

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成28年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目 次

平成28年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第540号	山 本 直 之	CEACAM1 and hollow spheroid formation modulate the chemosensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil. (大腸癌における CEACAM1 および hollow spheroid 形成と 5-fluorouracil に対する抗癌剤感受性に関する検討)	1
博(医)甲第541号	糸 永 昌 弘	Novel methodology for rapid detection of KRAS mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification (PNA-LNA mediated LAMP 法を用いた KRAS 点変異の迅速検出法の開発)	4
博(医)甲第542号	丸 山 希 実子	Evaluation of arteriosclerosis using the brachial-ankle pulse wave velocity in patients with visceral lesion-free systemic lupus erythematosus characterized by skin lesions (皮膚病変主体で内臓病変を伴わない SLE 患者の baPWV による動脈硬化の評価)	8
博(医)甲第543号	長 島 康 洋	Effects of soybean ingestion on pharmacokinetics of levodopa and motor symptoms of Parkinson's disease - In relation to the effects of Mucuna pruriens (大豆の摂取がパーキンソン病患者の levodopa の薬物動態と運動症状に与える影響について—八升豆との比較)	1 1
博(医)甲第544号	竹 島 健	Elevated serum immunoglobulin G4 levels in patients with Graves' disease and their clinical implications. (バセドウ病患者における血清 IgG4 値上昇とその臨床的意義)	1 3
博(医)甲第545号	北 畑 裕 司	Circulating nano-particulate TLR9 agonist scouts out tumor microenvironment to release immunogenic dead tumor cells (ナノ粒子を形成する TLR9 アゴニストは、全身を循環し、腫瘍環境を標的とすることで、免疫細胞死を誘導する)	1 5
博(医)甲第546号	西 口 毅	Local Matrix Metalloproteinase 9 Level Determines Early Clinical Presentation of ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction (冠動脈プラーク局所のマトリックスメタロプロテイナーゼ9濃度が急性心筋梗塞の臨床表現型を決定	

	する) ……………	1 9
博(医)甲第547号	岩橋弘樹 The association between the cross-sectional area of the dural sac and low back pain in a large population: The Wakayama Spine Study (一般地域住民における硬膜管面積と腰痛の関連-The Wakayama Spine Study-) ……………	2 2
博(医)甲第548号	河上和紀 Persistent fibroblast growth factor 23 signalling in the parathyroid glands for secondary hyperparathyroidism in mice with chronic kidney disease (慢性腎臓病マウスにおける副甲状腺への長期的な FGF23 シグナルは二次性副甲状腺機能亢進症を発症させる)……………	2 4
博(医)甲第549号	中島悠里 Expression and localization of Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 and Klotho in the spleen: Its physiological and functional implications (脾臓における FGF23 とそのリガンドである Klotho の発現部位および生物学的役割) ……………	2 8
博(医)甲第550号	曾根勝真弓 Interferon-gamma potentiates NMDA receptor signaling in spinal dorsal horn neurons via microglia-neuron interaction (インターフェロンγはミクログリアを介して脊髄後角細胞の NMDA 電流を増強する) ……………	3 1
博(医)甲第551号	浅野真里絵 Determination of the structures of radicals formed in the reaction of antimalarial drug artemisinin with ferrous ions (抗マラリア薬 アルテミシニンと2価鉄イオンとの反応において生成されたラジカル種の同定) ……………	3 4
博(医)甲第552号	増本明日香 Calcium overload accelerates phosphate-induced vascular calcification via Pit-1, but not calcium-sensing receptor (過剰カルシウムは、CaSR ではなく、Pit-1 を介して、リンが導く血管石灰化を促進する。) ……………	3 8
博(医)甲第553号	細川聖記 Optimal scanning timing by use of multi-detector row computed tomography during thoracic aortography for depiction of arteries causing hemoptysis (咯血の原因となる動脈を描写するための胸部大動脈造影 CT を用いた最適な撮影タイミングの検討) ……………	4 1
博(医)甲第554号	岡本健二郎 Effect of interleukin-1beta and dehydroepiandrosterone on the expression of lumican and fibromodulin in fibroblast-like synovial cells of the human temporomandibular joint (顎関節滑膜線維芽細胞様細胞における	

		Dehydroepiandrosterone に対する Lumican 及び Fibromodulin の発現) ……………	4 3
博(医)甲第555号	貴志真也	Achilles tendon injury in Kendo players in junior and senior high schools: with a focus on foot function (ジュニア剣道選手のアキレス腱傷害に対する一考察～足部機能の検討～) ……………	4 6
博(医)甲第556号	岩根直美	Altered Calcium Handling in Peripheral Nerve Terminals and Blood Vessels in Spontaneously Hypertensive Rats. (高血圧自然発症ラットの末梢神経終末および血管床におけるカルシウム・ハンドリングの異常) ……………	4 8
博(医)乙第937号	出口久暢	Argon plasma coagulation is effective for prevention of recurrent esophageal varices after endoscopic injection sclerotherapy : Single-center case-control study (アルゴンプラズマ凝固は内視鏡的食道静脈瘤硬化療法後の食道静脈瘤の再発予防に有効である : Single-center case-control study) ……………	5 1
博(医)乙第938号	三井利仁	Exercise Significantly Increases Plasma Adrenaline and Oxidized Low-Density Lipoprotein in Normal Healthy Subjects But Not in Persons With Spinal Cord Injury (脊髄損傷者の運動負荷における酸化 LDL の動態について) ……………	5 4
博(医)乙第939号	津田祐子	An electroclinical study of absence seizures in Dravet syndrome (ドラベ症候群における欠神発作の脳波的・臨床的研究) ……………	5 8
博(医)乙第940号	石田和也	Suppression of activation of muscle sympathetic nerve during non-noxious local cooling after the end of local cooling in normal adults (健常成人においてマイルドな局所冷却後に筋交感神経活動は抑制される) ……………	6 1
博(医)乙第941号	荒川英樹	The hypothalamic arcuate nucleus: a new site of cardiovascular action of angiotensin-(1-12) and angiotensin II (視床下部弓状核 : アンジオテンシン-(1-12)とアンジオテンシン II が循環調節機能に関与する新規部位) ……………	6 4
博(医)乙第942号	岩谷潤	Use of T1-weighted/T2-weighted magnetic resonance ratio images to elucidate changes in the schizophrenic brain (MRI の T1 強調/T2 強調比を用いた統合失調症患者の脳内変化の検討) ……………	6 5

博(医)乙第943号	国本佳代	The continued use of sunscreen prevents the development of actinic keratosis in aged Japanese subjects. (高齢日本人におけるサンスクリーン剤の継続使用は日光角化症の進展を抑制する) ……………	68
博(医)乙第944号	延興良夫	Radiographic natural course of lumbar degenerative spondylolisthesis and its risk factors related to the progression and onset in a 15-year community-based cohort study: the Miyama study (腰椎変性すべりの X 線学的な自然経過と進行・発生の危険因子—地域住民コホートをを用いた 15 年の縦断的研究より—) ……………	71
博(医)乙第945号	田村彰	Total parenteral nutrition treatment efficacy in adolescent eating disorders (思春期摂食障害への中心静脈栄養療法の効果) …	73
博(医)乙第946号	太田慎吾	Association between Hyperglycemia at Admission and Microvascular Obstruction in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (ST 上昇型心筋梗塞患者における来院時高血糖と冠微小循環障害の関連) ……………	76
博(医)乙第947号	山口智由	Optical coherence tomography assessment of efficacy of thrombus aspiration in patients undergoing a primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction (直接的冠動脈インターベンションを施行した ST 上昇型心筋梗塞患者における血栓吸引療法の有用性に対する光干渉断層法による検討) ……………	80
博(医)乙第948号	松中浩	Non-invasive quantification of melanin in the stratum corneum: a novel indicator of skin lesions in pigmentation diseases (皮膚色素沈着症の新しい病勢指標となりうる角層中メラニンの非侵襲的定量) ……………	84
博(医)乙第949号	田中文浩	1.Balloon-assisted packing of wide-neck aneurysms with a mixture of n-butyl cyanoacrylate, Lipiodol, and ethanol:An experimental study 2.Effect of transcatheter arterial embolization with a mixture of n-butylcyanoacrylate, lipiodol, and ethanol on the vascular wall:macroscopic and microscopic studies (1.NBCA-lipiodol-ethanol 混合物 (NLE) による wide-neck の動脈瘤に対するバルーンアシスト法を用いた充填術の実験的検討)	

		(2.NBCA-lipiodol-ethanol 混合物(NLE)を使用した動脈塞栓術後の血管の観察-肉眼的、組織学的検討) …	8 7
博(医)乙第950号	森 喬 史	Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population (G2/M 期関連抗原を標的とした癌免疫療法の効果に関する検討) …	9 1
博(医)乙第951号	八 木 重 孝	Primary tumor SUVmax on preoperative FDG-PET/CT is a prognostic indicator in stage IA2-IIB cervical cancer patients treated with radical hysterectomy (広汎子宮全摘術を施行した子宮頸癌 IA2-IIB 症例の術前 FDG-PET/CT による SUVmax 値は予後予測因子である。) …	9 3
博(医)乙第952号	峰 巨	Synaptic modulation of excitatory synaptic transmission by nicotinic acetylcholine receptors in spinal ventral horn neurons (脊髄前角ニューロンにおけるニコチン性アセチルコリン受容体による興奮性シナプス伝達制御機構) …	9 6
博(医)乙第953号	末 永 智 浩	Detection of multiple superantigen genes in stools of patients with Kawasaki Disease (川崎病急性期患児の便中から複数スーパー抗原遺伝子が検出される意義) …	9 9
博(医)乙第954号	篠 原 裕 志	Inhibition of fibrous adhesion formation in the temporomandibular joint of tenascin-C knockout mice (テネイシン C ノックアウトマウスにおける顎関節線維性癒着の抑制) …	102
博(医)乙第955号	前 田 義 政	Video capsule endoscopy as the initial examination for overt obscure gastrointestinal bleeding can efficiently identify patients who require double-balloon enteroscopy (顕性原因不明消化管出血に対し小腸カプセル内視鏡を先行して実施すればダブルバルーン小腸内視鏡を必要とする患者を効率よく特定できる) …	105
博(医)乙第956号	土 井 直 孝	Acute-phase effects of single-time topical or systemic corticosteroid application immediately after hot water-induced burn injury of various grades (熱湯による初期の各グレード熱傷に対するステロイドの局所および、全身投与の影響の検討) …	107
博(医)乙第957号	貴 志 知 生	Expression of chemokine receptors in angiosarcoma (血管肉腫におけるケモカインレセプターの発現) …	110

博(医)乙第958号 福井大輔	Gait abnormality due to spinal instability after lumbar facetectomy in the rat. (ラット腰椎椎間関節切除後脊椎不安定性モデルに おける歩行異常)	113
-----------------	---	-----

学位記番号	博(医)甲第540号		
学位授与の日	平成28年4月12日		
氏名	山本 直之		
学位論文の題目	CEACAM1 and hollow spheroid formation modulate the chemosensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil. (大腸癌における CEACAM1 および hollow spheroid 形成と 5-fluorouracil に対する抗癌剤感受性に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 一瀬 雅夫	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

緒言

Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1)は上皮細胞や血球系細胞、血管内皮細胞に発現するI型膜貫通型糖蛋白であり、Immunoglobulin super family, CEA familyに属する接着分子である。3個または4個の細胞外ドメインと long isoform または short isoform の細胞内ドメインを有する。

大腸癌において、long cytoplasmic domain isoform 優位のものにはリンパ節及び血行性に転移しやすく、生存率も不良であることが報告されている。また3次元培養下での特徴的な形態、中空を伴う球体 (HS:Hollow spheroid) が大腸癌の臨床検体に存在し、long cytoplasmic domain isoform の発現が大腸癌先進部でのHS形成に関与すること、腫瘍先進部でのHSの存在が転移・予後の独立因子となり、悪性度診断に重要であることが報告されている。CEACAM1の細胞内ドメインバランスとHS形成が大腸癌の悪性度と相関することから、CEACAM1の細胞内ドメインバランスやHS形成の変化により抗癌剤に対する感受性が変化する可能性が考えられる。

本研究は、大腸癌におけるCEACAM1およびHS形成が大腸癌の抗癌剤の一つである5-fluorouracil (5FU)に対する感受性への影響について検討した。

対象と方法

【基礎的研究】

CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance が抗癌剤感受性に関与するかを検討するために、大腸癌培養細胞株を用いて基礎的検討を行った。

CEACAM1を中等度発現する大腸癌培養細胞HT29と、CEACAM1-Lを強度発現するLS174Tを使用した。HT29細胞にCEACAM1-4L, CEACAM1-4Sを強制発現させ、cytoplasmic domain isoform balanceを変化させて培養した。それぞれに抗癌剤(5FU)を投与し、その生細胞数を経時的に観察した。またLS174T細胞にCEACAM1-4Sを強制発現させ、CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balanceを変化させた細胞と、shRNAを用いてCEACAM1をknock downさせた細胞を使用して、5FUへの感受性を検討した。

さらにHS形成と抗癌剤(5FU)との関連を検討するため、3次元培養下での5FUへの感受性について検討した。マトリゲルを用いて遺伝子導入したHT29, LS174Tを培養し、HSの形成を確認した後5FUを投与し、その形態変化について経時的に観察した。

【臨床的研究】

<対象>

2002年から2003年の間に和歌山県立医科大学附属病院第2外科にて手術を施行した大腸癌症例164人のうち、5FUによる術後補助化学療法を施行したStageIII症例82人を対象とした。

<免疫組織化学染色>

ホルマリン固定パラフィン包埋保存された標本から薄切切片を作成し、CEACAM1 mouse monoclonal antibody [29H2] (Abcam, USA)により免疫組織化学染色を施行した。腫瘍先進部において、HS形成の見られる標本をHS陽性群とした。

<解析>

臨床病理学的因子（年齢、性別、腫瘍部位、分化度、深達度、リンパ管浸潤、血管浸潤、簇出、HS）と再発について、また HS と予後について検討した。統計学的処理として、再発に関しては χ^2 乗検定、ロジスティック回帰モデルによる解析を行った。HS 陽性と生存率との相関は log rank test および Kaplan-Meier 法で検討した。

結果

【基礎的研究】

① CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance と抗癌剤感受性についての検討

CEACAM1 を中等度発現する HT29 細胞の cytoplasmic domain isoform balance を変化させ、それぞれに抗癌剤(5FU)を投与したところ、long cytoplasmic domain isoform は short cytoplasmic domain isoform と比較して優位に抗癌剤抵抗性を示した($p<0.05$)。CEACAM1-4L を強度発現する LS174T 細胞の cytoplasmic domain isoform balance を変化させ、それぞれに抗癌剤(5FU)を投与したところ、vector control は short cytoplasmic domain isoform および knock down させたものよりも優位に抗癌剤抵抗性を示した($p<0.001$)。

② Hollow spheroid 形成と抗癌剤感受性に関する検討

3 次元培養下において cytoplasmic domain isoform balance を変化させた HT29 細胞、LS174T 細胞に抗癌剤(5FU)を投与したところ、HS 陰性の細胞では優位に sphere の崩壊が見られた($p<0.001$)。sphere 崩壊が見られた細胞を Annexin V-FITC 染色したところ、apoptosis の発生が見られた。

【臨床的研究】

Hollow spheroid 形成と再発および予後について

5FU による術後補助化学療法を施行した Stage III 症例 82 人について臨床病理学的因子と再発について解析したところ、HS 形成が重要な因子として挙げられた($p<0.001$)。また Kaplan-Meier 法で HS 形成の有無で生存率を比較したところ、HS 陽性で優位に予後不良であった ($p<0.001$)。

考察・結語

これまで、大腸癌では CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance が悪性度と関連し、大腸癌浸潤先進部での CEACAM1-long cytoplasmic domain isoform の強いものが転移や浸潤に影響することが報告された。また Hollow spheroid の存在が転移・予後の独立因子となり、悪性度診断に重要であることが報告されている。本研究において、CEACAM1-long cytoplasmic domain isoform および Hollow spheroid が抗癌剤(5FU)に対する抵抗性を示すことが示唆された。さらに抗癌剤による apoptosis を制御し、転移・再発や予後にも関与していることが明らかになった。

臨床的検討により、腫瘍先進部の Hollow spheroid 形成は、根治手術および補助化学療法が施行されている症例においても再発傾向を予測できる因子であり、HS 形成により 5FU に対し抵抗性となっている可能性がある。基礎的検討から CEACAM1-short cytoplasmic domain isoform 優位な大腸癌細胞では抗癌剤感受性が高いことが示されたことから、大腸癌における CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance と hollow spheroid が 5FU 抵抗性を改善するターゲットとなる可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成28年3月23日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

大腸癌において、CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform(CEACAM1-L)優位のものリンパ節及び血行性に転移しやすく、生存率も不良であることが報告されている。また3次元培養下での特徴的な形態、中空を伴う球体(HS:Hollow spheroid)が大腸癌の臨床検体に存在し、CEACAM1-Lの発現が大腸癌先進部でのHS形成に関与すること、腫瘍先進部でのHSの存在が転移・予後の独立因子となり、悪性度診断に重要であることが報告されてきた。CEACAM1の細胞内ドメインバラ

ンスと HS 形成が大腸癌の悪性度と相関することから、CEACAM1 の細胞内ドメインバランスや HS 形成の変化により抗癌剤に対する感受性が変化する可能性が考えられる。本研究は、大腸癌における CEACAM1 および HS 形成が大腸癌の抗癌剤の一つである 5-fluorouracil (5FU) に対する感受性への影響について検討した。

CEACAM1 cytoplasmic domain isoform balance が抗癌剤感受性に関与するかを検討するために、大腸癌培養細胞株を用いて基礎的検討を行った。CEACAM1 を中等度発現する HT29 細胞の cytoplasmic domain isoform balance を変化させ、それぞれに抗癌剤(5FU)を投与したところ、CEACAM1-L は short cytoplasmic domain isoform(CEACAM1-S)と比較して優位に抗癌剤抵抗性を示した($p < 0.05$)。また CEACAM1-L を強度発現する LS174T 細胞の cytoplasmic domain isoform balance を変化させ、それぞれに 5FU を投与したところ、vector control は CEACAM1-S および shRNA を用いて CEACAM1 発現を knock down させたものよりも優位に抗癌剤抵抗性を示した($p < 0.001$)。

3次元培養下において cytoplasmic domain isoform balance を変化させた HT29 細胞、LS174T 細胞に 5FU を投与したところ、HS 陰性の細胞では優位に sphere の崩壊が見られた($p < 0.001$)。sphere 崩壊が見られた細胞を Annexin V-FITC 染色したところ、apoptosis の発生が見られた。

次に、5FU による術後補助化学療法を施行した大腸癌 Stage III 症例 82 人を対象に、臨床病理学的因子(年齢、性別、腫瘍部位、分化度、深達度、リンパ管浸潤、血管浸潤、簇出、HS)と再発について解析すると、HS 形成が重要な因子として挙げられた($p < 0.001$)。また HS と予後について、Kaplan-Meier 法で HS 形成の有無で生存率を比較したところ、HS 陽性で優位に予後不良であった($p < 0.001$)。

以上の結果より、CEACAM1-L および HS が 5FU に対する抵抗性を示すことが示唆された。さらに抗癌剤による apoptosis を制御し、転移・再発や予後にも関与していることが明らかになったことから、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第541号		
学位授与の日	平成28年4月12日		
氏名	糸永 昌弘		
学位論文の題目	Novel methodology for rapid detection of <i>KRAS</i> mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification (PNA-LNA mediated LAMP 法を用いた <i>KRAS</i> 点変異の迅速検出法の開発)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 村田 晋一

論文内容の要旨

緒言

現在、悪性腫瘍の病理診断や臨床的治療において、遺伝子点突然変異の有無は非常に大きな役割を果たしている。たとえば、*KRAS* のコドン 12, 13 の点変異は膵管癌の 80-90%、大腸癌では 35-50% に認められ、膵管癌では、超音波内視鏡下穿刺吸引術において、細胞診と *KRAS* 点変異の有無を組み合わせることにより、診断能を向上させることが報告されており、大腸癌では、*KRAS* 点変異の有無により、分子標的薬の治療効果に差があることが報告されている。このように、現在の実地臨床においては、*KRAS* の点変異の有無を解析することは非常に重要である。遺伝子点変異を診断する方法は数多く報告されているが、臨床現場で使用するには2つの大きな条件が挙げられる。一つ目に、臨床検体では、腫瘍細胞と多くの正常細胞が混在するため、可能なかぎり感度の高い診断法が必要であること、2つ目に、できる限り早急に診断、治療に結びつけるために、迅速に結果がでる必要がことである。この2つの条件を満たす方法として、我々は LAMP 法に着目した。LAMP 法は、迅速で感度の高い方法として、2000 年に開発され、一定温度で 60 分以内に検体を増幅させることができ、目視で増幅の有無を判定することも可能な方法である。元来、細菌やウイルスの診断に用いられてきたが、臨床現場への応用として、乳癌患者のリンパ節転移の有無を術中に診断する方法 (OSNA 法) が一般化している。しかし、LAMP 法で点変異を診断する方法は一般化していない。そこで我々は、PCR 法で用いられている PNA-LNA clamp 法の手法を LAMP 法に応用し、迅速で感度の高い点変異の診断法を開発したのでここに報告する。

対象と方法

1. 実験 1

KRAS exon2 codon12 をターゲットにした 4 種類のプライマー、PNA プローベ、LNA プライマーを作成し、4 種類の膵癌培養細胞を用いて、PNA-LNA clamping LAMP の点変異の診断能、感度、点変異の種類別の診断能について検討した。

1) 膵癌由来培養細胞

KRAS 遺伝子が野性型である細胞と点突然変異をもつ細胞の計 4 種類の膵癌由来培養細胞を用いた。

BxPC-3-Luc#2 (Bx)	: codon 12 wild type
Panc-1	: codon 12 GGT>GAT [G12D]
HS766T	: codon 12 wild type
QGP-1	: codon 12 GGT>GTT [G12V]

2) 培養細胞からの *KRAS* 遺伝子の c-DNA の作成

各サンプル RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、GoScript Reverse Transcription System (Promega) にて c-DNA を合成した。

3) PNA-LNA clamping LAMP 法の原理

ターゲット遺伝子を増幅させるため、6つの領域とそれを認識する4つのプライマーを設計した。Codon12領域はB1、B2間に設計した。次に、wild typeに相補となるようにPNAプローベを設計し、mutation typeに相補となるようにLNAプライマー(2種類)を設計した。サンプルがwild typeであった場合、PNAが安定した相補鎖を形成するため、LNAプライマーが結合できず、LAMPの反応が停止し、増幅されなくなる。それに対して、サンプルがmutation typeであった場合、PNAが相補鎖を形成されず、LNAプライマーが結合するため、LAMPの反応が進む。これにより、点変異の有無を診断できる。

4) LAMP法プライマーの作成

4つのLAMPプライマーはPrimerExplorer V4 (Eiken Chemical)にて作成した。PNAプローベはwild typeに相補となるようにPANAGENE (Korea)に設計を依頼した。LNAプライマー(2種類)はmutation typeに相補となるようにEXIQON (Denmark)に設計を依頼した。

5) PNA-LNA clamping LAMP法

LAMP反応液はBest DNA polymerase (8 units, Nippon gene)、dNTPs Mixture (1.4mM each, Nippon gene)、YO-PRO-1 (312.5nM, life technology)、プライマー (40umol FIP、40umol BIP、5umol F3、5umol B3、20umol LNA、5umol PNA)とした。PNAプローベを除いたサンプルをpositive controlとし、cDNAを除いたサンプルをnegative controlとし、一緒に反応させた。LAMP反応は65度一定で38サイクル(50分)とし、反応物はリアルタイムPCR観測装置(MyIQ, BioRad)で測定した。最後に95度で5分反応させた。RFU値が100を超えたthreshold cycle (CT)値で分析を行った。

6) PNA-LNA clamping LAMP目視法

Fluorescent Detection Reagent (1ul) (Loopamp)を反応液に追加し、LAMP反応を行った。反応後、チューブをUV light下で目視した。positive controlと同様に緑色になった場合を陽性と判定した。

2. 実験2

従来法として、PCR direct sequence法とPNA clamping PCR法を同様のサンプルを用いて行い、PNA-LNA clamping LAMP法と感度、反応時間の比較を行った。

1) PCR direct sequence法

プライマーは、forward primer: 5'-ATTTCGGACTGGGAGCGAGC-3'、reverse primer: 5'-GTCCCTCATTGCACTGTACTC-3'を用いた。PCR反応を行った後、1.5%アガロースゲルで英道、目的産物を切り出し、QIA quick Spin (life technologies)で精製した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (life technologies)にて、シークエンス反応のPCRを行った。3500 Genetic analyzer (life technologies)を用いて分析を行った。

2) PNA clamping PCR法

プライマーはthe forward primer 5'-GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAA-3'、reverse primer 5'-CGTCAAGGCACTCTTGCCTAC-3'を用い、PNAプローベとして5'-TACGCCACCAGCTCC-3'を用いた。反応物はリアルタイムPCR観測装置(MyIQ, BioRad)で測定した。

結果

1. 実験1

1) PNA-LNA clamping LAMP法でのK-RAS点変異の診断

2つのK-RAS wild typeの培養細胞(Bx, HS766T)と2つのKRAS mutation typeの培養細胞(Panc-1, QGP-1)を用いた。LNAプライマーは、Bx、Panc-1では、LNA(G12D)を、HS766T、QGP-1では、LNA(G12V)を用いた。反応はリアルタイムPCR装置にて50分後まで測定した。PNAを除いたサンプル(positive control)では、すべてのサンプルにて増幅を認めた。PNAを入れた場合、wild typeの培養細胞では、増幅を認めず、mutation typeの培養細胞では増幅を認めた。

2) PNA-LNA clamping LAMP目視法

Fluorescent Detection Reagentを用いて、UV light下に目視を行った。リアルタイムPCR装置を用いた場合と同様の結果であった。

3) PNA-LNA clamping LAMP法の感度

感度を測定するために薄めたPanc-1細胞のc-DNA(100、50、10、1、0.5、0.1、0%)をBx細胞のcDNA

と混在させ、それぞれ測定した。リアルタイム PCR 装置、目視法ともに、0.1%まで診断可能であった。

4) PNA-LNA clamping LAMP 法の遺伝子点変異亜型の判別能

LNA を変えることにより、遺伝子点変異亜型の判別が可能かどうかについて検討を行った。リアルタイム PCR 装置を用いて、Panc-1, QGP-1 の cDNA をそれぞれ LNA(G12D), LNA(G12V)にて LAMP 法を 10 回ずつ施行した。なお、RFU100 の cycle 数を CT 値とし、CT(PNA+)-CT(PNA-)を ΔCT とした。LNA(G12D)を用いた場合、Panc-1 群で QGP-1 群に比べて優位に ΔCT が小さい傾向にあった。逆に LNA(G12V)を用いた場合、QGP-1 群で Panc-1 群に比べて有意に ΔCT が小さい傾向にあった。以上より、変異と合致した LNA を用いると、変異が合致しない LNA を用いた場合に比べて ΔCT が小さいことが示され、変異亜型の判別が可能であった。

2. 実験 2

PCR direct sequence 法と PNA clamping PCR 法の感度を上記と同様の方法で測定した。PCR direct sequence 法では、30%まで、PNA clamping PCR 法では 1%まで診断可能であった。以上より、PNA-LNA clamping LAMP 法がもっとも感度が優れている結果となった。次に検査時間を比較した。cDNA を用いて、診断までの時間は PNA-LNA clamping LAMP 法 50 分、PNA clamping PCR 法 2 時間、PCR direct sequence 法 6 時間であった。検査時間においても、PNA-LNA clamping LAMP 法が優れていた。

結語

本研究で開発した PNA-LNA clamping LAMP 法は *KRAS* の遺伝子点変異を他の検査法と比べて迅速にかつより感度が高く診断可能であった。また、目視でも診断可能であり、これは他の検査法にはない利点である。これらの特徴は、FNA 穿刺や生検などを行う臨床現場において、遺伝子点変異の即時に知ることを可能とし、病理診断や迅速な治療を行う場合に、非常に有用であると考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成28年3月29日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

現在、悪性腫瘍の病理診断や臨床的治療において、遺伝子点突然変異の有無は非常に大きな役割を果たしている。遺伝子点変異を診断する方法は数多く報告されているが、臨床現場で使用するには2つの大きな条件が挙げられる。一つ目に、臨床検体では、腫瘍細胞と多くの正常細胞が混在するため、可能なかぎり感度の高い診断法が必要であること、二つ目に、できる限り早急に診断、治療に結びつけるために、迅速に結果がでる必要がことである。

この2つの条件を満たす方法として、我々は LAMP 法に着目した。LAMP 法は、迅速で感度の高い方法として、2000 年に開発され、一定温度で 60 分以内に検体を増幅させることができ、目視で増幅の有無を判定することも可能な方法である。しかし、LAMP 法で点変異を診断する方法は一般化していない。そこで我々は、PCR 法で用いられている PNA-LNA clamp 法の手法を LAMP 法に応用し、迅速で感度の高い点変異の診断法を開発した。その結果、

1) 4つの膵癌培養細胞 (*KRAS* 野生型 2つ、変異型 2つ) を用い、リアルタイム PCR 観測装置、目視法ともに、野生型では増幅せず、変異型では増幅を認めた。

2) 感度を測定するために薄めた変異型細胞の c-DNA (100、50、10、1、0.5、0.1、0%) を野生型細胞の cDNA と混在させ、それぞれ測定した。リアルタイム PCR 装置、目視法ともに、0.1%まで診断可能であった。これは従来法と比較して感度が優れており、検査時間も短かった。

3) LNA を変えることにより、遺伝子点変異亜型の判別が可能であった。

以上より、本論文で開発した PNA-LNA clamping LAMP 法は *KRAS* の遺伝子点変異を他の検査法と比

べて迅速にかつより感度が高く診断可能であった。また、目視でも診断可能であり、これは他の検査法にはない利点である。迅速で感度の高い遺伝子点突然変異の検査法に関する新しい知見を提示した研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第542号		
学位授与の日	平成28年6月21日		
氏名	丸山 希実子		
学位論文の題目	Evaluation of arteriosclerosis using the brachial-ankle pulse wave velocity in patients with visceral lesion-free systemic lupus erythematosus characterized by skin lesions (皮膚病変主体で内臓病変を伴わないSLE患者のbaPWVによる動脈硬化の評価)		
論文審査委員	主査	教授 羽野 卓三	
	副査	教授 古川 福実	教授 藤井 隆夫

論文内容の要旨

【諸言】

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus 以下 SLE) 患者の死因は、近年になり大きく変化している。2006年のBernatskyらの報告によると、死因の約25%を血管障害が占める。この血管障害は動脈硬化の結果として引き起こされることが多い。ManziらはSLE患者ではアテローム性動脈硬化が若年から進み、患者の40%に粥状硬化を示すプラークが認められ、SLE患者のアテローム性動脈硬化症の相対リスクは5倍であり、45歳未満では50倍であるとも報告している。従って若年の患者が多いSLEでは特に動脈硬化に対する評価および加療が重要となる。

動脈硬化の評価としては血液検査が基本である。しかしSLE患者の心筋梗塞の発病率は従来の危険因子と相関しないという報告もあり、血液検査だけでは評価は不完全である。

多忙な臨床現場において、早期診断を目的に、多くの患者を対象に非侵襲的に検査を行うことができる方法として我々はbaPWV (brachial-ankle pulse wave velocity) を使用した。

【方法】

当科にて加療中の患者で、検査に口頭で同意を得た138人に通常のスクリーニング検査として1年に1回baPWVを施行した。人数の内訳は、SLE患者29 (平均年齢47.8±12.0、男性3名、女性26名) 人、全身性強皮症(以下SSc)27 (平均年齢67.64±12.8、男性3名、女性24名) 人、その他の皮膚疾患 (湿疹・皮膚炎群など) 85人 (男性19名、女性66名) であった。経過観察は1～7年であった。

① SLE患者のbaPWVの測定

baPWVは日本コーリン株式会社 (OMRON COLIN Co.,Ltd.Japan) の血圧脈波検査装置を用いた。

② SLE患者のbaPWVと従来の動脈硬化指数の相関

従来の動脈硬化指数である $([T\text{-Chol}] - [HDL]) / [HDL]$ や、 $[LDL] / [HDL]$ 比をbaPWVの測定とほぼ同時期に計算した。

③ ステロイドの内服とbaPWVの相関

ステロイド内服量を5年ごとに区切り、その期間の最初と最後のステロイド量を加算し年数をかけて2で割ったものを係数とした。

④ ヒドロキシクロロキンの内服とbaPWVの関連

測定者のうち、経過中にヒドロキシクロロキンの内服を行った患者には内服前後のbaPWV値に変化が出るか検討した。

これらの項目について単回帰分析を行った。

【結果】

① SLE患者のbaPWVの測定

26名のSLE患者のbaPWVの値は年齢別の平均値と比較してSLE患者は若年のうちから高値であ

った。SLE 患者 27 名のうち 13 名で標準偏差が 2SD を、4 名が 1SD を超えた。強皮症患者では 30 代などの若年のうちは健常人の平均と大きな差はつかなかったが、加齢とともに大きく離れ、60 代を超えると標準偏差が 2SD を超える患者が半数以上を占めた。

② SLE 患者の baPWV と従来の動脈硬化指数の相関

baPWV が 2SD を超えている患者群で[LDL]/[HDL]比が正常だった患者は 2 名、2 回であった。高値を示したのは 3 名 5 回であった。baPWV が 1SD を超えている患者群で[LDL]/[HDL]比が正常だった患者は 1 名、1 回だった。高値だったのは 4 名 5 回だった。baPWV が正常範囲内の患者群で[LDL]/[HDL]が正常だった患者は 3 名、3 回だった。高値を示した患者はいなかった。

baPWV が 2SD を超えている患者群で ([総コレステロール値]-[HDL]) / [HDL]が正常だったのは 3 名 4 回で、高値だったのは 2 名 5 回であった。baPWV が 1SD を超えている患者群で ([総コレステロール]-[HDL]) / [HDL]が正常だった患者は 4 名 4 回だった。高値だった患者は 1 名 2 回だった。baPWV が正常範囲内の患者群で ([T-CHO]-[HDL]) / [HDL]が正常だった患者は 3 名 5 回だった。高値だった患者はいなかった。

③ ステロイドの内服と baPWV の相関

ステロイド内服係数と baPWV 値は大きくばらつきがみられ、有意な相関は認められなかった。

④ ヒドロキシクロロキンの内服と baPWV の関連

ヒドロキシクロロキンの内服と baPWV には有意な相関がなかった。

単回帰分析の結果、SLE 患者の baPWV は若年から高値を示し、従来の動脈硬化指数とは相関しなかった。またステロイド内服との相関もなかった。ヒドロキシクロロキンの関連はなかった。強皮症患者では年齢があがるにつれ急激に baPWV 値が上昇した。

【考察】

SLE 患者の予後を左右するのは動脈硬化病変であり、その予防には早期診断が重要である。今回我々が測定した SLE 患者 29 名の baPWV 値は 40 代から+1SD~+2SD を超えることが多かった。また SLE 患者では従来の動脈硬化危険因子である LDL/HDL、T-Cho-HDL/HDL が正常でも baPWV が高値を示すことがあった。従来の採血データのみでの管理は危険である可能性が示唆された。以上により SLE 患者の動脈硬化病変の管理法として非侵襲的で動脈硬化病変の診断ができる baPWV は、外来におけるよい評価法であると考えた。

SScにおいても高齢になると baPWV 値が高くなるので、定期的なスクリーニングとして考慮してもよいと考えた。

経過観察の期間中 baPWV が正常範囲内で経過しているように見受けられる SLE 患者でも、毎年の検査結果を健常人の変化の平均と比較してみると 5 年後には 1SD の値に近似するなど baPWV 値の増加率が著しかった。このまま経過すると健常人との差異が大きく開いていくであろうことが予測された。

ステロイドの投与量、投与期間やヒドロキシクロロキンの投与と baPWV には明らかな相関はなかった。ステロイドのもつ強力な抗炎症作用が SLE に対し抑制的に働くため、SLE による動脈硬化促進作用が相殺される可能性があると思われた。また動脈硬化自体も炎症が原因の一部を担っているため、ステロイドの抗炎症作用が進行を抑制する可能性もあると考えた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 6 月 1 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus:SLE)は腎臓、心臓、関節、中枢神経、皮膚など多臓器を障害し、若年女性に好発する自己免疫疾患である。1975年の報告ではSLEの死因の多くは腎症などSLEそのものあるいは感染症であったが、近年では死因の25%を血管障害が

占める。この血管障害は動脈硬化に関連して引き起こされることが多い。SLEの患者では若年からアテローム性動脈硬化が進むことが分かっている。またSLE患者の動脈硬化の評価は従来使われるような血液検査でわかる危険因子とは相関しない。本研究は皮膚病変主体のSLE患者の動脈硬化病変を早期に評価することを目的として非侵襲的なbrachial-ankle pulse wave velocity (baPWV) を使用したものである。

皮膚病変が主体で内臓病変を伴わないSLE患者29名に対し、1～7年の研究期間において1年に1回baPWVを施行した。従来の血液検査でわかる動脈硬化指数である ([t-cho]-HDL) /HDL、LDL/HDL比も同時期に測定した。単回帰分析で求めたSLE患者のbaPWV予測値は、健常人の年齢別平均と比較してすべての年代で有意に高値を示した。同様な傾向は実測値でも認められた。また、SLE患者では動脈硬化指数が正常でもbaPWVが高値の患者がいた。

皮膚病変が主体のSLEの治療でも副腎皮質ステロイド内服がしばしば使用される。副腎皮質ステロイドの副作用として高コレステロール血症、高中性脂肪血症、高血糖、高血圧、肥満などがあり、これらは複雑に絡み合っただけで動脈硬化が促進される可能性がある。今回の研究内ではステロイドの投与量と投与期間を考慮した係数を採用し比較したところステロイド係数とbaPWV値に相関はなかった。

また2015年から皮膚エリテマトーデスおよび皮膚病変を伴うSLEに保険適応となった抗マラリア剤ヒドロキシクロロキンについても少数例に予備的に研究を行った。内服前と比較し、内服後のbaPWV値に変動が認められ、内服との関連が示唆された。

以上、本研究は皮膚病変が主体のSLE患者において、すべての年代でbaPWV予測値は、健常人の年齢別平均と比較して有意に高値を示した。従来の動脈硬化指数よりもbaPWVによるスクリーニングが動脈硬化病変の早期発見に優れていることを明らかにした研究である。また、皮膚病変が主体のSLE患者において副腎皮質ステロイドの内服量は動脈硬化病変の進行に直接的には関連しないことを示唆した。本論文は、皮膚病変主体のSLE患者の動脈硬化病変についての新たな知見を示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第543号		
学位授与の日	平成28年10月18日		
氏名	長島 康洋		
学位論文の題目	Effects of soybean ingestion on pharmacokinetics of levodopa and motor symptoms of Parkinson's disease — In relation to the effects of Mucuna pruriens (大豆の摂取がパーキンソン病患者の levodopa の薬物動態と運動症状に与える影響について—八升豆との比較)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡 史郎	
	副査	教授 中尾 直之	教授 伊東 秀文

論文内容の要旨

1.目的

パーキンソン病は進行性の神経変性疾患で内科的治療の一つとしてドパミンを補充する治療が行われる。体内でドパミンに変換される L-DOPA(LD)製剤や、LD やドパミンの代謝を阻害する catechol-O-methyltransferase(COMT)阻害薬や monoamine oxidase-B(MAO-B)阻害薬などが治療に用いられる。これらの薬物を用いたパーキンソン病治療における問題点として、罹病期間が長くなるにつれて、時間帯によって薬の効きが変動するウェアリングオフやジスキネジアといった運動合併症が挙げられる。

八升豆は1-5%のL-DOPAを含有している豆で、パーキンソン病患者に投与した際に薬の効果のある on 時間の延長は見られる一方で、ジスキネジアは悪化しないことが報告されている。またパーキンソンモデルのラットでは、八升豆抽出物の投与により、長時間のパーキンソン症状の改善と、ジスキネジアの減少が報告されている。これらのことは、八升豆にはジスキネジアを減らすための物質または機序があり、その検索の方法の一つとして、今回の研究では大豆を用いて臨床症状とLDの薬物動態について検討した。

2.方法

7例のウェアリングオフやジスキネジアのあるパーキンソン病患者を対象とした。平均年齢は67.1歳、罹病期間は平均10.7年、1日のLD製剤服用量は平均378.6mg/日であった。全症例でドパミンアゴニストを使用しており、5例でMAO-B阻害薬、アマンタジン、4例でCOMT阻害薬、3例でゾニサミドを使用していた。また、神経疾患や消化器疾患を持たない5例の健常例(平均年齢51.0歳)を対象とした。

試験はクロスオーバー試験とした。参加者は1週間以上の期間を空けて2回の検査を行った。試験前日の21時以降は水分摂取のみとし翌朝の試験とした。2回のうち1回はLD 100mg/Carbidopa 10mg (LD/CD)を内服、別の1回は大豆11gを摂食したのちにLD/CDを内服した(LD/CD/soy)。運動症状はUnified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) part III、ジスキネジアは the modified Abnormal Involuntary Movement Scale (mAIMS)による評価を摂取前、15、30、45、60、90、120、150及び180分に行った。180分以降の評価は自記式のシートを用いた。血液検体は症状の評価と同時に採血し、LD、その代謝産物である3-O-Methyldopa(3-OMD)、3,4-Dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)及びhomovanillic acid(HVA)の測定を行った。

3.結果

臨床症状ではLD/CD/soy摂取時にはLD/CD摂取時と比べ有意にon時間の延長を認めた(LD/CD: 150 min vs LD/CD/soy: 270 min, $p = 0.028$)。線形混合モデルにおけるUPDRS part IIIの変化量の推定周辺平均に有意差は見られなかった($p = 0.61$)。mAIMSの変化量の推定周辺平均は有意差を認めた(LD/CD: 3.9 vs LD/CD/soy: 1.9, $p < 0.001$)。パーキンソン病患者における血中の薬物濃度では3-OMDとHVAの推定周辺平均はそれぞれLD/CDとLD/CD/soyの間に有意差を認めた(LD/CD:

374.6 ng/ml vs LD/CD/soy: 317.0 ng/ml , p = 0.03, LD/CD: 223.5 ng/ml vs LD/CD/soy: 267.8 ng/ml, p = 0.002)。健常例では血中 3-OMD の area under the curve は LD/CD/soy で有意に低かった (LD/CD: 627.8 ng · h/ml vs LD/CD/soy: 532.4 ng · h/ml , p = 0.04)。

4.考察

この研究では LD/CD/soy 摂取時は LD/CD 摂取時に比べると on 時間の延長とジスキネジアの軽減を認めた。また UPDRS part III では有意差は見られなかった。LD/CD/soy 摂取時の 3-OMD の有意な低下や HVA の上昇、健常例における LD/CD/soy 摂取時の 3-OMD の有意な低下は、大豆が COMT を阻害するような働きを持っていることを示唆し、前述した on 時間延長の理由として考えられる。

COMT 阻害作用はパーキンソン症状の改善には有用であると考えられるが、ジスキネジアは潜在的に悪化する。しかしながら、今回の研究では LD/CD/soy 摂取時にジスキネジアは悪化せずむしろ軽減した。この効果は COMT 阻害作用では説明ができず、何らかの抗ジスキネジア作用をもたらす物質または機序が示唆される。これは過去の八升豆の同様の結果であり、大豆にも八升豆と同様に抗ジスキネジア作用のある物質や機序が存在する可能性が示唆され、それを同定することは進行期パーキンソン病の治療の一助となる可能性がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 7 月 14 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

パーキンソン病は進行性の神経変性疾患で内科的治療としてドパミンを補充する治療を中心に行われる。治療における問題点として、罹病期間が長くなるにつれて、時間帯によって薬の効きが変動するウェアリングオフやジスキネジアといった運動合併症がある。1-5%の L-DOPA(LD)を含有している八升豆は、パーキンソン病患者に投与した際に薬の効果がある on 時間を延長させる一方で、ジスキネジアは緩和することが報告されている。このことは、八升豆にはジスキネジアを減らすための物質または機序があることが推測されており、本研究はその機序を推測するために大豆を用いて臨床症状と L-DOPA の薬物動態について検討したものである。

