

## 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	授与年月日	博士論文名	学位審査委員	
				主査	副査
小林秀樹	甲第1252号	R 3. 3.31	Association between Inter-atrial Septum motion and Persistent Atrial Fibrillation Recurrence after Catheter Ablation (心房中隔運動とカテーテルアブレーション後の持続性心房細動再発の関連性)	山田充彦	柴 祐司 瀬戸達一郎
植木康志	甲第1253号	R 4. 3.31	Comparison of leg loader and treadmill exercise for evaluating patients with peripheral artery disease (末梢閉塞性動脈硬化症患者におけるレグローダとトレッドミル負荷の診断能の比較)	柴 祐司	杠 俊介 瀬戸達一郎
井出裕一郎	甲第1254号	R 4. 3.31	Relationship between allergic sensitization-associated single-nucleotide polymorphisms and allergic transfusion reactions and febrile non-hemolytic transfusion reactions in pediatric cases (小児患者における ATR および FNHTR とアレルギー関連 SNPs との関係)	栗田 浩	花岡正幸 上原 剛 井上克枝
山崎聖子	甲第1255号	R 2. 9.30	Ventricular myocardial response to exercise in patients with Fontan circulaiton (フォンタン循環患者における運動負荷に対する心室心筋の反応)	中沢洋三	桑原宏一郎 山田充彦
五十嵐佑一	甲第1256号	R 3. 3.31	Glavonoid-rich oil supplementation reduces stearoyl-coenzyme A desaturase 1 expression and improves systemic metabolism in diabetic, obese KK-A <sup>y</sup> mice (グラボノイドリッチオイルはステアロイル-コエンザイム A 不飽和化酵素 1 の発現を減少させ, 糖尿病・肥満モデル KK-A <sup>y</sup> マウスの全身的代謝を改善する)	田中直樹	増木静江 竹下敏一
小松雅宙	甲第1257号	R 4. 3.31	The utility of serum C-C chemokine ligand 1 in sarcoidosis: A comparison to IgG4-related disease (サルコイドーシスにおける血清 CCL1 の有用性: IgG4関連疾患との比較)	桑原宏一郎	梅村武司 小泉知展 松井祥子
梶原 稜	甲第1258号	R 4. 3.31	Water intake releases from enterochromaffin cells in rat jejunal villi (飲水によるラット空腸壁のエンテロクロマフィン細胞からのセロトニン分泌機構)	栗田 浩	梅村武司 中山 淳 各務秀明
WEI YANGXUAN	甲第1259号	R 3. 9.30	Adrenomedullin ameliorates pulmonary fibrosis by regulating TGF- $\beta$ -Smads signaling and myofibroblast differentiation (アドレノメデュリンは, TGF- $\beta$ -Smads 経路と筋線維芽細胞の分化を調節することにより, 肺線維症を改善する)	菅野祐幸	田渕克彦 柴 祐司

審査学位論文要旨

赤羽順平	甲第1260号	R 4. 3.31	Blood urea nitrogen-to-serum albumin ratio and A-DROP are useful in assessing the severity of <i>Pneumocystis</i> pneumonia in patients without human immunodeficiency virus infection (血中尿素窒素 / 血清アルブミン比および A-DROP はヒト免疫不全ウイルス感染のない患者のニューモシスチス肺炎の重症度を評価するために有用)	関島良樹	今村 浩 小泉知展 菊池利明
田中竜介	甲第1261号	R 3. 9.30	The histamine H1 receptor antagonist hydroxyzine enhances sevoflurane and propofol anesthesia: A quantitative EEG study (ヒスタミン H1受容体拮抗薬であるヒドロキシジンはセボフルラン及びプロポフォールの麻酔作用を増強する: 定量的脳波研究)	関島良樹	鷺塚伸介 田淵克彦
柏木大輔	甲第1262号	R 4. 3.31	Prognostic usefulness of residual SYNTAX score combined with clinical factors for patients with acute coronary syndrome who underwent percutaneous coronary intervention from the SHINANO Registry (急性冠症候群に経皮的冠動脈形成術を施行した症例に対して残存 SYNTAX スコアと他の臨床因子を複合させた新規スコアの長期予後予測評価としての有用性)	瀬戸達一郎	柴 祐司 増木静江 川井 真
由井寿典	甲第1263号	R 4. 3.31	Impact of changes in body mass index after percutaneous coronary intervention on long-term outcomes in patients with coronary artery disease (経皮的冠動脈形成術後の BMI 変化が冠動脈疾患患者の長期予後に与える影響)	駒津光久	瀬戸達一郎 山田充彦 川井 真
小野真由	甲第1264号	R 3. 9.30	The mechanisms involved in the resistance of estrogen receptor-positive breast cancer cells to palbociclib are multiple and change over time (エストロゲン受容体陽性乳癌細胞のバルボシクリブ耐性機序は複数あり経時的に変化する)	平塚佐千枝	塩沢丹里 古庄知己
MOATAZ ABDALLA MOHAMED AHMED BADAWI	甲第1265号	R 4. 3.31	Risperidone mitigates enhanced excitatory neuronal function and repetitive behavior caused by an ASD-associated mutation of SIK1 (SIK1の ASD 関連変異によって引き起こされた興奮性神経機能と反復行動はリスペリドンによって軽減される)	新藤隆行	沢村達也 鷺塚伸介 杉田修三
小川洋平	甲第1266号	R 4. 3.31	Prevalence of latent tuberculosis infection and its risk factors in Japanese hemodialysis patients (日本の血液透析患者における潜在性結核感染症の有病率とそのリスク因子について)	花岡正幸	石塚 修 梅村武司 今田恒夫

審査学位論文要旨

丸山周作	甲第1267号	R 4. 3.31	Impact of nutritional index on long-term outcomes of elderly patients with coronary artery disease : sub-analysis of the SHINANO 5 year registry (冠動脈疾患を伴う高齢患者の長期予後に関する栄養指標の影響 : SHINANO レジストリー5年間のサブ解析)	今村 浩	駒津光久 柴 祐司 川井 真
MAUREEN TANIA WIDYASAPUTRA	甲第1268号	R 4. 3.31	Increased expression of secreted protein acidic and rich in cysteine and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 in epidermotropic melanoma metastasis (悪性黒色腫の表皮向性転移における, secreted protein acidic and rich in cysteine および tissue inhibitor of metalloproteinase-3の発現増強)	菅野 祐幸	藤永康成 竹下敏一 岩 潤徳郎
池田 淳司	甲第1269号	R 4. 3.31	Cerebrospinal fluid biomarkers implicated in the pathogenesis of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-related hypertrophic pachymeningitis (ANCA 関連肥厚性硬膜炎の病態に係る脳脊髄液のバイオマーカー解析研究)	工 穰	福島菜奈恵 矢崎正英 中島 一郎
市川 貴規	甲第1270号	R 4. 3.31	The implication of interferon- $\gamma$ -producing immunocompetent cells for evaluating disease activity and severity in adult-onset Still's disease (成人スチル病における IFN- $\gamma$ 産生免疫担当細胞の疾患活動性および重症度への関連解析研究)	梅村 武司	瀧 伸介 矢崎正英 向井知之
青村 大輝	甲第1271号	R 4. 3.31	Pemafibrate Protects against Fatty Acid-Induced Nephropathy by Maintaining Renal Fatty Acid Metabolism (ペマフィブラートは、腎臓の脂肪酸代謝を保持することにより、脂肪酸負荷による腎障害を軽減する)	山田 充彦	菅野 祐幸 梅村 武司 長谷川 元
千葉 一平	甲第1272号	R 4. 3.31	Difference in sarcopenia characteristics associated with physical activity and disability incidences in older adults (高齢者の障害発生と身体活動量の関連 —サルコペニアの状態による違い—)	沢村 達也	香山 瑞恵 関島 良樹 牧迫 飛雄馬
野沢 修平	甲第1273号	R 4. 3.31	The positional characteristics of patients with obstructive sleep apnea : a single institute retrospective study in Japan (閉塞性睡眠時無呼吸症候群における睡眠体位の特徴 : 日本人を対象とした単施設の後向き研究)	鷺塚 伸介	工 穰 小泉 知展 小賀 徹
若林 諒	甲第1274号	R 4. 3.31	Efficacy of stylet angulation at the holding position during tracheal intubation with a video-laryngoscope : a randomized controlled trial (ビデオ喉頭鏡を使用した気管挿管における気管チューブ保持部位でのスタイレット屈曲の有効性 : ランダム化比較試験)	川真田樹人	工 穰 今村 浩

審査学位論文要旨

齊藤 徹一	甲第1275号	R 3. 9.30	Time-dependent progression of neurogenic lower urinary tract dysfunction after spinal cord injury in the mouse model (脊髄損傷マウスにおける神経原性下部尿路障害の経時的変化)	高橋 淳	関島良樹 堀内哲吉
CUI XIAORAN	甲第1276号	R 3. 9.30	Exercise suppresses mouse systemic AApoAII amyloidosis through enhancement of the p38 MAPK signaling pathway (運動は p38 MAPK シグナル経路の増強を介してマウス AApoAII アミロイドーシスを抑制する)	増木 静江	竹下敏一 関島良樹
高坂美恵子	甲第1277号	R 4. 3.31	Biokinetic Evaluation of Contrast Media Loaded Carbon Nanotubes Using a Radiographic Device (造影剤を中空内に担持したカーボンナノチューブによる X線撮影装置を用いた体内動態評価)	高橋 淳	柴 祐司 竹内あかり 大神 明
RIDZKY FIRMANSYAH HARDIAN	甲第1278号	R 4. 3.31	Intraoperative Facial Motor Evoked Potential Monitoring for Pontine Cavernous Malformation Resection (橋海綿状血管腫摘出における術中顔面運動誘発電位モニタリングの有用性)	鷺塚 伸介	関島良樹 田 潤克彦 田中雄一郎
石田 悠	甲第1279号	R 4. 3.31	In Vitro and In Vivo Evaluation of Starfish Bone-Derived $\beta$ -Tricalcium Phosphate as a Bone Substitute Material (ヒトデ骨由来 $\beta$ リン酸三カルシウムの骨補填材としての In Vitro, In Vivo 評価)	高橋 淳	栗田 浩 森山 徹 松田佳和
柴田有亮	甲第1280号	R 3. 3.31	Changes in serum uric acid levels as a predictor of future decline in renal function in older adults with type 2 diabetes (高齢2型糖尿病患者における血清尿酸値の変化は腎機能低下の予測因子となりうる)	桑原宏一郎	石塚 修 田中直樹
岩川 紘子	甲第1281号	R 4. 3.31	Magnetic resonance imaging of diffusion characteristics following collagenase clostridium histolyticum injection in Dupuytren's contracture (デュピュイトラン拘縮におけるコラゲナーゼ注射後の MRI 画像変化)	杠 俊介	内藤隆文 福島菜奈恵
LIU CHANG	甲第1282号	R 4. 3.31	Involvement of increased endoplasmic reticulum stress in the development of cataracts in BALB.NCT- <i>Cpox<sup>net</sup></i> mice (BALB.NCT- <i>Cpox<sup>net</sup></i> マウスの白内障発症に対する小胞体ストレスの亢進の関与)	田 潤克彦	田中直樹 柴 祐司 横井伯英
上野 晃弘	甲第1283号	R 4. 3.31	Therapeutic Outcome of Lenalidomide-dexamethasone in Patients with Relapsed or Refractory Systemic Immunoglobulin Light Chain (AL) Amyloidosis: A Single-center Analysis and Review of the Literature (再発・難治性の全身性免疫グロブリン軽鎖 (AL) アミロイドーシス患者におけるレナリドミドとデキサメタゾンの治療成績—単施設解析と文献レビュー—)	小泉 知展	中沢洋三 田中直樹

審査学位論文要旨

園田光佑	甲第1284号	R 3. 3.31	Relationship between Glomerular Number in Fresh Kidney Biopsy Samples and Light Microscopy Samples (新鮮腎生検検体の糸球体数と光顕標本の糸球体数の関連)	田中直樹	上原 剛 梅村武司
竹田 哲	甲第1285号	R 3. 3.31	Prediction of pulmonary artery-adherent lymph nodes for minimally invasive lung resection (低侵襲肺切除術における肺動脈浸み込みリンパ節の予測)	花岡正幸	伊藤研一 藤永康成
平松 憲	甲第1286号	R 3. 3.31	Prevalence and Clinical Characteristics of Hearing Loss Caused by MYH14 Variants (MYH14 遺伝子変異による難聴の有病率と臨床的特徴)	古庄知己	関島良樹 工 穰
鈴木 中	甲第1287号	R 4. 3.31	The combination of $\alpha 1$ -adrenergic receptor antagonist and phosphodiesterase 5 inhibitor mitigates cold stress-induced detrusor overactivity through resineratoxin-sensitive nerves in bladder outlet obstructed rats (下部尿路閉塞ラットの冷えストレス誘発排尿筋過活動に対する $\alpha 1$ 交感神経受容体遮断薬とホスホジエステラーゼ5阻害薬の併用によるレジニフェラトキシン感受性求心性神経を介した抑制機序)	梅村武司	村田敏規 栗田 浩 齋藤源顕
川上史裕	甲第1288号	R 3. 3.31	T cell clonal expansion and <i>STAT3</i> mutations: A characteristic feature of acquired chronic T-cell mediated pure red cell aplasia (T細胞が介在する後天性慢性赤芽球癆の特徴: T細胞のクローン性増殖と <i>STAT3</i> 変異の検討)	中沢洋三	小泉知展 梅村武司
夏目岳典	甲第1289号	R 3. 3.31	High Incidence of Hippocampal Abnormalities in Pediatric Patients with Congenital Cytomegalovirus Infection (先天性サイトメガロウイルス感染症では海馬の構造異常が高率で発生する)	中沢洋三	古庄知己 福島菜奈恵
田名部はるか	甲第1290号	R 4. 3.31	Sex differences in serum levels of $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ , $17\beta$ -diol, and androstenediol in the young adults: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry study (若年成人における $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ , $17\beta$ -diol と androstenediol の血清濃度の性差について: 液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) 法を用いた研究)	塩沢丹里	駒津光久 野見山哲生 松尾幸治
柳沢俊光	甲第1291号	R 3. 3.31	Survey of hospitalization for respiratory syncytial virus in Nagano, Japan (長野県におけるRSウイルス入院患者の調査)	中沢洋三	竹下敏一 古庄知己
甘利 景	甲第1292号	R 4. 3.31	Portal blood flow-dependent NO-mediated lymph formation in rat jejunum (ラット門脈血流に依存した一酸化窒素 (NO) を介するリンパ産生機構)	栗田 浩	山田充彦 浅村英樹 各務秀明

審査学位論文要旨

渡邊達夫	甲第1293号	R 3. 3.31	Follow-up System for Childhood Cancer Survivors Via Germline Clinical Sequencing (小児がん経験者に対する生殖細胞系列のクリニカルシーケンスを用いたフォローアップシステム)	小泉知展	関島良樹 工 穰
結城淳子	甲第1294号	R 4. 3.31	Glycosylation of MUC6 by $\alpha$ 1,4-linked <i>N</i> -acetylglucosamine enhances suppression of pancreatic cancer malignancy ( $\alpha$ 1,4結合型 <i>N</i> -アセチルグルコサミンによる MUC6の糖鎖修飾は膵癌の悪性化抑制効果を増強させる)	平塚佐千枝	田中直樹 杠 俊介 三善英知
長谷川航平	甲第1295号	R 4. 3.31	Short-Term Associations of Ambient Fine Particulate Matter (PM <sub>2.5</sub> ) with All-Cause Hospital Admissions and Total Charges in 12 Japanese Cities (日本の12都市における大気中微小粒子状物質 (PM <sub>2.5</sub> ) と全要因による入院件数および入院医療費との短期的関連)	花岡正幸	柴 祐司 鷲塚伸介 菅沼成文
師川絃一	甲第1296号	R 4. 3.31	Autologous non-human primate model for safety assessment of piggyBac transposon-mediated chimeric antigen receptor T cells on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (ピギーバック・トランスポゾン法を用いて作製した GMR CAR-T 細胞の安全性評価のための自家霊長類モデル)	柴 祐司	清水公裕 米倉真一 犬飼岳史

審査学位論文要旨

氏名	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
山浦 洵	甲第42号	R 3. 3.31	Altered Serum Lysophosphatidylethanolamine Species Profile in Patients with Autoimmune Pancreatitis (自己免疫性膵炎患者における、血清リゾホスファチジルエタノールアミン分子種組成)	矢崎正英	石田文宏 松田和之
木下 愛未	甲第43号	R 4. 3.20	Effectiveness of an Aggression Management Training Program in Japan: A Quasi-Experimental Study (日本における攻撃性マネジメント研修プログラムの効果：準実験研究)	會田信子	杉山暢宏 下里誠二 田中留伊
林 航	甲第44号	R 4. 3.20	Genomic characterisation and epidemiology of nosocomial <i>Serratia marcescens</i> isolates resistant to ceftazidime and their plasmids mediating rare blaTEM-61 (医療関連感染事例由来セフトジジム耐性 <i>Serratia marcescens</i> の全ゲノム解析による blaTEM-61保有プラスミド伝播事象の解明)	松田和之	長野則之 樋口由美子 中野竜一

Association between Inter-atrial Septum Motion and Persistent Atrial Fibrillation Recurrence after Catheter Ablation (心房中隔運動とカテーテルアブレーション後の持続性心房細動再発の関連性)

小林 秀 樹

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、心房細動 (AF) に対するカテーテルアブレーション (CA) の有効性が確立されており、3次元マッピングやイリゲーションカテーテルの登場、種々のアブレーション方法の開発によって、持続性心房細動 (psAF) においても、その治療成績は向上している。しかし、左心房のリモデリングが進行している症例においては、CA後の心房細動の再発率は依然として高いことが知られており、術前に再発の程度を予測しておくことは、治療方針を立てる上で重要である。AFの再発予測については、心臓超音波検査上のいくつかのパラメータの有用性が報告されており、実臨床にも応用されている。

心房中隔 (IAS) は、左心房と右心房を分離する膜様構造物であるが、経食道心臓超音波検査によって、心拍動によって振幅運動をしている様子が詳細に観察される。このIAS運動は、心房の過負荷状態、すなわち、左房圧の上昇により低下すると報告されており、左心房のコンプライアンスを反映していると考えられている。しかしながら、IAS運動とAFとの関係性についての研究はいまだなく、特にIAS運動がCA後のAFの再発予測に有用であるかは不明である。そこで、本研究では、IAS運動の低下が、CA施行後のpsAFの再発と関連しているか、評価することを目的とした。

【方法】信州大学医学部附属病院において、2014年8月から2018年5月までに、CAが施行された連続103人のpsAFの患者を後ろ向きに解析した。IAS運動は、CA施行48~72時間前に、経食道心臓超音波検査を行い測定した。また、同時に経胸壁心臓超音波検査を施行し、各種パラメータを測定するとともに、CA中に、ロングシースを左房に挿入することで、直接、左房圧を測定した。主要評価項目は、CA施行日から3か月以降のAFの再発とし、フォローアップ期間はCA施行後12か月とした。

【結果】登録された103人の患者のうち、フォローアップ期間中に29人の患者 (28.2%) において、心房細動の再発が確認された。IAS運動の中央値は4.1 mm

(四分位範囲: 2.4-5.4 mm) であった。回帰分析では、高 Body mass index, 左房容積増大, 左房圧上昇, IAS運動低下が、psAFの再発に関連する要因であり、それらを調整したモデルにおける多変量解析において、IAS運動の低下は、CA後のpsAF再発に関する独立した予後予測因子であることが示された (OR: 0.66, 95% 信頼区間: 0.49-0.88,  $p=0.005$ )。ROC曲線分析に基づき、IAS運動保持群 (IAS運動 $\geq 4.2$  mm,  $n=47$ )、およびIAS運動低下群 (IAS運動 $< 4.2$  mm,  $n=56$ ) とで、カプランマイヤー分析を施行したところ、IAS運動低下群において、有意にAFの再発率が高かった (log-rank検定,  $p=0.001$ )。また、IAS運動と他の心臓超音波検査上のパラメータとの関連を調べたところ、IAS運動と左房容積、および、左室急速流入血流速度/僧帽弁輪最大拡張早期運動速度 ( $E/e'$ ) との間には、それぞれ負の相関が観察され、逆に、IAS運動と左心耳血流速度との間には、正の相関が観察された。さらに、IAS運動低下群は、IAS運動保持群よりも、有意に左房圧が高かった。

【考察】この研究では、IAS運動の低下がCA後のpsAF再発と関連していることを明らかにした。さらに、IAS運動は、これまでAFの再発に関連すると提唱されてきた左房容積や $E/e'$ などの心臓超音波検査上のパラメータと有意に相関していた。さらに、IAS運動が低下した患者は、IAS運動が保持された患者よりも、測定された左房圧が高かった。以上の結果は、IAS運動の低下が、左房圧上昇を反映しており、CA後のAF再発の予後予測因子である可能性を示唆している。これまで、CA施行後のpsAFの再発とIAS運動との関係性を評価したという研究はなく、本研究は、IAS運動の有用性を示した最初の報告である。

現在、AFに対するCAの前には、心臓の形態評価や左心耳内血栓評価として、恒常的に経食道心臓超音波検査が行われている。本研究結果は、そうした術前検査で得られるパラメータを、AF再発の予後予測に利用できる可能性を示すものであり、臨床的に有用かつ意義の大きいものと考えられる。



(論文審査の結果の要旨)

左房のリモデリングが進行している持続性心房細動 (psAF) 症例においては、カテーテルアブレーション (CA) 後の再発率は依然として高く、術前に再発の程度を予見しておくことは、治療方針を立てる上で重要である。CA 前に施行される経食道心臓超音波検査において、心房中隔 (IAS) は、心拍動に伴い振幅運動をしている様子が観察される。この IAS 運動の低下は、左房圧の上昇と関連しており、左房のリモデリングの推定に役立つ。そこで、本研究では、IAS 運動の低下が、CA 施行後の psAF の再発と関連しているか調査し、再発を予測するパラメータになりうるか評価することを目的とした。

その結果、以下の結論を得た。

1. 測定された IAS 運動の中央値は 4.1 mm (四分位範囲: 2.4-5.4 mm) であった。
2. 高 Body mass index, 左房容積増大, 左房圧上昇, IAS 運動低下が, psAF の再発に関連しており, 多変量解析において, IAS 運動の低下は, CA 後の psAF 再発に関する独立した予後予測因子であった (OR: 0.66, 95 % CI: 0.49-0.88, p=0.005)。

Comparison of leg loader and treadmill exercise for evaluating patients with peripheral artery disease (末梢閉塞性動脈硬化症患者におけるレグローダとトレッドミル負荷の診断能の比較)

植 木 康 志

(論文の内容の要旨)

【目的】足関節上腕血圧比 (Ankle-brachial index: ABI) は足首と上腕の血圧の比で求められ、安静時 ABI $\leq$ 0.9 は閉塞性動脈硬化症 (Peripheral arterial disease: PAD) の診断のゴールドスタンダードである。運動負荷 ABI は間欠性跛行があるが安静時 ABI は正常である患者に対して推奨されている。日常臨床ではトレッドミルを用いた運動負荷が一般的に用いられているが、PAD 患者では心疾患や脳血管疾患、整形外科疾患などの併存症により、トレッドミルの施行が困難である場合が多い。レグローダは仰臥位でペダルを用いた足関節底屈運動のみで運動負荷を行う装置であり、簡便かつ安全に施行可能であるが、現在までにトレッドミルとレグローダを比較した研究は行われていない。よって本研究では PAD 患者におけるレグローダ運動負荷の ABI に与える影響をトレッドミル運動負荷と比較した。

3. カプランマイヤー分析において、IAS 運動低下群 (IAS 運動 $<$ 4.2 mm) は、IAS 運動保持群 (IAS 運動 $\geq$ 4.2 mm) に比べ、有意に AF の再発率が高かった (log-rank 検定, p=0.001)。

4. IAS 運動は、左房容積、E/e' との間に負の相関、左心耳血流速度との間に正の相関が認められた。

5. IAS 運動低下群は、IAS 運動保持群よりも、有意に左房圧が高かった。

以上より、本研究では、IAS 運動の低下が CA 後の psAF 再発と関連していることが明らかになった。IAS 運動は、AF の再発に関連するとされる他の心臓超音波検査上のパラメータと相関しており、IAS 運動が低下した患者は、IAS 運動が保持された患者よりも左房圧が高かった。これらの結果から、IAS 運動の低下は、左房のリモデリングの進行を反映したパラメータであり、CA 後の AF 再発の予後予測因子である可能性が示唆された。IAS 運動は、CA 術前に容易かつ非侵襲的に測定することが可能であり、その結果が CA 後の AF 患者の治療の一助となることが期待された。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。

【方法】2016年4月から11月の間に PAD と診断され、信州大学医学部附属病院に血管造影もしくは血管形成術目的に入院した患者を対象とした。重症下肢虚血、ABI $>$ 1.4、トレッドミルやレグローダが施行できない患者は除外した。足関節底屈運動は30分の安静臥床の後、レグローダ (VSL-100A, フクダ電子, 東京, 日本) を用いて 2 相性負荷プロトコール (3.3J100 サイクル, 5.3J100 サイクル) で行い、直後に ABI を測定した。トレッドミル運動負荷は足関節底屈運動後、少なくとも 1 時間あけて 5 分間 (12 % grade, 2.4 km/h) 行い、直後に ABI を測定した。

【結果】対象は 27 名 (54 肢) であり、平均年齢 74 歳、男性 19 名 (70 %) であった。ABI $\leq$ 0.9 であった 37 肢の内、11 肢が腸骨動脈、27 肢が浅大腿動脈に病変を認めた。平均 ABI は 0.78 $\pm$ 0.21 であった。27 人中、24 人において下肢の疲労のためレグローダを用いた足関節底屈運動を完遂できなかった。また、20 人において

下肢痛 (n=15), 息切れ (n=4), 背部痛 (n=1) のためトレッドミルを完遂できなかった。レグローダ負荷 ABI はトレッドミル負荷 ABI と比較し有意に高かった ( $0.63 \pm 0.33$  vs.  $0.57 \pm 0.37$ ,  $P=0.002$ )。ABI の運動負荷後の低下率もレグローダ負荷の方がトレッドミル負荷よりも小さかった (14.0% [5.6, 30.1] vs. 25.8% [6.1, 53.1],  $P<0.001$ ) が, レグローダ負荷 ABI とトレッドミル負荷 ABI の間に非常に強い相関を認めた ( $r=0.925$ ,  $P<0.001$ )。

【考察】本研究は PAD 患者においてレグローダ負荷 ABI とトレッドミル負荷 ABI を比較した最初の研究である。本研究では, レグローダと比較しトレッドミルの方がより負荷後の ABI を低下させた。これは, 1) レグローダを用いた足関節底屈運動が腓腹筋のみの運動であるため, 負荷量がトレッドミルよりも少ないこと, 2) レグローダ負荷において跛行症状の出現ではなく腓腹筋疲労のため負荷試験が終了している可能性があること, 3) 十分なインターバルを用いて2つの検査を施行したが, レグローダの後にトレッドミルを施行したこと, などが原因として考えられた。しかし, 両負荷方法の間には ABI の低下率において非常に強い相関を認め, レグローダ負荷 ABI の PAD 診断における有用性が示唆された。トレッドミルは最も標準的な運動負荷の方法であり, ABI の低下や跛行症状出現までの歩行距離を客観的に評価することができるが, 1) ABI 施行前後のカフの取り外しが煩雑, 2) 運動負荷後の ABI 測定まで時間がかかる, 3) 運動負荷中の心血管事故のリスク, 4) 歩行困難患者では測定不能などの問題がある。レグローダは ABI のカフを付けたまま施行可能であり, 運動負荷から測定までのタイムラグが無く, 心血管疾患や整形外科疾患が併存している症例においても安全に施行可能な負荷方法である。今後, ボーダーライン ABI やトレッドミルが行えない患者におけるレグローダ負荷 ABI の診断能の検討が必要であると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

足関節上腕血圧比 (Ankle-brachial index : ABI) は足首と上腕の血圧の比で求められ, 安静時 ABI  $\leq 0.9$  は閉塞性動脈硬化症 (Peripheral arterial disease : PAD) の診断のゴールドスタンダードである。運動負荷 ABI は間欠性跛行があるが安静時 ABI は正常である患者に対して推奨されている。日常臨床ではトレッドミルを用いた運動負荷が一般的に用いられているが, PAD 患者では心疾患や脳血管疾患, 整形外科

疾患などの併存症により, トレッドミルの施行が困難である場合が多い。レグローダは仰臥位でペダルを用いた足関節底屈運動のみで運動負荷を行う装置であり, 簡便かつ安全に施行可能であるが, 現在までにトレッドミルとレグローダを比較した研究は行われていない。よって本研究では PAD 患者におけるレグローダ運動負荷の ABI に与える影響をトレッドミル運動負荷と比較した。

その結果, 以下の結論を得た。

1. PAD 患者27人中, 24人の患者は下肢の疲労のためレグローダを用いた足関節底屈運動を完遂できなかった。また, 20人の患者は下肢痛 (n=15), 息切れ (n=4), 背部痛 (n=1) のためトレッドミルを完遂できなかった。
2. レグローダ負荷後の ABI の値はトレッドミル負荷後の ABI 値と比較し有意に高かった ( $0.63 \pm 0.33$  vs.  $0.57 \pm 0.37$ ,  $P=0.002$ )。
3. レグローダ負荷後の ABI の低下率はトレッドミル負荷よりも有意に小さかった (14.0% [5.6, 30.1] vs. 25.8% [6.1, 53.1],  $P<0.001$ )
4. レグローダ負荷後とトレッドミル負荷後の ABI の低下率の間に非常に強い相関を認めた ( $r=0.925$ ,  $P<0.001$ )。
5. 下肢超音波での有意狭窄 (peak systolic velocity ratio  $>2.5$ ) に対するレグローダとトレッドミルの ABI 低下率の C 統計値はそれぞれ0.85, 0.86であった。レグローダによる ABI 低下率の最適カットオフ値は7.1%の低下で, 感度・特異度はそれぞれ87.5%と78.6%だった。

以上より, 本研究ではトレッドミル負荷の方がレグローダ負荷よりも負荷後の ABI の値を有意に大きく下げたが, 両者の間には強い相関があることが明らかとなった。これらの結果から, レグローダは運動負荷 ABI の方法としてトレッドミルの代替手段となり得る可能性が示唆された。レグローダはトレッドミルと比較し安全かつ簡便に運動負荷を行えることから, PAD が疑われる患者において診断の一助となることが期待された。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。

Relationship between allergic sensitization-associated single-nucleotide polymorphisms and allergic transfusion reactions and febrile non-hemolytic transfusion reactions in pediatric cases (小児患者における ATR および FNHTR とアレルギー関連 SNPs との関係)

井出 裕一郎

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 小児がん患者の診療において輸血療法は重要な支持療法の1つであるが、アレルギー性輸血副反応 (Allergic transfusion reaction, ATR) や発熱性非溶血性輸血副反応 (Febrile non-hemolytic transfusion reaction, FNHTR) などの輸血副反応の発生が問題となる。特に ATR は血小板輸血に伴って発症することが多く、洗浄血小板を用いることによって予防可能であることから、血液製剤中の血漿成分が発症に深く関与していると考えられる。一方、FNHTR では血液製剤中に含まれる抗 HLA 抗体などの同種抗体や白血球や血小板から放出される生理活性物質が発症に関与していると考えられている。しかし、ATR や FNHTR の発症機序はまだ不明な点が多く、またドナーや製剤に由来する因子の他に、患者に由来する因子も存在することが報告されている。近年、様々な疾患の発症や薬剤の感受性等に関連する一塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) のが研究され、アレルギー性疾患の発症に関与する SNPs も数多く報告されている。そこで本研究では、アレルギー性疾患に関与する SNPs と輸血副反応との関連性に着目し、SNPs が輸血副反応発症の予測因子となりうるか検討することとした。

**【対象および方法】** 2003年4月から2020年3月までの期間中に、長野県立こども病院血液腫瘍科において赤血球製剤、血小板製剤のいずれかが複数回輸血された20歳未満の患者を対象に後方視的解析を実施した。解析対象症例において発生した全ての ATR と FNHTR を確認するとともに、アレルギー疾患の発症に関連する22種類の SNPs についてジェノタイピングを行った。SNPs の検出には、リアルタイム PCR 法を応用した SNP 解析、アレル特異的 PCR、制限酵素による断片長の違いを利用した解析法 (RFLP-PCR) を用いた。得られた結果に対しては、フィッシャーの正確率検定により輸血副反応発症との関連性について検討を行った。

**【結果】** 対象患者219例の年齢は0歳から19.2歳 (中央値4.2歳)、男女比は男児133:女児86であった。219例

のうち輸血副反応が認められたのは105例で、内訳は ATR 発症が71例、FNHTR 発症が19例、ATR と FNHTR の双方を発症したのが15例であった。また、ATR 発症71例のうち、発熱を伴う ATR が10例で認められた。上記3つの群それぞれについて、非発症例との比較を行った結果、ATR においては rs6473223 (Odds 比: 2.281, 95 % CI: 1.018-5.111, P 値: 0.044)、FNHTR では rs10893845 (Odds 比: 3.767, 95 % CI: 1.701-8.339, P 値: 0.001)、また発熱を伴う ATR 発症群においても rs10893845 (Odds 比: 5.500, 95 % CI: 1.140-26.533, P 値: 0.023) の SNPs において関連性が認められた。

**【考察】** ATR 発症においてリスク SNP となった rs6473223 の近傍には免疫関連遺伝子である ZBTB10 遺伝子と TPD52 遺伝子が存在する。rs6473223 はそれら遺伝子の調節機構に何らかの影響を与えることによって ATR の発症に関与していることが推察される。一方、FNHTR および発熱を伴う ATR においてリスク SNP となった rs10893845 は ETS1 遺伝子の近傍に座位する。ETS1 遺伝子は Th2 サイトカインの調節因子として知られ、形質細胞からの抗体産生亢進や好酸球等の活性化をもたらすアレルギー性疾患の発症に関与している。これまで FNHTR と ATR は異なる機序で発症していると考えられてきたが、FNHTR には ATR と共通する発症機序も存在しており、患者のアレルギー体質にも関連性があり得ることが示された。本研究結果からアレルギー関連 SNPs が輸血副反応発症の予測因子になりうること、輸血副反応の発症機序の更なる解明の手段になり得る可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

小児がん患者の診療において輸血は重要な支持療法の1つであるが、アレルギー性輸血副反応 (Allergic transfusion reaction, ATR) や発熱性非溶血性輸血副反応 (Febrile non-hemolytic transfusion reaction, FNHTR) などの副反応の発生が問題となる。これらの発症機序は未解明な点が多いが、近年、様々な疾患の発症や薬剤の感受性等に関連する一塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) が研究され、

アレルギー性疾患の発症に関与する SNPs も数多く報告されている。そこで本研究では、アレルギー性疾患に関与する SNPs と輸血副反応との関連性に着目し、SNPs が輸血副反応発症の予測因子となりうるかを検討した。

2003年4月から2020年3月までの期間中に、長野県立こども病院血液腫瘍科において赤血球製剤、血小板製剤のいずれかが複数回輸血された20歳未満の患者(0歳から19.2歳(中央値4.2歳)、男女比は男児133:女児86)を対象に後方視的解析を実施した。解析対象症例において発生した全ての ATR と FNHTR を確認するとともに、アレルギー疾患の発症に関連する22種類の SNPs についてジェノタイプングを行った。得られた結果に対し、フィッシャーの正確確率検定より輸血副反応発症との関連性について検討を行った。

その結果、井出は次の結論を得た。

1. 219例のうち副反応が認められたのは105例で、内訳は ATR が71例、FNHTR が19例、ATR と FNHTR の双方を発症したのが15例であった。また、ATR 発症71例のうち、発熱を伴う ATR が10例で認められた。
2. 上記3つの群それぞれについて、非発症例との比較を行った結果、以下の SNP において関連性が認められた。

められた。

- A) ATR 発症群：rs6473223 (Odds 比：2.281, 95 % CI：1.018-5.111, P 値：0.044),
- B) FNHTR 発症群：rs10893845 (Odds 比：3.767, 95 % CI：1.701-8.339, P 値：0.001),
- C) 発熱を伴う ATR 発症群：rs10893845 (Odds 比：5.500, 95 % CI：1.140-26.533, P 値：0.023)

ATR 発症においてリスク SNP となった rs6473223 の近傍には免疫関連遺伝子である *ZBTB10* と *TPD52* が存在する。rs6473223 がそれら遺伝子の調節機構に何らかの影響を与えることで ATR の発症に関与していることが推察される。一方、FNHTR および発熱を伴う ATR においてリスク SNP となった rs10893845 は *ETSI* の近傍に座位する。*ETSI* は Th2 サイトカインの調節因子で、形質細胞からの抗体産生亢進や好酸球等の活性化をもたらすアレルギー性疾患の発症に関与している。これまで FNHTR と ATR は異なる機序で発症していると考えられてきたが、FNHTR には ATR と共通する発症機序も存在しており、患者のアレルギー体質にも関連性があり得ることが示された。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。

## Ventricular myocardial response to exercise in patients with Fontan circulation (フォンタン循環患者における運動負荷に対する心室心筋の反応)

山崎 聖子

### (論文の内容の要旨)

【背景】フォンタン手術は、機能的単心室患者の生存率を大きく向上させたが、長期死亡率は他の先天性心疾患と比較して依然として高い。フォンタン術後患者は経年的に運動耐容能が低下し、運動耐容能の指標が予後予測因子となる。フォンタン術後患者の運動時の血行動態反応の異常が、運動能力に大きな影響を及ぼしていると考えられているが、フォンタン循環における運動負荷に対する心筋予備能については未だ明らかではない。

臥位エルゴメーターを用いた運動負荷心エコーは、運動中の血行動態指標をリアルタイムで経時的に観察することが可能である。運動負荷心エコーによる運動時の心機能や心筋予備能評価の有用性が様々な心疾患で認められているが、フォンタン術後患者の運動時の心筋反応についての報告は少ない。本研究の目的は、

運動負荷心エコーを用いて、フォンタン術後患者の運動負荷に対する心室心筋の反応を明らかにする事である。

【対象と方法】2015年8月から2018年1月にフォンタン術後患者を対象とした前方視的横断研究を実施した。健常群は同時期にボランティアから募集した。エルゴメーターが実施不能、重度の心機能障害、不整脈、解析に値する良好な画質が得られない者は除外した。対象者には臥位エルゴメーターを用いて運動負荷心エコー検査を施行し、Bruce プロトコルで運動負荷をして、安静時 (rest) と最大心拍数時 (peak) に心エコーを記録した。心室の FAC (面積変化率)、パルスドプラ法での心室流入波形の拡張早期波 (E)、組織ドプラ法での房室弁輪移動速度の収縮期波 (s'), 拡張早期波 (e'), スペックルトラッキング法での GLS (global longitudinal strain), strain rate (SR) を

rest と peak で計測し、これらの心機能指標をフォンタン術後患者群、健常群の間で比較検討した。また peak と rest の差： $\Delta$  (peak-rest) を心筋予備能と定義し、2群で比較検討した。

2群間の比較は Student's t test と Mann-Whitney's U test の適切な方を用いて行い、 $p < 0.05$  を統計学的有意差ありとした。

**【結果】**・25名のフォンタン術後患者（年齢中央値14歳：8-21歳）と19名の健常対照者が参加した。

・フォンタン患者群は健常対照群と比較して、rest および peak の心機能指標が有意に低かったが、両群ともに、運動負荷によって各心機能指標は優位に peak で上昇した。

・心筋予備能 ( $\Delta$ ) はフォンタン患者群 (F群) の方が健常対照群 (N群) より優位に低値であった。

(F群 vs N群： $\Delta E$ (cm/s)  $32.2 \pm 20.9$  vs  $47.8 \pm 27.3$ ,  $\Delta e'$ (cm/s)  $3.6 \pm 2.4$  vs  $5.1 \pm 1.7$ ,  $\Delta s'$ (cm/s)  $2.3 \pm 1.4$  vs  $4.9 \pm 2.4$ ,  $\Delta FAC$   $0.04 \pm 0.038$  vs  $0.069 \pm 0.025$ ,  $\Delta GLS$ (%)  $3.0 \pm 2.2$  vs  $5.64 \pm 2.4$ ,  $\Delta$  systolic SR(%/s)  $0.39 \pm 0.21$  vs  $1.0 \pm 0.22$ ,  $\Delta$  diastolic SR(%/s)  $0.91 \pm 0.62$  vs  $1.4 \pm 0.68$ , (いずれも  $p < 0.001$ - $p < 0.05$ ))

・F群において、体心室形態の解剖学的形態の違いによる心予備能の差はなかった。

**【考察】**本研究では、フォンタン術後患者の運動に対する心室心筋反応について運動負荷心エコーを用いて評価した。フォンタン術後患者は、健常対照者と同様に運動に対して心拍数、収縮機能、拡張機能のパラメータの優位な増加を示したが、その程度（予備能）は健常対照群より優位に低いことを示した。

健常者は、心拍数の増加、前負荷の増加、心収縮の増大により、運動時の心拍出量が著しく増加する。フォンタン術後患者の運動時の心筋反応低下の要因は、心拍応答の低下、収縮予備能の低下、前負荷の低下など多岐にわたると考えられる。

既知の報告と同様、本研究でも健常者に比してフォンタン術後患者の運動中の心拍数上昇は乏しかった。組織ドプラで得られた心機能指標や GLS は、心拍数に依存して線形関係があることが分かっているため、フォンタン術後患者の心筋予備能の低下は、心拍応答不全が一因である可能性がある。一方で、フォンタン術後患者の心拍応答の低下は、心室充満の低下や、心収縮予備能の低下によって二次的に引き起こされるとの報告もある。本研究において、フォンタン術後患者

