

信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名	学位授与番号	学位授与年月日	学位論文題目	学位審査委員	
				主査	副査
坂本道雄	甲第839号	22. 3.31	Re-evaluation of spontaneous regeneration of the lateral olfactory tract (外側嗅索の自然再生の再評価)	本郷一博	加藤博之 天野直二
中村勝哉	甲第840号	23. 3.31	Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6): Clinical pilot trial with gabapentin (ガバペンチンを用いた脊髄小脳失調症6型(SCA6)に対するパイロット試験)	天野直二	能勢博 福嶋義光
矢野志春	甲第841号	23. 3.31	Selective $\alpha 1A$ -adrenoceptor stimulation induces Mueller's smooth muscle contraction in an isolated canine upper eyelid preparation (選択的 $\alpha 1A$ -アドレナリン受容体の刺激は、単離イヌ上眼瞼標本のミューラー筋を収縮させる)	森泉哲次	池田修一 村田敏規
森周介	甲第842号	22. 9.30	Application of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the detection of proximal lesions in obstructive colorectal cancer (FDG-PET検査の閉塞大腸癌に対する近位側病変評価への応用)	岡元和文	宮川眞一 角谷眞澄
松下一彦	甲第843号	22. 3.31	A splice variant of ASC regulates IL-1 β release and aggregates differently from intact ASC (カスペース-1活性化シグナル経路のアプター分子のASCスプライシング変異体(vASC)はIL-1 β の放出と凝集において全長ASCとは異なっている)	竹下敏一	小池健一 瀧伸介
銭金澤	甲第844号	22. 9.30	Mouse Senile Amyloid Fibrils Deposited in Skeletal Muscle Exhibit Amyloidosis-Enhancing Activity (骨格筋に沈着したマウス老化アミロイド線維はアミロイドーシス発症促進効果を持つ)	池田修一	谷口俊一郎 能勢博
長屋匡信	甲第845号	22. 9.30	Down-regulation of SREBP-1c is associated with the development of burned-out NASH (非アルコール性脂肪肝炎の進行に伴う肝脂肪沈着の減少は、1c型ステロール調節領域結合蛋白の発現低下に関連する)	谷口俊一郎	宮川眞一 本田孝行
堀込実岐	甲第846号	22. 9.30	Assessment of Left Ventricular Dyssynchrony in Patients with Coronary Artery Disease During Adenosine Stress Using ECG-gated Myocardial Perfusion Single Photon Emission Computed Tomography (冠動脈疾患患者における心電図同期SPECTを用いたアデノシン負荷中の左室非同期性の評価)	天野純	角谷眞澄 山田充彦

審査学位論文要旨

小林 宣隆	甲第847号	23. 3.31	Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization (腫瘍間質のヒアルロン酸欠損はマクロファージ動員と腫瘍血管新生を阻害する)	中山 淳	鎌田 徹 池田 宇一
八田 朋子	甲第848号	23. 3.31	Accurate and simple method for quantification of hepatic fat content using magnetic resonance imaging: a prospective study in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease (MRI を用いた肝脂肪含有量の非侵襲的定量法: 非アルコール性脂肪性肝疾患における検討)	本田 孝行	青山 俊文 駒津 光久
藤原 祝子	甲第849号	22. 3.31	A C-terminal amino acid substitution in the γ -chain caused by a novel heterozygous frameshift mutation (Fibrinogen Matsumoto VII) results in hypofibrinogenaemia (新規フレームシフト変異のヘテロ接合体であるフィブリノゲン Matsumoto VII に起因する γ 鎖C末端アミノ酸置換は低フィブリノゲン血症の原因である)	本田 孝行	樋口 京一 谷口 俊一郎
星野 瞳	甲第850号	23. 3.31	Membrane-associated Activation of Cholesterol α -Glucosyltransferase, an Enzyme Responsible for Biosynthesis of Cholesteryl- α -D-glucopyranoside in <i>Helicobacter pylori</i> Critical for its Survival (ピロリ菌の生存に必須なコレステロール- α -D-グルコピラノシド生合成に関わるコレステロール- α -D-グルコース転移酵素の膜結合型活性)	竹下 敏一	本田 孝行 佐々木 克典
小岩井慶一郎	甲第851号	23. 3.31	Risk Factors for Severe Dysphagia after Concurrent Chemoradiotherapy for Head and Neck Cancers (頭頸部癌に対する同時化学放射線療法後に生じる摂食障害のリスク因子)	田中 榮司	宇佐美 真一 松尾 清
林 晶子	甲第852号	22. 3.31	Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin (卵巣癌における histone decetylase 発現は, サブタイプにより役割が異なる。HDAC1は細胞増殖を促進し, HDAC3はEカドヘリン発現抑制を介して細胞の移動を促進する)	谷口 俊一郎	中山 淳 本田 孝行
日高 奈緒	甲第853号	23. 3.31	Endoscopic identification of <i>Helicobacter pylori</i> Gastritis in children (小児における <i>Helicobacter pylori</i> 胃炎の内視鏡的識別)	小池 健一	田中 榮司 宮川 真一
赤澤 陽平	甲第854号	23. 3.31	Intratracheal catheter suction removes the same volume of meconium with less impact on desaturation compared with meconium aspirator in meconium aspiration syndrome (胎便吸引症候群において気管内吸引カテーテルを用いた気管内吸引法はメコニウムアスピレーターを用いた気管内吸引法と比較して, 同等の吸引効果があり, 血中酸素飽和度の低下は小さい)	小池 健一	久保 惠嗣 塩沢 丹里

審査学位論文要旨

鈴木 彰	甲第855号	23. 3.31	Induction of high endothelial venule-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) in a mouse model of “ <i>Candidatus Helicobacter heilmannii</i> ”-induced gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (ヘリコバクター・ハイマニ感染マウス胃炎・MALTリンパ腫モデルにおけるL-セレクチンリガンド糖鎖と粘膜アドレシン細胞接着分子-1 (MAdCAM-1) を発現した高内皮細静脈様血管の誘導)	中山 淳	田中 榮司 本田 孝行
宮川 健	甲第856号	22. 3.31	Reduced hyperthermia-induced cutaneous vasodilation and enhanced exercise-induced plasma water loss at simulated high altitude (3200 m) in humans (3200 m 高地環境下における運動時の皮膚血管拡張抑制は運動による血漿量低下亢進に起因する)	岡元 和文	久保 惠嗣 川真田樹人
増田 雄一	甲第857号	23. 3.31	Clinicopathological features of hepatitis C virus disease after living donor liver transplantation: relationship with in situ hybridisation data (生体肝移植後のC型肝炎の臨床病理学的特徴: in situ hybridisation 法の結果との関係)	田中 榮司	中山 淳 竹下 敏一
菊池 忠	甲第858号	22. 3.31	Protocol-based noninvasive positive pressure ventilation for acute respiratory failure (急性呼吸不全に対するプロトコルに基づいた非侵襲的陽圧換気療法)	川真田樹人	久保 惠嗣 本田 孝行
池上 章太	甲第859号	23. 3.31	Bone mineral density measurement at both spine and hip for diagnosing osteoporosis in Japanese patients (日本人の骨粗鬆症診断における脊椎・大腿骨両部位骨密度測定的重要性)	野見山 哲生	角谷 眞澄 佐々木 克典
筒井 将	甲第860号	23. 3.31	Serum Fragmented Cytokeratin 18 Levels Reflect the Histologic Activity Score of Nonalcoholic Fatty Liver Disease More Accurately Than Serum Alanine Aminotransferase Levels (サイトケラチン18フラグメントの血清レベルは、非アルコール性脂肪肝疾患の組織学的活動性スコアを血清アラニンアミノトランスフェラーゼレベルよりもより正確に反映する)	谷口 俊一郎	本田 孝行 宮川 眞一
堀内 美和	甲第861号	22. 3.31	Decrease in the density of t-tubular L-type Ca^{2+} channel currents in failing ventricular myocytes (不全心室筋細胞のT管のL型 Ca^{2+} チャネル電流密度の低下)	池田 宇一	青山 俊文 川真田樹人
小平 農	甲第862号	22. 3.31	Electrophysiological features of familial amyloid polyneuropathy in endemic area (集積地家族性アミロイドポリニューロパチーの電気生理学的特徴)	能勢 博	多田 剛 山田 充彦

審査学位論文要旨

米田 傑	甲第863号	23. 3.31	Association of Serum Cytokine Levels with Treatment Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients (ジェノタイプ1型のC型慢性肝炎患者における、ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の治療効果と血清サイトカインの関連性)	竹下敏一	宮川真一 本田孝行
重村 倫成	甲第864号	22. 3.31	Effect of the mutant <i>microphthalmia-associated transcription factor</i> found in Tietz syndrome on the in vitro development of mast cells (Tietz 症候群で認められる変異型 <i>microphthalmia-associated transcription factor</i> の in vitro における肥満細胞の増殖・分化に対する影響)	奥山隆平	瀧 伸介 村田敏規
百瀬 正信	甲第865号	22. 3.31	Reevaluation of melanin-bleaching using warm dilute hydrogen peroxide for histopathological analysis (病理組織学的解析のための加温希釈過酸化水素を用いたメラニン漂白の再評価)	本田孝行	青山俊文 中山 淳
酒井 宏司	甲第866号	23. 3.31	Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells (門脈結紮により誘導された Hmga2陽性肝前駆細胞の分離と機能解析)	谷口俊一郎	田中 榮 司 瀧 伸介
宮崎 大吾	甲第867号	23. 3.31	Matrix metalloproteinase -2 ablation in dystrophin-deficient <i>mdx</i> muscle reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers (ジストロフィン欠損 <i>mdx</i> マウス骨格筋における MMP-2の欠損は血管新生を阻害し、再生筋線維の成長障害を引き起こす)	池田 宇一	佐々木克典 中山 淳
加納 義也	甲第868号	23. 3.31	In vitro transdifferentiation of HepG2 cells to pancreatic-like cells by CCl ₄ , D-galactosamine, and ZnCl ₂ (CCl ₄ , D-galactosamine, ZnCl ₂ による HepG2細胞から膵臓様細胞への in vitro における分化転換)	大森 栄	森泉 哲次 駒津光久
李 玉輝	甲第869号	23. 3.31	Mechanism of alkalosis-induced constriction of rat cerebral penetrating arterioles (アルカローシスにより喚起されるラット脳細動脈の収縮反応の解析)	池田 修一	大橋 俊夫 川真田樹人
小田切久八	甲第870号	22. 9.30	Early Intervention with Rosuvastatin Decreases the Lipid Components of the Plaque in Acute Coronary Syndrome: Analysis Using Integrated Backscatter IVUS (ELAN Study) (ロスバスタチンによる急性期脂質低下療法は急性冠症候群における冠動脈プラークの脂質成分を減少させる: Integrated Backscatter IVUS を用いた検討から)	天野 純	岡元和文 駒津光久

Re-evaluation of spontaneous regeneration of the lateral olfactory tract (外側嗅索の自然再生の再評価)

坂本道雄

(論文の内容の要旨)

【目的】外側嗅索 (LOT) は、嗅球からの嗅覚情報を嗅皮質へ伝える嗅覚系の主要な伝導路である。新生児ラットの LOT を切断すると、長期間経過後に、嗅覚伝導路の自然再生がおこるとい興味深い研究論文が 1997年に発表された。しかし、論文を詳細に検討すると、LOT 切断の客観的評価 (完全切断・不完全切断)、LOT 再生の形態的評価 (切断部を越えて伸長する再生神経線維の証明)、LOT 再生の機能的評価 (嗅覚機能)、再生までの期間など、脳内伝導路再生に関する重要な点が不明瞭であり、これらの課題を解明することを目的として本研究を行った。

【方法】

1. 手術：生後1日または2日の新生児ラット (n = 78) の左 LOT を切断し、完全切断を客観的に評価する目的で、左嗅皮質に逆行性の神経トレーサー Fast Blue (FB) を注入した。
2. 逆行性神経トレーサーによる再生の証明：左 LOT 切断・FB 注入後、一定期間 (4～8週間) 生存させた後に、左嗅皮質に別の逆行性の神経トレーサー Fluoro-Gold (FG) を注入した。FG 注入2日後に還流固定を行い、嗅球・脳の凍結切片 (30 μm) を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。
3. 順行性神経トレーサーによる再生の証明：左 LOT 切断・FB 注入後、4～8週間生存させた後に、両側の嗅球に順行性の神経トレーサー Biotinylated dextran amine (BDA-10000) を注入した。BDA 注入7日後に還流固定を行い、嗅球・脳の凍結切片 (50 μm) を作成し、蛍光顕微鏡で観察した。隣接切片は、DAB 反応を行い、BDA を可視化し、光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察した。また、髄鞘形成を見る目的で、抗 Myelin basic protein (MBP) 抗体を用いて、免疫組織化学反応を行った。
4. 嗅覚機能検査：左 LOT 切断・FB 注入後、4～6週間生存させた後に、切断側の嗅覚神経系の機能を知る目的で、非切断側の右嗅球を吸引除去した。その後2日間絶水させ、0.01% シクロヘキシミド溶液を用いて嗅覚機能 (olfactory aversion behavior)

を調べた。嗅覚機能検査後のラットは、逆行性または順行性の神経トレーサーを注入し、同様に神経再生の有無を検索した。

【結果】

1. LOT 完全切断例は、正常成熟ラットで見られる白い髄鞘帯が完全に欠損し、さらに嗅球投射ニューロン (僧帽細胞) が神経トレーサー FB で標識されないことにより、客観的に評価できた。完全切断例は 69.2% で、不完全切断例は 30.8% であった。
2. LOT 完全切断 4～8週後に、切断部後方の嗅皮質に注入された神経トレーサー FG は逆行性に軸索輸送され、切断部を越えて多数の嗅球投射ニューロンが標識された。
3. LOT 完全切断 4～8週後に、嗅球に注入された神経トレーサー BDA は順行性に軸索輸送され、切断部を越えて後方の嗅皮質にまで多数の標識が観察された。正常側と比べると、BDA (+) 領域は嗅皮質内で厚さが薄く、視交叉より後方の遠位嗅皮質にまでは及んでいなかった。また、MBP (+) の軸索線維が欠損し、電子顕微鏡では多くの BDA (+) の軸索終末が見られたが、ミエリン鞘を欠いていた。
4. シクロヘキシミド溶液を用いた嗅覚識別検査の正解率は、LOT 完全切断群 (新生児左 LOT 完全切断・4～6週右嗅球除去) 91.3±1.2% で、右嗅球除去のみの対照群の 92.8±1.0% と同様であった。両側嗅球除去群や LOT 完全切断と反対側嗅球除去を同時に行った群のそれぞれの正解率は、49.6±1.7% と 54.3±2.5% であり、有意差 ($P < 0.01$) を認めた。

【結論】

1. 新生児ラット LOT の完全切断後、4週以内に切断部を越えて神経線維が伸長し、嗅覚伝導路の自然再生がおこることが、順行性並びに逆行性の神経トレーサーを用いて証明された。
2. 再生された LOT は、正常と異なり髄鞘形成がないが、嗅球投射ニューロン由来の軸索終末は嗅皮質に多数存在し、シナプスを形成し、機能的にも嗅覚識別能が正常に維持されていることが明らかにされた。

以上の結果より、形態的・機能的両面から、脳内伝導路の自然再生がおこると結論された。

(論文審査の結果の要旨)

本研究で坂本は、主要な嗅覚伝導路である外側嗅索

(LOT) の自然再生に対して、LOT 切断の客観的評価、切断部を越える再生神経線維の直接的証明、嗅覚検査による LOT 再生の機能的評価、再生期間の決定などの未解明なこれらの課題を明らかにすることを目的として、新生児ラットについて LOT 切断実験を行った。

その結果、坂本は次の結果を得た。

1. LOT の完全切断は、正常成熟ラットで見られる白い髄鞘帯が完全に欠損していること、そして、LOT 切断直後、切断部後方の嗅皮質に注入された神経トレーサー FB によって嗅球投射ニューロン(僧帽細胞)が逆行性に標識されないことにより、客観的に評価できた。
 2. LOT 完全切断 4～8 週後に、切断部後方の嗅皮質に注入された神経トレーサー FG は逆行性に軸索輸送され、切断部を越えて多数の嗅球投射ニューロンが標識された。また、LOT 完全切断 4～8 週後に、嗅球に注入された神経トレーサー BDA は順行性に軸索輸送され、切断部を越えて後方の嗅皮質にまで多数の標識が観察された。よって、新生児ラット LOT の完全切断後、4 週以内に切断部を越えて神経線維が伸長し、嗅覚伝導路の自然再生がおこることが、順行性並びに逆行性の神経トレーサーを用いて証明された。
 3. さらに詳細に LOT 再生神経線維の形態的評価を行うと、正常側と比べると、BDA (+) 領域は嗅皮質内で厚さが薄く、視交叉より後方の遠位嗅皮質にまでは及んでいなかった。また、MBP (+) の軸索線維が欠損し、電子顕微鏡では多くの BDA (+) の軸索終末が見られたが、ミエリン鞘を欠いていた。よって、再生された LOT は、正常と異なり髄鞘形成がないが、嗅球投射ニューロン由来の軸索終末は嗅皮質に多数存在し、シナプスを形成していることが明らかにされた。
 4. シクロヘキシミド溶液を用いて嗅覚識別検査を行った。正解率は、LOT 完全切断群(新生児左 LOT 完全切断・4～6 週右嗅球除去) $91.3 \pm 1.2\%$ で、右嗅球除去のみの対照群の $92.8 \pm 1.0\%$ と同様であった。両側嗅球除去群や LOT 完全切断と反対側嗅球除去を同時に行った群のそれぞれの正解率は、 $49.6 \pm 1.7\%$ と $54.3 \pm 2.5\%$ であり、有意差 ($P < 0.01$) を認めた。機能的にも嗅覚識別能が正常に維持されていることが明らかにされた。
- 以上により、新生児ラットの外側嗅索切断後の自然

再生が明らかにされた。これまでの研究で行われなかった外側嗅索切断の客観的評価、順行性神経トレーサーを用いた再生神経線維の直接的な証明、再生神経線維による機能獲得といった機能的評価がなされており、生物学的にも臨床医学的にも意義があるものと考えられ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6):
Clinical pilot trial with gabapentin
(ガバペンチンを用いた脊髄小脳失調症 6 型
(SCA6) に対するパイロット試験)

中 村 勝 哉

(論文の内容の要旨)

【背景】脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) は常染色体優性遺伝性の脊髄小脳失調症の一病型であり、本邦では比較的頻度が高い疾患である。主に中高年に発症し、小脳症状が主体で他の神経症状が乏しい純粋小脳型を呈する。SCA6 の病因は電位依存性カルシウムチャネル (voltage-dependent calcium channel, VDCC) の $\alpha 1$ サブユニットをコードする遺伝子内にある CAG リピートの過剰伸長であり、結果的に $\alpha 1$ サブユニットの蛋白構造が変化し、カルシウムチャネルの機能異常をきたすと考えられている。ガバペンチン(商品名ガバペン)は GABA 系神経伝達の賦活化だけでなく、VDCC の $\alpha 2\delta$ サブユニットに結合してカルシウムチャネルの機能調節作用も併せ持つ。このため SCA6 の運動失調への効果が期待されるが、SCA6 に対しガバペンチンを用いた臨床研究は今までに報告されていない。そこで、今回我々は、Internal Co-operative Ataxia Rating Scale (ICARS) と重心動揺検査を評価項目に用い、ガバペンチンの臨床効果を検討した。

【方法】対象は遺伝子検査にて確定診断された SCA6 患者 11 名 (平均年齢 55.4 歳 (range 39-65 歳)、平均発症年齢 38.6 歳 (range 29-54 歳)、平均罹病期間 12.9 年 (range 2-26 年))。ガバペンチンは投与開始日のみ 400 mg/日を単回投与、2 日目以降は 1200 mg/日を 3 回分割で 4 週間投与した。内服前後で、Internal Co-operative Ataxia Rating Scale (ICARS) による失調症状の評価・重心動揺検査・脳血流シンチを行った。重心動揺検査は、動揺面積 (SA, cm^2) および単位軌跡長 (SPL, cm/s) をそれぞれ評価した。髄液

GABA 濃度は内服前および 4 週間後に、ガバペンチンの血中濃度は 2 週間後に測定した。本研究はパイロット試験であるため、統計学的検定は SIGMASTAT (version 2.0) にて paired t-test を用いた。

【結果】 ICARS 総合点は、内服前 29.9 ± 12.6 点 (mean \pm SD) と比較し、3 時間後 27.4 ± 10.7 点 ($p = 0.07$)、2 週間後 26.3 ± 11.1 点 ($p < 0.05$)、4 週間後 26.8 ± 11.9 点 ($p = 0.09$) と改善し、内服終了後 4 週間後は 28.3 ± 13.4 点と再び上昇する傾向が見られた。ICARS の変化は主に姿勢・歩行障害 (静的点数) と四肢協調運動 (動的点数) の改善によるものであり、構音障害・眼球運動障害分野の点数に変化はみられなかった。重心動揺検査は、外周面積は内服前 $14.5 \pm 9.6 \text{ cm}^2$ と比較し、3 時間後 $11.6 \pm 5.5 \text{ cm}^2$ ($p = 0.18$)、4 週間後 $10.6 \pm 5.2 \text{ cm}^2$ ($p = 0.25$)、内服終了 4 週間後 $19.9 \pm 13.0 \text{ cm}^2$ であった ($p < 0.05$, vs. week 4)。単位軌跡長は、内服前 $5.7 \pm 2.7 \text{ cm/sec}$ と比較し、3 時間後 $4.0 \pm 1.4 \text{ cm/sec}$ ($p < 0.05$)、4 週間後 $4.3 \pm 1.9 \text{ cm/sec}$ ($p = 0.06$)、内服終了 4 週間後 $6.8 \pm 4.9 \text{ cm/sec}$ ($p < 0.06$, vs. week 4) と、ICARS と同様の傾向が見られた。脳血流シンチでは、明らかな血流改善効果を認めなかった。髄液中 GABA 濃度は 9 名で測定し、内服前 $183.9 \pm 110.2 \text{ pmol/ml}$ 、内服後 $110.2 \pm 35.6 \text{ pmol/ml}$ ($p < 0.05$) と有意に低下した。ガバペンチン血中濃度は 10 名で測定し、 $6.2 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$ 。ガバペンチン血中濃度は、腎機能正常群 (eGFR $> 90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, $n = 4$) で $4.7 \pm 0.9 \square \text{ g/ml}$ に対し、軽度低下群 (eGFR $60\text{--}90 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, $n = 6$) $7.1 \pm 1.3 \square \text{ g/ml}$ と明らかに高値であった ($p < 0.05$)。投与期間中、7 人が軽度の眠気を訴えた以外は有害事象は認めず、全 11 例が予定観察期間を終了した。

【考察】 今回の研究では、ガバペンチン内服中の SCA6 患者の臨床症状に一定の改善傾向が見られたものの有意な改善ではなかった。一つの要因としては、ガバペンチン血中濃度が不十分であった可能性がある。ガバペンチン血中濃度は、腎機能に逆相関するため、最大臨床効果を期待するには留意する必要がある。また、患者背景として罹病期間が 10 年を超える例が多かったことも影響した可能性がある。本研究の問題点としては、稀少疾患である SCA6 に対する初めての試みであったこともあり、全例に実薬を open label で投与した前後比較研究に過ぎず、プラセボ効果や評価者の主観などの混入があり得た点が挙げられる。

(論文審査の結果の要旨)

脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) は常染色体優性遺伝性の脊髄小脳失調症の一病型であり、その病因は電位依存性カルシウムチャネル (voltage-dependent calcium channel, VDCC) の $\alpha 1$ サブユニット遺伝子 (CACNA1A 遺伝子) 内の CAG リピートの過剰伸長である。SCA6 は、本邦の優性遺伝性脊髄小脳変性症の約 25% を占めるが、根治的な治療法は存在しない。ガバペンチン (商品名ガバペン®) は GABA 系神経伝達の賦活化だけでなく、VDCC の $\alpha 2\delta$ サブユニットに結合してカルシウムチャネルの機能調節作用も併せ持つ。本論文は、ガバペンチンの SCA6 に対する臨床効果を検討した結果を述べたものである。

対象は遺伝学的検査にて確定診断された SCA6 患者 11 名。ガバペンチンは投与開始日のみ 400 mg/日を単回、2 日目以降は 1200 mg/日を 3 回分割で 4 週間投与し、内服前後で、International Co-operative Ataxia Rating Scale (ICARS)、重心動揺を評価した。ICARS 総合点は、内服前 29.9 ± 12.6 点 (mean \pm SD) と比較し、3 時間後 27.4 ± 10.7 点 ($p = 0.07$)、2 週間後 26.3 ± 11.1 点 ($p < 0.05$)、4 週間後 26.8 ± 11.9 点 ($p = 0.09$) と改善し、内服終了後 4 週間後は 28.3 ± 13.4 点と再び上昇する傾向が見られた。重心動揺検査は、外周面積は内服前 $14.5 \pm 9.6 \text{ cm}^2$ 、3 時間後 $11.6 \pm 5.5 \text{ cm}^2$ ($p = 0.18$)、4 週間後 $10.6 \pm 5.2 \text{ cm}^2$ ($p = 0.25$)、内服終了 4 週間後 $19.9 \pm 13.0 \text{ cm}^2$ ($p < 0.05$, vs. week 4)。単位軌跡長は、内服前 $5.7 \pm 2.7 \text{ cm/sec}$ 、3 時間後 $4.0 \pm 1.4 \text{ cm/sec}$ ($p < 0.05$)、4 週間後 $4.3 \pm 1.9 \text{ cm/sec}$ ($p = 0.06$)、内服終了 4 週間後 $6.8 \pm 4.9 \text{ cm/sec}$ ($p < 0.06$, vs. week 4) と、ICARS と同様の傾向が見られた。髄液中 GABA 濃度は 9 名で測定し、内服前 $183.9 \pm 110.2 \text{ pmol/ml}$ 、内服後 $110.2 \pm 35.6 \text{ pmol/ml}$ ($p < 0.05$) と有意に低下した。ガバペンチン血中濃度は 10 名で測定し、腎機能 (推算糸球体濾過量) との負の相関がみられた。

今回の研究では、ガバペンチン内服中の SCA6 患者の臨床症状に一定の改善傾向が見られたものの、統計学的に有意な改善ではなかった。要因としては、少数例での検討であった点、ガバペンチン投与量が適正であったかという点、全例に実薬を open label で投与した前後比較研究であった点、などがあげられる。これらの結果は SCA6 の新規治療薬開発に寄与する新しい知見であり、学位論文として十分価値があるものと

主査，副査は一致して認めた。

Selective α_{1A} -adrenoceptor stimulation induces Mueller's smooth muscle contraction in an isolated canine upper eyelid preparation (選択的 α_{1A} -アドレナリン受容体の刺激は，単離イヌ上眼瞼標本のミュラー筋を収縮させる。)

