

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成27年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目 次

平成27年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第517号	尾川 貴洋	Elevation of interleukin-6 and attenuation of tumor necrosis factor- α during wheelchair half marathon in athletes with cervical spinal cord injuries (頸随損傷選手による車いすハーフマラソン時の IL-6 増加と TNF- α 抑制)	1
博(医)甲第518号	山中 学	In vivo patch-clamp analysis of the antinociceptive actions of TRPA1 activation in the spinal dorsal horn (脊髄後角における TRPA1 活性の抗侵害性作用の In vivo パッチクランプを用いた解析)	3
博(医)甲第519号	陳 清法	EphA4 regulates the balance between self-renewal and differentiation of radial glial cells and intermediate neuronal precursors in cooperation with FGF signaling (EphA4 は FGF シグナルと協調することにより放射状グリア細胞および神経前駆細胞の自己再生と分化を調節する)	6
博(医)甲第520号	矢田 和弥	MicroRNA expression profiles of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma (頭頸部扁平上皮癌の癌幹細胞における microRNA 発現プロフィールに関する研究)	8
博(医)甲第521号	溝口 晋	Disruption of eyelid and cornea morphogenesis by epithelial β -catenin gain-of-function (β -catenin の gain-of-function による角膜および眼瞼の形態形成への影響)	11
博(医)甲第522号	小林 彩	AG490, a Jak2 inhibitor, suppressed the progression of murine ovarian cancer (Jak2 阻害剤である AG490 はマウス卵巣癌の進展を抑制する)	13
博(医)甲第523号	金子 政弘	Extracellular High Mobility Group Box 1 Plays a Role in the Effect of Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Heart Failure (細胞外 high mobility group box 1 は心不全に対する骨髄単核球移植療法の効果においてある一定の役割を果たす)	16

博(医)甲第524号	村田 祥吾	Real-time monitoring of antimicrobial use density to reduce antimicrobial resistance through the promotion of antimicrobial heterogeneity in a haematology/oncology unit (血液腫瘍科病棟におけるリアルタイムAUDモニタリングによるantimicrobial heterogeneityを介した抗菌薬耐性菌の減少) …	19
博(医)甲第525号	比嘉 明日美	Long-term outcome of childhood IgA nephropathy with minimal proteinuria (微量蛋白尿を呈する小児 IgA 腎症患者の長期予後についての検討) …	22
博(医)甲第526号	榊野 敦子	Amount of Haemophilus influenzae genomic DNA in middle ear fluids of pediatric acute otitis media. (小児急性中耳炎の中耳貯留液中におけるインフルエンザ菌ゲノムDNA 定量について) …	24
博(医)甲第527号	竹本 和司	Acceleration Time of Systolic Coronary Flow Velocity to Diagnose Coronary Stenosis in Patients with Microvascular Dysfunction. (経胸壁心エコードプラ法による、冠微小循環障害を伴う患者の冠動脈狭窄診断) …	27
博(医)甲第528号	岡 亜早子	Ongoing Allergic Rhinitis Impairs Asthma Control by Enhancing the Lower Airway Inflammation (アレルギー性鼻炎合併喘息における上気道と下気道炎症の関連とその機序の検討) …	29
博(医)甲第529号	柏木 学	Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction (急性心筋梗塞における Toll 様受容体4 発現とヒト単球サブセットについての検討) …	32
博(医)甲第530号	大橋 拓矢	Class III Beta-tubulin Expression in Non-small Cell Lung Cancer: A Predictive Factor for Paclitaxel Response (非小細胞肺癌におけるクラス III β チューブリン発現とパクリタキセル感受性の関係) …	34
博(医)甲第531号	室谷 和宏	Change in portal vein hemodynamics after chemoembolization for hepatocellular carcinoma: evaluation through multilevel dynamic multidetector computed tomography during arterial portography (肝細胞癌による化学塞栓術後の門脈の血行動態の変化—MLD-CTAP での評価—) …	36
博(医)甲第532号	松下 祥子	Androgen regulates Mafk expression through its 3'UTR during mouse urethral masculinization (マウス尿道雄性化過程において、アンドロゲンは Mafk 遺伝子3' UTR を介してその遺伝子発現を制御する) …	38

博(医)甲第533号	鈴木 裕子	Systematic analyses of murine masculinization processes based on genital sex differentiation parameters (外陰部性差解析パラメーターによるマウス雄性化の統合的解析)	41
博(医)甲第534号	深津 和弘	Microscopic invasion patterns and epithelial cell-phenotypes in early gastric cancer with submucosal invasion (早期胃癌における粘膜下層浸潤形式と形質発現との関連性の検討)	44
博(医)甲第535号	平山 三智子	Muscarinic Receptor-Mediated Excitation of Rat Intracardiac Ganglion Neurons (心臓副交感神経節ニューロンのムスカリン応答)	47
博(医)甲第536号	下松 達哉	The effect of hydroxychloroquine on lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice (MRL/lpr mice のループスエリテマトーデス様皮疹に対するヒドロキシクロロキンの効果)	50
博(医)甲第537号	吉田 悟	Epigenetic Inactivation of FAT4 Contributes to Gastric Field Cancerization (FAT4 遺伝子のエピジェネティックな不活化は胃がんの素地に関与する)	53
博(医)甲第538号	橋本 磨和	Relationships of alcohol dehydrogenase 1B (ADH1B) and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) genotypes with alcohol sensitivity, drinking behavior and problem drinking in Japanese older men (日本人男性高齢者における ADH1B および ALDH2 遺伝子型とアルコール感受性、飲酒行動、問題飲酒との関連)	55
博(医)甲第539号	水野 誠	The effects of continuous application of sunscreen on photoaged skin in Japanese elderly people - The relationship with the usage - (日本人高齢者の光老化皮膚症状に対する日焼け止め料の長期使用の効果 - 使用量との関係 -)	58
博(医)乙第917号	小林 悠佳	Macrophage-T cell interactions mediate neuropathic pain through the glucocorticoid-induced tumor necrosis factor ligand system (GITRL system を介したマクロファージ-T 細胞間相互作用は神経障害性疼痛を伝達する)	61

博(医)乙第918号	川副 友	The impact of inspiratory pressure on stroke volume variation and the evaluation of indexing stroke volume variation to inspiratory pressure under various preload conditions in experimental animals (様々な前負荷状態において吸気圧が SVV に与える影響および吸気圧による指数化 SVV に関する動物研究) …………… 64	64
博(医)乙第919号	Anselm Ting Su (徐 廷)	A Comparison of Hand-arm Vibration Syndrome between Malaysian and Japanese Workers (マレーシア人労働者と日本人労働者における手腕振動障害の比較) Dose-response relationship between hand-transmitted vibration and hand-arm vibration syndrome in a tropical environment (熱帯環境における手腕振動と手腕振動障害の量・反応関係) …… 66	66
博(医)乙第920号	本田 賢太朗	Graft flow assessment using a transit time flow meter in fractional flow reserve-guided coronary artery bypass surgery (冠血流予備量比に基づいた冠動脈バイパス術の、術中グラフト流量に関する検討) …………… 70	70
博(医)乙第921号	塩野 泰紹	Optical Coherence Tomography-Derived Anatomical Criteria for Functionally Significant Coronary Stenosis Assessed by Fractional Flow Reserve (冠動脈狭窄病変における光干渉断層法による解剖学的狭窄度と心筋血流予備量比による機能的狭窄度の関連) …………… 72	72
博(医)乙第922号	森 良幸	Signal intensity of small hepatocellular carcinoma on apparent diffusion coefficient mapping and outcome after radiofrequency ablation (拡散係数画像における肝細胞癌の信号強度と経皮的ラジオ波焼灼術後の再発および予後との関係について) …………… 75	75
博(医)乙第923号	西尾 誠人	Serum Heparan Sulfate Concentration is Correlated with the Failure of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment in Patients with Lung Adenocarcinoma (上皮成長因子受容体阻害剤の治療効果と血清ヘパラン硫酸濃度の関係) …………… 78	78
博(医)乙第924号	三田 裕記	Synthesis of 24-Hour-Soluble Gelatin Sponge Particles and Their Effect on Liver Necrosis Following Hepatic Artery Embolization: Results of in Vitro and in Vivo Studies (24 時間溶解型ゼラチンスポンジ粒子の作製とそれらを用いた肝動脈塞栓術における肝壊死効果の検討) …………… 80	80

博(医)乙第925号	山野 貴司	Advantage of right ventricular outflow tract pacing on cardiac function and coronary circulation in comparison with right ventricular apex pacing (心機能と冠循環から検討した右室心尖部ペーシングと比較した右室流出路ペーシングの有効性について) ……………	83
博(医)乙第926号	折居 誠	Myocardial Damage Detected by Two-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography in Patients with Extracardiac Sarcoidosis: Comparison with Magnetic Resonance Imaging (サルコイドーシスにおける 2D スペックルトラッキング法を用いた傷害心筋早期発見の検討) ……………	85
博(医)乙第927号	檜皮谷 泰寛	Ultrasonography of the diaphragm in amyotrophic lateral sclerosis: Clinical significance in assessment of respiratory functions (筋萎縮性側索硬化症における横隔膜エコーの臨床的有用性) ……	88
博(医)乙第928号	中西 浩子	Incremental Value of Coronary Flow Velocity Reserve, Measured by Transthoracic Echocardiography, Compared with Computed Tomography Angiography Alone, for Detecting Flow-Limiting Coronary Stenoses (血流制限のある冠動脈狭窄の診断: 冠動脈CT単独評価と比較した経胸壁心エコー検査を用いて計測した冠血流予備能併用の有用性について) ……………	91
博(医)乙第929号	石橋 耕平	Improvement of Cardiac Function by Increasing Stimulus Strength During Left Ventricular Pacing in Cardiac Resynchronization Therapy (心室再同期療法中の左室ペーシングの出力増加がもたらす心機能の改善に関する検討) ……………	93
博(医)乙第930号	新垣 直樹	Serological and histological indices of hepatocellular carcinoma and tumor volume doubling time (肝細胞癌の腫瘍体積倍加時間と血清腫瘍マーカーおよび組織学的分化度との関係について) ……………	95
博(医)乙第931号	田伏 弘行	Excessive watering eyes in gastric cancer patients receiving S-1 chemotherapy (胃癌術後 S-1 補助化学療法の流涙の検討) ……………	98
博(医)乙第932号	友寄 勝夫	Suppression of in vivo neovascularization by the loss of TRPV1 in mouse cornea. (TRPV1 欠失マウス角膜における血管新生の抑制) ……………	101
博(医)乙第933号	仲地 健一郎	Prediction of poorly differentiated hepatocellular carcinoma using contrast computed tomography (造影 CT を用いた低分化型肝細胞癌の診断に関する研究) ……	103

博(医)乙第934号	白木 達也	Altered cytokine levels and increased CD4+CD57+ T cells in the peripheral blood of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma patients	106
		(HCV 関連肝癌患者の末梢血中におけるサイトカイン値の変動およびCD4+CD57+ T細胞の増加) ……………	
博(医)乙第935号	和田 有紀	Prediction of efficacy to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin in patients with genotype 2 hepatitis C virus using viral response within 2 weeks.	109
		(2型高ウイルス量C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α 2b・リバビリン併用療法の治療効果予測に関する研究) ………	
博(医)乙第936号	岩西 宏樹	Inhibition of development of laser-induced choroidal neovascularization with suppression of infiltration of macrophages in Smad3-null mice	112
		(Smad3 ノックアウトマウスではマクロファージの流入抑制によりレーザー誘発脈絡膜新生血管の成長は抑制される。) ……………	

学位記番号	博(医)甲第517号		
学位授与の日	平成27年5月12日		
氏名	尾川 貴洋		
学位論文の題目	Elevation of interleukin-6 and attenuation of tumor necrosis factor- α during wheelchair half marathon in athletes with cervical spinal cord injuries (頸髄損傷選手による車いすハーフマラソン時の IL-6 増加と TNF- α 抑制)		
論文審査委員	主査	教授 吉田 宗人	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 田島 文博

論文内容の要旨

緒言：運動による TNF- α 抑制は筋組織からの IL-6 による抗炎症作用の結果であると Pederson らは推察している。しかし、運動負荷後に TNF- α が直接低下することに関するデータは乏しい。そこで、交感神経活動が比較的保たれている胸腰髄損傷者と交感神経が完全に障害されている頸髄損傷者を対象に IL-6 の上昇が期待できる高強度長時間運動を負荷し IL-6 の分泌の有無とそれに伴う TNF- α の変化を観察するために実験を計画した。

方法：大分国際車いすマラソン大会ハーフマラソン部門に参加し、完走が見込める男性選手を被験者とした。被験者は頸髄損傷者 6 名とコントロールとして胸腰髄損傷者 8 名とした。採血を運動開始前のレース当日の朝、レース直後、レース後 2 時間の 3 回実施した。測定項目は、ヘマトクリット・白血球分画・アドレナリン・IL-6・TNF- α を測定した。

結果：被験者は全員完走し、レース時間は胸腰髄損傷者に比べて頸髄損傷者は有意に遅かった。ヘマトクリットは頸髄損傷者と胸腰髄損傷者ともにレース前・レース直後・レース後 2 時間において有意差は認めなかった。アドレナリンは、実験を通して頸髄損傷者は胸腰髄損傷者より有意に低い数値であった。胸腰髄損傷者ではレース直後にアドレナリンが有意に上昇したが、頸髄損傷者では変化しなかった。モノサイトは、頸髄損傷者はレース前・レース直後・レース後 2 時間において有意な上昇は認めなかったが、胸腰髄損傷者ではレース後 2 時間で有意に上昇を認めた。血中 IL-6 は、両群ともレース前よりもレース直後に有意に上昇を認めたが、胸腰髄損傷者の上昇の方が大きく、レース直後には頸髄損傷者よりも有意に高い値となった。また、IL-6 とアドレナリンでは相関関係が認められた。TNF- α の結果は胸腰髄損傷者では有意な変化は認めなかったが、頸髄損傷者ではレース後 2 時間で有意な低下を認めた。

考察：両群において、レース直後に上昇した IL-6 は、モノサイトの変化がないことから筋組織で産生されたものと考えられる。レース直後、頸髄損傷者の IL-6 が胸腰髄損傷者より低値であった理由は、筋肉量が少ないことと、アドレナリンが上昇しない影響が考えられる。TNF- α が頸髄損傷者においてレース後 2 時間で低下を認めたが、胸腰髄損傷者では低下しなかった結果は、モノサイトによるものと考えられる。すなわち、胸腰髄損傷者でのみモノサイトが上昇し、それによる TNF- α 上昇が加味され、有意な低下を認めなかったと考える。これまで IL-6 は pro-inflammatory サイトカインと認知されていたが、頸髄損傷者で TNF- α が低下している結果は、IL-6 の anti-inflammatory として働いていることを示している。TNF- α 抑制の機序として、IL-6 は抗炎症性サイトカインである IL-1 receptor antagonist や IL-10 の産生を刺激した可能性がある。本実験は、頸髄損傷者が高強度長時間運動を行うと、IL-6 が分泌され、モノサイトの上昇がなく、TNF- α を低下させることをはじめて明らかにした。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 4 月 24 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

本論文は、交感神経活動が比較的保たれている胸腰髄損傷者と交感神経が完全に障害されている頸髄損傷者において、IL-6 の上昇が期待できる高強度長時間運動を負荷し IL-6 の分泌の有無とそれに伴う TNF- α の変化を観察することを目的としている。車いすハーフマラソン完走した対象者では、血中 IL-6 は胸腰髄損傷者・頸髄損傷者ともレース前よりもレース直後に有意に上昇を認めた。また、TNF- α の結果は胸腰髄損傷者では有意な変化は認めなかったが、頸髄損傷者ではレース後 2 時間で有意な低下を認めた。

以上より、本研究および本論文は、頸髄損傷者が高強度長時間運動を行うと、IL-6 が分泌され TNF- α が低下することを初めて示したものであり、学位論文として十分価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第518号		
学位授与の日	平成27年7月14日		
氏名	山中学		
学位論文の題目	In vivo patch-clamp analysis of the antinociceptive actions of TRPA1 activation in the spinal dorsal horn (脊髄後角における TRPA1 活性の抗侵害性作用の In vivo パッチクランプを用いた解析)		
審査委員	主査	教授 川股 知之	
	副査	教授 田島 文博	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

【緒言】

TRP (transient receptor potential) チャネルは4つの6回膜貫通型サブユニットからなる非選択的カチオンチャネルであり、これらのチャネルは感覚神経の自由終末部や後根神経節(細胞体)のみならずその中枢端(脊髄内終末部)にも発現し、痛覚シナプス伝達を調節することが見いだされた。その中でも TRPA1 チャネルは脊髄終末部において疼痛増強や神経過敏、アロディニアなどに関与していると考えられているが、近年、TRPA1 チャネルが抗侵害刺激作用に関与しているとの報告もあり、その機能的役割には不明な点が多い。そこで今回、我々は TRPA1 チャネルの脊髄後角における生理的作用について in vivo パッチクランプ法を用いて電気生理学的に解析した。

【方法】

5週齢のラットをウレタン腹腔内麻酔下に椎弓切除術を行い、脊髄膠様質ニューロンに in vivo パッチクランプ法を適用した。TRPA1 作動薬に Allylisothiocyanete (AITC) 300 μ M を用い、脊髄表面に灌流した際の自発性興奮性シナプス後電流 (EPSC)、自発性抑制性シナプス後電流 (IPSC) および膜電位の変化をさまざまな条件下で解析した。また、記録細胞の受容野に疼痛 (pinch)・触 (air puff) 刺激試験を行うと誘発性興奮性シナプス後電流 (evoked EPSC) が激しく連続的に出現するが、AITC 存在下で pinch・air puff 激誘起応答に変化があるか検討した。

【結果】

電圧固定法により記録膜電位を-70mVに固定した。AITC 300 μ M を3分間脊髄表面に灌流すると、内向き電流の発生ならびに EPSC の頻度・振幅の増加 (68ニューロン中36ニューロン) が観察された。これらの EPSC の増強はグルタミン酸受容体アンタゴニストである CNQX 20 μ M、AP5 50 μ M にて消失したが、Na⁺チャネルブロッカー (tetrodotoxin) 0.5 μ M 存在下では EPSC の増強に影響を与えなかった。また、記録膜電位を-0mVに固定した状態で AITC 300 μ M を灌流すると、IPSC の頻度・振幅の増加が観察された。これらの IPSC の増強は GABA_A 受容体アンタゴニスト (Bicuculline 20 μ M)、グリシン受容体アンタゴニスト (Strychnine 4 μ M) 存在下で消失した。さらに、TTX 0.5 μ M 存在下や CNQX 20 μ M + AP5 50 μ M 存在下では IPSC の増強は認められなかった。これらの結果から、TRPA1 チャネルは一次求心性線維の脊髄終末部に存在しグルタミン酸の放出を促進しており、さらに一次求心性線維が抑制性介在ニューロンとシナプスを形成していることを示唆する。

また、EPSC 増強の持続時間と IPSC 増強の持続時間を比較検討したところ、IPSC 増強の持続時間の方が有意に長いことが判明した。これらの作用の強度を検討するために、電流固定法を用い膜電位の変化を調査した。AITC 300 μ M を脊髄表面に灌流すると、膜電位は過分極を示した。一方、TTX 0.5 μ M 存在下では AITC 300 μ M により脱分極を示した。

次に、AITC 300 μ M 存在下に記録細胞の受容野に pinch・air puff 刺激を加え、非存在下での誘起

応答と比較した。AITC 300 μ M 存在下では非存在下と比較して pinch および air puff 刺激による evoked EPSC と基線の形成する面積は有意に減少した。(pinch : 10 ニューロン中 11 ニューロン、air puff : 6 ニューロン中 6 ニューロン)。さらに、電流固定法による膜電位測定において pinch 刺激を加え AITC 300 μ M の存在下と非存在下の変化を観察したところ、存在下で pinch 刺激による誘発性興奮性シナプス後電位 (evoked EPSP) と基線の形成する面積は減弱した。これらの結果から、脊髄後角部では TRPA1 活性により抑制性介在ニューロンによる疼痛抑制がより強く働いていると考えられる。

【考察】

脊髄後角部 TRPA1 は一次求心性線維のシナプス前終膜に存在しており、また抑制性介在ニューロンへもシナプスを形成し、そのシナプス前終膜にも存在していることが明らかになった。これらの脊髄後角部 TRPA1 活性は EPSC を増強させると同時に IPSC も増強させ、さらに IPSCの方が EPSC より持続しかつ電流固定法では脱分極を示したことから、脊髄後角において抗侵害刺激作用の役割があると考えられる。また、実際の末梢刺激に対しても抑制効果を持つことから、脊髄後角部 TRPA1 活性は抑制性がより強く働き鎮痛作用を引き起こしたと考えられた。このことから、脊髄後角部 TRPA1 活性は鎮痛作用を持っていると考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成26年6月25日、29日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

【背景と目的】

臨床において慢性神経障害性疼痛の治療にしばしば難渋する。そのため新たな治療薬の開発が今後の疼痛治療において最重要課題と考えられる。今回、注目した TRP (transient receptor potential) A1 チャネルは感覚神経の自由終末部や後根神経節 (細胞体) のみならずその中枢端 (脊髄内終末部) にも発現し、疼痛増強や神経過敏、アロディニアなどに関与していると考えられている。しかし、その機能的役割には不明な点が多い。そのため、我々は TRPA1 チャネルの脊髄後角における生理的作用について in vivo パッチクランプ法を用いて電気生理学的に解析した。

【結果】

記録は脊髄後角の膠様質細胞から記録を行った。TRPA1 作動薬に Allylisothiocyanate (AITC) を用いた。

①TRPA1 活性により EPSC (興奮性シナプス後電流) および IPSC (抑制性シナプス後電流) とともに増強を認めた。②TRPA1 活性による EPSC の増強はグルタミン酸受容体アンタゴニストである CNQX、AP5 にて消失したが、Na⁺チャネルブロッカー tetrodotoxin (TTX) 存在下では EPSC の増強に影響を与えなかった。③TRPA1 活性による IPSC の増強は GABA_A 受容体アンタゴニスト Bicuculline、グリシン受容体アンタゴニスト Strychnine 存在下で消失した。さらに、TTX 存在下や CNQX+AP5 存在下では IPSC の増強は認められなかった。④IPSC の増強時間は EPSC の増強時間より有意に長かった。⑤TRPA1 活性により、膠様質細胞の膜電位は過分極を示したが、TTX 存在下では AITC により脱分極を示した。⑥TRPA1 活性により、末梢組織刺激による誘発性 EPSC は減弱した。

【考察】

脊髄後角部 TRPA1 は一次求心性線維のシナプス前終膜に存在しており、また抑制性介在ニューロンへもシナプスを形成し、そのシナプス前終膜にも存在していることが明らかになった。これらの脊髄後角部 TRPA1 活性は EPSC を増強させると同時に IPSC も増強させ、さらに IPSCの方が EPSC より持続しかつ電流固定法では脱分極を示したことから、脊髄後角において抗侵害刺激作用の役割があると考えられる。また、実際の末梢刺激に対しても抑制効果を持つことから、脊髄後角部 TRPA1 活性

は抑制性がより強く働き鎮痛作用を引き起こしたと考えられた。このことから、脊髄後角部 TRPA1 活性は鎮痛作用を持っていると考えられ、今後の神経障害生疼痛に対する新たな鎮痛薬のターゲットと成り得る可能性が示された。

本論文は、脊髄後角部のTRPA1の生理的役割に関して、In vivo patch-clamp法を用いて明らかにした点で意義深いものであり、学位論文としての価値のあるものであると認めた。

学位記番号	博(医)甲第519号		
学位授与の日	平成27年7月14日		
氏名	陳 清法		
学位論文の題目	EphA4 regulates the balance between self-renewal and differentiation of radial glial cells and intermediate neuronal precursors in cooperation with FGF signaling (EphA4はFGFシグナルと協調することにより放射状グリア細胞および神経前駆細胞の自己再生と分化を調節する)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 平井 秀一	教授 坂口 和成

論文内容の要旨

In mouse cerebral corticogenesis, neurons are generated from radial glial cells (RGCs) or from their immediate progeny, intermediate neuronal precursors (INPs). The balance between self-renewal of these neuronal precursors and specification of cell fate is critical for proper cortical development, but the signaling mechanisms that regulate this process are poorly understood. EphA4, a member of the receptor tyrosine kinase superfamily, is expressed in RGCs during embryogenesis. Little is known of the cell- and stage-specific function of EphA4 in corticogenesis. In particular, it is unclear whether EphA4 contributes to proliferation and/or differentiation of neural stem/progenitor cells. To study the function of EphA4 in RGC cell fate determination during early corticogenesis, we conditionally deleted *Epha4* in RGCs of the mouse cortex before onset of deep cortical layer formation (E11.5) or upper layer formation (E13.5). By deleting *Epha4* in the cortex at two different developmental stages, we were able to obtain the following findings:

- ① The size of the cerebral cortex at P0 was smaller than that of controls when *Epha4* was deleted at E11.5 but not when it was deleted at E13.5.
- ② The number of RGCs decreased at later developmental stages only in the E11.5-deletion mutants.
- ③ In both deletion mutants, the number of neurons temporarily increased at E14.5, the stage of most enhanced neurogenesis. However, E11.5-deletion mutants eventually decreased the number at P0, whereas E13.5-deletion mutants did not.
- ④ The number of INPs and mitotic INPs that differentiated from RGCs increased at E14.5 in both mutants, and their number decreased at later developmental stages in the E11.5-deletion mutants.
- ⑤ Cortical cells isolated at E14.5 and E15.5 from both deletion mutants showed reduced capacity for neurosphere formation with greater differentiation toward neurons.
- ⑥ Loss of EphA4 at both stages led to precocious *in vivo* RGC differentiation toward neurogenesis.
- ⑦ Loss of EphA4 at both stages also exhibited lower phosphorylation of ERK and FRS2 α in the presence of FGF.

These results suggest that EphA4, in cooperation with an FGF signal, contributes to maintenance of RGC self-renewal and repression of RGC differentiation through the neuronal lineage,

determining the neonatal cortex size. This function of EphA4 is especially critical and uncompensated in early stages of corticogenesis.

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 6 月 16 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文の審査を行った。

マウス大脳皮質形成において、神経細胞は放射状グリア細胞（RGC）または神経前駆細胞（INP）から産生される。これらの細胞の自己再生と分化のバランスは適切な皮質形成のために重要であるが、これを調節するシグナル機構の全容はまだよく知られていない。EphA4 は受容体型チロシンキナーゼファミリーに属す分子で種々の細胞で発現しており、胚形成の過程で RGC にも発現されている。しかし、その大脳皮質形成上の機能に関しては、胚形成のどの時期にどの細胞で働き、どのような作用をするのかはよく知られていなかった。特に、EphA4 がこれらの細胞の増殖・分化に関与するのかどうかに関しては不明であった。私共に以前に EphA4 が FGF 受容体と相互作用し、下流シグナルを増強することを報告している。

EphA4 の初期皮質形成期における RGC 運命決定作用を明確にするため、この度 *Epha4* を E11.5 および E13.5 の RGC で特異的に KO し (E11.5-*Epha4*cKO および E13.5-*Epha4*cKO)、P0 までの脳を組織学的および分子生物学的に調べた。また、神経幹細胞自己再生能を培養にて調べた。その結果以下のようなことを発見した。

- ① P0 期における大脳皮質のサイズについては、E11.5-*Epha4* cKO マウスはコントロールマウスと比べて小さかったが、E13.5-*Epha4* cKO マウスでは不変であった。
- ② RGC の数は、E17.5 以降で調べると、E11.5-*Epha4* cKO マウスでのみ減少していた。
- ③ 分化した神経細胞数については、神経細胞分化能がピークを迎える E14.5 では、両 cKO マウス共にコントロールと比べ一時的に増加していた。しかし、生直後の P0 で比べた場合、E11.5-*Epha4* cKO マウスでのみコントロールと比べて神経細胞数が減少をしていた。
- ④ INP の数は、分化した神経細胞同様両 cKO マウスで E14.5 において一時的に増加したが、その後の時期での INP 数は E11.5-*Epha4* cKO でのみ減少した。
- ⑤ 神経幹細胞自己再生能を調べるため E14.5 および E15.5 の時期に単離した皮質由来細胞を培養し形成される neurosphere の数を調べた。両 cKO マウス由来の脳組織からの neurosphere の数はコントロールと比べて少なく、多くの幹細胞は神経細胞へ分化した。
- ⑥ 両 cKO マウスにおいて、RGC は *Epha4* KO 後の各時期で神経細胞へ早熟的に分化した。
- ⑦ FGF 受容体下流の ERK および FRS2 α のリン酸化は、両 cKO マウスの E15.5 大脳皮質細胞において低下していた。

これらの結果から、EphA4 は特に E11.5 より以前の時期に FGF シグナルを増強することにより、RGC の自己再生維持および分化抑制に作用し、大脳皮質サイズの決定に関与することが示唆された。本研究は、哺乳類大脳皮質形成に EphA4 が FGF シグナル調節により関与す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認めた。

学位記番号	博(医)甲第520号		
学位授与の日	平成27年10月20日		
氏名	矢田 和弥		
学位論文の題目	MicroRNA expression profiles of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma (頭頸部扁平上皮癌の癌幹細胞における microRNA 発現プロファイルに関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山中 昇

論文内容の要旨

【はじめに】

頭頸部扁平上皮癌は化学療法、放射線療法および手術療法の進歩により治療成績の向上が認められているが、再発症例の予後は不良で50%以上の死亡率となっている。近年、癌細胞の小さな集団は移植実験において癌成長の強い推進力を持つことが明らかになり、この腫瘍増生能力を持ち得た小細胞集団は癌幹細胞と定義された。癌幹細胞は化学療法や放射線療法に対して治療抵抗性を備えている。癌幹細胞は頭頸部扁平上皮癌を含む数種類の癌で分離されており、大部分はFACSで分離し細胞ソートされている。これらの分離された小細胞集団は主に免疫不全マウスへの移植能力にて癌幹細胞の特性を確認されている。ALDEFUOR assayはALDH1活性に基づいて癌幹細胞を分離するために用いられており、頭頸部癌領域ではCD44細胞表面マーカーを用いた分離よりも純度が高いことが報告されている。

MicroRNAは20-25塩基からなるnoncodingRNAであり、mRNAの転写後に作用することによって遺伝子の発現を調節している。最近の研究では何種類かのmicroRNAは癌幹細胞の調節に関与していることが示された。人のゲノムにおいて2,500以上のmicroRNAがデータベースに公開されているが、癌幹細胞と関連のあるmicroRNAはすべて明らかになっていない。癌幹細胞と関連するmicroRNAを同定することは、癌幹細胞の特性や腫瘍形成の経路を理解するうえで有益な情報となる。本研究において我々は、ALDH1の発現が強い頭頸部扁平上皮癌の小集団を分離して、それらの癌幹細胞の特性を調べた。さらに、癌幹細胞の特徴を把握することや、新たな治療の標的となり得る可能性のあるmicroRNAを見いだすことを目的としてmicroRNAプロファイル分析を行なった。

【方法】

1. 癌幹細胞の濃縮

頭頸部扁平上皮癌細胞株2種類(UTSCC-9、UTSCC-90)をプロトコールに従ってALDEFUOR assayをおこない、染色された細胞をFACS Ariaにより分析およびソートすることで、ALDH陽性細胞集団(癌幹細胞が濃縮された細胞集団)とALDH陰性細胞集団(癌幹細胞を含まない細胞集団)に分離した。

2. 癌幹細胞の検証

ALDH陽性細胞集団が、ALDH陰性細胞集団に比べて癌幹細胞の性質を持つかどうかを評価した。

1) 幹細胞マーカーの検索

ALDH1、SOX2、nanog、oct4の4種類の遺伝子の発現を比較した。ALDH陽性細胞集団とALDH陰性細胞集団からそれぞれRNAを抽出後、逆転写によりcDNAを合成し、realtime PCRにて幹細胞マーカーの発現の比較を行なった。

2) Sphere formation assay

幹細胞は浮遊状態でも sphere を形成する性質を用いた。ALDH 陽性細胞集団と ALDH 陰性細胞集団それぞれ 5000 個を非接着プレートで培養し、形成する sphere の数の比較を行なった。

3) 移植実験

PBS とマトリゲルを混ぜた液に ALDH 陽性細胞集団と ALDH 陰性細胞をそれぞれ 5,000 個の細胞を入れて、免疫不全マウス (NOD/SCID) の背部の皮膚に移植した。マウス皮下に形成される腫瘍の大きさを計測し、2 種類の細胞集団における腫瘍形成能力の比較を行なった。

3. microRNA microarray による比較

ALDH 陽性細胞集団と ALDH 陰性細胞集団をそれぞれ、約 36,000 個の microRNA のプローブが貼り付けられた基板である GeneChip miRNA 4.0 Array を用いて、網羅的に microRNA の発現を検索した。その結果をスキャタープロットによる解析を行い、2 種類の細胞株ともに、ALDH 陽性細胞集団の発現が ALDH 陰性細胞集団発現に比べて 2 倍以上の上昇、あるいは 2 倍以上の低下が認められる microRNA に絞り込んだ。絞り込まれた microRNA について、ALDH 陽性細胞集団と ALDH 陰性細胞集団から抽出された cDNA を用いて realtimePCR により比較検討した。

【結果】

1. 癌幹細胞の濃縮

2 種類の細胞株 UTSCC-9、UTSCC-90UTSCC 9 における ALDEFUOR assay 陽性細胞集団 (ALDH 陽性細胞集団) は、それぞれ 12.3%、10.3%であった。

2. 癌幹細胞の証明

1) realtimePCR を用いた幹細胞マーカー発現の比較

2 種類の細胞株ともに幹細胞マーカーである ALDH 1、nanog、SOX2、oct4 の発現は、ALDH 陰性細胞に比べて ALDH 陽性細胞の方が有意差を持って強かった。

2) Sphere formation assay

2 種類の細胞株において ALDH 陽性細胞集団と ALDH 陰性細胞集団を浮遊状態で 5,000 細胞培養したのち、28 日後に形成した sphere を計測した。それを 3 回行って平均値を測定した。sphere を形成した数は両細胞株とも ALDH 陽性細胞集団において有意に多かった。

3) 免疫不全マウスを用いた細胞移植による腫瘍形成能力の比較

2 種類の細胞株において、ALDH 陽性細胞集団と ALDH 陰性細胞集団それぞれ 5,000 個を 4 匹の NOD/SCID マウスの皮下に移植した。UTSCC-9 細胞群のマウスは 1 匹 3 週目に死亡した。両細胞株ともに ALDH 陽性細胞集団では腫瘍を形成したが、ALDH 陰性細胞集団では腫瘍を形成しなかった。

3. microRNA microarray による網羅的解析

2 種類の細胞株における ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞を microRNA microarray を用いて網羅的に解析した。発現が 2 倍以上上昇している microRNA は miR-147、miR1976、miR3622 の 3 種類、2 倍以上低下している microRNA は miR424、miR4730、miR6836、miR6873、miR7152、let-7 の 6 種類であった。その 9 種類について realtimePCR を用いて再度発現を確認したところ、miR1976、miR3622 を除く 7 種類で同様の発現を示した。

【考察】

頭頸部癌細胞株において、ALDEFUOR assay を用いた ALDH 陽性細胞集団は ALDH 陰性細胞に比べて癌幹細胞の性質を持つことを明らかにした。さらに microRNA の発現を網羅的に検索することによって、ALDH 陽性細胞集団は ALDH 陰性細胞と比較して、異なった microRNA の発現プロファイルを有することを示した。これらの結果は癌幹細胞が腫瘍を形成する過程に関連する microRNA を理解するうえで重要な情報を提供すると考えている。

本研究において、まず ALDH 陽性細胞集団が ALDH 陰性細胞に比べて癌幹細胞の特性を持ち得るかを検索した。sphere 形成能力の比較、幹細胞マーカーによる発現の比較、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能力の比較を行い、いずれの方法においても ALDH 陽性細胞集団は ALDH 陰性細胞に比べて癌幹細胞の性質を持ち得ることを証明した。さらに ALDH 陽性細胞集団が ALDH 陰性細胞集団に

比べて発現が上昇している、または、低下している microRNA を microRNAarray にて網羅的に検索し、絞り込まれた microRNA をさらに realtimePCR にて確認した。本研究で頭頸部癌癌幹細胞との

関連が認められた miR424、let-7、miR147 は、他の領域の癌細胞および癌幹細胞においても関わりのある microRNA として報告されている。これは本研究の信頼性を指示するものと考えている。その他の miR-4730、miR-6836、miR-6873、miR-7152 は現在まで報告がなく、使用した microarray の基板が最新のものであることを考えると、頭頸部癌癌幹細胞に特徴的なものである可能性もあり、今後その機能が明らかされていくと考えられる。今後、絞り込まれた各々の microRNA の機能の喪失や獲得が、浸潤能や薬剤耐性、癌幹細胞の性質にどのように効果があるか評価する必要がある。

【まとめ】

- ・頭頸部癌扁平上皮細胞株である UTSCC-9 と UTSCC-90 の 2 種類において、ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞に分離した。
- ・Sphere formation assay および主要幹細胞マーカーの発現、免疫不全マウスによる腫瘍形成能力を比較することによって ALDH 陽性細胞は ALDH 陰性細胞に比べて癌幹細胞の性質を持つことを証明した。
- ・microRNAarray を用いて ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞の microRNA 発現を比較することにより、癌幹細胞に関与している可能性がある microRNA 9 種類認めた。そのうち miR424、miR147、let7 に関しては他の領域において癌に関わりのある microRNA としての報告を認めた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年9月17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。

近年、癌細胞の小さな集団は移植実験において癌成長の強い推進力を持つことが明らかになり、この腫瘍増生能力を持ち得た小細胞集団は癌幹細胞と定義された。MicroRNA は 20-25 塩基からなる non-codingRNA であり、mRNA の転写後に作用することによって遺伝子の発現を調節している。本論文は癌幹細胞の特徴を把握することを目的として、癌幹細胞に関与する microRNA を見いだすため microRNA プロフィール分析を行なったものである。

頭頸部癌細胞株を用いて ALDEFUOR assay を行ない、FACS で sorting することで ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞に分離した。ALDH 陽性細胞が ALDH 陰性細胞に比べて癌幹細胞の性質を持つことを、幹細胞マーカーの発現、Sphere formation assay、免疫不全マウスへの移植腫瘍形成能を用いて検討した。幹細胞マーカーである ALDH1、nanog、SOX2、oct4 を realtimePCR で発現を比較した結果、ALDH 陽性細胞は ALDH 陰性細胞に比べて有意に発現が高かった。さらに非接触環境下での培養において、Sphere の形成数および NOD/DCID マウスにおける細胞移植での腫瘍形成数は、ALDH 陰性細胞に比べて ALDH 陽性細胞は有意に多かった。以上より ALDH 陽性細胞群は癌幹細胞の性質を持つことを証明した。次に、ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞を microRNA microarray を行い網羅的に解析した。発現が2倍以上上昇している microRNA は miR-147、miR1976、miR3622 の 3 種類、2倍以上低下している microRNA は miR424、miR4730、miR6836、miR6873、miR7152、let-7 の 6 種類であった。その 9 種類について realtimePCR を用いて再度発現を確認したところ、miR1976、miR3622 を除く 7 種類で同様の発現を示した。

以上の結果より、ALDH 陽性細胞集団は癌幹細胞の性質を持ち得ており、ALDH 陰性細胞と異なる microRNA の発現プロフィールを有することを示した。その絞り込まれた microRNA 9 種類のうち miR424、miR147、let7 に関しては他の領域において癌に関わりのある microRNA としての報告を認めた。

本論文は、頭頸部癌幹細胞の性質に関与する microRNA の役割を解明する上で重要な情報を提供する物であり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第521号		
学位授与の日	平成27年10月20日		
氏名	溝口 晋		
学位論文の題目	Disruption of eyelid and cornea morphogenesis by epithelial β -catenin gain-of-function (β -catenin の gain-of-function による角膜および眼瞼の形態形成への影響)		
論文審査委員	主査	教授 村田 晋一	
	副査	教授 古川 福実	教授 雑賀 司珠也

論文内容の要旨

【緒言】

眼表面(角膜、結膜)には上皮異形成から扁平上皮癌と多岐にわたる上皮性腫瘍性病変が発生する。一般に上皮性腫瘍形成には Wnt/ β -catenin シグナルが関与していることが以前より報告されている。 β -catenin には、細胞膜でカドヘリンとの結合による細胞間接着としての役割だけでなく、Wnt シグナルのメディエーターとして遺伝子発現を誘導し、結果として細胞の増殖分化を制御する役割があることが知られている。Wnt は複数のシグナル伝達経路を活性化するが、Wnt/ β -catenin シグナルはその中でも代表的なシグナル経路である。

今回、眼表面での腫瘍性病変の形成に焦点を合わせ、gain-of-function 技術による遺伝子改変マウスを用いて角膜・結膜上皮での Wnt/ β -catenin シグナル過剰発現が上皮性腫瘍性病変を誘発するか否かとその病態解析を行った。さらに予備実験において、マウスの眼瞼形成不全も認めため、Wnt/ β -catenin シグナルによる眼瞼形成不全のメカニズムについても検討を行った。

【方法】

β -catenin 遺伝子の exon3 領域には Gsk3 β によりリン酸化を受けるアミノ酸が存在し、同領域に変異を受けると β -catenin は Gsk3 β によるリン酸化を免れ蓄積され、 β -catenin シグナルが恒常的に活性化する。そこで、 β -catenin 遺伝子の exon3 領域を LoxP 化した β -catenin flox(ex3) (Catnb(ex3)^{fl/+})とケラチン (K) 5 プロモーターで作動する Cre レコンビナーゼを発現させたマウス (K5-Cre)を交配させた。

上記のマウスを交配させることで、Cre レコンビナーゼにより LoxP 領域に変異がおこり、このことにより exon3 領域のリン酸化部位が変異し、ケラチン 5 において特異的に Wnt/ β -catenin シグナルが活性化され、 β -catenin が過剰発現したマウス、すなわち上皮基底細胞特異的に β -catenin が恒常的に発現するミュータントマウス(K5-Cre Catnb(ex3)^{fl/+})を作成した。胎生(E)13.5日、15.5日、17.5日および18.5日の各ステージにおいて眼球および眼瞼を組織学(光学顕微鏡、電子顕微鏡)的、免疫組織化学的に検討した。

【結果】

野生型マウスと比較してミュータントマウスでは胎生 15.5 日以降で、角膜上皮において白色結節性の腫瘍様過形成を認め、免疫組織学的に β -catenin 強陽性(核内、細胞質内)であった。ミュータントマウスでは角膜上皮全体での角膜上皮特異的ケラチン 12 の発現が低下していた。また、腫瘍病変部は実質に浸潤するかのよう基底膜が欠損していた。この時、角膜実質においても、実質細胞の過剰な細胞増殖が見られ、角膜実質内の細胞外マトリックスであるケラトカン(角膜実質細胞特異的ケラタン硫酸プロテオグリカンコア蛋白質)、I型コラーゲンの発現が低下していた。さらにミュータントマウスでは、胎生 15.5 日以降で眼瞼形成が著しく障害されており、眼瞼上皮においても β -catenin