7 例のウェアリングオフやジスキネジアのあるパーキンソン病患者と 5 例の健常例を対象とした。参加者は 1 週間以上の期間を空けて 2 回の検査を行った。2 回のうち 1 回は LD 100mg/Carbidopa 10mg (LD/CD) を内服、別の 1 回は大豆 11g を摂食したのちに LD/CD を内服した (LD/CD/soy)。運動症状は Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) part III による評価、ジスキネジアは the modified Abnormal Involuntary Movement Scale (mAIMS) による評価を行った。血液検体からは LD、その代謝産物である 3-O-Methyldopa(3-OMD)、3,4-Dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)、homovanillic acid(HVA)の測定を行った。

臨床症状では LD/CD/soy 摂取時には LD/CD 摂取時と比べ有意に on 時間の延長を認めた。UPDRS part III の変化量に有意差は見られなかったが、mAIMS は有意に低下した。パーキンソン病患者における血中の薬物濃度では LD/CD/soy 摂取時に 3-OMD の有意な減少と HVA の有意な上昇を認めた。健常例では血中 3-OMD の area under the curve は LD/CD/soy で有意な低下を認めた。

本研究では大豆摂取は COMT を阻害するような働きを持っていることを示唆し、臨床症状において on 時間の延長とジスキネジアの軽減を認め、大豆にも八升豆と同様に抗ジスキネジア作用を有する可能性が示唆された。本論文は、大豆の摂取がパーキンソン病患者の L-DOPA の薬物動態と運動症状に与える影響についての新たな知見であり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第544号		
学位授与の日	平成28年10月18日		
氏名	竹島 健		
学位論文の題目	Elevated serum immunoglobulin G4 levels in patients with Graves' disease and their clinical implications. (バセドウ病患者における血清 IgG4 値上昇とその臨床的意義)		
論文審査委員	主査	教授 古川 福実	
	副査	教授 藤井 隆夫	教授 赤水 尚史

論文内容の要旨

【緒言】 IgG4 関連疾患（以下、IgG4-RD）は、リンパ球と IgG4 陽性形質細胞の著しい浸潤と線維化により、同時性あるいは異時性に全身諸臓器の腫大や結節・肥厚性病変などを認める原因不明の疾患である。甲状腺疾患との関連について、IgG4-RD の約 19% に甲状腺機能低下症が合併し甲状腺サイズの増加と抗甲状腺自己抗体陽性者が多いとされる。近年、橋本病において IgG4 陽性形質細胞の浸潤と著明な線維化および濾胞構造の破壊を伴う疾患群が報告され、IgG4 甲状腺炎として提唱された。また、多臓器の硬化性線維化と甲状腺外浸潤を特徴とするリーデル甲状腺炎においても、血清 IgG4 高値や IgG4 陽性形質細胞浸潤を伴う症例が報告され、IgG4-RD と甲状腺疾患の関連性が示唆されている。

一方、IgG4-RD とバセドウ病との関連は明らかにされておらず、血清 IgG4 値の臨床的意義も未だ不明な点が多い。そこで我々は、バセドウ病患者の血清 IgG4 値を前向きに測定し、その臨床的意義について検討を行った。

【対象と方法】 2011 年 1 月から 2012 年 10 月に当院を受診したバセドウ病患者 109 名（男性 15 名、女性 94 名、平均年齢 44.1 ± 15.2 才）を対象とし、血清 IgG4 値測定（ネフェロメトリー法）を行いその臨床的特徴を前向きに検討した。IgG4-RD 包括診断基準に基づき、対象患者のうち血清 IgG4 ≥ 135 mg/dL を IgG4 高値群、血清 IgG4 < 135 mg/dL を IgG4 非高値群として 2 群に分類した。両群の年齢、性別、自己免疫性甲状腺疾患の家族歴、甲状腺機能（TSH、free T3、free T4）、抗甲状腺自己抗体（TgAb、TPOAb）、抗甲状腺受容体抗体（TRAb）、甲状腺刺激抗体（TSAb）、バセドウ病眼症の有無（Clinical activity score、NOSPECS 分類）、甲状腺超音波所見（甲状腺サイズ、内部エコー、内部血流）などについて統計学的手法を用いて比較検討を行った。超音波検査の低エコー所見は、既報に基づき Grade 0-3 にスコア化を行い検討した。更に、少量の抗甲状腺薬で甲状腺機能のコントロールが行っている群をコントロール良好群（ $n=39$ ）、残りをコントロール不良群（ $n=18$ ）として 2 群に分類し、各パラメータについて群間比較を行った。

【結果】 バセドウ病患者 109 名の血清 IgG4 値は、 48.3 ± 44.0 mg/dL であり、7 名（6.4%）が血清 IgG4 ≥ 135 mg/dL であった。IgG4 高値群は、IgG4 非高値群に比して有意に高年齢（ 54.7 ± 6.2 才 vs. 43.4 ± 15.4 才、 $p=0.026$ ）であり、甲状腺超音波検査で低エコー領域の拡大（低エコースコア： 1.66 ± 0.81 vs. 0.61 ± 0.89 、 $p=0.005$ ）を認めた。甲状腺自己抗体価は IgG4 高値群の方が高値であったが、有意な差は認めなかった。その他、性別、家族歴、喫煙歴、甲状腺機能などは、両群間で有意差は認めなかった。また、TSAb は血清 IgG4 値と有意な正の相関（ $rs=0.385$ 、 $n=42$ ）を認めた。それ以外のパラメータと血清 IgG4 値の間には有意な相関を認めなかった。

IgG4 高値 7 症例は、いずれの症例も少量の抗甲状腺薬でバセドウ病の病勢コントロールが可能であり、そのうち 2 症例は甲状腺機能低下症に陥り甲状腺ホルモン補充が必要であった。コントロール良好群とコントロール不良群の比較では、前者で血清 IgG4 が高値であったが有意な差は認めなかった（ 70.5 ± 75.1 mg/dL vs. 47.2 ± 29.6 mg/dL）。

なお、観察期間中に IgG4-RD に関連した甲状腺外病変を発症した症例はなかった。

【考察・結語】本研究では、バセドウ病患者の血清 IgG4 を初めて前向きに検討し、その約 6.4% が血清 IgG4 \geq 135 mg/dL を呈することを確認した。血清 IgG4 高値バセドウ病の患者は、高年齢、低エコー領域の拡大などの特徴を示し、前者は IgG4-RD、後者は IgG4 甲状腺炎に合致する所見であった。一方、観察期間では IgG4-RD に合併する全身病変を伴っておらず、血清 IgG4 が甲状腺由来である可能性を示唆した。血清 IgG4 高値群が抗甲状腺薬治療に対する良好な反応性を示した点は、血清 IgG4 測定により新たな疾患群を抽出し、抗甲状腺薬への反応性を踏まえた治療戦略と新たな治療選択が可能になると考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成28年10月3日、学位審査担当者が学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

IgG4関連疾患（以下、IgG4-RD）は、リンパ球とIgG4陽性形質細胞の著しい浸潤と線維化により、全身諸臓器の腫大を認める原因不明の疾患である。IgG4-RDと甲状腺疾患について、IgG4-RDの約19%に甲状腺機能低下症が合併し甲状腺腫大が報告されている。近年、橋本病ではIgG4陽性形質細胞の浸潤と著明な線維化、濾胞構造の破壊を伴うIgG4甲状腺炎が報告された。また、多臓器の硬化性線維化と甲状腺外浸潤を特徴とするリーデル甲状腺炎とIgG4-RDの関連も示唆されている。一方、バセドウ病における血清IgG4値やIgG4-RDとの関連は明らかでない。そこで、バセドウ病患者の血清IgG4値を前向きに測定し、その臨床的意義について検討を行った。

2011年1月から2012年10月に当院を受診したバセドウ病患者109名（男性15名、女性94名）を対象とし、血清IgG4値とその臨床的特徴を前向きに検討した。IgG4-RD包括診断基準に基づき、IgG4高値群（IgG4 \geq 135mg/dL）、IgG4非高値群（IgG4 $<$ 135mg/dL）の2群に分類した。両群間で年齢、性別、自己免疫性甲状腺疾患の家族歴、甲状腺機能（TSH、fT3、fT4）、抗甲状腺自己抗体（TgAb、TPOAb）、抗甲状腺受容体抗体（TRAb）、甲状腺刺激抗体（TSAb）、バセドウ病眼症の有無、甲状腺超音波所見について統計学的手法を用いて比較検討を行った。更に、少量の抗甲状腺薬で甲状腺機能が管理できたコントロール良好群（n=39）とそれ以外のコントロール不良群（n=18）に分類し検討した。

バセドウ病患者109名の血清IgG4値は 48.3 ± 44.0 mg/dL（平均 \pm SD）で、7名（6.4%）が血清IgG4 \geq 135mg/dLであった。IgG4高値群は有意に高年齢（ 54.7 ± 6.2 才 vs. 43.4 ± 15.4 才、 $p=0.026$ ）で、超音波検査で低エコー領域の拡大（低エコースコア： 1.66 ± 0.81 vs. 0.61 ± 0.89 、 $p=0.005$ ）を認めた。甲状腺自己抗体価はIgG4高値群が高値であったが、有意差はなかった。また、TSAbと血清IgG4値が有意な正の相関（ $r_s=0.385$ 、 $n=42$ ）を示した。IgG4高値7例は少量の抗甲状腺薬でバセドウ病のコントロールが可能であり、2例は甲状腺機能低下症に陥り甲状腺ホルモン補充が必要であった。コントロール良好群と不良群の比較では、前者で血清IgG4が高値であったが有意な差は認めなかった。観察期間中、IgG4-RDに合併する全身病変を伴わず、血清IgG4は甲状腺由来と考えられた。

本研究では、バセドウ病患者の血清 IgG4 値を初めて前向きに検討し、血清 IgG4 高値バセドウ病患者が、高年齢、低エコー領域拡大などの特徴を有することを示した。また、これらの患者は抗甲状腺薬治療に対し良好な反応性を示し、血清 IgG4 値を踏まえた治療戦略が可能になると考えられた。以上より、当論文は、バセドウ病患者における血清 IgG4 値の臨床的意義を明らかにし、血清 IgG4 値を踏まえたバセドウ病治療選択の可能性を示した意義ある論文であり、学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第545号		
学位授与の日	平成28年11月15日		
氏名	北畑 裕司		
学位論文の題目	Circulating nano-particulate TLR9 agonist scouts out tumor microenvironment to release immunogenic dead tumor cells (ナノ粒子を形成する TLR9 アゴニストは、全身を循環し、腫瘍環境を標的とすることで、免疫細胞死を誘導する)		
論文審査委員	主査	教授 改正 恒康	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

緒言

癌治療においては様々な戦略が提案されているが、最近では、腫瘍の微小環境を標的とする治療戦略が注目されている。つまり腫瘍局所に存在する腫瘍浸潤マクロファージや樹状細胞 (DC) を標的として、抗腫瘍免疫活性を増強するように修飾することで、自然免疫の賦活化および腫瘍に対する獲得免疫を誘導する。これにより腫瘍微小環境における腫瘍細胞の不均一性や、免疫抑制状態を克服することが可能となる。また、一定の条件の下においては、プログラムされた細胞死、つまり immunogenic cell death (ICD) が引き起こされた腫瘍細胞が DC に貪食されることで、死細胞由来の腫瘍抗原が DC に提示され、腫瘍抗原特異的傷害性 T リンパ球が誘導されることが報告されている。

本研究では、以前に我々のグループがワクチンアジュバントとして報告した K3-SPG の単剤での抗癌効果とそのメカニズムについて検討した。K3-SPG は、K3-CpG-DNA (K3) と Schizophyllan (SPG) からなる複合体を形成したナノ粒子である。K3 は自然免疫受容体のひとつである Toll like receptor 9 (TLR9) の ligand であり、これまでもワクチンアジュバントをはじめとした抗癌免疫療法に用いられている。SPG はスエヒロタケに由来する水溶性の β グルカンであり、本邦においては、子宮頸癌に対する治療薬として承認されている。また、SPG は食細胞によって貪食されることが知られている。我々は、K3 と SPG の複合体ナノ粒子 K3-SPG が、相乗的抗腫瘍効果、また、その抗腫瘍メカニズムを解析した。

方法

実験 I. K3-SPG 静脈内投与による腫瘍増殖抑制効果の検討

C57BL/6 マウスを用いて、マウス胸腺腫の cell line である EG7 を right flank に皮下接種し、皮下腫瘍モデルを作製した。腫瘍移植後 7、9、11 日目に、PBS、SPG、K3-dA40、K3-dA40+ SPG、または K3-SPG を静脈内投与して、経時的に腫瘍径を計測し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。次に、マウス melanoma の cell line である B16、B16F10 または、マウス大腸癌の cell line である MC38 を皮下接種し、それぞれ長径約 5mm となる腫瘍移植後、10 日目、7 日目、14 日目から 1 日おきに 3 回、PBS、K3、K3-SPG を静脈内投与し、経時的に腫瘍径を計測し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。さらに、より臨床的なモデルとして、マウス膵癌の cell line である Pan02 を腹腔内投与し、膵臓癌腹膜播種モデルを作製、K3-SPG の抗腫瘍増殖抑制効果を検討した。腫瘍移植後 11 日目から 1 日おきに 3 回、PBS、K3、K3-SPG を静脈内投与し、21 日目にマウスを sacrifice して、腹膜播種結節を回収、その重量を計測した。また、同様のモデルを作製し、マウスの生存率を観察した。

実験 II. K3-SPG 静脈投与時の生体内動態の解析

K3-SPG 静脈内投与時の生体内動態を macroscopic 並びに microscopic に解析した。

1. in vivo における K3-SPG 静脈内投与時の macroscopic の解析

K3-SPG 静脈内投与における in vivo での分布を観察するために、EG7 を C57BL/6 マウスの right flank に皮下接種、移植後 12 日目に PBS、Alexa647-K3 または Alexa647-K3-SPG を静脈内に投与した。投与 1 時間後に、in vivo fluorescence imaging system (IVIS) によって分析した。

2. in vivo における K3-SPG 静脈内投与時の microscopic の解析

腫瘍微小環境での K3-SPG 静脈内投与における分布を観察するために、上記マウスの腫瘍凍結切片を抗 CD3e 抗体 (赤、EG7 染色) および Hoechst 33258 (青、核染色) で染色し、蛍光顕微鏡で分析した。

実験 III. K3-SPG の腫瘍微小環境における動態とその抗腫瘍効果の検討

K3-SPG 静脈内投与時の腫瘍微小環境における局在及び抗腫瘍効果に及ぼす検討した。

1. K3-SPG の腫瘍微小環境における動態の検討

K3-SPG の腫瘍微小環境での動態を検討するために、EG7 を C57BL/6 マウスの right flank に皮下接種、腫瘍移植後 12 日目に Alexa647-K3、Alexa647-K3-SPG、FITC-SPG を dextran-PE とともに静脈内に投与した。投与 1 時間後に、腫瘍を摘出して凍結切片を作製し、それぞれ蛍光顕微鏡で分析した。

2. K3-SPG の腫瘍微小環境内での動態が抗腫瘍効果におよぼす影響の検討

実験 III-1 の結果より、腫瘍微小環境内で、K3-SPG が食細胞に取り込まれていることが示唆された。そこで clodronate liposomes を用いて、食細胞を deplete し、皮下腫瘍モデルによる K3-SPG の腫瘍増殖抑制効果を検討した。EG7 を C57BL/6 マウスの right flank に皮下接種、腫瘍移植後 5 日目に clodronate liposomes あるいはコントロールの liposomes を静脈内に投与した。7 日目から 1 日おきに 3 回、PBS または K3-SPG を静脈内投与して、経時的に腫瘍径を計測した。

実験 IV. K3-SPG 静脈内投与における immunogenic cell death 誘導の検討

EG7 皮下腫瘍マウスモデルにおいて、K3-SPG 静脈内投与後の脾臓内に CD45 陰性の非免疫細胞が少なからず存在していた。我々は、これらの CD45 陰性細胞が K3-SPG の抗腫瘍効果により誘導された免疫原性のある腫瘍死細胞であるという仮説を立て、以下の検討を行った。

1. K3-SPG 投与時に脾臓内で観察される CD45 陰性細胞の検討

CD45 陰性細胞が host 由来でなく、腫瘍由来であることを確認するために、GFP マウスを用いて、EG7 皮下移植後 7 日目から 1 日おきに 3 回、PBS または K3-SPG を静脈内投与し、12 日目にそれぞれの脾臓を採取し、抗 CD45 抗体により染色した細胞を flow cytometry により分析した。また、CD45 陰性細胞を BD INFLUX™ を用いて sorting し、死細胞染色のため、Hoechst 33342 と propidium iodide (PI) で染色し、flow cytometry により分析した。

2. CD45 陰性細胞の免疫原性の検討

CD45 陰性細胞の抗腫瘍免疫応答の検討を行うために、K3-SPG 投与によって誘導された CD45 陰性細胞を BD INFLUX™ を用いて sorting し、naïve の C57BL/6 マウスに皮内投与し、コントロール群とともに免疫 7 日後に EG7 を皮下接種し、腫瘍増殖を経時的に測定した。また、免疫されたマウスの腫瘍抗原特異的応答を検討するために、EG7 に発現する抗原 OVA に対する CTL の誘導を tetramer assay により分析した。

3. 腫瘍増殖抑制と CD45 陰性細胞の誘導との関連性の検討

CD45 陰性細胞が誘導される治療法の検討を行うために、EG7 を C57BL/6 マウスの right flank に皮下接種、腫瘍移植後 7 日目から 1 日おきに 3 回、PBS または K3-SPG を静脈内投与、または K3 を腫瘍内投与、あるいは K3-SPG を皮内投与し、12 日目にそれぞれの脾臓を採取し、抗 CD45 抗体により染色した細胞を flow cytometry により分析した。

実験 V. 自然免疫活性と immunogenic cell death 誘導の検討

CD45 陰性細胞の誘導および、その後の抗腫瘍免疫応答の誘導において、K3-SPG により産生される IL-12 および type I- IFN の活性がおよぼす影響を検討するために、IL-12 p40 および I 型 IFN 受容体を double knock out したマウスにおいて、CD45 陰性細胞の誘導と K3-SPG 投与時の抗腫瘍効果を検討した。

結 果

実験 I. K3-SPG 静脈内投与による腫瘍増殖抑制効果の検討

EG7 移植担癌マウスにおいて、K3-SPG 静脈内投与群でのみ強い腫瘍増殖抑制を認めた。K3-dA40、SPG、K3-dA40+ SPG 静脈内投与では、ほとんど腫瘍増殖抑制は認めず、また、B16、B16F10 および MC38 移植担癌マウスにおいても、K3 静脈内投与群に比較して、K3-SPG 静脈内投与群において強い腫瘍増殖抑制を認めた。さらに、脾臓癌腹膜播種モデルにおいても、K3-SPG 静脈内投与群にお

いてのみ腫瘍増殖抑制を認め、生存率の延長を認めた。

以上より、K3-SPG は静脈内投与によりマウス皮下腫瘍モデルでは癌種に関わらず、また、膀胱癌腹膜播種モデルにおいても強い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

実験 II. K3-SPG 静脈投与時の生体内動態の解析

1. *in vivo* における K3-SPG 静脈内投与時の **macroscopic** の解析

IVIS 観察により、静脈内投与された Alexa647-K3-SPG は腫瘍に集積することが明らかとなった。一方、Alexa647-K3 は腫瘍への集積を認めなかった。

2. *in vivo* における K3-SPG 静脈内投与時の **microscopic** の解析

腫瘍微小環境内での K3-SPG の分布を免疫染色にて検討したところ、腫瘍環境内で、腫瘍とは一致せずに存在していることが明らかとなった。

以上より、K3-SPG は腫瘍環境に **delivery** され、腫瘍微小環境内の細胞に作用していることが示された。

実験 III. K3-SPG の腫瘍微小環境における動態とその抗腫瘍効果の検討

1. K3-SPG の腫瘍微小環境における動態の検討

腫瘍微小環境における局在を詳細に免疫染色で検討したところ、Alexa647-K3-SPG および FITC-SPG は dextran-PE と一定の割合で **merge** することが明らかになった。このことから、K3-SPG および SPG は腫瘍微小環境で食細胞に取り込まれていることが示唆された。

2. K3-SPG の腫瘍微小環境での動態が抗腫瘍効果におよぼす影響の検討

clodronate liposomes を用いて、食細胞を **deplete** した結果、K3-SPG の抗腫瘍効果が消失することが明らかとなった。

以上より、K3-SPG は腫瘍環境の食細胞に作用し、抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

実験 IV. K3-SPG 静脈内投与における **immunogenic cell death** 誘導の検討

1. K3-SPG 投与時に脾臓内で観察される CD45 陰性細胞の検討

GFP マウスを用いた検討より、CD45 陰性細胞が **host** 由来でなく、外因由来、つまり腫瘍由来であることが明らかとなった。また、得られた CD45 陰性細胞は、**necrosis** や **apoptosis** が観察される死細胞であることが明らかとなった。

2. CD45 陰性細胞の免疫原性の検討

K3-SPG 投与によって誘導された CD45 陰性死細胞を、**naive** マウスに免疫し、腫瘍増殖を継時的に観察した結果、CD45 陰性死細胞は抗腫瘍免疫応答を誘導することが明らかとなった。また、CD45 陰性死細胞により免疫されたマウスにおいて、腫瘍増殖抑制の結果と単一の腫瘍抗原特異的応答の誘導は相関しないことが明らかとなった。

3. 腫瘍増殖抑制と CD45 陰性細胞の誘導との関連性の検討

CD45 陰性細胞の誘導は腫瘍増殖抑制が認められる投与群である K3 腫瘍内投与群と K3-SPG 静脈内投与群でのみ得られることが明らかとなった。

以上より、K3-SPG 投与により誘導される CD45 陰性細胞は、CpG の効果により認められる免疫原性をもった死細胞であり、単一の腫瘍抗原の誘導ではなく **neodominant** あるいは **subdominant** な腫瘍抗原特異的 CD8+ T リンパ球の活性化をもたらすため腫瘍増殖抑制が得られると考えられた。

実験 V. 自然免疫活性と **immunogenic cell death** 誘導の検討

K3-SPG 静脈内投与時の CD45 陰性死細胞の誘導は、IL-12 p40 および I 型 IFN 受容体を **double knock out** したマウスにおいては得られないことが明らかとなった。また、腫瘍増殖抑制効果は、IL-12 単独および type I-IFN 単独を **knock out** したマウスにおいて認められたが、それらを **double knock out** したマウスにおいては、認められないことが明らかとなった。

以上より、K3-SPG 投与により産生される IL-12 および type-I-IFN が腫瘍局所において、**immunogenic cell death** 誘導に関与していることが示唆された。

考 察

今回の我々の研究により、SPG と複合体を形成する **nanoparticulate CpG** ; K3-SPG はその形態学的特徴から、これまでの CpG-ODN では得られなかった全身投与で抗腫瘍効果が得られることが明らかとなり、そのメカニズムを解明した。静脈内投与された K3-SPG は、腫瘍微小環境にターゲットされ、マクロファージや樹状細胞などの腫瘍微小環境における食細胞に貪食されることで、腫瘍増殖抑

制がもたらされることが明らかとなった。さらに、K3-SPGにより腫瘍微小環境で誘導される IL-12 および type I- IFN が、抗腫瘍免疫応答に関与することが示唆された。つまり、それらのサイトカインは腫瘍微小環境で immunogenic cell death を誘導し、neodominant あるいは subdominant な腫瘍抗原特異的 CD8+ T リンパ球の活性化をもたらすと考えられた (付図 6)。K3-SPG の全身投与は、腫瘍微小環境を標的とし、腫瘍微小環境で自然免疫の活性化とそれに引き続く獲得免疫の誘導を可能とする効果的な抗がん mono-immunotherapeutic agent となり得ることが示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成28年10月25日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。本論文は、新規アジュバント (K3-SPG) の単独でのがん免疫療法への有用性とそのメカニズムを解析・証明したものである。K3-SPGは、自然免疫受容体Toll-like Receptor9のリガンドであるCpG-ODNの臨床的欠点を克服するために開発された新規アジュバントであり、K3-CpG-DNA (K3) とSchizophyllan (SPG) からなる複合体を形成したナノ粒子である。まず、マウス皮下腫瘍モデルにおいてK3-SPG静脈内投与による腫瘍増殖抑制効果の検討を行った。cell lineはEG7(胸腺腫)、B16、B16F10(melanoma)、MC38(大腸癌)を用いた。結果、すべてのcell lineにおいて強い抗腫瘍効果を認めた。さらに、Pan02(膵癌)を用いて、腹膜播種モデルを作成し、K3-SPGを静脈内投与したところ、強い抗腫瘍効果を認め、コントロール群に比較して、有意に生存期間を延長した。次に、K3-SPG静脈投与時の生体内動態の解析を行った。蛍光ラベルを付加したK3-SPGを静脈内投与し、in vivo imaging system (IVIS) および蛍光顕微鏡での観察で、K3-SPGが腫瘍環境内に存在することが示された。よって、K3-SPGがDrug Delivery System(DDS)を有していることが示唆された。また、腫瘍微小環境内のK3-SPGはマクロファージや樹状細胞といった貪食細胞に取り込まれ、K3-SPGを貪食したことによって自然免疫が活性化されることが抗腫瘍効果に必須であることを示した。さらに、K3-SPG投与により免疫原性をもった腫瘍由来死細胞が誘導され、その死細胞は単一の腫瘍抗原の誘導ではなく neodominant あるいは subdominant な腫瘍抗原特異的 CD8+ T リンパ球の活性化をもたらし、腫瘍増殖抑制が得られると考えられた。その腫瘍由来死細胞の誘導には、腫瘍局所でサイトカインIL-12およびtype-I- IFNが誘導されることが必須であることが証明された。

今回の我々の研究により、SPGと複合体を形成するnanoparticulate CpG ; K3-SPGはその形態学的特徴から、これまでのCpG-ODNでは得られなかった全身投与で抗腫瘍効果が得られることが明らかとなり、そのメカニズムを解明した。K3-SPGの全身投与は、腫瘍微小環境を標的とし、腫瘍微小環境で自然免疫の活性化とそれに引き続く獲得免疫の誘導を可能とする効果的な抗がんmono-immunotherapeutic agentとなり得ることが示された。

これらの結果により、新規アジュバントの有効性が、がん免疫治療における新たな治療戦略となり得る可能性があることが認められ、学位論文として価値のあるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第546号		
学位授与の日	平成28年12月20日		
氏名	西口 毅		
学位論文の題目	Local Matrix Metalloproteinase 9 Level Determines Early Clinical Presentation of ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction (冠動脈プラーク局所のマトリックスメタロプロテイナーゼ9濃度が急性心筋梗塞の臨床表現型を決定する)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 加藤 正哉	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

緒言

急性心筋梗塞症は、心電図上の臨床表現形から ST 上昇型心筋梗塞(ST-segment-elevation myocardial infarction: STEMI)と非 ST 上昇型心筋梗塞(non-ST-segment-elevation myocardial infarction: NSTEMI)に分類される。急性期の治療方針や予後が大きく異なることから、この分類は臨床上非常に重要である。

古典的な考えでは、プラークの破綻を契機として引き起こされる冠動脈内腔の血栓形成量の多寡により、冠動脈内腔が完全に閉塞すると STEMI となり、亜完全閉塞にとどまる場合は NSTEMI となると考えられてきた。しかし最新の画像診断学の成果により、責任病変の形態が STEMI と NSTEMI で異なることが示され、単純な続発性血栓形成量の多寡だけでなく病変背景の差異が STEMI と NSTEMI の差異を生み出していることが示唆されている。

プラークの形成から破綻に至る経路には炎症機転が大きく関与していることが報告されてきた。病理学的検討から、急性心筋梗塞患者の責任病変では、マクロファージや好中球の浸潤が多く認められ、それに伴いマトリックスメタロプロテアーゼ9(matrix metalloproteinase 9: MMP-9)やミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase: MPO)といった炎症性サイトカインの発現増加が報告されている。臨床研究においても、急性心筋梗塞患者で末梢血中の MMP-9 や MPO が正常例に比較し有意に上昇し、それらが高い群では心筋梗塞の発症率が高いことが報告されている。

以上のことから、プラーク局所の炎症活動性が、急性心筋梗塞の臨床表現形にも何らかの影響を及ぼしていると推察されるが、それらの関係について明らかにした報告は皆無である。

目的

今回の研究の目的は、光干渉断層法(optical coherence tomography: OCT)を用い急性心筋梗塞責任病変の詳細な病変形態を評価し、同時にプラーク局所の炎症活動性を評価する事により、プラーク局所の炎症活動性が急性心筋梗塞の臨床表現形に影響を及ぼしているか検討することである。

方法

発症6時間以内に来院した新規の急性心筋梗塞患者109例と、安定狭心症(stable angina pectoris: SAP)患者17例の計126例を登録した。心原性ショック、腎機能障害(クレアチニン値: 1.5mg/dL以上)、活動性の炎症性疾患を合併する例は除外した。

緊急冠動脈造影開始時に末梢動脈血を採取した。冠動脈造影にて責任病変を同定した後に、血栓吸引カテーテルを用いて責任病変部の冠動脈血(pre-stent localと定義)を採取した。その後、OCTを用い責任病変の形態を観察した。OCTにおける評価項目は、プラーク破裂の有無、前方開口型のプラーク破裂の有無、最も不安定なプラークとされるthin-cap fibroatheroma (TCFA)の有無、マクロファージ数の半定量評価、血管断面図において脂質性病変が占める角度、赤色血栓/白色血栓の有無、血管

径とした。全例、冠動脈ステントによる標準的な血行再建術を施行した。ステント植え込み直後に、再度血栓吸引カテーテルを用い、冠動脈血(post-stent localと定義)を採取した。Systemic, pre-stent local, post-stent local 血を用い、血清 MMP-9、MPO を測定した。

結果

急性心筋梗塞 109 例のうち、OCT 施行不可能、画像不良などにより 15 例を除外した。最終的に 94 例の急性心筋梗塞(STEMI:69、NSTEMI:25)、17 例の SAP の合計 111 例を解析した。全例血行再建に成功した。SAP に比較し、STEMI および NSTEMI では OCT におけるプラーク破裂の頻度、TCFA の頻度、脂質角度、マクロファージ数が有意に高値であったが、STEMI と NSTEMI 間では差を認めなかった。STEMI と NSTEMI 間の比較ではプラーク破裂の頻度に差を認めなかったが、前方開口型のプラーク破裂は STEMI で有意に多い結果となった。また STEMI では赤色血栓の頻度が有意に高かった。

STEMI、NSTEMI ともにプラーク局所の MMP-9 濃度や MPO 濃度は末梢血と比較し有意に高値であった。Post-stent local の MMP-9 濃度は、STEMI で有意に上昇していた ($p < 0.01$) が、MPO 濃度に差を認めなかった。多変量解析では、post-stent local MMP-9 濃度と、赤色血栓の存在が、急性心筋梗塞患者で STEMI を決定づける独立した因子であった。

考察と結語

STEMI と NSTEMI の責任プラークは、SAP のものと比較して、多数のマクロファージが浸潤し、より脂質成分に富み、破綻しやすい形態であった。しかし STEMI と NSTEMI の間の比較では、プラーク破裂の頻度に差を認めずマクロファージ数や脂質成分にも差を認めなかった。しかし前方開口型プラーク破裂の頻度や局所の MMP-9 濃度に有意差を認めた。これは STEMI と NSTEMI では、急性心筋梗塞発症にいたる機転そのものには差がないが、その病変背景にある局所の炎症活動性に大きな差がある事を意味する。MMP-9 は外因系凝固系を亢進させる事が知られている。MMP-9 を多量に含むプラークの破綻は、より多くの MMP-9 を冠動脈内に放出することとなり、その結果としてより多くの血栓形成が引き起こされ STEMI を発症しているのではないかと考えられた。また STEMI には前方開口型のプラーク破裂が多いことは、より多くのプラーク内 MMP-9 が血流に接触する流体力学的機序も多量の血栓形成に関与していることが示唆された。また同じプラーク破裂が発症機転となっているにもかかわらず、STEMI では赤色血栓の頻度が高かった。MMP-9 濃度は独立した因子であり、なぜ同じプラーク破裂から異なった性状の血栓が形成されるのか今後検討する必要がある。

本研究により、プラーク局所の MMP-9 濃度は、急性心筋梗塞の臨床表現形の発現に関与している事が明らかとなった。病変形態のみならず、MMP-9 を含めたプラーク局所の炎症活動性を評価することは重要であることが示された。本研究の成果は、急性心筋梗塞の病態解明に寄与するのみならず、危険なプラークを心筋梗塞発症前に検出し、その発症予防に役立つと期待される。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 11 月 15 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

急性心筋梗塞症は、心電図上の臨床表現形から ST 上昇型心筋梗塞(ST-segment elevation myocardial infarction: STEMI)と非 ST 上昇型心筋梗塞(non-ST-segment-elevation myocardial infarction: NSTEMI)に分類される。急性期の治療方針や予後が大きく異なることから、この分類は臨床非常に重要である。これまでプラークの破綻を契機として引き起こされる冠動脈内腔の血栓形成量の多寡により、冠動脈内腔が完全に閉塞すると STEMI となり、亜完全閉塞にとどまる場合は NSTEMI となると考えられてきた。しかし最新の画像診断学の成果により、責任病変の形態が STEMI と NSTEMI で異なることが示され、単純な続発性血栓形成量の多寡だけでなく病変背景の差異が STEMI と NSTEMI の差異を生み出していることが示唆されている。一方、プラークの形成から破綻に至る経路には炎症機転が大きく

関与していることが報告されてきた。病理学的検討から、急性心筋梗塞患者の責任病変では、マクロファージや好中球の浸潤が多く認められ、それに伴いマトリックスメタロプロテアーゼ9(matrix metalloproteinase 9: MMP-9)やミエロペルオキシダーゼ(myeloperoxidase: MPO)といった炎症性サイトカインの発現増加が報告されプラーク局所の炎症活動性が、急性心筋梗塞の臨床表現形にも何らかの影響を及ぼしていると推察されるが、それらの関係について明らかにした報告は皆無であった。

本論文は 94 例の急性心筋梗塞(STEMI:69、NSTEMI:25)と 17 例の安定狭心症患者の責任病変を対象としている。光干渉断層法を用いてプラーク局所の形態的特徴を観察し、また病変の末梢から冠動脈血を採取し、プラーク局所の炎症性マーカーを評価した。STEMI と NSTEMI 間の比較ではプラーク破裂の頻度に差を認めなかったが、前方開口型のプラーク破裂は STEMI で有意に多い結果となった。また STEMI では赤色血栓の頻度が有意に高かった。STEMI、NSTEMI ともにプラーク局所の MMP-9 濃度や MPO 濃度は末梢血と比較し有意に高値であった。Post-stent local の MMP-9 濃度は、STEMI で有意に上昇していたが、MPO 濃度に差を認めなかった。多変量解析では、post-stent local MMP-9 濃度と、赤色血栓の存在が、急性心筋梗塞患者で STEMI を決定づける独立した因子であった。

以上、本論文は急性心筋梗塞の臨床表現型の差異を決定する因子としてプラーク局所の MMP-9 の発現が重要であることを示したものである。本研究は生体におけるプラーク局所の炎症を評価する手法を確立した点、およびプラーク局所の MMP-9 が、新たな治療ターゲットとなる可能性を示したものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第547号		
学位授与の日	平成29年1月17日		
氏名	岩橋 弘樹		
学位論文の題目	The association between the cross-sectional area of the dural sac and low back pain in a large population: The Wakayama Spine Study (一般地域住民における硬膜管面積と腰痛の関連 -The Wakayama Spine Study-)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 中尾 直之	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

【緒言】腰部脊柱管狭窄症(LSS)は脊椎の周囲組織の退行性変化のため脊柱管の面積が減少し神経組織が機械的圧迫をうけた状態であり、臀部下肢痛などの臨床症状を呈する。神経症状に加え腰痛を訴えることも多く、LSS 患者における腰痛の頻度は 67.5-95%と報告されている。LSS における腰痛は多因子な症状であり、椎間板や椎間関節の変性、さらには、神経の圧迫を回避するための前傾姿勢が原因として推察される。近年、LSS において、下肢症状の改善を目的として行なわれる神経除圧術が、副次的な効果として、腰痛の改善効果も有していることが報告され、硬膜管の狭窄と腰痛との関連が注目されている。しかしながら、これまで一般住民を対象に硬膜管面積と腰痛の関連を示した報告はない。

【方法】一般地域住民において、MRI で測定した腰部硬膜管面積と腰痛との関連を明らかにすること。和歌山県太地町で2013年に実施した The Wakayama Spine Study 第2次検診への参加者 952名(男性 303名、女性 649名)のうち、腰椎 MRI 横断像で硬膜管面積の測定が可能であったもの 802名(男性 247名、女性 555名、平均年齢 63.5±13.1歳)を対象とした。MRI T2 強調横断像を用い L1/2 から L4/5 椎間各レベルの硬膜管面積を測定した。各椎間レベルの内、最も面積の狭い硬膜管面積を minimum cross sectional area (mCSA)とした。参加者を mCSA の四分位点によって the narrow group (mCSA≤Q1)、the middle group (Q1<mCSA≤Q3)、the wide group (Q3<mCSA)の3群に分けた。椎間板変性は T2 強調矢状断像を Pfirrmann 分類に従い評価し、grade1-3を『椎間板変性なし』、grade4-5を『椎間板変性あり』とした。

腰痛の有無、臀部・下肢痛の有無については整形外科医がすべての参加者を診察し決定した。現在も含め過去1ヶ月の間、ほとんど毎日、腰痛(臀部・下肢痛)があった場合、腰痛(臀部・下肢痛)ありと定義した。腰痛の有無を目的変数、mCSAを説明変数、臀部下肢痛の有無、椎間板変性、性・年齢・BMIを調整変数とするロジスティック回帰分析を行い、硬膜管面積と腰痛の有無との関連を検討した(有意水準 p<0.05)。また、the wide group を reference とし the middle group、the narrow group の腰痛有病率のオッズ比を算出した。また、多重ロジスティック解析で用いた予測モデルの Receiver operating characteristic (ROC)曲線を作成し、各モデルにおける area under the curve (AUC)を比較した。

【結果】腰痛と臀部・下肢痛の有病率はそれぞれ 38.6%、23.3%であった。mCSA の平均値は 117.3mm²(男性 114.4mm²、女性 118.6mm²)であり、mCSA の第1四分位点、第3四分位点はそれぞれ 85.8mm²と 147.2mm²であった。

腰痛の有病率は mCSA が狭い群ほど高くなっていた(p<0.0001)。The narrow group の腰痛有病率は 50.3%、the middle group は 36.6%、the wide group は 30.8%であった。

腰痛の有無と mCSA の関連をロジスティック回帰分析で検討した。まず目的変数を腰痛、mCSA を説明変数とし年齢、性別、BMI を調整変数として検討をおこなった(モデル1)。The middle group は腰痛との有意な関連を認めなかった(odds ratio, [OR] 1.26; 95% confidence interval [CI], 0.87-1.82)が、the narrow group は腰痛との有意な関連を認めた(OR, 1.97; 95% CI, 1.27-3.04)。次に椎間板変性の有無を調整変数として加え、解析をおこなった(モデル2)。The middle group と腰

痛との有意な関連はみとめなかった(OR, 1.19; 95% CI, 0.82–1.74)が、the narrow group では腰痛と有意な関連を認めた(OR, 1.94; 95% CI, 1.25–3.02)。

さらに、臀部・下肢痛を調整変数に加え解析をおこなった(モデル3)。The middle group と腰痛との有意な関連はみとめなかった(OR, 1.18; 95% CI, 0.80–1.73)が、the narrow group では腰痛と有意な関連を認めた(OR, 1.78; 95% CI, 1.13–2.80)。

多重ロジスティック回帰分析の各モデルでROC曲線を作成したところ、各モデルのarea under the curve (AUC)はモデル1が0.59、モデル2が0.60、モデル3が0.66であった。モデル3のAUCは他の2つのモデルのAUCに比べ、有意に高かった($p=0.0008$)。

【考察】本研究の目的は硬膜間面積と腰痛との関連を明らかにすることであった。本研究により硬膜管面積の狭小が臀部・下肢痛とは独立した腰痛の原因であることが示された。硬膜管の狭窄が腰痛の原因となる理由としては硬膜管周囲の感覚神経の存在や、狭窄レベルでの腰背筋支配神経の虚血があげられる。LSSに腰痛を伴う場合、神経除圧術単独では腰痛の治療効果は期待できず、下肢症状に加えて腰痛の治療を希望する症例には、脊椎固定術を考慮するというのが従来の考え方であった。本研究結果は、腰痛をもつLSS患者には固定術が必要という従来の考えを再考する必要性を示唆する。また、椎間板変性、臀部・下肢痛の有無といった説明因子を加えることで多重ロジスティック回帰分析による予測モデルのAUCは有意に増加した。当科の寺口は先に一般住民において、椎間板変性が腰痛と有意に関連することを報告している。本研究結果は腰痛と関連する画像因子を積み重ねることで、非特異的腰痛と診断されるものの割合を減らせる可能性を示唆している。今後さらに脊柱管面積や椎間板変性と腰痛との関連を縦断的に調査することで、腰痛と画像所見との関連性や将来の腰痛発症のリスクを明らかに出来るものと考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成28年12月28日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行なった。

腰部脊柱管狭窄症(LSS)は脊椎の退行性変化のため神経組織が機械的圧迫をうけた状態であり、臀部下肢痛などの臨床症状を呈する。神経症状に加え腰痛を訴えることも多い。LSSにおける腰痛は多因子な症状であり、椎間板や椎間関節の変性、神経の圧迫を回避するための前傾姿勢などが原因として推察される。近年、LSSにおいて、下肢症状の改善を目的として行なわれる神経除圧術が、副次的な効果として、腰痛の改善効果も有していることが報告され、硬膜管の狭窄と腰痛との関連が注目されている。しかし、腰痛と硬膜管面積との関連を疫学データを元に明らかにした報告はない。本研究は一般地域住民802名を対象とし、腰痛、臀部下肢痛の有病率、硬膜管面積の代表値と分布、硬膜管面積と腰痛の有病率の関連について検討したものである。

申請者は地域住民802名のMRIを用いL1/2からL4/5椎間各レベルの硬膜管面積を測定した。各椎間レベルの内、最も面積の狭い硬膜管面積をminimum cross sectional area (mCSA)とした。参加者をmCSAの四分位点によってthe narrow group ($mCSA \leq Q1$)、the middle group ($Q1 < mCSA \leq Q3$)、the wide group ($Q3 < mCSA$)の3群に分けた。腰痛と臀部・下肢痛の有病率はそれぞれ38.6%、23.3%であった。mCSAの平均値は117.3mm²(男性114.4mm²、女性118.6mm²)であった。また硬膜管面積は高齢者ほど、また、下位椎間ほど狭くなっていた。腰痛の有病率はmCSAが狭い群ほど高くなっていた。腰痛の有無とmCSAの関連をロジスティック回帰分析を用い、年齢、性別、BMI、椎間板変性の有無、臀部・下肢痛を調整変数に加え解析をおこなったところthe narrow groupでは腰痛と有意な関連を認めた(OR, 1.78; 95% CI, 1.13–2.80)。

本研究により硬膜管面積の狭小が臀部・下肢痛とは独立した腰痛の原因であることが示された。硬膜管の狭窄が腰痛の原因となる理由としては硬膜管周囲の感覚神経の存在や、狭窄レベルでの腰背筋支配神経の虚血があげられる。LSSに腰痛を伴う場合、下肢症状に加えて腰痛の治療を希望する症例には、脊椎固定術を考慮するというのが従来の考え方であった。本研究結果は、腰痛をもつLSS患者には固定術が必要という従来の考えを再考する必要性を示唆する。また、本研究結果は臀部・下肢痛を伴わない腰痛患者において”非特異的”と診断されているものの中に、脊柱管狭窄による腰痛が存在することを示唆すると考えられる。