矢野志春

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】上眼瞼の平滑筋であるミュラー筋は開瞼を補助しており，眼瞼の挙上に重要な組織である。また，眼輪筋などの痙攣とミュラー筋の働きに関連がある可能性も報告されており，ミュラー筋には，瞼を開けるための補助的な役割以外の機能が存在するのではないかと考えられている。上眼瞼挙筋の腱膜と瞼板との接着が弱まり，瞼が開けづらくなっている腱膜性眼瞼下垂症患者では， α_1 アドレナリン受容体アゴニストであるフェニレフリンを点眼することによって上眼瞼のミュラー筋が収縮し，瞼が開くことが示されている。ヒトのミュラー筋に関しては，切除検体を用いた収縮反応実験から， α_1 アドレナリン受容体の α_{1A} ， α_{1B} ， α_{1D} のサブタイプのうち， α_{1A} アドレナリン受容体が優位であるという報告もあるが，受容体のサブタイプの検索が眼瞼下垂症の病態生理や，ミュラー筋の機能の解明を進めていくために重要であるため，イヌの上眼瞼を用いた新しい実験系を確立し，薬理学的手法にて，ミュラー筋の収縮を誘発する α_1 アドレナリン受容体サブタイプを分析した。

【材料および方法】22頭のビーグル犬(体重10-15 kg)から上眼瞼を周囲の軟部組織とともに採取した。眼瞼組織内に分布する眼角静脈にカニューレを挿入し，ここから逆行性に $36 \pm 1^\circ\text{C}$ の Krebs-Henseleit 液を灌流し，同液を満たした専用チャンバーに設置した。上眼瞼の瞼縁側に絹糸を4箇所取り付け，収縮力測定のためのトランスデューサと接続し，等尺性収縮力を測定した。 α_1 アドレナリン受容体アゴニストであるフェニレフリンをカニューレから累積的にボラス投与し，張力反応を測定した。収縮張力の用量反応曲線はHillの式で解析した。また，WB4101 (α_{1A} および α_{1D} アドレナリン受容体拮抗薬) (100 nM) を含む Krebs-Henseleit 液を灌流させて，フェニレフリンを注入したときの収縮を測定した。次に，フェ

ニレフリンでミュラー筋組織を収縮させた後に，BMY7378 (α_{1D} アドレナリン受容体拮抗薬) (100 nM) を Krebs-Henseleit 液に溶解して灌流し，その後 WB4101 (100 nM) を続けて灌流して弛緩する変化量を調べた。最後に，ABT-866 (α_{1A} アドレナリン受容体アゴニスト) をフェニレフリンの代わりに累積的にボラス投与し，収縮力を測定した。ミュラー筋の存在部位を確認するために，採取した上眼瞼を矢状断にスライスし，抗平滑筋アクチン抗体を用いて免疫染色した。

【結果】フェニレフリン (0.001-30 μmol) を注入すると，イヌ上眼瞼ミュラー筋は用量依存的に収縮した。Hillの式による解析では，フェニレフリンの最大張力は0.70 g， $K_{0.5}$ (最大反応の50%を引き起こすフェニレフリンの用量) は0.11 μmol ，Hill係数は1.50であった。フェニレフリンによる収縮は，平均 92 ± 6.4 分持続した。WB4101 (100 nM) が存在下での，フェニレフリンによる最大張力は0.64 g， $K_{0.5}$ は2.9 μmol ，Hill係数は0.86であった。WB4101 (100 nM) は，フェニレフリンの用量反応曲線を右方へシフトし，同じ収縮力を得るための用量を増加させたが，最大反応を有意に抑制しなかった。したがって，フェニレフリンの反応はWB4101によって競合的に阻害されたと考えられた。BMY7378 (100 nM) または WB4101 (100 nM) は，フェニレフリンにより誘発される持続的収縮をいずれも時間依存性に抑制したが，WB4101 (100 nM) は BMY7378 (100 nM) より有意に強い抑制を示した。したがって， α_{1D} アドレナリン受容体阻害よりも， α_{1A} アドレナリン受容体阻害が強く収縮を抑制した。ABT-866 (0.001-3 μmol) を注入するとイヌ上眼瞼ミュラー筋は用量依存的に収縮した。Hillの式による解析では，ABT-866の最大張力は0.67 g， $K_{0.5}$ (最大反応の50%を引き起こす ABT-866の用量) は0.19 μmol ，Hill係数は0.72であった。眼瞼組織の免疫染色では収縮力測定に用いたすべての標本で，眼瞼結膜下にミュラー筋に相当する平滑筋が密集して存在していることを認めた。

【結論】ミュラー筋の収縮と収縮の維持には， α_{1A} アドレナリン受容体の刺激が関わっている。ABT-866のような α_{1A} アドレナリン受容体アゴニストはミュラー筋の持続的収縮を惹起し，眼瞼下垂症の改善に役立つ可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

上眼瞼の平滑筋であるミュラー筋は開瞼を補助して

おり、眼瞼の挙上に重要な組織である。また、眼輪筋などの痙攣とミュラー筋の働きに関連がある可能性も報告されている。上眼瞼挙筋の腱膜と瞼板との接着が弱まり、瞼が開けづらくなっている腱膜性眼瞼下垂症患者では、 α_1 アドレナリン受容体アゴニストであるフェニレフリンを点眼することによって上眼瞼のミュラー筋が収縮し、瞼が開くことが示されている。受容体のサブタイプの検索が眼瞼下垂症の病態生理や、ミュラー筋の機能の解明を進めていくために重要であるため、本論文は、イヌの上眼瞼を用いた新しい実験系を確立し、薬理学的手法にて、ミュラー筋の収縮を誘発する α_1 アドレナリン受容体サブタイプを分析したものである。

22頭のビーグル犬(体重10-15 kg)から上眼瞼を周囲の軟部組織とともに採取した。眼瞼組織内に分布する眼角静脈にカニューレを挿入し、ここから逆行性に $36 \pm 1^\circ\text{C}$ の Krebs-Henseleit 液を灌流し、同液を満たした専用チャンバーに設置した。上眼瞼の瞼縁側に絹糸を取り付け、収縮力測定のためのトランスデューサーと接続し、等尺性収縮力を測定した。 α_1 アドレナリン受容体アゴニストであるフェニレフリンをカニューレから累積的に投与し、張力反応を測定した。収縮張力の用量反応曲線は Hill の式で解析した。また、WB4101 (α_{1A} および α_{1D} アドレナリン受容体拮抗薬) (100 nM) を含む Krebs-Henseleit 液を灌流させて、フェニレフリンを注入したときの収縮を測定した。次に、フェニレフリンでミュラー筋組織を収縮させた後に、BMY7378 (α_{1D} アドレナリン受容体拮抗薬) (100 nM) を Krebs-Henseleit 液に溶解して灌流し、その後 WB4101 (100 nM) を続けて灌流して弛緩する変化量を調べた。最後に、ABT-866 (α_{1A} アドレナリン受容体アゴニスト) をフェニレフリンの代わりに累積的に投与し、収縮力を測定した。ミュラー筋の存在部位を確認するために、採取した上眼瞼を矢状断にスライスし、抗平滑筋アクチン抗体を用いて免疫染色した。

フェニレフリン (0.001-30 μmol) を注入すると、イヌ上眼瞼ミュラー筋は用量依存的に収縮した。Hill の式による解析では、フェニレフリンの最大張力は 0.70 g, $K_{0.5}$ (最大反応の50%を引き起こすフェニレフリンの用量) は 0.11 μmol , Hill 係数は 1.50 であった。フェニレフリンによる収縮は、平均 92 ± 6.4 分持続した。WB4101 (100 nM) が存在下での、フェニレフリンによる最大張力は 0.64 g, $K_{0.5}$ は 2.9 μmol ,

Hill 係数は 0.86 であった。WB4101 (100 nM) は、フェニレフリンの用量反応曲線を右方へシフトし、同じ収縮力を得るための用量を増加させたが、最大反応を有意に抑制しなかった。したがって、フェニレフリンの反応は WB4101 によって競合的に阻害されたと考えられた。BMY7378 (100 nM) または WB4101 (100 nM) は、フェニレフリンにより誘発される持続的収縮をいずれも時間依存性に抑制したが、WB4101 (100 nM) は BMY7378 (100 nM) より有意に強い抑制を示した。したがって、 α_{1D} アドレナリン受容体阻害よりも、 α_{1A} アドレナリン受容体阻害が強く収縮を抑制した。ABT-866 (0.001-3 μmol) を注入するとイヌ上眼瞼ミュラー筋は用量依存的に収縮した。Hill の式による解析では、ABT-866 の最大張力は 0.67 g, $K_{0.5}$ (最大反応の50%を引き起こす ABT-866 の用量) は 0.19 μmol , Hill 係数は 0.72 であった。眼瞼組織の免疫染色では収縮力測定に用いたすべての標本で、眼瞼結膜下にミュラー筋に相当する平滑筋が密集して存在していることを認めた。

これらの結果より、ミュラー筋の収縮と収縮の維持には、 α_{1A} アドレナリン受容体の刺激が関わっている。ABT-866 のような α_{1A} アドレナリン受容体アゴニストはミュラー筋の持続的収縮を惹起し、眼瞼下垂症の改善に役立つ可能性があることが明らかにされた。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Application of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the detection of proximal lesions in obstructive colorectal cancer (FDG-PET 検査の閉塞大腸癌に対する近位側病変評価への応用)

森 周 介

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】大腸癌は先進国において増加傾向にあり、多発大腸癌は全大腸癌症例の4.6~11%にみられる。進行大腸癌による強い狭窄があつて内視鏡が通過できない場合これより口側腸管の評価は困難となる。内視鏡通過不可能な閉塞大腸癌に対する口側腸管の術前評価法として ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) が有用であるか検討を行った。

【対象と方法】過去78カ月間に内視鏡通過不可能であ

る閉塞大腸癌に対し術前に FDG-PET を施行した症例を後向きに調査し、病理組織検査もしくは術後12カ月以内に消化管内視鏡検査が施行され口側腸管の評価が行われたものを対象とし、FDG-PET 施行時に血糖値が200 mg/dL を超えるものを除外した。結果本研究の対象は52例となった。FDG-PET 検査は4時間以上の絶食の後 5 MBq/kg の FDG を静注し60分後に全身撮像を行い、腹部に局所的な集積を認めた場合は120分後にその部位の遅延像撮像を追加した。肝臓の集積よりも強い結節状集積であり遅延像で集積が同等から増強するものを異常集積と判断し、腸管に沿ったびまん性の集積もしくは結節状集積であっても遅延像で消失あるいは形状が変化するものは生理的集積と判断した。Standardized uptake value (SUV) は FDG の集積度を半定量化したもので、病的集積を認めた場合にその最高値 (SUV_{max}) を測定した。ここでは口側腸管に FDG の異常集積を認めるものを PET 陽性、認めないものを PET 陰性と定義した。統計解析は中央値およびノンパラメトリック検定を用い、*P*値0.05未満を統計学的有意とした。

【結果】対象の特徴として、内視鏡通過不可能な主病変の部位は上行結腸11例、横行結腸12例、下行結腸4例、S状結腸14例、直腸11例で、年齢は51-86歳(中央値70)、男女比は33対19、FDG投与20分前の血糖値は67-153 mg/dL(中央値86.5)、主病変の SUV_{max}は5.3-25.0(中央値13.8)であった。PET陽性群は52例中12例が該当し、計17の口側病変への異常集積を認め、その内訳は腺腫10、早期癌5、進行癌2であった。17病変のうち術前にCTで病変が指摘可能であったものは2病変でありいずれも進行癌であった。PET陰性群は40例が該当し、うち25例は術後内視鏡検査による口側腸管の評価が行われた。残りの15例は結腸右半切除術が施行され病理組織診断で全例に口側病変を認めなかった。術後初回内視鏡検査までの期間は1-12カ月(中央値10)であり、12例に15病変が認められその内訳は腺腫13、早期癌2であった。統計解析で以下の結論を得た。1) 腫瘍径と SUV_{max}に正の相関を認めた (*P*=0.00016)。2) 口側腫瘍の存在に対する PET 検査の感度は50%で特異度は100%であった (*P*=0.002)。3) PET陽性群の口側病変の組織学的診断は腺癌7、腺腫10、PET陰性群は腺癌2、腺腫13であり、群間比較で有意差を認めず集積の有無で癌と腺腫の鑑別に至るという結果は得られなかった (*P*=0.12)。4) PET陽性群の口側病変の腫瘍径

は4-80 mm(中央値15)、PET陰性群は2-10 mm(中央値5)であり2群間に有意差を認めた (*P*=0.00014)。5) この2群を分ける腫瘍径をカットオフ値に設定し受信者操作特性曲線分析法を用いて至適感度と特異度を求めたところ、8 mm以上の腫瘍の検出に対する PET の感度は94.1%、特異度93.3%であった。

【結論】FDG-PET 検査は質的診断能には劣るが、口側腸管に異常集積を示した場合にはその SUV_{max}により腫瘍の大きさの推定が可能であり、8 mm以上の病変の検出に関し高い感度、特異度を持つことが示された。内視鏡通過不可能な閉塞大腸癌の術前検査として FDG-PET 検査は口側腸管病変の検索に有用であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

大腸癌による強い狭窄があつて内視鏡が通過できない場合これより口側腸管の評価は困難となる。内視鏡通過不可能な閉塞大腸癌に対する口側腸管の術前評価法として18 F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) 検査が有用であるか検討を行った。

閉塞大腸癌に対し術前に FDG-PET 検査を施行した症例を後向きに調査した。病理組織検査もしくは術後12カ月以内に消化管内視鏡検査が施行され口側腸管の評価が行われたものを対象とし、FDG-PET 検査施行時に血糖値が200 mg/dL を超えるものを除外した結果、本研究の対象は52例となった。FDG-PET 検査は4時間以上の絶食の後 5 MBq/kg の FDG を静注し60分後に全身撮像を行い、局所的な集積を認めた場合は120分後に遅延像を追加した。肝臓の集積よりも強い結節状集積であり遅延像で同等から増強するものを異常集積と判断し、腸管に沿ったびまん性の集積もしくは結節状集積であっても遅延像で消失あるいは形状が変化するものを生理的集積と判断した。Standardized uptake value (SUV) は FDG の集積度を半定量化したもので、異常集積を認めた場合に関心領域の最高値 (SUV_{max}) を測定した。統計解析は中央値およびノンパラメトリック検定を用い、*P*値0.05未満を有意とした。

その結果、森は次の結論を得た。

1. 腫瘍径と SUV_{max}に正の相関を認めた (*P*=0.00016)。
2. 腫瘍の存在に対する PET 検査の感度は50%、特異度は100%であった (*P*=0.002)。

3. 異常集積の有無より癌と腺腫を鑑別するには至らなかった。
4. 異常集積を認めた場合の口側病変の腫瘍径は4-80 mm (中央値15), 異常集積を認めない場合の腫瘍径は2-10 mm (中央値5) であり2群間に有意差を認めた ($P=0.00014$)。
5. 8 mm 以上の腫瘍の検出に対する PET 検査の感度は94.1%, 特異度は93.3%であった。

これらの結果より FDG-PET 検査は質的診断能には劣るが, SUV_{max} により腫瘍の大きさの推定が可能であり, 8 mm 以上の病変の検出に関し高い感度, 特異度を持つことが示され, 閉塞大腸癌の術前検査としての有用性が示唆された。よって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A splice variant of ASC regulates IL-1 β release and aggregates differently from intact ASC (カスペース-1 活性化シグナル経路のアダプター分子の ASC スプライシング変異体 (vASC) は IL-1 β の放出と凝集において全長 ASC とは異なっている)

松 下 一 彦

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ASC (apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruit domain) は, CARD (caspase recruit domain) と PYD (pyrin domain) から成るアダプター分子であり, 分子腫瘍学分野で22KDa のアポトーシス促進蛋白質として同定された。ASC は PYD と CARD という二つの結合モチーフを持ち, ASC と結合する主要な蛋白質は CARD を有するカスペース-1と, ロイシンリッチ領域を持つ細胞質の病原体受容体として最近注目されている PYRIN ファミリー蛋白質 NLRPs が知られており, ASC はカスペース-1活性化分子であることが確立されている。

ASC の mRNA は3つのエクソンによって構成されており, エクソン1およびエクソン3には結合モチーフである PYD と CARD がそれぞれ対応しエクソン2には19残基のアミノ酸がコードされているが, 3個のグリシン残基と4個のプロリン残基が含まれる。遺伝子データバンクで ASC mRNA にはエクソン1とエクソン3のみからなるものが知られてきたが, 我々は蛋白質レベルでも普通の全長 ASC (fASC) よ

りも小さい変異体 (vASC) が存在することをウエスタンブロット解析法および質量分析法により確認した。本研究では fASC と vASC の性質の違いを調べることによって, エクソン2に対応する蛋白質部位の役割と ASC の活性機構を調べることを目的とした。

【方法と結果】fASC および vASC を細胞内で強制発現させて分布を調べたところ, 2つとも自己結合によって繊維状の凝集体をつくったが, 2つの点で違いがあった。fASC は一部の細胞でのみ凝集体が形成されたが, vASC は発現した全ての細胞で凝集体が形成された。また, 凝集体の形態を見ると, fASC は円形の繊維状凝集体をつくるが, vASC は分枝形の繊維状凝集体を形成した。

fASC と vASC の活性作用の違いがあるのか調べるため細胞内にカスペース-1前駆体, IL-1 β 前駆体, fASC または vASC を共強制発現させて, カスペース-1の活性化をウエスタンブロット解析法により測定した。fASC と vASC はほぼ同程度にカスペース-1前駆体を活性型にし, IL-1 β 前駆体も活性型にプロセッシングされることを確認することができた。プロセッシングされた IL-1 β は速やかに細胞外に放出されるので, 培地中に放出された IL-1 β の量を ELISA で測定したところ, fASC, vASC の活性化により培地中に IL-1 β が検出され, vASC を強制発現させた時の方がより IL-1 β の放出量が多い傾向にあった。

【考察】以上の結果から, エクソン2はカスペース-1活性化には必須ではないが, inflammasome 形成上重要な役割を果たしていることが示唆された。また, この部分がヒンジ部分に相当すると推定され, 凝集体形成頻度が vASC において高いことから fASC の不活性状態ではヒンジ部分で折りたたまれて閉じた状態に維持されており, ヒンジ部分のない vASC では常に活性化された状態になっているのではないかと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

細胞質病原受容体 (cytosolic pathogen receptor) とその下流分子は炎症と自然免疫の分野で近年注目されている。ASC は細胞質型の自然免疫シグナル調節蛋白質として機能しており, NLRPs やカスペース-1前駆体などとともに inflammasome を形成し, カスペース-1を活性化することがわかっている。ASC は ASC 遺伝子のエクソン1 (1-90 aa) エクソン2 (91-110 aa) エクソン3 (111-195 aa) から構成され, エクソン1に対応する PYD (pyrin domain), エクソン

3に対応するCARD (caspase recruit domain) となるアダプター分子であり、当初、HL-60細胞におけるアポトーシス促進蛋白質として見出された。HL-60細胞をSDS-PAGEで泳動し、抗ASC抗体でウェスタンブロット解析を行うと、ASCの他に低発現の低分子量蛋白質も見出されており、松下はこの低分子量蛋白質Xに注目して検討し、以下の結果を得た。

1. この蛋白質Xを質量分析しデータベースで解析すると、ASCからグリシンとプロリンに富むエクソン2に対応するオリゴペプチドが欠失したsplicing variantであることが分かった。
2. このvariant ASC (vASC) とfull length ASC (fASC) の機能カスパー-1活性化能の相違を調べた。そのために、Cos7細胞に、カスパー-1前駆体、IL-1 β 前駆体、fASCもしくはvASCの発現ベクターを導入し強制発現させた。その結果、細胞内のカスパー-1、IL-1 β の産生に有意な差はみられなかったが、細胞外に放出されたIL-1 β はvASC強制発現細胞においてfASC強制発現細胞よりも多いことが認められた。
3. fASCあるいはvASCの強制発現細胞内においてvASCの方がfASCよりも高頻度で凝集体を形成し、fASCは環状凝集体を作ったのに対し、vASCは枝状の凝集体を作った。
4. 以上の結果より、グリシンとプロリンに富むASCエクソン2対応部分はASCによるカスパー-1活性化に必須ではないが、ASC構造に影響し、結果としてinflammasome形成・IL-1放出制御に関わると考えられた。

本研究は、カスパー-1活性化因子ASCのPYDとCARD間のエクソン2対応部分が細胞内でのinflammasome形成とIL-1産生放出の制御に関わっていることを示唆し、ASCのsplicing variantの同定は臨床における炎症の解析に対して有用な情報を提供するものと考えられ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値あるものと認めた。

Mouse Senile Amyloid Fibrils Deposited in Skeletal Muscle Exhibit Amyloidosis-Enhancing Activity (骨格筋に沈着したマウス老化アミロイド線維はアミロイドーシス発症促進効果を持つ)

銭 金 澤

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】アミロイドーシスとはアミロイドタンパク質がアミロイド線維を形成し、臓器/組織に沈着する「タンパク質のフォールディング異常」が原因の疾患群である。マウス老化アミロイドーシスではapolipoprotein A-II (apoA-II) がアミロイド線維(AApoAII)を形成して全身臓器に沈着するが、アミロイドーシスが発症したマウスから排出された糞、ミルクや唾液を介した、個体から個体への伝播の可能性が示されてきた。すなわちマウスAApoAIIアミロイドーシスは「伝播性疾患」であることが明らかになった。最近Creutzfeldt-Jacob病などの各種プリオン病では骨格筋中に異常プリオンタンパク質(PrP^{Sc})が検出され、筋肉を食することによる疾患の伝播の可能性が危惧されている。そこで、本研究では、AApoAIIアミロイドーシスの伝播機構をより詳細に解明するために、骨格筋組織へのAApoAII線維の沈着と沈着したAApoAII線維の伝播性を解析した。

【材料及び方法】マウス：R1.P1-Apoa2^c (SAMR1C) マウスはアミロイドーシスを好発するapoA-IIの対立遺伝子(Apoa2^c)を持つコンジェニックマウス系統、Apoa2^cTgは全身臓器でApoa2^cタンパク質が過剰発現し、老化アミロイドーシスを好発するトランスジェニックマウス系統である。アミロイドーシスの誘発：重度にアミロイド線維が沈着したSAMR1Cマウス肝臓よりアミロイドーシス誘発用のAApoAIIアミロイド線維を分取した。2カ月齢のSAMR1CとApoa2^cTgマウスの尾静脈にAApoAIIアミロイド線維を投与後、2カ月と4カ月で屠殺した。筋肉へのアミロイド沈着をコンゴ赤染色、免疫組織染色、Western blot解析と電子顕微鏡で検討した。筋肉から抽出したAApoAII線維による2次伝播性：AApoAIIが沈着した骨格筋からアミロイド線維分画を抽出し、SAMR1Cマウスの尾静脈に投与し、2カ月後に屠殺して、各臓器へのアミロイド沈着をAmyloid Indexで評価した。

【結果】AApoAII線維を投与したSAMR1Cや*Apoa2^o*Tgマウスでは、投与後2カ月で、全身臓器にAApoAIIアミロイド線維が沈着するとともに、複数の部位（前肢、後肢、胸部、背部）の骨格筋組織中にAApoAIIアミロイド線維が沈着し、大胸筋への沈着の程度が一番強いことが明らかになった。4カ月後には骨格筋への沈着程度は増大したが、*Apoa2^o*TgマウスがSAMR1Cマウスよりも有意に強かった。沈着部位は主に筋肉の血管及び間質組織（筋内膜）であることが明らかになった。骨格筋から分取されたアミロイド線維のWestern blot解析の結果、AApoAIIアミロイド線維の沈着が確認された。また、電子顕微鏡による観察では血管壁及び筋内膜へのアミロイド線維の沈着を確認した。骨格筋から抽出したアミロイド線維は、肝臓から分取されたアミロイド線維に比較すると細く、短い線維であった。骨格筋から分取したAApoAIIアミロイド線維分画をSAMR1Cマウスへ投与すると、アミロイドーシスを誘発したが、6Mグアニジン塩酸処理でアミロイド線維構造を破壊すると、誘発は起こらなかった。この結果から骨格筋肉中に存在するアミロイド線維構造による伝播が示唆された。

【結論】本研究では、マウスの骨格筋へのAApoAIIアミロイド線維の沈着を確認し、沈着したアミロイド線維のマウスへの投与実験では2次伝播性を示した。すなわち、AApoAIIのような全身性アミロイドーシスでも、プリオンと同様に筋肉を介して伝播する可能性が示唆され、アミロイドーシスの発症機構の解明と予防法の開発に新たな視点を与える。

（論文審査の結果の要旨）

AApoAIIアミロイドーシスでは、発症したマウスから排出された糞、ミルクや唾液を介した伝播の可能性が示されてきた。今回、AApoAIIアミロイドーシスの伝播機構をより詳細に解明するために、骨格筋組織へのAApoAII線維の沈着と沈着したAApoAII線維の伝播性を解析した。

アミロイドーシスを好発するapoA-IIの対立遺伝子(*Apoa2^o*)を持つコンジェニックマウス<R1.P1-*Apoa2^o*>(SAMR1C)>及び全身臓器で*Apoa2^o*タンパク質が過剰発現するトランスジェニックマウス<*Apoa2^o*Tg>系統を用いた。重度にアミロイド線維が沈着したSAMR1Cマウス肝臓よりアミロイドーシス誘発用のAApoAIIアミロイド線維を分取し、SAMR1Cと*Apoa2^o*Tgマウスの尾静脈に投与した。アミロイドーシスを誘発2カ月と4カ月後に屠殺し、

筋肉へのアミロイド沈着をコンゴー赤染色、免疫組織染色、Western blot解析と電子顕微鏡で検討した。さらに、AApoAIIが沈着した骨格筋からアミロイド線維分画を抽出し、SAMR1Cマウスの尾静脈に投与し、2カ月後に屠殺して、全身へのアミロイド沈着の程度を調べた。

その結果、銭金澤は次の結論を得た。

1. Real-Time PCR法により、肝臓と比較すると少量であるが、骨格筋でもapoA-II mRNAが発現が明らかになった。骨格筋でのapoA-II発現のアミロイド沈着への関与は不明である。
2. 全身臓器にAApoAIIアミロイド線維が沈着するとともに、複数の部位（前肢、後肢、胸部、背部）の骨格筋組織中にAApoAIIアミロイド線維の沈着が認められたが、大胸筋への沈着の程度が一番強かった。
3. 筋肉へのアミロイド沈着は、アミロイド誘発後の時間経過に伴い沈着程度が増加した。
4. 沈着部位は主に筋肉の血管及び間質組織（筋内膜）であった。
5. 骨格筋から分取したAApoAII線維の投与（静脈内）はアミロイド線維構造に依存して、アミロイドーシスを誘発した。

以上の結果は、AApoAIIアミロイドーシスでも、Prion病と同様に、筋肉を介した伝播の可能性が示唆され、全身性アミロイドーシス（AApoAIIやAA等）の発症機構の解明や予防法の開発に新たな視点を与えるものである。このような銭金澤の研究成果は非常に重要でありかつ意義あることと考えられた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Down-regulation of SREBP-1c is associated with the development of burned-out NASH (非アルコール性脂肪肝炎の進行に伴う肝脂肪沈着の減少は、1c型ステロール調節領域結合蛋白の発現低下に関連する)