の運動時の心筋反応の低下が、心拍応答不全に付随するものか心筋固有の予備能の低下によるものかを明確に区別することはできないが、フォンタン循環特有の心収縮予備能の低下をみている可能性があり、今後さらなる検討が必要である。

**【結論】**フォンタン術後患者は、健常対照者と比較して運動時の心筋予備能が著しく低下している。運動負荷心エコーは、フォンタン術後患者の遠隔期の臨床管理に有用なツールとなる可能性がある。

#### (論文審査の結果の要旨)

フォンタン術後患者は、遠隔期の運動耐容能低下が問題となる。フォンタン循環の運動時の血行動態反応の異常が、運動能力に大きな影響を及ぼすと考えられているが、フォンタン循環における運動負荷に対する心筋予備能については未だ明らかではない。

臥位エルゴメーターを用いた運動負荷心エコーは、運動中の血行動態をリアルタイムで経時的に観察することが可能である。運動負荷心エコーによる運動時の心機能や心予備能評価の有用性は、様々な心疾患で認められているが、フォンタン術後患者の運動時の心筋反応についての報告は少ない。そこで運動負荷心エコーを用いて、フォンタン術後患者の運動負荷に対する心室心筋の反応を明らかにする事とした。

その結果、山崎らは次の結果を得た。

・25名のフォンタン術後患者（年齢中央値14歳：8-21歳）と19名の健常対照者が参加した。

・フォンタン患者群は健常対照群と比較して、安静時および運動時の心機能指標が有意に低かったが、両群とも運動負荷によって各心機能指標は優位に上昇した。

・心筋予備能 ( $\Delta$ ) はフォンタン患者群 (F群) の方が健常対照群 (N群) より優位に低値であった。

(F群 vs N群： $\Delta E$ (cm/s)  $32.2 \pm 20.9$  vs  $47.8 \pm 27.3$ ,  $\Delta e'$ (cm/s)  $3.6 \pm 2.4$  vs  $5.1 \pm 1.7$ ,  $\Delta s'$ (cm/s)  $2.3 \pm 1.4$  vs  $4.9 \pm 2.4$ ,  $\Delta FAC$   $0.04 \pm 0.038$  vs  $0.069 \pm 0.025$ ,  $\Delta GLS$ (%)  $3.0 \pm 2.2$  vs  $5.64 \pm 2.4$ ,  $\Delta$  systolic SR(%/s)  $0.39 \pm 0.21$  vs  $1.0 \pm 0.22$ ,  $\Delta$  diastolic SR(%/s)  $0.91 \pm 0.62$  vs  $1.4 \pm 0.68$ , (いずれも  $p < 0.001$ - $p < 0.05$ ))

フォンタン術後患者は、健常対照者と同様に運動に対して心拍数、収縮能、拡張能の指標の優位な増加を示したが、その程度 ( $\Delta$ 予備能) は健常対照群より優位に低いことがわかった。

健常者は、心拍数の増加、前負荷の増加、心収縮の

増大により、運動時の心拍出力が増加する。フォンタン術後患者は健常対照者より運動中の心拍数上昇が乏しかった。組織ドプラなどで得られた心機能指標は、心拍数に依存し線形関係があるため、フォンタン術後患者の心筋予備能の低下は、心拍応答不全が一因である可能性がある。一方で、フォンタン循環の心拍応答の低下は、心室充満の障害や、心収縮予備能の低下によって二次的に引き起こされるとの報告もある。本研究において、フォンタン循環の運動時の心筋反応の低

下が、心拍応答不全に付随するものか、心筋固有の予備能の低下によるものかを明確に判別することはできないが、フォンタン循環特有の心収縮予備能の低下をみている可能性があり、さらなる検討が期待される。

運動負荷心エコーを用いた心予備能評価が、フォンタン術後患者の遠隔期の臨床管理に有用なツールとなる可能性を示した知見であり、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。

Glavonoid-rich oil supplementation reduces stearoyl-coenzyme A desaturase 1 expression and improves systemic metabolism in diabetic, obese KK-*A<sup>y</sup>* mice (グラボノイドリッチオイルはステアロイル-コエンザイム A 不飽和化酵素 1 の発現を減少させ、糖尿病・肥満モデル KK-*A<sup>y</sup>* マウスの全身的代謝を改善する)

## 五十嵐 佑一

### (論文の内容の要旨)

【背景・目的】肥満とは体脂肪が過剰に蓄積した状態を指し、世界中で有病者数が増加し続けている。肥満は多様な代謝性疾患の危険因子であり、中でも近年深刻な健康問題として認識されるインスリン抵抗性や 2 型糖尿病とは密接に関係する。Glavonoid Rich Oil (GRO) は甘草 (*Glycyrrhiza glabra* Linne) 根由来の親油性抽出物であり、グラブリジンを含む。これまでに高脂肪食と同時に摂取させた場合に体重増加や白色脂肪組織重量の増加の抑制効果、血糖値の増加の抑制など健康増進効果があると報告されてきた。一方で既報では投与期間が短期間であることから一時的な効果である可能性を棄却できず、健康増進効果のメカニズムは未解明である。よって本研究では 12 週間という比較的長期間にわたる GRO 摂取の健康増進効果とその分子的メカニズムの解明を目的とした。

【方法】肥満・糖尿病モデルである KK-*A<sup>y</sup>* マウスの雌 8 週齢に対し 4, 8, 12 週間の間、通常飼料 CE-2 または CE-2 に対し重量比 0.3%, 0.8% の GRO を含む餌を供与した。マウスは 12, 16, 20 週齢にて 5 匹ずつセボフルラン吸気麻酔による安楽死を行い解剖した。耐糖能の評価として体重比 1 g/kg の腹腔内グルコース投与試験を行い、尾静脈血から血糖値推移を測定した。GRO の脂質・糖代謝に対する効果は、RNA シーケンスや定量 PCR、ウェスタンブロッティングを用いた生理学的または分子生物学的マーカーを測定し解析した。

【結果】通常飼料を与えられたマウス (Cont) と比較して 0.8% GRO 含有飼料を与えられたマウス (GRO8) は体重および鼠蹊部白色脂肪組織重量の増加が継続的に抑制された。20 週齢では、白色脂肪組織における肥大した脂肪細胞数の減少や間質血管領域の浸潤細胞の減少が認められ、肝臓では肥満に伴う脂肪滴が減少する傾向が観察された。また、総コレステロールや中性脂肪量といった血中脂質指標が、12, 16, 20 週齢のいずれにおいても減少した。腹腔内ブドウ糖負荷試験においても、12, 16, 20 週齢のいずれにおいても GRO8 で耐糖能の改善が認められた。これらの結果から、GRO の KK-*A<sup>y</sup>* マウスに対する健康増進効果が肝臓や白色脂肪組織における脂質・糖代謝の改善によるものと考察し、20 週齢の肝臓を用いてトランスクリプトーム解析 (RNA シーケンス) により分子メカニズムの解析を行った。GRO 摂取によって 65 個の遺伝子の発現量が有意に変動し、Gene Ontology に基づく機能集積解析から脂肪酸代謝プロセスなどの脂質代謝に関係する遺伝子群の集積が認められた。特に、脂肪酸合成系の酵素である Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (*Scd1*) は、定量 PCR において Cont と比較して GRO8 では遺伝子発現レベルが 20% まで減少した。ウェスタンブロット法によってタンパク質発現レベルでも SCD1 の減少を認め、更に *Scd1* の転写因子である Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ /Ppara), ならびに SCD1 を含む脂質合成系酵素の発現を抑制する Adenosine monophosphate protein kinase (AMPK) のリン酸化の増加が認められた。また、Gene Ontolo-

gyに基づく機能集積解析では糖代謝に関わる遺伝子群の集積は認められなかったが、肝臓での定量PCRでは解糖系抑制遺伝子 Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*Pdk4*) および糖新生律速酵素遺伝子 Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*) の発現量が減少した。一方で、白色脂肪組織では Fatty acid synthetase (*Fasn*) と炎症性サイトカインである Interleukin 6 (*Il6*) の遺伝子発現レベルが減少した。以上の結果から、GROは肝臓および白色脂肪組織における脂肪酸合成系の抑制、ならびに肝臓における解糖系の亢進と糖新生の抑制によって、KK-*A*<sup>y</sup> マウスにおける肥満形質と耐糖能異常を改善することが示された。【考察・結論】これまで、GROの健康増進効果は現象論としての理解にとどまっていた。本研究は過食による肥満・糖尿病マウスに対する長期投与の観察結果に基づき、網羅的な遺伝子変動解析を駆使することで、その分子経路を明らかとした。特に、肝臓における *Scd1* の発現低下に伴う代謝機能の改善効果は、*Scd1* ノックアウトマウスにおける糖新生の減少や AMPK 活性化の報告と合致し、GROの健康増進作用の基盤に位置すると考える。本研究成果は、GROが肥満にまつわる代謝性疾患の予防に寄与するメカニズムの解明に新たな知見を与え、GROが抗肥満作用を示すサプリメントとして新たな治療戦略となり得る可能性を示すものである。

#### (論文審査の結果の要旨)

肥満者数は世界中で増加し続けており、様々な代謝性疾患を併発するため深刻な健康問題として認識される。一方、現行の治療は摂取カロリーの制限や継続的な運動など患者への負荷の大きい方法が主なため、負荷の小さな肥満治療法としてサプリメントが着目されている。甘草に含まれるポリフェノール類であるグラブリジン(GB)は肥満を改善し血糖値上昇を抑制する効果が報告されているが、既存の研究では実験期間が短く、メカニズムが未解明であった。本研究ではグラブリジン3%含有中鎖脂肪酸油であるグラボノイドリッチオイル(GRO)の長期的な健康増進効果を検証し、網羅的な遺伝子解析による分子メカニズムの解明を目的として肥満・糖尿病モデル KK-*A*<sup>y</sup> マウスへ GRO を摂取させ解析を行った。

8週齢の KK-*A*<sup>y</sup> 雌マウスを5匹ずつ通常飼料群、重量比0.3%または0.8% GRO 添加飼料群に分け自由摂食させ、それぞれ4, 8, 12週間後に麻酔安楽死させ解剖した。実験期間中マウスの摂餌量と体重を毎週

測定し、解剖後の臓器から病理切片を作成し脂質蓄積を評価した。解剖時に採取した血清から血中脂質量を測定した。耐糖能の評価として、12時間の絶食後腹腔内グルコース投与試験を行った。GRO 摂取による遺伝子発現の変化を解析するため肝臓組織を用いて RNA シーケンスを行った。real time-PCR により肝臓、白色脂肪組織の遺伝子発現量を解析した。

その結果、五十嵐佑一は以下の結論を得た。

1. GRO の長期摂取は白色脂肪組織と肝臓における脂質蓄積を減少させた。
2. GRO の長期摂取は血中の脂質プロファイルを改善した。
3. GRO の長期摂取は耐糖能を改善した。
4. GRO は肝臓で糖代謝と脂質代謝関連遺伝子の発現を調節した。特に肝臓で中性脂質合成酵素 Stearoyl-CoA desaturase 1 (*Scd1*) が顕著に減少した。
5. GRO は白色脂肪組織で中性脂質合成と炎症性アディポカイン *Il6* の遺伝子発現を抑制した。

GRO の長期摂取が肝臓における糖・脂質代謝経路と白色脂肪組織における脂質代謝経路を調節することで、肥満・脂質異常症・糖尿病を抑制することを明らかにした。既存の研究では *Scd1* の全身的、または肝臓特異的ノックアウトマウスで体重と白色脂肪組織重量の増加が抑制され、耐糖能が改善され糖新生が減少するほか、AMP-activated protein kinase が活性化するなど、本研究の結果に合致する。よって *Scd1* は GRO の健康増進効果の基盤に位置すると考えられる。

これらの結果はグラボノイドの健康増進効果の作用機序に新たな知見を与えるとともに、肥満および肥満に伴う代謝性疾患に対する治療・予防法としてグラボノイドの有効性を示すものである。

以上をもって主査、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。

The utility of serum C-C chemokine ligand 1 in sarcoidosis: A comparison to IgG4-related disease (サルコイドーシスにおける血清 CCL1の有用性: IgG4関連疾患との比較)

小松 雅 宙

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】サルコイドーシス(サ症)およびIgG4関連疾患(IgG4-related disease: IgG4-RD)はいずれも様々な臓器に病変を呈する全身性疾患である。両疾患の胸部画像所見は、いずれもリンパ路沿いに進展し、肺門リンパ節腫脹を特徴とする。一方でサ症は、Th1型細胞免疫反応により病変部に類上皮細胞肉芽腫が形成されるのに対して、IgG4-RDの病変部ではTh2型細胞免疫反応の活性化がみられ、その病態は異なる。先行研究では、サ症および肺に病変を有するIgG4-RDの気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage: BAL)液におけるサイトカイン・ケモカインの解析を行い、IgG4-RDではサ症に比してTh2優位であることを報告した。

CCL1は、単球やリンパ球の遊走・活性化に関連するケモカインである。これまでに気管支喘息やアトピー性皮膚炎などの疾患で上昇がみられ、一般的にはTh2に関連したケモカインとされる。上述の先行研究では、BAL液中CCL1は、サ症においてIgG4-RDに比して有意に高値であった。Th1優位な疾患であるサ症においてCCL1上昇がみられたことに着目したところ、BAL液中CCL1はサ症の活動性と相関があり、さらにTh1関連のメディエーターとの関連が示唆された。

本研究では、血清CCL1を含めた各種メディエーターをサ症、IgG4-RD、健常者の3群で評価した。またサ症においては血清CCL1と臨床情報との関連を検討した。

【方法】対象は2010年4月から2018年9月の期間に信州大学医学部附属病院呼吸器・感染症・アレルギー内科を受診し、病理学的所見に基づいてサ症と診断された44例、IgG4-RD 14例、アレルギー疾患の既往のない健常者14例である。臨床情報は電子カルテから抽出し、後ろ向きに解析を行った。サ症における画像評価は胸部X線写真および胸部CTを解析した。胸部CTについては、既報に準じて気管支血管束の肥厚、小粒状影、網状影、浸潤影、リンパ節腫大、胸膜肥厚についてそれぞれ4段階にスコア化した。3群の血清CCL1はELISAを用いて測定した。また、血清中の

17種類のメディエーター(IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, eotaxin, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )はマルチプレックスアッセイで測定した。さらにサ症においては、血清およびBAL液中CCL1, CCL17, CCL18をELISAで測定した。2群間での解析においてはMann-WhitneyのU検定を用いた。3群間の検定で、正規分布とみなせる場合には一元配置分散解析を、みなせない場合にはKruskal-Wallis検定を用いた。2変量における相関についてはSpearmanの相関係数を用いた。有意水準は5%未満とした。

【結果】解析対象の内訳は、サ症群(男性27人、女性17人、年齢中央値49歳)、IgG4-RD群(男性9人、女性5人、年齢中央値68.5歳)、健常者(男性14人、年齢中央値34.5歳)であった。

血清CCL1の評価では、サ症群(中央値55.5 pg/mL)はIgG4-RD群(中央値6.2 pg/mL)、健常者(中央値0.0 pg/mL)と比べて有意に高値であった。またCTで肺門縦隔リンパ節の腫大が著明な群では、乏しい群に比して血清CCL1は有意に高値であった。さらにサ症において血清CCL1は血清可溶性IL-2受容体と正の相関がみられた。また、BAL液での総細胞数およびリンパ球数と正の相関を認めた。

3群における各種血清メディエーターの解析では、IP-10はサ症においてIgG4-RDおよび健常者に比べて有意に高値であった。

また血清CCL1とBAL液中CCL1との間に正の相関がみられた。サ症における血清CCL1はTh1関連の血清マーカー(IP-10, TNF- $\alpha$ )との間に正の相関がみられた。一方、血清CCL1とTh2関連の血清マーカー(CCL-17, CCL18)との間に、有意な相関はみられなかった。

【考察】サ症における血清CCL1はIgG4-RD、健常者に比べて有意に高値であることが判明した。また、血清CCL1は血清可溶性IL-2受容体や胸部CTにおけるリンパ節腫大との間に相関がみられ、サ症の活動性を反映することが示唆された。

サ症は何らかの抗原物質に対する慢性炎症が原因と



され、抗原物質としてアクネ菌や抗酸菌が候補として考えられている。CCL1は感染に対する抵抗性に重要な因子とされているが、その役割は明らかではない。岸らはCCL1を強発現させた遺伝子改変マウスモデルを作製し、肺の慢性炎症に関する評価を行った。BCGを同マウスに投与したところ、対照群と比較して肺組織内で有意な肉芽形成の促進が観察された。また、別の動物モデルでは、抗酸菌抗原による肉芽形成においてCCL1の高発現が報告されている。これらから、CCL1はサ症の肉芽形成に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

また本研究で血清CCL1は血清IP-10と正の相関がみられた。IP-10はIFN- $\gamma$ により誘導され、Th1型細胞免疫反応に関与するとされる。IP-10はサ症における肉芽形成に強い関連が報告されている。

サ症における肉芽形成においてTh2型細胞免疫反応も重要な役割を果たすとされているが、本研究ではTh2関連ケモカインであるCCL17、CCL18との間に有意な相関は見られなかった。以上から、サ症においてCCL1はTh2よりもTh1に関連した役割を果たしていると考えられた。

**【結論】** 血清CCL1はサ症の活動性と有意な相関が認められた。またサ症においてCCL1はTh2よりもTh1に関連した病態に関与していると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

サルコイドーシス(サ症)およびIgG4関連疾患(IgG4-related disease: IgG4-RD)はいずれも様々な臓器に病変を呈する全身性疾患であり、両疾患の胸部画像所見は、リンパ路沿いに進展し、肺門リンパ節腫脹を特徴とするという点で類似する。一方でサ症は、Th1型細胞免疫反応により病変部に類上皮細胞肉芽腫が形成されるのに対して、IgG4-RDの病変部ではTh2型細胞免疫反応の活性化がみられ、その病態は異なる。先行研究では、サ症および肺に病変を有するIgG4-RDの気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage: BAL)液におけるサイトカイン・ケモカインの解析を行い、

BAL液中CCL1は、サ症においてIgG4-RDに比して有意に高値であった。また、BAL液中CCL1はサ症の活動性との関連が示唆された。

本研究では、血清CCL1を含めた各種メディエーターをサ症、IgG4-RD、健常者の3群で評価した。また、サ症においては血清CCL1と臨床情報との関連を検討した。

対象は、2010年4月から2018年9月の期間に信州大学医学部附属病院呼吸器・感染症・アレルギー内科を受診し、病理学的所見に基づいてサ症と診断された44例、包括診断基準で診断されたIgG4-RD 14例、健常者14例である。血清CCL1に加え17種類の血清メディエーターを測定した。また、サ症においては血清、気管支肺胞洗浄(BAL)液でCCL1、CCL17、CCL18を測定した。

その結果、下記の結果を得た。

1. サ症における血清CCL1は、IgG4-RDおよび健常者と比較して有意に高値であった。
2. サ症において、血清CCL1は胸部CTで評価した肺門・縦隔リンパ節のサイズと、有意な正の相関がみられた。また、血清可溶性IL-2受容体と、有意な正の相関がみられた。
3. サ症において、血清CCL1はBAL液中総細胞数、リンパ球数との間に、有意な正の相関がみられた。
4. サ症において、血清CCL1はBAL液中CCL1との間に、有意な正の相関がみられた。
5. サ症において、血清CCL1はTh1関連の血清マーカーとの間に、有意な正の相関がみられた。一方でTh2関連の血清マーカーとの間に、有意な相関はみられなかった。

これらの結果より、血清CCL1はサ症の活動性と有意な相関があり、Th2よりもTh1に関連した病態に関与し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。

Water intake releases serotonin from enterochromaffin cells in rat jejunal villi (飲水によるラット空腸壁のエンテロクロマフィン細胞からのセロトニン分泌機構)

梶原 稜

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 日本では古来より適度な水分を摂取することが健康の秘訣であると言われている。我々は以

前、ラットに蒸留水を経口投与することで腸管膜リンパ管の流量、アルブミンの総量が増加し、空腸上部粘膜固有層に局在する3型自然リンパ球(以下ILC-3)

を活性化し、IL-22の分泌を促進することを報告した。セロトニンはリンパ管の収縮に重要な物質であり、能動輸送に関与することが知られている。セロトニンは腸管に存在するエンテロクロマフィン細胞にて産生され血小板に貯蔵されている。しかしながら、セロトニンによる腸管膜リンパ管におけるリンパ機構の制御に関しての報告はない。そこで、本研究では飲水によるセロトニンを介した空腸微小循環におけるリンパ機構の生理的制御、自然免疫の維持、向上機構の解明を目的とした。

**【方法】** ラット (SD オス10-12週齢) を使用した。蒸留水 (3 mL) は経口投与し、セロトニン、5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬であるケタンセリン、セロトニン受容体非特異的拮抗薬であるメチセルジドは静脈投与した。門脈血、腸管膜リンパ管よりリンパ液を採取し、それぞれ流量を測定し、ELISA 法にてセロトニン、アルブミン、IL-22の濃度を測定した。また、空腸を摘出し、蛍光染色、鍍銀染色を行った。さらに空腸粘膜固有層から ILC-3をセルソーターにて単離し、セロトニン10<sup>-6</sup>Mを加えた培養液にて培養し、RT-PCR でIL-22の mRNA の発現を調べた。

**【結果】** 蒸留水経口投与後に摘出した空腸上皮にてセロトニンの発現が有意に増加し、エンテロクロマフィン細胞中の好銀性の顆粒が有意に減少した。また、蒸留水経口投与後に門脈、腸管膜リンパ管において流量、セロトニンの総量が有意に増加し、門脈におけるセロトニンの総量は腸管膜リンパ管の約1000倍であった。次にセロトニン10<sup>-5</sup>M (0.3 mL)、5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬であるケタンセリン10<sup>-6</sup>M (0.3 mL) をそれぞれ静脈投与した。セロトニン投与群において腸管膜リンパ管の流量、アルブミン、IL-22の濃度がそれぞれ有意に増加した。一方、ケタンセリン投与群では腸管膜リンパ管の流量、アルブミンの濃度が有意に減少したが、IL-22の濃度に有意な変化は認めなかった。最後に ILC-3におけるセロトニンの効果について調べた。空腸粘膜固有層より ILC-3をセルソーターを用いて分離し、セロトニン10<sup>-6</sup>Mを含む培養液にて培養した。その結果、IL-22の mRNA が有意に増加した。また、ケタンセリン、メチセルジド持続投与下で蒸留水を経口投与した後に空腸を摘出した。蒸留水のみ投与した群、ケタンセリン投与群においてはIL-22の発現が有意に増加した。一方、メチセルジド投与群は蒸留水のみ投与した群と比較してIL-22の発現が有意に減少した。

**【結論】** 蒸留水経口投与後に空腸上皮内、門脈血中のセロトニンが増加したことは、機械的刺激によりエンテロクロマフィン細胞よりセロトニンが分泌され、門脈を経由し、全身へ運搬されると考えた。またケタンセリン静脈投与により腸管膜リンパ管のリンパ流量、アルブミン濃度が減少したことは、セロトニンは5-HT<sub>2</sub>受容体を介して空腸微小循環を制御していると考えられた。さらにセロトニンによって ILC-3中のIL-22の mRNA が増加し、メチセルジド持続投与下で蒸留水を経口投与したラットの空腸粘膜固有層のIL-22が減少したことは、ILC-3はセロトニンによって5-HT<sub>2</sub>受容体とは異なる受容体を介してIL-22を分泌すると考えられた。これらのことから、飲水によってセロトニンを介した空腸微小循環におけるリンパ機構の生理的制御、自然免疫の維持向上機構がある可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

日本では古来より適度な水分を摂取することが健康の秘訣であると言われている。我々は以前、ラットに蒸留水を経口投与することで腸管膜リンパ管の流量、アルブミンの総量が増加し、空腸上部粘膜固有層に局在する3型自然リンパ球(以下 ILC-3)を活性化し、IL-22の分泌を促進することを報告した。セロトニンは腸管に存在するエンテロクロマフィン細胞にて産生され、リンパ管の収縮に重要な物質であり、能動輸送に関与することが知られている。しかしながら、セロトニンによる腸管膜リンパ管におけるリンパ機構の制御に関しての報告はない。そこで、本研究では飲水によるセロトニンを介した空腸微小循環におけるリンパ機構の生理的制御、自然免疫の維持、向上機構の解明を目的とした。

ラット (SD オス10-12週齢) を使用した。蒸留水 (3 mL) は経口投与し、セロトニン、5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬であるケタンセリン、セロトニン受容体非特異的拮抗薬であるメチセルジドは静脈投与した。門脈血、腸管膜リンパ管よりリンパ液を採取し、それぞれ流量を測定し、ELISA 法にてセロトニン、アルブミン、IL-22の濃度を測定した。また、蒸留水 (3 mL) を経口投与後に空腸を摘出し、蛍光染色、鍍銀染色を行った。さらに空腸粘膜固有層から ILC-3をセルソーターにて単離し、セロトニン10<sup>-6</sup>Mを加えた培養液にて培養し RT-PCR にてIL-22の mRNA の発現を調べた。

その結果以下の結論を得た。

1. 蒸留水 (3 mL) を経口投与後、空腸上皮にてセ

ロトニンの発現が有意に増加し、エンテロクロマフィン細胞中の好銀性の顆粒が有意に減少した。また、蒸留水経口投与後に門脈、腸管膜リンパ管において流量、セロトニンの総量が有意に増加し、門脈におけるセロトニンの総量は腸管膜リンパ管の約1000倍であった。

2. セロトニン投与群において腸管膜リンパ管の流量、アルブミン、IL-22の濃度がそれぞれ有意に増加した。一方、ケタンセリン投与群では腸管膜リンパ管の流量、アルブミンの濃度が有意に減少したが、IL-22の濃度に有意な変化は認めなかった。
3. ILC-3をセロトニン $10^{-6}$ Mを含む培養液にて培養後、IL-22のmRNAが有意に増加した。また、空腸粘膜固有層において蒸留水のみ投与した群、ケタンセリン投与群においてはIL-22の発現が有意に増

加した。一方、メチセルジド投与群は蒸留水のみ投与した群と比較してIL-22の発現が有意に減少した。

これらの結果から、蒸留水経口投与による機械的刺激によりエンテロクロマフィン細胞よりセロトニンが分泌され、門脈を經由し、全身へ運搬されること、またセロトニンは5-HT<sub>2</sub>受容体を介して空腸微小循環を制御していることが示唆された。さらにILC-3はセロトニンによって5-HT<sub>2</sub>受容体とは異なる受容体を介してIL-22を分泌することが明らかになった。これらのことから、飲水によってセロトニンを介した空腸微小循環におけるリンパ機構の生理的制御、自然免疫の維持向上機構があ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。

Adrenomedullin ameliorates pulmonary fibrosis by regulating TGF- $\beta$ -Smads signaling and myofibroblast differentiation (アドレノメデュリンは、TGF- $\beta$ -Smads 経路と筋線維芽細胞の分化を調節することにより、肺線維症を改善する)

Wei Yangxuan

(論文の内容の要旨)

【背景】肺線維症は、肺の構造と機能を不可逆的に破壊し、しばしば致命的な結果をもたらす疾患である。アドレノメデュリン (AM) は抗炎症、臓器保護作用など多彩な作用を有する生理活性ペプチドであり、その活性は主として、AMの受容体CLRに結合する受容体活性調節タンパク RAMP2あるいはRAMP3によって制御されている。我々は、AMあるいはRAMP2ノックアウトマウスが、血管の発達不全により胎生致死となることを報告し、血管の発達・恒常性維持におけるAM-RAMP2システムの重要性を報告してきた。一方、AM、RAMP2は肺においても高発現しているが、その意義については不明である。本研究では、AMとRAMP2ヘテロノックアウトマウス (+/-) を用いて、ブレオマイシン (BLM) 誘発マウス肺線維症モデルを作成し、肺におけるAM-RAMP2系の病態生理学的意義を検討した。

【方法と結果】10週齢AM +/-、RAMP2 +/- の雄マウスに対して、ブレオマイシン (2 mg/kg) の気管内投与を行い、肺線維症モデルを作成した。AM +/- においては、肺重量、肺のヒドロキシプロリン含有量、肺線維症の重症度を示すアッシュクロフトスコアが野生型マウスと比較して有意に上昇した。BLM投与後3

日目の急性期では、FACS分析により、AM +/- において、肺に浸潤した好酸球、単球、および好中球の有意な増加が示された。14日目の慢性期では、遺伝子発現解析により、AM +/- では線維化関連因子の有意な上昇が認められた。各種免疫組織染色においても、AM +/- では、急性期の炎症所見と慢性期の線維化所見の増悪が確認された。同様の所見は、RAMP2 +/- でも確認された。一方、外因性にAMの持続投与を行ったところ、これらの炎症と線維化の双方の所見が改善された。

TGF- $\beta$ -Smads 経路は、組織線維化など多彩な作用を有する。最近、microRNAがこの経路の調節に関与していることが報告されている。BLMで処理されたAM +/- の肺では、野生型と比較して、TGF- $\beta$ の発現に変化を認めないのに対し、受容体活性型Smad (Smad3) が有意に活性化されており、抑制性Smad (Smad7) の発現が有意に低下していた。さらに、線維化の促進に関与するとされるmicroRNA (miR-21) の発現が有意に亢進していた。

次に、野生型マウスおよびAM +/- マウスの肺より線維芽細胞を初代培養して検討を進めた。アクチン染色、 $\alpha$ SMA免疫染色、Ki67免疫染色、および形態によって、細胞をfibroblast (Fb)、proto-myofibro-

blast (proto-MyoFb), proliferating myofibroblast (p-MyoFb), nonproliferating myofibroblast (non-p-MyoFb) の4種類に分類した。TGF- $\beta$  刺激を行った AM+/- 由来細胞は、野生型と比較して、non-p-MyoFb の出現が有意に亢進していた。AM+/- 由来細胞は、細胞のサイズが大きく、細胞増殖能と遊走能が低下しており、細胞収縮能が亢進していた。さらに AM+/- 由来細胞は、細胞外マトリックス産生能と、ケモカイン産生能が高い一方で、間葉系幹細胞のマーカーである Mefflin の発現は著明に低下していた。

miR21は Smad7の発現を抑制し、Smad7は Smad3の活性化を抑制することが報告されている。実際に、AM+/- 由来細胞では、野生型と比較して、TGF- $\beta$  刺激時の miR21の発現が亢進し、Smad7発現が低下し、Smad3活性化が亢進していた。AM を投与するとこれらの差はキャンセルされた。TGF- $\beta$ 1型受容体阻害剤である SB431542, Smad3阻害剤である SIS3, あるいは miR21阻害剤の投与によって、AM+/- 由来細胞における non-p-MyoFb 出現は抑制された。このことから、AM-RAMP2システムは、miR21-TGF- $\beta$ -Smad3経路を抑制し、non-p-MyoFb の分化を抑制することで肺線維症の進行に抑制的に働くと考えられた。

以上の結果から、AM-RAMP2系は、BLM 肺線維症モデルにおいて、急性期の炎症の抑制に加えて、miR21発現を抑制し、Smad3のリン酸化を抑制することで、TGF- $\beta$ -Smad 経路を抑制し、線維芽細胞の非増殖性筋線維芽細胞 (nonproliferating myofibroblast) への分化を抑制することで、肺線維症の病態を改善することが明らかとなった。AM-RAMP2系は、肺線維症の新たな治療標的としての応用が期待される。

#### (論文審査の結果の要旨)

アドレノメデュリン (AM) は多彩な作用を有する生理活性ペプチドであり、その活性は、受容体活性調節タンパク RAMP によって制御されている。AM および RAMP2は肺においても高発現しているが、これらの病態学的意義は不明である。

本研究では、AM と RAMP2ヘテロノックアウトマウス (+/-) を用いて、ブレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルを作製し、肺における AM-RAMP2系の役割を検討した。

その結果、Wei Yangxuan は次の結論を得た。

1. 野生型マウス (WT) と比較して、AM+/-, RAMP2+/-ともに急性期における炎症は増強し、

慢性期における線維化が亢進した。一方で外因性に AM を投与することによって、これらの双方の所見は抑制された。

2. AM+/-由来肺線維芽細胞は、TGF- $\beta$  刺激によって、細胞のサイズが大きく、増殖性が低下し、収縮能が高い筋線維芽細胞へと分化するものが多かった。
3. この細胞は、線維症の病態を増悪させる非増殖性筋線維芽細胞 (non-p-MyoFb) と考えられた。
4. AM+/-由来筋線維芽細胞では、TGF- $\beta$  受容体によって活性化される Smad である Smad3の活性が亢進し、さらに線維化の促進因子として働く microRNA-21の発現が亢進していた。
5. AM の外因性投与によって、抑制型 Smad である Smad7の発現が亢進するとともに、TGF- $\beta$ -Smad3経路は抑制され、線維芽細胞の非増殖性筋線維芽細胞への分化は抑制された。

以上の結果から、AM-RAMP2系は、BLM 肺線維症において、急性期の炎症の抑制に加えて、慢性期の microRNA-21発現および TGF- $\beta$ -Smad3経路の抑制により、線維芽細胞の非増殖性筋線維芽細胞 (non-p-MyoFb) への分化を抑制し、肺線維症の病態を改善することが明らかとなった。AM-RAMP2系は肺線維症における治療標的として期待される結果が得られた。

以上の結果から、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。

Blood urea nitrogen-to-serum albumin ratio and A-DROP are useful in assessing the severity of *Pneumocystis* pneumonia in patients without human immunodeficiency virus infection (血中尿素窒素 / 血清アルブミン比および A-DROP はヒト免疫不全ウイルス感染のない患者のニューモシスチス肺炎の重症度を評価するために有用)

赤 羽 順 平

(論文の内容の要旨)

【背景】 ニューモシスチス肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*: PcP) は、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染に関連する最も深刻な日和見感染症の1つである。PcP 予防と高活性抗レトロウイルス療法の導入により、HIV 感染患者における PcP (HIV-PcP) の発生率と死亡率が低下した。対照的に PcP の発生率は、HIV 感染のない患者 (非 HIV-PcP) で増加している。死亡率は HIV-PcP 患者と非 HIV-PcP 患者でそれぞれ 10%~20% と 19.6%~60% と報告され、非 HIV-PcP 患者の予後は不良であるが、非 HIV-PcP の予後因子は確立されていない。ただし、肺胞気一動脈血酸素分圧較差 (A-aDO<sub>2</sub>) 高値、乳酸脱水素酵素 (LDH) 高値、血中尿素窒素 (BUN) 高値、血清アルブミン (Alb) 低値、Pneumonia Severity Index (PSI) 高値は、非 HIV-PcP の予後不良との関連が報告されている。BUN 高値と Alb 低値は、市中肺炎患者の予後不良因子でもあり、さらに BUN/Alb 比高値は市中肺炎による死亡率の有用なマーカーとされている。ただし BUN/Alb 比の有効性は、非 HIV-PcP 患者では評価されていない。A-DROP は日本呼吸器学会によって提案された市中肺炎の重症度を評価するためのスコアリングシステムであるが、以前の報告では、A-DROP が非 HIV-PcP の重症度を過小評価している可能性があることが示唆され、非 HIV-PcP 患者の予後因子として確立されていない。本研究では、非 HIV-PcP 患者の予後因子を特定することを目的とした。また、PSI よりも単純なスコアリングシステムである A-DROP と市中肺炎患者に有用な BUN/Alb 比を非 HIV-PcP 患者における予後予測因子と考え、その有効性を評価した。

【方法】 長野県内の5施設 (信州大学医学部附属病院、長野市民病院、南長野医療センター篠ノ井総合病院、長野赤十字病院、諏訪赤十字病院) において2003年1月から2019年5月までに、非 HIV-PcP と診断された患者を対象とし、診療録を用いて非 HIV-PcP 患者の予後因子を後方視的に解析した。本研究の治療結果は、

治療開始から30日以内の非 HIV-PcP 患者の全死因死亡で評価した。30日死亡率に関連する予後因子は、多重ロジスティック回帰分析によって評価し、受信者動作特性 (ROC) 曲線は、30日死亡率を推定する予後因子の能力を評価するために使用した。

【結果】 症例は全102例で、患者背景は年齢中央値69.5歳 (22-88歳)、男性55例 (53.9%)、女性47例 (46.1%)、基礎疾患は自己免疫疾患46例 (45.1%)、造血器悪性腫瘍19例 (18.6%)、固形癌18例 (17.7%)、その他19例 (18.6%) であった。基礎疾患に対しては34例 (33.3%) がコルチコステロイド単独、53例 (52.0%) は免疫抑制剤、生物学的製剤、抗腫瘍薬などの他の薬剤と組み合わせたコルチコステロイドで治療され、15例 (14.7%) はコルチコステロイドなしで治療されていた。本検討における非 HIV-PcP 患者の30日死亡率は20.5% (21例/102例) であった。

生存群と比較して、非生存群は Alb が有意に低く (2.2 g/dL vs. 2.8 g/dL,  $p=0.002$ )、年齢 (75歳 vs. 67歳,  $p=0.019$ )、PcP 発症時のコルチコステロイド投与量 (25 mg/日 vs. 15mg/日,  $p=0.001$ )、A-aDO<sub>2</sub> (194.6 Torr vs. 64.3 Torr,  $p=0.001$ )、A-DROP スコア (3 vs. 1,  $p<0.001$ )、LDH (525 IU/L vs. 374 IU/L,  $p=0.001$ )、BUN (31.5 mg/dL vs. 20.0 mg/dL,  $p=0.004$ )、および BUN/Alb 比 (16.0 vs. 7.1,  $p=0.002$ ) が有意に高値であった。

多重ロジスティック回帰分析により、BUN/Alb 比 (OR 1.060; 95%CI 1.006-1.117;  $p=0.029$ ) が30日死亡率と独立して関連していた。

BUN、Alb、BUN/Alb 比および A-DROP の ROC 曲線を使用して、非 HIV-PcP 患者の30日死亡率を推定する予後因子の能力を評価した。曲線下面積 (AUC) は、BUN 0.702 (95%CI 0.577-0.826)、Alb 0.715 (95%CI 0.598-0.833)、BUN/Alb 比 0.719 (95%CI 0.594-0.844)、A-DROP 0.76 (95%CI 0.659-0.860) であった。ROC 曲線から A-DROP スコアが30日死亡率を推定する能力の最も高い予後因子であった。

【考察】以前の報告では、BUN 高値と Alb 低値は市中肺炎および非 HIV-PcP 患者の予後不良因子とされている。肺炎患者はしばしば脱水状態になり、腎臓による尿素の再吸収が増加し、また低 Alb 血症は全身性の炎症と栄養不良を反映していると考えられる。本研究でも非生存群は生存群よりも有意に BUN 高値と Alb 低値であった。既報では BUN/Alb 比は市中肺炎、院内肺炎、誤嚥性肺炎患者の死亡率を予測するための有用なマーカーとされ、本研究でも BUN/Alb 比の上昇が、非 HIV-PcP 患者の30日死亡率と有意に関連していた。BUN と Alb は一般的に測定される生化学的マーカーでもあり、また本研究の ROC 曲線の結果から、非 HIV-PcP 患者の予後を予測する上で BUN または Alb 単独よりも BUN/Alb 比は優れており、BUN/Alb 比の有用性が示唆された。

既報で A-DROP スコアは非 HIV-PcP 患者の重症度を過小評価していると報告されているが、本研究では治療開始時の A-DROP スコア上昇に伴い30日死亡率が増加し、A-DROP スコアは生存群よりも非生存群の方が有意に高値であった。A-DROP スコアは、多変量解析で統計的有意性に達しなかったが、ROC 曲線から30日死亡率を推定する能力の最も高い予後因子であった。したがって、A-DROP は非 HIV-PcP 患者の重症度分類と予後評価に有用となる可能性がある。

【結論】非 HIV-PcP 患者では、BUN/Alb 比高値は死亡リスクの独立した予後因子であり、A-DROP は重症度の分類に有用である。

#### (論文審査の結果の要旨)

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染していない症例におけるニューモシスチス肺炎 (*Pneumocystis pneumonia*: PcP) の発生率が高くなっている。HIV-PcP 患者と比較し、非 HIV-PcP 患者の予後は不良であるが、非 HIV-PcP 患者の予後因子は確立されていない。さらに、市中肺炎の重症度分類である A-DROP または市中肺炎の死亡率の予測に有用である血中尿素窒素/血清アルブミン比 (BUN/Alb 比) も、非 HIV-PcP 患者の予後因子として確立されていない。本研究では、非 HIV-PcP 患者の予後因子を特定することを目的とした。また、A-DROP と BUN/Alb 比を非 HIV-PcP 患者における予後予測因子と考え、その有効性を評価した。

長野県内の5施設 (信州大学医学部附属病院, 長野市民病院, 南長野医療センター篠ノ井総合病院, 長野

赤十字病院, 諏訪赤十字病院) において2003年1月から2019年5月までに、非 HIV-PcP と診断された患者 (全102例) を対象とし、予後因子を後方視的に解析した。本研究の治療結果は、治療開始から30日以内の非 HIV-PcP 患者の全死因死亡で評価した。30日死亡率に関連する予後因子は、多重ロジスティック回帰分析によって評価し、受信者動作特性 (ROC) 曲線は、30日死亡率を推定する予後因子の能力を評価するために使用した。

