

信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名	学位授与番号	授与年月日	博士論文名	学位審査委員	
				主査	副査
吉江幸司	甲第1215号	R 2. 3.31	Cardiac TRPV1 afferent signaling promotes arrhythmogenic ventricular remodeling after myocardial infarction (心臓由来 TRPV1求心性シグナルは心筋梗塞後不整脈源性心室リモデリングを促進する)	桑原宏一郎	山田充彦 柴 祐司
WANG YAPING	甲第1216号	R 2. 9.30	Polyunsaturated fatty acid deficiency affects sulfatides and other sulfated glycans in lysosomes through autophagy-mediated degradation (多価不飽和脂肪酸欠乏は、ライソゾームにおいてオートファジーを介した分解を通じてスルファチドおよび硫酸化グリカンに影響を与える)	樋口京一	関島良樹 福島菜奈恵
上野史香	甲第1217号	R 2. 9.30	The interstitial lung disease-gender-age-physiology index can predict the prognosis in surgically resected patients with interstitial lung disease and concomitant lung cancer (ILD-GAP index は間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例において予後予測指標になり得る)	清水公裕	本田孝行 小泉知展
宗像 諒	甲第1218号	R 3. 3.31	Selecting the C7-LIV Line Vertebra as the Upper Instrumented Vertebra for Adolescent Idiopathic Scoliosis Lenke Type 1A Curves Multicenter and a Minimum 2-Year Follow-up Study (思春期特発性側弯症 Lenke Type 1A カーブへの上位固定椎としてC7-LIVライン椎体の選択 多施設研究かつ最低2年以上のフォローアップ研究)	古庄知己	藤永康成 清水公裕
前川カルナ	甲第1219号	R 3. 3.31	Mutational Spectrum and Clinical Features of Patients with LOXHD1 Variants Identified in an 8,074 Hearing Loss Patient Cohort (難聴患者8,074名における LOXHD1遺伝子変異の頻度, 種類と臨床像の検討)	古庄知己	関島良樹 田 潤克彦
安川梨香	甲第1220号	R 3. 3.31	The Prevalence and Clinical Characteristics ofTECTA-Associated Autosomal Dominant Hearing Loss (TECTA 遺伝子変異によって常染色体優性遺伝形式をとる難聴の頻度および臨床的特徴)	古庄知己	関島良樹 田 潤克彦

審査学位論文要旨

GAUTAM SILWAL SUDHA	甲第1221号	R 2. 3.31	Recovery of Cryo-injured Rabbit Urethras by Biofabricated C-shaped Adipose-derived Mesenchymal Cell Structures (ウサギ尿道凍結傷害モデルを用いたC型脂肪由来間葉系細胞構造体による尿道再生の試み)	柴 祐司	村田敏規 高橋 淳
曹 雪杉	甲第1222号	R 1. 9.30	Inhibition of CASK expression by adeno associated virus-mediated RNA interference in medial prefrontal cortex affects social behavior in the adult mouse (アデノ随伴ウイルスを用いたRNA干渉による内側前頭前皮質でのCASKの発現抑制で成体マウスの社会行動が阻害される)	樋口京一	新藤隆行 沢村達也
高曽根 健	甲第1223号	R 3. 3.31	Non-invasive detection and differentiation of cardiac amyloidosis using 99mTc-pyrophosphate scintigraphy and 11C-Pittsburgh compound B PET imaging (99mTc-PYP心筋シンチと11C-PiB PETを用いた非侵襲的な心アミロイドシスの検出と鑑別)	藤永康成	桑原宏一郎 樋口京一
金城 匠	甲第1224号	R 3. 3.31	The Gly82Ser mutation in AGER contributes to pathogenesis of pulmonary fibrosis in combined pulmonary fibrosis (CPF) in Japanese patients (AGER遺伝子のGly82Ser変異は日本人における気腫合併肺線維症に関与する)	本田孝行	関島良樹 小泉知展
牛山 哲	甲第1225号	R 3. 3.31	Clinical characteristics of patients with myalgia as the initial manifestation of small and medium sized vasculitis: a retrospective study (筋痛を初発症状とした小型・中型血管炎の臨床的特徴)	菅野祐幸	藤永康成 高橋 淳
小山吉人	甲第1226号	R 2. 3.31	Detection of swallowing disorders using a multiple channel surface electromyography sheet: a preliminary study (複数チャンネルの表面筋電図シートを用いた嚥下障害の評価: 初期研究)	本田孝行	関島良樹 福島菜奈恵
赤岡裕介	甲第1227号	R 2. 9.30	Aperture Elongation of the Femoral Tunnel on the Lateral Cortex in Anatomical Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using the Outside-In Technique (アウトサイドイン法を用いた前十字靭帯二重束再建術における大腿骨外側開口部の楕円化について)	高橋 淳	福島菜奈恵 藤永康成
倉石康弘	甲第1228号	R 3. 3.31	Corticosteroids prevent the progression of autoimmune pancreatitis to chronic pancreatitis (ステロイドは自己免疫性膵炎の慢性膵炎進展を予防する)	藤永康成	副島雄二 鷲塚伸介

審査学位論文要旨

松岡大輔	甲第1229号	R 2. 3.31	Assessment of kidney function using inulin-based and estimated glomerular filtration rates before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients (小児同種造血幹細胞移植前後におけるイヌリンによる糸球体濾過量及び推定糸球体濾過量を用いた腎機能評価)	石塚 修	梅村武司 山田充彦
曾根原 圭	甲第1230号	R 3. 3.31	The efficacy of amrubicin third-line chemotherapy in patients with relapsed extensive-disease small-cell lung cancer: A retrospective and historical study in a single institute (再発進展型小細胞肺癌の症例に対する3次化学療法としてのアムルビシンの有効性(単施設における後方視的な研究))	藤永康成	本田孝行 平塚佐千枝
鈴木 宏	甲第1231号	R 3. 3.31	Polymorphism at rs9264942 is associated with HLA-C expression and inflammatory bowel disease in the Japanese (rs9264942の多型は日本人のHLA-C発現量と炎症性腸疾患と関連する)	古庄知己	関島良樹 中沢洋三
宜保隆彦	甲第1232号	R 2. 3.31	Immunohistochemical Investigation of Predictive Biomarkers for Mandibular Bone Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma (口腔扁平上皮癌における下顎骨浸潤予測因子の免疫組織化学的検討)	小泉知展	菅野祐幸 高橋 淳
鎌仲貴之	甲第1233号	R 2. 3.31	Carbon fibers for treatment of cancer metastasis in bone (カーボンファイバーを用いた癌転移骨の治療)	平塚佐千枝	小泉知展 柴 祐司
芦原典宏	甲第1234号	R 3. 3.31	Correlation of Pancreatic T1 Values Using Modified Look-Locker Inversion Recovery Sequence (MOLLI) with Pancreatic Exocrine and Endocrine Function (Modified Look-Locker Inversion Recovery Sequence (MOLLI) を用いて測定した膵 T1値と膵内外分泌機能との相関についての検討)	副島雄二	伊藤研一 駒津光久
岡野孝弘	甲第1235号	R 3. 3.31	Cardio-renal and cardio-hepatic interactions predict cardiovascular events in elderly patients with heart failure (高齢心不全患者における心腎、心肝連関による心血管イベントの予測)	柴 祐司	今村 浩 梅村武司
山中万次郎	甲第1236号	R 3. 3.31	Investigation of factors associated with allergic transfusion reaction due to platelet transfusion and the efficacy of platelets resuspended in BRS-A in adult patients (成人領域における血小板輸血に伴ったアレルギー性輸血副反応に関与する因子の探索とBRS-Aを用いた洗浄血小板の効果)	本田孝行	栗田 浩 花岡正幸

審査学位論文要旨

衣川 康弘	甲第1237号	R 3. 3.31	Promoter hypomethylation of SKI in autoimmune pancreatitis (自己免疫性膵炎におけるSKI 遺伝子プロモーター領域の脱メチル化)	本田 孝行	栗田 浩 花岡 正幸
田中 正明	甲第1238号	R 3. 3.31	Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates subretinal fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition in age-related macular degeneration (アドレノメデュリン-RAMP2系は、加齢黄斑変性において上皮間葉転換を抑制し、網膜下線維化を改善する)	菅野 祐幸	樋口 京一 田 潤克彦
JIA FANGPING	甲第1239号	R 3. 3.31	Dietary restriction suppresses steatosis-associated hepatic tumorigenesis in the hepatitis C virus core gene transgenic mice (食事制限はC型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいて脂肪肝に関連した肝腫瘍の発生を抑制する)	樋口 京一	駒津 光久 副島 雄二
小山 誠	甲第1240号	R 2. 3.31	Low-dose trametinib and Bcl-xL antagonist have a specific antitumor effect in KRAS-mutated colorectal cancer cells (低濃度トラメチニブと Bcl-xL 阻害剤は、KRAS 変異型大腸癌細胞に対して特異的な抗腫瘍効果を示す)	伊藤 研一	小泉 知展 平塚 佐千枝
佐藤 幸一	甲第1241号	R 3. 3.31	Correlation of clinicopathological features and LGR5 expression in colon adenocarcinoma (結腸腺癌における臨床病理学的特徴と LGR5発現の相関)	菅野 祐幸	本田 孝行 平塚 佐千枝
箱山 友祐	甲第1242号	R 3. 3.31	Oral Candida Mannan Concentrations Correlate with Symptoms/Signs of Ill Health and the Immune Status (口腔カンジダ菌量は宿主の免疫および全身状態 / 症状と関連する)	竹下 敏一	駒津 光久 伊藤 研一
柴崎 拓実	甲第1243号	R 3. 3.31	Association between pesticide usage during pregnancy and neonatal hyperbilirubinemia requiring treatment: the Japan Environment and Children's Study (母体の妊娠中の殺虫剤・防虫剤の使用と、治療を要する新生児高ビリルビン血症との関連)	古庄 知己	塩沢 丹里 鷲塚 伸介
CUI NANQI	甲第1244号	R 3. 3.31	Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 Systems Regulate Cardiac Homeostasis during Cardiovascular Stress (アドレノメデュリン-RAMP2系・RAMP3系は、心血管系ストレスに対して、心臓の恒常性を維持する)	菅野 祐幸	樋口 京一 田 潤克彦
阿部 隆太	甲第1245号	R 2. 3.31	Distribution of amyloidosis subtypes based on tissue biopsy site-Consecutive analysis of 729 patients at a single amyloidosis center in Japan-(本邦の単一アミロイドーシス診断センターにおける連続729例の組織診断に基づいたアミロイドーシスの病型分布)	樋口 京一	本田 孝行 梅村 武司

審査学位論文要旨

中村千鶴子	甲第1246号	R 2. 3.31	Relationship between placental weight and late-onset circulatory collapse (早産児における晩期循環不全と胎盤重量との関連)	古庄知己	塩沢丹里 杠 俊介
川本真貴子	甲第1247号	R 3. 3.31	Relationship between dry mouth and hypertension (口腔乾燥と高血圧症との関連)	駒津光久	野見山哲生 桑原宏一郎
奥村征大	甲第1248号	R 2. 3.31	Decreased alpha-1,4-linked N-acetylglucosamine glycosylation in biliary tract cancer progression from biliary intraepithelial neoplasia to invasive adenocarcinoma (胆管内上皮腫瘍から浸潤性腺癌に至る胆道癌の発癌過程でαGlcNAcの糖鎖付加は減少する)	副島雄二	小泉知展 平塚佐千枝
紺野沙織	甲第1249号	R 3. 3.31	Predictive factors of poor blood collecting flow during leukocyte apheresis for cellular therapy (細胞療法のための白血球アフェレーシス中に生じる脱血不良を予測する因子の検討)	本田孝行	中沢洋三 梅村武司
櫻井精齊	甲第1250号	R 3. 3.31	Accuracy of a salivary examination kit for the screening of periodontal disease in a group medical check-up (Japanese-specific health check-up) (集団健診(特定健診)における歯周病スクリーニングのための唾液検査キットの精度)	野見山哲生	駒津光久 桑原宏一郎
佐藤友香	甲第1251号	R 2. 3.31	Pharmacokinetics of insulin disappearance after massive overdosing. (過量投与されたインスリンの薬物動態解析)	関島良樹	梅村武司 駒津光久

審査学位論文要旨

氏名	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
佐藤正彬	甲第38号	R 3. 3.20	Relationship of malnutrition during hospitalization with functional recovery and postdischarge destination in elderly stroke patients (入院中の急性期高齢脳卒中患者の低栄養状態と機能回復および退院先との関連性)	上村 智子	佐賀里 昭 務 臺 均 千 島 亮
川内翔平	甲第39号	R 3. 3.20	Metronome-Paced Incremental Hyperventilation May Predict Exercise Tolerance and Dyspnea as a Surrogate for Dynamic Lung Hyperinflation During Exercise (過呼吸による動的肺過膨張の評価は運動耐容能および呼吸困難感を予測し、運動負荷を用いた動的肺過膨張評価の代替となる)	百瀬 公人	矢崎正英 藤本圭作 神津 玲
山崎春奈	甲第40号	R 3. 3.20	A new noninvasive method for measurement of dynamic lung compliance from fluctuations on photoplethysmography in respiration (光電式容積脈波を用いた新たな非侵襲的動肺コンプライアンス測定法の検討)	伊澤 淳	矢崎正英 藤本圭作 野田明子
岡野怜己	甲第41号	R 3. 3.20	Convergent validity of a simplified device and relationship between blood lactate and salivary lactate after a vertical squat jump in healthy non-athletes (簡易デバイスの妥当性及び健康成人におけるスクワットジャンプ課題後の血中乳酸と唾液中乳酸の関係性)	百瀬 公人	青木 薫 西澤公美 松田佳和

Cardiac TRPV1 afferent signaling promotes arrhythmogenic ventricular remodeling after myocardial infarction (心臓由来 TRPV1 求心性シグナルは心筋梗塞後不整脈源性心室リモデリングを促進する)

吉 江 幸 司

(論文の内容の要旨)

【目的】 心筋梗塞による心筋障害症例において、交感神経活性が心室性不整脈に関与することが知られている。しかしながら、この交感神経活性が心室性不整脈に関与する詳細なメカニズムについては、心臓に input する遠心性神経、心臓から情報を中枢に伝える求心性神経を始めとした複雑な神経回路そのものの理解が不十分であることから、未だ明らかとは言えない。本研究では、この回路の形成にかかわる求心性交感神経線維に着目し、その機能が心筋梗塞後の不整脈発生および病的な心筋リモデリングにいかに関与するかを検討することを目的とした。

【方法】 Yorkshire Pig をモデルとして、正常心機能を有するもの (model 1)、心筋梗塞を人為的に作成したもの (model 2)、心筋梗塞を人為的に作成し、TRPV1 依存性に求心性交感神経を不活化する resiniferatoxin (RTX) を心嚢腔に注入したもの (model 3) の 3 群を作成した。この 3 群間において免疫組織学的に心臓交感神経支配を確認するとともに、プログラム刺激や Cesium Chloride による心室性不整脈の誘発性解析、超音波による心機能解析、RNA sequencing およびリアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析、電気生理学的解析を行い、不整脈源性心筋リモデリングおよびそこに関与するメカニズムを解析した。求心性交感神経障害の遠心性交感神経活性への影響については交感神経節での神経発火頻度を各モデルにおける複数の心負荷条件下で解析した。

【結果】 CGRP および TH に対する免疫染色と、Capsaicin および Bradykinin に対する反応性の結果より、Model 3 における求心性交感神経線維の機能障害が良好に得られたことを確認した。求心性交感神経に介入していない心筋障害 model 2 ではプログラム刺激および Cesium Chloride による薬理的刺激により、容易に心室性不整脈が誘発されたが、求心性交感神経機能を障害した Model 3 においては、これら刺激による心室性不整脈誘発は抑制されていた。超音波の結果より、model 3 においては model 2 と比較して、心筋障害後の病的な心筋リモデリングが有意に抑制されており、ま

た組織学的に線維化が抑制され、線維化関連遺伝子の発現も変化していた。電気生理学解析では、個々の心筋細胞の活動電位やカルシウムハンドリングおよびそれらにかかわるイオンチャネルの発現には model 2 と 3 とで変化がないものの、心筋梗塞ボーダーゾーンにおける心筋の電氣的興奮のバラツキが model 3 において model 2 に比し有意に少ないことを確認した。遠心性交感神経活動を星状神経節における細胞外記録にて評価したところ、model 1 と比較した場合の、model 2 における非刺激時の交感神経発火頻度の増加、および各種血行動態ストレス環境下における異常反応は、model 3 にて改善していた。

【考察】 以上の結果より求心性交感神経シグナルの障害が、心筋梗塞後の遠心性交感神経の異常活性化を抑制し、心筋梗塞後の病的な心筋リモデリングおよび悪性不整脈発生を抑制することが示された。こうした不整脈抑制効果は、心筋細胞の電気生理学的変化とは独立して認められ、線維化など心臓の不整脈源性リモデリングを抑制したことによると考えられた。これらのことから、TRPV1 発現求心性交感神経が心筋梗塞後の交感神経機能異常に関連し、病的な心筋リモデリングおよび悪性不整脈発症に関与していることが示唆された。本研究結果は、心筋梗塞後リモデリング、悪性不整脈発生に対する TRPV1 発現求心性交感神経の新規治療ターゲットとしての可能性を示唆するものである。

(論文審査の結果の要旨)

近年、自律神経を介した心疾患への治療応用が注目されている。本研究では、心臓交感神経の中でも特に求心性神経に存在する TRPV1 チャンネルに注目した。この TRPV1 を介した求心性交感神経の障害が動物実験によって心筋のリバースリモデリングをもたらし、心機能の改善を得ることが報告されており、この知見は同時に心筋障害を有する症例において心室性不整脈の温床となる壊死心筋および線維化の抑制ならびに改善と、致死性心室性不整脈の予防に繋がる可能性有していると考えられた。

その結果、以下の結果を得た。

1. Resiniferatoxin (RTX) の心嚢腔への注入モデル

- において、免疫組織染色により、CGRPによる求心性交感神経の染色反応がないことを確認し、さらにTRPV1 agonistを心外膜に投与したin vivoでの反応性の検証により、この求心性交感神経は機能的にも阻害されていることを確認した。
2. 心筋梗塞 (MI) 単独モデルと心筋梗塞+求心性交感神経阻害 (MI+RTX) モデルにおいて心室へのプログラムペーシングとCesium Chloride投与による心室性不整脈誘発性に関して検討し、MI+RTXモデルにおける心室性不整脈抑制効果を示した。
 3. 心室性不整脈耐性獲得メカニズムについては、心筋におけるイオンチャネル発現量、action potentialならびに心筋細胞内Ca²⁺イオンの動態について、有意な所見は見られなかった。
 4. 組織学的には、MIモデルと比較し、MI+RTXモデルにおける線維化は有意に減少していることが示された。この結果、心筋内での興奮伝播の違いを生み出し、MI+RTXモデルにおいては心筋伝導遅延を回避していることが示された。またMI+RTXモデルにおいてはConnexin 43の発現が、MIモデ

- ルとの比較において有意に維持されていた。
5. 超音波検査ではMI+RTXモデルはその収縮能、左室容量、壁厚において正常モデルと近似しており、MIモデルと比較して障害の程度は有意に軽減されていた。
 6. 求心性交感神経阻害は遠心性交感神経の発火様式に影響を与え、MIモデルにおいて認められる遠心性交感神経の発火様式の変化が、MI+RTXモデルで正常モデルと同程度の発火形態まで軽減されていた。
- 以上より、RTXによる求心性交感神経の阻害は、心筋梗塞による遠心性交感神経の異常な発火増強を抑制し、心筋梗塞周囲巢の線維化を抑制する。病的心筋リモデリングを抑制することで、心筋障害後の心室性不整脈抑制につながることを示された。本研究の成果は、新たな切り口による心筋梗塞後心筋障害改善と致死性不整脈の予防法開発の可能性を有している。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。

Polyunsaturated fatty acid deficiency affects sulfatides and other sulfated glycans in lysosomes through autophagy-mediated degradation (多価不飽和脂肪酸欠乏は、ライソゾームにおいてオートファジーを介した分解を通じてスルファチドおよび硫酸化グリカンに影響を与える)

WANG YAPING

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】硫酸化スフィンゴ糖脂質であるスルファチドやグリコサミノグリカンなどの硫酸化グリカンは脳や腎で重要な生理機能を発揮している。スルファチドやグリコサミノグリカンはライソゾームで分解され、それらの代謝変化はアルツハイマー病など多くの疾病発症に関連する。多価不飽和脂肪酸は生体内の必須成分であり脳疾患や腎疾患の発症に重要な働きをすることが知られているが、ライソゾーム基質の代謝過程やその関連疾患における重要性は不明である。本研究では多価不飽和脂肪酸欠乏食投与に伴う、脳と腎のライソゾーム基質の変化を解析した。

【方法】8-9週齢の野生型オスマウス (C57/BL6J) を普通食群、不飽和脂肪酸欠乏食群、不飽和脂肪酸欠乏食+不飽和脂肪酸投与群の3群に分け、投与0週 (n=3)、5週 (n=4)、8週 (n=4) の時点で脳および腎サンプルを採取した。組織中のスルファチド

は脂質抽出後に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。組織中のグリコサミノグリカンは、パパイン処理後に測定キットを用いて定量した。組織学的解析は免疫染色および電子顕微鏡を用いて施行した。スルファチド代謝、ライソゾーム酵素、オートファジー関連因子のmRNAと蛋白発現は、それぞれreal-time PCR法およびImmunoblot法を用いて比較検討した。群間における統計的有意差はANOVA, Post hoc test, 時系列変化についてはunpaired Student's t-testにより検定し、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

【結果】5週間以上の多価不飽和脂肪酸欠乏食投与により、脳および腎におけるスルファチド含有量が低下し、スルファチド分解酵素であるarylsulfatase Aとgalactosylceramidaseが増加した。両臓器においてオートファゴリソームが多数観察され、オートファジー抑制経路であるErk/mTOR経路が抑制されてい

たことから、スルファチド含有量の低下はオートファジーの亢進に伴うスルファチド異化亢進に起因すると考えられた。他のライソゾーム基質であるグリコサミノグリカンも同様に低下していた。多価不飽和脂肪酸欠乏食を投与したマウス脳において、アルツハイマー病の発症初期に見られるアミロイドβ前駆体タンパクの減少が認められた。このモデルに多価不飽和脂肪酸の補充を行うと、上記の異常は全て消失した。

【結論】多価不飽和脂肪酸欠乏は、脳と腎においてオートファジーとライソゾーム機能の活性化をもたらし、スルファチドやグリコサミノグリカンなどのライソゾーム基質を減少させることにより、様々な疾病発症に関連する可能性が示唆された。本研究は、多価不飽和脂肪酸の欠乏により生じる病態を理解する上で、新たな知見を提示している。

(論文審査の結果の要旨)

多価不飽和脂肪酸は生体内の必須成分であり脳疾患や腎疾患の発症に重要な働きをすることが知られているが、ライソゾーム基質の代謝過程やその関連疾患における重要性は不明である。本研究では多価不飽和脂肪酸欠乏食投与に伴う、脳と腎のライソゾーム基質硫酸化スフィンゴ糖脂質であるスルファチドやグリコサミノグリカンなどの硫酸化グリカンの変化を解析した。

8-9週齢の野生型オスマウス(C57/BL6J)を普通食群、不飽和脂肪酸欠乏食群、不飽和脂肪酸欠乏食+不飽和脂肪酸投与群の3群に分け、投与0週(n=3)、5週(n=4)、8週(n=4)の時点で脳および腎サンプルを採取した。

その結果、WANG YAPING は次の結論を得た。

1. 5週間以上の多価不飽和脂肪酸欠乏食投与により、脳および腎におけるスルファチド含有量が低下し、スルファチド分解酵素である arylsulfatase A と galactosylceramidase が増加した。
2. 両臓器においてオートファゴリソソームが多数観察され、オートファジー抑制経路である Erk/mTOR 経路が抑制されていたことから、スルファチド含有量の低下はオートファジーの亢進に伴うスルファチド異化亢進に起因すると考えられた。
3. 多価不飽和脂肪酸欠乏食を投与したマウス脳において、アルツハイマー病の発症初期に見られるアミロイドβ前駆体タンパクの減少が認められた。
4. 多価不飽和脂肪酸欠乏食を投与したマウス脳および腎において、他のライソゾーム基質であるグリコサミノグリカンも同様に低下していた。このモデルに多価不飽和脂肪酸の補充を行うと、上記の異常は全て消失した。

これらの結果より、多価不飽和脂肪酸欠乏は、脳と腎においてオートファジーとライソゾーム機能の活性化をもたらし、スルファチドやグリコサミノグリカンなどのライソゾーム基質を減少させることにより、様々な疾病発症に関連する可能性が示唆された。本研究は、多価不飽和脂肪酸の欠乏により生じる病態を理解する上で、新たな知見を提示している。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

The interstitial lung disease-gender-age-physiology index can predict the prognosis in surgically resected patients with interstitial lung disease and concomitant lung cancer

(ILD-GAP index は間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例において予後予測指標になり得る)

上野史香

(論文の内容の要旨)

【はじめに】間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例において術後合併症や死亡のリスクは高いとされている。特発性肺線維症を含めた様々なサブタイプの間質性肺炎において Interstitial Lung Disease-Gender-Age-Physiology (ILD-GAP) Index が予後予測指標として提唱されている。一方肺癌において Prognostic Nutritional Index (PNI) 等の慢性炎症を基礎とした予後予測指標が複数提唱されている。本研究では、間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例におけるこれらの予

後予測指標と死亡リスクとの関連を検討した。また術後の急性増悪の発症や術後の長期酸素療法導入との関連も検討し、手術が安全に行えるか判断する上で有用な情報となり得るか検討した。

【方法】信州大学医学部附属病院呼吸器外科において、2001年8月から2016年9月の間に肺癌に対して肺切除術が施行された1,449例のうち、胸部CTにおいて間質性肺炎の合併を認めた102例の診療記録を後方視的に検討した。術前の血液検査・呼吸機能検査・胸部CT検査の各結果、ILD-GAP index・PNI等の各指標、

肺癌病期等の臨床的特徴と死亡リスクとの関連をCoxハザードモデルによって解析した。また術後の急性増悪の発症および術後の長期酸素療法導入との関連をそれぞれ多重ロジスティック回帰分析によって解析した。

【結果】ILD-GAP index 0-1の群とILD-GAP index ≥ 4 の群との比較、またILD-GAP index 2-3の群とILD-GAP index ≥ 4 の群との比較において術後生存期間に有意差が認められ（それぞれ $p=0.0001$, $p=0.0236$ ）、ILD-GAP index 高値は独立して死亡リスクと関連していた（hazard ratio[HR]1.32030； $p=0.0059$ ）。また、Body Mass Index (BMI) 高値、血清C-reactive protein (CRP) 高値は、独立して術後の間質性肺炎の急性増悪の発症と関連していた（それぞれHR 1.28336； $p=0.0206$, HR 26.3943； $p=0.0165$ ）。さらに、胸部CTにおける間質性肺炎の重症度は、独立して長期酸素療法の導入と関連していた（HR 2.78670； $p=0.0313$ ）。

【考察】間質性肺炎の予後予測指標とされるILD-GAP indexは、本研究の結果より間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例においても予後と関連があることが示された一方で、肺癌症例の予後予測指標とされているPNI等の慢性炎症を基礎とした予後予測指標は、いずれも予後と関連がなかった。血清CRP値と急性増悪が関連したことから、術前の間質性肺炎もしくは肺癌の高活動性による全身性の炎症が術後の急性増悪の発症に関与することが示唆された。胸部CTにおける間質性肺炎の重症度・ILD-GAP index・血清KL-6値は、単変量解析で術後の長期酸素療法の導入と関連しており、それぞれ画像的・呼吸生理学的・血清学的に間質性肺炎の重症度を反映していると考えられ、特に画像的な評価は独立したリスク因子として重要であることが示唆された。BMI高値は急性増悪の独立したリスク因子であり、単変量解析で長期酸素療法の導入との関連も示唆されたが、過去に同様の患者群を対象とした研究は報告されておらず、その意味付けについては更なる検討が必要と考えられた。

【結論】ILD-GAP indexは間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例において予後予測指標になると考えられ、特にILD-GAP index 4以上の症例において高い死亡率が予測される。また術前のBMIおよび血清CRP値は術後の急性増悪を、胸部CTにおける間質性肺炎の重症度は術後の長期酸素療法の導入を予測する上で有用と考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例において術後合併症や死亡のリスクは高いとされている。特発性肺線維症を含めた様々なサブタイプの間質性肺炎においてILD-GAP indexが予後予測指標として提唱されている。一方肺癌においてPNI等の慢性炎症を基礎とした予後予測指標が複数提唱されている。本研究では、間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例におけるこれらの予後予測指標と死亡リスク・術後の急性増悪の発症・術後の長期酸素療法導入との関連を検討した。

当院呼吸器外科において2001年8月から2016年9月の間に肺癌に対して肺切除術が施行された1,449例のうち、間質性肺炎の合併を認めた102例の診療記録を後方視的に検討した。術前の血液検査・呼吸機能検査・胸部CT検査の各結果、ILD-GAP index・PNI等の各指標、肺癌病期等の臨床的特徴と死亡リスクとの関連をCoxハザードモデルによって解析した。また術後の急性増悪の発症および術後の長期酸素療法導入との関連をそれぞれ多重ロジスティック回帰分析によって解析した。

その結果、上野は次の結論を得た。

1. ILD-GAP index 0-1の群とILD-GAP index ≥ 4 の群との比較、またILD-GAP index 2-3の群とILD-GAP index ≥ 4 の群との比較において術後生存期間に有意差が認められ（それぞれ $p=0.0001$, $p=0.0236$ ）、ILD-GAP index 高値は独立して死亡リスクと関連していた（HR 1.32030； $p=0.0059$ ）。
2. BMI高値、血清CRP高値は、独立して術後の間質性肺炎の急性増悪の発症と関連していた（それぞれHR 1.28336； $p=0.0206$, HR 26.3943； $p=0.0165$ ）。
3. 胸部CTにおける間質性肺炎の重症度は、独立して長期酸素療法の導入と関連していた（HR 2.78670； $p=0.0313$ ）。

これらの結果より、ILD-GAP indexは間質性肺炎に合併した肺癌の術後症例において予後予測指標になると考えられ、特にILD-GAP index 4以上の症例において高い死亡率が予測された。また術前のBMIおよび血清CRP値は術後の急性増悪を、胸部CTにおける間質性肺炎の重症度は術後の長期酸素療法の導入を予測する上で有用と考えられた。

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。

Selecting the C7-LIV Line Vertebra as the Upper Instrumented Vertebra for Adolescent Idiopathic Scoliosis Lenke Type 1A Curves —Multicenter and a Minimum 2-Year Follow-up Study— (思春期特発性側弯症 Lenke Type 1A カーブへの上位固定椎として C7-LIV ライン椎体の選択 多施設研究かつ最低2年以上のフォローアップ研究)

宗 像 諒

(論文の内容の要旨)

思春期特発性側弯症 (Adolescent Idiopathic Scoliosis: AIS) の分類方法には Lenke 分類があり, Lenke type 1A カーブは最も一般的で多いカーブである。近年, 椎弓根スクリューの開発による矯正能力の進歩により術後結果は向上してきた。しかし未だ, 術後冠状面バランス不良を来す症例が存在し, 術後の良好な冠状面バランスを得るための明確な固定範囲決定方法への一定の見解はない。下位固定椎 lower instrumented vertebra (LIV) に関しては仙骨中央から引いた垂線が最後に接する椎体 last touching vertebra (LTV) または実質的に接する椎体 last substantially touching vertebra (LSTV) とすることで一定の見解として得られているが, 上位固定椎 upper instrumented vertebra (UIV) に関して一定の見解は得ていない。本研究の目的は, AIS Lenke type1A カーブにおいて, 術後の良好な冠状面バランス等を得るための UIV の決定方法を検討することである。

LIV に基づく UIV の決定方法として, これまでの様々な研究では UIV と LIV を別々に検討していたが, 当院の Oba らは Lenke type 5C カーブにおいて Shinshu-line (S-line) という LIV に基づき UIV を決定する手法を提唱した (Oba et al. J Neurosurg Spine 2019)。今回我々は, この S-line を元に, C7-LIV line (modified S-Line; MSL) を考案した。MSL は LIV 棘突起と C7棘突起を結んだ線で, MSL から逸脱する直前の椎体を MSLV と定義する。術前 X線で実際の手術の UIV が MSLV と一致している群 (M群), 頭側にある群 (P群), 尾側にある群 (D群) に分け, MSLV を利用した UIV 決定法の臨床的有用性を検討した。

当院を含めた多施設における AIS Lenke type 1A カーブを有する患者で術後2年以上フォローアップ可能であった45例 (女性44例, 男性1例; 平均年齢14.4 ± 2.4歳) を対象とした。測定項目は術前・術後2年時での, C7棘突起と CSVL の距離 (C7PL: 体幹バランスの指標), clavicle rib inter angle (CRIA: 肩バランスの指標), 主胸椎カーブの Cobb 角 (カーブの

大きさ) とその矯正率, apical vertebral translation (側弯頂椎の側方偏移), SRS-22r (患者立脚型アンケート), 矢状面バランス (SVA, T5-L2, T10-L2, T12-S1後弯角) とし, それぞれM群をコントロールとして Dunnett の多重比較を施行した。結果は, M群において, P群, D群と比較し C7PL, CRIA ともに有意に優れた結果となった。C7PL 1 cm 以上または肩バランス3度以上を術後冠状面バランス不良と定義すると, M群に対しP群でオッズ比16.0, D群でオッズ比9.3となり, P群, D群で術後冠状面バランス不良と相関を認めた。M群においては, 矯正率もD群に対し良好な傾向にあり, かつP群に比して劣ることはなかった。矢状面バランスは各群間で有意差は認められなかった。

以上から, Lenke type1A カーブに対する後方矯正固定術において, MSL を用いた新しい UIV 決定法は, 矯正率, 矢状面バランスを落とさず, より良好な冠状面バランスが得られ臨床的に有用である。

(論文審査の結果の要旨)

椎弓根スクリューの開発により, 思春期特発性側弯症 (adolescent idiopathic scoliosis; AIS) Lenke type1A カーブに対する後方矯正固定術は, 矯正能力・固定保持能力の進歩により術後結果は向上してきた。しかし術後に冠状面バランス不良を来す症例はいまだに存在し, 術後の良好な冠状面バランスを得るための明確な固定範囲決定方法への一定の見解はない。宗像らは, AIS Lenke type 1A カーブにおいて, 術後の良好な冠状面バランス等を得るための固定範囲決定方法を検討した。

宗像らは Modified Shinshu-line; MSL を考案し, 検討した。術前 X線で実際の手術の上位固定椎 upper instrumented vertebra (UIV) が MSL により想定される UIV と一致している群 (M群), 頭側にある群 (P群), 尾側にある群 (D群) に分け検討した。

当院を含めた多施設における AIS Lenke type 1A カーブを有する患者で術後2年以上フォローアップ可能であった45例を対象とした。測定項目は術前・術後2

