint Satellite Planning System[®], Vronchus Technologies, Inc., Mountain View, CA, USA）のイメージ像により病変への仮想ルートを事前にまた気管支鏡検査中に随時確認した。気管支鏡は BF-type P260F（外径4.0 mm，チャンネル径2.0 mm，OLYMPUS, Tokyo）を使用した。X線透視の代わりに，CT（Aquilion16TM, Toshiba, Tokyo）を使用した。病変と生検鉗子はリアルタイム CT スキャン（管電圧 120 kV，管電流 10 mA，照射時間 0.5 秒，スライス間隔 2 mm）にて位置関係を確認し，鉗子の位置を変える毎に CT スキャンを行い，鉗子が病変を捉えていることを確認した後，生検を行った。検査終了のタイミングは，通常我々が行う経験的な時間の範囲内で行った。検査開始から，初回の CT スキャン施行までの時間，初回の生検施行までの時間，検査終了までの時間を測定した。診断率は，各群における CT-TBB によって得た組織で確定診断された患者数の割合と定義した。

【結果】 Small PPLs に対する VBN+ の診断率は 84.0 %，VBN- の診断率は 58.0 % であった（ $P=0.013$ ）。生検個数は，VBN+ で 3.54 ± 1.07 に対し，VBN- で 2.98 ± 1.06 （ $P<0.05$ ）であった。総検査時間に有意差はなかったが，初回の CT スキャン，初回の生検までの時間は VBN+ で有意に短縮していた（ $P<0.01$ ）。臨床経過では，最終的に VBN+ の 47 名，VBN- の 40 名の診断が確定した。本研究中に重篤な合併症はみられなかった。

【考察】 本研究により，CT-TBB において，VBN の併用が径 20 mm 以下の small PPLs の診断率を上昇させることが示された。直接比較ではないが，本研究における VBN+ の診断率（84.0 %）は，既報の VBN

併用 EBUS-GS の 80.4 % を上回っていた。TTNA は，径 20 mm 以下の small PPLs に対し 92.8 % と優れた診断率を持つが，気胸，出血，空気塞栓，stage I 肺癌の胸壁再発のリスクが増加し得る。このため，TTNA は CT-BS 0 の PPLs や，CT-TBB でも診断不可能であった症例に行うなどの住み分けを行うのが良いと考える。

今回の研究では VBN 併用による検査時間の短縮や被曝量の低下は得られなかった。一方，VBN- よりも VBN+ の方が初回生検に至る時間が短く，生検に十分な時間を割くことが可能となり，より多くの生検検体を得ることで診断率の上昇につながったと考える。**【結論】** VBN の併用は small PPLs の CT ガイド下経気管支肺生検の診断率を有意に向上させた。

（論文審査の結果の要旨）

CT 検診の普及は末梢肺野の小病変（以下 small PPLs）の早期発見を可能とし，肺癌の死亡率減少に寄与した。直径 20 mm 以下の small PPLs は，従来の X 線透視下気管支鏡では診断率が 30 % 程度と低い。診断率向上のためにガイドシース併用超音波気管支鏡（以下 EBUS-GS），CT ガイド下経気管支肺生検（以下 CT-TBB），経皮的 CT ガイド下針生検（以下 TTNA）が開発された。CT-TBB は TTNA と比べ合併症は少ないが，診断率は劣る。バーチャル気管支鏡ナビゲーション（以下 VBN）併用は EBUS-GS の診断率を向上させるという研究はあるが，VBN 併用の CT-TBB に関する報告はなく，我々は CT-TBB における VBN の診断率への寄与について検討した。

2011 年 11 月から 2014 年 11 月に，胸部 CT 検査で径 20 mm 以下の small PPLs で，病変を気管支が貫通または接している 100 名を VBN 併用群（以下 VBN+）と非併用群（以下 VBN-）に 50 名ずつ交互に割り振り，CT-TBB を施行した。

VBN のイメージ像とリアルタイム CT を用いて生検を行い，検査時間を測定した。診断率は，CT-TBB で確定診断された患者数の割合と定義した。

その結果，加藤は次の結論を得た。

1. VBN+ の診断率は 84.0 %，VBN- の診断率は 58.0 % であった（ $P=0.013$ ）。
2. 生検個数は VBN+ で 3.54 ± 1.07 に対し，VBN- で 2.98 ± 1.06 （ $P<0.05$ ）であった。
3. 総検査時間に有意差はなかったが，初回の CT スキャン，初回の生検までの時間は VBN+ で有意に短縮していた（ $P<0.01$ ）。

4. 臨床経過では、最終的に VBN+ の47名, VBN- の40名の診断が確定した。本研究中に重篤な合併症はなかった。
5. 被曝量は VBN+ で 134.8 ± 179.0 mGy, VBN- で 98.4 ± 38.8 mGy ($P=0.17$) であった。これらの結果により, VBN 併用下では CT-TBB は,

20 mm 以下の small PPLs の診断率を有意に改善した。この結果は、現在世界的に普及している EBUS-GS に VBN を併用した場合の診断率を上回っており, VBN 併用下の CT-TBB は早期肺癌の診断率向上に貢献することが示唆された。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。

Diversity of respiratory impedance based on quantitative computed tomography in patients with COPD (定量 CT に基づく COPD 患者における呼吸インピーダンスの多様性)

和田 洋典

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は CT により気腫性病変と気道病変を評価することができ、それぞれの存在の有無により画像的なフェノタイプに分類することができる。強制オシレーション法 (FOT) は努力呼吸を要さず安静換気の状態で行え、スパイロメトリーと比べて患者負担が少ない検査であるが、FOT によって得られる各インピーダンスが COPD の画像的なフェノタイプにおいて多様性があるかについては明らかにされていない。本研究では、胸部 CT 所見における肺気腫および気管支壁肥厚に対して客観的な解析を行い、FOT による呼吸インピーダンスを含む呼吸機能との関連を検討した。

【方法】2012年4月～2016年10月に信州大学医学部附属病院呼吸器・感染症・アレルギー内科を受診し、GOLD ガイドライン stage II 以上の安定期の COPD 患者174症例を対象として、画像所見の解析、呼吸機能検査を行った。画像解析により得られる気腫病変の指標 (%LAV) と気道病変の指標 (AWT-Pi10) により4つのフェノタイプ (正常型, 気道病変優位型, 気腫病変優位型, 混合型) に分類し、その臨床的特徴、呼吸インピーダンスを含む呼吸機能の特徴を後方視的に検討した。

【結果】気道可逆性試験陽性 (気管支拡張薬吸入後に1秒量が12%以上かつ200 ml 以上吸入前と比較して増加) 患者の割合は、気道病変優位型において正常型, 気腫病変優位型よりも有意に多かった。気腫病変優位型において body mass index が有意に低値であった。1秒量 (FEV1) は混合型において他のフェノタイプよりも低値だった。肺拡散能の指標である DLco, DLco/VA は気腫病変優位型と混合型において有意に低値だった。他のフェノタイプに比べて気道病変優位型, 混合型において 5 Hz, 20Hz における呼吸抵抗

(R5, R20) は有意に高く, 5 Hz における呼吸リアクタンス (X5) は有意に低かった。正常型, 気腫病変優位型に比べて, X5の吸気と呼気の差 ($\Delta X5$) は混合型において有意に高値だった。FOT の各指標 (R5, R20, X5) は気管支壁肥厚の程度 (AWT-Pi10およびWA%) と有意に相関していた。FOT の各指標 (R5, R20, X5) は気道可逆性と弱く相関していた。FOT の各指標 (R5, R20, X5) と気腫の程度 (%LAV) との間に有意な相関はみられなかった。

【考察】FOT により得られる呼吸抵抗 (Rrs) と呼吸リアクタンス (Xrs) の各指標は、1秒量や1秒率と有意に相関する (COPD 2011; 8(6): 456-463)。本研究において FOT の各指標 (R5, R20, X5) は気道病変の指標 (AWT-Pi10, WA%) と有意な相関がみられ、気腫病変の指標 (%LAV) と有意な相関がみられなかった。これらの結果は FOT の各指標は気管支壁肥厚の程度を反映し、気道リモデリングを検知し得ることが示唆された。COPD 患者において $\Delta X5$ が気管支樹のチョークポイント (choke point) の数と分布を反映し (Eur Respir J 2004; 23(2): 232-240), $\Delta X5$ は COPD 患者において高値を示す。また $\Delta X5$ が COPD と喘息の鑑別に有効であるとされている (Intern Med 2010; 49(1): 23-40)。しかしながら本研究の結果より COPD 患者において FOT の各指標 (R5, R20, $\Delta X5$) は気道病変の有無, 肺気腫病変の有無で異なることが示唆され、必ずしも同様の所見が得られるわけではないと考えられる。

【結論】COPD 患者に対し定量 CT に基づく形態学的フェノタイプ分類を行うと呼吸インピーダンス, 気道可逆性を含む呼吸生理学的な多様性があることが示唆された。FOT を用いた呼吸インピーダンス測定は、気道病変の程度を反映し、COPD 患者における気道リモデリングを検知し得ると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

2012年4月～2016年10月に信州大学医学部附属病院呼吸器・感染症・アレルギー内科を受診し、GOLDガイドライン stage II 以上の安定期の COPD 患者174症例を対象として、画像所見の解析、呼吸機能検査を行った。画像解析により得られる気腫病変の指標 (% LAV) と気道病変の指標 (AWT-Pi10) により4つのフェノタイプ (正常型、気道病変優位型、気腫病変優位型、混合型) に分類し、その臨床的特徴、呼吸インピーダンスを含む呼吸機能の特徴を後方視的に検討した。

その結果、和田は次の結論を得た。

1. 気道可逆性試験陽性 (気管支拡張薬吸入後に1秒量が12%以上かつ200 ml以上吸入前と比較して増加) 患者の割合は、気道病変優位型において正常型、気腫病変優位型よりも有意に多かった。
2. 気腫病変優位型において body mass index が有意に低値であった。
3. 1秒量 (FEV1) は混合型において他のフェノタイプよりも低値だった。
4. 1秒率 (FEV1/FVC) は気腫病変優位型と混合型において、正常型、気道病変優位型よりも低値だった。
5. 肺拡散能の指標である DLco, DLco/VA は気腫病変優位型と混合型において、他のフェノタイプよりも有意に低値だった。一方、換気不均等分布の指標である $\Delta N2$ は気腫病変優位型において有意に正常型、気道病変優位型よりも高値だった。
6. 他のフェノタイプに比べて気道病変優位型、混合型において 5 Hz, 20 Hz における呼吸抵抗 (R5, R20) は有意に高く、5 Hz における呼吸リアクタンス (X5) は有意に低かった。
7. 正常型、気腫病変優位型に比べて、X5の吸気と呼気の差 ($\Delta X5$) は混合型において有意に高値だった。
8. FOTの各指標 (R5, R20, X5) は気管支壁肥厚の程度 (AWT-Pi10およびWA%) と有意に相関していた。またFOTの各指標 (R5, R20, X5) は気道可逆性と弱く相関していた。
9. FOTの各指標 (R5, R20, X5) と気腫の程度 (%LAV) との間に有意な相関はみられなかった。

これらの結果により COPD 患者に対し定量 CT に基づく形態学的フェノタイプ分類を行うと呼吸インピーダンス、気道可逆性を含む呼吸生理学的な多様性があることが示唆された。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。

Hemolytic Characteristics of Three Suctioning Systems for Use with a Newly Developed Cardiopulmonary Bypass System (新しく開発した人工心肺システムで使用する3つの吸引システムの溶血特性に関する研究)

道 永 祐 希

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】閉鎖型人工心肺システムは血液の空気接触が少ないため、従来の人工心肺と比較して凝固や炎症反応の活性化が抑えられると報告されている。しかし、閉鎖型人工心肺システムは手術中に大量出血が発生した際には循環血液量が急速に失われ血液循環を維持することが困難である。したがって、冠動脈バイパス術 (CABG) のような突発的な出血が起こりにくい症例のみ適用可能であった。我々は予期せぬ大量出血が発生しても血液回収可能な閉鎖型人工心肺システム Dihead CPB を開発した。このシステムは血液回収装置を搭載したことにより、CABG 症例だけでなく弁置換術など突発的な出血が起こりうる症例への適用が可能である。しかし、血液回収の問題として吸引管先端の過度な陰圧と空気暴露による溶血があげられ

る。そこで、Dihead CPB に搭載可能な3種類の吸引システムの吸引圧・速度、血液回収時の溶血率を in vitro で検討し、次いでもっとも溶血率が少なかった吸引装置を搭載した Dihead CPB の溶血の程度を臨床評価した。

【対象と方法】ローラーポンプ吸引、吸引圧力が先端の状況により自動可変するスマートサクション、壁配管を使用した吸引システム3装置を対象とした。最初にこれら3種類の吸引管内圧力の特徴を評価した (Mock 試験)。次いで、ACD 液添加の成牛血液50 ml を用意して1検体5サイクル吸引する in vitro 試験を行い溶血、吸引速度を比較した。in vitro の結果よりもっとも溶血率が低かった吸引システム (壁吸引 -90 mmHg) を Dihead CPB に搭載し、冠動脈バイパス手術 (CABG) 患者を対象に手術前・中・後の溶血を

検討した (N = 15)。

【結果】 Mock 試験では吸引管内圧力は、ローラーポンプ吸引で最大吸引流量1.5L/min で -22.5 ± 0.1 mmHg, スマートサクシオンで吸引条件に応じて -76.3 ± 1.0 から -130.3 ± 1.5 mmHg, 壁吸引の設定吸引圧力 -150 mmHg に対して -43.4 ± 0.1 mmHg であった。吸引速度はスマートサクシオン (69.7 ± 3.58 s) が、ローラーポンプ吸引 (117.3 ± 8.47 s), 壁吸引 (96.9 ± 7.10) に比べ有意に速かった ($P < 0.001$)。溶血率はスマートサクシオン (2.00 ± 0.33 %) が、ローラーポンプ吸引 (0.61 ± 0.10 %), 壁吸引 (0.41 ± 0.11 %) に比べ、有意に高かった ($P < 0.001$)。カリウム濃度は各システムにおいて吸引前後で増加は認められたがローラーポンプ吸引の増加は明らかに他の2システムよりも少なかった。壁吸引システム搭載の Dihead CPB での臨床試験では手術前と比較して、人工心肺中または手術後の遊離ヘモグロビン濃度に有意な増加はなかった。

【結語】 本研究結果より、壁吸引システムは十分な吸引速度があり、吸引時間の遅れを生じさせず、ローラーポンプ吸引やスマートサクシオンに比べ溶血が少ないことが示された。そして、壁吸引システム (-90 mmHg) を搭載した Dihead CPB は、臨床上也溶血を認めず有用であることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

閉鎖型人工心肺システムは血液の空気接触が少ないため、従来の人工心肺と比較して凝固や炎症反応の活性化が抑えられると報告されている。しかし、閉鎖型人工心肺システムは手術中に大量出血が発生した際には循環血液量が急速に失われ血液循環を維持することが困難である。したがって、冠動脈バイパス術 (CABG) のような突発的出血が起こりにくい症例のみ適用可能であった。我々は予期せぬ大量出血が発生しても血液回収可能な閉鎖型人工心肺システム Dihead CPB を開発した。このシステムでは、血液回収システムを搭載したことにより、CABG 症例だけではなく弁置換術など予期せぬ出血が起こりうる症例にも適用できる。しかし、血液回収時に発生する吸引管先端の過度な陰圧と空気暴露による溶血は避けられない。そこで、Dihead CPB に搭載可能な3種類の吸引システムの吸引圧を Mock 試験、速度を in vitro で計測し、次いで3種類の吸引システムの溶血の程度を ACD 液添加の成牛血液を用いて比較検討した。最後に、もっとも溶血率が少なかった壁吸引システム (-90

mmHg 設定) を搭載した Dihead CPB の溶血の程度を臨床評価した。

その結果、道永は次の結論を得た。

1. Mock 試験では吸引管内圧力は、ローラーポンプ吸引で最大吸引流量1.5L/min で -22.5 ± 0.1 mmHg, スマートサクシオンで吸引条件に応じて -76.3 ± 1.0 から -130.3 ± 1.5 mmHg, 壁吸引の設定吸引圧力 -150 mmHg に対して -43.4 ± 0.1 mmHg であった。
2. 吸引速度はスマートサクシオンが他の方法に比べて有意に速く (69.7 ± 3.58 s), ローラーポンプ吸引は 117.3 ± 8.47 s, 壁吸引は 96.9 ± 7.10 s であった ($P < 0.001$)。
3. 溶血率はスマートサクシオン 2.00 ± 0.33 % が他の2つの方法に比べて有意に高く、ローラーポンプ吸引で 0.61 ± 0.10 %, 壁吸引で 0.41 ± 0.11 % であった ($P < 0.001$)。
4. カリウム濃度はそれぞれの方法の吸引前後で増加したが、ローラーポンプ吸引の増加が他の2システムよりも少なかった。
5. 壁吸引システム (-90 mmHg 設定) 搭載の Dihead CPB での臨床試験では手術前と比較して、人工心肺中および手術後の遊離ヘモグロビン濃度に有意な増加はなかった。

本研究結果より、壁吸引システムは十分な吸引速度があり、吸引時間の遅れを生じさせず、ローラーポンプ吸引やスマートサクシオンに比べ溶血が少なく、臨床上也有用であることが示された。

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。

Impact of Frailty on Outcomes in Acute Type A Aortic Dissection (A型急性大動脈解離におけるフレイルの影響)

五味 俊 仁

(論文の内容の要旨)

【背景】フレイル(虚弱)の心臓血管外科領域における臨床成績と予後への関連が注目されている。しかし、Stanford A型急性大動脈解離におけるフレイルの影響を検討した研究はない。今回Stanford A型急性大動脈解離における術前フレイルの有無から検討した。

【対象と方法】2004年5月から2017年3月までに当院で手術を施行されたStanford A型急性大動脈解離310例を対象とした。術前フレイルの定義はGanapathi AMらの報告(JTCVS 2014; 147: 186-91)に準じて、1) 70歳以上高齢者、2) BMI<18.5 kg/m², 3) Cre>1.2 mg/dl, 4) 貧血(男性<13.0 g/dL, 女性<12.0 g/dL), 5) 主要な脳血管障害の既往、6) 低アルブミン血症(<3.5 g/dL), 7) psoas muscle area index(第3腰椎下縁での両側腸腰筋を面積の和をBSAで除した値)のうち、3つ以上を満たす症例とした。フレイル症例をF群、非フレイル症例をN群として比較検討した。

【結果】310例中、F群は106例(34.2%)でN群は204例(65.8%)であった。80歳以上高齢者はF群36例(34.0%), N群11例(5.4%)であった。病院死亡はF群:N群で11例(10.4%):17例(8.3%)で、2群間で有意差はなかった(p=0.54)。術後主要合併症(長期挿管管理, 新規透析導入, 主要脳血管障害など)の発症頻度は術後の再開胸止血術を除き2群間で有意差はなかった。ICU滞在日数は7.8±8.3:6.9±8.0日, 入院日数は38.2±32.5, 36.3±30.3日と2群間に有意差はなかったが、転院数は46例(43.4%):48例(23.5%)とF群に有意に多かった(p=0.0004)。

5年生存率はF群が57.7%, N群が85.1%とF群が有意に不良であった(p=0.0001)。遠隔期死亡の危険因子はフレイル症例(p<0.0001, リスク比4.7), 男性(p=0.005, リスク比3.6), 術前ADL低下(p=0.002, リスク比14.4)であった。

【結語】7つの因子を用いたフレイル評価は急性大動脈解離の遠隔期予後の独立因子となった。このフレイル評価は術前に評価することが簡便であり、術後経過を予測する上で有用な情報を与えることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

フレイル(虚弱)の心臓血管外科領域における臨床成績と予後への関連が注目されている。しかし、Stanford A型急性大動脈解離におけるフレイルの影響を検討した研究はない。今回Stanford A型急性大動脈解離における術前フレイルの有無から検討した。

2004年5月から2017年3月までに当院で手術を施行されたStanford A型急性大動脈解離310例を対象とした。術前フレイルの定義はGanapathi AMらの報告(JTCVS 2014; 147: 186-91)に準じて、1) 70歳以上高齢者、2) BMI<18.5 kg/m², 3) Cre>1.2 mg/dl, 4) 貧血(男性<13.0 g/dL, 女性<12.0 g/dL), 5) 主要な脳血管障害の既往、6) 低アルブミン血症(<3.5 g/dL), 7) psoas muscle area index(第3腰椎下縁での両側腸腰筋を面積の和をBSAで除した値)のうち、3つ以上を満たす症例とした。フレイル症例をF群、非フレイル症例をN群として比較検討した。

その結果、次の結論を得た。

1. 病院死亡はF群:N群で11例(10.4%):17例(8.3%)で、2群間で有意差はなかった。
2. 術後主要合併症(長期挿管管理, 新規透析導入, 主要脳血管障害など)の発症頻度は術後の再開胸止血術を除き2群間で有意差はなかった。
3. 転院数は46例(43.4%):48例(23.5%)とF群に有意に多かった。
4. 5年生存率はF群が57.7%, N群が85.1%とF群が有意に不良であった。Frailty scoreで比較すると、遠隔期成績は層別化することが可能であった。
5. 遠隔期死亡の危険因子はフレイル症例, 男性, 術前ADL低下, 臓器灌流障害であった。

これらの結果より、7つの因子を用いたフレイル評価は急性大動脈解離の遠隔期予後の独立因子となることが示唆された。このフレイル評価は術前に評価することが簡便であり、術後経過を予測する上で有用な情報を与えることが示唆された。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。

Histopathological findings of pregnancy-induced hypertension: histopathology of early-onset type reflects two-stage disorder theory (妊娠高血圧症候群の病理組織学的所見は早発型において二段階発症説を反映している)

立石 文子

(論文の内容の要旨)

【目的】妊娠高血圧症候群 (PIH) の発症機序は、まずらせん動脈リモデリング不全により低酸素に陥り、絨毛細胞が出す sFlt1 や sEng などの因子により内皮細胞障害が惹起されて高血圧や腎障害が誘導されるという二段階発症説が支持されているが、病型によって病態が異なる可能性が論じられている。PIH 患者の胎盤組織では多発梗塞、らせん動脈アテロシス、遠位絨毛形成不全や合胞体結節の増加を認めるが、これらの所見は全ての PIH で観察されるわけではなく、その特異性も不明である。このため我々は病型に関連している組織学的変化を明らかにすることを目的とし、病理組織学的所見の出現頻度を PIH 発症時期での分類である早発型と遅発型、重症度での分類である軽症型と重症型で比較検討した。

【方法】2008年1月から2014年12月に信州大学医学部附属病院で PIH と診断された単胎107例を対象とし、臨床情報は診療録から抽出した。重症度は血圧が収縮期血圧160 mmHg あるいは拡張期血圧110 mmHg 以上の症例と、蛋白尿が2 g / 日以上以上の症例を重症型と判定した。発症時期での分類は34週未満のものを早発型、34週以降のものを遅発型とした。病理学的所見はヘマトキシリンエオジン標本から多発梗塞、らせん動脈アテロシス、遠位絨毛形成不全、合胞体結節の増加の有無を評価した。多発梗塞は2個以上の梗塞巣があるか、3 cm 以上の大きさの梗塞巣がありかつ顕微鏡下で観察される微小な梗塞が多数認められるものと定義した。らせん動脈アテロシスは動脈内に内皮細胞の残存があり、泡沫状マクロファージ集簇と層状のフィブリン沈着のあるものとした。遠位絨毛形成不全は末端絨毛の直径が30から40 μm の範囲の小型のものと定義し、合胞体結節は絨毛100に対して100以上あるときに増加とした。得られた所見について統計学的解析を行い、早発型と遅発型、軽症型と重症型の病型との関連を検討した。

【結果】解析した症例107例中、早発型40例、遅発型67例、軽症型22例、重症型85例であった。病理組織学的所見の出現頻度については、早発型において、らせん

動脈アテロシス、遠位絨毛形成不全、合胞体結節の増加を遅発型に比して高頻度に認めた。多発梗塞は統計学的有意差がなかった。また、重症型と軽症型での比較では、全ての所見項目で有意差はなかった。

【考察】らせん動脈アテロシスは内皮細胞が残存していることから妊娠時のリモデリング不全を反映している所見と考えられ、遠位絨毛形成不全や合胞体結節の増加は胎盤内の低酸素を示す所見である。これらの所見は二段階発症説に伴う病理組織学的変化と捉えられ、早発型でより高頻度に観察された。このことから早発型は二段階発症説で想定される機序で発症しているが、遅発型は異なる可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

妊娠高血圧症候群 (PIH) の発症機序は、まずらせん動脈リモデリング不全により低酸素に陥り、絨毛細胞が出す sFlt-1 や sEng などの因子により内皮細胞障害が惹起されて高血圧や腎障害が誘導されるという二段階発症説が支持されているが、病型によって病態が異なる可能性が論じられている。PIH 患者の胎盤組織では多発梗塞、らせん動脈アテロシス、遠位絨毛形成不全や合胞体結節の増加を認めるが、これらの所見は全ての PIH で観察されるわけではなく、その特異性も不明瞭である。本研究では、病型に関連する組織学的変化を明らかにすることを目的とし、病理組織学的所見の出現頻度が PIH の病型に関連するかの検討を行った。

2008年1月から2014年12月に信州大学医学部附属病院で PIH と診断された単胎107例を対象とし、HE 標本から得た所見と診療録から収集した臨床情報を解析した。病理学的所見は多発梗塞、らせん動脈アテロシス、遠位絨毛形成不全、合胞体結節の増加を評価した。

その結果、立石文子は次の結論を得た。

1. 遅発型に比し、早発型においてはらせん動脈アテロシス、遠位絨毛形成不全、合胞体結節の増加を高頻度に認めた。多発梗塞は統計学的有意差がなかった。
2. 重症型と軽症型での比較では、全ての所見項目で

有意差はなかった。

これらの結果から、早発型は二段階発症説に矛盾しない病理組織所見であるらせん動脈アテロシス、遠位絨毛形成不全、合胞体結節の増加がより高頻度に観察されることが明らかとなった。このことから、早発

型は二段階発症説で想定される機序で発症しているが、遅発型は異なる可能性が示された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Effects of hypertension and antihypertensive treatments on sulfatide levels in serum and its metabolism (高血圧や降圧治療は血清スルファチドレベルとその代謝に影響する)

郭 然

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】血清スルファチドはリポ蛋白質に存在している主要なスフィンゴ糖脂質であり、血栓形成と止血における調節因子として機能することが報告されている。我々の過去の研究では、血清スルファチドの減少は心血管病に関連する可能性が示唆されている。心血管病の重要な危険因子である高血圧は血清スルファチドに影響を与える可能性が考えられるが、その関連性や機序を検討した研究は行われていない。本研究では、この点を明らかにするために、確立した高血圧動物モデルとしてアンジオテンシンⅡ (Ang Ⅱ) の持続投与を行ったマウスを用いて、血清スルファチドの量的変化とその代謝変化について検討した。また、降圧の影響を調べるため、降圧剤を用いた解析も行った。

【材料及び方法】10週齢の野生型オスマウス (C57/BL6J) を高血圧 (HT: Ang Ⅱ 単独投与) 群、低血圧 (LBP: 降圧剤投与) 群、高血圧治療 (HT-T: Ang Ⅱ 投与 + 降圧剤投与) 群とコントロール群の4群に分けて、薬剤投与を28日間行った。Ang Ⅱ は浸透圧ポンプを用いて持続投与を行った。降圧剤 (ロサルタン、イルベサルタン、ニフェジピン、ヒドララジン) は、同等の降圧力を発揮する投与量を事前に検討し、餌に混ぜて投与した。血圧は tail cuff 法で測定した。血清と肝組織中のスルファチドは、総脂質を抽出後、スルファチドをリゾスルファチドに変換した。次いで、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析機 (MALDI-TOF MS) で定量した。また、スルファチド代謝変化に加え、既知のスルファチド代謝影響因子である酸化ストレス及びペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α 型 (PPAR α) の変化について、各々の関連因子の mRNA と蛋白発現を real-time PCR 法及び Immunoblot 法を用いて測定した。統計的有意差は one-way ANOVA, PLSD 法検定にて行い、 $p <$

0.05を統計的有意差ありとした。

【結果】血清スルファチド値は HT 群で減少し、LBP 群で増加し、HT-T 群ではコントロール群に近い値になった。これらの変化はスルファチド合成系の律速酵素であるセレブロシド硫酸基転移酵素 (CST) の肝臓発現量と強く相関した。さらに、CST の発現に影響する主な因子は、酸化ストレス、PPAR α 活性、そして血圧そのものであることが示唆された。

【結論】本研究は、高血圧が様々な Ang Ⅱ 作用を介して肝臓の CST 発現量を減少させ、血清スルファチドレベルを有意に低下させることを初めて見出した。また、降圧治療は高血圧に伴う血清スルファチドレベルの低下を改善させることが示された。本研究結果は、高血圧が誘発する心血管病に対して、スルファチド代謝の改善を目標とした新たな治療法の開発に寄与する可能性を示した。

(論文審査の結果の要旨)

血清スルファチドは抗凝固抗血小板凝集作用を発揮することが知られており、血清スルファチド値の異常低下が心血管病の発症に関連している可能性が報告されている。心血管病の重要な危険因子である高血圧は血清スルファチド値異常に関連すると仮説をたて、その関連性や機序を明らかにするために、アンジオテンシンⅡ (Ang Ⅱ) の持続投与高血圧マウスモデルを用いて、血清スルファチドの量的変化とその代謝変化について検討した。また、降圧の影響を調べるため、降圧剤を用いた解析も行った。血清と肝組織中のスルファチド値そして肝臓におけるスルファチド代謝酵素群を測定した。

その結果、郭然は以下の結論を得た

1. 血清スルファチド値は Ang Ⅱ 用量依存的に減少した。降圧剤投与は血清スルファチドレベルを増加させた。そして Ang Ⅱ により誘導された血清スルファチド値の低下は降圧剤の投与により改善した。

2. 高血圧によって誘発されるスルファチド値の変化は、主に肝臓におけるセブレロシド硫酸基転移酵素 (CST) の発現に関与することが判明した。さらに、CST の発現に影響する主な因子は、酸化ストレス、PPAR α 活性、そして血圧そのものであることが示唆された。

これらの結果により、高血圧は Ang II がもたらす様々な作用を介して肝臓の CST 発現量を減少させ、

血清スルファチドレベルを有意に低下させることが初めて明らかとなった。また、降圧治療は高血圧に伴う血清スルファチド値の低下を改善させることが示された。本研究結果は、高血圧が誘発する心血管病に対して、スルファチド代謝の改善を目標とした新たな治療法の開発に寄与する可能性を示した。従って、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Development of a novel model of central retinal vascular occlusion and the therapeutic potential of the adrenomedullin-RAMP2 system (網膜中心血管閉塞モデルの新規開発とアドレノメデュリン-RAMP2系の治療応用への可能性)

平 林 一 貴

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】網膜静脈閉塞 (RVO) は糖尿病網膜症 (DR) に次いで多い網膜血管疾患であり、網膜毛細血管の脱落、虚血、および黄斑浮腫により重度の視力障害を引き起こす可能性がある。アドレノメデュリン (ADM) は、全身で産生される血管拡張性ペプチドで、抗炎症作用、血管新生作用など様々な作用が報告されている。また RAMP2 は ADM の受容体調節タンパクであり、血管においては AM-RAMP2系が重要な働きをしていることが明らかとなっている。一方、ADM および RAMP2 は眼内でも高発現し、炎症や虚血により発現上昇することが報告されている。我々はこれまで、ADM ヘテロノックアウトマウス (ADM +/-) および受容体活性調節タンパク RAMP2ヘテロノックアウトマウス (RAMP2 +/-) を用いた酸素誘発性網膜症モデルにおいて、網膜血管新生に ADM-RAMP2系が重要な働きをすることを示し、また ADM 投与は DR モデルにおける血管透過性と炎症を抑制することを示した。これらの所見から、本研究では RVO における ADM-RAMP2系の意義を検討することにした。現在のところ、網膜中心静脈閉塞 (CRVO) の病態を正確に再現する標準動物モデルは存在しないため、本研究ではマウスで CRVO を簡便に再現するモデルを開発し、このモデルを用いて毛細血管脱落、虚血、黄斑浮腫および炎症などの病態を解析した。さらに、ADM の CRVO 治療薬としての可能性を検討した。

【材料および方法】9~12週齢雄の、1) 野生型マウス (WT)、2) ADM +/- および RAMP2 +/-、3) 浸透圧ポンプを用いて ADM を全身投与した WT を用

いた。ローズベンガル腹腔内投与後、網膜血管起始部に低出力レーザーを照射し、CRVO モデルを作成した。処置後 1, 3, 7 日目にフルオレセインナトリウムを用いて蛍光眼底造影検査 (FA) を行い、Angio Tool[®] を用いて血管密度を測定した。7 日後にフルオレセインイソチオサイアネートデキストラン (FITC) を心注後に、眼球摘出して網膜展開標本を作製し、蛍光顕微鏡にて Angio Tool[®] を用いて血管密度を測定した。また、光干渉断層計 (OCT) を用いて網膜厚、体積を経時的に測定し、網膜浮腫を評価した。OCT による血管造影 (OCTA)、および網膜標本のアイソレクチン B4 (IB4) 染色、免疫染色にて血管構造の評価を行った。処置後の網膜のリアルタイム PCR とアレイアッセイにて、遺伝子発現の評価を行った。4) 不死化ラット血管内皮細胞ライン TR-iBRB 細胞に対して、TNF α 20 ng/ml、TNF α +AM10⁻⁷M、10⁻⁹M を添加し、24 時間後に遺伝子発現を検討した。

【結果】1) CRVO 処置マウスでは、ヒト臨床で認められる所見に類似した網膜出血及び、静脈の拡張蛇行を認めた。FA、FITC 画像では、未処置と比較し血管密度が低下した。また OCT では処置後に網膜浮腫を認め、網膜層構造が粗造であった。OCTA では、処置後は中小血管および毛細血管が描出されず、大血管も経時的に狭小化した。FITC 非灌流領域では樹状または球状の形態の IB4 染色強陽性を認め、かつ F4/80 染色陽性となることから、マクロファージ、活性化ミクログリアと考えられた。リアルタイム PCR、アレイアッセイでは CRVO 群において炎症因子が上昇し、血管新生因子の発現が抑制されていた。また CRVO 群では ADM が著明に発現上昇し、凝固因子

