

# 博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成29年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

# 目 次

平成 29 年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第 5 5 7 号	石 田 卓 也	Elucidating the aberrant brain regions in bipolar disorder using T1-weighted/T2-weighted magnetic resonance ratio images. (T1/T2 比画像で明らかになった双極性障害の脳異常) …	1
博(医)甲第 5 5 8 号	細 井 裕 樹	An Epstein-Barr virus susceptible immature T-cell line, WILL4, established from a patient with T-lymphoblastic lymphoma bearing CD21 and a clonal EBV genome (CD21 とクローナルな EB ウイルスゲノムを有する T リンパ芽球性リンパ腫患者から樹立した EB ウィルスに感受性のある未熟 T 細胞株 WILL4) ………	6
博(医)甲第 5 5 9 号	里 神 和 美	Omega-3 fatty acids related to cognitive impairment in patients with schizophrenia (統合失調症における認知機能障害と ω-3 脂肪酸の関連) ……………	10
博(医)甲第 5 6 0 号	南 條 佐 輝 子	The levels of serum-circulating angiogenic factors within one week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with preeclampsia, gestational hypertension and/or fetal growth restriction (妊娠高血圧腎症、妊娠高血圧症および胎児発育不全合併妊娠における分娩 1 週間前の母体血中血管新生関連因子は、その重症度と密接に関連する) ……	12
博(医)甲第 5 6 1 号	中 嶋 宏 児	Molecular epidemiology of nonencapsulated <i>Streptococcus pneumoniae</i> among Japanese children with acute otitis media (日本の急性中耳炎患児における肺炎球菌無莢膜型株の分子疫学的検討) ……………	15
博(医)甲第 5 6 2 号	尾 崎 充 宣	Optogenetic activation of the sensorimotor cortex reveals “local inhibitory and global excitatory” inputs to the basal ganglia (大脳皮質の運動感覚領域から大脳基底核への入力は「抑制性成分が狭く、興奮性成分が広く」分布していることを光遺伝学を応用した刺激方法で示す) ……	17
博(医)甲第 5 6 3 号	山 本 円	Calreticulin is involved in invasion of human extravillous trophoblasts through functional regulation of integrin β1 (カルレティキュリンはインテグリン β1 の機能調節	

		を介してヒト絨毛外栄養膜細胞浸潤を制御する) ……	20
博(医)甲第564号	蒸野寿紀	An Optimal Approach for Fluoroquinolone Garenoxacin Prophylaxis in Patients with Hematological Malignancies and Chemotherapy-induced Neutropenia (造血器悪性腫瘍患者における抗菌薬ガレノキサシンによる化学療法関連発熱性好中球減少症に対する予防内服効果の検討) ……	22
博(医)甲第565号	稲葉豊	Severer lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice with homozygous Kitwsh/wsh mutation. (Kit 変異を有する MRL/lpr マウスは、より重症なループス様皮疹を呈する) ……	25
博(医)甲第566号	辻あさみ	Effectiveness of Patient Group Meetings for Postoperative Patients with Defecatory Dysfunction. (排便機能障害のある直腸がん患者のがんサバイバーシップを高めるための介入プログラムとその評価) ……	28
博(医)甲第567号	中尾友美	Impact of heart-specific disruption of the circadian clock on systemic glucose metabolism in mice (心臓特異的な時計遺伝子 <i>Bmal1</i> の欠損は肝臓のインスリン抵抗性を惹起する) ……	31
博(医)甲第568号	西崎大祐	Oxygen-centered radicals formed in the reaction mixtures containing chloroiron tetraphenylporphyrin, iodosylbenzene and ethanol. (テトラフェニルポルフィン塩化鉄(III)、ヨードシルベンゼン、エタノール反応溶液中に生成する酸素中心エタノールラジカル) ……	34
博(医)甲第569号	金星匡人	Inhibition of inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels facilitates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in astrocytes (内向き整流性カリウム (Kir) 4.1 チャンネルの阻害はアストロサイトの脳由来神経栄養因子 (BDNF) 発現を促進する) ……	37
博(医)甲第570号	坪井宏幸	Properties of Paraspinal Muscles in Japanese High School Baseball Players With Terminal-Stage Lumbar Spondylolysis (終末期腰椎分離症の高校野球選手における傍脊柱筋の特性) ……	39
博(医)甲第571号	樽谷玲	Vasa Vasorum Restructuring in Human Atherosclerotic Plaque Vulnerability: A Clinical Optical Coherence Tomography Study (Vasa vasorum の3次元構造改変はヒト冠動脈粥腫	

		の不安定化に係る) ……………	42
博(医)甲第572号	森 木 貴 司	Noninvasive positive pressure ventilation enhances the effects of aerobic training on cardiopulmonary function (非侵襲的陽圧換気下の有酸素トレーニングによる心肺機能向上効果の増大) ……………	44
博(医)甲第573号	山 口 俊 介	CEACAM1 is associated with recurrence after hepatectomy for colorectal liver metastasis. (CEACAM1 細胞内ドメイン isoform と大腸癌肝転移の肝切除後再発に関する検討) ……………	47
博(医)甲第574号	松 井 有 史	Radical formation in individual aqueous solutions of some unsaturated fatty acids and in their mixtures (種々の不飽和脂肪酸を単独で水溶液中においてインキュベーションした時のラジカル生成とそれらの内から 2 種類を選んで混合した時のラジカル生成の比較) ……………	50
博(医)乙第959号	田 村 崇	Rapid On-Site Evaluation by Endosonographers during Endoscopic Ultrasonography-Guided Fine-Needle Aspiration for Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST の EUS-FNA における内視鏡医主導の迅速細胞診の有用性について) ……………	52
博(医)乙第960号	北 野 岳 史	Impaired healing of a cutaneous wound in an inducible nitric oxide synthase-knockout mouse (誘導型一酸化窒素合成酵素ノックアウトマウスにおける皮膚創傷治癒に関する実験的研究) ……………	55
博(医)乙第961号	太 田 圭 介	Grag1 controls the growth of human parainfluenza virus type 2 through inactivation of RhoA signaling (Grag1 は、RhoA シグナルを不活化することで、ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型の増殖を制御する。) ……………	58
博(医)乙第962号	坂 本 友 香	Efficacy of a Rework Program for Sick Leave due to Depressive Disorders (うつ病性障害による休職者に対するリワークプログラムの有効性) ……………	61
博(医)乙第963号	下 江 隆 司	Analysis of Shoulder Abduction by Dynamic Shoulder Radiograph following Suprascapular Nerve Repair in Brachial Plexus Injury (動的肩レントゲン撮影を用いた腕神経叢損傷患者に対する肩甲上神経修復術後の肩外転機能評価) ……………	63
博(医)乙第964号	塩 崎 万 起	Job Stress and Behavioral Characteristics in Relation to	

	Coronary Heart Disease Risk among Japanese Police Officers (警察官における職業性ストレスおよび行動特性が冠動脈疾患リスクに及ぼす影響) ……………	65
博(医)乙第965号	西川 彰 則 Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma : retrospective analysis of 16 patients (多発性骨髄腫に対する同種造血幹細胞移植の有効性について : 16例の後方視的解析) ……………	68
博(医)乙第966号	竹村 重 輝 Associations between anthropometric factors and peripheral neuropathy defined by vibrotactile perception threshold among industrial vibrating tool operators in Japan (日本の振動工具取扱作業における体格指標と振動感覚閾値でみた末梢神経障害の関連) ……………	71
博(医)乙第967号	嶋村 邦 宏 Difference of ruptured plaque morphology between asymptomatic coronary artery disease and non-ST elevation acute coronary syndrome patients: an optical coherence tomography study (OCTによる無症候性冠動脈疾患と非ST上昇型急性冠症候群における破裂プラーク形態の検討) ……………	74
博(医)乙第968号	今村 沙 梨 Relation of Albuminuria to Coronary Microvascular Function in Patients With Chronic Kidney Disease (慢性腎臓病患者における、アルブミン尿と冠微小循環の関連性についての検討) ……………	77
博(医)乙第969号	赤松 弘 朗 Multiplexed molecular profiling of lung cancer using pleural effusion. (肺癌胸水症例に対する複数の分子プロファイル診断の試み) ……………	80
博(医)乙第970号	松田 芳 和 Angiographic Characteristics of Pseudo-occlusion of the Internal Carotid Artery Before and After Stenting (内頸動脈仮性閉塞のステント留置術前後の血管撮影の特徴) ……………	83
博(医)乙第971号	林 佑 子 Bacteriology of the conjunctiva in pre-cataract surgery patients with occluded nasolacrimal ducts and the operation outcomes in Japanese patients (鼻涙管閉塞合併症例での日帰り白内障手術術前の結膜囊細菌の検討) ……………	86
博(医)乙第972号	服部 園 美 Cross-Sectional Study on the Preventive Effects of Living Activities on Cognitive Function Decline in Community-Dwelling Elderly	

## Individuals

(地域在住高齢者における生活行動が認知機能低下に及ぼす予防的効果に関する横断的解析) …………… 89

学位記番号	博(医)甲第557号		
学位授与の日	平成29年6月20日		
氏名	石田 卓也		
学位論文の題目	Elucidating the aberrant brain regions in bipolar disorder using T1-weighted/T2-weighted magnetic resonance ratio images (T1/T2 比画像で明らかになった双極性障害の脳異常)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 中尾 直之	教授 金桶 吉起

## 論文内容の要旨

### [緒言]

精神疾患患者の脳病態機構は皮質、皮質下灰白質を結ぶネットワークの結合が障害されているという *disconnectivity* 仮説が考えられている([Friston, 1998](#))。拡散テンソル画像(DTI)の解析で統合失調症([Ellison-Wright and Bullmore, 2009](#); [Kubota et al., 2013](#))や双極性障害([Benedetti et al., 2011](#); [Nortje et al., 2013](#))の広範な白質神経束の微細構造異常が捉えられた。灰白質では統合失調症、双極性障害共に脳の体積萎縮や皮質厚さの委縮([Glahn et al., 2008](#); [Maller et al., 2014](#); [Schultz et al., 2010](#))が報告され、白質と灰白質の異常は相互に関連していると考えられている([Douaud et al., 2007](#); [Koch et al., 2013](#))。合わせて考えると、灰白質領域のミエリン異常も精神疾患の生物学的基盤で重要な役割を果たしている可能性が高い。

### [目的]

近年、T1 強調画像(T1w)の信号値がミエリン量に比例し、T2w 強調画像(T2w)信号値がミエリン量に反比例することから、T1w/T2w 比画像がミエリンを反映した信号をより鋭敏に検出し、皮質のミエリンマップとして使用できることを示された([Glasser and Van Essen, 2011](#))。また T1w/T2w 比画像は DTI に比べて、神経繊維束の方向に依存せず、白質で神経繊維束が交叉する脳幹部等の領域ではミエリンの成分を DTI よりも鋭敏にとらえ、DTI の補助的手段として使用できる可能性がある。

我々は T1w/T2w 比画像が精神疾患に対する臨床応用が可能であることを検討するために、33 人の健常者、29 人の双極性障害患者に対して標準化した T1w/T2w 比画像を作成し、比較検討を行った。

## [方法]

### MRI 撮像

T1w、T2w 画像の撮像は 3.0T の MRI 装置(Philips, Amsterdam, the Netherlands)で、32 チャンネルのコイルを用いた。DTI の撮像は 15 方向からの single-shot spin-echo echo-planar imaging diffusion sequence で撮像した。

### T1w/T2w 比画像によるミエリンマップの作成と解析

画像作成には Matlab と SPM8 を用いた。各被験者の T1w、T2w 画像をそれぞれ MNI 標準脳へ標準化し、標準化された T2w 画像を標準化された T1w 画像へ位置を合わせた。標準化された T1w 画像を位置を合わせた T2w 画像で割り、T1w/T2w 比画像を作成し、空間的平滑化を行った。

### DTI の解析

DTI データは水分子の拡散指標によって白質繊維統合性の評価を行う。Voxel あたりの楕円体のモデルを想定し、3 次元の直行するベクトルのスカラー量( $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ )を使って以下の異方性比率(FA)を求める。

$$FA = \frac{\sqrt{\frac{1}{2}(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}$$

FA は 0 から 1 までの値をとり、ミエリンの存在で白質の統合性が高いほど大きい値を取り、小さい値ほど白質の統合性が低下する。各被験者の DTI から、FSL を用いて渦電流の補正、頭部の動きを補正して各被験者の FA 画像を作成し、Tract-Based Spatial



statistics (TBSS)を用いて各群で群間比較を行った。各被験者の FA 画像を標準脳に標準化し、全被験者の共通した白質神経束部分を skeleton として抽出し、skeleton 上に投射した FA 値を各 voxel で群間比較を行った。

### 双極性障害群の解析

33 人の健常者と 29 人の双極性障害患者 (DSM IV で診断) を対象として MRI を撮像した。被験者はすべて和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ている。標準化した T1w/T2w 画像を作成し、SPM8 を用いて voxel-based analysis で年齢、性別、頭蓋内容積を共変量として、灰白質、白質で両群間の信号値を two-sample t-test で比較した。多重比較補正には 5000 回の permutation ( $p < 0.05$ ) を用いた。さらに、健常成人 24 人と双極性障害患者 25 人で拡散テンソル画像(DTI)を撮像 TBSS による白質繊維束の FA 値、白質での T1w/T2w 信号値の群間比較 (年齢による補正後) を行い、両手法に基づく白質微小構造異常の検出に対して比較を行った。多重比較補正には 5000 回の permutation( $p < 0.05$ )を行った。

### [結果]

T1w/T2w 信号値の群間比較では、双極性障害群が健常者群に対して白質で広範な領域において有意な信号値の低下を認めた (脳梁膝部、脳梁体部、脳梁膨大部、大脳脚、中小脳脚、前放線冠、視放線、外包、内包レンズ後脚)。また、TBSS では双極性障害群が健常者群より脳梁部位で FA 値の低下を認め、同じ集団で比較した T1w/T2w 比画像解析では、双極性障害群が脳梁部位に加えて小脳や中小脳脚で信号値の有意な低下を認めた。脳梁で有意差を認めた領域の空間分布がほぼ一致したため、有意差を認めた脳梁での T1w/T2w 信号値の平均と FA 値の平均とで相関を調べると、有意に正の相関を認めた (健常者群:  $r = 0.619, p = 0.0013$ 、双極性障害群:  $r = 0.742, p < 0.0001$ )。白質全体における T1w/T2w 信号値の平均と FA 値の平均でも有意な正の相関を認めた。(健常者

群: $r=0.542, p=0.0062$ 、双極性障害群: $r=0.691, p=0.000131$ 。

## [考察]

脳梁でのミエリン量低下は両半球間の神経接続異常が双極性障害の病態生理の重要な要因であることを示し、過去の DTI の報告とも一致する([Barnea-Goraly et al., 2009](#); [Chaddock et al., 2009](#))。放線冠や内包でのミエリン量低下も DTI の報告と一致している([Barnea-Goraly et al., 2009](#); [Bauer et al., 2015](#); [Poletti et al., 2015](#))。それに対して、脳幹の白質繊維の微小異常をとらえた報告はほとんど報告されていない。今回の研究では、橋小脳線維に相当する小脳、脳幹の領域でミエリン量が低下していることが明らかとなった。小脳は認知や気分の調整にも関連されている([Gordon, 2007](#))。橋小脳線維の異常は皮質と辺縁系間の相互作用を調節する機能に異常をきたし、双極性障害では気分の変動の調整を困難にする可能性を示唆する([Strakowski et al., 2002](#))。同じ被験者群を用いた TBSS と T1w/T2w 画像解析での比較では共に双極性障害群で脳梁のミエリン量低下を示し、その空間分布もほぼ一致したのと同時に、T1w/T2w 比画像解析では中小脳脚でもミエリン量が疾患群で低下していることが示された。DTI を用いた手法は、神経線維束に沿った水分子のブラウン運動を検出しているため、脳幹のような神経繊維束の交叉している領域でのミエリン異常の評価には精度が落ちるのに対して、T1w/T2w 比画像では神経繊維束の方向に関係なくミエリン量进行评估でき、神経繊維束交叉領域でのミエリン異常評価には T1w/T2w 比画像のほうが DTI よりもより適切な手法であると考えられる。さらに我々は FA 値、T1w/T2w 信号値の平均との相関をみたところ有意な正の相関を認め、定量的にも T1w/T2w 信号値は正しく白質のミエリンを反映していることが示された。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 29 年 5 月 29 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。

MRI の T1 強調画像 (T1w) の信号値を T2 強調画像 (T2w) の信号値で割った T1w/T2w 比画像の値は、脳組織のミエリンに比例するといわれている (Glasser and Van Essen 2011)。本研究ではミエリン形成不全が一因として考えられている双極性障害の病態把握に T1w/T2w 比画像が応用可能かを検討した。

健常成人 33 人と双極性障害患者 29 人で標準化した T1w/T2w 比画像を作成し、SPM8 を用いて両群間の信号値を比較した。灰白質では有意差のある領域は認めなかったが、白質では脳梁、放線冠、外包、内包後脚、中小脳脚でミエリン量の低下と考えられる有意な信号値の低下を認めた。また、ミエリンの微細構造異常をとらえる従来の拡散テンソル画像と比較するため、健常成人 24 人と双極性障害患者 25 人で fractional anisotropy (FA) を用いて tract-based spatial statistics (TBSS) を行うと同時に、T1w/T2w 比画像を用いて両群間の信号値の比較を行った。両手法において脳梁で双極性障害群がミエリン異常を認めた。さらに、T1w/T2w 比画像では双極性障害群が放線冠、小脳で信号値の低下を認めた。これは、拡散テンソル画像でミエリン異常の検出が困難な白質繊維が入り組んだ領域でも、T1w/T2w 比画像ではより鋭敏にミエリン異常をとらえることができる可能性を示している。これらの結果は T1w/T2w 比画像が双極性障害のミエリン異常を明らかにするために、白質においても拡散テンソル画像の補足的な手段として有用である可能性を示唆するものである。

本論文は、T1w/T2w 比画像が双極性障害のミエリン異常を明らかにすることで、その病態把握に有用であ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して認めた。

学位記番号	博(医)甲第558号		
学位授与の日	平成29年7月18日		
氏名	細井 裕樹		
学位論文の題目	An Epstein-Barr virus susceptible immature T-cell line, WILL4, established from a patient with T-lymphoblastic lymphoma bearing CD21 and a clonal EBV genome (CD21 とクローナルな EB ウイルスゲノムを有する T リンパ芽球性リンパ腫患者から樹立した EB ウイルスに感受性のある未熟 T 細胞株 WILL4)		
論文審査委員	主査	教授 保富 宗城	
	副査	教授 西尾 真智子	教授 園木 孝志

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

Epstein-Barr virus (EBV)はヒトヘルペスウイルス科に属し、様々な臓器のヒト疾患発症に関連している。EBVは標的細胞に侵入したあと潜伏感染し、時にEBV感染細胞の腫瘍性増殖が生じて悪性腫瘍を発生させる。造血器においては、EBVはB、T、NK細胞の腫瘍発生にかかわっている。大多数がB細胞性腫瘍であり、T細胞性やNK細胞性腫瘍は少ない。また、B、T、NK細胞の種類を問わず腫瘍細胞は成熟表現型を示し、未熟表現型を示す腫瘍細胞は極めてまれである。

B細胞においてEBVは細胞表面CD21を介して細胞内に侵入するが、T細胞やNK細胞における侵入門戸は確定されていない。また、EBVがT細胞、NK細胞腫瘍発症にはたす役割も明らかになっていない。EBVが潜伏感染すると、宿主細胞内で種々のウイルス由来の遺伝子（EBV潜伏感染遺伝子）が発現する。EBV潜伏感染遺伝子の発現パターンはLatency I、II、IIIに分類され、疾患単位によって異なる。EBV関連成熟B細胞性腫瘍の代表であるバーキットリンパ腫ではLatency Iで、免疫不全関連の成熟B細胞性腫瘍ではLatency IIIである。EBV関連成熟TやEBV関連成熟NK細胞性腫瘍ではLatency IIが多い。しかし、EBV関連未熟T細胞性腫瘍における潜伏感染遺伝子発現パターンは全く不明である。潜伏感染遺伝子の発現パターンの違いは、EBV感染細胞の抗原性の違いを示しており、EBV関連腫瘍発症機構の違いと関連していると考えられる。多くの抗原を発現するほどEBV感染細胞は細胞傷害性T細胞の攻撃を受けやすくなる。そのため、多くの抗原を発現しているEBV関連腫瘍では宿主の免疫能低下がEBV関連腫瘍発症に関与していると考えられる。このように、EBV関連腫瘍の潜伏感染状態を検討することは、EBV関連腫瘍発症機序を考える際に有用である。

今回、私たちはEBV関連T細胞腫瘍発症機序について検討するために、EBV関連未熟T細胞性腫瘍患者から細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いて、EBV関連未熟T細胞性腫瘍における潜伏感染遺伝子発現パターンを調べた。また、本細胞株におけるEBVの侵入門戸を検討した。

### 【材料と方法】

#### 細胞株 (WILL4) の樹立

WILL4は縦隔Tリンパ芽球性リンパ腫 (T-lymphoblastic lymphoma; T-LBL) と診断された患者の胸水中腫瘍細胞から樹立された。腫瘍細胞の表現型は、CD3、CD4、CD8、TdT陽性で、未熟T細胞の表現型を示した。免疫組織染色でEBERが陽性であり、EBV関連T-LBLと診断した。造血幹細胞移植治療後の再発時に胸水細胞を採取した。患者胸水細胞を血清無添加培養液 (X-VIVO) 中で継代培養し、細胞株「WILL4」を樹立した。

#### 実験 1. 表面抗原の検討

CD3、CD4、CD8などのT細胞表面抗原の発現をフローサイトメトリーで検討した。EBVの侵入門戸として既に知られているCD21の発現を検討した。WILL4のCD21発現を成熟B細胞株であるRajiのCD21発現と比較した。

## 実験 2. 胸水細胞と細胞株の同一性の検討

T 細胞受容体 C $\beta$ 1 プローブと、EBV の terminal repeat 近傍を認識するプローブ (EBV-TR プローブ) を用いてサザンブロット解析を行った。胸水細胞、WILL4 より抽出した DNA を Hind III で消化してサザンブロットを作成し、C $\beta$ 1 プローブを用いてハイブリダイゼーションした。また、DNA を Bam HI で消化してサザンブロットを作成し、EBV-TR プローブを用いてハイブリダイゼーションした。

## 実験 3. 潜伏感染遺伝子発現の検討

胸水細胞、WILL4 から RNA を抽出し、逆転写により cDNA を作成した。既報のプライマーセットを用いて、5 つの潜伏感染遺伝子 (EBNA1、EBNA2、LMP1、LMP2A、LMP2B) の発現を RT-PCR 法で検討した。

## 実験 4. In vitro での EBV 再感染実験

EBV 産生細胞株である B95-8 の培養上清から EB ウイルス粒子を濃縮した。1 $\times$ 10<sup>6</sup> 細胞の WILL4 に EBV を 37 度で 12 時間暴露させた。PBS で洗浄後 WILL4 を培養した。培養 3 日目と 14 日目に細胞を回収して、DNA を抽出し、EBV-TR プローブを用いてサザンブロット解析を行った。B95-8 細胞から産生された EBV は多様な長さの terminal repeat を持っているため、B95-8 細胞由来の EBV が感染するとラダー様のバンドが検出される。

## 実験 5. 抗 CD21 抗体を用いた感染阻害実験

WILL4 は CD21 を発現していた。そこで、WILL4 でも B 細胞と同様に、CD21 が EBV の侵入門戸であるとの仮説を立て、抗 CD21 抗体による EBV 感染阻害について検討した。前処理として、種々の濃度の抗 CD21 抗体 (OKB-7) を含む X-VIVO 培地にて WILL4 を 37 度 1 時間培養し、細胞表面 CD21 抗原をブロックした。PBS で細胞を除去後、WILL4 に EB ウイルス粒子を暴露させた。WILL4 を 7 日間培養し、回収した細胞から DNA を抽出してサザンブロット解析を行った。EB ウイルス粒子を作用させた細胞を用いて、潜伏感染遺伝子発現を解析し、EB ウイルス粒子に作用させる前と比較検討した。

### **【結果】**

## 実験 1. 表面抗原の検討

胸水細胞、WILL4 とも、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、 $\alpha\beta$ T 細胞受容体、TdT は陽性であった。WILL4 は CD21 を発現していた。WILL4 の CD21 発現強度は Raji より 1 log 低かった。

## 実験 2. 胸水細胞と細胞株の同一性の検討

胸水細胞、WILL4 において、C $\beta$ 1 プローブで同一の再構成バンドが検出され、同一の T 細胞クローンであることが確認できた。EBV-TR プローブでは単一のバンドが検出され、モノクローナルな EBV 感染が確認できた。

## 実験 3. 潜伏感染遺伝子発現の検討

胸水細胞、WILL4 とも、EBNA1、LMP2A を発現していた。EBNA2、LMP1、LMP2B は発現していなかった。

## 実験 4. In vitro での EBV 感染の検討

EBV-TR プローブでのサザンブロット解析で、EBV を暴露した細胞では、ラダー様のバンドが検出された。培養 3 日目より培養 14 日目の方が、検出されたバンドは増強していた。この結果から、B95-8 細胞由来の EBV が WILL4 に感染し、感染細胞が増殖したことが示された。

## 実験 5. 抗 CD21 抗体を用いた感染阻害実験

抗 CD21 抗体で前処理作用させると、B95-8 細胞由来の EBV 感染を示すバンドが減弱した。EBV

感染を示すバンドの減弱の程度は、抗CD21抗体濃度に依存していた。CD21がWILL4においてEBV侵入経路となっていることが示唆された。EBウイルス粒子を作用させた細胞の潜伏感染遺伝子発現パターンは、ウイルス粒子作用前の細胞の潜伏感染遺伝子発現パターンと変わらなかった。

#### 【考察】

我々は、EBV関連の未熟T細胞腫瘍患者より細胞株を樹立し、EBV潜伏感染遺伝子発現パターンの検討と、EBV侵入門戸の検討を行った。

EBV潜伏関連遺伝子発現検討ではWILL4はEBNA1、LMP2A陽性で、EBNA2、LMP1陰性であり、既存の潜伏感染遺伝子発現パターン(Latency I、II、III)とは合致しなかった。日本人の成熟T細胞腫瘍で同様の発現パターンを認めたという報告がある。我々の検討で、EBV関連T細胞腫瘍の中には、既存のEBV潜伏感染遺伝子発現パターンとは合致しない潜伏感染遺伝子発現パターンがあることを改めて示した。潜伏感染遺伝子発現パターンと発症疾患の種類とは関連しており、EBV関連未熟T細胞腫瘍発症機序を今後検討するにあたって、本研究は有用であると考えられる。

EBVはT細胞腫瘍発症にも関連する。これまでにEBVのT細胞への侵入に関連する分子として、CD21、CD35、HLA class IIなどが報告されているが、いまだ確定されていない。一方で、B細胞へはCD21を介してEBVが感染することが明らかにされている。大部分のT細胞はCD21を発現していないが、胸腺内の未熟T細胞では一過性にCD21を発現しているという報告がある。WILL4はCD21を発現しており、WILL4に新たにEBVが感染した。さらに、CD21を阻害するとWILL4へのEBV感染が減弱した。これらの結果からCD21がWILL4へのEBV侵入に関わっていることが確認できた。患者体内での未熟T細胞へのEBV感染もCD21を介していることが推察される。興味深いことに、本症例再発時の末梢リンパ節腫瘍細胞は、CD4陽性、CD8陰性であり、成熟T細胞腫瘍の表現型を示していた。

我々の結果は、①T細胞におけるEBV潜伏感染パターンが既存のパターンと異なること、②EBVのT細胞への侵入門戸としてCD21が重要であることを示唆した。EBV関連T細胞腫瘍に関しては、EBV感染経路など未確立なことが多く、本研究はEBV関連T細胞腫瘍機序解明の一助となると考えられる。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成29年6月23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。

Epstein-Barr virus (EBV)は様々な臓器のヒト疾患発症に関連している。血液悪性腫瘍では、大部分がB細胞性腫瘍であり、T細胞性やNK細胞性腫瘍は少ない。腫瘍細胞は成熟表現型を示し、未熟表現型を示すことはまれである。未熟T細胞腫瘍のEBV潜伏感染様式は不明である。また、T細胞へのEBV侵入門戸は確立されていない。本研究では、EBV関連未熟T細胞性腫瘍患者から細胞株を樹立し、EBV関連未熟T細胞腫瘍における潜伏感染遺伝子発現パターンとEBV侵入門戸の検討を行った。

縦隔Tリンパ芽球性リンパ腫と診断された患者の胸水細胞中腫瘍細胞から、細胞株WILL4を樹立した。サザンブロット解析にて患者胸水細胞とWILL4が同一であることを示した。次に、EBVの潜伏感染遺伝子発現パターンを、RT-PCRを用いて検討した。患者胸水細胞とWILL4は、既報のEBV潜伏感染遺伝子発現パターンとは異なった潜伏感染遺伝子パターンを示した。潜伏感染遺伝子発現パターンは発症疾患の種類と関連しているため、EBV関連未熟T細胞腫瘍ではB細胞腫瘍と腫瘍発症機序が異なることが考えられた。

EBVのB細胞への侵入門戸として既に知られているCD21発現を検討すると、WILL4はCD21を発現していた。WILL4にEBV産生細胞株であるB95-8培養上清から濃縮したEBVを曝露させると、WILL4に新たにEBVが感染した。そこで、WILL4でもCD21がEBVの侵入門戸であるとの仮説を立て、抗CD21抗体によるEBV感染阻害を検討した。抗CD21抗体で前処理してEBVに曝露させると、B95-8細胞由来のEBV感染は減少した。B95-8細胞由来のEBV感染の減少程度は、抗CD21抗体濃度に依存していた。このことから、WILL4においてCD21がEBV侵入経路であることが示唆された。成熟T細胞はCD21を発現していないが、胸腺内の未熟T細胞では一過性にC

D21を発現する。EBV関連T細胞腫瘍では、未熟T細胞の段階でCD21を介してEBVが感染していることが考えられる。

以上の結果から、①T細胞におけるEBV潜伏感染遺伝子発現パターンは既存のパターンと異なること、②EBVのT細胞への侵入門戸としてCD21が重要であることが示唆された。EBV関連未熟T細胞腫瘍に関してはEBV感染経路など未確立なことが多く、本研究はEBV関連T細胞腫瘍発症機序解明の一助になると考えられ、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第559号		
学位授与の日	平成29年8月8日		
氏名	里神 和美		
学位論文の題目	Omega-3 fatty acids related to cognitive impairment in patients with schizophrenia (統合失調症における認知機能障害と $\omega$ -3脂肪酸の関連)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 鶴飼 聡

## 論文内容の要旨

### 【諸言】

統合失調症は、陽性症状、陰性症状、認知機能障害からなる慢性疾患である。そのうち認知機能障害は、対人関係や余暇活動、仕事、学業といった社会予後と強い関係を持つとされるが、その生物学的基盤はいまだ明らかでない。

$\omega$ -3脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) やドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid, DHA) は、抗炎症・抗酸化作用、神経新生などの神経保護作用を持つとされ、ラットを使った動物実験や、軽度の認知機能障害をもつ高齢者において認知機能と $\omega$ -3脂肪酸との関連が多く報告されるようになった。統合失調症では、メタ解析で脳内および血液中の $\omega$ -3脂肪酸量の減少が報告されている。これまでにいくつかの $\omega$ -3脂肪酸量と精神症状との関係の報告があるが、認知機能との関係をみた研究はほとんどない。そこで本研究では、統合失調症における $\omega$ -3脂肪酸と認知機能、社会機能、精神症状との関係を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

対象は、統合失調症患者 30 名である。すべての患者は抗精神病薬による治療を受けていた。被験者のうち 2 人は降圧薬を、別の 2 人は高脂血症治療薬を内服していた。

精神症状、認知機能、社会機能はそれぞれ陽性・陰性症状評価尺度 (Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS)、統合失調症認知機能簡易評価尺度 (The Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia, BACS)、社会機能評価尺度 (Social Functioning Scale, SFS) を用いて評価した。早朝空腹時に血液検体を採取し、high-density lipoprotein (HDL) コレステロール、low-density lipoprotein (LDL) コレステロール、トリグリセリド (TG)、HbA1c、空腹時血糖、および脂肪酸 (EPA, DHA, dihomo-gamma-linolenic acid, arachidonic acid) を測定した。

各脂肪酸、BACS、PANSS、SFS、抗精神病薬との関連を Spearman の順位相関係数を用いて検討した (有意水準  $p < 0.01$ )。また、社会機能における認知機能、精神症状、抗精神病薬の関連をみるため、SFS を従属変数とし、BACS、PANSS、抗精神病薬量を独立変数とした Step-wise multiple regression analysis を用いて検討した (有意水準  $p < 0.05$ )。

本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ており、すべての対象者から文書による同意を取得している。

### 【結果】

被験者のうち、4 人が高血圧と脂質代謝異常の基準を満たし、1 人が高血圧と糖尿病の基準を満たし、1 人が脂質代謝異常と糖尿病の基準を満たした。また 3 人は高血圧のみ、6 人は脂質代謝異常のみ、1 人は糖尿病のみの基準を満たした。

Spearman の順位相関解析では、BACS は EPA ( $r = 0.474$ ,  $p = 0.008$ )、DHA ( $r = 0.524$ ,  $p = 0.009$ ) と有意な相関を認めた。加えて、抗精神病薬量は DHA ( $r = -0.469$ ,  $p = 0.009$ )、BACS ( $r = -0.501$ ,  $p = 0.006$ ) との間に有意な負の相関を認めた。Step-wise multiple regression analysis では、SFS と BACS との間に有意な関連が認められた ( $\beta = 0.522$ ,  $P = 0.003$ )。



## 【考察】

本研究では、統合失調症患者において、血液中 EPA・DHA 値が BACS と有意に相関し、BACS は SFS と有意に関連することが示された。これらの結果は、統合失調症患者において $\omega$ -3 脂肪酸の低値が認知機能障害の誘因となり、認知機能障害は社会機能へ影響を与える可能性を示唆している。

$\omega$ -3 脂肪酸は、細胞膜や神経軸索のミエリン鞘の重要な構成因子である。健常者を対象とした研究では、 $\omega$ -3 脂肪酸の摂取により、前頭葉機能の向上や、脳灰白質、白質結合性の増加などが報告されているが、本研究は統合失調症における $\omega$ -3 脂肪酸と認知機能の直接的な関係をみた初めての報告である。

本研究では、抗精神病薬が DHA と有意な負の相関を持ち、 $\omega$ -3 脂肪酸と精神症状の間に有意な相関は認められなかった。 $\omega$ -3 脂肪酸と薬剤、精神症状との関係はいくつかの報告があるが結果は一定しておらず、その要因としては、被検者の精神症状の重症度や罹病期間、使用薬剤、年齢、人種、食生活を含めた生活習慣の違いなどがあげられる。今後は、 $\omega$ -3 脂肪酸が認知機能障害の進展にどのような影響を与えるのか、さらなる研究が必要である。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 7 月 25 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は、統合失調症における $\omega$ -3 脂肪酸と認知機能、社会機能、精神症状との関係を明らかにすることである。

統合失調症患者 30 名を対象に、血中脂肪酸と、認知機能（The Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia, BACS）、精神症状（Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS）、社会機能（Social Functioning Scale, SFS）を測定した。血中脂肪酸、BACS、PANSS、SFS、抗精神病薬量との関連を Spearman の順位相関係数を用いて検討した（有意水準  $p < 0.01$ ）。また、SFS を従属変数とし、BACS、PANSS、抗精神病薬量を独立変数とした Step-wise multiple regression analysis を用いて検討した（有意水準  $p < 0.05$ ）。Spearman の順位相関解析では、BACS は EPA、DHA と有意な相関を認めた。抗精神病薬量は DHA、BACS との間に有意な負の相関を認めた。Step-wise multiple regression analysis では、SFS と BACS との間に有意な関連を認めた。一方で、 $\omega$ -3 脂肪酸と精神症状の間に有意な相関は認められなかった。

本論文では、統合失調症患者において、血液中 EPA・DHA 値が BACS と有意に相関し、BACS は SFS と有意に関連することが示された。これらの結果は、統合失調症患者において $\omega$ -3 脂肪酸の低値が認知機能障害の誘因となり、認知機能障害は社会機能へ影響を与える可能性を示唆している。

$\omega$ -3 脂肪酸は細胞膜や神経軸索のミエリン鞘の重要な構成因子であり、健常者を対象とした研究では、 $\omega$ -3 脂肪酸の摂取により前頭葉機能の向上や、脳灰白質、白質結合性の増加などが報告されている。統合失調症では、脳内および血液中の $\omega$ -3 脂肪酸量の減少がメタ解析で報告され、 $\omega$ -3 脂肪酸量と精神症状との関係の報告はあるものの、認知機能との関係性を評価した研究はほとんどない。

本論文は統合失調症における $\omega$ -3 脂肪酸と認知機能の直接的な関係を評価した初めての報告であり、統合失調症における認知機能障害の病態解明や $\omega$ -3 脂肪酸による治療法の開発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560号		
学位授与の日	平成29年9月19日		
氏名	南條 佐輝子		
学位論文の題目	The levels of serum-circulating angiogenic factors within one week prior to delivery are closely related to conditions of pregnant women with preeclampsia, gestational hypertension and/or fetal growth restriction (妊娠高血圧腎症、妊娠高血圧症および胎児発育不全合併妊娠における分娩1週間前の母体血中血管新生関連因子は、その重症度と密接に相関する)		
論文審査委員	主査	教授 鈴木 啓之	
	副査	教授 重松 隆	教授 井篁 一彦

