

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成23年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目 次

平成23年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第443号	飯 田 武	Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer (胃癌における腫瘍浸潤 Th17 細胞と腫瘍増殖の関連) ……………	1
博(医)甲第444号	宮 澤 基 樹	Dendritic cells adenovirally-transduced with full-length mesothelin cDNA elicit mesothelin-specific cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines in vitro (アデノウイルスベクターを用いた全長 mesothelin cDNA 遺伝子導入樹状細胞による膵癌細胞株に対する mesothelin 特異的細胞傷害活性の誘導) ……………	3
博(医)甲第445号	勝 田 将 裕	Comparison of different classes of CpG-ODN in augmenting the generation of human epitope peptide-specific CTLs (食道癌のペプチドワクチン療法におけるCpG-ODNのadjuvant効果に関する基礎的検討) ……………	6
博(医)甲第446号	中 谷 宗 幹	Numbness and paresthesia in bilateral toes and soles and disproportional sweating restricted to face and trunk are suitable symptoms useful for the diagnosis of diabetic symmetric polyneuropathy (糖尿病多発神経障害の自覚症状の特徴に関する研究) ……………	9
博(医)甲第447号	南 方 克 之	Effect of some naturally occurring iron ion chelators on the formation of radicals in the reaction mixtures of rat liver microsomes with ADP, Fe ³⁺ and NADPH (天然物由来鉄イオンキレート化剤がラット肝ミクロソーム/ADP/鉄(III)/NADPH反応溶液中のラジカル生成に及ぼす影響) ……	11
博(医)甲第448号	坂 本 恵 子	Cardiovascular responses to arm static exercise in men with thoracic spinal cord lesions (男性胸髄損傷者における上肢静的運動時の循環反応) ……	14
博(医)甲第449号	梅 本 安 則	Plasma IL-6 levels during arm exercise in persons with spinal cord injury (脊髄損傷者における上肢運動時の血中 I L - 6 動態) ……………	16

博(医)甲第450号	辻岡洋人	Impact of Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction (心筋梗塞後の心筋救済における末梢血単球サブセットの病的意義)	17
博(医)甲第451号	安君岭	① Forensic application of intrarenal aquaporin-2 expression for differential diagnosis between freshwater and saltwater drowning. (腎における aquaporin-2 発現の淡水溺死と海水溺死鑑別診断への法医学的応用) ② Immunohistochemical examination of intracerebral aquaporin-4 expression and its application for differential diagnosis between freshwater and saltwater drowning. (脳における AQP4 発現の免疫組織化学的解析と、その淡水溺死と海水溺死鑑別診断への応用)	19
博(医)甲第452号	河崎敬	Renal function and endocrine responses to arm exercise in euhydrated individuals with spinal cord injury (脊髄損傷者における自由飲水下での上肢運動時腎機能及び内分泌応答)	22
博(医)甲第453号	井澤眞沙江	Combination of transcranial sonography, olfactory testing, and MIBG myocardial scintigraphy as a diagnostic indicator for Parkinson's disease (パーキンソン病診断における経頭蓋超音波検査、嗅覚機能検査、MIBG 心筋シンチグラフィの有用性について)	24
博(医)甲第454号	中尾慎一	The influence of alendronate on spine fusion in an osteoporotic animal model. (骨粗鬆症モデル動物に対する脊椎固定術におけるアレンドロネートの影響)	27
博(医)甲第455号	田村耕一	Hollow spheroids beyond the invasive margin indicate the malignant potential of colorectal cancer (大腸癌浸潤先進部における分化型癌細胞巢の悪性度との関連)	30
博(医)甲第456号	河野正充	Maternal Immunization with Pneumococcal Surface Protein A Protects against Pneumococcal Infections among Derived Offspring (Pneumococcal surface protein A を用いた母体免疫による仔マウスの肺炎球菌感染症の予防)	33

博(医)甲第457号	八子理恵	Cilostazol Activates Function of Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cell for Re-endothelialization in a Carotid Balloon Injury Model (シロスタゾールは血管内皮前駆細胞の機能を亢進させ頸動脈擦過モデルにおける再内皮化を促進する) ……………	35
博(医)甲第458号	家田淳司	Re-expression of CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and migration of colorectal cancer. (CEACAM1-long cytoplasmic domain isoform の再発現と大腸癌の浸潤、転移に関する検討) ……………	37
博(医)甲第459号	神田匡兄	Validation of the triaxial accelerometer for the evaluation of physical activity in Japanese patients with COPD (日本人 COPD 患者の活動性評価法としての三軸加速度計の妥当性に関する検討) ……………	40
博(医)甲第460号	高岸美和	IL-6 microinjected in the nucleus tractus solitarii attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats. (延髄孤束核への IL-6 微量注入は動脈圧受容器心臓反射機能を抑制する) ……………	42
博(医)甲第461号	平井慶充	Fibulin-5 protein is reduced in the lung of patients with spontaneous pneumothorax who are under 25 years old (25歳未満の自然気胸患者の肺における Fibulin-5 蛋白の減少) ……………	45
博(医)甲第462号	刘勇	Association between circulating monocyte subsets and in-stent stenosis after coronary stent implantation in patients with ST-elevation myocardial infarction. (ST上昇型心筋梗塞患者における循環血中単球サブセットとステント内再狭窄の関連について) ……………	47
博(医)甲第463号	北山真理	Activated Microglia Inhibit Axonal Growth through RGMA (活性化ミクログリアが RGMA を介して軸索伸長を阻害する) ……	49
博(医)甲第464号	坂野元彦	Wheelchair half marathon race increases natural killer cell activity in persons with cervical spinal cord injury. (頸髄損傷者における車いすハーフマラソンレースでの Natural killer 細胞活性動態) ……………	52
博(医)甲第465号	吉田岳市	Alu and Sat α hypomethylation in <i>Helicobacter pylori</i> -infected gastric mucosae (<i>Helicobacter pylori</i> 感染胃粘膜での繰り返し配列 DNA 低メチル化解析) ……………	54

博(医)甲第466号	岩井茂樹	Inhibition of morphine tolerance is mediated by painful stimuli via central mechanisms (種々疼痛負荷によるモルヒネ耐性の抑制) ……	56
博(医)甲第467号	森 広子	Identification of the radicals formed in the reactions of some endogenous photosensitizers with oleic acid under the UVA irradiation. (UVA照射下において内因性光増感剤とオレイン酸との反応溶液中に生成するラジカルの同定) ……	58
博(医)甲第468号	芝 寿実子	Longitudinal changes in physical capacity over 20 years in athletes with spinal cord injury (脊髄損傷対麻痺アスリートの20年における身体機能の変化) ……	60

博(医)乙第870号	木口倫一	Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 β up-regulation (MIP-1 α はIL-1 β 発現増加を介して神経障害性疼痛形成に関与する)	62
博(医)乙第871号	巽 邦 浩	Effect of anti-oxidants, Ricetrienol and α -tocopherol, on Adipocytokine abnormalities and fatty liver in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty diabetic rats (OLETF ラットにおけるアディポサイトカイン異常および脂肪肝に対する抗酸化物質 (ライストリエノール、 α トコフェロール) の効果)	64
博(医)乙第872号	上松伸彦	Sevoflurane inhibits angiotensin II-induced Rho kinase-mediated contraction of vascular smooth muscle from hypertensive rat (高血圧ラット血管平滑筋収縮に及ぼすセボフルランの作用に関する研究 - Rho-kinase の関与 -)	67
博(医)乙第873号	上山栄子	Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats (反復経頭蓋磁気刺激によるラット海馬における神経細胞新生の増加)	70
博(医)乙第874号	米満尚史	Comparison of Hemostatic Durability between N-Butyl Cyanoacrylate and Gelatin Sponge Particles in Transcatheter Arterial Embolization for Acute Arterial Hemorrhage in a Coagulopathic Condition in a Swine Model (ブタ動脈出血モデルによる高度凝固障害時のNBCA-TAEの有効性に関する実験的研究)	72
博(医)乙第875号	根来健二	Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line, KB-R, derived from oral carcinoma cell line, KB (口腔癌由来細胞株KBからシスプラチン耐性株KB-Rの樹立およびその特性解析)	75
博(医)乙第876号	古川加奈子	Increase of nitrosative stress in patients with eosinophilic pneumonia (好酸球性肺炎における窒素化ストレスの関与)	78

博(医)乙第877号	石川伸之	Cell adhesion on explanted intraocular lenses. Part1: Analysis of explanted IOLs (眼内レンズへの異物反応と細胞付着に関する研究 Part1: 摘出 眼内レンズの検討) Cell adhesion on explanted intraocular lenses. Part2: Experimental study of a surface-modified IOL in rabbits (眼内レンズへの異物反応と細胞付着に関する研究 Part2: 家兎 移植後に摘出した表面処理眼内レンズの実験的研究) ……………	80
博(医)乙第878号	猪野靖	Difference of Culprit Lesion Morphologies Between ST-Segment Elevation Myocardial Infarction and Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome: An Optical Coherence Tomography Study (OCTによるST上昇型心筋梗塞と非ST上昇型急性冠症候群におけ る責任病変のプラーク形態の検討) ……………	83
博(医)乙第879号	松浦英夫	Relationship between coffee consumption and the prevalence of metabolic syndrome among Japanese civil servants (職域集団におけるコーヒー摂取とメタボリックシンドロームとの関連) ……………	85
博(医)乙第880号	大矢昌樹	Vascular Calcification Estimated by Aortic Calcification Area Index is a Significant Predictive Parameter of Cardiovascular Mortality in Hemodialysis Patients. (大動脈石灰化面積指数によって評価された腹部大動脈石灰化 は、血液透析患者の心血管死亡の有意な予後因子である) ……………	88
博(医)乙第881号	高橋佑輔	Two routes for pollen entering indoors: ventilation and clothes (住居内へのスギ花粉侵入経路としての換気と繊維製品に ついて) ……………	91
博(医)乙第882号	石田玲子	The effect on brain activity of clenching with a bite plate increasing occlusal vertical dimension to mandibular rest position : a functional MRI study (fMRI を用いた下顎安静位の咬合高径に相当するバイトプレート 装着に伴う clenching が脳活動に及ぼす影響について) ……………	93

学位記番号	博(医)甲第443号		
学位授与の日	平成23年4月12日		
氏名	飯田 武		
学位論文の題目	Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor Microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer (胃癌における腫瘍浸潤 Th17 細胞と腫瘍増殖の関連)		
論文審査委員	主査	教授 一瀬 雅夫	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

【諸言】従来から腫瘍局所における慢性炎症が腫瘍増殖に関連する可能性が示唆されてきたが、その詳細な機序についてはいまだ解明されていないのが現状である。近年自己免疫疾患や、種々の炎症性疾患を惹起するサイトカインである IL-17 と腫瘍増殖との関連が報告された。また、最近 IL-17 を産生する新たな T 細胞サブセットである Th17 の分化、増殖に IL-21 および IL-23 が関与しているとの報告がなされた。これまでに IL-17 は種々の炎症性疾患マウスモデルにおいて好中球浸潤を伴う血管新生を促進し炎症を惹起することが示されてきた。しかしながら、それらをヒト腫瘍組織において検討した報告はない。今回、胃癌腫瘍局所におけるこれらの炎症性サイトカインである IL-17, IL-21, IL-23 mRNA の発現を定量的に評価し、それらと臨床病理学的因子、発現量の相関関係および腫瘍血管新生、好中球浸潤との関連について検討し、腫瘍浸潤 Th17 の腫瘍増殖における意義を検討した。

【方法】胃癌手術症例 82 症例を対象とし正常組織、腫瘍組織より total RNA を抽出し、Reverse Transcription system にて cDNA を合成した。正常組織、腫瘍組織での IL-17 mRNA, IL-21 mRNA および IL-23 mRNA の発現量を比較した。また、腫瘍組織での IL-17 mRNA の発現量と臨床病理学的因子との関連および IL-23 mRNA, IL-21 mRNA の発現量との相関について検討した。血管内皮マーカーとして mouse Anti-Human CD34 を用いて、また好中球浸潤は mouse Anti-Human CD66b を用いて酵素標識ポリマ法にて染色し、新生血管数、好中球浸潤数を hot spot 法にて画像解析ソフトを用いて定量的に評価した。

【結果】胃癌腫瘍組織において IL-17 mRNA, IL-21 mRNA および IL-23 mRNA の発現は正常組織に比較して有意に高発現であった($p < 0.0005$)。IL-17 mRNA の発現は深達度、stage の進行に伴い有意に高発現であり($p < 0.005$, $p < 0.05$)また、静脈浸潤陽性群、リンパ管浸潤陽性群およびリンパ節転移陽性群において有意に高発現であった($p < 0.05$)。胃癌腫瘍組織における IL-17 mRNA の発現は IL-21 mRNA の発現と強い相関関係を認めた($r = 0.730$, $p < 0.0001$)。IL-17 mRNA 定量値を中央値にて高発現群、低発現群の 2 群にわけ新生血管数、好中球浸潤数を評価すると、腫瘍局所における IL-17 mRNA 高発現群では低発現群に比較して有意に新生血管数の増加、好中球浸潤数の増加を認めた($p < 0.01$)。

【結語】腫瘍局所における IL-17 産生の増加により好中球浸潤を伴う慢性炎症、および新生血管の増生が惹起され、腫瘍の増殖・進展が促進されると考えられた。IL-17, IL-21 が腫瘍の増殖・進展を制御する分子標的になりえ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23年3月25日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

腫瘍微小環境における慢性炎症と腫瘍増殖との関連に着目し、胃癌腫瘍局所において炎症性サイトカインであるIL-17、IL-21、IL-23 mRNAの発現を定量的に評価し、それらと臨床病理学的因子、発現量の相関関係および腫瘍血管新生、好中球浸潤との関連について検討し、腫瘍浸潤Th17の腫瘍増殖における意義を明らかにすることを試みたものである。

胃癌手術症例82症例を対象とし正常組織、腫瘍組織よりtotal RNAを抽出し、Reverse Transcription systemにてcDNAを合成した。正常組織、腫瘍組織でのIL-17 mRNA、IL-21 mRNAおよびIL-23 mRNAの発現量を比較した。また、腫瘍組織でのIL-17 mRNAの発現量と臨床病理学的因子との関連およびIL-23 mRNA、IL-21 mRNAの発現量との相関について検討した。血管内皮マーカーとしてmouse Anti-Human CD34を用いて、また好中球浸潤はmouse Anti-Human CD66bを用いて酵素標識ポリマー法にて染色し、新生血管数、好中球浸潤数をhot spot法にて画像解析ソフトを用いて定量的に評価した。

結果、胃癌腫瘍組織においてIL-17 mRNA、IL-21 mRNAおよびIL-23 mRNAの発現は正常組織に比較して有意に高発現であった($p < 0.0005$)。IL-17 mRNAの発現は深達度、stageの進行に伴い有意に高発現であり($p < 0.005$, $p < 0.05$)、また、静脈浸潤陽性群、リンパ管浸潤陽性群およびリンパ節転移陽性群において有意に高発現であった($p < 0.05$)。胃癌腫瘍組織におけるIL-17 mRNAの発現はIL-21 mRNAの発現と強い相関関係を認めた($r = 0.730$, $p < 0.0001$)。

IL-17 mRNA定量値を中央値にて高発現群、低発現群の2群にわけ新生血管数、好中球浸潤数を評価すると、腫瘍局所におけるIL-17 mRNA高発現群では低発現群に比較して有意に新生血管数の増加、好中球浸潤数の増加を認めた($p < 0.01$)。

以上より本論文は、腫瘍局所におけるIL-17産生の増加により好中球浸潤を伴う慢性炎症、および新生血管の増生が惹起され、腫瘍の増殖・進展が促進され、IL-17が腫瘍の増殖・進展を制御する分子標的になり得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)甲第444号		
学位授与の日	平成23年5月10日		
氏名	宮澤基樹		
学位論文の題目	Dendritic cells adenovirally-transduced with full-length mesothelin cDNA elicit mesothelin-specific cytotoxicity against pancreatic cancer cell lines in vitro (アデノウイルスベクターを用いた全長 mesothelin cDNA 遺伝子導入樹状細胞による膵癌細胞株に対する mesothelin 特異的細胞傷害活性の誘導)		
論文審査委員	主査	教授 一瀬雅夫	
	副査	教授 村垣泰光	教授 山上裕機

論文内容の要旨

緒言

癌免疫療法の治療戦略として樹状細胞 (DC) に腫瘍関連抗原 (TAA) 遺伝子を導入し、TAA 特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を誘導する手法を膵癌に応用し、膵癌で高頻度に発現している Mesothelin (MSLN) 遺伝子を DC に導入し、Mesothelin 特異的 CTL の誘導を試み、免疫学的検討を行った。

方法

1. 免疫組織化学染色

浸潤性膵管癌 10 例および膵管内乳頭粘液性腫瘍 (adenoma 7 例, carcinoma in situ 7 例, invasive adenocarcinoma 10 例) の組織標本についてホルマリン固定パラフィン包埋固定標本を作製し、酵素標識ポリマー法 (DAKO; ENVISION kit) にて免疫組織化学染色を行った。1 次抗体として mouse monoclonal anti-human mesothelin (Clone 5B2; LAB VISION, dilution x 20) を用いた。

2. Mesothelin 遺伝子発現 Adenovirus vector (AxCAMSLN) の作製

Adenovirus cosmid vector pAxCAwt (TAKARA) の SmaI site に Mesothelin cDNA を ligation し、COS-TPC 法にて AxCAMSLN を作製した。同様に control として AxCALacZ を作成した。

3. DC の誘導と Adenovirus vector による遺伝子導入

Ficol-Hypaque 密度勾配遠心法で健常人末梢血から単核球 (PBMC) を分離し、PRIMARIA cell culture dish (BD) にまき、接着細胞を GM-CSF (1000 IU/ml)、IL-4 (500 IU/ml) で 5 日間培養後、IL-6 (1000 IU/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml)、PGE₂ (1 μ g/ml) を添加し、成熟 DC を誘導した。DC への各種 Adenovirus vector による遺伝子導入は遠心法 (2000 \times g, 37 $^{\circ}$ C, 2hr, 100MOI) で行った。

4. Mesothelin 遺伝子導入 DC による CTL 誘導

遺伝子導入 DC と PBMC を 24 well plate にそれぞれ 2×10^5 、 4×10^6 / 1ml/well ずつまき、IL-7 (10 ng/ml) を添加しておいた。DAY2 に IL-2 (20 U/ml) を 1ml 加え、その後も 2-3 日に 1 回 half medium change を行った。7 日毎に計 3 回 DC で刺激して CTL を誘導した。

5. 標的細胞

Mesothelin 陽性細胞として自己 LCL-AxCAMSLN、膵癌細胞株 PK1 (HLA-A24/24)、CfPAC1 (HLA-A2/3)、AsPC1 (HLA-A1/26) を用いた。Mesothelin 陰性細胞として自己 LCL-AxCALacZ を用いた。LCL はヒト type I EBV-transformed marmoset B-cell line である B95-8 の培養上清を健常人 PBMC に加えて培養し、作製した。また、HLA-A24 および HLA-A2 との binding affinity が確認されている 4 種の Mesothelin 由来ペプチド (A24₍₄₇₅₋₄₈₃₎: LYPKARLAF, A24₍₂₀₆₋₂₁₄₎: AFLPWHLRF, A2₍₂₀₋₂₈₎: SLLFLLFSL, A2₍₅₃₀₋₅₃₈₎: VLPLTVAEV) をそれぞれパルス (20 μ g/ml, 16 h, 37 $^{\circ}$ C) した自己 LCL を標的細胞として用いた。

6. ⁵¹Cr 遊離試験

Target 細胞を Na₂⁵¹CrO₄ で 37 $^{\circ}$ C、1 時間ラベルし、種々の effector/target 比で 37 $^{\circ}$ C、4 時間培養し、上清を γ -counter で解析した。CTL の phenotype 解析のため各抗体にて antibody blocking assay を施行した。また、LCL-AxCAMSLN を cold target として PK1 に対する細胞傷害活性の inhibition assay を行った。

7. IFN- γ ELISA

誘導した Mesothelin 特異的 CTL より CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞を autoMACSTM (Miltenyi Biotec) で

単離した。CD4⁺とCD8⁺T細胞を各DC(DC-AxCAMSLN, DC-AxCALacZ)と24時間共培養(T細胞:DC=10:1)した。その上清中のIFN- γ をELISA kit (Endogen)を用いて測定した。

8. 統計学的解析

統計学的解析は Student's t-test で行った。統計ソフトは StatView 5.0 を使用した。

P<0.05 をもって有意差ありとした。

結果

1. 浸潤性膵管癌及び IPMN 由来膵癌組織標本における Mesothelin 発現の検討

浸潤性膵管癌で 100%(10/10)、IPMN 由来浸潤癌で 70%(7/10)に Mesothelin の発現を認めた。IPMN 由来浸潤癌では同一標本内で浸潤部にのみ発現を認め、adenoma や carcinoma in situ の部位では発現を認めなかった。

2. DC-AxCAMSLN で誘導した CTL の細胞傷害活性

- 1) LCL-AxCALacZ と比較して LCL-AxCAMSLN に対し、E/T 依存的に細胞傷害活性を示した(p<0.01)。
- 2) Mesothelin 発現膵癌細胞株 PK1、CfPAC1 に対し、HLA 拘束性に細胞傷害活性を認めた(各細胞株で p<0.01, p<0.05)。
- 3) PK1 に対する細胞傷害活性は ⁵¹Cr 非標識 LCL-AxCALacZ と比較して ⁵¹Cr 非標識 LCL-AxCAMSLN で強く抑制された。
- 4) PK1 に対する細胞傷害活性は HLA class I 抗体で抑制された。
- 5) Mesothelin 由来エピトープペプチドパルス自己 LCL に対して、HLA 拘束性に複数のペプチドに対して細胞傷害活性を認めた。

3. Mesothelin 特異的 CTL と DC-AxCAMSLN 共培養による IFN- γ の産生

誘導された CTL より分離した CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞と DC-AxCAMSLN の共培養 24 時間後の上清中の IFN- γ はコントロールに比べて CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞共に産生が増加していた(p<0.01)。

結語

1. Mesothelin は浸潤性膵管癌および膵 IPMN 由来浸潤癌で高発現を認め、膵癌免疫療法の標的分子として有用であると考えられた。
2. Mesothelin 遺伝子導入 DC は Mesothelin 特異的 CTL を誘導し、HLA 拘束性に膵癌細胞株に対して細胞傷害活性を認めた。
3. Mesothelin 遺伝子導入 DC は Mesothelin 特異的な CD8⁺T 細胞のみならず、CD4⁺ヘルパーT 細胞も誘導した。
4. 本手法で誘導された Mesothelin 特異的 CTL は複数の Mesothelin 由来エピトープペプチドを認識し、細胞傷害活性を示した。

以上より、Mesothelin 遺伝子導入 DC により誘導された CTL は膵癌細胞株に対する強力な細胞傷害活性を有することから、膵癌の新規治療法となる可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成23年4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。

癌免疫療法の治療戦略として樹状細胞 (DC) に腫瘍関連抗原 (TAA) 遺伝子を導入し、TAA 特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) を誘導する手法を膵癌に応用し、膵癌で高頻度に発現している Mesothelin (MSLN) 遺伝子を DC に導入し、MSLN 特異的 CTL の誘導を試み、免疫学的検討を行った。

まず、浸潤性膵管癌及び膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 由来膵癌組織標本における MSLN 発現を免疫組織化学染色法で検討した結果、浸潤性膵管癌で 100%(10/10)、IPMN 由来浸潤癌で 70%(7/10)に MSLN の発現を認めた。IPMN 由来浸潤癌では同一標本内で浸潤部にのみ発現を認め、adenoma や carcinoma in situ の部位では発現を認めなかった。次に、MSLN 遺伝子導入のため Adenovirus vector (AxCAMSLN) を作製した。Adenovirus cosmid vector pAxCawt (TAKARA) の SwaI site に MSLN cDNA を ligation し、COS-TPC 法にて AxCAMSLN を作製した。同様に control として AxCALacZ を作成した。MSLN 遺伝子導入 DC (DC-AxCAMSLN) で健常人ヒト末梢血単核球

(PBMC)を週1回、計3回刺激して誘導したCTLの細胞傷害活性について⁵¹Cr遊離試験で検討した結果、①LacZ 発現 lymphoblastoid cell line (LCL) (LCL-AxCALacZ)と比較してLCL-AxCAMSLNを標的とした場合において、Effector/Target (E/T)依存的に細胞傷害活性を示した(p <0.01)。②MSLN 発現膀胱癌細胞株 PK1、CfPAC1 に対し、HLA 拘束性に細胞傷害活性を認めた(各細胞株で p <0.01 , p <0.05)。③PK1 に対する細胞傷害活性はLCL-AxCALacZと比較してLCL-AxCAMSLNで強く抑制された(Cold target inhibition assay)。④PK1 に対する細胞傷害活性はHLA class I抗体で抑制された。⑤MSLN 由来エピトープペプチドパルス自己LCLに対して、HLA 拘束性に複数のペプチドに対して細胞傷害活性を認めた。また、MSLN 特異的CTLとDC-AxCAMSLN共培養によるIFN- γ の産生について検討した結果、MSLN 特異的CTLより分離したCD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞とDC-AxCAMSLNの共培養24時間後の上清中のIFN- γ はCD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞共に産生が増加していた(p <0.01)。

以上の結果より、MSLNは膀胱癌で高発現し、膀胱癌の浸潤との関係が示唆され、膀胱癌免疫療法の標的分子として有用であると考えられた。MSLN遺伝子導入DCはMSLN特異的CD4⁺T細胞を誘導し、効率的にMSLN特異的CTLを誘導可能であった。DC-AxCAMSLNで誘導されたMSLN特異的CTLは複数のMSLN由来エピトープペプチドを認識するとともに、膀胱癌細胞株に対して、MSLN特異的、HLA拘束性に強力な細胞傷害活性を有した。したがって、MSLNを標的とした樹状細胞ワクチン療法は膀胱癌の新規治療法としての可能性が示唆され、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445号		
学位授与の日	平成23年5月10日		
氏名	勝田将裕		
学位論文の題目	Comparison of different classes of CpG-ODN in augmenting the generation of human epitope peptide-specific CTLs (食道癌のペプチドワクチン療法における CpG-ODN の adjuvant 効果に関する基礎的検討)		
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

緒言

癌患者に対する免疫療法はこれまで多くのアプローチが試みられてきたが、未だ臨床的有効性を示す成果が得られていない。この原因として、癌患者では Th1/2 バランスが不均衡な状態であることや、制御性 T 細胞などにより免疫抑制状態にあることが従来から指摘されている。従って、癌患者を対象として免疫療法を行う際には、その負に傾いた免疫環境を改善する強力なアジュバントが極めて重要となる。

近年、自然免疫系の細胞が微生物に特有のパターン分子 (PAMPs) を認識して活性化することが報告され、このパターン認識受容体として Toll-like receptor (TLR) が同定された。なかでも、CpG 配列を含む CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) は TLR-9 のリガンドであり、自然免疫の活性化とともに獲得免疫への橋渡しとなることから癌ワクチン療法のアジュバントとしての作用が期待されている。実際、マウスにおける癌ワクチン療法のモデル実験にて CpG-ODN を併用することで効率よく特異的細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が誘導され、極めて強力な抗腫瘍効果が得られることが報告されており、マウスにおいては CpG-ODN のアジュバント効果が明らかとなっている。しかしながら、ヒトとマウスでは CpG-ODN のリガンドである TLR-9 の発現細胞が異なるため、マウスにおける CpG の実験結果をヒトに適用できない。一方、ヒトにおいては免疫療法における CpG のアジュバント効果を *in vitro* で明らかにした研究はほとんどなく、そのメカニズムも明らかではない。さらに、CpG-ODN はその構造と機能の違いにより CpG-A、CpG-B、CpG-C の3つのタイプに分類されるが、いずれのタイプが癌ワクチン療法のアジュバントとして優れているかも明らかでない。

本研究では、ヒトの腫瘍抗原特異的ペプチドワクチン療法における CpG-ODN のアジュバント効果を *in vitro* で検討した。

方法

実験Ⅰ. CpG-ODN刺激による健常人末梢血単核球 (PBMC) の IFN- α 産生の検討

同意を得て採取した健常人15人の末梢血から Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心法で PBMC を分離した。PBMC (2×10^6 /ml) を AIMV に懸濁し、CpG-ODN (CpG-A; D35 (ggTGCATCGATGCAGGGGgg)、CpG-B; ODN7909 (tcgtcgTTTTgtcgTTTTgtcgTT)、CpG-C; C274 (tcgtcgaacgttcgagagatgat)、GpC-ODN (tgctgctTTTTgtcTTTTgtcTTT)) (北海道システムサイエンス) を種々の濃度 (0, 1, 5, 20, 80 μ g/ml) で添加して48時間培養後に培養上清を採取した。培養上清中の IFN- α 産生量を IFN- α ELISA kit (PBL) で検討した。

実験Ⅱ. ペプチド特異的 CTL の誘導における CpG-ODN の効果の検討

1. Fluペプチド特異的 CTL の誘導における CpG-ODN の効果の検討

HLA-A24陽性の健常人 PBMC (2×10^6 /ml) にインフルエンザに対する HLA-A24 拘束性エピトープペプチドである Flu peptide (10 μ g/ml) (RFYIQMCYEL) (タカラバイオ) および CpG-ODN を添加し、2% AB serum 添加 AIMV (GIBCO) で 48 well flat bottom cell culture plate (FALCON) にて培養した。Plasmacytoid DC (PDC) を enrich する実験においては、同一検体より採取した PBMC から Plasmacytoid DC isolation kit

(ミルテニーバイオテック)を用いてMACSで採取したPDC (2×10^4 /ml) を添加し、PDCをdepletionする実験においては、PBMCからMACSでPDCを除去したPBMCを用いた。3日毎にIL-2 (20IU/ml)と2%AB serumを添加したAIMVでHalf medium changeした。7日目に細胞を回収して得られたResponder細胞をStimulator細胞で再刺激した。Stimulator細胞は同一検体より採取したPBMCにFlu peptideを添加して放射線照射にて非動化し、Plateにまいて上清を除去した接着細胞を用いた。14日目に培養細胞を回収してEffector細胞とし、Flu peptideをパルスしたA24+LCL細胞をTarget細胞として4hr ^{51}Cr -release assayにて特異的細胞障害活性を解析した。

2. URLC10特異的CTLの誘導におけるCpG-ODNの効果の検討

HLA-A24陽性の健常人PBMC (2×10^6 /ml) をPRIMARIA cell culture Dish (Becton Dickinson) にまき、付着細胞をGM-CSF (1000IU/ml)、IL-4 (500IU/ml) を添加したAIMVで培養した。5日後、IL-6 (1000IU/ml)、TNF- α (10ng/ml)、IL-1 β (10ng/ml)、PGE₂ (1 μ g/ml)を添加し、2日間培養して成熟単球由来樹状細胞 (mMoDC) を誘導した。Peptide特異的CTL誘導において、Responder細胞は、PBMC (1×10^6 /ml) とCD8+T cell isolation kit II (ミルテニーバイオテック) を用いてMACSで採取したCD8+T細胞 (2×10^6 /ml) を混合したものをを用いた。PDCをdepletionする実験では、PBMCからMACSを用いてPDCをdepletionしたPBMCをCD8+T細胞と混和したものをを用いた。Stimulator細胞はmMoDCに食道扁平上皮癌特異的癌抗原由来のHLA-A24拘束性エピトープペプチドであるURLC10ペプチド (LY6K-177:RYCNLEGPPI) (タカラバイオ) を添加して放射線照射にて非動化したものをを用いた。Responder細胞 (3×10^6 /ml) とStimulator細胞 (1×10^5 /ml) を2%AB serum添加AIMVで培養した。3日毎にIL-2 (20IU/ml) とAB serumを添加したAIMVでHalf medium changeした。7日目にStimulator細胞を添加し、Responder細胞を再刺激した。14日目に細胞を回収してEffector細胞とし、URLC10ペプチドあるいはコントロールとしてHIVペプチド (RYLRDQQLL) (タカラバイオ) をパルスしたA24+LCL細胞をTarget細胞として4hr ^{51}Cr -release assayにて特異的細胞障害活性を解析した。

結果

実験 I. CpG-ODN刺激によりPBMCから産生されるIFN- α の産生量

PBMCを各タイプのCpGで刺激すると、いずれにおいてもIFN- α の産生を認め、その産生量はCpG-A > CpG-C > CpG-Bの順であった。また、CpG-BやCpG-Cは5 μ g/mlの添加でIFN- α の産生がピークになるのに対してCpG-Aは20 μ g/mlまでその産生量が増加した(図1)。以上の結果より、以下の実験においてはCpG-A:20 μ g/ml, CpG-B:5 μ g/ml, CpG-C:5 μ g/mlを用いることとした。

実験 II. ペプチド特異的CTLの誘導におけるCpG-ODNのアジュバント効果

1. Fluペプチド特異的CTL誘導におけるCpG-ODNの細胞障害活性増強効果

各種CpG-ODNはFluペプチド特異的細胞障害活性を増強した。その効果はCpG-A > CpG-C > CpG-Bの順に強力であった。また、PDCをenrichすると細胞障害活性はさらに増強するのに対し、PDCをdepletionすることによりこのアジュバント効果が消失することから、Flu peptide特異的CTL誘導におけるCpG-ODNのアジュバント効果はPDC依存性であることが明らかとなった(図2)。

2. URLC10ペプチド特異的CTL誘導におけるCpG-ODNの細胞障害活性増強効果

URLC10特異的CTL誘導において、CpG-Aを添加した場合に限りURLC10ペプチドに特異的な細胞障害活性を増強した。PDCをdepletionすることによりこの細胞障害活性は消失したことから、CpG-Aの増強効果はPDC依存性であることが明らかとなった(図3)。

考察

ヒトin vitroにおける食道扁平上皮癌特異的癌抗原であるURLC10のエピトープペプチドを用いた特異的CTLの誘導において、CpG-ODNはPDCを介したIFN- α の産生により強力なCTLを誘導・活性化させるアジュバント効果を認めることが明らかとなった。

このことから、in vivoにおける食道癌に対するペプチドワクチン療法にCpG-ODNを併用することで、所属リンパ節のPDC活性化を介して効率よくCTLが誘導され、さらに誘導されたCTLはCpG-ODNに刺激されたPDCから産生される大量のIFN-1により局所で直接活性化され、癌細胞を攻撃することが期待される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 4 月 19 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。

癌患者に対する免疫療法はこれまで多くのアプローチが試みられてきたが、未だ臨床的有効性を示す成果が得られていない。従って、癌患者を対象として免疫療法を行う際には、その負に傾いた免疫環境を改善する強力なアジュバントが極めて重要となる。CpG 配列を含む CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) は TLR-9 のリガンドであり、自然免疫の活性化とともに獲得免疫への橋渡しとなることから癌ワクチン療法のアジュバントとしての作用が期待されている。本研究では、ヒトの腫瘍抗原特異的ペプチドワクチン療法における CpG-ODN のアジュバント効果を *in vitro* で検討した。まず、PBMC を各タイプの CpG で刺激すると、いずれにおいても IFN- α の産生を認め、その産生量は CpG-A > CpG-C > CpG-B の順であった。また、CpG-B や CpG-C は 5 μ g/ml の添加で IFN- α の産生がピークになるのに対して CpG-A は 20 μ g/ml までその産生量が増加した。以上の結果より、以下の実験においては CpG-A: 20 μ g/ml, CpG-B: 5 μ g/ml, CpG-C: 5 μ g/ml を用いることとした。各種 CpG-ODN は Flu ペプチド特異的細胞障害活性を増強した。その効果は CpG-A > CpG-C > CpG-B の順に強力であった。また、PDC を enrich すると細胞障害活性はさらに増強するのに対し、PDC を depletion することによりこのアジュバント効果が消失することから、Flu peptide 特異的 CTL 誘導における CpG-ODN のアジュバント効果は PDC 依存性であることが明らかとなった。さらに、URLC10 特異的 CTL 誘導において、CpG-A を添加した場合に限り URLC10 ペプチドに特異的な細胞障害活性を増強した。PDC を depletion することによりこの細胞障害活性は消失したことから、CpG-A の増強効果は PDC 依存性であることが明らかとなった。

ヒト *in vitro* における食道扁平上皮癌特異的癌抗原である URLC10 のエピトープペプチドを用いた特異的 CTL の誘導において、CpG-ODN は PDC を介した IFN- α の産生により強力な CTL を誘導・活性化させるアジュバント効果を認めることが明らかとなった。このことから、*in vivo* における食道癌に対するペプチドワクチン療法に CpG-ODN を併用することで、所属リンパ節の PDC 活性化を介して効率よく CTL が誘導され、さらに誘導された CTL は CpG-ODN に刺激された PDC から産生される大量の IFN-1 により局所で直接活性化され、癌細胞を攻撃することが期待されることが明らかとなったことから、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446号		
学位授与の日	平成23年6月14日		
氏名	中谷宗幹		
学位論文の題目	Numbness and paresthesia in bilateral toes and soles and disproportional sweating restricted to face and trunk are suitable symptoms useful for the diagnosis of diabetic symmetric polyneuropathy (糖尿病多発神経障害の自覚症状の特徴に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 近藤智善	
	副査	教授 三家登喜夫	教授 宮下和久

論文内容の要旨

【緒言】

DSPNは患者のQOL低下を惹起し、生命予後にも関連するため早期診断が必要であるが世界共通の診断基準はなく、診断に有用な自覚症状を知ることは臨床的に重要と思われる。そのために、糖尿病の罹病期間や特異的な合併症である網膜症などの臨床的背景や定量的神経機能とよく相関し、糖尿病患者の方が非糖尿病患者より高頻度にみられる自覚症状について検討を行った。