長 屋 匡 信

（論文の内容の要旨）

【目的】非アルコール性脂肪肝炎（以下NASH）では線維化進行に伴い肝臓内の脂肪沈着量の減少を認める、いわゆるburned-out NASHの状態になることが知られているが、その形成機構は不明である。本研究で

は、NASH の線維化進行に伴う脂肪酸・中性脂肪代謝の変化を遺伝子レベルで解析することで burned-out NASH の形成機構を解明することを目的とした。【方法】2006年4月～2008年3月までに当院及び関連病院で肝生検を施行し、NAFLD と診断された50例 [単純性脂肪肝10例、線維化の比較的軽度な NASH (Mild NASH) 20例、高度の線維化を伴う NASH (Advanced NASH) 20例]、正常肝 6 例を対象とした。各群間における患者背景、生化学、組織学的解析に加え、肝生検により得られた肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を定量 PCR 法で解析した。また、蛋白発現量は免疫染色及びイムノプロット法を用いて測定した。

【結果】脂肪酸取り込み・輸送系、脂肪酸酸化関連遺伝子及び very-low-density lipoprotein (VLDL) 合成・分泌系に関連する遺伝子においては各群間での差は認められなかった。脂肪酸合成関連遺伝子である fatty acid synthase (FAS), Acetyl-CoA carboxylase1 (ACC1), また、中性脂肪合成に関与する diacylglycerol-acyltransferase1 (DGAT1) では単純性脂肪肝と比較して、NASH 群で有意に mRNA の発現量低下を認めた。それらの遺伝子を調節している核内転写因子である 1c 型ステロール調節領域結合蛋白 sterol regulatory element-binding protein (SREBP) -1c も同様に NASH の進行により低下していた。FAS, ACC1, DGAT1, SREBP-1c は線維化 stage と優位に逆相関していた。また、SREBP-1 免疫染色に加え、蛋白電気泳動においても同様に、NASH の線維化進行に伴い、SREBP-1 の発現低下を認めた。さらに、NASH の進行に伴い、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF) - α の増加を認め、SREBP-1c の発現低下との関連が示唆された。

【結論】SREBP-1c 及び、SREBP-1c に調節されている脂肪・中性脂肪合成遺伝子の発現低下が burned-out NASH の形成に関連することが示された。本研究は NASH の進行に伴う遺伝子発現変化を考える上で有用な情報を提示するものと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

非アルコール性脂肪肝炎 (以下 NASH) では線維化進行に伴い肝臓内の脂肪沈着量の減少を認める、いわゆる burned-out NASH の状態になることが知られているが、その形成機構は不明である。本研究では、非アルコール性脂肪肝疾患 (以下 NAFLD) と診断

された50例 [単純性脂肪肝10例、線維化の比較的軽度な NASH (Mild NASH) 20例、高度の線維化を伴う NASH (Advanced NASH) 20例]、正常肝 6 例を対象とし、各群間における患者背景、生化学、組織学的解析に加え、肝生検により得られた肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を定量 PCR 法で、また、蛋白発現量は免疫染色及びイムノプロット法を用いて測定した。

その結果、長屋は以下の結論を得た。

1. 脂肪酸取り込み・輸送系、脂肪酸酸化関連遺伝子及び very-low-density lipoprotein (VLDL) 合成・分泌系に関連する遺伝子においては各群間での差は認められなかった。
2. 脂肪酸合成関連遺伝子である fatty acid synthase (FAS), Acetyl-CoA carboxylase1 (ACC1), また、中性脂肪合成に関与する diacylglycerol-acyltransferase1 (DGAT1) では単純性脂肪肝と比較して、NASH 群で有意に mRNA の発現量低下を認めた。
3. 核内転写因子である 1c 型ステロール調節領域結合蛋白 sterol regulatory element-binding protein (SREBP) -1c も同様に NASH の進行により低下していた。
4. FAS, ACC1, DGAT1, SREBP-1c は線維化 stage と有意に逆相関していた。
5. SREBP-1 免疫染色に加え、蛋白電気泳動においても同様に、NASH の線維化進行に伴い、SREBP-1 の発現低下を認めた。
6. liver X receptor (LXR) α , retinoid X receptor (RXR) α , peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α , PPAR δ , PPAR γ , PPAR γ coactivator (PGC) 1 β , carbohydrate regulatory element-binding protein (ChREBP) などの転写因子の発現には各群間での差は認められなかった。
7. NASH の進行に伴い、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF) - α の増加を認め、SREBP-1c の発現低下との関連が示唆された。今回の研究は日本人 NAFLD 患者において各病期での脂質代謝遺伝子の発現解析を行った最初の研究である。NASH の進行による肝臓における脂肪沈着低下の原因として転写因子である SREBP1c が関与していることが解明できた。このことにより NASH の病態の解明、将来的には各病期での治療法の選択にも

つながると考えられる。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Assessment of Left Ventricular Dys-synchrony in Patients with Coronary Artery Disease During Adenosine Stress Using ECG-gated Myocardial Perfusion Single Photon Emission Computed Tomography (冠動脈疾患患者における心電図同期 SPECT を用いたアデノシン負荷中の左室非同期性の評価)

堀 込 実 岐

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】左心室の非同期性は左室収縮能が低下し、心電図上 QRS 幅が拡大した心不全患者に生じると考えられてきた。しかし、最近の報告では QRS 幅が正常であっても非同期性がみられると報告されている。さらに冠動脈疾患を有する患者でも、心電図上 QRS 幅が正常であっても左室に非同期性が生じることが報告されている。これまで、冠動脈疾患を有する患者については安静時の左室非同期性の評価が報告されているが、運動または薬物負荷時の評価を行った報告はなく、本研究では左室収縮能が保たれている冠動脈疾患患者に対してアデノシン負荷を行った際の左室非同期性について、心電図同期 SPECT による左室局所壁運動解析法を用いて検討した。

【方法】冠動脈疾患患者18名、コントロール18名を対象とした。冠動脈造影検査にて冠動脈に75%以上の有意狭窄があり、心筋梗塞の既往がなく、EF>50%、心電図上 QRS 幅が正常の患者を冠動脈疾患患者とした。SPECT 画像は安静時とアデノシン負荷時の2回撮影した。QGS を用いて左室局所の壁運動を17分画にわけて解析し、それぞれ0から収縮末期までの時間 (time to end systole ; TES), 0から収縮極期までの時間 (time to peak ejection ; TPE), 0から拡張極期までの時間 (time from 0 to peak filling during the whole diastolic period ; TPF1), 収縮末期から拡張極期までの時間 (time from end systole to peak filling during the whole diastolic period ; TPF2) を測定した。各項目毎の maximal difference (MD) (17領域中最長と最短の差) を測定し、これを心室非同期性の指標とした。

【結果】冠動脈疾患患者ではアデノシン負荷中の MD-TES と MD-TPF1は安静時に比し有意に延長したが、コントロール群では有意な変化は認めなかった。さらに、冠動脈疾患患者では虚血の重症度を示す SDS (summed difference score) と the extent of change of MD-TES (post-stress MD-TES minus rest MD-TES) 間に正の相関を認め、the extent of changes in MD-TPF1 (post-stress MD-TPF1 minus rest MD TPF1) との間にも正の相関を認めた。

【考察】本研究では、正常心機能の冠動脈疾患患者において、アデノシン負荷により左室の非同期性が生じることが初めて示された。これまで、冠動脈疾患患者では運動または薬物負荷により心筋の stunning が生じ、LV dysfunction が生じうことは報告されている。しかし、運動または薬物負荷による左心室の非同期性についてはこれまでに報告されていない。負荷を行わない安静時の検討としては、豚の心臓において心筋に局所的な stunning が生じると非同期性が起こることが報告されている。また、人の心臓については心電図同期ボラーマップという手法を用いて、左心室の非同期性をみる指標として SDP (standard deviation of the peak contraction phase) を評価した研究が報告されているが、これによると収縮時相の SDP と左室駆出率 (EF), 最大駆出速度 (PER) などの収縮指標は逆相関し、拡張時相の SDP と最大充満速度 (PFR), 拡張早期1/3での平均充満速度 (1/3 FR) などの拡張指標は逆相関することが示されている。このことから、運動または薬物負荷により虚血心筋の stunning が生じ、EF や PER の低下または PFR や1/3FR の低下がみられ LV dysfunction が生じている場合には、それぞれ収縮時相、拡張時相での非同期性の増大が生じうると考えられる。本研究では、薬物負荷により心筋の局所的な stunning が生じ、結果として左室の非同期性が生じたと考える。さらに、左室の非同期性と虚血の重症度を示す SDS (summed difference score) との間には正の相関関係があることが示されており、左室の非同期性を負荷時に評価することにより、虚血の存在や重症度の評価に貢献できる可能性があると考ええる。

(論文審査の結果の要旨)

左心室の非同期性は左室収縮能が低下し、心電図上 QRS 幅が拡大した心不全患者に生じると考えられてきた。しかし、最近の報告では QRS 幅が正常であっても非同期性がみられると報告されている。さらに冠

動脈疾患を有する患者でも、心電図上 QRS 幅が正常であっても左室に非同期性が生じることが報告されている。これまで、冠動脈疾患を有する患者については安静時の左室非同期性の評価が報告されているが、負荷時の評価を行った報告はなく、当研究では左室収縮能が保たれている冠動脈疾患患者に対してアデノシン負荷を行った際の左室機能および左室非同期性について、心電図同期 SPECT による左室局所壁運動解析法を用いて検討した。

冠動脈疾患患者18名、コントロール18名を対象とした。SPECT 画像は安静時とアデノシン負荷時の2回撮影した。左室局所壁運動解析ソフト (QGS) を用いて左室局所の壁運動を17分画にわけて解析し、それぞれ0から収縮末期までの時間、0から収縮極期までの時間、0から拡張極期までの時間を測定した。各項目毎の maximal difference (17領域中最長と最短の差) を測定し、これを心室非同期性の指標とした。

その結果、掘込は次の結論を得た。

1. 冠動脈疾患患者では、アデノシン負荷後、左室の収縮指標 (左室駆出率, 最大駆出速度) と拡張指標 (最大充満速度) の低下を認めた。
2. コントロール群では、アデノシン負荷による左室収縮能, 拡張能の変化は認めなかった。
3. 冠動脈疾患患者では、アデノシン負荷後、収縮時相の左室非同期性と拡張時相の左室非同期性が認められた。
4. コントロール群では、アデノシン負荷による左室同期性の有意な変化は認めなかった。
5. 冠動脈疾患患者では、負荷による左室同期性の変化度と虚血の重症度との間に正の相関関係を認めた。

これらの結果より、心筋梗塞の既往がなく正常 QRS 幅で正常心機能の冠動脈疾患患者においても、アデノシン負荷により左室の非同期性が生じることが示された。さらに、左室の非同期性との間には正の相関関係があることも示され、左室の非同期性を負荷時に評価することにより、虚血の存在や重症度の評価に貢献できる可能性があると考えられる。

以上より、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization (腫瘍間質のヒアルロン酸欠損はマクロファージ動員と腫瘍血管新生を阻害する)

小林 宣 隆

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 癌の進展過程は、単に癌細胞自身の自律的増殖のみならず、腫瘍微小環境との相互作用によって制御される。ヒアルロン酸 (HA) は細胞外マトリックス (ECM) を構成する主要な分子であり、腫瘍間質の HA の蓄積は予後不良因子であることが報告されている。我々は *Has-2* を過剰発現する乳癌モデルマウスを作成し解析を行ってきた。*Has-2* 過剰発現 (*Has2^{ΔNeo}*) 群に発生した乳癌では、対照 (*Has2^{+/Neo}*) 群に比べ、HA に富んだ腫瘍間質が形成され血管およびリンパ管の新生が認められた。この結果から、腫瘍間質の HA が腫瘍の悪性度を規定する可能性が示唆された。近年、腫瘍間質に腫瘍関連マクロファージが集簇して、腫瘍進展に寄与することが報告され注目を集めている。そこで本研究では、腫瘍間質の HA が TAM の動員に果たす意義を検討した。

【方法】 *Has2^{ΔNeo}* 群および *Has2^{+/Neo}* 群から腫瘍細胞株 (*Has2^{ΔNeo}T*, *Has2^{+/Neo}T*) と線維芽細胞株 (TAF) を樹立した。これらの細胞株を単独あるいは共に、ヌードマウスに移植して腫瘍を作製した。フローサイトメトリー法で腫瘍内の F4/80⁺CD206⁺マクロファージ数を評価した。同時に免疫組織染色を行って、マクロファージ、血管およびリンパ管数を評価した。ここで、マクロファージの機能を検討するため、clodronate liposome 法でマクロファージを枯渇させた腫瘍を作製して、上記と同様に免疫組織染色を行った。さらに、線維芽細胞が産生する HA の機能を評価するため、*Has-1* と *Has-2* を欠損した線維芽細胞株と *Has2^{+/Neo}T* をヌードマウスに共移植して腫瘍を作製し、上記と同様の評価を行った。④線維芽細胞に発現する versican の機能を検討するため、高分子 HA と versican を添加して *Has2^{+/Neo}T* 移植腫瘍を作成し、上記と同様の評価を行った。

【結果】 ① F4/80⁺CD206⁺マクロファージ数は、*Has2^{+/Neo}T* 移植腫瘍に比べ、*Has2^{ΔNeo}T* 移植腫瘍に多かった。一方で *Has2^{+/Neo}T* 移植腫瘍では、TAF を

共移植するとマクロファージ動員数が増加した。②マクロファージを枯渇させると腫瘍の発育、腫瘍血管およびリンパ管新生が抑制された。③腫瘍間質のHAを欠損させると、F4/80⁺CD206⁺マクロファージの動員数、腫瘍血管およびリンパ管新生が抑制された。④Has2^{+Neo}T移植腫瘍に versican を添加した場合に、F4/80⁺CD206⁺マクロファージの動員が誘導された。以上のことから、腫瘍間質のHAは腫瘍関連マクロファージの動員を促進し、腫瘍血管およびリンパ管新生を誘導して腫瘍進展に寄与することが示された。**【考察】**HAが制御する細胞間相互作用のメカニズムの解明によって、腫瘍血管新生阻害薬の新規開発に寄与する可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

我々はこれまでヒアルロン酸(HA)を過剰産生する乳癌モデルマウスを作成し解析を行ってきた。HA合成酵素(*Has*)⁻²過剰発現(Has2^{ΔNeo})群に発生した乳癌では、対照(Has2^{+Neo})群に比べ、HAに富んだ腫瘍間質が形成され、血管およびリンパ管の新生が認められた。近年、腫瘍間質に腫瘍関連マクロファージ(TAM)が集簇して腫瘍進展に寄与することが報告されている。そこで本研究では、腫瘍間質のHAがTAMの動員に果たす意義を検討した。

Has2^{ΔNeo}群およびHas2^{+Neo}群から腫瘍細胞株(Has2^{ΔNeo}T, Has2^{+Neo}T)と線維芽細胞株(TAF)を樹立して、ヌードマウスに移植して腫瘍を作製した。フローサイトメトリー法でTAM数を評価した。同時に免疫組織染色を行って、血管およびリンパ管数を評価した。ここで、clodronate liposome法でTAMを枯渇させた腫瘍を作製して同様な解析を行った。さらに、線維芽細胞が産生するHAの意義を評価するため、Has1 null fibroblastあるいはHas1/Has2 double KO fibroblastをHas2^{+Neo}Tと共移植した腫瘍を作製して同様な解析を行った。最後に、腫瘍間質のHAの特性を評価するため、高分子HAとversicanを添加したHas2^{+Neo}T移植腫瘍に作製して同様な解析を行った。

以下の結果を得た。

TAM数は、Has2^{+Neo}T移植腫瘍に比べて、Has2^{ΔNeo}T移植腫瘍に顕著に観察された。Has2^{+Neo}T移植腫瘍にTAFを共存させるとTAM動員数が増加したことから、TAFの産生するHAの重要性が示唆された。TAMを枯渇させると、腫瘍の発育、血管およびリンパ管新生が抑制された。さらに、腫瘍間質

のHAを欠損させるとTAMの動員数、血管およびリンパ管新生が抑制された。Has2^{+Neo}T移植腫瘍にversicanを添加した場合に、TAMの動員数が増加した。

以上のことから、腫瘍間質のHAはTAMの動員を促進し、腫瘍血管およびリンパ管新生を誘導して腫瘍進展に寄与することが示された。

HAが制御する細胞間相互作用のメカニズムのさらなる解明は、腫瘍微小環境を標的にした、腫瘍血管新生の阻害薬の新規開発に寄与することが期待できる。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Accurate and simple method for quantification of hepatic fat content using magnetic resonance imaging: a prospective study in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease (MRIを用いた肝脂肪含有量の非侵襲的定量法:非アルコール性脂肪性肝疾患における検討)

八 田 朋 子

(論文の内容の要旨)

【背景】近年、非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)は日本を含め世界的な罹患率増加が確認されている。罹患症例の検出および経過観察において、簡便かつ非侵襲的で正確な肝脂肪含有量の定量法が望まれている。MRIはその候補の一つであるが、肝脂肪定量の正確性に対する検討は未だ十分とは言えない。

【目的】我々はファントムを用いたMRIによる基礎実験を行い、その結果に基づく簡便な肝脂肪含有量の定量法を考案した。本研究の目的は、このMRIによる肝脂肪定量法を臨床応用し、病理組織学的な脂肪量評価の結果と比較することにより本法の脂肪量測定の正確性を検証することである。

【方法】MRI撮像機器は市販されている1.5Tの機種を使用し、撮像法は脂肪検出に最も鋭敏であるとされる化学シフト法(double-echo fast low-angle shot sequence)を用いた。対象は臨床的にNAFLDあるいは非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic hepatitis: NASH)を疑われ、肝生検により罹患が証明された連続した26症例(平均年齢44.7±16.4歳、男性12名、女性14名)。ファントム実験の結果に基づいた

脂肪含有量算出法を用いて MRI 画像から各症例の肝脂肪含有量を算出し、生検検体を用いて病理組織学的に測定した肝脂肪含有量との相関を検証した。

【結果】対象26症例の内、肥満 (BMI>25 kg/m²) を有する症例は21例 (81%)、NASH と診断された症例は15例 (58%) であった。病理組織学的に測定した肝脂肪含有量は21.5±8.6% (平均±標準誤差)、MRI 画像から算出した肝脂肪含有量は22.9±9.5% であった。両者は良好な相関を示し (相関係数0.91, P<0.001)、CT や US では評価が難しいとされる軽度脂肪肝 (脂肪含有量 5-33%) の症例群でも高い相関を認めた (相関係数0.91, P<0.001)。両者の誤差は軽度脂肪肝の症例群で3.2±2.5%、中等度以上脂肪肝 (脂肪含有量33%以上) の症例群で3.9±1.0% であった。また、stage2以上の線維化を有する症例群、および score2あるいは3の lobular inflammation を有する症例群でも、MRI により算出した脂肪含有量と病理組織学的に評価した脂肪含有量の相関は高かった (相関係数0.93および0.94、それぞれ P<0.001)。

【考察】MRI は被曝することなく客観的な全肝脂肪含有量の評価が可能であり、その正確性は過去の研究結果から示唆されている。しかしこれらの研究の撮像法や病理組織学的な脂肪量評価法には統一性がなく、ファントムを用いた基礎実験も施行されていない場合が多いため、半定量的な検討であった。本法はファントムを使用した基礎実験とそのデータに裏付けられた臨床応用を行い、病理組織学的な脂肪含有量評価に関しても従来採用されているグレーディングシステムでなく脂肪滴の面積測定という客観的方法を使用しており、他の研究と比較してより厳密に定量の正確性を検証した。加えて本法は1.5TのMRI機器を有する施設であればどこでも施行可能であり、定量過程において特殊なハードウェアおよびソフトウェアを一切必要としないという簡便さを特長としている。

【結論】NAFLDにおける本法を用いた肝脂肪含有量の定量は、肝生検による病理組織学的な肝脂肪含有量評価とほぼ同等の正確性を有すると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

近年、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) は日本を含め世界的な罹患率増加が確認されている。罹患症例の検出および経過観察において、簡便かつ非侵襲的で正確な肝脂肪含有量の定量法が望まれている。MRIはその候補の一つであるが、肝脂肪定量の正確性に対する検討は

未だ十分とはいえないため、MRIによるファントム実験 (基礎実験) の結果に基づいた簡便な肝脂肪含有量の定量法 (以下、本法とする) を考案し、本法を臨床応用した肝脂肪含有量測定の結果と病理組織学的な脂肪含有量測定の結果とを比較して、本法の脂肪定量における正確性を検証した。

その結果、八田は次の結論を得た。

1. ファントムを使用した基礎実験の結果、肝脂肪含有量と、in-phase と opposed-phase との信号強度比の関係は3次多項式にほぼ近似できた。
2. 1. で得られた3次多項式に基づいて得られた、NAFLD症例群全体におけるMRIによる肝脂肪含有量の測定結果と、病理組織学的な肝脂肪含有量の測定結果とは、強い相関を示した。
3. CT や US では評価が難しいとされる軽度脂肪肝 (33%以下の脂肪沈着) の症例でも、MRIでの脂肪含有量測定の結果と病理組織学的な脂肪含有量測定の結果とは良好な相関を示した。
4. 線維化および肝小葉の炎症の重症度は、MRIによる脂肪含有量測定の結果と病理組織学的な脂肪含有量測定の結果との相関に明らかな影響を及ぼさなかった。

以上の結果より、本法を用いた肝脂肪含有量の定量は、肝生検による病理組織学的な肝脂肪含有量評価とほぼ同等の正確性を有すると考えられた。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

A C-terminal amino acid substitution in the γ -chain caused by a novel heterozygous frameshift mutation (Fibrinogen Matsumoto VII) results in hypofibrinogenemia (新規フレームシフト変異のヘテロ接合体であるフィブリノゲン Matsumoto VII に起因する γ 鎖C末端アミノ酸置換は低フィブリノゲン血症の原因である)

藤原 祝子

(論文の内容の要旨)

【目的と背景】フィブリノゲン (Fbg) は生体内において血液凝固カスケードの最終段階で働く分子量340 kDaの糖タンパクであり、肝臓において合成されるA α 鎖 (アミノ酸610個)、B β 鎖 (461個)、 γ 鎖 (411個) の3種のポリペプチドの複合体 (A α B β γ) がN

末端でS-S結合し、2量体 ($A\alpha B\beta\gamma$)₂として血流中に存在している。また、 γ 鎖には健常者でも alternative splicing により生じたバリエント (γ' 鎖: 427個) が8-15%程度存在することが知られている。本研究では、 γ 鎖7651番アデニル酸が欠失し、フレームシフトにより387番アミノ酸 Ile およびそれ以降の24アミノ酸の置換と終止コドンのシフトにより15アミノ酸の延長を認めた新たな変異 Fbg Matsumoto VII (Fbg M-VII) を同定し、その変異の特徴と低 Fbg 血症を引き起こす原因を解析・検討した。

【症例】 45歳女性。子宮筋腫の術前検査においてフィブリノゲン量が低値であったことから発見され、出血および血栓の既往はなかった。PT, APTT は正常で、Fbg は活性量0.77 g/L, 抗原量0.89 g/L で共に低下していた。

【材料および方法】 患者末梢血より DNA を抽出し、PCR 産物のダイレクトシーケンスを行って Fbg 遺伝子変異を同定した。患者血漿のウエスタンブロット (WB) 解析を行って Fbg の異常ポリペプチド鎖を検出し、さらに N-Glycosidase F を反応させてから WB を行うことで新たな糖鎖の付加を証明した。また、患者血漿とトロンビン, XIIIa 因子を反応させてから WB を行い、患者 Fbg の架橋結合部位の機能について解析した。正常 γ 鎖および γ' 鎖 cDNA 発現ベクターを鋳型として11組の変異プライマーを用いた site-directed mutagenesis 法により患者および患者関連変異プラスミドを作成し、 $A\alpha$ 鎖 $B\beta$ 鎖をすでに発現している CHO 細胞にトランスフェクションした。培養液および細胞破碎液の Fbg は ELISA 法により定量し、WB 解析を行った。さらに Pulse-chase 解析を行い異常な Fbg の動態を経時的に追った。

【結果】 患者ゲノム DNA のダイレクトシーケンスおよびサブクローニングにより γ 鎖7651番アデニル酸が一方の allele で欠失している事を確認した。また、Fbg 遺伝子全ての領域を検索したが他に変異は認められなかった。患者血漿の WB では正常 γ 鎖 (γ), γ' 鎖 (γ') の他に $B\beta$ 鎖とほぼ同様の分子サイズに異常 γ 鎖 (γ^*), $A\alpha$ 鎖と $B\beta$ 鎖の間に異常 γ' 鎖 (γ'^*) を認め、検出バンドをデンストメトリーで解析した結果 γ , γ^* , γ' , γ'^* はそれぞれ60%, 27%, 11%, 2%であった。患者血漿にトロンビン, XIIIa 因子を反応させた WB の結果、正常な γ - γ は認められるものの γ^* あるいは γ'^* のダイマーは検出されなかった。CHO 細胞における発現実験により得られた

Fbg を ELISA 法により定量した結果、患者 γ 鎖, γ' 鎖と同様の変異を持つ $\gamma\Delta 7651A$, $\gamma'\Delta 7651A$ と、 $\gamma\Delta 7651A$ の変異にさらに糖鎖結合を妨げた $\gamma\Delta 7651A/399T$ において培養液, 細胞破碎液ともに有意な低下が認められ、そのほかの変異では Fbg 量の有意な低下は認められなかった。 $\gamma\Delta 7651A$ および $\gamma'\Delta 7651A$ を WB 解析した結果、 γ^* , γ'^* は患者血漿中で確認したものと同様であり、N-Glycosidase F 反応により新たな糖鎖の付加が証明された。Pulse-chase 解析の結果、異常な Fbg は細胞中で3-6時間後に少量認め、培養液中には24時間後にかろうじて僅かに認められた。**【結論】** Fbg γ 鎖7651番アデニル酸が欠失したことにより387番アミノ酸 Ile およびそれ以降の24アミノ酸の置換と15アミノ酸の延長を認め、低 Fbg 血症を引き起こす新たな変異 Fbg M-VII を同定した。Fbg M-VII に関連したアミノ酸変異を有する Fbg を発現させた実験より、387Ile より C 末端側である391~398の8個のアミノ酸変異が Fbg M-VII において Fbg の著減に大きく関与しており、15個アミノ酸伸長されることや新たに糖鎖が結合することが原因ではないことが示唆された。 $\gamma\Delta 7651A$ では細胞内、培養液中ともに Fbg 量が著しく低下していたものの (培養液中 Fbg 量/細胞内 Fbg 量) 比は正常と変わらないことから分泌異常はないことが明らかとなった。Pulse-chase 解析の結果より γ 鎖産生低下かもしくは Fbg の組み立て低下によって細胞内で少量の Fbg が時間をかけて産生され、細胞外へ分泌されることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