免疫染色陽性の結節性の腫瘍様過形成を認めた。眼瞼上皮の分化異常と間葉系細胞の配列異常が観察された。

【考察】

上皮基底細胞で特異的に β -catenin シグナルを過剰発現させることにより、角結膜上皮において、 β -catenin 強陽性の腫瘍様結節の形成が観察された。角膜上皮においては、細胞増殖が促進していた以外に特異的ケラチン 12 の発現が消失し、上皮の角膜上皮への分化が障害されていると考えられた。また、ミュータントマウスでは、角膜実質においても角膜実質特異的細胞外マトリックスであるケラトカンや I 型コラーゲンの著明な減少を認めた。神経堤細胞から角膜実質細胞への分化も障害されていると考えられた。上皮基底細胞において過剰発現した β -catenin が何らかの液性因子の発現を介して角膜実質へも影響を及ぼし、間葉細胞の分化が阻害されたと考えられる（上皮-間葉系相互作用）。ヒトの眼表面上皮性腫瘍性病変では、腫瘍下の角膜実質部分に混濁や線維化を来す症例があることの機序説明になると考えられた。本研究で着目した Wnt/ β -catenin シグナルが眼表面上皮性腫瘍性病変の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

今回のミュータントマウスでは、眼瞼表皮において、角膜、結膜同様の腫瘍様結節の形成が見られる以外に、胎生期眼瞼の形成が著しく阻害された。電子顕微鏡での観察では、眼瞼の間葉において、細胞外マトリックスの減少が確認された。眼瞼の形成については、様々な要素が関与している。何らかの上皮-間葉系相互作用のアンバランスにより眼瞼の形成が阻害されたと考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 9 月 24 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。眼表面（角膜、結膜）には多岐にわたる上皮性腫瘍性病変が発生する。上皮性腫瘍形成には Wnt/ β -catenin シグナルが関与することが報告されており、本研究では、眼表面での腫瘍性病変の形成に焦点を合わせ、gain-of-function 技術による遺伝子改変マウスを用いて角膜・結膜上皮での Wnt/ β -catenin シグナル過剰発現が上皮性腫瘍性病変を誘発するか否かとその病態解析を行った。予備実験において眼瞼形成不全も認めたため、Wnt/ β -catenin シグナルによる眼瞼形成不全のメカニズムについても検討を行った。ミュータントマウスでは胎生 15.5 日以降、角膜上皮で β -catenin 免疫染色陽性の白色結節性の腫瘍様過形成を認め、角膜上皮の分化異常を認めた。また、実質細胞の過剰な細胞増殖も見られ、正常組織の発生が阻害されていた。さらに眼瞼形成も著しく障害されており、眼瞼上皮においても β -catenin 免疫染色陽性の結節性の腫瘍様過形成を認めた。眼瞼上皮の分化異常と間葉系細胞の配列異常が観察された。これらのことより、上皮基底細胞において過剰発現した β -catenin が何らかの液性因子の発現を介して角膜実質へも影響を及ぼし、間葉細胞の分化が阻害されたと考えられる（上皮-間葉系相互作用）。ヒトの眼表面上皮性腫瘍性病変では、腫瘍下の角膜実質部分に混濁や線維化を来す症例があることの機序説明になると考えられた。眼瞼の形成については、様々な要素が関与しており、本研究においても、何らかの上皮-間葉系相互作用のアンバランスにより眼瞼の形成が阻害されたと考えられた。

以上のように、本論文は β -catenin シグナルを過剰発現することで、眼表面での腫瘍性病変の形成と眼瞼形成不全について明らかにした論文である。本研究で着目した Wnt/ β -catenin シグナルが眼表面上皮性腫瘍性病変の治療ターゲットとなる可能性が期待され、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522号		
学位授与の日	平成27年11月17日		
氏名	小林 彩		
学位論文の題目	AG490, a Jak2 inhibitor, suppressed the progression of murine ovarian cancer (Jak2 阻害剤である AG490 はマウス卵巣癌の進展を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 原 勲	教授 井 篁 一彦

論文内容の要旨

【緒言】

卵巣癌は半数以上がadvanced stageで発見され、約8割が再発することが知られている。そのような症例では有効な治療法がなく、最も予後不良である。近年、化学療法 of 進歩により、早期の卵巣癌や進行癌の短期予後は改善されつつあるが、腹膜播種やリンパ節転移を伴う症例や再発例の長期予後は、依然として改善されていない。そのため、進行癌、再発・難治性症例の長期生存に寄与するような新たな治療法の開発が求められている。具体的には従来の手術/化学療法に加え、新規予後規定分子マーカーの同定とそれらを標的とする分子標的薬の開発、加えて化学療法との併用可能で有害事象の少ない新規免疫療法 of 開発が期待される。

癌が増殖・進展するためには、癌微小環境の構築と免疫寛容の獲得が不可欠である。これまでマウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて免疫寛容分子であるトリプトファン代謝酵素 (IDO) の癌微小環境内における役割について検討し、IDOが卵巣癌の免疫寛容に関与し播種の促進・生存期間の短縮に寄与し、抗癌剤とIDO阻害剤の併用が有効な治療となりえることを報告した。

IFN- γ は宿主免疫を活性化する液性因子として捉えられてきたが、近年、Programmed death-ligand 1 (PD-L1) やIDOなどの免疫寛容分子を誘導することが注目されている。そこで、IFN- γ の主要伝達経路であるJAK/STAT経路に着目し、マウス卵巣癌モデルを用いて癌微小環境におけるJAK/STAT経路の病態生理学的役割を検討した。

【目的】

卵巣癌進展におけるJAK/STAT経路の機能的役割を解明し、JAK2阻害剤(AG490)の治療効果について検討した。

【方法】

(1) JAK/STAT経路のIDO遺伝子発現への関与の確認

マウス卵巣癌細胞株OV2944-HM-1 (HM-1) におけるIDO遺伝子の発現をReal time PCR法とWestern Blotting法で確認した。

(2) マウス卵巣癌モデルの作成及びJAK2阻害剤(AG490)の抗腫瘍効果の検討

HM-1 (1×10⁶cells) をB6C3F1マウス(♀、8週齢)に腹腔内または皮下に移植し、各種モデルを作成した。腫瘍細胞投与後day1より各々モデルマウスにJAK2阻害剤であるAG490 (500 μ g/マウス) または同容量のPBSを連日腹腔内投与し、前者をAG490投与群、後者を(Vehicle群)とした。両群について、生存率や腹水量・腹膜播種重量・皮下腫瘍容積を比較検討した。さらに得られた腫瘍組織を用いて病理組織および免疫組織化学的検討並びに各種サイトカインや増殖因子の遺伝子発現レベルの解析を行った。

【結果】

(1) JAK/STAT経路のIDO 遺伝子発現への関与の確認

Real time PCR 法、Western-blotting 法により、HM-1においてAG490 添加によりIFN- γ によるIDO 遺伝子発現誘導は有意に抑制され、IDO 遺伝子発現へのJAK2/STAT1 経路の関与を確認した。

(2) JAK2阻害剤の抗腫瘍効果の検討

腹膜播種モデルでは、Vehicle群と比較してAG490投与群で有意に生存期間の延長を認めた ($P=0.014$)。また腹膜播種モデルにおいて、day14 でAG490 投与群の腹水量及び腹膜播種重量は対照群と比較し有意に減少し(腹水量; $p=0.025$ 、播種重量; $p=0.024$)、皮下腫瘍モデルでもAG490 投与群で腫瘍容量が有意に減少した($p=0.029$)。

免疫組織化学的検討では、Vehicle 群と比較して AG490 投与群において pSTAT1 陽性細胞、IDO 陽性細胞の腫瘍内浸潤数が減弱し、腫瘍内の FOXP3+Treg 細胞の減少と、CD8⁺T 細胞、NK 細胞、マクロファージの増加を認めた。また AG490 投与群で腫瘍間質の線維化、腫瘍内新生血管数が有意に減弱した。さらに AG490 投与群で腫瘍組織中の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-12 の遺伝子発現レベルが有意に増加し、VEGF や α SMA、IL10、TNF α の遺伝子発現レベルが有意に減少した。

【考察・結語】

JAK/STAT1経路の阻害によりマウス卵巣癌の増殖進展が抑制された。そのメカニズムとして、腫瘍細胞上の免疫寛容誘導分子であるIDO発現の抑制を介した癌微小環境内の免疫寛容状態の回復と、種々の抗腫瘍性サイトカイン発現の増強などにより癌に有利な微小環境の構築が妨げられることが考えられた。これまで癌抑制因子と捉えられているSTAT1の二面性の可能性を明らかにし、JAK/STAT1経路が卵巣癌の進展に対する治療的意義を持つことを明らかにした。

卵巣癌の進展には、癌微小環境の構築と免疫寛容の獲得が不可欠で、癌組織中の線維芽細胞・血管内皮細胞などいわゆるストローマ細胞と宿主免疫細胞は、癌細胞との相互作用を介して炎症性サイトカインなどの生理活性物質を産生し癌の増殖進展に重要な役割を果たしている。そのメカニズムを詳細に解明することで、卵巣癌における新規治療戦略の確立が期待できる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成27年10月27日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。

癌が増殖・進展するためには、癌微小環境の構築と免疫寛容の獲得が不可欠である。これまでマウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて免疫寛容分子であるトリプトファン代謝酵素 (IDO) の癌微小環境内における役割について検討し、IDO が卵巣癌の免疫寛容に関与し癌増殖に寄与し、抗癌剤と IDO 阻害剤の併用が有効な治療となりえることを報告してきた。また、IFN- γ は宿主免疫を活性化する液性因子として捉えられてきたが、近年、Programmed death-ligand 1 (PD-L1) や IDO などの免疫寛容分子を誘導することが注目されている。そこで、本論文では IFN- γ の主要伝達経路である JAK/STAT 経路に着目し、マウス卵巣癌モデルを用いて癌微小環境における JAK/STAT 経路の病態生理学的役割を解明し、JAK2 阻害剤(AG490)の治療効果について検討した。

マウス卵巣癌細胞株OV2944-HM-1 (HM-1) におけるIDO 遺伝子の発現をReal time RT-PCR法とWestern Blotting 法で検討し、HM-1においてAG490 添加によりIFN- γ によるIDO 遺伝子発現誘導は有意に抑制され、IDO 遺伝子発現へのJAK2/STAT1 経路の関与が確認できた。次に、HM-1 (1×10^6 cells) をB6C3F1 マウス (♀、8 週齢) に腹腔内または皮下に移植し、翌日よりJAK2阻害剤であるAG490 (500 μ g/マウス) (AG490投与群)、またはPBS (Vehicle群)を連日腹腔内投与し、腫瘍増殖について比較検討した。腹膜播種モデルでは、Vehicle群と比較してAG490投与群で有意に

生存期間の延長を認め、day14 でAG490 投与群の腹水量及び腹膜播種重量は対照群と比較し有意に減少した。皮下腫瘍モデルでもAG490 投与群で腫瘍容量が有意に減少した。免疫組織化学的検討で、Vehicle群と比較してAG490投与群においてpSTAT1陽性細胞、IDO陽性細胞の腫瘍内浸潤数が減弱し、腫瘍内のFOXP3+Treg細胞の減少と、CD8⁺T細胞、NK細胞、マクロファージの増加を認めた。またAG490投与群で腫瘍間質の線維化、腫瘍内新生血管数が有意に減弱した。さらにAG490投与群で腫瘍組織、腹水中のIL-1 α 、IL-1 β 、IL-12が有意に増加し、VEGFやIL10、TNF α が有意に減少した。

JAK/STAT1 経路の阻害によりマウス卵巣癌の増殖進展が抑制された。そのメカニズムとして、腫瘍細胞上の免疫寛容誘導分子であるIDO発現の抑制を介した癌微小環境内の免疫寛容状態の回復と、種々の抗腫瘍性サイトカイン発現の増強などにより癌に有利な微小環境の構築が妨げられることが考えられた。これまで癌抑制因子と捉えられているSTAT1の二面性の可能性を明らかにし、JAK/STAT1経路が卵巣癌の進展に対する治療的意義を持つことを示唆し、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第523号		
学位授与の日	平成27年11月17日		
氏名	金子政弘		
学位論文の題目	Extracellular High Mobility Group Box 1 Plays a Role in the Effect of Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation for Heart Failure (細胞外 high mobility group box 1 は心不全に対する骨髄単核球移植療法の効果においてある一定の役割を果たす)		
論文審査委員	主査	教授 前田 正信	
	副査	教授 赤阪 隆史	教授 岡村 吉隆

論文内容の要旨

【緒言】 心不全はあらゆる心疾患の臨床終末期像として、死因の上位に位置している。治療として薬物療法、カテーテル治療、心臓手術があるが、どれも十分な効果を得ているとは言い難い。また根治的療法として心臓移植があるが、donor 数の不足という問題がある。心不全に対する骨髄由来単核球 (bone marrow mononuclear cell : BMC) 移植療法は、現在脚光を浴びている心不全に対する新しい治療法であるが、心臓移植の代替療法となるにはまだまだ改良すべき問題がある。以前は、移植された BMC が心筋細胞に分化することによって、低下した心機能が改善されると考えられていたが、現在、その概念は否定的で、心筋への移植後に生存している BMC から分泌されるサイトカイン、ケモカイン、そして成長因子等が障害を受けた心筋を回復させる、もしくは再生させると考えられている (パラクライン効果)。しかしながら、このパラクライン効果の詳細なメカニズムは今のところ未知の部分が多く、これらを明らかにすることが、この新しい治療法を臨床応用するためにも重要である。前述のとおりパラクライン効果の主要な役割を果たすのは移植された生存 BMC であると考えられているが、様々な動物実験および前臨床研究の結果においては、移植細胞の生存率は極めて少ないことが知られている。この矛盾から、我々は心不全に対する BMC の治療効果は、生存ドナー細胞のみならず死んだドナー細胞もまた寄与しているかもしれないという仮説を立てるに至った。今回我々が注目した High mobility group box 1 (HMGB1) はもともと染色体のヌクレオソーム構造を安定化させる核タンパク質として 40 年ほど前に発見されたが、近年ダメージを受けた細胞から放出される多機能サイトカインとしても機能するということが数多く報告されている。そこで我々は、本研究で細胞外に放出された HMGB1 が心不全に対する BMC 移植療法の治療効果に及ぼす影響について検討した。

【実験方法および結果】 同系交配種の Lewis ラットの雌の左冠動脈を結紮してから 4 週間飼育することで作成した虚血性心不全ラットを BMC 群 (雄 Lewis ラットから採取した BMC 懸濁液を心筋梗塞部と正常心筋との境界域に心筋内注入する群)、AB 群 (BMC および抗 HMGB1 抗体との懸濁液を心筋内注入する群)、IgG 群 (BMC およびコントロール IgG タンパクとの懸濁液を心筋内注入する群)、および CON 群 (コントロール群としてリン酸化緩衝生理食塩水 (PBS) のみを心筋内注入する群) のランダムに 4 群に割り振った。BMC 心筋内注入後、1 時間で循環血清中の細胞外 HMGB1 が CON 群と比べると BMC 群で有意に上昇することが ELISA によって示された。雄特異的 sry 遺伝子についてのポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) によって、移植後 BMC の生存率を量化することが可能であり、その結果移植後 3 日目には約 10% 未満、さらに 28 日目には 1% 未満にまで低下することが示された。心エコー検査、および左室内圧測定カテーテル検査では、BMC 群では CON 群に比べて心筋梗塞発症後の心機能が有意に改善したことが示されたが、その一方で AB 群では、CON 群と同程度の心機能のままであり、HMGB1 を中和することにより心不全に対する BMC 移植療法の治療効果が相殺されることが示された。組織学的検討によると、BMC 移植後 28 日目の心筋においては、心筋梗塞後の心室リモデリングの原因となる線維化が減少し、心機能改善をもたらす新生血管が増生し、

そして心筋再生の指標になる心筋内の細胞増殖の増加が認められたが、抗 HMGB1 抗体を BMC と同時に投与することによって、その効果が減少し、CON 群と差を認めることができなかった。さらに心筋への BMC 移植は CON 群と比べると移植 3 日後に炎症細胞であるマクロファージの極性を、抗炎症性 M2 マクロファージへと誘導するが、HMGB1 の機能を抑制することによってその現象が認められなかった。リアルタイム RT-PCR によって、BMC 心筋内移植は抗炎症性サイトカインの一種である IL-10 の発現を治療後 3 日目に CON 群と比べて有意に上昇させたが、抗体による HMGB1 機能抑制によってこのサイトカイン発現は抑制された。なお、IgG 群においては、AB 群で認められたような BMC 移植の虚血性心不全に対する治療効果を減ずるような結果は認めず、心機能評価、組織学的評価、および生化学的評価においていずれも BMC 群とほぼ同等の結果であることが示されており、AB 群で認められた、心不全に対する BMC 移植の治療効果が減少する現象は、HMGB1 の機能を抑制することによって誘導されたことが示唆された。

【結論】 本研究で我々が得たデータは、ダメージを受けたり死亡したりした移植 BMC から放出された細胞外 HMGB1 は、心不全において自然免疫を調整することによって障害心筋を回復させるという BMC 移植の治療効果に寄与していることを示唆している。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 11 月 4 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

【背景および目的】 心不全に対する骨髄由来単核球 (bone marrow mononuclear cell : BMC) 移植療法は、現在注目されている心不全に対する新しい治療法であるが、その機序はまだ明らかでない。近年、提唱されているパラクライン効果という機序は、従来生存した移植細胞のみがその治療効果に寄与していると考えられてきたが、我々は心不全に対する BMC の治療効果は、生存ドナー細胞のみならず死んだドナー細胞もまた寄与しているかもしれないという仮説を立てた。今回本研究では核タンパク質の一種で、ダメージを受けた細胞から放出される多機能サイトカインとしても機能する High mobility group box 1 (HMGB1) に注目し、細胞外に放出された HMGB1 が心不全に対する BMC 移植療法の治療効果に及ぼす影響について検討した。

【実験概要および結果】 雌 Lewis ラットの左冠動脈を結紮して作成した虚血性心不全ラットを BMC 群 (雄 Lewis ラットから採取した BMC 懸濁液を心筋梗塞部と正常心筋との境界域に心筋内注入する群)、AB 群 (BMC および抗 HMGB1 抗体との懸濁液を心筋内注入する群)、IgG 群 (BMC およびコントロール IgG タンパクとの懸濁液を心筋内注入する群)、および CON 群 (コントロール群としてリン酸化緩衝生理食塩水 (PBS) のみを心筋内注入する群) のランダムに 4 群に割り振った。BMC 心筋内注入後、1 時間で循環血清中の細胞外 HMGB1 が CON 群と比べると BMC 群で有意に上昇した。雄特異的 sry 遺伝子についてのポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) によって、移植後 BMC の生存率を定量化することが可能であり、その結果移植後 3 日目には BMC 生存率が約 10%未満、さらに 28 日目には 1%未満にまで低下した。心エコー検査、および左室内圧測定カテーテル検査では、BMC 群では CON 群に比べて心筋梗塞発症後の心機能が有意に改善したが、その一方で AB 群では、CON 群と同程度の心機能のみであり、HMGB1 を中和することにより心不全に対する BMC 移植療法の治療効果が相殺されることが示された。組織学的検討では、BMC 移植後 28 日目の心筋においては、心筋梗塞後の心室の線維化が減少し、心機能改善をもたらす新生血管が増生し、そして心筋再生の指標になる心筋内の細胞増殖の増加が認められたが、抗 HMGB1 抗体を BMC と同時に投与することによって、その効果が減少し、CON 群と差を認めることができなかった。さらに心筋への BMC 移植は CON 群と比べると移植 3 日後に炎症細胞であるマクロファージの極性を、抗炎症性 M2 マクロファージへと誘導するが、HMGB1 の機能を抑制することによってその現象が認められなかった。リア

リアルタイム RT-PCR によって、BMC 心筋内移植は抗炎症性サイトカインの一種である IL-10 の発現を

治療後3日目にCON群と比べて有意に上昇させたが、抗体によるHMGB1機能抑制によってこのサイトカイン発現は抑制された。なお、IgG群においては、AB群で認められたBMC移植の虚血性心不全に対する治療効果を減ずるような結果は認めず、心機能評価、組織学的評価、および生化学的評価においていずれもBMC群とほぼ同等の結果であることが示されており、AB群で認められた心不全に対するBMC移植の治療効果が減少する現象は、HMGB1の機能を抑制することによって誘導されたことが示唆された。

【結論】 本研究で我々が得たデータは、ダメージを受けたり死亡したりした移植BMCから放出された細胞外HMGB1は、心不全において自然免疫を調整することによって障害心筋を回復させるというBMC移植の治療効果に寄与していることを示唆している。

本論文は、心不全に対する細胞治療の治療メカニズムについて生存移植細胞ではなく、死んだ移植細胞に注目した初の論文であり、学位論文として価値あるものと考えた。

学位記番号	博(医)甲第524号		
学位授与の日	平成27年12月15日		
氏名	村田 祥吾		
学位論文の題目	Real-time monitoring of antimicrobial use density to reduce antimicrobial resistance through the promotion of antimicrobial heterogeneity in a haematology/oncology unit (血液腫瘍科病棟におけるリアルタイム AUD モニタリングによる antimicrobial heterogeneity を介した抗菌薬耐性菌の減少)		
論文審査委員	主査	教授 西尾 真智子	
	副査	教授 岸岡 史郎	教授 園木 孝志

論文内容の要旨

【緒言】

抗癌剤治療や造血幹細胞移植により高度の好中球減少や免疫低下を来した患者の多い血液内科において、細菌感染症は致命的合併症である。そのため、発熱性好中球減少症発症時には、患者の生命を優先して、広域抗菌薬を第一選択薬として使用することが推奨されている。しかし、特定の広域抗菌薬を長期間、大量に偏って使用すると耐性菌発生が惹起される。そこで、広域抗菌薬を有効かつ安全に使用し、その上で耐性菌発生を抑制できれば、血液疾患の治療成績向上に繋がると着想した。

耐性菌発生を予防する試みには、抗菌薬の総投与量削減や、広域抗菌薬の使用制限がある。一方で抗菌薬使用を制限しなくとも、病棟内で複数の抗菌薬を均等に使用 (antimicrobial heterogeneity: AH) すれば、耐性菌発生を抑制できる可能性が示唆されている。その一手段として抗菌薬ミキシングが提唱されているが、効果は未確立であり、実臨床で厳密な AH を実践し、維持することは困難であった。

抗菌薬使用量を評価する方法として、1000 ベッドあたりの 1 日抗菌薬使用量を表す antimicrobial use density: AUD が用いられる。本研究では AUD を常時監視することにより、厳密な AH を実現する方法として Real-time AUD Monitoring System: RAMS を開発し、耐性菌抑制に有効な手段となり得るか検討した。

【方法】

本研究は和歌山県立医科大学倫理委員会の承認のもと行った。

1. 対象患者

2009年4月-2012年6月(39ヶ月間)に和歌山県立医科大学附属病院血液内科病棟に入院した血液腫瘍を有する患者の内、本研究に同意の得られた970名を対象とした。

2. Real-time AUD Monitoring System (RAMS) の開発

Antimicrobial Use Density (AUD)

= [Total antimicrobial dose (g) / Define Daily Dose (DDD) (days)] x 1000 patient·days

カルバペネム系抗菌薬5剤 (MEPM, BIPM, PAPM/BP, IPM/CS, DRPM)、非カルバペネム系抗菌薬4剤 (TAZ/PIPC, CFPM, CZOP, CAZ) の AUD をリアルタイムに算出できるシステムを Microsoft Excel で作成した。

3. ミキシング精度、耐性菌発生率の比較

抗菌薬使用方法別に下記の3期間を設定した。

- ① Control 期 (12 ヶ月; 313 名): 非介入期間 (主治医による抗菌薬自由選択)。
- ② Conventional mixing (CM) 期 (15 ヶ月; 372 名): 事前に計画された順序で抗菌薬を割り当てる mixing 期間。
- ③ RAMS-based mixing 期 (12 ヶ月; 285 名): RAMS により算出された AUD に基づいて、抗菌薬を割り当てる mixing 期間。

i) ミキシング精度の比較

AUD deviation (%)

$$= |500 - \text{全カルバペネム系 AUD (or 全非カルバペネム系 AUD)}| / 1000 \times 100$$

(AUD deviation < 10% を AH な状態と定義した)

上記を指標に各期間のミキシング精度を比較した。

ii) 耐性菌発生率の比較

各期間で methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* の発生率を比較した。

【結果】

1. ミキシング精度の比較

RAMS 期の平均 AUD-deviation は 6.0% (0.5-15.8%)、非 RAMS 期は Control 期: 11.4% (1.1-33.2%)、CM 期: 12.6% (0.1-31.7%) であった。AH を満たす月数割合は RAMS 期: 83.3%、Control 期: 50%、CM 期: 46.7% であり、RAMS 期で有意に安定的な AH が維持されていた ($p < 0.05$)。

2. 耐性菌発生率の比較

全菌種の発生率は RAMS 期: 7.4% (21 件)、Control 期: 11.8% (37 件)、CM 期: 11.0% (41 件) であった。一方で *S.maltophilia* を除外した 3 菌種の発生率は RAMS 期で有意に減少を認めた (3.5% vs 7.9%; $p < 0.05$)。

3. AUD-deviation 変化が MRSA, *S.maltophilia* 発生率に及ぼす影響の検討

RAMS 期と非 RAMS 期の比較において MRSA の発生率は有意に減少した (1.1% vs 4.8%; $p < 0.01$)。一方で *S.maltophilia* は両期間で発生率に差を認めなかった (3.9% vs 3.5%; $p = 0.850$)。この結果は両耐性菌の発生機序の違いに起因すると考え、AH 持続期間と *S.maltophilia* 発生率の関係を検討したところ、以下の興味深い 3 点が確認された。

- i) 長期間 AH が維持されるほど発生は抑制される。
- ii) 一旦 AH を逸脱すると、翌月には速やかに発生増加を認める。
- iii) AH が長期間維持されるほど、AH 逸脱後の発生も抑制される。

MRSA についても同様の傾向を認めた。

【考察】

1) AH は RAMS により実現でき、耐性菌抑制に有効であることを示した。本研究は血液内科病棟におけるミキシング法の有効性を評価した最初の報告である。これまでミキシング法の耐性菌抑制効果には賛否両論があった。本研究における従来のミキシング法 (CM 期) 再現と、AUD を用いた再評価により、既報のミキシング無効例では十分な AH が得られていなかった可能性が考えられた。

2) *S.maltophilia*, MRSA という性質の異なる耐性菌に対して、AH を長期間維持できれば、発生を抑制できることが示唆された。RAMS を用いて厳密な AH が実現できれば、耐性菌の種類、患者背景を問わず、耐性菌発生の抑制効果が期待できる可能性がある。

3) AH の実現により、血液内科病棟において抗菌薬の総投与量を削減しなくとも耐性菌発生が抑制できることを示した。RAMS は実臨床において長期間、安定的な AH を維持し、耐性菌に関連した合併

症を減らす有効な方法となり得る。今後、RAMS の有用性を非血液疾患患者や他病棟、他施設でも検討していく意義があると考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 11 月 27 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

感染症治療における同一抗菌薬の長期間、大量使用は耐性菌発生を惹起する。一方で複数抗菌薬の病棟内での均等使用 (antimicrobial heterogeneity: AH) により、耐性菌発生を抑制できる可能性が示唆されている。学位申請者らは antimicrobial use density: AUD (= [Total antimicrobial dose (g) / Define Daily Dose (DDD) (days)] x 1000 patient days) を指標に、厳密な AH を実現する方法として Real-time AUD Monitoring System: RAMS を開発し、耐性菌抑制効果を検討した。本研究は 2009 年 4 月-2012 年 6 月に和歌山県立医科大学附属病院血液内科病棟に入院した患者の内、同意の得られた 970 名を対象とした。

まず、カルバペネム系抗菌薬 5 剤、非カルバペネム系抗菌薬 4 剤の AUD をリアルタイムに算出できる RAMS を Microsoft Excel で作成した。両抗菌薬群全体の AUD 差を AUD-deviation とし、AUD-deviation < 10%を AH と定義した。次に、①Control 期、②Conventional mixing (CM) 期、③RAMS-based mixing 期の 3 期間を設定し、AH 精度ならびに methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)、extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains、*Pseudomonas aeruginosa*、*Stenotrophomonas maltophilia* の発生率を比較した。

RAMS 期の平均 AUD-deviation は 6.0% (0.5-15.8%)、非 RAMS 期は Control 期: 11.4% (1.1-33.2%)、CM 期: 12.6% (0.1-31.7%) であった。AH を満たす月数割合は RAMS 期: 83.3%、Control 期: 50%、CM 期: 46.7%であり、RAMS 期で有意に安定的な AH が維持されていた ($p < 0.05$)。全菌種の発生率は RAMS 期: 7.4%、Control 期: 11.8%、CM 期: 11.0% であった。一方、*S.maltophilia* を除外した 3 菌種の発生率は RAMS 期で有意に減少を認めた (3.5% vs 7.9%; $p < 0.05$)。

S.maltophilia について AH 持続期間と発生率の関係を検討したところ、以下の 3 点が確認された。(i) 長期間 AH が維持されるほど発生が抑制される。(ii) 一旦 AH を逸脱すると、翌月には速やかに発生が増加する。(iii) AH が長期間維持されるほど、AH 逸脱後の発生も抑制される。

本論文は RAMS が厳密な AH 実現を可能とし、耐性菌発生抑制に寄与することを示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第525号		
学位授与の日	平成28年3月8日		
氏名	比嘉 明日美		
学位論文の題目	Long-term outcome of childhood IgA nephropathy with minimal proteinuria		
	(微少蛋白尿を呈する小児 IgA 腎症患者の長期予後についての検討)		
論文審査委員	主査	教授 重松 隆	
	副査	教授 原 勲	教授 村垣 泰光

論文内容の要旨

【背景】

IgA 腎症は世界的に最も頻度の高い糸球体腎炎であり、末期腎不全の主要な原因となっている。日本の小児 IgA 腎症を調べた研究では、患者の 11%が 15 年以内に末期腎不全へと進行している。びまん性メサンギウム増殖を示した患者では腎機能障害のリスクが高く、17%が末期腎不全へ進行したという報告もある。しかし、軽症例では無治療で寛解に至ることもある。

発症時に微少蛋白尿を呈する IgA 腎症は予後良好といわれているが、その長期予後については不明である。今回、診断時に微少蛋白尿を呈する小児 IgA 腎症の特徴と長期予後を明らかにすることを目的とした。

【対象及び方法】

1976 年 6 月から 2009 年 7 月の間に当院と神戸大学において治療開始前に腎生検を行った症例で、初回腎生検時 20 歳未満、新規に IgA 腎症と診断された 515 例を後方視的に検討した。オックスフォード分類に基づいて腎生検組織を評価できたのは 385 例であった。

385 例を微少蛋白尿群と非微少蛋白尿群にわけて評価した。微少蛋白尿は、1 日蛋白尿が 0.5g/day/1.73 m² 未満、非微少蛋白尿はそれ以上と定義した。それぞれの群において、発見契機、初回腎生検時の年齢・蛋白尿の程度など臨床所見、病理組織、治療などを調べた。

【結果】

385 例の IgA 腎症患者のうち微少蛋白尿群は 106 例(27.5%)であった。微少蛋白尿群の発見契機は、学校検尿(73.6%)、肉眼的血尿(26.4%)であった。非微少蛋白尿群では学校検尿(79.2%)、肉眼的血尿(14.7%)、その他急性腎炎、ネフローゼ症候群などを認めた。両群ともに学校検尿で発見されることが多く、重症な発症形式は微少蛋白尿群ではみられなかった。また、微少蛋白尿群のほうが発症時の年齢が高く、発症から初回腎生検までの期間が長かった。

病理所見では、微少蛋白尿群のほうが軽症であった。オックスフォード分類での M0/M1、E0/E1 比と半月体の有無、全節性硬化において単変量・多変量解析ともに有意差を認めた。微少蛋白尿群 106 例の病理組織はそれぞれ微少変化(21.7%)、巣状メサンギウム増殖(69.8%)、びまん性メサンギウム増殖(8.5%)であった。

治療は無治療(36.8%)、抗血小板/抗凝固療法(13.2%)、プレドニゾン(1.9%)、免疫抑制剤(1.9%)、漢方薬(柴苓湯 8.5%)、ACE 阻害薬あるいはアンギオテンシン受容体拮抗薬(30.2%)、不明(7.5%)であった。微少蛋白尿群のうち 2 名は初期治療が無効であったため、2 例は病理所見が重症であったためプレドニゾンを選択した。微少蛋白尿群を免疫抑制剤の有無で検討すると、発症から腎生検までの期間に有意差がみられた。無治療で自然寛解したものは 20 例であった。

腎生存率は微少蛋白尿群のほうが有意に良好であり、15 年腎生存率は微少蛋白尿群と非微少蛋白尿群でそれぞれ 100%と 78.7%であった。

【考察】

IgA 腎症の長期予後については、重症なものや高度蛋白尿を対象とした研究は数多く報告されているが、微少蛋白尿などの軽微な症状についてはほとんど検討されていないため今回の報告は貴重

である。我々の検討では微少蛋白尿群は非微少蛋白尿群よりも予後良好であることがわかった。

今回、学校検尿で発見された症例が多かったが、日本では毎年学校検尿が行われており、初期から IgA 腎症をとらえ、自覚症状のない軽症患者も分析できたと考えられる。

発症時年齢と初回腎生検までの期間で両群間に差を認めていたが、初回腎生検までの期間に差がでたのは腎生検の適応自体が蛋白尿の程度によって決定しているためだろう。

病理所見では微少蛋白尿群のほうが軽症であった。微少蛋白尿群でも、重症組織所見と考えられるびまん性メサンギウム増殖を認めたものがあつた。故に、軽症と考えられる患者についても腎生検の必要がある。

治療内容では、非微少蛋白尿群のほうが免疫抑制療法を必要としたものが多かつた。しかし、微少蛋白尿群でも 4 例が免疫抑制療法を施行しており、うち 2 例は漢方薬や抗血小板/抗凝固療法などの初期治療無効のため免疫抑制療法を必要とした。最近では、これらの初期治療は病理学的に軽症な症例においても不十分であると言われている。ACE 阻害剤は IgA 腎症に効果があると示されており、治療の選択肢としてもよいだろう。

長期予後では、微少蛋白尿群で腎生存率が有意に良好で、15 年の経過で微少蛋白尿群において腎不全例は認めなかつた。予後予測因子については、我々の過去の報告では半月体形成であり、他の検討では蛋白尿の程度と分節性硬化と報告されているものもある。今回の我々の検討では腎生検（診断）までの期間が他の報告とは違うために、予後予測因子の違いが出ていたのだろう。

今回の我々の研究では、微少蛋白尿群の 75% が学校検尿で発見されている。学校検尿を行っていない国では今回の研究結果とは異なる結果になるだろう。

【結論】

微少蛋白尿を呈する小児 IgA 腎症は長期予後が良好であつた。しかし、中には蛋白尿が増加し免疫抑制療法を必要とする症例もあり、長期間慎重に経過を見ていくことが必要である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 1 月 22 日、学位審査担当者は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

IgA 腎症は世界的に最も頻度の高い糸球体腎炎であり、末期腎不全の主要な原因となっている。日本の小児 IgA 腎症を調べた研究では、患者の 11% が 15 年以内に末期腎不全へと進行している。びまん性メサンギウム増殖を示した患者では腎機能障害のリスクが高く、17% が末期腎不全へ進行したという報告もある。しかし、軽症例では無治療で寛解に至ることもある。発症時に微少蛋白尿を呈する IgA 腎症は予後良好といわれているが、その長期予後については不明である。今回、診断時に微少蛋白尿を呈する小児 IgA 腎症の特徴と長期予後を明らかにすることを目的とし検討を行った。

1976 年 6 月から 2009 年 7 月の間に新規 IgA 腎症と診断された、初回腎生検時 20 歳未満、オックスフォード分類に基づいて腎生検組織を評価できた 385 例について検討した。385 例のうち蛋白尿 0.5g/day/1.73m² 未満の微少蛋白尿群は 106 例(27.5%)、それ以上の蛋白尿を呈した非微少蛋白尿群は 279 例であつた。IgA 腎症の発見契機は、微少蛋白尿群では学校検尿(73.6%)、肉眼的血尿(26.4%)で発見されることが多かつた。急性腎炎やネフローゼ症候群といった重症な発症形式は微少蛋白尿群ではみられなかつた。病理所見では、微少蛋白尿群のほうが軽症であつた。治療内容は ACE 阻害薬(30.2%)と無治療(36.8%)が最も多かつた。非微少蛋白尿群のほうが免疫抑制療法を施行した症例が多かつた。しかし、微少蛋白尿群でも 4 例が、初期治療が無効あるいは病理所見が重症であつたため、免疫抑制療法を行った。発症から 15 年の経過において、微少蛋白尿群で stage III の慢性腎疾患まで悪化した例はなかつた。

IgA 腎症の長期予後については、重症なものや高度蛋白尿を対象とした研究は数多く報告されてきているが、微少蛋白尿などの軽微な症状についてはほとんど検討されていないため今回の報告は貴重である。今回の検討では微少蛋白尿群は非微少蛋白尿群よりも予後良好であることがわかつた。しかし、中には蛋白尿が増加し免疫抑制療法を必要とする症例もあり、長期間慎重に経過を見ていくことが必要である。

以上より本論文は微少蛋白尿を呈する小児 IgA 腎症における長期予後を検討した初めての論文であり、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526号		
学位授与の日	平成28年3月8日		
氏名	榊野 敦子		
学位論文の題目	Amount of <i>Haemophilus influenzae</i> genomic DNA in middle ear fluids of pediatric acute otitis media. (小児急性中耳炎の中耳貯留液中におけるインフルエンザ菌ゲノム DNA 定量について)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 村田 晋一	教授 山中 昇

論文内容の要旨

I. はじめに

急性中耳炎は小児における代表的な上気道感染症であるが、近年では抗菌薬治療にも関わらず、遷延例や反復例などの難治例が増加しており、临床上の大きな問題となっている。主要な起炎菌としてインフルエンザ菌および肺炎球菌の2菌種が挙げられるが、これらの細菌の薬剤耐性化が進行しており難治化の大きな原因となっている。さらに当教室のこれまでの研究では、難治例ではインフルエンザ菌の分離頻度が高いことや、インフルエンザ菌による難治化の機序としてバイオフィーム形成が関与していることを報告してきた。

急性中耳炎の起炎菌検査の Gold Standard は従来から中耳貯留液の培養検査による半定量的評価であるが、抗菌薬の使用前・後にかかわらず非常に低い培養陽性率のため、急性中耳炎の起炎菌の同定のみならず、病態の難治化の対策が難しい原因となっている。近年、polymerase chain reaction (PCR)などによる分子生物学方法論の進歩により、従来のウイルス・細菌感染症における起炎微生物の同定が飛躍的に高まり、感染症診療に大きく貢献している。

今回の研究では、real-time PCR を用いて急性中耳炎患児の中耳貯留液における細菌のゲノム DNA を定量的に評価し、鼓膜所見や臨床像の改善度との関連を検討した。

II. 症例と方法

1. 症例

小児急性中耳炎ガイドライン 2013 年版の重症度判断基準で「重症」と診断し、鼓膜切開術の適応となった患児 32 例（生後 6 カ月～8 歳）を対象とした。

2. 臨床評価・患者背景

ガイドラインに基づいて急性中耳炎スコア（＝臨床スコア＋鼓膜スコア）を評価した。また、初診時と再診時（初診から 2～3 日後）に評価した鼓膜所見から、再診時の鼓膜改善率 $[100 - (\text{初診時鼓膜スコア} - \text{再診時鼓膜スコア}) / \text{初診時鼓膜スコア} \times 100 (\%)]$ を算出した。

また患者背景として、性別、年齢、乳児期栄養方法、集団保育の有無、同胞の有無、受動喫煙の有無、初診時より 1 ヶ月以前の抗菌薬投与有無について調査した。

3. 検体採取

初診時に局所麻酔を行った後に鼓膜切開を行い、中耳貯留液を無菌的に吸引採取した。得られた中耳貯留液の一部はスワブで採取し、通常の培養検査を行った。

4. DNA 抽出

採取した中耳貯留液から QIAamp OR DNA Blood Mini Kit (Qiagen 社) を用いて、DNA を抽出・精製した。

5. Real-time PCR

インフルエンザ菌について glpQ gene に対する primer, probe を用いて、real-time PCR を行った。段階希釈した DNA の陽性コントロールを用いて standard curve を作成し、臨床検体中のインフルエンザ菌のゲノム DNA 量を算出した。

中耳貯留液は両親または保護者のインフォームドコンセントを得た上で採取した。本研究は和歌山県

立医科大学倫理委員会の承認（承認番号 1212）のもとに行われた。

III. 結果

1. 定量的 real-time PCR および培養検査によるインフルエンザ菌の検出率

インフルエンザ菌が培養で同定されたのは、32 例中 12 例（38%）であった。インフルエンザ菌ゲノム DNA が検出されたのは 32 例中 20 例（63%）であった。

2. インフルエンザ菌の培養結果とインフルエンザ菌ゲノム DNA 量の比較

中耳貯留液培養でのインフルエンザ菌培養陽性、陰性の 2 群でゲノム DNA 量を比較したが、有意差は認められなかった（ $p=0.1690$ ）。

3. 1ヶ月以内の抗菌薬使用有無によるインフルエンザ菌ゲノム DNA 量の比較

初診日より 1ヶ月以前の抗菌薬投与がない群、ある群の 2 群でゲノム DNA 量を比較したが、有意差は認められなかった（ $p=0.1816$ ）。

4. 再診時の鼓膜改善率と中耳貯留液中インフルエンザ菌ゲノム DNA 量の相関

インフルエンザ菌 DNA 量と鼓膜改善率に相関が認められた。（ $r=-0.61$, $p=0.004$ ）。

5. 再診時の鼓膜改善率別のインフルエンザ菌ゲノム DNA 量の比較

再診時の鼓膜改善率を 50%以下と 50%超の 2 群に分けてインフルエンザ菌ゲノム DNA 量を比較したところ、鼓膜改善率が 50%以下である場合、インフルエンザ菌ゲノム DNA 量が有意に多かった（ $p=0.001$ ）。

IV. 考察

本研究は定量的 real-time PCR を用いて急性中耳炎患児の中耳貯留液中のゲノム DNA を測定し、ゲノム DNA 量と臨床的予後との関連を検討したものである。Real-time PCR 法を用いたインフルエンザ菌ゲノム DNA の定量的検索により、培養で陰性であっても、中耳貯留液内に多量のゲノム DNA が認められることがわかった。細菌のゲノム DNA の存在が代謝活性を有する生菌を示すかどうか議論があるが、チンチラ中耳炎モデルにおいて死菌 DNA は検出されない、肺炎球菌中耳炎貯留液では経過と共に DNA の検出率が低下する、RT-PCR による mRNA 検出、などの最近の報告から、細菌ゲノム DNA の検出は生菌の存在を示している可能性が高いと考えられる。