本論文は、硬膜管狭窄と腰痛の関連について、一般住民コホートをを用いて明らかにした点で意義深いものであり、学位論文として価値のあるものであると認めた。

学位記番号	博(医)甲第548号		
学位授与の日	平成29年1月17日		
氏名	河上 和紀		
学位論文の題目	Persistent fibroblast growth factor 23 signalling in the parathyroid glands for secondary hyperparathyroidism in mice with chronic kidney disease (慢性腎臓病マウスにおける副甲状腺への長期的な FGF23 シグナルは二次性副甲状腺機能亢進症を発症させる)		
論文審査委員	主査	教授 赤水 尚史	
	副査	教授 重松 隆	教授 坂口 和成

論文内容の要旨

【緒言】

副甲状腺は細胞外カルシウム濃度の調節に不可欠な副甲状腺ホルモン(PTH)を分泌する器官である。副甲状腺の機能が亢進すると PTH が過剰に生産され、骨吸収亢進により骨密度が低下することで骨変形・病的骨折などの原因となる他、血中のカルシウム・リン積が高くなり異所性石灰化、動脈硬化などを引き起こし、生命予後不良につながる。PTH の分泌は血中のカルシウム、リン、活性型ビタミン D(1,25(OH)₂D)、FGF23 等によって直接的/間接的に調節されることが知られているが、FGF23 の副甲状腺に対する機能については議論のあるところである。In vivo および In vitro の実験では高濃度の FGF23 を投与することで PTH の mRNA 発現や PTH の分泌が抑制されるという報告がある一方で、血中 FGF23 の高値が持続する典型的な疾患である慢性腎臓病(CKD)では、副甲状腺細胞の過形成を伴う二次性副甲状腺機能亢進症を併発することが知られている。

私たちの仮説は、過剰に増加した FGF23 の長期的な刺激が副甲状腺の過形成を誘起するというものであり、これを証明するため Cre-LoxP システムを用いて FGF 受容体及び α Klotho の遺伝子を副甲状腺特異的にノックアウトした。これらのマウスを使用して、in vivo および in vitro の系で研究を実施した。in vivo では CKD モデルマウスを作製し、in vitro では副甲状腺長期培養系で FGF23 を添加することにより FGF23 が高値となる環境を再現し、二次性副甲状腺機能亢進症における FGF23/ α Klotho/FGF 受容体の役割について検討した。

【方法】

4種類存在する FGF 受容体遺伝子のうち *Fgfr1*、*Fgfr2* および *Fgfr3* のトリプル Flox マウス、 α Klotho の Flox マウス、及び *Fgfr1*~4 の全てを Flox で持つマウスに PTH-Cre マウスをかけ合わせ、副甲状腺特異的な KO [*Fgfr(1-3) cKO*、*Klotho cKO*、*Fgfr(1-4) cKO*] マウスを作製した。また、コントロールとして PTH-Cre を持たない *Fgfr(1-3) Flox*、 α Klotho Flox、および *Fgfr(1-4) Flox* マウスを使用した。

In vivo の実験系では各マウスの 8 週齢時に片腎摘出を行い、12 週齢から 12 週間の高リン(2%) 低カルシウム(0.4%)食を与えることにより CKD モデルマウスを作製した。また、コントロール実験として片腎摘出無、通常食の non-CKD モデルマウスを作製した。全てのマウスは 4 週齢で離乳を行い、24 週齢で採血および採尿後に解剖し、遺伝子発現解析、生化学検査、組織学検査等を行った。

In vitro の実験系では *Fgfr(1-3) cKO* マウス、 α Klotho cKO マウスおよびコントロールマウスの副甲状腺を単離してコラーゲンゲル内に包埋し、カルシウム濃度を 0.95 mM に調

節した MEM 培養液中で、培養液を交換しながら 4 日間培養した。培養液には FGF23 (100 ng/mL に調節)を添加したものと未添加のものを用い、基準となる培養開始後 2 時間時点の PTH 濃度と比較することで、PTH の分泌の変化、及び副甲状腺の細胞増殖を解析した。

【結果】

- (1)組織学的な解析により、non-CKD 群マウス副甲状腺での FGFR1-3、 α KLOTHO の発現が確認されたが FGFR4 は検出できなかった。また、*Fgfr(1-3)*、 *α Klotho* 及び *Fgfr(1-4)*cKO マウスの副甲状腺ではそれぞれの発現が無くなっていることを確認した。また、CKD 群の *Fgfr1-4* cKO マウス副甲状腺は non-CKD 群マウスと比べて FGFR1-4、及び α Klotho の発現に変化は見られなかった。
- (2)*in vivo* の実験系では CKD 群のマウスは腎臓における血管石灰化マーカー *Opn*、線維化マーカー *Vim*、腎障害マーカー *Ngal* 及び *Kim*、ビタミン D 活性化酵素 *Cyp27b1*、ビタミン D 不活化酵素 *Cyp24a1* の発現が有意に上昇しており、*Fgfr(1-3)*、 *α Klotho* 及び *Fgfr(1-4)* の cKO の有無で差は無かった。 *α Klotho* の発現、クレアチニン・クリアランスは CKD 群のマウスで有意に減少しており、各遺伝子の cKO の有無で差はなかった。
- (3)生化学検査では CKD 群の血中カルシウムが有意に減少し、リン、FGF23 および $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ は有意に上昇していたが、これらの指標は *Fgfr(1-3)*、 *α Klotho* 及び *Fgfr(1-4)* の cKO による差は認められなかった。しかし、PTH は non-CKD 群マウスと比べて CKD 群で有意に上昇し、*Fgfr(1-3)*、 *α Klotho* 及び *Fgfr(1-4)* の cKO によって上昇が有意に抑制された。 $25(\text{OH})\text{D}$ は CKD 群、non-CKD 群の間で有意差は無く、 *α Klotho* 及び *Fgfr(1-4)* の cKO による差も無かった。
- (4)副甲状腺の組織学的な解析では、CKD マウスは non-CKD マウスに比べて ERK のリン酸化が顕著に増加しており、non-CKD、CKD マウス共に *Fgfr(1-3)*、 *α Klotho* 及び *Fgfr(1-4)* の cKO によって著しく減少した。カルシウム感知受容体蛋白発現量は CKD マウスの副甲状腺で減少していたが、各遺伝子の cKO による差はなかった。ビタミン D 受容体蛋白発現量は、non-CKD と CKD の群間で差はなく、*Fgfr(1-3)*、 *α Klotho* および *Fgfr(1-4)* の cKO による差もなかった。
- (5)マウスの副甲状腺の細胞数に対する、細胞増殖マーカー Ki67 の陽性細胞の割合を調べたところ non-CKD 群と比べて CKD 群の副甲状腺は Ki67 陽性細胞が顕著に増加しており、その増加は *Fgfr(1-3)*、 *α Klotho* 及び *Fgfr(1-4)* 各遺伝子の cKO により non-CKD のレベルまで抑制された。
- (6)野生型マウスの副甲状腺を用いた *In vitro* の組織培養では FGF23 添加後 1 時間での PTH 分泌量は非添加の培養と比べて有意に減少した。添加後 13 時間では非添加の培養と差は無かった。しかし、添加後 4 日目では FGF23 添加群で PTH の分泌が著明に増加した。この FGF23 添加後 4 日目での PTH 分泌増加は *Fgfr(1-3)* または *α Klotho* の cKO によりほぼ完全に抑制された。また、副甲状腺細胞の増殖状況を調べると、培養 4 日目での細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞数は増加していたが、この増加は *Fgfr(1-3)* または *α Klotho* の cKO によってほぼ完全に抑制された。それに合わせて、FGF23 存在下において顕著に増加していた副甲状腺 ERK のリン酸化は *Fgfr(1-3)*、 *α Klotho* の cKO によって著しく減少した。

【考察】

本研究は、CKD における二次性副甲状腺機能亢進症に FGF23 がどのように関わっているかを調べたものである。副甲状腺細胞に発現しているすべての *Fgfr* および *α Klotho* をこの細胞特異的に KO する (cKO) マウス系を使い、*in vivo* での CKD モデルマウスを用いた実験および *in vitro* 組織培養系を用いた実験を行った。CKD モデルマウスを用いた

実験では、正常コントロールマウスと比較して顕著に上昇した血中 PTH 濃度は *Fgfr* および *αKlotho* の cKO により有意に抑制され、副甲状腺細胞の増殖も cKO により抑制された。組織培養系は、コラーゲンゲルに包埋することにより長期培養を可能とした新しい培養系を用いた。この系では、FGF23 は短期間では PTH 分泌の抑制に働くが、長期での作用は副甲状腺細胞の増殖を促進することによる PTH 分泌促進であることが明らかとなった。Non-cKO マウスでは FGF23 添加後の培養 4 日目での PTH 分泌は無添加コントロールと比べて著明に上昇したが、この上昇は cKO によりほぼ完全に抑制された。この長期培養系での結果は、CKD モデルマウスにおける結果を支持するものであった。培養副甲状腺の増殖も cKO により抑制された。これらの結果から、CKD に伴う二次性副甲状腺機能亢進症の発症機序として FGF23 が副甲状腺の過形成誘導を介して深く関わっていることが判明した。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成28年12月27日、学位審査担当者は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

副甲状腺ホルモン（PTH）分泌は血中カルシウム、リン、活性型ビタミンD

(1,25(OH)₂D)、FGF23 等によって直接および間接的に調節されることが知られている。これらの因子に異常をきたす慢性腎臓病（CKD）では副甲状腺機能が二次的に亢進し、PTH が過剰に産生される。この病態は骨吸収亢進による骨密度の低下や病的骨折を惹起し、また血中のカルシウム・リン積を高くすることで異所性石灰化や動脈硬化などを引き起こし、生命予後を悪化させる。しかし、FGF23 の副甲状腺に対する直接作用については議論のあるところである。本研究では、FGF23 の機能を阻害するため、副甲状腺細胞に発現しているすべての *Fgfr* および *αKlotho* をこの細胞特異的に KO する

(cKO) マウス系を使い、*in vivo* での CKD モデルマウスにおける実験および *in vitro* での長期組織培養系を用いた実験により、CKD に随伴する二次性副甲状腺機能亢進症に FGF23 がどのように関わっているかを検討した。

In vivo の実験系では各マウスの8週齢時に片腎摘出を行い、12週齢から12週間の高リン（2%）低カルシウム（0.4%）食を与えることにより CKD モデルマウスを作製し、腎摘出無しで通常食にて飼育した non-CKD モデルマウスと比較した。全てのマウスは4週齢で離乳を行い、24週齢で採血および採尿後に解剖し、遺伝子発現解析、生化学検査、組織学検査等を実施した。*In vitro* の実験系では、*Fgfr* cKO、*αKlotho* cKO および non-cKO の各マウス群の副甲状腺を単離してコラーゲンゲル内に包埋し、16時間の前培養後、カルシウム濃度を調節した MEM 培養液中で FGF23 添加有無の条件下にて培養液を24時間おきに交換しながら4日間培養した。PTH 分泌基準は前培養後培養開始前2時間の PTH 分泌量とした。4日間の副甲状腺組織培養直後の細胞増殖状態も解析した。

CKD モデルマウスを用いた実験では、血中のカルシウム、リン、FGF23、1,25(OH)₂D 及び 25(OH)D 濃度は *Fgfr* および *αKlotho* の cKO の有無で有意差は認められなかったが、non-CKD マウスと比較して顕著に上昇した血中 PTH 濃度は *Fgfr* および *αKlotho* の cKO により有意に抑制された。副甲状腺細胞の増殖も cKO により抑制された。組織培養系では、FGF23 は時間単位の短期間では PTH 分泌の抑制に働くが、日単位の長期間での作用は副甲状腺細胞の増殖を促進することによる PTH 分泌促進であることが明らかとなった。non-cKO マウス由来の副甲状腺において FGF23 添加培養4日目の PTH 分泌は無添加コントロールと比べて著明に上昇したが、この上昇は cKO によりほぼ完全に抑制された。培養副甲状腺の増殖も cKO により抑制された。こ

の長期培養系での結果は、CKD モデルマウスにおける結果を支持するものである。これらの結果から、CKD に伴う二次性副甲状腺機能亢進症の発症機序として FGF23 が副甲状腺細胞の増殖誘導を介して深く関わっていることが判明した。

本研究は慢性腎臓病に伴う二次性副甲状腺機能亢進症の予防および治療の基盤となる病態を解明した点で有意義な研究であり、学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第549号		
学位授与の日	平成29年2月7日		
氏名	中島 悠里		
学位論文の題目	Expression and localization of Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 and Klotho in the spleen: Its physiological and functional implications (脾臓における FGF23 とそのリガンドである Klotho の発現部位および生物学的役割)		
論文審査委員	主査	教授	古川福実
	副査	教授	赤水尚史
			教授 重松隆

論文内容の要旨

【緒言】

これまでに、線維芽細胞増殖因子 23 (fibroblast growth factor 23; FGF23) /Klotho 欠損マウスは短命・早老であることから、FGF23/Klotho シグナルは老化に関わると報告されている。FGF23 と Klotho は、それぞれ骨と腎臓で発現し、リン・カルシウム代謝に関与し、その異常が老化を加速していると考えられている。しかし、近年、FGF23 のリン・カルシウム代謝以外の作用が報告されてきた。例えば、FGF23 は心臓心室肥大をきたすことや、好中球の遊走能を妨げ炎症反応を修飾することが報告されている。また、我々は FGF23 が骨組織以外にも脾臓で発現し、その制御がリン・カルシウム代謝と異なる可能性があることをこれまでに報告してきた。具体的には、FGF23 mRNA 発現は、尿毒症状態での骨組織では増加するが脾臓では増加しないこと、さらに、尿毒症状態での骨細胞における FGF23 mRNA 発現上昇は副甲状腺摘出後の骨組織では減少するが、脾臓では影響を受けない。これらの結果から、FGF23/Klotho シグナルはリン・カルシウム代謝以外に免疫系にも関わる可能性があることが示唆される。そこで、脾臓での FGF23 と Klotho 発現細胞を特定することにより、脾臓における FGF23/Klotho の生物学的役割を解明することを試みた。本研究は脾臓での FGF23/Klotho の機能を解明することで、新たな免疫システムの知見を得ることを目的とした。

【方法】

1. 脾臓での FGF23/Klotho 発現を確認するため、定量的 PCR を用いて解析した。また、脾臓におけるそれぞれの分布を確認するために、抗 FGF23 抗体・抗 Klotho 抗体、抗 MOMA-1 抗体 (脾臓辺縁帯に存在するマクロファージのマーカー) を用いて、酵素抗体法・蛍光抗体法による免疫組織染色を行った。
2. 脾臓での Klotho 発現細胞を特定するために、フローサイトメトリーを施行した。FITC 標識した抗 CD3 抗体 (T 細胞マーカー)、抗 CD19 抗体 (B 細胞マーカー)、抗 CD11c 抗体 (樹状細胞マーカー) と PE 標識抗 Klotho 抗体を用いて Klotho を発現している細胞を特定し、さらに、B 細胞の各分化段階に特徴的に発現する抗 CD45R/B220 抗体 (FITC)、抗 CD21/35 抗体 (Texas-Red)、抗 CD1d 抗体 (PE/Cy7)、抗 CD43 抗体 (PE) と抗 Klotho 抗体 (Alexa Fluor 647) を用いてフローサイトメトリーを施行した。
3. Klotho はその co-receptor である FGF receptor 1 (FGFR1) と受容体複合体を形成し、FGF23 シグナルを細胞内に伝達すると報告されている。脾臓での Klotho 発現細胞が FGF23 シグナルを受容・伝達することを検討するため、Klotho 陽性細胞における FGFR1 発現を検討した。FITC 標識した抗 Klotho 抗体、Alexa Fluor 647 で標識した抗 FGFR1 抗体を用いて蛍光抗体法による二重免疫組織染色を施行した。さらに、Alexa Fluor 647 標識抗 Klotho 抗体、PE/Cy7 標識抗 FGFR1 抗体、FITC 標識抗 CD45R/B220 抗体、Texas Red 標識 CD21/35 抗体を用いてフローサイトメトリーを施行した。
4. 脾臓での FGF23 発現細胞を特定するために、FITC 標識した抗 CD3 抗体 (T 細胞マーカー)、抗 CD19 抗体 (B 細胞マーカー)、抗 CD11c 抗体 (樹状細胞マーカー) と Alexa Fluor 647 で標識した抗 FGF23 抗体を用いて蛍光二重免疫組織染色を施行した。樹状細胞についてはサブタイ

ブ特定のため FITC 標識した抗 CD11b 抗体、抗 CD8 α 抗体、抗 CD45R/B220 抗体を用いて解析を加えた。さらに、CD45R/B220⁺CD11c⁺細胞、CD45R/B220⁺CD19⁺細胞をフローサイトメトリーでソーティング後、蛋白を抽出し、ウェスタンブロットにより FGF23 蛋白の発現を解析した。

5. 脾臓での FGF23 発現細胞と Klotho 発現細胞の細胞間相互作用を検討するため、二重免疫組織染色によりそれぞれの細胞の局在について解析した。FITC 標識した抗 Klotho 抗体、Alexa Fluor 647 標識した抗 FGF23 抗体を用いた。さらに、FGF23 陽性細胞に近接している Klotho 陽性細胞が B 細胞であるか否かを検討するため、抗 FGF23 抗体 (Alexa Fluor 647)、抗 Klotho 抗体 (Hylite Fluor 555)、抗 CD19 抗体 (FITC) を用いて三重免疫組織染色を行った。
免疫染色、定量的 PCR 法、フローサイトメトリーの手法は定法に従った。

【結果】

1. 定量的 PCR により脾臓での FGF23・Klotho 遺伝子の発現が確認された。また、酵素抗体法による免疫染色で、FGF23・Klotho 蛋白はともに脾臓辺縁帯から赤脾にかけて分布することが認められた。さらに、蛍光抗体法による免疫組織染色で、FGF23・Klotho 蛋白は脾臓辺縁帯のマーカーである MOMA-1 陽性細胞の周囲に局在し、脾臓辺縁帯に存在することが示唆された。
2. フローサイトメトリーにより、CD19 陽性細胞に Klotho 発現が見られたが、CD3 および CD11c 陽性細胞には Klotho 発現は認められなかった。さらに、CD21/CD35⁺CD45R/B220⁺CD1d⁺CD43⁺細胞の 18.3 \pm 6.2%(n=5)に Klotho の発現が認められ、Klotho 発現細胞は分化した B 細胞であることが明らかとなった。
3. 二重蛍光免疫組織染色で、同一細胞に Klotho と FGFR1 の発現を認めた。また、フローサイトメトリーで、CD45R/B220⁺CD21/CD35⁺FGFR1⁺細胞の 31.3 \pm 9.2%(n=5)で Klotho が陽性であり、Klotho と FGFR1 を共発現する B 細胞が存在することが明らかとなった。
4. 二重蛍光免疫組織染色で、FGF23 の発現は CD3、CD19 の陽性細胞には認められなかったが、CD11c 陽性細胞内に認められたため、FGF23 産生細胞は樹状細胞系統であることが示唆された。また、CD11b 陽性細胞、CD8 α 陽性細胞には FGF23 の発現は認められず、CD45R/B220 陽性細胞で発現を認めたことから、FGF23 産生樹状細胞は myeloid DCs (CD11c⁺CD11b⁺CD45R/B220⁻) や CD8 α DC (CD11c⁺CD8 α ⁺CD45R/B220⁻) ではなく、plasmacytoid DC (CD11c⁺CD11b⁻CD8 α ⁻CD45R/B220⁺) であることが示唆された。さらに、ウェスタンブロットにより CD45R/B220⁺CD19⁺細胞には FGF23 蛋白を認めず、CD45R/B220⁺CD11c⁺細胞に FGF23 蛋白を認め、plasmacytoid DC が FGF23 蛋白を産生していることが確認された。
5. 二重蛍光免疫組織染色で、FGF23 陽性細胞と Klotho 陽性細胞は接していた。さらに FGF23 陽性細胞に近接する Klotho 陽性細胞は CD19 陽性であり、Klotho 陽性 B 細胞が FGF23 陽性樹状細胞に近接していることが示唆された。

【考察および結論】

これまで、FGF23/Klotho シグナルは老化に関わり、その主な機序はリン・カルシウム代謝であると報告されていた。しかし、我々は脾臓でも FGF23/Klotho が発現することをみだし、リン・カルシウム代謝以外に免疫系に関わる可能性を示唆してきた。今回、脾臓において Klotho は辺縁帯に分布する B 細胞に発現し、さらに Klotho 発現細胞が同時に FGFR1 を発現していた。このことは、脾臓における Klotho 陽性 B 細胞が FGF23 刺激により何らかの生物学的機能を発現することを示唆する。さらに、脾臓における Klotho 陽性 B 細胞は細胞表面マーカーの解析より分化した B 細胞であり、FGF23 産生細胞は plasmacytoid DC であることを特定した。さらに、Klotho 陽性細胞は FGF23 産生細胞と近接していることから、脾臓で産生される FGF23 は局所で分化した B 細胞に生物学的役割を果たしていることが示唆される。したがって、脾臓の辺縁帯といった局所でのみ分化した B 細胞の調整を行っているか、もしくは分化した B 細胞の調節に他の細胞間相互作用が必要であると考えられる。以上の結果より、FGF23/Klotho シグナルが、新たな免疫システムの調節に関与していることが示唆された。

FGF23 は他の FGF ファミリーが主に局所 (local) で働くことに対し、全身性 (systemic) に作用

する点で特異的である。具体的には、FGF23 は高リン状態で骨から分泌され、腎臓の尿細管や副甲状腺に作用し、1,25(OH)₂ ビタミン D の低下や PTH 分泌抑制を介して systemic に骨代謝に関わる。最近、FGF23 は関節の成長板を構成する肥大軟骨や静止軟骨から分泌され、Klotho 陽性軟骨細胞の分化と組織の骨化を促進するという local な役割も合わせ持つことが報告されてきた。このように、骨代謝において FGF23 は systemic と local な作用を有し、さらに、それぞれの働きに相違がみられる。本研究により、類似のシステムが免疫系においても存在する可能性が示唆された。つまり、高リン状態により骨から分泌された FGF23 は、1,25(OH)₂ ビタミン D の低下によりビタミン D レセプター/ビタミン D の応答不全を介して systemic に T 細胞や B 細胞の免疫応答を妨げる。一方、今回の研究で明らかにした様に、脾臓樹状細胞から産生された FGF23 は脾臓 Klotho B 細胞に local に作用する。これらのことから、免疫応答の方向性は、FGF23 の systemic な役割と local な役割のバランスによって決定される可能性が考えられた。例えば、慢性腎不全の患者では免疫能が低下していることが知られているが、血清 FGF23 が高値であるため、FGF23 の systemic な作用による免疫応答の低下が、脾臓における local な B 細胞への作用を凌駕することにより免疫不全に関わっている可能性が考えられる。このことについては、今後、詳細な機序の解明が必要である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 1 月 24 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

これまでに、線維芽細胞増殖因子 23 (fibroblast growth factor 23; FGF23) /Klotho シグナルは老化に関わると報告されている。FGF23 と Klotho は、それぞれ骨と腎臓で発現し、リン・カルシウム代謝に関与し、その異常が老化を加速していると考えられている。一方、我々は FGF23 が骨組織以外にも脾臓で発現し、その制御がリン・カルシウム代謝と異なる可能性があることをこれまでに報告してきた。これらの結果から、FGF23/Klotho シグナルはリン・カルシウム代謝以外に免疫系にも関わる可能性があることが示唆される。そこで、脾臓での FGF23 と Klotho 発現細胞を特定することにより、脾臓における FGF23/Klotho の生物学的役割を解明することを試みた。

まず、脾臓での FGF23/Klotho 発現を、定量的 PCR、免疫組織染色を用いて解析した。次に、脾臓での Klotho 発現細胞を特定するために、フローサイトメトリーを施行した。続いて、脾臓での Klotho 発現細胞が FGF23 シグナルを受容・伝達することを検討するため、Klotho 陽性細胞における FGF receptor 1(FGFR1)発現 (Klotho の co-receptor) を二重免疫組織染色により検討した。さらに、脾臓での FGF23 発現細胞を特定するために、蛍光二重免疫組織染色を施行した。最後に、脾臓での FGF23 発現細胞と Klotho 発現細胞の細胞間相互作用を検討するため、二重免疫組織染色によりそれぞれの細胞の局在について解析した。

その結果、脾臓において Klotho は辺縁帯に分布する B 細胞に発現し、さらに Klotho 発現細胞が同時に FGFR1 を発現していた。このことは、脾臓における Klotho 陽性 B 細胞が FGF23 刺激により何らかの生物学的機能を発現することを示唆する。さらに、脾臓における Klotho 陽性 B 細胞は細胞表面マーカーの解析より分化した B 細胞であり、FGF23 産生細胞は plasmacytoid DC であることを特定した。さらに、Klotho 陽性細胞は FGF23 産生細胞と近接していることから、脾臓で産生される FGF23 は局所で分化した B 細胞に生物学的役割を果たしていることが示唆される。したがって、脾臓の辺縁帯といった局所でのみ分化した B 細胞の調整を行っているか、もしくは分化した B 細胞の調節に他の細胞間相互作用が必要であると考えられる。

本研究により、FGF23/Klotho シグナルが、新たな免疫システムの調節に関与していることが示唆されたことから、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第550号		
学位授与の日	平成29年3月21日		
氏名	曾根勝 真弓		
学位論文の題目	Interferon-gamma potentiates NMDA receptor signaling in spinal dorsal horn neurons via microglia-neuron interaction (インターフェロン γ はミクログリアを介して脊髄後角細胞の NMDA 電流を増強する)		
論文審査委員	主査	教授	川股 知之
	副査	教授	田島 文博 教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

【緒言】神経障害性疼痛は難治性であることが多く、アロディニアや痛覚過敏、自発痛、灼熱痛等により患者の生活の質を著しく低下させる。このメカニズムの一因には脊髄レベルでの中枢性感作があると認識されているが、近年、種々のサイトカインやケモカインによって引き起こされる脊髄内ニューロン-グリア間のクロストークが、神経障害性疼痛の形成において重要な役割を果たしていることが示唆されている。炎症性サイトカインの一種であるインターフェロン γ (IFN γ) は、末梢神経損傷後の脊髄後角で発現が増加し、またラットに髄腔内投与するとアロディニア形成が確認されることから、脊髄内で神経障害性疼痛の形成に関与していると考えられる。しかしながら、IFN γ の脊髄後角レベルにおける疼痛増強作用についての報告は少ない。従って本研究では、IFN γ の脊髄後角細胞における興奮性増強作用を、電気生理学的に解析することを目的とした。

【方法】本実験計画は和歌山県立医科大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

1. 脊髄スライス標本の作製

5~6週齢の成熟 Sprague-Dawley 系雄性ラット(180-210 g)をウレタン腹腔内投与(1.2-1.5g/kg)で麻酔し、胸椎 Th9 から腰椎 L4 までの椎弓切除を行い、脊髄腰膨大部を摘出した。摘出脊髄の硬膜、クモ膜、軟膜を実体顕微鏡下に除去し、マイクロスライサー(DTK-1000、堂阪イーエム社)を用いて650 μ mの厚さにスライスした。脊髄スライスを生理的環境に保つため、95% O₂ - 5% CO₂で飽和したクレブス液(10 ml/min)を、36 \pm 1 $^{\circ}$ Cに保ちながら灌流した。クレブス液の組成は117 NaCl, 3.6 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 11 glucose (mM)であった。

2. ホールセルパッチクランプ記録

脊髄後角第II層の膠様質細胞にブラインドホールセルパッチクランプ法を適用し、voltage-clamp modeで電流応答を記録した。パッチ電極はガラス先端の抵抗が5-10 Ω のものを用いた。電極内液の組成は135 potassium gluconate, 5 KCl, 0.5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5 EGTA, 5 HEPES, and 5 ATP-Mg(mM)とした。興奮性伝達物質であるグルタミン酸の受容体であるAMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-Isloxazole-4-propionic acid)受容体、NMDA(*N*-methyl-*D*-aspartate)受容体にそれぞれの作動薬を流した際に観察される一過性の緩徐な内向き電流(それぞれAMPA電流、NMDA電流とよぶ)の振幅を計測した。AMPA電流は-70 mVの保持膜電位下に、NMDA電流は-50 mVの保持膜電位下に観察した。それぞれ得られた電流は専用の増幅器(Axopatch 200B、Molecular Devices)で増幅し、Digidata 1440A(Molecular Devices)で変換後、pCLAMP 10(Molecular Devices)で解析、記録を行った。すべてのデータは平均 \pm 標準誤差で表し、Paired Student's *t* 検定を用いた。使用した試薬については、AMPA, NMDA, minocycline hydrochloride, Teijin compound 1 hydrochloride, GDP- β -S, and tofacitinib citrateはSigma-Aldrichから、IFN γ はPeproTech、IFN γ antagonistはVWR International、MCP-1はR&Dから購入した。

【結果】AMPA、NMDAを単独で繰り返し適用することによる、膠様質細胞での内向き電流の変化がない(再現性がある)ことを確認し(それぞれ101.3 \pm 0.6%, *n* = 5, *p* = 0.09、97.9 \pm 3.1%, *n* = 5, *p* = 0.53)、まずIFN γ のAMPA電流への影響について検討を行ったところ、AMPA電流には特に変化を認めなかった(100.0 \pm 3.7%, *n* = 11, *p* = 0.87)。一方でIFN γ はNMDA電流を有意に増強させた(147.3 \pm 10.7%, *n* = 14, *p* = 0.0002)。このIFN γ によるNMDA電流増強作用は、IFN γ 受容体の選択

的アンタゴニストを同時に適用することで抑制されたことから(90.0 ± 3.6%, n = 10, p = 0.053)、IFN γ 受容体を介した作用であると考えられた。次に IFN γ 受容体の局在には、脊髄後角細胞上とミクログリア上の両方の報告があるため、IFN γ の NMDA 電流増強作用がどちらの IFN γ 受容体を介した作用であるかを検討した。ミクログリア活性化のインヒビターであるミノサイクリンを適用すると、IFN γ による NMDA 電流増強作用は抑制された(90.3 ± 6.4%, n = 12, p = 0.12)。またパッチ電極内に IFN γ の細胞内シグナル伝達経路である JAK-STAT 経路の阻害薬を混入しても IFN γ による NMDA 電流増強作用は抑制されなかったことから(98.9 ± 6.0%, n = 7, p = 0.99)、IFN γ はミクログリア上の IFN γ 受容体を介して作用していることが明らかとなった。次に IFN γ がミクログリア上の IFN γ 受容体に結合したのちにどのようなシグナルを介して膠様質細胞の NMDA 電流を増強させているのかを調べるため、パッチ電極内に G タンパクの阻害薬である GDP- β S を混入して記録を行ったところ、IFN γ による NMDA 電流増強作用は有意に抑制された(78.7 ± 5.1%, n = 6, p = 0.023)。よって細胞内シグナル伝達として G タンパク共役型受容体を介していることが示唆されたので、G タンパクを細胞内シグナルとする物質のうち、神経障害性疼痛形成への関与が知られている C-C chemokine receptor type 2 (CCR2)の選択的アンタゴニストを共に灌流投与したところ、IFN γ による NMDA 電流増強作用は抑制された(95.0 ± 5.3%, n = 6, p = 0.43)。さらに CCR2 の唯一のリガンドである CCL2 (MCP-1; monocyte chemoattractant protein 1) を単独で適用すると、NMDA 電流増強作用が確認された(128.3 ± 6.4%, n = 5, p = 0.006)。

【考察】本研究では、IFN γ は膠様質細胞の AMPA 電流ではなく NMDA 電流を有意に増強させていた。この NMDA 電流増強作用は IFN γ 受容体アンタゴニストと、ミクログリアのインヒビターであるミノサイクリンにより抑制され、またニューロン内の JAK 阻害による影響を受けなかったことから、ミクログリアにある IFN γ 受容体を介した作用であることが明らかとなった。さらにパッチクランプ記録を行っている膠様質細胞の G タンパクを阻害することによって IFN γ による NMDA 電流増強作用は抑制され、CCR2 の選択的アンタゴニストによっても NMDA 電流増強作用の抑制が見られたため、膠様質細胞の CCR2 を介している可能性が示唆された。また、CCR2 のリガンドである CCL2 の適用によっても膠様質細胞の NMDA 電流が有意に増強した。以上から IFN γ は脊髄後角に届くと、ミクログリアにある IFN γ 受容体に結合し、CCL2/CCR2 シグナリングを介して膠様質細胞の NMDA 電流を増強させていると考えられた。NMDA 受容体の活性化は、中枢性感作の一つの主要因であることが知られており、慢性疼痛の病態において重要な役割を果たしている。今回 IFN γ は膠様質細胞の NMDA 電流を増強させており、このシナプス後性作用は、IFN γ の髄腔内投与により疼痛行動が引き起こされるという種々の実験結果と合致すると考えられる。さらに今回 IFN γ による NMDA 電流増強作用が、ミクログリア上の IFN γ 受容体を介した作用であることが判明した。Tsuda らはミクログリアにおける IFN γ 受容体がアロディニア形成の主病態であると報告しており、本研究結果と一致した。さらに、CCR2 をブロックすることにより IFN γ の NMDA 電流増強作用は打ち消され、CCL2 は NMDA 電流を有意に増強させた。Gao らも CCL2 が 2 分以内という短いタイムコースで脊髄後角細胞の NMDA 電流を増強させることを報告しており、CCL2 によりマウスの脊髄スライスで後角第 I、II 層ニューロンの extracellular regulated kinase (ERK) のリン酸化が見られることも蛍光免疫染色により報告している。従って CCL2 の NMDA 電流増強作用は、後角細胞に対する直接作用であると考えられる。諸家の報告でも、マウスへの CCL2 髄腔内投与でアロディニア形成が観察されたり、CCR2 ノックアウトマウスでは神経障害によるモデルアロディニア形成が見られないこと等、CCL2/CCR2 シグナリングの神経障害性疼痛への関与を示唆する文献は多い。これに加え本研究では、CCL2 の上流に IFN γ がある可能性が示唆された。

【結語】IFN γ は脊髄後角のミクログリアにある IFN γ 受容体を介し、膠様質細胞の NMDA 電流を増強させることが明らかとなり、また CCL2 が一つのメディエーターであると考えられた。IFN γ はグリア-ニューロン間の入力を惹起することで、神経障害性疼痛形成の一因となっている可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成28年6月27日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

神経障害性疼痛は難治性であることが多く、アロディニアや痛覚過敏、自発痛、灼熱痛等により患者の生活の質を著しく低下させる。炎症性サイトカインの一種であるインターフェロン- γ (IFN γ) は、末梢神経損傷後の脊髄後角で発現が増加し、またラットに髄腔内投与するとアロディニア形成が確認されることから、脊髄内で神経障害性疼痛の形成に関与していると考えられる。従って本研究では、脊髄後角膠様質細胞にパッチクランプ法を適用し、IFN γ の脊髄後角における興奮性増強作用を電気生理学的に解析した。

IFN γ を成熟雄性ラットの脊髄スライスに灌流投与すると、AMPA 電流への影響は確認されなかったが、NMDA 電流の有意な増強が認められた。この IFN γ による NMDA 電流増強作用は、IFN γ 受容体の選択的アンタゴニストにより抑制されたことから、IFN γ 受容体を介した作用であると考えられた。IFN γ 受容体の局在には、脊髄後角細胞上とミクログリア上の両方の報告があるため、ミクログリア活性の抑制にはミノサイクリンを、また後角細胞上の IFN γ 受容体のブロックにはパッチ電極内に JAK 阻害薬を混入することにより実験を行い、IFN γ の NMDA 電流増強作用はミクログリア上の IFN γ 受容体を介した作用であることが判明した。次にパッチ電極内に G タンパク阻害剤を混入して記録を行うと IFN γ による NMDA 電流増強作用は有意に抑制され、細胞内シグナル伝達としては G タンパク共役型受容体を介していることが示唆されたので、神経障害性疼痛形成への関与が知られている CCR2 の選択的アンタゴニストを共に灌流投与したところ、IFN γ による NMDA 電流増強作用は抑制された。さらに CCR2 の唯一のリガンドである CCL2 の単独投与により、NMDA 電流増強作用が確認された。

上記結果から、IFN γ は脊髄後角のミクログリアにある IFN γ 受容体に結合し、CCL2/CCR2 シグナリングを介して膠様質細胞の NMDA 電流を増強させていることが明らかとなった。

以上、本研究は IFN γ がグリア - ニューロン間の入力を惹起することで、神経障害性疼痛形成の一因となっている可能性を示唆するものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第551号		
学位授与の日	平成29年3月21日		
氏名	浅野 真里絵		
学位論文の題目	Determination of the structures of radicals formed in the reaction of antimalarial drug artemisinin with ferrous ions (抗マラリア薬 アルテミシニンと2価鉄イオンとの反応において生成されたラジカル種の同定)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡 史郎	
	副査	教授 西尾 真智子	教授 岩橋 秀夫

論文内容の要旨

【緒言】

マラリアはハマダラ蚊によって伝播される致死率の高い感染症である。マラリアの治療薬としては、アルテミシニン **1** とその誘導体であるアルテメーター **2** およびアルテスナート **3** が広く使用されている (Figure 1)。これらは、分子内にエンドパーオキシサイド構造をもつことから、2価鉄イオンと反応しラジカルを生成すると考えられる。このラジカルの生成が、マラリア原虫の殺傷に関与していると思われる。しかしながら、ラジカルの検出および同定に関する報告はほとんどない。本研究では、アルテミシニンとその誘導体が2価鉄イオンと反応することで生成されるラジカル種の検出、分離および同定を行った。

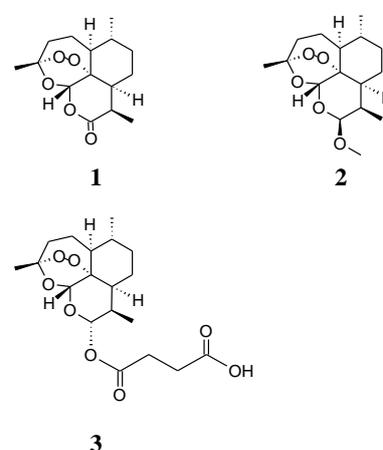


Figure 1. アルテミシニンと誘導体

【方法】

抗マラリア薬のアルテミシニン、その誘導体のアルテメーターもしくはアルテスナートと2価鉄イオンとの反応で生成するラジカルを比較的安定なラジカル付加体にするために、スピントラッピング法を用いた。ラジカル付加体の検出、分離および同定を行うため、ESR (電子スピン共鳴)、HPLC-ESR (高速液体クロマトグラフィー-電子スピン共鳴) および HPLC-ESR-MS (高速液体クロマトグラフィー-電子スピン共鳴-質量分析) 法を用いた。標準反応溶液は、67 mM アルテミシニン (もしくはアルテメーター、またはアルテスナート)、333 mM 4-POBN (スピントラップ剤)、67 mM $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2$ を含む。反応は37°Cで60分間行った。反応後、ESR分析によりラジカルの検出、HPLC-ESR分析によりラジカルの分離、HPLC-ESR-MS分析によりラジカルの同定を行った。

【結果および考察】

1. ラジカルの検出

標準反応液の ESR 測定を行なうと、トリプレット・ダブレットからなる典型的な 4-POBN ラジカル

付加体の ESR スペクトルが得られた。一方、標準反応溶液に 2 価鉄イオンあるいは抗マラリア薬を添加しない場合、ESR スペクトルは観測されなかった。

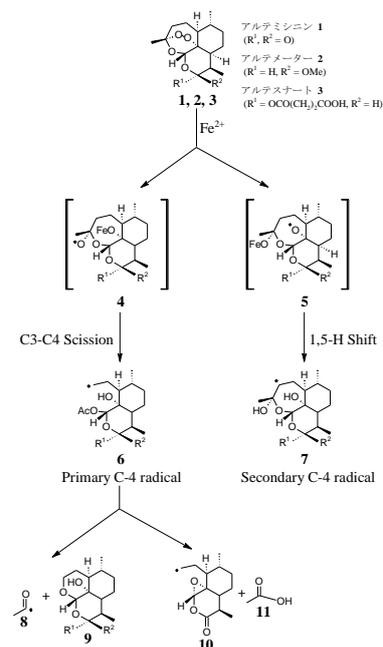
2. ラジカルの分離

標準反応液中のラジカル種を分離するため、移動相として酢酸酸性溶媒を用い、HPLC-ESR 分析を行った。アルテミシニン標準反応液では、Peak 1 (保持時間 31.3 分)、Peak 2 (保持時間 41.7 分)、Peak 3 (保持時間 42.8 分)、Peak 4 (保持時間 43.7 分) および Peak 5 (保持時間 45.1 分) の 5 個のピークが出現した。これらのピークは 2 価鉄イオンあるいはアルテミシニンを添加しない場合は出現しなかった。アルテメーター標準反応液では、Peak 1 (保持時間 31.3 分)、Peak 6 (保持時間 47.8 分) および Peak 7 (保持時間 48.9 分) の 3 個の顕著なピークが出現した。アルテスナート標準反応液では、Peak 1 (保持時間 31.7 分)、Peak 8 (保持時間 41.9 分) および Peak 9 (保持時間 42.9 分) の 3 個のピークが出現した。

同様の反応溶液について、移動相として酢酸アンモニウムによる中性溶媒を用いて HPLC-ESR 分析を行った。アルテミシニン標準反応液では、Peak 1' (保持時間 30.9 分) および Peak 2' (保持時間 44.6 分) の 2 個の顕著なピークが出現し、移動相に酸性溶媒を用いた時と比較すると溶出パターンが大きく変化した。これらのピークは 2 価鉄イオンあるいはアルテミシニンを添加しない場合は出現しなかった。アルテメーター標準反応液では、Peak 1' (保持時間 31.2 分)、Peak 3' (保持時間 47.8 分) および Peak 4' (保持時間 48.6 分) のピークが出現した。アルテメーター標準反応液は酸性溶媒を用いた時と保持時間が同様であった。アルテスナート標準反応液では、Peak 1' (保持時間 31.4 分)、Peak 5' (保持時間 35.2 分) および Peak 6' (保持時間 36.2 分) の 3 個の顕著なピークが出現した。移動相に酸性溶媒を用いた場合と比較すると、溶出パターンが大きく変化した。中性溶媒で分離されたアルテスナート標準反応液の Peak 1'、Peak 5' および Peak 6' を分取し、酸性溶媒で HPLC-ESR 分析を行うと、それぞれ Peak 1、Peak 8 および Peak 9 と同じ保持時間を示した。

3. ラジカルの同定

HPLC-ESR 分析で得られたそれぞれのピークを、HPLC-ESR-MS を用いて質量分析を行った。Peak 1 からは m/z 238 の分子イオンと m/z 151 のフラグメントイオンの質量スペクトルが得られた。この結果より、4-POBN と **8** ラジカル (Scheme 1) 付加体が検出されたことが示唆される。Peak 2、Peak 3、Peak 4 からは m/z 478 のイオンが得られた。この結果より、4-POBN と **6** あるいは **7** ラジカル (Scheme 1) 付加体が検出されたと思われる。Peak 5 からは m/z 418 のイオンが検出された。この結果より、4-POBN と **10** ラジカル (Scheme 1) 付加体が検出されたと考えられる。Peak 6 と



Scheme 1. アルテミシニンと誘導体のラジカル生成機構

Peak 7からは、 m/z 494 の分子イオンが検出された。この結果より、4-POBN と **6** あるいは **7** ラジカル (Scheme 1) 付加体が検出されたと思われる。Peak 8 と Peak 9からは、 m/z 580 の分子イオンが得られた。この結果より、4-POBN と **6** あるいは **7** ラジカル (Scheme 1) 付加体が検出されたと思われる。Peak 1' は m/z 238 の分子イオンと m/z 151 のフラグメントイオンの質量スペクトルが得られた。この結果より、4-POBN と **8** ラジカル (Scheme 1) 付加体が検出されたと思われる。Peak 2' からは m/z 418 のイオンが検出された。この結果より、4-POBN と **10** ラジカル (Scheme 1) 付加体が検出されたと考えられる。