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

妊娠高血圧症候群 (Hypertensive Disorders of Pregnancy: HDP) は母児の予後が不良な周産期合併症の一つである。HDP は、妊娠 20 週以降、分娩後 12 週までに診断される高血圧がみられる場合、または高血圧に蛋白尿を伴う場合のいずれかで、かつこれらの症状が単なる妊娠の偶発症状によるものではないものと定義される。HDP の病態として、妊娠初期の胎盤形成不全とそれに続く母体の血管内皮障害であるとされる 2step theory が広く提唱されているが、その病態については未だ解明されていないことが多い。

HDP では、母体血清中の free placental growth factor (PlGF) が低下し、soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1)、soluble endoglin (sEng) が増加することが分かっており、中でも特に sFlt-1/PlGF 比は、より鋭敏なマーカーであるとされている。これらの血清マーカーの変化は HDP を発症する数週間前より推移するとされ、近年 HDP の発症を予知するマーカーとして注目されている。

HDP のうち、蛋白尿を伴わないものを妊娠高血圧症 (Gestational Hypertension: GH)、高血圧に蛋白尿も伴うものを妊娠高血圧腎症 (Preeclampsia: PE) という。また、妊娠 32 週までに発症するものを早発型 (Early Onset: Eo)、妊娠 32 週以降の発症のものを遅発型 (Late Onset: Lo) と分類する。HDP では、母体合併症状の重篤化や胎児機能不全などにより早期に妊娠の終了を選択せざるを得ない症例が多い。特に蛋白尿を伴う PE 症例や PE に胎児発育不全 (Fetal Growth Restriction: FGR) を合併する症例、早発型の PE 症例では、管理が困難であり児の予後は不良である。

### 【目的】

今回我々は、HDP や FGR の症例を細かく病態により分類し、その病態毎での母体血中の上記マーカーを検討することで、血清学的特徴から HDP や FGR の病態を解析する事を目的とした。

### 【方法】

本学倫理委員会の承認のもと、2009 年から 2015 年の 6 年間に当院で分娩を行った妊婦のうち、インフォームドコンセントで同意の得られた症例を対象とし、分娩前 1 週間以内に採取した血清を用い、ELISA 法にて血清の解析を行った。

#### 1. 妊娠高血圧症候群 (HDP) への蛋白尿合併の有無での検討

HDP の症例のうち、蛋白尿を伴わない GH 群 (n=19) と蛋白尿を伴う PE 群 (n=72)、合併症のない正常経過の妊婦 (Control 群) (n=11) について、母児の臨床アウトカムや測定した血清マーカーの比較検討を行った。

#### 2. 妊娠高血圧腎症 (PE) への FGR 合併の有無での検討

HDP に蛋白尿を伴う妊娠高血圧腎症に症例を絞り、PE の中で、胎児に発育不全を伴う症例 (PE+FGR 群) (n=32)、FGR を伴わない PE 症例 (PE only 群) (n=40)、高血圧・蛋白尿を伴わない FGR 症例 (FGR only 群) (n=47)、対象群 (PE+FGR 群に週数をマッチさせた Preterm 群 (n=16)、Control 群 (n=11)) の 5 群間で母児の臨床アウトカムや測定した血清マーカーの比較検討を行った。

#### 3. 妊娠高血圧腎症 (PE) の発症時期での検討

PE 症例のうち、32 週までに発症した早発型 PE (Eo 群) (n=24)、32 週以降に発症した遅発型 PE

(Lo 群) (n=48)、Control 群 (n=11) の 3 群間で同様に比較検討を行った。

## 【結果】

### 1. 妊娠高血圧症候群 (HDP) への蛋白尿合併の有無での検討

児のアウトカムは GH 群と Control 群で有意差を認めなかったが、PE 群では Control 群や GH 群と比較して、分娩週数も早く帝王切開率も高かった。

血清学的検討では、PE 群では Control 群と比較して有意な PIGF 低値、sFlt-1 高値、sEng 高値、sFlt-1/PIGF 高値を認めた。一方、GH 群では PIGF、sFlt-1、sEng それぞれ単独の因子では Control 群と有意差を認めなかったが、sFlt-1/PIGF 比のみ Control より有意に高値となった。

### 2. 妊娠高血圧腎症 (PE) への FGR 合併の有無での検討

PE の中で FGR の合併の有無で検討した時、PE+FGR 群は PE 群と比較して分娩週数は早く、帝王切開率も 78.1% と有意に高かったが、血圧や蛋白尿などの母体症状は両群で有意差を認めなかった。PE+FGR 群の児は出生体重も小さく、アプガースコアや臍帯動脈血 pH も低値であった。

血清学的検討では、PE only 群は Control 群と比較して有意に sFlt-1、sEng、sFlt-1/PIGF 比が高値であった。PE+FGR 群では、他の全群と比較して有意な PIGF 低値、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PIGF 比高値を認めた。FGR only 群では、PE 症例と類似した血清マーカーの傾向を示したが、Control 群と有意差を認めたのは PIGF、sEng のみであった。

### 3. 妊娠高血圧腎症 (PE) の発症時期での検討

PE の中で発症週数が 32 週未満 (Eo) の症例と 32 週以降 (Lo) の症例で比較した時、Eo 群は帝王切開率が 95.8% と高く、FGR の合併率も高かった。また、Eo 群は Lo 群より母体血圧や蛋白尿が有意に高値であった。

血清学的検討では、Lo 群は Control 群と比較して sFlt-1、sEng、sFlt-1/PIGF 比が有意に高値であった。Eo 群では Lo 群や Control 群と比較して有意な PIGF 低値、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PIGF 比高値を認めた。

## 【考察】

今回、我々は HDP 患者および FGR 患者血清中での PIGF、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PIGF 比を測定することで、HDP の病態毎での臨床背景と血管新生関連因子との相関を検討した。

HDP の中でも蛋白尿を伴わない GH は、母児のアウトカムを増悪させなかった。血清マーカーについても、PIGF、sFlt-1、sEng それぞれ単独の因子の検討では Control と有意差を認めず sFlt-1/PIGF 比のみで有意な上昇を認めた。蛋白尿を伴う PE では、すべての血清マーカーで Control と有意差を認めた。

PE 症例の中で、FGR 合併の有無による検討では、より重症である PE+FGR 群では、FGR を合併しない PE only 群と比較して有意な PIGF 低下、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PIGF 比上昇を認め、FGR の合併の有無による重症度に血清マーカーが相関する事が示された。また、FGR 単独症例は PE 症例と比較すると程度は軽度であるが、PE 症例と類似した血清マーカーの傾向を示し、PE と FGR には共通する病態が存在する可能性が示唆された。

PE 症例の中で、PE の発症時期での検討では、より重症である早発型の Eo 群では、Lo 群と比較して、児への FGR 合併率も高く、母体血圧や蛋白尿の程度も強く、母児のアウトカムが不良であった。血清マーカーについても Eo 群では、より有意な PIGF 低下、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PIGF 比上昇を認め、PE の発症時期による重症度とも相関する事が分かった。

## 【結語】

今回、我々の 3 つの検討を通し、分娩前の母体血清中 Angiogenic factor 値が妊娠高血圧症候群の病態毎での重症度と相関すること、特に母児の予後が不良となる胎児発育不全を合併する妊娠高血圧腎症症例や早発症例で血清マーカーの変化が顕著であること、sFlt-1/PIGF 比は軽症の妊娠高血圧症候群症例でも Control より有意に上昇する有用なマーカーであること、妊娠高血圧症候群と胎児発育不全は類似した血清学的特徴を示し、両疾患に共通する病態が存在する可能性が示された。今後、中期血清の検討や胎盤組織を用いた研究を加えることで、重症妊娠高血圧腎症の発症予知や病態解明などにつなげる事が期待できる研究であった。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 8 月 7 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。妊娠高血圧症候群（Hypertensive Disorders of Pregnancy: HDP）は母児の予後が不良な周産期合併症の 1 つである。HDP は多彩な臨床像を示すが、その病態については未だ解明されていないことが多い。また、HDP では母体血清中の free placental growth factor (PlGF) が低下、soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1)、soluble endoglin (sEng) が増加することが分かっており、特に sFlt-1/PlGF 比はより鋭敏なマーカーであるとの報告がある。本論文では、HDP や胎児発育不全（Fetal Growth Restriction: FGR）症例を①蛋白尿の有無、②FGR 合併の有無、③発症時期による病態毎に細分類し、母体の分娩前の血清中の上記マーカーを検討することで、血清学的特徴から HDP や FGR の病態を解析した。

①HDP を蛋白尿の有無で蛋白尿を伴わない妊娠高血圧症群（Gestational Hypertension: GH）19 例、高血圧に蛋白尿も伴う妊娠高血圧腎症群（Preeclampsia: PE）72 例、正常妊娠経過の正期産群（Term Control）11 例について母児の臨床アウトカムや血清マーカーの比較検討を行った。臨床アウトカムは GH と Control で有意差を認めなかったが、PE では Control や GH と比較して予後不良であった。血清マーカーでは、PE では Term Control と比較して有意な PlGF 低値、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PlGF 高値を認めた。一方、GH では sFlt-1/PlGF 比以外では Control と有意差を認めなかった。

②PE の中で、胎児発育不全を伴う群（PE+FGR）32 例、FGR を伴わない PE 群（PE alone）40 例、高血圧・蛋白尿を伴わない FGR 群（FGR alone）47 例、対象群（PE+FGR 群に週数をマッチさせた Preterm Control 群 16 例、Term Control 群 11 例）の 5 群間で同様に比較検討を行った。PE+FGR 群は PE alone 群と比較して児の予後は不良であったが、血圧や蛋白尿などの母体症状には有意差を認めなかった。血清マーカーでは、PE+FGR 群では他の全群と比較して有意な PlGF 低値、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PlGF 比高値を認めた。PE alone 群は Term Control と比較して有意に sFlt-1、sEng、sFlt-1/PlGF 比が高値であった。FGR alone 群では、PE 症例と類似した血清マーカーの傾向を示した。

③PE 症例の発症週数別で、早発型 PE 群（Eo PE）24 例、遅発型 PE 群（Lo PE）48 例、Term Control 群 11 例の 3 群間で同様に比較検討を行った。Eo PE 群は帝王切開率が高く、FGR の合併率も高かった。また、母体血圧や蛋白尿が有意に高値であった。血清マーカーでは、Lo PE 群は Control と比較して sFlt-1、sEng、sFlt-1/PlGF 比が有意に高値であった。Eo PE 群では Lo PE 群や Control 群と比較して有意な PlGF 低値、sFlt-1、sEng、sFlt-1/PlGF 比高値を認めた。

今回の我々の 3 つの検討を通し、分娩前の母体血清中 Angiogenic factor が HDP の病態毎での重症度と相関すること、特に母児の予後が不良となる FGR 合併 PE や Eo PE 症例で血清マーカーの変化が顕著であること、sFlt-1/PlGF 比は軽症の HDP でも有意に上昇する有用なマーカーであること、HDP と FGR は類似した血清学的特徴を示し、両疾患に共通する病態が存在する可能性が示された。HDP での血清マーカーの解析が各病態の解明に有用である可能性が示唆され、学位論文として価値のあるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第561号		
学位授与の日	平成29年9月25日		
氏名	中嶋 宏児		
学位論文の題目	Molecular epidemiology of nonencapsulated <i>Streptococcus pneumoniae</i> among Japanese children with acute otitis media (日本の急性中耳炎患児における肺炎球菌無莢膜型株の分子疫学的検討)		
論文審査委員	主査	教授 西尾 真智子	
	副査	教授 宮下 和久	教授 保富 宗城

## 論文内容の要旨

### 「緒言」

肺炎球菌の血清型は、その構成成分である莢膜多糖体によって分類される。現在 90 あまりの莢膜型が知られている。そのうち 7 種類の莢膜型に対応した PCV 7 の摂取が開始され、ワクチン非カバー型の血清型 19A による肺炎球菌感染症の増加が問題となってきた。その後、6 莢膜型が追加された PCV13 の接種が開始された。しかしながら、すでに米国、ヨーロッパでは非ワクチン血清型の有病率が増加しているとの報告がある。この非ワクチン血清型のうち、無莢膜型肺炎球菌 NTSP については、強力な病原因子である莢膜をもたないため、病原性は低いと推測され、その病原性や分離頻度の変化についての報告は少ない。

今回我々は無莢膜型肺炎球菌の分離頻度と無莢膜型のみを確認される病原因子 PspK について、本邦で初めて検討した。

### 「方法」

275 株の肺炎球菌単離株を用いた。200 株は急性中耳炎の全国サーベイランスでえられた株であり、75 株は国保日高総合病院の耳鼻咽喉科外来で採取した。全て鼻咽腔からの採取であり 75 株中 38 株は急性中耳炎患児、21 株は急性鼻副鼻腔炎患児、16 株は健常児から採取した。QIAamp blood mini kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いて DNA を抽出した。莢膜コード領域 *wzg* のプライマーを用いて PCR で増幅し、電気泳動で増幅の有無を判定した。さらに、無莢膜型と判定した肺炎球菌株の MLST 解析をおこなった。

### 「結果」

急性中耳炎罹患児 238 検体中、無莢膜型肺炎球菌は 15 検体 6.4%、急性副鼻腔炎罹患児 21 検体中、無莢膜型肺炎球菌は 3 検体 14.0%。そして、健常児 16 検体中、無莢膜型肺炎球菌は 2 検体 12.5%であった。無莢膜型肺炎球菌 20 検体中 15 検体 (75.0%) が *pspk* 遺伝子を持っていた。MLST 解析により 20 検体中 13 検体で ST を特定できた。すなわち、ST7502 (5 株) ST1106 (2 株) ST7803 (2 株) ST778 (1 株) ST6741 (1 株) ST7496 (1 株) ST8642 (1 株) であった。

### 「考察」

タンパク結合型肺炎球菌ワクチンの普及に伴い、肺炎球菌に占める、非ワクチン血清型肺炎球菌の割合増加が問題視されている。非ワクチン血清型肺炎球菌である無莢膜型肺炎球菌の割合が今後増加すると予想される。無莢膜型肺炎球菌は莢膜を形成しないため、莢膜多糖体をターゲットとした現行の結合型ワクチンの有効性が期待できない。したがって、莢膜以外の蛋白抗原ワクチンの新規開発、及び無莢膜型も含めた肺炎球菌血清型の持続的なサーベイランスが重要となる。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

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

肺炎球菌の血清型は、その構成成分である莢膜多糖体によって分類される。現在 90 あまりの莢膜型が知られている。そのうち 7 種類の莢膜型に対応した PCV 7 の接種が開始され、ワクチ

ン非カバー型の血清型 19A による肺炎球菌感染症の増加が問題となってきた。その後、6 莢膜型が追加された PCV13 の接種が開始された。しかしながら、すでに米国、ヨーロッパでは非ワクチン血清型の有病率が増加しているとの報告がある。この非ワクチン血清型のうち、無莢膜型肺炎球菌 NTSP については、強力な病原因子である莢膜をもたないため、病原性は低いと推測され、その病原性や分離頻度の変化についての報告は少ない。

本論文は、無莢膜型肺炎球菌の分離頻度と無莢膜型のみに確認される病原因子 PspK について、本邦で初めて検討した。

275 株の肺炎球菌単離株を用いた。200 株は急性中耳炎の全国サーベイランスでえられた株であり、75 株は国保日高総合病院の耳鼻咽喉科外来で採取した。全て鼻咽腔からの採取であり 75 株中 38 株は急性中耳炎患児、21 株は急性鼻副鼻腔炎患児、16 株は健常児から採取した。QIAamp blood mini kit(QIAGEN, Valencia, CA, USA)を用いて DNA を抽出した。莢膜コード領域 *wzg* のプライマーを用いて PCR で増幅し、電気泳動で増幅の有無を判定した。さらに、無莢膜型と判定した肺炎球菌株の MLST 解析をおこなった。

急性中耳炎罹患児 238 検体中、無莢膜型肺炎球菌は 15 検体 6.4%、急性副鼻腔炎罹患児 21 検体中、無莢膜型肺炎球菌は 3 検体 14.0%。そして、健常児 16 検体中、無莢膜型肺炎球菌は 2 検体 12.5%であった。無莢膜型肺炎球菌 20 検体中 15 検体 (75.0%) が *pspk* 遺伝子を持っていた。MLST 解析により 20 検体中 13 検体で ST を特定できた。すなわち、ST7502 (5 株) ST1106 (2 株) ST7803 (2 株) ST778 (1 株) ST6741 (1 株) ST7496 (1 株) ST8642 (1 株) であった。

タンパク結合型肺炎球菌ワクチンの普及に伴い、肺炎球菌に占める、非ワクチン血清型肺炎球菌の割合増加が問題視されている。非ワクチン血清型肺炎球菌である無莢膜型肺炎球菌の割合が今後増加すると予想される。無莢膜型肺炎球菌は莢膜を形成しないため、莢膜多糖体をターゲットとした現行の結合型ワクチンの有効性が期待できない。したがって、莢膜以外の蛋白抗原ワクチンの新規開発、及び無莢膜型も含めた肺炎球菌血清型の持続的なサーベイランスが重要となる。

以上、本論文は無莢膜型肺炎球菌の分離頻度と、無莢膜型のみに確認される病原因子 PspK 陽性株の頻度について、本邦で初めて報告したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第562号		
学位授与の日	平成29年10月17日		
氏名	尾崎 充宣		
学位論文の題目	Optogenetic activation of the sensorimotor cortex reveals “local inhibitory and global excitatory” inputs to the basal ganglia (大脳皮質の運動感覚領域から大脳基底核への入力は「抑制性成分が狭く、興奮性成分が広く」分布していることを光遺伝学を応用した刺激方法で示す)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 森川 吉博	教授 中尾 直之

## 論文内容の要旨

### <緒言>

大脳基底核は、大脳皮質の幅広い領域から受け取った情報を修飾し、視床を介して大脳皮質に戻す役割があると考えられている。大脳皮質を電気刺激すると大脳基底核の中継核である淡蒼球外節と出力核である淡蒼球内節の双方で3相性(早い興奮、抑制、遅い興奮)の反応を記録できることが知られている。この3相性はそれぞれハイパー直接路(大脳皮質-視床下核-淡蒼球外節/内節)、直接路(大脳皮質-線条体-淡蒼球外節/内節)、間接路(大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球外節/内節)といった大脳基底核内の異なる経路を表しているとされている。しかしながら大脳皮質の刺激部位によってはこれらの3相性がみられないこともあり、それぞれの要素の分布については明らかになっていない。そこで今回私達は光遺伝学を応用した新しい方法を用いてマウスの運動・感覚野に相当する大脳皮質12カ所を刺激し、得られた淡蒼球外節、内節の反応を記録した。大脳皮質内に刺激電極を埋め込む従来の電気刺激の方法では困難であった、複数箇所の大脳皮質刺激を行い、前述の3相性の分布を電気生理学的に明らかにしたので報告する。

### <目的>

大脳皮質の異なる部位を刺激することで得られる淡蒼球外節、内節での反応を記録することで、大脳皮質基底核ループに存在する3つの経路(ハイパー直接路、直接路、間接路)の分布を明らかにする。

### <対象と方法>

Thy1-ChR2-YFP トランスジェニックマウス10匹を用いた。これは大脳皮質第5層に存在する神経細胞にチャンネルロドプシン2を発現させ、青色光を当てることで選択的にその神経細胞を興奮させることができるマウスである。このマウスの頭部にU字型のフォルダーを取付けた後に、右半球を広範囲に開頭した。U字型のフォルダーを用いて頭部を固定し、覚醒下(無麻酔)の状態でも慢性期実験を行った。プロジェクターに機械式シャッターを取り付けた光源を使用し、顕微鏡を用いて光を集束させ、直径1mmの光円を作成、大脳皮質の運動・感覚野に相当する部位12カ所にそれぞれ光刺激を行った。まず予備実験として、光刺激を行った際に得られる大脳皮質の神経細胞の反応を記録したうえで、次に淡蒼球外節/内節で単細胞記録を行い、12カ所の異なる大脳皮質刺激部位で得られる反応をそれぞれ記録した。

### <結果>

本実験系で大脳皮質を光刺激すると $5.0 \pm 1.9$ ms (n=10)の潜時をもって大脳皮質神経細胞を興奮させることができた。また光刺激に反応する大脳皮質神経細胞は、ほぼその照射範囲内に局限することが分かった。12カ所の異なる部位で大脳皮質に光刺激を行ったとき、少なくとも1カ所以上に3相性の反応が得られた神経細胞は、淡蒼球外節で82個、内節で43個であった。3相性が得られた大脳皮質刺激部位が2カ所以上の場合、抑制性成分が最も大きく得られた箇所をbest spotと定義し、best

spot における各要素の潜時、持続時間、振幅を算出した。淡蒼球外節、内節双方において、抑制を引き起こすことができる大脳皮質の領域は狭く、逆に早い興奮、遅い興奮を引き起こす大脳皮質の領域は広がった。

#### <考察>

Thy1-ChR2-YFP トランスジェニックマウスの大脳皮質の神経細胞を光刺激により照射範囲に局限して興奮させることができた。また、その光刺激によって淡蒼球外節、内節ともに3相性の反応が記録できた。3相性各要素の潜時は前述の光刺激の潜時を考慮すると既知の電気刺激による潜時の値とほぼ同等であった。これにより本実験系によって得られたデータは従来の電気刺激による実験系のデータと同様に解釈することができると考えた。

運動・感覚野に相当する大脳皮質 12 カ所を刺激したときに得られる淡蒼球外節、内節の反応を解析すると、抑制を誘発する大脳皮質の領域は狭く、逆に早い興奮、遅い興奮を誘発する領域は広がった。これらの結果より、大脳皮質からの入力には淡蒼球外節、内節ともに興奮性成分であるハイパー直接路、間接路が広く分布しており、抑制性成分である直接路が狭く分布していることが分かった。以前より解剖学的には、視床下核から淡蒼球への投射（興奮性成分）は淡蒼球内の多くの神経細胞に広く軸索を送っている一方で、線条体から淡蒼球への投射（抑制性成分）は淡蒼球内の同じ神経細胞に集束して軸索を送っているといわれていた。本研究は、大脳基底核内において興奮性成分は大脳皮質の広い領域からの入力を受け、抑制性成分は狭い領域からの入力を受けていることを電気生理学的に初めて示したものである。大脳皮質からの情報が大脳基底核内において本様式で集束、拡散していることは、例えば意図した運動を行う際に、大脳皮質からの必要な情報が大脳基底核を通ることができる一方で、粗大な運動などの意図しない不要な情報は大脳基底核内で消去され、通過できないことを示唆している。本研究の内容は大脳皮質基底核ループの機能を理解することに大きく貢献するものであると考えられる。

#### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年9月26日、28日、10月2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。

大脳基底核は、大脳皮質の幅広い領域から受け取った情報を修飾し、視床を介して大脳皮質に戻す役割があると考えられている。大脳皮質を電気刺激すると大脳基底核の中継核である淡蒼球外節と出力核である淡蒼球内節の双方で3相性（早い興奮、抑制、遅い興奮）の反応を記録できることが知られている。この3相性はそれぞれハイパー直接路（大脳皮質-視床下核-淡蒼球外節/内節）、直接路（大脳皮質-線条体-淡蒼球外節/内節）、間接路（大脳皮質-線条体-淡蒼球外節-視床下核-淡蒼球外節/内節）といった大脳基底核内の異なる経路を表しているとされている。しかしながら大脳皮質の刺激部位によってはこれらの3相性がみられないこともあり、それぞれの要素の分布については明らかになっていない。そこで学位申請者は光遺伝学を応用した新しい方法を用いてマウスの運動・感覚野に相当する大脳皮質 12 カ所を刺激し、得られた淡蒼球外節、内節の反応を記録した。大脳皮質内に刺激電極を埋め込む従来の電気刺激の方法では困難であった、複数箇所の大脳皮質刺激を行い、前述の3相性の分布を電気生理学的に明らかにしたので報告する。Thy1-ChR2-YFP トランスジェニックマウスの大脳皮質の神経細胞を光刺激により照射範囲に局限して興奮させることができた。また、その光刺激によって淡蒼球外節、内節ともに3相性の反応が記録できた。3相性各要素の潜時は前述の光刺激の潜時を考慮すると既知の電気刺激による潜時の値とほぼ同等であった。これにより本実験系によって得られたデータは従来の電気刺激による実験系のデータと同様に解釈することができると考えた。運動・感覚野に相当する大脳皮質 12 カ所を刺激したときに得られる淡蒼球外節、内節の反応を解析すると、抑制を誘発する大脳皮質の領域は狭く、逆に早い興奮、遅い興奮を誘発する領域は広がった。これらの結果より、大脳皮質からの入力には淡蒼球外節、内節ともに興奮性成分であるハイパー直接路、間接路が広く分布しており、抑制性成分である直接路が狭く分布していることが分かった。以前より解剖学的には、視床下核から淡蒼球への投射（興奮性成分）は淡蒼球内の多くの神経細胞に広く軸索を送っている一方で、線条体から淡蒼球への投射（抑制性成分）は淡蒼球内の同じ神経細胞に集束し



て軸索を送っているといわれていた。本研究は、大脳基底核内において興奮性成分は大脳皮質の広い領域からの入力を受け、抑制性成分は狭い領域からの入力を受けていることを電気生理学的に初めて示したものである。大脳皮質からの情報が大脳基底核内において本様式で集束、拡散していることは、例えば意図した運動を行う際に、大脳皮質からの必要な情報が大脳基底核を通ることができる一方で、粗大な運動などの意図しない不要な情報は大脳基底核内で消去され、通過できないことを示唆している。本研究の内容は大脳皮質基底核ループの機能を理解することに大きく貢献するものであると考えられる。

本論文は大脳皮質基底核ループの興奮性成分、抑制性成分の分布を電気生理学的に初めて報告したものである。大脳基底核の機能的役割についての新しい知見を含んでおり、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563号		
学位授与の日	平成29年10月17日		
氏名	山本 円		
学位論文の題目	Calreticulin is involved in invasion of human extravillous trophoblasts through functional regulation of integrin $\beta$ 1 (カルレティキュリンはインテグリン $\beta$ 1の機能調節を介してヒト絨毛外栄養膜細胞浸潤を制御する)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 井篁 一彦

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

胎盤は母体と胎児を結び、児の生命を維持する非常に重要な臓器である。妊娠初期における胎盤形成の過程において絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) の浸潤が非常に重要な役割を果たす。EVT は母体の脱落膜内から子宮筋層の浅層に浸潤し、子宮壁の血管構造が EVT により置換されることにより絨毛間腔へと流入する母体血液量が確保される。妊娠初期の EVT の浸潤が不十分であると胎盤形成不全となり妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの疾患をきたすと言われている。EVT の浸潤機構はまだ不明な部分も多く、その解明は胎盤形成の生理的意義のみならず妊娠高血圧腎症などの疾患の病態解明にもつながる可能性がある。近年、妊娠とともに血中濃度が増加し、妊娠高血圧腎症に関与する分子としてカルレティキュリン (CRT) が報告された。CRT は小胞体に局在する分子シャペロンの一つで、小胞体における  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの貯蔵と糖タンパク質のフォールディング、品質管理に関わる。CRT は細胞接着やアポトーシスなど、様々な細胞の機能にも関わることが報告されているが、胎盤におけるその機能や生理的意義については未だ明らかではない。そこで、今回 CRT の EVT 浸潤に果たす役割について検討した。

### 【目的】

胎盤形成における絨毛外栄養膜細胞浸潤に着目し、EVT における CRT の役割について検討する。

### 【方法】

3つの絨毛癌細胞株 BeWo、Jar、JEG3、ヒト EVT 細胞株 HTR8/SVneo、およびインフォームド・コンセントの下に得られたヒト胎盤組織において、CRT の発現を Western blotting もしくは免疫組織化学染色を用いて検討した。HTR8/SVneo に CRT-shRNA 発現ベクターを遺伝子導入し、CRT 低発現安定細胞株を作製した。CRT の発現抑制による細胞増殖能、マトリゲル浸潤能、および細胞外基質への接着能の変化について比較検討した。さらに、CRT が関与すると考えられたインテグリンを介した細胞接着の分子機構についての生化学的解析を進めた。

### 【結果】

1. ヒト絨毛細胞株、ヒト胎盤組織における CRT の発現の検討  
Western blotting では絨毛細胞株および正常ヒト胎盤組織において CRT が高発現していた。特に妊娠初期では高いレベルで発現していた。また免疫組織化学染色において脱落膜内の EVT に CRT の局在を認めた。
2. CRT 発現抑制株の作製  
CRT-shRNA 発現ベクターの遺伝子導入により CRT 発現抑制安定細胞株を作製した。mRNA とタンパクレベルで CRT の発現が抑制されていることを確認した。
3. CRT 発現抑制による細胞機能の変化についての検討

HTR8/SVneo において CRT 発現抑制によりマトリゲル浸潤能およびフィブロネクチン(FN)への接着能が低下していた。また CRT 低発現細胞では FN 接着後の Akt のリン酸化が抑制されていた。

#### 4. CRT 発現抑制によるインテグリンの発現と局在の変化

FN の受容体であるインテグリン(Itg)  $\alpha 5 \beta 1$  に着目し Itg の発現を解析した。Itg  $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 5$  の発現量に差は認めなかったが、CRT 低発現細胞において Itg  $\beta 1$  が高分子化していた。免疫蛍光染色では、CRT 低発現細胞において Itg  $\beta 1$  は小胞体内に少なく細胞膜への偏在を認め、局在が異なっていた。

#### 5. CRT 発現抑制による Itg $\beta 1$ の糖鎖修飾の変化、および糖転移酵素の発現の検討

CRT 低発現細胞において Itg  $\beta 1$  が糖鎖修飾を受けている可能性が考えられ、糖鎖構造の評価を行った。抗 Itg  $\beta 1$  抗体で免疫沈降した後の Lectin blotting により、CRT 低発現細胞では Itg  $\beta 1$  に結合する DSA (ガラクトース結合性) は多く、ConA (マンノース結合性)、SSA (シアル酸結合性)、UEA1 (フコース結合性) は少なくなっていた。糖転移酵素の発現を解析したところ、CRT 低発現細胞では  $\beta 1,4$ -ガラクトース転移酵素-I の転写およびタンパクレベルの増加、 $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素-I と  $\alpha 1,2$ -フコース転移酵素-I のタンパクレベルの減少を認めた。

#### 【考察・結語】

今回の我々の研究により、HTR8/SVneo において、小胞体分子シャペロンである CRT が Itg  $\beta 1$  の糖鎖合成系への関与を介してその機能を制御し、基質接着能および浸潤能を調節していることが示された。これにより、CRT が妊娠初期における胎盤形成に促進的な役割を果たしていると考えられた。また EVT 浸潤不全を基盤とする妊娠高血圧腎症の病態に CRT が関与している可能性が示唆された。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 29 年 10 月 4 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。

妊娠初期における胎盤形成において、絨毛外栄養膜細胞 (extravillous trophoblast, EVT) 浸潤が重要な役割を果たす。EVT の浸潤が不十分であると胎盤形成不全となり妊娠高血圧症候群 (preeclampsia, PE) などの疾患をきたすと言われている。近年、小胞体ストレスと PE との関連が指摘されており、中でも妊娠とともに血中濃度が増加し PE に関与する分子として、小胞体の分子シャペロンであるカルレティキュリン (CRT) が報告されている。本論文では CRT の EVT 浸潤に果たす役割について検討した。

はじめに、同意が得られた正常妊婦の胎盤組織および絨毛細胞株における CRT の発現の有無を確認した。正常ヒト胎盤組織において Western blotting では CRT が高発現しており、免疫組織化学染色では脱落膜内の EVT 細胞への局在を認めた。また 4 つの絨毛細胞株で CRT の発現を認めた。次にヒト EVT 細胞株 HTR8/SVneo 細胞にヒト CRT-shRNA 発現ベクターを導入し、CRT 低発現細胞株を作製した。HTR8/SVneo 細胞において CRT 発現抑制は細胞浸潤能およびフィブロネクチンへの接着能を低下させた。CRT 低発現細胞において、免疫蛍光染色ではインテグリン(Itg)  $\beta 1$  の細胞形質膜への偏在が観察され、Western blotting では Itg  $\beta 1$  がやや高分子化しており、Itg  $\beta 1$  の糖鎖修飾に変化があると考えられた。また CRT 低発現細胞において Itg  $\beta 1$  の N-グリカンが変化しており、複数の主要な糖転移酵素の発現レベルが変化していた。

HTR8/SVneo 細胞において CRT 発現抑制は浸潤能を低下させた。CRT は糖鎖を認識する分子シャペロンであり、糖鎖をもつ Itg  $\beta 1$  の合成への関与を介して EVT 細胞の基質接着能および浸潤能を調節している可能性が示唆された。

以上より CRT が妊娠初期における胎盤形成に促進的な役割を果たしていると考えられた。また EVT 浸潤不全を基盤とする PE の病態に CRT が関与している可能性が示唆され、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第564号		
学位授与の日	平成29年10月17日		
氏名	蒸野 寿紀		
学位論文の題目	An Optimal Approach for Fluoroquinolone Garenoxacin Prophylaxis in Patients with Hematological Malignancies and Chemotherapy-induced Neutropenia (造血器悪性腫瘍患者における抗菌薬ガレノキサシンによる化学療法関連発熱性好中球減少症に対する予防内服効果の検討)		
論文審査委員	主査	教授 鈴木 啓之	
	副査	教授 岸岡 史郎	教授 園木 孝志

## 論文内容の要旨

### 緒言

急性白血病をはじめとする造血器悪性腫瘍は、化学療法等により治癒を期待できる疾患であるが、化学療法時の骨髄抑制および続発する感染症発症が重大な有害事象の一つである。特に、好中球減少時に菌血症を生じた場合の死亡率は2割を超えるとする報告もある。また、感染症発症による化学療法サイクル開始の遅延・休薬期間延長は腫瘍増悪を助長し、再発率や死亡率の上昇が懸念される。新規抗菌薬開発により、感染症発症後のコントロールは改善されたが、感染症発症に伴う化学療法サイクル開始の遅延は回避できない。つまり、造血器悪性腫瘍患者の感染症発症予防は、治療効果や予後に関連するため、極めて重要な課題である。これまで、好中球減少時の発熱イベント発生予防にトリメトプリム・スルファメトキサゾールやフルオロキノロンの内服が有用とされてきた。そのため、実際の血液内科診療では、多くの施設で化学療法時にレボフロキサシン (LVFX) の予防内服が行われ、予防内服をした患者で約20%の発熱イベント発生抑制効果が見られる。しかし、近年LVFX耐性菌発生が問題となっており、耐性菌出現抑制策の確立が望まれている。耐性菌発生は、抗菌薬単剤の長期使用が一因とされ、複数の抗菌薬の使い分けによる耐性菌発生率低減への有用性に関するエビデンスが揃いつつある。このような背景から、血液内科診療で広く用いられているLVFXと使い分け可能で、予防内服に有用な薬剤の探索が必要と考えた。近年上市された抗菌薬ガレノキサシン (GRNX) は、LVFXと同じキノロン系抗菌薬で、耐性菌発生が少なく、胆汁中への排泄特性から腸管内 bacterial translocation の予防も期待できるため、有力な候補薬剤と考えた。本研究では、GRNXの化学療法に関連した発熱イベント発生の予防効果、その適切な投与方法、予防を要する患者背景について検討し、化学療法関連好中球減少時の、より現実的で効果的な感染症発症予防法の確立を目指した。

### 対象および方法

#### 対象

2011年6月から2013年4月までに和歌山県立医科大学附属病院血液内科病棟に入院し、化学療法を行った造血器悪性腫瘍患者66例(男性32例、女性34例、平均年齢54歳 (range, 19-77歳))を対象とした。骨髄抑制期において好中球 $1,000/\mu\text{L}$ 未満が7日間以上持続した患者を解析した。対象患者の好中球減少期間は平均16.4日 (range, 7-47日)であった。

#### 方法

化学療法導入時からGRNX投与を開始し、1日400mg内服を好中球回復まで継続した。GRNX内服開始から好中球減少期間を経て、好中球が回復するまでの期間における、発熱イベント発生の有無・発熱患者における発熱持続期間・白血球および好中球数・菌血症発症・有害事象発生について解析した。発熱は、欧米の大規模臨床研究等で用いられた、腋窩温で $38.5^{\circ}\text{C}$ 以上が1回、または、12時間以内に $38^{\circ}\text{C}$ 以上が2回認められた場合、と定義した。発熱イベント発生時は、血液培養と感染が疑われた部位の培養を採取後、抗緑膿菌活性のある広域抗生剤(第4世代セフェム系抗菌薬、カルバパネム系抗菌薬)を経験的に追加投与した。有害事象は、Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Ver.4.0

により評価した。本研究はヘルシンキ宣言に従い、和歌山県立医科大学倫理委員会で承認された。Fever-Free Survivalの解析にはKaplan-Meier法を用いた。統計解析には、Mann-Whitney U検定および、 $\chi^2$  検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

## 結果

対象患者の内訳は、急性白血病23例（35%）、悪性リンパ腫37例（56%）、多発性骨髄腫5例（8%）、その他1例（2%）であった。GRNX内服期間は平均24.7日（range, 11-56日）であり、GRNX内服開始から好中球回復までの間、66例中29例（44%）で発熱イベント発生を認めなかった。発熱した患者での発熱持続期間は平均6日（range, 1-44日）であった。

高度好中球減少例（好中球  $0/\mu\text{L}$  まで低下）では、73%の患者で発熱イベントを認め、好中球が  $0/\mu\text{L}$  に至らなかった患者の発熱イベント発生率（34%）と比較して有意に多かった。さらに、骨髄抑制期における最低到達白血球数に分けて発熱イベント発生率を詳細に検討したところ、白血球  $100/\mu\text{L}$  以下となる患者では72%で発熱イベントを認めたのに対し、最低白血球数が  $200/\mu\text{L}$  以上で発熱イベント発生頻度が低下傾向となり、 $500\text{-}1,000/\mu\text{L}$  までの低下に留まった患者では発熱イベント発生率22%と有意に発熱イベントが減少した。一方、化学療法レジメンによる好中球減少リスク4段階での検討では、リスク別の発熱イベント発生に有意差は認めなかった。

