

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
出田 宏和	甲第1297号	R 4. 3.31	Antitumor effect of sclerostin against osteosarcoma (骨肉腫に対するスクレロスタチンの抗腫瘍効果)	中 沢 洋 三	平塚佐千枝 柴 祐 司 河 野 博 隆
小 山 傑	甲第1298号	R 4. 3.31	A new remnant preservation technique reduces bone tunnel enlargement after anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction (解剖学的2重束前十字靭帯再建術における新しい遺残組織温存方法は術後骨孔拡大を抑制する)	栗 田 浩	藤 永 康 成 福 島 菜 奈 恵
由 井 千 枝	甲第1299号	R 4. 3.31	Effects of cardiac surgical support on long-term outcomes of emergent or complex percutaneous coronary intervention cases: a sub-analysis of the SHINANO 5-year registry (冠動脈疾患に対する経皮的冠動脈形成術施行施設の心臓血管外科の有無に伴う長期予後の検討: SHINANO レジストリー5年間のサブ解析)	瀬 戸 達 一 郎	今 村 浩 柴 祐 司 尾 崎 和 幸
山 本 悠 太	甲第1300号	R 4. 9.30	Circulating T cells and resident non-T cells restrict type 2 innate lymphoid cell expansion in the small intestine (循環T細胞および組織常在性非T細胞が小腸における2型自然リンパ球集団の拡大を制限する)	菅 野 祐 幸	竹 下 敏 一 柴 祐 司 高 橋 将 文
PANG BO	甲第1301号	R 3. 9.30	An epilepsy-associated mutation of salt-inducible kinase 1 increases the susceptibility to epileptic seizures and interferes with adrenocorticotrophic hormone therapy for infantile spasms in mice (Salt-induced kinase 1 遺伝子のでんかん関連変異はてんかん発作の感受性を高めるとともに、マウスの点頭てんかんに対する ACTH の効果を減弱させる)	関 島 良 樹	新 藤 隆 行 古 庄 知 己
SHEN DANDAN	甲第1302号	R 5. 3.31	Subfascial infiltration of 0.5 % ropivacaine, but not 0.25 % ropivacaine, exacerbates damage and inflammation in surgically incised abdominal muscles of rats (0.5 % ロピバカインによる筋膜下浸潤麻酔は、外科的切開後の筋損傷と炎症を増悪するが、0.25 % ロピバカインはそれらを増悪しない)	杠 俊 介	高 橋 淳 川 真 田 樹 人 川 股 知 之

審査学位論文要旨

DIAO PAN	甲第1303号	R 5. 3.31	Dietary fat composition affects hepatic angiogenesis and lymphangiogenesis in HCV core gene transgenic mice (食事中脂肪組成はC型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝血管新生およびリンパ管新生に影響を与える)	副島雄二	栗田浩 駒津光久 寺井崇二
江原毅人	甲第1304号	R 5. 3.31	LGR5 expression is associated with prognosis in poorly differentiated gastric adenocarcinoma (低分化胃腺癌においてLGR5の発現は予後と関連する)	伊藤研一	小泉知展 平塚佐千枝 市川大輔
畠中輝枝	甲第1305号	R 5. 3.31	Comparison of differences and random errors in pedicle diameter measurements between MRI and CT: observational study of 315 pedicles in Lenke type 1 adolescent idiopathic scoliosis patients (MRIとCTによる椎弓根径測定の違いとランダムエラーの比較: Lenke 1型思春期特発性側弯症患者における315椎弓根の観察的研究)	藤永康成	清水公裕 古庄知己 波呂浩孝
田畑裕章	甲第1306号	R 4. 3.31	Usefulness of the controlled-rotation dilator sheath “Evolution RL” for extraction of old leads in two Japanese centers-An experience in use (回転制御型ダイレーターシース“Evolution RL”の、国内2施設における長期植え込みリード抜去への有用性)	山田充彦	瀬戸達一郎 柴祐司
西村輝	甲第1307号	R 5. 3.31	Detection of cognitive decline by spinal posture assessment in health exams of the general older population (一般高齢者の健康診断における脊椎姿勢評価による認知機能低下の検出)	野見山哲生	鷺塚伸介 高橋淳 松山幸弘
小川典之	甲第1308号	R 4. 3.31	Autologous Bilayered Adipose-Derived Mesenchymal Cell-Gelatin Sheets Reconstruct Ureters in Rabbits (脂肪由来間葉系幹細胞から作製した積層細胞シートを用いたウサギ尿管再生の試み)	柴祐司	高橋淳 栗田浩 三井貴彦
中村加世子	甲第1309号	R 5. 3.31	Autologous antigen-presenting cells efficiently expand piggyBac transposon chimeric antigen receptor T cells with predominant memory phenotype (自己末梢血由来遺伝子改変フィーダー細胞は、メモリー機能を保持したピギーバクトランスポゾン遺伝子改変キメラ抗原受容体T細胞の増殖に寄与する)	清水公裕	塩沢丹里 上原剛 今井千速
後藤憲彦	甲第1310号	R 5. 3.31	The usefulness of a combination of age, body mass index, and blood urea nitrogen as prognostic factors in predicting oxygen requirements in patients with coronavirus disease 2019 (年齢, BML, 血清BUN値は新型コロナウイルス感染症患者の酸素投与の必要性の予測に有用である)	今村浩	関島良樹 小泉知展 菊地利明

審査学位論文要旨

HAN YIBING	甲第1311号	R 5. 3.31	Immunohistochemical investigation of biomarkers for predicting adipose tissue invasion in oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌の脂肪浸潤予見因子の免疫組織化学的研究)	平塚佐千枝	伊藤 研一 浅村 英樹 各務 秀明
細見 謙登	甲第1312号	R 5. 3.31	NanoSPECT imaging reveals the uptake of ¹²³ I-labeled oxidized low-density lipoprotein in the brown adipose tissue of mice via CD36 (NanoSPECT イメージングによるマウス褐色脂肪組織における CD36を介した ¹²³ I 標識酸化 LDL 取込みの発見)	田中直樹	桑原宏一郎 杠 俊介 下村伊一郎
高橋 芳之	甲第1313号	R 4. 3.31	CD8+ lymphocyte infiltration is a specific feature of colitis induced by immune checkpoint inhibitors (CD8陽性リンパ球は免疫チェックポイント阻害薬による腸炎に特異的な所見である)	小泉知展	菅野 祐幸 梅村 武司 櫻庭 裕丈
高橋 佑介	甲第1314号	R 4. 3.31	Distribution and progression of cerebral amyloid angiopathy in early-onset V30M (p.V50M) hereditary ATTR amyloidosis (若年発症 V30M 変異型遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者における脳アミロイド血管症の進展および分布)	藤永康成	堀内 哲吉 古庄 知己 植田 光晴
ZHANG ZHE	甲第1315号	R 5. 3.31	Clinically Relevant Dose of Pemafibrate, a Novel Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Modulator (SPPARM α), Lowers Serum Triglyceride Levels by Targeting Hepatic PPAR α in Mice (臨床投与相当量の新規選択的 PPAR α モジュレーター・ペマフィブラートをマウスに投与すると、肝臓の PPAR α に作用して血中の中性脂肪値が低下する)	竹下 敏一	梅村 武司 森 政之 本多 彰
MEHTA ANURADHA	甲第1316号	R 5. 3.31	IQSEC2 Deficiency Results in Abnormal Social Behaviors Relevant to Autism by Affecting Functions of Neural Circuits in the Medial Prefrontal Cortex (IQSEC2の欠損は内側前頭前皮質の神経回路機能に影響を与え自閉症に関連した社会行動の異常をきたす)	新藤 隆行	鷺塚 伸介 田 潤克彦 深田 正紀
柿原 伸次	甲第1317号	R 5. 3.31	Role of adrenomedullin-2/intermedin in the pathogenesis of neovascular age-related macular degeneration (滲出型加齢黄斑変性症の病態におけるアドレノメデュリン2/インターメディンの役割)	菅野 祐幸	田 潤克彦 新藤 隆行 今井 靖
三村 哲彦	甲第1318号	R 5. 3.31	Adjacent segment pathology following posterior lumbar interbody fusion for lumbar degenerative spondylolisthesis: a comparison between minimally invasive and conventional open approach (腰椎変形すべり症に対する腰椎後方椎体間固定術後の隣接椎間障害：低侵襲アプローチと従来アプローチの比較)	堀内 哲吉	清水 公裕 高橋 淳 波呂 浩孝

審査学位論文要旨

大倉 絵梨	甲第1319号	R 5. 3.31	Cancer among children, adolescents and young adults in the Hokushin region, Japan, between 2010 and 2015 (2010~2015年の北信地域における小児・AYA世代のがん罹患の実態)	塩 沢 丹 里	古庄 知 己 伊原 正 喜 今井 千 速
内海 雅史	甲第1320号	R 5. 3.31	Predictors of a Non-response to Prophylactic Indomethacin for Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants (早産児における動脈管開存症に対するインドメタシン予防投与への不応予測因子の検討)	中 沢 洋 三	山田 充 彦 伊原 正 喜 犬飼 岳 史
武田 良淳	甲第1321号	R 4. 3.31	Clinical and molecular features of patients with <i>COL1</i> -related disorders: implications for the wider spectrum and the risk of vascular complications (<i>COL1</i> 関連症候群における分子遺伝学的・臨床的検討)	中 沢 洋 三	高橋 淳 駒津 光久 澤井 英明
一戸 記人	甲第1322号	R 5. 3.31	Usefulness of breath-hold fat-suppressed T2-weighted images with deep learning-based reconstruction of the liver: comparison to conventional free-breathing turbo spin echo (深層学習再構成を用いた肝の呼吸停止下 T2強調画像の有用性: 自由呼吸下高速スピネコー法との比較)	梅 村 武 司	副島 雄二 田中 直樹 五島 聡
原 大地	甲第1323号	R 5. 3.31	Histopathologically defined intestinal metaplasia in lesser curvature of corpus prior to <i>Helicobacter pylori</i> eradication is a risk factor for gastric cancer development (ヘリコバクター・ピロリ除菌療法前の胃体部小弯の組織学的腸上皮化生は除菌後胃癌のリスク因子である)	竹 下 敏 一	中山 佳子 梅村 武司 佐藤 貴一
林 桃子	甲第1324号	R 5. 3.31	Development of the rabbit NASH model resembling human NASH and atherosclerosis (ヒト NASH および動脈硬化を模したウサギ NASH モデルの作出)	瀧 伸 介	森 政之 松田 和之 本多 彰
鈴木 大介	甲第1325号	R 5. 3.31	Correlations between the properties of saliva and metabolic syndrome: A prospective observational study (唾液性状とメタボリックシンドロームの関係性: 前向き研究)	田 中 直 樹	石塚 修 浅村 英樹 宇田川 信之
上田 勝也	甲第1326号	R 5. 3.31	Biocompatibility Evaluation of Carbon Nanohorns in Bone Tissues (Carbon nanohorns に対する骨組織での生体応答性評価)	栗 田 浩	高橋 淳 竹内 あかり 松田 佳和
原 寛彰	甲第1327号	R 4. 3.31	Cold stress-induced bladder overactivity in type 2 diabetic mellitus rats is mitigated by the combination of a M ₃ -muscarinic antagonist and a β ₃ -adrenergic agonist (冷えストレスに起因する2型糖尿病ラット排尿筋過活動に対する M ₃ ムスカリン受容体拮抗薬と β ₃ アドレナリン受容体作動薬の併用による抑制効果)	田 中 直 樹	梅村 武司 栗田 浩 齊藤 源顕

