

## 信州大学において審査された医学博士論文要旨

氏名 (所属教室)	学位授与 番号	授与年月日	博 士 論 文 名	学位審査委員	
				主 査	副 査
遠山周明 (病態解析 診断学)	乙第1193号	28. 4.27	<i>Candida</i> concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs (濃縮されたうがい液により決定されるカンジダ濃度は、臨床所見・症状を反映する)	小泉知展	竹下敏一 多田 剛
浅香亮一 (分子腫瘍学)	乙第1194号	28. 6. 8	Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target. (Sirtuin1は子宮内膜癌細胞の増殖とシスプラチン耐性を亢進させる: 新規治療標的の可能性)	伊藤研一	本田孝行 菅野祐幸
海老澤聡一郎 (内科学(5))	乙第1195号	28. 6.22	Impact of endovascular therapy on oxidative stress in patients with peripheral artery disease (閉塞性動脈硬化症患者の酸化ストレスに対する血管内治療の影響)	今村 浩	岡田健次 駒津光久
三浦 崇 (内科学(5))	乙第1196号	28. 6.22	Five-year prognosis after endovascular therapy in claudicant patients with iliofemoral artery disease (腸骨大腿動脈病変を有する跛行患者に対する EVT の5年予後検討)	今村 浩	駒津光久 岡田健次
片岡由布子 (スポーツ 医科学)	乙第1197号	28. 7.27	Effects of hypervolemia by protein and glucose supplementation during aerobic training on thermal and arterial pressure regulations in hypertensive older men (高血圧症の高齢男性における持久性トレーニング中の糖質・蛋白質補助食品摂取が体温と血圧調節能に与える効果)	川真田樹人	今村 浩 小泉知展
布施谷仁志 (麻酔蘇生学)	乙第1198号	28. 9.28	Systemic QX-314 Reduces Bone Cancer Pain through Selective Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1-expressing Primary Afferents in Mice (QX-314 全身投与は、マウスにおいては Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1 を発現している1次知覚神経を選択的に抑制することによって骨がん痛を減弱させる)	森泉哲次	加藤博之 小泉知展
小林美雪 (精神医学)	乙第1199号	28. 9.28	Sex differences in the serum level of endogenous ligands for estrogen receptor $\beta$ in the elderly population (老年期におけるエストロゲン $\beta$ 受容体内因性リガンドの血清濃度の性差について)	塩沢丹里	駒津光久 伊藤研一

審査学位論文要旨

古賀弘志 (皮膚科学)	乙第1200号	29. 1.25	Automated evaluation system of dermoscopic images of longitudinal melanonychia : proposition of a discrimination index for detecting early nail apparatus melanoma (爪甲色素線条ダーモスコピー画像の自動評価システム：早期爪部悪性黒色腫検出のための鑑別指数の提案)	森泉哲次	角谷眞澄 菅野祐幸
所 弥生 (内科学(1))	乙第1201号	29. 1.25	Computed tomography-guided bronchoscopy in the diagnosis of small peripheral pulmonary lesions : A retrospective study of 240 examinations in a single academic center (小末梢肺病変の診断における CT ガイド下気管支鏡：単一の教育施設における240例の後向き研究)	小泉知展	角谷眞澄 田中榮司
森 健太郎 (耳鼻咽喉科学)	乙第1202号	29. 2. 8	Social health insurance-based simultaneous screening for 154 mutations in 19 deafness genes efficiently identified causative mutations in Japanese hearing loss patients (国民健康保険を基にした日本人難聴患者における難聴原因遺伝子19遺伝子154変異のスクリーニング)	福嶋義光	本田孝行 塩沢丹里
佐藤 篤 (脳神経外科学)	乙第1203号	29. 2. 8	Interpretation of the causes of instability of flash visual evoked potential in intraoperative monitoring and proposal of a recording method for reliable functional monitoring of visual evoked potential using a light-emitting device (術中フラッシュVEP の不安定性の理由と信頼性のある機能的視覚誘発電位の記録方法の提案)	本郷一博	多田 剛 村田敏規
松下 剛 (画像医学)	乙第1204号	29. 2.22	Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Brain Activation by Sound Localization in Artificial Unilateral Hearing Loss (機能的MRIを用いた擬似的な一側性難聴における音源定位に関連する脳賦活領域の検討)	鷲塚伸介	宇佐美真一 本郷一博
李 琳 (加齢生物学)	乙第1205号	29. 3.22	Caloric restriction reduces the systemic progression of mouse AApoAII amyloidosis (摂取カロリー制限はマウス AApoAII アミロイドーシスの全身での進行を抑制する)	竹下敏一	鈴木龍雄 菅野祐幸

*Candida* concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs (濃縮されたうがい液により決定されるカンジダ濃度は、臨床所見・症状を反映する)

遠山 周 明

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 口腔カンジダ症はカンジダ属菌により引き起こされ、日常的に認められる感染症である。し

かし、カンジダ属菌は健常人からも検出されるため、一般的に行われているスワブ検査では感染と保菌との鑑別が困難である。そのため、臨床所見および症状で

診断されることが多く、客観的基準が必要と考えられる。本研究では、感染と保菌とを鑑別する基準を作成するため、口腔カンジダの定量的検査法を検討した。

【方法】(サンプル採取方法) スワブ：綿棒で舌背部を5回擦過後、直接クロモアガー培地に塗布。口腔内うがい液：10 mlの生理食塩水を口に含み口腔内を5秒間すすぐ、回収後のすすぎ液100  $\mu$ Lをクロモアガー培地に塗布。濃縮液：10 mlの生理食塩水を口に含み口腔内を5秒間すすぐ、回収後のすすぎ液を3,500rpm  $\times$  20分間遠心した。得られた沈渣に生理食塩水500  $\mu$ Lを加え、その浮遊液100  $\mu$ Lをクロモアガー培地に塗布。37  $^{\circ}$ Cで48時間培養後、コロニー数をカウントした。

1. 口腔カンジダ定量に適する検体の検討：臨床的にカンジダ症と診断した患者10名から採取したスワブ、うがい液、濃縮液を用いてカンジダコロニー数をカウントし検討した。2. 健常人の保有口腔カンジダコロニー数の検討：臨床所見および症状にて口腔カンジダ症を認めない30名から採取したスワブ、濃縮液を用いてカンジダコロニー数をカウントし検討した。3. カンジダコロニー数と臨床所見および症状との関連の検討：2011年3月～6月に某病院歯科口腔外科外来を受診した初診患者200名から採取したスワブ、濃縮液を用いてカンジダコロニー数をカウントし、臨床所見および症状と比較した。

【結果と考察】 1. 口腔カンジダ症と診断した10名から得られたカンジダコロニー数の中央値はそれぞれ、スワブ法で23 CFU/plate、うがい法で56 CFU/100  $\mu$ L、濃縮法で485 CFU/100  $\mu$ Lであった。濃縮法の検出率は、スワブ法、うがい法に比べて優位に高かった。以後、本研究では検出率の高い濃縮法と従来法のスワブ法との比較検討を行った。2. 臨床所見および症状にてカンジダ症を認めない健常人30名における検出率および検出カンジダ数上限値は、スワブ法では10%、5 CFU/plate、濃縮法では26.7%、67 CFU/100  $\mu$ Lであった。健常人において、スワブ法で5 CFU/plate、濃縮法で67 CFU/100  $\mu$ Lがカンジダ非感染者の上限と考えられた。3. 外来患者200名における検出率および検出カンジダ数中央値は、スワブ法では33.5%、7 CFU/plate、濃縮法では52%、141 CFU/100  $\mu$ Lであり、濃縮法の検出率が優位に高く、半数の患者からカンジダを検出した。濃縮法では、舌痛、口腔乾燥、口腔粘膜の発赤、舌発赤、舌苔、残根、義歯の7項目で、カンジダの有無と臨床所見および症状の有無に関

連が認められた。また、上記の同じ7項目において、口腔カンジダ数と臨床所見および症状の程度にも関連が認められた。舌痛、味覚障害、口腔乾燥、口腔粘膜の発赤、残根、義歯の6項目では陽性的中率が高く、それらの所見もしくは症状が認められた場合に口腔内に口腔カンジダ症が存在する可能性の高いことが示唆された。外来患者200名のうち、臨床所見および症状の異常が全くない患者から検出したカンジダ数の上限値は90 CFU/100  $\mu$ Lであった。健常人から算出した値67 CFU/100  $\mu$ Lを考慮すると、90 CFU/100  $\mu$ Lが口腔カンジダ症を診断するカットオフ値であると考えられた。口腔臨床所見および症状とカンジダ数には関連があり、口腔カンジダの定量により、カンジダ感染の有無や感染の程度を推測が可能である。定量法の確立により、カットオフ値を90 CFU/100  $\mu$ Lとすることで、HIV等で免疫が低下している患者の口腔カンジダ数を定量することができ、患者の免疫状態の評価判定に役立つことが期待される。

#### (論文審査の結果の要旨)

口腔カンジダ症は日常的に認められる感染症であるが、口腔内においてカンジダは健常人からも検出され、一般的に行われるスワブによるカンジダ検査では感染と保菌の鑑別が困難である。したがって、臨床所見および症状で口腔カンジダ症と診断されることが多く、信頼される客観的基準がない。本研究では、口腔カンジダ感染症とカンジダ保菌を鑑別する基準を作成するため、(1)カンジダ定量に適する検体、(2)健常人の保有カンジダコロニー数、(3)カンジダコロニー数と臨床所見および症状との関連を検討することにより、実用できる口腔カンジダ定量法を検討した。

その結果以下の成績を得た。

1. 10名の口腔カンジダ症患者において、カンジダコロニー数の中央値は、スワブ法で23 CFU/plate、うがい法で56 CFU/100  $\mu$ L、濃縮法で485 CFU/100  $\mu$ Lであった。濃縮法の検出率は、スワブ法、うがい法に比べて優位に高かった。
2. 臨床的に口腔カンジダ症を認めない健常人30名において、口腔カンジダ検出率および検出カンジダ数上限値は、スワブ法では10%、5 CFU/plate、濃縮法では26.7%、67 CFU/100  $\mu$ Lであった。
3. 外来患者200名において、検出率および検出カンジダ数中央値は、スワブ法では33.5%、7 CFU/plate、濃縮法では52%、141 CFU/100  $\mu$ Lであり、濃縮法の検出率が優位に高かった。

4. 濃縮法では、舌痛、口腔乾燥、口腔粘膜の発赤、舌発赤、舌苔、残根、義歯の7項目で、口腔カンジダの有無と臨床所見および症状の有無に相関が見られた。
5. 口腔カンジダ症の濃縮法による陽性的中率は、舌痛82.4%、味覚障害71.4%、口腔乾燥77.2%、口腔粘膜の発赤88.9%、残根90.0%、義歯83.7%であった。
6. 濃縮法では、舌痛、口腔乾燥、口腔粘膜の発赤、舌発赤、舌苔、残根、義歯の7項目で、カンジダ数

と臨床所見および症状の程度に相関が認められた。  
7. 外来患者200名において、臨床所見および症状に異常のない患者の口腔カンジダ数の上限値は90 CFU/100  $\mu$ Lであった。

以上より、濃縮法を用いた口腔カンジダ定量法の確立により、口腔カンジダ症の有無および重症度が客観的に診断できるようになった。また、口腔カンジダ定量法は、HIVなどの免疫不全患者の免疫状態の判定にも使用できる可能性があり、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。

### Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target (Sirtuin1は子宮内膜癌細胞の増殖とシスプラチン耐性を亢進させる：新規治療標的の可能性)

