

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

令和3年4月～令和4年3月

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目 次

令和3年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 626号	村上 大地	Exposure to Cigarette Smoke Enhances Pneumococcal Transmission Among Littermates in an Infant Mouse Model (タバコ煙曝露が肺炎球菌兄弟間伝播に及ぼす影響の検討)	... 1
博(医)甲第 627号	Mellissa Chua Alcantara	Stage-dependent function of Wnt5a during male external genitalia development	... 3
博(医)甲第 628号	大古 拓史	The effects of endurance exercise combined with high-temperature head-out water immersion on serum concentration of brain-derived neurotrophic factor in healthy young men (若年健常者男性における頸下浸水温熱を併用した持久力運動が血清BDNF濃度に与える影響)	... 6
博(医)甲第 629号	川路 祐輝	Computed tomography findings for predicting the future occurrence of pancreatic cancer: value of pancreatic volumetry (膵癌の発生を予測するCT所見に関する膵volumetryを用いた後ろ向き研究)	... 9
博(医)甲第 630号	濱 瑞貴	Balloon-Assisted Embolization of Wide-Neck Aneurysms Using a Mixture of n-Butyl Cyanoacrylate, Lipiodol, and Ethanol in Swine: A Comparison of Four n-Butyl Cyanoacrylate Concentrations (豚のwide neck動脈瘤に対するN-butyl cyanoacrylate-lipiodol-ethanol混合物を用いた瘤内塞栓術の比較検討)	... 11
博(医)甲第 631号	白井 聖一	TET1 upregulation drives cancer cell growth through aberrant enhancer hydroxymethylation of HMGA2 in hepatocellular carcinoma. (肝細胞癌においてTET1はHMGA2のエンハンサーの異常なヒドロキシメチル化により悪性形質を促進させる)	... 14
博(医)甲第 632号	屋代 充	Active vitamin D and vitamin D analogs stimulate Fibroblast Growth Factor 23 production in osteocyte-like cells via the vitamin D receptor (骨細胞様細胞における活性型ビタミンDおよびビタミンDアナログによる線維芽細胞増殖因子23の産生はビタミンD受容体を介している)	... 16
博(医)甲第 633号	安田 香澄	Hippocampal Subfield Volumes and Cognitive Function in Schizophrenia and Mood Disorders (統合失調症および気分障害における海馬subfieldの体積と認知機能の関係)	... 19

目 次

令和3年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 634号	奥平 尚子	Prognostic factors of daily blood examination for advanced melanoma patients treated with nivolumab. (ニボルマブを投与した進行期悪性黒色腫の患者における日常一般採血中の効果予測因子)	... 21
博(医)甲第 635号	村田 鎮優	Microendoscopic decompression for lumbosacral foraminal stenosis: A novel surgical strategy based on anatomic considerations using three-dimensional image fusion with magnetic resonance imaging/computed tomography. (3次元 CT/MRI fusion画像を用いた解剖学的病態分析に基づく腰椎椎間孔部狭窄症に対する新たな治療戦略の提唱)	... 23
博(医)甲第 636号	太地 良	Anti-allodynic and promotive effect on inhibitory synaptic transmission of riluzole in rat spinal dorsal horn (リルゾールの神経障害性疼痛抑制効果と脊髄後角におけるシナプス伝達抑制作用)	... 26
博(医)甲第 637号	梶本 みずき	Androgen/Wnt/ β -catenin signal axis augments cell proliferation of the mouse erectile tissue, corpus cavernosum (アンドロゲン依存性のマウス海綿体性差形成機構の解明)	... 28
博(医)甲第 638号	酒谷 英樹	A novel pneumococcal surface protein K of nonencapsulated Streptococcus pneumoniae promotes transmission among littermates in an infant mouse model with influenza A virus co-infection. (IAV共感染仔マウスモデルにおける無莢膜型肺炎球菌の特異抗原PspKが鼻腔保菌・伝播に及ぼす影響の検討.)	... 32
博(医)甲第 639号	丸岡 慎平	Tumor RNA transfected DCs derived from iPS cells elicit cytotoxicity against cancer cells induced from colorectal cancer patients in vitro. (腫瘍RNAを導入したiPS細胞由来樹状細胞による、腫瘍特異的な細胞障害活性の検討)	... 35
博(医)甲第 640号	神前 拓平	Lumbosacral fusion including sacroiliac joint fixation increases the stress and angular motion at the hip joint : a finite element study	... 39
博(医)甲第 641号	村上 公英	Prevalence of cervical anterior and posterior spondylolisthesis and its association with degenerative cervical myelopathy in a general population (一般住民調査における頸椎辺りの有所見率及び退行性頸髄症との関連)	... 41

目 次

令和3年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第 1006 号	米良 好正	Association between types of Modic changes in the lumbar region and low back pain in a large cohort.: The Wakayama Spine Study (腰椎におけるModic変化と腰痛の関係：-The Wakayama Spine Study-)	44
博(医)乙第 1007 号	佐々木 貴浩	Radiomics and MGMT promoter methylation for prognostication of newly diagnosed glioblastoma (RadiomicsとMGMTプロモーター領域のメチル化を用いた膠芽腫の予後の階層化)	47
博(医)乙第 1008 号	谷口 隆哉	Prevalence and Associated Factors of Pistol Grip Deformity in a Japanese local residents (日本の一般住民におけるピストルグリップ変形の有所見率および関連因子の検討)	49
博(医)乙第 1009 号	中井 康雄	Regional abnormality of functional connectivity is associated with clinical manifestations in individuals with intractable focal epilepsy. (安静時機能的磁気共鳴画像法を用いた難治性てんかんにおける脳内ネットワークに関する研究)	52
博(医)乙第 1010 号	武田 早織	Pneumococcal capsular phase shift is associated with invasion into cell-to-cell junctions and is inhibited by macrolides (莢膜フェーズ変化による肺炎球菌の細胞間隙侵入とマクロライド系抗菌薬による阻害作用の研究)	55
博(医)乙第 1011 号	中村 有貴	Preoperative detection of KRAS mutated circulating tumor DNA is an independent risk factor for recurrence in colorectal cancer (大腸癌術前におけるKRAS変異血中循環腫瘍DNA測定の再発予測因子としての有用性)	58
博(医)乙第 1012 号	三谷 泰之	Optimum therapeutic strategy for meconium-related ileus in very-low-birth-weight infants (極・超低出生体重児における胎便関連性腸閉塞に対する至適治療方針)	60
博(医)乙第 1013 号	金子 富美恵	Neutrophil infiltration in co-housed littermates plays a key role in nasal transmission of Streptococcus pneumoniae in an infant mouse model (乳仔マウスの鼻腔を介した肺炎球菌伝播における好中球の役割)	63

目 次

令和3年度（4月～3月）

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第 1014 号	渡邊 高士	Asymptomatic patent processus vaginalis is a risk for developing external inguinal hernia in adults:A prospective cohort study (無症状腹膜鞘状突起の開存は、成人の外鼠径ヘルニア発症のリスク因子である：前向き観察研究)	... 66
博(医)乙第 1015 号	松村 修一	Oncolytic virotherapy with SOCS3 enhances viral replicative potency and oncolysis for gastric cancer (胃癌においてSOCS3を発現させる腫瘍溶解型ウイルスは複製能と腫瘍溶解能を増強する)	... 68
博(医)乙第 1016 号	佐藤 大樹	Comparison of Uterine Necrosis After Uterine Artery Embolization with Soluble Gelatin Sponge Particles or Tris-acryl Gelatin Microspheres in Swine (溶解型ゼラチンスポンジとマイクロスフィアを用いた豚の子宮動脈塞栓術後の子宮壊死の比較)	... 70
博(医)乙第 1017 号	藤本 大智	Pembrolizumab plus chemotherapy-induced pneumonitis in chemo-naïve patients with non-squamous non-small cell lung cancer: A multicentre, retrospective cohort study (プラチナ製剤/ペメトレキセド/ペムブロリズマブ併用療法における薬剤性肺障害の多施設観察研究)	... 73
博(保)第 7 号	川村 小千代	介護老人福祉施設の介護職者におけるワーク・エンゲイジメントと職業性ストレスに対する職場グループでのポジティブな出来事の筆記と読み上げの効果：クロスオーバー試験 (Effects of writing and reading aloud positive events in the workplace group on work engagement and occupational stress of care workers in welfare facilities for the elderly requiring long-term care: A crossover trial)	... 75
博(保)第 8 号	川井 美緒	The Prevalence of Orthostatic Dysregulation among Newly Graduated Female Nurses after Employment and its Associations with Autonomic Nervous Function, Stress, and Depressive Symptoms (新卒看護師における就職後の起立性調節障害の変化と自律神経機能、ストレス、抑うつ症状の関連)	... 78

学位記番号	博(医)甲第626号		
学位授与の日	令和3年7月27日		
氏名	村上 大地		
学位論文の題目	Exposure to Cigarette Smoke Enhances Pneumococcal Transmission Among Littermates in an Infant Mouse Model (タバコ煙曝露が肺炎球菌兄弟間伝播に及ぼす影響の検討)		
論文審査委員	主査	教授	山本 信之
	副査	教授	雑賀 司珠也 教授 保富 宗城

論文内容の要旨

【緒言】

肺炎球菌は濃厚接触環境で伝播し鼻腔保菌状態となり、組織移行により上気道感染症、侵襲性肺炎球菌感染症を引き起こす。このため、感染の第一段階となる伝播の機序解明、予防戦略の確立が急務である。ウイルス重感染、肺炎球菌の病原因子が、鼻腔局所炎症を引き起こすことで肺炎球菌伝播を促進することが報告されている一方、環境因子がどのように伝播に影響するかに関しては報告を認めない。受動喫煙は社会的関心が高い環境因子であるとともに、小児における肺炎球菌感染症の危険因子であり、タバコ煙曝露が気道組織での局所炎症、組織障害、粘液過分泌を引き起こすことが解明されているものの、肺炎球菌伝播に対する影響に関しては報告されていない。

タバコ煙曝露が小児の肺炎球菌伝播に及ぼす影響とその機序の解明を目的とし、同胞仔マウスを用いたタバコ煙曝露による兄弟間伝播モデルを作成し検討した。

【方法】

前処置：新生仔マウスに対し、タバコ煙抽出液 (Cigarette smoke extract; CSE) を CSE 群に、PBS を PBS 群に点鼻した。点鼻終了翌日に肺炎球菌 (血清型 6A) を経鼻接種した。

1. 肺炎球菌接種翌日以降の鼻腔保菌量、鼻汁中排菌量、鼻腔好中球数を測定した。
2. 同一ケージ内の無作為に選択した半数の仔マウスにのみ肺炎球菌を接種 (index) し、非接種マウス (contact) とともに集団哺育した後、contact の鼻腔保菌の有無により伝播率を比較した。index のみ、あるいは contact のみに CSE 処置を行った場合の伝播率も検討した。
3. 肺炎球菌接種量を低用量とし、接種後早期の鼻腔保菌量を測定した。
4. 鼻腔における炎症、粘膜性状の変化を鼻腔病理組織で評価した。
5. 鼻汁粘液 (lectin) 量をイムノブロットで評価した。

【結果】

1. CSE 群で鼻腔保菌量、鼻汁中排菌量、鼻腔好中球数が有意に増加した。
2. CSE 群で伝播率が有意に上昇した。一方で、index のみ、あるいは contact のみに CSE 処置を行った場合は有意な伝播率上昇は認めなかった。
3. CSE 群で低用量接種後早期においても鼻腔保菌量は有意に増加しており、肺炎球菌の鼻腔への定着のしやすさが高まっていた。
4. CSE 群で出血や粘膜配列破綻などの組織障害や、炎症細胞遊走を認めた。また、粘液過分泌に伴い、粘液に取り込まれた肺炎球菌の鼻腔への排菌像や上皮への保菌像を認めた。
5. CSE 群で、鼻汁粘液量が有意に増加した。

【考察】

タバコ煙曝露により、感染宿主からの排菌、新たな宿主での定着のしやすさの両方が高まることで伝播が有意に促進された。特に排菌者となる感染宿主、接触者となる非感染宿主のいずれもが影響を受ける、受動喫煙環境が伝播に強く影響する可能性が示唆された。

タバコ煙曝露が鼻腔局所炎症を介し、鼻腔での組織障害や粘液過分泌を引き起こすことが重要な

機序であると考えられた。すなわち、組織障害の観点からは、粘膜バリアを障害し鼻腔上皮の防御機構を破綻させること、また、粘液過分泌の観点からは、粘液を介した鼻腔上皮への付着促進と粘液に付着した肺炎球菌の体外排出促進が重要であることが示された。受動喫煙を回避することで乳幼児期の肺炎球菌伝播を予防できる可能性が示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年6月18日、6月21日及び6月25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。

肺炎球菌は感染宿主から鼻汁を介して排菌され、新たな宿主鼻腔に付着、定着し、保菌を成立させる。保菌状態の肺炎球菌はさらなる宿主へと排菌され、保菌を成立させることで伝播していく。保菌状態の肺炎球菌は鼻腔から組織移行することで肺炎、髄膜炎、敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症を発症させるため、保菌、伝播は肺炎球菌感染症発症の第一段階と考えられ、感染症対策として保菌、伝播の機序解明、対策が急務の課題となっている。肺炎球菌の病原因子や宿主の基礎疾患と保菌、伝播との関与が報告され、鼻腔局所炎症の誘導が重要機序であることが解明されている。一方、環境因子の関与に関しては研究モデル確立の困難さなどから多くの報告を認めない。受動喫煙は小児期の侵襲性肺炎球菌感染症の危険因子であり、また、気道組織での局所炎症を引き起こすことが報告されているが、肺炎球菌伝播に及ぼす影響は未解明である。本研究ではタバコ煙暴露が乳幼児期の肺炎球菌伝播に及ぼす影響を、動物実験モデルを作成し検討した。

本研究では、生後4日齢の授乳仔マウスに4日間連続でタバコ煙抽出液（Cigarette smoke extract ; CSE）もしくはPBSを点鼻処置し、生後8日齢に肺炎球菌血清型6Aを経鼻接種し、その後の鼻腔保菌量、鼻汁中排菌量、鼻腔好中球数、伝播率を評価した。また、鼻腔の病理学的変化をHematoxylin and eosin染色、肺炎球菌莢膜に対する免疫組織化学染色と粘液に対するアルシアンブルー染色の二重染色法を用いて評価した。さらにイムノブロットを用いた鼻汁粘液量の比較を行った。

その結果、タバコ煙暴露により肺炎球菌の鼻腔保菌量、鼻汁中排菌量、鼻腔好中球数が有意に増加し、伝播率は有意に上昇した。また、接種する肺炎球菌量が低用量であっても接種早期から有意に鼻腔保菌量が増加し、タバコ煙暴露により鼻腔での定着のしやすさが高まっていた。病理学的検討ではタバコ煙暴露により出血や粘膜配列破綻などの組織障害、炎症細胞遊走などの鼻腔局所炎症所見を認めた。さらに、過分泌された粘液中に肺炎球菌が取り込まれ、鼻腔に浮遊している排菌像や鼻腔上皮に付着している保菌像が認められた。タバコ煙暴露により鼻汁粘液量は有意に増加した。

本論文において、タバコ煙暴露が感染症の増悪因子であるだけでなく、宿主間伝播の促進因子であることを初めて証明した。乳幼児期の受動喫煙を回避することで肺炎球菌伝播、保菌を抑制し肺炎球菌感染症予防に貢献でき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627号		
学位授与の日	令和3年9月28日		
氏名	Melissa Chua Alcantara		
学位論文の題目	Stage-dependent function of Wnt5a during male external genitalia development		
論文審査委員	主査	教授 平井 秀一	
	副査	教授 山田 源	教授 井上 徳光

論文内容の要旨

Two distinct developmental processes occur during male external genitalia (ExG) development: outgrowth of the genital tubercle (GT), the anlage of the ExG, and urethral tube formation. Any disruptions in this process may lead to genital defects such as micropenis and hypospadias. *Wnt5a*, one of the major Wnt ligands, is a crucial developmental regulator of outgrowing organs such as the limb, the mandible, and the ExG. Defects in *Wnt5a* signaling has been linked to Robinow's syndrome, a genetic disorder in which male patients manifest a micropenis and defective urethral tube formation. Whereas *Wnt5a* is required for cell proliferation during GT outgrowth, its role for urethral tube formation has yet to be understood. Here, it is shown that *Wnt5a* contributed to urethral tube formation as well as GT outgrowth. Mesenchymal-specific conditional *Wnt5a* knockout mice (*Wnt5a* cKO) resulted in hypospadias-like urethral defects. Early deletion of *Wnt5a* at E10.5 showed severe defects in both GT outgrowth and urethral tube formation, along with reduced cell proliferation. The severe urethral tube defect persisted during later timing deletion of *Wnt5a* (E13.5). Further analyses revealed that loss of *Wnt5a* disrupted cell polarity and led to a reduction of phosphorylated myosin light chain and the focal adhesion protein, vinculin. Altogether, these results suggest that *Wnt5a* coordinated cell proliferation and directed cell migration in a stage-dependent manner during male ExG development. Furthermore, *Wnt5a* may regulate cell polarity, focal adhesion formation, and cell contractility, leading to directed cell migration during male-type urethral formation in a manner that has not been reported in other organ fusion events.

MATERIALS AND METHODS

1. Animals

ICR mice and a Tamoxifen-induced, mesenchymal-specific *Wnt5a* knockout mouse line, *Sall1^{creER/+}Wnt5a^{lox/flox}* (*Wnt5a* conditional KO), were utilized for this study.

2. Histological and immunohistochemical analyses

All embryos were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS then subjected to serial methanol dehydration prior to GT dissection and paraffin embedding. For histological analysis, slides were deparaffinized, rehydrated, then stained with Mayer's hematoxylin and eosin. For protein detection, after deparaffinization and rehydration, the slides were subjected to antigen retrieval then incubated with the primary antibody at 4°C overnight. Immunostaining was visualized via immunofluorescence using Alexa Fluor 546-conjugated or 488-conjugated IgG. Slides were also incubated with TrueVIEW to reduce background signal from auto-fluorescing blood cells.

For the cell proliferation assay, proliferating cells were labeled using the ClickiT EdU staining kit. Counterstaining was done using Hoechst33342. For immunohistochemical staining, the signal was amplified using the Vectastain ABC Kit and TSA Indirect Kit and was visualized through 3,3'-diaminobenzidine staining. *In situ* hybridization was performed per standard protocol.

3. Cell Polarity Analysis

Cell polarity was analyzed using ImageJ software. The front end of MAFB-positive cells were assessed using GM130 localization. The polarity of each cell was labeled and categorized into four quadrants, based on their orientation with respect to the urethral epithelium. At least 70 cells were counted per replicate. The data was assessed using two-tailed Student's T-test, assuming equal variances. The p-

value was set at 0.05.

RESULTS

1. Deletion of *Wnt5a* during early GT outgrowth stage (E10.5) led to ExG hypoplasia and a severe urethral closure defect, with a reduction in cell proliferation. When deletion occurred at E13.5, the urethral closure defect persisted without the severe outgrowth defect and corresponding reduction of cell proliferation.
2. The bilateral mesenchyme (bi-Ms), marked by MAFB, is located adjacent to the urethral epithelium (UE) and is essential during androgen-induced urethral tube formation. *Wnt5a* and its receptor, ROR2, were expressed in the bi-Ms at E16.5, and urethral closure defect resulting from mesenchymal deletion of *Wnt5a* at E13.5 can already be observed at E16.5. These results suggest that Wnt5a-Ror2 signaling contributes to urethral tube formation.
3. Around 60% of the cells in the bi-Ms of control mice were directed ventrally and towards the midline. This polarity was lost in the *Wnt5a* cKO, with the number of Q4 cells significantly reduced. In fact, an increased number of mutant cells were directed ventrally and away from the midline.
4. The expressions of phosphorylated Myosin Light Chain (pMLC), a cell contractility marker, and vinculin (VIN), a component of focal adhesions, were downregulated in the *Wnt5a* cKO versus the control.

DISCUSSION

This study revealed that *Wnt5a*-regulated cell proliferation is indispensable for GT outgrowth, but not for subsequent urethral tube formation. The results suggest that a different cellular process through *Wnt5a* signaling is required for male-type urethral tube formation. It was observed that cell polarity was disturbed in the bi-Ms of the *Wnt5a* cKO mice, and that cell contractility and FA formation were also reduced in the mutants. Thus, it is possible that *Wnt5a* facilitates cell migration in the bi-Ms by regulating FA formation that is required for force generation. Furthermore, at E16.5, both *Wnt5a* and ROR2 were expressed in the bi-Ms, suggesting that *Wnt5a* exerts its function through *Ror2*. Further analyses are required to understand the exact molecular mechanisms correlated with Wnt5a signaling during urethral tube formation.

Wnt5a regulates various processes during organ fusion events, acting as regulators for cell proliferation and convergent extension during gut closure^{1,2}, for chemoattraction during palate fusion³, and for convergent extension in neural tube formation⁴. To our knowledge, the current study is the first report suggesting *Wnt5a*-induced directional cell migration through the regulation of cell contractility and FA formation during organ fusion.

CONCLUSION

The current study revealed that mesenchymal *Wnt5a* is essential during two distinct stages of male ExG development. *Wnt5a* cKO showed stage-dependent phenotypes of the external genitalia. Deletion of *Wnt5a* during early GT outgrowth (E10.5) induced severe outgrowth and urethral closure defects. Meanwhile, deletion of *Wnt5a* at a later timing (E13.5) did not result in any obvious outgrowth defect, but the severe urethral closure defect persisted. Furthermore, the role of *Wnt5a* shifted temporally from the regulation of cell proliferation into the regulation of directed cell migration. These results provide new insight on the contribution of *Wnt5a* loss into micropenis and/or hypospadias observed in Robinow syndrome patients.

References:

1. Cervantes S, Yamaguchi TP, Hebrok M. Wnt5a is essential for intestinal elongation in mice. *Dev Biol.* Feb 2009;326(2):285-94. doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.020
2. Yamada M, Udagawa J, Matsumoto A, et al. Ror2 is required for midgut elongation during mouse development. *Dev Dyn.* Mar 2010;239(3):941-53. doi:10.1002/dvdy.22212
3. He F, Xiong W, Yu X, et al. Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development.* Dec 2008;135(23):3871-9. doi:10.1242/dev.025767
4. Wang M, Marco P, Capra V, Kibar Z. Update on the Role of the Non-Canonical Wnt/Planar Cell Polarity Pathway in Neural Tube Defects. *Cells.* 10 2019;8(10)doi:10.3390/cells8101198

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年6月22日、論文審査委員会は、学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

外生殖器は、雌雄共通の伸長過程とアンドロゲン（男性ホルモン）に依存した性分化過程を有するユニークな器官である。外生殖器形成過程の破綻は、マイクロペニスや尿道上裂など様々な先天性形成異常を引き起こす。近年、アンドロゲンシグナルの異常を発端とする尿道下裂の発症頻度が急増しているがその発症機序はほとんどわかっていない。

Wntリガンドの1つであるWnt5aは、マイクロペニスや尿道下裂を症状とする遺伝性疾患、ルビノー症候群の原因遺伝子として知られている。Wnt5aコンベンショナルノックアウトマウスは、ヒトのマイクロペニスに類似した形成異常を示し、外生殖器伸長過程の細胞増殖に必須であることが明らかになっているが、尿道形成における役割はわかっていない。本研究は、尿道形成過程におけるWnt5aの機能を明らかにするため、尿道形成に不可欠な尿道両側間葉領域にCre（組み換え酵素）を発現するSa111-Creドライバーマウスを用いて、Wnt5aコンディショナルノックアウトマウス（*Wnt5a* cKO）を作成し解析した。伸長過程初期の胎生10.5日（E10.5）からWnt5aを欠損させると、外生殖器原基の伸長および尿道形成の両方に重篤な形成異常が見られ、間葉細胞の増殖も著しく低下していた。伸長過程後期の胎生13.5日（E13.5）からWnt5aを欠損させると、伸長異常は見られなくなった一方、尿道形成不全は引き続き起こっていた。さらに同*Wnt5a* cKOマウスを詳細に解析したところ、尿道両側間葉細胞の極性が乱れ、細胞移動に不可欠なアクトミオシン収縮活性の低下、さらにフォーカルアドヒージョン（接着斑）タンパク質であるピンキュリンの発現が低下しており、Wnt5aは細胞移動に必要な細胞極性、細胞-基質間の接着および力の発生に寄与している可能性を見出した。

本研究は、Wnt5aが外生殖器形成過程において伸長制御に不可欠な細胞増殖制御因子としてだけでなく、尿道形成過程に不可欠な細胞移動制御因子であることを明らかにした。またその機能は細胞増殖制御から細胞移動制御に発生が進むにつれシフトする可能性をコンディショナルノックアウトマウスの解析から見出した。本研究成果からこれまで遅れていた尿道下裂発症機序の理解が進むことが期待され、博士論文に値すると考える。

学位記番号	博(医)甲第628号		
学位授与の日	令和3年10月19日		
氏名	大古 拓史		
学位論文の題目	The effects of endurance exercise combined with high-temperature head-out water immersion on serum concentration of brain-derived neurotrophic factor in healthy young men (若年健常者男性における頸下浸水温熱を併用した持久力運動が血清 BDNF 濃度に与える影響)		
論文審査委員	主査	教授	村田 顕也
	副査	教授	藤吉 朗
		教授	田島 文博

論文内容の要旨

【緒言】

脳由来神経栄養因子 (BDNF ; Brain-derived neurotrophic factor) は、神経発生や神経保護、神経再生、ニューロン間のシナプス結合の発達と維持、糖代謝やエネルギー代謝などに作用する keyprotein である。薬理的、持久力運動を通じた BDNF の増加は、脳梗塞や脊髄損傷の損傷部位の組織修復や運動機能の改善に関与することが報告されている。BDNF は、骨格筋をはじめ、大脳皮質や海馬、血管内皮細胞や免疫細胞など、様々な器官で産生されることが報告されている。BDNF を増加させる要因として、運動と温熱が挙げられ、両者は独立した経路で産生され、BDNF の増加に相加作用を示す。

運動による BDNF 産生では、長期間の抵抗運動および持久力運動が安静時の血清 BDNF を増加させることが報告されており、コンセンサスが得られている。また、1 回の単回運動による効果として、30 分以上、最大酸素摂取量 (VO₂ max) の 60% 以上の自転車エルゴメータ運動が、血清 BDNF を増加させることが報告されている。しかし、運動実施環境や被験者特性、運動の種類や負荷量設定によっては、30 分以上、60%VO₂ max の運動負荷設定であっても血清 BDNF が増加しないとの報告もある。温熱による BDNF 発現では、42°C 20 分間の頸下浸水のみで血清 BDNF が増加し、深部温度の上昇は、血清 BDNF を増加させる因子であると報告されている。

血清 BDNF を増加させる手段として、運動もしくは温熱刺激のどちらかのみでは、実施時間や負荷量が高いため、臨床応用の障壁となっている。

【目的】

本研究では、頸下浸水を用いた温熱と水中自転車エルゴメータを使用した持久力運動を 15 分間行い、血清 BDNF の増加に必要な運動時間や負荷量を減少させることを目的とした。本研究の臨床的意義は、15 分間の短時間で BDNF を増加させる運動療法プログラムを確立することで、身体機能が低下した脳血管障害や脊髄損傷後の患者や高齢者にも実施することが可能となり、運動機能の改善や神経疾患の予防・改善に寄与することが期待される。

【方法】

対象は、若年健常男性 10 名 (年齢 23.7±0.8 歳) とした。実験は、40°C の頸下浸水群 (40°C HOI ; head-out water immersion) と 40°C の頸下浸水に自転車エルゴメータ運動を組み合わせた群 (40°C HOI-ex) をクロスオーバー試験で実施した。後日、対照群として、運動時の深部温度が上昇しない 23°C の頸下浸水での自転車エルゴメータ運動 (23°C HOI-ex) を実施した。各実験は、1 週間以上の期間を空けて実施した。

参加者は、実験開始 1 週間以上前に、最大酸素摂取量を自転車エルゴメータで測定した。実験前日は、激しい運動やアルコール、カフェインの摂取を禁止し、22 時以降は、飲水のみとした。実験当日は、同じ軽食を摂取し、実験を開始した。自転車エルゴメータ運動は、最大酸素

摂取量の 60% で実施し、呼気ガス分析装置にて運動強度を確認しながら負荷量設定を行った。

プロトコルは、安静 30 分、介入 15 分、回復 30 分とし、採血は安静 30 分後、介入直後、回復 15 分後、回復 30 分後の 4 ポイントで実施した。実験中は、心拍数、血圧、食道温（深部温度）を連続的に測定した。血液サンプルの解析項目は、血清 BDNF、P-セレクチン、乳酸、血漿コルチゾール、血小板数、ヘモグロビン、ヘマトクリットとした。

データの正規性は、Shapiro-Wilk 検定で確認された。40°C HOI-ex、40°C HOI、23°C HOI-ex は、二元配置分散分析を用いて検定し、有意差があった場合は、事後検定として Bonferroni を実施した。統計ソフトは、SPSS version 25.0 を使用し、有意水準は、5%未満とした。

【結果】

①血清 BDNF

40°C HOI-ex では、介入直後、回復 15 分後に有意に増加し、回復 30 分後に安静時レベルに戻った。40°C HOI、23°C HOI-ex では、有意な変化はなかった。群間比較では、介入直後において、40°C HOI-ex が 40°C HOI、23°C HOI-ex に比べ有意に増加した。

②深部体温

40°C HOI-ex、40°C HOI では、介入直後、回復 15 分後、回復 30 分後に有意に上昇した。23°C HOI-ex では、有意な変化はなかった。群間比較では、介入直後と回復 15 分後において、40°C HOI-ex が 40°C HOI、23°C HOI-ex に比べ有意に増加した。

③血小板数、P セレクチン

血小板数は、3 群とも有意な変化はなかった。P セレクチンは、40°C HOI-ex では、介入直後、回復 15 分後に有意に増加した。群間比較では、介入直後において、40°C HOI-ex が 40°C HOI、23°C HOI-ex に比べ有意に増加した。

【考察】

温熱と運動を併用した 40°C HOI-ex は、温熱のみの 40°C HOI よりも深部温度が上昇した。深部温度の上昇は、血清 BDNF を増加させる因子であることから、本研究における血清 BDNF の増加に寄与したと考えられる。また、深部温度の急激な上昇がなくとも、自転車エルゴメータ運動を実施することで血清 BDNF が増加することが報告されている。本研究においても、40°C HOI では、血清 BDNF が増加しなかったが、60%VO₂ max の自転車エルゴメータ運動を付加することで、運動の効果によって血清 BDNF が増加した可能性が考えられる。本研究では、運動と温熱の 2 つの独立した BDNF 産生経路が働き、相加作用によって血清 BDNF が増加したと考えられる。

運動を実施することで血小板が刺激され、血小板に貯蔵されていた BDNF が血中にリリースされることが報告されており、運動時の血清 BDNF 増加は、主に血小板由来であると考えられている。本研究では、血小板数は実験中に有意な変化はなかったが、血小板活性化の指標である P セレクチンが、40°C HOI-ex の実施直後、回復 15 分後において、40°C HOI、23°C HOI-ex に比較し、有意に増加した。これらから、本研究における血清 BDNF の増加は、主に血小板由来であることが示唆される。

本研究プロトコルでは、深部温度の上昇と運動の相加作用で血清 BDNF が増加したが、どちらの要素が大きいかは、明らかには出来ない。今後は、頸下浸水の温度や運動負荷量や時間と血清 BDNF 動態について検討していく必要がある。

【結論】

40°C の頸下浸水中の 60%VO₂ max での自転車エルゴメータ運動は、15 分間の実施で血清 BDNF を増加させる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年10月8日に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。

運動によるBDNF産生では、長期間の運動が安静時の血清BDNFを増加させることが報告されており、コンセンサスが得られている。また、1回の単回運動による効果として、30分以上、最大酸素摂取量（VO₂ max）の60%以上の自転車エルゴメータ運動が、血清BDNFを増加させることが報告されている。しかし、運動実施環境や被験者特性、運動の種類や負荷量設定によっては、30分以上、60%VO₂ maxの運動負荷設定であっても血清BDNFが増加しないとの報告もある。

BDNFを増加させる要因として、運動と温熱が挙げられ、両者は独立した経路で産生され、BDNFの増加に相加作用を示す。運動もしくは温熱刺激のどちらかのみでは、実施時間や負荷量が高いため、臨床応用の障壁となっている。本論文では、頸下浸水を用いた温熱と水中自転車エルゴメータを使用した持久力運動を15分間行い、血清BDNFの増加に必要な運動時間や負荷量を減少させることを目的とした。