や白血球接着分子, 炎症因子, 酸化ストレスマーカーの経時的上昇を認めた。

2) ADM+/- および RAMP2+/- では, CRVO 処置後に FA, FITC で血管密度減少を認めた。また ADM+/- の網膜では WT と比較し, 凝固因子や白血球接着分子, 炎症因子, 酸化ストレスマーカーの発現が上昇し, 免疫染色にて CD68陽性マクロファージ, ミクログリアは増加し, 抗炎症作用を持つ CD206陽性ミクログリアは減少した。

3) 反対に CRVO モデルへの ADM 投与は, FA, FITC で血管密度が上昇し, 凝固因子や白血球接着分子, 炎症因子, 酸化ストレスマーカーの低下を認め, CD68陽性マクロファージ, ミクログリアは減少し, CD206陽性ミクログリアは増加した。処置後の網膜層構造の破壊は, ADM+/- で増悪し, ADM 投与マウスでは抑制された。ADM+/- は酸化ストレスマーカーの発現が亢進していた。

4) TR-iBRB 細胞では, TNF- α 刺激により白血球接着分子, 炎症因子, 酸化ストレスマーカー, VEGF 受容体である VEGFR-2の発現が亢進したが, ADM 添加によって抑制されることから, ADM が網膜血管内皮細胞傷害を直接抑制することが示された。

【結論】 ADM は CRVO 処置後の血管再灌流を改善し, 抗凝固効果や内皮細胞傷害抑制効果を示す。また血管透過性亢進による網膜浮腫を抑制し包括的に CRVO の病態を改善する。以上のことから ADM-RAMP2系は CRVO 治療の有望な治療標的となると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

網膜静脈閉塞 (RVO) は, 網膜毛細血管の脱落, 虚血, および黄斑浮腫により重度の視力障害を引き起こす可能性がある。アドレノメデュリン (ADM) は, 全身で産生される血管拡張性ペプチドで, 抗炎症作用, 血管新生作用など様々な作用が報告されている。また RAMP2は ADM の受容体活調節タンパクであり, 血管においては AM-RAMP2系が重要な働きをしていることが明らかとなっている。ADM および RAMP2 は眼内でも高発現し, 炎症や虚血により発現上昇することが報告されている。そこで平林一貴は RVO における ADM-RAMP2系の意義を検討することにした。マウスで網膜中心静脈閉塞 (CRVO) を簡便に再現するモデルを開発し, このモデルを用いて毛細血管脱落, 虚血, 網膜浮腫および炎症などの病態を解析した。さらに, ADM の CRVO 治療薬としての可能性を検討した。

その結果平林一貴は次の結論を得た。

1. CRVO 処置マウスでは, 網膜出血, 静脈の拡張蛇行, 血管密度低下, 網膜浮腫を認め, 網膜層構造が粗造であった。マクロファージ, 活性化ミクログリアが網膜内に多数存在した。血管新生因子の発現が抑制され, ADM が著明に発現上昇し, 凝固因子や白血球接着分子, 炎症因子, 酸化ストレスマーカーの経時的上昇を認めた。

2. ADM ヘテロノックアウトマウス (+/-) および RAMP2+/- では, CRVO 処置後に WT と比較し血管密度減少を認めた。また ADM+/- の網膜では凝固因子や白血球接着分子, 炎症因子, 酸化ストレスマーカーの発現が上昇し, 免疫染色にて CD68陽性マクロファージ, ミクログリアは増加し, 抗炎症作用を持つ CD206陽性ミクログリアは減少した。

3. 反対に CRVO モデルへの ADM 投与は血管密度を上昇し, 凝固因子や白血球接着分子, 炎症因子, 酸化ストレスマーカーの低下を認め, CD68陽性マクロファージ, ミクログリアは減少し, CD206陽性ミクログリアは増加した。

4. 網膜血管内皮細胞株, TR-iBRB 細胞では, TNF- α 刺激により白血球接着分子, 炎症因子, 酸化ストレスマーカー, VEGF 受容体である VEGFR-2の発現が亢進したが, これらは ADM 添加で抑制され, ADM が網膜血管内皮細胞傷害を直接抑制することが示された。

以上の結果から, 平林一貴は, ADM が CRVO 処置後の血管再灌流を改善し, 抗凝固効果や内皮細胞傷害抑制効果を示すこと, また血管透過性亢進による網膜浮腫を抑制し包括的に CRVO の病態を改善する事を示し, ADM-RAMP2系が CRVO 治療の有望な治療標的となる可能性を示した。

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。

Predictors of improvement in low back pain after lumbar decompression surgery:
Prospective study of 140 patients (下肢神経症状に伴う腰痛の手術後変化～腰痛は除圧のみ
で改善するのか～)

大 場 悠 己

(論文内容の要旨)

【背景と目的】 国民生活基礎調査で明らかなように、腰痛は日本国民のほぼすべての年齢層にわたって1番もしくは2番目の愁訴であり日常診療で出会うことが多い。2012年の本邦の腰痛ガイドラインには『重度の慢性腰痛をもつ患者に対して、脊椎固定術を行うことにより疼痛軽減および機能障害を減じる可能性がある(Grade B)』『腰痛治療において脊椎固定術と集中的リハビリテーションとは明確な差は無い(Grade B)』と記載されている。また2017年の英国の国立健康保健衛生研究所のガイドラインは非特異的腰痛に対する固定術は、無作為化比較試験の一部としてのみ実施すべきであり、人工椎間板置換術は実施すべきでないとして述べている。手術治療による腰痛の軽減を期待し得る病態は限られているため、手術治療を行うのであれば治療する標的を明確に定めることが求められる。我々は腰部脊柱管狭窄症に対して椎弓切除術を、腰椎椎間板ヘルニアに対して腰椎椎間板ヘルニア摘出術をそれぞれ下肢神経症状の改善目的で行っている。この手術後に下肢神経症状のみならず腰痛の軽減も得られることを経験するが、腰椎除圧術による腰痛改善に関する報告は少ない。この研究の目的は腰椎疾患に対して固定術を併用しない腰椎手術の術後腰痛の改善程度を調べること。また腰痛改善の予測因子を検討することである。

【方法】 この研究は2013年9月に国保依田窪病院の倫理委員会で承認を得て開始した。2013年9月から2014年7月の期間に当研究への参加の同意をあらかじめ得られた140名(平均年齢60.4±18歳, 男性87名, 女性39名, 腰部脊柱管狭窄症80名, 腰椎椎間板ヘルニア60名)を対象とした。腰椎前後屈撮影で4mm以上, あるいは10°の椎間不安定性を認める患者, 30°以上の側彎を認める患者, 認知機能障害などで正確な問診が困難な患者は除外した。手術前, 術後2週, 3か月, 6か月の腰痛程度を Visual analog scale (0-10cm) (以下VAS) を用いて前向きに評価した。アンケート用紙は手術と関係の無いスタッフが渡した。腰痛の変化を評価後に腰痛が残存する術前予測因子を多変量解

析にて評価した。

【結果】 腰痛のVASは術前, 術後2週, 3か月, 6か月でそれぞれ4.4, 1.1, 1.3, そして1.9 cmであった。腰痛は術前から術後2週間に有意に軽減し (P<0.001), 術後2週から3か月の間にわずかだが有意に再増悪した (P<0.001)。術後6か月の時点で腰痛が残存している患者は47%であり, 術前と比較し腰痛の改善が得られていない患者は1/4であった。腰痛残存の独立した危険因子は変性側彎の有無 (OR4.2, P=0.007) であった。

【結論】 腰部脊柱管狭窄症に対する椎弓切除術と腰椎椎間板ヘルニアに対する腰椎椎間板ヘルニア摘出術の結果, 腰痛は術後2週間の時点で有意に改善した。腰痛残存の危険因子は変性側彎の存在であった。

(論文審査の結果の要旨)

腰痛は日本国民ほぼすべての年齢層にわたって1番もしくは2番目の愁訴であり日常診療で出会うことが多い。近年腰痛の治療目的で脊椎の広範囲固定術が行われることが増えてきたが, 一方で2017年の英国の国立健康保健衛生研究所のガイドラインにより非特異的腰痛に対する固定術を控えるように報告されている。腰部脊柱管狭窄症や腰椎椎間板ヘルニアにより下肢痛や下肢痺れの軽減を得られることはすでに報告されているが腰痛が軽減するかどうかについてはほとんど報告されていない。

固定術を併用しない腰椎除圧術のみを予定されている腰痛を有する腰部脊柱管狭窄症あるいは腰椎椎間板ヘルニア患者126人を対象に腰痛の変化を前向きに検討した。手術前, 術後2週, 3か月, 6か月の腰痛程度を Visual analog scale (0-10 cm) (以下VAS) を用いて評価し, 腰痛が残存する術前予測因子を多変量解析にて評価した。

その結果, 大場は次の結論を得た。

1. 腰痛のVASは術前から術後2週間に有意に軽減した。
2. 腰痛のVASは術後2週から3か月の間にわずかだが有意に再増悪したものの, 術前と比較すると術後6か月の時点でも腰痛は有意に軽減していた。

3. 術後6か月の時点で腰痛が残存した患者は47%であり、術前と比較し腰痛の改善が得られていない患者は1/4であった。

4. 腰痛残存の独立した危険因子は変性側彎の存在であった。

これらの結果より、腰部脊柱管狭窄症に対する椎弓切除術と腰椎椎間板ヘルニアに対する腰椎椎間板ヘルニア摘出術により腰痛が有意に改善することが分かった。術後2週の時点で既に有意な改善を認めており術

後半年の時点でも腰痛が改善した状態は維持されていた。また除圧術後に腰痛が残存する危険因子は変性側彎の存在であった。この結果から、変性側彎が無く腰部脊柱管狭窄症あるいは腰椎椎間板ヘルニアを有する患者に対しては固定術を用いなくても腰椎除圧術のみで腰痛の改善を得られ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。

KIR2DL2 combined with HLA-C1 confers risk of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma in younger patients (KIR2DL2とHLA-C1の組み合わせはC型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の若年発症リスクと関連する)

齊藤 博美

(論文の内容の要旨)

【緒言】C型慢性肝炎は、長年の経過で肝硬変から肝細胞癌(HCC)へと進展する。C型肝炎ウイルス(HCV)感染によるHCC発症の機序にはウイルス因子、環境因子、宿主因子が示唆されている。腫瘍免疫で重要な役割を持つナチュラルキラー細胞(NK細胞)は複数の活性化および抑制性受容体を発現しており、その活性は刺激と抑制のシグナルにより繊細なバランスでコントロールされている。悪性細胞に対する免疫学的監視は主にKIRやNKG2Dのような受容体がそれぞれ特定のHLAクラスI分子を認識することにより調節されている。KIR-HLAの組み合わせは、HCV感染におけるウイルスの自然排除、抗ウイルス療法の成績、さらにHCC発症との関連が報告されている。また、全ゲノム関連解析(GWAS)によりNKG2Dのリガンドの一つであるMICAの一塩基多型(SNPs)がHCV関連HCCの発症に影響することが最近報告された。しかし、日本人のHCV関連HCCにおけるKIRとHLA遺伝子型の関与はいまだ明らかではない。

【目的と方法】本研究は日本人におけるHLA、KIR、KIR-HLA、MICA SNPsとHCCの関連性を明らかにすることを目的とした。174人のHCC患者を含む日本人のC型肝炎患者787人と、健康人325人を対象とした。HLA-Bw4、-C1、-C2とKIRの遺伝子型はPCR-Sequence-specific primers (PCR-SSP)法を用いて決定し、これら遺伝子型の組み合わせ(KIR2DL1/2DS1-HLA-C2、2DL2/3/2DS2-HLA-C1、3DL1/3DS1-HLA-Bw4.)とHCC発症との関連を検討した。また

MICA 遺伝子の rs2596542 と rs1051792 遺伝子型は TaqMan SNP genotyping allelic discrimination method を用いて決定した。

【結果】C型肝炎患者を健康人と比較すると、HLA-Bw4およびKIR3DL1-HLA-Bw4の頻度は有意に高く、HLA-C2の頻度は低かった。HCC患者を65歳未満と65歳以上に層別化し、HLA・KIR遺伝子型とHCC発症との関連を検討すると、HLA-Bw4とHLA-C1アレルの頻度は両群で同等であり、KIR2DL2とKIR2DS2、KIR2DL2-HLA-C1とKIR2DS2-HLA-C1が若年HCC患者で頻度が高く、KIR2DS5とKIR3DS1の頻度が低かった。MICAのSNPsについてC型肝炎患者を健康人と比較すると、rs2596542 Aアレルと、rs1051792 Aアレルがともに有意に頻度が高かった。また、両SNPsのAアレルは、若年HCC患者で有意に頻度が高かった。両SNPsのAAの頻度も、同様に有意差があった。若年患者のHCC発症に影響する因子をロジスティック回帰分析により検討したところ、KIR2DL2-HLA-C1C1 (OR=2.75, P=0.015) と、rs1051792AA (OR=2.48, P=0.011) が有意な危険因子として抽出された。

【考察】HCV感染の慢性化とHLAクラスIアレルの相関はこれまでも報告があるが、本研究では健康人と比較しC型肝炎患者においてHLA-Bw4の頻度が高く、HLA-C2の頻度が低く、KIR3DL1-HLA-Bw4の組み合わせの頻度が有意に高いことが示された。スペインやイタリアからはKIR3DS1とHLA Bw4がHCC患者で有意に少ないと報告されているが、本研究ではHCC発症と関連するものは認めなかった。

一方で HCC 患者を年齢で層別化し検討すると 65 歳未満の若年 HCC 患者で KIR2DL2-HLA-C1 の頻度が有意に高率であった。若年 HCC 患者では、NK 細胞活性が抑制されることが早期の HCC 発症に影響する可能性が示唆された。また、これまでに MICA の 5'UTR の rs2596542 と HCV 関連 HCC および血中可溶性 MICA 濃度高値との関連が示されており、NK 細胞活性の低下と関連することが報告されている。本研究では MICA SNPs と HCC の関係は示されなかったが、若年 HCC との関連は示された。ロジスティック回帰分析では、KIR2DL2-HLA-C1C1 と rs1051792AA が 65 歳未満の患者における HCC 発症の独立したリスク因子であった。ただし、本研究は後ろ向きの横断研究であり、研究結果の裏付けには、今後より大規模な前向き研究が必要である。

【結語】日本人では 65 歳未満の HCV 関連 HCC の発症に KIR2DL2-HLA-C1C1 と MICA 遺伝子の rs1051792AA が関連していることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

C 型慢性肝炎は長年の経過で肝硬変から肝細胞癌 (HCC) へと進展する。これまでに C 型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染、肝の線維化、HCC 発症などにナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) が影響していることが示唆され、NK 細胞活性を制御する NK 細胞受容体と C 型慢性肝炎に対する治療成績や HCC 発症との関連も報告されてきた。NK 細胞の受容体には、Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) や、Natural killer receptor group2 (NKG2) 等があげられ、KIR は主に HLA class I をリガンドとし、NK 細胞の活性化型受容体の 1 つである NKG2D は MHC class I 関連分子をリガンドとする。

今回、日本人の HCC 患者を含む慢性 C 型肝炎患者および健康人を対象として、KIR、HLA の遺伝子多型および NKG2D のリガンドである MICA の一塩基多型 (SNPs) と HCV 関連 HCC との関連を検討した。

HLA-Bw4、HLA-C1、HLA-C2 と KIR の遺伝子型を PCR-SSP 法を用いて決定し、遺伝子型の組み合わせと HCC 発症との関連を検討した。また、MICA 遺伝子の SNPs (rs2596542、rs1051792) を TaqMan SNP genotyping allelic discrimination method を用いて決定し、HCC 発症との関連を検討した。

その結果、齊藤博美は次の結論を得た。

1. 慢性 C 型肝炎患者と健康人の比較では、慢性 C 型肝炎患者で HLA-Bw4 の頻度が高く、HLA-C2 の頻

度が低かった。KIR の頻度は両者に差はなかったが、KIR と HLA の組み合わせでは、慢性 C 型肝炎患者で KIR3DL1+HLA-Bw4 の組み合わせの頻度が高く、KIR2DL1+HLA-C2 の組み合わせの頻度が低かった。

2. 慢性 C 型肝炎患者の HCC+ と HCC- の比較では、HLA および KIR の頻度に差はなかった。
3. HCC の 65 歳未満の若年発症と、65 歳以上の高齢発症の比較では、HLA の頻度に差はなかったが、HCC の若年発症患者で KIR2DL2 と KIR2DS2 の頻度が高く、KIR2DS5 と KIR3DS1 の頻度が低かった。KIR と HLA の組み合わせでは、HCC 若年発症患者で KIR2DL2+HLA-C1 と KIR2DS2+HLA-C1 の組み合わせの頻度が高く、HLA-C1 をホモ接合体で持つ場合にオッズ比の上昇が見られた。
4. MICA SNPs について HCC の若年発症患者と高齢発症患者で比較をすると、rs2596542、rs1051792 とともに若年発症患者で A allele の頻度が高く、ホモ接合体を持つ場合はオッズ比が上昇した。
5. 患者背景、遺伝的要因を含めロジスティック回帰分析で HCC 若年発症に関連する因子を検討し、KIR2DL2+HLA-C1C1 (OR=2.75; 95%CI 1.21-6.21, P=0.015) と rs1051792 AA (OR=2.48, 95%CI 1.23-4.98, P=0.011) が独立した危険因子であった。

これらの結果より、HCV 関連 HCC 若年発症には NK 細胞の活性化に関係する遺伝的背景が関連していると考えられた。

以上の内容より、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。

Predictive Factors for Autoimmune Pancreatitis Relapse After 3 Years of Maintenance Therapy (維持療法3年以降の自己免疫性膵炎再燃リスク因子)

中 村 晃

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis; AIP) は、リンパ形質細胞浸潤を伴う硬化性膵炎、血清 IgG4 高値、著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする。また、膵以外に涙腺・唾液腺病変、肺、肺門・縦隔リンパ節腫脹、胆管、腎、後腹膜といった全身の臓器にも同様の病理学的背景を有する病変が存在することが判明し、IgG4 関連疾患という疾患概念が確立された。高齢の男性に多く、膵腫瘤を形成し、閉塞性黄疸を来すことがあり、しばしば膵癌との鑑別を要する。経口コルチコステロイド投与が非常に有用であるが、ステロイド中止後の40~60%、ステロイド少量投与による維持療法中でも20~30%が再燃を来すとされる。再燃は膵石形成や膵外分泌機能の低下のリスクとされており、本邦では再燃が多いとされる3年間は少なくとも維持療法継続が推奨されている。再燃予防の観点からは維持療法3年以降もステロイド継続が望ましいが、長期投与による有害事象も懸念される。本検討では、維持療法3年以降の再燃リスク因子を明らかにすることを目的とした。

【方法】2015年12月31日までに当院、もしくは関連施設で診断から5年以上治療されたAIP患者56例を対象とした。ステロイド非導入、ステロイド中止歴などにより18例が除外され、維持療法を5年以上継続している38例を最終的に対象とした。この38例について、維持療法3年未満の再燃の有無は問わず、3年以降の再燃について、再燃群、非再燃群に分けて後方視的に比較、検討を行った。

【結果】再燃群13例、非再燃群25例であり、多変量解析により、診断時の膵外病変4個以上 (hazard ratio, 5.82; 95% confidence interval, 1.203-28.192)、維持療法3年時点での血清 IgG 1400 mg/dL 以上 (hazard ratio, 4.41; 95% confidence interval, 1.096-17.790) が、維持療法3年以降の再燃リスク因子であることが明らかとなった。また、リスク因子を2個有する症例では、1個以下の症例に比べ、累積再燃率が高値であった。

【結論】AIPにおける維持療法3年以降の再燃について、2個のリスク因子を明らかにした。この結果は、

ステロイド治療戦略を考える上で、再燃リスクやステロイドによる有害事象を最小限にするための一助となる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis; AIP) は、リンパ形質細胞浸潤を伴う硬化性膵炎、血清 IgG4 高値、著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする自己免疫的機序による慢性膵炎である。また、全身の臓器に同様の病理学的背景を持つ病変を合併し、IgG4 関連疾患という疾患の膵病変と考えられている。ステロイド (prednisolone; PSL) が有用で、本邦では再燃が多いとされる3年間の維持療法継続が推奨されている。

維持療法を5年以上継続している38例を維持療法3年以後の再燃の有無で、再燃群13例、非再燃群25例に分けて維持療法3年以後の再燃リスク因子の検討を行った。検討項目は、診断時患者背景、診断時・維持療法3年時点の検査所見や画像所見、維持療法3年未満・以後の再燃とした。

その結果、中村は次の結論を得た。

1. 再燃群で、診断時の黄疸が有意に低頻度であった。
2. 再燃群で、診断時、涙腺・唾液腺、肺、腎病変、後腹膜線維症の合併頻度が有意に高く、膵外病変4個以上の症例を有意に多く認めた。
3. 再燃群で、膵外病変による症状に対しPSLを導入した症例が有意に多かった。
4. 両群で、維持療法3年未満の再燃頻度や臓器に差を認めず、3年以後の再燃は膵が最も高頻度であった。
5. 再燃群で、維持療法3年時点のIgG、IgG4が有意に高値であり、維持療法3年時点のIgG 1400 mg/dL、IgG4 330 mg/dLをカットオフ値とすると、比較的良好な感度・特異度が得られた。
6. 診断時、維持療法3年時点の膵前後径を比較すると、再燃群で、維持療法3年時点の頭部、尾部が有意に厚く、頭部の縮小率が有意に低値であった。
7. 膵石形成や石灰化に差を認めなかった。
8. 多変量解析により、診断時の膵外病変4個以上、維持療法3年時点の血清IgG 1400 mg/dL以上を維

持療法3年以後の再燃リスク因子と同定した。また、リスク因子を2個有する症例は、1個以下の症例に比べ、累積再燃率が高値であった。

以上より、AIPにおける維持療法3年以後の再燃について、2個のリスク因子を明らかにした。この結

果は、ステロイド治療戦略において、再燃リスクやPSLによる有害事象を最小限にするための一助となる可能性があると考えられる。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。

Association of Serum Autotaxin Levels with Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C (C型慢性肝炎患者における血清 Autotaxin の肝線維化マーカーとしての有用性)

山 崎 智 生

(論文の内容の要旨)

【目的】 Autotaxin (ATX) は血清中に存在する脂質分解酵素であり、肝の類洞内皮細胞で代謝される。このため、肝線維化に伴う代謝低下で血中 ATX 濃度が上昇すると予測され、新規肝線維化マーカーとしての可能性が示唆されている。本研究では、C型慢性肝炎および肝硬変患者を対象に、ATX の肝線維化予測マーカーとしての有用性を検討することを目的とした。

【方法】 1982年から2015年までに当院においてC型慢性肝疾患と診断された1030症例のうち、経皮的および腹腔鏡下肝生検を施行し、かつ、生検時の血清が保存されている593例を対象とした。肝生検施行時の凍結保存血清を用い、ラット抗 ATX 抗体を用いたサンドイッチ EIA 法により ATX 濃度を測定した。肝の組織学的評価は METAVIR scoring system を用いて行った。また健常人160名についても同様に測定し、患者群と比較検討した。ATX は性別による差異が報告あり、本研究においては全て男女別に統計学的解析を行った。

【結果】 患者背景は男性292名、女性301名で年齢中央値はそれぞれ56歳、60歳であった。ATX は健常人 (0.76 mg/L) と比較し、患者群 (1.40) で有意に高かった ($p < 0.001$)。男性での健常人および肝線維化ステージ F1, F2, F3, F4 の ATX 中央値はそれぞれ 0.70, 0.90, 1.33, 1.56, 2.17であり、女性ではそれぞれ 0.82, 1.33, 1.96, 2.21, 2.16であり、線維化の進行とともに ATX が上昇することが分かった (男性: $r = 0.77$, $p < 0.001$, 女性: $r = 0.73$, $p < 0.001$)。ATX は既存の肝線維化マーカーである WFA+ - M2BP, APRI, FIB-4 index, Forn's index と正の相関関係にあり、中でも WFA+ - M2BP との相関係数は男性 0.829 ($p < 0.001$)、女性 0.710 ($p < 0.001$) と高い値を示した。肝線維化の診断精度について ATX の ROC 曲線下面積を計算すると、男性では F1以上

(0.910), F2以上 (0.861), F3以上 (0.834), F4 (0.862), 女性では F1以上 (0.930), F2以上 (0.801), F3以上 (0.782), F4 (0.739) と早期線維化診断において高い診断能を有していた。また ATX は組織学的活動性 (男性: $r = 0.71$, $p < 0.001$, 女性: $r = 0.67$, $p < 0.001$)、ALT (男性: $r = 0.44$, $p < 0.001$, 女性: $r = 0.38$, $p < 0.001$)、AFP (男性: $r = 0.64$, $p < 0.001$, 女性: $r = 0.55$, $p < 0.001$) と正の相関関係にあった。

【結論】 C型慢性肝炎および肝硬変患者において、性別の考慮は必要であるものの、ATX は肝線維化予測マーカーとして有用であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者において、肝硬変への進展や肝細胞癌の発症は肝線維化の程度と強く関連しており、肝線維化ステージを評価することは臨床的に重要である。現在、肝線維化を評価するゴールドスタンダードは肝生検であるが、侵襲的検査であり、サンプリングエラーなどの問題点もある。このため、非侵襲的且つ正確に肝線維化を評価することができるバイオマーカーが必要とされている。Autotaxin (以下 ATX) は1992年にヒト悪性黒色腫細胞株の培養上清中より抽出された125キロダルトンの糖蛋白質である。ATX は細胞外に分泌タンパクとして放出され、リゾホスファチジル酸 (LPA) 産生反応を触媒することで様々な生理活性を發揮するといわれている。一方、ATX は肝類洞内皮細胞により代謝され、線維化の進行した肝臓においては代謝が低下し、血中濃度が上昇すると考えられている。すなわち新規肝線維化予測マーカーとして有用である可能性が示唆されている。臨床検体を用いた多数例での検討はなく、ATX の臨床的特徴はいまだ明らかにされていない。1982年から2015年までに当院においてC型慢性肝疾患と診断された1030症例のうち、経皮的および腹腔鏡下肝生検を施

行し、かつ、生検時の血清が保存されている593例を対象とし、組織学的肝線維化と血清 ATX との相関関係を検討した。

その結果、山崎智生は以下の結論を得た。

1. ATX は健康人および患者群において男性と比較し、女性で有意に高値である。
2. ATX は組織学的肝線維化ステージと有意な正の相関を示す。
3. ATX は既存の肝線維化マーカーと比較し、劣らないマーカーである。
4. ATX は特に F1, F2 など早期線維化の判別能において優れている。

多数例の検討により、C型慢性肝炎患者における血清 ATX と組織学的肝線維化との相関を明らかにした報告である。ROC 解析の結果からは、特に早期肝線維化の診断能に優れていることが判明した。現在、C型肝炎治療の第一選択になっている直接作用型抗ウイルス薬 (DAAs) は副作用が少なく著効率が極めて高いことから、これまで治療対象になりにくかった高齢者や肝機能正常例においても使用することができるようになっており、ATX で早期肝線維化を評価することが治療適応を判断する一助になりうると考えられた。

従って主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Deficiency of calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) disrupts the excitatory-inhibitory balance of synapses by down-regulating GluN2B. (CASK 欠損で GluN2B の発現低下による興奮性・抑制性シナプスのバランス異常をきたす)

Enas Ahmed Fathalla Kasem

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】シナプス足場タンパク質である CASK は、シナプスの形成や機能に関わっていると考えられている。近年、CASK が MICPCH 症候群の原因遺伝子であることが判明している。MICPCH 症候群は、小脳・橋の低形成を特徴とする X連鎖性神経発達障害で、知的障害や點頭てんかんを伴う症例が多く、患者のほとんどは女児である。X染色体上の遺伝子は、女性ではX染色体不活性化を受け、2本ある染色体の一つが細胞ごとにランダムに不活性化されることが知られている。本研究で、MICPCH 症候群の神経病態を解明すべく、CASK のメスヘテロノックアウトマウスを疾患モデルとして、CASK 欠損ニューロンの状態を電気生理学的、形態学的に解析した。

【方法】CASK メスヘテロノックアウトマウスから急性脳スライスを作成し、大脳皮質のニューロンから patch pipette で mRNA を吸引し、single-cell RT-PCR によりニューロンごとのジェノタイピングを行い、CASK 発現ニューロンと、CASK 欠損ニューロンを区別した。patch clamp 法により、CASK 発現ニューロンと、CASK 欠損ニューロンでのニューロンの発火様式、興奮性および抑制性シナプスの自発的活動 (mEPSC と mIPSC)、電気刺激によるシナプス応答 (eEPSC と eIPSC) を解析した。子宮内エレクトロポレーション法を用いて、CASK および CASK の制御下にあると予測される GluN2B に対する shRNA、

野生型および変異型 CASK、野生型 GluN2B のコンストラクトをマウス大脳皮質2/3層の錐体ニューロンに導入し、patch clamp 法によりシナプス伝達機能を測定した。

【結果】single-cell RT-PCR により、CASK メスヘテロノックアウトマウスの脳は、CASK 発現ニューロンと CASK 欠損ニューロンが、ランダムなモザイク状に分布していることが確認された。patch clamp 法により CASK 欠損ニューロンの電氣的活動を解析した結果、mEPSC の頻度が上昇し、mIPSC の頻度が低下するという興奮性・抑制性シナプス機能のバランス異常が認められた。子宮内エレクトロポレーション法によりマウスの大脳皮質2/3層の錐体ニューロンに CASK の shRNA を導入し、CASK の発現を抑制 (knockdown) したものに対し、CASK の各種変異コンストラクトでレスキューを試みたところ、CASK のグアニレートキナーゼドメインを欠損したコンストラクトでは CASK 欠損の表現型がレスキューされなかった。CASK のグアニレートキナーゼドメインの、TBR1 という転写調節因子との結合部位に変異を加えた T704A 変異でもレスキューできなかった。CASK-TBR1 複合体は、NMDA 受容体サブユニットである GluN2B の転写を促進することが知られているため、CASK を knockdown したニューロンに GluN2B を過剰発現すると、CASK 欠損で見られた興奮性・抑制性シナプスのバランス異常がレスキューされた。この

ことから、この表現型は CASK の TBR1 との結合を介した GluN2B の転写が、ニューロンの発達過程で正常に機能しないために起こっていることによって起こることが示唆された。

【結論】 CASK メスヘテロノックアウトマウスをモデルとした研究から、MICPCH 症候群の脳では、X 染色体不活性化によって CASK 欠損ニューロンがモザイク状の分布をし、CASK 欠損ニューロン特異的な興奮性・抑制性シナプスのバランス異常が起きていることを見出した。そして、これは CASK-TBR1 複合体による GluN2B の転写の異常によることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

近年、MICPCH 症候群の原因遺伝子として CASK が特定されていた。CASK は、X 染色体上の遺伝子であること、MICPCH 症候群は、ほぼ女性特有の疾患であることから、Enas Ahmed Fathalla Kasem は、X 染色体不活性化に着目し、メスの CASK ヘテロノックアウトマウスをモデルとして、分子病態メカニズムの解明を目指した。このため、脳切片において、パッチピペットを用いた single-cell RT-PCR によって、CASK 発現ニューロンと CASK 欠損ニューロンを同定し、パッチクランプ法を用いた電気生理学実験によって、シナプス機能の解析を行った。さらに、子宮内エレクトロポレーション法を用いて、CASK に

対する shRNA とレスキューコンストラクトを大脳皮質錐体ニューロンに導入することにより、CASK 欠損によるシナプス機能の異常の分子メカニズムの解析を行った。

その結果、Enas Ahmed Fathalla Kasem は、次の結論を得た。

1. CASK ヘテロノックアウトマウスの脳では、CASK 発現ニューロンと CASK 欠損ニューロンが、それぞれ 50 % ずつの割合で混在していた。
2. CASK ヘテロノックアウトマウスの脳では、CASK 欠損ニューロンに投射する興奮性シナプスの数が増加し、抑制性シナプスの数が減少していた。
3. CASK 欠損ニューロンにおけるこれらの異常は、CASK がグアニレートキナーゼドメインを介して転写因子 TBR1 と結合し、NMDA 受容体サブユニットの一つである GluN2B の発現を促進する機能が破綻することによることを突き止めた。

これらの結果により、MICPCH 症候群における、脳のシナプス機能の異常の様態が明らかとなった。さらに、X 染色体不活性化と関連した女性特有の神経発達障害のモデル動物による研究はこれまでになく、学術的に意義深いものであると判断された。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。

Visualization of multiple organ amyloid involvement in systemic amyloidosis using ¹¹C-PiB PET imaging (¹¹C-PiB PET を用いた全身性アミロイドーシスにおける多臓器アミロイド沈着の評価)

江 澤 直 樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 全身性アミロイドーシスはアミロイド蛋白が全身諸臓器に沈着し機能障害を起こす生命予後不良な疾患群で、早期の適切な診断、治療が予後の改善に重要である。診断には組織学的なアミロイド沈着の証明が必要だが、組織生検には侵襲性や一部の組織のみしか評価できない問題点が存在する。一方、アミロイドイメージングは全身性アミロイドーシスの低侵襲的な評価方法となりうる。¹¹C-Pittsburgh compound B (¹¹C-PiB) を用いたアミロイド PET は Aβ 型アミロイドが脳に沈着するアルツハイマー病における評価方法として確立しているが、PiB はアミロイド結合色素であるチオフラビン T の誘導体であり、理論的には

様々なアミロイド蛋白と結合すると考えられる。今回、全身性 AL アミロイドーシス患者と遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者における低侵襲な全身アミロイド沈着の評価法として、¹¹C-PiB PET の有用性を検討した。

【方法】 対象は 2015 年 6 月から 2016 年 12 月までの間に信州大学医学部附属病院で診断、検査された全身性 AL アミロイドーシス患者 7 名、遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者 7 名、TTR 遺伝子変異を有する未発症患者 1 名、健常者 3 名。¹¹C-PiB を用いた全身アミロイド PET 検査を施行し、各臓器における ¹¹C-PiB の異常取り込みの有無と臨床的臓器障害の有無および組織学的なアミロイド沈着との関連を検討した。臨床

