

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
竹内穂高	乙第1257号	R 4. 4.27	PIM1 is a poor prognostic factor for and potential therapeutic target in serous carcinoma of the endometrium (PIM1は子宮内膜漿液性癌の予後不良因子であり, 治療標的となる可能性がある)	清水公裕	伊藤研一 菅野祐幸 吉田好雄
杉浦善弥	乙第1258号	R 4. 6.22	Prognostic value of CD34 expression status in patients with myxofibrosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas (粘液線維肉腫と未分化多形肉腫におけるCD34発現の予後予測因子としての価値)	菅野祐幸	中山淳 高橋淳 久岡正典
八子武裕	乙第1259号	R 4. 7. 6	Role of Microelectrode Recording in Deep Brain Stimulation of the Pedunculopontine Nucleus: A Physiological Study of Two Cases (脚橋核の脳深部刺激術における微小電極記録の役割: 2例の生理学的研究)	田淵克彦	矢崎正英 堀内哲吉 長島久
北澤健	乙第1260号	R 4. 7.13	Impact of single eyelid on superior visual field (一重瞼が上方視野に及ぼす影響)	村田敏規	福島菜奈恵 工穰 宮脇剛司
八塩章弘	乙第1261号	R 4. 9.14	Prevalence of Takotsubo Syndrome among Patients Admitted to an Emergency Department (救急入院患者におけるタコツボ症候群の有病率)	桑原宏一郎	柴祐司 川真田樹人 松田直之
川上勝弘	乙第1262号	R 4.10.26	Intrathecal morphine exacerbates paresis with increasing muscle tone of hindlimbs in rats with mild thoracic spinal cord injury but without damage of lumbar α -motoneurons (モルヒネの髄腔内投与は, 軽度の胸髄損傷を伴うラットにおいて, 腰髄の α -運動ニューロンの損傷を伴わずに, 後肢の筋緊張の増加を伴う脊髄損傷後の不全麻痺を悪化させる)	高橋淳	内藤隆文 川真田樹人 川股知之
酒井貴弘	乙第1263号	R 4.11. 9	Comparison of prognostic impact of anticoagulants in heart failure patients with atrial fibrillation and renal dysfunction: direct oral anticoagulants versus vitamin K antagonists (心房細動と腎機能障害を合併する心不全患者における抗凝固療法の予後への影響の比較: 直接経口抗凝固薬とビタミンK拮抗剤)	山田充彦	関島良樹 柴祐司 尾崎和幸

審査学位論文要旨

石嶺南生	乙第1264号	R 4.12.14	Development of Free 25-Hydroxyvitamin D ₃ Assay Method Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析法による遊離型25-ヒドロキシビタミン D ₃ 測定法の構築)	内藤隆文	田中直樹 上原剛 井上克枝
道面尚久	乙第1265号	R 5. 2. 8	A Pilot Prospective Randomized Trial with Cancer Fatigue Scale and Juzentaihoto for Cancer-related Fatigue during Cisplatin-based Chemotherapy for Advanced Urothelial Carcinoma (進行尿路上皮癌に対するシスプラチンを用いた化学療法時の全身倦怠感に対して Cancer Fatigue Scale と十全大補湯を用いた予備的前向き無作為化試験)	小泉知展	工 穰 田中直樹 三井貴彦
由井寿美江	乙第1266号	R 5. 2.22	Altered levels of salivary cytokines in patients with major depressive disorder (大うつ病患者における唾液サイトカインレベルの変化)	竹下敏一	野見山哲生 梅村武司 渡邊衡一郎
得丸重夫	乙第1267号	R 5. 3. 8	Interferon regulatory factor-2 is required for the establishment of the gut intraepithelial T cell compartment (インターフェロン制御因子-2は腸管上皮内T細胞集団形成に重要である)	竹下敏一	平塚佐千枝 高本雅哉 肥田重明
山下 浩	乙第1268号	R 5. 3.22	Reduction of Severe Hypoglycemic Events Among Outpatients with Type 2 Diabetes Following Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Marketing in Japan (Sodium-Glucose Cotransporter 2 阻害薬上市後に本邦における2型糖尿病患者の重症低血糖頻度が減少した)	駒津光久	桑原宏一郎 田中直樹 櫻井晃洋

PIM1 is a poor prognostic factor for and potential therapeutic target in serous carcinoma of the endometrium (PIM1は子宮内膜漿液性癌の予後不良因子であり、治療標的となる可能性がある)

竹内穂高

(論文の内容の要旨)

【研究の背景と目的】子宮内膜癌 (EMC: endometrial carcinoma) は増加傾向であり、組織型では類内膜癌 (EC: endometrioid carcinoma) の頻度が高く、漿液性癌 (SC: serous carcinoma) の占める頻度は低いが、SCはECに比較し悪性度が高く予後不良であることが問題である。SCに対しては、近年、HER2 (human epidermal growth factor type 2) 阻害薬 Trastuzumab と抗がん剤の併用療法の有用性が報告されているが、治療効果は十分とは言えず、SCに対する新たな治療法の開発は依然として重要な課題である。

Pim-1 proto-oncogene (PIM1) は JAK/STAT 経路により調節されるセリン・スレオニンキナーゼであり、リン酸化を介して MYC などの標的タンパク質の機能を調節し、細胞周期の進行、アポトーシス、転写活性化など、様々な細胞機能に関与すると考えられている。PIM1は白血病、悪性黒色腫、前立腺癌など、いくつかの癌で過剰発現し、進行や治療抵抗性への関与が報告されている。さらに The Cancer Genome Atlas (TCGA) の統合ゲノム解析により SC との類似性が見出されているトリプルネガティブ乳癌 (TNBC: triple negative breast cancer) においても、PIM1の腫瘍増殖や抗がん剤抵抗性への関与が報告されている。一方、EMCにおける報告はない。そこで我々は EMC、特に SC における PIM1の発現や機能、PIM1阻害剤 (SGI-1776) の効果を検討した。

【方法】倫理委員会承認のもと、信州大学で子宮全摘術を施行された EMC133例 (EC Grade1: 62例, Grade2: 21例, Grade3: 20例, SC: 30例) のホルマリン固定パラフィン包埋切片に PIM1免疫染色を施行し、核染色強度を H-Score (histo-score: 0-300) として定量化した後、無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) との関連を評価した。次に、SC 細胞株 ARK1の PIM1発現を siRNA で抑制し、増殖能 (生存能)、遊走能、浸潤能をそれぞれ WST-1アッセイ、膜貫通アッセイ、マトリゲル浸潤アッセイで検討した。また、SC 細胞株 ARK1, ARK2, SPAC-1L および SPEC2に PIM1阻害剤 SGI-1776を添加し、同様に増殖能 (生存能)、遊

走能、浸潤能の検討を行った。さらに、BALB/c マウスノドマウスの ARK1皮下異種移植腫瘍に対し、SGI-1776 経口投与の抗腫瘍効果を検討した。

【結果および考察】免疫染色による検討では、PIM1 H-score は EC (中央値 90.0) よりも SC (中央値 122.5) で有意に高値であった ($P < 0.0005$)。EMC 全体で H-score 140 (90 percentile 値) で高発現 (PIM1-high) と低発現 (PIM1-low) を分類すると、無増悪生存 (PFS: progression-free survival)、全生存 (OS: overall survival) とも PIM1-high で有意に不良であった (それぞれ $P = 0.016$, $P = 0.001$)。SC のみにおいても、H-score 140 (75 percentile 値) で分類すると、やはり PFS, OS とも PIM1-high で有意に不良であった (それぞれ $P = 0.003$, $P = 0.001$)。COX 回帰分析では PIM1-high は進行期 (Ⅲ, Ⅳ期) とともに独立した予後不良因子であった。これらのことから、PIM1高発現は EMC、特に SC の悪性度上昇に関与することが考えられた。

そこで SC 細胞株を用いて PIM1機能の検討を行った。まず、ARK1細胞の PIM1発現を siRNA でノックダウンさせたところ、細胞増殖能の低下 ($P < 0.001$)、遊走能 ($P < 0.001$) および浸潤能 ($P < 0.001$) の低下が観察された。次に PIM1阻害薬 SGI-1776添加を行ったところ、SC 細胞株 ARK1, ARK2, SPEC2において IC50が 1 ~ 5 μM で細胞生存率を低下させた。また、SGI-1776投与は濃度依存的に ARK1細胞の遊走および浸潤を減少させた。

さらにマウスノドマウスの ARK1皮下異種移植腫瘍の増大は、SGI-1776経口投与により著明に抑制された ($P < 0.0005$)。一方でマウスの体重増加は SGI-1776 投与の有無で差がなく、明らかな有害事象は観察されなかった。

【結論】本研究により、PIM1が EMC、特に SC の新規予後マーカーや治療標的となり得ることや、PIM1阻害剤 SGI-1776が SC に対する分子標的薬となる可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

子宮内膜癌 (EMC: endometrial carcinoma) は増

加傾向であり、組織型では類内膜癌（EC：endometrioid carcinoma）の頻度が高く、漿液性癌（SC：serous carcinoma）の占める頻度は低いが、SCはECに比較し悪性度が高く予後不良であることが問題である。SCに対する新たな治療法の開発は依然として重要な課題である。こうした問題に対応すべく、The Cancer Genome Atlas（TCGA）の統合ゲノム解析によりSCとの類似性が見出されているトリプルネガティブ乳癌（TNBC：triple negative breast cancer）において、腫瘍増殖や抗がん剤抵抗性への関与が報告されているPIM1の発現や機能、PIM1阻害剤（SGI-1776）の効果をEMC、特にSCにおいて検討した。

その結果、竹内穂高は以下の結論を得た。

1. PIM1は、子宮体癌の特に漿液性癌（SC）で発現

が亢進しており、PIM1高発現が独立した予後不良因子となる可能性が示された。

2. siRNA およびPIM1阻害剤SGI-1776によるPIM1抑制により、SC細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が抑制された。

3. SGI-1776経口投与により、SC細胞のヌードマウス皮下異種移植腫瘍の増大が抑制された。

以上より、本研究により、PIM1がEMC、特にSCの新規予後マーカーや治療標的となり得ることや、PIM1阻害剤SGI-1776がSCに対する分子標的薬となる可能性が示されたことを確認できた。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。

Prognostic value of CD34 expression status in patients with myxofibrosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas（粘液線維肉腫と未分化多形肉腫におけるCD34発現の予後予測因子としての価値）