対象は、若年健常男性10名（年齢23.7±0.8歳）とした。実験は、40℃の頸下浸水群（40℃HOI；head-out water immersion）と40℃の頸下浸水に自転車エルゴメータ運動を組み合わせた群（40℃HOI-ex）をクロスオーバー試験で実施した。後日、対照群として、運動時の深部温度が上昇しない23℃の頸下浸水での自転車エルゴメータ運動（23℃HOI-ex）を実施した。プロトコルは、安静30分、介入15分、回復30分とし、採血は安静30分後、介入直後、回復15分後、回復30分後の4ポイントで実施した。実験中は、心拍数、血圧、食道温（深部温度）を連続的に測定した。血液サンプルの解析項目は、血清BDNF、P-セレクチン、乳酸、血漿コルチゾール、血小板数、ヘモグロビン、ヘマトクリットとした。

血清BDNFは、40℃HOI-exの介入直後、回復15分後で有意に増加し、他の群と群間差があった。深部体温は、40℃HOI-ex、40℃HOIの介入直後、回復15分後、回復30分後で有意に上昇し、介入直後と回復15分後において、他の群と群間差があった。血小板数は、3群とも有意な変化はなかった。P-セレクチンは、40℃HOI-exの介入直後、回復15分後に有意に増加し、他の群と群間差があった。

本論文は、温熱刺激と運動を併用することによって、15分間の短時間でBDNFを増加させることを明らかにし、新たな運動療法プログラム確立に繋がる内容である。今後の臨床応用を考えると、脳血管障害や脊髄損傷後の患者や身体機能が低下した高齢者にも実施することが可能となり、運動機能の改善や神経疾患の予防・改善に寄与することが期待される。

学位論文審査を通じて、本論文は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629号		
学位授与の日	令和3年11月24日		
氏名	川路 祐輝		
学位論文の題目	Computed tomography findings for predicting the future occurrence of pancreatic cancer: value of pancreatic volumetry (膵癌の発生を予測する CT 所見に関する膵 volumetry を用いた後ろ向き研究)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 園村 哲郎	教授 北野 雅之

論文内容の要旨

【緒言】

膵癌は極めて予後不良な疾患である。しかしながら Stage 0 の 5 年生存率は 85.8%, Stage Ia の 5 年生存率は 68.7%, Stage Ib の 5 年生存率は 59.7% と良好であり, 早期に発見し治療すれば予後を改善することができる。また、どのような膵実質の CT 所見が膵癌発症の高リスクであるか未だ明らかではない。膵癌と膵 volume の関連を報告した論文は少数あるが、これらは膵癌発症後の膵 volume を評価したものであり、膵癌そのものによる膵実質への影響が除外できていない。本研究では、膵癌患者において、膵癌発症 6 ヶ月以上前に撮影した腹部造影 CT を用いて膵 volumetry を行い、膵癌発症の高リスクとなる CT 所見を同定することを目的とした。

【方法】

和歌山県立医科大学附属病院と和歌山南放射線クリニックの診療録を検索し、2009 年 4 月～2017 年 3 月に診断された膵癌症例のうち、膵癌と診断される以前に腹部造影 CT を受けていた膵癌患者（膵癌グループ）を検索した。膵癌グループの選択基準は下記の通り。(1) 病理学的に膵癌と診断された患者。または病理診断がなくとも、膵癌に矛盾しない膵腫瘍を有し、かつ明らかな遠隔転移を伴い臨床的に膵癌と診断された患者、(2) 膵癌と診断される以前に腹部造影 CT 検査を受けその DICOM 画像が保存されており、その CT 検査で膵癌が描出されていない患者、(3) 膵癌診断前の CT 検査が、膵癌と診断される 6～120 カ月前に撮影されている患者。また、膵疾患以外の精査目的に腹部造影 CT 検査を受けた患者を検索し、非膵癌グループを設定した。非膵癌症例は、膵癌グループの過去画像が撮影された期間と同一の期間に造影 CT 検査を行った症例とした。非膵癌症例の選択基準は下記の通り。(1) 膵疾患の精査以外の目的で腹部造影 CT 検査を受け、画像が DICOM 形式で保存されている患者、(2) 膵癌を有しない患者。選択基準を満たす非膵癌症例の中から、膵癌症例の 10 倍の数の非膵癌患者を無作為に抽出し非膵癌グループとした。選択バイアスを減ずるため、1 対 1 の傾向スコアマッチングを用いた。傾向スコアは、年齢、性別、BMI、体表面積 (BSA)、CT スキャナの種類を因子とするロジスティック回帰法で算出し、マッチングには最近傍マッチングを用い、キャリバー係数は 0.18 とした。膵 volumetry に関して、CT 画像の解析には AZE VirtualPlace の三次元解析ソフトウェアを用いた。膵 volumetry を用いて、以下のパラメータを測定した：膵全体の体積、MPD+嚢胞性病変の体積、膵実質の体積、膵の最大断面積、膵の最小断面積、膵の断面積比、MPD の長さ、MPD 径。非膵癌グループについて膵実質の体積と BSA または BMI との相関を Pearson 相関係数を用いて検討した。また膵実質の体積およびその他の測定パラメータを BSA で除した値を用いて、患者間の体格差を是正したうえで比較した。膵癌グループと非膵癌グループについて、各パラメータを比較検討した。各パラメータのカットオフ値は ROC 曲線に基づき Youden 指数を用いて算出した。膵癌発症の予測に関するリスク因子を評価するため、単変量解析を行った。

【結果】

2009 年 4 月から 2017 年 3 月の間に、合計 3769 名が和歌山南放射線クリニックで腹部造影 CT を受けていた。その中で、膵癌と診断される 6～120 カ月前に他の目的で腹部造影 CT 検査を受

けていた膵癌患者は 15 名おり、これを膵癌グループとした。膵癌グループの患者の過去画像と同じ期間には 3225 名の患者が、膵疾患以外の精査のために腹部造影 CT 検査を行っていた。このうち非膵癌患者 150 名を無作為に抽出した。CT スキャナの種類は、膵癌グループと非膵癌グループで有意差が認められた (Brilliance i-CT SP 128 60.0% vs 85.3%, $P=0.025$)。年齢、性別、BMI、BSA、CT スキャナの種類を用いて傾向スコアを算出し、膵癌患者 15 名と非膵癌患者 15 名をマッチングした。マッチング後、両グループ間で背景因子に有意差は認めなかった。種々のパラメータを膵癌グループと非膵癌グループで比較したところ、MPD+嚢胞性病変の体積 (膵癌グループ vs 非膵癌グループ: 1.08 vs 0.32, $P=0.007$)、MPD+嚢胞性病変の体積/BSA (0.76 vs 0.24, $P=0.009$)、MPD 径 (2.4 vs 1.4, $P=0.011$)、MPD 径/BSA (1.5 vs 0.9, $P=0.013$) において有意差を認めた。各パラメータについてカットオフ値を決定し、膵発癌のリスク因子に関して単変量解析を行ったところ、MPD+嚢胞性病変の体積/BSA $\geq 0.53\text{mL/m}^2$ (OR 38.50, 95%CI 3.75-395.41, $P=0.002$)、膵実質の体積/BSA $< 27.0\text{ mL/m}^2$ (OR 12.25, 95%CI 1.27-118.36, $P=0.030$)、MPD 径/BSA $\geq 1.0\text{ mm/m}^2$ (OR 13.00, 95%CI 2.07-81.48, $P=0.006$) が有意なリスク因子であった。

【考察】

主膵管+嚢胞性病変の体積あるいは主膵管径が高値、または膵実質の体積が低値であることが膵癌発症の有意なリスク因子であり、造影 CT を用いた膵 volumetry により、将来膵癌を発症する高リスク群を絞り込めることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 3 年 11 月 8 日、9 日に論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

膵癌は極めて予後不良な疾患であるが、早期に発見し治療すれば予後を改善することができる。どのような膵実質の CT 所見が膵癌発症の高リスクであるか未だ明らかではない。本研究では膵癌患者において、膵癌発症 6 ヶ月以上前に撮影した腹部造影 CT を用いて膵 volumetry を行い、膵癌発症の高リスクとなる CT 所見を同定することを目的とした。

2009 年 4 月～2017 年 3 月に腹部造影 CT を受け DICOM 形式にて画像が保存されていた 3769 例の中で、膵癌と診断される 6～120 ヶ月前に別の目的で腹部造影 CT を受けていた患者 15 例を対象とした。この 15 例の膵癌患者 (膵癌グループ) と propensity score を用いて背景因子を matching した非膵癌患者 15 例 (非膵癌グループ) を後方視的に解析した。2 つのグループにおいて腹部造影 CT における膵 volumetry を行い、膵実質の体積などの計測値を比較した。膵癌グループについては膵癌と診断される 6～120 ヶ月前に撮像し膵腫瘍が描出されていない腹部造影 CT における膵 volumetry を行った。各患者の体格差による計測値の差を調整するため、各計測値を体表面積で除した数値も用いて比較した。

膵癌グループ ($n=15$) と非膵癌グループ ($n=15$) では年齢、性別、BMI、体表面積、CT 機器の種類において有意差は認めなかった。膵癌グループでは非膵癌グループと比較して、主膵管と嚢胞性病変の体積 (1.08 vs 0.32, $P=0.007$)、(主膵管と嚢胞性病変の体積)/体表面積 (0.76 vs 0.24, $P=0.009$)、主膵管径 (2.4 vs 1.4, $P=0.011$)、主膵管径/体表面積 (1.5 vs 0.9, $P=0.013$) が有意に高値であった。単変量解析では、(主膵管と嚢胞性病変の体積)/体表面積 $\geq 0.53\text{ mL/m}^2$ (OR: 38.50, $P=0.002$)、膵実質の体積/体表面積 $< 27.0\text{ mL/m}^2$ (OR: 12.25, $P=0.03$)、主膵管径/体表面積 $\geq 1.0\text{ mm/m}^2$ (OR: 13.00, $P=0.006$) が膵癌発症の有意なリスク因子であった。

主膵管と嚢胞性病変の体積あるいは主膵管径が高値、膵実質の体積が低値であることが膵癌発症の有意なリスク因子であり、造影 CT を用いた膵 volumetry により、将来膵癌を発症する高リスク群を絞り込めることが示唆された。

本論文により膵癌を発症するリスクの高い膵実質の CT 所見が示され、膵癌の早期診断に貢献できる可能性を示したことから、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630号		
学位授与の日	令和3年11月16日		
氏名	濱 瑞貴		
学位論文の題目	Balloon-Assisted Embolization of Wide-Neck Aneurysms Using a Mixture of n-Butyl Cyanoacrylate, Lipiodol, and Ethanol in Swine: A Comparison of Four n-Butyl Cyanoacrylate Concentrations (豚の wide neck 動脈瘤に対する N-butyl cyanoacrylate-lipiodol-ethanol 混合物を用いた瘤内塞栓術の比較検討)		
論文審査委員	主査	教授	西村 好晴
	副査	教授	中尾 直之 教授 園村 哲郎

論文内容の要旨

【緒言】

N-butyl cyanoacrylate (NBCA)-Lipiodol (Lp)は血液に接するとすばやく重合し固形化する強力な液性の塞栓物質である。このため、NBCA は臨床的に外傷性出血、産科出血、消化管出血などの緊急塞栓術によく用いられている。特に高度凝固障害を伴う動脈性出血に対する塞栓術において、NBCA は大きな力を発揮する。しかし、NBCA にはカテーテルと血管内膜の接着やカテーテル内腔の閉塞などの問題がある。これらの問題を解決するために、NBCA-Lp に無水 Ethanol を加えることで、カテーテルに接着しにくい新しい塞栓物質 NBCA-Lipiodol-Ethanol (NLE)を開発した。我々はすでに NLE による血管障害は NBCA よりも軽微であることやバルーン閉塞下で NLE を用いた動脈瘤内充填術が可能であることをブタを用いた動物実験で確認しているが、最適な混合比率は明らかではない。

本論文では、豚の総頸動脈や外腸骨動脈に wide neck 動脈瘤を作成し、バルーン閉塞下に混合比率の異なる NLE を用いた瘤内充填術を行い、NLE の migration、NLE とバルーンの接着性および動脈瘤の病理組織学的変化について比較検討することで最適な NLE の混合比率を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 正常豚 (デュロック種、雌) 8 頭 (体重 50.3 ± 3.38 kg、週齢 16.6 ± 0.992 週)を用いて動物実験を行う。全身麻酔下にヘパリン化を行い、両側の総頸動脈と外腸骨動脈に外頸静脈を用いた wide neck 動脈瘤 (ドーム/ネック比 < 2 、neck 長: 4 mm 以上) を作成する。

2. NLE の混合比

NLE221 NBCA : LP : Ethanol = 2:2:1 (40% NBCA)

NLE361 NBCA : LP : Ethanol = 3:6:1 (30% NBCA)

NLE271 NBCA : LP : Ethanol = 2:7:1 (20% NBCA)

NLE151 NBCA : LP : Ethanol = 1:5:1 (14.3% NBCA)

3. 両側大腿動脈よりマイクロカテーテルとバルーンカテーテルを挿入する。マイクロカテーテルを動脈瘤内に挿入し、術前の血管造影を行う。バルーン閉塞下にマイクロカテーテルより NLE を注入し、瘤内充填術を行う。バルーンによる閉塞時間は 3 分とする。術直後に血管造影を行い、NLE の migration および NLE とバルーンの接着性を確認する。

4. 3 日後の血管造影で NLE の migration を評価し、豚の動脈瘤を摘出する。動脈瘤をホルマリンで固定し、HE 染色を行い、瘤内の塞栓状態や動脈瘤部の病理組織学的変化を評価する。

5. 統計学的解析

各 NLE 群の比較は Fisher exact test および Kruskal-Wallis 検定を用いて行う。P < 0.05 を統

計学的に有意とした。

【結果】

1. 動脈瘤の作成

32 個の動脈瘤のうち 5 個は、不十分な瘤作成や血管の spasm などの理由で瘤内充填術を行わなかった。

2. 血管造影の結果

どの群でも NLE とバルーンの接着は認められなかった。NLE221 群および NLE361 群では migration は認められず、NLE271 群で 5/6、NLE151 群で 7/8 の migration が認められた。NLE271 群と NLE151 群で、術直後に NLE の migration がなく、3 日後に migration が認められた動脈瘤があった。また、NLE151 群で術直後に NLE の migration がみられ、3 日後に総頸動脈の閉塞がみられた動脈瘤もあった。

migration の頻度については、Fisher exact test を用いて有意差検定を行った。NLE221 群は NLE271 群および NLE151 群それぞれに対して有意に migration が少なかった (P=0.0047 および P=0.0014)。また、NLE361 群も NLE271 群および NLE151 群それぞれに対して有意に migration が少なかった (P=0.0152 および P=0.0047)。

3. 病理組織学的結果

HE 染色標本では、すべての群で動脈瘤辺縁部に血栓が認められ、中心部に塞栓物質の NLE が認められた。NLE151 群においては、中心部まで血栓が認められた。すべての群で動脈の外膜を中心としたリンパ球主体の炎症細胞浸潤や動脈の中膜壊死が認められた。中膜壊死の程度については、中膜壊死がなければ 0 点、動脈周囲長の 1/3 未満であれば 1 点、1/3~2/3 であれば 2 点、2/3 より広範囲であれば 3 点とした。Kruskal-Wallis 検定を用いた統計解析で、各 NLE 群に明らかな有意差は認められなかった。

【考察】

NLE の migration は NLE221 (40%NBCA)群で 0/7、NLE361 (30%NBCA)群で 0/6、NLE271 (20%NBCA)群で 5/6、NLE151 (14.3%NBCA)群で 7/8 であった。NBCA の濃度が低下するほど接着性が低くなり、NLE の migration は起こりやすくなると考えられた。バルーンで瘤内の血流を遮断した場合に、完全な瘤内塞栓のためには塞栓物質の接着力だけでなく、瘤内の血液の血栓化が必要であると考えられた。ethanol は組織障害性を有し、NLE に含有される ethanol が血栓化を促進している可能性が考えられた。NBCA は凝固能に依存しない塞栓物質で、NBCA-Lipiodol については NBCA の混合比率を低下させることで重合時間を延長させることができる。NLE も同様に NBCA の濃度を下げることで NLE の重合時間が延長すると思われる。NBCA 濃度が低い NLE151 のような塞栓物質では、病理組織学的に血栓成分が増加していることから、動脈瘤の充填術には血栓化が 1 つの重要な要因であり、NLE の塞栓効果が凝固能に依存すると推察された。

豚の wide neck 動脈瘤の瘤内充填術において、NLE 単独で治療を行う際には 30%以上の NBCA 濃度が必要であることがわかった。しかし、バルーン閉塞時間を長くする、瘤内充填術の際に金属コイルによる flow reduction を併用するなどの工夫で、NBCA 濃度が 30%以下の NLE でも確実な瘤内充填術を行える可能性があり、さらなる動物実験を行う必要がある。

豚は処置段階でヘパリン化されているが、実際の臨床においては塞栓術を行う際にはヘパリン化されていない場合があるため、NLE の接着性が強くなる可能性がある。また、完全にバルーンによる血流遮断ができない場合もあり、NLE の migration のリスクが高くなる。

【結論】

豚の wide neck 動脈瘤に対する瘤内塞栓術において、NBCA 濃度が 30%以上の NLE は安全で確実な塞栓物質になりうる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年10月29日、11月4日に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。

N-butyl cyanoacrylate (NBCA)-Lipiodol (Lp)は血液に接するとすばやく重合し固形化する強力な液性の塞栓物質であるが、NBCAにはカテーテルの接着やカテーテル内腔の閉塞などの問題がある。これらの問題を解決するために、NBCA-Lpに無水 Ethanolを加えることで、カテーテルに接着しにくい新しい塞栓物質 NBCA-Lipiodol-Ethanol (NLE)を開発したが、NLEの最適な混合比率は明らかになっていなかった。

本研究では、豚の総頸動脈や外腸骨動脈に wide neck 動脈瘤を作成し、バルーン閉塞下に混合比率の異なる NLE (NLE221:40% NBCA、NLE361:30% NBCA、NLE271:20% NBCA、NLE151:14.3% NBCA) を用い、合計 27 個の wide neck 動脈瘤に対して瘤内塞栓術を行った。どの群でも NLE とバルーンの接着は認められなかった。NLE221 群および NLE361 群では NLE の migration は認められず、NLE271 群で 5/6、NLE151 群で 7/8 の migration が認められた。NLE221 群は NLE271 群および NLE151 群それぞれに対して有意に migration が少なかった。また、NLE361 群も NLE271 群および NLE151 群それぞれに対して有意に migration が少なかった。後日、HE 染色標本で病理組織学的な評価を行った。すべての群で動脈瘤の辺縁部に血栓がみられ、中心部に塞栓物質の NLE が認められた。NLE151 群においては、動脈瘤の中心部まで血栓が認められた。すべての群で動脈の外膜を中心としたリンパ球主体の炎症細胞浸潤や動脈の中膜壊死が認められた。中膜壊死の程度については、各 NLE 群間で明らかな有意差は認められなかった。

以上から NBCA の濃度が低下するほど接着性が低くなり、NLE の migration は起こりやすくなると考えられた。NBCA 濃度が低い NLE151 のような塞栓物質では、病理組織学的に血栓成分が増加していることから、動脈瘤の塞栓術には血栓化が 1 つの重要な要因であり、NLE の塞栓効果が凝固能に依存すると推察された。

本研究によって、wide neck 動脈瘤の瘤内塞栓術において NLE 単独で治療を行う際には 30%以上の NBCA 濃度が必要であることが示された。今回の報告は、NLE がカテーテルに接着しにくい安全かつ確実な塞栓物質であること、および臨床使用における NLE の適切な NBCA 濃度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631号		
学位授与の日	令和3年12月21日		
氏名	白井 聖一		
学位論文の題目	TET1 upregulation drives cancer cell growth through aberrant enhancer hydroxymethylation of HMGA2 in hepatocellular carcinoma. (肝細胞癌において TET1 は HMGA2 のエンハンサーの異常なヒドロキシメチル化により悪性形質を促進させる)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 井原 義人	教授 北野 雅之

論文内容の要旨

【緒言】

近年、Ten-eleven translocation (TET) ファミリー蛋白である TET1、TET2、TET3 が 5-メチルシトシン (5-methylcytosine ; 5mC) を 5-ヒドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine ; 5hmC) に変換する酸化酵素として発見され、哺乳類ゲノムのシトシン脱メチル化過程で重要な役割を果たす可能性が示された。TET1 は ES 細胞での幹細胞機能維持に関わるが、癌での機能は明らかでない。今回、肝細胞癌 (HCC) の一部で TET1 の発現が高いことに注目した。

【方法】

HCC 患者の臨床検体と TET1 の発現が高い肝癌細胞株である HepG2 と Huh7 を用い、遺伝子発現解析 (定量 RT-PCR、遺伝子発現マイクロアレイ)、機能解析 (siRNA によるノックダウンアッセイ、WST-8 による細胞増殖アッセイ、強制発現アッセイ、クロマチン免疫沈降、メチル化とヒドロキシメチル化 DNA 免疫沈降、次世代シーケンスを用いたシーケンシング、3C アッセイによるエンハンサー活性の評価) を行った。

【結果】

臨床検体の HCC における発現アレイの結果、53 例中 14 例で非腫瘍肝に比べ TET1 の発現が高く、TET1 が高い HCC は有意に血清 AFP 値が高く、若年であり、組織学的に低分化であった。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) では、TET1 の発現が高い HCC は、肝芽腫や肝癌幹細胞分画で認める遺伝子の発現パターンを示した。siRNA により TET1 をノックダウンすると、HepG2 と Huh7 の増殖を抑制し、TET1 を強制発現させると、siRNA による増殖抑制効果から回復した。HepG2 の遺伝子要素での 5hmC の分布を、DNA 免疫沈降シーケンシングにより ENCODE 計画のデータと比較すると、遺伝子のエンハンサー領域に 5hmC が多く存在した。ヒストンのクロマチン免疫沈降シーケンシングから抽出したエンハンサー領域周囲では、TET1 のノックダウンにより 5hmC が減少し、その遺伝子は発現が低下する傾向にあった。TET1 の標的遺伝子として、今まで癌遺伝子として報告があり、TET1 のノックダウンにより発現が低下し、5hmC の減少を示すアクティブなエンハンサー領域を有する HMGA2 に注目した。Chromatin conformation capture (3C) アッセイでは、このエンハンサー領域とプロモーター領域に相互作用があり、TET1 のノックダウンによりその相互作用が低下した。siRNA により HMGA2 をノックダウンすると、HepG2 と Huh7 の細胞増殖を抑制し、強制発現させると、TET1 のノックダウンによる細胞増殖抑制効果から回復した。

【考察】

今回我々は、HCC における TET1 の癌細胞増殖を促進する機能を報告した。5hmC 含有が多くの癌種で減少することから、TET1 は癌抑制遺伝子として考えられていたが、TCGA (Transcriptome analyses of the Cancer Genome Atlas) のデータでは、TET1 の発現は癌種によって異なり、最近では TET1 の抑制による細胞増殖抑制効果、癌遺伝子としての報告もみられ

る。今回我々は、5hmCのマッピングにより、5hmCがエンハンサー領域に多く存在することを示し、TET1のターゲット遺伝子としてHMGA2の解析を行い、同遺伝子はTET1のノックダウンにより5hmCの減少とともに活性低下を認めるエンハンサーを有することを示した。これらの結果は、癌生物学においてTET1と5hmCが重要な役割を果たしていることを示している。今後、TET1や5hmCがどのような分子生物学的メカニズムで遺伝子発現調節に関わっているのかについて、検討が必要である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年10月5日、11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。近年発見されたTET1は、DNA脱メチル化経路の重要な酵素であり、ES細胞において幹細胞機能維持に関わることが知られているが、ヒトの各種の癌における発現異常も報告されている。しかしながらTET1のそれら病態における役割は明らかではない。TET1は、当初に癌抑制遺伝子と考えられていたが、最近では癌遺伝子としての報告も散見され、癌種によりその役割が異なる可能性が考えられている。本研究では、TET1がヒト肝癌の細胞増殖を促進することを報告した。臨床サンプルのトランスクリプトーム解析でTET1の発現が高い肝細胞癌のサブグループを認め、それらは肝芽腫様の遺伝子発現パターンを示した。さらに、ゲノム状態の包括的な解析のために、次世代シーケンスを用いた5mCと5hmCのゲノムワイドな評価を行い、5hmCはアクティブなエンハンサーに豊富に含まれていることを見出した。肝癌細胞株においてTET1をノックダウンすると、5hmCの減少とともに、機能解析の知見として細胞増殖抑制を認めた。肝癌を含む各種の癌で癌関連遺伝子として報告されているHMGA2は、TET1の発現が高い肝細胞癌で発現が高く、同遺伝子に5hmCと関連するアクティブなエンハンサーを認めた。肝癌細胞株においても同様なエンハンサーを認め、TET1のノックダウンによりその活性の低下を認めた。以上を総合して本論文は、肝芽腫様の肝癌においてTET1がHMGA2のエンハンサーを介して細胞増殖を促進し、新しいエピジェネティックな調節不全を主体とする病態に新知見を与えたものと評価され、医学博士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632号		
学位授与の日	令和3年12月21日		
氏名	屋代 充		
学位論文の題目	Active vitamin D and vitamin D analogs stimulate Fibroblast Growth Factor 23 production in osteocyte-like cells via the vitamin D receptor (骨細胞様細胞における活性型ビタミン D およびビタミン D アナログによる線維芽細胞増殖因子 23 の産生はビタミン D 受容体を介している)		
論文審査委員	主査	教授 山田 宏	
	副査	教授 金井 克光	教授 荒木 信一

論文内容の要旨

【緒言】

骨細胞は線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) を産生することにより、血清リン濃度の調節において重要な役割を果たしている。骨細胞における FGF23 産生は 1,25-dihydroxyvitamin D3 によって誘導されることが報告されているが、これまでの研究では骨組織の培養もしくはマウスを用いた研究であったので骨細胞以外の細胞の関与が否定できないため、FGF23 産生を直接誘導するかどうかは不明である。そこで、本研究では骨細胞前駆細胞由来の MC3T3-E1 細胞を骨細胞様細胞に分化誘導し、活性型ビタミン D による FGF23 産生誘導を直接検討した。さらに、1,25-dihydroxyvitamin D3 とそのアナログによる FGF23 産生能の違いについても検討した。MC3T3-E1 細胞を β -グリセロリン酸とアスコルビン酸を用いて骨細胞様細胞 (MCT3-E1-osteocyte like cell; MCT3-E1-OLC) に分化させた。MCT3-E1-OLC を 1,25-dihydroxyvitamin D3 で刺激すると、FGF23 発現は無刺激の細胞と比較して 2631 ± 605 倍増加した。さらに、この産生誘導にビタミン D 受容体 (vitamin D receptor; VDR) が関与しているか検討するために、VDR に対する shRNA を MCT3-E1-OLC に導入し 1,25-dihydroxyvitamin D3 刺激による FGF23 発現を検討した。その結果、コントロールベクターを導入した細胞と比較して有意に減少した。したがって、活性型ビタミン D による骨細胞における FGF23 の産生誘導は、主に VDR を介していることが示唆された。次に、1,25-dihydroxyvitamin D3 とそのアナログ (25(OH)vitamin D3, paricalcitol, maxacalcitol, falecalcitriol と eldecalcitol) による FGF23 誘導能の相違について検討をおこなった。その結果、25(OH)vitamin D3、paricalcitol、maxacalcitol については 1,25-dihydroxyvitamin D3 と明らかな差はみられなかった。一方、falecalcitriol と eldecalcitol は、1,25-dihydroxyvitamin D3 と比較して有意にその誘導能は低かった。このことから、FGF23 誘導能について 1,25-dihydroxyvitamin D3 のアナログ間で異なることが示唆された。このことは、血清リン濃度が十分に高くないかもしくは PTH の血清濃度が高い患者では、falecalcitriol または eldecalcitol を使用の方が良く、血清リン濃度が高いもしくは PTH の血清濃度が十分に高くない患者では、falecalcitriol または eldecalcitol よりも 25(OH)vitamin D3、paricalcitol または maxacalcitol を使用の方が良いと考えられ、実臨床に有益な情報となる。したがって、ミネラル代謝異常および骨障害のある患者ごとに、FGF23 産生への影響を考慮して、適切なビタミン D アナログを選択して使用する必要がある。

【方法】

1. 前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を β -グリセロリン酸とアスコルビン酸を添加した α -MEM で 14 日間培養し骨細胞様細胞 (MCT3-E1-OLC) に分化させた。
2. 分化については、アルカリホスファターゼ (ALP) の発現を ALP 染色を用いて、石灰化能をアリザリンレッド染色を用いて検討した。また、骨細胞前駆細胞から骨細胞への分化にかかわるケラトカンとスクレロスチンについて、遺伝子発現を定量的 PCR 法を用いて解析した。
3. 活性型ビタミン D である 1,25-dihydroxyvitamin D3 を添加し FGF23 遺伝子を定量的 PCR

- 法を用いて、培養上清中の FGF23 濃度を ELISA を用いて測定した。
4. 前骨芽細胞株 MC3T3-E1 に VDR に対する shRNA を遺伝子導入し MCT3-E1-OLC に分化させ、1,25-dihydroxyvitamin D3 を添加して FGF23 遺伝子と培養上清中の FGF23 濃度を測定した。
 5. 活性型ビタミン D のアナログである 25(OH)vitamin D3、paricalcitol、maxacalcitol、falecalcitriol と eldecacitol を添加し FGF23 遺伝子発現を定量的 PCR 法を用いて、培養上清中の FGF23 濃度を ELISA を用いて測定した。用いたそれぞれのアナログ濃度は VDR との親和性から決定した。

【結果】

1. 骨細胞誘導前の MC3T3-E1 細胞では、ALP の発現とアリザリンレッド染色の両方は検出されなかった。刺激後 7 日目(骨芽細胞様細胞)では ALP 発現は強く、弱い石灰化が検出された。刺激後 14 日目(骨細胞様細胞)では ALP は 7 日目と比較して減少しより強い石灰化が検出され、骨細胞様細胞 (MCT3-E1-OLC) に分化したことが確認された。
2. 分化にかかわる遺伝子については、骨芽細胞様細胞に比べて骨細胞様細胞ではケラトカンの遺伝子発現が低下していた。一方、スクレロスチンの遺伝子発現は、骨芽細胞と比較して骨細胞様細胞で増加した。以上のように、骨細胞への分化に関わる遺伝子についても骨細胞へ分化していることが確認された。
3. VDR の shRNA を導入した MC3T3-E1 細胞における VDR の遺伝子およびタンパクの発現レベルは、コントロールベクターを導入した細胞よりも有意に低下していた。次に、この細胞を骨細胞様細胞に分化させ、1,25-dihydroxyvitamin D3 で刺激した。その結果、刺激による shRNA 導入骨細胞様細胞における FGF23 の発現は、コントロールベクターを導入した細胞と比較して有意に低下した。
4. MCT3-E1-OLC を活性型ビタミン D である 1,25-dihydroxyvitamin D3 で刺激すると FGF23 遺伝子発現は、無刺激と比較して 2631 倍に増加した。次に、そのアナログにおける FGF23 発現誘導能を比較すると 25(OH)vitamin D3、paricalcitol、maxacalcitol では、 1 ± 0.54 、 1.19 ± 0.34 、 0.91 ± 0.16 と有意な差は認めなかった。一方、falecalcitriol と eldecacitol は、それぞれ 0.22 ± 0.23 、 0.46 ± 0.07 で 1,25-dihydroxyvitamin D3 よりも有意に低下した。さらに、FGF23 タンパク発現は、遺伝子発現と同じ傾向を示したが、falecalcitriol と eldecacitol で有意な低下は認めなかった。

【考察】

骨細胞は、カルシウム・リン代謝において重要な役割を果たしている。これらのことを明らかにするためには骨から骨細胞を単離することが必要であるが、単離することは困難である。その結果、骨細胞に関するこれまでの多くの研究には、組織培養実験や骨細胞特異的ではない *in vivo* モデルといった骨細胞以外の細胞の関与が否定できない。したがって、骨細胞特異的な知見を得るためには、骨細胞前駆細胞から骨細胞様細胞を誘導する必要があると考えた。骨細胞前駆細胞である MC3T3-E1 細胞は、分化誘導刺激により骨細胞に分化することが知られている。この細胞に骨細胞への分化誘導刺激を行ったところ、ALP の発現と石灰化能について前骨芽細胞、骨芽細胞から骨細胞への分化と同じ経過を示した。さらに、骨細胞への分化に関わるケラトカンとスクレロスチン遺伝子発現の変化も同じ経過を示した。以上から、MC3T3-E1 細胞から誘導した細胞は骨細胞様細胞であると考えられる。