重症急性中耳炎患児の中耳貯留液中インフルエンザ菌ゲノム DNA 量と、再診時の鼓膜改善率に負の相関が認められ、再診時の鼓膜改善率を 50%前後で 2 群に分けると、改善率が 50%以下の患児では、初診時の中耳貯留液中のインフルエンザ菌 DNA 量が有意に多かった結果から、インフルエンザ菌ゲノム DNA 量が多いと鼓膜改善率が不良であり、難治化と密接に関連していることが判明した。すなわち発症時の菌量が多い場合にはより難治化する可能性が示唆された。

臨床的には、重症急性中耳炎患児に対する鼓膜切開等の外科的処置による早期の中耳貯留液排泄、細菌の減量が有効であることを強く支持する成績と考えられた。

V. まとめ

Real-time PCR 法を用いて、従来の培養検査のみではわかりえない急性中耳炎起炎菌の細菌量と臨床経過との密接な関連を示すことができた。すなわち初診時の中耳貯留液中のインフルエンザ菌ゲノム DNA 量が、中耳炎の難治化に関与している可能性が示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 2 月 16 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。

急性中耳炎は小児における代表的な上気道感染症であるが、近年では抗菌薬治療にも関わらず、遷延例や反復例などの難治例が増加しており、临床上の大きな問題となっている。中耳貯留液の起炎菌培養検査は抗菌薬の使用前後にかかわらず非常に低い培養陽性率であり、起炎菌の同定および薬剤感受性による治療選択が難しい原因となっている。本論文は定量的 real-time PCR を用いて急性中耳炎患児の中耳貯留液中のインフルエンザ菌ゲノム DNA を測定し、ゲノム DNA 量と臨床的予後との関連を検討したものである。

小児急性中耳炎ガイドライン 2013 年版の重症度判断基準で重症と診断し、鼓膜切開術の適応となった患児 32 例を対象とした。初診時と再診時にガイドラインに基づいて急性中耳炎スコアを評価し、再診時の鼓膜所見の改善率を算出した。鼓膜切開時に採取した中耳貯留液から DNA を抽出精製し、インフルエンザ菌について、*glpQ* gene に対する primer および probe を用いて real-time PCR を

行い、臨床検体中のインフルエンザ菌のゲノム DNA 量を算出した。再診時の鼓膜改善率と中耳貯留液中インフルエンザ菌ゲノム DNA 量について検討したところ、負の相関($r=-0.61$, $p=0.04$)が認められた。また再診時の鼓膜改善率を 50%以下と 50%超の 2 群に分けてインフルエンザ菌ゲノム DNA 量を比較したところ、鼓膜改善率が 50%以下である場合、インフルエンザ菌ゲノム DNA 量が有意に多かった($p=0.001$)。

Real-time PCR 法を用いたインフルエンザ菌ゲノム DNA の定量的検索により、培養で陰性であっても、中耳貯留液内に多量のゲノム DNA が認められ、さらに発症時の菌量が多い場合にはより難治化することが示された。臨床的には、重症急性中耳炎患児に対する鼓膜切開等の外科的処置による早期の中耳貯留液排泄、細菌の減量が有効であることを強く支持する成績と考えられた。

本論文は、従来の培養検査のみではわかりえない急性中耳炎起炎菌の細菌量と臨床経過との密接な関連を示し、急性中耳炎の難治化を解明する上で重要な情報を提供するものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第527号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	竹本 和司		
学位論文の題目	Acceleration Time of Systolic Coronary Flow Velocity to Diagnose Coronary Stenosis in Patients with Microvascular Dysfunction. (経胸壁心エコードプラ法による、冠微小循環障害を伴う患者の冠動脈狭窄診断)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 前田 正信	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

心臓の栄養血管である冠動脈血流の大部分は拡張期に流れる。このため、冠動脈狭窄の評価は、拡張時相に得られた指標を用いて行われることが多い。冠血流予備能 (coronary flow velocity reserve : CFVR) は、心筋酸素消費量の増大に応じて冠血流量を増大させ得る能力を示す指標であり、冠動脈狭窄があると低下することで知られる。しかしながら、CFVRは冠動脈微小循環の影響も、同時に受けるため、糖尿病や高血圧などで高度の微小循環障害を認める患者の冠動脈狭窄評価には適さない。一方、収縮期の血流速度は、拡張期に比較すれば低値であるが、収縮する心筋の圧迫により毛細血管の血流はほとんど認められなくなるため、冠動脈血流速度に対する微小循環障害の影響は低いと考えられる。近年の心臓超音波機器の進歩により、低速の冠動脈血流速度評価も可能となっている。このため、冠動脈内に挿入する必要があるドプラガイドワイヤーを用いずに、体表から収縮期血流速度波形の評価が可能となった。我々は、経胸壁心エコーにより記録した収縮期血流速度波形を用いると、冠微小循環障害の有無にかかわらず、冠動脈狭窄評価が可能であると仮定した。

【目的】

収縮期の冠動脈血流速度波形による冠動脈狭窄診断が可能かどうかを検討すること。

【方法】

1) 対象患者

48時間以内に血管造影が予定されている502名の患者と、10名の健常者。

2) 超音波検査

左室径は断層で計測、左室収縮率 (LVEF) と左房容積は Modified Simpson's 法で求めた。左室肥大の有無は、左室心筋重量から体表面積で補正した値を用いた指標 (LV mass Index) を用い、男性 >150g/m²、女性 >120g/m²を左室肥大とした。

3) 経胸壁ドプラ法による冠血流測定

使用装置は Vivid 7 (GE Healthcare) で、4MHz セクタ型探触子を使用した。左前下行枝の血流速度波形記録は、カラードプラで冠血流を描出した部位にサンプルボリュームを設定して3拍以上記録した。安静時血流速度波形した後、ATP(0.14 mg/kg/min)を負荷して最大冠血流速度を記録した。CFVRは、最大冠血流時の拡張期平均血流速度 / 安静時拡張期平均速度で算出した。また、収縮期波形は、最大冠拡張時に記録した波形を使用し、収縮期血流速度波形の立ち上がり時間を計測と収縮期時間との比率を求めた (立ち上がり時間/収縮期時間×100 : %AT)。

4) 冠動脈造影

左前下行枝高度狭窄は、冠動脈造影像上50%以上とした。502名のうち、無作為に抽出した14名の患者において、dualsensor guidewireを冠動脈内に挿入し、%ATを計測し、同時記録した経

胸壁心エコーにより計測した%AT と比較した。加えて、最大冠拡張時の左前下行枝平均圧と大動脈平均圧を計測し、生理的な冠動脈狭窄の指標である、冠血流予備量比 (fractional flow reserve :FFR) を求め、経胸壁心エコーにより計測した%AT と比較した。

【結果】

502 名中 466 名で、左前下行枝血流速度波形の計測が可能であった。冠動脈高度狭窄群の CFVR 及び%AT は、 1.7 ± 0.4 、 $65 \pm 9\%$ 、非冠動脈狭窄群 2.6 ± 0.6 、 $50 \pm 13\%$ 、健常者 3.3 ± 0.7 、 $48 \pm 10\%$ で、冠動脈狭窄群は非冠動脈狭窄群、健常者に比べ有意に%AT 延長を認めた。経胸壁ドプラ法とカテーテルで計測した%AT ($r=0.98$)、及び、FFR と%AT ($r=0.74$) は相関関係を示した。Cutoff 値を CFVR 2.0、%AT 60 とすると、冠動脈狭窄を検出する診断精度は、CFVR が感度 83.4%、特異度 71.8%、正診率 75.4%、%AT が感度 81.1%、特異度 84.1%、正診率 73.4%であった。微小循環を伴う疾患である陳旧性心筋梗塞、弁膜症、左室肥大の CFVR と%AT の正診率は、それぞれ、陳旧性心筋梗塞で 63.5%及び 81.1%、弁膜症 66.7%及び 84.1%、左室肥大 65.6%及び 73.4%であった。

【結語】

冠動脈造影を行った全症例を対象とすると、%ATによる冠動脈狭窄の正診率は CFVR と同等であったが、微小循環障害の強い疾患では CFVR よりも優れていた。収縮期冠動脈血流速度波形によっても冠動脈狭窄診断が可能であり、さらに、微小循環障害を有する患者での有用性が示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 27 年 6 月 26 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。冠血流予備能 (coronary flow velocity reserve : CFVR) は、心筋酸素消費量の増大に応じて冠血流量を増大させ得る能力を示す指標で、心外膜冠動脈狭窄と微小循環障害の程度を反映している。反応性充血時の最大冠血流速度と安静時冠血流速度の比で算出することができるが、高度な微小循環障害を合併する重症な糖尿病、高血圧、心筋梗塞などの疾患では CFVR が低値となり、正確な冠動脈狭窄の程度を反映しないことが報告されている。従来冠動脈狭窄と微小循環障害の程度は、CFVR と冠内圧計測 (fractional flow reserve : FFR) を同時に計測して評価されてきた。ドプラガイドワイヤーによる冠動脈高度狭窄末梢側の血流速度波形パターンは、収縮期のピーク時相が後方に変移し、狭窄を解除後収縮期のピークは中央になる現象がみられることから、冠動脈狭窄病変と収縮期血流速度波形のパターンに注目し、狭窄の程度と収縮期のピークの位置の関係について経胸壁ドプラ法で検討した。経胸壁ドプラ法で記録された波形とカテーテル中の冠動脈血流速度波形のピークの時相を比較して同じであった。冠動脈血流速度波形は、冠動脈非狭窄群に比べ高度冠動脈狭窄群の収縮期立ち上がり時間延長が見られた。また微小循環障害を伴う心筋梗塞、肥大心、弁膜疾患では経胸壁ドプラ法による CFVR より収縮期のピーク時相解析が、冠動脈狭窄の診断精度が高かった。

以上、本論文は非侵襲的に微小循環障害の有無と冠動脈狭窄の評価法として有用な検査法であること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)甲第528号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	岡 亜早子		
学位論文の題目	Ongoing Allergic Rhinitis Impairs Asthma Control by Enhancing the Lower Airway Inflammation (アレルギー性鼻炎合併喘息における上気道と下気道炎症の関連とその機序の検討)		
論文審査委員	主査	教授 古川 福実	
	副査	教授 山中 昇	教授 山本 信之

論文内容の要旨

[背景と目的]

アレルギー性鼻炎は喘息と高率に合併し、喘息発症因子のみならず難治化因子としてしても知られている。喘息にアレルギー性鼻炎が合併すると喘息のコントロールが悪化し、喘息発作のリスクを高め、喘息による救急室受診や入院を増やす。そのため喘息単独の患者に比べ医療費の増加に繋がることが示されている。アレルギー性鼻炎と喘息の重症度とコントロールの悪化には関連性があることが報告されているが、上下気道の炎症が相互に影響を及ぼすメカニズムについて、いまだ明確な答えは得られていない。メカニズムの1つとして上気道および下気道の炎症は連動して推移し、上気道で発生された炎症関連物質が、全身循環を介して下気道の好酸球性炎症を増悪させることが示唆されている。しかし下気道の炎症を評価する気管支粘膜生検や気管支肺胞洗浄などは侵襲的あるいは煩雑もあり実臨床の場では評価困難であった。近年、呼気NO分析装置が開発され呼気NO濃度を測定することにより簡易に下気道の炎症を定量化できるようになった。以前に我々は健常人や慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease : COPD)患者と比較し喘息患者では有意に呼気NO濃度が上昇すること、また喘息単独に比べアレルギー性鼻炎合併喘息で呼気NO濃度が有意に高いことを報告した。しかしながら、これまでの研究でアレルギー性鼻炎の活動性が喘息コントロールや呼吸機能、気道炎症に及ぼす影響については十分に明らかにされていない。

そこで本研究では①アレルギー性鼻炎についてアレルギー性鼻炎症状とアトピー素因の有無を確認し客観的な診断、重症度分類を行い、アレルギー性鼻炎の重症度による喘息の症状や下気道の炎症の程度、呼吸機能の差異を横断的に検討すること(study1)、②中等症/重症持続性鼻炎合併喘息患者に対する点鼻ステロイド薬治療が喘息コントロールの指標に及ぼす影響を縦断的に検討することを目的とした(study2)。

[方法]

8週間以上喘息ガイドラインに準じ標準的治療を行った非喫煙成人喘息患者520例を対象とした。試験期間中に喫煙、喘息増悪または全身性ステロイドが投与されたもの、服用アドヒアランスが明らかに不良と判断されたもの、COPDなど他の呼吸器疾患が併存するもの、点鼻ステロイド薬がすでに投与されているものは除外した。アレルギー性鼻炎については複数のアレルギー特異的IgEを測定し1つ以上が陽性(0.7U/ml以上)であることに加え、アレルギー性鼻炎とその喘息への影響についてまとめられた国際的ガイドライン(allergic rhinitis and its impact on asthma : ARIA)を元に作成されたSACRA questionnaireにより診断を行った。背景因子の調査、Asthma Control Questionnaire(ACQ)、呼吸機能検査、呼気NO濃度(FENO)、血清IgE、SACRA questionnaire、末梢血好酸球数の測定を横断的に実施した(study1)。また対象症例の中で、中等症/重症持続性鼻炎を合併する喘息コントロールが不十分な患者(ACQスコア>0.75)のうち治療に同意を得られた40症例に対し点鼻ステロイド治療(モメタゾン フランカルボン酸エステル 200μg)を4週間行い、点鼻ステロイド薬の投与が喘息指標に及ぼす影響を検討した(study2)。

[結果]

喘息患者520症例のうち、アレルギー性鼻炎合併例は348症例(66.9%)であった。アレルギー性鼻炎

合併例は喘息単独例と比較し性別や年齢に有意差は認められなかったが、吸入ステロイド薬の使用量やロイコトリエン受容体拮抗薬の使用が多いにも関わらず、喘息の症状が強く、喘息コントロールが不完全な患者が有意に多く存在し($p < 0.001$)、呼気NO濃度の上昇および気流閉塞の増強が認められた。また喘息のコントロールの悪化と下気道炎症の亢進は、アレルギー性鼻炎の重症度と有意な関連を示した。

Study2においては点鼻ステロイド治療による上気道の治療により鼻症状の改善のみならず、下気道の炎症反応の程度、喘息の症状、コントロール状態が有意($p < 0.001$)に改善を認め、気流閉塞も改善した。また有意差は認められなかったが治療により血中の好酸球数の低下傾向が認められた($p < 0.1$)。鼻症状VAS値と呼気NO濃度の変化率には有意な正の相関が認められ鼻症状の改善が下気道の炎症反応の改善につながることを示された($r = 0.52$, $p < 0.001$, 図3B)。また点鼻ステロイド治療による呼気NO値の変化量はACQスコアの変化量と有意な正の相関を示した($r = 0.73$, $p < 0.001$)。

[考察]

アレルギー性鼻炎合併例では喘息単独例に比べ喘息のコントロールの悪化と下気道炎症の亢進を認めた。また、喘息のコントロールの悪化と下気道炎症の亢進は、アレルギー性鼻炎の重症度と関連することが示された。本研究は対照群との比較は行っていないものの、喘息コントロールが不十分でアレルギー性鼻炎の重症度が高い症例では、点鼻ステロイド薬の追加治療による下気道炎症の抑制を介して、喘息コントロールが改善する可能性が示唆された。下気道炎症の抑制において、全身循環における炎症細胞や液性因子の制御が関連しているかについては今後のさらなる検討が必要である。

[結論]

アレルギー性鼻炎の重症度が増すと、下気道の炎症反応が増悪し、喘息のコントロール不十分な割合が増加する。そのためアレルギー性鼻炎の重症度を判定し、適切なアレルギー性鼻炎に対する治療介入を行なうことは喘息コントロールの改善に結びつく可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成27年8月13日 論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

アレルギー性鼻炎は喘息と高率に合併し、喘息発症因子のみならず難治化因子としても知られている。アレルギー性鼻炎と喘息の重症度とコントロールの悪化には関連性があることが報告されているが、上下気道の炎症が相互に影響を及ぼすメカニズムについて、いまだ明確な答えは得られていない。またこれまでの研究でアレルギー性鼻炎の活動性が喘息コントロールや呼吸機能、気道炎症に及ぼす影響については十分に明らかにされていない。そこで本論文ではアレルギー性鼻炎についてアレルギー性鼻炎症状とアトピー素因の有無を確認し客観的な診断、重症度分類を行い、アレルギー性鼻炎の重症度による喘息の症状や下気道の炎症の程度、呼吸機能の差異を横断的に検討すること(study1)、中等症/重症持続性鼻炎合併喘息患者に対する点鼻ステロイド薬治療が喘息コントロールの指標に及ぼす影響について前向きに検討を行った(study2)。

アレルギー性鼻炎合併例は喘息単独例と比較し性別や年齢に有意差は認められなかったが、吸入ステロイド薬の使用量やロイコトリエン受容体拮抗薬の使用が多いにも関わらず、喘息の症状が強く、喘息コントロールが不完全な患者が有意に多く存在し($p < 0.001$)、呼気NO濃度の上昇および気流閉塞の増強が認められた。また喘息のコントロールの悪化と下気道炎症の亢進は、アレルギー性鼻炎の重症度と有意な関連を示した。

Study2においては点鼻ステロイド治療による上気道の治療により鼻症状の改善のみならず、下気道の炎症反応の程度、喘息の症状、コントロール状態が有意($p < 0.001$)に改善を認め、気流閉塞も改善した。鼻症状VAS値と呼気NO濃度の変化率には有意な正の相関が認められ鼻症状の改善が下気道の炎症反応の改善につながることを示された($r = 0.52$, $p < 0.001$)。また点鼻ステロイド治療による呼気NO値の変化量はACQスコアの変化量と有意な正の相関を示した($r = 0.73$, $p < 0.001$)。

以上のように、本論文はアレルギー性鼻炎合併例では喘息単独例に比べ喘息のコントロールの悪化と下気道炎症の亢進を認めた。また、喘息のコントロールの悪化と下気道炎症の亢進は、アレルギー性鼻炎の重症度と関連することが示された初めての論文である。アレルギー性鼻炎の重症度を判定し、適切なアレルギー性鼻炎に対する治療介入を行うことは喘息コントロールの改善に結びつくことも期

待され、学位論文に値するものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第529号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	柏木 学		
学位論文の題目	Differential expression of Toll-like receptor 4 and human monocyte subsets in acute myocardial infarction (急性心筋梗塞における Toll 様受容体 4 発現とヒト単球サブセットについての検討)		
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

【諸言】

剖検例での病理学検討から、冠動脈内において、アテロームの線維性被膜が破綻し、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。Thin-capped fibroatheroma (TCFA)と呼ばれる、65 μ m以下の薄い線維性被膜を有する、脂質に富んだ病変が、プラーク破綻を起こしやすいと考えられている。近年、冠動脈CTを用いて非観血的に冠動脈プラーク形態の観察が可能となった。観血的なイメージングモダリティとしては、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 μ mという高い解像度により、生体内においてリアルタイムにTCFAの同定が可能となった。我々は以前、OCTを用いることで、冠動脈CTにおける不安定プラークの特徴が、陽性リモデリングを有し、CT値の低い冠動脈プラークであることを報告した。

冠動脈プラーク破裂の詳細な機序は不明であるが、炎症および免疫反応の関与が指摘されている。冠動脈プラーク内には単球・マクロファージやリンパ球などの免疫細胞が集積し、その破綻機序に深く関与していると考えられている。

末梢血単球は単一ではなく、炎症性(CD14陽性CD16陰性)及び非炎症性(CD14陽性CD16陽性)単球の二つのサブセットに大きく分類される。我々は、冠動脈CTにおける不安定プラークを有する患者において、非炎症性単球が有意に上昇していることを報告し、CD14陽性CD16陽性単球が冠動脈粥腫の不安定化に関連していると考えた。

自然免疫反応の際に中心的な働きをするToll様受容体Toll-like receptor (TLR)が動脈硬化性病変において、有意に発現頻度が増加しており、単球に関しては、急性冠症候群において、Toll-like receptor 4 (TLR-4)受容体が高頻度で発現していることが明らかになっている。本研究では、急性心筋梗塞における末梢血および責任冠動脈内血の単球上のTLR-4受容体の発現と単球サブセットの関係について検討した。

【方法】

和歌山県立医大附属病院に入院した急性心筋梗塞(AMI)22例、不安定狭心症(UAP)16例、安定狭心症(SAP)27例、コントロール群15例の計80例を対象とした。

入院時に末梢血を採取し、AMI症例ではカテーテルインターベンション施行時に血栓吸引カテーテルを用いて責任冠動脈内血も採取した。PE、PE-Cy5、FITCの蛍光抗体を用いて単球を2つのサブセットに分類し、それぞれにおいて単球上のTLR4の発現を測定した。

【結果】

フローサイトメトリーによる単球上のTLR-4発現についての検討では、AMIにおいてTLR-4の発現は

UAP、SAP およびコントロール群と比較して有意に上昇していた ($p < 0.01$)。単球を CD14 陽性 CD16

陽性、CD14 陽性 CD16 陰性、の 2 つのサブセットに分類して検討した結果、全症例およびコントロール群において CD14 陽性 CD16 陽性単球上の TLR-4 の発現頻度がその他の単球サブセットと比較して有意に高かった。また、CD14 陽性 CD16 陽性単球上の TLR-4 の発現頻度は AMI において UAP、SAP、コントロール群と比較して有意に上昇していた ($p < 0.01$)。さらに AMI において単球上の TLR-4 の発現は血栓吸引カテーテルで採取した責任冠動脈内血で末梢血と比較して有意な上昇が認められた ($p < 0.05$)。

急性期に上昇している CD14 陽性 CD16 陽性単球上の TLR-4 の発現は、AMI 発症から 12 日後に有意に減少していた ($p < 0.01$)。さらに AMI 症例において単球上の TLR-4 発現頻度と Tumor necrosis factor- α の血漿濃度は有意な相関関係にあった ($r=0.47$, $p < 0.05$)。

【考察と結語】

今回の我々の研究により、AMI において単球上の TLR-4 の発現が UAP や SAP と比較して上昇していること、特に CD14 陽性 CD16 陽性単球において TLR-4 発現は有意に高頻度であることが判明した。また AMI においては、末梢血と比較して、責任冠動脈内血の単球上の TLR-4 発現は有意に上昇していることが分かった。これら急性期に上昇した単球上の TLR-4 の発現率は、慢性期に有意に低下していることが判明した。この結果から、CD14 陽性 CD16 陽性単球の TLR-4 の up-regulation が急性心筋梗塞の急性期において重要な役割を担っていることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 27 年 9 月 16 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。冠動脈内の薄い線維性被膜をもつアテローム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) 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。冠動脈プラークの破綻の詳細な機序は不明であるが、炎症および免疫反応の関与が示唆されている。末梢血単球は単一ではなく、炎症性 (CD14 陽性 CD16 陰性) 及び非炎症性 (CD14 陽性 CD16 陽性) 単球の二つのサブセットに大きく分類される。学位申請者は、以前に冠動脈 CT を用いて、不安定プラークを有する患者において、非炎症性単球が有意に上昇していることを報告し、CD14 陽性 CD16 陽性単球が冠動脈粥種形成に関与していると考えた。また自然免疫反応の際に中心的な働きをする Toll 様受容体 (Toll-like receptor ; TLR) が動脈硬化性病変において、有意に発現頻度が増加しており、単球に関しては、急性冠症候群において、Toll-like receptor 4 (TLR-4) 受容体が高頻度で発現していることが明らかになっている。

本論文は末梢血および責任冠動脈血の単球上の TLR-4 の発現頻度と単球サブセットについて、急性心筋梗塞、不安定狭心症、安定狭心症、コントロール群患者を対象に、フローサイトメトリーを用いて明らかにしたものである。

その結果、不安定狭心症、安定狭心症、コントロール群に比べ、急性心筋梗塞において、単球上の TLR-4 の発現頻度が有意に高く、特に CD14 陽性 CD16 陽性単球において有意に高頻度であった。また、末梢血と比較して、責任冠動脈内血の単球上の TLR-4 発現は有意に上昇していることが明らかになった。これら、急性期に上昇した TLR-4 の発現は、12 日後において有意に低下していることが確認された。さらに AMI 症例において単球上の TLR-4 発現頻度と Tumor necrosis factor- α の血漿濃度は有意な相関関係にあった。

以上、本論文は急性心筋梗塞患者において、単球上の TLR-4 の発現頻度と CD14 陽性 CD16 陽性単球細胞の関係を初めて報告したものである。CD14 陽性 CD16 陽性単球の TLR-4 の up-regulation が、急性心筋梗塞発症に重要な役割を担ってい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)甲第530号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	大橋拓矢		
学位論文の題目	Class III Beta-tubulin Expression in Non-small Cell Lung Cancer: A Predictive Factor for Paclitaxel Response (非小細胞肺癌におけるクラス III β チューブリン発現とパクリタキセル感受性の関係)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 岸岡 史郎	教授 岡村 吉隆

論文内容の要旨

【緒言】

非小細胞肺癌 (NSCLC) に対する化学療法の key drug の一つである paclitaxel (PTX) は微小管作用薬であり, β -Tubulin に結合し安定化させ脱重合を阻害することで抗腫瘍効果を発現する. NSCLC における class III β -Tubulin (TUBB3) の高発現は PTX の効果不良を予測する因子である可能性が報告されている. しかし, TUBB3 高発現は同時に予後不良因子でもあるため, *in vivo* の検討のみでは結論するに十分ではないと思われる. 我々はこれまで, *in vitro* にて肺癌手術検体を用いた組織培養法抗癌剤感受性試験 (HDRA) により, 複数の抗癌剤感受性規定因子の検討を行ってきた. 本研究は HDRA を用いて, NSCLC における TUBB3 発現が真に PTX の感受性規定因子であるかを明らかにすることを目的とした.

【方法】

NSCLC 41 例の手術検体を用いた. 男性 26 例, 女性 15 例. 年齢 72 ± 6.8 歳. 腺癌 24 例, 扁平上皮癌 17 例. TUBB3 発現はモノクローナル抗体 (clone TUJ1) にて免疫組織染色を行い, H-score を用いて評価した. HDRA はまず, 初期の 12 検体を用いて PTX の量反応曲線を作成した. 最大濃度 256 $\mu\text{g/ml}$ から 8 段階の希釈系列にて HDRA を行い, 最小二乗法にて fitting して量反応曲線を求め ED50 を算出した. ED50 は 24.5 ± 8.1 (15.0 - 41.0) $\mu\text{g/ml}$ であった. そこで, 平均値(24.5)近傍の 25 $\mu\text{g/ml}$ を PTX の接触濃度と定め, HDRA にて 41 検体の抑制率 (IR25) を測定し, TUBB3 の発現程度との関係を検討した.

【結果】

TUBB3 免疫組織染色の結果, H-score の中央値; (25% - 75%値) は 50; (20-140) であった. ED50 を測定した 12 例のうち, ED50 が接触濃度の 25 $\mu\text{g/ml}$ を超える耐性例 ($n=5$) の H-score は 240; (75-285) であり, 25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の陽性例 ($n=7$) の H-score は 10; (0-20) であった. 耐性例の H-score は陽性例に比し有意 ($p=0.0076$) に高値であった. また, 41 例の IR25 は 53.8 ± 26.6 (0-83.3)% であった. IR25 からみると, IR25 < 50% の耐性例 ($n=15$) の H-score は 60; (30-240) で, IR25 \geq 50% の陽性例 ($n=26$) の H-score は 35; (9-270) であった. IR25 にても同様に, 耐性例の H-score は陽性例に比し有意 ($p=0.0337$) に高値であった.

【考察】

肺癌根治切除術後の治療成績を改善するために補助化学療法が用いられている. 肺癌の術後補助化学療法は大規模試験の結果により cisplatin (CDDP) + vinorelbine (VNR) の手術単独に対する生存率は, II 期で 43% が 54%、III 期で 25% が 40% と有意な向上を認め, CDDP+VNR が術後補助化学療法に対する標準治療となっている. しかし当然のことながら, 全ての症例が同等に化学療法の効果を受受できるわけではない. これは, 抗癌剤に対する感受性は個々の症例で異なっていることが一因であり, 個別に最適な化学療法を選択するために *in vitro* に抗癌剤感受性試験が開発され, 応用されてきた. 我々はこれまでに HDRA を用いて, VNR において TUBB3 高発現が正の効果予測因子であること

を明らかにしており、今回 PTX においては TUBB3 低発現が正の効果予測因子であることを明らかにした。

TUBB3 の発現に応じて適切な化学療法を選択するためには今後さらなる臨床的検討を要するが、既存の研究結果と本研究の結果により、TUBB3 高発現群は VNR を、低発現群には PTX を用いた化学療法を選択することでより多くの症例で術後補助化学療法の効果を享受できる可能性がある。

これまで *in vitro* で TUBB3 と PTX の関係性について検討した研究はなく、TUBB3 の発現によって PTX の感受性が異なることを明らかにした本研究の意義は大きい。

《結論》

非小細胞肺癌における class III β -tubulin 発現は paclitaxel の感受性規定因子であり、高発現例においては paclitaxel の効果が十分でなく、低発現例においては paclitaxel の効果が得られやすい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27年9月18日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。非小細胞肺癌に対する化学療法のkey drugの一つであるpaclitaxelは微小管作用薬であり、 β チューブリンに結合し安定化させ脱重合を阻害することで抗腫瘍効果を発現する。非小細胞肺癌におけるクラスIII β チューブリンの高発現は予後不良因子であることが知られているが、効果予測因子であるかは明らかにされていない。

【目的】

非小細胞肺癌におけるクラスIII β チューブリン発現が真にpaclitaxelの感受性規定因子であるかを明らかにすること。

【対象および方法】

非小細胞肺癌41例の手術検体を用いた。男性26例、女性15例。平均年齢72歳。腺癌24例、扁平上皮癌17例。クラスIII β チューブリン発現はモノクローナル抗体にて免疫組織染色を行い、H-scoreを用いて評価した。41検体におけるpaclitaxelの接触濃度25 $\mu\text{g/ml}$ における抑制率 (IR25) を測定し、クラスIII β チューブリンの発現程度との関係を検討した。

【結果】

ED50を測定した12例のうち、ED50が接触濃度の25 $\mu\text{g/ml}$ を超える耐性例が5例、25 $\mu\text{g/ml}$ 以下の陽性例が7例であった。耐性例のH-scoreは240、陽性例のH-scoreは10であり、耐性例は陽性例に比し有意にH-scoreが高値であった。また、41例のIR25は53.8%であった。IR25からみると、IR25が50%以下の耐性例は15例で、50%以上の陽性例が26例であった。耐性例のH-scoreは60、陽性例のH-scoreは35であり、IR25にても同様に、耐性例は陽性例に比し有意にH-scoreが高値であった。

今回の研究のように *in vitro* でクラスIII β チューブリンと paclitaxel の関係性について検討した研究はこれまでなく、クラスIII β チューブリンの発現によって paclitaxel の感受性が異なることを明らかにした。クラスIII β チューブリンの発現に応じて適切な化学療法を選択するためには今後さらなる臨床的検討を要するが、低発現群には paclitaxel を用いた化学療法を選択することでより多くの症例で術後補助化学療法の効果を享受できる可能性があり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第531号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	室谷 和宏		
学位論文の題目	Change in portal vein hemodynamics after chemoembolization for hepatocellular carcinoma: evaluation through multilevel dynamic multidetector computed tomography during arterial portography (肝細胞癌による化学塞栓術後の門脈の血行動態の変化—MLD-CTAP での評価—)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 一瀬 雅夫	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

[緒言]

経カテーテル的肝動脈塞栓術(Transcatheter Arterial Chemoembolization:TACE)はリピオドールによる抗癌剤の集積と塞栓物質による阻血効果を利用した hepatocellular carcinoma (HCC) に対する治療法であり良好な治療効果が報告されている。これまでの臨床病理学的研究により、正常肝組織にリピオドールを注入すると、リピオドールは一部動脈から類洞を通して門脈内に流入することが証明されてきた。門脈内にリピオドールが流入することにより、TACE 後に門脈血流の低下が引き起こされ、肝機能低下につながる事が推測されるが、TACE の門脈血流への影響の詳細な検討はこれまでなされていない。TACE 後の肝機能評価のため、multilevel dynamic CT during arterial portography (MLD-CTAP)を考案し、TACE 前後で MLD-CTAP を行い、門脈血流動態の変化を観察し TACE による門脈血流への影響を検討した。

[対象と方法]

対象は HCC 患者 20 例であり、あらかじめ血管造影にて上腸間膜動脈造影を施行し門脈の求肝性血流を確認した症例である。64 列 IVR-CT 装置を使用し、TACE 前後で MLD-CTAP を施行した。MLD-CTAP の条件は上腸間膜動脈より 3 倍希釈造影剤を注入速度 4.0ml/sec、総注入量 50ml で注入し安静呼吸下で 2 秒毎に注入開始直後から 40sec 後まで撮影を行った。撮影後、門脈本幹に region of Interests(ROI)(50mm²)を設定し、Time density curve(TDC)を作成した。また、得られた TDC より門脈本幹の CT 値が 150HU(Hounsfield unit)を越えた時点の時間(Arrival time to the main portal vein; ATMPV)、門脈ピーク CT 値(Peak CT value; PV)、門脈ピーク CT 値に到達するまでの時間(Time to the peak CT value; TPV)を測定し、TACE 前後でそれらの比較を行った。さらに、ワークステーションを用いて全肝体積及び、TACE を施行した塞栓領域の体積を計測した。門脈本幹での TPV と塞栓体積率との関連性及び TDC の傾きの変化と塞栓体積率との関連性を検討した。

[結果]

ATMPV は TACE 前 13.4 ± 2.5 (sec) で TACE 後 15.7 ± 2.5 (sec) であった($p=0.006$)。TPV は TACE 前 22.2 ± 2.5 (sec) で TACE 後 25.9 ± 2.7 (sec) であった($p=0.0007$)。TDC の傾きは TACE 前 21.6 ± 7.3 で TACE 後 15.5 ± 6.1 であった($p=0.006$)。TACE 後、ATMPV 及び TPV の遅延が増大し TDC の傾きが緩やかになった。TPV と塞栓体積率との関連性について、肝臓全体に対する塞栓体積率が増加するに伴い TPV の遅延が有意に増大した($p=0.02$)。TDC の傾きの変化と塞栓体積率との関連性について、門脈本幹の TDC の傾きが有意に緩やかになった ($p<0.001$)。

[考察]

TACE 後に ATMPV 及び TPV が遅延し、TDC の傾きが緩やかになった。これは TACE 施行後、リ

ピオドールが正常肝実質の類洞を介して門脈枝内に流入し、門脈枝の閉塞の結果、門脈血流が減少することに帰因すると推察される。さらに塞栓体積率の増加により、さらに多くの門脈枝の閉塞により門脈血流が減少することが推察される。TACE後に食道静脈瘤の破裂や門脈圧亢進症を引き起こすことが報告されており、TACEによる門脈圧の上昇が推察される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年11月20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。

ATMPVとTPVはTACE前よりTACE後の方が有意に遅延し、TDCの傾きはTACE前よりTACE後の方が有意に緩やかになった。TPVの遅延は塞栓体積率の増加に伴い有意に上昇し、TDCの傾き率は塞栓体積率の増加に伴い有意に減少した。TACE前後にMLD-CTAPを行いTDCを取得することで、TACE後の門脈本幹の血流量が有意に遅延することが明らかになった。さらに塞栓範囲が門脈血流の遅延の程度に相関していることが明らかになった。

本論文はTACE前後にMLD-CTAPを用いて門脈の血行動態の影響を評価することにより、TACE後の肝機能を予測し背景肝機能に応じて、肝の塞栓範囲を決定する一助となりうると考えられ、今後の臨床研究の基盤となりうるものであり、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532号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	松下 祥子		
学位論文の題目	Androgen regulates <i>Mafb</i> expression through its 3'UTR during mouse urethral masculinization (マウス尿道雄性化過程において、アンドロゲンは <i>Mafb</i> 遺伝子 3'UTR を介してその遺伝子発現を制御する)		
論文審査委員	主査	教授 平井 秀一	
	副査	教授 赤水 尚史	教授 山田 源

論文内容の要旨

【緒言】

外生殖器は、ホルモン依存的性分化形成を示す代表的な器官であり、雌雄においてその形態が大きく異なる。外生殖器における胎生期の尿道形成過程は、顕著に性差が見られる過程であり、ホルモン依存的性分化を理解する上で有用なモデルである。さらに尿道形成過程は、アンドロゲン受容体シグナルに加えて細胞増殖因子による制御の重要性が示唆されている。しかしながら、その詳細な分子機構は未解明であった。また尿道下裂は、外生殖器に高頻度にみられる先天異常である。よって尿道形成過程の分子機構の解明は、ホルモン依存性の遺伝子発現制御機構の理解ばかりでなくその病態を理解する上でも重要である。我々は、マウス外生殖器原基である生殖結節 (GT) において雄の尿道両側間葉細胞に強く発現する *Mafb* 遺伝子を同定した。さらに *Mafb* がアンドロゲン受容体シグナルの下流で尿道形成の雄性化に不可欠である事を最近明らかにした。しかしながら、尿道形成過程における *Mafb* 遺伝子の性差発現制御機構の詳細は、依然として不明であった。

私は、尿道形成過程における *Mafb* 遺伝子の発現制御機構を理解し、その発現制御エレメントを探索するために、マウス GT を用いた詳細な発現解析、*in silico* 解析、*in vitro* レポーターアッセイ、そしてアンドロゲン受容体 (AR) に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降解析 (ChIP assay) を行った。また *Mafb* 遺伝子上流因子の候補として、外生殖器雄性化因子の一つである β -catenin が *Mafb* の発現をマウス GT において制御する可能性についても検討を行った。

【材料および方法】

マウス

発現解析には妊娠 ICR マウス (日本クレア) を用いた。すべての動物実験は和歌山県立医科大学動物実験指針に基づいて実施した。

ルシフェラーゼレポーターベクター

Mafb 遺伝子周辺の候補制御エレメントの配列を C57BL/6J マウスのゲノムを用いて PCR で増幅した。その後 pGL3, pGL4 シリーズレポーターベクター (Promega) に in Fusion HD cloning kit (Takara) を用いて組み込んだ。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

トランスフェクションの前日に HepG2 細胞を 104 cells/well の細胞密度で 24well プレートに播いた。細胞の播種から 24 時間後、FuGENE HD (Promega) を用いてプラスミドベクターを導入した。6 時間後、dihydrotestosterone (DHT) を含む培地へ交換した。24 時間後、細胞を回収し、細胞抽出液を用いて Dual-Luciferase Reporter Assay System (Progema) によりルシフェラーゼ活性を測定した。血清中のホルモンの影響を減弱するため、チャコールフィルターによるホルモンフリーの血清

を使用した。

【結果】

- ① *Ma1b* 遺伝子の mRNA の発現は、アンドロゲン投与によって発現が亢進した。
- ② *Ma1b* 遺伝子近傍の多くの生物種に保存されている領域は、アンドロゲン応答性を示した。
- ③ 生物種間で高い保存性を示す *Ma1b* 遺伝子 3' 非翻訳領域 (3'UTR) は、アンドロゲン受容体シグナルによって制御されるエンハンサー様の領域であった。
- ④ アンドロゲン受容体 (AR) は、マウス外生殖器において *Ma1b* 3'UTR 上に存在する 2 つの機能的なアンドロゲン応答エレメント (ARE) に結合した。
- ⑤ 3'UTR 同様、*Ma1b* 遺伝子 5'UTR もアンドロゲン応答性の領域を含んでいた。
- ⑥ 外生殖器雄性化因子の一つである β -catenin は、*Ma1b* 遺伝子の上流因子である可能性が示唆された。
- ⑦ β -catenin は、*Ma1b* 遺伝子の転写制御においては AR と独立して制御する事が示唆された。

【考察】

本研究により、*Ma1b* 遺伝子 3'非翻訳領域 (UTR) がアンドロゲン受容体シグナルによって制御されるエンハンサー様の領域であること、そして同領域に含まれる 2 個のアンドロゲン応答エレメント (ARE) が同定された。3'UTR は、従来から頻繁に解析されている翻訳制御のみならず、転写制御にも重要と報告かつ注目されている。外生殖器先天異常である尿道下裂の患者の中には、*Bmp7* 遺伝子や *Ma1b* 遺伝子と同じ bZip ファミリーの *Atf3* 遺伝子の 3'UTR 内の変異が報告されている。UTR を介した転写制御機構をさらに詳細に解析する事は、尿道下裂をはじめとした病態解明に役立つと考えられる。さらにアンドロゲン応答性の遺伝子発現制御機構のモデルとしても今後注目される。

また本研究では *Ma1b* 3'UTR に加えて、*Ma1b* 5'UTR もアンドロゲン応答性の領域を含む事が明らかになった。しかしながらデータベースで探索したところ 5'UTR には ARE 候補となる配列は存在しなかった (data not shown)。*Ma1b* 5'UTR には他の転写因子結合候補サイトが存在していたことから、AR は他の因子と相互作用して 5'UTR を介して *Ma1b* 遺伝子の発現を制御している可能性が考えられた。

Wnt シグナルに含まれる重要な制御因子である β -catenin は、外生殖器雄性化因子の一つである事が報告されているが、尿道両側間葉細胞における下流因子は不明であった。本研究により、 β -catenin が *Ma1b* 遺伝子の発現を制御する可能性が初めて示唆された。今後は β -catenin ミュータントマウスを用いた解析に加え、タンパク質相互作用解析等を行い、外生殖器における β -catenin による *Ma1b* 遺伝子制御の詳細な分子機構を解析する予定である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成27年12月21日、論文審査委員会は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

外生殖器における胎生期の尿道形成過程は、顕著に性差が見られる過程であり、ホルモン依存的性分化を理解する上で有用なモデルである。さらに尿道形成過程は、アンドロゲン受容体シグナルに加えて細胞増殖因子による制御の重要性が示唆されている。しかしながら、その詳細な分子機構は未解明であった。最近、マウス外生殖器原基である生殖結節 (GT) において雄の尿道両側間葉細胞に強く発現する *Ma1b* 遺伝子を同定されていた。さらに *Ma1b* がアンドロゲン受容体シグナルの下流で尿道形成の雄性化に不可欠である事が最近明らかにされたが、尿道形成過程における *Ma1b* 遺伝子の性差発現制御機構の詳細は、依然として不明であった。

本研究では、尿道形成過程における *Ma1b* 遺伝子の発現制御機構を理解し、その発現制御エレメントを探索するために、マウス GT を用いた詳細な発現解析、*in silico* 解析、*in vitro* レポータ

ーアッセイ、そしてアンドロゲン受容体（AR）に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降解析（ChIP assay）を行った。また*Mafb*遺伝子上流因子の候補として、外生殖器雄性化因子の一つである β -cateninが*Mafb*の発現をマウスGTにおいて制御する可能性についても検討を行った。