その結果、赤羽は下記の結果を得た。

1. 本研究での非 HIV-PcP 患者の30日死亡率は 20.5%であった。
2. 非生存群では Alb が有意に低く、年齢、PcP 発症時のコルチコステロイド投与量、肺胞気-動脈血酸素分圧較差 (A-aDO<sub>2</sub>)、A-DROP スコア、乳酸脱水素酵素 (LDH)、BUN、BUN/Alb 比が有意に高値であった。
3. 多重ロジスティック回帰分析により、BUN/Alb 比が非 HIV-PcP 患者の30日死亡率と独立して関連していた。
4. 非 HIV-PcP 患者の30日死亡率と A-DROP スコアの間には正の相関があり、30日死亡率は A-DROP スコアの増加とともに上昇した。
5. ROC 曲線から A-DROP スコアが非 HIV-PcP 患者の30日死亡率を推定する能力の最も高い予後因子であった。

これらの結果より、非 HIV-PcP 患者では BUN/Alb 比高値は死亡リスクの独立した予後因子であり、A-DROP は非 HIV-PcP 患者の重症度の分類に有用であると考えられた。

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。

The histamine H<sub>1</sub> receptor antagonist hydroxyzine enhances sevoflurane and propofol anesthesia: A quantitative EEG study (ヒスタミン H<sub>1</sub>受容体拮抗薬であるヒドロキシジンはセボフルラン及びプロポフォールの麻酔作用を増強する：定量的脳波研究)

田 中 竜 介

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** ヒスタミン H<sub>1</sub>受容体拮抗薬であるヒドロキシジンは鎮静作用、制吐作用を有し周術期に広く使用されているが、全身麻酔深度に与える影響は調べられていない。脳波は臨床上麻酔深度を評価するために用いられ、全身麻酔中の脳波は、麻酔薬毎に異なりその作用機序を反映する。臨床で広く用いられる吸入麻酔薬であるセボフルランと、プロポフォールの主な作用機序はγ-アミノ酪酸（以下 GABA）受容体刺激とされている。GABA 作動性麻酔薬により、脳波はα-δ 波律動を呈する。この脳波リズムの起源は視床であり、GABA 作動性麻酔薬が視床を過分極した結果、視床と皮質の電気活動が同期しα-δ 波律動が形成される。α-δ 波律動は脳波のスペクトル解析により可視化される。さらに視床—皮質の同期活動は、原理的に再帰的回路の動態抽出が可能なバイコヒーランス解析により調べることができる。本研究の目的は、吸入麻酔薬のセボフルラン麻酔下及び静脈麻酔薬のプロポフォール麻酔下脳波に対するヒドロキシジンの影響を調べることである。

**【方法】** 対象は、セボフルラン麻酔下あるいはプロポフォール麻酔下に予定手術を受ける患者43名（セボフルラン群20名、プロポフォール群23名）である。脳波は麻酔深度モニターであるバイスペクトラルインデックス（以下 BIS）モニターから抽出した前頭部脳波を用いた。麻酔導入後気管挿管し、BIS 値が50—60となるように麻酔薬濃度を調整した。呼気セボフルラン濃度、プロポフォール効果部位濃度が安定し10分以上経過した後、ヒドロキシジン投与前の対照脳波として3分間脳波の記録を行った。その後、ヒドロキシジンを0.5 mg/kg 静脈内投与した。10分後、ヒドロキシジン投与後脳波として3分間脳波の記録を行った。ヒドロキシジン投与前後の脳波をスペクトル解析、バイコヒーランス解析を用いて解析し、α 波及び δ 波を比較した。さらにヒドロキシジン投与前後の BIS 値を比較した。

**【結果】** ヒドロキシジン投与前、BIS 値はセボフルラン群で57（55—58）（95 %信頼区間）、プロポフォー

ル群で56（54—57）であった。ヒドロキシジン投与後、BIS 値は両群共に有意に低下し、セボフルラン群で43（42—45）（P<0.001）、プロポフォール群で40（37—43）（P<0.001）となった。セボフルラン群、プロポフォール群共に、ヒドロキシジン投与後α パワーピーク周波数が低周波帯域に遷移し、δ パワーが増強した。バイコヒーランス解析では、セボフルラン群、プロポフォール群共に、α バイコヒーランスのピーク周波数が低周波域に遷移し、α バイコヒーランスが増強した。また両群共にδ バイコヒーランスの増強を認めた。

**【結論】** 本研究結果から、ヒドロキシジンはセボフルラン及びプロポフォールの麻酔深度を深めることが分かった。ヒドロキシジン投与による脳波変化は、GABA 作動性麻酔薬の麻酔深度を深めた際に見られる脳波変化と一致している。このことはヒドロキシジンがGABA 神経回路を介し、セボフルラン、プロポフォールの麻酔作用を増強している可能性を示唆している。

(論文審査の結果の要旨)

ヒスタミン H<sub>1</sub>受容体拮抗薬であるヒドロキシジンは鎮静作用、制吐作用を有し周術期に広く使用されている。しかしながら、全身麻酔深度に与える影響は調べられていない。麻酔深度を評価するために臨床では脳波を利用している。全身麻酔中の脳波は麻酔薬毎に異なりその作用機序を反映している。本研究では脳波を解析し、吸入麻酔薬であるセボフルランと静脈麻酔薬であるプロポフォールの臨床的な麻酔深度に対するヒドロキシジンの影響を調べた。

対象はセボフルラン麻酔下あるいはプロポフォール麻酔下に予定手術を受ける患者43名（セボフルラン群20名、プロポフォール群23名）である。脳波は麻酔深度モニターであるバイスペクトラルインデックス（以下 BIS）モニターから抽出した前頭部脳波を用いた。麻酔導入後麻酔薬濃度一定で維持し、ヒドロキシジン0.5 mg/kg 静脈内投与した。ヒドロキシジン投与前の3分間とヒドロキシジン投与10分後の3分間の脳波を解析し比較した。脳波解析は、スペクトル解析と、原理的に視床—皮質の再帰的回路の動態抽出が可能な

バイコヒーランス解析を行った。さらにヒドロキシジン投与前後の BIS 値を比較した。

その結果、田中は次の結論を得た。

1. ヒドロキシジン投与後、BIS 値はセボフルラン群、プロポフォール群ともに有意に低下した。
2. スペクトル解析の結果では、セボフルラン群、プロポフォール群共に、ヒドロキシジン投与後、 $\alpha$  パワーピーク周波数が低周波帯域に遷移し、 $\delta$  パワーが増強した。
3. バイコヒーランス解析の結果では、セボフルラン群、プロポフォール群共に、 $\alpha$  バイコヒーランスのピーク周波数が低周波帯域に遷移し、 $\alpha$  バイコヒー

ランスが増強した。また両群共に  $\delta$  バイコヒーランスが増強した。

これらの結果より、ヒドロキシジンはセボフルラン及びプロポフォールの麻酔深度を深めることが分かった。ヒドロキシジン投与による脳波変化は、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性麻酔薬の麻酔深度を深めた際に見られる脳波変化と一致している。このことはヒドロキシジンが GABA 神経回路を介し、セボフルラン、プロポフォールの麻酔作用を増強している可能性を示唆している。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。

Prognostic usefulness of residual SYNTAX score combined with clinical factors for patients with acute coronary syndrome who underwent percutaneous coronary intervention from the SHINANO Registry (急性冠症候群に経皮的冠動脈形成術を施行した症例に対して残存 SYNTAX スコアと他の臨床因子を複合させた新規スコアの長期予後予測評価としての有用性)

## 柏木大輔

(論文の内容の要旨)

**【目的】** 冠動脈多枝疾患 (MVD) を有する急性冠症候群 (ACS) の症例への経皮的冠動脈形成術 (PCI) に関して、ACS の責任病変への血行再建治療のみを行う方が良いのか、もしくは非責任病変も含めた完全血行再建を行った方が良いのか、最適な治療法に関する一致した見解は確立されているとは言えない。残存 SYNTAX スコアは冠動脈病変評価に有用で、MVD を有する ACS 患者の PCI 後の予後評価に役立つことが知られている。しかし、残存 SYNTAX スコアは解剖学的評価のみでその他の臨床因子を含んでおらず、予後予測評価ツールとして十分とは言えない。そこで、本研究では残存 SYNTAX スコアとその他の臨床要素を含めた新たなスコアを設定し、その予後予測評価の有用性を評価した。

**【方法】** 長野県内の13施設において、2012年8月から2013年7月までに、PCIが施行された連続1,665人の患者を前向きに5年間フォローアップした研究 (SHINANO レジストリー) を用いて、MVD を有する ACS の120人に対して解析を行った。新たなスコアは “Combined score” と命名した。既存の SYNTAX スコア II (解剖学的評価である SYNTAX スコアと年齢・性別・LVEF・腎機能・肺機能等の7つの臨床因子を複合させたスコア) の計算式を利用し、その内の SYNTAX スコアを用いる部分のみを残存 SYNTAX スコアに

差し替えて計算したスコアを Combined score とした。Combined score を、全死亡率に対する ROC 曲線分析に基づくカットオフ値を用いて2群に分けて評価を行った。主要評価項目は PCI 施行後の5年間フォローアップ期間中の全死亡率とし、副次評価項目は同期間中の主要心血管イベント (MACE: 心血管死・心筋梗塞・脳梗塞・再血行再建術の複合エンドポイント) とした。

**【結果】** 多枝疾患に対する PCI を施行した症例は120人中68人の患者 (56.7%) においてみられ、一期的治療が24人 (20.0%)、段階的治療が44人 (36.7%) であった。登録された120人の患者を ROC 曲線分析に基づき高得点群 (38点超,  $n=50$ ) と低得点群 (38点以下,  $n=70$ ) とに分類した。 Kaplan-Meier 分析を施行したところ、フォローアップ期間中の全死亡の発生率は有意に高得点群の方が高かった (38.0% 対 5.7%, log-rank 検定  $p<0.01$ )。同様に、MACE の発生率に関しても優位に高得点群の方が高かった (60% 対 5.7%, log-rank 検定  $p<0.01$ )。全死亡に関連する要因と考えられたヘモグロビン、心筋梗塞の既往、糖尿病を加えて調整したモデルにおける多変量 COX 解析において、Combined score は全死亡に関する独立した予後予測因子であることが示された (ハザード比: 1.08, 95% 信頼区間: 1.04-1.12),  $p<0.001$ )。またフォローアップ期間中の全死亡率に関す



る ROC 曲線分析において、Combined score の AUC (0.82, 95 % 信頼区間: 0.74-0.91) は、既存のスコアである残存 SYNTAX スコア (0.54, 95 % 信頼区間: 0.1-0.67) や SYNTAX スコア II (0.80, 95 % 信頼区間: 0.71-0.90) と比較してより高い AUC を描いた。

【考察】この研究では、残存冠動脈病変と他の臨床因子を組み合わせた新たなスコア (Combined score) が、MVD を有する ACS 患者に対する PCI 後の 5 年間の全死亡・MACE 発生率の予後予測評価として有用であること、また残存 SYNTAX スコアと比較して統計学的に有意に優れている予後予測スコアであることを明らかにした。

近年の研究から MVD を有する ACS 患者にとって、残存冠動脈病変の存在は予後を悪くすることは知られており、完全血行再建治療が望ましいことが明らかになってきている。しかし、実臨床の場ではそれぞれの患者背景によって完全血行再建や複数冠動脈病変への血行再建が困難であることがあり、解剖学的評価だけでなく年齢や心機能、腎機能と言った臨床因子も考慮することが重要である。最近使われるようになってきた SYNTAX スコア II は、冠動脈病変の解剖学的情報と、他の臨床因子を含めた情報との双方を複合的に評価しているスコアである。このスコアは ACS 患者の治療戦略を構築するための包括的リスク評価スコアとして一般的に使われている GRACE リスクスコアと比較して、ACS 患者の予後予測に対するより優良なリスク評価スコアであることが報告されている。

我々の研究では、Combined score は SYNTAX スコア II と比較して統計学的に有意ではないものより強い予後予測因子であった。これは Combined score が SYNTAX スコア II と異なり、残存 SYNTAX スコアを用いて残存冠動脈病変の評価をしているためと考えられ、残存冠動脈病変の情報と他の臨床因子を含めた情報を共に考慮することが予後予測評価には重要であると考えられた。

本研究結果は、MVD を有する ACS 患者に対してより適切な治療選択を行うにあたり Combined score が有用である可能性を示すものと考えられた。

#### (論文審査の結果の要旨)

冠動脈多枝疾患 (MVD) を有する急性冠症候群 (ACS) の症例への経皮的冠動脈形成術 (PCI) に関して、ACS の責任病変への血行再建治療のみを行う方が良いのか、もしくは非責任病変も含めた完全血

行再建を行った方が良いのか、最適な治療法に関する一致した見解は確立されているとは言えない。残存 SYNTAX スコアは冠動脈病変評価に有用で、MVD を有する ACS 患者の PCI 後の予後評価に役立つことが知られている。しかし、残存 SYNTAX スコアは解剖学的評価のみでその他の臨床因子を含んでおらず、予後予測評価ツールとして十分とは言えない。そこで、本研究では残存 SYNTAX スコアとその他の臨床要素を含めた新たなスコアを設定し、その予後予測評価の有用性を評価した。PCI を施行した MVD を有する ACS 症例の登録された 120 人の患者を ROC 曲線分析に基づき高得点群 (38 点超, n=50) と低得点群 (38 点以下, n=70) とに分類し解析を行った。

その結果、以下の結論を得た。

1. 多枝疾患に対する PCI を施行した症例は 120 人中 68 人の患者 (56.7 %) においてみられ、一次的治療が 24 人 (20.0 %), 段階的治療が 44 人 (36.7 %) であった。
2. フォローアップ期間中の全死亡の発生率は有意に高得点群の方が高かった (38.0 % 対 5.7 %, log-rank 検定  $p < 0.01$ )。
3. 全死亡に関連する要因と考えられたヘモグロビン値、心筋梗塞の既往、糖尿病を加えて調整したモデルにおける多変量 COX 解析において、Combined score は全死亡に関する独立した予後予測因子であることが示された (ハザード比: 1.08, 95 % 信頼区間: 1.04-1.12),  $p < 0.001$ )。
4. 全死亡率に関する ROC 曲線分析において、Combined score の AUC (0.82, 95 % 信頼区間: 0.74-0.91) は、既存のスコアである残存 SYNTAX スコア (0.54, 95 % 信頼区間: 0.1-0.67) や SYNTAX スコア II (0.80, 95 % 信頼区間: 0.71-0.90) と比較してより高い AUC を描いた。

以上より、本研究では、残存冠動脈病変と他の臨床因子を組み合わせた新たなスコア (Combined score) が、MVD を有する ACS 患者に対する PCI 後の 5 年間の全死亡・MACE 発生率の予後予測評価として有用であること、また残存 SYNTAX スコアと比較して統計学的に有意に優れている予後予測スコアであることを明らかにした。これらの結果から MVD を有する ACS 患者に対してより適切な治療選択を行うにあたり Combined score が有用である可能性を示唆している。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。

Impact of changes in body mass index after percutaneous coronary intervention on long-term outcomes in patients with coronary artery disease (経皮的冠動脈形成術後の BMI 変化が冠動脈疾患患者の長期予後に与える影響)

由井 寿典

(論文の内容の要旨)

【目的】 一般に、肥満・やせのいずれも予後不良因子であることは知られている。肥満の程度は Body Mass Index (BMI) で評価され、肥満 (BMI 30.0 kg/m<sup>2</sup>) は冠動脈疾患 (CAD) の発生率を高くする。心不全領域においても肥満は心不全を発症する独立した危険因子であるが、心不全発症以降においては反対に体重減少が独立した予後不良因子であると報告されている (肥満パラドックス)。虚血性心疾患領域においては、これまで経皮的冠動脈形成術 (PCI) 後の体重変化が長期予後に与える影響についての研究はない。CAD 患者に肥満パラドックスが存在することが明らかになれば、PCI 後の体重変化が予後予測に利用できる可能性がある。したがって、本研究では PCI 後の体重変化が CAD 患者の長期予後に影響を及ぼすか、評価することを目的とした。

【方法】 長野県内の病院 (14施設) のいずれかの施設において、2012年8月から2013年7月の間に PCI を受けた CAD 患者を追跡した、多施設共同前向きコホート研究である SHINANO Registry をもとに解析を行った。PCI 施行時から PCI 施行後1年経過した時点での BMI 変化をもとに572人の患者を、BMI 減少群 (< -0.52 kg/m<sup>2</sup>) 191人、BMI 維持群 (-0.52 ~ +0.38 kg/m<sup>2</sup>) 191人、BMI 増加群 (≥ 0.38 kg/m<sup>2</sup>) 190人の3グループに分けて、そこから4年間追跡した。主要評価項目は有害心血管イベント (MACE: 全死亡、心筋梗塞、脳卒中)、副次評価項目は心臓死、出血、標的病変の再血行再建とした。

【結果】 PCI 施行後1年経過時の平均年齢は71.0歳で、平均 BMI は23.6 kg/m<sup>2</sup>で、高血圧・糖尿病などの冠動脈危険因子を含めて、グループ間の背景に有意差はなかった。フォローアップ期間中に60人に MACE が発生した。 Kaplan-Meier 分析では、BMI 減少群において、有意に MACE が多く発生していた (log-rank 検定, p=0.004)。MACE 内では全死亡・心筋梗塞、副次評価項目では心臓死に同様の傾向がみられた。多変量解析においては、治療後の BMI 減少が、MACE に関する独立した予後予測因子であることが

示された (HR: 2.24; 95% 信頼区間: 1.34-3.75)。

【考察】 本研究は、PCI 施行後1年での BMI 変化が MACE と関連していることを明らかにした。治療後に BMI が減少している患者は、BMI に変化がない患者と BMI が増加している患者よりも MACE の発生率が高い。この結果は、PCI 後の体重変化が予後予測因子となる可能性を示しており、心不全だけでなく、虚血性心疾患においても肥満パラドックスが存在することが示唆される。これまで、PCI 後の体重変化と予後との関連を評価した研究はなく、本研究は PCI 後の体重変化の臨床的意義を示した最初の研究である。日常診療で時間・費用コストをかけることのない、最も簡単なツールである BMI を用いて、PCI 施行後の予後予測に利用できる可能性を提示した点からも、本研究は臨床的に有用かつ意義の大きいものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

肥満の程度は Body Mass Index (BMI) で評価され、肥満 (BMI 30.0 kg/m<sup>2</sup>) は冠動脈疾患 (CAD) の発生率を高くする。心不全領域においても肥満は心不全を発症する独立した危険因子であるが、心不全発症以降においては反対に体重減少が独立した予後不良因子であると報告されている (肥満パラドックス)。虚血性心疾患領域においては、これまで経皮的冠動脈形成術 (PCI) 後の体重変化が長期予後に与える影響についての研究はない。よって、本研究では長野県内の14施設で PCI を受けた CAD 患者を登録した多施設共同前向きコホート研究である SHINANO Registry をもとに、PCI 施行時から1年経過した時点での BMI 変化をもとに572人の患者を、BMI 減少群・BMI 維持群・BMI 増加群の3グループに分けて、そこから4年間追跡した。

その結果、以下の結論を得た。

1. PCI 施行時の平均年齢は70.2歳で、平均 BMI は 23.9 kg/m<sup>2</sup>であった。baseline の BMI、高血圧・糖尿病などの冠動脈危険因子、冠動脈疾患の重症度など各グループ間の背景に有意差はなかった。
2. フォローアップ期間中に60人に MACE (major adverse cardiovascular events: 全死亡、心筋梗塞、

脳卒中)が発生した。 Kaplan-Meier分析では、BMI減少群において、有意にMACEが多く発生した (log-rank検定,  $p=0.004$ )。

3. MACE内では全死亡・心筋梗塞に同様の傾向がみられ、脳卒中には有意差はみられなかった。

4. 多変量解析では、治療後のBMI減少が、MACEに関する独立した予後予測因子であることが示された (HR: 2.14; 95%信頼区間: 1.29-3.57)。

以上より、本研究ではPCI施行後のBMI変化がMACEと関連していることが明らかとなった。これ

らの結果から、PCI治療後にBMIが減少している患者は、BMIに変化がない患者とBMIが増加している患者よりもMACEの発生率が高く、PCI後のBMI変化が予後予測因子となる可能性が示唆された。BMI測定は、日常診療で時間・費用コストが少なく、計測が簡便であり、予後予測に広く利用できる可能性が期待できる。よって、本研究は臨床的に有用かつ意義の大きいものであり、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。

The mechanisms involved in the resistance of estrogen receptor-positive breast cancer cells to palbociclib are multiple and change over time (エストロゲン受容体陽性乳癌細胞のバルボシクリブ耐性機序は複数あり経時的に変化する)

## 小野 真由

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】CDK4/6阻害剤は進行再発エストロゲン受容体 (ER) 陽性乳癌の治療に広く使用されるようになったが、この薬剤に耐性になった後の治療について、耐性機序の基礎研究に基づいた一定の見解はない。CDK4/6阻害剤に耐性となった乳癌の治療戦略を構築するために、バルボシクリブ耐性乳癌細胞を樹立し、その耐性機序の解析を行った。

【方法】ER陽性乳癌細胞株であるT47DとMCF7に長期間バルボシクリブを曝露し、バルボシクリブ耐性T47D (T47D-PR) と、 $1\mu\text{M}$ バルボシクリブ耐性MCF7 (MCF7-P1) および $2\mu\text{M}$ バルボシクリブ耐性MCF7 (MCF7-P2) を樹立した。これらの耐性株の化学療法剤や分子標的薬に対する薬剤感受性の変化を細胞増殖測定法 (WST法) で解析した。また、短時間のバルボシクリブ曝露、耐性株樹立後の異なるバルボシクリブ曝露期間の耐性株およびバルボシクリブ非存在下で培養後の耐性株で、シグナル伝達経路や細胞周期調節に関与するタンパク発現やリン酸化の変化をウェスタンブロット法で解析した。さらに、これらの耐性株のRBI遺伝子のコピー数や変異を解析した。

【結果】すべてのバルボシクリブ耐性株でCDK6の発現上昇とRb発現およびそのリン酸化の減少が認められた。一方で、ER $\alpha$ の発現減少とmTORリン酸化の上昇はT47D-PRのみで認められ、T47D-PRとMCF7-P1ではcyclinE2とE2F-1の発現は減少するのに対しMCF7-P2では上昇する等、それぞれの細胞株で異なるタンパク発現やリン酸化の変化が認められた。また耐

性株をバルボシクリブに長期間曝露し続けた株 (-L) では、樹立直後の耐性株と比較し、一部のタンパク発現やリン酸化に変化が認められた。T47D-PR-LとMCF7-P2ではRbリン酸化の消失が認められ、これらをバルボシクリブ非存在下で長期培養してもRbリン酸化の回復は認められず、RBI遺伝子に、T47D-PR-Lではコピー数減少と欠失が、MCF7-P2ではコピー数減少と1塩基置換により停止コドンが生じていることが確認された。また、他の薬剤の感受性では、全ての耐性株でCDK4/6阻害剤であるアベマシクリブへの交叉耐性が認められ、CDK1/2/5/9阻害剤であるディナシクリブには親株と同等の感受性を示すことが確認された。さらに、mTORリン酸化の上昇を認めたT47D-PRではmTOR阻害剤エベロリムスに対する感受性が増加していた。一方、乳癌治療に使用される主な化学療法剤 (エリブリン、パクリタキセル、ドキソルピシン、フルオロウラシル) に対する感受性は、全ての耐性株で親株との変化は認めなかった。また、臨床での使用と同様なバルボシクリブとフルベストラントの併用では、親株で認められたフルベストラントによる増殖抑制効果の増強は、バルボシクリブに長期曝露した耐性株では認められなかったが、バルボシクリブ非存在下で長期培養した耐性株では増殖抑制の増強が認められた。

【考察】ER陽性乳癌細胞では複数の分子機構の変化がバルボシクリブ耐性獲得に関与しており、耐性細胞で活性化されているタンパクを標的とした治療戦略が、耐性克服に有用と考えられる。また、バルボシクリブ

単剤の投与により *RBI* 遺伝子にコピー数変化や変異が誘導されることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

CDK4/6阻害剤は進行再発エストロゲン受容体 (ER) 陽性乳癌の治療に広く使用されるようになったが、この薬剤に耐性になった後の治療について、耐性機序の基礎研究に基づいた一定の見解はない。CDK4/6阻害剤に耐性となった乳癌の治療戦略を構築するために、パルボシクリブ耐性乳癌細胞を樹立し、その耐性機序の解析を行った。

ER 陽性乳癌細胞株である T47D と MCF7 に長期間パルボシクリブを曝露し、パルボシクリブ耐性 T47D (T47D-PR) と、1  $\mu$ M パルボシクリブ耐性 MCF7 (MCF7-P1) および 2  $\mu$ M パルボシクリブ耐性 MCF7 (MCF7-P2) を樹立した。これらの耐性株の化学療法剤や分子標的薬に対する薬剤感受性の変化を細胞増殖測定法 (WST 法) で解析した。また、短時間のパルボシクリブ曝露、耐性株樹立後の異なるパルボシクリブ曝露期間の耐性株およびパルボシクリブ非存在下で培養後の耐性株で、シグナル伝達経路や細胞周期調節に関与するタンパク発現やリン酸化の変化をウエスタンブロット法で解析した。さらに、これらの耐性株の *RBI* 遺伝子のコピー数や変異を解析した。

その結果、小野は次の結論を得た。

1. すべてのパルボシクリブ耐性株で CDK6 の発現上昇と Rb 発現およびそのリン酸化の減少が認められた。一方で、ER $\alpha$  の発現減少と mTOR リン酸化の上昇は T47D-PR のみで認められ、T47D-PR と MCF7-P1 では cyclinE2 と E2F-1 の発現は減少するのに対し MCF7-P2 では上昇する等、耐性株ごとに異なるタンパク発現やリン酸化の変化が認められた。
2. 耐性株をパルボシクリブに長期間曝露し続けた株 (-L) では、樹立直後の耐性株と比較し、一部のタ

ンパク発現やリン酸化に変化が認められた。T47D-PR-L と MCF7-P2 では Rb リン酸化の消失が認められ、これらをパルボシクリブ非存在下で長期培養しても Rb リン酸化の回復は認められず、*RBI* 遺伝子に、T47D-PR-L ではコピー数減少と欠失が、MCF7-P2 ではコピー数減少と 1 塩基置換により停止コドンが生じていることが確認された。

3. 全ての耐性株で CDK4/6 阻害剤であるアベマシクリブへの交叉耐性が認められ、CDK1/2/5/9 阻害剤であるディナシクリブには親株と同等の感受性を示すことが確認された。
4. mTOR リン酸化の上昇を認めた T47D-PR では mTOR 阻害剤エベロリムスに対する感受性が増加していた。
5. 乳癌治療に使用される主な化学療法剤 (エリブリン、パクリタキセル、ドキシソルビシン、フルオロウラシル) に対する感受性は、全ての耐性株で親株との変化は認めなかった。
6. パルボシクリブとフルベストラントの併用では、親株で認められたフルベストラントによる増殖抑制効果の増強は、パルボシクリブに長期曝露した耐性株では認められなかったが、パルボシクリブ非存在下で長期培養した耐性株では増殖抑制の増強が認められた。

これらの結果より、ER 陽性乳癌細胞では複数の分子機構の変化がパルボシクリブ耐性獲得に関与しており、耐性細胞で活性化されているタンパクを標的とした治療戦略が、耐性克服に有用と考えられる。また、パルボシクリブ単剤の投与により *RBI* 遺伝子にコピー数変化や変異が誘導されることが示された。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。

Risperidone Mitigates Enhanced Excitatory Neuronal Function and Repetitive Behavior Caused by an ASD-Associated Mutation of SIK1 (SIK1 の ASD 関連変異によって引き起こされた興奮性神経機能と反復行動はリスペリドンによって軽減される)

Badawi, Moataz

(論文の内容の要旨)

【Background and Aims】 Salt inducible kinase 1 (SIK1) is a member of AMP-activated protein kinase (AMPK) proteins that modulates the function of transcriptional regulatory factors by phosphorylation both

in cytosol and nucleus. Six mutations in the SIK1 coding gene have been identified in the early infantile epileptic encephalopathy (EIEE-30) patients accompanied by autistic symptoms, such as repetitive behavior and social behavioral deficits. Among these

mutations, two are nonsense mutations that truncate the c-terminal nuclear localization domain (NLD). It has been shown that the C-terminal-truncated form of SIK1 protein affects the subcellular distribution of SIK1 protein, tempting to speculate the relevance to the pathophysiology of the symptoms.

**【Materials & Methods】** To study the effects of these mutations on the disorder, Badawi generated SIK1 mutant (SIK1-MT) mice recapitulating the c-terminal truncated mutations using CRISPR/Cas9 technology. He studied the behaviors relevant to neurodevelopmental disorders and electrophysiological properties in pyramidal neurons in layer 5 of the medial prefrontal cortex in SIK1-MT and wild-type control mice using whole cell patch clamp technology on the acute brain slices. Risperidone was administrated intraperitoneally to examine the rescue effect.

**【Results】** SIK1-MT mice grow normally without showing any abnormal morphological changes, early lethality or epileptic seizures. On the subcellular level, SIK1-MT protein was distributed in the nucleus and cytoplasm, whereas the distribution of wild-type SIK1 was restricted to the nucleus. Using patch clamp electrophysiology, we found the disruption of excitatory and inhibitory (E/I) synaptic balance due to an increase in excitatory synaptic transmission and an enhancement of neural excitability in the pyramidal neurons in layer 5 of medial prefrontal cortex (mPFC) in SIK1-MT mice. We also found the increased repetitive behavior and social behavioral deficits in SIK1-MT mice compared to the SIK1-WT mice. The Risperidone acute intraperitoneal administration attenuated the neural excitability and excitatory synaptic transmission, however; the disrupted E/I synaptic balance was unchanged because the

inhibitory synaptic transmission was also reduced. Risperidone also restored the repetitive behavior, but not the social behavioral deficits.

**【Conclusion】** Altogether, these findings suggest that the increased excitatory neural activity is responsible for the observed augmentation in repetitive behavior whereas the disrupted E/I synaptic balance accounts for the social behavioral deficits in SIK1-MT mice.

(論文審査の結果の要旨)

Salt inducible kinase 1 (SIK1) is a member of AMP-activated protein kinase (AMPK) proteins that modulates the function of transcriptional regulatory factors by phosphorylation both in cytosol and nucleus. SIK1 C-terminal-truncated mutations were identified in patients with EIEE-30. To study the effect of these mutations on the etiology of EIEE-30, Badawi generated C-terminal-truncated SIK1-MT mice using CRISPR/Cas9-mediated genome editing as disease models. He studied these mice by focusing on the synaptic function and behaviors and found the following:

- (1) The frequency of mEPSCs and the neuronal excitability were increased in pyramidal neurons in layer 5 of the mPFC of SIK1-MT mice.
- (2) Repetitive behavior was increased and the social behavior was impaired in the SIK1-MT mice.
- (3) Elevated excitatory synaptic transmission and neural excitability in the SIK1-MT mice were restored by risperidone treatment.
- (4) Increased repetitive behavior, but not social behaviors, in SIK1-MT mice was ameliorated by risperidone treatment.

The committee chair and vice chairs evaluated that the thesis deserved a doctoral dissertation.

Prevalence of latent tuberculosis infection and its risk factors in Japanese hemodialysis patients (日本の血液透析患者における潜在性結核感染症の有病率とそのリスク因子について)

小川 洋平

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 活動性結核は潜在性結核感染症から発症することが多いため潜在性結核感染症の治療は重要である。特に血液透析患者は活動性結核発症リスクが

高いため、積極的に潜在性結核感染症の治療検討を行うことが推奨されている。しかし、日本人の血液透析患者における潜在性結核感染症の有病率やリスク因子について不明な点が多いため、今回の研究を行った。

【方法】 病院機能の異なる3病院（急性期病院から慢性期病院）で外来維持血液透析中の患者を対象とした。IGRA（interferon-gamma release assay）としてQuantiferon<sup>®</sup>-3G（QFT）を用い、QFT陽性者のうち活動性結核を除外できた者を潜在性結核感染症と診断し、年齢、性別、透析歴、腎不全の原疾患、併存疾患、喫煙歴、血液検査データとの関連について横断的に解析した。

【結果】 対象血液透析患者118名の内、96名がQFT陰性、7名がQFT判定保留、14名がQFT陽性、1名がQFT判定不能であった。活動性結核の患者はおらず、潜在性結核感染症確定患者（QFT陽性）は14名（11.9%）、潜在性結核感染症疑いの患者（QFT陽性+判定保留）は21名（17.8%）であった。潜在性結核感染症のリスク因子としては高齢であるほどリスクが高く、また腎不全の原疾患としては腎硬化症が有意に多かった。その他に有意な潜在性結核感染症リスク因子は検出されなかった。QFTの判定保留群では有意に透析歴が長かった。ロジスティック回帰分析でも70歳以上であることが有意な潜在性結核感染症リスク因子として同定された。各年代別のQFT陽性率、QFT陽性+判定保留率は高齢になるほど高くなっており、60歳代からは潜在性結核感染症の有病率が高くなった。

【考察】 血液透析患者の潜在性結核感染症リスク因子として年齢が検出された。高齢者ほど結核罹患率が高い時代を経験しており、このことが結果に影響を与えた可能性がある。また、腎不全の原疾患として腎硬化症が有意に多かったが腎硬化症は高齢者の代表的な腎疾患であり、年齢による影響を強く受けているものと考えられた。国内の血液透析患者における潜在性結核感染症について検討した報告では病院の立地や機能の影響について調査されていなかったため、我々は異なる規模・機能の3病院の比較検討を行った。3病院間のQFT結果には有意差はなく、病院機能に関わらず透析患者の潜在性結核感染症スクリーニングが必要であると考えられた。また世界各国の結核罹患率と透析患者のIGRA陽性率に関連は認めず、その原因として移民や外国人比率の影響が考えられた。今後、日本国内でも外国人比率の上昇に伴って潜在性結核感染症の有病率がさらに上昇してくる可能性がある。なお、過去の報告では透析歴の長さやQFTの判定保留に関連性があることが報告されていたが、本研究でも同様の結果が得られたためQFTは透析導入期に施行するのが望ましいと考えられた。

【結論】 血液透析患者の潜在性結核感染症に対するIGRAを用いたスクリーニングは、病院の立地や機能に関わらず、60歳以上の血液透析患者や新規血液透析導入患者に対して積極的に施行すべきである。

（論文審査の結果の要旨）

活動性結核は潜在性結核感染症から発症することが多く潜在性結核感染症の治療は今後の結核根絶のため重要な治療戦略である。特に血液透析患者は潜在性結核感染症からの活動性結核発症リスクが高く、積極的に治療検討を行うことが推奨されている。しかし、日本国内の血液透析患者の潜在性結核感染症の有病率やリスク因子、病院の機能や立地により有病率に違いがあるのかどうかなど不明な点も多く、今回の研究を行った。本論文では信州大学医学部附属病院の関連施設のうち機能や立地の異なる3病院で外来維持血液透析中の118名を対象としてインターフェロン-γ遊離試験（Quantiferon<sup>®</sup>-3G、以下QFT）を用いて潜在性結核感染症の診断を行い、臨床データとともに統計解析を行って検討した。

その結果、小川は以下の結論を得た。

1. QFT陰性群に比べて潜在性結核感染症確定患者群（QFT陽性）、潜在性結核感染症疑いの患者群（QFT判定保留+陽性）は高齢であり、年齢はリスク因子で60歳代から増加した。
2. 腎不全の原疾患として潜在性結核感染症確定患者群では腎硬化症が多く、潜在性結核感染症疑いの患者群では腎硬化症、原疾患不明が多く、また慢性糸球体腎炎が少なかった。腎硬化症は高齢者において一般的な腎疾患であり、また高齢者ほど腎不全の原疾患不明も多くなるなど原疾患の有意差は年齢による影響が大きいと考えられた。
3. QFT判定保留は透析歴が長くなるほど出やすくなるため、より明確な結果を得るためには透析導入期に検査を施行すべきである
4. 病院の立地や機能によってQFT判定結果割合に差がなく、どんなタイプの病院でも潜在性結核感染症のスクリーニングをすべきである。

これらの結果より、病院の立地や機能に関わらず、60歳以上の血液透析患者や新規の血液透析導入患者に対して積極的に検査を施行すべきである。本研究は、血液透析患者の潜在性結核感染症の治療戦略に対して有益な情報を提示していると考えられる。

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。

Impact of nutritional index on long-term outcomes of elderly patients with coronary artery disease: sub-analysis of the SHINANO 5 year registry (冠動脈疾患を伴う高齢患者の長期予後に関する栄養指標の影響: SHINANO レジストリー 5 年間のサブ解析)

丸 山 周 作

(論文の内容の要旨)

**【目的】** 栄養状態は様々な患者集団における死亡率の重要な予測因子とされており, 安定冠動脈疾患, 慢性心不全, 慢性腎臓病や末梢動脈疾患などの心血管疾患における予後不良因子とも関連するとされる。以前の研究では血清アルブミン, Body Mass Index, コレステロールなどいくつかの栄養指標が心血管イベントのリスクに関与していることが示されており, 近年では Geriatric Nutritional Risk Index や the Controlling Nutritional Status が栄養指標として用いられるようになってきている。これらの指標は広く受け入れられているものの, 複雑な計算式のため一般診療ではあまり使用されていない。近年 Triglycerides (TG) × Total Cholesterol (TC) × Body Weight (BW)/1000 で計算される TCBI とよばれる簡便な新たな栄養指標が提案されており, これは心血管患者において一般的に測定される客観的パラメーターで構成されている点の特徴である。高齢患者と若年患者の栄養状態には明らかな違いがあり, 高齢者の栄養状態の評価は難しいとされる。TCBI は冠動脈疾患患者における栄養状態の評価に有用であるが, 高齢患者における有用性ははっきりとしていない。そこで本研究では, 経皮的血管形成術 (PCI) をうけた高齢患者の心血管イベントの予測における TCBI の有用性を評価することを目的とした。

**【方法】** SHINANO 5 year registry は, 長野県において2012年8月から2013年7月までに, 経皮的血管形成術を施行された連続1,665名の虚血性心疾患の患者を, 5年間にわたりフォローを行った。本研究では75歳以上の597名の高齢患者を後ろ向きに解析した。TCBI は Triglycerides (TG) × Total Cholesterol (TC) × Body Weight (BW)/1000 で計算され, 患者は四分位数で4グループに分類された。主要評価項目は全死亡, 脳卒中および心筋梗塞を含めた主要脳心血管イベント (MACCE) とした。

**【結果】** 登録された597名の患者のうち, lowest TCBI 群では61名の患者 (40.9%) において MACCE を認めた。lowest TCBI 群は他群と比較して, 高齢で低体重が多かった。また冠動脈危険因子については, 喫煙

歴, 高血圧と糖尿病の有病率に群間の差はなかったが, lowest TCBI 群で脂質異常症の割合と HbA1c 値は低い傾向であった。各 TCBI 群で Kaplan-Meier 解析を行ったところ, lowest TCBI 群において有意に MACCE の発症率が高かった (log rank 検定,  $P < 0.001$ )。単変量解析では low TCBI, 年齢, スタチン使用, 急性冠症候群, 低左室心駆出率, 慢性腎臓病が MACCE に関連する要因であり, それらを調整したモデルにおける多変量解析において, low TCBI が MACCE に関する独立して予後と関連していることが示された (ハザード比: 1.44; 95% 信頼区間 1.03-2.01;  $P = 0.031$ )。

**【考察】** 本研究では, 冠動脈疾患を有する高齢患者において, TCBI が心血管イベントの予測に有用であることを明らかにした。また以前の研究では TCBI と全死亡, 心疾患死および癌関連死を主要評価項目としており, 本研究では MACCE を主要評価項目として評価できたことは大きな研究結果と考える。今回, low TCBI 群では脂質異常症の有病率, TG, TC および BW は優位に低く, 栄養状態の指標として低脂質レベルおよび BW は予後不良因子であった。高齢患者における脂質管理の適切な管理についてはいまだ議論のあるところであり, 動脈硬化疾患予防ガイドラインにおいてもこれまで通り厳格な脂質管理が提唱されているものの, 75歳以上の患者では個々での判断を提唱されている。また BW に関しても肥満パラドックスという概念があり, 心不全, 冠動脈疾患, 慢性腎臓病などをもつ肥満患者がやせ患者よりも予後が良いという報告もある。これらを考慮すると, 脂質パラメーターおよび BW と臨床転帰との逆説的な関係が指摘されており, 本研究はこれらパラメーターで構成される TCBI で冠動脈疾患を伴う高齢患者の予後予測ができる可能性を示すものであり, 臨床的に有用かつ意義の高いものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

栄養状態は様々な患者集団における死亡率の重要な予測因子とされており, 安定冠動脈疾患, 慢性心不全, 慢性腎臓病や末梢動脈疾患などの心血管疾患における予

後不良因子とも関連するとされる。近年 Triglycerides (TG)×Total Cholesterol (TC)×Body Weight (BW)/1000で計算される TCBI とよばれる簡便な新たな栄養指標が提案されており、心血管患者において一般的に測定される客観的パラメーターで構成されている点の特徴である。TCBI は冠動脈疾患患者における栄養状態の評価に有用であるが、高齢患者における有用性ははっきりとしていない。そこで本研究では、経皮的血管形成術 (PCI) をうけた高齢患者の心血管イベントの予測における TCBI の有用性を評価することを目的とした。本研究では PCI を施行された75歳以上の597名の虚血性心疾患の高齢患者を、5年間にわたりフォローを行った。患者は四分位数で4グループに分類され、主要評価項目は全死亡、脳卒中および心筋梗塞を含めた主要脳心血管イベント (MACCE) とした。

その結果、以下の結論を得た。

1. 597名の患者のうち、low TCBI 群では61名の患者 (40.9%) において MACCE を認めた。
2. Low TCBI 群は他群と比較して高齢で低体重が

多く、冠動脈危険因子では、喫煙歴、高血圧と糖尿病の有病率に群間の差はなかったが、脂質異常症の割合と HbA1c 値は低い傾向であった。

3. Low TCBI 群において有意に MACCE の発症率が高かった (log rank 検定,  $P < 0.001$ )。
4. 予後に影響をもたらすと考えられる患者背景やリスクファクターを用いて行った多変量解析において、low TCBI は MACCE の独立した予後予測因子であった (ハザード比: 1.44; 95% 信頼区間 1.03-2.01;  $P = 0.031$ )。

以上より本研究では、新たな栄養指標である TCBI が、PCI を施行された75歳以上の高齢患者における MACCE 発生の予後予測に有用であることを明らかにした。また脂質パラメーターおよび体重で構成される TCBI で高齢患者の予後予測ができる可能性を示すものであり、臨床的に有用かつ意義の高いものと考えられる。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。

Increased expression of secreted protein acidic and rich in cysteine and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 in epidermotropic melanoma metastasis (悪性黒色腫の表皮向性転移における、secreted protein acidic and rich in cysteine および tissue inhibitor of metalloproteinase-3の発現増強)

### Maureen Tania Widyasaputra

(論文の内容の要旨)

**【Background】** Primary cutaneous melanoma generally arises in the epidermis, followed by invasion into the dermis. Next, melanoma can metastasize either by the lymphatic or by the hematogenous route to other organs or distant skin areas. When melanoma cells metastasize to the distant skin area, they will usually arise into the dermal area (common skin metastasis). Although infrequent, the metastases can develop more superficially than usual within the intraepidermal area and form epidermotropic melanoma metastasis (EMM).