【まとめ】

アルテミシニン、アルテメーターおよびアルテスナートと 2 価鉄イオンとの反応において、アルテミシニンからはラジカル **6**、**7**、**8** および **10**、アルテメーターからはラジカル **7** および **8**、アルテスナートからはラジカル **7** および **8** がそれぞれ検出・同定された。これらのラジカルはマラリアの治癒に関与する可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 29 年 2 月 1 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

マラリアは、マラリア原虫により引き起こされる致死率の高い感染症である。マラリア原虫は、ヒト赤血球内のヘモグロビンを栄養源にして増殖を繰り返す。治療薬として、クソニンジンの葉から発見され単離・構造決定されたアルテミシニンと、アルテミシニン誘導体のアルテメーターおよびアルテスナートが広く使用されている。これらの抗マラリア薬の作用機序として、分子内のエンドパーオキシサイド構造とヘモグロビンの 2 価鉄イオンが反応しラジカルが生じ、生成されたラジカルがマラリア原虫の死滅を引き起こすと考えられている。しかし、どのような構造のラジカル種が生成されているかについての報告はない。本研究では、アルテミシニンとアルテミシニン誘導体のアルテメーターおよびアルテスナートを 2 価鉄イオンと反応させ、生成されたラジカル種の検出、分離および構造決定を行った。

アルテミシニン (もしくはアルテメーター、またはアルテスナート)、 $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2$ 、4-POBN (スピントラップ剤) を含む標準反応溶液から顕著な電子共鳴 (ESR) スペクトルが得られた。ラジカル種を分離するために HPLC-ESR 分析を行うと、アルテミシニン標準反応液からは Peak 1 (保持時間 31.3 分)、Peak 2 (保持時間 41.7 分)、Peak 3 (保持時間 42.8 分)、Peak 4 (保持時間 43.7 分) および Peak 5 (保持時間 45.1 分) の 5 個のピークが出現した。アルテメーター標準反応液からは Peak 1 (保持時間 31.3 分)、Peak 6 (保持時間 47.8 分) および Peak 7 (保持時間 48.9 分) の 3 個のピークが出現した。また、アルテスナート標準反応液からは Peak 1 (保持時間 31.7 分)、Peak 8 (保

保持時間 41.9 分) および Peak 9 (保持時間 42.9 分) の 3 個のピークが出現した。それぞれのピークの構造決定を行うために、HPLC-ESR-MS を用い質量分析を行った。分析の結果、Peak 1–Peak 9 は、アルテミシニンあるいはアルテミシニン誘導体由来のラジカルと 4-POBN との付加体に相当することが明らかになった。

本研究で構造決定されたアルテミシニンあるいはアルテミシニン誘導体由来のラジカル種が、マラリア原虫の死滅に関与する可能性があり、その医学的関連の重要性から学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第552号		
学位授与の日	平成29年3月21日		
氏名	増本 明日香		
学位論文の題目	Calcium overload accelerates phosphate-induced vascular calcification via Pit-1, but not calcium-sensing receptor (過剰カルシウムは、CaSRではなく、Pit-1を介して、リンが導く血管石灰化を促進する。)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 岸岡 史郎	教授 重松 隆

論文内容の要旨

[緒言]

血管石灰化は慢性腎臓病（CKD）患者に頻発し、心血管病死、全死亡リスクを共に増加させることが明らかになっている。透析患者では、血管中膜石灰化が起こりやすく、石灰化のリスクを持たない若年者でも、血管石灰化が進行していることが報告されている。中膜石灰化の発症機序は ①カルシウム・リン代謝異常 ②血管平滑筋細胞の骨芽細胞への形質転換 ③血管平滑筋細胞のアポトーシス ④血管石灰化抑制因子の欠乏などが考えられている。

血清リン値はCKDに伴う骨ミネラル代謝異常（CKD-MBD）と血管石灰化の最も重要な因子であり、高リン血症は、血管石灰化を促進することが明らかになっている。我々は、これまでにⅢ型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター（NaPiⅢ：Pit-1）を介したリン上昇が、血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導し、血管平滑筋細胞の石灰化を促進することを、血管組織培養を用いた実験で報告した。臨床においても、カルシウム・リンをコントロールすることは、血管石灰化を抑制し、生命予後を改善するという点において、重要と考えられている。これまで多くの疫学研究により、透析患者において、高リン血症と死亡リスクに有意な相関性を認めることは、よく知られている。また、血清カルシウム濃度についても、死亡リスクと相関性があることが報告されているが、その機序は明らかにされていない。今回我々は、高リン条件下において、カルシウム負荷が血管石灰化に与える影響と、その機序に関する検討を行った。

[目的]

ラット血管組織培養モデルを用い、高リン条件下において、カルシウム負荷が血管石灰化に与える影響と、その機序に関する検討を行う。

[方法]

- 1) 7-8週齢の雄SDラットを使用した。ラット大動脈を摘出後、3-5mm厚に切断し、培養液のリン濃度を0.9mM（正常リン）、3.8mM（高リン）に調整し、カルシウム濃度をそれぞれ1.8mM（正常カルシウム）、2.2mM、2.6mM、3.0mM（高カルシウム）に調整した。von Kossa染色を用いて石灰化の程度を評価し、比色定量法を用いて組織のカルシウム含有量を測定した。
- 2) 培養組織から、蛋白を抽出し、Pit-1蛋白発現量をウェスタンブロット法を用いて測定した。
- 3) 正常リン・正常カルシウム群、高リン・正常カルシウム群、高リン・高カルシウム群の培養液にそれぞれPit-1阻害剤であるphosphonoformic acid（PFA）を添加し、組織培養を行った。von Kossa染色を用いて石灰化の程度を評価し、比色定量法を用いて組織のカルシウム含有量を測定した。
- 4) 高リン条件下で、正常カルシウム、高カルシウム培養液にcalcium-sensing receptor（CaSR）のアロステリック阻害薬であるCaltimimetics（R568）を0, 10, 100, 1000ng/mLの濃度でそれぞれ添加し、組織培養を行った。von Kossa染色を用いて石灰化の程度を評価し、比色定量法を用いて

組織のカルシウム含有量を測定した。

[結果]

1) 培養期間と血管石灰化の程度

正常リン群では、培養液のカルシウム濃度に関わらず、血管石灰化は認めなかった。高リン群では、培養期間依存性に血管石灰化が増加した。高リン・高カルシウム群では、高リン・正常カルシウム群よりもすべての培養期間において血管石灰化が増加した。

2) カルシウム濃度の影響

正常リン群では、培養液のカルシウム濃度に関わらず、血管石灰化は認めなかった。高リン群では、培養液のカルシウム濃度依存性に血管石灰化が増加した。

3) Pit-1 蛋白発現量

正常リン群と比較し、高リン群では、Pit-1 蛋白発現量が増加した。高リン群では、培養液のカルシウム濃度依存性に Pit-1 蛋白発現量が増加した。

4) PFA 添加の影響

PFA による Pit-1 の阻害により、高リン・正常カルシウム群及び高リン・高カルシウム群での血管石灰化は、ほぼ完全に抑制された。

5) Calcimimetics 添加の影響

Calcimimetics (R568) 添加では、高リン・正常カルシウム群及び高リン・高カルシウム群において血管石灰化の程度に変化は認めなかった。

[考察および結論]

カルシウム負荷は、高リン条件下で血管石灰化を増強した。Pit-1 蛋白発現量が、カルシウム濃度依存性に増加したこと、Pit-1 の阻害剤である PFA 添加により、血管石灰化が抑制されたことから、カルシウム負荷は高リン条件下で、Pit-1 発現を増加させることで、血管石灰化を増強することがわかった。Calcimimetics (R568) 添加によって、血管石灰化の程度は変化せず、血管 CaSR を介する機序は否定された。以上の結果より高リン条件下でのカルシウム負荷は、CaSR を介するのではなく、Pit-1 を介して血管石灰化を増強することが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 29 年 2 月 10 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。本論文は、ラット血管組織培養モデルを用い、高リン条件下において、カルシウム負荷が血管石灰化に与える影響と、その機序に関する検討を行ったものである。

血管石灰化は慢性腎臓病 (CKD) 患者に頻発し、心血管病死、全死亡リスクを共に増加させることが明らかになっている。透析患者では、血管中膜石灰化が起りやすく、石灰化のリスクを持たない若年者でも、血管石灰化が進行していることが報告されている。透析患者において、高リン血症と死亡リスクに有意な相関性を認めることは、よく知られている。また、血清カルシウム濃度についても、死亡リスクと相関性があることが報告されているが、その機序は明らかにされていない。

まず、7-8 週齢の雄 SD ラットを用いた大動脈組織培養において、カルシウム・リン負荷を行った培地での石灰化の程度を検討した。正常リン群 (リン濃度 0.9mM) では、培養液のカルシウム濃度 (1.8mM, 2.2mM, 2.6mM, 3.0mM) に関わらず、血管石灰化は認めなかった。高リン群 (リン濃度 3.8mM) では、培養液のカルシウム濃度依存性に血管石灰化が増加した。よって、カルシウム負荷は、高リン条件下でのみ血管石灰化を増強することがわかった。

次に、ウエスタンブロット法により、Pit-1 蛋白発現量を測定したところ、正常リン群と比較し、高リン群では、Pit-1 蛋白発現量が増加した。高リン群では、培養液のカルシウム濃度依存性に Pit-1 蛋白発現量が増加した。そこで、培地に Pit-1 の阻害薬である PFA を添加したところ、高リン・正常カルシウム群及び高リン・高カルシウム群での血管石灰化は、ほぼ完全に抑制された。以上より、Pit-1

蛋白発現量が、高リン条件下においては、カルシウム濃度依存性に増加したこと、PFA 添加により、血管石灰化が抑制されたことから、カルシウム負荷は高リン条件下で、Pit-1 発現を増加させることで、血管石灰化を増強することがわかった。

また、カルシウム感受性受容体 (CaSR) を介した石灰化機序を検討するために、培地に CaSR 作動薬である Calcimimetics (R568) 添加を行ったが、高リン・正常カルシウム群及び高リン・高カルシウム群において血管石灰化の程度に変化は認めなかった。つまり、Calcimimetics (R568) 添加によって、血管石灰化の程度は変化せず、血管 CaSR を介する機序は否定された。

今回の我々の研究により、カルシウム負荷は、高リン条件下でのみ血管石灰化を増強することが明らかとなり、高リン条件下でのカルシウム負荷は、CaSR を介するのではなく、Pit-1 を介して血管石灰化を増強するというメカニズムが解明された。

以上より、本研究は、カルシウム負荷による血管石灰化機序の解明を行ったものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第553号		
学位授与の日	平成29年3月21日		
氏名	細川 聖記		
学位論文の題目	Optimal scanning timing by use of multi-detector row computed tomography during thoracic aortography for depiction of arteries causing hemoptysis (咯血の原因となる動脈を描写するための胸部大動脈造影 CT を用いた最適な撮影タイミングの検討)		
論文審査委員	主査	教授 山本 信之	
	副査	教授 加藤 正哉	教授 園村 哲郎

論文内容の要旨

【背景】 咯血に対する気管支動脈塞栓術 (bronchial artery embolization:BAE) の責任血管同定のためには経静脈由来の CT angiography の有用性の報告がある。しかし CT angiography では、気管支動脈と肺動脈、肺静脈、心臓と気管支動脈がかさなり、大動脈からの分岐を同定することはしばしば困難である。さらに CT angiography では、非イオン性造影剤の多量投与 (100ml) がなされる。最適な撮影タイミングを用いて胸部大動脈造影 (Thoracic aortography:TA) 下に MDCT (multi-detector row computed tomography) を撮像 (MDCT-TA) することを試みることにより被曝と造影剤量の減量だけでなく、咯血を引き起こしている動脈のより詳細な描写を得ることが出来ると仮定した。本研究の目的は、咯血の責任動脈描出のための MDCT-TA の至適撮像条件とその臨床的有用性を明らかにすることである。

【対象と方法】 《対象》 咯血を主訴とし BAE を連続的に施行された 15 症例の患者を対象とした。すべての患者に対して TA と MDCT-TA を行い BAE の術前評価を行った。《TA》 すべての患者に対して塞栓前に TA を行った。TA にて円形の関心領域 (region of interest:ROI) を上行大動脈、大動脈弓、気管分岐の高さの下行大動脈、横隔膜の高さの下行大動脈の 4 箇所を設置した。それぞれの ROI から時間-造影効果曲線を作成した。それぞれの ROI における造影剤注入開始から、時間-造影効果曲線のフラットピーク終了までの平均時間を求めた。《MDCT-TA》 BAE 前に MDCT-TA を行った。得られたデータを用いて 3D-VR (three dimensional volume rendering) の画像処理を行った。当初の 5 人の患者に対し、3 倍の希釈造影剤を、次の 5 人の患者に対し 2.5 倍の希釈造影剤を、最後の 5 人の患者に 2 倍の希釈造影剤を用いた。《画像定量解析》 MDCT-TA の上で、上行大動脈、大動脈弓、気管分岐レベルの下行大動脈と横隔膜レベルの下行大動脈で、3 倍、2.5 倍、2 倍の各希釈群の CT 値を計測した。横隔膜レベルでの下行大動脈の CT 値を各希釈群の 3 群間比較を Student's t test と Bonferroni correction で行った。次に選択的気管支動脈造影をゴールデンスタンダードとして、MDCT-TA から作成された 3D-VR と TA の気管支動脈の画像を比較検討した。それぞれの画像を「excellent」と「not excellent」に分類し、Fisher's exact test を行った。

【結果】 《TA における造影剤注入開始からフラットピーク造影幅終端までの平均時間》 CM 注入開始からそれぞれのピーク造影幅終端までの平均時間は、それぞれ 4.20 ± 0.41 、 4.49 ± 0.53 、 4.66 ± 0.49 および 4.86 ± 0.42 秒であった。《MDCT-TA の造影剤注入時間》 TA で造影剤注入開始から横隔膜レベルの下行大動脈におけるピーク造影幅終端までの平均時間は 4.86 秒であったので、TA での造影剤注入完了から横隔膜レベルの下行大動脈のピーク造影幅終端までの平均時間は 1.86 秒となった。したがって造影剤注入は MDCT-TA で最後のスライスが得られる 1.86 秒 (約 2 秒) 前に完了する事が出来る。《3 倍、2.5 倍、2 倍の各希釈造影剤グループ間での CT 値》 横隔膜レベルの下行大動脈の CT 値 (HU) は、有意に 2 倍希釈群が高値であった。《TA と MDCT-TA における気管支動脈の可視性》 各症例で MDCT-TA から得られた 3D-VR により胸部大動脈からの気管支動脈の分岐部位が描出された。MDCT-TA の 3D-VR は TA の画像と比較しより多くの「excellent」の評価を受け、画像評価で「excellent」と「not excellent」に有意差を認めた。

【結語】 本研究における MDCT-TA を用いた咯血の責任血管を描出するための最適なプロトコールは以下の通りである。350ml I/ml の原液造影剤を 2 倍希釈し 10 ml / sec の早さで注入する、撮影は造影剤注入開始から約 5 秒後に開始する。また造影剤の注入時間は撮影時間に 3 秒をプラスして表すことができ、余分な注入量を回避できた。このプロトコールを用いて TA と MDCT-TA を行い、15 症例全てにおいて MDCT-TA では胸部大動脈から気管支動脈の分岐部位、気管支動脈の分布を描出する事ができ、TA と比べて有意に画像評価が高く、臨床的に有用であった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年2月17日と20日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

【背景】 咯血に対する気管支動脈塞栓術（bronchial artery embolization:BAE）の責任血管同定のためには経静脈由来のCT angiographyの有用性の報告がある。しかしCT angiographyでは、気管支動脈と肺動脈、肺静脈、心臓と気管支動脈がかさなり、大動脈からの分岐を同定することはしばしば困難である。さらにCT angiographyでは、非イオン性造影剤の多量投与（100ml）がなされる。最適な撮影タイミングを用いて胸部大動脈造影（Thoracic aortography:TA）下にMDCT（multi-detector row computed tomography）を撮像（MDCT-TA）することを試みることにより被曝と造影剤量の減量だけでなく、咯血を引き起こしている動脈のより詳細な描写を得ることが出来ると仮定した。本研究の目的は、咯血の責任動脈描出のためのMDCT-TAの至適撮像条件とその臨床的有用性を明らかにすることである。

【対象と方法】《対象》 咯血を主訴としBAEを連続的に施行された15症例の患者を対象とした。すべての患者に対してTAとMDCT-TAを行いBAEの術前評価を行った。《TA》すべての患者に対して塞栓前にTAを行った。TAにて円形の関心領域（region of interest:ROI）を上行大動脈、大動脈弓、気管分岐の高さの下行大動脈、横隔膜の高さの下行大動脈の4箇所を設置した。それぞれのROIから時間-造影効果曲線を作成した。それぞれのROIにおける造影剤注入開始から、時間-造影効果曲線のフラットピーク終了までの平均時間を求めた。《MDCT-TA》BAE前にMDCT-TAを行った。得られたデータを用いて3D-VR（three dimensional volume rendering）の画像処理を行った。当初の5人の患者に対し、3倍の希釈造影剤を、次の5人の患者に対し2.5倍の希釈造影剤を、最後の5人の患者に2倍の希釈造影剤を用いた。《画像定量解析》MDCT-TAの上で、上行大動脈、大動脈弓、気管分岐レベルの下行大動脈と横隔膜レベルの下行大動脈で、3倍、2.5倍、2倍の各希釈群のCT値を計測した。横隔膜レベルでの下行大動脈のCT値を各希釈群の3群間比較をStudent's t testとBonferroni correctionで行った。次に選択的気管支動脈造影をゴールデンスタンダードとして、MDCT-TAから作成された3D-VRとTAの気管支動脈の画像を比較検討した。それぞれの画像を「excellent」と「not excellent」に分類し、Fisher's exact testを行った。

【結果】《TAにおける造影剤注入開始からフラットピーク造影幅終端までの平均時間》CM注入開始からそれぞれのピーク造影幅終端までの平均時間は、それぞれ4.20±0.41、4.49±0.53、4.66±0.49 および4.86±0.42秒であった。《MDCT-TAの造影剤注入時間》TAで造影剤注入開始から横隔膜レベルの下行大動脈におけるピーク造影幅終端までの平均時間は4.86秒であったので、TAでの造影剤注入完了から横隔膜レベルの下行大動脈のピーク造影幅終端までの平均時間は1.86秒となった。したがって造影剤注入はMDCT-TAで最後のスライスが得られる1.86秒（約2秒）前に完了する事が出来る。《3倍、2.5倍、2倍の各希釈造影剤グループ間でのCT値》横隔膜レベルの下行大動脈のCT値（HU）は、有意に2倍希釈群が高値であった。《TAとMDCT-TAにおける気管支動脈の可視性》各症例でMDCT-TAから得られた3D-VRにより胸部大動脈からの気管支動脈の分岐部位が描出された。MDCT-TAの3D-VRはTAの画像と比較しより多くの「excellent」の評価を受け、画像評価で「excellent」と「not excellent」に有意差を認めた。

【結語】本研究におけるMDCT-TAを用いた咯血の責任血管を描出するための最適なプロトコールは以下の通りである。350ml I/mlの原液造影剤を2倍希釈し10 ml / secの早さで注入する、撮影は造影剤注入開始から約5秒後に開始する。また造影剤の注入時間は撮影時間に3秒をプラスして表すことができ、余分な注入量を回避できた。このプロトコールを用いてTAとMDCT-TAを行い、15症例全てにおいてMDCT-TAでは胸部大動脈から気管支動脈の分岐部位、気管支動脈の分布を描出する事ができ、TAと比べて有意に画像評価が高く、臨床的に有用であった。本論文は、咯血におけるTAEにおいて、責任血管を描出するために用いるMDCT-TAの最適な撮影タイミングを明らかにした論文である。これにより従来のTAより有意に画像評価を行うことができる意義のある論文であり、学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第554号		
学位授与の日	平成29年3月21日		
氏名	岡本 健二郎		
学位論文の題目	Effect of interleukin-1beta and dehydroepiandrosterone on the expression of lumican and fibromodulin in fibroblast-like synovial cells of the human temporomandibular joint (顎関節滑膜線維芽細胞様細胞におけるDehydroepiandrosteroneに対するLumican及びFibromodulinの発現)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 藤田 茂之

論文内容の要旨

【緒言】

顎関節症とは、疼痛、運動障害など様々な症状を特長とする疾患である。臨床統計上は女性に4-9倍多くみられ、以前より性ホルモンの関連性が注目されている。

近年の研究では、女性ホルモンである estrogen の顎関節への作用について多くの研究がなされているが、性ホルモンの一つである dehydroepiandrosterone (DHEA) に関しての研究は認められない。

一方、顎関節の病態に関して、顎関節滑膜組織では、慢性炎症に基づく線維性組織の過形成が観察される。そしてそれらが一因となり、滑膜部の線維組織の過増生、癒着が引き起されることが知られている。最近の研究では、繊維成分を含む細胞外基質に対して、Small leucine-rich repeat proteoglycans (SLRPs) の一部が、TGF- β などを介し調節作用があることが知られてきた。顎関節においても、TGF- β の作用による筋線維芽細胞からのコラーゲン繊維をはじめとする細胞外マトリクスの産生は、滑膜組織の肥厚、癒着が発生する過程を考えるうえで重要である。

そこで今回、各分野で組織損傷後の創傷治癒の過程において、細胞外基質などに機能して線維組織の形成を調節していると報告されている Lumican と Fibromodulin に着眼し、研究計画を行った。Lumican と Fibromodulin の顎関節滑膜組織での存在を確認すること、そして、DHEA が顎関節滑膜組織にある Lumican、Fibromodulin の発現に対して、どのような影響を与えるかについて検討した。

【方法】

実験1：8人の顎関節円板（5人は変形性顎関節症患者、3人は正常顎関節患者）を実験に使用した。患者の年齢は20-72歳で平均59.8歳。変形性顎関節症患者はMRIにてすべての患者で復位を伴わない円板の前方転位を示した。5人の患者は、保存的治療が奏功せず、外科的処置をおこなった患者であった。正常な顎関節円板の標本は顎関節症の臨床的既往のない3人の患者の病理解剖から得られた。彼らの死因は顎関節とは関連性がなかった（舌癌、肺癌）。患者は円板前方転位や変形ではないことを確認した。すべての標本は矢状断にて切断され、すぐに4%パラホルムアルデヒド含むリン酸緩衝液(PBS)にて一晩浸漬固定した後、パラフィンにて包埋し厚さ5 μ mで矢状断の薄切標本を作成した。免疫組織学的染色のため、脱パラフィン後、PBS水洗し内因性ペルオキシダーゼの活性阻止（0.3%過酸化水素添加メタノール）を行った。その後PBS水洗、3%スキムミルクにて60分ブロックした後、一次抗体として Lumican、fibromodulin に特異的な抗体（wakayama medical university, university of South Florida より提供）を一晩反応させた。PBSにて水洗したあと、二次抗体 HRP 標識, Anti-rabbit (DAKO, Glostrup, Denmark) を60分反応させた。発色はマイヤーのヘマトキシリンを対比染色とし DAB を用いて発色させた。

実験2：5名の20-70歳の変形性顎関節症患者の手術により摘出した滑膜組織より滑膜線維芽細胞様細胞を培養し、4-7継代のものを実験に使用した。細胞培養にて得た滑膜線維芽細胞様細胞に IL-1 β と DHEA を添加し、それぞれにおいて（3、6、12、24時間）とコントロール群に分けて RNA 抽出し、Real-time PCR を用いて Lumican、Fibromodulin の mRNA の発現測定を行った。また同様に、細胞培養にて得た滑膜線維芽細胞様細胞に IL-1 β と DHEA を添加し、24時間後それぞれにおいて、蛍

光免疫染色を用いて Lumican、Fibromodulin のタンパクの発現の比較検討を行った。

【結果】

実験1：変形性顎関節症滑膜組織において、Lumicanは、広く発現していた一方、Fibromodulinの発現弱かった。正常滑膜組織においても、Lumicanは滑膜組織に広く発現していた。統計学的有意差は認められなかったが、Fibromodulinの発現において、変形性顎関節症滑膜組織の滑膜組織に比べ、正常顎関節組織の方が強く発現する傾向にあった。

実験2：顎関節滑膜線維芽細胞様細胞においてLumican、FibromodulinのmRNAの発現がことなっていた。IL-1 β はLumicanのmRNAの発現を有意に増加させたが、DHEAによってLumicanのmRNAの発現に変化は認められなかった。DHEAとIL-1 β をそれぞれ単独添加させると、FibromodulinのmRNAの発現を増加させた。DHEAとIL-1 β の両方を添加するとDHEA、IL-1 β それぞれ単独添加させたものより有意にFibromodulinのmRNAの発現を増加させた。また、IL-1 β はLumicanのタンパクの発現を増加させた。DHEAとIL-1 β の両方を添加したのものとDHEA、IL-1 β それぞれ単独添加させたものは、Fibromodulinのタンパクの発現を増加させた。

【考察】

今回の研究結果から、顎関節滑膜組織において、DHEAは、IL-1 β が引き起す炎症下で、Fibromodulinの発現を増加させる可能性が示唆された。DHEAはLumicanに対しては、細胞レベルでは、効果の発現はみとめられなかった。Fibromodulinは、線維化を促すTGF- β 1の活性を阻害することが、様々な報告により示されている。DHEAは、Fibromodulinの発現を上昇させることによって、TGF- β 1が引き起す線維の過形成を抑制する効果があるかもしれない。今回の結果は、将来的に顎関節の変性や線維の過形成による癒着の治療に役立つかもしれない。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年2月27日、論文審査委員は、学位申請者の出席を求め、論文内容について審査をおこなった。

顎関節症とは、疼痛、運動障害など様々な症状を特徴とする疾患であり、臨床統計上、性差は、女性に多く見られ、以前より性ホルモンの関連が指摘されている。

一方、顎関節滑膜組織では、慢性炎症に基づく線維性組織の過形成が観察される。そしてそれらが一因となり、滑膜部の線維組織の過増生、癒着が引き起されることが知られている。最近の研究では、線維成分を含む細胞外基質に対して、Small leucine-rich repeat proteoglycans (SLRPs)の一部が、TGF- β などを介し、調節作用があることが知られてきた。顎関節においても、TGF- β の作用による筋線維芽細胞からのコラーゲン繊維をはじめとする細胞外マトリックスの産生は、滑膜組織の肥厚、癒着が発生する過程を考えるうえで重要である。

学位申請者は、SLRPsの中でも各分野で組織損傷後の創傷治癒の過程において、細胞外基質などに機能して線維組織の形成を調節していると報告されているLumicanとFibromodulinに着眼し、研究計画を行った。LumicanとFibromodulinの顎関節滑膜組織での存在を確認すること、そして、DHEAが顎関節滑膜組織にあるLumican、Fibromodulinの発現に対して、どのような影響を与えるかについて検討した。

変形性顎関節症滑膜炎患者の滑膜組織において、Lumicanは、広く発現していたが、Fibromodulinの発現は弱かった。正常滑膜組織においても、Lumicanは滑膜組織に広く発現していた。統計学的有意差は認められなかったが、Fibromodulinの発現において、変形性顎関節症滑膜炎患者の滑膜組織に比べ、正常顎関節組織の方が強く発現する傾向にあった。顎関節滑膜線維芽細胞様細胞への添加試験においては、IL-1 β はLumicanのmRNAの発現を有意に増加させたが、DHEAによってLumicanのmRNAの発現に変化は認められなかった。DHEAとIL-1 β をそれぞれ単独添加させると、FibromodulinのmRNAの発現を増加させた。DHEAとIL-1 β の両方を添加すると、DHEAとIL-1 β をそれぞれ単独添加させたものより有意にFibromodulinのmRNAの発現を増加させた。また、IL-1 β はLumicanのタンパクの発現を増加させた。DHEAとIL-1 β の両方を添加したのものとDHEA、IL-1 β をそれぞれ単独添加させたものは、

Fibromodulinのタンパクの発現を増加させた。これらのことから、DHEAが滑膜細胞に対し、Fibromodulinの発現を促す可能性が示唆された。

以上のように学位申請者は顎関節領域で臨床上問題となっている顎関節症、特に顎関節滑膜細胞においてDHEAが、Fibromodulinの発現に関与する可能性があり、病態を解明する上で、新しい視点を導き出した点において学位論文にふさわしい価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第555号		
学位授与の日	平成29年3月21日		
氏名	貴志 真也		
学位論文の題目	Achilles tendon injury in Kendo players in junior and senior high schools: with a focus on foot function (ジュニア剣道選手のアキレス腱傷害に対する一考察～足部機能の検討～)		
論文審査委員	主査	教授 雑賀 司珠也	
	副査	教授 岸岡 史郎	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

【諸言】

剣道競技は防具を着け竹刀で打突を競うもので、板床上を裸足で強く踏み込む日本の伝統的スポーツの一つである。その競技特性（右足前・左足後ろの構えから左足で素早く床を蹴るため強い筋収縮が生じ、踵骨に付着しているアキレス腱も急激に伸張される。剣道の稽古中にはこのような動作が繰り返されるため、アキレス腱に非常に大きなストレスが加わる）が原因で、馬場らの報告によれば剣道において、下腿、足部痛の障害は多く、その中でもアキレス腱痛は多く発生していると渡曾や貴志らは報告している。さらにアキレス腱の断裂はスポーツ傷害全体から見れば決して頻度の多いものではないが、剣道競技の傷害の中では特徴的な外傷の一つであるとの報告が散見される。しかし、その原因についての研究報告は非常に少ない。

【目的】

今回、アキレス腱傷害の要因について床との接地面である足部機能を調査し、その原因について検討を加え、障害予防の指標を得ることとした。

【対象および方法】

本研究の趣旨を説明し同意を得た年齢 14～18 歳の和歌山県下剣道選手 60 名（男子 33 名、女子 27 名、平均年齢 15.8±1.5 歳、剣道競技の平均経験年数 8.0±2.0 年）を対象に、アキレス腱痛やアキレス腱断裂の既往と現在のアキレス腱痛発生状況についてのアンケート調査を行った。さらに、アキレス腱断裂やアキレス腱痛を経験したことのある選手には、その発生時期と疼痛部位のアンケート調査を同時に行った。また、アンケート調査から過去にアキレス腱痛やアキレス腱断裂の経験がある選手（以下疼痛群）とアキレス腱痛を全く経験したことがない選手（以下非疼痛群）の 2 群に分類し、1) 足部アライメント: leg-heel alignment、足アーチ高率、2) 母趾の屈曲・伸展の関節可動域テスト (ROM-T) [日本整形外科学会が定める方法]、3) 母趾の屈曲・伸展筋力の体重比、4) 足の指をできるだけ開くように口頭指示し、足趾の開排動作の状態をチェックする開排動作チェックの 4 項目を測定し、男女それぞれで疼痛群と非疼痛群、左右差を比較検討した。統計学的分析は 1)–3) の項目については反復測定分散分析(Turkey HSD)、4)についてはカイ二乗検定を用い、有意水準を 5%未満とした。本研究は医療法人スミヤ角谷整形外科病院倫理委員会の承認を得た。

【結果】

60 名中 32 名の選手が過去にアキレス腱痛を経験し、そのうち 3 名（男子 1 名、女子 2 名）がアキレス腱断裂を経験していた。アキレス腱痛発生時期は小学生時期 5 名、中学生時期 17 名、高校生時期 10 名と中学生時期に発生することが多かった。アキレス腱断裂は中学生時期（中学 3 年生）が 1 名（女子）、高校生時期（高校 3 年生）が 2 名（男子 1 名、女子 1 名）であった。疼痛好発部位は、アキレス腱内側部 18 名、左アキレス腱中央部 12 名、踵骨隆起付着部 2 名で右側の疼痛は認められなかった。leg-heel alignment は男女とも疼痛群で有意に踵骨外反（回内位）を呈していた ($p < 0.01$)。足アーチ高率は疼痛群で有意に足アーチの低下が認められた ($p < 0.01$)。leg-heel alignment・足アーチ高率の左右差については、有意差は認められなかった。今回の対象者における母趾柔軟性の特徴として、男女とも屈曲は右側、伸展は左側の可動域が有意に大きいことを認めた ($p < 0.05$)。疼痛群・非疼痛群における 2 群間の比較では有意差は認めなかった。母趾屈曲・伸展筋力の体重比は 2 群間および左

右差でも差を認めなかった。足趾の開排動作は、Type I：開排できない。Type II：母趾のみ開排。Type III：小趾のみ開排。Type IV：5趾全て開排の4タイプに分類し、男女それぞれ疼痛群・非疼痛群の分布において有意差が認められ、男女とも非疼痛群では Type IVが多く、Type I が少なかった。疼痛群では Type I が多く、Type IV が少なかった ($p < 0.01$)。

【考察】

今回の研究結果では、53%の選手がアキレス腱痛を認めたことから過去の報告と同様に、アキレス腱傷害は剣道選手特有の傷害であると考えられる。その発生は中学生時期が多いことから、中学生時期にはセルフケアが十分行えるように指導することが傷害発生予防に重要であると思われた。今回の研究結果から足趾の筋力は障害発生との関係性が低いと考えられた。母趾柔軟性は男女とも屈曲は右側、伸展は左側の可動域が有意に大きいという特徴を認めたが疼痛群と非疼痛群で有意差が認められなかったことからアキレス腱傷害との関連性は低いと思われる。それに対し、疼痛群では荷重時の足アーチ低下、leg-heel alignment の外反(回内)が大きいなどの alignment 不良や足趾の開排動作の機能低下が認められたことから、alignment 不良や足趾開排動作の機能低下がアキレス腱傷害発生要因に関与していると考えられた。これらは、運動時の衝撃を吸収したり、打ち込み動作における蹴り出しの力を効率よく伝えるのに不利な要素であるため、衝撃吸収や力の伝達の効率が低下することがアキレス腱に大きな負担になっていると思われる。したがって、アキレス腱傷害予防には足部 alignment 改善に向けた足部筋力トレーニングやストレッチが必要である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 29 年 3 月 9 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

アキレス腱傷害は使いすぎによるオーバーユース症候群のひとつで、スポーツ障害としてはアスリートからレクリエーションレベルの方を含め多くのスポーツ競技において認められる傷害である。剣道競技においてもその競技特性(右足前・左足後ろの構えから左足で素早く床を蹴るため強い筋収縮が生じ、踵骨に付着しているアキレス腱も急激に伸張される。剣道の稽古中にはこのような動作が繰り返されるため、アキレス腱に非常に大きなストレスが加わる)が原因となり、剣道においてはアキレス腱痛およびアキレス腱断裂など、アキレス腱に関わる傷害が非常に多い。しかしながら、その傷害発生に対する予防対策については、いまだ十分な知見は得られていない。したがって、傷害発生の要因を明らかにして予防対策に向けたリハビリテーションの指標を得ることは重要である。本研究は、特に成長期であるジュニア期のアキレス腱傷害の発生要因を明らかにし、その予防に向けたリハビリテーションへの指標を得る目的に中・高校生の足部機能 (leg-heel alignment, 足アーチ高率、母趾の柔軟性と筋力、足趾開排機能) や疼痛の有無、疼痛発生時期、疼痛部位などのアンケート調査を行い、疼痛群と非疼痛群の 2 群に分類し比較検討した内容である。

その結果

- ①アキレス腱部の傷害は中学生時期に多く発生していた。
- ②アキレス腱部の疼痛部位はアキレス腱内側部に多く発生していた。
- ③母趾の柔軟性、筋力は傷害との関係性が認められなかった。
- ④疼痛群の足部 alignment は、非疼痛群と比較して Leg-heel alignment では有意に踵骨外反(回内) ($p < 0.01$) し、足アーチ高率では有意に低下していた ($p < 0.01$)。
- ⑤足趾開排機能は男女それぞれ疼痛群・非疼痛群の分布において有意差が認められ、男女とも非疼痛群では Type IV (5趾全て開排) が多く、Type I (開排できない) が少なかった。疼痛群では Type I (開排できない) が多く、Type IV (5趾全て開排) が少なかった ($p < 0.01$)。

今回の結果から①踵骨外反(回内)が大きい。②足アーチが低下している。③足趾の開排機能低下の 3 要因が中・高校生剣道選手におけるアキレス腱傷害の要因として考えられた。したがって、アキレス腱傷害の予防改善には、これらの 3 要因の改善に向けたセルフケア指導やリハビリテーションが重要であり、その時期は中学生時期までに行うことが重要と思われた。

本研究および論文は、中・高校剣道選手のアキレス腱傷害の発生要因を明らかにするとともに傷害予防に向けたセルフケア指導を含めたリハビリテーション・プログラム構築への指標を得る研究であり、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第556号		
学位授与の日	平成29年3月21日		
氏名	岩根 直美		
学位論文の題目	Altered Calcium Handling in Peripheral Nerve Terminals and Blood Vessels in Spontaneously Hypertensive Rats. (高血圧自然発症ラットの末梢神経終末および血管床におけるカルシウム・ハンドリングの異常)		
論文審査委員	主査	教授 加藤正哉	
	副査	教授 川股知之	教授 羽野卓三

論文内容の要旨

【目的】

高血圧自然発症ラット (SHR) においては、交感神経の亢進、血管反応性の亢進が報告されている。とくに交感神経終末からの神経伝達物質である norepinephrine 遊離に関しては摘出血管標本においても認められ、神経終末部位で異常があることが報告されている。神経伝達物質の遊離については、交感神経終末の N 型 Ca チャンネルや P/Q 型 Ca チャンネルが関与することが知られているが、SHR の交感神経終末においてどちらがより norepinephrine 遊離に関与しているかは明らかでない。血管収縮には Ca イオンが関与するが、 α_{1A} アドレナリン受容体を介する L 型 Ca チャンネルと α_{1B} アドレナリン受容体を介したフォスホリパーゼ C による細胞内 Ca 貯蔵からの Ca 動因が主要な経路として考えられる。また、細胞内 Ca 貯蔵量も細胞内 Ca の変化に影響する。高濃度の caffeine は細胞内 Ca 貯蔵部位から Ca を動因することで血管収縮をきたす。また、ryanodine は ryanodine 感受性 Ca 貯蔵を抑制することで、血管反応性を減弱させる。本研究では、SHR における交感神経終末からの norepinephrine 遊離亢進に N 型 Ca チャンネルと P/Q 型 Ca チャンネルのどちらがより強く関与しているかを明らかにするとともに細胞内 Ca 動態に係わる α_{1A} アドレナリン受容体と α_{1B} アドレナリン受容体のどちらがより血管反応性亢進に関与するかを明らかにする。さらに、SHR の細胞内 Ca 貯蔵量についても検討し、血管反応性への関与を明らかにする。

【方法】

実験には6週齢の雄性 SHR/Izm および同週齢の WKY/Izm を用いた。腸間膜動脈摘出標本を用いて腸間膜動脈基部の神経叢を電気刺激 (10Hz, 1msec.) した際の norepinephrine 遊離量を電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィで測定した。血管反応性は電気刺激または外因性 norepinephrine を動脈側に注入した際の灌流圧の上昇により計測した。N 型 Ca チャンネル阻害薬としては ω -conotoxin GVIA (5×10^{-9} M)、P/Q 型 Ca チャンネル阻害薬としては ω -agatoxin IVa (5×10^{-11} M) を用いた。阻害薬を灌流液に添加前後で電気刺激による NE 遊離量と血管反応性を測定し比較した。 α_{1A} アドレナリン受容体の阻害薬としては WB-4101 (10^{-10} M)、 α_{1B} アドレナリン受容体阻害薬としては chlorethyl clonidine (5×10^{-6} M) を用い、処置前後で外因性 norepinephrine による血管反応性を比較した。細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca 動因は、caffeine 収縮 (20mM) と ryanodine 感受性 Ca 貯蔵阻害により確認した。

【結果】

SHR と WKY の血圧は各々 167 ± 15 mmHg と 139 ± 8 mmHg であった。SHR の摘出血管の電気刺激による血管反応性と norepinephrine 遊離は WKY と比較して亢進していた (血管反応性: SHR, 35.9 ± 3.2 mmHg vs. WKY, 14.1 ± 2.4 mmHg; norepinephrine 遊離量: SHR, 1.56 ± 0.4 ng/g wet. wt vs. WKY, 0.65 ± 0.1 ng/g wet. wt)。 ω -conotoxin GVI および ω -agatoxin IVa はともに、電気刺激による交感神経終末からの norepinephrine 遊離を抑制した。SHR では WKY と比較して電気刺激による血管反応および

norepinephrine 遊離を ω -conotoxin GVI がより強く抑制した(血管反応性; SHR, $-82.1 \pm 1.7\%$ vs WKY, $-65.4 \pm 0.8\%$, $p < 0.05$ 、norepinephrine 遊離; $-79.9 \pm 1.5\%$, $-68.4 \pm 0.7\%$, $p < 0.05$)。 ω -agatoxin IVa による抑制の程度は SHR において WKY で減弱していた ($-20.3 \pm 1.0\%$, $-53.1 \pm 0.8\%$, $p < 0.05$)。 外因性 norepinephrine による血管反応性は WKY ($0.5 \mu\text{g}$, $13.1 \pm 3.1 \text{ mmHg}$; $1.0 \mu\text{g}$, $23.0 \pm 3.1 \text{ mmHg}$) と比較して SHR ($0.5 \mu\text{g}$, $39.0 \pm 0.9 \text{ mmHg}$; $1.0 \mu\text{g}$, $60.7 \pm 7.5 \text{ mmHg}$, $p < 0.01$) で亢進していた。 WB-4101 は外因性 norepinephrine による血管反応性を WKY ($0.5 \mu\text{g}$, $-78 \pm 8\%$; $1.0 \mu\text{g}$, $-78 \pm 12\%$) では抑制しなかったが、SHR ($0.5 \mu\text{g}$, $-35 \pm 2\%$; $1.0 \mu\text{g}$, $-53 \pm 2\%$, $p < 0.01$) では有意に抑制した。 一方、chlorethyl clonidine は外因性 norepinephrine による血管反応性を WKY、SHR ともに有意に抑制したがその抑制程度に差はなかった。 Caffeine 収縮は SHR と WKY 間で差がなかったが、最大収縮に差があることから、高濃度 KCl (128mM) による最大収縮との比をみると SHR (0.17 ± 0.01) が WKY (0.36 ± 0.02) と比較して有意に低かった。 また、ryanodine による血管反応の抑制も SHR ($-13.8 \pm 2.7\%$) が WKY ($-22.8 \pm 4.9\%$) と比較して有意に低かった。

【結語】

6 週齢の雄性 SHR における交感神経終末からの norepinephrine 遊離亢進については、 ω -conotoxin の効果が強かったことより、N 型 Ca チャネルが強く関与しており、 ω -agatoxin の効果が弱かったことより P/Q 型 Ca チャネルの関与はむしろ少ないことが示唆された。 また、SHR では WB-4101 による抑制が認められるが、WKY では認められないことから、SHR の血管反応性亢進には α_{1A} アドレナリン受容体を介する L 型 Ca チャネルによる細胞外 Ca の流入が強く関与していることが明らかとなった。 一方、chlorethyl clonidine による抑制作用が SHR では減弱していることから α_{1B} アドレナリン受容体を介する細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca 動因は減弱していた。 この原因として SHR では caffeine 収縮/最大収縮が低下していること、ryanodine 感受性細胞内カルシウム貯蔵量も低下していることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 29 年 3 月 9 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

高血圧自然発症ラット (SHR) における交感神経機能と血管反応性の亢進があることが知られているが、カルシウム・ハンドリングの異常の関与については明らかでない。そこで交感神経終末からの norepinephrine 遊離亢進に N 型 Ca チャネルと P/Q 型 Ca チャネルのどちらがより強く関与しているか、細胞内 Ca 動態に係わる α_{1A} アドレナリン受容体と α_{1B} アドレナリン受容体のどちらがより血管反応性亢進に関与するか、さらに SHR の血管における細胞内 Ca 貯蔵量の異常があるかについて検討した。