本研究は糖尿病左右対称性多発神経障害(DSPN)の診断に有用な自覚症状を明らかにすることを目的とした研究である。

【方法および結果】

先ず、和歌山県立医科大学第一内科で神経機能検査を実施した糖尿病患者593例において、神経障害の症状と考えられる10症状について聞き取り調査を行い、自覚症状と罹病期間、糖尿病網膜症、米国糖尿病学会(ADA)の診断基準によるDSPNと心血管系自律神経障害(CAN)および定量的神経機能検査との関連性を検討した。その結果、両側性の足指・足底のしびれ・異常感覚、両側性の足の痛みと発汗異常(顔面・体幹の発汗増加、下半身での減少)が上記の所見と関連性が深いことを明らかにした。

次に、同科の糖尿病外来通院中の糖尿病患者999例、全国の一般内科通院中の男性糖尿病患者1524例および健康診断を受診した非糖尿病患者501例において、上記と同様の10個の自覚症状についてアンケート調査を実施し、各群間で症状の頻度を比較検討した。その結果、両側性の足指・足底のしびれ・異常感覚、両側性の足の痛みと発汗異常は非糖尿病群者と比べて糖尿病患者で有意に高頻度であり、それぞれの頻度は20.1、15.3、9.4、17.8%であったことを示した。

【結論】

これらの結果より、両側性の足指・足底のしびれ・異常感覚と発汗異常は糖尿病に特徴的で、DSPN診断に有用と考えられ、また、両側性の足の痛みは頻度がやや少ないものの、糖尿病に特徴的で患者のQOLに及ぼす影響を考えると臨床的に重要な症状であると結論した。

審査の要旨(審査の日、方法、結果)

平成23年5月2日論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

DSPNは患者のQOL低下を惹起し、生命予後にも関連するため早期診断が必要であるが世界共通の診断基準はなく、診断に有用な自覚症状を知ることは臨床的に重要と思われる。そのために、糖尿病の罹病期間や特異的な合併症である網膜症などの臨床的背景や定量的神経機能とよく相関し、糖尿病患者の方が非糖尿病患者より高頻度にみられる自覚症状について検討を行った。

本研究は糖尿病左右対称性多発神経障害(DSPN)の診断に有用な自覚症状を明らかにすることを目的とした研究である。

先ず、和歌山県立医科大学第一内科で神経機能検査を実施した糖尿病患者 593 例において、神経障害の症状と考えられる 10 症状について聞き取り調査を行い、自覚症状と罹病期間、糖尿病網膜症、米国糖尿病学会(ADA)の診断基準による DSPN と心血管系自律神経障害(CAN)および定量的神経機能検査との関連性を検討している。その結果、両側性の足指・足底のしびれ・異常感覚、両側性の足の痛みと発汗異常(顔面・体幹の発汗増加、下半身での減少)が上記の所見と関連性が深いことを明らかにした。

次に、同科の糖尿病外来通院中の糖尿病患者 999 例、全国の一般内科通院中の男性糖尿病患者 1524 例および健康診断を受診した非糖尿病患者 501 例において、上記と同様の 10 個の自覚症状についてアンケート調査を実施し、各群間で症状の頻度を比較検討した。その結果、両側性の足指・足底のしびれ・異常感覚、両側性の足の痛みと発汗異常は非糖尿病群者と比べて糖尿病患者で有意に高頻度であり、それぞれの頻度は 20.1、15.3、9.4、17.8%であったことを示した。

これらの結果より、両側性の足指・足底のしびれ・異常感覚と発汗異常は糖尿病に特徴的で、DSPN 診断に有用と考えられ、また、両側性の足の痛みは頻度がやや少ないものの、糖尿病に特徴的で患者の QOL に及ぼす影響を考えると臨床的に重要な症状であると結論した。

これらの所見は糖尿病神経障害の診断・評価における自覚症状に客観的な裏づけを与えるものであり、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447号		
学位授与の日	平成23年7月12日		
氏名	南方克之		
学位論文の題目	Effect of some naturally occurring iron ion chelators on the formation of radicals in the reaction mixtures of rat liver microsomes with ADP, Fe ³⁺ and NADPH (天然物由来鉄イオンキレート化剤がラット肝ミクロソーム/ADP/鉄(III)/NADPH 反応溶液中のラジカル生成に及ぼす影響)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 小山 一	教授 岩橋 秀夫

論文内容の要旨

【緒言】

私は以前、ラット肝ミクロソーム/鉄(III)/ADP/NADPH 反応溶液を、電子スピン共鳴 (以下 ESR)、高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) 及びマススペクトル (以下 MS) を組み合わせた方法 HPLC-ESR-MS により分析し、オキソペンチルラジカル及びエチルラジカルを検出・同定した。

カフェ酸やクロロゲン酸はコーヒー豆、じゃがいも、リンゴやタバコの葉などに含まれており、また α -ピコリン酸はトリプトファンの代謝産物である。

本研究では、カフェ酸、その他のポリフェノール、 α -ピコリン酸及びその関連化合物がラット肝ミクロソーム/ADP/鉄(III)/NADPH 反応溶液中のラジカル生成に与える影響について検討した。

【方法】

1. カフェ酸とその他のポリフェノール化合物によるラジカル生成への影響

コントロール反応溶液(I)の組成を、ラット肝ミクロソーム (0.75 mg/ml protein)、スピントラップ剤 4-POBN (0.1 M)、ADP (20 mM)、FeCl₃ (0.1 mM)、NADPH (1 mM)、pH 7.4 リン酸緩衝液 (25 mM) とし、反応温度は 37 °C、反応時間は 60 分間とした。金属キレート化剤である EDTA (1 mM) の存在下あるいは非存在下で、コントロール反応溶液(I)に種々の濃度のカフェ酸やその他のポリフェノール化合物を添加し、ESR および HPLC-ESR 分析を行った。

2. α -ピコリン酸とその関連化合物によるラジカル生成への影響

コントロール反応溶液(II)の組成を、ラット肝ミクロソーム (0.75 mg/ml protein)、スピントラップ剤 4-POBN (0.1 M)、FeCl₃ (0.1 mM)、NADPH (1 mM)、pH 7.4 リン酸緩衝液 (25 mM) とし、反応温度は 37 °C、反応時間は 60 分間とした。金属キレート化剤である EDTA (1 mM) の存在下あるいは非存在下で、コントロール反応溶液(II)に種々の濃度の α -ピコリン酸やその関連化合物を添加し、ESR および HPLC-ESR 分析を行った。

3. 可視吸収スペクトル測定

金属キレート化剤である EDTA (1 mM) の存在下あるいは非存在下で、カフェ酸 (1.5 mM) と鉄(III)イオン (0.15 mM)、あるいは α -ピコリン酸 (7 mM) と鉄(II)イオン (1.4 mM) 混合溶液の可視吸収スペクトル測定を行った。

【結果および考察】

1. カフェ酸とその他のポリフェノール化合物によるラジカル生成への影響

コントロール反応溶液(I)にカフェ酸とその他のポリフェノール化合物を添加し、ESR 測定を行った。カフェ酸、カテコール、没食子酸、D-カテキン、L-ドーパ、クロロゲン酸及び L-ノルアドレナリンを添加すると、ESR ピーク高は有意に低下した。同様に、カフェ酸を添加すると、HPLC-ESR ピーク 1 (4-POBN/オキソペンチルラジカルアダクト、保持時間 30.3 分) とピーク 2 (4-POBN/エチルラジカルアダクト、保持時間 35.1 分) のピーク高は有意に減少した。EDTA 存在下ではそ

これらの ESR ピーク高の減少は見られなかった。

2. α -ピコリン酸とその関連化合物によるラジカル生成への影響

コントロール反応溶液(II)に α -ピコリン酸とその関連化合物を添加し、ESR 測定を行った。 α -ピコリン酸、2,6-ピリジンジカルボン酸を添加すると、ESR ピーク高は有意に増加した。同様に、 α -ピコリン酸を添加すると、HPLC-ESR ピーク 1 (保持時間 30.3 分) とピーク 2 (保持時間 35.1 分) のピーク高は有意に増加した。EDTA 存在下ではそれらの ESR ピーク高の増加は見られなかった。

3. 可視吸収スペクトルによるキレート効果の検討

鉄(III)/カフェ酸混合溶液の可視吸収スペクトルを測定すると、特徴的な吸収が可視部に見られた。この混合溶液に EDTA を添加すると、この吸収は消失した。

同様に、鉄(II)/ α -ピコリン酸混合溶液の可視吸収スペクトルを測定すると、特徴的な吸収が可視部に見られた。この混合溶液に EDTA を添加すると、この吸収は消失した。

4. 考察

鉄(III)/カフェ酸混合溶液の可視吸収スペクトルを測定すると、特徴的な吸収が可視部に見られた。この混合溶液に EDTA を添加すると、この特徴的な吸収は消失した。このことから、この特徴的な吸収は鉄(III)/カフェ酸の錯体によるものであることが示唆された。カフェ酸によるラジカル生成の阻害は、鉄(III)/カフェ酸の錯体形成によるものであることがわかった。

鉄(II)/ α -ピコリン酸混合溶液の可視吸収スペクトルを測定すると、特徴的な吸収が可視部に見られた。この混合溶液に EDTA を添加すると、この特徴的な吸収は消失した。このことから、この特徴的な吸収は鉄(II)/ α -ピコリン酸の錯体によるものであることが示唆された。 α -ピコリン酸によるラジカル生成の促進は、鉄(II)/ α -ピコリン酸の錯体形成によるものであることがわかった。

【結語】

ラット肝ミクロソーム/鉄(III)/ADP/NADPH 反応溶液におけるラジカルの生成は、カフェ酸とその他のポリフェノール化合物により阻害されることがわかった。またラット肝ミクロソーム/鉄(III)/NADPH 反応溶液におけるラジカルの生成は、 α -ピコリン酸とその関連化合物により促進されることがわかった。このラジカル生成の阻害および促進は鉄イオンに対するキレート効果によるものであることがわかった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成23年6月9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。

カフェ酸やクロロゲン酸はコーヒー豆、じゃがいも、リンゴなど多くの食品に含まれている。カフェ酸やクロロゲン酸は酸化ストレスに対する防御的な働きを持つと言われている。一方、 α -ピコリン酸はトリプトファン代謝産物であり、その誘導体であるキノリン酸は神経毒性や炎症に関与すると言われている。本論文は、カフェ酸やクロロゲン酸の酸化ストレスに対する防御的作用と、 α -ピコリン酸やキノリン酸の神経毒性あるいは炎症との関与についてのメカニズムを解明するために、カフェ酸やクロロゲン酸、 α -ピコリン酸やキノリン酸が、ラット肝ミクロソーム/ADP/鉄(III)/NADPH 反応溶液中のラジカル生成に与える影響について検討したものである。

実験の結果、ラット肝ミクロソーム/ADP/鉄(III)/NADPH 反応溶液中のラジカル生成は、カフェ酸やクロロゲン酸により阻害され、 α -ピコリン酸やキノリン酸により促進された。金属キレート剤である EDTA 存在下ではこれらの阻害あるいは促進作用は観測されなかった。

鉄(III)/カフェ酸混合溶液、鉄(II)/ α -ピコリン酸混合溶液の可視吸収スペクトルを測定すると、両溶液にそれぞれ特徴的な吸収が可視部に見られた。これらの混合溶液に EDTA を添加すると、それぞれの特徴的な吸収は消失した。この特徴的な吸収は鉄(III)/カフェ酸、鉄(II)/ α -ピコリン酸の錯体によるものであることが示唆された。以上より、カフェ酸あるいは α -ピコリン酸によるラット肝ミクロソーム/ADP/鉄(III)/NADPH 反応溶液中のラジカル生成の阻害あるいは促進は、鉄(III)/カフェ酸、鉄(II)/ α -ピコリン酸の錯体形成を通じた鉄イオンに対するキレート効果によるものと考えられ

た。

本研究で明らかとなったカフェ酸やポリフェノールによるラジカル生成阻害効果は、赤血球膜の酸化障害、エタノール誘導性脂肪肝、冠動脈心疾患、炎症反応などに対する防御的な働きとの関連を示唆するものである。また、 α ピコリン酸やキノリン酸によるラジカル生成促進効果は、これらの神経毒性や炎症反応機構への関与を示唆するものである。

以上より本論文は、天然由来鉄イオンキレート物質によるラジカル制御機構を明らかにしたものであり、その医学的関連の重要性から学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第448号		
学位授与の日	平成23年7月12日		
氏名	坂本恵子		
学位論文の題目	Cardiovascular responses to arm static exercise in men with thoracic spinal cord lesions (男性胸髄損傷者における上肢静的運動時の循環反応)		
論文審査委員	主査	教授 吉田宗人	
	副査	教授 近藤智善	教授 田島文博

論文内容の要旨

【緒言】

運動時の血流再配分に関する研究については、健常者の動的運動時に運動筋に優先的に血流を供給する血流再配分システムが知られている。しかし、筋緊張を維持する静的運動時血流再配分は健常者でも不明な部分が多く、我々が積極的なスポーツ参加を促す胸髄損傷対麻痺者においては全く報告がない。胸髄損傷者では、抵抗血管支配交感神経活動は健常部で正常だが、麻痺部では障害されている。したがって、胸髄損傷者を対象に静的運動時の血流再配分について調査すれば、胸髄損傷者のみならず、健常者における運動時血流再配分のメカニズムについて新たな知見を得る事が期待される。今回は胸髄損傷者に静的運動を負荷し、平均血圧、心拍数、心拍出量、総末梢血管抵抗、麻痺部皮膚血流量、筋血流量、循環血液中ホルモンを測定した。

【方法】

被験者は7名の健常男性と7名の男性胸髄損傷者（ASIA分類A）とした。ヘルシンキ宣言に基づき、被験者には実験の目的、方法および危険性を書面と口頭で十分に説明し、実験参加の同意を得た。被験者は背臥位で2分間安静時測定を行い、その後2分間最大筋力の35%強度で右肘屈曲持続静的運動を負荷した。運動終了後再び4分間安静臥床とし回復期の測定を行った。平均血圧、心拍数、心拍出量、下肢皮膚血流量と筋血流量は実験中継続して測定し、総末梢血管抵抗は平均血圧と心拍出量から算出した。循環血液中ホルモンは安静時、運動直後、運動終了後3分に測定し、これらのデータを健常者と胸髄損傷者で比較した。統計学的検討には、ANOVA followed by Turkey-Kramer's multiple comparison testを用い、有意水準5%未満を有意差有りとした。

【結果】

安静時の平均血圧、心拍数、心拍出量、総末梢血管抵抗、下肢の皮膚血流量および筋血流量は健常者と胸髄損傷者では有意差を認めなかった。血圧、心拍数、心拍出量、総末梢血管抵抗、下肢の皮膚血流量、筋血流量は健常者、胸髄損傷者ともに持続筋収縮時、安静時に比べ有意に増加した($P<0.05$)。エピネフリンは安静時においては健常者と胸髄損傷者において有意差はなかったが、運動時に健常者で有意に増加した($P<0.05$)。ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド、レニン活性、バソプレッシンは両群とも有意な変化はなかった。

【考察】

胸髄損傷者は上肢の持続筋収縮時に心拍数と心拍出量は健常者と同様の変化を示した。一般に、運動時心拍数上昇は迷走神経抑制と交感活動亢進の加算的効果の結果であると考えられているが、今回の胸髄損傷者は迷走神経も心臓支配の交感神経も問題がないため、両群ともに心拍数上昇が同様に観察された結果は予想されていた。しかし、平均血圧の上昇は血管支配の交感神経活動亢進によるものであるため、

胸髄損傷者の障害部位以下の血管支配交感神経活動は中枢神経からの支配を逸脱していると考えられる。両群ともに同様に上昇した結果は下位胸髄節からの血管支配交感神経が障害されていても静的運動時昇圧反応は影響を受けないという新たな知見を提示した。そして、この結果は、下位胸髄節からの血管交感神経支配は静的運動時昇圧反応に大きな寄与がないことを示している。

本実験により、上肢の持続筋収縮により両群ともに下肢の皮膚と筋の血流量が増加することが判明した。運動筋や局所の血管拡張による血流量の増加があることは報告されているが、非運動筋の血流が増加することは過去に報告がなく、新たな知見である。これは、心拍出量の増加がそのまま非運動筋へ受動的に配分された結果であると考えられる。臨床的にこの結果は重要で、静的運動は脊髄損傷者の下肢血流を増加させることができる。

本研究では静的運動による観察された。副腎髄質はコリン作動性自律神経節前線維が支配しており、主に胸髄 5-9 番からの神経支配を受けている。本研究での胸髄損傷者は障害部位が第 7 胸髄節以下であったため、副腎髄質への神経支配が一部障害されていると推察され、このため両群に運動時のエピネフリン変化に差が生じたと考えられる。最大筋力の 35% の上肢静的運動は交感神経活動亢進を生じる十分な負荷であったと考えられる。

レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系、バソプレッシン、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドは血圧調節に重要な役割をしているが、最大筋力の 35% での 2 分間の静的運動では有意な変化を認めず、胸髄損傷者の昇圧反応には関与していなかったと考えられる。

【結論】

下部胸髄節交感神経障害がある胸髄損傷対麻痺者には末梢性交感神経障害が存在すると考えられる。結果より、胸髄損傷者は持続等尺運動負荷で両下肢麻痺部に血流量を維持して血流再配分を行っていたことが判明した。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 6 月 28 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

運動時の血流再配分に関する研究については、健常者の動的運動時に運動筋に優先的に血流を供給する血流再配分システムが知られている。しかし、筋緊張を持続する静的運動時血流再配分は健常者でも不明な部分が多く、我々が積極的なスポーツ参加を促す胸髄損傷対麻痺者においては全く報告がない。胸髄損傷者では、抵抗血管支配交感神経活動は健常部で正常だが、麻痺部では障害されており、静的運動時の循環応答に対する影響は不明である。

本論文は胸髄損傷者と健常者を対象に静的運動時血流再配分のメカニズムについて調査することを目的に研究を行ったものである。

その結果、1) 安静時の平均血圧、心拍数、心拍出量、総末梢血管抵抗、下肢の皮膚血流量および筋血流量は安静時健常者と胸髄損傷者では有意差を認めなかった。2) 血圧、心拍数、心拍出量、総末梢血管抵抗、下肢の皮膚血流量、筋血流量は健常者、胸髄損傷者ともに持続筋収縮時、安静時に比べ有意に増加した。3) エピネフリンは運動時に健常者において有意に増加した。ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド、レニン活性、バソプレッシンは両群とも有意な変化はなかった。

結果より、両群において静的運動時の循環応答は同様の変化がみられた。下部胸髄節交感神経障害がある胸髄損傷対麻痺者には末梢性交感神経障害が存在すると考えられるが、胸髄損傷者は両下肢麻痺部でも血流量を維持して下肢への血流再配分を行っていたことは興味深い。以上、本論文は胸髄損傷者と健常者の静的運動時の循環応答を初めて示したものとして、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449号		
学位授与の日	平成23年7月12日		
氏名	梅本安則		
学位論文の題目	Plasma IL-6 levels during arm exercise in persons with spinal cord injury (脊髄損傷者における上肢運動時の血中IL-6動態)		
論文審査委員	主査	教授 近藤稔和	
	副査	教授 吉田宗人	教授 田島文博

論文内容の要旨

【目的】 Pedersen らは、運動負荷が代謝系へ影響する機序として、骨格筋の収縮により産生されるサイトカインである Myokine が重要な役割を果たしている結果を示している。Myokine の1つである IL-6 は、健常者において多機能サイトカインであると知られている。また、IL-6 はこれまで炎症性サイトカインとして知られていたが、運動による IL-6 上昇が、TNF- α などの炎症性サイトカインの上昇なしに IL-1ra や IL-10 などの抗炎症サイトカインの上昇を導く事が報告されている。

これまで脊髄損傷対麻痺者についての IL-6 動態に関する報告はなく、健常者と異なる可能性がある為、脊髄損傷対麻痺者の上肢運動負荷による血中 IL-6 濃度を測定し、健常者と比較検討を行った。

【方法】 対象は、脊髄損傷完全対麻痺者 (SCI) 6 人 (平均年齢: 30.7 \pm 6.9、損傷高位: T6-10)、健常者 (AB) 7 人 (平均年齢: 29.4 \pm 4.0) に上肢エルゴメーターによる運動負荷を行った。運動負荷は最大酸素摂取量の 60% とし、運動時間は 2 時間とした。運動前に安静を取り、運動負荷を 2 時間、その後回復 2 時間をとった。採血は安静時、運動中、運動直後、回復後で行った。測定項目は、血中 IL-6 濃度、TNF- α 、high sensitivity CRP (hs CRP)、myoglobin、adrenalin、noradrenalin、cortisol、血球数とし、また、control study として安静実験を行った。

【結果】 血中 IL-6 濃度で、SCI は、安静時(1.6 \pm 0.6 pg/ml)に比べ、運動 2 時間後(4.3 \pm 1.3 pg/ml)、回復 2 時間後(5.6 \pm 2.0 pg/ml)で有意に上昇した。AB は、安静時(1.2 \pm 0.8 pg/ml) TNF- α は実験を通して変化なく、AB と SCI でも差はなかった。hs CRP も実験を通して変動はなかったが、SCI は AB よりも有意に濃度が高かった。ミオグロビンは、SCI、AB 両群ともに運動終了直後、回復 2 時間後で有意に上昇し、アドレナリンは、AB で運動直後に安静時より有意に上昇した。SCI では上昇は見られなかった。

【考察】 今回の実験で、筋量の少ない脊髄損傷対麻痺者でも、上肢のみの運動により、炎症性サイトカインの上昇なしに血中 IL-6 濃度が上昇する事が初めて証明された。今回の血中 IL-6 動態は、健常者と同じである事から、骨格筋からの産生されている可能性が高い。また、炎症性サイトカインである TNF- α の上昇がない事から、炎症性カスケードによる IL-6 上昇の可能性も低く、アドレナリン濃度が変化しなかった事より、骨格筋のアドレナリン刺激による IL-6 mRNA 転写促進の可能性も低いと考えられる。

SCI は AB に比べ、CRP が高い値であり、脊髄損傷者対麻痺者が慢性炎症状態にあるという過去の報告と一致した。よって、慢性炎症状態にある脊損者に対する IL-6 の抗炎症作用の観点から最適な運動療法を考えていく必要がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 23 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。

この研究は、近年運動による脂質代謝の改善、抗炎症作用を説明する機序の一つと考えられる Myokine について、慢性炎症状態である脊髄損傷者で調査した初めての研究である。慢性炎症状態である脊髄損傷者でも、健常者と同じく運動時の血中 IL-6 濃度が上昇する事が初めて認められた。これは、今後の脊髄損傷者の運動療法を確立するに当たって、非常に重要な知見であり、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450号		
学位授与の日	平成23年9月27日		
氏名	辻岡洋人		
学位論文の題目	Impact of Heterogeneity of Human Peripheral Blood Monocyte Subsets on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction (心筋梗塞後の心筋救済における末梢血単球サブセットの病的意義)		
論文審査委員	主査	教授 岡村吉隆	
	副査	教授 村垣泰光	教授 赤阪隆史

論文内容の要旨

[背景]

最近の研究により、末梢血単球は単一ではなく、2つのサブセットに分類されることが明らかにされた。末梢血単球サブセット (CD14⁺CD16⁻CCR2⁺, CD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺) が心筋梗塞後の心筋救済にどのように関与するかを検討した。

[方法]

連続36人の再灌流療法に成功した心筋梗塞 (AMI) 患者を対象とした。末梢血は心筋梗塞発症後、1, 2, 3, 4, 5, 8, 12 日後に採取した。フローサイトメトリー (FACS) 法を用いて、CD14 抗体、CD16 抗体、CCR2 抗体、CX3CR1 抗体を用いた3重染色により、CD14、CD16、CCR2、CX3CR1 の発現様式の差異により2つのサブセット、すなわち、CD14⁺CD16⁻CCR2⁺単球 (以下炎症性単球)、CD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺単球 (以下非炎症性単球) に分類し、それぞれのピーク値を求めた。心筋救済は発症7日後に心臓MRI法 (T2強調画像で虚血サイズを、遅延造影MRI梗塞サイズを求める) を用いて心筋救済率 (梗塞サイズ/虚血サイズ×100) として求めた。心臓MRIは心筋梗塞発症6ヵ月後にも施行し、慢性期の左室機能の改善 (Δ Ejection fraction) も評価した。

[結果]

末梢血の炎症性単球数は発症2.6±0.8日後に、非炎症性単球数は発症4.8±2.9日後にそれぞれ、ピーク値となった。末梢血の炎症性単球数のピーク値は心筋救済率と有意に逆相関した ($r = -0.68$, $p < 0.001$)。一方、非炎症性単球数のピーク値は心筋救済率とは相関しなかった ($r = 0.13$, $p = 0.47$)。また、末梢血の炎症性単球数のピーク値は6ヵ月後の左室収縮能の改善と有意に逆相関した ($r = -0.60$, $p = 0.001$)。一方、非炎症性単球数のピーク値は6ヵ月後の左室収縮能の改善と相関しなかった。

[結論]

ヒト心筋梗塞においても、二峰性を有する特異的な単球サブセットの動員様式がみられ、また、炎症性単球のピーク値は心筋救済率及び左室収縮機能の悪化に関連した。以上より、末梢血単球の質的差異は、虚血心筋救済に対する新たなバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年11月5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。急性心筋梗塞の多くは冠動脈の粥腫の破綻及びそれに引き続く血栓が形成により冠動脈が閉塞することで発症する。急性心筋梗塞に対する再灌流療法は血行動態を安定させ、心筋壊死量を減らし、心筋梗塞の死亡率を5-10%と劇的に減少させた。しかしながら、心筋梗塞の慢性期に左室リモデリングが起り虚血性心筋症に進展し、心不全による再入院を繰り返す症例及び心不全による死亡率は増加している。この左室リモデリングの機序は、現時点において、十分に解明されていないが、心筋梗塞後に骨髄より障害心筋に動員される炎症細胞の関与が指摘されており、ヒト心筋梗塞後の末梢血単球の増加は、左室機能障害、左室のリモデリングに関与することが報告されている。また、最近の研究では、末梢血単球は単一ではなく、多様性 (炎症性及び非炎症性の二つのサブセット) を有することが明らかにされている。

以上の背景を踏まえ、本研究ではヒト心筋梗塞後の患者において、循環血液中の単球の量的・質的变化と心筋梗塞後の心筋救済及び慢性期の左室機能改善との関連性を検討したものである。結果、ヒト心筋梗塞患者において、末梢血 CD14⁺CD16⁺CCR2⁺単球数（以下炎症性単球）は発症 2.6±0.8 日後に CD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺単球数（以下非炎症性単球）は発症 4.8±2.9 日後にそれぞれピークとなった。末梢血の炎症性単球数のピーク値は心筋救済率と有意に逆相関した($r = -0.68, p < 0.001$)。一方、非炎症性単球数のピーク値は心筋救済率とは相関しなかった($r = 0.13, p = 0.47$)。また、末梢血の炎症性単球数のピーク値は 6 カ月後の左室収縮能の改善と有意に逆相関した ($r = -0.60, p = 0.001$)。一方、非炎症性単球数のピーク値は 6 カ月後の左室収縮能の改善と相関しなかった。

本論文は、ヒト心筋梗塞において、始めて、二峰性を有する特異的な単球サブセットの動員様式がみられ、また、炎症性単球のピーク値は心筋救済率及び左室収縮機能の悪化に関連すること示した。このことは、末梢血単球の質的差異が、虚血心筋救済に対する新たなバイオマーカーとなる可能性を提示したものととして、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451号		
学位授与の日	平成23年9月27日		
氏名	安 君 岭		
学位論文の題目	① Forensic application of intrarenal aquaporin-2 expression for differential diagnosis between freshwater and saltwater drowning. (腎における aquaporin-2 発現の淡水溺死と海水溺死鑑別診断への法医学的応用)		
	② Immunohistochemical examination of intracerebral aquaporin-4 expression and its application for differential diagnosis between freshwater and saltwater drowning. (脳における AQP4 発現の免疫組織化学的解析と、その淡水溺死と海水溺死鑑別診断への応用)		
論文審査委員	主 査	教授 村 垣 泰 光	
	副 査	教授 鶴 尾 吉 宏	教授 近 藤 稔 和

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

法医実務において、死因を明確に診断することは、最も重要な事項の1つである。現在溺死は、剖検所見及び病理組織学的所見、中毒学的所見とプランクトン検査結果に基づいて診断されている。溺死の典型的所見としては、気道内の泡沫、特に鼻口周囲にみられる微細泡沫、著明な肺水腫、胸腔内の液体貯留、肝臓や腎臓からプランクトン 検出があげられる。しかしながら、溺死の診断においては、淡水溺死と海水溺死を鑑別することも重要である。

AQPs は水チャンネル分子で、色々な上皮や内皮細胞に発現している、全身浸透圧を調節することが知られている。現在では、13種類の水チャンネル蛋白(AQP0-12)が同定されている。AQP2 は腎内の主な水チャンネルで、腎集合管主な細胞に発現し、AQP4 は脳内の星状膠細胞に発現している。そこで、本実験は、法医解剖溺死例の腎における AQP2 及び脳における AQP4 の発現を解析し、淡水溺死及び海水溺死の鑑別診断として有用な指標になるかどうかについて検討した。

第一部

【材料と方法】

材料 和歌山県立医科大学法医学教室の剖検例において、明らかに溺死と診断された 51 例の腎組織(淡水溺死 23 例、海水溺死 28 例)及び対照群 19 例の腎組織採取し(死後 3 日以内)、試料として。

方法 免疫染色：腎組織は 10% PBS 緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片(4 μ m 厚)を作製し、一次抗体に抗 AQP1、AQP4 ウサギポリクローナル抗体及びヒツジ AQP2 ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。さらに染色後、各切片について任意に 10 視野選択し(400 倍)、1 視野当たりの全腎管数に対する AQP1 陽性近位尿細管、AQP2 及び AQP4 陽性集合管数の割合を求め、その 10 視野の平均値を AQP1、AQP2 及び AQP4 発現量とした。さらに、顕微鏡下で各切片において無作為に選んだ 100 個の糸球体における AQP1 陽性数を数えた。

【結果】

腎の全例で、近位尿細管、糸球体に AQP1 陽性所見及び集合管に AQP4 陽性所見を認めたが、腎における AQP1 及び AQP4 発現を淡水溺死、海水溺死及び対照群に比較して統計的有意差が認められなかった。また、淡水溺死例の全例で、腎集合管の細胞膜及び細胞質に AQP2 陽性所見を認めた。海水溺死例の全例で、腎集合管の細胞膜に強い陽性及び細胞質の弱い陽性所見を認めた。海水溺死群では細胞膜における AQP2 の発現量が淡水溺死群及び対照群に比べて有意に高かった。淡水溺死群では AQP2 の発現量が対照群に比べて有意に低かった。さらに、剖検例の性別、年齢及び死後経過時間は腎内 AQPs

発現に影響を与えなかった。

【考察】

腎における AQP2 の発現量を免疫組織化学的に検索したところ、海水溺死群では淡水溺死群及び対照群に比較して、明らかに AQP2 の発現が増強しており。しかしながら、淡水溺死群では対照群に調べて、明らかに AQP2 の発現が減少しており。法医実務において、腎における AQP2 の免疫組織化学的検索が、淡水溺死及び海水溺死の鑑別診断のための有益な一つの指標となることを明らかにした。

第二部

【材料と方法】

材料 脳組織(淡水溺死 22 例、海水溺死 26 例及びコントロール 22 例)を計 70 個採取し、試料とした(死後経過時間 3 日以内)。

方法 脳組織は 10% PBS 緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片(4 μ m 厚)を作製し、一次抗体に抗 AQP1 及び AQP4 ウサギポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。さらに、蛍光二重免疫染色法を用いて、AQP1 及び AQP4 発現細胞の同定を行った。

染色結果について、各切片ごとに任意で 10 視野選択し(400 倍)、1 視野当たりの AQP1、AQP4 及び細胞核にヘマトキシリンとともに陽性所見の星状膠細胞数を求めて、10 視野の平均陽性星状膠細胞数を AQP1 及び AQP4 発現量とした。また、蛍光二重免疫染色各切片について任意に 10 視野(400 倍)における AQP1 陽性且つ CD31 陽性の血管の平均数を数えた。

【結果】

脳の全例で、GFAP 陽性星状膠細胞に AQP1 及び AQP4 陽性所見を認めた。さらに血管内皮に AQP1 陽性所見も認められた。星状膠細胞、血管内皮ともに AQP1 の発現量が淡水溺死、海水溺死及びコントロール例に比べて有意に認めなかった。一方、淡水溺死例では、AQP4 の発現量が海水溺死例及びコントロール例に比べて有意に高かった。海水溺死例では、AQP4 の発現量がコントロール例に比べて有意に低かった。さらに、剖検例の性別、年齢及び死後経過時間は脳内 AQP の発現に影響を与えなかった。

【考察】

淡水溺死例における脳組織においては AQP4 の発現量が有意に高いことが示され、海水溺死例における脳組織においては AQP4 の発現量が有意に低いことが示され。法医実務において、AQP4 の脳における発現を免疫組織化学的検索することが淡水溺死及び海水溺死の鑑別診断のための有益な一つの指標となることを明らかにした。

【結論】

本論文は腎における AQP2 と脳における AQP4 の免疫組織化学的検索が、淡水溺死及び海水溺死の法医病理学的鑑別診断のための有用な指標となることが示された。

審査の要旨(審査の日、方法、結果)

平成 23 年 6 月 24 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。

法医実務において、死因を明確に診断することは最も重要な事項である。現在、溺死は剖検所見、病理組織学的所見、中毒学的検査結果及びプランクトン検査結果に基づいて診断されている。しかしながら、溺死においては、淡水溺死及び海水溺死の鑑別診断することも重要である。

Aquaporin(AQP)は水チャンネル分子で、色々な上皮や内皮細胞に発現し、全身浸透圧を調節することが知られており、現在、13 種類の AQP が同定されている。本研究では、法医解剖の溺死例の腎における AQP2(第一部)及び脳における AQP4(第二部)の発現を免疫組織化学的に解析し、淡水溺死及び海水溺死の鑑別診断として有用な指標になるかどうかについて検討した。

第一部

溺死 51 例(淡水群 23 例、海水群 28 例)及び対照群 19 例の腎組織を採取し(いずれも死後経過時間 3 日以内)、抗 AQP1、抗 AQP2 及び抗 AQP4 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、腎では近位尿細管と糸球体に AQP1 陽性及び集合管に AQP4 陽性所見を認めたが、腎における AQP1 及び AQP4 発現について、淡水溺死、海水溺死及び対照群の間で有意差はなかった。一方、AQP2 は腎集合管の細胞

膜及び細胞質に陽性所見を認め、海水溺死群では細胞膜におけるAQP2の発現量が淡水溺死群及び対照群に比べて有意に高かった。

第二部

溺死 48 例(淡水群 22 例, 海水群 26 例)及び対照群 22 例の脳組織を採取し(いずれも死後経過時間 3 日以内)、抗 AQP1 及び抗 AQP4 抗体を用いて免疫染色を行った。脳組織では、GFAP 陽性星状膠細胞に AQP1 及び AQP4 陽性所見を認めた。さらに血管内皮にも AQP1 のみに陽性所見が認められた。星状膠細胞、血管内皮ともに AQP1 の発現量について、淡水溺死、海水溺死及び対照群の間で有意差はなかった。一方、淡水溺死例では、AQP4 の発現量が海水溺死例及び対照群に比べて有意に高かった。海水溺死例では、AQP4 の発現量がコントロール例に比べて有意に低かった。

以上より、本論文は腎における AQP2 と脳における AQP4 の発現を免疫組織化学的に解析することが、淡水溺死及び海水溺死の法医病理学的鑑別診断に有用となることが示され、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第452号		
学位授与の日	平成23年10月11日		
氏名	河崎 敬		
学位論文の題目	Renal function and endocrine responses to arm exercise in euhydrated individuals with spinal cord injury (脊髄損傷者における自由飲水下での上肢運動時腎機能及び内分泌応答)		
論文審査委員	主査	教授 重松 隆	
	副査	教授 原 勲	教授 田島 文博

論文内容の要旨

【緒言】多くの脊髄損傷完全対麻痺者（脊損）は運動・感覚障害と共に自律神経障害を持つ。神経因性膀胱は水腎症をもたらし、慢性腎不全に陥ることもあり、腎機能に障害を与える因子を極力排除する必要がある。

一方、脊損には運動の習慣化が不可欠であるが、健常者の下肢運動を対象とした研究では運動により糸球体濾過率が低下し、脊損において運動による糸球体濾過率低下が危惧される。したがって、T6～L1 障害脊損における運動時腎機能応答の知見は重要であるが、報告がない。また、健常者の運動時腎機能調節の一端を知るためにも興味深い。本研究の目的は、脊損の上肢運動に対する腎機能応答と利尿に関与する内分泌応答を観察し、その生理学的影響を明らかにすることである。

【方法】脊損男性 11 名（脊損群、損傷高位 T6-L1）と、対照として健常成人男性 14 名（健常群）を被験者とし、上肢エルゴメーターによる運動負荷を行った。負荷量は最大酸素摂取量の 60%とした。運動前に 1 時間の安静をとり運動負荷を 2 時間、その後回復を 2 時間行った。水和状態を一定にするため、測定の前日 22 時に 500ml の水分摂取を行い、その後は絶飲食とし、実験開始後は水道水による自由飲水のみ許可した。また、安静座位を 5 時間維持する対照実験（TC）を行った。1 時間毎に血圧測定、採血、採尿を行い、アドレナリン（P_{ad}）、Na、浸透圧、レニン活性（PRA）とアルドステロン（P_{ald}）、hANP、ADH を測定し、C_{cr}、C_{osm}、C_{H2O} と Na 排泄量、FE_{Na} を測定・算出した。