の臓器評価は、第10回国際アミロイド・アミロイドーシス会議コンセンサスガイドラインに従い評価した。¹¹C-PiB PET 画像は、PiB 投与後30分から被験者の頭頂部から骨盤まで撮影し、得られた画像をアミロイドーシス専門医3名と放射線科医1名により評価した。Maximum intensity projection (MIP) 画像において¹¹C-PiB の集積を視覚的に評価した。脳の評価は、Standardized uptake value ratio (SUVR) 画像を、基準を橋において標準化することにより評価した。異常集積は視覚的に3段階 (mild (+), moderate (++), intense (+++)) で分類した。また、心筋と胃粘膜における生検組織のアミロイド沈着所見と、同組織のPiB 集積所見とを対比、検討した。

【結果】 AL アミロイドーシス患者と ATTR アミロイドーシス患者で、MIP 画像において心臓、胃、甲状腺に¹¹C-PiB の異常集積を認め、臨床的臓器障害と良好に関連していた。以上から、これらの臓器は¹¹C-PiB を用いたアミロイド沈着の評価が可能であると考えられた。一方、PiB の代謝経路である尿路 (腎臓、尿管、膀胱) と腸肝循環系 (肝臓、胆嚢、胆管、小腸) は健常者を含む全被験者で集積を認めており、本 PET 検査はこれらの臓器の評価には適さないと考えられた。脾臓、涙腺、唾液腺、リンパ節、脳、頭皮、外眼筋、鼻腔、咽頭、舌、頸部筋では、臨床的臓器障害に比べて¹¹C-PiB PET の感度が高く、無症候性のPiB 集積が多数例で観察された。一方、末梢神経障害を有する患者においても末梢神経への¹¹C-PiB の集積は認められなかった。¹¹C-PiB で異常集積を認めた部位のアミロイド沈着が心筋と消化管粘膜の生検組織において確認された。

【結論】 先行研究にて、全身性アミロイドーシスを可視化するために様々な核種を用いた画像評価が行われてきた。しかしいずれの核種も AL アミロイドーシスの心アミロイド沈着は検出できていなかった。¹¹C-PiB PET の最大の利点は、遺伝性 ATTR アミロイドーシスに加えて、これまで核医学的な評価が困難であった AL アミロイドーシスにおける心臓へのアミロイド沈着が検出できることであると考えられた。本研究において、心臓と消化管における¹¹C-PiB 異常集積と組織学的なアミロイド沈着の良好な関連が確認された。一方、脾臓、涙腺、唾液腺、甲状腺、リンパ節においては患者群でのみ集積を認め病的な集積である可能性が考えられたが、本研究では、異常集積と組織学的なアミロイド沈着との関連は確認しておらず、今後

の病理組織的な検討が必要である。腎・尿路系と肝臓系、肺、末梢神経については¹¹C-PiB PET では評価できず、他の評価方法を併用する必要がある。

¹¹C-PiB PET は非侵襲的に全身性 AL アミロイドーシスや遺伝性 ATTR アミロイドーシスにおける全身臓器のアミロイド沈着を評価することが可能である。¹¹C-PiB PET は、定量的な解析により全身性アミロイドーシスの早期診断や治療効果判定に利用できる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

全身性アミロイドーシスはアミロイド蛋白が全身諸臓器に沈着し機能障害を起こす生命予後不良な疾患群で、早期の適切な診断、治療が予後の改善に重要である。診断には組織学的なアミロイド沈着の証明が必要だが、アミロイド結合色素であるチオフラビンTの誘導体である¹¹C-Pittsburgh compound B (¹¹C-PiB) を用いたアミロイド PET が全身性アミロイドーシスの低侵襲的な評価方法となる可能性がある。今回、全身性 AL アミロイドーシス患者と遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者において¹¹C-PiB PET の有用性を検討した。

対象は2015年6月から2016年12月までの間に信州大学医学部附属病院で診断、検査された全身性 AL アミロイドーシス患者7名、遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者7名、*TTR* 遺伝子変異を有する未発症患者1名、健常者3名。¹¹C-PiB を用いた全身アミロイド PET 検査を施行し、各臓器における¹¹C-PiB の異常取り込みの有無、臨床的臓器障害の有無および心筋と胃粘膜における組織学的なアミロイド沈着との関連を検討した。

その結果、江澤直樹は次の結論を得た。

1. AL アミロイドーシス患者と ATTR アミロイドーシス患者で、MIP 画像において心臓、胃、甲状腺に¹¹C-PiB の異常集積を認め、臨床的臓器障害と良好に関連した。これらの臓器は¹¹C-PiB を用いたアミロイド沈着の評価が可能である。
2. PiB の代謝経路である尿路 (腎臓、尿管、膀胱) と腸肝循環系 (肝臓、胆嚢、胆管、小腸) は健常者を含む全被験者で集積を認め、本 PET 検査はこれらの臓器の評価には適さない。
3. 涙腺、唾液腺、リンパ節、脳、頭皮、外眼筋、鼻腔、咽頭、舌、頸部筋、脾臓、では、臨床的臓器障害に比べ¹¹C-PiB PET の感度が高い。
4. 末梢神経障害を有する患者においても末梢神経へ

の¹¹C-PiBの集積は認めない。

5. ¹¹C-PiBで異常集積を認めた部位のアミロイド沈着を心筋と消化管粘膜の生検組織において確認した。本研究において、¹¹C-PiB PETは非侵襲的かつ高感度にALアミロイドーシスと遺伝性ATTRアミロイ

ドーシス患者の全身アミロイド沈着を評価することが可能であった。心筋と消化管粘膜においてはPiB異常集積と組織学的なアミロイド沈着の関連が確認された。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。

Comparison of administration of platelet concentrates suspended in M-sol or BRS-A for pediatric patients (小児患者におけるM-solまたはBRS-Aに浮遊させた血小板製剤投与の比較)

小 嶋 俊 介

(論文の内容の要旨)

【背景】血小板輸血によるアレルギー反応(以下、ATRとする)などを含めた非溶血性輸血副作用を軽減する目的で洗浄血小板が調製されており、その効果は明らかである。洗浄血小板調製において良質な添加液(以下、PASとする)は必要不可欠であり、様々な国でその報告がなされているが、日本では未だに標準化され市販されているPASがない。

近年、M-solとBRS-Aが新たなPASとして報告されており、それらは市販の輸液を混和して調製され、臨床応用されている。日本輸血・細胞治療学会の洗浄血小板に関するガイドラインでは、M-solまたはBRS-Aのように重炭酸を含むPASを推奨しているが、どちらが優先されるべきか明確にされていない。それゆえに、2つのPASによる洗浄血小板について比較し明らかにすることが必要である。

【対象および方法】2013年4月から2018年3月までに治療や疾患により血小板減少を来した血小板輸血を実施した19歳以下の血液腫瘍小児患者を対象とした。なお、2013年4月から2015年9月まではM-solを用いた血漿置換法による洗浄血小板を提供(以下、RPC-M群とする)し、2015年10月から2018年3月までは同様にBRS-Aを用いて提供(以下、RPC-B群とする)した。また、全期間内で非洗浄の血小板(以下、P-PC群とする)をコントロール群とした。

血小板輸血後のATR発症頻度は、对患者における頻度と対製剤バッグ数における頻度を算出し、3群間で評価した。輸血効果は、輸血前後の血算値より補正血小板増加数(以下、CCIとする)を算出し、3群間で評価した。なお、CCIにおいて、免疫学的輸血不応、感染、移植後GVHD、血管内凝集、脾腫大、出血等を来していた患者は除外した。また、洗浄血小板の機能や品質について、調製前後のサンプルを用いて評価した。検定は、いずれもEZR softwareを用い、有

意水準5%で検証した。

【結果】P-PC群では、84患者に対して679本が輸血され、ATR発症は12患者(14.3%)において12本(1.8%)であった。同様にRPC-M群およびRPC-B群では、それぞれ59患者に対して1182本、58患者に対して1044本が輸血され、ATR発症は1患者(1.7%)において5本(0.4%)、4患者(6.9%)において4本(0.4%)であった。P-PC群とRPC-M群およびRPC-B群では有意にATR頻度が低下していた。なお、3群は、年齢、性別、診断名の構成要素において群間での有意差を認めなかった。また、各群のCCIの中央値は、それぞれ $1.50 \times 10^{10}/L$ 、 $1.38 \times 10^{10}/L$ 、 $1.40 \times 10^{10}/L$ であり、いずれも有意差を認めなかった。さらに、血小板の機能および品質の評価においては、血小板活性化の指標であるCD62Pの陽性率の平均値は、それぞれ4.37%、3.92%、3.97%であり、洗浄操作による血小板の活性化を認めなかった。また、各洗浄血小板の操作における血小板回収率と蛋白除去率については、RPC-M群が90.56%、95.78%であり、RPC-B群が88.49%、95.90%であり、PASの違いによる操作の影響はなかった。その他の品質項目に関しては、PASの組成の相違による差のみであった。以上より、M-solとBRS-AにおいてPASの違いによるATR予防効果および輸血効果への影響はないことが示された。

【考察】今回の用手法による洗浄は血漿蛋白除去率が90-95%程度であり、約99%の血漿蛋白を除去する自動化法ほどの蛋白除去率を得ることは難しかったが、同様の報告より、PASや調製方法の違いによらずATRを効果的に予防することができたと考えられる。当院で洗浄血小板を使用している患者において、軽微な副作用を発症した患者はいたが、重篤なATRのために輸血を中止せざるを得なかった小児の経験はない。このことで改めて洗浄血小板の有効性が示された。

一方で、洗浄血小板は洗浄操作や血小板の活性化に

伴う短寿命化による輸血効果の低下が懸念されている。今回、異なる PAS に関して、同一方法で洗浄したところ、CCI に重大な違いは生じなかったことより、この 2 つの PAS の選択においては輸血効果に影響を与えないと考えられる。洗浄血小板において、血小板機能を維持するためには様々な電解質等の組成が重要であり、2 つの PAS において異なる組成の輸液を用いていることより、それらは同じではない。しかし、in vitro での血小板機能の品質評価より、実臨床において 2 つの PAS による血小板機能は同等であると考えられる。

従来の PAS と比較して、M-sol は優れている PAS であることが多数報告されている。M-sol に比較して、BRS-A は調製が容易であり、その非劣勢性については RPC-B 群の投与により確認された。しかし、BRS-A に浮遊させた洗浄血小板輸血の効果と安全性は見られたが、十分な証拠は確認されていないままである。今後は、適応疾患の拡大や成人症例における検証を行うための大規模な前向き研究が必要である。

【結語】小児患者において、異なる 2 つの PAS を用いた洗浄血小板は、いずれも臨床上、同等の血小板として輸血効果が期待でき、ATR 予防に有用であることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

1990年代より、血小板輸血によるアレルギー反応(以下、ATR とする)を軽減する目的で洗浄血小板が調製されており、その効果は明らかである。日本では生理食塩液から始まり多くの添加液(以下、PAS とする)が使用されているが、未だに標準化され市販されている PAS がなく、M-sol と BRS-A が新たな PAS として臨床応用されている。しかし、これらの PAS を比較した報告はないため、2 つの PAS による洗浄血小板について後ろ向きに比較検討した。

治療や疾患により血小板減少を来した血小板輸血を実施した19歳以下の血液腫瘍小児患者を対象とした。検討期間は5年間であり、前半期はM-solを用いて、後半期はBRS-Aを用いて洗浄血小板を提供した。また、全期間内で非洗浄の血小板をコントロール群とした。3群間における血小板輸血後のATR発症頻度、輸血前後の血算値より算出した補正血小板増加数(以下、CCI とする)、調製前後のサンプルを用いた洗浄血小板の機能や品質検査について評価した。機能および品質評価は、pH、電解質の測定、フローサイトメトリーによるCD62P陽性率に関して評価した。

その結果、小嶋俊介は次の結論を得た。

1. 洗浄血小板群における ATR 発症頻度はコントロール群と比較して有意に低下していた。
2. 輸血を中止するような重篤な ATR は全く起きなかったことより、洗浄血小板が ATR の予防に大きく寄与していることが確認された。
3. 洗浄血小板調製に伴い血小板回収率や血小板の短寿命化による輸血効果の低下が懸念されていたが、各 PAS における洗浄血小板の輸血効果はコントロール群と比較して同等であることが示された。
4. 血小板活性化の指標である CD62P の陽性率を比較したところ、洗浄操作および異なる PAS 間における活性化は認めず、血小板機能は維持されていることが示された。

これらの結果より、M-sol と BRS-A において PAS の違いによる ATR の予防効果および輸血効果への影響はないことが示された。また、多数の臨床報告がされている M-sol と比較し、BRS-A の非劣勢性について確認された。

現在までにこの 2 つの PAS を比較した臨床報告はされておらず、過去の小児患者における洗浄血小板報告との比較もされていることより、血小板輸血による非溶血性副反応の予防に関する重要な臨床報告といえる。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。

Lower number of 5-hydroxymethylcytosine-expressing cells in plasma cell myeloma than in reactive plasma cell hyperplasia : A useful immunohistochemical approach for identification of neoplastic plasma cells (多発性骨髄腫では反応性形質細胞過形成と比較して5-ヒドロキシメチルシトシン発現細胞の減少が見られる。：腫瘍性形質細胞の同定に有用な免疫組織化学的手法)

大谷 真紀

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】多発性骨髄腫 (Plasma cell myeloma : PCM) は、骨髄における形質細胞の異常な増殖によって定義される血液悪性腫瘍であり、その診断には、免疫グロブリン軽鎖の免疫染色またはフローサイトメトリーによる表面マーカー分析が必要であるが、これらは時には困難なことがある。哺乳類におけるシトシン5-positionの異常メチル化 (5-mC) は癌におけるエピジェネティックな特徴としてよく知られている。5-mCはTET family 蛋白, Fe²⁺, α -ケトグルタル酸などを介した酸化によって5-hmCに転換され、5-hmC発現の低下はいくつかの癌および造血器悪性腫瘍で生じることが知られている。他の固形腫瘍・造血器腫瘍において、5-hmCの発現低下が悪性腫瘍のマーカーのひとつとして報告されていることから、今回5-hmCの免疫組織化学が、腫瘍性形質細胞・非腫瘍性形質細胞の鑑別における補助的な診断手法として応用可能か評価を行った。

【方法】まつもと医療センター松本病院臨床検査科で2010年から2015年までの間に診断された、31例のPCM症例および14例の良性反応性形質細胞増生病変のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いて、免疫組織化学により、腫瘍性形質細胞と非腫瘍性形質細胞における5-hmCの発現を比較した。

【結果】5-hmCの免疫組織化学では、CD138陽性でかつグロブリン軽鎖の偏りを伴う腫瘍性形質細胞集簇において5-hmC陽性細胞数の減少が見られた。一方、反応性の形質細胞増生巣においては、比較的多くの5-hmC陽性細胞が確認された。CD138陽性形質細胞における5-hmC陽性率の平均は、PCMで7.8%、形質細胞過形成で81.5%であった。したがって、PCM標本における5-hmC陽性細胞の頻度は、反応性形質細胞過形成における頻度よりも有意に低かった (学生t検定により $p < 0.001$)。

【結論】5-hmCの免疫組織化学では、多発性骨髄腫における腫瘍性形質細胞では陽性細胞が減少している一

方で、反応性形質細胞増生巣においてはよく保たれており、5-hmCの免疫組織化学的発現が、腫瘍性・非腫瘍性形質細胞間において差異があることが明らかになった。このことから5-hmCの免疫組織化学は、フローサイトメトリー解析や免疫グロブリン軽鎖の免疫染色組織化学に適さない僅少な組織検体でも、腫瘍性形質細胞と非腫瘍性形質細胞を区別するのに有用な方法になり得ると考えた。

(論文審査の結果の要旨)

多発性骨髄腫 (Plasma cell myeloma : PCM) は骨髄における腫瘍性形質細胞の異常増加によって定義される血液悪性腫瘍であり、診断においては、腫瘍細胞の産生する monoclonal な異常グロブリンの同定が必要とされ、免疫グロブリン軽鎖の免疫組織学的検索による monoclonality の確認が診断上重要である。しかし、免疫グロブリンは血清中にも存在するため、軽鎖の免疫染色はしばしば判定が難しいことがある。腫瘍性形質細胞と非腫瘍性形質細胞は、フローサイトメトリー検査での細胞表面マーカー発現の違いや、ゲノム分析でのメチル化の違いなども知られているが、それぞれ日常検査での適応には限界がある。哺乳類におけるシトシン5-positionの異常メチル化 (5-メチル化シトシン : 5-mC) は癌の epigenetic な特徴としてよく知られている。5-mCはTET family 蛋白, Fe²⁺, α -ケトグルタル酸などを介した酸化によって5-ヒドロキシメチル化シトシン (5-hmC) に転換され、5-hmC免疫組織学的発現の低下はいくつかの癌および造血器悪性腫瘍で生じることが知られている。他の固形腫瘍・造血器腫瘍において、5-hmCの発現低下が悪性腫瘍のマーカーのひとつとして報告されていることから、今回5-hmCの免疫組織化学 (IHC) が、腫瘍性形質細胞・非腫瘍性形質細胞の鑑別における診断手法として応用可能か評価を行った。

まつもと医療センター松本病院臨床検査科で2010年から2015年までの間に診断された、31例のPCM症例および14例の反応性形質細胞増生病変のホルマリン固

定パラフィン包埋ブロックを用いて、IHCにより腫瘍性形質細胞と非腫瘍性形質細胞における5-hmCの発現を比較した。反応性形質細胞増生症例については、診断後少なくとも2年以上臨床的に経過情報が得られる症例で、経過中にリンパ腫などの造血器腫瘍の発生を伴わない症例に限定した。5-hmCのIHCを行った標本を検鏡し、茶褐色の核染色を有する細胞は、その染色強度にかかわらず5-hmC陽性と評価した。40倍の対物レンズを使用して、5-hmCとCD138の両方のIHC標本の同じ領域の顕微鏡写真を撮影した後、5-hmC陽性細胞およびCD138陽性細胞の数を盲検条件下で各標本上少なくとも500個を目安に手で計測した。

その結果、大谷真紀は次の結論を得た。

1. PCMの腫瘍性形質細胞における5-hmC陽性細胞の割合は平均7.6% (2.0~15.9%)と低下してお

り、対して反応性形質細胞における5-hmC陽性細胞の割合は平均81.5% (71.9~88.0%)とよく保たれていた。

2. 今回の検討においては、発色強度の差による評価を行わなかったにもかかわらず、5-hmCの免疫組織学的発現頻度は、腫瘍性・非腫瘍性形質細胞間において差異があることが明らかになった。

PCM(腫瘍性形質細胞)では、CD138陽性でかつグロブリン軽鎖の偏りを伴う腫瘍性形質細胞巢において5-hmCの免疫組織学的発現頻度の低下が見られたことから、5-hmCの免疫染色は、小さなサンプルの場合でも腫瘍性形質細胞と非腫瘍性形質細胞の鑑別に有用であると考えられた。

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。

Water intake increases mesenteric lymph flow and the total flux of albumin, long-chain fatty acids, and IL-22 in rats: New concept of absorption in jejunum (水の摂取によりラットの腸管膜リンパ流量とアルブミン、長鎖脂肪酸、IL-22の総量が増加する；空腸における吸収の生理機能の新概念)

長 汐 沙 千 穂

(論文の内容の要旨)

日本の伝統的な健康習慣として、毎日適当な量の水分を摂取することが薦められている。しかしながらその生理学的、免疫学的な根拠については未だ不明である。今回われわれはラットとウサギを使用した実験で蒸留水を投与した際の腸リンパ・リンパ液内のアルブミン、長鎖脂肪酸、IL22の濃度と移動総量との変化について、生理学的、免疫学的に検討したのでその結果を報告する。空腸の微小循環では細静脈の壁から組織間隙へ血漿アルブミンが多量漏出することが他の器官と異なっており、その結果細静脈側に高い膠質浸透圧が生まれる。また、空腸由来の腸管膜のリンパ流量は他の組織のそれと比較して多いことが知られている。これらの性質に加えて、腸管膜の集合リンパ管は心臓様の自発性収縮を示し、リンパ液の能動輸送を可能にしている。しかし、空腸の微小循環やリンパ循環と水や水溶性物質を摂取した際の腸リンパ系の関与についてはいまだに解明されていない。

そこでわれわれはラットの空腸由来の腸管膜リンパ管にカニューレーションをしてリンパ液を採取し、蒸留水投与前後のリンパ流量とリンパ球の濃度、アルブミ

ン、長鎖脂肪酸の濃度変化の測定とリンパ球の成分分析を、Flow cytometry, ELISA法とgas chromatographyを用いて行った。また血中からのアルブミンの漏出について調べるため、ウサギの左側外頸静脈にアルブミンと結合する性質のあるEvans blueを静注し、腸管膜リンパ管と乳び槽への移行を写真撮影で求め、さらに水分摂取の影響をScion image analysis programを用いて解析した。その結果、蒸留水の投与1時間後の腸リンパ液量、リンパ液中のリンパ球の総数、アルブミン、長鎖脂肪酸、リンパ液中のIL22の移動量に有意な増加を認めた。またウサギの外頸静脈に投与したEvans blueは細静脈から速やかに腸管膜リンパ管と乳び槽に移行することを確認した。

次に、水を摂取した際の健康効果を解明するために腸管壁に分布する自然免疫を司る細胞の動態を解析した。自然リンパ球(ILC)は自然免疫にかかわる細胞群で3つのグループに分類され、中でもILC3は腸管の粘膜固有層に局在しており、自然免疫に重要な役割をはたしているが、水を摂取した際の分布や活性の変化についてはわかっていない。われわれはラットの小腸を4分割にし、それぞれ空腸の上部、下部、回腸の

上部、下部と分類し、小腸の粘膜固有層の ILC3 の分布と ILC3 が産生するサイトカインである IL22 動態の蒸留水摂取に伴う影響を検討した。その結果、ILC3 の分布と IL22 の mRNA の発現は空腸上部が最大であった。また、リンパ液中に ILC3 の存在はほとんど確認されず、飲水条件下でも認められなかった。

これらの結果より、水や水溶性物質が門脈を通過して肝臓に運ばれるという従来の考え方に反して、空腸の微小循環におけるアルブミンの高い透過性によって、水や水溶性物質がアルブミンと共に空腸の腸管膜リンパ管内に移動することが見いだされた。また、長鎖脂肪酸を摂取していないにもかかわらず、蒸留水摂取後にリンパ液の長鎖脂肪酸が増加したことより、空腸の壁にアポタンパクと結合したカイロミクロンが残留されており、飲水をしたことで残留されていた長鎖脂肪酸がリンパ液中に移動し、白い血液と呼ばれる腸リンパを形成していることも判明した。加えて、水を摂取することで IL22 が腸管膜リンパ液中に迅速に移動することも確認し、これが自然免疫を維持増進させている可能性がある事が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

日本の伝統的な健康習慣として、毎日適当な量の水分を摂取することが薦められている。しかしながらその生理学的、免疫学的な根拠については未だ不明である。また、水や水溶性物質を摂取した際の腸リンパ系の関与についてはいまだに解明されていない。

そこでわれわれはラットの空腸由来の腸管膜リンパ管にカニューレーションをしてリンパ液を採取し、蒸留水投与前後のリンパ流量とリンパ球の濃度、アルブミン、長鎖脂肪酸の濃度変化の測定とリンパ球の成分分析を、Flow cytometry, ELISA 法と gas chromatography を用いて行った。またウサギの左側外頸静脈に

アルブミンと結合する性質のある Evans blue を静注し、腸管膜リンパ管と乳び槽への移行を写真撮影で求め、さらに水分摂取の影響を Scion image analysis program を用いて解析した。さらに、ラットの空腸粘膜固有層の ILC3 の分布と IL22 動態の蒸留水摂取に伴う影響を検討した。

その結果、次の結論を得た。

1. 蒸留水の投与 1 時間後の空腸由来の腸リンパ液量、リンパ液中のリンパ球の総数、アルブミン、長鎖脂肪酸、リンパ液中の IL22 の移動量に有意な増加を認めた。
2. ウサギの外頸静脈に投与した Evans blue は空腸微小循環の細静脈から速やかに腸管膜リンパ管と乳び槽に移行する事を確認した。
3. ラットの空腸粘膜固有層の ILC3 の分布と IL22 の mRNA の発現は空腸上部が最大であった。飲水条件下でもこの分布にほとんど変化はなかった。

これらの結果より、水や水溶性物質が門脈を通過して肝臓に運ばれるという従来の考え方に反して、空腸の微小循環におけるアルブミンの高い透過性によって、水や水溶性物質がアルブミンと共に空腸の腸管膜リンパ管内に移動することが見いだされた。また、蒸留水摂取後にリンパ液の長鎖脂肪酸が増加したことより、空腸の壁に残留されており、飲水をしたことで残留されていた長鎖脂肪酸がリンパ液中に移動し、白い血液と呼ばれる腸リンパを形成していることも判明した。加えて、水を摂取することで IL22 が腸リンパ液中に迅速に移動することも確認し、これが自然免疫を維持増進させている可能性がある事が示唆された。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。

Analysis of biomarker serum levels in IVIG and infliximab refractory Kawasaki disease patients (大量免疫グロブリン療法およびインフリキシマブ療法に不応である川崎病患者における血清バイオマーカーの解析)

蜂谷 明

(論文の内容の要旨)

【背景】川崎病 (KD) は乳幼児期に発症する原因不明の全身性急性炎症性血管炎である。特に冠動脈の炎症が強く、冠動脈瘤を合併した場合は、心筋梗塞や狭心症、冠動脈破裂などの生命予後に関わる後天性心疾患を引き起こす。大量免疫グロブリン療法 (IVIG)

は KD の炎症を抑制し、KD に対する第一選択の治療であるが、IVIG の不応例が 15-20 % 存在し、冠動脈瘤合併リスクが高い。近年、抗腫瘍壊死因子 (TNF) - α 阻害薬であるインフリキシマブ (IFX) の IVIG 不応の難治性 KD 患者における有効性が報告された。しかし、IFX 療法の KD の病態に関与するサイトカ

インへの影響および治療反応性を予測するバイオマーカーは報告されていない。

【目的】 ① IVIG 不応 KD 患者に対して IFX 投与を行い、IFX 治療前後の KD の炎症に関係するサイトカインを同定すること。

② IFX 有効例と不応例について比較検討し、IFX の有効性を推定できるバイオマーカーを同定すること。

【対象と方法】 2007年7月から2015年4月に信州大学病院において IFX 治療を行った IVIG2回不応 KD 患者29名（女児12名，男児17名，平均年齢37か月）を対象とした。IFX 治療後24時間以内に解熱（体温 37.5°C 未満）した患者を IFX 有効例（ $n=13$ ）とした。24時間以上持続する発熱（体温 $>37.5^{\circ}\text{C}$ ）または24時間以内に解熱後、KD 症状に伴う再発熱を示す患者を不応例（ $n=16$ ）とした。患者の KD 発症年齢、KD 症状、IFX 投与前後の WBC 数、好中球数、血清中の CRP、AST、ALT、LDH 等の情報は診療録から収集した。血清サイトカインについては以下の項目について測定した。IL-6、IL-8、IL-10、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 、G-CSF、IP-10、MIG、MCP-1を BDTM Cytometric Bead Array により測定した。データは、BD Cytometric Bead Array ソフトウェアを用いて分析した。sTNFR1、sTNFR2、IL-18を ELISA により測定した。

【結果】 ① IVIG2回不応 KD 患者における疾患活動期のサイトカインプロファイルを知るために血清サイトカインを測定した。IFX 投与前の IL-6、IL-18、G-CSF、IP-10、MIG、MCP-1、sTNFR1、sTNFR2 は健常群と比べて高値であった。IFN- γ および IL-1 β は一部の患者でのみ上昇していた。IL-8、IL-10、IL-17A および TNF- α は健常群と差がなかった。

② IFX 治療のサイトカインへの作用を知るために IFX 投与前と投与後の血清サイトカインを比較した。IFX 投与前に比し、投与後には IL-6、G-CSF、IP-10、MIG、MCP-1、sTNFR1、sTNFR2 は有意に低下した（すべて $p<0.0001$ ）。IL-18のみ有意な減少を認めなかった（ $p=0.66$ ）。一部の患者で認められた IFN- γ および IL-1 β 高値も IFX 治療後に健常群と同レベルに低下した。

③ IFX 不応例の予測マーカーを検討するため、有効例と不応例の2群間で比較した。KD 発症年齢、KD 症状、IFX 投与前における WBC 数、好中球数、血清中の CRP、AST、ALT、LDH について、有効群と不応例との間に明らかな差異はなかった。IFX 投与前、

不応例の G-CSF と sTNFR1 は有効例と比べて有意に高値であった（ $p=0.002$ 、 $p=0.0129$ ）。その他のサイトカインについては差を認めなかった。

④ IFX 不応例における IFX 投与後のサイトカインプロファイルの特徴について IFX 有効例と健常群を比較検討した。有効例と不応例の IL-6、IP-10、MIG、MCP-1、sTNFR2 は健常群の血清レベルまで低下した。不応例における G-CSF、sTNFR1 は IFX 投与後に低下したが、有効例と比べて高値（ $p=0.01$ 、 $p=0.0069$ ）であり、健常群と比べても高値（ $p=0.0011$ 、 $p=0.0024$ ）であった。臨床検査結果では、好中球数のみ不応例が有効例よりも有意に高かった（中央値、範囲：有効例 3.7 、 $[5.1-2.3] \times 10^3/\mu\text{l}$ 、不応例 8.9 、 $[10.7-7.6] \times 10^3/\mu\text{l}$ ； $p=0.0056$ ）。

【考察】 本研究では、IVIG 治療に不応であった KD 患者において、血清 IL-6、IL-18、G-CSF、MIG、MCP-1、IP-10、sTNFR1、sTNFR2 の発現が増加することが明らかになった。IFX 投与後は IL-18を除く全てのサイトカインが有意に減少した。IFX が炎症性サイトカインを抑制することが明らかとなった。

IFX 治療前において不応例の sTNFR1 および G-CSF は有効例より有意に高く、IFX に対する治療不応性を予測するバイオマーカーとなり得ることを示している。

sTNFR1 は、ヒト細胞上に普遍的に発現し、TNF- α を含む様々な刺激に応答して開口し、選択的スプライシングを介して循環系に放出される。KD 患者では TNF- α と sTNFR1 との間に正の相関が報告されている。血清 TNF- α は代謝が早く検出することが困難であるが、sTNFR1 は IFX 治療のターゲットである TNF- α 値を反映している可能性がある。

G-CSF は、顆粒球系前駆細胞の増殖、分化および生存に関与する炎症性サイトカインである。KD の病態に好中球性炎症は重要な役割を果たしており、G-CSF は直接的に関与している。G-CSF は KD において好中球性炎症の鋭敏な指標と考えられた。

IFX 治療後では、不応例の G-CSF および sTNFR1 は IFX 治療により改善しているが健常人のレベルまでは低下しておらず、現在の投与量では、サイトカインの抑制効果不十分であることが示唆された。今回の研究から、IFX 治療前の TNF- α と sTNFR1 高値の症例には IFX を増量する、または、1 回目の治療不応例には再投与することにより KD の炎症を抑制できる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

川崎病 (KD) は乳幼児期に発症する原因不明の全身性急性炎症性血管炎である。特に冠動脈の炎症が強く、冠動脈瘤を合併した場合は、心筋梗塞や狭心症、冠動脈破裂などの生命予後に関わる後天性心疾患を引き起こす。近年、抗腫瘍壊死因子 (TNF) α 阻害薬であるインフリキシマブ (IFX) の IVIG 不応の難治性 KD 患者における有効性が報告された。しかし、IFX 療法の KD の病態に関与するサイトカインへの影響および治療反応性を予測するバイオマーカーは報告されていない。

IVIG 不応 KD 患者 29 名に対して IFX を投与し、IFX 治療前後の KD の炎症に関係するサイトカインを測定した。IFX 有効例 13 名と不応例 16 名について比較し、IFX の有効性を推定できるバイオマーカーを検討した。

その結果、蜂谷らは次の結論を得た。

1. IVIG2回不応 KD 患者における疾患活動期のサイトカインプロファイルについては、IFX 投与前の IL-6, IL-18, G-CSF, IP-10, MIG, MCP-1, sTNFR1, sTNFR2は健常群と比べて高値であった。IFN- γ および IL-1 β は一部の患者でのみ上昇していた。IL-8, IL-10, IL-17A および TNF- α は健常群と差がなかった。
2. IFX 治療のサイトカインへの作用を知るために IFX 投与前と投与後の血清サイトカインを比較した。IFX 投与前に比し、投与後には IL-6, G-CSF, IP-10, MIG, MCP-1, sTNFR1, sTNFR2は有意に低下した (すべて $p < 0.0001$)。IL-18のみ有意な減少を認めなかった ($p = 0.66$)。一部の患者で認められた IFN- γ および IL-1 β 高値も IFX 治療後に健常群と同レベルに低下した。

Annexin A1 expression is correlated with malignant potential of renal cell carcinoma (腎細胞癌におけるアネキシン A1発現は、悪性度と相関する)

山ノ井 万里子

(論文の内容の要旨)

【背景】腎細胞癌は近年、その罹患率が上昇しつつある。切除数年後に他臓器に再発・転移を起こす症例や、急速に癌が進行する悪性度の高い症例があることも知られている。そのため、腎細胞癌切除後の予後予測のためにバイオマーカーを同定することは、腎細胞癌の予後予測並びに新たな治療標的の開発に必要不可欠で

3. IFX 不応例の予測マーカーを検討するため、有効例と不応例の 2 群間で比較した。KD 発症年齢、KD 症状、IFX 投与前における WBC 数、好中球数、血清中の CRP, AST, ALT, LDH について、有効群と不応例との間に明らかな差異はなかった。IFX 投与前、不応例の G-CSF と sTNFR1は有効例と比べて有意に高値であった ($p = 0.002$, $p = 0.0129$)。その他のサイトカインについては差を認めなかった。