**【Objective】** In this study, we focused on this unique manner of metastasis and tried to identify key molecules which affect EMM. Through this study, we further tried to illuminate invasion mechanism from the epidermis to the dermis.

**【Materials and Methods】** Gene expression in EMM

was compared with that in common skin metastasis (CSM). As an initial screening, mRNA expression was evaluated using PCR arrays for genes affecting the extracellular matrix, cellular adhesion, and tumor metastasis on three EMM and three CSM samples. For molecules showing altered expression in the EMM, expression levels were further verified using real-time quantitative PCR (qPCR) and immunohistochemistry. Next, we also compared the protein expression of EMM and CSM on molecules that were previously known to involve the melanoma metastasis pathway.

**【Results】** Five molecules showed an expression difference in the initial screening. Among these, SPARC was preferentially expressed in EMM ( $p = 0.01$ ) by real-time qPCR. Another candidate molecule, TIMP3, was not statistically significant ( $p = 0.07$ ), but showed the tendency of higher expression. These results cor-



related negatively to expression of N-cadherin and  $\beta$ -catenin.

**【Conclusion】** The upregulation of SPARC and TIMP3 may disrupt the continuity of the canonical Wnt pathway. This pathway regulates adhesion activity of melanoma cells to localize within the dermis, which consequently promotes EMM. Our study highlights the potential role of SPARC and TIMP3 as key molecules in EMM, and analysis of EMM may contribute for understanding melanoma invasion between the epidermis and the dermis.

(論文審査の結果の要旨)

**Background:** Primary cutaneous melanoma generally arises in the epidermis, followed by invasion into the dermis. Next, melanoma can metastasize either by the lymphatic or by the hematogenous route to other organs or distant skin areas. When melanoma cells metastasize to the distant skin area, they will usually arise into the dermal area (common skin metastasis). Although infrequent, the metastases can develop more superficially than usual within the intraepidermal area and form epidermotropic melanoma metastasis (EMM).

**Objective:** In this study, we focused on this unique manner of metastasis and tried to identify key molecules which affect EMM. Through this study, we further tried to illuminate invasion mechanism from the epidermis to the dermis.

**Materials and Methods:** Gene expression in EMM was compared with that in common skin metastasis (CSM). As an initial screening, mRNA expression was evaluated using PCR arrays for genes affecting the extracellular matrix, cellular adhesion, and tumor metastasis on three EMM and three CSM samples. For molecules showing altered expression in the EMM, expression levels were further verified using real-time quantitative PCR (qPCR) and immunohistochemistry. Next, we also compared the protein expression of EMM and CSM on molecules that were previously known to involve the melanoma metastasis pathway.

**Results:** We found the following results:

1. In the human extracellular matrix and adhesion matrix array, secreted protein acidic and rich in

cysteine (SPARC), tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3), collagen type I alpha I chain, collagen type XV alpha I chain, and connective tissue growth factor were higher in EMM samples than CSM samples.

2. Through real-time qPCR and immune staining, the increase of SPARC and TIMP3 in EMM were confirmed in the levels of mRNA and protein.
3. Different from CSM, EMM showed an absence of neural cadherin (N-cadherin) and  $\beta$ -catenin upregulation.
4. Most primary melanoma lesions expressed TIMP3 but not SPARC.

**Conclusions:** The present study showed novel findings of SPARC and TIMP3 expression in EMM and proposed a potential mechanism of melanoma cell invasion. These results correlated negatively to the expression of N-cadherin and  $\beta$ -catenin. The upregulation of SPARC and TIMP3 may disrupt the continuity of the canonical *Wnt* pathway. This pathway regulates the adhesion activity of melanoma cells to localize within the dermis, and the disruption consequently promotes EMM. Our study highlights the potential role of SPARC and TIMP3 as key molecules in EMM, and analysis of EMM may contribute to understanding melanoma invasion between the epidermis and the dermis.

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。

Cerebrospinal fluid biomarkers implicated in the pathogenesis of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-related hypertrophic pachymeningitis (ANCA 関連肥厚性硬膜炎の病態に関係する脳脊髄液のバイオマーカー解析研究)

池田 淳司

(論文の内容の要旨)

【背景】肥厚性硬膜炎 (HP) は硬膜に炎症性および線維性の肥厚をきたし、頭痛、脳神経障害、運動失調、意識障害、脊髄機能障害などを呈する。免疫介在性 HP の原因となる基礎疾患には、ANCA 関連血管炎 (AAV)、IgG4関連疾患 (IgG4RD)、サルコイドーシスのほか、様々な膠原病・リウマチ性疾患が含まれる。AAV に合併もしくは ANCA 陽性の HP (ANCA 関連 HP) は、免疫介在性 HP の中で最も多く 30~50% を占める。一方、基礎疾患が不明の場合は特発性 HP に分類されるが、中枢神経限局型 AAV や IgG4RD が含まれる可能性がある。実際、ANCA 関連 HP の範疇にある患者の約 15% は、AAV に分類できない。HP は AAV の初期症状として発症することが多く、病理学的根拠や診断代用マーカーが存在しないと、AAV の分類基準を満たすことが難しい。そのため、AAV を背景疾患とする場合でも特発性 HP と診断されることが懸念される。以上から発症早期でも ANCA 関連 HP の診断に有用なバイオマーカーが求められる。

本研究では ANCA 関連 HP の診断に有用なバイオマーカーの候補として、B 細胞の維持および活性化に関与するサイトカインである B-cell activation factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) および a proliferation-inducing ligand (APRIL)、線維化の促進に関係するサイトカインである TGF- $\beta$ 1 に注目し、ANCA 関連 HP、その他の免疫介在性 HP (Other HP)、MS (多発性硬化症) および非炎症性神経疾患 (NIND) との比較解析を行った。

【方法】研究対象は、信州大学医学部附属病院で診療した免疫介在性 HP 患者 24 名 (ANCA 関連 HP 12 名 [平均年齢 67 歳, 男性 7 名, 女性 5 名], Other HP 12 名 [平均年齢 63 歳, 男性 9 名, 女性 5 名])。Other HP 群の内訳は、IgG4RD-HP 4 名、サルコイドーシス関連 HP 2 名、再発性多発軟骨炎関連 HP 1 名、特発性 HP 5 名。ANCA 関連 HP 患者は、多発血管炎性肉芽腫症 (GPA) 9 名、顕微鏡的多発血管炎 1 名、分類不能血管炎 2 名であった。MS 14 名 (平均年齢 38

歳, 男性 3 名, 女性 11 名), NIND 10 名 (平均年齢 56 歳, 男性 5 名, 女性 5 名) を比較対象とした。

治療開始前の髄液、血清を用いた解析として、ELISA による BAFF、APRIL および TGF- $\beta$ 1 の測定と、化学発酵酵素免疫測定法 (CLEIA 法) による MPO-ANCA および PR3-ANCA の測定を行った。臨床背景 (神経・身体所見・Birmingham vasculitis activity score ver. 3: BVAS)、一般的検査所見 (血清) および髄液一般検査 (細胞数、蛋白、IgG index) との相関を解析した。

【結果】ANCA 関連 HP では 7 名、Other HP では 10 名が、HP を最初の臨床症状としていた。髄液の細胞数は、ANCA 関連 HP と Other HP で NIND に比して有意に上昇していた。IgG index は、ANCA 関連 HP、Other HP および MS 間で有意な差はなかった。ANCA 関連 HP の 7 名 (58%) で髄液中に ANCA が検出され、4 名が MPO-ANCA 陽性、3 名が PR3-ANCA 陽性であった。髄液中の PR3-ANCA が陽性の 1 名は、血清の ANCA は陰性であり、GPA の初発症候が HP であった。残りの 6 名は、髄液と血清で ANCA のサブタイプが一致していた。Other HP、MS および NIND の髄液からは、ANCA は検出されなかった。ANCA 関連 HP および Other HP 群の髄液 BAFF、APRIL および TGF- $\beta$ 1 は、MS および NIND に比して有意に上昇していた。これらは ANCA 関連 HP と Other HP の間で有意差はなかった。ANCA 関連 HP および Other HP の血清 BAFF は、NIND に比して有意に上昇していた。ANCA 関連 HP の血清 APRIL および TGF- $\beta$ 1 は、MS と NIND に比して有意に上昇していた。ANCA 関連 HP および Other HP とともに、髄液と血清に検出される値の相関解析 (回帰分析) において、BAFF、APRIL および TGF- $\beta$ 1 の各々で有意な相関を認めなかった。ANCA 関連 HP は、髄液の BAFF と APRIL の値が IgG index と有意に相関していた。Other HP では、髄液の BAFF と APRIL の値が髄液細胞数および蛋白と有意に相関していた。髄液の TGF- $\beta$ 1 は、いずれとも有意相関を示さなかった。ANCA 関連 HP で MPO-

ANCA 陽性と PR3-ANCA 陽性の 2 群に分けた比較では、BVAS、血清 CRP 値および神経症状で有意差は見られなかった。髄液細胞数は MPO-ANCA 陽性群で多い傾向であったが、有意差はなかった。髄液蛋白の値と IgG index は、MPO-ANCA 陽性群で有意に高い傾向が示された。血清・髄液ともに BAFF、APRIL および TGF- $\beta$ 1 の値には両群間で有意差は認められなかった。

【結論】髄液の BAFF、APRIL および TGF- $\beta$ 1 は免疫介在性 HP 患者の頭蓋内で産生され有意に上昇しており、疾患活動性を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。特に ANCA 関連 HP で、髄液中の BAFF と APRIL が IgG index と相関していたことは、自己反応性 B 細胞の活性化を介した反応が、ANCA 関連 HP の病態形成に関与していることが考察された。さらに ANCA 関連 HP 患者の半数以上で髄液中に ANCA が検出された。髄液中 ANCA の検出は ANCA 関連 HP に特異的であり、他の免疫介在性 HP との鑑別に有用である。

#### （論文審査の結果の要旨）

肥厚性硬膜炎（HP）は硬膜に炎症性および線維性の肥厚をきたし、頭痛、脳神経障害、運動失調、意識障害、脊髄機能障害などを呈する。免疫介在性 HP の原因となる基礎疾患には、ANCA 関連血管炎（AAV）、IgG4 関連疾患（IgG4RD）、サルコイドシスのほか、様々な膠原病・リウマチ性疾患が含まれる。ANCA 関連 HP は、免疫介在性 HP の中で最も多い。一方、基礎疾患が不明の場合は特発性 HP に分類されるが、中枢神経限局型 AAV や IgG4RD が含まれる可能性がある。HP は AAV の初期症状として発症することが多く、病理学的根拠や診断代用マーカーが存在しないと、AAV の分類基準を満たすことが難しい。そのため、AAV を背景疾患とする場合でも特発性 HP と診断されることが懸念される。以上から発症早期でも ANCA 関連 HP の診断に有用なバイオマーカーが求められる。

本研究では ANCA 関連 HP の診断に有用なバイオマーカーの候補として、B 細胞の維持および活性化に関与するサイトカインである B-cell activation factor of the tumor necrosis factor family（BAFF）および a proliferation-inducing ligand（APRIL）、線維化の促進に関係するサイトカインである TGF- $\beta$ 1 に注目し、ANCA 関連 HP、その他の免疫介在性 HP（Other HP）、MS および非炎症性神経疾患（NIND）との比

較解析を行った。

その結果、池田は次の結論を得た。

1. ANCA 関連 HP と Other HP で髄液・血清の BAFF、APRIL、TGF- $\beta$ 1 は有意に上昇していた。各々のサイトカインの血清値と髄液値に相関関係はないため、中枢神経で独自に産生されていることが示唆された。
2. ANCA 関連 HP は、髄液の BAFF と APRIL の値が IgG index と有意に相関していた。
3. ANCA 関連 HP の 7 名（58%）で髄液中に ANCA が検出され、4 名が MPO-ANCA 陽性、3 名が PR3-ANCA 陽性であった。髄液中の PR3-ANCA が陽性の 1 名は、血清の ANCA は陰性であった。残りの 6 名は、髄液と血清で ANCA のサブタイプが一致していた。Other HP、MS および NIND の髄液からは、ANCA は検出されなかった。
4. 髄液蛋白の値と IgG index は、MPO-ANCA 陽性群で有意に高かった。

これらの結果より、髄液の BAFF、APRIL および TGF- $\beta$ 1 は、免疫介在性 HP 患者の中枢神経で産生され有意に上昇し、疾患活動性を反映するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。特に ANCA 関連 HP で、髄液中の BAFF と APRIL が IgG index と相関していたことは、自己反応性 B 細胞の活性化を介した反応が、ANCA 関連 HP の病態形成に関与していることが考察された。髄液中の ANCA の検出は、ANCA 関連 HP に特異的で、他の免疫介在性 HP との鑑別に有用であった。

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。

The implication of interferon- $\gamma$ -producing immunocompetent cells for evaluating disease activity and severity in adult-onset Still's disease (成人スチル病における IFN- $\gamma$  産生免疫担当細胞の疾患活動性および重症度への関連解析研究)

市川 貴規

(論文の内容の要旨)

【背景】成人スチル病 (AOSD) は、マクロファージの活性化と高サイトカイン血症を病態背景として、発熱や皮疹、多発関節炎を呈する全身性の炎症性自己免疫疾患である。既存の免疫抑制療法を継続しても、再発を繰り返す AOSD 患者が多く経験される。また重症患者では、マクロファージ活性化症候群や重要臓器障害を合併し生命予後に直結する。炎症性サイトカインである interferon (IFN)- $\gamma$  は、T 細胞や natural killer (NK) 細胞などから分泌されマクロファージ活性化に寄与する。疾患活動性の高い AOSD 患者で IFN- $\gamma$  の有意な産生亢進が報告され、病態の中核をなすサイトカインとして知られるが、IFN- $\gamma$  を介した免疫応答や IFN- $\gamma$  産生細胞の動態が AOSD の臨床的特徴や予後とどのように関連するかは未だ分かっていない。

【目的】本研究では AOSD の臨床的特徴と、IFN- $\gamma$  の血清レベルおよび IFN- $\gamma$  産生細胞の動態との関連性を明らかにすることを目的とした。また、IFN- $\gamma$  産生細胞を誘導する関連サイトカインの関与についても評価した。

【方法】研究対象は、当科で診療した治療導入前の急性期 AOSD 患者 (急性期 AOSD 群) 25 名 (年齢中央値 51 歳, 男性 6 名 / 女性 19 名)。AOSD の診断は山口らの分類基準を用いた。急性期 AOSD 群 25 名の中で、Pouchot score (systemic score) が 0 点の寛解患者 9 名 (寛解群) および患者群と同齢の健常者 (HC) 12 名を比較対象とした。初期治療に抵抗性を示した患者は難治群と定義した。提供された末梢血を用いて、以下の手法にて実験的測定・解析を行った。末梢血から末梢血単核細胞 (PBMCs) および血清を分離。PBMCs は PMA および ionomycin で刺激を行った後、表面抗原の蛍光色素標識抗体で染色。細胞膜透過処理を行い染色処置後、フローサイトメトリーで CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞および NK (CD3-CD16+CD56+) 細胞の細胞内に発現する IFN- $\gamma$  を測定した。また市販の測定キットを用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) で、血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-12 および IL-18 の値を測定した。実験的測定値は急性期

AOSD 群と HC で比較するとともに、寛解群 9 名では急性期の値と比較、臨床所見との相関関係を解析した。また、難治群は非難治群と比較して、臨床所見および実験的測定値との有意差を検討した。

【結果】急性期 AOSD 群 25 名中、18 名 (72%) が難治群に分類された。臨床所見の項目では白血球数が難治群で有意に高値であったが、他の項目に有意差は認めなかった。CD4 陽性細胞の発現比率は急性期 AOSD 群と HC で有意差はなかったが、CD4+IFN- $\gamma$ +細胞の発現比率は有意上昇していた (中央値 5.89% vs. 1.06%,  $P=0.0002$ )。また細胞内 IFN- $\gamma$  発現および平均蛍光強度 (MFI) は急性期 AOSD 群で HC に比して有意に高値であった (中央値 5.84% vs. 1.75%,  $P=0.0002$ ,  $P<0.0001$ )。CD8 陽性細胞の発現比率は急性期 AOSD 群で HC に比して有意に低値であったが (中央値 13.8% vs. 19.4%,  $P=0.003$ )、CD8+IFN- $\gamma$ +細胞の発現比率は有意上昇していた (中央値 7.90% vs. 4.20%,  $P=0.041$ )。また細胞内の IFN- $\gamma$  発現および MFI は急性期 AOSD 患者群で有意に高値であった (中央値 72.8% vs. 23.6%,  $P=0.0002$ ,  $P=0.0002$ )。NK 細胞では、発現比率が急性期 AOSD 群で HC に比して有意に低値であったが (中央値 8.42% vs. 14.28%,  $P=0.0026$ )、IFN- $\gamma$  の細胞内発現および MFI は有意に高値であった (中央値 41.5% vs. 23.1%,  $P=0.0001$ ,  $P<0.0001$ )。寛解群 9 例では、CD4、CD8 陽性細胞および NK 細胞における IFN- $\gamma$  の発現は有意に低下し (中央値 5.84% vs. 2.84%,  $P=0.028$ , 72.8% vs. 27.0%,  $P=0.027$ , 41.5% vs. 17.5%,  $P=0.008$ )、NK 細胞の発現比率は有意に増加した (中央値 8.42% vs. 10.75%,  $P=0.038$ )。血清 IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-12 および IL-18 の値は急性期 AOSD 群で HC に比して有意に高値であった。寛解後に血清 IL-6 および IL-18 の値は有意に低下した (中央値 15.84 pg/mL vs. 3.53 pg/mL,  $P=0.008$ , 2271 pg/mL vs. 98.5 pg/mL,  $P=0.011$ ) が、HC との比較では寛解後も有意に高値を示した (中央値 3.53 pg/mL vs. 1.82 pg/mL,  $P=0.024$ , 98.5 pg/mL vs. 71.6 pg/mL,  $P=0.006$ )。血

清 IL-12 値は寛解後も有意差を認めず（中央値 1.55 pg/mL vs. 1.34 pg/mL,  $P=0.313$ ), HC との比較でも有意高値であった（中央値 1.34 pg/mL vs. 0.59 pg/mL,  $P=0.0001$ ）。血清 IL-15 値は 3 群間で有意差がなかった。臨床項目との相関解析では、血清 IFN- $\gamma$  値、CD4 陽性細胞の細胞内 IFN- $\gamma$  発現および MFI がそれぞれ血清フェリチン値と正の相関を示した（ $P=0.026$ ,  $P=0.016$ ,  $P=0.035$ ）。血清 IFN- $\gamma$  値と NK 細胞の発現比率は逆相関を示した（ $P=0.038$ ）。難治群は非難治群に比して NK 細胞割合が有意に低値であった（中央値 5.6 % vs. 14.1 %,  $P=0.025$ ）。

【結論】 血清 IFN- $\gamma$  値および CD4 陽性細胞内産生 IFN- $\gamma$  の増加、NK 細胞発現比率の低下は、AOSD の疾患活動性を反映する結果であった。また、NK 細胞発現比率の低下は、治療抵抗性の経過を予測し得る可能性が示された。寛解後も血清 IL-6, IL-12 および IL-18 値の上昇は残存しており、INF- $\gamma$  産生やマクロファージの再活性化の病態機序に作用して、疾患の再燃に寄与する因子となり得る可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

Interferon (IFN)- $\gamma$  は成人スチル病 (AOSD) の病態において、マクロファージの過剰な活性に寄与するキーサイトカインである。一方で、IFN- $\gamma$  を介した免疫応答や IFN- $\gamma$  産生細胞の動態と、AOSD の臨床的特徴や予後との関連性は未知である。本研究では、AOSD 患者における IFN- $\gamma$  の血清レベル、IFN- $\gamma$  産生細胞および関連サイトカインの動態を解析した。

当科で治療導入した急性期 AOSD 患者（急性期群）25 名を対象とし、臨床スコアが 0 点を達成した寛解患者 9 名（寛解群）および健常者 (HC) 12 名と比較した。初期治療に抵抗性を示した患者は難治群と定義した。末梢血から末梢血単核細胞 (PBMCs) および血清を分離。細胞刺激後、表面抗原の蛍光色素標識抗体で染色。細胞膜透過処理を行い染色処置後、フローサ

イトメトリーで CD4, CD8 陽性細胞および NK 細胞の細胞内 IFN- $\gamma$  発現を測定した。また enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) で、血清 IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, IL-15 および IL-18 の値を測定した。得られた結果は急性期群と HC で比較するとともに、寛解群では急性期の値と比較、臨床所見との相関関係を解析し、難治群と非難治群も比較した。

その結果、市川は次の結論を得た。

1. CD4+IFN- $\gamma$ +細胞の発現比率、細胞内 IFN- $\gamma$  発現は急性期群で HC に比して有意に高値。また、CD4 陽性細胞内 IFN- $\gamma$  発現、血清 IFN- $\gamma$  値がそれぞれ血清フェリチン値と有意な正の相関。
2. CD8+IFN- $\gamma$ +細胞の発現比率、細胞内 IFN- $\gamma$  発現は急性期群で HC に比して有意に高値。
3. NK 細胞の発現比率は急性期群で HC に比して有意に低値。IFN- $\gamma$  の細胞内発現は有意に高値。NK 細胞の発現比率は血清 IFN- $\gamma$  値と有意な逆相関。また、難治群は非難治群に比して NK 細胞割合が有意に低値。
4. 治療により CD4, CD8 陽性細胞および NK 細胞における IFN- $\gamma$  の発現は有意に低下し、NK 細胞の発現比率は有意に増加。
5. 血清 IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 および IL-18 の値は急性期群で HC に比して有意に高値。血清 IL-6, IL-12 および IL-18 の値は寛解後も HC との比較では有意に高値。

これらの結果より、血清 IFN- $\gamma$  値および CD4 陽性細胞内産生 IFN- $\gamma$  の増加、NK 細胞発現比率の低下は、AOSD の疾患活動性を反映すると考えられた。また、NK 細胞発現比率の低下は、治療抵抗性の経過を予測し得る可能性が示された。臨床的寛解後も血清 IL-6, IL-12 および IL-18 値の上昇は残存しており、疾患の再燃に寄与する因子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。

Pemafibrate Protects against Fatty Acid-Induced Nephropathy by Maintaining Renal Fatty Acid Metabolism (ペマフィブラートは、腎臓の脂肪酸代謝を保持することにより、脂肪酸負荷による腎障害を軽減する)

青 村 大 輝

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】 腎臓病の予後は尿細管間質障害の程度と強く相関する。また腎臓病は原疾患を問わず蛋白尿

が多いほど進行しやすく、蛋白尿に付随した脂肪酸が毒性を発揮して尿細管間質障害を生じるといった機序が想定されている。核内転写調節因子のペルオキシ

ソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  型 (PPAR $\alpha$ ) は近位尿細管に高発現し、腎臓の脂肪酸代謝を維持する作用を持つ。慢性腎臓病患者や様々な腎臓モデル動物では腎臓の PPAR $\alpha$  発現と脂肪酸代謝が低下しており、これらは近位尿細管の脂肪酸蓄積を誘発し、酸化ストレスやアポトーシスを介して尿細管間質障害を促進させることが示唆されている。以上の背景より、腎臓の PPAR $\alpha$  の活性化は、脂肪酸代謝の恒常性維持と脂肪酸毒性の解除を介して、腎保護的に作用する可能性がある。PPAR $\alpha$  活性化薬であるフィブラート系薬は脂質代謝治療薬として臨床的に使用されており、実際に、様々な腎臓モデルマウスにおいて腎臓の PPAR $\alpha$  活性化を介した腎保護作用を生じることが報告されている。しかし、フィブラート系薬は腎機能低下を含めた有害事象を多く生じるため、実臨床において同薬を腎臓病患者に投与することは不可能であった。ペマフィブラートは選択的 PPAR $\alpha$  モジュレーターに分類される、新規の PPAR $\alpha$  活性化薬である。PPAR $\alpha$  を選択的に活性化するという特徴を持ち、従来のフィブラート系薬よりも少量で強力な脂質代謝改善作用を示す一方で、有害事象を生じにくいとされる。さらに胆汁排泄であることから腎臓の発生率が低いと考えられ、腎臓病患者の PPAR $\alpha$  を安全かつ強力に活性化し、腎保護作用を生じることが期待される。しかし、ペマフィブラートが実際に腎臓の PPAR $\alpha$  を活性化するか、また腎保護作用を持つかは検証されていない。Fatty acid overload nephropathy (FAON) モデルは、蛋白尿に伴う脂肪酸毒性と尿細管障害の関係を直接的に検証できる確立した動物実験モデルである。脂肪酸含有ウシ血清アルブミン (FFA-BSA) の大量投与によって糸球体障害のないマウスに蛋白尿を誘発し、尿中アルブミンの再吸収を介して近位尿細管へ大量の脂肪酸を負荷する。また腎臓の PPAR $\alpha$  発現低下と脂肪酸代謝低下を伴う尿細管障害を生じるため、尿蛋白に付随した脂肪酸と腎臓の脂肪酸代謝低下を介した腎臓病進展の機序の検証に適している。本研究では FAON モデルを用い、同機序による腎臓病進展に対してペマフィブラートがもたらす効果を検証した。

【材料および方法】 実験 1：8 週齢の野生型の雄マウスにペマフィブラート (0.5 mg/kg/日) を 14 日間経口投与し、vehicle を投与した群と比較した。実験 2：13 週齢の野生型の雄マウスにペマフィブラート (0.5 mg/kg/日) もしくは vehicle を 21 日間経口投与した。投与 8 日目より FFA-BSA の大量腹腔内投与

を並行して 14 日間行い、FAON を生じさせた。さらに腎臓害のない対照群として、vehicle の経口投与と生理食塩水の腹腔内投与を行った群を作製した。以上より、FAON モデルにペマフィブラートを投与した群 (PEM+FAON 群)、FAON モデルに vehicle を投与した群 (FAON 群)、腎臓害負荷も薬剤投与も行わなかった群 (対照群) の 3 群を作製し、これらを比較した。

【結果】 実験 1：ペマフィブラート投与群では、血中トリグリセリド濃度の低下と HDL 濃度の上昇が認められ、また腎組織中の脂肪酸代謝に関連する PPAR $\alpha$  標的遺伝子群の発現が増加していた。以上より、ペマフィブラートが脂質代謝改善作用を持ち、また腎臓の PPAR $\alpha$  活性化と脂肪酸代謝亢進を生じることが示された。実験 2：病理学的評価において、FAON 群の腎臓では著明な尿細管障害所見を認めたが、PEM+FAON 群では尿細管障害所見が軽度であった。また FAON 群の腎臓では脂肪酸代謝に関連する PPAR $\alpha$  標的遺伝子群の発現が対照群より低下しており、腎組織中の ATP 濃度が低下していた。さらに遊離脂肪酸の過剰蓄積と脂質関連酸化ストレスバイオマーカーの増加が認められた。PEM+FAON 群の腎臓において、これら所見はいずれも軽減もしくは消失していた。以上より、ペマフィブラートは脂肪酸過剰負荷による腎臓の脂肪酸代謝異常を改善し、また過酸化脂質による酸化ストレスを低減することで、腎臓害を軽減することが示された。

【結論】 ペマフィブラートは腎臓の PPAR $\alpha$  活性化を介して脂肪酸代謝改善及び酸化ストレス軽減を生じ、腎保護に寄与する可能性がある。今後、他の病態モデルや培養細胞実験を用いて、尿細管委縮や間質線維化などの腎臓病進展機序に対する同薬の有効性評価を行うことで、さらなる腎保護作用の解明と普遍化が期待できる。

#### (論文審査の結果の要旨)

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体  $\alpha$  型 (PPAR $\alpha$ ) は核内転写調節因子の一種であるが、様々な腎臓モデルや慢性腎臓病患者において腎臓の PPAR $\alpha$  の発現と脂肪酸代謝が低下することが知られている。PPAR $\alpha$  活性化薬であるフィブラートは腎臓の近位尿細管の脂肪酸代謝を亢進させ、様々な腎臓モデルマウスにおいて腎保護作用を生じることが報告されている。しかし、フィブラートは腎機能低下を含めた有害事象を多く生じるため、実臨床において同薬を腎臓害

患者に投与することは不可能であった。ペマフィブラートは選択的PPAR $\alpha$ 修飾薬に分類される新薬であり、腎機能低下を含めた有害事象を生じにくく、また胆汁排泄される。このため、腎障害患者にも使用できるPPAR $\alpha$ 活性化薬かつ腎保護薬である可能性が期待されるが、ペマフィブラートが実際に腎臓の脂肪酸代謝を亢進させるか、腎保護作用を持つかは検証されていない。

そこで青村大輝は、野生型マウスにペマフィブラートを投与し、腎臓の脂肪酸代謝に対する同薬の作用を検証した。次に、脂肪酸含有ウシ血清アルブミンの腹腔内投与により、蛋白尿に伴う脂肪酸毒性と尿細管障害の関係を直接的に検証できるfatty acid overload nephropathy (FAON)モデルを作製した。これにペマフィブラートを投与し、蛋白尿に伴う脂肪酸毒性に対する同薬の効果を評価した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 野生型マウスでは、ペマフィブラートにより、腎

組織中の脂肪酸代謝に関連するPPAR $\alpha$ 標的遺伝子群の発現が増加する。

2. FAONモデルでは著明な尿細管障害所見と尿蛋白量の増加が生じるが、これらはペマフィブラートにより軽減する。

3. FAONモデルの腎臓では、遊離脂肪酸の過剰蓄積、脂肪酸代謝関連遺伝子の発現低下、ATP量の低下、酸化ストレスバイオマーカーの増加が生じるが、これらはペマフィブラートにより軽減もしくは改善する。

これらの結果により、ペマフィブラートはFAONモデルにおいて蛋白尿に伴う脂肪酸毒性による尿細管障害を軽減し、またその機序として腎臓の脂肪酸代謝改善と酸化ストレス低減が関与することが示された。本研究結果は、ペマフィブラートが腎障害患者の尿細管障害を軽減し、腎保護作用を示す可能性を示唆した。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。

## Difference in sarcopenia characteristics associated with physical activity and disability incidences in older adults (高齢者の障害発生と身体活動量の関連 —サルコペニアの状態による違い—)

千 葉 一 平

(論文の内容の要旨)

【目的】骨格筋の状態は高齢者の生活機能と関連し、運動機能と骨格筋量の低下が併存した状態であるサルコペニアは生活機能障害の危険因子である。本邦においてサルコペニアは高齢男性の9.8%、女性の10.1%に見られ、加齢に伴いその有病率は増加する。サルコペニアと加齢に伴う運動機能、および骨格筋量の低下は生活機能障害予防における介入対象である。

サルコペニアに対する運動は一般的にレジスタンス運動が用いられるが、日常の身体活動促進も骨格筋機能・量の維持に有用である。近年、ウォーキングによる身体活動が血中のインスリン様成長因子を増加させる事や、身体活動量とサルコペニア有病率との関連が報告されている。一方、サルコペニアを有する場合における身体活動量と生活機能障害との関連は明らかになっていない。一般的に高齢者の身体機能維持には中強度以上の身体活動が推奨されるが、サルコペニアを有する場合には身体機能・心肺機能が低下しており、高強度の身体活動は困難な場合がある。また、アメリカスポーツ医学会は体力が低下した者に対しては低強

度から中強度でも有益であると報告している。よって中高強度だけでなく、低強度であってもサルコペニアを有する場合には有益であると考えられる。本研究は高齢者における身体活動量と生活機能障害発生との関連について、サルコペニアの状態ごとに検討する事を目的とする。

【方法】高齢者機能健診に参加した70歳以上の高齢者5257名のうち、除外基準該当者を除く2,149名(女性55.7%、平均年齢75.5 $\pm$ 4.0歳)が対象となった。ベースライン調査として握力、歩行速度、体組成測定(生体電気インピーダンス法)を行い、3軸加速度計を配布して14日間の身体活動時間を測定した。サルコペニアの状態は、歩行速度のカットオフ値を1.0 m/sへ変更したアジアサルコペニアグループによる診断基準を用い、対象者を健常群(骨格筋量・運動機能正常)、筋量低下群(骨格筋量低下のみ)、運動機能低下群(運動機能低下のみ)、サルコペニア群(骨格筋量低下かつ運動機能低下)に分類した。生活機能障害の発生は追跡期間中に新規要介護認定がある場合とした。各群においてベースライン調査から5年間の新規要介

護認定発生を従属変数、中央値により2値化した強度別身体活動時間（低強度 [Light intensity physical activity ; LPA] および中高強度身体活動 [Moderate-to-vigorous physical activity ; MVPA]）を独立変数とし、共変量で調整した多変量 Cox 回帰分析を行った。

【結果】5年間の新規要介護認定発生率は追跡不可の場合を除き全対象者で15.4%であった。全対象者、健常群、筋量低下群、運動機能低下群、サルコペニア群における平均LPA時間は $43.8 \pm 18.0$ ,  $45.6 \pm 17.5$ ,  $45.4 \pm 16.6$ ,  $40.8 \pm 18.6$ ,  $41.4 \pm 18.5$ 分/日であり、MVPA時間は $24.6 \pm 17.6$ ,  $26.3 \pm 18.3$ ,  $27.2 \pm 17.3$ ,  $21.6 \pm 16.3$ ,  $21.5 \pm 16.4$ であった。多変量分析の結果、全対象者において高いMVPAは新規要介護認定と関連したが（Hazard Ratio [HR], 0.63 ; 95 % confidence interval [95 % CI], 0.49-0.81 ;  $P < 0.001$ ）、LPAは関連が見られなかった（HR, 0.86 ; 95 % CI, 0.68-1.10 ;  $P = 0.22$ ）。高いLPAはサルコペニア群において（HR, 0.35 ; 95 % CI, 0.15-0.85 ;  $P = 0.019$ ）、高いMVPAは健常群（HR, 0.58 ; 95 % CI, 0.39-0.87 ;  $P = 0.008$ ）および運動機能低下群（HR, 0.66 ; 95 % CI, 0.45-0.98 ;  $P = 0.040$ ）において関連が見られた。筋量低下群ではLPA, MVPAいずれも関連は見られなかった。LPA, MVPAとサルコペニアの状態との交互作用P値はそれぞれ0.017, 0.014であった。

【考察】本研究では健常、運動機能低下群においてMVPAが、サルコペニア群においてLPAが新規要介護認定発生と関連した。MVPAの促進は多くの身体活動ガイドラインでも推奨されており、高齢者の心肺機能や骨格筋の機能維持に関連する。健常または身体機能低下のみ有する場合は中強度以上の身体活動が有効である事が示唆され、先行研究の結果とも一致した。骨格筋量および身体機能の低下は心肺機能低下との関連が報告されており、それらを合併した状態であるサルコペニア群ではより低強度のLPAでも新規要介護認定との関連が見られたと考えられる。一方、筋量低下群では関連が見られなかった。新規要介護認定発生が少なく、統計学的検出力の不足が考えられる。特にMVPAは骨格筋の合成を促進し、筋量が低下した状態においても有益であると考えられるため今後継続した調査が必要である。

本研究の限界点として、高齢者機能健診への参加や活動量計の装着による選択バイアスがあること、測定

方法によりマシントレーニングなど特定の身体活動が測定されていないこと、身体活動量の測定がベースライン時点のみであること、栄養状態など考慮すべき交絡因子が全て含まれていないことが挙げられる

結論として、地域在住高齢者において身体活動量の増加は生活障害発生を抑制するが、関連する運動強度はサルコペニアの有無により異なる事が示唆された。

#### （論文審査の結果の要旨）

サルコペニアを含む骨格筋の状態悪化（運動機能低下および筋量の低下）は生活障害および要介護の危険因子である。要介護の予防には一般的に中高強以上の身体活動が推奨されており、サルコペニアの状態であっても中強度以上の身体活動が関連するか、より低い強度の身体活動であっても関連が見られるか縦断観察研究にて検討した。

対象者は自立した生活が可能な地域在住高齢者とした。ベースライン調査として運動機能（歩行速度および握力）と骨格筋量（生体電気インピーダンス法）を測定し対象者を正常群（筋量正常かつ運動機能正常）、筋量低下群（筋量低下かつ運動機能正常）、運動機能低下群（筋量正常かつ運動機能低下）、サルコペニア群（筋量低下かつ運動機能低下）に分類した。身体活動量はベースライン調査後14日間、身体活動量計を用いて中高強度および低強度身体活動時間を測定した。行政から得た介護保険認定情報よりベースライン調査から5年間の新規要介護発生を観察し、新たに要支援または要介護認定があった場合を新規要介護認定発生とした。

その結果、千葉は次のような結論を得た。

1. 正常群と比較して、運動機能低下群、サルコペニア群では有意に新規要介護発生リスクが高かった。
2. 正常群および運動機能低下群では中高強度身体活動が多いと新規要介護発生リスクが有意に低下し、筋量低下群およびサルコペニア群では有意な関連は見られなかった。
3. サルコペニア群では低強度身体活動時間が多いと新規要介護発生リスクが有意に低下し、正常群、筋量低下群および運動機能低下群では有意な関連は見られなかった。

これらの結果より、正常または運動機能低下のみ呈する場合には中強度以上の活動が要介護発生リスク低下と関連し、筋量低下と運動機能低下を合併したサルコペニアの状態に至ると低強度の活動であっても要介護発生と関連する事が示された。骨格筋量が保たれて



いる場合には中強度以上の活動が推奨される一方、要介護リスクの高いサルコペニアの状態にある場合には低い強度であっても身体活動を増やし、不活動を減ら

していく事が重要である可能性を示唆している。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。

The positional characteristics of patients with obstructive sleep apnea : a single institute retrospective study in Japan (閉塞性睡眠時無呼吸症候群における睡眠体位の特徴：日本人を対象とした単施設の後ろ向き研究)

野 沢 修 平

(論文の内容の要旨)

【背景】閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea : OSA) は、睡眠中の上気道狭窄によって引き起こされる疾患であり、日中の過度の眠気や心血管合併症を特徴とする。上気道の狭窄は体位の影響を大きく受けるため、睡眠中の体位は重要な寄与因子である。一般的に仰臥位では上気道が狭窄するため、無呼吸/低呼吸が発生しやすい。一方、側臥位では狭窄が軽減されるため、無呼吸/低呼吸が発生しにくい。治療の一つとして睡眠中の体位を仰臥位から側臥位に矯正する睡眠姿勢療法も報告されているが、その有効性は個人差が大きい。OSA の重症度を示す1時間当たりの無呼吸/低呼吸の平均回数 (apnea hypopnea index : AHI) が、仰臥位から側臥位への体位変換で50 %未満に軽減する患者を positional patients (PP)、軽減しない患者を non-positional patients (NPP) と定義し、その臨床的相違を検討した研究では、PP は NPP と比較して body mass index (BMI) が有意に低かった。肥満の OSA 患者は上気道周囲の軟部組織が厚く、上気道狭窄の程度がどの体位でも変わりにくいため、NPP に分類されやすい。それに対して、肥満度の低い OSA 患者では骨格の形状が上気道狭窄の原因であり、体位変換によって解除されやすいため、PP に分類されやすい。本研究では、日本人における PP の特徴を検証するため、PP と NPP の両群において、臨床背景について比較した。さらに PP と NPP では、体位による無呼吸/低呼吸の出現様式が異なることから、終夜睡眠ポリソムノグラフィー (polysomnography : PSG) の各項目の特徴と相違について解析した。【方法】信州大学医学部附属病院において2008年5月から2020年5月の間に PSG を施行し、仰臥位、側臥位の睡眠体位がそれぞれ30分以上あった OSA 患者 237例を対象とした。仰臥位から側臥位への体位変換で AHI が50 %未満に低下する患者を PP 群 (n=158)、低下しない患者を NPP 群 (n=79) に分類し、患者

背景と PSG の項目について比較した。また、サブ解析として、傾向スコアマッチング法を用いて、背景因子である年齢、性差、BMI、および AHI を同程度に調整した上で、両群の PSG の項目を比較した。