本研究により、*Mafb*遺伝子3'非翻訳領域（UTR）がアンドロゲン受容体シグナルによって制御されるエンハンサー様の領域であること、そして同領域に含まれる2個のアンドロゲン応答エレメント(ARE)が明らかになった。また3'UTRに加えて、5'UTRもアンドロゲン応答領域を含んでいた。さらに、外生殖器雄性化因子の一つである β -cateninが*Mafb*遺伝子の発現を制御する可能性が初めて示唆された。以上より、尿道形成過程における*Mafb*遺伝子の発現にはARによる直接的制御に加え、 β -cateninによる発現制御の重要性が示唆された。本研究はこれまで未解明であった外生殖器発生過程におけるホルモン依存的性差構築機構について新たな知見を与えるものであり、博士学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第533号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	鈴木 裕子		
学位論文の題目	Systematic analyses of murine masculinization processes based on genital sex differentiation parameters (外陰部性差解析パラメーターによるマウス雄性化の統合的解析)		
論文審査委員	主査	教授 原 勲	
	副査	教授 井篁 一彦	教授 山田 源

論文内容の要旨

【緒言】

外陰部の男性化において、アンドロゲン、特にジヒドロテストステロン(DHT)の重要性は明らかであるが、その詳細な作用メカニズムは未だ不明である。男性化における作用メカニズムを明らかにするため、マウス外生殖器形成をモデルとした遺伝子改変マウスの解析が行われてきた。しかし、雄性化の指標となる外陰部のパラメーターが確立されていないため、その表現型の正確な評価は困難であった。そこで本研究では、発生過程の外生殖器原基である生殖結節(genital tubercle; GT)の雄性化を評価するため、これまでの経時的形態観察に加え、組織学的データを基に再構築した3次元組織構築解析により7種のパラメーターを定義した。そして、このパラメーターを用いてGTの雄性化を評価し、性差を明確にすることを目的とした。さらに、GT局所のアンドロゲン濃度測定、DHT阻害モデルマウスを用いて、DHTがGT形成に及ぼす影響を統合的に解析した。

【試料及び実験方法】

マウス; C57BL/6 マウス(日本クレア)の胎仔を使用した。Mafb ノックアウトマウスは、筑波大学の高橋先生より供与頂いた。すべての動物実験は和歌山県立医科大学動物実験指針に基づいて実施した。finasteride 投与; 胎仔期のDHT産生阻害実験には、5 α 還元酵素阻害薬であるfinasterideを使用した。finasterideは、ごま油に溶解して使用した。それぞれの量(100、200、300mg/kg/day)のfinasterideを胎生(E)13.5から妊娠母獣マウスに1日1回連日経口投与し、以下の解析目的に応じた胎齢にて胎仔を採取した。コントロールのマウスには、finasteride投与群と同量のごま油を経口投与した。

GT局所のアンドロゲン濃度測定; E17.5で胎仔の生殖結節(GT)を採取し、GT局所のテストステロンとジヒドロテストステロン(DHT)の濃度測定を行った。測定にはliquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)を使用した。

3次元組織再構築とパラメーター設定; E15.5-E18.5の雌雄のマウス外陰部を採取し、Hematoxylin-Eosin (H.E.)染色を行った後、この切片画像を基に3次元解析ソフトAmira5により3次元画像を構築した。この外陰部の3次元画像解析と経時的形態変化の観察結果より、雄性化の指標となる7種の新規パラメーターを定義した。finasteride投与マウスの解析には、E18.5で雄の外陰部を採取し、DHTの低下とそれに伴う外生殖器雄性化への影響を7種のパラメーターを用いて評価した。統計学的解析; データの解析は、F検定で解析したのちStudentのt検定もしくはWelchのt検定を使用した。P値が0.05未満を有意とした。

【結果】

マウスの外陰部は、胎生(E)15.5以降に性差が現れ始め、出生直前のE18.5において肛門性器間距離(AGD)、生殖結節(GT)の大きさ、尿道などに顕著な性差を認めると考えられている。本研究では、7種のパラメーターとして、(1) AGD (anogenital distance)、(2) GT length、(3) GT width、(4) D-V length

(dorsal-ventral length)、(5) ventral length、(6) urethral length、(7) GT angle を定義した。発生過程の外陰部の性差を同パラメーターにより検証したところ、E15.5 では全てのパラメーターに性差が認められなかった。E16.5 において、上述のうち(1) (4) (5) (6) (7) の5種のパラメーターが有意な性差を示し、E18.5 では全てにおいて有意差を認めた。

finasteride 投与マウスの GT 局所のアンドロゲン濃度については、finasteride の濃度上昇に伴い、ジヒドロテストステロン(DHT)濃度は低下していた。一方、テストステロン濃度は、上昇していた。finasteride 投与により雄性化が阻害された雄 GT の形態を本パラメーターにより解析したところ、finasteride 濃度依存的に(DHT 濃度の低下に伴い)、尿道形成のパラメーター((4) (5) (6))は有意に低下していた。一方、GT の大きさを定義するパラメーター((2) (3))に有意な変化を認めなかった。

さらに、パラメーターの有用性を調べるために、尿道形成不全を示す *Mafb* ノックアウトマウスの GT を外陰部パラメーターで検証したところ、コントロールに比べて尿道形成のパラメーター((5) (6))が低下していた。

【考察】

胎生期のマウス外陰部の形態解析ツールとして、雄性化を定義する7つの新規パラメーターを設定した。本研究で設定したパラメーターを用いることで、外生殖器発生過程における外陰部の性差を認める部位が明らかとなった。生殖結節(GT)の大きさに関するパラメーターは、胎生後期に性差が現れ、一方、尿道形成に関するパラメーターは、より早期のE16.5より有意な性差が現れることが示された。また、外陰部パラメーターによる *Mafb* ノックアウトマウスの解析から、明確な尿道形成不全が示されたことより、ミュータントマウスの雄性化異常を評価するパラメーターとして有効であることが示された。

finasteride 投与マウスにおけるパラメーター解析によって、ジヒドロテストステロン(DHT)は雄の尿道形成に必須であることが判明した。さらに、尿道形成は DHT 濃度依存的であった。一方、胎仔期における GT の大きさの制御には DHT は顕著な役割を果たしていない可能性が示唆された。

先天性疾患である尿道下裂に見られる尿道形成不全は、陰茎の近位から遠位にかけて様々な部位で発症し、症例によってその程度に違いが見られる。また、その病態には DHT などのホルモン異常が関わっていることが知られている。本研究で示された尿道形成における DHT 濃度依存性をさらに理解することで、尿道下裂の病態解明が進むことが期待される。

【結論】

本研究は、マウス胎仔期の新規外陰部解析パラメーターを定義した。この外陰部解析パラメーターにより、雄マウスの GT 内の尿道形成は DHT 濃度依存的であること、DHT は、胎仔期の GT の大きさに影響を及ぼさない可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成27年12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。

外陰部の男性化において、ジヒドロテストステロン(DHT)の重要性は明らかであったが、その詳細な作用メカニズムは未だ不明である。これまでマウス外生殖器をモデルとした解析が行われてきたが、外陰部のパラメーターが確立されておらず、その表現型の正確な評価は困難であった。そこで本研究では、外生殖器原基である生殖結節(genital tubercle; GT)の雄性化を評価するため、3次元組織構築解析により7種のパラメーターを定義した。さらに、GT 局所の DHT 濃度測定、DHT 阻害モデルマウスを用いて、DHT が GT 形成に及ぼす影響を統合的に解析した。

胎仔期の DHT 産生阻害実験に 5α 還元酵素阻害薬 finasteride を使用した。100、200、300mg/kg/day 各種の量の finasteride を胎生(E)13.5 から妊娠マウスに投与し、胎仔の GT を E17.5 で採取して DHT 濃度測定を行い、翌日に3次元組織構築解析を行った。DHT 測定には liquid chromatography-tandem mass

spectrometry (LC-MS/MS) を、3次元組織構築には3次元解析ソフト Amira5 を使用した。

本研究では、7種のパラメーターとして、(1) AGD (anogenital distance)、(2) GT length、(3) GT width、(4) D-V length (dorsal-ventral length)、(5) ventral length、(6) urethral length、(7) GT angle を定義した。外陰部性差の検証として、E15.5 で全てのパラメーターに性差を認めず、E16.5 で(1) (4) (5) (6) (7) の5種のパラメーターが有意な性差を示し、E18.5 では全てに有意差を認めた。finasteride 投与マウスの解析では、finasteride の濃度上昇に伴い DHT 濃度は低下しており、形態解析では、濃度依存的に尿道形成のパラメーター(4) (5) (6) の有意な低下を認めた。一方、GT の大きさを定義するパラメーター(2) (3) に有意な変化を認めなかった。さらに、尿道形成不全を示す *Mafb* ノックアウトマウスで、コントロールに比べ尿道形成のパラメーター(5) (6) が低下していた。

本研究により、GT の大きさに関するパラメーターは胎生後期に、一方、尿道形成に関するパラメーターは、より早期に有意な性差が現れることが示された。また、*Mafb* ノックアウトマウスの解析で、尿道形成不全が明瞭に示され、ミュータントマウスの雄性化異常を評価する有効なパラメーターであることが示された。finasteride 投与マウスの解析では、DHT が雄の尿道形成に必須である事が判明し、さらに尿道形成は DHT 濃度依存的であった。一方、胎仔期における GT の大きさの制御には DHT は顕著な役割を果たしていない事が示唆された。

以上より本研究は、発生過程の外生殖器原基の形態を評価する有効な新規パラメーターを提唱し、胎仔期尿道形成に対する DHT の濃度依存性を示した。本研究結果は、外生殖器の発生について新たな知見を与えるものであり、これにより先天性疾患である尿道下裂の病態解明が進むことも期待され、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534号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	深津 和弘		
学位論文の題目	Microscopic invasion patterns and epithelial cell-phenotypes in early gastric cancer with submucosal invasion (早期胃癌における粘膜下層浸潤形式と形質発現との関連性の検討)		
論文審査委員	主査	教授	山上 裕機
	副査	教授	村垣 泰光
			教授 一瀬 雅夫

論文内容の要旨

【緒言】

胃癌は日本における主要死因の一つであり、2012年の全国における総死亡数は49129人にのぼる(厚生労働省平成24年「人口動態統計」より)。

近年の内視鏡的診断能の向上に伴い、粘膜内癌や粘膜下層癌といった早期胃癌に遭遇する機会が増え、内視鏡治療が広く行われるようになってきた。

しかし、粘膜下層に癌浸潤を来すと約20%の確率でリンパ節転移が認められるとされ、粘膜下層浸潤は胃癌の予後因子として非常に重要である。

胃癌は病理組織学的に分化型癌(intestinal type carcinoma; 乳頭腺癌、高・中分化型管状腺癌)と未分化型癌(diffuse type carcinoma; 印環細胞癌、低分化型腺癌)に大別される。1990年代以降、免疫組織化学的手法の発展により胃癌粘液形質に基づいた胃型癌と腸型癌の識別が可能となり、これまでに胃癌の組織型や予後との関連につき多数の検討が行われてきた。以前は、分化型癌は腸上皮仮生を前癌病変として発生し、腸型形質を有するものと考えられ、一方で、未分化型癌は若年者や女性などの萎縮性変化や腸上皮仮生を伴わない胃固有粘膜に発生し胃型の形質を発現するものと考えられていた。しかし、免疫組織化学的手法を用いた多くの報告により、実際には分化型癌の発生初期では腸型ではなく胃型の形質を示すものが多いことや癌の成長に伴って形質が変化することが明らかにされてきた。

胃癌が粘膜下層に浸潤する形式は、粘膜筋板を広範囲に破壊するパターンと粘膜筋板の間隙をすり抜けて浸潤するパターンに大別されるが、これら浸潤形式を免疫組織化学的手法を用いて検討した報告は過去にない。本研究では、胃癌の予後や内視鏡治療の適応を考えるうえで重要な段階である粘膜下層浸潤癌を対象として、粘膜層および粘膜下層の形質発現と粘膜下層浸潤形式との関連につき検討した(検討1)。また、粘膜下層浸潤形式と臨床病理学的特徴との関連性についても検討した(検討2)。

【方法】

2002年5月から2013年6月までの間に当科にて内視鏡的切除を行った早期胃癌症例809例のうち、病理学的評価が可能な粘膜下層浸潤癌44例を対象とし、粘膜層および粘膜下層の形質発現と粘膜下層浸潤形式との関連につき検討した(検討1)。

<免疫組織化学的手法>

胃型マーカーとしてMUC5ACおよびMUC6を、腸型マーカーとしてMUC2およびCD10を使用した。MUC5ACまたは/かつMUC6の発現が10%以上のものを胃型癌(G-type)、MUC2または/かつCD10の発現が10%以上のものを腸型癌(I-type)、MUC5ACまたは/かつMUC6の発現およびMUC2または/かつCD10の発現が10%以上のものを胃腸混合型(GI-type)、いずれのマーカーも10%以下のものを分類不能型(N-type)と定義した。

また、胃癌の悪性度を評価するために MIB1 モノクローナル抗体を用いて Ki-67 の発現の評価 (MI<marking index> Ki-67) も行った。

粘膜下層浸潤形式に関しては、以下の 2 群に分類した。

(i) 圧潰型

癌全体が一塊となって粘膜筋板を広範囲に破壊しながら粘膜下層に浸潤する形式。

病巣内において粘膜層と粘膜下層の間に肉眼的境界はない。

(ii) 間隙型

癌の一部が粘膜筋板の間隙 (粘膜筋板の血管・リンパ濾胞・異所性腺腔周囲の組織間隙やあるいはそれらの特別な構造を伴わない組織間隙) を伝って粘膜下層へ浸入する形式で、粘膜筋板の破壊をほとんど伴わない。粘膜筋板はほぼ正常に保たれており、病巣内において粘膜層と粘膜下層の境界部分にくびれを伴う。

なお、潰瘍や潰瘍癒痕を伴うものに関しては、粘膜筋板の同定が困難であるため今回の研究対象からは除外した。

また、粘膜下層浸潤形式と臨床病理学的特徴 (年齢・性別・部位・サイズ・肉眼型・組織型・脈管侵襲の有無・粘膜下層浸潤距離・MI Ki-67) との関連についても検討した (検討 2)。統計学的分析は、カイ二乗検定と Fisher の正確確率検定及び Mann-Whitney の U 検定を用いた (SPSS version 11.0)。 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。

【結果】

(検討 1)

圧潰型においては、病変内における粘膜層と粘膜下層の形質発現が同じでかつ両方とも腸型形質を含むものが有意に多かった。間隙型においては、粘膜層と粘膜下層の形質発現が異なりかつ粘膜下層が胃型形質単独のものが有意に多かった。

(検討 2)

圧潰型に関しては病変部位による有意差はなかったが、間隙型に関しては体部・噴門部病変の方が前庭部病変に比べて有意に多かった。その他、年齢、性別、腫瘍径、肉眼型、組織型、脈管侵襲の有無、sm1 (粘膜下層浸潤距離が $500\mu\text{m}$ 以下) と sm2 (粘膜下層浸潤距離が $500\mu\text{m}$ 以上) の頻度、MI Ki-67 いずれも有意差は認めなかった。なお、sm2 癌 24 例中追加手術を行ったのは 16 例で (残り 8 例は COPD, 心臓弁膜症、肝臓癌合併、精神疾患等の合併症があり手術せず)、うちリンパ節転移は 1 例のみ (間隙型) であった。

【考察】

(検討 1)

早期胃癌の粘膜下層浸潤形式と粘膜層・粘膜下層における形質発現のパターンとの間には関連性が見られた。圧潰型においては、粘膜層と粘膜下層の形質が同じでかつ腸型を含むものが有意に多かったが、これは粘膜層表面に存在する *H.pylori* の影響で癌全体が腸型化してから一塊となって粘膜筋板を破壊し粘膜下層に浸潤するためと考えられた。一方、間隙型においては、粘膜層と粘膜下層の形質が異なるものが有意に多かったが、これは癌が発生初期の胃型の段階で粘膜下層に浸潤し、粘膜層部分のみが *H.pylori* の影響で腸型化するのに対し粘膜下層部分は胃型形質を維持するためと考えられた。本研究により胃癌の粘膜下層浸潤形式と形質発現との関連が初めて示された。今後、胃癌の浸潤形式と臨床的悪性度との関連や、未分化型癌も含めたさらなる検討が望まれる。

(検討 2)

早期胃癌の粘膜下層浸潤形式と病変部位との間には有意差が見られた。体部・噴門部は前庭部に比べて間隙型の病変が多かったが、これは体部・噴門部の粘膜筋板の間隙が多く、また粘膜筋板が薄いこ

とが一因と考えられた。間隙型においては粘膜筋板の破壊をほとんど伴わないため深達度を過小評価する可能性があり、内視鏡治療の適応を判断するには細心の注意が必要と考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成28年1月26日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

胃癌は日本における主要死因の一つであり、2014年の全国における総死亡数は47903人にのぼる（厚生労働省平成26年「人口動態統計」より）。近年の内視鏡的診断能の向上に伴い、粘膜内癌や粘膜下層癌といった早期胃癌に遭遇する機会が増え、内視鏡治療が広く行われるようになってきた。しかし、粘膜下層に癌浸潤を来すと約20%の確率でリンパ節転移が認められるとされ、粘膜下層浸潤は胃癌の予後因子として非常に重要である。胃癌が粘膜下層に浸潤する形式は、粘膜筋板を広範囲に破壊するパターンと粘膜筋板の間隙をすり抜けて浸潤するパターンに大別されるが、これら浸潤形式を免疫組織化学的手法を用いて検討した報告は過去にない。

本研究では、胃癌の予後や内視鏡治療の適応を考えるうえで重要な段階である粘膜下層浸潤癌を対象として、粘膜層および粘膜下層の形質発現と粘膜下層浸潤形式との関連につき検討した。更に粘膜下層浸潤形式と臨床病理学的特徴との関連性についても検討した。その結果、

1) 圧潰型においては、病変内における粘膜層と粘膜下層の形質発現が同じでかつ両方とも腸型形質を含むものが有意に多かった。一方で間隙型においては、粘膜層と粘膜下層の形質発現が異なりかつ粘膜下層が胃型形質単独のものが有意に多かった。

2) 圧潰型に関しては病変部位による有意差はなかったが、間隙型に関しては体部・噴門部病変の方が前庭部病変に比べて有意に多かった。

以上より、本論文は胃癌の粘膜下層浸潤形式と形質発現との間に関連性があること、病変の部位により粘膜下層浸潤形式に差があることを明らかにした。胃癌の浸潤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 535 号		
学位授与の日	平成 28 年 3 月 15 日		
氏名	平山 三智子		
学位論文の題目	Muscarinic Receptor-Mediated Excitation of Rat Intracardiac Ganglion Neurons (心臓副交感神経節ニューロンのムスカリン応答)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡 史郎	
	副査	教授 前田 正信	教授 川股 知之

論文内容の要旨

<緒言>

心臓神経節 (intracardiac ganglion : ICG) は、副交感神経系の神経節で、その節後神経の活性化は陰性変時・変伝導・変力作用を発揮する。従来、ICG は副交感神経系において、中枢からの情報を心臓に伝える単なる中継点であると考えられてきた。しかしながら、近年、交感神経や感覚神経からも入力を受けることが明らかとなり、ICG はそれらの情報を統合し心機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

哺乳類の ICG ニューロンは、ニコチン型アセチルコリン (ACh) 受容体とムスカリン型 ACh 受容体も発現している。これまでに、ICG ニューロンの活性調節にはニコチン型 ACh 受容体だけでなく、ムスカリン型 ACh 受容体も関与していることが明らかになっている。しかしながら、ムスカリン型 ACh 受容体の活性化が ICG ニューロンの興奮性をどのようなメカニズムで調節しているかの詳細は明らかになっていない。本研究は、ラット ICG の急性単離ニューロンにアンホテリシン B 穿孔パッチクランプ法を適用し、選択的ムスカリン型 ACh 受容体作動薬の Oxotremorine (OxoM) を用いてムスカリン型 ACh 受容体の活性化によって誘発される反応とそのメカニズムを検討した。

<方法>

標本 : Wistar ラット(日齢 8 - 15)の ICG を摘出し、コラゲナーゼ (4 mg/ml) とトリプシン (4 mg/ml) で処理 (37°C、60 分間) した後、機械的に単離し急性単離ニューロン標本作製した。

電気生理学的測定 : アンホテリシン B 穿孔パッチクランプ法で行った。

溶液組成 (mM) :

- ・標準外液 ; NaCl 150、KCl 2.5、MgCl₂ 1、CaCl₂ 2、HEPES 10、glucose 10、Tris-OH で pH は 7.4 に調整した。
- ・膜電圧測定に用いたピペット内液 ; NaCl 10、KCl 60、potassium methanesulfonate 80、HEPES 10、Tris-OH で pH は 7.3 に調整した。
- ・膜電流測定に用いたピペット内液 ; cesium methanesulfonate 80、cesium chloride 70、HEPES 10、Tris-OH で pH は 7.3 に調整した。

<結果>

1. ムスカリン型 ACh 受容体作動薬は ICG ニューロンを脱分極する
膜電流固定下にて、ACh (3 μM)、ニコチン (3 μM) および選択的ムスカリン型 ACh 受容体作動薬 OxoM (1 μM) により活動電位を伴う脱分極が観察された (図 1)。以下の実験では、OxoM に対する ICG ニューロンの反応を検討した。

2. ムスカリン型 ACh 受容体の活性化は TRPC チャネルを介して内向き電流を誘発する

膜電位固定下、保持電位 -60 mV において、OxoM ($1 \mu\text{M}$) は膜コンダクタンスの増加を伴う微小な内向き電流を誘発した。細胞外液から Ca^{2+} を除去すると OxoM 誘発電流 (IOxoM) は、著明に増加した (図 2A, B)。保持電位 -60 mV で Na^{+} を除去するとほぼ完全に消失したが、保持電位を $+60$ mV とすると明らかな外向き電流を誘発した (図 2C)。信号雑音比を高くして測定を行うため、以下の膜電位固定法を用いた実験は Ca^{2+} を含まない細胞外液を用いて行った。図 2D に IOxoM の電流-電圧関係を示す。逆転電位は -10.4 ± 1.7 mV で明らかな整流性を認めなかったが、細胞外液 Na^{+} を除去すると強い外向き整流性を認めた。この性質は、非選択的カチオンチャネルの一つである transient receptor potential-canonical (TRPC) チャネルの電流-電圧関係と類似していた。そこで、TRPC チャネル拮抗薬である SKF-96365 ($30 \mu\text{M}$) および ML-204 ($3 \mu\text{M}$) を投与したところ、 IOxoM は有意に抑制された (図 3A-C)。

以上の結果から、ムスカリン型 ACh 受容体の活性化により、TRPC チャネルが活性化され内向き電流を誘発することが明らかになった。

3. ムスカリン型 ACh 受容体の活性化は PLC 活性化、 IP_3 産生、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出および CaM 活性化経路を介して TRPC チャネルを活性化させる

これまでの研究で、交感神経節の M2 および M4 は静止膜電位 (約 -60 mV) において不活性化されていることが明らかになっており、今回の実験系における OxoM に対する反応は M1、M3、M5 の関与が強く示唆された。M1、M3 および M5 受容体は、Gq/11 蛋白質と共役してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化し、PIP2 を加水分解して IP_3 とジアシルグリセロール (DG) を生成する。そこで、PLC および IP_3 の関与を検討した。

PLC 拮抗薬である U-73122 ($0.3 \mu\text{M}$) は IOxoM を有意に抑制したが、その不活性化体である U-73343 ($0.3 \mu\text{M}$) は抑制作用を示さなかった (図 4A)。また、 IP_3 受容体拮抗薬 Xestospongine C ($2 \mu\text{M}$) によっても、 IOxoM は有意に抑制された (図 4A)。従って、 IOxoM には PLC の活性化と IP_3 受容体活性化が関与することが明らかとなった。

IP_3 は PIP2 から合成される。PIP2 から IP_3 が合成され、その結果、PIP2 が減少し、PIP2 による抑制が解除されることにより開口するイオンチャネルが存在することが知られている。そこで、PIP2 減少が IOxoM に関与するか検討した。分解された PIP2 は、PI4K によって再合成される。この PI4K は高濃度の wortmannin によって抑制されるので、高濃度 wortmannin を用いて PIP2 を減少させた。低濃度 wortmannin ($0.3 \mu\text{M}$) は IOxoM に影響を与えなかった。また、高濃度 wortmannin ($50 \mu\text{M}$) 存在下でも、保持電流には影響は認められず、PIP2 の減少は IOxoM には関与していないことが示唆された。一方、OxoM の応答は投与毎に徐々に減少したため、PIP2 からの IP_3 の生成が重要であることが示唆された (図 4B)。

IP_3 受容体の活性化は、細胞内 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} 放出を誘発する。そこで細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させる thapsigargin および膜透過性 Ca^{2+} キレート薬 BAPTA-AM を用いて、細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出の関与を検討した。両薬剤は、 IOxoM を著明に抑制した (図 5A, B)。従って、 IOxoM には Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が関与することが明らかとなった。

細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はカルモジュリン (CaM) を活性化することが報告されている。そこで CaM の関与を検討した。CaM 阻害剤 W-7 ($3 \mu\text{M}$) は IOxoM を強く抑制した (図 5C)。CaM は種々のリン酸化酵素を活性化することが知られているが、CaMKII 拮抗薬 KN-62 ($3 \mu\text{M}$) や非選択的リン酸化酵素阻害剤 staurosporine ($0.3 \mu\text{M}$) は IOxoM に影響しなかった (図 5D)。

< 結語 >

ラット ICG ニューロンにおいて、ACh はニコチン型だけではなくムスカリン型 ACh 受容体の活性化を介して、情報伝達に関与していることが明らかとなった。そのメカニズムとして PLC 活性化、 IP_3 産生、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出および CaM 活性化により TRP チャネルが活性化され細胞内にカチオンが流入することが示唆された (図 6)。この反応は、M1、M3、もしくは M5 ムスカリン型 ACh 受容体活性化によって惹起されると推測されたが、関与する受容体サブタイプについてさらなる検討が必要である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 28 年 2 月 22 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。

心臓神経節 (intracardiac ganglion : ICG) は、副交感神経節であり、その節後神経の活性化は陰性変時・変伝導・変力作用に関与する。従来、ICG は副交感神経節として、中枢からの情報を心臓に伝える単なる中継点であると考えられてきた。しかしながら、近年、交感神経や感覚神経からも入力を受けていることが明らかとなり、ICG はそれらの情報を統合し心機能の調節に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

哺乳類の ICG ニューロンには、ニコチン性アセチルコリン (ACh) 受容体とムスカリン性 ACh 受容体が発現している。これまでに、ニコチン性 ACh 受容体による ICG ニューロンの活性調節機構の詳細は明らかにされてきたが、ムスカリン性 ACh 受容体による活性調節機構は解明されていない。本論文では、ラット ICG の急性単離ニューロンにアンホテリシン B 穿孔パッチクランプ法を適用し、選択的ムスカリン性 ACh 受容体作動薬の Oxotremorine (OxoM) を用いてムスカリン性 ACh 受容体による ICG ニューロンの活性調節機構を検討した。

まず、Current-clamp 法を用いてコリン作動性薬物 (ACh、ニコチン、OxoM) に対する応答を検討し、ムスカリン性 ACh 受容体作動薬は ICG ニューロンを脱分極することが明らかとなった。次に、Voltage-clamp 法を用いて OxoM 誘発電流の解析を行い、ムスカリン性 ACh 受容体の活性化は、phospholipase C (PLC) 活性化、inositol triphosphate (IP₃) 産生、細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出および calmodulin (CaM) 活性化経路を介して transient receptor potential-canonical (TRPC) チャネルを活性化させることで、細胞内に陽イオンが流入し内向き電流を誘発することを明らかにした。

以上より、本論文は、ラット ICG ニューロンにおいて、ACh はニコチン受容体だけではなく、ムスカリン性 ACh 受容体も活性化し、その興奮性を調節することを示したものであり、学位論文として価値があるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第536号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	下松 達哉		
学位論文の題目	The effect of hydroxychloroquine on lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice (MRL/lpr mice のループスエリテマトーデス様皮疹に対するヒドロキシクロロキンの効果)		
論文審査委員	主査	教授 園木 孝志	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 古川 福実

論文内容の要旨

[諸言]

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)や皮膚エリテマトーデス(cutaneous lupus erythematosus; CLE)を含むループス関連疾患は、原因不明の自己免疫疾患であり、その皮膚病変は、患者の quality of life(QOL)を低下させる要因でもある。従来局所治療としてステロイド外用剤が使用されることが多いが、治療困難な場合も多く、難治性の場合には、全身療法としてステロイドや免疫抑制剤を使用することになり、全身的副作用も懸念される。

一方で抗マラリヤ薬であるヒドロキシクロロキン(HCQ)は、関節リウマチの関節症状や SLE の関節症状、皮膚症状、CLE に有効であり、世界中で標準的治療法として使用されているが、その明らかな作用機序は解明されていない。今回我々は、SLE のモデルマウスで、ループスエリテマトーデス(LE)様皮疹を呈する MRL/lpr マウスに、生後 3 ヶ月目から 4 ヶ月間 HCQ を投与し、皮疹の抑制効果や炎症細胞浸潤、各種サイトカイン(IL-2, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- α)の mRNA の発現量、抗核抗体、抗 ds-DNA 抗体の発現量、肝障害、腎病変、生存率、体重減少への影響を調べることで、その有効性と安全性を検討した。

[方法]

○マウスの解析

生後 3 ヶ月の MRL/lpr マウスに HCQ を 4 ヶ月間投与した。

実験は次の 3 群に分けて行った。

- ① 蒸留水 (Control)
- ② HCQ(4mg/kg/day) (low dose)
- ③ HCQ(40mg/kg/day) (high dose)

1) 処置終了後に LE 様皮疹の出現する後頸部皮膚と腎臓を組織検索に供した。

皮膚、腎臓のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、トルイジンブルー(TB)染色、腎臓は HE 染色、PAS 染色を施行した。

2) 皮膚の TB 染色を用いて、5 視野(拡大倍率: 100 倍)を無作為に選び、真皮内の浸潤肥満細胞数の平均値を肉眼的に比較した。

3) 腎臓の組織学的評価は、PAS 染色を用いて、下記の評価法を用いて行った。

Grade 0: 正常

Grade 1: 分節性増殖性病変

Grade 2: ワイヤループもしくはヒアリン血栓を伴う分節性管内増殖性病変

Grade 3: Grade 2 の病変に硬化やヒアリン変性を伴う場合

4) 皮膚組織から抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行い、各種サイトカイン(IL-2, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- α)の発現量の変動を半定量的に調べた。

5) 蛋白尿の有無は試薬[ALBUSTIX urine test paper (Miles-Sankyo Co., Ltd, Tokyo, Japan)]を使用し、下記スコアで判定した。

[陰性(0-30mg/dl), 1+(30-100mg/dl), 2+(100-00mg/dl), 3+(300-1000mg/dl)]

6) 血清中の抗核抗体価(フルオロ HEPANA テスト)、抗 ds-DNA 抗体価(ELIZA 法)を測定し、皮膚凍結切片を用いてループスバンドテストを施行した。

7) 死亡率、体重変化は、実験期間を通じて累積した。

○統計学的解析

LE 様皮疹の出現頻度と死亡率の比較は、フィッシャーの正確確立検定を用いた。

肥満細胞の皮膚への浸潤度、蛋白尿、腎組織病変、体重変化、抗核抗体価、抗 ds-DNA 抗体価、各種サイトカインの発現量の比較は、スチューデントの t 検定を用いた。P 値<0.05 を統計学的有意とした。

[結果]

1) MRL/lpr マウスの LE 様皮疹の発生頻度

Control 群は 13 匹中 6 匹に、HCQ(4mg/kg/day)投与群では 11 匹中 3 匹に、HCQ(40mg/kg/day)投与群では 10 匹中 1 匹に皮疹を認め、Control 群と HCQ(40mg/kg/day)投与群において、有意差を認めた。(#, $p < 0.05$, フィッシャーの正確確立検定)

2) 肥満細胞の真皮への浸潤度

Control 群(81.1 \pm 68.2)と HCQ(40mg/kg/day)投与群(32.3 \pm 12.4)において、有意差を認めた。(#, $p < 0.05$, スチューデントの t 検定)

3) サイトカインの mRNA 発現

IL-2 に関しては、HCQ 投与群は、Control 群に比べて mRNA の発現量が低下していたが、有意差は認めなかった。

その他のサイトカインも同様に、有意差を認めなかった。(スチューデントの t 検定)

4) 肝臓障害 (血清 AST、ALT)・腎臓障害 (蛋白尿、腎組織病変、血清クレアチニン、尿素窒素)いずれも 3 群間に有意差は認めなかった。(スチューデントの t 検定)

5) 抗核抗体価、抗 ds-DNA 抗体価ともに 3 群間に有意差は認めなかった。またループスバンドテストに関しても、一定の傾向は認めなかった。

6) 死亡率と体重変化

いずれも 3 群間に有意差は認めなかった。(死亡率:フィッシャーの検定、体重変化:スチューデントの t 検定)

[結語]

この研究により、SLE モデルマウスの LE 様皮疹に対する HCQ の抑制効果が示された。またその効果発現の機序として、浸潤肥満細胞数や IL-2 発現の抑制が関与している可能性が考えられた。一方で明らかな全身的副作用も認めず、ヒトへの有益性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成28年2月18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。

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)や皮膚エリテマトーデス(cutaneous lupus erythematosus; CLE)を含むループス関連疾患は、原因不明の自己免疫疾患であり、その皮膚病変に対しては、局所治療としてステロイド外用剤が使用されることが多いが、難治性の場合には、全身療法としてステロイドや免疫抑制剤を使用することになり、全身的副作用も懸念される。

一方で平成 27 年本邦でも適応承認された抗マラリヤ薬であるヒドロキシクロロキン(HCQ)は、世界中で標準的治療法として使用されているが、その明らかな作用機序は解明されていない。今回我々は、SLE のモデルマウスで、ループスエリテマトーデス(LE)様皮疹を呈する MRL/lpr マウスに、HCQ を投与し、その有効性や全身的副作用について検討した。実験は、Control 群、HCQ(4mg/kg/day)投与群、HCQ(40mg/kg/day)投与群の3群に分け、生後3カ月目から4カ月間HCQを投与した。

結果は、皮疹の発生頻度に関して、Control 群と比べて、HCQ(40mg/kg/day)投与群は、病理組織学的に有意差をもって低値を示した。また真皮内の肥満細胞数も、同様に Control 群と比べて、HCQ(40mg/kg/day)投与群は、有意差をもって低下した。

皮膚組織から抽出した total RNA を用いて RT-PCR を行い、各種サイトカイン(IL-2, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- α)の mRNA の発現量の変動を半定量的に調べた結果では、IL-2 の mRNA 発現量に関しては、HCQ 投与群は、Control 群と比べて低下傾向を認めたが、有意差を認めなかった。その他のサイトカインにおいても統計上の有意差は観察されなかった。全身性副作用に関しては、腎障害（蛋白尿の有無、腎組織学的変化、血清クレアチニン、BUN）や肝障害（血清 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase）に異常値発現はなかった。また抗核抗体、抗 ds-DNA 抗体の力値、生存率、体重減少のいずれにおいても、Control 群と HCQ 投与群で有意差を認めなかった。

以上、本研究では、HCQ はヒトのみでなく、SLE のモデルマウスの LE 様皮疹に対しても抑制効果を示し、そこには肥満細胞数の減少が関与している可能性が考えられた。本研究は、SLE のモデルマウスに対して、抗マラリヤ薬である HCQ を投与した初の研究であり、HCQ の SLE モデルマウスの LE 様皮疹に対する効果が示され、明らかな副作用も認めず、ヒトへの有益性を示唆したことにより、学位論文として十分に価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第537号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	吉田 悟		
学位論文の題目	Epigenetic Inactivation of <i>FAT4</i> Contributes to Gastric Field Cancerization (<i>FAT4</i> 遺伝子のエピジェネティックな不活化は胃がんの素地に関与する)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 村垣泰光	教授 一瀬雅夫

論文内容の要旨

【緒言】

胃がんは *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)感染によるメチル化の異常によって高度に影響される。すなわち、胃粘膜におけるメチル化異常の蓄積はエピジェネティックな胃発がんの素地の発達を誘導する。しかしながら、このような発がんの素地に関与する個々のドライバー遺伝子については不明な点が多い。本研究では、胃がんの全エクソームシーケンシングにより同定された新規のがん抑制遺伝子である *FAT4* がメチル化サイレンシングされ、さらにそのようなメチル化が胃がんのエピジェネティックな発がんの素地に関与していることを実証することを目的とした。

【対象と方法】

まず、胃における *FAT4* の転写開始点を決定するために、正常なヒト胃上皮の細胞株 HGEC6B から抽出した RNA を用いて 5'RACE を行った。

次に、ヒト胃がんの細胞株 13 株と HGEC6B において *FAT4* のプロモーター領域のメチル化とその発現の喪失の関連について調べた。DNA メチル化は、次世代シーケンサーまたは qMSP 法を用いてバイサルファイトシーケンス法によって分析した。遺伝子発現は、定量的 RT-PCR 法によって分析した。*FAT4* のプロモーター領域のメチル化がその発現に及ぼす効果を確認するために、メチル化レベルの高かった上位 2 株の胃がん細胞株 (AGS および GC2) について、脱メチル化剤である 5-aza-dC で脱メチル化処理を行い、発現レベルの変化を調べた。

さらに、82 人の胃がん患者の手術標本を用いて、胃がん組織における *FAT4* のプロモーター領域のメチル化を qMSP 法によって解析した。プロモーター領域の密なメチル化の存在は、バイサルファイトシーケンス法によって確認した。プロモーター領域のメチル化と発現低下についての相関関係を、RNA が抽出可能であった 20 個の胃がん組織標本について分析した。*FAT4* のメチル化と胃がんの臨床病理学的特性との関連についても分析した。

最後に、ヒトの非がん部の胃粘膜について、*FAT4* のプロモーター領域のメチル化と *H. pylori* 感染との関連について分析した。

【結果】

DBTSS に登録されている *FAT4* の転写開始点は NCBI に登録されている転写開始点の約 1,500bp 上流であり、またヒトの胃以外の組織における発現データに基づくものであった。本研究では、ヒト胃上皮細胞における *FAT4* の転写開始点を 1 箇所同定し、そのプロモーター領域に CpG island (CGI) が存在することを確認した。

13 株の胃がん細胞株中 2 株 (AGS および GC2) において *FAT4* は高度にメチル化されており発現も認められなかった。さらに、その 2 株において 5-aza-dC による *FAT4* の脱メチル化によって *FAT4* の発現は回復された。

胃がん患者の手術標本では、82 検体中 12 検体 (14.6%) において *FAT4* のプロモーター領域はメチ

ル化されていた。バイサルファイトシークエンス法によって確認された *FAT4* が高度にメチル化されている分子の割合は、qMSP 法で得られた percentage of methylated reference (PMR) と一致していた。*FAT4* プロモーター領域のメチル化と発現低下については相関関係が認められなかった。

臨床病理学的特性については、*FAT4* のメチル化と予後、腫瘍の進展度、リンパ節転移、組織型との間に関連は認められなかったが、CpG アイランドメチル化形質(CIMP)と関連していた。

健常者の *H. pylori* 陽性グループでは陰性グループよりも有意に *FAT4* の PMR は高かった。胃がん患者の *H. pylori* 陽性グループでは陰性グループよりも *FAT4* の PMR は高い傾向が認められた。*H. pylori* 陰性グループ間の比較では、胃がん患者の *FAT4* の PMR は健常者よりも有意に高かったが、*H. pylori* 陽性グループ間の比較ではその逆であった。*H. pylori* の現感染を排除して、さらに胃粘膜の萎縮の有無で分類して解析すると、萎縮を認めるがん患者の非がん部の胃粘膜において PMR が高くなる傾向を認めた。

【結語】

FAT4 はヒト胃がんにおいてメチル化サイレンシングされることを示した。ヒト胃粘膜における *FAT4* のメチル化は、*H. pylori* 感染に関連しており、エピジェネティックな発がんの素地形成に関与している。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成28年2月22日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

胃がんは *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染によるメチル化の異常によって高度に影響される。すなわち、胃粘膜におけるメチル化異常の蓄積はエピジェネティックな胃発がんの素地の発達を誘導する。しかしながら、このような発がんの素地に関与する個々のドライバー遺伝子については不明な点が多い。本研究は、胃がんの新規のがん抑制遺伝子である *FAT4* がメチル化サイレンシングされ、さらにそのようなメチル化が胃がんのエピジェネティックな発がんの素地に関与していることを実証することを目的としたものである。

その結果、

(1) ヒト胃上皮細胞における *FAT4* の転写開始点を1箇所同定し、そのプロモーター領域に CpG island (CGI) が存在することを確認した。

(2) 13株の胃がん細胞株中2株(AGSおよびGC2)において *FAT4* は高度にメチル化されており発現も認められなかった。さらに、その2株において 5-aza-dC による *FAT4* の脱メチル化によって *FAT4* の発現は回復された。

(3) 胃がん患者の手術標本においても、82検体中12検体(14.6%)において *FAT4* のプロモーター領域はメチル化されていた。

(4) *FAT4* のメチル化と予後、腫瘍の進展度、リンパ節転移、組織型との間に関連は認められなかったが、CpG アイランドメチル化形質(CIMP)と関連していた。

(5) 健常者の *H. pylori* 陽性グループでは陰性グループよりも有意に *FAT4* の PMR は高かった。胃がん患者の *H. pylori* 陽性グループでは陰性グループよりも *FAT4* の PMR は高い傾向が認められた。*H. pylori* 陰性グループ間の比較では、胃がん患者の *FAT4* の PMR は健常者よりも有意に高かった。*H. pylori* の現感染を排除して、さらに胃粘膜の萎縮の有無で分類して解析すると、萎縮を認めるがん患者の非がん部の胃粘膜において PMR が高くなる傾向を認めた。

以上より、本論文は *FAT4* がヒト胃がんにおいてメチル化サイレンシングされることを示し、ヒト胃粘膜における *FAT4* のメチル化が *H. pylori* 感染に関連し、エピジェネティックな発がんの素地形成に関与していることを提示する研究であり、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538号		
学位授与の日	平成28年3月15日		
氏名	橋本 磨和		
学位論文の題目	Relationships of alcohol dehydrogenase 1B (<i>ADH1B</i>) and aldehyde dehydrogenase 2 (<i>ALDH2</i>) genotypes with alcohol sensitivity, drinking behavior and problem drinking in Japanese older men (日本人男性高齢者における <i>ADH1B</i> および <i>ALDH2</i> 遺伝子型とアルコール感受性、飲酒行動、問題飲酒との関連)		
論文審査委員	主査	教授 宮下和久	
	副査	教授 前田正信	教授 竹下達也