審査学位論文要旨

荒井勇輔	甲第1328号	R 5. 3.31	Analysis of the effect of brexpiprazole on sleep architecture in patients with schizophrenia: a preliminary study (統合失調症患者の睡眠構築に対するブレクスピラゾールの効果の分析: 予備研究)	花岡正幸	杉山暢宏 野見山哲生 渡邊衡一郎
沼田隆佑	甲第1329号	R 5. 3.31	Assessment of Left Atrial Deformation in Patients with Total Anomalous Pulmonary Venous Connection by Two-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography (2D speckle tracking 法を用いた総肺静脈還流異常症の左房機能解析)	古庄知己	桑原宏一郎 中沢洋三 濱田洋通
鈴木一浩	甲第1330号	R 4. 3.31	Role of advanced glycation end products in the longitudinal association between muscular strength and psychotic symptoms among adolescents (思春期の筋力と精神病症状の縦断関連における最終糖化産物の意義)	駒津光久	高橋 淳 杉山暢宏
河西彩香	甲第1331号	R 5. 3.31	Early phase increase in serum TIMP-1 in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (遅発性拡散低下を伴う二相性急性脳症患者における急性期血清 TIMP-1値の上昇)	古庄知己	関島良樹 中沢洋三 山中 岳
小池由美	甲第1332号	R 5. 3.31	Clinical study of pollen-food allergy syndrome estimated by double-blind, placebo-controlled food challenges of ten apple cultivars (リンゴ花粉-食物アレルギー症候群患者に対する10品種のリンゴを用いた二重盲検プラセボ対照食物負荷試験による臨床的特徴の検討)	古庄知己	花岡正幸 中沢洋三 吉原重美
山下裕騎	甲第1333号	R 5. 3.31	Prognostic utility of albumin-bilirubin grade in Japanese patients with primary biliary cholangitis (日本人原発性胆汁性胆管炎におけるアルブミン-ビリルビングレードによる予後予測の有用性)	田中直樹	副島雄二 梅村武司 寺井崇二
倉沢伸吾	甲第1334号	R 4. 3.31	Serum positivity of tTG-IgA in Japanese Children with IBD (日本人小児 IBD 患者における血清抗組織トランスグルタミナーゼ IgA 抗体の陽性率に関する検討)	中沢洋三	田中直樹 米倉真一 今井千速
小野元紀	甲第1335号	R 4. 3.31	Anti-tumor effect of Wasabi component, 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate, against endometrial carcinoma cells (ワサビ成分 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の子宮内膜癌細胞に対する抗腫瘍効果)	副島雄二	山田充彦 中沢洋三 高野政志

審査学位論文要旨

丸山 悠太	甲第1336号	R 4. 3.31	Factors affecting day-to-day variations in tacrolimus concentration among children and young adults undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (小児および若年成人における同種造血幹細胞移植時のタクロリムス血中濃度の変動に影響を与える因子の検討)	内藤 隆文	山田 充彦 米倉 真一 今井 千速
中村 聡	甲第1337号	R 5. 3.31	RhoA G17E/Vav1 signaling induces cancer invasion via matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer (胃癌における RhoA G17E/Vav1 シグナルはマトリックスメタロプロテアーゼ-9 を介したがん浸潤を誘導する)	伊藤 研一	小泉 知展 平塚 佐千枝
井上 貴浩	甲第1338号	R 4. 3.31	Development of Bilayered Bone Marrow-derived Cell-Gelatin Grafts for Augmentation Cystoplasty and Reconstruction of Bladder Tissues in Rats (膀胱組織を再構築する積層型骨髄由来間葉系幹細胞グラフトの開発)	柴 祐司	塩沢 丹里 栗田 浩 三井 貴彦
小田切宏樹	甲第1339号	R 5. 3.31	Efficacy of cetylpyridium chloride mouthwash compared to povidone iodine on oral flora for perioperative patient care: A randomized controlled feasibility study (周術期患者の口腔内細菌叢に対するポビドンヨードと比較した塩化セチルピリジニウムの有効性: 準ランダム化比較試験)	田中 直樹	工 穰 栗田 浩 宇田川 信之
小川 亮	甲第1340号	R 5. 3.31	Prospective cohort study for postnatal CMV infection in preterm infants (早産児における後天性 CMV 感染に関する前向きコホート研究)	古庄 知己	塩沢 丹里 中沢 洋三 森岡 一朗
湊川 真理	甲第1341号	R 5. 3.31	Clinical and molecular features of 66 patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by pathogenic variants in <i>CHST14</i> (mcEDS- <i>CHST14</i>) (<i>CHST14</i> の病的バリエントを原因とする筋拘縮型エーラスダンロス症候群 (mcEDS- <i>CHST14</i>) 66 症例の臨床的および分子学的特徴)	枉 俊介	高橋 淳 中沢 洋三 倉橋 浩樹

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
大塚りさ	甲第45号	R 4. 3.31	The changes in frailty and death within six months of discharge in heart failure patients 80 years and older (80歳以上の心不全患者における退院後6か月以内の虚弱の変化と死亡)	伊澤 淳	上村智子 務臺 均
西川良太	甲第46号	R 4. 3.31	The effects of visual cues from optical stimulation devices on gait disturbance in patients with Parkinson's disease (光刺激装置による視覚的キューがパーキンソン病患者の歩行障害に及ぼす影響について)	横川吉晴	百瀬公人 木村貞治
馬場孝浩	甲第47号	R 4. 3.31	Validity of temporo-spatial characteristics of gait as an index for fall risk screening in community-dwelling older people (地域在住高齢者の転倒リスク・スクリーニングの指標としての歩行における時間的・空間的パラメータの妥当性)	横川吉晴	西澤公美 木村貞治
小林千世	甲第48号	R 4. 3.31	Reminiscence Activates the Frontal Lobe and Ameliorates Negative Mood States in Cognitively Intact Older Adults (回想は認知機能が低下していない高齢者の前頭葉を活性化し、ネガティブな気分を改善する)	下里誠二	木村貞治 池上俊彦
藤本知宏	甲第49号	R 5. 3.20	Relative and absolute reliability of gait variables obtained from gait analysis with trunk acceleration in community-dwelling individuals with chronic stroke: a pilot study (地域在住の慢性期脳卒中患者の体幹加速度を用いた歩行分析から得られる歩行変数の相対・絶対信頼性: 予備研究)	木村貞治	横川吉晴 百瀬公人
小林 純	甲第50号	R 5. 3.20	Immature Platelet Fraction and its Kinetics in Neonates (新生児における未成熟血小板分画とその動態)	松田和之	中山佳子 石田文宏 井上克枝
須江慶太	甲第51号	R 5. 3.20	Preexisting brain lesions in patients with post stroke pusher behavior and their association with the recovery period: A one year retrospective cohort study in a rehabilitation setting (脳卒中患者の既往病変が pusher 現象の回復過程に与える影響: 回復期リハビリテーション病棟における1年間の後ろ向きコホート研究)	西澤公美	百瀬公人 横川吉晴 網本 和
小出将太	甲第52号	R 5. 3.20	Genomic Traits Associated with Virulence and Antimicrobial Resistance of Invasive Group B Streptococcus Isolates with Reduced Penicillin Susceptibility from Elderly Adults (高齢者より分離された侵襲性ペニシリン低感受性B群レンサ球菌の病原性と抗菌薬抵抗性に関するゲノム特性)	安尾将法	長野則之 木村文一 高橋 孝

Antitumor effect of sclerostin against osteosarcoma (骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果)

出 田 宏 和

(論文の内容の要旨)

【研究の背景と目的】 骨肉腫は骨芽細胞系細胞に由来する悪性腫瘍であり、異常な骨や類骨の形成が骨肉腫に共通する現象である。骨肉腫の治療には外科的治療と多剤併用化学療法が行われているが、過去数十年間は新薬が開発されておらず、生存率は頭打ちの状態となっている。

Wnt 経路は、恒常性の維持や幹細胞の発生・成長・分化など、生体の幅広い現象を制御している。 β カテニンを介する古典的 Wnt 経路は、Wnt が Frizzled と LRP5/6 の受容体複合体に結合し、 β カテニンが細胞内に蓄積され、核に移行すると標的遺伝子の発現を制御し、細胞の増殖や分化を調節する。骨代謝において古典的 Wnt 経路は骨芽細胞の分化・増殖を制御している。