次に、GRNX内服期間と発熱イベント発生との関連の検討を行った。GRNX内服開始から好中球  $1,000/\mu\text{L}$  未満に至るまでの期間が短い患者では、好中球  $1,000/\mu\text{L}$  未満に減少してから発熱イベント発生までの期間が長かった。菌血症は6例（9.1%）で認められ、うち5例はキノロン系抗菌薬耐性であった。GRNX内服に関連する有害事象は3例に認められ、軽度の腎障害が2例（grade 1とgrade 2）と皮膚障害1例のみでGRNX内服の忍容性は高かった。本研究の対象患者の中で、感染症発症を原因とする死亡はなかった。

## 考察

本研究のGRNX内服患者における発熱イベント発生率は56%であった。LVFXを用いた発熱性好中球減少症発症予防効果に関する大規模臨床研究では、プラセボコントロール群で85%の患者に発熱イベントが発生しており、GRNX予防内服の発熱イベント発生予防効果を期待させるものである。

米国感染症学会や日本臨床腫瘍学会の化学療法関連発熱性好中球減少症予防に関するガイドラインでは、好中球  $100/\mu\text{L}$  未満が7日以上持続する患者に対して抗菌薬予防内服が推奨されている。しかし興味深いことに、本研究においてこのような患者を含む高度好中球減少患者に着目すると、GRNX予防内服にも関わらず発熱イベント発生が多かった。GRNX内服による発熱イベント発生予防効果は、最低到達好中球数に依存する可能性があり、抗菌薬効果の発揮には好中球の関与も重要であることが示唆された。つまり、抗菌薬予防内服による発熱イベント発生予防効果を得るには、事前に個別の好中球減少リスク評価を行うことが有効かもしれない。

菌血症発生に注目すると、本研究で確認できた起炎菌は、グラム陰性桿菌4.5%、グラム陽性球菌3.0%であった。前述のLVFX研究では、グラム陰性桿菌4%、グラム陽性球菌11%であり、このことは、GRNXのグラム陽性球菌に対する抗菌特性が影響した可能性が考えられる。また、当該科では本研究開始前までLVFX単剤で予防内服を行っており、GRNX予防内服を主体とする本研究後は、検出された大腸菌のLVFX感受性株の割合が多くなった。複数抗菌薬の使い分けがアンチバイオグラムの可逆的回復につながる可能性を示唆するものであり、興味深い。

実臨床では、化学療法レジメンによる好中球減少の高リスク群に対して化学療法開始時から予防内服が導入されるが、終了時期は定まっていない。本研究の結果により、抗菌薬予防内服を、好中球が  $1000/\mu\text{L}$  未満に到達する直前から導入しても発熱イベント発生は抑制され、さらに予防内服終了の目安は、高度の好中球減少（白血球数  $100/\mu\text{L}$  以下）到達時が考えられた。今後、臨床的効果の評価について多施設ランダム化比較試験等での検証が必要ではあるが、本成果を基に予防法が確立されれば抗菌薬使用量の減少から、耐性菌の発生抑制や医療費の低減にもつながる可能性がある。

## 結語

GRNXは、予防内服により化学療法関連好中球減少時の発熱イベント発生予防効果が示唆され、内服継続忍容性も高くLVFXと使い分け可能な薬剤である。これら複数キノロンによる予防内服法は、

耐性菌出現抑制や造血器悪性腫瘍の治療成績向上に寄与すると考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年9月28日、10月3日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は、造血器悪性腫瘍患者における化学療法時の、ガレノキサシン（GRNX）内服の発熱イベント発生予防効果、適切な投与方法、予防を要する患者背景、について検討し、化学療法関連好中球減少時の感染症発症予防法を明らかにすることであった。

本研究では、造血器悪性腫瘍患者66例を対象に、好中球減少期間における、発熱イベント発生の有無・発熱持続期間・白血球および好中球数・菌血症発症・有害事象について解析した。対象患者は、急性白血病23例（35%）、悪性リンパ腫37例（56%）、多発性骨髄腫5例（8%）、その他1例（2%）であった。GRNX内服期間は平均24.7日（range, 11-56日）であり、66例中29例（44%）で発熱イベント発生を認めなかった。発熱患者での発熱持続期間は平均6日（range, 1-44日）であった。

高度好中球減少例（好中球0/μLまで低下）では、73%の患者で発熱イベントを認めたが、好中球が0/μLに至らなかった患者の発熱イベントは34%のみであった。最低到達白血球数別の検討では、白血球100/μL以下では72%で発熱イベントを認めたが、白血球数200/μL以上で発熱イベント発生頻度が低下傾向となり、白血球数500-1,000/μLまでの低下に留まった患者では22%の発熱イベント発生であり有意に減少した。一方、化学療法レジメンによる好中球減少リスク別の検討では、発熱イベント発生に有意差は認めなかった。GRNX内服開始から好中球1,000/μL未満に至るまでの期間が短い患者では、好中球1,000/μL未満に減少してから発熱イベント発生までの期間が長かった。

菌血症は6例（9.1%）で認められ、うち5例はレボフロキサシン（LVFX）耐性であった。起炎菌は、グラム陰性桿菌4.5%、グラム陽性球菌3.0%であった。また、本研究開始前まではLVFX単剤による予防内服を行いLVFX耐性菌率が高まっていたが、GRNX予防内服を主体とする本研究後は、検出された大腸菌のLVFX感受性株の割合が回復傾向となり、複数の抗菌薬を偏りなく使用する有用性が示唆された。GRNX内服に関連する有害事象は3例に認められ、軽度の腎障害2例と皮膚障害1例であった。対象患者の中で、感染症による死亡はなかった。

実臨床では、化学療法レジメンによる好中球減少の高リスク群に対して化学療法開始時から予防内服が導入されるが、終了時期は定まっていない。本研究結果からは、抗菌薬予防内服を、好中球が減少してから導入しても、発熱イベント発生が抑制される可能性が示唆された。また、予防内服終了の目安として、高度白血球・好中球減少到達時が考えられた。

本論文は、造血器悪性腫瘍患者における化学療法時の、GRNXによる発熱性好中球減少症発生の予防効果を検討した報告である。本成果を基に、感染症予防法が確立されれば、抗菌薬使用量減少、耐性菌発生抑制、医療費低減につながる可能性があると考えられ、造血器悪性腫瘍の治療成績向上に寄与する重要な知見が示されていることから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第565号		
学位授与の日	平成29年10月17日		
氏名	稲葉 豊		
学位論文の題目	Severer lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice with homozygous Kitwsh/wsh mutation. (Kit変異を有するMRL/lprマウスは、より重症なループス様皮疹を呈する)		
論文審査委員	主査	教授 改正 恒康	
	副査	教授 村田 晋一	教授 神人 正寿

## 論文内容の要旨

### 諸言

MRL-*lpr*マウスは、Fas抗原をコードする遺伝子内にトランスポゾンが挿入されることで生じた*lpr*変異を持つ。異常T細胞の増殖による脾腫、全身リンパ節腫脹とともに、自己抗体やリウマチ因子の産生を伴う全身性エリテマトーデスのモデルとして知られ、上背部にループス様皮疹が生じる。この皮疹に多数浸潤する肥満細胞に注目し、その病態における役割の解明を試みた。

### 材料と方法

#### 1) マウス

MRL-*lpr*マウス、C57BL6-*Kit<sup>fl-sh/w-sh</sup>*はSLC社より購入した。Specific pathogen freeの環境下で生育させた。MRL-*lpr*マウスに、肥満細胞が存在しないC57BL/6-*Kit<sup>fl-sh/w-sh</sup>*マウスを掛けあわせ、さらにMRL-*lpr*マウスに10代バッククロスし、MRL-*lpr*-*Kit*マウスを作成した。このマウスは肥満細胞が存在するMRL-*lpr*-*Kit<sup>+/+</sup>*、MRL-*lpr*-*Kit<sup>+/fl-sh</sup>*、肥満細胞が存在しないMRL-*lpr*-*Kit<sup>fl-sh/w-sh</sup>*の3グループに分けられる。(以下肥満細胞を有さない群をMC-MRLマウス、肥満細胞を有する群をMC+MRLマウスとする)

#### 2) 皮疹の程度

皮疹の重症度を三段階に区分し、週単位で観察した。重症度は視診、触診より皮疹を認めないものを0、紅斑、痂皮、脱毛を認めるものを1、さらに浸潤まで認めるものを2とした。

#### 3) 組織像

10%ホルマリン液で固定した皮膚、腎臓標本をパラフィン包埋し、皮膚はHE染色、トルイジンブルー染色し、腎臓はHE染色、PAS染色し、標本作製した。糸球体病変のgradeは、病変がないものをgrade0、limited segmental mesangial proliferationを認めるものをgrade1、endocapillary proliferation with segmental wire loop and/or hyaline thrombotic lesionsを認めるものをgrade2、grade2にdominant sclerosing and/or hyalinosis of the lesionsを認めるものをgrade3とした。

#### 4) 血清中抗核抗体

10カ月齢のマウスにおいて、フルオロHEPANAを用い、間接蛍光抗体法を原理とした。血液を採取後、40倍、80倍、160倍、320倍の希釈血清を基質スライドに30分間反応させ、その後標識抗体を30分反応させた。160倍以上を陽性とした。

#### 5) 抗ds-DNA抗体

10カ月齢のマウスにおいて、Mouse anti-dsDNA IgG specific ELISA Kitを用い、ELISA法で抗ds-DNA抗体を定量した。

#### 6) 血清中BUN、Cre

5カ月齢のマウスにおいて、Fuji DRI-CHEM 5500Vを用いて、測定した。

#### 7) 尿蛋白

5カ月齢のマウスにおいて、ALBUSTIX urine test paper を用いて、0-30 mg/dl を grade0、30-100 mg/dl を grade1、100-300 mg/dl を grade2、300-1000 mg/dl を grade3 とした。

8) 上背部のサイトカイン

10カ月齢のマウスの上背部皮膚（皮疹部または無疹部）を採取し、皮膚のサイトカイン産生を RT-PCR 法で測定した。サイトカインは、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-9、IL-10、IL-17、IL-18、IL-23、IL-33、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  を測定した。

結果

1) 皮疹

MC-MRL マウスは4カ月齢より皮疹の出現を認め、9カ月齢で出現率のピークを認めた。MC+MRL マウスでは5カ月齢より皮疹の出現を認めた。常に MC-MRL マウスの出現率は MC+MRL マウスに比べ高い出現率を保ち、10カ月齢で同程度の出現率となった。肥満細胞を有さずとも皮疹は出現し、肥満細胞を有することで皮疹の出現は抑制されていると考えられた。

2) 生存率

MC-MRL マウスは MC+MRL マウスに比べ、有意に低い生存率であることがわかった。肥満細胞が SLE の病勢を抑制していると考えられた。

3) 組織像

・皮膚

MC-MRL マウスと MC+MRL マウスにおいて、HE 染色では両者に違いはなく、トルイジンブルー染色にて MC-MRL マウスでは肥満細胞の浸潤は認めないことがわかった。

MC+MRL マウスにおいて皮膚への肥満細胞の浸潤数は、皮疹の重症度が悪化するに伴い、有意に増加していることがわかった。

・腎臓

MC-MRL マウスと MC+MRL マウスにおいて、PAS 染色では糸球体病変に有意な差異は認められなかった。

4) 抗核抗体、抗 ds-DNA 抗体

抗核抗体においては、両者で有意な差は認めなかった。抗 ds-DNA 抗体では、MC+MRL マウスにおいて有意に高値を示した。

5) 血清中 BUN、Cre

MC-MRL マウスと MC+MRL マウスにおいて、血清中 BUN、Cre に有意な差異は認められなかった。

6) 尿蛋白

MC-MRL マウスは MC+MRL マウスに比べ、有意に蛋白尿が低いことがわかった。

7) 上背部のサイトカイン (RT-PCR)

MC-MRL マウスにおいて、IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-4、IL-10、IL-33、IFN- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  に有意に上昇しており、IL-6 に関しては有意差を認めないものの、上昇している傾向にあった。MC+MRL マウスにおいては、IL-18 が有意に上昇しており、IL-23 と IFN- $\gamma$  に有意差はなく、IL-9 と IL-17 は測定感度以下であった。

結語

肥満細胞を欠損した SLE のモデルマウス MRL-*Ipr-Kit<sup>fl-sh/fl-sh</sup>* を作製した。MRL-*Ipr* マウスにおいて肥満細胞を欠損させても、皮疹が出現することを確認した。

MC-MRL マウスにおいて、生存率の低下、上背部におけるサイトカインの上昇から肥満細胞は SLE の病勢を抑制していると予想された。しかし MC+MRL マウスにおいて、抗 ds-DNA 抗体、尿蛋白が有意に上昇していたことが矛盾した。

MC+MRL マウスにおいて皮疹の重症度が悪化するに伴い浸潤する肥満細胞が増加していたこと、また MC-MRL マウスにおいて皮疹の出現率が高かったことより、肥満細胞は皮疹出現を抑制する方向に働くため浸潤したと予想された。



## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 9 月 28 日、10 月 3 日、4 日、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。MRL-*Ipr* マウスは、Fas 抗原をコードする遺伝子内にトランスポゾンが挿入されることで生じた *Ipr* 変異を持つ。異常 T 細胞の増殖による脾腫、全身リンパ節腫脹とともに、自己抗体やリウマチ因子の産生を伴う全身性エリテマトーデスのモデルとして知られ、上背部にループス様皮疹が生じる。この皮疹に多数浸潤する肥満細胞に注目し、その病態における役割の解明を試みた。

MRL-*Ipr* マウスに、肥満細胞が存在しない C57BL/6-*Kit*<sup>fl-sh/fl-sh</sup> マウスを掛けあわせ、さらに MRL-*Ipr* マウスに 10 代バッククロスし、MRL-*Ipr-Kit* マウスを作成した。このマウスは肥満細胞が存在する MRL-*Ipr-Kit*<sup>+/+</sup>、MRL-*Ipr-Kit*<sup>+/fl-sh</sup>、肥満細胞が存在しない MRL-*Ipr-Kit*<sup>fl-sh/fl-sh</sup> の 3 グループに分けられる。

肥満細胞が存在しない MRL-*Ipr* マウス、肥満細胞が存在する MRL-*Ipr* マウスにおいて、皮疹の出現率と重症度、生存率、上背部と腎臓の組織像、血清中の BUN、Cre、抗核抗体、抗 ds-DNA 抗体、尿蛋白、上背部におけるサイトカイン産生を比較した。

肥満細胞が存在しない MRL-*Ipr* マウスにおいて、皮疹が出現することを確認した。

肥満細胞が存在しない MRL-*Ipr* マウスにおいて、皮疹の出現率が高く、生存率の低下、上背部におけるサイトカインの上昇から肥満細胞は SLE の病勢を抑制していると予想された。しかし肥満細胞が存在する MRL-*Ipr* マウスにおいて、抗 ds-DNA 抗体、尿蛋白が有意に上昇していたことが矛盾した。

上背部と腎臓の組織像、血清中 BUN、Cre、抗核抗体に関しては、二群間で有意差は認めなかった。

肥満細胞が存在する MRL-*Ipr* マウスにおいて皮疹の重症度が悪化するに伴い浸潤する肥満細胞が増加していたこと、また肥満細胞が存在しない MRL-*Ipr* マウスにおいて皮疹の出現率が高かったことより、肥満細胞は皮疹出現を抑制する方向に働くため浸潤したと予想された。

以上、SLE のモデルマウスである MRL-*Ipr* マウスにおいて肥満細胞はループス様皮疹出現に抑制的に働く可能性が示唆された。本論文は、今後 SLE の皮疹に対する治療において、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)甲第566号		
学位授与の日	平成30年1月9日		
氏名	辻 あさみ		
学位論文の題目	Effectiveness of Patient Group Meetings for Postoperative Patients with Defecatory Dysfunction. (排便機能障害のある直腸がん患者のがんサバイバーシップを高めるための介入プログラムとその評価)		
論文審査委員	主査	教授 竹下 達也	
	副査	教授 山上 裕機	教授 宮井 和久

## 論文内容の要旨

### 【背景】

直腸がんの手術療法で低位前方切除術（以下LARと略する）が実施されるようになり、肛門温存率が向上した。しかし、LARを受けた患者は、肛門が温存されるかわりに術後に排便機能障害を生じることが多く、術後のQOLは低下する。しかし、このような患者への支援は生活指導が中心で、QOLに関する具体的な介入はあまり行われてこなかった。これまでの研究で、LAR後に排便機能障害のある患者には、教育的支援や情緒的支援が必要であることが明らかになっている。

そこで本研究は、LAR術後で排便機能障害のある患者に教育的支援と情緒的支援を含む患者交流会を開催し、その有効性を明らかにし、がん患者におけるQOLに関連するがんサバイバーシップを高める支援を検討する一助とすることを目的とした。

### 【方法】

1) 研究デザイン：前向き縦断研究で、研究期間は2015年1月から10月とした。

2) 患者交流会

直腸がん患者への教育モデルは日本においてまだ確立されていない。そのため、本研究における教育内容は、Fawzy および福井らの乳がん患者の教育モデルを参考にした。講義以外にも自分達の体験や思いを交換する場としてグループ討議を行うようにした。患者会は3回実施し、対象者は自由に参加できるようにした。

本研究は、和歌山県立医科大学倫理委員会の承認（承認番号1528）を受け実施した。

3) 対象者

対象者は2011年から2014年にLARを受けた患者84人を選択した。この対象者に研究依頼の文書を郵送し、30人から同意が得られた（同意率35.7%）。本研究では介入前後に回答が得られた26名を分析対象とした。

4) 調査方法

自記式質問紙による調査を1回目の会の1か月前（プレテスト）および3回目の会の5か月後（ポストテスト）に行った。調査項目は以下のように設定した。

①属性：年齢、性別、手術時期、化学療法・放射線療法の実施の有無。

②知識と情緒：知識は「排便機能障害の知識」「対処方法の知識」「がんの知識」「就労の知識」について、情緒は、「がんに伴う恐怖」「孤独感」「安心感」「日常生活に対する自信」について、Visual Analogue Scale (VAS) を用いて測定した。

③排便機能障害：佐藤が開発した排便機能評価尺度 ver.2 を用いて測定した。この尺度は、「便の保持と排泄」「つきまとう便意」の2つの下位項目から構成されており、得点が高いほど障害の程度が重い。

④QOL：QOLはEuropean Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of life questionnaire (EORTC QLQ-C30 日本語版) を用いて測定した。この尺度は、Global health status/QOL(1項目)および機能スケールFunction scales(5項目：PF身体、RF役割、EF認知、

CF 情緒、SF 社会的機能)と症状スケール Symptom scales(9 項目: FA 疲労、NV 嘔気、PA 痛み、DY 呼吸困難、SL 睡眠、AP 食欲不振、CO 便秘、DI 下痢、FI 経済難)から構成されており、機能スケールは、点数が高いほどその質が高く、症状スケールは、得点が低いほどその症状がないことを示す。

#### 5) 分析方法

対象者を、3 回の患者会に 1 回でも参加した 18 人(参加群)と、アンケートに協力はできたが患者交流会には参加できなかった 8 人(非参加群)に分類した。

参加群と非参加群における介入前後の比較には、対応のある t 検定を用いた。また、介入の有効性を明らかにするために参加後の得点を従属変数とし、参加回数と参加前の得点および年齢を独立変数として、重回帰分析(強制投入法)を行った。さらに、QOL の変化と排便機能障害との関連性を検討するために Spearman の順位相関係数を求めた。

解析には SPSS. Ver23 を用い、有意確率は 5%未満とした。

#### 【結果】

患者交流会には、1 回目 26 人中 16 人(参加率 62%)、2 回目 12 人(46%)、3 回目 12 人(46%)が参加した。どの項目も参加群と非参加者の 2 群間に有意な差はみられなかった。

知識の 4 つの項目、情緒の「安心感」と「日常生活に対する自信」の 2 項目は参加群で有意に増加した。非参加群ではいずれの項目も有意な変化はなかった。

排便障害は、2 項目とも 2 群間に有意な差はみられなかった。

Global health status/QOL(1 項目)および Function scales(5 項目)では、両群とも有意な変化はみられなかった。Symptom scales では「DI 下痢」の得点が有意に低下した。

重回帰分析(強制投入法)の結果、参加回数が独立して関連した項目は、知識の「排便機能障害の知識」「対処方法の知識」「がんの知識」の 3 つの要因、QOL の「FA 疲労」と「DI 下痢」の 2 つの要因であった。標準化回帰係数は、知識の 3 項目が正で、QOL の 2 項目が負であった。

「Global health status/QOL(1 項目)」は「PF 身体」と「SL 睡眠」「DI 下痢」に有意な相関がみられた。「DI 下痢」は「Global health status/QOL」と「SF 社会的機能」と有意な相関がみられた。「FA 疲労」は「RF 役割」と「CF 情緒」に有意な相関がみられた。排便機能障害は、いずれの QOL とも有意な相関はみられなかった。

#### 【考察】

乳がん患者に対する患者交流会の効果はこれまで、知識や QOL、不安尺度、Profile of Mood States(POMS)を用いて行われている。しかし、がんに関連する慢性疾患に対する介入はこれまで行われていない。

本研究では、患者交流会に参加することで参加者は排便機能障害に関する情報を入手し、それに対して対処できるようになった。「DI 下痢」が低下し、それに関連して「Global health status/QOL」が高くなった。「DI 下痢」の変化は患者交流会への参加回数と関連していた。このようなことは、患者交流会の有効性を示していると考えられる。私達が調べた範囲では、知識や情緒、QOL を用いて LAR 後の患者交流会を評価したのはこれが最初である。

「DI 下痢」の変化は「Global health status/QOL」と「SF 社会的機能」に関連していたが、排便機能障害の尺度とは関連がなかった。このことは「DI 下痢」の低下が排便機能障害の改善によるものではなく、患者交流会に参加して排便機能障害の知識を得て対処できるようになったことが示していると考えられる。

#### 【結論】

LAR 後に排便機能障害のある患者を対象に教育的支援と情緒的支援を含む患者交流会を 3 回開催した結果、患者の知識と QOL の向上がみられることが明らかになり、がんサバイバーシップを維持するための支援のひとつとして患者交流会の有効性が示唆された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年12月21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。

低位前方切除術（以下LARと略する）を受けた患者は、肛門が温存されるかわりに術後に排便機能障害を生じることが多く、術後のQOLは低下する。これまで、このような患者への支援は生活指導が中心で、QOLに関する具体的な介入はあまり行われてこなかった。

そこで本研究は、LAR術後で排便機能障害のある患者に教育的支援と情緒的支援を含む患者交流会を開催し、その有効性を明らかにした。

対象者は2011年から2014年にLARを受けた患者で、3回の患者会に1回でも参加した18名（参加群）と、アンケートに協力はできたが患者交流会には参加できなかった8名（非参加群）の26人を対象として介入前後の知識と情緒、排便機能障害の程度（排便機能評価尺度 ver. 2）、QOL（EORTC QLQ-C30 日本語版）の比較を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. 患者交流会には、1回目26人中16名（参加率62%）、2回目12名（46%）、3回目12名（46%）が参加した。
2. 知識の4つの項目、情緒の「安心感」と「日常生活に対する自信」の2項目は参加群で有意に増加した。非参加群ではいずれの項目も有意な変化はなかった。
3. 排便障害は、2項目とも2群間に有意な差はみられなかった。
4. Global health status/QOL(1項目)およびFunction scales(5項目)では、両群とも有意な変化はみられなかった。Symptom scalesでは「DI下痢」の得点が有意に低下した。重回帰分析（強制投入法）の結果、参加回数が独立して関連した項目は、知識の「排便機能障害の知識」「対処方法の知識」「がんの知識」の3つの要因、QOLの「FA疲労」と「DI下痢」の2つの要因であった。標準化回帰係数は、知識の3項目が正で、QOLの2項目が負であった。
5. 「Global health status/QOL(1項目)」は「PF身体」と「SL睡眠」「DI下痢」に有意な相関がみられた。「DI下痢」は「Global health status/QOL」と「SF社会的機能」と有意な相関がみられた。「FA疲労」は「RF役割」と「CF情緒」に有意な相関がみられた。排便機能障害は、いずれのQOLとも有意な相関はみられなかった。

以上の結果から、LAR後に排便機能障害のある患者を対象に教育的支援と情緒的支援を含む患者交流会を3回開催した結果、患者の知識とQOLの向上がみられることが明らかになり、がんサバイバーシップを維持するための支援のひとつとして患者交流会の有効性が示唆された。

本論文は、LAR術後で排便機能障害のある患者に開催した患者交流会の有効性を明らかにし、がん患者におけるQOLに関連するがんサバイバーシップを高める支援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(医)甲第567号		
学位授与の日	平成30年3月20日		
氏名	中尾 友美		
学位論文の題目	Impact of heart-specific disruption of the circadian clock on systemic glucose metabolism in mice (心臓特異的な時計遺伝子 <i>Bmal1</i> の欠損は肝臓のインスリン抵抗性を惹起する)		
論文審査委員	主査	教授 赤水 尚史	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 岸岡 史郎

## 論文内容の要旨

### 背景と目的

ヒトのシフトワーカーに代表される生体リズムの障害は、糖・脂質代謝異常発症の危険因子である。動物実験においても、生体リズムを制御する体内時計の異常が糖尿病の発症に関わることが報告されてきた。体内時計は、複数の時計遺伝子からなる分子時計が本体であり、分子時計は全身の細胞に存在している。興味深いことに、分子時計は生体リズムの制御だけではなく、リズム制御とはかけ離れた臓器機能にも関わることが近年知られるようになった。糖代謝調節もその一つであり、分子時計はさまざまな臓器機能を通して全身の糖代謝を制御している。たとえば、膵臓や肝臓の分子時計は、それぞれインスリン分泌と糖新生に直接関与している。しかしながら、分子時計と糖代謝調節との関わりは未だ不明な点が多く、とくに糖代謝との関連が薄い臓器の分子時計による糖代謝調節における役割は全く分かっていない。そこで本研究では、全身の糖代謝に直接関与しない臓器である心臓の分子時計と糖代謝調節の関係を心臓特異的な時計遺伝子欠損マウスを用いて検証した。

### 方法

#### 【使用したマウスと実験の概要】

実験には、時計遺伝子 *Bmal1* の心臓特異的なノックアウト (*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>) マウスを使用した。*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスは、*Cre-loxP*テクノロジーにより作製した。*Cre* タンパクは、ゲノム上に挿入された2つの *loxP* 配列間の組換えを引き起こす。このことを利用して、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスでは *Bmal1* 遺伝子上に2つの *loxP* 配列を挿入し、心臓特異的に *Cre* タンパクを発現させることで心臓のみで *Bmal1* 遺伝子の機能を喪失させた。コントロール群には、*Bmal1* 遺伝子上に *loxP* 配列をもつが *Cre* タンパクを発現していないマウスを使用した。実験には、とくに断りがなければ、12時間毎の明暗周期のもとで自由摂食・自由飲水できる環境で飼育した12週齢の雄を用いた。

心臓の形態学および機能的評価は、肉眼的観察、組織標本、心重量の測定、心臓超音波検査および心不全マーカー遺伝子の発現解析により行った。つぎに、全身の糖代謝調節について、随時血糖値および血中インスリン濃度の測定、ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験により評価した。さらに、インスリン抵抗性の有無を評価するために、肝臓のインスリン感受性を調べた。ここでは、インスリン負荷後の糖新生関連遺伝子の発現レベルを定量 PCR 法にて解析した。また、インスリン負荷後の Akt のリン酸化レベルもイムノプロット法にて調べた。最後に、全身の糖代謝調節に影響を与える可能性のあるインスリン拮抗ホルモン（コルチコステロンとノルアドレナリン）のレベルと臓器の炎症の有無を解析した。コルチコステロンとノルアドレナリンはそれぞれ血漿および尿サンプルを用いて ELISA 法で測定した。また、臓器（肝臓、白色脂肪組織および骨格筋）の炎症の評価は、炎症関連遺伝子の発現レベルを定量することで行った。

### 結果と考察

#### 【*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスは慢性心不全を発症する】

まず、時計遺伝子 *Bmal1* の欠損が心臓の形態に与える影響を評価した。*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスの心臓は、心室壁の肥大化に伴い増大していた。また、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスでは心重量の増加もみられた。つぎに、

心機能の評価を行った。心臓超音波検査では、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>群とコントロール群間に左室内径短縮率の差を認めなかった。しかしながら、心不全マーカーである *BNP* の遺伝子発現レベルは *H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスで有意な上昇を認めた。以上の結果から、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスは慢性心不全を発症することが明らかになり、心臓の時計遺伝子 *Bmal1* は心機能維持に必須であると考えられた。

#### 【*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスは週齢依存的に高血糖を示す】

つぎに、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスの糖代謝異常の有無について評価した。明期および暗期で随時血糖値を測定したところ、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>群とコントロール群間に明期と暗期のいずれにおいても有意差を認めなかった。同様に、明期に行ったブドウ糖負荷試験でも両群間に有意な差を認めず、12 週齢の *H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスでは血糖値に異常がないことが分かった。しかしながら、24 週齢の *H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスにおいては明期の随時血糖値に有意な上昇を認めた。これらの結果から、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスは週齢依存的な高血糖を示すことが明らかになった。

#### 【*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスはインスリン抵抗性を示す】

*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスでみられた高血糖の原因が、インスリンの分泌不全、あるいは感受性の低下によるものであったかを調べるために血中インスリン濃度を測定した。12 週齢の血中インスリン濃度は、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>群とコントロール群間で明期および暗期のいずれにおいても有意差を認めなかった。しかしながら、明期に行ったインスリン負荷試験の結果では、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスにおいて血糖値の低下率がコントロールマウスよりも小さかった。この結果は、明らかな高血糖を示さない 12 週齢においても、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスがすでにインスリン抵抗性を発症していることを示唆していた。さらに、24 週齢の *H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスでは暗期の血中インスリン濃度に有意な上昇を認め、心臓特異的な *Bmal1* 遺伝子の欠損は週齢依存的に顕著なインスリン抵抗性を引き起こすことが分かった。

#### 【心臓特異的な時計遺伝子 *Bmal1* の欠損は肝臓でのインスリン作用を減弱させる】

インスリン抵抗性の発症には、さまざまな臓器のインスリン感受性の低下が関与している。その中でも肝臓の影響が最も大きいことが知られている。このことから、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスにインスリンを負荷した後に採取した肝臓を用いて、糖新生の律速酵素遺伝子(*Pepck*, *FBPase*, *G6Pase*)の発現量を解析した。*Pepck* と *FBPase* については、インスリン負荷後の発現量に *H-Bmal1*<sup>-/-</sup>群とコントロール群間に有意な差を認めなかった。しかしながら、インスリン負荷後の *G6Pase* の発現量は、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>群においてコントロール群よりも高く、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスは肝臓にインスリン抵抗性をもつことが疑われた (図 4a)。さらに、インスリンの下流にある細胞内情報伝達系で重要な役割を果たす Akt のリン酸化レベルについても解析した。その結果、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスの肝臓においては、インスリン負荷後の Akt のリン酸化レベルがコントロール群に比べて低下していることが明らかになった。以上の結果により、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスの肝臓ではインスリンに対する感受性が低下していることが示唆された。

インスリン抵抗性には、インスリン拮抗ホルモンの増加や全身の炎症などが関与していることが知られている。このことから、血中コルチコステロンおよび尿中ノルアドレナリン濃度の測定を行ったが、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>群とコントロール群間でいずれのホルモンレベルにも明らかな差を認めなかった。全身の炎症に関しては、肝臓、白色脂肪組織、骨格筋における炎症関連遺伝子の発現量を解析した。しかしながら、*H-Bmal1*<sup>-/-</sup>マウスの各組織において炎症を示唆する所見を得ることはできなかった。

#### 【まとめ】

一連の実験により、心臓の時計遺伝子が、心機能の維持だけではなく、全身の糖代謝調節にも深く関わっていることが明らかになった。心臓の *Bmal1* の欠損により、肝臓にインスリン抵抗性が引き起こされることが分かったが、本研究では、その根底にあるメカニズムを解明するまでには至らなかった。本研究の結果は、シフトワーカー等にみられる糖代謝異常には糖代謝関連臓器だけではなく、心臓の分子時計も重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。今後、臓器間の分子時計と糖代謝調節との関わりについての研究のさらなる発展が期待される。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 30 年 1 月 16 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

近年、シフトワーカーや睡眠障害等に代表される生体リズムの障害が、肥満や糖尿病などのエネルギー代謝異常の発症と密接に関わることが知られるようになった。一方、体内時計の分子機構（分子時計）はこの 20 年で大いに解明され、生体リズム障害の病態が分子レベルで明らかになりつつある。このような疫学的、基礎医学的な背景に基づいて、本論文は「分子時計の異常と糖尿病発症の仕組みを解明すること」に焦点を当てている。

これまでの実験動物を用いた多くの研究により、分子時計の異常は糖代謝調節障害を惹起することが明らかにされてきた。しかしながら、それらは肝臓などの糖代謝関連臓器内の分子時計とその臓器の糖代謝調節に限定された報告ばかりであった。分子時計が全身の臓器に存在していることが知られているにもかかわらず、糖代謝に直接関与しない臓器の分子時計と全身の糖代謝調節との関わりについてはこれまで全く報告されて来なかった。このことから、本論文では主要な糖代謝臓器ではない心臓の分子時計の機能と全身の糖代謝調節との関わりを調べることを目的とした。

全身の糖代謝調節に心臓の分子時計がどのように関与するのかを明らかにするために、本論文では、分子時計を構成する時計遺伝子の一つである *Bmal1* の心臓特異的なノックアウト (KO) マウスを用いて糖代謝に関する解析を行った。KO マウスの心臓および糖代謝調節に関連した表現型の解析結果は以下ようになった。

- ① KO マウスは慢性心不全を発症する：  
心重量の増加および心不全マーカー (BNP) の上昇を認めた。
- ② KO マウスは高血糖を呈する：  
週齢依存的な随時血糖値の上昇を認めた。
- ③ KO マウスはインスリン抵抗性を示す：  
インスリン負荷試験での血糖値の抑制が不十分であった。
- ④ KO マウスは肝臓でのインスリン感受性が減弱する：  
インスリン負荷後の肝臓での糖新生関連遺伝子 (*Pepck*, *FBPase*, *G6Pase*) の発現が十分に抑制されなかった。またインスリン負荷による Akt のリン酸化が減弱していた。

以上の結果から、心臓の時計遺伝子 *Bmal1* が心機能の維持だけではなく、糖代謝調節にも深く関わっていることが明らかになった。とくに心臓の *Bmal1* の欠損は肝臓でのインスリン作用を減弱させることが示された。本論文は、シフトワーカー等にみられる糖代謝異常には糖代謝関連臓器だけではなく、心臓の分子時計も重要な役割を果たしている可能性があることを動物モデルによって十分に検証しており、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568号		
学位授与の日	平成30年3月20日		
氏名	西崎 大祐		
学位論文の題目	Oxygen-centered radicals formed in the reaction mixtures containing chloroiron tetraphenylporphyrin, iodosylbenzene and ethanol. (テトラフェニルポルフィン塩化鉄(III)、ヨードシルベンゼン、エタノール反応溶液中に生成する酸素中心エタノールラジカル)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡 史郎	
	副査	教授 井原 義人	教授 岩橋 秀夫

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

シトクロム P450 (P450 または CYP) は生物に広く分布するヘムタンパク質で、生体内で「薬物や環境汚染物質の代謝」、「ステロイドホルモンの生合成」、「アラキドン酸由来の生理活性物質の合成や代謝」、「レチノイン酸の代謝」など、体内での様々な脂溶性物質の代謝に関与している。さらに、アルコール代謝においても P450 が関与すると言われている。生体内に取り込まれたアルコールはほとんどが肝臓において代謝をうけ、その多くはアルコール脱水素酵素 (ADH) を介してアセトアルデヒドになるが、一部は P450 (CYP2E1) を中心としたシトクロム系の酵素が関与すると考えられている。

P450 によるモノオキシゲナーゼ (一原子酸素添加) 反応の触媒サイクルが明らかになっており、酸化活性種として  $O=Fe^{IV}$ ポルフィリン $\pi$ -カチオンラジカル (compound I) が生成する。 $O=Fe^{IV}$ ポルフィリン $\pi$ -カチオンラジカルが基質との反応し、ラジカル中間体を生成することが知られている。しかし、このラジカル中間体を直接検出したという報告はまだない。

今回、アルコールを基質とする  $O=Fe^{IV}$ ポルフィリン $\pi$ -カチオンラジカルの反応におけるラジカル中間体の存在を明らかにするために、 $O=Fe^{IV}$ ポルフィリン $\pi$ -カチオンラジカル生成系である、テトラフェニルポルフィン塩化鉄(III) [Fe(TPP)Cl]とヨードシルベンゼン (PhIO) の混合液にエタノールを加え研究を行った。

### 【方法】

(TPP)+ $Fe^{IV}=O$  反応溶液 (3 mL)は Fe(TPP)Cl (0.5 mM)、PhIO (60 mg)、エタノール (600  $\mu$ L)、 $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-*N-tert*-butylnitron (4-POBN) (17.5 mM)を 1,2-ジクロロエタン中に含む。4-POBN はスピントラップ剤として用いた。25°Cで、PhIO を加えて反応を開始し、10 分後 ESR スペクトルを測定した。

Fenton 反応溶液 (3 mL)は  $Fe(SO_4)_2(NH_4)_2$  (1 mM)、 $H_2O_2$  (1 mM)、エタノール (600  $\mu$ L)、4-POBN (20 mM)をリン酸緩衝溶液中 (pH 7.4) (20 mM)に含む。25°Cで、 $Fe(SO_4)_2(NH_4)_2$  を加えて反応を開始し、1 分後 ESR スペクトルを測定した。