論文内容の要旨

【緒言】

アルコール摂取は日本において、男性で3番目、女性で11番目の死亡リスク因子である。また日本における飲酒量は欧米諸国と同程度に増加しつつあり、2003年の全国調査では、60歳代から70歳代の男性は高い割合で毎日飲酒していることが報告されている。現在、日本の65歳以上の高齢者の割合は全人口の25%に達しており、今後も上昇すると考えられていることから、高齢者におけるアルコールの乱用防止は非高齢者と同様、非常に重要である。

アルコール感受性や飲酒行動に影響を与える遺伝子多型として、東アジア人はアルコール脱水素酵素 (*ADH1B*) における rs1229984 と、アルデヒド脱水素酵素 (*ALDH2*) における rs671 を高頻度に有している。低活性型をコードする *ADH1B**1/*1 の保有者はアルコール感受性が低く、アルコール依存症や食道がんに対して高リスクを示す。また *ALDH2**2 アレル保有者では *ALDH2* 活性が低い、あるいは欠損しているため、*ALDH2* の遺伝子型はアルコール感受性と強い関連がある。したがって *ALDH2**2 アレル保有者は少量の飲酒でもフラッシング反応を示しやすく、飲酒量は少ない傾向にある。*ALDH2**1/*1、*1/*2、*2/*2 はそれぞれ、アルコール依存症、食道がん、心筋梗塞の高リスクとの関連が報告されている。

これまで、高齢者における *ADH1B* と *ALDH2* の遺伝子型とアルコール感受性や飲酒行動との関連は明らかになっていない。したがって本研究では、これらの遺伝子型とフラッシング反応や飲酒行動、問題飲酒との関連を、日本人男性高齢者および非高齢者において解析した。

【研究方法】

解析対象者は西日本のある地域在住で、2012年および2013年度に実施された生活習慣病予防健診を受診した35歳から88歳の男性718名である。本研究に関する書面での同意を得た対象者に、飲酒後の顔面フラッシング反応、飲酒習慣、問題飲酒、喫煙、歩行習慣と食習慣に関する自記式の質問を実施した。問題飲酒に関する質問にはCAGEを用い、構成される4つの質問のうち2つ以上に該当した対象者をCAGE陽性(問題飲酒者)とした。*ADH1B* と *ALDH2* の遺伝子型は、対象者の全血を用いてTaqMan probe法により決定した。

統計解析は、対象者を年齢の中央値で分けた高齢群(65歳以上)と非高齢群(65歳未満)でそれぞれ行った。CAGE陽性の頻度と上記の生活習慣の頻度との比較にはカイ二乗検定を用いた。遺伝子型間での飲酒後の顔面フラッシング、飲酒習慣、CAGE陽性の頻度の比較にはカイ二乗検定を用い、Bonferroni法により調整を行った。また、各遺伝子型のフラッシングへの影響を評価するために、BMIや生活習慣、飲酒量および*ADH1B*もしくは*ALDH2*遺伝子型で調整した多変量ロジスティック解析を行った。飲酒量(unit/day)の比較には、Kruskal Wallis testを用いた。年齢、BMI、生活習慣、*ADH1B*

および *ALDH2* 遺伝子型と CAGE 陽性との関連の解析には、単変量および多変量ロジスティック解析を用いた。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とみなした。

【結果】

対象者 718 名の年齢は 63.3 ± 10.8 歳 (平均 \pm 標準偏差) で、中央値 (IQR) は 64.0 (57.0, 70.0) であった。このうち非高齢群 (65 歳未満) は 361 名 (55.1 ± 8.2 歳)、高齢群 (65 歳以上) は 357 名 (71.6 ± 5.4 歳) であった。

生活・飲酒習慣と CAGE 陽性に関して、非高齢群では、週 3 日以上朝食を抜いている、毎日飲酒する、1 日 1 unit (合) 以上飲酒する群で CAGE 陽性の頻度が有意に高かった。また高齢群では、1 日 1 unit 以上飲酒する群で CAGE 陽性の頻度が有意に高かった。

本研究では「飲酒時にいつも顔が赤くなる」をアルコール高感受性の指標とし、遺伝子型間でその割合を比較した。その結果、高齢群におけるアルコール高感受性の割合は、*ADH1B*1/*2* で *ADH1B*2/*2* よりも有意に低く ($p < 0.01$)、この *ADH1B*1/*2* の *ADH1B*2/*2* に対する調整オッズ比も 0.42 (95% CI 0.24-0.72, $p < 0.01$) で有意であった。さらに年齢群とこれらの *ADH1B* との交互作用項も有意であった ($p < 0.01$)。この *ADH1B*1/*2* と *ADH1B*2/*2* における差は、*ALDH2* 遺伝子型により層別化した場合には見られなかった。

次に飲酒行動に関して、高齢群における *ADH1B*1/*2* の飲酒量は *ADH1B*2/*2* よりも多い傾向にあった ($p < 0.1$)。また毎日飲酒する割合は *ADH1B*1/*2* で *ADH1B*2/*2* よりも有意に高く ($p < 0.05$)、この *ADH1B*1/*2* の *ADH1B*2/*2* に対する調整オッズ比も 1.7 (95% CI 1.0-2.9, $p < 0.05$) で有意であったが、年齢群とこれらの *ADH1B* 遺伝子型との交互作用項は有意ではなかった。これらの差は、*ALDH2* 遺伝子型で層別化した場合には見られなかった。一方、非高齢群では *ADH1B* 遺伝子型間でフラッシングや飲酒行動の頻度に有意差は見られず、また両方の年齢群で *ADH1B* 遺伝子型間で CAGE 陽性の頻度に有意差は見られなかった。

ALDH2 に関して、非高齢群と高齢群の両方でアルコール高感受性者の割合は、*ALDH2*1/*1* では *ALDH2*1/*2* および *ALDH2*2/*2* よりも有意に低かった (それぞれ $p < 0.001$)。飲酒行動に関しても、両方の年齢群において *ALDH2*1/*1* は *ALDH2*1/*2* および *ALDH2*2/*2* よりも飲酒量は有意に多く (それぞれ $p < 0.001$)、飲酒頻度 (≥ 1.0 unit/day および毎日飲酒) も有意に高かった (それぞれ $p < 0.001$)。また両方の年齢群で、CAGE 陽性の頻度は *ALDH2*1/*1* が *ALDH2*1/*2* よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。

多変量ロジスティック解析の結果、高齢群で *ADH1B*1/*1* は問題飲酒 (CAGE 陽性) と正に関連する傾向 ($p < 0.1$) が見られたが、非高齢群では関連は見られなかった。また *ALDH2*1/*1* は、高齢群では問題飲酒と有意な正の関連 (オッズ比: 3.8, 95%CI: 1.5 - 9.3, $p < 0.01$) が見られ、非高齢群では正に関連する傾向が見られた ($p < 0.1$)。

【結語】

65 歳以上の日本人男性高齢者において、*ADH1B*1/*2* と *ADH1B*2/*2* との間でアルコール感受性に有意な差があることが初めて明らかとなった。また *ADH1B*1/*2* は *ADH1B*2/*2* より飲酒頻度が高いことが示唆された。今後、これらの遺伝子型と飲酒行動および飲酒関連の健康影響について、さらなる検討が必要である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成28年2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。

東アジア人はアルコール感受性や飲酒行動に影響を与える遺伝子多型として、アルコール脱水素酵素 (*ADH1B*) における rs1229984 と、アルデヒド脱水素酵素 (*ALDH2*) における rs671 を高頻度

に有しているが、これまで高齢者においてこれらの遺伝子多型の影響は検討されていない。今後、高齢者におけるアルコール関連問題の予防対策は益々重要になると考えられることから、本論文では、これらの遺伝子型とフラッシング反応や飲酒行動、問題飲酒との関連について、日本人男性高齢者および非高齢者において検討した。

2012年および2013年度生活習慣病予防健診を受診した日本人男性718名（63.3±10.8歳）を、高齢群361名（65歳以上、71.6±5.4歳）と非高齢群357名（65歳未満、55.1±8.2歳）に分けて解析した。遺伝子型間でのフラッシング、飲酒習慣、CAGE陽性（問題飲酒）の頻度の比較はカイ二乗検定（Bonferroni法で調整）により、また各遺伝子型のフラッシング及び飲酒行動への影響、年齢と遺伝子型との交互作用については多変量ロジスティック回帰分析により解析を行った。CAGE陽性とADH1BおよびALDH2遺伝子型との関連の解析には、多変量ロジスティック回帰分析を用いた。結果は以下の通りである。

- 1) 高齢群においていつもフラッシングが起こる頻度は、ADH1B*1/*2でADH1B*2/*2よりも有意に低く（ $p < 0.01$ ）、このADH1B*1/*2の調整オッズ比は0.42（ $p < 0.01$ ）であったが、非高齢群では有意差は見られなかった。年齢群とADH1B遺伝子型との交互作用項は有意であった（ $p < 0.01$ ）。
- 2) 高齢群において毎日飲酒する割合はADH1B*1/*2でADH1B*2/*2よりも有意に高く（ $p < 0.05$ ）、このADH1B*1/*2の調整オッズ比も1.7（ $p < 0.05$ ）であった。一方、非高齢群では有意差は見られなかった。年齢群とADH1B遺伝子型との交互作用項は有意ではなかった。
- 3) 多変量ロジスティック解析の結果、高齢群でのみ、ALDH2*1/*1は、問題飲酒と有意な正の関連（オッズ比：3.8、 $p < 0.01$ ）が見られた。

以上、本論文は、高齢群においてADH1BおよびALDH2遺伝子型とアルコール感受性、飲酒行動および問題飲酒との関連について検討した研究であり、高齢群ではADH1B*1/*2保有者でADH1B*2/*2保有者よりもアルコール感受性が有意に低いことを初めて明らかにした。

断面研究ではあるものの、これまで検討されてこなかった高齢群において、ADH1B*1/*2保有者とADH1B*2/*2保有者でアルコール感受性が異なることを明らかにし、飲酒行動にも差がある可能性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539号		
学位授与の日	平成28年3月22日		
氏名	水野 誠		
学位論文の題目	The effects of continuous application of sunscreen on photoaged skin in Japanese elderly people - The relationship with the usage - (日本人高齢者の光老化皮膚症状に対する日焼け止め料の長期使用の効果 - 使用量との関係 -)		
論文審査委員	主査	教授 朝村 真一	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 古川 福実

論文内容の要旨

【諸言】

しみやしわなどの皮膚の光老化症状は慢性の紫外線曝露によって引き起こされ、この予防には日焼け止め料などによる遮光が重要とされている。日焼け止め料の白人の光老化に対する予防効果は、長期介入試験により直接的に実証されている。しかし、日本人については、疫学調査等による報告はあるものの、長期介入試験によりこの効果を検証した研究は未だなされていない。そこで、今回我々は、日本人を対象にした日焼け止め料の長期介入試験を実施し、日本人の光老化症状に対する日焼け止め料の継続使用の有用性について臨床所見と機器測定の結果を基に評価を行った。

【方法】

・対象

日本人高齢者 14 例（男性 7 例、女性 7 例、62 歳～91 歳、平均年齢 79.6 歳）を対象とした。

・日焼け止め料

紫外線防止効果 SPF30PA+++ の日焼け止め料を試料として用いた。被験者には 18 か月間毎朝露光部に日焼け止め料を塗布させた。

・測定検査項目

1) 臨床症状

試験開始時から終了時まで 6 か月毎計 4 回、皮膚科専門医が被験者の皮膚症状ならびに日焼け止め料による有害事象の有無についての診察を行った。

2) 角層パラメーター

試験開始時および終了時に被験者の角層水分量ならびに経表皮水分喪失量 (TEWL) を測定した。角層水分量は Corneometer® (Courage+Khazaka, ドイツ)、TEWL は Tewameter® TM300 (Courage+Khazaka, ドイツ) を用いて測定した。

3) 光老化指標

顔面部のしみの数、しわの数、皮膚色調のむらの程度を光老化の指標とした。試験開始時から終了時まで 6 か月毎計 4 回、被験者の顔面部写真を撮影、VISIA® Complexion Analysis (Canfield Scientific, 米国) を用い、試験前後の顔面部のしみ、しわの数、皮膚色調むらの程度を解析した。

4) 日焼け止め料の使用量

日焼け止め料の使用量は 6 ヶ月毎の診察時に、日焼け止め料の使用済み容器を回収し、その重量を計測することにより算出した。

・統計学的解析

試験前後における角層水分量、TEWL、しみの数、しわの数、ならびに色むらの程度の比較には paired t-test を用いた。日焼け止め料の使用量と角層・光老化の各種パラメータ変化量との相関性については Pearson の積率相関係数より評価した。さらに、この相関に関しては単回帰分析から回帰式を求め解析を行った。いずれも $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

解析はすべて統計解析ソフト jmp® 9 (SAS Institute Inc., 米国) にて行った。

【結果】

1) 臨床症状の変化

試験開始時、多くの被験者に皮膚の乾燥症状が認められた。さらに一部の被験者においては、皮膚の落屑症状や紅斑症状が確認された。

試験終了時、乾燥や落屑の症状が緩和され、一部の被験者においては紅斑症状の改善も認められた。なお、試料による有害事象はなかった。

2) 角層・光老化パラメータの変化

角層水分量は試験後有意に増加した。しかし、TEWL、しみの数、しわの数、色むらの程度の他の因子については試験前後での有意な変化は認められなかった (paired t-test)。

3) 日焼け止め使用量

使用量は 30.1 ± 15.0 (g/month) で、個人差が大きかったことが確認された。なお、男女間での差は認められなかった。

4) 日焼け止め使用量と角層・光老化パラメータの変化量との相関

各種パラメータと使用量との相関を単回帰分析から解析した。その結果、日焼け止め料の使用量と、しみの数、ならびに色むらの程度の改善度とに有意な相関が確認された。また、日焼け止め 18 ヶ月間未使用時にはしみの数、色むらの程度は悪化すること、また、18 ヶ月間でこれら症状を維持するには 20 g/month 以上の日焼け止め料の使用が必要なが推測された。

5) 皮膚のバリア状態の変化解析

TEWL 変化パターンの解析より、試験後の測定値の被験者間のばらつきが減少が確認できた。これは、試験前、異常な状態だった被験者の皮膚バリア機能が、試験後に正常な状態に回復したことを示すものだった。

【結論】

日本人においても日焼け止め料の長期使用によりしみの数や皮膚の色むらなどの光老化症状の進行が抑制されることが示唆された。また、抑制の程度は日焼け止め料の使用量に大きく依存しており、光老化抑制作用を得るためには、日焼け止め料の適切使用が重要であることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

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

皮膚の光老化症状は慢性の紫外線曝露によって引き起こされ、この予防には日焼け止め料などによる遮光が重要とされている。しかし、日本人においては、これまで臨床的にこの効果を示した研究報告はなく、未だに光老化防止が日焼け止め料の効能として認められていない状況にある。本研究では日本人高齢者を対象にした日焼け止め料の長期介入試験を実施し、日本人の光老化症状に対する日焼け止め料の継続使用の有用性について臨床所見と機器測定の結果を基に検討を行った。

日本人高齢者 14 例を対象とし、紫外線防止効果 SPF30PA+++ の日焼け止め料を 18 か月間毎朝露光部に塗布させた。試験開始時から終了時まで 6 か月毎計 4 回、被験者の皮膚症状の観察を行い、角層水分量、経表皮水分喪失量 (TEWL)、顔面部のしみの数、しわの数、皮膚色調のむらの程度についての機器測定を実施した。

その結果、皮膚の乾燥症状の緩和が多くの被験者に認められ、一部の被験者においては落屑、紅斑症状の改善が確認された。また、角層水分量は試験後の有意増加が確認できた。しみの数等の光老化因子については試験前後での有意変化は認められなかったが、日焼け止め料使用量と各種光老化因子との相関についての単回帰分析では、使用量と、しみの数、ならびに色むらの程度の改善度とに有意な相関が確認された。また、18 ヶ月間でこれら症状を維持するには 20 g/month 以上の日焼け止め料の使用が必要なが推測された。

本研究により日本人においても日焼け止め料の長期使用によりしみの数や皮膚の色むらなどの光老化症状の進行が抑制されることが示唆された。また、光老化症状の抑制の程度は日焼け止め料の使用量

に大きく依存しており、光老化抑制作用を得るためには、日焼け止め料の適切使用が重要であることが示唆された。

本論文は、日焼け止め料が日本人の光老化症状の予防に有用であることを検討し、その効果を臨床的に示した本邦初の長期介入試験に関する論文であり、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第917号		
学位授与の日	平成27年5月12日		
氏名	小林悠佳		
学位論文の題目	Macrophage-T cell interactions mediate neuropathic pain through the glucocorticoid-induced tumor necrosis factor ligand system (GITRL system を介したマクロファージ-T 細胞間相互作用は神経障害性疼痛を伝達する)		
論文審査委員	主査	教授 川股知之	
	副査	教授 伊東秀文	教授 岸岡史郎

論文内容の要旨

[緒言]

神経障害性疼痛は、傷害神経の治癒後も痛みが遷延し、従来の鎮痛薬に抵抗性を示すため、有効な治療法の確立が急務とされている。その病態は複雑かつ多岐に渡り、明確な機序は明らかにされていない。しかし近年、その病態基盤には慢性神経炎症と免疫細胞の活性化が重要な役割を担うと考えられてきた。そこで痛み慢性化の機序を明らかにすべく免疫細胞の機能に焦点を当てた研究がなされてきたが、未だに十分な知見が得られておらず、免疫細胞間クロストークの重要性を実証した報告も数少ない。

腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor; TNF) 受容体スーパーファミリーに属する glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) およびそのリガンドである GITRL は、それぞれ活性化 T 細胞およびマクロファージに多く発現している。これら免疫細胞間の GITRL-GITR 経路は免疫系活性化の調節に寄与し、多発性硬化症を代表とする自己免疫疾患や、呼吸器系および消化器系における炎症性疾患など免疫系の異常を伴う疾患と密接に関連すると考えられている。しかし、神経炎症を伴う神経障害性疼痛における GITRL-GITR 経路の役割についての報告はない。

本研究では、マクロファージおよび T 細胞による GITRL-GITR 経路に着目し、慢性疼痛におけるこれら免疫細胞間の活性化経路の役割を明らかにすることにより、慢性疼痛の病態基盤解明に新たな知見を提示することを目標とした。

[方法]

ICR 系雄性マウスを用い、後肢坐骨神経を部分結紮 (Partial sciatic nerve ligation; PSL) し、神経障害性疼痛モデルを作製した。対照群 (Sham) は、坐骨神経の露出のみを行った。神経障害性疼痛の特徴的的症状である熱痛覚過敏および触アロディニアはそれぞれ Hargreaves test および von Frey test で評価した。Hargreaves test は、ガラス板上で馴化させたマウスの後肢足底に輻射熱を照射し、逃避反応潜時で評価した。von Frey test は、金網上で馴化させたマウスの後肢足底を屈曲圧 0.07 g の von Frey フィラメントで刺激した際の逃避反応回数で評価した。Enhanced green fluorescent protein (EGFP)キメラマウスは、EGFP トランスジェニックマウスの大腿骨から骨髓細胞を採取し、あらかじめ放射線 (10 Gy, 25 min) 照射した野生型マウスの尾静脈から EGFP 陽性骨髓細胞 (2×10⁵ cells) を投与することで作製した。全身のマクロファージを枯渇するため、Liposomed clodronate (clo)を PSL 前日および PSL 後 4 日目に計 2 回、または Clophosome-A™ (clo-A)を PSL 前日に 1 回、尾静脈内投与した。また、T 細胞の機能を抑制するため、CD4 中和抗体を PSL 前 12 および 17 日目に計 2 回、または FTY720 を PSL 直後から PSL 後 7 日目まで 1 日 1 回計 8 回、腹腔内投与した。これらの薬物の効果は、腹腔マクロファージおよび末梢血液中の T 細胞を用いた Flow cytometry により確認した。局所のマクロファージを枯渇するため、clo-A を PSL 直後、PSL 後 2, 4, 6 日目に計 4 回、また、局所の GITRL-GITR 経路を遮断するため、

GITRL 中和抗体を PSL 直後、PSL 後 3, 6, 9, 12 日目に計 5 回、投与液量 10 μ L として傷害坐骨神経周囲へ局所投与した。Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction および免疫染色は定法に従った。

[結果]

PSL による傷害坐骨神経において、マクロファージマーカー (CD11b, CD14) および T 細胞マーカー (CD4, CD25) mRNA の発現増加が観察された。免疫組織学的に、PSL 後の傷害坐骨神経に F4/80 陽性マクロファージおよび CD4 陽性 T 細胞の集積が認められた。EGFP キメラマウスに PSL を施行すると、傷害坐骨神経に多数の EGFP 陽性細胞が認められ、血管から漏出した骨髄細胞が坐骨神経の傷害部位に集積することが明らかになった。さらに、EGFP 陽性細胞は F4/80 陽性細胞および CD4 陽性細胞と一致し、PSL により傷害坐骨神経に集積した細胞は、骨髄由来のマクロファージおよび CD4 陽性 T 細胞であった。マクロファージ枯渇薬である clo 全身投与により PSL 後 7 日目における熱痛覚過敏および触アロディニアは減弱し、clo-A 全身投与により PSL 後 4 日目における熱痛覚過敏は減弱した。さらに、clo-A を傷害坐骨神経周囲に局所投与し、そこに集積するマクロファージを枯渇すると、PSL 後傷害坐骨神経における炎症性サイトカイン (IL-1 β , TNF α) mRNA の発現増加および GITR 陽性 T 細胞の遊走が阻害された。次に、PSL により誘発される熱痛覚過敏および触アロディニアは、T 細胞の機能を抑制する CD4 中和抗体または FTY720 の全身投与により有意に減弱した。さらに、PSL 後傷害坐骨神経において GITRL および GITR mRNA の発現増加が観察され、その経時的変化はマクロファージマーカーおよび T 細胞マーカーのそれと類似していた。また、GITRL および GITR は傷害坐骨神経に遊走する F4/80 陽性マクロファージおよび CD4 陽性 T 細胞にそれぞれ局在していた。GITRL 中和抗体を傷害坐骨神経周囲に局所投与し、GITRL-GITR によるマクロファージ-T 細胞間活性化経路を遮断することで PSL 誘発性熱痛覚過敏および触アロディニアは有意に軽減された。さらに、GITRL 中和抗体の傷害坐骨神経周囲投与は PSL 後傷害坐骨神経に集積する F4/80 陽性マクロファージおよび GITR 陽性 T 細胞の遊走を阻害した。

[考察および結論]

坐骨神経傷害により様々な炎症性細胞が傷害坐骨神経周囲に集積し、それらの細胞に由来する液性因子を介する神経炎症が神経障害性疼痛の病態を担うことが報告されている。本研究では、神経傷害後早期にマクロファージ、次いで T 細胞が傷害坐骨神経に走行する末梢血管を介して集積することを明らかにした。また、マクロファージ枯渇薬の傷害坐骨神経周囲への局所投与により、PSL 誘発性神経障害性疼痛が抑制されたことから、マクロファージ由来の炎症性メディエーターが神経障害性疼痛に関与すると考えられた。さらに、マクロファージ-T 細胞間に存在する GITRL-GITR 経路の遮断により神経障害性疼痛が抑制され、GITRL-GITR 経路の活性化が神経炎症の進展に重要であることが明らかとなった。以上の結果より、GITRL-GITR 経路を介したマクロファージ-T 細胞間活性化は神経障害性疼痛の病態メカニズム解明を担う新たな病態基盤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27年4月15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。

神経障害性疼痛は持続的な痛覚過敏およびアロディニアを特徴とする。その病態は複雑かつ多岐に渡り、従来の鎮痛薬が著効を示さないため、新規治療標的の探索が急がれている。近年では、神経傷害後の中枢および末梢神経系における免疫系活性化の重要性が多数報告されている。しかし、神経障害性疼痛の病態機構の詳細については未だ不明な点が多い。本論文では、神経障害性疼痛モデルを用いて神経障害性疼痛におけるマクロファージおよび T 細胞の役割、さらにこれらの免疫細胞間の活性化経路である Glucocorticoid induced-tumor necrosis factor receptor ligand (GITRL)-GITR 経路の役割について検討した。

ICR系雄性マウスを用い、坐骨神経部分結紮により神経障害性疼痛モデルを作製した。マクロファージ枯渇薬であるリポソーム化クロドロネートは、尾静脈内投与および神経周囲局所投与とした。循環血液中のT細胞を減少させるため、CD4中和抗体の尾静脈内投与またはFTY720の腹腔内投与を行った。GITRL中和抗体の神経周囲局所投与によりGITRL-GITR経路を遮断した。RT-PCRおよび免疫染色は従来の方法に従った。得られた結果は以下の通りである。

- 1) 傷害神経において、F4/80陽性マクロファージおよびCD4陽性T細胞の集積が認められた。また、EGFP陽性骨髄細胞の移植により作製したEGFPキメラマウスの傷害神経においてEGFP陽性細胞が多数集積し、EGFP陽性細胞はF4/80およびCD4陽性細胞に一致していた。
- 2) リポソーム化クロドロネート処置により、熱痛覚過敏および触アロディニアが抑制された。また、リポソーム化クロドロネートの坐骨神経周囲局所投与により、傷害神経におけるIL-1 β およびTNF α の発現増加およびT細胞の集積が抑制された。
- 3) CD4中和抗体およびFTY720の処置により、熱痛覚過敏および触アロディニアが抑制された。
- 4) 傷害神経においてGITRLおよびGITRの発現増加が認められた。また、GITRLおよびGITRは、傷害神経周囲に集積したF4/80陽性マクロファージおよびCD4陽性T細胞にそれぞれ局在していた。
- 5) GITRL中和抗体の処置により、熱痛覚過敏および触アロディニアが抑制され、F4/80陽性マクロファージおよびCD4陽性T細胞の集積が阻止された。

以上、本論文は、GITRL-GITR 経路を介したマクロファージ-T 細胞間クロストークが傷害神経における神経炎症を促進する新規因子であることを見出し、GITRL-GITR 経路の遮断が神経障害性疼痛の新規治療戦略になり得る可能性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)乙第918号		
学位授与の日	平成27年5月12日		
氏名	川 副 友		
学位論文の題目	The impact of inspiratory pressure on stroke volume variation and the evaluation of indexing stroke volume variation to inspiratory pressure under various preload conditions in experimental animals (様々な前負荷状態において吸気圧が SVV に与える影響および吸気圧による指数化SVVに関する動物研究)		
論文審査委員	主査	教授 前田 正信	
	副査	教授 川股 知之	教授 加藤 正哉

論文内容の要旨

【背景および目的】

陽圧換気下における循環の指標である Stroke Volume Variation (以下 SVV) は輸液反応性を表し、確かな輸液管理を可能にする。我々は前負荷を変化させた動物において最大吸気圧 (以下 PIP) が SVV に及ぼす影響を明らかにし、SVV を PIP によって指数化することでその影響を軽減できるかを調べた。

【方法】

この研究は大阪府立大学獣医学科内研究室における実験犬を用いた前向き共同研究である。動物研究における倫理審査は大阪府立大学倫理審査委員会により実施され、承認されている。全身麻酔下人工呼吸器管理とした健常な9頭の実験犬 (10-12 kg) に対して、少量 (10ml/kg) 出血モデルおよび中等量 (20ml/kg) 出血モデルを作成した。正常モデル、少量出血モデル、中等量出血モデルにおいて PIP を最低 5 mmHg から 4 mmHg 毎に 21 mmHg まで5段階に上昇させ、SVV、SV、CVP、MAP、HR を測定した。

【結果】

PIP は、COtd を HR で除して求めた Stroke Volume (SVtd) とは独立して SVV と比例した ($P < 0.01$) が、PIP は CVP、MAP には影響しなかった (Table 1, Figure 1)。また吸気圧と SVV の回帰係数は base line、mild hemorrhage、moderate hemorrhage それぞれにおいて 0.59、0.86、1.4 であり上昇傾向を示した。two-way repeated measures ANOVA による解析では PIP 上昇と血液容量減少の SVV への影響には相互作用があることが証明された ($P < 0.01$) (Figure 2)。また PIP に指数化した SVV は、PIP が 9cmH₂O よりも大きい時、PIP の影響を受けずに出血の程度を反映した (Table 2)。

【考察および結論】

われわれは実験動物において PIP の SVV への影響と血液容量の SVV に対する影響が相互作用をもつことを証明した。これは先に証明されている人工呼吸によって生じる最大 SV と最少 SV の発生機序を加味すれば説明される。つまり吸気時に肺血管から血液が圧出されることによる一時的に生じる左室容量増加 (最大 SV) とそれにつづく肺血管内容量および左室容量の減少 (最少 SV) である。血管内容量と一回拍出量の関係はそもそも Cardiac function curve にて説明されるが、呼気時に一定化する SV (SVref) と SV 変化 (Δ SV) を考えることで、その曲線上で最大 SV と最少 SV を描写することができ、左室容量と SV 変化、SVV 変化を分かりやすく説明することができた (Figure 3)。また PIP および一回換気量が SVV と正の相関関係にあるから、Vistisen らによる研究において SVV を一回換気量で除して求めた indexed dynamic parameters が低容量換気において parameter の輸液反応性としての精度を改善したと報告していることが理解でき、SVV を PIP で指数化することを検討する妥当性があるものと考えられた。SVV の PIP による指数化は、PIP が 9cmH₂O 以上であれば PIP

によって生じる SVV の変化をなくすことができたが、PIP が小さければ指数化しても有用でない可能性があった。

今回我々の研究で SVV が血液容量減少状態でも PIP と相関すること、その相関が血液容量減少の程度と相互作用を持つことを実証し、さらには SVV の PIP による指数化の可能性を検討した。これらによって集中治療における様々な人工呼吸器設定によっても SVV を正しく解釈をする一助となり、急性期重症患者管理に貢献すると考える。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 4 月 17 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

Stroke Volume Variation（以下 SVV）は人工呼吸によって生じる一回拍出量: Stroke Volume（以下 SV）の変化率であり、循環血液量の増減により迅速に反応する動的指標とされる。SVV を指標に用いると、ショック患者や敗血症患者において輸液の必要性を簡便に理解でき、的確な輸液管理が可能になる。昨今では救急集中治療領域にも広く使用されるようになったが、ARDS 患者に用いる低容量換気では SVV の信頼性が低下するなど、SVV は換気方法によって影響を受けてしまうことが分かっている。本論文は、陽圧換気下における循環の指標である SVV が最大吸気圧: Peak Inspiratory Pressure（以下 PIP）によって受ける影響を解明し、さらに SVV を PIP によって除して求めた指数化 SVV（以下 indexed SVV）が PIP による影響を受けにくい指標となりうるかを調べたものである。

方法は、全身麻酔下人工呼吸器管理とした健常な 9 頭の実験犬（10-12 kg）を用い、正常モデル、少量出血モデル（10ml/kg 脱血）、中等量出血モデル（20ml/kg 脱血）において PIP を最低 5 mmHg から 4 mmHg 毎に 2 1 mmHg まで 5 段階に上昇させ、SVV の変化を記録した。SVV と PIP および前負荷の関係、Indexed SVV と PIP および前負荷の関係を検討した。

結果、SVV が前負荷に関する指標であるにもかかわらず、前負荷が一定の状態でも SVV は PIP に相関して大きくなった。さらに、前負荷の減少と PIP の SVV への影響には相互作用があり、前負荷が少なくなると PIP による SVV の変化が大きくなった。Indexed SVV は PIP が 5cmH₂O よりも大きい時、PIP の影響を受けずに出血の程度を反映する指標であった。つまり、ある一定の条件下では、indexed SVV が PIP の影響を受けずに前負荷の状態を反映することを示唆している。

本研究は、SVV と PIP の相関関係、SVV と PIP および前負荷との相互作用を示し、indexed SVV が PIP の影響を受けない循環の指標となる可能性を示した。本論文は SVV に関するさらなる研究の礎となり、臨床現場において急性期循環管理に貢献しうることから、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第919号		
学位授与の日	平成27年7月14日		
氏名	Anselm Ting Su (徐廷)		
学位論文の題目	A Comparison of Hand-arm Vibration Syndrome between Malaysian and Japanese Workers (マレーシア人労働者と日本人労働者における手腕振動障害の比較)		
	Dose-response relationship between hand-transmitted vibration and hand-arm vibration syndrome in a tropical environment (熱帯環境における手腕振動と手腕振動障害の量・反応関係)		
論文審査委員	主査	教授 竹下 達也	
	副査	教授 前田 正信	教授 宮下 和久

論文内容の要旨

INTRODUCTION

Hand-arm vibration syndrome (HAVS) is a well-recognized health disorder in temperate climate countries because of the appearance of its peripheral circulatory disturbances, especially the “white fingers,” along with its neurological disorders such as tingling, numbness and dullness of the fingers during cold seasons. The condition, however, has not been clearly demonstrated in the tropical environment. A recent systematic review of HAVS in tropical environment – which found only six papers on cross-sectional studies among vibratory tools workers in Singapore, Indonesia, Papua New Guinea, Southern Vietnam and Malaysia – revealed that none the studies reported vibration white finger in the tropical environment and the symptoms have been predominantly neurological. The quality of the studies included in the review was generally poor and the results could not be aggregated and compared with the published results from the United States National Institute of Occupational Safety and Health (US NIOSH) because the exposure and outcome information collection methods were not standardized. There was no previous study comparing the clinical outcomes of hand-transmitted vibration between the tropical and temperate environments. In Malaysia, periodic medical examinations for vibratory tools workers are not performed routinely because there is no provision under the national legislative framework due to unavailability of clinical evidence on the occurrence of HAVS in tropical environment. As there was no medical surveillance among workers exposed to hand-arm vibration, the extent of the occurrence of HAVS in this country is unknown. The aim of this paper was to compare the clinical features of HAVS in the tropical environment against cases from temperate climate environment who have more established and distinct characteristics. It is important to understand the differences in the clinical features of HAVS between the tropical and temperate environments, as this will affect both the clinical management and the formulation of national preventive measures against HAVS in tropical environments.

METHODS

Study design

This was a cross-sectional study, comparing the clinical characteristics of HAVS between Malaysian (tropical environment) and Japanese (temperate environment) workers.

Malaysian subjects

A total of 172 male Malaysian workers, comprised of 31 tree fellers, 31 construction workers and 110 automobile manufacturing plant workers were recruited. The construction workers used mainly concrete breakers, grinders, impact drills and powered cutters in their daily work. The forestry workers used only chain saws for tree-felling. The automobile manufacturing workers used mainly impact wrenches in their daily work.

Japanese subjects

The Japanese workers consisted of 385 male forestry workers who had undergone annual field medical examination by Wakayama Medical University. They were tree fellers who used mainly chain saws and brush cutters in their daily work.

Tests methodology

The test procedures for Malaysian subjects followed the test procedures utilized by Wakayama Medical University for annual medical examination for the cohort of 385 Japanese forestry workers, except for cold water immersion test. It consisted of questionnaire interview (employment history, type of vibratory tools used, daily, yearly and total years of vibration exposure and HAVS symptoms – tingling, numbness and dullness; white finger; finger coldness; musculoskeletal pain of the upper limbs), clinical physical examination (measurement of height, weight, blood pressure, pulse rate and an evaluation of the muscle power, range of movement and reflexes of the upper limbs) and specific hand examination (measurement of finger skin temperature, finger nail capillary return time, finger vibrotactile perception threshold (VPT), hand grip strength and pinch strength and a cold water immersion test). The cold water immersion test for Malaysian subjects utilized 5°C and a one minute immersion method. A group of 21 Japanese tree fellers confirmed to have HAVS were selected and underwent the same 5°C, one minute immersion cold water immersion test in order to facilitate comparison. We also measured the vibration exposure level for all Malaysian subjects and the selected 21 Japanese tree fellers.

Comparisons methods

1. Comparison between Malaysian and Japanese vibratory tools workers

We randomly matched 172 out of 385 Japanese cohort workers to the Malaysian workers individually according to the total years (± 2.5 years) of vibration exposure. We compared the total operating time, prevalence of white finger, finger coldness, finger tingling, numbness and dullness, pain of the upper limb, finger temperatures and finger VPTs between the two groups.

2. Comparison between Malaysian forestry workers and Japanese tree fellers with HAVS

We compared the outcomes of the 31 Malaysian tree fellers against the 21 selected Japanese tree fellers with HAVS symptoms. For the purpose of the baseline comparison, we also included all 15 Malaysian forestry workers in the same logging camp who had not used vibratory tools as control subjects. The outcomes compared were the prevalence of white finger, finger coldness, finger tingling, numbness and dullness, pain of the upper limb, finger temperatures, finger VPTs and cold water immersion test finding.

Dose response relationship

The life time vibration dose, total operating time and cumulative exposure index for all Malaysian subjects were calculated and regressed against the symptoms of HAVS. The correlation between each vibration exposure dose and the hand function evaluation results was analyzed.

Statistical analysis

Data entry, data cleaning and data analysis were performed using Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS) software version 19. We utilized nonparametric tests for the comparisons of quantitative data. The distribution of the symptoms of HAVS and other

categorical data were analyzed using the chi-square test. The dose response relationship was analyzed by calculating the adjusted prevalence ratio using general linear model Poisson distribution function from STATA Intercooled version 11. The Spearman r correlation was used to analyze the association between two quantitative variables.

RESULTS

1. Comparison between Malaysian and Japanese vibratory tools workers

None of the Malaysian workers reported white finger, whereas two of the Japanese workers reported the occurrence of white finger during winter. The prevalence of finger tingling, numbness and dullness among the Malaysian and Japanese workers were 25.0% and 21.5% respectively ($p = 0.444$). There was no difference in the finger coldness and musculoskeletal pain of the upper limbs between the two groups. Malaysian workers had lower finger skin temperatures and higher VPTs compared to Japanese subjects. There were no differences in the finger nail capillary return time, hand grip strength and pinch grip strength between the two groups.

2. Comparison between Malaysian forestry workers and Japanese tree fellers with HAVS

The Japanese tree fellers were confirmed cases of HAVS and hence had the highest prevalence of HAVS symptoms (finger tingling, numbness and dullness; white finger; finger coldness; pain of the fingers and hands). They were older and had longer total years of vibration exposure, but with lower frequency of yearly exposure days than the Malaysian tree fellers. Although none of the Malaysian forestry workers reported white finger, the prevalence of finger coldness was as high as Japanese tree fellers. Malaysian tree fellers had a higher prevalence of finger tingling, numbness and dullness, finger coldness, and pain of the upper limbs as compared to Malaysian controls. The finger skin temperatures of the Malaysian tree fellers were consistently lower than those of the Japanese tree fellers and significantly lower than those of the control subjects for some of the fingers. The VPTs for both Malaysian and Japanese tree fellers were significantly higher than those of the control subjects for most fingers. Malaysian tree fellers had weaker hand grip and pinch strength than the controls but stronger than the Japanese tree fellers. The cold water immersion test showed a similar temperature change curve for all three groups of workers. Both Malaysian and Japanese tree fellers recorded significantly higher VPTs after cold water immersion than the control subjects.

3. Dose response relationship

The adjusted prevalence ratio for finger tingling, numbness and dullness was 3.34 (95%CI = 1.27 to 8.98) for subjects with log lifetime vibration dose (lnLVD) of $\geq 20 \ln m^2 s^{-4}$ against those $< 16 \ln m^2 s^{-4}$. Similar dose response pattern was found for log cumulative exposure index (lnCEI) but not for log total operating time (lnTOT). The adjusted prevalence ratio for finger coldness showed non-statistically significant increase with both lnLVD and lnCEI. Vibrotactile perception thresholds correlated moderately with lnLVD and lnCEI. The relationship between 8-hour time weighted average vibration exposure (A(8)) and years of vibration exposure for neurological symptoms follows the similar pattern as finger blanching reported in ISO 5349-1 documentation.

CONCLUSIONS

Hand-arm vibration syndrome presents with predominantly neurological symptoms in the tropical environment. Deterioration in the sensory function of the hands is likely to precede the symptoms. The severity of sensory function disorders among the vibratory tool workers in the tropical environment is as bad as the temperate environment. Vascular disturbances do occur in the tropical environment but do not present clinically. Finger coldness is an important surrogate symptom for vascular disorder in tropical environment. The dose response relationship of HAVS

in a tropical environment is valid for finger tingling and numbness. The relationship between A(8) and years of vibration exposure for neurological symptoms follows the similar pattern as finger blanching reported in ISO 5349-1 documentation. The LVD and CEI are more useful than TOT when evaluating the dose-response pattern of a heterogeneous group of vibratory tools workers. Hand-arm vibration syndrome should be treated with equal importance in tropical countries as temperate countries. It is proposed to include the dose response relationship information for neurological symptoms in ISO5349-1 to facilitate its application in tropical environment. The results of this study serve as an evidence to formulate a national legislative framework to protect the health of the workers exposed to hand-transmitted vibration in tropical countries.