4. IFX 不応例における IFX 投与後のサイトカインプロファイルの特徴について IFX 有効例と健常群を比較検討した。有効例と不応例の IL-6, IP-10, MIG, MCP-1, sTNFR2は健常群の血清レベルまで低下した。不応例における G-CSF, sTNFR1は IFX 投与後に低下したが、有効例と比べて高値 ($p = 0.01$, $p = 0.0069$) であり、健常群と比べても高値 ($p = 0.0011$, $p = 0.0024$) であった。

本研究から、IFX が炎症性サイトカインを抑制することが明らかとなった。IFX 治療前において不応例の sTNFR1および G-CSF は有効例より有意に高く、IFX に対する治療不応性を予測するバイオマーカーとなり得ることを示している。IFX 治療後では、不応例の G-CSF および sTNFR1は IFX 治療により改善しているが健常人のレベルまでは低下しておらず、現在の投与量では、サイトカインの抑制効果不十分であることが示唆された。今回の研究から、IFX 治療前の TNF- α と sTNFR1高値の症例には IFX を増量する、または、1 回目の治療不応例には再投与することにより KD の炎症を抑制できる可能性が示唆された。これらのことは難治性川崎病患者に対する治療に役立つ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。

ある。アネキシンはカルシウムおよびリン脂質に結合するタンパク質ファミリーであり、アネキシン A1は、細胞増殖や遊走を引き起こすホスホリパーゼ A2の働きを阻害する、分子量 40kDa 程度のタンパク質である。ヒトの胃癌や肝癌においてアネキシン A1は過剰に発現しており、アネキシン A1の過剰発現は悪性度と相関があることが知られている。しかしながらヒト

腎癌においてアネキシン A1がどのような働きをしているかは完全には解明されていない。本研究では、ヒト腎細胞癌におけるアネキシン A1の発現と、患者の無再発生存期間との関連を評価した。また、ヒト淡明細胞型腎がん細胞株を用いて、アネキシン A1の発現が腎細胞癌の増殖、浸潤、運動および接着能と関連するか否かを評価した。

【目的】腎細胞癌におけるアネキシン A1 (Anxal) の発現と、癌の悪性度の関連について免疫組織化学的に検討した。また、ヒト淡明細胞型腎がん細胞株 (Caki-1) を用いて、Anxalの発現が腎細胞癌の増殖、浸潤、運動および接着能と関連するか否かを細胞生物学的に評価した。

【方法】根治的腎摘除術を施行された腎細胞癌の切除症例27例の標本を用いて、抗 Anxal抗体を用いた免疫染色により、Anxalの発現を検討した。また、無再発生存期間はログランク検定を用いて解析した。

さらにヒト淡明細胞型腎細胞癌由来の培養細胞株 Caki-1を用いて、レトロウイルスベクターにより Anxalの shRNA を恒常的に発現させて Anxalの発現を抑制し、細胞の増殖能、浸潤能、運動能および接着能に及ぼす影響をそれぞれ MTS アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイ、スクラッチアッセイ、接着アッセイにより解析した。さらに、real-time PCR 法並びにウエスタンブロッティング法により、種々の MMP と HIF1 α の発現量について解析した。

【結果】腎細胞癌27例のうち13例において、Anxalは腎癌細胞の細胞膜に高発現しており、残り14例でその発現は減弱していた。さらに、臨床病理学的因子や予後との関連を検討した結果、Anxalが腎癌細胞の細胞膜において高発現した13例では、無再発生存期間は有意に短かった ($P < 0.05$)。ヒト淡明細胞型腎細胞癌由来の培養細胞株 Caki-1において Anxalのノックダウンを行い、種々のがん形質について解析を行った。その結果、細胞増殖能は、コントロール細胞に比べ有意に低下した。次にマトリゲル浸潤アッセイを行ったところ、Anxalノックダウンにより、浸潤能が有意に低下した。また細胞の運動能をスクラッチアッセイにより解析した結果、細胞の運動能は、Anxalをノックダウンした細胞で14時間までの観察において有意に減弱した。さらに、種々の細胞外基質への接着能について解析を行ったところ、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、FBS (ビトロネクチンの代用) に対する接着能が、Anxalノックダウ

ンにより、有意に低下した。この分子機構について詳細に解析したところ、Anxalノックダウン細胞では、MT1-MMP mRNA の発現量が有意に低下しており、その制御因子の一つである HIF-1 α の発現量が、mRNA およびタンパク質ともに低下していた。

【結論】腎細胞癌において、Anxalは癌細胞の増殖、浸潤、運動および接着能の亢進に関わっていることが示された。従って、腎細胞癌の細胞膜に Anxalが高発現していると、予後が不良である可能性が高いことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

アネキシンの一部のサブタイプでは、胃癌や肝細胞癌等の癌細胞で発現が増強し、その発現は悪性度と相関があると言われている。前立腺癌、肝細胞癌、乳癌、肺癌ではアネキシン A1は、血管内皮細胞で高発現する。しかし VEGF 等の血管増生因子の発現が高い特徴を持つ腎細胞癌との関係は、十分には分かっていない。今回、腎細胞癌においてアネキシン A1発現は、悪性度と相関するか、調べた。

1. 根治的腎摘除術を施行された27例の腎細胞癌標本を用いアネキシン A1抗体で免疫染色を行った。一部の症例では癌細胞の膜が非癌部のコントロールより濃く染色され、このような症例をアネキシン A1陽性と判断した。
2. 染色結果と臨床病理学的因子である、年齢、性別、病期、Fahren 分類、組織学的分類、静脈侵襲との相関を検討したが、陽性例と陰性例の間に有意差は認めなかった。
3. 次に、予後との相関を検討した。27例のうち26例において予後が追跡できた。Log-rank 解析にて無病再発生存期間を検討すると、アネキシン A1陽性例は、陰性例に比べて、有意に無病再発生存期間が短く、腎細胞癌におけるアネキシン A1高発現は、予後不良因子であることが明らかになった。
4. アネキシン A1が、癌細胞の機能にどのような影響を与えているか詳しく調べるため、アネキシン A1に特異的な shRNA を発現するレトロウイルスベクターを用いて、ヒト腎癌細胞株 Caki-1でアネキシン A1の発現を抑制し、細胞に与える影響を検討した。
5. Quantitative Real TimePCR と Western blotting の結果、アネキシン A1shRNA を発現させた細胞では、コントロールと比較して、アネキシン A1mRNA、タンパク質共に発現が有意に低下した。

6. In vitro で Caki-1細胞においてアネキシン A1の発現抑制が細胞増殖に与える効果を MTS assay により調べたところ、アネキシン A1をノックダウンした細胞の増殖は、コントロールに比べ有意に低下した。
7. Matrigel invasion assay, Scratch assay, In vitro cell adhesion assay を用いた解析より、アネキシン A1をノックダウンすると細胞の浸潤能、運動能、接着能の、有意な減弱が見られた。
8. アネキシン A1をノックダウンすると、細胞の運

動・浸潤に関与する MT1-MMP の発現が低下し、この転写制御因子である HIF1 α の発現も低下した。

以上より、腎細胞癌において、アネキシン A1は癌細胞の増殖、浸潤、運動および接着能の亢進に関わっていることが示された。また、腎細胞癌の細胞膜にアネキシン A1が高発現していると、予後が不良であることが明らかになった。

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。

Watertight Robust Osteoconductive Barrier For Complex Skull Base Reconstruction: An Expanded-Endoscopic Endonasal Experimental Study (WRO バリヤー：広範頭蓋底腫瘍に対する経鼻内視鏡手術における新たな頭蓋底再建法)

NAGM ALHUSAIN

(論文の内容の要旨)

【Objectives】 Endoscopic skull base reconstruction (ESBR) following expanded-endoscopic endonasal approaches (EEA) in high-risk non-ideal endoscopic reconstructive candidates remains extremely challenging, and further innovations still necessary. Here, the aim is to study the reconstructive knowledge gap following expanded-EEA and to introduce the watertight robust osteoconductive (WRO) barrier as an alternative durable option.

【Methods】 Distinctively, we focused on ten clinical circumstances. A 3D-skull base-water system model was innovated to investigate the ESBR under realistic conditions. In the endoscopic, wet environment, a large-irregular defect (31×89 mm) extending from the crista galli to the mid-clivus was achieved. The internal carotid arteries on both sides are identified, based on the pertinent anatomical landmarks, and fully skeletonized. All exposed imaginary neurovascular structures are protected with Integran Sheet and Gore-Tex Sheet as an in-lay layer to avoid any potential injury and to prevent the injected substances from herniating into the cranial cavity during ESBR. Then, 12 ml of bone forming agent Biopex^R was carefully fashioned in an S-shaped manner starting from the anterior cranial base backwards to the clivus to adequately compensate for the defect and to make a “robust osteoconductive” layer. Furthermore,

in order to ensure water tightness, 5 ml of fibrin glue was applied to seal any invisible tiny channels in order to form a “watertight” barrier.

After creating the WRO-barrier, its tolerance was evaluated under stressful settings, including an exceedingly high (55 cmH₂O) pressure, with radiological assessment. Next, the whole WRO-barrier was drilled to examine its practical-safe removal (simulating redo-EEA) and the whole experiment was repeated five times. Finally, WRO-barrier was kept into place to value its 18-month long-term high-tolerance.

【Results】 In all experiments WRO-barriers were satisfactorily fashioned to conform the geometry of the created defect under realistic circumstances via EEA, tolerated an exceedingly high pressure without evidence of leak even under stressful settings, resisted sudden-elevated pressure, and remained in its position to maintain long-term watertight seal (18 months), efficiently evaluated with neuroimaging and simply removed-and-reconstructed when redo-EEA is needed.

【Conclusion】 WRO-barrier as an osteoconductive watertight robust design for cranial base reconstruction possesses several distinct qualities that might be beneficial for patients with complex skull base tumours.

(論文審査の結果の要旨)

By concluding experts' experiences and a thorough

survey of the English literature, we were able to study the reconstructive knowledge gap. If there is an available watertight robust barrier that is enough to withstand postoperative adjunctive radiation and chemotherapy, applicable for irregular-deep-critical bone defects, efficiently evaluated with neuroimaging, simple in its technique, without donor site complications and can be considered as a good endoscopic reconstructive alternative, it will be a great advantage. We selected a well-known malleable osteoconductive material, which became a robust barrier within a few minutes that has good biocompatibility and can survive avascular environment. Herein, we introduce the watertight robust osteoconductive barrier (WRO-barrier) for cranial base reconstruction as an alternative durable option and we will discuss its distinct qualities and limitations.

In conclusion

1. WRO-barrier is as an osteoconductive watertight robust design for endoscopic cranial base reconstruction.
2. WRO-barrier can contribute in decreasing the CSF leak rate.

3. WRO-barrier can be considered as a promising alternative durable option for designated patients with complex/invasive skull base tumours that require aggressive removal (with large defect) and postoperative adjunctive chemo-radiotherapy (avascular environment).
4. WRO-barrier tolerates an exceedingly high (55 cmH₂O) pressure and remains in its position to maintain watertight seal even under stressful conditions.
5. WRO-barrier can be simply removed and reconstructed when redo-surgery is needed.

Based on our results, WRO-barrier can be considered as an effective new option for complex skull base reconstruction following expanded endoscopic endonasal skull base surgeries

The chief and sub-investigators concurred and acknowledged this paper as worthy as a thesis.

これらの結果より、WRO バリヤーは、拡大経鼻頭蓋底手術で新たな頭蓋底再建法の一つとして有効なオプションになりうると考えられた。

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。

Impact of Chronic Kidney Dysfunction on Serum Sulfatides and Its Metabolic Pathway in Mice (マウスにおける慢性腎機能障害が血清スルファチドとその代謝経路に与える影響)

山 田 洋 輔

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 血清スルファチドはリポタンパク質に結合して血中に存在する重要なスフィンゴ糖脂質であり、抗凝固作用を有することが示唆されている。過去の研究において、血液透析を施行している末期腎不全患者では、健常人に比べて血清中のスルファチド濃度が低下することや、スルファチド濃度の低下が心血管病と関連することが報告されている。しかしながら、慢性腎臓病 (Chronic kidney disease; CKD) による血清スルファチド低下のメカニズムについては検討されていない。そこで今回我々は、CKD モデルとして確立されている腎臓の5/6を手術的に切除した5/6腎摘慢性腎臓病 (5/6 Nephrectomy Chronic Kidney Disease [5/6NCKD]) モデルマウスを用いて、CKD 状態が血清スルファチド濃度を低下させうるか、またその低下メカニズムはどのようなものかを検討した。

【材料および方法】 11匹の Wild type C57B6J マウスに対し、11週齢に一次手術 (右腎2/3摘除) と12週齢に二次手術 (左腎全摘) を行い、各々のマウス腎の5/6を摘除した (5/6NCKD 群)。13匹には11週齢と12週齢に皮膚切開のみの偽手術を行った (Control 群)。それぞれ術後4週 (5/6NCKD 群, N=5; Control 群, N=5) もしくは12週 (5/6NCKD 群, N=6; Control 群, N=8) に解剖した。血清スルファチド濃度をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析機 (MALDI-TOF MS 法) で定量の上、2群間で比較した。また、血清スルファチドの産生源として知られる肝組織中のスルファチド量を MALDI-TOF MS 法で、スルファチド代謝酵素の蛋白発現量を Immunoblot 法、mRNA 量を Real time PCR 法で評価した。

また、Hepal-6細胞 (マウス肝細胞株) を用いて、

代表的な尿毒素であるインドキシル硫酸を0.2 mM 培養液中に添加し2日間培養した細胞と、インドキシル硫酸を添加せずに培養した細胞で細胞中のスルファチド濃度を比較した。

統計学的検定は Student-t 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】 5/6NCKD 群は CKD を発症し、血清クレアチニン、インドキシル硫酸濃度の有意な上昇を認め、腎病理所見では尿細管間質の線維化を認めた。5/6 NCKD 群では、血清スルファチド濃度と肝臓中のスルファチド量が、Control 群に比べて術後4週、12週とも有意に減少した。スルファチド代謝酵素に関しては、Arylsulfatase A (ARSA) や Galactosylceramidase (GALC) といったスルファチドの分解に関わる酵素が有意に増加していた。

インドキシル硫酸を添加した培養液中で培養した Hepa1-6細胞では、5/6NCKD マウスと同じように細胞内のスルファチド濃度が低下し、ARSA、GALC といったスルファチド分解系酵素が増加した。

【結論】 本研究により、慢性腎機能低下が肝臓でのスルファチド分解亢進を引き起こし、血清スルファチド濃度を低下させることがマウスの *in vivo* および *in vitro* モデルにより見出された。その原因の一つとして、インドキシル硫酸などの尿毒素が肝組織中のスルファチド分解を亢進させている可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

血清スルファチドは抗凝固・抗血小板凝集作用を有していることが知られており、血清スルファチド値の異常低値が心血管病の発症に関連している可能性が報告されている。また、慢性腎臓病 (CKD) は心血管病の独立したリスク因子であることが多くの疫学研究で示されており、さらに急性腎障害モデルマウスにおいては血清スルファチド値が低下するという報告がある。しかしながら、CKD モデル動物での血清スル

ファチドの変化については検討されていない。

そこで山田洋輔は、代表的な CKD モデルである 5/6腎摘慢性腎臓病モデルマウス (5/6NCKD マウス) における血清スルファチドの量的変化、またその代謝経路の変化について調査した。また、追加検討としてマウスの肝細胞株である Hepa1-6細胞に代表的な尿毒素であるインドキシル硫酸を添加し、同細胞内でのスルファチド濃度変化についても検討した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 5/6NCKD マウスでは、血清 Creatinine 値、代表的な尿毒素であるインドキシル硫酸値が増加し、CKD を発症した。そして5/6NCKD マウスでは術後4週、12週共に血清スルファチド値が有意に低下した。血清スルファチドの産生源とされる肝細胞中のスルファチド量についても5/6NCKD マウスでは低下がみられた。肝細胞中のスルファチド関連酵素では、Arylsulfatase A (ARSA) ・ Galactosylceramidase (GALC) といったスルファチド分解系酵素の増加が認められた。
2. インドキシル硫酸を添加した Hepa1-6細胞では細胞内スルファチド量が低下し、細胞内の ARSA、GALC の存在量が増加しており、5/6NCKD マウスと同様の結果が得られた。

これらの結果により、CKD では血清スルファチドの低下が起こることが示唆され、肝細胞内のスルファチド分解酵素の増加がその原因として考えられた。また、細胞株を用いた検討により、インドキシル硫酸が肝細胞内でのスルファチド分解を促進させている可能性を見出した。本研究結果は、CKD と心血管病の関連において、血清スルファチドの低下が介在している可能性を示唆し、スルファチド濃度異常が CKD 患者の心血管病発症予防における新たな治療ターゲットになる可能性を示した。従って、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prostanoid EP4 receptor-mediated augmentation of I_h currents in $A\beta$ dorsal root ganglion neurons underlies neuropathic pain (プロスタノイド EP4受容体を介した $A\beta$ 後根神経細胞の I_h 電流増大が神経障害性疼痛を引き起こす)

張 昊

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 体性感覚システムの障害により神経障害性疼痛 (Neuropathic pain: NP) が生じる。NP は治療抵抗性で新規鎮痛薬の開発が求められている。後

根神経節 (DRG) に細胞体を有する一次感覚細胞の過分極で、過分極活性化環状ヌクレオチド調節性 (HCN) チャネルが活性化し、内向き非特異的陽イオン電流 (I_h 電流) が流れる。遺伝子改変マウスなどの

解析により、HCN チャンネルが神経の興奮性に関与し、NP 発症に関与していることが示唆されているが、薬物受容体としての有用性は不明である。本研究の目的は、NP モデル動物を用いて NP 発症における HCN チャンネルの役割と薬物受容体としての有用性を検討することである。

【方法】 雄性 SD ラット（体重180～220 g）を用い、麻酔下で左 L5 脊髄神経を後根神経節の遠位部で切断し、NP モデルを作製した。機械的および熱性痛覚過敏を、それぞれ足底へのフィラメント刺激と放射熱刺激に対する逃避閾値・潜時で評価した。HCN チャンネル阻害薬であるイバブラジンを経口投与し、プロスタノイド EP4 受容体拮抗薬（CJ-023423）は腰部髄腔内投与した。また、機械性・熱性痛覚過敏が最大となり安定した術後10日目に、両側 L5 DRG を採取し、コラゲナーゼで神経細胞を単離し、ホールセルパッチクランプ記録を行った。神経細胞の直径により細胞を分類し、個々の神経細胞の I_h 電流の機能特性と、種々の薬物の I_h 電流と NP に対する効果を評価した。

【結果】 膜電位固定下で、患側全サイズの神経細胞の興奮性が亢進していた。しかし直径40-50 μm の神経細胞のみ、過分極電流パルスに対する時間依存性電圧反跳（voltage sag）が増大していた。これと相応し、膜電位固定下では、直径40-50 μm の神経細胞の I_h 電流が増大していた。労作性狭心症治療薬で、洞房結節の HCN チャンネルを抑制するイバブラジンは、患健両側の I_h 電流を濃度依存性に阻害した（ $\text{IC}_{50} \sim 3 \mu\text{M}$ ）。モデル動物に対するイバブラジンの経口投与は、患側の機械的・熱性痛覚過敏を有意に軽減した。アデニル酸シクラーゼ阻害薬、あるいはプロスタノイド EP4 受容体拮抗薬 CJ-023423 は、直径40-50 μm の患側神経細胞の I_h 電流を選択的に抑制した。CJ-023423 の髄腔投与は、患側の機械的・熱性痛覚過敏を有意に軽減した。

【考察】 本研究の結果より、NP モデルでは全てのサイズの神経細胞の興奮性が亢進しており、直径40-50 μm の神経細胞（おそらく $A\beta$ 細胞）では、その原因が I_h 電流の増大であった。イバブラジンと CJ-023423 は、この増大した I_h 電流を抑制し、行動薬理的にも NP を抑制した。以上より、 $A\beta$ 神経細胞においてプロスタノイド EP4 受容体刺激により産生された cAMP により、HCN チャンネルの活性が亢進することが、NP 発症に関与していることが示唆された。イバブラジンと CJ-023423 は NP に対する新規鎮痛薬創薬のリード

化合物になり得ると考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

体性感覚システムの障害により神経障害性疼痛（Neuropathic pain: NP）が生じる。NP は従来の治療薬に抵抗性であるため、その病態生理の解明に基づいた新たな治療薬の開発が求められている。近年、過分極により活性化する Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) チャンネルが NP に関与していることが示されているが、その薬物受容体としての有用性は明らかになっていない。HCN チャンネルは神経細胞の過分極により内向きの非特異的陽イオン電流（ I_h 電流）を形成し、細胞の興奮性を高めることが知られている。そこで張らは、NP における I_h 電流の役割を検討した。

本研究ではラットの痛み関連行動分析と、単離後根神経節細胞を用いたパッチクランプ解析により以下の検討を行った。

1. L5 脊髄神経切断後の NP モデルにおける後根神経節ニューロンの機能変化
 2. 直径サイズで分類した神経細胞の I_h 電流特性
 3. I_h 電流に対する、労作性狭心症治療薬イバブラジン、アデニル酸シクラーゼ阻害薬 SQ22536、プロスタノイド EP4 受容体拮抗薬 CJ-023423 の効果
 4. L5 脊髄神経切断後 NP に対するイバブラジンの効果
 5. L5 脊髄神経切断後 NP に対する CJ-023423 の効果
- そこで、以下の結果を得た
1. L5 脊髄神経切断10日後、切断側後根神経節の全てのサイズの神経細胞の興奮性が増大していた。
 2. I_h 電流は、切断側の直径40～50 μm の神経細胞でのみ増大していた。
 3. イバブラジン、SQ22536、CJ-023423 は切断側直径40～50 μm の神経細胞の I_h 電流を抑制した。
 4. イバブラジン（経口投与）は L5 脊髄神経切断後の NP（機械性痛覚過敏・熱性痛覚過敏）を有意に抑制した。
 5. CJ-023423（髄腔投与）は L5 脊髄神経切断後の NP（機械性痛覚過敏・熱性痛覚過敏）を有意に抑制した。

以上より、L5 脊髄神経切断後には、切断側の全てのサイズの後根神経節神経細胞が易興奮性となったが、直径40～50 μm の神経細胞（おそらく $A\beta$ 細胞）では I_h 電流の増大により興奮性が亢進していた。イバブラジンで NP が有意に抑制されたことから、切断側 $A\beta$

細胞の I_h 電流増大と NP の発症に因果関係があることが示唆された。また、CJ-023423が、切断側 $A\beta$ 細胞の I_h 電流を抑制し、NP を有意に軽減したことから、 $A\beta$ 細胞でプロスタノイド EP4受容体刺激により産生された cAMP による HCN チャネルの活性化が NP 発

生の原因であると考えられた。

本研究の学術的内容は高く、質疑に対する応答は的確であり、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。

Glycogen metabolism in an oral dysplastic/cancerous (iodine-negative) epithelium: Glycogen was consumed in the pentose phosphate pathway, not in glycolysis. (口腔異型上皮/扁平上皮癌 (ヨード不染域) におけるグリコーゲン代謝に関する検討: グリコーゲンは解糖系ではなく、ペントースリン酸系経路において消費される)

吉村伸彦

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】口腔扁平上皮癌 (OSCC) は口腔内で最も発生頻度の高い悪性腫瘍である。安全域 5 mm 未満の場合明らかに再発率が高いという報告あることから、原発巣切除のための適切な安全域の設定は重要な予後因子の一つである。しかしながら、安全域の設定に関して視診や触診などの従来の方法で異型性上皮および腫瘍性病変と正常組織を区別し外科的安全域を設定することは困難である。ヨード染色による生体染色は、口腔粘膜上皮の異型上皮や OSCC との判別に広く用いられている。これまでに、われわれは OSCC および周囲の上皮異形成部であるヨード不染域における Glucose transporter 1 (GLUT 1) の活性化によるグルコースの取り込みの増加と、グリコーゲン分解を促進するグリコーゲンホスホリラーゼの活性化が関連することを報告してきた (Xiao et al. 2013 and Aizawa et al. 2017)。しかしながら、グルコース、グリコーゲンの分解に関連する Glucose 6-phosphate (G6 P) が、ヨード不染域における解糖系、ペントースリン酸経路における役割は不明である。したがって本研究では、グリコーゲンの代謝に関連する Glucose-1 phosphate (G1P) および Glucose 6-phosphate (G6 P) の代謝、すなわち Glucokinase (GK), Glucose 6-phosphatase (G6Pase), Phosphoglucomutase3 (PGM3) の活性化について検討を行った。併せて、OSCC 細胞におけるグリコーゲンおよび糖代謝を明らかにするために、メタボローム解析を用いて代謝の検討を行った。

【対象および方法】当科で加療した OSCC22例 (男性12例, 女性10例, 26歳から92歳までで中央値は73歳) において、免疫組織化学的染色にて GK, PGM3, G6 Pase の発現を同一症例における病変部 (OSCC/ 異型性上皮) と正常粘膜と比較検討した。口腔粘膜上皮は

表層, 傍基底層, 基底層の3層に分け、両者の細胞数を計測し陽性細胞数を比較した。加えて、その22例からランダムに10例を選択し capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry: CE-TOFMS を用い代謝産物の解析を行い、同一患者における病変部と正常粘膜における発現量を比較検討した。

【結果】免疫組織化学的染色では、GK, PGM3は病変と正常上皮で有意差を認めなかったが、GKの活性は正常粘膜および病変部両者で高かった。G6Paseは病変部で有意に増加していた。メタボローム解析では解糖系中間代謝産物は検出されないにも関わらず、最終産物の乳酸は検出された。ペントースリン酸経路は病変部で亢進している傾向がみられ、Guanineは病変部で有意に多く検出された。病変部でグルタミンの量が有意に増加しており、TCA回路の代謝産物も病変部は正常粘膜よりも多い傾向を認めた。

【結論】異型上皮・OSCC部では、細胞外からのグルコースの取り込み亢進、細胞内グリコーゲンの分解亢進、G6Paseの活性化により細胞内グリコーゲンの蓄積がみられる。その細胞内グリコーゲンは、解糖系ではなくペントースリン酸経路にて利用されていることが示唆された。Glutaminolysisが亢進し、アミノ酸の供給源となっていると共に、解糖系亢進により増加していると考えられていた乳酸の産生にも関与していると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は口腔内で最も発生頻度の高い悪性腫瘍である。切除手術において安全域 5 mm 未満の場合明らかに再発率が高いという報告あることから、適切な安全域の設定は重要な予後因子の一つである。ヨード生体染色は OSCC と正常粘膜を明瞭に染め分けることが出来るため OSCC 切除時に広

く用いられている。ヨード染色のメカニズムに口腔粘膜上皮細胞内のグリコーゲンが深く関わっている。これまでにヨード不染色域における、glucose transporter 1の活性化によるグルコースの取り込みの増加と、グリコーゲン分解を促進するグリコーゲンホスホリラーゼの活性化が生じていることを見いだした。今回、グリコーゲンの代謝に関連する Glucose-1 phosphate (G1P) および glucose 6-phosphate (G6 P) の代謝、すなわち Glucokinase (GK), Glucose 6-phosphatase (G6Pase), Phosphoglucomutase3 (PGM3) の活性化について検討を行った。併せて、OSCC 細胞におけるグリコーゲンおよび糖代謝を明らかにするために、メタボローム解析を用いて代謝を検討した。

対象および方法は、当科で加療した OSCC22例において、免疫組織化学的染色にて GK, PGM3, G6 Pase の発現を同一症例における病変部 (OSCC/ 異型性上皮) と正常粘膜で比較検討した。口腔粘膜上皮は表層、傍基底層、基底層の3層に分け、両者の細胞数を計測し陽性細胞数を比較した。加えて、その22例からランダムに10例を選択し capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry: CE-TOFMS を用い代謝産物の解析を行い、同一患者における病変部と正常粘膜における発現量を比較検討した。

その結果、吉村は次の結論を得た。

1. GK の活性は正常粘膜および病変部両者で高く、

両者でグルコース分解は進んでいると考えられた。

2. G6P の活性は、病変部で正常粘膜より有意に高く、病変部で細胞内グリコーゲンの蓄積が進んでいると考えられた。

3. メタボローム解析の結果では、解糖系において病変部では解糖系の中間代謝産物は検出されないにも関わらず、最終産物の乳酸は正常上皮より多く検出されていた。

4. ペントースリン酸経路において、病変部は正常上皮に比べ代謝産物が多い傾向を認め、最終産物である Guanine が病変部で有意に多くなっていた。

5. 病変部でグルタミンの量が有意に増加しており、TCA 回路の代謝産物も病変部は正常粘膜よりも多い傾向を認めた。

これらの結果により、異型上皮・OSCC 部では、細胞外からのグルコースの取り込み亢進、細胞内グリコーゲンの分解亢進、G6Pase の活性化により細胞内グリコーゲンの蓄積がみられ、そのグリコーゲンは、解糖系ではなくペントースリン酸経路にて利用されていることが示唆された。また、病変部では Glutaminolysis が亢進しており、アミノ酸の供給源となっていると共に、解糖系亢進により増加していると考えられていた乳酸の産生に関与していると考えられた。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。

Associations of Autism Spectrum Quotient and Personality Profiles with Eating Behaviors in Patients with Anorexia Nervosa and in a Non-clinical Population (神経性やせ症と健常群における摂食態度と自閉症スペクトラム指数およびパーソナリティプロフィールの関連)

浅井由佳

(論文の内容の要旨)

【背景】神経性やせ症は、持続性のカロリー摂取制限、体重増加や肥満になることへの強い恐怖または体重増加を阻害する行動の持続、体重や体型に関する自己認識の障害、の3つの特徴をもつ摂食障害である。

神経性やせ症の患者は、特徴的なパーソナリティプロフィールや自閉傾向を持つことが報告されているが、その特性が病前から存在するかはわかっていない。

【目的と方法】本研究の目的は、1) 神経性やせ症のパーソナリティプロフィールおよび自閉傾向を調査すること、2) 健常群の自閉傾向およびパーソナリティプロフィールが摂食態度に与える影響を調べることである。神経性やせ症22名、健常女性94名を対象に摂食

態度調査票、気質性格検査、自閉症スペクトラム指数を用いて評価を行った。

【結果】神経性やせ症では、先行研究と同様に気質性格検査において損害回避の高さ ($P < 0.001$) を認め、新奇性探究 ($P = 0.006$)、報酬依存 ($P = 0.009$)、自己志向性 ($P < 0.001$) の項目では得点が低かった。自閉症スペクトラム指数は健常群と比較して神経性やせ症で有意に高値であった ($P < 0.001$)。さらに、健常群において、神経性やせ症に類似したパーソナリティプロフィールや自閉症スペクトラム指数の高値が、制限型の摂食態度と関連することが明らかとなった。

【結論】神経性やせ症の自閉傾向およびパーソナリティプロフィールは、病前から摂食態度に関連してお

り、神経性やせ症を発症する危険因子となる可能性が示唆された。今後、縦断的な研究による検証が必要であるが、神経性やせ症の危険因子を明らかにすることは、リスクが高い者を対象とした、より効果的な予防活動を行うための手助けとなり得る。

(論文審査の結果の要旨)

神経性やせ症は、持続性のカロリー摂取制限、体重増加や肥満になることへの強い恐怖または体重増加を阻害する行動の持続、体重や体型に関する自己認識の障害、の3つの特徴をもつ摂食障害である。

神経性やせ症の患者は、特徴的なパーソナリティプロフィールや自閉傾向を持つことが報告されているが、その特性が病前から存在するのかわかっていない。

本研究の目的は、1) 神経性やせ症のパーソナリティプロフィールおよび自閉傾向を調査すること、2) 健常群の自閉傾向およびパーソナリティプロフィールが摂食態度に与える影響を調べることである。神経性やせ症22名、健常女性94名を対象に摂食態度調査票、気質性格検査、自閉症スペクトラム指数を用いて評価を行った。

その結果、浅井は次の結論を得た。

1. 神経性やせ症では、先行研究と同様に気質性格検査において損害回避の高さ ($P < 0.001$) を認め、新奇性探究 ($P = 0.006$)、報酬依存 ($P = 0.009$)、自己志向性 ($P < 0.001$) の項目では得点が低く、摂食態度調査票、自閉症スペクトラム指数も有意に高値であった ($P < 0.001$)。
2. 健常群において、神経性やせ症に類似したパーソナリティプロフィール (気質性格検査における高い損害回避と固執、低い新奇性探究、報酬依存、自己志向性) や自閉症スペクトラム指数の高値が、制限型の摂食態度と関連していた。

これらの結果より、神経性やせ症の自閉傾向およびパーソナリティプロフィールは、病前から摂食態度に関連しており、神経性やせ症を発症する危険因子となる可能性が示唆された。神経性やせ症の危険因子を明らかにすることは、リスクが高い者を対象とした、より効果的な予防活動を行うための手助けとなり得ると考えられた。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。

Clinical outcome of osteosarcoma and its correlation with programmed death-ligand 1 and T-cell activation markers (骨肉腫の臨床成績および programmed death-ligand1, T細胞活性化マーカーとの相関)

吉田 和 薫

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 現在臨床において抗 PD-1抗体や抗 PD-L1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤を用いたがんの治療が行われている。しかし、これらの治療効果はがんの種類によって異なる。この理由の一つとして、がんの種類によって免疫チェックポイント分子の発現の程度やそれらによる T細胞性免疫の抑制の程度が異なることが想定される。本研究の目的は、骨肉腫の臨床成績と PD-L1, perforin (PRF), granzyme B (GZMB), $IFN\gamma$ 発現の関係を評価することである。

【方法】 1995年から信州大学医学部附属病院整形外科において治療を行った骨肉腫の凍結標本を用いて研究を行った。対象は化学療法を受ける前に検体が採取されており、臨床経過の確認ができるものとした。腫瘍の PD-L1, PRF, GZMB, $IFN\gamma$ 発現を qPCR で測定し、各項目相互の関係を相関分析で評価した。健常成人の腸骨海綿骨をコントロールとし、その数値を cut

off 値として高発現群および低発現群に群分けを行った。転移および死亡をエンドポイントとした Kaplan-Meier 曲線を作成し、ログランク解析を行うことで臨床成績との関連について検証した。