(TPP)+ $Fe^{IV}=O$  反応溶液と Fenton 反応溶液中に生成するエタノール由来ラジカルを比較するために、HPLC-ESR 法、HPLC-ESR-MS 法を用いた。

### 【結果と考察】

(TPP)+ $Fe^{IV}=O$  反応溶液の ESR スペクトルを測定すると、顕著な ESR スペクトルが観測され、フリーラジカルが生成していることが示唆された。この顕著な ESR スペクトルはエタノールを加えなかった時、あるいは Fe(TPP)Cl を加えなかった時、その ESR シグナル強度は (TPP)+ $Fe^{IV}=O$  反応溶液のそれぞれ  $11 \pm 1\%$ 、 $32 \pm 1\%$ まで減少した。また、PhIO を加えなかった時は ESR シグナルを観測することはできなかった。このフリーラジカルを分離するために、HPLC-ESR 分析を行うと、保持時間 31.9 min にピークが得られた。その化学構造を決定するために、HPLC-ESR-MS 分析を行った結果  $m/z$  240 のイオンが観測された。このことから (TPP)+ $Fe^{IV}=O$  反応溶液中に生成したフリーラ



ジカルはエタノール由来のフリーラジカルであることが分かった。

一方、Fenton 反応溶液の ESR スペクトルを測定すると、顕著な ESR スペクトルが観測され、フリーラジカルが生成していることが示唆された。HPLC-ESR 分析を行うと、保持時間 25.2 min と 28.2 min に大きなピークが得られた。この 2本のピークについて HPLC-ESR-MS 分析を行うと、共に m/z 240 のイオンが観測された。このことから、この反応系でもエタノール由来のフリーラジカルが生成されていることがわかった。

(TPP)<sup>+</sup>•Fe<sup>IV</sup>=O 反応溶液と Fenton 反応溶液中に、保持時間の異なるエタノール由来ラジカルが 3 種存在した。この 3つのピークについて、その構造の違いを明らかにするために、エタノールの重水素化物 (ethanol-d6) を用い、HPLC-ESR-MS 分析を行った。(TPP)<sup>+</sup>•Fe<sup>IV</sup>=O 反応溶液中では、m/z 240 (4-POBN/•OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) のイオンが m/z 245 (4-POBN/•OCD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>)へ移動し、Fenton 反応溶液中では、m/z 240 (4-POBN/CH<sub>3</sub>•CHOH)のイオンが m/z 244 (4-POBN/CD<sub>3</sub>•CDOH)へそれぞれ移動した。この結果から、(TPP)<sup>+</sup>•Fe<sup>IV</sup>=O 反応溶液中では、酸素中心のエタノールラジカルが、Fenton 反応溶液中では炭素中心のエタノールラジカルが生成しているとわかった。また、エタノールの重水素化物 (ethanol-d3) を用いた Fenton 反応溶液の HPLC-ESR 分析を行うと、保持時間 25.4 min と 28.2 min に 2つのピークが得られた。この 2本のピークについて HPLC-ESR-MS 分析を行うと、共に m/z 243(4-POBN/CD<sub>3</sub>•CHOH)のイオンが得られた。このことから、Fenton 溶液中には α - ヒドロキシエチルラジカルと 4-POBN 付加体のジアステレオマーが生成していることがわかった。さらにこの結果を確認するために、3つのピークについて、エタノールの同位体 (ethanol-1-<sup>13</sup>C, ethanol-2-<sup>13</sup>C) を用い、ESR の超微細構造を確認すると、ethanol-1-<sup>13</sup>C を使用した場合、(TPP)<sup>+</sup>•Fe<sup>IV</sup>=O 反応溶液中の保持時間 31.9 min にピークは ethanol を使用した時と同じであったが、Fenton 反応溶液中の保持時間 25.2 min と 28.2 min の 2本のピークについてはシグナルの分裂構造が確認された。また、ethanol-2-<sup>13</sup>C を使用した場合は、これら 3本のピークに変化はなく、ethanol を使用した時と同じ構造であった。このことから、(TPP)<sup>+</sup>•Fe<sup>IV</sup>=O 反応溶液中には酸素中心のエタノールラジカルと 4-POBN 付加体が、Fenton 反応溶液中には炭素中心の α - ヒドロキシエチルラジカルと 4-POBN 付加体のジアステレオマーが生成していることが確認された。(TPP)<sup>+</sup>•Fe<sup>IV</sup>=O 反応溶液中に生じる酸素中心のエタノールラジカルは、C-H 結合エネルギー (96.1 kcal/mol) に対して、O-H 結合エネルギー (104.7 kcal/mol)の方が大きいので、より多くの生体化合物から H を引き抜くことが可能であり、強い細胞障害を来す可能性がある。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 30 年 1 月 15 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。

生体内に取り込まれたアルコール (エタノール) は、ほとんどがアルコール脱水素酵素 (ADH) を介してアセトアルデヒドになるが、一部はシトクロム P450 (CYP2E1) を中心としたシトクロム系の酵素が関与すると考えられている。本論文は、シトクロム P450 の触媒サイクル中の酸化活性種である O=Fe<sup>4+</sup>ポルフィリン π-カチオンラジカル (compound I) と基質 (エタノール) との反応を行ない、エタノール由来のラジカル中間体を検出し、その反応メカニズムを検討したものである。

シトクロム P450 によるモノオキシゲナーゼ (一原子酸素添加) 反応の触媒サイクルは明らかになっており、O=Fe<sup>4+</sup>ポルフィリン π-カチオンラジカルが基質と反応し、基質由来のラジカル中間体が生成することが推定されている。しかし、このラジカル中間体を直接検出したという報告はまだない。本論文は、エタノールを基質とし、O=Fe<sup>4+</sup>ポルフィリン π-カチオンラジカルとの反応における基質由来のラジカル中間体の存在を明らかにするために、O=Fe<sup>4+</sup>ポルフィリン π-カチオンラジカル生成系である、テトラフェニルポルフィン塩化鉄(III) [Fe(TPP)Cl] (0.5 mM) とヨードシルベンゼン (PhIO) (60 mg) の混合液にエタノール (200 μL/mL) を加え研究を行ったものである。

PhIO を加えて反応を開始し、10 分後、電子スピン共鳴 (ESR) 分析を行うと顕著なスペクトルが観測され、反応溶液中にフリーラジカルが生成していることが示唆された。このフリーラジカルを分離するために、高速液体クロマトグラフ (HPLC) -ESR 分析を行うと、保持時間 31.9 min にピークが得られ、また、化学構造を決定するために、HPLC-ESR-マススペクトル (MS) 分析を行った結果、m/z 240 のイオンが観測された。このことから反応溶液中に生成したフリーラジカルはエタノール由

来のフリーラジカルであることが分かった。次に、この生成したフリーラジカルが炭素中心ラジカルであるか、酸素中心ラジカルであるかを決定するために、重水素ラベル化エタノール( $\text{CD}_3\text{CD}_2\text{OD}$ )を用い、HPLC-ESR-MS 分析した結果、 $m/z$  245 のイオンが検出された。また、 $^{13}\text{C}$  ラベル化エタノール ( $\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$  あるいは  $^{13}\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) を用い、ESR 分析を行うと、ESR スペクトルに変化が見られなかった。これらの結果から、 $\text{O}=\text{Fe}^{4+}$ ポルフィリン  $\pi$ -カチオンラジカルとエタノールとの反応により酸素中心のエタノール由来ラジカルが生じていることを初めて明らかにしたものである。

本論文は、シトクロム P450 の触媒サイクル中の酸化活性種である  $\text{O}=\text{Fe}^{4+}$ ポルフィリン  $\pi$ -カチオンラジカル (compound I) とエタノールとの反応機序の解明を行ったものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第569号		
学位授与の日	平成30年3月20日		
氏名	金星 匡人		
学位論文の題目	Inhibition of inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels facilitates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in astrocytes (内向き整流性カリウム (Kir) 4.1 チャンネルの阻害はアストロサイトの脳由来神経栄養因子 (BDNF) 発現を促進する)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡 史郎	
	副査	教授 鶴飼 聡	教授 伊東 秀文

## 論文内容の要旨

【緒言】アストロサイトは神経細胞を保持し、脳内環境の恒常性を維持する支持組織として古くから考えられてきた。しかし、近年では、「神経-グリア間のクロストーク」とも呼ばれる相互作用を介して、神経活動の制御において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。最近では「tripartite synapse (三者間シナプス)」の概念が定着してきており、シナプス前神経終末、シナプス後神経細胞およびアストロサイトの足突起 (foot process) の三者が互いに密接してシナプスを構築すると考えられている。この tripartite synapse において、アストロサイトは、神経伝達物質 (グルタミン酸や GABA など) の取り込みと分泌、イオン環境の恒常性維持、神経栄養因子やサイトカインの分泌など、多彩な機能を通じて神経細胞の興奮性や可塑性を調節している。特に、興奮した神経細胞から放出された細胞外カリウムイオンを除去する空間的カリウム緩衝機構は、神経細胞の興奮調節に重要な役割を担っており、アストロサイトに局在する内向き整流性カリウム (Kir) 4.1 チャンネルによって仲介される。Kir4.1 チャンネルの機能不全は、ヒトおよび動物モデルにおいててんかんの発症に関与することが報告されているが、てんかん発症機序 (特にてんかん原性獲得) におけるアストロサイトの病態変化に関しては明らかではない。本研究では、てんかん原性を調節する因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF) に着目し、アストロサイト初代培養を用いて、Kir4.1 チャンネルの阻害およびノックダウンによる BDNF 発現変化を検討した。

【方法】正常マウス (ICR マウス) の大脳皮質からアストロサイト初代培養を行った。GFAP (アストロサイトマーカー)、Kir4.1、および BDNF に対する抗体を用いて、蛍光免疫染色を行った。Kir4.1 チャンネルを特異的に阻害する作用が報告されている抗うつ薬 (選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI)、フルオキセチン) を添加し、BDNF の mRNA およびタンパク質の発現レベルを評価した。さらに、Kir4.1 発現 HEK293 細胞を用いた各種抗うつ薬の Kir4.1 阻害作用と、アストロサイト初代培養の BDNF の mRNA 発現促進作用を比較した。また、アストロサイト初代培養への siRNA 導入によって Kir4.1 のノックダウンを行い、BDNF の mRNA およびタンパク質の発現レベルを評価した。さらに、各種細胞内シグナルの阻害薬を予め添加した上で siRNA 導入を行い、BDNF の mRNA の発現レベルを評価した。mRNA 発現レベルはリアルタイム PCR で、タンパク質発現レベルはウエスタンブロット法または ELISA 法で評価した。

【結果】蛍光二重免疫染色で、Kir4.1 の発現がアストロサイトに共存することが確認され、BDNF はアストロサイトの細胞内だけでなく、細胞外への分泌像も確認された。

Kir4.1 チャンネルの阻害作用が報告されている SSRI のフルオキセチンは、濃度依存的に BDNF の mRNA 発現を増加させた。また、30  $\mu$ M のフルオキセチンは、BDNF のタンパク質発現も増加させた。各種抗うつ薬 (SSRI ; フルオキセチン、セルトラリン、フルボキサミン、三環系抗うつ薬 ; イミプラミン、四環系抗うつ薬 ; ミアンセリン) は、セルトラリン > フルオキセチン > イミプラミン > フルボキサミン > ミアンセリンの順に、Kir4.1 チャンネルを介した K<sup>+</sup>電流の阻害作用を示した。一方、BDNF の mRNA 発現は、セルトラリン > フルオキセチン > イミプラミン > フルボキサミン = ミア

ンセリンの順に増加を認め、Kir4.1 チャネルの阻害作用と相関していた。

Kir4.1 に対する siRNA 導入によって、Kir4.1 の mRNA およびタンパク質レベルは 24 時間後および 48 時間後のいずれも有意に減少した。Kir4.1 のノックダウンによって、BDNF の mRNA およびタンパク質レベルは有意に増加した。Kir4.1 のノックダウンによる BDNF の mRNA 発現誘導は、p38 MAPK 阻害薬および JNK 阻害薬では抑制されなかったが、MEK1/2 阻害薬である U0126 (10  $\mu$ M) によって抑制された。

【考察】本研究の結果から、アストロサイトの Kir4.1 チャネルの阻害は、Ras/Raf/MEK/ERK シグナル経路の活性化によって BDNF 発現を促進することが示唆された。

Kir4.1 チャネルの機能不全によるてんかん発症において、アストロサイトの BDNF 発現上昇がてんかん原性獲得を誘発している可能性が示唆される。また、うつ病や自閉症などの神経精神障害においては、抗うつ薬の Kir4.1 チャネル阻害作用により促進された BDNF 分泌が、モノアミン非依存の機序による治療効果に貢献している可能性がある。

本研究は培養細胞による in vitro の結果であり、今後さらに in vivo において Kir4.1 チャネルの BDNF 発現調節を検証する必要がある。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 30 年 2 月 14 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。

アストロサイトの空間的カリウム緩衝機構は、神経細胞の興奮調節に重要な役割を担っており、内向き整流性カリウム (Kir) 4.1 チャネルによって仲介される。Kir4.1 チャネルの機能不全は、ヒトおよび動物モデルにおいて、てんかん発症に関与することが報告されているが、てんかん発症機序（特にてんかん原性獲得）におけるアストロサイトの病態変化に関しては明らかではない。

本研究は、てんかん原性を調節する因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF) に着目し、アストロサイト初代培養を用いて、Kir4.1 チャネルの阻害およびノックダウンによる BDNF 発現変化を検討した。

正常マウス大脳皮質からアストロサイト初代培養を行い、Kir4.1 チャネルを特異的に阻害する作用が報告されている抗うつ薬の適用、または、siRNA 導入による Kir4.1 のノックダウンを行った。

Kir4.1 チャネルの阻害作用が報告されている選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) のフルオキセチンは、濃度依存的に BDNF の mRNA 発現を増加させ、また、BDNF のタンパク質発現も増加させた。他の抗うつ薬（セルトラリン、イミプラミンなど）も、Kir4.1 チャネルの阻害作用と相関して BDNF の mRNA 発現を増加させた。一方、siRNA 導入による Kir4.1 のノックダウンによっても、BDNF の mRNA およびタンパク質レベルは有意に増加した。Kir4.1 のノックダウンによる BDNF の mRNA 発現誘導は、p38 MAPK 阻害薬および JNK 阻害薬では抑制されなかったが、MEK1/2 阻害薬の U0126 によって抑制された。

以上の結果から、アストロサイトの Kir4.1 チャネル阻害が、Ras/Raf/MEK/ERK シグナル経路の活性化によって、BDNF 発現を促進することが示唆された。

本論文は、Kir4.1 チャネルの機能不全によるてんかん発症において、アストロサイトの BDNF 発現上昇がてんかん原性獲得を誘発している可能性、および、うつ病や自閉症などの神経精神障害において、抗うつ薬の Kir4.1 チャネル阻害作用により促進された BDNF 分泌が、モノアミン非依存の機序による治療効果に貢献している可能性を示唆し、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第570号		
学位授与の日	平成30年3月20日		
氏名	坪井 宏幸		
学位論文の題目	Properties of Paraspinal Muscles in Japanese High School Baseball Players With Terminal-Stage Lumbar Spondylolysis (終末期腰椎分離症の高校野球選手における傍脊柱筋の特性)		
論文審査委員	主査	教授 川上 守	
	副査	教授 山田 宏	教授 田島 文博

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

腰椎分離症は若年者アスリートに生じやすい関節突起間部の疲労骨折であり、特に高校野球選手の発生率は高い。応力解析研究により体幹の伸展及び回旋運動時に腰椎関節突起間部に生じる負荷が最も高くなることが判明しており、腰椎分離症を発症する高校野球選手の原因となる代表的な動作は打撃及び投球動作と考えられている。傍脊柱筋は脊柱起立筋と多裂筋で構成され、体幹伸展及び回旋運動の主動作筋として働き、野球の打撃及び投球動作にも作用するが、脊柱起立筋と多裂筋でその役割は異なる。脊柱起立筋はより大きなトルクの産生に寄与するのに対し、多裂筋は各脊椎間の動きを制御し、脊柱を安定させる。一方、過去の研究より腰椎分離症を発症することで傍脊柱筋力が低下することが示唆されているが、腰椎分離症を発症した高校野球選手の傍脊柱筋を評価した研究はない。

信頼性の高い傍脊柱筋の質的評価法として、trunk holding test 中の傍脊柱筋の筋活動を表面筋電図で計測し、パワースペクトル解析を行う測定法が臨床家や研究者に広く用いられている。この測定法から算出される周波数中央値は経時的に減衰し、その減衰の程度が type1 線維の割合と相関することが立証されている。本研究の目的はこの測定法を用いて、腰椎分離症を発症した高校野球選手の傍脊柱筋を評価し、健常高校野球選手と比較することである。

### 【方法】

対象は終末期腰椎分離症と診断された硬式高校野球選手6名（腰椎分離症群）と腰椎分離症群と年齢及び身体特性が類似した健常硬式高校野球選手11名（コントロール群）とした。全ての被験者はコンピューター断層撮影法により腰椎を撮影し、日本整形外科学会認定スポーツ医による診察を受けた。全ての被験者は腰痛がなく、通常の練習内容を遂行している者であった。

被験者はベッド上腹臥位になり、徒手筋力計を用いて、等尺性体幹伸展最大筋力を測定した。その後、十分な安静をとり、被験者の両側股、膝、足関節をベッドに固定した状態で、可能な限り trunk holding test を実施した。その際の表面筋電図から得られた両側脊柱起立筋及び多裂筋の筋活動をサンプリング周波数 2000Hz で A/D 変換してコンピューターに取り込んだ。表面筋電導出電極の貼付部位は第1腰椎から 3cm 外側に位置する筋腹中央（脊柱起立筋）、上後腸骨棘の尾側端と第1腰椎と第2腰椎の間を結ぶ線上で第5腰椎レベルの位置（多裂筋）とし、不関電極の貼付部位は第1腰椎棘突起上とした。計測した両側脊柱起立筋及び多裂筋の筋活動は 20-500Hz のバンドパスフィルターにかけ、高速フーリエ変換によるパワースペクトル解析を行った。周波数中央値は1秒単位で算出し、回帰直線を引くことで、その初期値と傾きを求めた。両群間における体幹伸展最大筋力、trunk holding test の持続時間、周波数中央値の初期値と傾きは Mann-Whitney U test を用いて比較した。有意水準は 5% とした。

### 【結果】

腰椎分離症群の体幹伸展最大筋力はコントロール群より有意に低かった ( $2.51 \pm 0.26$  vs  $3.04 \pm 0.48$  Nm/kg,  $P=0.04$ )。trunk holding test の持続時間は両群間に有意差がなかった ( $147 \pm 39$  vs  $142 \pm 31$  sec,  $P=0.84$ )。全ての被験者の脊柱起立筋と多裂筋の周波数中央値は有意な右下がりの直線を示した。腰椎分離症

群の周波数中央値はコントロール群より初期値が低く（脊柱起立筋：87.9±24.9 vs 143.7±14.6 Hz, P<.001、多裂筋：131.5±32.6 vs 166.2±10.3 Hz, P=.006）、その傾きは緩やかであった（脊柱起立筋：-0.26±0.15 vs -0.42±0.1 Hz/sec, P=.001、多裂筋：-0.34±0.32 vs -0.44±0.18 Hz/sec, P=.03）。

#### 【考察】

本研究より以下の結果が判明した。①コントロール群と比較して腰椎分離症群の体幹伸展最大筋力は低いこと、②筋電図パワースペクトル解析より、コントロール群と比較して腰椎分離症群の脊柱起立筋と多裂筋の周波数中央値は初期値が低く、その傾きが緩やかであること。これらは過去に報告されていない新知見である。

過去の筋電図パワースペクトル解析と病理組織学的検査を組み合わせた研究より、type 1 線維の割合が高い筋ほど周波数中央値の初期値は低く、その傾きは緩やかであることが立証されている。同様に、trunk holding test 中の傍脊柱筋から得た周波数中央値の傾きと type 1 線維の割合は相関することが報告されている。従って、終末期腰椎分離症の高校野球選手の傍脊柱筋は type 1 線維の割合が高いと考えられる。この傍脊柱筋線維組成の発生機序は不明であるが、腰椎分離症発症後に変化する可能性がある。

実際に終末期腰椎分離症の高校野球選手は傍脊柱筋力が低下している結果から、打撃及び投球のパフォーマンスが低下していることが推測できる。従って、終末期腰椎分離症の高校野球選手に対する運動療法として、傍脊柱筋の筋力強化は必須であるといえるが、その負荷量は本研究では明らかにできていない。しかし、終末期腰椎分離症の高校野球選手における傍脊柱筋では相対的に type 1 線維が増しているため、主として type 2 線維を肥大させるトレーニングが合理的であると考えられる。type 2 線維は大きめの負荷量で肥大するため、我々は終末期腰椎分離症の高校野球選手に対して、医学的管理下で症状を増悪させない範囲での傍脊柱筋高強度トレーニングを推奨する。

#### 【結論】

終末期腰椎分離症と診断された高校野球選手の脊柱起立筋と多裂筋は健常高校野球選手と比較して、type 1 線維の割合が高いことが示唆された。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 12 月 1 日、5 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。

腰椎分離症は高校野球選手に多く、その原因となる動作として打撃及び投球動作が考えられている。これらの主動作筋は脊柱起立筋と多裂筋で構成する傍脊柱筋である。信頼性の高い傍脊柱筋の質的評価法として、trunk holding test 中の傍脊柱筋の筋活動を表面筋電図で計測し、パワースペクトル解析を行う測定法がある。この測定法から算出される周波数中央値は経時的に減衰し、その減衰の程度が type 1 線維の割合と相関することが報告されている。本研究はこの測定法を用いて、腰椎分離症の高校野球選手と健常高校野球選手における傍脊柱筋の違いを検討したものである。

対象は終末期腰椎分離症の高校野球選手 6 名（腰椎分離症群）と腰椎分離症群と年齢及び身体特性が類似した健常高校野球選手 11 名（コントロール群）とした。被験者は等尺性体幹伸展最大筋力を測定後、十分な安静をとり、可能な限り trunk holding test を実施した。その際の両側脊柱起立筋及び多裂筋の筋活動を表面筋電図で計測し、周波数中央値の初期値と傾きを算出した。

その結果、以下の新知見が判明した。

- ① 腰椎分離症群の体幹伸展最大筋力はコントロール群より低かった（2.51±0.26 vs 3.04±0.48 Nm/kg, P=.04）。
- ② 腰椎分離症群の脊柱起立筋と多裂筋の周波数中央値はコントロール群より初期値が低く（脊柱起立筋：87.9±24.9 vs 143.7±14.6 Hz, P<.001、多裂筋：131.5±32.6 vs 166.2±10.3 Hz, P=.006）、その傾きが緩やかであった（脊柱起立筋：-0.26±0.15 vs -0.42±0.1 Hz/sec, P=.001、多裂筋：-0.34±0.32 vs -0.44±0.18 Hz/sec, P=.03）。

終末期腰椎分離症の高校野球選手は傍脊柱筋力が低下しており、打撃及び投球のパフォーマンスが

低下していることが推測できることから、終末期腰椎分離症の高校野球選手は傍脊柱筋の筋力強化が必須である。筋電図パワースペクトル解析の結果より、終末期腰椎分離症の高校野球選手の傍脊柱筋は健常高校野球選手より **type 1** 線維の割合が高いことを示す。従って、**type 2** 線維を肥大させるトレーニングが合理的であると考ええる。体幹の伸展時と回旋時に関節突起間部に生じる負荷が最も高くなることから、症状を悪化させないためにもこれらの運動を避けた脊柱中間位での傍脊柱筋高強度トレーニングが望ましい。

本論文は腰椎分離症アスリートの傍脊柱筋を評価した初めての論文であり、検討したトレーニングが確立すればアスリートのパフォーマンスがさらに向上することが期待できることから、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571号		
学位授与の日	平成30年3月20日		
氏名	樽谷 玲		
学位論文の題目	Vasa Vasorum Restructuring in Human Atherosclerotic Plaque Vulnerability: A Clinical Optical Coherence Tomography Study (Vasa vasorum の3次元構造改変はヒト冠動脈粥腫の不安定化に関係する)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 加藤 正哉	教授 赤阪 隆史

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

血管栄養血管(vasa vasorum: VV)は、血管周囲に存在する血管壁を栄養する血管網である。VVはヒトの動脈硬化の進展や不安定化に深く関与していると推察されていた。しかし従来の報告は動物実験もしくは剖検心による検討のため、ヒト冠動脈におけるVVの定量評価やVVの三次元構造の解析が困難であり、またVVと動脈硬化病変性状との関係については永らく不明であった。しかし第2世代光干渉断層法(optical coherence tomography: OCT)である、frequency-domain OCT (FD-OCT)の登場によりin vivoでVVの観察が可能となった。

そこで、我々はFD-OCTを用いて冠動脈疾患患者にVVの定量評価およびその三次元構造と、冠動脈プラーク性状との関連について検討を行った。

### 【方法】

2012年2月から2014年10月にかけて和歌山県立医科大学附属病院に入院し、左冠動脈前下行枝近位部(LAD)に対しFD-OCTを施行した346症例を対象とした。そのうち、経皮的冠動脈形成術や冠動脈バイパス術を施行された既往のある症例(n=63)、LAD遠位部に狭窄を認める症例(n=23)、血栓が観察領域に認められた症例(n=102)、血管径が4mmを超える症例(n=51)、VVの解析が困難な画質の悪い症例(n=54)は除外した。最終的に53症例から得られた53本のLAD10mm分のOCT画像を解析対象とした。OCTコンセンサス文書(Tearney GJ, et al. JACC 2012)の病変性状分類に則り、OCT画像を①Normal群(n=9)、②Fibrous plaque群(n=14)、③Fibroatheroma群(n=10)、④Plaque rupture群(n=10)、⑤Fibrocalcification群(n=10)の5群に分類した。

低信号の管腔様構造物のうち、血管長軸方向に連続性を有するものをOCTにおけるVVと定義した。そのうち外膜にあるものをVV、プラーク内にあるものをintra-plaque neovesselとした。三次元解析において、血管長軸方向に1mm以上縦走するVVのうち、外膜に存在する物を外縦走タイプ、プラーク内に存在する物を内縦走タイプと定義した。さらに三次元画像において、プラーク内へ分枝しながら侵入するintra-plaque neovesselを珊瑚状パターンと定義した。

### 【結果】

5群間でVVの体積に有意な差異を認めた(Normal 0.329 (IQR 0.209 to 0.361)mm<sup>3</sup>、Fibrous plaque 0.433 (IQR 0.297 to 0.706)mm<sup>3</sup>、Fibroatheroma 0.288 (IQR 0.113 to 0.364)mm<sup>3</sup>、Plaque rupture 0.160 (IQR 0.141 to 0.193)mm<sup>3</sup>、Fibrocalcification 0.106 (IQR 0.053 to 0.165)mm<sup>3</sup>, p<0.01)。

またintra-plaque neovesselの体積も5群間で有意な差を認めた(Normal 0.00mm<sup>3</sup>、Fibrous plaque 0.00mm<sup>3</sup>、Fibroatheroma 0.028 (IQR 0.019 to 0.041)mm<sup>3</sup>、Plaque rupture 0.035 (IQR 0.026 to 0.042)mm<sup>3</sup>、Fibrocalcification 0.010 (IQR 0.005 to 0.014)mm<sup>3</sup>, P<0.001)。

三次元解析において、外縦走タイプの頻度は5群間で有意差を認めなかった(Normal 77.8%, Fibrous plaque 78.6%, Fibroatheroma 80.0%, Plaque rupture 60.0%, Fibrocalcification 70.0%, p=0.83)。一方、内縦走タイプ(Normal 0.0%, Fibrous plaque 28.6%, Fibroatheroma 40.0%, Plaque rupture 70.0%, Fibrocalcification 40.0%, p=0.032)および珊瑚状パターン(Normal 0.0%, Fibrous plaque 7.1%, Fibroatheroma 40.0%, Plaque



rupture 80.0%, Fibrocalcification 10.0%,  $p < 0.0001$ ) の頻度は、5 群間に有意差を認めた。また Fibrous plaque 群において、VV 体積とプラーク体積に有意な正の相関を認めた( $r=0.71$ ,  $p < 0.01$ )。また Fibroatheroma 群及び Plaque rupture 群において、intra-plaque neovessel の体積とプラーク体積に、有意な正の相関を認めた ( $r=0.53$ ,  $p=0.04$ )。

### 【考察と結語】

生体内ヒト冠動脈で VV 体積とプラーク体積に正の相関が存在することが明らかとなった。VV が栄養血管であることを考慮すれば、この関係はプラーク増生時に必要な酸素や栄養需要に応えた結果と考えられた。また動物実験では先行する VV の増生がプラークの増生を招くとされており、この関係は結果ではなく原因である可能性も示唆される。さらに intra-plaque neovessel の体積は、不安定プラークで多く、その体積と正の相関を示した。プラーク性状の変化に伴い、intra-plaque neovessel が増生する事が示唆された。また VV の三次元構造のうち、内縦走タイプおよび珊瑚状パターンは、プラークの不安定化に関係している事が示された。プラーク内新生血管は、もともとの VV と比較し脆弱な構造を有していることから、その破綻が冠動脈プラークの不安定化に関与し、plaque rupture の起点となる事が示唆された。またこれら intra-plaque neovessel が necrotic core の内容物の供給源となっていると推察された。

OCT による冠動脈 VV の画像化は、プラークの不安定性を判断する新たな指標となる可能性が示された。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 29 年 9 月 5 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

血管栄養血管(vasa vasorum: VV)は、血管周囲に存在する血管壁を栄養する血管網である。VV はヒトの動脈硬化の進展や不安定化に深く関与していると推察されていた。しかし従来の報告は動物実験もしくは剖検心による検討のため、ヒト冠動脈における VV の定量評価や VV の三次元構造の解析が困難で、また VV と動脈硬化病変性状との関係については永らく不明であった。しかし第 2 世代光干渉断層法(optical coherence tomography: OCT)である、frequency-domain OCT (FD-OCT)の登場により in vivo で VV の観察が可能となった。

本論文は左冠動脈前下行枝(left anterior descending artery: LAD)に対し FD-OCT を施行した 53 症例から得られた 53 本の LAD10mm 分の OCT 画像を解析対象とし、VV の定量評価およびその三次元構造と、冠動脈プラーク性状との関連について検討を行った。得られた OCT 画像を①Normal 群 (n=9)、②Fibrous plaque 群(n=14)、③Fibroatheroma 群(n=10)、④Plaque rupture 群(n=10)、⑤Fibrocalcification 群(n=10)の 5 群に分類した。また、低信号の管腔様構造物のうち、血管長軸方向に連続性を有するものを OCT における VV と定義した。そのうち血管外膜にあるものを VV、プラーク内にあるものを intra-plaque neovessel とした。三次元解析において、血管長軸方向に 1mm 以上縦走する VV のうち、血管外膜に存在する物を外縦走タイプ、プラーク内に存在する物を内縦走タイプと定義した。さらに三次元画像において、プラーク内へ分枝しながら侵入する intra-plaque neovessel を珊瑚状パターンと定義した。

VV 体積、intra-plaque neovessel 体積ともに 5 群間で有意な差異を認めた。三次元解析において、外縦走タイプの頻度は 5 群間で有意差を認めなかった。一方、内縦走タイプおよび珊瑚状パターンの頻度は、5 群間で有意差を認めた。Fibrous plaque 群において、VV 体積とプラーク体積に有意な正の相関を認めた。また Fibroatheroma 群及び Plaque rupture 群において、intra-plaque neovessel の体積とプラーク体積に、有意な正の相関を認めた。

以上、本論文は生体内ヒト冠動脈において VV が動脈硬化進展に関係している事、生体内ヒト冠動脈で VV、特に内縦走タイプおよび珊瑚状パターンの 3 次元構造を持つ VV がプラークの不安定化に関係している事を示したものである。本論文は OCT による冠動脈 VV の画像化はプラークの不安定性を判断する新たな指標となる可能性が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(医)甲第572号		
学位授与の日	平成30年3月20日		
氏名	森木 貴司		
学位論文の題目	Noninvasive positive pressure ventilation enhances the effects of aerobic training on cardiopulmonary function (非侵襲的陽圧換気下の有酸素トレーニングによる心肺機能向上効果の増大)		
論文審査委員	主査	教授 村田 顕也	
	副査	教授 園木 孝志	教授 田島 文博

## 論文内容の要旨

### 【背景・目的】

心肺機能の向上は、生活習慣病の予防や健康寿命の延長に寄与することが知られている。心肺機能の改善方法として運動がよく知られているが、それ以上に効率的に心肺機能を改善させる方法の検討は少ない。単なる運動負荷以上に効果的な方法が見出せれば心肺機能向上をより効率的に行え、疾患リスクや死亡率の大幅な低下につながる。

心肺運動負荷試験で測定する最大酸素摂取量 (maximal oxygen uptake :  $VO_{2max}$ ) は、最大心拍出量 (cardiac output : CO) と最大動静脈酸素較差の積で規定され、一般的な心肺機能の指標として用いられる。長期間の安静臥床では、静脈還流量の増加に伴う一回心拍出量 (stroke volume : SV) が一時的に増加し、中長期的に循環血漿量の減少や心臓の筋萎縮を引き起こす。その結果、 $VO_{2max}$  の低下をもたらす。一方、安静臥床状態においても下半身陰圧をかけ、静脈還流量が低下した状態で運動を行うと、長期間の安静臥床に伴う  $VO_{2max}$  の低下を予防できることが報告されている。

また、呼気終末陽圧 (positive end expiratory pressure : PEEP) を設定した非侵襲的陽圧換気 (noninvasive positive pressure ventilation : NPPV) は、慢性閉塞性肺疾患や睡眠時無呼吸症候群などに対する治療で行われることがある。その時、下半身陰圧と同様に静脈還流量が低下することが報告されている。そこで我々は、PEEP を設定した NPPV を付加して運動を行えば心肺機能の向上効果を増大させると仮説を立て、その検証を目的として研究計画を立てた。

### 【方法】

対象は、内科的疾患や整形外科的疾患のない若年健常男性 10 名 (平均年齢  $28.3 \pm 3.1$  歳) とした。本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た上で、口頭および書面で被験者に実験の目的、方法および危険性を説明し同意を得て行った。

まず、運動に使用する PEEP を決定するため、安静仰臥位で NPPV を使用し PEEP (0 cmH<sub>2</sub>O、4 cmH<sub>2</sub>O、8 cmH<sub>2</sub>O、12 cmH<sub>2</sub>O) をそれぞれ 5 分間行った。PEEP 0 cmH<sub>2</sub>O (通常安静仰臥位) と比較し、PEEP 12 cmH<sub>2</sub>O において SV と CO が有意に低値を示したため、付加する PEEP 値は 12 cmH<sub>2</sub>O とした。

つぎに、全ての被験者に対して、自転車エルゴメータを用い  $VO_{2max}$  測定と採血 (全血算) を行った。同時に最大心拍数 (maximal heart rate : HRmax)、最大分時換気量 (maximal minute ventilator volume : VEmax)、最大呼吸数 (maximal respiratory rate : RRmax) を記録した。その翌日から、それぞれの被験者に対して、それぞれの  $VO_{2max}$  の 60% の運動負荷で 1 日 30 分、連続 5 日間自転車エルゴメータ運動を施行した (有酸素トレーニング)。また、有酸素トレーニングは、通常状態 (non-NPPV 群) と NPPV による PEEP (NPPV 群) いずれかの条件を初日にランダムに決定し、その条件を 5 日間付加した。有酸素トレーニング終了翌日に再び  $VO_{2max}$  を測定した。その後、3 週間の wash out 期間を空け、それぞれの被験者は再び  $VO_{2max}$  測定を行い、その翌日から先に付加した条件と別の有酸素トレーニングを 5 日間行った。有酸素トレーニング前後での採血データから循環血漿量の変化割合 (percent change of plasma volume :  $\Delta$ IPV) を算出した。さらに、各有酸素トレーニングの 1 日目の運動開始時と運動終了時に HR、血圧 (blood pressure : BP)、Borg scale をそれぞれ

れ測定した。

各 PEEP によるデータの比較は ANOVA を行い post hoc test は Tukey-Kramer's test とした。また、それぞれの有酸素トレーニング前後と群間のデータ比較は paired t-test を行った。なお、統計学的有意水準は 5%未満とした。

### 【結果】

有酸素トレーニング前後での  $VO_2\max$  は、non-NPPV 群と NPPV 群の両群で有意に上昇した。有酸素トレーニング後の  $VO_2\max$  は、NPPV 群 ( $56.2 \pm 6.5 \text{ ml/kg/min}$ ) において non-NPPV 群 ( $54.0 \pm 6.3 \text{ ml/kg/min}$ ) より有意に高かった ( $P < 0.05$ )。有酸素トレーニング前後において  $VE_{\max}$  は NPPV 群で有意な上昇を認めたが、non-NPPV 群では上昇しなかった。一方、 $HR_{\max}$  と  $RR_{\max}$  は有酸素トレーニング前後で両群ともに有意な上昇は示さなかった。また、有酸素トレーニング前後の  $\Delta PV$  は両群間において有意な変化を認めなかった。

有酸素トレーニング 1 日目の運動 30 分では HR、BP、Borg scale が有意に上昇した。HR と BP の上昇程度は両群間に有意差はなかったが、Borg scale は NPPV 群において non-NPPV 群と比較して有意に高く上昇した。