スクレロスチンは主に骨細胞から分泌される Wnt 経路阻害因子のひとつで、骨形成を抑制し、骨量減少や骨粗鬆症を引き起こす。一方、抗スクレロスチン抗体はスクレロスチンに結合して古典的 Wnt 経路を活性化させ骨形成を促進させる作用があり、骨粗鬆症治療薬として利用されている。骨形成促進性の骨粗鬆症治療薬は、動物実験において過量投与により骨肉腫を含む骨腫瘍の発生頻度が増加したという報告がある。しかし、スクレロスチンや抗スクレロスチン抗体による骨肉腫への作用は不明である。そこで我々は、スクレロスチンが骨肉腫に対して抑制的に作用するのではないかと仮説を立てた。本研究の目的は骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果を検討することである。【方法】 マウス骨肉腫細胞株 LM8 およびヒト骨肉腫細胞株 143B を用いた。In vitro の実験で骨肉腫細胞株の増殖と遊走を評価した。細胞増殖の評価には AlamarBlue assay と scratch assay を用い、細胞遊走能の評価には migration assay を用いた。AlamarBlue assay では、143B および LM8 細胞株をスクレロスチンで 3 日間処理した。96 ウェルプレートに細胞を播種し、4 時間接着させた後 alamarBlue 試薬を添加した。ネガティブコントロールとして、細胞を含まない培地に alamarBlue 試薬を添加しないウェルを準備した。マニュアルに従い 3 時間後の蛍光強度を測定した。測定値からネガ

ティブコントロールの平均値を差し引き、補正を行った。Scratch assay では、143B および LM8 細胞をスクレロスチンで 3 日間処理した。細胞単層にピペットチップで傷をつけ、スクレロスチンを培地に再度添加した。経時的に画像を撮影し、スクラッチ領域の面積を定量化した。Migration assay には、孔径 8 μ m のポリカーボネートメンブレンのついた Transwell chamber kit を用いた。143B および LM8 細胞はスクレロスチンで 3 日間処理した。無血清培地で懸濁した 143B 細胞および LM8 細胞をアッパーチャンバーに播種した。血清を含む培地をボトムチャンバーに添加し、143B は 4 時間、LM8 は 16 時間培養した。メンブレン上面の非遊走細胞を綿棒で除去し、メンブレン下面の細胞を固定・染色した。光学顕微鏡で無作為に選んだ 5 つの領域で遊走細胞の数を計測した。

In vivo の実験では、それぞれ C3H/He および BALB/c-nu/nu マウスの背部に移植し、骨肉腫モデルマウスを作製した。スクレロスチンを腫瘍移植日より 7 日間連日腹腔内注射し、腫瘍サイズと生存期間を検討した。【結果】 マウスおよびヒト骨肉腫細胞にスクレロスチンを投与すると、AlamarBlue assay および scratch assay において、マウスおよびヒト骨肉腫細胞の増殖が優位に抑制され、migration assay においてマウスおよびヒト骨肉腫細胞の遊走が有意に抑制された。骨肉腫モデルマウスにスクレロスチンを投与すると、非投与群と比較して腫瘍の成長が有意に抑制され、生存期間が延長した。

【考察】 スクレロスチンは主に骨細胞から分泌され、骨組織に特異的に作用すると考えられている。スクレロスチンを骨肉腫治療に臨床応用する際には、いくつかの利点がある。骨組織への特異性が高いため、全身的な副作用は軽度で、他の臓器への影響はほとんどない可能性がある。また、スクレロスチンはすべての骨肉腫に共通する定義である骨形成を阻害するため、多様性の高い骨肉腫であってもより多くの患者に有効かもしれない。さらに、スクレロスチンは細胞毒性を有さないため、既存の抗がん剤治療との併用が可能な可能性がある。骨肉腫治療の主要薬剤の一つであるドキソルビシンは、骨肉腫の Wnt 経路を活性化させて薬

剤耐性を生じさせることが知られているが、Wnt 阻害剤であるスクレロスチンを併用することでドキシソルビシンの薬剤耐性を克服できる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

骨肉腫の治療には外科的治療と多剤併用化学療法が行われているが、過去数十年間は新薬が開発されていない。Wnt 経路は生体の幅広い現象を制御しており、骨代謝において古典的 Wnt 経路は骨芽細胞の分化・増殖を制御している。スクレロスチンは主に骨細胞から分泌される Wnt 経路阻害因子のひとつで、骨形成を抑制する。一方、抗スクレロスチン抗体はスクレロスチンに結合して古典的 Wnt 経路を活性化させ骨形成を促進させる作用があり、骨粗鬆症治療薬として利用されている。骨形成促進性の骨粗鬆症治療薬は、過量投与により骨肉腫を含む骨腫瘍の発生が懸念される。しかし、スクレロスチンや抗スクレロスチン抗体による骨肉腫への作用は不明である。我々はスクレロスチンが骨肉腫に対して抑制的に作用するのではないかと仮説を立て、骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果を評価した。

マウス骨肉腫細胞株 LM8 およびヒト骨肉腫細胞株 143B を用いた。In vitro の実験では、骨肉腫細胞株

の増殖の評価に AlamarBlue assay と scratch assay を行い、遊走能の評価に migration assay を行った。In vivo の実験では、LM8 と 143B をそれぞれ C3H/He および BALB/c-nu/nu マウスの背部に移植し、骨肉腫モデルマウスを作製した。スクレロスチンを腫瘍移植日より 7 日間連日腹腔内注射し、生存期間と腫瘍体積の変化を評価した。

調査結果は以下のとおりである。

1. マウスおよびヒト骨肉腫細胞にスクレロスチンを投与すると、骨肉腫細胞の増殖および遊走が有意に抑制された。
2. 骨肉腫モデルマウスにスクレロスチンを投与すると、非投与群と比較して腫瘍の成長が有意に抑制され、生存期間が延長した。

本研究により骨肉腫に対するスクレロスチンの抗腫瘍効果が示唆された。今後、スクレロスチンの骨特異性の有無や、モデルマウスにおける転移巣への影響などについて評価する必要があるが、スクレロスチンを骨肉腫に対する治療薬として応用した場合、副作用や薬剤耐性といった既存の抗がん剤がもつ問題を解決できる可能性がある。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。

A new remnant preservation technique reduces bone tunnel enlargement after anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction (解剖学的 2 重束前十字靭帯再建術における新しい遺残組織温存方法は術後骨孔拡大を抑制する)

小 山 傑

(論文の内容の要旨)

【目的】前十字靭帯損傷 (ACL) に対する前十字靭帯再建術 (ACLR) は標準的な術式であり、良好な成績が報告されているが、まだ解決すべき様々な合併症が存在する。再建靭帯を通す骨孔拡大はそのような ACLR 時の一般的な合併症の一つである。骨孔拡大は、術後膝安定性に関連しないと報告されているが、再 ACLR 時の治療戦略に影響を与える。近年、遺残組織 (remnant) 温存併用 ACLR が行われ、固有感覚器官の温存、移植腱の血行再建・靭帯化、膝安定性などさまざまな効果が注目されている。remnant 温存による骨孔拡大予防に関する報告も散見されるが、結果は一定ではない。一般的に remnant 温存は remnant 内に移植腱を通して再建するが、remnant の力学的機能に着目した新しい remnant 温存方法が報告されている。この手技は remnant の連続性を保ち、

移植腱で remnant を挟むことにより、術後の前方安定性を向上させるものである。しかし、この新しい方法が骨孔拡大に与える影響に関する研究はまだ行われていない。本研究の目的は、新しい remnant 保存法が術後の大腿骨および脛骨骨孔拡大に及ぼす影響を調査し、remnant 切除もしくは remnant が存在しなかった症例と比較することである。研究仮説は、術後骨孔拡大は remnant 切除した場合に比べ、この新しい remnant 温存併用 ACLR 手技によって減少するというものである。

【患者と方法】2012年7月—2019年12月に当院で ACL 再建を行った患者のうち、再手術、複合靭帯損傷、経過観察1年未満、術前後 CT 未撮影、骨孔癒合例を除外した150膝を後ろ向きに調査した。ACLR 時、鏡視下に正常の50%以上の remnant の連続性が確認できた症例は、全例温存を試みた。移植腱の anteromedi-

al (AM) 東, posterolateral (PL) 東で remnant を挟み込むように温存した。骨孔作成後, remnant の連続性が残存しているものを温存群 (P 群: 49膝), 連続性が残せなかったものを切除群 (R 群: 47膝) とした。remnant が最初から存在しなかったものは欠損群 (A 群: 54膝) とした。術直後, 術後1年CTにて各骨孔 (大腿骨 AM, 大腿骨 PL, 脛骨 AM, 脛骨 PL) 面積を測定し, 骨孔拡大率 ($[\text{術後1年骨孔面積} - \text{術後1週骨孔面積}] / \text{術後1週骨孔面積} \times 100$) を3群間で比較した。また骨孔拡大率 $\geq 30\%$ の割合を3群間で比較した。術後骨孔拡大リスク因子を評価するため, remnant 温存の有無, 年齢, 性別, 手術待機期間, 脛骨後方傾斜, 骨孔位置を独立因子として単・多変量ロジスティック回帰分析を行った。

【結果】 骨孔拡大率は, 大腿骨—AM: P 群27.1%, R 群61.2%, A 群59.8%, PL: P 群49.3%, R 群93.4%, A 群88.5%, 脛骨—AM: P 群2.5%, R 群27.0%, A 群27.2%, PL: P 群4.2%, R 群32.9%, A 群32.7%と全ての骨孔でP群は他2群よりも有意に小さかった (全骨孔: $P < 0.01$)。骨孔拡大率 $\geq 30\%$ の割合は, 大腿骨—AM: P 群36.7%, R 群80.9%, A 群77.8%, PL: P 群65.3%, R 群91.5%, A 群92.6%, 脛骨—AM: P 群10.2%, R 群46.8%, A 群38.9%, PL: P 群12.2%, R 群57.4%, A 群44.4%とP群はR群と比較して全ての骨孔で, A群に比較して大腿骨 AM と大腿骨 PL で有意に小さかった。ロジスティック回帰分析では, 全ての骨孔において, remnant 温存は骨孔拡大抑制の有意な因子であった。