骨芽細胞では、1,25-dihydroxyvitamin D3 が直接 FGF23 産生を誘導するが、骨細胞では確認されていない。本研究により、骨細胞様細胞でも 1,25-dihydroxyvitamin D3 が直接 FGF23 産生を誘導することが明らかとなった。この 1,25-dihydroxyvitamin D3 の FGF23 産生に VDR が関わっているについては明らかではない。中道ら(J Bone Miner Res. 2017.)は、eldecacitol が骨芽細胞特異的 VDR 欠損マウスを使用して VDR を介して FGF23 を誘導すると報告している。しかし、eldecacitol は、血清リン濃度を増加させる点で 1,25-dihydroxyvitamin D3 とは異なる。実際、eldecacitol による FGF23 産生誘導は、ビタミン D の天然型である 1,25-dihydroxyvitamin D3 よりも弱かった。したがって、活性型ビタミン D が VDR を介して FGF23 を誘導するか検討するには、1,25-dihydroxyvitamin D3 を用いる必要がある。MCT3-E1-OLC を 1,25-

dihydroxyvitamin D3 で刺激後、FGF23 遺伝子とタンパク質の発現が著明に増加し、VDR 遺伝子をノックダウンすると、FGF23 遺伝子とタンパク質発現の誘導が著明に抑制された。したがって、ビタミン D は骨細胞における FGF23 産生を直接増加させ、骨芽細胞様細胞と同様に VDR に依存していることが示唆された。

活性型ビタミン D アナログは骨粗鬆症の治療のために臨床で使用されている。FGF23 は血清リン濃度を減少しビタミン D を不活性化するため、結果として PTH が誘導される。そのため、ビタミン D アナログの FGF23 産生誘導能を知ることは重要である。25(OH)vitamin D3、paricalcitol、maxacalcitol による FGF23 遺伝子とタンパク質発現の誘導能は、1,25-dihydroxyvitamin D3 とほぼ同じだったが、falecalcitriol と eldecacititol は有意に低い誘導能を示した。これらの結果は、FGF23 産生誘導能がビタミン D のアナログ間で異なっていることを示唆している。このことは、血清リン濃度が十分に高くないかもしくは PTH の血清濃度が高い患者では、falecalcitriol または eldecacititol を使用する方が良く、血清リン濃度が高いもしくは PTH の血清濃度が十分に高くない患者では、falecalcitriol または eldecacititol よりも 25(OH)vitamin D3、paricalcitol または maxacalcitol を使用する方が良いと考えられ、実臨床に有益な情報となる。

【結語】

本研究により活性型ビタミン D が VDR を介して直接 FGF23 誘導することとビタミン D のアナログ間でその誘導能が異なることが示唆された。したがって、ミネラル代謝異常および骨障害のある患者ごとに FGF23 産生への影響を考慮して、適切なビタミン D アナログを選択する必要がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 3 年 11 月 30 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。

骨細胞は線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) を産生することにより、血清リン濃度の調節において重要な役割を果たしている。骨細胞における FGF23 産生は 1,25-dihydroxyvitamin D3 によって誘導されることが報告されているが、これまでの研究では骨組織の培養もしくはマウスを用いた研究であったので骨細胞以外の細胞の関与が否定できないため、FGF23 産生を直接誘導するかどうかは不明である。

本研究では骨細胞前駆細胞由来の MC3T3-E1 細胞を骨細胞様細胞に分化誘導し、活性型ビタミン D による FGF23 産生誘導を直接検討した。さらに、1,25-dihydroxyvitamin D3 とそのアナログによる FGF23 産生能の違いについても検討した。MC3T3-E1 細胞を β -グリセロリン酸とアスコルビン酸を用いて骨細胞様細胞 (MCT3-E1-osteocyte like cell; MCT3-E1-OLC) に分化させ、MCT3-E1-OLC を 1,25-dihydroxyvitamin D3 で刺激すると、FGF23 発現は無刺激の細胞と比較して 2631 ± 605 倍増加した。さらに、この産生誘導にビタミン D 受容体 (vitamin D receptor; VDR) が関与しているか検討するために、VDR に対する shRNA を MCT3-E1-OLC に導入し 1,25-dihydroxyvitamin D3 刺激による FGF23 発現を検討した。その結果、コントロールベクターを導入した細胞と比較して有意に減少した。したがって、活性型ビタミン D による骨細胞における FGF23 の産生誘導は、主に VDR を介していることが示唆された。次に、1,25-dihydroxyvitamin D3 とそのアナログ (25(OH)vitamin D3、paricalcitol、maxacalcitol、falecalcitriol と eldecacititol) による FGF23 誘導能の相違について検討をおこなった。その結果、25(OH)vitamin D3、paricalcitol、maxacalcitol については 1,25-dihydroxyvitamin D3 と明らかな差はみられなかった。一方、falecalcitriol と eldecacititol は、1,25-dihydroxyvitamin D3 と比較して有意にその誘導能は低かった。このことから、FGF23 誘導能について 1,25-dihydroxyvitamin D3 のアナログ間で異なることが示唆された。

本論文は骨細胞様細胞を用いて 1,25-dihydroxyvitamin D3 の各種アナログ間で FGF23 誘導能の相違について検討した初めての論文であり、実臨床において、ミネラル代謝異常および骨障害のある患者ごとに、FGF23 産生への影響を考慮し、適切なビタミン D アナログを選択して使用できる可能性を示したことから、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633号		
学位授与の日	令和4年3月8日		
氏名	安田 香澄		
学位論文の題目	Hippocampal Subfield Volumes and Cognitive Function in Schizophrenia and Mood Disorders (統合失調症および気分障害における海馬 subfield の体積と認知機能の関係)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 紀本 創兵

論文内容の要旨

【緒言】

海馬は、統合失調症、双極性障害、大うつ病性障害の認知機能との関わりが指摘されているが、海馬の構造は解剖学的に一樣ではなく下位部位 (subfield) に分けられ、各々の subfield の体積の減少、関連する機能についても研究がなされてきた。本研究では統合失調症と双極性障害、大うつ病性障害における海馬 subfield の体積の比較に加えて、海馬 subfield の体積と認知機能の関係を横断的に評価した。

【方法】

21名の統合失調症、22名の双極性障害、21名のうつ病性障害、25名の健常者の4群を解析の対象とした。認知機能の評価は、統合失調症認知機能簡易評価尺度 (Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia ; BACS) にて測定し、6つの下位項目を元に算出される全般的認知機能としての cognitive composite score を用いた。海馬 subfield の体積はMRIのT1強調画像を画像解析ソフトウェア FreeSurfer 6.0 にて測定し、各群差及び認知機能との相関を評価した。

【結果】

統合失調症群では、cognitive composite score が双極性障害群、うつ病性障害群、健常者群より有意に低かった。海馬 subfield においては、両側 hippocampal amygdala transition area (HATA)、右 subiculum、右 presubiculum の体積が統合失調症において健常者より有意に小さく、また左 presubiculum の体積が統合失調症においてはうつ病性障害群より有意に小さかった。その他疾患群との比較では、海馬 subfield の体積に有意な差は認めなかった。認知機能と海馬 subfield の体積との検討については、統合失調症群においてのみ、右 CA1、右 molecular layer of hippocampus、右 granule cell and molecular layer of the dentate gyrus (GC-ML-DG) の各領域の体積が cognitive composite score と有意な相関を示した。一方で、その他疾患群においては、cognitive composite score と有意な相関を示した海馬 subfield の部位はなかった。

【考察】

本研究は統合失調症と双極性障害、うつ病性障害における海馬 subfield の体積と認知機能との関連を疾患横断的に検討した初めての報告である。統合失調症において両側 HATA、右 subiculum、右 presubiculum が健常者群より小さく、右 CA1、右 molecular layer、右 GC-ML-DG の体積と認知機能障害の関連が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和4年2月21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。

海馬は統合失調症、双極性障害、うつ病の認知機能との関わりが指摘されている。本論文の目的は統合失調症 21名と双極性障害 22名、うつ病 21名、健常者 25名における海馬の下位部位 (subfield) の体積の比較と、海馬 subfield の体積と認知機能の関係を評価することである。

認知機能は統合失調症認知機能簡易評価尺度 (Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia; BACS) にて測定し、6つの下位項目を元に算出される全般的認知機能としての cognitive composite score を用いて検討した。海馬 subfield の体積は MRI の T1 強調画像を画像解析ソフトウェア FreeSurfer 6.0 を用いて検討した。統合失調症群では、cognitive composite score が双極性障害群、うつ病群、健常者群より有意に低かった。海馬 subfield においては、両側 hippocampal amygdala transition area (HATA)、右 subiculum、右 presubiculum の体積が統合失調症において健常者より有意に小さく、また左 presubiculum の体積が統合失調症においてはうつ病より有意に小さかった。その他疾患群との比較では、海馬 subfield の体積に有意な差は認めなかった。認知機能と海馬 subfield の体積との検討については、統合失調症群においてのみ、右 CA1、右 molecular layer of hippocampus、右 granule cell and molecular layer of the dentate gyrus (GC-ML-DG) の各領域の体積が cognitive composite score と有意な相関を示した。一方で、その他疾患群においては、認知機能と有意な相関を示した海馬 subfield の部位はなかった。

本論文は統合失調症と双極性障害、うつ病における海馬 subfield の体積と認知機能との関連を疾患横断的に検討した初めての報告である。統合失調症において両側 HATA、右 subiculum、右 presubiculum が健常者群より小さく、統合失調症において特異的に右 CA1、右 molecular layer、右 GC-ML-DG の体積と認知機能障害の関連が示唆され、統合失調症の認知機能障害の病態解明につながる重要な知見を得たことから、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634号		
学位授与の日	令和4年3月17日		
氏名	奥平 尚子		
学位論文の題目	Prognostic factors of daily blood examination for advanced melanoma patients treated with nivolumab. (ニボルマブを投与した進行期悪性黒色腫の患者における日常一般採血中の効果予測因子)		
論文審査委員	主査	教授 朝村 真一	
	副査	教授 藤井 隆夫	教授 神人 正寿

論文内容の要旨

【緒言】

悪性黒色腫（メラノーマ）は、メラノサイトから発生する皮膚癌で、皮膚癌のなかでも非常に悪性度が高い癌である。進行期メラノーマの治療は、1980年代から長期にわたりダカルバジンしか選択肢がない状況が続いたが、2014年に抗PD-1阻害薬であるニボルマブ（オプジーボ®）が他臓器癌に先駆け、根治切除不能なメラノーマに対して本邦で適応を取得した。以来、進行期メラノーマ治療戦略は劇的に変化しており、それに伴い以前より予後の改善やOverall survivalの延長がみられる。しかしそれでも、国内臨床試験においてニボルマブの奏効率は2-3割程度と高いとは言えない。どのような症例に奏効しやすいのかを一般採血から予測できれば、日常診療におおいに役立てることができると考え、当科でのニボルマブ投与症例を後ろ向きに検討した。

【方法】

当科でニボルマブを投与した、切除不能のメラノーマ患者16例を対象とした。ニボルマブの投与が2回未満の患者や、関節リウマチなどの炎症性基礎疾患を有する患者は除外した。RECIST v1.1で判定したニボルマブの臨床効果に基づき、患者を治療反応群（PR+SD）と非治療反応群（PD）に分類し2群間で治療前の一般採血における検査値、および治療前後の検査値をそれぞれ比較した。具体的には、白血球数（WBC）、リンパ球数（ALC）、好中球数（ANC）、単球数（AMC）、好酸球数（AEC）、好塩基球数（ABC）、乳酸脱水酵素（LDH）、C反応性タンパク質（CRP）、赤血球沈降速度1時間値（ESR）、5-S-システインドーパ（5-S-CD）の値について検討した。統計にはsingle-factor ANOVA、repeated measure ANOVAを用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とみなした。さらに、ROC曲線分析もGraphPad Prism software®を用いて行った。

【結果】

① 最良効果

16例の最良効果の内訳は、完全奏効（complete response; CR）が0例、部分奏効（partial response; PR）が2例、安定（stable disease; SD）が5例、進行（progressive disease; PD）が9例であった。観察期間中、多くの患者は最良効果を維持したが、1症例は、約1年間のSDのあとPDに進行した。PRとSD症例を治療反応群（responder）とし、PD症例を非治療反応群（non-responder）とした。

② 有害事象

免疫関連の有害事象としては、間質性肺炎（ $n=1$, grade3）、甲状腺機能低下症（ $n=1$, grade2）、白斑（ $n=3$ ）、乾癬様皮疹（ $n=2$ ）を認めた。その他の有害事象として、血小板低下（grade3）、口内炎（grade3）、悪心（grade3）があった。肝機能や腎機能などの血液検査値異常を認めた症例もみられたが、それらはすべてgrade1であった。grade3の間質性肺炎、grade2の甲状腺機能低下症およびgrade3の悪心を生じた3例では、これらの有害事象のためニボルマブ投与を中止した。

③治療前バイオマーカー

治療反応群と非治療反応群で WBC、ALC、ANC、AMC、AEC、ABC、LDH、CRP、ESR、5-S-CD の治療前中央値を比較検討したところ、ALC、CRP、ESR において両群間に有意差を認められた。治療反応群では、非治療反応群と比較して、治療前の ESR 高値 ($p=0.006$)、CRP 高値 ($p=0.014$)、ALC 低値 ($p=0.023$) を認めた。さらに、有意差を認めた ALC、CRP、ESR について、ROC 曲線を作製したところ、それぞれ曲線下面積 (AUC) は 0.89、1.00、0.86 で、CRP が最も高い AUC を有した。

④治療効果の早期予測バイオマーカー

治療反応群と非治療反応群で、治療前後の検査値の推移を比較したところ、ALC、ANC、CRP、ESR で両群間の有意差を認めた。治療反応群では、治療後に CRP の低下、ESR の低下、ANC の低下、ALC の増加を認めた。さらに、有意差を認めた ALC、ANC、CRP、ESR について、ROC 曲線では、AUC はそれぞれ 1.00、0.85、0.79、0.83 で、やはり CRP の AUC が最も高値であった。

【考察】

ニボルマブ治療の奏効率と相関するバイオマーカーとして、腫瘍組織における PD-L1、抹消血中の Th9 細胞、血清 LDH、CRP、ALC、ANC 値などが過去に報告されている。本研究では、ESR や CRP など炎症に関連する項目がバイオマーカーとなる可能性が示唆された。炎症と悪性腫瘍は密接に関連しており、1881 年に初めて、Virchow が癌細胞周辺の白血球を観察して以降、メラノーマにおいては CRP と予後やリンパ節転移との相関や、ESR の上昇と生存期間との逆相関が示されている。

ニボルマブは、腫瘍細胞が発現する PD-L1 と、T 細胞が発現する PD-1 の結合を阻害することで抗腫瘍効果を発現するとされている。PD-1 は炎症による免疫応答が起こってはじめて T 細胞に発現すると言われており、特にその発現は末梢炎症組織に浸潤するエフェクター T 細胞において顕著である。我々の研究結果において、治療反応群の炎症マーカーが投与前に高かったことを考慮すると、これらの患者は、強い免疫応答のためにより多くの PD-1 を投与前に発現していることで、ニボルマブの有効性が高かった可能性がある。近年、ニボルマブ治療と、放射線療法などの炎症を惹起する既存の治療との相乗効果が報告されている。このような事象も炎症とニボルマブの有効性の関連を示唆し、強い炎症を持つメラノーマではニボルマブの効果が出やすいという今回の結論に沿ったものであると考えた。

【結論】

メラノーマ患者に対するニボルマブ治療において、ESR の治療前バイオマーカーとしての有用性を初めて示した。さらに、CRP はニボルマブ治療前と治療中の両者で有効性を予測するのに有用であることを確認し、ROC 曲線では CRP が一般血液検査の中で最も精度の高いバイオマーカーである可能性を示した。強い炎症を伴うメラノーマではニボルマブ治療がより有効である可能性を、将来さらに症例数を増やした大規模な調査で再検討することによりメラノーマの治療戦略に貢献できると考える。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 3 年 6 月 21 日、22 日、7 月 6 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。

上記論文内容を確認し、口頭試問を行い、結果は優であった。本論文は、強い炎症を伴うメラノーマではニボルマブ治療がより有効である可能性を見出し、メラノーマ治療において新たな知見を示す研究であり、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635号		
学位授与の日	令和4年3月17日		
氏名	村田 鎮優		
学位論文の題目	Microendoscopic decompression for lumbosacral foraminal stenosis: A novel surgical strategy based on anatomic considerations using three-dimensional image fusion with magnetic resonance imaging/computed tomography. (3次元 CT/MRI fusion 画像を用いた解剖学的病態分析に基づく腰椎椎 間孔部狭窄症に対する新たな治療戦略の提唱)		
論文審査委員	主査	教授 廣西 昌也	
	副査	教授 山田 宏	教授 金井 克光

論文内容の要旨

【緒言】

腰椎椎間孔狭窄症の見逃しは、術後成績不良例の主たる原因となってきた。この理由は、同部が各種画像診断で病変を検出するのが困難な部位であったからに他ならない。しかし、近年の3次元画像診断モダリティの登場によって、その診断精度は著しく向上し、容易に病変を検出できるようになった。そのなかでもCT-MR fusion 画像は椎間孔内外の病変を3次元的に視覚化できるため、椎間孔狭窄症の病態認識や手術戦略立案時に極めて有用なツールとなっている。本研究の目的は、CT-MR fusion 画像と我々が新規作成した腰椎椎間孔狭窄の解剖学的分類を用いて、腰椎椎間孔狭窄の最狭窄部位と頻度を明らかにすることで、過去における各種椎間孔狭窄症除圧術式の妥当性を再考するとともに、新たな治療戦略を提唱することである。

【方法】

1. 対象

2013年1月から2017年12月に、腰仙椎移行部椎間孔狭窄症に対する初回手術を受け、術前のCTとMRIがCT-MRI image fusion software で使用可能であった78例(男性47例、女性31例、年齢33-88歳、平均69.1歳)を対象とした。

2. 腰椎椎間孔狭窄の解剖学的分類

椎間孔の解剖学的定義に世界的にコンセンサスの得られたものはないが、一般的に椎弓根内縁から椎弓根外縁までの領域を指し、椎弓根内縁までは脊柱管、椎弓根外縁から外側部は椎間孔外として区別される。本研究では、椎間孔内領域の病変をさらに2分割し、椎弓根内縁から中央までを内側椎間孔内狭窄(MF)、椎弓根中央から外縁までを外側椎間孔内狭窄(LF)と新たに定義した。他方、椎間孔外狭窄(EF)は従来どおりとした。

3. 評価方法

CT-MRI image fusion software を用いて、術前画像を解析し、前述の腰椎椎間孔狭窄の解剖学的分類をもとに、最狭窄部の位置と狭窄要素(骨または軟部組織)を調査した。また、術後の3次元MR画像と術中所見および術中動画をもとに実際に除圧を要した範囲についても後ろ向きに調査した。

【結果】

対象78例の疾患の術後1年時の腰痛・下肢痛VAS(visual analogue scale)は、術前と比較して、有意に改善していた。また、VASの臨床的有意な改善を示す術前後の最小変化量(MCID; minimum clinically important difference(腰痛VAS; 22mm以上減少、下肢痛VAS; 50mm以上減少))の達成率は、腰痛MCID 22は53%(41例)、下肢痛MCID 50は63%(49例)であった。最狭窄部位はMFが6%、LFが58%、EFが36%と、椎弓根中央(椎弓峡部)より外側に最狭窄部位を有する症例(LF+EF)は94%存在した。また、狭窄要素は骨性狭窄が53%、軟部組織による狭

窄が 47%だった。また、骨性狭窄の占める割合は、EF では 50%、LF では 60%であったのに対し、MF では 0%だった。骨性狭窄は椎弓根外縁近傍(LF + EF)に集中しており、内側椎間孔内狭窄(MF)は、ヘルニアまたは膨隆椎間板などの軟部組織による狭窄のみで、骨性狭窄は認めなかった。また実際に除圧を要した範囲は、MF+LF が 10%、MF+LF+EF が 14%、LF+EF が 39%、LF が 11%、EF が 26%だった。椎弓峡部の骨性除圧を要した症例はなかった。

【考察】

腰椎変性疾患の治療に際し、Jacobson が提唱した intraosseous segment と articular segment の概念を理解することは、極めて重要である。articular segment は intervertebral disc と intervertebral foramina、articular process、dorsal arch から構成され、変性変化に伴い神経圧迫(狭窄)が発生する場所である。一方の intraosseous segment は vertebral body と pedicles、pars、interarticularis、lamina、spinous process の連続した骨組織によって構成されるため、理論上は神経圧迫が発生しない場所とされる。この概念は、pars (椎弓峡部)は神経圧迫が発生しない intraosseous segment であり、狭窄症の除圧を行う上で必ずしも犠牲となる必要はなく、温存可能な組織であることを暗に示している。

しかし、術前の椎間孔狭窄の病態把握が困難であった過去に於いては、神経除圧を徹底するために、骨形成的椎弓形成術に代表されるような峡部を完全に開放する除圧術式が一般的に採用されていた経緯がある。このため、医原性分離症をきたすことで生じる脊椎不安定症への対応策として、後側方固定(PLF)や経椎間孔的椎体間固定術(TLIF)を併用する術式が現在まで主流となってきた。

一方、脊椎固定術は除圧単独・非固定手術と比較して、手術侵襲の大きさや周術期の合併症および死亡例の発生率の高さが指摘されており、隣接椎間障害の発生リスクを鑑みても、椎間孔狭窄症に対する標準手術の評価を得たとは言い難い。また、除圧単独・非固定手術に関しても、数多くの手術術式が提案されてきたが、十分な神経除圧と椎間関節や峡部の温存という二律背反的な問題を同時に解決することができる決定的に優れた術式は存在しなかった。

本研究によって、腰椎椎間孔狭窄の主たる病変は椎弓根外縁近傍に集中して存在すること、内側椎間孔内(椎弓峡部近傍)に骨性狭窄は存在しないことが明らかとなった。この結果から、腰椎椎間孔狭窄症は脊柱管内から峡部に除圧を進める必要はないこと、逆に峡部は温存し、椎間孔外からの神経除圧を進めていくことが理に適っていることを示している。よって、椎間関節を可能な限り温存できれば、固定術の併用は基本的に不要であると言える。通常の脊椎後方アプローチ手術では神経組織を露出展開するために椎間関節はある程度犠牲にせざるを得ないが、脊椎内視鏡の斜視鏡特性を応用した側方アプローチ手術であれば、椎間関節を最大限に温存できるはずである。このような新たな腰椎椎間孔狭窄症の病態認識と共に、脊椎内視鏡下手術を用いた新しい治療戦略で、われわれは腰椎椎間孔狭窄症に対して脊椎内視鏡下手術を連続的に実施してきた。その結果、従来法では達成できなかった十分な神経除圧と椎間関節や峡部の温存という二律背反的な問題を同時に解決し、良好な手術成績が得られることはこれまで報告してきた通りである。

腰椎椎間孔狭窄症に対する画像診断法と手術術式は近年大きく進歩している。腰椎椎間孔狭窄の主たる病変は椎弓根外縁近傍に集中して存在し、内側椎間孔内(椎弓峡部近傍)に骨性狭窄は存在しないということ、そして、同病変には脊椎内視鏡下手術のような側方アプローチ手術が理に適っていることを理解できれば、腰椎椎間孔狭窄症の手術成績は一層の向上を示すことが期待できる。

審査の要旨(審査の日、方法、結果)

令和3年10月20日、21日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本研究は、脊椎手術失敗症候群の原因の一つとされている腰椎椎間孔部狭窄症(LFS)に関して、CT-MR fusion 画像と新規作成した解剖学的分類を用いて、病態を解剖学的に明らかにし、最適な手術戦略を提唱したものである。LFSの見逃しと手術による過剰な骨破壊は、手術成績不良例の主たる原因として、近年、認識されるようになってきた。これには、従来の画像診断ツールでは、腰椎椎間孔部における神経圧迫は描出困難であり、LFSは非常に稀な疾患として過少評価され、解剖学的な病態理解が不足しているが故に、術中に神経圧迫の無い部分まで完全に骨切除するよ

うな術式が基本とされてきたことが背景にある。しかし、近年の発展が著しい3次元画像診断モダリティ、なかでもCT-MR fusion画像の登場によって椎間孔部の病変を3次的に視覚化できるようになってきた。

2013年1月から2017年12月に、LFSに対する初回手術を受けた78例を対象とし、CT-MRI image fusion softwareを用いて、最狭窄部の位置と狭窄要素(骨または軟部組織)を調査すると共に、新規開発し実践してきた内視鏡下椎間孔拡大術の手術成績を後ろ向きに調査した。結果は、LFSの最狭窄部位は内側椎間孔内が6%、外側椎間孔内が58%、椎間孔外が36%と、椎弓根中央(椎弓峡部)より外側に集中していた。また、狭窄要素は骨性狭窄が53%、軟部組織による狭窄が47%で、内側椎間孔内狭窄には、骨性狭窄は認めなかった。対象78例の腰痛・下肢痛は、術前と比較して、有意に改善しており、再手術症例はなく、内視鏡下椎間孔拡大術により良好な成績が得られた。

本研究によって、LFSの主たる病変は椎弓根外縁近傍に集中して存在すること、内側椎間孔内(椎弓峡部近傍)に骨性狭窄は存在しないことが明らかとなった。この結果から、LFSは脊柱管内から峡部に除圧を進める従来の術式は適切ではないこと、逆に峡部は温存し、椎間孔外からの神経除圧を進めていくことが理に適っていることを示している。この事実は、椎間孔外からアプローチする脊椎内視鏡下椎間孔拡大術が、従来法では達成できなかった十分な神経除圧と椎間関節や峡部の温存という二律背反的な問題を同時に解決し、良好な手術成績が得られたことを裏付けていると考える。本論文は、病態理解の不足している腰椎椎間孔部狭窄症に関し、解剖学的に病態を解明し、最適な手術方法を提唱している点で有意義なものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第636号		
学位授与の日	令和4年3月17日		
氏名	太地 良		
学位論文の題目	Anti-allodynic and promotive effect on inhibitory synaptic transmission of riluzole in rat spinal dorsal horn (リルゾールの神経障害性疼痛抑制効果と脊髄後角におけるシナプス伝達抑制作用)		
論文審査委員	主査	教授 中川 幸洋	
	副査	教授 川股 知之	教授 山田 宏

論文内容の要旨

【著言】

神経の損傷や機能障害をきっかけとして発症する神経障害性疼痛は、持続的な自発痛や痛覚過敏、アロディニアを生じ、患者に身体的・精神的苦痛を強いる過酷な痛みである。神経障害性疼痛の発症には、第1次求心性線維からの侵害刺激が入力・修飾される脊髄後角が関与することが明らかにされてきた。この神経障害性疼痛に対して、現在に至るまで種々の作用機序の鎮痛薬が開発され、近年ではプレガバリンやデュロキセチン、弱オピオイドなどの新規薬剤も登場している。しかし既存の治療薬では十分な鎮痛効果が得られていない患者が未だ多く存在し、新たな鎮痛薬の開発が待ち望まれている。リルゾールはグルタミン酸を介した興奮性シナプス伝達を抑制することで神経保護的な作用を有する薬剤であり、筋萎縮性側索硬化症の治療薬として臨床使用されている。そして、ラットの行動学的実験では、リルゾールに神経障害性疼痛を抑制する効果が報告され、鎮痛薬としての可能性も示唆された。リルゾールは様々な受容体に影響すると考えられているが、ラットの海馬において GABA_A 受容体を介した抑制性シナプス伝達に作用することが報告されている。しかしながら、神経障害性疼痛に深く関与する脊髄後角において、リルゾールが GABA_A 受容体を介した抑制性シナプス伝達に作用するかは明らかにされていない。本研究の目的は、神経障害性疼痛に対する抑制効果を行動学的に評価し、パッチクランプ法を用いて脊髄後角細胞におけるリルゾールの抑制性シナプス伝達への作用を電気生理学的に解明することである。

【方法】

5-6週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いて、5%イソフルラン吸入麻酔下に Spared nerve injury (坐骨神経の3分枝のうち腓腹神経を除く脛骨神経と総腓骨神経を結紮切離し、腓腹神経領域にアロディニアを誘発する) モデルを作成し、術後1週間で機械的アロディニアが完成したことを確認した。このモデルラットを、リルゾール投与群とコントロール群に分け、それぞれリルゾール(4mg/kg)とリルゾールを含まない溶媒(5% dimethyl sulfoxide)を単回投与し、機械的アロディニアに対する作用を評価した。行動学的評価は、10gのフィラメントを用いた von Frey 試験により、機械的刺激に対する逃避反応の出現頻度を測定した。試験は薬剤投与前、投与後1時間、6時間、12時間、24時間で実施した。また電気生理学的解析のため、同じく5-6週齢のラットを用いてウレタン麻酔下に椎弓を切除して脊髄を摘出した。摘出した脊髄は直ちに95%O₂、5%CO₂で飽和した1-3°Cのクレブス液(117 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 11 mM glucose at pH 7.4)に浸し、マイクロスライサーを用いて厚さ650 μmの脊髄横断スライス標本を作成した。腰膨大部の脊髄スライスを酸素負荷した36°Cのクレブス液で灌流し、ブラインドホールセル・パッチクランプ法により脊髄後角第II層膠様質細胞から膜電流記録を行った。0mV膜電位固定下で自発性抑制性シナプス後電流(sIPSC)を観察し、リルゾール還流適用による膜電流の変化を記録した。

【結果】

行動学実験ではリルゾールを投与した群は、コントロール群に比較して投与後1時間において機

機械刺激に対する逃避反応の頻度が有意に減少した。この作用は短時間に限り、投与後 6 時間以降では差を認めなかった。パッチクランプ法による膜電流記録では、 $300\mu\text{M}$ のリルゾールを還流適用したところ、約 60% の細胞で 5 pA 以上の外向き電流が観察され、その平均は 19.7 pA であった。この外向き電流は 2 回の繰り返し投与でも認められたが、2 回目ではその振幅が 49.3% に低下した。またこの外向き電流は Tetrodotoxin 適用下でも抑制されなかった。IPSC の解析では、リルゾール還流により頻度は $1.14 \pm 0.40\text{ Hz}$ から $0.96 \pm 0.34\text{ Hz}$ に低下したが、振幅、rise time、decay time に変化はみられなかった。次に外向き電流の発生に GABA やグリシンが関与しているかを検討するため、同一細胞においてリルゾールと同時に Strychnine (グリシン受容体拮抗薬) と Bicuculline (GABA_A 受容体拮抗薬) を還流適用したところ外向き電流はブロックされたが、Strychnine のみの同時適用では外向き電流はブロックされなかった。

【考察】

本研究から、リルゾールは神経障害性疼痛に対する抑制作用を有することが示された。またリルゾールはラット脊髄膠様質細胞に対して、細胞の過分極を示す外向き電流を発生させることが判明し、シナプス伝達抑制作用を有することが示された。受容体拮抗薬の同時還流試験により、この外向き電流には GABA_A 受容体が関与していることが示された。これらの結果は、リルゾールが脊髄レベルで GABA_A 受容体を介して抑制性シナプス伝達を亢進し、疼痛に対して抑制的に作用することを示唆している。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 3 年 11 月 26 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。

神経障害性疼痛は持続的な自発痛や痛覚過敏、アロディニアを生じる過酷な痛みであり、これまでに種々の鎮痛薬が開発されているが、既存の治療薬では十分な鎮痛効果が得られていない患者が未だ多く存在する。リルゾールはグルタミン酸を介した興奮性シナプス伝達を抑制することで神経保護的な効果を有し、筋萎縮性側索硬化症の治療薬として臨床使用されている薬剤である。このリルゾールにラットの行動学的実験において神経障害性疼痛に対する抑制的な効果が報告され、鎮痛薬としての可能性も示唆された。本研究では、リルゾールの神経障害性疼痛に対する効果を行動学的に評価し、パッチクランプ法を用いて脊髄後角細胞における抑制性シナプス伝達への作用を電気生理学的に解析した。

5-6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いて、腓腹神経領域のアロディニアモデルを作成した。リルゾールもしくはリルゾールを含まない溶媒を単回投与し、von Frey 試験により機械的アロディニアに対する抑制作用を行動学的に評価した。また 5-6 週齢のラット脊髄スライス標本に対してブラインドホールセル・パッチクランプ法を適用し、脊髄後角第 II 層膠様質細胞からの膜電流記録により、リルゾールの脊髄後角における抑制性シナプス伝達への作用を解析した。

行動学実験ではリルゾール (4 mg/kg) を投与した群は、溶媒のみを投与した群に比較して、投与後 1 時間において機械刺激に対する逃避反応の頻度が有意に減少した。この逃避反応頻度の減少は短時間に限ったものであり、6 時間以降では両群間に有意差は認めなかった。パッチクランプ法による膜電流記録では、 $300\mu\text{M}$ のリルゾールを還流適用したところ、約 60% の細胞で外向き電流が観察された。この外向き電流は Strychnine (グリシン受容体拮抗薬) と Bicuculline (GABA_A 受容体拮抗薬) の同時還流でブロックされたが、Strychnine のみの同時適用ではブロックされなかった。

本研究から、リルゾールは神経障害性疼痛に対する抑制作用を有することが示された。またリルゾールはラット脊髄膠様質細胞に対して、細胞の過分極を示す外向き電流を発生させることが判明し、脊髄レベルでシナプス伝達抑制作用を有することが示された。受容体拮抗薬の同時還流試験により、この外向き電流には GABA_A 受容体が関与していることが示された。