フィブリノゲン (Fbg) の分子異常は、全世界で約300家系以上が報告されている。本研究では低 Fbg 血症を呈した新たな変異 Fbg Matsumoto VII (M-VII) を見出し、その特徴と低フィブリノゲン血症を引き起こす原因を検討した。

遺伝子解析により Fbg 遺伝子の変異を同定し、患者血漿のウエスタンブロット (WB) 解析を行い、Fbg を構成している異常ポリペプチド鎖を検出した。患者と同様または患者と一部同様のアミノ酸配列を有するコンビナント Fbg を発現させ ELISA および WB 解析を行った。さらに Pulse-chase 解析を行い、細胞内外での異常な Fbg の動態を経時的に検討した。

その結果、藤原祝子は次の結論を得た。

1. 遺伝子解析の結果、一方の allele で Fbg γ 鎖7651番アデニル酸欠失が明らかとなり、そこから387番アミノ酸 Ile およびそれ以降の24アミノ酸置

換と15アミノ酸延長が推測された。

2. 患者血漿のWBでは、正常 γ 鎖(γ)、 γ' 鎖(γ')の他に $B\beta$ 鎖とほぼ同じ分子サイズと $A\alpha$ 鎖と $B\beta$ 鎖の間に異常なバンド、 γ^* と γ'^* をそれぞれ認めた。
3. 患者血漿にトロンビン、XIIIa因子を反応させたWBの結果、異常 γ 鎖は架橋形成が行えないことが示唆された。
4. リコンビナントFbgを定量した結果、患者 γ 鎖、 γ' 鎖と同様の変異を持つクローンおよびその変異に加えて糖鎖結合を妨げたクローンにおいて、培養液、細胞破碎液ともに有意な低下が認められた。その他の変異では、有意な低下は認められなかった。
5. リコンビナントFbgのWB解析により患者血漿で認められた γ^* と γ'^* は、異常 γ 鎖と γ' 鎖であることが証明されN-Glycosidase F反応により新たな糖鎖の付加が明らかとなった。
6. Pulse-chase解析の結果、異常なFbgは正常より少量のFbgが組み立てられ分泌されていることが明らかとなった。

以前、奥村らは γ 鎖388よりC末端側24アミノ酸の存在はFbgの組み立て・分泌に必須でないことを報告している。本研究の結果では、たとえC末端側アミノ酸が存在していても391~398位のアミノ酸に変異があるとFbg分泌が低下することが明らかになった。さらに、Fbgの低下は γ 鎖産生低下かもしくはFbg組み立ての低下によって引き起こされていることが明らかとなった。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Membrane-associated Activation of Cholesterol α -Glucosyltransferase, an Enzyme Responsible for Biosynthesis of Cholesteryl- α -D-glucopyranoside in *Helicobacter pylori* Critical for its Survival (ピロリ菌の生存に必須なコレステロール- α -D-グルコピラノシド生合成に関わるコレステロール α -D-グルコース転移酵素の膜結合型活性)

星 野 瞳

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】ピロリ菌は世界人口の約半数に感染しているグラム陰性のらせん状桿菌であり、慢性胃炎や胃潰瘍、胃悪性腫瘍、胃MALTリンパ腫といった

種々の胃関連疾患の原因菌とされている。胃粘液は表層粘液と腺粘液から構成されているが、腺粘液の特徴である α 1,4結合したN-アセチルグルコサミン残基をもつO-グリカン(α GlcNAc)は、ピロリ菌の主要な細胞壁構成成分であるコレステロール- α -D-グルコピラノシド(CGL)生合成に関わるコレステロール α -D-グルコース転移酵素(CHL α GcT)の活性を阻害することで、ピロリ菌の増殖と運動能を抑制することが知られている。しかしながら、ピロリ菌におけるCHL α GcTの局在は明らかにされていない。そこで本研究では、CHL α GcTに対するポリクローナル抗体を作製し、post-embedding法を用いた免疫電顕により、ピロリ菌におけるCHL α GcTの局在を定量的に解析した。また、ピロリ菌より抽出したタンパク質の分画を行い、各分画におけるCHL α GcTの存在および酵素活性の有無をWestern blotting法ならびに酵素活性測定法により解析した。

【方法】3種類の合成ペプチドをウサギに免疫し、その血清をアフィニティーカラムに通すことにより3種類の抗CHL α GcT抗体を得た。作製した抗体の特異性をCHL α GcT遺伝子で形質転換した大腸菌、ベクターのみで形質転換した大腸菌、ピロリ菌より抽出したタンパク質を用いたWestern blotting法にて確認した。次いで、ピロリ菌26695株(ATCC 700392)を急速凍結置換法により電子顕微鏡用試料とし、post-embedding法を用いて染色を行ったのち細胞質、内膜、ペリプラズム、外膜、菌体外に存在する金コロイド数を定量化した。さらに活性型CHL α GcTの局在を調べるため、ピロリ菌のタンパク質を浸透圧ショック法ならびに超遠心分離によりペリプラズム分画、細胞質分画、膜分画に分画し、これらを酵素供給源としたin vitro解析を行い、CHL α GcTの合成産物であるCGLの局在を薄層クロマトグラフィー(TLC)により検出した。

【結果】CHL α GcTの66.3%が内膜直下の細胞質に存在していた一方、24.7%は内膜上に認められた。加えて、2.6%、5.0%、1.4%のCHL α GcTが、ペリプラズム、外膜、菌体外のそれぞれに認められた。分画したピロリ菌のタンパク質をWestern blotting法で解析した結果、全分画よりCHL α GcTの存在を確認した。一方、これらの分画タンパク質を酵素源として用いたin vitroのCGL合成アッセイにおける反応産物をTLCにて解析したところ、膜分画の反応産物のみにCGLを認めた。

【結論】本研究では、抗 CHL α GcT 抗体を用いた免疫電顕微鏡ならびに in vitro の酵素解析の 2 つの方法を用いることにより、活性型 CHL α GcT が膜分画に存在することを明らかとした。以上の結果より CHL α GcT が非活性型として細胞質で合成され、細胞膜と結合することによって活性型に転換することが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

腺粘液の特徴である α 1,4 結合した *N*-アセチルグルコサミン残基をもつ *O*-グリカン (α GlcNAc) は、ピロリ菌の主要な細胞壁構成成分であるコレステロール- α -D-グルコピラノシド (CGL) 生合成に関わるコレステロール- α -D-グルコース転移酵素 (CHL α GcT) の活性を阻害することで、ピロリ菌の増殖と運動能を抑制することが知られている。しかしながら、ピロリ菌における CHL α GcT の局在は明らかにされていない。そこで本研究では、CHL α GcT に対するポリクローナル抗体を作製し、post-embedding 法を用いた免疫電顕により、ピロリ菌における CHL α GcT の局在を定量的に解析した。またピロリ菌より抽出したタンパク質の分画を行い、各分画における CHL α GcT の存在および酵素活性の有無を Western blotting 法ならびに酵素活性測定法により解析した。

ピロリ菌 26695 株 (ATCC 700392) のアミノ酸配列を基に 3 種類のポリクローナル抗体を作製し、Western blotting 法にて抗体の特異性を確認した。次に、急速凍結置換法により電子顕微鏡用試料としたピロリ菌に対して post-embedding 法を用いて染色を行い、CHL α GcT の局在を定量化した。さらに活性型 CHL α GcT の局在を調べるため、ピロリ菌タンパク質を分画し、これらを酵素供給源とした in vitro における解析を行い、CHL α GcT の合成産物である CGL の局在を薄層クロマトグラフィー (TLC) により検出した。

その結果、次の結論を得た。

1. CHL α GcT の 66.3% が内膜直下の細胞質に存在していた一方、24.7% は内膜上に認められた。加えて、2.6%、5.0%、1.4% がそれぞれペリプラズム、外膜、菌体外のそれぞれに認められた。
2. 細胞質分画、膜分画、ペリプラズム分画の全てに CHL α GcT のタンパク質は検出されたが、酵素活性は膜分画のみにしか認められなかった。

本研究では、抗 CHL α GcT 抗体を用いた免疫電顕

ならびに in vitro の酵素解析という 2 つの異なった方法を用いることにより、活性型 CHL α GcT が膜分画に存在することを明らかとした。以上の結果より CHL α GcT が非活性型として細胞質で合成され、細胞膜と結合することにより活性型に転換することが示唆された。現在、薬剤耐性ピロリ菌の出現が問題となっているが、本研究の成果を基に、ピロリ菌に対する新たな除菌法の開発が期待できる。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Risk Factors for Severe Dysphagia after Concurrent Chemoradiotherapy for Head and Neck Cancers (頭頸部癌に対する同時化学放射線療法後に生じる摂食障害のリスク因子)

小岩井 慶一郎

(論文の内容の要旨)

【背景および目的】進行期頭頸部癌に対する放射線治療では化学療法の同時併用が行われる。放射線治療単独に比べ治療成績は向上するが、同時に有害事象も増強することが知られている。本治療法が行われた患者の 50-80% で生じるとされる重症摂食障害は、患者の生活の質を著しく損なうことから問題点の一つとなっている。頭頸部癌に対する化学療法併用放射線治療に伴う摂食障害のリスク因子を解析する。

【対象と方法】1998年12月から2006年3月に頭頸部癌に対し根治的化学療法併用放射線治療を行った47例を対象とし、遡及的に解析した。年齢は16-81歳(中央値63)、原発部位は喉頭が18例、中咽頭が11例、上咽頭が7例、下咽頭が7例、その他が4例であった。臨床病期はII期が20例、III-IV期が27例であった。主としてプラチナ製剤を用いた化学療法が行われた。シスプラチンの累積投与量は80-300 mg/m² (中央値100)であった。放射線治療における投与線量は50-70 Gy (中央値70)であった。有害事象は Common Terminology Criteria for Adverse Events ver. 3.0で評価した。照射野サイズの指標として用いた等価正方形照射野の一辺の長さは、5.5-16.5 cm (中央値11.3)であった。統計学的解析では、フィッシャーの正確確率検定で単変量解析を、多重ロジスティック回帰分析で多変量解析をそれぞれ行い、有意水準はいずれも0.05未満とした。

【結果】47例中22例（47％）に急性期有害事象として重篤な摂食障害（grade 3-4）が認められた。そのうち1例は12カ月後の経過観察時にも経管栄養が必要であった。単変量解析において、臨床病期（Ⅲ-Ⅳ期）（ $P=0.017$ ）、原発巣（中-下咽頭）（ $P=0.041$ ）および照射野サイズ（等価正方形の一辺の長さ >11 cm）（ $P<0.001$ ）の3因子が重篤な摂食障害の発生と有意に関連していた。多変量解析においては照射野サイズのみが有意な関連性を示した（ $P=0.048$ ）。

【考察および結論】過去に報告されている重症摂食障害のリスク因子は、臨床病期、原発巣、全身状態、喫煙歴、年齢などである。臨床病期や原発巣は照射野の広さや照射部位に関連する因子であり、放射線治療が摂食障害形成に深く関与していることが示唆される。今回の検討から、照射野サイズは頭頸部癌に対する化学療法併用放射線治療に伴う摂食障害のリスク因子となり得ると結論した。本治療法で広範な照射野を必要とする場合、重症摂食障害の出現を想定した対応をすべきである。

（論文審査の結果の要旨）

進行期頭頸部癌に対する化学療法同時併用放射線治療では50-80％の症例に重症摂食障害が生じると報告されており、本治療法の大きな問題点の一つとなっている。今回小岩井慶一郎らは頭頸部癌に対する化学療法同時併用放射線治療に伴う摂食障害のリスク因子を解析した。

1998年12月から2006年3月にかけて根治的化学療法併用放射線治療を施行した頭頸部癌47例を対象とした。年齢は16-81歳（中央値63）、原発部位は喉頭が18例、中咽頭が11例、上咽頭が7例、下咽頭が7例、その他が4例であった。臨床病期はⅡ期が20例、Ⅲ-Ⅳ期が27例であった。化学療法にはプラチナ製剤が主として用いられた。放射線治療における投与線量は50-70 Gy（中央値70）であった。有害事象はCommon Terminology Criteria for Adverse Events ver. 3.0で評価した。照射野サイズの指標として用いた等価正方形照射野の一辺の長さは、5.5-16.5 cm（中央値11.3）であった。統計学的解析では、フィッシャーの正確確率検定で単変量解析を、多重ロジスティック回帰分析で多変量解析をそれぞれ行い、有意水準はいずれも0.05未満とした。

その結果、小岩井慶一郎らは次の成績を得た。

1. 47例中22例（47％）に急性期有害事象として重篤な摂食障害（grade 3-4）が認められた。

2. 重篤な摂食障害と年齢、全身状態、治療前体重減少、喫煙歴、原発巣、臨床病期、照射野サイズ、累積シスプラチン投与量、累積5-FU投与量および線量分割法の計11項目との関連を検討した単変量解析では、臨床病期（Ⅲ-Ⅳ期）（ $P=0.017$ ）、原発巣（中-下咽頭）（ $P=0.041$ ）および照射野サイズ（等価正方形の一辺の長さ >11 cm）（ $P<0.001$ ）の3因子と重篤な摂食障害の発生とに有意差が示された。
3. 原発巣、臨床病期、照射野サイズ、累積シスプラチン投与量の4因子を対象とした多変量解析においては、照射野サイズのみに関連性が示された（ $P=0.048$ ）。

これらの結果から、頭頸部癌に対する化学療法併用放射線治療において、照射野サイズは摂食障害のリスク因子となり得ると結論した。以上から、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin (卵巣癌における histone decetylase 発現は、サブタイプにより役割が異なる。HDAC1は細胞増殖を促進し、HDAC3はEカドヘリン発現抑制を介して細胞の移動を促進する)

林 晶 子

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】ヒストンのアセチル化と脱アセチル化は、epigeneticな変化の一つであり、核クロマチン活性、それに引き続いて起こる遺伝子発現を制御している。この制御機構にはHistone deacetylase (HDAC) が重要な役割を果たしており、悪性腫瘍ではHDACはp21等の癌抑制遺伝子の不活化をもたらすとされている。HDACには18のサブタイプがあり、4つのクラスに分類される。その中でもClass1 HDACであるHDAC1、HDAC2およびHDAC3は癌において発現増強が報告されており、最もよく研究されている。特に、悪性リンパ腫などの血液癌において、HDAC阻害剤は新たな分子標的薬剤として注目され臨床応用が開始されている。しかし、卵巣癌におけるHDACの発現および機能は解明されていない。そこ

で、上皮性卵巣腫瘍における Class1 HDAC である HDAC1, HDAC2, HDAC3 の発現を検討し、卵巣癌細胞における HDAC 抑制の効果を検討した。

【方法】患者の同意を得て採取した上皮性卵巣腫瘍115例（良性23例，境界悪性17例，悪性75例）に対して抗 HDAC1, HDAC2 および HDAC3 抗体を用いて免疫組織染色を行い，100細胞中の陽性細胞をカウントし Positivity Index (PI) として算出した。HDAC1, HDAC2 および HDAC3 の PI と増殖マーカーである Ki67, 接着因子である E-cadherin 発現との関連，および患者生存期間との関連を検討した。また，手術摘出組織から蛋白質を抽出し，それぞれの発現を Western blot にて検討した。さらに，ヒト培養卵巣癌細胞株に対し HDAC inhibitor (TSA, apicidin, SAHA) を添加し，細胞増殖能および apoptosis に対する効果を検討した。また，卵巣癌細胞株に HDAC1, HDAC2 および HDAC3 特異的 siRNA を導入し，HDAC 発現抑制による増殖能，細胞接着能および遊走能の変化を WST-1 assay, flow cytometry, anchorage-independent assay, migration assay にて検討した。

【成績】上皮性卵巣腫瘍において，HDAC1, HDAC2 および HDAC3 の発現は，良性，境界悪性，癌の順に発現が増強していた。Western blotting 解析でも同様の結果であった。HDAC1 および HDAC2 発現は，Ki67 発現と正の相関を示し (HDAC1 : $\rho=0.443$, $p<0.0001$, HDAC2 : $\rho=0.535$ $p<0.0001$)，HDAC3 発現は E-cadherin と逆相関を示した ($\rho=-0.404$, $p=0.001$)。これらの発現と患者生存期間を比較したところ，HDAC1 陽性症例は陰性症例に比べて生存期間が短縮していた ($p=0.043$)。卵巣癌細胞株 (A2780, OVCAR3, SKOV3) に HDAC inhibitor (TSA, apicidin, SAHA) を添加したところ，細胞増殖が有意に抑制され，同時に apoptosis が誘導された。さらに，細胞周期との関連を検討したところ，HDAC inhibitor によって G1 arrest が誘導され，細胞周期促進因子である cyclin A 発現の減少が確認された。HDAC 特異的 siRNA を用いて個々の HDAC の機能の違いを検討したところ，HDAC1 の抑制により細胞増殖能および造腫瘍能ともに抑制され ($p=0.001$)，HDAC3 の抑制により遊走細胞数が減少し，E-cadherin の発現が誘導された。

【考察】上皮性卵巣腫瘍において，HDAC 発現は悪性度が増すにつれて増強し，HDAC1 陽性例で患者生存

期間が有意に短縮していたことから，HDAC1 が卵巣癌の予後因子となりうると考えられた。また，ヒト培養卵巣癌細胞株において，HDAC1 は増殖との関連が示され，HDAC3 は細胞遊走能との関連が示され，HDAC のサブタイプによって機能が異なる可能性が示唆された。今後，HDAC を標的とした治療法を検討する際には，サブタイプによる機能の違いを考慮する必要があると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子発現制御に関連する核クロマチン活性は，ヒストンのアセチル化と脱アセチル化により調節され，Histone deacetylase (HDAC) が重要な役割を果たしている。悪性腫瘍では HDAC1, HDAC2 および HDAC3 の発現増強が報告されており，p21 等の癌抑制遺伝子の不活化をもたらすとされている。今回，上皮性卵巣腫瘍における Class1 HDAC である HDAC1, HDAC2, HDAC3 の発現を検討し，卵巣癌細胞における HDAC 抑制の効果を検討した。

患者の同意を得て採取した上皮性卵巣腫瘍115例（良性23例，境界悪性17例，悪性75例）に対して HDAC1, HDAC2 および HDAC3 抗体を用いて免疫組織染色を行い，100細胞中の陽性細胞数を Positivity Index (PI) として算出した。それぞれの PI と増殖マーカーである Ki67, 接着因子である E-cadherin 発現との関連，および患者生存期間との関連を検討した。また，手術摘出組織から蛋白質を抽出し，それぞれの発現を Western blot にて検討した。さらに，ヒト培養卵巣癌細胞株 (A2780, OVCAR3, SKOV3) に対し HDAC inhibitor (TSA, apicidin, SAHA) を添加し，細胞増殖能および apoptosis に対する効果を検討した。また，卵巣癌細胞株に HDAC1, HDAC2 および HDAC3 特異的 siRNA を導入し，増殖能，細胞接着能および遊走能の変化を WST-1 assay, flow cytometry, anchorage-independent assay, migration assay にて検討した。

その結果「林晶子」は次のような結論を得た。

1. 上皮性卵巣腫瘍において，HDAC1, HDAC2 および HDAC3 の発現は，良性，境界悪性，癌の順に発現が増強し，Western blotting 解析でも同様の結果であった。
2. HDAC1 および HDAC2 発現は，Ki67 発現と正の相関を示し，HDAC3 発現は E-cadherin と逆相関を示した。
3. 患者生存期間の検討では，HDAC1 陽性症例は陰

性症例に比べて生存期間が短縮していた。

4. 卵巣癌細胞株に HDAC inhibitor を添加したところ、細胞増殖が有意に抑制され、同時に apoptosis が誘導された。さらに、細胞周期との関連では、G1 arrest が誘導され、細胞周期促進因子である cyclin A 発現が減少した。
5. HDAC 特異的 siRNA による検討では、HDAC1 の抑制により細胞増殖能および造腫瘍能が抑制され、HDAC3 の抑制により遊走細胞数が減少し、E-cadherin の発現が誘導された。

これらの結果より、上皮性卵巣腫瘍において HDAC 発現は悪性度と関連し、HDAC1 が卵巣癌の予後因子となりうると考えられた。また、ヒト培養卵巣癌細胞株において、HDAC1 は増殖と関連し、HDAC3 は細胞遊走能と関連していたことから、HDAC のサブタイプによって機能が異なる可能性が示唆された。今後、HDAC を標的とした治療法を検討する際には、サブタイプによる機能の違いを考慮する必要があると考えられた。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Endoscopic identification of *Helicobacter pylori* Gastritis in children (小児における *Helicobacter pylori* 胃炎の内視鏡的識別)

日 高 奈 緒

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染は成人、小児ともに慢性胃炎を引き起こす原因である。上部消化管内視鏡検査は *H. pylori* 感染の診断に有用で、小児・成人とも、*H. pylori* 非感染の正常胃体部胃粘膜には、regular arrangement of collecting venules (RAC, 微細な発赤点の整然とした配列) が観察され、成人では集合細静脈と一致することが確認されている。小児の *H. pylori* 陽性慢性胃炎の内視鏡所見としては、以前から前庭部の結節性変化が広く知られているが、日本成人の *H. pylori* 陽性慢性胃炎に特徴的な粘膜委縮や腸上皮化生は、小児で観察されることはまれであり、小児において胃粘膜生検採取を決定する内視鏡所見は未だ確立していない。今回、RAC の消失が小児における生検採取の指標となり得るか否かを検討した。また、拡大内視鏡を用いて小児の胃体部の RAC を観察した。

【方法】2001年1月から2006年5月に、消化器症状や貧血の精査目的に上部消化管内視鏡検査を施行した小児87名(男児38名, 女児49名, 平均年齢13歳)を対象とした。内視鏡検査はキシロカインスプレーによる咽頭麻酔とミダゾラムの経静脈鎮静下で細径スコープ(GIF-XP240またはXP260)を用いて同一の小児科医が行った。通常の内視鏡検査に引き続き、胃体下部小弯と胃体上部大弯の胃粘膜を内視鏡先端からおよそ5 mmの近距離で観察し、微細な発赤点が整然と配列している像をRAC陽性、発赤点が不明または不規則に配列している像をRAC陰性とした。RACの判定は、患者の臨床経過や *H. pylori* 感染状況を知らされていない消化器内視鏡医が行った。拡大内視鏡観察はGIF-Q240Zを使用し、8名の患者に対して行った。*H. pylori* 感染の診断は13C尿素呼気試験、血清 *H. pylori* 抗体および病理組織により行った。前庭部大弯、胃体下部小弯、胃体上部大弯から組織を採取し、胃炎の程度はHE染色標本により、*H. pylori* 感染はGiemsa染色標本により、評価した。

【結果】87名の小児の中で、*H. pylori* 感染者は25名(29%)であった。年齢、性別に有意差を認めなかった。*H. pylori* 陽性者の7名に十二指腸潰瘍があり、前庭部の結節性変化は *H. pylori* 陽性者の21名(84%)に認められたが、*H. pylori* 陰性者には観察されなかった。*H. pylori* 感染を診断する上で、前庭部結節性変化は、感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率がそれぞれ84%、100%、100%、94%であった。一方、RAC陽性者は全例 *H. pylori* 陰性で、全ての *H. pylori* 感染者と5名の *H. pylori* 陰性者はRAC陰性と評価された。*H. pylori* 感染を診断する上で、胃体部のRAC陰性所見は、感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率がそれぞれ100%、92%、83%、100%であった。8名の拡大内視鏡による観察では、RAC陽性例では集合細静脈が観察され、RAC陰性例では集合細静脈が消失していた。

【考察】RAC陰性の *H. pylori* 陽性慢性胃炎に対する感度は胃体部の部位に依らず100%で前庭部結節性変化の感度より高く、他の *H. pylori* 陽性慢性胃炎の所見に乏しい小児においては、RAC陰性所見は *H. pylori* 陽性慢性胃炎の診断に有用であると考えられた。また、小児の *H. pylori* 陽性慢性胃炎は前庭部優位であるとされているが、RAC所見は胃体部の部位に関わらず全例で消失しており、*H. pylori* 感染が汎発性胃炎を引き起こすことを示唆するものであった。さら

に、成人と同様に小児においても RAC は集合細静脈を観察しているものであることが拡大内視鏡観察で確認された。

【結論】小児において、胃体部における RAC 所見の存在は *H. pylori* 陰性の診断情報として有用であった。RAC 陰性例では積極的に胃粘膜組織を採取し、病理組織学的に胃炎の評価と *H. pylori* 感染の有無を確認すべきであると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

日本成人の *Helicobacter pylori* (*Hp*) 陽性慢性胃炎に特徴的な粘膜委縮や腸上皮化生は小児で観察されることはまれである。小児の *Hp* 陽性慢性胃炎で以前から報告されている前庭部結節性変化は、特異度は高いものの感度が低く、小児において胃粘膜組織採取を決定する内視鏡所見は未だ確立していない。小児・成人とも、*Hp* 非感染の正常胃体部胃粘膜には、regular arrangement of collecting venules (RAC, 発赤点の整然とした配列) が観察され、成人では拡大観察により集合細静脈と一致することが確認されている。今回、RAC の消失が小児における組織採取の指標となり得るか否かを検討した。また、拡大内視鏡を用いて小児の胃体部の RAC を観察した。

消化器症状や貧血の精査目的に上部消化管内視鏡検査を行った小児87名を対象に、細経スコープ (GIF-X240又はXP260) を用いて、通常観察後に胃体下部小弯と胃体上部大弯の2箇所を近接観察して RAC の有無を判定し、同部位と前庭部から生検組織を採取した。拡大内視鏡観察は GIF-Q240Z を使用し、8名に対して行った。*Hp* 感染は13C 尿素呼気試験、血清 *Hp* 抗体および病理組織により診断した。

Hp 陽性者の21名 (84%) に前庭部結節性変化を認め、全例で胃体下部小弯・胃体上部大弯ともに RAC は陰性であった。RAC 陰性の *Hp* 陽性慢性胃炎に対する感度は胃体部の部位に依らず100%で、前庭部結節性変化の感度より高く、他の所見に乏しい小児においては、RAC 陰性所見は *Hp* 陽性慢性胃炎の診断に有用であると考えられた。また、小児の *Hp* 陽性慢性胃炎は前庭部優位であるとされているが、RAC 所見は胃体部の部位に関わらず全例で消失しており、*Hp* 感染が汎発性胃炎を引き起こすことを示唆するものであった。さらに、拡大内視鏡観察により、小児においても成人と同様に RAC は集合細静脈を観察しているものであることが確認された。

以上より、小児において、胃体部の RAC 所見は *Hp*

感染の診断情報として有用であった。RAC 陰性例では積極的に胃粘膜組織を採取し、病理組織学的に胃炎の評価と *Hp* 感染の有無を確認すべきであると考えられた。

情報の少ない小児の *Hp* 感染慢性胃炎の内視鏡所見に関する重要な知見であり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Intratracheal catheter suction removes the same volume of meconium with less impact on desaturation compared with meconium aspirator in meconium aspiration syndrome (胎便吸引症候群において気管内吸引カテーテルを用いた気管内吸引法はメコニウムアスピレーターを用いた気管内吸引法と比較して、同等の吸引効果があり、血中酸素飽和度の低下は小さい)