【結果】両群で、運動中の平均血圧、飲水量、尿流量、Na、血漿浸透圧は変化しなかった。両群とも PRA は運動終了後に有意に増加、P_{ald} と hANP は運動中に有意に増加し、運動終了後に運動前レベルに回復した。また、運動終了直後の脊損群の P_{ald} は健常群より有意に高値であった。ADH は運動終了直後に健常群で有意に増加したが脊損群では変化しなかった。FE_{Na} は両群とも運動による変化は見られなかったが、運動終了直後、運動終了 2 時間後で脊損群が健常群に比して有意に低い値となった。運動中 C_{cr}、C_{osm} と C_{H2O} は両群ともに変化しなかった。

【考察】脊損群の運動中の腎機能応答は健常群と同様であり、2 時間の 60% VO_{2max} 上肢運動は腎機能に影響しないことが判明した。また、今回の研究において運動中 PRA と P_{ald} が増加したにもかかわらず FE_{Na} が一定であった結果は過去の研究では認めなかった。過去の健常群を対象とした運動負荷実験では飲水を禁止し、脱水状態のもとで腎機能の変化を見ているため、FE_{Na} が低下した。しかし本研究では、脱水の影響を排除し、運動そのものが腎機能に及ぼす影響を観察するために自由飲水とした。その結果、尿流量が維持され、尿細管での Na 濃度が相対的に低下し、再吸収が脱水の加わった状態より亢進せず、FE_{Na} が低下しなかったと推察される。運動中の PRA 動態は両群とも同様であったが、P_{ald} は運動中脊損群で有意に高値であった。P_{ald} の上昇は下部交感神経系の損傷下でも腎機能を維持しようと適応した結果の可能性はある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 9 月 22 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。本研究は、運動習慣の必要性が広く社会に認知されつつある脊髄損傷者の運動時の腎機能、内分泌応答について初めて調査した研究である。過去に行われた健常者に対する運動負荷研究との大きな差異は、運動中に自由飲水を行ったことであり、そのことが健常者においても運動中の C_{cr} 低下を招かなかったものと推察される。アドレナリン、アルドステロン動態については健常者との差異は認められたものの、運動中腎機能に悪影響となるような変化は認められなかった。この結果より、自由飲水を行うことで脊髄損傷者は運動中に腎機能の悪化は招かないことが判明した。また、アドレナリン、アルドステロン動態の差異については、下部交感神経活動障害がその一因であることが示唆された。

以上、本論文は脊髄損傷者の運動時の腎機能、内分泌応答を初めて示したものとして、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453号		
学位授与の日	平成23年10月11日		
氏名	井澤 眞沙江		
学位論文の題目	Combination of transcranial sonography, olfactory testing, and MIBG myocardial scintigraphy as a diagnostic indicator for Parkinson's disease (パーキンソン病診断における経頭蓋超音波検査、嗅覚機能検査、MIBG 心筋シンチグラフィの有用性について)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 赤阪 隆史	教授 近藤 智善

論文内容の要旨

緒言

パーキンソン病 (PD) は、臨床症状に基づいて診断される。発症早期には他のパーキンソニズムを呈する疾患との鑑別が、しばしば難しいことがある。発症早期の PD 患者を正確に診断・治療することが求められる中で、PET / SPECT による神経伝達機能の評価や、I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィなどが PD 診断の補助検査として認知されてきている。

一方、PD 患者の中脳黒質は経頭蓋超音波検査 (Transcranial Sonography: TCS) で高輝度を示すことが EU 諸国を中心に報告されており、また PD の病初期から認める嗅覚低下についても研究が蓄積されるなど、PD のバイオマーカーが近年注目されている。しかし本邦では、TCS や嗅覚機能検査は、PD 診断のための検査としてほとんど認知されていないのが現状である。

本研究では、TCS と OSIT-J、I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィを合わせて施行し、診断的補助検査としてより有効な組み合わせについて検討した。

対象と方法

外来通院中の PD 患者 33 名 (平均年齢 64.8±8.4 歳、女性 16 名、男性 17 名)、コントロール 32 名 (平均年齢 57.3±13.9 歳、女性 15 名、男性 17 名) を対象とした。対象者には、頭部外傷や耳鼻科的疾患の既往がないことを確認した。PD 患者の罹病期間は 3 ヶ月から 13 年であった (平均 4.6±3.8 年)。重症度は the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS part III) で 0 点から 40 点 (平均 14.7±10.5 点) であった。

TCS

標準的設備として、超音波診断装置と 1.5~3MHz の低い周波数のプローブを用意し、エコー深度を 15~16cm に設定する。患者は仰臥位になり、検者はその頭側に座る。検査は両側の側頭骨に垂直にプローブをあてて行う。このときプローブを、眼窩中心と外耳孔を結ぶ眼窩耳孔線 (orbitomeatal line) と垂直になるようにあてると、脳底槽の高輝度に囲まれた、蝶形の中脳を観察できる。この中に、両側性の斑状または帯状の超音波輝度をもつ構造物として黒質が描出される。この黒質超音波輝度の輪郭を手動で描き、自動的に計算された面積を黒質高輝度面積として用いた。

OSIT-J

嗅覚機能は、OSIT-J (Odor Stick Identification Test for Japanese, 第一薬品産業株式会社) を用いて評価した。OSIT-J は、日本人になじみ深い 12 種類のおいから構成されている。おいを嗅いで、カードに書かれた 4 種類の選択肢のうちから正解を選ぶ。12 種類のうち 8 種類までしか正答できなければ嗅覚低下と評価する。

I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィ

I¹²³-MIBG を 111 MBq 安静時に静注し、15~30 分後心臓に集積された像 (早期像) を撮像する。正面プラナー像で、心臓 (H) と上縦隔 (M) に関心領域 region of interest (ROI) を設定し、バックグ

ラウンドに相当する上縦隔 ROI の平均カウントに対する心臓 ROI の平均カウントの比率 (H/M 比) を求める。我々のグループでは、早期像での H/M 比のカットオフ値を 1.66 (mean-2SD) に設定している。

結果

PD 診断における TCS の感度は 78.8%、特異度 93.8%、陽性的中度 92.6%、陰性的中度 81.1%であった。OSIT-J の感度は 84.8%、特異度 78.1%、陽性的中度 77.8%、陰性的中度 82.7%であった。I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの感度は 60.6%であった。2 つの検査の組み合わせでは、少なくともいずれか一方が陽性である場合に「陽性」と判定すると、TCS と OSIT-J を組み合わせでは、感度 100%、特異度 71.9%、陽性的中度 78.6%、陰性的中度 100%であった。TCS と I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの感度は 91.2%、または OSIT-J と I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの組み合わせでは、いずれも感度は 87.1%であった。

TCS、OSIT-J、I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの結果と、罹病期間または重症度 (UPDRS part III) との間に、それぞれ明らかな相関関係は認めなかった。2 検査間の相関について調べたところ、TCS と OSIT-J または TCS と I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの検査結果の間には相関関係は認められなかったが、OSIT-J と I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの結果の間には相関関係が認められた。これらは過去の報告と一致する結果であった。

結語

発症早期の PD では、臨床症状のみから診断することがしばしば困難である中で、TCS、OSIT-J、I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーといった診断的補助検査はきわめて有用と考えられる。今回の研究結果より、これらのうち TCS と OSIT-J の組み合わせが、診断的補助検査としてより優れていることが分かった。TCS、OSIT-J は、いずれも非侵襲的で、手技が簡便なうえに、コストも安いことから、パーキンソン病のスクリーニング検査としてベッドサイドで行うのに適していると考えられる。

近年、早期にドパミン系作動薬やその他の治療を開始することが、予後の改善につながることを示唆した報告がなされている。このような治療開始時期の早期化への潮流のなかで、早期診断のための補助検査への関心が高まるであろうと予想される。

今後は多施設で研究を行い、TCS の手技基準を作ることや、検査の有用性を再評価することが必要になると考える。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成23年9月26日論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

パーキンソン病 (PD) は、臨床症状に基づいて診断されるが、発症早期には他のパーキンソニズムを呈する疾患との鑑別がしばしば困難である。このため発症早期の PD 患者を正確に診断するための補助検査として PET / SPECT によるドパミン神経終末機能の評価や、I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーなどが注目されている。これらに加えて、経頭蓋超音波検査 (Transcranial Sonography: TCS) により描出される黒質の高輝度は、PD 患者に特徴的な所見であるとする報告や PD の病初期から認める嗅覚機能低下についても研究が蓄積されつつある。しかし本邦では、TCS や嗅覚機能検査は、PD 診断のための検査としてはほとんど認知されていないのが現状である。本研究では、TCS と嗅覚機能検査、I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーを合わせて施行し、診断的補助検査としてより有効な組み合わせについて検討した。

外来通院中の PD 患者 33 名、コントロール 32 名を対象とし、TCS、嗅覚機能検査 (Odor Stick Identification Test for Japanese: OSITJ)、¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィー (MIBG) を施行した。本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

その結果、PD 診断における TCS の感度は 78.8%、特異度 93.8%、陽性的中度 92.6%、陰性的中度 81.1%であった。OSIT-J の感度は 84.8%、特異度 78.1%、陽性的中度 77.8%、陰性的中度 82.7%で

あった。I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの感度は 60.6%であった。2 つの検査の組み合わせでは、少なくともいずれか一方が陽性である場合に「陽性」と判定すると、TCS と OSIT-J を組み合わせでは、感度 100%、特異度 71.9%、陽性的中度 78.6%、陰性的中度 100%であった。TCS と I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの感度は 91.2%、OSIT-J と I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの組み合わせでは感度は 87.1%であった。TCS と OSIT-J、TCS と I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの間に相関関係は認めなかったが、OSIT-J と I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの間には相関関係が認められた。

以上より、本論文は、TCS、OSIT-J、I¹²³-MIBG 心筋シンチグラフィーの中で、非侵襲、低コストで簡便な検査である TCS と OSIT-J の組み合わせが PD の診断的補助検査として統計学的に最も優れていることを初めて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して認めた。

学位記番号	博(医)甲第454号		
学位授与の日	平成23年11月8日		
氏名	中尾 慎一		
学位論文の題目	The influence of alendronate on spine fusion in an osteoporotic animal model. (骨粗鬆症モデル動物に対する脊椎固定術におけるアレンドロネートの影響)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 鶴尾 吉宏	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

緒言

脊椎固定術は中高年の変性脊椎において広く行われている一般的な手術である。他方、骨粗鬆症患者は中高年に数多く認められ、我国における患者は約 1000 万人と推定される。アレンドロネートは骨粗鬆症の治療のために臨床的に広く使われているため、脊椎固定術でのアレンドロネートの作用を明らかにすることは重要である。しかしながらアレンドロネートの脊椎固定術に対する影響については、一致した見解を得ていない。さらに過去の研究においては、骨粗鬆症モデル動物は選択されておらず、アレンドロネートが骨粗鬆症の脊椎で脊椎固定術にどのような影響を及ぼすかは、まだ知られていない。本研究の目的は、骨粗鬆症モデルラットにおける脊椎固定術でアレンドロネートの影響を明らかにすることである。

材料と方法

Sprague-Dawley ラット雌 46 匹を用い、生後 6 週にて無作為に 2 群に分け、一方に卵巣摘出手術 (OVX 群)、他方に sham 手術 (Sham 群) を行った。術後 8 週で両群のラットの L4-L5 の横突起間に自家尾骨を移植した、そして各群を更に 2 つのサブグループに分け、一方にアレンドロネート (Aln) を、他方には生理食塩水 (Control) を処置当日から週 1 回 8 週間皮下投与した。すなわち、(1) Sham-Control (N=13) : SC 群、(2) Sham-Aln (n=11) : SA 群、(3) OVX-Control (n=11) : OC 群、(4) OVX-Aln (n=11) : OA 群の 4 群を作成した。各群ともに固定術後 8 週で屠殺後、移植部分を摘出し以下の項目について比較検討を行った。

1. 軟 X 線撮影

移植部の骨の形状、量、さらに横突起間に連続した骨の架橋構造の有無による癒合率

2. peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) 撮影

移植部内の骨塩密度 (BMD) の測定及び断面積

3. 生体力学試験

3 点曲げ試験を測定器で行い、付属の software によって計算された最大荷重、剛性

4. 組織学的検査

ヘマトキシリン - エオジン (H&E) 染色にての骨新生、酒石酸塩耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性多核細胞 (=破骨細胞) 数

融合率については、フィッシャーの直接確率計算法を、その他のパラメータについては

Mann-Whitney の U 検定を使用して評価された。P < 0.05 で有意とした。

結果

1. 軟 X 線撮影

Aln を投与された動物の移植部は、Sham 群、OVX 群ともに Control 群よりも X 線画像上陰影が濃く大きくなっていった。融合率は、4 群間で統計学的に有意な差を認めなかった。

2. pQCT 撮影

移植部の骨密度については各群間で差は認めなかった。移植部の骨の断面積は Sham 群、OVX 群

ともに Aln 投与群で有意に大きくなっていた。

3. 生体力学試験

横突間癒合骨の三点の屈曲試験の結果では、剛性に関しては、各群間で有意差が認められなかった。また、最大荷重については、OA 群の値が OC 群に比し有意に大きくなっていた。SC 群と SA 群の間には有意な差は認められなかった。

4. 組織学的検査

癒合骨域の傍矢状断片の組織学的検査では、SC、SA、OA 群において移植骨周辺で旺盛に骨新生が認められ、移植骨と連続していた。OC 群においては、多くの炎症細胞が移植骨の周囲に集り、移植骨は他群に比し多く再吸収されており、骨新成も旺盛ではなかった。

TRAP で染色される断片で、OC 群の破骨細胞の数は、SC 群と比較すると有意に増加した。

そして、OA 群の破骨細胞の数は OC 群より有意に少なく、アレンドロネートが OVX ラットで破骨細胞の数を減少させていた。

考 察

本研究において、力学試験で癒合骨の強度を数値化したところ、質的（剛性）に変わらない骨が、多く作られることにより結果的に力学的強度（最大荷重）を増加させていた。組織学的検査においても Aln は骨形成を抑制することはなく、骨粗鬆症モデルラットにおいては、むしろ Aln 投与群において旺盛な骨新生が認められた。In vitro ではアレンドロネートが骨芽細胞分化を促進するとして報告もあり、特に骨粗鬆症モデルラットにおいて、破骨細胞と骨芽細胞のバランスでは、アレンドロネートが骨芽細胞優性を作ったことを示唆された。その骨脆弱性のため、確実な脊椎固定術を骨粗鬆症の脊椎において成し遂げることは難しい。骨粗鬆症は過剰な骨吸収によって骨リモデリングのバランスが崩れる全身性疾患であるので、これは骨新成を難しくする可能性がある。本研究においても、移植された骨は過度に再吸収され、骨新成は骨粗鬆症のラットで乏しかった。

本研究は、アレンドロネートが骨粗鬆症の動物モデルで脊椎固定術の成功を誘導することを示唆した。しかしながら、骨折治癒に関しては、アレンドロネートが骨の成熟を阻害するという報告もあり、脊椎固定術においても初期の強度が上がるものの成熟を遅延させる可能性もある。人骨のアレンドロネートの半減期が 12 年と推定されており、アレンドロネートの中断は効果がないと考えられる。アレンドロネートによって大きくなった癒合骨をどのように成熟させていくか、更なる研究が必要であると考えられる。

結 論

移植骨の多くが再吸収されなかったにもかかわらず、アレンドロネートは骨粗鬆症の動物で骨新形成を増加させることによって力学的強度を増した。我々のデータに基づいて、脊椎固定を受けている骨粗鬆症患者は、アレンドロネートを服用すべきと考える。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 10 月 21 日 論文審査委員会は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。脊椎固定術は中高年の変性脊椎において行われている一般的な手術である。他方、骨粗鬆症患者は中高年に多く認められ、我が国における患者は約 1000 万人と推定される。アレンドロネート(Aln)は骨粗鬆症治療のために広く使われているため、脊椎固定術の適応がある患者に投与されている例は多いと考えられる。Aln は、骨折予防効果に関する論文が数多く認められる有力なビスホスホネートであるが、脊椎固定術に対する影響については一致した見解を得ない。さらに過去の研究においては、骨粗鬆症モデル動物が使用されておらず、Aln が骨粗鬆症の脊椎で固定術にどのような影響を及ぼすかはまだ知られていない。本研究では、骨粗鬆症モデルラットにおける脊椎固定術に対する Aln の影響を検討した。

SD ラット雌 46 匹を 2 群に分け、一方に卵巣摘出手術(OVX 群)、他方に sham 手術 (Sham 群)

を行った。術後 8 週で両群のラットの L4-L5 の横突起間に自家尾骨を移植した、そして各群を更に 2 つのサブグループに分け、一方に Aln を、他方には生理食塩水を投与した。4 群ともに固定術後 8 週で屠殺後、移植部分を摘出し、軟 X 線撮影、peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) 撮影、生体力学試験、組織学的検査を行い、比較検討した。

その結果、軟 X 線撮影検査と pQCT によって横突起間では骨密度に差のない骨組織が、Sham 群、OVX 群ともに Aln 投与動物において対照より有意に大きくなっていることがわかった。力学試験において癒合骨の強度を数値化したところ、骨粗鬆症モデル動物においては、質的（剛性）に変わらない骨が、多く作られることにより結果的に力学的強度（最大荷重）を増加させていた。組織学的検査においても Aln は骨形成を抑制することはなく、骨粗鬆症モデルラットにおいては、むしろ Aln 投与群において旺盛な骨新生が認められた。

その骨脆弱性のため、確実な脊椎固定を骨粗鬆症脊椎において成し遂げることは困難であるが、本研究は、アレンドロネートが骨粗鬆症の動物モデルで脊椎固定術の成功を誘導することを示唆した点において意義深く、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455号		
学位授与の日	平成23年12月13日		
氏名	田村 耕一		
学位論文の題目	Hollow spheroids beyond the invasive margin indicate the malignant potential of colorectal cancer (大腸癌浸潤先進部における分化型癌細胞巢の悪性度との関連)		
論文審査委員	主査	教授 一瀬 雅夫	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

緒言

大腸癌の転移や予後を予測する臨床病理学的因子として、簇出など様々に検討されてきた。簇出は先進部間質に存在する5個未満の癌細胞から成る未分化な癌細胞巢と定義され、転移や予後との関連が報告されている。大腸癌浸潤先進部には未分化な癌細胞巢のほかに、管腔を伴う球体である分化型癌細胞巢(Hollow spheroid, 以下HS)が存在する。しかしながら、このHSと臨床病理学的因子に関する検討は現在まで行われていない。一方、このHSの形態形成に関与する可能性のある接着分子としてCEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1)があげられ、乳癌培養細胞において上皮細胞の極性と中心細胞のapoptosisを誘導し、HSを引き起こしていることが報告されており、大腸癌においても同様なメカニズムが存在する可能性がある。

本研究では大腸癌浸潤先進部に存在するHSの形態とCEACAM1発現について評価し、さらに、HSの臨床病理学的意義について検討する。基礎的検討として、CEACAM1の発現およびisoform balanceの変化と大腸癌の管腔形成能の関連について検討する。

目的と方法

① 臨床的研究

1. 大腸癌浸潤先進部におけるHSの存在とCEACAM1の発現について

和歌山県立医科大学附属病院第2外科にて2002年1月から2003年12月までに手術を施行した大腸癌164症例を対象として、H.E染色および免疫染色を施行した。大腸癌浸潤先進部のHSを確認し、その形態を連続切片にて評価した。免疫染色では、一次抗体としてCEACAM1 monoclonal抗体とCEACAM1のlong (CEACAM1-L)またはshort (CEACAM1-S) cytoplasmic domain isoformに特異的なpolyclonal抗体を使用し、CEACAM1の発現分布とisoform balanceについて検討した。球体の中心部のapoptosisによりHSが形成されていることを確認するため、apoptosisのマーカーであるM30抗体(cleaved cytokeratin 18)を使用し、大腸癌の臨床検体内においても乳癌培養細胞で報告されているメカニズムによりHS形成が引き起こされていることを確認する。

2. 大腸癌浸潤先進部のHSの臨床的意義

和歌山県立医科大学附属病院第2外科にて2002年1月から2005年8月までに手術を施行した大腸癌314症例を対象として、臨床病理学的因子を検討した。統計学的処理として、リンパ節転移と遠隔転移との相関はロジスティック回帰モデルで、予後との相関はCoxハザードモデル、およびKaplan-Meier法で検討した。

② 基礎的研究

CEACAM1を中等度発現する大腸癌培養細胞(HT29)にCEACAM1-LまたはCEACAM1-Sを強制発現させ、3次元培養系(マトリゲル)で経時的な管腔形成能を調べた。また、CEACAM1-Lを強く発現する大腸癌培養細胞(LS174T)にCEACAM1のshRNAにて発現抑制、またはCEACAM1-Sを強制発現させ、3次元培養系で経時的な管腔形成能を調べた。

結果

①臨床的研究

1. 大腸癌浸潤先進部におけるHSの存在とCEACAM1の発現について

大腸癌浸潤先進部で原発巣から離れた部位に、HSが存在しているのを確認した。この部位の連続切

片にて、その形態が tube 状ではなく、中空を伴う球体であることを確認した。さらに、全例において CEACAM1 が HS の管腔表面と管腔内に発現し、CEACAM1-L が優位な細胞内ドメインであることを確認した。中心部の細胞が M30 により染色されることから、中心細胞の apoptosis により形態が形成されていることを確認した。

2. 大腸癌浸潤先進部の HS の臨床的意義

100 倍視野において先進部以深の部分に 1 個以上の HS が存在するものを HS 陽性と定義し検討したところ、大腸癌症例 314 例のうち、96 例 (30.6%) に HS を認め、131 例 (41.7%) に簇出を認めた。リンパ節転移に関する多変量解析でリンパ管侵襲陽性 ($p=0.001$; OR 4.170) と HS 陽性 ($p<0.001$; OR 5.407) が独立予測因子となった。遠隔転移に関する多変量解析で簇出陽性 ($p=0.005$; OR 2.840) と HS 陽性 ($p<0.001$; OR 6.334) が独立予測因子となった。全生存に関する多変量解析で遠隔転移陽性 ($p<0.001$; HR 3.799) と HS 陽性 ($p=0.001$; HR 2.849) が独立危険因子となった。Kaplan-Meier 法では、HS 陽性群は有意に生存期間が不良であった ($p<0.0001$, 5 年生存率 44.8%)。

②基礎的研究

大腸癌培養細胞株の管腔形成における CEACAM1 の役割

HT29 細胞は CEACAM1 を中等度発現する細胞株であり、isoform バランス変化の影響を検討した。HT29 細胞に CEACAM1-L を強制発現すると経時的な管腔形成能は有意に増強し、CEACAM1-S を強制発現すると管腔形成能は有意に減弱した。CEACAM1-L を強く発現する LS174T 細胞は 3 次元培養系において HS を形成する特性を有する。この LS174T 細胞に CEACAM1 shRNA を遺伝子導入し、CEACAM1 を knock down させると経時的な管腔形成能は有意に減弱した。さらに LS174T 細胞に CEACAM1-S を遺伝子導入すると CEACAM1-L の発現は減弱し、経時的な管腔形成能は有意に減弱した。

考察

大腸癌浸潤先進部に存在する低分化癌細胞巣である簇出は転移や予後との関連が報告され、悪性度の指標として使われている。HS は、簇出が増殖し間葉上皮移行することで形成される形態と考えられる。本研究では、この簇出よりも転移や予後と相関する HS の存在および臨床的意義を明らかにし、大腸癌の悪性度診断に有用であることが示唆された。

CEACAM1 は上皮細胞や血球性細胞、血管内皮細胞に発現する I 型膜貫通型糖蛋白であり、Immunoglobulin superfamily および CEA family に属する接着分子である。大腸癌において CEACAM1 は腺腫や早期大腸癌では発現が低下することが報告されていたが、最近では進行大腸癌で再度発現すると報告されている。これまでに我々は大腸癌において表層部よりも浸潤先進部で CEACAM1 の発現が増強することを確認し、さらに CEACAM1-L が優位に発現している大腸癌は、浸潤能・遊走能が増強し転移や予後の危険因子であることを確認してきた。本研究では CEACAM1-L を発現する浸潤性大腸癌が大腸癌先進部の HS を形成することを明らかにした。さらに、培養細胞を用いた研究から、HS の形態は CEACAM1 の isoform balance によってコントロールでき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23年11月15日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

大腸癌の転移や予後を予測する臨床病理学的因子として、簇出のほかに管腔を伴う球体である分化型癌細胞巣 (Hollow spheroid; 以下 HS) が存在することと、その形態形成に接着分子である CEACAM1 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) が関与している可能性があることに着目し、大腸癌浸潤先進部に存在する HS の形態と CEACAM1 発現について評価し、臨床病理学的意義について検討した。

大腸癌手術症例 314 症例を対象に、H.E 染色または免疫染色を施行した。大腸癌浸潤先進部の HS を確認し、その形態を連続切片にて評価した。免疫染色では、一次抗体として CEACAM1 monoclonal 抗体と CEACAM1 の long (CEACAM1-L) または short (CEACAM1-S) の細胞内ドメインに特異的な polyclonal 抗体、apoptosis のマーカーである M30 抗体 (cleaved cytokeratin 18) を使用した。さらにこの 314 症例の臨床病理学的因子を検討した。CEACAM1 を中等度発現する大腸癌培養細胞 (HT29) に CEACAM1-L または CEACAM1-S を強制発現させ、CEACAM1-L を強く発現する大腸癌培養細胞 (LS174T) に CEACAM1 の shRNA にて発現抑制、または CEACAM1-S を強制発現させ、3 次元培養系で経時的な管腔形成能を調べた。

100 倍視野において先進部以深の部分に 1 個以上の HS が存在するものを HS 陽性と定義し検討した

ところ、314 例中、96 例(30.6%)に HS を認め、131 例(41.7%)に簇出を認めた。HS を認める部位の連続切片にて、その形態が tube 状ではなく、中心細胞の apoptosis により中空を伴う球体であること、CEACAM1-L が優位な細胞内ドメインであることを確認した。臨床病理学的にはリンパ節転移に関してリンパ管侵襲陽性(p=0.001; OR 4.170)と HS 陽性(p<0.001; OR 5.407)、遠隔転移に関して簇出陽性(p=0.005; OR 2.840)と HS 陽性(p<0.001; OR 6.334)が独立予測因子となった。全生存に関して遠隔転移陽性(p<0.001; HR 3.799)と HS 陽性(p=0.001, HR 2.849)が独立危険因子となった。Kaplan-Meier 法では、簇出陽性群とともに HS 陽性群は有意に生存期間が不良であった(p<0.0001)。

HT29 細胞を用いて isoform balance 変化の影響を経時的に検討した。HT29 細胞に CEACAM1-L を強制発現すると経時的な管腔形成能は有意に増強し、CEACAM1-S を強制発現すると管腔形成能は有意に減弱した。CEACAM1-L を強く発現する LS174T 細胞は 3 次元培養系において HS を形成する特性を有する。この LS174T 細胞に CEACAM1 shRNA にて knock down させると管腔形成能は有意に減弱し、CEACAM1-S を遺伝子導入すると CEACAM1-L の発現は減弱し、経時的な管腔形成能は有意に減弱した。

以上の結果より、簇出よりも転移や予後と相関する HS の存在および臨床的意義を明らかにし、大腸癌の悪性度診断に有用であることが示唆された。CEACAM1-L を発現する浸潤性大腸癌が大腸癌先進部の HS を形成することを臨床検体と培養細胞を用いて明らかにした。さらに、HS の形態は CEACAM1 の isoform balance によってコントロールできる可能性が示唆され、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456号		
学位授与の日	平成23年12月13日		
氏名	河野正充		
学位論文の題目	Maternal Immunization with Pneumococcal Surface Protein A Protects against Pneumococcal Infections among Derived Offspring (Pneumococcal surface protein A を用いた母体免疫による仔マウスの肺炎球菌感染症の予防)		
論文審査委員	主査	教授 吉川徳茂	
	副査	教授 山上裕機	教授 山中昇

論文内容の要旨

【背景】

肺炎球菌は小児上気道感染症の主な起炎菌の一つであり、近年抗菌薬に対する耐性化が大きな問題となっている。肺炎球菌の薬剤耐性化の対策として、ワクチンを用いた抗肺炎球菌抗原特異的抗体の誘導による肺炎球菌感染症の予防は重要な役割を持つと考えられている。しかし乳幼児期の免疫学的未発達な時期において現在臨床導入されている莢膜多糖体ワクチンでは、肺炎球菌感染症に対する十分な免疫応答を誘導することができず、難治化や反復化をきたしやすい。乳幼児期において肺炎球菌特異的免疫応答を効率的に誘導することが、重要であると考えられる。本研究で我々は肺炎球菌表面蛋白抗原である Pneumococcal surface protein A (PspA) を用いた母体免疫による新生児マウスの鼻咽腔保菌、肺炎、全身感染に対する予防効果について調査した。

【方法】

成熟メスマウスにコレラトキシン B をアジュバントとして PspA family 2(PspA2)にて経鼻免疫を行った後、成熟オスマウスと交配し仔マウスを得た。母マウスの血清、母乳中および仔マウスの血清中の抗 PspA2 特異的抗体価を評価した。さらに得られた仔マウスに肺炎球菌(TIGR4 株 : PspA2、血清型 4)を覚醒下および麻酔下で経鼻接種を行い、鼻咽腔保菌モデル、肺感染モデルを作成し、鼻腔および肺組織中の肺炎球菌数を検討した。また腹腔内接種により、全身感染モデルを作成し、仔マウスの生存期間を検討した。PspA family 1 (PspA1)を有する D39 株 (血清型 2)、EF3030 株 (血清型 19F)、BG7322 株 (血清型 6B)、L82016 株 (血清型 6B) についても腹腔内接種による全身感染モデルにおいて生存期間を検討した。

【結果】

哺乳期間中、母マウスの血清、母乳中および仔マウスの血清中に抗 PspA 特異的 IgG 抗体が誘導され、IgG1 サブクラスが優位であった。鼻咽腔保菌モデルおよび肺炎モデルにおいて、免疫群の仔マウスの鼻粘膜および肺組織中の肺炎球菌数は、非免疫群の仔マウスと比較してそれぞれ有意に減少していた。また全身感染モデルにおいて免疫群の仔マウスは非免疫群の仔マウスと比較して有意な生存期間の延長を認めた。また、PspA1 を有する肺炎球菌株による全身感染モデルにおいても、免疫群の仔マウスは、生存期間の延長を認めた。

【考察】

本研究の結果により、PspA を用いた母体免疫は経胎盤および経母乳的に新生児への抗肺炎球菌特異的抗体を誘導することが可能であった。また、PspA2 による母体免疫により仔マウスの鼻咽腔感染、肺感染および全身感染の予防が可能であるとともに、PspA1 を有する肺炎球菌に対しても全身感染に対する予防効果が認められた。肺炎球菌はほぼ全ての菌株で PspA を有し、そのほとんどが PspA1 あるいは PspA2 に分類される。PspA を用いた母体免疫は、能動免疫の誘導が困難な生後早期の肺炎球菌感染症の予防における有効な方法の一つである可能性が強く示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成23年11月22日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

肺炎球菌は急性中耳炎をはじめとする上・下気道感染症の重要な起炎菌であり、ワクチンによる感染予防が期待されている。とりわけ、乳幼児における肺炎球菌性中耳炎の難治化への対策は、耳鼻咽喉科臨床において大きな課題となっている。しかし乳幼児期の免疫学的未成熟な時期において現在臨床導入されている莢膜多糖体ワクチンでは、肺炎球菌感染症に対する十分な免疫応答を誘導することができない点が問題とされる。本論文は肺炎球菌表面蛋白抗原であるPneumococcal surface protein A (PspA)を用いた母体免疫により、新生児マウスに肺炎球菌特異的免疫応答が誘導されるとともに、肺炎球菌の鼻咽腔保菌、肺感染および全身感染が予防されることを明らかにしたものである。

BALB/c bly雌マウス(6週齢)にコレラトキシンBをアジュバントとしてPspA2にて経鼻免疫を行った後、雄マウスと交配し仔マウスを得た。出生後、母マウスの血清中および母乳中、新生児マウス血清中の抗PspA2特異的IgG(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3)、IgM、IgA抗体価の検討を行った。免疫群の母マウスの血清、母乳中および免疫群の母マウス由来の仔マウスの血清中にIgG1有意な抗PspA2特異的IgG抗体が誘導された。また、肺炎球菌TIGR4株を用いた鼻咽腔保菌モデルおよび肺炎モデルでは、免疫群の仔マウスの鼻粘膜および肺組織中の肺炎球菌数は非免疫群の仔マウスと比較してそれぞれ有意に減少していた。また全身感染モデルでは免疫群の仔マウスは非免疫群の仔マウスと比較して有意な生存期間の延長を認めた。さらに、PspA2と交差反応を示すPspA1を有する他の肺炎球菌株:D39株、EF3030株、BG7322株、L82016株による全身感染においても、PspA2母体免疫群においては、生存期間の延長を認めた。

本研究の結果により、PspAを用いた母体免疫は経胎盤および経母乳的経路により新生児へ抗肺炎球菌特異的抗体を誘導することが可能であり、生後早期の肺炎球菌感染症の予防において有効な方法であることが強く示された。

本論文は、免疫学的に未成熟な新生児期において、肺炎球菌に対する特異的免疫応答を誘導し、肺炎球菌感染症に対する予防効果を、肺炎球菌表面蛋白抗原を用いたマウス母体免疫モデルで証明し、学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第457号		
学位授与の日	平成23年12月13日		
氏名	八子理恵		
学位論文の題目	Cilostazol Activates Function of Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cell for Re-endothelialization in a Carotid Balloon Injury Model (シロスタゾールは血管内皮前駆細胞の機能を亢進させ頸動脈擦過モデルにおける再内皮化を促進する)		
論文審査委員	主査	教授 赤阪隆史	
	副査	教授 近藤智善	教授 中尾直之

論文内容の要旨

【諸言】

血管内皮前駆細胞（EPC）は血管新生だけではなく、血管内皮損傷に対して内皮修復にも働く。シロスタゾールは臨床的には抗血小板、血管拡張薬として使用されているが、その他にも血管内皮保護作用、平滑筋増殖抑制作用を有することが報告されている。しかしながら、シロスタゾールによる EPC の血管内皮再生作用についての報告はない。本実験では、ラット頸動脈擦過モデルを用い、シロスタゾールによる EPC の内皮再生作用について検討した。

【方法】

1, SD ラットにて頸動脈擦過モデルを作製し、擦過 2 週間、4 週間後で血管内皮再生と新生内膜肥厚、末梢血液中 EPC 数をシロスタゾール投与群と非投与群とで比較した。シロスタゾール投与群は擦過 2 週間前よりシロスタゾール混餌食を開始し、非投与群は普通食を与えた。

2, 致死放射線照射後のヌードラットに transgenic Tie2/lacZ マウスの骨髄を移植し、同様にシロスタゾール投与群と非投与群とに分け、頸動脈擦過モデルを作製した。擦過部分に recruitment している骨髄由来 EPC 数を定量した。

3, シロスタゾールの骨髄由来 EPC に対する作用を in vitro にて検討した。ラットの大腿骨から骨髄由来単核球を分離し 4 日間培養し、シロスタゾール 1, 3, 10, 30 μ M の濃度で 3 時間培養し、細胞増殖能、接着能、遊走能、分化能アッセイを行った。また骨髄由来 EPC における CXCR4 (CXCR4 chemokine receptor type 4 ; SDF-1 α のレセプター)、integrin α v β 3 (ビトロネクチンのレセプター)、VEGF の発現をリアルタイム PCR 法で調べた。

4, 血管損傷部分における SDF-1 α の発現を確認するために、シロスタゾール投与群と非投与群とでラットの頸動脈擦過モデルを作成し頸動脈を摘出し免疫染色とリアルタイム PCR 法で SDF-1 α の発現を比較した。

【結果】

1)シロスタゾールによる内皮再生促進作用

シロスタゾール群では擦過 2 週間後の内皮の再生化が有意に促進されており、また新生内膜肥厚も擦過 2 週間、4 週間ともに抑制されていた。

2)シロスタゾールによる EPC の mobilization、recruitment の促進作用

末梢血液中 EPC の数はシロスタゾール投与群で有意に増加していた。また擦過部分に recruitment している骨髄由来 EPC の数は、擦過 2 週間後でシロスタゾール投与群では非投与群に比べて有意に増加しており、またそれらの EPC は内皮細胞に分化していた。

3)シロスタゾールによる EPC の機能促進作用

シロスタゾールは、EPC の増殖能、接着能、遊走能、分化能ともに促進することが示された。

4)シロスタゾールによる SDF-1 α /CXCR4 シグナルの増強

シロスタゾールにより骨髄由来 EPC において CXCR4 の発現は濃度依存性に増加していた。また SDF-1 α は主に血管損傷部の中膜に発現が認められ、シロスタゾールにより有意に SDF-1 α の発現が増強していた。

5)シロスタゾールによる integrin α v β 3 の発現増強作用

シロスタゾールは骨髄由来 EPC の integrin $\alpha_v\beta_3$ の発現を増強した。

[結論]

シロスタゾールは骨髄由来 EPC における CXCR 4 の発現を増強するとともに、血管損傷部分での SDF-1 α の発現を増強することで、相乗的に遊走能を促進する。また、骨髄由来 EPC の integrin $\alpha_v\beta_3$ の発現を増強することで接着能、分化能を促進する。これらの機序により、シロスタゾールは血管内皮損傷部位への EPC の mobilization、recruitment 作用を促進し、早期に血管内皮再生を促し新生内皮増殖を抑制することが示された。