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年1月7日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

手腕振動障害は寒冷環境を伴う温帯での研究が主体で、熱帯での研究は限られている。本研究は、熱帯での手腕振動障害の発生状況および臨床的特徴を検討し、同時に温帯環境との差異について比較検討したものである。

マレーシア人振動工具取扱い男性労働者172人（林業、建設業、自動車工業に従事）を対象に、振動障害健康診断を実施した。質問票による振動ばく露歴および手腕振動障害症状（手指のしびれ、白指現象（レイノー現象）、手指の冷え症状、上肢筋骨格系の痛み）の調査、医師による診察、振動感覚閾値測定、手指皮膚温測定、冷水浸漬試験（5℃1分法）などの検査を実施した。これらマレーシア人労働者と、日本人林業労働者385人のうち、振動ばく露年数でマッチした172人および手腕振動障害を有する日本人林業労働者21人との間で、症状および検査所見について比較検討した。さらに、マレーシア人労働者における振動ばく露と手腕振動障害の量・反応関係を評価した。3種類の振動ばく露量（①lifetime vibration dose (LVD)、②total operating time (TOT)、③cumulative exposure index (CEI)）を計算し、それらの対数値の手腕振動障害症状に対する調整有病率比を算出するとともに、振動感覚閾値等検査所見との相関を評価した。

振動障害の典型症状とされる白指現象はマレーシア人労働者では認められなかった。マレーシア人労働者と日本人労働者を比較すると、手指のしびれ症状を訴える頻度は同程度に認められた（マレーシア 25.0%、日本 21.5%、 $p=0.444$ ）。手指の冷え症状、上肢筋骨格系の痛みも同程度に認められた。検査所見として、マレーシア人労働者は日本人林業労働者に比べて、振動ばく露年数が短いにもかかわらず、手指皮膚温が低値で、振動感覚閾値が高値であった。

マレーシア人の振動障害の量・反応関係について、LVD 高値の、手指のしびれ症状に対する調整有病率比は 3.34（95%信頼区間 1.27~8.98）であった（ $\ln LVD \geq 20 \ln m^2 s^4$ 対 $< 16 \ln m^2 s^4$ ）。同様の量・反応関係は CEI でも認められたが、TOT では認められなかった。振動感覚閾値は、 $\ln LVD$ および $\ln CEI$ と中等度の相関を示した。

熱帯環境では、手腕振動障害の循環障害である白指現象が認められず、主たる症状としてはしびれなどの神経障害が認められた。これは、環境要因としての寒冷が大きく影響していると考えられる。一方、熱帯地域における、振動レベルを加味した手腕振動ばく露指標（LVD、CEI）と手腕振動障害の量・反応関係は、手指のしびれ症状、振動感覚閾値において認められた。これらのことから、熱帯地方における手腕振動障害は温帯地域のそれと臨床像は若干異なるが神経障害を主体とする障害が存在していた。

以上、本論文は、熱帯環境における手腕振動障害の臨床的特徴を明らかにし、今後の熱帯の振動工具取扱い作業における労働衛生管理に寄与すると考えられ、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第920号		
学位授与の日	平成27年7月14日		
氏名	本田 賢太郎		
学位論文の題目	Graft flow assessment using a transit time flow meter in fractional flow reserve-guided coronary artery bypass surgery (冠血流予備量比に基づいた冠動脈バイパス術の、術中グラフト流量に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 前田 正信	
	副査	教授 赤阪 隆史	教授 岡村 吉隆

論文内容の要旨

【はじめに】冠動脈バイパス術は、有意狭窄病変を認める冠動脈に対して、狭窄部の末梢にグラフトを吻合し心筋虚血を改善する。従来この狭窄度評価には解剖学的方法が用いられてきたが、生理学的方法の重要性が認識され、生理学的评价法の一つである FFR : Fractional flow reserve が用いられるようになった。

【目的】FFR を用いて冠動脈狭窄度を評価し、術中グラフト流量、グラフトと自己冠動脈の血流競合、術後のグラフト開存率について検討すること。

【対象および方法】当院で冠動脈バイパス術を受けた患者のうち、術前に左冠動脈前下行枝 (LAD) の FFR を測定し、'in-situ' の内胸動脈 (ITA) を用いて LAD にバイパス術を施行した 72 症例。術中に TTFM を用いて Mean graft flow、Pulsatility index (PI : 吻合の質の指標であり、PI<3.0 であれば良好なグラフト、 $3 \leq PI < 5.0$ では血流競合)、Systolic reverse flow (SRF: 全血量の 3%以上あれば血流競合とされている)の有無について評価し、術後にグラフトの開存について評価を行った。男性 56 例、女性 16 例で平均年齢は 68.4 歳。術前の FFR 値から Group S : 高度狭窄群 (FFR<0.70)、Group M : 中等度狭窄群 ($0.70 \leq FFR < 0.75$)、Group N : 軽度狭窄群 ($0.75 \leq FFR$) の 3 群に分け比較検討した。

【結果】72 症例中 Group S は 44 例、Group M, N がそれぞれ 14 例。TTFM の結果、Mean graft flow は Group S, M, N でそれぞれ 24.7 ± 10.6 ml/min, 19.2 ± 14.0 ml/min, 16.0 ± 9.7 ml/min で 3 群間で有意差を認めた ($p = 0.009$)。PI は Group S, M, N でそれぞれ 2.35 ± 0.6 , 3.02 ± 1.1 , 5.51 ± 8.20 であり 3 群間で有意差を認めた ($p = 0.038$)。 $3.0 \leq PI$ であった症例の割合は Group S, M, N でそれぞれ 10 (23.2%), 5 (35.7%), 6 (42.9%) であり 3 群間に有意差はなかった。SRF を認めた症例は Group S, M, N でそれぞれ 3 (6.8%), 5 (35.7%), 4 (28.6%) で 3 群間に有意な差を認めた ($p = 0.023$)。術後グラフト評価では血流競合を示唆する Distal thread sign が、Group S, M, N でそれぞれ 2 (4.2%), 3 (21%), 6 (50%) であり、自己冠動脈の狭窄度が強い群で Distal thread sign は少ない結果となった ($p = 0.002$)。

【考察】本研究の結果から術前の冠動脈狭窄度から術中のグラフト流量や PI がある程度予想可能と考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 07 月 01 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

冠動脈バイパス術ではグラフト吻合部の選択に冠動脈造影検査が用いられ、造影検査で有意狭窄と判断されれば血行再建が行われてきた。しかし解剖学的評価である造影検査のみでは、中等度狭窄と思われる病変にバイパス術を行った場合に、自己冠動脈とグラフトの間で血流競合が生じるといった問題があり、狭窄度を解剖学的だけでなく、生理学的に定量化することが重要と認識されるようになった。近年冠動脈狭窄度の生理学的評価法として FFR : Fractional flow reserve が用いられるようになり、この FFR を外科手術でも応用できないかと考えた。

【目的】 FFR を用いて術前に冠動脈狭窄度を定量評価し、術中のグラフト流量、血流競合、術後のグラフト開存率との関係について検討すること。

【対象および方法】 対象は当院で冠動脈バイパス術を受けた患者のうち、'in-situ' の内胸動脈 (ITA) で LAD にバイパス術を施行した 72 例。術前の FFR 値から Group S : 高度狭窄群 (FFR<0.70)、Group M : 中等度狭窄群 (0.70≤FFR<0.75)、Group N : 軽度狭窄群 (0.75≤FFR) の 3 群に分け、グラフト流量、Pulsatility index (PI : PI<3.0 であれば良好なグラフト、3≤PI<5.0 では血流競合、吻合技術の問題等が疑われる)、Systolic reverse flow (SRF: 収縮期の自己冠動脈からグラフトへの逆行性血流のこと、全血量の 3%以上あれば血流競合とされている)の有無について、また術後のグラフト開存について比較検討した。男性 56 例、女性 16 例で平均年齢は 68.4 歳だった。

【結果】 72 症例中 Group S は 44 例、Group M, N がそれぞれ 14 例だった。心拍動下手術が 51 例、人工心肺下手術が 21 例であり、右内胸動脈を 14 例で、左内胸動脈を 58 例で使用した。術中のグラフト流量は Group S, M, N でそれぞれ 24.7±10.6 ml/min, 19.2±14.0 ml/min, 16.0±9.7 ml/min であり 3 群間に有意な差を認め (p<0.01)、自己冠動脈の狭窄度が強い群で冠動脈バイパスのグラフト流量は多かった。PI は Group S, M, N でそれぞれ 2.35±0.6, 3.02±1.1, 5.51±8.20 であり 3 群で有意な差を認め (p<0.05)、冠動脈の狭窄度が強いほど PI は低値であった。3.0≤PI であった症例の割合は Group S, M, N でそれぞれ 10 (23.2%), 5 (35.7%), 6(42.9%)であり 3 群間に有意差は認めなかった。SRF を認めた症例は Group S, M, N でそれぞれ 3 (6.8%), 5 (35.7%), 4(28.6%)で 3 群間に有意な差を認め(p<0.05)、自己冠動脈の狭窄度が高度な群では血流競合の頻度は低かった。術後のグラフト評価は 72 例中 69 例で行ったが、グラフトの血流競合を示唆する Distal thread sign を認めた症例は、Group S, M, N でそれぞれ 2 (4.2%), 3 (21%), 6 (50%) であり、冠動脈の狭窄度が強い群で Distal thread sign は少ない結果となった(p<0.01)。

今回の検討では、'in-situ' の ITA-LAD バイパスに関してのみ検討を行った。今後 LAD 以外の冠動脈や、また'in-situ' ITA 以外のグラフトについても検討する必要性はある。本研究は術前の冠動脈の狭窄度を FFR という生理学的指標を用いて定量化し、術前 FFR 値と術中のグラフト流量との関係、あるいは血流競合との関係について検討した初の論文である。術前の冠動脈狭窄度から術中のグラフト流量や PI がある程度予想可能であり、学位論文として価値あるものと考えた。

学位記番号	博(医)乙第921号		
学位授与の日	平成27年7月21日		
氏名	塩野 泰紹		
学位論文の題目	Optical Coherence Tomography-Derived Anatomical Criteria for Functionally Significant Coronary Stenosis Assessed by Fractional Flow Reserve (冠動脈狭窄病変における光干渉断層法による解剖学的狭窄度 と心筋血流予備量比による機能的狭窄度の関連)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 前田 正信	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

冠動脈疾患は有病率、死亡率ともに高く解決すべき疾患の1つである。冠動脈造影は冠動脈疾患の標準的検査法であり、冠動脈疾患の重症度は血管造影所見に基づく狭窄率によって決定されることが一般的である。しかし冠動脈造影は血管内腔のシルエット画像であるため、この方法によって実際の冠動脈狭窄を正しく評価するには限界がある。そのため冠動脈造影上の高度狭窄が血行動態的には非有意狭窄であることや、軽度狭窄が有意狭窄であることが生じうる。そして冠動脈造影所見に基づいて冠血行再建を実施しても冠動脈疾患患者の予後は改善しないことが報告されている。そこで冠動脈造影実施時には補助診断法を併用して詳細に冠動脈の評価を行うことが重要とされている。

心筋血流予備量比 (Fractional Flow Reserve=FFR)は冠動脈病変の生理学的な補助診断法の1つである。冠動脈造影実施時に冠動脈内に細径の(0.014inch)圧センサー付きガイドワイヤーを挿入して冠動脈内圧を計測して血行動態的に冠動脈病変の重症度を判定する。FFRは心筋虚血を誘発する冠動脈病変の同定において最も精度が高い診断法とされており、FFRに基づいて冠血行再建を実施することで冠動脈疾患患者の予後が改善することが報告されている。

光干渉断層法(Optical Coherence Tomography=OCT)は冠動脈病変の解剖学的な補助診断法の1つである。冠動脈造影時に冠動脈内に細径の(0.016inch)近赤外線を発するイメージワイヤーを挿入して冠動脈の断層像が描出できる。OCTの空間分解能は10 μ mであり高解像度の画像収集が可能である。OCTと同じ解剖学的補助診断法に血管内超音波(Intravascular ultrasound=IVUS)がある。IVUSを用いた先行研究では冠動脈病変の最小血管内腔面積が3.0 mm²もしくは4.0mm²以下の病変はFFRで規定される血行動態的有意狭窄であり、IVUSで血行動態的有意狭窄の同定が可能と報告されている。

本研究では、OCTでもIVUS同様に血行動態的有意狭窄の同定が可能であると仮定し、OCTで計測される冠動脈の解剖学的指標とFFRの関連性、そして心筋虚血が誘発される冠動脈の解剖学的指標のカットオフ値について検討した。

【目的】

OCTで計測される冠動脈狭窄の解剖学的指標と冠動脈の血行動態的狭窄度指標であるFFRとの関連性を明らかにし、心筋虚血が誘発される各解剖学的指標のカットオフ値を明らかにすること。

【方法】

和歌山県立医科大学循環器内科において心臓カテーテル検査を実施した冠動脈疾患患者 59 人、62 病変を後ろ向きに解析した。血管造影で目視 30%以上の狭窄病変を有し、その病変に対して OCT と FFR の両方で評価を受けた患者を対象とした。連続病変(同一冠動脈に 2 病変以上を有する場合)、冠動脈バイパス手術後の病変、左冠動脈主幹部病変、側枝病変、側副血行路を有する病変、血栓を含む病変は除外した。

FFR の計測では圧センサー付きガイドワイヤーを狭窄病変の遠位部まで進めて冠動脈内圧を計測して算出した。FFR はアデノシン三リン酸の持続静注によって心筋最大充血を誘発した状態で狭窄の近位部圧と遠位部圧の比で算出し、FFR が 0.75 未満の場合に心筋虚血陽性と判定した。

OCT は time-domain OCT (TD-OCT)を用いた。OCT イメージワイヤーを病変の遠位部まで進めた後、病変近位部をオクルージョンバルーンで閉塞させ乳酸リンゲル液もしくは低分子デキストランを灌流し血球成分を除去して撮像した。OCT 画像解析はオフラインソフトウェアを用いて実施し、最小血管内腔面積(minimal lumen area=MLA)、最小血管内腔径(minimal lumen diameter=MLD)、狭窄率 (percent area stenosis=%AS)を計測した。

FFR と OCT によるそれぞれの解剖学的狭窄度の指標との関係性に関しては回帰分析で検討し、MLA、MLD、%AS について FFR < 0.75 を予測するためのカットオフ値に関しては ROC 曲線で求めた。

【結果】

OCT による解剖学的狭窄度の指標と FFR の相関に関しては、いずれも良好な相関が得られた (MLA:R=0.75、MLD:R=0.76、%AS:R=-0.77)。FFR < 0.75 を予測するためのそれぞれのカットオフ値は MLA < 1.91mm² (AUC=0.904、95% CI=0.829–0.978、感度=93.5%、特異度=77.4%、陽性的中率=80.6%、陰性的中率=92.3%、精度=85.4%)、MLD < 1.35mm (AUC=0.917、95% CI=0.851–0.984、感度=90.3%、特異度=80.6%、陽性的中率=84.4%、陰性的中率=84.6%、精度=85.5%)、%AS < 70.0% (AUC=0.940、95% CI=0.883–0.997、感度=96.8%、特異度=83.9%、陽性的中率=85.7%、陰性的中率=96.3%、精度=90.3%)であった。さらに MLA と %AS の両方を組み合わせることで、MLA と %AS 両方で虚血陽性と判断される場合には 90.3%で虚血陽性であり、MLA、%AS の両方で虚血陰性と判断される場合には 100%虚血陰性であった。

【考察と結語】

今回の研究により、(1)OCT で計測した解剖学的狭窄度の各指標(MLD、MLA、%AS)と FFR の間には相関関係があること、(2)OCT で計測した各指標はそれぞれ、MLD < 1.35mm、MLA < 1.91mm²、%AS > 70%をカットオフ値として血行動態的な有意狭窄を予測し得ることが明らかとなった。

従来の IVUS を用いた研究でも、解剖学的狭窄度と FFR の間には相関関係があり、MLA < 3.0mm² もしくは 4.0mm² のカットオフ値を用いて血行動態的な有意狭窄(FFR < 0.75)を予測できると報告されている。今回の研究では OCT で血行動態的な有意狭窄を同定するための MLA のカットオフ値は MLA < 1.91mm² と従来の IVUS の報告と比較して小さかった。

従来血管内イメージングといえば IVUS が用いられてきたが、近年は IVUS よりも高解像度を有する OCT が用いられる機会が急速に増えてきている。その際に IVUS によるエビデンスをそのまま OCT に適応することはできず OCT はそれ独自のエビデンスの構築が必要であると考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 6 月 22 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。

冠動脈造影は冠動脈疾患の標準的検査法であり、冠動脈疾患の重症度は血管造影所見に基づく狭窄率によって決定される。しかし冠動脈造影は血管内腔のシルエット画像であるため、この方法によって実際の冠動脈狭窄を正しく評価することの限界も認識されている。そこで冠動脈造影実施時には補助診断法を併用して詳細に冠動脈の評価を行うことが重要である。

生理学的な補助診断法の 1 つに心筋血流予備量比 (Fractional Flow Reserve=FFR)がある。これは冠動脈造影時に冠動脈内に細径の(0.014inch)圧センサー付きガイドワイヤーを挿入して冠動脈内圧を計測しすることで、冠動脈病変の血行動態的の重症度を判定できる。FFR の値は 0~1.0 をとり、正常の場合は 1.0、0.75 未満の場合に血行動態的の有意狭窄であることを示す。FFR は心筋虚血を誘発する冠動脈病変の同定において現時点で最も診断精度が高く心筋虚血診断のゴールドスタンダードとされている。

また解剖学的な補助診断法の 1 つに光干渉断層法(Optical Coherence Tomography=OCT)がある。これは冠動脈造影時に冠動脈内に細径の(0.016inch)近赤外線を発するイメージワイヤーを挿入して冠動脈の断層像が描出できる。OCT の空間分解能は 10 μ m であり高解像度の画像収集が可能で冠動脈造影の限界を克服できる。

本研究は OCT を用いて冠動脈狭窄病変の形態を詳細に評価することで、FFR で規定される血行動態的の有意狭窄の同定が可能であることを検討したものである。冠動脈疾患患者において OCT と FFR の両方で冠動脈狭窄の評価を行っている。その結果、OCT で計測される最小血管内腔面積(minimal lumen area=MLA)、最小血管内腔径(minimal lumen diameter=MLD)、狭窄率 (percent area stenosis=%AS)と FFR はそれぞれ有意に相関し、OCT で計測される MLA <1.91mm²、MLD <1.35mm、%AS >70%、それぞれの値から高い診断精度で血行動態的の有意狭窄の同定が可能であることが示された。

以上、本論文は冠動脈造影では困難とされる血行動態的の有意狭窄の同定を、OCT によって冠動脈内腔を詳細に計測することで可能であることを示した論文で臨床的意義が高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922号		
学位授与の日	平成27年9月8日		
氏名	森 良幸		
学位論文の題目	Signal intensity of small hepatocellular carcinoma on apparent diffusion coefficient mapping and outcome after radiofrequency ablation (拡散係数画像における肝細胞癌の信号強度と経皮的ラジオ波焼灼術後の再発および予後との関係について)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 一瀬 雅夫

論文内容の要旨

緒言

経皮的ラジオ波焼灼術 (RFA) は切除不適小肝細胞癌に対する標準的な根治的治療法としてすでに確立されており、日本の肝癌診療ガイドライン上、その適応は腫瘍径 3cm 以内、腫瘍数 3 個以内とされている。しかし RFA の適応内であっても術後早期に転移や播種、脈管浸潤など根治的治療が困難な再発を来すことが少なくない。組織学的に低分化な肝細胞癌は、たとえ小肝癌であってもすでに顕微鏡的脈管浸潤や肝内微小転移を来している可能性が高いとすでに報告されており、より適切な治療方針を決定するためには、術前に組織学的分化度を評価すべきである。しかし腫瘍生検は、サンプリングエラーや出血や播種といった合併症の危険もあるため、ガイドライン上、画像的に確定診断が可能な典型例では推奨されていない。近年、低分化型肝細胞癌は、高分化や中分化型よりも Magnetic resonance imaging (MRI) の拡散強調画像 (DWI) における、みかけの拡散係数 : Apparent diffusion coefficient (ADC) 値が有意に低いと報告された。ADC 値の低い肝細胞癌は切除後早期に再発しやすいと報告されているが、ADC 値と RFA 後の再発・予後との関係に関する報告はない。本研究の目的は、MRI の拡散係数画像 (ADC map) における肝細胞癌の信号強度がラジオ波焼灼術(RFA)の治療成績に影響するのかを明らかにすることである。

対象と方法

1) 対象

2008年2月から2012年8月の間に、RFA施行前にMRI検査を施行した3cm、3個以下の多血性初発肝細胞癌136例を対象とした。

2) MRI撮像法

使用したMRIの撮像装置はPhilips Medical Systems社製Intera 1.5T。T1強調画像、T2強調画像に加えDWIを撮影した。DWIのスライス厚は4~5.5mm、b値50、800 sec/mm²で撮影し、ADC mapは自動的に作成された。

3) ADC mapにおける腫瘍の信号強度分類

ADC mapにおける腫瘍信号強度を周囲肝の信号強度と肉眼的に比較し、低信号群と非低信号群の2群に分類した。周囲肝に比べ腫瘍の全体あるいは部分的に低信号を示す腫瘍を低信号と定義し、等信号あるいは高信号の腫瘍を非低信号と定義した。病変が複数ある症例は腫瘍径が最も大きい腫瘍を画像解析の対象とした。

4) RFAの方法

RFAの使用装置はValleylab社製Cool-tip RFA system。全例超音波ガイド下でRFAを施行。腫瘍の大きさにより2または3cmの先端非絶縁部をもつ単極電極針を使用し、インピーダンスコントロールモードで腫瘍を焼灼した。

5) RFA 後の経過観察

完全焼灼と判断された後、3-4ヶ月毎の造影 Computed tomography (CT)または造影 MRI を施行した。局所再発は RFA 治療部位に接する再発と定義し、危機的再発は4個以上の再発、脈管浸潤、肝外転移、播種などの根治的治療が困難な再発と定義した。

6) 統計解析法

ADC map における腫瘍信号強度別の再発、生存を Kaplan Meier 法を用いて比較し、ADC map の信号強度を含め、再発・生存に影響する因子を Cox 回帰分析を用いて解析した。

結 果

1) 患者背景

平均年齢は 69.6±8.6 歳、男性 85 例、女性 51 例、C 型肝炎 101 例、平均腫瘍径は 20±6mm。観察期間の中央値は 619 日。

2) ADC map における腫瘍信号強度別の背景因子の比較

低信号群では血小板数が有意に高値であり、腫瘍径は有意に大きかった。腫瘍の平均 ADC 値は低信号群で有意に低かった。

3) ADC map における腫瘍信号強度別の再発率・生存率の比較

2年累積再発率は低信号群、非低信号群でそれぞれ 79%、50%、2年累積局所再発率はそれぞれ 18%、7%、2年累積危機的再発率はそれぞれ 38%、13%であり、低信号群の再発は、局所再発および危機的再発も含め、より早期に再発した(全再発 $P<0.001$ 、局所再発 $P=0.014$ 、危機的再発 $P=0.005$)。3年生存率は低信号群、非低信号群でそれぞれ 60%、82%であり、低信号群のほうが有意に生存期間が短かった ($P=0.007$)。

4) RFA 後の再発に影響する因子

再発に影響する因子の単変量解析では、C 型肝炎、ALT 値、ヒアルロン酸、4型コラーゲン 7S 値、腫瘍径、腫瘍数、AFP 値、ADC map 低信号が有意な因子であった。多変量解析では、ADC map 低信号が最も強い独立因子であった。局所再発に影響する因子の単変量解析では、DCP 値と ADC map 低信号が有意な因子であった。多変量解析では、DCP 値、ADC map 低信号ともに有意な独立因子であった。危機的再発に影響する因子の単変量解析では、ADC map 低信号、腫瘍径が有意な因子であった。多変量解析では ADC map 低信号のみが有意な独立因子であった。

5) RFA 後の予後に影響する因子

生存に影響する因子の単変量解析では、Child 分類、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン 7S 値、AFP 値、ADC map 低信号が有意な因子であった。多変量解析では IV型コラーゲン 7S 値、AFP 値、ADC map 低信号が有意な独立因子であった。

結 語

ADC map における多血性小肝細胞癌の信号強度と RFA 後の再発・予後との関係を検討した結果、以下の結論が得られた。

1. ADC map において低信号を呈する肝細胞癌は、術後早期に再発し、特に局所再発や危機的再発が多いことが示された。
2. ADC map における腫瘍信号強度は、既知の因子より、再発に強く寄与する独立因子であることが示された。
3. ADC map における腫瘍信号強度は、既知の因子より、生存に強く寄与する独立因子であることが示された。
4. RFA の適応である小肝細胞癌であっても、ADC map で低信号を呈する場合は RFA の適応を慎重に考えるべきであり、今後より有効な代替療法を確立する必要がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 27 年 8 月 25 日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

経皮的ラジオ波焼灼術（RFA）は切除不適小肝細胞癌に対する標準的な根治的治療法としてすでに確立されており、日本の肝癌診療ガイドライン上、その適応は腫瘍径 3cm 以内、腫瘍数 3 個以内とされている。しかし RFA の適応内であっても術後早期に転移や播種、脈管浸潤など根治的治療が困難な再発を来すことが少なくない。組織学的に低分化な肝細胞癌は、たとえ小肝癌であってもすでに顕微鏡的脈管浸潤や肝内微小転移を来している可能性が高いとすでに報告されており、より適切な治療方針を決定するためには、術前に組織学的分化度を評価すべきである。しかし腫瘍生検は、サンプリングエラーや出血や播種といった合併症の危険があるため、ガイドライン上、画像的に確定診断が可能な典型例では推奨されていない。近年、低分化型肝細胞癌は、高分化や中分化型よりも Magnetic resonance imaging (MRI) の拡散強調画像 (DWI) における、みかけの拡散係数 : Apparent diffusion coefficient (ADC) 値が有意に低いと報告された。ADC 値の低い肝細胞癌は切除後早期に再発しやすいと報告されているが、ADC 値と RFA 後の再発・予後との関係に関する報告はない。本研究では、MRI の拡散係数画像 (ADC map) における肝細胞癌の信号強度を背景肝と比較し低信号群と非低信号群の 2 群に分類し、RFA の治療成績に影響するのかを検討した。

その結果

(1)ADC map において低信号を呈する肝細胞癌は、術後早期に再発し、特に局所再発や危機的再発(4 個以上の再発、脈管浸潤、肝外転移、播種などの根治的治療が困難な再発と定義)が多いことが示された。

(2)ADC map における腫瘍信号強度は、既知の因子より、再発に強く寄与する独立因子であることが示された。

(3)ADC map における腫瘍信号強度は、既知の因子より、生存に強く寄与する独立因子であることが示された。

以上より、本論文は MRI の ADC map における肝細胞癌の信号強度が RFA の治療成績に影響するという新しい知見を提供するものであり、今後の肝細胞癌の治療方針決定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)乙第923号		
学位授与の日	平成27年9月8日		
氏名	西尾 誠人		
学位論文の題目	Serum Heparan Sulfate Concentration is Correlated with the Failure of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment in Patients with Lung Adenocarcinoma (上皮成長因子受容体阻害剤の治療効果と血清ヘパラン硫酸濃度の関係)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 前田 正信	教授 佐々木 秀行

論文内容の要旨

[背景]

肺癌は我が国において死亡原因の第一位であり、いまだ予後不良な疾患である。しかし、最近の薬物療法の進歩により予後が改善しつつある。特に一部の非小細胞肺癌(NSCLC)においては分子標的薬が著効することが示され、その効果予測因子となるバイオマーカーを探索することが重要な課題である。Gefitinib や erlotinib などの上皮成長因子受容体阻害剤(epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ;EGFR-TKI)では EGFR の遺伝子変異の有無が効果予測因子となる。しかし、EGFR の遺伝子変異を有する肺癌患者でもこれらの EGFR-TKI の奏効率は約 70%であり、その無増悪生存期間(PFS)は約 1 年である。このことは EGFR の遺伝子変異以外に EGFR-TKI の効果を規定する因子が存在することを示している。

ヘパラン硫酸(HS)は 2 糖の長い繰り返し直糖鎖であり、ヘパリン結合性タンパク (HB-EGF, HGF, FGF, VEGF 等) と結合する作用を有する。現在までに HS は、種々の増殖因子・増殖因子受容体の生物学的活性を増強すること、がん悪性度と関連することが知られている。HS は EGFR 活性に影響を与える可能性があることから、EGFR-TKI の感受性バイオマーカーになり得るとの仮説を設定した。

本研究では、肺癌に対する EGFR-TKI の治療効果と血中 HS 濃度の関連についてレトロスペクティブ解析を行った。

[方法]

病理学的に腺がんと診断され、EGFR-TKI (gefitinibもしくはerlotinib) による治療を受けたIV期 NSCLC患者83例を対象とし、EGFR-TKI治療前の血清HS濃度を測定した。血清HS濃度はhuman heparin sulfate enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) Kit (Code. No. 280564; Seikagaku Biobusiness,Tokyo, Japan)を用いて定量化した。

EGFR-TKIに対する治療効果を2-3か月毎にCTで評価し、the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) に従って partial response (PR), stable disease (SD), or progressive disease (PD) に分類した。統計解析はEGFR-TKIの抗腫瘍効果(PDとPD以外)と臨床背景はthe Fisher's exact test、生存期間無増悪生存期間[PFS]や全生存期間[OS]と臨床背景(性別、performance status [PS], 病期、喫煙歴)の関係はCox proportional hazards modelを用いて解析した。統計解析はSAS for Windows (version 9.1.3)を用いて行った。本研究は各施設の臨床試験審査委員会により承認され行われた。

[結果]

EGFR-TKI の抗腫瘍効果の解析においては、治療無効群 (PD) と治療有効群 (PR+SD) の間で、性別、PS、喫煙歴、EGFR 遺伝子変異に対して有意差が見られた。

血中 HS 濃度は、EGFR-TKI 治療無効例で有意に高い結果であった (22.2 ± 23.1 vs $10.9\pm 9.8\mu\text{g/mL}$, $p=0.003$)。次に、EGFR-TKI 治療の PFS および OS に対する解析では、臨床的背景因子として性別、喫煙歴、PS が予後不良因子であった。一方、血中 HS 濃度は、PFS および OS に対して強い予後不良因子 ($p=0.002$, $p=0.0003$)であった。最後に多変量解析においても血中ヘパラン硫酸濃度は有意な予後不良因子であることが示された。

[考察]

本研究では gefitinib もしくは erlotinib で治療されたが 効果なく PD となった患者で血清中 HS が有意に高値であること、さらに 血清 HS 値が高値である患者群において PFS や OS が短いことが示された。このことは血清 HS が EGFR-TKI 治療の耐性と関与している可能性を示している。HS による EGFR-TKI に対する耐性化を起こす機序としては HS がヘパリン結合性タンパク (HB-EGF, HGF, FGF, VEGF 等) と結合する作用を有することから、これら増殖因子との相互作用によるものが考えられる。

[結論]

血清 HS 濃度が EGFR-TKI 治療に対する新たなバイオマーカーとなること、 さらに EGFR-TKI の耐性に HS が関与する可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成27年8月11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。本研究では、病理学的に腺がんと診断され、EGFR-TKI (gefitinibもしくはerlotinib) による治療を受けたIV期 NSCLC患者83例を対象とし、EGFR-TKI治療前の血清HS濃度を測定しEGFR-TKIの治療効果と血中HS濃度の関連についてレトロスペクティブ解析を行い、EGFR-TKIの抗腫瘍効果の解析においては、治療無効群 (PD) と治療有効群 (PR+SD) の間で、性別、PS、喫煙歴、EGFR遺伝子変異に対して有意差が見られた。血中HS濃度は、EGFR-TKI治療無効例で有意に高い結果であった (22.2 ± 23.1 vs $10.9 \pm 9.8 \mu\text{g/mL}$, $p=0.003$)。次に、EGFR-TKI治療のPFSおよびOSに対する解析では、臨床的背景因子として性別、喫煙歴、PSが予後不良因子であった。一方、血中HS濃度は、PFSおよびOSに対して強い予後不良因子 ($p=0.002$, $p=0.0003$)であった。さらに多変量解析においても血中ヘパリン硫酸濃度は有意な予後不良因子であることが示された。

Gefitinib もしくは erlotinib で治療されたが効果なく PD となった患者で血清中 HS が有意に高値であること、さらに 血清 HS 値が高値である患者群において PFS や OS が短いことは血清 HS が EGFR-TKI 治療の耐性と関与している可能性を示している。HS による EGFR-TKI に対する耐性化を起こす機序としては HS がヘパリン結合性タンパク (HB-EGF, HGF, FGF, VEGF 等) と結合する作用を有することから、これら増殖因子との相互作用によるものが考えられる。

以上、本論文は血清 HS 濃度が EGFR-TKI 治療に対する新たなバイオマーカーとなること、さらに EGFR-TKI の耐性に HS が関与する可能性を示したものであり、学位論文をして価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第924号		
学位授与の日	平成27年9月8日		
氏名	三田 裕記		
学位論文の題目	Synthesis of 24-Hour-Soluble Gelatin Sponge Particles and Their Effect on Liver Necrosis Following Hepatic Artery Embolization: Results of <i>in Vitro</i> and <i>in Vivo</i> Studies (24 時間溶解型ゼラチンスポンジ粒子の作製とそれらを用いた肝動脈塞栓術における肝壊死効果の検討)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 一瀬 雅夫	教授 村田 晋一

論文内容の要旨

<諸言>

肝細胞癌に対する治療法の一つである肝動脈塞栓術 (TACE) は、治療を繰り返すことで肝動脈の狭小化や閉塞、側副血行路として肝外枝の発達をきたし、TACE 困難例となることが知られている。従来の TACE では、シート状のゼラチンスポンジを 1-2mm 角細片にしたものを、塞栓物質として用いてきた。それらのゼラチンスポンジは非溶解型であり、動脈の再開通を妨げる要因となっていると考えられ、高坂らは以前に再生医療の分野で用いられる低エンドトキシシ性ゼラチン (ゼラリス社, RMゼラチン®) を用いて、シート状の溶解型ゼラチンスポンジを作製した。それらは熱架橋温度を変えることで可溶性の調節が可能なものであった。河合らは 1-2mm 細片にした 48 時間溶解型ゼラチンスポンジ (soluble gelatin sponge particles : SGSPs) を用いて、肝細胞癌症例への肝動脈塞栓術について臨床研究を行い、非溶解型ゼラチンと比べ治療効果は同等であったが、肝動脈への障害は少なかったと報告した。潜在的な有効性として、1000 μm 以下の SGSPs を用いた場合、従来の TACE より強い虚血効果が得られるかもしれないが、胆管障害のリスクが高まる可能性もある。1000 μm 以下の SGSPs を用いた検討はなされていない。そこで今回我々は、200-500 μm と 500-1000 μm の SGSPs の開発と *in vitro* での溶解性を評価し、さらにそれら SGSPs を用いた肝動脈塞栓における閉塞肝動脈の再開通性と組織障害について評価することを目的とした。

<方法>

SGSP の準備

以前高坂らが作製したシート状の SGSPs はゼラチン濃度 2% (分子量約 50kDa) で作製されていたが、2~6%濃度では粒子化の際に形態の保持が困難であった。ゼラチン濃度 7% (分子量約 50kDa) にすることで形状を安定化させることができ、それらを粉碎化し、100、200、500、1000 μm のステンレスのふるいで分け、200-500 μm (平均径 $386.5 \pm 96.5 \mu\text{m}$)、500-1000 μm ($706.0 \pm 123.4 \mu\text{m}$) の粒子径のものを作製した。

(1) *in vitro*

GSPs の熱架橋温度の違いによる生理食塩水内での溶解時間を測定する。

200-500 μm 、500-1000 μm の GSPs (7%濃度、50kDa) を 110°C~135°C で 24 時間熱架橋したものの 100mg を、10ml 生理食塩水を満たした試験管内にいれ 37°C 恒温槽振盪下で溶解するまでの時間を各 4 回ずつ測定した。

(2) *in vivo*

SGSPs による豚肝動脈塞栓で、血管撮影による血管再開通性、病理学的評価を行う。

生後 3 か月の正常豚 8 頭を、120°C で熱架橋した SGSPs の 200-500 μm 粒子径群 4 頭、500-1000 μm 粒子群 4 頭に分ける。4Fr コブラ型カテーテルで腹腔動脈造影後、マイクロカテーテルを左右肝動

脈に先進させそれぞれ完全に塞栓する。肝動脈の血管撮影を塞栓前、塞栓直後、1 時間、2 時間、3 時間、24 時間、48 時間後に行い、血管再開通性の経時的評価を行う。2 日後とさつし、肝臓を摘出し 10%ホルマリン液で固定。肝標本を 10mm 厚にスライスし Excel ソフトで断面の総面積と壊死面積を測定し、壊死率=壊死面積/総面積で近似的に算出して粒子径による壊死範囲の差を比較する。その後、HE 染色標本作製し、壊死部と正常部組織で 100 倍率、30 視野でそれぞれ肝動脈の総血管数、肝動脈内にゼラチン粒子が残存している血管数を計測。粒子残存率 (%) = 粒子残存血管数/総血管数を算出し、残存粒子の分布の差を比較する。

<結果>

(1) in vitro

SGSPs (7%濃度、50kDa) の熱架橋温度が高くなると、生食内での溶解時間が長くなったが、以前の高坂らが報告した 1-2mm 径 SGSPs (2%濃度、50kDa) より低い架橋温度で溶解が得られた。125℃以上では 14 日間で溶解しなかった。以前の Takasaka らの報告では、1-2mm 径の SGSPs (2%濃度、50kDa) は生食内溶解時間が 57.7 ± 9.8 時間、249.0 時間 \pm 7.0 時間のものは、血管撮影上の肝動脈再開通時間はそれぞれ 24 時間、48 時間であったとしている。120℃熱架橋 SGSPs は、200-500 μ m 粒子径で 159.2 ± 12.4 時間、500-1000 μ m 粒子径で 168.8 ± 15.9 時間であり、これらは 24~48 時間で肝動脈の再開通が得られると推測された。

(2) in vivo

200-500 μ m 粒子群 4 頭、500-1000 μ m 粒子群 4 頭ともに 24 時間後の血管撮影で左右肝動脈の再開通が認められた。

肝標本の肉眼像では両群ともに肝末梢の辺縁に壊死と考えられる色調変化が見られた。

肝壊死率は 200-500 μ m 群で平均 $9.89 \pm 4.04\%$ 、500-1000 μ m 粒子群で平均 $4.44 \pm 0.67\%$ で、200-500 μ m 粒子群で高く有意差が見られた ($p < 0.05$)。

肝組織 HE 染色標本では両群ともに肝末梢に虚血壊死 (一部出血を伴う) がみられた。肝壊死部のグリソン鞘内の胆管周囲に炎症細胞の浸潤がみられたが、明らかな胆管壊死は認められなかった。それぞれの壊死部、正常部ともに末梢門脈域の 100~500 μ m の小中動脈、50 μ m 以下の細動脈にも異物反応を伴う塞栓物質の残存がみられた。

肝動脈内の粒子の残存率は、壊死部、正常部ともに、200-500 μ m 粒子群は 100-200 μ m 径の動脈で残存率が最も高く (残存率 65.1%、66.7%)、500-1000 μ m 粒子群は 200-500 μ m 径の動脈で最も残存率が高かった (残存率 42.9%、37.5%)。壊死部、正常部ともに 100-200 μ m 径の動脈での粒子残存率に有意差がみられた ($p < 0.05$)。

<結語>

我々は低エンドトキシンゼラチンを用いて溶解型のゼラチン粒子を作製し、熱架橋の温度を調整することで溶解性をコントロールできた。120℃で熱架橋した溶解型ゼラチン粒子を用いた肝動脈塞栓では、24 時間以内に閉塞血管の再開通が得られ、500-1000 μ m の粒子より 200-500 μ m の粒子のほうが、胆管壊死を引き起こすことなく、強い虚血効果が得られた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 27 年 7 月 28 日、論文審査員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は、肝細胞癌に対する肝動脈塞栓術に使用されている非溶解型の 1 から 2mm のゼラチンスポンジ細片の代わりに溶解型の 1mm 以下のゼラチンスポンジ細粒子を開発しその虚血性と安全性について基礎的に述べたものである。

In vitro の研究で 1mm 以下のゼラチンスポンジ細粒子を作成するには endotoxin-least gelatin 濃度が 2~6%濃度では粒子化する際に形態の保持が困難であり、endotoxin-least gelatin 濃度を 7%にすることで、200-500 μ m、500-1000 μ m の粒子径形状を安定化させ作製できる

こと示した。endotoxin-least gelatin を凍結後 110 から 122°C の熱架橋温度のゼラチンスポンジは温度が高くなるにつれ、生食内での溶解時間が長くなったが、125°C 以上では溶解しなかった。生食での溶解時間を測定し、教室の Takasaka らの結果をふまえ、120°C 熱架橋のゼラチンスポンジが 24～48 時間で肝動脈の再開通が得られると推測された。

In vivo では豚肝動脈塞栓後 24 時間後の血管撮影で 120°C 熱架橋の 200-500 μm 粒子群、500-1000 μm 粒子群ともに左右肝動脈の再開通が認められた。両群ともに肝末梢に虚血壊死がみられた。肝壊死率は 200-500 μm 群でより高かった。壊死部、正常部ともに塞栓物質の残存がみられたが、200-500 μm 粒子の方がより末梢に残存していた。一方、グリソン鞘内の胆管周囲に炎症細胞の浸潤がみられたが、明らかな胆管壊死は認められなかった。

以上の結果より、120°C で熱架橋した溶解型ゼラチン粒子を用いた肝動脈塞栓では、24 時間以内に閉塞血管の再開通性が得られ、500-1000 μm の粒子より 200-500 μm の粒子で、胆管壊死を引き起こすことなく、強い虚血効果が得られることが示された。抗腫瘍効果を高めつつ、安全性と血管再開通性を保つ可能性がある塞栓物質として、今後の臨床研究の基盤となりうるものであり、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925号		
学位授与の日	平成27年9月8日		
氏名	山野 貴司		
学位論文の題目	Advantage of right ventricular outflow tract pacing on cardiac function and coronary circulation in comparison with right ventricular apex pacing (心機能と冠循環から検討した右室心尖部ペーシングと比較した右室流出路ペーシングの有効性について)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 前田 正信	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

2D ティッシュトラッキング (2 DTT) 心エコー法は近年用いられるようになったストレインイメージング法とは違い、角度依存性にとらわれることなく任意の左心室の収縮期壁厚増加率を測定することが出来る。また 2 DTT 心エコー法は、左室拍出量の低下に密接に関与する dyssynchrony の検出に優れる。一方、ペースメーカーを植え込む患者にとって右室心尖部 (right ventricular apex :RVA) ペーシングより、右室流出路 (right ventricular outflow tract :RVOT) ペーシングのほうがより生理的とされているが、その詳細は判明していない。本研究では、RVOT ペーシングの RVA ペーシングに対する有効性に関して 2 DTT 心エコー法を用いた左室 dyssynchrony および冠血流ドップラー法を用いた冠血行動態に及ぼす効果について検討した。

【方法】

対象：20 人の電気生理学検査を行った患者を対象にした。慢性腎不全 (クレアチニン>1.5mg/dl)、冠動脈に有意狭窄の存在するもの、心収縮力低下を有する患者 (EF<50%)、心電図で右脚ブロックや左脚ブロックを持つ患者は除外した。

プロトコール：心臓カテーテル検査は標準的な大腿アプローチによって施行した。また、電気生理学検査はすべての患者において、大腿静脈を通じて、3 つの電極カテーテルを、高位右房、His 束と右心室にそれぞれ置き、一般的なプロトコールで行った。その後、右室心尖部 (RVA) ペーシングと右室流出路 (RVOT) ペーシングを施行し、EUB8500 (日立メディコ) を用いて、一回心拍出量を算出すると共に、2 DTT 法で左室の中隔と側壁の収縮を測定し、その収縮の時間差である心室内伝導遅延 (Intraventricular contraction delay: ICD) を算出した。

冠生理学的指標の測定と解析：心臓カテーテル検査で用いた左冠動脈カテーテルからドップラーガイドワイヤーを左前下行枝に通過し、右室心尖部 (RVA) ペーシングと右室流出路 (RVOT) ペーシングを施行中に、ドップラーガイドワイヤーを用いて、左前下行枝の平均冠血流速度 (time-averaged peak velocity: APV) を測定した。また、大動脈平均圧 (Pa) をガイディングカテーテル先端で測定し、微小血管抵抗指数 (microvascular resistance index: MVRI) を APV/Pa と算出した。

【結果】心電図の QRS 幅は RVA ペーシングと比べて RVOT ペーシングでは有意に短かった (162 ± 15 msec vs. 124 ± 15 msec, $p < 0.01$)。また、血压に関しては RVA ペーシングと RVOT ペーシングで有意な変化はなかった。左室 dyssynchrony の指標である ICD は RVA ペーシングと比べて RVOT ペーシングでは有意に短縮していた (142 ± 11 sec vs. 99 ± 9 sec, $p < 0.01$)。RVA ペーシングと比べて RVOT ペーシングでは一回心拍出量は有意に増加 (38.8 ± 7.2 vs. 42.9 ± 7.3 ml)、冠血流の指標であ