【結果】 対象となる検体は19例であった。年齢は6から77歳 (24.7 ± 19.8) であり、女性6例、男性13例だった。部位は大腿骨13例、脛骨2例、腓骨2例、上腕骨2例だった。初診時の転移を10例に認めた。術前化学療法は有効12例、無効6例であった。相関分析では、GZMB, PRF, $IFN\gamma$ は有意に正の相関をしていた。PD-L1とそれぞれの T細胞活性化マーカーも有意に正の相関をしていた。PD-L1高発現群は有意に早期に転移を起こしていた。GZMB 及び PRF の高発現群は全生存率が有意に高かった。

【考察】 本研究では骨肉腫の臨床検体を用いて PD-L1 および T細胞活性化マーカーの遺伝子発現を評価した。T細胞活性化マーカーと PD-L1が正の相関をしていた。 $IFN\gamma$ が腫瘍の PD-L1発現を増強することが報告

されており、今回の結果はT細胞の活性化によるPD-L1の発現上昇が関与していると考えられる。骨肉腫の臨床成績に関して、PD-L1高発現では肺転移が起りやすいことが分かったが、これは過去の他の癌腫における報告と一致するものである。また、T細胞活性化マーカーが高発現している群では全生存率が良いことが分かった。本研究の結果は抗PD-1抗体によるT細胞の再活性化が骨肉腫の予後を改善する可能性を示唆している。

【結論】 骨肉腫の臨床成績とPDL1, perforin, granzyme B, IFN γ 発現の関係を初めて明らかにした。本研究は、骨肉腫における抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体の治療の適応とその効果の予測に重要な情報を提供する。

(論文審査の結果の要旨)

抗PD-1抗体の臨床使用が開始され、適応となる癌腫も増えてきている。同治療は新規治療薬の開発が進んでいない骨肉腫に対する新規治療法として注目されているが、効果に関しては一定の結論が出ていない。腫瘍におけるPD-L1発現と予後の関係についても腫瘍の種類によってさまざまであることが示されており、各癌腫についてPD-L1発現およびその際のT細胞活性の状態と予後の関係の評価が必要である。本研究では腫瘍に対するT細胞活性の状態を評価するために、活性化したT細胞が産生することが知られているgranzyme B (GZMB) とperforin (PRF), IFN γ を評価した。GZMB およびPRFはT細胞が腫瘍細胞を殺傷する際の直接的なエフェクター分子であり、IFN γ は殺細胞作用を持つNK細胞の活性化などを行う炎症

性サイトカインである。

吉田和薫は、本学附属病院で1995年から2015年に診断、治療を行った通常型骨肉腫の凍結検体を用いて、PD-L1, GZMB, PRF, IFN γ の mRNA 発現を測定し、各遺伝子の相関をPearsonの相関分析で評価を行った。

また、正常健人の腸骨海綿骨検体をコントロールとし、その値をcut off値とした高低の群分けを行った。転移および死亡をエンドポイントとしたカプランマイヤー曲線を作成し、ログランク解析を行い、各遺伝子の発現の程度と臨床成績の関係を評価した。

解析および評価を行い、吉田は次の結果を得た。

1. GZMB, PRF, IFN γ の各T細胞活性化マーカーは相互に強く、もしくはかなり強く正の相関をしていた。
2. GZMB, PRF, IFN γ とPD-L1はそれぞれ強く、もしくはかなり強く正の相関をしていた。
3. PD-L1高発現群においては、低発現群と比較し有意に早期に転移をきたしていた。
4. GZMBもしくはPRFの高発現群は、それぞれの低発現群と比較し、有意に全生存率が良好であった。

これらの結果より、各T細胞活性化マーカーとPD-L1は相互に影響していることが示唆された。また、骨肉腫においてPD-L1の高発現は予後不良であることが示された。さらに、抗PD-1抗体でT細胞活性を賦活化することで骨肉腫患者の予後が改善する可能性を示した。

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。

A longitudinal study on the relationship between dental health and metabolic syndrome in Japan (日本での口腔衛生とメタボリックシンドロームの関連性についての縦断研究)

櫻井伸一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 メタボリックシンドロームと歯周炎の密接な関係はすでに報告されている。しかしながらわずかな縦断研究が存在するだけで、それらの関連性は完全には解明できていない。本研究の目的は縦断的研究を用いて歯科疾患の変化とメタボリックシンドロームとの関連性を調査検討することである。

【方法】 2014年に塩尻市国保特定健診を受けた2,716人中985人、2016年には2,456人のうち754人に成人歯科健診を行った。これらのうち、390人が2014年と2016

年の両方で特定健診と歯科検診を受けており、この390人について詳しく検討を行った。

【結果】 2014年から2016年にかけて、メタボリックシンドローム構成要素である高血圧、脂質代謝異常、高血糖の陽性者数は62人(15.9%)で減少し、104人(26.7%)で増加していた。多変量解析を用いて陽性の増減に寄与する影響因子を分析すると、性(オッズ比(OR):0.55, 95%信頼区間(CI):0.37-0.82, P<0.05)、飲酒行動(OR:2.06, 95%CI:1.14-3.73, P<0.05)、血糖治療薬(OR:6.45, 95%CI:1.45-

27.9 $P < 0.01$), 歯周病 (OR : 1.75, 95 %CI : 1.14-2.70, $P < 0.01$) はメタボリックシンドロームにとって有意に影響する因子であった。歯周炎の改善は高血圧 (OR : 2.14, 95 %CI : 1.03-4.43, $P < 0.05$) や高血糖 (OR : 2.52, 95 %CI : 1.27-4.98, $P < 0.01$) に影響を与えたが、脂質代謝異常、肥満には影響しなかった。

【結論】本研究の結果より、陽性のメタボリックシンドローム構成要素の保有率は歯周炎に罹患していないか、改善した人よりも持続的、進行性の歯周炎をもつ人の方が高かったことから、歯周炎を減らすことがメタボリックシンドローム予備軍やメタボリックシンドロームを防ぐために重要である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

メタボリックシンドローム (MetS) と歯周炎の密接な関連性はすでに報告されているが、その生物学的メカニズムは明らかになっていない。MetS と歯周炎に関する報告の多くは横断研究であり、縦断的研究は少ないため、歯周炎が MetS のリスク因子であるかの証明は困難であった。今回、MetS における歯周炎 (リスク因子) の影響を明らかにするため、特定健診に併せて歯科健診を行い縦断的に調査、分析を行った。

本研究では、2014年と2016年の両方で長野県塩尻市の特定健診と歯科健診を受診した30歳以上の国民健康保険被保険者390人を対象とした。なお特定健診受診者数は2014年2,716人、2016年2,454人であり、そのうち歯科健診受診者数は2014年985人 (28%), 2016年754人 (32%) であった。特定健診では生活習慣などに関する問診、身長・体重・腹囲の測定、血圧測定、血液検査が行われた。歯科健診では歯周組織の状態、

口腔清掃状態、残存歯の本数、未治療の喪失歯の本数を調査した。歯周組織の評価には WHO の地域歯周疾患歯数 CPI を用いた。多変量解析 (順序ロジスティック回帰分析) によりリスク因子の変化が MetS の変化にどのように影響するかを分析した。従属因子は MetS 構成要素 (高血圧、脂質代謝異常、高血糖、肥満) の該当要素数の増減と各因子の変化とし、MetS の各要素 (高血圧症、脂質代謝異常症、高血糖、肥満) の変化を「なし、改善、持続、発症」の4つのカテゴリに分類した。説明因子は生活習慣、投薬状況、歯科健診結果の変化で、各説明因子の変化を「なし、改善、持続、悪化」の4つのカテゴリに分類した。

その結果、櫻井伸一は次の結論を得た。

1. 歯周炎の変化は MetS 該当要素数の変化に有意な影響を与えていた。歯周炎が持続するか悪化した群は歯周炎に元々罹患していないか、歯周炎が改善した群よりも MetS の該当要素が増加した者の割合が高かった。
2. 歯周炎の変化は高血糖の変化に対して有意な影響を与えていた。歯周炎が持続している群はその他の群よりも高血糖の有病率・発症率が高くなった。
3. 歯周炎の変化は肥満の変化に対して有意な影響を認めなかったが、残存歯数の変化は肥満に有意な影響を与えた。残存歯数が少ない程肥満は持続するか発症する傾向にあった。

これらの結果より、歯周炎は MetS のリスク因子であり、歯周炎を減らすことが MetS の予防につながる可能性が示唆された。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。

Electrophysiological demyelinating features in hereditary ATTR amyloidosis (遺伝性 ATTR アミロイドーシスにおける電気生理学的脱髄所見)

大橋 信彦

(論文の内容の要旨)

【背景】遺伝性 ATTR アミロイドーシスはトランスサイレチン (TTR) 蛋白が全身に沈着することで末梢神経障害、心障害などを生じる致死性の遺伝性疾患であるが、肝移植、TTR 四量体安定化薬、遺伝子治療による治療法が確立されつつあり、早期診断が重要である。しかし、非集積地出身の家族歴がはっきりしない高齢発症の遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者は目立った特徴のない末梢神経障害を呈するため、病

初期に慢性進行性の免疫介在性末梢神経障害である慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) と誤診されることが多い。誤診される臨床的要因には、家族歴が明らかでないこと、非特異的な運動感覚神経障害を呈すること、心障害や自律神経障害が目立たないことなどが報告されている。前者が軸索障害、後者が脱髄を特徴とすることから、神経伝導検査による電気生理学的評価は鑑別に有用と考えられるが、遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者が CIDP と電気生理学的に誤解釈さ

れる要因は十分に検討されていない。今回、我々は遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者が CIDP と誤解釈される電気生理学的要因について検討した。

【対象】2003年1月から2016年12月に当施設を受診し、多発神経障害、手根管症候群、自律神経障害のうち、1つ以上の神経症状を呈した遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者102名を対象とした。確定診断は遺伝子検査における *TTR* 遺伝子変異、生検におけるアミロイド沈着の確認により行った。

【方法】運動神経伝導検査 (2Hz low-cut filter) を一側尺骨神経、脛骨神経で行い、複合筋活動電位 (CMAP)、遠位潜時 (DL)、運動神経伝導速度 (MCV)、F波最少潜時・出現率、遠位部 CMAP 持続時間、伝導ブロック、異常な時間的分散を評価した。これらの結果から、CIDP の代表的な電気診断基準である European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society (EFNS/PNS) 電気診断基準を満たす割合やその要因、患者背景を後方視的に検討した。EFNS/PNS 基準における遠位部 CMAP 持続時間の基準値は low-cut filter 20Hz の条件で設定されたものであることから、近年 Mitsuma らが示した low-cut filter 2Hz を用いた基準値でも遠位部 CMAP 持続時間を評価した。

【結果】102名の患者背景は、男性67名/女性35名、平均年齢 48.0 ± 17.1 歳、家族歴なし26名、Val30Met 変異85名/非 Val30Met 変異17名、集積地出身35名/非集積地出身67名であった。患者背景における集積地例と非集積地例の比較では、非集積地例は中高年で発症し、非 Val30Met 変異を有し、家族歴を欠く例が多かった。電気生理学的背景における両者の比較では、非集積地例で CMAP 振幅と MCV の低下が目立っていた。EFNS/PNS 電気診断基準の definite CIDP に該当した患者は102名中13名 (13%) で、EFNS/PNS 電気診断基準を多く満たした項目は、尺骨神経遠位部 CMAP 持続時間の延長 (13名)、脛骨神経 DL の延長 (5名)、異常な時間的分散 (5名) であった。伝導ブロックを呈した例はなかった。13例全例で脛骨神経 CMAP 振幅は高度に低下し (0.7 ± 0.7 mV)、高度の下肢軸索障害を呈していた。definite CIDP 群13名の患者背景は、男性10名/女性3名、平均年齢 54.3 ± 15.2 歳、家族歴なし6名、Val30Met 変異11名/非 Val30Met 変異2名、集積地出身3名/非集積地出身10名であった。definite CIDP 群と non-definite CIDP 群との患者背景の比較検討では両群間で明らかな差は認めなかった。

今回は2神経のみの電気生理学的検討であり、非集

積地出身例を中心とした軸索障害の非常に強い遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者では脛骨神経 CMAP 振幅が高度低下もしくは消失し、各種パラメータを解析できなかった。これらが Definite CIDP 群と non-definite CIDP 群の患者背景に差がでなかったことに影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、尺骨神経遠位部 CMAP 持続時間の延長については Mitsuma らの low-cut filter 2Hz における基準値を用いた場合、該当した患者は2名のみとなり、EFNS/PNS 電気診断基準の definite CIDP に該当した患者は3名のみとなった。

【結論】遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者は高度軸索障害に伴い伝導ブロックのない電気生理学的脱髄所見を呈することがあり、電気生理学的に CIDP と誤解釈される可能性がある。また、low-cut filter 設定により遠位部 CMAP 持続時間は大きく変化する可能性があることから注意が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝性 ATTR アミロイドーシスは家族歴のない高齢患者では目立った特徴のない末梢神経障害を呈し、病初期に慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (CIDP) と誤診されることも多いが、その電気生理学的要因は十分に検討されていない。今回、遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者が CIDP と誤解釈されうる電気生理学的要因について検討した。

遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者102名 (男性67名/女性35名、平均年齢 48.0 ± 17.1 歳、家族歴なし26名、Val30Met 変異85名/非 Val30Met 変異17名、集積地出身35名/非集積地出身67名) を対象に、運動神経伝導検査 (low-cut filter 2Hz) を一側尺骨神経、脛骨神経で行い、複合筋活動電位 (CMAP) 振幅、遠位潜時 (DL)、運動神経伝導速度 (MCV)、F波最少潜時・出現率、遠位部 CMAP 持続時間、伝導ブロック、異常な時間的分散を評価し、CIDP の代表的な電気診断基準である European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society (EFNS/PNS) 電気診断基準を満たす割合やその要因、患者背景を後方視的に検討した。遠位部 CMAP 持続時間は low-cut filter 設定で変化することが知られており、近年 Mitsuma らが示した low-cut filter 2Hz における基準値でも評価した。

遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者102名中13名 (13%) が EFNS/PNS 電気診断基準の definite CIDP に該当した。13名において EFNS/PNS 電気診断基準

を多く満たした項目は、尺骨神経遠位部 CMAP 持続時間の延長 (13名)、脛骨神経 DL の延長 (5名)、異常な時間的分散 (5名) であったが、伝導ブロックを呈した例はなかった。13例全例で脛骨神経 CMAP 振幅は高度に低下し (0.7 ± 0.7 mV)、高度の下肢軸索障害を呈していた。尺骨神経遠位部 CMAP 持続時間は Mitsuma らの基準値を用いた場合、definite CIDP は3名のみとなった。

遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者は高度軸索障害により伝導ブロックを伴わない伝導遅延を呈し、電気生理学的に CIDP と誤解釈される可能性がある。遠位部 CMAP 持続時間の解釈には low-cut filter 設定を考慮する必要がある。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Loss of μ -crystallin causes PPAR γ activation and obesity in high-fat diet-fed mice

(μ -crystallin (CRYM) の欠損が高脂肪食負荷マウスで PPAR γ の活性化と肥満を誘発する)

大久保 洋輔

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】肥満はエネルギー貯蓄と消費のバランスの崩れがその発症要因となる。甲状腺ホルモンは脂肪の産生と消費を調節することによりエネルギー貯蓄-消費のバランスを司っている。 μ -crystallin (CRYM) は細胞内で甲状腺ホルモン (T3) と結合することで細胞内の T3 の働きを調節する蛋白である。CRYM が 2 型糖尿病合併肥満患者の白色脂肪内で減少している、CRYM が骨格筋の働きを調整している、といった近年の報告を踏まえ、我々は CRYM がエネルギー代謝に関与しているとの仮説を立てた。CRYM の全身欠損 (KO) マウスを用いて CRYM が高脂肪食負荷下でエネルギー代謝へどのような影響を与えるか解明することを目的とした。

【方法】8週齢の野生型マウスと CRYM KO マウスに対して、10週間の60%高脂肪食を与えた。体重および空腹時血糖値を2週間ごとに測定し、並行して摂餌量も測定した。負荷10週目に内臓脂肪、耐糖能、肝臓を評価した。内臓脂肪を重量測定と組織切片による脂肪細胞のサイズで評価した。耐糖能をグルコース腹腔内投与試験、インスリン腹腔内投与試験、islet 単離刺激試験で評価した。肝臓を重量測定および組織切片での脂肪滴サイズの比較、real time PCR を用いた炎症、脂肪合成、PPAR の遺伝子発現量の違いで評価した。統計学的処理は、PASW statistics (v18.0) を用いて、2群間の差を Mann-Whitney U test で確認し、P 値0.05未満を有意差ありとした。

【結果】野生型マウスに比べ CRYM KO マウスは、負荷後8週から体重、内臓脂肪が有意に上昇し、摂餌量も一貫して多い傾向を認めた。脂肪については内臓脂肪 (精巣周囲、後腹膜) の重量、および精巣周囲内臓

脂肪の組織切片による脂肪細胞面積の有意な増大を認めた。空腹時の血糖に差はなかったが、ブドウ糖負荷により耐糖能の低下を認めた。インスリン投与によるインスリンに対する反応、膵臓からラ氏島を分離してブドウ糖刺激に対するインスリン分泌を確認したが、有意な差は認められなかった。肝臓は重量に差はなく、CRYM KO マウスで組織切片での脂肪滴が有意な増加を認めた。肝臓の遺伝子発現量解析で、CRYM KO マウスでは炎症に関連する *Tnf- α* 、核内転写因子の *Ppar γ* と脂肪産生に関連する *Acc1* の有意な上昇を認めた。

【考察】甲状腺ホルモンの細胞内結合蛋白である CRYM を欠損させたマウスにおいて、高脂肪食の負荷は肥満を引き起こし、脂肪の増加および脂肪細胞の肥大化、耐糖能の低下、脂肪細胞および肝臓での炎症系遺伝子の活性化を認めた。さらには肝臓で *Ppar γ* と *Acc1* 遺伝子の有意な増加を認め、脂質産生と脂肪の蓄積に CRYM が抑制的に働いている可能性を示した。

白色脂肪について、T3 はノルエピネフリンの末梢での産生を刺激することで、脂肪分解増加や白色脂肪減少をおこす。既報で LXR (Liver X receptor) β が皮下脂肪の甲状腺ホルモン発現量を調整し、白色脂肪量を調整することが報告されており、CRYM は LXR β などの因子と影響しあう可能性も考えられる。

高脂肪食負荷下で CRYM KO マウスでは *Ppar γ* の著明な増加が起こる。*Ppar γ* は脂肪合成に関与する遺伝子を活性化し、*Ppar γ* の発現増加が脂肪肝を引き起こすことが知られている。また肝細胞およびマクロファージ特異的な *Ppar γ* 欠損マウスでは脂肪肝が起らないことが報告されている。今回我々は CRYM と *Ppar γ* の直接的な関連を示すことはできな

かったが、高脂肪食負荷下ではCRYMが*Ppar* γ 発現を抑制して肝臓への脂肪蓄積を減弱している可能性がある。

T3は*Acc1*, *Fasn*, *Srebp1*といった脂質産生に関連した遺伝子を誘導して脂質合成を促進することがわかっているが、我々のデータからCRYM KOマウスでは*Acc1*発現が有意に増加し、*Fasn*, *Srebp1*は有意差こそ認められなかったものの増加傾向を示すことがわかった。CRYMがT3と関係して*Acc1*などの遺伝子発現を抑制し、高脂肪食負荷の状態でも脂肪沈着をさせないように働いている可能性が示唆された。

糖代謝に関しては耐糖能の低下が認められた。肥満によるインスリン抵抗性上昇で耐糖能が低下するのではないかと考えたが、インスリン投与試験ではインスリン抵抗性に有意な差は認めなかった。一方でブドウ糖投与時の血中インスリン濃度およびインスリン分泌試験でもインスリン分泌に有意な差は認めないことから、耐糖能低下の原因は示せなかった。糖代謝への関与のメカニズムは今後の研究の課題である。

上記我々のデータからCRYMは高脂肪食負荷による脂肪肝生成と肥満発症を抑制するのに必須である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

μ -crystallin (CRYM) は細胞内で甲状腺ホルモン (T3) と結合することで細胞内の T3 の働きを調節する蛋白である。これまで当科ではCRYMの異常は人では聴覚異常を呈し、CRYM欠損マウスでは成長や心拍数、聴力には異常がないことを報告してきた。CRYMが2型糖尿病合併肥満患者の白色脂肪内で減少しているといった近年の報告を踏まえ、我々はCRYMがエネルギー代謝に関与しているとの仮説を立てた。CRYMの全身欠損 (KO) マウスを用いてCRYMが高脂肪食負荷下でエネルギー代謝へどのような影響を与えるか解明することを目的とした。

8週齢の野生型マウスとCRYM KOマウスに対し、10週間の60%高脂肪食を与えた。体重および空腹時血糖値を2週間ごとに測定し、並行して摂餌量も測定した。負荷10週目に内臓脂肪、耐糖能、肝臓を評価した。内臓脂肪を重量測定と組織切片による脂肪細胞のサイズで評価した。耐糖能をグルコース腹腔内投与試験、インスリン腹腔内投与試験、islet単離刺激試験で評価した。肝臓を重量測定及び組織切片での脂肪滴サイズの比較、real time PCRを用いた炎症、脂肪合成、PPARの遺伝子発現量の違いを調べた。

その結果、大久保洋輔は次の結論を得た。

1. 野生型マウスに比べCRYM KOマウスは、負荷後8週から体重、内臓脂肪が有意に上昇し、摂餌量も一貫して多い傾向を認めた。脳視床下部での食欲に関する遺伝子の発現量は、両群で差は認めなかった。
2. 糖代謝に関しては空腹時の血糖に差はなかったが、ブドウ糖負荷により耐糖能の低下を認めた。インスリン投与によるインスリンに対する反応と、膵臓からラ氏島を分離してブドウ糖刺激に対するインスリン分泌を確認したが、有意な差は認めなかった。
3. 肝臓は重量に差はなく、CRYM KOマウスで組織切片での脂肪滴が有意な増加を認めた。脂肪はCRYM KOマウスで内臓脂肪 (精巣周囲、後腹膜) の重量、および精巣周囲内臓脂肪の組織切片による脂肪細胞面積の有意な増大を認めた。
4. 肝臓の遺伝子発現量解析で、CRYM KOマウスでは炎症に関連する*Tnf- α* が増加し、脂肪肝に矛盾しない結果であった。また、CRYM KOマウスでは脂肪産生に関連する*Acc1*と核内転写因子の*Ppar* γ の有意な増加を認めた。

これらの結果より、CRYMはCRYM高脂肪食負荷による脂肪肝生成と脂肪増加を抑制すると思われた。追加で行った同一量の高脂肪食を野生型およびCRYM KOに与えた実験においても、CRYM KOで脂肪量の増加を認めたことから、CRYMが脂肪産生・蓄積を抑制することが示唆された。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のあるものと認めた。

A Cross-sectional Multivariate Analysis of the Relationship Between Dental Health and Metabolic Syndrome (横断的多変量解析による歯科疾患とメタボリックシンドロームの関連についての検討)

唐 澤 今 人

(論文の内容の要旨)

【背景】近年、歯周病とメタボリックシンドローム(以下Mets)との関連が報告されている。厚生労働省の基本指針では、医療保険の被保険者と40歳以上のその扶養者は内臓脂肪肥満に焦点を当てた特定健診を受診する義務があるとしている。しかし、現在のところ特定健診において歯科検診は実施されていない。そこで、本研究では特定健診に歯科検診を試験的に導入することにより歯周病とMetsとの関連性について横断的な検討、解析を行った。

【方法】2014年に長野県塩尻市にて国保特定健診を受診した30歳以上の受診者のうち、本研究への参加に同意し歯科健康診断を同時に行った985名について統計学的解析を行った。特定健診は厚生労働省により示された標準プログラムに基づいて行われた。歯科健診は「標準的な成人歯科健診プログラム・保健指導マニュアル」に準拠して行い、特に歯周病についてはCommunity Periodontal Indexを用いて評価を行った。そして得られたデータを用いて、歯科疾患とMetsとの関連について統計学的解析を行った。本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を得て行われた(承認番号:2775)。

【結果】被験者数は男性461名、女性524名、平均年齢は59.4歳であった。平均残存歯数は25.5本であった。多変量解析の結果では、Mets診断基準の該当項目数と歯周病との間に有意な関連は認められなかった。しかしながら、危険因子間での相関係数解析により、年齢と喫煙が歯周病とMetsの交絡因子(共通リスクファクター)であることが示唆された。また、共通リスクファクターを考慮すれば、歯周病はMetsの構成要素である肥満、高血圧症、高血糖それぞれとの間に有意な関連があることが示唆された。

【結論】本研究結果より、歯周病とMetsは加齢、喫煙などの共通リスクファクターに起因することが示唆された。歯周病とMetsに直接的な関係があるがどうかについては不明だが、歯周病とMetsについては共同で評価されるべきである。

(論文審査の結果の要旨)

歯科疾患、特に歯周病はその発症原因から生活習慣病の一つとして認識されているが、その予防を目的としている特定健診において歯科健診は現在実施されていない。WHOが提唱するコモンリスクファクターアプローチの観点からも、医科健診と歯科健診を併催することによる副次的効果は大きいと考えられる。今回、国保特定健診に歯科健診を試験的に導入し、その結果について横断的に解析を行った。対象は2014年に長野県塩尻市にて国保特定健診を受診した30歳以上の受診者(2,716名)のうち、歯科健診を希望し同意が得られた985名(平均年齢59.4歳)を被験者とした。特定健診に導入した歯科健診は「標準的な成人歯科健診プログラム・保健指導マニュアル(2009年)」に準拠し、歯式(健全歯、未処置歯、処置歯、現在歯、要補綴、欠損補綴歯、補綴不要歯)、歯周組織の状態(CPITN)、口腔衛生状態、その他の所見(楔状欠損、歯列・咬合不正、顎関節)、口腔乾燥度について調査を行った。統計解析では説明変数を性別、年齢、喫煙、飲酒、深夜の夜食、運動習慣、歯科検査項目では口腔衛生状態、CPITN、歯周ポケットの深さ、現在歯数、要補綴歯数に設定、目的変数をMetsの陽性項目数と各Mets構成項要素の腹部肥満、高血圧、脂質異常、高血糖、腎機能障害の有無と設定し、単変量解析およびステップワイズ法を用いた順序ロジスティック回帰分析を用いて多変量解析を行った。

その結果、唐澤今人は次の結果を得た。

1. Mets危険因子間での相関係数解析により、年齢や喫煙が歯科疾患とMetsの交絡因子であることが示唆された。
2. 多変量解析においてMets診断基準の該当項目数と歯科疾患との間に有意な関連は認められなかった。
3. Metsの構成要素を個々でみると、特に腹部肥満、高血圧症と歯周病との間に有意な関連を認め、高血糖と歯周病との間に関連する傾向があることが示唆された。

これらの結果により歯科疾患(特にう蝕や歯周病)はMetsと同じリスクファクターと関連していること

が示唆されたため、歯科疾患と Mets は共同で評価されるべきある事が示された。

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。

Long-term Effects of Ipragliflozin on Adipose Tissue in Japanese Patients with Obese Type 2 Diabetes (肥満症合併日本人2型糖尿病患者におけるイプラグリフロジンによる長期的体脂肪減量効果)

関 戸 貴 志

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 脂肪組織における過剰な脂肪蓄積による肥満は2型糖尿病や心血管疾患のリスクとなる病態であり、その有病率は我が国のみならず世界的にも増加傾向であり、現在重大な健康問題となっている。しかしこれまで我が国では肥満症に対する治療薬は限られていた。2型糖尿病に対する治療薬であるSGLT2阻害剤として我が国で最初に上市されたイプラグリフロジンは体重減少をきたすことが報告されている。そこで我々はイプラグリフロジンに抗肥満効果を有する可能性があると考え、肥満症合併2型糖尿病患者におけるイプラグリフロジンによる長期的体脂肪減量効果について検証した。

【方法】 肥満症合併2型糖尿病患者に対して、イプラグリフロジンを1日1回50 mg 投与した。投与開始時点、3か月後、6か月後、12か月後にデュアルインピーダンス法を用いて内臓脂肪面積、皮下脂肪面積の測定を実施した。同時に血液検査でHbA1c、腎機能、血清脂質、肝機能を測定し、体重測定、血圧測定も実施した。主要評価項目は内臓脂肪面積と皮下脂肪面積であらわされる体脂肪量の変化、副次的評価項目は体重変化と検査結果の変化とした。

【結果】 患者数は17名、平均年齢47.1歳、平均 body mass index (BMI) $35.1 \pm 1.1 \text{ kg/m}^2$ であった。平均内臓脂肪面積は投与前 $166.0 \pm 49.7 \text{ cm}^2$ 、3か月後 $149.7 \pm 46.1 \text{ cm}^2$ 、6か月後 $149.7 \pm 42.4 \text{ cm}^2$ 、12か月後 $148.5 \pm 40.2 \text{ cm}^2$ であった。3か月後には有意差を持って減少した ($p=0.027$) が、以後は有意な減少を認めなかった。平均皮下脂肪面積は投与前 $359.3 \pm 110.5 \text{ cm}^2$ 、3か月後 $316.6 \pm 87.1 \text{ cm}^2$ 、6か月後 $326.8 \pm 87.2 \text{ cm}^2$ 、12か月後 $325.9 \pm 90.4 \text{ cm}^2$ であった。3か月後以降、有意差をもって減少した ($p=0.003$, $p=0.018$, $p=0.036$)。平均体重は投与前の $97.6 \pm 15.2 \text{ kg}$ から3か月後以降、有意差をもって減少し12か月後には $93.8 \pm 13.4 \text{ kg}$ となった ($p=0.045$)。血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、血清アス

パラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ALT)、 γ グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) は3か月後以降有意差を持って減少した。胆道系酵素と体重変化量もしくは内臓脂肪面積変化量との有意な相関は認めなかったが、 γ -GTP 変化量と皮下脂肪面積変化量とは有意な相関を認めた (スピアマンの相関 $p=0.004$)。【結論】 肥満症合併2型糖尿病患者において、イプラグリフロジンは有意に皮下脂肪面積、血清 AST, ALT, γ -GTP を減少させ、その効果が1年以上持続することを示した。

(論文審査の結果の要旨)

脂肪組織における過剰な脂肪蓄積による肥満は2型糖尿病や心血管疾患のリスクとなる病態であり、その有病率は我が国のみならず世界的にも増加傾向であり、現在重大な健康問題となっている。しかしこれまで我が国では肥満に対する治療薬は限られていた。2型糖尿病に対する治療薬であるSGLT2阻害剤として我が国で最初に上市されたイプラグリフロジンは体重減少をきたすことが報告されている。そこで我々はイプラグリフロジンに抗肥満効果を有する可能性があると考え、肥満合併2型糖尿病患者におけるイプラグリフロジンによる長期的体脂肪減量効果について検証した。

肥満合併2型糖尿病患者に対して、イプラグリフロジンを1日1回50 mg 投与した。投与開始時点、3か月後、6か月後、12か月後にデュアルインピーダンス法を用いて内臓脂肪面積、皮下脂肪面積の測定を実施した。同時に血液検査でHbA1c、腎機能、血清脂質、肝機能を測定し、体重測定、血圧測定も実施した。主要評価項目は内臓脂肪面積と皮下脂肪面積であらわされる体脂肪量の変化量、副次的評価項目は体重変化と検査結果の変化とした。

その結果、関戸は次の結論を得た。

1. 患者数は17名、平均年齢47.1歳、平均 body mass index (BMI) $35.1 \pm 1.1 \text{ kg/m}^2$ であった。
2. 平均内臓脂肪面積は投与前 $166.0 \pm 49.7 \text{ cm}^2$ 、3か月後 $149.7 \pm 46.1 \text{ cm}^2$ 、6か月後 $149.7 \pm 42.4 \text{ cm}^2$ 、

- 12か月後 $148.5 \pm 40.2 \text{ cm}^2$ であった。3か月後には有意差を持って減少した ($p=0.027$) が、以後は有意な減少を認めなかった。
3. 平均皮下脂肪面積は投与前 $359.3 \pm 110.5 \text{ cm}^2$ 、3か月後 $316.6 \pm 87.1 \text{ cm}^2$ 、6か月後 $326.8 \pm 87.2 \text{ cm}^2$ 、12か月後 $325.9 \pm 90.4 \text{ cm}^2$ であった。3か月後以降、有意差をもって減少した ($p=0.003$, $p=0.018$, $p=0.036$)。
4. 平均体重は投与前の $97.6 \pm 15.2 \text{ kg}$ から3か月後以降、有意差をもって減少し12か月後には $93.8 \pm 13.4 \text{ kg}$ となった ($p=0.045$)。
5. 血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、血清アスパラギン酸アミノトランスフェ

ラーゼ (ALT)、 γ グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) は3か月後以降有意差を持って減少した。

6. 胆道系酵素と体重変化量もしくは内臓脂肪面積変化量との有意な相関は認めなかったが、 γ -GTP変化量と皮下脂肪面積変化量とは有意な相関を認めた (スピアマンの相関 $p=0.004$)。

これらの結果より、肥満合併2型糖尿病患者において、イブラグリフロジンは有意に皮下脂肪、血清AST, ALT, γ -GTPを減少させ、その効果が1年以上持続することを示した。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。

Increase in phospholamban content in mouse skeletal muscle after denervation (除神経モデルマウスの骨格筋におけるホスホランバンの発現量の増加)

小 松 雅 俊

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 骨格筋の萎縮は、神経障害、加齢、敗血症など様々な疾患で認められる病態である。筋萎縮は筋量 (筋断面積) の減少として定義されるが、多くの萎縮病態では単位面積当たりの筋力 (特異張力) も同時に減少することが知られている。この特異張力の減少の一因として、カルシウム代謝の異常が考えられる。骨格筋に活動電位が起こると、その膜電位変化を細胞膜上のL型カルシウムチャネルが感知し、筋小胞体上のリアノジン受容体を開口させる。これにより、リアノジン受容体から大量の Ca^{2+} が放出され、筋細胞が収縮する。細胞質内の Ca^{2+} は、筋小胞体上のカルシウムポンプ (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA) の働きにより、再び筋小胞体内に取り込まれる。このカルシウム代謝過程は、リン酸化やタンパク質間相互作用などにより厳密に制御されており、その破綻は筋収縮異常の原因となる。本論文では除神経モデルマウスを作製し、筋萎縮時における収縮力低下の分子基盤を明らかにするための検討を行った。