【考察】 本研究の最も重要な発見は, この新しい remnant 温存方法は全ての骨孔における骨孔拡大を抑制した点である。骨孔拡大は, 様々な生物学的要因と機械的要因が相互作用した結果に発生すると報告されている。従来の remnant 内を通過させる方法でも術後骨孔拡大を抑制した報告はあり, その理由は remnant を温存することによって骨孔開口部から骨孔内への炎症性サイトカインの流入を抑制したことにあると考察されている。しかし, remnant で全ての骨孔開口部を覆うことはできないため, 拡大抑制効果は覆うことが可能な一部の骨孔に限定されていた。本方法では remnant が移植腱と早期に癒着したことにより, 移植腱の micro motion や骨孔へのストレス軽減など, 機械的要因を抑制することによって拡大を抑制したと考えられた。本研究は簡便で特殊な器具も必要としない。ゆえに remnant の連続性が保たれている症例で

は, 行う価値があると考えている。

【結論】 新たな remnant 温存方法は, 大腿骨, 脛骨側ともに全ての骨孔拡大を予防できた。

(論文審査の結果の要旨)

前十字靭帯損傷 (ACL) に対する前十字靭帯再建術 (ACLR) は標準的な術式であり, 良好な成績が報告されているが, まだ解決すべき様々な合併症が存在する。再建靭帯を通す骨孔拡大はそのような ACLR 時の一般的な合併症の一つである。骨孔拡大は, 術後膝安定性に関連しないと報告されているが, 再 ACLR 時の治療戦略に影響を与える。近年, 遺残組織 (remnant) 温存併用 ACLR が行われ, 固有感覚器官の温存, 移植腱の血行再建・靭帯化, 膝安定性などさまざまな効果が注目されている。remnant 温存による骨孔拡大予防に関する報告も散見されるが, 結果は一定ではない。一般的に remnant 温存は remnant 内に移植腱を通して再建するが, remnant の力学的機能に着目した新しい remnant 温存方法が報告されている。この手技は remnant の連続性を保ち, 移植腱で remnant を挟むことにより, 術後の前方安定性を向上させるものである。しかし, この新しい方法が骨孔拡大に与える影響に関する研究はまだ行われていない。

そのため小山らは, 実際に解剖学的二重東再建術を施行した150例を, 骨孔作成後に remnant の連続性が残存しているものを温存群 (P 群: 49膝), 連続性が残せなかったものを切除群 (R 群: 47膝), 最初から存在しなかった欠損群 (A 群: 54膝) と3群に分け, CTにおける術後1週~術後1年の骨孔拡大率, 骨孔拡大率 $\geq 30\%$ の発生率を検討した。また骨孔拡大リスク因子について調査し, 以下の結果を得た。

1. 骨孔拡大率は, 大腿骨 anteromedial, 大腿骨 posterolateral, 脛骨 anteromedial, 脛骨 posterolateral 全ての骨孔でP群は他2群よりも有意に小さかった。
2. 骨孔拡大率 $\geq 30\%$ の発生率は, P群はR群と比較して全ての骨孔で, A群に比較して大腿骨 anteromedial と大腿骨 posterolateral で有意に小さかった。
3. ロジスティック回帰分析では, 全ての骨孔において, remnant 温存は骨孔拡大抑制の有意な因子であった。

これらの結果により, 新たな remnant 温存方法は, 大腿骨, 脛骨側ともに全ての骨孔拡大を予防できることが明らかとなった。

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。

Effects of cardiac surgical support on long-term outcomes of emergent or complex percutaneous coronary intervention cases: a sub-analysis of the SHINANO 5-year registry (冠動脈疾患に対する経皮的冠動脈形成術施行施設の心臓血管外科の有無に伴う長期予後の検討: SHINANO レジストリー 5年間のサブ解析)

由井千枝

(論文の内容の要旨)

【目的】冠動脈疾患 (CAD) に対する経皮的冠動脈形成術 (PCI) において技術とデバイスの進歩により手技の成功率, 合併症の発生率が改善し PCI は CAD に対する効果的な治療法となっている。そのため心臓血管外科のサポートのない病院での治療数も増え, また最新版の日本循環器学会によるガイドラインにおいて ST 上昇型心筋梗塞 (STEMI) に対する primary PCI は早期治療が望ましい観点から心臓血管外科のない施設での PCI もクラス IIa で推奨されている。近年, 大規模メタ解析などで心臓血管外科の有無によって CAD 患者に対する PCI の予後に差があるかを調査した報告がなされているが, 有意差を認める結果は得られていない。一方で待機的に治療を行うリスクを伴う複雑病変に関しては欧州心臓病学会のガイドラインで循環器系の集中治療が可能な医療機関でさらに十分な経験を積んだオペレーターのみ PCI を実施することをクラス IIa で推奨しているが, これらリスクを伴う複雑病変への PCI に関して, 心臓血管外科の有無での長期予後を比較検討した研究は少ない。そこで本研究では CAD に対して PCI を施行された患者において, 緊急で PCI 施行された群, 待機的に PCI を施行された複雑病変群も含めて, 施設の心臓血管外科の有無別に分類し初期治療の成功率, 長期予後に関して比較検討した。

【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, PCI を施行された連続1,665名の虚血性心筋症患者を, 5年間にわたりフォローを行った。本研究では1,665名の患者を後ろ向きに解析し患者は治療施設の心臓血管外科の有無で2グループに分類した。主要評価項目は全死亡と, 全死亡, 心筋梗塞, 脳卒中, 血管内再狭窄を含めた主要脳心血管イベント (MACCE) とした。

また, 238名の緊急症例, ESC のガイドラインに準拠した72名の待機的な複雑病変症例のサブグループに関してもそれぞれ2グループに分類し予後の比較検討

を行った。

【結果】登録した1,665名の患者のうち, 外科のある施設で治療された1,257名の患者群では透析症例, 末梢動脈疾患の既往, 冠動脈バイパス術の既往の割合が高く, 外科のない施設で治療された408名の患者群では緊急での PCI 症例, STEMI 症例の割合が有意に高い傾向であった。グループ間での Kaplan-Meier 分析を行ったところ, 長期予後, MACCE に関しての有意差は認めなかった。また, 緊急 PCI 症例群, 複雑病変群での心臓血管外科の有無によるサブグループ間比較でも長期予後, MACCE に関してそれぞれ有意差は認められなかった。

【考察】本研究では, 冠動脈疾患に対する PCI 施行施設において心臓血管外科の有無では長期予後に有意差を認めないこと, また緊急性を要する STEMI などに対する緊急症例や待機的な複雑病変に関しても心臓血管外科の有無では治療成績や長期予後に有意差を認めないことを明らかにした。この結果から現代において外科的なサポートのない施設でも CAD 患者に対して安全性の高い治療を提供できることが示唆される。特に地理的な背景や全身状態から搬送が困難な患者に対して, より迅速な治療を要する緊急症例において外科施設のない病院での治療成績が長期的にみても劣らないという点に関しては CAD 患者にとって非常に有益な結果と言える。過去の大規模研究では CAD 患者全体に対する PCI の治療成績を心臓血管外科の有無によって分類している研究がほとんどであるのに対し, 本研究ではさらに緊急症例, 複雑症例に対しての長期予後を評価し検討できたことは大きな研究結果と言える。ただ, 本研究は単一の地方県での検討であり緊急症例, 複雑症例事態の患者数が少ないことから今後さらなる研究が必要であると考えられる。また, 地域特性としてハートチームとしての連携が行いやすい環境であり適切に, 症例を振り分けられている背景も本結果に関連しているものと考えられる。PCI 施行時には外科的サポートが必要であることも多く, 今後も CAD 患

者のより安全な治療のために状況に応じた各施設間および施設内でのハートチーム内での連携によるよい治療を行っていく必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

経皮的冠動脈形成術 (PCI) は、冠動脈疾患 (CAD) 患者に対して安全で有益な治療となり、心臓血管外科のない施設での施行も増えている。過去の研究では心臓血管外科の有無で比較した大規模研究において予後に有意差は認めていないが、長期予後の検討を行っている研究はあまりない。また昨今、日本だけでなく欧州のガイドラインにおいて、ST 上昇型心筋梗塞 (STEMI) や待機的な複雑症例に対しての術者や治療施設に関する提言がなされているがそれらについて施設間の違いで比較検討した研究はない。本研究は長野県において PCI を受けた CAD 患者の追跡調査である SHINANO registry のデータを基に心臓血管外科のある病院、ない病院それぞれで PCI 患者の長期予後を比較、検討することを目的とした。本研究では外科のある施設での PCI 症例 1,257 名、外科のない施設での PCI 症例 408 名に分類し、またそれぞれの群において STEMI 患者、待機的な複雑症例患者などのサブグループ別に、5 年間のフォローを行った。主要評価項目は全死亡、Q 波心筋梗塞、非致死性脳卒中、標的病変の再血行再建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. 長野県において全死亡、MACCE とともに心臓血管外科の有無は PCI 後の CAD 患者の長期予後に影響しない結果であった。
2. 病変自体の PCI の難易度に有意差はないが、患者背景は心臓血管外科のある施設群でハイリスク症例の割合が多く、外科のない施設では STEMI や緊急症例の割合が多い傾向であった。
3. サブグループ解析については STEMI、待機的な複雑症例において全死亡、MACCE とともに有意差は認められず、心臓血管外科の有無は長期予後に影響しない結果であった。

以上より本研究は、長野県において PCI 施行施設の心臓血管外科の有無は PCI 後の CAD 患者の長期予後には影響しないことを明らかにした。また、STEMI、待機的な複雑症例においても同様の結果であることを明らかにした。地方の医療圏における今後の PCI 施設や心臓血管外科の在り方を含め、地域の CAD 患者にとって安全性の高い治療を維持していくために各々の施設が持つ責務を果たしていくことの重要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て。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。

Circulating T cells and resident non-T cells restrict type 2 innate lymphoid cell expansion in the small intestine (循環 T 細胞および組織常在性非 T 細胞が小腸における 2 型自然リンパ球集団の拡大を制限する)

山本 悠太

(論文の内容の要旨)

【背景】自然リンパ球 (innate lymphoid cells: ILCs) は組織常在性リンパ球で、炎症や感染の際と同様に steady state においても粘膜組織の維持に大きく関わっている。ヘルパー T 細胞の 3 つのサブセットと対応するように、ILCs にも 3 つのサブセットが存在する。すなわち、インターフェロン γ を産生する 1 型自然リンパ球 (ILC1)、IL-5 と IL-13 を産生する ILC2、そして IL-22 を産生する細胞や胎児期の lymphoid tissue inducer (LTi) 細胞に類似する細胞を含む ROR γ t 依存性 ILC3 である。肺や小腸粘膜固有層 (small intestine lamina propria: siLP) の ILC2 細胞集団の恒常性の維持には細胞間のクロストークや環境要因が影響していると考えられているが、詳細は明らかでな