浅 香 亮 一

#### (論文の内容の要旨)

子宮内膜癌は近年増加しており、より有効な薬剤開発のためには病態の解明が急務である。また肥満は子宮内膜癌の重要な危険因子であるが、肥満による内膜癌誘発の機序は解明されていない。この機序に関わる候補因子として、高カロリー摂取で発現抑制される可能性がある Sirtuin1 (SIRT1) に注目した。SIRT1は NAD 依存性ヒストン脱アセチル化酵素で、正常組織においてカロリー制限などのストレスにより発現が誘導され、ヒストンのみでなく p53などの蛋白を脱アセチル化して不活化することにより、代謝制御・細胞周期制御・DNA 修復・アポトーシスの抑制などに関与する。その結果細胞の寿命を延長させることから長寿遺伝子として知られている。SIRT1は従来癌抑制的に作用すると考えられてきたが、近年では癌細胞ではむしろ促進的に作用するという報告もある。本研究では、正常子宮内膜および子宮内膜癌における SIRT1発現とその機能の解明を目的とし、子宮内膜癌の新たな治療標的となる可能性を検討した。

当院倫理委員会の承認下で臨床検体での SIRT1蛋白の発現を免疫染色で検討したが、正常子宮内膜において体格指数 (BMI) と SIRT1の発現に相関を認めなかった。しかし、子宮内膜癌では正常子宮内膜よりも有意に SIRT1発現が亢進し (31.3 vs 8.5; PI (positivity index) 中央値:  $p < 0.05$ )、子宮内膜癌108症例の予後解析で PI50以上の高発現症例では、有意に生存期間が短縮していることを見出した ( $P < 0.05$ )。これらの結果から SIRT1が子宮内膜癌に促進的に作用し

ている可能性が考えられたため、in vitro の検討を行った。

子宮内膜癌細胞株 (HEC151, HEC1B, HHUA, ECC1, Ishikawa) を用い SIRT1の内膜癌細胞での機能解析を行った。増殖能を WST-1 assay で検討したところ、全ての細胞株において siRNA 法で SIRT1発現を抑制すると増殖能が抑制され ( $p < 0.05$ )、cDNA 導入で SIRT1を強制発現させると増殖能が亢進した ( $p < 0.05$ )。SIRT1を高発現させた HHUA 細胞 (HHUA-SIRT1) に SIRT1阻害剤の EX527を投与すると、増殖能は抑制された。また HHUA-SIRT1では、抗癌剤 [シスプラチン (CDDP)] に対する耐性が増強したが (WST-1 assay,  $p < 0.05$ )、この耐性も EX527の投与で抑制された。これらから、SIRT1は子宮内膜癌細胞の増殖と抗癌剤耐性を増強させると考えられた。

SIRT1による抗癌剤耐性の機序として、p53の抑制を介したアポトーシスの抑制による可能性が考えられたため、HHUA-SIRT1と HHUA-Control に CDDP を添加しアポトーシス細胞の割合を annexin-V/ propidium iodide (PI) 蛍光染色で検討した。HHUA-SIRT1では HHUA-Control より有意にアポトーシスが減少 (2% vs 5%:  $p < 0.05$ ) し、EX527添加により、両細胞ともアポトーシスの割合は増加したが (6% vs 10%)、この差は p53阻害剤 cyclic pifithrin- $\alpha$  (CP $\alpha$ ) の添加で抑制された。このことより、SIRT1は p53を介したアポトーシスの抑制により CDDP 耐性増強効果を示すことが示唆された。

一方、多くの内膜癌細胞株で p53変異の報告がある

ため、p53野生株 (HEC151) と p53機能喪失変異株 (HEC1B) に対して CDDP 耐性を検討した。p53機能喪失変異の有無によらず EX527による CDDP 耐性減弱が観察され、SIRT1は p53以外の経路でも CDDP 耐性を増強している可能性が考えられた。

次に SIRT1および EX527の効果をヌードマウス皮下の異種移植腫瘍で検討した。HHUA-SIRT1腫瘍は HHUA-Control 腫瘍に比べ、4 週後には約 40 % 腫瘍体積が増大した ( $p < 0.05$ )。また、CDDP 投与により HHUA-Control 腫瘍は縮小したが、HHUA-SIRT1 腫瘍は縮小しなかった ( $p < 0.05$ )。EX527投与により HHUA-Control と HHUA-SIRT1の両腫瘍とも増大が抑制された。HEC1B 細胞の異種移植腫瘍でも検討を行ったところ、やはり EX527投与により有意に腫瘍増大が抑制された ( $p < 0.05$ )。これらのことから、SIRT1は *in vivo* でも子宮内膜癌の増殖に促進的に作用し、EX527は SIRT1の効果を抑制し、抗腫瘍効果を持つことが示唆された。また、EX527の投与により明らかな有害事象は発生しなかった。

以上より SIRT1は、子宮内膜癌の増殖や抗癌剤耐性増強に関与し、SIRT1阻害剤 EX527は子宮内膜癌に対する新規治療薬となりうることが示唆された。

#### (論文審査の結果の要旨)

子宮内膜癌と肥満との関連における因子として SIRT1の関与を考え、(1) 正常子宮内膜、増殖症内膜、子宮内膜癌における SIRT1タンパクの発現を免疫染色で検討した。

その結果以下の成績を得た。

1. 正常子宮内膜において BMI と SIRT1発現には有意な相関を認めなかった。
2. 子宮内膜癌では正常子宮内膜よりも SIRT1発現が亢進していた (31.3 vs 8.5; PI 中央値:  $p < 0.05$ )。
3. 組織学的 Grade が高い、脈管侵襲陽性例で SIRT1 発現が亢進していた (いずれも  $P < 0.05$ )。
4. 子宮内膜癌108症例の予後解析で PI50以上の高発現症例で生存期間が短縮している ( $P < 0.05$ )。

以上より SIRT1は肥満とは関連を認めなかったが、癌の悪性度と関連することが示唆されたため、子宮内膜癌細胞株を用いて、SIRT1発現と(2)細胞の増殖能との関連、(3)SIRT1とストレスの関連、(4)SIRT1と抗癌剤耐性の関連、(5)p53経路の関与の検討、(6) *in vivo* での SIRT1の造腫瘍能への関与について検討した。

その結果以下の成績を得た。

5. siRNA/cDNA の導入で SIRT1を抑制/増強した細胞は増殖能が低下 / 亢進した ( $p < 0.05$ )。
6. HHUA で SIRT1発現増強させた細胞 (HHUA-SIRT1) の増殖能亢進は PI3K 阻害剤、MEK 阻害剤で相殺された。
7. シスプラチン投与により SIRT1の mRNA 発現は用量依存的に増強した。
8. HHUA-SIRT1ではシスプラチン耐性が増強した ( $p < 0.05$ )。
9. HHUA-SIRT1はアポトーシス細胞が減少した ( $p < 0.05$ )。
10. HHUA-SIRT1のアポトーシス減少効果は p53阻害剤で相殺された。
11. 子宮内膜癌細胞株では多くの株で p53の変異を認めた。
12. P53変異の有無にかかわらず、SIRT1阻害剤 (EX527) はシスプラチン耐性を低下させた。
13. マウス異種移植実験で HHUA-SIRT1はコントロールより腫瘍が有意に大きかった ( $p < 0.05$ )。
14. HHUA-SIRT1はシスプラチン抵抗性を示し、EX527は HHUA-SIRT1の増殖能を相殺した。
15. EX527は単剤で、p53変異株に対しても抗腫瘍効果を示した。

以上より、SIRT1は子宮内膜癌で高発現しており、腫瘍の悪性度にかかわっていると考えられた。腫瘍で高発現している SIRT1は PI3K や MAPK 経路を介して細胞の増殖能亢進に寄与し、p53あるいはそれ以外の経路を介して細胞死の抑制をし、抗癌剤耐性を亢進していると考えられた。SIRT1の阻害剤である EX527は単剤でも子宮内膜癌の新規治療薬となる可能性があることが示された。

したがって主査、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。

Impact of endovascular therapy on oxidative stress in patients with peripheral artery disease (閉塞性動脈硬化症患者の酸化ストレスに対する血管内治療の影響)

海老澤 聡一郎

(論文の内容の要旨)

【背景】動脈硬化性疾患は動脈硬化性プラークによる動脈内腔の狭小化あるいは閉塞によって臓器虚血が起る疾患である。主に虚血性心疾患、脳血管障害そして閉塞性動脈硬化症 (PAD) の三つに大分され、成因が同じためにこれらは互いに合併し、全身疾患としての認識が必要である。酸化ストレスの関与が心や脳血管の動脈硬化進展へ大きな影響をおよぼすことは徐々に明らかになっているが、PADへの関与については不明な点が多い。d-ROMs テストは全身の酸化ストレスを測る一つの手段である。今回、我々は d-ROMs テストを用いて PAD 患者の酸化ストレスを測定し、それが血行再建によってどのような影響を受けるか検証した。

【方法】25例の間欠性跛行を主訴に、当院で血管内治療 (EVT) を受けた PAD 患者を登録した。術前に足関節上腕血圧比 (ABI) とトレッドミルを用いた最大歩行距離を測定、さらに d-ROMs テストを施行した。3カ月後に再検してその変化を評価した。除外項目は酸化ストレスに影響する透析患者、担癌患者、運動負荷のかけにくい心疾患あるいは呼吸器疾患を持つ患者、歩行能力の低下からトレッドミル負荷試験が受けられない患者、重症虚血肢患者とした。

【結果】登録症例のうち23名 (92%) が男性で平均年齢は73.6±7.14歳であった。EVT 手技は全例成功した。歩行距離は術前109.9±104.2 m で、術後は313.7±271.8 m に改善した (p<0.0001)。ABI は術前0.61±0.15で、術後0.91±0.13に改善した (p<0.0001)。d-ROMs テストは術前472.8±64.8 (U.CARR) で、術後は390.2±46.7と低下した (p<0.0001)。また、d-ROMs テストの改善値と ABI および最大歩行距離の術前後の変化は互いに相関した (P=0.007 r=0.524, P=0.039 r=0.416)。また、d-ROMs テストは術前値が高いほど低下する傾向にあった (P<0.0001 r=0.707)。

【考察】酸化ストレスの動脈硬化性疾患に対する関与は明らかであり、過去にもいくつかの論文から報告がある。それは酸化ストレスにより血中 LDL コレステロールが酸化され、これが動脈硬化性プラークの形成

に關与しているからだと考えられている。しかし、酸化ストレスに主眼をおいた動脈硬化性疾患の治療法や予防法は明らかではない。一方、適度な運動が酸化ストレスを低減させることは次第に明らかになっており、運動療法がもたらす動脈硬化性疾患への影響は今後研究が必要な分野である。PAD 患者において EVT は下肢の血流改善をもたらす、歩行距離の改善や疼痛の軽減をもたらす。本研究でも PAD 患者に対する EVT は ABI、歩行距離の改善をもたらすと同時に酸化ストレスの改善をもたらすことが示された。これは、ABI と歩行距離の改善量と相関し EVT による血流改善がもたらす末梢の代謝的な側面や運動量の増加が影響した可能性が示唆された。EVT はこれまで局所治療という認識があり、生命予後改善効果を明らかにした研究はまだ発表されていない。しかし、PAD は間欠性跛行患者から下腿壊疽に至っている重症虚血肢患者まで幅広く、病勢のステージ間で予後に差がある。本研究は EVT により下肢の症状が改善すれば歩行距離が延びると考えられる病勢ステージが比較的早期の患者を対象にし、その結果歩行距離延長が酸化ストレス改善につながるという結果となった。EVT は局所治療のみならず全身へ影響がある治療であることが示され、結果的に動脈硬化疾患の二次予防に關与することが期待できるのかもしれない。つまり PAD 患者は早期発見・早期治療をすることで、長期予後が期待できるのかもしれないという結論にたどり着いた。