【方法と結果】 13-14週齢の雄性 C57BL/6マウスの片側の坐骨神経を切除し、14日後に解析を行った。除神経処置により、前脛骨筋の重量および断面積が有意に減少したことから、筋萎縮が起こっていることが確認された。前脛骨筋の収縮力を測定したところ、単刺激、強縮刺激の両方で有意な減少が認められた。強縮刺激

では、特異張力の有意な減少と、最大弛緩速度の減少も認められた。

次に、単離短趾屈筋線維を用いて、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 Fluo-4によるカルシウムイメージングを行った。その結果、除神経側由来の筋線維では、単縮刺激、強縮刺激の両方で、 Ca^{2+} トランジェントが有意に減弱していた。また、筋小胞体の Ca^{2+} 含有量も有意に低下していることが明らかになった。さらに、前脛骨筋のSERCA活性を測定すると、除神経側で有意に減少していることがわかった。

次に、除神経によってカルシウム代謝に関わる分子群の発現量がどのように変化しているか、ウェスタンブロットングにより検討した。その結果、除神経により、ホスホランバン (PLN) の発現量が、前脛骨筋で15倍、ヒラメ筋で10倍程度増加していることが明らかになった。ホスホランバンはSERCA活性を抑制するタンパク質で、通常心筋や、ヒラメ筋のような遅筋主体の筋組織に発現しているが、前脛骨筋のような速筋主体の筋組織にはほとんど発現していない。そこで、免疫染色法による検討を行ったところ、IIA, IIX, IIBと呼ばれる速筋線維群のすべてで、除神経によりPLNの発現量が増加していた。

【考察】 以上の結果から、除神経による筋の特異張力の低下の一因が、筋小胞体の Ca^{2+} 含有量の低下であること、また、その原因がPLNの発現量増加によるSERCA活性の低下であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

骨格筋の萎縮は、様々な疾患で認められる病態である。筋萎縮は筋量(筋断面積)の減少として定義されるが、多くの萎縮病態では単位面積当たりの筋力(特異張力)も同時に減少することが知られている。この特異張力の減少の一因として、カルシウム代謝の異常が考えられる。本研究で小松らは除神経モデルマウスを作製し、筋萎縮時における特異張力低下の分子基盤を明らかにするための検討を行った。

本研究では、マウスの片側の坐骨神経を切除した14日後に、以下の項目について除神経側と健側で比較検討を行った。

1. 前脛骨筋の収縮パラメータ
 2. 短趾屈筋の Ca^{2+} トランジェント
 3. 前脛骨筋の SERCA 活性
 4. 前脛骨筋とヒラメ筋における Ca^{2+} 代謝関連分子の発現量
 5. 前脛骨筋を構成する線維型のポピュレーション、各線維の断面積および PLN の発現量
- これらの実験を行い、以下の結果を得た。
1. 除神経により強縮刺激時の特異張力、弛緩速度が

有意に減少した。

2. 除神経により、単収縮および強縮電気刺激による Ca^{2+} トランジェントが有意に減少した。筋小胞体 Ca^{2+} 含有量が有意に減少した。
 3. 除神経により、前脛骨筋の SERCA 活性の V_{max} が有意に減少した。
 4. 除神経を行ったところ、前脛骨筋において複数の発現量の変化が認められた。その中でも SERCA 活性に関係する分子として、PLN 発現量が著明に増加した。
 5. 前脛骨筋を構成する線維型のポピュレーションは除神経によってほとんど影響を受けなかった。PLN の発現量は測定した全ての線維型で増加していたが、特に IIX 線維で著明に増加していた。
- 以上の結果から、除神経による筋の特異張力の低下の一因が、筋小胞体の Ca^{2+} 含有量の低下であること、また、その原因が PLN の発現量増加による SERCA 活性の低下であることが示唆された。

以上の内容より、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。

A retrospective analysis of the prevalence of dental diseases in patients with digestive system cancers (消化器癌患者の歯科疾患有病率に関する回顧的分析)

酒 井 洋 徳

(論文の内容の要旨)

【研究背景】消化器疾患を有する患者は、しばしば一般の人よりも歯科治療が必要であると言われている。しかし、その仮定はいまだに証明されておらず、消化器癌の有病率と歯科疾患の関係は明確にされていない。

【目的】本研究の目的は消化器癌の治療を受けた患者の歯科疾患有病率を調査すること。

【研究対象・方法】消化器癌患者の歯のう蝕罹患状況を調査した。対象は、2012年1月から2013年12月までの2年間に信州大学病院で消化器癌に対する周術期口腔機能管理を施行した332人(男性115, 女性217人。平均年齢 70.0 ± 5.02 歳)とした。調査項目は、DMFT指数(D:未処置う蝕歯数, M:喪失歯数, F:う蝕処置歯数)および義歯の使用状況である。次に、2017年の1年間長野市民病院で消化器癌に対する周術期口腔機能管理を施行した216人(男性125, 女性91人。平均年齢 65.2 ± 9.8 歳)を対象に歯周病の罹患状況を調査した。WHOのプロープを用い、WHOの地域歯周

疾患指数(CPI)に従い評価した。

【結果】調査の結果は歯科疾患実態調査と比較した。DMFT指数と義歯装着に関しては2011年の調査と、歯周疾患に関しては2016年の調査と比較した。統計学的手法はMann-Whitney U test, chi-squared test, Dunnett's multiple comparison testを用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

DMFT指数を歯科疾患実態調査と比較すると、消化器癌患者群では未処置歯と処置歯の歯数は有意に低く、喪失歯の歯数は少し高い傾向がみられた。癌の部位別で有意差は認めなかった。残存歯が20本以下の割合は60歳代で、義歯の装着率は70歳代で歯科疾患実態調査より有意に低い結果であった。癌の部位別に有意差は認めなかった。歯周病に関しては、消化器癌患者群では歯周病有病率が有意に高かった。CPIコードの3.4を歯周病とし、そのうちCPIコード4(重度な歯周病)は癌患者群で歯科疾患実態調査よりも有意に高い結果であった。癌の臓器別に有意差は認めなかった。

【結論】 以前より食道癌や胃癌では、歯周病のような慢性細菌感染による歯の喪失は一般的に知られていた。今回の結果より、消化器癌と多数の喪失歯ならびに低い義歯装着率は密接な関係が示された。また、重度な歯周病の有病率も癌患者群で高いことがわかった。これらの結果は歯周病と多数の喪失歯の関連性は、消化器癌発症に対し潜在的役割を果たしていることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

消化器疾患を有する患者は、しばしば一般の人よりも歯科治療が必要である。しかし、その仮定はいまだに証明されておらず、消化器癌の有病率と歯科疾患の関係は明確にされていない。今回、消化器癌の治療を受けた患者の歯科疾患有病率を調査した。

- ① 消化器癌患者のう蝕罹患状況を調査
- ② 消化器癌患者の歯周病罹患率を調査

それぞれを歯科疾患実態調査と比較し統計学的検討を加え、以下の結果を得た

- 1. 消化器癌患者群では DMFT 指数、未処置う蝕歯、う蝕処置済み歯の歯数は有意に少なく、喪失歯の歯

数はやや多い傾向がみられた。DMFT 指数は癌の臓器別で有意差は認めなかった。

- 2. 残存歯数が20本以下の割合に関しては60歳代で、義歯の装着率に関しては70歳代で歯科疾患実態調査より有意に低い結果であった。癌の臓器別に有意差は認めなかった。
- 3. 歯周病に関しては、消化器癌患者群では歯周病有病率が有意に高かった。CPI コードの3.4を歯周病(中程度、重度歯周病)とし、ともに50代以降の年代で、癌患者群の罹患率が歯科疾患実態調査よりも有意に高い結果であった。癌の臓器別に有意差は認めなかった。

これらの結果より、消化器癌と多数の喪失歯ならびに低い義歯装着率は密接な関係が示された。また、重度な歯周病の有病率も癌患者群で高いことがわかった。歯周病と多数の喪失歯の関連性は、消化器癌発症に対し潜在的役割を果たしていることが示唆された。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。

Ovarian function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children and young adults given 8-Gy total body irradiation-based reduced-toxicity myeloablative conditioning (8-Gy 全身放射線照射をベースとした前処置後に同種造血幹細胞移植を実施した女児における性腺機能の検討)

小 森 一 寿

(論文の内容の要旨)

【背景】 造血幹細胞移植 (HSCT) は小児血液悪性腫瘍の高リスク群の根治的治療として重要である。しかし、小児期に HSCT を受けた患者の多くは、晩期合併症のため長期にわたり生活の質の低下に苦しんでいる。特に性腺機能障害は HSCT 後に最も高頻度に認める合併症である。HSCT 後の女性の長期生存者では、移植前処置として大量ブスルファン療法を受けた患者の 1%, 全身放射線照射 (TBI) を受けた患者の 10-15% のみで性腺機能が回復したと報告されている。

晩期合併症を減らすため移植前処置の強度を減弱した非骨髄破壊的前処置を用いた HSCT が、主に非腫瘍性疾患に対して実施され、性腺機能を含めた晩期合併症を軽減できたと報告されている。我々は抗腫瘍効果を維持しながら治療関連毒性の軽減を目指して、8-Gy TBI, フルダラビンとシクロホスファミドで構成される毒性を軽減した骨髄破壊的前処置 (RTMAC)

を開発した。今回、RTMAC 後に HSCT を受けた女児の性腺機能への影響を明らかにするため本研究を実施した。

【方法】 信州大学医学部附属病院小児科で、2003年3月から2015年3月までに8-Gy TBI をベースとした RTMAC 後に HSCT を受けた女児の性腺機能を後方視的に解析した。2018年11月30日までの患者情報を使用した。本研究は、信州大学医学部附属病院倫理委員会で承認を受け (表題: 小児造血幹細胞移植後の女児における性腺機能に関する検討, 承認番号: 3650), 患者の両親および/または患者本人からインフォームドコンセントを得て実施した。

解析対象は、8-Gy TBI をベースとした RTMAC 後に続いて HSCT を行った女児で、除外基準は、(1) HSCT 前に放射線治療歴がある; (2) 初回の HSCT 後に TBI あるいはアルキル化剤を用いた HSCT を行っている; (3) 2018年11月30日の時点で13歳未満であ

る；(4)そして最終観察時より前に亡くなっている、とした。

原発性卵巣不全 (POI) は、卵胞刺激ホルモン (FSH) >30 mIU/mL を認め無月経である場合と定義した。HSCT 前に初潮がなく最終観察時点で16歳未満である女兒の POI は、FSH>30 mIU/mL を認め思春期遅発である場合と定義した。思春期遅発は13歳になっても思春期の開始を認めず、思春期の進行が1年以上の間認められない場合と定義した。POI の診断基準である FSH 上昇と無月経あるいは思春期遅発のうちいずれかひとつを認める場合を POI 疑いと定義した。卵巣機能の回復は、POI あるいは POI 疑いと診断された後、FSH の正常化 (12 mIU/mL 未満) とホルモン補充療法がない状態での月経周期の再開と定義した。**【結果】** 19名の女兒が8-Gy TBI をベースとした RTMAC 後に HSCT を受けていた。そのうち、除外基準に該当しなかった症例14名を解析対象とした。移植時年齢の中央値は9.6歳 (0.8-22.8歳)、HSCT 後の観察期間の中央値は12.2年 (3.7-15.7年) であった。急性移植片対宿主病 (GvHD) はグレード1が5名、グレード2が4名、グレード3が2名に観察され、慢性 GvHD は限局型が2名、全身型が4名に観察された。観察期間中に5名が POI、2名が POI 疑いと判定され、最終観察時点では14名中3名が POI の状態であった。

【結論】 本研究では、36% (14名中5名) の患者が観察期間中に POI を発症し、最終観察時点では21% (14名中3名) が POI の状態であった。12-Gy TBI をベースとする従来の骨髄破壊的前処置後の POI の発症率が85-90%と報告されているので、8-Gy TBI ベースの移植前処置は卵巣毒性を軽減できることが示唆された。移植時の性成熟度別に比較してみると、HSCT 時に思春期前の10名のうち1名のみが最終観察時点で POI の状態であった。一方、HSCT 時に思春期後の3名は全例 POI を発症し、そのうち2名は最終観察時点でも POI の状態であった。したがって、8-Gy TBI をベースとする RTMAC は、HSCT 時に思春期前の女兒の性腺機能を温存するのに適している可能性がある。

観察期間中に POI あるいは POI 疑いであった7名のうち5名が慢性 GvHD を発症していたが、POI を発症しなかった7名の中では1名のみ慢性 GvHD を発症していた。慢性 GvHD を発症した6名のうちでは5名が POI あるいは POI 疑いの状態であった。

よって、慢性 GvHD もまた POI のリスク因子であることが示唆された。

要約すると、8-Gy TBI をベースとした RTMAC を用いた HSCT は、従来の骨髄破壊的前処置を行った患者と比較して、HSCT 時に思春期前の患者において卵巣機能を温存できる可能性が高いことが示唆された。妊娠・出産に対する本前処置の影響に関しては、現時点では評価できていないため、更なるフォローアップが必要である。

(論文審査の結果の要旨)

造血幹細胞移植 (HSCT) は小児血液悪性腫瘍の高リスク群の根治的治療として重要である。しかし、小児期に HSCT を受けた患者の多くは、晩期合併症のため長期にわたり生活の質の低下に苦しんでいる。特に性腺機能障害は HSCT 後に最も高頻度に認める合併症である。HSCT 後の女性の長期生存者では、移植前処置として大量ブスルファン療法を受けた患者の1%、全身放射線照射 (TBI) を受けた患者の10-15%のみで性腺機能が回復したと報告されている。

晩期合併症を減らすため移植前処置の強度を減弱した非骨髄破壊的前処置を用いた HSCT が、主に非腫瘍性疾患に対して実施され、性腺機能を含めた晩期合併症を軽減できたと報告されている。我々は抗腫瘍効果を維持しながら治療関連毒性の軽減を目指して、8-Gy TBI、フルダラビンとシクロホスファミドで構成される毒性を軽減した骨髄破壊的前処置 (RTMAC) を開発した。今回、RTMAC 後に HSCT を受けた女兒の性腺機能への影響を明らかにするため本研究を実施した。

その結果、小森らは次の結論を得た。

1. 19名の女兒が8-Gy TBI をベースとした RTMAC 後に HSCT を受けていた。そのうち、除外基準に該当しなかった症例14例を解析対象とした。
2. 移植時年齢の中央値は9.6歳 (0.8-22.8歳)、HSCT 後の観察期間の中央値は12.2年 (3.7-15.7年) であった。
3. 観察期間中に5名が原発性卵巣不全 (POI)、2名が POI 疑いと判定された。最終観察時点では、14名中3名が POI の状態であった。
4. 36% (14名中5名) の患者が観察期間中に POI を発症したが、最終観察時点では21% (14名中3名) に減少した。
5. 移植時の性成熟度別に比較してみると、HSCT 時に思春期前の10名のうち1名のみが最終観察時点

で POI の状態であった。

一方、HSCT 時に思春期後の 3 名は全例 POI を発症し、そのうち 2 名は最終観察時点でも POI の状態であった。

本研究では、36 % (14 名中 5 名) の患者が観察期間中に POI を発症し、最終観察時点でも 21 % (14 名中 3 名) が POI の状態であった。12-Gy TBI をベースとする従来の骨髄破壊的前処置後の POI の発症率は 85-90 % と報告されているので、8-Gy TBI ベースの移植前処置は卵巣毒性を軽減できることが示唆された。移植時の性成熟度別に比較してみると、HSCT 時に思春期前の 10 名のうち 1 名のみが最終観察時点で POI の状態であった。一方、HSCT 時に思春期後の 3 名は全例 POI を発症し、そのうち 2 名は最終観察時

点でも POI の状態であった。したがって、8-Gy TBI をベースとする RTMAC は、HSCT 時に思春期前の女性の性腺機能を温存するのに適している可能性がある。今回の研究から、8-Gy TBI をベースとした RTMAC を用いた HSCT は、従来の骨髄破壊的前処置を行った患者と比較して、HSCT 時に思春期前の患者において卵巣機能を温存できる可能性が高いことが示唆された。一方で、HSCT 時に思春期後の患者における卵巣機能を十分に保存できていないことも示された。これらのことは小児、思春期がん患者の妊孕性温存に関する診療に役立つ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。

Generation of a common innate lymphoid cell progenitor requires interferon regulatory factor 2 (自然リンパ球共通前駆細胞の分化成熟におけるインターフェロン制御因子-2の役割)

大久保 洋平

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】自然リンパ球 (Innate lymphoid cells: ILCs) は、特に粘膜表面の免疫制御に関連する自然免疫系のリンパ球であり、近年、ILCs の分化のステップや、リンパ系共通前駆細胞 (Common lymphoid progenitors: CLPs) からの分化成熟経路は解明されてきている。しかし、複雑な転写因子の関与により、分化経路の詳細は未だ完全には明らかになっていない。ILC は産生されるサイトカインの種類により、大まかに 3 つのサブタイプに分類される。それぞれのサブセットは、獲得免疫系のヘルパー T (Th) 細胞と対応関係にあり、IFN γ を主に産生するナチュラルキラー細胞 (conventional NK: cNK) と ILC1 (Th1 に対応)、IL-5、IL-13 といった寄生虫感染防御に関連するサイトカインを産生する ILC2 (Th2 に対応)、主に腸管粘膜の防御機構に作用する IL-17、IL-22 を産生する ILC3 (Th17 に対応) である。以前、cNK の成熟にインターフェロン制御因子 2 (Interferon regulatory factor 2: IRF-2) が必要であることを当教室より報告しており、他の ILC 分化も IRF-2 により制御されている可能性があると思われ、IRF-2 欠損マウスを用いて実験を行った。

【方法と結果】① C57BL/6J マウスを背景とする対照マウスと IRF-2 欠損マウスを比較検討した。成熟した ILCs は肺、肝臓、腸管などに分布しており、特に腸

管の粘膜固有層に多く存在することが知られている。まずマウス腸管粘膜固有層の ILCs については、IRF-2 が欠損することにより cNK、ILC1、ILC2、ILC3 (NKp46 陽性亜集団および NKp46 (-) CD4 (-) 亜集団) の細胞数減少を認めたと、ILC3 亜集団のひとつであるリンパ組織誘導細胞 (Lymphoid tissue inducers: LTi, NKp46 (-) CD4 (+)) は影響を受けていなかった。肝臓、肺でも同様にそれぞれ成熟した ILC1 および ILC2s の減少が観察された。② 次に、骨髄移植実験を行った。9.5 Gy の放射線を照射した B6-Ly5.1 マウスをレシピエントとし、IRF-2 欠損もしくは対照マウス (Ly5.2) をドナーとして骨髄移植を施行した。結果、IRF-2 欠損マウスの骨髄を移植したマウス群で LTi 以外の成熟した ILCs の減少を認め、IRF-2 は骨髄中の造血系細胞内で機能しているものと判断した。③ ILC 前駆細胞および骨髄内での分化成熟段階は、CLP \rightarrow aLP \rightarrow EILP (Early ILC progenitor) \rightarrow PD1^{lo}PLZF^{lo}CHILP (Common helper-like innate lymphoid progenitor) \rightarrow PD1^{hi}PLZF^{lo}CHILP \rightarrow PD1^{hi}PLZF^{hi}CHILP (=ILCP: ILC progenitor) と進行していくことが報告されている。ここで PLZF は核内に存在する転写因子である。そこで、IRF-2 欠損および対照マウス骨髄中の各段階の ILC 前駆細胞を検討した。その結果、IRF-2 欠損マウスの骨髄でも CLPs から PD-1^{hi}PLZF^{lo}CHILP にいたる段階では大きな異常を

認めなかったが、次のステップである PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP の細胞数著減を認めた。PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP は、LTi を除く ILC1, ILC2, ILC3 へと分化することが知られており、このことは IRF-2 欠損によって PD-1^{hi}PLZF^{lo}CHILP → PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP の分化ステップが障害されていることを示唆する。④ さらに対照マウスと IRF-2 欠損マウス骨髄から CLPs, PD-1^{lo}PLZF^{lo}CHILP, PD-1^{hi}PLZF^{hi/lo}CHILP をセルソーターを用いて選別回収し、RNA を抽出し RT-PCR を行い、それぞれの細胞群の *Zbtb16* (PLZF をエンコードする遺伝子) RNA 発現量を調べた。結果、コントロールマウスと IRF-2 欠損マウスの PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP においても *Zbtb16* 発現量は変化していなかった。また、PLZF は胸腺内ナチュラルキラー T (NKT) 細胞にも発現し、その分化に必須であることが知られているが、IRF-2 欠損細胞は PLZF タンパク質を正常に発現していた。

【考察】 IRF-2 は ILCs の分化に重要な機能を果たしており、その作用点は PD-1^{hi}PLZF^{lo}CHILP が PLZF タンパク質を発現し、PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP へと分化するステップであることが明らかになった。IRF-2 は胸腺内 NKT 細胞の PLZF 発現に影響せず、直接 *Zbtb16* 遺伝子発現を制御しているのではなく、おそらく別の未知の遺伝子の発現を制御することによって ILC 前駆細胞の分化を推進しているものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

【背景と目的】 自然リンパ球 (Innate lymphoid cells : ILCs) は、自然免疫系のリンパ球であり、近年、炎症性、アレルギー性疾患に関与する細胞として注目されてきた。ILC は、大まかに 3 つのサブタイプに分類される。IFN γ を主に産生するナチュラルキラー細胞 (conventional NK : cNK) と ILC1, IL-5, IL-13 といった寄生虫感染防御に関連するサイトカインを産生する ILC2, 主に腸管粘膜の防御機構に作用する IL-17, IL-22 を産生する ILC3 である。ILCs の分化成熟経路は、CLP (common lymphoid progenitor) → α LP → EILP (Early ILC progenitor) → PD-1^{lo}PLZF^{lo}CHILP (Common helper-like innate lymphoid progenitor) → PD-1^{hi}PLZF^{lo}CHILP → PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP (= ILCP : ILC progenitor) の段階を経て進むことが分かっているが、各ステップの進行においてどのような転写因子が機能しているのかについては未だ不明な所も多い。過去の論文より、cNK の成熟に転写因子インターフェロン制御因子 2 (Interferon regulatory

factor 2 : IRF-2) が必要であることが報告されており、他の ILCs の分化も IRF-2 により制御されている可能性があると思われ、IRF-2 欠損マウスを用いて実験を行った。

その結果、大久保洋平は次の結果を得た。

1. マウス腸管粘膜固有層の ILCs については、IRF-2 が欠損することにより cNK, ILC1, ILC2, ILC3 の細胞数減少を認めたが、もう一つの ILC3 亜集団であるリンパ組織誘導細胞 (Lymphoid tissue inducers : LTi) は影響を受けていなかった。肝臓、肺でも同様にそれぞれ成熟した ILC1 および ILC2 の減少が観察された。
2. 骨髄移植実験の結果、野生型骨髄を移植したマウスに比較して IRF-2 欠損マウスの骨髄を移植したキメラマウス群で LTi 以外の成熟した ILCs の減少を認め、IRF-2 は造血系細胞内で機能しているものと考えられた。
3. IRF-2 欠損マウスの骨髄でも CLPs から PD-1^{hi}PLZF^{lo}CHILP にいたる段階では大きな異常を認めなかったが、一段階分化の進んだ前駆細胞である PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP の細胞数著減を認めた。PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP は、LTi を除く ILC1, ILC2, ILC3 へと分化することが知られており、PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP の分化障害は IRF-2 欠損マウスで観察された ILC 亜集団の異常をよく説明できる。
4. CLP, PD-1^{lo}PLZF^{lo}CHILP, PD-1^{hi}PLZF^{hi/lo}CHILP から RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、CLP, PD-1^{lo}PLZF^{lo}CHILP だけでなく、PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP においても、コントロールマウスと IRF-2 欠損マウスの *Zbtb16* 発現量は変化しなかった。

以上の結果から、IRF-2 は ILCs の分化に重要な機能を果たしており、その作用点は PD-1^{hi}PLZF^{lo}CHILP が PD-1^{hi}PLZF^{hi}CHILP へと分化するステップにおいて *Zbtb16* 遺伝子が転写され PLZF タンパク質が発現する過程であると結論した。本論文は、初期免疫に重要な ILCs の分化成熟経路におけるこれまで不明であったステップを見いだしたものであり、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。

FGF2-FGFR1 pathway activation together with thymidylate synthase upregulation is induced in pemetrexed-resistant lung cancer cells (ペメトレキセド耐性肺癌細胞では FGF2-FGFR1経路の活性化と thymidylate synthase の発現上昇が誘導される)

三浦 健太郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 ペメトレキセドは扁平上皮癌を除く非小細胞肺癌に適応が認められている葉酸代謝拮抗剤である。ペメトレキセドに対する耐性に関しては、これまでに thymidylate synthase (TS) や ATP-binding cassette transporter 11 (ABCC11) などの関与が報告されているが、その機序は完全には解明されていない。Fibroblast growth factor 2 (FGF2) は血管新生、創傷治癒などに関連する増殖因子で、細胞の増殖や分化の過程で重要な役割を担っており、癌細胞の上皮間葉転換 (EMT) を誘導することも知られている。今回、*EGFR* status の異なる2つの肺腺癌細胞株を用いてペメトレキセド耐性細胞株を樹立し、ペメトレキセド耐性機序を明らかにすべく解析を行った。

【方法】 *EGFR* status の異なる2つの肺腺癌細胞株 PC9 (mutant *EGFR*), H1993 (wild-type *EGFR*) に長期間ペメトレキセドを曝露し、ペメトレキセド耐性株 PC9-MTA と H1993-MTA を樹立し、マイクロアレイ法での網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、親株と耐性株での FGF2 および EMT 関連マーカー、TS、MAPK/ERK および PI3K-AKT 経路の蛋白発現およびリン酸化をウェスタンブロット (WB) 法、RT-PCR 法、ELISA 法を用いて解析した。また、FGF2 発現を si RNA を用いてノックダウンした際のペメトレキセド感受性と、FGFR1 の阻害剤である PD173074 を耐性株に投与した際のペメトレキセド感受性を WST 法で解析し、その際の EMT 関連マーカーと MAPK/ERK および PI3K-AKT 経路の蛋白発現およびリン酸化の変化を解析した。

【結果】 マイクロアレイ解析では、二つのペメトレキセド耐性株 (PC9-MTA, H1993-MTA) で、親株に比べて FGF2 と FGFR1、TS の mRNA 発現が上昇しており、FGF2 の蛋白発現増加は WB 法と培養上清の定量で、FGFR1 発現は RT-PCR で、TS の蛋白発現増加は WB 法でそれぞれ確認された。親株との形態の比較では、PC9-MTA では変化を認めなかったが、H1993-MTA は紡錘形に変化していた。PC9-MTA では pERK の増加を認めたが、H1993-MTA では、

pEGFR の著明な低下と pMEK の低下、一方で間葉系マーカー蛋白の発現上昇が認められた。PC9-MTA, H1993-MTA で siRNA を用いて FGF2 のノックダウンを行うと部分的にペメトレキセド耐性の回復が認められ、TS のノックダウンでは、著明なペメトレキセド耐性の回復が認められた。また、FGFR 阻害剤 PD173074 の投与により、PC9-MTA では有意な耐性の回復が認められたが、H1993-MTA ではわずかな回復にとどまった。FGF2 抑制または FGFR1 阻害剤により、PC9-MTA では pERK の発現低下を認めたが、H1993-MTA では EGFR と下流のシグナル伝達分子のリン酸化の上昇と EMT マーカーの発現低下を認めた。一方、PC9-MTA, H1993-MTA とともに、FGF2 のノックダウンによる TS 発現の変化は認められなかった。ZEB1 のノックダウンにより、H1993-MTA では Slug や pSmad の発現低下が誘導され、ペメトレキセド感受性は部分的に回復した。

【考察】 今回の結果から、(i) 肺腺癌細胞のペメトレキセド耐性には、TS の発現増加と部分的に FGF2-FGFR 経路の活性化が関与する、(ii) *EGFR* 変異を有する PC9 では、EGFR 経路を介したシグナル伝達を変えことなく、FGF2-FGFR 経路の活性化により MAPK/ERK 経路が活性化されペメトレキセド耐性が誘導される、(iii) 野生型 *EGFR* の H1993 では、EGFR 経路の抑制と FGF2-FGFR 経路の活性化、およびそれにより誘導される EMT がペメトレキセド耐性に関与する、これらの可能性が示唆された。本研究の結果から、肺腺癌細胞がペメトレキセド耐性を獲得する機序は癌細胞の *EGFR* status により異なり、ペメトレキセドと FGFR を標的とした治療の併用が、非小細胞肺癌の新規治療戦略となる可能性が示唆される。

(論文審査の結果の要旨)

ペメトレキセドは扁平上皮癌を除く非小細胞肺癌に適応が認められている葉酸代謝拮抗剤である。これまでに thymidylate synthase (TS) や ATP-binding cassette transporter 11 (ABCC11) などの関与が報告されているが、その機序は完全には解明されてい

い。一方、Fibroblast growth factor 2 (FGF2) は血管新生、創傷治癒などに関連する増殖因子で、細胞の増殖や分化の過程で重要な役割を担っている。今回、この蛋白に着目してペメトレキセド耐性との関連を解析した。

EGFR status の異なる 2 つの肺腺癌細胞株 PC9 (mutant *EGFR*), H1993 (wild-type *EGFR*) に長期間ペメトレキセドを曝露し、ペメトレキセド耐性株 PC9-MTA と H1993-MTA を樹立し、マイクロアレイ法での網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、親株と耐性株での FGF2 および EMT 関連マーカー、TS, MAPK/ERK および PI3K-AKT 経路の蛋白発現およびリン酸化をウェスタンブロット (WB) 法、RT-PCR 法、ELISA 法を用いて解析した。また、FGF2 発現を si RNA を用いてノックダウンした際のペメトレキセド感受性と、FGFR1 の阻害剤である PD173074 を耐性株に投与した際のペメトレキセド感受性を WST 法で解析し、その際の EMT 関連マーカーと MAPK/ERK および PI3K-AKT 経路の蛋白発

現およびリン酸化の変化を解析した。

その結果、三浦は次の結論を得た。

1. 肺腺癌細胞のペメトレキセド耐性には、TS の発現増加と部分的に FGF2-FGFR 経路の活性化が関与する。
 2. *EGFR* 変異を有する PC9 では、EGFR 経路を介したシグナル伝達を変えることなく、FGF2-FGFR 経路の活性化により MAPK/ERK 経路が活性化されペメトレキセド耐性が誘導される。
 3. 野生型 *EGFR* の H1993 では、EGFR 経路の抑制と FGF2-FGFR 経路の活性化、およびそれにより誘導される EMT がペメトレキセド耐性に関与する。
- これらの結果より、ペメトレキセドの耐性には TS の発現が強く関与しているが、FGF2-FGFR1 経路の活性化も関与していることが示された。ペメトレキセドと、FGFR1 を標的とした治療の併用が非小細胞肺癌の新規治療戦略となる可能性が示された。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Distribution of *Lgr5*-positive cancer cells in intramucosal gastric signet-ring cell carcinoma (胃粘膜内印環細胞癌における *Lgr5* 陽性癌細胞の分布)

中 嶋 智 之

(論文の内容の要旨)

【背景】 Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (*Lgr5*) は腸管上皮における幹細胞マーカーとして報告された。その後、腸管上皮以外にも様々な組織における発現が明らかにされてきた。胃においても幽門腺や腸上皮化生腺管の腺底部での発現が報告されている。さらに大腸癌や肝細胞癌等の癌腫における *Lgr5* 発現も多数報告されており、*Lgr5* は癌幹細胞マーカーとして有望であると考えられている。胃癌における *Lgr5* の発現解析の報告は少なく、組織型と *Lgr5* の発現との関連は明らかにされていない。そこで我々は胃癌組織亜型の一つである印環細胞癌 (signet-ring cell carcinoma: SRCC) に着目した。粘膜内に限局する SRCC はしばしば類器官分化と呼ばれる非腫瘍胃粘膜構造に類似した層状構造を示すことが知られている。本研究では粘膜内 SRCC における類器官分化に着目して *Lgr5* 発現細胞の分布や性状を解析した。

【材料と方法】 信州大学医学部附属病院で切除された胃癌症例で、粘膜固有層内に限局する SRCC 35 症例

(2010年1月から2014年7月) を対象とした。各症例から腫瘍部粘膜全層を含む 3 mm 組織コアを採取し、組織アレイを作製した。組織アレイを薄切し Hematoxylin & Eosin 染色を実施し、さらに CD10, MUC2, MUC5AC, MUC6, Pepsinogen I, CDX2, および Ki67 を用いて免疫組織化学染色を施行した。*Lgr5* は高感度 RNA *in situ* hybridization 法である RNAscope kit を用いて検出した。1 つ以上シグナルドットを持つ細胞を *Lgr5* 陽性とし、*Lgr5* の発現程度の評価は *Lgr5* を発現した腫瘍細胞の割合を 5 段階 (0, no staining; 1, 1-3 dots/cell; 2, 4-10 dots/cell; 3, >10 dots/cell; 4, >15 dots/cell with >10 % of dots in clusters) に分類し、半定量的数値である H-score [以下計算式: (% of grade 1 cells × 1) + (% of grade 2 cells × 2) + (% of grade 3 cells × 3) + (% of grade 4 cells × 4)] を症例毎に腫瘍部を粘膜固有層内で等間隔に上部、中部、下部の 3 領域に分け算出した。また Ki67 陽性率も *Lgr5* H-score を算出した上部、中部、下部の 3 領域で算出した。

さらに Ki67 陽性細胞が帯状に増殖帯をなして分布

する症例を用いて、*Lgr5* RNA in situ hybridization と Ki67免疫組織化学の二重染色を実施し、*Lgr5*陽性細胞と陰性細胞における Ki67陽性率を算出した。