本論文は、リルゾールの神経障害性疼痛に対する抑制作用、および脊髄後角での GABA_A 受容体を介したシナプス伝達抑制作用を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と認めた。

学位記番号	博(医)甲第637号		
学位授与の日	令和4年3月17日		
氏名	梶本 みずき		
学位論文の題目	Androgen/Wnt/ β -catenin signal axis augments cell proliferation of the mouse erectile tissue, corpus cavernosum (アンドロゲン依存性のマウス海綿体性差形成機構の解明)		
論文審査委員	主査	教授	平井 秀一
	副査	教授	井上 徳光
		教授	山田 源

論文内容の要旨

【緒言】

外生殖器は、性差が認められる器官の一つである。胎仔外生殖器は、発生学的に雌雄共通の原基から、男性において顕著に発達する海綿体 (CC) や尿道へと分化する。CC は、男性ホルモン (アンドロゲン) 依存的に、血管、平滑筋、結合組織を含む勃起組織として顕著な性差を提示すると考えられている。しかし、CC 形成過程において、アンドロゲン依存性の性差形成機構およびその下流因子は全くわかっていない。

本研究は、マウス CC 形成過程をモデルとして、雌雄 CC 間の詳細な組織学的解析、アンドロゲン受容体 (AR) の発現パターンや細胞増殖に関する解析を行った。その結果、胎生中期からオス CC 形成領域において、細胞増殖パターンおよび AR の発現に、顕著な性差が認められた。さらに、器官形成において細胞増殖の制御を担う Wnt/ β -catenin シグナル経路の主要因子である β -catenin の発現にも、性差が示された。また、アンドロゲンに曝露されたメスの CC では、 β -catenin の発現が増加し、細胞増殖が促進された。本研究では、ミュータントマウスのモデル実験として、CC 特異的な Cre ドライバーマウスを用いて、 β -catenin コンディショナルノックアウトマウスおよび恒常的 Wnt/ β -catenin 活性化マウスを作成し、アンドロゲン依存性の CC 性差形成機構における Wnt/ β -catenin による信号系の意義を解析した。

【方法】

マウスおよびアンドロゲン投与実験、EdU (細胞増殖) 取り込み実験

全ての実験は ICR および C57BL/6J (日本クレア) を遺伝的背景に持つ成体マウスを用いて行った。海綿体 (CC) に Cre recombinase を発現する *Sox9^{CreERT2}* マウス (CC 特異的 Cre ドライバーマウス)、 β -catenin^{lox/lox} および β -catenin^{loxEx3/+} マウスを用いて、各々海綿体特異的な、 β -catenin コンディショナルノックアウトマウス (*Sox9^{CreERT2/+}; β -catenin cKO* マウス)、恒常的 Wnt/ β -catenin 活性化マウス (*Sox9Cre; β -catenin^{loxEx3/+}* マウス) を作製した。マウスの外生殖器は、胎仔期 (E16.5, E18.5) および新生仔期 (PND0, 3, 7, 21) に採取した。アンドロゲン曝露は、Testosterone Propionate (TP) を 100mg/kg で投与 (腹腔内注射 (ip)) した。*Sox9* 発現細胞が CC 形成に寄与する可能性は、*Sox9^{CreERT2/+}; Roza26^{lacZ}* (*R26lacZ*) マウスを用いて *Sox9* 陽性細胞を可視化し検定した。タモキシフェン (TM) による Cre recombinase の発現誘導は、*Sox9^{CreERT2/+}* マウスと交配した妊娠中の以下の母獣マウス (β -catenin^{loxEx3/+} マウス、 β -catenin^{lox/lox} マウス、*R26lacZ* マウス) に、100mg/kg 体重で投与 (ip) した。細胞増殖は、採取 1 時間前に胎仔期および出生後のマウスに EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を 100mg/kg 体重で投与し、Click-it EdU 染色 kit を用いて可視化した。

免疫組織化学染色および Hematoxylin-Eosin (HE)、Masson's Trichrome 染色

マウス海綿体組織を 4%PFA/PBS で一晩固定後にパラフィン (連続および隣接) 切片を作製し、HE 染色、Masson's Trichrome 染色による組織学的解析を行った。免疫組織化学染色は、親水化および抗原賦活化処理を行い、1%ヤギ血清/PBS を用いて 1 時間の Blocking 処理を行った。Blocking 溶液で希釈した抗 AR 抗体、抗 CTNBN1 抗体または抗 LEF1 抗体を加え、4°C で一晩抗原抗体反応を行い、蛍光免疫染色法により確認した。

In situ hybridization 法

パラフィン組織切片を作製後、親水処理を施し、4%PFA/PBS 溶液により再固定化した。DIG 標識した 1 μ g/ml の RNA プローブ (*Sox9*, *Dkk2*) を添加し、65°C で 1 晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、洗浄行程を経て、Blocking 溶液で希釈した 0.1% アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG ポリクローナル抗体で 60 分間室温にて抗原抗体反応させた。同反応後に、5-Bromo,4-Chloro,3-indolylphosphate (BCIP) 及び Nitroblue tetrazolium (NBT) 基質を用いて発色反応を行った。

β -ガラクトシダーゼ (lacZ) 染色

Sox9^{CreERT2/+}; Roza26 マウスの外生殖器を固定液 (1%ホルマリン、0.2%グルタルアルデヒド、0.02%NP40、1xPBS) で 4°C、60 分間処理し、PBS で洗浄した。その後、PBS+1M MgCl₂ で 20 分間、室温で洗浄し、lacZ 反応液中において 37°C で一晩発色させた。染色後 PBS で洗浄した後、4%PFA で一晩固定した。10 μ m の連続パラフィン切片作製した後、Eosin を用いて対比染色を行った。

面積測定に基づく海綿体の大きさの評価

本研究では、CC の冠状隣接切片における断面積を CC の大きさと定義した。CC の断面積を ImageJ (Image Processing and Analysis in Java; National Institutes of Health) ソフトウェアを用いて測定することで CC の大きさを評価した。解析に使用した画像は、Masson Trichrome 染色を施した雌雄外生殖器 (E16.5, E18.5, PND0, 3, 7) の、陰茎骨から屈曲前部までの領域に対し、正立顕微鏡 (Olympus® BX51; 10X) を用いて撮影した。面積は、ImageJ を用いて画像切片上における、CC の外周をマークし、トリミングした後、その平均値を pixel 単位で算出した。1 個体 (N \geq 3) につき約 30 μ m ごと、3 箇所以上の CC (n \geq 13) の面積を測定した。

統計処理

全てのデータは平均 \pm SEM で表した。グループ間における統計的な有意差は、T 検定、ターキークライマーテストを用いて分析した。

【結果】

1. オスマウス海綿体 (CC) の大きさは、生後顕著に増大し、メスよりも早期にコラーゲンなどの膠原繊維が豊富な組織像を呈した。
2. アンドロゲン (TP) に曝露したメス CC は、オスと類似した形態的構造を示した。
3. オス CC では、メスより早期にアンドロゲン受容体 (AR) が発現し、EdU 陽性の増殖細胞が多数観察された。さらに TP の投与は、メス CC において細胞増殖を亢進させた。
4. 細胞増殖の性差がみられる E16.5 において、CTNNB1 の発現、同シグナルの活性化の指標である LEF1 の発現が、オスで顕著に検出された。
5. Wnt/ β -catenin シグナルの阻害因子である *Dkk2* の発現は、メスで顕著に検出された。さらに、メスにおける TP の投与は、LEF1 陽性細胞を増加させた。
6. β -catenin シグナルを欠損させたオスマウスの CC は、細胞増殖の低下を示した。一方、恒常的に β -catenin シグナルを活性化させたメスマウスの CC は、細胞増殖の亢進を示した。

【考察】

海綿体 (CC) は、外生殖器において男性型尿道形成と同様に、性差が顕著に観察される器官である。これまで CC の大きさは、アンドロゲン依存的にその性差が形成されると推察されてきた。しかし、実際にその過程において発現する制御遺伝子を含め、その組織的な形成過程については、理解が不十分であった。本研究は、胎仔および新生仔の CC を用いた細胞増殖および遺伝子発現解析により、アンドロゲン依存的な細胞増殖の亢進による性差形成機構を明らかにした。さらに、この増殖制御は、 β -catenin シグナルの活性化を介する可能性を見出した。男性型尿道形成過程において、Wnt/ β -catenin シグナルの阻害因子である *Dkk2* の発現が、アンドロゲン依存的に抑制されることが報告されている。本研究においても、CC における *Dkk2* の発現は、オスで低レベルで

あった。さらに、本研究では、アンドロゲンの曝露により、 β -catenin シグナルの活性化の指標である LEF1 発現細胞の増加を示した。以上から、CC における細胞増殖制御は、アンドロゲンが *Dkk2* の発現を抑制し、Wnt/ β -catenin シグナルの活性化を介す可能性が示唆された。

本研究から、CC における Wnt/ β -catenin シグナルの活性化制御候補因子として同定された *Dkk2* は、血管形成の成熟を促進することが報告されている。また近年、前立腺がんにおいて *Dkk2* は、 β -catenin、cyclin D1、Myc の発現と細胞増殖を抑制することも報告されている。血管内皮細胞における β -catenin シグナルの欠損は、同細胞における先端細胞の形成や発芽が減少し、網膜や脳における血管新生の低下を導くことが報告されている。そのため今後、CC の血管形成過程における Wnt/ β -catenin シグナルを明らかにすることは、血管疾患との併発が多数報告されている勃起機能不全への応用が期待でき、大変意義深いと考えられる。今後は、CC の分化過程におけるアンドロゲンによる Wnt/ β -catenin シグナル発現制御機構の解明も重要な課題であると考えられる。

【結語】

本研究は、性差が認められる器官である海綿体 (CC) を用いて、その形成過程におけるアンドロゲン依存性の細胞増殖機構および、同制御における Wnt/ β -catenin シグナルの重要性を明らかにした。Wnt/ β -catenin シグナルは、外生殖器において、重要なオス型・メス型を示す尿道形成過程などにおいても、性差形成を誘導することが報告されている。さらに、同シグナルは、前立腺がんなど様々な病態の発症に関与している。本研究の成果は、外生殖器の CC 形成のみならず、今後、各種の病態に伴うアンドロゲン依存的な細胞増殖に伴う‘性差’形成を理解する上でも有用な知見であると期待される。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和4年1月25日及び31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。

外生殖器は、性差が認められる器官の一つである。胎仔外生殖器は、発生学的にオス/メス共通の原基から、男性において顕著に発達する海綿体 (CC) 及び尿道へと分化する。CC は、血管、平滑筋、結合組織を含む勃起組織であり、男性ホルモン (アンドロゲン) 依存的に顕著な性差を提示すると考えられている。しかし、CC の形成過程におけるアンドロゲン依存性の性差形成機構、及びその下流因子は、明らかになっていない。Wnt/ β -catenin シグナルは、細胞増殖や分化などの重要な機能を制御する。

β -catenin は、アンドロゲン受容体 (AR) と相互作用し、そのシグナルは AR アゴニストの存在によって増強されることが示唆されている。ガン研究において、Wnt/ β -catenin シグナルは、アンドロゲン依存的に細胞増殖を制御することが報告されている。したがって、Wnt/ β -catenin シグナルは、性差を顕著に示す CC 形成過程において、アンドロゲン下流に存在する魅力的な候補シグナルと考えられる。

本研究では、マウス CC 形成過程をモデルとして、オス及びメス CC 間の詳細な組織学的解析、AR の発現パターン、細胞増殖に関する解析を行った。アンドロゲン依存性の細胞増殖を明らかにするため、メスマウスにテストステロンプロピオネートを投与し、その CC を解析した。さらに、本研究では、ミュータントマウスのモデル実験として、CC 特異的な Cre ドライバーマウスを用いて、 β -catenin コンディショナルノックアウトマウスおよび恒常的 Wnt/ β -catenin 活性化マウスを作製し、CC 性差形成機構 (細胞増殖制御) におけるアンドロゲン依存性の Wnt/ β -catenin シグナルの意義を解析した。

胎生中期からオス CC 形成領域において、細胞増殖パターン及び AR の発現に、顕著な性差が認められた。器官形成において細胞増殖の制御を担う Wnt/ β -catenin シグナル経路の阻害因子である *Dkk2* は、メスで高く発現し、加えて β -catenin シグナルは、オスで活性化されていた。アンドロゲンを曝露したメスマウスの CC は、 β -catenin シグナルの活性化及び細胞増殖の亢進を示した。また、CC 特異的な β -catenin 条件付き変異 (β -catenin の機能獲得及び喪失) マウスを用いた解析は、CC の細胞増殖制御において β -catenin シグナルの活性化が必要であることを明らかにした。本研究の結果から、CC における細胞増殖制御は、アンドロゲンが *Dkk2* の発現を抑制し、Wnt/ β -catenin シグナルの活性化を介す可能性を示唆した。

本研究は、性差が認められる器官である CC を用いて、その形成過程におけるアンドロゲン依存

性の細胞増殖制御機構及び、同制御における Wnt/ β -catenin シグナルの重要性を明らかにした。本研究の成果は、これまで未解明であったアンドロゲン依存的な細胞増殖制御を伴う‘性差’形成機構の解明に新たな知見を与えるものであり、今後、矮小陰茎やアンドロゲンが関与する前立腺がんなど、様々な病態の解明に貢献することが期待され、博士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638号		
学位授与の日	令和4年3月17日		
氏名	酒谷 英樹		
学位論文の題目	A novel pneumococcal surface protein K of nonencapsulated <i>Streptococcus pneumoniae</i> promotes transmission among littermates in an infant mouse model with influenza A virus co-infection. (IAV 共感染仔マウスモデルにおける無莢膜型肺炎球菌の特異抗原 PspK が鼻腔保菌・伝播に及ぼす影響の検討.)		
論文審査委員	主査	教授	西尾 真智子
	副査	教授	保富 宗城
		教授	井上 徳光

論文内容の要旨

【緒言】

蛋白結合型肺炎球菌ワクチンの世界的な普及に伴い、侵襲性肺炎球菌感染症が減少する一方で、近年ワクチンの無効な肺炎球菌株による感染症が増加している。その中で無莢膜型肺炎球菌 (nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: NESp) が薬剤耐性、及び病原性の観点から臨床上の脅威となることが警鐘されるようになった。NESp に対しては莢膜を標的とした従来のワクチンが無効であるため、新規予防戦略の開発が必要である。肺炎球菌感染の前段階である鼻腔保菌、伝播における NESp の特性に関する報告はなく、これらの機序を解明するための動物モデルの確立が急務であった。本研究では NESp の特異表面蛋白抗原である PspK が上気道上皮への定着促進因子であることに着目し、肺炎球菌の主な宿主である小児を想定した仔マウスにおける NESp の鼻腔保菌および伝播に PspK が及ぼす影響を調査した。

【方法】

生後 4～14 日齢の哺乳仔マウス (BALB/cA) を使用した。

無莢膜型肺炎球菌である MNZ11(NESp 臨床分離株) と MNZ1131(pspK 欠損型 MNZ11 変異株)、及び莢膜型肺炎球菌の 6A(血清型 6 型) を用いた。これらの菌株はアラバマ州立大学バーミングハム校微生物学教室の Moon H. Nahm 教授およびニューヨーク大学微生物学教室の Jeffrey N. Weiser 教授より提供を受けた。

1. NESp の鼻腔保菌数及び鼻腔中の好中球数の感染時日齢における変化

4, 7, 14 日齢時に各肺炎球菌株 7000CFU を経鼻接種し、感染 5 日後の鼻腔中の保菌数と好中球数を調査した。

2. 鼻腔中の好中球が NESp の保菌数に及ぼす影響

3 日齢時に好中球誘導性サイトカインである CXCL1 を点鼻投与し、4 日齢時に肺炎球菌を感染させ感染 5 日後の保菌数を比較した。またマウス骨髄から分離した好中球をウサギ血清とともに共培養を行い、各肺炎球菌株の好中球貪食殺菌抵抗性を比較した。

3. NESp の排菌特性

肺炎球菌伝播の重要な因子である排菌量を調査するため、4 日齢時に肺炎球菌を感染させ 12 日齢時までの排菌量を連日計測した。

4. 鼻腔粘膜の組織学的検討

Gram 染色により肺炎球菌経鼻接種後のマウス鼻腔における肺炎球菌の定着状態を組織学的に評価した。

5. 同胞仔マウス間における NESp 伝播モデルの確立と IAV 共感染の影響

同一ケージ内の 4 日齢の仔マウスの半数を無作為に選択し、“感染群”として肺炎球菌を感染させた後、残りの半数の“接触群”とともに同一ケージ内で飼育した。宿主間伝播の成立は 12 日齢時の接触群の鼻腔洗浄液中の肺炎球菌の有無で評価した。さらに莢膜型肺炎球菌伝播の促進因子であるインフルエンザウイルス (IAV) 共感染を 8 日齢時にを行い、伝播に及ぼす影響を調査した。

6. IAV 共感染が感染群仔マウスの保菌, 排菌に及ぼす影響

5. で得られた感染群の 12 日齢時の保菌数, 及び 9~12 日齢時の排菌数を IAV 共感染の有無で比較した.

7. IAV 共感染が接触群仔マウスの保菌感受性に及ぼす影響

5. の接触群を模したモデルとして, 8 日齢時に IAV または PBS を経鼻接種し, 9 日齢時に低用量の肺炎球菌(500CFU)を感染させ 10 日齢時の保菌数を調査した.

【結果】

1. NESp の鼻腔保菌数及び鼻腔中の好中球数の感染時日齢における変化

4 日齢時感染マウスにおける MNZ11 の保菌数は MNZ1131 より有意に高く, 6A と同等であったが, 感染時日齢に伴い著明な低下がみられた. 一方鼻腔洗浄液中の好中球数(CD11b+, Ly-6G+, CD45+細胞数)は感染時日齢に伴い増加した.

2. 鼻腔中の好中球が NESp の保菌数に及ぼす影響

CXCL-1 点鼻処置は鼻腔中の好中球数を有意に増加させた. CXCL1 処置群では MNZ11 の保菌量が有意に低下した. MNZ11 は 6A と比較し好中球貪食殺菌抵抗性が低かった.

3. NESp の排菌特性

6A は観察期間中を通じて一定数の排菌数が持続していた. MNZ11 は 7, 8 日齢時に排菌数の増加を認めた. MNZ1131 は全観察期間中低値であった. 観察期間中の排菌数総数は NESp 間で有意差はなかったが, 伝播に必要な排菌数閾値を超える割合は, MNZ11 は MNZ1131 より高く, 6A と同等であった.

4. 鼻腔粘膜の組織学的検討

MNZ11 では, 6A と同様に鼻腔粘膜上に付着, または鼻腔中に浮遊する肺炎球菌が複数確認された. MNZ1131 では観察しうる肺炎球菌はわずかだった.

5. 同胞仔マウス間における NESp 伝播の確立と IAV 共感染の影響

IAV 非共感染下では MNZ11 の伝播率は低値(8.3%)であったが, IAV 共感染下では優位に伝播率は上昇(63.6%)し, 6A(70.0%)と同等の伝播率を示した. MNZ1131 は IAV 共感染の有無によらず伝播率は低値であった. 保菌量も同様の傾向を示した.

6. IAV 共感染が感染群仔マウスの保菌, 排菌に及ぼす影響

IAV 共感染は MNZ11 の保菌数に影響を与えなかったが, 排菌数が有意に増加していた. MNZ1131 では排菌数の増加は見られなかった.

7. IAV 共感染が接触群仔マウスの保菌感受性に及ぼす影響

IAV 先行感染群では MNZ11 の保菌率が 44.4%と有意に上昇した. 一方で MNZ1131 では IAV 先行感染の有無によらず保菌が成立しなかった.

【考察】

本研究では NESp の保菌, 排菌, 伝播に対する宿主因子(年齢に伴う好中球誘導), 環境因子(IAV の共感染), 病原体因子(PspK)の関わりを明らかにした.

NESp は生後早期において莢膜型と同等の保菌能を示した. NESp は好中球貪食殺菌抵抗性が低く, 年齢依存的な鼻腔内への好中球誘導が NESp の保菌に関する宿主因子であることが示唆される.

IAV の共感染は①感染群の排菌数を増加し, ②接触群の保菌感受性を亢進することで, NESp の伝播を促進する環境因子である. 過去の報告にある莢膜型程の排菌数の増加は NESp では見られず, NESp は①と②の双方を利用することで伝播を達成していると考えられる.

これら宿主, 環境因子との相互作用により, 病原体因子 PspK は NESp の保菌能を増加させるだけでなく, 伝播能の上昇にも関与していた. これは PspK が NESp の保菌, 伝播の制御における重要な因子であることを示唆している.

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 4 年 2 月 18 日に論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った.

蛋白結合型肺炎球菌ワクチンの世界的な普及に伴い, 侵襲性肺炎球菌感染症が減少する一方で, 近年ワクチンの無効な肺炎球菌株による感染症が増加している. その中で無莢膜型肺炎球菌

(nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: NESp)が薬剤耐性、及び病原性の観点から臨床上の脅威となることが警鐘されるようになった。

NESp に対しては莢膜を標的とした従来のワクチンが無効であるため、新規予防戦略の開発が必要である。肺炎球菌感染の前段階である鼻腔保菌、伝播における NESp の特性に関する報告はなく、これらの機序を解明するための動物モデルの確立が急務であった。本研究では NESp の特異表面蛋白抗原である PspK が上気道上皮への定着促進因子であることに着目し、肺炎球菌の主な宿主である小児を想定した仔マウスにおける NESp の鼻腔保菌および伝播に PspK が及ぼす影響を調査した。

BALBc 仔マウスを使用した。生後日齢の異なる 3 群に NESp 野生株(MNZ11)を経鼻接種し、5 日後の鼻腔中の保菌量と好中球数を調査した。また、好中球誘導性サイトカインである CXCL1 点鼻処置、及び好中球殺菌抵抗性試験を行い好中球誘導と保菌の関連を調査した。次に日齢 4 で肺炎球菌を経鼻接種し連日の排菌量を調査した。さらに同胞兄弟マウスの半分を無作為に選択して日齢 4 に肺炎球菌を経鼻接種し、日齢 12 における肺炎球菌非接種兄弟マウスへの肺炎球菌伝播を調査した。肺炎球菌感染症の増悪因子であるインフルエンザウイルス(IAV)重感染の本モデルへの影響をあわせて検討し、これら仔マウス保菌、排菌、伝播モデルにおける PspK の影響を調査した。

MNZ11 は日齢 4 感染群では莢膜型株と同等の保菌量と、伝播に必要な閾値を超える排菌量を認めた。一方、MNZ11 は莢膜型肺炎球菌株(6A)より好中球殺菌抵抗性が低く、年齢依存的な宿主免疫能の増加に脆弱であった。さらに、IAV 重感染下に MNZ11 は保菌率、排菌数が共に上昇し、それにあわせ著明に伝播が促進された。一方 PspK 欠損株(MNZ1131)は保菌、排菌がいずれも低下し、IAV 重感染による保菌、排菌、伝播の促進が見られなかった。

NESp は仔マウスモデルにおいて生後早期における十分な保菌能を有するとともに、上気道ウイルス感染によって周囲に伝播する機構を有していた。また NESp の特異的抗原である PspK は仔マウスにおける NESp の定着・感染に関与する因子であり、表面蛋白抗原を標的とする新規肺炎球菌感染予防戦略の開発に有用な因子であると考えられる。本論文により潜在的脅威である NESp の感染症予防に貢献できる可能性を示し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639号		
学位授与の日	令和4年3月22日		
氏名	丸岡 慎平		
学位論文の題目	Tumor RNA transfected DCs derived from iPS cells elicit cytotoxicity against cancer cells induced from colorectal cancer patients <i>in vitro</i> . (腫瘍 RNA を導入した iPS 細胞由来樹状細胞による、腫瘍特異的な細胞障害活性の検討)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔和	
	副査	教授 山上 裕機	教授 改正 恒康

論文内容の要旨

【緒言】

樹状細胞 dendritic cells (DCs) は、T 細胞への最も効果的な抗原提示能力を担う免疫細胞である。しかしながら、臨床的に用いる場合、担癌患者から誘導した DCs は成熟能が低く、さらに抗原提示能が低いとされる。われわれは、iPS 細胞 induced pluripotent stem cells (iPSCs) が癌免疫療法に用いる DCs を作製する材料として有用ではないかと考えた。当教室は、以前マウス iPSCs は、骨髄由来 DCs と同等の樹状細胞としての機能及び抗原提示能を有していることを報告した。さらに胃癌・大腸癌に高率に発現する carcinoembryonic antigen (CEA) 遺伝子導入ヒト iPSCs を作成し、*in vitro* での cytotoxic T lymphocytes (CTLs) 誘導が可能であることを報告した。また、*in vivo* でのワクチン効果を確認するべく、CEA transgenic mice 大腸癌モデルを用いて CEA 遺伝子導入マウス iPSCs が、実際に抗腫瘍効果を発揮することを報告した。この iPSCs ワクチンの抗腫瘍効果をより強力なものとするべく、本研究において、担癌患者 iPS 細胞から iPSCs の分化誘導を行い、これに同患者の腫瘍由来 RNA を導入し、*in vitro* においてその抗腫瘍効果を検討した。また、この腫瘍由来 RNA を導入した iPSCs により誘導された CTLs が、neoantigen に対し免疫応答可能かどうかを検討した。

【方法】

実験 I. 担癌患者 iPSCs の分化誘導

3 名の 大腸癌患者ドナーの末梢血単核細胞 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) へ、センダイウイルスベクター (ID Pharma) にて山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立を行った。得られた iPS 細胞を Matrigel コートした dish でフィーダーレス培養を行い、その後 5 ステップ法で iPSCs へ分化誘導を行った。第 1 に bone morphogenetic protein (BMP) 4 を添加し 4 日間培養した。第 2 に vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), stem cell factor (SCF) を添加した StemPro-34 (Thermo Fisher Scientific) に置き換え 2 日間培養した。第 3 に SCF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), thrombopoietin (TPO), Fms-related tyrosine kinase (Flt) -3 ligand, interleukin (IL) -3 を添加した StemPro-34 に変更し、7 日間培養した。第 4 に M-CSF, Flt-3 ligand, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) を添加した StemPro-34 に変更し、3 日間培養した。浮遊してくる細胞を CD14 抗体で標識し、auto MACS Pro (Miltenyi) にて分離した。第 5 に回収した細胞を GM-CSF, IL-4 を加え 5 日間培養し、その後 maturation cocktail として prostaglandin E2 (PGE2), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - α を添加し 2 日間培養後に浮遊細胞を回収した。

実験 II. 担癌患者 iPSCs と単球由来 DCs の抗原提示細胞としての機能の評価

1. 成熟能の比較検討

担癌患者 iPSCs と単球由来樹状細胞の成熟能を比較検討するためにそれぞれの未成熟、成熟 DCs にて表面マーカーの発現 (CD11c, CD80, CD83, CD40, HLA-ABC, HLA-DR) を flow

cytometryにて比較検討した。

2. サイトカイン分泌能の比較検討

担癌患者 iPSDCs と単球由来 DCs のサイトカイン分泌能を比較検討するためそれぞれの未成熟, 成熟 DCs にてサイトカインの分泌 (IFN- γ , IL-12p70, TNF- α) を ELISA 法にて比較検討した。

実験 III. 患者由来癌スフェロイド Cancer tissue-originated spheroids (CTOS)の樹立

3名の大腸癌患者ドナーより CTOS 法にて, 癌スフェロイドを樹立した。ドナーより摘出した癌組織を細断したのちに, Liberase DH solution (Roche Diagnostics)を加え 2 時間溶解分離した。この溶解過程で single cell とならず細胞間接着を維持したままの細胞塊を 100 μ m および 40 μ m の cell strainer を用いて回収し, 培養することで癌スフェロイドの樹立を行った。

実験 IV. 腫瘍 RNA の *in vitro* における増幅と評価

3名の大腸癌患者ドナーから樹立した CTOS より RNeasy plus micro kit (Qiagen)を用いて, total RNA を抽出した。oligo-dT primer [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)VN-3']および T7 strand switch primer [5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCGGG-3']を加え, SuperScript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を用いた逆転写反応にて cDNA を作成した。この cDNA を PCR で増幅した。増幅した cDNA を T7 mMESSAGE mMACHINE Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いることで, *in vitro* 転写し, *in vitro* transcriptional RNA (ivtRNA)を作成した。ivtRNA は変性アガロースゲル電気泳動と, 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて品質の確認を行った。

実験 V. エレクトロポレーション法を用いた iPSDCs への ivtRNA 導入効率の検討

導入効率の検討に先立ち, green fluorescent protein (GFP)の ivtRNA を作成した。エレクトロポレーションは Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)を用いて, square-wave pulse, 500 V, 0.5 ms の条件にて実施した。GFP ivtRNA を 20 μ g/mL から 160 μ g/mL までの各濃度で iPSDCs へエレクトロポレーションした際の GFP タンパクの発現率を flow cytometry にて検討した。

実験 VI. 腫瘍 RNA 導入 iPSDCs による *in vitro* における細胞障害活性誘導能の検討

回収した成熟 iPSDCs へ腫瘍由来 ivtRNA をエレクトロポレーションし iPSDCs-CTOS ivtRNA を得た。Responder をドナー患者の PBMCs, stimulator を腫瘍由来 ivtRNA 導入 iPSDCs とし, 20:1 の割合で 1 週毎に 3 回刺激した。得られた細胞から auto MACS Pro にて CD8(+) CTLs を抽出した。ターゲット細胞として, CTOS を用い, ⁵¹Cr-release assay にて特異的細胞傷害活性を解析した。また, 3名の大腸癌患者ドナーのうち 1 名から樹立した CTOS には高い CEA 発現を認めため, CTOS ivtRNA を導入した iPSDCs (multiple antigen をターゲットとするワクチン) と CEA のみ発現する CEA ivtRNA を導入した iPSDCs (single antigen をターゲットとするワクチン) を作成し, どちらが高い細胞障害活性が誘導されるかを検討した。

実験 VII. 腫瘍 RNA 導入 iPSDCs による *in vitro* における neoantigen をターゲットとした CTLs 誘導能の検討

腫瘍 (CTOS) および正常組織(PBMCs)を次世代シーケンサーにより whole exome 解析し, 腫瘍特異的な遺伝子変異を同定した。遺伝子変異により発生しうる変異ペプチドを *in silico* にて予測した。これらの予測された変異ペプチドの中から, HLA 分子との親和性が高く, RNA シーケンスにより発現量が多いと予測されたペプチドを選出し合成を行った。選出した変異ペプチドに対して, ELISpot assay を用いたバリデーションスタディを実施した。ELISpot assay では腫瘍由来の RNA を導入した iPSDCs (iPSDCs-CTOS ivtRNA)により誘導された CTLs が, 変異ペプチドに対して免疫応答するかを検証した。また, 選出した変異ペプチドを iPSDCs に直接パルスすることで iPSDCs-neoantigen peptide を作成し, これにより誘導した CTLs が変異ペプチドに対し免疫応答するかについても検討した。

【結果】

実験 I. 担癌患者 iPSDCs の分化誘導

3名の大腸癌ドナーの PBMCs からいずれも iPS 細胞の樹立が可能であり, 分化開始後 23 日

目で成熟した iPSCs が分化誘導された。第 1 ステップでは、平坦で粗なコロニーとなり、第 2 ステップでは血管内皮様の紡錘形の細胞集塊を形成した。第 3 ステップの後半になると、ドーム状の CD45 陽性細胞からなる細胞集塊を認め、第 4 ステップでは単球様の小円形の浮遊細胞を多数認めた。これらのほとんどは CD14 陽性細胞であった。第 5 ステップでは、樹状突起を持つ淡明な細胞が現れ、成熟化によりその数も多くなった。形態を単球由来 DCs と比較すると樹状突起の数や長さ、細胞サイズは類似するものであった (図 1)。

実験 II. 担癌患者 iPSCs と単球由来 DCs の抗原提示細胞としての機能の評価

1. 成熟能の比較検討

担癌患者より樹立した iPSCs は単球由来 DCs と同様に maturation cocktail にて成熟し、表面マーカーである CD11c, CD83, HLA-ABC の同程度の発現を認めた。CD80, CD40, HLA-DR については iPSCs において発現が低かった (図 2)。

2. サイトカイン分泌能の比較検討

担癌患者より樹立した iPSCs, 単球由来 DCs いずれも、未成熟な DCs では、ほとんど IFN- γ や IL-12p70 の産生を認めなかったが、成熟した DCs では、IFN- γ , IL-12p70 は共に高い産生を認め、iPSCs と単球由来 DCs で同等であった。また、TNF- α の産生に関しても同等であった (図 3)。

実験 III. 患者由来癌スフェロイド Cancer tissue-originated spheroids (CTOS) の樹立

3 名の大腸癌ドナーの癌組織からいずれも CTOS の樹立が可能であった。腫瘍細胞マーカーである EpCAM の高い発現を確認した。また CD45 の発現は認めなかった。3 名のドナーのうち 1 名において CEA の高い発現を認めた (図 4)。

