

## 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
花岡吉亀	乙第1238号	R 2. 7. 1	Transradial approach as the primary vascular access with a 6Fr Simmons guiding sheath for anterior circulation interventions: a single-center case series of 130 consecutive patients (前方循環病変の血管内治療において6Fr シモンズ型ガイディングシースを用いた第一選択としての橈骨動脈アプローチ: 単施設連続130例によるケースシリーズ研究)	藤永康成	関島良樹 福島菜奈恵 長島久
眞鍋憲正	乙第1239号	R 2. 7. 8	Countdown before voluntary exercise induces muscle vasodilation with baroreflex-mediated decrease in muscle sympathetic nerve activity in humans (ヒト自発運動開始前のカウントダウンによる圧反射性筋交感神経活動抑制と筋血管拡張)	川眞田樹人	今村 浩 関島良樹 鷹股 亮
宮嶋宏樹	乙第1240号	R 2. 7.22	Novel ACTG1 mutations in patients identified by massively parallel DNA sequencing cause progressive hearing loss (超並列 DNA シーケンシングにより同定された ACTG1新規変異による難聴患者は進行性難聴を引き起こす)	古庄知己	関島良樹 田渕克彦 松原 篤
上條知子	乙第1241号	R 2.10.28	Risk Factors for Duty-Related Posttraumatic Stress Disorder among Police Officers in the Mt. Ontake Eruption Disaster-Support Task Force (御嶽噴火災害対策支援業務に従事した警察官における PTSD のリスク要因)	鷲塚伸介	浅村英樹 古庄知己 堤 明純
常川主裕	乙第1242号	R 2.10.28	Halucal thenar index: a new index to detect peripheral arterial disease using laser speckle flowgraphy (母趾球-母指球比: レーザースペックルフローグラフィーを使った末梢動脈疾患の新たな指標)	桑原宏一郎	沢村達也 柴 祐司 宮脇剛司
小澤秀介	乙第1243号	R 3. 1.13	Expression profile of cytochrome P450s and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and antiepileptic drugs on CYP1 expression in MOG-G-CCM cells (ヒトアストロサイトーマ由来 MOG-G-CCM 細胞におけるシトクロム P450 の発現プロファイルおよび多環芳香族炭化水素と抗てんかん薬による CYP1 遺伝子の発現解析)	鷲塚伸介	中沢洋三 中山 淳 松永民秀

審査学位論文要旨

佐藤 貴久	乙第1244号	R 3. 1.27	Efficacy of protocol-based non-invasive positive pressure ventilation for acute respiratory distress syndrome: a retrospective observational study (急性呼吸促進症候群に対するプロトコルを用いた非侵襲的陽圧換気の有用性: 後方視的観察研究)	小泉 知展	花岡 正幸 増木 静江 松田 直之
宮崎あかり	乙第1245号	R 3. 2.24	Highly oxidized low-density lipoprotein does not facilitate platelet aggregation (高度に酸化した低比重リポ蛋白は血小板凝集を促進しない)	本田 孝行	小泉 知展 梅村 武司 吉澤 明彦
市村 創	乙第1246号	R 3. 3. 4	Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vivo (生体内においてES細胞由来心筋細胞の成熟した心室筋分画が増加する)	清水 公裕	伊藤 研一 新藤 隆行 小野 稔
草刈 麻衣	乙第1247号	R 3. 3. 4	Trends in gastroesophageal reflux disease in Japanese children and adolescents (日本の小児における胃食道逆流症の傾向)	菅野 祐幸	梅村 武司 福島 菜奈恵 犬飼 岳史
中村 敏範	乙第1248号	R 3. 3.24	Reduced functional connectivity in the prefrontal cortex of elderly catatonia patients: A longitudinal study using functional near-infrared spectroscopy (高齢カタトニア患者の前頭皮質の機能的結合性の低下: 近赤外線スペクトロスコピィを使用した縦断研究)	藤永 康成	堀内 哲吉 古庄 知己 松尾 幸治
井出 進	乙第1249号	R 3. 3.24	Phospholipase C $\beta$ 3 Expressed in Mouse DRGs is Involved in Inflammatory and Postoperative Pain (マウス後根神経節に発現する PLC $\beta$ 3は炎症性及び術後性疼痛に関与する)	中山 淳	高橋 淳 福島 菜奈恵 飯田 宏樹

Transradial approach as the primary vascular access with a 6Fr Simmons guiding sheath for anterior circulation interventions: a single-center case series of 130 consecutive patients (前方循環病変の血管内治療において6Fr シモンズ型ガイディングシースを用いた第一選択としての橈骨動脈アプローチ：単施設連続130例によるケースシリーズ研究)

花岡吉亀

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 大腿動脈アプローチによるカテーテル治療は、重大な穿刺部合併症（穿刺部血腫、仮性動脈瘤、動静脈瘻、後腹膜血腫）や静脈血栓塞栓症を来す危険性を常に伴っている。心臓血管領域では、橈骨動脈アプローチによるカテーテル治療の安全性、有用性が確立されており、現在、第一選択として一般的に使用されている。一方、脳血管内治療、特に前方循環病変に対しては、解剖学的特性から大腿動脈アプローチが広く選択され、橈骨動脈アプローチは大腿動脈アプローチが困難な場合のみ、その代替として使用されているのが現状である。従来のカテーテル（先端形状：ストレート型）を使用した右橈骨動脈アプローチでは、右鎖骨下動脈に対して急峻に分岐する右総頸動脈や左総頸動脈へのカニューレーションは困難とされている。従って、これまでに橈骨動脈アプローチを第一選択とした前方循環病変に対する脳血管内治療の報告はない。本研究の目的は、前方循環病変に対してシモンズ型ガイディングシース（先端形状：シモンズ型）を使用した橈骨動脈アプローチを第一選択とする血管内治療の実現可能性および安全性に関して評価することである。

【方法】 2018年6月から、我々は前方循環病変に対する血管内治療を行う際、右橈骨動脈アプローチを第一選択、左橈骨動脈アプローチを第二選択、大腿動脈アプローチを第三選択としている。橈骨動脈アプローチを行う症例では、1) 大動脈弓を含むアクセスルートに関する術前画像検査の施行、2) 橈骨動脈の拍動触知、3) アレントテスト陰性を必須条件としている。2018年6月から2019年9月までに148症例（148病変）に対して、頸動脈ステント留置術または脳動脈瘤コイル塞栓術が施行された。これらのうち、橈骨動脈アプローチを第一選択とした130例（右橈骨動脈アプローチ：124例、左橈骨動脈アプローチ：6例）を対象とした。アプローチ側総頸動脈（標的総頸動脈）および大動脈弓の形態は、術前画像検査に基づいて評価され、前者は右総頸動脈、左総頸動脈（bovine type）、左総頸動脈（nonbovine type）、後者は type I、type II、type III

arch に分類された。橈骨動脈穿刺側、標的総頸動脈および大動脈弓の形態に応じて、6Fr シモンズ型ガイディングシースの標的総頸動脈への誘導方法が選択された。治療は全例全身麻酔下に施行された。頸動脈ステント留置術は、6Fr シモンズ型ガイディングシースを標的総頸動脈に誘導後施行された。脳動脈瘤コイル塞栓術は、6Fr シモンズ型ガイディングシースを標的総頸動脈に誘導後、さらに6Fr 中間カテーテルを内頸動脈錐体部または遠位頸部に誘導し施行された。6Fr シモンズ型ガイディングシースは治療直後に抜去し、穿刺部止血には止血デバイスを使用した。止血デバイスの減圧は4時間かけて段階的に実施し、前腕以外の安静度は制限しなかった。6Fr シモンズ型ガイディングシースの標的総頸動脈への誘導方法、成功率、治療成功率、周術期合併症および穿刺部合併症に関して、後方視的に評価した。

【結果】 標的総頸動脈は、右総頸動脈69例（53.0%）、左総頸動脈（bovine type）6例（4.6%）、左総頸動脈（nonbovine type）55例（42.3%）であった。頸動脈ステント留置術は75例（57.7%）、脳動脈瘤コイル塞栓術は55例（42.3%）に実施された。標的総頸動脈への6Fr シモンズ型ガイディングシースの誘導は、穿刺側、標的総頸動脈および大動脈弓の形態に応じて誘導方法を選択することによって、全130例において成功した。全例において大腿動脈アプローチに変更することなく、橈骨動脈アプローチにより治療は完遂された。無症候性橈骨動脈閉塞は2例（1.5%）で認められたが、周術期合併症および穿刺部合併症は認めなかった。

【結論】 穿刺側、標的総頸動脈および大動脈弓の種類に応じて6Fr シモンズ型ガイディングシースの誘導方法を適切に選択することによって、橈骨動脈アプローチによる脳血管内治療は高い成功率と安全性を併せ持っていた。ゆえに、橈骨動脈アプローチを第一選択にすることの妥当性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

脳血管内治療、特に前方循環病変に対しては、解剖

学的特性から大腿動脈アプローチが広く選択され、橈骨動脈アプローチは大腿動脈アプローチが困難な場合のみ、その代替として使用されているのが現状である。これまでに橈骨動脈アプローチを第一選択とした前方循環病変に対する脳血管内治療の報告はない。本研究の目的は、前方循環病変に対して6Fr シモンズ型ガイディングシースを使用した橈骨動脈アプローチを第一選択とする血管内治療の実現可能性および安全性に関して評価した。

2018年6月から2019年9月までに148症例（148病変）に対して、頸動脈ステント留置術または脳動脈瘤コイル塞栓術が施行された。これらのうち、橈骨動脈アプローチを第一選択とした130例（右橈骨動脈アプローチ：124例、左橈骨動脈アプローチ：6例）を対象とした。橈骨動脈穿刺側、標的総頸動脈および大動脈弓の形態に応じて、6Fr シモンズ型ガイディングシースの標的総頸動脈への誘導方法が選択された。治療は全例全身麻酔下に施行された。6Fr シモンズ型ガイディングシースは治療直後に抜去し、穿刺部止血には止血デバイスを使用した。6Fr シモンズ型ガイディングシースの標的総頸動脈への誘導方法、成功率、治療成功率、周術期合併症および穿刺部合併症に関して、

後方視的に評価した。

その結果、以下の成績を得た。

1. 標的総頸動脈は、右総頸動脈69例（53.0%）、左総頸動脈（bovine type）6例（4.6%）、左総頸動脈（nonbovine type）55例（42.3%）であった。
2. 頸動脈ステント留置術は75例（57.7%）、脳動脈瘤コイル塞栓術は55例（42.3%）に実施された。
3. 標的総頸動脈への6Fr シモンズ型ガイディングシースの誘導は、全130例において成功した。
4. 全例において大腿動脈アプローチに変更することなく、橈骨動脈アプローチにより治療は完遂された。
5. 無症候性橈骨動脈閉塞は1例（1.5%）で認められたが、周術期合併症および穿刺部合併症は認めなかった。

以上より、穿刺側、標的総頸動脈および大動脈弓の種類に応じて6Fr シモンズ型ガイディングシースの誘導方法を適切に選択することによって、橈骨動脈アプローチによる脳血管内治療は高い成功率と安全性を併せ持っていると考えられた。ゆえに、橈骨動脈アプローチを第一選択にすることの妥当性が示された。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