赤澤陽平

(論文の内容の要旨)

【はじめに】胎便吸引症候群 (Meconium aspiration syndrome, 以下 MAS) は子宮内もしくは出生後に胎便が気管内に吸引されることにより発症する呼吸障害である。発症した場合有効な治療法はなく、重症 MAS では人工呼吸管理や NO 吸入療法などの集中治療を要し、予後不良の疾患である。子宮内での胎便吸引を予防する方法はないため、MAS 発症のリスクが高い新生児では、出生後早期からの介入が必要となる。新生児心肺蘇生法 (Neonatal Resuscitation Program, 以下 NRP) では、MAS 発症予防のために出生後、羊水が胎便で混濁しており、児の元気がない場合 (自発呼吸が弱い、筋緊張が低下している、心拍数が100回/分未満のいずれかを認める場合)、蘇生者は児に20秒以内で気管内挿管し、挿管チューブに直接接続したメコニウムアスピレーター (Meconium Aspirator, 以下 MA) を用いて、気管内から胎便が吸引されなくなるまで、吸引を反復することを推奨している。新生児への気管内挿管は習得までに経験を要し、しかも、低酸素、徐脈などの vital sign に影響しうる侵襲的な手技である。さらに、MA による気管内吸引では、MA は直接挿管チューブに接続し、挿管チューブを引き抜きながら吸引するため、反復吸引が必要な際や、吸引後に人工呼吸管理が必要な場合は、気管内挿管を繰り返し施行しなければならない。一方、

日本では気管内吸引が必要な場合は、気管内挿管後、挿管チューブ内に直接吸引カテーテルを挿入し、胎便を吸引する。この手技の場合、繰り返し吸引が必要な場合や吸引後人工換気を行う場合も、挿管チューブは留置したままでよいとため、気管内挿管を反復する必要がない。本研究では、MAS 動物モデルを用い、MA による気管内吸引法と吸引カテーテルを用いた吸引法での胎便回収率、回収後の vital sign への影響について比較検討した。

【対象と方法】 48羽の成熟日本家兎を使用した。鎮静後、気管切開を行い、気管切開孔から20%胎便(3.5 ml/kg)を気管内注入し、MAS モデルを作成し、以下の実験1, 2を行った。実験1では、MA 群および吸引カテーテル群の2群(それぞれn=8)に無作為に振り分け、胎便回収率および胎便吸引後20分、以降30分毎2時間後までの合計5回の時点で酸素分圧(以下PaO₂)、脈拍数、平均血圧値を2群間で比較した。実験2では、MA 群を胎便を吸引してから再挿管するまでの時間で3群に分類し(MA-05群:再挿管まで5秒, MA-10群:再挿管まで10秒, MA-15群:再挿管まで15秒)、吸引カテーテル群との4群間(それぞれn=8)に無作為に振り分け、胎便吸引後急性期の酸素飽和度(以下SpO₂)、心拍数、平均血圧値の変化を連続測定し、4群間で比較した。

【結果】 実験1では両群間の胎便回収率に有意差はなかった(MA 群 14.8%±5.5%, 吸引カテーテル群 19.5%±5.0%)。胎便吸引後2時間の人工換気中のPaO₂、心拍数、平均血圧値はいずれの時点でも2群間で有意差はなかった。実験2では胎便注入後のSpO₂は、MA-15群が吸引カテーテル群に比較して有意に低値であった(p<0.05)。また、胎便吸引後、一旦低下したSpO₂が90%以上に上昇するまでの時間はMA-15群がその他の群に比較し有意に長かった(p<0.05)。

【考察】 今回の研究ではMASの動物モデルにおいて、気管内胎便吸引法の違いによる効果とvital signへの影響を検証した。MAによる吸引法と吸引カテーテルによる吸引法は吸引効果に差はなかったが、MAによる吸引法は、再挿管までの時間が長い場合、吸引カテーテルによる吸引法に比較し、吸引後の酸素飽和度の低下が大きいことが示された。新生児への気管内挿管は、児に徐脈、低酸素、血圧変動などを惹起しうる侵襲的な手技である。新生児蘇生の現場では気管内挿管が1回で成功する割合は60%程度と低く、挿管

手技に要する時間も20秒以上要することが多いとする報告がある。NRPが推奨する20秒以内での気管内挿管は必ずしも容易ではないと考えられ、吸引カテーテルによる吸引法は、気管内挿管を繰り返す必要のあるMAによる吸引法と比較し、吸引効果は同程度でありながらも、児にとって侵襲が少なく、低酸素血症のリスクも低いと考えられた。

【結論】 胎便吸引症候群においてMAによる吸引法と比較し、気管内吸引カテーテルを用いた気管内吸引法は同等の吸引効果があり、胎便吸引後の血中酸素飽和度の低下は小さいことから、吸引カテーテルを用いた気管内吸引法の有効性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

胎便吸引症候群(Meconium aspiration syndrome, 以下MAS)は胎便が気管内に吸引されることにより発症する呼吸障害である。新生児心肺蘇生法(Neonatal Resuscitation Program, 以下NRP)では、MAS発症予防のために出生後、羊水が胎便で混濁しており、児の元気がない場合、蘇生者は児に20秒以内で挿管し、メコニウムアスピレーター(Meconium Aspirator, 以下MA)を用いて、気管内から胎便が吸引されなくなるまで、再挿管、吸引を反復することを推奨している。しかし、MAを用いた場合、反復吸引が必要な際や、吸引後に人工呼吸管理が必要な際は、再挿管を繰り返す必要がある。一方、日本では、挿管後に挿管チューブ内に直接吸引カテーテルを挿入し、胎便を吸引する。この場合、挿管チューブは留置したままでよく、再挿管の必要がない。本研究では、MAS動物モデルを用い、MAによる気管内吸引法を施行した群と吸引カテーテルによる気管内吸引法を施行した群での胎便回収率、回収後のvital signへの影響について比較検討した。

その結果、赤澤は次の結論を得た。

1. 両群間で胎便回収率に有意差はなかった。
2. 胎便吸引後2時間の人工換気中の血中酸素分圧、心拍数、平均血圧値はいずれの時点でも両群間で有意差はなかった。
3. 胎便注入後10分間の動脈血酸素飽和度は、MAにより胎便を吸引し、吸引後再挿管までの時間を15秒と設定した群は吸引カテーテル群に比較して有意に低値であった。また、胎便吸引後、一旦低下したSpO₂が90%以上に上昇するまでの時間もMAにより胎便を吸引し、再挿管までの時間を15秒と設定した群は有意に長かった。

以上より、2つの方法間で吸引効果に差はなかったが、MAによる吸引法では再挿管までの時間が15秒以上と長い場合、吸引カテーテルによる吸引法よりも吸引後の酸素飽和度の低下が大きいことが示された。また、新生児への気管内挿管は侵襲的な手技であり、蘇生の現場では迅速な挿管は必ずしも容易ではない。この点からも気管内吸引カテーテルを用いた気管内吸引法の方が、吸引効果は同等でありながら児の vital sign への影響が少ないことが明らかとなった。これらの知見は新生児蘇生法にとって重要と思われ、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Induction of high endothelial venule-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) in a mouse model of “*Candidatus Helicobacter heilmannii*”-induced gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma (ヘリコバクター・ハイルマニ感染マウス胃炎・MALTリンパ腫モデルにおけるL-セレクチンリガンド糖鎖と粘膜アドレシン細胞接着分子-1 (MAdCAM-1) を発現した高内皮細静脈様血管の誘導)

鈴木 彰

(論文の内容の要旨)

【背景】ヘリコバクター・ハイルマニは慢性胃炎を引き起こし、時にB細胞型胃MALTリンパ腫を惹起する。本研究ではヘリコバクター・ハイルマニ感染マウスモデルを用い、感染胃粘膜にみられる組織学的変化や血管内皮細胞上のリンパ球接着分子の発現を検討し、ヘリコバクター・ハイルマニ感染により胃粘膜に惹起される慢性炎症およびMALTリンパ腫の発症機序を解析した。

【対象と方法】ヒトから分離したSH4ヘリコバクター・ハイルマニ株を8週齢のBALB/Cマウスに感染させた。感染後8, 26, 54, そして83週後にマウスを屠殺し、胃粘膜にみられる病理組織学的変化を以下の方法を用いて検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、1) HE染色による病理組織像の評価、2) peripheral lymph node addressin (PNAd) に提

示されるLセレクチン結合糖鎖、mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1)、ヘリコバクター・ハイルマニ、およびB細胞 (CD45R/B220) の免疫染色、および3) L-およびE-セレクチン・IgMキメラ蛋白を用いたin vitro binding assayを行った。また、ヘリコバクター・ハイルマニ感染後83週目のマウスと非感染マウスから胃粘膜を採取し、それぞれから作製したcDNAを基にPNAdに提示されるLセレクチン結合糖鎖の合成に関与するN-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases (GlcNAc6STs) およびMAdCAM-1 mRNAの発現をリアルタイム定量PCR法により、また α 1,3-flucosyltransferase (*Fut4* と *Fut7*) mRNAの発現をPCR法により検討した。

【結果】肉眼的に感染マウスの胃粘膜には感染後26週で小結節が出現し、83週では多数の小結節が観察された。感染マウスにおいては慢性胃炎が発症し、感染の経過に伴い炎症の増強をみた。非感染マウスでは観察期間を通じて組織学的に変化が認められなかった。CD45R/B220陽性の杯中心細胞様細胞の集簇とリンパ上皮性病変を認めるMALTリンパ腫が感染後54週および83週のマウスでそれぞれ11.1% (1/9) 1, 77.8% (7/9) に認められた。胃炎やMALTリンパ腫を発症した感染マウス胃粘膜にはPNAdおよびMAdCAM-1を発現した高内皮細静脈 (HEV) 様血管が認められた。慢性胃炎の進行に伴い、HEV様血管の数は増加した。誘導されたHEV様血管にはCa²⁺の存在下にL-およびE-セレクチン・IgMキメラ蛋白が結合し、EDTAの存在下ではこれらの結合は認められなかった。*GlcNAc6ST-1* と *MAdCAM-1* mRNAの発現が感染後83週のマウスにおいて亢進していた。また、L-セレクチンリガンド糖鎖の生合成に関与する*Fut4* と *Fut7* は感染マウスおよび非感染マウスにおいて発現していた。

【結語】GlcNAc6ST-1により硫酸化を受けたL-セレクチンリガンド糖鎖と粘膜細胞接着分子-1 (MAdCAM-1) を発現するHEV様血管がヘリコバクター・ハイルマニによる慢性胃炎とMALTリンパ腫の発症に重要な役割を担っていると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

ヘリコバクター・ハイルマニは慢性胃炎を引き起こし、時にB細胞型胃MALTリンパ腫を惹起する。本研究ではヘリコバクター・ハイルマニ感染マウスモデルを用い、感染胃粘膜にみられる組織学的変化や血管内皮細

胞上のリンパ球接着分子の発現を検討し、ヘリコバクター・ヒールマニ感染により胃粘膜に惹起される慢性炎症および MALT リンパ腫の発症機序を解析した。

ヒトから分離した SH4ヘリコバクター・ヒールマニ株を 8 週齢の BALB/C マウスに感染させた。感染後 8, 26, 54, そして 83 週後にマウスを屠殺し、胃粘膜にみられる病理組織学的変化を以下の方法を用いて検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、1) HE 染色による病理組織像の評価、2) peripheral lymph node addressin (PNAd) に提示される L セレクチン結合糖鎖, mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1), ヘリコバクター・ヒールマニ, および B 細胞 (CD45R/B220) の免疫染色, および 3) L-および E-セレクチン・IgM キメラ蛋白を用いた in vitro binding assay を行った。また、ヘリコバクター・ヒールマニ感染後 83 週目のマウスと非感染マウスから胃粘膜を採取し、それぞれから作製した cDNA を基に PNAd に提示される L セレクチン結合糖鎖の合成に関与する *N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferases (GlcNAc6STs) および MAdCAM-1 mRNA の発現をリアルタイム定量 PCR 法により、また α 1,3-flucosyltransferase (*Fut4* と *Fut7*) mRNA の発現を PCR 法により検討した。

その結果、次の結論を得た。

1. 肉眼的に感染マウスの胃粘膜には感染後 26 週で小結節が出現し、83 週では多数の小結節が観察された。感染マウスにおいては慢性胃炎が発症し、感染の経過に伴い炎症の増強をみた。非感染マウスでは観察期間を通じて組織学的に変化が認められなかった。
2. CD45R/B220 陽性の杯中心細胞様細胞の集簇とリンパ上皮性病変を認める MALT リンパ腫が感染後 54 週および 83 週のマウスでそれぞれ 11.1% (1/9) 1, 77.8% (7/9) に認められた。
3. 胃炎や MALT リンパ腫を発症した感染マウス胃粘膜には PNAd および MAdCAM-1 を発現した高内皮細静脈 (HEV) 様血管が認められた。慢性胃炎の進行に伴い、HEV 様血管の数は増加した。
4. 肉眼的に感染マウスの胃粘膜には感染後 26 週で小結節が出現し、83 週では多数の小結節が観察された。感染マウスにおいては慢性胃炎が発症し、感染の経過に伴い炎症の増強をみた。非感染マウスでは観察期間を通じて組織学的に変化が認められなかった。
5. 誘導された HEV 様血管には Ca^{2+} の存在下に L- および E-セレクチン・IgM キメラ蛋白が結合し、

EDTA の存在下ではこれらの結合は認められなかった。

6. GlcNAc6ST-1 と MAdCAM-1 mRNA の発現が感染後 83 週のマウスにおいて亢進していた。また、L-セレクチンリガンド糖鎖の生合成に関与する *Fut4* と *Fut7* は感染マウスおよび非感染マウスにおいて発現していた。

これらの結果より、GlcNAc6ST-1 により硫酸化を受けた L-セレクチンリガンド糖鎖と粘膜細胞接着分子-1 (MAdCAM-1) を発現する HEV 様血管がヘリコバクター・ヒールマニによる慢性胃炎と MALT リンパ腫の発症に重要な役割を担っていると考えられた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Reduced hyperthermia-induced cutaneous vasodilation and enhanced exercise-induced plasma water loss at simulated high altitude (3200 m) in humans (3200 m 高地環境下における運動時の皮膚血管拡張抑制は運動による血漿量低下亢進に起因する)

宮 川 健

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】本研究では、高地では低地と比較して対流による熱放散量が減少することが知られているが、それは運動時の活動筋への血漿水分移動が亢進することで血漿量が減少し、それによって圧反射性に皮膚血管拡張が抑制されるのではないかと、さらに、それは低圧よりも低酸素によって引き起こされるのではないかと、という仮説を検証した。

【方法】7 名の若年男性を被験者とし、室温 30°C、相対湿度 50% に設定された人工気象室において、1) 標高 610 m の正常圧 (710 mmHg; CNT), 2) 標高 3,200 m 相当の低圧低酸素 (510 mmHg; LPLO), 3) 標高 610 m であるが低酸素吸入を行う正常圧低酸素 (710 mmHg; NPLO) の 3 条件下で、CNT における最大酸素摂取量の 50% の強度で自転車運動を 40 分間行わせた。CNT および LPLO では気象室内の空気を吸入させ、NPLO は LPLO の O_2 分圧相当である 14% O_2 と N_2 の混合ガスを吸入させた。測定項目は、血漿量の変化量 (ΔPV), 酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$), 平均動脈血圧 (MBP), 食道温 (T_{es}), 平均皮膚温 (T_{sk}), 前腕皮膚血流量 (FBF), 発汗速度 (SR) であった。

【結果】MBP, $\dot{V}O_2$, T_{sk} , SR は3条件間で有意な差を認めなかった ($P>0.05$)。また, SRの T_{es} の上昇に対する感受性は3条件間で有意な差を認めなかったにもかかわらず, 皮膚血管コンダクタンス (FBF/MBP) の感受性はCNTに比べLPLO, NPLOで低下した ($P<0.05$)。その結果, T_{es} の運動開始5分目から40分目までの上昇はCNTに比べLPLO, NPLOで亢進した (それぞれ, $P=0.026$, $P=0.011$)。さらに, ΔPV は運動開始後10分目以降, CNTに比べLPLO, NPLOで大きく亢進した ($P<0.05$)。一方で, LPLOとNPLOの2条件間ではこれらの測定項目において有意な差を認めなかった。

【結論】これらの結果から, 3,200 m高地における運動時の対流による熱放散の減少は, 血漿量の低下に起因する皮膚血管拡張の抑制が引き起こすことが明らかとなった。さらに, これらの現象は低圧よりも低酸素によって引き起こされることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

本研究では, 高地では低地と比較して対流による熱放散量が減少することが知られているが, それは運動時の活動筋への血漿水分移動が亢進することで血漿量が減少し, それによって圧反射性に皮膚血管拡張が抑制されるのではないかと, さらに, それは低圧よりも低酸素によって引き起こされるのではないかと, という実験仮説を検証した。

7名の若年男性を被験者とし, 室温30°C, 相対湿度50%に設定された人工気象室において, 1) 標高610 mの正常圧 (710 mmHg; CNT), 2) 標高3,200 m相当の低圧低酸素 (510 mmHg; LPLO), 3) 標高610 mであるが低酸素吸入を行う正常圧低酸素 (710 mmHg; NPLO) の3条件下で, CNTにおける最大酸素摂取量の50%の強度で自転車運動を40分間行わせた。CNTおよびLPLOでは気象室内の空気を吸入させ, NPLOはLPLOの O_2 分圧相当である14% O_2 と N_2 の混合ガスを吸入させた。そして運動中の血漿量の変化量 (ΔPV), 酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$), 食道温 (T_{es}), 前腕皮膚血流量 (FBF), 発汗速度 (SR) を測定した。

その結果, 次の結果を得た。

LPLOおよびNPLOはCNTと比較して,

1. 運動に伴う血漿量の減少が亢進した。
2. そのため, 食道温上昇に対する皮膚血管拡張が抑制された。
3. 一方で, 食道温上昇に対する発汗速度はその影響

を受けなかった。

4. LPLOとNPLO間ですべての測定項目において差を認めなかった。

これらの結果から, 3,200 m高度における運動時の対流による熱放散の減少は, 血漿量の低下に起因する圧反射性皮膚血管拡張抑制が関与していること, さらに, これらの現象は低圧よりも低酸素によって引き起こされることが明らかとなった。

以上, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Clinicopathological features of hepatitis C virus disease after living donor liver transplantation: relationship with in situ hybridisation data (生体肝移植後のC型肝炎の臨床病理学的特徴: in situ hybridisation法の結果との関係)

増田 雄一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】C型肝炎硬変は, 肝移植の適応となる末期肝不全患者の原疾患のなかで最も多い疾患である。本疾患では, 肝移植後にC型肝炎ウイルス (HCV) の再感染がほぼ全例に起こり, 移植後5年で30%の患者が肝硬変に進展するとも報告されている。C型肝炎例に対する肝移植後の肝機能障害の治療において再発C型肝炎と急性拒絶反応では治療が全く異なり, 両者の正確な鑑別診断が必要とされている。また, 肝移植後の再発C型肝炎に対して, インターフェロン (IFN) とリバビリンを用いた抗ウイルス療法が一般的であるが, 治療に対する反応は個体差が大きく, 治療効果予測因子の検討は臨床的に有用である。肝移植後の再発C型肝炎に関する研究は多いが, 肝生検組織を用いた in situ hybridisation (ISH) 法による研究報告は極めて少ない。今回我々は, 陽性シグナルがHCVの感染細胞を表していると考えられるHCVゲノム (G) に対するRNAプローブと, 陽性シグナルがHCVの増殖を表していると考えられる複製中間体 (replicate-intermediate: RI) に対するRNAプローブを作製し, C型肝炎患者に対する生体肝移植後の肝生検組織を用いてISH法によるHCV感染状態の検討を行った。この結果を臨床病理学的に解析し, ISH法による検討が再発C型肝炎と急性拒絶反応の鑑別に有用であるか, また再発C型肝炎に対する治療効果予

測に有用であるか否かについて検討した。

【方法】当科にて2007年10月までにC型肝炎（genotype 1b）に対して成人間生体肝移植が施行された症例を対象とし、術後初回肝生検検体を用いてISH法による検討を行った。再発C型肝炎が組織学的に診断された患者に対しては、IFN α もしくはpegylated IFN α 2bにリバビリンを加えた抗ウイルス療法を施行した。ISH法に用いるプローブは、Qianらにより報告された方法に準じて作製した。すなわちHCVの5'末端側非翻訳領域を逆転写し、TOPOベクターを用いてサブクローニングした後、digoxigeninで標識し、G・RIそれぞれに対するHCV-RNAプローブを作製した。プローブの方向はdirect sequenceにより確認した。これらのプローブを用いてISHを行った肝生検組織標本を400倍顕微鏡下で観察し、任意の10視野においてHCV陽性細胞を同定し、同視野内の総肝細胞数に対する陽性細胞数の割合を算出した。また、肝生検組織をHE染色の所見により、再発C型肝炎（RHC）、急性拒絶反応（ACR）、その両者の混在（MIX）の3群に分け、ISH法により得られた陽性細胞割合と比較し、臨床病理学的に検討を行った。さらにRHC群において抗ウイルス療法が施行された症例を、治療開始後1カ月後に血清中のHCV量が減少した症例と減少しなかった症例に分けて、ISH法により得られた結果を臨床検査所見と比較し検討を行った。

【結果】男性15名、女性4名で、RHC群は11例、ACR群は5例、MIX群は3例であった。臨床背景因子において3群間に有意差を認めなかった。ISHによるG、RI陽性シグナルを肝細胞の核周囲および細胞質に認めた。RHC群、ACR群、MIX群それぞれにおけるシグナル陽性細胞数割合は、Gにおいて14.8%、13.4%、12.0%、RIにおいては19.4%、14.8%、14.0%であり、3群間に有意差を認めなかった。抗ウイルス療法が施行された症例のうち、HCV量が減少した症例（D群）は7例、減少しなかった症例（ND群）は3例であった。G、RIそれぞれの陽性細胞数の割合は、D群で11.7%、13.1%であり、これはND群の24.7%、31.6%と比較し有意に低値であり、特にRIにおいてより差が大きかった。臨床検査所見においては、2群間に有意差を認めなかった。

【結語】C型肝炎患者に対する生体肝移植後の肝生検組織における、ISH法を用いた検討では、急性拒絶反応と診断された肝生検組織においても再発C型肝炎

と診断された肝生検組織と同等にHCVのG、RI陽性シグナルが認められ、ISH陽性肝細胞数の割合で再発C型肝炎との鑑別を行うことはできなかった。しかし、ISH法による肝生検組織の評価は生体肝移植後の再発C型肝炎に対する抗ウイルス療法の早期の効果予測に有用である可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

C型肝炎硬変に対する肝移植後には、C型肝炎ウイルス（HCV）の再感染がほぼ全例に起こることが報告されている。再発C型肝炎と急性拒絶反応では治療が全く異なるため、肝移植後の肝機能障害の治療にあたっては両者の鑑別が大きな問題とされている。また肝移植後再発肝炎に対して、インターフェロンとリバビリンを用いた抗ウイルス療法が一般的であるが、治療に対する反応は個体差が大きく、治療効果予測因子の検討が行われている。今回、陽性シグナルがHCVの感染を表していると考えられるHCVゲノム（G）に対するプローブと、陽性シグナルがHCVの増殖を表していると考えられる複製中間体（replicate-intermediate：RI）に対するプローブを作製し、C型肝炎患者に対する生体肝移植後の肝生検組織を用いてin situ hybridisation（ISH）法によるHCV感染状態の検討を行った。この結果を臨床病理学的に解析し、ISH法による検討が再発C型肝炎と急性拒絶反応の鑑別に有用であるか、また再発C型肝炎に対する治療効果予測に有用であるかについて検討した。

【方法】

1. 肝生検組織をHE染色の所見により、再発C型肝炎（RHC）、急性拒絶反応（ACR）、その両者の混在（MIX）の3群に分け、ISH法により得られた陽性細胞割合と比較し、臨床病理学的に検討を行った。
 2. RHC群において抗ウイルス療法が施行された症例を、治療開始後1カ月後に血清中のHCV量が減少した症例と減少しなかった症例に分けて、ISH法により得られた結果を臨床検査所見と比較し検討を行った。
その結果、増田は次の結論を得た。
1. RHC群、ACR群、MIX群それぞれにおけるシグナル陽性細胞数割合は、Gにおいて14.8%、13.4%、12.0%、RIにおいては19.4%、14.8%、14.0%であり、3群間に有意差を認めなかった。
 2. HCV量が減少した症例のG、RIそれぞれの陽性細胞数の割合は11.7%、13.1%であり、減少し

なかった症例の24.7%, 31.6%と比較し有意に低値であった。両群間の臨床検査所見には有意な差を認めなかった。

これらの結果より、C型肝炎患者に対する生体肝移植後では、組織学的に急性拒絶反応と診断された症例においても、再発肝炎と診断された症例と有意差なくHCVの感染・増殖が起こっていることが示唆され、免疫抑制療法の強化を必要とする急性拒絶反応の治療時に、HCV感染・増殖がより顕著になる可能性が考えられた。また組織学的に再発肝炎と診断された症例においてISH法による陽性シグナルが強く認められる症例では、従来のインターフェロン治療の効果が低い可能性が示唆された。これらの成績は、C型肝炎患者に対する肝移植後に出現する肝機能障害の原因検索、および再発C型肝炎の治療方針を考える上で有用な知見であると考えられる。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Protocol-based noninvasive positive pressure ventilation for acute respiratory failure (急性呼吸不全に対するプロトコルに基づいた非侵襲的陽圧換気療法)

菊池 忠

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】非侵襲的陽圧換気療法 (noninvasive positive pressure ventilation, NPPV) は、急性呼吸不全患者の呼吸管理において一般的なものとなってきた。これまで慢性閉塞性肺疾患の急性増悪、心原性肺水腫、免疫不全状態の患者における急性呼吸不全に対してはNPPVの有用性が実証されている。しかし、NPPVは気管挿管下人工呼吸に比べマスク換気である点でその効果については限界がある。救急患者にNPPVを施行したとき気管挿管の遅れにより死亡率が増加したという報告がある。そこで、NPPVの使用方法を標準化し、NPPV使用に関する方針決定のためのプロトコルを作成した。このプロトコルに基づいたNPPV (protocol-based NPPV, pNPPV) を行えば、各医師の独自の判断に基づいたNPPV (individual physician-directed NPPV, iNPPV) を行った場合よりも急性呼吸不全患者の予後を改善するのではないかと仮説を立てた。この研究の目的は、pNPPVがiNPPVに比し急性呼吸不全患者の予後を改善するという仮説を検証することである。