杉浦善弥

（論文の内容の要旨）

【背景】軟部肉腫の20-25%は分化方向の不明な紡錘形細胞肉腫/多形性肉腫であり、以前は悪性線維性組織球腫 malignant fibrous histiocytoma（MFH）と称されていた。近年、粘液状成分の多いmyxoid MFHが粘液線維肉腫 myxofibrosarcoma MFSと、また粘液状成分の少ないnon-myxoid MFHが未分化多形肉腫 undifferentiated pleomorphic sarcoma（UPS）と診断されるようになり、MFHという疾患概念は消失した。しかし、MFSとUPSを分ける特異的な遺伝子異常は同定されておらず、また、粘液状成分の割合についてもWeissらの診断基準では粘液状成分50%以上の病変をMFS、Mentzelらの診断基準では粘液状成分10%以上をMFSとしており、腫瘍の診断基準はいまだ定まっていない。今回私は、WeissらとMentzelらの診断基準の有用性を比較検討した。また、MFSがUPSより予後が一般に良好とされているが、その科学的根拠は乏しく、現状ではMFS/UPSに有用な予後予測因子は明らかにされていない。さらに、MFS/UPSの症例の一定数がCD34陽性であることが知られており、孤立性線維性腫瘍、隆起性線維肉腫、乳腺葉状腫瘍では悪性転化とCD34発現喪失が関連することが知られていることから、本研究では広範切除術を受けたMFS/UPSを対象に、CD34発現喪失が予後不良

因子となるかどうかについても検証した。

【症例と方法】広範切除された軟部MFS/UPS症例を対象とし、全例でCD34, desmin, SMA, S100, CK_AE1/AE3, MDM2の発現を免疫染色で評価し、特定の分化が認められた腫瘍を除外した。また、CD34陽性例ではSTAT6, CD31, INI1の発現も検討し、孤立性線維性腫瘍、血管系腫瘍、類上皮肉腫を除外した。Log-rank testによる単変量解析、Cox比例ハザードモデルを用いた多変量解析にて生存分析を行い、MFS/UPSにおける予後予測因子を探索した。本解析にはR（version 3.6.2）を使用した。

【結果】192例のMFS/UPSが解析対象となった。それらにおいてMFSを粘液状成分50%以上とする基準と10%以上とする基準とで予後に差があるかを検証した。Log-rank testで10%以上の基準を用いると、MFS（n=93）はUPS（n=99）より有意に予後良好であったが（p=0.03）、50%以上の基準を用いるとMFS（n=59）はUPS（n=133）より予後良好な傾向があるに留まった（p=0.1）。よって10%以上の基準が診断学的に優れていると判断し、この基準を用いて以下の解析を施行した。すなわち、MFS 93例とUPS 99例を対象とし、組織型（MFS vs. UPS）、免疫染色でのCD34やSMAの発現、年齢、性別、腫瘍径、腫瘍の部位、深達度、広範切除術時のリンパ節転移や

遠隔転移の有無, FNCLCC grade, 切除断端の状態, 化学療法施行の有無を含む種々の因子が予後に与える影響を単変量解析にて検討した。その結果, 組織型が UPS ($p=0.027$), CD34陰性 (陰性は192例中160例) ($p<0.001$), 腫瘍径 5 cm 以上, 深部組織への浸潤, リンパ節転移あり, 遠隔転移あり, FNCLCC high grade が全生存率を有意に悪化させる因子であった。多変量解析では, CD34陰性 (hazard ratio=3.327; 95 % confidence interval, 1.334-8.295), 遠隔転移あり, FNCLCC high grade は独立した予後因子として残った (hazard ratio=1.084; 95 % confidence interval, 0.679-1.727)。さらに, 全患者192例のうち予後良好な CD34陽性群 ($n=32$) を除いた CD34陰性群 ($n=160$) を対象として, 組織型が UPS であることが全生存率に与える影響を単変量解析・多変量解析で検討した。その結果, 組織型が UPS であることが全生存率を悪化させる独立した予後因子となった (hazard ratio=1.574; 95 % confidence interval, 1.022-2.425)。

【考察】以上の結果より, ① MFS と UPS を区別するには粘液状成分10 % をカットオフ値にするのが妥当であり, ② MFS/UPS と診断された全症例を対象とすると, 全生存率に影響する独立予後因子として, CD34 発現 (陽性 vs. 陰性) が残るものの組織型 (MFS vs. UPS) は脱落し, ③ CD34陰性症例のみ対象とすると組織型 (MFS vs. UPS) は独立予後因子として残ると言える。①は, MFS の診断には粘液状領域が少量でも存在すれば十分なことを意味する。また, ②と③より, MFS/UPS と診断された症例のうち, CD34陽性群は全生存率の良好な群として扱うことができ, CD34陰性群では MFS と UPS とに分けることが予後の点で妥当性があるものと考えられる。CD34陽性例が予後良好な理由として, 以下の二つの点が挙げられる。まず生存分析の結果に基づけば, CD34陽性例は遠隔転移が有意に低頻度であって, 化学/放射線療法に高感受性な傾向があるために予後良好であると推察される。もう一つは, 細胞・分子レベルでの考察した場合, 線維芽細胞, 筋細胞, 骨・軟骨細胞に分化する間葉系前駆細胞 CD34-positive stromal fibroblastic/fibrocytic cells (CD34+SFCs) の存在が知られていることから, CD34陽性の MFS/UPS は CD34+SFCs に近く, CD34陰性の MFS/UPS は腫瘍の progression 或いは脱分化が生じて CD34+SFCs から遠ざかった細胞から構成される肉腫の可能性もある。あるいは CD34陽性の

MFS/UPS は CD34+SFCs 由来であり, CD34陰性の MFS/UPS は別の前駆細胞由来であって細胞の系統が異なる可能性もある。さらには, CD34に未知の肉腫細胞制御の分子機構があるために CD34陽性 MFS/UPS は予後良好なのかもしれない。これらの点について今後の検証による知見の蓄積が必要である。

【結論】分化方向の不明な紡錘形細胞/多形性肉腫において, CD34発現状態は有意な予後予測因子であることから, これらの腫瘍の病理学的評価において CD34発現状態も加味されることが望ましい。

(論文審査の結果の要旨)

かつて malignant fibrous histiocytoma (MFH) と診断された症例のうち, 粘液状成分の多い myxoid MFH は粘液線維肉腫 myxofibrosarcoma (MFS), 粘液状成分の少ない non-myxoid MFH は未分化多形肉腫 undifferentiated pleomorphic sarcoma (UPS) として, 近年再分類されるようになった。しかし, MFS と UPS に固有の遺伝子異常は未同定で, また, 粘液状成分の割合についても, Weiss らは50 % 以上の腫瘍を MFS, Mentzel らは10 % 以上を MFS としており, その基準も定まっていないことから, MFS と UPS の疾患概念はいまだ曖昧である。また, MFS が UPS より予後良好とされるが, エビデンスは確立されていない。さらに, MFS/UPS の一部は CD34陽性であることが知られており, 孤立性線維性腫瘍, 隆起性線維肉腫, 乳腺葉状腫瘍では悪性転化と CD34発現喪失が関連することが報告されている。

今回杉浦は, 広範切除を受けた MFS/UPS192例を対象とし, まず, (1) Weiss らと Mentzel らの診断基準の有用性を比較した。次に(2) MFS vs. UPS の組織診断が真に予後に相関するか, また, (3) CD34発現喪失が予後不良因子となるかどうかについても検証した。

その結果, 以下の知見を得た。

1. Weiss らの基準で MFS と UPS を分けると, 全生存率は UPS が MFS より不良な傾向だったが有意ではなかった ($p=0.1$)。Mentzel らの基準で分けると, 全生存率は UPS が MFS より有意に不良であった ($p=0.03$)。予後の観点から Mentzel らの基準が Weiss らの基準より優れるものと考え, 以降の解析では Mentzel らの基準を用いた。
2. 全患者を対象とした単変量解析では, UPS の組織診断 ($p=0.03$), CD34発現喪失 ($p<0.001$) が, 全生存率に有意に影響する予後不良因子であった。
3. 全患者を対象とした多変量解析では, CD34発現

- 喪失は全生存率を不良にする独立した予後因子として残ったが (HR : 3.33 ; 95 %CI : 1.33-8.3), UPS の組織診断は脱落した (HR : 1.084 ; 95 %CI : 0.68-1.73)。
4. MFS 群と UPS 群とに症例を分けて単変量解析を行うと, CD34発現喪失は, MFS 群 (p=0.04) でも UPS 群 (p=0.002) でも全生存率に有意に影響する予後不良因子であった。
5. CD34陽性群と陰性群に分けて単変量解析を行うと, CD34陽性群では MFS と UPS の全生存率に有意差は無かったが (p=0.4), CD34陰性群では UPS が有意に予後不良だった (p=0.04)。

6. CD34陰性群のみを対象として多変量解析すると, UPS の組織診断は全生存率を不良にする独立予後因子として残った (HR : 1.57 ; 95 %CI : 1.02-2.43)。
- 以上より, MFS/UPS の予後を評価するには, まず, CD34陽性群を予後良好群として扱い, CD34陰性群を MFS と UPS に分けることが望ましい。CD34陽性群は軟部肉腫の新しい疾患概念となる可能性がある。また, 軟部肉腫での CD34発現喪失が予後不良の性格をもたらす分子機構を今後解明できれば, 新規薬剤の開発等につながる可能性もある。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適格であると認めた。

Role of Microelectrode Recording in Deep Brain Stimulation of the Pedunculopontine Nucleus : A Physiological Study of Two Cases (脚橋核の脳深部刺激術における微小電極記録の役割 : 2例の生理学的研究)

八子 武裕

(論文の内容の要旨)

【背景】パーキンソン病 (Parkinson disease : 以下 PD) において, すくみ足 (freezing of gait : FOG) による歩行障害は大きく生活の質を損ねる一因となっている。これに対し, 視床下核 (subthalamic nucleus : STN) や淡蒼球内節 (internal segment of the globus pallidus : GPi) への脳深部刺激療法 (deep brain stimulation : DBS) が広く行われているが, その効果は限定的であり比較的短期間で再悪化することが多い。近年, 中脳一橋に存在する脚橋核 (pedunculopontine nucleus : PPN) への DBS が FOG を含めた歩行障害を改善することが報告されているが, 少数例の報告であり, 術中のターゲット確認や最適な刺激パラメータを決定するための放射線学的・電気生理学的手法についてはまだ議論が残る。

【目的】薬剤不応性 PD の患者に対する両側 PPN への DBS において, 効果的な刺激部位を特定するための術中微小電極記録 (microelectrode recording : MER) の役割を評価するために, 術中の電気生理学的マッピングで収集した推定脚橋核 (estimated pedunculopontine nucleus : ePPN) 位置と神経細胞活動の相関を調査した。

【方法】薬剤不応性歩行障害を有する PD 患者 2 名に両側 PPN DBS を行った。それぞれの患者は以前に, STN (症例 1) と GPi (症例 2) への DBS が実施されて一定期間効果を得られたが, その後効果が低下し

顕著な歩行障害を呈していた。ePPN は術前 MRI で穿刺目標座標を設定し, 定位脳手術手技により行われた術中 MER で同定した。記録された神経細胞活動について, 平均放電速度, バースト, および振動活動を分析した。臨床的評価は, 1) Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) Part III, 2) Gait and Falls Questionnaire, 3) Freezing of Gait Questionnaire を術前, 術後 1 か月, 術後 1 年で評価した。