い。我々は以前に獲得免疫が欠損している *Rag1* 欠損マウスにおいて、siLP の ILC2 の数が野生型に比べて多いことを報告した。そのことから、獲得免疫細胞が siLP 中の ILC2 数の上限を規定していると仮説を立て、検討を行った。

【方法】複数の遺伝子改変マウス (*Rag1*^{-/-}, *Ihgm1* ^{μ MT/ μ MT}, *Stat6*^{-/-}, *RORc*(γ t)^{*gfp/gfp*}) を用いた。小腸粘膜固有層から採取した単核細胞を蛍光抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて解析し、細胞数を算定した。CD4⁺ T 細胞の adoptive transfer は、同細胞を野生型マウスの腸管膜リンパ節と脾臓から autoMACS を用いて調整し、5 × 10⁶ 個を尾静脈から注入し、4-5 週間後に解析した。並体結合 (parabiosis) については、麻酔下に 2 匹のマウスの肘関節から膝関節まで皮膚を切

開し、上腕骨と大腿骨を縫合した後に皮膚を縫合閉鎖して行った。この際、白血球細胞がどちらのマウス由来なのかを確認するためにCD45.1/45.2コンジュニックマウスを用い、術後4-5週間後に解析した。T細胞の除去は、抗CD3抗体もしくは抗CD4抗体および抗CD8 α 抗体の混合物を4週齢から1週間ごとに5回以上腹腔内投与して行った。また、Ki67陽性細胞ならびに5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 含有水を3日間飲ませた後に、EdU 取り組み細胞の比率を測定して細胞増殖率の測定を行った。

【結果】 先天的にT、B細胞を欠く *RagI*^{-/-}マウスでは、コントロールマウスと比較して siLP の ILC2 および複数の ILC3 サブセットの細胞数が増加していた。一方、抗CD3抗体でT細胞を後天的に除去すると、ILC2の数が増加したが、ILC3のダブル・ネガティブ以外のサブセットでは細胞数が増加しなかった。B細胞欠損 *Ighm* ^{μ MT/ μ MT}マウスでは、siLP の ILC2 の数は同等であった。また、*RagI*^{-/-}マウスでも骨髄の ILC2 precursor の数に変化はなかった。これらのことから、T細胞は ILC2 の発生・分化ではなく恒常性に影響を与えていると考えられた。一方で、抗CD4抗体と抗CD8 α 抗体によって conventional T細胞を除去しても、抗CD3抗体を用いた場合とは対照的に ILC2 数の増加はみられなかった。このとき、TCR $\gamma\delta$ または TCR $\alpha\beta$ を発現するダブル・ネガティブ (CD4⁻CD8⁻) T細胞の増加がみられたことから、conventional single positive T細胞と同様に、これら非定型T細胞も ILC2 数の制限が可能であることが示唆された。

逆に *RagI*^{-/-}マウスに野生型マウスの脾臓および腸間膜リンパ節から採取精製した CD4⁺T細胞を transfer すると、siLP の ILC2 が減少した。同様に、野生型マウスとの parabiosis によって *RagI*^{-/-}マウスにT細胞とB細胞を経循環的に流入させると、siLP の ILC2 が減少した。*RagI*^{-/-}マウスの NKp46⁺ ILC3 の Ki-67 陽性率は、CD4⁺T細胞の transfer や野生型マウスとの parabiosis によって著明に低下したが、ILC2 に関してはそのような変化は認めなかった。*RagI*^{-/-}マウスでは、siLP において特に若いマウスで NKp46 陽性 ILC3 の EdU 陽性率がコントロールマウスと比較して高かったが、ILC2 に関してはほぼ同等であった。これらのことから、T細胞が siLP 中の細胞集団サイズを制御する機序は ILC2 と ILC3 で異なり、前者では増殖の抑制とは異なることが分かった。

1型ヘルパーT細胞 (Th1) が産生する主要なサイ

トカインで、ILC2の機能を抑制することが知られているインターフェロン γ の受容体のノックアウトマウスの siLP では、ILC2は増加していなかった。一方で、Th2細胞の分化に必須な Stat6 および Th17の分化に必須な ROR γ t をそれぞれ欠損するマウスの siLP の ILC2はコントロールと比較して増加していた。しかしながら、STAT6もしくはROR γ tを欠くCD4⁺T細胞が *RagI*^{-/-}マウスに adoptive transfer されると、野生型CD4⁺T細胞と同様に ILC2数を減少させた。また ROR γ t や STAT6 を欠くマウスでは、野生型マウスと parabiosis し、siLP に十分な野生型CD4⁺T細胞が存在していても、ILC2は野生型マウスのものよりも多いままであった。これらのことから、CD4⁺T細胞の ILC2数の制限は、Th細胞のエフェクター機能とは無関係であり、そしてT細胞非依存性でSTAT6 および ROR γ t 依存的な組織常在性細胞による ILC2数制限機構が存在することが示唆された。

【結論】 この研究によって、steady state の siLP においてT細胞による機構に加えて ROR γ t および STAT6 に依存的な機構を通じて ILC2数が制限されていることが初めて明らかになった。アレルギーや寄生虫感染の際の2型免疫応答には組織の ILC2が大きく関与していることから、ILC2集団をホメオスタティックに制御する細胞間の相互作用を更に詳しく明らかにすることはこれら疾患の病因、病態の理解につながるものと期待される。

(論文審査の結果の要旨)

自然リンパ球 (innate lymphoid cells : ILCs) は組織常在性リンパ球で、炎症や感染の際と同様に steady state においても粘膜組織の維持に大きく関わっている。ILCsには3つのサブセットが存在し、ILC2は IL-5 と IL-13 を産生することを特徴とする。肺や小腸粘膜固有層 (small intestine lamina propria : siLP) の ILC2細胞集団の恒常性の維持には細胞間のクロストークや環境要因が影響していると考えられているが、詳細は明らかでない。獲得免疫が欠損している *RagI* 欠損マウスにおいて、siLP の ILC2 の数が野生型に比べて多いことから、獲得免疫細胞が siLP 中の ILC2 数の上限を規定していると仮説を立て、検討を行った。

複数の遺伝子改変マウスを用い、小腸粘膜固有層から採取した単核細胞を蛍光抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて解析し、細胞数を算定した。*RagI*^{-/-}に対する CD4⁺T細胞の adoptive transfer、*RagI*^{-/-}と野生型マウスの並体結合 (parabiosis) による

T細胞の移入を行った。また、depletion抗体によるT細胞の除去は、抗CD3抗体もしくは抗CD4抗体および抗CD8 α 抗体の混合物を腹腔内投与して行った。Ki-67の核内染色および5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)含有水を用いたEdU取り組み実験を行い、細胞増殖率の測定を行った。さらに、ILC2の数に対するヘルパーT細胞(Th)のeffector functionの影響、およびSTAT6とROR γ t依存的な組織常在性細胞の影響を検討した。

その結果、山本は次の結論を得た。

1. T細胞が先天的に欠損するマウスでは、siLPのILC2の数が増加していた。また、抗CD3抗体を用いてT細胞を後天的に欠損させても、ILC2が増加した。Rag1欠損マウスでは骨髄のILC2 precursorの数に変化はなかった。
2. adoptive transfer および並体結合(parabiosis)によってRag1^{-/-}マウスにT細胞の移入すると、ILC2の数が減少した。

3. T細胞がsiLP中の細胞集団サイズを制御する機序はILC2とILC3で異なり、後者は増殖の抑制だが、前者では増殖の抑制とは異なるメカニズムであった。
4. CD4⁺T細胞のILC2数の制限は、Th細胞のエフェクター機能とは無関係であり、そしてT細胞非依存性でSTAT6およびROR γ t依存的な組織常在性細胞によるILC2数制限機構が存在することが示唆された。

以上の結果から、steady stateのsiLPにおいて、T細胞による機構に加えてROR γ tおよびSTAT6に依存的な機構を通じてILC2数が制限されていると結論付けた。アレルギーや寄生虫感染の際の2型免疫応答には組織のILC2が大きく関与している。ILC2集団を恒常的に制御する細胞間の相互作用を更に詳しく明らかにすることは、これら疾患の病因、病態の理解につながるものと期待され、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

An epilepsy-associated mutation of salt-inducible kinase 1 increases the susceptibility to epileptic seizures and interferes with adrenocorticotrophic hormone therapy for infantile spasms in mice (Salt-induced kinase 1 遺伝子のでんかん関連変異はてんかん発作の感受性を高めるとともに、マウスの點頭てんかんに対するACTHの効果を減弱させる)

Pang Bo

(論文の内容の要旨)

【Background and Aims】 Salt-inducible kinase 1 (SIK1) is an AMP-activated protein kinase (AMPK) with inducible expression in the adrenal cortex in response to the salt intake or adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Six mutations in the salt-inducible kinase 1 (SIK1)-coding gene have been identified in patients with early infantile epilepticencephalopathy (EIEE-30) accompanied by autistic symptoms. Two of the mutations are nonsense mutations that truncate the C-terminal region of SIK1. Although the relevance between the SIK1 mutation and autistic behaviors has been uncovered in SIK1-MT mice, the effect of the SIK1 mutation on epilepsy remains unknown.

【Materials & Methods】 To study the effects of these mutations on the disorder, we injected NMDA or PTZ into SIK1-MT males to induce epileptic seizures in mice. Activated brain regions were identified by immunohistochemistry against c-fos, Iba1, and GFAP.

ACTH was administrated intraperitoneally to examine the rescue effect in SIK1-MT and wild-type control mice. We also analyzed electrophysiological properties of the cortical neurons in SS using patch clamp recordings.