実験には 6-7 週齢の雄性 SHR/Izm および同週齢の WKY/Izm を用いた。腸間膜動脈摘出標本を用いて腸間膜動脈基部の神経叢を電気刺激した際の血管反応性と norepinephrine 遊離量を測定した。N 型 Ca チャネル阻害薬としては ω -conotoxin GVIA、P/Q 型 Ca チャネル阻害薬としては ω -agatoxin IVa を用いた。 α_{1A} アドレナリン受容体の阻害薬としては WB-4101、 α_{1B} アドレナリン受容体阻害薬としては chlorethyl clonidine を用い、処置前後で外因性 norepinephrine による血管反応性を比較した。細胞内 Ca 貯蔵については、caffeine 収縮と ryanodine による反応を観察した。

その結果、摘出血管において電気刺激による血管反応性と norepinephrine 遊離は WKY と比較して SHR で亢進していた。 ω -conotoxin GVI および ω -agatoxin IVa はともに、電気刺激による交感神経終末からの norepinephrine 遊離を抑制した。 SHR では WKY と比較して電気刺激による血管反応および norepinephrine 遊離を ω -conotoxin GVI がより強く抑制した。 ω -agatoxin IVa による抑制の程度は WKY に比較して SHR で減弱していた。 外因性 norepinephrine による血管反応性は WKY と比較して SHR で亢進していた。 WB-4101 は外因性 norepinephrine による血管反応性を WKY では抑制しなかったが、SHR では有意に抑制した。 一方、chlorethyl clonidine は外因性 norepinephrine による血管反応性を WKY、SHR ともに有意に抑制したが、その抑制程度に差はなかった。 Caffeine 収縮は SHR と WKY 間で差がなかったが、高濃度 KCl (128mM) による最大収縮との比をみると WKY と比較して SHR で有意に低かった。 また、ryanodine による血管反応性の抑制

も WKY と比較して SHR で有意に低かった。

以上の結果より、SHR の交感神経終末では norepinephrine 遊離に N 型 Ca チャネルが強く関与し、P/Q 型 Ca チャネルの関与は少ないことが示唆された。また、血管反応性亢進には α_{1A} アドレナリン受容体を介する系が強く関与していた。一方、 α_{1B} アドレナリン受容体を介する系は WKY と差がなかった。またカルシウム貯蔵量の低下が示唆された。SHR では交感神経終末および血管におけるカルシウム・ハンドリングの異常があり高血圧の病態と関連していた。

本論文は、高血圧の病態および降圧薬であるカルシウム拮抗薬の作用機序について重要な情報を提供したものであり、学位論文として価値のあるものであると認めた。

学位記番号	博(医)乙第937号		
学位授与の日	平成28年4月12日		
氏名	出口 久暢		
学位論文の題目	Argon plasma coagulation is effective for prevention of recurrent esophageal varices after endoscopic injection sclerotherapy : Single-center case-control study (アルゴンプラズマ凝固は内視鏡的食道静脈瘤硬化療法後の食道静脈瘤の再発予防に有効である : Single-center case-control study)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 村垣泰光	教授 一瀬雅夫

論文内容の要旨

【緒言】

食道静脈瘤は門脈圧亢進症を有する肝硬変患者などの約 50～60%に発症し、静脈瘤破裂による出血をきたした患者の約 20%が死に至ると報告されている。

内視鏡的食道静脈瘤硬化療法(EIS)は食道静脈瘤の治療法として確立されている。一方、食道静脈瘤結紮術(EVL)はその手技の簡便さと安全性で世界的に広まっている手技ではあるが、半年後の再発率が約 50%前後と高く、日本では EIS が広く普及している。EIS 後の再発は 20%前後と報告されており、再治療が必要となる。

アルゴンプラズマ凝固法(APC)は非接触性の熱凝固法として腹腔鏡手術の使用のために開発され、後に内視鏡治療に応用された。アルゴンガスのジェットにのせてプラズマを吹き付け、組織を焼灼する手技である。食道静脈瘤治療への応用としては、EVL 後の再発予防目的に食道粘膜を焼灼し、その治療過程で粘膜の線維化を促すことで、再発が有意に減少することが報告された。我々は 2012 年2月より導入した EIS 後の APC 追加による再発予防効果について検討した。

【対象と方法】

単施設での後ろ向き研究を case-control study にて行った。

対象は 2002 年 9 月から 2013 年 9 月までの間に和歌山県立医科大学で食道静脈瘤に対して EIS を行った患者を対象とした。2012 年 1 月までは APC は未施行、2012 年 2 月以降は全例 APC を追加した。

APC を追加した群(APC 群)62 例(男性 32 名、女性 28 名、年齢中央値 69 歳、Child-pugh 分類 A40 名、B22 名)で、2012 年 1 月以前の EIS 単独群(非 APC 群)で年齢、性別、肝機能(Child-pugh 分)を match させた 124 例を対照群とした。この両群間で再発率を比較検討した。

EIS は内視鏡下に静脈瘤を穿刺し、静脈瘤内に 5%濃度の monoethanolamine oleate (5%EOI)を静脈瘤の供血路まで注入。血管内に 5%EOI を注入すると、血管内皮細胞の障害が起こり、血小板凝集および血栓化をきたし、最終的に器質化され静脈瘤は消失する。また静脈瘤が細く血管内注入が困難な場合は、1% polidocanol(1%AS)を静脈瘤周囲の粘膜内に注入し、組織内で炎症を起こして、組織を線維化させ静脈瘤を消失させる。

APC は EIS 終了後1～4 週間後に静脈瘤の消失を確認したのちに施行した。機器は ERBE 社製 ICC200もしくは VIO300 を使用。設定は、出力 30～40W、アルゴンガス流量は 1～1.6L/min。焼灼部位は食道胃接合部から口側粘膜 5cm と、胃側粘膜 1cm の範囲を焼灼した。

術後は発熱、胸痛、狭窄、閉塞等の症状をチェックした。1 ヶ月後に follow の内視鏡を行い、以降、3～6ヵ月ごとに再発のチェックを行った。

【結果】

APC 群と非 APC 群の間の患者背景には、入院期間と観察期間以外、有意差は認めなかった。

APC 群の 1 年後及び 2 年後再発率はそれぞれ 9.7%と 11.3%、非 APC 群はそれぞれ 29%と 34.7%であった。Kaplan-Meier 法による検討では log-rank test : $p = 0.013$ で、有意に APC 群の再発率は低かった。

静脈瘤再発の危険因子を Cox 比例ハザードモデルで検討したところ、多変量解析で APC の追加が Hazrd ratio, 0.31 ($p=0.02$) で再発抑制因子であった。また治療前の静脈瘤に red color sign を認めた場合は有意に再発のリスクが上昇した。

Telangiectasia の再発の検討では、Kaplan-Meier 法で log-rank test: $p = 0.024$ で、有意に APC 群の再発率は低かった。多変量解析では、APC の追加が唯一の再発抑制の因子 (Hazrd ratio, 0.10, $p<0.01$) であった。

APC 追加による副作用では、37.5°C以上の発熱が 66%、胸痛が 18%に認められたが、数日で自然軽快した。食道のバルン拡張を要する狭窄をきたした例は APC 群、非 APC 群とも 1 例ずつ認めた。

【考察】

APC は 1 回の治療で安全に有意に静脈瘤の再発を抑制した。

食道静脈瘤の内視鏡治療は、欧米では EVL が広く普及している。本邦でも EVL も普及しているが、その高い再発率のため EIS での治療が本流である。EIS は静脈瘤の供血路まで閉塞するため再発予防効果が高いが、EVL は局所制御だけのため供血路は残存するため再発しやすい。

APC は食道粘膜を焼灼し、浅い潰瘍を形成させ、その治癒過程で組織に線維化を引き起こし、粘膜内への血管の侵入を防ぐ事によって静脈瘤の再発を抑制させるための治療で、いわゆる「地固め療法」と呼ばれるものである。再発率の高い EVL 後の食道への APC の追加で有意に静脈瘤の再発が抑制されることが報告され、ガイドラインにも推奨されるようになった。

しかし、EIS 後の APC の追加についての報告はなく、実際に有効かどうか不明であった。今回の検討で EIS 単独よりもさらに再発抑制が得られ、かつ副作用も軽微で安全に施行できる手技であった。

審査の要旨(審査の日、方法、結果)

2016年3月16日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

内視鏡的食道静脈瘤硬化療法(EIS)は食道静脈瘤の治療法として確立されている。EIS 後の再発は 20%前後と報告されている。再発予防のための地固め療法としてのアルゴンプラズマ凝固法(APC)は、内視鏡的食道静脈瘤結紮術(EVL)後に施行することで再発が有意に減少することが報告された。しかし、EIS 後の APC 追加の有効性のまとまった報告はない。我々は 2012 年 3 月より導入した EIS 後の APC 追加による再発予防効果について検討した。

EIS 後に APC を追加した群(APC 群)62 例(男性 32 名、女性 28 名、年齢中央値 69 歳、Child-pugh 分類 A40 名、B22 名)を対象に、EIS 単独群(非 APC 群)で年齢、性別、肝機能(Child-pugh 分類)を match させた 124 例を対照群とし、この両群間で再発率を比較検討した。

EIS は内視鏡下に食道静脈瘤内に 5%monoethanolamine oleate (5%EOI)を注入、及び食道粘膜内に 1% polidocanol (1%AS)を局注。APC は EIS 終了後 1~4 週間後に静脈瘤の消失を確認したのちに施行した。機器は ERBE 社製 ICC200 もしくは VIO300 を使用。設定は、出力 30~40W、アルゴンガス流量は 1~1.6L/min。焼灼部位は食道胃接合部から口側粘膜 5cm と、胃側粘膜 1cm の範囲を焼灼した。

術後は発熱、胸痛、狭窄、閉塞等の症状をチェックした。1 ヶ月後に経過観察の内視鏡を行い、以降、3~6 ヶ月ごとに再発のチェックを行った。

その結果、

- (1) APC 群と非 APC 群の間の患者背景には、入院期間と観察期間以外、有意差は認めなかった。
- (2) APC 群の 1 年後及び 2 年後再発率はそれぞれ 9.7%と 11.3%、非 APC 群はそれぞれ 29%と 34.7%であった。
- (3) Kaplan-Meier 法による検討では log-rank test: $p = 0.013$ で、有意に APC 群の再発率は低かった。
- (4) 静脈瘤再発の危険因子を Cox 比例ハザードモデルで検討したところ、多変量解析で APC の追加が Hazrd ratio, 0.31 ($p=0.02$) で再発抑制因子であった。また治療前の静脈瘤に red color sign を認めた場合は有意に再発のリスクが上昇した (Hazrd ratio, 4.25 ($p=0.02$))。
- (5) Telangiectasia の再発の検討では、Kaplan-Meier 法で log-rank test: $p = 0.024$ で、有意に APC 群の再発率は低かった。多変量解析では、APC の追加が唯一の再発抑制の因子 (Hazrd ratio, 0.10、

$p < 0.01$)であった。

(6) APC追加による副作用では、 37.5°C 以上の発熱が66%、胸痛が18%に認められたが、数日で自然軽快した。食道のバルン拡張を要する狭窄をきたした例はAPC群、非APC群とも1例ずつ認められた。

以上より、本論文はEIS後のAPCによる地固め療法の食道静脈瘤の再発予防効果について検討し有意に再発予防に優れること、またAPC追加による合併症も軽微なもので安全に施行できることを明らかにした。

本論文はEIS後のAPCによる食道静脈瘤再発抑制効果に関する新しい知見を提示した研究であり、学位論文

学位記番号	博(医)乙第938号		
学位授与の日	平成28年5月17日		
氏名	三井 利仁		
学位論文の題目	Exercise Significantly Increases Plasma Adrenaline and Oxidized Low-Density Lipoprotein in Normal Healthy Subjects But Not in Persons With Spinal Cord Injury (脊髄損傷者の運動負荷における酸化 LDL の動態について)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 吉田 宗人	教授 田島 文博

論文内容の要旨

これまで我々は障害者の運動時の安全性、有用性について報告してきた。運動療法を行う際に循環調節が健常者と異なる障害者において、運動時にどのような現象が起こっているかを一つ一つ検証し、運動の安全性を確認することは重要である。これまで酸化 LDL(oxLDL)の動態・作用の報告は多数ある。oxLDL は、動脈硬化の形成・進展に関与し、影響を及ぼすと考えられている酸化ストレスマーカーである。動脈硬化巣から様々な脂質酸化生成物とともに検出されており、高脂血症や糖尿病で高値を示すことが知られている。健常者の運動と oxLDL の研究は、KAWAI らの長時間に及ぶ激しい運動の動脈硬化に対する研究など多くある。LDL の酸化は Adrenaline が三価鉄 (Fe³⁺) とのキレート作用にあり、ヒドロキシラジカルを生成する。このヒドロキシラジカルが LDL に作用し、oxLDL に変化させることが分かっている。しかし、現在、我々が積極的なスポーツ参加を促す胸髄損傷対麻痺者において報告は全くない。本実験は胸髄損傷対麻痺者に運動負荷を行い、運動前、運動中、運動後、回復時の oxLDL 濃度を測定し、oxLDL の動態を健常者と比較検討した。胸髄損傷対麻痺者の oxLDL の血中濃度の動態が健常者と異なる場合、抗酸化能力について新たな知見を得る事が期待出来る。

今回は胸髄損傷者に自転車エルゴメーターで最大酸素摂取量 (Vo₂max) 60%の運動を行い、oxLDL・アドレナリンを測定した。

【方法】

被験者は7名の健常男性と9名の男性胸髄損傷者（ASIA分類A）とした。ヘルシンキ宣言に基づき、被験者には実験の目的、方法および危険性を書面と口頭で十分に説明し、実験参加の同意を得て3日間の実験を行った。

研究第1日目は、Vo2max測定のため、上肢エルゴメーター運動を行った、呼気ガス計を装着し、最大負荷量時の呼気ガス計で測定された酸素摂取量をVo2maxとし、Vo2maxの60%(60% Vo2max)を算出した。

研究第2日目は、運動負荷の対象実験のため、安静時のoxLDLを測定した。安静開始後1時間、2時間、3時間、5時間の計4回に1回10mlの血液を採取した。

研究第3日目は、運動負荷実験を実施した。1時間の安静の後、60% Vo2maxの負荷量で2時間の上肢エルゴメーターの運動を実施し終了後、2時間の安静回復を行った。血液の採取は安静1時間後、運動開始1時間後、2時間後、安静回復2時間の計4回で実施し、血液の採取量は2日目同様の1回10mlとした。

血液の採取方法は、まず、左前腕に留置針を用い、ルートを確認し、1時間毎にそのルートを用いて血液を採取した。もし、留置針が閉塞する等のトラブルがあった場合は、被験者の同意を得て、再度留置針でルートを確認した。

これらのデータを健常者と胸髄損傷者で比較した。統計学的検討には、ANOVAを用い、有意水準5%未満を有意差有りとした。

【結果】

アドレナリンはコントロール時では、両グループ共に変化せず、運動時には、運動中と運動直後に有意に増加した。しかし、運動中の胸髄損傷者のアドレナリンは、健常者と比較して低い数値だった。

oxLDLは胸髄損傷者のエルゴメーター運動では、有意な上昇はなく、しかし、健常者では運動直後oxLDLは有意に上昇した。回復期に、健常者のoxLDLは、運動前のレベル

に回復した。

【考察】

胸髄損傷者における Vo2max60%での運動負荷では oxLDL の増加が見れなかった。そして、彼らは LDL の酸化に影響するアドレナリンも健常者より少ない値であった。運動は交感神経活動を活性化し、副腎髄質からのアドレナリン分泌を促す。しかし、胸髄障害者では副腎髄質への交感神経支配が障害されているために運動時アドレナリン分泌が健常者より低下しているため、運動による上昇が予想されていた oxLDL が健常者より胸髄障害者の方が抑制された理由は、このアドレナリン分泌の低下が原因であると推察される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 4 月 27 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

胸髄損傷対麻痺者（胸損者）は運動・感覚神経傷害だけではなく交感神経の一部を傷害され、運動時生理学的応答が健常者と異なることが知られている。したがって、胸損者運動時の安全性を確認することは重要である。近年、健常者において、酸化 LDL(oxLDL)の動態・作用がよく研究され、運動負荷により oxLDL 上昇が生じることが健常者で報告されている。しかし、積極的な運動・スポーツ参加を促している胸損者における報告は全くなく、健常者よりも運動時 oxLDL が上昇する可能性が危惧されている。そのため、運動時 oxLDL を測定し、そのメカニズムを考察し、最適なスポーツ指導の一助にする事が望まれている。本実験は胸損者と健常者に運動負荷を行い、アドレナリンと oxLDL 動態を比較した。

被験者は 7 名の男性健常者（対照群）と 9 名の ASIA 分類 A 男性胸損者とし、朝 9 時に実験室に集合した。1 時間の安静座位後、ハンドエルゴメーターで最大酸素摂取量（Vo2max）60%の運動負荷 1 時間運動時と 2 時間運動時、および、運動終了後 2 時間

の回復時に採血を行った。測定項目は血中 oxLDL、アドレナリンとした。別の日に安静座位で5時間過ごすタイムコントロール (TC) 実験を行い、同じ時間で採血を施行した。

その結果

- ① TC 時では、oxLDL、アドレナリン共に両グループで変化しなかった。
- ② 健常者の oxLDL ($102 \pm 30 \text{U/L}$) は、運動直後 ($180 \pm 60 \text{U/L}$) に有意 ($P < 0.05$) に増加した。アドレナリン ($45 \pm 32 \text{pg/ml}$) は、運動中 ($112 \pm 37 \text{pg/ml}$)、運動直後 ($201 \pm 114 \text{pg/ml}$) に有意 ($P < 0.05$) に増加し、回復期に運動前のレベル ($45 \pm 13 \text{pg/ml}$) に戻った。
- ③ 胸損者の oxLDL ($124 \pm 66 \text{U/L}$) は、運動中 ($150 \pm 71 \text{U/L}$)、運動直後 ($138 \pm 60 \text{U/L}$) では有意な増加はなかった。アドレナリン ($45 \pm 14 \text{pg/ml}$) は、運動直後 ($83 \pm 56 \text{pg/ml}$) に有意 ($P < 0.05$) に増加し、回復期に運動前のレベル ($48 \pm 21 \text{pg/ml}$) に戻った。
- ④ 胸損者 ($83 \pm 56 \text{pg/ml}$) の運動直後のアドレナリンは、健常者 ($201 \pm 114 \text{pg/ml}$) と比較して有意に低値 ($P < 0.05$) であった。

運動は交感神経活動を活性化し、副腎髄質からのアドレナリン分泌を促すが、胸損者では副腎髄質への交感神経支配が傷害されているために運動時アドレナリン分泌が健常者より低下していたと考えられる。運動による上昇が予想されていた oxLDL が健常者より胸損者の方が抑制されていた理由は、このアドレナリン分泌の低下が原因であると推察される。以上より、胸損者における 60% Vo₂max での2時間運動は酸化ストレスの観点では安全であることが示唆された。

本研究および論文は、胸損者において交感神経障害が運動負荷時酸化ストレスを悪化させる危険性が少ないことをはじめて明らかにした研究であり、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第939号		
学位授与の日	平成28年6月21日		
氏名	津田 祐子		
学位論文の題目	An electroclinical study of absence seizures in Dravet syndrome (ドラベ症候群における欠神発作の脳波的・臨床的研究)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 中尾 直之	教授 金桶 吉起

論文内容の要旨

【諸言】

Dravet症候群 (DS) は、乳児期に有熱時または無熱時の強直間代発作で発症し、1歳以降でミオクローヌス、非定型欠神発作、複雑部分発作などさまざまな痙攣発作も出現する、その後てんかん発作は小康状態となるが、一方で精神発達遅滞を伴ってくるという経過が特徴の稀なてんかん症候群である。

DSの欠神発作 (absence seizure : AS) は、一般的には1~3歳の低年齢に出現する。欠神発作を呈する小児の代表的な疾患である小児欠神てんかん (childhood absence epilepsy : CAE) の好発年齢 (4~10歳) とは年齢層が異なる。しかし、発作時の脳波像は似ており、2~3.5Hzの全般性棘徐波複合 (generalized spike&wave : GSW) を呈する。時にはCAEの定型欠神発作 (typical absence seizure : TAS) の脳波に非常に酷似した、規則的な3HzのGSWを呈することもある。

ASに着目すると、複数のてんかん症候群でそれぞれ異なる年齢でASを呈すること、先天代謝異常症や染色体異常などでてんかん以外の疾患でも、早期発症のASがみられる報告があることから、各疾患におけるASの特徴に、近年関心が寄せられている。しかしながら、DSのASについては詳細な報告が少なく、ASを有する他のてんかん症候群との相違点や類似点については不明な点が多い。そこで今回、DS患者のASの特徴を明らかにすること、またCAEのASとの類似点・相違点を見出すことを目的に、DSのASの臨床像と脳波像について分析した。

【対象と方法】

東京女子医科大学病院小児科において、脳波もしくはビデオポリグラフでASの発作が記録された12名のDS患者を対象とした。DSの診断は、臨床症状、臨床経過に基づいて行った。ASは、①臨床症状を伴い脳波上GSWを呈するもの、②臨床症状の有無にかかわらず2秒以上GSWが持続するものと定義した。

ASの臨床症状・脳波の特徴については、SadleirらのTASの研究報告に従い、以下の項目について後方視的に分析した：

- (1)臨床症状：先行症状の有無、発作の持続時間、眼瞼の動き・ミオクローヌス・自動症の有無
- (2)発作時脳波：GSWに先行する局在の有無・局在部位、GSWの形（棘波の数、周波数、規則性・連続性の有無）、発作後の脳波変化
- (3)ASの治療に対する反応性、転帰

【結果】

1. 患者データ

対象はDS患者の12名で、発作時脳波は全患者で記録され合計102発作、ビデオ上のASの臨床発作は7名で合計78発作が記録された。4名で光過敏性、3名で図形過敏性を有していた。SCN1A遺伝子の変異は、遺伝子解析を行った8名中7名で認められた。てんかん発作の発症年齢は3~9か

月、平均 6.1 ± 1.6 か月 (中央値: 6 か月) であった。AS の出現年齢は 9 か月 ~ 2 歳 9 か月、平均 16.2 ± 7.1 か月 (中央値: 14 か月) で、1 歳台に最も多く分布していた。

2. AS の臨床症状

ビデオで記録された 78 の発作では、発作の持続時間は平均 6.9 ± 5.7 秒 (中央値: 5 秒) で、4 ~ 20 秒の長さの発作が 58% を占めていた。発作像については、動作停止のみが 30/54 (55%)、眼瞼ミオクローヌスを伴ったものは 9/54 (17%) (24 の AS は姿勢のため顔の様子が確認できなかったため除外した)、全身ミオクローヌスを伴ったものは 4/7 名 (57%) で 34/78 発作 (44%) であった。自動症を伴った発作はなかった。

3. AS の発作時脳波

局在のある先行波は 49/102 (48%) の発作時脳波でみられ、持続は平均 1.6 ± 2.3 秒 (中央値: 1 秒) で、最も多くみられた局在部位は後頭部 45%、続いて前頭部 28% であった。周波数は 2 ~ 4 Hz (平均 3.2 ± 0.5 Hz、中央値: 3.0 Hz) であった。GSW の形が不規則もしくは途中で連続性を欠いたものは 66/102 (65%) でみられた。発作後の徐波は全患者で、72/102 (70%) の発作時脳波でみられ、平均 4.9 ± 10.1 秒 (中央値: 2 秒) 持続した。

4. 治療への反応性および AS の転帰

2 名の患者で高用量のバルプロ酸ナトリウムが有効、1 名でエトサクシミド、1 名でケトン食が有効であった。6 名は、初期は多剤の抗てんかん薬にも難治であったが、後に思春期までに寛解もしくは改善が得られた。残りの 2 名はまだ発症してからの観察年数が数年であり発作継続中である。

【考察】

本研究で得られた DS の AS の特徴は以下であった：

TAS との類似点として、(1) GSW の周波数が約 3 Hz である、(2) 局在性のある先行波が高頻度でみられる、(3) GSW の持続時間は 4 ~ 20 秒である、(4) 初期は抗てんかん薬に抵抗性であるが思春期までに寛解あるいは改善する傾向がある。TAS との相違点として、(1) 早期発症で 1 歳台の発症が多い、(2) 全身ミオクローヌスを伴うことが多く自動症は確認されない、(3) GSW の形の不規則性・不連続性が高頻度でみられる。このように、DS の AS は CAE の TAS と共通する特徴を有することがわかった。

【結論】

DS の AS は、早期発症である点、GSW の形において不規則性・不連続性が高い点、全身ミオクローヌスを高頻度で伴い自動症がみられない点を除けば、臨床症状・脳波ともに CAE の TAS に類似した特徴をもつことが分かった。DS の AS は、基本的には TAS と共通の特徴をもつが、相違点に関しては本症候群に起因する一次的な脳障害、あるいは重積発作を繰り返すことによる二次的な脳障害により、非定型的な臨床像・脳波像に変容していく可能性が示唆された。しかし、今回の研究では、DS 患者の数が少なく、統計学的な検討ができなかったこと、また、後方視的な検討のみで、時系列に沿っての変化の検討ができていないことが、限界点と考えている。

今後の展望として、今回の結果を、早期発症の AS を呈する疾患群との比較研究や、DS のさらなる研究に生かしていくことを考えている。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 5 月 2 日、学位審査担当者が学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

Dravet 症候群は、正常発達の乳児において有熱時または無熱時の強直間代発作で発症し、1 歳以降でミオクローヌス、非定型欠神発作、複雑部分発作などさまざまな痙攣発作も出現し、精神発達遅滞も伴ってくるという経過が特徴の、稀なてんかん症候群である。Dravet 症候群の欠神発作については、詳細な報告が少なく、欠神発作を呈する他のてんかんと相違点や類似点については不明な点が多い。そこで、Dravet 症候群の欠神発作の特徴を明らかにし、定型欠神発作との相違を明らかにするために、臨床像・脳波像について分析した。

112 人の Dravet 症候群のデータの中から、脳波かビデオポリグラフで欠神発作が記録された患

者12名を対象とした。患者の特徴、および、記録された欠神発作の臨床症状・脳波の特徴を、Sadleirらの定型欠神発作の研究報告にある項目について、後方視的に分析した。

脳波で記録された発作は102個、ビデオで記録された発作は78個であった。欠神発作を発症した年齢は 16.2 ± 7.1 カ月、研究時年齢は 40.3 ± 22.1 カ月。発作時脳波では、49/102（48%）で局在のある先行波を認め、発作波の持続時間は 10.2 ± 22.6 秒（中央値4.0秒）、発作波の周波数は2~4 Hz（中央値3.0Hz）、66/102（65%）で不規則で連続性を欠く全般性棘徐波複合（GSW）の形であった。発作の臨床像では、9/54（17%）で眼瞼ミオクローヌス、34/78（44%）で全身ミオクローヌスを伴っていた。自動症を伴った発作はなかった。

本研究で得られたDravet症候群の欠神発作の特徴は以下であった。小児欠神てんかんの定型欠神発作との類似点として、(1)GSWの周波数が約3Hzである、(2)局在をもつ先行波が高頻度で見られる、(3)GSWの持続時間は4~20秒である、(4)初期は抗てんかん薬に抵抗性であるが思春期までに寛解・改善する傾向がある。定型欠神発作との相違点として、(1)早期発症で1歳台での発症が多い、(2)全身ミオクローヌスを伴うことが多く自動症は確認されない、(3)GSWの形の不規則性・不連続性が高頻度で見られる。結果より、Dravet症候群の欠神発作は、基本的には定型欠神発作と共通の特徴をもつが、相違点に関しては本症候群に起因する脳障害により、非定型的な臨床像・脳波像に変容していく可能性が示唆された。

しかし、今回の研究では対象患者数が少なく、統計学的な検討ができなかったこと、また、後方視的な検討のみで、時系列に沿っての変化の検討ができていないことが、限界点と考える。

以上より、当論文は、Dravet 症候群の欠神発作を詳細に分析しその特徴を明らかにした意義のある論文であり、学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第 940 号		
学位授与の日	平成 28 年 6 月 21 日		
氏名	石田 和也		
学位論文の題目	Suppression of activation of muscle sympathetic nerve during non-noxious local cooling after the end of local cooling in normal adults (健常成人においてマイルドな局所冷却後に筋交感神経活動は抑制される)		
論文審査委員	主査	教授 羽野 卓三	
	副査	教授 前田 正信	教授 田島 文博

論文内容の要旨

【緒言】

筋交感神経活動(Muscle Sympathetic Nerve Activity ; MSNA)は、マイクロニューログラフィーの手法により効果器を介さず直接測定する事が可能であり、抵抗血管収縮後交感神経活動を直接評価できる。MSNA が亢進すると、主に骨格筋の血管が収縮し総末梢血管抵抗が増加する事により血圧が上昇する。つまり MSNA は、血圧調節に重要な役割を果たしていると考えられている。一般的に、寒冷昇圧試験は自律神経の賦活試験に用いられ、強い痛みを引き起こす氷水に手を浸すことで心拍数、MSNA、血圧の上昇を起こすことが知られている。一方、痛みや不快感を示さない程度 (マイルド) の局所冷却は寒冷療法として知られ、リハビリテーションでよく用いられる物理療法の一つである。しかしながらマイルドな局所冷却が MSNA や循環動態に及ぼす影響については不明である。我々は過去に健常者においてマイルドな局所温熱が心拍数や血圧を変化させず MSNA を減弱させることを報告し、全身性の MSNA の変化は起こさない局所の反射的なメカニズムによる反応であると考えた。今回、マイルドな局所冷却による MSNA や心拍数、血圧の反応を測定し検証した。

【方法】

21 歳～35 歳の心血管系、神経筋疾患のない 8 名の健常者を対象とした。MSNA は、右総腓骨神経に直接タングステン製の針電極を刺入して導出し、筋電計で増幅しバンドパスフィルタを通し、全波整流の後、100ms の時定数で積分し、実験を通して記録を行った。その結果は burst rate (bursts/min) と total MSNA (bursts/min×毎分の平均振幅) で評価し 10 分間の安静臥床(control)の平均値を解析のベースラインの値として用いパーセント変化で評価した。他の測定項目は、右下腿前面皮膚温、心電計による心拍数、コルサコフ法による血圧、プレチスモグラフィー法による右下腿血流とした。プロトコールは、control の後右下腿前面から足背部分を 2 枚の紙タオルで包んだアイスパックによる局所冷却(local cooling : LC)を 15 分間施行し、LC 終了後 20 分間を回復期(recovery)とした。MSNA 測定と血流測定は同時に行えないため、実験は日を変えて同一被験者で 2 回行った。1 回目の測定では血流測定のみ行わず、2 回目は MSNA のみ行わなかったが、その順番はランダムに入れ替えた。MSNA と血流以外の測定値が 2 回ともほぼ同じ事を確認した上で、MSNA 測定時の値を解析した。Normality test で各パラメータの正規性は否定されたため Mann-Whitney U テストで統計学的検定を行った。P 値は 0.05 未満を有意とした。

【結果】

下腿の皮膚温は 31.5℃から 16.0℃まで LC で有意に低下した。LC 中に痛みや苦痛を訴える被験者はいなかった。下腿の皮膚温は recovery で徐々に上昇したが、recovery の終了時点でも control より有意に低いままであった。心拍数と平均血圧、右下腿血流は LC と recovery を通して有意な変化を示さなかった。MSNA の burst rate は control で 14.5 ± 2.04 bursts/min であり、LC 中に control から最大 $141.1 \pm 12.54\%$ まで有意に上昇し、recovery 中に最小 $73.6 \pm 5.86\%$ まで有意に低下した。Total MSNA は LC で control より最大 $148.0\% \pm 14.22\%$ まで有意に上昇し、recovery で control と比し最小で $74.0 \pm 13.91\%$ まで有意に低下した。LC 中の burst rate の変化と皮膚温に有意な負の相関が見られた ($R = -0.34$, $P = 0.0105$)。

【考察】

下腿前面と足部背側の 15°C の局所冷却で同側の総腓骨神経からの MSNA は有意に上昇し、局所冷却終了後に有意な低下を認めた。さらに、局所冷却中の MSNA は皮膚温と有意な相関を示した。しかし、心拍数、平均血圧、下腿血流は実験を通して有意な変化を示さなかった。マイルドな冷却による局所皮膚温の低下は MSNA を賦活するが、この変化は心拍や血圧の変化を起こさない局所の限局した変化であることが示された。寒冷昇圧試験では速やかな心拍数と平均血圧の上昇および MSNA の 2.5 倍以上の上昇を示すことが知られている。一方、今回の実験ではマイルドな局所冷却を行っており、寒冷昇圧試験と比較して MSNA の上昇は最大でも 50% 未満と軽度で、心拍や血圧の変化は起こらなかった。このことから、MSNA の局所反応に必要な下腿前面の皮膚温の変化の閾値は、心拍数を変化させる閾値より小さいと考えられる。今回の実験において局所冷却中に痛みを訴えた被験者はおらず、心拍数も増加しなかった。痛みによる求心性の刺激と MSNA の関係を考えると、今回の痛みを伴わない局所冷却は脊髄の上向性の経路や延髄の血管運動中枢を賦活せず局所の反射的なメカニズムによる MSNA の上昇であったと考えられる。我々の知る限り、今回の研究はマイルドな局所冷却に対する MSNA の反応を評価した初めての報告である。我々の知見は、寒冷療法が冷却部の血流減少や心血管反応をきたさないため治療を受ける患者に対し生理学的観点からも安全であることを示唆している。

【結語】

今回の研究でマイルドな局所冷却は心拍数や血圧に変化を起こさず MSNA は賦活され、冷却後は抑制されることを示した。マイルドな局所冷却と痛みを伴う寒冷刺激における MSNA の制御は異なったメカニズムをもっており、マイルド局所冷却による MSNA の反応は局所の反射的なメカニズムによって起こることが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 4 月 26 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。筋交感神経活動(MSNA)は血圧調節に重要な役割を果たすと考えられている。寒冷昇圧試験は自律神経の賦活試験に用いられ、強い痛みを引き起こす氷水に手を浸すことで心拍数、血圧、MSNA の上昇を起こすことが知られている。一方で痛みや不快感を示さない程度（マイルド）の局所冷却は寒冷療法として知られ、リハビリテーションでよく用いられる物理療法の一つであるが、MSNA や循環動態に及ぼす影響については不明である。今回、マイルドな局所冷却による MSNA や心拍数、血圧の反応を検証した。若年健康者 8 名を対象とし 10 分間の安静臥床の後、15 分間右下腿前面をアイスパックで冷却し 20 分間の回復期を観察した。測定項目は右下腿前面皮膚温、心拍数、血圧、右下腿血流、MSNA とした。MSNA は右総腓骨神経より Microneurography の手法を持ちいて導出し burst rate(bursts/min)と total MSNA(bursts/min × 毎分の平均振幅)で評価した。右下腿皮膚温は局所冷却中有意に低下し回復期で上昇したが安静臥床の水準には戻らなかった。心拍数と平均血圧、右下腿血流は実験を通して有意な変化は見られなかった。burst rate および total MSNA は局所冷却中有意に上昇し、回復期で有意に低下した。マイルドな冷却による局所皮膚温の低下は MSNA を賦活するが心拍数や血圧の変化を起こさないことが示された。寒冷昇圧試験では心拍数と平均血圧の上昇および MSNA の 2.5 倍以上の上昇を示すことが知られているが、今回の検討では MSNA の上昇は最大でも 1.5 倍に満たず心拍数や血圧の変化は起こらなかった。このことからマイルドな局所冷却による MSNA の変化は循環動態を変化させる閾値より小さいと考えられた。また、マイルドな局所冷却では脊髄の上向性の経路や延髄の血管運動中枢を賦活せず局所の反射的な機序による MSNA の上昇であったと考えられた。我々の知る限り、今回の研究はマイルドな局所冷却に対する MSNA の反応を評価した初めての報告である。この知見は寒冷療法が冷却部の血流減少や心血管反応をきたさないため生理学的観点から安全であることを示唆している。マイルドな局所冷却と痛みを伴う寒冷刺激における MSNA の制御は異なったメカニズムをもっており、今回の MSNA の反応は局所の反射的なメカニズムによって起こることが示唆された。

以上の結果より、局所冷却に対する自律神経活動を検討したこと、リハビリテーション医療で用いられる局所冷却療法に関する生理学的な安全性について検証されたことから学位論文として価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第941号		
学位授与の日	平成28年6月21日		
氏名	荒川 英樹		
学位論文の題目	The hypothalamic arcuate nucleus: a new site of cardiovascular action of angiotensin-(1-12) and angiotensin II (視床下部弓状核: アンジオテンシン-(1-12)とアンジオテンシン II が循環調節機能に關与する新規部位)		
論文審査委員	主査	教授 前田正信	
	副査	教授 赤坂隆史	教授 田島文博

論文内容の要旨

視床下部に存在する弓状核(arcuate nucleus: ARC)は摂食や肥満の1次中枢であるが、近年、延髄孤束核(nucleus tractus solitarius: NTS)や延髄吻側腹外側野(rostral ventrolateral medulla: RVLM)などと同様に中枢性循環調節機能を示唆する報告があった。NTSやRVLMではアンジオテンシン受容体(Angiotensin type 1 receptor: AT1R)が存在し、脳内レニン・アンジオテンシン系(Renin-Angiotensin system: RAS)の循環調節や高血圧への関与を示す報告もあるが、この作用に関しては循環血液を介して全身性に作用するRAS以外に、局所組織で生成される組織RASの重要性が指摘されている。この組織RASでは、古典的RAS経路以外にレニン非依存的RAS経路が存在しており、その経路においては、アンジオテンシン II (Angiotensin II: ANG II)の前駆物質として新規アンジオテンシン関連ペプチドであるアンジオテンシン-(1-12) [Angiotensin-(1-12): ANG-(1-12)]が同定され、その役割が注目されている。ARCにおいても、AT1Rやアンジオテンシン変換酵素(Angiotensin converting enzyme: ACE)などのRAS関連因子の存在が報告されており、ARCの組織RASが中枢性循環調節に対する作用を有する可能性が考えられ、その解明を研究の目的とした。雄Wistar系ラット計105匹を用いて実験を行った。ARCにマイクロインジェクション法を用いてANG IIおよびANG-(1-12)の直接的微量投与を行い、血圧(MAP)と心拍数(HR)、交感神経活動(GSNA)の変化を記録した。交感神経活動は大内臓神経より測定した。また、ARCへのAT1R拮抗薬の前投与や、レニン非依存的RAS経路を阻害するACE阻害薬やキマーゼ阻害薬の前投与を行い、その後のANG-(1-12)投与によるMAP、HR、GSNAの変化を記録した。最後に色素を投与し、摘出した脳の凍結切片を顕微鏡下に観察することで投与部位の確認を行った。全身麻酔下ラットのMAP、HRのベースラインはMAP 86.9±1.5mmHg、HR 383.1±4.2bpmであった。ARCへのANG II(1mM)の投与によりMAP 14.8±1.2mmHg、HR 17.6±1.7bpmの上昇、ANG-(1-12)(1mM)の投与ではMAP 10.4±0.6mmHg、HR 12.8±1.2bpmの上昇を生じ、GSNAは35.3±8.8%の増加を認めた。更にそのANG-(1-12)の反応は、AT1R拮抗薬の前投与により有意に抑制され、またレニン非依存的RAS経路に關与するACE阻害薬やキマーゼ阻害薬の前投与によっても有意に減弱した。以上の結果より今回の研究からは、①ARCは交感神経を介した中枢性循環調節機能を有すること、②ARCでは組織RASによるレニン非依存的RAS経路を介してANG-(1-12)からANG IIが産生され、AT1Rに結合することによって作用を発現すること、などが明らかとなった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成28年5月20日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。本論文は、循環調節機能が示された新規部位であるARCにおいて、組織RAS因子による中枢性循環調節への作用を精密に研究したものであり、我々の知る限りでは初めての論文報告である。これらの結果から、中枢性循環調節に関する新たな知見が得られ、学位論文として価値があるものと認められた。

学位記番号	博(医)乙第942号		
学位授与の日	平成28年6月21日		
氏名	岩谷 潤		
学位論文の題目	Use of T1-weighted/T2-weighted magnetic resonance ratio images to elucidate changes in the schizophrenic brain (MRI の T1 強調/T2 強調比を用いた統合失調症患者の脳内変化の検討)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 上山 敬司	教授 篠崎 和弘

論文内容の要旨

背景

ヒト脳において神経伝導速度を調整する役割を担うミエリンの量は MRI 信号に反映される。近年 Glasser and Van Essen (2011) は T1 強調信号と T2 強調信号の比 (T1w/T2w 比) を用いて個人差に基づく MRI 信号のバイアスを補正するとともにミエリン量に対する MRI 信号コントラストを上昇させ、T1w/T2w 比を用いて精度の高いミエリン量の視覚化と対象者間の比較が可能となった。

一方、統合失調症は、環境因子と遺伝因子が複雑に絡み合っただ脳発達過程で異常が生じる神経発達疾患と考えられており、その機作仮説の一つとしてミエリンの形成不全が指摘されている。MRI の拡散テンソル画像を用いた研究では、一部ミエリンの異常を反映する白質の神経線維走行の乱れが示唆されている。灰白質においても容積の低下や皮質厚の菲薄化が示されているが、灰白質のミエリン異常については我々の知る限り報告されていない。

本研究の目的は、T1w/T2w 比を用いて統合失調症の灰白質と白質のミエリン量の変化をとらえることである。作業仮説は、統合失調症ではミエリン量の低下に伴う T1w/T2w 比の有意な低下が、灰白質と白質の両方で検出されることである。

方法

本研究には 29 名の統合失調症患者群と 33 名の健常対照群が参加した。平均年齢は患者群 41.4±9.8 歳、健常群 37.6±9.8 歳で有意差なく、患者群の罹病期間の平均は 17.1±11.3 年であった。以下の測定と解析を行った。

1. 健常群と患者群で全脳の T1w/T2w 比を算出し、脳内の分布パターンを検討した。
2. 健常群と患者群で灰白質および白質の平均の T1w/T2w 比を比較した。
3. 患者群における灰白質と白質それぞれの T1w/T2w 比の平均と、臨床症状との偏相関を算出した。臨床症状スケールは陽性・陰性症状評価尺度 (PANSS)、機能の全体的評定 (GAF) 尺度を用いた。
4. 2群間で単位画素 (ボクセル) ごとに T1w/T2w 比を比較した。
5. 2群間で灰白質と白質それぞれの脳容積を比較した。

結果

1. T1w/T2w 比は両群で、側頭葉、小脳、視覚野で高値という分布パターンを示した。
2. T1w/T2w 比は両群で年齢とともに低下し、患者群は健常群よりも有意に低値を示した (ANCOVA : 灰白質 $F(1, 55)=10.883$, $p=0.002$; 白質 $F(1, 55)=8.183$, $p=0.006$)。T1 強調画像では 2群間の差を検出できなかった。
3. 患者群において、機能の全体的評定が低いほど (偏相関 : $Rho=0.500$, 補正後 $p=0.0389$)、陽性症状 (幻覚、妄想) が強いほど ($Rho=-0.523$, 補正後 $p=0.0389$)、白質の T1w/T2w 比が低下

していた。

4. ボクセルごとの解析では、患者群で健常群よりも側坐核を含む右被殻の T1w/T2w 比が有意に低値を示した (t 検定: p family-wise error [FWE] $< .01$)。なお、患者群では腹側前頭葉、側頭葉など広範囲にわたって T1w/T2w 比が健常群より低値を示した (uncorrected $p < 0.001$) が、FDR 補正を行うと有意差が消失した。

5. 2 群間で、灰白質の容積 (t 検定: $p = 0.302$)、白質の容積 ($p = 0.136$) に有意差は認めなかった。

考察

1. 脳内のミエリン量の分布パターンと年齢による影響について先行研究の結果を再現できたことは、我々の T1w/T2w 比が主にミエリン量を反映していることを示している。

2. 統合失調症において、灰白質と白質の両方でミエリン量が低下していることを示した。また、この異常を T1w/T2w 比を用いて T1 強調画像よりも鋭敏に検出することができた。

3. 白質のミエリン量が全般的な認知機能の低下や陽性症状と関連していたことは、白質のミエリン化の異常が統合失調症の臨床症状と関係するというこれまでの報告に合致した。