実験 IV. 腫瘍 RNA の *in vitro* における増幅と評価

腫瘍(CTOS)より RNA を抽出し、増幅することにより、iPSCs へ導入するための十分な量の ivtRNA が得られた。ivtRNA は変性アガロースゲル電気泳動にてスメア状に分布した。また 2100 Bioanalyzer による検討では、正規分布の形を示した (図 5)。

実験 V. エレクトロポレーション法を用いた iPSCs への ivtRNA 導入効率の検討

GFP タンパクをコードした ivtRNA を iPSCs へエレクトロポレーションし flow cytometry にて発現率を検討し、GFP の発現率は、エレクトロポレーション時に加えた GFP ivtRNA の容量依存的に増加し、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上での発現率は 90%程度で一定となった。この結果より以降の ivtRNA の投与量を 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした (図 6)。

実験 VI. 腫瘍 RNA 導入 iPSCs による *in vitro* における細胞障害活性誘導能の検討

3 名の担癌患者ドナーから腫瘍 RNA 導入 iPSCs (iPSCs-CTOS ivtRNA) を作成した。いずれのドナーにおいても iPSCs-CTOS ivtRNA での刺激により誘導された CTLs は自己仮想ターゲットである CTOS に対し、細胞傷害活性をみとめたが、コントロールである iPSCs-GFP ivtRNA により誘導された CTLs は細胞傷害活性を認めなかった。CTOS に CEA の発現を認めた Case 1 においては、single antigen (この場合 CEA) をターゲットとした iPSCs-CEA ivtRNA により誘導された CTLs にも細胞傷害活性を認めた。しかし、multiple antigen をターゲットとした iPSCs-CTOS ivtRNA による細胞傷害活性よりも低かった (図 7)。

実験 VII. 腫瘍 RNA 導入 iPSCs による *in vitro* における neoantigen をターゲットとした CTLs 誘導能の検討

In silico による neoantigen 解析を実施し 12 個の候補変異タンパクを選出した(図 8)。ELISpot assay において、腫瘍由来 ivtRNA を導入した iPSCs-CTOS ivtRNA は、遺伝子変異の結果生じると予測された変異ペプチドの 1 つである No.9 neoantigen (STTA p.Arg300Gln QQFEVLFQSV) に対し免疫応答を示した(図 9)。予測ペプチドを iPSCs にパルスすることで作成した iPSCs-neoantigen peptide により誘導した CTLs では、2 つの予測ペプチドに対して免疫応答し、うち 1 つは上記 No.9 neoantigen と同じペプチドであった(図 10)。

【考察】

今回のわれわれの研究により、担癌患者より作成した iPSDCs は、単球由来 DCs と同等の CD83, HLA-ABC の発現、およびサイトカイン産生能を有することが立証された。しかし、他の細胞表面マーカーについては iPSDCs における発現が低く、成熟化の方法等についてさらなる検討と改善が必要と考えられた。腫瘍由来 RNA を導入した iPSDCs により誘導された CTLs は、高い腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することが証明された。また、single antigen のみをターゲットとしたワクチンモデルよりも、multiple antigen をターゲットとしたワクチンモデルの方がより高い細胞傷害活性を示した。さらに、腫瘍由来 RNA を導入した iPSDCs により誘導された CTLs は、neoantigen に対する免疫応答が可能であることが示唆された。

近年、immune check point inhibitor の登場により、癌免疫治療の有用性は明らかとなったが、それでも有効な症例は限られている。neoantigen のような強力な抗原を提示することによる陽性の癌免疫療法の適応が必要である。われわれは、iPS 細胞は、癌免疫治療の分野において有用な材料であると考え、iPSDCs がんワクチン療法は、臨床応用されれば、癌免疫療法においてこれまでの DC ワクチン療法の問題点を克服するものと確信している。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 4 年 3 月 9 日, 11 日に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。樹状細胞 dendritic cells (DCs) は、T 細胞への最も効果的な抗原提示を担う免疫細胞である。しかしながら、臨床的に用いる場合、担癌患者から誘導した DCs は成熟能が低く、さらに抗原提示能が低いとされる。そこで、学位申請者の所属する外科学第 2 講座では iPS 細胞 induced pluripotent stem cells (iPSCs) が癌免疫療法に用いる DCs を作製する材料として有用ではないかという仮説のもと研究を行ってきた。同講座では、これまでに、マウス iPSDCs は、骨髄由来 DCs と同等の樹状細胞としての機能及び抗原提示能を有していることを報告している。さらに胃癌・大腸癌に高率に発現する carcinoembryonic antigen (CEA) 遺伝子導入 iPSDCs を作成し、*in vitro* および *in vivo* での cytotoxic T lymphocytes (CTLs) 誘導が可能であることを報告した。このたび、学位申請者らは iPSDCs ワクチンの抗腫瘍効果をより強力なものとするべく、担癌患者において iPS 細胞から iPSDCs の分化誘導を行い、これに同患者の腫瘍由来 mRNA を導入し、*in vitro* においてその抗腫瘍効果を検討した。また、この腫瘍由来 mRNA を導入した iPSDCs により誘導された CTLs が、neoantigen に対し免疫応答することが可能かどうかを検討した。

その結果、(1) 3 名の担癌患者の末梢血単核球からいずれも iPS 細胞の樹立が可能であり、分化開始後 23 日目で成熟した iPSDCs が分化誘導された。この iPSDCs は、単球由来 DCs と一部の細胞表面マーカー (CD11c, CD83, HLA-ABC) の発現や、サイトカイン産生能 (IFN- γ , IL-12p70, TNF- α) が同等であることを立証した。(2) また、腫瘍由来 mRNA を導入した iPSDCs により誘導された CTLs は、*in vitro* において腫瘍細胞特異的な細胞障害活性を有することを証明した。(3) さらに、腫瘍由来 mRNA を導入した iPSDCs は、腫瘍特異的な遺伝子変異の結果生じる変異ペプチド (neoantigen) に対する特異的な CTLs の誘導が可能であることを *in vitro* で証明した。これらの結果から、腫瘍由来 mRNA を導入した iPSDCs は、*in vitro* における腫瘍特異的な細胞障害活性を有し、これには neoantigen に対する CTLs の誘導が関与していることが示唆された。

以上より、本論文の検討の結果、iPSDCs がんワクチン療法は、腫瘍特異的な抗原提示の強化による陽性的がん免疫療法として、これまでの DC ワクチン療法の問題点を克服する可能性が示唆され、学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第640号		
学位授与の日	令和4年3月22日		
氏名	神前 拓平		
学位論文の題目	Lumbosacral fusion including sacroiliac joint fixation increases the stress and angular motion at the hip joint : a finite element study		
論文審査委員	主査	教授	中川 幸洋
	副査	教授	田島 文博
		教授	山田 宏

論文内容の要旨

【緒言】

3次元有限要素解析を用いて脊椎骨盤固定術後の股関節における応力の観察を行い、これまでに明らかになっていない脊椎骨盤固定術後の股関節症の発症及び進行予防のメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

【方法】

モデルは非固定モデル(NF)、腰椎固定モデル(L4-5固定;L5F)、腰椎仙椎固定モデル(L4-S1固定;S1F)、腰椎仙椎骨盤固定モデル(L4-S2AI固定;S2AI)を作製した。このモデルに対して400Nの荷重をかけた上で屈曲・伸展・側屈・回旋力を適用(10.0Nm)し、各動きにおいて股関節に働く相当応力と股関節が行う角運動量を調査した。

【結果】

S2AIモデルにおいて、股関節には働く相当応力と角運動量が最も増加していた。

【考察】

これまでの報告から腰椎固定を施行するとその隣接椎間に働く相当応力と角運動量が増加することが示されており、本病態も固定後の隣接関節障害の可能性を示唆する。本解釈は近年報告されているhip-spine relationにおいても妥当なものと考えられる。例えば、ヒトは座位姿勢をとる際に腰椎を後弯、骨盤を後傾させるとともに股関節を屈曲させるという複合的な動きによって座位姿勢をとる。腰椎仙椎骨盤固定術後では、腰椎仙椎、骨盤の動きは失われており、股関節がその動きを代償する必要がある。このため脊椎骨盤固定術後には股関節の必要とされる動きの増加が、応力の増加につながったと考えられ、股関節症の発症、進行リスクを有していると考えられることができる。

腰椎仙椎骨盤固定後に股関節に働く相当応力と角運動量の増加することを有限要素解析にて明らかとした。今後は仙腸関節固定を併用するリスク因子として術後の股関節症をインフォームド・コンセントに加える必要があると考えた。

審査の要旨(審査の日、方法、結果)

令和4年3月10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。

令和4年3月10日 口頭

椎間板に骨移植を行う腰椎椎体間固定モデルに対し椎間板を温存した後側方固定モデルを用いた際に予想される股関節ないしは上位隣接椎間への力学的影響の変化及び臨床成績の予測可能性について述べよ。 紀北分院脊椎脊髄病学 中川幸洋教授 結果;優

令和4年3月10日 筆答

第4腰椎から骨盤まで固定したときに股関節にかかる応力を減らす工夫としてどのようなことが考えられるか記せ。 リハビリテーション医学 田島文博教授 結果;優

令和4年3月10日 口頭

本研究結果をいかにして実臨床に活用するのかについて述べよ。

整形外科 山田宏教授 結果；優

本論文は脊椎骨盤固定術後に発症する股関節症を隣接関節障害という新たな疾患概念を生体力学的に裏付けたものであり、学位論文として価値あるものとした。

学位記番号	博(医)甲第641号		
学位授与の日	令和4年3月22日		
氏名	村上 公英		
学位論文の題目	Prevalence of cervical anterior and posterior spondylolisthesis and its association with degenerative cervical myelopathy in a general population (一般住民調査における頸椎迂りの有所見率及び退行性頸髄症との関連)		
論文審査委員	主査	教授 廣西 昌也	
	副査	教授 山田 宏	教授 中川 幸洋

論文内容の要旨

【諸言】

退行性頸髄症（以下 DCM）は、椎間板疾患、椎体リモデリング、脊椎靭帯の肥大・骨化、脊椎すべり症など、頸椎の加齢性退行性変化を含む疾患概念である。

頸椎前方迂り（AS）と頸椎後方迂り（PS）は、主に椎間板と椎間関節の変性によって起こる。頸椎迂りは、進行すると頸部痛だけでなく、神経根症や脊髄症を引き起こすため、決して放置してはならない疾患である。高齢化社会を迎え、頸椎の退行性変化患者の増加が予想されるが、現在、頸椎迂りと DCM の関連についての報告はほとんどない。頸椎迂りは、頸椎単純 X 線写真（側面像）により比較的容易に診断することができ、頸椎迂りと DCM の関連が明らかになれば、頸椎迂りであると診断された患者において、単純 X 線写真のような比較的使いやすい画像検査で DCM のリスク評価を行うことが期待される。

【目的】

本研究では、性・年齢・椎体レベルに応じた頸椎迂りの有所見率および DCM との関連性を検討することである

【対象と方法】

この横断的観察研究は、適切な倫理委員会によって承認されたもので、本研究は、大規模な集団ベースの磁気共鳴画像（MRI）研究である Wakayama Spine Study の一部である。和歌山県日高川町の山間部と太地町の海岸部において、2008 年から 2010 年にかけてベースライン調査を実施した。日高川町、太地町の住民 1063 人を対象に頸椎単純 X 線、MRI 検査を実施し、除外基準に当てはまらなかった 959 人を対象とした。身長、体重、BMI、握力、脊髄症の兆候（Hoffmann 反射・Babinski 反射、膝蓋腱反射、感覚障害）を評価した。

画像評価として、単純 X 線では、頸椎単純 X 線中間位で C5 椎体中央での脊柱管前後径（CSC 径）、頭側椎体の後下角から尾側椎体の後縁に沿った接線までの距離を迂り距離（2mm 以上で迂り症と定義）、頸椎症は Kellgren-Lawrence 分類を用いて判定した。MRI は 1.5-T Excelart イメージングシステムを用いて、各参加者の仰臥位での頸椎を撮像した。

臨床的 DCM の定義は、脊髄症兆候を有し、かつ MRI で頸髄の圧迫を認めたものとした。

ベースラインの特性は Student の t-test を用いて男女間で比較した。Cochran-Armitage 傾向検定により、頸部脊柱管径、KL グレード、脊椎すべり症有病率の加齢との関連を評価した。KL グレード ≥ 3 および ≥ 4 と AS および PS の有病率は、カイ二乗検定を用いて DCM の有無で比較された。年齢、BMI、CSC 直径は、対でない Student-t 検定を用いて、DCM の有無で比較された。DCM と単純 X 線の関連性を調べるため、年齢、性別、BMI をすべて調整した後、ロジスティック回帰分析を行った。統計学的検定はすべて 0.05 の有意水準で行った。

【結果】

AS の有所見率は C4 椎体高位で最も多く観察され、PS の有所見率は男女とも C4、C5 椎体高位で多く観察された。CSC 径は、女性では年齢とともに有意に狭くなっており、各年齢群において

女性の CSC 径は男性の CSC 径より狭くなっていた。KL ≥ 3 ($p < 0.001$), KL ≥ 4 ($p < 0.001$) の脊椎症は加齢とともに増加した。PS の有所見率は男性 ($p = 0.047$)、女性 ($p = 0.029$) とともに年齢とともに増加した。

CSC 径は、男性では DCM と有意な関連は認めなかったが ($p = 0.11$)、女性では DCM と有意に関連した ($p < 0.0001$)。KL ≥ 3 (男性 : $p = 0.49$ 、女性 : $p = 0.98$)、KL ≥ 4 (男性 : $p = 0.39$ 、女性 : $p = 0.21$) の頸椎症のどちらも男女とも DCM と有意な関連を認めなかった。さらに、AS は男性 ($p = 0.66$)、女性 ($p = 0.70$) で DCM と有意な関連を認めなかったが、PS は男性 ($p < 0.0001$)、女性 ($p = 0.03$) とともに DCM と有意に関連した。

年齢、性別、BMI を調整した後の X 線学的指標における DCM の予測因子を評価するために、多重ロジスティック回帰分析を行った。CSC 径 (オッズ比 [OR]、2.4 ; 95%信頼区間 [CI]、1.6-3.6 ; $p < 0.0001$) および PS (OR、4.3 ; 95%CI、1.7-10.1 ; $p = 0.0011$) は DCM の独立した有意な予測因子であった。さらに、発育性脊柱管狭窄 ($\leq 13\text{mm}$) と PS の同時発生は、DCM のより有意な予測因子であった (OR、19.7 ; 95%CI、5.6-63.1 ; $p < 0.0001$)。

【考察】

AS の有所見率は男性 6.0%、女性 6.3%、PS の有所見率は男性 13.2%、女性 8.9%で、いずれも高齢者に多く見られ、AS は C4 椎体で、PS は C4 椎体または C5 椎体が多かった。元来可動性の大きい下位頸椎が変性により可動性が低下し、それを補うために隣接椎体すなわち中位頸椎レベルでの負荷の増加、強いては椎間関節の変性、椎体変位や迂りを引き起こす可能性があると考えられた。

椎間関節の変性が、年齢とともに増加することは過去の報告でもあるが、今回のような男女間の PS 有所見率の違いは、男女間の労働負荷によるものと考えられた。すなわち今回の対象の地域は農村と漁村地域であり、男性が主に重労働に従事し負荷が大きかった可能性が挙げられた。

AS と DCM の間に関連は認めなかったが、PS と DCM 間に関連を認めた。要因として、Pincer mechanism すなわち頸椎伸展時の上位椎体後下方縁と下位椎体椎弓上前縁間の動的な脊髄圧迫が重要と考えられた。さらに女性では CSC 径が男性より小さく、PS が合併するとさらに DCM 発症リスクが高くなることがわかった。頸椎単純 X 線における CSC 径や PS などのパラメータが、DCM のリスクを予測するために使用され、これらのパラメータが DCM のスクリーニングを容易にする可能性があると考えられた。

【結論】

頸椎迂りは年齢とともに増加し、女性より男性に多くみられた。X 線上の脊柱管狭窄と変性頸椎後方迂りは DCM の予測・診断に有用である可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和4年3月10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。

退行性頸髄症 (以下 DCM) は、椎間板変性、脊椎靭帯の肥大・骨化、脊椎迂りなど、頸椎の高齢性退行性変化を含む疾患概念である。頸椎前方迂り (AS) と後方迂り (PS) は、主に椎間板と椎間関節の変性によって起こり、頸椎迂りは進行すると頸部痛だけでなく、神経根症や脊髄症を引き起こすため、決して放置してはならない疾患である。頸椎迂りは、頸椎単純 X 線側面像により比較的容易に診断することができ、頸椎迂りと DCM の関連が明らかになれば、頸椎迂りであると診断された患者において、単純 X 線写真のような比較的簡便な画像検査で DCM のリスク評価を行うことが期待される。本研究は一般住民 959 人を対象とし、頸椎迂りの有所見率および DCM との関連を検討したものである。

参加者 959 人に対し、単純 X 線側面像は、頸椎単純 X 線中間位で C5 椎体中央での脊柱管前後径 (CSC 径)、頭側椎体の後下角から尾側椎体の後縁に沿った接線までの距離を迂り距離 (2mm 以上で迂りと定義)、頸椎症は Kellgren-Lawrence 分類に準じて判定した。MRI は 1.5-T Excelart イメージングシステムを用いて、各参加者の仰臥位での頸椎を撮像し硬膜管の圧迫の有無を評価した。

申請者は、参加者 959 名の画像を測定した。AS の有所見率は男性 6.0%、女性 6.3%、PS の有所見率は男性 13.2%、女性 8.9%で、いずれも高齢者に多く見られ、AS は C4 高位で PS は C4、C5 高

位が多かった。

CSC 径は、男性では DCM と有意な関連は認めなかったが ($p = 0.11$)、女性では DCM と有意に関連を認めた ($p < 0.0001$)。KL ≥ 3 (男性： $p=0.49$ 、女性： $p=0.98$)、KL=4 (男性： $p=0.39$ 、女性： $p=0.21$) の高度変性は、男女とも DCM と有意な関連を認めなかった。さらに、AS は男性 ($p=0.66$)、女性 ($p=0.70$) で DCM と有意な関連を認めなかったが、PS は男性 ($p < 0.0001$)、女性 ($p=0.03$) とともに DCM と有意に関連を認めた。年齢、性別、BMI を調整した後の X 線学的指標における DCM の予測因子を評価するために、多重ロジスティック回帰分析を行い、発育性脊柱管狭窄 ($\leq 13\text{mm}$) と PS の同時発生は、DCM のより有意な予測因子であることがわかった (OR, 19.7 ; 95%CI, 5.6-63.1 ; $p < 0.0001$)。

本研究により、AS と DCM の間に関連は認めなかったが、PS と DCM 間には関連を認めた。要因として、AS では頸椎前屈時に黄色靭帯の撓みこみが生じないことにより硬膜管の圧迫が生じにくいこと、一方 PS では頸椎後屈時に上位椎体後下角と棘突起基部並びに撓みこんだ黄色靭帯によって硬膜管の圧迫が生じやすいと考えられた。さらに女性では CSC 径が男性より小さく、PS が合併するとさらに DCM 発症リスクが高くなることがわかった。頸椎単純 X 線側面像における発育性脊柱管狭窄と PS の存在が、DCM のスクリーニングに利用できる可能性があると考えられた。

本論文は DCM と頸椎迂りの関連について、一般住民コホートをを用いて明らかにした点で非常に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)乙第1006号		
学位授与の日	令和3年4月20日		
氏名	米良 好正		
学位論文の題目	Association between types of Modic changes in the lumbar region and low back pain in a large cohort.: The Wakayama Spine Study (腰椎における Modic 変化と腰痛の関係 : -The Wakayama Spine Study-)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 園村 哲郎	教授 山田 宏

論文内容の要旨

【背景と目的】

腰痛は機能障害や就労制限、生活の質の低下による精神的苦痛および医療費の増加の原因となることが報告されている。近年、腰椎 MRI は腰痛の原因となり得る所見の一つであり治療方針の決定のために重要視されている。過去の報告から腰痛の原因となる腰椎 MRI の所見の1つに、椎体終板の骨髄の信号強度の変化である Modic 変化がある。1988年に Modic により提唱された Modic 変化は、MRI の T1 および T2 強調像に基づいて、3つの Type に区別される。Type1 は骨髄浮腫と炎症を表し、Type2 は骨髄虚血に伴う脂肪変性に関連し、Type3 は軟骨下骨硬化症を表す。過去の報告において腰痛の画像診断マーカーとしての Modic 変化の役割を提案している研究があるが、解析対象が少ない、対象者に偏りがあるなど結果が一致されていない。他に腰痛の原因とされている椎間板変性や変位などとの交絡因子を検討する必要がある。申請者は、2013年に行われた The second Wakayama Spine Study で撮像した住民 814 例の腰椎 MRI データを用いて、Modic 変化と腰痛および腰痛の程度との関連を調べた。本研究の目的は、腰椎における Modic 変化の各椎間での発現率を調べ、Modic 変化と腰痛および腰痛の程度との関連を明らかにすることである。

【対象と方法】

2013年の The second Wakayama Spine Study の漁村地域である太地町に住む 814 人を対象とした。MRI により測定された終板変化の程度は、Modic 分類に基づいて分類された。Type1 は T1 強調で低信号、T2 強調像で高信号、Type2 は T1、T2 強調像でいずれも高信号、Type3 は T1、T2 強調像ともに低信号とし、椎体幅の 50%以上の変化と定義し腰椎椎間各レベルでの発現率を算出した。椎間板変性は一般的な Pfirrmann 分類を用いて grade4 以上を変性ありとした。椎間板変位は、椎間板の膨隆、突出、脱出の3つで評価した。膨隆は隣接する椎体の後縁を結ぶ線を超えた後方の椎間板膨隆とし、突出は線維輪外への髄核変位とし、脱出は椎間板内髄核が後縦靭帯より後方へ脱出した場合とした。髄核変位スコアは膨隆、突出は1ポイント、脱出は2ポイントとし、腰椎各レベル (L1-S1) でのすべてのスコアを加算した。腰痛は過去1か月の継続する痛みを有りとし、腰痛の程度の評価は Visual analog scale (VAS) スコアを使用して評価した。

さらに Modic 変化と腰痛の関連を年齢、性別、Body mass index (BMI)、椎間板変性、椎間板変位を補正して多変量ロジスティック回帰分析を行った。腰痛の VAS は χ^2 乗検定を用い、Modic 変化と変化なしを比較して χ^2 乗検定にて検討した。

【結果】

腰痛の有病率は男性と女性でそれぞれ 30.9%と 31.5%であった。平均 VAS スコアおよび標準偏差はそれぞれ 12.4±20.8 と 14.3±22.9 だった。腰椎内での Modic 変化は 63.5%で認められた。その中で Type1、Type2、および Type3 は、それぞれ 18.4%、41.9%、2.8%で Type2 が最も多かった。Modic 変化の存在部位は Type1 が L4/5 レベルで最も多く、次に L5/S、L3/4 の順であった (L1/2 で 1.4%、L2/3 で 4.4%、L3/4 で 4.8%、L4/5 で 8.5%、L5/S で 5.5%)。Type2 の

変化は L5/S レベルで最も多く、L3/4 で続いた (L1/2 で 14.0%、L2/3 で 20.0%、L3/4 で 23.3%、L4/5 で 23.2%、および L5/S で 32.7%)。Type3 でも同様の結果が得られ、各レベルでの発現率は L1/2 で 1.8%、L2/3 で 2.1%、L3/4 で 2.7%、L4/5 で 2.7%、L5/S で 2.8% となっておりほぼ同等だった。Type1 の Modic 変化のみが変化なしと比較して腰痛と有意に関連していた (オッズ比: 1.84、95%信頼区間: 1.1-2.9 Modic 変化が無い場合の腰痛をオッズ比 1 とした)。腰痛の VAS は、Type1 の Modic 変化のある被験者の方が、Modic 変化のない被験者よりも有意に高かった (23.9±26.3 vs 9.9±19.4、p <0.05)。

【考察・結論】腰痛と Modic 変化の臨床的意義については未だ解明されていない。申請者は腰椎の Modic 変化について一般住民を対象にした大規模コホートをを用いて、腰痛の原因とされている椎間板変性や椎間板変位を除外しても、Modic type1 が腰痛と有意に関連していることを示した。さらに、腰痛の VAS スコアは、Modic type1 のある被験者の方が Modic 変化のない被験者よりも高く、Modic type1 がより重度の腰痛と関連していることを示した。過去の文献では、Modic type1 は終板の炎症に伴う疼痛に関連すると報告されており、本研究においても同様の結果であり、さらに強い腰痛と関連することが明らかになった。したがって、Modic 変化は、腰痛のより正確な診断と新しい治療方法に役立つ可能性がある。Modic 変化は、有用な腰痛の画像診断マーカーとなり得るため、今後も引き続き解明していく必要がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 3 年 3 月 24 日、25 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。

【背景と目的】

腰痛は機能障害や就労制限、生活の質の低下による精神的苦痛および医療費の増加の原因となる。腰痛の原因となる腰椎 MRI の所見として、椎体終板の骨髄の信号強度の変化がある。1988 年に Modic が提唱した Modic 変化では、MRI の T1 および T2 強調像に基づいて、3 つの Type に区別される。

Type1 は骨髄浮腫と炎症を表し、Type2 は骨髄虚血に伴う脂肪変性に関連し、Type3 は軟骨下骨硬化症を表す。過去の報告において腰痛の画像診断マーカーとしての Modic 変化の役割を提案している研究があるが、解析対象が少ないため結論が出ていない。申請者は 2013 年に行われた The second Wakayama Spine Study で撮像した一般住民 814 例の腰椎 MRI データを用いて、腰椎各椎間における椎体終板の Modic 変化発現率を調べた。また、Modic 変化と腰痛の有無とその程度を Visual analogue scale (VAS) で調べ、それらの関連を明らかにした。

【結果】

以下の結果を得た。1) 腰痛の有病率、腰痛の VAS に性別による有意差は認めなかった。2) 腰椎内の Modic 変化は 63.5% で認められ、Type2 が 41.9% と最も多かった。3) Modic 変化は Type1 が

L4/5 レベルで最も多く、Type2、Type3 の変化は L5/S レベルで最も多かった。4) Modic type1 が変化なしと比較して腰痛と有意に関連していた (オッズ比: 1.84、95%信頼区間: 1.1-2.9)。5) 腰痛の VAS は、Modic type1 のある被験者の方が、Modic 変化のない被験者よりも有意に高かった。

【考察・結論】

腰痛と Modic 変化の臨床的意義については未だ解明されていない。申請者は腰椎の Modic 変化について一般住民を対象にした大規模コホートをを用いて、Modic type1 が腰痛と有意に関連していることを示した。さらに、腰痛の VAS スコアは、Modic type1 のある被験者の方が Modic 変化のない被験者よりも高く、Modic type1 がより重度の腰痛と関連していることを示した。したがって、Modic 変化は、有用な腰痛の画像診断マーカーとなり得ることを、一般住民を対象として初めて示した。加えて、未だ確立したエビデンスのない腰痛の原因に関して、Modic 変化と腰痛が関連していることを示した本研究成果は、腰痛解明の一助となりうる可能性がある。

本論文は、Modic 変化の疫学的実態に関して、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)乙第1007号		
学位授与の日	令和3年4月20日		
氏名	佐々木 貴浩		
学位論文の題目	Radiomics and MGMT promoter methylation for prognostication of newly diagnosed glioblastoma (Radiomics と MGMT プロモーター領域のメチル化を用いた膠芽腫の予後の階層化)		
論文審査委員	主査	教授 園村 哲郎	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 中尾 直之

論文内容の要旨

【目的】

Radiomics とは、本来は定性的である医用画像を数値化して、多くの定量的データを抽出し、診断の精度向上、さらに予後や遺伝子変異などの予測を試みる研究手法である。本研究では膠芽腫の術前 MRI を用いた radiomics 解析を行い、膠芽腫の予後の予測、予後因子である MGMT プロモーター領域のメチル化(pMGMT-met)の予測、さらにこれらを用いた予後の階層化を試みた。

【対象と方法】

関西中枢神経系腫瘍分子診断ネットワークに登録された膠芽腫のうち、初発時 MRI、臨床情報、分子生物学的情報が入手可能な 201 例を対象とした。画像を定量化し、radiomics 解析で抽出された 489 種類の特徴量から、Supervised principal component analysis (SPCA)、ならびに least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) 回帰分析を用いて、予後ならびに pMGMT-met の予測モデル構築を試みた。

【結果】

SPCA では 22 種類の画像特徴量が予後と関連しており、それらを元に radiomic high risk group と low risk group に階層化が可能であった(中央生存期間、15 ヶ月 vs 18 ヶ月、 $p=0.004$)。また、LASSO 回帰を用いた解析で長期生存の予測を試みたところ、80-90%程度の予測精度が得られた。一方、pMGMT のメチル化の有無の予測に有効な画像特徴量はわずか 2 種類のみ同定され、それらを用いた予測モデルの精度も 67%であった。多変量解析の結果、radiomics 解析による階層と pMGMT のメチル化の有無は独立した予後因子であったため、それらを組み合わせた予後の階層化が構築可能であった(中央生存期間、高リスク群:13 ヶ月、中リスク群:18 ヶ月、低リスク群:20 ヶ月、 $p=0.0003$)。

【考察・結論】

本研究では、膠芽腫の予後予測に有効な radiomics 特徴量が検出され、これらを用いた予後の階層化が可能であった。さらに、多変量解析から、radiomics 特徴量によるリスク群別と pMGMT のメチル化の有無とは独立した予後因子であったため、これらを組み合わせることによってより詳細な予後の階層化が可能であった。一方、pMGMT のメチル化の予測に関連する画像特徴量は 2 種類のみで、その精度も 67%と低かった。Radiomics による pMGMT のメチル化の推定精度は過去の報告でも 70%前後で推移しており、MRI 単独での予測は実用的でないと考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和3年3月29日、4月1日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行なった。

Radiomics とは、本来は定性的である医用画像を数値化して、多くの定量的データを抽出し、診断の精度向上、さらに予後や遺伝子変異などの予測を試みる研究手法である。本研究では膠芽腫の術前 MRI を用いた radiomics 解析を行い、膠芽腫の予後ならびに予後因子である MGMT プ

ロモーター領域のメチル化(pMGMT-met)の予測、さらにこれらを用いた予後の階層化を試みた。関西中枢神経系腫瘍分子診断ネットワークに登録された膠芽腫のうち、初発時 MRI、臨床情報、分子生物学的情報が入手可能な 201 例を対象とした。画像を定量化し、radiomics 解析で抽出された 489 種類の特徴量から、Supervised principal component analysis (SPCA)、ならびに least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) 回帰分析を用いて、予後ならびに pMGMT-met の予測モデル構築を試みた。SPCA では 22 種類の画像特徴量が予後と関連しており、それらを元に radiomic high risk group と low risk group に階層化が可能であった。また、LASSO 回帰を用いた解析で長期生存の予測を試みたところ、80-90%程度の予測精度が得られた。多変量解析の結果、radiomics 解析によるリスク群別と pMGMT のメチル化の有無は独立した予後因子であったため、それらを組み合わせた予後の階層化が構築可能であった。一方、pMGMT のメチル化の有無の予測に有効な画像特徴量はわずか 2 種類のみ同定され、それらを用いた予測モデルの精度も 67%であった。

本研究では、膠芽腫の予後予測に有効な radiomics 特徴量が検出され、これらを用いた予後の階層化が可能であった。さらに、radiomics 特徴量によるリスク群別と pMGMT のメチル化有無を組み合わせることによってより詳細な予後の階層化が可能であった。本論文は、膠芽腫における radiomics 解析を用いた予後予測の有効性を示唆したものであり、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1008号		
学位授与の日	令和3年5月18日		
氏名	谷口 隆哉		
学位論文の題目	Prevalence and Associated Factors of Pistol Grip Deformity in a Japanese local residents (日本の一般住民におけるピストルグリップ変形の有所見率および関連因子の検討)		
論文審査委員	主査	教授 中川 幸洋	
	副査	教授 山田 宏	教授 田島 文博

論文内容の要旨

【諸言】

一次性変形性股関節症には大腿骨骨頭頸部移行部外側部の膨隆した症例が存在するが Harris らはこれを Pistol Grip Deformity (PGD) と名付けた。しかし病的意味は不明であった。Femoroacetabular Impingement (FAI) は 2003 年に Ganz らによって報告された疾患概念で股関節痛、変形性股関節症の病因として注目されるようになった。二次性変形性股関節症が多い本邦においても MRI 診断や股関節鏡技術の進歩によりその存在や病態が注目されつつある。FAI には3つの異なるタイプがあり、大腿骨側に主因をおくものを cam type、臼蓋側に主因を置くものを pincer type、双方有する type を combined type と分類されている。近年になり変形性股関節症や股関節痛の発症形態として FAI の関与を示唆する報告は多く認められている。また、大腿骨近位部の形態異常である PGD は cam type による FAI 発症の主要因と証明されてきた。しかしながら本邦における PGD の有所見率などの疫学的実態は不明であり、PGD そのものがどの程度股関節痛や股関節症などの臨床症状と関連しているのか不明である。