る APV は有意に上昇した (47 ± 17 cm/sec vs. 54 ± 18 cm/sec, $p < 0.05$)。また、MVRI は RVA ペーシングに比し、RVOT ペーシングで有意に低下した (5.8 ± 3.1 vs. 4.6 ± 1.9 , $p < 0.05$, and 2.4 ± 1.1 vs. 2.0 ± 0.8 , $p < 0.05$)。

【考察】 dyssynchrony の評価として M モードから求めた中隔と後壁の収縮時間のずれ (Septal-to-posterior wall motion delay : SPWMD) を使用する論文が多いが、本研究では SPWMD 同様に ICD でも dyssynchrony の評価に有用であった。RVOT pacing による左室の dyssynchrony を改善効果は、左室 1 回拍出量、冠血流量の増加に関連した。また、RVOT ペーシングは微小血管抵抗も減少させたことにより、微小循環レベルの冠血行動態の改善にも関与する可能性が示唆された。

【結論】 本研究は、RVOT ペーシングは RVA ペーシングと比較し dyssynchrony を改善させることで、心拍出量、冠血流量を増加させると共に、微小血管抵抗が減少することを明らかにした。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 27 年 7 月 31 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。2D ティッシュトラッキング (2 DTT) 心エコー法は近年用いられるようになったストレイインイメージング法とは違い、角度依存性にとらわれることなく任意の左心室の収縮期壁厚増加率を測定することが出来る。また 2 DTT 心エコー法は、左室拍出量の低下に密接に関与する dyssynchrony の検出に優れる。一方、ペースメーカーを植え込む患者にとって右室心尖部 (right ventricular apex : RVA) ペーシングより、右室流出路 (right ventricular outflow tract : RVOT) ペーシングのほうがより生理的とされているが、その詳細は判明していない。

本論文は、RVOT ペーシングの RVA ペーシングに対する有効性に関して 2 DTT 心エコー法を用いた左室 dyssynchrony および冠血流ドップラー法を用いた冠血行動態に及ぼす効果について検討した。電気生理学検査を行った患者を対象に RVA ペーシングと RVOT ペーシングを施行し、左室 1 回拍出量と、2 DTT 心エコー法で左室の中隔と側壁の収縮の時間差である心室内伝導遅延 (Intraventricular contraction delay: ICD) を算出した。同時に左冠動脈カテーテルとドップラーガイドワイヤーを用いて、左前下行枝の平均冠血流速度 (time-averaged peak velocity: APV) と微小血管抵抗指数 (microvascular resistance index: MVRI) を測定した。

結果は、RVA ペーシングと比べて RVOT ペーシングでは左室 1 回拍出量が有意に増加し、有意に ICD が短縮していた。以上から、dyssynchrony の改善が証明された。また、APV は有意に上昇し、MVRI は有意に低下したため、RVOT ペーシングによる dyssynchrony の改善が、冠血流量の増加と微小血管抵抗の低下に関連していることが確認された。

本論文は、2 DTT 心エコー法で測定した ICD が dyssynchrony の評価に有用で、RVOT ペーシングが左室の dyssynchrony の改善と微小循環レベルの冠血行動態の改善に関与すること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926号		
学位授与の日	平成27年9月8日		
氏名	折居 誠		
学位論文の題目	Myocardial Damage Detected by Two-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography in Patients with Extracardiac Sarcoidosis: Comparison with Magnetic Resonance Imaging (サルコイドーシスにおける 2D スペックルトラッキング法を用いた傷害心筋早期発見の検討)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 村田 晋一	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

サルコイドーシスは、原因不明の多臓器疾患である。心病変は死亡原因の約2/3を占め、房室伝導障害、致死性不整脈、収縮・拡張機能障害など多彩な病型を呈する。サルコイドーシスの確定診断は、生検による非乾酪性類上皮細胞肉芽腫の同定であるが、心病変は心外膜側もしくは中層に局在するため、心内膜下生検の同定率が低いことが報告されている。このことから、心サルコイドーシス診断の多くは画像診断を組み合わせた臨床診断群となる。心病変の形態評価には、心エコー図が用いられてきた。好発部位である心室中隔基部の菲薄化が特徴的な所見とされてきたが、約7割は心室中隔以外に病変が存在し、本症急性期は心筋の浮腫を反映して壁厚は厚くなるなど、心エコー図では病態の全てを網羅できないことが問題であった。近年心臓MRIが臨床応用され、その高い空間分解能により、シネMRIでの解剖学的評価のみならず、T2強調画像での心筋浮腫、さらに遅延造影での心筋線維化といった組織性状まで評価することが可能となった。特に遅延造影MRIは、心病変に対する高い感度と特異度を有し、有害事象の発生予測に対する有用性も報告されている。しかし、心臓MRIは撮像可能な施設に限られ、腎機能低下例では遅延造影が施行できない。またペースメーカー、植え込み型除細動器といったデバイスが植え込まれている場合には撮像禁忌となる。一方心エコー図では、2D スペックルトラッキング法によるストレインが臨床応用され、局所的な壁運動の変化を鋭敏に評価することが可能となった。本法は角度非依存性で検査禁忌がなく、負荷が不要で、繰り返し検査が可能という長所を有する。すでに我々は、遅延造影MRIで同定された心サルコイドーシス病変部位のストレイン値が低下することを明らかにした(Orii M, et al. J Echocardiogr 2013; 11: 69–71)。本研究では、心機能が保たれた心臓外サルコイドーシスの症例を対象に、心臓MRIを用いて心病変の有病率およびその特徴について検討した。さらに、2D スペックルトラッキング法によるストレインが、心病変を同定し得るかについても検討した。

【目的】

心機能が保たれた心臓外サルコイドーシスの症例における心病変の有病率およびその特徴と、2D スペックルトラッキング法によるストレインが、心病変を同定し得るかについても検討すること。

【方法】生検で非乾酪性肉芽腫が同定された心臓外サルコイドーシス48例を登録した。左室壁運動異常を認めた1例、右脚ブロック、高度房室ブロックを認めたそれぞれ1例は除外し、最終的に45例を対象とした。同時に年齢、性別を適合させた正常コントロール10例も検討に加えた。12誘導心電図では、上室性、心室性不整脈の有無、PQ時間、QRS幅、QT時間を計測した。経胸壁心エコー図では、心室中隔と後壁の壁厚、左室駆出率、左房径、左室重量を計測した。引き続き、左室16分画でradial、circumferential、longitudinalストレイン計測を行った。心臓MRI検査では、ストレインと同様にT2強調画像での高信号域

(心筋浮腫)、ガドリニウムによる遅延造影領域(心筋線維化)を左室 16 分画で評価した。遅延造影領域は、心内膜下、中層、心外膜側に分けて検討した。

【結果】

明らかな壁運動異常のない心臓外サルコイドーシス 45 例中 13 例(29%)、36 領域で遅延造影を認めた。心外膜側が 13 領域(36%)、中層が 21 領域(58%)、心内膜側が 2 領域(6%)であった。T2 強調画像で陽性例は認めなかった。年齢、性別、罹患期間、冠危険因子、血清 ACE、BNP、血中、尿中カルシウム、高感度 CRP、副腎皮質ステロイドを含む内服歴は、遅延造影陽性群、陰性群間で有意な差を認めなかった。12 誘導心電図、経胸壁心エコー図検査の指標も 2 群間で有意な差は認めなかった。全 720 領域中 677 領域(97%)で 2D スペックルトラッキング法によるストレイン解析が可能であった。遅延造影陽性群は陰性群、コントロール群に比して circumferential ストレインが有意に低値であった($-14\pm 5\%$ vs. $-28\pm 7\%$ vs. $-30\pm 7\%$, $P<0.0001$)。遅延造影陽性群における longitudinal ストレインは、コントロール群に比して有意に低値であった($-19\pm 4\%$ vs. $-23\pm 5\%$, $P=0.005$)。一方 radial ストレインは 3 群間で有意な差を認めなかった($41\pm 17\%$ vs. $45\pm 23\%$ vs. $46\pm 18\%$, $P=0.50$)。ROC 解析では、radial ストレインのカットオフ値を 37.51%、longitudinal ストレインのカットオフ値を-19.88%とすると、遅延造影を同定する感度と特異度は radial ストレインがそれぞれ 58%と 67%(曲線下面積(AUC);0.55)、longitudinal ストレインがそれぞれ 52%と 60%(AUC;0.62)であった。Circumferential ストレインのカットオフ値を-18.66%とすると、遅延造影を同定する感度と特異度はそれぞれ 92%と 91%(AUC;0.96)であった。Circumferential ストレインにおける ROC 曲線の AUC は radial ストレイン、longitudinal ストレインの AUC に比して有意に高値であった(circumferential vs. radial, $P<0.0001$; circumferential vs. longitudinal, $P<0.0001$)。Radial ストレインと longitudinal ストレインとの間で AUC に有意な差は認めなかった($P=0.19$)。平均 21 \pm 7 ヶ月の観察期間で、死亡、心不全、房室伝導障害、心室性不整脈を含む有害事象が発生した症例は認めなかった。

【考察と結語】

2D スペックルトラッキング法で求めた circumferential ストレインは、心サルコイドーシスにおける局所的な心筋線維化の同定に有用であることが示された。遅延造影 MRI で同定された心筋線維化は、94%が中層および心外膜側に分布しており、壁厚増加とずり応力を組み合わせた壁運動を反映する radial ストレイン、心内膜下の壁運動を反映する longitudinal ストレインよりも、中層の壁運動を反映する circumferential ストレインが有用であった。今回の我々の研究により、2D スペックルトラッキング法は、心サルコイドーシスにおける傷害心筋を非侵襲的に同定し得ることが示唆された。今後は、臨床徴候が出現した心サルコイドーシスの壁運動評価、および治療効果判定に対する検討が期待される。

なお、本研究の要旨は、日本循環器学会(2013. 3, 横浜)、日本心臓病学会(2013. 9, 熊本)、EUROECHO & other Imaging Modalities(2013. 12, イスタンブール:YIA 受賞)にて発表し、Journal of the American Society of Echocardiography 2015; 28: 683-691 に掲載された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 27 年 8 月 7 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。サルコイドーシスは原因不明の多臓器疾患であり、心病変は死亡原因の約 2/3 を占める。房室伝導障害、致死性不整脈、収縮・拡張障害など多彩な病型を呈し、早期診断、治療介入が必要である。確定診断は、生検による非乾酪性類上皮細胞肉芽腫の同定であるが、心外膜側もしくは心筋中層に病変が局在するため、診断の多くは画像診断を組み合わせた臨床診断群となる。

形態評価には心エコー図が用いられてきたが、微細な病変の検出が困難で早期発見には不向きとされてきた。心臓MRIが臨床応用され、その高い空間分解能により、形態評価のみならず心筋の組織性状まで評価することが可能となった。特に遅延造影MRIは、高い感度と特異度を有し、有害事象の発生予測に対する有用性も報告されている。しかし、心臓MRIは撮像可能な施設に限られ、体内金属植え込み例では撮像禁忌となり、腎機能低下例では遅延造影が施行できない。近年心エコー領域では、2Dスペックルトラッキング法によるストレインが臨床応用され、局所的な壁運動の変化を鋭敏に評価することが可能となった。本論文は遅延造影MRIで同定された心病変を、2Dスペックルトラッキング法によるストレインを用いても同定し得ることを明らかにしたものである。明らかな壁運動異常のない心臓外サルコイドーシス症例の30%で遅延造影を認めた。壁厚増加とずり応力を組み合わせた壁運動を反映するradialストレイン、心内膜下の壁運動を反映するlongitudinalストレイン、心筋中層の壁運動を反映するcircumferentialストレインのうち、longitudinalとcircumferentialストレインが遅延造影部位で有意に低下することが明らかになった。さらに遅延造影を同定する診断精度はcircumferentialストレインが最も優れていることが明らかになった。以上、本論文は2Dスペックルトラッキング法によるストレインがサルコイドーシスにおける傷害心筋を非侵襲的に同定し得ることを初めて報告したものである。今後、本法を用いた前向き研究、治療効果判定への応用の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927号		
学位授与の日	平成27年12月15日		
氏名	檜皮谷 泰寛		
学位論文の題目	Ultrasonography of the diaphragm in amyotrophic lateral sclerosis: Clinical significance in assessment of respiratory functions (筋萎縮性側索硬化症における横隔膜エコーの臨床的有用性)		
論文審査委員	主査	教授 中尾 直之	
	副査	教授 村田 晋一	教授 伊東 秀文

論文内容の要旨

【緒言】筋萎縮性側索硬化症(ALS)は中年以降に発症し、上位運動ニューロンと下位運動ニューロンが選択的にかつ進行性に変性していく原因不明の疾患である。運動ニューロンの変性により筋萎縮と筋力低下が認められ、進行すると四肢筋力低下、構音障害、嚥下障害、呼吸障害などを呈する。治療は対症療法が主となるが嚥下障害に対しては胃瘻造設、呼吸不全に対しては人工呼吸器を使用されることがある。人工呼吸器による長期生存例も認められるが、用いなければ通常は2～5年で死亡することが多い。近年は人工呼吸器の使用を患者が希望しないことも多く認められる。呼吸機能の状態は呼吸器装着や気管切開の治療時期を決定するだけでなく、胃瘻造設に関しても呼吸機能の低下がリスクとなるため特に呼吸器装着を希望していない患者にとっては、呼吸機能評価は重要となる。呼吸機能の評価する方法としてはスパイロメトリー、血液ガス検査が主に施行されるが、スパイロメトリーでは顔面筋や咽頭筋の筋力低下により評価が不十分になることがあり、血液ガス検査では呼吸機能とタイムラグを認めることも少なくない。呼吸機能の低下は肋間筋や横隔膜の筋力低下に起因するが、今回エコー検査にて横隔膜の収縮を観察することにより、呼吸機能の評価が可能であると考え検討した。

【対象・方法】ALS患者36名(女性18名、男性18名、平均年齢66.9 ± 7.6歳、罹病期間28.0 ± 26.8ヶ月)と年齢をマッチさせた対照患者19名(女性7名、男性12名、平均年齢63.4 ± 10.8歳)に対して横隔膜エコーを施行した。横隔膜エコーの方法としては、7.5MHzの超音波プローブ(Aplio 80 SSA-770A; Toshiba)を右胸部側壁にあて横隔膜を描出し、胸膜と腹膜が平行に観察できる位置にて横隔膜の厚みを吸気時の最大値(DTmax)と呼気時の最小値(DTmin)でそれぞれ測定した。それぞれ3カ所で測定しその平均値を算出した。吸気時の値から呼気時の値を除いたものを収縮率(The thickening ratio; TR)として算出した。ALS患者ではスパイロメトリーおよび血液ガス検査し施行し、%VCが80未満の群(ALS %VC < 80)と80以上の群(ALS %VC ≥ 80)に分け、横隔膜の厚さおよびTRと従来の呼吸機能検査の各パラメーターとの関連性を検討した。また、無作為に抽出した10名において2名の評価者によりエコー検査を施行し、評価者間信頼性を検討した。

【結果】ALS %VC ≥ 80 と対照群の間に DTmax、DTmin、TR において有意差は認めなかった。ALS %VC < 80 と対照群およびALS %VC < 80 とALS %VC ≥ 80 との比較ではDTmax、DTmin、TRすべてにおいてALS %VC < 80の有意な低下を認めた。%VCとDTmax、DTmin、TRはそれぞれ相関が認められ、特に%VCとTRには強い相関が認められた。また、PaCO₂とDTmax、DTmin、TRとの間にもそれぞれ相関が認められた。HCO₃⁻はDTmax、TRと相関を認めたがDTminとは認められなかった。FEV1/FVCおよびPaO₂はDTmax、DTmin、TRとの相関はすべて認められなかった。

評価者間信頼性の検討ではDTmax、DTmin、TRすべてで相関が認められ十分な級内相関係数が認められた。

【考察】本研究において認められた呼吸機能の低下した ALS 患者における DTmin の低下は横隔膜の萎縮を、TR の低下は横隔膜の収縮力の低下を示唆していると考えられた。呼吸機能と横隔膜との関連は以前の報告からも散見されている。最大吸気圧と横隔膜厚の変化率に相関を認める (Ueki ら、Thorax 1995)、呼吸機能の低下した ALS 患者において横隔膜の萎縮が認められる (Yoshioka ら、Respirology 2007) などの報告が認められ、本研究においても同様の結果が得られた。本研究ではさらに各種の呼吸機能パラメーターとの関連を検討することにより呼吸機能の評価として有用である可能性を示した。ALS では球麻痺症状が呼吸機能障害に先行することがあり、スパイロメトリーでは十分な評価ができないこともしばしば認められ、また血液ガス検査で高 CO₂血症を認める時期になると胃瘻造設術のリスクが高まることが知られている。

横隔膜エコーにより TR を算出することにより、高 CO₂血症が認められる前に呼吸機能の悪化をとらえられる可能性があり、また非侵襲性かつ簡便であることから ALS の呼吸機能評価に有用であると期待される。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 27 年 11 月 12 日および 11 月 19 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

【背景・目的】筋萎縮性側索硬化症 (ALS) において、呼吸機能の評価は治療方針や治療時期の決定に重要な要素である。呼吸機能の評価する従来の方法としてはスパイロメトリー、血液ガス検査がある。しかし、スパイロメトリーでは顔面筋や咽頭筋の筋力低下により評価が不十分になることがあり、血液ガス検査では呼吸機能とタイムラグを認めることも少なくない。呼吸機能の低下は肋間筋や横隔膜の筋力低下に起因するが、今回エコー検査にて横隔膜の収縮を観察することにより呼吸機能の評価が可能であると考え検討した。

【対象・方法】ALS 患者 36 名と年齢をマッチさせた対照患者 19 名に対して横隔膜エコーを施行した。横隔膜エコーの方法としては、7.5MHz の超音波プローブを右胸部側壁にあて横隔膜を描出し、胸膜と腹膜が平行に観察できる位置にて横隔膜の厚みを吸気時の最大値 (DTmax) と呼気時の最小値 (DTmin) でそれぞれ測定した。吸気時の値から呼気時の値を除いたものを収縮率 (The thickening ratio; TR) として算出した。ALS 患者ではスパイロメトリーおよび血液ガス検査し施行し、%VC が 80 未満の群 (ALS %VC < 80) と 80 以上の群 (ALS %VC ≥ 80) に分け、横隔膜の厚さおよび TR と従来の呼吸機能検査の各パラメーターとの関連性を検討した。また、無作為に抽出した 10 名において 2 名の評価者によりエコー検査を施行し、評価者間信頼性を検討した。

【結果】

- ① ALS %VC ≥ 80 と対照群の間に DTmax、DTmin、TR において有意差は認めなかった。
- ② ALS %VC < 80 と対照群および ALS %VC < 80 と ALS %VC ≥ 80 との比較では DTmax、DTmin、TR すべてにおいて ALS %VC < 80 の有意な低下を認めた。
- ③ %VC と DTmax、DTmin、TR はそれぞれ相関が認められ、特に %VC と TR には強い相関が認められた。
- ④ PaCO₂ と DTmax、DTmin、TR との間にもそれぞれ相関が認められた。
- ⑤ 評価者間信頼性の検討では DTmax、DTmin、TR すべてで相関が認められ十分な級内相関係数が認められた。

呼吸機能の低下した ALS 患者における DTmin の低下は横隔膜の萎縮を、TR の低下は横隔膜の収縮力の低下を示唆していると考えられる。呼吸機能と TR の間には相関が認められ、TR を算出することにより呼吸機能の評価が可能であると考えた。本論文は ALS において横隔膜エコーによる呼吸機能評価が可能であることを明らかにした。横隔膜エコーと呼吸機能の関連についての報告はあるが、疾患単位で検討した報告は少なく、特に ALS における多数例の報告は本論文が初めてである。横隔膜エコーは簡便かつ非侵襲性の検査であり、今後の臨床的応用の観点からも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928号		
学位授与の日	平成28年1月12日		
氏名	中西浩子		
学位論文の題目	Incremental Value of Coronary Flow Velocity Reserve, Measured by Transthoracic Echocardiography, Compared with Computed Tomography Angiography Alone, for Detecting Flow-Limiting Coronary Stenoses (血流制限のある冠動脈狭窄の診断：冠動脈CT単独評価と比較した経胸壁心エコー検査を用いて計測した冠血流予備能併用の有用性について)		
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】

近年普及してきた冠動脈CTは解剖学的冠動脈狭窄評価法として高い感度を持っている一方、特異度についてはやや低い傾向にある。これまでの報告でも陰性的中率については優れているものの陽性的中率については低い傾向にある。一方生理学的冠動脈狭窄評価法として冠血流速度を測定し冠血流速度予備能をもとめる方法があるが、近年心エコー装置の発達に伴い経胸壁心エコーにより非侵襲的に冠血流速度を測定することが可能になっている。

本研究の目的は経胸壁心エコーを用いて冠動脈血流速度予備能(CFVR)を計測し、冠動脈造影の狭窄率と比較して主要冠動脈の有意狭窄に対する診断能を評価すること、血流制限を伴った冠動脈狭窄病変の診断精度に対するCFVR測定と冠動脈CTの併用の有用性を冠動脈CT単独診断と比較検討することである。

【方法】

最初に冠動脈径の70%以上の狭窄を予測できるCFVR測定値のカットオフ値をもとめるため冠動脈造影施行前に経胸壁心エコーでCFVR測定を行った60人の患者を後ろ向きに選び、ROCカーブを用いて主要冠動脈ごとにカットオフ値をもとめた。次に前向きに選択された冠動脈造影が予定されている50人の患者にCFVR測定値と冠動脈CTを行った後、冠動脈造影を施行した。冠動脈CT撮影には64列CTスキャナ装置を用い、主要冠動脈近位部～中央部のCFVR測定には経胸壁心エコー装置を用いた。

【結果】

冠動脈径の70%以上の狭窄を予測できるCFVRのカットオフ値は左冠動脈前下降枝2.0、回旋枝と右冠動脈は2.1だった。次に前向きに行われたCFVR結果と冠動脈造影結果を比較したが、冠動脈造影により冠動脈に70%以上の狭窄が見られた群のCFVRの平均値は1.8、70%未満の狭窄にとどまった群のCFVRの平均値は2.6と70%以上の狭窄群で有意に低値だった($p < 0.001$)。本研究で求められたカットオフ値を用いたCFVR単独の冠動脈造影による70%以上の狭窄の診断能は感度84%、特異度87%、陽性予測値66%、陰性予測値95%で、冠動脈CT単独の冠動脈造影による70%以上の狭窄の診断能は感度91%、特異度80%、陽性予測値58%、陰性予測値97%だった。冠動脈CTとCFVR両方の予測が一致した場合の冠動脈造影による70%以上の狭窄の診断能は感度75%、特異度94%、陽性予測値77%、陰性予測値93%であった。

【考察と結語】

経胸壁心エコーによる冠血流速度予備能計測は非侵襲的に冠動脈の定量的かつ機能的情報を得ることができるが、本研究では主要冠動脈三枝ともに冠動脈病変評価に有用であることを明らかにした。また冠血流予備能評価と冠動脈CT所見が一致する場合には冠動脈狭窄の診断および除外が高い診断能で行えることを明らかにした。

冠動脈 CT 検査の特異度の低さを考慮すると冠血流予備能測定を追加することは冠動脈 CT による偽陽性診断を減らすことに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 27 年 12 月 8 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。

従来冠動脈病変の評価法としては冠動脈造影による解剖学的評価が用いられていたが、侵襲的な手法で管腔に満たされた造影剤のシルエットの評価で冠動脈病変評価における限界が報告されている。近年非侵襲的な冠動脈病変評価法として普及してきた冠動脈 CT は解剖学的冠動脈狭窄評価法として高い感度を持っている一方特異度については低い傾向にあり、高い陰性的中率と低い陽性的中率が報告されている。近年心エコー装置の発達に伴い経胸壁心エコーにより非侵襲的に冠血流速を定量的に測定することが可能となり冠血流速を測定し冠血流速予備能（CFVR）をもとめることによる生理学的冠動脈狭窄評価が可能となっている。

本論文は経胸壁心エコーを用いた CFVR 計測が主要冠動脈三枝ともに冠動脈病変評価に有用であることを明らかにするとともに冠動脈 CT による解剖学的評価に CFVR 計測による生理学的冠動脈狭窄評価を組み合わせることで冠血流制限を伴った有意狭窄病変の診断を高い診断能で行えることを明らかにしたものである。

○1 主要三枝冠動脈に対する経胸壁心エコーにより求められた CFVR と冠動脈造影結果を比較：冠動脈造影により冠動脈に 70%以上の狭窄が見られた群の CFVR の平均値は 1.8、70%未満の狭窄にとどまった群の CFVR の平均値は 2.6 と 70%以上の狭窄群で有意に低値 ($p < 0.001$) で CFVR 計測を用いた生理学的評価法により有意冠動脈狭窄病変を三枝ともに診断できる可能性が示された。

○2 冠動脈 CT 単独による冠動脈狭窄病変評価と CFVR 併用による評価：冠動脈造影による 70%以上の狭窄の診断能は冠動脈 CT 単独では感度 91%、特異度 80%、陽性予測値 58%、陰性予測値 97%だった。一方冠動脈 CT と CFVR 両方の予測が一致した場合の冠動脈造影による 70%以上の狭窄の診断能は感度 75%、特異度 94%、陽性予測値 77%、陰性予測値 93%で冠動脈 CT 単独評価よりも特異度、陽性予測値の改善がみられた。

以上、本論文は主要冠動脈三枝における非侵襲的冠動脈狭窄病変評価において冠動脈 CT による評価に経胸壁心エコーを用いた冠動脈血流速評価を併用することで冠動脈有意狭窄病変診断の精度が上がることを報告したもので、日常臨床において不要な冠動脈造影検査を減少させる事ができ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929号		
学位授与の日	平成28年1月12日		
氏名	石橋耕平		
学位論文の題目	Improvement of Cardiac Function by Increasing Stimulus Strength During Left Ventricular Pacing in Cardiac Resynchronization Therapy (心室再同期療法中の左室ペーシングの出力増加がもたらす心機能の改善に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 前田 正信	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

心室再同期療法は、左心室同期不全を有する重症心不全患者において、確立された治療法である。心室再同期療法は、心不全症状、生活の質、運動対応能、左室収縮能が改善する。しかしながら、約20%の患者が心室再同期療法に反応しない、と言われている。心室再同期療法は左室ペーシングリードの位置に規定され、冠静脈走行の影響で不適切な位置に留置されると、ペーシングの刺激が伝導ブロックを乗り越えることができない。左室ペーシングの出力増加は、より広範囲の心筋を刺激することができる。もし広範囲の心筋刺激が伝導ブロックを乗り越える効果を持つなら、左室ペーシングの出力増加は速い心室内電気興奮を可能とする。左室ペーシングの出力増加は、心電図のQRS幅を改善するという報告がある。しかしながら、左室ペーシングの出力増加が左心室同期不全や心機能を改善するかは、不明である。この研究の目的は、心室再同期療法により加療されている患者において、左室ペーシングの出力増加が左心室同期不全や心機能を改善するかどうかを、検討することである。

【方法】

心室再同期療法により加療されている26例の患者が研究に参加した。広範前壁中隔心筋梗塞既往のある患者、著明な心機能障害（左室駆出率<10%）を認める患者、左室リードを留置できなかった患者は除外とした。この研究は、心室再同期療法デバイス植込手術から6か月経った安定期に施行した。各リード（右房、右室、左室）のペーシングのタイミング等のデバイス設定は、全ての患者で同じ設定とした（AV delay 120ms、VV delay 0ms）。左室ペーシングの出力のみを、オフ、通常出力（2.5V）、高出力（5V）に変更した。それぞれの設定に変更して10分間のインターバルの後に、心電図と心エコーを施行した。QRS幅、左心室同期不全、心機能を評価した。左心室同期不全の評価項目は、過去に報告されている、中隔-後壁運動遅延、大動脈前駆出時間、両心室間同期不全、心周期に対する左室充満時間の比、左室12区分間のQRSから最大収縮までの時間の標準偏差、中隔-側壁間のQRSから最大収縮までの時間、とした。心機能の評価項目は、修正シンプソン法による左室駆出率、修正シンプソン法による拡張・収縮期左室容積、左室流出路で計測した血流速度の積分値（VTI）、VTIから算出した一回拍出量、三尖弁逆流の圧格差、とした。

【結果】

QRSは、左室ペーシング出力の増加により、過去の報告と同じく改善を認めた（139ms VS 127ms, $p<0.001$ ）。左心室同期不全の評価項目である、中隔-後壁運動遅延（127ms VS 111ms, $p=0.012$ ）、左室12区分間のQRSから最大収縮までの時間の標準偏差（70ms VS 56ms, $p<0.001$ ）も、通常出力群と比して高出力群において、有意差を持って改善を認めた。さらに、左室駆出率（29% VS 33%, $p=0.005$ ）、左室一回拍出量（51ml VS 64ml, $p<0.001$ ）も、左室ペーシングの出力増加により、有意差を持って改善した。

【考察】

本研究は、心室再同期療法により加療されている患者において、左室ペーシングの出力増加は左心室同期不全や心機能を改善することを示した。我々が知る限り、左室ペーシングの出力増加が心室再同期療法に効果的であったことを示したのは、本研究が初めてである。しかし、本研究にはいくつかの問題点がある。1つ目は、伝導ブロックを起こす瘢痕組織の評価を行っていないことである。2つ目は、本研究は急性期効果の検討しかできておらず、長期的な効果に関しては依然不明なままである。3つ目は、心房細動の患者が5名含まれていた点である。心房細動は脈が不整となるため、ペーシングの効果が評価不能となる可能性がある。しかし、本研究の心房細動を有する患者は、心拍数コントロールが非常に良好であったため、評価に関しては許容範囲であったと思われる。4つ目は、左心室同期不全の評価項目を改善させることが、心室再同期療法の反応に重要な意味があるかは不明である。最後は、左室ペーシングの出力増加は、横隔神経刺激を起こす可能性があり、激しい電池消耗を呈するため、臨床では使用しづらいことである。多点ペーシングは、広範囲の心筋刺激を可能とする点で、左室ペーシングの出力増加と同じ効果を持つ。本研究は、多点ペーシングの効果を支持する基礎データとなる、と思われる。

心室再同期療法により加療されている患者において、左室ペーシングの出力増加は左心室同期不全や心機能を改善した。左室ペーシングの出力増加による広範囲の心筋刺激は、心室再同期療法により加療されている患者に対して、急性期の血行動態改善をもたらす可能性がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年12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。

心室再同期療法は、左心室同期不全を有する重症心不全患者において、確立された治療法であるが、約20%の患者が心室再同期療法に反応しないとされている。心室再同期療法の左室ペーシングリードが冠静脈走行の影響で不適切な位置に留置されると、ペーシングの刺激が伝導ブロックを乗り越えられない。左室ペーシングの出力増加は、より広範囲の心筋を刺激することができ、心電図のQRS幅を改善する。しかしながら、左室ペーシングの出力増加が左心室同期不全や心機能を改善するかは、不明である。

本論文では、心室再同期療法により加療されている26例の患者が研究に参加した。この研究は、心室再同期療法デバイス植込手術から6か月経った安定期に施行された。左室ペーシングの出力を、オフ、通常出力(2.5V)、高出力(5V)に変更し、それぞれの設定にて心電図と心エコーが施行された(測定項目:QRS幅、左心室同期不全、心機能)。結果、QRSは、左室ペーシング出力の増加により、過去の報告と同じく改善を認めた(139ms VS 127ms, $p<0.001$)。左心室同期不全の評価項目である、中隔-後壁運動遅延(127ms VS 111ms, $p=0.012$)、左室12区分間のQRSから最大収縮までの時間の標準偏差(70ms VS 56ms, $p<0.001$)も、通常出力群と比して高出力群において、有意差を持って改善を認めた。さらに、左室駆出率(29% VS 33%, $p=0.005$)、左室一回拍出量(51ml VS 64ml, $p<0.001$)も、左室ペーシングの出力増加により、有意差を持って改善した。本研究は、心室再同期療法により加療されている患者において、左室ペーシングの出力増加は左心室同期不全や心機能を改善することを示している。左室ペーシングの出力増加が心室再同期療法に効果的であったことを示したのは、本研究が初めてである。また、多点ペーシングは、広範囲の心筋刺激を可能とする点で、左室ペーシングの出力増加と同じ効果を持つ。本研究は、多点ペーシングの効果を支持する基礎データとなる、と思われる。

本論文は、心室再同期療法により加療されている患者において、左室ペーシングの出力増加が左心室同期不全や心機能を改善することを証明したものであり、これにより、心室再同期療法により加療されている患者の急性期の血行動態改善をもたらす可能性があり、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930号		
学位授与の日	平成28年2月9日		
氏名	新垣 直樹		
学位論文の題目	Serological and histological indices of hepatocellular carcinoma and tumor volume doubling time (肝細胞癌の腫瘍体積倍加時間と血清腫瘍マーカーおよび組織学的分化度との関係について)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 一瀬 雅夫

論文内容の要旨

【緒言】

肝細胞癌(HCC)は硬変肝においてもっとも高頻度に発症する癌腫である。一般に硬変肝における発癌過程において軽度異形性結節から進行HCCまで多段階に進行することが知られている。また、高分化癌から中分化癌を経て低分化癌に進むにつれて脈管浸潤や転移の頻度が上昇するため、組織学的分化度が低くなるほど生物学的悪性度が高くなると言える。

腫瘍体積倍加時間(Tumor Volume Doubling Time: TVDT)は腫瘍の増殖率を反映し、HCCの生物学的悪性度の指標の一つとなるため、適切な治療方針や経過観察の間隔の決定に有用となる。しかしTVDTの評価は、診断後引き続き行った同一画像検査と比較して、明かな腫瘍径の増大がなければ困難である。

α -fetoprotein (AFP)は頻用されるHCCの腫瘍マーカーの一つである。低分化HCCでは高中分化HCCより血清AFP値やAFP-L3分画が有意に高いことが報告されている。AFP産生腫瘍ではAFP倍加時間(T2AFP)はTVDTと相関し、HCCの生物学的悪性度の指標になりうると考えられるが、T2AFPとTVDTや組織学的分化度との関係については未だ十分に解明されていない。T2AFPとTVDTに強い相関が認められれば、TVDTに代わり、より短期間で簡便に腫瘍の悪性度の評価が可能になると思われる。

本研究ではHCC症例における組織学的分化度、TVDT、T2AFPとの関係について検討を行い、HCCの悪性度評価におけるT2AFP測定の有用性を検討した。

【方法】

1) 腫瘍倍加時間(TVDT)の測定。

肝生検または肝切除による組織学的評価と造影CTにて腫瘍径の経時変化が評価できた肝細胞癌53例を対象とした。症例の内訳はEdmondson (Ed) 1型13例、Ed2型28例、Ed3型12例である。腫瘍体積が2倍に増加する期間(TVDT)を、観察期間をt、腫瘍径前値をm0、腫瘍径後値をm1として以下の式で計算した。

$$TVDT = (t \log 2) / 3 \{ \log(m1) - \log(m0) \}$$

TVDTと組織学的分化度との関係について検討した。

2) AFP倍加時間(T2AFP)の測定。

未治療期間のAFPの測定間隔が14日以上かつ初回測定時AFP値が200ng/ml以上の症例(慢性肝炎によるAFP上昇例を除外するため)44例を対象とした。AFP-L3分画のカットオフ値を10%に設定し、10%以上を陽性とした。

Ed2型29例、Ed3型15例。AFP-L3分画陽性(10%以上)34例、陰性10例。血清AFP値が前値の2倍になるのに要する時間[AFP倍加時間(T2AFP)]は観察期間をt、AFP前値をAFP0、AFP後値をAFP2として以下の式で計算した。

$T2AFP = (t \log 2) / \{ \log (AFP1) - \log (AFP0) \}$

T2AFP と腫瘍分化度、および AFP-L3 分画との関係について検討した。

3) さらに TVDT と T2AFP の両方が測定可能であった 27 例について T2AFP と TVDT の間に相関関係があるか検討した。

【結 果】

1) TVDT と組織学的分化度の関係

患者背景を Table 1 に示す。検討した HCC 症例の TVDT (平均±SD) はそれぞれ以下の通りであった。Ed1 型 : 138.3±110.3 日、Ed2 型 : 94.9±91.5 日、Ed3 型 : 32.2±20.8 日、すなわち Ed3 型、では Ed1 型、Ed2 型に比べ有意な短縮が観察された ($p < 0.05$)。

2) T2AFP と組織学的分化度の関係

患者背景を Table 2 に示す。T2AFP は Ed2 型、Ed3 型でそれぞれ平均 121.0±167.5 日、37.3±24.6 日であり、有意に Ed2 型に比べて Ed3 型で短縮が観察された ($p < 0.01$)。

3) T2AFP と AFP-L3 分画の関係

AFP-L3 陽性例と陰性例ではそれぞれ平均 63.2±101.2 日、191.9±209.9 日であり、AFP-L3 陽性例では陰性例に比べ有意な短縮が観察された ($p < 0.01$)。

4) T2AFP と TVDT の関係

T2AFP と TVDT の両者間に有意で強い相関関係を認めた ($r=0.70$, $p < 0.01$)。

【考 察】

1. TVDT は病理組織学的低分化群で有意な短縮を示し、組織学的悪性度を反映した動態を示した。

2. T2AFP も同様に病理組織学的低分化群で短縮する傾向を示した。

3. また AFP-L3 陽性群では陰性群に比べ T2AFP の有意な短縮が観察され、増殖速度の観点で、AFP-L3 陽性癌の悪性度が高い事が示された。

4. T2AFP と TVDT の間に有意で高い相関が示され、T2AFP の測定により短時間に TVDT の推定ができ、悪性度の指標として用いる事が可能である事が示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

2015年12月22日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

肝細胞癌 (HCC) は硬変肝においてもっとも高頻度に発症する癌腫である。一般に硬変肝における発癌過程において軽度異形性結節から進行HCCまで多段階に進行することが知られている。また、高分化癌から中分化癌を経て低分化癌に進むにつれて脈管浸潤や転移の頻度が上昇するため、組織学的分化度が低くなるほど生物学的悪性度が高くなると言える。

腫瘍体積倍加時間 (Tumor Volume Doubling Time : TVDT) は腫瘍の増殖率を反映し、HCCの生物学的悪性度の指標の一つとなるため、適切な治療方針や経過観察の間隔の決定に有用となる。しかし TVDT の評価は、診断後引き続き行った同一画像検査と比較して、明かな腫瘍径の増大がなければ困難である。

α -fetoprotein (AFP) は頻用されるHCCの腫瘍マーカーの一つである。低分化HCCでは高中分化HCCより血清AFP値やAFP-L3分画が有意に高いことが報告されている。AFP産生腫瘍ではAFP倍加時間 (T2AFP) はTVDTと相関し、HCCの生物学的悪性度の指標になりうると考えられるが、T2AFP とTVDTや組織学的分化度との関係については未だ十分に解明されていない。T2AFPとTVDTに強い相関が認められれば、TVDTに代わり、より短期間で簡便に腫瘍の悪性度の評価が可能になると思われる。

本研究ではHCC症例における組織学的分化度、TVDT、T2AFPとの関係について検討を行い、HCCの悪性度評価におけるT2AFP測定の有用性を検討した。

その結果

1. TVDT は病理組織学的低分化群で有意な短縮を示し、組織学的悪性度を反映した動態を示した。
2. T2AFP も同様に病理組織学的低分化群で短縮する傾向を示した。
3. また AFP-L3 陽性群では陰性群に比べ T2AFP の有意な短縮が観察され、増殖速度の観点で、AFP-L3 陽性癌の悪性度が高い事が示された。
4. T2AFP と TVDT の間に有意で高い相関が示され、T2AFP の測定により短時間に TVDT の推定ができ、悪性度の指標として用いる事が可能である事が示された。

以上より、本論文は肝細胞癌症例における α -fetoprotein 倍加時間が組織学的分化度や腫瘍体積倍加時間を反映するという新しい知見を提供するものであり、今後の肝細胞癌の診療に貢献するものと考え、学位論文として価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第931号		
学位授与の日	平成28年2月9日		
氏名	田伏弘行		
学位論文の題目	Excessive watering eyes in gastric cancer patients receiving S-1 chemotherapy (胃癌術後 S-1 補助化学療法の流涙の検討)		
論文審査委員	主査	教授 山本信之	
	副査	教授 山上裕機	教授 一瀬雅夫

論文内容の要旨

【緒言】

S-1はテガフルとギメラシルとオテラシルが1:0.4:1で構成される経口の抗癌剤である。S-1+シスプラチン併用療法は切除不能進行胃癌の標準治療として認識されており、S-1単独療法はステージⅡとⅢの胃癌に対するD2郭清を伴う根治的胃切除術後の補助化学療法の標準治療である。そのためS-1は切除不能胃癌と切除後胃癌で重要な薬剤である。近年、S-1は胃癌を含めて様々な癌で広く使用されており、流涙は患者のQuality of life(QOL)を低下させる有害事象として重要視されるようになった。

嘔気、下痢、口内炎、食欲不振、味覚障害、色素沈着、皮疹と同様に流涙がS-1に関連する非血液学的有害事象であることはほとんど報告されていなかった。これまでの流涙の報告は様々なレジメンでの少数例のみであった。

流涙は粘膜炎の一種として結膜炎や涙道閉塞によって起こるとされているが、その正確な機序は解明されていない。多くの臨床医は流涙にあまり注意をしないが、流涙は生活に影響し、流涙の悪化は視界を減少させQOLを低下させるかもしれない。そのため流涙の予測と予防は重要であるが、リスク因子は確立されていない。

本研究で我々は流涙の臨床経過を明らかにし、胃癌術後S-1補助化学療法の流涙の予測因子を探索した。

【対象と方法】

1) 対象

2007年1月から2011年8月までの間に静岡がんセンターで胃癌術後S-1補助化学療法を施行した304例を対象とした。

2) 治療

術後補助化学療法として40mg/m²のS-1を28日間は1日2回の内服し14日間は休薬し、手術1年後まで継続する。S-1の投与量は体表面積に基づき1.25m²未満で1回40mg、1.25~1.5m²で1回50mg、1.51m²以上で1回60mgとした。減量、治療サイクル延期や治療計画の変更は主治医判断で決定された。グレード(Gr)3以上の血液毒性やGr2以上の非血液学的毒性与Gr3の流涙が起こった場合は減量かつ又は2週間内服し1週間休薬の3週間サイクルへの治療計画の変更とした。

Gr2以上の流涙出現時に眼科医に紹介した。Gr2の流涙は、人工涙液の点眼で治療し、通水テストで適応があればGr3として涙道ドレナージ目的で涙道ステントを留置した。

3) 有害事象の評価

診察と血液検査は2~3週毎に施行した。有害事象はNational Cancer Institute common terminology criteria for adverse events (CTCAE) version 4.0によって評価した。食欲低下、下痢、全身倦怠感、口内炎、嘔気、色素沈着、味覚障害と皮疹のデータはS-1療法の開始時から計画された8サイクル終了後30日までか8サイクル前に治療を中止した場合のS-1最終投与までを後方視的に