年時での, C7 Plumb line と CSVL の距離 (C7PL: 体幹バランスの指標), clavicle rib inter angle (CRIA: 肩バランスの指標), 主胸椎カーブの Cobb 角 (カーブの大きさ) とその矯正率, apical vertebral translation (側弯頂椎の側方偏移), SRS-22r (患者立脚型アンケート), 矢状面バランス (SVA, T5-12, T10-L2, T12-S1後弯角) とし, それぞれM群をコントロールとして Dunnett の多重比較を施行した。その結果, 宗像らは次の結果を得た。

1. M群では, P群, D群と比較し C7PL, CRIA ともに有意に優れた結果となった。
2. M群に対し, P群, D群では, 術後冠状面バラン

ス不良との相関があった (オッズ比はそれぞれ16.0, 9.3)。

3. 矯正率は, M群では, D群に比して良好な傾向にあり, P群に比して劣ることはなかった。
4. 矢状面バランスは各群間で有意差は認められなかった。

これらの結果より, Lenke type1A カーブに対する後方矯正固定術において, MSL を用いた新しい UIV 決定法により, 矯正率, 矢状面バランスを落とさず, より良好な体幹・肩バランスが得られることが明らかになった。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。

Mutational Spectrum and Clinical Features of Patients with *LOXHD1* Variants Identified in an 8,074 Hearing Loss Patient Cohort (8,074名の難聴患者における *LOXHD1* 遺伝子変異の種類と臨床像の検討)

前川 カルナ

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 先天発症あるいは小児期に発症する非症候群性難聴に関与する遺伝子は100種類以上同定されている。そのうち常染色体劣性遺伝形式をとるものは70程度同定されている。難聴の原因を特定することは, 罹患者の難聴のタイプ, 随伴症状, 予後予測等を可能にし, 治療介入する上で重要な情報をもたらす。近年, 次世代シーケンサー解析によって頻度の低い稀な遺伝子変異の特定が可能となってきた。内耳有毛細胞に発現している *LOXHD1* 遺伝子は常染色体劣性遺伝形式をとる非症候群性難聴 (DFNB77) の原因遺伝子であるが, 罹患者頻度が低いために報告例が少なく, どのような表現型を呈するかに関しては明らかとなっていなかった。そこで, 本研究では, 8,074名の難聴患者を対象に次世代シーケンサーによる解析を行い, *LOXHD1* 遺伝子変異を持つ患者を同定するとともに, 変異の種類とその表現型を明らかにすることを目的に研究を行った。

【材料および方法】 全国67施設より集められた日本人難聴患者8,074例を対象に, *LOXHD1* 遺伝子を含む既知難聴原因遺伝子68を次世代シーケンサーにて網羅的に解析した。検出された変異を, 変異の種類や健常コントロールにおけるアレル頻度を元にフィルタリングし, *LOXHD1* 遺伝子変異による難聴と考えられる検体に関しては, サンガー法により変異の確認を行った。また, *LOXHD1* 遺伝子変異による難聴患者の臨床情報

(家族歴, 聴力検査, 発症年齢, 難聴の進行, 随伴症状の有無, 人工内耳の効果) について検討を行った。また, 複数家系より高頻度で見出された c.4212+1G>A 変異については *LOXHD1* 遺伝子周辺の SNPs を用いたハプロタイプ解析を行った。

【結果】 次世代シーケンサー解析の結果, *LOXHD1* 遺伝子変異による難聴患者が25家系28例認められた。見出された *LOXHD1* 遺伝子変異は21種類であり, うち13種類は新規変異であった。難聴の発症時期は0~36歳 (平均6.1歳) であり, うち14例は先天性難聴であった。15例 (53.6%) が検査時に難聴の進行を自覚していた。また, 経時的に聴力検査を施行した14例では0.1dB/年~9.3dB/年 (平均3.5dB/年) の難聴の進行を認めた。難聴以外の自覚的症状としては, 6例に耳鳴を認めたが, めまいを認めた例はなかった。また, 詳細な前庭機能検査を6例に実施したが全例異常を認めなかった。検査時の聴力像としては, 14例が水平型, 8例が高音漸傾型, 6例が高音急墜型であった。難聴の程度に関しては, 3例が軽度 (11%), 7例が中等度 (26%), 6例が高度 (22%) 11例が重度 (41%) であった。8例が人工内耳植込術を施行されており, うち術後評価を実施した4例に関しては全例日本語聴取能の大幅な改善を認めた。c.4212+1G>A 変異は28例中18例に認め日本人難聴患者に多く認められる変異であることが明らかとなった。難聴の程度に関しては, 10歳までは軽度~重度難聴とばらつきが大

きいが、10歳以降の患者は全例高度～重度難聴であった。この変異が共通祖先由来であるかの評価を行うため、同変異をホモ接合体で有する6例を対象にハプロタイプ解析を行ったところ、家系間で異なるハプロタイプを有していた。

【考察】日本人難聴患者における *LOXHDI* 遺伝子変異による難聴の頻度は0.37% (28/8,074) であった。難聴の発症時期に関しては85.7% (24/28) が先天性または小児期発症であった。難聴の程度（重症度）に関してははばらつきが大きいものの、c.4212+1G>A 変異を持つ症例では10歳以降には全例高度から重度難聴を呈していた。また、難聴の進行を64.3%に認めたが、進行の程度は多様であった。過去の報告では、*LOXHDI* 遺伝子変異により Fuchs 角膜内皮ジストロフィをきた例が報告されていたが、本研究では眼症状を認めなかった。また、*LOXHDI* 遺伝子が末梢前庭器の有毛細胞にも発現するため前庭機能障害をきたす可能性が考えられたが、本研究では前庭機能障害を呈する例は認めなかった。以上より、*LOXHDI* 遺伝子変異による難聴は、基本的には先天性あるいは小児期発症の進行性難聴を呈するが、重症度や進行速度などに関してははばらつきが大きく、変異の種類や他の因子が関与していると考えられた。また、人工内耳装用により語音弁別能の著明な改善を認めたため、本遺伝子変異を認め人工内耳の適応聴力である場合には、早期の人工内耳による介入が望ましいと考えられる。また、日本人難聴患者に多く認められる c.4212+1G>A 変異は、ハプロタイプ解析により mutation hot spot の可能性が高いと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

LOXHDI 遺伝子変異は常染色体劣性遺伝形式をとる非症候群性難聴 (DFNB77) の原因遺伝子である。*LOXHDI* 遺伝子は内耳の前庭と蝸牛の有毛細胞に発現している遺伝子であり、難聴や前庭機能障害をきたすと推測されていたが、罹患者頻度が低く希少であるため、詳細な表現型に関しては明らかとなっていない。本研究では日本人難聴患者大規模コホートにおける *LOXHDI* 遺伝子変異の頻度と詳細な臨床像を明らかにすることを目的に検討を行った。

日本人難聴患者8,074名を対象に、既知難聴原因遺伝子68遺伝子をターゲットにした次世代シーケンサーによる解析を行い、解析プログラムを用いたフィルタリングを施行し、*LOXHDI* 遺伝子変異による難聴患者を同定した。また、見出された症例の臨床データ

を詳細に分析した。また、複数家系より見出された c.4212+1G>A 変異に関してハプロタイプ解析を行った。

その結果、前川は次の結論を得た。

1. 難聴患者8,074例中28例 (0.37%) が *LOXHDI* 遺伝子変異による難聴と考えられた。
 2. 28例より21種類の *LOXHDI* 遺伝子変異が見出され、うち13種類が新規変異であった。
 3. 28例中24例 (85.7%) が先天性もしくは小児期発症であった。
 4. 高音障害型の聴力像を呈し、徐々に進行し重度難聴に至る例が多く見られた。
 5. 難聴以外の随伴症状は認めなかった。*LOXHDI* 遺伝子は前庭機能障害を呈する可能性も示唆されていたが、詳細な前庭機能検査でも異常は認めなかった。
 6. 25例中19例 (76%) に難聴の進行を認めた。進行の程度は0.1dB～9.3dB/年とばらつきが大きく、変異の種類や他の要因、他の遺伝子等の関与が示唆された。
 7. c.4212+1G>A 変異が28例中18例 (64%) に認められ頻度の高い変異であることが明らかとなった。また、本変異を有する症例は全例10歳までに難聴が進行し高度から重度難聴に至ることが明らかとなった。
 8. c.4212+1G>A 変異は日本人難聴患者のみからの報告されていることより founder 変異の可能性が考えられたが、ハプロタイプ解析の結果、mutational hot spot に生じた変異であると考えられた。
 9. *LOXHDI* 遺伝子変異による難聴患者に対する人工内耳植込術は非常に有効であり、人工内耳装用後の語音弁別能が著明に改善しており、人工内耳植込術の良い適応であることが明らかとなった。
- 以上より、*LOXHDI* 遺伝子変異は随伴症状のない先天性あるいは小児期発症の進行性難聴をきたす例が多く、人工内耳植込術の良い適応であることが明らかとなった。また、本研究では c.4212+1G>A 変異が多数例より検出されたが、本変異は mutational hot spot に生じた変異であることが明らかとなった。また、c.4212+1G>A を有する症例では10歳までに難聴が進行し高度から重度難聴に至ることが明らかとなった。以上、本研究を通じて、*LOXHDI* 遺伝子変異による難聴患者に対する予後の予測や、適切な治療介入の選択に有用な情報が得られた。

したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

The Prevalence and Clinical Characteristics of *TECTA*-Associated Autosomal Dominant Hearing Loss (*TECTA* 遺伝子変異による常染色体優性遺伝形式をとる難聴の頻度および臨床的特徴)

安川 梨香

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】先天性難聴は新生児500~600人に一人の割合で生じる比較的頻度の高い疾患であり、約60%に遺伝的要因が関与するとされている。現在までに、難聴以外の症状を伴わない非症候群性難聴の原因として約120種類の遺伝子が同定されている。*TECTA* 遺伝子は非症候性難聴の原因遺伝子の1つであり、常染色体優性遺伝形式 (DFNA8/12) 及び常染色体劣性遺伝形式 (DFNB22) の両方の遺伝形式をとる。*TECTA* 遺伝子のコードする α -テクトリンは、内耳の蓋膜を構成する細胞外マトリックスのうち、非コラーゲン基質の大部分を占めるグリコプロテインであることが知られている。*TECTA* 遺伝子変異による難聴では変異の部位により、中音域の閾値上昇を伴う皿型もしくは高音域の閾値上昇を伴う高音漸傾型という特徴的な聴力像を呈することが報告されているが、難聴の進行速度などの詳細な臨床像に関しては必ずしも明らかとなっていなかった。そこで、本研究では、常染色体優性遺伝形式を示す日本人感音難聴患者を対象に次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行い、*TECTA* 遺伝子変異による難聴の頻度を明らかにするとともに、遺伝子型と表現型の関連、難聴の進行度合いなど詳細な臨床像を明らかにすることを目的とした。また、複数の家系より認められた変異に関しては、ハプロタイプ解析を行い、同一変異が生じたメカニズムが hot spot mutation か founder mutation についても検討を行った。

【対象と方法】常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴者812例を対象に、次世代シーケンサーを用いた既知難聴原因遺伝子68遺伝子の網羅的解析を行った。見出された *TECTA* 遺伝子変異に関してはサンガー法で確認を行った。また、複数家系に認められた c.5597C>T に関しては周辺の SNPs をもちいたハプロタイプ解析を行った。

【結果】常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者812例のうち *TECTA* 遺伝子変異による難聴患者を26例見出し、常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患

者での有病率は3.2% (26/812) であることを明らかにした。また、*TECTA* 遺伝子変異の見出された症例の聴力をドメイン毎に比較すると、ZPドメインに変異を有する症例では、中音域の閾値上昇を伴う皿型の聴力像を呈することが確認された。また、*TECTA* 遺伝子変異による難聴患者群と日本人コントロール群の間で難聴の進行度合いを比較したところ、同程度の進行であり、遺伝子変異により難聴の進行が加速することは無いことを明らかにした。また、異なる4家系が同一のミスセンス変異 (c.5597C>T:p.Thr1866Met) を有していたため、変異周辺の SNPs を用いてハプロタイプ解析を行ったところ、症例毎に異なるハプロタイプを有しており、hot spot mutation であることが示唆された。

【結論】*TECTA* 遺伝子変異は、常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者において、2番目に頻度の高い原因遺伝子であることが明らかとなった。また、ZPドメインに変異が生じた場合、皿型の聴力図を示すことがわかった。*TECTA* 遺伝子変異による難聴に関しては難聴の進行速度は健常コントロールと同程度であり、加齢性変化を反映している可能性が示唆された。また、ハプロタイプ解析では c.5597C>T (p.Thr1866Met) は異なるハプロタイプより見出されたことより hot spot mutation であることが示唆された。同変異はアメリカ人やスペイン人などの他人種の難聴患者からも見つかっており、人種に関係せず生じる mutational hot spot に生じた変異であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

TECTA 遺伝子は非症候性難聴の原因遺伝子の1つであり、常染色体優性遺伝形式 (DFNA8/12) 及び常染色体劣性遺伝形式 (DFNB22) の両方の原因として知られている。*TECTA* 遺伝子のコードする α -テクトリンは、内耳の蓋膜を構成する細胞外マトリックスの一つであり、非コラーゲン基質の大部分を占めるグリコプロテインである。*TECTA* 遺伝子変異による難聴は、蓋膜の形態異常を生じ、その結果として内耳の外有毛細胞と蓋膜により小さな音の振動を増幅

する蝸牛増幅の機能が障害されることで生じると考えられている。*TECTA* 遺伝子変異による難聴では変異の部位により、中音域の閾値上昇を伴う皿型もしくは高音域の閾値上昇を伴う高音漸傾型という特徴的な聴力像を呈することが報告されているが、難聴の進行速度などの詳細な臨床像に関しては必ずしも明らかとなっていなかった。

本研究では、常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者を対象に次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行い、日本人難聴患者における *TECTA* 遺伝子変異による難聴の頻度を明らかにするとともに、遺伝子型と表現型の関連、難聴の進行度合いなど詳細な臨床像を明らかにすることを目的とした。また、複数の家系より認められた変異に関しては、ハプロタイプ解析を行い、変異が生じたメカニズムが hot spot mutation か founder mutation かを検討した。具体的には、常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者 812 例を対象に、次世代シーケンサーを用いて既知難聴原因遺伝子 68 遺伝子を網羅的に解析した。次世代シーケンスにより見出された *TECTA* 遺伝子変異はサンガー法で確認するとともに、ACMG ガイドライン 2015 に基づいて病原性の判断を行った。加えて、Minor Allele Frequency および CADD スコアを用いて病原性の評価を行った。

その結果、安川は次の結論を得た。

1. 常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴者 812 例

中 26 例 (3.2%) が *TECTA* 遺伝子変異による難聴と考えられた。

2. 本研究で見出した *TECTA* 遺伝子変異のうち、18 種類は新規変異、4 種類は既知変異であった。
3. *TECTA* 遺伝子変異による難聴は、常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者で 2 番目に頻度の高い原因遺伝子であることを明らかにした。
4. *TECTA* 遺伝子変異による難聴は、変異の位置するドメインによって表現型に特徴があり、ZP ドメインの変異では皿型の聴力像を呈することが明らかとなった。
5. *TECTA* 遺伝子変異による難聴患者における難聴の進行速度は、健常コントロールにみられる加齢性難聴の進行速度と同程度であることを明らかにした。
6. 異なる 4 家系より検出された c.5597C>T 変異 (p.Thr1866Met) 周辺のパロタイプは家系毎に異なっていた。また、アメリカ人やスペイン人などの他人種の難聴患者からも報告されており、mutational hot spot に生じた変異と考えられた。

以上より、*TECTA* 遺伝子変異による難聴は常染色体優性遺伝形式をとる難聴の中で比較的頻度が高い疾患であることを明らかにした。また、本研究で明らかとなった詳細な臨床像は *TECTA* 遺伝子変異による難聴例の予後の予測や治療法選択の際に重要な情報として活用可能である。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Recovery of Cryo-injured Rabbit Urethras by Biofabricated C-shaped Adipose-derived Mesenchymal Cell Structures (ウサギ尿道凍結傷害モデルを用いた C 型脂肪由来間葉系細胞構造体による尿道再生の試み)

Gautam Silwal Sudha

(論文の内容の要旨)

【Background and Purpose】Urethral tissue damage can cause stress urinary incontinence or urinary retention, and there are very few long-term, effective treatments. In our previous study, we have shown that direct injection of single autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (AMCs) into cryo-injured urethra of rabbits restored structures and function. However, there was the major hindrance with the direct injection of cells having low survival, retention and integration of transplanted cells. Therefore, for structural and functional recovery of

urethral tissues, we designed and constructed C-shaped AMCs by using three-dimensional (3D) bioprinter system, which could be transplanted in damaged urethras without obstructing the lumen.

【Material and Methods】Adipose tissues harvested from 10-weeks old female New Zealand White rabbits were cultured and labeled with a fluorescent cell linker. After the culture, the adherent proliferating cells were seeded into 96 well plates to form cell-aggregation called spheroid. All spheroids were positioned in 3D structure according to a predesigned configuration to form C-shape by a robotic biofabri-

cation system. The biofabricated structures were perfusion cultured for 7 days. Exposed urethra was sprayed with liquid nitrogen for 20 seconds, and small incision within the cryo-injured region was made. Following, the structure was immediately transplanted into the incision (n=4). As control, sham surgeries without the structure were performed (n=4). Two and four weeks after transplantation, the urethras were harvested for histological and immunohistological analysis.

【 Results 】 Before transplantation, the C-shaped AMC structures expressed the mesenchymal cell marker STRO1, and extracellular matrices; integrin and cadherin. In the gross anatomy, sham-operated urethra seemed narrowed and diverted. However, AMC structure transplanted urethra seemed wider and straight. Histological investigations showed that there was presence of distinct and regenerated muscle structures at 4 weeks after transplantation. The cells within the transplanted structures differentiated into skeletal, or smooth muscle cells and formed layered muscle structures at the surrounding neighborhood of transplanted regions at 4 weeks after transplantation. Also, the cells within the structures were positive for nerve cell markers. The cells within the structures secreted growth factors; vascular endothelial growth factor and nerve growth factor, and cytokines; transforming growth factor- β 1 and tumor necrosis factor- α . At two and four weeks after sham surgery in which no biofabricated structure was transplanted, the urethral wound site contained collagen fibers in the extracellular matrix along with damaged skeletal and smooth muscle layers. However, in the transplanted urethral tissues, the collagen fibers were located between the recovering skeletal and smooth muscle layers. The transplanted urethras decreased P4HB- and HIF1 α -positive cells, and apoptotic cells compared to the control urethras.

【 Conclusions 】 The biofabricated C-shaped AMC structures might have potential to regenerate the urethra by differentiating into skeletal muscle cells, smooth muscle cells, and nerve cells. Furthermore, these cells secreted growth factors and/or cytokines

that likely enhanced myogenesis and neurogenesis. The transplanted urethra showed that development of urethral strictures during the recovery process was inhibited. Therefore, the transplantation of C-shaped biofabricated AMC structures has the potential to provide novel and effective treatments for storage or voiding dysfunctions associated with damaged urethras.

(論文審査の結果の要旨)

Stress urinary incontinence is an involuntary leakage of urine through urethra during physical activity that causes an increase in abdominal pressure, and there are few long-term, effective treatments.

We designed and constructed C-shaped structures composed of adipose-derived mesenchymal cells (AMCs) by using three-dimensional (3D) bioprinter system, which could be transplanted in damaged urethras without obstructing the lumen for the structural and functional recovery of the urethral tissues. Adipose tissues harvested from rabbits were cultured and labeled with a fluorescent cell linker, PKH26. After the labeling, the adherent proliferating cells were seeded in 96-well plates to make spheroids. The formed spheroids were assembled according to predesigned configuration by robotic biofabrication system. The biofabricated structures were perfusion cultured for 7 days to attain the desired structural organization and robustness.

Exposed urethra was sprayed with liquid nitrogen for 20 seconds, and a small incision within the cryo-injured region was made. Following the biofabricated structure was immediately transplanted within the incision and the incision was closed. As controls, sham operations without the structure was performed. Finally, two and four weeks after operation, the urethras were harvested for histological and immunohistological analyses.

Gautam Silwal Sudha showed results of these investigations, as below.

1. In gross anatomy, sham-operated urethra seemed narrowed and diverted. However, the structure-transplanted urethra was patent.
2. At 4 weeks after transplantation, cells within the transplanted structure differentiated into skeletal

- muscle cells, smooth muscle cells or nerve cells. These differentiated cells formed distinct muscle layers at the surrounding neighborhood of the transplanted structures.
3. The AMCs within the transplanted structures secreted higher growth factors and cytokines comparing to sham-operated control urethras.
 4. Within the control urethras, collagen fibers invaded the spaces of the damaged skeletal and smooth muscle layers. In contrast, in the structure-transplanted urethra, collagen fibers were located between the recovering skeletal and smooth muscle layers.
 5. The transplanted urethra decreased P4HB-

HIF1- α positive or apoptotic cells comparing to sham controlled urethra.

These results suggested that the biofabricated C-shaped structures might regenerate urethra by differentiating into muscles and nerve cells, and secretion of growth factors and cytokines that likely enhanced myogenesis and neurogenesis. Therefore, the transplantation of biofabricated C-shaped AMC structures has potentials to be effective treatments for stress urinary incontinence associated with damaged urethras.

以上の研究結果から主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Inhibition of CASK expression by adeno associated virus-mediated RNA interference in medial prefrontal cortex affects social behavior in the adult mouse (アデノ随伴ウイルスを用いたRNA干渉による内側前頭前皮質でのCASKの発現抑制で成体マウスの社会行動が阻害される)

曹 雪 杉

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK) は, membrane associated guanylate kinase protein (MAGUK) ファミリータンパク質の一種であり, 主にシナプス終膜を裏打ちする形で存在し, 様々なタンパク質と結合することによりシナプスの形成や成熟に寄与していることが知られている。CASK 遺伝子はX染色体上に存在し, 近年, 様々な神経発達障害の患者から遺伝子変異が見つまっている。この中でも特に, X染色体劣性遺伝性神経発達障害である microcephaly with cerebellar and pontine hypoplasia (MICPCH) 症候群 (小脳・橋低形成を伴う小頭症候群) の原因遺伝子として注目されている。MICPCH 症候群は女性特有の疾患であり, 小脳・橋低形成の他に, 社会性の異常, 知的障害, 点頭てんかんなどを伴うことが知られている。私が所属する分子細胞生理学教室では, これまでCASKのノックアウトマウスを用いて, MICPCH 症候群の病態研究を行ってきた。CASKのオスマたはホモのノックアウトマウスは, 生直後致死となる。CASKのメスヘテロノックアウトマウスは, 正常マウスに比べて小さく, 成長遅延を伴うが, 多くの個体で成獣になるまで生き延びる。これまでの解析により, CASKヘテ

ロノックアウトマウスの脳では, X染色体不活性化によりCASKが正常に発現する細胞と, CASKの欠損細胞がランダムなモザイク状に入り混じっており, これによって作られる神経回路異常が, 病態の原因となっていることを見出している。CASKが完全に欠損した遺伝子変異は, 女性患者からしか見つからないが, これはCASKの完全欠損では男性の場合胎生致死になるからだと考えられる。一方, CASKのハイボモルフ変異は男性患者からも発見されており, 社会行動異常, 知的障害などの症状を呈することが知られている。男性患者の場合, X染色体不活性化が行わないため, CASKヘテロノックアウトマウスで得られた知見とは別の病態メカニズムによって発症している可能性が考えられる。本研究では, CASK変異によって引き起こされる男性患者での神経発達障害の病態メカニズムを研究する目的で, 代表的な症状である社会行動の異常に着目し, 責任領域として知られる前頭前皮質でCASKの発現をノックダウンすることで, どのような異常がみられるかについて検討を行った。

【材料および方法】 生後20日前後のオスのC57Bl/6マウスを脳定位固定器にセットし, 頭皮を剥がし, 頭蓋骨に穴を開け, 両側前頭前皮質にCASK shRNA発現

アデノ随伴ウイルス (AAV) またはコントロールとして EGFP 発現 AAV をインジェクションした。2 か月齢以降のウイルスインジェクションマウスに対して、オープンフィールドでの行動観察、幼若マウスとの接触試験、three-chamber によるマウス標的と無生物標的との接触試験 (社会的認識)、既知マウスと新奇マウスとの接触試験 (社会的記憶) を行い、統計学的に評価を行った。

【結果】前頭前皮質特異的 CASK ノックダウンマウスでは、オープンフィールドでの一定時間の移動距離の低下が見られたものの、移動速度や不安様行動、繰り返しの行動 (over grooming) の異常は見られなかった。幼若マウスとの接触に低下がみられた。Three-chamber 試験では、無生物標的よりマウス標的に対する接触時間が多く、社会的認識能力に異常は見られなかったが、既知マウスと新奇マウスで接触時間に有意な差がみられず、社会的記憶が低下していることを示す結果が得られた。

【結論】今回の研究は、CASK の発現を操作したマウスで行動実験を行った世界で最初の例である。前頭前皮質で CASK の発現を抑制することにより、神経発達障害の代表的な症状である社会行動の異常が見られ、特に社会的記憶力が障害されていることを突き止めた。本研究により、CASK 変異による神経発達障害の病態を解明していく上での礎となる知見を得ることができた。

(論文審査の結果の要旨)

シナプス足場タンパク質 CASK は、シナプスの形成、成熟に寄与していることが知られている。近年、CASK の遺伝子変異が神経発達障害の患者から相次いで発見されるようになり、CASK の異常と神経発達障害との関係が指摘されるようになった。CASK 遺伝子は X 染色体上に存在し、CASK 遺伝子の完全欠損では致死となる。CASK 遺伝子病で有名なものに MICPCH 症候群という小脳。橋低形成を伴う神経発達障害があり、患者の多くは女性である。MICPCH

症候群の患者では X 染色体不活性化により CASK 発現細胞と非発現細胞がモザイク状に分布し、興奮性・抑制性シナプス機能のバランス異常が起こることを以前の研究で突き止めている。一方、CASK のハイボモルフ変異は、男性の神経発達障害の患者からも多数発見されている。CASK ハイボモルフ変異と神経発達障害との因果関係を調べるため、神経発達障害の代表的な症状である社会行動の異常に着目し、研究を行った。オスマウスの脳のうち、社会行動の異常との関係が指摘されている前頭前皮質の深層にアデノ随伴ウイルスを用いて CASK に対する shRNA をを導入し、この領域特異的に CASK の発現を抑制させた。このマウスを用いて、オープンフィールドと three-chamber を用いて行動解析を行った。その結果、曹雪杉は次の結果を得た。

1. オスマウスの前頭前皮質での CASK のノックダウンで、社会行動に異常をきたした。
2. オスマウスの前頭前皮質での CASK のノックダウンで、幼若マウスに対する社会的相互作用が低下した。
3. オスマウスの前頭前皮質での CASK のノックダウンでは、社会的記憶に低下がみられた。

これらの結果より、マウス前頭前皮質での CASK 遺伝子の正常な発現が障害されると、社会行動の異常をきたすことが見いだされた。CASK はシナプスの形成や成熟に関わる分子と複合体を形成して機能することから、CASK の障害で前頭前皮質における神経回路の機能不全が引き起こされていると考えられ、これが CASK 変異による神経発達障害の病態メカニズムになっていることが示唆された。本研究は、CASK の機能を行動レベルで解析した世界で最初の研究であり、CASK 異常によって起こされる神経発達障害の病態解明の礎となるものである。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。

Non-invasive detection and differentiation of cardiac amyloidosis using ^{99m}Tc-pyrophosphate scintigraphy and ¹¹C-Pittsburgh compound B PET imaging (^{99m}Tc-PYP 心筋シンチと¹¹C-PiB PET を用いた非侵襲的な心アミロイドーシスの検出と鑑別)

高 曾 根 健

(論文の内容の要旨)

【背景】心アミロイドーシスは心臓の間質にアミロイ

ド線維が沈着し、形態的かつ機能的な異常をきたす病態である。心アミロイドーシスの主たる病型には、免

疫グロブリン軽鎖 (AL) アミロイドーシス, 遺伝性トランスサイレチン (ATTRv) アミロイドーシス, 野生型トランスサイレチン (ATTRwt) アミロイドーシスがある。病型によって予後と治療法が異なるため, 沈着したアミロイドの検出と病型分類が重要であり, 通常心筋生検が必要となる。心筋生検には侵襲の問題があるため, アミロイドイメーシングによる診断の重要性が高まっている。

【目的】 ^{99m}Tc -Pyrophosphate scintigraphy (PYP) と ^{11}C -Pittsburgh compound B PET Imaging (PiB) を用いて, 非侵襲的に心アミロイドーシスの検出と病型分類を行う。

【方法】 対象は信州大学医学部附属病院で診断した全身性アミロイドーシス患者 (AL, ATTRv, ATTRwt アミロイドーシス) の内, 2015年9月1日から2019年7月31日の期間に PYP と PiB の両検査が施行された患者47例。内訳は, AL アミロイドーシス患者17例, ATTRv アミロイドーシス患者22例, ATTRwt アミロイドーシス患者8例。ATTRv アミロイドーシス患者の *TTR* 遺伝子型は, V30M (p.V50M) 変異が16名, 非 V30M 変異が6名。V30M 型 ATTRv アミロイドーシス患者においては, 発症年齢50歳未満を若年発症, 50歳以上を高年齢発症と定義した。臨床的心障害に関しては, 心臓超音波検査で平均左室壁厚12 mm 以上, 心電図異常 (低電位かつ QS パターン, 洞不全症候群, 房室ブロック, 心房細動のいずれか), BNP >100 pg/ml 以上のいずれかを満たした場合を臨床的心障害ありと判定した。心筋への核種の集積に関しては, PYP の集積は既報告の visual score による grading system (胸骨を基準として集積の程度を半定量的に評価) を用い, grade 2以上を集積ありと判定した。PiB の集積は SUV (Standardized Uptake Value) max を用い, 患者の左心房内の循環血液プール SUV max の平均+2SD (2.11) 以上を集積ありと判定した。**【結果】** 臨床的心障害ありの患者は全例, PYP あるいは PiB のいずれかで心アミロイドーシスを検出することができた。病型の鑑別に関しては, AL アミロイドーシス患者は全例 PYP 集積陰性・PiB 集積陽性 (PiB パターン) を呈し, ATTRwt アミロイドーシス患者は全例 PYP 集積陽性・PiB 集積陰性 (PYP パターン) を呈した。一方, ATTRv アミロイドーシス患者は PiB パターンか PYP パターンのいずれかを呈し, 若年発症 V30M 型は PiB パターンを, 高年齢発症 V30M 型と非 V30M 型は PYP パターンを呈した。

【結論】 2種のアミロイドイメーシング法と, ATTRv と ATTRwt を区別するための *TTR* 遺伝子検査を組み合わせることで, 非侵襲的に主たる3種類の心アミロイドーシスの検出と病型分類が可能である。

(論文審査の結果の要旨)

心アミロイドーシスは心臓の間質にアミロイド線維が沈着し, 形態的かつ機能的な異常をきたす病態である。心アミロイドーシスの主たる病型には, 免疫グロブリン軽鎖 (AL) アミロイドーシス, 遺伝性トランスサイレチン (ATTRv) アミロイドーシス, 野生型トランスサイレチン (ATTRwt) アミロイドーシスがある。病型によって予後と治療法が異なるため, 沈着したアミロイドの検出と病型分類が重要であり, 通常心筋生検が必要となる。心筋生検には侵襲の問題があるため, アミロイドイメーシングによる診断の重要性が高まっている。 ^{99m}Tc -Pyrophosphate scintigraphy (PYP) と ^{11}C -Pittsburgh compound B PET Imaging (PiB) を用いて, 非侵襲的に心アミロイドーシスの検出と病型分類を行う。

対象は信州大学医学部附属病院で診断した全身性アミロイドーシス患者 (AL, ATTRv, ATTRwt アミロイドーシス) の内, 2015年9月1日から2019年7月31日の期間に PYP と PiB の両検査が施行された患者47例。内訳は, AL アミロイドーシス患者17例, ATTRv アミロイドーシス患者22例, ATTRwt アミロイドーシス患者8例。ATTRv アミロイドーシス患者の *TTR* 遺伝子型は, V30M (p.V50M) 変異が16名, 非 V30M 変異が6名。V30M 型 ATTRv アミロイドーシス患者においては, 発症年齢50歳未満を若年発症, 50歳以上を高年齢発症と定義した。臨床的心障害に関しては, 心臓超音波検査で平均左室壁厚12 mm 以上, 心電図異常 (低電位かつ QS パターン, 洞不全症候群, 房室ブロック, 心房細動のいずれか), BNP >100 pg/ml 以上のいずれかを満たした場合を臨床的心障害ありと判定した。心筋への核種の集積に関しては, PYP の集積は既報告の visual score による grading system (胸骨を基準として集積の程度を半定量的に評価) を用い, grade 2以上を集積ありと判定した。PiB の集積は SUV (Standardized Uptake Value) max を用い, 患者の左心房内の循環血液プール SUV max の平均+2SD (2.11) 以上を集積ありと判定した。

その結果, 高曾根は次の結論を得た。

1. 臨床的心障害ありの患者は全例, PYP あるいは PiB のいずれかで心アミロイドーシスを検出するこ

とができた。

2. 病型の鑑別に関しては, AL アミロイドーシス患者は全例 PYP 集積陰性・PiB 集積陽性 (PiB パターン) を呈し, ATTRwt アミロイドーシス患者は全例 PYP 集積陽性・PiB 集積陰性 (PYP パターン) を呈した。一方, ATTRv アミロイドーシス患者は PiB パターンか PYP パターンのいずれかを呈し, 若年発症 V30M 型は PiB パターンを, 高齢発

症 V30M 型と非 V30M 型は PYP パターンを呈した。

これらの結果より, 2 種のアミロイドイメージング法と, ATTRv と ATTRwt を区別するための TTR 遺伝子検査を組み合わせることで, 非侵襲的に主たる 3 種類の心アミロイドーシスの検出と病型分類が可能である。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。

The Gly82Ser mutation in AGER contributes to pathogenesis of pulmonary fibrosis in combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) in Japanese patients (AGER 遺伝子の Gly82Ser 変異は日本人の気腫合併肺線維症における肺線維化に関与する)

金城 匠

(論文の内容の要旨)

【はじめに】気腫合併肺線維症 (combined pulmonary fibrosis and emphysema; CPFE) は胸部 CT にて上葉優位に気腫性変化, 下葉優位に線維化を伴う臨床症候群である。気腫性変化のみを伴う慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease; COPD) とは異なる臨床的特徴を持つ。CPFE において気腫性変化に加えて線維化を発症する機序は明らかにされていない。The receptor for advanced glycation end products (RAGE) は様々な細胞表面に発現するパターン認識受容体の一つであり, 多因子のリガンドと反応し, 様々なサイトカイン様活性を発揮することで組織リモデリングや炎症病態の形成に関与する。RAGE は肺組織に高発現し, COPD, 特発性肺線維症, 肺癌等の肺疾患との関連が報告されている。炎症のバイオマーカーと言われている soluble RAGE (sRAGE) はリガンドを捕捉し, RAGE との相互作用を阻害するデコイレセプターとして働き, 上述の肺疾患で低下することが報告されている。本研究では CPFE と COPD の病態の違いに RAGE をコードする AGER 遺伝子多型が関連するか検討した。