【方法】(1)NPPV開始前の換気補助の必要性、(2)NPPVの適応、(3)NPPV開始から30~120分後の有効性の評価、(4)NPPV開始から12~24時間後の有効性の評価、(5)ウィーニングの適応、(6)NPPV中止から30~120分後の評価、の6つのチェックリストからなるプロトコルを開発した。急性呼吸不全のため緊急入院した救急患者213名のうち、救急外来で気管挿管を行った患者133名とNPPVの経過中に気管挿管を望まない6名を除いた74名を対象とし、pNPPV群(37例)とiNPPV群(37例)のデータを比較した。本研究はプロトコル導入前の後ろ向き研究の結果と、プロトコル導入後の前向き研究の結果を比較したものである。

【結果】患者背景においては両群間で、NPPV開始前の性、急性呼吸不全のタイプ(高二酸化炭素血症性または低酸素血症性)、急性呼吸不全の原因、SOFAスコア、APACHE IIスコア、バイタルサイン、血液ガスデータに差を認めなかった。ただし、平均年齢はpNPPV群の方がiNPPV群よりも有意に高かった(69±17 vs 58±23yr, p=0.02)。気管挿管への移行率は2群間で有意差を認めなかった(6/37 vs 10/37, p=0.26)。しかし、気管挿管が必要であった症例では、pNPPV群の方がiNPPV群より気管挿管までの時間が短縮する傾向にあった(2±1 vs 4±4 days, p=0.11)。人工呼吸期間は2群間で有意差を認めなかった(8±10 vs 6±10 days, p=0.43)。入院期間はpNPPV群でiNPPV群に比べ短縮する傾向にあった(35±21 vs 48±46 days, p=0.14)。28日死亡率および院内死亡率はpNPPV群がiNPPV群に比べ有意に低くなった(2/37 vs 8/37, p=0.049)。

急性呼吸不全のタイプ別にサブグループ解析を行った。高二酸化炭素血症性急性呼吸不全患者(pNPPV:iNPPV=12:14)においては、気管挿管への移行率(1/12 vs 4/14, p=0.33)、人工呼吸期間(5.9±5.5 vs 5.4±10.9 days, p=0.89)、入院期間(39±20 vs 44±44 days, p=0.69)は2群間で有意差を認めなかった。しかし、気管挿管が必要であった症例では、pNPPV群の方がiNPPV群より気管挿管までの時間が短縮する傾向にあった(2 vs 7±4 days, p=0.10)。28日死亡率および院内死亡率はpNPPV群がiNPPV群に比べ有意に低くなった(0/12 vs 5/14, p=0.04)。一方、低酸素血症性急性呼吸不全患者(pNPPV:iNPPV=25:23)においては、気管挿管への移行率(5/25 vs 6/23, p=0.62)、気管挿管

が必要であった症例の気管挿管までの時間 (2 ± 1 vs 3 ± 2 days, $p=0.48$), 人工呼吸期間 (8.5 ± 12.0 vs 6.1 ± 9.6 days, $p=0.45$), 入院期間 (35 ± 22 vs 50 ± 48 days, $p=0.16$), 28日死亡率および院内死亡率 ($2/25$ vs $3/23$, $p=0.66$) とともに2群間で有意差を認めなかった。

【結論】 pNPPV を行うと iNPPV の場合よりも有意に死亡率が低下した。特に高二酸化炭素血症性急性呼吸不全患者で有効であった。本研究は、プロトコルに基づいた NPPV は、各医師の独自の判断による NPPV に比べ、急性呼吸不全を合併した救急患者の呼吸管理に有用であり、急性呼吸不全で救急搬送される患者の予後を改善させる可能性を示唆している。

(論文審査の結果の要旨)

非侵襲的陽圧換気療法 (noninvasive positive pressure ventilation, NPPV) は、急性呼吸不全患者の呼吸管理において一般的なものとなってきている。しかし、救急患者に NPPV を施行したとき気管挿管の遅れにより、死亡率がむしろ増加したという報告がある。そこで、NPPV の使用に関する共通のプロトコルを作成し、このプロトコルに基づいた NPPV (protocol-based NPPV, pNPPV) を行えば、各医師の独自の判断に基づいた NPPV (individual physician-directed NPPV, iNPPV) を行った場合よりも急性呼吸不全患者の予後を改善すると仮定し、これを検証した。

(1) NPPV 開始前の換気補助の必要性, (2) NPPV の適応, (3) NPPV 開始から 30~120 分後の有効性の評価, (4) NPPV 開始から 12~24 時間後の有効性の評価, (5) ウィーニングの適応, (6) NPPV 中止から 30~120 分後の評価, の 6 つのチェックリストからなるプロトコルを開発した。急性呼吸不全のため緊急入院した救急患者 213 名の内、救急外来で気管挿管を行った患者 133 名と気管挿管を望まない 6 名を除いた 74 名を対象とし、pNPPV 群 (37 例) と iNPPV 群 (37 例) のデータを比較した。

その結果、菊池は次の結論を得た。

1. 気管挿管が必要であった症例では、pNPPV 群の方が iNPPV 群より気管挿管までの時間が短縮する傾向にあった (2 ± 1 vs 4 ± 4 days, $p=0.11$)。
2. 28日死亡率および院内死亡率は pNPPV 群が iNPPV 群に比べ有意に低くなった ($2/37$ vs $8/37$, $p=0.049$)。
3. サブグループ解析では、高二酸化炭素血症性急性

呼吸不全患者においては、28日死亡率および院内死亡率は pNPPV 群が iNPPV 群に比べ有意に低くなった ($0/12$ vs $5/14$, $p=0.04$) が、低酸素血症性急性呼吸不全患者では有意差を認めなかった。

これらの結果より、プロトコルに基づいた NPPV は、各医師の独自の判断による NPPV に比べ、急性呼吸不全を合併した救急患者の呼吸管理に有用であり、急性呼吸不全で救急搬送される患者の予後を改善させる可能性があると思われた。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Bone mineral density measurement at both spine and hip for diagnosing osteoporosis in Japanese patients (日本人の骨粗鬆症診断における脊椎・大腿骨両部位骨密度測定的重要性)

池上章太

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】日本における骨粗鬆症診断では骨密度測定がゴールドスタンダードとなっている。2006年版骨粗鬆症ガイドラインでは、診断の際骨密度は腰椎と大腿骨近位部の両方を測定することを推奨している。しかし現状ではまだ腰椎骨密度測定のみを行なっていることが多いと思われる。我々は2003年より全症例に腰椎正面と大腿骨近位部 (片側) の DXA を施行している。今回我々は個人の腰椎と大腿骨の骨密度間の乖離について調査し、骨密度測定部位が骨粗鬆症診断に与える影響を検討した。

【方法】2003年~2006年の間、DXA を施行した 2,026 名 (男性 485 名, 女性 1,541 名) を検討対象とした。平均年齢は男性 63.7 歳, 女性 65.4 歳であった。測定装置は Hologic QDR2000。大腿骨骨密度を測定前に予測するのに有効な因子を検討するため、同骨密度を従属変数、年齢・体重・身長を独立変数とした重回帰分析を行なった。また腰椎・大腿骨骨密度間の相関係数を求めた。腰椎正面あるいは大腿骨近位部全体いずれかの骨密度が YAM の -2.5SD 以下 (WHO 基準) である対象者を骨粗鬆症と診断し、骨密度評価部位による診断不一致例の割合を計算した。腰椎 DXA の大腿骨低骨密度 (YAM の -2.5SD 以下) 検出力を評価するため陽性および陰性尤度比 (LR+, LR-) を計算し、LR+ 5 以上を確定診断に有効、LR- 0.2 以下を除外診

断に有効なものとした。

【結果】年齢・身長・体重のうち男性では体重，女性では年齢が大腿骨骨密度の予測力が他より大きかった。腰椎・大腿骨骨密度間の相関係数は年齢で調整して男性0.65，女性0.53。対象患者のうち男性23%，女性44%が骨粗鬆症診断基準に適合していた。骨粗鬆症診断基準に適合した対象者の中で，大腿骨のみ低骨密度であり腰椎は低骨密度ではない患者，すなわち腰椎DXAでは見つけられない骨粗鬆症患者の割合は，男性16%，女性18%であった。腰椎DXAの大腿骨低骨密度に対するLR+は男性5.32，女性3.66，LR-は男性0.36，女性0.33であった。

【まとめ】大腿骨骨密度は年齢や体重からある程度予測できるが，十分ではなく，また腰椎・大腿骨骨密度間の相関は十分高いとはいえず，腰椎骨密度からは大腿骨骨密度の予測は難しいと考えられた。また評価部位による骨粗鬆症診断の不一致が多く生じていた。骨密度測定部位選択が及ぼす骨粗鬆症診断への影響は大きく，骨粗鬆症を見逃さないためには全症例に腰椎・大腿骨両方の骨密度を測定するのが望ましいと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

日本における骨粗鬆症診断では骨密度測定がゴールドスタンダードとなっている。骨密度は腰椎で測定することが多いが，腰椎骨密度は変性等の要因で測定値が高めになることがしばしばあり，他の身体部位の骨量低下，特に大腿骨の低骨密度を見落とす可能性がある。今回池上は，骨粗鬆症診断のために骨密度測定を行った男性485名，女性1,541名，計2,026名の腰椎・大腿骨骨密度間の乖離について調査し，骨密度測定部位が骨粗鬆症診断に与える影響を検討した。

その結果以下の成績を得た。

1. 腰椎骨密度に関連するのは男性では体重だったが，年齢は関連しなかった。一方女性では年齢，体重が関連した。また，大腿骨骨密度に関連するのは，男性，女性共に体重，年齢だった。
2. 腰椎・大腿骨骨密度間の相関係数は年齢で調整した場合，男性0.65，女性0.53でいずれも有意であった。
3. 骨粗鬆症診断基準を満たす対象者は腰椎・大腿骨1部位（近位部全体）の骨密度測定では，男性112名（23%），女性679名（44%）がいたが，その対象者のうち腰椎は低骨密度でないが大腿骨は低骨密度である者の割合は男性16%，女性で18%だった。

腰椎・大腿骨3部位（近位部全体・頸部・転子部）の骨密度測定では，骨粗鬆症対象者は男性146名（30%），女性910名（59%）がいたが，その対象者のうち腰椎は低骨密度でないが大腿骨は低骨密度である者の割合は男性36%，女性39%だった。

4. 骨粗鬆症診断の感度は，腰椎・大腿骨1部位の骨密度測定では，40～69歳まで大腿骨測定の感度が男女とも低かった。一方，腰椎・大腿骨3部位では特に女性において40歳以上全ての年代で大腿骨測定の感度が高かった。

5. 大腿骨骨粗鬆症に対する腰椎骨密度測定は，腰椎・大腿骨1部位の骨密度測定で陽性尤度比が男性5.32，女性3.66，陰性尤度比が男性0.36，女性0.33だった。一方，腰椎・大腿骨3部位の測定では，陽性尤度比が男性5.14，女性8.87，陰性尤度比が男性0.54，女性0.44だった。

骨粗鬆症を診断する際，腰椎骨密度測定のみでは大腿骨が低骨密度であるものが検知できていなかった。しかし大腿骨骨密度測定を含めた診断を行うことにより全年齢で骨粗鬆症を検知できることが明らかになった。この結果から池上は，骨粗鬆症診断の際に骨粗鬆症を見逃さないためには腰椎・大腿骨両方の骨密度を測定するのが望ましいと結論付けた。この内容に対し，主査，副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Serum Fragmented Cytokeratin 18 Levels Reflect the Histologic Activity Score of Nonalcoholic Fatty Liver Disease More Accurately Than Serum Alanine Aminotransferase Levels (サイトケラチン18フラグメントの血清レベルは，非アルコール性脂肪肝疾患の組織学的活動性スコアを血清アラニンアミノトランスフェラーゼレベルよりもより正確に反映する)

筒井 将

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は，非飲酒にもかかわらず肝への脂肪沈着を認める疾患群であり，肥満，耐糖能異常，脂質異常症を始めたメタボリック症候群に起因している。そして，NAFLDの中には非アルコール性脂肪肝炎（NASH）と呼ばれる重症型・進行型が存在し，肝硬変，肝不全，

肝細胞癌に進展すると考えられている。NAFLDの組織学的活動性の評価やNASHの診断には、肝生検が必須とされているのが現状である。アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) は、肝細胞障害の信頼できるバイオマーカーであるが、基準値レベルの維持が必ずしもNASHの非進展を保証するものではないことが報告されており、NASHの活動性とALT値の乖離が問題になる場合がある。よってNAFLDの組織学的活動性を反映した新規バイオマーカーが求められている。今回、NASHの病理組織学的診断に有用な因子の一つであるマロリー小体が、疾患の重症度や進展とよく関連していることに着目し、血中に出現したマロリー小体を構成成分が、NAFLDの組織学的活動性と相関するのではないかと仮説を設定し、それを検討した。

【方法】肝生検を実施した118名のNAFLD患者を対象に、マロリー小体の構成成分 (Total CK18, CK18フラグメント, Hsp70, Hsp90 α , ユビキチン+1及びp38 α) の血清レベルを測定し、組織学的所見及びNAFLD組織学的活動性スコア (NAS) との関係を検討した。組織学的所見は、Kleinerらによって提案されたステージング・グレーディングシステム [脂肪蓄積 (0~3), 肝小葉炎症 (0~3), 肝細胞風船様変性 (0~2) の合計スコアをNASとする] に従ってスコア化した。また、マロリー小体は、3段階 [rare (0), few (1), many (2)] でスコア化した。更に、治療前後に肝生検を実施した20名のNASH患者を対象に、NASの変化とマロリー小体構成成分の血中濃度の変化との関係について検討した。

【結果】118名のNAFLD患者は、組織学的所見によりNASH患者105名、非NASH患者13名に分類された。非NASH患者に対してNASH患者が有意に高値であったのは、Total CK18, CK18フラグメントの両CK18及びHsp90 α の他、年齢, BMI, コレステロール, グルコース, インスリン, グリコヘモグロビン, HOMA-IRであった。組織学的所見と血清パラメータとの相関は、脂肪蓄積の程度には、両CK18, Hsp90 α , ALT及び血小板数が、肝小葉炎症の重症度には、両CK18, Hsp90 α , AST, ALT及びHOMA-IRが、肝細胞風船様変性の程度には、両CK18, Hsp90 α , AST及びHOMA-IRが相関した。また、マロリー小体の程度には、CK18フラグメント, AST及びHOMA-IRが正の相関を示し、血小板数は負の相関を示した。興味深いことに、NASのすべ

ての因子について、両CK18及びHsp90 α は正の相関を示した。NASとの相関については、CK18フラグメントが最も強い正の相関を示し、重回帰分析では、CK18フラグメントがNASの最も効果的な予測因子となった。次に、治療前後に肝生検を実施した20名のNAFLD患者を対象に、血清パラメータの変化量とNASの変化量との関係を検討した。NAS改善群13名 (65%) のうち、CK18フラグメント, AST及びALTが減少した患者は、それぞれ12名 (92%), 12名 (92%) 及び11名 (85%) であり、いずれも有意に減少した。一方、NAS悪化群7名 (35%) については、CK18フラグメントは6名 (86%) の増加が認められたが、AST及びALTの増加はいずれも2名 (29%) のみであった。NAS悪化群では、いずれのパラメータも有意な増加は示されなかったものの、ALTやASTに比べてCK18フラグメントの増加が、より一致する傾向を示した。さらに、NASの変化量に対しては、CK18フラグメントの変化量が最もよく相関し、ASTやALTよりも強くNASの変化量を反映した。

【考察】この研究では、非侵襲的な血清バイオマーカーとして、マロリー小体構成成分であるCK18フラグメントが有用であり、ALT測定の弱点を補うことができることが示された。そして、CK18フラグメントは、疾患の状態をモニターし、NASH患者の治療効果を評価することができる有望なツールであることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) は、非飲酒にもかかわらず肝への脂肪沈着を認める疾患群であり、肥満, 耐糖能異常, 脂質異常症を始めとしたメタボリック症候群に起因している。そして、NAFLDの中には非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) と呼ばれる重症型・進行型が存在し、肝硬変, 肝不全, 肝細胞癌に進展すると考えられている。NAFLDの組織学的活動性の評価やNASHの診断には、肝生検が必須とされているのが現状である。アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) は、臨床現場で使用されている代表的な肝細胞障害のバイオマーカーであるが、基準値レベルの維持が必ずしもNASHへの非進展を保証するものではないことが報告されており、NASHの活動性とALT値の乖離が問題になる場合がある。よってNAFLDの組織学的活動性を反映した新規バイオマーカーが求められている。今回、NASHの病理

組織学的診断に有用な因子の一つであるマロリー小体が、疾患の重症度や進展とよく関連していることに着目し、血中に出現したマロリー小体の構成成分がNAFLDの組織学的活動性と相関するのではないかと仮説を設定し、それを検討した。

肝生検を実施した118名のNAFLD患者を対象に、マロリー小体の構成成分である総サイトケラチン18 (Total CK18), CK18フラグメント (カスパーゼで切断された断片), 熱ショック蛋白 (Hsp) 70, Hsp90 α , ユビキチン+1 及び p38 α の血清レベルをELISA法で測定し、組織学的所見及びNAFLD組織学的活動性スコア (NAS) との関係を検討した。組織学的所見は、Kleinerらによって提案されたスコアリングシステム [脂肪蓄積 (0~3), 肝小葉炎症 (0~3), 肝細胞風船様変性 (0~2) の合計スコアをNASとする] に従ってスコア化した。また、マロリー小体は、3段階 [rare (0), few (1), many (2)] でスコア化した。更に、治療前後に肝生検を実施した20名のNASH患者を対象に、NASの変化とマロリー小体構成成分の血中濃度の変化との関係について検討した。

その結果、筒井は次の結論を得た。

1. Total CK18, CK18フラグメント及びHsp90 α の血清レベルが、NASの構成因子である脂肪蓄積、肝小葉炎症及び肝細胞風船様変性に対して有意な正の相関を示した。
2. CK18フラグメントは、NASと最も強い相関を示し、NASの最も効果的な予測因子であった。
3. 治療前後のCK18フラグメントの変化率は、ALTやASTの変化率に比べて、NASの変化率と強く相関した。

これらの結果から、血清CK18フラグメントレベルは、NASHの組織学的活動性を反映していることが示された。このことは、CK18フラグメントがNASHの病勢把握や治療効果の評価に有用なバイオマーカーになりうることを示唆している。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Decrease in the density of t-tubular L-type Ca²⁺ channel currents in failing ventricular myocytes (不全心室筋細胞のT管のL型Ca²⁺チャネル電流密度の低下)

堀内美和

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】心不全は、あらゆる循環器疾患の終末病態である。心不全では、心室筋細胞内Ca²⁺代謝異常が生じる。心室筋細胞では、活動電位により細胞膜のL型カルシウムチャネル (LTCC) が開口し、Ca²⁺が細胞内に流入する。表面細胞膜 (SS) とT管 (TT) のLTCCの近傍には、筋小胞体 (SR) のリアノジン受容体 (RyR) が集合し、それぞれ peripheral junction または dyad という構造を形成している。LTCCから流入したCa²⁺は、これらの構造内のRyRを活性化し、SRから大量のCa²⁺放出を生じ収縮を引き起こす (Ca²⁺-induced Ca²⁺-release (CICR))。TTはSSより数倍多くのLTCCを発現し、興奮収縮連関で重要な役割を果たす。これまでの研究では、心不全でLTCC活性は大きく変化しないと言われてきた。しかしある種の心不全モデルでは、CICR gain (LTCCから流入したCa²⁺量に対する、SRから放出されたCa²⁺量の比) が低下する。そしてその原因は、dyadまたはTT構造の乱れであると推察されてきた。しかしこれらの研究では、CICR gainは、興奮収縮連関で重要な役割を果たすTTのLTCCから流入したCa²⁺量ではなく、細胞全体のLTCCから流入したCa²⁺量を基に計算されている。そこで申請者らは、心不全でのCICR gainの低下はTTのLTCC電流密度の低下を反映しているのではないかと仮定し、この仮説の検証を行った。

【材料及び方法】C57BL/6マウスにイソプロテレノールを21日間皮下投与し心不全マウス (ISOマウス) を作成した。コントロールには、生理的食塩水を投与したマウスを用いた (CONTマウス)。心機能評価は心臓超音波法と左室圧の計測、タンパク量測定はウェスタンブロット法、形態学的解析には組織染色と共焦点レーザー顕微鏡、膜電位電流測定はパッチクランプ法を用いた。

【結果】ISOマウスの左心室 fractional shortening と dP/dt_{max} はCONTマウスより有意に小さく、ISOマウスは心不全を呈していた。LTCCサブユニットの

タンパク発現量はCONTマウスとISOマウスで有意差はなかった。単離心室筋細胞の画像解析より得たSS膜面積に対するTT膜面積の比はCONTマウスとISOマウスで有意差はなく、ISOマウスのTT構造は維持されていた。本研究では、浸透圧ショックにより心室筋細胞のTTを急速に閉塞させ、SSとTTのLTCC電流を別々に計測した。その結果ISOマウスではCONTマウスと比較して、TTのLTCC電流密度が約半分に低下し、SSのLTCC電流密度が有意に増加していた。この異常の機序を知るために、タンパク質リン酸化酵素(PK)・脱リン酸化酵素(PP)阻害薬のLTCC電流密度への影響を検討した。その結果、CONTマウスのTTのLTCC電流密度は、Aキナーゼ(PKA)阻害薬H-89、カルモジュリン依存性キナーゼII(CaMKII)阻害薬KN-93、PP1/2A阻害薬Okadaic acid(OA)、PP2B阻害薬Cyclosporin(CsA)により影響を受けなかったが、非特異的PK阻害薬staurosporine(SP)により有意に減少した。一方、ISOマウスのTTのLTCC電流密度は、SP、H-89、KN-93、CsAにより影響を受けなかったが、OAにより約2倍に増加した。次に、CONTマウスのSSのLTCC電流密度は、H-89、KN-93、CsAにより影響を受けなかったが、SPで有意に減少、OAで有意に増加した。一方ISOマウスのSSのLTCC電流密度は、H-89、KN-93、OA、CsAにより影響を受けなかったが、SPで有意に減少した。

【結論】以上の結果より、ISOマウスのTTのLTCCはCONTマウスのTTのLTCCよりPKAやCaMKII以外のPKにより弱く活性化され、PP1/2Aにより強く抑制されているため、活性が低いと考えられた。またISOマウスとCONTマウスのSSのLTCCは、ともにPKAやCaMKII以外のリン酸化酵素により活性化されているが、ISOマウスのSSのLTCCの方がCONTマウスのSSのLTCCよりPP1/2Aによる脱リン酸化により弱く抑制されているので、活性が高いと考えられた。したがって、心不全ではタンパク質リン酸化酵素とタンパク質脱リン酸化酵素によるLTCCの調節が変化し、TTとSSのLTCC活性が変化したと考えられた。この現象は心不全における心室筋細胞の興奮収縮連関の異常の新たな原因となりうる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

心不全は、あらゆる循環器疾患の終末病態である。心不全では心室筋細胞内Ca²⁺代謝異常が生じるが、

L型カルシウムチャネル(LTCC)の機能に大きな異常は生じないと言われてきた。しかし堀内は、心不全で興奮収縮連関の要であるT管細胞膜(TT)のLTCC活性が低下しているのではないかと仮定し、本研究を行った。

心不全モデルマウスは、C57BL/6マウスにイソプロテレンールを21日間皮下投与し作成した(ISOマウス)。コントロールには、生理的食塩水を投与したマウスを用いた(CONTマウス)。心機能評価は心臓超音波法と左室圧の計測、タンパク量測定はウェスタンブロット法、膜電流測定はパッチクランプ法を用いた。

その結果、堀内は次の結論を得た。

1. ISOマウスの左心室fractional shorteningとdP/dt_{max}はCONTマウスより有意に小さく、ISOマウスは心不全を呈していた。
2. LTCCサブユニットのタンパク発現量はCONTマウスとISOマウスで有意差はなかった。
3. ISOマウスではCONTマウスと比較して、TTのLTCC活性が約半分に低下し、表面細胞膜(SS)のLTCC活性が有意に増加していた。
4. 薬理的検討の結果、ISOマウスのTTのLTCCはCONTマウスのTTのLTCCよりAキナーゼ(PKA)やカルモジュリン依存性キナーゼII阻害薬(CaMKII)以外の蛋白質リン酸化酵素により弱く活性化され、蛋白質脱リン酸化酵素(PP)1/2Aにより強く抑制されているため、活性が低いと考えられた。
5. ISOマウスとCONTマウスのSSのLTCCは、ともにPKAやCaMKII以外のリン酸化酵素により活性化されているが、ISOマウスのSSのLTCCの方がCONTマウスのSSのLTCCよりPP1/2Aによる脱リン酸化により弱く抑制されているので、活性が高いと考えられた。

これらの結果により、不全心室筋細胞では、タンパク質リン酸化酵素と脱リン酸化酵素によるLTCCの調節が変化し、TTのLTCC活性が減少、SSのLTCC活性が上昇したと考えられた。この現象は心不全における心室筋細胞の興奮収縮連関の異常の新たな原因となりうる可能性が示唆された。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Electrophysiological features of familial amyloid polyneuropathy in endemic area (集積地家族性アミロイドポリニューロパチーの電気生理学的特徴)

小 平 農

(論文の内容の要旨)

【目的】家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、トランスサイレチン遺伝子の変異に起因する遺伝性全身性アミロイドーシスである。下肢から始まる末梢神経障害、自律神経障害、心臓や腎臓などの臓器障害を特徴とするが、最も頻度が高い遺伝子変異は30番目のバリンからメチオニンへの変異 (Val30 Met) である。従来FAPは集積地に限局した疾患と考えられてきたが、非集積地出身の孤発例が多数見いだされ、遺伝性末梢神経障害の主要な原因として注目されている。大部分のトランスサイレチンは肝臓で産生されるため20年ほど前より肝移植が施行され、肝移植後は末梢神経障害の進行抑制が報告されている。さらに、トランスサイレチンの凝集を抑制する薬物療法の臨床試験も進行中であり、末梢神経障害の正確な発症機序や薬物療法の効果の客観的評価を行うことが重要である。しかし、未治療の本症の自然経過を客観的定量的指標を用いて多数例で検討した研究はない。我々は未治療の集積地FAP患者の末梢神経障害の自然経過を男女差にも注目して、末梢神経伝導機能検査を用いて定量的に検討した。