収集した。Gr2 又は Gr3 の流涙の患者は眼科医によって再評価された。流涙の臨床経過をモニターするためにグレードダウンした症例を流涙の改善と定義した。

4) 統計解析法

流涙の累積発生を流涙の発生をイベントとして Kaplan-Meier 法で算出した。流涙のリスクを探索するために、流涙と S-1 治療開始時の患者背景との関連を χ^2 検定で検討し、1 コース中の非血液学的毒性と流涙との統計学的な関連を多変量解析で検討した。

【結果】

1) 患者背景

年齢中央値は 67 歳、男性/女性は 211/93 人、PS0/1/2 は 166/135/ 3 人であった。

2) 流涙と他の有害事象

Gr2 と 3 の流涙は 77 人(25.3%)であった。治療期間中の Gr2 と 3 の流涙の発生を Figure 1 に示す。Gr2 と 3 の流涙の発生期間中央値はそれぞれ 82 日と 249 日で、1 コース中に流涙を認めたのは 19 人であった。患者背景と流涙の間には統計学的な関連は認めなかった。

3) 流涙予測のための他の有害事象との多変量解析

単変量解析では食欲低下、口内炎、色素沈着、皮疹が有意な因子であり、多変量解析でも同様の結果であった。

4) リスク因子の個数と流涙

1 コース中に食欲低下、口内炎、色素沈着、皮疹の 1 つも認めなかった 162 人のうち 19 人(11.7%)、1 つ認めた 107 人のうち 37 人(34.6%)、2 つ認めた 32 人のうち 19 人(59.4%)が全治療期間中に流涙を認めた。

5) 流涙の臨床経過

Gr2 の流涙の 72 人のうち 3 人は治療終了後に転院したため観察出来なかった。10 人は点眼薬のみで S-1 治療終了前に流涙が完全に消失した。残りの 59 人は S-1 治療終了後に 28 人は流涙が改善したが、31 人は 162 日の期間中央値で Gr3 の流涙に悪化した。

Gr3 で発見した 5 人を含めて Gr3 の流涙の 36 人のうち、1 人は外科的治療を希望しなかった。涙道ドレナージ目的のステント治療を受けた残りの 35 人のうち、高度の涙道閉塞のため 5 人はステント留置が出来なかった。ステント留置の成功した 30 人のうち 22 人は流涙が改善し、改善しなかった 8 人は 1087 日の期間中央値で Gr3 の流涙を認めた。

【結語】

胃癌術後 S-1 補助化学療法における流涙の臨床経過と予測因子を検討した。流涙を認めた患者のうち点眼薬のみで改善した患者は少なく、Gr3 に対する涙道ステント留置後も流涙が残存した患者もいたことを明らかにした。また S-1 の 1 コース中に食欲低下、口内炎、色素沈着、皮疹を認めた患者はそれらを認めなかった患者よりも流涙のリスクが高かった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

2016 年 1 月 7 日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

S-1 単独療法は stage II と III の胃癌に対する D2 郭清を伴う根治的胃切除術後の補助化学療法の標準治療である。近年、S-1 は胃癌を含めて様々な癌で広く使用されており、流涙は患者の Quality of life(QOL)を低下させる有害事象として重要視されるようになったが、流涙が S-1 に関連する非血液学的有害事象であることはほとんど報告されておらず、これまでの流涙の報告は様々なレジメンでの少数例のみであった。

流涙は粘膜炎の一種として結膜炎や涙道閉塞によって起こるとされているが、その正確な機序は解明されていない。流涙は生活に影響し流涙の悪化は視界を減少させ QOL を低下させるため、流涙の予測と予防は重要であるがリスク因子は確立されていない。そこで申請者らは、流涙の臨床経過を明ら

かにし、胃癌術後 S-1 補助化学療法の流涙の予測因子を探索した。胃癌術後 S-1 補助化学療法を施行した 304 例を対象とした。流涙と他の非血液学的毒性を National Cancer Institute common terminology criteria for adverse events(CTCAE)で評価し、流涙の頻度やリスク因子を検討した。その結果、(1) 流涙は 25.3%に認め、グレード(Gr)2 と Gr3 の発生期間中央値はそれぞれ 82 日と 249 日であったが、患者背景と流涙との間に統計学的な関連は認めなかった。(2) 流涙予測のための他の有害事象との多変量解析では、S-1 の 1 コース中の食欲低下、口内炎、色素沈着、皮疹が有意であった。(3) 流涙の臨床経過は、観察し得た Gr2 の流涙の 69 人のうち 10 人は点眼薬のみで S-1 治療終了前に流涙が完全に消失した。残りの 59 人は S-1 治療終了後に 28 人は流涙が改善したが、31 人は 162 日の期間中央値で Gr3 の流涙に悪化した。Gr3 で発見した 5 人を含めた 36 人のうち、35 人は涙道ステント治療を受けたが、高度の涙道閉塞のため 5 人はステント留置が出来なかった。ステント留置の成功した 30 人のうち 22 人は流涙が改善し、無改善の 8 人は 1087 日の期間中央値で Gr3 の流涙を認めた。

以上より、本論文は胃癌術後 S-1 補助化学療法における流涙を認めた患者のうち点眼薬のみで改善した患者は少なく、Gr3 に対する涙道ステント留置後も流涙が残存した患者もいたことと、S-1 の 1 コース中に食欲低下、口内炎、色素沈着、皮疹を認めた患者は流涙のリスクが高かったことを明らかにした。S-1 による流涙の臨床経過とリスク因子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のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第932号		
学位授与の日	平成28年2月9日		
氏名	友寄 勝夫		
学位論文の題目	Suppression of in vivo neovascularization by the loss of TRPV1 in mouse cornea. (TRPV1 欠失マウス角膜における血管新生の抑制)		
論文審査委員	主査	教授	川股 知之
	副査	教授	山田 源 教授 雑賀 珠司也

論文内容の要旨

緒言

創傷治癒反応として、血管新生の発生や線維化が起こる。この治癒反応によって角膜疾患では透明性の維持が困難となる場合がある。血管新生の制御が角膜の視機能維持にとって重要と考え、マウス角膜における TRPV1 に着目した。

方法

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて、TRPV1 のアンタゴニストである SB366791(10 μ M)と血管内皮細胞増殖因子(10ng/ml)とを添加した群と、血管内皮細胞増殖因子のみ添加した群とで、血管様管腔構造の変化を比較検討した。②電気組織凝固によるマウス角膜障害モデルでの角膜血管新生の伸展長の検討を行った。③同様に作製したマウス角膜障害モデルから角膜を摘出し、mRNA の発現を Real-time RT PCR 法で測定した。また同様に作製したマウス角膜障害モデルの免疫組織学的検討も行った。

結果

①HUVEC を用いた血管様管腔構造の検討では伸展長、分岐数ともに有意差がなかった。②WT および TRPV1 欠失マウスともに血管新生の伸展がみられたが、WT では 14 日目には退縮し、欠失マウスでは 7 日目をピークに退縮した。さらに両群では 3 日目、7 日目で有意差をもって欠失マウスでの伸展長の抑制が認められた。③mRNA の発現結果は、TRPV1 欠失マウスでは VEGF がわずかに多く発現された。TGF β 1 は欠失マウスで有意差をもって少なく発現した。サブスタンス P と IL-6 は有意差が認められなかった。免疫組織学的検討では VEGF、TGF β 1 とともに WT で上皮基底層により強く染色された。サブスタンス P は WT、欠失マウスともに上皮基底層に検出された。Real time RT PCR 法による mRNA の発現および免疫組織学的検討では F4/80、MPO の角膜浸潤レベルに有意差は認められなかった。

考察

TRPV1 欠損で新生血管成長が抑制されたのは、①HUVEC の結果から血管内皮細胞の挙動は TRPV1 阻害で影響がなかった。②Real-time RT PCR での TGF β 1 の mRNA 発現が著明に低下していた。一方、炎症細胞の浸潤は TRPV1 欠損で影響されなかった。③免疫組織学的検討では TGF β 1 と VEGF の染色性が低下していた。これらの結果から TRPV1 欠失はマウス角膜では血管新生を抑制し、それは TGF β 1 の発現の抑制を伴っていた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 1 月 26 日、論文審査委員会は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

本論文では角膜疾患における炎症反応の治癒過程で起こる組織の線維化・癒着化がその混濁により恒久的

な視力障害となりえるため、新生血管の動態を観察することで TRPV1 が影響していることを示した。方法は、TRPV1 欠損マウスにおける新生血管の動態を観察した。角膜中央部を焼却し、角膜輪部から発生する新生血管が、WT と比べ 3 日目と 7 日目で有意差を持って新生血管の伸展が抑制された。また角膜中央部を焼却し、焼却後 3 日目のマウス角膜の mRNA の発現を観察。TRPV1 欠損マウスで角膜実質での TGF β が低下していた。これらのことから TRPV1 欠損では TGF β 1 の発現の抑制が抑制されることで新生血管が制御されたと考えられた。

以上、本論文は TRPV1 欠失における新生血管の制御が行えることで、角膜の透明性を維持した治療が行える重要な知見と考えられ、学位論文にふさわしい価値があると認めた。

学位記番号	博(医)乙第933号		
学位授与の日	平成28年2月9日		
氏名	仲地 健一郎		
学位論文の題目	Prediction of poorly differentiated hepatocellular carcinoma using contrast computed tomography		
	(造影 CT を用いた低分化型肝細胞癌の診断に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授	山上裕機
	副査	教授	村垣泰光
			教授 一瀬雅夫

論文内容の要旨

【緒言】

経皮的ラジオ波焼灼術 (RFA) はすでに切除不適小肝細胞癌 (HCC) に対して確立された局所療法の一つである。しかしながら、術後の播種や転移など根治的治療が困難な再発を来すことがあり、組織学的低分化が関係すると報告されている。肝細胞癌の主な発癌様式は多段階発癌であり、経時的に脱分化する。組織学的に分化度が低いほど、増殖能が高く、浸潤傾向が強い傾向にある。それ故、たとえ経皮的局所療法の適応となる小肝癌であっても、低分化型肝細胞癌は、すでに顕微鏡的脈管浸潤や肝内転移を伴う進行癌である確率が高く、慎重に治療方針を決定することが重要である。腫瘍生検による組織診断は、出血や播種の危険があり、癌の存在部位によっては組織の採取が困難など、サンプリングエラーの問題もあり、ガイドライン上腫瘍生検は推奨されていない。さらに、低分化型肝癌の画像診断法も十分に確立されていない。本研究では、肝細胞癌の組織学的分化度と造影 computed tomography (CT) の造影パターンとの関係を明らかにし、造影 CT を用いた低分化型肝細胞癌の診断が可能であるか検討した。

【方法】

1. 患者抽出と患者背景

2001年5月から2010年12月までの間に、当院にて生検または切除により組織学的に診断された310例315結節の肝細胞癌のうち、造影CT動脈相にて腫瘍濃染が確認され、結節内結節を呈する肝細胞癌と混合型肝癌を除外した223例226結節を対象とした。

2. 造影CT撮像法

全例4列以上のmulti-detector-low CTを用いて、非イオン性ヨード造影剤580 mgI/kg投与し、動脈相40秒後、門脈相70秒後、平衡相180秒後より、スライス厚5mmで撮影した。

3. 画像および組織評価法

動脈相における腫瘍濃染内に不染域を含むものを不均一濃染、含まないものを均一濃染と定義した。また門脈相、平衡相における腫瘍濃染 washout を、腫瘍のほぼ全体が背景肝より low density を呈するものと定義した。組織学的分化度の評価は International Working Party classification を用いて、腫瘍内の最も分化度の低い組織を基に分類した。

4. 統計解析

腫瘍径と組織学的分化度の関係は、Jonckheere-Terpstra test を、濃染パターンと組織学的分化度の関係は、Fisher's exact test or the chi-square testを用いて解析した。診断能は、McNemar test を用いて比較した。

【結果】

1. 腫瘍径と組織学的分化度の関係

組織学的分化度は well differentiated (w-) 56 例、moderately differentiated (m-) 137 例、poorly differentiated (p-) 33 例に分類され、分類別平均腫瘍径は w-HCC 26 ± 13 mm、m-HCC 33 ± 20 mm、p-HCC 44 ± 33 mm であり、腫瘍径が増大するにつれて分化度は有意に低下していた。

2. 腫瘍濃染パターンと組織学的分化度の関係

分化度が低下するほど、不均一濃染を認めた腫瘍の割合は有意に高かった ($p < 0.001$)。これら 2 群間の比較では、m-HCC と p-HCC の間で有意差を認めたが、w-HCC と m-HCC の間では有意差を認めなかった。腫瘍径が 3 cm 以下の HCC に関しても同様の関連性を認めた ($p < 0.001$)。

3. 腫瘍濃染 washout と組織学的分化度の関係

組織学的分化度が低下するほど門脈相における washout を認めた腫瘍の割合は有意に高かった ($p < 0.001$)。2 群間の比較では、全ての群間で有意差を認めた ($p < 0.001$)。

分化度が低下するほど平衡相における washout を認めた腫瘍の割合は有意に高かった ($p < 0.001$)。しかし、m-HCC と p-HCC の間では有意差を認めず、低分化型と中分化型の鑑別には、門脈相 washout のほうが平衡相 washout よりも優れていた。腫瘍径が 3 cm 以下の HCC に関しても同様の関連性を認めた。

4. 造影 CT を用いた低分化型肝癌の診断能

造影 CT の造影パターンを用いた低分化型肝細胞癌の診断感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および正確度を求めた。診断感度は不均一濃染の方が門脈相濃染 washout よりも劣っていたが、特異度と正確度に優れていた。腫瘍径が 3 cm 以下の HCC においても同程度の診断能であった。不均一濃染と門脈相 washout の組み合わせにより、正確度の向上を認めたが、有意ではなかった。

【考察】

肝細胞癌の組織学的分化度と造影 CT の濃染パターンの関連性を検討した結果、以下の結論が得られた。

1. 腫瘍が増大するにつれて分化度は低下する。
2. 動脈相で不均一に濃染される腫瘍は分化度が低い。
3. 門脈相で濃染が washout される腫瘍は分化度が低い。
4. 不均一濃染を用いた低分化型肝細胞癌の診断能は、門脈相 washout よりも正確度に優れる。
5. 上記の造影パターンと組織学的分化度との関係と造影パターンを用いた低分化型肝細胞癌の診断能は 3cm 以下の小肝癌でも同様である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

2016 年 1 月 19 日、審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

経皮的ラジオ波焼灼術 (RFA) はすでに切除不適小肝細胞癌 (HCC) に対して確立された局所療法の一つである。しかしながら、術後の播種や転移など根治的治療が困難な再発を来すことがあり、組織学的低分化が関係すると報告されている。本研究では、肝細胞癌の組織学的分化度と造影 computed tomography (CT) の造影パターンとの関係を明らかにし、造影 CT を用いた低分化型肝細胞癌の診断が可能であるか検討した。

生検または切除により組織学的に診断された肝細胞癌のうち、造影 CT 動脈相にて腫瘍濃染が確認され、結節内結節を呈する肝細胞癌と混合型肝癌を除外した病変を対象とした。動脈相における腫瘍濃染内の不均一濃染と、門脈相、平衡相における腫瘍濃染の washout について評価し、組織学的分化度の評価は International Working Party classification を用いて、腫瘍内の最も分化度の低い組織を基に分類した。その結果、

- (1) 腫瘍径が増大するにつれて分化度は有意に低下していた。

(2) 分化度が低下するほど、動脈相における不均一濃染を認めた腫瘍の割合は有意に高かった。これら 2 群間の比較では、中分化型と低分化型の間で有意差を認めたが、高分化型と中分化型の間では有意差を認めなかった。

(3) 組織学的分化度が低下するほど門脈相における washout を認めた腫瘍の割合は有意に高かった。2 群間の比較では、全ての群間で有意差を認めた。

(4) 組織学的分化度が低下するほど平衡相における washout を認めた腫瘍の割合は有意に高かった。しかし、中分化型と低分化型の間では有意差を認めず、低分化型と中分化型の鑑別には、門脈相 washout のほうが平衡相 washout よりも優れていた。

(5) 造影 CT の造影パターンを用いた低分化型肝細胞癌の診断感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、および正確度を表 5 に示す。診断感度は不均一濃染の方が門脈相濃染 washout よりも劣っていたが、特異度と正確度に優れていた。

以上より、本論文は肝細胞癌の組織学的分化度と造影 CT の濃染パターンの関連を検討し、腫瘍が増大するにつれて分化度が低下し、動脈相で不均一に濃染される腫瘍は分化度が低い、門脈相で濃染が washout される腫瘍は分化度が低く、不均一濃染を用いた低分化度肝細胞癌の診断能は、門脈相 washout よりも正確度に優れることを明らかにした。肝細胞癌の分化度と造影 CT の濃染パターン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のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第934号		
学位授与の日	平成28年2月9日		
氏名	白木 達也		
学位論文の題目	Altered cytokine levels and increased CD4 ⁺ CD57 ⁺ T cells in the peripheral blood of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma patients (HCV 関連肝癌患者の末梢血中におけるサイトカイン値の変動および CD4 ⁺ CD57 ⁺ T 細胞の増加)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 園木 孝志	教授 一瀬 雅夫

論文内容の要旨

【緒言】

癌の臨床像は、腫瘍浸潤免疫細胞や末梢血細胞など様々なサイトカインが重要な役割を果たす宿主の免疫反応に影響される。また、これらの免疫細胞やサイトカインは、腫瘍進展や予後にも関係する。肝癌患者での CD57⁺リンパ球の局所腫瘍浸潤の組織学的な分析や末梢血中のフローサイトメトリー分析により、CD57⁺細胞が予後に密接に関係していると言われており、他の癌でもまた同様に予後と関係していると報告されている。

IL-10、IL-12、IL-18 や TNF- α のような血漿サイトカイン値は様々な癌の予後マーカーであり、IFN- γ は細胞性免疫を賦活化する事で抗腫瘍免疫において重要な役割を果たす。CD57⁺T 細胞は年齢とともに増加し、多量の IFN- γ を産生し強い細胞障害性を示すが、ほとんどが CD8 陽性である。しかし肝癌患者や慢性感染症患者では CD4⁺CD57⁺T 細胞が増加し、IL-10 の産生増加や IFN- γ の産生低下と相関し、予後不良のマーカーともなりうる事が示唆されており、IFN- γ の産生能は進行胃癌患者で減少すると報告されている。しかし肝癌患者において、これらのサイトカインが CD57⁺リンパ球により影響されるかどうかは分かっていない。

これらの事実を踏まえて本研究では、HCV 関連肝癌症例での抗腫瘍免疫の動態解明を目的に、肝癌進展に伴う血漿中のサイトカイン (IFN- γ 、IL-10、TNF- α 、IL-12、IL-18) 濃度、サイトカイン産生能 (IFN- γ 、IL-10、TNF- α 、IL-12、IL-18)、そして末梢血中の CD4⁺CD57⁺T 細胞の動態について検討を行った。

【方法】

2006年11月から2008年3月の間に当科受診し、追跡可能であった HCV 関連肝癌症例 96 人 (男性 62 人/女性 34 人) を対象とした。全症例 HCV 抗体または HCV-RNA が陽性であり、画像所見や組織学的診断にて肝癌との確定診断可能であった。臨床病期は、日本肝癌研究会の TNM 分類に基づいて決定した。

患者よりヘパリン管にて採血した血液サンプル中 1ml を用いて、室温保存 24 時間以内に以下の解析を行った。血算など通常血液検査に加え、血漿中サイトカイン、また血球培養によるサイトカイン産生能、さらにリンパ球構成について検討した。すなわち、室温、1200g、15 分間遠心分離後得た血漿中のサイトカイン (IFN- γ 、IL-10、TNF- α 、IL-12、IL-18) 濃度を ELISA 法にて測定した。また、末梢血 100 μ l を RPMI1640 100 μ l と共に、リポ多糖(LPS)(最終濃度 1 μ g/ml) 刺激下 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂-95%Room air で培養、24 時間後の上清中サイトカイン (IFN- γ 、IL-10、TNF- α 、IL-12、IL-18) を ELISA 法にて測定した。さらに、末梢血 50 μ l 中の CD4⁺CD57⁺T 細胞を特異抗体で標識の上、FACS

法にて測定した。

統計学的検討は、各項目について対象患者を TNM 分類に基づき 4 群の stage に分類し、2 群間比較は t 検定、多重比較は One-way ANOVA 法に続いて Tukey-Kramer 法、相関係数は Spearman 法にて検討し、p 値 0.05 以下を統計学的に有意であると判定した。

【結果】

全群間で、年齢・性別・血清 ALT 値において統計学的に有意差は認められなかった。stage IV 群では、他群よりもリンパ球数の平均値は有意に低く、AFP の平均値は著明に高いことが特徴的であった。血漿中 IL-12 濃度は、全群間で有意差はなかったが、血漿中 TNF- α 、IL-10 濃度は、早期 stage に比べ進行 stage において有意に増加し、血漿中 IL-18 濃度は、stage IV 群において他群に比べ有意に高かった。IFN- γ は肝癌 stage に関わらず測定感度以下であった。リンパ球サイトカイン産生能は、IL-18、IL-10、IL-12 産生能に関しては、IV 群ではなく III 群において有意に増加し ($p < 0.05$)、TNF- α 産生能は IV 群において他群に比べ有意な低値を示した ($p < 0.05$)。IFN- γ 産生能に関しては、肝癌 stage の進行と共に低下し IV 群で有意な低値を示した ($p < 0.01$)。CD4+CD57+T 細胞集団は、I 群、II 群、III 群の順に段階的に有意な増加を示し、IV 群に至り有意に低下を示した ($p < 0.05$)。CD4+CD57+T 細胞/CD4+T 細胞比は、III 群において有意に増加を示した ($p < 0.05$)。IL-10 産生能は、CD57+NK 細胞や CD57+細胞と有意な正相関が見られた ($p < 0.05$)。IFN- γ 産生能と TNF- α 産生能は、CD57+T 細胞または CD4+CD57+T 細胞とそれぞれ有意な逆相関が見られた ($p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)。さらに IFN- γ 産生能と TNF- α 産生能は、CD4+CD57+T 細胞/CD4+T 細胞比とそれぞれ有意な逆相関が見られた ($p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)。

【考察】

- (1) 血漿 TNF- α 、IL-10 および IL-18 濃度は、既報の予後との相関から予測された通り、肝癌 stage の進行と共に有意な増加を示した。
- (2) リンパ球の IFN- γ 産生能は段階的かつ有意に低下し、肝癌の進展に伴う抗腫瘍免疫能の低下を反映したものと考えられた。
- (3) HCV 関連肝癌においても CD4+CD57+T 細胞集団は癌の進展に伴って増加した。同時に観察された IFN- γ 産生能低下すなわち抗腫瘍免疫能低下は、本 T 細胞 subset 増加に起因する可能性が強く示唆された。
- (4) IV 群における著しい抗腫瘍免疫能の低下は、癌の進展に伴う免疫能を含む肝臓機能低下に起因する可能性だけでなく、繰り返し行われた癌治療の影響による免疫能の変化も考えられた。
- (5) 本研究で使用した迅速かつ簡便性に優れた末梢血培養上清中 IFN- γ 測定法および末梢血中 CD4+CD57+T 細胞集団測定法については、HCV 関連肝癌において癌進行度を判断するのみならず、抗腫瘍免疫能を含む肝臓機能の判定に有用である可能性、さらには検査や治療評価に加えて、抗腫瘍免疫能の維持を念頭においた症例管理に有用な情報を提供する可能性が強く示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成28年1月27日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

癌の臨床像は、腫瘍浸潤免疫細胞や末梢血細胞など様々なサイトカインが重要な役割を果たす宿主の免疫反応に影響される。また、これらの免疫細胞やサイトカインは、腫瘍進展や予後にも関係する。肝癌患者での CD57+リンパ球の局所腫瘍浸潤の組織学的な分析や末梢血中のフローサイトメトリー分析により、CD57+細胞が予後に密接に関係していると言われており、他の癌でもまた同様に予後と関係していると報告されている。

IL-10、IL-12、IL-18 や TNF- α のような血漿サイトカイン値は様々な癌の予後マーカーであり、

IFN- γ は細胞性免疫を賦活化する事で抗腫瘍免疫において重要な役割を果たす。CD57+T 細胞は年齢とともに増加し、多量の IFN- γ を産生し強い細胞障害性を示すが、ほとんどが CD8 陽性である。しかし担癌患者や慢性感染症患者では CD4+CD57+T 細胞が増加し、IL-10 の産生増加や IFN- γ の産生低下と相関し、予後不良のマーカーともなりうる事が示唆されており、IFN- γ の産生能は進行胃癌患者で減少すると報告されている。しかし肝癌患者において、これらのサイトカインが CD57+リンパ球により影響されるかどうかは分かっていない。

これらの事実を踏まえ本研究では、HCV 関連肝癌症例での抗腫瘍免疫の動態解明を目的に、肝癌進展に伴う血漿中のサイトカイン (IFN- γ 、IL-10、TNF- α 、IL-12、IL-18) 濃度、サイトカイン産生能 (IFN- γ 、IL-10、TNF- α 、IL-12、IL-18)、そして末梢血中の CD4+CD57+T 細胞の動態について検討を行った。

その結果、

- (1) 血漿中の IFN- γ 値は肝癌の stage に関わらず測定感度以下であったが、IL-12 を除く血漿中 TNF- α 、IL-10、IL-18 値は、stage IV 群において早期 stage に比べ有意に高かった。
- (2) 末梢血 IFN- γ 産生能は stage I 群で最も高く、stage の進行と共に徐々に低下し IV 群で有意な低値を示した。末梢血 IL-10、IL-18、IL-12 産生能は、stage I 群から III 群へと有意に増加したが、IV 群においては、末梢血 TNF- α 、IL-10、IL-18 産生能の有意な減少がみられ、繰り返し行われた癌に対する治療の影響があると思われた。
- (3) 末梢血リンパ球中の CD4+CD57+T 細胞集団は、腫瘍の進行と共に増加した。その上、末梢血リンパ球中の CD4+CD57+T 細胞集団の割合と CD4+CD57+T 細胞/CD4+T 細胞比それぞれと、末梢血 IFN- γ 産生能との間に有意な逆相関が見られた。

以上より本論文は、肝癌患者において CD4+CD57+T 細胞集団による末梢血 IFN- γ 産生能の調節や、腫瘍進展に伴う末梢血 IFN- γ 産生能の破綻について新しい知見を示した研究であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第935号		
学位授与の日	平成28年3月8日		
氏名	和田 有紀		
学位論文の題目	Prediction of efficacy to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin in patients with genotype 2 hepatitis C virus using viral response within 2 weeks. (2型高ウイルス量C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α 2b・リバビリン併用療法の治療効果予測に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 村田 晋一	
	副査	教授 山上 裕機	教授 一瀬 雅夫

論文内容の要旨

【緒言】C型肝炎は、肝硬変、肝細胞癌の主な原因の一つである。治療目標はC型肝炎ウイルス(HCV)の排除であり、ウイルスが排除されれば、肝線維化は改善し、肝発癌リスクも低下することがすでに明らかにされている。C型肝炎に対する標準的治療は、ペグインターフェロン(PEG-IFN)・リバビリン併用療法であるが、治療に対する反応性は、ジェノタイプやHCV-RNA量によって異なる。ジェノタイプ2型は、1型に比べ治療に対する反応性がよく、期待される血中HCV-RNA持続陰性化(sustained virological response; SVR)率は、約80%と高率ではあるが、まだ約20%は排除できない。PEG-IFN・リバビリン併用療法は副作用の強い治療法であり、精度の高い治療効果予測が可能となれば、治療方針の決定上、極めて有用な情報になるであろう。ジェノタイプ1型では宿主のインターロイキン(IL)28Bの遺伝子多型、ウイルスのNS5A領域の変異数、コア領域のアミノ酸変異などを用いた治療効果予測法が確立されつつあるが、ジェノタイプ2型においては未だ確立されておらず、治療開始4週後の血中HCV-RNA陰性化(rapid virological response; RVR)が最も有用な治療効果予測因子であると報告されている。もし、わずかに1,2週間の治療の反応性により、RVRよりも精度の高い効果予測が可能であれば、個々の症例に適した治療方針を決定することが可能となる。本研究では、2週間以内のウイルス反応性を用いて、精度の高い治療効果予測が可能であるか検討した。またHCV-RNA定量よりも安価で結果が迅速であるコア抗原定量が、治療効果予測に有用であるかも検討した。

【対象と方法】

- 1) 対象
除外基準に抵触しない2型高ウイルス(>5.0 logIU/mL) C型肝炎を対象とし、2008年3月から2011年9月までの間、計64例にPEG-IFN α 2b・リバビリン併用療法を行った。すでに減量と推奨用量の無作為比較試験の結果、治療効果に差がないことが報告されているため、薬剤アドヒアランス67%以上の患者58例を治療効果寄与因子の解析の対象とした。
- 2) 治療法
推奨用量とされるPEG-IFN α 2b(PEG-INTRON; MSD, Tokyo, Japan) 1.5 μ g/kgを週一回皮下注射、リバビリン(Rebetol; MSD) 600~800mg/日内服で24週間治療した。
- 3) 測定項目
早期のウイルス反応性と薬剤の血中濃度を評価するため、治療開始当日、翌日、1週、2週後のHCV-RNA量とHCVコア抗原量、2週後のリバビリン濃度を測定した。リバウンドインデックスは、1週後のウイルス量/翌日のウイルス量と定義した。
- 4) 治療効果の評価
治療終了時および終了後24週時のウイルス陰性化をSVR、治療終了時のウイルス陽性をNo Response、治療終了時ウイルス陰性であるが、終了後24週時ウイルス陰性をRelapseと定義した。
- 5) 統計解析
治療効果はIntention to treat解析で評価した。SVR寄与因子の解析には、アドヒアランス67%未満

を除外した Per protocol 解析で行った。SVR 群と非 SVR 群の背景因子、ウイルス反応性等を比較し、有意な SVR 寄与因子を抽出した。SVR 寄与因子を用いた SVR 予測の ROC 曲線を作成し、Area under the curve (AUC) 値を比較した。Yuden Index 法により最適なカットオフ値を設定。SVR 予測の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、正確度を算出し、RVR の SVR 予測能と比較した。

【結果】

1) 患者背景

平均年齢は 56±13 歳、男性 31 名、女性 33 名。

2) 治療効果と薬剤アドヒアランス

RVR 率 78%、SVR 率 73%、Relapse 率 17%、No Response 率 9%であった。全 64 例の平均アドヒアランスはそれぞれ PEG-IFN- α -2b で 97±8%、リバビリンで 88±16%であった。副作用により 64 例中 9 例 (14%) が PEG-IFN- α -2b を減量または中断を必要とした。27 例 (42%) が、貧血によりリバビリンを減量または中断を必要とした。年齢別にみると、60 歳以上の患者は、60 歳未満に比べリバビリンの用量変更を必要とした割合が有意に高かった (60%vs 26%、 $p=0.007$)。性別では、女性の方が男性に比べリバビリンの用量変更を必要とした割合が有意に高かった (67%vs 29%、 $p=0.003$)。60 歳以上の高齢女性は、高齢男性に比べリバビリンの用量変更した割合が有意に高かった (83%vs 42%、 $p=0.018$)。高齢女性の SVR 率は 39%と低率であった。

3) SVR 寄与因子

SVR 群と非 SVR 群の背景因子および治療後のリバウンドインデックス、リバビリン濃度を比較すると、年齢、体重、白血球数、血小板数、血清線維化マーカー (タイプIV型コラーゲン 7S、ヒアルロン酸) 値、治療前 HCV-RNA 量、HCV コア抗原量、リバウンドインデックスに有意差がみられたが、IL28B 遺伝子多型には有意差を認めなかった。SVR 群と非 SVR 群間の、治療開始より 2 週間の HCV コア抗原量、HCV - RNA 量の推移を比較すると、治療開始翌日、1 週後、2 週後すべてにおいて有意差を認めた。

4) SVR 予測

SVR 寄与因子の AUC 値は、1 週後の HCV コア抗原量が最も高い AUC 値を示した (0.940)。4 週以内のウイルス反応性に関連する SVR 寄与因子の SVR 予測感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率、正確度は、1 週目の HCV コア抗原量のカットオフ値を 100 とすると、正確度は 97%であった。これに対し RVR の正確度は 72%であった。

【結語】

2 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN・リバビリン併用療法において、治療開始 2 週間以内の早期ウイルス反応性を用いた治療効果予測が可能であるか、またコア抗原定量が効果予測に有用であるか検討した結果、以下の結論が得られた。

1. 高齢女性のリバビリンアドヒアランスは有意に低く、SVR 率が低率である。
2. 薬剤アドヒアランスが十分であっても、年齢、線維化、ウイルス量は、治療効果に強く影響する因子である。
3. 治療開始 1 週後のコア抗原量は、RVR よりも治療効果予測の精度が高く、1 週間の試験投与による予測が可能である。
4. コア抗原量の測定は、本治療法の効果予測において HCV-RNA 定量よりも有用である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 28 年 2 月 4 日、審査委員は学位請求者の出席を求め、論文審査を行った。

C 型肝炎は、肝硬変、肝細胞癌の主な原因の一つである。治療目標は C 型肝炎ウイルス (HCV) の排除であり、ウイルスが排除されれば、肝線維化は改善し、肝発癌リスクも低下することが明らかにされている。C 型肝炎に対する標準的治療は、ペグインターフェロン (PEG-IFN)・リバビリン併用療法であるが、治療に対する反応性は、ジェノタイプや HCV-RNA 量によって異なる。ジェノタイプ

2型は、1型に比べ治療に対する反応性がよく、期待される血中 HCV-RNA 持続陰性化 (sustained virological response ; SVR) 率は、約 80%と高率ではあるが、まだ約 20%は排除できない。PEG-IFN・リバビリン併用療法は副作用の強い治療法であり、精度の高い治療効果予測が可能となれば、治療方針の決定上、極めて有用な情報になるであろう。ジェノタイプ1型では宿主のインターロイキン (IL) 28B の遺伝子多型、ウイルスの NS5A 領域の変異数、コア領域のアミノ酸変異などを用いた治療効果予測法が確立されつつあるが、ジェノタイプ2型においては未だ確立されておらず、治療開始4週後の血中 HCV-RNA 陰性化 (rapid virological response ; RVR) が最も有用な治療効果予測因子であると報告されている。もし、わずか1, 2週間の治療の反応性により、RVR よりも精度の高い効果予測が可能であれば、個々の症例に適した治療方針を決定することが可能となる。本研究では、2週間以内のウイルス反応性を用いて、精度の高い治療効果予測が可能であるか検討した。また HCV-RNA 定量よりも安価で結果が迅速であるコア抗原定量が、治療効果予測に有用であるかも検討した。

その結果

(1) 高齢女性のリバビリンアドヒアランスは有意に低く、SVR 率が低率であることが示された。

(2) 薬剤アドヒアランスが十分であっても、年齢、線維化、ウイルス量は、治療効果に強く影響する因子であることが示された。

(3) 治療開始1週後のコア抗原量は、RVR よりも治療効果予測の精度が高く、1週間の試験投与による予測が可能であることが示された。

(4) コア抗原量の測定は、本治療法の効果予測において HCV-RNA 定量よりも有用であることが示された。

以上より、本論文は2型C型慢性肝炎において、早期のウイルスの反応性を用いて治療効果予測が可能であるという新しい知見を提供するものであり、今後のC型慢性肝炎の治療方針決定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)乙第936号		
学位授与の日	平成28年3月8日		
氏名	岩西 宏樹		
学位論文の題目	Inhibition of development of laser-induced choroidal neovascularization with suppression of infiltration of macrophages in Smad3-null mice (Smad3 ノックアウトマウスではマクロファージの流入抑制によりレーザー誘発脈絡膜新生血管の成長は抑制される。)		
論文審査委員	主査	教授 古川 福美	
	副査	教授 村田 晋一	教授 雑賀 司珠也

論文内容の要旨

【緒言】

加齢黄斑変性症は先進国中途失明原因の上位疾患で、その病型は滲出型と萎縮型に分類される。滲出型加齢黄斑変性の主病態は脈絡膜新生血管の発生とそれによる漿液性網膜剥離や網膜下・脈絡膜出血である。脈絡膜新生血管の発症メカニズムは十分には解明されていない。抗血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor : VEGF) 抗体の硝子体内への投与が効果的であるが、効果が弱い症例や血管退縮後に線維瘢痕形成が増強される症例など、より良い治療戦略の検討が必要である。外科的に摘出された脈絡膜新生血管組織にマクロファージを中心とした炎症反応があることが報告された。そのため、これまでも動物病態モデルとしてマウスやラットを用いてレーザー誘発脈絡膜新生血管による研究が報告されている。

Transforming growth factor β (TGF β) は、創傷治癒や組織線維化で細胞の挙動を大きく調節する成長因子である。あらかじめ組織に不活性型として存在し創傷治癒の初動因子として作用する。TGF β がTGF β II 受容体に作用するとALK5受容体を介してSmad2/3が、ALK1受容体を介してSmad1/5/8が活性化される。当教室はこれまでTGF β /Smad3シグナル阻害で角結膜外傷後の炎症性瘢痕や血管新生が少ないこと報告してきた。脈絡膜での炎症と血管新生という病態もTGF β /Smadシグナルが関与している可能性がある。

今回、Smad3ノックアウト (KO) マウスを用いて、レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルにおける脈絡膜新生血管の程度を調べ、その病態解析を行なった。さらに、培養ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いてTGF β /Smad3シグナルが血管新生にどのように関与するかを*in vitro*で検討した。

【方法】

1. マウスを用いた研究

野生型 (WT) マウスと KO マウスでアルゴンレーザーの眼底照射により脈絡膜新生血管を誘発した。照射条件は、スポット径 80 μ m、出力 150mW、照射時間 0.05 秒であった。発症した新生血管の面積を脈絡膜伸展標本でフルオレスセイン標識デキストランによる血管造影で描出した。コ

ンピューターソフトウェアを用いて面積を測定し、比較した。また、パラフィンおよび凍結切片で免疫組織学的に検討した。レーザー照射脈絡膜組織における各種サイトカイン、細胞成分マーカーの発現を real-time RT-PCR にて比較検討した。合計 WT マウス 47 匹、KO マウス 47 匹を用いた。

2. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた研究

HUVEC とヒト皮膚線維芽細胞の共培養系では、HUVEC による管腔様構造の形成で血管新生活性を評価できる。本アッセイで、TGFβ1 存在下で、Smad3 阻害薬 (SIS3) と ALK5 阻害薬 (SB431542) を添加し、HUVEC の管腔様構造形成の長さと同数分岐数を比較検討した。

【結果】

1. マウスを用いた研究

WT マウスと比較して KO マウスではレーザー誘発脈絡膜新生血管組織は有意に小さい結果であった。KO マウスではレーザー照射部位での F4/80 陽性マクロファージの浸潤が少なく、また筋線維芽細胞の出現も少なかった。Real-time RT-PCR での遺伝子発現の検討では、レーザー照射脈絡膜組織における VEGF、TGFβ1、Monocyte Chemotactic Protein-1、Interleukin-6、F4/80、α平滑筋アクチン (筋線維芽細胞マーカー) の mRNA 発現が KO マウス組織で有意に少なかった。

2. HUVEC を用いた研究

添加 TGFβ1 は、HUVEC による管腔様構造形成を促進した。Smad3 阻害薬 (SIS3) 及び ALK5 阻害薬 (SB431542) の添加は TGFβ1 による管腔様構造形成促進作用をさらに増強した。

【考察】

マウスで Smad3 欠失はアルゴンレーザー誘発脈絡膜新生血管の成長を抑制した。レーザー照射部位では、免疫組織学的にマクロファージの流入が少なく、Real-time RT-PCR では VEGF mRNA と TGFβ1 mRNA 発現以外に、マクロファージや炎症及び線維瘢痕化に関連した mRNA 発現が有意に低下していた。

一方、HUVEC を用いた *in vitro* の実験結果は ALK5 受容体または Smad3 の阻害は、TGFβ1 による血管新生促進作用の指標である管腔様構造形成促進作用をさらに増強した。

これらの結果から、KO マウスでのレーザー照射部位による脈絡膜血管新生の抑制効果は、血管内皮細胞に対する直接的な抑制効果によるものではなく、マクロファージに関連した炎症とそれによる組織での炎症関連成長因子の発現が抑制されたことにより、二次的に脈絡膜血管新生が減弱したことによると考えられた。また、アルゴンレーザー照射による脈絡膜血管新生に伴う線維瘢痕化 (筋線維芽細胞の出現) も Smad3 欠失で抑制された。

本研究で着目した TGFβ/Smad3 シグナルが滲出型加齢黄斑変性を含む脈絡膜新生血管関連疾患とそれに伴う脈絡膜の線維化の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成27年2月23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。

先進国における中途失明の上位疾患である加齢黄斑変性は滲出型と萎縮型に分類され、滲出型の最大の特徴は黄斑部脈絡膜新生血管である。脈絡膜新生血管の発症には血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)が深く関与し、抗VEGF抗体治療は臨床上効果的であるが、その治療効果が及ばない症例を経験する上、さらに、治療後に線維瘢痕化が増強し治療不可能になる症例の存在が問題である。

本論文は、組織線維化や炎症制御に関与する主要因子であるTransforming Growth Factor β (TGF β)のシグナル伝達のメインストリームであるSmad3シグナルに着目し、Smad3ノックアウトマウス(Smad3-KOマウス)を用い、滲出型加齢黄斑変性の疾患モデルとして広く用いられているアルゴンレーザー誘発実験的脈絡膜新生血管モデルでTGF β /Smad3シグナルの役割について検討した結果を報告するものである。以下に結果を要約する。

- ・野生型マウスに比較してSmad3-KOマウスではレーザー誘発脈絡膜新生血管組織の大きさは優位に小さいという結果であった（フォレオレスセイン血管造影による）。

さらに、

- ・野生型マウスに比較してSmad3-KOマウスではレーザー照射部位でのF4/80陽性マクロファージの浸潤が少なく、また筋線維芽細胞の出現も少なかった（免疫組織化学）。

- ・遺伝子発現の検討では、レーザー照射組織におけるVEGF、TGF β 1、MCP-1、IL-6、F4/80、 α 平滑筋アクチンのmRNA 発現がSmad3-KOマウス組織で少なかった（Real-time RT-PCR）。

- ・ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた培養研究では、ヒト線維芽細胞との共培養系においてSmad3阻害薬およびALK5阻害薬はTGF β 1による管腔構造形成促進作用をさらに増強した。In vitroでは、in vivoと異なりSmad3シグナル阻害は血管造成に抑制的であると考えられた。

以上の結果から、TGF β /Smad3シグナルの抑制は、レーザー照射組織へのマクロファージの浸潤による炎症を抑制し、新生血管の成長と線維瘢痕化を抑制すると結論づけた。

TGF β /Smad3シグナルの脈絡膜新生血管に及ぼす役割の一端が明らかになった。

本論文はTGF β /Smad3シグナルの抑制が、線維化抑制および血管新生抑制につながる

一端を明らかにし、今後の創薬に繋がる重要な所見の報告と考えられ、学位論文として価値あるものと認めた。