### 【考察】

今回の研究により、PEEP 12 cmH<sub>2</sub>O 下の有酸素トレーニングは、運動単独よりも  $VO_2\max$  を有意に上昇させることが判明した。これは、PEEP により静脈還流量が低下した状態での有酸素トレーニングにより、NPPV 群においては心臓への負荷量が増大し、最大 CO の向上に寄与したことが考えられる。その理由として、①相対的な拡張期左心室内圧が NPPV 群では低下し、心筋仕事量が増している可能性、②左心房への静脈還流量低下が左心房の容量受容器を刺激し、交感神経活動を上昇させ、相対的に後負荷を上昇させた可能性、などが考えられる。被験者の Borg scale も NPPV 群において有意に高く上昇した結果であり、同一の運動強度であっても主観的強度が大きく、心肺機能への負担が強かったことを示唆している。

さらに、呼吸器系で考えると PEEP は吸気筋に対しては補助的に働き、呼気筋に対しては抵抗となる。NPPV 下有酸素トレーニングでは、主に呼気筋の強化に働き短期的な効果として、肺胞換気量を増加させ換気効率を上昇させるといわれている。そのため、NPPV 群における有酸素トレーニング後の  $VE_{\max}$  が上昇したと考えられる。さらに、動静脈酸素較差を向上させ、 $VO_2\max$  を上昇させた可能性がある。また、 $\Delta PV$  には有意差がなかったため、両群間の  $VO_2\max$  上昇差に血漿量は関係しなかったと考えられる。しかし、循環血液量が NPPV 群で有意に上昇した可能性は否定できない。NPPV を使用した PEEP 12 cmH<sub>2</sub>O 下 60% $VO_2\max$  での 30 分間、連続 5 日間の自転車エルゴメータ運動は、運動単独よりも心肺機能向上効果を増大させ、健康増進に有効なトレーニング方法となる可能性がある。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成29年10月10日、10月11日、10月16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。

心肺機能の改善方法として運動がよく知られている。単なる運動負荷以上に効果的な方法が見出せれば心肺機能向上をより効率的に行え、疾患リスクや死亡率の大幅な低下につながる。呼気終末陽圧 (PEEP) をかけることにより、静脈還流量が低下することが報告されている。そこで、我々は PEEP を設定した非侵襲的陽圧換気 (NPPV) を付加して運動を行えば心肺機能の向上効果を増大させると仮説を立て、その検証を目的として研究計画を立てた。

対象は、若年健常男性 10 名 (平均年齢  $28.3 \pm 3.1$  歳) とした。自転車エルゴメータを用い最大酸素摂取量 ( $VO_2\max$ ) の 60% の運動負荷で 1 日 30 分、連続 5 日間自転車エルゴメータ運動を施行した (有酸素トレーニング)。また、有酸素トレーニングは、通常状態 (non-NPPV 群) と NPPV による PEEP 12cmH<sub>2</sub>O (NPPV 群)、いずれかの条件を初日にランダムに決定し、その条件を 5 日間付加した。その後、3 週間の wash out 期間を空け、先に付加した条件と別の有酸素トレーニングを 5 日間行った。それぞれの有酸素トレーニング前後に  $VO_2\max$ 、最大分時換気量 ( $VE_{\max}$ ) を測定した。

有酸素トレーニング前後で採血（全血算）し、その採血データから循環血漿量の変化割合（percent change of plasma volume： $\Delta$ PV）を算出した。

結果、有酸素トレーニング前後での $VO_{2max}$ は、non-NPPV群とNPPV群の両群で有意に上昇した。さらに有酸素トレーニング後の $VO_{2max}$ は、NPPV群（ $56.2 \pm 6.5 \text{ ml/kg/min}$ ）においてnon-NPPV群（ $54.0 \pm 6.3 \text{ ml/kg/min}$ ）より有意に高かった。有酸素トレーニング前後において $VE_{max}$ はNPPV群で有意な上昇を認めたが、non-NPPV群では上昇しなかった。また、有酸素トレーニング前後の $\Delta$ PVは両群間において有意な変化を認めなかった。

以上の結果から、NPPVを使用したPEEP 12 cmH<sub>2</sub>O下60% $VO_{2max}$ での30分間、連続5日間の自転車エルゴメータ運動は、運動単独よりも $VO_{2max}$ を有意に上昇させることが判明した。本論文は、健康増進に有効で新たなトレーニング方法となる可能性を示唆し、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第573号		
学位授与の日	平成30年3月20日		
氏名	山口 俊介		
学位論文の題目	CEACAM1 is associated with recurrence after hepatectomy for colorectal liver metastasis. (CEACAM1 細胞内ドメイン isoform と大腸癌肝転移の肝切除後再発に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山上 裕機

## 論文内容の要旨

### 諸言

CEACAM1(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1)は、大腸腺腫から早期大腸癌において発現が低下し、進行大腸癌において浸潤先進部で CEACAM1 が、再発現する。癌浸潤先進部で細胞内ドメインの長い CEACAM1-L が短い CEACAM1-S に対し優位となることにより、大腸癌の浸潤・転移および予後と関連することが報告された。これまで、浸潤した大腸癌細胞が肝転移することで CEACAM1 の発現や CEACAM1 cytoplasmic isoform balance がどう変化するかは明らかにされていない。

本研究は大腸癌肝転移症例に対して肝切除を行った原発巣と転移巣での CEACAM1 の発現と CEACAM cytoplasmic domain isoforms について検討し、大腸癌肝転移後の重要な課題である切除後再発との関連について検討した。さらに、基礎的検討として CEACAM1 cytoplasmic domain isoform の強制発現により、転移形成に必要と考えられる癌幹細胞様特性を誘導するか否かについて検討した。

### 対象と方法

#### 【臨床的研究】

<対象>1999年から2008年に和歌山県立医科大学第2外科にて大腸癌肝転移に対し根治肝切除術を施行した67例と、2002年から2003年に肝転移を認めない大腸癌に対し根治大腸切除術を施行した127例を対象とした。

<免疫組織化学染色>ホルマリンパラフィン包埋保存された大腸癌原発巣と大腸癌肝転移巣摘出標本から薄切標本を作成し、CEACAM1(4D1C2)(Merck,Darmstadt, Germany)、CEACAM1 long isoform (CEACAM1-L) または short isoform (CEACAM1-S) specific polyclonal antibody(Dr. JE Shively, City of Hope, CA, USA より供与)により免疫組織化学染色を施行した。

#### 【基礎的研究】

CEACAM1 による癌幹細胞様特性の誘導に関する検討のため、大腸癌培養細胞株 HT29 細胞と HCT116 細胞に CEACAM1-4L または CEACAM1-4S を強制発現させ、CEACAM1 の発現による癌幹細胞マーカー (CD44,CD133) の発現について Western Blotting にて検討し、ALDH1 活性を Flow cytometry にて検討した。さらに CEACAM1 cytoplasmic domain isoform が癌幹細胞様特性の1つである足場非依存性を誘導するか否かを検討するために、CEACAM1-4L または CEACAM1-4S を強制発現させた HT29 細胞と HCT116 細胞について soft-agar colony formation assay の Limiting dilution assay を施行した。

### 結果

#### 【臨床的研究】

肝転移がある症例とない症例で、浸潤先進部における CEACAM1-S の発現が変化するかについて検討した結果、肝転移のない症例に比べて肝転移のある症例では有意に CEACAM1-S の発現を認め、肝転移のある症例では CEACAM1-S を強く発現する症例の割合がより多かった。大腸癌の肝転移巣

において CEACAM1 (4D1C2)、および CEACAM1-L、CEACAM1-S の強い発現を認め、発現差を認めなかった。肝転移のある大腸癌原発巣の浸潤先進部では CEACAM1-L 優位バランスであったが、CEACAM1-S の発現が強い症例 (29 例) と弱い症例 (39 例) を認めた。肝切除後再発について単変量および多変量解析を施行したところ、CEACAM1-S 強発現と肝転移個数が複数であることが、独立した再発危険因子であった ( $p < 0.047$ ,  $p < 0.024$ )。また Kaplan-Meier 法で CEACAM1-S 発現強度で生存率を比較したところ、CEACAM1-S 強発現は有意に予後不良であった ( $p = 0.006$ )。一方、肝転移のない大腸癌症例での大腸癌浸潤先進部の CEACAM1-S 発現の有無で生存率を比較したところ有意差を認めなかった。

#### 【基礎的研究】

##### ① CEACAM1 cytoplasmic domain isoform による幹細胞マーカー誘導に関する検討

大腸癌培養細胞株 HT29 細胞と HCT116 細胞に CEACAM1-4L または CEACAM1-4S を強制発現させ、CEACAM1 の発現による癌幹細胞マーカー (CD44, CD133) の発現について Western Blotting にて検討したところ、CD133 は HT29、HCT116 ともに有意な増強を認めず、CD44 は HT29 細胞、HCT116 細胞ともに有意な発現増強を認めた。ALDH1 活性を Flow cytometry にて検討した結果、HT29 細胞では CEACAM1-4L および CEACAM1-4S が優位に ALDH1 活性を増強し、HCT116 細胞では CEACAM1-4S のみが ALDH1 活性を増強した。

##### ② CEACAM1 cytoplasmic domain isoform による足場非依存性増殖に関する検討

CEACAM1-4L または CEACAM1-4S を強制発現させた HT29 細胞と HCT116 細胞について soft-agar colony formation assay の Limiting dilution assay を施行したところ、CEACAM1-4S を強制発現させた HT29 細胞は vector control と CEACAM1-4L と比べ、有意に colony 形成した。また、CEACAM1-4S または CEACAM1-4L を強制発現した HCT116 細胞は vector control に比べて有意に colony 形成した。

#### 考察・結語

本研究にて、大腸癌浸潤先進部での CEACAM1-S 発現強度が大腸癌肝転移症例の肝切除後再発の予測因子であることが示された。また、基礎的検討から CEACAM1-4S の発現が、CD44 発現増強、ALDH1 活性増強および足場非依存性増殖に関与することで、肝臓での腫瘍増殖能を促進している可能性が示唆された。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 30 年 2 月 23 日、論文審査委員会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。

CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) は、CEACAM1-L が、CEACAM1-S に対し優位となることにより、大腸癌の浸潤・転移および予後と関連することが報告されている。しかし、浸潤した大腸癌細胞が肝転移することで CEACAM1 の発現や CEACAM1 cytoplasmic isoform balance がどう変化するかは明らかにされていない。本研究は大腸癌肝転移症例における原発巣と転移巣での CEACAM1 の発現と CEACAM cytoplasmic domain isoforms について検討し、大腸癌肝転移後の重要な課題である切除後再発との関連について検討した。さらに、基礎的検討として CEACAM1 cytoplasmic domain isoform の強制発現により、転移形成に必要と考えられる癌幹細胞様特性を誘導するか否かについて検討した。

まずは、肝転移を認める大腸癌原発巣と肝転移巣、肝転移を認めない大腸癌原発巣の CEACAM1 cytoplasmic isoform balance を免疫組織化学染色にて検討した。結果、大腸癌浸潤先進部において肝転移のない症例に比べて肝転移のある症例では CEACAM1-S の発現を認め、肝転移のある大腸癌原発巣の浸潤先進部では CEACAM1-L 優位バランスであったが、CEACAM1-S の発現が強い症例と弱い症例を認めた。さらに、大腸癌原発巣浸潤先進部における CEACAM1-S 強発現は、肝転移に対する肝切除後の再発に対する独立した危険因子であり、肝転移のある大腸癌原発巣において大腸癌浸潤先進部の CEACAM1-S 強発現群は弱発現群に比べ、無再発生存率、全生存率ともに不良であった。次に CEACAM1 による癌幹細胞様特性の誘導に関する検討のため、大腸癌培養細胞株に CEACAM1-4L または CEACAM1-4S を強制発現させ、CEACAM1 の発現による癌幹細胞マーカー (CD44, CD133)

の発現について Western Blotting にて検討し、ALDH1 活性を Flow cytometry にて検討した。結果、CEACAM1 の発現により、大腸癌細胞株において CD44 は発現増強を認めたが、CD133 は増強を認めず、CEACAM1-4S 発現が、ALDH1 活性を有意に増強した。さらに CEACAM1 cytoplasmic domain isoform が癌幹細胞様特性の 1 つである足場非依存性を誘導するか否かを検討するために、soft-agar colony formation assay の Limiting dilution assay を施行した。結果、CEACAM1-4S を強制発現させた大腸癌細胞株は vector control および CEACAM1-4L と比べ、非足場依存性に有意に colony を形成した。

以上の結果より本研究にて、大腸癌浸潤先進部での CEACAM1-S 発現強度が大腸癌肝転移症例の肝切除後再発の予測因子であることが示された。また、基礎的検討から CEACAM1-4S の発現が、CD44 発現増強、ALDH1 活性増強および足場非依存性増殖に関与することで、肝臓での腫瘍増殖能を促進している可能性が示唆され、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第574号		
学位授与の日	平成30年3月20日		
氏名	松井 有史		
学位論文の題目	Radical formation in individual aqueous solutions of some unsaturated fatty acids and in their mixtures (種々の不飽和脂肪酸を単独で水溶液中においてインキュベーションした時のラジカル生成とそれらの内から2種類を選んで混合した時のラジカル生成の比較)		
論文審査委員	主査	教授 平井 秀一	
	副査	教授 井原 義人	教授 岩橋 秀夫

## 論文内容の要旨

### 【序論】

過酸化脂質は、DNA や染色体などと反応し、変異原性、発癌性を有する可能性があるため、注目を集めている。多価不飽和脂肪酸の過酸化速度を非水系で測定すると、それらの過酸化速度は、分子中に含まれる2つの二重結合に挟まれた炭素上の水素(ビスアリル水素)の数に比例すると報告されてきた。一方、宮下らは、多価不飽和脂肪酸の過酸化速度を水溶液中で測定すると、酸化速度はビスアリル水素の数に反比例すると報告し、水性ミセル中の不飽和脂肪酸はアシル鎖立体配座の高い柔軟性があるため水透過性をもたらすことにより、過酸化反応に対して安定であると述べている。

このように多価不飽和脂肪酸分子全体としての過酸化反応速度に関する研究は行われてきたが、多価不飽和脂肪酸分子中のどの部分で過酸化が起こりやすいかについての報告はない。多価不飽和脂肪酸分子中のどの部分で過酸化が起こりやすいかを調べるために、オレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸を単独で水溶液中においてインキュベーションした時とそれらの内から2種類を選んで混合した時のラジカル生成を液体クロマトグラフ-電子スピン共鳴(HPLC-ESR)、液体クロマトグラフ-電子スピン共鳴-マススペクトル(HPLC-ESR-MS)を用い比較検討した。

### 【実験】

反応液は、0.89 mM オレイン酸(リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸あるいはアラキドン酸)単独あるいはそれらの内から2種類を選んで混合、50 mM リン酸緩衝液(pH7.4)、0.1 M  $\alpha$ -4-pyridyl-1-oxide N-tert-butyl nitron(4-POBN)、0.38 M アセトニトリル、20  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>を含む。4-POBNはスピントラップ剤である。反応は、30°C、168時間行った。反応後、HPLC-ESR、HPLC-ESR-MS分析を行った。

### 【結果と考察】

オレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸およびアラキドン酸反応溶液をHPLC-ESR及びHPLC-ESR-MSで分析した結果、オレイン酸とアラキドン酸反応溶液からはラジカルが検出されなかった。一方、リノール酸から7-カルボキシヘプチルラジカルとペンチルラジカルが、 $\alpha$ -リノレン酸からはエチルラジカルと7-カルボキシヘプチルラジカルが、 $\gamma$ -リノレン酸からは4-カルボキシブチルラジカルがそれぞれ検出された。2種類を混合すると、4-カルボキシブチルラジカルは、248% $\pm$ 4%(リノール酸/ $\gamma$ -リノレン酸)、270% $\pm$ 80%( $\alpha$ -リノレン酸/ $\gamma$ -リノレン酸)および227% $\pm$ 14%( $\gamma$ -リノレン酸/オレイン酸)に増加した。エチルラジカルは119% $\pm$ 17%(リノール酸/ $\alpha$ -リノレン酸)、40% $\pm$ 14%( $\alpha$ -リノレン酸/ $\gamma$ -リノレン酸)および47% $\pm$ 6%( $\alpha$ -リノレン酸/オレイン酸)になった。7-カルボキシヘプチルラジカルは56% $\pm$ 8%(リノール酸/ $\alpha$ -リノレン酸)、6.1% $\pm$ 0.9%(リノール酸/ $\gamma$ -リノレン酸)、48% $\pm$ 18%(リノール酸/オレイン酸)、58% $\pm$ 1%( $\alpha$ -リノレン酸/オレイン酸)および44% $\pm$ 0.2%(リノール酸/アラキドン酸)に減少した。ペンチルラジカルは、0%(リノール酸/ $\alpha$ -リノレン酸)、36% $\pm$ 5%(リノール酸/ $\gamma$ -リノレン酸)、14% $\pm$ 0.8%(リノール酸/アラキドン酸)、および0%( $\alpha$ -リノレン酸/オレイン酸)になった。

以上の結果より、カルボキシ末端に近い8位の炭素に結合した水素原子が引き抜かれることにより形



成される 4-カルボキシブチルラジカルの生成量は、混合すると増加した。メチル末端に近い炭素 14 位に結合した水素原子が引き抜きによって形成されるエチルラジカル、メチル末端に近い炭素 11 位に結合した水素原子が引き抜かれることにより生成される 7-カルボキシヘプチルラジカル、メチル末端に近い炭素 11 位に結合した水素原子が引き抜かれることによって形成されるペンチルラジカルについてはそれらのラジカル生成量は混合によって減少した。2 種の脂肪酸を混合することによって、不飽和脂肪酸はより密集したミセルを形成し、カルボキシ基に配位した鉄イオンは、カルボキシ基の近くのビスアリル水素原子と反応しやすくなったと考えられる。

#### 【結語】

オレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸を単独で水溶液中においてインキュベーションした時とそれらの内から 2 種類を選んで混合した時のラジカル生成を比較した。混合によって不飽和脂肪酸のカルボキシ末端に近い炭素に結合した水素原子の引き抜きにより形成される 4-カルボキシブチルラジカルの生成量は増加し、不飽和脂肪酸のメチル末端に近い炭素に結合した水素原子の引き抜きにより形成されるエチルラジカル、7-カルボキシヘプチルラジカル、ペンチルラジカルの生成量は減少した。

#### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 30 年 3 月 8 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。多価不飽和脂肪酸の過酸化速度を非水系で測定すると、それらの過酸化速度は、分子中に含まれる 2 つの二重結合に挟まれた炭素上の水素（ビスアリル水素）の数に比例すると報告されてきた。一方、多価不飽和脂肪酸の過酸化速度を水溶液中で測定すると、酸化速度はビスアリル水素の数に反比例すると報告されている。水溶液中の多価不飽和脂肪酸分子全体としての過酸化反応速度に関する研究は行われてきたが、多価不飽和脂肪酸分子中のどの部分で過酸化が起こりやすいかについての報告はない。本論文では多価不飽和脂肪酸分子中のどの部分で過酸化が起こりやすいかを調べるために、複数の多価不飽和脂肪酸を単独で水溶液中においてインキュベーションした時とそれらの内から 2 種類を選んで混合した時のラジカル生成を液体クロマトグラフ-電子スピン共鳴 (HPLC-ESR)、液体クロマトグラフ-電子スピン共鳴-マススペクトル (HPLC-ESR-MS) を用い比較検討した。

反応溶液は、0.89 mM オレイン酸（リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸あるいはアラキドン酸）単独あるいはそれらの内から 2 種類を選んで混合、50 mM リン酸緩衝液 (pH7.4)、0.1 M 4-POBN（スピントラップ剤）、0.38 M アセトニトリル、20  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> を含む。反応は、30°C、168 時間行った。反応溶液を HPLC-ESR 及び HPLC-ESR-MS で分析した結果、オレイン酸とアラキドン酸反応溶液からはラジカルが検出されなかった。一方、リノール酸から 7-カルボキシヘプチルラジカルとペンチルラジカルが、 $\alpha$ -リノレン酸からはエチルラジカルと 7-カルボキシヘプチルラジカルが、 $\gamma$ -リノレン酸からは 4-カルボキシブチルラジカルがそれぞれ検出された。次に 2 種類を選んで混合した時のラジカル生成を比較した結果、混合によって 4-カルボキシブチルラジカルの生成量は増加し、エチルラジカル、7-カルボキシヘプチルラジカル、ペンチルラジカルの生成量は減少した。エチルラジカル、7-カルボキシヘプチルラジカルおよびペンチルラジカルは、メチル末端に近い炭素（11 位または 14 位）に結合した水素原子の引き抜きにより、4-カルボキシブチルラジカルはカルボキシ末端に近い 8 位の炭素に結合した水素原子の引き抜きにより形成されることから、カルボキシ末端に近い炭素のプロトン引き抜きによるラジカル生成は混合によって増加し、メチル末端に近い炭素のプロトン引き抜きによるラジカル生成は混合によって減少したことが明らかとなった。

本研究では、水溶液中の反応にて多価不飽和脂肪酸分子中の過酸化部分の解明と多価不飽和脂肪酸を混合した時のラジカル生成の特徴を捉えたことにより、その医学的関連の重要性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959号		
学位授与の日	平成29年4月18日		
氏名	田村 崇		
学位論文の題目	Rapid On-Site Evaluation by Endosonographers during Endoscopic Ultrasonography-Guided Fine-Needle Aspiration for Diagnosis of Gastrointestinal Stromal Tumors. ( GIST の EUS-FNA における内視鏡医主導の迅速細胞診の有用性について)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 村田 晋一	教授 北野 雅之

## 論文内容の要旨

【緒言】超音波内視鏡下吸引針生検 ( Endoscopic Ultrasonography-Guided Fine-Needle Aspiration ; EUS-FNA ) は胃や十二指腸等の消化管から超音波内視鏡で胸腹部や骨盤内の腫瘍を観察し、消化管内から針を刺して組織を採取する手技であり、胆膵領域を中心に病理診断目的に日常臨床において幅広く用いられている。また、消化管領域では、粘膜下腫瘍の病理組織診断目的に用いられている。しかしながら、消化管粘膜下腫瘍の EUS-FNA による診断能は胆膵領域における EUS-FNA 診断能に比べ劣ることが報告されている。これは、消化管粘膜下腫瘍の診断には免疫組織染色が必要であり、EUS-FNA ではしばしば、免疫組織染色を行うのに十分な検体量が得られないことが主な理由である。一方近年、膵腫瘍診断において、EUS-FNA の際に十分な検体が得られているかどうかを、検査室内で迅速に評価する手法 ( rapid on-site evaluation ) ( ROSE ) が取り入れられ、その有用性が報告されている。ROSE では、一度の穿刺ごとに、得られた検体をその場で Diff-Quik 法を用いて染色し、病理診断に十分な検体量が得られているかを評価する。そのため、検査終了後に検体不足で診断不能の場合や、十分な検体が得られているにもかかわらず、余分な穿刺を行うことを避けられる。一方で、細胞検査士もしくは病理医が常に同席して検体を迅速評価することが理想的であるが、現実的には難しい状況にある多い施設が多い。そこで、内視鏡医が行うことにより、その障害を取り除くことができ、ROSE 導入をスムーズに行うことができる。しかしながら、粘膜下腫瘍診断における内視鏡医による ROSE の有用性については報告されていない。本研究では、EUS-FNA 時の内視鏡医による消化管粘膜下腫瘍診断における ROSE の有効性を検討した。

【目的】消化管粘膜下腫瘍診断における EUS-FNA の内視鏡医による ROSE の有用性について検体採取率と正診率を用いて有効性を検討した。

【対象】2009年1月から2015年の10月の期間に消化管粘膜下腫瘍に対してEUS-FNAを行った37例のうち、最終手術により診断が確定した32例を対象とした。2009年1月から2013年1月のROSEを行わずEUS-FNAを施行した期間を period 1 とし、2013年2月から2015年10月の内視鏡医によるROSEを行いEUS-FNAを施行した期間を period 2 とした。

【方法】①EUS-FNA : 1 : 粘膜下腫瘍をコンベックス型の超音波内視鏡下を使用して描出。超音波内視鏡下に粘膜下腫瘍を19または22 G の FNA 穿刺針を用いて粘膜下腫瘍を穿刺し、20ml のシリンジで針に吸引圧をかけながら10回から20回、腫瘍内を動かし細胞を採取した。FNA 針に関しては、period 1 では19Gを使用し、period 2 は初回の3回までは19Gを使用し、それ以降は22Gを使用した。

②検体処理: Period 1 : 1 : FNA 検体の一部に白色部の有無を同定した。2 : 検体に白色部があれば、10%ホルマリン固定し、病理検査に提出し、手技は終了。白色部がなければ、再度FNAを行った。

Period 2 : 1 : FNA より採取した検体の一部を、ピンセットを用いて切り取り 1 枚のスライドガラスの上においた。2 : 2 枚を重ね合わせ、1 枚はその場で Diff.Quik 染色を行い、もう 1 枚は 90% エタノール液に固定し細胞診として提出した。残った検体は組織として 10% ホルマリン固定し、病理検査に提出した。3 : Diff.Quik 染色を行ったスライドガラスは、内視鏡室内の顕微鏡で観察し、迅速細胞診(ROSE)を行った。4 : 40 倍の視野で 1 視野あたり核をもつ 10 個以上の紡錘形を呈する細胞塊が 4 個以上認められれば、十分に組織検体を採取できていると考え FNA を終了した。採取した細胞量が不十分であれば、再度 FNA をおこなった。

○Diff.Quik 染色 : スライドガラスにスメアや捺印を行ったのち、1 分間ドライヤーなどの冷風で風乾する。1.メタノールが主成分である固定液 I に 10 秒間浸漬。2.エオジンが主成分である染色液 I に 20 秒前後浸漬。3.メチレンブルーとアズール I 液が主成分である染色液 II に 20 秒前後浸漬。4.顕微鏡で観察。

③病理診断 : EUS-FNA で採取した検体を病理組織標本では、Hematoxylin-Eosin( HE )染色で病理診断を行った。粘膜下腫瘍の鑑別目的に免疫染色を行った。特に Gastrointestinal stromal tumor ( GIST ) が疑われる場合は、診断目的に GIST に特異的な免疫組織染色として、pH6 で熱処置を行い 400 倍希釈し、rabbit polyclonal 抗体を用いて c-kit( CD117 )、pH6 で熱処置を行い 200 倍希釈し monoclonal 抗体を用いて CD34、前処置は行わず 2000 倍に希釈し rabbit polyclonal 抗体を用いて S-100 を染色し組織診断を行った。また GIST の悪性度評価に関しては、MIB-1 染色、Ki-67 染色、核分裂像を用いて GIST の Modified Fletcher 分類での悪性度を予測した。最終手術を行い、手術標本で確定診断を行い、粘膜下腫瘍が GIST の場合は、Modified Fletcher 分類も用いて悪性度評価を行った。

主評価項目として EUS-FNA の正診率と検体採取率、副次評価項目として FNA 採取検体での免疫染色の可否、合併症、穿刺回数、穿刺時間、また粘膜下腫瘍が GIST の場合は、CD34、c-kit ( CD117 )、S-100 の免疫組織染色の可否、それに加えて FNA 検体の病理組織で予測した悪性度と手術で摘出した病理検体での Modified Fletcher 分類での悪性度の合致率を period 1 と period 2 で比較し内視鏡医による ROSE の有用性について検討した。

【結果】 period 1 と period 2 の患者では、年齢、性別、腫瘍のサイズ、腫瘍の場所では明らかな有意差は認められなかった。period 1 では主に 19G 針を使用した。period 2 では採取検体量の評価が可能であるため主に 22G 針を使用した。period 1 では粘膜下腫瘍の最終診断はすべて GIST であったが、period 2 では 82% が GIST であった。period 1 の GIST の悪性度は、手術検体より Modified Fletcher 分類で超低悪性度 30%、低悪性度 30%、中悪性度 20%、高悪性度 20% であった。また period 2 の GIST の悪性度は、手術検体より超低悪性度 33%、低悪性度 50%、中悪性度 11.1%、高悪性度 11% であった。EUS-FNA の施行時間は、period 1 では平均 24 分 period 2 では平均 28 分で有意差は認められず ( $24 \pm 11.8$  vs  $28 \pm 12.3$ ;  $p = 0.42$ )、穿刺回数は、period 1 では平均 5.9 回、period 2 では平均 3.3 回と有意差は認められなかったが、period 2 で減少傾向を示した ( $5.9 \pm 3.8$  vs  $3.3 \pm 1.3$ ;  $p = 0.06$ )。period 1 と比較し period 2 では、検体採取率、正診率は有意差をもって高値であった (80% 8/10 vs 100% 22/22;  $p = 0.03$ )。また、粘膜下腫瘍の鑑別に免疫染色まで可能であった割合に関しても period 1 では 70% であったが period 2 においては 100% で ROSE により有意に免疫染色を行うのに十分な検体量を採取できていた (70% 7/10 vs 100% 22/22;  $p = 0.007$ )。また最終診断が GIST の症例において c-kit、CD34、S-100 の免疫染色による評価が可能であった割合は period 1 ではそれぞれ 70%、70%、70% であり、period 2 では 100%、100%、94.4% であり明らかな有意差は認めなかった (7/10, 7/10, 7/10 vs 18/18, 18/18, 17/18;  $p = 0.14, 0.14, 0.77$ )。GIST における悪性度評価において、FNA で採取した組織と手術摘出した組織の悪性度評価を比較検討したところ、period 1 では 40% しか合致していなかったのに対して period 2 では、77% と有意に高値であった。(40% 4/10 vs 77% 14/18;  $p = 0.046$ ) 合併症に関しては、period 1 では血腫が 1 例認められたが、period 2 では認められなかった (10% 1/10 vs 0% 0/22;  $p = 0.132$ )

【結語】 粘膜下腫瘍において、内視鏡医による ROSE 導入前と比較し ROSE 導入後では確定診断に必要な量の検体を以前より細い 22G 針でも確実に採取することが可能となった。内視鏡による ROSE により免疫染色に必要な検体量の採取率も上がるため、FNA の診断が困難である粘膜下腫瘍の正診率は上昇した。また、GIST に対する術前の悪性度の診断も ROSE 導入により向上が認められた。従来

行われている細胞士や病理医による ROSE でなく、内視鏡医による ROSE というより安易な方法であっても、粘膜下腫瘍の FNA の診断や GIST の FNA 悪性度評価において有用であると考えられる。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 3 月 15 日、22 日に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。（村田晋一、北野雅之：平成 29 年 3 月 15 日、山上裕機：3 月 22 日）膵腫瘍に対して超音波内視鏡下吸引針生検（Endoscopic Ultrasonography-Guided Fine-Needle Aspiration；EUS-FNA）の迅速細胞診（ROSE: rapid on site evaluation）を行うことで正診率上昇に繋がることが報告されている。胃粘膜下腫瘍における EUS-FNA で ROSE を用いれば、正診率の向上に繋がると考えられる。粘膜下腫瘍に対して EUS-FNA を行った症例に対して内視鏡医主導の ROSE を行い、その有用性について検討を行なった。2009 年 1 月から 2015 年 10 月までに粘膜下腫瘍に対して EUS-FNA を施行した 37 例のうち、手術により確定診断がついた 32 例を対象とした。2009 年 1 月から 2012 年 4 月までの胃粘膜下腫瘍に対して EUS-FNA を行った 10 例を period1 とし、内視鏡医による ROSE 導入後に行った 2012 年 5 月から 2015 年 10 月までの EUS-FNA を行った 22 例を period2 とした。ROSE の方法としては、FNA で採取した検体に対して Diff-Quik 染色（Diff-Quik 染色は風乾したのちメタノールが主成分である固定液 I、エオジンが主成分である染色液 I、メチレンブルーとアズール I 液が主成分である染色液 II に浸漬し染色法である）を行い、1 視野に 10 個の細胞集塊を 5 集塊認めれば、検体量が十分採取できていると判断した。period1、period2 それぞれの正診率、穿刺回数、検査時間、合併症、GIST(Gastrointestinal stromal tumor)における免疫染色、Modified Fletcher 分類を用いた GIST の悪性度評価予測について比較検討した。

その結果、period 1 では粘膜腫瘍の最終診断はすべて GIST であったが、period 2 では 82%が GIST であった。EUS-FNA の施行時間は、period 1 では平均 24 分 period 2 では平均 28 分で有意差は認められず（ $24 \pm 11.8$  vs  $28 \pm 12.3$ ； $p = 0.42$ ）、穿刺回数は、period 1 では平均 5.9 回、period 2 では平均 3.3 回と有意差は認められなかったが、period 2 で減少傾向を示した（ $5.9 \pm 3.8$  vs  $3.3 \pm 1.3$ ； $p = 0.06$ ）。period 1 と比較し period 2 では、正診率は有意差をもって高値であった（80% 8/10 vs 100% 22/22； $p = 0.03$ ）。粘膜下腫瘍の鑑別に免疫染色まで可能であった割合に関しても period 1 では 70%であったが period 2 においては 100%で、ROSE により有意に免疫染色を行うのに十分な検体量を採取できた（70% 7/10 vs 100% 22/22； $p = 0.007$ ）。GIST の症例において c-kit、CD34、S-100 の免疫染色による評価が可能であった割合は period 1 ではそれぞれ 70%、70%、70%であり、period 2 では 100%、100%、94.4%であり明らかな有意差は認めなかった（7/10, 7/10, 7/10 vs 18/18, 18/18, 17/18； $p = 0.14, 0.14, 0.77$ ）。GIST における悪性度評価において、FNA で採取した組織と手術摘出した組織の悪性度評価を比較検討したところ、period 1 では 40%しか合致していなかったのに対して period 2 では、77%と有意に高値であった。（40% 4/10 vs 77% 14/18； $p = 0.05$ ）合併症に関しては、period 1 では血腫が 1 例認められたが、period 2 では認められなかった（10% 1/10 vs 0% 0/22； $p = 0.13$ ）。これらの結果から内視鏡による ROSE により FNA の診断が困難である粘膜下腫瘍の検体量の増加により正診率、術前の悪性度正診率は上昇が認められた。細胞士や病理医による ROSE でなく、内視鏡医による ROSE という従来の方法より安易な方法で、粘膜下腫瘍の FNA の診断や GIST の FNA 悪性度評価において有用であることが示唆された。本論文は、GIST における内視鏡医の ROSE の有用性を示した初めての研究であり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第960号		
学位授与の日	平成29年4月18日		
氏名	北野 岳史		
学位論文の題目	Impaired healing of a cutaneous wound in an inducible nitric oxide synthase-knockout mouse (誘導型一酸化窒素合成酵素ノックアウトマウスにおける皮膚創傷治癒に関する実験的研究)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 雑賀 司珠也	教授 岸岡 史郎

## 論文内容の要旨

### 【背景】

迅速な皮膚の創傷治癒は創傷部の過剰な炎症反応を抑え、外界の過酷な環境における感染回避に不可欠である。創傷治癒過程の炎症期には好中球、マクロファージ、リンパ球など様々な炎症細胞が浸潤する。一酸化窒素(nitric oxide: NO)は創傷治癒過程において皮膚血管拡張作用、血管新生、炎症反応、その他様々な免疫反応と関連し重要な役割を担っており、誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase: iNOS)により細胞内カルシウム濃度に依存せず独立し産生される。

iNOS が欠損した皮膚では NO は減少しており、糖尿病、ステロイド加療中、低栄養状態、皮膚がん、自己免疫疾患患者の皮膚でも NO 濃度の減少が観察される。これらの疾患では感染制御を含めた創傷治療に難渋する。NO は一般的に神経伝達物質、血管拡張因子として知られているが、創傷治癒過程での創傷局所における炎症反応、線維化への役割の詳細について明らかにされていない。本研究において iNOS 欠損マウスを用いて、皮膚における NO 濃度減少下の創傷治癒過程を調査した。

### 【材料と方法】

#### 1. マウスの上皮全層切除モデル

8~10 週齢の iNOS 欠損マウスおよび野生 (WT) マウスを用いて調査を開始した。径 5mm のマウス皮膚の上皮全層欠損創を生検用トレパンにて作成した。

#### 2. 肉眼的観察

創傷作成より経時的に皮膚欠損部分を観察した。創傷治癒過程にある皮膚欠損部分の面積を測定後、創傷作成時の面積との割合で表示し、統計学的に分析を行った。

#### 3. 組織学的検討

経時的にマウスの創部を採取し、HE 染色を行い組織学的検討した。創部に形成された肉芽組織を、創部中央の最も薄い部分の長さ、創部辺縁の最も厚い部分の長さを測定し統計学的に分析した。

#### 4. 再上皮化の検討

経時的に創部採取した組織切片にマッソン・トリクローム染色を施し、創傷部での結合組織の分布を観察し再上皮化を検討した。創部両端に形成された再上皮化部位を確認し、再上皮化率を再上皮化により被覆された領域と作成創部との割合で表示し統計学的に検討した。

#### 5. 免疫組織化学の検討

再生された創部の細胞組成を評価するため、免疫組織化学染色を avidin-biotin complex(ABC)法で行った。ラットモノクローナル F4/80 抗マクロファージ抗体を使用し、単球・マクロファージの浸潤を観察した。組織の癒着の指標となる線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化をウサギモノクローナル抗  $\alpha$  平滑筋アクチン(SMA)抗体を使用し  $\alpha$ SMA の発現を観察した。

#### 6. Real-time RT-PCR を用いた mRNA の検出

Real-time RT-PCR を用いて経時的に治癒過程にある組織の F4/80、TGF $\beta$ 、 $\alpha$ SMA、collagen1  $\alpha$ 2 の mRNA の発現について検討した。

### 【結果】

#### 1.肉眼的所見

創傷作成から1日目における皮膚欠損部分はiNOS欠損マウスとWTマウスでは明らかな差は認められなかった。創傷作成から3日、6日、8日、11日目の皮膚欠損部分はiNOS欠損マウスにおいてWTマウスと比較し、統計学的に創傷治癒遅延が有意に認められた。