【目的】

大規模一般住民コホート調査により、日本人における各年齢層別および男女別の PGD 有所見率を明らかにすること、また股関節痛や脊椎骨盤アライメントなど関連因子との関係を調査する事である。

【対象】

2012 年 10 月 - 2013 年 12 月に行われた第 3 次 ROAD study (The Research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study) の和歌山県内 2 地域 (日高川町、太地町) に参加した一般住民 1575 人(男性 513 人、女性 1062 人、年齢平均 65.6±13 歳(19-94 歳))のうち、データ不備などを除く 1481 人を対象とした。

【方法】

年齢、性別、身長、体重、BMI の他、PGD に関連する因子として過去一か月以内の股関節痛の有無、X 線評価として股関節パラメーターとして PGD の有無、立位股関節正面像より CE (center-edge) 角、mJSW (内側関節裂隙間距離)、脊椎パラメーターとして、立位全脊柱側面像より LL (腰椎前弯角)、SS (仙骨傾斜角)、PT (骨盤傾斜角)、PI (pelvic incidence) を計測した。

【結果】

PGD の有所見率

PGD の有所見率は 73/1481 (4.9%) であり、男性における PGD の有所見率 (52/491 ; 10.6%) は女性 (21/990 ; 2.1%) よりも有意に高かった。また、PGD の有所見率は男女ともに年齢とともに有意に増加した。

対象者背景と PGD との関連

PGD 陽性群は、PGD 陰性群よりも男性、高齢、体重および体重指数(BMI)の割合が有意に高かった。

股関節痛と PGD との関連

2962 関節中股関節痛は 58 関節（男性 2/102；2% 女性 56/2860；2%）であり、PGD の有無と股関節痛には関連性は認められなかった（ $P=0.9984$ ）。PGD 両側例は 29/71（40.8%）であった。

股関節パラメーターと PGD との関連

性別、年齢、BMI、CE 角、mJSW を説明変数とした多重ロジスティック回帰分析では、PGD の存在が CE 角または mJSW と有意に関連付けられておらず、性別、年齢、および BMI は、PGD の存在と有意に関連していた。

脊椎骨盤パラメーターと PGD との関連

性別、年齢、BMI LL、PT、PI を説明変数とした多重ロジスティック回帰分析では、PGD は PT のみ正のオッズ比 95%CI（1.00-1.10）を示した。

【考察】

FAI に関する大規模コホート研究は海外を含めて非常に少なく、症状のない日本人股関節を対象とした PGD の有所見率またその関連因子についての報告は本研究が最初である。本研究では、本邦の PGD の有所見率は 4.9%（男性 10.6%、女性 2.1%）であった。Goodman らは、2,665 人の献体を調べ、215 股関節（8%）で PGD をもつことを報告しているが、これと比較すると日本人の PGD の有所見率は欧米よりも低いことが示唆された。過去の研究では、PGD の罹患率と年齢の間に相関関係が報告されておらず、むしろ、男性の PGD は 15 歳から減少傾向があると報告されている。Allen らは、cam type FAI を有する 113 例を調べ、PGD が先天性である可能性のあることを報告した。しかし、本研究では PGD の有所見率が男女ともに年齢とともに増加し、さらに PGD は体重および BMI と有意に関連していたことより、日本人においては大腿骨頸部の先天的形態異常に加えて、後天的に獲得された要因を含むことが示唆された。

本研究のもう一つの特筆すべき結果として、PGD の存在は股関節痛または関節裂隙狭小化に相関していなかった。欧米の研究では、PGD は隣接する臼蓋との間で impingement を受けやすく、股関節痛、FAI、および変形性関節症の一般的な原因であるとされている。この差異は、日本人と欧米人の股関節形態の違いによるものと考えられ、PGD の病理学的意義が日本と欧米諸国によって異なることを示唆している。

本研究には、いくつかの limitation が存在する。まず、横断研究により、評価変数間の因果関係は証明されておらず、縦断研究による Follow-up が必要である。第二に、被験者(任意参加者)が 2 つの地域から募集されたため、健康意識の強い人の高齢者の参加者が多かったことと地域選択のバイアスがあることに留意する必要がある。

【結論】

本研究では、日本の一般集団における PGD の疫学的指標と関連因子との関係を明らかにした。PGD は先天性形態学的異常と考えられていたが、本邦では PGD に関連するいくつかの後天性獲得要因が存在する可能性がある。さらに、PGD そのものは股関節痛と関連していなかった。本研究結果は今後、PGD の病因と臨床的意義に関する新しい知見を提供すると考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 3 年 4 月 26 日、28 日論文審査委員は学位申請者の出席を求め上記論文について審査を行った。

本研究は、大腿骨近位部の特徴的形態である Pistol Grip Deformity について、大規模一般住民コホート調査により、日本人における各年齢層別及び男女別の有所見率や病態を明らかにし、股関節痛等との関連性を明らかにしたものである。一次性変形性股関節症には大腿骨近位部の膨隆した症例が存在する場合があります。Harris らによって Pistol Grip Deformity (PGD) と名付けられたものの、その病的意義は不明であった。しかし、2003 年に Ganz らに報告された疾患概念である Femoroacetabular impingement (FAI) は、股関節痛、変形性股関節症の病因として注目されるようになり、FAI と PGD との関係性が指摘されるようになった。即ち PGD は FAI 発症の主要因であると欧米から報告された。しかし本邦では PGD の有所見率などの疫学的実態は不明で、PGD と股関節痛や股関節症との関連性についても報告がなかった。今回の調査では、大

規模一般住民コホート調査に参加した 1575 人のうち、データ不備などを除く 1481 人を対象とし検討を行った。PGD の有所見率は 4.9%であり、男性における PGD の有所見率 (10.6%) は女性 (2.1%) よりも有意に高く、PGD 両側例は 40.8%であり欧米の報告と同等であった。股関節痛は、PGD の有無と股関節痛には関連性は認められなかった。さらに PGD を説明変数とした多重ロジスティック回帰分析では、性別、年齢、BMI のみと相関を認めた。即ち、本研究では、PGD の有所見率が男女共に加齢に伴い増加し、さらに PGD は体重および BMI と有意に関連していたことより、欧米では先天的な骨形態異常と考えられている PGD は、日本人においては先天的形態異常に加えて、後天的要因を含むことが示唆された。本研究のもう一つの特筆すべき結果として、PGD は股関節痛、関節裂隙狭小化との相関は認めなかった。欧米では PGD は臼蓋と **impingement** を受け、股関節痛、FAI、及び変形性関節症の原因とされている。しかし、臼蓋が浅く、頸部が細いといった日本人特有の骨盤形態の違いにより、日本人においては股関節痛を生じず、その深屈曲を要する床上生活スタイルが軽微で経年的に生じる **impingement** が後天的に発生する理由であると考えられる。これは、PGD の臨床的意義が日本と欧米では異なることを示唆している。本研究では、日本人における PGD の疫学的指標と関連因子とを明らかにした。欧米では、PGD は先天性形態学的異常と考えられていたが、本邦では PGD に関連する幾つかの後天性獲得要因が存在すること、更に、PGD は股関節痛との関連性は認めなかった。本研究結果は、PGD の病因と臨床的意義に関する新しい知見を提供すると考えられる。本論文は、日本人における PGD の概念を確立する有意義なものであり、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1009号		
学位授与の日	令和3年6月15日		
氏名	中井 康雄		
学位論文の題目	Regional abnormality of functional connectivity is associated with clinical manifestations in individuals with intractable focal epilepsy. (安静時機能的磁気共鳴画像法を用いた難治性てんかんにおける脳内ネットワークに関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 中尾 直之

論文内容の要旨

【緒言】

薬剤抵抗性難治性てんかんの治療選択肢として、発作を軽減し生活の質改善を目的とした外科的治療がある。しかし、外科手術の良い適応とされる海馬硬化症による側頭葉てんかんや新皮質てんかんでも、発作消失率はそれぞれ 53-84%、36-76%と報告されており、その治療成績は十分とは言えない。この理由として、てんかん原性領域の広がりや従来検査だけでは十分な術前評価ができていないことが考えられる。本研究では、安静時機能的磁気共鳴画像法 (rs-fMRI) を用いて全脳レベルで脳内ネットワーク解析を行い、多数の健常者のデータからネットワーク指標の基準値を定義し、次に個々の難治性部分てんかん患者において、どの程度強いネットワークがあるかを調べた。そして、強いネットワークも持つ領域数と種々の臨床パラメータとの相関を調べ、本手法がてんかん患者の脳の状態の評価に応用できるかを検討した。

【方法】

対象は 2012 年から 2014 年の間に、和歌山南放射線科クリニックにて rs-fMRI を撮影された難治性部分てんかん患者 25 名、健常者 582 名である。3 テスラ MRI にて、構造画像 (T1 強調画像) と機能画像を撮影した。構造画像に基づき、既存の解剖アトラスを用いて、全脳を 388 領域に分割した。各領域で、機能画像で得られた BOLD 信号変化の平均を求め、全ての領域間で相互相関係数を計算し、有意に高い相関が認められた領域間を機能的結合ありと定義した。その結果からネットワーク構造を隣接行列で表し、各領域におけるネットワークの特徴を示す指標として、二種類の脳機能指標を用いた。一つは他の領域とどの程度つながっているかを示唆する次数中心性 (nAC0、局所ネットワーク) で、二つ目の指標はつながりの強い領域とどの程度つながっているかを示す固有ベクトル中心性 (nAC1、全体ネットワーク) である。これら二種類のネットワーク指標に関して、582 名の健常者の分布を用いて、平均+2×標準偏差を超えるような値を示すネットワーク異常領域をそれぞれ “aR0” と “aR1” と定義した。てんかん患者と健常者において nAC0 と nAC1 の度数分布、aR0 と aR1 の数の相対度数分布をカイ二乗検定で比較した。てんかん患者において、aR0 と aR1 の数と罹病期間との関連は、年齢の影響を取り除いたスピアマン偏相関係数にて、抗てんかん薬の数、the Quality of Life in the Epilepsy Inventory (QOLIE-31)、Liverpool Seizure Severity Scale (LSSS) との関連はスピアマン順位相関係数を用いて検討した。aR0 と aR1 が空間的一致度を kappa 係数を用いて評価した。kappa 係数は 0.41-0.6 であれば中等度 (moderate)、0.61-0.8 であれば高度 (substantial)、0.81-1.0 であればほぼ完全 (almost perfect) な一致と定義される。また、有意水準は $p=0.05$ とした。

【結果】

患者背景：対象となった難治性部分てんかん症例は、平均年齢 39.1 歳 (範囲 16-70)、男性 16 名、女性 9 名、平均罹病期間 19.8 年 (範囲 1-42)、病因は構造異常 11 例、感染 1 例、不明 8 例である。平均抗てんかん薬内服数は 2.8 剤 (範囲 1-5)、平均 QOLIE-31 は 58.4 (範囲 31.6-80.2)、平均 LSSS は 25 (範囲 5-50) であった。一方、健常者は男性 222 名、平均年齢 34.2 歳 (範囲 18-83) で、女性 360 名、平均年齢 36.8 歳 (範囲 18-84) であった。中心性の分布：難治性部分て

んかん患者群と健常者群では、局所ネットワークを示す nAC0 と全体ネットワークを示す nAC1 の値の分布に有意な差を認めた ($p < 0.005$)。また、てんかん患者群では健常者群に比べて、高値 (0.5 以上) と低値 (0.2 未満) を示す領域が多い傾向にあった。ネットワーク異常領域：局所ネットワーク (aR0) と全体ネットワークの異常領域 (aR1) の相対度数分布は、てんかん患者群と健常者群との間に有意な差を認めた (aR0 ; $p < 0.00001$, aR1 ; $p = 0.00078$)。aR0 は健常者群よりてんかん患者群の方が有意に多かったが ($p = 0.00033$)、aR1 には二群間に有意差は認めなかった ($p > 0.05$)。一方、aR0 と aR1 それぞれの数の中には正の相関を認めた (相関係数 = 0.68、 $p = 0.00016$)。また、aR0 と aR1 の空間的分布は中等度一致していた (kappa 係数：平均 0.518、標準偏差 0.162)。ネットワーク異常領域と臨床パラメータの関係：aR0 の数は、罹病期間、抗てんかん薬数、LSSS との間に有意な正の相関を認めた。一方、aR1 の数は罹病期間のみ正の相関を認めた。

【考察】

難治性部分てんかん患者群と健常者群との間では、ネットワークの特徴を示す指標となる値の分布に有意な差を認めた。すなわち、局所ネットワークの異常領域や全体ネットワークの異常領域がてんかん患者群で増えている傾向が認められた。今回のわれわれの研究結果は発作症状の異なる難治性部分てんかん患者であっても、共通したネットワークの特徴が存在する可能性を示唆しており、過去のメタアナリシスの報告と一致する。

局所ネットワークの異常領域の数は、てんかん患者群の方が健常者群に比べて有意に多かった。また、てんかん患者群における局所ネットワークの異常領域の数が多きほど、罹病期間が長く、抗てんかん薬の内服数も多く、さらに、てんかん重症度スケールが重症となるという結果であった。このことから、局所ネットワークの異常領域の数は、てんかん患者の臨床症状を評価するのに有用である可能性が示唆された。

全体ネットワークの異常領域の数は、てんかん患者群と健常者群との間に有意差は認めなかった。しかし、局所ネットワークと全体ネットワークの異常領域の空間的な一致が中等認められたことと、てんかん患者における全体ネットワークの異常領域の数が多きほど罹病期間が長い傾向にあったことなどから、全体ネットワークの異常領域の数も他の何らかのてんかんの病態を反映している可能性があると考えられる。

【結論】

多数の健常者のデータと個々の難治性部分てんかん患者を比較することで、異常なネットワークを示す領域を同定でき、本手法が客観的なてんかんの病勢を示す指標となる可能性が示唆された。さらなる症例の蓄積により、本手法が、難治性てんかん患者における外科治療の適応、抗てんかん薬や外科治療の治療効果判定に有用となり、個々のてんかん患者の脳の状態に合わせた治療方針の決定に役立つことが期待される。また、てんかん分類ごとに解析を行うことでてんかん病態解明の一助となることも期待される。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 3 年 5 月 31 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。

本研究は、安静時機能的 MRI を用いた難治性部分てんかん患者におけるネットワーク異常に関する研究である。本研究の特徴は、多数の健常者のデータを用いて、脳機能指標の基準値を定義し、個々の難治性部分てんかん患者において、その基準値を超えるような強いネットワークを示す領域がどの程度認められるかを示したことである。

本研究では、難治性部分てんかん患者 25 名、健常者 582 名を対象とした。全脳を 388 領域に分類し、その領域毎に他領域とのつながりの多さの指標となる脳機能指標を算出した。各領域の脳機能指標に関して、健常者の分布を用いて、平均 + 2 × 標準偏差を超える値を示した領域をネットワーク異常領域と定義した。これに基づき、個々のてんかん患者におけるネットワーク異常領域の数と罹病期間、抗てんかん薬数、the Quality of Life in the Epilepsy Inventory (生活の質の指標)、Liverpool Seizure Severity Scale (発作重症度の指標) との相関を調べた。

脳機能指標の度数分布とネットワーク異常領域の数の相対度数分布について、カイ二乗検定を行うと、難治性部分てんかん患者と健常者の間で有意差を認めた。また、てんかん患者群ではネ

ネットワーク異常領域の数が多い傾向にあった。さらに、スピアマン順位相関係数を用いて、ネットワーク異常領域の数と臨床パラメータと相関をみると、ネットワーク異常領域の数と、罹病期間、抗てんかん薬の数、てんかん発作重症度との間に正の相関を認めた。

これらの結果から、ネットワーク異常領域の数は、てんかんの重症度を評価する上で、有用な指標となる可能性が示唆された。また、多数の健常者から導かれた基準値を用いる本手法は、難治性部分てんかん患者一人一人のてんかんの病勢を客観的に評価できる可能性を有しており、本研究は、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1010号		
学位授与の日	令和3年6月15日		
氏名	武田 早織		
学位論文の題目	Pneumococcal capsular phase shift is associated with invasion into cell-to-cell junctions and is inhibited by macrolides (莢膜フェーズ変化による肺炎球菌の細胞間隙侵入とマクロライド系抗菌薬による阻害作用の研究)		
論文審査委員	主査	教授 西尾 真智子	
	副査	教授 雑賀 司珠也	教授 保富 宗城

論文内容の要旨

【緒言】

肺炎球菌は、しばしば宿主の鼻咽頭腔にコロニー形成をする。大多数の細菌は宿主に侵入し粘膜表面に定着するが、肺炎球菌は急性中耳炎や急性副鼻腔炎のような非侵襲性感染症のみならず肺炎や敗血症、髄膜炎を含めた侵襲性感染症の原因にもなりうる。

肺炎球菌は周囲の環境に適応し莢膜の状態を変化させる。これを **Phase Variation** という。この変化による肺炎球菌の形態は莢膜の薄い **Transparent** 型と莢膜が厚い **Opaque** 型の2つに分類されている。**Transparent** 型肺炎球菌は、上皮細胞に付着する際に有利であり、**Opaque** 型肺炎球菌は厚い莢膜による補体や抗体の菌体への結合を阻害することで、食食処理に抵抗し、組織内で長期に存在する。一般的に **Opaque** 型肺炎球菌は病原性が高く、肺炎球菌感染症の特徴の一つである感染部位における強い炎症所見との関連が示唆される。

本研究では、肺炎球菌の重要な病原因子である莢膜多糖体に注目し、肺炎球菌が **Phase** を変化させることにより、宿主防御機構から巧妙に逃避し、鼻咽腔に定着し、保菌が成立するメカニズムを解明するとともに、マクロライド系抗菌薬の免疫修飾作用による **Phase** コントロールの可能性について検討した。

【方法】

肺炎球菌株は臨床分離株である BG7322 株（血清型 6A 型）、L82016 株（血清型 6B 型）を用いた。

1、肺炎球菌の付着と定着の可視化

Minimum essential medium (MEM) 培養液で 3×10^5 個の Detroit562 細胞を 37°C 、5% CO_2 で 80% コンフルエントの状態まで約 1 週間培養した。肺炎球菌 BG7322 株 1×10^5 CFUs を添加し共培養した。約 24 時間後まで 6 時間おきに培地を交換しながら、肺炎球菌を位相差顕微鏡、共焦点顕微鏡で撮影した。

2、細胞付着菌における莢膜多糖体の定量化と抗菌薬の作用

Modified Eagle Medium (MEM) 培養液で 3×10^5 個の Detroit562 細胞をコンフルエントの状態まで培養し、1/32 MIC CAM 添加 MEM に変更のうえ **Transparent** 型肺炎球菌 1×10^5 colony forming units (CFUs) 添加し 24 時間培養した。その後、4% パラホルムアルデヒドにて固定し、6A 型ウサギ抗血清を用いて蛍光免疫染色した後、共焦点顕微鏡で莢膜を撮影し画像解析した。

3、浮遊菌における莢膜多糖体の定量化と抗菌薬の作用

Todd-Hewitt+Yeast extract (THY) 培養液で肺炎球菌を $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$ まで前培養し 10 倍希釈した後、1/32MIC のクラリスロマイシン (CAM) 添加 THY 培養液、1/32MIC のアモキシシリン (AMPC) 添加 THY 培養液あるいは THY 培養液 (コントロール群) にて再度 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.5$ となるまで増殖させ、コロニー数、**Transparent** および **Opaque** 株の比率を検討し、また莢膜多糖体量は 6B 型に対するモノクローナル抗体を用いて inhibition ELISA 法により定量評価した。

【結果】

1、肺炎球菌の付着と定着の可視化

肺炎球菌は莢膜の厚さにより **Transparent** 型と **Opaque** 型に分かれる。

位相差顕微鏡、共焦点顕微鏡の観察によって **Transparent** 型は細胞間隙に侵入するのに対して、**Opaque** 型では細胞間隙に侵入できず、細胞表面上に付着し増殖することがわかった。

2、肺炎球菌と上皮細胞の共培養での検討

共培養する前の **Transparent** 型と比較すると細胞に付着後、莢膜が肥厚していた。一方、共培養した培地に CAM を添加することで、莢膜の肥厚が抑制された。

3、培養液中での検討

OD600nm=0.5 の時点でのコロニー数は CAM 群、AMPC 群、コントロール群で有意差は認められなかったが、CAM 群では AMPC 群やコントロール群に比較して **Transparent** 型肺炎球菌の比率が上昇し、それに伴い莢膜多糖体量が有意に低下した。

【考察】

今回の結果で肺炎球菌は上皮細胞へ付着すると細胞間隙から組織内へ侵入し **Transparent** 型肺炎球菌から **Opaque** 型肺炎球菌に変化することを確認した。また、CAM は **Transparent** 型肺炎球菌から **Opaque** 型肺炎球菌への変化を抑制することがわかった。**Transparent** 型肺炎球菌は莢膜が薄いことで表面抗原により上皮への付着に有利であり、**Opaque** 型肺炎球菌は莢膜を厚くすることで生体防御から回避すると考えられる。今までの報告として敗血症患者では鼻咽腔で 89%が **Transparent** 型肺炎球菌であるのに対し、血液中では 63%が **Opaque** 型肺炎球菌であった。また当研究室においては急性中耳炎患者の鼻咽腔より中耳貯留液の方が **Opaque** 型肺炎球菌が有意に多いことが臨床的に証明された。このことから CAM の通常の殺菌作用とは異なる作用により、**Opaque** 型肺炎球菌を抑制する、つまり莢膜多糖体量を減少させることで宿主の免疫学的排除を容易にし、重症感染症の治療へ寄与すると考えられた。

【まとめ】

肺炎球菌に対する従来の抗菌薬治療は PK/PD 理論に基づいた治療戦略であるが、急性中耳炎を初め感染症には肺炎球菌の病原性を視野に入れた治療の検討が必要と考えられ、肺炎球菌の感染メカニズムと莢膜多糖体の変化に着目し抗菌薬による変化を検討した。その結果、CAM は肺炎球菌の莢膜産生を抑制し、**Transparent** 型肺炎球菌から **opaque** 型肺炎球菌への変化を阻止することで宿主側の補体の結合、オプソニン化による貪食作用などの免疫学的排除をしやすくすることが考えられ、従来の抗菌薬治療とは異なったメカニズムでの感染防御をするという CAM の新しい有効性を示した。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年6月1日、2日に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。

肺炎球菌は周囲の環境に適応し莢膜の状態を変化させる。これを Phase Variation という。この変化による肺炎球菌の形態は莢膜の薄い **Transparent** 型と莢膜が厚い **Opaque** 型の2つに分類されている。本論文では肺炎球菌の重要な病原因子の一つである莢膜多糖体に注目し、肺炎球菌が Phase を変化させることにより、宿主防御機構から巧妙に逃避し、鼻咽腔に定着し、保菌が成立するメカニズムを解明するとともに、マクロライド系抗菌薬の免疫修飾作用による Phase コントロールの可能性について検討した。

肺炎球菌株は臨床分離株である BG7322 株（血清型 6A 型）、L82016 株（血清型 6B 型）と、Detroit562 細胞を用いて肺炎球菌の付着と定着の過程を位相差顕微鏡、共焦点顕微鏡にて静止画と動画で撮影した。また細胞付着菌、浮遊菌における莢膜多糖体量を定量化し、抗菌薬（クラリスロマイシンやアモキシシリン）を添加して莢膜の変化を定量評価した。

その結果、**Transparent** 型肺炎球菌は細胞間隙に侵入するのに対して、**Opaque** 型肺炎球菌では細胞間隙に侵入できず細胞表面上に付着し増殖することがわかった。また、**Transparent** 型肺炎球菌は細胞に付着後、莢膜が肥厚し、クラリスロマイシンを添加することで莢膜の肥厚が抑制された。さらに、OD600nm=0.5 の時点でのコロニー数はクラリスロマイシン群、アモキシシリン

群、コントロール群で有意差は認めなかったが、クラリスロマイシン群ではアモキシシリン群やコントロール群に比較して Transparent 型肺炎球菌の比率が上昇し、それに伴い莢膜多糖体量が有意に低下した。

以上の結果から、本研究により Transparent 型肺炎球菌は上皮細胞へ付着すると細胞間隙から組織内へ侵入し Opaque 型肺炎球菌に変化することが初めて証明された。さらにクラリスロマイシンが肺炎球菌の莢膜産生を抑制し、Transparent 型肺炎球菌から Opaque 型肺炎球菌への変化を阻止することで宿主側の補体の結合、オプソニン化による貪食作用などの免疫学的排除を容易にすることが考えられ、従来の抗菌薬治療とは異なったメカニズムでの感染防御をするというマクロライド系抗菌薬の新しい有効性を示したことから、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)乙第1011号		
学位授与の日	令和3年7月20日		
氏名	中村 有貴		
学位論文の題目	Preoperative detection of KRAS mutated circulating tumor DNA is an independent risk factor for recurrence in colorectal cancer (大腸癌術前における KRAS 変異血中循環腫瘍 DNA 測定の再発予測因子としての有用性)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔和	
	副査	教授 橋本 真一	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

【諸言】

大腸癌術後の血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) の検出は再発のリスク因子であることが近年報告されている。一方、術前の ctDNA の検出と再発との関連については膵癌や乳癌における報告が散見されるものの、大腸癌においては明らかではない。大腸癌根治切除術後には ctDNA の検出頻度は著明に減少することが報告されていることから、術後の ctDNA の評価では、再発リスクの高い患者を十分に抽出できない可能性がある。

本研究では、大腸癌における術前の ctDNA の検出と再発、予後を含む臨床病理学的因子との関連について検討を行った。ctDNA の検出にはデジタル PCR (digital droplet PCR, ddPCR) を用いた。また、大腸癌組織においては、約 40% に KRAS 変異が検出され、KRAS 変異を有する大腸癌は再発や予後の不良因子とされることから、KRAS 遺伝子をターゲットとして、KRAS 変異 ctDNA を測定し、臨床病理学的因子および再発、予後との関連について評価した。

【対象・方法】

2017 年 4 月から 2018 年 12 月に当科で大腸癌手術を行った 180 例を対象とし、術前に採取した血漿より ctDNA を抽出、KRAS exon2 の変異を ddPCR を用いて測定し、臨床病理学的因子 (年齢、性別、原発部位、組織型、腫瘍深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、TNM 分類、術前血清 CEA 値) との関連、および、リンパ節転移、遠隔転移との関連について検討した。化学療法、放射線療法、内視鏡治療など術前治療を行った症例や重複癌を有する症例は除外した。さらに、180 例のうち遠隔転移を有する症例および術後癌遺残を認めた症例、在院死症例を除き、根治切除術を施行しえた 150 例において、KRAS 変異 ctDNA の検出と再発、予後との関連を評価した。

【結果】

① KRAS 変異 ctDNA の検出と臨床病理学的因子との関連

180 例中 59 例 (32.8%) で KRAS 変異 ctDNA が検出された。変異アレル頻度 (mutant allele frequency, MAF) の中央値は 0.20% であった。KRAS 変異 ctDNA は組織型が高分化腺癌以外 ($p=0.027$)、深達度 T3 以深 ($p=0.006$)、リンパ管侵襲陽性 ($p=0.036$)、静脈侵襲陽性 ($p=0.005$)、StageIV ($p=0.043$) の症例で有意に検出率が高かった。

② KRAS 変異 ctDNA の検出とリンパ節転移、遠隔転移との関連

単変量解析において、リンパ節転移のリスク因子として組織型が高分化腺癌以外 ($p=0.013$)、深達度 T3 以深 ($p<0.001$)、リンパ管侵襲陽性 ($p<0.001$)、静脈侵襲陽性 ($p<0.001$)、術前血清 CEA 高値が ($p<0.001$) が挙げられ、KRAS 変異 ctDNA においては検出例でリンパ節転移が多い傾向を認めた ($p=0.051$)。一方で遠隔転移のリスク因子としては、深達度 T3 以深 ($p=0.001$)、リンパ管侵襲陽性 ($p=0.013$)、静脈侵襲陽性 ($p=0.002$)、術前血清 CEA 高値 ($p<0.001$)、KRAS 変異 ctDNA の検出 ($p=0.043$) が挙げられた。多変量解析においては、KRAS 変異 ctDNA の検出はリンパ節転移 (OR 1.11; $p=0.772$)、遠隔転移 (OR 1.68; $p=0.301$) いずれにおいても有意なリスク因子ではなかった。

③ KRAS 変異 ctDNA の検出と再発、予後との関連

150 例中 21 例 (14.0%) に再発を認めた (観察期間中央値 24 か月)。Kaplan-Meier 法において術前 KRAS 変異 ctDNA 検出症例は無再発期間 (Recurrence-free interval, RFI) ($p=0.002$)、無再発生存期間 (Recurrence-free survival, RFS) ($p=0.025$) とともに有意に短く、Cox 比例ハザード回帰分析においても、術前 KRAS 変異 ctDNA 検出症例は RFI (HR 3.08; $p=0.012$)、RFS (HR 2.18; $p=0.044$) とともに有意に不良であった。

【考察・結語】

本研究において、術前の KRAS 変異 ctDNA の検出は再発、予後に関する独立したリスク因子であることが明らかとなった。術前に KRAS 変異 ctDNA を測定することで、再発リスクの高い症例をより抽出できる可能性があり、検出症例に対しては術後経過を厳重に観察する必要があるとともに、術後補助化学療法を検討する際の有用な指標となりうる可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和 3 年 7 月 6 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、大腸癌における術前の KRAS 変異血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) の検出と臨床病理学的因子との関連について明らかにするとともに、術前の KRAS 変異 ctDNA の検出は再発、予後に関する独立したリスク因子であることを示したものである。

これまで、大腸癌術後の ctDNA の検出は再発のリスク因子であることが報告されていたが、大腸癌術前の ctDNA の検出と再発との関連については明らかではなかった。大腸癌根治切除術後には ctDNA の検出頻度は著明に減少することが報告されていることから、術後の ctDNA の評価では、再発リスクの高い患者を十分に抽出できない可能性があると考えられたため、本論文では術前の ctDNA 測定の有用性について検討された。

対象は当院で大腸癌手術を行った 180 例で、術前に採取した血漿より ctDNA を抽出、KRAS exon2 の変異をデジタル PCR を用いて測定し、臨床病理学的因子 (年齢、性別、原発部位、組織型、腫瘍深達度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、TNM 分類、術前血清 CEA 値) との関連、および、リンパ節転移、遠隔転移との関連について検討された。180 例中 59 例 (32.8%) で KRAS 変異 ctDNA が検出され、KRAS 変異 ctDNA は組織型が高分化腺癌以外 ($p=0.027$)、深達度 T3 以深 ($p=0.006$)、リンパ管侵襲陽性 ($p=0.036$)、静脈侵襲陽性 ($p=0.005$)、StageIV ($p=0.043$) の症例で有意に検出率が高いことが示された。また、KRAS 変異 ctDNA の検出とリンパ節転移、遠隔転移との関連については、単変量解析において、KRAS 変異 ctDNA 検出症例はリンパ節転移が多い傾向があり ($p=0.051$)、遠隔転移も多かったが ($p=0.043$)、多変量解析においては、KRAS 変異 ctDNA の検出はリンパ節転移 (OR 1.11; $p=0.772$)、遠隔転移 (OR 1.68; $p=0.301$) いずれにおいても有意なリスク因子ではなかった。

さらに、180 例のうち根治切除術を施行しえた 150 例において、KRAS 変異 ctDNA の検出と再発、予後との関連について評価された。150 例中 21 例 (14.0%) に再発を認め (観察期間中央値 24 か月)、Kaplan-Meier 法において術前 KRAS 変異 ctDNA 検出症例は無再発期間 (Recurrence-free interval, RFI) ($p=0.002$)、無再発生存期間 (Recurrence-free survival, RFS) ($p=0.025$) とともに有意に短く、Cox 比例ハザード回帰分析においても、術前 KRAS 変異 ctDNA 検出症例は RFI (HR 3.08; $p=0.012$)、RFS (HR 2.18; $p=0.044$) とともに有意に不良であった。

以上の結果より、術前の KRAS 変異 ctDNA の測定は再発、予後予測マーカーとして非常に有用であることが示された。術前 KRAS 変異 ctDNA 検出症例に対しては術後経過を厳重に観察する必要があるとともに、術後補助化学療法を検討する際の指標となる可能性が示唆されるなど、術前の KRAS 変異 ctDNA の測定は、大腸癌診療における有用なバイオマーカーとなり得る可能性があると考えられ、本論文を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1012号		
学位授与の日	令和3年9月21日		
氏名	三谷 泰之		
学位論文の題目	Optimum therapeutic strategy for meconium-related ileus in very-low-birth-weight infants (極・超低出生体重児における胎便関連性腸閉塞に対する至適治療方針)		
論文審査委員	主査	教授 井篁 一彦	
	副査	教授 村田 晋一	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