【結果】全症例において *Lgr5*陽性細胞を認めたが、*Lgr5* H-score と臨床病理学的因子に有意な相関は認めなかった。検討した35症例中20症例は粘膜固有層の中央部に Ki67陽性細胞の帯状の分布領域を有しており、これらの症例において高密度の *Lgr5*陽性細胞が粘膜固有層の下部領域に帯状に認められた。さらに、これら20症例は全例が非腫瘍胃粘膜構造を模倣する類器官分化を呈しており、粘膜固有層の上部には MUC5AC 陽性細胞が、下部には MUC6陽性細胞が認められた。MUC5AC 陽性細胞と MUC6陽性細胞との間に Ki67陽性細胞の帯状分布領域（増殖帯）が観察され、多くの *Lgr5*陽性細胞は下層領域付近の MUC6 陽性領域内に分布していた。また CDX2陽性であり、Pepsinogen I は全例陰性であった。

粘膜固有層の上部、中部、および下部領域における *Lgr5* H-score の中央値は、各々17.5 (10.0-32.5), 27.5 (16.3-40.0), および47.5 (25.5-86.3) であり、上部、中部領域と比較して、下部領域で有意に高値を示した ($P<0.001$)。また中部領域の *Lgr5* H-score は上部領域より有意に高値を示した ($P<0.001$)。一方で、Ki67陽性率は、上部、中部、下部領域において各々15.0% (10.0-35%), 47.5% (31.3-60.0%), 12.5% (5.0-23.8%) であり、上部、下部領域と比較して中央領域で有意に高値であった ($P<0.001$)。上部領域と下部領域で Ki67陽性率に有意差は認められなかった ($P=0.410$)。粘膜固有層において Ki67陽性細胞の帯状分布領域を示した20症例の内、十分な標本材料が利用できた16症例において *Lgr5* RNA in situ hybridization と Ki67免疫組織化学の二重染色による解析を行った。*Lgr5*陽性細胞における Ki67陽性率は38.1% (30.5-64.4%) で、*Lgr5*陰性細胞における Ki67陽性率55.5% (38.6-76.1%) と比較して有意に低値を示した ($P<0.001$)。

【考察】本研究において、粘膜内 SRCC における *Lgr5*陽性細胞の分布とその性状の特徴について報告した。粘膜内 SRCC における類器官分化は以前から報告されており、胃粘膜を模倣する層構造が認められ、Ki67陽性細胞の帯状陽性領域を有する増殖帯が存在する。本検討では Ki67陽性領域とは異なる下層領域に *Lgr5*陽性細胞の帯状陽性像を認めており、*Lgr5*陽性細胞の存在部位も胃粘膜を模倣することが判明した。

*Lgr5*は癌幹細胞マーカーとしての有望であると報告されている。本研究において *Lgr5*陽性細胞は低い増殖能を示しており、癌幹細胞の特徴の一つを示しているとも考えられた。我々が同定した粘膜内 SRCC における *Lgr5*陽性細胞の粘膜深層における分布様式は、SRCC における癌幹細胞ニッチの研究への発展が期待される。今回の報告では *Lgr5*発現と臨床病理学的因子との間に有意差は得られていないが、進行癌において *Lgr5*発現と予後など様々な因子との間に相関が報告されており、今後の検討が必要である。また胃底腺領域に *Lgr5*陽性細胞は存在しないと報告されているが、類器官分化を伴い胃底腺への分化を示す SRCC の探索と、それらの症例における *Lgr5*陽性細胞の存在の検討なども今後の課題である。*Lgr5*発現は胃癌、特に SRCC で治療のターゲットとして役立つ可能性がある。これらの課題の解明に向け、今後、胃癌における *Lgr5*発現について更なる研究が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (LGR5) は腸管、及び胃幽門腺などにおいて上皮幹細胞マーカーの役割を果たすことが報告され、さらに胃癌や大腸癌における癌幹細胞マーカーとしても有望であると報告されている。正常胃幽門腺は上層に MUC5AC、下層に MUC6と呼ばれるムチンコアタンパク質が陽性を呈し、中間層には増殖細胞マーカーである Ki-67が陽性を示す増殖帯が局在する。*LGR5*の発現は下層領域の腺底部に局在することが報告されている。

一方で粘膜内に限局する印環細胞癌は、しばしば類器官分化と呼ばれる非腫瘍性胃粘膜構造における細胞構成に類似した層状構造を示す。本研究では類器官分化を示す粘膜内印環細胞癌における *LGR5*発現と病理学的特徴の解析、さらに *LGR5*陽性細胞における増殖能の解析を実施した。

その結果、中嶋智之は以下の結論を得た。

1. 対象とした35症例全例において *LGR5*の発現を認め、20症例において Ki-67が帯状に分布した増殖帯を伴った類器官分化を認めた。
2. 類器官分化を伴う症例は全例で *LGR5*高発現細胞が下層に局在していた。
3. 粘膜固有層を3等分し上層、中層、下層に分けて *LGR5* H-score と Ki-67 陽性率を算出すると、*LGR5* H-score は上層、中間層に比較して有意に下層において高値を示した。Ki-67陽性率は中層に

において上層，下層に比べ有意に高値であった。本研究から類器官分化を呈する印環細胞癌における *LGR5* の局在は，Ki-67陽性細胞の帯状陽性領域とは異なる下層領域に認められ，*LGR5*陽性細胞の局在部位も胃粘膜を模倣することが判明した。

4. *LGR5* RNA *in situ* hybridization と Ki-67免疫組織化学染色の二重染色を実施し，*LGR5*陽性細胞における Ki-67陽性率を算出すると *LGR5*陰性細胞における Ki-67陽性率に比較して有意に低値を示した。本研究により粘膜内印環細胞癌における *LGR5*発現と病理学的特徴が明らかになり，類器官分化を呈す

る印環細胞癌において *LGR5* の局在は，通常の胃粘膜と同様に Ki-67陽性細胞の帯状陽性領域とは異なる下層領域に認められることが判明した。また類器官分化を呈する印環細胞癌において *LGR5*陽性細胞の低い増殖能は，癌幹細胞の特徴の一つを示しているとも考えられた。本研究で明らかとなった *LGR5*陽性細胞の特徴的な分布様式は，印環細胞癌における癌幹細胞ニッチ研究の発展への寄与が期待される。

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。

Infant Suffocation Incidents Related to Co-Sleeping or Breastfeeding in the Side-Lying Position in Japan (日本における添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験頻度と関連要因)

徳 武 千 足

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】日本では古来より乳児と母親との添い寝や添え乳が一般的であり、母親と乳児は顔を見合わせて寝る姿勢が多かったが、近年、添い寝や添え乳による乳児窒息が乳児死亡の原因と推測される報告が散見されるようになった。しかし家庭内で起こる添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験に関する実態報告は認めていない。そこでインシデントの発生頻度と関連要因の解明を目的に、乳児を育てる母親の添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験を調査した。

【方法】2011年1月～9月に乳児健診(月齢1か月、4か月、10か月)に来所した1,223人の母親を対象に無記名自記式質問紙で調査した。調査内容は、母親の年齢、経産回数、児の出生体重、栄養方法、母児の睡眠環境、添い寝・添え乳に関する項目の有無(添い寝・添え乳の実施、医療専門職からの指導、母親が注意していること、乳児窒息のインシデント経験)とした。974人からの回答を得て(回収率79.6%)、欠損値のあるデータを除く895人(有効回答率91.9%)を分析対象とした。分析は単純集計、一元配置分散分析、t検定、 χ^2 検定を行い、有意水準は5%とした。 χ^2 検定は、月齢別(1か月、4か月、10か月)の3群に有意差があることを確認後、群間の有意確率を算出した。なお、本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を受けて実施した。本研究における「インシデント経験」とは、家庭内で起こったヒヤリまたはハットした経験で窒息事故までには至らなかった経験と定義した。

【結果】母親の平均年齢は全体で31.8歳、全月齢で初産婦は約半数であった。子どもの栄養方法は、母乳栄養が全体で63.7%だった。母児の背景は全て、1か月、4か月、10か月の3群に有意差を認めなかった。

添い寝・添え乳は、どちらも実施しないが全体で15.7%、添い寝のみを行うが28.3%、添え乳を行うが56.0%で、添え乳は添い寝しながら行うので併せて84.3%が添い寝をしていた。医療専門職から具体的な方法や注意に関する指導を受けた母親は、添い寝のみを行

う母親が36.3%、添え乳を行う母親が60.1%であった。

添い寝時の乳児窒息のインシデント経験は、全体で10.6%に認めた。月齢別では、1か月12.0%、4か月14.1%で、ともに10か月6.1%よりも有意に高頻度であったが、1か月と4か月では有意差を認めなかった。インシデントの具体例は「寝具や周辺の物が子どもの口や鼻を覆っていた」が全体の58.8%を占めた。次に、添え乳時のインシデント経験は全体で13.2%に認めたが、月齢別で有意差は認めなかった。具体例は「子どもよりも先に自分(母親)が眠ってしまった」が全体の59.1%を占めた。

添い寝時の乳児窒息のインシデント経験の関連要因は、子どもの月齢のみが有意に抽出され、1か月、4か月の方が、10か月よりも有意にインシデント経験を多く認めた。添え乳時のインシデント経験の関連要因で有意差を認めた項目はなかった。さらに、添い寝時のインシデント経験は添え乳時にインシデント経験がある母親では45.5%に認め、添え乳時にインシデント経験のない母親6.9%及び添え乳を行わない母親7.9%よりも有意に高頻度であった。

【考察】本研究では、母親全体の84.3%が添い寝や添え乳を行っていたが、医療専門職からの指導を受けた母親は添い寝のみ群で36.3%、添え乳群で60.1%であった。この実態は、窒息予防に対する指導が行き届いているとは言い難いと考えられる。

添い寝時のインシデント経験は全体の10.6%に認め、月齢1か月、4か月の方が10か月よりも有意に高頻度であったことより、添い寝は母児が密着することで寝具や周りの物で子どもの口鼻腔を覆う危険性を有し、寝返り可能になる時期(平均的には月齢5～6か月)までは自分の体を移動し危険を回避できないという乳児の成長発達との関連が示唆された。乳児期早期に添い寝を行うことは、窒息インシデントのリスクを高め、この中の極一部ではあるが死亡や重大事故に至る可能性がある。従って、添い寝に伴うインシデントの減少が添い寝に伴う窒息死亡事故の減少にもつながる可能性があり、その予防対策は急務である。また、添え乳時は全体の13.2%にインシデント経験を認め

た。添え乳は添い寝よりも母親と子どもがさらに密着した体勢となり、乳房などによる口鼻腔閉塞の危険性が増加するとともに、添え乳をしながら母親が眠り込むと危険な状況に気付くのが遅くなることも推察される。

以上、添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験の実態を初めて明らかにした。添い寝・添え乳による乳児窒息死を予防するためには、母親に添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験の実態や乳児窒息予防の注意喚起を周知することが急務である。

(論文審査の結果の要旨)

【背景・目的】 日本では古来より乳児と母親との添い寝や添え乳が一般的であり、母親と乳児は顔を見合わせて寝る姿勢が多かったが、近年、添い寝や添え乳による乳児窒息が乳児死亡の原因と推測される報告が散見されるようになった。しかし家庭内で起こる添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験に関する実態報告は認めていない。そこでインシデントの発生頻度と関連要因の解明を目的に、乳児を育てる母親の添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験を調査した。

【方法】 2011年1月～9月に乳児健診（月齢1か月、4か月、10か月）に来所した1,223人の母親を対象に無記名自記式質問紙で調査した。調査内容は、母親の年齢、経産回数、児の出生体重、栄養方法、母親の睡眠環境、添い寝・添え乳に関する項目の有無（添い寝・添え乳の実施、医療専門職からの指導、母親が注意していること、乳児窒息のインシデント経験）とした。974人からの回答を得て（回収率79.6%）、欠損値のあるデータを除く895人（有効回答率91.9%）を分析対象とした。分析は単純集計、一元配置分散分析、t検定、 χ^2 検定を行い、有意水準は5%とした。 χ^2 検定は、月齢別（1か月、4か月、10か月）の3群に有意差があることを確認後、群間の有意確率を算出した。なお、本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を受けて実施した。本研究における「インシデント経験」とは、家庭内で起こったヒヤリまたはハットした経験で窒息事故までには至らなかった経験と定義した。

【結果】 母親の平均年齢は全体で31.8歳、全月齢で初産婦は約半数であった。子どもの栄養方法は、母乳栄養が全体で63.7%だった。母親の背景は全て、1か月、4か月、10か月の3群に有意差を認めなかった。

添い寝・添え乳は、どちらも実施しないが全体で15.7%、添い寝のみを行うが28.3%、添え乳を行うが56.0%で、添え乳は添い寝しながら行うので併せて84.3%が添い寝をしていた。医療専門職から具体的な方法や注意に関する指導を受けた母親は、添い寝のみを行う母親が36.3%、添え乳を行う母親が60.1%であった。

添い寝時の乳児窒息のインシデント経験は、全体で10.6%に認めた。月齢別では、1か月12.0%、4か月14.1%で、ともに10か月6.1%よりも有意に高頻度であったが、1か月と4か月では有意差を認めなかった。インシデントの具体例は「寝具や周辺の物が子どもの口や鼻を覆っていた」が全体の58.8%を占めた。次に、添え乳時のインシデント経験は全体で13.2%に認めたが、月齢別で有意差は認めなかった。具体例は「子どもよりも先に自分（母親）が眠ってしまった」が全体の59.1%を占めた。

添い寝時の乳児窒息のインシデント経験の関連要因は、子どもの月齢のみが有意に抽出され、1か月、4か月の方が、10か月よりも有意にインシデント経験を多く認めた。添え乳時のインシデント経験の関連要因で有意差を認めた項目はなかった。さらに、添い寝時のインシデント経験は添え乳時にインシデント経験がある母親では45.5%に認め、添え乳時にインシデント経験のない母親6.9%及び添え乳を行わない母親7.9%よりも有意に高頻度であった。

【考察】 本研究では、母親全体の84.3%が添い寝や添え乳を行っていたが、医療専門職からの指導を受けた母親は添い寝のみ群で36.3%、添え乳群で60.1%であった。この実態は、窒息予防に対する指導が行き届いているとは言い難いと考えられる。

添い寝時のインシデント経験は全体の10.6%に認め、月齢1か月、4か月の方が10か月よりも有意に高頻度であったことより、添い寝は母親が密着することで寝具や周りの物で子どもの口鼻腔を覆う危険性を有し、寝返り可能になる時期（平均的には月齢5～6か月）までは自分の体を移動し危険を回避できないという乳児の成長発達との関連が示唆された。乳児期早期に添い寝を行うことは、窒息インシデントのリスクを高め、この中の極一部ではあるが死亡や重大事故に至る可能性がある。従って、添い寝に伴うインシデントの減少が添い寝に伴う窒息死亡事故の減少にもつながる可能性があり、その予防対策は急務である。また、添え乳時は全体の13.2%にインシデント経験を認め

た。添え乳は添い寝よりも母親と子どもがさらに密着した体勢となり、乳房などによる口鼻腔閉塞の危険性が増加するとともに、添え乳をしながら母親が眠り込むと危険な状況に気付くのが遅くなることも推察される。

以上、添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験の実態を初めて明らかにした。添い寝・添え乳

による乳児窒息死を予防するためには、母親に添い寝・添え乳に伴う乳児窒息のインシデント経験の実態や乳児窒息予防の注意喚起を周知することが急務である。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Autonomic Nervous System Changes in Term Infants during Early Skin-to-skin Contact (SSC): Examination of SSC Effectiveness and the Influence of Meconium-stained Amniotic Fluid (早期母子接触中の正期産新生児の自律神経機能の変化～早期母子接触の有効性と羊水混濁の影響に関する検討～)

芳賀 亜紀子

(論文の内容の要旨)

【目的】 出生直後の母子のきずな形成の促進のために、裸の児を腹臥位で母親の胸に抱き肌と肌を接触する早期母子接触 (early skin-to-skin contact: SSC) の実施が増加している。一方、出生直後の新生児は、子宮外生活への急激な変化の適応過程にあるため、本邦では SSC の安全な実施を目指し、2012年に“SSC 実施の留意点”が示され、その適応基準には、正期産新生児で低出生体重児ではない、胎児機能不全および新生児仮死がない、医療者が実施の可否を判断する等が挙げられている。しかし、適応基準に則った SSC 実施の有無で新生児の自律神経機能を検討した報告は認めない。また分娩の約14%に認める羊水混濁は、重度では出生後の児の呼吸状態を悪化させるが、適応基準に羊水混濁の有無は示されていない。さらに SSC 実施中の自律神経機能を羊水混濁の有無で検討した報告は認めない。本研究の目的は、正常経陰分娩で出生した正期産児の自律神経機能及び生理的指標の検討による SSC の有効性 (Study A) と SSC 適応基準を満たした児における羊水混濁の影響 (Study B) の検証である。

【方法】 対象は SSC 適応基準を満たした児で、Study A は SSC 群12例と非 SSC 群10例、Study B は羊水混濁 (+) SSC 群9例と羊水混濁 (-) SSC 群12例である。測定内容は、心拍変動・心拍数・SpO₂・睡眠覚醒状態を出生直後から2時間連続測定し、呼吸数・体温を15分毎に測定した。心拍変動はアクティブトレーサーを用いて記録し、Memcalc/Tarawa による周波数解析で低周波 (LF) 成分と高周波 (HF) 成分に分類して、LF/HF を交感神経活動、HFnu (nor-

malized unit) を副交感神経活動の指標として分析した。SpO₂は、動脈管以前の体循環を表す上肢と動脈管以後を表す下肢を測定した。睡眠覚醒状態は、観察時間全体に占める睡眠状態の割合を求めた。Study A の SSC は出生後23.5±12.7分に開始され73.8±9.2分間実施されており、出生直後、出生1時間後、出生2時間後を比較した。Study B の SSC は羊水混濁 (+) 群は出生後32.0±12.1分で開始され64.2±15.3分間実施されており、羊水混濁 (-) 群は出生後23.5±12.7分で開始され73.8±9.2分間実施されており、SSC の開始前、開始30分後、終了前、終了後の4時点で解析した。本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認後に実施した。

【結果】 Study A: 2群の在胎週数、アプガースコア、臍帯動脈血 pH、出生時体重に差はなかった。SSC 群と非 SSC 群の LF/HF は出生直後と1時間後に差はなかったが、2時間後では、SSC 群が有意に低かった ($p < 0.05$)。LF/HF の推移は SSC 群・非 SSC 群共に出生直後から1時間後へ有意に増加した ($p < 0.05$, $p < 0.05$) が、1時間後から2時間後は SSC 群が低下傾向、非 SSC 群が増加傾向を示した。一方、HFnu は SSC 群と非 SSC 群で差を認めず、両群共に推移でも差を認めなかった。心拍数と呼吸数は両群で差を認めず正常範囲で経過した。体温は、出生2時間後の SSC 群が非 SSC 群より有意に上昇し ($p < 0.01$)、SSC 群の推移でも1時間後から2時間後に有意に上昇した ($p < 0.01$)。上下肢 SpO₂が90%に達した時間は両群で差はなく、SSC 実施中の上下肢 SpO₂は正常範囲で経過した。睡眠状態の割合は SSC 群が有意に高かった ($p < 0.05$)。

Study B：2群の在胎週数，アプガースコア，臍帯動脈血 pH，出生時体重に差はなかった。羊水混濁の有無で SSC 開始時間や実施時間に有意差はなかった。LF/HF，HFnu は両群の4時点全てで有意差を認めなかった。心拍数，呼吸数，体温は羊水混濁の有無で差は認めず，正常範囲で経過した。上下肢 SpO₂が90%に達した時間は羊水混濁の有無で差はなく，SSC 実施中の上下肢 SpO₂は正常範囲で経過した。SSC 実施中の睡眠状態の割合は両群で差を認めなかった。

【考察】Study A：SSC 実施の有無に関わらず，出生から1時間後まで交感神経活動は亢進するが，SSC 実施により2時間後の交感神経活動が抑制され，睡眠状態が有意に増加することから，児の安静化に關与している可能性が示された。しかし，副交感神経活動では有意な変化を認めず，交感神経活動と副交感神経活動の相反支配関係から想定される結果ではなかった。これは出生直後の新生児が子宮外生活への適応過程にあり，自律神経活動の未熟性が關与している可能性がある。心拍数と呼吸数は SSC 実施による差異を認めなかったが，出生2時間後の体温は，SSC 実施により有意に高かったことから体温上昇効果が認められた。SSC 実施中の SpO₂の推移より，SSC 中の呼吸状態に問題はなかった。以上より SSC の有益性が示唆された。

Study B：分娩時に羊水混濁を認めても，SSC 適応基準を満たすまで新生児の観察を十分に行ってから SSC を開始すれば，羊水混濁がない場合と同等に SSC が開始可能であり，自律神経機能の変化も同程度と考えられた。心拍数，呼吸数，体温，SpO₂は正常範囲で経過しており，羊水混濁の有無による違いは認めないことが示唆された。

【結論】SSC 実施による出生2時間後の児の交感神経活動抑制，睡眠状態増加，体温上昇から，SSC は新生児の安静化および低体温予防効果を有する可能性があり，適応基準を満たせば，羊水混濁による悪影響がないことを初めて検証した。

(論文審査の結果の要旨)

【目的】出生直後の母子のきずな形成の促進のために，裸の児を腹臥位で母親の胸に抱き肌と肌を接触する早期母子接触 (early skin-to-skin contact: SSC) の実施が増加している。一方，出生直後の新生児は，子宮外生活への急激な変化の適応過程にあるため，本邦では SSC の安全な実施を目指し，2012年に“SSC 実施

の留意点”が示され，その適応基準には，正期産新生児で低出生体重児ではない，胎児機能不全および新生児仮死がない，医療者が実施の可否を判断する等が挙げられている。しかし，適応基準に則った SSC 実施の有無で新生児の自律神経機能を検討した報告は認めない。また分娩の約14%に認める羊水混濁は，重度では出生後の児の呼吸状態を悪化させるが，適応基準に羊水混濁の有無は示されていない。さらに SSC 実施中の自律神経機能を羊水混濁の有無で検討した報告は認めない。本研究の目的は，正常経陰分娩で出生した正期産児の自律神経機能及び生理的指標の検討による SSC の有効性 (Study A) と SSC 適応基準を満たした児における羊水混濁の影響 (Study B) の検証である。

【方法】対象は SSC 適応基準を満たした児で，Study A は SSC 群12例と非 SSC 群10例，Study B は羊水混濁 (+) SSC 群9例と羊水混濁 (-) SSC 群12例である。測定内容は，心拍変動・心拍数・SpO₂・睡眠覚醒状態を出生直後から2時間連続測定し，呼吸数・体温を15分毎に測定した。心拍変動はアクティブトレーサーを用いて記録し，Memcalc/Tarawa による周波数解析で低周波 (LF) 成分と高周波 (HF) 成分に分類して，LF/HF を交感神経活動，HFnu (normalized unit) を副交感神経活動の指標として分析した。SpO₂は，動脈管以前の体循環を表す上肢と動脈管以後を表す下肢を測定した。睡眠覚醒状態は，観察時間全体に占める睡眠状態の割合を求めた。Study A の SSC は出生後23.5±12.7分に開始され73.8±9.2分間実施されており，出生直後，出生1時間後，出生2時間後を比較した。Study B の SSC は羊水混濁 (+) 群は出生後32.0±12.1分で開始され64.2±15.3分間実施されており，羊水混濁 (-) 群は出生後23.5±12.7分で開始され73.8±9.2分間実施されており，SSC の開始前，開始30分後，終了前，終了後の4時点で解析した。本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認後に実施した。

【結果】Study A：2群の在胎週数，アプガースコア，臍帯動脈血 pH，出生時体重に差はなかった。SSC 群と非 SSC 群の LF/HF は出生直後と1時間後に差はなかったが，2時間後では，SSC 群が有意に低かった (p<0.05)。LF/HF の推移は SSC 群・非 SSC 群共に出生直後から1時間後へ有意に増加した (p<0.05, p<0.05) が，1時間後から2時間後は SSC 群が低下傾向，非 SSC 群が増加傾向を示した。一方，

HFnu は SSC 群と非 SSC 群で差を認めず、両群共に推移でも差を認めなかった。心拍数と呼吸数は両群で差を認めず正常範囲で経過した。体温は、出生 2 時間後の SSC 群が非 SSC 群より有意に上昇し ($p < 0.01$)、SSC 群の推移でも 1 時間後から 2 時間後に有意に上昇した ($p < 0.01$)。上下肢 SpO₂ が 90 % に達した時間は両群で差はなく、SSC 実施中の上下肢 SpO₂ は正常範囲で経過した。睡眠状態の割合は SSC 群が有意に高かった ($p < 0.05$)。

Study B：2 群の在胎週数、アプガースコア、臍帯動脈血 pH、出生時体重に差はなかった。羊水混濁の有無で SSC 開始時間や実施時間に有意差はなかった。LF/HF、HFnu は両群の 4 時点全てで有意差を認めなかった。心拍数、呼吸数、体温は羊水混濁の有無で差は認めず、正常範囲で経過した。上下肢 SpO₂ が 90 % に達した時間は羊水混濁の有無で差はなく、SSC 実施中の上下肢 SpO₂ は正常範囲で経過した。SSC 実施中の睡眠状態の割合は両群で差を認めなかった。

【考察】 Study A：SSC 実施の有無に関わらず、出生から 1 時間後まで交感神経活動は亢進するが、SSC 実施により 2 時間後の交感神経活動が抑制され、睡眠状態が有意に増加することから、児の安静化に関与している可能性が示された。しかし、副交感神経活動で

は有意な変化を認めず、交感神経活動と副交感神経活動の相反支配関係から想定される結果ではなかった。これは出生直後の新生児が子宮外生活への適応過程にあり、自律神経活動の未熟性が関与している可能性がある。心拍数と呼吸数は SSC 実施による差異を認めなかったが、出生 2 時間後の体温は、SSC 実施により有意に高かったことから体温上昇効果が認められた。SSC 実施中の SpO₂ の推移より、SSC 中の呼吸状態に問題はなかった。以上より SSC の有益性が示唆された。

Study B：分娩時に羊水混濁を認めても、SSC 適応基準を満たすまで新生児の観察を十分に行ってから SSC を開始すれば、羊水混濁がない場合と同等に SSC が開始可能であり、自律神経機能の変化も同程度と考えられた。心拍数、呼吸数、体温、SpO₂ は正常範囲で経過しており、羊水混濁の有無による違いは認めないことが示唆された。

【結論】 SSC 実施による出生 2 時間後の児の交感神経活動抑制、睡眠状態増加、体温上昇から、SSC は新生児の安静化および低体温予防効果を有する可能性があり、適応基準を満たせば、羊水混濁による悪影響がないことを初めて検証した。

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 sleep-disordered breathing and sleeping position at the 37th week of pregnancy : an observational cross-sectional study (妊娠37週における睡眠呼吸障害と睡眠時姿勢との関係：観察横断研究)

浦 みどり

(論文の内容の要旨)

【背景】 妊娠中の女性は体重増加や気流制限などをはじめとする、様々な体の変化により睡眠呼吸障害が増加することが知られている。特に肥満は閉塞性睡眠時無呼吸症候群のリスクファクターとされ、妊娠高血圧症候群や妊娠糖尿病などの合併症、また胎児発育遅延や死産を引き起こす可能性があり、母児ともに危険な状態に曝される。そのため、妊娠中の睡眠時無呼吸症候群は早期発見が重要であるが、そのスクリーニング検査などは確立されていない。

一般の睡眠呼吸障害は、側臥位の姿勢をとることで軽減される可能性が報告されている。妊娠中の女性においても同様の仮説はあるが、未だ証明されていない。睡眠時の姿勢を自己申告に依存した過去の研究とは異

なり、本研究は客観的指標を用いて妊娠後期の睡眠呼吸障害と睡眠時の姿勢との関係について検討した。

【方法】 妊娠37週の女性30名と非妊娠女性30名が本研究に参加し、妊娠中の女性は BMI30以上と30未満の2群に分けられた。データ収集は、睡眠呼吸障害を検出するポータブルのスクリーニング用機器を用いて、呼吸障害指数 (Respiratory disturbance index : RDI) と睡眠時の姿勢を記録した。

【結果】 側臥位での睡眠時間は非妊娠女性と比べ、妊娠中の女性で有意に増加していた。全 RDI (平均 ± 標準偏差) は、BMI30以上の妊婦群 : 10.7 (3.1)、BMI30未満の妊婦群 : 7.0 (3.0)、非妊婦群 : 4.3 (2.9) と 3 群それぞれで有意差を認めた。BMI30以上の妊婦群は、仰臥位に比べ側臥位で有意に RDI が低下した

($p=0.04$)。さらに、BMI30以上の妊婦群とBMI30未満の妊婦群の間に、仰臥位におけるRDIは有意に差があった($p=0.001$)。しかし、側臥位ではこの群間で差を認めなかった。

【結語】肥満を伴う妊娠後期の女性は、側臥位で睡眠をとることで睡眠呼吸障害を緩和する可能性が示唆された。また診断されていない睡眠呼吸障害と、それに伴う妊娠関連合併症に対する効果的な対策となり得る可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、妊娠中の女性は睡眠呼吸障害が増加し、特に肥満は閉塞性睡眠時無呼吸症候群のみならず、妊娠高血圧症候群や妊娠糖尿病などの妊娠合併症のリスク因子であることを背景に、客観的指標を用いて妊娠後期の睡眠呼吸障害と睡眠時の姿勢との関係を明らかにする目的で、妊娠37週の妊婦をBMI30以上と30未満の2群に分け、非妊婦を対照に、睡眠呼吸障害の簡易型検出機器で、呼吸障害指数(Respiratory disturbance index: RDI)と睡眠時の姿勢を記録し検討したものである。

その結果、側臥位での睡眠時間は非妊婦と比べ妊婦で有意に増加していること、全RDIはBMI30以上の妊婦群、BMI30未満の妊婦群、非妊婦群の順で有意に

高いことが明らかになった。また、BMI30以上の妊婦群は仰臥位に比べ側臥位で有意にRDIが低下すること、BMI30以上の妊婦群とBMI30未満の妊婦群との間に、仰臥位のRDIでは有意差を認めるが、側臥位では差を認めないことも明らかになった。

これらの結果から、肥満を伴う妊娠後期の女性は、側臥位をとることで睡眠呼吸障害を緩和する傾向が示され、簡易型検出機器での呼吸障害指数の測定は、未診断の睡眠呼吸障害と、それに伴う妊娠関連合併症に対する簡便で効果的な対策となる可能性が示唆された。また、簡易型検出機器は自宅にて測定可能であり、多数の電極装着や入院を必要とする妊婦の負担が大きい終夜睡眠ポリグラフ検査による確定診断に先駆けて、ハイリスク妊婦群のスクリーニング検査としての有用性が期待される。これはスクリーニング検査確立による合併症予防という、公衆衛生上においても重要な課題に対する将来性ある研究と考える。

学位審査においては、主査・副査からの質問に適切に回答しており、今回の研究の成果と限界、今後の発展性についても十分に理解していることが確認できた。

以上のことから、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。

A multicenter, randomized controlled trial of individualized occupational therapy for patients with schizophrenia in Japan (統合失調症に対する個別作業療法：多施設共同ランダム化比較試験)

島 田 岳

(論文の内容の要旨)

統合失調症治療では、精神症状の軽減だけでなく、中核障害である認知機能障害を改善させ、再発の予防と転帰の向上を図り、リカバリーの達成を支援することが重要である。認知機能の改善とリカバリーの達成に向けた支援では、対象者の回復状態や生活課題を考慮した個別介入が必要である。しかし、現行の精神科作業療法(OT)の診療報酬体系は、1974年に長期入院患者に対する集団的処遇を想定して策定されたもので、短期入院患者への個別介入を必要とする現代の精神科医療の実情にはそぐわない。臨床では従来の集団的処遇に基づくOT(集団OT)を基本に、必要に応じて一部の対象者に部分的に、個別介入に基づいたOTが実施されているに過ぎない。そこでわれわれは、急性期統合失調症患者を主対象として認知機能やその

他のアウトカムの改善を図り治療への参加を促すことを目的に個別OTプログラムを作成した。本研究では、通常治療の集団OTに個別OTを加えた群(個別OT群)と集団OTのみを実施した群(集団OT群)を比較し、統合失調症に対する個別OTの効果を検討した。個別OTの効果が実証されることによって、個別OTの普及促進や精神科OTの診療報酬改正に繋がり、精神科医療の質の向上に寄与できるものと思われる。

DSM-5で統合失調症または統合失調感情障害と診断された新規入院患者をランダムに個別OT群と集団OT群に割付ける multicenter, single-blind, randomized controlled trial を実施した。個別OTは、動機づけ面接、セルフモニタリング、訪問指導、クラブ活動、個別心理教育、退院プランの作成で構成され、

作業療法士とマンツーマンの時間を設けて実施され、OT時間の半分以上を個別OTの時間にあてた。集団OTは、集団での身体運動、手工芸、心理教育など、各施設の週間スケジュールに沿った通常のOTプログラムを実施した。評価は、割付け前と退院時または入院3ヵ月後に、統合失調症認知機能簡易評価尺度(BACS)、統合失調症認知評価尺度(SCoRS)、社会機能評価尺度(SFS)、内発的動機付け尺度(IMI)、機能の全体的評定尺度(GAF)、陽性・陰性症状評価尺度(PANSS)、Client Satisfaction Questionnaire 8項目版(CSQ-8)を実施した。解析は、Intention-to-treat analysisを実施した。群による違いを検討するために、対象者、研究実施施設、研究実施施設と群の交互作用をランダム効果、年齢、性別、入院回数、ベースラインスコア、群、時間、群と時間の交互作用を固定効果とした混合効果モデルを用いた。なお、BACS、SCoRSの解析には、ベースライン時のIMI合計スコアも固定効果に含めた。効果量の指標はCohen's dを用いた。検定の有意水準はBonferroni法で補正し、両側 $p < 0.05$ とした。