【結果】2 名の手術において, MER により ePPN が検出された。術後 MRI での計測で電極先端位置は症例 1 では前交連—後交連 (AC-PC) 面より尾側 12.6 (左) / 11.7 (右) mm, 第 4 脳室底より腹側 5.1 / 8.2 mm, 正中線より腹側 9.4 / 9.0 mm だった。症例 2 では, AC-PC 面の尾側 19.5 / 15.2 mm, 第四脳室底の腹側 4.1 / 5.0 mm, 正中より 6.9 / 8.6 mm 外側だった。視床下部より尾側 9-10 mm 付近から持続性放電を特徴とする神経細胞群が認められた。平均発火頻度は, ePPN では 19.1 ± 15.1 Hz (n=18), PPN 近傍の推定赤核 (estimated red nucleus : eRN) では 9.4 ± 6.4 Hz (n=5) で有意差はなかった (p=0.18)。バースト特性に関しては, ePPN ではバースト頻度は 73.7 ± 84.6 burst/min, バースト中スパイク率は 29.6 ± 17.7 % であった。eRN では, バースト頻度は 61.0 ± 39.1 bursts/min で, バースト中スパイク率は 57.3 ± 8.0 % であった。バースト頻度に有意差はなく (p=0.55), バースト中スパイク率の差は有意であった

($p=0.002$)。手足の他動運動や口舌の自動運動時に33%のニューロンの放電頻度が上昇した。術後の周波数10-30 Hz 双極刺激で両患者とも UPDRS の改善を認めた。最適刺激部位の検討では ePPN 内あるいは近傍で刺激効果の違いはなかった。症例1では術後から数か月に劇的改善を認めたが、一年後に再度症状が悪化した。症例2では術後早期の改善は軽度だったが3年間改善が得られた。

【結論】 PPN DBS は、薬物療法と STN/GPi DBS との併用に治療効果不応の PD 患者においてもさらなる治療効果利益をもたらす可能性がある。MER による術中ナビゲーションは PPN の領域を検出するのに有効だが、この領域で観察される活動パターンが特徴的でなく、放電パターンで隣接する核と区別することは困難な可能性がある。また周辺構造に刺激が伝播して発生する副作用により刺激強度が制限されることも、改善の可能性を阻む要因である。PPN DBS の最適な標的部位と刺激パラメータを確定するためには、PPN とその周辺の経路の役割を明らかにするなどさらなる研究が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

パーキンソン病患者はすくみ足など歩行障害により大きく生活の質を損ねる。脚橋核 (PPN) への脳深部刺激電極療法 (DBS) が歩行障害を改善する可能性があるが、そのターゲットの位置や刺激パラメータについては一定の見解がない。このため進行性パーキンソン病患者2名を対象に PPN をターゲットとした微小電極記録 (MER) を用いて DBS を行い、電極位置と神経細胞活動の関係を調査した。その結果、以下の結果を得た。

1. MER により PPN が推定・検出され、術後 MRI

での計測で電極先端位置は症例1では前交連—後交連 (AC-PC) 面より尾側12.6 (左) /11.7 (右) mm, 第4脳室底より腹側5.1/8.2 mm, 正中線より腹側9.4/9.0 mm だった。症例2では、AC-PC 面尾側19.5/15.2 mm, 第四脳室底腹側4.1/5.0 mm, 正中より6.9/8.6 mm 外側だった。

2. 視床下部より尾側9-10 mm 付近から持続性放電を特徴とする神経細胞群が認められた。平均発火頻度は、PPN では 19.1 ± 15.1 Hz ($n=18$), PPN 近傍の赤核 (RN) では 9.4 ± 6.4 Hz ($n=5$) で有意差はなかった ($p=0.18$)。バースト特性に関しては、PPN ではバースト頻度は 73.7 ± 84.6 burst/min, バースト中スパイク率は 29.6 ± 17.7 % だった。RN では、バースト頻度は 61.0 ± 39.1 bursts/min, バースト中スパイク率は 57.3 ± 8.0 % だった。PPN と RN とでバースト頻度に有意差はなく ($p=0.55$), バースト中スパイク率の差は有意だった ($p=0.002$)。
3. 術後10-30 Hz 双極刺激で両患者とも UPDRS の改善を認めた。症例1では術後から数か月に劇的改善を認めたが、一年後に再度症状が悪化した。症例2では術後早期の改善は軽度だったが3年間改善が得られた。

以上より、PPN DBS において MER は PPN の領域を検出するのに有効だが、観察される活動パターンは特徴的でなく、放電パターンで隣接する核と区別することは困難な可能性が示された。しかし、臨床的歩行障害の改善は得られており、薬物療法や他の神経核への DBS などの治療効果不応の PD 患者においても治療効果利益をもたらす可能性がある。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Impact of single eyelid on superior visual field (一重瞼が上方視野に及ぼす影響)

北 澤 健

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 厚ぼったい一重瞼は東アジア人に特徴的な眼瞼形態であり疾患とは考えられていない。しかしながら二重瞼を魅力的とする風潮もあり、重瞼術は広く普及している。我々は重瞼術後に視野が拡大したと感じた患者を少なからず経験しており、二重瞼になることによって視野が拡大すると仮説を立てて本研究を行った。

【対象】 2015年1月～2020年8月に松波総合病院形成

外科において重瞼術を行った、10代から20代で上眼瞼挙筋機能に異常がなく、疾患、外傷、眼瞼手術の既往のない一重瞼の男女。

【計測方法】 瞼裂高の指標として palpebral edge reflex distance (ERD) を、前頭筋の収縮度の度合いとして brow reflex distance (BRD) を、術前および術後3か月で測定した。計測は10 mm 角の定規を額に貼った状態でデジタル写真を撮影し、写真編集ソフト photoshop を用いて0.1 mm 刻みで行った。

ゴールドマン視野計による計測は術前の通常の状態および瞼をテープで引き上げて額に貼りつけた状態と、術後3か月に通常の状態で計3回測定した。テープで瞼を引き上げての計測は眼瞼以外に視野の狭小化をきたす障害がないことを示すためであった。

上方視野面積をゴールドマン視野検査票のV4e isopterの上半分の楕円形の面積で表すことにして、その楕円の面積を内接する13角形の面積で近似することとした。13角形の面積は15度刻みで区切られる12個の三角形の集合体と考えられ、一般に斜辺a, b, とその鈍角15度を有する三角形の面積は $\sin 15^\circ ab$ と定義される。12個の三角形の各辺の長さはV4e isopterが各子午線と交差する値であり、それらを0度から順にd1, d2, d3, …, d13とすると、内接する13角形の面積は $\sin 15^\circ (d1d2 + d2d3 + d3d4 + \dots + d12d13)$ とあらわされるが、本研究で重要なのは視野面積の絶対値ではなく術前後の変化であるので、係数部分は無視して変数部分である $d1d2 + d2d3 + d3d4 + \dots + d12d13$ の値のみを比較した。

また、視野計において鉛直方向の値を上方視野角と定義し、術前後でのERD, BRD, 上方視野面積, 上方視野角を比較し、ERDと上方視野面積, ERDと上方視野角との相関を調べた。また、瞼裂高が同程度であった場合の一重瞼と二重瞼での上方視野の違いを比較するためにERDが2.0~4.0 mmの範囲内の上方視野面積の比較を行った。

【統計解析】結果は中央値(範囲), [四分位範囲]で示し、術前後のERD, MRD, 上方視野面積, 上方視野角の比較をフリードマン検定, およびウィルコクソン符号順位和検定で $P < 0.01$ をもって有意差ありとした。また、ERDと上方視野面積, 上方視野角との相関係数をスピアマンの順位相関係数の検定で求めた。

【結果】本研究に含まれたのは男性5名女性15名の計20名40眼瞼で中央値年齢は21歳であった。14名が慢性的な頭痛を訴えていたが、術後は全員において消失ないし軽減していた。開瞼時に上眼瞼縁が露出していたのは5眼瞼, 皮膚によって隠れていたのは35眼瞼であった。

術前非テープ時, および術後のERDの中央値はそれぞれ1.45 mm, 3.4 mm, 術前非テープ時, および術後のBRDの中央値はそれぞれ15.1 mm, 14.4 mmであった。また, 上方視野面積は術前非テープ時, 術前テープ時, 術後の中央値がそれぞれ34,443度², 49,975度², 50796度²であった。上方視野角の術前非

テープ時, テープ時, 術後の中央値はそれぞれ38.5度, 57.5度, 56度であった。視野面積, 視野角ともに術前非テープ時と術後では有意差を認めた。

術前非テープ時のERDと上方視野面積, ERDと上方視野角の大きさには正の相関関係を認めたものの, 術後のERDと上方視野面積, ERDと上方視野角の間には相関関係が認められなかった。

また, 中央値が2.7 mmとなる, ERDが2 mmより大きく4 mm未満にあった術前15眼瞼と術後17眼瞼では上方視野面積がそれぞれ35,079度², 50,563度²と, 瞼裂高が同程度であるにも関わらず上方視野は術後の二重瞼群の方が有意に広がった。

【考察】一重瞼が手術によって二重瞼になることによって上方視野が拡大したのは眼瞼縁を超えて垂れ下がっていた皮膚に上眼瞼挙筋の作用が伝わり, 開瞼とともに後方に引かれることによって瞼裂高が拡大したためと考えられる。既に眼瞼下垂症や眼瞼皮膚弛緩症の患者において瞼裂高と上方視野との間には正の相関関係があることが報告されているが, 本研究でも術前の一重瞼では同様の相関関係が認められた。また, 術前非テープ時の上方視野角が正常範囲を大きく下回っていた結果からも, 本態的には一重瞼は眼瞼下垂とは異なるものの, 臨床的には酷似している。

瞼裂高が同じであれば二重瞼よりも一重瞼の方が上方視野が狭いのは, 図6に示した如く上眼瞼の最下点はずかしながら前方に位置することによって上方視野を妨げているためと推測している。

一重瞼は単に整容上の主観的な問題のみならず, 上方視野が狭いという視機能にかかわる問題も内包している。

(論文審査の結果の要旨)

厚ぼったい一重瞼は東アジア人に特徴的な眼瞼形態であり疾患とは考えられていない。しかしながら北澤は重瞼術後に視野が拡大したと感じた患者を少なからず経験しており, 二重瞼になることによって視野が拡大すると仮説を立てて本研究を行った。検討方法はゴールドマン視野計を用いて10~20代の一重瞼の日本人の上方視野を重瞼術前後で測定して比較した。

また, 開瞼時の上眼瞼の高さの指標としてEdge Reflex Distance (ERD), 眉毛の高さの指標としてBrow Reflex Distance (BRD)を術前後で計測した。