虚血性疾患において、経皮的血管形成術(PTA)やステント留置術などの血管内治療がいろいろな分野で頻繁に行われているが、再内皮化の促進は術後の血栓症や再狭窄を予防する。このことから抗血栓作用だけでなく、内皮再生促進作用をもつシロスタゾールは臨床的に非常に有用であると考えられる。また、内皮再生は動脈硬化の進展を予防するという観点からも注目されており、この実験結果からシロスタゾールは動脈硬化予防薬としても有用であると考えられる。わが国では、脳梗塞、慢性動脈閉塞症に対してシロスタゾールはすでに臨床的によく使用されているが、再内皮化促進薬、動脈硬化予防薬として他の抗血小板薬と違った作用を有する点で、臨床的な使用が期待される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成23年11月29日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め上記論文について審査を行った。

血管内皮前駆細胞 (EPC) は血管新生だけではなく、血管内皮損傷に対して内皮修復にも働く。再内皮化の促進は虚血性疾患における経皮的血管形成術(PTA)やステント留置術などの血栓症や再狭窄、動脈硬化進展を予防する。シロスタゾールは臨床的に抗血小板、血管拡張薬として使用されているが、本論文はシロスタゾールによる EPC の血管内皮再生作用について検討したものである。

1)SD ラットにて頸動脈擦過モデルを作製し、血管内皮の再内皮化と新生内皮増殖を検討した。シロスタゾールは血管内皮損傷に対して有意に内皮再生を促進し新生内皮増殖を抑制した。

2)致死放射線照射後のヌードラットに transgenic Tie2/lacZ マウスの骨髄細胞を移植し、頸動脈擦過モデルを作製し末梢血液中 EPC 数と擦過部分における骨髄由来 EPC 数を定量した。末梢血液中 EPC 数、擦過部分に recruitment する骨髄由来 EPC 数は、シロスタゾール投与にて有意に増加した。

3) ラットの大腿骨から単核球を分離し骨髄由来 EPC を培養した。シロスタゾール 1, 3, 10, 30 μ M の濃度で3時間培養し、細胞増殖能、接着能、遊走能、分化能アッセイを行った。シロスタゾールは、EPC の増殖能、接着能、遊走能、分化能ともに促進した。

4)シロスタゾール投与により骨髄由来 EPC における CXCR 4 の発現は濃度依存性に増加し、血管損傷部での中膜における SDF-1 α の発現も増強した。また、シロスタゾールは EPC の integrin $\alpha_v\beta_3$ の発現を増強させた。

以上の結果より、シロスタゾールは骨髄由来 EPC の CXCR 4 の発現を増強するとともに、血管損傷部分での SDF-1 α の発現も増強することで、相乗的に EPC の遊走能を促進する。また骨髄由来 EPC の integrin $\alpha_v\beta_3$ の発現を増強することで、EPC の接着能、分化能を促進する。これらの機序によりシロスタゾールは血管内皮損傷部分への EPC の mobilization、recruitment 作用を促進し、早期に血管内皮を修復することが証明された。シロスタゾールは抗血小板薬としてだけではなく、再内皮化促進薬、動脈硬化予防薬として臨床的に有用である可能性が示唆され、学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第458号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	家田 淳 司		
学位論文の題目	Re-expression of CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and migration of colorectal cancer. (CEACAM1-long cytoplasmic domain isoform の再発現と大腸癌の浸潤、転移に関する検討)		
論文審査委員	主 査	教授 村 垣 泰 光	
	副 査	教授 原 勲	教授 山 上 裕 機

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

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

悪性黒色腫や肺癌ではCEACAM1は浸潤、転移に関与していることが報告されている。大腸癌においては、大腸腺腫や早期大腸癌では、CEACAM1の発現は低下すると報告されてきた。しかし、近年、進行大腸癌ではCEACAM1は強発現するということが報告されている。また、大腸癌ではCEACAM1の発現の強度は転移とは関連するが、生存率とは相関しない。

本研究は大腸癌におけるCEACAM1発現の関連についてisoform balanceに着目して検討した。

対象と方法

実験 I. 2002年1月から2003年12月に和歌山県立医科大学第2外科にて手術した大腸癌症例164人を対象とした。

ホルマリン固定パラフィン包埋保存された標本から薄切切片を作成した。

一次抗体にCEACAM1-long cytoplasmic domain(CEACAM1-L)またはCEACAM1-short cytoplasmic domain(CEACAM1-S)に特異的な抗体(Dr. JE. Shively, City of Hope, CA, USAより提供)を用いて免疫組織化学染色を施行した。抗体が他のCEA familyとcross reactionがないことをWestern blotにより確認した。また、市販されている抗CEACAM1 monoclonal抗体(29H2)と同部位を認識することを免疫組織化学染色とproximity ligation assay (Duolink™ in situ PLA, Olink Bioscience, Uppsala, Sweden)により確認した。正常粘膜や血管内皮をinternal controlとし、2種類の抗体をそれぞれinternal controlと癌腺腔との染色強度の差で比較した。

CEACAM1 isoform balanceを含めた臨床病理学的因子(年齢、性別、腫瘍部位、分化度、深達度、リンパ管浸潤、血管浸潤)とリンパ節転移、血行性転移、生存率について検討した。統計学的処理として、リンパ節転移と遠隔転移との相関は χ^2 乗検定、ロジスティック回帰モデルで、生存率との相関はCoxハザードモデル、およびKaplan-Meier法で検討した。

実験 II. CEACAM1の発現と、そのisoform balanceが癌の浸潤や転移・遊走に関与するかを検討するために、大腸癌細胞株を用いて基礎的検討を行った。

CEACAM1を中等度発現する大腸癌細胞HT29と、CEACAM1-Lを特に強く発現するLS174Tを使用した。HT29細胞にCEACAM1-L, CEACAM1-Sを強制発現させ、HT29細胞のCEACAM1 isoform balanceを変化させ、invasion assay, wound healing assayを施行した。またはCEACAM1-Lを強発現するLS174T細胞にCEACAM1-Sを強制発現させ、CEACAM1 isoform balanceを変化させた細胞と、shRNAを用いてCEACAM1をノックダウンさせた細胞を使用して、同様の実験を施行した。

遺伝子導入に関しては、RT-PCRとWestern blotにより、CEACAM1の発現を確認した。

結 果

実験 I.

1. CEACAM1 の発現様式について

CEACAM1-L, S ともに、164 例中 149 例 (91%) で癌腺腔表層では発現が弱く、癌浸潤先進部において強発現していた。15 例は全例、癌の浸潤が粘膜下層までにとどまる早期癌であり、CEACAM1-L, S ともに発現が低下していた。

2. CEACAM1 isoform balance と転移について

癌浸潤先進部における最も発現の強い部分の評価により CEACAM1-L dominant 群 (n=94) とその他 (n=70) に分類した。

リンパ節転移とそれぞれの因子の単変量解析の結果、分化度(mod)、深達度(SS 以深)、リンパ管浸潤陽性、血管浸潤陽性、CEACAM1-L isoform dominant がリンパ節転移に関与する有意な因子であった。これらの因子を用いた多変量解析の結果、深達度(SS 以深)、リンパ管浸潤、CEACAM1-L isoform dominant が統計学的に有意であった($p=0.02$, $p=0.03$, $p<0.0001$)。

血行性転移とそれぞれの因子の単変量解析の結果、分化度(mod)、深達度(SS 以深)、リンパ管浸潤陽性、血管浸潤陽性、CEACAM1-L isoform dominant が血行性転移に関与する有意な因子であった。これらの因子を用いた多変量解析の結果、CEACAM1-L isoform のみが有意な因子であった($p=0.0092$)。

3. CEACAM1 isoform balance と生存率について

Cox 比例ハザードモデルで、単変量解析で生存率に有意に関連のあったものは、リンパ管浸潤、リンパ節転移、血行性転移のあるものと、CEACAM1-L dominant 群であった。多変量解析では生存率に有意に関連のあったものは、血行性転移のあるもの($p=0.0027$)と、CEACAM1-L dominant 群($p=0.02$)であった。

Kaplan-Meier 法で、CEACAM1 の発現強度で生存率を比較したところ、有意差を認めなかったが($p=0.10$)、CEACAM1 isoform balance で比較したところ、有意差を認めた($p<0.0001$)。

実験 II.

1. CEACAM1-L の発現と大腸癌の浸潤・遊走に関する検討

CEACAM1-L を強く発現する LS174T 細胞を shRNA を用いて CEACAM1 発現を knockdown したところ、vector control と比較して invasion ($p<0.01$), migration ($p<0.01$) とともに抑制された。

2. CEACAM1 isoform balance と大腸癌の浸潤・遊走に関する検討

CEACAM1 を中等度発現する HT29 細胞株に CEACAM1-L を強制発現させ、isoform balance を変化させたところ、vector control と比較して、invasion ($p<0.01$), migration ($p<0.05$) とともに増強した。HT29 細胞株に CEACAM1-S を強制発現させたところ、vector control と比較して、invasion ($p<0.05$), migration ($p<0.05$) とともに抑制された。

CEACAM1-L を強く発現する LS174T 細胞株に CEACAM1-S を強制発現させ、isoform balance を変化させたところ、vector control と比較して、invasion ($p<0.01$), migration ($p<0.01$) とともに抑制された。

考 察・結 語

これまで、CEACAM1 は大腸癌では発現が低下するという報告と発現が増強するという相反する報告がされてきた。本研究において、癌表層部では発現が低下しており、進行がんの浸潤先進部では発現が増強するという点を明らかにし、この矛盾点を解決した。また、大腸癌においては CEACAM1 の発現強度は悪性度と関連しないという点においても、本研究において、発現強度よりも isoform balance が悪性度と関連することを明らかにした。基礎的研究から CEACAM1-L isoform の強い大腸癌は、転移・浸潤に関連することを確認した。CEACAM1 isoform balance をコントロールすることにより大腸癌の浸潤、転移を抑制でき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 23 年 1 月 17 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。

これまで、他の癌とは異なり、CEACAM1 の発現強度は癌の悪性度と関連がないとされてきた。また、大腸癌 CEACAM1 の発現が低下するという報告と増強するという相反する報告がされてきた。そこで本研究は大腸癌における CEACAM1 発現の関連について isoform balance に着目して検討した。

大腸癌症例 164 人を対象に免疫組織化学染色を施行した。一次抗体に CEACAM1-long cytoplasmic domain (CEACAM1-L) または CEACAM1-short cytoplasmic domain (CEACAM1-S) に特異的な抗体を用いて免疫組織化学染色を施行した。正常粘膜や血管内皮を internal control とし、2 種類の抗体をそれぞれ internal control と癌腺腔との染色強度の差で比較した。

CEACAM1 isoform balance を含めた臨床病理学的因子とリンパ節転移、血行性転移、生存率について検討した。

CEACAM1-L, S とともに、164 例中 149 例 (91%) で癌腺腔表層では発現が弱く、癌浸潤先進部において強発現していた。癌浸潤先進部における最も発現の強い部分の評価により CEACAM1-L dominant 群 (n=94) とその他 (n=70) に分類した。

CEACAM1-L 優位な症例はリンパ節転移 ($p < 0.0001$)、血行性転移 ($p = 0.0092$) と有意な関連を認め、生存率も有意に短かった ($p = 0.02$)。Kaplan-Meier 法で、CEACAM1 の発現強度で生存率を比較したところ、有意差を認めなかったが ($p = 0.10$)、CEACAM1 isoform balance で比較したところ、有意差を認めた ($p < 0.0001$)。

次に、CEACAM1 の発現と、その isoform balance が癌の浸潤や転移・遊走に関与するかを検討するために、大腸癌細胞株を用いて基礎的検討を行った。

CEACAM1-L を強く発現する LS174T 細胞株に shRNA を用いて CEACAM1 発現を knockdown したところ、invasion ($p < 0.01$)、migration ($p < 0.01$) とともに抑制された。

CEACAM1 を中等度発現する HT29 細胞株に CEACAM1-L を強制発現させたところ、invasion ($p < 0.01$)、migration ($p < 0.05$) とともに増強した。HT29 細胞株に CEACAM1-S を強制発現させたところ、invasion ($p < 0.05$)、migration ($p < 0.05$) とともに抑制された。

CEACAM1-L を強く発現する LS174T 細胞株に CEACAM1-S を強制発現させたところ、invasion ($p < 0.01$)、migration ($p < 0.01$) とともに抑制された。

以上の結果より、大腸癌において CEACAM1 は癌表層部では発現が低下しており、浸潤先進部において強発現することが明らかとなった。また、大腸癌では CEACAM1 の発現強度ではなく isoform balance が癌の悪性度と関連することが明らかとなったことから、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第459号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	神田 匡 兄		
学位論文の題目	Validation of the triaxial accelerometer for the evaluation of physical activity in Japanese patients with COPD (日本人 COPD 患者の活動性評価法としての三軸加速度計の妥当性に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 宮下 和久	
	副査	教授 竹下 達也	教授 一ノ瀬 正和

論文内容の要旨

【緒言】

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、タバコ煙等を長期に吸入することで生じる肺の慢性炎症性疾患であり、呼吸機能検査で非可逆の気流閉塞を示す。これは末梢気道病変と気腫性病変が様々な割合で作用することにより起こり進行性である。臨床的に徐々に生じる労作時の息切れと、慢性の咳・痰を特徴とする。労作時の息切れは日常生活における身体活動性の低下を来し、その結果運動耐容能低下、骨格筋萎縮に繋がり、更なる労作時の息切れを引き起こす。この悪循環が COPD の病状を進行させる。身体活動性は COPD 患者の再入院リスクと死亡率の重要な予測因子でもあると言われているが、その測定法はまだ確立されていない。三軸の加速度計である DynaPort Activity Monitor (DAM) は、欧州で唯一、COPD 患者の身体活動性測定に有用である事が確認された加速度計である。一方、身体活動性は患者の社会的・経済的状況の影響を受けやすいと言われ、また COPD の罹患率や死亡率にも人種差があり、それらの要因が身体活動性に影響を与える可能性は否定出来ない。

以上のように COPD 患者の身体活動性測定法として、欧州では DAM の妥当性が確認されている状況ではあるが、日本の COPD 患者に直接応用可能かの検証は成されておらず、その妥当性は確認されていない。そこで今回我々は、日本人 COPD 患者の日常活動性の測定法として、DAM が妥当であるかを検討した。まず若年健常者を対象とし、DAM の機器としての再現性を評価し、次に COPD 患者を対象として測定の反復性が得られる測定日数を評価した。最後に COPD 患者の身体活動性を規定する因子を評価した。

【方法と結果】

①再現性の検討：若年健常者4名にDAMを装着し様々な種類・強度の活動を行わせ、自身で活動内容・時間を記録した。記録結果とDAMで測定した各活動の時間を、直線回帰式、Bland-Altman plot法(B-A plots)、級内相関係数(ICC)を用いて解析した。両者は直線回帰式で非常に高い相関を示した。B-A plotsでも系統誤差を認めず、ICCの数値は0.99以上であり、DAMの再現性が確認出来た。

②反復性の検討：安定期COPD患者20名を対象に平日3日間、各7時間ずつ活動性を記録した。得られた3日間の活動時間のうち時間差の少ない2日分の数値を抽出し、B-A plots、ICCを用いて反復性が得られるかを検討した。B-A plotsで系統誤差を認めず、ICCの数値も0.84以上であり、2日間のデータで反復性が確認出来た。

③身体活動性を規定する因子の検討：安定期COPD患者20名の患者背景、精密呼吸機能検査、漸増シヤトルウォーキングテスト(ISWT)、筋力検査の結果と、反復性が得られた2日分の平均活動時間の関連性を検討した。その結果、肺の過膨張の指標であるTLC % predicted及び末梢気道閉塞の指標であるCC/TLCと負の相関をみとめた。

【結論】

日本人 COPD 患者の身体活動性の評価法として信頼し得るものである事が確認出来た。また日本人 COPD 患者の身体活動性は、肺の過膨張と末梢気道の閉塞が関与する事が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成23年12月15日 論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は喫煙で生じる肺の炎症性疾患であり、非可逆の気流閉塞を示し進行性である。徐々に生じる労作時の息切れは日常生活における身体活動性の低下を来し、運動耐容能低下、骨格筋萎縮に繋がり、更なる労作時の息切れを引き起こす。この悪循環がCOPDの病状を進行させる。身体活動性はCOPD患者の重要な予後予測因子だと言われているが測定法は確立されていない。

DynaPort Activity Monitor (DAM) は欧州COPD患者の身体活動性測定に有用とされる加速度計であるが、日本のCOPD患者に直接応用可能かの検証は成されていない。今回日本人COPD患者の日常活動性の評価法としてDAMが妥当であるかを検討した。

①再現性の検討：若年健常者4名にDAMを装着し様々な種類・強度の活動を行わせ、自身で活動内容・時間を記録した。記録結果とDAMで測定した各活動の時間を、直線回帰式, Bland-Altman plot法 (B-A plots), 級内相関係数 (ICC) を用いて解析した。両者は直線回帰式で非常に高い相関を示した。

B-A plotsでも系統誤差を認めず、ICCの数値は0.99以上であり、DAMの再現性が確認出来た。

②反復性の検討：安定期COPD患者20名を対象に平日3日間、各7時間ずつ活動性を記録した。得られた3日間の活動時間のうち時間差の少ない2日分の数値を抽出し、B-A plots, ICCを用いて反復性が得られるかを検討した。B-A plotsで系統誤差を認めず、ICCの数値も0.84以上であり、2日間のデータで反復性が確認出来た。

③身体活動性を規定する因子の検討：安定期COPD患者20名の患者背景、精密呼吸機能検査、漸増シヤトルウォーキングテスト (ISWT)、筋力検査の結果と、反復性が得られた2日分の平均活動時間の関連性を検討した。その結果、肺の過膨張の指標であるTLC % predicted及び末梢気道閉塞の指標であるCC/TLCと負の相関をみとめた。

以上の結果から日本人COPD患者の身体活動性の評価法として信頼し得るものである事が確認出来た。また身体活動性は肺の過膨張と末梢気道の閉塞が関与する事が示唆された。本研究は日本人COPD患者の活動性評価法として臨床的に大きな意義があり、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460号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	高岸美和		
学位論文の題目	IL-6 microinjected in the nucleus tractus solitarii attenuates cardiac baroreceptor reflex function in rats. (延髄孤束核への IL-6 微量注入は動脈圧受容器心臓反射機能を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 仙波恵美子	教授 前田正信

論文内容の要旨

【緒言】

高血圧の状態が長く続くと、脳、心臓および腎臓など生命維持に必要な臓器が障害され生命の危険にさらされる。従って、血圧を適正範囲に維持することは健康上きわめて重要である。血圧の恒常性を維持するための主な神経性循環調節機構は動脈圧受容器反射である。延髄孤束核 (nucleus tractus solitarii : NTS) は動脈圧受容器からの脳内ターミナルであり、動脈圧受容器反射を急性にかつ慢性的に調節しながら、循環動態の恒常性維持につとめている。NTS では今までに様々な神経伝達物質や神経調節因子、およびそれらの受容体の発現が確認されており、特に近年種々のサイトカインが脳内でも常時発現しており、神経細胞の分化や成長に関わるだけでなく、循環調節作用を有する可能性が報告されるようになってきた。そのような中で、自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rat : SHR) の NTS 内では、インターロイキン6 (IL-6) 遺伝子が異常発現しており、それが高血圧発症の一因となっている可能性が報告されている。しかし、NTS 内 IL-6 の循環調節に関わる機能的役割についてはよく分かっていなかった。

このような背景のもと、本研究では、NTS 内 IL-6 が循環調節に及ぼす影響について検討することを目的とした。特に、NTS 内 IL-6 が動脈圧受容器心臓反射に及ぼす影響について調べた。また、NTS 内における IL-6 受容体及びそのシグナル伝達分子である gp-130 の遺伝子発現や IL-6 蛋白質発現局在についても併せて検討した。

【方法】

1 基本的な手技

Wistar ラット (雄, 280~350 g) を用い、ウレタン (1.45 g/kg、腹腔内投与) で麻酔後、気管チューブを挿入しレスピレーターへ接続した。動脈圧 (arterial pressure : AP) 測定、薬剤注入用に両側の大腿動静脈にカニューレを挿入した。動脈に挿入したカニューレを圧トランスデューサーに接続し、ポリグラフシステムおよび Mac Lab システムに接続して AP、平均動脈圧 (mean AP : MAP) 及び心拍数 (heart rate : HR) の記録を行った。最後に、脳定位固定装置に頭部を固定し、延髄背側部を露出し、マイクロピペットによる NTS への薬剤微量注入に備えた。

2 IL-6 の NTS への片側微量注入が動脈圧受容器反射に及ぼす影響

まず、IL-6 を NTS に片側微量注入した際の循環動態の変化を観察した。そして、大腿静脈に挿入したカニューレから phenylephrine を静注し、動脈圧受容器反射を惹起させ、IL-6 片側微量注入前後に反射感度を求めることにより、IL-6 の当該圧受容器反射に及ぼす影響について検討した。

3 IL-6 が動脈圧受容器反射に及ぼす影響の特異性について

上記の反応が IL-6 特異的なものかを調べるために IL-6 blocking 抗体と IL-6 を混合し IL-6 の生理活性を阻害した試薬を作成した。この試薬の片側微量注入前後の動脈圧受容器反射感度を求め、IL-6 単独微量注入時の値と比較した。

4 IL-6 の NTS への片側微量注入が L-glutamate 依存性循環反応に及ぼす影響

NTS に L-glutamate 微量注入した時に観察される降圧、除脈作用が、IL-6 微量注入後に変化するかどうかを検討した。

5 IL-6 受容体と gp-130 の遺伝子発現

ラット延髄より取り出した NTS から RNA を抽出し、iCycler Thermal Cycler と QuantiFast SYBR Green RT-PCR kit を用いて RT-PCR を行い IL-6 受容体とそのシグナル伝達分子である gp-130 の遺伝子発現を調べた。

6 蛍光免疫染色

NTS を含む組織切片 (30 μ m) を、IL-6 抗体でインキュベート後、biotinylated horse anti-goat IgG で、さらに streptavidin-conjugated Alexa-Fluor 488 でインキュベートした。標本は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また IL-6 蛋白質の発現部位を同定するために、二重標識蛍光免疫染色を行った。神経細胞を染色するために anti-NeuN、グリア細胞を染色するために anti-GFAP を用いた。

【結果】

1 NTS 内における IL-6 蛋白質発現の局在

免疫組織化学的に NTS 内において IL-6 蛋白質の発現が確認され、さらにそれは神経細胞に発現している事が確認された。

2 IL-6 関連分子の NTS 内遺伝子発現

IL-6 受容体と gp-130 の mRNA の発現が確認された。

3 IL-6 の NTS への片側微量注入が動脈圧受容器反射に及ぼす影響

IL-6 の NTS 内片側微量注入は AP と HR を変化させなかった。一方、IL-6 の片側微量注入は phenylephrine 静注時の昇圧性除脈反応を抑制し、動脈圧受容器反射感度は有意に抑制された。この抑制反応は濃度依存性を示した。ロジスティック回帰分析においても同様の結果が確認された。

4 IL-6 が動脈圧受容器反射に及ぼす影響の特異性

IL-6 blocking 抗体と IL-6 を混合した試薬の片側微量注入では、IL-6 微量注入時に観察された動脈圧受容器反射感度の抑制率が減少した。

5 IL-6 の NTS への片側微量注入が L-glutamate 依存性循環反応に及ぼす影響

NTS に L-glutamate 微量注入した時に観察される循環応答のうち、徐脈反応は IL-6 の微量注入後に有意に小さくなった。

【考察】

本実験により、IL-6 は NTS において動脈圧受容器反射を抑制し、さらにその抑制作用は濃度依存性であることが確認された。また、NTS への IL-6 片側微量注入が L-glutamate 依存性の徐脈作用を減弱させたので、NTS 内 IL-6 は動脈圧受容器反射性徐脈反応に関わる NTS 神経細胞をシナプス後性に抑制している可能性が考えられた。以上に加え、IL-6 蛋白質は主として NTS 神経細胞に発現していることから、NTS 神経細胞が IL-6 産生および放出に関連していること、さらに、IL-6 受容体やそのシグナル伝達分子である gp-130 の遺伝子発現を NTS 内で認めたことにより、あらためて NTS 内 IL-6 の神経性調節因子としての重要性が示された。

以上のように、NTS 内 IL-6 は急性の循環調節作用があることが示唆された。しかし、脳内 IL-6 mRNA レベルは出生後の成長につれて増加するという報告があり、NTS 内 IL-6 の循環調節に関わる慢性的効果も今後検討していく必要がある。そして、NTS 内 IL-6 の動脈圧受容器反射抑制作用のより詳細な機序ならびにその生理学的意義、特に高血圧発症との関連について今後さらに検討していく必要がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 24 年 1 月 18 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。

延髄の心臓血管中枢内には種々のサイトカインとそれらの受容体の発現が見られる。しかしこれらの循環調節に対する作用については不明なものが多い。本研究の目的は、動脈圧受容器からの脳内ターミナルである延髄孤束核 (nucleus tractus solitarius: NTS) においてインターロイキン 6 (IL-6) が循環調節機能に及ぼす影響について検討することである。特に NTS 内の IL-6 が動脈圧受容器心臓反射機能に及ぼす影響について調べた。また、その作用機序を調べる一助として、NTS 内の IL-6 受容体およびそのシグナル伝達分子である gp-130 の遺伝子発現や、IL-6 蛋白質発現局在についても調べた。ウレタン麻酔下ラット

を用いて、NTSにIL-6を片側微量注入し動脈圧と心拍数の変化を観察した。そして、大腿静脈からphenylephrineを静注し動脈圧受容器反射を惹起させ、IL-6片側微量注入前後の動脈圧受容器反射感度を求めた。IL-6のNTSへの片側微量注入がL-glutamate依存性循環反応に及ぼす影響について観察した。IL-6受容体とgp-130の遺伝子発現をRT-PCRにより、さらに神経細胞およびグリア細胞のマーカーを用いた免疫組織化学的手法によりIL-6蛋白質発現の局在についても観察した。結果は以下のように要約される。

- 1) IL-6のNTS内片側微量注入は動脈圧と心拍数を変化させなかった。
- 2) IL-6のNTS内片側微量注入はphenylephrine静注時の昇圧性徐脈反応を抑制し、動脈圧受容器反射感度を有意に抑制させた。また、この抑制反応は濃度依存性を示した。
- 3) IL-6 blocking抗体により上記2)の反応は有意に減少した。
- 4) IL-6のNTS内片側微量注入はL-glutamate依存性の徐脈作用を有意に減弱させた。
- 5) NTS内にIL-6受容体とgp-130の遺伝子発現が確認された。
- 6) NTS内にIL-6蛋白質の発現が確認され、さらにそれは神経細胞に発現していた。

これらの結果から、NTS内のIL-6が動脈圧受容器反射性徐脈反応に関わるNTS神経細胞をシナプス後性に抑制している可能性が示された。また、NTS神経細胞がIL-6産生および放出に関連している可能性が示され、NTS内のIL-6の神経性調節因子としての重要性が示された。

本研究は、NTS内のIL-6の動脈圧受容器反射における作用を示し、NTS内のIL-6に急性の循環調節機能があることを明らかにしたものである。

以上により本研究は、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)甲第461号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	平井慶充		
学位論文の題目	Fibulin-5 protein is reduced in the lung of patients with spontaneous pneumothorax who are under 25 years old (25歳未満の自然気胸患者の肺における Fibulin-5 蛋白の減少)		
論文審査委員	主査	教授 三家登喜夫	
	副査	教授 村垣泰光	教授 岡村吉隆

論文内容の要旨

若年性自然気胸の原因はいまだ明らかになっていない。若年性自然気胸は特有の体型を持つ若年男性に好発し、何らかの結合組織の脆弱性に起因して生じている可能性がある。

本研究では若年性自然気胸の発症に弾性線維形成に関わるFibulin-5について遺伝子発現、蛋白発現やその局在について検討した。また、体型に関する臨床情報を検討した。

2009年7月以降、自然気胸で手術した36例を対象とし、転移性肺腫瘍で手術した6例と法医学解剖の検体から得た4サンプルをコントロールとした。25歳未満の気胸群をY群、25歳以上の気胸群をO群、コントロールをC群とした。臨床データとして胸部X-pで胸郭の縦横比、胸部CTで胸郭の前後比を計測した。elastica van Gieson 染色、Fibulin-5の免疫染色を行った。また、Fibulin-5についてreal-time PCR, Western blotを行った。統計検定は χ^2 testとone-factor ANOVAを行い $p < 0.05$ を有意とした。その結果

- 臨床データの解析では、身長はY群、O群とC群では男性のみの比較では差を認めなかった($p=0.91$)。体重は3群で差を認めなかった。胸郭の縦横比(H/W比)はY群で有意に大きかった($p < 0.01$)。胸郭の前後比(a/b比)は、Y群はC群に比し有意に小さかった($p=0.02$)。
- 組織学的検討ではFibulin-5は弾性線維と同部位に染色され、O群に比しY群で染色が弱い傾向があった。
- Fibulin-5のmRNA発現はY、O、C群でそれぞれ 0.82 ± 0.43 , 0.90 ± 0.41 , 0.76 ± 0.27 であり、Fibulin-5のmRNA発現に有意な差を認めなかった($p=0.64$)。
- Fibulin-5蛋白発現Y、O、C群でそれぞれ 1.10 ± 0.44 , 1.64 ± 0.58 , 2.05 ± 0.98 であった。Y群はO群、C群に比し有意に少なかったが($p=0.006$, $p=0.003$)、O群とC群では有意な差は認めなかった($p=0.14$)

以上より25歳未満の自然気胸群では、他の群と比較して胸郭が扁平で縦に長い身体的特徴を持つことが示された。また今までに若年性自然気胸において特定の蛋白の変動が報告されたことはないが、Fibulin-5に関してmRNA発現が不変であるにもかかわらず、蛋白レベルでの減少が確認された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年1月18日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

若年性自然気胸の原因はいまだ明らかになっていない。若年性自然気胸は特有の体型を持つ若年男性に好発し、何らかの結合組織の脆弱性に起因して生じている可能性がある。

本研究では若年性自然気胸の発症に弾性線維形成に関わるFibulin-5について遺伝子発現、蛋白発現やその局在について検討した。また、体型に関する臨床情報を検討した。

2009年7月以降、自然気胸で手術した36例を対象とし、転移性肺腫瘍で手術した6例と法医解剖の検体から得た4サンプルをコントロールとした。25歳未満の気胸群をY群、25歳以上の気胸群をO群、コントロールをC群とした。臨床データとして胸部X-pで胸郭の縦横比、胸部CTで胸郭の前後比を計測した。elastica van Gieson 染色、Fibulin-5の免疫染色を行った。また、Fibulin-5についてreal-time PCR, Western blotを行った。統計検定は χ^2 testとone-factor ANOVAを行い $p < 0.05$ を有意とした。その結果

- 5) 臨床データの解析では、身長はY群、O群とC群では男性のみの比較では差を認めなかった ($p=0.91$)。体重は3群で差を認めなかった。胸郭の縦横比(H/W比)はY群で有意に大きかった ($p < 0.01$)。胸郭の前後比(a/b比)は、Y群はC群に比し有意に小さかった ($p=0.02$)。
- 6) 組織学的検討ではFibulin-5は弾性線維と同部位に染色され、O群に比しY群で染色が弱い傾向があった。
- 7) Fibulin-5のmRNA発現はY、O、C群でそれぞれ 0.82 ± 0.43 , 0.90 ± 0.41 , 0.76 ± 0.27 であり、Fibulin-5のmRNA発現に有意な差を認めなかった ($p=0.64$)。
- 8) Fibulin-5蛋白発現Y, O, C群でそれぞれ 1.10 ± 0.44 , 1.64 ± 0.58 , 2.05 ± 0.98 であった。Y群はO群、C群に比し有意に少なかったが ($p=0.006$, $p=0.003$)、O群とC群では有意な差は認めなかった ($p=0.14$)

以上より25歳未満の自然気胸群では、他の群と比較して胸郭が扁平で縦に長い身体的特徴を持つことが示された。また今までに若年性自然気胸において特定の蛋白の変動が報告されたことはないが、Fibulin-5に関してmRNA発現が不変であるにもかかわらず、蛋白レベルでの減少が確認された。

以上より、本論文は若年性自然気胸における病態解明の理解と今後の治療法開発への情報となるものであり、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)甲第462号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	刘 勇		
学位論文の題目	Association between circulating monocyte subsets and in-stentrestenosis after coronary stent implantation in patients with ST-elevation myocardial infarction. (ST上昇型心筋梗塞患者における循環血中単球サブセットとステント内再狭窄の関連について)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 重松 隆	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

Backgrounds: Recent studies have shown that monocytes in human peripheral blood are heterogeneous. We examined the clinical significance of two distinct monocyte subsets as a marker of late in-stent restenosis following implantation of bare-metal stents (BMSs) in patients with acute myocardial infarction (AMI).

Methods and Results: Seventy-one consecutive patients with AMI who underwent BMS implantation were enrolled in the study. Peripheral blood was collected 12 days after AMI onset. Two distinct monocyte subsets (CD14+CD16-CCR2+ and CD14+CD16+CX3CR1+) were measured by flow cytometry. All patients underwent angiography at scheduled follow-up after 9 months. CD14+CD16+CX3CR1+ monocyte subset counts were significantly higher in patients with restenosis than in patients without restenosis, whereas neither the total monocytes nor the CD14+CD16-CCR2+ subset counts differed significantly between the two groups of patients. There was also a significant positive correlation between the CD14+CD16+CX3CR1+ monocyte counts and angiographic late lumen loss. In multivariate analysis, CD14+CD16+CX3CR1+ monocyte count was an independent predictor for in-stent late lumen loss.

Conclusions: CD14+CD16+CX3CR1+ monocytes may have a role in in-stent restenosis following coronary BMS implantation in patients with AMI.