【結果】PP 群と NPP 群の比較で、有意差を認めた項目は、年齢 (歳) ( $60.3 \pm 12.5$  vs.  $55.9 \pm 14.9$ ,  $P < 0.05$ ), BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) ( $26.1 \pm 3.9$  vs.  $30.0 \pm 5.1$ ,  $P < 0.001$ ), AHI (回/時間) ( $25.6 \pm 3.9$  vs.  $50.8 \pm 27.1$ ,  $P < 0.001$ ), mean  $\text{SpO}_2$  (%) ( $93.8 \pm 2.1$  vs.  $91.7 \pm 3.2$ ,  $P < 0.001$ ), lowest  $\text{SpO}_2$  (%) ( $78.0 \pm 10.0$  vs.  $66.9 \pm 14.4$ ,  $P < 0.001$ ), 3 % of oxygen desaturation index (3 % ODI) (回/時間) ( $22.0 \pm 15.5$  vs.  $45.6 \pm 26.6$ ,  $P < 0.001$ ), cumulative percentage of sleep time with  $\text{SpO}_2$  below 90 % (CT90) (%) ( $7.9 \pm 12.3$  vs.  $24.8 \pm 21.0$ ,  $P < 0.001$ ) であった。すなわち、PP 群は NPP 群と比較して、高齢かつ BMI が低値であった。さらに AHI も低値で、それに伴う睡眠中の低酸素血症も軽度であった。

傾向スコアマッチング法を用いて、年齢 ( $59.8 \pm 12.9$  vs.  $57.9 \pm 14.4$ ,  $P = 0.48$ ), 性差 (男/女) ( $42/11$  vs.  $42/11$ ,  $P = 1.0$ ), BMI ( $27.9 \pm 4.6$  vs.  $28.2 \pm 4.1$ ,  $P = 0.78$ ), AHI ( $34.1 \pm 18.2$  vs.  $38.4 \pm 20.1$ ,  $P = 0.25$ ) を調整したサブ解析では、mean  $\text{SpO}_2$  (%) ( $93.5 \pm 2.0$  vs.  $92.4 \pm 2.9$ ,  $P < 0.05$ ), lowest  $\text{SpO}_2$  (%) ( $76.9 \pm 11.1$  vs.  $70.4 \pm 12.3$ ,  $P < 0.05$ ), CT90 (%) ( $9.9 \pm 12.3$  vs.  $19.4 \pm 19.7$ ,  $P < 0.05$ ) に有意差を認めた。すなわち、PP 群は NPP 群と比較して、臨床背景や AHI の重症度を同程度に調整しても、睡眠中の低酸素血症が軽度であった。

【考察】既報と同様に、PP 群の BMI と AHI は、NPP 群と比較して有意に低値であったが、さらに本研究では PP 群が有意に高齢であった。アジア人を対象とした大規模臨床試験で、高齢 OSA 患者は、非高齢 OSA 患者と比較して肥満度が低いことが報告されており、本研究でも年齢と BMI の間には負の相関を認

めた。すなわち、高齢者は肥満度が低いPP群に分類される傾向にあった。また、傾向スコアマッチング法を用いたサブ解析で、年齢、性差、BMI、AHIの背景因子を同程度に調整しても、PP群の睡眠中の低酸素血症が軽度であることが分かった。PP群では体位依存性に無呼吸/低呼吸が大きく変化するのに対して、NPP群では体位に依存性がなく、同程度の無呼吸/低呼吸が持続的に出現していると思われる。この無呼吸/低呼吸の出現様式の相違が、睡眠中の低酸素血症の重症度と関連すると考えられた。

**【結論】**日本人におけるPPは、NPPと比較して、肥満度が低く、AHIが軽症、さらに高齢な傾向があった。さらに、OSAの重症度の指標であるAHIが同程度であっても、無呼吸/低呼吸の出現様式によって、睡眠中の低酸素血症の重症度が異なる可能性が示唆された。非肥満・高齢のOSA患者ではPPが多いと予想され、continuous positive airway pressure (CPAP)以外の選択肢として、睡眠姿勢療法の有用性も高いと考えられる。特に高齢者ではCPAPの忍容性が低いいため、睡眠姿勢療法も検討すべきと考える。

(論文審査の結果の要旨)

閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea : OSA) は睡眠中に上気道が閉塞し低酸素血症を来す疾患であるが、その病態と睡眠体位には密接な関係がある。一般的に仰臥位では上気道が狭窄しやすく、無呼吸/低呼吸が発生しやすい。側臥位では上気道の狭窄が解除されやすく、無呼吸/低呼吸は発生しにくい。無呼吸/低呼吸の1時間あたりの平均回数であるapnea hypopnea index (AHI) は、睡眠体位によって変動し、仰臥位で高くなりやすく、側臥位で低くなりやすい。しかし、体位によるAHIの変動が大きい患者と、そうではない患者が存在する。前者はpositional patients (PP)、後者はnon-positional patients (NPP) と呼ばれ、両群の臨床的な差異は、これまで

多く報告されているが、日本人についての報告は少ないため、今回の検討を行った。さらに、これまでに報告されていないサブ解析を行い、両群の差異をさらに詳しく検証した。

信州大学医学部附属病院において2008年5月から2020年5月の間に終夜睡眠ポリソムノグラフィー (PSG) を施行し、仰臥位、側臥位の睡眠体位がそれぞれ30分以上あったOSA患者237例を対象とした。仰臥位から側臥位への体位変換でAHIが50%未満に低下する患者をPP群 (n=158)、低下しない患者をNPP群 (n=79) に分類し、臨床背景とPSGの項目について比較した。また、サブ解析として、傾向スコアマッチング法を用いて、背景因子である年齢、性差、body mass index (BMI) とAHIを同程度に調整した上で、両群のPSGの項目を比較した。

その結果、野沢は下記の結果を得た。

1. 臨床背景について、PP群では、NPP群と比較して、高齢かつBMIが低値だった。
2. PSGについて、PP群では、NPP群と比較してAHIが低く、それに伴って、睡眠中の低酸素血症が軽度であった。
3. 傾向スコアマッチング法を用いたサブ解析で、年齢、性差、BMIとAHIを同程度に調整しても、PP群はNPP群よりも睡眠中の低酸素血症が軽度であった。

これらの結果より、日本人のPP群は、NPP群と比較して、高齢かつ肥満度が低く、AHIも軽症であることが分かった。また、臨床背景とAHIに相違がなくても、睡眠中の低酸素血症に違いが生じていることから、睡眠体位のAHIへの影響の強さによって、睡眠中の低酸素血症の重症度が異なることが示唆された。

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。

Efficacy of stylet angulation at the holding position during tracheal intubation with a videolaryngoscope : a randomized controlled trial (ビデオ喉頭鏡を使用した気管挿管における気管チューブ保持部位でのスタイレット屈曲の有用性：ランダム化比較試験)

若 林 諒

(論文の内容の要旨)

**【背景】**ビデオ喉頭鏡は従来の直視型喉頭鏡と比べ、喉頭の視野を良好にする。しかし、良好な喉頭視野は必ずしも気管挿管の容易化を保証しない。ビデオ喉頭

鏡を使用すると喉頭の視野確保が容易となる一方、口腔・咽頭・喉頭の軸が一直線に揃わないため声門への気管チューブ誘導が難しくなる。気管チューブ先端の操作性を向上させるためスタイレットが広く使用され

るが、スタイレット近位部の最適な形状に関してはこれまで詳細な検討がなされていない。気管挿管実施者の気管チューブ保持部位でスタイレットを屈曲させると、右母指の気管チューブ保持力が縦方向ベクトルに分解され、右示指あるいは右中指を支点として気管チューブ先端を動かすことができる。精密操作に適した手指の運動で気管チューブ先端を操作可能となり、気管チューブ先端を喉頭に誘導する際に通常必要となる右上肢の後方レバー運動を減少させ、気管挿管の容易化・円滑化につながる可能性がある。本研究では、気管チューブ保持部位でのスタイレット屈曲が気管チューブの操作性を向上させ、容易で円滑で速やかな気管チューブ誘導を可能にするという仮説を検証した。

**【方法】** 米国麻酔科学会の術前全身状態分類が1あるいは2で、全身麻酔および経口気管挿管下での手術を予定した20歳以上の患者を対象とした。適格患者を気管チューブ保持部位でスタイレットを屈曲させない群（以下、非屈曲群）と屈曲させる群（以下、屈曲群）にランダムに割り振った。前酸素化を行ったのち、全身麻酔を導入した。ロクロニウム（0.6 mg/kg）を投与し、尺骨神経の四連反応の消失を確認後、気管挿管を行った。すべての患者で McGRATH MAC ビデオ喉頭鏡を使用し、男性患者にはサイズ4、女性患者にはサイズ3のブレードを用いた。男性患者には内径8.0 mm、女性患者には内径7.0 mm の気管チューブを使用した。外径4.0 mm の軟性スタイレットを使用し、非屈曲群では気管チューブ遠位端から15 cm までを McGRATH MAC のブレードのカーブに合わせて成形し、屈曲群ではそれに加えて気管チューブ近位端から8.0 cm の部分（気管チューブ保持部位）を60度屈曲させた。主要評価項目は気管チューブ誘導時間とした。副次的評価項目は気管挿管の初回成功率、気管挿管実施者の気管チューブ誘導に対する主観的困難度、Intubation difficulty scale score、気管チューブ誘導の施行回数、気管チューブ誘導中に気管挿管実施者の右肩関節・肘関節・手関節の運動角度とした。

**【結果】** 各群30人ずつ、合計60人の患者で解析を行った。主要評価項目である気管チューブ誘導時間は非屈曲群で21.3±5.6秒、屈曲群で16.9±3.8秒であった（ $P<0.001$ ）。気管挿管実施者の気管チューブ誘導に対する主観的困難度は非屈曲群で3（3-4）点、屈曲群で2（1-3）点であった（ $P<0.001$ ）。気管チューブ誘導の施行回数は非屈曲群で2（1-3）回、屈曲群で1（1-1）回であった（ $P=0.002$ ）。気管チューブ

誘導中の気管挿管実施者の右肩関節の伸展角度・外転角度・内旋角度および右手関節の伸展角度は非屈曲群に比べ屈曲群で有意に小さかった。

**【結論】** McGRATH MAC を使用した気管挿管において、気管チューブ保持部位でのスタイレット屈曲は気管チューブの操作性を向上させ、容易で円滑で速やかな気管チューブ誘導を可能にすると考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

ビデオ喉頭鏡の使用は喉頭の視野を良好にする一方、口腔・咽頭・喉頭の軸が一直線に揃わないため声門への気管チューブ誘導が難しくなる。気管挿管実施者の気管チューブ保持部位でスタイレットを屈曲させると、右母指の気管チューブ保持力が縦方向ベクトルに分解され、右示指・中指を支点として気管チューブ先端を動かすことができる。精密操作に適した手指の運動で気管チューブ先端を操作可能となり、気管チューブ誘導の際に通常必要となる右上肢の後方レバー運動を減少させ、気管挿管の容易化・円滑化につながる可能性がある。本研究では、気管チューブ保持部位でのスタイレット屈曲が気管チューブの操作性を向上させ、容易で円滑で速やかな気管チューブ誘導を可能にするという仮説を検証した。

米国麻酔科学会の術前全身状態分類が1あるいは2で、全身麻酔および経口気管挿管下での手術を予定した20歳以上の患者を対象とした。適格患者を気管チューブ保持部位でスタイレットを屈曲させない群（以下、非屈曲群）と屈曲させる群（以下、屈曲群）にランダムに割り振り、各群30人ずつ、合計60人の患者で解析を行った。

その結果、「若林 諒」は以下の結論を得た。

1. 気管チューブ誘導時間は非屈曲群に比べ屈曲群で有意に短かった。
2. 気管チューブ誘導に対する気管挿管実施者の主観的困難度は非屈曲群に比べ屈曲群で有意に低かった。
3. 気管チューブ誘導の施行回数は非屈曲群に比べ屈曲群で有意に少なかった。
4. 気管チューブ誘導中の気管挿管実施者の右肩関節の伸展角度・外転角度・内旋角度および右手関節の伸展角度は非屈曲群に比べ屈曲群で有意に小さかった。

これらの結果より、ビデオ喉頭鏡を使用した気管挿管において、気管チューブ保持部位でのスタイレット屈曲は気管チューブの操作性を向上させ、容易で円滑で速やかな気管チューブ誘導を可能にすることが示唆

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。

Time-dependent progression of neurogenic lower urinary tract dysfunction after spinal cord injury in the mouse model (脊髄損傷マウスにおける神経原性下部尿路障害の経時的变化)

齊藤 徹一

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】脊髄損傷後の排尿障害は膀胱過活動 (Detrusor overactivity : DO) による蓄尿障害, そして排尿筋—括約筋協調不全 (Detrusor sphincter dyssynergia : DSD) による排出障害が挙げられる。これまで脊髄損傷動物モデルを用いて様々な排尿障害治療が検討されてきた。これまでの研究はラットを用いた研究が主であったが, ラットの DSD は人間とは異なり, 括約筋の収縮が膀胱内圧を上昇させることによってポンピングのように排尿を行う。近年, マウスの脊髄損傷モデルの排尿障害が検討されており, マウスの DSD の状態は人間と似て排尿筋収縮時に括約筋が収縮することで排尿障害が起こる。以上より, 脊髄損傷による排尿障害の研究を行うには, ラットではなくマウスが適している可能性がある。しかし, 脊髄損傷後の排尿障害は経時的に変化することが知られており, 脊髄損傷後のマウスにおける DSD を調べるにあたり, 脊髄損傷後の至適な評価のタイミングはまだ明らかにされていない。また, 脊髄損傷マウスにおける膀胱求心路における神経受容体, 膀胱における神経成長因子の経時的变化についても明らかにされていない。これらの背景から, 本研究は脊髄損傷後のマウスの排尿障害を経時的变化を検討した。

【方法】実験には 8-9 週齢雌マウスを使用した。全身麻酔下に Th8/9 のレベルにて脊髄を切断し, 脊髄損傷モデルを作成した。以後評価時まで連日, 下腹部圧迫による用手排尿にて排尿管理を行った。脊髄損傷後, 2, 4, 6 週までマウスを管理し, 排尿機能評価を膀胱内圧検査 (Cystometrogram : CMG) と外尿道括約筋筋電図測定 (External urethral sphincter-electromyography : EUS-EMG) 行った。CMG のために麻酔下に下腹部を切開し, 膀胱を露出させて膀胱頂部から PE50 ポリエチレンカテーテルを挿入して固定を行い下腹部閉創後に圧トランスデューサーと接続して膀胱内圧を測定した。また, 経会陰的に括約筋に筋電図電極を留置し, EUS-EMG 測定を行った。測定終了後, 麻酔下に L6/S1 脊髄後根神経節を採取し, RT-PCR

による神経受容体発現の評価を行った。また, 別個の脊髄損傷マウスを用いて膀胱を採取し, 膀胱における Brain-derived neurotrophic factor : (BDNF) 蛋白質の定量を行った。

【結果】脊髄損傷マウスにおいて, DO は損傷 2 週後のマウスにおいて既に認められ, 経時的な増悪は認めなかった (図 1, 表 1)。DSD は損傷後 2 週においては認められなかったが, 4 週マウスにおいて認められた。排尿効率に寄与する DSD 中の筋電図の減弱は 6 週にかけて増加が認められ, 排尿効率改善に寄与していた (図 2, 表 1)。L6/S1 脊髄神経根の mRNA においては膀胱過活動の亢進に寄与する C 線維神経に発現している Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の増加が損傷後 2 週において認められ, 6 週まで上昇を認めた。C 線維神経, A $\delta$  神経共に発現している Acid-sensing ion channels (ASIC) 1-3, Piezo2 においては, 6 週において ASIC2, ASIC3 の発現低下, Piezo2 の発現亢進を認めた (図 3)。また, 膀胱尿路上皮において BDNF は 2 週において上昇を認め, 経時的な減少傾向を認めた (図 4)。本研究の結果から, 脊髄損傷マウスにおいて DO は脊髄損傷後早期から確立して経時的に変化はせず, DSD は 4 週において確立された後に経時的に改善することがわかった。また, その変化には膀胱における BDNF の発現変化, および, 発現変化に由来する脊髄神経における神経受容体の変化が寄与している可能性が考えられた。

【結論】脊髄損傷マウスにおいて DO は受傷後早期に, DSD はより晩期に確立される事を確認した。これらの変化には BDNF の変化を介した神経細胞における受容体発現変化が関与している可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

脊髄損傷マウスにおける排尿障害の経時的な変化は, まだ明らかにされていない。また, 脊髄損傷後の排尿障害に伴う脊髄後根神経節における神経受容体, 膀胱における神経成長因子の変化も明らかにされていない。今回, 脊髄損傷マウスにおける排尿障害機能と膀胱尿

路上皮における神経成長因子・膀胱求心路における神経受容体の経時的变化を検討した。

マウスは8-9週齢の雌マウスを使用した。実験は脊髄正常群、脊髄損傷後2、4、6週群の計4群にて評価を行った。脊髄損傷は麻酔下にTh8-9を損傷して行った。脊髄損傷後、評価時まで用手的下腹部圧迫によって排尿管理を行った。排尿機能評価は膀胱内圧測定 (Cystometrogram : CMG), 外尿道括約筋筋電図測定 (External urethral sphincter-electromyography : EUS-EMG) を施行した。また、L6/S1脊髄後根神経節と膀胱尿路上皮を採取し、神経受容体・神経成長因子の変化を検討した。

その結果、次の結論を得た。

1. 脊髄損傷マウスにおいて、膀胱過活動は脊髄損傷後2週において確認され、経過で変化を認めなかった。
2. 脊髄損傷マウスにおいて排尿筋括約筋協調不全は4週において形成が確立され、6週にかけて改善を

認めた。

3. 脊髄後根神経節神経細胞の mRNA の測定において、Acid-sensing ion channels (ASIC) 2/3は脊髄正常群と比較して脊髄損傷2-4週において上昇した後に、6週にて改善を認め、Piezo2は脊髄損傷後4週まで変化を認めず、6週において上昇を認めた。
4. 膀胱尿路上皮における Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は脊髄正常群と比較して脊髄損傷後2週において上昇し、経時的に減少を認めた。

これらの結果より、脊髄損傷後の神経原性排尿障害は経時的变化を認め、DSDの晩期形成にはBDNFを介したAδ求心路神経細胞におけるASIC、Piezo2などの受容体が関与している可能性があること示唆され、今後のDSD治療の標的となり得ると考えられた。

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。

Exercise suppresses mouse systemic AApoAII amyloidosis through enhancement of the p38 MAPK signaling pathway (運動は p38 MAPK シグナル経路の増強を介してマウス AApoAII アミロイドーシスを抑制する)

## CUI XIAORAN

### (論文の内容の要旨)

【背景・目的】マウス AApoAII アミロイドーシスは、老化に伴い ApoA-II タンパク質がアミロイド線維 (AApoAII) を形成し、脳以外の全身に沈着する全身性アミロイドーシスの一種である。運動は加齢に伴う疾患リスク (癌、心血管疾患、糖尿病など) を低下させることが報告されていたが、運動のアミロイドーシスの発症や進行に及ぼす予防、治療効果やそのメカニズムに関する研究は十分ではなかった。信州大学で開発された筋力レーニングと持久力トレーニングを兼ね備えたインターバル運動 (IWT) は、中高年の健康促進に効果的であることが報告されてきた (Nemoto et al., 2007 ; Masuki et al., 2019)。本研究ではヒトの IWT に相当するインターバル運動を AApoAII アミロイドーシスモデルマウス (R1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup>) で実施し、アミロイドーシス抑制効果、およびその分子メカニズムを解明した。

【方法】8週齢の R1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup> 雌マウスに AApoAII アミロイド線維 (1 μg/匹) を投与してアミロイドーシスを誘発した (Fibril : F群)。トレッドミルによる

16週間の1) インターバル運動 (3分間ずつの最高走行速度の70%と30%の速度での走行を交互に繰り返す30分間の運動を4回/週) を実施 (FI群)、2) 連続運動 (最高走行速度の50%の速度で30分間の連続走行する運動を4回/週。運動量はインターバル運動と同一) 実施 (FC群)、3) 運動なし (FS群)。また運動単独の効果を確認するため、生理食塩水を注射し (Vehicle : V群)、トレッドミルによる16週間のインターバル運動 (VI群)、連続運動 (VC群)、および運動なし (VS群) を実施した。運動終了後に運動の生理的効果や AApoAII アミロイド沈着を解析した。運動やアミロイド沈着による遺伝子発現の変化を網羅的に解析するために、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析 (RNA-Sequencing 解析) を実施し、さらにマウス生体での分子的变化を解析した。

【結果・考察】16週間のインターバル運動および連続運動は、マウス的大腿四頭筋の重量を増加させ、加齢に伴う耐糖能の減少と血圧上昇、空腹時の体温低下の改善効果を示し、インターバル運動はより効果的であ

る傾向が認められた。特にインターバル運動は筋肉由来のミオカイン (IL-6) およびエネルギー代謝に関する遺伝子の発現の上昇に有意に高い効果を示した。両運動は AApoAII アミロイドーシスを有意に抑制した。特に、肝臓及び脾臓では強い抑制効果が認められた。運動がアミロイドーシスを抑制するメカニズムを明らかにするために、FI, FS, VI, VS 群間で肝臓の RNA-Sequencing 解析を実施した。その結果、インターバル運動が p38 MAPK 及びその下流の p53シグナル伝達経路を活性化し、アミロイドーシスの進行を遅らせるのに重要な下流分子シャペロン (熱ショックタンパク質) HSPB1の発現と活性化 (リン酸化) を増加させることを明らかにした。さらに、この反応はアミロイド沈着への小胞体ストレス応答により、相加的に増強され、HSPB1の発現と活性化が亢進されることが明らかになった。肝臓において増加したリン酸化 HSPB1 (p-HSPB1) は細胞外の AApoAII アミロイド沈着部位に共在していることから、p-HSPB1がアミロイド線維の形成を阻害している可能性が示唆された。今回のマウスを用いた研究結果は① インターバル速歩をマウスで解析できる実験系を構築することができた。② アミロイドーシスの新たな予防・治療法としてリン酸化 HSPB1の増加が有効である可能性を示した。③ 運動が p38 MAPK/p53シグナル経路を活性化することで、ストレスへの応答、適応を増強することが明らかになった。しかし、リン酸化 HSPB1がアミロイド沈着を抑制するメカニズム、運動が p38 MAPK/p53経路を活性化するメカニズム、運動が HSPB1をリン酸化するメカニズムは解明できていない。今後のより詳細な研究が必要だと考えている。

(論文審査の結果の要旨)

マウスでは加齢に伴い全身性 AApoAII アミロイドーシスが発症する。運動は加齢に伴う様々な疾患リスクを低下させることが報告されていたが、アミロイドーシスの発症や進行に及ぼす予防、治療効果やそのメカニズムに関係する研究は不十分であった。信州大学で開発されたインターバル運動 (IWT) は中高年の健康促進に効果的であることが報告されてきた。本研究ではヒトの IWT に相当するインターバル運動 (IT) を AApoAII アミロイドーシスモデルマウスで実施し、アミロイドーシス抑制効果と分子的メカニズムを解明した。

8 週齢の R1.P1-*Apoa2*<sup>c</sup> 雌マウスに AApoAII アミロイド線維を投与してアミロイドーシスを誘発し、

1) トレッドミルによる16週間の IT 運動 (3分間ずつの最高走行速度の70%と30%の速度での走行を交互に繰り返す30分間の運動を4回/週) (FI群), 2) 連続運動 (最高走行速度の50%の速度で30分間の連続走行する運動を4回/週) (FC群), 3) 運動なし (FS群), アミロイドーシスを誘発しない4) IT 運動群 (VI群), 連続運動 (VC群), 運動なし (VS群) の6群で実施した。運動終了後に運動の生理的効果やアミロイドーシス病態への抑制効果を検証し、RNA-Sequencing によるトランスクリプトーム解析を行うことで運動やアミロイド沈着に応答する分子経路を解析した。

その結果、CUI XIAORAN は次の結論を得た。

1. 両運動は筋肉の量の増加、耐糖能、空腹時体温、血圧などの加齢に伴う変化を改善した。IT 運動は大腿四頭筋の *Il6* およびエネルギー代謝関連遺伝子の発現誘導に関して CT よりも高い効果を示した。
2. 両運動は、血中 ApoA-II レベルに影響することなく、肝臓と脾臓におけるアミロイド沈着を抑制した。
3. 肝臓のトランスクリプトーム解析の結果、IT 運動が p38 MAPK シグナル経路を活性化し、分子シャペロン HSPB1の発現および活性化 (リン酸化) を増強させることを明らかにした。この反応はアミロイド沈着がある場合は相加的に増強されたが、HSPB1のリン酸化は運動のみで増加した。
4. IT 運動は肝細胞でのリン酸化 HSPB1量と、アミロイド沈着部位への集積を増大させることから、増加したリン酸化 HSPB1がアミロイドの沈着を阻害していることが示唆された。
5. IT 運動は p38 MAPK の活性化し、下流の p53を介した *Hspb1* の転写を誘導する可能性を示した。
6. アミロイド沈着は小胞体ストレス応答により p38 MAPK シグナル経路を活性化した。

運動は AApoAII アミロイドの肝臓と脾臓への沈着を、p38 MAPK/p53/Hspb1経路を介して抑制するという新しい分子メカニズムを提案した。

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。

Biokinetic Evaluation of Contrast Media Loaded Carbon Nanotubes Using a Radiographic Device (造影剤を中空内に担持したカーボンナノチューブによるX線撮影装置を用いた体内動態評価)

高坂 美恵子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】カーボンナノチューブ (CNTs) は様々な分野での応用研究が進められているが、一方で繊維状のナノ材料であるため、アスベストのように発がん性を有する可能性が危惧され、その生体安全性についての議論が続いている。CNTsの吸入毒性を評価する場合やドラッグデリバリーシステムなどで生体材料に用いた場合に、体内動態の評価は極めて重要であり、これまで、炭素の放射性同位体を使用する方法やCNTsの表面に標識を付加する方法が報告されてきた。しかし、放射性同位体を使用する方法では、放射性物質を扱う特殊な施設が必要であり、CNTsの表面に標識を付加する方法では、表面の性状が変化する、時間経過において標識が脱落する等の問題点がある。これらの問題点を解決し、CNTsの体内動態を適切に評価するために、CNTsの中空内に白金 (Pt) を付加したPt-Peapodsを作製しX線撮影装置を用いて体内動態を評価する新しいシステムを開発した。

【材料および方法】本研究では、Double-Walled CNTs (DWCNTs) と platinum (II) chloride (PtCl<sub>2</sub>) を高真空下で加熱することによりPt-Peapodsを作製した。作製したPt-Peapodsは透過型電子顕微鏡 (TEM) と蛍光X線分析法 (X-Ray Fluorescence Spectrometry : XRF) による特性評価を行った。また、Pt-Peapodsの細胞応答を評価するために、MESO-1細胞 (ヒト悪性胸膜中皮腫由来細胞) とA549細胞 (ヒト肺腺癌基底上皮腺癌細胞) を用いた細胞毒性試験、細胞取り込み試験、炎症性サイトカイン測定を実施した。細胞応答の評価には、PtCl<sub>2</sub>を加えず高真空中で加熱処理を実施したDWCNTs (HeatedCNTs) をコントロールとして使用した。さらに、CNTsの吸い込みにおいて最も重要となる肺組織におけるPt-Peapodsの体内動態を解析するために、気管内投与を行ったラットの肺を摘出し、2つのX線撮影装置 (3DマイクロX線CT, 3D X線顕微鏡) によるPt-Peapodsの検出を行った。

【結果】作製したPt-PeapodsをTEMで観察しCNTsの中空内にPtが充填していることを確認した (図1 a)。Ptの含有量はXRFによる結果で約2 wt%であり理

論的な飽和状態とはほぼ同じであった (図1 b)。細胞毒性試験、細胞取り込み試験、炎症性サイトカイン測定の中でPt-PeapodsはHeatedCNTsと同等であり、Ptを内包することが細胞応答に影響を与えないことが示された (図2, 3)。体内動態の解析では、3DマイクロX線CTを用いることで肺全体におけるPt-Peapodsの空間的な分布の概略を評価することができた (図4 b - d)。しかしその分解能は10 μm/pixelであり、粒子径の小さいPt-Peapodsの描出はできなかった。一方、3D X線顕微鏡は肺全体を評価することはできず、切って2 mm角程度まで小さくする必要があるが、その分解能は270 nm/pixelと圧倒的に高く、肺胞の構造と沈着したPt-Peapodsを詳細に描出することができた (図4 e)。

【結論】本研究は生体組織において、X線撮影装置を使用することにより組織内のPt-Peapodsの検出が可能であることを実証した。Pt-Peapodsは表面を修飾することなく作製できることから、様々なCNT製品への応用が考えられ、CNTsの体内動態評価を行う新しい手法の一つとして応用が可能であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

カーボンナノチューブ (CNTs) の体内分布についての報告の多くがCNTsの表面に標識を付加する方法や、放射性物質を使用するものであった。しかしこれらの方法は、標識物質が脱落する可能性や、放射性物質を扱う施設が必要になるなど課題がある。それらの課題を解決するため、本研究ではCNTsの中空に物質を内包させるPeapod技術の応用による体内動態評価法を考案した。

本研究ではX線撮影装置での使用のため白金 (Pt) を内包したPt-Peapodsを作製した。Pt-Peapodsの特性を確認した後、Pt-Peapodsを曝露することによるMESO-1細胞とA549細胞の細胞応答評価を細胞毒性試験、細胞取り込み試験、炎症性サイトカイン測定により実施した。また、組織でのPt-Peapodsの検出を行うため、7週齢のWistarラットに気管内投与を行い、投与後1週間で犠牲にし、摘出した肺組織におけるPt-Peapodsの検出を2つのX線撮影装置 (3D

マイクロX線CT, 3D X線顕微鏡) を用いて実施した。

その結果, 高坂は次の結果を得た。

1. 真空加熱処理を行うことにより CNTs の中空内に Pt が担持された Pt-Peapods が得られ, Pt の含有量は理論的な飽和状態とほぼ同じであった。
2. Pt-Peapods は細胞毒性試験, 細胞取り込み試験, 炎症性サイトカイン測定の中で, Pt を加えず真空熱処理のみ実施した CNTs と同等であった。
3. 3D マイクロX線CT を用いた摘出肺の観察では, 検出された粒子は右肺での分布が多く, 特に右上葉には粒子径の大きいものが認められ, 下葉に下がるにつれて粒子径が小さくなっている傾向を示した。

4. 3D X線顕微鏡を用いた摘出肺の観察では, 肺胞の構造を温存したまま, 内部に沈着した Pt-Peapods を確認した。観察された粒子のサイズは画像解析結果から約  $1\mu\text{m}$  であった。

これらの結果より, 本研究は, 真空加熱処理によって作製した Pt-Peapods を用いることで, 3D マイクロX線CT を用いた組織内の空間的配置と併せて3D X線顕微鏡を用いた組織内の微細な構造中の描出も可能であることを実証しており, CNTs の体内動態評価を行う新しい手法の一つとして応用が可能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。

### Intraoperative Facial Motor Evoked Potential Monitoring for Pontine Cavernous Malformation Resection (橋海綿状血管腫摘出における術中顔面運動誘発電位モニタリングの有用性)

RIDZKY FIRMANSYAH HARDIAN

(論文の内容の要旨)

【Objective】 The purpose of this study was to assess the usability of facial motor evoked potential (FMEP) to monitor facial nerve function during pontine cavernous malformation surgery.

【Methods】 Ten patients with pontine cavernous malformation underwent surgery by trans-fourth ventricular floor approach with FMEP monitoring. House-Brackmann (HB) and Karnofsky Performance Scale (KPS) score were obtained. Six patients were operated on using the suprafacial triangle approach, and four patients were operated on using the infrafacial triangle approach. FMEP was stimulated with a cranial peg-screw electrode and monitored from the ipsilateral face.

【Results】 FMEPs were successfully monitored in eight patients. Transient FME deterioraton appeared in all patients operated on with the suprafacial approach. FMEPs in patients operated on using the infrafacial approach were stable. HB scores unchanged postoperatively in all patients. Postoperative KPS scores improved in three patients, decreased in one, and remained same in six.

【Conclusions】 FMEP can be used to monitor facial nerve function during surgery of pontine cavernous malformation, especially in the suprafacial approach.

(論文審査の結果の要旨)

Despite advancements in surgical techniques for the surgery of pontine cavernous malformation, there are still risks of injury to the cranial nerves, especially the facial nerve. Facial motor evoked potential (FMEP) was introduced to monitor facial motor function intraoperatively, although there were issues such as difficulty of stimulation and interpretation of results. There was also lack of data regarding the usefulness of FMEP for pontine cavernous malformation surgery.

In this study, 10 patients underwent surgery for pontine cavernous malformation from 2008 to 2017 in Shinshu University Hospital. Six patients were operated on using the suprafacial triangle approach, and four patients were operated on using the infrafacial triangle approach. FMEP was stimulated with a cranial peg-screw electrode and monitored from the ipsilateral face with threshold-level monitoring method.

In conclusion :

1. FMEP was successfully recorded in all patients who underwent the suprafacial triangle approach. However, it could not be recorded in 2 patients who underwent the suprafacial triangle approach due to severe preoperative facial palsy.
2. FMEP was transiently attenuated in all 6 pa-



tients who underwent the suprafacial triangle approach and stable in 2 patients who underwent the infrafacial approach.

3. There was no deterioration of postoperative facial motor function in all patients.

Based on these results, this FMEP is useful to monitor facial nerve function during surgery of pontine cavernous malformation, especially in the suprafacial approach.

### In Vitro and In Vivo Evaluation of Starfish Bone-Derived $\beta$ -Tricalcium Phosphate as a Bone Substitute Material (ヒトデ骨由来 $\beta$ リン酸三カルシウムの骨補填材としての In Vitro, In Vivo 評価)

石 田 悠

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】 骨欠損部の修復には、欠損部を充填するための骨補填材が必要となる。骨補填材のうち、人工材料としてはハイドロキシアパタイト (HAp) や  $\beta$  リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) が用いられる。本研究では、気孔径約  $10\mu\text{m}$  の連通気孔構造を持つヒトデ骨を水熱処理することで得られるヒトデ骨由来  $\beta$  リン酸三カルシウム (Sf-TCP) を、骨補填材として評価した。

【材料及び方法】 Sf-TCP の物性評価として SEM による表面観察、気孔率および同質量あたりの表面積を示す比表面積の測定を行った。in vitro 実験として Alamar blue assay による細胞増殖性の評価と、SEM による Sf-TCP 表面への細胞接着を観察した。これらの細胞実験に際しては、マウス頭蓋骨由来の MC3T3-E1 を用いた。さらに in vivo 実験としてラット頭蓋骨欠損部へ埋入し欠損部の修復について評価した。評価に際しては 4 週間、8 週間の 2 群を設け、それぞれで作製した薄切標本をマッソントリクローム法で染色し、組織像について定量解析を行った。以上の実験について、比較対象として既存の医療用  $\beta$ -TCP であるセラソルブ M (CM) を用いた。CM のサイズは直径  $150\text{--}500\mu\text{m}$  であるため、Sf-TCP もすべて  $150\text{--}500\mu\text{m}$  となるよう篩分した。

【結果】 Sf-TCP は CM と同程度の気孔率でありながら、比表面積は約 3 倍の大きさを示した。(表 1, 図 3) SEM による観察では気孔が内部まで連続して繋がっている様子が表面から見て取れた (図 2 b)。細胞増殖性試験では CM よりも細胞増殖性の向上が認

The chief and sub-investigators concurred and acknowledged this paper as worthy as a thesis.