そして以下の結果を得た。

1. 対象は13~27歳, 中央値年齢21歳の男女20名40眼瞼で上眼瞼挙筋機能は14~16 mmであり, すべて

- の眼瞼で機能低下は認めなかった。
2. ERD の中央値は術前が1.45 mm, 術後は3.4 mm と有意に拡大していた。
 3. BRD の中央値は術前が15.1 mm, 術後は14.4 mm と有意に短縮していた。
 4. 上方視野面積の中央値は術前が34,443度², 術後が50,796度²と有意に拡大していた。
 5. 上方視野角度の中央値は術前が38.5度で正常とされる55度以上に達していなかったが, 術後は56度と正常化し, しかも有意差をもって増大していた。
 6. 術前の一重瞼ではERDの値が大きいほど上方視野面積, 上方視野角ともに大きくなる傾向があった

が, 術後の二重瞼ではERDと上方視野面積, 上方視野角との間に相関関係が見られなかった。

7. ERD が同程度であれば上方視野面積は一重瞼よりも二重瞼の方が広がった。
8. 術前20名中14名が訴えていた慢性頭痛は術後すべて消失ないし軽減していた。

以上より一重瞼は単に外見上の問題のみならず, 上方視野の狭小化という視機能面での短所や, 開瞼を代償するための前頭筋の断続的収縮を原因とした慢性頭痛という健康上の問題を包含する可能性を示唆した初の研究であり, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Prevalence of Takotsubo Syndrome among Patients Admitted to an Emergency Department (救急入院患者におけるタコツボ症候群の有病率)

八 塩 章 弘

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 タコツボ症候群 (TTS) は急性冠症候群に類似する, 急性な可逆性の左心不全として1990年に初めて報告された。以降, 様々な疾患に伴って発症することが知られてきた一方, 未だその疫学的な報告は蓄積段階にある。本研究により, 三次救命センターに入院した患者における, TTSの有病率および臨床的特徴を明らかにする。

【方法】 対象は2003年4月から2014年3月までの期間に当院救命センターに入院した全患者とし, 単施設前向き観察研究の事後解析を行った。TTSが疑われる兆候を呈する全ての患者にTTSのスクリーニングとして心臓超音波検査を行い, Mayo 診断基準を用いてTTSの診断を行った。TTSと診断された患者のうち, TTSが入院の端緒となったものを一次性TTS群, 他の身体疾患に合併してTTSを発症したものを二次性TTS群として, 臨床的特徴を比較した。

【結果】 14,178人の救急入院患者のうち, TTSと診断された患者は33人 (男性36%, 年齢中央値76 (四分位範囲 70-80) 歳) であり, 有病率は0.23%であった。冠動脈造影は施行不能な5例を除く28例に行った。心電図異常は診断時点で全例に認められ, ST上昇が39%, 陰性T波が48%, 異常Q波が24%, R波増高不良が18%であった。発症季節は秋が最多 (39%) であった。

33例のTTSのうち, 一次性TTS群が40%, 二次性TTS群が60%であった。二次性TTS群に先行し

た身体ストレスの内訳は, 低糖昏睡, 急性下痢症に伴う急性腎障害, 痙攣発作, 細菌感染症, 腸閉塞, 喘息発作, 上腸間膜動脈閉塞症, 頭部外傷, ヘビ咬傷, 上気道閉塞, 反発性腹膜炎, 予定肝切除術, 硬膜外麻酔であった。二次性TTS群のうち, 6例には先行する精神的ストレスを認めた。

胸部症状を呈した割合は一次性TTS群で92%であったのに対し, 二次性TTS群では25%のみ ($p < 0.001$) であった。従って一次性TTS群の多くは胸部症状が診断の端緒となったのに対し, 二次性TTS群の多くは肺水腫や心電図異常, 低血圧などの客観的所見が診断の端緒となっていた。APACHEIIスコア ($P=0.002$), 入院期間 ($P=0.018$), ICU滞在期間 ($P=0.006$) は二次性TTS群で有意に高く ($P=0.002$), 不整脈の出現率も二次性TTSで高い傾向にあった ($P=0.067$)。死亡例は1例 (上腸間膜動脈閉塞症に伴う多臓器不全) であった。

【考察】 救急入院患者におけるTTSは, 有病率0.23%であった。身体的疾患に合併したTTSの割合が高く, その多くが胸部症状を欠いていた。胸部症状を訴えない患者であっても, 救急入院患者の評価の一環として, TTSのスクリーニングを行うべきである。

米国の予定外入院患者の0.02%にTTSを認めたという報告や, ICU患者の0.9-26%にTTSが見られたという報告がある。本研究における有病率の違いは, 母集団における重症度の相違や, 見過ごされるTTSが多く存在することに起因すると推測する。本研究で

は TTS の兆候を呈する全ての患者に心エコー検査を実施しており、ほぼ全ての TTS 症例を網羅している。

TTS は近年、TTS 自体の胸部症状が受診動機となる一次性 TTS と、他の身体疾患に伴って発症する二次性 TTS に分類される。本研究でもこの分類に従って TTS を分類した。本研究においては二次性 TTS の割合が60%と既知の報告(40%)より高いのは、一般に二次性 TTS の見落としが多いが、本研究ではほぼ全てを網羅していることにあると推測する。

TTS の51%に胸部症状を呈することは既知の報告と合致するが、特筆すべきは二次性 TTS の25%しか、胸部症状を呈していなかったことである。ゆえに、一次性 TTS の多くは胸部症状が診断の端緒になる一方、二次性 TTS の多くは心電図異常や肺水腫などの客観的所見が診断の端緒となっていた。したがって、これらの所見がある患者においては TTS の可能性を十分考慮する必要がある、ポイントオブケアとしての心臓超音波を身体診察の一環として繰り返し施行することを提唱する。

ICU において TTS は死亡リスクを高めることが報告されている。救急現場においても身体疾患に TTS を合併している症例は、特に TTS の診断が遅れることによって、臨床転帰を悪化させる可能性が推測される。さらに、TTS の早期診断は適切な血行動態管理に不可欠であり、救急患者の予後を改善する可能性がある。

【結論】 三次救命センターに入院する患者における TTS の有病率は0.23%であった。二次性 TTS はほとんどの症例で胸部症状を欠き、心電図変化などの客観的所見が診断の端緒となっていた。胸部症状がなくとも、患者評価の一環として TTS のスクリーニングを行うべきである。

(論文審査の結果の要旨)

タコツボ症候群 (TTS) は急性冠症候群に類似する、急性な可逆性の左心不全として1990年に初めて報告された。以降、様々な疾患に伴って発症することが知られてきた一方、未だその疫学的な報告は蓄積段階にある。そこで八塩は、三次救命センターにおける TTS の有病率および臨床的特徴を明らかにすることを目的とし、単施設前向き研究の事後解析を行った。対象は2003年4月から2014年3月までの期間に当院救命センターに入院した全患者として、TTS が疑われる兆候を呈する全ての患者に心臓超音波検査を実施し、Mayo 診断基準に沿って診断した。TTS 自体が入院の端緒となったものを一次性 TTS 群、他の身体疾患に合併して TTS を発症したものを二次性 TTS 群として、各群の特徴を比較した。

その結果、八塩章弘は以下の成績を得た。

1. 救急入院患者14,178人中、33例に TTS を認めた。ゆえに救急入院患者における有病率は0.23%であった。
 2. 救急入院患者における TTS は、身体的疾患に合併した TTS (二次性 TTS 群) の割合が60%と高かった。
 3. 一次性 TTS 群では92%が胸部症状を呈するのに対し、二次性 TTS 群では25%しか呈さなかった。(P<0.001)
 4. したがって、多くの二次性 TTS 患者では、心電図変化や肺水腫、原因の明らかでない低血圧などの客観的所見が TTS を疑う端緒となった。
- 以上より、救急入院患者における TTS の有病率が明らかとなった。特に救急入院患者においては二次性 TTS の割合が高く、その多くが胸部症状を欠いていた。胸部症状を訴えない患者であっても、心電図変化や肺水腫、原因の明らかでない低血圧などは診断の端緒となりうることを認識し、積極的にポイントオブケアとしての心臓超音波を実施し、TTS を診断する必要がある。これにより、救急患者の予後を改善させる可能性がある。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。

Intrathecal morphine exacerbates paresis with increasing muscle tone of hindlimbs in rats with mild thoracic spinal cord injury but without damage of lumbar α -motoneurons (モルヒネの髄腔内投与は、軽度の胸髄損傷を伴うラットにおいて、腰髄の α -運動ニューロンの損傷を伴わずに、後肢の筋緊張の増加を伴う脊髄損傷後の不全麻痺を悪化させる)

川上 勝弘

(論文の内容の要旨)

【背景】脊髄損傷 (SCI) は損傷領域より尾側の脊髄に支配されている運動および体性感覚機能に障害を生じさせ、その多くの場合で歩行機能が低下し、生活の質も大きく低下する。モルヒネやフェンタニルのようなオピオイド鎮痛薬は、SCI の急性疼痛の治療と脊椎外科手術のために広く使用されてきた。しかし、SCI ラットモデルを用いた実験およびヒトでの臨床観察から、鎮痛用量のモルヒネの髄腔内投与は、脊髄虚血に伴う α -運動ニューロンの壊死と運動機能障害を悪化させることが示された。さらに、中等度から重度の挫傷性 SCI ラットでは、髄腔内モルヒネは脊髄損傷部位の病変サイズを増大させ、機能回復に負の影響を及ぼす。しかし、中等度から重度の脊髄損傷後の運動機能に対するモルヒネの副作用が報告されているが、腰髄の α -運動ニューロン損傷のない軽度の SCI 後の、残存歩行機能に対するモルヒネの影響については検討されていない。

【目的】本研究では、モルヒネ髄腔内投与が軽度胸髄損傷後の運動機能に及ぼす影響と、オピオイド受容体活性化の関与について検討した。

【方法】240—300 g の Sprague Dawley 系雄性ラットに対し、セボフルランを用いた全身麻酔下に T9-10 レベルで椎弓切除し硬膜を露出させた。重錘落下法により、第 9-10 胸椎レベルの軽度胸髄挫減性 SCI を誘発した。後肢の運動機能と筋緊張に対するモルヒネおよび選択的 μ -, δ -, κ -オピオイド受容体作動薬の単回投与、次いで、皮下埋め込み式の浸透圧ポンプを用いて、モルヒネあるいは生理食塩水の 72 時間持続注入の影響を検討した。後肢運動機能評価は 22 段階の Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) テスト (BBB スコア 21 点—下肢麻痺無し, BBB スコア 0 点—完全麻痺) を、後肢の他動運動時の筋緊張の程度は Ashworth スケール (Ashworth スコア 4 点—過剰な筋緊張, Ashworth スコア 0 点—筋緊張無し) を用いて 5 段階に評価した。また、持続注入を受けたラットの腰髄の切片を Klüver-Barrera 染色を施した後、損傷した α -

運動ニューロン数および正常な α -運動ニューロン数について検討した。

【結果】本研究による脊髄損傷 6 時間後における BBB スコアは 7.5 ± 1.8 [平均 \pm 標準偏差] まで低下し、モルヒネ $30 \mu\text{g}$ の髄腔内投与 30 分後には、BBB スコアは 1.7 ± 2.7 [平均 \pm 標準偏差] まで有意に低下した ($P = 0.006$)。しかし、モルヒネ群の翌日以降の歩行機能回復は、生理食塩水群のそれと有意差はなかった。