本研究の問題点として、症例数の少なさが挙げられる。これは多施設共同研究などで解決していくべき課題である。また、観察期間が3カ月と短く長期予後の評価をするには不十分であったことも挙げられた。今後は、PAD 患者に対する EVT が酸化ストレス以外のバイオマーカーに与える影響も調べ、そのバイオマーカーと長期予後の関連を調べていく必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

酸化ストレスの関与が心や脳血管の動脈硬化進展へ大きな影響をおよぼすことは徐々に明らかになっているが、閉塞性動脈硬化症への関与については不明な点が多い。d-ROMs テストは全身の酸化ストレスを測る一つの手段である。今回、我々は d-ROMs テスト

を用いて PAD 患者の酸化ストレスを測定し、それが血行再建によってどのような影響を受けるか検証した。

その結果以下の成績を得た。

1. 25例が登録され、そのうち23名(92%)が男性で平均年齢は73.6±7.14歳であった。手技は全例成功し歩行距離は術前、術後で改善を認め、ABIも改善した。
2. d-ROMs テストは術前術後で明らかな改善を認めた。
3. ABIの改善が大きいほど d-ROMs テストの改善値は著明でありこれらは互いに相関した。
4. 最大歩行距離が延び幅が大きいほど d-ROMs テ

ストの改善値は著明でありこれらは互いに相関した。  
5. d-ROMs テストは術前値が高いほど低下する傾向にあった。

本研究で閉塞性動脈硬化症患者に対する血管内治療は ABI, 歩行距離の改善をもたらすとともに酸化ストレスの改善をもたらすことが示された。血管内治療は局所治療のみならず全身へ影響がある治療であることが示され、結果的に動脈硬化疾患の二次予防に関与することができる可能性が示唆された臨床研究であり、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。

### Five-year prognosis after endovascular therapy in claudicant patients with iliofemoral artery disease (腸骨大腿動脈病変を有する跛行患者に対する EVT の 5 年予後検討)

#### 三 浦 崇

##### (論文の内容の要旨)

【背景】 社会の高齢化や生活習慣の変化により動脈硬化性疾患は世界的に増加の一途を示し、中でも閉塞性動脈硬化症患者の増加は著しい。重症下肢虚血患者の自然予後は 1 年死亡率 25%，間欠性跛行患者の 5 年死亡率は 15% であるため、間欠性跛行患者は比較的予後良好と思われがちだが、非閉塞性動脈硬化症患者の 2.5 倍の死亡率を有し、心血管イベントは 3～6 倍である。そうした患者に対して Trans Atlantic Inter-Society Consensus II (TASC II) のガイドラインは経皮的末梢血管形成術 (Endovascular Therapy: EVT) やバイパス手術を推奨しているが、EVT 治療後の跛行患者の長期予後は明らかではない。本研究は EVT 治療後の跛行患者の長期の生命予後と下肢予後を検討した。

【方法】 本研究は多施設、後ろ向き、観察研究で、2005 年 1 月から 2009 年 12 月に全国 18 施設で腸骨動脈領域、大腿膝窩動脈領域に EVT を施行された連続 7177 患者のうち、EVT または下肢バイパス術の既往、重症下肢虚血、再狭窄病変、急性動脈閉塞、Rutherford class I などの患者を除外した 3132 EVT (2930 患者) を登録した。主要エンドポイントは生存率、2 次エンドポイントは主要心血管イベント [major adverse cardiac events: MACE (総死亡、心筋梗塞、脳梗塞)] からの回避と主要心血管下肢イベント [major adverse cardiac and limb events: MACLE (MACE, 患肢の再血行再建、患肢の大切断)] からの回避と定義した。

【結果】 1, 3, 5 年生存率は 97.2%, 90.8%, 83.4%, MACE 回避率は 96.7%, 88.6%, 77.3%, MACLE 回避率は 84.5%, 68.1%, 58.7% であった。腸骨動脈病変を有する患者と浅大腿動脈病変を有する患者の 5 年生存率、5 年 MACE 回避率に有意差は認めなかったが、5 年 MACLE 回避率は浅大腿動脈領域群で有意に低値であった (62.8% vs. 50.4%,  $P < 0.0001$ )。Rutherford 2 群と 3 群でも 5 年生存率、MACE 回避率に有意差はなかったが、MACLE 回避率は前者で有意に高値であった (61.0% vs. 53.9%,  $P < 0.0001$ )。また、TASC II A/B 群と TASC II C/D 群では 5 年生存率に有意差は認めなかった。経過中、243 人の死亡が確認され、心臓死 73 人 (30%)、血管死 31 人 (12.8%) で心血管死は計 104 人 (42.8%) であった。多変量コックス回帰分析では高齢者 (70 歳以上)、透析、低心機能 (EF40% 以下)、インスリン治療中糖尿病、致命的な血腫、冠動脈疾患、腸骨動脈病変と浅大腿動脈病変の合併は総死亡に対する独立規定因子であった。この 7 つの因子を用いて、EVT 後の総死亡に対するリスク層別化を行った。それぞれのハザード比より前 5 つの因子を 2 点、後ろ 2 つの因子を 1 点として合計 0-2 点を低リスク群 1,410 人 (48.1%)、3-5 点を中リスク群 1,406 人 (48.0%)、6 点以上を高リスク群 114 人 (3.9%) と 3 群に層別化した。5 年生存率、5 年 MACE 回避率、5 年 MACLE 回避率はそれぞれ有意に高リスク群で低値であった。(90.1% vs. 78.6% vs. 53.5%,  $P < 0.0001$ , 87.0% vs. 72.3% vs. 52.4%,

$P < 0.0001$ , 65.5 % vs. 50.7 % vs. 32.3 %,  $P < 0.0001$ )

なお、ACEI/ARBs, Ca拮抗薬の内服は総死亡を抑制する側の独立規定因子であった。総死亡の独立規定因子になったEVTの合併症は入院の延長を必要とした血腫のみであり42人に認め、8人が死亡した。これらの患者のうち4人が60日以内に死亡し、全員が血腫関連死であった。

**【考察】**本研究の臨床的意義はEVT治療後の跛行患者の5年生存率は過去に報告されている跛行患者の自然予後と近い結果であったことである。これはQOLの改善を目的としたEVTが生命予後を悪化するものではないことを示唆している。過去の報告ではABIは低値であればあるほど、予後は悪いことが知られている。本研究では跛行症状の重篤度や病変の重症度では総死亡に差はなかったが、低、中、高リスク群のリスク層別化を行うことにより、虚血性イベントハイリスク群が存在することが明らかとなった。このリスク層別化因子は介入不能な患者背景因子であるが、入院を延長するような血腫は唯一、介入が可能な因子である。血腫はほぼ穿刺部出血が原因であり、総大腿動脈穿刺に多かった。高度動脈硬化を有する症例では穿刺部出血が多いが、術中の穿刺部の頻回な確認と穿刺部位の入念な選択が必要である。本研究では死因の42.8%が心血管死と高値であったが、過去の報告では閉塞性動脈硬化症患者の60%に冠動脈疾患か脳血管疾患を合併するとされている。そのため、EVTを受ける患者においては全身動脈硬化性疾患のスクリーニングを行うことが必要と思われる。また、跛行患者へのEVTの目的はQOLの改善であり、歩行距離を増やすことであるが、過去の報告では最大歩行距離の延長やQOLの改善は虚血イベントの抑制と関連があるとされる。また、本研究ではACEI/ARBs, Ca拮抗薬の内服は虚血性イベントを抑制する独立規定因子であった。これらの薬剤は冠動脈疾患の2次予防として認識されているが、閉塞性動脈硬化症患者においても有用な薬剤と思われる。間欠性跛行患者のEVT後の予後改善のポイントは、①合併症からの回避（穿刺部血腫）、②閉塞性動脈硬化症の診断の際に全身動脈硬化スクリーニングを行う、③EVT後の運動療法、④高血圧や脂質異常症へのACEI/ARBs, Ca拮抗薬, スタチンを用いた積極的介入の4つと思われた。

**【結語】**EVTを施行された患者の予後は比較的良好であるが、その中には虚血性イベントを高率に起こす高リスク群が存在する。

### (論文審査の結果の要旨)

間欠性跛行を有する閉塞性動脈硬化症に対しての血行再建術として、Trans Atlantic Inter-Society Consensus II (TASC II)のガイドラインでは経皮的末梢血管形成術(Endovascular Therapy: EVT)やバイパス手術が推奨されている。跛行患者の5年自然予後は15%-30%の死亡率と言われている。EVT後の治療部位の開存率の報告は数多く存在するが、跛行患者に対するEVT治療後の長期予後は明らかではない。本研究はEVT治療後の跛行患者の長期の生命予後と下肢予後を検討した。

その結果以下の成績を得た。

1. 腸骨大腿動脈領域に新規病変を有する間欠性跛行患者に対してEVTを成功した2,930患者(平均年齢 $71.5 \pm 8.9$ , 男性78.7%)を後ろ向きに登録した。
2. 5年生存率は16.6%であった。
3. Cox比例ハザード解析では、高齢者(70歳以上)、透析、低心機能(EF40%以下)、インスリン治療中糖尿病、入院を延長するような血腫、冠動脈疾患、腸骨動脈病変と浅大腿動脈病変の合併は総死亡に対する独立規定因子であった。
4. 上記の独立規定因子からリスク層別化を行うと高リスク群では5年生存率は53.5%と低値であった。
5. 入院を延長するような穿刺部血腫をきたした患者は42人でそのうち8人が死亡した。そのうち4人が60日以内に死亡しすべて血腫関連死であった。

本研究で跛行患者に対するEVT治療後の5年生存率は過去に報告されている跛行患者の自然予後とほぼ同等であることが示された。またEVTにおいて入院を延長するような穿刺部血腫は死亡に関連することが明らかになり、穿刺部の選択や周術期の穿刺部への注意により予後改善の可能性が示唆された臨床研究であり、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。

Effects of hypervolemia by protein and glucose supplementation during aerobic training on thermal and arterial pressure regulations in hypertensive older men (高血圧症の高齢男性における持久性トレーニング中の糖質・蛋白質補助食品摂取が体温と血圧調節能に与える効果)

片岡 由布子

(論文の内容の要旨)

【背景】高齢者の熱中症の発症率はこの10年で急速に増加している。我々は持久性トレーニング+糖質・蛋白質補助食品摂取が血漿量増加を促進し体温調節能を改善することを報告した。しかし、高齢者の60%以上が罹患する高血圧症の患者では、この血漿量の増加が血圧を上昇させることが危惧される。

【目的】高血圧症の高齢男性で持久性トレーニング+糖質・蛋白質補助食品摂取により血漿量が増加し、体温調節能が改善したとき、1)血管コンプライアンスが増加し、心拍数の血圧反射感受性が上昇し、2)血圧はむしろ低下する、という仮説を検証する。

【方法】高血圧症を有する高齢男性(平均年齢69歳、収縮期血圧約160 mmHg、拡張期血圧約90 mmHg)をGlc群(11名)、Pro-Glc群(10名)の2群に無作為にわけ、最大酸素摂取量の60~75%の強度で60分/日、3日/週の頻度で、8週間、自転車を用いて運動トレーニングを実施させた。日々の運動後15分以内にGlc群はブドウ糖25g、Pro-Glc群はブドウ糖15g+蛋白質10gを摂取させた。トレーニング期間前後で血漿アルブミン量(吸光度法)、血漿量(色素法)、血圧(コロトコフ法)を測定した。また、体温調節能を評価するために、気温30℃、相対湿度50%に設定した人工気候室内で、最大酸素摂取量の60%の強度で20分間自転車運動をさせ、その間の食道温(熱電対法)、前腕皮膚血流(プレチスモ法)、発汗速度(カプセル換気法)を測定した。さらに、別途、血圧調節能を評価するために、気温28℃、相対湿度50%に設定した人工気候室内において、安静仰臥位で、頸動脈血管コンプライアンス(超音波ドップラー法)、心拍数(ECG法)の圧反射感受性(バルサルバ法)を測定した。