## 2. 組織学的所見

HE染色を行った組織観察において、創部に形成された肉芽組織の中央部分で、最も薄い部分を測定した。iNOS欠損マウスではWTマウスと比較し、新たな肉芽形成が創傷作成から6日目と8日目で統計学的に薄いことが有意に認められた。創部に形成された肉芽組織の辺縁部分で、最も厚い部分を測定した。iNOS欠損マウスはWTマウスと比較し、新たな肉芽形成は創傷作成から6日目で統計学的に薄いことが有意に認められた。

## 3. 再上皮化

マッソン・トリクローム染色を施し、創部の創傷治癒過程における結合組織の分布、新たに形成された再上皮化を調査した。iNOS欠損マウスではWTマウスと比較し、新たな上皮化は創傷作成から6日目と8日目で統計学的に遅延することが有意に認められた。WTマウスでは創傷作成から6日目で再上皮化が完成するのに対し、iNOS欠損マウスでは再上皮化までに11日を要した。iNOS欠損マウスの皮膚は創部の再上皮化が明らかに遅延することが示された。

## 4. 免疫組織化学染色

創傷治癒過程にある組織の細胞分布について免疫組織化学染色を行い検討した。F4/80陽性細胞の出現は、6日と8日においてWTマウスと比較しiNOS欠損マウスが有意に減少していた。抗 $\alpha$ -SMA抗体陽性線維芽細胞の出現は、6日と8日においてWTマウスと比較しiNOS欠損マウスが有意に減少していた。

## 5. 正常皮膚における mRNA 発現

Real-time RT-PCRを用いて調査した正常皮膚における mRNA 発現は、F4/80、TGF $\beta$ 、 $\alpha$  SMA で有意にiNOS欠損マウスがWTマウスに比較し増加していた。

## 6. 創傷治癒過程における mRNA 発現

Real-time RT-PCRを用いて調査した mRNA 発現は、F4/80、TGF $\beta$ 、 $\alpha$  SMA、collagen1 $\alpha$ 2で有意にiNOS欠損マウスがWTマウスに比較し減少していた。

### 【考察】

本研究において、創傷治癒におけるNOの関与についてiNOS欠損マウスを用いて皮膚創傷治癒過程を、検討した。iNOS欠損マウスの皮膚創傷では肉眼的所見・組織学的所見において肉芽組織形成、再上皮化が遅延しその結果、創傷治癒遅延することが示され、NOの創傷治癒過程への関与が示された。

過去の報告ではiNOS欠損マウスはWTマウスと比較し筋線維芽細胞の増殖、コラーゲン合成が遅延することが示されている。本研究における免疫組織化学染色、Real-time RT-PCRの検討においてiNOS欠損マウスでは筋線維芽細胞とマクロファージ侵入が抑制されていた。この結果より新生された肉芽組織内への筋線維芽細胞、マクロファージ侵入においてNOにより調整されている可能性が示唆された。

TGF $\beta$ は多機能な成長因子であり修復過程にある組織にも存在し重要な役割を担っている。その一つに筋線維芽細胞や細胞外マトリックスはTGF $\beta$ の働きによりコラーゲンマトリックスへと置換されてゆく。本研究ではiNOS欠損マウスにおいてTGF $\beta$  mRNA発現が抑制されており、NOとの関連が示唆できた。また、マクロファージは皮膚創傷治癒に重要な働きを有していることが報告されており、本研究においてNO減少下では創傷皮膚においてTGF $\beta$ 発現抑制と関連し、マクロファージ浸潤を抑制していることが示唆された。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年3月28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。

皮膚の速やかな創傷治癒には創傷部の過剰な炎症反応を抑え、感染を抑制することが必要である。創傷治癒反応が適切に進まなければ、肉芽組織の過剰形成や遅延を認める。その結果、再上皮化の遅延、組織の癒痕化・線維化に影響を及ぼすこととなる。創傷治癒過程の炎症期には様々な炎症細胞が

浸潤し創傷治癒が進行するが、一酸化窒素(nitric oxide: NO)は創傷治癒過程において皮膚血管拡張作用、血管新生、炎症反応、その他様々な免疫反応と関連し重要な役割を担っており、誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase: iNOS)により産生される。iNOS が欠損した皮膚では NO は減少しており、NO 減少した皮膚疾患では感染制御を含めた創傷治療に難渋する。NO は一般的に神経伝達物質、血管拡張因子として知られているが、創傷治癒過程での創傷局所における炎症反応、線維化への役割の詳細について明らかにされていない。本研究は、iNOS 欠損マウスを用いて、マウス皮膚における NO 濃度減少下の創傷治癒過程を検討したものである。

方法はマウスの上皮全層切除モデルを作成し、創傷の経時的な肉眼的観察、組織学的検討、再上皮化の検討を行った。また、単球・マクロファージの浸潤、 $\alpha$ SMA の発現について免疫組織化学を用いて検討し、Real-time RT-PCR を用いて F4/80、TGF $\beta$ 、 $\alpha$ SMA、collagen1 $\alpha$ 2 の mRNA 検出を行った。

その結果、iNOS 欠損マウスの皮膚創傷では肉眼的所見・組織学的所見において肉芽組織形成、再上皮化が遅延し、創傷治癒遅延することが示され、NO の創傷治癒過程への関与が示された。免疫組織化学染色の検討において iNOS 欠損マウスでは筋線維芽細胞とマクロファージ侵入が抑制されていた。この結果より新生された肉芽組織内への筋線維芽細胞、マクロファージ侵入は NO により調整されている可能性が示唆された。Real-time RT-PCR の検討において、iNOS 欠損マウスにおける TGF $\beta$  mRNA 発現は抑制されており、TGF $\beta$  と NO の関連が示唆できた。さらに NO 減少下では創傷皮膚において TGF $\beta$  発現抑制と関連し、マクロファージ浸潤を抑制していることが示唆された。以上のことから、iNOS 欠損により筋線維芽細胞とマクロファージ浸潤が減少し、TGF $\beta$  発現が抑制された結果、肉芽形成の遅延が発生し、肉芽組織の収縮による創閉鎖の抑制がなされたと考える。

本論文は iNOS 欠損マウスを用いて NO 減少下の皮膚創傷モデルを作成したものである。今後、本モデルを用いて NO 減少下の皮膚創傷治癒のメカニズム解析や薬剤効果調査など臨床につながる研究も可能であり意義深いものであり、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961号		
学位授与の日	平成29年5月16日		
氏名	太田 圭介		
学位論文の題目	Graf1 controls the growth of human parainfluenza virus type 2 through inactivation of RhoA signaling. (Graf1 は、RhoA シグナルを不活化することで、ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型の増殖を制御する。)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 竹下 達也	教授 西尾 真智子

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型(hPIV-2)は、モノネガウイルス目パラミクソウイルス科に属し、ヒトに呼吸器感染を引き起こす。hPIV-2 は、NP、P、M、F、HN、L の 6 つの遺伝子をコードしており、P 遺伝子からは、RNA 編集により読み枠をシフトさせることで、N 末端に共通の配列をもつ 2 つの蛋白(P 蛋白と V 蛋白)が産生される。ウイルスは自身の効率的な増殖のため、宿主蛋白と相互作用し、シグナル伝達を制御する。本教室では、hPIV-2 の V 蛋白が、STAT1/2、AIP1/Alix、TRAF6、Tetherin などの宿主蛋白と結合し、ウイルス増殖を促進させていることを明らかにしてきた。さらに、hPIV-2 感染による細胞融合に Rho ファミリー低分子量 GTPase (Rho GTPase) が関与していることが明らかとなったが、ウイルス増殖への影響は不明であった。代表的な Rho GTPase として RhoA、Cdc42、Rac1 が知られており、これらは guanine nucleotide exchange factor (GEF) により活性化され、GTPase activating protein (GAP) により不活化される。Rho GTPase は GEF と GAP による制御を受けながら、細胞のアクチン再構成や細胞輸送などを調節する。本研究では、hPIV-2 感染と Rho シグナルの関係と、それに関連する宿主蛋白の同定を試みるため、以下の検討を行った。

### 【方法】

Rho 活性化剤として LPA を、阻害剤として Cdc42 を阻害する ML 141、Rac1 を阻害する NSC23766、Cdc42 と Rac1 を阻害する AZA1 を使用した。プラークアッセイにより hPIV-2 の定量を行った。感染細胞中の活性化 RhoA は、RhoA Pull-down Activation Assay Biochem kit により定量した。蛋白の細胞内局在は共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫染色により、蛋白の結合は免疫沈降によりそれぞれ検討した。細胞は、Graf1 安定発現 HEK293 細胞(HEK293/Graf1)、Graf1 ノックダウン(KD)細胞(HEK293/Graf1KD)、hPIV-2 V 蛋白あるいは P 蛋白の安定発現 HEK293 細胞(HEK293/V、HEK293/P)を作製し、使用した。



## 【結果】

hPIV-2 の増殖は、RhoA、Cdc42、Rac1 をいずれも活性化させる LPA で促進されたが、Cdc42 や Rac1 の阻害剤(ML 141、NSC23766、AZA1)の影響は見られなかった。また、感染細胞中の活性化 RhoA を経時的に定量したところ、感染 1 時間後では活性化 RhoA 量に変化は見られなかったが、感染 6、12 時間後では有意に活性化 RhoA 量が増加していた。Yeast two-hybrid 解析により、hPIV-2 蛋白との相互作用が示唆された宿主因子の一つに Graf1 がある。Graf1 は GAP の一つであり、hPIV-2 増殖への関与が示唆された RhoA に特異性をもつことから、Graf1 が hPIV-2 による RhoA 活性化に関与すると推測された。非感染細胞では過剰発現させた Graf1 は細胞質に均一に存在していたが、感染細胞ではその局在が顆粒状に変化した。さらに、Graf1 はウイルスリボヌクレオ蛋白を形成する hPIV-2 蛋白(NP・P・L 蛋白)と共局在した。免疫沈降の結果、Graf1 は P 蛋白と V 蛋白に結合した。P 蛋白の欠損変異体や V 蛋白変異体を用いた免疫沈降により、Graf1 との結合には P、V 蛋白共通領域である N 末端領域の 48-110 アミノ酸部分が重要であることがわかった。Graf1 は、BAR・PH・GAP・SH3 の 4 つのドメインからなっているが、その欠損変異体の免疫沈降により、P 蛋白・V 蛋白との結合には C 末端の SH3 が重要であることがわかった。HEK293/Graf1 では、hPIV-2 増殖が抑制され、normal HEK293 細胞で見られた hPIV-2 感染による活性化 RhoA 量の増加が見られなかった。一方で、HEK293/Graf1KD では、hPIV-2 増殖が促進され、normal HEK293 細胞と同様に hPIV-2 感染による RhoA 活性化が見られた。HEK293/P、HEK293/V の hPIV-2 感染では、normal HEK293 細胞よりも早期(感染 1 時間後)に RhoA 活性化が見られた。

## 【結語】

本研究では、hPIV-2 感染と RhoA シグナルの関係を明らかにし、それらに関与する GAP として Graf1 を同定した。Graf1 は RhoA を不活化することで hPIV-2 増殖を抑制していると考えられる。一方、hPIV-2 は、P・V 蛋白により Graf1 の RhoA 不活化能を阻害し、RhoA を活性化させることで、自身の増殖を促進していることが示唆された。

hPIV-2 と同じモノネガウイルス目には、RS ウイルスやエボラウイルスなどワクチン開発が困難なウイルスや病原性が強いウイルスが多く存在する。本研究では hPIV-2 に関連する新規の宿主因子やシグナル伝達の同定に成功したが、それらは近縁ウイルスの増殖にも関与する可能性が考えられ、そのウイルスの性状を知る重要な知見となり得る。得られた知見は、抗ウイルス薬開発の基盤となることが期待される。したがって、本研究はウイルス学的観点のみならず、医学的な観点からも意義のある研究と考える。

## 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年4月25日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

ヒトパラインフルエンザウイルス2型(hPIV-2)感染による細胞融合にRhoファミリー低分子量GTPase (Rho GTPase)が関与することが知られているが、Rho GTPaseのウイルス増殖への影響は不明であった。本研究では、hPIV-2増殖とRho GTPaseの関係と、それに関連する宿主蛋白の同定を試みた。

Rho活性化剤としてLPAを、阻害剤としてCdc42を阻害するML 141、Rac1を阻害するNSC23766、Cdc42とRac1を阻害するAZA1を使用し、プラークアッセイによりhPIV-2の定量を行った。その結果、hPIV-2の増殖はLPAで促進されたが、ML 141、NSC23766、AZA1の影響は見られなかった。次に、感染細胞中の活性化RhoAをRhoA Pull-down Activation Assay Biochem kitにより定量したところ、hPIV-2感染6、12時間後に有意に活性化RhoA量が増加していた。Yeast two-hybrid解析によりhPIV-2蛋白との結合が示唆された宿主蛋白にGraf1があるが、これはRhoAを不活化するGAPであることから、Graf1がhPIV-2によるRhoA活性化に関与すると推測された。そこで、免疫染色により感染細胞中のGraf1の局在を解析したところ、Graf1はhPIV-2のNP・P・L蛋白と共局在していた。免疫沈降の結果、Graf1はP・V蛋白に結合し、結合にはP・V蛋白共通領域とGraf1のC末端のSH3が重要であった。Graf1の安定発現細胞ではhPIV-2増殖は抑制され、normal細胞で見られたhPIV-2感染による活性化RhoA量の増加が見られなかった。一方で、Graf1ノックダウン細胞ではhPIV-2増殖が促進され、normal細胞と同様にhPIV-2感染によるRhoA活性化が見られた。hPIV-2 VまたはP蛋白の安定発現細胞へのhPIV-2感染では、normal細胞よりも早期にRhoA活性化が見られた。

以上の結果から、hPIV-2は、P・V蛋白によりGraf1のRhoA不活化能を阻害し、RhoAを活性化させることで、自身の増殖を促進していることが示唆された。本論文は、hPIV-2増殖に影響を与える宿主蛋白Graf1とRhoAシグナルについて重要な情報を提供したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第962号		
学位授与の日	平成29年5月16日		
氏名	坂本 友香		
学位論文の題目	Efficacy of a Rework Program for Sick Leave due to Depressive Disorders (うつ病性障害による休職者に対するリワークプログラムの有効性)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 宮下 和久	教授 竹下 達也

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

うつ病による離職、休職、生産性の低下は、患者・家族の生活を大きく障害することに加え、社会経済的損失の観点からも精神科臨床が抱える重要な課題の一つである。うつ病患者の病休は長期間になる傾向があり、長期間休職した労働者は将来的な再休職のハイリスク群であると言われている。日本では、休職後も同じ職場への復帰を求められることが少なくないことから、そのような労働環境では、抑うつ症状が回復したのみで復職すると復職後に対処困難な事例が起きると抑うつ症状を再発する危険が高い。復職後も精神健康を維持していくためには、患者の持つ抑うつ症状を誘発する認知行動特性を修正し、対処能力を向上させることが求められる。そこで、休職した患者の復職準備性、再発予防性を高めるために集団プログラムを中心としたリハビリテーションプログラムが開発され、リワークプログラムと呼ばれている。患者と社会のニーズに応じてリワークプログラムは急速に普及して複数の施設で実施されるようになったが、標準化されたプログラムは存在せず、効果の科学的根拠も不十分だという問題がある。

和歌山県立医科大学附属病院では、2013年5月よりリワークプログラムを開始した。当院のリワークプログラムは認知行動療法をベースとし、リワークの場を安全な疑似職場と捉え、自己の脆弱性を把握し、それに対する対策を立て、実践できるようになることを目標とし、再発予防性に重点を置いている。今回の研究で、我々は、当院のリワークプログラム前後12カ月の就労期間を比較することにより、プログラムの復職と再発予防への効果を検討した。加えて、復職準備性を評価する標準化評価シート(Rework Assist Program Assessment Sheet, RAPAS)のプログラム前後の得点の変化についても調査した。

### 【方法】

対象は2013年5月から2016年1月までに和歌山県立医科大学附属病院のリワークプログラムに参加した21名(大うつ病性障害:19名、双極性障害Ⅱ型:1名、気分変調症:1名)である。当院のリワークプログラムは、9時から16時まで週4.5日、デイケアの形で運営している。担当スタッフは看護師1名、精神保健福祉士1名、精神科医2名から構成されている。プログラム内容としては、オフィスワーク、個人面談、心理教育、ヨガやアロマ、集団活動、集団精神療法、集団認知行動療法などが含まれている。

リワークプログラムによる復職後の再発予防効果を調査するため、リワークプログラム介入前後12カ月の就労期間をWilcoxonの符号付順位検定を用いて比較検討した。復職準備性の評価として、プログラム前後のRAPASの各項目の得点変化を対応のあるt検定を用いて比較検討した。本研究は、臨床の取り組みの後方視的カルテ調査研究であり、和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ている。

### 【結果】

21名中15名がプログラムを修了し、プログラムを修了した15名中14名が復職した。プログラムを修了しなかった6名中2人が復職した。復職した16名中、1人が12か月以内に再休職した。プログラムの平均参加期間は7.6ヶ月であった。プログラム後の就労期間は平均8.0ヶ月であり、プログラム前の平均3.4ヶ月よりも有意に長かった( $p=0.002$ )。プログラム終了者のRAPASの得点は、出席率( $p=0.005$ )、適切な自己主張( $p=0.002$ )、対処行動( $p=0.003$ )、積極性( $p<0.001$ )、他のメンバ

ーやスタッフからの注意や指摘への反応 ( $p=0.001$ ) の項目においてプログラム前より有意に高かった。

#### 【考察】

プログラム参加者の76%は復職し、12ヵ月のフォロー期間中に復職者の90%以上が再休職せずに就労を継続することができた。プログラム介入前後12ヵ月において、プログラム後の就労期間の方がプログラム前よりも有意に長かった。この結果は、復職及び、最初の復職後の再発予防の点においてリワークプログラムが有効であることを示唆している。また、RAPASの得点変化からは、出席率や適切な自己主張、対処行動、積極性、他のメンバーやスタッフからの注意や指摘への反応の改善が復職準備性や再発予防性と関連することが示唆された。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年4月28日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

本論文の目的は、和歌山県立医科大学附属病院のリワークプログラムによる介入前後12ヵ月の就労期間を比較することにより、プログラムの復職と再発予防への効果を検討することと、復職準備性を評価する標準化評価シート（Rework Assist Program Assessment Sheet, RAPAS）のプログラム前後の得点の変化について調査することである。

2013年5月から2016年1月までに当院のリワークプログラムに参加した21名（大うつ病性障害：19名、双極性障害Ⅱ型：1名、気分変調症：1名）を対象とし、リワークプログラムによる復職後の再発予防効果を調査するため、介入前後12ヵ月の就労期間をWilcoxonの符号付順位検定を用いて比較検討した。また、プログラム前後のRAPASの各項目の得点変化を対応のあるt検定を用いて比較検討した。

プログラム参加者の76%は復職し、12ヵ月のフォロー期間中に復職者の90%以上が再休職せずに就労を継続することができた。プログラム後の就労期間は平均8.0ヶ月であり、プログラム前の平均3.4ヶ月よりも有意に長かった ( $p=0.002$ )。プログラム終了者のRAPASの得点は、出席率 ( $p=0.005$ )、適切な自己主張 ( $p=0.002$ )、対処行動 ( $p=0.003$ )、積極性 ( $p<0.001$ )、他のメンバーやスタッフからの注意や指摘への反応 ( $p=0.001$ ) の項目においてプログラム前より有意に高かった。

プログラム介入前後12ヵ月においてプログラム後の就労期間が有意に長かったことから、復職、復職後の再発予防の点において、リワークプログラムが有効であるという結果であった。RAPASの得点変化からは、出席率や適切な自己主張、対処行動、積極性、他のメンバーやスタッフからの注意や指摘への反応の改善が復職準備性や再発予防性と関連することが示唆された。本論文は、プログラム前後12ヶ月の就労期間を比較することで、リワークプログラムが有効であるという結果を示した初めての報告であり、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第963号		
学位授与の日	平成29年7月18日		
氏名	下江 隆司		
学位論文の題目	Analysis of Shoulder Abduction by Dynamic Shoulder Radiograph following Suprascapular Nerve Repair in Brachial Plexus Injury (動的肩レントゲン撮影を用いた腕神経叢損傷患者に対する肩甲上神経修復術後の肩外転機能評価)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 中尾 直之	教授 山田 宏

## 論文内容の要旨

【背景】肩甲上神経修復術は腕神経叢損傷の肩機能再建における第一選択として広く認められている。本術式は肩甲上腕関節運動のみを再建するが、現在臨床現場で標準的に用いられている測定方法では肩甲胸郭関節運動も含めて評価を行っている。本研究の目的は、腕神経叢損傷患者における肩甲上神経修復術後の治療成績を正確に分析する、新しい方法を提唱することである。

【方法】肩甲上神経修復術を行った症例における棘上筋の作用単独での肩外転を客観的に評価するために、動的肩レントゲン撮影を用いた。両肩関節を含めて肩内転位と最大自動外転位の正面像を撮影した。各レントゲン画像で、全肩外転角 (GL)、肩甲上腕関節での外転 (GH)、肩甲胸郭関節での外転 (ST)、鎖骨による外転 (CL)、そして胸椎側屈による外転作用 (SP) の5つのパラメーターを計測し、肩甲上腕関節と肩甲胸郭関節での外転を区別して分析した。まず本撮影法の再現性、また計測の信頼性を評価した。その上で、肩甲上腕関節運動のバイオメカニクスを分析し、肩甲胸郭関節運動との関連および、それぞれが全肩外転角にどのように関与しているかを調査した。

【結果】Test-retest reliability および intra-examiner and inter-examiner reliability を、級内相関係数 (ICC) と Bland-Altman plots を用いて分析した。その結果、撮影および測定 of 再現性は高く、臨床上的利用に適切であることを確認した (ICC ( $\gamma$ ) = 0.818~0.999)。Pearson の相関係数と単回帰分析を用いて、角度計を用いた全肩外転角 GL および動的肩レントゲンで計測した棘上筋による外転 GH との相関を分析すると、GL と GH には相関はみられるものの、回帰直線の残差が大きく、ばらつきがみられた。すなわち、角度計による全肩外転角の計測では棘上筋機能の正確な評価とならないことが示された。動的肩レントゲン撮影による評価では肩甲上腕関節での外転角は、単回帰分析にて全肩外転角から肩甲胸郭関節での外転角を除いた値と最も相関が高かった (adjusted  $\gamma^2 = 0.974$ )。全肩外転角がプラスであっても肩甲上腕関節ではむしろ内転が起こっている症例が69例中26例 (37.7%) みられた (Paradoxical adduction)。さらに詳細に分析を行うと、肩甲上腕関節での外転角がマイナスであっても肩甲上神経修復術の失敗を意味するのではなく、肩甲胸郭関節での外転に伴う臼蓋の傾斜に応じてかかる重力に抗するだけの棘上筋筋力が獲得されていることがわかった。

【考察】Malessy らは肩甲骨内側縁の骨性隆起を触知することで、角度計を用いて肩甲上腕関節運動と肩甲胸郭運動を区別して計測する方法を報告している。しかし、彼らはその測定信頼性について述べていない。我々の行った追試では、69例中25例で皮下脂肪のために肩甲骨内側縁の触知触知が困難で、計測可能であった症例でも動的肩レントゲン撮影で測定した角度との相関は低く ( $\gamma = 0.339$ )、その測定信頼性は低かった。また、彼らは肩甲上神経修復術後の肩甲上腕関節での外転角がマイナスである症例は神経修復術の失敗であると結論しているが、我々の動的肩レントゲン撮影による計測を分析した結果では、肩甲上腕関節での外転角がマイナス値であっても肩甲上神経修復術によって肩甲上腕関節運動は回復していることが示された。逆に、角度計で計測した全肩外転角が術後に良好に回復している症例の中には、その大部分が肩甲胸郭運動による外転であり、肩甲上腕関節での外転はわずかである症例が含まれることもわかった。肩甲胸郭関節での外転は長胸神経支配である前鋸筋、副神経支配である僧帽筋によって行われる。自験例69例中21例では前鋸筋麻痺の自然回復がみられていた。肩甲上神経修復術後に全肩外転角が良好に改善している症例が観察された際には、前鋸筋麻痺

の自然回復が高率に起こることを念頭に置いておく必要がある。しかし、前鋸筋麻痺の診断は腕神経叢損傷患者では困難である。Winging scapula を呈するまでの外転ができず、また shoulder protraction test も偽陽性率が高いためである。動的肩レントゲン撮影による肩甲胸郭関節運動の評価は、前鋸筋麻痺の診断に有用な手法である。今後の展望として、術後定期的に動的肩レントゲン撮影を評価することで、神経修復術後の回復経過の評価が可能となると考えている。本研究の limitation として、実際の肩関節外転は三次元的に行われるものの、レントゲンでは単一面での評価となることが挙げられる。しかし、本手法を用いることで単一面での評価ではあっても麻痺肩の病態、神経修復術後の成績評価のために重要な情報を得ることができる。また、単純レントゲンというシンプルなツールを用いているため、外来診療の中で簡便に利用できるという利点を有する。

#### 【結論】

角度計で全肩外転角を計測する従来の方法では、腕神経叢損傷患者における肩甲上神経修復術後の治療成績を正確に評価できない。そのため、本論文で紹介した動的肩レントゲン撮影法を用い、肩甲上腕関節と肩甲胸郭関節を区別して評価することを提唱する。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成29年6月22、23、27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。肩甲上神経修復術は腕神経叢損傷の肩機能再建における第一選択として広く認められている。本術式は肩甲上腕関節運動のみを再建するが、現在の標準的な測定方法では肩甲胸郭関節運動も含めて評価を行っている。本研究の目的は、肩甲上神経修復術後の治療成績を正確に分析する、新しい方法を提唱することである。

肩甲上神経修復術を行った症例の肩外転を客観的に評価するために、動的肩レントゲン撮影を用いた。両肩関節を含め肩内転位と最大自動外転位の正面像を撮影した。各画像で、全肩外転角(GL)、肩甲上腕関節での外転(GH)、肩甲胸郭関節での外転(ST)、鎖骨による外転(CL)、そして胸椎側屈による外転作用(SP)の5つのパラメーターを計測し、肩甲上腕関節と肩甲胸郭関節の外転を区別して分析した。まず本撮影法の再現性、また計測の信頼性を評価した。その上で、肩甲上腕関節運動のバイオメカニクスを分析し、肩甲胸郭関節運動との関連および、それぞれが全肩外転角にどのように関与しているかを調査した。

Test-retest reliability および intra-examiner and inter-examiner reliability を、級内相関係数(ICC)と Bland-Altman plots を用いて分析した。その結果、撮影および測定 of 再現性は高く、臨床上的利用に適切であることを確認した(ICC ( $\gamma$ ) = 0.818~0.999)。動的肩レントゲン撮影による評価では肩甲上腕関節での外転角は、単回帰分析にて全肩外転角から肩甲胸郭関節での外転角を除いた値と最も相関が高かった(adjusted  $\gamma^2 = 0.974$ )。全肩外転角がプラスであっても肩甲上腕関節ではむしろ内転が起こっている症例が69例中26例(37.7%)みられた。さらに詳細に分析を行うと、肩甲上腕関節の外転角がマイナスであっても肩甲上神経修復術の失敗を意味するのではなく、肩甲胸郭関節での外転に伴う臼蓋の傾斜に応じてかかる重力に抗するだけの棘上筋筋力が獲得されていることがわかった。

動的肩レントゲン撮影による計測を分析した結果では、肩甲上腕関節での外転角がマイナス値であっても肩甲上神経修復術によって肩甲上腕関節運動は回復していることが示された。逆に、角度計で計測した全肩外転角が術後に良好に回復している症例の中には、その大部分が肩甲胸郭運動による外転であり、肩甲上腕関節での外転はわずかである症例が含まれることもわかった。肩甲胸郭関節での外転は長胸神経支配である前鋸筋、副神経支配である僧帽筋によって行われる。自験例69例中21例では前鋸筋麻痺の自然回復がみられていた。肩甲上神経修復術後に全肩外転角が良好に改善している症例が観察された際には、前鋸筋麻痺の自然回復が高率に起こることを念頭に置いておく必要があるが、動的肩レントゲン撮影による肩甲胸郭関節運動の評価は、前鋸筋麻痺の診断に有用な手法である。また、本評価法は、単純レントゲンというシンプルなツールを用いているため、外来診療の中で簡便に利用できるという利点を有する。

本論文は動的肩レントゲン撮影法を用いて肩甲上腕関節と肩甲胸郭関節を区別して評価する、新しい手術成績の評価法を提唱したものである。実臨床で簡便かつ従来法より正確な治療成績の評価が可能となる意義深い研究であり、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964号		
学位授与の日	平成29年8月8日		
氏名	塩崎 万起		
学位論文の題目	Job Stress and Behavioral Characteristics in Relation to Coronary Heart Disease Risk among Japanese Police Officers (警察官における職業性ストレスおよび行動特性が冠動脈疾患リスクに及ぼす影響)		
論文審査委員	主査	教授 竹下 達也	
	副査	教授 宮下 和久	教授 赤阪 隆史

## 論文内容の要旨

### 〔緒言〕

近年、労働者を取り巻く環境は大きく変化し、複雑多様化するニーズへの対応、長時間労働によるワークライフ・バランスの乱れ、疲労やストレスの蓄積による健康影響が懸念されている。警察組織においても例外ではなく、犯罪の凶悪化、スピード化、広域化の進展や新たなるサイバー犯罪への迅速な対応など、個々の職員の置かれた環境は年々厳しさを増し、心身への過重負荷による様々な健康障害が報告されている。とりわけ、警察官は、一般集団に比べて冠動脈疾患の罹患率や死亡率が高率であることが、海外の多くの研究で指摘されており、本邦でも警察庁健康統計において、心疾患による長期休業者率が、他の地方公務員に比べて高い水準にある。

このような背景には、長時間労働や交替制勤務に伴う生活習慣の歪みとともに、職務における努力-報酬不均衡、支援体制の欠如、暴力・凶悪事件による心的外傷、社会的期待に対する心理的圧迫など複合的に影響しているものと予想されるが、これらを追究した研究は国内外をみても依然少ない状況にある。また、これまでの職業性ストレスに関する研究の多くは、労働者の健康に悪影響を及ぼす職場環境の要因に焦点が当てられてきたが、個人におけるストレスの認知や脆弱性、回復力などの特性も考慮すべきと考えられる。この点に関し、近年の研究では、警察官が高い職業性ストレスに曝されている一方で、主観的なストレスレベルが低く、抑うつ感や不安感などの心理的症状の訴えもむしろ少ないことが報告されている。加えて、警察官はいわゆるタイプA型の性格傾向を持つ者が多いことも示されており、このような警察官特有の性格・行動特性が、先行研究における職業性ストレスと冠動脈疾患リスクとの関係を少なからず修飾している可能性があるものと推察される。これらを踏まえ、本研究では、某県警察の男性警察官を対象として、職業性ストレスと個人の性格・行動特性との関係を明らかにするとともに、これらが冠動脈疾患リスクに及ぼす影響について横断的資料の解析に基づく検討を行った。

### 〔対象および方法〕

対象者は、A県警察に所属する警察官と職員のうち、年齢が30～59歳、勤続年数5年以上、慢性疾患や精神障害などで勤務制限がない、解析に必要なデータに欠損のないこと条件を満たした男性1,196名（警察官1,081名・職員115名）で、平均年齢は44.8±9.5歳であった。

調査項目は、(1) 職業性ストレス：職業性ストレス簡易調査票を使用し、①仕事のストレス要因（仕事の負担感、対人関係、技能の活用、適性、働きがいなど）、②ストレス反応（不安感、イライラ感、疲労感、抑うつ感、身体愁訴など）、③職場での上司や同僚からの支援を調査した。(2) 冠動脈疾患親和性の行動特性：日本人冠動脈疾患親和性行動調査票を使用し、①仕事中心のライフスタイル、②社会的優位性、③顕在的タイプA行動の抑制を調査した。(3) 冠動脈疾患リスク：高血圧、

脂質異常症、耐糖能障害、高尿酸血症の4項目を採用し、個人における集積数を指標とした。(4) 基本属性および勤務状況：年齢、既往歴、所属部門、階級、勤務年数、勤務形態（日勤制・交代制）、一月あたりの時間外労働時間と休日取得日数、(5) 生活習慣：睡眠（勤務日の睡眠時間）、喫煙（現在または過去の喫煙）、飲酒（種類・量・頻度）、身体活動量（一日あたりの歩行時間）であった。

統計解析には、IBM SPSS for Windows 21.0 を使用した。2 群間の比較は、連続変数では独立 2 標本の t 検定または Welch 検定、カテゴリ変数では  $\chi^2$  検定（イエーツの補正）を用いた。また、冠動脈疾患の危険因子の集積数を従属変数とする 2 要因分散分析によって、職種（警察官・職員）と年齢（45 歳未満・45 歳以上）の主効果および交互作用を検討した。さらに、職業性ストレス、冠動脈疾患親和性の行動特性、勤務状況、生活習慣の各要因を独立変数とする階層的重回帰分析を行った。統計学的有意水準は 5% とした。

#### 〔結果および考察〕

警察官は職員に比べて、交替制勤務の従事者が多く、一月あたりの時間外労働が 80 時間以上および休日取得日数が 3 日未満の者の割合が高かった。また、過体重（BMI  $\geq 25\text{kg}/\text{m}^2$ ）や腹部肥満（腹囲  $\geq 85\text{cm}$ ）の頻度が高く、高中性脂肪血症の所見率も有意に高率であった。年齢を 45 歳未満と 45 歳以上に層別化して比較した結果、高血圧、脂質異常症、耐糖能障害、高尿酸血症の 4 項目の個人における集積数は、45 歳未満に比べて 45 歳以上の年齢層で、また、職員に比べて警察官で多く、2 要因分散分析において職種と年齢の主効果が有意となった。さらに、警察官は年齢層の上昇に伴う集積数の増加が職員に比べて顕著であり、職種と年齢の有意な交互作用も認められた。

職業性ストレスについては、警察官は職員に比べて、仕事の身体的負担感が高いものの、質的・量的な心理的負担感と同程度またはやや低いと認識しており、仕事への適性、技能の活用、働きがい、同僚からの支援をより強く感じていた。また、倦怠感、イライラ感、疲労感、不安感、抑うつ感などのストレス反応の訴えも有意に少なかった。

警察官では、冠動脈疾患親和性の行動特性を持つ者が職員の約 3 倍多く、特に、仕事中心のライフスタイルや社会的優位性を保つ傾向が強かった。警察官において、この行動特性を持つ者では、交替制勤務に従事する者、時間外労働が 80 時間以上の者、休日取得日数が 3 日未満の者の頻度が高く、また、仕事の主観的なストレスレベルが低く、上司や同僚からの支援が多いと認識していた。さらに、高血圧、脂質異常症、耐糖能障害、高尿酸血症の有所見率がいずれも高く、これらの危険因子の集積数も有意に多くなっていた。

冠動脈疾患の危険因子の集積数を従属変数とする階層的重回帰分析を行った結果、まず、年齢のみを調整したモデルでは、飲酒、身体活動量、仕事の質的・心理的負担感、働きがい、職場での上司や同僚からの支援、冠動脈疾患親和性の行動特性が独立の有意な規定因子となった。続いて、職位、勤務形態（日勤制・交代制）、時間外労働時間、休日取得日数、喫煙、飲酒、身体活動量、睡眠時間を調整したモデルでは、職業性ストレスの各項目の寄与は相対的に小さくなったが、冠動脈疾患親和性の行動特性では有意な関連が認められた。さらに、すべての変数を投入してステップワイズ法で変数選択を行ったモデルでは、年齢、飲酒、身体活動量、職場での上司や同僚からの支援、冠動脈親和性の行動特性が有意な変数として採択された。

以上のように、警察官は職員に比べて、高血圧、脂質異常症、耐糖能障害、高尿酸血症の集積数を指標とした冠動脈疾患リスクが高く、その傾向は年齢層が高くなるにつれて顕著であった。その背景には、警察業務に起因する多様なストレスとそれに修飾された生活習慣の乱れが関係していると推察されるが、警察官では、仕事中心のライフスタイルに代表される冠動脈疾患親和性の行動特性を持つ者が多く、このような性格・行動特性がストレスに対する認知や対処に影響を与え、冠動脈疾患リスクを増強させている可能性が示唆された。したがって、職業性ストレスを軽減するよう



な職場環境および業務形態の改善に加えて、警察官特有の性格・行動特性を考慮した健康管理対策が必要であると考えられた。

〔結語〕

某県警察の男性警察官を対象として、職業性ストレスと個人の性格・行動特性との関係を明らかにするとともに、これらが冠動脈疾患リスクに及ぼす影響について検討した結果、以下のことが明らかとなった。

1. 警察官は、高血圧、脂質異常症、耐糖能障害、高尿酸血症の個人における集積数が職員に比べて有意に多く、その傾向は年齢層が高くなるにつれて顕著であった。
2. 警察官は職員に比べて、仕事の身体的負担感が高いものの、質的・量的な心理的負担感は同程度かやや低く、仕事への適性、技能の活用、働きがい、同僚からの支援をより強く感じていた。また、倦怠感、イライラ感、疲労感、不安感、抑うつ感などのストレス反応の訴えも有意に少なかった。
3. 警察官は仕事中心のライフスタイルに代表される冠動脈疾患親和性の行動特性を持つ傾向が強く、そのことがストレスに対する認知や対処に影響を与え、冠動脈疾患リスクの増大につながっている可能性が示された。
4. 職業性ストレスを軽減するような職場環境および業務形態の改善に加えて、警察官特有の性格・行動特性を考慮した健康管理対策が必要と考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 7 月 26 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文の審査を行った。