### Countdown before voluntary exercise induces muscle vasodilation with baroreflex-mediated decrease in muscle sympathetic nerve activity in humans (ヒト自発運動開始前のカウントダウンによる圧反射性筋交感神経活動抑制と筋血管拡張)

#### 眞 鍋 憲 正

##### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】これまで、運動を始めようと意図すると、まだ運動を開始していないにもかかわらず、昇圧反応や筋血管拡張反応が起こることが報告されていた。しかし、これから動こうと意図することで脳活動上昇が起こるが、その後、一連の循環反応がどのようなメカニズムで起こるのかは不明であった。さらに、これらの反応が運動開始後にどのようなメリットがあるのかについて、ほとんど研究がされていなかった。そこで、本研究では自発運動開始前にあらかじめカウントダウン（CD）の合図によって「動こう」という動機付けを行ってから自転車運動させると、下肢血管の拡張が起こるかどうか、もし起こるならば、その反応に筋交感神経活動はどのように関与しているのか、そして、それらの反応が下肢筋の酸素消費量にどのように影響するのかについて検討した。

【方法】若年健常男性14名（23±4歳）を対象として、半臥位にて自転車運動を負荷し、その際の中大脳動脈血流速度（経頭蓋超音波ドップラー法）、心拍数（心電図）、血圧（指尖部フォトプレチスモグラフィ）、酸素消費量（呼気ガス分析法）、大腿部筋組織酸素飽和度（近赤外分光法）を連続測定した。また、心拍出量、総末梢血管抵抗を血圧波形（Model flow法）より算出した（実験1）。また、別の若年健常男性10名（27±3歳）を対象として、実験1と同様の運動プロトコルにて、ただし右脚のみで行う自転車運動を負荷し、その際、左脚の腓骨神経から筋交感神経活動（マイクロニューログラフィ）を連続測定した（実験2）。全被験者において、各運動の間に5分以上の休憩をさみ計8回の運動を行わせた。8回の運動のうち無作為に選んだ4回において、運動開始30秒前からカウントダウンの合図を送り自転車運動を開始させたのに対



して、残りの4回はカウントダウンなしで開始させた。  
**【結果】** 実験1において、CDをすると、まず中大脳動脈血流速度、心拍数、心拍出量、平均血圧が上昇し、それに続いて総末梢血管抵抗が低下し、大腿部筋組織酸素飽和度、酸素消費量が上昇した(すべて、 $P < 0.021$ )。さらに、実験2において、CDによる平均血圧の上昇は圧反射性に総筋交感神経活動量、筋交感神経発火頻度を低下させ(共に、 $P < 0.048$ )、これに伴い、総末梢血管抵抗が低下し大腿部筋組織酸素飽和度が上昇した(すべて、 $P < 0.001$ )。この血管拡張と酸素消費量の亢進は運動開始後も数秒間継続した。

**【結論】** 自転車運動開始に先行してCDをすると圧反射性に筋交感神経活動が抑制され下肢の筋血管が拡張すること、これは運動開始後の下肢筋の好氣的エネルギー産生を促進し、運動をスムーズに開始するメリットがあることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

これまで、運動を始めようと意図すると、まだ運動を開始していないにもかかわらず、昇圧反応や筋血管拡張反応が起こることが報告されていた。しかし、これから動こうと意図することで脳活動上昇が起こるが、その後、一連の循環反応がどのようなメカニズムで起こるのかは不明であった。さらに、これらの反応が運動開始後にどのようなメリットがあるのかについて、ほとんど研究がされていなかった。

そこで、眞鍋は自発運動開始前にあらかじめカウントダウン(CD)の合図によって「動こう」という動機付けを行ってから自転車運動させると、下肢血管の拡張が起こるかどうか、もし起こるならば、その反応に筋交感神経活動はどのように関与しているのか、そして、それらの反応が酸素消費量にどのように影響するのかについて検討した。

若年健常男性14名(23±4歳)を対象として、半臥位にて自転車運動を負荷し、その際の中大脳動脈血流速度(経頭蓋超音波ドップラー法)、心拍数(心電図)、

血圧(指尖部フォトプレチスモグラフィ)、酸素消費量(呼吸ガス分析法)、大腿部筋組織酸素飽和度(近赤外分光法)を連続測定した。また、心拍出量、総末梢血管抵抗を血圧波形(Model flow法)より算出した(実験1)。また、別の若年健常男性10名(27±3歳)を対象として、実験1と同様の運動プロトコールにて、ただし右脚のみで行う自転車運動を負荷し、その際、左脚の腓骨神経から筋交感神経活動(マイクロニューログラフィ)を連続測定した(実験2)。全被験者において、各運動の間に5分以上の休憩をはさみ計8回の運動を行わせた。8回の運動のうち無作為に選んだ4回において、運動開始30秒前からカウントダウンの合図を送り自転車運動を開始させたのに対して、残りの4回はカウントダウンなしで開始させた。

そして、次のような結果を得た。

1. 実験1において、CDをすると、まず中大脳動脈血流速度、心拍数、心拍出量、平均血圧が上昇し、それに続いて総末梢血管抵抗が低下し、大腿部筋組織酸素飽和度、酸素消費量が上昇した(すべて、 $P < 0.021$ )。
2. さらに、実験2において、CDによる平均血圧の上昇は圧反射性に筋交感神経総活動量、筋交感神経発火頻度を低下させ(共に、 $P < 0.048$ )、これに伴い、総末梢血管抵抗が低下し大腿部筋組織酸素飽和度が上昇した(すべて、 $P < 0.001$ )
3. この血管拡張と酸素消費量の亢進は運動開始後も数秒間継続した。

これらの結果より、自転車運動開始に先行してCDをすると圧反射性に筋交感神経活動が抑制され下肢の筋血管が拡張すること、これは運動開始後の下肢筋の好氣的エネルギー産生を促進し、運動をスムーズに開始するメリット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。

Novel *ACTG1* mutations in patients identified by massively parallel DNA sequencing cause progressive hearing loss (超並列DNAシーケンシングにより同定された*ACTG1*新規変異による難聴患者は進行性難聴を引き起こす)

宮 嶋 宏 樹

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** *ACTG1*遺伝子は常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性難聴の原因の一つ(DFNA20/26)

である。*ACTG1*遺伝子にコードされているgamma( $\gamma$ )-actinは内耳有毛細胞の不動毛に局在しており、細胞骨格の形成・修復に関与していると考えられてい

る。ACTGI遺伝子変異による難聴の臨床像としては、高音域の難聴が徐々に進行していくことが報告されていたが、多症例で検討した報告はなく詳細な臨床像は不明であった。そこで本研究では全国の共同研究施設から集められた日本人難聴患者7,408例を対象に次世代シーケンサー解析を実施し、ACTGI遺伝子変異による難聴患者を同定するとともに頻度と臨床像を明らかにすることを目的に研究を実施した。

【対象と方法】 信州大学および全国の共同研究施設から収集された日本人難聴患者7,408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遺伝子の網羅的解析を行った。常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者1,336例からACTGI遺伝子バリエーションを持つ患者を抽出し、バリエーションの病原性や難聴患者の臨床的特徴について検討を行った。また本研究で見出した新規変異をNIH/3T3線維芽細胞株に導入し変異型 $\gamma$ -actinの細胞内局在の変化に関して検討を行った。

【結果】 常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者1,336例中、15例よりACTGI遺伝子変異を同定し、常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者における頻度は1.1% (15/1336)であることを明らかにした。見出された13種類の遺伝子変異のうち7種類は過去に報告のある変異であり、6種類が新規変異であった。ACTGI遺伝子変異による難聴症例の聴力像については、10歳頃より発症し、高音域は40歳代までに高度まで障害されるのに対し、低音域は徐々に障害されていく傾向が認められた。純音聴力検査の結果、中音域4周波数(500Hz, 1000Hz, 2000Hz, 4000Hz)の難聴の進行度合いは平均1.7dB/年であるのに対し、低音域(125Hz, 250Hz, 500Hz)は0.8-1.0dB/年、高音域(2000Hz, 4000Hz, 8000Hz)は1.9dB/年であり、高音部の方が難聴の進行速度が速いことを明らかにした。また、60歳以上の症例は全例、高度～重度難聴まで進行していた。人工内耳を施行している症例は2例認めた。また、見出された新規変異の機能を調べることを目的に、NIH/3T3線維芽細胞株に野生型および変異型 $\gamma$ -actin発現ベクターを導入し、細胞内局在を調べた。その結果、ACTGI変異体 p.I34M, p.M82I, p.K118M および p.I165V は細胞内で小さな凝集体を形成したが、野生型、および p.R37H, p.G48R, p.E241K, p.H275Y 変異はアクチンネットワークに広く分布していた。これらの結果から、ACTGI遺伝子変異による難聴の病因の一部は、変異型 $\gamma$ -actinがF-actinに重合できないことによって不動毛形成に必要なアクチンネット

ワークに組み込まれず、その結果Stereociliaの変性が生じて難聴が引き起こされる可能性が示唆された。

【結論】 本研究によりACTGI遺伝子変異による難聴の頻度、詳細な臨床像を明らかにすることができた。また、培養細胞系を用いることで発症メカニズムの推定を行うことができた。本研究で得られた情報は、難聴の遺伝学的検査の診断率向上に寄与するとともに、ACTGI遺伝子変異による難聴患者の予後の予測や、適切な介入手法の選択に有用である。

#### (論文審査の結果の要旨)

ACTGI遺伝子は常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性難聴の原因の一つ(DFNA20/26)である。ACTGI遺伝子にコードされる $\gamma$ -actinは内耳有毛細胞の不動毛に局在しており、細胞骨格の形成・修復に関与している。ACTGI遺伝子変異による難聴の臨床像としては、高音域の難聴が徐々に進行していくことが報告されていたが、多症例で検討した報告はなく詳細な臨床像は不明であった。

本研究では、信州大学および全国の共同研究施設から集められた日本人難聴患者7,408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の網羅的解析を行った。常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者1,336例からACTGI遺伝子バリエーションを持つ患者を抽出し、バリエーションの病原性や難聴患者の詳細な臨床的特徴について検討を行った。また、見出された新規変異の機能を調べることを目的に、NIH/3T3線維芽細胞株に野生型および変異型 $\gamma$ -actin発現ベクターを導入し細胞内局在を調べた。

その結果、宮嶋は次の結論を得た。

1. 常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者1,336例中15例(1.1%)がACTGI遺伝子変異による難聴と考えられた。
2. 13種類のACTGI遺伝子変異を同定した。うち新規変異は6種類・既知変異は7種類であった。
3. ACTGI遺伝子変異による難聴は後天発症であり、進行性難聴であった。
4. 4周波数(500Hz, 1000Hz, 2000Hz, 4000Hz)の平均聴力における難聴の進行速度は平均1.7dB/年であった。
5. 低音域(125Hz, 250Hz, 500Hz)の進行度はそれぞれ0.8-1.0dB/年、高音域(2000Hz, 4000Hz, 8000Hz)は1.9dB/年であり、高音域の方が難聴の進行速度が速かった。
6. NIH/3T3線維芽細胞内ではACTGI変異体 p.I