軽度脊髄損傷後の Ashworth スコアは 0 ± 0 [中央値 \pm 95 % 信頼区間] であったが、モルヒネ $30 \mu\text{g}$ の髄腔内投与により、 4 ± 0 [中央値 \pm 95 % 信頼区間] と有意に上昇したが ($P = 0.007$)、その効果はナロキソンによって拮抗された ($P = 0.040$)。 μ -, δ -オピオイド受容体作動薬の単回投与も、用量依存性に脊髄損傷後の残存運動機能を筋緊張の上昇とともに有意に悪化させ、その効果はナロキソンによって拮抗された。一方、 κ -オピオイド受容体作動薬は、脊髄損傷後の残存歩行機能に影響を与えなかった。

モルヒネの 72 時間持続投与では、筋緊張の上昇を伴う運動機能の持続的な低下が認められ、これはナロキソンでは回復しなかったが、損傷した腰髄 α -運動ニューロン数は増加しなかった。

【考察】本研究では、歩行機能がある程度残存する軽度脊髄損傷に対するモルヒネ、およびオピオイド受容体活性化の関与を調査した。これらの結果は、鎮痛用量のモルヒネ単回投与は脊髄 μ -および δ -オピオイド受容体の活性化を介して後肢の筋緊張を一過性に増加させ、軽度 SCI の急性期における運動機能のさらなる悪化をもたらすことを示唆している。また、モルヒネの長期持続投与による増量は、オピオイド受容体の直接活性化以外の機序で筋緊張の上昇を伴う運動機能の持続的低下をもたらすことが示唆された。その機序は本研究からは明らかにはならないが、モルヒネ持続投与による腰髄 α -運動ニューロン数の減少が原因である可能性は低いと考えられる。軽度の脊髄損傷後であっても、モルヒネは歩行機能や筋緊張を評価しながら慎重に使用されるべきものである。

(論文審査の結果の要旨)

脊髄損傷 (SCI) は損傷領域より尾側の脊髄に支配されている運動および体性感覚機能に障害を生じさせ、その多くの場合で歩行機能が低下し、生活の質も大きく低下する。モルヒネやフェンタニルのようなオピオイド鎮痛薬は、脊髄損傷の急性疼痛の治療と脊椎外科手術のための鎮痛薬として広く使用されてきた。近年、SCI ラットモデルを用いた実験およびヒトでの臨床観察から、鎮痛用量のモルヒネの髄腔内投与は、脊髄組織の障害を悪化させ、後肢の運動機能障害を悪化させることが報告された。しかし、腰髄の α -運動ニューロン損傷のない軽度の SCI 後の、残存歩行機能に対するモルヒネの影響については検討されていない。そこで川上勝弘は、モルヒネ髄腔内投与が軽度胸髄損傷後の運動機能に及ぼす影響と、オピオイド受容体活性化の関与について検討した。

本研究ではラットに重錘落下法により、第9-10胸椎間の軽度胸髄挫滅性 SCI を誘発した。併せて Sham 手術のラットも作成した。後肢の運動機能と筋緊張に対するモルヒネおよび選択的 μ -、 δ -、 κ -オピオイド受容体作動薬の髄腔内単回投与、次いで、皮下埋め込み式の浸透圧ポンプを用いて、髄腔内モルヒネあるいは生理食塩水の72時間持続注入を行い、以下の検討を行った。

1. 胸髄損傷後の歩行機能に対する鎮痛量モルヒネ (単回投与) の影響
2. 胸髄損傷後の歩行機能と筋緊張に対するモルヒネと選択的オピオイド受容体作動薬の影響
3. 胸髄損傷後の歩行機能と筋緊張に対する72時間のモルヒネ持続投与の影響
4. 胸髄損傷後の72時間モルヒネ持続投与後の歩行機能に対するナロキソンの影響
5. 胸髄損傷後の腰髄 α -運動ニューロンに対する72

時間のモルヒネ持続投与の影響

その結果、以下の成績を得た。

1. 胸髄損傷後に歩行機能は悪化した。鎮痛量モルヒネの単回投与により、一過性の歩行機能悪化が生じた。翌日以降の回復は、モルヒネ群と生理食塩水群間で差が認められなかった。
2. モルヒネ、 μ -受容体作動薬、 δ -受容体作動薬は、胸髄損傷後の下肢に筋緊張を生じさせ、歩行機能を悪化させた。それらの影響は、ナロキソンで拮抗された。一方、 κ -受容体作動薬は影響を与えなかった。
3. 胸髄損傷後のモルヒネ持続投与によって、単回投与と同様に後肢の筋緊張が亢進し、歩行機能の回復を遅延させた。脊髄損傷がない場合には、モルヒネの持続投与は歩行機能に影響を与えなかった。
4. 胸髄損傷後、モルヒネを72時間持続投与した後の歩行機能低下は、ナロキソンによって拮抗されなかった。胸髄損傷後に生理食塩水を72時間持続投与した後、モルヒネ単回投与によって悪化した歩行機能は、ナロキソンによって拮抗された。
5. モルヒネを72時間持続投与した後の腰髄 α -運動ニューロン数は、他群と違いが認められなかった。

以上より、軽度の胸髄損傷に対する鎮痛用量のモルヒネ単回投与は、脊髄の μ -および δ -オピオイド受容体を活性化させることにより、後肢の筋緊張を伴う残存歩行機能の更なる悪化を誘発することが示された。持続投与によるモルヒネの用量増加は、オピオイド受容体の直接的な活性化以外の機序を介して、脊髄損傷からの歩行機能回復を遅延させる。軽度の SCI であっても、モルヒネは歩行機能や筋緊張を評価しながら慎重に使用する必要があることを提示できた。

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。

Comparison of prognostic impact of anticoagulants in heart failure patients with atrial fibrillation and renal dysfunction: direct oral anticoagulants versus vitamin K antagonists (心房細動と腎機能障害を合併する心不全患者における抗凝固療法の予後への影響の比較: 直接経口抗凝固薬とビタミンK拮抗剤)

酒井 貴弘

(論文の内容の要旨)

【背景】心房細動は高齢者において有病率が高く、また心不全や腎機能障害をしばしば合併する。心不全と心房細動が併存する高齢者は血栓形成リスクが高いこ

とが知られている。ビタミンK拮抗剤 (VKA) はかつて心房細動の標準的治療であったが、PT-INR の不適切なコントロールがしばしば問題となってきた。近年、直接経口抗凝固薬 (DOAC) が心房細動患者に

おける脳梗塞や全身性塞栓症予防において主流となっている。DOACはVKAよりも脳梗塞、全身性塞栓症、大出血が低下することが示されているが、腎機能障害合併例での効果や安全性は十分に解明されていない。我々は心房細動と腎機能障害を合併する心不全患者においてDOACがVKAよりも予後の改善に関連すると仮説を立てて検証を行った。

【方法】 2014年7月から2019年8月まで、長野県内の13病院に急性非代償性心不全で入院した患者1,037人のうち、65歳以上かつ非弁膜症性心房細動を有する329人を解析対象とした。抗凝固療法の内容によりVKA群(119人)とDOAC群(210人)の2群に分類し、さらにVKA群、DOAC群それぞれを推算糸球体濾過量(eGFR)45未満/以上の2群に分類してサブ解析を行った。主要評価項目は全死亡とし、副次評価項目は非心血管死および脳卒中とした。

【結果】 中央値730日間の観察期間中(四分位値:334-1194日)、全死亡は84例、非心血管死は25例、脳卒中は14例に観察された。 Kaplan-Meier解析を行うと、全死亡はDOAC群よりもVKA群で有意に多く観察されたが(log-rank $p=0.033$)、非心血管死および脳卒中の発生には両群で有意差を認めなかった。多変量解析において、患者群全体を対象とするとDOACの使用は全死亡の低下に関連する独立因子ではなかったが、eGFR別のサブ解析では、eGFR45未満の群においてDOACの使用は死亡率の低下と関連していた(log-rank $p=0.036$)。多変量解析でも、eGFR45未満の群においてDOACの使用は死亡率の低下に関連する独立因子であった(ハザード比、0.55; 95%信頼区間、0.30-0.99; $p=0.045$)。

【考察】 本研究では、心房細動および腎機能障害を合併した心不全患者において、DOACの使用がVKAと比較して死亡率の低下と関連することが示された。従来のDOACに関する大規模研究のうち、ROCKET AF、RE-LY、ENGAGE AF-TIMI 48はCcr<30 mL/minの患者群を除外しており、またARISTOTLEはCcr<25 mL/minの患者群を除外しているため実臨床にはそぐわない面があった。近年、Makaniらが心房細動と腎機能障害を合併した患者でのDOACの安全性を報告したが、人種や民族によりDOACの有効性・安全性に差異があるとされているため一概に日本人の患者に当てはめることは難しかった。近年、国内で報告されたSAKURA-AF registryでは、傾向スコアマッチング後の解析においてVKAとDOACの間に

脳卒中、全身性塞栓、大出血、全死亡に有意差はないとされた。SAKURA-AF registryと異なり我々の研究でDOACが死亡率低下と関連していた理由は2つ考えられる。1つはSAKURA-AF registryのVKA群の至適範囲内時間(TTR: 65.4%±31.1%)が他のregistry(mean TTR: 55-68%)よりも高いために、イベント数が少なくなった可能性が考えられた。もう1つは、我々の研究における患者群のCHADS2スコアの中央値は3.0と国内の他の研究(1.8-2.1)やSAKURA-AF registry(1.7-1.9)よりも高値であり、患者が比較的多くの併存疾患を有していたために併存疾患による予後への影響や、ポリファーマシーによる副作用の影響で死亡や出血との関連が強まった可能性が考えられた。本研究は後方視研究ではあるが、腎機能障害例においてもDOACはVKAと比較して非劣性と考えられ、日常診療においてこれらの患者群へのDOACの処方躊躇わなくともよいことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

心不全と心房細動が併存する高齢者は血栓形成リスクが高いことが知られている。ビタミンK拮抗剤(VKA)はかつて心房細動の標準的治療であったが、PT-INRの不適切なコントロールがしばしば問題となってきた。近年、直接経口抗凝固薬(DOAC)が心房細動患者における脳梗塞や全身性塞栓症予防において主流となっており、DOACはVKAよりも脳梗塞、全身性塞栓症、大出血が低下することが示されているが、腎機能障害合併例での効果や安全性は十分に解明されていない。我々は心房細動と腎機能障害を合併する心不全患者においてDOACがVKAよりも予後の改善に関連すると仮説を立てて検証を行った。

2014年7月から2019年8月まで、長野県内の13病院に急性非代償性心不全で入院した患者1,037人のうち、65歳以上かつ非弁膜症性心房細動を有する329人を解析対象とした。抗凝固療法の内容によりVKA群(119人)とDOAC群(210人)の2群に分類し、さらにVKA群、DOAC群それぞれを推算糸球体濾過量(eGFR)45未満/以上の2群に分類してサブグループ解析を行った。主要評価項目は全死亡とし、副次評価項目は非心血管死および脳卒中とした。