260名について適格性が評価され、基準を満たした136名が研究に参加し、個別OT群(n=68、男性34名、 41.39 ± 11.04 歳)と集団OT群(n=68、男性33名、 43.39 ± 9.97 歳)に割付けられ、個別OT群で2名、集団OT群で5名がドロップアウトし、最終的な解析対象は個別OT群(n=66)と集団OT群(n=63)となった。ベースライン評価では、人口統計学的データと評価尺度は両群で有意差はなかった。退院時または入院3ヵ月後の評価では、個別OT群で、BACSの言語性記憶($F = 11.23, p < 0.01, d = 0.58$)、ワーキングメモリ($F = 6.47, p = 0.02, d = 0.28$)、言語流暢性($F = 21.10, p < 0.01, d = 0.27$)、注意($F = 22.92, p < 0.01, d = 0.30$)、総合得点($F = 14.16, p < 0.01, d = 0.44$)、IMIの興味・楽しみ($F = 16.61, p < 0.01, d = 0.55$)、価値・有用性($F = 10.67, p < 0.01, d = 0.46$)、選択観($F = 19.12, p < 0.01, d = 0.62$)、IMI total($F = 21.77, p < 0.01, d = 0.61$)で有意な改善を示し、CSQ-8が有意に高かった($t = 3.28, p < 0.01, d = 0.59$)。

本研究の結果は、統合失調症に対する個別OTプログラムが精神科病院において実行可能であり、認知機能を含めたアウトカムの改善に有効であることを示している。これらの知見は、精神科病院において個別OTの普及を促進し、統合失調症治療の質の向上に寄

与できる可能性がある。今後の課題は、個別OTの効果をより詳細に検討することや追試験の実施、個別OTが再発・再入院に及ぼす影響を検討することである。

(論文審査の結果の要旨)

統合失調症治療における認知機能の改善とリカバリーの達成に向けた支援では、対象者の回復状態や生活課題を考慮した個別介入が必要である。しかし、現行の精神科作業療法(OT)の診療報酬体系は、短期入院患者への個別介入を必要とする現代の精神科医療の実情にはそぐわない。実臨床では従来の集団的処遇に基づくOT(集団OT)を基本に、必要に応じて一部の患者に部分的に、個別介入に基づいたOTが実施されているに過ぎない。

そこで島田岳は、急性期統合失調症患者を主対象として認知機能やその他のアウトカムの改善を図り治療への参加を促すことを目的に個別OTプログラムを作成した。本研究では、通常治療の集団OTに個別OTを加えた群(個別OT群)と集団OTのみを実施した群(集団OT群)を比較し、統合失調症に対する個別OTの効果を検討した。

DSM-5で統合失調症または統合失調感情障害と診断された新規入院患者をランダムに個別OT群と集団OT群に割付ける multicenter, single-blind, randomized controlled trial を実施した。個別OTは、動機づけ面接、セルフモニタリング、訪問指導、クラフト活動、個別心理教育、退院プランの作成で構成され、作業療法士とマンツーマンの時間を設けて実施され、OT時間の半分以上を個別OTの時間にあてた。集団OTは、集団での身体運動、手工芸、心理教育など、各施設の週間スケジュールに沿った通常のOTプログラムを実施した。評価は、割付け前と退院時または入院3ヵ月後に、統合失調症認知機能簡易評価尺度(BACS)、統合失調症認知評価尺度(SCoRS)、社会機能評価尺度(SFS)、内発的動機付け尺度(IMI)、機能の全体的評定尺度(GAF)、陽性・陰性症状評価尺度(PANSS)、Client Satisfaction Questionnaire 8項目版(CSQ-8)を実施した。解析は、Intention-to-treat analysis を実施した。群による違いを検討するために、対象者、研究実施施設、研究実施施設と群の交互作用をランダム効果、年齢、性別、入院回数、ベースラインスコア、群、時間、群と時間の交互作用を固定効果とした混合効果モデルを用いた。なお、BACS、SCoRSの解析には、ベースライン時のIMI

合計スコアも固定効果に含めた。効果量の指標は Cohen's d を用いた。検定の有意水準は Bonferroni 法で補正し、両側 $p < 0.05$ とした。

その結果、島田岳は次の結論を得た。

260名について適格性が評価され、基準を満たした136名が研究に参加し、個別 OT 群 ($n=68$, 男性34名, 41.39 ± 11.04 歳) と集団 OT 群 ($n=68$, 男性33名, 43.39 ± 9.97 歳) に割付けられ、個別 OT 群で2名、集団 OT 群で5名がドロップアウトし、最終的な解析対象は個別 OT 群 ($n=66$) と集団 OT 群 ($n=63$) となった。ベースライン評価では、基本情報と評価尺度は両群で有意差はなかった。退院時または入院3ヵ月後の評価では、個別 OT 群で、BACS の言語性記憶 ($F=11.23$, $p < 0.01$, $d=0.58$), ワーキングメモリ ($F=6.47$, $p=0.02$, $d=0.28$), 言語流暢性 ($F=21.10$, $p < 0.01$, $d=0.27$), 注意 ($F=22.92$, $p < 0.01$, $d=0.30$), 総合得点 ($F=14.16$, $p < 0.01$, $d=0.44$), IMI の興味・楽しみ ($F=16.61$, $p < 0.01$, $d=0.55$), 価値・有用性 ($F=10.67$, $p < 0.01$, $d=$

0.46), 選択観 ($F=19.12$, $p < 0.01$, $d=0.62$), IMI total ($F=21.77$, $p < 0.01$, $d=0.61$) で有意な改善を示し、CSQ-8が有意に高かった ($t=3.28$, $p < 0.01$, $d=0.59$)。

これらの結果は、統合失調症に対する個別 OT プログラムが精神科病院において実行可能であり、認知機能を含めたアウトカムの改善に有効であることを示している。精神科病院において個別 OT の普及を促進し、統合失調症治療の質の向上に寄与できる可能性があることが明らかとなった。今後の課題は、個別 OT の効果をより詳細に検討することや追試験の実施、個別 OT が再発・再入院に及ぼす影響を検討することである。

一般に精神科 OT の効果は定量化が困難であり、臨床研究には常に多数の障壁が存在するが、島田岳は多施設共同研究を完遂し、精神科個別 OT の実行可能性と有効性を証明した。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 sudden unexpected mechanical perturbation training aimed at the primary prevention of inversion ankle sprain on reactivity of ankle movement and cortical activity in normal young adults (若年健常成人における足関節内反捻挫の一次予防を目的とした不意で突発的な機械的外乱トレーニングが足関節運動の反応性と皮質活動に及ぼす影響)

太田佳織

(論文の内容の要旨)

【目的】 スポーツ現場において、足関節内反捻挫 (inversion ankle sprain, 以下, IAS) は、多くの種目で発生頻度の高い外傷であり、受傷後のパフォーマンスの低下や再受傷が多いことから、一次予防が重要であると考えられる。これまで、IAS の再受傷の予防を目的とした介入の効果については広く検証が行われてきているが、一方で、一次予防を目的とした介入効果を検証した先行研究は少なく、さらに実際の IAS 受傷場面に近い足関節への不意で突発的な機械的外乱 (sudden unexpected mechanical perturbation, 以下, SUMP) に対するトレーニングを行い、その効果について末梢と中枢の両方から定量的に検証した研究はなされていない。そこで、本研究では若年健常成人における IAS の一次予防を目的とした SUMP training が足関節運動の反応性と皮質活動に及ぼす影響について検証し、その有効性を明らかにすることを目的とした。**【方法】** 60名の若年健常成人に対し、本研究への参加

の任意性及び個人情報保護について、文書及び口頭で説明し、同意を得た。本研究は、医学部医倫理委員会 (承認番号: 2068) の承認を得て実施した。60名の参加者を、乱数表を用いて無作為に、① SUMP training 群、② セルフペーストレーニング群 (self-paced training 群, 以下, SP training 群)、③ トレーニングを行わず測定のみを行う群 (control 群) の3群に20名ずつ割り付けた。そして、4週間のトレーニング前後において、足関節内外反 0° から内反 30° まで、角速度 $300^\circ/\text{sec}$ の SUMP を足関節内反方向へ与えることができる IAS をシミュレートした特注の外乱装置からの外乱に対し、参加者ができるだけ速く外乱装置のプレートを外反中間位まで戻す反応を行った際の足関節運動の反応性と皮質活動を測定した。足関節運動の反応性としては、長腓骨筋の表面筋電図における最大振幅までの潜時 (latency to peak amplitude, 以下, LPA) とプレートを元の位置に戻すまでの時間 (time to reposition the plate, 以下, TRP) を、皮質活動と

しては、機能的近赤外線分光装置（functional near-infrared spectroscopy, 以下、fNIRS）を用いて外乱に対する反応課題実施時の運動関連領域等における酸素化ヘモグロビン（oxygenated hemoglobin, 以下、oxy-Hb）の濃度変化をそれぞれ解析した。

【結果】4週間のトレーニング後では、SUMP training 群におけるLPAがSP training 群と比較して有意に短縮し、TRPは3群の中で最も速くなるということが認められた。また、SUMP training 群におけるトレーニング後の運動関連領域等におけるoxy-Hbの濃度変化は、補足運動野と運動前野において、有意な増加が認められた。

【考察】本研究の結果、SUMP trainingによって、不意で突発的な機械的外乱刺激に対する長腓骨筋の反応性が高まるとともに、他動的に内反位に動いたプレートを外反中間位に戻すまでの時間が有意に短縮したことから、SUMP trainingは、IASを引き起こすようなrisky positionに足関節が変位することに対する防御的反応を高める可能性があることが考えられた。そして、SUMP trainingによるそういった効果の背景として、高次運動野である補足運動野や運動前野による自動化された運動制御特性の向上が影響した可能性があるものと考えられた。本研究の限界としては、①SUMP trainingによる実際のIASの発生率や長期的効果は観察できていないこと、②fNIRSのoptode数の限界により、一次感覚野における皮質活動までは測定できなかったことなどが挙げられた。今後は、SUMP trainingがIASの一次予防に与える効果を、フィールドにおける実際のIASの発生率、足関節運動の反応性と皮質活動へのリテンション効果、および足関節運動の反応課題実施時における一次感覚野でのoxy-Hbの濃度変化などの点から多角的に検証していくことが必要であると考えられる。

【結語】特注の機械的外乱装置を用いたSUMP trainingは、足関節運動の反応性と皮質活動において認められた有意な変化から、IASの一次予防のための効

果的なトレーニング方法として位置付けられるものと考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

本研究は内反捻挫予防における、突発的・定量的・機械的・外乱刺激を利用してトレーニングを行うことが、中枢に及ぼす影響を機能的近赤外線分光装置を用いて皮質活動を酸素化ヘモグロビンの濃度変化としてとらえるとともに、末梢に及ぼす影響を長腓骨筋の表面筋電図からの最大振幅反応時間および足関節をもとに戻すまでの時間としてとらえて明らかにした研究である。

内反捻挫予防に関する今までのトレーニング方法には予測できてしまうことなどの不備があり、トレーニング効果を最大にもたらさない可能性があったが、本研究において開発した機械的外乱発生装置は今までの欠点を解消した装置である。

この装置を用いて、トレーニングを行うとともに、足関節をもとの位置に戻すまでの反応時間を計測できることから、評価にも利用して介入効果を明らかにしている。今後は、健常者のみならず、スポーツを実際に行っているものの1次予防や3次予防のトレーニング機器として利用する発展性が考えられる。また、高齢者の反応時間の改善を含めた練習機器としての応用性もあると考えられる。

この研究の研究計画は十分に準備されており、また、倫理に対する配慮も十分されていた。さらに、得られたデータの処理および統計的手法には問題が無かった。また、結果の解釈においても論理性が十分にあり、問題が無かった。

今後、臨床応用が考えられる価値のある研究であり博士論文に値すると考えられる。

以上のことから、本論文は博士論文としての十分な内容と非常に高いレベルの成果を示しており、優秀であると評価できる。

以上のように、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。

Development of the Japanese version of the Westmead Home Safety Assessment for the elderly in Japan（日本の高齢者におけるWestmead Home Safety Assessment日本語版の開発）

長谷川 文

（論文の内容の要旨）

転倒による外傷は、高齢者が要介護状態になる主たる原因であり、有効な転倒予防策が求められている。

住まいの安全評価と介入は転倒予防に有効な手段の1つであり、作業療法士（以下、OT）が転倒リスクのある高齢者の自宅を訪問して転倒ハザードを評価して

介入することで、転倒や転倒リスクを減らせることがわかってきた。そして海外では、良好な信頼性を備えた住まいの評価が開発されている。しかし、日本には、対象者の能力に応じて住まいでの転倒ハザードを評価する標準化されたツールがない。

本研究で目指すのは、転倒リスクのある日本の高齢者に対して、高齢者ごとに能力に応じた住まいの安全評価の実施ツールを開発することである。本研究では、その端緒として信頼性が検証された海外の評価ツールの中から、項目数が最多であった Westmead Home Safety Assessment の日本語版を作成し、その検者間信頼性と内容妥当性を検証した。

Westmead Home Safety Assessment 日本語版（以下、WeHSA-J）の作成は、評価票とマニュアルの翻訳と逆翻訳、日本の高齢者へのパイロットスタディ、文化的な適応を経て、原著者の許可を得て行った。また、WeHSA-Jの検者養成用教材も作成した。

WeHSA-Jは、自宅内の場所や道具の71項目について、転倒ハザードあり、なし、非該当の3件法で評定するツールである。また項目ごとに、転倒ハザードの内容の選択肢が示されていて、ハザードありの場合には、その内容も評価できるものである。

検者間信頼性の被検者は、WeHSA-J 検者養成研修を修了したOT 経由で募集した。適格条件は、在宅高齢者（退院予定の高齢者も含む）、屋内歩行が可能、転倒リスクのある者とした。データ収集は、対象者を紹介した担当OTとWeHSA-Jを開発したOTの2名が同時に自宅訪問して、独立にWeHSA-Jを実施した。本研究では、検者間信頼性係数としてCohenの κ 係数を用い、「ハザードあり」と、「ハザードなし」か「非該当」の2分法で κ を算出した。Fleissらの基準に従い、0.75以上が非常に良好、0.4~0.75が中等度に良好、0.4以下が不良とした。

内容妥当性は、臨床経験10年以上のOTによるエキスパートパネルで検討した。WeHSA-Jの項目ごとに、日本の高齢者の自宅の転倒ハザードの同定項目として適切かどうか4件法で回答を求めた。方法は郵送法で行った。各項目の内容妥当性係数（以下、I-CVI）と尺度全体の内容妥当性係数（以下、S-CVI）を算出し、Politらの基準、I-CVIは0.78以上を良好、S-CVIは0.90以上を良好とした。信頼性・妥当性検証のデータ分析には、SPSS ver.23.0Jを用いた。

本研究は、信州大学医学部医倫理委員会の承認を得て実施した。

検者間信頼性の検証には、50名の高齢者（78.2±7.1歳、女性21名）が参加した。内容妥当性検証のエキスパートとしては18名のOTが回答した（回答率75%）。

WeHSA-Jの項目で転倒ハザードありが多かったのは、屋内の階段/段差（n=32；64%、担当OTの評定）、シーティング（n=32；64%）、浴室（n=26；52%）、浴槽（n=24；48%）、屋外の階段/段差（n=22；44%）、トイレの場所（n=21；42%）、履物（n=20；40%）、屋内の階段/段差の手すり（n=20；40%）、フロアマット（n=18；36%）、敷地内の歩道と車の進入路（n=18；36%）であった。

WeHSA-Jの71項目中、検者間信頼性が中等度以上で内容妥当性が良好であった項目は、49項目（69%）であった。この中には、先に述べた、転倒ハザードの多かった項目に加えて、BADL（基本的日常生活動作）を網羅し、IADL（手段的日常生活動作）のなかでも高齢者で実施頻度の高い項目、簡単な食事の支度などに関するものが含まれていた。それ以外の22項目は、ハザードありの被検者がいなかったために検者間信頼性が算出不可か、内容妥当性が不良であった。これらの項目には、調理や洗濯などのIADLに関するものが多かった。一方で、検者間信頼性が不良の項目はなかった。また、WeHSA-J全体の内容妥当性は良好ではなかった（S-CVI=0.78±0.16）。

本研究によって、WeHSA-Jの49項目については、検者間信頼性と内容妥当性が良好であり、日本の高齢者の転倒事故発生場所やBADLを広く含んでいることから、転倒リスクのある日本の高齢者のための住まいの安全評価の項目として適切と考えられた。また、WeHSA-J実施により、海外との比較で、日本では屋内段差や浴槽での転倒ハザードが特異的に高いことも示すことができた。そして、良好な検者間信頼性を確保するには、検者養成研修が重要と思われた。

本研究の結果は、転倒リスクのある日本の高齢者のための住まいの安全評価として適切な項目を示し、良好な検者間信頼性を得るための検者養成研修の重要性を明らかにした。これらの知見は、転倒予防策としての住まいへの介入を構造化して有用性を検証するための基盤整備につながることを期待される。

今後の課題として、さらに信頼性と妥当性の良好な評価開発につなげるために、日本の高齢者のための追加項目の必要性についても検証することが挙げられる。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、日本の高齢者の転倒リスクを評価するツールの開発に向けて、海外で信頼性が検証されている Westmead Home Safety Assessment の日本語版 (WeHSA-J) を開発し、検者間信頼性と内容妥当性を検討したものである。

検者間信頼性は、WeHSA-J 検者養成研修を修了した作業療法士が検者となり、50名の高齢者が被験者 (78.2±7.1歳、女性21名) となり実施された。被験者の担当作業療法士と WeHSA-J の開発者が同時に自宅訪問し、独自に WeHSA-J を使った転倒リスク評価を行い、結果の信頼性を Cohen の κ 係数を求めて評価した。内容妥当性については、臨床経験10年以上の作業療法士18名が WeHSA-J の各項目について、日本の高齢者の自宅の転倒ハザードの同定項目として適切かどうかを4件法で評価した。

WeHSA-J で転倒ハザードが多かったのは、屋内の階段/段差、シーティング、浴室、浴槽、屋外の階段/段差、トイレの場所、履物、屋内の階段/段差の手すり、フロアマット、敷地内の歩道と車の進入路等で、WeHSA-J 全71項目のうち、中等度以上で検者間信頼性が得られ、良好な内容妥当性を認めた49項目 (69%) を抽出した。これらの項目は、日本における高齢者の転倒事故発生場所や基本的日常生活動作

(BADL) を広範に含んでおり、日本の高齢者の住まいの安全性を評価する項目として適切と考えられた。また、海外データとの比較により、日本では屋内段差や浴槽での転倒ハザードが特異的に高いことが明らかとなり、さらに、WeHSA-J による評価では、検者間信頼性を高めるための検者養成研修の必要性が示唆された。

わが国では、転倒による外傷は高齢者が要介護状態になる主たる原因であることから、有効な転倒予防策が求められている。住まいの安全評価は、高齢者の転倒予防に向けた有効な介入手段となり得るが、現在、日本では対象者の転倒ハザードを評価する標準化されたツールはない。本研究によって、転倒リスクのある日本の高齢者の住まいの安全性を評価するのに適した項目が選定され、良好な検者間信頼性を得るための検者養成研修の重要性が明らかとなった。これらの知見は、転倒予防策としての住まいへの介入を構造化し、有用性を検証するための基盤整備につながる。今後、日本の家屋構造と高齢者の転倒リスクを考慮した評価項目を追加することにより、さらに信頼性と妥当性の高い評価ツールの完成が期待できる研究である。

以上の評価から、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。

Intertrial rest for maximum grip and key pinch strength in Japanese young adults (日本人若者を対象とした最大握力測定および鍵ピンチ力測定の試行間休憩時間)

黒崎 真樹

(論文の内容の要旨)

握力・鍵ピンチ力測定は機能評価や治療判定に使われ、場所を選ばず工程は単純かつ結果が明瞭であり多くの場面で用いられている。標準値の研究は世界各国で行われ、国や人種、性別、左右や年齢による相違があることから階層化され報告されている。測定方法に関して、肢位や指示は標準的な方法が示され、3回測定は信頼性が高く採用されている場合が多い。しかしながらその試行間休憩時間に関しては一致した見解はなく研究によって異なり、適切な休憩時間は統一されていない。本研究の目的は握力・鍵ピンチ力3回測定において適切な試行間休憩時間を明らかにすることである。

対象者は20歳以上の健常大学生、男性40名、女性40名であり、握力・鍵ピンチ力測定を左右3回試行した。

反復測定デザインを用い試行間休憩時間を15秒、30秒、60秒、90秒、120秒、150秒の条件で測定をそれぞれ別日に実施した。統計解析は握力・鍵ピンチ力、男女、左右すべての測定においてKolmogorov-Smirnov検定にて正規性を確認した後、試行間休憩時間6条件の1試行間およびそれぞれ測定の3試行間の検定(正規性ありの場合は反復測定分散分析、正規性がない場合はフリードマンテスト)および効果量を算出した。更に試行間休憩時間6条件のペアごとの検定(対応のあるt検定)を行い、それぞれ測定の3試行間の信頼性を級内相関係数ICC(1, 3)で算出した。

結果、握力・鍵ピンチ力ともそれぞれの測定で一部を除き正規性を認め、6条件の1試行間では有意差を認めなかった。また一部を除きすべての測定で3回測定間では有意差を認め、測定値は1回目に最大値を示

し回数が増すにつれ低下、また最大値と最小値との差は試行間休憩時間が長くなるにつれ小さくなった。効果量は握力では男性90秒以降、女性60秒以降、また鍵ピンチ力では男性60秒以降、女性右側60秒以降・左側30秒以降0.5を下回った。6条件ペアごとの検定では握力では男性右側60秒以降、男性左側と女性では90秒以降有意差はなく、鍵ピンチ力では男女とも60秒以降有意差がなかった。ICC (1, 3)は握力では男性右側60秒以降・左90秒以降、女性右側30秒以降・左側すべて0.9を上回った。鍵ピンチ力では男性右側90秒以降・左側60秒以降、女性はすべての条件で0.9を上回った。

試行間休憩時間6条件の1試行間では有意差を認めず、すべての測定は同条件で測定できたものとする。一部を除きすべての測定で3回試行間の有意差を認め、測定値は1試行目で最大となり徐々に低下した。本結果はDunwoodyらによる試行間休憩時間120秒で測定値が有意に上昇すること、またWatanabeらによる試行間休憩時間60秒で有意な差はないという報告とは一致しない。彼らの報告では試行前の練習の記載がなく学習効果の影響が排除できない。それに対し試行前の練習を行ったTrossmanらによる試行間休憩時間15秒、30秒、60秒の報告とは傾向が一致する。最も長い試行間休憩時間である150秒でも測定値は低下し疲労の影響がわずかに残存していると推察する。

3回試行間で有意な低下は認められたものの、握力に関して一部を除き、90秒以降でそれより長い試行間休憩時間との有意差はなく、ICC (1, 3)は0.9以上、効果量は0.5以下となり差の影響は小さいと考える。そのため最適な試行間休憩時間は90秒と判断する。また鍵ピンチ力でも同様に60秒以降でそれより長い試行間休憩時間との有意差はなく、一部を除きICC (1, 3)は0.9以上、効果量は0.5以下となり差の影響は小さいと考える。そのため最適な試行間休憩時間は60秒と判断する。握力と鍵ピンチ力での試行間休憩時間の差は手内在筋の関与とその回復速度が影響したものと推察する。Kozinらは正中神経および尺骨神経をブロックし手内在筋を麻痺させ握力・鍵ピンチ力を測定した。結果握力では概ね50%減少するのに対し、鍵ピンチ力は85%減少し、鍵ピンチ力は主に手内在筋で行われていることを示唆した。日常生活で頻回に使用される手指の動きを主に行う手内在筋の関与が握力と鍵ピンチ力の試行間休憩時間の差につながったと推察する。

本研究の限界として、一つは対象者による限界がある。本研究は20～22歳の健常者を対象としており年代が異なる人、また障害を持つ人に適応できるかわからない。もう一つは筋が完全に元の状態に戻るまでの時間である。本研究で最も長い試行間休憩時間である150秒でも測定値はわずかに低下しており、どのくらい長い時間が必要なのかはわからない。

(論文審査の結果の要旨)

最初に、黒崎氏より学位論文「日本人若年者を対象とした握力及びピンチ力測定時の試行間休憩時間」の概要の発表が行われた。研究内容は、健康な若年成人を対象に6条件の休憩時間を設定して、それぞれ別日に握力とピンチ力を3回測定した。6条件間で差を認めなかった休憩時間を2条件間の比較により明らかにしたものである。この後、主査・副査との質疑応答を行った。

研究背景では、現行の問題点を導くための先行研究の抄読が適切に行われていた。その中で最大値を測定した研究のレビューと測定信頼性のレビューが混在しており、整理するとよりわかりやすいと指摘があった。サンプルサイズの設定では先行研究に基づき適切に設定されていた。統計解析では研究解析に選択した方法を明確に説明することができていた。審査担当者からの質問や異なる解析方法の質問についても的確に答えることができていた。ただし、3回の測定値間で同等性を示す検定は行われておらず、反復測定分散分析を実施していた。この点は先行研究に倣って行われており、今後同様の研究を行っていく上で検討が必要な点と思われた。

6条件のうち特定の休憩時間から3試行測定の差を判別できると仮定していたが、本研究目的である試行間休憩時間を明確に提示できなかった。そのため、6条件からすべての2条件の組み合わせを比較することによって適切な休憩時間を導き出していた。3試行測定の差を用いて研究目的を明らかにできなかったこと、二次的な解析方法による結果を用いて結論に結びつけている点は、(論文の字数制限のため)紙面上で説明がやや足りていないと思われた。その上で、考察では結果の解釈にあたって論理的な説明が行われており十分評価できる。

スライドプレゼンテーションによる発表内容はわかりやすいものであり、学位論文を補足する結果やデータを提示していた。討論全体を通じて、質疑応答も的確に解答できており、研究者としてふさわしいスキル

を習得できていることが推測された。

位論文として価値があるものと認めた。

以上のことから、主査、副査は一致して本論文を学

Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from canine and feline clinical specimens in Japan (国内のイヌ及びネコの臨床材料から分離された第三世代セファロスポリン耐性 *Enterobacteriaceae* における ESBL/AmpC 遺伝子及び特定クローンの分布)

前山佳彦

(論文の内容の要旨)

【目的】近年、extended-spectrum β -lactamase (ESBL) やプラスミド性 AmpC (pAmpC) 産生 *Enterobacteriaceae* のヒト医療環境及び市中環境における拡散・蔓延が危惧される中、愛玩動物、家畜、食品、環境材料からの第三世代セファロスポリン (3GC) 耐性菌の報告も世界的に認められてきている。国内ではこれまで愛玩動物に対する抗菌薬の使用にほとんど注意が払われず、獣医師個々の裁量に委ねられている。本研究は愛玩動物由来3GC耐性菌における ESBL 遺伝子や pAmpC 遺伝子、さらには宿主菌の遺伝系統の解析により、これらの伝播の動態を明らかにすることを目的とした。加えて愛玩動物とヒトにおける薬剤耐性菌の循環の可能性や愛玩動物が薬剤耐性菌のリザーバーとなる可能性を探求する。

【方法】2016年5月～9月に全国の動物病院より収集したイヌ及びネコ由来 *Enterobacteriaceae* 487株を対象とした。ESBL 及び pAmpC 産生性の表現型試験による推定、 β -lactamase 遺伝子とその他各種耐性遺伝子の同定、 β -lactamase 産生株のうち B2系統発生群に属する *Escherichia coli* 及び *Klebsiella pneumoniae* については、7種のハウスキーピング遺伝子に基づく Multilocus sequence typing (MLST) 解析より Sequence type (ST) を決定した。さらに、*E. coli* については系統発生群解析、O25血清型別、O25b分子型別、サブクローン/系統の判定に用いられる H30/Rx の検索、病原遺伝子解析による Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) 及び Uropathogenic *E. coli* (UPEC) の分類を行った。また、*bla*_{CTX-M} 保有株については遺伝子の周辺構造解析を行った。

【結果】第三世代セファロスポリン耐性株は *E. coli* で 381株中81株 (21.3%)、*K. pneumoniae* で50株中21株 (42.0%)、*Proteus mirabilis* で56株中2株 (3.6%) と、*K. pneumoniae* で高率であった。これら耐性株を臨床材料別で見ると尿由来が最も多く104

株中59株であった。*E. coli* 81株のうち *bla*_{CTX-M-27} が16株、*bla*_{CMY-2} が15株、*bla*_{CTX-M-15} が14株、*bla*_{CTX-M-14} が10株で検出された。*K. pneumoniae* 21株のうち *bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{CTX-M-2} が各4株、*bla*_{CTX-M-14} が3株であったが、*E. coli* で多く検出された *bla*_{CTX-M-27} は検出されなかった。また、21株中7株がヒト流行クローン ST15と同定されたが、保有する *bla* 遺伝子は多様であった。*P. mirabilis* 2株は *bla*_{CTX-M-2} 保有株であった。その他 *E. coli* で *fosA3* が2株、*K. pneumoniae* で *armA* が1株、*armA* + *fosA3* が1株から検出された。*E. coli* 81株の系統発生群別では B2が42株、次いで F が16株と多かった。特に B2に属する O25b-ST131クローン24株のうち22株が H30R サブクローンと同定され、その多くが ExPEC かつ UPEC であった。さらに、これら22株のうち13株が *bla*_{CTX-M-27} 保有株、5株が *bla*_{CTX-M-15} 保有株であり、愛玩動物においても *bla*_{CTX-M-27} 保有ヒト病原性世界流行クローンの優位性が確認された。一方、*bla*_{CTX-M-27} 保有 *E. coli* 16株中13株が B2-O25b-ST131-H30R/non-Rx であり、それ以外の *bla*_{CTX-M-27} 保有クローン3株とは異なる共通の周辺構造を有していた。すなわち、流行クローンの場合 IS26- Δ ISEcp1 (208 bp)-*bla*_{CTX-M-27}- Δ IS903D-IS26 であったのに対し、それ以外のクローンの場合 IS26- Δ ISEcp1 (388 bp)-*bla*_{CTX-M-27}-IS903D であった。また、中国で新たに出現した *E. coli* B2-non-O25b-ST1193クローンも5株確認された。

【考察】本研究では *bla*_{CTX-M-27} 保有 B2-O25b-ST131-H30R/non-Rx クローンの優位性が見いだされた。さらにはヒト由来株と愛玩動物由来株で耐性遺伝子及びクローンの同一性が確認されたことから、ヒトと愛玩動物の間での耐性菌の伝播、拡散、循環が立証された。また、愛玩動物が薬剤耐性菌のリザーバーとなり得る可能性が示唆されたことから、特に獣医療分野における尿路感染症の適正抗菌薬治療が薬剤耐性対策として重要と考える。

(論文審査の結果の要旨)

近年, extended-spectrum β -lactamase やプラスミド性 AmpC 産生 *Enterobacteriaceae* のヒト医療環境及び市中環境における世界的な拡散・蔓延が危惧される中, 最近ワンヘルスの概念に基づく薬剤耐性 (AMR) アクションプランのもと愛玩動物, 家畜, 食品, 環境材料由来 AMR の動向調査が重要視されてきている。国内ではこれまで愛玩動物への抗菌薬使用は獣医師の裁量に委ねられており, また AMR の実態も把握されていない。本研究は愛玩動物における第三世代セファロsporin (セフォタキシム [CTX]) 耐性菌の実態解明を行った点で意義深い。さらには耐性遺伝子に加え, これらを担う可動性遺伝因子, 宿主菌の遺伝系統の包括的な解析により, 愛玩動物とヒトの間での薬剤耐性菌の伝播・拡散の可能性や愛玩動物が薬剤耐性菌のリザーバーとなる可能性を探求した。

2016年5月～9月に全国の動物病院より収集したイヌ・ネコ由来 *Enterobacteriaceae* 487株を解析対象とした。CTX 耐性株は *E. coli* で381株中81株 (21.3%), *Klebsiella pneumoniae* で50株中21株 (42%), *Proteus mirabilis* で56株中2株 (3.6%) と, *K. pneumoniae* で高率であった。CTX 耐性株104株中尿由来株が59株 (56.7%) と最も多かった。*E. coli* 81株の保有耐性遺伝子は $bla_{CTX-M-27}$ が16株, bla_{CMY-2} が15株, $bla_{CTX-M-15}$ が14株, $bla_{CTX-M-14}$ が10株と優位に検出された。*K. pneumoniae* 21株では $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-2}$ が各4株, $bla_{CTX-M-14}$ が3株で検出されたが, *E. coli* で高頻度に検出された $bla_{CTX-M-27}$ は検出されなかった。また, 21株中7株がヒト流行クローン ST15 と同定されたが, 保有する bla 遺伝子は多様であった。*P. mirabilis* 2株は $bla_{CTX-M-2}$ 保有株であった。その他 *E.*

coli で $fosA3$ が2株, *K. pneumoniae* で $armA$ が1株, $armA + fosA3$ が1株から検出された。*E. coli* 81株の系統発生群は B2群が42株, 次いで F群が16株と多かったが, 特にヒト病原性世界流行クローンである B2-O25b-ST131クローン24株のうち22株が H30R サブクローンと同定され, その多くがヒトの腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) かつ尿路病原性大腸菌 (UPEC) であった。さらにこれら22株のうち13株が $bla_{CTX-M-27}$ 保有株, 5株が $bla_{CTX-M-15}$ 保有株であり, 愛玩動物においても $bla_{CTX-M-27}$ 保有ヒト病原性クローンの優位性が確認された。一方, $bla_{CTX-M-27}$ 保有 *E. coli* 全16株中13株が B2-O25b-ST131-H30R/non-Rx で, 共通の周辺構造 IS26- Δ ISEcp1 (208 bp)- $bla_{CTX-M-27}$ - Δ IS903D-IS26を有していた。一方, それ以外の $bla_{CTX-M-27}$ 保有クローン3株はこれと異なる周辺構造 IS26- Δ ISEcp1 (388 bp)- $bla_{CTX-M-27}$ -IS903Dを共有していた。また, 中国で新たに出現したキノロン耐性を特徴とする *E. coli* B2-non-O25b-ST1193クローンも5株確認され, ExPEC 且つ UPEC と同定されたことから今後の動向に注意が必要である。

愛玩動物由来薬剤耐性菌の詳細な研究はこれまで国内では実施されてきていない。本研究でヒト由来株と愛玩動物由来株で耐性遺伝子周辺構造及びクローンの共通性が確認されたことから, ヒトと愛玩動物の間での耐性菌の伝播, 拡散, 循環が示唆され, 厚生労働省が推進する AMR アクションプランにおいて重要な知見を提供している点で評価できる。研究は適正に行われており, 今後も継続的な監視が必要とされる研究領域である。学位審査においても質疑に対し適切に答えていることから, 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。