【結果】運動トレーニング後、Pro-Glc群では、Glc群に比べ、血漿アルブミン量と血漿量の増加が亢進し、運動時の食道温上昇に対する皮膚血管拡張感受性(前腕皮膚血流量/平均血圧)の増加が亢進した(すべて $P<0.05$ )。一方、トレーニング後、Pro-Glc群で、頸動脈血管コンプライアンスの増加、心拍数の圧反射感

受性の改善がおき、血漿量が増加したにも拘らず、動脈血圧は低下した(すべて $P<0.05$ )。

【結論】熱中症予防のために、運動トレーニング+糖質蛋白質補助食品摂取により血漿量を増やす方法は高血圧症の高齢男性にも推奨できる。

(論文審査の結果の要旨)

熱中症死亡者数は65~90歳の高齢者で圧倒的に多く、高齢者の熱中症予防が重要である。我々は持久性トレーニング+糖質・蛋白質補助食品摂取が血漿量増加を促進し体温調節能を改善することを報告した。しかし、65歳以上の高齢者の実に60%以上が罹患する高血圧症では、この血液量の増加が血圧を上昇させることが危惧される。

そこで、高血圧症の高齢男性を対象とし、持久性トレーニング+糖質蛋白質補助食品摂取により血漿量が増加し、体温調節能が改善したとき、1)血管コンプライアンスが増加し、血圧反射感受性が上昇し、2)そのため血圧はむしろ低下する、という仮説を検証した。

高血圧男性21名(平均年齢69歳、収縮期血圧約160 mmHg、拡張期血圧約90 mmHg)をGlc群(11名)、Pro-Glc群(10名)に無作為にわけ、60分/日、3日/週の頻度で、8週間、最大酸素摂取量の60~75%の強度で自転車運動をさせた。日々の運動後15分以内にGlc群はブドウ糖25g、Pro-Glc群はブドウ糖15g+蛋白質10gを摂取させた。トレーニング期間前後5日以内で血漿アルブミン量(吸光度法)、血漿量(色素法)、血圧(コロトコフ法)を測定した。また、体温調節能を評価するために、気温30℃、相対湿度50%に設定した人工気候室内で、最大酸素摂取量の60%の強度で20分間自転車運動をさせ、その間の食道温(熱電対法)、前腕皮膚血流(プレチスモ法)、発汗速度(カプセル換気法)を測定した。さらに、別途、血圧調節能を評価するために、気温28℃、相対湿度50%に設定した人工気候室内において、安静仰臥位で、頸動脈血管コンプライアンス(超音波ドップラー法)、心拍数(ECG法)の圧反射感受性(バルサルバ法)を測定した。

その結果、片岡は次の結果を得た。

- 高血圧症の高齢男性が、持久性トレーニング中、日々の運動直後に糖質・蛋白質補助食品を摂取すると、
1. 対照群に比べ、血漿量、アルブミン量の増加が亢進した。
  2. 対照群に比べ、食道温に対する皮膚血管拡張感受性の増加が亢進した。
  3. 血漿量が増えたにも拘らず、対照群と同様、血圧は安静時、運動時ともに減少した。
  4. 頸動脈コンプライアンスと血圧反射感受性が共に上昇した。

Systemic QX-314 Reduces Bone Cancer Pain through Selective Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1-expressing Primary Afferents in Mice (QX-314 全身投与は、マウスにおいては Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1 を発現している 1 次知覚神経を選択的に抑制することによって骨がん痛を減弱させる)

#### 布施谷 仁 志

##### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】 骨転移などの骨がんによる痛み（骨がん痛）は難治性のがん性疼痛で、オピオイドは骨がん痛には効果が弱く、新たな鎮痛薬・方法の開発が求められている。四級アミン局所麻酔薬である QX-314 は単独投与では鎮痛作用を生じないが、Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1 (TRPV1) が活性化した状態では TRPV1 を介して細胞内に流入し、局所麻酔/鎮痛作用を生じる。われわれの先行研究で、骨がん痛には TRPV1 の活性化が関与することを示した。以上より、QX-314 全身投与は、TRPV1 を発現している 1 次知覚神経を抑制して骨がん痛を減弱させるという仮説を立てた。本研究の目的は、骨がん痛モデルマウスを用いて、QX-314 全身投与の骨がん痛に対する有効性と、その効果が TRPV1 発現神経の選択的抑制によるものかどうかを明らかにすることである。

【方法】 雄性 C3H/HeJ マウス (20-25 g) の左大腿骨に肉腫細胞を注入し、骨がん痛モデルマウスを作製した。QX-314 単回 (0.01- 3 mg/kg) および持続 (5 mg/kg/h) 全身投与の骨がん痛関連行動への効果、および後根神経節細胞での phosphorylated cyclic-adenosine monophosphate response element-binding protein (p-CREB) 発現への効果を調べた。TRPV1 陽性神経脱落が骨がん痛関連行動に及ぼす効果も調べた。

【結果】 QX-314 はコントロールと比較して、単回投

これらの結果により、高血圧症の高齢男性が、熱中症予防のために、運動トレーニング中、日々の運動直後に糖質・蛋白質補助食品を摂取して血漿量を増やしたとしても、血圧は低下した。よって、この熱中症予防法は、健常者はもちろん、高血圧症の高齢者にも推奨できることが明らかとなった。

以上、本論文は、高血圧症の高齢者における熱中症予防法を提案するもので、学術的のみならず社会的意義も高く、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。

与10分後および持続投与24時間、および48時間後において、自発痛関連行動を有意に減らしたが、動作時痛関連行動は改善しなかった。QX-314 はコントロールと比較して、TRPV1 陽性後根神経節細胞の p-CREB 発現の増加を選択的に抑制した。TRPV1 陽性神経脱落は、QX-314 投与の効果と同様に、自発痛関連行動のみを抑制した。

【結語】 骨がん痛モデルマウスにおける QX-314 全身投与は、TRPV1 発現神経を選択的に抑制することによって、自発痛を減弱させた。本研究から、QX-314 が骨がん痛などの TRPV1 が関与する疼痛状態における新たな鎮痛薬となる可能性が示唆された。

##### (論文審査の結果の要旨)

四級アミン局所麻酔薬である QX-314 は、単独投与では鎮痛作用を生じないが、Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1 (TRPV1) が活性化した状態では TRPV1 を介して細胞内に流入し、局所麻酔/鎮痛作用を生じる。TRPV1 は、痛みを伝える A $\delta$  や C 線維に特異的に発現し、触覚を伝える A $\beta$  線維や運動神経には発現していないため、QX-314 は触覚や運動を障害することなく痛みだけを減弱させることができると期待される。ところで、骨転移などの骨がんによる痛み（骨がん痛）は難治性のがん性疼痛で、オピオイドは骨がん痛には効果が弱く、新たな鎮痛薬・方法の開発が求められている。われわれの先行研究で、骨がん痛には TRPV1 の活性化が関与すること

を示した。以上から、QX-314全身投与は、TRPV1陽性1次知覚神経を抑制して骨がん痛を減弱できる、しかも痛覚のみを抑制できる可能性がある。そこで本研究では、QX-314全身投与の骨がん痛に対する有効性と、その効果がTRPV1発現神経の選択的抑制によるものかどうかを検討した。

雄性C3H/HeJマウス(20-25g)の左大腿骨に肉腫細胞を注入し、骨がん痛モデルマウスを作製した。QX-314単回(0.01-3mg/kg)および持続(5mg/kg/h)全身投与の骨がん痛関連行動への効果、および後根神経節細胞でのphosphorylated cyclic-adenosine monophosphate response element-binding protein(p-CREB)発現への効果を調べた。TRPV1陽性神経脱落が骨がん痛関連行動に及ぼす効果も調べた。

その結果、布施谷は次の結論を得た。

1. QX-314はコントロールと比較して、単回投与10分後および持続投与24時間、および48時間後において、自発痛関連行動を有意に減らしたが、動作時痛

関連行動は改善しなかった。

2. QX-314の自発痛関連行動への効果は用量依存性だった。
3. QX-314はコントロールと比較して、TRPV1陽性後根神経節細胞のp-CREB発現の増加を抑制したが、TRPV1陰性後根神経節細胞のp-CREB発現の増加は抑制しなかった。
4. TRPV1陽性神経脱落は、QX-314投与の効果と同様に、自発痛関連行動のみを抑制した。

これらの結果より、骨がん痛モデルマウスにおけるQX-314全身投与は、TRPV1発現神経を選択的に抑制することによって、自発痛を減弱させることが明らかとなった。本研究から、QX-314が骨がん痛などのTRPV1が関与する疼痛状態における新たな鎮痛薬となる可能性が示唆された。

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。

## Sex differences in the serum level of endogenous ligands for estrogen receptor $\beta$ in the elderly population (老年期におけるエストロゲン $\beta$ 受容体内因性リガンドの血清濃度の性差について)

小林 美雪

### (論文の内容の要旨)

【背景】うつ病は女性に多く閉経後にリスクは増大する。動物実験では卵巣除去後のエストロゲン $\beta$ 受容体(ER $\beta$ )選択的リガンド(LY3201, diarylpropionitrile)投与によりトリプトファン水酸化酵素(TPH)の増加、Tph2mRNAの発現増加を認め、うつ病様行動が減少することが示されている。ER $\beta$ 内因性リガンドとして研究が進んでいる5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol(3 $\beta$  Adiol)は5 $\alpha$ -dihydrotestosterone(DHT)から代謝産生される。動物実験により3 $\beta$  Adiolは不安の減少、認知機能強化、抗うつ作用があると考えられている。Androstenediol( $\Delta$ 5-diol)はER $\beta$ に親和性が高くdehydroepiandrosterone(DHEA)から合成される内因性リガンドである。7 $\alpha$ -hydroxydehydroepiandrosterone(7 $\alpha$ -OH-DHEA)はDHEAからcytochromeP450 family 7, subfamily B, polypeptide 1(CYP7B1)を介して産生されるリガンドである。そのER $\beta$ の活性化作用は3 $\beta$  Adiolより弱い、血清中濃度は脳脊髄液中の濃度と相関している。ER $\beta$ 内因性リガンドの閉経後抑うつ予防の可能性が示され

ているが、どのリガンドがうつ病の病態生理と関連しているかは未だ解明されていない。

我々はDHEAから3 $\beta$  Adiol,  $\Delta$ 5-diol, 7 $\alpha$ -OH-DHEAに至る経路である「DHEA-ER axis」に着目し、血清中のこれら3種のER $\beta$ 内因性リガンド、DHEA, E2, ストレス指標としてのコルチゾール(F)の濃度測定を行い、その性差とうつ病罹患の有無による差異を評価した。より侵襲の少ない方法による濃度測定の可否を検討するために、唾液の測定も併せて行った。

【方法】2011年~2014年に51例の男女(65.2 $\pm$ 6.52歳)を対象とした。急性期のうつ病、認知症、軽度認知機能障害、卵巣及び精巣摘除の既往のある例を除外した。神経・精神疾患の既往のない①男性コントロール群(n=12, 65.7 $\pm$ 6.01歳)、②女性コントロール群(n=16, 60.6 $\pm$ 2.42歳)、大うつ病の診断を受け、研究参加時に寛解に至っている③男性うつ病群(n=10, 67.4 $\pm$ 7.38歳)、④女性うつ病群(n=13, 68.8 $\pm$ 6.95)の4群に分けた。③および④群は全例外来治療中であり23例中18例は抗うつ剤投与中であつた。抗う