【緒言】

胎便関連性腸閉塞(meconium related ileus: MRI)は、超・極出生体重児に好発する胎便排泄遅延を特徴とする機能性腸閉塞症である。さらに、胎児期に未熟な腸管蠕動によって腸内に停滞した胎便の水分が過剰に吸収されることによって胎便が粘稠になり、二次的に器質的腸閉塞をきたす。保存的治療に反応する軽症例から消化管穿孔あるいはうっ滞性腸炎により死亡する重症例まで広いスペクトラムを有する疾患群である。

日本小児外科学会の新生児外科に関する全国調査の2018年の集計では、主な新生児外科疾患の死亡率は4.4%であったが、消化管穿孔は10.7%と高い死亡率であった。新生児特有の消化管穿孔をきたす疾患として壊死性腸炎、限局性腸管穿孔およびMRIがある。壊死性腸炎は、一度発症すると予後不良であるが、母乳栄養やプロバイオティクスの予防投与などで発症率が減少傾向を示している。また、限局性腸管穿孔は早期に診断されれば、予後良好な疾患である。一方、MRIの穿孔症例の予後は不良で、特に超低出生体重児での死亡率が70%であったとする報告もある。予後不良の原因は、治療方が確立されていないために、穿孔あるいはうっ滞性腸炎に至る症例が多いためと考えられる。

本研究では、超・極出生体重児(出生時体重 1,500g 未満の新生児: Very-low-birth-weight infants: VLBWs)におけるMRIの病態を明らかにし、至適治療方針を確立することを目的とする。本研究により、MRIの至適な治療方針を確立することで、VLBWの生存率の向上に貢献できる。

【目的】

VLBWにおけるMRIの病態を明らかにし、至適治療方針を確立することを目的とした。

【対象】

2009年から2019まで当院NICUで治療を行ったVLBWのMRI 42例を対象とした。

【方法】

MRIは、胎便排泄遅延(グリセリン浣腸に反応せず胎便の排出を認めない)を呈し、ガストログラフィン注腸(Gastrografin enema: GaE)でmicro colonを認めた症例と定義した。当院NICUのMRIに対する治療方針は、VLBWに対して全症例に出生直後数時間以内にグリセリン浣腸を行い、反復して行ったグリセリン浣腸に対して反応便を認めない場合に診断的治療として、GaEを行い、反応便がみられず、腹部膨満が悪化する場合や単純X線写真で穿孔を疑う場合は早期開腹手術を行うことを基本としてきた。

当院NICUで治療したVLBWにおいてMRI群の病態を当院の非MRI群と性差、在胎週数、出生体重、体重の標準偏差、子宮内胎児発育遅延の割合、母体因子について比較し検討した。また、当院NICUにおける治療方針の妥当性について、2013年に日本小児外科学会学術・先進医療検討委員会が行ったアンケート調査の結果と比較し検討した。

ガストログラフィンが拡張腸管内に流入した症例では、高率に胎便排出が得られているという臨床的経験から、手術適応を検討するために、GaE2回目までに拡張した腸管まで造影剤が流入

した症例を A 群、逆流しなかった症例を B 群として、性差、在胎週数、出生体重、体重の標準偏差、子宮内胎児発育遅延の割合、発症日、穿孔率、手術の割合、在院日数、死亡率についてウィルコクソンの符号順位検定にて 2 群間を比較した(Figure1)。

【結果】

MRI の発症率は 11.3%(42/371)であった。患者因子では、単変量および多変量解析では、在胎週数において、MRI 群(27w1d (22w2d-34w2d)) は非 MRI 群(29w1d (22w0d-36w3d))と比較し早産であった($P<0.01$)。また、単変量解析で出生体重において、MRI 群 (744 g (339-1495 g)) は非 MRI 群(1104 g (384-1495 g))よりも小さかった($P<0.01$)。母体因子について有意差は認めなかった。(Table1,2)

A 群の全症例において、24 時間以内に胎便が排出され、手術症例は認めなかった。B 群において、12 例(57.1%)が手術となり($P<0.01$)、そのうち 6 例(28.6%)で消化管穿孔を認めた($P<0.01$)。GaE に関係する消化管穿孔は認めなかった。在院日数において、A 群が B 群よりも短期であった ($P=0.013$)(Table3)。死亡率は、2.4%(1/42)で、手術症例は全例生存した。

【考察】

本研究では、MRI 症例の病態として、非 MRI 症例と比較し、在胎週数が短く、体重が小さいことが示され、これらの結果は過去の報告と一致していた。性差、子宮内胎児発育、母体因子などでは差はなかった。また、胎児期に腸管蠕動障害を起こす原因となるような因子で差は認めず、病態解明につながる因子は同定できなかった。

本研究では、当院の VLBWs における MRI 症例に対する治療は、全症例の死亡率が 2.4%、消化管穿孔例を含む手術症例の死亡率が 0%と良好な結果であった。また、退院時に全例経管栄養が確立できていた。出生後すぐからのグリセリン浣腸、グリセリン浣腸無効時の GaE、GaE 無効時や穿孔疑い時の早期手術という当院の治療方針の妥当性が示された。

本研究では、手術適応について、GaE 所見に注目し、2 回の GaE までにガストログラフィンが拡張した腸管に流入した症例としていない症例で比較検討した。その結果、ガストログラフィンが流入した症例すべてで手術を回避でき、2 回の GaE で拡張部まで流入しなかった症例の 57.1% が手術となり、28.6%で消化管穿孔を発症していた。よって、2 回の GaE で拡張部まで流入しない症例は、腹部膨満が改善せず消化管穿孔をきたすリスクが高く、手術適応であることが示唆された。また、GaE に直接関係する消化管穿孔は認めなかった。熟練した医師が注意深く行えば、VLBWs に対する GaE は安全に施行可能なことが示された。

本研究では、VLBWs における MRI の明確な治療方針を初めて報告した。本治療方針は、VLBWs における MRI 患者の生存率向上に貢献できる可能性がある。

【結語】

MRI 症例の病態として、非 MRI 症例と比較し、在胎週数が短く、体重が小さいことが示された。VLBWs の MRI に対する当院が行っている治療方針である、出生後すぐからのグリセリン浣腸、グリセリン浣腸無効時の GaE、GaE 無効時の早期手術、は至適な治療方針であることが示唆された。また、2 回のガストログラフィン注腸で拡張部まで造影剤が流入しない場合は、臨床症状の悪化や穿孔を予防するために早期手術が勧められる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和3年8月24日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は、当院での超・極低出生体重児(出生時体重1,500g未満の新生児：Very-low-birth-weight infants: VLBWs)における胎便関連性腸閉塞 (meconium-related ileus: MRI)の症例における病態および至適治療方針を検討したものである。

2009年から2019まで当院NICUで治療を行ったVLBWsのMRI 42例を対象とした。MRIは、胎便排泄遅延 (グリセリン浣腸に反応せず胎便の排出を認めない) を呈し、ガストログラフィン注腸(Gastrografin enema: GaE)でmicro colonを認めた症例と定義した。当院NICUのMRIに対する治療方針は、VLBWsに対して全症例に出生直後数時間以内にグリセリン浣腸を行い、

反復して行ったグリセリン浣腸に対して反応便を認めない場合に診断的治療として、GaEを行い、反応便がみらず、腹部膨満が悪化する場合や単純X線写真で穿孔を疑う場合は早期開腹手術を行うことを基本としてきた。当院NICUで治療したVLBWsにおいてMRIの病態を当院の非MRI 329例と性差、在胎週数、出生体重、体重の標準偏差、子宮内胎児発育遅延の割合、母体因子について比較した。続いて、ガストログラフィンが拡張腸管内に流入した症例では、高率に胎便排出が得られているという臨床的経験から、手術適応を検討するために、GaE2回目までに拡張した腸管まで造影剤が流入した症例をA群、逆流しなかった症例をB群として、性差、在胎週数、出生体重、体重の標準偏差、子宮内胎児発育遅延の割合、発症日、穿孔率、手術の割合、在院日数、死亡率について2群間を比較した。

MRIの発症率は11.3%(42/371例)であった。患者因子では、単変量および多変量解析では、在胎週数において、MRI群(27w1d(22w2d-34w2d))は非MRI群(29w1d(22w0d-36w3d))と比較し早産であった($P<0.01$)。また、単変量解析で出生体重において、MRI群(744g(339-1495g))は非MRI群(1104g(384-1495g))よりも小さかった($P<0.01$)。母体因子について有意差は認めなかった。A群の全症例において、24時間以内に胎便が排出され、手術症例は認めなかった。B群において、12例(57.1%)が手術となり($P<0.01$)、そのうち6例(28.6%)で消化管穿孔を認めた($P<0.01$)。GaE手技に直接関係する消化管穿孔は認めなかった。在院日数において、A群がB群よりも短期であった($P=0.013$)。死亡率は、2.4%(1/42)で、手術症例は全例生存した。以上の結果より、MRI症例では、在胎週数が短く、体重が小さいことが示された。また、出生後すぐからのグリセリン浣腸、グリセリン浣腸無効時のGaE、GaE無効時の早期手術、は至適な治療方針であり、2回のGaEで拡張部まで造影剤が流入しない場合は、臨床症状の悪化や穿孔を予防するために早期手術が勧められることが示され、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1013号		
学位授与の日	令和3年10月19日		
氏名	金子 富美恵		
学位論文の題目	Neutrophil infiltration in co-housed littermates plays a key role in nasal transmission of <i>Streptococcus pneumoniae</i> in an infant mouse model (乳仔マウスの鼻腔を介した肺炎球菌伝播における好中球の役割)		
論文審査委員	主査	教授 西尾 真智子	
	副査	教授 井上 徳光	教授 保富 宗城

論文内容の要旨

【緒言】

肺炎球菌は、1歳までに30~50%の健康児の鼻咽頭に保菌されるとともに、急性中耳炎や鼻副鼻腔炎などの耳鼻咽喉科領域感染症、肺炎や敗血症、髄膜炎など侵襲性感染症の重要な原因菌となる。

肺炎球菌の鼻腔での保菌には、肺炎球菌を保菌する宿主(保菌宿主)から肺炎球菌を保菌しない新たな宿主(非保菌宿主)に伝播する必要がある。伝播の過程は、保菌宿主の鼻腔から肺炎球菌が排菌され、非保菌宿主の鼻腔に付着したのちに、非保菌宿主の鼻腔に定着するという3つの重要な段階より成立する。

本研究では、哺乳仔マウスを用いた肺炎球菌伝播モデルを用い、鼻腔における肺炎球菌の伝播における非保菌宿主側の要因について検討した。

【方法】

マウスは、4日齢の哺乳仔マウス(C57BL6/J)を用いた。肺炎球菌株は、TIGR4(血清型4型: Jeffrey N. Weiser 教授、ニューヨーク大学微生物学教室より提供)を用いた。

肺炎球菌伝播モデルは、同腹仔マウスの半数を感染群として無作為に選択し、TIGR4株5000 CFUを無麻酔で鼻腔内に接種した。肺炎球菌接種を行わなかった半数の同胞仔マウスは、接触群として、母マウスと共に感染群と同一ケージで飼育した。

肺炎球菌の経鼻接種後8日間(12日齢まで)まで観察を行った(観察期間1:菌接種後1~5日、観察期間2:菌接種後4~8日目)。各観察期間の最終日にマウスを安楽死させた。また、すべての同胞仔マウスに肺炎球菌を接種していない無処置マウスを異なるケージで飼育し、非接触群とした。

1. 感染群からの肺炎球菌の排菌群における肺炎球菌獲得

各観察期間の5日間(菌接種後1~5日あるいは4~8日)、Trypticase Soy 寒天培地上に仔マウス鼻腔を10回タッピングし鼻汁を採取、36°Cで一晩培養しコロニー数を評価した。感染群の結果を保菌宿主鼻孔からの肺炎球菌の排菌、接触群の結果を非保菌宿主鼻孔への肺炎球菌の侵入と定義した。

2. 同腹仔マウス間における肺炎球菌伝播の確立

菌接種後5または8日目、安楽死後に仔マウス鼻腔をPBS 200 µLにて洗浄し、得られた鼻腔洗浄液中の肺炎球菌コロニー数を、鼻腔粘膜における肺炎球菌の保菌と定義した。

3. 鼻腔内への好中球およびマクロファージの浸潤

2.で得られた鼻腔洗浄液中の好中球数及びマクロファージ数をフローサイトメトリーにて解析した。CD11b⁺、Ly-6G⁺、CD45⁺細胞を好中球(顆粒白血球)、CD11b⁺、Ly6G⁻、F4/80⁺細胞をマクロファージ(単球)として評価した。

4. 鼻腔粘膜の免疫組織学的検討

感染群への菌接種後8日目に全ての仔マウスを安楽死させ鼻腔組織を採取、組織切片を作成。抗肺炎球菌4型莢膜抗血清により肺炎球菌を染色、加えて抗マウスミエロペルオキシダーゼ(MPO)抗体にて染色された顆粒球を好中球と定義し、免疫組織学的検討を行った。

5. 鼻腔粘膜におけるケモカイン mRNA の発現

PBS による鼻腔洗浄後の仔マウス鼻腔を溶解バッファー600 μL で洗浄し、得られた検体より RNA を単離、cDNA に逆転写したのち、RT-PCR にて炎症性ケモカイン (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CCL2) の mRNA 発現を評価した。

6. 低用量接種による鼻腔保菌モデル

9 日齢の C57BL/6J 雌仔マウス群と、前日に組換え CXCL1 を鼻腔内投与した同日齢子マウス群に、肺炎球菌 TIGR 4 株 100 CFU を無麻酔で鼻腔接種した。菌接種後 3 日目に仔マウスを安楽死させ、PBS 200 μL による鼻腔洗浄液を採取、鼻腔洗浄液中の肺炎球菌数、フローサイトメトリーによる好中球とマクロファージ数を評価した。

【結果】

1. 保菌宿主 (感染群) 鼻孔よりの肺炎球菌排出と非保菌宿主 (接触群) 鼻孔への侵入

感染群の肺炎球菌排菌数は菌接種後 4 日目にピークに達した以後プラトーとなった。半数以上の接触群仔マウスの鼻腔で肺炎球菌の獲得が確認されたが、観察期間中に肺炎球菌の排菌が持続的に検出されたのは 1 匹のみであった。

2. 仔マウス間における肺炎球菌の保菌・伝播の確立

菌接種後 5 日目、8 日目ではほぼ全ての感染群仔マウスで肺炎球菌が定着していたにもかかわらず、伝播が成立した接触群仔マウスは 1 匹のみであった。

3. 鼻腔内への好中球およびマクロファージの浸潤

鼻粘膜に浸潤したマクロファージ数は 3 群間で同程度であったが、好中球数は、菌接種後 8 日目に感染群と接触群が共に非接触群よりも増加した。

4. 鼻腔粘膜の免疫組織学的検討

感染群仔マウスでは、肺炎球菌と好中球の集合体が鼻腔粘膜に付着していた。接触群仔マウスでは、抗肺炎球菌莢膜抗体にも陽性を示す好中球が鼻腔内で少数検出された。非接触群では好中球の蓄積を示さなかった。

5. 鼻腔粘膜におけるケモカイン mRNA の発現

菌接種後 5 日目、8 日目では、CXCL1、CXCL2、CXCL5 の発現レベルは感染群仔マウス鼻腔で有意に上昇した。CXCL1 は、接触群においても有意に増加した。CCL2 は菌接種後 8 日目に、感染群、接触群いずれも非接触群より高レベルを示した。

6. 低用量接種による鼻腔保菌モデル

肺炎球菌の保菌率は、CXCL1 の前処理によって、統計的な有意性はないも 80% から 20% へと低下した。鼻腔洗浄液中の好中球数は CXCL1 の前処理によって有意な増加をみたが、マクロファージは CXCL1 前処理の有無で有意差はなかった。

【考察】

これまで肺炎球菌の伝播機序の解明、とりわけ宿主の免疫応答については十分にはされていない。

本研究では、感染群の鼻腔より肺炎球菌が十分量が排菌され、細菌学的、また病理学的に接触群の鼻腔まで到達していたにもかかわらず、接触群における保菌成立に至らなかった。

とりわけ、接触群の鼻腔における CXCL1 の発現亢進に伴う好中球の鼻腔への集簇が重要であり、好中球が宿主間伝播抑制機構の中心であることを示唆する結果である。

接触群を模した低用量接種モデルでは、CXCL1 前処理によって鼻腔に好中球が誘導され、肺炎球菌の定着率が低下した。

この結果は、これまで報告されていた保菌宿主 (感染群) からの排菌量に加え、新たな非保菌宿主 (接触群) の免疫応答が、肺炎球菌の宿主間伝播を規定する重要な因子であることを示唆するものである。

肺炎球菌の保菌が成立する前段階である宿主間における伝播の機序の解明は、肺炎球菌伝播の抑制による新たな肺炎球菌感染症治療の標的として重要と考える。

【結論】

本研究により、宿主の鼻腔に集簇した好中球は、肺炎球菌の宿主間伝播の重要な制御因子で

あることが明らかとなった。本研究結果は、肺炎球菌伝播の抑制による新たな肺炎球菌感染症治療の可能性を示す基盤となる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和3年10月5日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め上記論文について審査を行った。

肺炎球菌は約半数の健康児の鼻腔に保菌され、耳鼻咽喉科領域感染症、侵襲性感染症の重要な原因菌となるが、そのためには肺炎球菌を保菌する宿主（保菌宿主）から肺炎球菌を保菌しない新たな宿主（非保菌宿主）に伝播する必要がある。本研究では、哺乳仔マウスによる肺炎球菌伝播モデルを用い、保菌宿主の鼻腔から肺炎球菌が排菌され、非保菌宿主の鼻腔に付着したのちに、非保菌宿主の鼻腔に定着するという3段階における、非保菌宿主側の要因について検討した。

肺炎球菌伝播モデルは、4日齢の同腹哺乳仔マウス(C57BL6/J)群の半数を感染群として無作為に選択し、肺炎球菌 TIGR4 株 5000CFU を鼻腔内に接種し、肺炎球菌接種を行わなかった半数の同胞仔マウスを接触群として、母マウスと共に感染群と同一ケージで飼育した。これら2群において、肺炎球菌の感染群鼻孔よりの排出、接触群の鼻孔への侵入、両群の鼻腔における保菌を評価した。また、すべての同胞仔マウスに肺炎球菌を接種していない無処置マウスを非接触群として異なるケージで飼育し、3群間における鼻腔への炎症細胞の浸潤、鼻腔組織の免疫染色、炎症性ケモカイン発現を比較した。

結果、感染群の鼻腔より肺炎球菌が十分排菌され、接触群の鼻腔に到達していたにも関わらず、接触群鼻腔での肺炎球菌保菌成立には至らなかった。接触群の鼻腔には肺炎球菌とともに好中球が集簇、CXCL1 を中心としたケモカインの発現が増加した。さらに、肺炎球菌接触群の獲得肺炎球菌量を模した低菌量接種モデルにて、CXCL1 前処理により鼻腔に好中球が集簇し、肺炎球菌の保菌が低下することを確認した。

これまで肺炎球菌の伝播機序、とりわけ宿主の免疫応答については十分には解明されておらず、本研究により、これまで報告されていた保菌宿主からの排菌量に加え、新たな非保菌宿主（接触群）の好中球を中心とした免疫応答が、肺炎球菌の宿主間伝播を規定する重要な因子であることが初めて示された。肺炎球菌の保菌が成立する前段階である宿主間における伝播の機序の解明は、肺炎球菌伝播の抑制による新たな肺炎球菌感染症治療の可能性を示す基盤となり得ることから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第1014号		
学位授与の日	令和3年11月16日		
氏名	渡邊 高士		
学位論文の題目	Asymptomatic patent processus vaginalis is a risk for developing external inguinal hernia in adults:A prospective cohort study (無症状腹膜鞘状突起の開存は、成人の外鼠径ヘルニア発症のリスク因子である：前向き観察研究)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 北野 雅之	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

【諸言】

鼠径ヘルニアに対する修復術は世界で年間約2千万件行われており、その生涯発生率は、男性で27%、女性で3%と言われている。鼠径ヘルニアは小児期と中高年以降の2峰性に発症し、20代30代の年齢層での発症は少ない。一般的に小児期のヘルニア発症の原因は先天的な腹膜鞘状突起の開存が原因であると考えられている。この腹膜鞘状突起の開存は、成長とともに消失するのか、または成人以降も開存し続けて成人の外鼠径ヘルニア発症の原因となるのか、明らかではない。剖検例での報告では鼠径ヘルニアの既往のない男性の15-30%に腹膜鞘状突起の開存を認めたとの報告がある。今回の研究では腹膜鞘状突起の開存率と長さや開口径が年齢ごとにどのように変化するか、また、腹膜鞘状突起開存と鼠径ヘルニア発症との関連について明らかにすることを目的とする。

【対象と方法】

対象：2013年4月～2015年3月の2年間に、和歌山県立医科大学消化器外科と教育関連施設にて腹腔鏡手術を行った1008症例（腹腔鏡によるヘルニア修復術、過去に鼠径ヘルニアの手術を受けた事のある症例、癒着等により観察できなかった症例を除く）を対象とした。

方法：腹腔鏡手術時に気腹圧を8-12mmhgで内鼠径輪の観察を行い腹膜鞘状突起の開存の有無を確認し、腹膜鞘状突起開存を認めた場合は、メモリ付き鉗子を用いて開口径と長さを左右それぞれ測定した。腹腔鏡手術から3年間追跡調査し、腹部エコー検査や腹部CT検査等の画像的診断、手術記録より鼠径ヘルニア発症を診断した。年齢ごとの腹膜鞘状突起の開存を調べるため、症例を20歳未満、40歳未満、60歳以下、75歳未満、75歳以上でグループ化し検討した。

【結果】

① 腹膜鞘状突起の開存率

1008症例中の169例(16.8%)に腹膜鞘状突起の開存を認めた。男性では119例(20.6%)、女性は50例(11.6%)の開存を認めた($p < 0.01$)。右の腹膜鞘状突起の開存は93例(55%)、左は41例(24%)、両側は35例(21%)であった($p < 0.01$)。

② 世代による腹膜鞘状突起の開存率の変化

各年齢層での開存率は20歳未満3例(9.1%)、40歳未満7例(15.2%)、60歳未満33例(14.7%)、75歳未満74例(17.0%)、75歳以上52例(19.3%)であり、年齢層で開存率に有意な差は認めなかった($p = 0.11$) (Figure 1)。また腹膜鞘状突起の長さや開口径についても各年齢層に置いて差は認められなかった($p = 0.87$, $p = 0.71$)。

③ 鼠径ヘルニア発症におけるリスク因子の解析

鼠径部を観察した1008例のうち、3年間フォローできたのは765人(死亡67例、追跡不能183例)であった。3年間のフォローにて外鼠径ヘルニアを発症したのは計8例であった。

鼠径ヘルニア発症した症例と発症しなかった症例の臨床的因子を比較検討したところ、性別、腹膜鞘状突起開存、右の腹膜鞘状突起の長さと同径に有意差を認めた。

外鼠径ヘルニアを発症したのは計8例の全員が男性であったため、男性における鼠径ヘルニ

ア発症した症例と発症しなかった症例の臨床的因子を比較検討したところ、腹膜鞘状突起開存、右の腹膜鞘状突起の長さや直径に有意差を認めた (Table 2)。

男性の腹膜鞘状突起有りの症例からのヘルニア発症率は 4.8% (5 例/105 例)、腹膜鞘状突起を認めなかったグループからの発症は 0.9% (3 例/332 例)であった。男性における鼠径ヘルニア発症のリスクファクターに関する多変量解析の結果、腹膜鞘状突起を認めることが独立したヘルニア発症のリスク因子であった ($p=0.0222$)。

腹膜鞘状突起の長さに関するヘルニア発症のリスクに関して多変量解析を行ったところ、右腹膜鞘状突起の長さが独立したリスク因子であった ($p=0.0293$)。

【考察・結語】

本研究において、腹膜鞘状突起の開存率は、小児期より成人に至るまで年齢で変化しないことが明らかとなった。また、成人のヘルニア発症に腹膜鞘状突起の開存が大きく関係していることが明らかとなった。特に男性の右側の無症状な腹膜鞘状突起の開存は将来のヘルニア発症の因子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)

令和3年10月21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、外科手術を行う頻度の高い疾患の一つである成人の鼠径ヘルニアの原因が、新生児期から残存する腹膜鞘状突起の開存に起因するかを検討したものである。

2013年4月～2015年3月の2年間に、当院と教育関連施設にて腹腔鏡手術を行った1008症例を対象とし、腹腔鏡手術時に内鼠径輪の観察を行い腹膜鞘状突起の開存の有無を確認、腹膜鞘状突起開存を認めた場合は、開口径と長さを測定した。その後、腹腔鏡手術から3年間追跡調査し、鼠径ヘルニア発症の有無を診断した。年齢ごとの腹膜鞘状突起の開存を調べるため、症例を20歳未満、40歳未満、60歳以下、75歳未満、75歳以上の5つにグループ化し検討した。

その結果、1008 症例中の 169 例 (16.8%) に腹膜鞘状突起の開存を認め、男性では 119 例 (20.6%)、女性は 50 例 (11.6%) と男性で有意に腹膜鞘状突起の開存をみとめた ($p<0.01$)。さらに世代による腹膜鞘状突起の開存率の変化については、各年齢層での開存率は 20 歳未満 3 例 (9.1%)、40 歳未満 7 例 (15.2%)、60 歳未満 33 例 (14.7%)、75 歳未満 74 例 (17.0%)、75 歳以上 52 例 (19.3%) であり、年齢層で開存率に有意な差は認めなかった ($p=0.11$)。また腹膜鞘状突起の長さや開口径についても各年齢層に置いて差は認められなかった ($p=0.87$, $p=0.71$)。鼠径部を観察した 1008 例のうち、3 年間フォローできたのは 765 人で、3 年間のフォロー期間中、外鼠径ヘルニアを発症したのは 8 例であった。

外鼠径ヘルニアを発症したのは計 8 例の全員が男性であったため、男性において鼠径ヘルニア発症した症例と発症しなかった症例の臨床的因子を比較検討した。男性の腹膜鞘状突起有りの症例からのヘルニア発症率は 4.8% (5 例/105 例)、腹膜鞘状突起の開存を認めなかったグループからの発症は 0.9% (3 例/332 例)であった。成人男性における鼠径ヘルニア発症のリスクファクターに関する多変量解析の結果、腹膜鞘状突起を認めることが独立したヘルニア発症のリスク因子であった ($p=0.0222$)。さらにヘルニア発症のリスクに関して多変量解析を行ったところ、右腹膜鞘状突起の長さが独立したリスク因子であった ($p=0.0293$)。以上のことから、腹膜鞘状突起の開存率、長さや開口径は、小児期より成人に至るまで年齢により変化しないことが明らかとなり、成人のヘルニア発症に腹膜鞘状突起の開存が大きく関係していることが明らかとなった。特に男性の右側の無症状な腹膜鞘状突起の開存は将来のヘルニア発症の因子となる可能性が示唆され、本論文は今後鼠径ヘルニア発症予防治療に向けた新たな知見を示したものであり、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1015号		
学位授与の日	令和4年3月8日		
氏名	松村 修一		
学位論文の題目	Oncolytic virotherapy with SOCS3 enhances viral replicative potency and oncolysis for gastric cancer (胃癌において SOCS3 を発現させる腫瘍溶解型ウイルスは複製能と腫瘍溶解能を増強する)		
論文審査委員	主査	教授	橋本 真一
	副査	教授	山上 裕機
		教授	改正 恒康

論文内容の要旨

【諸言】

進行胃癌の標準治療は系統的な外科切除であるが、切除不能な場合は抗癌剤治療、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤の適応となる。しかし治療法はまだ数少く、胃癌に対する新たな治療法の開発が強く望まれている。そこで我々はウイルス療法に注目した。癌細胞でのみ複製するよう遺伝子操作された oncolytic viruses(以下 OV)は癌細胞に感染し、腫瘍溶解を誘発する。その中でも oncolytic herpes simplex viruses(以下 oHSVs)の研究を自施設で行ってきたが、一部の細胞株にはウイルス療法に耐性があることが分かった。

本研究では、サイトカインシグナルの重要な調節因子である SOCS family に注目した。その中でも SOCS3 は HSV が細胞に感染すると初期段階から誘導され、HSV の複製に適した環境を作ると報告されている。そのため SOCS3 を発現する oHSV は胃癌細胞内でも効果的に複製し、腫瘍溶解を起こすことができると考えた。そこで T-SOCS3 という SOCS-3 を発現する新たな oHSV を生成し、ウイルスの複製能と殺細胞効果について第3世代型 oHSV である T-01 と比較検討した。

【方法】

- ① ヒト胃癌細胞株 MKN1、MKN28、MKN78 に対して抗 SOCS3 抗体を用いて免疫染色を行い、胃癌細胞株における SOCS3 の発現の有無を確認した。また先のヒト胃癌細胞株において、T-01 感染による SOCS3 の発現の変化を western blotting assay にて確認した。
- ② BAC system を用いて SOCS3 発現 oHSV (以下 T-SOCS3) を作成。作成した T-SOCS3 が SOCS3 を細胞内で発現しているかどうかを Vero 細胞と MKN 1 に 0.01pfu/cell で感染させ、western blotting assay を用いて確認した。T-SOCS3 が発現させた SOCS3 が下流 signal である STAT 3 のリン酸化を行っているかについて western blotting assay にて確認した。
- ③ MKN1 に T-01 と T-SOCS3 を 0.01pfu/cell、0.1pfu/cell で感染させ、12 時間後、24 時間後、36 時間後、42 時間後の殺細胞効果とのウイルス量を測定し、replication 能を比較した。
- ④ 胃癌切除標本をコラーゲル培地で培養し、PBS (-) をコントロールとし、T-01 と T-SOCS3 をそれぞれ 0.01pfu/cell、0.1pfu/cell で感染させ、感染後 72 時間後に凍結切片を作成し、H & E 染色と MTS assay で腫瘍細胞の viability を確認する。

【結果】

- ① ヒト胃癌細胞株 MKN1、MKN28、MKN78 において T-01 の殺細胞効果は MKN1 が有位に低かった。また western blotting assay 法を用いた検討では、T-01 感染後 MKN 1 では有意に SOCS3 の発現が低下していた。
- ② Vero 細胞、MKN1 において、T-SOCS3 を感染させると T-01 に比べて SOCS3 を有意に発現させることができた。また T-SOCS3 が発現した SOCS3 が STAT 3 のリン酸化を行えていることを確認した。
- ③ MKN1 において T-SOCS3 が有意に T-01 より殺細胞効果を示した。replication 能の比較において、Vero 細胞細胞内での replication 能には差は認められなかったが、MKN 1 においては

T-SOCS3 が有意に replication をしていた。

- ④ oHSV を感染させた胃癌切除標本では腫瘍の溶解像が観察された。T-01、T-SOCS3 に感染後 72 時間後それぞれ 25.2%、36.5%の細胞が死滅しており、コントロールの PBS (-) と比較し有意な抗腫瘍効果を示した。T-01 と T-SOCS3 を比較しても有意に T-SOCS3 が抗腫瘍効果を示していた。

【考察・結語】

本研究において、SOCS3(suppressors of cytokine signaling 3)は oHSV の効果増強に有効な分子であることが示唆された。またヒト SOCS3 を強制発現させる oHSV;T-SOCS3 は従来の oHSV 以上の抗腫瘍効果を期待できる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和4年2月22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、胃癌の新たな治療法になりうるウイルス療法に着目し、その中でも癌細胞でのみで複製するよう遺伝子操作された oncolytic herpes simplex viruses(以下 oHSVs)について検討したものである。これまでも自施設では oHSVs の研究を行ってきたが、一部の細胞株にはウイルス療法に耐性があることが分かった。本研究ではサイトカインシグナルの重要な調節因子である SOCS family に注目し、その中でも SOCS3(suppressors of cytokine signaling 3)は HSV が細胞に感染すると初期段階から誘導され、HSV の複製に適した環境を作ると報告されている。そのため SOCS3 を発現する oHSV は胃癌細胞内でも効果的に複製し、腫瘍溶解を起こすことができると考えた。そこで T-SOCS3 という SOCS-3 を発現する新たな oHSV を生成し、ウイルスの複製能と殺細胞効果について第3世代型 oHSV である T-01 と比較検討した。

①ヒト胃癌細胞株 MKN1、MKN28、MKN78 に対して抗 SOCS3 抗体を用いて免疫染色を行い、T-01 感染による SOCS3 の発現の変化を western blotting assay にて確認したところ、T-01 の殺細胞効果は MKN1 が有位に低く、また western blotting assay 法を用いた検討では、T-01 感染後 MKN1 では有意に SOCS3 の発現が低下していた。