4. 被殻・側坐核は、統合失調症で過活動であるとされる中脳辺縁系ドーパミン経路の主要な投射領域であり、この領域にミエリンの異常があることを示した。

5. T1w/T2w 比を用いて、容積測定法よりも高い感度で統合失調症の脳の異常を検出できた。

ミエリンの形成不全は統合失調症発症以前からあるとも考えられている。統合失調症は有病率が高く、10 代後半から 20 代に好発する。発症後の社会的な負担が大きいため、発症以前にこの異常を発見できれば大きな意義をもつ。

今後の課題として、ミエリンへの特異性を高めるためにミエリン以外に信号値に影響を与える物質 (例えば鉄分) の影響を除外すること、ミエリン形成不全を示す統合失調症を統合失調症の他の病態から区別すること、あるいは、他の脳神経疾患から識別すること、臨床応用を進めるために特に若年層を中心とした正常データを蓄積すること、を挙げる。

以上

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 5 月 24 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

本研究は、T1 強調信号と T2 強調信号の比 (T1w/T2w 比) により精度の高いミエリン量の視覚化が可能となった近年の MRI 研究を背景とし、この T1w/T2w 比を用いて、統合失調症の灰白質と白質のミエリン量の変化をとらえることを目的として行われた。29 名の統合失調症患者群 (平均年齢 41.4 ± 9.8 歳、平均罹病期間 17.1 ± 11.3 年) と 33 名の健常対照群 (平均年齢 37.6 ± 9.8 歳) が参加し、MRI が撮像された。健常群と患者群の全脳の T1w/T2w 比の算出と脳内分布パターンの検討、患者群と健常群の灰白質および白質の平均の T1w/T2w 比の比較、患者群における灰白質と白質それぞれの T1w/T2w 比の平均と臨床症状との偏相関の算出、2 群間のボクセルごとの T1w/T2w 比の比較、2 群間の灰白質と白質それぞれの脳容積の比較が行われた。

その結果、T1w/T2w 比は両群で、側頭葉、小脳、視覚野で高値という分布パターンを示し、灰白質および白質の平均の T1w/T2w 比は両群で年齢とともに低下していた。患者群の T1w/T2w 比は健常群よりも有意に低値を示し (ANCOVA: 灰白質 $F(1, 55) = 10.883$, $p = 0.002$; 白質 $F(1, 55) = 8.183$, $p = 0.006$)、この 2 群間の差は T1 強調画像では検出できなかった。患者群においては、機能の全体的評定が低いほど (偏相関: $Rho = 0.500$ 、補正後 $p = 0.0389$)、陽性症状 (幻覚、妄想) が強いほど ($Rho = -0.523$ 、補正後 $p = 0.0389$)、白質の T1w/T2w 比が低下していた。さらに、ボクセルごとの解析では、患者群で健常群よりも側

坐核を含む右被殻のT1w/T2w比が有意に低値を示した（t検定：p family-wise error [FWE] < .01）。なお、患者群では腹側前頭葉、側頭葉など広範囲にわたってT1w/T2w比が健常群より低値を示した（uncorrected $p < 0.001$ ）が、FDR補正を行うと有意差が消失した。2群間で、灰白質の容積（t検定： $p = 0.302$ ）、白質の容積（ $p = 0.136$ ）に有意差は認めなかった。

脳内のミエリン量の分布パターンと年齢による影響について先行研究の結果を再現できたことは本研究で測定されたT1w/T2w比が主にミエリン量を反映していることを示している。統合失調症において、灰白質と白質の両方でミエリン量が低下していることを示し、この異常をT1w/T2w比を用いてT1強調画像よりも鋭敏に検出することができた。また、白質のミエリン量が全般的な認知機能の低下や陽性症状と関連していたことは、白質のミエリン化の異常が統合失調症の臨床症状と関係するというこれまでの報告に合致した。さらに、統合失調症で過活動であるとされる中脳辺縁系ドパミン経路の主要な投射領域である被殻・側坐核にミエリンの異常があることを示した。統合失調症の脳における異常をT1w/T2w比を用いて、容積測定法よりも高い感度で検出した。

以上により本論文は、統合失調症の灰白質と白質の両方における、ミエリン量の低下に伴うT1w/T2w比の有意な低下の検出という新しい知見を示した研究であり、学位論文として価値あるものとして認めた。

以上

学位記番号	博(医)乙第943号		
学位授与の日	平成28年6月21日		
氏名	国本 佳代		
学位論文の題目	The continued use of sunscreen prevents the development of actinic keratosis in aged Japanese subjects. (高齢日本人におけるサンスクリーン剤の継続使用は日光角化症の進展を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 近藤稔和	教授 古川福実

論文内容の要旨

【緒言】

日光角化症(actinic keratosis: AK)は、主に高齢者の露光部位に出現する有棘細胞癌 (squamous cell carcinoma: SCC) の前癌病変として位置づけられる疾患であり、発症要因として最も重要なものは慢性の紫外線暴露である。

日光角化症の発症、進行予防に対するサンスクリーン剤の使用は、白人を対象にした臨床試験で有効性が認められているが、日本人、アジア人に対する効果を評価した報告は少ない。また、これまでの報告では、一定期間のサンスクリーンの使用後、日光角化症の個数の変化で評価されており、サンスクリーン使用前後での組織学的な評価やダーモスコピーを用いての評価を行った論文はほとんどない。今回我々は、日本人の日光角化症患者を対象に、サンスクリーン剤を18か月間継続使用することの有用性を病理組織学所見とダーモスコピー所見を用いて評価する open study を行った。

【方法】

【対象】

年齢60歳以上の露光部の日光角化症患者で、男性7名、女性6名、平均年齢80歳(62~91歳)の計13例を対象とした。

【評価項目】

試験期間は18ヶ月で、サンスクリーン剤の使用前後で、皮膚所見(既存の皮疹の状態、新規に生じる皮疹の有無)、写真撮影、ダーモスコピー、組織学的検討(HE染色、免疫組織化学染色)、有害事象を評価した。

【サンスクリーン剤】

サンスクリーン剤はSPF30、PA+++のものを使い、 $2\text{mg}/\text{cm}^2$ を顔面、耳介、手背へ塗布するように指示した。受診毎に容器は回収し、使用量を測定した。

【評価スケジュール】

試験を行う前に、評価対象とする日光角化症部を4mmパンチで皮膚生検を行い、病理組織学的な確定診断を行った。試験開始より6カ月後(±14日)、12カ月後(±14日)、18カ月後(±14日)に日光角化症の個数や性状、ダーモスコピーの評価を行い、試験終了時に評価対象病変部の皮膚生検を行った。

【病理組織学的評価】

AKの組織学的分類と異型ケラチノサイトの浸潤度を評価した grade を用いた。p53、Ki-67、COX-2の免疫組織化学染色を行い、HPFで5視野の陽性細胞数をカウントし、その平均値を試験前後で比較した。血管の評価としてCD31の染色で真皮上層の血管を同定し、Chalkley grid lensを用い、3視野のカウント数の平均値で比較した。

【ダーモスコピーの評価】

ダーモスコピーの評価では皮疹のダーモスコピー像を4分割し、follicular plug with halo、pseudo network、linear wavy vessels、vessel dots、scalingについて観察した。各々の所見が4ヶ所中、何ヶ所にあるかカウントし、その合計で評価した(最大20点、最低0点)。

【統計解析】

日光角化症の個数についてはWilcoxon signed-rank testを用い、免疫染色、ダーモスコピーについてはpaired-t testを用いて検定した。

【結果】

- 1) 試験前後での日光角化症の個数に有意差は認めなかった。
- 2) HE染色での病理組織学的な変化では、gradeの改善が2例、増悪例が1例であった。AKIII、有棘細胞癌に進展した症例はなかった。組織学的分類で変化のみられた症例は4例で、そのうち3例は典型的な分類からは外れた所見を呈した unclassified type への変化であった。しかし、keratinocyteの異型性は残存するものの、錯角化の改善や表皮の肥厚の改善がみられるなど、組織学的に改善傾向を認めた。
- 3) 免疫組織化学染色の結果はp53、Ki-67、COX-2で陽性細胞数に有意差はみられなかった。CD31で染色された真皮上層の血管数をChalkley法でカウントし、試験前後で比較したところ、有意な低下がみられた。(p<0.05 vs before.)
- 4) ダーモスコピー所見の評価ではスコアの合計点は有意に低下していた。各々の所見の変化を検討すると、vessel dotsとscalingでスコアが有意に低下していた。(p<0.05、p<0.01 vs before.)
- 5) サンスクリーン剤の使用量と日光角化症の個数の変化の相関については、有意差はなかったが、負の相関傾向がみられた。

【結語】

18か月間のサンスクリーン剤の露光部への外用により、日光角化症の個数に有意な変化はみられなかった。日光角化症の臨床的・組織学的な改善がみられた例があった。免疫染色でp53、Ki-67、COX-2の陽性細胞数には統計学的に有意な変化はみられなかったが、明らかな増悪はなかった。ダーモスコピー所見においてvessel dotsの所見が改善していたことと、真皮上層の血管が減少していたことは、臨床的な紅斑の改善を示しているものと考えられる。使用量については、適正量の塗布の必要性を示すものである。本試験の結果から、高齢者の日光角化症に対するサンスクリーン剤の外用は、日光角化症の進展予防に有効であることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成28年5月16日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

日光角化症(actinic keratosis: AK)は、慢性の紫外線暴露を主な発症要因とする高齢者の露光部位に出現する有棘細胞癌(squamous cell carcinoma: SCC)の前癌病変として位置づけられる疾患である。日光角化症の発症、進行予防に対するサンスクリーン剤の使用は、白人を対象にした臨床試験で有効

性が認められているが、日本人、アジア人に対する効果を評価した報告は少ない。本研究では、高齢日本人の日光角化症患者を対象に、サンスクリーン剤を 18 か月間継続使用することの有用性を病理組織学所見とダーモスコピー所見を用いて評価する open study を行った。

18 か月間の研究期間において、年齢 60 歳以上の露光部の日光角化症患者で、男性 7 名、女性 6 名、平均年齢 80 歳(62~91 歳)の計 13 例を対象とし、SPF30、PA+++のサンスクリーン剤の使用前後で、皮膚所見(既存の皮疹の状態、新規に生じる皮疹の有無)を評価したところ、試験前後での日光角化症の個数に有意差は認めなかった。組織学的検討において、HE 染色での病理組織学的な変化では、AKIII、有棘細胞癌に進展した症例はなく、3 例では keratinocyte の異型性は残存するものの、錯角化の改善や表皮の肥厚の改善がみられるなど、組織学的に改善傾向を認めた。免疫組織化学染色の結果では p53、Ki-67、COX-2 で陽性細胞数に有意差はなかったが、CD31 で染色された真皮上層の血管数を Chalkley 法でカウントし、試験前後で比較したところ、有意な低下がみられ、血管新生の抑制を表すものと考えられた。ダーモスコピーの評価では、follicular plug with halo、pseudo network、linear wavy vessels、vessel dots、scaling について観察しスコア化して評価すると、vessel dots と scaling で有意にスコアが低下し、点状血管と鱗屑について改善を認めた。研究期間中、接触皮膚炎などの有害事象はみられなかった。

上記結果より、18 か月間のサンスクリーン剤の外用により日光角化症の有棘細胞癌への進展はみられなかったことが明らかとなった。

以上、本論文は欧米で日光角化症の発症、進行予防として一般的に行われているサンスクリーン剤の外用が、日本人高齢者の日光角化症においても有効であることを示唆するものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第944号		
学位授与の日	平成28年8月9日		
氏名	延與 良夫		
学位論文の題目	Radiographic natural course of lumbar degenerative spondylolisthesis and its risk factors related to the progression and onset in a 15-year community-based cohort study: the Miyama study (腰椎変性すべりのX線学的な自然経過と進行・発生の危険因子 —地域住民コホートをを用いた15年の縦断的研究より—)		
論文審査委員	主査	教授	中尾 直之
	副査	教授	宮下 和久 教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

【緒言】腰椎変性すべりは、中年より見られる加齢に伴う疾患であるが、危険因子や自然経過と言った疫学的指標はまだ明らかになっておらず、そのような指標に沿った治療指針も定まっていない。本研究は、地域住民コホートをを用いて腰椎変性すべり患者を縦断的に調査し、X線学的に進行、発症に関する危険因子について調査した。

【方法】1990年に和歌山県M村にて40-79歳の全住民から男女各年代50人ずつ計400人を無作為抽出した骨折予防検診参加者のうち、15年後に同地域で再度行われた骨関節疾患予防検診にも参加した200人を調査対象とした。すべりの有無については3mm以上のものを「あり」、3mm未満のものを「なし」と定義し、すべり進行の有無については3mm以上進行したものを「あり」、3mm未満のものを「なし」と定義した。L4すべり進行、発生の危険因子を明らかにするため、L4すべり進行群と非進行群の間でベースライン時（1990年）における性、年齢、レントゲンの各計測値（椎間高、前弯角、L1前方偏位、仙骨傾斜角、椎間角、骨棘形成、椎間関節矢状化、終板の骨硬化の有無、圧迫骨折の有無、L4すべりの有無）の単変量解析を行った。またL4すべり進行の有無を目的変数とし、性、年齢、レントゲン上の各評価項目を説明変数とする多重ロジスティック回帰分析を行った。

【結果】ベースライン時(1990年)でL3、L4、L5いずれかの椎体にすべりを認めたものは20/200(10%)であった。15年後(2005年)の時点でL3、L4、L5いずれかの椎体にすべりを認めたものは45例で、15年間の新規発生例は25例/180例(13.9%)であった。単変量解析において、すべり進行群では有意に女性の割合が高く、前弯角、L1前方偏位が大きく、椎間関節矢状化を有する割合が高かった。ロジスティック回帰分析において、年齢が40歳代と50歳代との比較ではすべり進行のリスクはかわらなかったが、60歳代と40歳代、50歳代との比較では、有意に60歳代において進行は抑制されていた。女性、大きなL1前方偏位(19mm以上)、椎間関節矢状化、ベースライン時のすべり(3mm以上)は単変量解析でも多変量解析でも有意なL4すべりの進行、発生の危険因子であった。

【考察】一般住民を15年間追跡した結果から、加齢はすべり進行、発生の有意な防御因子であり、女性・大きなL1前方偏位、椎間関節矢状化はすべり進行、発生の有意な危険因子であることが明らかとなった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成28年7月8日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文の審査を行った。本研究は、和歌山県山村地域での地域住民コホートを、住民200名を15年間縦断的に調査し、腰椎変性すべりのX線学的な進行、発症に関する危険因子について調査した。ロジスティック回帰分析において、年齢が40歳代と50歳代との比較ではすべり進行のリスクはかわらなかったが、60歳代と40歳代、50歳代との比較では、有意に60歳代において進行は抑制されていた。女性、大

きなL1前方偏位（19mm以上）、椎間関節矢状化、ベースライン時のすべり（3mm以上）は単変量解析、多変量解析でも有意なL4すべりの進行、発生の危険因子であった。

本論文は、腰椎変性すべりのX線学的な15年間の自然経過を明らかにした点で、すべりを伴う脊柱管狭窄を加療する際に有用な情報となり、学位論文として価値のあるものであると認めた。

学位記番号	博(医)乙第945号		
学位授与の日	平成28年8月9日		
氏名	田村 彰		
学位論文の題目	Total parenteral nutrition treatment efficacy in adolescent eating disorders (思春期摂食障害への中心静脈栄養療法の効果)		
論文審査委員	主 査	教授 篠崎 和弘	
	副 査	教授 赤水 尚史	教授 鈴木 啓之

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

摂食障害は心理的要因により著しいやせ、食行動の異常、精神症状を伴う疾患で、近年、小児期発症例が増加している。患者は治療されることに抵抗する例が多いため、しばしば再発を繰り返しながら経過し、死亡する例も多数報告されている。

本研究では小児の重症摂食障害患者に中心静脈栄養（以下、TPN と略す）療法を積極的に勧め、栄養の改善が、身体的回復へ与える影響だけではなく、摂食障害の食行動の異常、精神的回復へ与える影響について検討をおこなった。

【方法】

対象：外来治療で改善なく、体重減少のため生命の危険があると判断された摂食障害患者で、2005年から2012年にTPN治療の同意が家族と本人から得られた10歳から15歳の女性患者25例。

プロトコール：小児科一般病棟に入院し、直ちにTPNを開始した。食事量の強制は一切行わなかった。TPNは初めの1週は1日500～1,000kcalで開始し、体重増加が得られるまで徐々に増量した。経口摂食の増加があれば徐々に減量し、経口摂取のみでも体重増加が得られるようになれば中止した。その後、外泊を繰り返し、問題がなければ退院とした。認知療法は、担当医により栄養治療を継続することに焦点に置き、原因の追求は優先せず実施した。

解析：後方視的に生化学的検査、ゴナドトロピン値、治療経過を検討した。摂食障害の疾患分類はThe Great Ormond Streetの疾患分類を使用し、食物回避性情緒障害、神経性食欲不振症、広汎性拒絶症候群に分類し、それぞれの経過を検討した。

【結果】

体重減少開始から入院までは全例1年未満（中央値6ヶ月）で、入院時の平均体重は28.6kgで入院治療により平均8.0kgの体重増加が得られ、平均BMIは入院時12.7から16.5まで改善した。TPNの期間は平均103.6日、入院期間は平均189.6日だった。

生化学検査所見では総ビリルビン値、総コレステロール値とも有意に低下し、アルカリフォスファターゼ値は有意に上昇し、6か月時まで上昇が持続した。

卵胞刺激ホルモン値の回復は黄体形成ホルモン値の回復に平均24.8日先行した。また、卵胞刺激ホルモン値の回復は食欲の回復（TPNを中止：経口摂食のみで体重維持可能）より34.4日先行した。入院時のBMI値は、卵胞刺激ホルモンの回復と負の相関（BMI値が低いと卵胞刺激ホルモンの回復まで時間がかかる）を認めた。

治療後の再燃

25名中9名で退院後に食欲低下の再燃を認めた。食物回避性情緒障害と分類された例では再燃はなく、神経性食欲不振症と分類された例では10名中5名、広汎性拒絶症候群と分類された例では5名中4名で再燃が見られた。再燃した例は入院治療中の1日当りの体重増加が少なかった例、

入院時のアルカリフォスファターゼ値が高かった例で有意に多かった。

【考察】

食事量の強制がなく、注入栄養も行わない治療への同意は得られやすく、本治療を勧めた全例で治療の同意が得られた。

入院期間は平均約 190 日で平均 8.0kg の体重増加がみられた。体重増加は月平均約 1kg のペースであった。予後因子と言われる年齢、入院までの期間、BMI は入院期間に有意な影響をもたらさなかった。

摂食不良の再燃は全症例 25 例中 9 例で認めたと、再燃した 9 例うち 7 例は入院による環境調整のみで食欲が改善した。環境調整のみで食欲改善がなかった 2 例には再度 TPN 療法が必要となった。強制的な関わりが少ないため医療者との険悪な関係になる例は少数で、再入院への抵抗は少なかった。

入院治療を開始後、総ビリルビン値、総コレステロール値、アルカリフォスファターゼ値は改善し、アルカリフォスファターゼ値は栄養回復後、さらに上昇が持続し、骨成長に關与する骨性アルカリフォスファターゼの上昇と考えられ、持続した栄養維持が骨成長の再開ために必要である事が示唆された。これらの結果は経口摂食療法の生化学所見の経時経過を検討した過去の報告に比較して良好な結果であった。

治療の効果判定に入院期間の短縮が使用される場合が多いが、この研究では食欲の回復という新しい指標を設定した。経口摂取が増加し TPN が中止できた地点、つまり摂食障害の主症状である食欲低下を完全に克服できた時を食欲の回復と定義した。食欲の回復とゴナドトロピン値の関係を検討では、血清 FSH 値は食欲の回復より平均 34 日先行して回復した。ゴナドトロピンの回復が食欲の回復に先行することから、低ゴナドトロピン血症は食欲低下、食行動の異常との關与があることを示唆する結果となり、栄養療法により低ゴナドトロピン血症を改善することが、食欲低下、食行動異常自体へ影響を与える可能性が推察された。

Great Ormond Street Criteria の分類で経過を検討すると、治療抵抗は広汎性拒絶、神経性食欲不振、食物回避性情緒障害の順に強く、点滴への抵抗、過剰運動等の問題行動があったが、栄養維持に焦点を置いた認知療法により、体重増加とともに治療抵抗は見られなくなった。

再発のリスクの検討では、入院時のアルカリフォスファターゼ値が高い例で有意に再発例が多かった。摂食障害患者の特殊な食事と水分摂取のこだわりや運動による胆汁排泄への影響が關与したと考えられた。体重増加を入院日数で除して増加率を比較すると再発例で有意に体重増加が少なかった。体重増加への抵抗が強いほど再発のリスクが高いことが示唆された。再発のリスクを評価しておけば、栄養状態改善後に一層の配慮が必要な例をあらかじめ予想することが可能となると思われた。

【結語】

小児摂食障害の症例に対して、TPN による早期の栄養回復をおこない、生化学的、内分泌的回復も早期に認められた。さらに本研究ではゴナドトロピンの回復が食欲の回復に先行して起こることも確認され、栄養療法によって摂食障害の主症状である食欲自体が治癒してくる可能性が示唆された。再燃時においても、強制的な治療が少ない TPN 療法では、治療者と医療者の関係悪化が少なく、再入院の同意も容易に得られた。今後、重度の体重減少の小児患者に対して標準的な治療となり得ると考える。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 7 月 22 日、学位審査担当者が学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

摂食障害は心理的要因により著しいやせ、食行動の異常、精神症状を伴う疾患で、近年、小児期発症例が増加している。患者は治療されることに抵抗し、しばしば再発を繰り返しながら経過し、死亡する例も多数報告されている。本研究では小児の重症摂食障害患者に中心静脈栄養療法を積極的に勧め、栄養状態の改善が、身体的回復へ与える影響だけでなく、摂食障害の食行動の異常、精神的回復へ与える影響についても検討をおこなった。

外来治療で改善なく、生命の危険があると判断された摂食障害患者で10歳から15歳の女性患者25例を対象とした。中心静脈栄養を体重増加が得られるまで継続し、後方視的に生化学的検査、ゴナドトロピン値、治療経過を検討した。体重減少開始から入院までは全例1年未満（中央値6ヶ月）、入院時の平均体重は28.6kgで治療により平均8.0kgの体重増加が得られ、BMI値は12.7から16.5に改善した。中心静脈栄養の期間は平均103.6日、入院期間は平均189.6日だった。生化学検査所見では総ビリルビン値、総コレステロール値とも有意に低下し、アルカリフォスファターゼ値は有意に上昇し、6か月時まで上昇が持続した。卵胞刺激ホルモン値の回復は黄体形成ホルモン値の回復に平均24.8日先行、卵胞刺激ホルモン値の回復は食欲の回復に34.4日先行した。

治療後の食欲低下の再燃は25名中9名で認められた。食物回避性情緒障害の例では再燃はなく、神経性食欲不振症の例では10名中5名、広汎性拒絶症候群の例では5名中4名で再燃が見られた。再燃した例は入院治療中の1日当りの体重増加が少なかった例、入院時のアルカリフォスファターゼ値が高かった例で有意に多かった。

入院治療を開始後、総ビリルビン値、総コレステロール値、アルカリフォスファターゼ値は改善し、アルカリフォスファターゼ値は栄養回復後、さらに上昇が持続し、骨成長に関与する骨性アルカリフォスファターゼの上昇と考えられ、持続した栄養維持が骨成長の再開ために必要である事が示唆された。これらの結果は経口摂食療法の生化学所見の経時経過を検討した過去の報告に比較して良好な結果であった。

食欲の回復とゴナドトロピン値の関係を検討では、ゴナドトロピンの回復が食欲の回復に先行することから、栄養療法による低ゴナドトロピン血症の改善が、食欲低下、食行動異常の改善に先行する可能性が推察された。

本治療により成長期の小児への低栄養暴露を最短期間にとどめ、生化学的、内分泌的回復も過去の経口摂食療法の報告より早期に認められた。さらに本研究ではゴナドトロピンの回復が食欲の回復に先行して起こることも確認され、栄養療法によって摂食障害の主症状である食欲自体が治癒してくる可能性が示唆された。以上より、当論文は、これまで難治とされていた重度の摂食障害の小児患者に対して本治療が標準的な治療となり得ることを証明した意義のある論文であり、学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第946号		
学位授与の日	平成28年9月20日		
氏名	太田 慎吾		
学位論文の題目	Association between Hyperglycemia at Admission and Microvascular Obstruction in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (ST上昇型心筋梗塞患者における来院時高血糖と冠微小循環障害の関連)		
論文審査委員	主査	教授 加藤 正哉	
	副査	教授 前田 正信	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

「緒言」

急性心筋梗塞(acute myocardial infarction; AMI)における primary percutaneous coronary intervention (PPCI)は予後を改善させる確立した治療法である。しかし、心外膜を走行する冠動脈の再灌流が良好であっても心筋組織内を走行する冠微小循環の再灌流が得られていない症例が存在し、これらの患者では予後不良であることが報告されている。心臓MRI検査は冠微小循環閉塞(microvascular obstruction; MVO)を検出することができる有用な検査法である。心臓MRI検査で評価されたMVOが、予後不良因子であることは多数報告されているものの、MVO発症に関与する因子については不明な点が多い。

AMI患者では糖尿病の有無に関わらず来院時高血糖を来す症例が存在し、来院時高血糖は予後を悪化させることが報告されている。コントラストエコー法を用いた研究により、来院時高血糖と冠微小循環障害との関連が報告されており、冠微小循環障害が来院時高血糖を来したAMI患者の予後を悪化させる一つの機序であることが示唆されている。

今回我々は、ST上昇型AMI患者において来院時高血糖とMVOとの関連について心臓MRI検査を用いて検討した。

「方法」

対象：当院を受診した初回ST上昇型AMI患者93例を対象とした。心原性ショック、陈旧性心筋梗塞、慢性腎不全(GFR<30ml/min/1.73m²)を持つ患者を除外した。また、MRI

に禁忌（ペースメーカー、閉所恐怖症など）を持つ患者も除外した。

プロトコール：薬物投与前で来院直後に採取した静脈血の血糖値を来院時血糖値と定義した。心臓カテーテル検査は6Fのガイディングカテーテルを用いて行った。検査開始前にアスピリン200mgを内服後、活性型全血凝固時間を250秒以上に維持するようにヘパリン100IU/kgを経静脈的に投与した。責任病変はバルーンによる拡張を行った後、ステントを留置した。また、入院時と発症から24時間は3時間ごとに採血を行い最大クレアチンキナーゼ（CK）値と最大CK-MB値を決定した。

心臓MRI検査のプロトコールと解析：心臓MRI検査を発症から7日以内に施行した。シネMRIにて左室拡張末期容積、左室収縮末期容積、左室駆出率を算出した。また、遅延造影MRIによりMVOの有無ならびに梗塞サイズを評価した。内部に低信号を伴う高信号領域をMVOと定義した(付図)。また、梗塞サイズを総左室心筋体積に占める総遅延造影領域の割合(%)として算出した。

「結果」

MVOは93人中34人(37%)で認められた。MVO群では非MVO群と比較して統計学的に有意に来院時血糖が高値であった(204 [153-267] mg/dl 対 157 [127-200] mg/dl, $p=0.002$)。両群間において糖尿病罹患率およびHbA1cに有意差は認めなかった。MVO群では非MVO群と比較し、peak CK-MB、梗塞サイズが有意に大きかった(373 [223-501] IU/l 対 193 [79-276] IU/l, $p<0.001$ 、20 [13-30] %対 15 [8-20] %, $p<0.001$)。またMVO群では非MVO群と比較しno reflow現象(PCI後のTIMI flowがgrade 0, 1, 2)と再灌流障害(ST再上昇、心室頻拍、心室細動)の出現率が有意に高かった(10人 [29%]対 3人[5%]、 $p=0.002$ 、16人 [47%]対 14人 [24%]、 $p=0.02$)。多変量解析の結果、来院時高血糖、no reflow現象の出現、peak CK-MBが、MVO発症に関与する独立因子であった(odd比:1.014、95%CI:1.004-1.023、 $p=0.006$ 、odd比:9.311、95%CI:1.067-81.26、 $p=0.044$ 、odd比:1.007、95%CI:1.003-1.012、 $p=0.002$)。ROC解析の結果、MVOを検出する上での来院時血糖のcutoff値は190mg/dlであった(感度53%、特異度73%、AUC=0.69)。来院時血糖値190mg/dl

以上の患者群では、190mg/dl 未満の患者群に比較して有意に MVO 発症率は高値であった (18 人 [53%] 対 16 人 [27%]、 $p=0.023$)。

「考察」

本研究では、ST 上昇型 AMI 患者 93 人を対象とし来院時高血糖と MVO との関連について検討した。MVO は全患者の 34 人 (37%) に認められ、MVO 群では非 MVO 群に比較し来院時血糖値が有意に高く、一方、両群間で HbA1c、糖尿病罹患率に有意差を認めなかった。多変量解析の結果、来院時高血糖は MVO 発症に関与する独立因子であることが示された。

高血糖が微小循環レベルでの凝固能亢進に関与するという基礎研究からの報告がある。ST 上昇型 AMI 患者では、糖尿病の有無に関わらず来院時高血糖により冠微小循環レベルで過凝固が生じ、結果として MVO 発症に繋がったと考えられる。

AMI 患者において MVO が予後不良因子であることはすでに多数報告されている。また糖尿病の有無に関わらず来院時高血糖を来す AMI 患者は院内死亡率が高く予後不良であることも報告されている。本研究の結果により、来院時高血糖を来す ST 上昇型 AMI 患者の予後を悪化させる原因として、MVO 発症に関与している可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 8 月 4 日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

急性心筋梗塞 (acute myocardial infarction; AMI) 患者では糖尿病の有無に関わらず来院時高血糖を来す症例が存在し、来院時高血糖は予後を悪化させることが報告されている。コントラストエコー法を用いた研究により、来院時高血糖と冠微小循環閉塞 (microvascular obstruction; MVO) との関連が報告されており、MVO が来院時高血糖を来した AMI 患者の予後を悪化させる一つの機序であることが示唆されている。

本論文では、再灌流療法が施行された 93 人の ST 上昇型 AMI 患者において来院時高血糖と MVO との関連について心臓 MRI 検査を用いて検討した。

MVO は 93 人中 34 人 (37%) で認められた。MVO 群では非 MVO 群に比較して統計学的に有意に来院時血糖が高値であった (204 [153-267] mg/dl 対 157 [127-200] mg/dl、 $p=0.002$)。両群間において糖尿病罹患率および HbA1c に有意差は認めなかった。MVO 群では非 MVO 群と比較し、peak CK-MB、梗塞サイズが有意に大きかった (373 [223-501] IU/l 対 193 [79-276] IU/l、 $p<0.001$ 、20 [13-30] % 対 15 [8-20] %、 $p<0.001$)。また MVO 群では非 MVO 群と比較し no reflow 現象 (PCI 後の TIMI flow が grade 0, 1, 2) と再灌流障害 (ST 再上昇、心室頻拍、心室細動) の出現率が有意に高かった (10 人 [29%] 対 3 人 [5%]、 $p=0.002$ 、16 人 [47%] 対 14 人 [24%]、 $p=0.02$)。多変量解析の結果、来院時高血糖、no reflow 現象の出現、peak CK-MB が、MVO 発症に関与する独立因子であった (odd 比:1.014、95%CI:1.004-1.023、 $p=0.006$ 、odd 比:9.311、95%CI:1.067-81.26、 $p=0.044$ 、odd 比:1.007、95%CI:1.003-1.012、 $p=0.002$)。ROC 解析の結果、MVO を検出する上での来院時血糖の cutoff 値は 190mg/dl であった (感度 53%、特異度 73%、 $AUC=0.69$)。来院時血糖値 190mg/dl 以上の患者群では、190mg/dl 未満の患者群に比較して有意に MVO 発症率は高値であった (18 人 [53%] 対 16 人 [27%]、 $p=0.023$)。

本論文は、ST 上昇型 AMI 患者において、来院時高血糖が MVO 発症に関連することを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第947号		
学位授与の日	平成28年9月20日		
氏名	山口 智由		
学位論文の題目	Optical coherence tomography assessment of efficacy of thrombus aspiration in patients undergoing a primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction (直接的冠動脈インターベンションを施行したST上昇型心筋梗塞患者における血栓吸引療法の有用性に対する光干渉断層法による検討)		
論文審査委員	主査	教授 加藤正哉	
	副査	教授 前田正信	教授 赤阪隆史

論文内容の要旨

[背景]

ST 上昇型急性心筋梗塞(STEMI)は、血栓によって冠動脈が閉塞することにより発症する。STEMI に対する直接的経皮的冠動脈インターベンション(Primary percutaneous coronary intervention : primary PCI)は、標準的再灌流治療として確立されている。しかし、Primary PCI 施行時に合併症を伴うことがあり、その重篤なものは主に血栓によってもたらされる。血栓は末梢塞栓やno reflow 現象を引き起こすとされ、梗塞サイズを増大させる。さらにステント内の血栓が、将来のステント血栓症の原因になる可能性が報告されている。

Primary PCI 施行前に血栓吸引療法を行うことは、血栓塞栓の予防、梗塞サイズの縮小、臨床的アウトカムの改善をもたらすと報告がある。一方でその有用性に対して否定的な研究結果もあり、臨床的意義にはまだ不明な点が多い。

最近臨床応用されている血管内光干渉断層法 (optical coherence tomography; OCT) は約 10-20 μ m という高い解像度を有し、血栓の描出に優れている。OCT 画像では、血栓は血管内に突出する物体として描出される(thrombus protrusion)。

本研究では、Primary PCI 施行前に行った血栓吸引療法によってステント留置後の thrombus protrusion にどのような影響があるかを、OCT を用いて検討した。

[対象と方法]

1. 対象

2011年4月から2013年3月にかけて、当院及び紀南病院において primary PCI 後に OCT を施行した 188 名の ST 上昇型急性心筋梗塞患者を後ろ向きに評価した。すべて新規病変を対象とした。血栓吸引療法を行うかどうかは、主治医の判断に従った。

2. 血栓吸引療法

Thrombuster III GR 血栓吸引カテーテル[®](カネカ社、日本)を用いて、冠動脈ステント留置前に用手的に血栓吸引を行った。

3. OCT イメージング

心筋梗塞の責任病変へのステント留置直後に OCT イメージングを施行した。OCT は C7-XR/ILUMIEN (St. Jude Medical, St. Paul, Minnesota, USA) を使用した。OCT カテーテルを病変の遠位部まで進め、造影剤による血球除去を行いながら、OCT カテーテルを近位部へ引き戻して撮像した。

4. OCT イメージ解析

得られた OCT の画像から①thrombus protrusion の断面積、②ステント断面積、③血管内腔断面積、④ステントの malposition を計測した。

5. 冠動脈造影の解析

①対象血管径、②最少血管径、③狭窄度、④再灌流時の血流を半定量的に示す TIMI flow grade、⑤no reflow 現象の有無、⑥末梢塞栓の有無を評価した。

6. 統計学的解析

カテゴリーは頻度で表示し、2群間の比較には χ^2 検定またはFisher検定を用いた。連続変数は中央値±四分位範囲(IQR)で表示し、2群間の比較にはMann-Whitney検定を用いた。いずれも $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判定した。

[結果]

188 名の STEMI 患者のうち、113 名に対して PCI 前に血栓吸引療法を施行した(血栓吸

引 PCI 群)。75 名に対しては血栓吸引を行わずに PCI を施行した (標準 PCI 群)。

患者背景、梗塞責任血管、TIMI flow grade、PCI 手技、血管造影による評価項目に有意差は認めなかった。

OCTにより計測された最少ステント断面積に血栓吸引PCI 群と標準 PCI 群の間に有意差は認めなかった[7.4 (IQR): 5.8-9.4 vs. 7.4 IQR: 5.8-8.9mm², P=0.788]。最大thrombus protrusion 面積 [0.6 (IQR: 0.3-1.1) vs. 1.2 (IQR: 0.8-1.9)mm², P<0.001]、平均 thrombus protrusion面積 [0.1 (IQR: 0.1-0.2) vs. 0.5 (IQR: 0.3-0.8)mm², P<0.001]、そしてthrombus protrusion体積 [2.3 (IQR: 1.3-4.3) vs. 8.3 (IQR: 5.4-14.6)mm³, P<0.001] は血栓吸引PCI 群が標準 PCI 群に比べて有意に小さかった。この為、最少血管内腔断面積は血栓吸引PCI 群で有意に大きかった [6.9 (IQR: 5.4-8.8) vs. 6.3 (IQR: 4.6-7.8)mm², P=0.033]。

[結語]

ST 上昇型急性心筋梗塞患者に対する primary PCI 施行前に血栓吸引療法を追加することにより、thrombus protrusion は小さくなり、大きな血管内腔が得られた。primary PCI 施行前の血栓吸引療法により、ステント内の形態に好影響をもたらすと考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 8 月 2 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

急性心筋梗塞は、冠動脈内の動脈硬化性プラークの破綻に続いて起こる血栓形成と血流の途絶が原因で発症する。冠動脈ステントを用いた経皮的冠動脈インターベンションは、急性心筋梗塞に対する標準的な冠動脈再灌流治療法である。本論文は、急性心筋梗塞患者に対する経皮的冠動脈インターベンションに血栓吸引療法を併用することの

有効性を、血管内光干渉断層法を用いて検討した。その結果、血栓吸引療法を実施した群では、実施しなかった群に比較して、(1)ステント内に残存する血栓量が少なく有効血管内腔断面積を大きく確保できること、(2)経皮的冠動脈インターベンションの合併症である冠血流遅滞の頻度が減少すること、(3)血栓吸引療法による合併症が見られなかったことを明らかにした。以上より、急性心筋梗塞患者に対する経皮的冠動脈インターベンションに血栓吸引療法を併用することは、冠動脈再灌流治療に有用かつ安全であると結論づけた。本論文は急性心筋梗塞患者の急性期治療において新たな知見を加えたもので、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第948号		
学位授与の日	平成28年9月20日		
氏名	松中 浩		
学位論文の題目	Non-invasive quantification of melanin in the stratum corneum: a novel indicator of skin lesions in pigmentation diseases (皮膚色素沈着症の新しい病勢指標となりうる角層中メラニンの非侵襲的定量)		
論文審査委員	主査	教授 赤水 尚史	
	副査	教授 古川 福実	教授 朝村 真一

論文内容の要旨

【緒言】

皮膚中のメラニンは、皮膚色素沈着を伴う疾患においてその病勢を推しはかる上で重要な指標となる。しかし、従来の皮膚中のメラニン定量法では多量の生検組織を必要とし、患者への負担が大きく、また同部位の経時的な変化を追跡することができない。さらに、病勢判断の上で重要となる黒色のユウメラニンと黄色のフェオメラニンの分離精度が低いという欠点がある。そこで本研究においては、非侵襲的に、かつ皮膚の同部位を経時的に観察できるメラニンの正確な測定方法を確立した。

【方法】

- 角層メラニンの定量
 - ①対象および角層採取部位
夏場において半袖を着用し過度の日光曝露を受けず、サンスクリーン剤を腕に塗布しなかった健常人11名（男性5名、女性6名：平均年齢38±3歳）を対象とした。
日光曝露部位として前腕外側部、非曝露部位として上腕内側部に家庭用のセロハンテープ（ニチバン社製、セロテープ®、24×50 mm）を軽く貼付し剥離することで角層を採取した。
 - ②メラニンの分離定量
HPLCを用いて角層中のユウメラニンの特異的還元成分であるPTCA(pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid)、フェオメラニンの特異的還元成分である3-AHP(3-amino-4-hydroxyphenylalanin)および4-AHP(4-amino-3-hydroxyphenylalanin)を定量した。
- 皮膚色および生理活性物質の解析
 - ①皮膚の色調パラメーターの測定および算出
分光測色計（コニカミノルタ社製、CM2600d）にて対象部位を測定（L*, a*, b*）した。また分光反射率からメラニン指数（MI：Melanin Index）、紅斑指数（EI：Erythema Index）を算出した。
 - ②生理活性物質
著者らの既報の方法にて、メラニン生成に関与するET-1（endothelin-1）およびIL-6（interleukin-6）を半定量的に解析した。
- 角層メラニンの経時変化
 - ①対象および角層採取部位
通年において長ズボンを着用し屋内の仕事に従事する健常人4名（男性4名：平均年齢29±1歳）を対象とした。左右の下腿前部に2MEDの日光を曝露し、曝露前および曝露直後、3日後、1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 18.5, 20週間後に角層を採取した。
 - ②メラニンの分離定量
HPLCを用いてPTCA, 3-AHPおよび4-AHPを定量した。

【結果】

1. 角層メラニンの定量
 - ・PTCA, 4-AHP, 3-AHP ともに明瞭な分離検出を得た。
 - ・PTCA のみ, 日光曝露部の方が非曝露部よりも有意に高値であった。
 - ・ユウメラニン (PTCT) とフェオメラニン (AHPs) は, 正の相関の傾向を認めたが有意性はなかった。
2. 皮膚色および生理活性物質の解析
 - ・日光曝露部と非曝露部の比較において, L^* , a^* , b^* , MI, EI のすべてに有意な差を認めた。
 - ・ET-1 と IL-6 のどちらも, 日光曝露部の方が非曝露部よりも有意に高値であった。
 - ・PTCA, 総メラニン, ET-1 と L^* が負, a^* および MI が正の相関性を, ET-1 と b^* が正の相関性を示した。
3. 角層メラニンの経時変化
 - ・PTCA は, 日光曝露 4-5 週後にピークを認め, 11-15 週後に大きなピークを認めた。
 - ・AHPs は, 日光曝露 1-3 週後にピークを認めた。

【考察】

1. 皮膚の色調に差のある日光曝露部と非曝露部において, PTCA のみが皮膚の色調パラメーターと相関することから, 少なくとも, 過度の日光曝露を受けていない日本人の皮膚色には主にユウメラニンが関与していることが明らかとなった。
2. メラノサイトに対してメラニンの産生を亢進する ET-1 は日光曝露部の方が非曝露部よりも有意に高値であり, かつ, 皮膚の色調パラメーターとも相関していることから, 日光曝露によって持続的にメラノサイトへの刺激がなされメラニンが生成していることが裏付けられた。
また逆に抑制的に作用する IL-6 が日光曝露部において有意に高いことも確認され, 日光曝露による皮膚内の様々な生理活性物質の変動が示唆された。
3. 角層メラニンの経時変化において, PTCA の日光曝露 4-5 週後のピークは, 日光曝露によって基底層メラノサイトで通常観察されるメラニン生成であり, ケラチノサイトへ受け渡されたメラノソーム由来のメラニンと考えられる。11-15 週後の大きなピークは, 基底層メラノサイトで生成されたメラノソームがケラチノサイトのみならず TA 細胞 (transit amplifying cells) にも取り込まれ, TA 細胞内のメラノソームは分解されながらメラニンは保持され, 約 6 週後以降に TA 細胞が基底層を離れ分化をはじめたと考えることもできる。これは紫外線の影響を受けやすい分裂細胞の紫外線防御の仕組みの一つの仮説ともなる。
AHPs の日光曝露 1-3 週後のピークは皮膚のターンオーバー期間よりも短いことから, 基底層メラノサイト内での生成ではなく, 上層のケラチノサイト内のメラニン (前駆体) が非酵素的に酸化したものと考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

(赤水尚史：平成 28 年 8 月 26 日, 古川福実：平成 28 年 8 月 23 日, 朝村真一：平成 28 年 8 月 24 日)

皮膚中のメラニンは, 皮膚色素沈着を伴う疾患においてその病勢を推しはかる上で重要な指標となる。しかし, 従来の皮膚中のメラニン定量法では多量の生検組織を必要とし, 患者への負担が大きく, また同部位の経時的な変化を追跡することができない。さらに, 病勢判断の上で重要となる黒色のユウメラニンと黄色のフェオメラニンの分離精度が低いという欠点がある。そこで本研究においては, 非侵襲的に, かつ皮膚の同部位を経時的に観察できるメラニンの正確な測定方法を確立した。