警察官においては、心疾患による長期休業者率が他の地方公務員に比べて高い水準にある。海外研究では警察官は高い職業性ストレスに曝されている一方、主観的なストレスレベルが低く、抑うつ感や不安感など心理的症狀の訴えが少ないこと、また、タイプ A 型の性格傾向を持つ者が多いことが示されている。本研究では、職業性ストレス及び行動特性が冠動脈疾患リスクに及ぼす影響について検討を行った。

A 県警察に所属する警察官と職員のうち、年齢 30～59 歳、勤続年数 5 年以上、勤務制限がなくかつ解析に必要なデータに欠損がない男性 1,196 名（警察官 1,081 名・職員 115 名、平均年齢 44.8 ± 9.5 歳）を対象として分析した結果、以下のことが明らかとなった。

- 冠動脈疾患リスクについて、警察官は、高血圧、脂質異常症、耐糖能障害、高尿酸血症の個人における集積数が職員に比べて有意に多く、その傾向は 45 歳以上の年齢層で顕著であった。
- 職業性ストレスについて、警察官は職員に比べて、仕事の身体的負担感が高いものの、質的・量的な心理的負担感と同程度かやや低く、仕事への適性、技能の活用、働きがい、同僚からの支援をより強く感じていた。また、倦怠感、イライラ感、疲労感、不安感、抑うつ感などのストレス反応の訴えも有意に少なかった。
- 警察官は、仕事中心のライフスタイルに代表される冠動脈疾患親和性の行動特性（①仕事中心のライフスタイル ②顕在的タイプ A 行動の抑制 ③社会的優位性）を持つ者が職員の約 3 倍と高率であり、このような行動特性がストレスに対する認知や対処に影響を与え、冠動脈疾患リスクを増大させている可能性が示唆された。

以上の結果から、職業性ストレスを軽減するような職場環境改善に加え、警察官特有の行動特性を考慮した個別支援など予防対策の充実強化が重要と考えられた。

本論文は、警察官特有の心理行動様式と健康影響の関係を明らかにすることで、冠動脈疾患のリスク低減に有用である可能性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965号		
学位授与の日	平成29年10月17日		
氏名	西川 彰則		
学位論文の題目	Outcome of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma : retrospective analysis of 16 patients (多発性骨髄腫に対する同種造血幹細胞移植の有効性について:16例の後方視的解析)		
論文審査委員	主査	教授 園村 哲郎	
	副査	教授 下川 敏雄	教授 園木 孝志

## 論文内容の要旨

### 【背景】

多発性骨髄腫は、形質細胞が腫瘍化した疾患であり、複数のがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活化により発症・進展する。そのため、治療のターゲットは多彩であり、腫瘍進展を薬剤のみで抑えることは困難である。

近年、多発性骨髄腫に対する有効な新規薬剤(ボルテゾミブ、レナリドミドなど)が登場し、平均7年以上の長期生存が望めるようになった。しかし強力な薬剤登場にもかかわらず、多発性骨髄腫はクローン進化による薬剤耐性を獲得し難治性となる。

よって、治癒を目指すためには薬剤のみならず、同種造血幹細胞移植による免疫学的殺腫瘍細胞効果を利用することが有効と考える。

本研究では、難治性多発性骨髄腫における同種造血幹細胞移植の有効性について後方視的に検討をおこなった。

### 【対象および方法】

当院およびりんくう総合医療センターにて2001年6月から2012年12月の期間に同種造血幹細胞移植を行った多発性骨髄腫患者16名について解析を行った。対象は、高リスク、もしくは再発難治の多発性骨髄腫であり、65歳未満、HCT-CI (Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index) score  $\leq 2$ 、危険性と有用性について十分説明し同意が得られた患者とした。評価項目は、全生存率、無増悪生存率、治療関連死、再発率とし、移植患者16名の各条件ごとの集団間でのlog-rank testにて比較をおこない、同種移植治療の有効性を評価した。統計解析はすべてEZR (Easy R: 統計解析ソフト、Bone Marrow Transplantation (2013) 48, 452-458) を用いた。

### 【結果】

#### 患者背景

同種造血幹細胞移植をおこなった多発性骨髄腫患者16例の年齢中央値は47歳。すべての患者は、同種造血幹細胞移植前に寛解導入療法を受けており、そのうち14例は1~2レジメン、2例は3レジメン以上施行されていた。自家移植は8例で行われていた。再発難治例に対する救援療法として同種造血幹細胞移植を行った症例は8例、新規症例に対して初回奏功時治療として同種造血幹細胞移植を8例におこなった。移植時に再発・再燃は7例であった。

#### 移植

移植源について、8例が同胞のHLA完全一致であった。移植前処置は14例が強度減弱前処置であった。Graft vs host disease (GVHD) 予防はタクロリムス10例、シクロスポリン6例、HCT-CIは0が11例、1もしくは2が4例であった。

## GVHD と治療関連死

急性 GVHD、慢性 GVHD の累積発症率は 41.7%、72.8%であった。移植後 100 日での治療関連死は 25%、3 年では 31.3%であった。

初回奏功時群、救済治療群では 3 年での治療関連死はそれぞれ 12.5%、50%であり、救済治療群が劣る傾向となったが有意差はみられなかった ( $P=0.19$ )。

## 死因

移植後 100 日での死因は、2 例が多臓器不全、敗血症、心筋梗塞、生着不全がそれぞれ 1 例であった。100 日後では、細菌性肺炎、閉塞性気管支炎がそれぞれ 1 例、骨髄腫の増悪、再燃が 2 例であった。

## 移植後の効果および生存率

移植後 3 年での再発率は 72.8%であり、初回奏功時治療群、救済治療群にわけるとそれぞれ 57.2%と 100%であり有意差を認めた ( $P=0.006$ )。全 16 例中 10 例は再発、再燃を認め、うち 4 例は髄外腫瘍として再発した。髄外腫瘍で再発した患者に対しては外照射を行い、平均 7.8 年の長期生存が得られた。

16 例すべての 3 年無増悪生存率は 18.4%、全生存率は 54.7%であった。初回奏功時治療群と救済治療群では 3 年無増悪生存率、全生存率とも有意に初回奏功時群が優れていた ( $P=0.003$ ,  $P=0.05$ )。初回奏功時治療群と救済治療群の 3 年再発率 (57.2% vs 100%) を比較すると救済治療群の再発率が有意に高かった ( $P=0.006$ )。

単変量解析では、移植時年齢、移植時病期、同種移植時期の戦略(初回奏功時、救済)、自家移植の有無、前処置、移植源、HLA 適合度、慢性 GVHD の有無の項目による全生存率への影響を解析したところ、移植時病期 (非増悪, 増悪) のみが有意差をみとめた ( $P=0.03$ )。

## **【考察】**

我々の研究により、初回奏功時治療群と救済治療群の比較で、3 年全生存率、無増悪生存率、再発率すべてにおいて初回奏功時治療群が有意に優れていること、移植時病期が非増悪であることが全生存率に寄与する因子であること、が示された。

新規薬剤を使用し、より深い病勢コントロールを行い、かつ的確なタイミングで同種移植を行うことが、更なる長期生存、治癒につながると考える。同時に同種移植による高い治療関連死を克服する安全な移植方法の確立も重要な課題である。

## 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成29年10月5日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

本論文の目的は多発性骨髄腫における同種造血幹細胞移植の有効性を評価することである。当院およびりんくう総合医療センターにて2001年6月から2012年12月の期間に同種造血幹細胞移植を行った多発性骨髄腫患者16名について解析を行った。対象は、高リスク、もしくは再発難治の多発性骨髄腫であり、65歳未満、HCT-CI (Hematopoietic Cell Transplantation-Comorbidity Index) score  $\leq 2$ 、危険性と有用性について十分説明し同意が得られた患者とした。

評価項目は、全生存率、無増悪生存率、治療関連死、再発率とし、移植患者16名の条件ごとの集団間でのlog-rank testにて比較を行った。

対象となった16例の年齢中央値は47歳であった。すべての患者は、同種造血幹細胞移植前に寛解導入療法を受けており、そのうち14例は1~2レジメン、2例は3レジメン以上施行されていた。自家移植は8例で行われていた。新規症例に対する「初回奏功時治療」として同種造血幹細胞移植を行

った症例は8例、再発難治例に対する「救援治療」として同種造血幹細胞移植を行った症例は8例であった。16例の3年全生存率は54.7%、無増悪生存率は18.4%であった。初回奏効時治療群と救援治療群で治療成績を比べると3年全生存率(72.9% vs 37.5%)、無増悪生存率(37.5% vs 0%)ともに初回奏効時治療群が有意に優れていた( $P=0.05$ ,  $P=0.003$ )。16例の3年治療関連死は31.3%であり、初回奏効時治療群と救援治療群の3年治療関連死(12.5% vs 50%)を比較すると、救援治療群が劣る傾向となったが有意差はなかった( $P=0.19$ )。16例の移植後3年での再発率は72.8%であり、初回奏効時治療群と救援治療群の3年再発率(57.2% vs 100%)を比較すると救援治療群の再発率が有意に高かった( $P=0.006$ )。また、単変量解析では、移植時年齢、移植時病期、同種移植時期の戦略(初回奏効時、救援時)、自家移植の有無、前処置、移植源、HLA適合度、慢性GVHDの有無の項目による全生存率への影響を解析したところ、移植時病期(非増悪、増悪)のみが有意差をみとめた( $P=0.03$ )。

本邦において、多発性骨髄腫に対する同種造血幹細胞移植成績のまとまった報告は少ない。本論文において私たちは、①初回奏効時治療群と救援治療群の比較で、3年全生存率、無増悪生存率、再発率すべてにおいて初回奏効時治療群が有意に優れていること、②同種造血幹細胞移植時の病期が非増悪であることが全生存率に寄与すること、を報告した。

今後の骨髄腫の治療方針の決定につながる知見であり、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966号		
学位授与の日	平成29年11月21日		
氏名	竹村 重輝		
学位論文の題目	Associations between anthropometric factors and peripheral neuropathy defined by vibrotactile perception threshold among industrial vibrating tool operators in Japan (日本の振動工具取扱作業における体格指標と振動感覚閾値でみた末梢神経障害の関連)		
論文審査委員	主査	教授 竹下 達也	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 宮下 和久

## 論文内容の要旨

### 【背景】

長期の手腕振動ばく露は、振動障害の一因である。振動障害は、上肢の循環障害、神経障害、運動器障害に分類される。この中で、神経障害は手指の振動感覚閾値測定で評価する。

最近の研究では、高身長・肥満の者に末梢神経障害が生じやすいことを示す研究がある。一方で、体格の大きい者は単位体重当たりの体表面積が小さいため、相対的に体熱放散が少なく、体熱が保たれて末梢神経障害が生じにくいことが予想される。しかしながら、体格の大きい者に末梢神経障害が生じにくいことを示す研究はみられない。そこで本研究では、「体格の大きさは末梢神経障害と負の関連を示す」という仮説を立て、振動工具取扱作業において、体格の大きさと末梢神経障害の関連を評価した。

### 【方法】

#### (対象者)

和歌山県下で実施している、厚生労働省通達に基づく振動工具取扱作業者を対象とする特殊健康診断受診者のうち、次の2集団を調査対象者とした。

【集団1】主に林業に従事する者 336人（調査時期：2013年11月～12月）

【集団2】公務員で道路や農場の維持管理に従事する者 92人（調査時期：2012年1～2月）

健診データの研究目的使用について説明し、書面による同意を個別に取得した（集団1：331人、集団2：92人）。本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会から承認を受けた（受付番号 892）。

#### (測定)

自記式質問票を用いて、振動工具取扱状況（振動工具の取扱年数、1年当たりの取扱日数、1日当たりの取扱時間）等について情報を取得し、総取扱時間を計算した。また、既往歴（高血圧、糖尿病等）を確認した。

健診会場は気温を20～23℃に設定し、30分以上の馴化時間を設けた。手指振動感覚閾値は、集団1では両手の第2～5指で、集団2では両手の第1～5指で、振動感覚計（リオン株式会社・AU-02、上昇法）を用いて測定した。

その後、冷水浸漬試験を実施した（集団1：10℃10分法、集団2：12℃5分法）。症状（しびれ、痛み、白指現象など）がない場合は利き手、症状がある場合は症状のより強い方の手を浸漬した。浸漬終了後、0・5・10分後に、浸漬手の第2指で振動感覚閾値を測定した。

また、体格の大きさの指標として、受診者の身長・体重を測定し、body mass index (BMI) を算出した。身長計が使用できない場合は、受診者の自己申告値を採用した。

#### (統計解析)

データの揃っていた男性作業員（集団1：325人、集団2：68人）を解析対象にした。

集団2の母集団で、10℃10分法（調査時期：2010年1～2月）と12℃5分法（調査時期：2012

年1～2月)で浸漬終了10分後の振動感覚閾値に有意な差を認めなかったため、集団1・集団2とも、冷水浸漬終了後10分時点で振動感覚閾値 $\geq 17.5\text{dB}$ の者を末梢神経障害ありとした。

振動工具取扱作業者の特性を、集団1と集団2で比較した。連続変数(年齢、身長、体重、BMI、振動工具の取扱年数、1年当たりの取扱日数、1日当たりの取扱時間、総取扱時間)はMann-WhitneyのU検定で、カテゴリ変数(末梢神経障害の頻度)は $\chi^2$ 検定で比較した。

ロジスティック回帰モデルで、各説明変数(集団ごとに対象者を4分位に分割)の末梢神経障害に対するオッズ比(95%信頼区間)を算出した(説明変数:年齢、身長、体重、BMI、振動工具の取扱年数、1年当たりの取扱日数、1日当たりの取扱時間、総取扱時間)。

多変量解析では、集団1については、単変量解析で $p < 0.10$ であった変数と体重、BMIを説明変数に含めた。集団2については、解析対象者が少ないため、単変量解析で $p < 0.10$ であった変数に加えて、集団1の多変量解析で用いた変数を説明変数に含めた。さらに、BMIの大きい者は体重も大きいことが予想されることから、これら2変数の間に生じうる多重共線性を制御するため、2変数を相互排他的に除去する解析を実施した。 $p < 0.05$ を有意、 $0.05 \leq p < 0.10$ を境界域の有意と判定した。解析にはSAS 9.3を用いた。

### 【結果】

集団1と集団2では、年齢・身長・体重に有意な差を認めなかった。集団2は集団1よりBMIが大きかった。集団1は集団2に比べて、振動工具の取扱年数は短いものの、1年当たりの取扱日数、1日当たりの取扱時間ならびに総取扱時間は長かった。末梢神経障害の有所見率は、集団1で24.3%(79/325)、集団2で13.2%(9/68)であった。

集団1の単変量解析では、体重高値、BMI高値は末梢神経障害と有意な負の関連を示した。身長は有意な関連を示さなかった。多変量解析では、体重の有意性は消失した。そこで、多変量モデルからBMIを除いたところ、体重と末梢神経障害の負の関連は境界域の有意性を示すにとどまった。一方、多変量モデルから代わりに体重を除いても、BMIと末梢神経障害の有意な負の関連は維持された。

集団2の単変量解析では、体重高値、BMI高値は末梢神経障害と有意な負の関連を示した。身長は有意な関連を示さなかった。多変量解析では、BMI高値と末梢神経障害の負の関連は保たれたが、体重高値と末梢神経障害の負の関連は消失した。集団1と同様に、体重とBMIを相互排他的に多変量モデルから除くと、BMIは依然として末梢神経障害のリスクを低減させた。一方、体重の負の関連は再出現したが、有意性を示すには到らなかった。

### 【考察】

本研究では、体重・BMIともに、末梢神経障害と負の関連を示した。この関連は、前述の仮説「体格の大きさは末梢神経障害と負の関連を示す」に矛盾しない。体格の大きい者は、単位体重当たりの体表面積が小さいため、相対的に体熱放散が少ない。また、体熱産生が大きい。このような状態が、手の温度と振動感覚閾値の回復に寄与したものと考えられる。

本研究から、作業者の体格指標を考慮して振動障害のリスクの高い者を特定することが、振動障害の減少に寄与することが示唆された。

### 【結論】

振動工具取扱作業者において、体熱産生を反映する因子(体重・BMI)は、振動感覚閾値でみた末梢神経障害リスク低減と関連していた。この関連は業務内容にかかわらず認められた。

## 審査の要旨(審査の日、方法、結果)

平成29年10月27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。

体格指標が振動工具取扱作業者の手指振動感覚閾値に及ぼす影響は詳細不明である。本研究では、「体格の大きさは末梢神経障害と負の関連を示す」という仮説を立て、体格指標と手指振動感覚閾値の関連を調査した。

本研究の解析対象者は、次の2集団に属する男性の振動工具取扱作業者である: 集団1(主に林業に

従事する者) 325 人、集団 2 (和歌山県職員) 92 人。振動障害特殊健康診断では、自記式質問票による振動工具取扱状況 (振動工具の取扱年数、1 年当たりの取扱日数、1 日当たりの取扱時間) 等について情報を取得し、総取扱時間を計算した。手指振動感覚閾値を冷水浸漬試験 (集団 1 では 10°C10 分法、集団 2 では 12°C 5 分法) の前後で測定した。また、身長と体重を測定し body mass index (BMI) を算出した。冷水浸漬終了 10 分後の手指振動感覚閾値 $\geq 17.5$  dB の場合に、末梢神経障害ありと判定した。

ロジスティック回帰モデルで、各説明変数 (集団ごとに対象者を 4 分位に分割) の末梢神経障害に対するオッズ比 (95%信頼区間) を算出した (説明変数: 年齢、身長、体重、BMI、振動工具の取扱年数、1 年当たりの取扱日数、1 日当たりの取扱時間、総取扱時間)。多変量解析では、集団 1 については、単変量解析で $p < 0.10$ であった変数と体重、BMIを説明変数に含めた。集団 2 については、解析対象者が少ないため、単変量解析で $p < 0.10$ であった変数に加えて、集団 1 の多変量解析で用いた変数を説明変数に含めた。さらに、BMIの大きい者は体重も大きいことが予想されることから、これら 2 変数の間に生じうる多重共線性を制御するため、2 変数を相互排他的に除去して解析した。

末梢神経障害の有所見率は、集団 1 で 24.3% (79/325)、集団 2 で 13.2% (9/68) であった。

集団 1 の単変量解析では、体重高値、BMI高値は末梢神経障害と有意な負の関連を示した。多変量解析では、体重の有意性は消失した。そこで、多変量モデルからBMIを除いたところ、体重と末梢神経障害の負の関連は境界域の有意性を示すにとどまった。一方、多変量モデルから代わりに体重を除いても、BMIと末梢神経障害の有意な負の関連は維持された。集団 2 の単変量解析では、体重高値、BMI高値は末梢神経障害と有意な負の関連を示した。多変量解析では、BMI高値と末梢神経障害の負の関連は保たれたが、体重高値と末梢神経障害の負の関連は消失した。集団 1 と同様に、体重とBMIを相互排他的に多変量モデルから除くと、BMIは依然として末梢神経障害と負の関連を示した。一方、体重の負の関連は再出現したが、有意性を示すには到らなかった。

振動工具取扱作業において、体熱産生を反映する因子 (体重・BMI) は、振動感覚閾値でみた末梢神経障害リスク低減と関連していた。この関連は業務内容にかかわらず認められた。

以上、本論文は、振動工具取扱作業において、体熱産生を反映する因子と振動感覚閾値でみた末梢神経障害との間における負の関連を明らかにし、今後の振動工具取扱作業における健康管理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(医)乙第967号		
学位授与の日	平成29年11月21日		
氏名	嶋村 邦宏		
学位論文の題目	Difference of ruptured plaque morphology between asymptomatic coronary artery disease and non-ST elevation acute coronary syndrome patients: an optical coherence tomography study (OCTによる無症候性冠動脈疾患と非ST上昇型急性冠症候群における破裂プラーク形態の検討)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 西村 好晴	教授 赤阪 隆史

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

剖検例での病理学検討において、冠動脈内の薄い線維性被膜をもつアテローマ (thin-cap fibroatheroma; TCFA) の破綻とそれに続いて起こる血栓形成が、急性冠症候群 (acute coronary syndrome; ACS) を引き起こす最も重要なメカニズムであることが報告されている。一方で、血管内超音波 (intravascular ultrasound; IVUS) を用いた研究にて、プラーク破裂を有するものの破裂部位が自然修復され、症状を呈さない無症候性冠動脈病変が存在していることが報告されている。IVUS で ACS の発症につながりやすいプラーク破裂についての検討が行われているが、しかし実際には、どのようなタイプのプラーク破裂が ACS の発症につながり、また、どのようなタイプが無症候のままに自然修復されるのか、はっきりとしていない。その一因として、IVUS はその低解像度 (100-150  $\mu\text{m}$ ) のため線維性被膜の厚さやプラーク破裂の cavity の大きさなどの破綻したプラークの形態を詳細に検討することは困難であることが挙げられる。

近赤外線を用いて冠動脈内を観察する血管内光干渉断層法 (optical coherence tomography; OCT) が臨床応用され、約 10-20  $\mu\text{m}$  という高い解像度 (IVUS の約 10 倍) により、ACS の責任病変に高頻度に認められるプラーク破裂、TCFA、冠動脈内血栓などの同定が可能であることが報告されている。

本研究では、無症候性冠動脈疾患と NSTEMI/ACS における責任病変のプラーク形態の違いについて OCT を用いて検討した。

### 【方法】

#### 1. 対象

2011年8月から2013年7月まで和歌山県立医大附属病院で冠動脈造影検査及びOCTが施行された502症例のうち、プラーク破裂が明瞭に観察された80例(無症候性冠動脈疾患33例、NSTEMI/ACS 47例)を対象とした。

#### 2. OCT イメージング

冠動脈造影検査にて ACS の対象病変 (責任病変) を同定し、引き続きカテーテルインターベンション治療の施行前に OCT イメージングを施行した。Frequency domain (FD) OCT カテーテル (Dragonfly™ imaging catheter, Light Lab Imaging, Inc./St. Jude Medical) を病変部の遠位部まですすめ、造影剤をフラッシュし、冠動脈内の赤血球を除去した上でイメージングを施行した。また OCT の imaging core の pull-back のスピードは 20 mm/秒で 50 mm の pull-back 長で遠位部から近位部にかけて観察を行った。無症候性冠動脈疾患の対象病変は心筋虚血所見を有さない領域を灌流する冠動脈の動脈硬化性病変であり、それに対して、同様の手技にて OCT イメージングを施行し、観察を行った。

#### 3. OCT イメージ解析

脂質に富むプラーク (lipid-rich plaque)、冠動脈内血栓(赤色と白色の分類も含めて)の有無を評価した。また短軸像において、脂質プラークの広がり (角度)、プラーク破裂部の血管内腔の断面積および



同部の cavity の最大断面積、また最小内腔断面積を計測した。さらに破裂プラークの長軸方向の再構築画像において、最小内腔断面とプラーク破裂部の位置関係により近位部型、中間部型、遠位部型の 3 タイプに分類した。

#### 4. 統計学的解析

カテゴリーは頻度で表示し、2 群間の比較には  $\chi^2$  検定または Fisher 検定を用いた。連続変数は平均 ± 標準偏差で表示し、2 群間の比較には unpaired Student t 検定を用いた。いずれも  $P < 0.05$  を統計学的に有意差ありと判定した。

#### 【結果】

患者背景では、無症候性冠動脈疾患群において、スタチンの使用率が有意に高く、2 剤の抗血小板剤の使用率も高い傾向があった。冠動脈造影所見に関しては、NSTEACS 群において有意に TIMI flow grade が低く、複雑病変や血栓像の頻度が高かった。また最小血管径が小さく、狭窄度も大きかった。OCT 所見に関しては、lipid-rich plaque の頻度、血栓（赤色および白色を含む）および赤色血栓の頻度が、無症候性冠動脈疾患群において、NSTEACS 群に比して有意に低かった（それぞれ 67% vs. 85%,  $p=0.013$ , 9% vs. 83%,  $p=0.031$ , および 0% vs. 32%,  $p < 0.001$ ）。プラーク破裂部の cavity の断面積は両群で有意差がなかったが ( $1.63 \pm 0.86 \text{ mm}^2$  vs.  $1.66 \pm 1.35 \text{ mm}^2$ ,  $p=0.884$ )、プラーク破裂部の血管内腔の断面積および最小内腔断面積に関しては無症候性冠動脈疾患群で有意に大きかった（それぞれ  $3.78 \pm 1.50 \text{ mm}^2$  vs.  $2.70 \pm 1.55 \text{ mm}^2$ ,  $p=0.003$ , および  $2.75 \pm 1.72 \text{ mm}^2$  vs.  $1.72 \pm 0.90 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0.001$ ）。さらに破裂プラークと最小内腔断面との長軸方向の位置関係（近位部型、中間部型、あるいは遠位部型）については、両群で有意差はなかった。

#### 【考察】

本研究では、無症候性冠動脈疾患の患者の無症候性プラーク破裂と NSTEACS の患者の有症候性プラーク破裂の形態について OCT で比較検討を行った。無症候性プラーク破裂は有症候性プラーク破裂と比較して、より大きな冠動脈内腔面積を伴っており、脂質に富むプラークや冠動脈内血栓の頻度はより少なかった。

IVUS を用いた研究で、ACS の責任病変における破裂プラークは同一症例における非責任病変での破裂プラークと比較してより小さな冠動脈内腔断面積とより高度な狭窄率であったということが報告されている。IVUS よりも解像度が高く、計測値の信頼性および再現性のより高い OCT を用いた本研究でも、小さな内腔の冠動脈にプラーク破裂が起きた場合、ACS 発症につながりやすいという可能性が示唆された。一方で、プラーク破裂が ACS 発症につながるかどうかは、多因子が関連していると考えられ、本研究の患者背景において、無症候性冠動脈疾患群において、2 剤の抗血小板剤の使用率も高い傾向があり、プラーク破裂後の血栓形成が抑制された可能性も考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 29 年 11 月 7 日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

剖検例での病理学検討において、冠動脈内の薄い線維性被膜をもつアテローム (thin-cap fibroatheroma; TCFA) の破綻とそれに続いて起こる血栓形成が、急性冠症候群 (acute coronary syndrome; ACS) を引き起こす最も重要なメカニズムであることが報告されている。一方で、血管内超音波 (intravascular ultrasound; IVUS) を用いた研究にて、プラーク破裂を有するものの破裂部位が自然修復され、症状を呈さない無症候性冠動脈病変が存在していることが報告されている。IVUS でどのようなタイプのプラーク破裂が ACS の発症につながり、どのようなタイプが自然修復されるのか検討が行われているが、はっきりとしていない。その一因として、IVUS の画像解像度 ( $100\text{--}150 \mu\text{m}$ ) の問題があり、線維性被膜の厚さやプラーク破裂の cavity の大きさなどの破綻プラークの形態を詳細に検討することが困難であることが挙げられる。

本論文では、33 例の無症候性冠動脈疾患と 47 例の非 ST 上昇型急性冠症候群 (non-ST elevation acute coronary syndrome; NSTEACS) を対象に、それぞれにおける責任病変のプラ

ーク形態の違いについて、IVUS の約 10 倍の高い解像度を有する血管内光干渉断層法 (optical coherence tomography; OCT) を用いて検討した。

結果は、OCT 所見において、lipid-rich plaque の頻度、血栓 (赤色および白色を含む) および赤色血栓の頻度が、無症候性冠動脈疾患群において、NSTEACS 群に比して有意に低かった (それぞれ 67% vs. 85%,  $p=0.013$ , 9% vs. 83%,  $p=0.031$ , および 0% vs. 32%,  $p<0.001$ )。プラーク破裂部の cavity の断面積は両群間で有意差がなかったが ( $1.63\pm 0.86\text{ mm}^2$  vs.  $1.66\pm 1.35\text{ mm}^2$ ,  $p=0.884$ )、プラーク破裂部の血管内腔の断面積および最小内腔断面積に関しては無症候性冠動脈疾患群で有意に大きかった (それぞれ  $3.78\pm 1.50\text{ mm}^2$  vs.  $2.70\pm 1.55\text{ mm}^2$ ,  $p=0.003$ , および  $2.75\pm 1.72\text{ mm}^2$  vs.  $1.72\pm 0.90\text{ mm}^2$ ,  $p<0.001$ )。破裂プラークと最小内腔断面との長軸方向の位置関係 (近位部型、中間部型、あるいは遠位部型) については、両群間で有意差はなかった ( $p=0.380$ )。以上、本論文は、無症候性プラーク破裂は有症候性プラーク破裂と比較してより大きな冠動脈内腔面積を伴っており、脂質に富むプラークや冠動脈内血栓を伴う頻度はより少なかったことを示したものである。本研究は、ACS の発症につながりうる破裂プラークの形態を明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第968号		
学位授与の日	平成30年2月6日		
氏名	今村 沙梨		
学位論文の題目	Relation of Albuminuria to Coronary Microvascular Function in Patients With Chronic Kidney Disease (慢性腎臓病患者における、アルブミン尿と冠微小循環の関連性についての検討)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 川股 知之	教授 赤阪 隆史

## 論文内容の要旨

### [背景]

糸球体濾過量(glomerular filtration rate; GFR)の低下している症例では、心血管イベントが高率に生じることが知られている。

また GFR 以外に腎障害を規定するアルブミン尿も、心血管イベントの強力なリスク因子であり、これまでの文献にて、アルブミン尿により微小血管の内皮障害を生じ、結果として動脈硬化へとつながる可能性が示されている。冠血流予備能(coronary flow velocity reserve; CFVR)は冠動脈微小血管の機能を反映する指標であり、陽電子放射線断層撮影(positron emission tomography; PET)検査を用いて、GFR 低下例において CFVR の低下を示した報告がある。その他、ドップラーガイドワイヤー(Doppler guide wire)を用いた研究では、アルブミン尿が CFVR の低下に関連しているという報告もある。これら過去の文献より、冠微小循環障害の程度が、冠血管疾患と腎障害との関連性を解明する上で有用と考える。

しかしながら、全てのステージの慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD)の患者における、アルブミン尿と冠微小循環の関連性についてはこれまでほとんど検討されていない。

本研究では、経胸壁心エコー・ドプラ検査を用いて、CKD 患者における GFR の低下およびアルブミン尿が冠微小循環障害に与える影響について検討した。

### [対象と方法]

#### 1. 対象

CKD を有し、経胸壁心エコー検査を施行され、ドブタミン負荷心エコー検査にて心筋虚血が陰性であった 175 例(アルブミン尿陽性群 35 例、陰性群 140 例)を対象とした。糖尿病、コントロール不良の高血圧、左室肥大、冠動脈疾患、心房細動、中等度以上の弁膜症、透析、アデノシン三リン酸の使用禁忌の症例は除外した。また年齢、性別をマッチさせた 15 例を対照群とした。

#### 2. CKD とアルブミン尿の定義

3 か月以上にわたる、腎組織、画像、検尿に異常がある症例または糸球体濾過量(glomerular filtration rate; GFR)の低下( $GFR < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ )を CKD と定義した。また、CKD を推定糸球体濾過量(estimated GFR; e GFR)により以下の 5 つのステージに分類した。Stage1 は、 $e \text{ GFR} \geq 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ 、Stage2 は、 $60 \leq e \text{ GFR} \leq 89$ 、Stage3 は  $30 \leq e \text{ GFR} \leq 59$ 、Stage4 は  $15 \leq e \text{ GFR} \leq 29$ 、Stage5 は  $e \text{ GFR} < 15$  と分類した。また、スポット尿の総蛋白が 30mg/dl 以上をアルブミン尿陽性と定義した。

#### 3. 経胸壁心エコーと CFVR の測定方法

経胸壁心エコー検査は全例 Vivid 7(GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin)を用いて行った。冠動脈左前下行枝末梢の冠動脈血流速(coronary flow velocity; CFV)を測定し、5 心拍以上の平均値を基準の CFV(baseline CFV)とした。続いて 2 分間のアデノシン三リン酸の持続点滴中に同部位での CFV の測定を行った。持続点滴の速度を 0.14mg/kg/min とし、持続点滴下の 5 心拍以上の平均 CFV を冠充血時の CFV(hyperemia CFV)とした。CFVR は hyperemia CFV を baseline CFV で除したものと定義した。

#### 4. 統計学的解析

統計はすべて SPSS を用いて行った。アルブミン尿陽性群・陰性群・対照群の 3 群間における、カテゴリー変数の比較には  $\chi^2$  検定を、連続変数の比較には Scheffe 法を用いた。多変量解析では、CFVR と各因子との相互関連を分析した。P<0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。

##### [結果]

対照群、アルブミン尿陰性群、アルブミン尿陽性群の 3 群間で CFV について比較すると、アルブミン尿陽性群は他の 2 群と比して、baseline CFV が有意に高く、hyperemia CFV が有意に低いという結果であった。また、アルブミン尿陰性群は対照群に比して、hyperemia CFV が低かった。3 群間の CFVR の比較においては、対照群は他の 2 群よりも有意に高く、またアルブミン尿陰性群は陽性群よりも有意に高かった。さらに CKD のステージの進行に伴い、CFVR は低下を認め、CKD の各ステージ別で評価すると、ステージ 2 および 3 については、アルブミン尿陽性群において陰性群よりも CFVR の有意な低下を示した。単変量解析では、年齢、性別、eGFR、血清クレアチニン値、アルブミン尿、経胸壁心エコー検査における僧帽弁輪部の拡張早期最大移動速度(e') および僧帽弁口血流速度波形の拡張早期波の血流速度(E)を e' で除して算出される E/e' と CFVR との関連性が示された。さらに多変量解析の結果、CFVR 低下に関与する最も強力なリスク因子はアルブミン尿であることが示された。

##### [考察]

アルブミン尿では、酸化ストレスの増大、慢性炎症の持続、脂質異常などが動脈硬化の進展に影響を与えることが報告されており、これらの因子はいずれも冠微小循環を障害する可能性がある。本研究においては、アルブミン尿陽性例における CFVR 低下の機序に関しては直接証明できていないが、微小循環障害により CFVR が低下したことは明白であり、前述の因子が関与した可能性が十分考えられる。今後本研究を発展させるためには、アルブミン尿の有無だけでなく、動脈硬化を促進すると考えられる様々な因子やマーカーなどとアルブミン尿の有無・冠血流予備能との関係についての検討が必要である。

##### [結語]

CKD 患者において、アルブミン尿と冠微小循環障害は強く関連する。

#### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 29 年 12 月 11 日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。糸球体濾過量(glomerular filtration rate; GFR) の低下している症例では、心血管イベントが高率に生じることが知られており、過去の文献にて、アルブミン尿も心血管イベントの強力なリスク因子であり、アルブミン尿により微小血管の内皮障害を生じ、結果として動脈硬化へとつながる可能性が示されている。冠血流予備能(coronary flow velocity reserve; CFVR)は冠動脈微小血管の機能を反映する指標であり、陽電子放射線断層撮影(positron emission tomography; PET) やドップラーガイドワイヤーを用いた報告で、アルブミン尿と CFVR の低下の関連性が示されている。以上より、冠微小循環障害の程度が冠血管疾患と腎障害との関連性を解明する上で有用と考えられるが、全てのステージの慢性腎臓病(chronic kidney disease; CKD) の患者における、アルブミン尿と冠微小循環の関連性についてはこれまでほとんど検討されていない。全てのステージにおいてアルブミン尿陽性の CKD 患者では、冠微小循環障害が強く、冠血流予備能が低下しているという仮説を立て、経胸壁心エコー・ドプラ検査を用いて、CKD 患者における GFR の低下およびアルブミン尿が冠微小循環障害に与える影響について検討した。CKD を有し、経胸壁心エコー検査を施行されドプタミン負荷心エコー検査にて心筋虚血が陰性であった 175 例(アルブミン尿陽性群 35 例、陰性群 140 例)を対象とし、年齢、性別等をマッチさせた健常例 15 例を対照群とした。経胸壁心エコーのパルスドプラ法で冠動脈左前下行枝末梢の冠動脈血流速度(coronary flow velocity; CFV) を測定し、baseline CFV とした。アデノシン三リン酸の持続点滴による冠充血時の CFV を hyperemia CFV とした。CFVR は hyperemia CFV を baseline CFV で除したものと定義した。また国際腎臓財団の分類に基づき、CKD のステージを 5 段階に分類した。3 群間の CFVR の比較において、アルブミン尿陽性群では対照群・陰性群と比較して CFVR は有意に低下していた。さらに CKD の重症度が進行するのに伴い CFVR が低下することが示された。CKD の各ステージ別で評価すると、CKD の stage2~3 の軽度から中等度の段階

においては、アルブミン尿陽性群の方が陰性群に比べて、CFVRの有意な低下が認められた。多変量解析の結果、CFVR低下に関与する最も強力なリスク因子はアルブミン尿であることが示された。本論文は、CKD患者においてアルブミン尿と冠微小循環障害が強く関連することを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第969号		
学位授与の日	平成30年2月6日		
氏名	赤松 弘朗		
学位論文の題目	Multiplexed molecular profiling of lung cancer using pleural effusion. (肺癌胸水症例に対する複数の分子プロファイル診断の試み)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 園木 孝志	教授 山本 信之

## 論文内容の要旨

### 1. はじめに

従来、肺癌の診断は形態学的特徴による組織診断がもとになっており、進行期においてはこれに応じた治療方針が採られてきた。近年、分子生物学的な解析手法の発展に伴い、肺癌における遺伝子変異の詳細が明らかになっている。それらの中にはドライバー遺伝子と総称される、癌の進行・転移などに大きく影響する遺伝子異常が含まれ、2004年の上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異を嚆矢にその後も複数の遺伝子異常が指摘された。これらの遺伝子異常に対してはそれぞれ特異的阻害剤の開発が並行して進められ既にいくつかの標準治療を塗り替えており、これら複数の遺伝子変異を診断と同時に測定することは患者の治療に大きな影響を与えることが分かっている。

一方で肺癌においては、解剖学的な問題から解析に十分な腫瘍組織の採取が難しい場合も散見される。そこで、我々は肺癌で日常的に観察される胸水に着目し、複数の遺伝子変異を同時に解析することの意義を検討した。