34M, p.M82I, p.K118M および p.I165V は小さな凝集体を形成した。一方, p.R37H, p.G48R, p.E241K および p.H275Y は野生型  $\gamma$ -actin と同様の分布を示した。

以上により, *ACTG1* 遺伝子は後天発症の難聴の原因として重要な遺伝子のひとつであり, 今回明らかになった新規変異により遺伝学的検査の診断率の向上を寄与することができると考えられる。また *ACTG1* 遺伝子変異による難聴の詳細な臨床像や難聴の進行速度を明らかにした。これらの情報は, *ACTG1* 遺伝子変異による難聴患者の予後予測や治療法を選択する上

で重要な情報として活用可能である。また NIH/3T3 線維芽細胞を用いた実験により p.I34M, p.M82I および p.I165V が病的変異であることを積極的に支持する結果を得た。また, *ACTG1* 遺伝子変異による難聴の病因の一部は, 不動毛形成に必要なアクチンネットワークに変異型  $\gamma$ -actin が組み込まれず, その結果不動毛の変性を生じて難聴が引き起こされる可能性を示した。

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。

## Risk Factors for Duty-Related Posttraumatic Stress Disorder among Police Officers in the Mt. Ontake Eruption Disaster-Support Task Force (御嶽山噴火災害支援業務に従事した警察官における PTSD のリスク要因)

上 條 知 子

### (論文の内容の要旨)

【背景】2014年9月27日, 長野県の御嶽山の噴火により, 多くの犠牲者が出た。自衛隊, 消防, 地方警察からも災害支援活動として職員が派遣され, 救助等の作業に従事した。一般的に救助活動を行うレスキューワーカーは非常事態によるストレスにさらされるため, 心的外傷後ストレス障害 (Post-Traumatic Stress Disorder: PTSD) は救援業務従事者にとって課題の一つである。今回, 御嶽山噴火災害の救援, 災害支援業務に従事した警察職員を対象に, PTSD の発症頻度, 重症度を明らかとすること, また PTSD の重症度と本災害支援業務従事前後の状況との関連を調べることを目的とし調査を実施した。

【方法】2015年1月, 長野県警察において, 御嶽山噴火災害支援業務に携わった警察官・職員全員 (1,082人) に対し, 災害ストレスに関する健康調査を実施した。本研究は, 全対象のうち, 災害支援業務からの帰還後に何らかの PTSD 症状を持ち, データが欠落していない213人を対象に分析を行った。アウトカムである PTSD の重症度は The Post-traumatic Stress Diagnostic Scale (PDS) 日本語版を用いて調べ, それに寄与する可能性のある因子として, 性別, 同居者の有無, 職員経験年数, コナー・デビッドソン回復力尺度によるレジリエンス得点, 派遣前のストレスの自覚状況, 派遣前の支援者の有無, 災害支援業務への累積従事日数, 支援業務内容, 派遣後のストレス解消法を確認した。分析は多重ロジスティック回帰分析を行

い, 参加者の症状の重症度と参加者の災害業務従事前後状況 (噴火前のストレッサー, 噴火前の支援者の有無, 災害支援業務, 災害後のストレス解消法 等) との関連を分析した。

【結果】対象者のなかで PTSD の診断基準を満たす人はいなかった。PDS スコアによる PTSD の重症度は, 0点 (73.2%), 軽度 (1~10点) が55人 (25.8%), 中等度 (11~20点) が2人 (0.9%) であり, 中程度から重度 (21~35点), 重度 (36点以上) の対象者はいなかった。PDS スコアの平均 ( $0.9 \pm SD 2.3$ ) は既存報告より低かった。対象者の PTSD 重症度に「累積従事日数が7日以上」(オッズ比 [OR] 2.47, 95% 信頼区間 [CI] 1.21-5.06), 「災害支援業務後のストレス解消として飲酒や喫煙を選択」(OR 2.35, 95% CI 1.09-5.04), 「女性」(OR 3.58, 95% CI 1.19-10.77) が関連し, 災害支援業務の内容については, 「被災者家族の支援」(OR=1.99, 95% CI 0.95-4.21) が関連する傾向が認められた。

【考察】この研究で以下の2点について明らかになった。

- (1) PTSD 測定尺度 (PDS) を用いて測定された御嶽山噴火災害支援業務による PTSD の重症度
- (2) PTSD 症状の重症度 (PDS スコア  $\geq 1$ : 軽度以上の症状) に関連する因子

(1)では, 今回の対象者で PTSD の診断基準を満たす人はおらず, 中程度以上の症状を持った人も無く, PDS スコアの平均値も低かった。この理由として,



一般的に暴行や事故などと比較すると自然災害はリスクが低いとされており、今回の結果と一致した。また、警察職員は非常時における日ごろの経験と訓練によるもの、が影響していると考えられる。

(2)について、「女性」であることが最も重症度と関連し、既存報告と一致した。災害前後の状況による因子の中では、「累積従事日数の長さ」が最も関連があったことから、業務の期間管理による予防の可能性が考えられた。また、自身の身の危険や遺体、負傷者への接触のリスクがあるが、「捜索・輸送・検視の従事」に有意な関連がなかった。このことは、この業務の従事者の精神的健康度が他の業務の従事者より高かったことから、健康度の高く、訓練された職員が派遣されていた結果と考えられる。一方で「被害者家族支援の従事」のリスクが比較的高く、トラウマの二次受傷の可能性がある。既存報告からも二次受傷リスクが指摘されている。帰還後の行動として「飲酒と喫煙によるストレス解消」も重症度と関連し、これまでの報告と一致している。アルコールや喫煙も含む物質依存の傾向は自己治癒のための行動との報告もあるが、こうした大規模災害業務後には注意が必要であり、これらの行動がPTSDの早期発見にも繋がり得る。また、事前に飲酒・喫煙以外のストレス対処方法を教育しておくこともPTSDの併存症状を予防する方法の一つと考えられた。

【まとめ】PTSDの重症度と、災害支援活動の日数、ストレス解消行動、性別が関連したことから、災害支援業務への派遣の際、管理、フォローアップ等を行うことで健康影響を予防することの一助となると考えられる。

### Hallucal thenar index : A new index to detect peripheral arterial disease using laser speckle flowgraphy (母趾球—母指球比：レーザースペックルフローグラフィーを使った末梢動脈疾患の新たな指標)

常川主裕

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】下肢末梢動脈疾患(peripheral arterial disease : PAD)の血流評価としてankle brachial index (ABI), skin perfusion pressure (SPP)が広く利用されている。ABIはカットオフ0.9に設定した場合、感度95%特異度90%, SPPはカットオフ40 mmHgに設

#### (論文審査の結果の要旨)

一般的に救助活動を行うレスキューワーカーは非常事態によるストレスにさらされるため、心的外傷後ストレス障害(Post-Traumatic Stress Disorder : PTSD)は救援業務従事者にとって課題の一つである。今回、御嶽山噴火災害の救援、災害支援業務に従事した警察職員を対象に、PTSDの発症頻度、重症度を明らかにすること、またPTSDの重症度と本災害支援業務従事前後の状況との関連を調べることを目的とし調査を実施した。

その結果以下の知見を得た。

1. PTSD測定尺度(PDS)を用いて測定された御嶽山噴火災害業務によるPTSDの重症度
  - ・PTSDの診断基準を満たす人はおらず、中程度以上の症状を持った人もいなかった。
2. PTSD症状の重症度(PDSスコア $\geq 1$ :軽度以上の症状)に関連する因子
  - ・「女性」の派遣者でリスクが高かった。
  - ・災害対策業務への「累積従事日数の長さ」が7日未満に比して7日以上の場合にリスクが高かった。
  - ・災害対策業務で「被害者家族支援の従事」をしているとリスクが高かった。
  - ・災害対策業務の帰還後に「飲酒と喫煙によるストレス解消」を選択した場合にリスクが高かった。

以上のように、御嶽山噴火災害支援従事者における軽度以上のPTSD症状に関連するいくつかの因子を確認できた。

この結果から、災害派遣においては、業務管理や事前の教育、事後のケアの計画などの組織対応がPTSD予防や早期発見に役立つ可能性が示唆された。

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。

定した場合、感度76.1%特異度84.2%と報告されている。PADの評価、診断に有用な検査であるが、いずれも足にカフを巻いて圧迫する検査であり患者への苦痛を伴う。本研究はレーザースペックルフローグラフィー(LSFG)を使って母趾球と母指球の比(hallucal thenar index : HTI)によって足の虚血が評価できると仮説を



たてて行った。

LSFG は皮膚に非接触で短時間（4 秒）に 20×15 cm の範囲における相対的な血流を計測できる。計測原理としては機器から 24 cm 離れた対象に近赤外光を照射して皮下 1～2 mm の赤血球から反射散乱した光を内蔵カメラでとらえる。2 つのパラメータがあり、赤血球の移動する速さを相対的に示した mean blur rate : MBR と心拍周期を感知し心拍あたりの時間軸に対する血流速度の変化をフーリエ変換することでパワースペクトラムに変換して表示した beat strength of skin perfusion (BSSP) である。モニター画面内に region of interest (ROI) を任意の場所に設定すると MBR・BSSP が相対値で表示される。

【対象】2017年～2019年における信州大学医学部附属病院循環器内科、形成外科、腎臓内科の外来・入院患者を対象とした。PAD 群は臨床的に下肢虚血所見があるもしくは ABI0.9 以下のために血管内治療を行う目的で循環器内科の外来受診もしくは入院している患者 33 名、非 PAD 群は臨床的に明らかな足虚血症状のない 40 名である。除外基準は足切断後、安静時振戦、足部に感染である。

【計測方法】外来診察室もしくは入院病室で少なくとも 5 分安静にして仰臥位で計測を行った。PAD 群は足虚血の症状がある側、非 PAD 群は右手足を LSFG で計測した。これと同時に ABI も計測を行った。LSFG 計測は母指（趾）球に ROI を設定し、MBR と BSSP それぞれで HTI を計算した。

検討項目は以下の 3 つである。① ABI, HTI (MBR, BSSP) を PAD 群と非 PAD 群とで比較② receiver operation characteristic (ROC) 曲線から 3 つのパラメータを比較し、カットオフを設定して感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を計算③ ABI と HTI (BSSP) との相関関係である。③については計測した全体群、血液透析群、非血液透析群の 3 つの群で調査した。

【統計解析】結果は平均値±標準偏差、中央値〔四分位範囲〕で示し、Mann-Whitney U test 及びカイ 2 乗テストで比較した。 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。解析ソフトは IBM 社 SPSS version 23 を使用した。

【結果】① HTI (MBR) は PAD 群で有意に低かった (0.44 vs 0.63,  $p = 0.007$ )。HTI (BSSP) は PAD 群で有意に低かった (0.27 vs 0.87,  $p < 0.001$ )。ABI は PAD 群で有意に低かった (0.8 vs 1.1,  $p < 0.001$ )。② ROC 曲線より area under the curve (AUC) は