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年1月16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。

本邦におけるST上昇型心筋梗塞 (STEMI) に対する再灌流療法の主流はペアメタルステント (BMS) 留置である。BMSによるステント治療の最大の問題点は新生血管内膜の過剰増殖を主因とするステント内再狭窄であり、BMS留置後の循環血中単球のピーク値はステント内の新生血管内膜容量と有意に相関すると報告されている。末梢血単球は単一ではなく、機能的に不均一な細胞集団である。最近の研究により、ヒト末梢血単球は二つのサブセット (CD14⁺CD16⁻CCR2⁺およびCD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺) を有することが明らかにされている。CD14⁺CD16⁻CCR2⁺単球は通常、健常人の単球の約85~95

%を占め、CD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺単球は約5~15%を占める。しかしながら、我々および他のグループより、冠動脈疾患等の病的状態下では、これらの単球サブセットは量的・質的に変化を来すと報告されている。

以上の背景を踏まえ、本研究では、STEMIに対して緊急経皮的冠動脈形成術を施行しBMSにより再灌流に成功した連続71症例を対象とし、循環血液中の二つの異なる単球サブセットとBMS留置後のステント内再狭窄との関連性について検討したものである。方法、STEMI発症12日後の末梢血を採取し、直ちにフローサイトメトリー法を施行し、2つの異なる単球サブセットを測定した。定量的冠動脈解析はベースライン（冠動脈形成術後）および慢性期（9ヵ月後）に施行した。評価項目は、percent diameter stenosis（%DS）およびlate lumen lossであり、ステント内再狭窄は慢性期%DS>50%と定義した。結果、ステント再狭窄群は、非狭窄群に比較して、末梢血のCD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺単球数は有意に高値を示した。一方末梢血のCD14⁺CD16⁺CCR2⁺単球数には有意な差異は認められなかった。また、late lumen lossは末梢血のCD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺単球数と有意な正の相関関係を認めたのに対して、末梢血のCD14⁺CD16⁺CCR2⁺単球数との間には有意な相関関係は認められなかった。ステント内late lumen loss予測因子を多変量解析にて求めたところ、末梢血のCD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺単球数はステント内late lumen loss予測の独立因子であった（R=0.48, P<0.001）。

本論文は末梢血のCD14⁺CD16⁺CX3CR1⁺単球数はAMI患者に対するBMS留置後のステント内再狭窄に密接に関連することを示した。このことは、末梢血単球の量的・質的差異は、ステント内再狭窄の新たなマーカーとなる可能性を提示したものとして、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463号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	北山 真理		
学位論文の題目	Activated Microglia Inhibit Axonal Growth through RGMa (活性化ミクログリアが RGMa を介して軸索伸長を阻害する)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 近藤 智善	教授 中尾 直之

論文内容の要旨

【目的】 脊髄が損傷を受けると神経回路網の破綻により運動・感覚機能が障害されるが、機能を回復するには神経軸索と回路網の再生が不可欠である。ミクログリアは脊髄損傷後に活性化する主要な細胞の1つであるが、機能回復にとって有益か有害であるかについては相反する報告がある。本研究では、活性化ミクログリアが RGMa (repulsive guidance molecule a) を介して軸索伸長を阻害する、という新たな知見を得たので報告する。

【方法】

初代培養

ニューロンは、妊娠18日目のマウス胎仔の脳皮質より採取した。

ミクログリアは、哺乳3日齢のマウス脳を用いて培養を行った。

マクロファージは、成人マウスの大腿骨より採取した骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子で分化させたものを用いた。

neurite outgrowth assay

100本の神経突起の長さを測定し、その平均値を算出した。

コントロール群の神経突起長を1とし、これに対する比率を求めた。

collapse assay

50個の成長円錐の状態を評価し、虚脱している成長円錐の割合を求めた。

Lamellipodia が欠損している、または filopodia が2本以下の状態を「虚脱」と定義した。

RNA 干渉

ミクログリアに、RGMa の siRNA を lipofection にて導入した。

ニューロンに、neogenin の siRNA を nucleofection にて導入した。

ウェスタンブロット

ミクログリアと損傷脊髄の lysate を用いて、RGMa と neogenin の発現量を調べるために行った。actin をインターナルコントロールとした。

マウス脊髄損傷モデル作成

ソムノペンチル (50mg/kg) の腹腔内投与下に、C57BL/6J マウス (8週齢、メス) を用いて脊髄背側半切断モデル (T9) を作成した。

トレーサーを用いた皮質脊髄路の標識

マウス脳皮質運動野の後肢領域に biotinylated dextran amine (BDA) を注入し、皮質脊髄路を標識した。

免疫組織化学検査

脊髄損傷後7日目と14日目に、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、一晩後固定を行った。30%スクロースで置換し、損傷部を含んだ脊髄を OCT コンパウンドで包埋した後-80℃で凍結した。厚さ14μm、20μm で切片を作成し、CD11b 抗体、RGMa 抗体、リン酸化ニューロフィラメント抗体を用いて免疫染色を行った。

統計解析

多群間の解析は one-way analysis of variance (ANOVA) tests に続いて Tukey-Kramer tests を行っ

た。2群間の比較には Student's *t*-tests を用いた。P < 0.05 を有意差と考えた。

【結果】

ニューロンとの共培養系におけるミクログリアの作用

[1] LPS 刺激によりミクログリアを活性化したところ、培養神経細胞の軸索伸長が有意に阻害された。
[2] トランスウェルを用いてニューロンとミクログリアの接触を断った状態での共培養では軸索伸長に変化がなかった。このことから、活性化ミクログリアの軸索伸長阻害作用は接着性の因子が関与していることが示唆された。

軸索伸長阻害因子 RGMa の関与

[3] LPS 刺激により活性化したミクログリアでは RGMa の発現量が増加する。
[4] ミクログリアとニューロンの共培養系に RGMa 中和抗体を加えたところ、活性化ミクログリアによる軸索伸長阻害作用が抑制された。
[5] RGMa の siRNA を導入したミクログリアとニューロンとの共培養系において、活性化ミクログリアによる軸索伸長阻害作用が抑制された。
[6] RGMa のレセプターである neogenin の siRNA を導入したニューロンとミクログリアの共培養系において、活性化ミクログリアによる軸索伸長阻害作用が抑制された。
[7] ミクログリアの活性化を抑えるミノサイクリンを添加すると、ミクログリアにおける RGMa の発現が低下し、それに伴い軸索伸長阻害作用も抑制された。

マウス脊髄損傷モデルを用いたミクログリアの軸索伸長阻害作用の評価

[8] 脊髄損傷後にミノサイクリンを投与すると、免疫組織化学検査にて CD11b 陽性細胞であるミクログリア数の減少が認められた。またウェスタンブロットにて RGMa の発現低下が認められた。次に、皮質脊髄路の退縮の評価を行った。退縮とは、神経軸索が切断された時に軸索断端が頭側に移動する現象のことである。損傷部辺縁と皮質脊髄路の断端の距離を測定したところ、ミノサイクリン投与により退縮が有意に抑制されていた。

【考察】ミクログリアには、M1(classically activated)とM2(alternatively activated)といった2つのサブタイプが存在する。M1は炎症性のサイトカインを産生し、M2は組織の修復を促す作用と炎症反応を軽減する作用を持っているといわれている。性質の異なる2つのサブタイプが存在し、中枢神経損傷後に両方のサブタイプのミクログリアが損傷部に集積するため、これまで活性化ミクログリアが機能回復にとって有益か有害であるかについて相反する報告があるのではないかと推察されている。今回 vitro の実験に用いたミクログリアはLPS刺激を加えて活性化させたものであり、これはミクログリアのサブタイプのM1に相当する。これまでの報告で、M1には神経毒性があり、M2には神経保護的な性質が備わっているといわれているが、M1の軸索再生阻害作用についての分子メカニズムは明らかにされていなかった。本研究では、M1に分化した活性化ミクログリアがRGMaを介して軸索の伸長を阻害する、といった新しい知見を得ることができた。

【結論】本研究の結果から、活性化ミクログリアはRGMaを介して軸索の伸長を阻害することが明らかとなった。脊髄損傷におけるミクログリアの機能の解明に役立つ結果と考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年1月13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。

本論文は、活性化ミクログリアがRGMa(repulsive guidance molecule a)を介して軸索伸長を阻害する、という新たな知見を示したものである。

まず、ミクログリアとニューロンの共培養系において、LPSによりミクログリアを活性化したところ、軸索の伸長が有意に阻害された。トランスウェルを用いた共培養では軸索伸長に変化がなかったことから、接着性の因子の関与が示唆された。そこで、活性化ミクログリアに発現すると報告されている軸索伸長阻害因子RGMaに着目した。ミクログリアとニューロンの共培養系にRGMa中和抗体を加えたところ、活性化ミクログリアによる軸索伸長阻害作用が抑制された。また、RGMaのsiRNAを導入したミクログリアを用いたニューロンとの共培養系やRGMaの受容体であるneogeninのsiRNAを導入したニューロンと活性化ミクログリアの共培養系においても、活性化ミクログリアによる軸索伸長阻害作用が抑制された。さらに、ミクログリアの活性化を抑えるミノサイクリンを添加すると、RGMaの

発現低下に伴い軸索伸長阻害作用も抑制された。最後にマウス脊髄損傷モデルを用いて、ミクログリアの軸索伸長阻害作用を評価した。脊髄損傷後にミノサイクリンを投与すると、ミクログリア数の減少と RGMa の発現低下が認められ、切断された皮質脊髄路の軸索の退縮が有意に抑制された。

以上、本論文では活性化ミクログリアは RGMa を介して軸索の伸長を阻害することが明らかとなった。これらの結果は脊髄損傷におけるミクログリアの機能の解明に役立つものと考えられ、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第464号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	坂野元彦		
学位論文の題目	Wheelchair half marathon race increases natural killer cell activity in persons with cervical spinal cord injury. (頸髄損傷者における車いすハーフマラソンレースでの Natural killer 細胞活性動態)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 近藤稔和	教授 田島文博

論文内容の要旨

【目的】 Natural Killer (NK) 細胞はリンパ球の中で最も精神的、身体的ストレスに反応する。そして、NK 細胞活性 (NKCA) は健常者において短時間の運動負荷では上昇するが、長時間運動になると一時的に低下する事が知られている。NKCA 上昇は主としてアドレナリンの作用により惹起され、高強度長時間運動による NKCA 抑制の機序はコルチゾールによるものではないかと考えられている。下部胸髄節以下に傷害を持つ胸・腰髄損傷対麻痺者 (SCI) では交感神経活動がおおよそ維持されており、運動時の血中アドレナリンは上昇する。一方、頸髄損傷者 (CSCI) は交感神経障害のため運動を負荷してもアドレナリンが上昇しない。先行研究で、健常者において血中アドレナリンと NKCA が上昇する程度の運動を負荷しても CSCI では NKCA が上昇しなかった事が報告されている。したがって、CSCI が長時間高負荷運動を行った際には NKCA の上昇がない分、健常者と同様に NKCA 低下作用のみが発現する可能性が考えられる。加えて、交感神経障害のある CSCI が運動を行った時の NKCA 動態を知る事で、健常者の運動時免疫動態解明にも役立つ。しかし、頸髄損傷者は自動運動が可能な残存筋は上肢の一部に限られ、交感神経障害により心拍数も 100bpm 程度までしか上昇しえないため、高強度長時間運動を行うことは非常に困難である。先行研究で実験室における 1 時間以上の運動負荷を試みたが、CSCI では 20 分程度が限界であった。そこで、本研究は車いすハーフマラソンに出場している CSCI アスリートに注目し、彼らの NKCA 動態について、同レースに出場している SCI アスリートを対照として、高強度長時間運動が NKCA に及ぼす影響のメカニズムの一端を明らかにすることを目的に調査を行った。

【方法】 被験者は、第 29 回大分国際車いすマラソン大会に出場し、完走が見込める CSCI 男性 6 名(損傷高位 C6-8)と SCI 男性 7 名(損傷高位 T4-L1)とした。レース当日の早朝、ゴール直後、ゴール 2 時間後の 3 回採血を行った。測定項目は、フローサイトメトリー法による NK 細胞数、⁵¹Cr 遊離法による NK 細胞活性、高速液体クロマトグラフィー法によるアドレナリン、そして、ラジオイムノアッセイ固相法によるコルチゾールとした。結果は、分散分析を行い、post hoc テストとして Fisher's LSD 法を行い、有意水準は 5%とした。CSCI と SCI の検定には Student's unpaired t-test を行い、有意水準は 5%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、被験者の同意を得て行った。

【結果】 NK 細胞数は、CSCI で測定を通じた有意な変化を認めなかったが、SCI ではレース前 $858 \pm 147/\mu\text{L}$ からゴール直後 $1352 \pm 294/\mu\text{L}$ に有意に増加して、2 時間後にレース前の値まで戻った。NKCA は、CSCI でレース前 $32.8 \pm 3.7\%$ からゴール直後 $44.8 \pm 5.6\%$ に有意に上昇し、ゴール 2 時間後にレース前の値まで戻った。SCI ではレース前 $35.3 \pm 5.1\%$ からゴール直後 $50.7 \pm 4.7\%$ に有意に上昇し、ゴール 2 時間後に $27.9 \pm 3.0\%$ とレース前より有意に低下した。また、ゴール 2 時間後の NKCA は CSCI で SCI よりも有意に高値だった。血中コルチゾールは、両群で測定を通じた有意な変化を認めなかった。血中アドレナリンは、CSCI で測定を通じて有意な変化を認めなかった。しかし、SCI でレース前 $23.4 \pm 5.2\text{pg/mL}$ からゴール直後 $215.7 \pm 67.0\text{pg/mL}$ に有意に上昇し、ゴール 2 時間後にレース前の値まで戻った。また、血中アドレナリンは測定を通じて CSCI で変化を認めず、SCI よりも有意に低値だった。

【考察】 本研究により、交感神経障害により運動後に血中アドレナリンが上昇しない CSCI においても、車いすハーフマラソンにより NKCA 上昇が惹起されることが判明した。これまでの運動時 NKCA 上昇は、アドレナリンにより NK 細胞が循環血液中に動員された結果であると考えられてきた。実際、

CSCIの20分間の運動では血中アドレナリン、NK細胞数、NKCAが上昇しないことが判明している。本研究で、レースによりCSCIの血中アドレナリンが上昇しなかった結果は、交感神経活動が完全に障害され、運動により亢進しなかったことの証拠である。また、CSCIではレース後のNK細胞数の増加がなく、NKCAのみが上昇した結果は、NK細胞一つ当たりの活性が上昇したためではないかと考えられる。したがって、NKCAを刺激する因子として、これまでに報告された血中アドレナリン以外のものがCSCIの運動中に発現し、長時間の運動でNKCAを上昇させた可能性がある。先行研究で行った短時間の運動では、この因子が不十分だったためにNKCA上昇をもたらすことができなかったと考える。また、NKCAを低下させる血中コルチゾールがレースにより上昇しなかった事から、CSCIにはNKCAを積極的に低下させる要因がなく、NKCAを低下させなかった一因となったと考えられる。そこにNKCAを上昇させる未知の因子が働いたことで、個々のNK細胞の活性が高まったと推察する。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年1月25日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

運動時のNK細胞活性（NKCA）の上昇は、主としてアドレナリンの作用により惹起される。交感神経障害のため運動を负荷してもアドレナリンが上昇しない頸髄損傷者（CSCI）に短時間の運動を负荷してもNKCAが上昇しなかったとの報告はあったが、長時間高負荷運動を行った際のNKCA動態についての報告はなかった。そこで、本研究は車いすハーフマラソンに出場しているCSCIアスリートに注目し、彼らのNKCA動態について、同レースに出場しているSCIアスリートを対照として、高強度長時間運動がNKCAに及ぼす影響のメカニズムの一端を明らかにすることを目的に調査を行った。

対象は、第29回大分国際車いすマラソン大会に出場し、完走が見込めるCSCI男性6名（損傷高位C6-8）とSCI男性7名（損傷高位T4-L1）とした。レース当日の早朝、ゴール直後、ゴール2時間後の3回採血を行い、フローサイトメトリー法によるNK細胞数、⁵¹Cr遊離法によるNK細胞活性、高速液体クロマトグラフィー法によるアドレナリン、そして、ラジオイムノアッセイ固相法によるコルチゾールを測定した。

結果、NK細胞数は、CSCIで測定を通じた有意な変化を認めなかった。NKCAは、CSCIでレース前からゴール直後に有意に上昇し（ $p<0.05$ ）、ゴール2時間後にレース前の値まで戻った。また、ゴール2時間後のNKCAはCSCIでSCIよりも有意に高値だった（ $p<0.05$ ）。血中コルチゾールは、両群で測定を通じた有意な変化を認めなかった。血中アドレナリンは、CSCIで測定を通じて有意な変化を認めなかった。また、血中アドレナリンは測定を通じてCSCIで変化を認めず、SCIよりも有意に低値だった（ $p<0.05$ ）。

本研究により、交感神経障害により運動後に血中アドレナリンが上昇しないCSCIにおいても、車いすハーフマラソンによりNKCA上昇が惹起されることが判明した。本研究で、レースによりCSCIの血中アドレナリンが上昇しなかった結果は、交感神経活動が完全に障害され、運動により亢進しなかったことの証拠である。また、CSCIではレース後のNK細胞数の増加がなく、NKCAのみが上昇した結果は、NK細胞一つ当たりの活性が上昇したためではないかと考えられる。したがって、NKCAを刺激する因子として、これまでに報告された血中アドレナリン以外のものがCSCIの運動中に発現し、長時間の運動でNKCAを上昇させた可能性がある。また、NKCAを低下させる血中コルチゾールがレースにより上昇しなかった事から、CSCIにはNKCAを積極的に低下させる要因がなく、NKCAを低下させなかった一因となったと考えられる。そこにNKCAを上昇させる未知の因子が働いたことで、個々のNK細胞の活性が高まったと推察する。

以上より本論文は交感神経活動が障害された頸髄損傷者において長時間運動負荷によりNK細胞活性が上昇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)甲第465号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	吉田 岳市		
学位論文の題目	Alu and Sata α hypomethylation in <i>Helicobacter pylori</i> infected gastric mucosae (<i>Helicobacter pylori</i> 感染胃粘膜での繰り返し配列 DNA 低メチル化解析)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 三家 登喜夫	教授 一瀬 雅夫

論文内容の要旨

癌細胞でみられる DNA メチル化異常は全体の低メチル化と部分的な高メチル化であると考えられてきた。全体の低メチル化とはゲノムに含まれる 5 メチルシトシンの総量が減少することで、ゲノムの大部分を占める繰り返し配列の低メチル化が主因である。ゲノム全体の低メチル化は染色体密度の低下を招きゲノム不安定性を増加させ、正常細胞で高メチル化状態である繰り返し配列の低メチル化はそのトランスポゾン活性を増加させ、腫瘍抗原や癌遺伝子の活性化を誘導する。一方で正常細胞ではメチル化されていない遺伝子プロモーター領域の CpG アイランド (CpG islands: CGIs) の高メチル化は、がん抑制遺伝子を含む多くの遺伝子の転写を抑制する。

CGIs の高メチルは癌細胞だけでなく癌でない組織にも観察される。特に胃粘膜では、胃癌の主因である *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染によって CGIs の高メチル化が誘導される。胃粘膜におけるメチル化異常の蓄積は胃癌のリスクと相関することが報告されている。CGIs の高メチル化に対して、胃発癌過程におけるゲノム全体のメチル化については不明な点が多い。特に発癌過程のどの段階で、ゲノムのどの領域に起きるのかについても詳細不明である。正常細胞で高メチル化状態にある代表的な繰り返し配列は Alu、LINE1、Sata α でゲノム全体のそれぞれ 10%、17%、4% を占める。Alu と LINE1 は散在性、Sata α はセントロメア付近に存在する縦列繰り返し配列である。

そこで申請者らは、健常人および胃癌患者を対象とし胃粘膜と癌組織での繰り返し配列のメチル化レベルを測定し、胃発癌過程における DNA メチル化異常の役割について調べた。*H. pylori* 未感染健常者をコントロール (G1) とし、*H. pylori* 感染健常者 (G2) の胃粘膜および胃癌患者の非癌部胃粘膜 (G3: *H. pylori* 感染陽性、G4: *H. pylori* 感染陰性) および胃癌組織 (Cancer) を採取した。G1、G2、G3、G4 は順番に *H. pylori* 感染による胃発癌過程を示すと考えられる。胃検体から DNA を抽出し bisulfite pyrosequence 法を用いて Alu、LINE1、Sata α を対象にメチル化レベルを測定した。また液体クロマトグラフィー法を用いて 5 メチルシトシンの総量を定量した。

個々の繰り返し配列の最大数をなす variant をそれぞれ決定した。Alu のメチル化レベルは、G1 に比べ G2、G3、G4、Cancer で有意に低下した。Sata α のメチル化レベルは、G1 に比べ G2 で有意に低下し、G3 でも低下傾向にあったが、G4 や Cancer では低下しなかった。LINE1 のメチル化レベルは G1 に比べて G2、G3、G4、Cancer で有意な低下を認めず、Cancer でのみ有意に低下した。5 メチルシトシンの総量は G1 に比べて G2、G3、G4 で低下せず、Cancer では高度にばらつきがみられた。

今回の結果から、Alu と Sata α の低メチル化は *H. pylori* 感染により発癌早期に胃粘膜に誘導されると考えられた。またゲノム全体の低メチル化は胃癌で普遍的に観察される現象ではないと考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年2月22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。

癌細胞でみられる DNA メチル化異常は全体の低メチル化と部分的な高メチル化であると考えられてきた。*H. pylori* 感染が原因である胃発癌過程で、部分的な高メチル化は *H. pylori* 感染胃粘膜で観察される。一方で、胃発癌過程でのゲノム全体およびその主因となる個々の繰り返し配列での低メチル化についてはほとんど知られていない。そこで申請者らは、ヒトを対象としたゲノム全体および個々

の繰り返し配列のメチル化レベルの胃発癌過程における変化について次のように検討した。

H. pylori 未感染健常者をコントロール(G1)とし、*H. pylori* 感染健常者(G2)の胃粘膜および胃癌患者の非癌部胃粘膜(G3: *H. pylori* 感染陽性, G4: *H. pylori* 感染陰性)および胃癌組織(Cancer)を採取した。G1、G2、G3、G4は順番に *H. pylori* 感染による胃発癌過程を示すと考えられる。抽出したDNAをBisufite処理したのち、pyrosequencing法を用いてAlu、LINE1、Sata α のDNAメチル化レベルを測定した。また抽出したDNAを1塩基単位に分解後、Liquid chromatography (LCMS)法を用いて5メチルシトシンの総量を測定し、*H. pylori* 感染による胃発癌過程での繰り返し配列のDNAメチル化状態の変化を検討した。その結果、

- (1) 個々の繰り返し配列ごとに決定した最大数のvariantに基づいてpyrosequencingに必要なプライマーを設計し、Aluの2カ所(ALU1, ALU2)、LINE1の3カ所(LINE1-1, LINE1-2, LINE1-3)、Sata α の1カ所のCpGを対象にメチル化レベルを測定した。
- (2) ALU1のメチル化レベルは、G1に比しG2、G3、G4、Cancerで有意に低下していた。ALU2でも同様に、G1に比しG2、G3、G4で有意に低下していたがCancerでは低下を認めなかった。Sata α のメチル化レベルは、G1に比しG2で有意に低下し、G3でも低下傾向にあったが、G4やCancerでは低下を認めなかった。
- (3) LINE1-1、LINE1-2、LINE1-3のメチル化レベルはいずれもG1に比しG2、G3、G4で有意な低下を認めなかった。Cancerでのメチル化レベルは一定の傾向を示さず、LINE1-1とLINE1-2ではG1と比べて低下、LINE1-3では上昇を認めた。
- (4) 5メチルシトシン全体の量は、G1に比しG2、G3、G4で有意な低下を認めなかった。Cancerでは、非常に多様であり一部に低下を示す症例を認める一方で、低下傾向を示さない症例も多く認めた。

以上より、本論文は健常者および癌患者の胃粘膜のDNAメチル化レベルをコントロールと比較し、解析することでAluとSata α の低メチル化が胃癌組織のみならず *H. pylori* 感染胃粘膜で認められること、一方5メチルシトシンの総量低下は癌の特徴の一つと報告されてきたが胃癌では普遍的に観察される現象ではないことを明らかにした。*H. pylori* 感染による胃発癌の分子機序に関する新しい知見を提示した研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第466号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	岩井茂樹		
学位論文の題目	Inhibition of morphine tolerance is mediated by painful stimuli via central mechanisms (種々疼痛負荷によるモルヒネ耐性の抑制)		
論文審査委員	主査	教授 前田正信	
	副査	教授 吉田宗人	教授 岸岡史郎

論文内容の要旨

[緒言]

モルヒネに代表される医療用麻薬は強力な鎮痛効果を有し、様々な急性痛および慢性痛の治療に用いられる。その有効性に反し、医療用麻薬を長期間使用すると鎮痛耐性ならびに精神的・身体的依存が形成され、これらが医療用麻薬の使用限界を決定づける要因の一つとなっている。近年、疼痛を有する患者において医療用麻薬を適正に使用する限り、耐性が形成されにくい可能性があるとの知見が報告されている。また、動物実験においても、疼痛を負荷することでモルヒネの鎮痛作用に対する耐性形成が抑制されることを示唆する報告が増えつつある。すなわち、疼痛緩和の目的でモルヒネを長期投与しても、耐性形成は問題とされないと考えられるようになってきた。しかしながら、疼痛存在下における医療用麻薬の耐性形成についての系統だった検討はされていない。そこで本研究では、モルヒネの耐性形成に及ぼす神経障害性および炎症性疼痛の影響について検討した。

[方法]

実験には、ICR系雄性マウスを使用した。神経障害性疼痛モデルマウスは、両後肢坐骨神経の約1/3を縫合糸で部分結紮 (Partial sciatic nerve ligation: PSL) することにより作製した。コントロール (Sham) として坐骨神経の露出のみを行った。炎症性疼痛モデルマウスは、2%ホルマリンまたは1%カラゲニン 20 μ l を両後肢足底皮下に投与することにより作製した。コントロールとして溶媒 (PBS) を投与した。モルヒネの鎮痛効果は Tail Pinch 法に従って定量した。すなわち、加重 500 g 圧の動脈クレンメでマウスの尾を挟み、マウスが逃避行動を示すまでの潜時を測定した。モルヒネ耐性は、モルヒネ (10 mg/kg, s.c.) を1日1回、5日間反復投与し形成した。耐性形成の評価は、1日目、3日目および5日目のモルヒネ投与時の鎮痛効果を測定することにより行った。脳室内 (i.c.v.) または脊髄くも膜下腔内 (i.t.) 投与に対する耐性は、2-4日目にモルヒネ (10 mg/kg) 反復皮下投与し、1日目および5日目のモルヒネ i.c.v. (10 nmol) または i.t. (5 nmol) の鎮痛効果を比較することにより評価した。モルヒネの血清コルチコステロン上昇作用に対する耐性は、モルヒネ (10 mg/kg s.c.) を5日間反復投与し、6日目のモルヒネ 10 mg/kg 投与1時間後の血清コルチコステロン濃度を蛍光法に従って定量することにより評価した。

[結果]

モルヒネの単回皮下投与により、投与後15分から75分まで最大鎮痛効果が認められ、その効果は2時間以内に消失した。モルヒネの鎮痛効果は、モルヒネ反復投与により徐々に減弱し、4および5日目には有意な鎮痛効果の減弱、すなわち耐性形成が認められた。

PSL誘発神経障害性疼痛群1日目 (モルヒネ初回投与) の鎮痛効果は、Sham処置群の鎮痛効果と差は認められなかったが、モルヒネ反復処置5日目のPSL誘発神経障害性疼痛群の鎮痛効果は、Sham処置群のそれよりも有意に強く、神経障害性疼痛負荷により耐性形成が抑制された。

ホルマリン誘発炎症性疼痛群の1日目の鎮痛効果は対照群のそれと同程度であったが、3および5日目のホルマリン誘発炎症性疼痛群の鎮痛効果は対照群のそれよりも有意に強力であった。また、モルヒネの血清コルチコステロン上昇作用も、モルヒネ反復投与により減弱し、耐性が形成された。こ

の耐性形成もまた、ホルマリン誘発炎症性疼痛負荷により抑制された。

カラゲニン誘発炎症性疼痛群においても、モルヒネ耐性形成の抑制が認められた。疼痛下におけるモルヒネ鎮痛耐性形成阻害の責任部位を同定するため、モルヒネ i.c.v. または i.t. 投与における耐性形成を検討した。モルヒネ反復皮下投与により、5日目のモルヒネ i.c.v. または i.t. 投与の鎮痛効果が1日目のそれに比べて有意に減弱し、耐性形成が認められた。この耐性形成も、カラゲニン誘発炎症性疼痛負荷により抑制された。

[考察および結論]

本研究において、神経結紮に基づく神経障害性疼痛負荷ならびにホルマリンやカラゲニンによる炎症性疼痛負荷により、モルヒネの鎮痛耐性形成が抑制されることを明らかにした。モルヒネの血清コルチコステロン上昇作用における耐性形成もまた、ホルマリン誘発炎症性疼痛負荷により抑制された。この結果は、疼痛の性質に依存せず、疼痛存在下においては医療用麻薬の鎮痛作用および内分泌作用に対する耐性形成が抑制されることを示唆している。さらにモルヒネ反復皮下投与によりモルヒネの i.c.v. および i.t. 投与による鎮痛作用に耐性が形成され、この耐性もカラゲニン誘発炎症性疼痛負荷により抑制された。従って、種々疼痛負荷によるモルヒネ耐性形成の抑制機構は、少なくとも中枢神経系に存在すると考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 24 年 2 月 13 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

痛みは、侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛、心因性疼痛に分類されている。一方、モルヒネなどの医療用麻薬は強力な鎮痛作用を有し、主に侵害受容性疼痛の治療に用いられているが、長期間反復使用すると耐性ならびに依存が形成され、それが医療用麻薬の使用限界を決定づける要因と考えられてきた。その中で、近年、疼痛緩和の目的でモルヒネを患者に長期間反復使用しても、耐性形成は問題にならないとの報告が見られるようになった。しかしながら、疼痛存在下における医療用麻薬の耐性形成についての基礎的検討は十分にされていないのが現状である。本論文は、モルヒネの耐性形成に及ぼす神経障害性および侵害受容性疼痛（炎症性疼痛）の影響を、実験動物を用いて基礎的に検討したものである。

動物は、ICR 系雄性マウスを用いた。神経障害性疼痛モデルは坐骨神経部分結紮により作製し、炎症性疼痛モデルは 2%ホルマリンまたは 1%カラゲニン 20 μ l を両後肢足底皮下に投与することにより作製した。モルヒネの鎮痛作用は、皮下投与、脳室内投与または脊髄くも膜下腔内投与により、また、血清コルチコステロン上昇作用は皮下投与により観察した。痛覚閾値は Tail-Pinch 法にて、血清コルチコステロン濃度は蛍光法にて評価した。

その結果、

- 1) モルヒネの反復投与により、モルヒネの鎮痛作用およびコルチコステロン上昇作用に耐性が形成された。
- 2) 神経障害性疼痛および炎症性疼痛負荷により、モルヒネの鎮痛耐性形成が抑制された。さらに、モルヒネの血清コルチコステロン上昇作用に対する耐性形成も、炎症性疼痛負荷により抑制された。
- 3) 炎症性疼痛負荷により抑制されるモルヒネ鎮痛に対する耐性形成の抑制は、モルヒネの脳室内および脊髄くも膜下腔内投与による鎮痛作用においても認められた。

以上より、本論文は、神経障害性疼痛および炎症性疼痛負荷によりモルヒネ耐性形成は抑制され、その責任部位は少なくとも中枢神経系に存在する可能性を示唆したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第467号		
学位授与の日	平成24年3月27日		
氏名	森 広子		
学位論文の題目	Identification of the radicals formed in the reactions of some endogenous photosensitizers with oleic acid under the UVA irradiation. (UVA照射下において内因性光増感剤とオレイン酸との反応溶液中に生成するラジカルの同定)		
論文審査委員	主査	教授 小山 一	
	副査	教授 井原 義人	教授 岩橋 秀夫

論文内容の要旨

【緒言】

地表に届く紫外線の約90%はUVA (320-400 nm) であり、UVA照射は光増感剤を介して一重項酸素を発生し、生体に障害を及ぼすとされている。生体内に存在する光増感剤としてFMN (フラビンモノヌクレオチド), FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド), Folic acid (葉酸), Urocanic acid (ウロカニン酸), NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド), NADP (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリニン酸), PLP (ピリドキサルリン酸) などが知られている。本研究では、これらの光増感剤が生体へ及ぼす影響を知るために、これらの光増感剤の脂質ラジカル生成への影響について検討した。

【方法】

標準反応溶液は4.3 mM Oleic acid, 25 μ M FMN (FAD, Folic acid, Urocanic acid, NAD, NADP, PLP), 40 mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4), 10 mM コール酸, 0.1 M 4-POBN, 1 mM FeSO₄であった。スピントラップ剤として4-POBNを用いた。FeSO₄と4-POBNを含まない標準反応溶液に7.8 J/cm²のUVAを照射後、4-POBNを添加し、FeSO₄を加えて反応を開始した。反応温度は25°Cであった。反応液の電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルを測定することにより、ラジカルを検出した。さらに、高速液体クロマトグラフィー-電子スピン共鳴装置-マススペクトロメーター (HPLC-ESR-MS) 分析をすることにより、そのラジカル種の構造決定を行った。

【結果および考察】

1. 各種内因性光増感剤によるオレイン酸由来ラジカル生成

FMN, FAD, Folic acid, Urocanic acid, NAD, NADP, PLP などの内因性光増感剤を含む標準反応溶液のESR分析を行った。FMN, FAD, Folic acid を含む標準反応溶液で顕著なESRシグナルが得られ、ラジカルの生成が示唆された。FMNのESRシグナル強度と比べ、FADは55 \pm 15%、Folic acidは64 \pm 12% (7.8 J/cm²)、105 \pm 23% (23.4 J/cm²) であった。この反応に対する一重項酸素の影響をみるために、D₂O中で反応を行った。その結果、FMN, FAD, Folic acid を含む標準反応溶液で顕著なESRシグナル強度の増加がみられた。

Urocanic acid, NAD, NADP, PLP を含む標準反応溶液を、それぞれ23.4 J/cm²で照射したが、ラジカルは検出されなかった。

2. オレイン酸由来ラジカルの構造決定

FMN, FAD, Folic acid を含む標準反応溶液中に生成するラジカル種の構造決定を行うためにHPLC-ESR-MS分析を行った。FMN, FAD, Folic acid のD₂O反応溶液を分析すると、FMNについては保持時間26.8 min (Peak 1), 27.3 min (Peak 2), 36.9 min (Peak 3)のピークが、FADについては保持時間37.0 min (Peak 3)のピークが、Folic acidについては保持時間27.1 min (Peak 1), 27.7 min (Peak 2), 36.9 min (Peak 3)のピークが得られた。Peak 1, 2, 3のマススペクトルを測定すると、m/z 354, m/z 354, m/z 338のイオンが得られた。このことから、Peak 1 および Peak 2 は、4-POBN/1-(3-carboxypropyl)-4-hydroxybutyl radical 付加体の2つのジアステレオマーであると、Peak 3は、

4-POBN/7-carboxyheptyl radical 付加体であると推測された。

3. 1-(3-carboxypropyl)-4-hydroxybutyl radical および 7-carboxyheptyl radical の生成機構

D₂O 中で反応を行った結果、FMN, FAD, Folic acid を含む標準反応溶液で顕著に ESR シグナル強度が増加したことより、これらのラジカル生成に一重項酸素が関与すると考えられる。それぞれの光増感剤は、365 nm の光照射により励起一重項状態に遷移し、項間交差を経て励起三重項状態となる。この励起三重項状態の光増感剤と三重項酸素との Type II 反応により、一重項酸素が生成するものと思われる。この一重項酸素とオレイン酸とのエン反応により過酸化脂質が生じ、鉄イオンとの反応を通して 1-(3-carboxypropyl)-4-hydroxybutyl radical および 7-carboxyheptyl radical が生成するものと思われる。

【結語】

種々の内因性光増感剤 (FMN, FAD, Folic acid, Urocanic acid, NAD, NADP, PLP) の中で、FMN, FAD, Folic acid を含む標準反応溶液で顕著な ESR シグナルがみとめられ、ラジカル種の生成が示唆された。HPLC-ESR-MS 分析によりそれらのラジカル種は、1-(3-carboxypropyl)-4-hydroxybutyl radical および 7-carboxyheptyl radical であると同定された。内因性光増感剤はこれらのラジカル生成を介して、生体に障害を及ぼす可能性が考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 24 年 3 月 8 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。

活性酸素発生には様々な要因があるが、中でも紫外線照射はその発生に大きく関わっている。地表に届く紫外線の約 90% は UVA (320~400nm) であり、UVA は光増感剤を介して一重項酸素を生成し、生体に障害を及ぼすとされている。生体内に存在する光増感剤として FMN (フラビンモノヌクレオチド)、FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド)、Folic acid (葉酸)、Urocanic acid (ウロカイン酸)、NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)、NADP (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸)、PLP (ピリドキサルリン酸) などが知られている。本論文は、これらの内因性光増感剤の脂質ラジカル生成への影響について検討したものである。

FMN, FAD, Folic acid を含むオレイン酸反応溶液に UVA (365nm) を照射した結果、顕著な ESR シグナルが得られ、ラジカルの生成が示唆された。さらにこれら 3 種の光増感剤においては、重水反応溶液で 3~4 倍の ESR シグナルを認めたことより一重項酸素が関与しているものと思われた。一方、Urocanic acid, NAD, NADP, PLP を含むオレイン酸反応溶液ではラジカル検出を認めなかった。FMN, FAD, Folic acid で検出されたラジカルを HPLC-ESR 分析した結果、Peak 1, 2, 3 が検出され、HPLC-ESR-MS 分析の結果、Peak 1, 2 では m/z 354 のイオンが得られ、これは 4-POBN/1-(3-carboxypropyl)-4-hydroxybutyl radical adducts の 2 つのジアステレオマーであると推測された。Peak 3 では m/z 251 と m/z 338 のイオンが検出され、m/z 338 イオンは 4-POBN/7-carboxyheptyl radical adduct, (M+H)⁺ であり、m/z 251 は m/z 338 から (CH₃)₃C(O)N が解離したものであると推測された。

本研究の結果、内因性光増感剤 FMN, FAD, Folic acid を含むオレイン酸反応溶液で顕著な ESR シグナルが得られ、ラジカル種の生成が示唆された。HPLC-ESR-MS 分析によりそれらのラジカル種は、1-(3-carboxypropyl)-4-hydroxybutyl radical および 7-carboxyheptyl radical であると同定された。この結果から、UVA 照射下でこれらの内因性光増感剤は脂質由来ラジカルを生成し、生体に障害を及ぼす可能性が示唆された。

以上より本論文は、内因性光増感剤が一重項酸素の生成を介して、脂質由来のラジカルを生成させることをはじめて明らかにしたものであり、その医学的関連の重要性から学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第468号		
学位授与の日	平成24年3月27日		
氏名	芝 寿実子		
学位論文の題目	Longitudinal changes in physical capacity over 20 years in athletes with spinal cord injury (脊髄損傷対麻痺アスリートの20年における身体機能の変化)		
論文審査委員	主査	教授 三家 登喜夫	
	副査	教授 宮下 和久	教授 田島 文博

論文内容の要旨

【緒言】身体機能は加齢と共に低下するが、スポーツ活動参加に代表される活発な身体活動はこの加齢に伴う身体機能の低下を防止すると広く認識されている。加齢に伴う身体機能の変化に関する報告は、健常者を対象としたものはあるが、身体障害のある者を対象とした縦断的調査はほとんどみられない。特に、スポーツを積極的に行っている脊髄損傷対麻痺者（脊損者）を対象とした縦断的調査はこれまで実施されていない。また、脊損者では、起立性低血圧や自律神経過反射、体温調節障害、基礎代謝の低下など、健常者とは異なる循環代謝応答を示すため、脊損者のスポーツ参加が身体機能低下を防止するという効果に疑問が持たれていた。本研究の仮説は、スポーツ活動が脊損者の最大酸素摂取量維持に寄与するというものである。その検証のため、スポーツ参加脊損者を対象に20年にわたる縦断的調査を行った。

【対象・方法】対象は、1986年～1988年に開催された第4、5、6回の大分国際車いすマラソン大会に競技者として参加していたTH8～L1レベルの脊損者7名。全ての被験者は座業就労者であり、日常生活は車いすで全て自立していた。そのマラソン大会参加直前と、20年後に測定を実施した。検査項目は、最大酸素摂取量（VO₂max）、安静時の血圧と心拍数。また、身体機能に影響を与えると考えられる身体活動について聞き取り調査を行った。VO₂maxは、呼気ガス分析装置(COSMED K4b2, Rome, Italy)を用いて、最大運動負荷試験により計測した。統計学的検討には、paired-t testを用い、有意水準5%未満を有意差有とした。

なお、本研究は大分国際車いすマラソン大会開催準備委員会と和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た上で実施した。