【方法】当院を受診した50歳以上で10 pack years 以上の喫煙歴を有し, 精密呼吸機能検査および胸部 CT が施行された CPFE 患者111人, COPD 患者337人を対象とした。胸部 CT における気腫性変化および線維化の程度を視覚的評価法によって評価した。血液検体より genomic DNA を抽出し, RAGE をコードする AGER 遺伝子 (the gene encoding RAGE) 内の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) 3 種類 rs2070600 (Gly82Ser), rs1800625, rs2853807に

ついて, TaqMan Probe を用いた Real Time PCR 法 (StepOne Plus, ABI) でアレルタイピングを行った。血清 sRAGE 値は ELISA 法によって測定した。

【結果】CPFE 群と COPD 群の 2 群間において肺気腫の程度に有意差は認められなかった。2 群間において rs2070600 の遺伝子型頻度分布に有意差が認められ ($P_c=0.033$), minor T allele が CPFE 群に高頻度で認められた (Odds Ratio[OR]1.84; $P_c=0.015$)。また, dominant model で minor T allele は CPFE と有意な相関を示した (OR 1.93; $P_c=0.018$)。解析した 3 つの SNP における遺伝子型と肺癌の間には有意な関連は認められなかった。COPD 群と比較して CPFE 群において血清 sRAGE は有意に低値であった ($P=0.014$)。CPFE 群において血清 sRAGE 値を目的変数とした重回帰分析を行ったところ, 血清 sRAGE 低値は rs2070600 の minor T allele と有意な関連が認められたが ($P=0.020$), COPD 群において有意な関連は認められなかった。

【考察】rs2070600 の遺伝子型は特発性肺線維症, 肺気腫, 肺癌の病態に関連し, 血清 sRAGE 値は特発性肺線維症, 肺気腫, 肺癌および rs2070600 の minor T allele の保有で低下すると報告されているが, 一定の見解は得られていない。本研究では, 2 群間において肺気腫の程度に有意差は認められず, CPFE と COPD の相違点は肺の線維化の有無であることから, rs2070600 の遺伝子型が CPFE における線維化に関連すると推測された。CPFE 群において血清 sRAGE はより低値であったが, rs2070600 の minor T allele の頻度の相違, 線維化の有無, 肺癌の頻度の相違に関連していると推測された。そこで CPFE 群における血清 sRAGE 値を

目的変数とする重回帰分析を行ったところ、rs2070600の遺伝子型における minor T allele のみに有意な相関が認められた。これらの所見より RAGE が CPFЕ における肺の線維化の病態に関連することが示唆された。**【結論】** RAGE をコードする *AGER* 遺伝子の SNP rs2070600 (Gly82Ser) は CPFЕ の線維化の病態に関連していることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

CPFЕ は胸部 CT にて上葉優位に気腫性変化、下葉優位に線維化を伴う臨床症候群である。気腫性変化のみを伴う COPD とは異なる臨床的特徴を持つ。CPFЕ において気腫性変化に加えて線維化を発症する機序は明らかにされていない。RAGE は様々な細胞表面に発現するパターン認識受容体の一つであり、多因子のリガンドと反応し、様々なサイトカイン様活性を発揮することで組織リモデリングや炎症病態の形成に関与する。RAGE は肺組織に高発現し、COPD、特発性肺線維症、肺癌等の肺疾患との関連が報告されている。炎症のバイオマーカーと言われている sRAGE はリガンドを捕捉し、RAGE との相互作用を阻害するデコイレセプターとして働き、上述の肺疾患で低下することが報告されている。本研究では CPFЕ と COPD の病態の違いに RAGE をコードする *AGER* 遺伝子多型が関連するか検討した。

当院を受診した50歳以上で10 pack years 以上の喫煙歴を有し、精密呼吸機能検査および胸部 CT が施行された CPFЕ 患者111例、COPD 患者337例を対象とした。*AGER* 遺伝子内の一塩基多型である rs2070600 (Gly82Ser)、rs1800625、rs2853807について TaqMan Probe を用いた Real Time PCR 法でアレルタイプ

グを行った。血清 sRAGE 値は ELISA 法によって測定した。

その結果、金城は次の結論を得た。

1. CPFЕ 群と COPD 群の 2 群間において肺気腫の程度に有意差は認められなかった。2 群間において rs2070600 の遺伝子型頻度分布に有意差が認められ ($P=0.033$)、minor T allele が CPFЕ 群に高頻度で認められた (OR 1.84 ; $P=0.015$)。また、dominant model で minor T allele は CPFЕ と有意な相関を示した (OR 1.93 ; $P=0.018$)。
2. COPD 群と比較して CPFЕ 群において血清 sRAGE は有意に低値であった ($P=0.014$)。CPFЕ 群において血清 sRAGE 値を目的変数とした重回帰分析を行ったところ、血清 sRAGE 低値は rs2070600 の minor T allele と有意な関連が認められたが ($P=0.020$)、COPD 群において有意な関連は認められなかった。

2 群間において肺気腫の程度に有意差は認められず、CPFЕ と COPD の相違点は肺の線維化の有無であることから rs2070600 の遺伝子型が CPFЕ における線維化に関連することが示唆された。また、CPFЕ 群における血清 sRAGE 値を目的変数とする重回帰分析で、rs2070600 の遺伝子型における minor T allele のみに有意な相関が認められことから、RAGE をコードする *AGER* 遺伝子多型 rs2070600 (Gly82Ser) は CPFЕ の線維化の病態に関連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。

Clinical characteristics of patients with myalgia as the initial manifestation of small and medium sized vasculitis : aretrospective study (筋痛を初発症状とした小型・中型血管炎の臨床的特徴)

牛 山 哲

(論文の内容の要旨)

【背景】 原発性全身性血管炎 (PSV) は血管壁に炎症を呈する炎症性自己免疫疾患であり、障害血管の種類や血管径で疾患が分類されている。血管内腔狭窄に伴う虚血性変化、血管壁破綻による出血性変化および炎症波及により、障害血管が栄養する領域の器官障害を呈する。結節性多発動脈炎 (PAN) は中型血管炎、抗好中球細胞質抗体関連血管炎 (AAV) である顕微鏡的

多発血管炎 (MPA)、多発血管炎性肉芽腫症 (GPA) および好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (EGPA) は小型血管炎として分類される。免疫複合体沈着を伴わない壊死性血管炎が AAV および PAN の病理学的特徴であり、いずれも重篤な臓器障害を起こす可能性があるため、早期に診断し迅速な治療導入を行うことが求められる。一方で、筋痛は PSV に認める一般的症状であるが、筋痛を初期症状として発症することがあり、

早期診断において重要な症候であると考える。

【目的】本研究では初期症状として筋痛を呈する AAV および PAN 患者の臨床的特徴と診断過程について明らかにする。

【方法】2006年9月から2019年10月の期間に当科を受診し、AAV もしくは PAN と診断された患者102名の診療録を後方視的に調査。疾患分類は2012年 Chapel Hill Consensus Conference (CHCC) の血管炎分類および European Medical Agency (EMA) のアルゴリズムに基づいて行い、診断および臨床背景解析のための臨床情報が不十分な場合と、悪性腫瘍および感染症の合併患者を除外した。93名(平均年齢62歳, 男性35名/女性58名)を本研究の対象とした。疾患分類の内訳は、MPA 40名, GPA 19名, EGPA 13名, PAN 21名。初発症状で筋痛を呈する患者を筋痛群, その他を非筋痛群に分け、筋痛の部位、臨床所見を比較した。筋痛の部位は診察記録より、頸部、上肢近位・遠位、下肢近位・遠位に区分。血液検査データと Birmingham vasculitis activity score version 3 (BVAS) の項目に基づいた臨床所見を評価した。筋痛群では、筋 MRI および筋病理所見について評価を行い、STIR 画像の高信号変化および CHCC 基準に合致する壊死性血管炎を陽性と判断した。

【結果】93名中21名で筋痛を認め、12名が MPA, 2名が GPA, 2名が EGPA, 5名が PAN に分類された。BVAS は非筋痛群 (17.2 ± 7.7) と比較し筋痛群 (11.8 ± 7.0) で有意に低く ($p=0.0034$)、関節痛の合併頻度は非筋痛群 (15名) よりも筋痛群 (10名) において高かった ($p=0.0178$)。神経障害の合併頻度は非筋痛群 (48名) よりも筋痛群 (8名) において低く ($p=0.0185$)、特に多発単神経炎は非筋痛群 (31名) と比較して筋痛群 (3名) で有意に少なかった ($p=0.0129$)。抗好中球細胞質抗体の陽性率と CRP などの検査値は筋痛群、非筋痛群間で有意差はなく、CK 値は筋痛群の MPA, EGPA, PAN の患者 1 名ずつ (580 U/L, 307 U/L, 926 U/L), 非筋痛群の PAN 1 名 (410 U/L) で上昇を認め、CK 値の上昇頻度は筋痛群で高かった ($p=0.0348$)。一方、CK の上昇を認めなかった筋痛群患者ではアルドラーゼ値も基準値範囲内であった。筋痛部位は21名全例で下肢筋痛を呈し、18名で下腿筋痛を認めた。頸部痛 (3名)、上肢筋痛 (11名) と比較し、下肢筋痛の頻度は有意に高かった ($p<0.0001$, $p=0.0011$)。筋生検が施行された MPA 7 名および PAN 3 名では筋痛が主体であり、

生検対象となり得る他の関連臓器の合併に乏しい傾向が見られた。

筋生検を施行した全例で筋 MRI が施行され、罹患筋の T2強調像高信号が確認された。MRI で信号変化を示した腓腹筋もしくは大腿四頭筋から生検を施行し、MPA 患者 5 名, PAN 患者 3 名で壊死性血管炎の所見が確認された。MPA 患者 2 名は血管壁にフィブリノイド変性のない炎症細胞の浸潤を示したが、診断のための病理学的所見としては不十分であり、EMA のアルゴリズムの代用マーカーで診断に至った。10名とも筋破壊・壊死所見は認めなかった。

【結論】小型・中型血管炎において、下肢の筋痛は初期症状となる可能性がある。下肢の筋痛を主症状として発症する患者では、筋生検による病理学的検索で壊死性血管炎を証明することにより、早期診断が可能となり得る。筋 MRI は、筋障害部位の検出および筋生検部位の決定にその有用性が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

筋痛は全身性炎症性血管炎で認める一般的な症状であるが、筋痛を初発症状として発症する血管炎が経験される。血管炎は重篤な臓器障害を起こすことから、筋痛は早期診断において重要な症候と考える。本研究は初期症状として筋痛を呈する小型血管炎の ANCA 関連血管炎および中型血管炎の結節性多発動脈炎患者の臨床的特徴と診断過程を明らかにすることを目的とした。

2006年9月から2019年10月の期間に当科を受診し、ANCA 関連血管炎、結節性多発動脈炎と診断し、治療を行った93名を対象とし診療録を後方視的に調査した。初診時に筋痛を呈する群を筋痛群、筋痛を呈さない群を非筋痛群に分類し、筋痛部位、血液検査データ、Birmingham Vasculitis Score (BVAS) に基づいた臨床所見を比較し、MRI を撮像した患者は画像所見、筋生検を行った患者は病理組織所見を検討した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 93名中21名で筋痛を呈しており、その全例で下肢筋痛を認め、頸部・上肢筋痛に比べ下肢筋痛の頻度は有意に高かった。
2. 筋痛群の BVAS は有意に低く、関節痛の合併頻度が高く、神経障害の合併頻度が低かった。
3. 筋痛群の10名は筋以外に生検に適した障害臓器を認めなかったため、筋 MRI T2強調像で高信号変化を認めた下肢筋から筋生検を行い、8名で壊死性血管炎の所見を認め、診断に至った。

これらの結果より、筋痛を初期症状とする小型・中型血管炎において下肢の筋痛は初発症状となる可能性があり、下肢の筋痛を主症状とする患者では、筋生検による病理学的検索で筋痛を証明することにより、早期診断が可能となり得る。また、筋MRIは筋障害部

位の検出および筋生検部位の決定に有用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。

Detection of swallowing disorders using a multiple channel surface electromyography sheet: a preliminary study (複数チャンネルの表面筋電図シートを用いた嚥下障害の評価：初期研究)

小 山 吉 人

(論文の内容の要旨)

【背景】嚥下は咽頭筋の複雑な連携活動により行われる。嚥下の評価方法として、嚥下造影検査や嚥下内視鏡や嚥下音等があるが、時にこれらは複雑で侵襲的である。誰でも手軽にできる嚥下機能評価があれば患者のQOLは向上すると思われる。表面筋電図の評価が嚥下機能評価において有効といわれているが、表面筋電図を正しい位置に貼るために解剖学的な知識が必要であり普及していない。そのため、我々は複数の表面電極が一体となり装着しやすいセンサシートを開発した。健常者および嚥下障害患者に利用し嚥下の機能を評価できる可能性に関して検証した。

【対象および方法】10人の健常者(29.5±3.9歳、男性8人・女性2人)および18人の嚥下障害患者(67.8±12.1歳、男性15人・女性3人)を対象に嚥下造影検査施行時に頸部に我々の開発したセンサシートおよび喉頭マイク(SH-12jK, 有限会社南豆無線電機社)を装着し表面筋電図の測定を行った。健常者は反復唾液嚥下テストにて3回以上、改定水飲みテストにて4点以上のものとした。嚥下障害患者は脳血管疾患後、頭頸部癌切除再建後、廃用症候群の3群よりなる。我々の開発したシートは高さ150mm、最大幅62mm、最大厚み3mmであり甲状軟骨を指標に左側頸部に貼り付けるものである。配置されている表面筋電図電極により舌骨上筋群の上部(位置A)、舌骨上筋群の下部(位置B)、舌骨下筋群の上部(位置C)、舌骨下筋群の下部(位置D)の筋電図を測定するものである。嚥下開始は嚥下音で判断し、安静時の筋活動量の2倍を超えた点を筋活動開始点、最初に下回った点を筋活動終了点とした。筋活動開始点および筋活動終了点を基に筋活動継続時間、筋活動パターン(各計測点の活動順位)を評価し、健常者と嚥下障害患者間で比較を行った。検査食としてバリウムゼリースライス、ヨー

グルト3cm³、とろみ水3ml、水3mlを用いた。健常者は検査食全ての検査が行えたが、嚥下障害患者は誤嚥を防ぐため嚥下造影検査で得られた評価に基づき、使用する検査食およびその検査回数を決定した。統計学的検討では、筋活動継続時間に関してMann-Whitney U testを、筋活動パターンに関してFisherの正確確率検定を用いた。

【結果】誤嚥を防ぐための検査数の制約、データクリーニングにより解析に使用した値の割合は健常者が89%と高く、嚥下障害患者が65%と低かった。その中で特に脳血管疾患後患者のゼリー、ヨーグルト、とろみ水を用いた検査では41%と低かった。筋活動継続時間においては、位置Bにて、ゼリー、とろみ水、水において嚥下障害患者の方が筋活動継続時間の有意な短縮を認めた。また、位置Dにて、ヨーグルトにおいて嚥下障害患者の方が筋活動継続時間の有意な延長を認めた。

筋活動パターンに関して、健常者は位置AもしくはBから始まるパターンが多かったが、嚥下障害患者の水において位置Dから始まるパターンの割合が高かった。

【考察】健常者と嚥下障害患者で舌骨上筋群では筋活動継続時間の短縮、舌骨下筋群では筋活動継続時間の延長を認めた。舌骨下筋群での筋活動継続時間の延長は嚥下筋の筋力低下や嚥下開始のタイミングのずれ、嚥下に対する不安が原因と思われる。健常者において舌骨上筋群から舌骨下筋群へと連続する筋活動がみられたが、嚥下障害患者において舌骨下筋群から舌骨上筋群といった流れを認めた。

本研究で開発したセンサシートの利点として、甲状軟骨を起点としてセンサシートを張り付けるため、触診なく貼り付けることが可能であった。一枚のシートで複数の表面筋電図電極を一定の位置関係に装着でき

る。欠点として、患者にあわせて電極間距離が変更できないことと、平均以外の体格の被験者の場合は別の大きさのセンサシートが必要となることである。

本研究の限界として、脳血管疾患後の患者の場合はデータ取得成功率が低いことと、技術的や生物学的理由によりきれいなデータが得られなかったケースが多い点がある。また、健常者と嚥下障害者で性別と年齢の分布に偏りを認めた。年齢による喉頭の下垂があり、それによってセンサシートの装着位置が変わり表面筋電図の結果が変化する可能性があった。健常者と嚥下障害者の違いを評価するためには性別・年齢も調整する必要がある、現在追加研究を行っている。

個人による筋肉の大きさや活動量の違いに対する電極の位置や閾値の設定において安静時のノイズに影響をうけるといった科学的・技術的な問題はあがるが、若年健常者と嚥下障害患者の間の筋活動継続時間と筋活動開始パターンは異なっていた。以上より、固定配置電極での表面筋電図センサシートでの嚥下評価が有効である可能性を認めた。

(論文審査の結果の要旨)

表面筋電図は嚥下機能評価において有効といわれているが、表面筋電図を正しい位置に貼るために解剖学的な知識が必要であり普及していない。そのため、我々は複数の表面電極が一体となり装着しやすいセンサシートを開発した。健常者および嚥下障害患者に利用し嚥下機能を評価できる可能性に関して検証した。

10人の健常者(29.5±3.9歳)および18人の嚥下障害患者(67.8±12.1歳)を対象に、嚥下造影検査施行時に頸部に我々の開発したセンサシートおよび喉頭マイク(SH-12jkL, 有限会社南豆無線電機社)を装着し表面筋電図の測定を行った。嚥下障害患者は脳血管疾患後、頭頸部癌切除再建後、廃用症候群の3群より

なる。我々の開発したシートは高さ150 mm, 最大幅62 mm, 最大厚み3 mmのものであり甲状軟骨を指標に頸部に貼り付けるものである。配置されている表面筋電図電極により舌骨上筋群の上部(位置A), 舌骨上筋群の下部(位置B), 舌骨下筋群の上部(位置C), 舌骨下筋群の下部(位置D)の筋電図を測定するものである。筋活動継続時間, 筋活動パターン(各計測点の活動順位)を評価し, 健常者と嚥下障害患者間で比較を行った。統計学的検討では, 筋活動継続時間に関してMann-Whitney U testを, 筋活動パターンに関してFisherの正確確率検定を用いた。

その結果, 小山吉人は次の結論を得た。

1. 筋活動継続時間においては, 位置Bにて, ゼリー, ころみ水, 水において嚥下障害患者の方が有意な短縮を認めた。また, 位置Dにて, ヨーグルトにおいて嚥下障害患者の方が有意な延長を認めた。
2. 筋活動パターンに関して, 健常者は位置AもしくはBから始まるパターンが多かったが, 嚥下障害患者の水において位置Dから始まるパターンの割合が高かった。

これらの結果により, 若年健常者と比べて, 嚥下障害患者で舌骨上筋群では筋活動継続時間の短縮, 舌骨下筋群では筋活動継続時間の延長を認めた。若年健常者において舌骨上筋群から舌骨下筋群へと連続する筋活動がみられたが, 嚥下障害患者において舌骨下筋群から舌骨上筋群といった流れを認めた。若年健常者と嚥下障害患者の間の筋活動継続時間と筋活動開始パターンは異なっていた。以上より, 固定配置電極での表面筋電図センサシートでの嚥下評価が有効である可能性を認めた。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。

Aperture Elongation of the Femoral Tunnel on the Lateral Cortex in Anatomical Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using the Outside-In Technique (アウトサイドイン法を用いた前十字靭帯二重束再建術における大腿骨外側開口部の楕円化について)

赤岡 裕介

(論文の内容の要旨)

【背景】前十字靭帯(ACL)断裂の治療は, 他の部位から腱を採取し移植する, 靭帯再建術が行われる。ACLは, 解剖学的研究より, anteromedial bundle(AM)とposterolateral bundle(PL)の2つの異なる線維走行を有すること

が知られている。そのため, 正常の靭帯機能を再現するために2本の靭帯を別々に再建する解剖学的二重束再建術と呼ばれる方法で手術が行われる。再建術は, 大腿骨, 脛骨のそれぞれの骨に, 靭帯を通す骨孔と呼ばれるトンネルを2つずつ作成し, この骨孔内に新し

い靭帯となる移植腱を通し、固定する。移植腱の固定には、大腿骨側にボタンという器具を用いて骨に引っかけるようにし、固定する。しかし、作成した骨孔が大きいと、引っ掛かりが不安定なり、さらには、骨孔がボタンの半分の6 mmを超えると脱落が増加するとの報告がある (Herbert et al. Arthroscopy. 2012)。

ACL 再建術は、もとの靭帯が付着していた位置に骨孔を正確に作成することが、最も重要であるが、Outside in (OI) 法は、特殊な器具を用いて、関節外から関節内に骨孔を作成する方法で、正確な位置に骨孔が作成できるという利点がある。しかし、関節外から関節内に骨孔を作成するため、皮質へのドリル入射角により開口部が楕円化し、拡大するため、開口部は使用するドリル径より大きくなる。そのため、ボタンを使用した靭帯固定を行った際には、開口部の拡大により、骨孔内へのボタンの脱落の危険が増す。

この、OI 法における外側開口部の楕円化における拡大については、外側上顆とドリル刺入点との関係についての報告がある (Okazaki et al. Arthroscopy : 2014)。しかし、この報告は、骨孔を1つ作成したとき、つまり ACL を1本で再建したときの報告であり、実際に臨床で行っている骨孔を2つ作る、2本の靭帯を再建した際の報告ではない。

そのため、我々は、実際に解剖学的二重束再建術を施行した術直後の CT 画像を用いて外側開口部の楕円化の程度、実際に長軸が6 mmを超える割合、楕円化の程度と開口部位置の関係について検討した。また、楕円化による臨床的影響についても調査した。

【対象と方法】OI 法を使用して解剖学的 ACL 二重束再建術を行った75例の、術直後の CT を用いて外側開口部楕円形長軸を計測し、各線維束で、実際に使用したドリル径で除した値を開口部拡大率とした (Fig. 1)。外側上顆を基準とし、大腿骨骨軸と開口部位置のなす角度、外側上顆と開口部間の距離で大腿骨外側を各領域に分け (Fig. 2)、拡大率と開口部位置の関係について検討し、拡大率が最小となる領域を調査した。各ドリル径における骨孔の長軸が6 mmを超える例の割合について検討した。また、術後最低2年以内の経過観察期間で、ボタンの骨孔内脱落の発生率と転位例、非転位例の臨床成績についても比較検討を行った。

【結果】AM 束、PL 束共に、楕円形の長軸径は、120 %と拡大し、長軸径は短軸径よりも有意に大きくなっていった (Table 1)。各ドリル径と楕円形長軸径の関係には、AM 側では、56 %で6 mm以上の開口部

となり、5 mm以上のドリルの使用で、6 mmを超える開口部が出現した (Table 2)。PL 側では30.7 %の例が6 mm以上の開口部となり、4 mm以上のドリルを使用できても、6 mmを超える例が出現した (Table 3)。骨孔拡大率と領域の関係は、AM 側では、外側上顆より10-20 mm、角度30-60°の領域で拡大率が113.8 %と最小となり、外側上顆より近位、後方への開口部は拡大する傾向があった (Fig. 3)。PL 側では、外側上顆より0-10 mm、角度30-60°の領域で拡大率が107.5 %と最小となり、また、外側上顆より後方への開口部は拡大する傾向があった (Fig. 4)。術後2年までの期間で、ボタンは4例、5.3 %で骨孔内に転位を認め、転位を認めた4例すべてが6 mm以上の開口部を有した例であった (Fig. 5)。しかし、最終評価時の臨床スコア、膝の不安定性の評価では転落群、非転落群で有意差を示さなかった。

【考察】本研究では、OI 法を用いた ACL 二重束再建術において大腿骨外側皮質開口部の楕円化の程度について調査した。この楕円化は、AM 側、PL 側ともにドリル径に対して約120 %拡大した。再建靭帯固定に広く用いられているボタンの半分の6 mmを超える骨孔では、骨孔内へのボタンの脱落が危惧されるが、AM 側で56 %、PL 側で30.7 %が6 mmを超える開口部であり、潜在的に、ボタン脱落の危険を有していること示した。また、開口部楕円化と位置の関係については、Okazaki らが、外側上顆より開口部の位置が離れると拡大率は増加することを報告しているが、これは、ACL 一重束再建術でのシミュレーションによるものであり、開口部位置各点での検証である。しかし、実際の開口部位置には、ばらつきがあるため、我々は、開口部位置を領域について分類し、その拡大率について検討した。それによると、AM 側では外側上顆との距離が10-20 mm、角度30-60°の領域、PL 側は距離が0-10 mm、角度30-60°の領域で最小となった。しかし、この2つの最小となる領域は、近接しており、そのため、実際の临床上「楕円化を最少にする」、「tunnel がつながらないようにする」ことを両立することは困難であった。

(論文審査の結果の要旨)

前十字靭帯 (ACL) 断裂の治療は、他の部位から腱を採取し移植する、靭帯再建術が行われる。ACL は、anteromedial bundle (AM) と posterolateral bundle (PL) の2つの異なる線維走行を有するため、2本の靭帯を別々に再建する解剖学的二重束再建術と

呼ばれる方法で手術が行われる。この再建術は、大腿骨、脛骨のそれぞれの骨に、靭帯を通す骨孔と呼ばれるトンネルを2つずつ作成し、この骨孔内に新しい靭帯となる移植腱を通し、固定する。大腿骨側の移植腱の固定には、ボタンという器具を使用し、骨に引っ掛け、固定する。しかし、作成した骨孔がボタンの半分の6 mmを超えると脱落が増加する。

再建術は、もとの靭帯が付着していた位置に骨孔を正確に作成することが、最も重要である。Outside in (OI) 法は、関節外から関節内に骨孔を作成する方法で、正確な位置に骨孔が作成できる利点があるが、皮質へのドリル入射角により開口部が楕円化し、拡大する。そのため、開口部の楕円化による拡大に伴い、骨孔内へのボタンの脱落の危険が増す。

この、OI法における開口部の楕円化による拡大については、外側上顆とドリル刺入点との関係についての報告がある。しかし、この報告は、骨孔を1つ作成したとき、つまり前十字靭帯を1本で再建したときの報告であり、実際に臨床で行っている骨孔を2つつくる、2本の靭帯を再建した報告ではない。

そのため、赤岡らは、実際に解剖学的二重束再建術を施行した75例を対象に術直後のCT画像を用いて外

側開口部の楕円化の程度、実際に長軸が6 mmを超える割合、楕円化の程度と開口部位置の関係について検討した。また、楕円化による臨床的影響についても調査し、以下の結果を得た。

1. AM側、PL側ともにドリル径に対して約120%拡大していた。
2. AM側で56%、PL側で30.7%が6 mmを超える開口部を有していた。
3. AM側では外側上顆との距離が10-20 mm、角度30-60°の領域、PL側は距離が0-10 mm、角度30-60°の領域で最小となった。
4. 術後2年までの経過で骨孔内にボタンが脱落した例を4例、5.3%に認めたと、脱落群、非脱落群で臨床結果に有意差は認めなかった。

これらの結果から、潜在的に骨孔にボタンが脱落する危険があること、また、楕円化が最小となる領域は、近接しており、実際の临床上、楕円化を最少にする、tunnelがつかないようにすることを両立することは困難であることが、明らかとなった。

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。

Corticosteroids prevent the progression of autoimmune pancreatitis to chronic pancreatitis (ステロイドは自己免疫性膵炎の慢性膵炎進展を予防する)

倉石 康弘

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis: AIP) は、血中 IgG4 高値、画像所見における膵腫大・膵管狭細化、病理所見における著明な IgG4 陽性形質細胞浸潤を特徴とする。AIP は病変局所の著明なリンパ球・形質細胞浸潤とステロイド (PSL) 治療に対する良好な反応性から以前は急性期の病態と考えられていたが、症例の蓄積とともに膵石灰化や膵萎縮など慢性期の病態に移行する症例があることがわかってきた。我々は、AIP が膵頭部腫大や主膵管狭細化に伴う膵液鬱滞を機序に長期経過で高度膵石灰化を主体とした慢性膵炎へ進展しうることが報告してきた。AIP における PSL 治療の適応は黄疸や腹痛などの症状を呈する症例である。PSL 投与により膵腫大や主膵管狭細化は短期間で改善し、AIP に伴う諸症状も改善するため、短期的な予後は良好である。しかし、慢性膵炎の合併など長期予後に対する効果は十分

には明らかになっておらず、AIP の慢性膵炎への進展予防に PSL 投与が有用であるかどうかを明らかにするために本検討を行った。

【方法】1996~2018年に当院で診療し、1年以上経過観察した AIP 患者145例 (男性107例、年齢中央値67歳、観察期間中央値78か月) を対象とした。慢性膵炎の確診所見である主膵管内結石や膵全体のびまん性石灰化を CT にて認めた症例を高度石灰化と定義し、後方視的に以下の検討を行った。1) 高度石灰化を合併した AIP 患者の膵内外分泌能や合併症の頻度、2) Kaplan-Meier 曲線を用いた PSL 投与の有無による高度石灰化合併率の比較、3) 多変量解析 (COX 比例 Hazard 解析) による高度石灰化進展に関連する因子の検証、4) PSL 投与群における治療抵抗因子の検証。

【結果】1) AIP 患者145例のうち高度石灰化への進展を19例 (13%) に認めた。高度石灰化進展例の便中エラスターゼ中央値は68 $\mu\text{g/g}$ と低く、73%に膵外分

泌能の低下（便中エラスターゼ値 $<200\mu\text{g/g}$ ）を認めた。膵内分泌能に関しては、高度石灰化進展例のうち17例（90%）が糖尿病を合併し、41%でインスリン分泌能の低下があり、7例でインスリン治療を要した。合併症は仮性嚢胞を5例、急性膵炎を2例に認め、膵癌の合併例はおらず、膵石治療として8例に体外衝撃波破碎療法、1例に手術を施行した。2) Kaplan-Meier 曲線を用いた解析では、PSL 投与群は非投与群と比較して有意に高度石灰化合併率が低かった（ハザード比[HR]0.33, 95%信頼区間[CI]0.12-0.94; $p=0.0379$ ）。膵頭部腫大は AIP における慢性膵炎進展の危険因子と報告されており、その有無で患者を分けると診断時に膵頭部腫大を伴っていた症例でのみ高度石灰化の合併を認めた。そこで、診断時に膵頭部腫大を伴った95例のみを対象として検討したところ、PSL 投与群は非投与群と比較して有意に高度石灰化合併率が低かった（HR 0.18, 95% CI 0.07-0.52; $p<0.001$ ）。診断時に膵頭部腫大を伴わなかった症例では高度石灰化の合併を認めなかったことから、以下の検討はリスク集団である診断時膵頭部腫大例のみを対象とした。3) 高度石灰化合併に関連する独立した因子を評価するため多変量解析を行ったところ、高度石灰化の合併は PSL 投与群で有意に低く（HR 0.11, 95% CI 0.03-0.34; $p<0.001$ ）、診断時に主膵管拡張を認めた症例で有意に高かった（HR 4.02, 95% CI 1.43-11.7; $p=0.009$ ）。4) PSL 治療の抵抗因子を評価するため、PSL 投与群の中で高度石灰化合併例と非合併例の背景因子を比較したところ、再燃例で有意に高度石灰化の合併率が高かった（ $p=0.005$ ）。

【結論】 高度石灰化に進展した AIP では通常の慢性膵炎と同様膵内外分泌能の低下や仮性嚢胞・急性膵炎などの合併症を認め、臨床的に問題となる。PSL 治療は慢性膵炎への進展予防に有用であり、特にリスク集団である膵頭部腫大例を対象とした治療は効果が高い。一方で再燃は PSL 治療の抵抗因子であり、再燃を予防するための治療戦略も必要である。診断時に膵頭部腫大と主膵管拡張を伴った症例では慢性膵炎進展のリスクが特に高いことから PSL 治療導入の適応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、ステロイド治療（PSL）に対して良好な反応性を示し、以前は急性期の病態と考えられていたが、症例の蓄積とともに通常の慢性膵炎と同様な病態に移行し

うることがわかってきた。過去の報告より、AIP が慢性膵炎に進展する機序として膵頭部腫大や膵管狭細化による膵液鬱滞が関与していると考えられる。PSL は短期的な治療効果は非常に良好であるが、長期的な予後に対する影響は明らかになっておらず、ガイドラインでも長期予後に対する治療選択は述べられていない。AIP における慢性膵炎進展に対して PSL が有効であるかどうかを検討した。

当院にて1年以上経過観察した AIP 患者145例を対象として、慢性膵炎の確信所見である主膵管内結石や膵全体のびまん性石灰化を認めた症例を高度石灰化と定義し、後方視的にその有無を評価した。高度石灰化を合併した AIP 患者の臨床像、PSL 投与の慢性膵炎進展予防に対する効果を検証した。

その結果、倉石は次の結論を得た。

1. 高度石灰化の合併は13%に認め、高度石灰化進展例では膵内外分泌機能の低下や仮性嚢胞・慢性膵炎急性増悪などの合併症を認めた。
2. Kaplan-Meier 曲線を用いた解析では、PSL 投与群は非投与群と比較して有意に高度石灰化合併率が低かった。
3. 高度石灰化の合併は膵頭部腫大例でのみ認めた。膵頭部腫大例のみを対象として解析を行ったところ、PSL 投与群は非投与群と比較して有意に高度石灰化合併率が低く、全体例での解析（結果2）と比較してHazard比が低くなっていた。
4. 膵頭部腫大例のみを対象として高度石灰化合併のリスク因子に関して多変量解析を行ったところ、高度石灰化の合併は PSL 投与群で有意に低く、診断時に主膵管拡張を認めた症例で有意に高かった。
5. PSL 投与群のみの解析では、再燃例で有意に高度石灰化の合併率が高かった。

以上より、PSL は慢性膵炎への進展予防に有用であり、特に膵頭部腫大例を対象とした治療は効果が高い。診断時に膵頭部腫大と主膵管拡張を伴った症例では慢性膵炎進展のリスクが特に高いことから治療導入の適応となる可能性がある。この結果は、AIP の長期予後を改善させるための治療戦略を考える上で一助になると思われる。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。

Assessment of kidney function using inulin-based and estimated glomerular filtration rates before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients
(小児同種造血幹細胞移植前後におけるインスリンによる糸球体濾過量及び推定糸球体濾過量を用いた腎機能評価)

松岡大輔

(論文の内容の要旨)

【背景】腎機能は、同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) の前処置や移植方法、免疫抑制薬や抗菌薬の選択の際に最も重要な要因の一つである。しかし、allo-HSCT 前後での腎機能評価方法は確立していない。

糸球体濾過量 (GFR) は腎機能の最も一般的な指標である。インスリンクリアランス、すなわちインスリンによる GFR (iGFR) は GFR 測定のゴールドスタンダードとされている。しかし、小児 HSCT 患者における iGFR を用いて GFR を評価した報告はない。理由として、iGFR 検査が高価、準備や検査が煩雑、インスリンの供給が限定されているなどの問題があるからである。そのため、臨床的には、クレアチニン (Cr)、シスタチン C (CysC)、 β 2ミクログロブリン (β 2MG) を用いた推定 GFR (eGFR) が腎機能の評価に使用されているが、eGFR の小児 allo-HSCT 患者での有用性もまた明らかではない。