【Results】 SIK1-MT mice grow normally without showing early lethality. In the SIK1-MT mice, we found NMDA-induced spasms are more severe. Using patch clamp electrophysiology, we found input resistance and the number of action potentials was increased in SIK1-MT mice and an increase in the density of c-fos positive cells in 12 out of 126 brain regions by immunohistochemistry against c-fos, and pretreatment of ACTH did not alleviate the severity of NMDA-induced spasms in SIK1-MT mice. We also found that SIK1 is involved in temporal lobe epilepsy by PTZ-induced seizure, and the neural circuits activated by PTZ and NMDA injection may be different base on the laminar distribution of c-fos

positive cells in the somatosensory cortex.

【Conclusion】 Altogether, epilepsy-associated SIK1 mutant mice were subjected to NMDA- and PTZ-induced seizures, rodent models for infantile spasms, and temporal lobe epilepsy. As suggested in human clinical research, our data support the hypothesis that the SIK1 gene is closely associated with epileptic seizures and raise the notion that SIK1 may be involved in the molecular pathway underlying the ACTH therapy for infantile spasms.

(論文審査の結果の要旨)

Salt-inducible kinase 1 (SIK1) is an AMP-activated protein kinase (AMPK) with inducible expression in the adrenal cortex in response to the salt intake or adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Six mutations in the salt-inducible kinase 1 (SIK1)-coding gene have been identified in patients with early infantile epileptencephalopathy (EIEE-30) accompanied by autistic symptoms. To study the effects of these mu-

tations on epilepsy, NMDA or PTZ was injected into SIK1-MT males to induce epileptic seizures. I studied these epilepsy model by focusing on the susceptibility to epileptic seizures and adrenocorticotrophic hormone therapy for infantile spasms and found following:

1. Seizure susceptibility induced by both NMDA and PTZ was enhanced in SIK1-MT mice.
2. Distinct brain regions were activated in NMDA-induced seizures.
3. No microglial activation was detected in NMDA-induced seizures.
4. SIK1-MT canceled the effect of ACTH treatment on NMDA-induced seizures.
5. Distinctive neurons within the cortical layer formation were activated in NMDA- or PTZ-induced seizures.

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

Subfascial infiltration of 0.5 % ropivacaine, but not 0.25 % ropivacaine, exacerbates damage and inflammation in surgically incised abdominal muscles of rats (0.5 %ロピバカインによる筋膜下浸潤麻酔は、外科的切開後の筋損傷と炎症を増悪するが、0.25 %ロピバカインはそれらを増悪しない)

SHEN DANDAN

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 局所麻酔薬の創部浸潤麻酔は神経ブロックと比較して手技が比較的容易であり、様々な手術において術後鎮痛効果があり、術期のオピオイドの使用量を減少させることが知られている。特に開腹手術でも創部浸潤麻酔が広く実施されているが、鎮痛効果を発揮するためには比較的大量の局所麻酔薬投与が必要である。これまでの研究では、正常な骨格筋に対して筋内投与した場合の局所麻酔薬の筋毒性やアポトーシス作用が報告されているが、切開した筋組織に対する低濃度の局所麻酔薬の影響については十分に調査されていない。本研究では、ラットの開腹手術モデルを用いて、臨床的に頻用される局所麻酔薬の一つであるロピバカインを0.25 %と0.5 %の濃度で創部筋膜下に投与し、切開した筋組織の損傷、炎症反応、および筋再生に及ぼす影響と鎮痛効果を検討した。

【材料及び方法】 本研究は、6-7週齢雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。開腹手術モデル (Laparoto-

my : LAP) は、吸入麻酔下に右側最下部肋骨から0.5 cm 離れた腹部の皮膚を2.5 cm 斜切開し、さらに筋肉 (外腹斜筋、内腹斜筋、腹横筋) を2 cm 切開して作成した。局所麻酔薬は、以下の二種類の 방법으로投与した。(1) 実験1 (単回投与) : 開腹手術モデル作成後、0.25 %ロピバカイン (LAP+0.25 %RPV 群)、0.5 %ロピバカイン (LAP+0.5 %RPV 群) または生理食塩水 (LAP+saline 群) 100 μl を切開線に沿って筋膜下に単回投与した。(2) 実験2 (繰り返し投与) : 開腹手術モデルを作成後、先端に15個のサイドホールをついた15 cm のカテーテルを筋膜下に留置した。0.25 %ロピバカイン (LAP+repeated 0.25 %RPV 群)、0.5 %ロピバカイン (LAP+repeated 0.5 %RPV 群)、または生理食塩水 (LAP+repeated saline 群) 100 μl を切開直後と切開1日後、2日後、3日後、4日後にカテーテルから注入した。

2種類の実験において、自発痛の指標である Rat Grimace Scale (RGS) と von Frey フィラメントを用

いた腹部創部近傍の逃避閾値 (abdominal constriction threshold: ACT) の経時的変化を記録した。また、切開 5～10 日後に、筋組織を取り出し、hematoxylin-eosin (HE) 染色を行い、筋損傷の領域を調査した。さらに、炎症反応、および筋再生に及ぼす影響を検討するために、切開 2～5 日後に、筋組織を取り出し、マクロファージ全体の標識マーカー (CD68) や筋再生マーカー (MyoD) を用いて免疫染色を行った。

【結果】 実験 1 (単回投与)：切開 2 時間後に、LAP+saline 群と比較して、LAP+0.25 %RPV 群と LAP+0.5 %RPV 群で自発痛と機械性痛覚過敏は有意に軽減したが、それ以降は観察期間を通して三群間に有意差はなかった。また、LAP+0.25 %RPV 群と LAP+0.5 %RPV では鎮痛効果に差はなかった。HE 染色において、切開後の筋損傷の領域は、切開 5、10 日後に、LAP+0.5 %RPV 群は LAP+saline 群と比較して有意に拡大した。筋組織の免疫染色において、LAP+0.5 %RPV 群は、LAP+saline 群と比較して、切開 2、5 日後に、CD68 の発現が有意に増加し、切開 5 日後に、MyoD の発現が有意に増加した。一方、LAP+0.25 %RPV 群は、LAP+saline 群と比較して筋損傷の領域、CD68 と MyoD の発現に有意差はなかった。

実験 2 (繰り返し投与)：カテーテルを介した繰り返し投与の局所麻酔薬投与によって、2 時間後の機械性痛覚過敏は有意に軽減した。HE 染色において、切開 5、10 日後の LAP+repeated 0.5 %RPV 群の筋損傷の領域は、LAP+repeated saline 群と比較して有意に拡大した。LAP+repeated 0.5 %RPV 群の切開 5 日後の筋組織の CD68 と MyoD の発現は、LAP+saline 群と比較して有意に増加した。一方、LAP+repeated 0.25 %RPV 群は、LAP+repeated saline 群と比較して、筋損傷の領域、CD68 と MyoD の発現に有意差はなかった。

【考察】 本研究では、臨床を模した投与量と濃度のロピバカインを、筋切開近傍の筋膜下に投与した。ロピバカインによる一過性の鎮痛効果がみられたことは、臨床における報告と矛盾しない。また、本研究においては、0.25 %と 0.5 %のロピバカインの鎮痛効果に差はなかった。0.25 %ロピバカインの筋膜下への単回または反復投与は、開腹手術後の筋損傷、炎症反応、筋再生に影響を与えなかった。一方、開腹後の創部近傍に 0.5 %ロピバカインの筋膜下浸潤麻酔を行った場合、HE 染色では筋損傷領域の拡大と、CD68 の発現増加がみられた。この結果は、0.5 %ロピバカインが

切開した筋肉の損傷を更に増悪させたことを示唆する。0.5 %ロピバカインは、筋再生のマーカーの発現も増加させたが、筋損傷が増悪した二次的な結果をみている可能性がある。

【結論】 本研究では 0.25 %ロピバカインの単回・繰り返し投与は、切開筋近傍の筋損傷に影響を与えないことが示された。一方、筋内投与でなくても、切開筋近傍に臨床使用濃度である 0.5 %ロピバカインを投与した場合、骨格筋の損傷をさらに悪化させる可能性が示された。今後、有益性と有害性のバランスを考慮しながら、筋切開近傍の創部浸潤麻酔に使用する局所麻酔薬の最適な濃度と投与量についてさらに検討する必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

開腹手術では、創部浸潤麻酔が広く実施されているが、鎮痛効果を発揮するためには比較的大量の局所麻酔薬投与が必要である。これまでの研究において、正常な骨格筋に対して筋内投与した場合の局所麻酔薬の筋毒性やアポトーシス作用が報告されているが、切開した筋組織に対する低濃度の局所麻酔薬の影響については十分に調査されていない。そこで SHEN DAN-DAN は、局所麻酔薬の切開した筋組織の損傷、炎症反応、および筋再生に及ぼす影響と鎮痛効果を検討した。

本研究では、ラットの開腹手術モデルを用いて、臨床的に頻用される局所麻酔薬の一つであるロピバカイン (RPV) を 0.25 %と 0.5 %の濃度で二種類の投与方法 (単回投与および繰り返し投与) で筋膜下に投与し、以下の検討を行った。

1. 行動評価として自発痛の観察、機械刺激に対する逃避閾値測定
2. HE 染色を用いた筋損傷の領域の調査
3. 免疫染色による CD68 発現の検討 (炎症反応に及ぼす影響の検討)
4. 免疫染色による MyoD 発現の検討 (筋再生に及ぼす影響の検討)

その結果、以下の結果を得た。

1. 0.25 %RPV と 0.5 %RPV の単回投与では、切開 2 時間後の自発痛、機械性痛覚過敏が軽減した。一方、0.25 %RPV と 0.5 %RPV の繰り返し投与では、投与 2 時間後の機械性痛覚過敏が軽減した。
2. 単回投与、繰り返し投与共に、0.25 %RPV 群と 0.5 %RPV 群を比較して鎮痛効果に差はなかった。
3. 筋損傷の領域は、単回投与、繰り返し投与共に切

- 開5, 10日後に, 0.5%RPV群はsaline群と比較して有意に拡大した。
4. CD68の発現は, 単回投与において, 切開2, 5日後に, 0.5%RPV群はsaline群と比較して有意に増加した。一方, 繰り返し投与では, 切開5日後に, 0.5%RPV群はsaline群と比較して有意に増加した。
 5. MyoDの発現は, 単回投与, 繰り返し投与共に, 切開5日後に, 0.5%RPV群はsaline群と比較して有意に増加した。
 6. 0.25%RPV群は, 単回投与, 繰り返し投与共にsaline群と比較して筋損傷の領域, CD68とMyoD