その結果、以下の結論を得た。

1. 全死亡はDOAC群よりもVKA群で有意に多く観察されたが、非心血管死および脳卒中の発生には両群で有意差を認めなかった。

2. eGFR で分類したサブグループ解析にて, eGFR <45のグループでは全死亡は DOAC 群にて VKA 群よりも有意に少なかったが, eGFR ≥45のグループでは DOAC 群と VKA 群で全死亡に有意差は認めなかった。
 3. 多変量解析の結果, 患者全体では DOAC の使用は全死亡の低下に関連する独立因子ではなかったが, eGFR45未満のグループにおいては DOAC の使用は死亡率の低下と関連する独立因子であった。
- 以上より本研究は, 65歳以上の非弁膜症性心房細動

を有する心不全患者の中で, 腎機能障害合併例において DOAC の使用が VKA と比較して死亡率の低下と関連する独立因子であることを明らかにした。抗凝固療法を考慮する際, 従来 DOAC の使用が躊躇される傾向にあった腎機能障害合併例に対しても DOAC を選択することが有益であることが示唆され, 臨床的に有用かつ意義の高いものとする。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。

Development of Free 25-Hydroxyvitamin D₃ Assay Method Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析法による遊離型 25-ヒドロキシビタミン D₃測定法の構築)

石 嶺 南 生

(論文の内容の要旨)

【背景】ビタミン D (VD) 代謝物は骨の健康だけでなく, 癌や自己免疫疾患をはじめとする様々な疾患のバイオマーカーとして広く測定されている。VD の自然形であるビタミン VD₃は紫外線照射によって皮膚で産生されるが, 一部魚などの食物から摂取される。また, 植物からはわずかに分子構造の異なる VD₂が摂取されるが, その血漿中濃度は VD₃に比べて極めて低い。VD₃と VD₂は肝臓で代謝されて25-ヒドロキシビタミン D (25(OH)D₃と25(OH)D₂) に変換される。体内循環では VD とその代謝物は VD 結合蛋白 (DBP) に85-90%, アルブミンに10-15%が結合しており, 0.03%未満が遊離型として存在している。25(OH)D は DBP との結合親和性が最も高く, 血漿の濃度が相対的に高いことから臨床検査における測定対象とされている。近年, 遊離型の25(OH)D が VD 欠乏状態や病態をより反映するという仮説が提唱されたが, これを立証するためには正確で精密な測定法が必要である。本研究では遊離型のほとんどを占める遊離型25(OH)D₃の測定系の構築とその基礎性能, 臨床的有用性について検討した (信州大学医学部倫理委員会承認番号 4928)。

【方法】液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 装置を用いた総25(OH)D₃, 遊離型25(OH)D₃の測定は, ビタミン D 代謝物定量測定キット JeoQuant™ 試薬 (日本電子株式会社) を用いた。総25(OH)D₃の測定は JeoQuant™ 試薬の基本的操作手順に従って実施した。遊離型25(OH)D₃の測定は第一

段階として血清の限外濾過 (アミコンウルトラ-2 30 K) により総25(OH)D₃から遊離型25(OH)D₃を分離後, 濾液の25(OH)D₃を測定し遊離型25(OH)D₃測定値とした。慢性腎不全患者, 肝硬変患者, 妊婦, 健常者 (各15名) の総25(OH)D₃, 遊離型25(OH)D₃濃度を測定した。一部の検体については, DBP およびアルブミンを測定し, 計算式による遊離型25(OH)D₃濃度を算出した。また, 遊離型25(OH)D 測定用の ELISA キット (DIAsource 社) を用いて限外濾過液の測定等を実施し, LC-MS/MS 法による遊離型25(OH)D₃測定法との相違について検討した。

【結果】測定系の基礎性能は, 併行精度 (変動係数 3.8-4.5%), 室内精度 (変動係数4.8-5.9%), 直線性 (80 pg/mL), 定量限界 (0.97 pg/mL), 添加回収試験 (84.5-92.4%), マトリクス効果 (94.5-104.9%) のいずれも良好であった。慢性腎不全患者, 肝硬変患者, 妊婦 (各15名) の総25(OH)D₃は健常者と比較してどのグループも有意差が認められなかった。一方, 遊離型25(OH)D₃は慢性腎不全患者, 肝硬変患者で健常者と比較して有意に低下していた。全検体の総25(OH)D₃と遊離型25(OH)D₃には比較的強い相関関係 (r=0.738) が認められたが, グループ毎で線形回帰式の傾きは異なっていた。計算式で算出した遊離型25(OH)D と実測総25(OH)D₃および実測遊離型25(OH)D₃の相関係数はそれぞれ r=0.621, r=0.423 であった。LC-MS/MS 法 (遊離型25(OH)D₃) で 16.71 pg/mL であった限外濾過液を市販 ELISA キット (遊離型25(OH)D 濃度) で測定したところ, 0.46

pg/mL と大きく乖離した。JeoQuant™ 試薬付属の校正物質を10, 20 pg/mL に希釈したものを ELISA で測定するとそれぞれ0.39, 0.43 pg/mL となり, 同様の乖離が認められた。

【考察】 LC-MS/MS 法による遊離型25(OH)D₃の測定精度等の基本性能は満足できるものであった。また, 疾患等の個体の状態によって総25(OH)D₃と遊離型25(OH)D₃は異なる動態を示すことが示唆された。しかし, ELISA 法を用いて遊離型25(OH)D₃を測定した既報とは必ずしも同様な結果にはならなかった。

要因として LC-MS/MS 法と ELISA 法の乖離が考えられた。ELISA 法は簡便であるが, 抗体の特異性, 希釈測定による遊離型と結合型の平衡の変動, 低希釈倍率によるバックグラウンドの上昇等の課題があることは否定できない。

【結論】 LC-MS/MS 法による遊離型25(OH)D₃の基本性能は満足できるものであり, ELISA 法やその他のイムノアッセイなどの測定系の評価・開発に有用である。

(論文審査の結果の要旨)

ビタミン D₃とビタミン D₂は肝臓で代謝されて25-ヒドロキシビタミン D (25(OH)D₃と25(OH)D₂) に変換され, 血中ではビタミン D (VD) 結合蛋白への結合型 (85-90%), アルブミン結合型 (10-15%), 遊離型 (0.03%未満) として存在している。現在, 臨床検査における測定対象は血中濃度が相対的に高い総25(OH)D であるが, 近年, 遊離型25(OH)D が VD 欠乏状態や病態をより反映するという仮説が提唱されている。そこで石嶺は正確で精密な測定法が必要であ

ると考え, (1)遊離型25(OH)D のほとんどを占める遊離型25(OH)D₃の測定系の構築とその基礎性能, (2)構築した LC-MS/MS 法を用いた患者・健常者血清の総25(OH)D₃と遊離型25(OH)D₃濃度測定, (3)構築した LC-MS/MS 法と市販 ELISA キットとの比較, について検討した。

その結果, 石嶺は以下の成績を得た。

1. 併行精度, 室内精度, 直線性, 定量限界, 添加回収試験, マトリクス効果のいずれも, 基準を満たす良好な成績が得られた。
2. 慢性腎不全患者, 肝硬変患者, 妊婦 (各15名) の総25(OH)D₃は, 健常者と比較して有意差が認められなかったが, 遊離型25(OH)D₃は慢性腎不全患者, 肝硬変患者で有意に低下していた。
3. LC-MS/MS 法 (遊離型25(OH)D₃) と市販 ELISA キット (遊離型25(OH)D 濃度) で限外濾過液, LC-MS/MS 法の標準液を測定したところ, 測定値に大きな乖離が認められた。

以上より, 総25(OH)D₃, 遊離型25(OH)D₃の関係性は, 疾患などの個体の状態によって異なる動態を示すことが示唆され, 遊離型25(OH)D₃測定による VD 欠乏状態や, 様々な病態の評価への応用が期待される。本方法を基準法として, ELISA 法やその他のイムノアッセイなどのハイスループットな測定系の評価を行うことができれば, より正確な遊離型25(OH)D₃測定を臨床検査に広く普及できる可能性がある。したがって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A Pilot Prospective Randomized Trial with Cancer Fatigue Scale and Juzentaihoto for Cancer-related Fatigue during Cisplatin-based Chemotherapy for Advanced Urothelial Carcinoma (進行尿路上皮癌に対するシスプラチンを用いた化学療法時の全身倦怠感に対して Cancer Fatigue Scale と十全大補湯を用いた予備的前向き無作為化試験)

道 面 尚 久

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 ゲムシタピン・シスプラチン併用療法 (GC 療法) は進行尿路上皮癌の標準的治療であるが, 施行された患者の約70%に有害事象として癌関連倦怠感 (Cancer-related Fatigue: CRF) を認める。CRF の正確な評価は困難であり, 治療, モニタリング方法の開発が必要である。CRF を評価する尺度として, Cancer Fatigue Scale (CFS) が報告されているが,

GC 療法中のモニタリングとして利用された報告はない。十全大補湯は, 貧血, 疲労を有する患者に処方され, 制癌作用が示唆されている。本研究では GC 療法中の進行尿路上皮癌患者の全身倦怠感を観察する新規手法として CFS を用い, 十全大補湯の全身倦怠感に対する治療効果について検討を行った。

【方法】 本研究は単施設前向き無作為化試験を行った。進行尿路上皮癌患者25人を試験に登録し, 十全大補湯

投与群とコントロール群に無作為に振り分けた。GC療法は、ゲムシタビン1000 mg/m²を1, 8, 15日目に、シスプラチン70 mg/m²を2日目に投与するレジメンで行われた。十全大補湯群には、GC療法開始から連続14日間、十全大補湯7.5 g / 日を1日3回、毎食前に経口投与し、コントロール群では経過観察のみを行った。患者全体および十全大補湯群とコントロール群のCFSを主要評価項目とした。総合的倦怠感とCFSサブスコアは、ベースラインであるGC療法開始前日の0日目から14日目まで観察された。2次評価項目は収縮期血圧、脈拍、食事摂取量とした。また、十全大補湯投与による副作用の発現と重症度を治療期間中に記録した。血液検査は0日目、7日目、14日目に実施した。すべての測定の基本ラインは、GC療法開始前日の0日目と設定した。

【結果】対象患者25名を十全大補湯投与群 (n=12) またはコントロール群 (n=13) に無作為に割り付けた。十全大補湯投与群では1名の患者が服薬継続困難で脱落した。また、各群1名ずつがCFSの記入が困難であったため脱落した。最終的に十全大補湯投与群10人、コントロール群12人を解析した。総合的倦怠感は、2日目から14日まで、ベースラインより有意に増加し、ピークは6日目と10日目に観察された。CFSサブスコアにも同様の傾向がみられた。十全大補湯投与群とコントロール群との比較では、1, 2, 3, 10, 11, 13, 14日目の総合的倦怠感、十全大補湯投与群でコントロール群に比べ有意に減少した。精神的倦怠感、9日目から13日目にかけて十全大補湯投与群で有意に減少した。収縮期血圧、脈拍数は観察期間中に有意な変化は認めず、両群間でも有意な差は認めなかった。一方、食事摂取量は6日目、10日目、14日目に有意に低下し、群間比較では、6, 10, 14日目の食欲減退は、十全大補湯投与群で有意に改善した。十全大補湯投与群では薬剤投与による重篤な有害事象や検査データの差は検出されなかった。