これらの結果より、この FMEP モニタリング方法は、特に suprafacial triangle approach において、橋海綿状血管腫の手術中に顔面神経機能をモニタリングするのに有用と思われた。

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。

められた (図 4)。Sf-TCP 上の細胞は糸状仮足を伸ばして接着しており、表面だけでなく気孔内へ遊走している様子が見られた (図 5)。ラット頭蓋骨への埋入時には Sf-TCP において気孔内への旺盛な組織侵入が観察され (図 6)、CM よりも多量の繊維質が認められた (図 8, 9, 10)。また、Sf-TCP では気孔内に赤血球の存在を示す染色像が得られたことから血管形成が認められた (図 7, 11)。

【結論】 Sf-TCP はバイオマテリアル開発で重要視される細胞毒性を持たず、臨床応用の可能性が示されたと考えられる。in vitro 実験では物性評価に見られた比表面積の大きさが理由として考えられる優れた細胞接着性と増殖性を示した。これは Sf-TCP の高い生体適合性を示すものである。in vivo 実験では CM との内部構造の違いが要因と思われるより旺盛な骨形成が認められたため、骨補填材として有用な可能性が示されたと結論する。また、これまで研究で毛細血管の侵入や血管新生に必要とされてきた気孔径よりも小さい直径  $10\mu\text{m}$  程度の気孔径を持つ Sf-TCP において補填材内への血管形成が認められた。

#### (論文審査の結果の要旨)

骨欠損部へ補填する人工材料のひとつに、 $\beta$  リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) がある。今回、海洋廃棄物であるヒトデ骨を水熱処理することにより得られたヒトデ骨由来  $\beta$ -TCP (Sf-TCP) の人工骨補填材としての評価を行った。

評価項目は、物性評価と細胞増殖試験、及びラット頭蓋骨への埋入試験の 3 つとした。これらの実験に際して、比較対象として既存の医療用  $\beta$ -TCP であるセ

ラソルブM (CM) を用いた。

その結果, 石田は次の結論を得た。

1. Sf-TCP は CM と同程度の気孔率でありながら, 比表面積は約 3 倍の大きさを示した。SEM による観察では気孔が内部まで連続して繋がっている様子が表面から見て取れた。
2. 細胞増殖性試験では CM よりも有意な細胞増殖性の向上が認められた。Sf-TCP 上の細胞は糸状仮足を伸ばして接着しており, 表面だけでなく気孔内へ遊走している様子が見られた。
3. ラット頭蓋骨への埋入試験で Sf-TCP は気孔内への旺盛な組織侵入が観察され, CM よりも多量の繊維質が認められた。また, Sf-TCP では気孔内に赤血球の存在を示す染色像が得られた。

これらの結果から, Sf-TCP はバイオマテリアル開発で重要視される細胞毒性を持たず, 臨床応用の可能性が示されたと考えられる。細胞増殖試験では物性評

価に見られた比表面積の大きさが理由として考えられる優れた細胞接着性と増殖性を示した。これは Sf-TCP の高い生体適合性を示すものである。ラット頭蓋骨への埋入試験では CM との内部構造の違いが要因と思われる旺盛な骨形成が認められたため, 骨補填材として有用な可能性が示されたと結論する。また, これまで研究で毛細血管の侵入や血管新生に必要とされてきた気孔径よりも小さい直径 $10\mu\text{m}$ 程度の気孔径を持つ Sf-TCP において, 補填材内への血管形成を示唆しうる血球の流入が認められた。気孔径の小ささは材料の強度向上に繋がる要素であり, CM では見られなかった血球の流入が Sf-TCP において見られたことから, より優れた人工骨の開発へと繋がる可能性も本研究により示唆されたと考える。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。

## Changes in serum uric acid levels as a predictor of future decline in renal function in older adults with type 2 diabetes (高齢2型糖尿病患者における血清尿酸値の上昇は腎機能低下の予測因子となりうる)

柴田有亮

### (論文の内容の要旨)

【諸言】糖尿病性腎症 (DN) は微量アルブミン尿・蛋白尿を伴う進行性の腎機能低下と古典的に定義される。近年提唱されている糖尿病性腎疾患 (DKD) という概念には, 古典的 DN だけではなく, 微量アルブミン尿・蛋白尿を伴わない腎機能低下も含まれる。DKD 進行のリスク因子として, ヘモグロビン A1c (HbA1c) や収縮期血圧, 尿中アルブミン, 推算糸球体濾過量 (eGFR) の早期低下, 糖尿病罹病期間, 年齢, 血清尿酸 (UA) 値, 他の糖尿病細小血管合併症の有無などが知られている。DKD 進行抑制のためには, 血糖, 血圧, 脂質に対する集学的治療に加え, アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の使用が重要とされている。高齢2型糖尿病患者においても DKD の悪化は重大な問題の一つとなっており, 糖尿病合併症や老年症候群であるフレイルの発症リスクを上昇させ得る。DKD 進行のリスク因子に基づく腎機能低下の予測は, 高齢糖尿病患者における生命予後の改善や QOL の向上の一助になると考えられるが, 腎機能に影響を与える因子は必ずしも定まっておらず議論の余地があ

る。そこで, 前向き観察研究におけるシリアルデータを用いて, 日本人高齢2型糖尿病患者における eGFR 低下の重要予測因子を検討した。

【方法】2012年8月~2016年6月に信州大学医学部附属病院へ1年以上通院する, 20歳以上の日本人2型糖尿病患者268名の転帰に関する前向き観察研究 (5年間) の臨床データベース (1年毎取得) を基に, 初回より3年間のデータを用いて, 65歳以上の高齢者における eGFR 低下リスク因子につき統計学的に解析した。なお, 1) HbA1c < 6.9% (75歳以上の患者では < 7.4%), 2) 血圧 < 130/80 mmHg (65~74歳の患者では < 140/85 mmHg), 75歳以上の患者または脳梗塞の既往歴のある患者では 150/90 mmHg 未満), 3) 低密度リポタンパク質コレステロール (LDL-C) 120 mg/dL 以下 (冠動脈疾患の家族歴を有する患者では 100 mg/dL 以下), 4) 悪性腫瘍の早期発見に努めることを治療目標とした。

【結果】登録者中3年時点までデータを収集し得たのは205名であり, うち112名の高齢2型糖尿病患者を解析対象とした。対象者のベースラインにおける年齢, 糖尿病罹病期間, HbA1c, eGFR, 血清 UA の平均値

は、それぞれ73.6歳、15.9年、7.1%、62.0 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>、5.5 mg/dLであった。また、糖尿病に合併する網膜症、腎症、神経障害の患者は、それぞれ29名(25.9%)、54名(48.2%)、69名(61.6%)であった。さらに、正常アルブミン尿、微量アルブミン尿、顕性アルブミン尿である患者は、それぞれ56名(50.0%)、37名(33.0%)、および19名(17.0%)を占めた。糖尿病治療薬は97名(93.8%)の患者で使用され、ナトリウム-グルコース共輸送体2 (SGLT2) 阻害薬の使用者はいなかった。また、ARB・ACEIは91名(81.3%)で投与され、高尿酸血症治療薬の内服は9名(5.4%)にとどまった。

ベースラインと比較し、3年時には拡張期血圧やヘモグロビン濃度に加え、eGFRが有意に低下した(56.2 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>)。一方、血糖や脂質プロファイル、血清UA値および尿中アルブミン排泄率(ACR)に変化を認めなかった。

eGFRの変化量( $\Delta$ eGFR)に関する二変量解析では、血清UA値の変化量( $\Delta$ UA)と有意な相関( $r = -0.491$ ,  $p < 0.001$ )を認めていたが、登録時の血清UA値とは相関はなかった( $r = 0.073$ ,  $p = 0.444$ )。年齢、BMI、血清アルブミン値、血清クレアチニン値、 $\Delta$ UAを説明変数とした $\Delta$ eGFRに関する重回帰モデル(調整後R<sup>2</sup> 0.233)において、 $\Delta$ UAは独立した相関因子であった( $\beta = -3.648$ ,  $p < 0.001$ )。さらに、多重ロジスティック解析では、 $\Delta$ UAは $\Delta$ eGFR $<0$ と正の相関を示した(オッズ比2.374; 95%信頼区間 1.294-4.357)。

**【考察】** 血糖、血圧、脂質がよく管理され、比較的長い罹病期間を有する高齢2型糖尿病患者を対象とした本研究において、血清UA値の変化が高齢2型糖尿病患者における将来のeGFR低下を予測する因子であることを初めて示した。本研究において、先行研究とは対照的に、腎機能悪化がベースラインの血清UA値と関連せず、むしろ3年間でのUA変化と関連したことは注目に値する。糖尿病患者においてeGFR低下がACR増加と関連することが知られているが、本研究では明らかでなかった。今回の研究対象集団の約半数で正常アルブミン尿であったことが影響したと考えられる。

本研究には次のような限界がある：①観察研究であるため、 $\Delta$ UAと $\Delta$ eGFRとの間の因果関係が明らかでない；②単一の施設での研究のため、選択バイアスが存在する可能性がある；③解析対象に高尿酸

血症治療薬使用者が含まれ、解析結果への影響を与え得る；④SGLT2阻害薬による治療患者が含まれていない。

集学的治療下の高齢2型糖尿病患者において、3年時点でのeGFR低下は、ベースラインの血清UA値ではなく、血清UA値の変化により予測し得る。血清UA値の改善がeGFR低下を含むDKD進行を予防できるかどうか見極めるため、更なる研究が必要である。

#### (論文審査の結果の要旨)

糖尿病性腎疾患(DKD)は微量アルブミン尿・蛋白尿を伴う進行性の腎機能低下と古典的に定義される糖尿病性腎症だけではなく、微量アルブミン尿・蛋白尿を伴わない腎機能低下も含まれる。DKD進行のリスク因子に基づく腎機能低下の予測は、高齢糖尿病患者における生命予後の改善やQOLの向上の一助になると考えられるが、腎機能に影響を与える因子は必ずしも定まっていない。そこで、前向き観察研究におけるシリアルデータを用いて、日本人高齢2型糖尿病患者におけるeGFR低下の重要予測因子を検討した。

2012年8月～2016年6月に信州大学医学部附属病院へ1年以上通院する、20歳以上の日本人2型糖尿病患者268名の転帰に関する前向き観察研究(5年間)の臨床データベース(1年毎取得)を基に、初回より3年時点までデータを収集し得た65歳以上の高齢2型糖尿病患者112名においてeGFR低下リスク因子につき統計的に解析した。

対象者のベースラインにおける年齢、糖尿病罹病期間、HbA1c、eGFR、血清UAの平均値は、それぞれ73.6歳、15.9年、7.1%、62.0 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>、5.5 mg/dLであった。また、糖尿病に合併する網膜症、腎症、神経障害の患者は、それぞれ29名、54名、69名であった。さらに、正常アルブミン尿、微量アルブミン尿、顕性アルブミン尿である患者はそれぞれ56名、37名、および19名を占めた。解析結果は以下の通りであった。

1. 3年時ではベースラインと比較し拡張期血圧、ヘモグロビン濃度、eGFRが有意に低下した。一方、血糖や脂質プロファイル、血清UA値および尿中アルブミン排泄率(ACR)に変化を認めなかった。
2. eGFRの変化量( $\Delta$ eGFR)に関する二変量解析で、血清UA値の変化量( $\Delta$ UA)と有意な相関( $r = -0.491$ ,  $p < 0.001$ )を認めたが、登録時の血清UA値とは相関はなかった( $r = 0.073$ ,  $p = 0.444$ )。
3. 年齢、BMI、血清アルブミン値、血清クレアチニ

ン値,  $\Delta UA$  を説明変数とした  $\Delta eGFR$  に関する重回帰モデル (調整後  $R^2$  0.233) において,  $\Delta UA$  は独立した相関因子であった ( $\beta = -3.648, p < 0.001$ )。4. 多重ロジスティック解析では,  $\Delta UA$  は  $\Delta eGFR < 0$  と正の相関を示した (オッズ比 2.374; 95% 信頼区間 1.294-4.357)。

これらの結果より集学的治療下の高齢2型糖尿病患者において, 3年時点での  $eGFR$  低下の予測因子として, ベースラインの血清  $UA$  値ではなく, 血清  $UA$  値の変化が有用であることが示唆された。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。

### Magnetic resonance imaging of diffusion characteristics following collagenase clostridium histolyticum injection in Dupuytren's contracture (デュピュイトラン拘縮におけるコラゲナーゼ注射後の MRI 画像変化)

岩川 紘子

#### (論文の内容の要旨)

【研究の背景と目的】デュピュイトラン拘縮は手掌腱膜の線維増殖性疾患であり, 皮下に形成される結節および拘縮索によって指の伸展障害が生じ QOL を大きく低下させる。従来治療は外科的治療が主だったが, 2015年に本邦でコラゲナーゼ・クロストリジウム・ヒストリチウム (CCH) の注射治療が保険適応となった。CCH の良好な治療成績が報告される一方で, 合併症では皮下出血や皮膚裂創などはほぼ全例に発生し, 重篤な屈筋腱損傷や神経血管損傷も少なからず報告されている。CCH は非選択的なコラゲナーゼであるため, 注射溶液の拘縮索周辺組織への拡散による組織障害が生じる可能性がある。しかし, その一方で CCH の注射後の周辺組織への拡散を調査した研究はない。本研究はデュピュイトラン拘縮に対して CCH の拘縮索への注射後15分以内に磁気共鳴画像 (MRI) を行い周辺組織への拡散を調査し, 本治療の安全性を評価することを目的とした。

【方法】2016年4月から翌年3月に当院でデュピュイトラン拘縮と診断された22例中, 中手指節 (MCP) 関節に拘縮を有し, CCH 注射治療を行った10例を対象とした。全例が男性で年齢は57-79歳 (平均70.7歳), 伸展障害は MCP 関節で  $10-60^\circ$  (平均  $34.3^\circ$ ), 近位指節間 (PIP) 関節で  $0-60^\circ$  (平均  $26.6^\circ$ ) であった。CCH を拘縮索へ注射することにより破断強度を低下させ, 24時間後に伸展処置を行った。MRI は術前, CCH 注入直後 (15分以内), 注射後3か月時に撮影し画像所見および臨床所見の比較検討を行った。調査項目は画像所見では拘縮索外の信号変化, すなわち血管神経束, 屈筋腱の内部およびその周辺組織, MCP 関節内部および手背側の信号変化とし, 臨床所見は手指 ROM に加え, 合併症の有無を注射前, 伸展処置前, 伸展処置

後1週, 1か月後, 3か月後に評価した。

【結果】MRI 所見では, 全例で CCH 注射直後の拘縮索外において Short TI Inversion Recovery (STIR) 条件での高信号領域を認めた。高信号領域は注射部位から連続しており屈筋腱掌側と神経血管束に接していたが, 屈筋腱内部および神経血管束には信号変化を認めなかった。また MCP 関節内および手背側における信号変化も認めなかった。注射後3か月の MRI では注射直後で認めた高信号領域は消失していたが, 注射部位の拘縮索の断面積の減少を認めた。臨床所見では治療後の MCP 関節の平均伸展改善角度は  $32.5^\circ$  (94.7%) であった。全例で皮下出血や皮膚裂創などの合併症を認めたが, これらはいずれも自然回復した。また神経血管損傷や腱断裂などの重篤な合併症は認めなかった。

【結論】MRI の STIR 条件は液体および炎症性浮腫の描出に優れている。また CCH は動物モデルの皮下組織において30分と早期の浮腫, 血液透過性亢進のピークに達するという報告から, 全例で認めた拘縮索外の STIR 高信号は CCH の拘縮索外への漏出および炎症性浮腫変化と考えられた。CCH 治療後の伸展改善角度は良好であり, 臨床成績は過去の報告と同等であった。また腱断裂および神経血管損傷などの重篤な合併症は認めなかった。以上より, 本研究結果は CCH の拘縮索外への漏出を示唆し, CCH 注射治療は周辺組織の脆弱化を常に考慮する必要がある。一方で重篤な合併症は少数であり, 適応を十分に考慮し, 適切な注射手技を行う事により, CCH 治療によるベネフィットはリスクを上回ると考えられる。

#### (論文審査の結果の要旨)

デュピュイトラン拘縮は手掌腱膜の線維増殖性疾患であり, 皮下に形成される結節および拘縮索によって

指の伸展障害が生じ QOL を大きく低下させる。従来の治療は外科的治療が主だったが、2015年にコラゲナーゼ・クロストリジウム・ヒストリチウム (CCH) の注射治療が保険適応となった。CCH の良好な治療成績が報告される一方で、合併症では皮下出血や皮膚裂創などはほぼ全例に発生し、重篤な屈筋腱損傷や神経血管損傷も少なからず報告されている。CCH は非選択的なコラゲナーゼであるため、注射溶液の拘縮索周辺組織への拡散による組織障害が生じる可能性がある。しかし、その一方で CCH の注射後の周辺組織への拡散を調査した研究はない。本研究はデュピュイトラン拘縮に対して CCH の拘縮索への注射後15分以内に磁気共鳴画像 (MRI) を行い周辺組織への拡散を調査し、本治療の安全性を評価することを目的とした。

2016年4月から翌年3月に当院でデュピュイトラン拘縮と診断された22例中、中手指節 (MCP) 関節に拘縮を有し、CCH 注射治療を行った10例を対象とした。全例が男性で年齢は57-79歳 (平均70.7歳)、伸展障害は MCP 関節で10-60° (平均34.3°)、近位指節間 (PIP) 関節で0-60° (平均26.6°) であった。CCH を拘縮索へ注射することにより破断強度を低下させ、24時間後に伸展処置を行った。MRI は術前、CCH 注入直後 (15分以内)、注射後3か月時に撮影し画像所見および臨床所見の比較検討を行った。調査項目は画像所見では拘縮索外の信号変化、すなわち血管神経束、屈筋腱の内部およびその周辺組織、MCP 関節内部および手背側の信号変化とし、臨床所見は手指 ROM に

加え、合併症の有無を注射前、伸展処置前、伸展処置後1週、1か月後、3か月後に評価した。

調査結果は以下の通りである。

1. MRI 所見では、全例で CCH 注射直後の拘縮索外において Short TI Inversion Recovery (STIR) 条件での高信号領域を認めた。高信号領域は注射部位から連続しており屈筋腱掌側と神経血管束に接していたが、屈筋腱内部および神経血管束には信号変化を認めなかった。また、MCP 関節内および手背側における信号変化も認めなかった。
2. 注射後3か月の MRI では注射直後で認めた高信号領域は消失していたが、注射部位の拘縮索の断面積の減少を認めた。
3. 臨床所見では治療後の MCP 関節の平均伸展改善角度は32.5° (94.7%) であった。
4. 全例で皮下出血や皮膚裂創などの合併症を認めたが、これらはいずれも自然回復した。神経血管損傷や腱断裂などの重篤な合併症は認めなかった。

本研究結果より CCH 注射直後の拘縮索外への漏出が示唆されたことから、CCH 注射治療を行う際には周辺組織の脆弱化を常に考慮する必要がある。一方で重篤な合併症は少数であり、適応を十分に考慮し、適切な注射手技を行う事により、CCH 治療によるベネフィットはリスクを上回ることも明らかとなった。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。

## Involvement of increased endoplasmic reticulum stress in the development of cataracts in BALB.NCT-*Cpox*<sup>nct</sup> mice (BALB.NCT-*Cpox*<sup>nct</sup> マウスの白内障発症に対する小胞体ストレスの亢進の関与)

Liu Chang

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】BALB.NCT-*Cpox*<sup>nct</sup> マウス (以下 *Cpox*<sup>nct</sup> マウス) は遺伝性白内障のモデルマウスである。以前の研究により、*Cpox*<sup>nct</sup> マウスの白内障発症の根本的な原因は、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ (*Cpox*) 遺伝子の変異によるものであること、すなわち、この変異により *Cpox*<sup>nct</sup> マウスにおける CPOX 活性が野生型 BALB/c マウスの15%程度に低下し、レンズにコプロポルフィリンが過剰かつ慢性的に蓄積することが白内障発症の原因となっていることが報告されていた。しかし、コプロポルフィリンの蓄

積から白内障発症に至る機序は解明されていない。そこで、*Cpox*<sup>nct</sup> マウスのレンズのトランスクリプトーム解析によりその白内障発症機序を明らかにする研究を行った。

【方法】4週齢 (透明レンズ)、および12週齢 (白濁レンズ) の *Cpox*<sup>nct</sup> マウス、および野生型 BALB/c マウスのレンズから抽出した RNA をテンプレートとして cDNA ライブラリーを構築し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム (RNA-seq) データを取得し、そのバイオインフォーマティクス解析を行った。リアルタイム PCR により遺伝子転写発

現レベルを追認した。タンパク質レベルの確認は特異抗体を用いたウェスタン・ブロット解析により行った。TUNEL染色によりレンズでのアポトーシスを調査した。特異抗体を用いてレンズにおけるCHOPの免疫蛍光染色を行った。レンズのホモジネートを遠心して可溶性画分と不溶性画分に分離し、それぞれをSDSポリアクリルゲル電気泳動した後に高分子領域のゲルからタンパク質を抽出し、LC-Ms/Msを用いたプロテオーム解析を行った。蛍光基質を使用してレンズにおけるプロテアソーム活性を測定した。

【結果・考察】RNA-seq解析の結果、*Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズでは小胞体ストレスが亢進し、小胞体ストレス応答経路のPERKシグナル伝達経路が活性化されていた。PERK経路のATF4、CHOP、およびリン酸化eIF2 $\alpha$ の上昇は転写産物、およびタンパク質レベルにおいても確認された。レンズにおける $\alpha$ -クリスタリンの量も*Cpox<sup>nc1</sup>*マウスでは低下していた。*Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズ上皮細胞では、CHOPレベルが上昇しているにもかかわらず、アポトーシスは生じていなかった。*Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズでは、白内障発症前からケラチン凝集体の蓄積が認められ、白内障発症後には不溶化したクリスタリンも蓄積していた。以上の結果から、*Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズにおいては小胞体ストレスが亢進するために小胞体ストレス応答が活性化され、それがクリスタリンを含むタンパク質の翻訳産生を抑制し、そのためにタンパク質の凝集と不溶性タンパク質がさらに増加するとの悪循環が生じており、これが本マウスの白内障の発症に関連している可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

BALB.NCT-*Cpox<sup>nc1</sup>*マウス(以下*Cpox<sup>nc1</sup>*マウス)は、コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ(*Cpox*)遺伝子の変異によりレンズにコプロポルフィリンが蓄積するために白内障を発症することが報告されていたが、コプロポルフィリンの蓄積から白内障発症に至る機序は解明されていない。そこで、*Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズのトランスクリプトーム解析により、その白内障発症機序を明らかにする研究を行った。

4週齢、および12週齢の*Cpox<sup>nc1</sup>*マウス、および野生型BALB/cマウスのレンズから抽出したRNAをテンプレートとしてcDNAライブラリーを構築し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトームデータを取得し、そのバイオインフォマティクス解析を行った。遺伝子転写発現レベル、およびタンパク

質レベルはそれぞれリアルタイムPCR、およびウェスタン・ブロット解析により確認した。TUNEL染色によりレンズでのアポトーシスを調査した。特異抗体を用いてレンズにおけるCHOPの免疫蛍光染色を行った。レンズのホモジネートの可溶性画分と不溶性画分をSDS-PAGEした後に高分子領域のゲルからタンパク質を抽出し、LC-Ms/Msを用いたプロテオーム解析を行った。

その結果、劉暢は次の結論を得た。

1. *Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズでは小胞体ストレスが亢進し、小胞体ストレス応答経路のPERKシグナル伝達経路が活性化されていた。
2. *Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズでは、 $\alpha$ -クリスタリン量が低下していた。
3. *Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズ上皮細胞では、小胞体ストレスが上昇しているにもかかわらず、アポトーシスは生じていなかった。
4. *Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズでは、白内障発症前からケラチン凝集体が蓄積していた。
5. 白内障を発症した*Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズでは、不溶化したクリスタリンが蓄積していた。

これらの結果より、*Cpox<sup>nc1</sup>*マウスのレンズでは、小胞体ストレスが亢進しており、それがクリスタリンを含むタンパク質の翻訳産生を抑制し、そのためにタンパク質の凝集と不溶性タンパク質がさらに増加するとの悪循環が生じており、これが本マウスの白内障の発症に関連してい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。

Therapeutic Outcome of Lenalidomide-dexamethasone in Patients with Relapsed or Refractory Systemic Immunoglobulin Light Chain (AL) Amyloidosis: A Single center Analysis and Review of the Literature (再発・難治性の全身性免疫グロブリン軽鎖 (AL) アミロイドーシス患者におけるレナリドミドとデキサメタゾンの治療成績—単施設解析と文献レビュー—)

上野 晃 弘

(論文の内容の要旨)

【背景】 全身性 AL アミロイドーシスは骨髄中の異常形質細胞が産生するモノクローナルな免疫グロブリン軽鎖がアミロイド線維となって全身の重要臓器へ沈着して機能障害を呈する予後不良の疾患である。近年、移植治療やプロテアソーム阻害薬によって治療成績が向上したが、一定数の患者は初期治療に抵抗性であったり治療後に再発したりするため、それらの患者に対する適切な救援療法の検討が問題となっていた。

【目的】 初期治療に抵抗性であるか、あるいは初期治療後に再発が見られた AL アミロイドーシス患者に対するレナリドミドデキサメタゾン (Rd) 療法の治療経過を検討し、救援療法選択肢としての Rd 療法の安全性と有効性を検討した。

【方法】 2001年9月から2019年12月までに当科で診療された262名の AL アミロイドーシス患者の中から、再発/難治性患者(すなわち1つ以上の先行レジメン使用後に救援療法として Rd で治療された患者)を後方視的に抽出し、患者背景と Rd 療法の安全性、治療効果を解析した。

【結果】 対象患者は22名、年齢中央値は64.5歳(範囲48-82)、観察期間中央値は41か月(範囲1-68)、先行治療レジメン数中央値は2(範囲1-4)であった。主たる臓器障害は腎障害が18名(82%)、心障害が13名(59%)で見られた。重症度分類 Stage $\geq$ Ⅲは9名(41%)であった。19名(86%)の患者は病的遊離軽鎖(iFLC)が100 mg/L未満であった。血液学的効果は完全奏功(CR)、最良部分奏功(VGPR)、部分奏功(PR)、非奏功(NR)がそれぞれ14名(64%)、0名(0%)、2名(9%)、6(27%)であった。Grade 3以上の有害事象は末梢感覚神経障害1名、浮腫1名、皮疹3名、血小板減少3名、疲労3名、トランスアミナーゼ上昇1名であった。有害事象に起因する治療中断は4名(18%)に観察された。治療関連死亡は0名(0%)であった。観察期間中に4名が亡くなり、うち3人は原疾患の進行に伴うものであった。

【考察】 AL アミロイドーシスに対する Rd 療法の治療

成績は過去に4件(臨床試験3件、観察研究1件)が報告されている。当科の成績は、安全性、有効性のいずれにおいても過去の報告と同等かより良い結果であった。多くの過去の報告では除外されていたiFLCが低値の患者が多く含まれていた患者背景や、レナリドミドを少量開始漸増としたレジメンの工夫(過去の報告では全て高用量開始漸減)などが良好な成績の要因と推察された。

【結論】 再発/難治性の全身性 AL アミロイドーシス患者に対する Rd 療法は安全で有効と考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

全身性 AL アミロイドーシスは骨髄中の異常形質細胞が産生するモノクローナルな免疫グロブリン軽鎖がアミロイド線維となって全身の重要臓器へ沈着して機能障害を呈する予後不良の疾患である。近年、移植治療やプロテアソーム阻害薬によって治療成績が向上したが、一定数の患者は初期治療に抵抗性であったり治療後に再発したりするため、それらの患者に対する適切な救援療法の検討が問題となっていた。本研究では、初期治療に抵抗性であるか、あるいは初期治療後に再発が見られた AL アミロイドーシス患者に対するレナリドミドデキサメタゾン療法(Rd療法)の治療経過を検討し、救援療法選択肢としての Rd 療法の安全性と有効性を検討した。2001年9月から2019年12月までに当科で診療された262名の AL アミロイドーシス患者の中から、再発/難治性患者(すなわち1つ以上の先行レジメン使用後に救援療法として Rd 療法が使用された患者)を後方視的に抽出し、患者背景と Rd 療法の安全性、治療効果を解析し、過去の Rd 療法の報告と比較検討した。

その結果、上野は次の結論を得た。

1. 対象患者22名のうち、14名(64%)で完全奏功が得られた。
2. Grade 3以上の有害事象は8名(36.4%)に見られ、有害事象に起因する治療中断は4名(18%)に観察されたが治療関連死亡は0名(0%)であった。

3. これらの成績は、安全性、有効性のいずれにおいても過去の報告と同等かより良い結果であった。多くの過去の報告では除外されていた病的遊離軽鎖 (iFLC) が低値の患者が多く含まれていた患者背景や、レナリドミドを少量開始漸増としたレジメンの工夫 (過去の報告では全て高用量開始漸減) などが

良好な成績の要因と推察された。

これらの結果より、Rd療法は再発/難治性の全身性ALアミロイドーシス患者に対する救済療法選択肢として安全で有効であると考えられた。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。

## Relationship between Glomerular Number in Fresh Kidney Biopsy Samples and Light Microscopy Samples (新鮮腎生検検体の糸球体数と光顕標本の糸球体数の関連)

園田光佑

### (論文の内容の要旨)

**【背景と目的】**腎生検直後の新鮮検体に対する顕微鏡評価 (現場評価) は、光顕標本での病理診断に適切な検体、つまり糸球体を含む皮質が十分に得られたかどうかを確認するために、有用であると報告されている。しかし、新鮮検体で確認された糸球体数と光顕標本内に認められる糸球体数の相関が乏しい症例も存在する。新鮮検体で糸球体数を実際より少なく判定した場合 (過小評価時) には、腎生検穿刺回数の不必要な増加をもたらし、実際より多く判定した場合 (過大評価時) には診断に必要な糸球体数が十分得られていない可能性があるため、どちらも臨床で大きな問題となる。これまで、新鮮検体における糸球体数の過小評価・過大評価の要因に関して、詳細な検討は行われていない。本研究は、新鮮腎生検検体で確認される糸球体数と光顕標本内の糸球体数との相関、および相関に影響を及ぼす因子を明らかにすることを目的とした。

**【対象患者及び方法】**2018年11月から2020年5月の当院腎生検症例129症例を対象に、後ろ向き横断観察研究を行った。臨床的特徴、新鮮検体の現場評価所見、腎病理所見について情報を収集し、統計的に解析した。光顕標本内糸球体数/新鮮検体確認糸球体数の比を計測し、その四分位に従って、全体を四分位範囲内の妥当評価群 (65症例)、第三四分位数以上の過小評価群 (32症例)、第一四分位数以下の過大評価群 (32症例) の3群に分けた。

**【結果】**新鮮検体と光顕標本の糸球体数に正の相関 ( $r = 0.398$ ,  $P < 0.001$ ) を認めた。光顕標本内糸球体数/新鮮検体確認糸球体数の比の中央値は0.74であった。過小評価群は妥当評価群に比較し、IFTA (間質線維化と尿管萎縮) および間質炎症細胞浸潤の各範囲面積が有意に大きかった。ロジスティック回帰分析でもIFTA および間質炎症細胞浸潤の範囲が有意に過小評

価と関連していた。さらに新鮮検体の合計皮質長は尿細管間質障害に関わらず光顕標本の糸球体数と関連していた。過大評価群は妥当評価群に比較し光顕標本の皮質長が短い傾向があった。

**【結論】**新鮮検体の糸球体数は、光顕標本の糸球体数を予測するのに有用である。尿細管間質障害は新鮮検体の糸球体数の認識を妨げるので、同障害が予測される場合には過小評価の可能性を考慮すべきである。そのような症例では、新鮮検体の皮質長が現場評価において適切な糸球体数確保の参考になる可能性がある。

### (論文審査の結果の要旨)

腎生検直後の新鮮検体に対する顕微鏡評価 (現場評価) は、光顕標本での病理診断に適切な検体、つまり糸球体を含む皮質が十分に得られたかどうかを確認するために、有用であると報告されている。しかし、新鮮検体で確認された糸球体数と光顕標本内に認められる糸球体数の相関が乏しい症例も存在する。新鮮検体で糸球体数を実際より少なく判定した場合 (過小評価時) には、腎生検穿刺回数の不必要な増加をもたらし、実際より多く判定した場合 (過大評価時) には診断に必要な糸球体数が十分得られていない可能性があるため、どちらも臨床で大きな問題となる。これまで、新鮮検体における糸球体数の過小評価・過大評価の要因に関して、詳細な検討は行われていない。本研究は、新鮮検体で確認される糸球体数と光顕標本内の糸球体数との相関、および相関に影響を及ぼす因子を明らかにすることを目的とした。2018年11月から2020年5月の当院腎生検症例129症例を対象に、後ろ向き横断観察研究を行った。臨床的特徴、新鮮検体の現場評価所見、腎病理所見について情報を収集し、統計的に解析した。

その結果、園田光佑は次の結論を得た。

1. 新鮮検体と光顕標本の糸球体数に正の相関を認め



- た。
- 新鮮検体の糸球体数の過小評価に尿細管間質障害が関連していた。
  - 新鮮検体の皮質の長さと同標本の糸球体数に正の相関を認め、この相関は尿細管間質障害によって阻害されなかった。
- これらの結果より、新鮮検体の糸球体数評価が妥当

である根拠が示された。また尿細管間質障害が予測される症例では、現場評価の糸球体視認が困難となる可能性に注意し、新鮮検体の合計皮質長も糸球体数確保の参考所見となりうることを示唆された。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。

## Prediction of pulmonary artery-adherent lymph nodes for minimally invasive lung resection (低侵襲肺切除術における肺動脈しみ込みリンパ節の予測)

竹 田 哲

### (論文の内容の要旨)

【背景】肺切除において、胸腔鏡手術やロボット支援手術など低侵襲手術が増加しており、疼痛軽減、入院期間短縮、術後合併症リスクの軽減、非癌死亡率の低下が証明されつつある。しかし低侵襲手術では、予期せぬ開胸手術への移行が避けられない場合があり、術後合併症や死亡率のリスク上昇につながる。

肺動脈しみ込みリンパ節（以下しみ込みリンパ節）は、肺門の炎症や炭粉沈着・線維化のために肺動脈壁に強固に固着したリンパ節であり、しみ込みリンパ節の存在により肺動脈損傷や開胸移行のリスクが高まる。しみ込みリンパ節の予測因子としてCTでの肺門リンパ節石灰化が報告されているが、CTで肺門リンパ節石灰化の所見がないにも関わらず術中所見でしみ込みリンパ節が発見されることがある。本研究の目的は、①術前検査所見による予測因子を発見ししみ込みリンパ節の評価をすること、②術中開胸移行と肺動脈損傷の予測因子を検討することである。

【方法】2006年1月1日から2020年5月31日の間で信州大学医学部附属病院にて原発性肺癌に対して肺切除を施行した1,460名を調査した。楔状切除が行われた250例を除外し解剖学的肺切除を受けた1,210名を対象とし、2つのコホートに分けた。①術前検査としてCT・PET-CT・気管支鏡を施行された594名について、しみ込みリンパ節の予測因子の検討を行い、②低侵襲手術を受けた772名について術中開胸移行や肺動脈損傷の予測因子の検討を行った。しみ込みリンパ節は、肺動脈に強く固着し、メツェンバウム剪刀を用いた鋭的剥離で肺動脈壁から剥離できない肺門リンパ節と定義し、手術記録及び手術ビデオを確認ししみ込みリンパ節の有無や肺動脈損傷、開胸移行につき判断した。

【結果】コホート①におけるしみ込みリンパ節の予測

因子として、単変量解析では年齢、cNステージ、CTでの肺門リンパ節の大きさ・石灰化、PETでの両側肺門リンパ節集積、気管支鏡での黒色肺門リンパ節透見が有意に関連しており（表1）、多変量解析ではCTでの肺門リンパ節の大きさ・石灰化、気管支鏡での黒色肺門リンパ節透見が独立した予測因子となった（表2）。しみ込みリンパ節の予測に関するROC解析では、CTでのリンパ節の大きさ8mm以上+気管支鏡での黒色リンパ節透見所見の組み合わせが、最も高いAUC（0.833）を示した。（図3）

コホート②において、772例のうち32例（4%）が開胸移行し、25例（3%）に肺動脈損傷があった。多変量解析では、開胸移行の予測因子として、抗凝固剤の使用、腫瘍のPET高集積、切除肺葉、しみ込みリンパ節が独立した予測因子となり、肺動脈損傷の予測因子として、術前化学療法、腫瘍のPET高集積、しみ込みリンパ節が独立した予測因子となった。（表5）

腫瘍の局在による開胸移行に対するリスクについては、しみ込みリンパ節の有無によって差があり、しみ込みリンパ節があると有意に左上葉>右中葉>右上葉>両下葉の順に開胸移行するリスクの差を生じた。（表6）

【討論】本研究では、術前の気管支鏡検査とCTによるしみ込みリンパ節の予測への有用性と、しみ込みリンパ節が低侵襲手術時の開胸移行や肺動脈損傷に与える影響について実証した。本研究の新規性や特徴としては、①術前CT・PET-CT・気管支鏡を評価してしみ込みリンパ節の予測因子を検討した初めての研究であり、②気管支鏡とCT所見の組み合わせによりしみ込みリンパ節のリスクに応じた階級化に成功し、③開胸移行の予測における葉別の特異的解析を検討した初めての研究であり、呼吸器外科医に実用的な情報を

与えることにある。

気管支鏡での黒色リンパ節透見所見とCTでのリンパ節の大きさとの組み合わせによりしみ込みリンパ節の予測に高い特異度を持つことを明らかにし、開胸移行や肺動脈損傷などの術中トラブルを予測することに役立つ。補足図3は、開発したしみ込みリンパ節評価モデルを実臨床に生かして我々が開発したプロトコルである。しみ込みリンパ節のリスクが高い場合は、低侵襲手術の是非をまず判断し、開胸移行や出血のリスクが高いことをインフォームドコンセントで十分に患者さんと話し合い、経験豊富な術者が手術を行い、輸血の準備をするなどの対策を取り術中合併症の可能性に備えることができる。

本研究の限界としては、術者の違いにより技術的なスキルが結果に影響を与えた可能性がある点、気管支鏡画像データが確認できない症例が多く見られ、選択バイアスを引き起こした可能性がある点、開胸移行や肺動脈出血のイベント数が少ないことで統計学的正確性に影響を及ぼした可能性がある点、単一施設の研究であり患者がすべて日本人である点などが挙げられる。

結論として、しみ込みリンパ節の存在は低侵襲手術の際に開胸移行や肺動脈出血の高リスクとなり得る。気管支鏡での黒色リンパ節透見所見などの術前検査所見はしみ込みリンパ節を予測する上で有用であり、対策をとることでより安全な手術を可能にする一助となり得る。

#### (論文審査の結果の要旨)

肺切除術において低侵襲肺切除術が増加しているが、低侵襲手術のデメリットとして出血時の対応が開胸手術と比較して遅れるという点がある。肺動脈出血や開胸移行の原因の一つとして肺動脈しみ込みリンパ節があり、炭粉沈着や炎症により肺動脈や気管支に強固に固着するリンパ節のことを指す。しみ込みリンパ節の予測について、CTでのリンパ節の大きさ・石灰化、FDG-PETでの左右対称性肺門リンパ節集積、気管支鏡での黒色リンパ節透見所見が報告されているが、こ

れらを比較した研究は行われていない。しみ込みリンパ節を予測する上で最も有用な検査を見出すこと、また肺動脈出血や開胸移行のリスク因子を検索することを主目的として過去の手術症例を解析した。

2006年から2020年に解剖学的肺切除術を受けた1,210例を対象とし、術前にCT・FDG-PET・気管支鏡の3検査をいずれも施行された594例を対象にしみ込みリンパ節の予測因子を検討し、また低侵襲手術を受けた772例を対象に開胸移行や肺動脈損傷のリスク因子を検討した。

その結果、竹田 哲は次の結論を得た。

1. しみ込みリンパ節の独立した予測因子となったのは、気管支鏡での黒色リンパ節透見所見、CTでの肺門リンパ節の大きさ、CTでの肺門リンパ節の石灰化であった。
2. ROC 曲線解析では、気管支鏡での黒色リンパ節透見所見とCTでの肺門リンパ節の短径8mm以上の組み合わせが最もしみ込みリンパ節を予測する上で有用であった。
3. 低侵襲手術症例において、開胸移行と肺動脈出血の両方に対して独立したリスク因子となったのはしみ込みリンパ節であった。
4. 左上葉や右中葉は他葉と比べて、しみ込みリンパ節症例での開胸移行のリスクが有意に高かった。

これらの結果により、低侵襲手術時の開胸移行や肺動脈出血のリスクとしてしみ込みリンパ節があり、しみ込みリンパ節は術前のCTと気管支鏡検査所見により予測可能であることが明らかになった。術前検査にてしみ込みリンパ節の可能性が高い症例では、予防的に開胸したり経験豊富な術者が担当したり輸血の準備を行うことで出血のトラブルがあった際に迅速に対応できることとなり、より安全な低侵襲手術の提供が可能となる。

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。

## Prevalence and Clinical Characteristics of Hearing Loss Caused by *MYH14* Variants (*MYH14* 遺伝子変異による難聴の有病率と臨床的特徴)

平 松 憲

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】*MYH14*遺伝子変異は、常染色体顕性遺伝(優性遺伝)形式をとる非症候群性難聴(ADNSHL)

を引き起こすとされており、現在までに様々な人種から34種類の変異が難聴の原因として報告されている。しかしながら、過去の報告では*MYH14*遺伝子変異に

よる難聴患者の有病率および臨床的特徴に関して断片的な情報しかなく、全体像は明らかとなっていない。

【材料及び方法】大規模日本人難聴患者コホートを対象に、血縁関係の無い日本人難聴患者8,074人（常染色体顕性遺伝（優性遺伝）形式をとる非症候群性難聴患者1,336人を含む）を対象に、既知難聴原因遺伝子68遺伝子の次世代シーケンス解析を行った。*MYH14*遺伝子にバリエントを有する患者を抽出し、さらに、コントロールにおけるアレル頻度およびCADDスコアを基準に*MYH14*遺伝子変異による難聴患者を同定した。また、家族サンプルがある場合には直接シーケンス法により罹患家族歴との整合性を確認した。

【結果】11家系から難聴の原因と考えられる*MYH14*遺伝子変異を10種類同定することができた。従って、大規模日本人難聴患者コホート（8,074人）のうち、日本人難聴患者における*MYH14*遺伝子変異による難聴症例の割合は、すべての難聴患者のうち0.14%（11/8,074）であり、常染色体顕性遺伝（優性遺伝）形式をとる非症候群性難聴患者のうち0.82%（11/1336）であることが明らかとなった。同定された11種類の変異のうち9種類は過去に報告の無い新規変異であった。*MYH14*遺伝子変異による難聴患者の臨床像としては、個人差が大きいものの20歳以降に発症する遅発性難聴の症例が多く（64.3%）、また、難聴の進行を自覚している症例が大部分であった（92.3%）。また、難聴の程度としては中等度難聴の症例が多く（62.5%）、聴力型としては水平型の聴力像を呈する難聴の割合が高い（68.8%）ことが明らかとなった。さらにまた、複数回聴力検査を施行できた症例に関して*MYH14*遺伝子変異による難聴患者の難聴の進行について、詳細に検討を行ったところ、長期間フォローできた症例はいずれも難聴が進行していることを確認でき、進行性の難聴であることが*MYH14*遺伝子変異による難聴の特徴であることを明らかにすることができた。

【結論】本研究により、日本人難聴患者に占める*MYH14*遺伝子変異による難聴患者の割合は0.14%であることが明らかとなった。また、*MYH14*遺伝子変異による難聴の特徴として90%以上の症例が進行性難聴であることが明らかとなった。本研究によって明らかとなった詳細な臨床的特徴に関する情報は、*MYH14*遺伝子変異による難聴患者の診断と適切な医学的介入手法の選択のために有用であり、今後対象患者の診断・治療に貢献するものである。

### （論文審査の結果の要旨）

*MYH14*遺伝子変異は、常染色体顕性遺伝（優性遺伝）形式をとる非症候群性難聴（ADNSHL）を引き起こすとされており、現在までに様々な人種から34種類の変異が難聴の原因として報告されている。しかしながら、過去の報告では*MYH14*遺伝子変異による難聴患者の有病率および臨床的特徴に関して断片的な情報しかなく、全体像は明らかとなっていない状況であった。

今回、大規模日本人難聴患者コホートを対象に、血縁関係の無い日本人難聴患者8,074人（うち、常染色体顕性遺伝（優性遺伝）形式をとる非症候群性難聴患者1,336人を含む）を対象に、既知難聴原因遺伝子68遺伝子の次世代シーケンス解析を行い、*MYH14*遺伝子にバリエントを有する患者を抽出し、さらに、コントロールにおけるアレル頻度およびCADDスコアを基準に見出されたバリエントの病原性の判断を行い、*MYH14*遺伝子変異による難聴患者を同定した。また、家族サンプルがある場合には直接シーケンス法により罹患家族歴との整合性を確認するとともに、聴力像や重症度、随伴症状や治療介入に関して情報収集を行い、*MYH14*遺伝子変異による難聴の臨床的特徴を明らかにする研究を実施した。

その結果、平松は次の結論を得た。

1. *MYH14*遺伝子変異による難聴患者の臨床像としては、個人差が大きいものの20歳以降に発症する遅発性難聴の症例が多く（64.3%）、また、難聴の進行を自覚している症例が大部分であった（92.3%）。
2. 難聴の程度としては中等度難聴の症例が多く（62.5%）、聴力型としては水平型の聴力像を呈する難聴の割合が高い（68.8%）ことを明らかにした。また、治療介入としては補聴器を装着している症例が多く、補聴器が有効な治療法であることを明らかにした。
3. *MYH14*遺伝子変異による難聴患者の難聴の進行に関して、複数回聴力検査を施行できた症例に関して詳細に検討を行ったところ、長期間フォローできた症例はいずれも難聴が進行していることを確認でき、進行性の難聴を呈することが*MYH14*遺伝子変異による難聴の特徴であることを明らかにした。

これらの結果によって明らかとなった詳細な臨床的特徴は、*MYH14*遺伝子変異による難聴患者の診断と適切な医学的介入手法の選択のために有用であり、今後対象患者の診断・治療に貢献するものである。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。

The combination of  $\alpha 1$ -adrenergic receptor antagonist and phosphodiesterase 5 inhibitor mitigates cold stress-induced detrusor overactivity through resiniferatoxin-sensitive nerves in bladder outlet obstructed rats. (下部尿路閉塞ラットの冷えストレス誘発排尿筋過活動に対する  $\alpha 1$ 交感神経受容体遮断薬とホスホジエステラーゼ5阻害薬の併用によるレジニフェラトキシン感受性求心性神経を介した抑制機序)

## 鈴木 中

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】前立腺肥大などの下部尿路閉塞にともなう下部尿路症状 (LUTS) を悪化させるひとつの要因として、急激な低温環境下への暴露などの冷えストレスが挙げられる。本研究では、ラット下部尿路閉塞モデルを用いて、下部尿路閉塞にともなう LUTS の治療薬である  $\alpha 1$ 交感神経受容体遮断薬とホスホジエステラーゼ5阻害薬の併用によって、効果的に冷えストレスによって誘発される排尿筋過活動を抑制できるのか検討した。また、抑制機序として、膀胱内のレジニフェラトキシン (RTX) 感受性の無髄C線維に着目して検討を行った。