ABI 0.890, HTI (BSSP) 0.873, HTI (MBR) 0.686 であった。ABI のカットオフは 0.938 と算出され、感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率はそれぞれ 78.8%・95%・93.8%・92.3% であった。HTI (BSSP) のカットオフは 0.4416 と算出され、感度・特異度・陽性的中率・陰性的中率はそれぞれ 68.7%・95%・91.7%・77.6% であった。

③ ABI と HTI (BSSP) の相関係数は全体群  $r = 0.486$ , 非血液透析群  $r = 0.743$ , 血液透析群  $r = 0.102$  であった。

【考察】LSFG は下肢血流評価に関する報告は少ない。MBR, BSSP とも相対値であるため個体間比較には使用できないと考え、本研究では HTI という比を利用した。HTI は MBR, BSSP とも PAD 患者群で有意に低かったが、ROC 曲線よりこの 2 つのパラメータのうち BSSP のほうが PAD を評価する上では有用性が高いと考える。ABI との相関においては血液透析群を除けば強い相関関係を示した。血液透析患者では血管の石灰化が高度なため ABI が虚血を反映していないことが多く、toe brachial index のほうが透析患者の PAD 評価には有用とされており今後の課題と考える。HTI (BSSP) と ABI を比較すると、本研究では感度、陰性的中率、AUC からは ABI のほうが有用性は高かった。LSFG が ABI に置き換わるものではないが特異度、陽性的中率は遜色ない結果が示され、足に痛みがある・安静が難しい対象者には LSFG にも優位性があると考え。検査時間が短く、検査手技も容易なため何度も検査を施行しやすく、PAD のリスクが高い患者の多い血液透析クリニックでスクリーニング的な利用が一つの利用方法とも考える。

本研究の限界としては、対象者が少ないこと、他の検査 (SPP, TBI など) との相関を調査していないことがある。また近赤外線の下への透過を考えると皮膚の厚い人や皮膚の色素沈着などの影響については評価していない。本研究結果は限定的なケース (やせている、黄色人種、色素沈着がない、体毛が薄い) でのものである。

【結論】本研究結果では ABI と同じレベルで PAD の診断が下せることは示されなかった。しかし、HTI が低かった場合に PAD リスクの高い対象者へ注意喚起や精査を促すことで重症化を防ぐことにつなげられる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

下肢末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease :

PAD) の血流評価として ABI, SPP が広く利用されている。PAD の評価, 診断に有用な検査であるが, いずれも足にカフを巻いて圧迫する検査であり患者への苦痛を伴う。レーザースペックルフローグラフィ (LSFG) は皮膚に非接触で短時間 (4 秒) に 20×15 cm の範囲における血流を計測できるが相対値で表示されることが問題である。そこで常川は LSFG を使って母趾球と母指球の比 (hallucal thenar index : HTI) によって PAD 患者と非 PAD 患者を区別できると仮説をたてて検討を行った。検討方法は LSFG により HTI を計算し, ABI も計測して比較した。

その結果以下の結果を得た。

1. PAD 群 33 名と非 PAD 群 40 名とで 2 つのパラメーター MBR, BSSP を使った HTI, ABI のいずれにおいても PAD 群において有意に低かった。
2. 3 つのパラメーターを使った ROC 曲線を作成し, AUC (area under the curve) は ABI : 0.890, HTI (BSSP) : 0.873, HTI (MBR) : 0.686 であった。
3. ROC 曲線よりカットオフを ABI : 0.938, HTI (BSSP) : 0.4416 と設定した場合の感度/特異度はそれぞれ,

ABI : 78.8 % / 95 %, HTI (BSSP) : 68.7 % / 95 % であった。

4. ABI のカットオフを 0.938 とした場合の陽性的中率 93.8 %, 陰性的中率 92.7 %, 真陽性率 90.1 %, 偽陽性率 5 %, 真陰性率 95 %, 偽陰性率 9 % であった。
5. HTI (BSSP) のカットオフを 0.4416 とした場合の陽性的中率 91.7 %, 陰性的中率 77.6 %, 真陽性率 66.7 %, 偽陽性率 5 %, 真陰性率 95 %, 偽陰性率 33.7 % であった。
6. ABI と HTI (BSSP) との相関係数は対象全体 :  $r=0.486$ , 血液透析群 :  $r=0.743$ , 非血液透析群 :  $r=0.102$  であった。

以上より, LSFG 計測結果を比にして下肢血流を評価することは ABI との比較からもある程度は血流状態を反映していると考えられ既存の検査でスクリーニングが難しい対象者にとっては新たな下肢血流評価の選択肢となる可能性はあると考えられた。

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

Expression profile of cytochrome P450s and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and antiepileptic drugs on CYP1 expression in MOG-G-CCM cells (ヒトアストロサイトー由来 MOG-G-CCM 細胞におけるシトクロム P450 の発現プロファイルおよび多環芳香族炭化水素と抗てんかん薬による CYP1 遺伝子の発現解析)

## 小澤 秀介

### (論文の内容の要旨)

【背景・目的】 てんかんは脳における神経細胞の異常活動に由来する発作を特徴とし, 治療には薬物療法, 外科治療, 迷走神経刺激療法などがあるが, その主体は抗てんかん薬 (AEDs) による薬物療法である。てんかん患者の中には喫煙者も多く含まれており, 国や地域によってはその喫煙率は一般人口よりも高いことが報告されている。近年, 喫煙がてんかん発病およびてんかん発作のリスク因子である可能性が示されている。そのため, タバコの喫煙と AEDs 投与が脳機能に与える影響を明らかにすることは临床上重要である。

薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) は, 肝臓や小腸の他, 様々な臓器に発現しており, 脳においては中枢作用薬やニューロステロイドを含む種々の化合物の代謝に関与している。一般に, CYP は特定の生体外異物に反応し発現誘導を受ける。特に, CYP1 遺伝子はタバコ煙中に含まれる多環芳香族炭化

水素 (PAHs) によって誘導されることが知られている。これまでに, 喫煙者の脳において CYP1A1 および CYP1B1 の発現量が非喫煙者に比べて高い傾向を示すことが報告されている。このことから, タバコ煙中の PAHs が脳内 CYP1 遺伝子の発現調節に関わっている可能性が考えられる。また, CYP1 分子種はニューロステロイドである 17 $\beta$ -エストラジオールの代謝に関与することから, 脳においてはニューロステロイドの機能維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。もしタバコ煙成分と薬物の間の相互作用により CYP1 遺伝子の過剰応答がヒト脳で起こるとすれば, ニューロステロイド調節機構が変動し, 正常な脳機能形成に影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし, PAHs が脳内 CYP1 遺伝子の発現調節に与える影響について詳細な研究は行われていない。特に, 脳内 CYP1 遺伝子の発現における PAHs と AEDs の相互作用についての検討は皆無である。

本研究では、ヒトアストロサイトーマ由来 MOG-G-CCM 細胞を用いて、CYP の発現プロファイル、ならびに PAHs および AEDs が *CYP1* 遺伝子の発現に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】MOG-G-CCM 細胞に主要なタバコ煙成分を含む各種 PAHs (13 化合物), バルプロ酸 (VPA) を含む各種 AEDs (5 化合物) 等を処理し, CYP1A1 および CYP1B1 を含む各種 CYP 分子種の発現をリアルタイム PCR 法およびウェスタンブロットティング法により解析した。

【結果】1) MOG-G-CCM 細胞には, 種々の CYP 分子種が発現していた。中でも CYP1B1 が最も高度に発現しており, 次いで CYP1A1 が高かった。

2) CYP1 を誘導する代表的な PAH である 3-メチルコラントレン (3-MC), タバコ煙中の主要な PAH であるベンズ[ $\alpha$ ]アントラセン (B[ $\alpha$ ]A) およびベンゾ[ $\alpha$ ]ピレン (B[ $\alpha$ ]P), AED である VPA は CYP1B1 および CYP1A1 の発現を誘導した。

3) 3-MC および VPA による CYP1B1 および CYP1A1 の発現誘導は芳香族炭化水素受容体 (AhR) アンタゴニストである GNF351 によって有意に抑制された。

4) VPA は 3-MC, B[ $\alpha$ ]A および B[ $\alpha$ ]P による CYP1B1 および CYP1A1 の誘導作用を増強した。カルバマゼピン, ラモトリギン, レベチラセタムおよびフェニトインは 3-MC の誘導作用に影響を与えなかった。

5) VPA はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用を有するが, 代表的な HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) は 3-MC による CYP1A1 の誘導作用を増強したが, CYP1B1 の誘導作用には影響を与えなかった。

【考察】本研究結果より, MOG-G-CCM 細胞における CYP 分子種の発現プロファイルが明らかとなり, CYP1B1 の発現レベルが最も高いことが示された。CYP1B1 は正常脳だけでなく様々な脳腫瘍にも発現していることから, 今後これらのモデル細胞としての有用性が期待される。

本研究において, 3-MC および VPA が AhR シグナル伝達を介して CYP1B1 および CYP1A1 の発現を誘導することが明らかとなった。これまでに, VPA を含む種々の HDAC 阻害剤による両遺伝子の誘導は他の細胞株においても観察されている。また, HDAC 阻害剤による CYP1A1 誘導はヒストンアセチル化によりプロモーター領域への AhR 結合量が増加したことによって引き起こされることが示されている。このこと

から, HDAC 阻害も VPA による CYP1B1 および CYP1A1 の発現誘導に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

さらに, VPA は *CYP1B1* および *CYP1A1* 遺伝子の PAH 応答性を増強することが明らかとなった。*CYP1A1* については, TSA も同様の増強作用を示したことから, VPA による PAH 応答性の増強にはヒストンアセチル化が関与していることが示唆された。一方, *CYP1B1* については, TSA による増強作用は認められなかったが, 他の細胞株においても同様に TSA による PAH 応答性の増強は観察されていない。対照的に, 他の HDAC 阻害剤 (酪酸, パノビノスタット, ポリノスタット) では PAH 応答性の増強が報告されていることから, 本研究で示された VPA による *CYP1B1* 遺伝子の PAH 応答性の増強作用もヒストンアセチル化が関与していることを一部説明できるものと考えられる。

【結論】MOG-G-CCM 細胞における CYP 分子種の発現プロファイルを明らかにした。また, VPA による *CYP1* 遺伝子の誘導および PAH 応答性の増強には AhR やヒストンアセチル化が関与している可能性が示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

てんかん治療の主体は抗てんかん薬 (AEDs) による薬物療法である。また, 喫煙がてんかん発病およびてんかん発作のリスク因子である可能性が示されていることから, タバコの喫煙と AEDs 投与が脳機能に与える影響を明らかにすることは臨床重要である。一方, 薬物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) は脳内においても発現し, 特に, タバコ煙中に含まれる多環芳香族炭化水素 (PAHs) によって発現誘導を受ける CYP1 分子種は脳機能維持に関与することが報告されている。そのため, 脳における CYP1 分子種の薬物応答性を明らかにすることは薬物治療上重要である。そこで, 小澤は, ヒトアストロサイトーマ由来 MOG-G-CCM 細胞を用いて, CYP の発現プロファイル, ならびに主要なタバコ煙成分を含む各種 PAHs および AEDs が *CYP1* 遺伝子の発現に与える影響をリアルタイム PCR 法, ウェスタンブロットティング法および細胞免疫染色法により解析した。