つ剤はパロキセチン5例, セルトラリン5例, デュロキセチン4例, ミルタザピン2例, エスシタロプラム1例, アミトリプチリン1例であった。うつ病群はいずれも Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder-IV-TR (DSM-IV-TR) により診断されたものである。身長, 体重, body mass index (BMI), 体脂肪率, 腹囲を測定し, 神経心理学的指標は17-item Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D), Beck Depression Inventory II (Beck II), Clinical Dementia Rating (CDR), Mini-Mental State Examination (MMSE), Frontal Assessment Battery (FAB) を用いた。日内変動を考慮して検体は全例午前10時に採取し, 測定を行うまでの間-20℃で冷凍保存した。濃度測定には液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析を用い, 統計解析は StatMate IV for Windows<sup>®</sup> を用いた。すべての統計解析は両側検定で行い, 有意水準は  $p < 0.05$  とした。各群のステロイドの唾液, 血清中濃度の平均値の比較は Kruskal-Wallis H 検定とカイ二乗検定で行った。Kruskal-Wallis H 検定で有意差を認めた場合, 有意差のある群間の多重比較を Dunn 検定で行った。ステロイドの唾液と血清中の濃度の相関を評価する際には Spearman の順位相関係数を用いた。欠損している値は分析から除外した。各群の BMI は Bartlett の等分散検定を行った後 one-way analysis of variance (one-way ANOVA) で比較した。体脂肪率と腹囲は F 検定で等分散検定を行ったのち Welch 検定で比較した。E2, 7 $\alpha$ -OH-DHEA,  $\Delta$ 5-diol, 3 $\beta$  Adiol には定量限界値以下の測定値も含まれた。本研究は信州大学医学部医倫理委員会および小諸高原病院倫理委員会の承認を得ており, 対象者には研究の内容を説明の上, 文書で同意を得た。

**【結果】** 血清では, 3 $\beta$  Adiol,  $\Delta$ 5-diol, E2で男女間に有意差を認めた。この3種のステロイドは血清中で男性が高濃度であった。血清中 DHEA は女性のコントロール群は女性のうつ病群より高値であった。その他のステロイドは男女ともコントロール群とうつ病群には有意差を認めなかった。男性のうつ病群は女性のうつ病群と比較して血清 F が高値であった。

血清と唾液の比較では, DHEA, 7 $\alpha$ -OH-DHEA, F, 3 $\beta$  Adiol は濃度に相関を認めた。ただし唾液中の3 $\beta$  Adiol 濃度は大部分が測定限界値以下であった。 $\Delta$ 5-diol, E2は血清と唾液の相関を認めなかった。

**【考察】** 閉経後に行われる E2投与 (ホルモン補充療法; HRT) の有効性については, 大規模無作為化試

験の Women's Health Initiative (WHI) では HRT の開始時期が重要であるとされたが, 閉経後3年以内に HRT を行った Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS) では治療群とプラセボ群の間で差異はないことが示されるなど未だ議論がある。これらの結果と本研究における女性の3 $\beta$ -Adiol と  $\Delta$ 5-diol の低値も踏まえ, 我々は HRT には3 $\beta$  Adiol や  $\Delta$ 5-diol などの ER  $\beta$  特異的アゴニストの適時投与が必要であると考えた。うつ病群とコントロール群の間で3 $\beta$  Adiol と  $\Delta$ 5-diol の濃度に有意差はなかったが, 本研究ではうつ病群が寛解後であるため, うつ病の急性期では異なる可能性がある。DHEA 濃度は女性ではコントロール群で高値であるが, DHEA の濃度そのものよりも, 強力な DHEA-ER  $\beta$  axis をもつ女性は DHEA からの迅速な3 $\beta$  Adiol と  $\Delta$ 5-diol 産生が可能で, それがつ病予防につながっている可能性がある。DHEA は閉経後うつに対する脆弱性の指標となり得る。

#### (論文審査の結果の要旨)

うつ病は女性に多く閉経後にリスクは増大する。動物実験では卵巣除去後のエストロゲン  $\beta$  受容体 (ER  $\beta$ ) 選択的リガンド (LY3201, diarylpropionitrile) 投与によりトリプトファン酸化酵素 (TPH) の増加, Tph2mRNA の発現増加を認め, うつ病様行動が減少することが示されている。同様に, dehydroepiandrosterone (DHEA) から代謝産生される  $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol (3 $\beta$  Adiol), Androstenediol ( $\Delta$ 5-diol), 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone (7 $\alpha$ -OH-DHEA) の3つのリガンドは ER  $\beta$  選択性が高く閉経後うつ病予防の可能性が示唆されているが, この3種を含めどのリガンドがつ病の病態生理と関連しているかは未だ解明されていない。

そこで小林美雪は DHEA から3 $\beta$  Adiol,  $\Delta$ 5-diol, 7 $\alpha$ -OH-DHEA に至る経路である「DHEA-ER axis」に着目し, 血清中のこれら3種の ER  $\beta$  内因性リガンド, DHEA, E2, ストレス指標としてのコルチゾール (F) の濃度測定を行い, その性差とうつ病罹患の有無による差異を評価した。より侵襲の少ない方法による濃度測定の可否を検討するために, 唾液の測定も併せて行った。

2011年~2014年の期間に急性期のうつ病, 認知症, 軽度認知機能障害, 卵巣及び精巣摘除の既往のある例を除外した51例の男女 (65.2 $\pm$ 6.52歳) を対象とした。神経・精神疾患の既往のない①男性コントロール群 (n=12, 65.7 $\pm$ 6.01歳), ②女性コントロール群 (n

=16, 60.6±2.42歳), 大うつ病の診断を受け, 研究参加時に寛解に至っている③男性うつ病群 (n=10, 67.4±7.38歳), ④女性うつ病群 (n=13, 68.8±6.95) の4群に分けた。③および④群は全例外来治療中であり, 抗うつ剤投与中の症例が18例含まれた。うつ病群はいずれも Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder-IV-TR (DSM-IV-TR) により診断されたものであり, 身長, 体重, body mass index (BMI), 体脂肪率, 腹囲を測定し, 神経心理学的指標は 17-item Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D), Beck Depression Inventory II (Beck II), Clinical Dementia Rating (CDR), Mini-Mental State Examination (MMSE), Frontal Assessment Battery (FAB) を用いた。

その結果, 小林美雪は次の結論を得た。

1. 血清 E2, 3β Adiol, Δ5-diol 濃度は女性よりも男性で高値であり, 明らかな性差が認められた。ただし男女ともコントロール群とうつ病群に有意差はなかった。
2. 血清 DHEA 濃度は性差はなかったが, 女性コン

トロール群と比較して女性うつ病群で低値であった。  
3. 血清中および唾液中の各ステロイドホルモン濃度については測定下限値以下の参考値を多く含むこと, Δ5-diol と E2 で相関を認めなかったことからさらなる方法論の改良を要する。

これらの結果より 3β Adiol, Δ5-diol には性差があり, 大規模無作為試験での E2 単独投与での有用性が示されなかったことを合わせると, この二つのリガンドの閉経後ホルモン補充療法への応用の可能性があることが示唆された。また DHEA は男女ともに大量に有するホルモンであり, 代謝産物の一部は性差がないので, 今回発見した性差は基質の量で規定されているのではなく, より複雑な未知の機序の存在が推測された。これらの結果から女性に多く男性に少ないうつ病の病態生理を考える際には, E2 以外にこれらの新規生理活性ステロイドの研究をしていくことが重要であることが示唆された。本研究はうつ病発症の男女比とその病因に ERβ 選択的リガンドが関与している可能性を示すものであり, 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。

### Automated evaluation system of dermoscopic images of longitudinal melanonychia: proposition of a discrimination index for detecting early nail apparatus melanoma. (爪甲色素線条ダーモスコピー画像の自動評価システム: 早期爪部悪性黒色腫検出のための鑑別指数の提案)

古賀弘志

#### (論文の内容の要旨)

【背景】 爪部メラノーマは日本人におけるメラノーマの9%を占めるが, 早期病変の段階で診断することは難しく一般的に爪部メラノーマの予後は悪い。爪甲に褐色から黒色の縦線が生じる爪甲色素線条は, 早期のメラノーマだけでなく, 爪部の色素細胞母斑などの良性病変でも生じる。爪甲色素線条をダーモスコピー検査によって評価する試みが報告されているが, 色調と形態の違いを医師が判断するダーモスコピー検査は主観的要素が排除できない。デジタルイメージを解析してメラノーマを診断しようとする試みも多数報告されている。しかし, 爪甲色素線条を対象としたデジタルイメージ解析の研究報告はいまだ無い。

【目的】 デジタルダーモスコピー画像を用いた爪甲色素線条の自動解析コンピュータソフト確立に向け, 爪部メラノーマと良性爪甲色素線条の鑑別に有用な鑑別指数を確立する。

【対象と方法】 2005年1月から2008年3月の間に信州大学皮膚科を受診した日本人爪甲色素線条患者31例(表皮内メラノーマ6例, 良性爪甲色素線条25例)について, デジタルカメラで撮影した爪甲のダーモスコピー画像を解析対象とした。メラノーマ症例は全例病理検査で診断を確定した。良性症例は病理検査を行っていないが, その後5年間の経過観察でメラノーマと診断された症例はない。それぞれのデジタル画像について, 爪甲周囲皮膚の色素斑や気泡は除外し, 爪甲のみを解析対象領域とした。デジタルカメラで撮影した画像を構成する各画素(ピクセル)は, それぞれ光の三原色であるRGB(R赤, G緑, B青)の輝度情報を有している。このピクセルごとのRGB輝度情報を, 三次元色ベクトル( $p_i = R_i, G_i, B_i$ )と考え, それぞれのベクトルをR軸, G軸, B軸からなる3次元直交座標(色空間)上にプロットする。爪部メラノーマによる爪甲色素線条に含まれる色の多様性は, この色ベ

クトルの多様性に反映されると考えた。色空間上の色ベクトル  $p_i$  の多様性をさらに明確に示すため、 $p_i$  の緯度  $\theta_i$  と経度  $\phi_i$  を規定した。個々の画素の緯度  $\theta_i$  と経度  $\phi_i$  におけるそれぞれの平均値との差を、平均平方根偏差 root mean square deviation: RMSD として計算し、RMSD をメラノーマ鑑別指数と定義した。表皮内メラノーマ6例、良性爪甲色素線条25例におけるメラノーマ鑑別指数について検討した。

**【結果】** 表皮内メラノーマ6例と良性爪甲色素線条25例のメラノーマ鑑別指数において、メラノーマ群の鑑別指数は良性爪甲色素線条群の鑑別指数よりも高値である傾向が認められた。ノンパラメトリック検定で検討したところ、メラノーマ群の鑑別指数中央値が良性爪甲色素線条群のそれに等しいという帰無仮説は棄却された。メラノーマ鑑別指数の診断性能について ROC カーブを用いて検討した。メラノーマ鑑別指数 = 0.0928 において、感度 100 %、特異度 92 % となった。以上の結果から、本研究で提示したメラノーマ鑑別指数は爪甲色素線条の診断に極めて有用であると考えた。

**【考察】** 本研究で算出した鑑別指数は、より非侵襲的かつ正確な早期爪部メラノーマ検出システムの構築に寄与すると考えられる。このようなシステムの開発により爪部メラノーマの予後改善が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

爪甲色素線条はメラノーマや色素細胞母斑など多彩な疾患によって生じる爪甲の色素沈着である。個々の爪甲色素線条に対する良性悪性を含めた原疾患の診断は医師の臨床経験によるところが大きい。爪部メラノーマである可能性について、客観的診断根拠を得るためには、爪甲色素線条の良性悪性を示す指標の決定