【対象と方法】2016年8月から2019年12月に信州大学医学部附属病院小児科で allo-HSCT を実施した18歳未満の患者を対象として前方視的観察研究を実施した。研究参加に同意を得られなかった場合と自排尿が確立されていない場合は研究から除外した。年齢、性別、診断名、身長、体重、前処置、移植方法、急性移植片対宿主病、ステロイド、アムホテリシン B、カルシニューリン阻害薬の使用、検査データを含む臨床データは診療録から収集した。

iGFR 測定は小児標準化インスリンクリアランス法を用いた。eGFR は Cr, CysC, β 2MG, 尿素窒素, 24時間クレアチンクリアランス (24hCcr) を用いて全8種類を算出した。eGFR-Cr は original Schwartz formula, Bedside CKiD, Uemura's formula を用いた。eGFR-CysC は CKiDcys と Uemura's formula を用いた。eGFR- β 2MG は Ikezumi's formula を用いた。また、Cr, CysC, 尿素窒素を用いた eGFR-full CKiD も算出した。iGFR は allo-HSCT 前20日以内と移植後退院前20日以内実施した。また、各 eGFR は iGFR 測定3日以内に実施した。

本研究の主要評価目的は、小児 allo-HSCT 患者において、allo-HSCT の腎機能への影響を iGFR を用いて評価することとした。副次的評価項目として、iGFR を比較対照として、最も信頼できる (バイアスが小さく正確性の高い) eGFR 測定法を明らかにすることとした。

allo-HSCT の iGFR に対する影響は、ウィルコクソンの符号順位検定で評価した。iGFR を比較対照として、各 eGFR のバイアス (絶対数および百分率)、95%一致限界 (limits of agreement, LOA)、10%・30%精密度 (P10と P30) を算出した。また、eGFR 間でのバイアスおよび正確性を視覚的に明確化するため、Bland-Altman plot を用いた。10%以下のバイアスおよび75%以上の P30は臨床的に許容できるものと定義した。

【結果】研究期間中31名の患者が信州大学医学部附属病院小児科で allo-HSCT を受けた。そのうち17名が本研究に参加した。3名は allo-HSCT 前後一方のみの測定だった。研究に参加しなかった14名のうち8名は排尿がコントロールできなかった。ほかの6名は本研究の承諾が得られず参加しなかった。研究参加者の中央値年齢は10.9歳 (4-17歳) だった。すべての参加者は全身放射線照射をベースとした前処置を受けていた。

Allo-HSCT 後の iGFR は、allo-HSCT 前のものと比較し有意な変化はなかった (iGFR: 105.7 and 105.9 mL/min/1.73 m²; P>0.999)。eGFR-CysC CKiD は GFR を過少評価しており、それ以外の eGFR は GFR を過大評価していた。eGFR- β 2MG, eGFR-24hCcr, eGFR-full CKiD では10%未満の平均バイアスだった (それぞれ9.7%, 8.5%, 8.9%)。eGFR-CysC, eGFR-24hCcr, eGFR-full CKiD では95% LOA が狭かった。P10は eGFR-24hCcr と eGFR-full CKiD が高かったが (それぞれ41.4%と48.4%)、P30は eGFR- β 2MG, eGFR-CysC CKiD, eGFR-24hCcr, eGFR-full CKiD で75%以上であった (それぞれ80.6%, 80.6%, 79.3%, 80.6%)。

【考察】本研究では，allo-HSCT 前後で GFR の有意な変化は認めなかった。この結果は，移植後早期における移植の腎機能に対する影響は，我々のコホートにおいて軽微であることを示している。ただし，allo-HSCT 後の iGFR は移植後中央値73.5日に実施されているため，腎機能に影響すると報告されている慢性移植片対宿主病の影響が反映されていない。また，慢性腎臓病の診断には90日以上腎機能障害の持続と定義されていることから，allo-HSCT の腎臓に対する影響については，移植後1年などもう少し移植から時間が経過した時点での iGFR 評価が必要と考えられた。

iGFR を比較対照とした eGFR の信頼性の比較においては，最も使用される Cr による eGFR はいずれの計算方法でも GFR を過大評価しており，95 %LOA も大きく，小児 allo-HSCT 患者の腎機能評価には適さないと考えられた。平均バイアス，95 %LOA，P10，P30を総合的に考慮すると，eGFR-24hCcr と eGFR-full CKiD が腎機能の推定方法として最も信頼できる方法と考えられた。eGFR-24hCcr は自排尿の確立に加え夜尿が無いことが実施に際して必要であり，また外来患者では実施困難である。一方，eGFR-full CKiD は蓄尿の必要性が無くワンポイントでの採血によって測定できることから，臨床的・簡便性の観点から小児 allo-HSCT 患者においては eGFR-full CKiD が今回測定した8種類の eGFR の中では最も有望な eGFR 測定法と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

腎機能は，同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) の前処置や移植方法，薬剤を選択する際に最も重要な要因の一つである。しかし，allo-HSCT 前後での腎機能評価方法は確立していない。糸球体濾過量 (GFR) は腎機能の最も一般的な指標である。イヌリンクリアランス (iGFR) は GFR 測定のゴールドスタンダードである。しかし，小児 HSCT 患者における iGFR を用いて GFR を評価した報告はない。臨床的には，クレアチニン (Cr)，シスタチン C (CysC)， β 2ミクログロブリン (β 2MG) を用いた推定 GFR (eGFR) が腎機能評価に使用されているが，eGFR の小児 allo-HSCT 患者での有用性は明らかではない。

allo-HSCT を実施した17名に小児標準化イヌリンクリアランス法を用いて iGFR を測定した。eGFR は Cr，CysC， β 2MG，尿素窒素，24時間クレアチニンクリアランス (24hCcr) を用いて全8種類を算出した。小児 allo-HSCT 患者において，allo-HSCT の腎

機能への影響を iGFR により評価した。また，iGFR を比較対照として，最も信頼できる (バイアスが小さく正確性の高い) eGFR 測定法を明らかにすることとした。

その結果，松岡らは次の結論を得た。

1. Allo-HSCT 後の iGFR は，allo-HSCT 前のものと比較し有意な変化はなかった (iGFR: 105.7 and 105.9 mL/min/1.73 m²; P>0.999)。
2. eGFR-CysC CKiD は GFR を過少評価しており，それ以外の eGFR は過大評価していた。eGFR- β 2MG, eGFR-24hCcr, eGFR-full CKiD では10 %未満の平均バイアスだった (それぞれ9.7 %, 8.5 %, 8.9 %)。eGFR-CysC, eGFR-24hCcr, eGFR-full CKiD では95 %LOA が狭かった。精密度 P30は eGFR- β 2MG, eGFR-CysC CKiD, eGFR-24hCcr, eGFR-full CKiD で75 %以上であった (それぞれ80.6 %, 80.6 %, 79.3 %, 80.6 %)。

本研究から，移植後早期における allo-HSCT の腎機能に対する影響は軽微であることがわかった。ただし，allo-HSCT 後の iGFR は移植後中央値73.5日に実施されているため，腎機能に影響すると報告されている慢性移植片対宿主病の影響が反映されていない。また，慢性腎臓病の診断には90日以上腎機能障害の持続と定義されていることから，allo-HSCT の腎臓に対する影響については，移植から時間が経過した時点での iGFR 評価が必要と考えられた。

iGFR を比較対照とした eGFR の信頼性の比較においては，総合的に考慮すると，eGFR-24hCcr と eGFR-full CKiD が腎機能の推定方法として信頼できる方法と考えられた。eGFR-24hCcr は自排尿の確立に加え夜尿が無いことが実施に際して必要である。一方，eGFR-full CKiD は蓄尿が不要で1回の採血で測定できることから，臨床的・簡便性の観点から小児 allo-HSCT 患者においては eGFR-full CKiD が今回測定した8種類の eGFR の中では最も有望な eGFR 測定法と考えられた。

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。

The efficacy of amrubicin third-line chemotherapy in patients with relapsed extensive-disease small-cell lung cancer : A retrospective and historical study in a single institute
 (再発進展型小細胞肺癌の症例に対する3次化学療法としてのアムルビシンの有効性：単施設における後方視的な研究)

曾根原 圭

(論文の内容の要旨)

【背景】小細胞肺癌は、肺癌の中で約15%を占める化学療法の感受性が良好な固形腫瘍である。3分の2は進展型に分類され予後不良である。アムルビシンは第3世代アントラサイクリン系の薬剤で、強力なトポイソメラーゼIIの阻害作用を有している。進展型小細胞肺癌に対する3次治療としてのアムルビシンの有効性を検証した報告はほとんどない。しかし実臨床では、1次治療でプラチナ製剤併用化学療法が奏功した症例では2次治療でプラチナ製剤併用化学療法を再施行することがあり、3次治療でアムルビシンが選択されることがある。

【目的・方法】2000年5月から2016年7月まで信州大学医学部附属病院で進展型小細胞肺癌と診断され、3次治療としてアムルビシンを使用した症例（アムルビシン使用群）を診療録から抽出し、アムルビシンの治療効果と毒性を後方視的に解析した。また、全生存期間に関しては、アムルビシンを使用しないで2レジメン以上の化学療法を施行した症例（アムルビシン未使用群）と比較し、アムルビシンが生存期間の延長に寄与するか検討した。

【結果】対象期間に進展型小細胞肺癌として治療された症例は91例であった。アムルビシン使用群は18例、アムルビシン未使用群は19例が抽出された。2群間の患者背景で年齢、性別、パフォーマンスステータス(PS)、喫煙歴の有無、転移性病変(脳、肝、骨、胸膜)の有無に差は認めなかった。アムルビシンの開始用量(1日目～3日目)は40 mg/m²が11例(61.1%)、35 mg/m²が3例(16.7%)、30 mg/m²が4例(22.2%)であった。アムルビシンの治療効果に関しては、奏効率が25.8%、病勢制御率が66.7%であった。アムルビシン使用群の無増悪生存期間中央値は2.9か月、アムルビシン使用からの生存期間中央値は5.2か月、全生存期間中央値は18.1か月であった。アムルビシン未使用群の全生存期間中央値は12.6か月であった。アムルビシンの毒性に関しては、グレード3以上の白血球減少を12例(66.6%)、好中球減少を13

例(72.2%)、発熱性好中球減少症を7例(38.9%)、貧血を2例(11.1%)、血小板減少を2例(11.1%)、肺障害を1例(5.5%)に認めた。治療関連死亡は認めなかった。

【考察】アムルビシン使用群はアムルビシン未使用群と比較して有意に生存期間が延長していた(p=0.005)。また、信州大学医学部附属病院においてアムルビシンの採用後から治療された67例と採用前に治療された24例の全生存期間を比較すると15.4か月 vs. 10.3か月であり、採用後の症例で生存期間の有意な延長を認めた(p=0.013)。以上からアムルビシンによる治療を施行することは生存期間の延長につながる可能性が考えられた。発熱性好中球減少症に関しては、開始用量が40 mg/m²で施行された11例のうち7例に発症したが、35 mg/m²、30 mg/m²で施行された症例では発症せず、40 mg/m²で開始された症例と比較して有意に少なかった(63.6% vs. 0.0%, p=0.002)。薬剤投与量の減量により発熱性好中球減少症の発症リスクを軽減できると考えられた。

【結論】本研究により再発小細胞肺癌に対する3次治療としてのアムルビシンの治療効果が確認された。また、発熱性好中球減少症を高率に発症したが、薬剤投与量の減量により忍容可能であった。以上から再発進展型小細胞肺癌の治療として、アムルビシンは有用な選択肢であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

小細胞肺癌は、肺癌の中で約15%を占める化学療法の感受性が良好な固形腫瘍である。3分の2は進展型に分類され予後不良である。アムルビシンは第3世代アントラサイクリン系の薬剤で、強力なトポイソメラーゼIIの阻害作用を有している。進展型小細胞肺癌に対する3次治療としてのアムルビシンの有効性を検証した報告はほとんどない。しかし実臨床では、1次治療でプラチナ製剤併用化学療法が奏功した症例では2次治療でプラチナ製剤併用化学療法を再施行することがあり、3次治療でアムルビシンが選択されることがあることから、3次治療としてのアムルビシンの治

療効果, 有害事象を検討することにした。対象は, 信州大学医学部附属病院で進展型小細胞肺癌と診断された症例で, アムルピシン使用群 (3次治療としてアムルピシンを使用した症例) は18例, アムルピシン未使用群 (アムルピシンを使用しないで2レジメン以上の化学療法を施行した症例) は19例が抽出された。3次治療としてのアムルピシンの有効性と毒性の評価に加えて, 全生存期間に関しては両群で比較しアムルピシンが生存期間の延長に寄与するか検討した。

その結果, 下記の結果を得た。

1. アムルピシン使用群における3次治療としてのアムルピシンの奏効率は25.8%, 病勢制御率は66.7%であった。また, アムルピシンの無増悪生存期間中央値は2.9か月, アムルピシン使用からの生存期間中央値は5.2か月であった。
2. アムルピシン使用群の全生存期間中央値は18.6

か月であり, アムルピシン未使用群の全生存期間中央値12.6か月と比較して有意に延長していた ($p=0.015$)。

3. アムルピシンの有害事象に関しては, 発熱性好中球減少症を7例 (38.9%) と高頻度に認めた。開始用量を減量投与 (35 mg/m^2 , 30 mg/m^2) で開始した症例は発熱性好中球減少症を発症しなかった。

これらの結果により, 再発進展型小細胞肺癌に対する3次治療としてのアムルピシンの治療効果が確認された。発熱性好中球減少症は高率に発症したが, 薬剤投与量の減量により忍容可能であった。以上から再発進展型小細胞肺癌の3次治療としてアムルピシンは有用な選択肢で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。

Polymorphism at rs9264942 is associated with HLA-C expression and inflammatory bowel disease in the Japanese (rs9264942の多型は日本人のHLA-C発現量と炎症性腸疾患と関連する)

鈴木 宏

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】炎症性腸疾患 (IBD) は再燃と寛解を繰り返す腸の炎症性疾患である。主に潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) に大別される。一塩基多型 (SNP) rs9264942は, 発現量調節遺伝子座 (eQTL) としてヒト白血球抗原 (HLA) -Cの発現量と関連することがヨーロッパ人において示されており, HLA-C発現量はCDの発症に正の感受性 ($p=3.0 \times 10^{-7}$, OR 1.35) を示す疾患感受性遺伝子であることが報告された。また, 日本人ではHLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02ハプロタイプがUC発症に正の相関 ($p=4.0 \times 10^{-21}$, OR 2.65), CD発症に対して負の相関 ($p=1.1 \times 10^{-7}$, OR 0.40) を示すことが報告された。またrs9264942がeQTLであるかどうかは人種により異なるとされておりこのSNPが日本人のIBDの疾患感受性に関連するかを検討した報告はなかった。本研究の目的は, rs9264942が日本人においてHLA-C発現量を調節しているeQTLであるかどうか, および日本人のIBD感受性と強い相関を示すHLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02ハプロタイプとrs9264942がどのような関連を示すかを日本人の集団で明らかにするために本検討を行った。

【方法】健常人32名においてrs9264942の多型をPCRで調べ, フローサイトメトリーで発現量を解析した。また, IBD感受性を示すHLA-C*12:02, B*52:01およびDRB1*15:02の各アレルと非常に強い連鎖不平衡を有する3つのSNPs (rs2270191, rs3132550, rs6915986) を選出し, 当院, 諏訪赤十字病院, 東京山手メディカルセンターの3施設で集めたUC160例, CD275例と当科での過去の研究で用いた健常人325例, Disease Controlとして原発性胆汁性胆管炎 (Primary Biliary Cholangitis; PBC) 328例をについてRealtime-PCRでGenotypingを行い, ハプロビューを用いた推定ハプロタイプの相関解析を行った。

【結果】rs9264942アレルとHLA-C発現量に関するフローサイトメトリーを用いた解析結果は, CD3e⁺CD8a⁺リンパ球においてTT遺伝子型よりもCCまたはCT遺伝子型の方がHLA-Cの発現量が有意に高かった ($p=0.0021$)。また, IBD感受性を示すHLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02ハプロタイプに相応する3つのSNPsからなる推定ハプロタイプTACにrs9264942アレル (C) を加えた4つのSNPからなるハプロタイプTA (C) Cは, UCで強い感受性 ($p=3.96 \times 10^{-7}$, OR 2.53) を示し, CDで抵抗性 ($p=0.002$,

OR 0.50) を示した。また、rs9264942-C アレルの IBD 感受性について SNPs ハプロタイプから検討すると、UC と強い相関を示した TA (C) C の相補ハプロタイプ CG (T) T は UC で有意な抵抗性 ($p=2.66 \times 10^{-5}$, OR 0.56) を示し、CD では有意差を示さなかった ($p=0.828$, OR 1.03)。しかし、(T) が (C) に代わった CG (C) T ハプロタイプは CD 感受性を示した ($p=0.042$, OR 1.31)。このことから rs9264942 C アレルは CD 感受性に影響していることが示唆された。**【結論】** rs9264942 の eQTL SNP は日本人の HLA-C 発現量を調節し、CD 感受性に影響していることを示唆した。また、強い連鎖不平衡にある 3 つの SNPs (rs2270191, rs3132550, rs6915986) は IBD 感受性に関わる特定の HLA ハプロタイプ HLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02 の代理マーカーとなり得ることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease ; IBD) は主に潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) に大別される。rs9264942 の発現量調節遺伝子座 (eQTL) の一塩基多型 (SNP) は、ヨーロッパ人においてヒト白血球抗原 (HLA)-C の発現量と関連付けられており、HLA-C 発現量はクローン病における疾患感受性遺伝子であることが報告されていた。また、日本人において HLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02 ハプロタイプが UC 発症に正の相関、CD 発症に対して負の相関を示すことが報告されており、日本人において rs9264942 が eQTL であるかどうかおよびこのハプロタイプとの相関解析を検討した報告はなかった。そのため、日本人で rs9264942 の eQTL SNP が HLA-C の発現量を調節するかどうか、および既報の HLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02 の各アレルと強い連鎖不平衡を有する rs2270191, rs3132550, rs6915986 の 3 つの SNPs, および rs9264942 の eQTL SNP が日本人の炎症性腸疾患発症とどのように関連するかを検討した。

当院の健常なスタッフ 32 例でフローサイトメトリーでの rs9264942 多型間での HLA-C 発現量の解析を評価した。続いて当院、諏訪赤十字病院、東京山手メディカルセンターの 3 施設で集めた UC160 例、CD 275 例と当科での過去の研究で用いた健常人 325 例、Disease Control として原発性胆汁性胆管炎 (Primary Biliary Cholangitis ; PBC) 328 例を用いて Realtime-PCR で Genotyping を行い、ハプロビューを用いた推定ハプロタイプの相関解析を行った。

その結果、鈴木は次の結論を得た。

1. rs9264942 (C) は日本の健常人において HLA-C 発現量を調節する eQTL である。
2. HLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02 ハプロタイプを持つと推定される TACC ハプロタイプはこの特定のハプロタイプと同様に UC 発症に正の感受性、CD 発症に負の感受性を示した。
3. 推定ハプロタイプ TACC の有無により CD 患者において臨床転帰 (腸管切除歴など) との関連が示唆された。
4. 4SNPs の相関解析から、欧米の既報と同様に日本人においても HLA-C の高発現は CD 発症に正の相関を示した。
5. 強い連鎖不平衡にある 3 つの SNP が特定の HLA ハプロタイプである HLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02 の代理マーカー候補となる可能性が示唆された。

以上より、rs9264942 の eQTL SNP は日本人の HLA-C 発現量を調節することを示唆した。また、強い連鎖不平衡にある 3 つの SNP が特定の HLA ハプロタイプである HLA-C*12:02~B*52:01~DRB1*15:02 の代理マーカー候補である可能性を示唆しており、IBD 感受性および疾患転帰に関連していた。この結果は、IBD の発症および CD 患者の臨床経過を考える上で一助になると思われる。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。

Immunohistochemical Investigation of Predictive Biomarkers for Mandibular Bone Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma (口腔扁平上皮癌における下顎骨浸潤予測因子の免疫組織化学的検討)

宜保隆彦

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 口腔扁平上皮癌 (OSCC) は、口腔に

おける頭頸部悪性腫瘍の 90 % 以上を占める。口腔の解剖学的特徴から、OSCC は口腔粘膜と接する顎骨へ

と容易に浸潤するが、顎骨を切除することは機能、および、QOLの低下を招くため、必要かつ最小限の骨切除が肝要である。この研究では、OSCCの顎骨浸潤の有無を予測するためのバイオマーカーを特定するため、免疫組織化学染色（IHC）による検討を行った。

【対象と方法】2003年1月から2017年12月の間に、信州大学医学部附属病院で手術を行ったOSCC患者45例について、レトロスペクティブに調査し、組織学的な骨浸潤の分類を行うとともに、浸潤予測マーカー候補（MMP-2, MMP-9, E-cadherin, N-cadherin, α -SMA, TGF- β , RANKL, MCP-1, OPG, IL-6）の発現状況をIHCにて検索した。染色対象には生検標本から腫瘍表層部を、手術標本から腫瘍と骨の接触部を用い、染色の反応性は、染色強度と染色細胞の割合に基づくHスコアで評価した。

【結果】骨浸潤の種類（圧迫型と浸潤型）と浸潤様式（Y-K分類）の比較では、Y-K分類のgradeが高いほど、浸潤型の腫瘍が多くなった（カイ2乗検定, $p < 0.05$ ）。骨浸潤の有無とIHCの比較では、腫瘍表層部においては骨浸潤を有する方がIL-6の反応性が有意に高い結果となったが、その活性は非常に低かった（Hスコアの中央値8.0 vs 4.0, Wilcoxon検定, $p < 0.05$ ）。腫瘍と骨の接触部においては、骨浸潤を有する方がE-cadherinと α -SMAの反応性が有意に高かった（E-cadherin: 97.5 vs 71.5, Wilcoxon検定, $p < 0.05$. α -SMA: 65 vs 5.5, Wilcoxon検定, $p < 0.01$ ）。骨浸潤の種類（圧迫型と浸潤型）とIHCの比較では、腫瘍表層部においてはOPGの反応性が浸潤型において高い傾向を認めたが（14 vs 4, Wilcoxon検定, $p = 0.058$ ）、その他では相関関係は認めなかった。腫瘍と骨の接触部においては α -SMAとOPGの反応性は、浸潤型の方が圧迫型よりも有意に高かった（ α -SMA: 79 vs 48.5, Wilcoxon検定, $p < 0.05$. OPG: 40 vs 4.5, Wilcoxon検定, $p < 0.05$ ）。

【考察】腫瘍と骨の接触部におけるE-cadherin, α -SMA, OPGのより強い反応性、または、浸潤様式（Y-K分類）の高gradeが、浸潤型のOSCCのバイオマーカーである可能性がある。腫瘍表層部における、IL-6は有意差を認めたものの、その反応性は非常に弱く、骨浸潤のバイオマーカーとして使用するには困難な可能性がある。腫瘍と骨の接触部において、 α -SMAおよびOPGの発現と骨浸潤の間に有意な相関関係が示されたが、ほとんどの症例においては、腫瘍と骨の接触部を術前生検にて採取することは困難であるため、腫

瘍表層部で検出できる α -SMAおよびOPGに関連するバイオマーカーを見つけるさらなる研究が必要である。

（論文審査の結果の要旨）

口腔扁平上皮癌（OSCC）は、口腔における頭頸部悪性腫瘍の90%以上を占める。口腔の解剖学的特徴から、OSCCは口腔粘膜と接する顎骨へと容易に浸潤するが、顎骨を切除することは機能、および、QOLの低下を招くため、必要かつ最小限の骨切除が肝要である。今回、OSCCの顎骨浸潤を予測するためのバイオマーカーを特定するため、免疫組織化学染色（IHC）による検討を行った。

2003年1月から2017年12月の間に信州大学医学部附属病院で手術を行ったOSCC患者45例について、レトロスペクティブに調査し、組織学的な骨浸潤の分類を行うとともに、浸潤予測マーカー候補（MMP-2, MMP-9, E-cadherin, N-cadherin, α -SMA, TGF- β , RANKL, MCP-1, OPG, IL-6）の発現状況をIHCにて検索した。染色対象には生検標本から腫瘍表層部を、手術標本から腫瘍と骨の接触部を用い、染色の反応性は染色強度と染色細胞の割合に基づくHスコアで評価した。

その結果、宜保隆彦らは次の結果を得た。

1. 顎骨浸潤の種類（圧迫型と浸潤型）と浸潤様式（Y-K分類）の比較では、Y-K分類のgradeが高くなるほど、浸潤型の腫瘍が多くなった（カイ2乗検定, $p < 0.05$ ）。
2. 骨浸潤の有無とIHCの比較では、腫瘍表層部においては骨浸潤を有する方がIL-6の反応性が有意に高い結果となったが、その活性は非常に低かった（Hスコアの中央値8.0 vs 4.0, Wilcoxon検定, $p < 0.05$ ）。
3. 腫瘍と骨の接触部においては、骨浸潤を有する方がE-cadherinと α -SMAの反応性が有意に高かった（E-cadherin: 97.5 vs 71.5, Wilcoxon検定, $p < 0.05$. α -SMA: 65 vs 5.5, Wilcoxon検定, $p < 0.01$ ）。
4. 骨浸潤の種類（圧迫型と浸潤型）とIHCの比較では、腫瘍表層部においてはOPGの反応性が浸潤型において高い傾向を認めたが（14 vs 4, Wilcoxon検定, $p = 0.058$ ）、その他では相関関係は認めなかった。
5. 腫瘍と骨の接触部においては、 α -SMAとOPGの反応性は、浸潤型の方が圧迫型よりも有意に高かった（ α -SMA: 79 vs 48.5, Wilcoxon検定, $p < 0.05$. OPG: 40 vs 4.5, Wilcoxon検定, $p < 0.05$ ）。

これらの結果より腫瘍と骨の接触部における E-cadherin, α -SMA, OPG のより強い反応性, または, 浸潤様式 (Y-K 分類) の高 grade が, 浸潤型の OSCC のバイオマーカーである可能性がある。腫瘍表層部における, IL-6は有意差を認めたものの, その反応性は

非常に弱く, 骨浸潤のバイオマーカーとして使用するには困難な可能性がある。腫瘍と骨の接触部において, α -SMA および OPG の発現と骨浸潤の間に有意な相関関係が示された。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。

Carbon fibers for treatment of cancer metastasis in bone (カーボンファイバーを用いた癌転移骨の治療)

鎌 仲 貴 之

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 癌が骨に転移すると骨破壊による痛みと機能障害により Quality of life が大きく低下する。従来, 癌治療の Drug delivery system (DDS) や骨修復の足場材は生体分解性材料が多かったが, 癌転移骨環境は秩序性に乏しく, 薬剤徐放や骨修復のタイミングを従来の材料では十分制御できない。Carbon fiber (CF) は非生体分解性で様々な分子を担持しやすく, 骨親和性が極めて高い。我々はこの CF に抗癌剤を複合した新しい癌転移骨環境制御システムを開発した。本研究の目的は, 抗癌剤複合 CF の抗癌剤徐放による癌抑制および破壊された骨の修復などの局所における機能と, 投与後血中抗癌剤濃度の計測により全身への影響を評価することである。

【材料および方法】 使用した Carbon fiber は円柱構造で, 直径 $0.4\mu\text{m}$, 長さ $20\sim 100\mu\text{m}$ であり, $800\sim 900^\circ\text{C}$ の高温熱加工処理により表面に平均 2.79nm の孔をあけシスプラチンを付加させた。In vitro の実験で, ラット乳癌細胞 walker 256を用いて Cisplatin (CDDP) 複合 CF (CF-CDDP) の癌抑制効果を alamarBlue assay にて評価した。さらに使用した CF-CDDP の CDDP 徐放効果を確認した。In vivo の実験では Wistar 雌ラットの脛骨髓腔内にラット乳癌細胞である walker 256を 1×10^5 cells 注入し癌骨転移モデルを作製し, 2日後に同部位に CF-CDDP または CDDP を注入した。また癌骨転移モデルのラットの右外頸静脈より CDDP を投与した。これらを比較することにより, CF-CDDP の癌転移骨環境における癌抑制効果を評価した。さらに CF-CDDP または CDDP を骨転移部に投与した際の血中の抗癌剤濃度を原子吸光分析法で評価した。一方, 健常ラットの脛骨に CF を拡散させた Phosphate buffered salts (PBS) または PBS を注入し, 経時的に骨孔面積, 骨密度を測定して, CF の骨形成能を評価した。

【結果】 In vitro の実験では CF-CDDP 群, CDDP 単独群ともに有意に癌細胞抑制効果を認めた。両群とも癌細胞は死滅したが, CF-CDDP の方が緩徐に癌細胞が減少した。In vivo の実験では, CF-CDDP 局所注射 (local injection ; l. i.) 群と CDDP 局所注射 (l. i.) 群は有意に癌抑制効果を認めたが, 両者に有意な差を認めなかった。しかし, 抗癌剤血中濃度は CF-CDDP l. i. 群で優位に低かった。CDDP 静脈注射 (intravenous ; i. v.) 群では癌抑制効果は認めなかった。骨形成能評価では, CF 群は control 群と比べてより早期に骨孔面積の減少, 骨密度の上昇, 新生骨の増生を認めた。

【結論】 本研究により, CF-CDDP は癌転移骨環境において CDDP 単独と同等の癌抑制効果があり, CDDP 単独より血中に抗癌剤を放出させにくいことが明らかになった。これは, CDDP と CF の複合体を局所投与することにより, 全身への影響が少なくなり副作用が起りにくくなることを示した。更に癌を抑制した後に CF は癌転移骨環境内に留まり, 癌転移により破壊された骨組織を修復する足場として機能することを明らかにした。癌転移骨に対して CF-CDDP の局所投与は, 副作用が少なく癌を抑制するとともに骨を修復する, 初めての治療法になることが期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

癌転移骨環境は秩序性に乏しく, 薬剤徐放や骨修復のタイミングを従来の材料では十分制御できない。Carbon fiber (CF) は非生体分解性で様々な分子を担持しやすく, 骨親和性が極めて高い。我々はこの CF に抗癌剤を複合した新しい癌転移骨環境制御システムを開発した。今回, 抗癌剤複合 CF の抗癌剤徐放による癌抑制および破壊された骨の修復などの局所における機能と, 投与後血中抗癌剤濃度の計測により全身への影響を評価した。

使用した CF は円柱構造で, 直径 $0.4\mu\text{m}$, 長さ $20\sim$

100 μm であり、800~900 $^{\circ}\text{C}$ の高温熱加工処理により表面に平均2.79 nm の孔を開け、Cisplatin (CDDP) を付加させた。透析カセットを用いてCF-CDDP のCDDP 徐放効果を確認した。In vitro の実験で、ラット乳癌細胞 walker 256を用いてCF-CDDP の癌抑制効果を alamarBlue assay にて評価した。In vivo の実験では Wistar 雌ラットの脛骨髓腔内に walker 256を 1×10^5 cells 注入し癌骨転移モデルを作製し、2日後に同部位にCF-CDDP またはCDDP を注入した。また癌骨転移モデルのラットの右外頸静脈よりCDDP を投与した。これらを比較することにより、CF-CDDP の癌転移骨環境における癌抑制機能を μCT 、組織像にて評価した。さらにCF-CDDP またはCDDP を骨転移部に投与した際の血中の抗癌剤濃度を、原子吸光分析法で評価した。一方、健常ラットの脛骨にCFを拡散させた Phosphate buffered salts (PBS) またはPBS を注入し、経時的に骨孔面積、骨密度を測定して、CFの骨形成機能を評価した。

その結果、鎌仲らは次の結論を得た。

1. CF-CDDP からCDDP は12時間で約50%、24時間で約70%放出した。

2. CF-CDDP 群、CDDP 単独群ともに有意に癌細胞抑制効果を認めた。両群とも癌細胞は死滅したが、CF-CDDP の方が緩徐に癌細胞が減少した。
3. CF-CDDP 局所投与によって明らかな癌転移骨部の癌抑制効果を認め、投与後に血中抗癌剤濃度が上昇しにくい傾向を認めた。
4. 骨形成能評価ではCF群はコントロールに比べ早期に骨孔面積の縮小、骨密度の上昇を認め、CF周囲に線維性骨組織を多く認めた。CFが骨修復の足場材となることが示唆された。

これらの結果により、CDDP とCFの複合体を局所投与することで、全身への影響が少なくなり副作用が起りにくくなることを示した。更に癌を抑制した後にCFは癌転移骨環境内に留まり、癌転移により破壊された骨組織を修復する足場として機能することを明らかにした。癌転移骨に対してCF-CDDP の局所投与は、副作用が少なく癌を抑制するとともに骨を修復する、初めての治療法になることが期待できる。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。

Correlation of Pancreatic T1 Values Using Modified Look-Locker Inversion Recovery Sequence (MOLLI) with Pancreatic Exocrine and Endocrine Function (Modified Look-Locker Inversion Recovery Sequence (MOLLI 法) を用いて測定した膵 T1 値と膵内外分泌機能との相関についての検討)

芦原典宏

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】膵外分泌機能障害は膵実質の線維化を伴う慢性膵炎患者においてしばしば認める。膵外分泌機能障害が出現すると脂肪消化機能が低下する。脂肪消化機能低下により生じる症状として脂肪便、下痢、腹痛や体重減少などがある。しかし、実際には無症状であることが多く、症状が出現する際には高度の障害が生じていると報告されている。膵外分泌機能障害は脂肪便や下痢だけではなく、栄養吸収障害により感染、骨粗鬆症や心血管障害のリスクを増やすと報告されており、膵外分泌機能障害のある症例は、健常人よりも平均余命が約15-20年短いと報告されている。標準的な膵外分泌機能検査にはセクレチン負荷試験、BT-PABA 試験、benzoyl-L-tyrosyl (l-13C) alanine 呼吸試験や便中エラスターゼ I 試験などがある。しかし、これらの検査は時間を要し、さらに検査手技が煩雑で

ある。近年、MRI T1 mapping による心筋線維化評価が有用であることが報告されている。T1 mapping は特定の範囲の T1 値を定量化し、対象組織の特性を評価する手法である。特に心筋で測定した T1 mapping 値が心筋細胞間の膠原繊維の増生を反映していることが病理組織学的に証明されている。心筋の線維化と同様に、慢性膵炎における膵実質線維化も細胞間の膠原繊維の増生により進行する。そこで我々は膵線維化の進行によって生じる膵外分泌機能障害と膵 MRI T1 mapping 値との相関関係を検討した。また、膵線維化の進行によって同様に生じる膵内分泌機能とも相関関係があるか検討した。

【対象患者及び方法】2017年10月から2019年2月の期間に当科で腹部造影 MRI 検査を施行した32症例を対象に解析した。本検討は膵内外分泌機能と T1 mapping 値との相関関係の検討が目的であり、特定の疾