【対象と方法】対象は1981年から2009年までに遺伝子診断にて確定診断された未治療の集積地 (長野県小川村) 出身FAP (Val30Met) 患者69名 (男性34名, 女性35名)。初発症状は下肢感覚障害が68%, 自律神経障害が32%で、全例ともいずれかの末梢神経障害で発症していた。発症年齢は19~63歳 (35.8 ± 9.3 歳) で、男性が 33.4 ± 9.4 歳, 女性が 38.1 ± 8.7 歳と男性がより若年発症であった ($p < 0.05$)。発症から0.4~10年 (3.6 ± 2.4 年) に、尺骨神経と脛骨神経で、複合筋活動電位 (CMAP), 終末潜時 (DL), 最大運動神経伝導速度 (MCV), 最大感覚神経伝導速度 (SCV) を記録した。表面電極を用いた通常感覚神経伝導検査では早期より感覚神経活動電位 (SNAP) が消失するため、針電極を用いたnear nerve法で感覚神経伝導検査を施行した。これらの指標をCountinhoらのFAP臨床病期 (stage 0が2名, stage Iが35名,

stage IIが32名, stage IIIが0名) 及び発症からの期間と比較検討した。

【結果】FAP臨床病期のstage Iは発症4年以内, stage IIは発症4年以上の症例が大部分であった。Stage Iでは下肢と比較して上肢の神経障害は軽度であったが, stage IIでは上下肢とも神経障害は高度となり, 脛骨神経のCMAPは38%, SNAPは50%の症例で消失した。一方, 針電極を用いたnear nerve法を行うことでstage Iでは80%の症例でSNAPが導出可能であった。発症からの期間との比較では, 尺骨神経のCMAPは 0.75 mV/年で低下, DLは 0.15 ms/年で延長, MCV, SCVはそれぞれ 1.7 m/s/年, 1.1 m/s/年で低下した。脛骨神経においてはDLが 0.32 ms/年で延長し, 女性 (0.23 m/s) より男性 (0.48 ms/年) でDLがより延長する傾向があった ($p = 0.13$)。脛骨神経のCMAP, SNAPは早期より多くの症例で導出不能となり, CMAPは発症3年, SNAPは発症1年後から導出不能例が出現し, CMAPは発症7.7年, SNAPは発症6.5年で, 半数例で導出不能となった。

【考察】25年前の検討では発症年齢の男女差はなかったが, 今回の検討では男性のみに年齢促進現象が認められ, 一部の測定項目では男性における進行の方が早い傾向にあったことから, 性別が集積地FAP患者の発症や症状の進行へ関与していると考えられた。集積地FAP患者では発病初期の小径有髄神経と無髄神経の選択的障害が強調されてきたが, 神経伝導機能検査で評価できるものは大径有髄神経機能が主体であり, 発症直後から上下肢ともに大径有髄神経の障害が出現していることが確認された。運動神経伝導機能指標のうちDLとMCVは最速, 最大径の運動神経機能のみしか評価できないが, CMAPの振幅は運動神経線維束全体の機能を反映しており, 本症の末梢神経における運動神経機能の評価に適していると推測された。実際, 脛骨神経では発症2年以内に急速にCMAPの振幅は低下し, 長期にわたって小さなCMAPを導出できたことは本症の病態の進行をよく反映していると考えられる。また, 針電極を用いたnear nerve法は末梢神経障害が最も高度である下肢遠位部の感覚神経機能においても比較的長期にわたって評価することができ, 有用であると考えられた。今回の検討により集積地のFAP患者の末梢神経障害の機能的進行過程の自然経過が詳細に明らかとなった。これは今後の本症に対する薬物療法の効果を客観的に評価する際に重要な情報となりうる。

(論文審査の結果の要旨)

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、トランスサイレチン遺伝子の30番目のバリンからメチオニンへの変異 (Val30Met) が最も頻度が高い遺伝性全身性アミロイドーシスである。下肢から始まる末梢神経障害、自律神経障害、心臓や腎臓などの臓器障害を特徴とするが、未治療の本症の自然経過を、客観的定量的指標を用いて多数例で検討した研究はない。本論文は未治療の集積地 (長野県小川村) 出身 FAP (Val30Met) 患者において尺骨神経と脛骨神経で神経伝導検査を行い、男女差にも注目して本症の末梢神経障害の自然経過を神経生理学的に定量評価したものである。

遺伝子診断にて確定診断された未治療の集積地 FAP 患者69名 (男性34名, 女性35名) を対象に検討した。発症年齢は男性 33.4 ± 9.4 歳, 女性 38.1 ± 8.7 歳と男性がより若年発症であった。FAP臨床病期 stage I では下肢と比較して上肢の神経障害は軽度であったが, stage II では上下肢とも神経障害が高度となり, 脛骨神経の複合筋活動電位 (CMAP) は38%, 感覚神経活動電位 (SNAP) は50%の症例で消失した。一方, 感覚神経伝導検査は針電極を用いた near nerve 法を行うことで, stage I では80%の症例で SNAP が導出可能であった。発症からの期間との比較では, 尺骨神経の CMAP は 0.75 mV/年 で低下, 遠位潜時 (DL) は 0.15 ms/年 で延長, 運動神経伝導速度 (MCV), 感覚神経伝導速度 (SCV) はそれぞれ 1.7 m/s/年 , 1.1 m/s/年 で低下した。脛骨神経においては DL が女性 (0.23 m/s) より男性 (0.48 ms/年) で延長する傾向があり, CMAP は発症7.7年, SNAP は発症6.5年で, 半数例で導出不能となった。

今回の研究により集積地 FAP 患者の末梢神経障害の機能的進行過程の自然経過が詳細に明らかとなった。また, 性別が集積地 FAP 患者の発症や症状の進行へ関与していると考えられた。CMAP の振幅が本症の運動神経機能の評価に適しており, 針電極を用いた near nerve 法により比較的長期にわたって感覚神経機能の評価可能であった。これらの結果は本症に対する薬物療法の効果を客観的に評価する際に重要な情報となる新しい知見であり, 学位論文として十分価値があるものと主査, 副査は一致して認めた。

Association of Serum Cytokine Levels with Treatment Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients (ジェノタイプ1型のC型慢性肝炎患者における, ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の治療効果と血清サイトカインの関連性)

米田 傑

(論文の内容の要旨)

【目的】肝細胞癌は日本人の死因の上位 (男性4位, 女性5位) を占める疾患であり, その70-80%はC型肝炎ウイルス (HCV) 感染による慢性肝炎が原因である。このため, 肝細胞癌の撲滅には, HCV を排除し肝炎を治癒させることが重要とされている。しかし, ジェノタイプ1型で高ウイルス量の症例では, 現在最も強力なペグインターフェロンとリバビリンの併用療法を用いても約50%しか著効しない。この治療効果を規定する因子として, ウィルス因子, 治療因子, 宿主因子が挙げられるが, この中で, 免疫応答を含む宿主因子は必ずしも十分な検討はなされていない。一方, HCV 感染において, 各種サイトカインは病態の形成や治療感受性において重要な役割を演じているという報告がなされている。本研究では, ジェノタイプ1型のC型慢性肝炎患者を対象として各種サイトカインを測定し, C型慢性肝炎の病態と関連するサイトカインを明らかにするとともに, ペグインターフェロン・リバビリン併用療法に対する反応性との関連を検討した。

【方法】ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行した, ジェノタイプ1型C型慢性肝炎患者79人 (著効31人, 再燃23人, 無効25人) を対象とした。各症例について, 治療開始前, 治療開始後4週, 治療終了後24週の3ポイントで, 血清中の8種類のサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70, IL-18, VEGF) をLuminex® Multiplex Cytokine Kits を用いて測定した。また, 治療効果と関連する HCV 遺伝子のコア70番変異と ISDR 変異を直接シーケンス法にて測定した。コントロール群として, 26人のトランスアミナーゼ正常健康人の血清サイトカインを測定した。

【成績】IL-2とIL-6を除く6項目のサイトカインが定量可能であった。患者群とコントロール群の比較では,

IL-10 (P=0.032), IL-12p40 (P<0.001), IL-12p70 (P<0.001), IL-18 (P=0.008) の4項目が患者群で高値であった。著効群と非著効(再燃+無効)群の比較において, IL-12p40 (P=0.003), IL-12p70 (P=0.001), IL-18 (P=0.001), VEGF (P<0.001) の4項目は著効群で高値であり, IL-10は非著効群で高値であった (P=0.002)。多変量解析では, IL-10低値 (P=0.014), IL-12高値 (P=0.024), IL-18高値 (P=0.006) が, それぞれ著効と関連する独立因子であった。また HCV 遺伝子変異の解析では, IL-12は ISDR (P=0.027) と, IL-10はコア蛋白 Glu70 (P<0.001) と, 有意な相関を認めた。

【考案】本研究では血清中の IL-10, IL-12, IL-18濃度が併用療法の治療効果と関連していた。この中で, 免疫応答抑制因子とされる IL-10の高値は HCV 遺伝子の変異 (Glu70) と相関し, Th1から誘導される炎症性サイトカインである IL-12の高値が ISDR 変異 (mutant type) と相関した。これまで, これら血清サイトカインと HCV 遺伝子変異との関連を示唆した報告は過去になく, 今回の成績は HCV に対する宿主の免疫応答の解明に重要であると考えられた。また臨床現場においては, これらのサイトカインを治療前に測定することで, 併用療法の治療効果を予測できる可能性が示唆された。

【結語】C型慢性肝炎患者において, IL-10, IL-12, IL-18などの血中濃度は, インターフェロン治療感受性を決める HCV 遺伝子変異と関連すること, およびペグインターフェロン・リバビリン併用療法における治療効果の予測因子になりうる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

本邦において, 肝細胞癌は悪性腫瘍による死因の上位(男性3位, 女性4位)を占める疾患であり, その80%はC型肝炎ウイルス(HCV)による慢性肝炎が原因とされている。このため肝細胞癌を撲滅するためにはHCVを排除することが重要だが, 最も有効な治療であるPEG-IFN/RBV併用療法を用いても, 著効率は50%と低く, 治療効果の規定因子の検討が進められている。本研究では, 1b高ウイルス量のC型肝炎患者79例(著効31例, 再燃23例, 無効25例)を対象とし, 治療前, 治療開始4週後, 治療終了後24週の保存血清を用いて, 8項目の血清サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, VEGF)を測定し, 治療効果およびウイルス遺伝子変異との関連を検討した。またコントロール群

として健常人26例の血清サイトカインを測定した。

その結果, 米田は以下の結論を得た。

1. 測定した8項目のサイトカインのうち2項目(IL-2, IL-6)は測定感度以下となったため, 残る6項目(IL-4, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-18, VEGF)について解析を行った。
2. 患者群とコントロール群の比較では, IL-10 (P=0.032), IL-12p40 (P<0.001), IL-12p70 (P<0.001), IL-18 (P=0.008) の4項目が患者群で高値であった。
3. IL-10, IL-12, IL-18が, 著効に関連する独立因子であった。
4. 治療無効群で高値を示したIL-10は, Core70変異と相関を認め (P=0.045), 治療奏功群で高値を示したIL-12は, ISDR 変異と相関を認めた (P=0.027)。
5. 著効群において, IL-10, IL-12, IL-18はいずれも治療経過に伴って有意に低下を認めた。一方, 非著効(再燃+無効)群では有意な変化を認めなかった。

今回の研究によって, PEG-IFN/RBV併用療法の治療開始前の血清サイトカインを測定することにより, 治療効果を予測できる可能性が示唆された。また本研究は, PEG-IFN/RBV併用療法における宿主側因子(血清サイトカイン)とウイルス側因子(ウイルス遺伝子変異)とに相関があることを報告した最初の研究でもある。複雑なネットワークを有するサイトカインの検討において, 多項目を同時に測定し上記結果を得たことは, その病態の解明に寄与するものであり, 将来的にはC型肝炎の治療の選択や治療法の開発にもつながると考えられる。よって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Effect of the mutant *microphthalmia-associated transcription factor* found in Tietz syndrome on the in vitro development of mast cells (Tietz 症候群で認められる変異型 *microphthalmia-associated transcription factor* の in vitro における肥満細胞の増殖・分化に対する影響)

重村 倫成

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】Microphthalmia-associated transcrip-

tion factor (MITF) は basic-helix-loop-helix-leucine-zipper 型の転写因子で、メラニン生成に最も重要な酵素である tyrosinase の promoter の転写活性を有し、メラニン産生細胞であるメラノサイトや網膜色素上皮の分化に必須である。MITF に異常を持つマウスは肥満細胞の分化に異常をきたし、数の減少や表現型の異常を起こすことが報告されている。ヒト MITF は皮膚や毛髪の色素欠損、虹彩の色素異常、難聴を 3 主徴する Waardenburg 症候群 II 型 (WS2) の責任遺伝子として同定されているが、肥満細胞の増殖、分化能に対する影響については不明である。代表的な MITF の変異マウスである *mi/mi* マウスと同じ変異を有する Tietz 症候群 (WS2 の重症表現型) 患者で、末梢血 CD34⁺細胞を用いて、stem cell factor (SCF) の存在下で無血清培養し、産生される肥満細胞数や肥満細胞の代表的なプロテアーゼである tryptase の発現を検討した。

【方法】(1) MITF の wild type と変異型ベクター (mutant MITF) をそれぞれ作成し、tyrosinase promoter における転写刺激活性を reporter assay で比較した。(2) MITF の tyrosinase promoter 刺激活性に対する mutant MITF の刺激阻害効果を検討した。(3) 患者と control の末梢血 CD34⁺細胞 5X10³個を SCF 50 ng/ml 存在下で 6 週間無血清培養し、細胞数および tryptase 染色陽性細胞比率を比較した。(4) tryptase および MITF の mRNA 発現を real time RT-PCR で比較した。(5) 肥満細胞の起源と考えられる末梢血 CD34⁺細胞における c-kit⁺および c-kit⁺CD13⁺比率を flow cytometry で比較した。

【結果】(1) Mutant MITF では wild type MITF に比し、tyrosinase promoter 刺激活性の著明な減弱がみられた。(2) Mutant MITF は、wild type MITF の tyrosinase promoter 刺激活性を用量依存的に阻害した。(3) 末梢血 CD34⁺細胞を SCF 存在下 6 週間培養後の細胞数および tryptase 陽性細胞比率は、患者と control 間で差異は認められなかった。また、tryptase および MITF の mRNA の発現にも違いはみられなかった。(4) 患者および control の末梢血 CD34⁺細胞における c-kit 陽性率はそれぞれ 49.1%, 67.4% で、c-kit 陽性 CD13 陽性細胞比率は 33.9%, 37.1% であった。

【結論】(1) Wild type MITF と mutant MITF との tyrosinase promoter における転写刺激活性を reporter assay で比較したところ、マウスの報告と同様、

mutant MITF は wild type MITF に対してドミナントネガティブに作用することが明らかとなった。(2) SCF 刺激に対する肥満細胞の増殖能は、MITF 変異マウスと異なり、ヒトでは異常は認められなかった。また、CD34⁺細胞からの肥満細胞の分化能は保持されていることが示唆された。以上から肥満細胞における MITF の機能はヒトとマウスでは異なることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) はメラニン生成に最も重要な酵素である tyrosinase の promoter の転写活性を有し、メラニン産生細胞であるメラノサイトや網膜色素上皮の分化に必須である。さらに、MITF は肥満細胞の分化にも関与するといわれており、MITF に変異を持つマウスでは肥満細胞の分化に異常をきたし、数の減少や表現型の異常を起こすことが報告されている。ヒト MITF は Waardenburg 症候群 II 型 (WS2) の責任遺伝子として同定されているが、肥満細胞の増殖、分化に対する影響については不明である。本研究は MITF 変異マウスの中でも最も重篤な表現型をきたす *mi/mi* マウスと同一の変異を有する Tietz 症候群 (WS2 の重症表現型) 患者で肥満細胞への増殖能、分化能を中心に解析した。

その結果、重村は次の結論を得た。

1. Wild type MITF と mutant MITF との tyrosinase promoter における転写活性を reporter assay で比較したところ、wild type MITF は tyrosinase promoter 転写活性を有しており、mutant MITF はその転写活性を用量依存的に抑制することから、mutant MITF は wild type MITF に対してドミナントネガティブに作用することが示された。
2. 患者と control 由来培養肥満細胞での細胞数および tryptase 陽性細胞比率、また tryptase および MITF の mRNA の発現にはそれぞれ違いはなく、肥満細胞の起源と考えられる末梢血 CD34⁺細胞における c-kit⁺および c-kit⁺CD13⁺比率にも差はないことから、*mi/mi* マウスと同じ変異を持つ Tietz 症候群患者では、in vitro での末梢血 CD34⁺細胞から肥満細胞への増殖能、分化能には異常がないことが示された。

このように、MITF はマウスと同様にメラニン産生細胞に対して大きく関与しているが、肥満細胞の増

殖, 分化に対しては影響がない可能性が示された。ヒトでの MITF の肥満細胞に対する役割は不明であり, 今回の研究でヒトとマウスでは異なることが示されたことは重要な知見と思われ, 主査・副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Reevaluation of melanin-bleaching using warm dilute hydrogen peroxide for histopathological analysis (病理組織学的解析のための加温希釈過酸化水素を用いたメラニン漂白の再評価)

百瀬 正信

(論文の内容の要旨)

【目的】メラノサイト関連病変における過剰なメラニン顆粒の細胞内沈着は, 細胞形態の把握を困難とし, 抗原抗体反応を直接的に阻害することで病理組織学的評価を困難にする場合がある。特に酵素抗体法に, DAB を用いると茶褐色の DAB 発色産物とメラニン顆粒の区別が難しくなる。これに対処する方法には, ①アルカリフォスファターゼ (ニューブクシン) 法を用いる方法と②DAB-immunoperoxidase 法の対比染色として azure B を用いてメラニン顆粒を緑青色に変化させる方法とがある。しかし何れの方法も過剰のメラニン顆粒が存在していることに変わり無く物理的に抗原抗体反応を阻害している状態にある。そこで, 幾つかのメラニン漂白法が報告された。中でも①過マンガン酸カリウム・シュウ酸 (KMnO₄/oxalate) 法と②希釈過酸化水素 (H₂O₂) 法が良く用いられている。前者は迅速に漂白可能であるが, 抗原性の減弱を起ししやすい。後者は抗原性の減弱は起こりにくいが, 漂白に長時間を要する。そこで, 短時間処理が可能な10%過酸化水素を60°Cに加温する改良メラニン漂白法が報告された。本研究では, 加温による過酸化水素漂白法を抗原賦活化法と関連付けて再評価し, 組織形態の保持と抗原性の保持を満たす最適なメラニン漂白条件を検討した。

【材料】免疫組織化学的に HMB-45 と MART-1 に陽性でメラニン顆粒沈着の強いメラノーマ 5 例及び amelanotic melanoma 5 例, 扁桃組織 5 例 (メラノサイトに含まれない種々の抗体を用いた免疫染色に使用) を本学部附属病院臨床検査部病理検査症例より抽出した。組織はホルマリン固定パラフィン包埋後, 3 μm に薄切し, コーティングスライドガラスに貼付し,

伸展乾燥させた。

【方法】1. 最適な過酸化水素漂白条件を決定するために, メラニン顆粒沈着の強いメラノーマ 5 例の薄切切片を用いて, 以下の検討を行った。①適切な希釈剤評価のために 0.03M Na₂HPO₄ (pH9.3), 0.05M PB (pH7.4), 0.05M PBS (pH7.4) に対して 55°C にて 0.5 時間, 1 時間, 2 時間, 3 時間反応させた。②適切な温度と反応時間の評価のために 3%又は10%の H₂O₂・PB にて 50°C, 55°C, 60°C で 0.5 時間, 1 時間, 2 時間, 3 時間反応させた。2. 抗原賦活化と漂白の順番が組織形態の保持に及ぼす影響を調べるために, メラニン顆粒沈着の強いメラノーマ 5 例の切片に対して, 抗原賦活化法 (0.01M Tris-HCl buffer (1 mM EDTA-2Na 含有) によるマイクロウェーブ処理, 0.2%トリプシン処理) の前後に漂白処理 (加温 H₂O₂・0.05M PB (pH7.4) 又は KMnO₄/oxalate 法: 0.025% KMnO₄ 処理 40 分後 2% oxalic acid にて切片が無色になるまで還元) を行い評価した。3. 漂白処理の抗原性に対する影響を amelanotic melanoma 5 例と扁桃組織を用いてメラノサイト関連マーカー, リンパ球マーカー, 及び内皮マーカーを中心に免疫組織化学的に評価した。

【結果】1. 0.05M PB (pH7.4) を 3% H₂O₂ の希釈剤として用いると 2 時間以内に漂白が完了し, 組織・細胞形態の保持が 0.03M Na₂HPO₄ 溶液及び 0.05 M PBS を希釈剤とした場合より優れていた。この結果を基に希釈剤は PB とし 0.3%, 3%, 10% H₂O₂ を用いて 50°C, 55°C, 60°C における漂白完了時間を調べたところ, 0.3% では何れの温度でも 3 時間以内に漂白は完了せず, 3% では 55°C, 60°C で 2 時間以内 10% では 55°C, 60°C で 1 時間以内に漂白が完了した。この条件で組織・細胞形態は保持されていた。

2. マイクロウェーブ或いはトリプシンによる抗原賦活化を漂白処理の後に実施すると組織・細胞形態の傷害が強く, 組織・細胞像の評価が困難となった。組織・細胞形態の保持のためには, 抗原賦活化後 3% H₂O₂ (PB, 55°C, 2 時間) の処理が 3% H₂O₂ (PB, 60°C, 2 時間), 10% H₂O₂ (PB, 55°C/60°C, 1 時間) より優れていた。

3. 3% H₂O₂ (PB, 55°C, 2 時間) 処理後の免疫染色における染色性は 3% H₂O₂ (0.03M Na₂HPO₄, 室温 24 時間) 処理とほぼ同等であった。例外として CD1a は 3% H₂O₂ (PB, 55°C, 2 時間) 処理で減弱した。CD4, CD31 は室温及び加温による H₂O₂ 処理

で減弱, CD21は逆に増強した。KMnO₄/oxalate 処理ではMART-1, CD1a, CD4, CD10, CD21, CD31, cytokeratin に対する抗原性が減弱した。

【結論】本研究では, メラニン色素沈着の強い病変の免疫組織学的検索のための漂白法として, 組織・細胞形態の保持, 抗原性の保持, 迅速性の観点から, 抗原賦活化後, 0.05M PB (pH7.4) を用いて3%に希釈した過酸化水素にて, 55°C, 2時間の加温処理が至適条件であった。

(論文審査の結果の要旨)

メラノサイト関連病変における過剰なメラニン顆粒の細胞内沈着は, 細胞形態の把握と免疫組織化学的評価を困難とすることで, 病理組織学的評価を困難にする場合がある。酵素抗体法におけるDABの使用は, メラニン顆粒との識別が難しくなり, 対処法として, 発色産物の色調を変えたり, azureBを用いてメラニン顆粒の色調を変えるなどの方法があるが, 過剰なメラニンの存在下では, これらの方法は効果的とは言えない。そこで, 過マンガン酸カリウム・シュウ酸法や希釈過酸化水素法などの漂白法が考案され, 近年では加温による過酸化水素漂白法が報告されている。本研究では加温による過酸化水素漂白法を抗原賦活化法と関連付けて再検討し, 組織形態と抗原性の保持を満たす最適なメラニン漂白条件を検討した。

1. 過酸化水素の希釈剤として, 0.05M PB (pH 7.4) を用いると2時間以内に漂白が完了し, 組織・細胞形態の保持の点で0.03M Na₂HPO₄, 0.05M PBS (pH7.4) を用いた場合より優れていた。よって希釈剤はPBとした。更に, 過酸化水素濃度を0.3%, 3%, 10%とし, 50°C, 55°C, 60°Cにおいて, 0.5時間, 1時間, 2時間, 3時間反応させたところ, 10%, 55°C, 60°Cで1時間以内に漂白可能であった。また組織・細胞形態も保持されていた。
2. 抗原賦活化処理を漂白処理の後に実施すると, 組織・細胞形態の傷害が強く, 組織・細胞像の評価が困難であった。
組織・細胞形態保持のためには, 抗原賦活化後3% H₂O₂ (0.05M PB, 55°C, 2時間) の処理が最も優れていた。
3. 抗原賦活化後3% H₂O₂ (0.05M PB, 55°C, 2時間) 処理後の免疫染色は, 従来法として最も免疫染色に適しているとされている3% H₂O₂ (0.03M Na₂HPO₄, 室温24時間) 処理と, ほぼ同等の結果

が得られた。

これらの結果より, 免疫組織化学的方法に適した脱メラニン法は, 組織・細胞形態の保持, 抗原性の保持, 迅速性の観点から, 抗原賦活化後, 0.05M PB (pH 7.4) を用いて3%に希釈した過酸化水素にて, 55°C, 2時間の加温処理が最適と結論づけた。

よって主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Isolation and characterization of portal branch ligation-stimulated Hmga2-positive bipotent hepatic progenitor cells (門脈結紮により誘導された Hmga2陽性肝前駆細胞の分離と機能解析)

酒井 宏 司

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】マウスやラットの成体から分離された肝非実質細胞分画中には肝前駆細胞様の性質を示す細胞が存在し, 発ガン物質投与などによる肝障害時に増殖することが知られている。しかしながら, この誘導方法を臨床応用することは難しい。門脈塞栓術は拡大肝葉切除の前治療として既に臨床で広く利用されている。門脈塞栓を行うと, 塞栓葉の萎縮, 非塞栓葉の代償性肥大を生じる。塞栓葉の萎縮は肝細胞自体の萎縮と apoptosis によるとされている。Oval cellをはじめとした肝前駆細胞は, 肝細胞が増殖できない重篤な肝障害が起きたときに増殖するとされており, 門脈結紮により肝前駆細胞が増殖する可能性があると考えた。本研究ではマウス門脈結紮モデルで肝前駆細胞の増殖が誘導されることを確認し, さらに肝前駆細胞の簡易な分離方法の確立, その発現遺伝子の解析, in vitro での分化誘導を目的とした。

【方法と結果】C57BL/6J マウス (8~12週齢, 雄) の門脈一次分枝 (左枝) を結紮し, 術後肝非実質分画を分離した。これらをラミニンコートディッシュ上で培養したところ, 術後7日後, 14日後の肝非実質分画より上皮様細胞のコロニーが形成された。さらに限界希釈法によりsingle cell cloningを行った。これにより6カ月以上維持可能な上皮様細胞集団 (Portal branch-ligation-stimulated hepatic cells: PBLHCs) を分離し得た。RT-PCRによる解析ではPBLHCsは胆管上皮のマーカーであるck19, 肝細胞のマーカーであるalbuminを発現していた。また,

前駆細胞のマーカーである sca-1, CD44, Hmga2 を発現していた。免疫細胞染色で CK19, HNF4 α , HMGA2 の発現を確認した。PBLHCs を oncostatin M 添加のもと, matrigel 上で培養すると RT-PCR で glucose-6-phosphatase をはじめとする成熟肝細胞マーカーの発現が増加することが確認された。また, アンモニア代謝能, 尿素合成活性が培養後 1 週間まで徐々に増加, その後少なくとも培養 2 週間後まで同様の活性が持続することがわかった。PBLHCs をマトリゲルを含むコラーゲンゲル内で 3 次元培養を行うと, cyst 様の構造を形成した。免疫染色により actin の cyst 内腔側への集積が確認され, 管腔構造として極性を持っていることがわかった。さらに培養を継続すると枝分かれ様の形態を示し, 胆管上皮細胞への分化が示唆された。成体肝での HMGA2 の発現を免疫組織染色で確認したところ, 正常肝では胆管上皮にその発現が認められた。門脈結紮を行うと, HMGA2 陽性細胞は肝実質内に向かって進展増殖していた。門脈結紮により Hmga2 陽性肝前駆細胞が増殖したと考えられた。