が必要である。本研究では良性悪性を示す指標として爪甲色素線条に含まれる色の多様性に着目し以下の検討を行った。デジタルカメラ JPEG 画像に含まれる画素 (ピクセル) ごとの RGB 情報を、画素ごとの RGB 3次元ベクトルと考え、この3次元ベクトルを2次元平面に投影した際の緯度経度を決定した。デジタル画像全体に含まれる色の多様性がこの画素ごとの緯度経度のばらつきに反映されると考え、数学的手法を用いて緯度経度の平均平方根偏差を計算し、これをメラノーマ鑑別指数と定義した。爪部表皮内メラノーマ6例と良性爪甲色素線条25例の各爪甲色素線条ダーモスコピーデジタル画像からメラノーマ鑑別指数を計算し、2群間で比較検討を行った。

その結果、古賀は次の結論を得た。

1. 表皮内メラノーマ群の鑑別指数は良性爪甲色素線条群の鑑別指数よりも有意に高値となった。
2. メラノーマ鑑別指数による2群の診断性能について検討を行い、メラノーマ鑑別指数 = 0.0928 を閾値とした場合に、表皮内メラノーマに対して感度 100 %、特異度 92 % となった。
3. メラノーマ鑑別指数による2群の診断性能について検討を行い、ROC 曲線を描くと AUC = 0.960 となった。

これらの結果より、爪甲色素線条のデジタルダーモスコピー画像を用いてメラノーマ鑑別指数を算出することは、爪部メラノーマの早期診断に有用であると考えられた。また、本方法は爪甲色素線条の自動解析コンピュータソフトとして臨床応用され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。

Computed tomography-guided bronchoscopy in the diagnosis of small peripheral pulmonary lesions: A retrospective study of 240 examinations in a single academic center (小末梢肺病変の診断における CT ガイド下気管支鏡: 単一の教育施設における240例の後向き研究)

所 弥 生

(論文の内容の要旨)

**【背景・目的】** Computed tomography (以下 CT) の発展と CT 健診によって、X線透視でも見えないような小さい末梢肺病変が発見されるようになった。診断法として従来はX線透視を併用した気管支鏡的生検が行われてきたが、特に20 mm 以下の小末梢肺病変では診断率が低かった。この問題を解決するため、CT ガイド下気管支鏡のような技術が発展してきた。しか

し、病変の大きさ、部位、生検検体数などの CT ガイド下気管支鏡の診断率に関連する因子は未だ十分にかかってはいない。

**【対象及び方法】** 2003年10月から2011年11月の間に当施設にて CT ガイド下気管支鏡を施行された237人の患者の240病変のデータを集積した。CT bronchus sign (以下 CT-BS) (標的とする病変に隣接する、または病変へ入り込む気管支の存在を認めることと定義され

る), 病変の大きさ, 部位, 組織検体の数, 気管支鏡の種類と診断率の関係を後方視的に調べた。

【結果】男性が127人, 女性が110人であり, 平均年齢は $67.0 \pm 10.4$ 歳であった。末梢肺病変の平均径は $15.4 \pm 6.8$  mmであった。negative CT-BSの末梢肺病変の診断率はpositive CT-BSの病変に比べて有意に低かった (2.9 % vs 52.2 % ;  $p < 0.001$ )。その後の解析はpositive CT-BSの病変でのみ行った。positive CT-BSの末梢肺病変では, 左 $S^3$ の診断率がその他の肺区域の診断率と比較して有意に診断率が高かった (83.3 % vs 50.3 % ;  $p < 0.05$ )。病変の大きさは診断率に影響しなかった。肺組織を生検で採取できなかった場合の診断率は, 1個以上採取できた場合に比べて有意に低かった ( $p < 0.01$ )。細径気管支鏡を用いた診断率は他の気管支鏡を用いた場合と比較して有意に高かった (66.0 % vs 47.6 % ;  $p < 0.05$ )。多変量解析では生検組織の数が診断率に影響する最も重要な因子であった。

【考察】我々の研究では, CTガイド下気管支鏡において, positive CT-BSの病変は診断率が有意に高いことを示した。この結果はCTガイド下気管支鏡を行う前にCTによりCT-BSの状態を評価することを強く推奨するものである。一方, Negative CT-BSの末梢肺病変では, CTガイド下気管支鏡以外の(経皮的針吸引生検などの)診断法が推奨される。組織検体が全く無い場合と比較して1個以上の末梢肺組織検体が取られた場合は有意に診断率が高く, また, 生検検体の取得数が診断率を規定する最も重要な因子であった。病変の大きさと診断率の関係では, 20 mm以下の末梢肺病変では従来の気管支鏡検査では診断率は著しく低い, 今回の研究のCTガイド下気管支鏡では, 末梢肺病変の大きさは診断率には影響しなかった。このことから, 先述したpositive CT-BSの病変であれば, 比較的小さい末梢肺病変であってもCTガイド下気管支鏡が良い適応であると考えられる。病変の部位と診断率に関しては, 左肺尖前区域( $S^3$ )は, その他の肺区域よりも高い診断率を示した。これは, 気管支の解剖学的角度により左肺尖後区域よりも左 $B3$ の方がより気管支鏡を進めやすかったことが関係していると思われる。用いた気管支鏡の種類と診断率の関係では, 細径気管支鏡が他のタイプの気管支鏡より高い診断率を示した。極細径気管支鏡の診断率が高いという報告はこれまでもあったが, 細径気管支鏡が高い診断率を示した一因は, 適度な外径が操作性を良好にした点

や, チャンネル径が極細径気管支鏡より大きいことが良好な吸引力を保ち, より多くの組織検体を得ることを可能であったことが関係していると考えられた。

【結論】CTガイド下気管支鏡はpositive CT-BSの末梢肺病変において有用であった。一方でnegative CT-BSの末梢肺病変はCTガイド下気管支鏡の適応から除外すべきである。また, 生検によって組織検体を得ることが末梢肺病変の診断率に影響する重要な因子であった。

#### (論文審査の結果の要旨)

Computed tomography (以下CT)の発展とCT健診によって, X線透視でも見えないような小さい末梢肺病変が発見されるようになった。診断法として従来はX線透視を併用した気管支鏡的生検が行われてきたが, 特に20 mm以下の小末梢肺病変では診断率が低かった。この問題を解決するため, CTガイド下気管支鏡のような技術が発展してきた。しかし, 病変の大きさ, 部位, 生検検体数などのCTガイド下気管支鏡の診断率に関連する因子は未だ十分にわかってはいない。

2003年10月から2011年11月の間に当施設にてCTガイド下気管支鏡を施行された237人の患者の240病変のデータを集積した。CT bronchus sign (以下CT-BS)(標的とする病変に隣接する, または病変へ入り込む気管支の存在を認めることと定義される), 病変の大きさ, 部位, 組織検体の数, 気管支鏡の種類と診断率の関係を後方視的に調べた。

その結果, 所は次の結論を得た。

1. 男性が127人, 女性が110人であり, 平均年齢は $67.0 \pm 10.4$ 歳であった。末梢肺病変の平均径は $15.4 \pm 6.8$  mmであった。
2. Negative CT-BSの末梢肺病変の診断率はpositive CT-BSの病変に比べて有意に低かった (2.9 % vs 52.2 % ;  $p < 0.001$ )。その後の解析はpositive CT-BSの病変でのみ行った。
3. 左 $S^3$ の診断率がその他の肺区域の診断率と比較して有意に診断率が高かった (83.3 % vs 50.3 % ;  $p < 0.05$ )。
4. 病変の大きさは診断率に影響しなかった。
5. 肺組織を生検で採取できなかった場合の診断率は, 1個以上採取できた場合に比べて有意に低かった ( $p < 0.01$ )。
6. 細径気管支鏡を用いた診断率は他の気管支鏡を用いた場合と比較して有意に高かった (66.0 % vs

47.6% ;  $p < 0.05$  )。

7. 多変量解析では生検組織の数が診断率に影響する最も重要な因子であった。

これらの結果より、CTガイド下気管支鏡は positive CT-BS の末梢肺病変において有用であった。この結果はCTガイド下気管支鏡を行う前にCTによりCT-BS の状態を評価することを強く推奨するものである。

一方、negative CT-BS の末梢肺病変はCTガイド下気管支鏡の適応から除外すべきであり、CTガイド下気管支鏡以外の(経皮的針吸引生検などの)診断法が推奨される。また、生検によって組織検体を得ることが末梢肺病変の診断率に影響する重要な因子であったことが示された。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。

## Social health insurance-based simultaneous screening for 154 mutations in 19 deafness genes efficiently identified causative mutations in Japanese hearing loss patients (国民健康保険を基にした日本人難聴患者における難聴原因遺伝子19遺伝子154変異のスクリーニング)

森 健太郎

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】 感音難聴は先天性障害の中で最も頻度の高い疾患の一つであり、新生児500から1,000人に1人に認める。また、先天性難聴患者の原因のうち約半数に遺伝子が関与するとされている。わが国では、2012年にインバーダー法を使用した13遺伝子46変異の難聴原因遺伝子の遺伝学的検査が保険収載された。さらに2015年8月よりインバーダー法と次世代シーケンス法を併用することで、遺伝学的検査による解析対象が19遺伝子154変異に拡張された。今回、日本人難聴患者における19遺伝子154変異の頻度及び診断率、国民健康保険を基にした遺伝学的検査の有用性、2つ以上の異なる難聴の原因遺伝子に認める症例の頻度を明らかにすることを目的に日本人難聴患者717例を対象に解析を行った。

【方法】 日本人難聴患者717例を対象に研究に関する十分な情報提供を行ったのちに書面で同意を得てDNAサンプルを得た。遺伝学的検査として、インバーダー法、次世代シーケンス法、タックマン法を併用し、既知難聴原因遺伝子変異19遺伝子154変異の遺伝子解析を行うとともに、臨床像についても詳細に検討を行った。

【結果と考察】 日本人難聴患者の大規模解析の結果、*GJB2*遺伝子変異を最も高頻度に認め(18.7%, 269/1434アレル)、次いで*SLC26A4*遺伝子変異(5.3%, 76/1434)、*CDH23*遺伝子変異(3.97%, 57/1434)を高頻度に認めた。総アレル頻度は32.6%(468/1434アレル)であった。少なくとも一つ以上の変異を認めた症例の頻度(変異検出率)は44%(316/717例)であった。そのうち、原因診断に至ったのは212例であり、確定診断率は30%(212/717例)であった。また臨床的特

徴と診断率の関係について検討した結果、遺伝形式では常染色体劣性遺伝の家系、難聴の重症度では重度難聴、発症年齢は早期の症例でそれぞれ確定診断率が高かった。これらは*GJB2*遺伝子変異による遺伝性難聴の特徴と合致しており、*GJB2*遺伝子変異を最も高頻度に認めたことを反映していると考えられた。また、難聴の重症度ごとに同定される難聴原因遺伝子の種類に違いを認めた。具体的には、*GJB2*遺伝子変異は軽度難聴から重度難聴まで均等に認めるが、*SLC26A4*、*CDH23*遺伝子変異は高度から重度難聴に認める傾向にあり、一方で*KCNQ4*、mitochondria 遺伝子変異は軽度から中等度難聴に認める傾向にあった。発症年齢についても同様に検討したところ、*GJB2*、*SLC26A4* 遺伝子変異は発症年齢が早期である症例で同定されることが多く、*KCNQ4*、mitochondria、*COCH*、*ACTG1* 遺伝子変異は発症が遅い症例が多かった。今回の検討では従来のインバーダー法と比較し、診断率が約7%向上しており、費用面では、米国の次世代シーケンサーより低コストで行うことが可能であり、診断率、費用面から国民健康保険を基にした日本人難聴患者における19遺伝子154変異のスクリーニングは有用であると考えられた。また、27例(3.8%, 27/717例)に、2つ以上の異なる難聴の原因遺伝子に変異を認め、さらにそのうちの5例(0.7%, 5/717例)に2つ以上の難聴の原因となる遺伝子変異を認めた。異なる複数の遺伝子に変異を認める例では、遺伝子変異の組み合わせが表現型・再発率に影響を与える可能性があるため、遺伝カウンセリングの際、注意する必要があると考えられた。