### 2. 対象と方法

#### 2-1. 対象

2011年7月から2013年4月まで静岡がんセンターで網羅的遺伝子解析に関する前向き観察研究に参加した患者のうち、胸水検体を採取できた肺癌症例を対象とした。

#### 2-2. 方法

胸水は診断もしくは治療目的で最大 250mL まで採取され、施設の病理診断医によって腫瘍細胞の有無が診断された。本研究への文書同意を取得した後、胸水検体から細胞を遠心分離し解析まで-80℃で保管した。解析にあたっては DNA・RNA を抽出し、pyrosequencing・reverse-transcriptase polymerase chain reaction によって EGFR、KRAS、BRAF、PIK3CA、NRAS、MEK1、AKT1、PTEN、HER2 遺伝子変異、EGFR、MET、FGFR1、FGFR2、PIK3CA 遺伝子増幅、ALK、ROS1、RET 融合遺伝子の有無について解析した。

#### 2-3. 検討項目と統計学的解析

胸水検体における遺伝子異常陽性例の割合について検討した。うち、細胞診陽性・陰性群における遺伝子異常陽性例の割合について Fischer の正確検定を用いて比較した。ホルマリン包埋の腫瘍組織検体が存在する患者に関しては胸水検体との遺伝子異常解析結果の一致率を検討した。P 値は 0.05 以下を統計学的有意とし、解析は JMP ver.7 (SAS Institute Inc) を用いた。

### 3. 結果

観察研究に登録された 845 例のうち、胸水検体を採取できた肺癌症例は 84 例、のべ 102 検体であった。患者背景は年齢中央値 69 歳 (範囲 29-85 歳)、男性が 69%、喫煙者が 73%、組織型は腺癌：扁平上皮癌：小細胞癌がそれぞれ 82%：10%：8%であった。

何らかの遺伝子異常が検出された患者は 84 例中 35 例 (42%) で、腫瘍組織検体との遺伝子異常の一致率は 88%であった。胸水細胞診の結果による遺伝子変異の割合は、陽性群 63 例中 30 例 (48%)・陰性群 17 例中 3 例 (18%) で、前者における検出率は統計学的有意に高かった ( $p = 0.03$ )。検出された遺伝子異常は EGFR 遺伝子変異が最も多く (29%)、EML4-ALK 融合遺伝子 (5%)、KRAS 遺伝子変異 (4%)、EGFR 遺伝子増幅 (4%) の順であった。

分子標的薬の治療前後で胸水から遺伝子異常の推移を確認できた症例が5例（EGFR 遺伝子変異陽性3例、EML4-ALK 融合遺伝子異常2例）あり、EGFR 遺伝子変異陽性例では増悪時検体の全例で耐性変異である EGFR T790M 変異が確認された。

#### 4. 考察

本研究は肺癌胸水検体を用いた、複数の分子プロファイル診断の試みである。胸水検体の42%で何らかの遺伝子異常が検出され、これは Sequist らが腫瘍組織を用いて行った同様の試み（51%）と遜色ない結果であった。また我々の研究でも胸水と腫瘍組織における遺伝子異常結果の一致率は88%と十分満足できる結果であった。胸水からの遺伝子異常検出率は細胞診陽性例で陰性例に比して有意に高いことから、事前に病理学的診断を行うことが重要と考えられたが、一方で細胞診陰性例でも18%の症例で遺伝子異常が検出された事は驚きであった。Buttitta らは、細胞診陰性の胸水検体に対して次世代シーケンサーによる解析を行ったところ42%の症例でEGFR 遺伝子変異を検出できたと報告しており、細胞数の少ない検体においても高感度系を用いることで遺伝子異常を検出できる可能性が示唆された。

最後に、5例と少数ながら治療開始後の遺伝子異常の推移を確認できた。このような試みは今後の耐性機序の解明などに寄与する可能性がある。

我々の研究における限界として、様々な組織型を含んでいることや採取した胸水の量が様々であることが挙げられる。これらは遺伝子異常の割合などの解析結果に影響している可能性がある。

#### 5. 結語

肺癌患者の胸水検体を用いて、約40%の症例から何らかの遺伝子異常が確認できた。結果は組織検体での結果と高率に一致しており、肺癌患者の胸水検体は複数の分子プロファイルを検索するに足ると考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成30年1月4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。

近年、肺癌の遺伝子変異については多くが同定され、そのうちいくつかは分子標的薬の効果予測因子であることが判明している。しかしながら従来、遺伝子変異解析については腫瘍組織の採取が必須である一方で、進行期肺癌においては解析に足る十分な腫瘍組織の採取が困難な症例が散見されることが実臨床における問題であった。そこで本研究では、進行期肺癌においてより侵襲度の低い方法で採取可能な胸水を用いて、複数の遺伝子変異の解析が可能であるかについて検討を行った。

研究の対象は、2011年7月から2013年4月にかけて静岡県立静岡がんセンターで肺癌と診断され、遺伝子変異のための検体保存研究に同意した845例のうち、胸水検体を採取可能であった92例である。うち、8例の不適格例を除いた84例（のべ102検体）について解析を行った。なお採取された胸水検体は一部を病理細胞診検査に提出し、同時に本研究の解析分を-80℃で保存した。遺伝子変異解析にはパイロシーケンス法を用い、EML4-ALKなどの融合遺伝子についてはRT-PCR法で検討した。

84例の患者背景は、年齢中央値69歳（29-85歳）、男性が58例（69%）、喫煙者が61例（73%）であった。腫瘍の組織型は腺癌が69例（82%）と最も多く、扁平上皮癌が8例（10%）・小細胞癌が7例（8%）となっていた。解析の結果、何らかの遺伝子変異を確認できたものは35例（42%）で、遺伝子変異の内訳は、EGFR 29%、EML4-ALK 5%、KRAS 4%の順に多く、頻度や種類は腫瘍組織検体を用いた過去の報告とほぼ一致していた。また、本研究では16例について腫瘍組織と胸水検体で遺伝子変異の状況を比較しており、6例で検出された変異が一致、8例で共に遺伝子変異が検出されず、両方で結果が不一致であったものは2例のみであった（腫瘍組織と胸水における一致率は88%）。なお、解析した84例中、病理細胞診陽性例は63例・陰性例は21例で、細胞診陽性例における遺伝子変異検出率が48%であったのに対し、細胞診陰性例における遺伝子変異検出率は18%で有意な差を認めた（ $P = 0.03$ , Fischer's exact test）。検査の効率を考慮した場合、まず細胞診結果を確認した後に遺伝子変異検査を行う事が有用と考えられる一方で、細胞診陰性の症例であっても高感度法で解析することで遺伝子変異が検出される症例が存在することが示唆された。分子標的薬の開始前後で複数回の解析結果が確認できた症例は5例であった。治療開始前にEGFR 遺伝子変異陽性と確認された3例では、治療後の胸水検体でいずれもEGFR T790M という耐性変異が検出されている。一方、治療前にEML4-ALK 陽性と確認された2例では、治療後の胸水から遺伝子変異は検出されなかった。

EGFR 陽性例における耐性のほぼ半数が T790M 変異により生じるのに対して、ALK 陽性例における耐性機序は非常に多彩であり、本研究の解析系では検出されなかったものと思われる。

以上、本論分は進行肺癌の遺伝子変異検査において、胸水検体を用いて複数の遺伝子変異を確認可能であることを明らかにした報告であり、学位論文として価値のあるものと認めた。



学位記番号	博(医)乙第970号		
学位授与の日	平成30年2月6日		
氏名	松田 芳和		
学位論文の題目	Angiographic Characteristics of Pseudo-occlusion of the Internal Carotid Artery Before and After Stenting (内頸動脈仮性閉塞のステント留置術前後の血管撮影の特徴)		
論文審査委員	主査	教授 園村 哲郎	
	副査	教授 赤阪 隆史	教授 中尾 直之

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

(研究の背景) 内頸動脈仮性閉塞とは、一般的には狭窄部位が極度に狭いため、その遠位内頸動脈が虚脱した病態を指すが、その明確な定義や臨床経過についての報告は過去に散見されるものの、その狭窄部位の性状の詳細については未だ明らかにされていない。

(目的) 本研究では、このような内頸動脈仮性閉塞の狭窄部位の類型とステント留置後の遠位部内頸動脈の形態との関連性、さらにその治療方針について後方視的に調査、検討した。

### 【方法】

(対象と神経放射線学的評価) 内頸動脈仮性閉塞の定義は過去の文献に基づき、脳血管撮影上 (1) 高度狭窄と遠位の内頸動脈の虚脱、(2) 動脈相早期に内頸動脈 **siphon** 部に逆行性の造影、(3) 動脈相後期に病変部内頸動脈から順行性の造影とし、内頸動脈仮性閉塞と診断された症例に対して和歌山県立医科大学脳神経外科学教室およびその関連施設において、2002年12月から2013年7月の期間で、後視的な検討を行った。上記の内頸動脈仮性閉塞の要件を満たし、かつ頸動脈ステント留置術が行われた症例は56例であった。これらの56例に対して、狭窄部位の性状とステント留置遠位の内頸動脈の形状を評価・類型化した。そして、これらの類型別に患者の各種臨床パラメーターや臨床経過の評価を行った。治療部位の経過観察は6か月後に血管撮影もしくはCT血管造影で行った。

(統計学的解析) 二群間の比較は $\chi^2$  test、Fisher exact test、Mann-Whitney U test を用いた。また、**restricted-dilatation** 群の危険因子を評価するためにロジスティック回帰分析を用いた多変量解析を行った。P<0.05 を統計学的に有意とした。

(頸動脈ステント留置術手技) 全症例において、頸動脈ステント留置術は局所麻酔下で行われた。治療の5日以上前に抗血小板剤2剤(アスピリン100mg、クロピドグレル75mgもしくはチクロピジン200mgもしくはシロスタゾール200mg)が投与された。遠位塞栓予防デバイスを用い、狭窄部のバルーンによる前拡張を行った後ステント留置を行った。ステントの拡張程度に応じてバルーンによる後拡張を追加した。また、症例によっては遠位塞栓予防のため、動脈血流を逆流させフィルターを介して静脈へ還流させる逆流法を用いた。全身ヘパリン化を行い、活性化凝固時間を250秒から350秒に維持した。

### 【結果】

(内頸動脈仮性閉塞の形態) 狭窄部位は、脳血管撮影の所見から内腔が単一の群 (**single channel**) と内腔が多数存在する群 (**multiple channel**) の2群に分類することができた。また、頸動脈ステント留置術直後のステント遠位内頸動脈の形態から、内頸動脈が拡張する群 (**immediate-dilatation** 群) と拡張しない群 (**restricted-dilatation** 群) とに分類することができた。ここで、ステント遠位径の75%以上の径を呈する状態を『拡張』とみなした。

(患者背景) 内頸動脈仮性閉塞で頸動脈ステント留置術を行った56症例中、**single-channel** 群は

33例、multiple-channel群は23例であった。患者背景を附表1に示す。患者の各種臨床パラメーターについては、二群間で有意な差は認めなかった。

(ステント留置術および臨床経過) 頸動脈ステント留置術を行った56例中31例がimmediate dilatation群、25例がrestricted-dilatation群であった。Immediate dilatation群31例のうち20例に経過観察が可能であり、その全20例において、十分な拡張状態が保たれていた。一方、restricted-dilatation群は25例中19例で経過観察が可能であった。その19例中医源性動脈解離症例2例を除外した17例において、13例(76.5%)は十分な拡張を認め、2例はrestricted-dilatationを維持、2例において閉塞を認めた。

ステント使用数 ( $P=0.01$ ) やステント内閉塞の発生率 ( $P=0.016$ ) は multiple-channel 群において有意に多かった。ステント留置直後、経過観察時の遠位内頸動脈の immediate-dilatation は single-channel 群に有意に多かった ( $P=0.002$ )。周術期の脳卒中イベントの発生率は multiple-channel 群に多い傾向にあった ( $P=0.06$ )。周術期脳卒中イベントの内訳は、1例は軽微な脳梗塞、2例は過還流による重篤な脳出血を発症し、そのうち1例は死亡であった。

Restricted-dilatation 群の危険因子を同定するため、ロジスティック回帰分析を行ったところ、multiple channels が独立した危険因子であった。

#### 【考察】

(内頸動脈仮性閉塞の狭窄部位の性状) 今回の研究では、内頸動脈仮性閉塞はその血管撮影上の形態から、single-channel 群と multiple-channel 群に分類できることを見出した。Hirata は17例の内頸動脈仮性閉塞を調査し、(1) original lumen の高度狭窄、(2) 完全閉塞と新生血管の channel による再開通の2群に分類されると報告している。この報告と今回の報告を照らし合わせると、我々の multiple-channel 群は Hirata らの報告での『完全閉塞と新生血管の channel による再開通』に相当する。

(ステント留置後の遠位内頸動脈の性状) Glagov らは、血流の減少下では intimal cell が血管内腔を狭くさせると報告している。また、Hirata らは古い器質化した血栓は初期の血栓が長期間経過していると報告している。これらを考慮すると multiple-channel 群ではステント留置以遠の内頸動脈の intimal cell が器質的变化を起こすため、血管が狭窄状態を維持し、ステント留置後すぐには拡張しないと考えられる。逆に single-channel 群ではステント以遠内頸動脈が器質的变化を伴っていないため、ステント留置後すぐに拡張すると考えられる。

(ステント遠位の内頸動脈の経過観察) 今回の調査では、restricted-dilatation 群で経過観察された症例のうち 76.5% に遠位内頸動脈の拡張を認めた。これはステント留置後の血流増加に伴う remodeling により血管径の正常化が起こったものと推測できる。その一方で、経過観察の画像評価において血管径が拡張しなかった2人の患者では、側副血行が発達することにより、内頸動脈からの血流の需要が減少したためと考えられる。また、CREST trial では、内頸動脈狭窄症患者に対しステント留置2年後の閉塞率は1%以下との報告があり、今回の結果を考慮すると内頸動脈仮性閉塞は通常の内頸動脈狭窄症より閉塞率が高いと言える。Greiner らは血行再建の失敗の原因は低形成もしくは線維化した血管、慢性血栓化、診断から治療までの期間が長すぎることでありと報告している。これらの要因は restricted-dilatation 群の血行再建失敗の原因となり得る。経過観察で閉塞した症例は全て無症候性であったが、multiple-channel 群の場合には注意深い経過観察が必要である。

(治療成績) 内頸動脈仮性閉塞症例の内科的治療の脳卒中発症率は1年で11.1%から14.0%、3年で15.1%と報告されている。今回の multiple-channel 群の周術期脳卒中発症率は13.0%で、脳虚血を示す拡散強調画像陽性率は43%、周術期合併症は21%であり、これらの頻度は全て single-channel 群と比べ高い傾向にあった。Multiple-channel 群の周術期脳卒中発症率は内科的治療と同程度であるが、今後内科的治療の進歩によりその治療成績が向上する可能性はある。しかも、multiple-channel 群では、血行再建を必要とする病態すなわち血行力学的脳虚血の頻度は44%と半数以下であったことから、multiple-channel 群の血行再建の適応については今後注意深く検討する必要がある。

#### 【結論】

内頸動脈仮性閉塞の狭窄部位をその血管撮影所見から single-channel 群と multiple-channel 群に分類した。また、ステント留置以遠の内頸動脈の血管径の変化は immediate-dilatation 群と

restricted-dilatation 群に分類することができた。Restricted-dilatation は multiple-channel 群に有意に多く見られた。この群はステント内閉塞の確率が高いため、注意深い経過観察が必要である。有害事象は multiple-channel 群で多く、ステント留置術に対する適応は慎重になるべきである。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成30年1月15日論文審査委員は学位申請者の出席を求め上記論文の審査を行った。

内頸動脈仮性閉塞とは一般的には狭窄部位が極度に狭く、その遠位内頸動脈が虚脱した病態を指すが、その狭窄部位の性状の詳細は不明である。そこで、学位申請者は内頸動脈仮性閉塞の狭窄部位の類型とステント留置後の遠位部内頸動脈の形態との関連性、さらにその治療成績について後方視的に検討した。対象は2002年12月から2013年7月の期間において内頸動脈仮性閉塞と診断され、頸動脈ステント留置術が行われた56例で、(1)狭窄部位の性状、(2)ステント留置後の遠位内頸動脈の形状、(3)患者の各種臨床パラメーター及び臨床経過を評価した。

狭窄部位の形態の放射線学的評価は血管撮影またはCT血管造影により行い、その所見から内腔が単一の群(single-channel 群 n=33)と内腔が多数存在する群(multiple-channel 群 n=23)の2群に分類することができた。また、頸動脈ステント留置術直後のステント遠位内頸動脈の形態から、内頸動脈が拡張する群(immediate-dilatation 群 n=31)と拡張しない群(restricted-dilatation 群 n=25)とに分類することができた。Single-channel 群と multiple-channel 群とでは患者の各種臨床パラメーターに有意な差は認めなかった。ステント留置6ヶ月後の狭窄部位の放射線学的評価では、immediate-dilatation 群で全例に、restricted-dilatation 群では76.5%にそれぞれ十分な拡張を認めた。ステント使用数やステント内閉塞の発生率は multiple-channel 群において有意に多かった(43.5 vs 6.1%,  $P=0.001$ ; 25.0 vs 0.0%,  $P=0.016$ )。ステント留置直後の遠位内頸動脈の immediate-dilatation は multiple-channel 群に比して single-channel 群に有意に多かった(34.8 vs 69.7%,  $P=0.01$ )。周術期の脳卒中イベントの発生率は multiple-channel 群に多い傾向にあったが、有意差は認めなかった。頸動脈ステント留置術直後のステント遠位内頸動脈が拡張しない restricted-dilatation の関連因子を同定するため、ロジスティック回帰分析を行ったところ、狭窄部位の内腔が多数認められる multiple-channel が独立した危険因子であった。

以上の結果から狭窄部位の形態が単一の腔ではなく多数の内腔を認める multiple-channel 群において、ステント留置後の拡張不全(restricted-dilatation)及びステント内閉塞の比率が統計学的に有意に高く、周術期の有害事象も多い傾向にあったことから、このタイプの内頸動脈仮性閉塞のステント留置術の適応については慎重に考慮すべきと考えられた。

本論文は内頸動脈仮性閉塞の病態を放射線学的に評価したものであり、内頸動脈仮性閉塞の形態とその治療成績の関連性を明らかにすることによりその治療方針決定に有用な知見を提供し、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971号		
学位授与の日	平成30年3月6日		
氏名	林 佑子		
学位論文の題目	Bacteriology of the conjunctiva in pre-cataract surgery patients with occluded nasolacrimal ducts and the operation outcomes in Japanese patients (鼻涙管閉塞合併症例での日帰り白内障手術術前の結膜囊細菌の検討)		
論文審査委員	主査	教授 朝村 真一	
	副査	教授 保富 宗城	教授 雑賀 司珠也

## 論文内容の要旨

### 緒言

白内障術後の感染性眼内炎の発症率は約 0.05%と報告されている。しかし、発症すれば失明に至ることもある重篤な合併症である。特に黄色ブドウ球菌、腸球菌やグラム陰性桿菌は、感染症に至ると重篤な経過となりやすいと報告されている菌種である。

鼻涙管閉塞症は涙液が涙囊内に貯留し、病原微生物の増殖母地となる可能性が高く、それが結膜囊に逆流した場合、白内障手術時や術後に手術創を介して細菌が眼内に感染する可能性があり、術後眼内炎の発症の危険性が高いと想定される。実態として鼻涙管閉塞症患者の白内障手術後の細菌感染による眼内炎の症例報告は多い。従って鼻涙管閉塞症は術後眼内炎の危険因子の一つと推測されるが、現在のところ大規模研究が行われていないため世界的に用いられている白内障術後眼内炎の予防および治療に関する欧州白内障屈折矯正手術学会のガイドラインにも、その危険因子としての鼻涙管閉塞症に関する記載がない。

鼻涙管閉塞症は白内障手術後の細菌感染の背景であったという他施設からの複数の症例報告を重要視し、これまで日帰り白内障術前患者全例に涙管通水検査を施行し、閉塞症例に対して、結膜囊常在細菌と薬剤感受性を調べ、薬剤感受性検査に基づいた抗菌薬を処方し、抗菌薬投与後 2~3 日毎に細菌培養検査を施行し、連続 3 回陰性になるのを確認してから手術を施行してきた。これまで少なくとも術後 1 年まで術後眼内炎の発症は見られなかった。その結果について、3 年間に遡って後ろ向き研究を行ったので、その結果を報告する。

### 方法

本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ておこなった。2011 年 1 月から 2013 年 12 月までの 3 年間に和歌山県立医科大学眼科外来において、日帰り白内障施行した患者を 2384 人 3754 眼対象とした。手術日の約 3 週間前に涙管通水検査を行い、鼻涙管閉塞症例に対して結膜囊細菌培養検査を施行した。閉塞を認めた全症例に涙管通水検査後、結膜擦過培養をして、陽性のものは薬剤感受性試験を施行した。鼻涙管閉塞症例に対しては、検査日より抗菌点眼薬を処方した。

### 結果

#### 1.鼻涙管閉塞症例数

鼻涙管閉塞症例は 125 眼 (3754 眼中) 3.3%で、平均年齢 79±8.5 歳であった。男女比は既報と同様に女性に多かった。鼻涙管の解剖学的な性差が理由として考えられる。

#### 2.細菌検出率 (初回時)

初回時の培養検査の結果は 125 眼中 56 眼に検出された。細菌の検出率は 44.8%であった。内訳は Coagulase-negative Staphylococcus(CNS) が 28 眼と最も多く検出され、次いで Corynebacterium species が 17 眼、Staphylococcus aureus が 7 眼で内 Methicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA) 1 人 2 眼に検出された。

グラム陽性球菌が 64%と最も多く、グラム陽性桿菌が 24%、グラム陰性桿菌が 11%で、真菌が 1%であった。

### 3.薬剤感受性検査

薬剤感受性検査の結果は CNS に多剤耐性をもつものがあつた。バンコマイシン耐性の MRSA はなかつた。コリネバクテリウム属の過半数にキノロン系に耐性をもつとの報告があり、今回も同様の結果となつた。グラム陰性桿菌はセフェム系に耐性を持つものがあつた、アミノグリコシド系に感性が高い結果となつた。

### 4.キノロン系、セフェム系以外の抗菌点眼薬を追加した症例

キノロン系、セフェム系以外の抗菌点眼薬を追加した症例は 7 眼であつた。

LVFX、CEZ、GM とともに耐性の CNS 症例が 3 眼あつた。

初回培養検査で、MRSA が検出されず、2 回目に陽性となつた症例が 2 人 3 眼にあつた。MRSA はバンコマイシン(以下 VCM)に感性で 0.5%バンコマイシン点眼薬を追加した。

グラム陰性桿菌がガチフロキサシン点眼処方後陰性化したがつ、その後コリネバクテリウムが検出された。抗菌点眼薬によってある種の菌が減少すると同時に、その抗菌薬に無効な菌が選択的に増加してくるといった菌交代現象の可能性があつた、コリネバクテリウムに感性のアミノグリコシド系点眼薬を追加し、陰性化した。以上の 7 眼で、細菌培養検査が 3 回連続陰性化するまでに 3 週間以上要し、白内障手術が延期された。

### 考察

他施設からの鼻涙管閉塞の無い場合の健常な結膜嚢での常在細菌の検討結果の報告と比較して、予後不良の眼内炎起炎菌のグラム陰性菌の検出率が高かつた。既報によると涙道閉塞が涙嚢や結膜嚢でのグラム陰性桿菌繁殖のリスク因子との報告があつた、今回の結果をサポートすると考えた。

鼻涙管閉塞の外科的根治には涙嚢鼻腔吻合術やそれに準じる鼻涙管チュービングが適応される。他施設からの報告によると、涙嚢鼻腔吻合術による鼻涙管閉塞の解除後、結膜嚢の除菌までに術後 4 から 5 週かかるとされる。今回のプロトコールでは、鼻涙管閉塞と診断後、全例外科的対応をせずに抗菌薬点眼で対応した。その結果、125 眼中 118 眼 (94.4%) で 3 週間以内に白内障手術を延期せずに施行できた。鼻涙管閉塞症の全症例で涙管チューブ挿入術や涙嚢鼻腔吻合術を施行せずに抗菌薬点眼で除菌した上で白内障手術を施行しても、術後 1 年まで全例に眼内炎の発症は見られなかつた。鼻涙管閉塞患者での抗菌薬点眼で除菌は有効なオプションであると考えられた。

欧州白内障屈折矯正手術学会のガイドラインに、その危険因子としての鼻涙管閉塞症に関する記載がないものの、鼻涙管閉塞患者での白内障手術後の眼内感染の報告が散見される。他施設での後ろ向き研究で国内の現状をサーベイする事が望まれる。

### 審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成30年1月31日と2月13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。白内障術後の感染性眼内炎の発症率は約 0.05%と報告されている。しかし、発症すれば失明にいたることもある重篤な合併症である。特に黄色ブドウ球菌、腸球菌やグラム陰性桿菌は、感染症に至ると重篤な経過となりやすいと報告されている菌種である。

鼻涙管閉塞症は涙液が涙嚢内に貯留し、病原微生物の増殖母地となる可能性が高く、それが結膜嚢に逆流した場合、白内障手術時や術後に手術創を介して細菌が眼内に感染する可能性があつた、術後眼内炎の発症の危険性が高いと想定される。実態として鼻涙管閉塞症患者の白内障手術後の細菌感染による眼内炎の症例報告は多い。従つて鼻涙管閉塞症は術後眼内炎の危険因子の一つと推測されるが、現在のところ大規模研究が行われていないため世界的に用いられている白内障術後眼内炎の予防および治療に関する欧州白内障屈折矯正手術学会のガイドラインにも、その危険因子としての鼻涙管閉塞症に関する記載がない。

当施設では、これまで日帰り白内障術前患者全例に涙管通水検査を施行し、閉塞症例に対して、

結膜嚢常在細菌と薬剤感受性を調べ、薬剤感受性検査に基づいた抗菌薬を処方し、抗菌薬投与後 2～3 日毎に細菌培養検査を施行し、連続 3 回陰性になるのを確認してから手術を施行してきた。鼻涙管閉塞の外科的根治には涙嚢鼻腔吻合術やそれに準じる鼻涙管チュービングが適応される。

当施設でのプロトコールでは、鼻涙管閉塞と診断後、全例外科的対応をせずに抗菌薬点眼で対応した。その結果、125 眼中 118 眼 (94.4%) で 3 週間以内に白内障手術を延期せずに施行できた。鼻涙管閉塞症の全症例で涙管チューブ挿入術や涙嚢鼻腔吻合術を施行せずに抗菌薬点眼で除菌した上で白内障手術を施行しても、術後 1 年まで全例に眼内炎の発症は見られなかった。鼻涙管閉塞症患者での抗菌薬点眼で除菌は有効なオプションである考えられた。

本論文は今後の鼻涙管閉塞症患者の白内障後眼内炎の予防に繋がる重要な所見の報告したものであり、学位論文として価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第972号		
学位授与の日	平成30年3月6日		
氏名	服部 園美		
学位論文の題目	Cross-Sectional Study on the Preventive Effects of Living Activities on Cognitive Function Decline in Community-Dwelling Elderly Individuals (地域在住高齢者における生活行動が認知機能低下に及ぼす予防的効果に関する横断的解析)		
論文審査委員	主査	教授 竹下 達也	
	副査	教授 宮下 和久	教授 中尾 直之

## 論文内容の要旨

### [緒言]

厚生労働省の2012年の推計によると、本邦の認知症患者は462万人、軽度認知障害者(MCI)は約400万人に達し、860万人以上が認知症またはその予備群となっている。高齢者の認知機能低下には、遺伝、ストレス、精神状態などの内因的要因と、仕事、趣味、身体活動などの外因的要因が複合的に関与することが明らかにされている。生活行動は、外因的要因の一つであり、新聞や本を読むなどの知的活動の他に、人との交流や地域参加などの社会的活動が含まれる。生活行動を扱った先行研究において、「新聞や本、雑誌を読む」「トランプやチェスなどのゲームをする」「楽器の演奏やダンスをする」「テレビやラジオを視聴する」「博物館に行く」などが、高齢者の認知機能維持に効果をもたらすことが示唆されている。しかし一方では、論理的記憶、言語機能、処理速度などの脳機能は、隣人と交流したり、文化施設を訪れたりする行動に影響を受けないことや、日常生活上のありきたりの知的活動は認知機能低下の抑制に必ずしも有効でないことが報告されており、生活行動と認知機能の関連については依然として一致した見解が得られていない。

また、認知機能検査としては、Mini Mental State Examination (MMSE) が使用されることが多い。しかし、MMSEは認知機能障害のスクリーニングを目的としているため、正常からMCIへの変化を含めて、認知機能レベルを幅広く評価するには十分とは言えない。標準的な加齢変化から独立した生活行動の影響による認知機能低下を捉えるためには、前頭葉や側頭葉などの脳機能も追加して多角的に評価することが望ましい。

そこで、本研究では、地域在住の一般住民からなる集団を対象に、全般的な認知機能とともに、論理的記憶、言語流暢性、注意機能などの脳機能の包括的な評価を行い、これらに生活行動がどのように関連するかを横断的資料の解析に基づいて検討した。

### [対象および方法]

対象者は、W県内の3地域(北東部、中央部、南西部)で実施した健康調査に参加した一般住民のうち、年齢が65歳以上で、研究参加に同意の得られた1,160人であった。なお、本研究では、(1)意思の疎通ができず、調査の遂行が困難である者、(2)認知症を含む精神および行動の障害を認める者、(3)身体機能の障害等の理由で日常生活が制限される者、(4)生活行動または神経心理学検査のデータに不備のある者を対象者から除外した。

生活行動は、自記式質問票を用いて調査した。調査項目は、先行研究を参考に、知的活動、地域や人との交流、身体活動に関する内容として、「新聞を読む」「読書をする」「ラジオを聞く」「ゲームをする」「趣味をしている」「外出する」「地域の活動に参加する」「友人との交流がある」「近所と付き合いがある」「定期的に運動する」「散歩をする」の11項目を採用した。

神経心理学検査は、MMSE、ウエクスラー記憶検査(論理的記憶)、言語流暢性課題、数字抹消検査(注意機

能)を実施した。検査は、脳神経外科医または心理学の専門家から事前に十分な指導を受けた検査者によって行われた。

統計解析には IBM SPSS for Windows 22.0 を使用した。3 群以上の比較には一元配置分散分析および年齢と性を共変量とする共分散分析を使用した。また、群間の差の程度を標準化するために効果量 (Effect size : ES) を算出した。さらに、神経心理学検査の得点を従属変数とする重回帰分析を行い、認知機能に関連する生活行動の項目を抽出した。この際、年齢と性を補正して生活行動の各項目の関連を個別に検討するモデルと、すべての項目を投入してステップワイズ法による変数選択を行うモデルを設定した。統計学的有意水準は 5%とした。

#### [結果および考察]

対象者の年齢は 74.2±6.4 歳で、前期高齢者 (51.1%) と後期高齢者 (48.9%)、男性 (48.1%) と女性 (51.9%) の構成比率は概ね同じであった。生活行動については、全体の約半数が「定期的に運動する」または「散歩をする」と回答した。さらに、「新聞を読む」「趣味をしている」はほぼすべての者が、「読書をする」「ラジオを聞く」は約 4 割の者が日常的に行っていた。隣人などと人的な交流の多い生活を送っている者は約 7 割であった。一方、地域活動に積極的に参加する者は少なく、約 6 割がほとんど参加していなかった。

MMSE の得点の平均は 27.5 点で、認知症の疑いのある者、MCI の疑いのある者は、それぞれ 5.3%、39.1% であった。論理記憶、言語流暢性、注意機能の各検査の得点は、年齢階層 (70 歳未満、70~74 歳、75 歳以上) が上がるにつれて連続的に低値となり、分散分析による年齢の有意な主効果が認められた。また、群間の差の程度を示す効果量 (ES) は、MMSE で最も小さく、論理的記憶、言語流暢性、注意機能の順に大きくなった。

MMSE および神経心理学検査の得点を従属変数とする重回帰分析において、性と年齢を調整したモデル 1 では、MMSE と論理的記憶は、共通して「新聞を読む」「読書をする」「地域の活動に参加する」「近所と付き合いがある」の項目で、また、言語流暢性は、「定期的に運動する」「散歩をする」「読書をする」「趣味をしている」「地域の活動に参加する」「友人との交流がある」の項目と有意な関連を示した。注意機能については、「定期的に運動する」「読書をする」「地域の活動に参加する」「近所と付き合いがある」の他に、「ラジオを聴く」「トランプなどのゲームをする」とも有意な関連が認められた。

性と年齢を調整した上で、生活行動の項目をすべて投入してステップワイズ法による変数選択を行ったモデル 2 では、「新聞を読む」「読書をする」「地域の活動に参加する」「近所と付き合いがある」「散歩をする」「ラジオを聴く」「趣味をしている」の 7 項目が認知機能を高める有意な変数としてモデルに採択された。

重回帰分析で抽出された生活行動についての個人における実施数の合計を求め、その階層別に認知機能を比較した結果、MMSE、論理的記憶、言語流暢性、注意機能の検査の得点はいずれも生活行動の実施数が多くなるにつれて連続的に高値となり、性と年齢の補正した後も有意な主効果が認められた。また、多重比較検定では、言語流暢性と注意機能の一部を除くすべての群間の組合せで有意な差が認められた。

以上のように、日常生活において、身体運動や知的活動、人的交流を活発に行う生活スタイルが認知機能の維持に少なからず貢献していることが明らかとなった。このことから、高齢者の認知症予防のための介入指導に、複数の生活行動の組合せや、グループでの活動を通じた人的な交流を追加した複合的なプログラムを取り入れることで、健常高齢者における認知機能低下の抑制や、軽度認知障害を認める高齢者の認知症発症リスクの軽減に効果が期待できる可能性がある。今後は、縦断的研究によって、研究成果の信頼性を確認するとともに、介入研究によって生活行動の複合的プログラムの効果を検証する必要があると考えられる。

#### [結語]

地域在住の一般住民で構成される集団を対象として、MMSE による全般的な認知機能とともに、論理的記憶、言語流暢性、注意機能などの脳機能の包括的な評価を行い、生活行動が認知機能の低下に及ぼす予防的効果



を横断的解析に基づいて検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. MMSE と神経心理学検査（論理的記憶、言語流暢性、注意機能）の得点は、年齢階層が上がるにつれて低値となった。また、群間の差の効果量は、MMSE で最も小さく、論理的記憶、言語流暢性、注意機能の順に大きかった。
2. MMSE と神経心理学検査の得点を従属変数とする重回帰分析において、「新聞を読む」「読書をする」「地域の活動に参加する」「近所と付き合いがある」「散歩をする」「ラジオを聴く」「趣味をしている」の7項目が認知機能を高める有意な変数としてモデルに採択された。
3. 重回帰分析で抽出された生活行動についての個人における実施数の合計を求め、その階層別に比較した結果、MMSE と神経心理学検査の得点は実施数の増加に伴って高値となり、言語流暢性と注意機能の一部を除くすべての群間の組合せで有意な差が認められた。
4. 従来のような単一の知的活動に絞ったプログラムではなく、複数の生活行動の組合せや、グループ活動を通じた人的な交流を追加した複合的なプログラムによって、認知機能低下の予防と改善により大きな効果がもたらされる可能性があると考えられた。

### 審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成30年2月15日、論文審査委員は学位申請者の出席を認め、上記論文の審査を行った。

高齢者の認知機能低下には、内因的要因と外因的要因が複合的に関与するといわれているが、外因的要因の一つである生活行動と認知機能の関連については一致した見解が得られていない。そこで、MMSE による全般的な認知機能とともに、論理的記憶、言語流暢性、注意機能などの脳機能の包括的な評価を行い、生活行動が認知機能の低下に及ぼす予防的効果を横断的解析に基づいて検討した。W 県内の3地域で実施した健康調査に参加した一般住民のうち、年齢が65歳以上で、研究参加に同意の得られた1,160人を対象として分析した結果、以下のことが明らかになった。

1. MMSE と神経心理学検査（論理的記憶、言語流暢性、注意機能）の得点は、年齢階層が上がるにつれて低値となった。また、群間の差の効果量は、MMSE で最も小さく、論理的記憶、言語流暢性、注意機能の順に大きかった。
2. MMSE と神経心理学検査の得点を従属変数とする重回帰分析において、「新聞を読む」「読書をする」「地域の活動に参加する」「近所と付き合いがある」「散歩をする」「ラジオを聴く」「趣味をしている」の7項目が認知機能を高める有意な変数としてモデルに採択された。
3. 重回帰分析で抽出された生活行動についての個人における実施数の合計を求め、その階層別に比較した結果、MMSE と神経心理学検査の得点は実施数の増加に伴って高値となり、言語流暢性と注意機能の一部を除くすべての群間の組合せで有意な差が認められた。

以上の結果から日常生活において、身体運動や知的活動、人的交流を活発に行う生活スタイルが認知機能の維持に貢献していることが明らかとなった。このことから、高齢者の認知症予防のための介入指導に、複数の生活行動の組合せや、グループでの活動を通じた人的な交流を追加した複合的なプログラムを取り入れることで、健常高齢者における認知機能低下の抑制や、軽度認知障害を認める高齢者の認知症発症リスクの軽減に効果が期待できる。

本論文は、MMSE による全般的な認知機能とともに、論理的記憶、言語流暢性、注意機能などの脳機能の包括的な評価を行い、生活行動が認知機能の低下に及ぼす予防的効果を明らかにした。単一の知的活動に絞ったプログラムではなく、複数の生活行動の組合せや、グループ活動を通じた人的な交流を追加した複合的なプログラムによって、認知機能低下の予防と改善により大きな効果がもたらされる可能性を示したものであり、学位論文として価値あるものとして認めた。