【結論】 マウスの門脈一次分枝を結紮することにより, 肝内に出現した肝細胞および胆管上皮細胞に分化しうる肝前駆細胞を簡便な方法で分離できることが示された。将来的に臨床で肝前駆細胞を得るための方法として本手法が利用できる可能性が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

マウスやラットの成体から分離された肝非実質細胞分画中には肝前駆細胞様の性質を示す細胞が存在し, 発ガン物質投与などによる肝障害時に増殖することが知られている。しかしながら, この誘導方法を臨床応用することは難しい。門脈塞栓術は拡大肝葉切除の前治療として既に臨床で広く利用されている。門脈塞栓を行うと, 塞栓葉の萎縮, 非塞栓葉の代償性肥大を生じる。塞栓葉の萎縮は肝細胞自体の萎縮と apoptosis によるとされている。Oval cell をはじめとした肝前駆細胞は, 肝細胞が増殖できない重篤な肝障害が起きたときに増殖するとされており, 門脈結紮により肝前駆細胞が増殖する可能性がある。今回, マウス門脈結紮モデルで肝前駆細胞が増殖するか, またその前駆細胞を分離し, その性質を調べることを目的とした。

C57BL/6J マウス (8~12 週齢, 雄) の門脈一次分枝 (左枝) を結紮し, 術後肝非実質分画を分離した。これらをラミニンコートプレート上で培養したところ, 術後 7 日後, 14 日後の肝非実質分画より上皮様細胞の

コロニーが形成された。さらに限界希釈法により single cell cloning を行った。これにより 6 カ月以上維持可能な上皮様細胞集団 (Portal branch-ligation-stimulated hepatic cells: PBLHCs) を分離し得た。PBLHCs の発現遺伝子を RT-PCR により解析し, 肝細胞マーカー, 胆管上皮細胞マーカーで免疫細胞染色を行った。次に PBLHCs を異なる培養条件下におき分化誘導を試みた。最後に PBLHCs で HMGA2 が陽性であることを確認し, 生体肝でのこの前駆細胞の局在を調べた。

その結果, 酒井宏司は次の結論をえた。

1. PBLHCs は RT-PCR で ck19 (胆管上皮細胞マーカー), albumin (肝細胞マーカー), sca-1, CD44, Hmga2 (前駆細胞マーカー) の発現があることを確認した。免疫細胞染色でも CK19 (胆管上皮細胞マーカー), HNF4 α (肝細胞マーカー), HMGA2 (前駆細胞マーカー) の発現があり, これらはこれまで報告されている肝前駆細胞の性質に矛盾しない。
2. PBLHCs を oncostatin M 添加のもと, matrigel 上で培養すると RT-PCR で glucose-6-phosphatase をはじめとする成熟肝細胞マーカーの発現が増加することが確認された。また, アンモニア代謝能, 尿素合成活性が培養後 1 週間まで徐々に増加, その後少なくとも培養 2 週間後まで同様の活性が持続することがわかった。したがって, 肝細胞様の細胞に分化することが示唆された。
3. PBLHCs をマトリゲルを含むコラーゲンゲル内で 3 次元培養を行うと, cyst 様の構造を形成した。免疫染色により actin の cyst 内腔側への集積が確認され, 管腔構造として極性を持っていることがわかった。さらに培養を継続すると枝分かれ様の形態を示し, 胆管上皮細胞への分化が示唆された。
4. 成体肝での HMGA2 の発現を免疫組織染色で確認したところ, 正常肝では胆管上皮にその発現が認められた。門脈結紮を行うと, HMGA2 陽性細胞は肝実質内に向かって進展増殖していた。門脈結紮により胆管内に存在する Hmga2 陽性肝前駆細胞が増殖したと考えられた。

これらの結果より, マウスの門脈一次分枝を結紮することにより肝内に出現した肝細胞および胆管上皮細胞に分化しうる肝前駆細胞を簡便な方法で分離できることが示された。将来的に臨床で肝前駆細胞を得るための方法として本手法が利用できる可能性が期待される。よって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文

として価値があるものと認めた。

Matrix metalloproteinase-2 ablation in dystrophin-deficient *mdx* muscle reduces angiogenesis resulting in impaired growth of regenerated muscle fibers (ジストロフィン欠損 *mdx* マウス骨格筋における MMP-2 の欠損は血管新生を阻害し、再生筋線維の成長障害を引き起こす)

宮崎大吾

(論文の内容の要旨)

【背景】 Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は進行性の筋萎縮と筋力低下を呈する X連鎖性の致死性筋疾患であり、DMD 遺伝子の変異により細胞骨格タンパク質であるジストロフィンが欠損する。ジストロフィンの欠損に伴いジストロフィン結合タンパク質 (ジストログリカン、サルコグリカンや神経型 nitric oxide synthase (nNOS) など) の発現も低下し、筋形質膜が脆弱となり細胞内への Ca^{2+} の流入増加が起こる。この結果、筋の変性・壊死、炎症細胞浸潤、線維化や脂肪浸潤が起こるが、詳細な機序には不明な点が多い。DMD やモデル動物である *mdx* マウスの骨格筋では、細胞外基底膜成分の分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -2, -9が過剰に発現してジストログリカンの分解に関与していることが報告されている。我々も以前に、壊死や変性筋において MMP-9の発現が増加し、再生筋では MMP-2の発現が増加していることを報告してきた。また、MMP-9を欠損させた *mdx* マウスの骨格筋では壊死や炎症が減少しており、MMP-9がジストロフィン欠損筋の筋障害に関連していることが最近報告された。しかし、ジストロフィン欠損筋における MMP-2の役割は十分には明らかにされていないことから、MMP-2を欠損させた *mdx* マウスを用いてジストロフィン欠損筋における MMP-2の役割を解明することを目的とした。

【方法】 MMP-2欠損 (MMP-2^{-/-}) マウスと *mdx* マウスを交配して MMP-2とジストロフィンの二重欠損 (*mdx*/MMP-2^{-/-}) マウスを作製した。1カ月と3カ月齢の wild-type, MMP-2^{-/-}, *mdx* および *mdx*/MMP-2^{-/-}の各マウスから種々の骨格筋を採取し、筋線維や筋線維内の毛細血管について病理組織学的に解析した。また、様々な成長因子、筋特異的転写因子お

よびジストロフィン結合タンパク質 (nNOS, β -ジストログリカン) について定量的 RT-PCR およびウェスタンブロットを用いて解析した。さらに、マイクロアレイを用いて *mdx* と *mdx*/MMP-2^{-/-}マウスの前脛骨筋における発現量の異なる遺伝子について網羅的に解析した。

【結果】 Wild-type, MMP-2^{-/-}, *mdx* および *mdx*/MMP-2^{-/-}の各マウスの前脛骨筋、腓腹筋、大腿四頭筋、横隔膜について病理組織学的に解析した結果、3カ月齢の *mdx* マウスに比べて同月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウスの再生筋線維が有意に小径であり、再生筋線維の成長に障害が起こっていることを見出した。3カ月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウスの骨格筋において、平均血管径、筋線維当たりの血管数と endothelial area が同月齢の *mdx* マウスに比べて有意に減少し、血管新生の関連因子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその受容体 Flt-1の発現は3カ月齢の *mdx* マウスに比べて同月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウスの骨格筋で有意に低下していたことから、MMP-2欠損により *mdx* マウス骨格筋の血管新生が障害されることが分かった。さらに、3カ月齢の *mdx* マウスに比べて同月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウスで誘導型 NOS (iNOS) や血管型 NOS (eNOS) の発現に差はなかったものの、nNOS の発現は有意に低下していた。

マイクロアレイによる解析では、S100カルシウム結合タンパク質 (S100) A8, A9や CCケモカイン CCL-2, -7, CCケモカイン受容体 CCR-1, -2および chitinase 3-like 3の発現が3カ月齢の *mdx* と比べて同月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウスの骨格筋で有意に増加していた。ジストロフィン欠損筋では MMPにより β -ジストログリカンが分解されることが知られているが、同月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}と *mdx* とマウス骨格筋との間に β -ジストログリカンの分解の程度に差は見られず、MMP-2は β -ジストログリカンの分解への関与は少ないと考えられた。

【考察】 我々は、ジストロフィン欠損筋における MMP-2の欠損により血管新生の障害と再生筋線維の成長障害が起こることを見出したが、その分子機構の1つとして VEGF の発現低下の関与が考えられる。VEGF は正常骨格筋の血管に発現しているが、骨格筋障害により活性化された筋衛星細胞や再生筋線維にも発現することから、筋再生に対して促進的に働くと考えられている。従来、MMP-2は VEGF の下流に位置する分子と考えられていたが、MMP-2の抑制に

より integrin α V β 3-mediated phosphoinositide 3-kinase/Akt を介して VEGF の発現が低下することが最近報告され、3 カ月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウスの骨格筋においても同様の機序が働いている可能性がある。また、3 カ月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウス骨格筋では nNOS の発現が低下していた。炎症などの高サイトカイン状態では nNOS の発現が抑制されることが報告されているが、事実、3 カ月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウス骨格筋では CCL-2 などの幾つかのサイトカインの発現が増加していた。これらのサイトカインは S100A8/A9 により誘導されることが知られている。また、S100A8/A9 は MMP-2 の転写を誘導しており、S100A8/A9 の発現増加は MMP-2 の欠損に伴い代償性に起こっている可能性が考えられることから、3 カ月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウス骨格筋で見られた nNOS の発現低下は、代償性に発現が増加した S100A8/A9 よりサイトカインが誘導された結果と考えられる。nNOS は骨格筋の血管新生にも関与することが報告されていることから、3 カ月齢の *mdx*/MMP-2^{-/-}マウスの骨格筋で見られた血管新生の障害には VEGF や nNOS の発現低下が関与している可能性が考えられた。

以上の研究成果から、ジストロフィン欠損筋における MMP-2 の役割は、血管新生を介した再生筋線維の成長の促進であることをはじめに指摘した。

(論文審査の結果の要旨)

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は進行性の筋萎縮と筋力低下を呈する X連鎖性の致死性筋疾患であり、DMD 遺伝子の変異によりジストロフィンが欠損する。さらに、ジストロフィン結合タンパク質 (ジストログリカンや nNOS など) の発現も低下し、筋形質膜が破綻して細胞内への Ca²⁺ の流入増加が起こる。この結果、筋の変性・壊死、炎症細胞浸潤、線維化や脂肪浸潤が起こるが、詳細な機序には不明な点が多い。DMD やモデル動物である *mdx* マウスの骨格筋では、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -2, -9 の過剰発現が知られている。本研究では壊死や変性筋においては MMP-9、再生筋では MMP-2 の発現が増加していることを報告した。最近、MMP-9 がジストロフィン欠損筋の筋障害に関連していることが報告されたが、MMP-2 の役割は十分には明らかにされていない。本研究は、MMP-2 を欠損させた *mdx* マウスを用いてジストロフィン欠損筋における MMP-2 の役割の解明を目的とした。

Wild-type, MMP-2^{-/-}, *mdx* および *mdx*/MMP-2^{-/-} (二重欠損) の各マウスの骨格筋についての病理組織学的評価からは、3 カ月齢で *mdx* に比べて二重欠損マウスの再生筋線維が有意に小径であった。また、骨格筋内の平均血管径、筋線維当たりの血管数と endothelial area は 3 カ月齢の *mdx* に比べて同月齢の二重欠損マウスで有意に減少していた。さらに、血管新生に関連する血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその受容体 Flt-1 の発現は二重欠損マウスで特異的に低下していたことから、MMP-2 欠損により VEGF の発現低下を介して血管新生が障害されていることが示唆された。また、nNOS が 3 カ月齢において *mdx* に比べて二重欠損マウスで有意に低下し、血管新生への影響を及ぼした可能性が考えられた。マイクロアレイによる遺伝子発現解析では、S100カルシウム結合タンパク質 (S100) A8, A9 や CCL-2, -7, CCR-1, -2 および chitinase 3-like 3 の発現が 3 カ月齢の *mdx* に比べて同月齢の二重欠損マウスで有意に増加していた。これは MMP-2 欠損に対する代償性の S100A8/A9 の発現増加に伴う高サイトカイン状態と考えられ、nNOS の発現低下への影響も考えられた。

以上から MMP-2 の欠損によりジストロフィン欠損筋に血管新生の障害と再生筋線維の成長障害が起こることを見出し、これらに VEGF や nNOS の発現低下が関与している可能性を示唆した。本研究結果はジストロフィン欠損筋における MMP-2 の役割が、血管新生を介した再生筋線維の成長促進であるとの可能性を明らかにした新しい知見であり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

In vitro transdifferentiation of HepG2 cells to pancreatic-like cells by CCl₄, D-galactosamine, and ZnCl₂ (CCl₄, D-galactosamine, ZnCl₂による HepG2細胞から膵臓様細胞への in vitro における分化転換)

加納 義也

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】分化転換とは、一度分化した細胞が異なる種類の細胞に変わることであり、広義においては、組織における変異形成や組織幹細胞の分化も含まれる。本研究で対象とする膵臓と肝臓は、発生初期において、共通の領域から発生するため、お互いの分化転換は起

こりやすいと考えられる。実際、肝臓から膵臓への分化転換は、in vivo すなわち実験動物において肝障害を引き起こす薬剤を使うことにより惹起されている。また、人間においても特定の病的状態で出現することが報告されている。しかし、薬剤を用いた分化転換に関して in vitro では報告されていない。一方、ウイルスを用い Pdx-1 を過剰に発現させるプラスミドを HepG2 細胞に遺伝子導入することにより膵臓様細胞への分化転換を引き起こす in vitro の研究は散見される。しかし、遺伝子操作には様々な弊害を伴うため、移植治療などを念頭に臨床応用可能な分化転換法を開発するためには、遺伝子操作をさけるべきだと考えた。そこで、肝障害をもたらす試薬である CCl₄、D-galactosamine や膵臓の機能と発生を促進する ZnCl₂ 等の低分子の試薬を用いて分化転換を行うことにした。

【材料及び方法】 分化転換を行う細胞として cell line 化されたヒト肝癌細胞 HepG2 を選んだ。分化転換を視覚的に観察出来るようにするために、HepG2 細胞に、肝臓マーカープラスミド“Albumin-GFP”と膵臓マーカープラスミド“Elastase-DsRed”を遺伝子導入し、クローニング後、FAE-HepG2 細胞を作成した。この細胞を単層培養し、それぞれ CCl₄ (100 mM)、D-galactosamine (2 mM)、ZnCl₂ (200 μM) を投与し、その後起こる変化を蛍光観察し分化転換を追跡した。各試薬の最適濃度は、あらかじめ生存率を検討し、細胞が死滅することのない最大量を選んだ。分化転換の状況を把握するため、アミラーゼ、グルカゴン、インスリンの免疫組織化学解析及びインスリン、アミラーゼの遺伝子発現量を解析した。

【結果】 FAE-HepG2 細胞を各試薬で 30 日間培養することで、Elastase-DsRed 陽性細胞を確認できた。また、免疫組織化学解析において、各試薬いずれにおいても、外分泌マーカーであるアミラーゼ、内分泌マーカーであるインスリン及びグルカゴンの発現をみた。また、遺伝子発現量を解析した結果、各試薬でアミラーゼ及びインスリンはともにコントロールの細胞に比べて上昇した。

【結論】 HepG2 細胞に CCl₄ (100 mM)、D-galactosamine (2 mM)、ZnCl₂ (200 μM) で 30 日間培養することにより膵臓様細胞に分化転換することが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

膵臓から肝臓への分化転換は、in vivo の研究において肝障害により引き起こされることが報告されてい

る。in vitro の研究においては Pdx-1 などの遺伝子を細胞内で人為的に過剰発現することにより分化転換が起きることが報告されている。分化転換により得た細胞を臨床応用することを念頭に、遺伝子操作による弊害を避けるためにこの研究では薬剤による分化転換法を試みた。

株化された肝癌細胞である HepG2 細胞を研究材料とし、分化転換の指標とするため肝臓マーカー Albumin-GFP と膵臓マーカーの Elastase-DsRed を遺伝子導入した。クローニングを行い、FAE-HepG2 細胞を作成した。

HepG2 細胞をそれぞれ CCl₄ (100 mM)、D-galactosamine (2 mM)、ZnCl₂ (200 μM) を含む培地で培養をした。其々の試薬ごとの経時変化を蛍光顕微鏡で観察した。HepG2 細胞が膵臓細胞に分化転換する割合を FACS 解析で明らかにした。また、分化転換した細胞の性状を明らかにするため、膵外分泌細胞のマーカーであるアミラーゼ、内分泌マーカーであるインスリンとグルカゴンの免疫組織化学的解析を行った。さらに、各試薬で分化転換した細胞についてアミラーゼとインスリンの遺伝子発現量解析を行った。

以上の解析より加納は次の結論を得た。

1. FAE-HepG2 細胞に CCl₄ (100 mM)、D-galactosamine (2 mM)、ZnCl₂ (200 μM) をそれぞれ 30 日間与えることによりすべての試薬において Elastase-DsRed 陽性細胞を確認することが出来た。また、日を追うごとに Elastase-DsRed 陽性細胞が増加していくことが蛍光顕微鏡解析と FACS 解析から明らかとなった。特に ZnCl₂ は他の二剤に比較し、早期に膵細胞様細胞に転換した。
2. 30 日間処理された細胞コロニーに、どの試薬においても、アミラーゼ陽性細胞とグルカゴン陽性細胞とインスリン陽性細胞が存在した。
3. 30 日間処理され分化転換した細胞は、それぞれの試薬において、コントロールと比較し、インスリンとアミラーゼの遺伝子発現量が大幅に増加した。

このように、株化されたヒトの肝癌細胞 HepG2 細胞にそれぞれ CCl₄、D-galactosamine、ZnCl₂ を加えることにより in vitro で膵臓様細胞に分化転換することが明らかとなった。また、ZnCl₂ は他の 2 つの試薬に比べて安全性が高く、アルブミンを抑制して短期間で Elastase-DsRed 陽性細胞に分化転換が起きることがわかった。今後、移植治療に向けた強力なツールになると考える。以上の知見から、主査、副査は一致し

て本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Mechanism of alkalosis-induced constriction of rat cerebral penetrating arterioles (アルカローシスにより喚起されるラット脳細動脈の収縮反応の解析)

李 玉 輝

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】脳血流量は、自動調節能により一定に保たれている。このメカニズムの一つとして脳内での pH 変化が知られている。アルカローシスによる血管収縮反応自体はよく知られているがそのメカニズムについては不明な点が多い。最近 Na^+/H^+ exchanger (NHE) が脳血管の収縮、弛緩反応に重要な働きが有ることが注目されているため、ラット摘出脳細動脈を用いてアルカローシスによる脳血管収縮反応と NHE の関係を中心に解析した。

【方法】実験には雄のSDラット (n=35, 350-450 g) を用いて行った。ペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔後、脳を摘出し中大脳動脈より分枝し Virchow-Robin 腔を走行する穿通枝 (細動脈) を摘出した (内径60-80 μm)。摘出した穿通枝を、微小ガラスピペットを用いて臓器槽内でカニューレーションし血管内径を倒立顕微鏡下に測定した。

細動脈に60 mmHg の内圧を負荷し、血管外腔を持続的に灌流液で循環した。臓器槽の温度を室温から 38°C に維持すると自発性の収縮を認め (内径50-60 μm)、この内径をコントロールとし実験を行った。

pH は7.3をコントロールとし、そこから0.1刻みで上昇させ、その血管の収縮反応を観察した。また、種々の阻害剤の影響についても解析を行った。

【結果】アルカローシスにより細動脈は有意な収縮反応を示した。5-N,N hexamethylene-amiloride (NHE inhibitor), 3',4'-dichlorobenzamil ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor) と ouabain (Na^+/K^+ -adenosine triphosphatase inhibitor) の存在下では、アルカローシスの収縮は有意に抑制された。Glibenclamide と tetraethylammonium ions (K^+ channel inhibitor) の存在下では有意な変化は見られなかった。

【結語】アルカローシスによる脳細動脈の収縮には、NHE, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger と Na^+/K^+ -adenosine triphosphatase が関係していることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

脳血流量は、自動調節能により一定に保たれている。このメカニズムの一つとして脳内での pH 変化が知られている。アルカローシスによる血管収縮反応自体はよく知られているがそのメカニズムについては不明な点が多い。最近 Na^+/H^+ exchanger (NHE) が脳血管の収縮、弛緩反応に重要な働きが有ることが注目されているため、ラット摘出脳細動脈を用いてアルカローシスによる脳血管収縮反応と NHE の関係を中心に解析した。

実験には雄のSDラット (n=35, 350-450 g) を用いて行った。ペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔後、脳を摘出し中大脳動脈より分枝し Virchow-Robin 腔を走行する穿通枝 (細動脈) を摘出した (内径60-80 μm)。摘出した穿通枝を、微小ガラスピペットを用いて臓器槽内でカニューレーションし血管内径を倒立顕微鏡下に測定した。

細動脈に60 mmHg の内圧を負荷し、血管外腔を持続的に灌流液で循環した。臓器槽の温度を室温から 38°C に維持すると自発性の収縮を認め (内径50-60 μm)、この内径をコントロールとし実験を行った。

pH は7.3をコントロールとし、そこから0.1刻みで上昇させ、その血管の収縮反応を観察した。また、種々の阻害剤の影響についても解析を行った。

その結果、次の結論を得た。

1. アルカローシスにより細動脈は有意な収縮反応を示した。
2. 5-N,N hexamethylene-amiloride (NHE inhibitor), 3',4'-dichlorobenzamil ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger inhibitor) と ouabain (Na^+/K^+ -adenosine triphosphatase inhibitor) の存在下では、アルカローシスの収縮は有意に抑制された。
3. Glibenclamide と tetraethylammonium ions (K^+ channel inhibitor) の存在下では有意な変化は見られなかった。

これらの結果より、アルカローシスによる脳細動脈の収縮には、NHE, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger と Na^+/K^+ -adenosine triphosphatase が関係していることが示唆された。主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Early Intervention with Rosuvastatin Decreases the Lipid Components of the Plaque in Acute Coronary Syndrome: Analysis Using Integrated Backscatter IVUS (ELAN Study) (ロスバスタチンによる急性期脂質低下療法は急性冠症候群における冠動脈プラークの脂質成分を減少させる: Integrated Backscatter IVUS を用いた検討から)

小田切 久 八

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、後方散乱波を用いた血管内超音波検査 (Integrated backscatter intravascular ultrasound: IB-IVUS) により、冠動脈プラークの組織性状を検査することが可能となった。さらにこの IB-IVUS の検討から、急性冠症候群 (Acute coronary syndrome: ACS) の原因となる不安定プラークは、プラーク容積と内包する脂質成分の割合が高いことが報告されている。一方、冠動脈疾患においてスタチンによる脂質低下療法によるプラークの退縮効果が注目されている。これらより本研究の目的は、ロスバスタチンを用いた急性期脂質低下療法が、ACS 症例のプラークの組織性状に与える影響を IB-IVUS により検討することである。

【方法】ACS にて当院へ救急搬送され、緊急経皮的冠動脈形成術 (percutaneous coronary intervention: PCI) を施行された際に、非責任病変の冠動脈プラークを IB-IVUS で記録しえた症例を対象とした。対象は PCI 後にロスバスタチンの内服を開始し、6 カ月後から 9 カ月後の確認冠動脈造影検査までの期間内服を継続した。この確認検査の際に同部位に IB-IVUS を施行し、冠動脈プラークの量的な変化および質的な変化に関して検討を加えた。

【結果】ACS 発症から上記プロトコル通りに追跡し得た 20 例の ACS 症例を本研究の対象とした。LDL コレステロール値は急性期脂質低下療法により、ACS 発症時には 117 ± 34 mg/dl であったが、確認冠動脈造影検査時には 73 ± 19 mg/dl ($p < 0.001$) へと低下していた。IB-IVUS による検討では、プラーク量は 98.4 ± 42.1 mm³/10 mm から 80.2 ± 35.8 mm³/10 mm ($p < 0.001$) へと減少し、またプラーク中の脂質成分は 44.1 ± 29.6 mm³/10 mm から 28.6 ± 17.8 mm³/

10 mm ($p < 0.001$) へと減少していた。さらに脂質成分の変化率は、ACS 発症時におけるプラークの脂質成分割合と負の相関が認められた ($r = -0.498$, $p = 0.024$)。

【考察】ロスバスタチンを用いた ACS 症例に対する急性期脂質低下療法により、6 カ月間で冠動脈プラーク容積の有意な減少が観察された。さらに、この減少は主としてプラークの脂質成分が減少することによりもたらされておりプラークの安定化が示唆された。また、この効果には ACS 発症時のプラークの組織性状が関与している可能性も推察された。

(論文審査の結果の要旨)

近年、後方散乱波を用いた血管内超音波検査 (Integrated backscatter intravascular ultrasound: IB-IVUS) により、冠動脈プラークの組織性状を検査することが可能となった。急性冠症候群 (Acute coronary syndrome: ACS) の原因となる不安定プラークは、その容積と内包する脂質成分の割合が高いことが報告されている。一方、冠動脈疾患においてスタチンを用いた脂質低下療法によるプラークの退縮効果が注目されている。今回小田切は、ロスバスタチンを用いた急性期脂質低下療法が ACS 症例のプラークの組織性状に与える影響を IB-IVUS により検討した。

ACS にて緊急経皮的冠動脈形成術 (percutaneous coronary intervention: PCI) を施行された際に、非責任病変の冠動脈プラークを IB-IVUS で記録しえた 20 症例を対象とした。PCI 後にロスバスタチンの内服を開始し、6 カ月後から 9 カ月後の確認冠動脈造影検査までの期間内服を継続した。この確認検査の際に同部位に IB-IVUS を施行し、冠動脈プラークの量的な変化および質的な変化に関して検討を加えた。

その結果、小田切は次の結論を得た。

1. 急性期脂質低下療法により、LDL コレステロール値は 117 ± 34 mg/dl から 73 ± 19 mg/dl ($p < 0.001$) へと低下した。
2. プラーク量は 98.4 ± 42.1 mm³/10 mm から 80.2 ± 35.8 mm³/10 mm ($p < 0.001$) へと減少した。
3. プラーク中の脂質成分は 44.1 ± 29.6 mm³/10 mm から 28.6 ± 17.8 mm³/10 mm ($p < 0.001$) へと減少した。
4. 脂質成分の変化率は、ACS 発症時におけるプラークの脂質成分割合と負の相関が認められた ($r = -0.498$, $p = 0.024$)。

これらの結果より、ロスバスタチンを用いた ACS

審査学位論文要旨

症例に対する急性期脂質低下療法は、冠動脈プラーク容積を減少させる効果があることが観察された。さらに、この効果は主として脂質成分の減少によりもたらされており、プラークの安定化が示唆された。また、この効果には ACS 発症時のプラークの組織性状が関

与している可能性も推察された。スタチン療法により ACS 患者の冠動脈プラークが安定化することを IB-IVUS により証明した臨床的有用な研究であり、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。