【結論】CFSはGC療法中の全身倦怠感の観察に有用と思われた。十全大補湯の投与は、進行尿路上皮癌に対する治療を受ける患者の全身倦怠感への対処に安全で有用な治療選択枝となりうるかが示された。CFSと十全大補湯投与の組み合わせは、進行尿路上皮癌患者のGC療法中のCRFを管理するための新しい治療戦略となる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

GC療法中の癌関連倦怠感 (CRF) の評価は困難で、治療、モニタリング方法の開発が必要である。CRFを評価する尺度として、Cancer Fatigue Scale (CFS) が報告されているが、GC療法中のモニタリングとして利用された報告はない。また、十全大補湯は、貧血、疲労、食欲不振に悩む欠乏症の患者に処方され、制癌作用が示唆されている。そこで道面はGC療法中の進行尿路上皮癌患者の全身倦怠感を観察する新規手法としてCancer Fatigue Scale (CFS) を用い、十全大補湯の全身倦怠感に対する治療効果について検討した。

その結果以下の結果を得た。

1. 進行尿路上皮癌患者25人を試験に登録し、最終的に十全大補湯投与群10人、コントロール群12人を解析した。
2. 総合的倦怠感、GC療法中ベースラインより有意に増加し、ピークは6日目と10日目の二峰性に増悪する所見が観察された。
3. 身体的倦怠感、すべての時点で、精神的倦怠感、6, 8日目で、認知的倦怠感、6, 7, 8日目に有意に増加した。
4. 十全大補湯投与群で全身倦怠感の有意な早期改善を認めた。
5. 十全大補湯投与群で身体的倦怠感、精神的倦怠感の有意な早期改善を認めた。
6. 十全大補湯投与群で食欲低下が有意に抑制された。
7. 収縮期血圧、脈拍数は観察期間中に有意な変化は認めず、両群間でも有意な差は認めなかった。
8. 十全大補湯投与による重篤な有害事象や血液検査データの差は検出されなかった。

以上より、CFSはGC療法中の全身倦怠感の観察に有用と思われた。十全大補湯の投与は、進行尿路上皮癌に対するGC療法中のCRFの対処に安全で有用な治療選択枝となりうることを示された。CFSと十全大補湯投与の組み合わせは、進行尿路上皮癌患者のGC療法中のCRFを管理するための新しい治療戦略となる可能性がある。したがって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Altered levels of salivary cytokines in patients with major depressive disorder (大うつ病患者における唾液サイトカインレベルの変化)

由井 寿美江

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 うつ病は抑うつ気分と興味・喜びの喪失という精神症状によって特徴づけられる、世界的に有病率の高い精神疾患である。この疾患による患者の心理的苦痛や社会の経済的損失は大きく、有効な治療法の開発は喫緊の課題である。現在、頻用されている抗うつ薬はモノアミン経路を標的としているが、うつ病患者への効果は限定的であり、複合的な治療によっても患者の3分の1は寛解に至らないのが実情である。うつ病の原因はいまだ特定されていないが、このことは、モノアミン仮説以外の病態生理学的経路が関与している可能性を示唆するものであり、その探求は新たな治療戦略につながる可能性がある。近年、精神障害と神経炎症との関連が指摘されるようになり、その知見が蓄積されつつある。うつ病患者の末梢血や脳脊髄液で炎症性サイトカインが上昇していることが多くの研究で示されている。炎症がうつ病の病態生理にどのように関与しているのかを明らかにするためには縦断的研究が必要であるが、複数回の検体採取は被験者および検体採取者の負担が大きいのが難点である。その点、唾液を検体として利用できれば、被験者自身が検体採取できるという簡便性、採血のように針を刺す必要のない非侵襲性という点で有用と考えられる。本研究の目的は、うつ病患者と健常者の唾液中サイトカインレベルの違いを調べ、うつ症状の重症度との関連、バイオマーカーとしての唾液サイトカインの有用性について探索することである。

【方法】 信州大学医学部附属病院等に通院中のうつ病患者19人と健常者50人に対し、3種類の自記式簡易検査(簡易抑うつ症状尺度(QIDS-SR-J)、ケスラー心理的苦痛尺度(K10)、アテネ不眠尺度(AIS))を実施した。被験者自身により採取された唾液検体は、multiplex bead array assayにより測定した。測定したサイトカインは、IL-1 β ; IL-1ra; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-12(p70); IL-13; IL-15; IL-17A; Chemokine CCL11(Eotaxin); FGF2; G-CSF; GM-CSF; IFN- γ ; TNF- α ; IP-10; MCP-1; MIP-1 α ; MIP-1 β ; PDGF-BB; RANTES; VEGFの27種類である。

【結果】 マン・ホイットニーのU検定により、IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-13, CCL11, MIP-1 α , RANTES, VEGFの値がうつ病患者において有意差が示された。また、性、年齢、検体採取時間などで調整した分位点回帰分析においてIL-1 β , IL-12p70, CCL11, VEGFの値がうつ病患者において有意に高いことが示された。

【考察】 うつ病患者の唾液でいくつかのサイトカインレベルが有意に上昇していることが示された。この結果は、うつ病患者における血液のサイトカインレベルの上昇を示したこれまでの報告と一致する部分があるが、現段階で唾液を血液の代用とするには慎重さが必要であり、今後さらなる検証を重ねる必要がある。今回の結果では、唾液サイトカインの上昇度とうつ症状の重症度との関連は見いだせなかった。本研究は、うつ病患者の唾液サイトカインレベルの変化に関する予備的な証拠を提供するものであり、唾液サイトカインがうつ病の病態生理を解明するための新たな研究対象となる可能性を示唆する。

(論文審査の結果の要旨)

うつ病の病態生理に神経炎症がどのように関与しているかを解明するためには縦断的研究が必要である。唾液は簡便性と非侵襲性という点で、縦断的研究の検体として有用と考えられる。うつ病患者の血液でサイトカインレベルが上昇しているという研究結果が蓄積されつつあるが、うつ病患者の唾液サイトカインレベルに同様の変化がみられるのかを網羅的に調べ、その上昇度はうつ病の重症度と関連するのか、唾液サイトカインがうつ病のマーカーになりうるかについて検討した。

その結果、以下の成績を得た。

1. うつ病患者の唾液サイトカインのうち、IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-13, CCL11, MIP-1 α , RANTES, VEGFが健常群と比較して有意差があった。
2. 性、年齢、検体採取時間、アッセイキットのロットナンバーで調整すると、IL-1 β , IL-12p70, CCL11, VEGFで有意な上昇がみられた。
3. 各群ともサイトカイン同士に相関がみられた。

4. うつ病群において AIS (アテネ不眠尺度) スコアと IL-13, Eotaxin (CCL11) に負の相関が認められた。

うつ病患者の唾液でサイトカインレベルの上昇が認められ、血液を検体とした研究結果と部分的に一致した。以上より、唾液と血液の違いについてはさらなる

検証が必要であるが、唾液サイトカインがうつ病の病態生理を解明するための新たな研究対象となる可能性、および将来的にうつ病のマーカーとして臨床応用される可能性がある。したがって、主査・副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Interferon regulatory factor-2 is required for the establishment of the gut intraepithelial T cell compartment (インターフェロン制御因子-2は腸管上皮内T細胞集団形成に重要である)

得丸重夫

(論文の内容の要旨)

腸管上皮内リンパ球 (iIELs: intestinal intraepithelial lymphocytes) は腸管上皮層に分布する不均一な T細胞集団であり、Conventional CD8 $\alpha\beta^+$ TCR $\alpha\beta^+$ T cellsに加えて、TCR $\gamma\delta$ を発現する TCR $\gamma\delta^+$ T cellsや TCR $\alpha\beta$ を発現するが、CD8 α ホモダイマーを発現する二つの Unconventional T cellが存在する。CD8 $\alpha\alpha^+$ iIELs は、腸管上皮のバリアを維持するために Conventional T cellとは異なった重要な役割を持つことが知られているが、この細胞の分化や成熟に関わる要因は十分には解明されていない。

2次リンパ器官で生成され、粘膜に移動するエフェクターメモリーT cellである CD8 $\alpha\beta^+$ TCR $\alpha\beta^+$ T cellsとは異なり、TCR $\gamma\delta^+$ と CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ iIELsは胸腺内の IEL 前駆細胞 (IELP) から直接発生すると考えられている。自己抗原による agonist selectionを受けた IELPは腸管粘膜に移動し、腸管で局所的に産生される interleukin-15 (IL-15) と transforming growth factor β (TGF- β) によって最終的に成熟する。本研究では、転写調節因子であるインターフェロン制御因子-2 (IRF-2) が、iIELs 集団を確立するために iIELs 細胞内で不可欠な機能を果たしていることを見出した。

フローサイトメトリーによる iIELs の解析では、IRF-2を欠くマウス (*Irf2*^{-/-}マウス) では、TCR $\gamma\delta^+$ T cellsは極端に減少していた。一方、TCR $\alpha\beta^+$ T cells全体の細胞数は増加していたが、そのうち Unconventional CD8 $\alpha\alpha^+$ T cellsの数は減少していた。IRF-2には type I interferon (IFN-I) シグナルを減弱する機能がある、IFN-I と IRF-2の欠損した二重変異マウスでも同様の iIELs の変化を認め、IFN-Iとは無関係な機能であると考えられた。*Irf2*^{-/-}マウスに残存する CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ iIELsの大部分は成熟した iIELsで高発現する T-betの発現が低く、また Thy1.2^{high}

phenotypeであり、未熟な細胞であることがわかった。*Irf2*^{-/-}マウスから採取した骨髄細胞を用いた骨髄移植実験では、CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ および TCR $\gamma\delta^+$ iIELsを効率的に生成することが出来なかった。逆に *Irf2*^{-/-}マウスに野生型の骨髄細胞を移植する実験では、正常に iIELs が生成され、環境ではなく細胞内の IRF-2が成熟に重要であることが示された。胸腺細胞の移植実験でも同様の結果が得られ、胸腺内の IELPで IRF-2が重要な役割をしていることが考えられた。