の発現に有意差はなかった。

以上より, 0.25%ロピバカインの単回・繰り返し投与は, 切開筋近傍の筋損傷に影響を与えないことが示された。一方, 筋内投与でなくても, 切開筋近傍に臨床使用濃度である0.5%ロピバカインを投与した場合, 骨格筋の損傷をさらに悪化させる可能性が示された。0.25%ロピバカインは鎮痛効果もあり, 切開筋に筋損傷を悪化させないことは, 有益な情報であると考ええる。

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。

Dietary fat composition affects hepatic angiogenesis and lymphangiogenesis in HCV core gene transgenic mice (食事中脂肪組成はC型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝血管新生およびリンパ管新生に影響を与える)

DIAO PAN

(論文の内容の要旨)

【Introduction】 Previous research has demonstrated that an isocaloric diet rich in trans fatty acid (TFA), saturated fatty acid (SFA), and cholesterol (Chol) promoted steatosis-derived hepatic tumorigenesis in hepatitis C virus core gene transgenic (HCVcpTg) mice in different manners. Growth factor signaling and ensuing angiogenesis/lymphangiogenesis are key factors in hepatic tumorigenesis that have become recent therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. However, the influence of dietary fat composition on these factors remains unclear. This study investigated whether the type of dietary fat would have a specific impact on hepatic angiogenesis/lymphangiogenesis in HCVcpTg mice.

【Methods】 Male HCVcpTg mice were treated with a control diet, an isocaloric diet containing 1.5% cholesterol (Chol diet), or a diet replacing soybean oil with hydrogenated coconut oil (SFA diet) for a period of 15 months, or with shortening (TFA diet) for 5 months. The degree of angiogenesis/lymphangiogenesis and the expression of growth factors, including fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and platelet-derived growth factor (PDGF), were evaluated in non-tumorous liver tissues using quantitative mRNA measurement, immunoblot anal-

ysis, and immunohistochemistry.

【Results】 Long-term feeding of SFA and TFA diets to HCVcpTg mice increased the expressions of vascular endothelial cell indicators, such as CD31 and TEK tyrosine kinase, in addition to lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1, indicating that angiogenesis/lymphangiogenesis were up-regulated only by these fatty acid-enriched diets. This promoting effect correlated with elevated VEGF-C and FGF receptor 2 and 3 levels in the liver. c-Jun N-terminal kinase (JNK) and hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α , both key regulators of VEGF-C expression, were enhanced in the SFA- and TFA-rich diet groups as well. The Chol diet significantly increased the expressions of such growth factors as FGF2 and PDGF subunit B (PDGF-B), without any detectable impact on angiogenesis/lymphangiogenesis.

【Conclusion】 This study revealed that diets rich in SFA and TFA, but not Chol, might stimulate hepatic angiogenesis/lymphangiogenesis mainly through the JNK-HIF1 α -VEGF-C axis. Our observations indicate an importance of dietary fat species for preventing hepatic tumorigenesis.

(論文審査の結果の要旨)

Previous research has demonstrated that an isocaloric diet rich in trans fatty acid (TFA), saturated

fatty acid (SFA), and cholesterol (Chol) promoted steatosis-derived hepatic tumorigenesis in hepatitis C virus core gene transgenic (HCVcpTg) mice in different manners. Growth factor signaling and ensuing angiogenesis/lymphangiogenesis are key factors in hepatic tumorigenesis that have become recent therapeutic targets for hepatocellular carcinoma. However, the influence of dietary fat composition on these factors remains unclear. This study investigated whether the type of dietary fat would specifically impact hepatic angiogenesis/lymphangiogenesis in HCVcpTg mice.

Male HCVcpTg mice were treated with a control diet, an isocaloric diet containing 1.5 % cholesterol (Chol diet), or a diet replacing soybean oil with hydrogenated coconut oil (SFA diet) for a period of 15 months, or with shortening (TFA diet) for 5 months. The degree of angiogenesis/lymphangiogenesis and the expression of growth factors, including fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and platelet-derived growth factor (PDGF), were evaluated in non-tumorous liver tissues using quantitative mRNA measurement, immunoblot analysis, and immunohistochemistry.

As a result, 「DIAO PAN」 obtained the following conclusions.

1. Long-term feeding of SFA and TFA diets to HCVcpTg mice increased the expressions of vascular endothelial cell indicators, such as CD31 and TEK tyrosine kinase, in addition to lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1, indicating that angiogenesis/lymphangiogenesis was up-regulated only by these fatty acid-enriched diets. This promoting effect correlated with elevated VEGF-C and FGF receptor 2 and 3 levels in the liver.
2. c-Jun N-terminal kinase (JNK) and hypoxia-inducible factor (HIF) 1 α , both key regulators of VEGF-C expression, were enhanced in the SFA- and TFA-rich diet groups as well.
3. The Chol diet significantly increased the expressions of such growth factors as FGF2 and PDGF subunit B (PDGF-B), without any detectable impact on angiogenesis/lymphangiogenesis.

This study revealed that diets rich in SFA and TFA, but not Chol, might stimulate hepatic angiogenesis/lymphangiogenesis mainly through the JNK-HIF1 α -VEGF-C axis. Our observations indicate the importance of dietary fat species for preventing hepatic tumorigenesis.

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。

LGR5 expression is associated with prognosis in poorly differentiated gastric adenocarcinoma (低分化胃腺癌において LGR5 の発現は予後と関連する)

江原毅人

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (LGR5) は Wnt/ β カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子の一つである。腸管上皮の幹細胞マーカーとして知られているが、癌幹細胞マーカーとしての可能性も報告されている。本研究はステージ II/III の低分化胃癌における LGR5 の発現と臨床病理学的因子について検討し、予後不良である低分化胃癌における LGR5 発現の意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】 2008年から2018年の間に長野県内の6施設で切除された低分化胃癌91例の内、再評価によって低分化成分を含まない5例、ステージ I の35例、ステージ

IV の10例を除外し、ステージ II/III の41例を解析対象とした。LGR5 mRNA の発現を RNA in situ hybridization (RNA ISH) を用いてグレード 0 から 4 までの5段階で評価し、グレード 0 から 2 を低発現群 (LGR5-L)、グレード 3 から 4 を高発現群 (LGR5-H) と定義し、臨床病理学的因子と比較検討した。

【結果】 41例中38例で LGR5 mRNA の発現を認め、そのうち17例は LGR5-H であった。臨床病理学的因子との比較検討では75歳以上 ($p=0.0472$) と男性 ($p=0.0498$) が LGR5-H と有意な関連性を示したが、EBV 感染、脈管侵襲、TIL (Tumor-infiltrating lymphocyte) スコア、高頻度マイクロサテライト不安定性、びまん型、TNM 病期分類は LGR5 の発現とは有意な

関連は見られなかった。全生存率解析では LGR5-L の 5 年生存率が 64.3 % なのに対し LGR5-H は 22.0 % と LGR5-H が有意に予後不良であった ($p=0.0108$)。累積生存率に対する多変量解析では予後不良因子としてステージ III (HR=0.36, 95 % CI 0.13-0.89, $p=0.026$) と LGR5-H (HR=3.48, 95 % CI 1.36-9.22, $p=0.01$) が抽出された。

【考察】 LGR5 に対する免疫染色は特異性が低く、正確な評価が困難である。近年、免疫染色より特異性の高い評価方法として RNA ISH の手法が開発された。免疫染色を用いた評価ではステージ I/II の胃癌における LGR5 高発現は予後不良因子として報告されたが、近年の RNA ISH を用いた研究では、LGR5 の発現が胃癌の予後に関連しないと報告された。前者は再発リスクの低いステージ I/II、後者は全ステージを対象とし、両研究共に組織型別には解析されていなかった。基礎研究では LGR5 は遊走能や上皮間葉転換 (EMT) を制御する分子であることが明らかになっており、予後不良な低分化腺癌や再発リスクの高いステージ II/III 胃癌においては、さらなる検討の余地があると考え本研究を行った。我々の仮説通り、ステージ II/III の低分化胃癌における LGR5 高発現は予後不良因子として抽出された。本研究で予後不良であった要因としては、LGR5 が制御する癌幹細胞や EMT の関連が予想され、LGR5 が低分化胃癌のバイオマーカーや治療標的になる可能性が示唆された。

【結語】 ステージ II/III の低分化胃癌において LGR5 高発現は予後不良と関連していた。LGR5 の胃癌での役割はまだ解明されていない部分が多く、更なる研究が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5) は胃癌の癌幹細胞としての機能が報告されている。既報では免疫染色を用いて解析している報告が多いが、感度・特異度が高いとされてい

る RNA in situ hybridization (RNA ISH) を用いた LGR5 発現と胃癌の臨床病理学的因子を検討した研究は少ない。RNA ISH を用いた既報では胃癌において LGR5 発現は予後に影響を及ぼさなかったと報告しているが、組織型やステージ別の検討がなされておらず、さらなる検討の余地があると考えた。そこで予後不良であるステージ II/III の低分化胃癌における LGR5 の発現と臨床病理学的因子との関連を RNA ISH を用いて調べることにした。

2008 年から 2018 年の間に長野県内の 6 施設で切除された低分化胃癌 91 例の内、再評価によって低分化成分を含まない 5 例、ステージ I 35 例、ステージ IV 10 例を除外し、41 例を解析対象とした。LGR5 mRNA の発現を RNA ISH を用いてグレード 0 から 4 までの 5 段階で評価し、グレード 0 から 2 を低発現群 (LGR5-L)、グレード 3 から 4 を高発現群 (LGR5-H) と定義し、臨床病理学的因子と比較検討した。