【結果】20年間の日常のスポーツ活動は様々であった。7名のうち6名はスポーツ活動を継続しており、特に被験者2名（アスリート）はマラソン大会参加のために車いすローラーやロードトレーニングなどの有酸素トレーニングを精力的に実施していた。1名の被験者のみ（セダンタリー）20年前に実施された調査の後にスポーツ活動をやめていた。

被験者の平均体重は20年間で有意に増加していたが、安静時血圧および心拍数に変化は認められなかった。VO₂maxは20年後も維持されていたが、アスリート2名のVO₂maxは著明に増加しており、反対にセダンタリーのVO₂maxは53%へと著明に減少していた。

【考察】

本研究は、20年にわたる縦断研究であり、脊損者の加齢の影響を評価した研究では最も長期にわたる。被験者全員の体重は20年後に増加していたが、体重で調整したVO₂maxは、20年後も同じレベルに維持されていた。このことから、本研究の被験者の心肺機能は20年後も維持されていたといえる。

一方、個人差も認められた；1) セダンタリー1名を除くマラソン大会の参加を継続していた被験者のVO₂maxは維持、あるいは増加していた；2) アスリート2名のVO₂maxは、著明に増加していた；3) 当初はスポーツを行っていたが、途中でスポーツ参加をやめたセダンタリーのVO₂maxは、20年後に著明に減少した。これらの結果は、少数グループではあるが、脊損者のVO₂maxは年齢よりもむしろスポーツ活動を反映していることを示している。

健常者の有酸素能力は、加齢に伴い低下することが広く知られており、Astrandらは、20年の縦断研究で VO_2max は $0.44mL.kg^{-1}.min^{-1}.y^{-1}$ 低下したと報告している。また、健常者の VO_2max の加齢に伴う低下は、運動によっても完全に防止することはできず、運動習慣のある者の方が運動習慣のない者より高く保たれているものの、年齢と共に低下すると報告されている。しかし、20年前に全てのスポーツ活動をやめてしまったセダンタリーの VO_2max が著明に減少したことや、車いすマラソン大会参加のためのトレーニングが脊損者の VO_2max を維持したこと、また、トレーニングの程度が被験者の VO_2max に反映していたことから、定期的な持久力運動は、脊損者の加齢に伴う VO_2max の低下を防ぐことが示唆される。健常者の研究報告から推察すれば、アスリート2名は特異例として注目されるべきであるかもしれないが、この少人数のグループの中で、積極的にスポーツを続けていた2名が2名とも VO_2max を明らかに増やしていた点は注目される。

VO_2max の低下は、生活の質や機能的自立に大きな影響を与える。特に、障害者では、さらにその影響力は大きくなる。車いす使用者である脊損者の日常生活活動は非常に限られており、通常の日常生活活動だけでは身体機能を維持改善するには不十分である。本研究は、積極的なスポーツ参加が脊損者の加齢に対して VO_2max を維持する可能性を示した。それ故、積極的にスポーツに参加することは、健常者以上の利益が期待できる。

【結語】本研究により、脊損者において20年にわたるスポーツ活動の継続は VO_2max の低下防止に寄与することが示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年3月15日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

ヒトの身体機能は加齢に伴い低下する。しかし、スポーツ活動参加に代表される活発な身体活動はこの加齢に伴う身体機能の低下を抑制あるいは遅延させると認識されている。体力の指標とされる最大酸素摂取量（ VO_2max ）は、活発な身体活動を行っている人では、行っていない人に比較して、高いまま推移することが知られている。

これまでスポーツを積極的に行っている脊髄損傷対麻痺者（脊損者）を対象とした縦断的調査は実施されていない。脊損者では、起立性低血圧や自律神経過反射、体温調節障害、基礎代謝の低下など、健常者とは異なる循環代謝応答を示すため、脊損者のスポーツ参加が身体機能低下を防止するという効果に疑問が持たれていた。本研究では、スポーツ活動が脊損者の VO_2max に寄与するという仮説のもと、スポーツ参加脊損者を対象に20年にわたる縦断的調査を行い、その検証を行った。

1986年～1988年に開催された大分国際車いすマラソン大会に競技者として参加していた脊損者を対象に、そのマラソン大会参加直前と、20年後に VO_2max を測定し比較検討した。結果として、被験者の平均 VO_2max は20年後も維持されていた。しかし、個人差もみられた。マラソン大会の参加を継続していた者の VO_2max は維持あるいはわずかに増加していたのに対し、積極的にトレーニングを実施していた者の VO_2max は著明に増加していた。一方、スポーツをやめてしまった者の VO_2max は著明に減少していた。以上から、スポーツ参加の有無とトレーニングの程度が被験者の VO_2max に反映していたことが示され、定期的な持久力運動は脊損者の加齢に伴う VO_2max の低下を防ぐことが示唆された。

VO_2max の低下は、生活の質や機能的自立に大きな影響を与える。特に、障害者では、さらにその影響力は大きくなることから、 VO_2max をできる限り高く保つことが望まれる。本研究は、積極的なスポーツ参加が脊損者の加齢に対して VO_2max を維持することを明らかにし、スポーツが脊損者の健康の維持増進に貢献することを示した。

本研究により、脊損者において20年にわたるスポーツ活動の継続は VO_2max の低下防止に寄与することが示され、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第870号		
学位授与の日	平成23年5月10日		
氏名	木口 倫一		
学位論文の題目	Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 β up-regulation (MIP-1 α はIL-1 β 発現増加を介して神経障害性疼痛形成に関与する)		
論文審査委員	主査	教授 仙波 恵美子	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 岸岡 史郎

論文内容の要旨

【緒言】

神経系の物理的損傷や機能障害に起因する神経障害性疼痛は、慢性化する激しい痛みを特徴とし、従来の鎮痛薬も奏功しないことから生活の質を大きく損なう。その成因は多岐に渡るが、近年では神経細胞、グリア細胞および炎症性細胞間のクロストークにより形成される慢性的な神経炎症がその病態生理の分子基盤を担うことが示唆されている。この概念に基づく様々な視点から新たな創薬シーズが探索されているものの、慢性疼痛の詳細な機構については依然として明らかにされていない。炎症の主要なメディエーターであるケモカインは炎症性細胞の遊走・活性化を調節する液性因子であり、4種類のファミリーに大別される。サイトカイン・ケモカインネットワークは通常、組織修復および炎症の収束に重要な役割を果たしているが、その破綻により慢性的な炎症性疾患の誘導因子ともなる。神経障害性疼痛においても、サイトカイン・ケモカインの関与が注目を集めつつあるが、多くのケモカインは慢性疼痛における役割が十分に知られていない。そこで本研究では炎症性 CC ケモカインに属する CC-chemokine ligand 3 (Macrophage inflammatory protein-1 alpha; MIP-1 α) が神経障害性疼痛に及ぼす役割について、動物モデルを用いて検討を行った。

【方法】

ICR 系雄性マウス後肢の坐骨神経 (SCN) を部分結紮 (Partial sciatic nerve ligation; PSL) し、神経障害性疼痛モデルを作製した。対照 (Sham) 処置として、SCN の露出のみを行った。神経障害性疼痛の評価として、その特徴的的症状である触アロディニアおよび熱痛覚過敏を観察した。金網上で馴化させたマウスの後肢を屈曲圧 0.16 g–0.4 g の von Frey フィラメントで刺激し、その逃避反応回数を触アロディニアの指標とした。またガラス板上で馴化させたマウスの後肢に放射熱を照射し、その逃避反応潜時を熱痛覚過敏の指標とした。薬物はいずれも PBS に溶解し、SCN 周囲 (10 μ l) に局所投与した。SCN 組織における RT-PCR、Western blotting、免疫染色は定法に従い行った。

【結果】

PSL により長期的な触アロディニアおよび熱痛覚過敏が惹起された。傷害部位である SCN において、MIP-1 α mRNA の発現増加が PSL3 時間後より観察され、1 週間以上持続した。免疫染色により PSL1 日後の MIP-1 α 発現を評価したところ、MIP-1 α 陽性細胞数が有意に増加しており、それらは GFAP 陽性シュワン細胞および F4/80 陽性マクロファージに局在していることが明らかとなった。MIP-1 α 中和抗体を PSL 直後より SCN 周囲に局所投与すると、触アロディニアおよび熱痛覚過敏の形成が抑制された。その効果は投与時期に依存し、PSL2 週間以後における MIP-1 α 中和抗体の投与では触アロディニアおよび熱痛覚過敏の抑制効果は認められなかった。Sham 処置 SCN にリコンビナント MIP-1 α を局所投与すると、持続的な触アロディニアおよび熱痛覚過敏が惹起された。MIP-1 α の受容体である CCR1 および CCR5 の発現を RT-PCR および Western blotting により評価すると、両者ともシュワン細胞およびマクロファージにおいて mRNA およびタンパク質レベルでの発現増加が認められた。各々に

特異的な siRNA を SCN 周囲に局所投与したところ、CCR1 ノックダウンにより触アロディニアが、また CCR5 ノックダウンにより触アロディニアおよび熱痛覚過敏が減弱した。神経障害性疼痛形成因子の一つである Interleukin-1beta (IL-1 β) の発現を RT-PCR および Western blotting により評価したところ、PSL3 時間後より 2 週間後まで増加が認められ、IL-1 β 中和抗体を SCN 周囲に局所投与すると触アロディニアおよび熱痛覚過敏が抑制された。MIP-1 α 中和抗体の局所投与により、IL-1 β の mRNA およびタンパク質レベルでの発現増加が抑制され、更に CCR1 および CCR5 の siRNA 処置によっても IL-1 β のタンパク質レベルの発現が抑制された。マクロファージの活性化抑制薬であるニコチンを局所投与すると、触アロディニアおよび熱痛覚過敏が抑制され、MIP-1 α および IL-1 β の発現増加も抑制された。

【考察および結論】

傷害後の末梢神経においてシュワン細胞の活性化およびマクロファージに代表される炎症性細胞の集積が認められ、それらのクロストークは慢性疼痛の病態を担うことが知られている。本研究ではケモカインである MIP-1 α が PSL 後の SCN においてシュワン細胞およびマクロファージに発現し、触アロディニアおよび熱痛覚過敏の形成に重要な役割を果たすことを見出した。またその作用の一部には、炎症性サイトカインの発現増加および維持を介していることが示唆された。本研究の結論として、傷害後の末梢神経において増加した MIP-1 α が、その受容体である CCR1 および CCR5 を介し、神経障害性疼痛の病態を担うメディエーターとして機能することが明らかとなった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 4 月 19 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

神経障害性疼痛は慢性化する激しい痛みを特徴とし、従来の鎮痛薬も奏功しないことから生活の質を大きく損なうことが知られている。その病態生理の分子基盤にはグリア細胞および免疫細胞間のクロストークを介する神経炎症が重要な役割を担うとされており、この概念に基づいた創薬シーズが探索されている。本論文は、動物実験モデルを用いて神経障害性疼痛における MIP-1 α の役割について検討したものである。

動物は ICR 系雄性マウスを用い、神経障害性疼痛は坐骨神経部分結紮により誘発した。また MIP-1 α -CCR 経路の阻害は、MIP-1 α 中和抗体ならびに CCR1 および CCR5 に対する siRNA を用いた。

その結果、

- 1) 傷害後の末梢神経において MIP-1 α およびその受容体である CCR1、CCR5 の発現増加が認められ、それらは活性化シュワン細胞および傷害神経に遊走するマクロファージに局在していた。
- 2) MIP-1 α の局所投与（坐骨神経周囲）により持続的な疼痛が惹起された。
- 3) 傷害初期に MIP-1 α -CCR 経路を阻害すると、神経障害性疼痛の形成が抑制され、傷害神経における IL-1 β の発現増加も抑制された。
- 4) マクロファージ抑制薬であるニコチンの局所投与は、神経障害性疼痛を抑制し、MIP-1 α および IL-1 β の発現増加も抑制した。

以上より、本論文は、ケモカインである MIP-1 α が神経傷害後のグリア細胞および免疫細胞において発現増加し、神経障害性疼痛の形成に重要な役割を果たすことを初めて明らかにしたものであり、その作用の一部には炎症性サイトカインの発現増加を介していることを示唆した点においても意義深く、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871号		
学位授与の日	平成23年6月14日		
氏名	巽 邦 浩		
学位論文の題目	Effect of anti-oxidants, Ricetrienol and α -tocopherol, on adipocytokine abnormalities and fatty liver in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty diabetic rats (OLETF ラットにおけるアディポサイトカイン異常および脂肪肝に対する抗酸化物質 (ライストリエノール、 α トコフェロール) の効果)		
論文審査委員	主 査	教授 三 家 登喜夫	
	副 査	教授 村 垣 泰 光	教授 井 原 義 人

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

2型糖尿病およびメタボリックシンドロームは、動脈硬化性疾患や肝疾患の重大な危険因子である。動脈硬化性疾患の成因にアディポサイトカイン異常が重要な役割を果たしており、酸化ストレスがこれら異常の原因の一つであると報告されている。さらに近年、脂肪肝から末期肝硬変に進行する例が知られ、酸化ストレスが肝障害に関与していると言われている。アディポサイトカイン異常や脂肪肝の予防に対する抗酸化療法の有効性が報告されており、2型糖尿病やメタボリックシンドローム患者に抗酸化作用のあるサプリメントを投与すれば、動脈硬化性疾患の発症を抑制できる可能性がある。ライストリエノール (RT) は米糠から抽出した抗酸化物質であり、トコフェロール類 (>3%)、トコトリエノール (>3%)、スクアレン (>8%)、植物ステロール類 (>10%) などを含む多成分の混合物である。我々はOLETF ラット (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat) を用いて、アディポサイトカイン異常および脂肪肝に対する RT の効果を検討し、 α トコフェロール (AT) と比較した。

【対象・方法】

OLETF ラットは自然発症肥満 2型糖尿病のモデル動物であり、高ショ糖食負荷により糖尿病発症を促進することができる。5週齢で実験を開始した。18匹のOLETF ラットを30%蔗糖溶液で飼育し、肥満2型糖尿病の実験モデルとした (DM群)。別の18匹のOLETF ラットを水道水で飼育し、糖尿病未発症の肥満群とした (OB群)。全てのラットは初め標準飼料で飼育した。17週齢で、DM群のOLETF ラットが全て糖尿病を発症 (随時血糖値 200mg/dl 以上) した後、両群を体重、血糖値に偏りがないように各々3群ずつに分け、各群を標準飼料、0.05%のRTあるいはAT含有飼料で12週間飼育した。OB群の標準飼料群をOB-S群、RT含有飼料群をOB-R群、AT含有飼料群をOB-A群とし、DM群も同様にDM-S群、DM-R群、DM-A群とした (各群 n=6)。飼育期間終了時 (29週齢)、24時間尿を採取し、8時間絶食後に血糖値を測定した。腹腔内にペントバルビタール (60mg/kg 体重) を注射して麻酔した後開腹し、心臓より血液を採取した。さらに肝臓を摘出してホルマリン固定し、一部を凍結保存した。

採取した血液を用いて、糖化ヘモグロビンをHPLC法、血中インスリン、アディポネクチン、レジスチン、レプチン、MCP-1、ICAM-1、尿中8イソプロスタンをEIA法で測定した。肝組織をHE染色し、Kleinerらの方法に従って病理組織学的検討を行った。脂肪化の程度は、脂肪滴を有する肝細胞の割合により0~3に評価した (0,<5%; 1,5%-33%; 2,>33%-66%; 3,>66%)。実質の炎症は、炎症巣の個数により0~3に評価した (0,なし; 1,<200倍で2カ所未満; 2,200倍で2-4カ所; 3,200倍で5カ所以上)。肝細胞障害は、ballooning cellの個数により0~2に評価した (0,なし; 1,数個のballooning cells; 2,多数のballooning cells)。これら3つのスコアの合計を病理スコアとした。病理スコアは3人の研究者が別々に判定し、3人の平均を各ラットの病理スコアとした。また肝組織をhomogenizeして、肝組織の中性脂肪量をFolch法を用いて測定した。

病理スコアは正規分布でないためKruskal-Wallis検定を用い、post-hoc testはMann-WhitneyのU-testを用いた。他のデータは正規分布のため分散分析を用い、post-hoc testはFisherのPLSD法を用いた。データは平均値±標準偏差で示す。p<0.05を有意とした。

【結果】

体重、血糖値、糖化ヘモグロビン、血中インスリン、サイトカインおよび尿中 8 イソプロスタン

体重は各群間で有意差はなかった。血糖値および糖化ヘモグロビンは、OB 群より DM 群で有意に高値であった。RT あるいは AT の投与はこれらに影響しなかった。

血中アディポネクチンは OB-S より DM-S で有意に低下したが (3.44 ± 0.44 vs. 2.16 ± 0.46 ng/ml, $p < 0.001$)、DM-R、DM-A で DM-S に比し有意に低下が抑制された (2.16 ± 0.46 vs. 3.64 ± 0.62 ng/ml, $p < 0.001$ および 2.16 ± 0.46 vs. 2.98 ± 0.52 ng/ml, $p < 0.01$)。血中レジスチンは OB-S より DM-S で有意に増加しており (16.2 ± 5.2 vs. 32.2 ± 9.6 ng/ml, $p < 0.01$)、DM-A で DM-S に比し有意に増加が抑制された (32.2 ± 9.6 vs. 19.6 ± 11.0 ng/ml, $p < 0.05$)。DM-R でもやや抑制されたが、有意ではなかった。血中インスリン、レプチン、MCP-1、ICAM-1 は各群間で有意差はなかった。

尿中 8 イソプロスタンは OB-S より DM-S で有意に増加した (47.3 ± 2.9 vs. 69.3 ± 17.8 pg/mgCr, $p < 0.05$)。DM-R、DM-A でやや抑制されたが、有意ではなかった。

病理組織学的検討および肝組織の中性脂肪

病理スコアは OB-S より DM-S で有意に高かった。DM-R でやや抑制されたが有意ではなかった。肝組織の中性脂肪量は OB-S より DM-S で有意に増加しており (59.2 ± 18.5 vs. 121.4 ± 20.7 mg/g, $p < 0.001$)、DM-R で DM-S に比し有意に増加が抑制された (121.4 ± 20.7 vs. 96.2 ± 22.9 mg/g, $p < 0.05$)。

【考察】

- ① 糖尿病ラットでアディポネクチン低下、レジスチン上昇などのアディポサイトカイン異常を認めたが、非糖尿病ラットでは認めなかった。高血糖が脂肪細胞の機能異常に影響していることが示された。尿中 8 イソプロスタンは糖尿病ラットで有意に増加しており、酸化ストレスの増加が示唆された。2 型糖尿病におけるアディポサイトカイン異常に酸化ストレスが関与しているとの報告があり、これらの結果と一致するものであった。
- ② RT あるいは AT の投与でこれらアディポサイトカイン異常が改善することが示された。RT あるいは AT の投与で血糖値およびグリコヘモグロビンは変化しておらず、これらの作用は血糖改善によるものではない。RT あるいは AT の投与で尿中 8 イソプロスタンは低下したが、有意ではなかった。我々は以前に、糖尿病マウスにおいて RT に抗酸化作用があることを報告している。従って、糖尿病ラットにおいても RT や AT の抗酸化作用がアディポサイトカイン異常の改善に大きな役割を果たしていると考え、詳細な機序の解明にはさらなる研究が必要である。
- ③ 糖尿病、非糖尿病ラット両方で脂肪肝を認めたが、糖尿病ラットでより顕著であった。高血糖が脂肪肝を促進することが確認された。
- ④ 糖尿病ラットにおいて RT 投与で脂肪肝が改善しており、RT が脂肪肝予防に有効である可能性が示された。AT では脂肪肝は改善しなかった。RT による脂肪肝改善の最も妥当な理由は RT の抗酸化作用であるが、抗酸化物質である AT の効果が乏しかったことから他の機序も考えられる。アディポネクチンには脂肪肝改善作用があることが報告されており、アディポネクチンの上昇を介した脂肪肝の改善。RT に含まれる植物ステロールは腸でのコレステロールの吸収を抑制するため、それによる脂肪肝の改善。RT は多成分の混合物であり、他の成分による脂肪肝の改善などが考えられる。

ビタミン E は非アルコール性脂肪肝炎の抑制にピオグリタゾンよりも有効であったとの報告がある。本研究で、RT は AT (ビタミン E) よりも脂肪肝抑制に有効であった。RT は脂肪肝を予防するサプリメントとして有望であると思われる。

本研究で、ライストリエノールは肥満 2 型糖尿病ラットにおけるアディポサイトカイン異常を改善し、脂肪肝を抑制することが示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 23 年 3 月 24 日論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

2 型糖尿病やメタボリックシンドロームにおける動脈硬化の成因にアディポサイトカイン異常が重要な役割を果たしており、その原因として酸化ストレスの亢進が報告されている。また、非アルコール性脂肪肝炎においても発症に酸化ストレスの関与が指摘されている。2 型糖尿病やメタボリックシンドロームの患者に抗酸化物質を投与すれば、アディポサイトカイン異常や脂肪肝の発症を抑制でき

る可能性がある。

本論文は、肥満 2 型糖尿病のモデルである OLETF ラット (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat) を用いて、アディポサイトカイン異常および脂肪肝に対する抗酸化物質ライストリエノール (RT) の効果を検討し、 α トコフェロール (AT) と比較した。RT は米糠から抽出した、トコフェロール、トコトリエノール、スクアレン、植物ステロールなどを豊富に含む混合物である。OLETF ラット (n=36) を 30% 蔗糖溶液で飼育して糖尿病を発症させた DM 群と、水道水で飼育し肥満だが糖尿病未発症の OB 群に分けた。DM 群のラットが全て糖尿病を発症後、両群を各々 3 群に分け、標準飼料 (DM-S、OB-S 群)、RT 含有飼料 (DM-R、OB-R 群) あるいは AT 含有飼料 (DM-A、OB-A 群) で飼育した。DM-S の血中アディポネクチンは OB-S より有意に低値であったが、DM-R および DM-A の血中アディポネクチンは DM-S より有意に高値であった。肝の中性脂肪量は、DM-S は OB-S より有意に増加したが、DM-R では DM-S に比し有意に改善した。一方、DM-A では改善を認めなかった。RT は糖尿病におけるアディポサイトカイン異常と脂肪肝を改善し、AT より有用であることが示された。

本論文は、ライストリエノールが肥満 2 型糖尿病ラットにおけるアディポサイトカイン異常を改善し、脂肪肝を抑制することを初めて示したものであり、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872号		
学位授与の日	平成23年6月14日		
氏名	上松伸彦		
学位論文の題目	Sevoflurane inhibits angiotensin II-induced Rho kinase-mediated contraction of vascular smooth muscle from hypertensive rat (高血圧ラット血管平滑筋収縮に及ぼすセボフルランの作用に関する研究 - Rho-kinase の関与 -)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡史郎	
	副査	教授 赤阪隆史	教授 岡村良隆

論文内容の要旨

【緒言】

現在、本邦において全身麻酔薬の中心は、揮発性麻酔薬であり、その中でもセボフルランがその調節性の高さから頻用されている。一般的に、揮発性麻酔薬により血圧は低下する。血圧低下の機序として、心拍出量の低下に加え血管拡張が大きく関与している。アンジオテンシン II は、血管平滑筋収縮作用により全身の血圧調節に関与しており、平滑筋収縮機序には細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇による機構と収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性増強による機構が存在する。これらの機序に関して、セボフルランは主として収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性調節を抑制することによりアンジオテンシン II 収縮を抑制することを Wistar ラットにおいて既に報告した。

高血圧患者では、揮発性麻酔薬により過度の低血圧を来すことがある。最近、Rho-kinase を介する Ca^{2+} 感受性の増強が高血圧の発生と進展に深く関与していることが明らかになってきた。Rho-kinase 刺激薬である GTP γ S による Rho-kinase の活性化はセボフルランにより強く抑制されたことから、高血圧患者において、セボフルランが過度の血圧低下を来すのは、Rho-kinase の活性化を抑制することにより収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性を低下させ、強い血管拡張作用を来すことが原因であるとの仮説を立てた。

本研究の目的は、この仮説を、自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rats ; SHR) と対照ラット (Wistar-Kyoto rats ; WKY) を用い、血管張力、細胞内 Ca^{2+} 濃度、Rho-kinase の活性を測定することにより証明することである。

【方法】

和歌山県立医科大学動物実験倫理委員会よりこの実験に対する承認を得た。

生後 11 ~ 13 週の WKY および SHR ラットを用い、収縮期血圧は実験 1 ~ 2 日前に、Tail cuff 法で測定した。

1、等尺性張力変化測定

胸部下行大動脈を摘出し、内皮除去リング状標本を作製した。標本をリング液中に懸垂し、アンジオテンシン II 投与 (10^{-9} ~ 10^{-6} M) し、等尺性張力変化を計測した。また一部の標本にはアンジオテンシン II 投与 15 分前に、セボフルラン (1.7 ~ 5.1%) または、Rho kinase 阻害薬である、Y27632 (3×10^{-7} M) を投与しその作用を検討した。

2、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化測定

胸部下行大動脈を摘出し、内皮除去柵状標本を作製した。標本をカルシウム蛍光指示薬である Fura-2 acetoxymethyl ester に暴露した後、リング液中に懸垂し、セボフルランの存在下 (1.7 ~ 5.1%) あるいは非存在下で、アンジオテンシン II (10^{-7} M) を投与し、340nm、380nm の波長光で励起したときの 510nm の吸光度 (F340、F380) を計測した。それぞれの波長で励起した時の吸光度の比 F340/F380 を細胞内 Ca^{2+} 濃度の指標として用いた。

3、Rho-kinase の活性の測定

胸部下行大動脈を摘出し、内皮除去柵状標本を作製した。標本をリング液中に懸垂し、アンジオテンシン II (10^{-7} M) を投与し、4 分後にドライアイスで瞬間凍結させ、ホモジナイズし細胞内抽出

液を得た。一部の標本にはアンジオテンシン II 投与前 15 分より、セボフルラン (1.7~5.1%) または、Y27632 (10^{-6} M) に暴露した。細胞抽出液を $100,000\times g$ でさらに遠心し、膜分画と細胞質分画とに分離し、それぞれの Rho kinase を Western blotting により定量し、全分画 (膜分画+細胞質分画) 中の膜分画の割合を Rho kinase の活性の指標とした。

【結果】

- 1、SHR の収縮期血圧は 186 ± 11 mmHg ($n=30$) で、WKY の収縮期血圧の 113 ± 8 mmHg ($n=30$) に比べ高かった。
- 2、セボフルランは、3.4、5.1% でアンジオテンシン II 収縮を抑制した。
- 3、セボフルランによるアンジオテンシン II 収縮の抑制は、5.1% で $SHR > WKY$ であった。
- 4、アンジオテンシン II による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、WKY、SHR の両群ともセボフルランにより抑制されなかった。
- 5、ラット大動脈におけるアンジオテンシン II 収縮は、Y27632 で SHR において有意な抑制がみられたが、WKY では抑制されなかった。
- 6、WKY では、アンジオテンシン II による Rho-kinase の細胞質分画からの細胞膜分画への移行は認められなかった。それに対し、SHR では、アンジオテンシン II は、Rho-kinase の細胞質分画からの細胞膜分画への移行を促進し、セボフルランはそれを抑制した。

【考察】 セボフルランは、アンジオテンシン II による血管平滑筋収縮作用を抑制するが、セボフルランによる抑制は、自然発症高血圧ラット (SHR) で正常血圧ラット (WKY) より大きいことを示した。このことは、高血圧患者において、揮発性麻酔薬使用時に過度の低血圧を経験することに合致する。

ラット大動脈におけるアンジオテンシン II 収縮には、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存した機構と Ca^{2+} 感受性に依存した機構の両方が関与している。本研究において、セボフルランは、WKY、SHR ともにアンジオテンシン II による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に影響を来さないことが明らかになった。つまりセボフルランは Ca^{2+} 感受性に影響を及ぼし、アンジオテンシン II 収縮を抑制していると考えられた。本研究では、 Ca^{2+} 感受性の調節に関わる蛋白質のなかで高血圧の成因が示唆されている Rho-kinase について検討した。Rho-kinase の特異的阻害剤 Y27632 を用いた検討から、WKY に比べ SHR におけるアンジオテンシン II 収縮には Rho-kinase が強く関係していると考えられた。そこで Western blotting により検討したところ、SHR のアンジオテンシン II 収縮における Rho-kinase 活性化の関与が証明され、さらにセボフルランによりそれが強く抑制されるのを確認した。高血圧患者におけるセボフルラン使用時の低血圧は Rho-kinase を介する経路の抑制が一因となっていることが示唆された。

【結論】

自然発症高血圧ラットにおいて、セボフルランは、細胞内カルシウム濃度変化をきたさずアンジオテンシン II 収縮を抑制し、それは、Rho-kinase を介する経路の抑制が関与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 23 年 5 月 2 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

揮発性麻酔薬のセボフルランは、本邦においてその調節性の高さから頻用されている。一般的に揮発性麻酔薬により血圧は低下し、特に高血圧患者では、過度の低血圧を来すことが多い。最近、Rho kinase を介するカルシウム感受性の亢進が高血圧の発生と進展に深く関与していることが明らかになってきたが、それに対する揮発性麻酔薬の影響についての報告はされていない。

本論文では、自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rats ; SHR) と対照ラット (Wistar-Kyoto rats ; WKY) を用い、アンジオテンシン II 惹起血管平滑筋収縮における等尺性張力、細胞内 Ca^{2+} 濃度、Rho kinase の活性に及ぼすセボフルランの影響について検討した。

その結果、

- (1) セボフルランは、3.4、5.1% の濃度で WKY、SHR の両群ともアンジオテンシン II 収縮を抑制し

た。

(2) セボフルランによるアンジオテンシン II 収縮の抑制は、5.1%の濃度で SHR>WKY であった。

(3) アンジオテンシン II による細胞内 Ca²⁺濃度上昇は、WKY、SHR の両群ともセボフルランにより抑制されなかった。

(4) SHR では、アンジオテンシン II 収縮は、Rho kinase 阻害薬である Y27632 によって抑制されたが、WKY では抑制されなかった。

(5) WKY では、アンジオテンシン II による Rho kinase 活性の上昇は認められなかった。それに対し、SHR では、アンジオテンシン II により Rho kinase 活性は上昇し、セボフルランはそれを抑制した。

以上より本論文は、自然発症高血圧ラットにおいて、セボフルランは、細胞内カルシウム濃度変化を来さずアンジオテンシン II 収縮を抑制し、それは、Rho-kinase を介する経路の抑制が関与していることを明らかにしたものであり、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)乙第873号		
学位授与の日	平成23年6月14日		
氏名	上山栄子		
学位論文の題目	Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation increases hippocampal neurogenesis in rats (反復経頭蓋磁気刺激によるラット海馬における神経細胞新生の増加)		
論文審査委員	主査	教授 近藤智善	
	副査	教授 鶴尾吉宏	教授 篠崎和弘

論文内容の要旨

【緒言】

経頭蓋磁気刺激(transcranial magnetic stimulation: TMS)は非侵襲的に脳を電気刺激する技術のひとつである。頭蓋上に置いたコイルに電流を瞬間的に流して変動磁場を発生させると、磁場は頭蓋骨を非侵襲的に通過し、電気的良導体である脳にコイルの電流と逆向きの電流が生じる。当初は運動野刺激により生じる筋収縮を測定する錐体路系を評価する検査として用いられたが、その後、一定の刺激頻度で反復して行う反復経頭蓋磁気刺激(repetitive TMS: rTMS)が開発され、うつ病への有効性は1995年に初めて報告された。現在、種々の精神・神経疾患に対してrTMS治療の臨床研究がおこなわれているが、うつ病に対する症例数や有効性の報告が圧倒的に多い。しかし、その作用機序については、神経機能画像などによるヒトを用いた検討や基礎的な動物を用いた研究が報告されているが、未だ解明されていない。

一方、成熟期でも神経細胞新生がヒトや動物の側脳室下帯や海馬歯状回などで生じていることが明らかにされ、さらに、動物を用いたいくつかの研究からは、種々の抗うつ治療の効果発現に海馬神経細胞新生が関わる可能性が示唆されている。例えば、動物を用い、海馬神経細胞新生はうつ病の危険因子であるストレスにより抑制され、抗うつ薬の慢性投与やヒトの電気けいれん療法に類似の電気けいれん刺激により促進されること、脳の一部にX線照射して海馬神経細胞新生を阻害すると抗うつ薬の効果がみられなくなったとの報告などがある。

そこで、本研究では、うつ病患者に対するrTMS治療のプロトコールに準じて連日rTMSをラットに施行し、rTMSが海馬神経細胞新生に及ぼす効果について検討した。

【方法】

1. rTMSとBrdU投与

rTMSにはMagstim社製のMagstim Super Rapidを用いた。雄性Sprague-DawleyラットをrTMS施行群(刺激群; n=5)と対照群(sham刺激群; n=5)に分け、直径70mmの8の字コイルを用い、刺激強度はrTMS装置の最大出力の70%、刺激頻度25Hz、刺激時間10secで、頭部に1000発/日、14日間連日rTMSを行った。刺激期間中、bromodeoxyuridine (BrdU)を連日rTMS施行後腹腔内投与し、最終刺激の24時間後に灌流固定した。

2. 免疫組織学的検討

最終刺激終了24時間後、ラットを深麻酔下に4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定を行い、摘出脳を用いて海馬を含む冠状断のパラフィン切片を作成した。抗BrdU抗体を一次抗体として反応後、ABC法を経て3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)を用いて発色させ、BrdU陽性細胞数をカウントした。また、二重免疫組織染色では抗BrdU抗体、抗neuron-specific classIII β -tubulin (TuJ1)抗体を一次抗体として反応後、蛍光標識二次抗体を使用し、蛍光顕微鏡にて観察した。

3. 統計学的解析

rTMS施行群、対照群で海馬歯状回の顆粒細胞層、下顆粒細胞層における単位面積当たりのBrdU陽性細胞数を算出した。各個体あたり少なくとも50以上のBrdU陽性細胞について、抗TuJ1抗体との二重染色の割合を解析した。統計検定はStudent's *t*-testを用いた。

【結果】

rTMS 施行群では対照群と比較し、海馬歯状回顆粒細胞層、下顆粒細胞層における単位面積あたりの BrdU 陽性細胞の有意な増加がみられた。

抗 BrdU 抗体とニューロンのマーカーである TuJ1 に対する抗体を用いた蛍光二重染色では、BrdU 陽性細胞の約 80%が TuJ1 陽性で、群間での差はみられなかった (rTMS 施行群 $81.3 \pm 2.5\%$ 、対照群 $80.4 \pm 3.1\%$)。

【考察】

14 日間連日の rTMS によりラット海馬歯状回における subgranular progenitor cells の有意な増加を認めた。rTMS による海馬神経細胞新生を検討したこれまでの報告ではその増加は示されておらず、本研究は rTMS による増加を示した初めての報告である。本研究では、強制水泳試験によって抗うつ効果が報告された先行研究(Sachdev et al. 2002)に準じて刺激頻度、強度、回数を設定し、期間についてのみ先行研究の 5 日間に対して臨床で標準的に行われる 14 日間連日で rTMS を行っており、より高い刺激頻度で多数回の刺激を行ったことが有効であった可能性が考えられる。

これまでに動物でも rTMS の抗うつ効果が強制水泳試験などで報告されている。抗うつ治療の効果発現に海馬神経細胞新生が関わる可能性については否定的な報告もあるが、本仮説と本研究の結果からは、rTMS の抗うつ効果には海馬神経細胞新生が関与する可能性があると考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 23 年 5 月 24 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。

経頭蓋磁気刺激 (transcranial magnetic stimulation: TMS) は非侵襲的に脳を電気刺激する技術のひとつである。当初は錐体路系を評価する検査として用いられたが、その後、反復経頭蓋磁気刺激 (repetitive TMS: rTMS) が開発され、うつ病への有効性が報告されているが、その作用機序については、未だ解明されていない。一方、近年成熟期の脳 (動物、ヒト) においても神経細胞が新生されることが明らかにされており、抗うつ薬や電気けいれん刺激などの抗うつ治療により海馬神経細胞新生が促進されることが報告されている。

本研究では、rTMS が神経細胞新生に及ぼす効果について検討した。うつ病患者に対する rTMS 治療のプロトコールに準じてラットを用いて免疫組織学的検討を行った。rTMS には Magstim 社製の Magstim Super Rapid を用いた。ラットを rTMS 施行群と対照群に分け、直径 70mm の 8 の字コイルを用い、刺激強度は rTMS 装置の最大出力の 70%、刺激頻度 25Hz、刺激時間 10sec で、頭部に 1000 発/日、14 日間連日 rTMS を行った。bromodeoxyuridine(BrdU)を連日 rTMS 施行後腹腔内投与し、最終刺激の 24 時間後に灌流固定を行い、パラフィン切片を作成した。

その結果、rTMS 施行群では対照群と比較し、海馬歯状回顆粒細胞層、下顆粒細胞層において単位面積あたりの BrdU 陽性細胞の有意な増加がみられた。抗 BrdU 抗体とニューロンのマーカーである抗 neuron-specific class III β -tubulin (TuJ1) 抗体を用いた蛍光二重染色では、BrdU 陽性細胞の約 80%が TuJ1 陽性で、群間での差はみられなかった (rTMS 施行群 $81.3 \pm 2.5\%$ 、対照群 $80.4 \pm 3.1\%$)。先行研究では新生促進がみられなかったが、本研究では、より高い刺激頻度で多数回の刺激を行ったことが有効であったと考えられる。