患に限定しなかった。膵外分泌機能はMRI施行前後1か月以内に採取した便から便中エラスターゼ1値(FE-1)を測定して評価した。そして200 $\mu\text{g/g}$ 未満の症例を膵外分泌機能低下と定義した。膵内外分泌機能はMRI施行時に測定した空腹時血糖値、インスリン値から評価したHOMA- β を用いて評価した。HOMA- β 30%未満をインスリン分泌低下、15%未満を重度のインスリン分泌低下と定義した。また背景の栄養状態の評価としてBMI、血清アルブミン、中性脂肪も評価した。全症例に対し3.0T MR scannerを用いて評価した。T1 mappingの方法は既報からmodified Look-Locker inversion recovery sequence (MOLLI法)を採用した。T1測定範囲は膵頭部、体部、尾部から測定し、その中央値を対象のT1 mapping値として定義した。

【結果】 症例は男性9例、女性23例、年齢中央値は71歳(49-84歳)だった。症例の内訳は嚢胞性膵疾患が18例、アルコール性慢性膵炎が3例、膵癌が3例、自己免疫性膵炎、急性膵炎治療後、胆道腫瘍が2例ずつ、特発性慢性膵炎が1例、健常人が1例だった。対象のFE-1中央値は361.7 $\mu\text{g/g}$ 、HOMA- β 中央値は38.57%だった。膵外分泌機能低下を認めた症例は9例、インスリン分泌低下を認めた症例は14例、重度のインスリン分泌低下を認めた症例は2例だった。T1 mapping値の中央値は857.5 ms (597-2569ms)だった。T1 mapping値とFE-1の間には統計学的に有意な負の相関が見られた($r = -0.715$, $p < 0.001$)。しかし、T1 mapping値とHOMA- β の間には相関関係は認めなかった($r = -0.094$, $p = 0.636$)。なお背景疾患によるT1 mapping値の差は認めなかった。

【結論】 膵臓におけるT1 mapping値と膵外分泌機能とは有意に相関しており、膵外分泌機能不全の評価に有用である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

膵外分泌機能障害は膵実質の線維化を伴う慢性膵炎患者においてしばしば認め、結果として脂肪消化機能が低下する。実際には無症状の患者が多く、脂肪便、

下痢、腹痛や体重減少などの症状が出現したときには既に高度の膵外分泌機能障害が生じている。しかし、膵外分泌機能を評価する検査にはセクレチン負荷試験、BT-PABA試験、benzoyl-L-tyrosyl (1-13C) alanine 呼気試験、便中エラスターゼ1試験などがあるが、検査自体の煩雑さのために容易に行えない、試薬が入手できないため施行できないという問題がある。このため、正確に膵外分泌機能を評価することのできる方法の開発が必要とされている。近年、MRI T1 mappingが心筋線維化の評価に有用であることが示されている。そこで膵線維化の進行によって生じる膵内外分泌機能障害とMRI T1 mapping値との相関関係を検討した。

2017年から2019年に当科で3.0T MR scannerを用いた腹部造影MRI検査を施行した32症例を対象に、膵外分泌機能は便中エラスターゼ1値(FE-1)、膵内外分泌機能は空腹時血糖値、インスリン値から計算したHOMA- β を用いて評価した。T1 mappingはmodified Look-Locker inversion recovery sequence (MOLLI)法を用いて、膵頭部、体部、尾部測定値の中央値をT1 mapping値として定義した。

その結果、「芦原典宏」は以下の結論を得た。

1. 今回検討した対象の内、9例が外分泌機能低下、14例に内分泌機能低下を認めた。
2. 膵外分泌機能を示すFE-1とT1 mapping値に有意な負の相関関係を認めた($r = -0.715$, $p < 0.001$)。
3. 膵内分泌機能を示すHOMA- β とT1 mapping値には相関関係を認めなかった($r = -0.094$, $p = 0.636$)。
4. T1 mapping値1097msをCut off値に設定すると重度の膵外分泌機能障害の高い診断精度を示した。

以上より、MOLLI法を用いて測定した膵T1 mapping値と膵外分泌機能との相関を明らかにした。ROC解析の結果から重度の膵外分泌機能障害の診断能に優れていることが判明した。臨床的には無症状であっても本法で膵外分泌機能障害を正確に評価し、早期に予防、治療介入をすることで予後を改善させるための一助になる可能性がある。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。

Cardio-renal and cardio-hepatic interactions predict cardiovascular events in elderly patients with heart failure (高齢心不全患者における心腎、心肝連関による心血管イベントの予測)

岡野孝弘

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 高齢者は高血圧、貧血、腎機能障害や

慢性閉塞性肺疾患などの複数の併存疾患を抱えていることが多い。また、心不全患者において、多臓器の障

害は予後を悪化させることが知られている。

The composite Model for End-Stage Liver Disease Score (MELD) は元々、末期の肝疾患患者の予後予測や肝移植の適応を判断するスコアとして開発された。重症心不全患者において MELD は心腎、心肝連関を評価し、予後を予測出来ることが報告されており、補助人工心臓術後や心移植術後の患者に使用されるようになった。

近年、抗凝固療法が導入されている患者においても使用可能な The composite Model for End-Stage Liver Disease Excluding International Normalized Ratio Score (MELD-XI) が開発された。MELD-XI は心房細動や血栓症を合併し、抗凝固療法が導入された患者においても使用可能であり、より一般的な心不全患者に適用出来る可能性がある。

しかしながら、現時点において MELD-XI の高齢心不全患者の、心血管死、心不全入院といった心血管イベントにおける有用性は明らかではない。そこで本研究では、MELD-XI が高齢心不全患者における、心血管イベントの予測因子となり得るか調査した。

【方法】 2014年7月から2018年7月まで長野県内の16病院に入院した心不全患者851人のうち、65歳以上の676人の臨床的特徴、退院時の血液検査、心エコー検査データを記録した。MELD-XI は $5.11 \times \text{Ln}[\text{total bilirubin}] + 11.76 \times \text{Ln}[\text{creatinine}] + 9.44$ で計算され、スコアの中央値に基づいてコホートを低 MELD-XI 群 (<11) と高 MELD-XI 群 (≥ 11) に分けた。心血管死と心不全再入院の複合心血管イベントを主要評価項目とし、イベントの有無を追跡した。

【結果】 高 MELD-XI 群では低 MELD-XI 群と比較し、男性、NYHA class III/IV、以前の心不全入院歴、高尿酸血症、心室頻拍、貧血、および虚血性心疾患が多く含まれ、収縮期血圧、心拍数、血清ナトリウム、および総コレステロールは低値であった。内服薬には大きな違いを認めなかったが、心エコー検査上は左房径、左室容積、下大静脈径が高値であった。観察期間中央値1年 (interquartile range : 91-622 days) のうちに264人 (39.1%) の高齢心不全患者において心血管イベントを生じ、高 MELD-XI 群において有意に多く観察された ($p < 0.001$)。

Kaplan-Meier 分析において、高 MELD-XI 群は有意に予後不良であり ($\log\text{-rank } p \leq 0.001$)、COX ハザード分析において、MELD-XI は年齢、性別、BMI、NYHA class III/IV、以前の心不全入院歴、収縮期血圧、

虚血性心疾患、心室頻拍、貧血、BNP、LVEF で調整した式において、独立した予後予測因子となり得た (HR : 1.033, 95 % CI : 1.006-1.061, $p = 0.015$)。

【考察】 本研究において、MELD-XI による多臓器障害の高齢心不全入院患者に対する臨床的影響を明らかにした。まず、MELD-XI が高い患者は低い患者よりも心血管イベントが有意に多く、予後が不良であった。次に MELD-XI 高値は年齢、性別、および広く知られている予後予測因子 (NYHA class III/IV、以前の心不全入院歴、BNP、LVEF) とは独立して、心血管イベント増加と有意な関連があった。これらから、MELD-XI が心血管イベントのリスク層別化に適切な指標となる可能性があること、多臓器障害が高齢心不全入院患者の予後の悪化と関連することが示された。

これまで、一般的な心不全における MELD-XI の有用性を評価した研究はほとんどなく、本研究では心血管イベントと心不全再入院を含んだ複合エンドポイントの詳細な検討を行った最初の報告となる。

心不全による臓器障害は心拍出量および臓器灌流の低下、交感神経の活性化、右室不全、三尖弁逆流、中心静脈圧や腹腔内圧の上昇などが併存することで発生すると考えられている。本研究では心エコー検査上、高 MELD-XI において、下大静脈径と左房径、左室容積の拡大を認め、中心静脈圧の上昇と容量負荷が示され、これまでの心不全における多臓器障害に関する報告と同様の所見が得られた。

MELD-XI はクレアチニンやビリルビンなどの日常的に測定される客観的なパラメーターを使用し、抗凝固療法を受けている患者にも適応できる。また、心腎および心肝連関の指標として高齢心不全患者の予後予測に有用である可能性を示した点において、本研究結果は臨床的意義も大きいものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

高齢者は複数の併存疾患を抱えていることが多く、心不全患者において多臓器の障害は予後を悪化させる。The composite Model for End-Stage Liver Disease Score (MELD) は末期の肝疾患患者の予後予測や肝移植の適応を判断するスコアとして開発されたが、重症心不全患者においても予後を予測出来ることが報告されている。近年、抗凝固療法が導入されている患者においても使用可能な The composite Model for End-Stage Liver Disease Excluding International Normalized Ratio Score (MELD-XI) が開発された。MELD-XI による高齢心不全患者の心血管死や心不全

入院といった心血管イベントにおける有用性は明らかではなく、本研究では、MELD-XIが高齢心不全患者における、心血管イベントの予測因子となり得るか調査した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 高 MELD-XI 群 (≥ 11) は男性、NYHA class III/IV、以前の心不全入院歴、高尿酸血症、心室頻拍、貧血、および虚血性心疾患が多く含まれ、収縮期血圧、心拍数、血清ナトリウム、および総コレステロールは低値であった。心エコー検査上は左房径、左室拡張末期容積、下大静脈径が高値であった。
2. 観察期間中央値1年のうちに264人 (39.1%) の高齢心不全患者において心血管イベントを生じ、高 MELD-XI 群において有意に多く観察された ($p < 0.001$)。
3. カプランマイヤー分析において、高 MELD-XI 群は有意に予後不良であった ($\log\text{-rank } p \leq 0.001$)。
4. COX ハザード分析において、MELD-XI は年齢、性別、BMI、NYHA class III/IV、以前の心不全入院歴、収縮期血圧、虚血性心疾患、心室頻拍、貧血、BNP、LVEF で調整した式において、独立した予

後予測因子となり得た (HR : 1.033, 95 % CI : 1.006-1.061, $p = 0.015$)。

5. MELD-XI の各構成要素の識別能を比較するために、年齢と性別の影響を調整したモデルを作成した。AUC を比較すると MELD-XI はクレアチニン、総ビリルビンより有意に高い C 統計量が得られた。

以上より、本研究では、MELD-XI による多臓器障害の高齢心不全入院患者に対する臨床的影響を明らかにした。MELD-XI が高い患者は心血管イベントが有意に多く、予後が不良であった。また、MELD-XI 高値は年齢、性別、および広く知られている予後予測因子 (NYHA class III/IV、以前の心不全入院歴、BNP、LVEF) とは独立して、心血管イベント増加と有意な関連があり、リスク層別化に適切な指標となる可能性があることが示された。加えて、MELD-XI はクレアチニンやビリルビンなどの日常的に測定される客観的なパラメーターで評価出来、抗凝固療法を受けている患者にも適応できる点で優れており、今後の心不全加療の一助となることが期待された。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。

Investigation of factors associated with allergic transfusion reaction due to platelet transfusion and the efficacy of platelets resuspended in BRS-A in adult patients (成人領域における血小板輸血に伴ったアレルギー性輸血副反応に関与する因子の探索と BRS-A を用いた洗浄血小板の効果)

山中 万次郎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】血液製剤による輸血副反応としてアレルギー性輸血副反応 (ATR) が高頻度で発症することが知られている。特に、濃厚血小板製剤 (PC) 輸血が ATR 発症の原因となることが多いが、血漿の大部分を除去した洗浄 PC を使用すれば ATR を予防できることも示されている。したがって ATR の発症には血漿成分中に含まれるドナーまたは製剤に由来する因子が深く関与していることが推察される。一方、日常診療においては特定の患者が ATR を繰り返し発症することも経験されるため、ATR の発症には患者側の要因も関与していると考えられる。しかしながら、これらの ATR 発症メカニズムはまだ完全には明らかにされていない。また、患者側のリスク因子を有する症例に対して洗浄 PC を用いることによって、どの程度効果的に ATR が予防できるかについての検討も十

分なされているとは言い難い状況にある。そこで、本研究では PC 輸血が行われた成人症例を対象に ATR 発症に関連する患者側のリスク因子について解析を行うこととした。さらに、患者側のリスク因子を有する症例に対して洗浄 PC を導入した際の ATR 予防効果についても併せて検討した。

【対象・方法】2015年10月1日から2018年9月30日の期間中に信州大学医学部附属病院において PC 輸血が実施された全ての成人患者を対象とした。臨床的背景 (年齢、身長、体重、体表面積、BMI、性別、食物アレルギー歴、薬剤アレルギー歴、喫煙歴、飲酒歴、原疾患、ABO 血液型、輸血回数、輸血期間、他の輸血製剤の併用) と ATR 発症との関連性を Mann-Whitney U 検定または Fisher の正確検定にて検討した後、Logistic 回帰分析を行いリスク因子の抽出を行った。また、対象期間中に他の薬剤で予防困難な複数回の ATR を発

症した症例に対しては洗浄 PC が導入されていたが、抽出されたリスク因子を用いて患者を 2 群に分けた際の洗浄 PC の導入前後における ATR の発症頻度を Fisher の正確検定で比較した。さらに輸血効果として輸血後 24 時間後の補正血小板増加数 (CCI_{24h}) を Mann-Whitney U 検定で確認した。

【結果】対象期間中に 914 名の成人患者に対して 4677 本の PC 輸血が行われた。ATR は 65 名 (7.1 %) に対する 92 本 (2.0 %) で発症していた。ATR 発症に関連する患者背景を検討したところ、年齢、原疾患、他の輸血製剤との併用の 3 項目が患者側のリスク因子であった。特に、40 歳以下の症例、血液疾患においては ATR の発症頻度が高くなることが示され、新鮮凍結血漿 (FFP) 輸血を併用した症例では ATR 発症が低頻度であった。これらリスク因子のうち特に血液疾患の有無に着目し、ATR 発症例に対する洗浄 PC 導入前後の ATR 発症頻度を検討した。血液疾患では洗浄 PC の導入によって患者・製剤本数あたりいずれの検討においても ATR 発症頻度が有意に減少していた。さらに洗浄 PC による輸血効果も非洗浄 PC 輸血と同等の結果であった。また洗浄 PC を導入したことによる有害事象も認めなかった。

【考察】ATR の発症にはドナーや製剤に由来する因子とは別に、患者側の要因も関与していることが本研究によって明らかとなった。ATR に関与する患者側因子に関するエビデンスは乏しいものの、過去には患者が保有するアレルギー体質との関連性が指摘されている。本研究においてリスク因子となった年齢や原疾患の相違も患者側の免疫学的背景を反映している可能性がある。さらに FFP が併用された症例においては ATR 発症が抑制されるような免疫学的修飾が加えられている可能性が示唆された。一方、患者側のリスク因子 (血液疾患) を有する症例であっても洗浄 PC を用いることによって効果的に ATR が予防できることが示された。今後、更なる検討を重ねた上で特にリスクの高い症例に対しては洗浄 PC を優先的に導入することで、より安全な輸血療法が実現できうと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

血液製剤による輸血副反応ではアレルギー性輸血副反応 (ATR) が高頻度であり、特に濃厚血小板製剤 (PC) 輸血が原因となることが多い。ATR 発症には血漿成分中に含まれるドナーまたは製剤に由来する因子もしくは患者側の要因が関与していると考えられるが詳細なメカニズムはまだ解明されていない。本研究

では PC 輸血が行われた成人症例を対象に ATR 発症に関連する患者側のリスク因子について解析を行った。さらに、患者側のリスク因子を有する症例に対して洗浄 PC を導入した際の ATR 予防効果についても併せて検討した。

2015 年 10 月 1 日から 2018 年 9 月 30 日の期間中に信州大学医学部附属病院において PC 輸血が実施された全ての成人患者を対象とした。臨床的背景と ATR 発症との関連性を Mann-Whitney U 検定または Fisher の正確検定にて検討した後、Logistic 回帰分析を行いリスク因子の抽出を行った。また、抽出されたリスク因子を用いて患者を 2 群に分けた際の洗浄 PC の導入前後における ATR の発症頻度を Fisher の正確検定で比較した。さらに輸血効果として輸血後 24 時間後の補正血小板増加数を Mann-Whitney U 検定で確認した。

その結果、山中は次の結論を得た。

1. ATR 発症に関連する患者背景を検討したところ、年齢、原疾患、他の輸血製剤との併用の 3 項目が患者側のリスク因子であった。特に、40 歳以下の症例、血液疾患においては ATR の発症頻度が高く、新鮮凍結血漿 (FFP) 輸血を併用した症例では ATR 発症が低頻度であることが示された。
2. これらリスク因子のうち血液疾患の有無に着目し、ATR 発症例に対する洗浄 PC 導入前後の ATR 発症頻度を検討したところ血液疾患では洗浄 PC の導入によって患者・製剤本数あたりいずれの検討においても ATR 発症頻度が有意に減少していた。
3. さらに洗浄 PC による輸血効果も非洗浄 PC 輸血と同等の結果であり、洗浄 PC 導入による有害事象も認めなかった。

これらの結果より、ATR の発症にはドナーや製剤に由来する因子とは別に、患者側の要因も関与していることが明らかとなった。本研究においてリスク因子となった年齢や原疾患の相違も患者側の免疫学的背景を反映している可能性がある。さらに FFP が併用された症例においては ATR 発症が抑制されるような免疫学的修飾が加えられている可能性が示唆された。一方、患者側のリスク因子 (血液疾患) を有する症例であっても洗浄 PC を用いることによって効果的に ATR が予防できることが示された。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。

Promoter hypomethylation of SKI in autoimmune pancreatitis (自己免疫性膵炎における SKI 遺伝子プロモーター領域の脱メチル化)

衣川 康弘

(論文の内容の要旨)

【はじめに】自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis; AIP) は原因不明の炎症性疾患であり、IgG4高値を血清学的特徴とする代表的な IgG4関連疾患である。また、病理学的に病変組織へのリンパ球、形質細胞浸潤および花筵状線維化を呈することが特徴である。さらに近年、AIP と発癌との関連性も報告されている。慢性炎症と発癌との関連性としては、潰瘍性大腸炎や慢性膵炎などにおいて発癌に関連する遺伝子にエピジェネティック変異一つである DNA メチル化異常が生じることが知られており、DNA メチル化異常は慢性炎症組織における発癌過程に関与していると考えられている。しかし、慢性炎症性疾患である AIP における発癌関連遺伝子の DNA メチル化異常の解析は報告がほとんどない。本研究では AIP における網羅的メチル化アレイ解析の結果を基に選定した、SKI についてプロモーター領域の CpG island におけるメチル化状態を解析した。SKI はトリレトロウイルス (ν -SKI) の形質転換タンパクとして同定され、TGF- β /Smad シグナル伝達経路を負に制御する因子である。我々はさらに AIP における SKI のメチル化状態についての再検証や臨床病理学的な検討を加えた。

【材料・方法】AIP10例、膵癌によって生じた閉塞性膵炎 (obstructive pancreatitis area (area はいるか) in pancreatic ductal adenocarcinoma: PDA) 14例、正常膵 (normal pancreas: NP) 4例を用い、マクロダイセクションしたホルマリン固定パラフィン包埋切片から DNA を抽出し、bisulfite 処理をした後、イルミナ Infinium Human Methylation 450K BeadChip によって網羅的なメチル化状態のアレイ解析を行った。その結果、がん遺伝子の一つである SKI (Sloan-Kettering Institute) 遺伝子が、AIP においてプロモーター領域に高度な脱メチル化を生じていることが判明した。

そこで我々は AIP10例、PDA14例、NP9例を用いて再検証を行った。方法はマクロダイセクションしたホルマリン固定パラフィン包埋切片から DNA を抽出し、bisulfite 処理をした後、定量 Methylation Specific PCR (MSP) 法を実施した。結果をもとに相対定量

法を用いてメチル化率を算出した。さらに、AIP の病理組織における SKI の発現について免疫組織化学を用いて解析した。染色性の評価は染色強度 (0:陰性, 1:弱陽性, 2:中等度陽性, 3:強陽性) を示す intensity score (IS) と強拡大一視野の陽性細胞割合 (0:陰性, 1:<10%, 2:10-50%, 3:>50%) を示す percentage score (PS) を 0-3 に分類し、IS と PS の和から staining-index (SI) を算出した。

【結果】SKI メチル化率は AIP において 7.11% (3.35-18.45%), PDA において 28.89% (14.87-35.15%), NP において 60.55% (49.72-76.11%) を示し、PDA, NP に比して AIP において有意に低値であった (各 $p=0.0041$, $p=0.0011$)。免疫組織化学では AIP の膵腺房細胞および膵管上皮細胞、PDA の膵腺房細胞が陽性となった。NP において陽性は確認されなかった。また、SKI の SI は AIP において 4.0 (3.75-5.0), PDA において 3.5 (2.75-5.0), NP において 0 であった。AIP は NP に比して有意に高値を示した ($p=0.0001$) が、AIP と PDA における SI に有意差は認められなかった ($p=0.2610$)。SKI のメチル化率と SI には中等度の負の相関傾向が認められた ($r=-0.6142$, $p=0.0785$)。SKI のメチル化率と血清 IgG4 値には強い負の相関が認められた ($r=-0.8503$, $p=0.0075$)。また、SI と血清 IgG4 値では中等度の正の相関が認められた ($r=0.6739$, $p=0.0466$)。

【考察】本研究から AIP において SKI プロモーター領域におけるメチル化率の低下とそれに伴う AIP の組織における SKI の発現量増加が明らかとなった。AIP における SKI の増加は、TGF- β シグナル経路による細胞増殖抑制や転写活性機能を負に制御することで、AIP における腫瘍発生の一因となる可能性がある。さらに、本研究からエピジェネティック変異がその制御の一端を担っていることが示唆された。また、SKI メチル率と血清 IgG4 値との有意な負の相関は、SKI による IgG4 産生制御機構が存在する可能性を示唆し、SKI が AIP の病因に関与する可能性も認められた。しかし、SKI の慢性炎症や IgG4 関連疾患、発癌過程における役割は明確には解明されず、今後のさらなる研究が望まれる。

(論文審査の結果の要旨)

自己免疫性膵炎 (autoimmune pancreatitis; AIP) は原因不明の炎症性疾患であり, IgG4高値を血清学的特徴とする代表的な IgG4関連疾患である。また, 病理学的に病変組織へのリンパ球, 形質細胞浸潤および花筵状線維化を呈することが特徴である。さらに近年, AIP と発癌との関連性も報告されている。慢性炎症と発癌の関連性としては, 潰瘍性大腸炎や慢性膵炎などにおいて発癌に関連する遺伝子にエピジェネティック変異の一つである DNA メチル化異常が生じることが知られており, DNA メチル化異常は慢性炎症組織における発癌過程に関与していると考えられている。しかし, 慢性炎症性疾患である AIP における発癌関連遺伝子の DNA メチル化異常の解析は報告がほとんどない。本研究では AIP における網羅的メチル化アレイ解析の結果を基に選定した, がん遺伝子である *SKI* についてさらにメチル化状態の再検索を行い, 臨床病理学的な検討を加えた。

その結果, 衣川康弘は以下の結論を得た。

1. AIP における *SKI* メチル化率は膵癌によって生じた閉塞性膵炎 (PDA), 正常膵 (NP) と比しては有意に低値であった。
2. *SKI* に対する免疫組織化学において, AIP の膵

腺房細胞および膵管上皮細胞, PDA の膵腺房細胞に陽性であったが, NP では陰性であった。

3. AIP は NP に比して *SKI* の染色指数 (SI) が有意に高値であったが, AIP と PDA において有意差は認められなかった。
4. *SKI* のメチル化率と血清 IgG4値には強い負の相関, SI と血清 IgG4値では中等度の正の相関, *SKI* のメチル化率と SI は中等度の負の相関傾向が認められた。

本研究により AIP において *SKI* プロモーター領域の低メチル化が *SKI* の転写を抑制することや膵腺房細胞および膵管上皮細胞の *SKI* 発現増加が認められたことは, *SKI* 低メチル化が発現の一端を担い, TGF- β シグナル経路の細胞増殖抑制機能や転写活性機能を抑制することで AIP における腫瘍発生の一因となる可能性が明らかとなった。また今後は *SKI* 発現の DNA メチル化以外の制御機構や *SKI* 脱メチル化による IgG4産生機構に関するさらなる解析も加え, AIP と発癌の関連性や AIP の病因についてのより深い理解が期待される。

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。

Adrenomedullin-RAMP2 system ameliorates subretinal fibrosis by suppressing epithelial-mesenchymal transition in age-related macular degeneration (アドレノメデュリン-RAMP2 系は, 加齢黄斑変性において上皮間葉転換を抑制し, 網膜下線維化を改善する)

田 中 正 明

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD) は失明原因の上位を占める眼疾患である。滲出型 AMD は, 脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) からの滲出液の漏出や, 血管破綻による網膜出血により視力障害を引き起こす。CNV の形成には, vascular endothelial growth factor (VEGF) が重要な役割を果たしていると考えられている。このため, 現在 AMD の治療としては, 抗 VEGF 薬の硝子体投与が主に行われている。しかしながら, 抗 VEGF 薬療法を繰り返すことで網膜下線維化を引き起こし, 滲出性変化とは異なる不可逆的な視力障害をきたす症例が存在する。我々は多彩な生理活性を有するペプチドであるアドレノメデュリン (AM) と, その受容体活性調節タンパクである

RAMP2に着目した。AM-RAMP2系には, 抗炎症作用, 抗線維化作用, 臓器保護作用などが報告されている。本研究では, AMD における AM-RAMP2系の病態生理学的意義, 特に網膜下線維化や上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) に対する影響に注目して検討を行った。

【材料および方法】1) 9-12週齢雄の野生型 (WT) マウスおよび AM, RAMP2のヘテロノックアウト (KO) マウスを用いた。AMD の生体モデルであるレーザー誘導脈絡膜新生血管 (laser-induced choroidal neovascularization: LI-CNV) をマウス眼へ誘導し, 7日後に眼球を摘出して脈絡膜展開標本を作成した。免疫染色を行い, CNV や線維化の面積, マクロファージ浸潤を評価した。また, LI-CNV 誘導マウスに対して, AM あるいは PBS の硝子体注射による影響を検

討した。

2) LI-CNV 誘導マウスに対して、浸透圧ポンプを用いて AM あるいは PBS を持続投与し、14日目の脈絡膜サンプルを用いてアレイアッセイを行い、線維化関連因子の発現を網羅的に評価した。

3) ヒト網膜色素上皮細胞 (ARPE19) に対して、TGF- β +TNF- α の48時間刺激を行い、EMT を誘導した。AM 投与の有無による EMT への影響を、上皮系マーカー (ZO-1) や間葉系マーカー (SM22 α) を指標にし、免疫染色およびリアルタイム PCR にて検討した。

4) TGF- β 阻害剤 (SB431542), あるいは CXCR4 阻害剤 (Plerixafor) を、LI-CNV 誘導した RAMP2KO マウスと WT マウスへ投与し、CNV と線維化面積におよぼす影響を検討した。

5) 網膜下線維化における TGF- β -RhoA-ROCK1-CXCR4経路の関与と、AM-RAMP2系との関連を検討するため、レーザー処置した RAMP2 KO マウスと WT マウスの脈絡膜において、免疫染色やリアルタイム PCR によって RhoA, ROCK1の発現を検討した。さらに ROCK1, CXCR4遺伝子発現に対する、SB431542, ROCK1阻害剤 (Y27632) の投与の影響を検討した。

【結果】1) AM, RAMP2 KO マウスでは、WT マウスと比較して CNV は拡大し、網膜下線維化、マクロファージ浸潤の悪化を認めた。反対に、LI-CNV を誘導したマウスに AM を硝子体投与したところ、CNV の縮小、網膜下線維化、マクロファージ浸潤の改善を認めた。

2) LI-CNV を誘導した脈絡膜では、TGF- β , CXCR4, CTGF, THBS1などの線維化関連因子の発現が上昇したが、AM 投与により低下した。

3) TGF- β +TNF- α 刺激は、ARPE19において EMT を誘導し、上皮系マーカーの発現減少と間葉系マーカーの発現亢進をもたらしたが、AM の投与によりそれらは抑制された。また、AM の投与は、EMT を誘導した ARPE19において、TGF- β , RhoA, ROCK1, CXCR4の遺伝子発現を抑制した。

4) LI-CNV モデルにおける SB431542, Plerixafor の投与によって、RAMP2 WT マウスと KO マウスの間でみられた CNV と網膜下面積の差は消失した。

5) RAMP2+/-マウスでは、LI-CNV モデルにおいて、脈絡膜の RhoA, ROCK1の発現亢進を認めた。SB431542, あるいは ROCK1阻害剤 (Y27632) を投与すると、脈絡膜における RhoA, ROCK1の遺伝子

発現は低下した。

【結論】AM-RAMP2系は、TGF- β -RhoA-ROCK1-CXCR4経路を介する EMT を抑制することで、LI-CNV における網膜下線維化を改善する。AM-RAMP2系は、AMD における網膜下線維化に対して、有望な治療標的になることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

加齢黄斑変性 (AMD) は失明原因の上位を占める眼疾患であり、脈絡膜新生血管 (CNV) が原因となり視力障害を引き起こす。CNV の形成には、血管内皮増殖因子 (VEGF) が重要な役割を果たしており、AMD の治療として抗 VEGF 薬の硝子体投与が主に行われている。しかしながら、抗 VEGF 薬療法を繰り返すことで網膜下線維化を引き起こし、不可逆的な視力障害をきたす症例が存在する。田中は多彩な生理活性を有するペプチドであるアドレノメデュリン (AM) と、その受容体活性調節タンパクである RAMP2に着目した。AM-RAMP2系には、抗炎症作用、抗線維化作用、臓器保護作用などが報告されている。田中は、AMD における AM-RAMP2系の病態生理学的意義、特に網膜下線維化や上皮間葉転換 (EMT) に対する影響に注目して検討を行った。

その結果田中正明は次の結論を得た。

1. レーザー誘導脈絡膜血管新生 (LI-CNV) をマウスに誘導すると、AM, RAMP2 ノックアウト (KO) マウスでは、野生型 (WT) マウスと比較して CNV は拡大し、網膜下線維化、マクロファージ浸潤の悪化を認めた。反対に、LI-CNV を誘導したマウスに AM を硝子体投与したところ、CNV の縮小、網膜下線維化、マクロファージ浸潤の改善を認めた。
2. LI-CNV を誘導した脈絡膜では、TGF- β , CXCR4, CTGF, THBS1などの線維化関連因子の発現が上昇したが、AM 投与により低下した。
3. 網膜色素上皮細胞 ARPE19に対する TGF- β +TNF- α 刺激は、EMT を誘導し、上皮系マーカーの発現減少と間葉系マーカーの発現亢進をもたらしたが、AM の投与によりそれらは抑制された。また、AM の投与は、EMT を誘導した ARPE19において、TGF- β , RhoA, ROCK1, CXCR4の遺伝子発現を抑制した。
4. LI-CNV モデルにおける TGF- β 阻害剤 (SB431542), CXCR4阻害剤 (Plerixafor) の投与によって、WT マウスと RAMP2 KO マウスの間でみられた CNV と網膜下面積の差は消失した。

5. RAMP2 KO マウスでは、LI-CNV モデルにおいて、脈絡膜の RhoA, ROCK1 の発現亢進を認めた。SB431542, あるいは ROCK1 阻害剤 (Y27632) を投与すると、脈絡膜における RhoA, ROCK1 の遺伝子発現は低下した。

以上の結果から、田中正明は、AM-RAMP2系は、TGF- β -RhoA-ROCK1-CXCR4経路を介する EMT を

抑制することで、LI-CNV における網膜下線維化を改善することを示し、AM-RAMP2系は、AMD における網膜下線維化に対して、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。

Dietary restriction suppresses steatosis-associated hepatic tumorigenesis in hepatitis C virus core gene transgenic mice (食事制限はC型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいて脂肪肝に関連した肝腫瘍の発生を抑制する)

JIA FANGPING

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 食事制限は肥満、メタボリックシンドローム、心血管疾患、糖尿病を予防する有用な方法である。肝細胞癌の危険因子として、近年肥満やメタボリックシンドローム、脂肪肝が重要視されているが、脂肪肝に起因する肝腫瘍発生に対して、食事制限が本当に有用かどうかは不明である。本研究の目的は、脂肪肝から肝癌を自然発症するモデルマウスを用いて、食事量を30%減らすことにより肝発癌が抑制できるかを検証すること、またその分子メカニズムを解明することである。

【方法】 C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスは、加齢に伴いインスリン抵抗性、耐糖能異常、脂肪肝を発症し、約18~20か月齢で約4割の雄マウスに肝腫瘍が発生する。そこで2~3か月齢の雄マウスを通常量食事投与群、通常の70%量の食事投与群(30%食事制限)の2群に無作為に振り分けた。15か月後に解剖し、肝腫瘍の個数や径を計測した。また血清と肝臓を採取し、血中脂質・インスリン濃度の測定、非腫瘍部の病理組織学的解析、リアルタイムPCR法による mRNA の定量、ウェスタンブロット法による蛋白発現の定量、免疫染色、トランスクリプトーム解析を施行した。

【結果】 30%食事制限により、肝腫瘍の発生頻度、個数と腫瘍体積が有意に減少した。肝臓ではインフラマソームや酸化ストレス・小胞体ストレスの軽減、nuclear factor kappa B の活性化の抑制、signal transducer and activator of transcription (STAT) 3/5 や Extracellular signal regulated kinase の抑制による癌遺伝子サイクリン D1 の発現低下、血中インスリン・IGF1 の低下に伴うインスリン-PI3K-AKT 経路の抑制、

細胞老化促進因子の抑制、オートファジーの活性化、AMPK/FGF21 の活性化が複合的に生じていた。トランスクリプトーム解析により、なかでも STAT3 経路が食事制限によって最も顕著に抑制されたことが判明した。

【結論】 30%食事制限は肝臓の炎症シグナル、細胞ストレス、肝細胞の増殖、インスリンシグナル、および細胞老化を抑制することで、脂肪肝に関連する肝腫瘍の発生を抑制した。これらの結果は、近年増加傾向で問題となっている脂肪肝関連肝癌に対して、食事制限の有用性とその分子メカニズムを提示している。

(論文審査の結果の要旨)

食事制限は肥満、メタボリックシンドローム、心血管疾患、糖尿病を予防する有用な方法である。肝細胞癌の危険因子として、近年肥満やメタボリックシンドローム、脂肪肝が重要視されているが、脂肪肝に起因する肝腫瘍発生に対して、食事制限が本当に有用かどうかは不明である。本研究の目的は、脂肪肝から肝癌を自然発症するC型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスを用いて、食事量を30%減らすことにより肝発癌が抑制できるかを検証すること、またその分子メカニズムを解明することである。