【方法】10週齢雌 Sprague-Dawley (SD) ラットの尿道を結紮した。4週間通常飼育した後、膀胱容量が2-5 ml となったものを下部尿路閉塞ラットとした。膀胱内圧測定2日前に、測定用のカテーテル、および、薬剤投与用のカテーテルをそれぞれ膀胱、腹腔内に留置した。無作為に対照薬 (生理食塩水, n=11),  $\alpha 1$ 交感神経受容体遮断薬としてのナフトピジル (0.15 mg/kg, n=7), ホスホジエステラーゼ5阻害薬としてのタダラフィル (0.5 mg/kg, n=7), 同用量のナフトピジルとタダラフィル併用 (n=11) 投与の4群に分けた。膀胱内圧測定は、室温 ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) で10 ml/hr の生理食塩水を膀胱注入して測定した。それぞれの薬剤を腹腔内投与して20分後、速やかに低温 ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ) へ移行して膀胱内圧測定を継続した。別の下部尿路閉塞ラット (n=8) に対して、膀胱内圧測定2日前に測定用カテーテルの留置と同時に、0.3 mg/kg RTX を皮下投与した。投与2日後、室温から低温に移行する膀胱内圧測定を実施した。測定後に膀胱を摘出して、smooth muscle actin (SMA) 陽性排尿筋層でのカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) を発現する求心性無髄C線維の組織学的解析を行った。

【結果】室温下での薬剤投与による膀胱機能の変化を認めなかった。また、薬剤投与後における群間での膀胱

機能の差を認めなかった。室温から低温に移行して冷えストレスを与えると、生食、ナフトピジル、タダラフィル投与群では、一回排尿間隔時間と膀胱容量が低下した。しかし、同用量のナフトピジルとタダラフィルを併用投与した下部尿路閉塞ラットでは、一回排尿間隔時間と膀胱容量の低下は、他の群と比較して抑制された。RTX 投与群でも、室温から低温に移行したときの一回排尿間隔と膀胱容量の低下が併用群と同様に抑制された。RTX 投与群では、SMA 陽性排尿筋層中の CGRP 陽性求心性神経の発現が他の群よりも減少した。

【結論】下部尿路閉塞ラットは、室温から低温に移行すると一回排尿間隔時間と膀胱容量が低下する排尿筋過活動を呈した。ナフトピジル、あるいは、タダラフィルの単剤投与では、冷えストレスによって誘発される排尿筋過活動が抑制されなかった。しかし、抑制効果が認められなかった同用量のナフトピジルとタダラフィルを併用することによって、冷えストレス誘発排尿筋過活動が効果的に抑制された。また、RTX 投与によって、CGRP 陽性求心性神経が減少した下部尿路閉塞ラットにおいても、冷えストレス誘発排尿筋過活動が抑制された。したがって、ナフトピジルとタダラフィルを併用することによって、RTX 感受性求心性無髄C線維の活性化が抑制され、冷えストレス排尿筋過活動が一部抑制されたと結論づけた。

### (論文審査の結果の要旨)

前立腺肥大などの下部尿路閉塞にともなう下部尿路症状 (LUTS) を悪化させるひとつの要因として、急激な低温環境下への暴露などの冷えストレスが挙げられる。本研究では、ラット下部尿路閉塞モデルを用いて、下部尿路閉塞にともなう LUTS の治療薬である  $\alpha 1$ 交感神経受容体遮断薬とホスホジエステラーゼ5阻害薬の併用によって、効果的に冷えストレスによって誘発される排尿筋過活動を抑制できるのか検討した。また、抑制機序として、膀胱内の無髄C線維に着目し

て検討を行った。

10週齢雌 Sprague-Dawley (SD) ラットの尿道を結紮し4週間飼育して、膀胱容量が2-5 mlになったものを下部尿路閉塞ラットとした。膀胱内圧測定2日前に、測定用のカテーテル、および、薬剤投与用のカテーテルをそれぞれ膀胱、腹腔内に留置した。無作為に対照薬（生理食塩水、n=11）、 $\alpha$ 1交感神経受容体遮断薬としてのナフトピジル（0.15 mg/kg, n=7）、ホスホジエステラーゼ5阻害薬としてのタダラフィル（0.5 mg/kg, n=7）、同用量のナフトピジルとタダラフィル併用（n=11）投与の4群に分けた。膀胱内圧測定は、室温（27±2℃）で10 ml/hrの生理食塩水を膀胱注入して測定した。それぞれの薬剤を腹腔内投与して20分後、低温（4±2℃）へ速やかに移行して膀胱内圧測定を継続した。別の下部尿路閉塞ラット（n=8）に対して、膀胱内圧測定2日前に測定用膀胱カテーテル留置と同時に、0.3 mg/kg レジニフェラトキシシン（RTX）を皮下投与した。投与2日後、室温から低温に移行する膀胱内圧測定を実施した。膀胱内圧測定後に、膀胱を摘出して、smooth muscle actin（SMA）陽性排尿筋層でのカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）を発現するRTX感受性求心性無髄C線維の組織学的解析を行った。

その結果、鈴木 中は次の結論を得た。

1. 室温下では、薬剤投与後における膀胱機能の群間での差は、認めなかった。

2. 室温から低温に移行して冷えストレスを与えると、生食、ナフトピジル、タダラフィル投与した下部尿路閉塞ラットは、一回排尿間隔時間と膀胱容量が低下する排尿筋過活動が認められた。しかし、同用量のナフトピジルとタダラフィルを併用投与したラットでは、一回排尿間隔時間や膀胱容量の低下が他の群と比較して抑制された。

3. 室温でのRTX投与群の下部尿路閉塞ラットの膀胱機能には、他の群との差が認められなかった。しかし、室温から低温に移行したときの一回排尿間隔と膀胱容量の低下が併用群と同様に抑制された。

4. RTX投与群では、SMA陽性排尿筋層中のCGRP陽性求心性無髄C線維の発現が他の群よりも減少していた。

これらの結果により、下部尿路閉塞ラットの冷えストレス誘発排尿筋過活動は、ナフトピジルとタダラフィルを併用することによって効果的に抑制できることを明らかにした。また、RTX投与群でも併用群と同様に冷えストレス誘発排尿筋過活動が抑制されたことから、RTX感受性求心性無髄C線維の関与を明らかにした。ナフトピジルとタダラフィル併用による無髄C線維の活性化抑制によって、冷えストレス排尿筋過活動が一部抑制されたと結論づけた。

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。

## T cell clonal expansion and *STAT3* mutations: A characteristic feature of acquired chronic T-cell mediated pure red cell aplasia (T細胞が介在する後天性慢性赤芽球癆の特徴：T細胞のクローン性増殖と*STAT3*変異の検討)

川 上 史 裕

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】後天性赤芽球癆（PRCA）は貧血、網状赤血球数減少および骨髄での赤芽球の著減を特徴とする疾患群である。経過から急性、慢性に区分され、後天性慢性赤芽球癆は、原因の明らかでない特発性と、T細胞大顆粒リンパ球性白血病（T-LGLL）や胸腺腫などに伴う続発性がある。PRCAの細胞性免疫異常として細胞障害性T細胞の関与が知られている。我々の先行研究ではPRCA症例の4割でCD8陽性T細胞に細胞内シグナル伝達系分子の一つである signal transducer and activator of transcription (*STAT*) 3の体細胞変異を認めた。本研究でPRCAにおけるT

細胞免疫異常の詳細のさらなる理解を目的として、対象症例を増やし、*STAT3*遺伝子変異、T細胞受容体（TCR）レパトア、TCR遺伝子のクロナリティを同時に解析し、後天性PRCAにおける細胞障害性T細胞の細胞遺伝学的特徴と表現型との関係を探した。

【対象及び方法】後天性PRCA 90例（特発性26例、T-LGLL関連36例、胸腺腫関連15例を含む）を対象とした。末梢血から単核球を分離した。CD8陽性T細胞をフローサイトメトリー法（FCM）でTCRVβファミリーのレパトアを解析し、BIOMED-2を用いたPCR法およびフラグメント解析でTCRβ/TCRγ遺伝子のクロナリティを評価した。*STAT3*遺伝子変異

はアレル特異的 PCR ならびにアンプリコンシーケンスで解析を行った。臨床背景や治療効果、T細胞異常、PRCAの病型との関係も検討した。

【結果】病型間で臨床的な差は認めなかった。FCMで解析可能であった36例中17例(47%)でTCRVβレパトアの偏りを認め、Vβ1への偏りが最も多かった(41%)。TCRβ/TCRγ遺伝子クロナリティ陽性は62人(69%)で認め、いずれの病型でも陽性例を認めた。STAT3遺伝子変異は41例(46%)で陽性で、変異量の中央値は4.4%だった。TCR遺伝子クロナリティの陽性率とSTAT3遺伝子変異は有意に相関していた(P=0.0398)。STAT3遺伝子変異陰性症例の60%でもTCR遺伝子クロナリティが陽性だった。TCRVβレパトアの偏りはTCR遺伝子クロナリティ陽性例(P=0.0198)とSTAT3遺伝子変異陽性例(P=0.018)でそれぞれ有意に認められた。胸腺腫関連PRCA症例で、PRCA発症前に認めなかったTCRVβ1の偏りを有するT細胞集団が、9か月後の発症時に出現し、同集団中からSTAT3遺伝子変異が検出された。治療経過が判明している51例の治療効果は、シクロスポリンA(CsA)ならびにシクロホスファミド(CY)の奏効率はそれぞれ73.9%、62.0%であり、病型間で差はなかった。CYの奏効率はSTAT3遺伝子変異陽性例で有意に高いが(P=0.018)、CsAでは有意差はなかった。TCR遺伝子クロナリティの有無でも奏効率に差はなかった。推定10年全生存率は82.4%であり、STAT3遺伝子変異の有無、TCR遺伝子クロナリティの有無、PRCAの病型で差は認められなかった。

【結論】PRCAにおいて、TCR遺伝子クロナリティとSTAT3遺伝子変異は高率かつ相関性をもって陽性であることが多数症例の解析によって明らかになり、病型に関わらずPRCAの発症に関与していることが示唆された。また、STAT3遺伝子変異を要するPRCAではCYがより奏効する可能性が示唆された。

## High Incidence of Hippocampal Abnormalities in Pediatric Patients with Congenital Cytomegalovirus Infection (先天性サイトメガロウイルス感染症の小児患者では海馬の構造異常が高率で発生する)

夏目 岳典

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】先天性サイトメガロウイルス(CMV)

(論文審査の結果の要旨)

後天性赤芽球癆(PRCA)は貧血、網状赤血球数減少および骨髄での赤芽球の著減を特徴とする非常にまれな疾患群であり、発症にはT細胞免疫異常の関与が示唆されている。少数例の検討でPRCAではCD8陽性T細胞にsignal transducer and activator of transcription(STAT)3の体細胞変異が認められることを報告しているが、詳細なT細胞の免疫異常や臨床像との関連は不明である。今回、後天性PRCA患者90例を対象としてT細胞の細胞遺伝学的特徴と表現型との関係を検討した。末梢血あるいは骨髄液の単核球からDNAを抽出してSTAT3遺伝子変異、TCRβ/TCRγ遺伝子のクロナリティ解析を行った。一部の症例ではフローサイトメトリー法でCD8陽性T細胞のT細胞受容体(TCR)レパトアも同時に解析した。臨床データを収集し、治療効果との関連性についても検討を行った。

その結果、川上は次の結論を得た。

1. STAT3遺伝子変異は半数の症例で、TCR遺伝子クロナリティは7割の症例で認め、STAT3遺伝子変異とTCR遺伝子クロナリティは有意に相関していた。
2. TCRVβレパトアの偏りは半数の症例で認め、中でもTCRVβ1への偏りが最も多かった。
3. TCRVβレパトアの偏りはTCR遺伝子クロナリティ陽性例とSTAT3遺伝子変異陽性例でそれぞれ有意に相関していた。
4. シクロホスファミドの奏効率はSTAT3遺伝子変異陽性例で有意に高率であった。

これらの結果より、病型に関わらず後天性PRCAの発症にはCD8陽性T細胞の細胞性免疫異常が関与している可能性が示された。さらに、STAT3遺伝子解析が治療効果の予測に応用でき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。

感染症は、知的障害、神経発達症、感音性難聴、てんかんなどの中枢神経合併症を引き起こし、頭蓋内石灰

化、脳室拡大、皮質形成異常など様々な神経画像異常をきたす。我々の先天性 CMV 感染症に関する先行研究で、側脳室下角の拡大の発生率が高いことが示唆され、先天性の CMV 感染が海馬の形状に影響を与えると推察された。また、脳構造異常の有無にかかわらず神経発達症が高頻度に見られるため、海馬の形状変化が神経発達症の原因である可能性も推察された。しかし、先天性 CMV 感染症における海馬の構造異常についてはほとんど報告がなかったため、本研究では先天性 CMV 感染症における海馬の構造異常につきに検討した。

海馬の構造異常として海馬回旋異常 (HIMAL) の概念がある。胎児期の海馬の外観に似ているため、胎児期の発達途中の内側側頭葉構造の不完全な回旋の結果と推定されている。HIMAL については様々な研究はあるものの統一された定量的診断基準がないが、Tsai らは、脳 MRI の海馬長軸に垂直な冠状断面における海馬の高さと幅の比 (海馬直径比) が 0.8 を超える海馬の形状変化が、HIMAL の診断において重要な特徴として報告した。本研究では、先天性 CMV 感染症における HIMAL の発生率を、Tsai らの指標を参考に海馬直径比を用いて検討した。

**【材料及び方法】** 先天性 CMV 感染症症例 17 例と同年齢の対照群 17 例の脳 MRI を後向視的に評価した。脳 MRI の解析には、1.5T MRI にて撮像された冠状断の T2 強調画像を用い、海馬直径比を計測、算出した。今回用いた冠状断は、「前交連—後交連 (AC-PC) 線に垂直な断面」となるルーチンプロトコルで撮像されていたが、Tsai らは「海馬長軸に垂直な断面」で撮像された冠状断を用いていた。AC-PC 線と海馬長軸とは平均約 30° の角度をなすとされているため、AC-PC 線に垂直な冠状断面で計測される海馬の高さは、海馬長軸に垂直な冠状断面での  $2/\sqrt{3}$  倍になる。したがって、Tsai らの仮説に基づき、今回の研究では 0.92 ( $0.8 \times 2/\sqrt{3}$ ) を超える症例を HIMAL と定義した。測定は、臨床所見を知らされていない 3 人の小児神経科医によって各々施行され、最終値は各計測値の平均値として算出した。同時に脳 MRI におけるその他の画像異常や臨床症状についても検証した。

**【結果】** 先天性 CMV 感染症群と対照群の海馬直径比の中央値は、右側海馬 0.99 対 0.71、左側海馬 0.85 対 0.71、と両側ともに有意に大きかった。海馬直径比が 0.92 を超える HIMAL と診断される症例は、先天性 CMV 感染症群の海馬 34 例中 17 例 (50%)、対照群の

海馬 34 例中 1 例 (2.9%) と有意差があった。少なくとも片側に HIMAL をもつ症例は、先天性 CMV 感染症群で 17 例中 11 例 (64.7%)、対照群で 17 例中 1 例 (5.9%) と有意に多かった。知能指数もしくは自閉スペクトラム症と海馬直径比については有意な相関関係はなかった。

**【考察】** 本研究により、先天性 CMV 感染症において海馬直径比が有意に大きく、HIMAL と診断できる症例も有意に多かったことが判明した。一方で、皮質形成異常など大脳皮質構造の異常がある症例は少なかった。以上より、先天性 CMV 感染症症例においては、大脳皮質構造の異常がなくても海馬構造に異常をきたすことが示唆された。妊娠中の CMV 感染においては感染時期による中枢神経障害の違いが報告されており、18 週以前の感染はびまん性の脳障害を引き起こすとされているが、海馬の回旋は妊娠 25 週までに完了するため、びまん性の脳構造異常のない HIMAL の症例は CMV が妊娠 18~25 週の間感染した可能性があるかと推察された。

HIMAL の病理学的重要性に関しては、健康成人の被験者でも 20% にみられる正常変異であるという報告もあるが、てんかんや種々の疾患との関連も報告されており、未だ明らかになっていない。本研究においてもてんかん、知能指数、自閉スペクトラム症と HIMAL との相関関係は示せなかった。神経機能に対する HIMAL の影響については更なる研究が必要である。

#### (論文審査の結果の要旨)

先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症は、知的障害、神経発達症などの中枢神経合併症を引き起こし、頭蓋内石灰化、脳室拡大、皮質形成異常など様々な神経画像異常をきたす。先天性 CMV 感染症に関する先行研究で、側脳室下角の拡大の発生率が高いことが示唆され、先天性 CMV 感染が海馬の形状に影響を与えると推察された。また、脳構造異常の有無にかかわらず神経発達症が高頻度に見られるため、海馬の形状変化が神経発達症の原因である可能性が推察された。先天性 CMV 感染症における海馬の構造異常についてはほとんど報告がなかったため、本研究では先天性 CMV 感染症における海馬の構造異常につきに検討した。

海馬の構造異常として海馬回旋異常 (HIMAL) の概念がある。胎児期の海馬の外観に似ているため、胎児期の発達途中の内側側頭葉構造の不完全な回旋の結

果と推定されている。HIMAL については統一された定量的診断基準がないが、Tsai らは脳 MRI の海馬長軸に垂直な冠状断面における海馬の高さと幅の比（海馬直径比）が0.8を超える海馬の形状変化が、HIMAL の診断において重要な特徴として報告した。本研究では、先天性 CMV 感染症における HIMAL の発生率を、Tsai らの指標を参考に海馬直径比を用いて検討した。

先天性 CMV 感染症症例17例と同年齢の対照群17例の脳 MRI を後向視的に評価した。冠状断の T2強調画像を用い、海馬直径比を計測・算出した。同時にその他の画像異常や臨床症状についても検証した。

その結果、夏目は次の結論を得た。

1. 先天性 CMV 感染症群では、対照群に比して海馬

直径比が両側ともに有意に大きかった。

2. HIMAL と診断される症例も先天性 CMV 感染症群では対照群に比して有意に多かった。

3. 知能指数もしくは自閉スペクトラム症と海馬直径比については有意な相関関係はなかった。

本研究により、先天性 CMV 感染症において海馬直径比が有意に大きく、HIMAL と診断できる症例も有意に多かったことが判明した。一方で、皮質形成異常など大脳皮質構造の異常がある症例は少なかった。以上より、先天性 CMV 感染症症例においては、大脳皮質構造の異常がなくても海馬構造に異常をきたすことが示唆された。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。

### Sex differences in serum levels of $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ , $17\beta$ -diol, and androstenediol in the young adults: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry study (若年成人における $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ , $17\beta$ -diol と androstenediol の血清濃度の性差について: 液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) 法を用いた研究)

田名部 はるか

(論文の内容の要旨)

【背景】 エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor: ER) には  $ER\alpha$  と  $ER\beta$  という 2 種類のアイソフォームが存在する。 $ER\alpha$  ではなく  $ER\beta$  の選択的刺激によって抗うつ作用や抗不安作用が発現されることが示されてきた。

$ER\beta$  の内因性リガンドとして  $5\alpha$ -androstane- $3\beta$ ,  $17\beta$ -diol ( $3\beta$ Adiol) と Androstenediol ( $\Delta 5$ -diol) の 2 つが知られている。これら 2 つのステロイドの生理作用は動物実験で検討されているが、ヒトを対象とした研究はほとんど存在しない。

論文提出者の教室ではこれまでに高齢被験者を対象として  $3\beta$ Adiol と  $\Delta 5$ -diol の血清濃度を測定し、男性は女性に比べて  $3\beta$ Adiol は約 5 倍、 $\Delta 5$ -diol は約 2 倍血清濃度が高いことを明らかにしてきた。今回本研究では、健康な若年ボランティアを対象として  $3\beta$ Adiol と  $\Delta 5$ -diol の血清濃度を測定し、月経周期における変化の評価と男女比較を行った。

【方法】 被験者は女性23名 (平均年齢  $28.4 \pm 7.8$  歳, 卵胞期・排卵期・黄体期の計 3 回検体採取) と男性25名 (同  $31.4 \pm 7.8$  歳) の計48名で、合計92の血液サンプルを採取した。ステロイド測定には液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) 法を用いた。 $3\beta$ Adiol 及び  $\Delta 5$ -diol と同時にポジティブコン

トロールとして dehydroepiandrosterone (DHEA) 及び  $17\beta$ -estradiol (E2) も分析に含めた。採血時にうつ病評価尺度 (ハミルトンうつ病評価尺度 Hamilton Rating Scale for Depression: HAM-D, ベックうつ病調査票 Beck Depression Inventory-II: Beck-II, 簡易抑うつ尺度日本語版 Quick Inventory of Depressive Symptomatology: QIDS-J) の得点を記録した。

【結果】 女性の月経周期においては、排卵期が卵胞期や黄体期と比較して  $3\beta$ Adiol と E2 の血清濃度が高く、うつ病評価尺度の得点は低かった。 $\Delta 5$ -diol と DHEA の血清濃度には有意な変化を認めなかった。

男女の比較では  $3\beta$ Adiol と  $\Delta 5$ -diol は月経周期のどの時点においても女性より男性の方が有意に高い血清濃度を示した。E2 血清濃度は女性の排卵期と黄体期で男性よりも有意に高かったが、卵胞期では男女間に血清濃度の差はみられなかった。DHEA 血清濃度は男女差を認めなかった。うつ病評価尺度の得点は女性の方が男性より高い傾向を示した。

過去に行われた研究の高齢被験者のデータと比較したところ、測定した血液検査の項目全てにおいて男女ともに若年層の方が高齢層より高い血清濃度を示した。

【考察】 女性は男性のほぼ 2 倍うつ病に罹患しやすく、その性差の原因は未だ不明である。内因性  $ER\beta$  アゴニストが月経周期に関連する女性の気分変動に影響を



与えていると仮定すると、本研究の結果から、その主な要因は $\Delta 5$ -diolではなく $3\beta$ AdiolとE2である可能性が考えられる。 $3\beta$ Adiolの効果がE2の効果に比べて無視できる程度のものなのか、それともさらに大きな効果があるのかは、月経前症候群や月経前不快気分障害の患者を含むより大規模な研究で検討する必要がある。また、男性のうつ病評価尺度の得点を低値に保つ要因が内因性ER $\beta$ アゴニストにあるとすれば、この保護効果はE2ではなく $3\beta$ Adiolと $\Delta 5$ -diolに起因する可能性が考えられる。

本研究における限界として、サンプル数の少なさや、被験者の多くが医学部附属病院関係者であり一般化が困難な点が挙げられる。また、プロゲステロンなど女性の気分に影響を与える他の重要なホルモンを測定できていない。これらの限界はあるが、本研究が明らかにした $3\beta$ Adiolと $\Delta 5$ -diolの血清濃度の明確な性差は、うつ病の病態生理の理解を深める上で重要な知見であり、うつ病の新しい治療法や予防法の開発につながる可能性がある。

#### (論文審査の結果の要旨)

エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor: ER) には、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ の2つが存在する。これまでにER $\beta$ の選択的刺激によって抗うつ作用が発現されることが示されてきた。ER $\beta$ の内因性リガンドとして5 $\alpha$ -androstane- $3\beta$ , 17 $\beta$ -diol ( $3\beta$ Adiol)とAndrostenediol ( $\Delta 5$ -diol)の2つが知られている。

申請者らはこれまでに高齢被験者を対象として $3\beta$ Adiolと $\Delta 5$ -diolの血清濃度の調査を行い、男性が女性に比べて高値であることを明らかにしてきた。本研究では健康な若年被験者を対象として血清濃度を調べ、

月経周期の影響を確認し、性別・年齢別の比較を行った。

被検者は女性23名(卵胞期・排卵期・黄体期の計3回検体採取)と男性25名の計48名だった。血清ステロイド測定には液体クロマトグラフィー—タンデム型質量分析法を用いた。dehydroepiandrosterone (DHEA)及び17 $\beta$ -estradiol (E2)も分析に含めた。採血時にうつ病評価尺度の得点を記録した。

その結果、田名部は次の結論を得た。

1. 月経周期においては排卵期に $3\beta$ AdiolとE2の血清濃度が高く、うつ病評価尺度の得点は低かった。
2. 男女比較では $3\beta$ Adiolと $\Delta 5$ -diolは月経周期のどの時点においても女性より男性の方が高い血清濃度を示した。E2は女性の排卵期と黄体期で男性よりも有意に高かったが卵胞期では男女間に差はみられなかった。うつ病評価尺度の得点は女性が男性より高い傾向を示した。
3. 高齢被験者との比較では全ての項目において若年層が高齢層より高い血清濃度を示した。

以上より内因性ER $\beta$ アゴニストが月経周期に関連する女性の気分変動に影響を与えていると仮定すると、うつ病罹患率の性差の要因は $\Delta 5$ -diolではなく $3\beta$ AdiolとE2にある可能性がある。また男性のうつ病評価尺度の得点を低値に保つ要因として、 $3\beta$ Adiolと $\Delta 5$ -diolに保護効果がある可能性が示唆される。

本研究が明らかにした $3\beta$ Adiolと $\Delta 5$ -diolの血清濃度の明確な性差は、うつ病の病態生理の理解を深める上で重要な知見であり、うつ病の予防や治療に役立つ可能性を有している。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。

## Survey of hospitalization for respiratory syncytial virus in Nagano, Japan (長野県におけるRSウイルス入院患者の調査)

柳 沢 俊 光

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】RSウイルス感染症は日本において冬季に入院を必要とする主要な疾患の一つであり、乳幼児は下気道にまで感染がおよび重症化しやすい。特に早産児、慢性肺疾患、血行動態に異常のある先天性心疾患を合併する乳幼児は重症化のリスクが高く、重症化の予防として流行開始時期からパリビズマブ(RSウイルスに対するモノクローナル抗体)の投与が行われている。また2013年より免疫不全、ダウン症候群を

合併する患者に対しても保険適応が追加されている。

長野県においてもRSウイルス感染患者は冬季に多く、重症患者に関しては信州大学医学部附属病院または長野県立こども病院で治療が行われている。国内においても流行開始時期や流行状況は都道府県によってかなりばらつきがあり、疫学的な調査も都道府県単位で調査した報告はない。

今回我々は長野県におけるRSウイルス感染入院患者の全容を把握するために、この調査を実施した。

【対象と方法】2016年4月から2017年3月の1年間にRSウイルス感染症で入院した症例を対象として、長野県の主要小児11施設〔信州大学医学部附属病院、長野県立こども病院、北信総合病院、長野赤十字病院、篠ノ井総合病院（現：南長野医療センター）、信州上田医療センター、佐久医療センター、中信松本病院（現：まつもと医療センター）、諏訪赤十字病院、伊那中央病院、飯田市立病院〕にアンケート方式を用いて調査を行い、後方視的に検討した。

調査項目としては、年齢、性別、出生体重、在胎週数、基礎疾患の有無、同胞の有無、入院時月齢、入院した月、酸素投与などの治療内容、転帰、転院の有無、パリーブズマブ投与の有無、RSウイルスの診断方法に加え、各施設の年間の一般病棟総入院数（NICUの入院患者は除く）に対するRSウイルス感染患者の割合を調査した。

RSウイルス抗原迅速検査を実施せず症状のみで診断された患者は解析対象から除外した。本研究は長野県立こども病院の倫理委員会で承認が行われ、すべての患者情報は匿名で収集された。

【結果】調査期間中に438人のRSウイルス感染症患者が調査施設に入院した。患者背景としては、男女差はなく67.1%に同胞がいた。基礎疾患を合併していたのは16.9%で気管支喘息を合併している症例が多かった。平均在胎週数は38週2日（22週1日～42週3日）、平均出生体重は2,834g（388～3,926g）だった。

一般病院（信州大学医学部附属病院と長野県立こども病院以外の病院）に入院した患者は420人で、一般病院の年間入院患者総数（NICUを除く）に対するRSウイルス感染患者の割合は全体で平均7.0%であり、病院間の比率にばらつきはあまり見られなかった。

また調査施設から三次施設に転院となったのは合計で8名（信州大学医学部附属病院1名、長野県立こども病院7名）だった。長野県立こども病院に直接入院となったのは6名で、更に調査施設以外の施設から10名が長野県立こども病院に搬送された。患者の34名（7.8%）が早産児であったが、その多くがパリーブズマブ投与適応月齢より月齢が超過しており、投与の適応が無い症例だった。一方でパリーブズマブの適応があったが、投与が間に合わなかった症例は7名だった。

入院時点での年齢の平均は1歳4か月（日齢12～9歳6か月）で、生後1か月未満は全体の5.3%、生後12か月未満は全体の50.9%、更に生後24か月未満は全体の80.1%を占めていた。

2016年度の入院数は10月～12月にかけて増加し、同年度の長野県の定点報告数の感染増加と入院数の増加はおおむね一致していた。

治療に関しては全体の69.2%が酸素の投与が必要で、人工呼吸器管理が必要となった症例は1.8%だった。全ての症例で症状は軽快を認め、死亡または後遺症を認めた患者は一人もいなかった。

またパリーブズマブを投与されたのにもかかわらず入院となった患者は6名（早産児3名、先天性心疾患3名）だったが、いずれも人工呼吸器を必要とすることは無く軽症だった。

【考察】長野県におけるRSウイルス感染患者の年齢分布や在胎週数などは、全国12施設で検討した調査（Kusuda et al.）と同様の動向を示していた。

パリーブズマブに耐性のあるRSウイルス感染症は海外で報告はあるが日本では報告はない。パリーブズマブの投与後に入院を要したケースはいくつか報告されている。また、パリーブズマブの抗体量が重症化に大きく関与しているということが報告されている。（Forbes et al.）

パリーブズマブの抗体量がしっかりと上昇するには2回以上の投与が必要であり、今回パリーブズマブ投与後に感染した6名に関しては月齢と入院月から、いずれも1.2回しか投与がされていないと推察され、有効に抗体量が上昇していない可能性があった。しかしながら、いずれの症例も重症化は無く軽症で退院した。パリーブズマブ投与は流行時期より1.2か月前に投与が開始されることが望ましいと考えられた。

#### （論文審査の結果の要旨）

RSウイルス感染症は日本において冬季に入院を必要とする主要な疾患の一つであり、特に早産児、慢性肺疾患、先天性心疾患を合併する乳幼児は重症化のリスクが高く、重症化の予防として流行開始時期からパリーブズマブの投与が行われている。また2013年より免疫不全、ダウン症候群に対しても保険適応が追加されている。我々は長野県におけるRSウイルス感染入院患者の全容を把握するために、この調査を実施した。

2016年4月から2017年3月の1年間にRSウイルス感染症で入院した症例を対象として、長野県の主要小児11施設にアンケート方式を用いて調査を行い後方視的に検討した。

その結果、柳沢らは次の結論を得た。

1. 調査期間中に438人のRSウイルス感染症患者が入院した。患者背景としては67.1%に同胞がいた。

- 基礎疾患を合併していたのは16.9%で気管支喘息の合併が多かった。
2. 一般病院に入院した患者は420人で、一般病院の年間入院患者総数に対するRSウイルス感染患者の割合は平均7.0%であり、病院間の比率にばらつきはあまり見られなかった。調査施設から三次施設に転院となったのは8名だった。
  3. 早産児の割合は7.8%だったが、多くがパリビズマブ投与適応月齢より月齢が超過しており投与の適応が無い症例だった。一方でパリビズマブの適応があったが、投与が間に合わなかった症例は7名だった。
  4. 入院時点での年齢の平均は1歳4か月（日齢12～9歳6か月）であった。また入院数は10月～12月にかけて増加し、同年度の長野県の定点報告数と一致していた。酸素の投与が必要だったのは69.2%で、人工呼吸器管理が必要だったのは1.8%だった。全

ての症例で症状は軽快を認め、死亡または後遺症を認めた患者は一人もいなかった。

5. パリビズマブを投与されたにもかかわらず入院となった患者は6名（早産児3名、先天性心疾患3名）だったが、いずれも人工呼吸器を必要とするとは無く軽症だった。

パリビズマブの抗体量がしっかりと上昇するには2回以上の投与が必要であり、今回パリビズマブ投与後に感染した6名に関しては月齢と入院月から、いずれも1.2回しか投与がされていないと推察され有効に抗体量が上昇していない可能性があった。しかしながら、いずれの症例も重症化は無く軽症で退院した。パリビズマブ投与は流行時期より1.2か月前に投与が開始されることが望ましいと考えられた。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。

## Portal blood flow-dependent NO-mediated lymph formation in rat jejunum (ラット門脈血流に依存した一酸化窒素 (NO) を介するリンパ産生機構)

### 甘 利 景

#### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】日本では毎日の水分摂取が健康の秘訣であるとされてきた。ところが、その医学的根拠についてはほとんど解明されていない。そこで我々はラットに水分を投与することで腸間膜のリンパ流量、そのリンパ液内のアルブミン濃度並びに、自然リンパ球 (ILC-3) から分泌される、IL-22の動態を検索した。その結果、水分摂取によって腸間膜リンパ流量は著しく増加し、アルブミン、IL-22も著明に増加することを報告した。さらに、この水分摂取によって空腸壁に分布するエンテロクロマフィン細胞からセロトニンが分泌され、血液循環を介したセロトニンが腸の微小循環に作用し腸間膜リンパ流量、並びにそのリンパ液内のアルブミン濃度を著明に増加させることをあわせて報告した。ところが、血液中を流れるセロトニン、並びに門脈の血流量が空腸壁の水分、アルブミンなどの高分子物質の透過性を亢進するメカニズムは未だ不明である。そこで今回我々は、ラット空腸の微小循環におけるセロトニンの作用機序と門脈流量とリンパ産生との関連について薬理学的手法を用いて解析した。

【材料及び方法】ラットをイソフルランで麻酔し仰臥位で手術台に固定した。腹部を切開し、空腸の腸間膜

リンパ管からリンパ液を採取した。同時にそのリンパ液中のアルブミン濃度を測定した。加えて水分負荷によって門脈の血流量を変化させ、腸間膜リンパ流量とリンパ液内のアルブミン濃度を測定する実験を行った。NOシンターゼの阻害薬であるL-NAME、カルシウム拮抗薬であるニカルジピン、カルシウムイオノフォアであるA23187、ミオシンライチェンカイネースインヒビターであるML-7を用いて、それぞれに対する影響を検討した。

【結果】セロトニンを静脈内投与しての腸間膜リンパ流量、リンパ液内のアルブミン濃度の増加現象に対する、L-NAMEの静脈内投与による効果をみると、明らかにセロトニンによる腸間膜リンパ流量とリンパ液内のアルブミン濃度の増加はL-NAMEの前処置によって抑制された。驚くべきことに、セロトニンを静脈内投与しない状態でL-NAMEを静脈内に投与したところ、同じように腸間膜リンパ流とリンパ液内のアルブミン濃度が著しく減少することを見出した。そこで、門脈血流量を変化させて腸間膜リンパ流量とリンパ液内のアルブミン濃度を測定したところ、門脈血流量が増えると両者とも増加し、L-NAMEの静注前処置によって両者とも抑制されたことを確認した。同じ

門脈血流量を増加させた同じ条件下でニカルジピンを静脈内に投与したところ両者とも明らかに増加することを見出した。反対に A23187を静脈内に投与すると、両者とも明らかに減少することを確認した。さらに ML-7を静脈内に投与すると、腸間膜リンパ流量とリンパ液内のアルブミン濃度はともに減少した。門脈血流が空腸細静脈の内皮細胞に対するずり応力を増加させ、それによって内因性の NO が分泌されアルブミンを含めた水分透過性が亢進し、腸間膜リンパ流量とそのリンパ液内のアルブミン濃度を増加させたものと考えられた。この内因性 NO による細静脈内皮細胞の収縮性には細胞外からのカルシウム流入が関与しているものと考えられる。A23187でリンパ管内皮細胞の収縮性を高めると、アルブミンの高分子を含めた透過性が抑制されたのはその為と考えられる。ところが、ML-7によるアルブミンの高分子を含めた水分透過性の減少は内皮細胞の収縮性だけでは説明ができないので今後の課題と考えられる。

**【結論】** 空腸細静脈内皮細胞のアルブミンを含めた水分透過性は門脈の血流量に依存して制御されており、それはリンパ管内皮細胞の内因性 NO を介する弛緩作用に基づくものと推定された。さらに、セロトニンの空腸壁のリンパ産生機構にも、内因性 NO が関与していることも明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

日本では毎日の水分摂取が健康の秘訣であるとされてきた。ところが、その医学的な根拠についてはほとんど解明されていない。そこで我々はラットに水分を投与することで腸間膜のリンパ流量、アルブミン濃度並びに、自然リンパ球 (ILC-3) から分泌される、IL-22の動態を検索した。その結果、水分摂取によって腸間膜リンパ流量は著しく増加し、アルブミン、IL-22も著明に増加することを報告した。さらに、この水分摂取によって空腸壁に分布するエンテロクロマフィン細胞からセロトニンが分泌され、血液循環を介

したセロトニンが腸の微小循環に作用し腸間膜リンパ流量、並びにそのアルブミン濃度を増加させることをあわせて報告した。ところが、血液中を流れるセロトニン、並びに門脈の血流量が空腸壁の水分、アルブミンの透過性を亢進するメカニズムは未だ不明である。そこで我々は、ラット空腸の微小循環におけるセロトニンの作用機序と門脈流量とリンパ産生との関連について薬理学的手法を用いて解析した。

ラットをイソフルランで麻酔し仰臥位で手術台に固定した。空腸の腸間膜リンパ管からリンパ液を採取し、同時にそのリンパ液中のアルブミン濃度を測定した。加えて水分負荷によって門脈の血流量を変化させ、リンパ流量とリンパ液内のアルブミン濃度を測定した。L-NAME, ニカルジピン, A23187, ML-7を用いて、それぞれ検討した。

その結果、以下の結論を得た。

1. L-NAME による前処置後にセロトニンを投与するとリンパ流量、アルブミン濃度の増加は抑制された。
2. L-NAME 単独の投与でリンパ流量、アルブミン濃度が減少した。L-NAME による前処置後に蒸留水の経口投与を行うと、蒸留水のリンパ形成の効果は抑制された。
3. A23187の投与によりリンパ流量、アルブミン濃度が減少した。反対にニカルジピンの投与では両者とも増加した。

これらの結果から、セロトニンによる空腸のリンパ機構には内因性の NO が関与すること、門脈血流に依存したずり応力によるリンパ産生機構には、NO を介する弛緩作用によるアルブミン透過性の亢進が寄与することが解明された。また、内因性の NO による細胞の収縮性には細胞外からのカルシウムイオンの流入機構も関与す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。

Follow-up System for Childhood Cancer Survivors Via Germline Clinical Sequencing (小児がん経験者に対する生殖細胞系列のクリニカルシーケンスを用いたフォローアップシステム)

渡 邊 達 夫

(論文の内容の要旨)

**【背景と目的】** 近年、小児がんの治癒率が向上したことにより、小児がん経験者の晩期合併症が問題となっ

ている。中でも二次がんは、長期生命予後にもっとも大きな影響を与える晩期合併症である。そのため、小児がん経験者の二次がんを早期に発見することが、長

期生命予後の改善に重要と考えられる。二次がんの危険因子として、抗がん剤や放射線治療などが以前より指摘されているが、がん素因遺伝子の生殖細胞系列の病的バリエーションも重要な因子であることが近年報告されている。しかし、小児がん経験者に対する現行の二次がんサーベイランスでは、遺伝学的要素は一部のがんでしか考慮されていない。

本研究では、小児がん経験者に対する生殖細胞系列のクリニカルシーケンスを用いた二次がんサーベイランスシステムを構築し、その有効性および心理的影響について評価することを目的とした。

【方法】信州大学医学部倫理委員会の承認を得たうえで、信州大学医学部附属病院小児科長期フォローアップ外来に通院している小児がん経験者の中で本研究への参加に同意が得られた人を対象とした。臨床遺伝専門医、小児血液腫瘍科医、認定遺伝カウンセラーから成る診療チームで本研究について説明し、同意を得た後に検体を採取した。採取した検体からDNAを抽出し、独自に作成した165種のがん素因遺伝子のパネルを用いて次世代シーケンサーで解析した。また、小児がん経験者に病的バリエーションが多いと報告されているTP53遺伝子については、multiplex ligation-dependent probe amplification法を併用した。これらの解析結果を、臨床遺伝専門医、分子遺伝学者、小児血液腫瘍科医から成るエキスパートパネルで検討して、病的意義を判断した。

解析結果は、認定遺伝カウンセラー同席のもとで小児がん経験者および保護者に伝えた。病的バリエーションが見付かった場合の二次がんサーベイランスとして、National Comprehensive Cancer Networkのガイドラインや各種文献をもとに、それぞれの遺伝子毎のフォローアップ体制を用意した。さらに、このシステムが小児がん経験者や保護者に与える心理的影響を評価することを目的として、検査前後で二次がんおよびサーベイランスに関するアンケートを実施した。

【結果】2021年3月までに、16名が本研究に参加した。一次がんの種類は急性白血病が13名と大多数を占め、それ以外は神経芽腫2名、腎芽腫1名だった。16名の年齢中央値は22歳（15～42歳）であり、その中の4名が既に二次がんを発症していた。遺伝学的検査の結果、病的意義不明なバリエーションは10名に認められたものの、病的バリエーションは検出されなかった。二次がんサーベイランスは、MUTYH遺伝子にヘテロ接合性のバリエーションを認めた1名に提案した。

このバリエーションはデータベースの情報に基づき病的意義不明と判定したが、「良性」から「病原性あり」まで評価が分かれていた。さらに、抗がん剤投与と全身放射性照射の治療歴もあったため、二次がんサーベイランスを提案した。