胸腺内の IELP の総数は対照マウスと有意差を認めなかったが、表現型に変化が認められ前駆細胞の分化に異常があることが示唆された。IELPを含む胸腺細胞を IL-15刺激下で培養する in vitroの実験で、*Irf2*^{-/-}マウス由来の細胞から CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ 細胞を効率的に生成することが出来ず、IRF-2が IL-15の応答性を制御して iIELsの分化を促進していると考えられた。しかし、IL-15と IRF-2の両方を欠損した二重変異マウスでも、IL-15だけを欠損したマウスよりもさらに深刻な iIELs の欠損が見られ、IL-15とは独立した IRF-2の役割もあると考えられた。

agonist selectionを促進することが知られている、OT-II TCR トランスジェンを導入したところ対照マウスでは CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ iIELsはより効率的に成熟、生成され、*Irf2*^{-/-}バックグラウンドでも総数は増加した。しかし、iIELsの詳細を検討すると *Irf2*^{-/-}バックグラウンドでは Thy1.2^{high} phenotypeが多く、未熟なままであった。したがって、IRF-2は胸腺内での agonist selectionに加えて、それとは独立して末梢での成熟においても重要な役割をしていることが示唆された。

以上のように、本研究では、IRF-2の TCR $\gamma\delta^+$ と CD8 $\alpha\alpha^+$ TCR $\alpha\beta^+$ iIELsの分化、成熟に重要な役割を担っており、IRF-2は胸腺の IELPの分化と、IL-15依存的、非依存的に末梢の iIELsの成熟を促進するユ

ニークな二面的な機能を持つことが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

得丸重夫の共同研究者らは、*Irf2*^{-/-} mice を用いて NK 細胞などの免疫細胞と IRF-2 の関連性を解明してきた。腸管上皮内リンパ球 (iIELs) は腸管上皮層に分布する T 細胞集団で、Conventional な CD8αβ⁺ TCRαβ⁺ T cells と TCRγδ⁺ や CD8αα⁺ TCRαβ⁺ の二つの Unconventional な T cells が存在する。

本研究では、*Irf2*^{-/-} mice に様々な遺伝子変異を導入したマウスの解析、細胞移植、IL-15 刺激培養実験や mRNA 解析などで iIELs の分化、成熟について検討した。

その結果、得丸重夫は以下の結論を得た。

1. *Irf2*^{-/-} mice では iIELs 中の Conventional T cells 増加、Unconventional T cells 減少を認め、CD8αα⁺ TCRαβ⁺ iIELs は未成熟であった。
2. *Irf2*^{-/-} mice の骨髓、胸腺細胞を T cells の存在しない *Rag1*^{-/-} mice に移植する実験で再現され、*Irf2*^{-/-} *Rag1*^{-/-} mice recipient では再現されなかった。
3. *Irf2*^{-/-} mice では胸腺内で IELP の成熟が障害さ

れていた。

4. OT-II transgenesis による agonist selection 強化では、CD8αα⁺ TCRβ⁺ iIELs の分化が部分的に回復したが、末梢の細胞数と成熟は回復しなかった。
 5. *Irf2*^{-/-} 由来の IELP から IL-15 刺激で CD8αα⁺ iIELs を効率的に誘導できなかった。
 6. IL-15 非存在下でも *Irf2*^{-/-} mice で iIELs 中の Unconventional T cells 減少と成熟障害が観察された。
- 以上より IRF-2 は腸管上皮内 T 細胞集団の形成において、Cell-intrinsic に必要とされ、胸腺内での agonist selection による IELP の成熟に重要な役割を担っているだけでなく、末梢の腸管内の環境でも IL-15 に依存性、非依存性の 2 つの経路で関与していることがわかった。腸管上皮内 T 細胞集団は、様々な自己免疫性炎症疾患や抗腫瘍免疫応答に影響を与える腸管の恒常性維持に重要な細胞であり、その分化機構の一端を解明した本研究は、この細胞集団の人為的制御による治療法の開発に重要な情報を提供するものであり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Reduction of Severe Hypoglycemic Events Among Outpatients with Type 2 Diabetes Following Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Marketing in Japan (Sodium-Glucose Cotransporter 2 阻害薬上市後に本邦における 2 型糖尿病患者の重症低血糖頻度が減少した)

山下 浩

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、新しい機序の血糖降下作用を有する経口糖尿病薬が次々と上市されてきた。この背景には、より安全で、より有効な血糖コントロールを目指していることがある。糖尿病に関連した合併症の発症・進展を阻止するためには、厳格な血糖管理が必要であることが指摘されているが、その一方で、心血管系をはじめ、薬剤による Adverse event に対する配慮も求められている。特に、投薬加療中における薬剤性低血糖症については、意識障害などを呈し、生命に直結しうる危険性を有するのみならず、近年の研究では、認知症や「生活の質」の低下とも密接に関連していることが指摘されている。そのため、実臨床の場においては、低血糖症を回避しつつ、かつ良好な血糖管理を得ることが極めて重要である。本邦では、2009年に dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (DPP4 阻害薬) が、2014年に sodium-glucose co-transporter 2 inhib-

itor (SGLT2 阻害薬) が発売された。DPP4 阻害薬は摂食時に腸管壁から分泌されるインクレチン (K 細胞から分泌される GIP と L 細胞から分泌される GLP-1) を分解する DPP-4 を阻害することにより、血糖依存性にインスリンを分泌すると考えられている。日本糖尿病学会雑誌である「糖尿病」に掲載された 2 型糖尿病の薬物療法のアルゴリズムでも、低血糖リスクは低く、「血糖依存性インスリン分泌促進作用を有する」と考えられている。一方の SGLT2 阻害薬は近位尿細管に発現している SGLT2 を阻害することにより、尿糖排泄量を増加させることで、インスリン非依存的に血糖降下作用を有する薬剤である。この薬剤も、単独での低血糖リスクは低いと考えられている。より安全な治療方法の検討を目的とし、今回、当院救命救急センターを受診した重症低血糖患者について、その経時的変遷と治療方法の推移について検討を実施した。

【方法】本研究では、2008年1月1日から2019年12月

31日までの12年間に相澤病院救命救急センターを受診した553,201人の中から低血糖症を診断された20歳以上の1,185名を抽出し、さらに血糖値が59.4 mg/dL (3.3 mmol/l) 以下を確認できた648名を抽出した。そこからさらに第三者支援を必要とする重症低血糖症の1型糖尿病患者60名、2型糖尿病患者437名を研究対象とした。各年の低血糖患者人数を算出し、日本全国の各経口血糖降下薬の年毎の処方動向との関連について分析を行った。

【結果と考察】 研究期間の12年の間に、1型および2型の糖尿病患者における重症低血糖患者数は、2010年の61名/年をピークとして、2019年には39人に減少を認めていた。その内訳としては、1型糖尿病の低血糖患者数は明らかな低下傾向は認めず、2型糖尿病の重症低血糖患者数について減少傾向を認めていた。

次に、低血糖症のために単剤での加療を受けていた患者について検討を行った。その結果、インスリン製剤もしくはスルホニル尿素薬が多かったが、一部にDPP4阻害薬単剤服用患者が含まれていた。

さらに、2型糖尿病の重症低血糖患者数の減少傾向について、DPP4阻害薬、およびSGLT2阻害薬について、低血糖の年間人数と、その薬剤カテゴリーのシェアの推移に関連性があるかどうかについて、検討を行った。方法としては、発売前年から発売後4年の計5年の重症低血糖患者数の変化と薬剤シェアの推移との関連について、Jonkheere-Terpstraの傾向検定で検討した。

DPP4阻害薬については、上市後急速にそのシェアの拡大を認めたが、上市する前年から上市後4年間では低血糖患者数について、有意な低下は認めなかった。一方で、SGLT2阻害薬については、上市前年から上市後4年間で低血糖患者数の低下を認め、その低下については、SGLT2阻害薬のシェアの増加と有意な相関を認めていた。

以上の結果から、2型糖尿病の重症低血糖患者数の変化について、経年的に減少傾向であること、そしてその変化については、一般的に低血糖リスクが低いとして急速に普及したDPP4阻害薬の影響ではなく、SGLT2阻害薬のシェアの増加と有意に関連していることがわかった。

【結論】 一般臨床現場において、DPP4阻害薬の低血糖リスクが過小評価されている可能性、すなわち、相応の低血糖リスクがありえることを示唆しており、処方の際にそのリスクを念頭に置いた治療開始後の注意

が必要であることを意味していると考えた。一方で、SGLT2阻害薬については、上市後急速に低血糖患者数が低下しており、DPP4阻害薬発売後の経過と比較すると、低血糖リスクは低く、比較的 safely に使用できるとことを意味していると考えた。

(論文審査の結果の要旨)

本邦において、糖尿病、特に2型糖尿病に対する治療方法は日進月歩の進化を認めている。

近年上市されたDPP4阻害薬とSGLT2阻害薬は急速にその処方割合を増加させている。

とりわけ、SGLT2阻害薬については糖尿病以外の疾患(心不全や慢性腎臓病)に対する保険適応の承認が進むなど、糖尿病治療の枠組みを超えて、その有用性が指摘されている。

一方で、治療強化と低血糖の危険性は以前から指摘されており、ときに重症低血糖症が生命予後のみならず、認知機能低下などへの影響もあることが分かってきている。

そこで、山下は重症低血糖症がどのように変化してきているのかについて、相澤病院救命救急センターに搬送された重症低血糖症患者についての解析を行った。

そして、以下の結果を得た。

1. 2008年から2019年の間に低血糖患者数の減少を認めた。
2. 2型糖尿病の重症低血糖患者は1型糖尿病の重症低血糖患者より高齢でありeGFRは低かった。
3. 2型糖尿病重症低血糖患者数は減少していたが1型糖尿病重症低血糖患者数は明確な変化は認めなかった。
4. 2型糖尿病重症低血糖患者はスルホニル尿素薬を内服している患者とインスリン療法を実施している患者が多かった
5. 単剤治療での重症低血糖患者の解析において、投与されていた薬剤としてはインスリンとスルホニル尿素薬が多かったが、一部DPP4阻害薬が含まれていた。
6. DPP4阻害薬は2009年12月に上市されてから2012年にかけて急速にそのシェアを増加させていた
7. SGLT2阻害薬は2014年4月に上市されて比較的速やかにそのシェアを増加させていた。
8. DPP4阻害薬の発売前年と発売後4年間においては、明らかな低血糖患者の減少傾向は確認できなかった。
9. SGLT2阻害薬の発売前年と発売後4年間におい

て、SGLT2阻害薬のシェアの変化と重症低血糖患者人数については明らかな逆相関を認めていた。

以上より、SGLT2阻害薬は低血糖リスクの減少にも寄与している可能性があると考えた。その一方で、DPP4阻害薬は、その作用機序からは低血糖リスク軽減が期待された。しかし、本研究の結果からは、DPP4阻害薬のシェアが拡大しても低血糖患者数の減少は認めず、そのリスク軽減には関与していないと考えた。また、ごく少人数ながらも、単剤での治療患者

において、重症低血糖患者が認められたことは、DPP4阻害薬単独治療の際にも低血糖症については留意する必要があると考えた。

このことは、2型糖尿病の低血糖リスクを考慮した薬剤選択の際に、どの薬剤を選択することがより安全であるかについての示唆を与えており、臨床的な意義があると考えた。

従って、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。