以上より、本論文は、rTMS によるラット海馬神経細胞新生の増加を示した初めての論文であり、rTMS の抗うつ効果が抗うつ薬や電気けいれん療法と同じく神経細胞新生を介している可能性を示唆するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第874号		
学位授与の日	平成23年7月12日		
氏名	米満尚史		
学位論文の題目	Comparison of Hemostatic Durability between N-Butyl Cyanoacrylate and Gelatin Sponge Particles in Transcatheter Arterial Embolization for Acute Arterial Hemorrhage in a Coagulopathic Condition in a Swine Model (ブタ動脈出血モデルによる高度凝固障害時のNBCA-TAEの有用性に関する実験的研究)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 岡村吉隆	教授 佐藤守男

論文内容の要旨

【緒言】

救命救急・集中治療領域で遭遇する体幹部を中心とした急性動脈出血(重症多発外傷・大量消化管出血・術後出血・産科出血・動脈瘤破裂など)に対する止血治療として、出血源となる動脈自体を様々な塞栓物質で血流停滞・血管閉塞させる経カテーテル的動脈塞栓術(TAE)が普及している。

止血TAEでは、最も一般的な塞栓物質であるゼラチンスポンジ(GS)を先ず選択・使用することがほとんどであるが、GSは生体由来の血栓形成補助下に血管内腔を閉塞させることで塞栓効果を発揮するとされているため、高度凝固障害を来した状態ではその塞栓能力が著しく低下し一次止血困難や再出血を経験することがある。これに対し、脳動静脈奇形などの脳神経外科領域や一部の放射線科領域において使用されるN-Butyl Cyanoacrylate(NBCA)は、生体凝固能と関係なく血液電解質と重合する機序で即座に血管塞栓を完了できる塞栓物質であり、使用に習熟が必要なものの、高度凝固障害を伴っている場合の急性動脈出血においてはGSよりも塞栓能力の高い塞栓物質であることが予想されていた。

本研究の目的は、高度凝固障害時の急性動脈出血における、塞栓物質NBCAのGSに対する優位性を明らかにすることである。

【方法】

1. 軽度/高度凝固障害2群の作成

体重約50kgの正常豚を全身麻酔導入後、Seldinger法で5Fr.シースを両側大腿動静脈に計4本(それぞれカテーテル操作用・動脈圧ライン用・急速大量輸液用・ヘパリン持続静注用)挿入・留置、開腹し両側腎臓・脾臓を露出、以下の方法で軽度/高度凝固障害2群に分類した。

①少量出血/軽度凝固障害群の作成：動脈圧ラインより総循環血漿量(BW/13×1000mL)の10%を30～60分間かけて瀉血し少量出血状況を作成、同時に瀉血量の4倍量の細胞外液で急速輸液し血圧維持した。ヘパリンは静注せず活性化凝固時間(ACT)測定のみ15分毎に行った。

②大量出血/高度凝固障害群の作成：動脈圧ラインより総循環血漿量(BW/13×1000mL)の30%を30～60分間かけて瀉血し大量出血状況を作成、同時に瀉血量の4倍量の細胞外液で急速輸液し血圧維持、ヘパリン25000単位静注とヘパリン4000単位/時間の持続静注を開始した。15分毎にACT測定し、ACT≥400以上となるように適宜ヘパリン静注ないし持続速度増減でコントロールし高度凝固障害を維持した。

2. 両腎・脾損傷(外傷性動脈出血モデル)の作成

両側腎動脈・脾動脈本幹の5Fr.カテーテルによる損傷前造影と2.5Fr.マイクロカテーテルによる損傷予定部位直近動脈枝(両側腎動脈上極/下極枝・脾動脈本幹末梢側)造影を行った。次に開腹直視下に両腎上極/下極と脾臓末梢をそれぞれ外科剪刀で損傷し、すぐさま血管造影でextravasation(造影剤漏出所見)を確認した。

3. GS/NBCAによるTAE

extravasation確認後すぐさまGSないしNBCAをマイクロカテーテルより注入し動脈塞栓した。軽度凝固障害群(計10血管)のうち、腎損傷4血管・脾損傷1血管に対してGS

塞栓、腎損傷 4 血管・脾損傷 1 血管に対して NBCA 塞栓を行った。さらに高度凝固障害群(計 10 血管)のうち、腎損傷 4 血管・脾損傷 1 血管に対して GS 塞栓、腎損傷 4 血管・脾損傷 1 血管に対して NBCA 塞栓を行った。GS は眼科用剪刀で約 1 mm 角に細断したものをヨード造影剤と混和し使用した。NBCA は油性造影剤 Lipiodol(LPD)と 1:5 の割合で混合し、この混和物(NBCA-LPD)を使用した。

4. 一時止血・再出血の評価、塞栓血管の病理学的評価

塞栓物質(GS・NBCA)注入により先ず extravasation 消失が得られれば「一次止血成功」と判断した。一次止血成功後、5 分・10 分・15 分・30 分後に塞栓臓器の中樞動脈本幹(両側腎動脈・脾動脈)を造影し、再出血の評価を行った。extravasation の再出現がみられれば「再出血あり」と判断した。出血性ショックによる対象豚死亡後、塞栓臓器(両腎・脾臓)をそれぞれ摘出し、塞栓血管・組織を HE(Hematoxylin-Eosin)染色し病理学的評価を行った。

【結果】

1. 一次止血の評価

軽度凝固障害群(n=10)・高度凝固障害群(n=10)両方の群で、GS・NBCA の塞栓物質に関係なく全例で一次止血に成功した。

2. 再出血の評価

軽度凝固障害群(n=10)では GS・NBCA 塞栓に関わらず全例で再出血はみられなかった。高度凝固障害群(n=10)では、GS 塞栓が 5 血管中 4 血管(80%)に 5 分後の再出血がみられたのに対し、NBCA 塞栓は 5 血管中 1 血管の 15 分後再出血がみられたのみであった。

3. 塞栓血管の病理学的評価

GS で塞栓された血管を HE 染色下で観察すると、軽度凝固障害群では GS 周囲に赤色血栓が付着する状態で動脈塞栓されていたのに対し、高度凝固障害群では GS 周囲の赤色血栓形成が少ない傾向がみられた。NBCA-LPD は HE 染色では明らかに同定できず、病理切片を作成する際の有機溶媒処理で油性造影剤であるリピオドールとともに流れてしまった可能性が考えられた。

【考察】

凝固障害が軽度の場合は GS と NBCA で塞栓効果に違いはほとんどないが、凝固障害が高度になると GS は塞栓効果が低下し、その塞栓能力において NBCA より劣ると考えられた。病理学的評価において凝固障害が高度になると塞栓血管内の GS 周囲に赤色血栓がほとんど付着していないことから、GS が生体に本来備わっている凝固能による血栓形成補助下でないで塞栓効果を発揮し難いことが示唆された。これまでも GS が血栓形成補助下に動脈塞栓していることは予想されていたが、本実験研究はその推定を病理学的に裏付けることができた。

また急性動脈出血に対する NBCA 塞栓の有用性は過去の文献においても報告が散見されるものの、凝固障害が高度である場合の有用性については推定の範囲内であった。本実験研究によって、NBCA は高度凝固障害において GS よりも塞栓能力が高いことが示唆された。

【結論】

肝細胞癌など待機的な通常の TAE 手技では凝固障害の程度に応じた塞栓効果の「強弱」を意識する必要はあまりないが、本実験研究の結果を考慮すると、凝固障害が高度となる重症の急性動脈出血に対する緊急止血 TAE においては、待機 TAE と異なる塞栓物質選択を含めた TAE 治療戦略(GS よりも NBCA の方がより確実)が必要となることを TAE 術者に意識させる一助となり、最終的には TAE による止血率・救命率改善を促すものと考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成23年6月20日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文審査を行った。

本論文は、急性動脈出血に対して最も効果的なTAEを行うために、高度凝固障害併存時におけるNBCAの有用性を動物実験で検討したものである。

急性動脈出血に対する TAE は効果的な止血治療として汎用されている。止血 TAE 時の塞栓物質としてはゼラチンスポンジ(GS)を先ず使用するのが最も一般的であるが、必ずしも全例で止血が成功するとは限らない。GS で止血不成功の場合でも、血管内で電解質と瞬時に重合・閉塞する

塞栓物質である NBCA を使用するとより確実な塞栓止血が得られるとの報告があるが、これまでどのような状況で GS が止血不成功に陥りやすく、NBCA でより確実な塞栓が可能なのかは明らかにされていなかった。

本学位請求者は高度凝固障害を有する止血 TAE46 症例(63 血管)の臨床的検討を行い、高度凝固障害時において NBCA が GS よりも確実に止血可能であることを先ず臨床例で明らかにした(T Yonemitsu, et al. J Vasc Interv Radiol 20:1176-1187, 2009)。この臨床的検討を元に、凝固障害の程度による GS・NBCA の塞栓効果の差異を明らかにする目的で、本実験研究が行われた。

本論文では、全身麻酔導入した正常豚を開腹し両側腎臓・脾臓を外科剪刀で損傷し急性動脈出血モデルを作成、瀉血とヘパリン投与で凝固能をコントロールすることにより軽度凝固障害群(ACT<200 秒、全 10 血管)と高度凝固障害群(ACT>400 秒、全 10 血管)に分別し、各群それぞれ塞栓物質 GS(軽度 5 血管/高度 5 血管)・NBCA(軽度 5 血管/高度 5 血管)で出血動脈を塞栓した。一次止血・再出血の有無評価と塞栓血管・組織の病理学的評価を行い、以下の結果を得た。

- ① 軽度/高度凝固障害群両方で、GS・NBCA の塞栓物質に関係なく全例で一次止血に成功。
- ② 軽度凝固障害群では塞栓物質に関係なく全例で再出血はみられなかった。高度凝固障害群では GS 塞栓 5 血管中 4 血管(80%)に 5 分後再出血がみられたのに対し、NBCA 塞栓では 5 血管中 1 血管(20%)に 15 分後再出血をみたのみであった。
- ③ 組織学的検討にて、軽度凝固障害群の GS 塞栓では血管内 GS 周囲に赤色血栓が付着し血管内に充満する状態で塞栓されていたのに対し、高度凝固障害群では GS 周囲の赤色血栓形成が少量しかみられなかった。NBCA は切片処理時の有機溶媒処理で消失し評価不可能であった。

以上より本論文は、高度凝固障害時の止血 TAE における GS に対する NBCA 塞栓効果の優位性と、病理学的に GS 塞栓効果が生体由来の赤色血栓形成の補助下に発揮されていることを明らかにした。臨床現場において止血不成功に陥りやすい高度凝固障害症例での効果的な TAE を実践するための塞栓物質 NBCA の有用性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875号		
学位授与の日	平成23年9月13日		
氏名	根来健二		
学位論文の題目	Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line, KB-R, derived from oral carcinoma cell line, KB (口腔癌由来細胞株 KB からシスプラチン耐性株 KB-R の樹立およびその特性解析)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 井篁一彦	教授 藤田茂之

論文内容の要旨

緒言

CDDP は多くの悪性腫瘍に対する化学療法の第一選択である。しかし、口腔扁平上皮癌に対する化学療法において抵抗性を示すものもあり、それは自然耐性または獲得体制によるものと考えられる。抗癌剤に対する耐性機構を解明するために、口腔扁平上皮癌由来細胞株 KB から CDDP 耐性を示す細胞株 KB-R を樹立し、遺伝子発現プロファイルを解析した。

材料と方法

1. 細胞株

DMEM に CDDP を低濃度から添加し、段階的に増加させ、ヒト口腔扁平上皮癌 KB 細胞を培養した。これによって得られた CDDP 耐性の最も強い株を CDDP 耐性株 KB-R とした。KB-R は CDDP に対して強い耐性を示し、0.5 μ g/ml の CDDP 存在下でも指数関数的に増殖した。KB-R は、CDDP 非存在下で2ヵ月の培養の後においても耐性を維持していた。

2. MTT アッセイ

MTT アッセイにより増殖率を解析した。各濃度の CDDP (0.02、0.04、0.16、0.32、0.62、1.25、2.5、5、10 μ g/ml) を添加した DMEM で培養を行い、生存細胞数を MTT 細胞増殖分析にて解析した。結果から得られた生存曲線をもとに 50%抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。

3. マイクロアレイ分析

KB、KB-R の遺伝子発現プロファイルを、Affymetrix 社の Human Genome U133 Plus2.0 を用いて解析を行った。

4. ABC トランスポーター遺伝子の mRNA 発現解析

代表的な ABC トランスポーター遺伝子 (MDR1, MRP1, MRP2) の発現状態を RT-PCR および real-time PCR にて確認を行った。

5. ネットワークと遺伝子形而上学分析

IPA (Ingenuity pathway analysis) は論文等により得られた遺伝子の相互作用、生物学的機能、疾病情報、薬剤情報等がデータベース化されたソフトウェアで、これを用いて microarray 解析で感受性株 KB に対して耐性株 KB-R において5倍以上の発現変化を認める遺伝子のネットワーク解析を行った。

結果

1. Cell 成長と MTT 分析

KB と KB-R 細胞の形態と成長曲線に有意差はなかった。KB、KB-R の IC₅₀ はそれぞれ 0.65 の μ g/ml と 3.7 の μ g/ml で、KB に対して KB-R の IC₅₀ は約 5.5 倍高かった。

2. KB と KB-R 細胞のマイクロアレイ分析

マイクロアレイ分析の結果、KB と比較して KB-R で 5 倍以上の発現亢進を示す遺伝子を 1,718 同定できた。

3. RT-PCR と Real-time qRT-PCR 分析による ABC トランスポーター遺伝子の発現解析

KB-R では KB と比較して、MRP1、MRP2 は発現が上昇したが、MDR1 は発現が低下した。

4. ネットワークと遺伝子形而上学分析

GeneChip 結果で、KB に対して KB-R で 5 倍以上の発現上昇がみられた 1,718 の遺伝子を IPA ツールを用いてネットワーク解析を行った。その結果、105 の遺伝子が 3 つの重要なネットワークを形成した。各々のネットワークは、それぞれ異なる機能（細胞の movement、development、morphology など）を持っていることが明らかになった。その中でも、もっとも有意であった機能は「細胞間のシグナル伝達と相互作用」であった。これに関与する 144 個の遺伝子をさらにネットワーク解析すると、35 の遺伝子が 1 つのネットワークに位置することが分かった。

考察

プラチナ錯体は固形癌（卵巣、膀胱癌、精巣、頭頸部癌、肺癌など）に対する化学療法における key drug である。CDDP はプラチナ錯体の一つで、DNA と結合することで DNA の複製および RNA の転写の阻害し、細胞周期を停止させたり、アポトーシスを誘導することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。CDDP に対する耐性機構は不明な点が多く、その耐性機構を研究する上で CDDP 耐性細胞株が必要不可欠で、過去にいくつかの耐性株を樹立されてきた。今回、我々は口腔扁平上皮癌由来の細胞株 KB から CDDP 耐性株 KB-R を樹立した。

過去の報告では 2.5~4 倍の耐性の報告はあったが、KB-R は CDDP に対して約 5.5 倍と、より強い耐性を示した。CDDP 耐性と関連のある ABC トランスポーターの MDR1、MRP1、MRP2 の発現状態を確認したところ、KB と比較して KB-R では MRP1 と MRP2 の発現が亢進していたが、MDR1 は抑制されていた。このことから KB-R の強い耐性は、ABC トランスポーターのみで説明はできず、多くの因子が関連していることが考えられた。

我々はマイクロアレイによって網羅的に多くの遺伝子発現を解析することで、CDDP 耐性に関与する遺伝子を特定できると考え、解析を行った。その結果、KB と比較して 1,718 の遺伝子の発現レベルが、KB-R で 5 倍以上亢進を示した。これら 1,718 の遺伝子を IPA ツールを用いてネットワーク解析を行った。その結果、105 の遺伝子が 3 つの重要なネットワークを形成した。各々のネットワークは、それぞれの異なる機能を持っていることが明らかになった。その中で、もっとも有意であった機能は「細胞間のシグナル伝達と相互作用」であった。「細胞間のシグナル伝達と相互作用」に関与する 144 個の遺伝子をさらにネットワーク解析すると、35 の遺伝子が 1 つのネットワークに位置することが分かった。

遺伝子発現プロファイリングにパスウェイ解析を加えることで、CDDP 耐性候補遺伝子を絞り込むことができ、これらの遺伝子を解析することで CDDP 耐性の分子機構を解明でき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 23 年 8 月 19 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

抗癌剤に対する耐性機構を解明するために、口腔扁平上皮癌由来細胞株 KB から CDDP 耐性を示す細胞株 KB-R を樹立し、マイクロアレイ分析とリアルタイム PCR によってこれらの CDDP 感受性株と CDDP 耐性株の遺伝子発現プロファイルを解析した。

まず、①培養液に CDDP を低濃度から添加し、段階的に増加させヒト口腔扁平上皮癌 KB 細胞を培養した。これによって得られた CDDP 耐性の最も強い株を CDDP 耐性株 KB-R とした。②CDDP (0.02、0.04、0.16、0.32、0.62、1.25、2.5、5、10 $\mu\text{g/ml}$) を培養液に添加し、72 時間培養を行った後、MTT アッセイを行った。結果から得られた生存曲線をもとに 50%抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。③KB、KB-R の遺伝子発現プロファイルを、Affymetrix 社の Human Genome U133 Plus2.0 を用いて解析を行った。④代表的な ABC トランスポーター遺伝子 (MDR1、MRP1、MRP2) の発現状態を RT-PCR および real-time PCR にて確認を行った。⑤IPA (Ingenuity pathway analysis) を用いて microarray 解析で感受性株 KB に対して耐性株 KB-R において 5 倍以上の発現変化を認める遺伝子のネットワーク解析を行った。

その結果、①KB-R は CDDP に対して強い耐性を示し、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の CDDP 存在下でも指数関数的に増殖した。KB-R は、CDDP 非存在下で 2 ヶ月の培養の後においても耐性を維持していた。②KB、KB-R の IC₅₀ はそれぞれ 0.65 の $\mu\text{g/ml}$ と 3.7 の $\mu\text{g/ml}$ で、KB に対して KB-R の IC₅₀ は約 5.7 倍高かった。③マイクロアレイ分析の結果、KB と比較して KB-R で 5 倍以上の発現亢進を示す遺伝子を 1,718 同定できた。④ABC トランスポーターの発現状況は、KB-R では KB と比較して、MRP1、MRP2 は発現が上昇した

が、MDR1 は発現が低下した。⑤パスウェイ解析の結果、105 の遺伝子が 3 つの重要なネットワークを形成した。各々のネットワークは、それぞれ異なる機能（細胞の movement、development、morphology など）を持っていることが明らかになった。その中でも、もっとも有意であった機能は“細胞間のシグナル伝達と相互作用”であった。“細胞間のシグナル伝達と相互作用”に關与する 144 個の遺伝子をさらにネットワーク解析すると、35 の遺伝子が 1 つのネットワークに位置することが分かった。以上の結果より、KB-R は CDDP に対して約 5.7 倍と、より強い耐性を示した。CDDP 耐性と關連のある ABC トランスポーターの MDR1、MRP1、MRP2 の発現は、KB と比較して KB-R では MRP1 と MRP2 の発現が亢進していたが、MDR1 は抑制されていた。このことから KB-R の強い耐性は、ABC トランスポーターの作用のみではなく、マイクロアレイの結果からも多くの遺伝子の相互作用が關連していることが考えられた。遺伝子発現プロファイリングにパスウェイ解析を加えることで、CDDP 耐性候補遺伝子を絞り込むことができ、これらの遺伝子を解析することで CDDP 耐性の分子機構を解明できる可能性が示唆されたことから、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第876号		
学位授与の日	平成23年10月11日		
氏名	古川 加奈子		
学位論文の題目	Increase of nitrosative stress in patients with eosinophilic pneumonia (好酸球性肺炎における窒素化ストレスの関与)		
論文審査委員	主査	教授 古川 福実	
	副査	教授 井原 義人	教授 一ノ瀬 正和

論文内容の要旨

【緒言】

好酸球性肺炎 (eosinophilic pneumonia: EP) は肺の実質・間質への好酸球の浸潤を特徴とする間質性肺疾患であり、その確定診断には気管支鏡検査が必要である。さらに、本疾患は、ステロイドの治療反応性は良好であるが、薬剤の減量中や中止後に再発しやすいことが知られている。上述した観点から EP の非侵襲的鑑別診断法や病勢の管理に有用なバイオマーカーの確立は、臨床上非常に重要と考えられる。一方、気管支喘息は気道の好酸球性炎症を特徴とする炎症性気道疾患であるが、喘息患者では、呼気一酸化窒素濃度 (fractional exhaled nitric oxide: FE_{NO}) が上昇し、その値は診断および気道炎症を反映するバイオマーカーとして喘息患者の管理に用いられている。さらに NO は喘息の病態に深く関与することが報告されている。肺実質の好酸球性炎症を特徴とする EP において鑑別診断および病勢のバイオマーカー、またその病態への関連についての NO および窒素化ストレスの意義については全く確立されていない。

近年、呼気 NO 測定において、測定時の呼気流速を変化させることによって、中枢気道領域の NO (JawNO) と末梢気道および肺胞由来の NO (Calv) をわけて測定することが可能となった。そこで本研究では EP における呼気 NO (FE_{NO} および JawNO、Calv) を測定し、①間質性肺疾患の鑑別診断に対する有用性、②EP の病勢に対するバイオマーカーとしての有用性、③活性窒素種 (reactive nitrogen species: RNS) による窒素化ストレスの病態への関与について検討を行った。

【方法】

健常者 10 名、特発性間質性肺炎 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) 13 名、EP 13 名を対象とした。対象者の呼気 NO 測定、呼吸機能検査を施行し、呼気凝縮液 (exhaled breath condensate : EBC) を採取した。さらに EP 群は、気管支鏡検査にて確定診断を行った。EP 群 13 名中 8 名は、ステロイド 1mg/kg/日 で 4 週間内服治療後に、胸部レントゲンおよび CT、呼気 NO 測定、呼吸機能検査を行った。

次に、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALf) 細胞を用いて、窒素化ストレスのマーカーとして誘導型 NO 合成酵素 (inducible type of NO synthase: iNOS) の発現、RNS 産生のマーカーとして 3-nitrotyrosine (3-NT) 産生を免疫染色で検討した。また、EP における呼気 NO と呼吸機能および血清炎症データ (末梢血好酸球数、C-reactive protein : CRP) との相関を検討した。EBC 中の炎症性メディエーターの発現について、42 種類のサイトカイン・ケモカインを測定し、比較検討した。さらに、EP 群で、ステロイド投与前後の各種パラメーターの変化について検討した。

【結果】

EP における FE_{NO} は 35.0 ± 5.2 ppb であり、健常者 (17.8 ± 2.2 ppb) や IPF (20.8 ± 1.8 ppb) と比較して有意に高値を示した (both p < 0.01)。さらに、EP における末梢側 NO (Calv) は 14.4 ± 2.0 ppb で、健常者 (5.1 ± 0.6 ppb) や IPF (6.3 ± 0.6 ppb) と比較して有意に高値を示した (both p < 0.01)。一方、JawNO は 3 群間で有意差を認めなかった。気道由来の NO の影響をさけるために corrected Calv を算出したところ、EP では 13.3 ± 2.0 ppb であり、健常者 (4.5 ± 0.6 ppb) や IPF (5.3 ± 0.6 ppb) と比較して有意に高値を示した (both p < 0.01)。

次に BALf 細胞の免疫染色を施行した。EP 患者の iNOS 陽性細胞は健常者や IPF と比較して多くみられた。EP における iNOS 陽性細胞率 (%) と FE_{NO} (r = 0.913, p < 0.01)、末梢側 NO (Calv) (r = 0.858, p < 0.05) はそれぞれ正の相関を認めた。さらに RNS 産生のマーカーである 3-NT 陽性細胞も EP におい

て健常者やIPFと比較して多くみられた。EPにおける3-NT陽性細胞率(%)とFE_{NO}($r=0.890, p<0.01$)、末梢側NO(Calv)($r=0.924, p<0.01$)もそれぞれ正の相関を認めた。またEPにおいてiNOS陽性細胞率(%)と3-NT陽性細胞率(%)は正の相関を認めた($r=0.919, p<0.01$)。

EPにおける治療前の呼気NOと呼吸機能、炎症性データとの相関を検討した。FE_{NO}とは相関はみられなかったが、末梢側NO(Calv)は、VC($r=-0.670, p<0.05$)、%VC($r=-0.645, p<0.05$)と負の相関を認め、末梢血好酸球数と正の相関を認めた($r=0.658, p<0.05$)。また、健常人9名、IPF11名、EP9名のEBC中のサイトカインおよびケモカインの発現を検討したところ、3群間でその発現量に有意差は認められなかった。

次に、EP患者8名において全身性のステロイド治療前後の呼気NO、呼吸機能、炎症データ(末梢血好酸球数、CRP)の変化を検討した。FE_{NO}($p<0.05$)、Calv($p<0.01$)は、有意に低下し、VC、%VCは有意に改善した(both $p<0.01$)。末梢血好酸球数($p<0.01$)、CRP($p<0.05$)も有意に低下した。また、ステロイド治療前後の呼気NOの減少率と呼吸機能、炎症データの改善率を検討したところ、末梢側NO(Calv)の減少程度と末梢血好酸球数の減少程度が正の相関を示した($r=0.022, p<0.05$)。

【考察】

1. 好酸球性肺炎では、FE_{NO}と末梢側NO(Calv)が増加していた。その程度は末梢側で顕著で、Calv測定は非侵襲的に好酸球性肺炎を診断する補助となりうる可能性が示唆された。
2. 末梢側NO(Calv)が上昇し、窒素化ストレスのマーカーである3-NTも上昇していたことより、好酸球性肺炎における肺傷害にNOから生じる窒素化ストレスが関与していると考えられた。
3. ステロイド治療によって、末梢血好酸球数の減少程度と末梢側NOの減少程度が相関を示したことより、末梢側NO(Calv)測定は好酸球性肺炎の病勢を示すマーカーとなり得る可能性が示唆された。

【結語】

好酸球性肺炎の肺傷害に窒素化ストレスが関与し、末梢側NO(Calv)が好酸球性肺炎の病勢を反映す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23年9月16日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文について審査した。

好酸球性肺炎(EP)は肺の実質・間質への好酸球の浸潤を特徴とする間質性肺疾患であるが、その診断には気管支鏡検査が必要である。また、ステロイドの治療反応性は良好であるが、薬剤の減量中に再発しやすいことが知られている。これらのことより、EPの非侵襲的鑑別診断法や病勢の管理に有用なバイオマーカーの確立は重要であると考えられる。さらに、同じ好酸球性炎症を特徴とする気管支喘息では一酸化窒素(NO)がその病態に関与することが報告されているが、EPとNOおよび窒素化ストレスの関与については今まで検討されていない。

本論文は、EPにおける呼気NOを測定し、①間質性肺疾患の鑑別診断に対する有用性、②EPの病勢に対するバイオマーカーとしての有用性、③窒素化ストレスの病態への関与について検討した。

EPでは肺末梢側NOが著明に上昇しており、非侵襲的に診断する補助となり得、さらに病勢を反映するマーカーとなりうる可能性も示唆された。また、EPにおいて窒素化ストレスのマーカーが上昇しており、EPの肺傷害に窒素化ストレスが関与していると考えられた。

以上のように、本論文はEPの肺傷害に窒素化ストレスが関与し、肺末梢側NOが病勢を反映する可能性があることを示したはじめての論文であり、臨床上的意義も大きく、学位論文として値するものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第877号
学位授与の日	平成23年11月8日
氏名	石川伸之
学位論文の題目	Cell adhesion on explanted intraocular lenses. Part1: Analysis of explanted IOLs (眼内レンズへの異物反応と細胞付着に関する研究 Part1:摘出眼内レンズの検討) Cell adhesion on explanted intraocular lenses. Part2: Experimental study of a surface-modified IOL in rabbits (眼内レンズへの異物反応と細胞付着に関する研究 Part2:家兎移植後に摘出した表面処理眼内レンズの実験的研究)
論文審査委員	主査 教授 藤田茂之 副査 教授 村垣泰光 教授 雑賀司珠也

論文内容の要旨

【緒言】

白内障手術時に行われる眼内レンズ(Intraocular lens; IOL)挿入術は、現代医療において最も成功した異物移植手術の1つである。現在用いられている IOL の材質で主なものとしては、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、シリコーン、疎水性アクリルがある。

PMMA 製 IOL は最初に考案された IOL で、眼内で長期間安定であることが、歴史的に証明されている。しかし、硬い材質であるため、折り畳む事ができず眼内への挿入時に大きな切開創が必要になる。シリコーン、疎水性アクリルは柔らかい材質であり、折り畳むことにより小さな切開創から挿入できるという利点がある。

IOL の眼内での生体適合性について評価する事は臨床的に重要であるが、眼内は特殊な環境であるため、他組織での結果をそのまま適応できるかは結論が得られておらず、眼内から得られた標本の解析が必要である。眼内に挿入されている IOL に対する反応には、マクロファージ系細胞による異物反応と、水晶体上皮細胞による創傷治癒反応がある。IOL の生体適合性の評価はこの2つの面から評価する事ができる。IOL に対する異物反応と創傷治癒反応は、白内障手術後の視力低下の原因の一つである後発白内障を引き起こす原因となる。後発白内障は様々な眼科診療の場面で妨げになる為、これらの反応を抑制するために、IOL の材質、形状、表面処理など様々な工夫がされてきた。

我々は、まずヒト眼内に挿入後に様々な理由で眼内から摘出された多数の各種 IOL の表面への細胞付着について検討した。次に、現在臨床で最も一般的に用いられている疎水性アクリル IOL の表面処理による細胞付着の抑制を試みた。MPC ポリマー (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer) は親水性を有する重合可能構造、リン脂質類似構造の共重合体で、生体内で異物として認識されず、生体との相互作用も抑制されポリマー表面でのタンパク質吸着や血栓形成を抑制する。この性質を利用して現在微量タンパク測定用の容器や人工腎臓や人工血管に臨床応用されている。MPC で IOL 表面を処理することにより、IOL 表面への細胞付着が抑制される可能性が考えられる。本研究では、MPC で表面処理した IOL に対する生体反応を検討し、未処理の IOL との比較を行った。

【方法】

研究1 日本人から摘出した IOL への細胞付着

1997年1月1日以降に各施設から眼内レンズ屈折手術学会内に設立された眼内レンズインプラントデータシステム委員会に送付された摘出 IOL のうち、現在主に使用されている材質の IOL (n=436) を検討した。材質の内訳は、PMMA 271 個、疎水性アクリル 117 個、シリコーン 48 個であった。今回の検討では眼内炎により摘出に至った症例は除外した。また、眼内への挿入期間が1ヶ月未満の症例も除外した。

摘出 IOL にヘマトキシリン・エオジン染色を施行後、光学顕微鏡で観察し、虹彩や水晶体囊からの細胞供給を算定から除外する目的で IOL 表面 (中央2×2mm の範囲) への付着細胞数を測定した。

眼内への挿入期間が1~5ヶ月、6~11ヶ月、12~23ヶ月、24ヶ月以上の4期間に分け、期間毎に材質間でIOL表面への細胞付着に差があるか検討した。

研究2 家兎移植後に摘出した表面処理IOLへの細胞付着

(MPCコート of の作製について) MPC処理は、疎水性アクリルIOLをMPC濃度が0.2%のアルコール溶液に浸漬し(3秒、23℃)、真空乾燥した(2mmHg、40℃、1時間)。

日本白色家兎(n=36)に白内障手術を施行後、MPCコートIOL又は未処理IOLを移植した。1ヶ月後又は3ヶ月後に屠殺し眼球を摘出、10%ホルマリンで固定し水晶体囊ごとIOLを摘出し水晶体囊からIOLを外した後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施行し、光学顕微鏡で観察を行い、IOL表面(中央2×2mm)への付着細胞数を測定した。

1ヶ月後に摘出したIOLの一部は、2%グルタルアルデヒドで固定し、走査型電子顕微鏡を用いて表面を観察し、MPC表面処理の効果を細胞形態学的に評価した。

【結果】

研究1 日本人から摘出したIOLへの細胞付着

IOL表面には、マクロファージとマクロファージの融合から形成されると言われている異物巨細胞が観察された。全体的には、手術後の期間が長くなると、付着細胞数が減少する傾向を示した。統計処理の結果、挿入期間1~5ヶ月、6~11ヶ月、24ヶ月以上において、シリコンIOLへの細胞付着はPMMAIOLと比べて有意に少なかった。(P<0.05)疎水性アクリルIOLとシリコンIOLの間にはいずれの挿入期間においても有意な差は得られなかった。

研究2 家兎移植後に摘出した表面処理IOLへの細胞付着

IOL表面には、マクロファージとマクロファージの融合から形成されると言われている異物巨細胞が観察された。1ヶ月後ではMPC群は未処理群に比べて表面への付着細胞数は有意に少なかった(P<0.05)。3ヶ月後では両群間には有意差は認めなかった。

電子顕微鏡下の観察では、未処理群ではIOL表面に形成されたマトリックス線維構造に付着した細胞質突起がみられたが、MPC群では抑制されていた。

【考察】

ヒトから摘出したIOLの検討では、細胞付着は概ね、時間経過と共に減少した。シリコンIOLへの細胞付着はPMMAIOLへの細胞付着より有意に少なく、シリコンIOLと疎水性アクリルIOLの比較では統計的に有意な差を認めなかった。異物表面への細胞付着は、材質の接触角(水濡れ性)に影響されるといわれており、接触角が親水性又は疎水性に偏ることで細胞付着が抑制されると言われている。今回の結果、PMMAより疎水性であるシリコンで細胞付着が少なかったことは説明できると考えられる。白内障手術の切開創の大きさ、位置、創の創傷治癒反応の程度が異なる為と思われる中で、PMMAIOLではより大きな切開創が必要であるので、これらの相違が細胞反応に影響を及ぼしている可能性はあるが、それは術後早期に限定されると考えた。

ヒトからの摘出IOLの検討では疎水性アクリルIOLはシリコンIOLのような明らかな細胞付着の抑制効果は認められなかった。しかしシリコンIOLでは前囊切開縁の線維性混濁による眼底透視性の低下や、硝子体手術時の液-空気置換やシリコンオイルの眼内での使用によりIOLに滴露が生じ視認性の低下を引き起こすという欠点がある。疎水性アクリルIOLでは、シリコンIOLほど混濁や滴露を生じない為、近年臨床においては疎水性アクリルIOLが一般的に用いられている。

そこで我々は、疎水性アクリルIOLへの細胞付着の抑制を目指した検討を行った。マクロファージ系異物細胞付着には、上記のように表面の接触角が関与するといわれている。MPCポリマーは親水性を有しており、生体との相互作用も抑制されポリマー表面でのタンパク質吸着や血栓形成を抑制する。MPC表面処理により疎水性アクリルIOLに親水性の性質が加わり、表面への細胞付着が抑制される事を期待して検討を行った。今回の検討では、家兎眼内移植1ヶ月後に摘出したMPCコートIOL表面への細胞付着が抑制された。しかし3ヶ月後では両群間で細胞付着に有意な差がなかった。この理由として、術後1ヶ月ではMPCの表面処理効果で細胞付着を減弱できたが、3ヶ月後ではMPCが溶出して

IOL 表面上の濃度が薄くなり表面処理効果が減弱した可能性が考えられる。しかし、術後早期の炎症反応と細胞付着が著しい時期を想定して、MPC で表面処理を行った疎水性アクリル IOL は臨床的に有益である事が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 10 月 3 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。

白内障手術時に行われる眼内レンズ(Intraocular lens; IOL)挿入術は、現代医療において最も成功した異物移植手術の 1 つである。現在用いられている IOL の材質で主なものとしては、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、シリコーン、疎水性アクリルがある。

IOL の眼内での生体適合性について評価する事は臨床的に重要であるが、眼内は特殊な環境であるため、他組織での結果をそのまま適応できるかは結論が得られておらず、眼内から得られた標本の解析が必要である。眼内に挿入されている IOL に対する反応には、マクロファージ系細胞による異物反応と、水晶体上皮細胞による創傷治癒反応がある。IOL の生体適合性の評価はこの 2 つの面から評価する事ができる。IOL に対する異物反応と創傷治癒反応は、白内障手術後の視力低下の原因の一つである後発白内障を引き起こす原因となる。後発白内障は様々な眼科診療の場面で妨げになる為、これらの反応を抑制するために、IOL の材質、形状、表面処理など様々な工夫がされてきた。

我々は、まずヒト眼内に挿入後に様々な理由で眼内から摘出された多数の各種 IOL の表面への細胞付着について検討した。疎水性アクリル IOL は前囊切開縁の線維性混濁による眼底透見性の低下や、硝子体手術時の液-空気置換及びシリコーンオイル使用に伴う滴露による眼底視認性の低下がシリコーン IOL ほどではない為、現在臨床で最も一般的に用いられている。そこで、次に家兎を用いて疎水性アクリル IOL の表面処理による細胞付着の抑制を試みた。MPC ポリマー (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer) は親水性を有する重合可能構造、リン脂質類似構造の共重合体で、生体内で異物として認識されず、生体との相互作用も抑制されポリマー表面でのタンパク質吸着や血栓形成を抑制する。MPC で IOL 表面を処理することにより、IOL 表面への細胞付着が抑制される可能性が考えられる。本研究では、MPC で表面処理した IOL に対する生体反応を検討し、未処理の IOL との比較を行った。各々の検討から以下の結果を得た。

1) 挿入期間 1~5 ヶ月、6~11 ヶ月、24 ヶ月以上において、シリコーン IOL への細胞付着は PMMA IOL と比べて有意に少なかった。疎水性アクリル IOL とシリコーン IOL の間にはいずれの挿入期間においても有意な差は得られなかった。

2) 1 ヶ月後では MPC 群は未処理群に比べて表面への付着細胞数は有意に少なかった。3 ヶ月後では両群間には有意差は認めなかった。電子顕微鏡下の観察では、未処理群では IOL 表面に形成されたマトリックス線維構造に付着した細胞質突起がみられたが、MPC 群では抑制されていた。