### (論文審査の結果の要旨)

本邦では、2012年よりインバーダー法を使用した13

遺伝子46変異の難聴原因遺伝子の遺伝学的検査が保険収載されており、さらに2015年8月よりインベーター法に次世代シーケンス法を併用することで、遺伝学的検査による対象が19遺伝子154変異に拡張された。今回森は、日本人難聴患者717例を対象に保険診療の検査と同等の手法で既知難聴原因遺伝子変異（19遺伝子154変異）の網羅的解析を行い、日本人難聴患者における変異の種類と頻度及び診断率、国民健康保険を基にした遺伝学的検査の有用性、2つ以上の異なる難聴の原因遺伝子に認める頻度を詳細に検討した。

その結果は以下の通りであった。

1. 日本人難聴患者における既知難聴原因遺伝子変異（19遺伝子154変異）の総アレル頻度は32.6%（468/1434アレル）であった。
2. 少なくとも一つ以上の変異を認めた頻度（変異検出率）は44%（316/717例）であった。そのうち、難聴の原因遺伝子が同定され、遺伝性難聴と確定診断されたのは212例であり、確定診断率は30%（212/717例）であった。
3. 遺伝形式では常染色体劣性遺伝の家系、難聴の重症度では重度難聴、発症年齢は早期の症例でそれぞれ診断率が高く、GJB2遺伝子変異による遺伝性難

聴の特徴と合致していた。

4. 難聴の重症度、発症年齢によって同定される難聴原因遺伝子の種類が異なることを明らかにした。
5. 今回検討した新しい検査手法は、従来のインベーター法と比較し診断率が約7%向上していた。
6. 費用面について、米国の次世代シーケンサーより低コストで行うことが可能である。
7. 27例（3.8%、27/717例）に、2つ以上の異なる難聴の原因遺伝子に変異を認め、さらにそのうちの5例（0.7%、5/717例）に2つ以上の難聴の原因となる遺伝子変異を認めた。
8. 異なる複数の遺伝子に変異を認める例では、異なる遺伝子変異の組み合わせが表現型・再発率に影響を与える可能性があることを示唆した。

以上より、国民健康保険を基にした日本人難聴患者における19遺伝子154変異のスクリーニングは臨床上有用であると考えられた。また、見いだされる変異の種類や頻度は、臨床像ごとに大きく異なっていることを明らかにしたことは、予後の予測や治療法の選択などに重要な情報として活用可能であることを示した。

したがって主査、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。

Interpretation of the causes of instability of flash visual evoked potential in intraoperative monitoring and proposal of a recording method for reliable functional monitoring of visual evoked potential using a light-emitting device (術中フラッシュVEPの不安定性の理由と信頼性のある機能的視覚誘発電位の記録方法の提案)

## 佐藤 篤

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】脳神経外科手術における機能温存のためには、麻酔環境下での機能的モニタリングが必須となっている。手術中の神経機能評価には、主に誘発電位が応用され、感覚誘発電位、聴性脳幹反応、運動誘発電位などが実用化されている。しかし、視機能の術中評価は非常に困難とされてきている。手術中の視覚誘発電位（VEP）の記録報告は複数報告されているものの、機能的評価との関連の根拠はいまだ不確定である。その理由は、手術中という特殊環境において施術できる視覚的誘発刺激が発光刺激に限局されてしまうことが根本的な原因である。発光刺激による視覚誘発電位はフラッシュVEPと呼ばれ、短時間発光を刺激とする誘発電位であるが、このフラッシュVEPは個体差が多く再現性も低いことから機能的な評価が定

まっておらず、臨床的信頼性は低いものとされている。本論文は発光刺激を根本的に見直し手術中に施術可能でありながら再現性が高く個体差の少ない刺激方法で、なおかつ刺激の入力に相関する反応を見出すことを目指すものである。同時に、なぜ今までフラッシュVEPの誘発電位がうまく評価できなかったか、その不安定性の理由について言及する。

【対象と方法】本研究は全身麻酔での脳神経外科手術を施行した患者のうち、視路に影響を与えない26症例についてデータを得た。刺激方法は、眼瞼上よりダイオードを埋め込んだシリコン発光パッドを装着しこの発光を刺激とする。両耳を基準電極として後頭葉正中から左右対称に1.5 cm 間隔で7極の電極を設置して記録された。加算回数は100回で記録周波数帯域は、0.1 Hz から200 Hz とした。刺激の作成は neurostim-

ulatorにて発光量と時間を調整した。問題解決のためには、発光刺激そのものを見直す必要があると考え、発光を構成する二つの要素、すなわち発光時間と発光強度を変更すること試みた。次いでこの波を構成する要素のうち、一次視覚野由来のものを同定する必要がある。本論文での起源推定方法は一次視覚野が左右対称で後頭葉正中内側面に位置する、という解剖学的特徴を利用し波を構成する要素の頂点間電位の分布が正中を最高とする電位となることを想定して、統計学的に正中からの距離による電位の分布状況を確認し観察点を絞ることとした。

【結果】発光時間を短時間ではなく、長時間に延長した状態での誘発電位を調べたところ、二つの反応、すなわち発光開始時反応 (on response) と発光停止時反応 (off response) が誘発されてきた。その結果いずれの反応波形でも潜時100 ms 周辺の三相波が観察点であるとわかった。この二つの波形は、発光強度を一定に固定して発光時間を100 ms ずつ延長していくと、300 ms 以上の発光時間で分離が明瞭となり、500 ms 以上の刺激時間で off response のみが波形の頂点潜時の個体差が優位に減少した。On response は個体差のばらつきを発光時間の変化によって解消することはできなかった。一方で、発光時間を一定にした状態で発光強度を3段階に変化させたところ、off response においては発光強度が少ないほど潜時個体差が解消され、on response は発光強度が高いほど潜時個体差の縮小が得られた。

【考察】この結果を総括すると、波形の個体差をなくす方法は比較的少ない発光量で500 ms 以上の発光刺激を行うことであり、その際の off response の観察が術中モニタリングに使用可能であるという結論となった。また、短時間発光すなわちフラッシュ刺激は on response と off response が同時に存在している状態である。on response と off response の潜時安定性は光量において相反しているため、発光量を調整しようともフラッシュ刺激である限り不安定性を除去することは出来ないのだ、と推定できる。これが今までのフラッシュVEP が安定しない理由であると考えられた。本文では実際の手術時に視神経障害が加わった際に VEP の潜時の延長と電位の低下が確認されモニターとして有効に機能した症例と、頸動脈内膜剥離を行った際に頸動脈の遮断による網膜血流の低下がやはり潜時延長と電位低下をもたらした症例を実例として示し、その有効性を実証した。

(論文審査の結果の要旨)

発光長を長くすることで二つの視覚刺激由来反応を導くことができる。それぞれを発光時反応 (on response)、消灯時反応 (off response) と命名する。それぞれの反応のうち一次視覚野由来の構成要素を抽出し、それらが光刺激を構成する2要素すなわち発光強度と発光長を調整することで個体差の少ない状態を作り出すことができるかを検討した。

その結果、佐藤は次の結論を得た。

1. 発光長を延長すると二つの反応波が分離されて識別されるようになった。
2. 一次視覚野由来の波は、潜時100 ms 周辺の三相波と確定できた。
3. この波において発光強度と発光長を調整することで潜時個体差を減らすことができる条件が確認された。
4. Off response は発光時間の300 ms 以上で明瞭化し、500 ms 以上で潜時個体差の縮小を見た。
5. 発光強度の調整では off response は発光強度の減少に伴い潜時個体差が縮小したのに対して、on response は発光強度が高いほうが潜時個体差が縮小した。
6. 実症例において視神経に侵襲性のある場面で off response の潜時の延長と電位の低下を認めた。
7. 潜時の延長と電位の低下は発光強度を減量調整することで再現できた。
8. 電位の低下は発光強度10,000 Lx 以下で明瞭化された。

以上より、手術中の視覚モニタリングとしては off response における潜時100 ms の波を観察することが手術中の視覚機能評価につながる。off response の波形変化は入力量に応答して潜時、電位が変化するので潜時の延長、電位の低下は手術中の視路への障害を示唆する。モニタリングを可能とする条件としては、電位刺激強度8,000 Lx、発光長500 ms 程度が至適と考えられた。視路への侵襲を手術中に量的に観察できる方法およびその観察点を示した世界で初めての報告である。発光強度に対する潜時安定性が on response と off response では反対となるため、両者がほぼ同時に出現するフラッシュ刺激では、光強度調整しても安定しえない。これが、フラッシュVEP の不安定性の理由であると推定できる。また、入力に対する量的応答を観察できるこの方法は臨床的診断への応用につながる可能性があり、新しい視覚誘発電位の刺激方法とし

が普及する可能性を持っている。したがって、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。

Functional Magnetic Resonance Imaging Study of Brain Activation by Sound Localization in Artificial Unilateral Hearing Loss (機能的MRIを用いた擬似的な一側性難聴における音源定位に関連する脳賦活領域の検討)

松下 剛

(論文の内容の要旨)

【背景】音源定位とは、両耳の間の音圧差や到達時間の差を利用して音源の位置を特定することである。よって、一側性難聴では音源定位が障害される。音源定位に関連する脳領域として、聴覚野、前運動野、頭頂葉などが報告されているが、左右半球のどちらが優位であるかについては結論が出ていない。健常者では、刺激された耳の対側聴覚野が優位に賦活されるが、慢性期の一側性難聴では両側が賦活されるとの報告がある。これは、中枢神経系の可塑性によると考えられている。音源定位においても、脳の可塑性が回復に寄与している可能性がある。

脳梗塞による手足の麻痺では、脳の可塑性を促すために障害肢のリハビリを行うべきとされている。良好な回復を得るためには、障害された能力に関連した領域を効率的に活動させる必要があると推測される。障害された機能に関連する脳領域を同定することによって、そこを効率的に活動させるためのリハビリを選択できる可能性がある。また、突発性難聴の患者に対して音療法を行い、オーディオグラムや脳磁図を利用して治療効果判定を行った報告がある。それに対して、機能的MRIを用いて、より詳細に治療効果を判定できる可能性がある。それゆえに、治療前の急性期一側性難聴を想定して脳賦活領域を評価することは有用と考えられる。

【目的】機能的MRIを用いて、耳栓による擬似的な一側性難聴下の音源定位に関連する脳賦活部位を明らかにする。

【方法】健常ボランティア(16名)を対象とし、耳栓を用い右難聴群(8名)と左難聴群(8名)とした。3T MRI装置を用い、機能画像は、TR 10秒、データ取得時間2.5秒とした。刺激音は左右の振幅の割合の異なる2000 Hzの純音で、ブロックデザインを用い、タスク(30秒間)では刺激音を2秒ごとに呈示した。レスト(30秒間)は無音とした。タスクとレストを8セット行い1セッションとした。正常聴力状態で実験