家庭用セロハンテープにて表皮角層を採取し、生検組織からの HPLC を用いてユウメラニンとフェオメラニンを分離定量した。さらに、本測定方法の有用性を検証するために、日光曝露部と非曝露部のユウメラニン (PTCA:pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid) とフェオメラニン (3-AHP:3-amino-4-hydroxyphenylalanin および 4-AHP:4-amino-3-hydroxyphenylalanin), 皮膚の色調パラメーター(L*,a*,b*,MI:melanin index, EI:erythema index), メラニン産生に関わる生理活性物質(ET-1:endothelin-1 および IL-6:interleukin-6)との関連性を解析した。また日光曝露後の皮膚の同部位のメラニン変化を経時的に解析した。

日光曝露部と非曝露部の比較において、ユウメラニン(PTCA)のみが有意に高値であり皮膚の色調パラメーターとも相関した。また日光曝露後の表皮角層中のユウメラニンは 4-5 週と 11-15 週後にピークを観察した。4-5 週後のピークは日光曝露によって基底層メラノサイトで通常観察されるメラニン生成であり、ケラチノサイトへ受け渡されたメラノソーム由来のメラニンと考えられる。一方、11-15 週後のピークは、基底層メラノサイトで生成されたメラノソームがケラチノサイトのみならず TA 細胞 (transit amplifying cells) にも取り込まれ、TA 細胞内のメラノソームは分解されながらメラニンは保持され、約 6 週後以降に TA 細胞が基底層を離れ分化をはじめたと考えることもできる。これは紫外線の影響を受けやすい分裂細胞の紫外線防御の仕組みの一つの仮説ともなる。このように本方法は、メラニンの生成、沈着、排出および皮膚の紫外線防御機序の解明、さらに、皮膚色素沈着症の病勢の新しい指標となることが期待される

以上のことより、本論文は皮膚色素沈着症を伴う疾患における病勢を評価できる新たな知見と成り得るものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第949号		
学位授与の日	平成28年9月20日		
氏名	田中 文浩		
学位論文の題目	1.Balloon-assisted packing of wide-neck aneurysms with a mixture of n-butyl cyanoacrylate, Lipiodol, and ethanol:An experimental study 2.Effect of transcatheter arterial embolization with a mixture of n-butylcyanoacrylate, lipiodol, and ethanol on the vascular wall: macroscopic and microscopic studies (1.NBCA-lipiodol-ethanol 混合物(NLE)による wide-neck の動脈瘤に対するバルーンアシスト法を用いた充填術の実験的検討 2. NBCA-lipiodol-ethanol 混合物(NLE)を使用した動脈塞栓術後の血管の観察-肉眼的、組織学的検討)		
論文審査委員	主査	教授 加藤 正哉	
	副査	教授 園村 哲郎	教授 村田 晋一

論文内容の要旨

緒言

N-butyl 2-cyanoacrylate (NBCA) は出血性病変に対する塞栓物質として最近使用されるようになった。NBCA の塞栓機序は陰イオンと結合すると液体の monomer から個体の polymer に重合することによる。NBCA を動脈塞栓術に用いる場合、マイクロカテーテルに接着する危険性があるため、NBCA の取扱いには習熟を要するとされてきた。また X 線不透過性を得るために、NBCA は経カテーテル的動脈塞栓術に用いる際に lipiodol (Lp) との混合物として使用される。重合時間は、これら 2 つの成分の希釈率に依存する。NBCA と Lp の混合物 (NL) を血液または生理食塩水に注入すると、形状は Lp と同様の油滴状となる。しかし、Lp と ethanol のエマルジョンに NBCA を混入した混合物 (NLE) を生理食塩水または血液中に注入すると、ethanol の割合に応じて、単一の丸い液滴またはヌードル状の形状となり、NLE のマイクロカテーテルへの接着は最小限に留められる。一方で、NBCA 単独注入では血管内皮障害に伴う血管炎、ethanol 単独注入ではタンパク変性や凝固壊死などの組織障害を生じることが報告されており、NLE は NL よりも血管壁に重大な影響を及ぼす危険性がある。

本研究の目的は、NLE によるバルーンアシスト法を用いた wide-neck の動脈瘤への充填術の実現可能性および有用性を評価すること、さらに NLE および NL を用いた動脈塞栓術において血管壁に及ぼす影響について病理学的に比較検討を行うことである。

対象と方法

NL および NLE の作成方法

NBCA を、lipiodol と ethanol のエマルジョンに混合する。NBCA、lipiodol と ethanol を 1:1:2 の割合で数分間手で振とうし混合したものを、NLE112 と表す。対照として、NBCA と lipiodol を 1:1 の割合で混合したものを NL11 と表す。

Wide-neck の動脈瘤に対するバルーンアシスト法を用いた充填術の検討

雌の正常豚の頸動脈を外科的に露出し、頸静脈を用いて瘤作成を行った。血流遮断下で頸静脈を約 3cm の長さで摘出、頸動脈に縫合し、10 個の動脈瘤を作成した (長径 11.0 ± 1.36 mm、短径 9.8 ± 1.8 mm、neck 径 8.3 ± 1.24 mm)。各動脈瘤を作成後すぐに、左大腿動脈に 5 Fr シースを 2 本留置した。ヘパリン投与下で 5 Fr シースの一方より 5 Fr ガイディングカテーテルを挿入した。5 Fr ガイディングカテーテルを用いて、瘤と親動脈がそれぞれ描出される角度で頸動脈造影を行った。2.4Fr マイクロカテーテルを 5Fr ガイディングカテーテルを介して瘤内へ先進させた。もう一方の

5 Fr シースより経皮経管的血管形成術用の 4 Fr バルーンカテーテルを挿入し、頸動脈まで進めた。NL11 および NLE112 の注入前に、マイクロカテーテル内での NBCA の重合を防ぐ目的で 5% グルコースでフラッシュを行った。塞栓物質は、NL11 を 3 つの動脈瘤に、NLE112 を 7 つの動脈瘤に使用した。注入 10 分後、バルーン拡張を解除した。その後、バルーンカテーテルを用いて、塞栓物質の閉塞効力を評価するために頸動脈血管造影を行った。閉塞が不十分であった場合、追加の塞栓物質の注入をバルーン再拡張下で行った。NL11 と NLE112 グループ間について、バルーンカテーテルおよびマイクロカテーテルへの接着、塞栓性、再注入性について比較した。

NL, NLE を用いた動脈塞栓術後の血管の観察

対象は 52-55kg, 雌の正常豚 4 頭とし、総肝-固有肝動脈、左右内腸骨動脈に対し、動脈塞栓術を行うこととした。豚 4 頭 (総肝-固有肝動脈 4 本、内腸骨動脈 8 本) のうち、NL11 は 1 頭 (総肝-固有肝動脈 1 本、内腸骨動脈 2 本)、NLE112 は 3 頭 (総肝-固有肝動脈 3 本、内腸骨動脈 6 本) に使用した。全身麻酔下で、右大腿動脈に 5 Fr シースを 1 本留置し、ヘパリン投与を行った。5Fr バルーンカテーテルを肝動脈及び左右内腸骨動脈に先進させ、更にバルーンカテーテルを介し 2.2Fr. マイクロカテーテルを進めた。バルーン拡張し動脈血流遮断下に塞栓物質(NLE112,NL11)を注入した。塞栓物質の注入前に、マイクロカテーテル内での NBCA の重合を防ぐ目的で 5% グルコースでフラッシュを行った。注入 10 分後にバルーンを解除し、X 線透視にて塞栓物質の位置を記録した。2 日後に X 線透視にて塞栓物質の移動の有無を確認した。その後に豚を安楽死させ、剖検を実施し、総肝動脈、左右内腸骨動脈を周囲組織を含み摘出した。7.5% 中性ホルマリン緩衝液中に 3mm の厚さの切片に切断し、固定した。HE 染色にて血管壁及び周囲の組織障害の様子を観察した。塞栓物質移動の有無 (0、2 日後の X 線透視の比較)、血管内腔 (塞栓形状、血栓などの観察)、塞栓血管壁の病理学的観察を行うこととした。

結果

Wide-neck の動脈瘤に対するバルーンアシスト法を用いた充填術の検討

NL11 を使用したバルーンアシスト法による動脈瘤充填術を行った 3 つの動脈瘤モデルでは、バルーンカテーテルおよびマイクロカテーテルは、注入した NL11 と強固に接着し、抜去は困難を極め、追加注入は不可能であった。また、術後の確認造影ができないため、塞栓性については評価困難であった。これに対し、NLE112 を用いた 7 つの動脈瘤モデルでは、動脈瘤を完全に充填するために 1-3 回の NLE112 の注入を要したが、全例で NLE112 注入後にバルーンカテーテル及びマイクロカテーテルは共に容易に抜去することができ、さらに動脈瘤内にマイクロカテーテルの再挿入し、バルーンカテーテルの再拡張下に NLE112 を再注入し、追加充填することが可能であった。充填後の血管造影では、7 例それぞれにおいて NLE112 は動脈瘤内に十分に充填されていた。切除動脈瘤の肉眼的観察では、動脈瘤嚢に NLE112 が隙間なく充填されていた。

NL, NLE を用いた動脈塞栓術後の血管の観察 塞栓物質の移動度

NL11、NLE112 の注入 10 分後の腹部 X 線撮影にて、塞栓物質は標的血管の目的の位置に留まっていたが、2 日後の腹部 X 線撮影にて NLE112 の 9 例中 3 例が血管内を移動していた。

塞栓物質の血管内での肉眼的検討

NLE112 の 1 例は観察範囲外に移動したため、評価不能であった。残りの 11 例の病理学的変化について評価した。いずれの群においても血管壁に重大な損傷はなかった。NL11 や NLE112 の塞栓物質は、血管を拡張させ、血管内腔を占拠していた。NL11 は赤色血栓と網状構成を示した。NLE112 は一塊の類円形の液滴状の形状を呈し、血管内壁に沿った ring 状の赤色血栓によって取り囲まれていた。

血管壁の組織学的検討

顕微鏡検査では、いずれの試験片の血管壁にも壊死性変化は見られなかった。NL11 の 3 例にて、内膜の剥脱および中膜および外膜への好中球の浸潤を認めた。NLE112 の 8 例にて、内膜の剥脱、および外膜層への好中球の浸潤を認めたが、中膜への好中球の浸潤はなかった。

結語

NLE によるバルーンアシスト下における wide-neck 動脈瘤充填術は実現可能かつ有用な方法であることを実証した。NL および NLE を用いた動脈塞栓術後の塞栓血管の病理学的観察では、NL の形状は in vitro で油滴状であったが in vivo で網目状を呈していたのに対し、NLE112 の形状は in vivo でも in vitro と同様の一塊の類円形の液滴状を呈した。NLE112 における血管障害は NL11 よりも軽度であった。NLE112 は動脈瘤充填術に適用できる充填剤である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成28年8月25日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

【背景】 N-butyl 2-cyanoacrylate (NBCA) と lipiodol (Lp) の混合物 (NL) は動脈塞栓術に使用する塞栓物質であるが、NBCAは血液と重合する際にマイクロカテーテルに接着する危険性があるため、使用には習熟を要するとされている。一方NBCA、Lp、ethanolの混合物 (NLE) では、NBCAには無水ethanolを加え重合が促進する特徴があり、血液中に注入する際にNLEのマイクロカテーテルへの接着は最小限に留められる。このNLEの接着性は、NLEの使用にバルーンカテーテルなどのデバイスが併用できる可能性が示唆される。また、NBCA、ethanolの動脈注入において、NBCAでは血管内皮障害に伴う血管炎、ethanolではタンパク変性や凝固壊死などの組織障害を生じることが知られており、NLEはNLよりも血管壁に重大な影響を及ぼす可能性がある。本研究の目的は、NLEによるバルーンアシスト法を用いたwide-neckの動脈瘤への充填術の実現可能性および有用性を評価することに加え、NLEおよびNLが動脈塞栓術において血管壁に及ぼす影響について病理学的に比較評価を行うことである。

【方法】 NBCA、lipiodol と ethanol を 1:1:2 の割合で混合したものを、NLE112 と表す。対照として、NBCA と lipiodol を 1:1 の割合で混合したものを NL11 と表す。Wide-neck の動脈瘤に対するバルーンアシスト法を用いた充填術の検討のため、雌の正常豚の頸動脈を外科的に露出し、頸静脈を用いて計 10 個の瘤作成を行った。動脈瘤を作成後すぐに、左大腿動脈に 5 Fr シースを 2 本留置した。5 Fr シースの一方より 2.4Fr マイクロカテーテルを 5Fr ガイディングカテーテルを介して瘤内へ先進させた。もう一方の 5 Fr シースより経皮経管的血管形成術用の 4 Fr バルーンカテーテルを挿入し、頸動脈まで進めた。塞栓物質は、NL11 を 3 つの動脈瘤に、NLE112 を 7 つの動脈瘤に使用した。注入 10 分後、バルーン拡張を解除し、頸動脈血管造影を行った。閉塞が不十分であった場合、追加の塞栓物質の注入を行った。NL11 と NLE112 グループ間について、バルーンカテーテルおよびマイクロカテーテルへの接着、塞栓性、再注入性について比較した。また、NL、NLE を用いた動脈塞栓術後の血管の観察のため、雌の正常豚 4 頭の総肝-固有肝動脈、左右内腸骨動脈に対し、動脈塞栓術を行うこととした。NL11 は 1 頭（総肝-固有肝動脈 1 本、内腸骨動脈 2 本）、NLE112 は 3 頭（総肝-固有肝動脈 3 本、内腸骨動脈 6 本）に使用した。5Fr バルーンカテーテルを肝動脈及び左右内腸骨動脈に先進させ、更に 2.2Fr マイクロカテーテルを進めた。動脈血流遮断下に塞栓物質(NLE112,NL11)を注入した。注入 10 分後にバルーンを解除し、X 線透視にて塞栓物質の位置を記録した。2 日後に X 線透視にて塞栓物質の移動の有無を確認した。その後総肝動脈、左右内腸骨動脈を周囲組織を含み摘出し、HE 染色にて血管壁及び周囲の組織障害の様子を観察した。塞栓物質移動の有無 (0、2 日後の X 線透視の比較)、血管内腔 (塞栓形状、血栓などの観察)、塞栓血管壁の病理学的観察を行うこととした。

【結果】 NL11 を使用したバルーンアシスト法による動脈瘤充填術を行った 3 つの動脈瘤モデルでは、バルーンカテーテルおよびマイクロカテーテルは、NL11 と強固に接着し、抜去は困難を極めた。これに対し、NLE112 を用いた 7 つの動脈瘤モデルでは、全例で NLE112 注入後にバルーンカテーテル及びマイクロカテーテルは共に容易に抜去することができ、さらに動脈瘤内にマイクロカテーテルの再挿入し、バルーンカテーテルの再拡張下に NLE112 を再注入し、追加充填することが可能であった。充填後の血管造影では、7 例それぞれにおいて NLE112 は動脈瘤内に十分に充填されていた。NL、NLE を用いた動脈塞栓術後の血管の観察において、塞栓物質の移

動度に関して、NL11、NLE112の注入10分後の腹部X線撮影にて、塞栓物質の移動はみられなかったが、2日後の腹部X線撮影にてNLE112の9例中3例が血管内を移動していた。塞栓物質の血管内での肉眼的検討に関して、NL11やNLE112の塞栓物質は、血管を拡張させ、血管内腔を占拠していた。NL11は赤色血栓と網状構成を示した。NLE112は一塊の類円形の液滴状の形状を呈し、血管内壁に沿ったring状の赤色血栓によって取り囲まれていた。血管壁の組織学的検討に関して、顕微鏡検査ではいずれの試験片の血管壁にも壊死性変化は見られなかった。NL11の3例にて、内膜の剥脱および中膜および外膜への好中球の浸潤を認めた。NLE112の8例にて、内膜の剥脱、および外膜層への好中球の浸潤を認めたが、中膜への好中球の浸潤はなかった。

【結語】NLEによるバルーンアシスト下におけるwide-neck動脈瘤充填術は実現可能かつ有用な方法であることを実証した。NLおよびNLEを用いた動脈塞栓術後の塞栓血管の病理学的観察では、NLの形状はin vitroで油滴状であったがin vivoで網目状を呈していたのに対し、NLE112の形状はin vivoでもin vitroと同様の一塊の類円形の液滴状を呈した。NLE112における血管障害はNL11よりも軽度であった。NLE112は動脈瘤充填術に適用できる充填剤である。

本論文は、NLEは新たな塞栓物質として有用な特徴を示し、かつ従来使用されているNLと同程度に安全に使用できることを明らかにした意義のある論文であり、学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第950号		
学位授与の日	平成28年12月20日		
氏名	森 喬史		
学位論文の題目	Efficiency of G2/M-related tumor-associated antigen-targeting cancer immunotherapy depends on antigen expression in the cancer stem-like population (G2/M 期関連抗原を標的とした癌免疫療法の効果に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 井篁 一彦	教授 原 勲

論文内容の要旨

今回の研究の目的は、癌に対する有効な DNA ワクチンの作成である。種々の腫瘍関連抗原の存在が報告されているが、おのおのに関して効果の面での報告は少ない。細胞周期における G2/M 期では、細胞が分裂を通して劇的な形態変化を生じる。この時に、種々の蛋白が機能していると考えられる。癌細胞では正常細胞よりも活発に細胞分裂が行われるため、ここでは、G2/M 期に関連する蛋白が作用し、高頻度に発現しているため、これらの蛋白が癌免疫療法のよい標的となると考えられる。このうち、Birc5、Aurka、Nek2、Plk1 といった G2/M 期関連抗原に対する分子標的療法が確立され、すでに試薬を用いた臨床試験も行われている。今回、DNA ワクチンモデルを用いて、G2/M 期関連抗原の Birc5、Aurka、Nek2、Plk1 を標的とした腫瘍免疫療法の効果を検討した。

G2/M 期関連抗原をおのおのコードしたプラスミドを作成し、BALB/c マウスに1週おきに2回注射した。CT26 大腸癌細胞株を接種し、1週おきに腫瘍体積を測定した。Birc5、Aurka で腫瘍増大抑制効果を認めしたが、Nek2、Plk1 ではその効果を認めなかった。

次に、G2/M 期関連抗原における抗腫瘍効果を検証するため、癌幹細胞様細胞群におけるそれぞれの抗原の発現性を検証した。癌幹細胞様細胞とは、①高い腫瘍誘導能を有している②高い自己複製能を有している③高い分化能を有している細胞と考えられている。癌幹細胞様細胞を分離する方法としてセルソーターを用いて side population (SP) として分離する方法が報告されている。癌幹細胞様細胞では膜トランスポーター分子が高発現しており、ヘキスト 33342 という色素を細胞外に汲み出す能力が高く、染色され難いことを利用した方法である。このため癌幹細胞様細胞は化学療法や放射線療法に抵抗性を示すこととなる。今回 CT26 大腸癌細胞株より癌幹細胞様細胞を分離するため、この方法を用いた。癌幹細胞様細胞と非癌幹細胞様細胞において RT-PCR 法を用いて、Birc5、Aurka、Nek2、Plk1 の発現を検証した。Birc5 と Aurka では、癌幹細胞様細胞、非癌幹細胞様細胞ともに発現していたが、Nek2、Plk1 では非癌幹細胞様細胞に有意に発現していた。癌幹細胞様細胞群に発現している抗原は、癌免疫療法における抗腫瘍効果と関連している可能性が示唆された。

さらに、熱ショック蛋白の1つである Hsp90 と融合させた Birc5 プラスミドを作成し、抗腫瘍効果を検証した。熱ショック蛋白はもともと熱ショックにより発現が増加する細胞内蛋白質として発見され、熱以外でも放射線・低栄養などのストレスに反応して増加することが知られている。その後、分子シャペロンとして蛋白と結合して機能することが分かっている。抗原性を有するペプチドと結合した Hsp90 が、効率よく抗原提示細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションを促進し、抗原ペプチド特異的 CTL が誘導され、抗腫瘍効果を増強することが報告されている。そこで DNA ワクチンにおける Hsp90 による抗腫瘍効果の増強に関して検証した。Birc5 をコードしたプラスミドへ、Hsp90 の N 末端領域を挿入したプラスミドと、C 末端領域を挿入したプラスミドを作成した。この2つのプラスミドと Hsp90 を融合させていない Birc5 をコードしたプラスミドとを BALB/c マウスに1週おきに2回注射した。CT26 大腸癌細胞株を接種し、1週おきに腫瘍体積を測定した。Hsp90 の N 末端領域と融合させた Birc5 プラスミドでは、強力な抗腫瘍効果を示したが、C 末端領域と融合させた Birc5 プラスミドでは、Hsp90 を融合させていない Birc5 プラスミドと比べて抗腫瘍効果が増強しなかった。

これらの研究で、腫瘍関連抗原の癌幹細胞様細胞群での発現が、腫瘍関連抗原をコードした DNA ワクチン療法における腫瘍の縮小効果に不可欠であった。また Hsp90 の N 末端領域と腫瘍関連抗原を融合させることにより DNA ワクチンの抗腫瘍効果が増強することが示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 11 月 8 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め上記学位論文の審査を行った。

本論文では、DNA ワクチンモデルを用いて、G2/M 期関連抗原の Birc5、Aurka、Nek2、Plk1 を標的とした腫瘍免疫療法の効果を検討した。

G2/M 期関連抗原をおのおのコードしたプラスミドを作成し、BALB/c マウスに 1 週おきに 2 回注射した。CT26 大腸癌細胞株を接種し、1 週おきに腫瘍体積を測定した。Birc5、Aurka で腫瘍増大抑制効果を認めたが、Nek2、Plk1 ではその効果を認めなかった。

次に、G2/M 期関連抗原における抗腫瘍効果を検証するため、癌幹細胞様細胞群におけるそれぞれの抗原の発現性を検証した。癌幹細胞様細胞とは、①高い腫瘍誘導能を有している②高い自己複製能を有している③高い分化能を有している細胞と考えられている。癌幹細胞様細胞を分離する方法としてセルソーターを用いて side population (SP) として分離する方法が報告されている。癌幹細胞様細胞では膜トランスポーター分子が高発現しており、ヘキスト 33342 という色素を細胞外に汲み出す能力が高く、染色され難いことを利用した方法である。このため癌幹細胞様細胞は化学療法や放射線療法に抵抗性を示すこととなる。今回 CT26 大腸癌細胞株より癌幹細胞様細胞を分離するため、この方法を用いた。癌幹細胞様細胞と非癌幹細胞様細胞において RT-PCR 法を用いて、Birc5、Aurka、Nek2、Plk1 の発現を検証した。Birc5 と Aurka では、癌幹細胞様細胞、非癌幹細胞様細胞ともに発現していたが、Nek2、Plk1 では非癌幹細胞様細胞に有意に発現していた。癌幹細胞様細胞群に発現している抗原は、癌免疫療法における抗腫瘍効果と関連している可能性が示唆された。

さらに、熱ショック蛋白の 1 つである Hsp90 と融合させた Birc5 プラスミドを作成し、抗腫瘍効果を検証した。熱ショック蛋白はもともと熱ショックにより発現が増加する細胞内蛋白質として発見され、熱以外でも放射線・低栄養などのストレスに反応して増加することが知られている。その後、分子シャペロンとして蛋白と結合して機能することが分かってきている。そこで DNA ワクチンにおける Hsp90 による抗腫瘍効果の増強に関して検証した。Birc5 をコードしたプラスミドへ、Hsp90 の N 末端領域を挿入したプラスミドと、C 末端領域を挿入したプラスミドを作成した。この 2 つのプラスミドと Hsp90 を融合させていない Birc5 をコードしたプラスミドとを BALB/c マウスに 1 週おきに 2 回注射した。CT26 大腸癌細胞株を接種し、1 週おきに腫瘍体積を測定した。Hsp90 の N 末端領域と融合させた Birc5 プラスミドでは、強力な抗腫瘍効果を示したが、C 末端領域と融合させた Birc5 プラスミドでは、Hsp90 を融合させていない Birc5 プラスミドと比べて抗腫瘍効果が増強しなかった。

これらの研究で、腫瘍関連抗原の癌幹細胞様細胞群での発現が、腫瘍関連抗原をコードした DNA ワクチン療法における腫瘍の縮小効果に不可欠であった。また Hsp90 の N 末端領域と腫瘍関連抗原を融合させることにより DNA ワクチンの抗腫瘍効果が増強することが示され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第951号		
学位授与の日	平成28年12月20日		
氏名	八木 重孝		
学位論文の題目	Primary tumor SUVmax on preoperative FDG-PET/CT is a prognostic indicator in stage IA2-IIB cervical cancer patients treated with radical hysterectomy (広汎子宮全摘術を施行した子宮頸癌 IA2-IIB 症例の術前 FDG-PET/CT による SUVmax 値は予後予測因子である。)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 園村 哲郎	教授 井篁 一彦

論文内容の要旨

【緒言】

子宮頸癌は女性にとって2番目に多い癌であり、治療としては手術、放射線治療を中心にしてこれに化学療法を組み合わせられて行われている。日本では子宮頸癌 stageIB-IIB に対しては主として広汎性子宮全摘術が行われている。これらの比較的早期の子宮頸癌の予後は一般に良好であるが20~30%の症例に再発を認める。そのため手術後の再発高リスク群を予測し補助治療を個別化するためには、信頼できる新規マーカーの開発が急務である。

婦人科領域においてPET/CT (positron emission tomography/computed tomography) は悪性腫瘍の治療前の遠隔転移の評価や原発病巣の状態の把握、治療方針の決定に用いられている。しかしながら子宮頸癌に関してPET/CTにおけるSUVMax (Standardized uptake value) と臨床病理学的因子や予後との関連に関する研究は十分ではない。今回、子宮頸癌の術前PET/CTにおける原発巣SUVmax と臨床病理学的因子及び予後因子との関連について検討した。

【方法】

当院で、2008年11月から2013年6月までに術前PET/CT施行後、初回治療として広汎子宮全摘術を施行したステージIA2からIIB2の59例を対象とした(中央値46歳)(ステージIA2:6例、IB1:36例、IB2:3例、IIA:4例、IIB:10例)。原発巣SUVmax と臨床病理学的因子(組織型:扁平上皮癌35名、腺癌19例、腺扁平上皮癌5例、リンパ節転移:あり44例、なし15例、脈管侵襲:あり24例、なし35例)腫瘍径、無増悪生存期間(progression-free survival:PFS)、および全生存期間(overall survival:OS)との関連を検討した。さらにIB期(39例)におけるサブグループ解析を同様に行った。

FDG-PET/CTは ^{18}F -FDG(2.6Mq/kg body weight)注射し50分後に撮影を開始した。臨床病理学的因子の相関はMann-Whitney U 検定で行った。ROC 曲線解析でSUVMaxのカットオフ値を決定した。生存率分析にはKaplan-Meier法を用いた。グループ間の生存率の比較はlog-rank testを使用した。

【成績】

59人のSUVmaxの中央値は4.31であった。ステージ別ではIA2の中央値は1.29、IB1は3.73、IB2は11.03、IIAは5.27、IIBは8.05であった。IB1はIA2より有意にSUVmaxが高値でIB2はIA2とIB1より有意に高値であった。IIB2ではIA2とIB1よりは有意にSUVmaxが高値であるが、IB2とIIAとは有意では無かった。

リンパ節転移なし(44例)のSUVmaxの中央値は3.79で、リンパ節転移あり(15例)では8.56であった。脈管侵襲なし(35例)では3.81で、脈管侵襲あり(24例)では7.70であった。リンパ節転移、脈管侵襲の有無で有意差が認められた。扁平上皮癌(35例)のSUVmaxの中央値は3.80で腺癌と腺扁平上皮癌(24例)では4.89であり、組織型では差が認められなかった。腫瘍径20mm以上の

方が有意に高値であった。

リンパ節転移、脈管浸潤における ROC 曲線解析では、それぞれの最適な SUVmax のカットオフ値は 6.03、4.42 であり、各因子において高値群では 67～80%の感度をもって有意にリスク因子陽性となった。腫瘍径 20mm 以上、40mm 以上での最適な SUVmax のカットオフ値は 4.71、9.66 であり 71～80%の感度をもって有意にリスク因子陽性となった。

次に SUVmax と患者予後との相関について解析したところ PFS では最適なカットオフ値は 5.59 であり、SUVmax 高値群では SUVmax 低値群に比べて有意に短縮した(P=0.006)。同様に OS ではカットオフ値は 7.36 であり、高値群で有意に短縮した(P=0.004)。多変量解析では SUVmax は PFS の独立した予後不良因子であった(hazard ratio=3.947、P=0.011)。

さらにステージ IB39 例におけるサブグループ解析において PFS では最適なカットオフ値は 6.69 であり、SUVmax 高値群で有意に PFS の短縮を認めた(P=0.014)。同様に OS ではカットオフ値は 7.90 であり、SUVmax 高値群で有意に短縮した(P=0.001)。多変量解析でも SUVmax が独立した予後不良因子であった(hazard ratio=4.851、P=0.026)。

【考察】

これまでの研究において子宮頸癌については SUVmax と予後に関してのいくつかの報告があるが進行した子宮頸癌を含めたものや治療方針のことなる症例も含まれており SUVmax の予後因子としての意義は明らかでなかった。今回我々の研究では、初回治療で広汎子宮全摘術を行った早期の子宮頸癌に関して SUVmax の高値はリンパ節転移や脈管侵襲陽性や腫瘍サイズの大きさといった臨床病理学的因子と相関していた。さらに OS や PFS に関して術前 FDG-PET/CT における SUVmax は高値群の方が低値群より予後不良であった。さらに多変量解析において SUVmax 高値は独立した予後不良因子であった。このことより SUVmax は子宮頸癌、特に I B 期の予後を予測し術後治療の個別化に貢献するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

最近では SUVmax に体積を考慮した MTV (metabolic tumor volume) や TLG (total lesion glycolysis) と臨床病理学的因子との関連についての報告がなされている。SUVmax は簡便であるが、腫瘍内の不均一な状態を評価できておらず、その点に関しては SUVmax のみを指標とした本研究の限界と考えられる。

今後、さらに別の指標、glut-1 や cytoplasmic hexokinase II といった免疫染色や SCC などの腫瘍マーカー、MRIdiffusion などの他の画像 tool などを組み合わせて新たな予後規定のバイオマーカーを検討していく必要がある。

今回の研究において原発巣の SUVmax の高値は手術可能な I-II 期の子宮頸癌において予後不良を予測する因子であることを証明した。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 11 月 29 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。本論文は、子宮頸癌の術前 PET/CT における原発巣 SUVmax と臨床病理学的因子及び予後因子との関連について検討し、原発巣 SUVmax の高値は手術可能な I-II 期の子宮頸癌において予後不良を予測する因子であることを証明したものである。

当院で、2008 年 11 月から 2013 年 6 月までに術前 PET/CT 施行後、初回治療として広汎子宮全摘術を施行したステージ IA2 から IIB の 59 例を対象とした。原発巣 SUVmax と臨床病理学的因子 (組織型、リンパ節転移、脈管侵襲、腫瘍径、無増悪生存期間 (progression-free survival:PFS)、および全生存期間 (overall survival:OS) との関連を検討した。さらに IB 期 (39 例) におけるサブグループ解析を同様に行った。

59 人の SUVmax の中央値は 4.31 であった。ステージ別の解析では IB1 は IA2 より有意に SUVmax が高値で IB2 は IA2 と IB1 より有意に高値であった。IIB では IA2 と IB1 より有意に SUVmax が高値であった。また、リンパ節転移陽性例や脈管侵襲陽性例において SUVmax は有意に高値であったが、組織型では有意な差が認められなかった。リンパ節転移、脈管侵襲における ROC 曲線解析では、それぞれの最適な SUVmax のカットオフ値を決定し、各因子において高値群では 67～80%の感

度をもって有意にリスク因子陽性となった。また腫瘍径 20mm 以上、40mm 以上での最適な SUVmax のカットオフ値を決定し、71~80%の感度をもって有意にリスク因子陽性となった。

次に SUVmax と患者予後との相関について解析したところ PFS では最適なカットオフ値は 5.59 であり、SUVmax 高値群では SUVmax 低値群に比べて有意に PFS は短縮した。同様に OS ではカットオフ値は 7.36 であり、SUVmax 高値群で OS は有意に短縮した。多変量解析では SUVmax は PFS の独立した予後不良因子であった。

さらにステージ IB39 例におけるサブグループ解析において PFS では最適なカットオフ値は 6.69 であり、SUVmax 高値群で有意に PFS の短縮を認めた。同様に OS ではカットオフ値は 7.90 であり、SUVmax 高値群で有意に短縮した。多変量解析でも SUVmax が独立した予後不良因子であった。

今回我々の研究では、SUVmax の高値はリンパ節転移や脈管侵襲陽性や腫瘍サイズの大きさなど、臨床病理学的因子と相関していた。さらに OS や PFS に関して SUVmax は高値群の方が低値群より予後不良であった。さらに多変量解析において SUVmax 高値は独立した予後不良因子であった。

これらの結果により、SUVmax は手術可能な IA2 から IIB の子宮頸癌の予後を予測し術後治療の個別化に貢献するバイオマーカーとなる可能性が示唆され、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第952号		
学位授与の日	平成28年12月20日		
氏名	峰 巨		
学位論文の題目	Synaptic modulation of excitatory synaptic transmission by nicotinic acetylcholine receptors in spinal ventral horn neurons (脊髄前角ニューロンにおけるニコチン性アセチルコリン受容体による興奮性シナプス伝達制御機構)		
論文審査委員	主査	教授 川股知之	
	副査	教授 田島文博	教授 吉田宗人

論文内容の要旨

【諸言】

コリン作動性神経系は中枢神経系に広く発現し、学習・記憶・認知機能など様々な脳機能に関与している。脊髄運動ニューロンに対するコリン作動性神経系の機能的役割についてはなお不明な点が多い。コリン作動性神経系に関与しているアセチルコリン(以下、ACh)はニコチン(以下、Nic)性 ACh 受容体とムスカリン性 ACh 受容体の両方の受容体に作用し、Nic 性、ムスカリン性に作用していることは広く知られている。Nic 性 ACh 受容体は五量体で 16 種類のサブユニットの組み合わせによって構成されている。また中枢神経系、自律神経系、神経筋接合部で、そのサブユニット構成には特性がある。脊髄における ACh は脊髄後角では神経情報伝達に対し抑制的に作用することが報告されているが、脊髄前角において運動制御機構にどのように作用しているのか不明である。今回の研究では ACh 受容体、とくに Nic 性 ACh 受容体(以下、nAChRs)に着目し、whole-cell patch-clamp 法を適用し、同受容体によるシナプス伝達制御機構について解析した。

【研究】

幼若雄性 Sprague-Dawley 系ラット (8-12 日年齢) より摘出した脊髄から 500 μ m のスライス標本を作製し、脊髄前角細胞にホールセル・パッチクランプ法を適用した。

【結果】

電位を -70mV に固定し、脊髄前角の IX 層からパッチクランプ記録を行うと自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous EPSCs 以下、sEPSCs) が観察された。グルタミン酸受容体拮抗薬 (CNQX 10 μ M, AP-5 50 μ M) 存在下では sEPSCs は観察されなかった。

ACh (100 μ M) を単独で 2 分間灌流すると、内向き電流が出現する (n=8; average amplitude -44.6 \pm 10.9pA) とともに、興奮性シナプス後電流の頻度の増加 (n=8; 306.1 \pm 89.1%) および振幅の増加 (n=8; 139.2 \pm 16.2%) が観察された。ナトリウムチャネル阻害剤 (TTX 0.5 μ M) 存在下では活動電位が阻害されるため、神経終末の作用のみ解析でき、微小自発性興奮性シナプス後電流 (miniature EPSCs 以下、mEPSCs) が観察できる。TTX 存在下では ACh 灌流により mEPSC の頻度 (n=5; 598.3 \pm 153.7%) と振幅 (n=5; 113.9 \pm 3.5%) の増加がみられた。また TTX 存在下でも ACh による内向き電流の出現 (n=6; average amplitude -33.0 \pm 6.8pA) が観察された。また CNQX・AP-5 存在下では ACh による内向き電流の出現 (n=5; average amplitude -24.2 \pm 3.4pA) が観察された。ACh による内向き電流の振幅は、ACh 単独灌流時、TTX 存在下、CNQX・AP-5 存在下の 3 群間で有意差は認められなかった。

次に Nic 性 ACh 受容体のアゴニストである Nic (100 μ M) を単独で 2 分間灌流すると、内向き電流が出現し (n=7; average amplitude -148.4 \pm 36.7pA)、EPSC の頻度の増加 (n=7; 567.4 \pm 300.7%) と振幅の増加 (n=7; 171.6 \pm 28.7%) が観察された。TTX 存在下では Nic による内向き電流の出現 (n=14; average amplitude -137.1 \pm 19.5pA) と mEPSC の頻度の増加 (n=10; 545.2 \pm 61.4%) と振幅の増加 (n=10; 133.1 \pm 10.6%) が観察された。CNQX・AP-5 存在下では Nic による内向き電流の出現 (n=6; average amplitude -154.0 \pm 60.2pA) が観察された。Nic による内向き電流の振幅は、ACh 単独灌流時、TTX 存在下、CNQX・AP-5 存在下の 3 群間で有意差は認められなかった。以上の

結果から、nAChRs はシナプス前性・シナプス後性に発現し興奮性の情報伝達を行っていること、またシナプス前性に発現した nAChRs は神経終末に存在しておりグルタミン酸を介した応答を行っていることが示唆された。

中枢神経系には $\alpha 4\beta 2$ 型・ $\alpha 7$ 型の nAChR が主に発現しているとの報告があり、脊髓前角における nAChR のサブタイプを明らかにするため、それぞれの受容体拮抗薬の存在下に Nic を投与し、観察を行った。 $\alpha 4\beta 2$ 型 nAChR 拮抗薬である Dh β E 存在下では Nic による内向き電流の振幅 (n=13; average amplitude -48.6 ± 9.3 pA) は有意に減少したが、Nic による EPSC の頻度の増加 (n=13; $1060.0 \pm 518.6\%$) と振幅の増加 (n=13; $146.7 \pm 16.6\%$) は Nic 単独灌流時と比べて有意差は認めなかった。一方、 $\alpha 7$ 型 nAChR 拮抗薬である MLA 存在下では Nic による内向き電流 (n=17; average amplitude -127.1 ± 18.1 pA) ならびに興奮性シナプス後電流の頻度の増加 (n=14; $1068.5 \pm 214.8\%$) と振幅の増加 (n=14; $196.3 \pm 10.6\%$) は Nic 単独灌流時と比べて有意差は認めなかった。また、TTX 存在下でも、各受容体拮抗薬存在下の Nic による内向き電流の振幅 (Dh β E n=7; -33.9 ± 10.8 pA, MLA n=6; -119.7 ± 85.8 pA) ならびに mEPSC の頻度の増加 (Dh β E n=6; $642.0 \pm 216.6\%$, MLA n=12; $602.5 \pm 185.4\%$) と振幅の増加 (Dh β E n=6; $106.4 \pm 34.9\%$, MLA n=12; $117.2 \pm 11.1\%$) の変化を認めたが、TTX 非存在下と同様に Dh β E 存在下の Nic による内向き電流の振幅の減少のみに有意差を認めた。

【考察】

今回の実験において脊髓運動ニューロンのシナプス後性に $\alpha 4\beta 2$ 型を含むサブタイプが、シナプス前性には $\alpha 4\beta 2$ 、 $\alpha 7$ 型以外のサブタイプを含む nAChR が脊髓前角ニューロンに発現しており、nAChR の活性化により脊髓運動ニューロンの膜興奮性が高まることが明らかとなった。

最近の研究で Nic は慢性期や急性期の神経毒性の状態に対し潜在的な神経保護作用がある可能性が示唆されている。ラットにおいて脊髓損傷後の機能的回復に Nic が効果的な作用をもたらしているとの報告もある。これには nAChRs を介したメカニズムが大きな役割を果たしていると考えられているがそのメカニズムは完全には解明されていない。今回の結果より脊髓運動ニューロンにおいて ACh の興奮性作用に $\alpha 4\beta 2$ や他のサブタイプの nAChRs ($\alpha 7$ 以外) が関与していると考えられ、これらの受容体のアゴニストが脊髓損傷後の機能的回復に寄与する可能性があると考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 12 月 9 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は、脊髓前細胞におけるニコチン性アセチルコリン受容体(以下、nAChR)の運動制御機構を電気生理学的に解析したものである。幼若 SD 系ラットの脊髓スライスの脊髓前角細胞に whole-cell patch-clamp 法を適用し、同受容体によるシナプス伝達制御機構について解析した。

膜電位を -70 mV に固定し、脊髓前角から記録を行うと自発性興奮性シナプス後電流(以下、sEPSCs)が観察された。グルタミン酸受容体拮抗薬 (CNQX, AP-5) 存在下では sEPSCs は観察されなかった。ACh を単独で灌流すると、内向き電流(以下、IC)が出現するとともに、興奮性シナプス後電流(以下、EPSC)の頻度の増加および振幅の増加が観察された。ナトリウムチャンネル阻害剤(TTX)存在下でも ACh による IC の出現が観察された。CNQX・AP-5 存在下では ACh による IC の出現が観察された。ACh による IC の振幅は、ACh 単独灌流時、TTX 存在下、CNQX・AP-5 存在下の 3 群間で有意差は認められなかった。次に nAChR のアゴニストである Nic を単独で灌流すると、IC が出現し、EPSC の頻度の増加と振幅の増加が観察された。TTX 存在下では Nic による IC の出現と mEPSC の頻度の増加と振幅の増加が観察された。CNQX・AP-5 存在下では Nic による IC の出現が観察された。Nic による IC の振幅は、ACh 単独灌流時、TTX 存在下、CNQX・AP-5 存在下の 3 群間で有意差は認められなかった。以上の結果から、nAChR はシナプス前性・シナプス後性に発現し興奮性の情報伝達を行っていること、またシナプス前性に発現した nAChR は神経終末に存在しておりグルタミン酸を介した応答を行っていることが示唆された。脊髓前角における nAChR のサブタイプを明らかにするため、サブタイプ別の受容体拮抗薬の存在下に Nic を投与し、観察を行った。 $\alpha 4\beta 2$ 型 nAChR 拮抗薬である Dh β E 存在下では Nic による IC の振幅は有意に減少したが、Nic による EPSC の頻度の増加と振幅の増加は Nic 単独灌流時と比べて有意差は認めなかった。 $\alpha 7$ 型 nAChR 拮抗薬である MLA 存在下では Nic による IC ならびに EPSC の頻度の増加と振幅の増加は Nic 単独灌流時と比べて有意

差は認めなかった。TTX 存在下でも、各受容体拮抗薬存在下の Nic による IC の振幅ならびに mEPSC の頻度の増加と振幅の増加を認めたが、TTX 非存在下と同様に DhβE 存在下の Nic による IC の振幅の減少のみに有意差を認めた。

今回の研究により脊髄前角細胞のシナプス後性に $\alpha 4 \beta 2$ 型を含むサブタイプが、シナプス前性には $\alpha 4 \beta 2$, $\alpha 7$ 型以外のサブタイプを含む nAChR が脊髄前角細胞に発現しており、nAChR の活性化により脊髄前角細胞の膜興奮性が高まることが明らかとなった。

これらの結果から脊髄前角における nAChR の選択的アゴニストの解析が脊髄損傷後の機能的回復など効果的な治療につながる可能性があると考えられ、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第953号		
学位授与の日	平成28年12月20日		
氏名	末永 智浩		
学位論文の題目	Detection of multiple superantigen genes in stools of patients with Kawasaki Disease (川崎病急性期患児の便中から複数スーパー抗原遺伝子が検出される意義)		
論文審査委員	主査	教授 西尾 真智子	
	副査	教授 藤井 隆夫	教授 鈴木 啓之

論文内容の要旨

緒言

川崎病(以下 KD)はその疫学的特性により感染症的な側面を有するとされており、以前から起因となる病原微生物の同定が試みられているが、急性期患児から一定の感染性因子を分離しえた報告はなく未だに確定に至っていない。