その結果以下の結果を得た。

1. MOG-G-CCM 細胞には, 種々の CYP 分子種が発現していた。中でも CYP1B1 が最も高度に発現しており, 次いで CYP1A1 が高かった。



2. CYP1を誘導する代表的な PAH である3-メチルコラントレン (3-MC), タバコ煙中の主要な PAH であるベンズ[ $\alpha$ ]アントラセン (B[ $\alpha$ ]A) およびベンゾ[ $\alpha$ ]ピレン (B[ $\alpha$ ]P), AED であるバルプロ酸 (VPA) は CYP1B1 および CYP1A1 の発現を誘導した。
3. 3-MC および VPA による CYP1B1 および CYP1A1 の発現誘導は芳香族炭化水素受容体 (AhR) アンタゴニストである GNF351 によって有意に抑制された。
4. VPA は3-MC, B[ $\alpha$ ]A および B[ $\alpha$ ]P による CYP1B1 および CYP1A1 の誘導作用を増強した。カルバマゼピン, ラモトリギン, レベチラセタムおよびフェ

ニトインは3-MC の誘導作用に影響を与えなかった。  
5. VPA はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用を有するが, 代表的な HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A は3-MC による CYP1A1 の誘導作用を増強したが, CYP1B1 の誘導作用には影響を与えなかった。

以上より, MOG-G-CCM 細胞は *CYP1* 遺伝子に対する PAH 応答性を有することが示された。さらに, VPA による *CYP1* 遺伝子の誘導および PAH 応答性の増強には AhR やヒストンアセチル化が関与している可能性が示された。したがって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Efficacy of protocol-based non-invasive positive pressure ventilation for acute respiratory distress syndrome: a retrospective observational study (急性呼吸促進症候群に対するプロトコルを用いた非侵襲的陽圧換気の有用性: 後方視的観察研究)

佐藤 貴久

### (論文の内容の要旨)

【緒言】 NPPV (non-invasive positive pressure ventilation: 非侵襲的陽圧換気) は救急や集中治療分野で広く使用されるようになった。chronic obstruction pulmonary disease (COPD) の急性増悪や心不全に対する NPPV の有用性がいくつかのランダム研究で報告されている。しかしながら ARDS (acute respiratory distress syndrome: 急性呼吸促進症候群) 患者に対する NPPV の有用性は依然定まっていない。ARDS は原因や重症度が様々であるため, NPPV の適応を判断するのが難しいことがその理由だと考える。我々は NPPV のプロトコルを開発し ARDS の初期治療に使用している。プロトコルを使用して NPPV の必要性や適応だけでなく weaning や中断の判断も行っている。これはプロトコルを用いた NPPV が ARDS 患者の予後を改善するか検証した観察研究である。

【方法】 2006年3月から2010年3月の間に信州大学病院高度救命救急センターでプロトコルを用いて NPPV を行った ARDS 患者を, 成功群と失敗群に分類し比較検討した。成功群は気管挿管を回避し NPPV 使用中に死亡しなかった症例とした。ARDS は Berline definition を用いて NPPV 開始30-120分後で判定した。

【結果・考察】 ARDS と診断された169例中88例に NPPV が導入され, 今回の研究に登録されたのは68例であった。68例中52例 (76%) が NPPV の管理に

成功し気管挿管されなかった。全体の死亡率は12%だった。NPPV が有効な ARDS もあるが, 重症度の幅が広いため NPPV が奏効するかを判定することが難しい。これが ARDS に対して NPPV が確立しない理由の一つかもしれない。今回の研究では ARDS の患者169例中81例はプロトコルによって NPPV の適応はないと判断された。およそ半分の患者が排除されたことは判断の難しさを示唆しているが, 導入された患者の成功率は高かったのでプロトコルは ARDS に対する NPPV の適応を適切に判断していると考えられる。

過去の研究で NPPV 開始後早期の PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio 低値が NPPV 失敗の予測因子であると報告されている。我々の研究でも NPPV 開始12-24時間後の PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio は失敗群で有意に低く, ロジスティック回帰分析でも NPPV 開始後早期の低 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio が NPPV 失敗の予測因子として検出された。また前述した過去の研究において気管挿管された患者の死亡率は53%で挿管遅延が悪影響を与えた可能性があると報告されている。この研究と比較し本研究の死亡率は28%と極めて低かった。我々のプロトコルは NPPV 開始後早期に PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio を測定し NPPV を継続するか判定するように作成されている。上述した結果は PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio を測定し NPPV を継続するか判断することは合理的であることを示唆している。また NPPV 開始早期に判定することで挿管遅延を予防し死亡率を低下させているのかもしれない。

挿管遅延は死亡率を増加させている可能性があるもので、NPPV 失敗の予測因子を解明し、失敗をできるだけ早期に予測することで挿管遅延を回避することが重要である。本研究では、失敗群の NPPV 開始12-24時間後の PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio が NPPV 開始30-120分後よりも有意に悪化していた。一方、成功群の開始12-24時間後の呼吸回数と PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio は NPPV 開始30-120分後よりも有意に改善していた。以上の結果は NPPV 開始後24時間以内に PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio やバイタルサインが改善しない場合は失敗しやすいことを示唆している。失敗群での NPPV 中断の主要な原因は“意識レベルの悪化”，“酸素化の改善なし”，“痰の喀出障害”であった。我々はプロトコルを使用して NPPV が適合しやすい患者を選択し NPPV を導入しているので今回の研究では NPPV 開始24時間以内に NPPV 中断基準を満たした症例はなく、全ての気管挿管はチェックリスト4かそれ以降に行われていた。しかしながら、上記特徴をもつ患者にはいたずらに NPPV を継続することなく通常よりも早期に気管挿管をすべきであると考えられる。

我々の研究で severe ARDS の患者の成功率はわずか20%で moderate ARDS として有意に低かったため、NPPV は severe ARDS 患者には導入されるべきではないことが示唆された。しかしながら今回の研究で5例の severe ARDS 患者が含まれてしまった。NPPV が severe ARDS 患者に導入された際の不良なアウトカムを考慮し、severe ARDS 患者に NPPV が導入されないようにプロトコルの改善が必要かもしれない。

本研究の限界としてサンプルサイズが小さい、単一施設での観察研究であることなどが挙げられる。

#### (論文審査の結果の要旨)

ARDS (acute respiratory distress syndrome : 急性呼吸促進症候群) に対する NPPV (non-invasive positive pressure ventilation : 非侵襲的陽圧換気) の有用性は依然定まっていない。ARDS は原因や重症度が様々であるため NPPV が有効な患者を見つけることが難しい。それが ARDS に対する治療として NPPV が確立しない一因と考える。我々は NPPV 管理の精度を上げるためプロトコルを開発し ARDS の初期治療に使用している。今回はプロトコルを用いた NPPV が ARDS に対して有用かを後方視的観察研究で検証した。

2006年3月から2010年3月の間に信州大学病院高度

救命救急センターでプロトコルを用いて NPPV を行った ARDS 患者を、成功群と失敗群に分類し比較検討した。成功群は気管挿管を回避し NPPV 使用中に死亡しなかった症例とした。

その結果以下の結果を得た。

1. ARDS と診断された169例中88例に NPPV が導入され、本研究に登録されたのは68例だった。成功群52例、失敗群16例で全体の成功率は76%、全体の死亡率は12% (8例/68例) で過去研究と比較し良好な成績であった。本研究ではおよそ半分の ARDS 患者がチェックリスト I, II で適応外とされており、NPPV の適応を判断することの難しさが示唆されたが、導入された患者の成功率は高かったのでプロトコルは ARDS に対する NPPV の適応を適切に判断していると考えた。
2. NPPV 開始12-24時間後の PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio は失敗群で有意に低く、ロジスティック回帰分析でも NPPV 開始後早期の低 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio が NPPV 失敗の予測因子として検出された。我々のプロトコルは NPPV 開始後早期に PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio を測定し NPPV を継続するか判定するように作成されており、これは先の結果からもプロトコルが合理的である事を示している。
3. 過去の研究と比較し本研究の失敗群の死亡率は38%と低かった。プロトコルにより NPPV 開始早期に継続するかを判断することで挿管遅延を予防し死亡率を低下させているのかもしれない。
4. 本研究では成功群の呼吸回数と PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio が NPPV 開始24時間以内有意に改善していた。このことから NPPV 開始後24時間以内に PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio やバイタルサインの改善がなければ失敗しやすいことが示唆された。また失敗群での NPPV 中断の主要な原因は“意識レベルの悪化”，“酸素化の改善なし”，“痰の喀出障害”であった。上記特徴をもつ患者は通常よりも早期に気管挿管をすべきかもしれない。
5. severe 症例の成功率はわずか20%と低かった。このことから severe 症例には NPPV を導入すべきではないことが示唆された。

これらの結果より、プロトコルを用いた NPPV は ARDS に対して有用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。

Highly oxidized low-density lipoprotein does not facilitate platelet aggregation (高度に酸化した低比重リポ蛋白は血小板凝集を促進しない)

宮崎 あかり

(論文の内容の要旨)

【背景】血中 low-density lipoprotein (LDL) の上昇は粥状動脈硬化症の危険因子であるが、LDL 濃度が基準値以下でも心血管疾患を発症する症例があり、LDL 濃度の定量評価だけでなく、質の評価が必要と考えられている。LDL が酸化した酸化 LDL は粥状動脈硬化症の発症および進行を促進するが、酸化 LDL が血小板凝集に及ぼす影響は定まった見解がない。本研究では、血小板凝集能測定を行うとともに、血小板活性化マーカーである  $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG) を測定することによって、酸化 LDL と血小板凝集の関連について検討した。

【方法】1) 酸化 LDL の作製：超遠心法で分離した LDL に次亜塩素酸を添加し、酸化 LDL を作製した。酸化 LDL の脂質組成およびアガロースゲル電気泳動パターンを未処理 LDL と比較した。2) 酸化 LDL と血小板凝集能の関係：精製血小板に、LDL、酸化 LDL、緩衝液 (対照) を添加し、血小板凝集能を比濁法と散乱光法でモニターした。その後、血小板凝集惹起物質である ADP を添加し、モニターを継続した。3) 酸化 LDL と  $\beta$ -TG 放出の関係：多血小板血漿に LDL、酸化 LDL、緩衝液を添加し、37℃で加温後、経時的に上清中の  $\beta$ -TG を ELISA 法で測定した。酸化 LDL が  $\beta$ -TG の異化・分解に関与しないことを、 $\beta$ -TG 高値試料の分解試験で確認した。

【結果・考察】1) 酸化 LDL：酸化 LDL の蛋白質等の組成は LDL と差が認められないのに対し、見かけ上の LDL-コレステロール測定値は低値傾向だった。また、酸化 LDL のアガロースゲル電気泳動像では、LDL よりも陽極側に 4 本のバンドを認めた。2) 酸化 LDL と血小板凝集能の関係：精製血小板に LDL、酸化 LDL、緩衝液を添加後、比濁法によるモニタリングでわずかな血小板凝集を認めたが、その程度に有意差は認めなかった。続いて ADP 添加により血小板凝集の増加を認めたが、凝集の程度は対照に比べて LDL 添加では低い傾向が、酸化 LDL 添加では有意に低かったため、酸化 LDL が ADP によって惹起される血小板凝集を抑制すると考えた。一方、LDL、酸化 LDL、緩衝液添加後の微弱な血小板凝集を散乱光