本研究の心理的影響に関するアンケート結果では、検査前後で大きな心理的变化はみられなかったが、病的意義不明なバリエーションが見付かった10名のうち4名が、検査後に二次がんへの不安が増大したと回答した。

【結論】我々は小児がん経験者に対し、がん素因遺伝子の生殖細胞系列の病的バリエーションの有無を調べ、病的バリエーションが見付かった場合に個別のサーベイランスを行うという新規のシステムを構築した。本研究の目的は、小児がん経験者に対する二次がんサーベイランスの有効性を示すことであつたが、研究期間中に病的バリエーションが検出されなかったため、有効性を示すことはできなかった。その理由としては、参加人数が少なかったことと、参加者の一次がんが白血病に偏っていたことが考えられた。本サーベイランスシステムの有用性を評価するためには、より多岐にわたる小児がん経験者を対象としたさらなる評価が必要と考えられた。また、本サーベイランスシステム前後でのアンケートの結果からは、病的意義不明なバリエーションでさえも小児がん経験者にとっては二次がんの不安が増強する可能性が示された。そのため、慎重な遺伝カウンセリングが必要と考えられた。

#### （論文審査の結果の要旨）

我々は小児がん経験者の長期生命予後改善を口的として、がん素因遺伝子の生殖細胞系列の病的バリエーションを検出し、独自の二次がんサーベイランスを行うシステムを構築した。

当院に通院している小児がん経験者を対象とし、独自に開発した165のがん素因遺伝子パネルを用いて次世代シーケンサーなどで解析した。

病的バリエーションが見付かった場合の二次がんサーベイランス方法は、米國小児がん研究グループの長期フォローアップガイドラインをベースとして、各種文献などを参考に構築した。

また、このシステムが小児がん経験者に与える心理的影響を評価するため、検査の前後でアンケート調査を実施した。

その結果、渡邊らは次の結論を得た。

1. 16名の小児がん経験者が本システムに参加した。年齢は15歳から42歳で、中央値は22歳であった。一

次がんの種類は白血病が13名と多数を占めていた。本システム受診時点で4名が既に二次がんを発症していて、うち1名は一次がんを除いて3度のがんに罹患していた。

2. がん素因遺伝子の病的バリエーションは一例も検出されていない。VUS (Variant of uncertain significance) は10名に検出された。
3. VUS の場合は原則として二次がんサーベイランスは強化しない方針としているが、1名のみサーベイランスの強化を提案し、同意を得た。その理由として、病的意義についての評価が分かっていること、化学療法や全身放射線照射を受けていることなどがあった。
4. アンケート調査結果は、全体的に検査前後で大きな変化はみられなかったが、VUS が見付かった10名のうち4名が検査後に不安が増大したと回答し、

VUS が見付からなかった6名中4名は検査後に不安が減少したと回答した。

上記のように、現段階では病的バリエーションは検出されておらず、二次がんサーベイランスの有効性は評価できていない。

今後、より多岐にわたる一次がんの経験者を対象に検査を行っていくことが、二次がんの早期発見のみならず本システムの評価のためにも重要であると考えられる。

本システムはまだスタートしたばかりであるが、報告されている限りでは世界に先駆けて行われている小児がん経験者の二次がんサーベイランス方法であり、非常に意義のあるものと思われることから、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。

Glycosylation of MUC6 by  $\alpha$ 1,4-linked *N*-acetylglucosamine enhances suppression of pancreatic cancer malignancy ( $\alpha$ 1,4結合型 *N*-アセチルグルコサミンによる MUC6の糖鎖修飾は膵癌の悪性化抑制効果を増強させる)

## 結 城 淳 子

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】  $\alpha$ 1,4結合型 *N*-アセチルグルコサミン ( $\alpha$ GlcNAc) は、胃腺粘液に特異的な糖鎖であり、 $\alpha$ 1,4-*N*-アセチルグルコサミン転移酵素 ( $\alpha$ 4GnT) により合成され、コア蛋白質 MUC6に結合している。本研究室ではこれまでに、1) MUC6陽性のヒト胃分化型癌において、 $\alpha$ GlcNAc 陰性症例は陽性症例に比べて予後不良であること、2) 膵癌ではその悪性化に伴い  $\alpha$ GlcNAc や MUC6の発現量が低下すること、を報告してきた。これらの研究結果から、 $\alpha$ GlcNAc と MUC6の発現量低下が、膵癌の早期診断において有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。今回、培養細胞レベルでこれら分子の機能を明らかにすることを目的として解析を行った。

【材料及び方法】  $\alpha$ 4GnT と MUC6を発現していない2種のヒト膵癌細胞株 MIA PaCa-2と PANC-1に、レトロウイルスベクターを用いて  $\alpha$ 4GnT をコードする遺伝子 *A4GNT*、コア蛋白質 MUC6をコードする遺伝子 *MUC6*を導入し、MUC6のみを発現する細胞、 $\alpha$ 4GnT と MUC6が共発現する細胞を樹立した。ベクターのみを導入した細胞を対照群とした。発現した遺伝子産物は、免疫沈降法とウェスタンブロッティング

法で確認した。得られた細胞について、標準的な培養条件下での足場依存性細胞増殖能と poly-HEMA コートプレートでの培養による足場非依存性細胞増殖能を、MTS 法により解析した。また、細胞運動能、細胞浸潤能を、トランスウェルを用いた遊走能評価、マトリゲル浸潤法により解析した。さらに、両細胞株における TFF2の発現をウェスタンブロッティング法により解析し、培養上清中に分泌された TFF2と MUC6との複合体について免疫沈降法を用いて解析した。*A4GNT* または *MUC6* の mRNA 発現量と、膵癌患者の予後との相関関係を評価するために、GEO データベースに登録されている浸潤性膵管癌患者のデータを用いて生存曲線を作成した。

【結果】 足場依存性細胞増殖能は、MIA PaCa-2では MUC6を単独発現させると有意に低下し、MUC6と  $\alpha$ 4GnT を共発現させるとさらに低下した。PANC-1では、MUC6と  $\alpha$ 4GnT を共発現させると、対照群、MUC6単独発現群に比べ、増殖能が低下した。足場非依存性細胞増殖能は、MUC6単独発現または MUC6と  $\alpha$ 4GnT を共発現させた MIA PaCa-2では、対照群と比較して有意に低下したが、PANC-1では、対照群、MUC6発現群、MUC6と  $\alpha$ 4GnT 共発現群で増殖能は

同程度であった。細胞運動能、細胞浸潤能は、MIA PaCa-2, PANC-1ともに、MUC6を単独発現させると対照群に比べて有意に低下し、MUC6と $\alpha$ 4GnTの共発現により、さらに低下した。この分子機構を明らかにするため、 $\alpha$ GlcNAcに結合することが報告されているTFF2に着目した。TFF2は、両細胞株で発現しており、MUC6と $\alpha$ 4GnTを共発現させるとその発現量が亢進した。また、遺伝子導入細胞の培養上清を用いた免疫沈降法による解析から、 $\alpha$ GlcNAc結合型MUC6は、TFF2との複合体として分泌されていることが示唆された。TFF2は、ムチンと結合することにより、その粘度を増加させることが報告されている。粘性の高い $\alpha$ GlcNAc結合型MUC6-TFF2複合体が分泌された結果、細胞の運動能、浸潤能がより強く抑制されるという分子機構が考えられた。さらに、浸潤性膵管癌患者の生存曲線を作成したところ、*A4GNT*のmRNA発現量が高い集団は、発現量が低い集団に比べ有意に良好な予後を示し、*MUC6*のmRNA発現量が高い集団は、発現量が低い集団に比べ予後が有意に良好であった。

**【結論】** 今回の結果より、 $\alpha$ GlcNAcとMUC6は、膵癌の悪性化を抑制していることが、培養細胞レベルで明らかになった。予後解析の結果と考えあわせ、 $\alpha$ GlcNAcとMUC6が、膵癌の有用なバイオマーカーになり得ることが示された。

(論文審査の結果の要旨)

$\alpha$ 1,4結合型N-アセチルグルコサミン ( $\alpha$ GlcNAc) は、胃腺粘液に特異的な糖鎖であり、 $\alpha$ 1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素 ( $\alpha$ 4GnT) により生合成され、コア蛋白質MUC6に結合している。これまでに、膵癌ではその悪性化に伴い $\alpha$ GlcNAcやMUC6の発現量が低下することが報告されている。本研究では、膵癌での $\alpha$ GlcNAcとMUC6の発現量低下が、腫瘍の悪性化を引き起こす原因であることを明らかにするために、培養細胞レベルで解析を行った。 $\alpha$ 4GnTとMUC6を発現していない2種のヒト膵癌細胞株MIA PaCa-2とPANC-1に、レトロウイルスベクターを用いて $\alpha$ 4GnTまたはMUC6をコードする遺伝子*A4GNT*または*MUC6*を導入し、MUC6を単独発現する細胞、 $\alpha$ 4GnTとMUC6を共発現する細胞を樹立し、ベクターのみを導入した細胞を対照群とした。作成した3種類の細胞を用いて形質変化を解析した。また、*A4GNT*または*MUC6*の転写レベルと膵癌患者の予後との相関関係を評価するために、GEOデータベースに登録されているデー

タを用いて浸潤性膵管癌患者の生存曲線を作成した。

その結果、結城淳子は次の結論を得た。

1. 遺伝子導入細胞の総タンパク質抽出液を、免疫沈降法とウェスタンブロッティング法により解析し、 $\alpha$ 4GnT、MUC6の発現と $\alpha$ GlcNAcによるMUC6の糖鎖修飾を確認した。
  2. 足場依存性細胞増殖能をMTS法により解析した。MIA PaCa-2ではMUC6単独発現群で増殖能は対照群に比べ有意に低下し、MUC6/ $\alpha$ 4GnT共発現群でさらに低下した。PANC-1では、MUC6/ $\alpha$ 4GnT共発現群で、対照群、MUC6単独発現群に比べ、増殖能が有意に低下した。
  3. 足場非依存性細胞増殖能をpoly-HEMAコートプレートでの培養後、MTS法により解析した。MIA PaCa-2では、MUC6単独発現またはMUC6/ $\alpha$ 4GnT共発現群で対照群と比較して増殖能が有意に低下したが、PANC-1では、対照群、MUC6単独発現群、MUC6/ $\alpha$ 4GnT共発現群で増殖能は同程度であった。
  4. 細胞運動能をトランスウェルを用いた遊走能評価により、細胞浸潤能をマトリゲル浸潤法により解析した。MIA PaCa-2, PANC-1ともに、MUC6単独発現群では対照群に比べて運動能及び浸潤能が有意に低下し、MUC6/ $\alpha$ 4GnT共発現群で、さらに低下した。
  5. これらの分子機構を明らかにするため、 $\alpha$ GlcNAcに結合することが報告されているTFF2に着目した。TFF2は、両細胞株で内在性に発現しており、MUC6/ $\alpha$ 4GnT共発現群でその発現量が亢進した。遺伝子導入細胞の培養上清を用いた免疫沈降法による解析から、 $\alpha$ GlcNAc結合型MUC6は、TFF2との複合体として分泌されていることが示唆された。
  6. *A4GNT*のmRNA発現量が高い集団は、発現量が低い集団に比べ予後が良好であり、*MUC6*のmRNA発現量が高い集団は、発現量が低い集団に比べ予後が良好であった。
- 以上より、 $\alpha$ GlcNAcとMUC6は、膵癌の悪性化を抑制していることが培養細胞レベルで明らかになった。予後関連の結果と合わせ、 $\alpha$ GlcNAcとMUC6の発現量を調べることが、膵癌の悪性度の診断に有用であることが示された。

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。

Short-Term Associations of Ambient Fine Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>) with All-Cause Hospital Admissions and Total Charges in 12 Japanese Cities (日本の12都市における大気中微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) と全要因による入院件数および入院医療費との短期的関連)

長谷川 航平

(論文の内容の要旨)

【背景】 大気汚染物質の1つである微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) は死亡および罹患のリスク因子であることが知られている。これまで、PM<sub>2.5</sub>と入院件数の関連については数多くの報告がなされているが、その多くが呼吸器疾患または循環器疾患による入院を対象としており、全要因による入院を対象とした報告は限られていた。また、入院医療費との関連についての報告はわずかであり、既存の報告は特定の疾患を対象とした報告に限られていた。以上の背景から、日本の12都市を対象としてPM<sub>2.5</sub>と全要因による入院件数、および入院医療費との関連について検討を行った。

【方法】 調査対象は日本の人口100万人以上の12都市とし、調査期間は2015年4月1日から2017年3月31日までとした。入院件数および入院医療費データは厚生労働省から、PM<sub>2.5</sub>を含む大気汚染物質のデータは国立環境研究所から、温度および湿度のデータは気象庁からそれぞれ入手した。入手したデータにより、2段階アプローチを用いてPM<sub>2.5</sub>と全要因による入院件数、入院医療費、および1人あたり入院医療費との関連を検討した。層別解析として、年齢 (65歳未満, 65歳以上)、性別、居住地域 (東日本, 西日本) に分けた解析を行った。

【結果】 2015年4月1日から2017年3月31日までの12都市において、合計2,017,750件の入院がみられた。対象都市における平均の日平均PM<sub>2.5</sub>濃度は7.9 μg/m<sup>3</sup>から10 μg/m<sup>3</sup>であった。PM<sub>2.5</sub>の当日および前日の2日間の移動平均における10 μg/m<sup>3</sup>の増加は0.56 % (95 % 信頼区間: 0.14-0.99 %) の入院件数, 1.17 % (95 % 信頼区間: 0.44-1.90 %) の入院医療費の増加と関連していた。PM<sub>2.5</sub>の2日前の10 μg/m<sup>3</sup>の増加は0.75 % (95 % 信頼区間: 0.34-1.16 %) の1人あたり入院医療費の増加と関連していた。層別解析では、入院医療費で65歳未満と比較して65歳以上で有意に強い関連が見られた。

【考察】 本研究では、PM<sub>2.5</sub>の10 μg/m<sup>3</sup>の増加は0.56 % (95 % 信頼区間: 0.14-0.99 %) の入院件数の増加と関連していたが、この結果はおおむね過去の複数都

市研究やメタアナリシスの結果と一致していた。入院医療費との関連については、過去の特定の疾患を対象とした報告と同様に、PM<sub>2.5</sub>の増加は全要因による入院医療費および1人あたり入院医療費の増加と有意に関連していた。

【結論】 大気中PM<sub>2.5</sub>濃度は全要因による入院件数、入院医療費、および1人あたり入院医療費とそれぞれに有意に関連していた。

(論文審査の結果の要旨)

大気汚染物質の1つである微小粒子状物質 (PM<sub>2.5</sub>) は死亡および罹患のリスク因子であることが知られている。これまで、PM<sub>2.5</sub>と入院件数の関連については数多くの報告がなされているが、その多くが呼吸器疾患または循環器疾患による入院を対象としており、全要因による入院を対象とした報告は限られていた。また、入院医療費との関連についての報告はわずかであり、既存の報告は特定の疾患を対象とした報告に限られていた。以上の背景から、日本の12都市を対象としてPM<sub>2.5</sub>と全要因による入院件数、および入院医療費との関連について検討を行った。

調査対象は日本の人口100万人以上の12都市とし、調査期間は2015年4月1日から2017年3月31日までとした。入院件数および入院医療費データは厚生労働省から、PM<sub>2.5</sub>を含む大気汚染物質のデータは国立環境研究所から、温度および湿度のデータは気象庁からそれぞれ入手した。入手したデータにより、2段階アプローチを用いてPM<sub>2.5</sub>と全要因による入院件数、入院医療費、および1人あたり入院医療費との関連を検討した。層別解析として、年齢 (65歳未満, 65歳以上)、性別、居住地域 (東日本, 西日本) に分けた解析を行った。

その結果、長谷川航平は次の結果を得た。

1. PM<sub>2.5</sub>の当日および前日の2日間の移動平均における10 μg/m<sup>3</sup>の増加は0.56 % (95 % 信頼区間: 0.14-0.99 %) の入院件数, 1.17 % (95 % 信頼区間: 0.44-1.90 %) の入院医療費の増加と関連していた。
2. PM<sub>2.5</sub>の2日前の10 μg/m<sup>3</sup>の増加は0.75 % (95 %



信頼区間：0.34-1.16 %) の1人あたり入院医療費の増加と関連していた。

3. 層別解析では、入院医療費で65歳未満と比較して65歳以上で有意に強い関連が見られた。

これらの結果より、大気中 PM<sub>2.5</sub>濃度の増加は全要

因による入院件数、入院医療費、および1人あたり入院医療費を増加させていることが示唆された。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。

## Autologous non-human primate model for safety assessment of piggyBac transposon-mediated chimeric antigen receptor T cells on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (ピギーバック・トランスポゾン法を用いて作製した GMR CAR-T細胞の安全性評価のための自家霊長類モデル)

師 川 紘 一

### (論文の内容の要旨)

【背景と目的】キメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor: CAR)-T細胞療法は、人工的な抗原受容体遺伝子を患者のT細胞に導入することにより、腫瘍関連抗原特異的に抗腫瘍効果を発揮させる次世代がん治療法である。再発・難治性腫瘍の治療の切り札として期待されている。現在、血液・固形腫瘍に対する多様な新規 CAR-T細胞の開発が進められている。急性リンパ性白血病に対する CD19 CAR-T細胞は優れた抗腫瘍効果を認める反面、重篤な有害事象が問題となっている。サイトカイン放出症候群 (CRS: cytokine releasing syndrome) や中枢神経合併症 (ICANS: immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome) のような炎症性サイトカインに関わるものや、on-target/off-tumor や off-target 毒性のような、CAR-T細胞の正常組織への反応による有害事象も認められる。新規 CAR-T細胞の開発において、腫瘍組織のみに発現している抗原を標的とすることが理想ではあるが、実際には正常組織にも発現していることが多く、極わずかな量の発現であっても、生命を脅かすような重篤な有害事象を認めたという報告がある。したがって、臨床試験の前に、非臨床安全性試験の中で on-target/off-tumor や off-target 毒性について慎重に評価されなければならない。CAR-T細胞の開発においては、従来の医薬品の毒性試験では評価・設定されていないこれら CAR-T細胞独自の重要項目が多く、開発の妨げとなっている。CAR-T細胞の開発に広く利用されている免疫不全マウスへのヒト CAR-T細胞の投与モデルでは、薬効・薬理評価は可能であっても、毒性の評価は困難である。このため本研究では、ヒトとの抗原相同性が高く、体格が近いことから用量設定試験が可能な霊長類モデルを使い、GVHDの影響をなくす

ためドナーとレシピエントの種が一致した自家モデルとして、新規安全性試験モデルの樹立を試みた。非ウイルスベクター (piggyBac) 法による CAR-T細胞の霊長類での安全性試験は、これまで報告がない。今回、独自の骨髄系腫瘍に対する GM-CSF 受容体 (GMR) を標的とした CAR-T細胞を用いて安全性試験を実施した。GMRは単球や造血幹細胞、血管内皮細胞などの正常細胞に発現しているため、on-target/off-tumor 毒性を認めるか、更に交差反応による off-target 毒性を引き起こすのかを評価した。

【方法】GM-CSF 受容体 (GMR) CAR トランスポゾン・piggyBac ベクターを用いて、カニクイザル末梢血から GMR CAR-T細胞を作製した。抗腫瘍効果を評価するために、GMRを発現する急性骨髄性白血病細胞株 (MV4-11) やカニクイザルの単球やマクロファージを用いて in vitro で共培養を行った。そして、ドナーとなった3匹の非担癌カニクイザルへ各々  $3 \times 10^5$ /kg 個の自家 GMR CAR-T細胞を投与し、全身状態、食餌量、体重を2週間観察した。その間、経時的に血液・生化学・凝固検査、サイトカイン測定、CAR-T細胞動態検査を行い、投与2週間後には病理組織学的検査を施行した。

【結果】カニクイザル由来 GMR CAR-T細胞は、 $11 \pm 3\%$  の抗ヒト GMR CARを発現し、in vitro 共培養においてヒト急性骨髄性白血病細胞株をほぼ完全に死滅させ、カニクイザルの単球やマクロファージも殺傷した。自家 GMR CAR-T細胞を投与されたカニクイザル3匹のすべての末梢血から GMR CAR-T細胞が検出され、逸脱酵素と炎症反応の一過性の上昇を認めた。

1匹において day 2をピークとする一過性の interleukin (IL)-6の軽度上昇がみられたが、他のサイトカ

インに変動はみられなかった。カニクイザルの全身状態は良好で、on-target/off-tumor 毒性として推定された、単球減少、骨髄抑制、血管炎や凝固障害などは認めず、その他明らかな有害事象は認めなかった。

【結論】 霊長類モデルを用いて、GMR CAR-T 細胞の予備毒性試験を実施し、安全性を確認した。非担癌モデルであることから、評価項目は限られるが、on-target/off-tumor や off-target 毒性をヒトでの臨床試験前に評価し、最低限の安全性を確認するための手段として、有用であることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

新規 CAR-T 細胞の開発において、非臨床安全性試験の中で on-target/off-tumor や off-target 毒性について慎重に評価されなければならない。本研究では、独自の骨髄系腫瘍に対する GM-CSF 受容体 (GMR) を標的とした CAR-T 細胞について、ヒトとの抗原相同性が高い霊長類を用い、自家モデルによる新規安全性試験を施行した。

GMR CAR トランスポゾン・piggyBac ベクターを用いて、カニクイザル末梢血から GMR CAR-T 細胞を作製した。抗腫瘍効果を評価するために、GMR を発現する急性骨髄性白血病細胞株やカニクイザルの単球やマクロファージを用いて in vitro で共培養 (E : T = 1 : 1) を行った。そして、ドナーとなった3匹の非担癌カニクイザルへ各々  $3 \times 10^5$ /kg 個の自家 GMR CAR-T 細胞を投与し、2週間全身状態の観察、経時的に血液検査、サイトカイン測定、CAR-T 細胞

動態検査を行い、投与2週間後に病理組織学的検査を施行した。

その結果、師川は次の結論を得た。

1. カニクイザル由来 GMR CAR-T 細胞は、 $11 \pm 3\%$  の抗ヒト GMR CAR の発現を認めた。
2. in vitro, ヒト急性骨髄性白血病細胞株との共培養において、GMR CAR-T 細胞は細胞株をほぼ完全に死滅させた。
3. in vitro, カニクイザルの単球やマクロファージとの共培養において、GMR CAR-T 細胞はコントロール群と比較して、有意な殺傷を認めた。
4. 自家 GMR CAR-T 細胞を投与されたカニクイザル3匹のすべての末梢血から GMR CAR-T 細胞が検出された。
5. 一過性に逸脱酵素と炎症反応の上昇を認めたが、対照群でも同様に認めた。
6. 一過性に interleukin-6 の軽度上昇を認めたが、対照群でも同様に認めた。
7. カニクイザルの全身状態は良好で、on-target/off-tumor 毒性として推定された、単球減少、骨髄抑制、血管炎や凝固障害などは認めず、その他明らかな有害事象は認めなかった。

これらの結果より、自家霊長類モデルは、ヒトでの臨床試験前に on-target/off-tumor や off-target 毒性を評価し、最低限の安全性を確認するための手段として、有用であることを示した。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。

Altered Serum Lysophosphatidylethanolamine Species Profile in Patients with Autoimmune Pancreatitis (自己免疫性膵炎患者における、血清リゾホスファチジルエタノールアミン分子種組成)

山 浦 洵

(論文の内容の要旨)

【はじめに】 リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) は、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) とアルケニル基を豊富に含むリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) の代謝産物である。LPE は、生体内において生理活性脂質としての機能が報告され、慢性自己免疫性疾患の炎症過程と関係していることが示唆されている。LPE は水溶性が高いため、血清中に存在するが、血清中 LPE の病態生理学的役割と代謝の詳細は今のところ不明である。

自己免疫膵臓炎 (AIP) は、原因不明の炎症性疾患であり、IgG4高値を血清学的特徴とする代表的な IgG4 関連疾患である。LPE をはじめリゾリン脂質は、様々な慢性自己免疫性疾患の炎症過程への関与が報告されている。しかし、慢性炎症性疾患である AIP における脂質代謝や LPE 代謝等を検証した報告はない。本研究では、AIP 患者のリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) 代謝を理解するために、健常被験者を対象に AIP 患者の血清中 LPE 組成の検討を行った。【材料と方法】 AIP 患者 7 例と健常被験者 9 例の血清を用い、ガスクロマトグラフィー質量分析を使用して、脂肪酸組成を測定し、マトリックス支援レーザー脱着 / イオン化飛行時間法 (MALDI-TOF) 質量分析を使用して、LPE 分子種を分析した。

【結果】 脂肪酸分析において、血清中アラキドン酸 (AA : C20 : 4) 濃度は、健常者に比べて AIP 患者で高値であったが、血清エイコサペンタエン酸 (EPA : C20 : 5) とドコサヘキサエン酸 (DHA : C22 : 6) 濃度については有意な差はなかった。LPE 分析において、AIP 患者の血清中総 LPE 濃度は、健常者と比較して有意に低値であった。また、LPE 20 : 4 濃度は、LPE 20 : 5, LPE 22 : 6 濃度と強い相関関係を示した。プラズマローゲン型 LPE p16 : 0 濃度は、LPE 20 : 4, LPE 20 : 5, LPE 22 : 6 濃度と強い相関関係を示した。

【結論】 本研究では、AIP 患者と健常被験者間で、血清中脂質濃度および脂肪酸組成は、類似していたが、血清 LPE 濃度は AIP 患者群で有意に低値を示し、また多価不飽和脂肪酸を結合する LPE とプラズマロー

ゲン型 LPE の濃度と関連して変動することを明らかにした。本研究は、炎症性疾患における LPE 代謝の分子メカニズムの解析に繋がると思われる。

(論文審査の結果の要旨)

リゾホスファチジルエタノールアミン (lysophosphatidylethanolamine : LPE) は、多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid : PUFA) とアルケニル基を豊富に含むリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (phosphatidylethanolamine : PE) の代謝産物である。LPE は、生体内において、生理活性脂質としての機能が報告され、またそれらは脂肪酸代謝を介して、慢性自己免疫性疾患の炎症過程と関係している。LPE は血清中にも存在するが、血清中 LPE の病態生理学的役割と代謝の詳細は今のところ不明である。自己免疫膵臓炎 (autoimmune pancreatitis : AIP) は、原因不明の炎症性疾患であり、IgG4 高値を血清学的特徴とする代表的な IgG4 関連疾患である。LPE をはじめリゾリン脂質は、様々な慢性自己免疫性疾患の炎症過程への関与が報告されている。しかし、慢性炎症性疾患である AIP における脂質代謝や LPE 代謝等を検証した報告はない。本研究では、AIP 患者の PE と LPE 代謝を理解するために、健常被験者を対象に AIP 患者の遊離脂肪酸、血清中 LPE 組成の比較検討を行った。

その結果、山浦 洵は以下の結論を得た。

1. 脂肪酸分析において、血清中アラキドン酸 (AA : C20 : 4) 濃度は、健常者に比べて AIP 患者で高値であったが、血清エイコサペンタエン酸 (EPA : C20 : 5) とドコサヘキサエン酸 (DHA : C22 : 6) 濃度については有意な差はなかった。
2. LPE 分析において、AIP 患者の血清中総 LPE 濃度は、健常者と比較して有意に低値であった。また、LPE 20 : 4 濃度は、LPE 20 : 5, LPE 22 : 6 濃度と正の相関関係を示した。プラズマローゲン型 LPE では、LPE p16 : 0 濃度のみが、LPE 20 : 4, LPE 20 : 5, LPE 22 : 6 濃度と強い負の相関関係を示した。

本研究により、AIP 患者と健常被験者間で、血清

中脂質濃度および脂肪酸組成は、類似していたが、血清 LPE 濃度は AIP 群で低値を示すことを明らかにした。またプラズマローゲン LPE のうち LPE p16 : 0 のみが、多価不飽和脂肪酸を持つ LPE と負の相関を示すことから、PE p16 : 0/PUFA に対して基質特異的なホスホリパーゼ A の存在が示唆された。本研究で得られた知識は、炎症性疾患における LPE 代謝の分

子メカニズムの解析に繋がること、また今後は AIP 特異的なのか、病期により LPE 濃度に差があるのか等のさらなる検討も加え、病期のマーカーや予後のマーカーへの応用に繋がること期待される。

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。

## Effectiveness of an Aggression Management Training Program in Japan: A Quasi-Experimental Study (日本における攻撃性マネジメント研修プログラムの効果：準実験研究)

木 下 愛 未

### (論文の内容の要旨)

精神科患者の攻撃性や暴力的行動の予防とマネジメントは精神科スタッフの重要な援助のひとつである。こうした援助の方法は、元来医療安全に焦点が置かれた強制的な身体拘束技術としての意味合いが強かったが、近年、攻撃性を誘発する可能性のある複雑な相互作用を理解し、ケアの視点で患者に介入することを重視するようになってきている。我が国唯一の攻撃性マネジメントプログラムは包括的暴力防止プログラム (Comprehensive Violence Prevention and Protection Program : CVPPP) であるが、CVPPP も2019年にケアを重視した方向を打ち出した。このようなケアのためにはスタッフが落ち着いて患者に配慮してかわることが必要であり、スタッフのケアへの自信と、暴力に対するスタッフの攻撃的な態度の変容が求められる。したがって本研究は、CVPPP の研修前と研修直後、1か月後での受講者の自信と患者の攻撃性への態度の変化を調査し、これらの変化と個人特性の関連を調べることを目的とした。

2019年度の CVPPP 研修受講生のうち95名を対象に、一群事前事後テストデザインによる質問紙調査を行った。信州大学医倫理委員会の承認を得て行い (承認 : 4502)、研究への参加がトレーニングに影響しないよう、研究参加者には協力できる場合のみ1か月後にすべての回答用紙を郵送してもらった。調査内容は、研修前に基本属性 (性別、年齢、職種、経験年数、被暴力経験、受講動機)、攻撃性 (BAQ)、看護援助特性 (IPC-PC) 患者の攻撃行動への怒りの程度、攻撃的な患者へのケアに対する自信、患者の攻撃に対する態度 (ATAS) とした。研修前と1か月後に怒りの程度を比較 (Paired T-test)、研修前・後と1か月後に自信、態度を比較 (反復測定分散分析後に多重比較 (ペアワ

イズ)) した。さらに研修前と1か月後は研修効果の有無で二群化した後、基本属性とはクロス集計表で比較し、BAQ と IPC-PC は unpaired T-test で比較した。

結果、50名が回答した。研修の効果として、研修前と1か月後では、自信 ( $p < 0.01$ )、患者の攻撃に対するポジティブな態度 ( $p < 0.01$ ) 得点が有意に高く、患者の攻撃に対するネガティブな態度 ( $p < 0.01$ )、身体的攻撃への怒りの程度 ( $p < 0.01$ )、非身体的攻撃への怒りの程度 ( $p < 0.01$ ) 得点が有意に低く、CVPPP の1か月間の継続効果が認められた。研修効果と個人特性では、身体的攻撃への怒りの程度において、男性よりも女性が ( $p < 0.05$ )、短気な傾向の強い方が有意に効果が高かった ( $p < 0.05$ )。管理的で ( $p < 0.05$ )、自己肯定的 ( $p < 0.05$ ) な援助特性を持つ傾向のスタッフは、攻撃に対するポジティブな態度が改善した。女性、短気であることや患者に対し優位性の高い特性に有効性が示唆されたことは肯定的に評価できる。しかし CVPPP 研修は2005年の開発時から日本各地で行われ、対照群を設定できずホーンソン効果の大きさを判断できなかったことは本研究の限界であり、今後の課題である。

### (論文審査の結果の要旨)

精神科患者の攻撃性や暴力的行動の予防とマネジメントは、精神科スタッフの重要な援助のひとつに位置づけられている。2005年に保護的モデルを基盤とした包括的防止プログラム (Comprehensive Violence Prevention and Protection Program : CVPPP) が開発され、医療スタッフを対象とした研修によって普及が図られてきたが、医療安全に焦点が置かれた強制的な身体拘束技術としての意味合いが強かった。論文提出者を中心とする研究組織では、攻撃性を誘発する可

能性のある複雑な相互作用を理解し、ケアの視点で患者に介入する協働的モデルを基盤とした CVPPP を 2019年に改訂し、研修によって普及に努めてきた。本研究は、改訂した CVPPP の効果検証を視座にすえて、CVPPP の研修前と研修直後、1 か月後での受講者の自信と患者の攻撃性への態度の変化、及びこれらの変化と個人特性の関連性を明らかにしたものである。

対象は、2019年度に実施した CVPPP のプログラムを受講した1,146名中、過去に CVPPP の受講経験がなく、すべてのプログラムを受講した95名で、分析対象は研究協力が同意が得られた50名であった。方法は、一群事前事後テストデザインによる質問紙法で、研修前と研修直後、1 か月後に実施した。調査内容は、対象特性としての基本属性と攻撃性 (BAQ)、看護援助特性 (IPC-PC) を、研修効果指標としての患者の攻撃行動への怒りの程度、攻撃的な患者へのケアに対する自信、患者の攻撃に対する態度 (ATAS) であった。分析方法は、Paired *t*-test、反復測定分散分析後に多重比較 (ペアワイズ比較)、 $\chi^2$ 検定、unpaired *t*-test を用いた。研修を含めた研究の実施にあたっては、信州大学医倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号 4502)。

その結果、木下愛未は次の結果を得た。

1. 研修前と1か月後では、自信 ( $p < 0.01$ ) と患者の攻撃性に対するポジティブな態度 ( $p < 0.01$ ) が有意に高く、患者の攻撃に対するネガティブな態度 ( $p < 0.01$ ) と身体的攻撃への怒りの程度 ( $p < 0.01$ )、非身体的攻撃への怒りの程度 ( $p < 0.01$ ) 得点が有意に低かった。
2. 研修効果と個人特性では、身体的攻撃への怒りの程度において、男性よりも女性が ( $p < 0.05$ )、短気得点の高い者が有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。管理的で ( $p < 0.05$ )、自己肯定的 ( $p < 0.05$ ) な援助特性をもつ傾向のスタッフは、攻撃に対するポジティブな態度が改善した。

以上の結果より、CVPPP の1 か月間の継続効果、および女性、短気であることや患者に対し優位性の高い特性に有効であることが示唆された。研究の限界として、対象が研修1 か月後まで回答に協力した者に限定されるセレクションバイアス、時間経過による成熟効果やホーン効果などは避けられないものの、協働的モデルを基盤とした CVPPP の研修効果を確認したデータは貴重であり、新規性の視点からは高く評価できる。

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。

## Genomic characterisation and epidemiology of nosocomial *Serratia marcescens* isolates resistant to ceftazidime and their plasmids mediating rare *bla*<sub>TEM-61</sub> (医療関連感染事例由来セフトジジム耐性 *Serratia marcescens* の全ゲノム解析による *bla*<sub>TEM-61</sub> 保有プラスミド伝播事象の解明)

林 航

### (論文の内容の要旨)

*Serratia marcescens* は病院内環境中に広く分布し、医療関連感染の起因菌の一つとして重要視されている。今回、国内の中規模医療機関でセフトジジム耐性 *S. marcescens* による医療関連感染事例を確認した。本研究では1年間にわたり7病棟で確認された20事例由来セフトジジム耐性 *S. marcescens* 20株 (呼吸器系材料由来15株、泌尿器系材料由来4株、膿由来1株) を対象に薬剤耐性遺伝子の同定、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE)、*Escherichia coli*  $\chi$ 1037への接合伝達実験を行なった。さらに、代表株12株を対象とした全ゲノム解析および接合伝達株におけるプラスミド NGS 解析を実施し、それぞれの分子学的特性と医療関連感染事象の動態の解明を試みた。

*S. marcescens* 20株 (Sm1~Sm20) はセフトジジム (MIC: 32- >128 mg/L) に耐性を示し、全株が ESBL 遺伝子として極めて稀な *bla*<sub>TEM-61</sub> を保有していた。また、本遺伝子の上流にはプロモーター領域 *Pa/Pb* が存在し、*Pb* 領域の下流に15塩基 (5'-ATGTCATGATAATAA-3') を1単位とする配列の重複が認められ、株間で2~4単位と重複配列数が異なっていた (2単位: 6株, 3単位: 12株, 4単位: 2株)。PFGE 型別の結果、20株は遺伝的に異なる2つのグループに大別された (pulsotype I: 14株, pulsotype II: 6株)。20株のうち pulsotype およびプロモーター領域における重複配列数に基づき選択した12株 (pulsotype I の Sm1, 7, 8, 10, 11, 14, 18 および pulsotype II の Sm2, 3, 4, 6, 20) を対象とし、

全ゲノム解析を実施した。SNP および wgMLST に基づく系統解析の結果、pulsotypes I の 7 株と pulsotypes II の 5 株は相互に高い配列類似性を示し、Genotype 1, Genotype 2 の別々のクラスターに分別された。これらクラスターに分類された株は病原遺伝子としてヒト臨床由来 *S. marcescens* に特徴的であるヘモリジン関連遺伝子 *shlB* と細菌接触依存性増殖抑制システムに関与する *cdiA* を保有しており、環境由来株（水系環境、植物等）とは遺伝的に異なり、ヒト臨床由来株の遺伝系統群に属していた。また、12 株全てが *S. marcescens* に特有な IV 型分泌系遺伝子群を骨格とするプラスミド（約 78.9bp）を共有しており、*repA* の下流に *bla*<sub>TEM-61</sub> を担う TnI（*tnpA-tnpR-bla*<sub>TEM-61</sub>）が存在していた。さらに、Sm14 は既報の *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* が保有するプラスミドの全塩基配列と高い相同性を示すプラスミド（約 37.6kb）も保有していた。注目すべきことに、本プラスミドと同一の骨格を持ち、*bla*<sub>TEM-61</sub> を含む TnI が挿入されたプラスミド（約 42.5 kb）が Sm10 に認められ、さらには *E. coli*  $\chi$ 1037 に対して非常に高頻度な伝達性を確認した（ $2.8 \times 10^{-3}$  CFU/donor cell）。

本研究で未だ報告のない *bla*<sub>TEM-61</sub> 保有 *S. marcescens* による医療関連感染事例を確認した。また、本院内伝播事例にはプロモーター領域に異なるコピー数の重複配列を有する *bla*<sub>TEM-61</sub> を担う狭宿主域プラスミドの 2 種の遺伝系統株間での水平伝播とそれを保有するクローン自体の伝播事象に加え、同時に保有する高頻度伝達能を有する広宿主域プラスミドへの TnI の転移事象が関与していることを明らかにした。本研究は医療関連感染に関連する薬剤耐性菌および可動性遺伝子の伝播様式の推定におけるゲノム解析の有用性を強調するものである。

（論文審査の結果の要旨）

*Serratia marcescens* は自然環境や医療環境、特に湿潤環境に広く分布し、ヒトや動物の腸内常在菌の 1 種で、健常者の感染症起因菌とはならない。しかしながら、本菌は高齢者、新生児、基礎疾患を有する易感染患者の日和見感染症の重要な病原体として認識されている。さらに、種々抗菌薬に対する内因性耐性機構を有する *S. marcescens* は獲得性耐性遺伝子を担う

プラスミドなどのリザーバー、拡散源となり得ることから感染症治療や医療関連感染の観点からも重要視すべき菌種である。本学位論文は同一医療機関の内科 2 病棟を主体とする 7 病棟で 1 年間に確認された医療関連感染 20 事例に由来するセフトジジム耐性 *S. marcescens* 20 株の分子学的特性解析から耐性遺伝子とこれを担う可動性遺伝因子及び遺伝系統株の動態を解明したものである。本論文の特記すべき点として、*S. marcescens* 全株の保有する基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ（ESBL）遺伝子が世界で 1 報のみの *bla*<sub>TEM-61</sub> であったことに加え、上流のプロモーター領域にこれまで確認されていない重複配列が 2～4 単位で認められたことである。さらに *bla*<sub>TEM-61</sub> は転移因子のトランスポゾン TnI 上にコードされ、*S. marcescens* 特有の 78.9-kb プラスミド（*Escherichia coli* に非伝達性）に担われていた。興味深い知見として、これらの 78.9-kb プラスミドに加え *S. marcescens* の 1 株では *E. coli* への高頻度伝達性を示す TnI-*bla*<sub>TEM-61</sub> 保有 42.5-kb プラスミド、他の 1 株ではこのプラスミドから TnI-*bla*<sub>TEM-61</sub> を除いた 37.6-kb プラスミドが確認された。この 37.6-kb プラスミドは種々のグラム陰性桿菌で認められており、広宿主域の高頻度伝達性プラスミドと考えられる。これにより、ESBL 遺伝子の院内伝播・拡散の戦略として狭宿主域プラスミドから広宿主域プラスミドへのトランスポゾンを介した転移事象が明らかとなった。全ゲノム配列を用いた single nucleotide polymorphism 解析、whole genome multi-locus sequence typing 解析で *S. marcescens* 株は 2 系統群に大別されたが、病棟や分離時期、上流のプロモーター領域の重複配列単位数の違いとの関連性はなかった。また、これらの株は環境由来株（水系環境、植物等）とは遺伝的に異なり、ヒト臨床由来株の遺伝系統群に属していた。

本学位論文では医療関連感染由来多剤耐性グラム陰性桿菌の間での耐性遺伝子とこれを担う可動性遺伝因子の動きを追跡することの重要性を示し、その結果として可動性遺伝因子の循環の正確な機序を推定し得た点で評価できる。研究は適正に行われており、学位審査においても質疑に対し適切に答えていることから、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。