その結果、「JIA FANGPING」は以下の結論を得た。

1. 30%食事制限により、肝腫瘍の発生頻度、個数と腫瘍体積が有意に減少した。
2. 30%食事制限により、肝臓ではインフラマソームや酸化ストレス・小胞体ストレスの軽減、nuclear factor kappa B の活性化の抑制、signal transducer and activator of transcription (STAT) 3/5 や Extracellular signal regulated kinase の抑制による癌遺伝子サイクリン D1 の発現低下、血中インスリン

ン・IGF1の低下に伴うインスリン-PI3K-AKT 経路の抑制, 細胞老化促進因子の抑制, オートファジーの活性化, AMPK/FGF21の活性化が複合的に生じていた。

3. トランスクリプトーム解析により, なかでも STAT3 経路が食事制限によって最も顕著に抑制されたことが判明した。

30% 食事制限は肝臓の炎症シグナル, 細胞ストレス, 肝細胞の増殖, インスリンシグナル, および細胞

老化を抑制することで, 脂肪肝に関連する肝腫瘍の発生を抑制した。肥満, メタボリックシンドローム, 糖尿病などを背景に発生する脂肪肝関連肝癌を, 30% 食事制限により予防できる可能性が示唆された。

本研究は, 近年増加傾向で問題となっている脂肪肝関連肝癌に対して, 食事制限の有用性とその分子メカニズムを提示している。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。

Low-dose trametinib and Bcl-xL antagonist have a specific antitumor effect in KRAS-mutated colorectal cancer cells (低濃度トラメチニブと Bcl-xL 阻害剤は, KRAS 変異型大腸癌細胞に対して特異的な抗腫瘍効果を示す)

小 山 誠

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 KRAS 遺伝子変異は大腸癌全体の約40% に認められる。抗 EGFR 抗体薬 (Cetuximab, Panitumumab) は KRAS 野生型大腸癌の予後を延長させたが, KRAS 変異型大腸癌には効果は認めず, 予後不良である。本研究は, KRAS 変異型大腸癌に対する特異的な治療法の開発を目的とし, *in vitro*, *in vivo* における KRAS 遺伝子変異導入細胞株を用いた実験系を確立し, 遂行した。

【方法】 KRAS 野生型大腸癌細胞株, CACO-2, SW48 を用いて実験を行った。これらの細胞に対して, PMX-IRES-GFP ベクター, pDON-5-Neo ベクター (レトロウイルス) を用いて, KRAS 野生型, 変異型 (G12D, G12V, G13D) の遺伝子導入を行った。これら遺伝子導入細胞において, 増殖能を細胞カウント, CCK-8 アッセイにて検討した。また KRAS の下流であるリン酸化 ERK のタンパク発現を評価した。また PMX-IRES-GFP ベクターにて遺伝子導入を行った細胞を用いて, 我々が提唱するミックスカルチャーアッセイ法により, 抗癌剤, 分子標的薬のスクリーニングを行った。その結果, MEK 阻害剤 (Trametinib) と抗アポトーシスタンパク Bcl-xL 阻害剤 (ABT263) の併用療法に着目した。Bcl-xL の mRNA, タンパクの発現を RT-qPCR, Western blotting にて評価した。MEK 阻害剤 (Trametinib) と Bcl-xL 阻害剤 (ABT263) 併用による細胞死誘導効果を, Annexin-7AAD アッセイ及び, Western blotting にて Caspase 3 発現を評価し検討を行った。*in vivo* において, ノードマウスに対して KRAS 野生型, 変異型 (G12V) 細胞の皮下移植を行

い, Xenograft model を作成した。KRAS 野生型, 変異型の増殖能を評価し, Bcl-xL の発現を RT-qPCR, 免疫染色にて評価した。さらに KRAS 変異型 (G12V) Xenograft model に対して Trametinib, ABT263 を投与し, 併用療法による抗腫瘍効果を, 腫瘍の大きさを測定し評価した。また, 腫瘍組織の TUNEL 染色を行いアポトーシスの評価を行った。

【結果】 KRAS 変異型は野生型に比べ高い増殖能を示し, リン酸化 ERK タンパクの発現亢進を認めた。ミックスカルチャーアッセイ法を用いた薬剤感受性スクリーニングでは, KRAS 変異型は Trametinib に対する感受性を認め, その効果は ABT263 との併用により増強した。そこで Bcl-xL mRNA, タンパクの発現を評価したところ, KRAS 変異型では野生型に比べ, 発現が亢進していた。さらに低濃度の Trametinib (1, 5, 10 nM) を投与した際には, 濃度依存性に Bcl-xL タンパク発現が亢進するという現象を確認した。そこで低濃度の Trametinib (10nM) と ABT263 (10 μ M) を投与したところ, KRAS 変異型において Cleaved Caspase 3 の発現上昇を認め, より効果的にアポトーシスを誘導した。*in vivo* Xenograft model でも, KRAS 変異型は高い増殖能と Bcl-xL の発現亢進を認めた。そして KRAS 変異型 (G12V) に対しては, Trametinib と ABT263 の併用により, 単剤投与に比べ高い抗腫瘍効果を示した。

【結論】 本実験では KRAS 遺伝子変異により亢進した, リン酸化 ERK と抗アポトーシスタンパク Bcl-xL を標的とする, Trametinib + ABT263 併用療法が, KRAS 変異型大腸癌細胞に対し特異的な抗腫瘍効果を示すこと

を示した。またミックスカルチャーアッセイ法は、KRAS 変異に対して選択的に Trametinib + ABT263 併用療法が有効であることを示し、更なる *in vitro*, *in vivo* の検討で同効果が証明され、有用なスクリーニングアッセイであった。Trametinib + ABT263 併用療法は、KRAS 変異型大腸癌に対する新規治療法となる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

KRAS 遺伝子変異型大腸癌は、実臨床において予後不良であり、KRAS に対する特異的な治療法の開発が求められている。KRAS の下流には RAF/MEK/ERK 経路を始め様々な増殖シグナルが存在し、発癌や癌の増殖に寄与すると考えられおり、同シグナルを治療ターゲットとすることで、より高い治療効果が期待される。

本研究では、KRAS 野生型大腸癌細胞株、CACO-2、SW48 に対して、レトロウイルスベクターを用いて KRAS 遺伝子変異導入細胞株を作成し、そのシグナル変化を qPCR, Western blotting を用いて行い解析した。また、ミックスカルチャーアッセイとう実験系を構築し、KRAS 変異に対して、有効な薬剤のスクリーニングを行った。さらに、ヌードマウスを用いた皮下移植モデルを作成し、KRAS 野生型と変異型の増殖能及び、薬剤投与による抗腫瘍効果の検討を行った。

その結果、小山 誠は以下の結論を得た。

1. KRAS 遺伝子変異導入大腸癌細胞株は増殖能が亢進し、リン酸化 ERK, 抗アポトーシスタンパク Bcl-xL の発現が亢進した。
2. ミックスカルチャーアッセイを用いた薬剤感受性スクリーニングの結果、KRAS 変異型細胞に対する MEK 阻害剤 (Trametinib) の高い感受性と、Trametinib と Bcl-xL 阻害剤 (ABT263) の併用による相乗効果を認めた。
3. 低濃度 Trametinib (0, 15, 5, 10 nM) を投与した際に、濃度依存的に Bcl-xL タンパクの発現上昇を認めた。
4. 低濃度 Trametinib と ABT263 の併用により、KRAS 変異型に対して特異的にアポトーシスを誘導した。
5. *in vivo* 皮下移植モデルにおいて、KRAS 変異型では腫瘍形成能及び、Bcl-xL の発現が亢進した。
6. Trametinib と ABT263 は、低濃度でも併用することにより、*in vivo* で腫瘍形成能を強く抑制した。

これらの結果から、KRAS 遺伝子変異によりリン酸化 ERK, Bcl-xL といったシグナルが亢進することが明らかになった。亢進したこれらのシグナルをターゲットとした、Trametinib + ABT263 併用療法は、*in vitro*, *in vivo* で KRAS 変異型細胞に対し特異的に腫瘍増殖抑制効果を示し、KRAS 変異型大腸癌に対する新たな治療法とな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。

Correlation of clinicopathological features and *LGR5* expression in colon adenocarcinoma
(結腸腺癌における臨床病理学的特徴と *LGR5* 発現の相関)

佐藤 幸一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】癌幹細胞 (Cancer Stem Cell: 以下 CSC) は癌組織をつくる「親」になる細胞であり、癌の再発、転移などの原因になると考えられている。結腸、直腸の重要な幹細胞マーカーとして同定された *LGR5* (leucine-rich repeat-containing G-protein coupled 5) は、その後の検討で結腸直腸癌 (Colon Rectum Cancer: 以下 CRC) における CSC マーカーであることが報告された。*LGR5* の発現量が多いと CRC の予後が不良であるという報告もあるが、結論はついていない。また、簇出 (Tumor Budding: 以下 TB) は腫瘍先進部に存在する単個または5個未満の構成細胞からなる腫瘍胞巣と定義されている。TB は腫瘍の浸潤前線とされ、腫

瘍細胞の攻撃と宿主側の防御の最前線であり、重要な予後情報を得られると考えられている。しかし、CRC での TB における *LGR5* の役割は未だ解明されておらず、今回我々は CRC での TB における *LGR5* RNA 発現の有無と臨床病理学的特徴、予後の解析を目的とした。

【方法】2010年から2012年に信州大学医学部附属病院で外科的切除を受け TB を認めた CRC 症例のうち、1年以上観察可能であった患者55例 (男性29例、年齢33-87歳) を対象とした。患者の年齢、性別、組織学的分化度、脈管侵襲、TNM 分類などの臨床病理学的データはカルテや病理学的診断の記録を参照することに加え、組織を再染色し検討した。*LGR5* は RNA *in*

situ hybridization を用いて染色し、TB の細胞において3dot 以下を陰性、4dot 以上を陽性と定義した。年齢 (71歳以上, 70歳以下), 性別 (男, 女), 組織学的 grade (High, Low), 腫瘍組織浸潤リンパ球 grade (High, Low), 脈管侵襲 (High, Low), TNM 分類 (I-II, III-IV), TB の grade (High, Low) をそれぞれ2群に分け評価項目とし、後方視的に以下の検討を行った。1) CRC およびその TB における *LGR5* 発現頻度とその量, 2) カイ二乗検定を用いた TB における *LGR5* の発現量と臨床病理学的特徴の比較, 3) Kaplan-Meier 曲線を用いた TB における *LGR5* 発現の有無における OS の比較, 4) 単変量解析 (COX 比例 Hazard 解析) による予後に関する因子の検証。

【結果】 1) すべての症例において、*LGR5* の発現を認めたが、TB においては26例が陽性、29例が陰性であった。2) カイ二乗検定を用いた検討において、*LGR5* 陽性群は *LGR5* 陰性群より腫瘍組織浸潤リンパ球 grade が低かった ($p=0.0407$)。また、*LGR5* 陽性群は *LGR5* 陰性群より組織学的 grade が低かった ($p=0.0436$)。その他、年齢、性別、脈管侵襲、TNM 分類、TB において有意差は認めなかった。3) Kaplan-Meier 曲線を用いた解析では、*LGR5* 陽性群と陰性群で予後に差は認めなかった ($p=0.6931$)。4) COX 比例 Hazard 解析を用いた予後の予測因子の解析では、腫瘍組織浸潤リンパ球 grade が最も強い予後予測因子 (ハザード比 [HR] 3.46, 95 %信頼区間 [CI] 1.34-10.66; $p=0.0095$) であったが、やはり *LGR5* は予後予測因子 (HR 0.87, 95 %CI 0.33-2.02; $p=0.6928$) ではなかった。

【結論】 CRC においてすべての症例で *LGR5* が発現していたが、その TB においては症例によりさまざまであった。TB での *LGR5* 発現は腫瘍組織浸潤リンパ球の発現と関連していた。TB における *LGR5* 発現の有無では予後に差は認めなかったが、腫瘍組織浸潤リンパ球の低発現そのものは予後不良と関連しており、TB での *LGR5* 発現は予後と何らかの関連を持っている可能性があると考えられる。

【追記】 本論文タイトルは一度撤回し、同じタイトルで再投稿した論文です。

(論文審査の結果の要旨)

癌幹細胞 (Cancer Stem Cell: 以下 CSC) は癌組織をつくる「親」になる細胞であり、癌の再発、転移などの原因になると考えられている。結腸、直腸の重要な幹細胞マーカーとして同定された *LGR5* (leucine-

rich repeat-containing G-protein coupled 5) は、その後の検討で結腸直腸癌 (Colon Rectum Cancer: 以下 CRC) における CSC マーカーであることが報告された。*LGR5* の発現量が多いと CRC の予後が不良であるという報告もあるが、結論はついていない。また、簇出 (Tumor Budding: 以下 TB) は腫瘍先進部に存在する単個または5個未満の構成細胞からなる腫瘍胞巣と定義されている。TB は腫瘍の浸潤前線とされ、腫瘍細胞の攻撃と宿主側の防御の最前線であり、重要な予後情報を得られると考えられている。しかし、CRC での TB における *LGR5* の役割は未だ解明されておらず、CRC での TB における *LGR5* RNA 発現の有無と臨床病理学的特徴、予後の解析を目的とした。

2010年から2012年に信州大学医学部附属病院にて外科的切除を受けたCRCのうちTBを認め、1年以上観察可能であった患者55例を対象とした。*LGR5* は RNA *in situ* hybridization を用いて染色し、TB の細胞において3dot 以下を陰性、4dot 以上を陽性と定義した。年齢、性別、組織学的分化度、脈管侵襲、腫瘍浸潤リンパ球、TNM 分類などの臨床病理学的データと TB における *LGR5* の発現の有無を比較し検討した。

その結果、佐藤は次の結論を得た。

1. すべての症例において、*LGR5* の発現を認めたが、TB においては47 %の症例が陽性であった。
2. *LGR5* 陽性群は *LGR5* 陰性群より腫瘍組織浸潤リンパ球 grade が低く、また *LGR5* 陽性群は *LGR5* 陰性群より組織学的 grade が低かった。
3. Kaplan-Meier 曲線を用いた解析では、*LGR5* 陽性群と陰性群で予後に差は認めなかった。
4. COX 比例 Hazard 解析を用いた予後の予測因子の解析では、腫瘍組織浸潤リンパ球 grade が最も強い予後予測因子であったが、*LGR5* は予後予測因子ではなかった。

以上より、TB における *LGR5* 発現は腫瘍組織浸潤リンパ球と関連していることを示唆した。TB における *LGR5* 発現量と予後に関連は認めなかったが、腫瘍組織浸潤リンパ球は予後と関連しており、TB における *LGR5* が予後と何らかの関連を持っていることを示唆する可能性がある。この結果は CRC での TB における *LGR5* や癌幹細胞の役割を解明する上で一助になると思われる。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。

Oral Candida Mannan Concentrations Correlate with Symptoms/Signs of Ill Health and the Immune Status (口腔カンジダ菌量は宿主の免疫および全身状態 / 症状と関連する)

箱 山 友 祐

(論文の内容の要旨)

【背景】 口腔カンジダ菌は全ての年代の健常人の15～75 %から分離されるとされ、その菌量は、義菌の使用、唾液 pH の低下、唾液分泌量の低下、齶蝕病変を含む様々な口腔内環境によって影響を受ける。また、口腔カンジダ菌は免疫機能が低下した宿主において増加し、病原性を発揮すると考えられている。そのため、口腔カンジダ菌量の測定は、宿主の免疫状態を評価する指標となる可能性がある。これまでの研究では、口腔カンジダ菌の増加と宿主の免疫状態との関係が報告されているが、口腔カンジダ菌量と宿主の健康状態や症状（発熱、悪寒、下痢を含む）との関係は明らかではない。したがって、本研究では口腔カンジダ菌量と全身状態 / 症状との関連性を検討して、宿主の健康状態や免疫状態が口腔カンジダ菌量を測定することで推測できるか否かを明らかにすることを目的とした。

【対象および方法】 ① 健常人25名を対象とし、連続した5日間の朝夕に被験者より口腔うがい液を回収し、口腔カンジダ菌量の測定を行った。また、うがい液回収時に、全身状態の評価として質問紙票を用いて体温、嘔気 / 嘔吐、下痢、疼痛、不眠感の有無を調査し、カンジダ菌量との関連を検討した。② 殺細胞性化学療法を受けているがん患者10名を対象に、化学療法治療中の14日間にうがい液を採取し、口腔カンジダ菌量の測定を行った。また、①と同様に全身状態に関するアンケート調査および体温測定を行なった。加えて、2、3日ごとに白血球数も調査し、口腔カンジダ菌量との関連を検討した。なお、本研究では、口腔カンジダ菌量はカンジダマンナン抗原濃度 (U/ml) を用いて測定した。統計学的解析に関しては、目的変数をカンジダマンナン抗原濃度、説明変数を性別、年齢、義菌の使用、検体を回収した曜日、検体回収時間（朝または夕）として、最小二乗法を用いた多変量解析を用いた。カンジダマンナン抗原濃度と症状 / 徴候との関係は単変量解析にて分析し、続いて独立因子として症状 / 徴候と被験者間の違いを含んで多変量解析にて分析した（有意水準：5 %未満）。

【考察】 口腔カンジダマンナン抗原濃度の増加と健康人の悪寒の発生、化学療法治療中のがん患者の中等度

の発熱 (37.5-38.4℃) との間に有意な相関を認めた。これらの症状 / 徴候は宿主の全身状態と関連しており、免疫システムの活性化と関係している可能性が考えられた。本研究より、健康 / 免疫状態に関する予測因子として口腔カンジダマンナン抗原濃度の測定が有用となる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

口腔カンジダ菌は免疫機能が低下した宿主において増加し、病原性を発揮すると考えられている。そのため、口腔カンジダ菌量の測定は、宿主の免疫状態を評価する指標となる可能性がある。これまでの研究では、口腔カンジダ菌の増加と宿主の免疫状態との関係が報告されているが、口腔カンジダ菌量と宿主の健康状態や症状（発熱、悪寒、下痢を含む）との関係は明らかではない。したがって、本研究では口腔カンジダ菌量と全身状態 / 症状との関連性を検討して、宿主の健康状態や免疫状態が口腔カンジダ菌量を測定することで推測できるか否かを明らかにすることを目的とした。

本研究では、健常人25名と殺細胞性化学療法を受けているがん患者10名を対象に、口腔うがい液を回収して口腔カンジダ菌量（カンジダマンナン抗原濃度）の測定を行った。また同時に、全身状態の評価として体温、嘔気 / 嘔吐、下痢、疼痛、不眠感の有無、加えてがん患者に対しては血液検査で白血球数を調査し、カンジダ菌量との関連を統計学的に分析した。

その結果、箱山友祐は、口腔カンジダ菌量の増加と健康人の悪寒の発生、化学療法治療中のがん患者の中等度の発熱 (37.5-38.4℃) との間に有意な相関を認め、これらの症状 / 徴候は宿主の全身状態と関連しており、免疫システムの活性化と関係している可能性を示した。

本研究より、健康 / 免疫状態に関する予測因子として口腔カンジダ菌量の測定が有用とな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。

Association between pesticide usage during pregnancy and neonatal hyperbilirubinemia requiring treatment: the Japan Environment and Children's Study (母体の妊娠中の殺虫剤・防虫剤の使用と、治療を要する新生児高ビリルビン血症との関連)

柴 崎 拓 実

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 新生児高ビリルビン血症による黄疸は新生児のおよそ60%に見られる頻度の高い臨床症状であるが、治療の必要な新生児高ビリルビン血症の発症は、アジアでは遺伝的要因により白人の倍、黒人の3倍の頻度である。新生児におけるビリルビン値の異常高値は核黄疸、脳性麻痺のリスクを高めることから、アジア人は核黄疸のリスクが他の人種よりも高いと考えられる。世界中で広く使用されている殺虫剤、防虫剤には、有機リン、ピレスロイド、カーバメート、ネオニコチノイド、DEETなどがある。これらの薬剤は体内で抗酸化作用を有する酵素であるSOD (superoxide dismutase)、カタラーゼ、グルタチオンリダクターゼなどの活性低下を来し酸化ストレスを誘導する。また、過剰な酸化ストレスは赤血球の脂質過酸化から溶血を引き起こす。妊娠中の母体がこれらの薬剤へばく露されることで、児は出生後に溶血を来し高ビリルビン血症を発症する可能性がある。本研究の目的は、妊婦の殺虫剤・防虫剤のばく露と治療を要する新生児高ビリルビン血症の発症との関連を調べることである。

【方法】 環境省が主体となり行っている子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)において、平成28年4月に固定が終了した出生時までの全固定データを用いた。母体の妊娠中の衣類用防虫剤、屋内でのスプレー式殺虫剤、蚊取り線香・電気式蚊取り器、園芸用農薬・殺虫剤、スプレーもしくはローションタイプの虫よけ剤の使用頻度に関するデータが揃った母親から出生した児のうち、死産、流産、出生体重<2,500g、および関連因子と考えたものに欠測データのある者を除いた61,751名を解析対象とした。母体の妊娠中の上記殺虫剤・防虫剤の使用頻度と光線療法を要した新生児高ビリルビン血症の発症との関連について、母体年齢、妊娠合併症の有無、分娩合併症の有無、性別、出生5分のApgar score、サプリメントの内服を交絡因子としてロジスティック回帰分析を行い検討した。

【結果】 61,751名の対象者のうち、5,985名(9.7%)が光線療法を要した。屋内でのスプレー式殺虫剤の使

用頻度が週に数回以上の群では、使用していなかった群に比べ光線療法を要する新生児高ビリルビン血症の発症が1.21倍(95%信頼区間1.05-1.38)高かった。一方、スプレーもしくはローションタイプの虫よけ剤では、使用頻度が月、週に数回以上の群で光線療法を要する新生児高ビリルビン血症の発症がそれぞれ0.84倍(95%信頼区間0.78-0.91)、0.70倍(95%信頼区間0.61-0.81)と低かった。それ以外の殺虫剤・防虫剤の使用に関しては、その使用頻度が高いことは光線療法を要する新生児高ビリルビン血症の発症の有無とは明らかな関連は認めなかった。

【考察】 本研究は、妊娠中の殺虫剤・防虫剤へのばく露が新生児に与える影響の1つとして、治療を要する新生児高ビリルビン血症を引き起こすリスクについて検討した初めての研究である。今回の研究の結果、妊娠中の殺虫剤・防虫剤の使用と新生児高ビリルビン血症との間に関連を認めた。人は日常の使用に加え、食物、大気、家庭内のハウスダストなど様々な経路により殺虫剤、防虫剤にばく露される。これらの成分は臍帯血や羊水中に検出されることが知られており、児のばく露に繋がると考えられる。今回の研究ではばく露要因の1つである日常生活における殺虫剤、防虫剤の使用の頻度について質問紙を用いて評価し、それが新生児高ビリルビン血症に与える影響について検討した。また、虫よけ剤の主成分であるDEETは動物実験では酸化ストレスを誘導することが示されているが、人体に直接塗布ないしは噴霧して使用することからその毒性は弱く、これまでの研究でも胎児、新生児に与える影響は少ないことが報告されている。それ故、高ビリルビン血症の発症に与える有害な影響は他の殺虫剤や農薬よりも少ないことが推測された。しかし、本研究の限界として①母体の農薬や殺虫剤のばく露に関する情報が血中濃度などの客観的なデータとして得られていないこと、②調査時期が妊娠中期であり、最も新生児に影響を与えられと考えられる妊娠後期におけるばく露の状態が正確に評価できていない可能性があること、③光線療法を行うビリルビン値の基準が各施設間で統一されていないことがあり、これらの課題

について考慮する必要がある。

【結論】 妊娠中の屋内でのスプレー式殺虫剤の高頻度の使用と、光線療法を要する新生児高ビリルビン血症発症との間に関連が示唆された。一方、スプレーもしくはローションタイプの虫よけ剤の高頻度使用の群で高ビリルビン血症の発症の可能性が低くなる結果となったが、この理由を説明し得る生理学的な機序については不明である。

(論文審査の結果の要旨)

一般に使用される殺虫剤、防虫剤には有機リン、ピレスロイド、カーバメート、ネオニコチノイド、DEETなどの成分が含まれ、これらは抗酸化作用を有する酵素であるSOD (superoxide dismutase)、カタラーゼ等の活性低下を来し酸化ストレスを誘導する。過剰な酸化ストレスは赤血球膜の脂質過酸化から溶血を引き起こすことが知られており、妊娠中の母体がこれらの薬剤にばく露されることで、児が出生後に生理的範囲を超えた高ビリルビン血症を発症する可能性がある。

子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)において、61,751名の母児のデータを用いて母の妊娠中の衣類用防虫剤、屋内でのスプレー式殺虫剤、蚊取り線香・電気式蚊取り器、園芸用農薬・殺虫剤、スプレー・ローションタイプの虫よけ剤の使用頻度と光線療法を要する新生児高ビリルビン血症の発症との関連について、ロジスティック回帰分析を行い検討した。

その結果、柴崎は次の結論を得た。

1. 屋内でのスプレー式殺虫剤の使用頻度が週に数回以上の母から出生した児は、使用頻度が週に数回未満であった母から出生した児に比べ光線療法を要する新生児高ビリルビン血症の発症が1.21倍(95%信頼区間1.05-1.38)高かった。
2. スプレー・ローションタイプの虫よけ剤では、使用頻度が月、週に数回以上の群で光線療法を要する新生児高ビリルビン血症の発生がそれぞれ0.84倍(95%信頼区間0.78-0.91)、0.70倍(95%信頼区間0.61-0.81)と低かった。
3. その他の殺虫剤・防虫剤に関しては、母の使用頻度と児の光線療法を要する新生児高ビリルビン血症の発生の有無に明らかな関連は認めなかった。

これらの結果から、妊娠中の屋内でのスプレー式殺虫剤の使用と、スプレー・ローションタイプの虫よけ剤の使用が児の光線療法を要する新生児高ビリルビン血症の発症との関連があることが示された。妊娠中の母体はこれらの殺虫剤・防虫剤に吸入、経口摂取、経皮的吸収などの経路でばく露され、その成分は胎盤を経由し臍帯血や羊水を介して児へ移行する。この結果は、妊娠中の殺虫剤・防虫剤の高頻度の使用が児の健康に影響を及ぼし、ばく露経路やその成分によって人体への影響が異なる可能性があることを示唆している。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Adrenomedullin-RAMP2 and -RAMP3 Systems Regulate Cardiac Homeostasis during Cardiovascular Stress (アドレノメデュリン-RAMP2系・RAMP3系は、心血管系ストレスに対して、心臓の恒常性を維持する)

CUI NANQI (崔 南奇)

(論文の内容の要旨)

【背景】 アdreノメデュリン(AM)は多彩な作用を有する生理活性ペプチドであり、その活性は主として、AMの受容体CLRに結合する受容体活性調節タンパクRAMP2あるいはRAMP3によって制御されている。AMあるいはRAMP2ノックアウトマウスは、心血管系の発達不全により胎生致死となるのに対し、RAMP3ノックアウトマウスは正常に生まれ、成体が得られることから、我々はRAMP2とRAMP3の機能分化に注目してきた。RAMP2、RAMP3は心臓においても高発現しているが、その機能分化については不明である。

本研究では、心筋細胞特異的RAMP2およびRAMP3ノックアウトマウスを用いて、心血管系ストレス応答における両者の病態生理学的意義を検討した。

【方法と結果】 成体マウスにおいてRAMP2を欠損誘導すると、拡張型心筋症様所見の自然発症を認め、致死となった。これに対し、先天的な心筋細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス(C-RAMP2^{-/-})は正常に生まれ、定常状態の心機能に変化はなかった。そこで、8週齢C-RAMP2^{-/-}雄マウスに対して、横行大動脈縮窄術(TAC)を行い、心血管系ストレス応答について検討した。C-RAMP2^{-/-}では、コン

トロールに比較し、TAC 7日目の早期から、心機能低下、心肥大、線維化が亢進し、生存率も低下した。C-RAMP2^{-/-}では、左室圧測定においてdP/dtmaxとdP/dtminの両者が低下しており、左室収縮能および拡張能の低下が認められた。C-RAMP2^{-/-}の心臓では、TUNEL染色陽性のアポトーシス細胞の増加、電顕での心筋原線維の走行異常とミトコンドリアの形態異常、ミトコンドリア関連因子の発現低下を認めた。

次に、C-RAMP2^{-/-}の心臓より心筋細胞を初代培養して検討を行った。C-RAMP2^{-/-}の心筋細胞では、TAC施行の有無に関わらず、細胞刺激時のカルシウムトランジェントのピークの低下と、消退の遅延が確認された。C-RAMP2^{-/-}の新生仔心筋細胞では、イソプロテレノール負荷24時間後に、細胞面積拡大、酸化ストレスレベルの亢進に加え、ミトコンドリア数の減少、ミトコンドリア膜電位低下、ミトコンドリア関連因子の発現低下を認めた。そこで、心筋細胞のミトコンドリアを分離し、細胞外フラックスアナライザーにて検討したところ、C-RAMP2^{-/-}ではミトコンドリア呼吸能とATP産生能の低下が確認された。C-RAMP2^{-/-}では、cAMPの産生低下と共に、cAMP-response element binding protein (CREB)の活性低下を認め、これがミトコンドリア新生のマスターレギュレーターであるPGC-1の発現低下とミトコンドリア機能異常につながったと考えられた。

一方、RAMP3^{-/-}では、TAC後28日目の後期になって初めて、コントロールに比較して、心機能の低下と冠動脈周囲の線維化の亢進が認められた。RAMP3^{-/-}の初代培養心筋細胞では、C-RAMP2^{-/-}で認められたミトコンドリアの異常は確認できなかった。RAMP3^{-/-}の心臓では、LYVE-1免疫染色陽性のリンパ管数の減少を特徴的に認め、リンパ管内皮細胞のギャップ結合タンパクであるコネキシン43の発現低下を認めた。**【結論】**以上の結果から、AM-RAMP2系は心筋細胞のミトコンドリア機能維持に必須であり、ストレス応答の早期から必要であるのに対し、AM-RAMP3系はリンパ管の恒常性制御によって、より後期の段階でのストレス応答に必要であることが明らかとなった。AM-RAMP2系、AM-RAMP3系は、異なったメカニズムにより心臓の恒常性を制御しており、各々、心不全の治療標的として期待される。

(論文審査の結果の要旨)

AMおよびRAMP2、RAMP3は、脈管系のみならず、心臓でも高発現している。しかし、これらの心臓に

おける役割や機能分化については、不明である。本研究では、先天性心臓特異的なRAMP2ノックアウトマウス(C-RAMP2^{-/-})と、RAMP3ノックアウトマウス(RAMP3^{-/-})の成体を用いて、心臓のRAMP2、RAMP3の欠損が循環器系に与える影響を検討した。

その結果、崔南奇は次の結論を得た。

1. C-RAMP2^{-/-}では、野生型と比較し、心臓に対する圧負荷の早期の段階から、心機能低下、心肥大、線維化が亢進した。
2. C-RAMP2^{-/-}の心臓では、アポトーシス細胞の増加、電顕での心筋原線維の走行異常とミトコンドリアの形態異常を認めた。
3. C-RAMP2^{-/-}の心臓では、ミトコンドリア関連遺伝子の発現低下を認めた。
4. C-RAMP2^{-/-}の心筋細胞では、TAC施行の有無に関わらず、細胞刺激時のカルシウムトランジェントの異常が確認された。
5. C-RAMP2^{-/-}の心筋細胞では、イソプロテレノール刺激によって、心筋細胞肥大、酸化ストレスレベルの亢進に加え、ミトコンドリア数の減少、ミトコンドリア膜電位低下、ミトコンドリア関連因子の発現低下を認めた。
6. C-RAMP2^{-/-}の心筋細胞では、ミトコンドリア呼吸とATP産生能の低下が確認された。
7. C-RAMP2^{-/-}の心筋細胞ではCREBの活性化の低下を認め、これがミトコンドリア新生のマスターレギュレーターであるPGC-1の発現低下と、ミトコンドリア機能異常につながったと考えられた。
8. RAMP3^{-/-}では、TAC後4週間の後期になって初めて、コントロールに比較して、心機能の低下と冠動脈周囲の線維化の亢進が認められた。
9. RAMP3^{-/-}の心臓では、C-RAMP2^{-/-}で見られた、ミトコンドリアの構造異常や機能異常は認められなかった。
10. RAMP3^{-/-}の心臓では、LYVE-1免疫染色陽性のリンパ管数の減少を特徴的に認め、リンパ管内皮細胞のギャップ結合タンパクであるコネキシン43の発現低下を認めた。

以上の結果から、AM-RAMP2系、AM-RAMP3系はともに、心血管系ストレスに対する適切な応答に、重要な役割を果たしていることが明らかとなった。C-RAMP2^{-/-}では、定常状態では、心エコーや心カテなどで評価した心機能は正常であったが、アポトーシス細胞の増加、カルシウムトランジェントの異

常, ミトコンドリアの形態異常などが認められ, 細胞レベルのサブクリニカルな異常は, 既に有していると考えられた。このため, 圧ストレスを加えた際に, すぐに顕著な表現型が現れたと考えられる。したがって, AM-RAMP2系は心筋細胞のミトコンドリア機能維持に必須であり, ストレス応答の早期から必要であると考えられた。一方で, AM-RAMP3系はリンパ管の恒

常性制御により, より後期の段階でのストレス応答に必要であることが明らかとなった。AM-RAMP2系, AM-RAMP3系は, 異なったメカニズムにより心臓の恒常性を制御しており, 各々, 心不全の治療標的として期待される結果と考えられた。

以上の結果から, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Distribution of amyloidosis subtypes based on tissue biopsy site –Consecutive analysis of 729 patients at a single amyloidosis center in Japan– (本邦の単一アミロイドーシス診断センターにおける連続729例の組織診断に基づいたアミロイドーシスの病型分布)

阿 部 隆 太

(論文の内容の要旨)

【背景】アミロイドーシスは原因蛋白(前駆蛋白)がアミロイド線維として様々な臓器に沈着して機能障害を来す疾患である。主要な前駆蛋白とその病型には免疫グロブリン軽鎖を前駆蛋白とするALアミロイドーシス, 免疫グロブリン重鎖を前駆蛋白とするAHアミロイドーシス, トランスサイレチン(TTR)を前駆蛋白とするATTRアミロイドーシス, β 2ミクログロブリンを前駆蛋白とする β 2Mアミロイドーシス, 血清アミロイドAを前駆蛋白とするAAアミロイドーシスがある。近年, 病型毎に病態が解明され, 疾患修飾療法が多数実用化されている。適切な治療選択には正確な病型診断が必須であるが, 主要2病型(AL型とATTR型)で用いる市販抗体の精度は十分でなく, 一般の施設での正確な病型診断は困難である。このような背景の中で, 我々は精度の高い抗体を用いた免疫組織染色(immunohistochemistry: IHC)と質量分析(mass spectrometry: MS)を用いたアミロイドーシス診断支援を提供してきた。

【目的】当科で診断, 蓄積したアミロイドーシス診断依頼症例を解析し, 臨床的特徴, 生検部位, アミロイドーシス病型との関連を明らかにする。

【方法】全国から当科に診断依頼があり, 2007年7月から2018年12月末までの間に解析結果が判明した連続810例の臨床情報と解析結果を後方視的に解析した。Congo red (CR) 染色で赤橙色に染色され, 偏光観察下で黄緑色の複屈折を呈する細胞外の沈着物を検体組織に認めた症例をアミロイドーシスと確定診断した。IHCには共同研究者が作成した精度の高いポリクローナル抗体(抗 κ 鎖, 抗 λ 鎖, 抗TTR)と市販の抗体(抗AA(モノクローナル), 抗 β 2M(ポリクローナル))を用い