②BAC system を用いて SOCS3 発現 oHSV (以下 T-SOCS3) を作成。作成した T-SOCS3 が SOCS3 を細胞内で発現しているかどうかを Vero 細胞と MKN1 に感染させ、western blotting assay を用いて確認したところ、Vero 細胞、MKN1 において T-SOCS3 を感染させると T-01 に比べて SOCS3 を有意に発現させることができた。

③MKN1 に T-01 と T-SOCS3 を感染させ、12 時間後、24 時間後、36 時間後、42 時間後の殺細胞効果とウイルス量を測定し、replication 能を比較したところ、MKN1 において T-SOCS3 が有意に T-01 より殺細胞効果を示した。replication 能の比較においては、Vero 細胞細胞内での replication 能には差は認められなかったが、MKN1 においては T-SOCS3 が有意に replication をしていた。

④胃癌新鮮切除標本を用いた短期培養系で T-01 と T-SOCS3 の抗腫瘍効果を検討したところ、T-01、T-SOCS3 に感染後 72 時間後で、それぞれ 25.2%、36.5%の細胞が死滅しており、コントロールの PBS(-) と比較し有意な抗腫瘍効果を示した。T-01 と T-SOCS3 を比較しても有意に T-SOCS3 が抗腫瘍効果を示していた。

本論文は SOCS3 が oHSV の効果増強に有効な分子であることが示唆され、またヒト SOCS3 を強制発現させる oHSV;T-SOCS3 は従来の oHSV 以上の抗腫瘍効果を期待できることを示したものであり、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1016号		
学位授与の日	令和4年3月22日		
氏名	佐藤 大樹		
学位論文の題目	Comparison of Uterine Necrosis After Uterine Artery Embolization with Soluble Gelatin Sponge Particles or Tris-acryl Gelatin Microspheres in Swine (溶解型ゼラチンスポンジとマイクロスフィアを用いた豚の子宮動脈塞栓術後の子宮壊死の比較)		
論文審査委員	主査	教授	井筒 一彦
	副査	教授	村田 晋一
		教授	園村 哲郎

論文内容の要旨

【はじめに】

子宮動脈塞栓術(uterine artery embolization; UAE)は、子宮筋腫による症状緩和を目的とした低侵襲治療で、手術療法の代替になる安全で効果的な手技とされている。しかしながら、UAEには強い疼痛や妊孕性喪失の可能性といった問題点がある。UAEでは筋腫のみでなく正常子宮や卵巣を栄養する動脈も同時に塞栓されるため、これらの正常組織も損傷を受ける。このことがUAEの問題点の原因と考えられている。UAEではマイクロスフィア(tris-acryl gelatin microspheres; MS)やゼラチンスポンジ(gelatin sponge particles; GS)が塞栓物質として用いられている。MSは永久塞栓物質、GSは2-6週間と長期間にわたり血管内に残存する一時的塞栓物質である。溶解型ゼラチンスポンジ(soluble gelatin sponge particles; SGS)は可溶性のゼラチンスポンジであり、その溶解時間は熱架橋を起こす条件を変化させることにより調節可能である。UAEにおいてこのSGSを用いることで、数分から数日といった短期間の塞栓が行えるため、手技に伴う正常組織への損傷を低減し、前述の問題点を改善できる可能性があると考えられた。本研究の目的は、豚においてSGSとMSを用いてUAEを実施し、子宮動脈の再開通や子宮壊死の程度を比較することである。

【対象と方法】

本研究は豚を用いた *in vivo* study であり、実験施設における倫理審査委員会の承認を取得済みである。実験には正常豚7頭を使用した。豚は双角子宮のため対象は14子宮となる。この14子宮を7子宮ずつSGS群とMS群に割り当てた。SGSは、RM-gelatin (Jellice, Sendai, Japan)を500-1000 μm に分級し、*in vitro* では24.0 \pm 4.3 hで溶解した条件で乾熱滅菌を実施し、使用した。MSはEmbosphere (Nippon Kayaku, Tokyo, Japan)の500-700 μm の規格を使用した。UAEは全身麻酔下で実施した。右大腿動脈に6Frシースを挿入後、4Frカテーテルを用いて子宮動脈を同定した。続いて2.8-3.0Frマイクロカテーテルを子宮動脈まで挿入し、塞栓を実施した。SGSは子宮動脈本幹の閉塞、MSは分枝の閉塞が得られるまでを塞栓のエンドポイントとした。術当日6時間後までと3日後に血管撮影を実施し、子宮動脈の再開通の程度を評価した。その評価には子宮実質の描出の程度を基準として用い、塞栓前の1/3以下を閉塞、1/3-2/3をやや開通、2/3以上を開通と定義した。3日後に豚の子宮を摘出した。肉眼的に子宮の黒色変化がみられた領域を壊死部と判断し、壊死率を算出した。その後、正常部、壊死部と判断したそれぞれの部位の壊死の有無と、塞栓物質の存在した最小血管径を組織学的に評価した。血管開通率の比較にはFisherの正確検定を用い、有意水準は0.7% (Bonferroni法による補正後)とした。子宮壊死率や最小血管径の比較にはWilcoxonの順位和検定を用い、有意水準を5%とした。

【結果】

すべての子宮動脈の塞栓に成功し、実験期間中の合併症は認められなかった。子宮動脈の再開通については、SGS群では5時間後において4子宮で開通、2子宮でやや開通、1子宮で閉塞して

いたが、MS群では6時間後においても7子宮すべてで閉塞していた。3日後における再開通率はSGS群で100.0%、MS群で14.3%で、SGS群で有意に高値であった($P = .0047$)。子宮壊死率はSGS群が $15.0 \pm 15.7\%$ 、MS群が $26.8 \pm 13.3\%$ で、有意差は認められなかった($P = .096$)。肉眼的に正常と判断された14部位(SGS群7、MS群7)のすべてで組織学的に壊死は認められなかった。肉眼的に壊死と判断された77部位(SGS群37、MS群40)のうちで、SGS群の1部位を除く76部位に組織学的な壊死が認められた。SGSは子宮動脈の中枢側から末梢側まで分布しており、その存在した最小血管径は $48.2 \pm 22.0 \mu\text{m}$ であった。MSは子宮動脈の中枢側にのみ分布しており、その存在した最小血管径は $446.7 \pm 107.0 \mu\text{m}$ であった。SGSは有意に子宮動脈の末梢側まで到達していた($P < .0001$)。

【考察】

SGS群では子宮動脈の早期再開通が認められた。組織学的にはSGSは注入時と比べて微細な細片となっていたが、MSは注入前と同様の状態でみられた。このSGS群での早期再開通はSGSの溶解や破砕の結果と考えられた。肝動脈塞栓術においてGSはその吸収過程で血管内腔の狭小化や閉塞などを引き起こすとされるが、SGSは塞栓後の血管損傷を低減するとの報告がある。UAEにおいてもSGSの同様の効果が期待でき、前述の問題点の改善につながる可能性があると考えられた。MSは非吸収性塞栓物質であり、投与数年後にも周囲炎症や血管損傷を伴って血管内に存在したとの報告がある。これはMSがUAEにおいて長期経過後にも虚血による影響をきたす可能性を示唆している。GSを用いた豚におけるUAEでの子宮壊死率は $4.6 \pm 6.1\%$ であったとの報告や、MSとGSの人におけるUAEでの治療効果に有意差はみられなかったとの報告から、SGSはMSやGSと同程度の臨床的治療効果を有していると考えられた。塞栓24時間後のMRIでの子宮虚血の程度と術後早期の疼痛の程度に関連があったとの報告からは、SGSの溶解時間を調節することで疼痛を軽減できる可能性があることが示唆された。SGS群ではMS群よりも早期から子宮動脈の再開通がみられた。SGS群とMS群の子宮壊死率は同程度であったが、SGSはMSよりも子宮動脈の末梢側まで到達していた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和4年3月1日と3日に論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

子宮動脈塞栓術(UAE)は、子宮筋腫による症状の緩和を目的とした低侵襲治療であり、手術療法の代替となりうる安全で効果的な手技とされる。しかしながら、疼痛や妊孕性喪失の可能性といった虚血に起因する問題点が存在する。UAEでは永久塞栓物質であるマイクロスフィア(MS)が主に用いられるが、血管内に遺残するため子宮・卵巣の虚血や子宮動脈の閉塞をきたすことがこれらの問題点の原因となると考えられた。そこで、投与後早期に溶解する性質を有した溶解型ゼラチンスポンジ(SGS)を用いてUAEを実施すればこれらの問題点を解決できると考え、SGSとMSを用いて豚の子宮動脈を塞栓し、子宮動脈の再開通と子宮壊死の程度を比較した。

正常豚7頭(14子宮)を準備し、SGSとMSを用いてそれぞれ7子宮にUAEを実施した。SGSはin vitroで 24.0 ± 4.3 時間で溶解するように調節し、そのサイズを500-1000 μm とした。MSはエンボスフィア(日本化薬)の500-700 μm のものを使用した。塞栓のエンドポイントはSGSが本幹の閉塞、MSが分枝の閉塞とした。UAE前とUAE後(直後、1-6時間後、3日後)に血管撮影を実施し、子宮実質の描出の程度から子宮動脈の再開通を評価した。UAE3日後に子宮を摘出し、肉眼的に色調変化がみられた領域を壊死部と判断し、壊死部と全体の面積比から子宮の壊死率を算出した。また、正常部、壊死部と判断したそれぞれの部位の組織学的壊死の有無および塞栓物質のみられた最小血管径を評価した。

SGS群ではUAEの2時間後から子宮動脈の再開通が始まり、5時間後に4子宮、3日後に7子宮全てで再開通がみられた。一方、MS群ではUAE当日に再開通はみられず、3日後には1子宮のみで再開通がみられた。3日後において、子宮動脈の再開通率に有意差が認められた(100% vs 14.7%, $P = 0.0047$)。子宮の壊死率はSGS群が $15.0 \pm 15.7\%$ 、MS群が $26.8 \pm 13.3\%$ で有意差は認められなかった($P = 0.096$)。肉眼的に壊死と判断した部位の組織学的壊死は76/77標本でみられ、肉眼的に正常と判断した部位の組織学的壊死は14標本全てでみられなかった。塞栓物質のみられた最小血管径はSGS群が $48.2 \pm 22.0 \mu\text{m}$ 、MS群が $446.7 \pm 107.0 \mu\text{m}$ で、SGSが有意

に末梢側まで到達していた($P<0.0001$)。

SGS は注入後に溶解や破砕により細径化したことで子宮動脈の早期再開通をきたしたことや、早期に溶解する性質が過度の組織障害を防いだ可能性があることが示唆された。また、血管内に遺残しない性質から血管損傷の低減が期待でき、疼痛の軽減や妊孕性喪失の可能性の低下をきたす可能性があることも示唆された。

本論文により SGS が血管の再開通を早期より生じさせることや血管内のより末梢側まで到達すること、子宮壊死の程度に有意差はないことが示され、痛みや妊孕性消失の可能性を低減できる可能性を示したことから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第1017号		
学位授与の日	令和4年3月22日		
氏名	藤本 大智		
学位論文の題目	Pembrolizumab plus chemotherapy-induced pneumonitis in chemo-naive patients with non-squamous non-small cell lung cancer: A multicentre, retrospective cohort study (プラチナ製剤/ペメトレキセド/ペムブロリズマブ併用療法における薬剤性肺障害の多施設観察研究)		
論文審査委員	主査	教授	伊東 秀文
	副査	教授	藤井 隆夫
		教授	山本 信之

論文内容の要旨

【背景】

プラチナ製剤/ペメトレキセド/ペムブロリズマブ併用療法 (KN189 レジメン) はプラチナ製剤/ペメトレキセド併用療法に PD-1 阻害薬であるペムブロリズマブの上乗せの意義を検討した無作為化第Ⅲ相試験 (KEYNOTE-189 試験) により、非扁平上皮非小細胞肺癌における生存期間の延長が証明され、実地臨床で最も汎用されている治療法である。しかしながら、臨床試験において日本人の肺障害の頻度が高く、我が国の実態調査を目的として、KN189 レジメンを投与された症例における肺臓炎発現頻度を含めた安全性調査を後方視的に行う本試験を立案した。

【方法】

本試験は多施設共同後ろ向き観察研究であり、2018年12月21日から2019年6月30日までにKN189 レジメンで治療された症例を連続的に登録し、本レジメンの安全性、有効性を検討した。主要評価項目として投与開始から90日以内の肺臓炎発現頻度を設定した。Keynote189 試験において全期間の肺臓炎発症割合は Any grade で 4.4%、Grade3 \leq は 2.7%と報告されている。このことから Keynote189 試験よりも短期間である90日以内という期間において、肺臓炎発症割合が Any Grade で 5%以上または Grade3 以上が 3%以上であれば、日常臨床で注意が必要なレジメンと結論づけることとした。また、肺臓炎が生存アウトカムに及ぼす影響については、不死身バイアスを調整するために、クローニング法を用いて評価した。

【結果】

全国 36 施設から 299 例の患者が登録された。重症有害事象のうち肺臓炎は最も頻度が高かった。試験期間中に 37 名(12.4%, 95% CI 8.9-16.7)が肺臓炎(全グレード)を発症しており、10 名(3.3%, 95% CI 1.6-6.1)が重症肺臓炎(グレード3以上)を発症していた。投与開始から90日以内の肺臓炎は全グレードで 21 名(7.0%, 95% CI 4.4-10.5)、グレード3以上で 9 名(3.0%, 95% CI 1.4-5.6)で発症していた。無増悪生存期間中央値は 7.5 か月(95% CI 6.5-8.7)であり、不死身バイアスを調整した生存期間解析にて肺臓炎発症は無増悪生存期間(HR 1.99, 95% CI 1.07-3.69, P = 0.03)、全生存期間(HR 3.03, 95% CI 1.12-8.20, P = 0.03)ともに独立した不良因子であった。

【結論】

日本人実地臨床においてKN189 レジメンによる肺臓炎は頻度が高く日常臨床で使用する上で注意が必要なレジメンである。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

令和4年2月22日、同年3月1日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

本論文の目的はプラチナ製剤/ペメトレキセド/ペムブロリズマブ併用療法 (KN189 レジメン)

の実地臨床における薬剤性肺障害の頻度と治療効果、予後への影響を検討することである。非小細胞肺癌治療において、PD-1/PD-L1 を標的とした免疫チェックポイント阻害剤は大きなパラダイムシフトを起こしている。中でも、KN189 レジメンは実地臨床で最も汎用されている治療法である。しかしながら、我が国における第1相試験において、KN189 レジメンは12例に投与され、薬剤性肺障害（以下、肺臓炎）を4例発症し、うち2例が死亡という結果であり、日本人実地診療における安全性に懸念を残した。更に日本人は薬剤性肺障害の頻度が高い人種であることが示唆されていることから、本試験は立案された。

本試験は多施設共同後ろ向き観察研究であり、2018年12月21日から2019年6月30日までにKN189 レジメンで治療された299例を連続性に登録し、検討を行った。結果は、重症有害事象のうち肺臓炎は最も頻度が高く、試験期間中に37名(12.4%, 95% CI 8.9-16.7)が肺臓炎（全グレード）を発症しており、10名(3.3%, 95% CI 1.6-6.1)が重症肺臓炎（グレード3以上）を発症していた。肺臓炎発症までの中央値は2.6か月(四分位範囲: 1.3-5.0か月)であり、肺臓炎発症患者のうち27名(73%)が肺臓炎による治療中止をしていた。肺臓炎発症における有意なリスク因子は認めなかった。無増悪生存期間中央値は7.5か月(95% CI 6.5-8.7)であり、不死身バイアスを調整した生存期間解析にて肺臓炎発症は無増悪生存期間(HR 1.99, 95% CI 1.07-3.69, P = 0.03)、全生存期間(HR 3.03, 95% CI 1.12-8.20, P = 0.03)ともに独立した不良因子であった。

以上のように、本論文はKN189 レジメンによる肺臓炎は頻度が高く、無増悪生存期間と全生存期間に負の影響をもたらすことを示し、今後の肺臓炎研究が実地患者において重要であること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(保) 第7号
学位授与の日	令和4年3月17日
氏名	川村 小千代
学位論文の題目	介護老人福祉施設の介護職者におけるワーク・エンゲイジメントと職業性ストレスに対する職場グループでのポジティブな出来事の筆記と読み上げの効果：クロスオーバー試験 (Effects of writing and reading aloud positive events in the workplace group on work engagement and occupational stress of care workers in welfare facilities for the elderly requiring long-term care: A crossover trial)
論文審査委員	主査 教授 岩村 龍子 副査 教授 宮井 信行 教授 森岡 郁晴

論文内容の要旨

【背景と目的】

高齢者福祉施設の介護職者には、強いストレスがあることが指摘されている。法改正により要介護者の介護の増大に伴うストレスの増大が懸念される。介護職者のストレスの実態を明らかにした報告はあるが、簡易な手法を用いてストレスの軽減を図る方策の有効性を検討した報告はない。そのため、労働者のポジティブな心理的側面に焦点を当てた概念として注目されているワーク・エンゲイジメントの向上や職業性ストレスの軽減を図る方策の確立が喫緊の課題である。

そこで本研究では、職場グループでのポジティブな出来事の筆記と読み上げが施設の介護職者のワーク・エンゲイジメントの向上と職業性ストレスの軽減を図る方策として有用かどうかを検討することを目的とした。

【対象と方法】

1) 対象者

和歌山県の7指定介護老人福祉施設に勤務する介護職者173名のうち研究参加に同意した13グループ57名(参加率32.9%)であった。

和歌山県立医科大学倫理審査委員会で承認(受付2042号)された後、UMIN臨床試験登録システムに登録後(UMIN30333)に開始した。

2) 調査方法

介入方法は、介入群と対照群の2群2期のクロスオーバーデザインとした。

対象者の割り付けは、各施設代表者が施設内で勤務する介護職者で、2群が同人数になるようにグループ単位で群分けをし、研究者で全体のグループ数と人数が同一になるように2群に分けた。介入群は、個人が就業中筆記のできる時間にポジティブな出来事を筆記した。さらに、グループで朝礼の時間などを使用してポジティブな出来事を読み上げた。対照群は通常どおり勤務した。A群(24名)は第1期に、B群(33名)は第2期に筆記と読み上げを行った。期間はそれぞれ8週間であった。

介入量の指標には、個人が介入中にポジティブな出来事を筆記した回数、読み上げを聞いた回数を用いた。介入効果の測定には、第1期、第2期の開始時、終了時の計4回自記式質問紙調査を実施した。ワーク・エンゲイジメントの評価として、ユトレヒト・ワーク・エンゲイジメント尺度日本語版(以下、UWES)を用いた。職業性ストレスの評価には、職業性ストレス簡易調査票(以下、BJSQ)を用いた。筆記した回数、読み上げを聞いた回数は、質問紙で介入終了時に尋ねた。

3) 分析方法

平均値の比較には対応のあるt検定を用いた。中央値の比較にはMann-WhitneyのU検定と

Wilcoxon の符合付順位検定を、割合の比較には χ^2 検定とマクネマー検定を用いた。

得点の変化量と介入量との関連を検討するために、重回帰分析（強制変数選択法）を用いた。従属変数には UWES の下位因子の介入終了時の得点、BJSQ の下位尺度の介入終了時の得点を用いた。UWES の下位因子の介入終了時の得点が従属変数の場合、独立変数には、性別、年齢、UWES の下位因子の介入開始時の得点、現在の施設での従事歴、勤務日数、平均勤務時間、残業の有無、夜勤の有無、夜勤に伴う負担、不規則な勤務を強制投入した。

BJSQ の下位尺度の介入終了時の得点が従属変数の場合、UWES の下位因子の介入終了時の得点との関連を検討した独立変数のうち、UWES の下位因子の介入開始時の得点を従属変数に用いた BJSQ の下位尺度の介入開始時の得点に変え、性別を除いたものを用いた。

それぞれ、筆記回数との関連をみる際は筆記回数を、読み上げ回数との関連をみる際は読み上げ回数を強制投入した。

【結果】

対象者 57 人の平均年齢は 39.9 歳であった。

ポジティブな出来事の筆記回数は、筆記したポジティブな出来事の合計は 318 個であった。筆記された語句を抽出すると、「ありがとう」「嬉しい」、「笑顔」の言葉が多かった。グループごとに介入中に筆記した回数の中央値は 1.4 個／人（四分位範囲 0.65 個／人-3.6 個／人）であった。個人が介入中に筆記した回数の中央値は 3 個（四分位範囲 1 個-5 個）であった。読み上げを聞いた回数は、「ほとんどなかった」と回答した者が 22 名（38.6%）であった。

職場グループでの筆記と読み上げの効果をみると、クロスオーバー試験における UWES の変化では、没頭で得点の変化量に有意差が認められた。

BJSQ の変化では、仕事のコントロール、働きがい、家族・友人からのサポートの得点の変化量に有意差が認められた。

介入量との関連をみると、UWES 没頭の得点の変化量に、筆記回数は有意な正の関連を示した。

BJSQ の働きがいの得点の変化量に、筆記回数は有意な正の関連を示した。

読み上げ回数は、UWES、BJSQ のいずれの下位尺度の変化量に関連を示さなかった。

【考察】

本研究の筆記内容をみると、「ありがとう」「嬉しい」、「笑顔」などの語が多かった。このような言葉が介護職者のポジティブな感情につながりやすいと考えられた。

UWES の下位因子の変化をみると、没頭の得点の変化量に筆記回数は正の関連を示した。すなわち、個人の筆記が没頭の向上に寄与したと考えられる。筆記内容のように感謝したことや嬉しいことをノートに記録すると、楽観的な見方が高まることで仕事に対する自信が高まり、没頭が高まりやすかったと考える。

BJSQ の下位尺度の変化をみると、働きがいの得点の変化量に筆記回数は正の関連を示した。すなわち、個人の筆記が働きがいの向上に寄与したと考えられる。働きがいは仕事のストレス要因の一尺度であるため、ポジティブな出来事への認知を高める介入が仕事のストレス要因に一定の効果を示す可能性が示唆された。

職場グループでの筆記と読み上げの有用性をみると、筆記することで UWES の没頭の向上、BJSQ の働きがいの向上がみられた。そのため、職場グループでのポジティブな出来事の筆記と読み上げは、UWES の没頭と BJSQ の働きがいの向上を図る方策のひとつであると考えられる。この方法は、費用を抑え、すぐに取り入れることができるため、多くの施設において容易に活用できると考える。

【結語】

1. 個人が介入中にポジティブな出来事を筆記した回数の中央値は 3 個（四分位範囲 1 個-5 個）であった。読み上げを聞いた回数は、「ほとんどなかった」と回答した者が 22 名（38.6%）であった。
2. UWES の下位因子では、没頭で得点の変化が得られた。没頭の得点の変化量は個人が筆記し

た個数と関連していたが、読み上げを聞いた回数とは関連していなかった。

3. BJSQ の下位尺度では、仕事のコントロール、働きがい、家族・友人からのサポートで得点の変化が得られた。働きがいの得点の変化量は個人が筆記した個数と関連していたが、いずれの下位尺度の変化量とも読み上げを聞いた回数とは関連していなかった。

4. 以上のことから、職場グループでポジティブな出来事を筆記し読み上げすることは、介護職者の UWES の没頭と BJSQ の働きがいの向上を図る方策のひとつであることが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和 3 年 6 月 29 日、審査委員会は学位申請者の出席を求め、論文審査をおこなった。

高齢者福祉施設の介護職者には強いストレスがあることは、以前から指摘されている。法改正によりストレスは更なる増大をきたし、ストレス反応や健康問題が生じることが懸念される。介護職者のストレスの実態を明らかにした報告はあるが、簡易な手法を用いてストレスの軽減を図る方策の有効性を検討した報告はない。そのため、労働者のポジティブな心理的側面に焦点を当てた概念として注目されているワーク・エンゲイジメントの向上や職業性ストレスの軽減を図る方策の確立が喫緊の課題である。

本論文は、職場グループでのポジティブな出来事の筆記と読み上げを 8 週間行い、ユトレヒト・ワーク・エンゲイジメント（以下、UWES）と職業性ストレス簡易調査票（以下、BJSQ）を用いて、ワーク・エンゲイジメントと職業性ストレスの変化を検討した研究である。ポジティブな出来事の筆記と読み上げによるワーク・エンゲイジメントの向上と職業性ストレスの軽減を明らかにした初めての研究であり、介護職者におけるワーク・エンゲイジメントの向上や職業性ストレスの軽減を図る方策の確立に向けての端緒を得たものである。

1. 参加者が介入中にポジティブな出来事を筆記した個数の中央値は 3 個（四分位範囲 1 個-5 個）であった。読み上げを聞いた回数は「ほとんどなかった」と回答した者が 22 名（38.6%）であった。
2. UWES の下位因子では、没頭で得点の変化が得られた。没頭の得点の変化量は、個人が筆記した個数と関連していたが、読み上げを聞いた回数とは関連していなかった。
3. BJSQ の下位尺度では、仕事のコントロール、働きがい、家族・友人からのサポートで得点の変化が得られた。働きがいの得点の変化量は、個人が筆記した個数と関連していたが、いずれの下位尺度の変化量とも読み上げを聞いた回数とは関連していなかった。

以上、本論文は、職場グループでのポジティブな出来事の筆記と読み上げは、介護職者における UWES の没頭と BJSQ の働きがいの向上を図る方策としての可能性があることを確認した研究であり、今後のワーク・エンゲイジメントの向上や職業性ストレスの軽減を図る対策の確立に寄与すると考えられ、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(保) 第8号
学位授与の日	令和4年3月17日
氏名	川井 美緒
学位論文の題目	The Prevalence of Orthostatic Dysregulation among Newly Graduated Female Nurses after Employment and its Associations with Autonomic Nervous Function, Stress, and Depressive Symptoms (新卒看護師における就職後の起立性調節障害の変化と自律神経機能、ストレス、抑うつ症状の関連)
論文審査委員	主査 教授 森岡 郁晴 副査 教授 岩村 龍子 教授 宮井 信行

論文内容の要旨

【緒言】

起立性調節障害 (OD) は、立ちくらみ、失神、倦怠感、動悸、頭痛などの多様な症状が出現し、概日リズム異常や睡眠障害を合併する場合もある。通常、思春期に好発して成長とともに軽快するが、成人期まで長期化したり、進学や就職などの環境の変化によって再発したりすることも稀ではない。新卒看護師は、看護技術の習得、患者や家族への対応、深夜業務、患者の急変や死の経験など、職務に伴う負担が大きく、多様なストレスに曝されることで OD が誘発または増悪する可能性がある。また、もともと OD があることで健康状態を悪化させやすくなり、体調不良からバーンアウトや早期離職に繋がることも予想される。OD は新卒看護師が業務に適応する上で注視すべき健康上の問題であるが、OD に焦点をあててストレスや心身の変調に及ぼす影響を検討した報告はみあたらない。本研究では、新卒看護師を対象に就職1か月後から7か月後の OD の状態の変化を追跡調査し、OD と自律神経機能の変調との関連、OD がストレスや抑うつ状態に及ぼす影響を検討した。

【方法】

急性期病院2施設に勤務する女性看護師のうち、他施設での勤務経験がない新卒看護師105名を対象者とした。就職1か月後と7か月後に自記式質問票による OD (日本小児心身医学会のスクリーニングチェックリスト)、ストレス (改訂出来事インパクト尺度: IES-R)、抑うつ状態 (抑うつ状態自己評価尺度: CES-D) の調査と、簡便な起立試験による自律神経機能検査を実施した。本研究では、1か月後と7か月後のデータの連結が可能であり、測定不備や欠損のなかった48名 (21.9±3.0歳) を分析対象者とした。

【結果】

OD 陽性者は1か月後に比べて7か月後に増加した。特に、立位での気分不良、動悸・息切れ、午前中の不調、食欲不振、倦怠感で陽性となる者が多かった。起立試験における自律神経活動では、起立直後の CV_{R-R} とその座位からの変化量が7か月後に有意に低下した。IES-R については、回避症状と過覚醒症状の得点が上昇した。CES-D では、うつ気分、身体症状、ポジティブ感情の得点が上昇し、抑うつ状態と判定される者が増加した。OD 陽性者は陰性者に比べて、起立試験における起立直後の CV_{R-R} とその座位からの変化量が7か月後で有意に低値であった。また、OD の状態を従属変数とするロジスティック回帰分析を行った結果、IES-R では、7か月後に侵入症状と過覚醒症状が有意に関連した。CES-D については、1か月後は身体症状のみであったが、7か月後はうつ気分でも有意な関連を認めた。1か月後から7か月後にかけての OD の状態の変化で分類した3群 (陰性持続群、陽性変化群、陽性持続群) を比較したところ、IES-R については、陰性持続群は1か月後と7か月後で明確な差はみられなかった。一方、陽性変化群はすべての因子で7か月後に有意に得点が増加した。特に、回避症状は陽性持続群よりも高値となり、1か月後からの変化が大きかった。CES-D については、陽性変化群はすべての因子が増加し、身体症状とうつ気分では有意な差が認められた。また、陽性持続群は1か月後と7か月後ともに他の群よりも得点が高い状態を維持した。

【考察】

新卒看護師は、看護業務に適応していくなかで様々なストレスを経験する。さらに、約半年を経過した時点から深夜勤務が導入されるため、睡眠・覚醒リズムが乱れやすくなると推察され、これらが複合的にODの増加を招いた可能性がある。就職7か月後には、起立直後のCV_{R-R}とその座位からの変化量が有意に低くなり、自律神経の活動性が相対的に減弱していた。また、就職後にODが陰性から陽性に変化した者は起立直後のCV_{R-R}が有意に低下した。このことは、ODが自律神経系の変調に伴って発現または増悪することを支持する結果と考えられる。IES-Rの得点は侵入症状、回避症状、過覚醒症状ともに7か月後に高くなっていた。また、ODが陰性から陽性に変化した者はすべての因子の得点が有意に上昇したことから、多様なストレスがOD症状の悪化に影響を及ぼすことが示唆された。CES-Dでは、うつ気分、身体症状、ポジティブ感情の得点が上昇した。新卒看護師は身体的・心理的負担を抱えやすく、抑うつ状態に陥るリスクが高いと予想される。また、ODの陽性者は陰性者に比べて得点が高かったことから、ODの症状と抑うつ状態は相互に影響しながら増悪するものと推察された。以上のように、新卒看護師はその適応段階において様々なストレスを経験するなかで、自律神経の変調を伴いながらODを発現または増悪させやすいこと、さらに、ODが存在する場合に抑うつ状態に陥りやすく体調の悪化を来す可能性があることが示唆された。これらは、新卒看護師が就職後に心身の不調を招く誘因としてのODの重要性を示唆するものであり、健康管理や職場適応に向けた支援に役立つ有益な知見となるものと考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

令和4年1月28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。

起立性調節障害（OD）は、立ちくらみ、失神、倦怠感、動悸、頭痛などの多様な症状が出現する。通常、思春期に好発して成長とともに軽快するが、成人期まで長期化したり、進学や就職などの環境の変化によって再発したりすることも稀ではない。新卒看護師は看護技術の習得を始めとする慣れない職務に伴う身体的・心理的負担が大きく、多様なストレスに曝されることでODが誘発または増悪する可能性がある。また、ODがあることで心身の健康状態を悪化させやすくなり、体調不良から仕事を休みがちになってバーンアウトや早期離職につながることも予想される。したがって、ODは新卒看護師が業務に適応する上で注視すべき健康上の問題であるが、ODに焦点をあてて、就職後のストレスや心身の変調に及ぼす影響を検討した報告はみあたらない。本論文は、新卒看護師を対象に、就職1か月後と7か月後にODの状態を調査し、ODと自律神経機能の変調との相互関係をみた上で、ODがストレスや抑うつ状態にどのように関連するかを検討したものである。その結果、

1. ODに伴随する大症状と小症状の訴え数は、1か月後に比べて7か月後に増加し、陽性者の割合も高くなっていた。
2. 起立負荷試験では、起立直後の心拍変動指標（CV_{R-R}）の値とその座位からの変化量が7か月後に低下し、自律神経の活動性が減弱していた。また、OD陽性者は陰性者に比べて有意に低い値を示したことから、OD症状が自律神経機能の変調に伴って増加することが示唆された。
3. 心的外傷性ストレス（IES-R）についての侵入症状、回避症状、過覚醒症状は7か月後に増加する傾向にあった。特に、ODの状態が陰性から陽性に変化した者では、すべての症状の得点が有意に上昇しており、ストレスの増加がOD症状の悪化に関連することが示された。
4. うつ症状（CES-D）に関するうつ気分、身体症状、ポジティブ感情の得点は7か月に高値を示し、抑うつ状態と判定される者も増加していた。ODの状態との関連は、1か月後は身体症状のみであったが、7か月後ではうつ気分がより強い関連を認めたことから、ODと抑うつの状態は相互に影響しながら増悪するものと推察された。

以上、本論文は新卒看護師が就職後に心身の不調を招く誘因としてのODの重要性を示唆するものであり、健康管理や職場適応に向けた支援に役立つ有益な知見を提供しており、学位論文として価値あるものと認めた。