を行った後、耳栓を装着し一側性難聴状態の実験を行った。Statistical Parametric Mappingを用いて、正常聴力状態と一側性難聴状態における賦活部位を検討した。評価する領域は主として聴覚野の存在するHeschl回と上側頭回を併せた領域とした。さらに、MarsBaR toolbox for SPMを用いて関心領域の% signal changeを算出し、左右半球の優位性を評価した。Laterality index (LI)を算出し、耳栓装着後の左右半球優位性の移動を評価した。LIとは、 $LI = (LH - RH) / (|LH| + |RH|)$ の数式で算出される値で、正值であれば左半球優位、負値であれば右半球優位となる(LH, RHはそれぞれ左半球、右半球の関心領域の% signal change)。Wilcoxon signed rank testで有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を統計学的有意とした。個人ごとのLIの耳栓装着後の変化も検討した。加えて、一次聴覚野であるブロードマン41野(BA41)と42野(BA42)を併せた領域も評価した。

【結果】一側性難聴状態では、音源定位課題において、難聴耳と同側半球に賦活を認めた。Heschl回と上側頭回を併せた領域の検討では、右難聴群の一側性難聴状態では右半球の% signal changeが有意に高値であった( $p = 0.0234$ )。左難聴群の正常聴力状態では左半球の% signal changeが有意に高値であった( $p = 0.0234$ )。LIは、右難聴群で耳栓装着後に有意に低下した( $p = 0.0078$ )。左難聴群では耳栓装着前後で有意差を認めなかった。個人ごとの解析では、左右半球の優位性が耳栓装着後に右側に移動する傾向を認めた。BA41とBA42を併せた領域の検討では、右難聴群の一側性難聴状態で、右半球の% signal changeが有意に高値であった( $p = 0.0156$ )。左難聴群では、正常聴覚状態( $p = 0.0156$ )、一側性難聴状態( $p = 0.0142$ )ともに、右半球の% signal changeが有意に高値であった。LIは、2群とも、耳栓装着前後の比較で有意差を認めなかった。

【考察】Heschl回と上側頭回を併せた領域において、% signal changeが耳栓装着後に右優位となる領域が

存在すると考えられた。一般的に、タスク困難度が高くなるにつれて、注意効果が増加する。特徴的な刺激音に関連した領域が、タスクの困難度の上昇に伴って右半球優位となって賦活された可能性があり、側頭葉においては音源定位に関連する領域は右優位であると考えられた。

【結論】 擬似的一側性難聴では、音源定位課題において、難聴耳と同側の Heschl 回と上側頭回に賦活を認めた。音源定位に関連する領域が右優位である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

一側性難聴では音源定位が障害される。音源定位に関連する脳領域として、聴覚野、前運動野、頭頂葉などが報告されているが、左右半球のどちらが優位であるかについては結論が出ていない。障害された機能に関連する脳領域を同定することによって、そこを効率的に活動させるためのリハビリを選択できる可能性がある。また、突発性難聴患者においてオーディオグラムや脳磁図を用いて治療効果判定を行った先行研究があり、機能的 MRI でも判定できる可能性がある。そこで、松下は治療前の急性期一側性難聴を想定し、機能的 MRI を用いて、耳栓による擬似的な一側性難聴下の音源定位に関連する脳賦活部位を検討した。

その結果、以下の成績を得た。

1. 一側性難聴状態では、音源定位課題において、難聴耳と同側の Heschl 回と上側頭回に有意な賦活を認めた。

2. Heschl 回と上側頭回を併せた領域の検討では、右難聴群の一側性難聴状態で右半球の % signal change が有意に高値であり、左難聴群の正常聴力状態で左半球が有意に高値であった。Laterality index (LI) は、右難聴群で耳栓装着後に有意に低下し、左難聴群では耳栓装着前後で有意差を認めなかった。個人ごとの解析では、左右半球の優位性が耳栓装着後に右側に移動する傾向を認めた。課題の困難度が増すとそれに関連した脳領域の賦活が増強するとの報告があり、耳栓装着後に右半球の信号変化が増加したことから、音源定位の困難度の増加に伴ってそれに関連した領域の賦活が強くなったとするならば、音源定位に関連する領域は右優位に存在すると考えられた。

3. ブロードマン41野 (BA41) と42野 (BA42) を併せた領域の検討では、右難聴群の一側性難聴状態で右半球の % signal change が有意に高値であり、左難聴群では正常聴覚状態と一側性難聴状態で右半球が有意に高値であった。LI は、2 群とも耳栓装着前後の比較で有意差を認めなかった。

以上より、急性期を想定した擬似的な一側性難聴では、音源定位課題において、難聴耳と同側の Heschl 回と上側頭回に有意な賦活を認めた。耳栓装着による % signal change の変化には、左右の非対称性が見られ、音源定位に関連する領域が右優位に存在す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。

Caloric restriction reduces the systemic progression of mouse AApoAII amyloidosis (摂取カロリー制限はマウス AApoAII アミロイドーシスの全身での進行を抑制する)

李 琳

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 アミロイドーシスとは、蛋白質がβシートに富んだ病的構造に変化して微細な線維 (アミロイド線維) を形成し、主として細胞外に沈着して組織に障害を与える疾患の総称である。アルツハイマー病や老人性全身性アミロイドーシスなど、多くのアミロイドーシスは高齢者に高頻度に発症する老化関連疾患でもあり、また、共通した病態が多いことから、動物モデルを用いた治療・予防法の開発が有効かつ重要であると考えられている。マウス老化アミロイドーシスでは、血清高密度リポ蛋白質 (HDL) のアポリポ蛋白質 A-II (ApoA-II) が加齢に伴ってアミロイド

線維 (AApoAII) を形成し、全身臓器に沈着する。マウス AApoAII アミロイドーシスでは、微量のアミロイド線維を投与すると、確実かつ定量的にアミロイド線維の沈着を誘発 (伝播) できるため、アミロイドーシスの治療・予防法の評価やメカニズムを解析するための有用なモデルシステムである。摂取カロリー制限 (CR) はマウスなど多くの動物で老化や様々な老化関連疾患の進行を抑制する処方としてよく知られており、アルツハイマー病モデルマウスでも病態進展の改善作用があることが報告されている。本研究では、AApoAII アミロイドーシスに対する CR のアミロイドーシス抑制効果とそのメカニズムについて解析した。

【方法】8週齢の雌 R1.P1-*Apoa2*<sup>-/-</sup> マウスを自由摂餌群 (AL 群) と CR 群の2群に分け、CR 群では AL 群の摂餌量の90%を1週間、翌週に75%を1週間与え、その後、60%のCRを16週間実施した。AL 群では普通飼料 (MF, オリエンタル酵母) を自由摂取させ、摂餌量を毎週測定した。CR 群への給餌は毎日実施した (土曜のみ2日分を給餌)。60%CR 開始時にアミロイド線維 (1  $\mu$ g/匹) を投与してアミロイドーシスを誘発した2群 (AL+F 群, CR+F 群) と PBS を投与した非誘発群の2群 (AL+V 群, CR+V 群) の合計4群に分けた。毎週月曜に体重を測定し、外傷や瘦、異常行動などの有無を確認した。60%CR16週間後の代謝指標 (空腹時血糖値, ブドウ糖負荷耐性, 心拍数, 血圧, 血漿 HDL および総コレステロール, 血漿トリグリセリド濃度, 血漿 ApoA-I および ApoA-II 濃度) を測定した。各臓器および全身のアミロイド線維の沈着程度を測定した。肝臓の *Apoa1*, *Apoa2* と、炎症, 酸化ストレス, ミトコンドリア機能, 小胞体ストレスに関連する各遺伝子の mRNA 発現レベルを real time PCR 法で解析した。

【結果と考察】AL+F 群と比較して、CR+F 群では肝臓, 舌, 小腸と皮膚の AApoAII アミロイド沈着が有意に抑制され、全身のアミロイド沈着程度 (Amyloid Index: AI) も有意に減少した。CR は成長期のマウスの体重増加の抑制を引き起こし、糖代謝を改善し、また、血漿 ApoA-II 濃度を減少させた。肝臓を用いた分子生物学的な解析により、CR が炎症反応を抑制し、アミロイド沈着によって引き起こされた小胞体ストレス応答や酸化ストレス反応も改善することを示唆した。さらに、CR は Sirtuin 1-Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (SIRT1-PGC-1 $\alpha$ ) 経路の活性化によってミトコンドリア機能を改善することも示唆した。CR は AApoAII アミロイド沈着を抑制し、その抑制メカニズムとして、原因蛋白質 ApoA-II の循環量の減少が考えられ、さらに、多様な生体反応の改善が関与することを示唆した。これらの結果は、CR がアミロイドーシス、特に血漿蛋白質が沈着する全身性のアミロイドーシスの発症や病態進行を抑制する効果的な処方である可能性を示している。アミロイドーシスに対する CR の効果の解析は、アミロイドーシスの発症要因を明らかにし、効果的な治療・予防法の開発への有用な情報を与えると考えている。

### (論文審査の結果の要旨)

アミロイドーシスとは生理的蛋白質が変性してアミロイド線維に重合、沈着し、組織障害を引き起こす疾患群である。マウスでは加齢に伴い、血漿高密度リポ蛋白質 (HDL) のアポ蛋白質である ApoA-II がアミロイド線維 (AApoAII) を形成し沈着する。マウス AApoAII アミロイドーシスでは、微量のアミロイド線維を投与すると、确实かつ定量的にアミロイドーシスを誘発 (伝播) できるため、アミロイドーシスの治療・予防法の評価するための有用なモデルシステムである。摂取カロリー制限 (CR) はマウスなど多くの動物で老化や老化関連疾患の進行を抑制する処方としてよく知られており、アルツハイマー病モデルマウスでも病態進展の改善作用があることが報告されている。

これらの知見に基づき、本研究では、アミロイド線維を投与して、AApoAII アミロイドーシスを誘発した R1.P1-*Apoa2*<sup>-/-</sup> マウスへ、60%CR を16週間実施することによって、アミロイドーシスに対する CR の抑制効果とそのメカニズムについて解析した。

その結果、李 琳は、次の結論を得た。

1. アミロイド沈着程度: CR によって肝臓, 舌, 小腸と皮膚の AApoAII アミロイド沈着が有意に抑制され、全身のアミロイド沈着程度 (Amyloid Index: AI) は有意に減少した。
2. 体重, 血圧等の身体変化: CR は成長期の体重増加を有意に抑制したが、心拍数や血圧には影響しなかった
3. 血液生化学指標 (空腹時血糖値, 耐糖能, 脂質量) の評価: CR は空腹時血糖値を減少させ、耐糖能の解析から、糖代謝を改善する可能性が示された。
4. 血漿および肝臓における ApoA-I と ApoA-II 量の変化: CR は肝臓での ApoA-II の遺伝子発現には影響しなかったが、ApoA-II 蛋白質の循環量を減少させることが考えられた
5. 作用メカニズムの解析 (肝臓での各種遺伝子群の発現量変化): CR は肝臓における炎症や酸化および小胞体ストレス応答反応, ミトコンドリア機能を改善すると考えられた。オートファジー機能に関しては変化が認められなかった。

以上の結果により、CR は AApoAII アミロイドーシスの全身レベルでの進行を抑制することが可能であることが明らかになった。抑制メカニズムとして、アミロイド蛋白質である ApoA-II の循環量の減少が主な要因であること、また、多様な生体反応の改善も関

#### 審査学位論文要旨

与する可能性が明らかになった。

以上より、CRがアミロイドーシス、特に血漿蛋白質が沈着する全身性のアミロイドーシスの発症や病態進行を抑制する効果的な処方であること明らかになった。アミロイドーシスに対するCRの効果の解析は、

アミロイドーシスの発症要因を明らかにし、効果的な治療・予防法の開発への有用な情報を与えると考えられる。

したがって、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。

---