1990年代に入って KD の原因としてスーパー抗原(以下 SAg)が注目されるようになった。これはA群溶血性レンサ球菌(以下 GAS)や黄色ブドウ球菌などが産生する蛋白で、強力なT細胞刺激作用を有し高サイトカイン血症を惹起する。KD 患児でみられる高サイトカイン血症や、発疹や苺舌など KD 急性期にみられる GAS 感染症類似症状は、SAg が KD の原因であるとする説の根拠となっている。しかし過去の SAg に関する報告は抗体反応とT細胞レセプターレポトリからの推測であり、KD 患児から SAg そのものが検出された報告はない。また GAS などの SAg 産生菌が KD 患児で有意に高頻度に培養分離された報告も限られている。従って KD 発症における SAg の関与については現時点では未解決のままである。

本研究では KD 急性期患児の便から抽出した全 DNA を用いて SAg 遺伝子の有無を検索し、SAg の KD 発症への関与の可能性について抗原因子側から検討した。

対象と方法

[対象]2004年6月から2007年6月に川崎病診断基準を満たして当院に入院した KD 患児 60 名を対象とした。コントロールとして年齢をマッチングさせた川崎病以外の急性熱性疾患患児 36 名を発熱群、健康小児 26 名を健常群とした。なお発熱群であるがウイルス感染症が主体で一部細菌感染症も含まれる。

[方法]対象およびコントロールの児から便を採取し、必要に応じて-20℃で凍結保存した。KD 患児については入院後初回の便を採取した。採取した便から QIAGEN 社の DNA Stool Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。抽出した全 DNA を用いて、これまでに KD との関連が報告されている SPE-C・溶連菌発熱性外毒素 type A(以下 SPE-A)・溶連菌発熱外毒素 type G(以下 SPE-G)・溶連菌発熱外毒素 type J(以下 SPE-J)・ブドウ球菌毒素性ショック症候群毒素-1(以下 TSST-1) の5種類の SAg 遺伝子について 40 サイクルの Polymerase Chain Reaction で遺伝子増幅を行い、陽性例についてはシーケンサー

で塩基配列を確認した。PCR の陽性コントロールには SPE-A・SPE-G・SPE-J は理化学研究所より購入した菌株 *S.pyogenes* JCM no.5674、SPE-C および TSST-1 は ATCC より購入した菌株 *S.pyogenes* no.700294 および *S.aureus* no.51651 から DNA を抽出し用いた。統計処理には一元配置分散分析および Fisher の正確確率検定を用い、オッズ比および 95%信頼区間も算出した。有意水準は 0.05%とした。

結果

KD 群・発熱群・健常群の概要であるが、男女比はそれぞれ順に 34:26、18:18、13:13 で、平均月齢は 24.6、25.9、25.5 と有意差を認めなかった。KD 群での便採取病日は平均第 5.7 病日であった。DNA 濃度は 3 群間で有意差を認めなかったが、平均は KD 群で 37.8ng/μl、発熱群で 38.5ng/μl に対し、健常群は 59.7ng/μl と濃度が高い傾向がみられた。

KD 群と発熱群の比較、KD 群と健常群の比較においては、5 種の SAg のうち少なくとも 1 つの SAg が検出されたのは KD 群で 60 例中 42 例(70.0%)、発熱群で 36 例中 14 例(38.9%)、健常群は 26 例中 7 例(26.9%)で、KD 群は発熱群($P=0.005$)とも健常群($P<0.001$)とも有意差を認めた。個々の SAg については SPE-G において KD 群で 60 例中 26 例(43.3%)、発熱群で 36 例中 7 例(19.4%)、健常群は 26 例中 2 例(7.7%)で、KD 群は発熱群($P=0.026$)とも健常群($P=0.001$)とも有意差を認めた。SPE-A は KD 群(60 例中 7 例、11.7%)と発熱群(36 例中 0 例)との間にのみ有意差($P=0.043$)を認めた。また同時に 2 種以上の SAg が検出されたのは KD 群で 60 例中 18 例(30.0%)、発熱群で 36 例中 4 例(11.1%)、健常群は 26 例中 1 例(3.8%)で、やはり KD 群は発熱群($P=0.044$)とも健常群($P=0.009$)とも有意差を認めた。

発熱群・健常群を合わせた非 KD 群($n=62$)と KD 群との比較においては、SAg 陽性($P<0.001$)・SAg 複数陽性($P=0.002$)・SPE-A($P=0.031$)・SPE-G($P=0.001$)・SPE-J($P=0.029$)の 5 項目で有意差が得られた。

結語

KD 患児の便から高頻度に SAg 遺伝子が検出されたことにより、KD 急性期の患児に SAg を産生しうる菌が存在し、川崎病発症に関与した可能性が示唆された。抗原抗体反応、SAg および SAg 産生菌の検出、宿主側因子との関連などが今後の検討課題である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 12 月 1 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

川崎病(以下 KD)は 3 歳以下の小児に好発する原因不明の急性熱性疾患で、心血管系に問題となる後遺症を残すことがある。疫学的特性により感染症的な側面を有するとされているが、急性期患児から一定の感染性因子を分離しえた報告はなく未だに確定に至っていない。1990 年代に入って KD の原因として一部の細菌やウイルスなどが産生し、強

力にT細胞を刺激し高サイトカイン血症を惹起する蛋白であるスーパー抗原(以下 SAg)が注目されるようになった。しかし過去の SAg に関する報告は抗体反応とT細胞レセプターレパートリーからの推測であり、KD 患児から SAg そのものが検出された報告はなく、SAg 産生菌が KD 患児で有意に高頻度に培養分離された報告も限られている。本研究では KD 急性期患児の便から抽出した全 DNA を用いて SAg 遺伝子の有無を検索し、SAg の KD 発症への関与の可能性について抗原因子側から検討した。

川崎病診断基準を満たして当院に入院した KD 患児 60 名を対象とし、コントロールとして年齢をマッチングさせた KD 以外の急性熱性疾患患児 36 名を発熱群、健康小児 26 名を健常群とした。対象およびコントロールの児から便を採取し便中の全 DNA を抽出、抽出した全 DNA を用いて、これまでに KD との関連が報告されている 5 種類の SAg 遺伝子について PCR 法で検出を試みた。

5 種の SAg のうち少なくとも 1 つの SAg が検出されたのは KD 群で 60 例中 42 例(70.0%)、発熱群で 36 例中 14 例(38.9%)、健常群は 26 例中 7 例(26.9%)で、KD 群は発熱群とも健常群とも有意差を認めた。個々の SAg についても一部は KD 群に有意に多く検出された。また同時に 2 種以上の SAg が検出されたのは KD 群で 60 例中 18 例(30.0%)、発熱群で 36 例中 4 例(11.1%)、健常群は 26 例中 1 例(3.8%)で、KD 群は発熱群とも健常群とも有意差を認めた。

KD 患児の便から高頻度に SAg 遺伝子が検出されたことにより、KD 急性期の患児に SAg を産生しうる菌が存在し川崎病発症に関与した可能性が示唆された。抗原抗体反応、SAg および SAg 産生菌の検出などが今後の検討課題であるが、本論文は川崎病の原因を明らかにし、かつ将来的に治療あるいはワクチンなどの発症予防に応用しうる点で有意義であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第954号		
学位授与の日	平成29年2月7日		
氏名	篠原 裕志		
学位論文の題目	Inhibition of fibrous adhesion formation in the temporomandibular joint of tenascin-C knockout mice (テネイシンCノックアウトマウスにおける顎関節線維性癒着の抑制)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 雑賀 司珠也	教授 藤田 茂之

論文内容の要旨

【緒言】

顎関節症の症状には、不定期なクリックから、下顎頭と関節窩の吸収を伴う退行性変化までの幅広い症状がある。なかでも顎関節における関節円板の線維性癒着は、退行性変化の一つであり、関節円板の機械的制限により顎関節の機能障害をもたらす。顎関節症の進行をもたらす。現在、関節円板の線維性癒着の病因は完全に解明されていない。

Tenascin C (TNC) は、ジスルフィド結合を持つ6量体で、分子量 120-300 kDa のサブユニットで構成されており、TNC は胚の発育、慢性炎症における組織修復において発現する細胞外マトリックスである。また免疫組織化学染色にて、顎関節症の顎関節滑膜と関節円板に TNC は強く発現しており、顎関節症に TNC は関係していると考えられるが、TNC が顎関節の線維性癒着を促進する因子であるかは結論が出ていない。

今回の研究では、マウス顎関節癒着モデルを作成し、野生型 (WT) マウスと TNC ノックアウト (TNCKO) マウスの顎関節組織の比較を行った。さらに、細胞外マトリックスのフィブロネクチン (FN) と α -smooth muscle actin (α -SMA) を発現する筋線維芽細胞に着目し、WT マウスの顎関節組織と TNCKO マウスの顎関節組織を比較検討した。

【方法】

1. マウス顎関節線維性癒着モデルを作成し、WT マウスと TNCKO マウスの線維性癒着時期を HE 標本で検討した。WT マウスと TNCKO マウスにメカニカルストレスとして 1 日 40 回の過開口運動を 20 日間行い、1 日後、7 日後、12 日後、20 日後まで各群 3 匹を灌流固定し標本にした。顎関節組織の線維性癒着時期を HE 標本にて評価した。

2. 過開口運動後のマウス顎関節組織の TNC の発現を免疫組織化学染色にて検討した。また、WT マウスに過開口運動を行い、1 日後、7 日後、12 日後、20 日後のマウス関節円板を摘出し、タンパクを抽出した。このサンプルを用いて、ウエスタンブロッティングにて TNC の発現を検討した。

3. WT マウスの顎関節組織と TNCKO マウスの顎関節組織における FN タンパクの発現を比較した。過開口運動後のマウス顎関節組織において、FN の発現を免疫組織化学染色で比較した。また、過開口運動後のマウス関節円板からタンパク抽出し、FN の発現をウエスタンブロッティングにて比較した。

4. WT マウスの顎関節組織と TNCKO マウスの顎関節組織における α -SMA タンパクの発現を比較した。過開口運動後のマウス顎関節組織において、 α -SMA の発現を免疫組織化学染色で比較した。過開口運動後のマウス関節円板からタンパクを抽出し、 α -SMA の発現をウエスタンブロッティングにて比較した。

【結果】

HE 標本にて形態の評価を行ったところ、過開口運動後 7 日目に WT マウスにおいて顎関節の線維性癒着を認めたが、TNCKO マウスでは、線維性癒着を認めなかった。過開口運動後 20 日目では、TNCKO マウスにおいても、線維性癒着を認めるようになったが、WT マウスよりも癒着の範囲は狭く線維性癒着が遅れる傾向にあった。

免疫組織化学染色では、TNC はコントロールのマウス顎関節組織の関節円板、下顎頭、関節窩に発現していたが、過開口運動後というメカニカルストレスにより、TNC が強く発現した。同様に、ウエスタンブロッティングにおいても、過開口運動後 1 日目から TNC は強く発現した。

FN の免疫組織化学染色は、WT マウス、TNCKO マウスのコントロールの顎関節組織において発現が認められたが、過開口運動後 1 日目から、WT マウスの顎関節組織において TNCKO マウスよりも多く FN が発現していた。ウエスタンブロッティングにおいても免疫組織化学染色の結果と同様に TNCKO マウスと比べて、WT マウスにおいてより多くの FN が発現していた。

α -SMA の免疫組織化学染色では、WT マウス、TNCKO マウスのコントロールの顎関節組織において発現が認められた。過開口運動後 12 日目において、WT マウスに強く α -SMA の発現が認められた。ウエスタンブロッティングでも免疫組織化学染色の結果と同様に、TNCKO マウスの関節円板と比べて、WT マウスにおいて α -SMA がより多く発現し、過開口運動後 12 日目において差が大きく出ている。

【考察】

過開口運動を加えたあとの、WT マウスと TNCKO マウスにおける顎関節の線維性癒着時期を比較した。TNCKO マウスでは顎関節線維性癒着の時期が WT マウスよりも遅れる傾向があったことから、TNC が欠失していると、顎関節組織の線維性癒着は抑制されると考えられた。また、FN と α -SMA の発現は、TNCKO マウスの顎関節において WT マウスよりも少なかった。TNC が欠失していると、FN と筋線維芽細胞の発現が減少し、線維性癒着が抑制されることが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 1 月 18 日、論文審査担当者は、学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

顎関節円板の線維性癒着の病因は完全には解明されてはいない。Tenascin C (TNC) は胚の発育、慢性炎症における組織修復において発現する細胞外マトリックスであるが、TNC が顎関節の線維性癒着を促進する因子であるかどうかについては、報告されていない。本論文では、マウス顎関節線維性癒着モデルを作成し、野生型 (WT) マウスと TNC ノックアウト (TNCKO) マウスの顎関節組織の比較を行った。さらに、細胞外マトリックスのフィブロネクチン (FN) と、 α -smooth muscle actin (α -SMA) を発現する筋線維芽細胞に着目し、WT マウスの顎関節組織と TNCKO マウスの顎関節組織を比較検討した。

その結果、

1. HE 標本にて、過開口運動後 7 日目に WT マウスにおいて顎関節の線維性癒着を認めたが、TNCKO マウスでは、線維性癒着を認めなかった。過開口運動後 20 日目では、TNCKO マウスにおいても、線維性癒着を認めるようになったが、WT マウスよりも癒着の範囲は狭く線維性癒着が遅れる傾向にあった。免疫組織化学染色では、TNC はコントロールの WT マウス顎関節組織の関節円板、下顎頭、関節窩に発現していたが、過開口運動後に、TNC が強く発現した。同様に、ウエスタンブロッティングにおいても過開口運動後 1 日目から TNC は強く発現した。
2. 免疫組織化学染色では、WT マウス、TNCKO マウスのコントロールの顎関節組織において FN の発現を認めた。過開口運動後 1 日目から WT マウスの顎関節組織において TNCKO マウスよりも多く FN が発現していた。ウエスタンブロッティングにおいても免疫組織化学染色の結果と同

様に TNCKO マウスと比べて WT マウスにおいて、より多くの FN が発現していた。

3. α -SMA の免疫組織化学染色では、WT マウス、TNCKO マウスのコントロールの顎関節組織において発現が認められた。過開口運動後 12 日目において、WT マウスに強く α -SMA の発現が認められた。ウェスタンブロッティングでも免疫組織化学染色の結果と同様に、TNCKO マウスの関節円板と比べて、WT マウスにおいて α -SMA がより多く発現し、過開口運動後 12 日目において差が大きく出ていた。

以上の結果より、TNC が欠失していると顎関節組織の線維性癒着は抑制されると考えられた。また、FN と α -SMA の発現は、TNCKO マウスの顎関節において WT マウスよりも少なかった。TNC が欠失していると、FN と筋線維芽細胞の発現が減少し、線維性癒着が抑制されることが示唆された。本論文は、顎関節円板の線維性癒着のメカニズムについて重要な情報を提供するものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第955号		
学位授与の日	平成29年2月7日		
氏名	前田 義政		
学位論文の題目	Video capsule endoscopy as the initial examination for overt obscure gastrointestinal bleeding can efficiently identify patients who require double-balloon enteroscopy (顕性原因不明消化管出血に対し小腸カプセル内視鏡を先行して実施すればダブルバルーン小腸内視鏡を必要とする患者を効率よく特定できる)		
論文審査委員	主査	教授	村田 晋一
	副査	教授	北野 雅之 教授 山上 裕機

論文内容の要旨

【緒言】以前、「暗黒大陸」と称された小腸領域の診断・治療法は21世紀に入って、カプセル小腸内視鏡(VCE)とダブルバルーン小腸内視鏡(DBE)の登場により目覚ましく進歩した。両モダリティは各々に特性があるが、その使い分けはいまだ定かではない。VCEの特性として、容易に全小腸を非侵襲的に観察できるが一方で止血などの処置ができない。DBEの特性として、止血などの処置が可能であるが、侵襲的検査であり、かつ一度に全小腸を観察することができないことが挙げられる。

上部下部内視鏡を行っても出血源を特定できない原因不明の消化管出血(obscure gastrointestinal bleeding 以下 OGIB)における両モダリティが果たす役割は大きい。なかでも、緊急性のある顕性の消化管出血(Overt OGIB)症例においては、その診断治療のアプローチに苦慮することが多い。

Overt OGIB 症例においては、DBEが可能であれば、VCEよりもまず経口的にDBEを試みるべきとする意見もある。DBEは処置が出来る長所はあるが、一度に経肛門的、経口的両方の検査をするのは困難で、さらにどちらのルートから検査をするか決めるのは非常に難しい。また、overt OGIB 症例にも止血などの処置を必要としない、すなわち、DBEが不要な症例もある。VCEの所見をもとにDBEの必要性の有無の決定、さらに、適切なDBE挿入ルートの選択が可能かを検討し、DBE前にVCEを行うことの意義について検討した。

【方法】当院で事前に上部・下部内視鏡が行われたovert OGIB 症例のうち、まずVCEによる検査を実施した89例をretrospectiveに調査した。

【結果】89例中VCEで小腸病変が確認できたのは58例、小腸外出血と診断したのは22例、出血性病変なしと診断したのは9例だった。小腸病変が確認できた症例のうちDBEが必要と判断し施行した症例は37例(42%)であった。37例中DBEを実施し小腸に異常があった症例は29例、異常なしが8例であった。異常の有った29例はVCEの所見によりDBEの挿入ルートを決定したが、全症例ともfirst routeで病変が発見できていた(経口的アプローチ21例、経肛門的アプローチ8例)。

【考察】overt OGIB 症例には、小腸外出血の症例や、内視鏡治療を必要としない病変が多数含まれておりVCEをまず行うことで効率的にDBEが必要な症例を選択できる。さらに、DBEを行う際の適切なroute selectが可能となる。Overt OGIB 症例に遭遇した場合、まずVCEでの観察が必須であると考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成29年1月24日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

原因不明の消化管出血 Obscure gastrointestinal bleeding (OGIB)は上部・下部内視鏡を行っても原因不明の消化管出血であり、顕性の出血を伴うものを Overt OGIB、不顕性のものを Occult OGIB と分類することが米国消化器病学会より提唱された。2000年に小腸カプセル内視鏡(VCE)が、続いて2001年に小腸ダブルバルーン内視鏡(DBE)が相次いで臨床応用され、それまで観察することが不

可能であった小腸内腔が直接観察可能になった。VCEは全小腸を簡便に非侵襲的に観察できるが、止血などの内視鏡処置はできない。一方でDBEは止血処置が可能であるが、全小腸を観察するには経口的、経肛門的の両方向からのスコープ挿入が必要で、さらに合併症や苦痛を伴い侵襲的な検査といえる。緊急性のあるOvertOGIB症例では、リスクを冒しつつもDBEで処置を急ぐべきか、あるいは先ずVCEで原因精査、正確な病変部位特定と全身状態の安定化の後に止血処置につなげるのが良いかは議論が分かれる。OvertOGIB症例における両モダリティーの使い分けを明らかにした検討は皆無であったと言えよう。

本論文は、事前に上部・下部内視鏡が行われたOvertOGIB症例のうち、まずVCEによる検査を実施した89例をretrospectiveに調査したものである。事前の通常内視鏡にもかかわらず、VCEを先行することで小腸外出血と判明したものは22例、出血性病変なしと判明されたものが9例含まれていた。小腸病変が確認できた症例のうちDBEが必要と判断し施行した症例は37例(42%)であった。

37例中DBEを実施し小腸に異常があった症例は29例、異常なしが8例であった。異常の有った29例はVCEの所見によりDBEの挿入ルートを選択しているが、全症例ともfirst routeで病変が発見できている。これらの結果はOvertOGIB症例には、VCEを先行して行うことで、58%の症例で侵襲的なDBEを回避できる可能性があることを示す。またVCEによるroute selectを実施することで適切な挿入ルートを選択でき、追加の侵襲的なDBEを削減できる可能性を示唆するものである。

以上、本論文は急を要するOvertOGIB症例において、まずVCEを行うことの有用性を明らかにしたものである。かつて、処置が可能なDBEを先ずは経口的に実施するという曖昧な指針もあったが、本研究は原因不明の消化管出血に対する明確なストラテジーを提案するものであり学位論文として価値あると認めた。

学位記番号	博(医)乙第956号		
学位授与の日	平成29年3月7日		
氏名	土井 直孝		
学位論文の題目	Acute-phase effects of single-time topical or systemic corticosteroid application immediately after hot water-induced burn injury of various grades (熱湯による初期の各グレード熱傷に対するステロイドの局所および、全身投与の影響の検討)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡 史郎	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 古川 福実

論文内容の要旨

【諸言】

熱傷にステロイドを使用することの可否は以前から議論となっている。ステロイドは特に熱傷初期において過剰な炎症の抑制・疼痛軽減効果があるのではないかと考えられる。そして、実際に臨床現場では熱傷に対してステロイドが使用される場面がしばしば見られる。しかし、これまでに報告されているものは熱傷に対するステロイドの局所・全身投与は効果がないというものばかりである。熱傷はその深さにより一般的にⅠ～Ⅲ度(Ⅰ:表皮熱傷で発赤のみで水疱を形成しない、Ⅱ:水疱が形成されるもので主に瘢痕を残さないものを浅達性、瘢痕を残すものを深達性と細分される、Ⅲ:皮膚全層が壊死・炭化したもの)に分類される。マウスにⅢ度熱傷を与えた場合、受傷後 3～9 時間で IL1 β , IL-6, TNF α , IFN γ 等が上昇し、その後 TGF β , IL-10, VEGF などが数日後に増加するという報告がある。

今回我々は、これらⅠ～Ⅲ度熱傷モデルマウスを作成しステロイドの局所に与える影響の検証を行った。熱傷時の皮膚の組織学的評価、特に熱傷初期の2～3日に上昇すると考えられる炎症性サイトカイン(IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ)に着目し、熱傷後の組織中のこれらのサイトカインを測定した。

【方法】

熱傷モデルマウスの作成:ヘアレスマウス(HR-1, 雌7～8週齢)を使用した。1cm角の窓を作成した50ccスピッツの中にマウスを固定し、窓から熱湯を浸した綿棒を背部皮膚に押し付け、人為的に熱傷を発生させた。温度と時間によりⅠ度熱傷(70度1秒)、Ⅱ度熱傷(80度5秒)、Ⅲ度熱傷(80度10秒)を作成した。各熱傷深度毎に30匹のマウスを使用した。

実験モデルの作成:30匹のマウスをコントロール群(ワセリン外用)、ステロイド外用群(diflorasone diacetateを使用)、ステロイド内服群(prednisolone 1mg/kg/day およびワセリン外用)のそれぞれ10匹づつに分けた。受傷1日目、2日目、3日目にそれぞれ3～4匹のマウスから受傷部の皮膚採取を行った。

組織学的評価:マウス熱傷皮膚から2～3切片のHE染色標本を作成し、1切片中の最も炎症細胞(好中球、リンパ球など)の浸潤が強い部位を200倍の視野で取りだした。取りだした画像の炎症細胞数をWinRoof®を用いて数えた。

サイトカイン発現解析:マウスの受傷部の組織を採取し、IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ についてリアルタイムPCRで計測した。一つの検体に対して3回計測を行い、 β アクチンで標準化した。

統計的解析:得られたデータはスチューデントのt検定を用いて分析した。

【結果】

組織学的評価では、ステロイド投与(外用・内服共に)により特にⅡ度熱傷において炎症細胞の浸潤は有意に抑制された。Ⅲ度熱傷では、1日目のみステロイド外用群で炎症細胞が有意に減少していた。

サイトカイン発現量の変化をコントロール群との比で比較した。特徴的な傾向が見られたのはⅡ度熱傷において3日目でステロイド外用群・内服群共にIL-1 β が有意に高く、IL-6も高い傾向を示した。

それに対し、Ⅲ度熱傷では2日目でステロイド外用群・内服群共にTNF α が有意に高く、IFN γ も高い傾向にあった。しかし、3日目ではすべてのサイトカインが減少傾向であった。

【考察】

ステロイドは、炎症細胞の浸潤と、炎症性サイトカインの産生を抑制すると考えたが、結果は予想とは異なった。サイトカイン発現量に関して、Ⅱ度熱傷でのステロイド投与によるIL-1 β , IL-6の受傷3日目での上昇とⅢ度熱傷での2日目におけるTNF α , IFN γ の上昇がみられた、この違いは、Ⅲ度熱傷ではケラチノサイトが早期にすべて熱により変性・壊死してしまっていることと、稠密な炎症細胞浸潤が見られたことが関連していると思われる。

熱傷の治癒過程では、受傷によりまずIL-1が増加し、次いで炎症性サイトカインが増加する。その後、受傷後5日目をピークにIL-4が増加し、Th2優位に傾くといわれている。間葉系幹細胞を移植したことにより創傷治癒が促進されたマウスにおいて、IFN γ , TNF α , IL-6はコントロールよりも低かったとの報告から炎症性サイトカインを抑える事が創傷治癒につながる可能性が想定される。今回の検討では、ステロイドの投与により、Ⅱ度熱傷では3日目においてもIL-1 β , IL-6は高値であり、TNF α , IFN γ は上昇していないものの治癒期への移行を阻害する可能性がある。一方でⅢ度熱傷では3日目には炎症性サイトカインは低下しており炎症は良く抑えていると思われるが、むしろ細菌感染などに対する抵抗が落ちてしまう可能性があるのではないかと考えられる。ステロイド投与により炎症細胞の浸潤を抑える効果はあるが、サイトカインの変動をみるとⅡ度熱傷では創傷治癒の遅延、Ⅲ度熱傷では感染リスクの上昇が特に憂慮される。

熱傷に対するステロイドの反応は、熱傷のグレードや投与経路で異なると考えられ、効果的なステロイドの使用法を検討するために、IL-4やIL-10などの抗炎症サイトカインの動きや、浸潤している炎症細胞のさらに細かな分類などが必要であると考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年2月17日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

熱傷の初期診療に臨床現場において、抗炎症作用を期待しステロイド外用薬を使用する事が多い。一方、熱傷に対するステロイド外用薬の使用のエビデンスレベルは低く、Ⅰ度熱傷、浅達性Ⅱ度熱傷に対しては推奨度C1とされ、深達性Ⅱ度熱傷やⅢ度熱傷については記載されていない。熱傷の初期にステロイドを使用する事で、組織障害に引き続いて発生する炎症の連鎖を最小限に抑える事が出来ると考え、動物実験を用いて熱傷初期におけるステロイドの使用により炎症反応を抑制（炎症性サイトカイン、炎症細胞の浸潤の抑制）されるのかを検討した。

熱傷モデルマウスの作製には熱湯を用い、それぞれⅠ度熱傷、Ⅱ度熱傷、Ⅲ度熱傷の各熱傷マウスを30匹作成した。それらをワセリン使用群（control）ステロイド(diflorasone diacetate)外用群（DD群）、ステロイド(prednisolone 1mg/kg)内服群（PDN群）の各群10匹にわけた。マウスの熱傷部の組織をday1～3に採取し、HE染色での病理組織評価と、サイトカインレベル（IL-1 β 、IL-6、TNF α 、IFN γ ）を検討した。

組織学的評価では、Ⅱ度熱傷においてDD、PDNでday1とday2での炎症細胞の浸潤は有意に抑制された。Ⅲ度熱傷では、day1のみPDNで炎症細胞が有意に減少していた。炎症細胞数とサイトカインをコントロール比で比較したところ、Ⅰ度熱傷ではDDとPDNでは炎症細胞数は共にday3で急激に増加しているのに対しサイトカインはIL-6を除きDDでは低値、PDNで高値となっていた。Ⅱ度熱傷においても、炎症細胞数はDD、PDN共に低下しているが、PDNでは特にIFN γ が高値であった。Ⅲ度熱傷では、PDNで炎症細胞数はコントロールと違いはほとんどないが、サイトカインは全体的に低値傾向を示していた。

熱傷マウスにステロイドを使用する事で、全体的に患部の炎症を抑え、ほとんどの炎症性サイトカインを抑制すると考えられていたが炎症細胞の浸潤は熱傷のグレードで結果が異なり、さら

に炎症性サイトカインの変化は投与経路によっても異なるという結果であった。その要因として、熱傷部位に存在する細胞の比率や、各サイトカインの産生バランス、ステロイドの各細胞への深達程度などが複雑に関連していると考えられる。

以上、ステロイド投与では単純に炎症系を抑制するだけではなく、熱傷のグレードや投与経路によって反応が違う事が示唆された。今後の熱傷治療において新たな知見を示唆する研究であり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医) 乙第957号		
学位授与の日	平成29年3月7日		
氏名	貴志 知生		
学位論文の題目	Expression of chemokine receptors in angiosarcoma (血管肉腫におけるケモカインレセプターの発現)		
論文審査委員	主査	教授 近藤稔和	
	副査	教授 朝村真一	教授 古川福実

論文内容の要旨

【緒言】

血管肉腫は高齢者の前頭部から前額部に好発する、当初は淡紅色から暗紅色の紅斑としてみられ、浮腫を伴い、次いでびらん、湿潤、痂皮を生じ、更に進行すると潰瘍化し結節を生ずる比較的まれな皮膚悪性腫瘍である。本疾患は極めて悪性度が高く、高率に局所再発し、また肺転移による血気胸を生ずることが多く予後不良の疾患である。一方、ケモカインは特定の白血球、リンパ球の遊走作用をもつ物質であるが、様々な悪性腫瘍においてケモカイン、ケモカインレセプターの発現が腫瘍の増生、浸潤、転移において重要な役割を担っていることが報告されている。CXCR4 はケモカイン SDF-1 (CXCL12)特異的レセプターであり、白血球や未分化造血細胞などの細胞膜上に発現している。SDF-1 の刺激により走化性が誘導され、さらに増殖、生存が促進される。我々は悪性黒色腫において、CXCR4、CCR6、CCR7、SDF-1 の発現を検討し、特に CXCR4 が悪性度において有用なマーカーの指標になることを報告した。また、悪性線維性組織球腫や隆起性皮膚線維肉腫に関しても、これらのケモカインの発現が、腫瘍進展のマーカーとなり得ることを報告した。血管肉腫におけるケモカインやケモカインレセプターの解析は未だ行われていないのが現状である。血管肉腫はひとたび発症すれば急速な転帰をとり予後不良な疾患であるが、現在においても有用なマーカーは見いだされておらず、知見を集積することが急務となっている。今回、我々は血管肉腫において、ケモカインレセプター、特に CXCR4、CCR6、CCR7、SDF-1(CXCL12)の免疫組織化学的検討を行った。

【方法】

1) 組織標本

和歌山県立医科大学附属病院皮膚科にて生検または手術によって得られた血管肉腫 12 検体と毛細血管拡張性肉芽腫 4 検体、対照として正常皮膚 16 検体を対象とした。

2) 免疫組織学的染色

各検体はまずホルマリンで固定しパラフィンに包埋処理した。その後脱パラフィンし厚さ 4 μ m の切片を作成し、control、抗 CXCR4 抗体、抗 CCR6 抗体、抗 CCR7 抗体、抗 SDF-1 抗体を用い、CSA (catalyzed signal amplification) 法により免疫組織化学的染色を実施し発現を評価した。

3) 評価方法

それぞれの切片につき患者の臨床所見を知り得ない 3 名の皮膚科専門医が無作為に 5 視野を選択し、400 倍で観察した。組織型については poorly differentiated angiosarcoma と判断される組織を本研究では cellular rich type と定義し、well~moderately differentiated angiosarcoma と判断されるものを vascular rich type と定義した。各抗体の染色態度を年齢、性別、発生部位、組織型との統計学的相関を検討した。

4) 検定方法

Fisher の正確確率検定を用いた。

【結果】

1) 正常皮膚の染色結果
CXCR4、CCR6、CCR7、SDF-1 いずれも発現陰性であった。

2) 毛細血管拡張性肉芽腫の染色結果
CXCR4、CCR6、CCR7、SDF-1 いずれも発現陰性であった。

3) 血管肉腫の染色結果

CXCR4 の発現

血管肉腫では 12 検体中 6 例で、細胞質または核に濃染し、発現陽性を示した。これら 6 例のうち、4 例は cellular rich type であり、2 例は vascular rich type であった。年齢、性別、発生部位、組織型との関連において有意な差はみられなかった。

CCR6 の発現

全例で陰性であった。年齢、性別、発生部位、組織型との関連において有意な差はみられなかった。

CCR7 の発現

全例で陰性であった。年齢、性別、発生部位、組織型との関連において有意な差はみられなかった。

SDF-1 の発現

12 検体中 4 例で陽性であった。CXCR4 陽性 6 例の内、SDF-1 陽性であったのは 4 例であった。CXCR4 と SDF-1 の両者の発現の有無には両者の間に有意な相関傾向がみられた。年齢、性別、発生部位、組織型との関連において有意な差はみられなかった。

【結語】

1) 血管肉腫の半数の例において CXCR4 が発現することを確認した。

2) 悪性黒色腫、日光角化症、Bowen 病、有棘細胞癌、悪性線維性組織球腫などの皮膚悪性腫瘍で CXCR4 と SDF-1 の発現は臨床像と有意な相関を示したが、血管肉腫においては臨床像との相関はみられなかった。CXCR4、CCR6、CCR7、SDF-1 のいずれもが、有用な腫瘍マーカーとはなり得ないことが示唆された。

3) 今後、血管肉腫において、新たなケモカインや腫瘍マーカーの検討が望まれる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。（近藤稔和、古川福実：平成29年2月21日、朝村真一：平成29年2月15日）

ケモカインは特定の白血球、リンパ球の遊走作用をもつ物質であり、様々な悪性腫瘍においてケモカイン、ケモカインレセプターの発現が増生、浸潤、転移に重要な役割を担っている。皮膚悪性腫瘍の中で、悪性黒色腫、有棘細胞癌、悪性線維性組織球腫や隆起性皮膚線維肉腫において、CXCR4、CCR6、CCR7などのケモカインレセプターの発現が転移、腫瘍進展(predicting tumor aggressiveness)や予後に関与しているという報告がある。血管肉腫は高齢者の前頭部から前額部に好発する、比較的まれな悪性度がきわめて高い予後不良の皮膚悪性腫瘍である。現在においても診療上、有用なマーカーは見いだされておらず、知見を集積することが急務となっている。

今回、我々は血管肉腫において、ケモカインレセプター、特にCXCR4、CCR6、CCR7、SDF-

1(CXCL12)の免疫組織化学的検討を行った。血管肉腫12検体(平均年齢75.7歳)と毛細血管拡張性肉芽腫4検体(平均年齢37.5歳)、対照として正常皮膚16検体を対象とした。各検体はまずホルマリンで固定しパラフィンに包埋処理した。その後脱パラフィンし厚さ4 μ mの切片を作成し、コントロール、抗CXCR4抗体、抗CCR6抗体、抗CCR7抗体、抗SDF-1抗体を用い、CSA(catalyzed signal amplification)法により免疫組織化学的染色を実施し発現を評価した。それぞれの切片につき患者の臨床所見を知り得ない3名の皮膚科専門医が無作為に5視野を選択し、400倍で観察した。組織型についてはpoorly differentiated angiosarcomaと判断される組織を本研究ではcellular rich typeと定義し、well~moderately differentiated angiosarcomaと判断されるものをvascular rich typeと定義した。各抗体の染色態度を年齢、性別、発生部位、組織型との統計学的相関を検討した。検定方法はFisherの正確確率検定を用いた。

その結果、血管肉腫は12検体中6例で、CXCR4の発現が陽性であった。これら6例のうち、4例はcellular rich typeであり、2例はvascular rich typeであった。また、CCR6、CCR7の発現はいずれも陰性であった。SDF-1は12検体中4検体で発現が陽性であった。CXCR4、CCR6、CCR7、SDF-1のいずれも年齢、性別、発生部位、組織型との関連においてこれらの因子との間には有意な差はみられなかった。一方、正常皮膚、毛細血管拡張性肉芽腫では、CXCR4、CCR6、CCR7、SDF-1のいずれも陰性であった。

これらの結果から、血管肉腫では他の皮膚悪性腫瘍と同様にCXCR4の発現はみられたが、臨床像との相関はみられなかった。このことは一部の症例ではCXCR4が治療上の標的分子になりうるが、他の腫瘍と比較して腫瘍マーカーとしての有用性は高くなく、今後、新たなケモカインや腫瘍マーカーの必要性が示唆された。本論文は、悪性度の高い血管肉腫において、初めてのケモカインレセプターの組織学的研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第958号		
学位授与の日	平成29年3月21日		
氏名	福井大輔		
学位論文の題目	Gait abnormality due to spinal instability after lumbar facetectomy in the rat. (ラット腰椎椎間関節切除後脊椎不安定性モデルにおける歩行異常)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 中尾 直之	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

【緒言】慢性腰痛は日常にありふれた疾患であり、現在までの多くの研究がなされているが、治療成績は改善していない。腰痛の原因は多岐にわたるが、そのなかでも椎間板は腰痛を惹起する主たる原因と報告され、今日まで多くの椎間板変性動物モデルが作成され報告されてきた。腰椎椎間板変性から生じる慢性腰痛を評価するためには、直接的に椎間板や神経組織を傷つけることなく椎間板変性が生じさせ、なおかつその痛みを定量化できることが必要である。しかしながら、上記の条件を満たすモデルは過去に報告されていない。本研究の目的は、椎間板に直接障害を加えない脊椎不安定性モデルを作成し、更にそのモデルに生じている腰痛を定量的に評価することである。

【方法】SDラット(250g)を用い、ペントバルビタールナトリウム 0.5ml/kg 腹腔内投与麻酔下にL4-5椎間関節を切除したExperiment群(n=14)、椎間関節の展開のみのSham群(n=8)を作成した。無処置ラットをControl群(n=8)としCatWalk XT(Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands)を用い、自然歩行下で行動解析を経時的に行った。行動解析にて差が認められた処置後7週に腰椎前後屈側面像を撮影しremote computer workstation (Virtual Place Lexus 64, Aze Co. Ltd, Tokyo, Japan)を用い、各群の椎間板高、椎間可動性を以下のごとく評価した。椎間板高は隣接椎間に対する比として、前・中・後方で計測、椎間可動性は屈曲、伸展での椎間前方の高さ/後方の高さ(それぞれ屈曲比・伸展比)を算出した。X線撮影後、腰椎を採取しホルマリンにて固定した。L4-5椎体間部を含めた矢状面の組織標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色、サフラニンO染色を施行し組織学的評価を施行した。組織学的標本から得られた椎間板変性の程度を点数化したChujoのscoreによって椎間板変性の程度をscoringした。得られたデータはKruskal-Wallis検定にて統計学的評価を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】歩行解析では、処置後3週の切除群で正常歩行割合の減少を認めたが、その後回復し、3群間に差はなかった。しかし、処置後7週のExperiment群で他の2群と比較し遊脚期における各肢の速度(swing speed)、歩幅(stride length)、後肢光学輝度(Optical intensity)、平均歩行速度(average speed)、の有意な減少と、歩数(number of steps)、前肢・後肢間距離(base of support, front, hind)の有意な上昇を認めた。X線学的にはExperiment群で80%に骨棘形成を認めた。また、椎間板高比はExperiment群において、伸展位の中央・後方では3群間で差は生じなかったが、それ以外では増加し全体的に椎間板高が増大していた。椎間可動性はExperiment群で伸展比の増大と屈曲比の減少を認め、前後屈での罹患椎間の可動性が大きいことをしめた。組織学的評価におではSham群はControl群と比較し有意な差は認めなかったが、Experiment群においては線維輪は断裂し、線維輪と髄核の境界が不明瞭となり、髄核部分においては髄核の細胞数減少や細胞外気質の凝集等を認め椎間板変性の所見を呈していた。椎間板変性の程度を組織学的に点数化したChujo's scoreにおいてもExperiment群は他の群と比べ有意に高い点数を示した。

【考察】CatWalkは過去に脊髄損傷モデルや坐骨神経損傷モデル、膝関節痛モデルにも使用されその有用性が報告されている。また、Miyagiらは腰痛モデルに対してCatWalkを使用したモデルを報告している。本モデルのExperiment群に処置後遅発性に生じた歩行異常のうちSwing speedやStride lengthの低下は、MiyagiらがCatWalkを用い報告したmyofascial inflammation modelやintervertebral disc injuryによる腰痛modelでも認めるものであった。脊椎不安定性モデルの処置

後7週目に生じた歩行異常をイメージするとゆっくりとしたスピード・短い歩幅・荷重負荷を逃避する・開脚歩行のような歩行である。

Maureen は腰痛患者の歩行は一般的にはゆっくりと短い歩幅になり足部の外側と後側の力が低下していると報告しており、本モデルの Experiment 群に生じた歩行異常は動物モデルやまた human material における腰痛の歩行様式に類似していた。本モデルに生じた歩行異常のメカニズムは、ラット腰椎 L4-5 椎間関節切除により L4-5 異常可動性が生じたことや、また椎間関節切除の際に棘突起や関節包等後方の支持組織も切除したことに、ラットは四足歩行動物であるため腰椎に荷重がかからないことも加わり椎間板の静水圧に対する抵抗力が減弱し L4-5 椎間板高が増大したことで L4-5 椎体終板の障害や L4-5 椎間板変性が生じ、このことが処置後遅発性に生じた疼痛関連行動と考えられる歩行異常を生じたと推察する。

【結語】ラット腰椎椎間関節切除後に手術侵襲によらない歩行パターンの異常を認めた。また、X 線学的検討での椎間高比や伸展比の増大は、椎間板障害が生じていることを示唆した。X 線学的検討および組織学的検討での椎間板異常は、歩行解析によるパラメーター変化と関連があると考えられる。本モデルは、椎間板変性から生じる慢性腰痛のモデルとして有用な可能性がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 2 月 21 日、27 日 論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

慢性腰痛は日常にありふれた疾患である。腰痛の原因は多岐にわたるが、そのなかでも椎間板は腰痛を惹起する主たる原因と報告され、今日まで多くの椎間板変性動物モデルが作成され報告されてきた。腰椎椎間板変性から生じる慢性腰痛を評価するためには、直接的に椎間板や神経組織を傷つけることなく椎間板変性を生じさせ、なおかつその痛みを定量化できることが必要である。しかしながら、上記の条件を満たすモデルは過去に報告されていない。本研究の目的は、椎間板に直接障害を加えない脊椎不安定性モデルを作成し、更にそのモデルに生じている腰痛を定量的に評価することである。

SD ラットを用い L4-5 椎間関節を切除した Experiment 群 (n=14)、椎間関節の展開のみの Sham 群 (n=8) を作成した。無処置ラットを Control 群 (n=8) とし CatWalk XT を用い、自然歩行下で行動解析を経時的に行った。行動解析にて差が認められた処置後 7 週に腰椎前後屈側面像を撮影し、各群の椎間板高、椎間可動性を以下のごとく評価した。椎間板高は隣接椎間に対する比として、前・中・後方で計測、椎間可動性は屈曲、伸展での椎間前方の高さ/後方の高さ（それぞれ屈曲比・伸展比）を算出した。X 線撮影後、腰椎を採取し組織学的評価を施行した。得られたデータは Kruskal-Wallis 検定にて統計学的評価を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

歩行解析では、処置後 7 週目の Experiment 群で他の 2 群と比較し各肢の速度、歩幅、後肢光学輝度、平均歩行速度の有意な減少と、歩数、前肢・後肢間距離の有意な上昇を認めた。X 線学的評価では椎間板高比は Experiment 群において増大していた。椎間可動性は Experiment 群で伸展比の増大と屈曲比の減少を認め、前後屈での罹患椎間の可動性が大きいことをしめした。組織学的評価では、Experiment 群において線維輪は断裂し、線維輪と髄核の境界が不明瞭となり、髄核部分においては髄核の細胞数減少や細胞外基質の凝集を認め椎間板変性の所見を呈していた。

X 線学的および組織学的検討にて、本モデルには脊椎不安定性から椎間板障害が生じていることが示唆された。ラット腰椎椎間関節切除後に認めた歩行パターンの異常は Miyagi らが CatWalk を用い報告した myofascial inflammation model や intervertebral disc injury による腰痛 model と類似していた。本歩行異常は処置後 7 週目になり生じていることから、手術侵襲や椎間関節不安定性から生じた歩行異常ではなく、処置後経時的に生じた椎間板変性が惹起させた疼痛の関与を示唆する。本モデルは椎間板変性から生じる慢性腰痛のモデルとして有用な可能性がある。

本論文は慢性腰痛の動物モデルを作成したものである。今後、本モデルを用いて慢性腰痛のメカニズム解明や薬剤効果の調査など臨床につながる研究も可能で意義深いものであり、学位論文として価値のあるものであると認めた。