法でモニターした結果、時間経過に伴った小凝集塊の増加が観察された。緩衝液を添加した場合の最大凝集率を基準とした場合、酸化 LDL 添加では対照と同程度であったが、LDL 添加では対照に比べて最大凝集率が有意に増加した。LDL は血小板の微小凝集を促進するが、次亜塩素酸で高度に酸化された LDL はむしろ抑制に働くことが示唆された。3) 酸化 LDL と  $\beta$ -TG 放出の関係：LDL、酸化 LDL、緩衝液を多血小板血漿に添加し、37℃で 2 分間加温後、上清中の  $\beta$ -TG 濃度を測定した結果、酸化 LDL を添加した場合は他に比べてわずかに高値傾向だった。時間経過に伴い、酸化 LDL 添加では緩やかな  $\beta$ -TG 濃度の上昇を認めたが、緩衝液添加では、その増加傾向が相対的に大きく、加温 15 分後の  $\beta$ -TG 濃度は緩衝液添加で最も高値傾向となった。酸化 LDL は添加 15 分後、対照や LDL よりも、 $\beta$ -TG を上昇させない傾向が見られたが、酸化 LDL による  $\beta$ -TG の異化・分解は確認されなかった。

【結論】高度に酸化された LDL は in vitro では血小板凝集と  $\beta$ -TG 放出を抑制する。しかし、生体内においては、酸化 LDL と一過性に接触した血小板が活性化し、凝集が促進される可能性は否定できない。

(論文審査の結果の要旨)

血中 low-density lipoprotein (LDL) の上昇は粥状動脈硬化症の危険因子であるが、LDL 濃度の定量評価だけではなく、質の評価も着目されている。LDL が酸化した酸化 LDL は粥状動脈硬化症の発症および進行を促進するが、酸化 LDL が血小板凝集に及ぼす影響は定まった見解がない。そこで宮崎は次亜塩素酸処理により作製した酸化 LDL を用いて、1) 従来の比濁法よりも感度の高い散乱光法も加えて血小板凝集能測定を行うとともに、2) 血小板活性化マーカーである  $\beta$ -thromboglobulin ( $\beta$ -TG) を測定することによって、酸化 LDL と血小板凝集の関連について検討した。

その結果以下の成績を得た。

1. 比濁法による血小板凝集能測定において、LDL および酸化 LDL 存在下の精製血小板に ADP を添加すると、対照と比較して最大凝集率は LDL では低下傾向が、酸化 LDL では有意に低下した。



2. LDL および酸化 LDL を精製血小板に添加すると、比濁法では最大凝集率に有意差はなかった。散乱光法においては、最大凝集率が対照と比較して LDL で有意に上昇したが、酸化 LDL では対照と比較して有意差はなかった。
3. 多血小板血漿に LDL および酸化 LDL を添加し、37℃で加温すると、2分後の $\beta$ -TGの放出は、酸化 LDL 添加で高い傾向を示したが、15分後には $\beta$ -TGの放出は高い順に対照, LDL, 酸化 LDL となり、酸化 LDL は対照および LDL よりも、 $\beta$ -TG 放出が少ない傾向が認められた。

4.  $\beta$ -TG 高濃度試料に酸化 LDL を添加し、37℃で加温しても、時間経過に伴う $\beta$ -TG濃度の低下は認められなかった。

以上より、次亜塩素酸処理により作製した酸化 LDL が血小板凝集能を促進せず、 $\beta$ -TG 放出を抑制することを明らかにした。また、放出された $\beta$ -TGの定量によって血小板に及ぼす LDL の影響を評価できる可能性が示唆され、患者個人ごとの LDL の質の評価への利用が期待される。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。

Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vivo (生体内において ES 細胞由来心筋細胞の成熟した心室筋分画が増加する)

## 市 村 創

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】現在、多能性幹細胞由来心筋細胞 (PSC-CM) の移植による小動物および大動物の心筋再生研究が、我々を含めた多くの研究室で行われている。これまでの研究から、障害心筋の移植心筋による置換、また大動物モデルにおける移植心筋と宿主心筋の電氣的結合が得られることが明らかになっている。しかしながら、カニクイザルおよびブタにおける PSC-CM 移植モデルにおいて、心筋細胞移植後に出現する心室性不整脈が、臨床応用にむけての問題となっている。我々の研究で、カニクイザルにおける移植後不整脈は移植後2週間程度で出現し、移植後12週の時点では全て消失することがわかっている。移植後不整脈の原因としては、移植部位におけるリエントリーや、移植グラフトのもつ自動能が挙げられるが、近年の研究では自動能がその原因として有力視されている。PSC-CM 移植後不整脈は経時的に消失することがわかっていることから、この消失メカニズムは移植グラフトの何らかの変化が関与していると考えられる。そこで、その変化を観察することで、移植後不整脈が消失する原因を解明することを目的とした。

【方法と結果】ヒト ES 細胞由来心筋細胞 (ESC-CM) を分化誘導し、トロポニン T 陽性率98.7%の心筋細胞を得た。パッチクランプ法で、ESC-CM の電氣的性質を確認したところ、8.9%が洞結節様 (Nodal-like)、残りが心室もしくは心房様の波形を示した。今回の実験では心室様、心房様心筋の区別はできず、

併せて Working-type と表した。Nodal-like 心筋は、Working-type と比較して早い拍動数、立ち上がり速度をもち、APD90/APD50比の高い心筋であることが確認でき、洞結節様と考えて矛盾しない結果であった。

次に、動物実験を実施した。ヌードラットの左心室前壁に ESC-CM を直接注入法にて移植し、移植後2週、4週、12週で犠牲死させ、組織学的な変化を確認した。移植した ESC-CM はラット心室内に良好に生着し、移植後12週でグラフト面積が増大する傾向を認めた。移植した ESC-CM の成熟化を確認するため、MLC2a, MLC2v の免疫染色を行った。経時的に MLC2a 陽性細胞の割合は有意に減少し、MLC2v 陽性細胞の割合は有意に増加した。また、洞結節特異的マーカーである SHOX2, TBX3, HCN4陽性細胞の割合の変化も確認したところ、いずれも経時的に陽性細胞が減少していることが確認された。特にグラフトに占める SHOX2, TBX3陽性細胞の割合は経時的に減少し、移植後12週で有意に減少することが確認出来た。このことから、グラフト内の洞結節様心筋の割合が経時的に減少していると判断できる。同期間の In vitro での細胞の変化を確認するため、2週、4週、12週間の平面培養の後、培養心筋細胞の細胞免疫染色を行った。MLC2a および MLC2v の割合は In vivo での結果と同様に MLC2v 陽性細胞の割合が増加している所見を認め、また HCN4, TBX3については減少傾向を認めたが、SHOX2陽性細胞については In vivo の結果と異なり減少を認めなかった。続いて、より移

植後の状態に近い In vitro モデルとして 3 次元培養を同期間行い、免疫染色を実施したところ、HCN4, SHOX2, TBX3いずれも減少傾向を認めなかった。

In vivo で経時的に Nodal-like 心筋分画の減少が生じる原因が各分画に分裂能力の差がある可能性を考え、SHOX2および TBX3と KI-67の多重免疫染色を行った。その結果、SHOX2および TBX3陽性細胞における KI-67陽性細胞の割合は経時的に減少し、移植後 2 週間で有意な差となった。他の細胞増殖タンパクとして Anillin を用いての免疫染色を行ったが、そもそも Anillin の発現が非常に乏しいことにより、有意な差はみられなかった。

In vivo での移植グラフトおよび In vitro での 2 次元培養細胞に対する RNA シークエンスも行った。PCA 分析で In vitro と In vivo の間には明確な差を認め、In vivo では移植後 12 週にでより成人心筋に近い傾向を認めた。また、移植後 12 週で心筋成熟化マーカーである TNNI3, MYL2 (MLC2V), MYH7 の発現が、移植前細胞と比較し有意に増加し、洞結節細胞のマーカーである ISL1, CACNA1H, TBX18 については有意に減少していた。

【まとめと考察】 今回の実験の結果、ESC-CM の 1 割程度に Nodal-like 心筋が混在しており、その拍動数はヒト心拍数より早いことが明らかとなった。このことから、Nodal-like 心筋の混在が PSC-CM 移植後不整脈の原因となっている可能性があると考えられる。また、SHOX2, TBX3, HCN4 陽性細胞の割合は、移植後 12 週で有意に減少しており、これは移植後不整脈の消失する時期と一致していた。さらに、SHOX2 陽性細胞の KI-67 陽性率は、SHOX2 陰性細胞のものよりも低く、このことが移植後不整脈が自然に消失する原因になっている可能性がある。しかしながら、今回の実験では ESC-CM の経時的な成熟化がみられており、Working-type 心筋も拍動数は遅いものの自動能を持っていたことから、幼若な Working-type 心筋の自動能によって移植後不整脈が生じ、その成熟化によって不整脈が自然消失する、という可能性も否定できない。今後、さらなる実験によって移植後不整脈の原因が明らかになっていくことが期待される。

#### (論文審査の結果の要旨)

大動物への多能性幹細胞由来心筋細胞 (PSC-CM) 移植実験後に生じる心室性不整脈は、移植後 12 週で消失する一過性のものであることが過去の研究で示されている。移植後不整脈の原因としては、移植部位にお

けるリエントリーや、移植グラフトのもつ自動能が挙げられるが、近年の研究では自動能がその原因として有力視されている。PSC-CM 移植後不整脈は経時的に消失することがわかっていることから、この消失メカニズムは移植グラフトの何らかの変化が関与していると考えられる。そこで、市村はヌードラットに ESC 細胞由来心筋細胞 (ESC-CM) を移植し、2 週、4 週、12 週間後の組織を免疫染色および RNA シークエンスを用いて解析することで、移植後不整脈が消失する原因を検討した。

その結果、以下の結果を得た。

1. パッチクランプ法で、分化誘導した ESC-CM の 8.9% が洞結節様 (Nodal-like)、残りが心室もしくは心房様波形を示した。心室、心房様波形を示す細胞は Working type と分類した。
2. ニュードラットへの移植後、12 週間で MLC2v 陽性細胞の割合が有意に増加し、移植細胞が成熟化していると考えられた。
3. ニュードラットへの移植後の組織を洞結節特異的マーカーである SHOX2, TBX3, HCN4 の免疫染色を行い、いずれも 12 週後で陽性細胞の割合が減少していた。
4. In vitro での ESC-CM の 3 次元培養モデルにおいては、SHOX2, TBX3, HCN4 陽性細胞の割合は経時的に減少を認めなかった。
5. SHOX2, TBX3 陽性細胞は、移植後 2 週の時点でそれぞれの陰性細胞と比べ KI-67 の陽性率が低く、Nodal-like 心筋は Working type 心筋に比べ増殖能が低い可能性が示された。
6. RNA シークエンスを用いた網羅的発現遺伝子解析でも、In vivo, In vitro 実験の結果に矛盾しない結果を得た。