た。IHCで診断が困難な症例に対してMS解析を追加した。

【結果】81例(10%)の症例はアミロイド陰性であった。疑陽性の原因の推定が可能であった42例のうち36例は, 標準的検査法(CR染色+偏光観察)の施行が依頼元で未施行であった。アミロイドーシスと診断された729例(90%)のうち689例はIHCのみで診断された。残り40例中36例でMSが施行され, 34例で確定診断を得た。患者背景は, AA型を除き男性優位であった。ATTR型は他病型に比べ有意に高齢であった。各病型割合はAL型59.1%, ATTR型32.9%, AA型4.0%, AH型1.4%, β 2M型0.8%, その他0.9%であった。心臓, 手根管, 末梢神経ではATTR型が最多であり, それ以外の臓器ではAL型が最多であった。腎臓で2番目に多い病型はAH型であった。AH型は県外施設において有意に診断割合が少なく(県内3.5%, 県外0.9%, $P=0.0285$), 専門施設以外では見逃されている可能性が示唆された。各臓器において少なくとも3病型以上のアミロイドーシスが確認された。

【結論】アミロイドーシスの正確な診断には標準的診断法(CR染色+偏光観察)の徹底が重要である。心臓, 手根管, 末梢神経検体ではATTR型, それ以外の組織ではAL型が鑑別の上位となる。一方で全臓器において複数例の病型が認められることから, 生検部位によらず正確な病型診断をIHCとMSで確定することが重要である。腎検体において正確な病型診断によらずAL型と診断されている症例の中にAH型が見逃されている可能性に注意を払う必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

アミロイドーシスは前駆蛋白が様々な臓器に沈着し

て機能障害を来す疾患であり多数の病型が存在する。適切な治療選択には正確な病型診断が必須であり、通常は免疫染色 (immunohistochemistry : IHC) や質量分析 (mass spectrometry : MS) が用いられる。しかし主要2病型 (AL型とATTR型) 用の市販抗体は不正確で、MSは限られた施設でしか行えない。そこで当科では高精度抗体を用いたIHCとIHC困難例に対するMSによりアミロイドーシス診断支援を提供してきた。蓄積された症例の臨床的特徴と、検体組織の種類と病型との関連を明らかにするために以下の検討を行った。

2007年7月から2018年12月末までの間に解析結果の判明した連続810例の臨床情報と解析結果を後方視的に解析した。提供検体にCongo red (CR) 染色陽性で偏光観察下で黄緑色複屈折を呈する沈着物を認めた症例をアミロイドーシスと確定診断した。IHCには精度の高いポリクローナル抗体 (抗 κ 鎖, 抗 λ 鎖, 抗TTR) と市販の抗体 (抗AA, 抗 β 2M) を用いた。IHCで結果が判然としない症例に対してはMS解析を追加した。

その結果、阿部は次の結論を得た。

1. 81例 (10%) はアミロイド陰性であり、標準的

検査法 (CR染色+偏光観察) の不徹底が主因であった。

2. 患者背景はAA型を除き男性優位であった。

ATTR型は有意に高齢であった。各病型割合はAL型 59.1%, ATTR型 32.9%, AA型 4.0%, AH型 1.4%, A β 2M型 0.8%, その他 0.9%であった。

3. 各臓器において少なくとも3病型以上のアミロイドーシス型が確認された。

4. 心臓, 手根管, 末梢神経ではATTR型が最多で、それ以外の多数の臓器ではAL型が最多であった。

5. 腎臓で2番目に多い病型はAH型であったが県外施設においては有意に診断割合が少なく見逃されている可能性が示唆された。

これらの結果より、アミロイドーシスの正確な存在診断には標準的診断法の徹底が重要であること、組織種類によらず正確な病型診断が必要であること、心臓/手根管/末梢神経ではATTR型、それ以外の組織ではAL型が鑑別の上位となること、腎検体においてはAH型が見逃されている可能性に留意すること、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。

Relationship between placental weight and late-onset circulatory collapse (早産児における晩期循環不全と胎盤重量との関連)

中村 千鶴子

(論文の内容の要旨)

【背景】晩期循環不全 (LCC) は、2000年以降に日本で報告され始めた早産児合併症の一つである。LCCは呼吸や循環動態が安定した時期に突然の低血圧や乏尿で発症し、在胎週数 (GA) と出生体重 (BW) が小さいほど発症しやすいとされる。相対的副腎不全と考えられており、副腎皮質ステロイドが有効である。脳室周囲白質軟化症や脳性麻痺のリスクとなり得る重篤な合併症であり、早期診断・早期治療が必要である。

近年、胎盤重量や出生体重/胎盤重量比 (BPR) が新生児予後と関連するとの報告が散見される。

本研究では、胎盤重量やBPRを含めた周産期因子とLCCの発症との関連を、統計的に検討した。

【対象と方法】2007年1月から2017年12月に信州大学医学部附属病院と長野赤十字病院で出生した胎32週未満の早産児を対象とし、後方視的に検討した (オプアウトを用いた臨床研究)。生後2週間内の死亡例、

多胎、染色体疾患、先天性心疾患例は除外した。また、動脈管開存症や壊死性腸炎等の外科治療のために他院に転院した症例も除外した。対象例をLCC発症群と非発症群に分類し、児とその母体の診療録から、胎盤重量も含めた周産期因子とその後の児合併症についてデータを収集した。

母体因子は、年齢、出産経験の有無、妊娠様式、分娩様式、妊娠中の合併症の有無、妊娠中の副腎皮質ステロイド薬投与の有無とした。児因子は、出生時の情報 (GA, 出生時体格評価, 性別, アプガースコア), 入院時の評価項目 (呼吸窮迫症候群の有無, 血圧, CRP, IgM), LCC発症前に要した治療あるいは非発症群では生後2週間内に要した治療 (サーファクタント投与, 経静脈的ステロイド投与, 吸入ステロイド投与, 挿管管理の有無) とした。胎盤重量とBWからBPRを算出し、GAごとのBPRのZ-scoreも算出した。

LCCを従属変数として、LCC発症群、非発症群の

2群で統計解析を行った。統計解析ソフトはSPSS Statistics version 26.0 (IBM, Corp., Armonk, N.Y., USA)を用いた。LCC発症と関連が強いGAとBWがバイアスとなることを除外するために、傾向スコアマッチングを選択した。名義変数・連続変数をそれぞれ unpaired t-test と Mann-Whitney U test を用いて2群比較を行った。変数間の相関の検討には Spearman's rank test を用いた。p<0.05を統計的有意差ありとして判定した。

【結果】対象は261例で、LCC発症群は67例(25.7%)、非発症群は194例だった。GAの中央値はLCC発症群で27.4週、非発症群で29.9週だった。LCC発症の中央値は日齢20(修正30週2日)だった。

LCC発症群と非発症群を比較したところ、母体因子や母体合併症の有無に差はなかった。児では、GA、BW、アプガースコア(1分値)、呼吸窮迫症候群の発症頻度に有意な差を認めた(それぞれ p<0.001, p<0.001, p=0.014, p=0.023)。胎盤重量とBPRはLCC群において有意に小さかった(それぞれ p=0.010, p<0.001)が、BPRのZ-scoreには有意差はなかった(p=0.22)。経静脈的ステロイド投与、吸入ステロイド投与頻度、挿管管理の頻度には有意差を認めた(それぞれ p<0.001, p=0.020, p<0.001)。合併症の発症頻度はLCC群で多い傾向であった。GAはBW、胎盤重量、BPRと有意に相関していた。

LCCの発症しやすさをGAとBWでマッチさせた傾向スコアを用いた2群比較では、BPRとBPRのZ-scoreには有意な差はなかった(それぞれ p=0.15, p=0.22)。重症脳室内出血の発症頻度には有意な差を認めた(p=0.042)。

【考察】本研究では胎盤重量に着目し、BPRを用いてLCCの発症予測因子の解析を試みた。GAとBWをマッチさせた傾向スコアを用いた解析では、LCC発症群と非発症群で胎盤重量・BPRに差はなかった。

BPRが小さい、すなわち‘不適切に大きな胎盤’は、相対的な胎盤の機能異常を示唆すると考えられている。BPRが小さいほど新生児合併症の罹患率と関連することや、成人期に影響することが報告されており、胎盤重量への注目が高まっている。また、胎盤は、機能的には胎児副腎の発育に大きく関連している。そのため、相対的副腎不全と考えられているLCC発症と胎盤重量とに関連があると仮定した。しかし、GAとBWをマッチさせた傾向スコアでは、LCC発症予測因子としての優位性は示されなかった。胎盤重量や

BPRはどの施設でも簡便に測定できる簡潔な指標ではあるが、その一方でBPRのZ-scoreはまだ十分に標準化されておらず、BPRを、LCCを含めた早産児合併症の予測に利用することの妥当性を検討するには今後のさらなる研究が必要と考えられた。

本研究は、GAとBWがLCC発症と関連しているという既報を支持する結果となり、LCCの発症予測因子としてのGAとBWの強い関連性が再検証された。

(論文審査の結果の要旨)

晩期循環不全(LCC)は、2000年以降に日本で報告され始めた早産児合併症の一つで、在胎週数(GA)と出生体重(BW)が小さいほど発症しやすいとされ、相対的副腎不全と考えられている。近年、胎盤重量や出生体重/胎盤重量比(BPR)が新生児予後と関連するとの報告が散見される。今回、胎盤重量やBPRを含めた周産期因子とLCCの発症との関連を、統計的に検討した。

在胎32週未満で出生した早産児を後方視的に検討した。生後2週間内の死亡例、多胎、染色体疾患、先天性心疾患例、動脈管開存症や壊死性腸炎等の外科治療のために他院に転院した症例は除外した。対象例をLCC発症群と非発症群に分類し、児とその母体の診療録から、周産期因子(母体因子・新生児因子・胎盤重量)と児合併症についてデータを収集した。胎盤重量とBWからBPRを算出し、GAごとのBPRのZ-scoreも算出した。

その結果、中村らは次の結論を得た。

1. 対象は261例で、LCC発症群は67例(25.7%)、非発症群は194例だった。GAの中央値はLCC発症群で27.4週、非発症群で29.9週だった。LCC発症の中央値は日齢20(修正30週2日)だった。
2. LCC発症群と非発症群で、母体因子や母体合併症の有無に差はなかった。児では、GA、BW、アプガースコア(1分値)、呼吸窮迫症候群の発症頻度に有意な差を認めた(それぞれ p<0.001, p<0.001, p=0.014, p=0.023)。胎盤重量とBPRはLCC群において有意に小さかった(それぞれ p=0.010, p<0.001)が、BPRのZ-scoreには有意差はなかった(p=0.22)。経静脈的ステロイド投与、吸入ステロイド投与頻度、挿管管理の頻度には有意差を認めた(それぞれ p<0.001, p=0.020, p<0.001)。合併症の発症頻度はLCC群で多い傾向であった。GAはBW、胎盤重量、BPRと有意に相関していた。

3. LCCの発症しやすさをGAとBWでマッチさせた傾向スコアを用いた2群比較では、BPRとBPRのZ-scoreには有意な差はなかった(それぞれ $p=0.15$, $p=0.22$)。重症脳室内出血の発症頻度には有意な差を認めた($p=0.042$)。

胎盤重量に着目し、BPRを用いてLCCの発症予測因子の解析を試みたが、GAとBW胎盤重量やBPRのLCC発症予測因子としての優位性は示されなかった。胎盤重量やBPRはどの施設でも簡便に測定できる簡潔な指標ではあるが、その一方でBPRのZ-scoreはま

だ十分に標準化されておらず、BPRを、LCCを含めた早産児合併症の予測に利用することの妥当性を検討するには今後のさらなる研究が必要と考えられた。

本研究は、GAとBWがLCC発症と関連しているという既報を支持する結果となり、LCCの発症予測因子としてのGAとBWの強い関連性が再検証された。

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。

Relationship between dry mouth and hypertension (口腔乾燥と高血圧症との関連)

川本 真貴子

(論文の内容の要旨)

【背景】口腔乾燥の原因は様々で、薬剤や全身疾患、加齢などの要素が関連しているとされている。高血圧は動脈硬化の代表的なリスク因子であり、動脈硬化による血管傷害は臓器の機能低下を引き起こすと考えられている。口腔乾燥と加齢との関連は報告されているが、高血圧症と口腔乾燥との関連は不明である。本研究では、疫学的および病理組織学的に口腔乾燥と高血圧症との関連を検討した。

【対象および方法】(1) 疫学的検討：2017年度の長野県安曇野市、塩尻市が行う国保特定健診および後期高齢者健診対象者で、本調査への同意が得られた1,933名を対象とした。口腔乾燥状態は柿木(2000)の臨床基準を用いて歯科医師が判定した。口腔乾燥状態と各種特定健診結果との関連について単変量解析、多変量解析にて分析した。

(2) 病理組織学的検討 2013年1月1日～2017年12月31日の期間に信州大学医学部附属病院で頸部郭清術を施行した頭頸部癌患者43名を対象とした。病歴から高血圧症の有無で2群に分けて以下の比較を行った。

① 術前に撮影されたMRI画像において計算した顎下腺の体積。② 摘出された顎下腺組織のHematoxylin and Eosin (H-E)染色標本にて、ImageJを用いて測定した顎下腺全体に占める腺組織の割合。③ 摘出された顎下腺組織のElastica van Gieson (EvG)染色標本にて計測した、細動脈硬化の有無(細動脈の内膜/中膜比)。

(3) 統計解析 口腔乾燥状態と各種特定健診結果との関連についてはカイ二乗検定とロジスティック回帰分析にて分析した。病理組織学的検討では、顎下腺組織

の萎縮度と細動脈の肥厚を高血圧症の既往ありの群と対照群に分けてWilcoxon検定、Fisherの正確確率検定、Studentのt検定を用いて比較検討した。いずれも有意水準は5%未満とした。

【結果】(1) 疫学的検討 対象1,933名のうち口腔乾燥状態と判定された受診者は129名(軽度110名、中等度18名、重度1名)で全体の6.8%を占めた。口腔乾燥該当者は女性及び高齢者(70代)に有意に多く認めた(カイ二乗検定, $p<0.01$)。特定健診判定結果との関連では高血圧該当者で口腔乾燥該当者が有意に多く(11.2% vs 6.0%, カイ二乗検定, $p<0.01$)、腎機能(eGFR)低下者で多い傾向(10.1% vs 7.7%, カイ二乗検定, $p=0.08$)を認めた。服薬に関しては降圧剤服薬者で口腔乾燥該当者が有意に多かった(11.3% vs 6.8%, カイ二乗検定, $p<0.01$)。多変量解析では口腔乾燥と性別、年齢、高血圧、高脂血症で有意な関連を認めた。

(2) 病理組織学的検討 術前にMRI画像を撮影した34症例において、高血圧症あり(13例)となし(21例)の2群間で、顎下腺の体積に有意差は認めなかった(7,636.8 mm³ vs. 6,787.7 mm³, Wilcoxon test, $p=0.47$)。H-E染色において、高血圧群では唾液腺組織全体に占める腺細胞の割合が有意に低かった(36.6% vs. 46.5%, Student's t-test, $p<0.05$)。EvG染色において、高血圧群では顎下腺内の細動脈の肥厚を認め、内膜/中膜比が有意に高かった(0.39 vs. 0.28, Wilcoxon test, $p<0.05$)。

【考察】疫学的検討では口腔乾燥が性別、年齢、高血圧症と有意な関連を認めた。病理組織学的検討では、年齢に関連なく高血圧症ありの群において顎下腺組織

に占める腺細胞の減少、脂肪組織の増加、細動脈の内膜肥厚・狭窄を認め、これら顎下腺組織変性の所見は高血圧症との有意な関連を認めた。本研究の結果より高血圧症が加齢変化に相乗して細動脈硬化を引き起こし、唾液腺組織を変性させ、唾液分泌低下・口腔乾燥の原因となる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

口腔乾燥症は唾液腺の機能異常を伴い唾液の分泌が低下することにより持続的に発症する口の乾きを示す病態で、その原因は全身疾患をはじめ様々である。腎硬化症では高血圧が細動脈硬化を引き起こし腎機能低下の原因となると報告されている。しかしながら、高血圧症が唾液腺に与える組織学的影響は不明である。本研究の目的は、疫学および病理組織学的に口腔乾燥と高血圧症との関連を調査検討することである。

本研究では、疫学的研究と病理組織学的研究を行った。疫学的研究では長野県安曇野市および塩尻市で国保特定健診を受けた1,933名(895人の男性と1,038人の女性)を対象とし、歯科健診で柿木の臨床基準に基づき判定した口腔乾燥の有無と特定健診結果との関連を統計学的に分析した。病理組織学的研究では、2013～2017年の期間に信州大学医学部附属病院で頸部郭清術

を施行した頭頸部癌患者49名を対象とし、病歴から高血圧症の有無で2群に分け、(1)顎下腺の体積(2)唾液腺腺細胞の割合(3)唾液腺細動脈の動脈硬化を比較した。

その結果、川本真貴子は次の結論を得た。

1. 疫学研究において、単変量解析では女性、年齢70歳以上、高血圧既往あり、内服薬あり、降圧剤内服ありの群で口腔乾燥との有意な相関を認めた。
 2. 疫学研究において、多変量解析では性別、年齢、高血圧、高脂血症で口腔乾燥との相関を認めた(高脂血症では負の相関)。
 3. MRI画像による比較では高血圧群と対照群で顎下腺の体積に有意差は認めなかった。
 4. H-E染色において高血圧群では唾液腺組織全体に占める腺細胞の割合が有意に低かった。
 5. EvG染色において高血圧群では顎下腺内の細動脈の肥厚を認め、内膜/中膜比が有意に高かった。
- これらの結果により、高血圧症が加齢変化に相乗して細動脈硬化を引き起こし、唾液腺組織を変性させ、唾液分泌低下・口腔乾燥の原因とな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。

Decreased alpha-1,4-linked *N*-acetylglucosamine glycosylation in biliary tract cancer progression from biliary intraepithelial neoplasia to invasive adenocarcinoma (胆管内上皮腫瘍から浸潤性腺癌に至る胆道癌の発癌過程で α GlcNAc の糖鎖付加は減少する)

奥村 征大

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】胆道癌の早期診断は困難であり、発見された段階で根治的な外科治療が困難であることが多い。胆道癌を早期に診断するためには、その前癌病変に対するバイオマーカーを見つけることが重要である。胆管内上皮腫瘍(BilIN)は胆道癌の前癌病変であり、組織学的に low-grade BilIN と high-grade BilIN に分類され、後者は胆道上皮内癌と同義である。一方、胃粘膜の幽門腺や副細胞から分泌される腺粘液は、 α 1,4-*N*-アセチルグコサミン(α GlcNAc)を有するユニークなO-グリカンが結合したMUC6を含んでいる。 α GlcNAcの生合成に必要な α 1,4-*N*-アセチルグコサミン転移酵素を欠損したA4gntノックアウトマウスの胃幽門粘膜では、過形成、異形成を経て分化型癌が発生することから、 α GlcNAcは胃分化型腺癌の腫瘍抑制分子として機能している。また、ヒトの胃癌、膵癌や子宮頸部

胃型腺癌でも、MUC6に対する α GlcNAcの相対的発現低下が癌病変のみならずその前癌病変でも生じている。しかしながら、BilINから胆道癌に至る過程での α GlcNAcとMUC6の発現パターンについて詳細な解析は報告されていない。

【方法】信州大学医学部附属病院で切除された胆道の浸潤性腺癌(IAC)手術検体51症例を対象とした。これらの症例から low-grade BilIN 45病変、high-grade BilIN 43病変、IAC 46病変に加えて非腫瘍性胆管周囲付属腺47箇所を選択し、MUC6と α GlcNAcに加えてMUC5ACの発現を免疫組織化学的に解析した。染色結果は、全癌細胞に占める陽性癌細胞の割合が10%以下を陰性、10%を越えた場合を陽性と判定した。更に、全癌細胞に占める陽性癌細胞の割合が10%以下を0点、11-33%を1点、34-66%を2点、67%以上を3点と半定量的にスコア化した。前者はFisher's

exact test, 後者は Wilcoxon matched pair test を用いて解析を行い, 両法ともに P -value が 0.05 以下を有意とした。

【結果】非腫瘍性胆管において, MUC5AC は胆管表層上皮で, MUC6 と α GlcNAc は胆管下層上皮と付属腺で発現していた。胆管病変における MUC5AC の陽性率は low-grade BilIN で 88.9%, high-grade BilIN で 93.0%, IAC で 89.1% に発現しており, いずれの病変間に有意差を認めなかった。MUC6 の陽性率は low-grade BilIN で 91.1%, high-grade BilIN で 79.1%, IAC では 52.2% であり, IAC は low-grade BilIN と high-grade BilIN と比較して有意に陽性率が低かった (それぞれ $P < 0.001$, $P < 0.01$)。しかしながら, low-grade BilIN と high-grade BilIN の間には有意差を認めなかった。 α GlcNAc の陽性率は low-grade BilIN で 42.2%, high-grade BilIN で 18.6%, IAC で 13.0% であり, low-grade BilIN は high-grade BilIN と IAC と比較して有意に高値であった (それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$)。しかしながら high-grade BilIN と IAC の間に有意差を認めなかった。一方, MUC5AC の発現スコアは low-grade BilIN, high-grade BilIN, IAC の何れでも高値であり, 病変間に有意差を認めなかった。MUC6 の発現スコアでは, IAC が low-grade BilIN と high-grade BilIN と比較し有意に低かった (それぞれ $P < 0.001$ または $P < 0.01$)。更に, α GlcNAc の発現スコアは, low-grade BilIN, high-grade BilIN, IAC の全てで低値であり, 有意差を認めなかった。 α GlcNAc と MUC6 のスコアを比較すると, low-grade BilIN, high-grade BilIN, IAC の全てにおいて α GlcNAc は MUC6 よりも優位に低かった (low-grade BilIN と high-grade BilIN で $P < 0.001$, IAC で $P < 0.01$)。最後に, 非腫瘍性胆管周囲付属腺における MUC6 の発現スコアは α GlcNAc と比べて有意に高値であったが ($P < 0.001$), α GlcNAc の発現スコアは low-grade BilIN, high-grade BilIN, IAC と比較し, 有意に高かった ($P < 0.0001$)。

【結論】MUC6 と比較して α GlcNAc の発現は胆道癌の発癌の初期段階から減少していることが示された。非腫瘍性胆道上皮と腫瘍性胆道上皮を鑑別する上で, α GlcNAc と MUC6 に対する免疫染色の有用性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

胆道癌の早期診断は困難であり, その前癌病変に対するバイオマーカーを見つけることが重要である。胃

腺粘液は, α 1,4-*N*-アセチルグコサミン (α GlcNAc) を有するユニークな *O*-グリカンが結合した MUC6 を含んでいる。 α GlcNAc の生合成に必要な α 1,4-*N*-アセチルグコサミン転移酵素を欠損した *A*Agnt ノックアウトマウスの胃幽門粘膜では, 過形成, 異形成を経て分化型癌が発生することから, α GlcNAc は胃分化型腺癌の腫瘍抑制分子として機能している。ヒトの胃癌, 膵癌でも MUC6 に対する α GlcNAc の相対的発現低下は癌病変のみならず, その前癌病変でも生じている。胆管内上皮腫瘍 (BilIN) は胆道癌の前癌病変であり, 組織学的に low-grade BilIN と high-grade BilIN に分類される。

今回, 信州大学医学部附属病院で切除された胆道の浸潤性腺癌 (IAC) 手術検体 51 症例を対象として, これらの症例から low-grade BilIN 45 病変, high-grade BilIN 43 病変, IAC 46 病変に加えて非腫瘍性胆管周囲付属腺 47 箇所を選択し, MUC6 と α GlcNAc に加えて MUC5AC の免疫染色を行った。染色結果は, 全癌細胞に占める陽性癌細胞の割合が 10% 以下を陰性, 10% を越えた場合を陽性と判定した。更に, 全癌細胞に占める陽性癌細胞の割合が 10% 以下を 0 点, 11-33% を 1 点, 34-66% を 2 点, 67% 以上を 3 点と半定量的にスコア化した。前者は Fisher's exact test, 後者は Wilcoxon matched pair test を用いて解析を行い, 両法ともに P -value が 0.05 以下を有意とした。

その結果, 奥村は次の結論を得た。

1. MUC5AC は陽性率と半定量的スコアの何れも low-grade BilIN, high-grade BilIN, IAC 間では有意差を認めなかった。
2. MUC6 は陽性率, 半定量的スコア共に IAC は low-grade BilIN と high-grade BilIN と比較して有意に低値であった。
3. α GlcNAc の陽性率は, low-grade BilIN では high-grade BilIN, IAC と比較して有意に高値であった。しかし半定量的スコアは low-grade BilIN, high-grade BilIN, IAC の全てで低値であり, 有意差を認めなかった。
4. α GlcNAc と MUC6 のスコアを比較すると, low-grade BilIN, high-grade BilIN, IAC の全てにおいて α GlcNAc は MUC6 よりも有意に低値であった。
5. 非腫瘍性胆管周囲付属腺における MUC6 の発現スコアは α GlcNAc と比べて有意に高値であったが, α GlcNAc の半定量的スコアは low-grade BilIN, high-grade BilIN, IAC と比較して有意に高値で

あった。

これらの結果から、 α GlcNAcの発現はMUC6と比較し胆道癌発癌過程の初期段階から減少し、MUC6の発現は発癌過程の後期段階から減少することが示された。従って、 α GlcNAcの発現減少は胆道癌の腫瘍化

に関与し、MUC6の発現は胆道癌の進展に関与することが示唆された。

以上より、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Predictive factors of poor blood collecting flow during leukocyte apheresis for cellular therapy (細胞療法のための白血球アフェレーシス中に生じる脱血不良を予測する因子の検討)

紺野 沙織

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、細胞療法の実施を目的として、末梢血から白血球のアフェレーシスを行う機会が増加している。しかし、アフェレーシス中には血管迷走神経反応(VVR)、血圧低下、クエン酸中毒による低カルシウム血症といった副作用に留意する必要がある。また、アフェレーシス実施には安定した血流確保が必要であるが、実施中に血流確保が困難となる脱血不良の状態が臨床的にしばしば経験される。被採血者に対しては事前に血液検査、心電図検査、X線検査のスクリーニングが実施されているが、アフェレーシス中に発生する副作用や脱血不良の予測は困難である。心電図より算出されるQT dispersion(QTD)は心室再分極の不均一性を反映し、致死性不整脈や心不全の予測に用いられ、自律神経失調症との関連性も指摘されている。アフェレーシス実施には、循環機能や自律神経機能が良好であることが望ましく、副作用や脱血不良に対してQTDが有用な予測因子となる可能性がある。本研究では、アフェレーシス中に発生する脱血不良に注目し、QTDを含めアフェレーシス実施前の検査と臨床所見との関連性について後方視的に検討した。

【方法】信州大学医学部附属病院にて、2012年11月～2017年12月に、WT1パルス樹状細胞ワクチン療法のために白血球アフェレーシスが実施された成人の担癌患者を対象とした。アフェレーシス手順は全例共通で、4000 mLの体外処理血液量から約160 mLのパフィーコート層を採取した。次の(a)と(b)を共に満たした場合を脱血不良とした。(a)血液成分分離装置において脱血不良アラームの発生記録があるか、脱血不良に関する記載が診療記録にあり、(b)脱血不良発生時の血流流速が10%以上低下した。標準12誘導心電図のQT時間とRR間隔から、Bazzet式(QTbc)とFridericia式(QTfc)で補正し、QTD・QTbcD・QTfcDを算出した。また、アフェレーシス前の身体所見、臨床検査所

見、胸部X線検査所見と脱血不良発生との関連性についても検討した。

【結果】アフェレーシスを行った160名中53名(33.1%)に脱血不良が発生した。脱血不良あり・なしの2群間で単変量解析を行い、女性、低身長、低体重、低体表面積、低循環血液量、低クレアチニン、およびQTD、QTbcD、QTfcDの延長が有意となった。さらに多変量解析にて、女性およびQTbcDの延長が有意となった。脱血不良群では、アフェレーシスの実施時間が延長し、採取細胞数も減少していた。また、脱血不良発生時に心拍、血圧、経皮的酸素飽和度が共に低下したが、VVRとは判断されなかった。

【考察】アフェレーシス開始直後の脱血不良は、血液が体外にシフトし循環血液量が減少したため生じたと考えられる。特に女性は体格が小さく、高リスクになりやすい。QTDは年齢、原疾患、化学療法歴など様々な要因とそれらの相互作用により延長すると推測される。アフェレーシス前の検査でQTD延長が認められる場合、アフェレーシス中に循環動態の変化に対して調節機能や自律神経系の応答が低下し、脱血不良が発生しやすくなると考えられる。以上より、女性やQTbcDの延長症例に対してアフェレーシスを実施する場合に、バイタル変動や脱血不良を注意深く観察する必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

近年、末梢血から白血球のアフェレーシスを行う機会が増加し、アフェレーシス中に、副作用や血流確保が困難となる脱血不良を経験することがある。被採血者に対しては事前にスクリーニング検査が実施されているが、副作用や脱血不良の予測は困難である。心電図より算出されるQT dispersion(QTD)は、致死性不整脈や心不全を予測し、自律神経失調症との関連性も指摘されている。アフェレーシス実施には、循環機能や自律神経機能が良好であることが望ましく、副作

用や脱血不良の予測に QTD が有用となる可能性がある。本研究では、アフエレーシス中に発生する脱血不良に注目し、アフエレーシス実施前の検査と臨床所見の関連性について後方視的に検討した。

2012年11月～2017年12月に、樹状細胞ワクチン療法を目的としてアフエレーシスが行われた成人担癌患者を対象とした。次の(a)と(b)を共に満たした場合を脱血不良とした。

- (a) 血液成分分離装置において脱血不良アラームの発生記録があるか、脱血不良に関する記載が診療記録にあり、
- (b) 脱血不良発生時の血流流速が10%以上低下した。

標準12誘導心電図の QT 時間と RR 間隔から、Bazett 式 (QTbc) と Fridericia 式 (QTfc) で補正し、QTD・QTbcD・QTfcD を算出した。また、アフエレーシス前の身体所見、臨床検査所見、胸部 X 線検査所見と脱血不良発生との関連性についても検討した。

その結果、紺野は次の結論を得た。

1. アフエレーシスを行った160名中53名 (33.1%) に脱血不良が発生した。
2. 脱血不良あり・なしの2群間において単変量解析にて有意な因子に対して多変量解析を実施し、最終的に女性および QTbcD 延長がリスク因子になった。
3. 脱血不良群では、アフエレーシスの実施時間が延長し、採取細胞数も減少していた。
4. 脱血不良発生時に心拍、血圧、経皮的酸素飽和度が共に低下した。

以上より、体格の小さな女性は循環血液量が少ないため高リスクになることが示唆された。また、QTD は様々な要因により延長するが、事前に QTD が延長している症例では、アフエレーシス中に循環動態の変化に対する調節機能や自律神経系の応答が低下しており、脱血不良が発生しやすくなると考えられた。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。

Accuracy of a salivary examination kit for the screening of periodontal disease in a group medical check-up (Japanese-specific health check-up) (集団健診 (特定健診) における歯周病スクリーニングのための唾液検査キットの精度)

櫻井 精 齊

(論文の内容の要旨)

【背景】メタボリックシンドローム (MetS) は、内臓脂肪型肥満、高血圧、代謝異常などの要素の複合障害であり、歯周病との間に強い関連がある。MetS と歯周炎を含む調査と公共政策は公衆衛生を促進するために重要である。内臓脂肪型肥満に焦点を当てた特定健康診断 (集団健康診断) が義務付けられているが、費用等の問題のため歯科健診は含まれていない。そのため、歯周病を効果的に診断する簡便で低コストの方法が必要である。この研究の目的は、唾液スクリーニング検査による歯周病の診断精度を検討することである。

【対象と方法】本研究は2017年から2018年にかけて、長野県安曇野市と塩尻市で特定健診を受診した個人を対象に、歯科検診、唾液検査を実施した。歯科検診は5人の歯科医師による診査が実施された。歯周病の評価には、世界保健機関 (WHO) の地域歯周菌数 (CPI) の基準を用い、コード1と2を歯肉炎、コード3と4を歯周炎 (コード1-4を歯周病) と判断した。また、2017年には問診票により、自己申告と実際の歯肉出血の関連を確認した。唾液検査は、3ml のうがい

薬を用い、2017年と2018年には Salivary Multi Test (SMT®) (ライオン株)、2018年には Perioscreen® (サンスター株) を用いた。SMT®は潜血、たんぱく質、アンモニアのレベルと白血球数 (WBC) の4つの項目を百分率で表し、3つのランク (多、平均、少) に分類し、Perioscreen®は潜血を陽性または陰性に判断した。歯科検診の結果と唾液検査の結果を比較し、唾液スクリーニング検査の精度を評価した。統計分析は、カイ二乗検定、スピアマンの順位相関係数、および一元配置分散分析を使用した。統計分析には、JMPver.13 (SAS Institute Inc., North Carolina, USA) を使用した。P値0.05未満を有意であるとみなした。

【結果】本研究の結果では、唾液中の潜血、たんぱく質、アンモニア、WBC 数がそれぞれ歯周病、歯周炎と関連しているが、特に唾液中アンモニアのレベルが歯周病と関連しており、特異度は低いものの歯周病のスクリーニングにおいて感度は高く最も正確なマーカーであることを示した (感度83.1-83.5%, 特異度21.6-22.9%, 精度69.3-73.0%, F値0.779)。また、潜血においては Perioscreen®が SMT®を使用する

より高い感度とF値を示しており、スクリーニングツールとしての使用が支持された（感度69.5%，特異度38.9%，精度59.7%）。自己申告による歯肉出血の有無は、特異度は高いものの、精度は低かった（感度11.0%，特異度93.8%，精度34.7%）。

【考察】本研究は、日本特有の健康診断での歯科検診などの大規模な集団研究において、歯周病および歯周炎の被験者スクリーニングにおけるSMT®およびPerioscreen®の有用性を初めて実証したものである。大集団における歯周病のスクリーニングのための唾液スクリーニング検査の妥当性を調査した結果、唾液中アンモニアが高精度で有用な唾液検査であることが示された。また、ヒトヘモグロビンに対するモノクローナル抗体によって検出された潜血（Perioscreen®）による方法も有用な唾液検査であった。本研究により、唾液検査が歯周病のスクリーニング検査とな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）は歯周病との間に強い関連があり、MetSと歯周炎を含む調査と公共政策は公衆衛生を促進するために重要である。特定健康診断（集団健康診断）が義務付けられているが、費用等の問題のため歯科健診は含まれていない。そのため、歯周病を効果的に診断する簡便で低コストの方法が必要である。この研究の目的は、唾液スクリーニング検査による歯周病の診断精度を検討することである。