以上の知見より、本研究論文はシリコーン IOL への細胞付着は PMMA IOL への細胞付着より有意に少なく、シリコーン IOL と疎水性アクリル IOL の比較では統計的に有意な差を認めない事、術後早期の炎症反応と細胞付着が著しい時期を想定して、MPC で表面処理を行った疎水性アクリル IOL は臨床的に有益である事を示唆しており、学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)乙第878号		
学位授与の日	平成23年12月13日		
氏名	猪野 靖		
学位論文の題目	Difference of Culprit Lesion Morphologies Between ST-Segment Elevation Myocardial Infarction and Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndrome: An Optical Coherence Tomography Study (OCTによるST上昇型心筋梗塞と非ST上昇型急性冠症候群における責任病変のプラーク形態の検討)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 村垣 泰光	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。プラーク破裂に引き続いて起こる血栓形成により、冠動脈が完全閉塞に陥れば ST 上昇型心筋梗塞 (ST elevation myocardial infarction; STEMI)、高度狭窄または亜完全閉塞で済めば非 ST 上昇型急性冠症候群 (non ST elevation acute coronary syndrome; NSTEMI) となり、また一部の症例では破裂部位が自然修復され症状を呈さない。血管内超音波 (intravascular ultrasound; IVUS) を用いた研究により、破裂部位のプラークの形態が冠動脈を閉塞させる血栓の形成に大きく関与することが報告されている。しかしながら、IVUS はその低解像度 (100-150 μm) 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。

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 μm 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、STEMI と NSTEMI における責任病変のプラーク形態の違いを OCT を用いて検討した。

[方法]

和歌山県立医大附属病院に ACS の診断にて入院し、緊急冠動脈造影検査を施行しえた 89 例 (STEMI 40 例、NSTEMI 49 例) を対象とした。冠動脈造影検査にて ACS の責任病変を同定し、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。0.016 インチ OCT カテーテル (Image Wire, Light Lab Imaging, Westford, Massachusetts, USA) を病変部の遠位部まですすめ、オクルージョンバルーンまたはガイドカテからの flash にて血流を遮断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。OCT イメージ解析については、プラーク破裂、TCFA、冠動脈内血栓 (赤色と白色の分類も含めて) の有無などを評価した。またプラーク破裂部の血管内腔の断面積および同部の cavity の最大断面積を計測した。さらに破綻プラークの長軸方向の再構築画像において、プラーク破裂部の位置により近位部型、中間部型、遠位部型の 3 タイプに分類した。

[結果]

両群間の患者背景では、左室駆出率が STEMI 群で有意に低かった。造影所見に関しては、STEMI 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、プラーク破裂、TCFA、赤色血栓の頻度が NSTEMACS 群に比して STEMI 群で有意に高かった (それぞれ 70% vs. 47%, $p=0.033$, 78% vs. 49%, $p=0.008$, および 78% vs. 27%, $p<0.001$)。プラーク破裂部の血管内腔の断面積は両群で差がなかったが ($2.44 \pm 1.34 \text{ mm}^2$ vs. $2.96 \pm 1.91 \text{ mm}^2$, $p=0.250$)、同部の cavity の最大断面積に関しては STEMI 群で有意に大きかった ($2.52 \pm 1.36 \text{ mm}^2$ vs. $1.67 \pm 1.37 \text{ mm}^2$, $p=0.034$)。さらに破綻プラークにおける長軸方向のプラーク形態に関しては、STEMI 群において近位部型の頻度が有意に高かった (46% vs. 17%, $p=0.036$)。

[考察と結語]

今回 OCT を使った ACS のプラーク形態の検討において、STEMI においてプラーク破裂の頻度がより高かった。さらに STEMI において、破綻したプラークの cavity size はより大きく、また冠血流方向に対して広く開口したような形態を呈する破綻プラークの頻度も高かった。大きな脂質コアの多量の内容物と血流が接触することにより、多量の血栓が形成され、さらに遠位部の狭窄部で血栓が堰き止められるため、冠動脈血流の途絶が生じやすいと考えられた。このような破綻プラークの形態的な特徴が、引き続いて生じる冠動脈内血栓および ACS 症例の臨床像に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 23 年 11 月 18 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。

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。血栓形成により、冠動脈が完全閉塞に陥れば ST 上昇型心筋梗塞 (ST elevation myocardial infarction; STEMI)、高度狭窄または亜完全閉塞で済めば非 ST 上昇型急性冠症候群 (non ST elevation acute coronary syndrome; NSTEMACS) となり、また一部の症例では破裂部位が自然修復され症状を呈さない。よって破裂部位のプラークの形態の違いが引き続いて生じる冠動脈を閉塞させる血栓形成にどのように関与するかを調べることは有用であると考えられる。冠動脈内イメージングのゴールドスタンダードとして血管内超音波 (intravascular ultrasound; IVUS) が以前から使用されているが、その低解像度 ($100\text{--}150 \mu\text{m}$) 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。

本論文は約 $10\text{--}20 \mu\text{m}$ という高い解像度 (IVUS の約 10 倍) をもつ血管内光干渉断層法 (optical coherence tomography; OCT) を用いて、STEMI と NSTEMACS 間において責任病変のプラーク形態の違いを明らかにしたものである。その結果プラーク破裂、TCFA、赤色血栓の頻度が NSTEMACS 群に比して STEMI 群で有意に高かった。またプラーク破裂部の cavity の最大断面積に関しては NSTEMACS 群に比して STEMI 群で有意に大きく、さらに破綻プラークにおける長軸方向のプラーク形態に関しては、STEMI 群において近位部型の頻度が有意に高いことが明らかになった。

以上、本論文は ACS において、STEMI と NSTEMACS 間で OCT にて観察した責任病変部のプラーク形態の違いがあることを初めて報告したものである。このような破綻プラークの形態的な特徴が、引き続いて生じる冠動脈内血栓および ACS 症例の臨床像に関連する可能性を提示したものであり、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879号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	松浦英夫		
学位論文の題目	Relationship between coffee consumption and the prevalence of metabolic syndrome among Japanese civil servants (職域集団におけるコーヒー摂取とメタボリックシンドロームとの関連)		
論文審査委員	主査	教授 宮下和久	
	副査	教授 三家登喜夫	教授 竹下達也

論文内容の要旨

【緒言】

メタボリックシンドロームは、現在、世界中で公衆衛生上の問題として注目されている疾患である。日本のメタボリックシンドロームの頻度は、20歳以上の男性25.3%、女性10.6%であり、近年、特に男性で増加している。そのため、職域や地域において、さまざまなメタボリックシンドローム予防対策がなされている。

コーヒーは世界的に最も多く飲まれている嗜好飲料のひとつであり、生活習慣病など、健康への影響に関する研究も広く行われている。最近のコホート研究では、コーヒー摂取は、糖尿病、心血管疾患、特定のがんの発病リスクを下げる可能性があることが示されている。しかし、コーヒー摂取とメタボリックシンドロームのリスクとの関連については、過去に報告が少なく、十分な検討がなされていない。

そこで、本研究は、職域において、コーヒー摂取とメタボリックシンドローム、さらにメタボリックシンドロームの構成要素との関連を明らかにすることを目的とした。

【研究方法】

(1) 研究対象

本研究は、ある地方自治体に勤務する職員で、2008年度職員健診を受診した20歳から65歳までの3,283人(男性2,335人、女性948人)を対象とした。

(2) 検査項目

解析に用いた検診項目は、身長、体重、腹囲、body mass index (BMI)、血圧、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、高血圧および高血糖の薬剤治療の有無、コーヒー摂取、運動習慣、喫煙状況、飲酒状況である。

コーヒー摂取、運動習慣、喫煙状況、飲酒状況については、自記式調査を行った。コーヒー摂取については、飲まない、1日1-3杯飲む、1日4杯以上飲む、の3つの選択肢で、回答を得た。

メタボリックシンドロームについては、日本内科学会の診断基準を採用した。ただし、脂質異常症の薬剤治療の有無については、聞いていない。

(3) 統計解析

コーヒー摂取量によるメタボリックシンドロームの構成要素の比較については、ANCOVA を用いて、年齢、BMI、その他の生活習慣要因を調整し、平均値や割合を示した。

また、コーヒー摂取とメタボリックシンドロームのリスクとの関連は、単変量解析、多変量解析を用いて評価した。多変量解析では、年齢、その他の生活習慣を含めた交絡因子を調整し、ロジスティック回帰モデルに投入し、オッズ比と95%信頼区間を求めた。

P値が0.05未満を統計学的に有意とみなした。

【結果および考察】

(1) コーヒー摂取とメタボリックシンドロームとの関連について

メタボリックシンドロームの該当者の割合は、50歳未満で男性10.6% (140/1,324)、女性1.8% (10/562)、50歳以上で男性23.1% (234/1,011)、女性5.7% (22/386)であった。コーヒーを飲まない群に対する1日4杯以上のコーヒー摂取群のメタボリックシンドロームのオッズ比は、男性では、

単変量解析, 多変量解析において, 0.79 (95%信頼区間: 0.56-1.03) と 0.61 (95%信頼区間: 0.39-0.95) であり, 負の関連が認められた。しかし, 女性では, 関連は認められなかった。このことは, 女性のメタボリックシンドロームの該当者が少なかったことが原因と考えられる。

また, 薬剤治療中の対象者を除外した分析においても, コーヒー摂取とメタボリックシンドロームのリスクとの関連は同じ傾向を示した。このことにより, 治療薬の有無による交絡の影響はあまり大きくないと考えられる。

(2) コーヒー摂取とメタボリックシンドロームの構成要素との関連について

血圧に関しては, 男性では, 1日4杯以上のコーヒー摂取と血圧高値の間で有意な負の関連が認められた。しかし, 女性では, 関連は認められなかった。

血糖に関しては, 男女共, コーヒー摂取と高血糖との間で有意な関連は認められなかった。これは, 最近の多くの研究で示されている, コーヒー摂取は糖尿病発症のリスクを下げるという結果と一致しなかった。

脂質に関しては, 男性では, 1日4杯以上のコーヒー摂取とトリグリセリド高値との間で有意な負の関連が認められた。しかし, 女性では関連は認められなかった。さらに, 1日4杯以上のコーヒー摂取とLDLコレステロール高値との間で, 男性で有意な正の関連が認められた。コーヒー摂取が血清脂質に及ぼす影響については, コーヒーにお湯を注いだ時に溶出する成分(diterpens)がコレステロールを上昇させる可能性が指摘されているが, この成分はフィルター紙によって除去されることが知られている。本研究では, コーヒーの入れ方等について聞いていない。そのため, この関連を明らかにするためにはさらなる詳細な調査が必要であると考えられる。

【結語】

男性において, 1日4杯以上のコーヒー摂取とメタボリックシンドロームのリスクとの間で有意な負の関連が認められた。さらに, メタボリックシンドロームの構成要素である血圧高値と脂質異常(トリグリセリド高値)は, 1日4杯以上のコーヒー摂取との間で有意な負の関連が認められた。

今回の研究において, コーヒーという身近な飲み物がメタボリックシンドロームの予防に働く可能性があることを示したことは, 横断研究ではあるが, メタボリックシンドロームの予防を考える上で重要な結果であると考えられる。他方, LDLコレステロールとは正の関連を示したため, 心血管疾患の発症リスク等を指標とした包括的研究が必要と考えられる。

今後は, コーヒー摂取とメタボリックシンドローム及び関連疾患との因果関係を解明するために, 縦断的研究を進める予定である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年2月29日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

コーヒーは世界的に最も多く飲まれている嗜好飲料のひとつであり、生活習慣病など、健康への影響に関する研究も広く行われている。最近では、コーヒー摂取は冠動脈疾患のリスク減少効果による総死亡率減少、2型糖尿病やある種のがんの予防にも効果があると考えられている。しかし、コーヒー摂取とメタボリックシンドロームのリスクとの関連については、過去に報告が少なく、十分な検討がなされていない。

そこで、本研究は、職域集団において、コーヒー摂取とメタボリックシンドローム、さらにメタボリックシンドロームの構成要素との関連を明らかにすることを目的として実施した。対象者は、ある地方自治体に勤務する職員で、2008年度職員健診を受診した20歳から65歳までの3283人(男性2335人、女性948人)である。メタボリックシンドロームの診断基準は日本内科学会の基準に準じた。コーヒー摂取量によるメタボリックシンドロームの構成要素の比較については、ANCOVAを用いて、年齢、BMI、その他の生活習慣要因を調整し、評価した。また、**コーヒー摂取とメタボリックシンドロームのリスクとの関連は、単変量および多変量ロジスティック回帰分析を用いて評価した。**

その結果、メタボリックシンドロームの該当者の割合は、男性16.0%(373/2335)、女性3.4%

(32/948)であった。コーヒーを飲まない群に対する1日4杯以上のコーヒー摂取群のメタボリックシンドロームのオッズ比は、男性では、単変量解析と多変量解析において、それぞれ0.79 (95%信頼区間: 0.56-1.03)と0.61 (95%信頼区間: 0.39-0.95)であり、負の関連が認められた。しかし、女性では、関連は認められなかった。また、薬剤治療中の対象者を除外した分析においても、コーヒー摂取とメタボリックシンドロームのリスクとの関連は同じ傾向を示した。血圧に関しては、男性では、1日4杯以上のコーヒー摂取と血圧高値の間に有意な負の関連が認められた。しかし、女性では、関連は認められなかった。血糖に関しては、男女共、コーヒー摂取と高血糖との間に有意な関連は認められなかった。脂質に関しては、男性では、1日4杯以上のコーヒー摂取とトリグリセリド高値との間に有意な負の関連が認められた。しかし、女性では関連は認められなかった。さらに、1日4杯以上のコーヒー摂取とLDLコレステロール高値との間で、男性で有意な正の関連が認められた。

メタボリックシンドロームのリスク低下との関連はみられたが、一方LDLコレステロール高値とも関連がみられており、心血管疾患リスクとの関連について、今後さらにコホート研究等の詳細な解析が必要である。

以上、本論文は、コーヒー摂取とメタボリックシンドロームとの関係という、知見が確立していない予防医学的に重要な課題に対して、断面研究および自記式質問紙法という限界はあるものの、同一職域で3,000人を超える大人数を対象に調査を実施し、コーヒー摂取とメタボリックシンドロームおよびその関連要素との関連を明らかにしたもので、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880号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	大矢昌樹		
学位論文の題目	Vascular Calcification Estimated by Aortic Calcification Area Index is a Significant Predictive Parameter of Cardiovascular Mortality in Hemodialysis Patients. (大動脈石灰化面積指数によって評価された腹部大動脈石灰化は、血液透析患者の心血管死亡の有意な予後因子である)		
論文審査委員	主査	教授 赤阪隆史	
	副査	教授 村垣泰光	教授 重松 隆

論文内容の要旨

[緒言]

血液透析 (HD) 患者の死因の第1位が心血管病による死亡である。慢性腎臓病 (CKD) 患者、特にHD患者における動脈硬化病変はアテローム性硬化による血管内膜病変のみならず、血管中膜における石灰化が好発することが知られている。血管石灰化は動脈硬化症の特徴の一つであるが、HD患者では若年者でも高率に合併することが知られている。この血管石灰化の高度な症例では生命予後が不良の可能性が指摘されており、血管石灰化を制御することはCKD患者の予後改善に貢献するものと考えられる。そのためには日々の診療の中で、血管石灰化を正確に把握し、診断することが必要である。本研究では、従来腹部大動脈血管石灰化の指標として用いられてきた腹部大動脈石灰化指数 (Aortic Calcification Index : ACI) をさらに改良、発展させた腹部大動脈石灰化面積指数 (Aortic Calcification Area Index: ACAI) を用いて血液透析患者における血管石灰化評価を行い、予後因子の検討を行った。

[方法]

対象

週3回1回4時間の維持血液透析中の患者137例を対象とした。CT撮影時の平均年齢は59.7±11.9歳、平均透析期間は80.5±64.5ヶ月。

腹部大動脈石灰化面積指数 (ACAI)

腹部単純CTにて腹部大動脈を総腸骨動脈分岐部より1cm間隔にて10スライスを撮影した。それらの動脈横断面積と石灰化面積を測定し石灰化面積を横断面積にて割ったものを百分率で表示し10スライス分の平均値をACAIとした。

予後検討

ACAIが平均値より高値な群と低値な群で、2群にわけ、Kaplan-Meier分析にて2群間の生命予後に関して全死亡と心血管死にわけ検討を行なった。透析患者における予後規定因子の検討として、ACAIを含む各因子と生命予後に関して全死亡と心血管死にわけ、単変量解析を行ない、有意であった因子に関して多変量解析を行なった。

[結果]

1) ACAI at baseline

ACAIが平均値(20.7%±15.3%)より高値な群をGroup H、低値な群をGroup Lとした。年齢以外の要素として収縮期血圧、脈圧、血清Ca濃度、non-HDLコレステロール、Lp(a)、renin-angiotensin system (RAS) 阻害薬服用率が有意にACAI高値群で高い傾向があった。

2) Kaplan-Meier分析

全死亡、心血管死ともACAI高値群 (Group H) は有意にACAI低値群 (Group L) に比べて、生存率が低かった。(P<0.001)

3) 患者予後

フォローアップ期間(1996年1月から2008年7月)中、137名中76名の患者が死亡した。全死亡に占める心血管死の割合は60.5%であった。Group H 70名のうち36名、Group L 67名のうち10名が心血管病で死亡された。

4) 単回帰分析

全死亡に対する予後因子として、年齢以外に透析期間、糖尿病の有無、収縮期血圧、脈圧、ACAIが有意であった。

心血管死に対する予後因子として、年齢以外に透析期間、糖尿病の有無、収縮期血圧、脈圧、Lp(a)、ACAIが有意であった。

5) 多変量解析

単変量解析で有意であった因子で全死亡と心血管死に対する予後因子として多変量解析を行なったところ、年齢以外の因子として、ACAIが心血管死の独立した予後因子であると認められた。

[考察]

本研究では、血液透析患者における石灰化の評価として従来用いられてきたACIをさらに発展、改良させたACAIを用いて、その予後因子としての有用性を検討した。ACAIが高値である群は低い群に比べ、有意に予後が不良であり、最終的な多変量解析の結果でもACAIは心血管死亡の独立した予後因子であると認められた。血管石灰化は血液透析患者における予後をみる上で非常に有用な因子であり、その正確な評価は日常診療の中で、心血管死亡の予測をし、石灰化制御つながる治療の効果を判定する上で非常に有用である。ACAIは再検が容易な腹部大動脈石灰化評価法であり、心血管死亡の独立した危険因子であると証明されたことで、今後のCKD診療で非常に有用な指標であると考えられた。

[結論]

CKD患者における腹部大動脈血管石灰化評価および心血管病予後因子としてACAIは有用であると考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年2月15日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。本研究では、従来腹部大動脈血管石灰化の指標として用いられてきた腹部大動脈石灰化指数(Aortic Calcification Index: ACI)をさらに改良、発展させた腹部大動脈石灰化面積指数(Aortic Calcification Area Index: ACAI)を用いて血液透析患者における血管石灰化評価を行い、予後因子の検討を行った。

維持血液透析中の患者137例を対象とし、腹部単純CTにて腹部大動脈を総腸骨動脈分岐部より1cm間隔にて10スライスを撮影し、動脈横断面積と石灰化面積を測定し石灰化面積を横断面積にて割ったものを百分率で表示し、10スライス分の平均値をACAIと定義した。ACAIは従来腹部大動脈血管石灰化の指標であったACIを発展させ、さらに正確に評価ができるように改良したもので、独自に創出したものである。

ACAIが平均値より高値な群と低値な群で、2群にわけ、Kaplan-Meier分析にて2群間の生命予後に関して全死亡と心血管死にわけ、検討を行なった。さらに透析患者における予後規定因子の検討として、ACAIを含む各因子と生命予後に関して全死亡と心血管死にわけ、単変量解析を行ない、有意であった因子に関して多変量解析を行なった。

フォローアップ期間(1996年1月から2008年7月)中、137名中76名の患者が死亡した。全死亡に占める心血管死の割合は60.5%であった。Kaplan-Meier分析では全死亡、心血管死ともACAI高値群は有意にACAI低値群に比べて、生存率が低かった。(P<0.001)

単変量解析では、全死亡に対する予後因子として、年齢以外に透析期間、糖尿病の有無、収縮期血圧、脈圧、ACAIが有意あり、心血管死に対する予後因子として、年齢以外に透析期間、糖尿病の有無、収縮期血圧、脈圧、Lp(a)、ACAIが有意であった。

さらに単変量解析で有意であった因子で全死亡と心血管死に対する予後因子の多変量解析を行なったところ、年齢以外の因子として、ACAIが心血管死の独立した予後因子であると認められた。

以上本論文は従来の腹部大動脈血管石灰化の指標をさらに発展させ、より正確な指標を創出し、さらにその有用性を示したものである。このことは透析患者の心血管死の予後予測や、石灰化制御につながる治療効果判定など、今後の慢性腎臓病診療に貢献できるものとして、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881号		
学位授与の日	平成24年3月6日		
氏名	高橋 佑輔		
学位論文の題目	Two routes for pollen entering indoors: ventilation and clothes (住居内へのスギ花粉侵入経路としての換気と繊維製品について)		
論文審査委員	主査	教授 宮下 和久	
	副査	教授 山中 昇	教授 竹下 達也

論文内容の要旨

【背景】

近年、スギ花粉症患者の急激な増加は大きな社会問題となっており、その対策が急務となっている。スギ花粉症の対策としては、医療機関にて適切な治療を受けることが有効だが、同時に、普段の生活の中で適切なセルフケアを実行し、症状を軽減、あるいは発症を予防することが重要である。鼻アレルギー診療ガイドラインによると、患者自身がスギ花粉の回避のために飛散期の外出を控えること、飛散期に窓や戸を閉めておくことなどがセルフケアとして推奨されている。しかしながら、スギ花粉症有症者が症状に悩む場面は屋外よりも室内の方が多く、スギ花粉症患者であっても、換気や衣類の手払いといった対策実施率は十分とはいえないことをこれまでに報告してきた。

室内のスギ花粉量と換気や掃除といった生活行動との関係については過去に報告がなく、スギ花粉の侵入を低減する方法や、侵入したスギ花粉への具体的な対策についての検討には至っていない。そこで、今回の研究ではスギ花粉飛散期における室内へのスギ花粉の侵入経路と侵入量について検討を行った。

【方法】

①換気によるスギ花粉の侵入について

2005年3月、千葉県のある同一集合住宅中の隣接する同じ間取りの空室6室を用い、換気条件を様々に変化させたときのスギ花粉の侵入量の変化について検討した。各住居内の窓際や床面にワセリンを塗布したスライドガラスを設置し、2日間にわたって換気を実施した。スライドガラス上に捕捉されたスギ花粉をGentian Violetで染色し、顕微鏡下で計数した。

②繊維製品に付着するスギ花粉について

2005年3月、東京都のある7階建ビルの屋上において、洗濯物(木綿Tシャツおよび木綿タオル)および布団をそれぞれ約6時間外干しした。表面に付着したスギ花粉を掃除機(日立, CV-CF4)の紙パックに回収した後、PBSでCry j 1を抽出し、比色ELISA法にて定量した。

【結果】

①換気によるスギ花粉の侵入について

窓を全開にした場合、屋内へのスギ花粉侵入量はベランダの24%であった。b)窓を全開でレースカーテンを閉めるとベランダの15.8%に減少した。c)さらに窓の開口幅を10cmにするとスギ花粉侵入量はベランダの3.3%に減少した。Friedman検定を行ったところ、a)~c)の3群間には有意差($p < 0.001$)がみられた。一方、窓を閉めた場合でも、換気扇を運転するとベランダの1.3~1.8%のスギ花粉が室内に侵入した。換気扇の運転台数が増えるとスギ花粉の侵入量は増加した。窓際と、窓際以外でWilcoxon検定を実施したところ、窓とカーテンを全開にした場合を除いて、侵入したスギ花粉は窓際で有意に多かった($p < 0.05$)。このことから、窓際を入念に清掃することによって、室内に侵入したスギ花粉を効率的に除去できる可能性が示唆された。

②繊維製品に付着するスギ花粉について

アイテムあたりのスギ花粉付着量については、布団が特に多かった。2つ折りにして干した布団では、内側にもスギ花粉の付着が観測された。また、布団、Tシャツおよびタオルのいずれも、手で払ったり、振りさばいたりしても、スギ花粉は半分以上が残留していた。いずれのアイテムにおいても、掃除機がけによってスギ花粉が紙パック中に回収されたことから、スギ花粉の持込を減らすには、洗濯物やふとんを外干した後、掃除機がけをすることが有効と考えられた。

【結語】

今回の検討により、室内へ侵入するスギ花粉の量を低減するために、特に換気条件に注意することが重要と考えられた。窓を開けて換気する際には、レースカーテンを閉めたり、窓の開け幅を狭めることによってスギ花粉の侵入量を低減することができる。さらに、窓を閉めていても、換気扇を運転することによってスギ花粉は室内に侵入する。換気扇の運転時間は長時間に及ぶため、スギ花粉の飛散期には、換気によって侵入するスギ花粉をこまめに除去することが重要である。換気によって侵入したスギ花粉は窓際に多く分布していたことから、窓際を入念に清掃することで効率よくスギ花粉を除去できると考えられる。

今後は、スギ花粉の具体的な除去方法を設定し、その効果を検証することによって、スギ花粉症の有効なセルフケア方法を提案していく予定である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成24年2月29日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

近年、スギ花粉症患者の急激な増加は大きな社会問題となっており、対策が急務となっている。鼻アレルギー診療ガイドラインによると、患者自身がスギ花粉の回避のためにスギ花粉飛散期の外出を控えること、飛散期に窓や戸を閉めておくことなどが推奨されている。しかし、有症者が症状に悩む場面は屋外同様に室内でも多いことや、換気や衣類の手払いなどの対策実施率が低いことを報告してきた。また、室内のスギ花粉量と換気や掃除といった生活行動との関係については過去に報告がなく、スギ花粉の侵入を低減する方法や、侵入したスギ花粉への具体的な対策についての検討には至っていない。

そこで、本研究はスギ花粉飛散期における室内へのスギ花粉の侵入経路と侵入量を明らかにする目的で実施した。①2005年3月、千葉県のある同一集合住宅中の隣接する同じ間取りの空室を用い、換気条件によるスギ花粉の侵入量の変化について検討した。各住居内の窓際や床面にワセリンを塗布したスライドグラスを設置してスギ花粉を採取し、染色後に顕微鏡下で計数した。②同月の別の日に、東京都のある7階建ビルにおいて洗濯物（木綿Tシャツおよび木綿タオル）および布団を屋上に設置し、一定時間曝露を行った。表面に付着したスギ花粉を掃除機（日立、CV-CF4）の紙パックに回収した後、PBSで*Cry j 1*を抽出し、比色ELISA法にて定量した。

その結果、①の実験においては、窓を開ける条件によってスギ花粉の侵入量が大きく変化した。a)窓を全開にした場合、屋内へのスギ花粉侵入量はベランダの24%であった。b)窓を全開でレースカーテンを閉めるとベランダの15.8%に減少した。c)さらに窓の開口幅を10cmにするとスギ花粉侵入量はベランダの3.3%に減少した。a)～c)の3群間には有意差($p < 0.001$)がみられた。一方、窓を閉めた場合でも、換気扇を運転するとベランダの1.3～1.8%のスギ花粉が室内に侵入した。窓とカーテンを全開にした場合を除いて、侵入したスギ花粉は室内の窓際で有意に多かった($p < 0.05$)。窓際を入念に清掃することによって、室内に侵入したスギ花粉を効率的に除去できる可能性が示唆された。②の実験においては、製品あたりのスギ花粉付着量については、布団が特に多かった。また、布団、Tシャツおよびタオルのいずれも、手で払う程度の物理力を加えてもスギ花粉量を50%以下に減少させることができなかった。

以上、本論文は、これまで研究報告の少ない住居内へのスギ花粉侵入経路について、複数の観点から量的な比較を行った貴重な研究である。従来、定性的な提案にとどまっていた抗原回避方法について、効果や優先順位を初めて定量的に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882号		
学位授与の日	平成24年3月27日		
氏名	石田 玲子		
学位論文の題目	The effect on brain activity of clenching with a bite plate increasing occlusal vertical dimension to mandibular rest position : a functional MRI study (fMRI を用いた下顎安静位の咬合高径に相当するバイトプレート装着に伴う clenching が脳活動に及ぼす影響について)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 鶴尾 吉宏	教授 藤田 茂之

論文内容の要旨

Abstract

今回我々は、下顎安静位に相当する咬合高径を付与したバイトプレートの非装着時、装着時の clenching 時の脳活動状態を fMRI で測定、解析し、下顎安静位への咬合挙上時の clenching が脳活動に及ぼす影響について研究を行った。20~40 歳の個性正常咬合を有する健常男性ボランティア 5 名を研究及び分析の対象として行った。各被験者に 22 秒間の non-clenching(安静)と 22 秒間の clenching (かみしめ)動作を交互に 458 秒間行わせた。

clenching は最大咬合力の 25~35%とした。このタスクを各被験者それぞれの下顎安静位にて作製したバイトプレートの非装着時と装着時で行い、各タスク時の脳活動領域を fMRI を用いて測定した。

その結果、

- 1) プレート非装着時では、左右両側の一次体性感覚野に脳活動が認められた。
- 2) プレート装着時では、左右両側の一次運動野に脳活動が認められた。

このことから、下顎安静位に相当するバイトプレート装着時の clenching により一次運動野が賦活されることが示唆された。

Introduction

近年、顎口腔系と全身機能との関連に関する研究が注目を集めてきている。昨今、fMRI を利用した脳活動についての探究も多く見受けられる。その中で特に、咬合や咀嚼といった顎口腔系の機能的運動により、ヒト脳の種々の領域における神経細胞の興奮性の活動が増大することが示唆されている。

我々は、これまで mouthguard (以下 MG) 装着時の体力測定を指標にした運動能力への影響に関する調査を行ってきた。その結果、MG 装着は経時的变化を含め、測定した全ての運動能力を有意に低下させないという結果が得られ、体力測定の種類によっては運動能力を向上させるものが存在するという結果を得た。その結果の一つの要因を、MG 装着時の顎位の変化に着目した。

そこで今回我々は、MG 装着時の顎位が下顎安静位の顎位と近似していることにより、下顎安静位に相当する咬合高径を付与したバイトプレートを用い、バイトプレートの非装着時、装着時の脳活動状態を fMRI で測定、解析し、下顎安静位への咬合挙上時の clenching が脳活動に及ぼす影響について検討した。

Materials and Methods

対象

20～40歳の個性正常咬合を有する健常男性ボランティア12名が本研究に参加した。統計解析画像でアーチファクトの認められた7名を除外し、残り5名を研究および分析の対象とした。

課題パラダイム

課題パラダイムは、硬質プレートを着した状態（WP）と、何も装着しない咬頭嵌合位の状態（NP）の2つの状態において、一定間隔でclenchingとnon-clenchingを交互に行うこととした。まず口腔印象採得による模型作りをし、顎機能測定装置（K6- I Evaluation System）を用いて下顎安静位の測定を行った上で、バイトプレート(acrylic resin)を作製した。そのプレートを用い、fMRIにて脳の活動領域を測定した。クレンチングについては、事前に顎機能測定装置や筋電図を用い、モニターを見ながら数回トレーニングを行った。

課題タイミング

22秒のclenching (on) と22秒のnon-clenching (off) を交互に458秒間行った。458秒間を完了した107スキャンを1測定シリーズとした。5分間の休憩を挟んで、さらに1測定シリーズを行った。

タスク音

それぞれのタスクブロック（“non-clenching”か“clenching”か）の開始の合図をするために、4つの信号音を連続させて用いた。それぞれの音は0.5秒の連続音で、P1（900Hz）またはP2（1100Hz）のピッチ（音の高低）を用いた。

画像の捕捉

fMRI画像は、1.5-T装置（Magnetom vision, Siemens社 Erlangen）とCPヘッドコイルにより捕捉した。厚さ3mm、スライス間隙0.75mmの38枚のスライスとし、大脳全体と小脳の大部分をカバーした。各被験者ごとに機能性（T2*強調）画像（FOV 192mm, matrix size 64×64, voxel size 3×3×3mm³, TR 4.28sec, TE 60ms, scan数107）をEPI法で撮像した。加えて解剖学的画像をmatrix size 128×128, voxel size 1.5×1.5×3mm³, scan数2に変更し、同様にEPI法で撮像した。

データ分析

各被験者から214のスキャン画像からなる時系列のデータを得た。fMRIデータ解析のため、SPM2ソフトウェアを使用した。統計解析によって優位な賦活部位のMNI座標が得られた。これらをMATLAB7のソフト“MNI to Talairach conversion”にてTalairach座標に変換し、その座標を元にTalairach Daemon Clientというソフトにて解剖学的部位の同定を行った。

Result

NPはプレートの無い咬頭嵌合位の状態、non-clenchingよりもclenchingの方が有意に賦活した部位を示す。一方、WPはプレートを装着した下顎安静位の高さの状態、non-clenchingよりもclenchingの方が有意に賦活した部位を示す。これらはFixed-effectによる分析にて得られた結果である。

1) 咬頭嵌合位での咬合時における脳の活動領域の検索

NPでは、左右両側の頭頂葉の中心後回に脳活動が認められた。つまり、機能局在に置き換えると、一次体性感覚野に相当する。

2) 下顎安静位での咬合時における脳の活動領域の変化

WP では、NP で見られた中心後回には脳活動は認められなかったが、左右両側の前頭葉の中心前回に脳活動が認められた。つまり、機能局在に置き換えると、一次運動野に相当する。

Discussion

今回の研究において、25～35%の咬合力での咬頭嵌合位における clenching 時 (NP) に両側において確認された一次体性感覚野における活動は、下顎安静位の咬合高径を付与したプレート装着時での clenching 時 (WP) では認められなかった。

舌や歯、口唇の体性感覚については報告されており、NP での一次体性感覚野における活動は過去の報告と同部位に見られた。WP において一次体性感覚野に活動が認められなかったのは、プレートを装着することにより、歯牙がプレートと持続的に接触しているため、non-clenching と clenching で差が出なかったと推測される。

一方、NP には一次運動野には活動が認められなかったが、WP には両側の一次運動野に活動を認めた。これまでの報告では、咬合力の増加にともない一次運動野での活動の増加が示されている。今回の NP で一次運動野に活動が認められなかったのは、咬合力の低さが考えられる。しかしながら、同じ条件で WP では両側の一次運動野に活動が認められた。このことから、プレートを入れてのクレンチングは一次運動野をより賦活させる効果があると推測される。

このことは、一次運動野が身体各部における動作に関係していることからすると、少なくとも運動能力を低下させる要因にはならないと考えられる。

今後は、咬合力および咬合高径の変化により、運動野および感覚野の活動にどのような変化が見られるか検索していき、これらの結果をスポーツ医学分野への応用に役立てたい。

Conclusion

下顎安静位の咬合高径に相当するバイトプレート装着に伴う最大咬合力の 25～35%の clenching により、一次運動野の脳活動が賦活されることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成24年3月12日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

近年、競技スポーツのみならず、健康維持を目的とするスポーツ人口の増加とともに、外傷予防の目的で mouthguard (以下 MG) 装着が世代を問わず普及しており、競技によっては国内外で、MG 装着の義務化が進んでいる。しかし、MG 装着による運動能力への影響については、明確な報告はなく研究途上といえる。先行研究として MG 装着時の体力測定を指標にした運動能力への影響に関する調査を行った結果、MG 装着は運動能力を有意に低下させないという結果が得られ、その一つの要因を、MG 装着時の顎位の変化に着目した。

今回、MG 装着時の顎位が下顎安静位の顎位と近似していることにより、下顎安静位に相当する咬合高径を付与したバイトプレートの非装着時、装着時の脳活動状態を fMRI で測定、解析し、下顎安静位の咬合高径に相当する状態での clenching が脳活動に及ぼす影響について検討した。

顎機能測定装置 (K6- I Evaluation System) を用いて下顎安静位の測定を行った上で、バイトプレート (acrylic resin) を作製し、筋電図を用いて最大咬合力の 25～35% で clenching を行うトレーニングを事前に行い、1.5-T の fMRI 装置 (Magnetom vision, Siemens 社 Erlangen) を用いて撮像を行い、得られた時系列のデータを SPM2 ソフトウェアを使用して解析を行った。統計解析によって優位な賦活部位の MNI 座標が得られ、これらを MATLAB7 のソフト “MNI to Talairach conversion” にて Talairach 座標に

変換し、その座標をもとに Talairach Daemon Client ソフトにて解剖学的部位の同定を行い、下記の結果を得た。

1) 咬頭嵌合位での咬合時における脳の活動領域の検索

左右両側の頭頂葉の中心後回に脳活動が認められた。つまり、機能局在に置き換えると、一次体性感覚野に相当する。

2) 下顎安静位での咬合時における脳の活動領域の変化

左右両側の前頭葉の中心前回に脳活動が認められた。つまり、機能局在に置き換えると、一次運動野に相当する。

以上より、バイトプレートを装着しての **clenching** は一次運動野をより賦活させる影響があると推測される。このことは、一次運動野が身体各部における動作に関係していることと、バイトプレートを装着しての **clenching** により身体各部の骨格筋の緊張が増加するという報告もあり、少なくとも運動能力を低下させる要因にはならないと考えられた。

従って、MG 装着に際し、運動能力の抑制なく安全性が確保されるということにつながり、MG の普及に有効な結果が得られたと考えられる。本論文はスポーツ医学分野への応用に重要な情報を提供するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。