以上より、Nodal-like 心筋の割合が移植後生体内で経時的に減少し、その時期が移植後不整脈の消失時期と一致しており、また Nodal-like 心筋は Working type 心筋と比較して増殖能が低い可能性が示唆された。このことは、ESC-CM 内の Nodal-like 心筋混在による自動能が移植後不整脈の原因となっている可能性を示唆するものであった。この結果をもとに更なる研究を行うことによって、より安全性の高い心筋再生療法の開発につながっていくと考えられる。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。

Trends in gastroesophageal reflux disease in Japanese children and adolescent (日本の小児における胃食道逆流症の傾向)

草刈 麻衣

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】胃食道逆流症(以下GERD)とは胃・十二指腸内容物が食道へ逆流することにより引き起こされる食道粘膜障害である。その合併症として、狭窄や食道の円柱上皮化(バレット食道)を引き起こすびらん性食道炎があり、バレット食道は食道腺癌の前駆病変として唯一認識されている。日本の成人においてはGERDの有病率増加が報告されているが、小児患者におけるGERDの有病率についてはほとんど知られていない。本研究では、日本の単一施設(昭和伊南総合病院)の内視鏡センターにおいて内視鏡的に証明された小児GERD患者の有病率を比較した。

【方法】本研究は2005年から2019年の間に上部消化管病変を疑う症状のために昭和伊南総合病院の内視鏡センターにて上部消化管内視鏡検査を受けた5歳から18歳までの患者に対する後ろ向き診療録レビューである。逆流性食道炎及び内視鏡所見としてのバレット食道(以下バレット食道)の有病率と重症度を2005年から2012年、2013年から2019年の期間の2群間で比較した。逆流性食道炎の重症度はLA分類に基づいて評価した。本邦においては食道下部の柵状血管の下端が食道胃接合部(esophagogastric junction, 以下EGJ)と定義されており、EGJとそれより口側の扁平円柱上皮接合部(the squamocolumnar junction, 以下SCJ)までがバレット食道と定義される。バレット食道の範囲はプラハC&M分類によって評価した。内視鏡検査時に、可能な症例では組織病理学的評価のため胃内3か所の他、EGJの評価のためにSCJに最も近い胃粘膜ひだから、遠位食道側から少なくとも2か所の粘膜を採取した。統計学的差異は独立性のカイ二乗検定及びフィッシャーの直接確率検定もしくはスチューデントのt検定によって分析し、 $P < 0.05$ を有意とした。

【結果】2005年から2012年までの315人[平均年齢13.8歳(5-18)歳, 男児147人], 2013年から2019年までの259人[平均年齢14.7(範囲5-18)歳, 男児108人]が評価の対象となった。BMI, *H.pylori*感染, 食道裂孔ヘルニアは両期間で有意差を認めなかった。びらん性食道炎またはバレット食道の割合は、後半の年代のグループで有意に増加した(GERDは9.8%から

18.1%,  $P=0.0045$ , バレット食道は2.5%から9.6%,  $P=0.0003$ )。またバレット食道を伴うGERD患者の割合も有意に増加した[53.3%(24/45)対25.8%(8/31),  $P=0.017$ ]。バレット食道患者は、プラハ分類C0M1の患者数が3人から17人, C1M1の患者数が5人から7人と増加傾向を認めた。びらん性食道炎の患者76人中SCJの上下で組織病理学的評価が可能だったのは55人(72.4%)で、組織学的に逆流性食道炎と診断された割合は2つのグループ間で有意差はなかった[14/24(58.3%)対17/31(54.8%),  $P=0.80$ ]。腸上皮化生はどの検体でも認められなかった。

【考察】逆流性食道炎及びバレット食道の有病率は、本研究においてこの15年間で大幅に増加していることが示された。これまでの報告から、日本の小児における*H.pylori*感染率の劇的な低下と食生活の欧米化にともなう胃酸分泌増加がGERDの増加に関与している可能性がある。本研究で認められたバレット食道は、プラハ分類でC0M1とC1M1のみであったが、肥満や基礎疾患のない患者が研究対象であったことに起因しているかもしれない。

本研究では逆流性食道炎の76人の患者のうち55人(72.4%)で組織病理学的評価を行ったが、腸上皮化生を認めた症例はなかった。バレット食道患者のうち7人は15年間で数回のEGDを施行されたが、内視鏡所見に変化はなく杯細胞出現も認めなかった。アメリカ合衆国では、EGJに腸上皮化生を伴った小児患者67%が、診断がつく前のEGDにおいてEGJの口側に杯細胞のない円柱上皮を認めていたとの報告があるが、本邦では小児におけるバレット食道の自然史については明確になっていない。

日本の小児全体におけるGERDの疫学の変化を把握し、その危険因子を明確にし、杯細胞出現を認めないバレット食道の重要性と自然経過を明らかにするために、本研究と同様の研究をさらに重ねていくことが必要である。

(論文審査の結果の要旨)

胃食道逆流症(以下GERD)の合併症として、狭窄や食道の円柱上皮化(バレット食道)を引き起こすびらん性食道炎があり、バレット食道は食道腺癌の前



駆病変として唯一認識されている。日本の成人においては GERD の有病率増加が報告されているが、小児患者における GERD の有病率についてはほとんど知られていない。本研究では、日本の単一施設（昭和伊南総合病院）の内視鏡センターにおいて内視鏡的に証明された小児 GERD 患者の有病率を2005年から2012年、2013年から2019年にわけて比較し検討した。

以下の結果を得た。

1. 2005年から2012年までの315人 [平均年齢13.8範囲 (5-18) 歳, 男児147人], 2013年から2019年までの259人 [平均年齢14.7 (範囲5-18) 歳, 男児108人] が評価の対象となった。
2. びらん性食道炎またはバレット食道の割合は、後半の期間のグループで有意に増加した (GERD は 9.8%から18.1%,  $P=0.0045$ , バレット食道は2.5%から9.6%,  $P=0.0003$ )。
3. バレット食道を伴う GERD 患者の割合は有意に増加した [53.3% (24/45) 対25.8% (8/31),  $P=$

0.017]。

4. バレット食道患者は、プラハ分類 C0M1の患者数が3人から17人, C1M1の患者数が5人から7人と増加傾向を認めた。

5. 76人の患者のうち55人 (72.4%) で組織病理学的評価を行ったが、腸上皮化生はどの検体でも認められなかった。

逆流性食道炎及びバレット食道の有病率は、本研究においてこの15年間で大幅に増加していることが示された。バレット食道患者のうち7人は15年間で数回のEGDを施行されたが、内視鏡所見に変化はなく杯細胞出現も認めなかった。本邦では小児におけるバレット食道の自然史については明確になっていない。本邦の小児においてGERDの疫学の変化、その危険因子を把握し、前癌病変であるバレット食道の自然経過を明らかにしていくことは非常に重要であり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

## Reduced functional connectivity in the prefrontal cortex of elderly catatonia patients: A longitudinal study using functional near-infrared spectroscopy (高齢カタトニア患者の前頭皮質の機能的結合性の低下: 近赤外線スペクトロスコピーを使用した縦断研究)

中 村 敏 範

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】カタトニアは1874年に Kahlbaum が提唱した概念で、昏迷、拒絶、興奮など様々な精神症状を不規則に繰り返す症候群であり、統合失調症のほか多くの精神疾患や、身体疾患を含む複数の状況下で起こりうる。精神症状の易変性や安定した姿勢を保持できないことから、特に重症例での神経画像研究は難しい。先行研究はカタトニア症状が消退した患者に対する SPECT や MRI を用いたものが多く、前頭領域や運動領域での変化が報告されている。近赤外線スペクトロスコピー (NIRS) は、近赤外線を用いて生体の酸素化ヘモグロビン濃度、脱酸素化ヘモグロビン濃度を測定し、それにより局所の血液量を推定し脳機能を間接的に計測するものである。非侵襲的かつ経時的な測定が可能なることから、カタトニア患者に対する症例報告も散見される。本研究の目的は、脳活動を比較的簡便に捉えることが可能な NIRS を用いて、カタトニアの症状出現時と消失時の脳機能変化を測定することである。患者は症状活発時には検者の指示に従うことが困難なため、休息時や睡眠時における脳の低周波自

発的活動を反映する安静時機能的結合性 (RSFC) の安定性を評価した。

【方法】対象は信州大学医学部附属病院に入院している50歳以上のカタトニア患者10名。男性2名、女性8名、年齢は平均64.5歳、統合失調症4名、双極性障害1名、うつ病5名であった。カタトニアの診断はDSM-5および Bush Francis Catatonia Rating Scale Screening Instrument (BFCSI) 双方の基準を満たすものとした。カタトニアの重症度は Bush Francis Catatonia Rating Scale (BF CRS) で測定した。研究開始時のBF CRSは平均16.9であり、カタトニア消失時のBFCSIは全員0であった。22チャンネルと49チャンネルのNIRSを使用し、カタトニア出現時、消失時とも検査時は5分間安静を保って、カタトニア消失時は開眼、閉眼それぞれで測定した。前頭領域の検査は Experiment1、運動領域の検査は Experiment2とした。得られたデータのうち0.009-0.08Hzの範囲内の信号のみを解析に用いた。各チャンネル間の酸素化ヘモグロビンレベルの変化の順位相関係数として定義されたRSFCを、関心領域間の左右のチャンネルのペアで解析した。

【結果】 Experiment1において、カタトニア出現時は消失時の閉眼での測定と比較してRSFCは有意に低かった ( $p=0.047$ )。Experiment2では、出現時と消失時で有意な差を認めなかった。双極性障害およびうつ病患者ではカタトニア消失時の閉眼、開眼での測定と比較し、出現時ではRSFCに有意な低下を認めた(それぞれ  $p=0.028$ ,  $p=0.046$ )。ECTの施行回数、ベンゾジアゼピン受容体アゴニストの投与量、抗精神病薬投与量でサブグループ解析を行ったが、カタトニア出現時と消失時でRSFCに有意差は認めなかった。多くの患者でカタトニア消失時にRSFCは増加したが、統合失調症患者の1名はカタトニア消失時にRSFCが低下した。

【考察】 本研究はNIRSを用いてカタトニア出現時のRSFCを調べた最初の研究である。カタトニア出現時は消失時と比較して前頭領域のRSFCが低下していた。NIRSを用いた前頭領域の機能変化を調べた先行研究では、統合失調症患者でGAF尺度と酸素化ヘモグロビン濃度変化の反応低下が相関していること、うつ病患者で課題施行時の酸素化ヘモグロビン濃度変化が健常群と比較し小さいことなどが指摘されている。カタトニア患者に対するNIRS研究は皆無であるが、SPECTでは統合失調症に伴うカタトニア患者は健常者と比較し前頭領域が低灌流であること、気分障害患者では機能的結合性が減少しているとの報告がある。これらの所見はカタトニア消失時に前頭領域のRSFCが増加した今回の研究結果と一致している。本研究では全例でECTが施行されている。言語流暢性課題で両側前頭皮質の酸素化ヘモグロビン濃度変化がECTにより著明に増加したというNIRSを用いた報告があるが、本研究でもECTにより前頭皮質の機能が改善することで両側前頭間での脳活動の正の相関が高まりRSFCが安定したとも考えられる。運動領域ではカタトニア出現時と消失時のRSFCに変化を認めなかった。先行研究では運動領域のRSFCの変化を認めたものもあるが、本研究では縦断研究であること、疾患がさまざまであること、比較的症例数が少ないことが結果の相違を生んでいる可能性がある。この研究の限界としては、縦断研究であり患者ごとの検査間隔の差が大きいこと、カタトニア出現時とカタトニア消失時に使用された向精神薬が異なること、RSFCの変化がカタトニアの改善によるものかECTの影響か判断できないこと、カタトニアの診断が非構造化面接により行われていること、検査人数が少なく疾患も同一では