本研究は2017年から2018年にかけて、長野県安曇野市と塩尻市で特定健診を受診した個人を対象に、歯科検診、唾液検査を実施した。歯科検診は5人の歯科医師による診査が実施された。歯周病の評価には、世界保健機関（WHO）の地域歯周歯数（CPI）の基準を用い、コード1と2を歯肉炎、コード3と4を歯周炎（コード1-4を歯周病）と判断した。また、2017年には問診票により、自己申告と実際の歯肉出血の関連を確認した。唾液検査は、3mlのうがい薬を用い、2017年と2018年にはSalivary Multi Test（SMT®）（ライ

オン株）、2018年にはPerioscreen®（サンスター株）を用いた。SMT®は潜血、たんぱく質、アンモニアのレベルと白血球数（WBC）の4つの項目を百分率で表し、3つのランク（多、平均、少）に分類し、Perioscreen®は潜血を陽性または陰性に判断した。歯科検診の結果と唾液検査の結果を比較し、唾液スクリーニング検査の精度を評価した。統計分析は、カイ二乗検定、スピアマンの順位相関係数、および一元配置分散分析を使用した。統計分析には、JMPver.13（SAS Institute Inc., North Carolina, USA）を使用した。P値0.05未満を有意であるとみなした。

本研究の結果では、唾液中の潜血、たんぱく質、アンモニア、WBC数がそれぞれ歯周病、歯周炎と関連しているが、特に唾液中アンモニアのレベルが歯周病と関連しており、特異度は低いものの歯周病のスクリーニングにおいて感度が高く最も正確なマーカーであることを示した（感度83.1-83.5%，特異度21.6-22.9%，精度69.3-73.0%，F値0.779）。また、潜血においてはPerioscreen®がSMT®を使用するより感度とF値が高く、スクリーニングツールとしての使用が支持された（感度69.5%，特異度38.9%，精度59.7%）。自己申告による歯肉出血の有無は、特異度は高いものの、精度は低かった（感度11.0%，特異度93.8%，精度34.7%）。

本研究は、集団健診において、歯周病および歯周炎スクリーニングにおけるSMT®およびPerioscreen®の有用性を初めて実証したものである。大集団における歯周病のスクリーニングのための唾液スクリーニング検査の精度を調査した結果、唾液中アンモニアが有用な唾液検査であることが示された。また、ヒトヘモグロビンに対するモノクローナル抗体によって検出された潜血（Perioscreen®）による方法も有用な唾液検査であった。本研究により、唾液検査が歯周病のスクリーニング検査とな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。

Pharmacokinetics of insulin disappearance after massive overdosing（過量投与されたインスリンの薬物動態解析）

佐藤友香

（論文の内容の要旨）

【緒言】自殺目的のインスリン過量注射ではインスリン

の血糖降下作用が非常に長くなるとされるが、その原因は不明である。我々はインスリンを超過量注射し

た症例に遭遇したため、文献から類似した症例のデータを入手し、ともに同様の手法で解析して超過量投与されたインスリンの薬物動態の一般化を試みた。

【対象】症例①：自験例。非糖尿病の男性が NovoRapid®30Mix {二相性インスリン：アスパルト 30%，プロタミン結晶化アスパルト 70%} を 600 単位皮下注射し 4 時間後に救急搬送された。意識清明，発汗顕著で血糖 46 mg/dL，血清インスリン 1560 μU/mL。ブドウ糖 15 g/hr 以上の静脈注射を 56 時間継続し救命した。最初に採血した時間を “time 0”，その後の採血時間を time 0 からの時間とした（単位は hour）。第 5 病日の空腹時血清インスリン 5.5 μU/mL（血糖 84 mg/dL，C ペプチド 1.30 ng/mL）を内因性の基礎インスリンと見なし，血清インスリンの全ての測定値から 5.4 μU/mL を差し引いた（対数計算のため 0 μU/mL は 0.1 μU/mL で置換）。血清インスリン濃度は Abbott 社の Architect® で測定（CLIA 法。遺伝子組み換えインスリンに 75% の交差反応性あり）。

症例②：文献報告例。300 単位のレギュラー（以下 R）インスリンと 1800 単位の Neutral Protamine Hagedorn（以下 NPH）インスリンを皮下注射した症例報告のデータを症例①と同様に解析。

対照群①：製薬会社が公表している資料。症例①の対照として，NovoRapid®30Mix の通常治療量 0.15 U/体重 kg を皮下注射した健常男性 8 名のデータ。注射後 1 時間の頂値を得た時間を “time 0”，その後の採血時間を time 0 からの時間として解析。

対照群②：製薬会社公表資料。症例②の対照。対照群② a は，R インスリン 0.1 U/体重 kg を皮下注射した健常男性 16 名。対照群② b は，NPH インスリン 0.2 U/体重 kg を皮下注射した健常男性 10 名。

【方法】“想定されるコンポーネントの数+1”のコンポーネントを有するモデルを設定した。

$$[I = A \exp^{-at} + B \exp^{-bt} + C \exp^{-ct}]$$

I ：特定の時点における血清インスリン濃度 (μU/mL)。

A, B, C ：各コンポーネントの初期インスリン濃度 (μU/mL)。

a, b, c ：各コンポーネントの時間依存性のインスリン減少の定数。

t ：インスリン頂値から経過した hour。

Excel Solver を用いて各コンポーネントの最適な数値を得た。コンポーネントを複数得ても “C がゼロ” “ $t_{1/2}$ は数分以内と超短時間” など機能しないものは排

除した。半減期 $t_{1/2}$ は 0.693 を時定数で割って算出した。

【結果】症例①：A 1490.04, a 0.15, $t_{1/2}$ 4.76.

$$B 60.66, b 0.04, t_{1/2} 19.41$$

対照群 ①：A 13.97, a 0.57, $t_{1/2}$ 1.22, B 8.33,

$$b 0.08, t_{1/2} 9.16$$

症例 ②：A 784.45, a 0.38, $t_{1/2}$ 1.83.

$$B 395.81, b 0.03, t_{1/2} 20.32$$

対照群② a：A 20.43, a 0.79, $t_{1/2}$ 0.88

対照群② b：B 8.15, b 0.24, $t_{1/2}$ 2.82

症例①②を分析すると，両者ともコンポーネントが 2 つあり，一方のコンポーネントの $t_{1/2}$ はもう一方よりもかなり短かった。症例①②の実際の血清インスリン濃度と，得られたコンポーネントモデルから推定されたインスリン濃度は高い一致率を示した（症例①で $r^2 > 0.99$ ，症例②で $r^2 = 0.9$ ）。

【考察】症例①②の解析で得た 2 つのコンポーネントのうち， $t_{1/2}$ が短い方は①インスリンアスパルトと② R インスリン， $t_{1/2}$ が長い方は①プロタミン結晶化アスパルトと② NPH インスリンを反映していると考えた。それぞれの $t_{1/2}$ は対照群と比べ，インスリンアスパルトは約 4 倍，プロタミン結晶化アスパルトは約 2 倍，R インスリンは約 2 倍，NPH インスリンは約 7 倍延びていた。インスリンを過量注射した患者でインスリン消退速度が著しく低下する理由として，次の 3 つが考えられる。1) 超大量のインスリン投与下では間質液によるインスリンの希釈が妨げられ，インスリンポリマーからモノマーへの解離が遅くなる。2) 過量のインスリン分子でインスリン受容体が完全に飽和してしまい，受容体を介したインスリン分解が減弱する。3) 腎におけるインスリンクリアランスのキャパシティを超えてしまう。この研究の限界は，症例数の少なさ（実際の症例は 2 名）であり，結果の普遍性については今後の検証が待たれる。

【結論】我々は初めて，インスリンを過量注射した患者で薬物動態解析を行い，インスリン消退速度の著明な低下を見出した。インスリン過量注射により持続する低血糖は，インスリン消退速度が著明に低下することで説明できる。

（論文審査の結果の要旨）

インスリンを過量注射するとインスリンの血糖降下作用が非常に長くなるが，その原因は不明である。我々はインスリンを過量注射した症例に遭遇したため，文献から類似した症例のデータを入手し，ともに

同様の手法で解析して超過量投与されたインスリンの薬物動態の特徴を解析した。

症例①：自験例。NovoRapid®30Mix600U 皮下注射。
症例②：文献報告例。レギュラー（以下，R）インスリン300Uと Neutral Protamine Hagedorn（NPH）インスリン1800U 皮下注射。コントロールとして、患者が使用したインスリンと同じ製剤を、健常男性に通常治療量皮下注射したデータを用いた。薬物動態モデルは次のように設定。

$$【I = A \cdot \exp(-at) + B \cdot \exp(-bt) + C \cdot \exp(-ct)】$$

I ：総血清インスリン濃度 ($\mu\text{U}/\text{mL}$)。 A , B , C ：各コンポーネントの初期インスリン濃度 ($\mu\text{U}/\text{mL}$)。 a , b , c ：各コンポーネントの時定数。 t ：インスリン頂値から経過した hour。必要に応じ追加のコンポーネントを検討した。Excel Solver を用いて最適なパラメータを得た。 $t_{1/2}$ は0.693を時定数で割って算出した。

その結果、佐藤友香は次の結論を得た。

1. 症例①を解析して得た2つのコンポーネント (A 1490.04, a 0.15, B 60.66, b 0.04) のうち、

$t_{1/2}$ が4.76時間と短い方はインスリンアスパルト、 $t_{1/2}$ が19.41時間と長い方はプロタミン結晶化アスパルトを反映していると考えられた。対照と比べ、それぞれ4倍と2倍長かった。

2. 症例②を解析して得た2つのコンポーネント (A 784.45, a 0.38, B 395.81, b 0.03) のうち、 $t_{1/2}$ が1.83時間と短い方はRインスリン、 $t_{1/2}$ が20.32時間と長い方はNPHインスリンを反映し、対照と比べ、それぞれ2倍と7倍長かった。

3. モデルから推定されたインスリン濃度と実際の血清インスリン濃度は極めて良く相関した。

これらの結果より、インスリンを超過量注射した患者で薬物動態解析を行い、血中からのインスリン消退速度の著明な低下を見出した。インスリンを超過量注射した患者で、異常に長く続く低血糖は、血中からのインスリン消退速度が著明に低下することで説明できる。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。

Relationship of Malnutrition During Hospitalization With Functional Recovery and Postdischarge Destination in Elderly Stroke Patients (入院中の急性期高齢脳卒中患者の低栄養状態と機能回復および退院先との関連性)

佐藤 正 彬

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】入院中の低栄養状態は脳卒中患者の機能回復や退院先に影響を及ぼすが、急性期病院入院中の脳卒中患者については十分に調査されていない。本研究の目的は、急性期高齢脳卒中患者における入院中の栄養状態の変化に関連する要因を検討すること、また、栄養状態の変化とADLの改善、自宅退院の可否との関連性を検討することである。

【方法】研究デザインは後ろ向き観察研究。2010年4月から2016年9月の間に信州大学医学部附属病院に入院した65歳以上の急性期脳卒中患者205名(平均年齢77±7, 女性91名)を対象とした。患者特性として、年齢、性別、家族構成、入院前の日常生活の自立度、病型(梗塞性or出血性)、病側(右or左)、脳卒中の重症度(National Institute of Health Stroke Scale; NIHSS)、嚥下障害の程度(Food Intake LEVEL Scale; FILS)、栄養状態(Geriatric Nutritional Risk Index; GNRI)、日常生活動作(Barthel Index; BI)、退院先(自宅or転院)を調査した。先行研究に基づきGNRI≤98を低栄養状態と定義した。退院時のGNRIから入院中のGNRIを引いた値をGNRI変化量とし、入院中の栄養状態の変化の指標とした。入院中の栄養状態の変化に関連する要因を検討するために、患者特性を説明変数とした重回帰分析を行った。入院中のBIの改善と栄養状態との関連性を検討するために、入院中の栄養状態と患者特性を説明変数とした重回帰分析を行った。また、退院先と入院中の栄養状態との関連性を検討するために、入院中の栄養状態と患者特性を説明変数とした二項ロジスティック回帰分析を行った。

【結果】対象者205名の入院時GNRIは101(中央値)であり退院時GNRIは89.5であった。低栄養は、入院時に42%存在し、退院時に76%に増加した。入院時のBIは5点(中央値)であり退院時は45点であった。退院先は自宅退院が54名(26.3%)であった。入院中の栄養状態の変化に関連する要因としては、年齢($\beta = -0.21, P < 0.001$)、梗塞性($\beta = 0.16, P = 0.008$)、入院時のNIHSS($\beta = -0.29, P < 0.001$)、入院時GNRI($\beta = -0.35, P < 0.001$)、および入院時

BI食事($\beta = 0.22, P = 0.002$)が抽出された。入院中のADL改善と入院中のGNRI変化量との間に関連性を認めた($\beta = 0.26, P < 0.001$)。また、自宅退院と入院中のGNRI変化量に関連性を認めた(OR=1.11, 95%CI: 1.03-1.19, $P = 0.008$)。

【結語】急性期高齢脳卒中患者において、入院後当初から低栄養状態に陥る患者は少なくなく、多くの患者で入院中に増悪することが確認された。入院中の栄養状態の悪化は急性期高齢脳卒中患者のADLの改善や退院先に負の影響を及ぼすため、入院中の栄養状態の変化および、今回抽出された栄養状態の変化に関連する要因について注意を払っていく必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

入院中の栄養状態の低下に脳卒中患者のADL能力の改善や退院先に影響を及ぼすが、急性期病院入院中の高齢脳卒中患者については十分に調査されていない。今回、急性期高齢脳卒中患者について、入院中の栄養状態の低下に関連する要因を明らかにすると共に、入院中の栄養状態の低下とADLの改善や自宅退院の可否との関連性について検討を行った。

研究デザインは後方視的観察研究で、信州大学医学部附属病院に入院した65歳以上の脳卒中患者205例を対象とした。患者の基本属性、リハビリテーション評価、栄養状態評価指標(Geriatric Nutritional Risk Index: GNRI)、転帰をそれぞれ電子診療録より調査した。入院中の栄養状態の低下に関連する要因を検討するために、基本属性、リハビリテーション評価入院時のGNRIを説明変数として重回帰分析を実施した。また、入院中の栄養状態の低下とADL能力の改善との関連性を検討するために基本属性、リハビリテーション評価、入院中の栄養状態の変化量を説明変数として重回帰分析を実施した。さらに、入院中の栄養状態の低下と退院先との関連性を検討するために二項ロジスティック回帰分析を実施した。

その結果、佐藤正彬は次の結果を得た。

1. 重回帰分析の結果、急性期高齢脳卒中患者の入院中の栄養状態の低下に関連する要因として、高年齢、出血性病変、入院時の神経学的重症度が高い、入院

時の栄養状態が高い、および入院時の食事動作の自立度が低いことが抽出された。

2. 先行研究で報告されている関連因子で調整を行った重回帰分析および二項ロジスティック回帰分析の結果、急性期高齢脳卒中患者の入院中の栄養状態の低下は、患者の ADL 能力の改善と退院先に関連する要因であった。

これらの結果より、急性期脳卒中患者において、高年齢、出血性病変、入院時の神経学的重症度が高い、入院時の栄養状態が高い、および入院時の食事動作の

自立度が低いといった特徴を持つ患者は入院中に栄養状態が低下する傾向にあることが明らかとなった。また、入院中の栄養状態の低下と ADL の改善や自宅退院関連することが明らかとなり、入院中に栄養状態が低下する要因を持つ患者に対してリハビリテーションを実施する際には、適切な負荷量や介入時間に留意しながら進めていくことの必要性が示唆された。

よって、主査、副査は一致して本論立を学位論文として価値があるものと認めた。

Metronome-paced incremental hyperventilation may predict exercise tolerance and dyspnea as a surrogate for dynamic lung hyperinflation during exercise (過呼吸による動的肺過膨張の評価は運動耐容能および呼吸困難感を予測し、運動負荷を用いた動的肺過膨張評価の代替となる)

川内 翔平

(論文の内容の要旨)

【背景】 動的肺過膨張とは慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease ; COPD) の呼吸困難感の要因である。動的肺過膨張は労作による呼吸数増加時に、COPD の呼気制限によって息を吐ききる前に次の呼吸が開始されることで肺に空気がトラップされ肺が過膨張する現象である。動的肺過膨張が生じることで息を吸う余力を表す最大吸気量 (inspiratory capacity ; IC) は減少するため、減少後の IC または安静時からの IC 減少量が動的肺過膨張の指標とされている。従来より運動中に IC を測定する運動負荷法が動的肺過膨張の評価に用いられているが、方法が複雑であり臨床現場では実施されていない。そこで我々は過呼吸によって生じる動的肺過膨張を評価する過呼吸法と測定のための専用のスパイロメーター (SP-370COPD 肺 Per ; フクダ電子株式会社、東京) を開発し、その有用性を報告してきた。本研究では我々が開発した過呼吸法による動的肺過膨張評価が COPD 患者の運動耐容能や呼吸困難感を予測し、従来の運動負荷法の代替となるかを明らかにすることを目的とした。

【方法】 35例の安定している COPD 患者を対象とした。運動負荷法による動的肺過膨張の評価には漸増運動負荷試験で評価した対象者の最大運動能力の60-70%を負荷とした定常運動負荷試験を用いた。定常運動中2分ごとに IC を測定し、運動中の最小 IC (IC_{lowest}) および安静時からの最大の IC 減少量 ($-IC_{lowest}$) を動的肺過膨張の指標とした。過呼吸法による動的肺過膨

張の評価は専用のスパイロメーターを用いた。対象者が20回、30回、40回/分の過呼吸をそれぞれ30秒間おこなった後にそれぞれの IC を測定した。過呼吸後の最小 IC (IC_{lowest}) および安静時からの最大の IC 減少量 ($-IC_{lowest}$) を動的肺過膨張とした。動的肺過膨張を表す各 IC 指標における2つの評価法間の相関関係、それぞれの評価法で得られた各 IC 指標と運動持続時間および呼吸困難感の指標である運動中の修正ボルグスケールとの相関関係を検討した。また、COPD の表現型である気腫優位型と非気腫優位型に対する各 IC 指標の違いも検討した。

【結果】 動的肺過膨張を表す各 IC 指標は過呼吸法と運動負荷法間で有意な正の相関関係を示した (IC_{lowest} ; $r=0.67$, $p<0.01$, $-IC_{lowest}$; $r=0.44$, $p<0.01$)。運動持続時間と過呼吸法の IC_{lowest} は有意な相関を示したが、運動負荷法の IC_{lowest} とは有意な相関を示さなかった。修正ボルグスケールは過呼吸法と運動負荷法で得られたそれぞれの $-IC_{lowest}$ と有意な正の相関を示した。非気腫優位型に比べて気腫優位型で過呼吸法の IC_{lowest} と運動持続時間の有意な相関関係を示した。

【結論】 過呼吸法による動的肺過膨張評価は従来の運動負荷法に比べてより運動耐容能を予測し、運動負荷法の代替となることが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は慢性閉塞性肺疾患患者に認められる呼吸苦の原因の一つである動的過膨張の新しい呼吸法を用

いた計測方法が従来の運動負荷法による計測の代替となるかを明らかにした研究である。

動的肺過膨張は運動負荷法による計測で求めることがゴールドスタンダードであるが、慢性閉塞性肺疾患患者においては運動負荷の中止原因が呼吸苦ではなく下肢疲労による運動困難により発生することもあり、今回のか呼吸法による測定は純粹に呼吸機能のみを計測できる良い方法であると考えられる。

研究では過呼吸法と運動負荷法による最大吸気量の減少は有意な相関を示した。また、運動中の呼吸困難感は量刑側方の最大吸気量の減少と有意な相関を示した。このことより、過呼吸法は運動負荷法の十分な代用評価として用いることが明らかになった。

過呼吸法は従来の運動負荷法より簡便に、被検者への負担も少なく計測できることから、高い臨床応用性を持っていると考えられる。また、副論文において、

薬剤効果を過呼吸法による計測において最大吸気量の減少が低下することを明らかにしており、臨床における有用性も確かめている。

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学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、臨床応用が高い価値のある研究であり博士論文に値すると思われる。

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。

これらのことより、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 new noninvasive method for measurement of dynamic lung compliance from fluctuations on photoplethysmography in respiration (光電式容積脈波を用いた新たな非侵襲的動肺コンプライアンス測定法の検討)

山 崎 春 奈

(論文の内容の要旨)

肺コンプライアンスは、間質性肺疾患 (Interstitial lung disease ; ILD) において肺の硬化を示す指標として重要である。しかし、肺コンプライアンスの測定には食道バルーンを用いた食道内圧 (esophageal pressure ; Pes) の測定が不可欠であり、臨床では日常的には行われていない。本研究では、光電式容積脈波センサ (photoplethysmograph ; PPG) を用いた動肺コンプライアンス (dynamic lung compliance ; Cdyn) の新たな非侵襲的測定法を開発・検証、有用性の検討のために3つの実験を行った。

実験①では、吸気抵抗負荷を用いたキャリブレーション方法の検証と PPG による推定胸腔内圧 (pleural pressure ; Ppl) と食道バルーンを用いて計測した Pes の一致について検討した。健康人3名に対し、PPG の装着とともに食道バルーンを挿入し、吸気抵抗を負荷した上で換気量を徐々に増加させながら4秒周期で12回呼吸を行い、このときの PPG 変化量、Pes、口腔内圧 (pressure at airway opening ; PaO) を測定した。吸気抵抗負荷を行った際の PaO の変化は Pes の変化と良好な相関関係 ($r=0.98$) を示し、傾きは1.05でほぼ同様の値を示した。この結果を踏まえ、抵抗負

荷時の PaO の変化を用いて、推定 Ppl 算出のための PPG 変化量の校正を行った。その後、抵抗負荷を外して同様に換気を行い、校正した PPG 変化量から算出した推定 Ppl と Pes の変化を同時測定したところ、推定 Ppl と Pes は有意な相関関係 ($r=0.89$) を示し、傾きは0.92であり、推定 Ppl と Pes はほぼ同様である事が示された。

実験②では、PPG より推定した Cdyn と食道バルーン法を用いて測定した Cdyn を比較検討した。健康人28名、慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease ; COPD) 患者14名、ILD 患者10名を対象に肺機能検査 (スパイロメトリー、肺気量分画、肺拡散能力等)、食道バルーン法による Cdyn 測定を行った。更に、実験①で検討した校正方法を使用し、PPG より算出した推定 Ppl 変化とスパイロメトリーによる1回換気量の測定を併用して推定 Cdyn を測定した。2つの方法で測定された Cdyn 値は少数の患者においては測定誤差を認めたものの、明らかな系統誤差は示さず、有意な相関関係 ($r=0.63$) が認められた。

実験③では、PPG を用いた推定 Cdyn の疾患毎の比較と、肺機能検査値との関係について検討した。健

常人33名, COPD 患者31名, ILD 患者30名を対象とし, 肺機能検査と PPG を用いた推定 Cdyn の測定を行った。推定% Cdyn (Cdyn 実測値 / Cdyn 予測値 × 100) は, 健常群と COPD 群の間では有意な差を認めなかったものの, ILD 群の推定% Cdyn (35.4 ± 12.3 %) は健常群 (60 ± 15.8 %, p < 0.01) 及び COPD 群 (66.7 ± 41.9 %, p < 0.01) と比較して有意に低値を示した。更に, ILD 群では推定% Cdyn は%肺活量 (VC) (r = 0.57, p < 0.01) 及び, %DLco (r = 0.50, p < 0.01) と有意な相関関係を示した。

以上の3つの実験結果から, 新たに開発した PPG とスパイロメトリーを組み合わせた非侵襲的で簡便な推定 Cdyn 測定法は, ILD 患者の肺硬化の評価に有用である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

山崎春奈による本論文は間質性肺疾患 (Interstitial lung disease : ILD) の病態指標として重要な動肺コンプライアンス (Dynamic lung compliance : Cdyn) を推算する新たな方法を開発し, その有用性を検討した研究論文である。本法では, 光電式容積脈波センサ (Photoplethysmograph : PPG) で得られる脈波の呼吸成分を口腔内圧 (pressure at airway opening : PaO) で補正することにより, 食道内圧 (Esophageal pressure : Pes) を測定せずに非侵襲的に胸腔内圧 (pleural pressure : Ppl) を推算し, Cdyn を算出することを目的として実施された。

1. 論文の概要

本論文の研究は3つの実験で構成されている。

実験①では, まず, 健常被験者3名を対象とし, 吸気抵抗負荷を行い吸気時の流速を抑えた際の PaO の変化と Pes の変化を比較した結果, 良好な相関を認めた。次に, この結果に基づき, PPG の呼吸成分の変化量を, PaO の変化を用いて校正した。最後に, PPG 変化量の校正値から推算した Ppl 変化量と, Pes 変化量を比較した結果, 有意な相関を認め, 相関直線の傾き (0.92) から推算 Ppl 変化量と Pes 変化量はほぼ一致する事が示され, PPG の解析により Ppl が推算されることが示された。

実験②では, 肺機能検査 (スパイロメトリー) による1回換気量および実験①で示された推算 Ppl 変化量を用いて Cdyn を推定し, Pes を用いた Cdyn の実測値と比較した。健常被験者28名, 慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease : COPD) 患者14名, ILD 患者10名を対象として比較した結果,

Cdyn の推定値と実測値には有意な相関を認めた。

実験③では, PPG を用いた Cdyn 推定値を疾患毎に比較し, 肺機能指標との関係について検討した。健常者33名, COPD 患者31名, ILD 患者30名を対象とし, 推定% Cdyn (Cdyn 実測値 / Cdyn 健常予測値 × 100) を算出した。その結果, 健常群と COPD 群には有意差を認めなかったが, ILD 群 (35.4 ± 12.3 %) では, 健常群 (60 ± 15.8 %) および COPD 群 (66.7 ± 41.9 %) と比較して有意に推定% Cdyn が低値だった。さらに ILD 群では, 推定% Cdyn は%肺活量 (VC) および%DLco と有意な相関を認めた。

以上より, PPG を用いた新たな Cdyn の推算法は, 特に ILD 患者の% Cdyn の低下を非侵襲的に推定可能であり, ILD 患者の病態の進行を早期に診断できる可能性が示唆された。

2. 論文の評価・最終審査結果

審査に先立ち, 山崎氏より本研究の概要について説明があった。本研究により開発された胸腔内圧と動肺コンプライアンス (Cdyn) の推算法は, 食道内圧の測定を必要としない非侵襲性に意義がある。吸気抵抗負荷時には胸腔内圧を反映する食道内圧が口腔内圧とほぼ一致することに基づいて, 脈波の呼吸変動の変化量を口腔内圧の変化を用いて校正し, 脈波の変化量から胸腔内圧変化量が推算され, さらに呼吸機能検査の結果に基づいて Cdyn が算出される方法について説明がなされた。

最終審査では, 本法が複数の測定モダリティを活用して各測定値の関連から胸腔内圧を推算しているために, 測定条件や校正方法において誤差が生じ, 測定結果が変動する点について議論となった。本法に含まれる変動要因として, 論文に考察されている自律神経による変動, 心不全による心拍出量の変動や動脈硬化の程度が影響する可能性について指摘があった。山崎氏は, 脈波が主に胸腔内圧の変動によって呼吸性変動を示し, その解析手法は確立されているが, 胸腔内圧の実測値を推算する手法はこれまでに報告されていないこと, 本研究では吸気抵抗を変化させて口腔内圧の変化量を計測して脈波の呼吸性変動を抽出している点に新規性があることが説明された。さらに, 測定環境や条件, 被験者の状態等による影響を考慮し, 呼吸性変動以外の要因を最小限とするため, 測定毎に口腔内圧の測定を含む校正を実施した上で計測する方法であることが確認された。続いて計測値の再現性が議論となり, 健常人を対象として同時再現性, 日内再現性, 日

差再現性をした結果、変動係数は15%だったことが説明された。

続いて、本法による Cdyn 推算法の信頼性について、被験者を解析群と検証群に分けて2群間の交差検定により検証されているかどうか質問があった。本法の精度検定については、掲載誌の査読者からも同様の指摘があったため大切な点と認識しているが、本研究の範囲においては実施されていないため、今後の課題とされた。

本研究によって開発された非侵襲的な Cdyn の推算法は以上の様に、測定毎に実施する校正の妥当性や再現性の検証において若干の課題が残るものの、各種の変動因子を考察し、それらの影響を最小限とする校正により脈波の呼吸性変動を抽出しており、今後の臨床

応用が期待される点において審査意見は一致した。特に、間質性肺疾患では病態を反映する Cdyn の低下の検出精度が高いことが示されたことから、肺の線維化の進行などの病態の早期診断や、治療効果の評価を可能とする簡便な指標となる可能性が期待されるとの意見があった。

以上から、本論文の研究成果は、新規の非侵襲的な Cdyn 推算法を開発し、詳細な解析により臨床的有用性を発表した点に意義があり、博士論文として、研究内容と研究成果は高く評価されるものである。主査および副査は全員一致で本論文が信州大学大学院医学系専攻保健学分野の博士論文にふさわしいものであると判断した。

Convergent validity of a simplified device and relationship between blood lactate and salivary lactate after a vertical squat jump in healthy non-athletes (簡易デバイスの妥当性及び健康成人におけるスクワットジャンプ課題後の血中乳酸と唾液中乳酸の関係性)

岡野 怜己

(論文の内容の要旨)

【背景】理学療法において、運動に対する生体の反応を包括的に評価することは重要である。スポーツ科学分野では血中乳酸 (BLA) 濃度と、漸増負荷運動試験中の BLA の指数関数的上昇点である乳酸閾値 (LT) が運動処方を目安として使用されており、代謝の指標として BLA を測定することは有酸素能力の評価手法として有用と考えられるものの、理学療法士による BLA 測定は実際の臨床場面においてはあまり普及していない。この理由の1つとして、採血による測定時の侵襲性が挙げられる。そこで近年、非侵襲的に採取できる唾液乳酸 (SLA) が BLA の代替となり得るかどうかを検討する試みが進められており、SLA と BLA の間には高い正の相関関係があることが明らかとなってきている。しかし現状の SLA の測定方法は、遠心分離や検体量の調整等の専門手技を必要とするため、研究室レベルでの測定に留まっている。そこで我々は、簡易デバイスである Lactate Pro 2 を使用して SLA を測定できるか調査した。Lactate Pro 2 は、BLA 測定用のポータブルデバイスとして市販されているが、SLA 測定に応用できるかどうかは不明である。更に SLA と BLA の相関関係を報告した論文は、サイクリングやトレッドミル等の有酸素系運動や漸増負荷運動に限局しているため、本研究では妥当性が検

証された際、嫌気性運動課題であるスクワットジャンプ (SJ) における BLA と SLA の挙動に関しても調査した。

【目的】① SLA を使用して Lactate Pro 2 と JCA-BM 8000 自動分析装置との収束の妥当性を検討すること (デバイステスト)、② SJ 課題後の BLA と SLA との関係性を調査すること (SJ テスト) とした。

【方法】デバイステストでは、5名の被験者が SJ 課題を行い、運動前、運動直後、3分後、その後2分おきに30分間唾液のみを採取した。Lactate Pro 2 を使用して SLA を測定後、遠心分離を行い上清を取り出して、自動分析装置にて同一サンプルの SLA を測定した。SJ テストでは20名の被験者で SJ 課題後の BLA と SLA の関係性を調査した。運動前、運動直後、その後5分おきに30分間 Lactate Pro 2 を用いて BLA と SLA を測定した。SJ 課題は46 bpm のピッチ音に合わせた1分30秒のスクワットジャンプ運動とした。Lactate Pro 2 の測定範囲は、0.5-25.0 mmol/L であり、0.5 mmol/L 未満の値は「Lo」と表示される。デバイステストでは、Lactate Pro2 で測定した SLA と自動分析装置で測定した SLA の間の収束の妥当性を級内相関係数 (ICC) の二元配置変量モデル (絶対一致) で評価した。分析の前に SLA, BLA の値をベスライン (運動前の乳酸値) で除することによりデー

タを正規化した。SJ テストでは、正規化したBLAとSLAに対して相互相関分析を行った。

【結果】 デバイステストでは、5名の被験者からそれぞれ16サンプルの唾液を採取した。計80サンプルの内、7サンプルで「Lo」が表示され、解析では欠損値として扱った。Lactate Pro 2と自動分析装置との間の各被験者のICC (2,1) は0.568-0.763であり、全体としては0.773 (95%信頼区間: 0.678 to 0.844, $p < 0.01$) であった。SJ テストでは、20名の被験者からBLAとSLAの8サンプルをそれぞれ測定した。SLAの160サンプルのうち20サンプルで「Lo」が表示され、運動前に「Lo」を表示した5名の被験者は解析から除外した。15名中14名でSLAよりもBLAが早くピーク値に到達し、相互相関係数はlag 0で0.535, lag 1で0.750となり、SLAがBLAよりも1測定分(5分)遅れて推移した。

【考察】 Lactate Pro 2は試料にセンサーを付着させるという簡便な操作で、15秒後に乳酸値を知ることが出来る。デバイステストの結果、Lactate Pro2とJCA-BM8000自動分析装置の間のICCは0.770であった。これは両者が比較的高い収束的妥当性を有し、臨床現場でもLactate Pro 2を使用して非侵襲的かつ即時的にSLAを評価できる可能性を示している。しかし2つのデバイスで測定したSLAの絶対値は一致せず、解析には正規化した値を使用した。SLAの測定結果を汎化するためには、Lactate Pro2を使用したSLA測定の標準化された方法を確立する必要がある。SJテストでは、BLAとSLAは同時には推移せず、BLAがSLAに5分先行することが示された。しかしながらエルゴメーターによる漸増負荷運動を運動課題とした先行研究では、BLAとSLAがタイムラグなしで同時に変化することが報告されている。このタイムラグの違いは、運動課題に起因する可能性がある。BLAは、最大努力下で30-120秒の運動を行った場合、3-8分後に素早くピークに達する一方、漸増運動では緩やかに増加し、運動終了に向かって急速に増加すると言われている。SLAは主として運動によって蓄積したBLAが唾液中に放出されるため、運動課題により乳酸の産生が生理学的に異なればその後のSLAの挙動にも影響を及ぼすと考えられる。

【結論】 本研究では、Lactate Pro 2を使用してSLAを測定できるか、その後SJ後のBLAとSLAの関係性を調査した。現行の測定手法とLactate Pro 2の測定値には高い妥当性が確認され、SLAを臨床現場で非侵襲的に測定できることが示唆された。SJ後のBLAとSLAの挙動にはタイムラグが認められ、唾液乳酸を血中乳酸の代替として使用するには運動課題を含め更なる研究が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は高強度運動負荷時における唾液中乳酸値が血中乳酸値とどのような関係があるかを明らかにした論文である。また、簡易乳酸測定器を用いて唾液中乳酸値を測定しているため、その測定方法の妥当性についても検討した。

運動中の生体反応は呼気ガス分析装置や血中乳酸値を用いて計測する方法が主流であり、大掛かりな機器が必要とされるか、侵襲を伴う方法が主流であるが、今回の方法は非侵襲で簡易的であることが特徴である。今回の計測については、計測の値も異なることが明らかとなり、妥当性検証の被検者数が少なく十分な妥当性や信頼性が明らかにはならなかったが、今後の可能性を期待させる方法であった。

また、高強度運動負荷試験を実施した今回の研究では、持続運動負荷試験の結果と異なり、血中乳酸値より唾液中乳酸値の方が5分遅れて反応することが明らかになった。これは運動様式の違いの影響が考えられる。

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学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。

これらのことより、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。