なく健常対照群がないことがあげられる。本研究の結果はカタトニア症状の改善を評価する指標となる可能性がある。

#### (論文審査の結果の要旨)

カタトニア患者を対象に、治療前の病勢活発時と治療後の寛解時の2点でNIRS (Near-Infrared Spectroscopy) を実施し、脳活動の相違を明らかにする。突然発症/再燃するカタトニアの出現予測はこれまで困難であった。寛解を維持しているのか、再燃しかけているのかを判断する検査として、NIRSが臨床に適用可能か検討する。カタトニア患者は多彩な精神症状と運動症状のため、長時間の検査を実施すること自体が困難である。そのため安静時脳機能的結合 (resting state functional connectivity : RSFC) の安定性を、NIRS以外の画像研究でカタトニアとの関連が報告されている、前頭領域、運動領域のそれぞれで調べた。

その結果以下の成績を得た。

1. 閉眼時の測定で、前頭領域ではカタトニア出現時は消失時と比較して酸素化ヘモグロビン濃度の信号変化の平均値は有意に低下していた。すなわち、カタトニア消失時はRSFCの安定度が高いことが示された。
2. 開眼、閉眼両測定下で、双極性障害、うつ病患者ではカタトニア出現時は消失時と比較して酸素化ヘモグロビン濃度の信号変化の平均値は有意に低下しており、カタトニア消失時はRSFCの安定度が高いことが示された。しかし、統合失調症では有意な変化は認められなかった。
3. 運動領域では、カタトニア出現時、消失時間の有意な変化は認められなかった。
4. 抗精神病薬の使用の有無、ベンゾジアゼピン受容体作動薬の使用量の変化は、カタトニア出現時、消失時間の酸素化ヘモグロビン濃度の信号変化の平均値に影響を及ぼさなかった。
5. 全例で電気けいれん療法を施行している。前頭領域のRSFCの安定度が高まったことは、カタトニアの改善による影響だけではなく、電気けいれん療法の影響も考えられる。
6. カタトニア消失後に前頭領域の酸素化ヘモグロビン濃度の信号変化の相関が低下した統合失調症1例を認めたが、この理由は不明である。

以上より、カタトニア消失時の前頭領域の酸素化ヘモグロビン濃度の信号変化の正の相関が高まった。こ

のことはカタトニア消失による前頭葉機能改善を示唆する。NIRSを測定することで急激に症状が出現するカタトニアの再燃・再発を予測できる可能性が示され

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

Phospholipase C $\beta$ 3 expressed in mouse DRGs is involved in inflammatory and postoperative pain (マウス後根神経節に発現する PLC $\beta$ 3は炎症性及び術後性疼痛に関与する)

井 出 進

(論文の内容の要旨)

【背景】組織に炎症が生じると、ブラジキニンなどさまざまなサイトカインが放出され、それぞれ固有の受容体を介してホスホリパーゼ C $\beta$  (PLC $\beta$ ) が活性化される。活性化された PLC $\beta$  はその後のカスケード反応を介して、痛み受容に関与するカプサイシン受容体 (TRPV1受容体) などを活性化し、痛覚過敏を引き起こされる。PLC $\beta$  には各受容体からのシグナルが集約してくるため、痛覚過敏治療の標的となりうる事が期待される。PLC $\beta$  には4つのサブタイプがあり、このうち末梢神経に発現するのは PLC $\beta$ 1, PLC $\beta$ 3, PLC $\beta$ 4 である。PLC $\beta$ 3は炎症性疼痛モデルにおいて痛覚過敏へ関与することが示されているが、詳細な検討はなされていない。また、術後痛モデルでの関与は示されていない。本研究では末梢神経に発現する PLC $\beta$ 3がどのような感覚神経に発現しているのか、また急性期および慢性期の炎症性疼痛における関与や術後性疼痛における関与を明らかにすることを目的とする。

【方法】免疫染色実験では、マウスの後根神経節 (DRG) を摘出して免疫染色を行った。一次抗体には PLC $\beta$ 3, 代表的な侵害受容体である TRPV1, 有髄神経のマーカーである NF-200, 非ペプチド作動性ニューロンに特異的に結合する IB4を使用した。蛍光標識二次抗体を用いて二重または三重染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した。PLC $\beta$ 3のたんぱく定量には、 $\beta$  アクチンを対照としたウェスタンブロット法を用いた。炎症性疼痛モデルマウスでは、マウスの左足底に起炎物質 (complete Freund's adjuvant : CFA) 30  $\mu$ L を注入した。術後痛モデルマウスでは、マウスの左足底を6 mm 切開したのち縫合した。PLC $\beta$ 3のノックダウン効果をみるために、マウスの脊髄も膜下腔に細径のチューブを留置し、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を3日間投与した。熱刺激実験は、マウスの足底に熱線を照射し、逃避潜時を評価した。機械刺激実験は、マウスの足底を機械的に刺激し、逃避閾値を計測した。ODN は、炎症急性期の効果を

評価するために CFA 投与前に、炎症慢性期の効果を評価するために CFA 投与後に、それぞれくも膜下投与した。術後痛モデルでは足底切開前に ODN を投与した。それぞれのモデルにおいて熱および機械刺激実験を経時的に行った。

【結果】免疫染色実験では、PLC $\beta$ 3は NF-200陽性細胞とは共発現せず、PLC $\beta$ 3陽性神経のうち64%は IB4陽性、30%は TRPV1陽性であり、IB4もしくは TRPV1のどちらかと共発現していた。CFA 投与により、7日間熱性および機械性痛覚過敏となることを確認した。CFA 投与前、1日後、3日後、7日後では PLC $\beta$ 3のたんぱく量は変化しなかった。アンチセンス ODN 投与24時間後に、PLC $\beta$ 3のたんぱく量は対照群に比べ60%に減少した。PLC $\beta$ 3アンチセンス ODN は PLC $\beta$ 1および PLC $\beta$ 4のたんぱく量には影響しなかった。アンチセンス ODN を投与しても、熱刺激および機械刺激に対する逃避閾値は変化しなかった。一方、アンチセンス ODN 投与は、CFA によって生じる熱性および機械性痛覚過敏を24時間抑制した。CFA 投与から2日後には ODN の痛覚過敏抑制効果は消失した。アンチセンス ODN の炎症慢性期への影響を調査するため、CFA 投与4日後から ODN を投与したところ、CFA 投与7日後の熱性痛覚過敏および機械性痛覚過敏は抑制された。8日後には痛覚過敏抑制効果は消失した。アンチセンス ODN の足底切開モデルでの熱性および機械性痛覚過敏への影響を調査するため、ODN を足底切開前に3日間投与したところ、足底切開から24時間後まで熱性および機械性痛覚過敏は抑制された。切開から2日後には痛覚過敏抑制効果は消失した。

【考察】非ペプチド作動性ニューロンに特異的な IB4 結合神経は機械性痛覚過敏に、ペプチド作動性ニューロンに特異的な TRPV1陽性神経は熱性痛覚過敏に関与していることが知られている。今回の免疫染色実験と行動学的実験との結果は矛盾しないことが示唆された。PLC $\beta$ 3は非炎症時における痛覚閾値には関与してい



なかった。また、PLC $\beta$ 3は炎症時にアップレギュレーションすることなく、ノックダウンによってPLC $\beta$ 3たんぱくが減少することにより熱性および機械性痛覚過敏が抑制された。PLC $\beta$ 3は炎症によって活性化され、痛覚過敏の発症に関与することが示唆された。PLC $\beta$ 3のノックダウンは炎症性モデルおよび術後痛モデルの両方で痛覚過敏を抑制したことから、PLC $\beta$ 3は痛覚過敏の治療ターゲットになりうるということが示唆された。  
**【結論】** マウス DRG に発現する PLC $\beta$ 3は炎症性疼痛及び術後性疼痛に関与した。

(論文審査の結果の要旨)

組織に炎症が生じると、ブラジキニンなどさまざまなサイトカインが放出され、それぞれ固有の受容体を介してホスホリパーゼ C $\beta$  (PLC $\beta$ ) が活性化される。活性化された PLC $\beta$  はその後のカスケード反応を介して、痛み受容に関与するカプサイシン受容体 (TRPV1 受容体) などを活性化し、痛覚過敏を引き起こされる。PLC $\beta$  には各受容体からのシグナルが集約してくるため、痛覚過敏治療の標的となりうるということが期待される。PLC $\beta$  には4つのサブタイプがあり、このうち末梢神経に発現するのは PLC $\beta$ 1, PLC $\beta$ 3, PLC $\beta$ 4である。PLC $\beta$ 3は炎症性疼痛モデルにおいて痛覚過敏への関与が一部示されたが、詳細な検討はなされていない。また、術後痛モデルでの関与は示されていない。本研究では末梢神経に発現する PLC $\beta$ 3がどのような感覚神経に発現しているのか、また急性期および慢性期の炎症性疼痛における関与や術後性疼痛における関与を明らかにすることを目的とした。

マウスの後根神経節 (DRG) を摘出して免疫染色を行った。炎症性疼痛モデルマウスでは、左足底に起炎物質 (CFA) を注入した。術後痛モデルマウスでは、マウスの左足底を切開したのち縫合した。PLC $\beta$ 3のノックダウン効果をみるために、マウスの脊髄くも膜下腔に細径チューブを留置し、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を3日間投与した。それぞれのモデルにおいて熱および機械刺激実験を経時的に行った。

その結果、井出は次の結論を得た。

1. DRG に発現する PLC $\beta$ 3は、NF-200とは共発現しなかった。PLC $\beta$ 3は TRPV1もしくは IB4と共発現していた。
2. PLC $\beta$ 3をノックダウンしても、正常時の痛覚閾値には変化がなかった。
3. PLC $\beta$ 3ノックダウンにより、炎症急性期および慢性期において、熱性および機械性痛覚過敏は抑制された。
4. PLC $\beta$ 3ノックダウンにより、術後性疼痛モデルにおいて、熱性および機械性痛覚過敏は抑制された。

これらの結果より、DRG に発現する PLC $\beta$ 3は、正常時の痛み知覚には関与しないが、炎症急性期および慢性期の痛覚過敏や術後性疼痛の痛覚過敏に関与することが明らかとなった。本研究から、PLC $\beta$ 3は痛覚過敏治療の標的となりうるということが示唆された。

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。