その結果 41 例中 38 例で LGR5 mRNA の発現を認め、そのうち 17 例は LGR5-H であった。臨床病理学的因子との比較検討では 75 歳以上 ($p=0.0472$) と男性 ($p=0.0498$) が LGR5-H と関連したが、EBV 感染、脈管侵襲、TIL (Tumor-infiltrating lymphocyte) スコア、MSI-H、びまん型、TNM 病期分類は LGR5 の発現とは有意な関連は見られなかった。全生存率解析では LGR5-L の 5 年生存率が 64.3 % なのに対し LGR5-H は 22.0 % と LGR5-H が有意に予後不良であった ($p=0.0108$)。累積生存率に対する多変量解析では予後不良因子としてステージ III (HR=0.36 (0.13-0.89), $p=0.026$) と LGR5-H (HR=3.48 (1.36-9.22), $p=0.01$) が検出された。

これらの結果よりステージ II/III の低分化胃癌において LGR5 高発現が予後不良因子であることが明らかになった。

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。

Comparison of differences and random errors in pedicle diameter measurements between MRI and CT : observational study of 315 pedicles in lenke type 1 adolescent idiopathic scoliosis patients (MRI と CT による椎弓根径測定の違いとランダムエラーの比較 : Lenkel 型思春期特発性側弯症患者における 315 椎弓根の観察的研究)

畠 中 輝 枝

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 思春期特発性側弯症 (AIS) の治療に

は、一般的に椎弓根スクリューを用いた脊椎後方固定術が用いられている。放射線被曝を低減するために、

CT 以外の方法で術前に椎弓根径を決定することが望ましいとされている。MRI と CT による椎弓根径の測定値の違いを調査し、関連する因子を検討することを目的とする。研究デザインは横断的研究を用いた。

【方法】2009年4月～2019年10月に脊椎後方固定術を施行した AIS Lenke 1型21名（女性19名，男性2名，手術時平均年齢：15.4歳）を対象とした。MRI と CT でそれぞれ撮影された T1から L3までの左右の椎弓根の内径と外径を2人の脊椎外科医が別々に測定し，統計的に比較した。

【結果】CT，MRI による椎弓根外径および内径の測定値平均は，どの椎体においても有意差は認めなかった。CT，MRI による測定値平均の差（CT-MRI）の最小値と最大値は，内径でそれぞれ-3.7 mm，4.7 mm，外径ではそれぞれ-4.6 mm と5.3 mm であった。CT，MRI による椎弓根の測定値の差の関係は外径，内径ともに弱い正の相関を示した。検査者間誤差については MRI，CT とも 2 mm の誤差が生じる確率は5%未満であった。また，1 mm の差の確率も5%以下であり，3 mm 以上の差の確率は，内径で2.1%，外径で2.9%であった。CT，MRI それぞれの測定値から推測されるスクリー径について比較したところ，スクリー径が一致した割合は41.7%であった。低体重の患者および太い椎弓根ほど，測定差が大きくなる傾向にあった。

【結果】MRI は，現時点では AIS 患者の椎弓根径を測定するための信頼性を持っていない。しかし，画像処理技術の進歩により，MRI による椎弓根径測定

精度は近いうちに向上すると思われる。

（論文審査の結果の要旨）

思春期特発性側弯症（AIS）の治療には，一般的に椎弓根スクリーを用いた脊椎後方固定術が用いられている。放射線被曝を低減するために，CT 以外の方法で術前に椎弓根径を決定することが望ましいとされている。MRI と CT による椎弓根径の測定値の違いを調査し，関連する因子を検討することを目的とした。研究デザインは横断的研究を用いた。

2009年4月～2019年10月に脊椎後方固定術を施行した AIS Lenke 1型21名（女性19名，男性2名，手術時平均年齢：15.4歳）を対象とした。MRI と CT でそれぞれ撮影された T1から L3までの左右の椎弓根の内径と外径を2人の脊椎外科医が別々に測定し，統計的に比較した。

その結果，畠中らは次の結論を得た。

1. 検者間・検者内の測定値の差は，CT・MRI どちらかに限って大きくなることはない。
2. 低体重の患者ほど，測定値の差が大きくなる傾向にある。
3. 太い椎弓根ほど，測定差が大きくなる傾向にある。

これらの結果より，MRI での測定は CT での測定と異なる特性があり，MRI による測定の精度は高くないと考えられた。将来 MRI 画像処理の進歩により，MRI による椎弓根測定精度が向上する可能性があると考えられた。

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。

Usefulness of the controlled-rotation dilator sheath “Evolution RL” for extraction of old leads in two Japanese centers—An experience in use（回転制御型ダイレーターシース “Evolution RL” の，国内2施設における長期植え込みリード抜去への有用性）

田 畑 裕 章

（論文の内容の要旨）

【目的】ペースメーカーや植え込み型除細動器などの心血管植え込み型電気デバイス（CIEDs）の感染やリードの機能不全において，経静脈的リード抜去術（TLE）は欠かせない手術となっている。過去20年の間にエキシマレーザーシースやポリプロピレンメカニカルシース，種々の形状のスネアなどのデバイスが導入され，TLE の手術成績は向上してきたが，植え込みから時間が経過した古いリードや癒着したリードの抜去には依然として困難や合併症のリスクが存在する。

第2世代の Evolution RL は2018年に本邦での使用が許可された新規のデバイスであり，ステンレス製の刃のついた先端を，手動で2方向に回転させることにより，第1世代 Evolution のリードの損傷などの問題を解決した。Evolution RL の有効性と安全性は海外の臨床試験で報告されているが，本邦での使用成績は報告されていない。また従来のデバイスでは困難を伴う，10年以上の長期間植え込まれたリードに関する Evolution RL の有効性・安全性のデータは存在しない。本研究では日本の2つの TLE 実施センターにおける，

Evolution RL の成績を報告し、10年以上植え込まれた古いリードの抜去における有効性と安全性を評価することを目的とした。

【方法】2017年9月から2019年12月までに、信州大学医学部附属病院と東京女子医科大学附属病院で、Evolution RL を使用してリード抜去術を行った連続27症例を後方視的に解析した。またリードの植え込み期間を10年以上と10年未満に分け、Evolution RL の長期植え込みリードにおける有効性と安全性や、手術の詳細を評価した。リード抜去術は全例手術室またはハイブリッド手術室で全身麻酔下に行われ、まず従来のエキシマレーザーシースやポリプロピレンメカニカルシースを使用し、成功しない場合に Evolution RL を使用した。術前の評価で、リードの重度の癒着や静脈閉塞を認める場合や、長期の植え込み期間である場合は、術者の判断で最初から Evolution RL を使用した。

【結果】連続27症例中、20名(74.1%)が男性で、年齢中央値は62歳(14-91)であった。リードの総数は58本、植え込み期間の中央値は136か月(8-448)であった。感染による抜去が22名(81%)であった。全例で臨床的成功が得られ、24名(88.9%)で完全な抜去に成功した。3例では4cm未満のリードの先端が心臓内に残存したが、臨床的な問題は生じなかった。重大な合併症は認めず、植え込みポケット部の血腫が2名で発生した。58本のリードのうち、45本(78%)のリードで Evolution RL を使用した。植え込み期間が10年以上のリードは34本あり、10年未満のリードと比較し、手術成功率には差がなく、Evolution RL の使用率が有意に高かった(94.1% vs 54.2%, $P=0.001$)。Evolution RL の口径の大きい11Fr, 13Fr シースの使用率も有意に高く(79.4% vs 33.3%, $p=0.001$, 52.9% vs 16.7%, $p=0.001$)、シースの先端を固定する補助シースである steady sheath の使用率も有意に高かった(64.7% vs 20.8%, $p=0.001$)。【考察】本研究では、日本の2つの TLE センターにおける、Evolution RL の、特に長期植え込みリードに対する有効性と安全性が示された。リードの植え込み期間の中央値136か月(8-448)は過去の TLE に関する大規模研究と比べて長期であった。リードの植え込み期間は手術の不成功や合併症の予測因子であるが、長期の植え込み期間のリードに対して、過去の研究と同等の成功率、安全性を示した。

リードの植え込み期間を10年以上と10年未満と比較すると、10年以上のリードでは口径の大きい Evolu-

tion RL や steady シースの使用頻度が有意に高かった。これは古いリードでは線維性癒着組織の量が多く、剥離した癒着組織が雪玉状になってシースに詰まる snow prowling 現象や、癒着組織でシースの先端が動かなくなる co-lateral rotation 現象が生じ、シースの口径を太くしたり steady シースを使用したりする必要があるためと考えられる。

本研究は本邦における Evolution RL の使用成績に関する初の報告である。本邦における TLE の症例数は年々増加しており、全国で月間100例近くが行われるようになってきているが、特に非感染性の適応で TLE を必要とする潜在的な患者は依然多いとされる。本研究で示された Evolution RL の有効性と安全性は、エキシマレーザーシースが高価なためこれまで TLE が施行できなかった施設や地域でも Evolution RL を用いて安全に抜去が行えることを示唆しており、潜在的な患者に対し TLE を拡大できる可能性がある。

本研究は患者数やイベントの少なさや、非感染症例の少なさなど患者背景の偏り、後方視的研究であり Evolution RL の使用や手術の戦略が術者の判断に任されている点などの制限があり、長期植え込みリードに対する Evolution RL の真の有効性と安全性を評価するためには前方視的なランダム化試験が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

ペースメーカーや植え込み型除細動器などの心血管植え込み型電気デバイス(CIEDs)の感染やリードの機能不全において、経静脈的リード抜去術(TLE)は欠かせない手術となっているが、植え込みから時間が経過した古いリードや癒着したリードの抜去には依然として困難や合併症のリスクが存在する。第2世代の Evolution RL は2018年に本邦での使用が許可された新規のデバイスであり、その有効性と安全性は海外の臨床試験で報告されているが、本邦での使用成績は報告されていない。また10年以上の長期間植え込まれたリードに関する Evolution RL の有効性・安全性のデータは存在しない。

本研究では日本の2つの TLE 実施センター(信州大学医学部附属病院と東京女子医科大学附属病院)において、Evolution RL を使用してリード抜去術を行った連続27症例を後方視的に解析した。またリードの植え込み期間を10年以上と10年未満に分け、Evolution RL の長期植え込みリードにおける有効性と安全性や、手術の詳細を評価した。

その結果、以下の結論を得た。

1. 連続27症例中、抜去したリードは58本であり、植え込み期間の中央値は136か月（8-448）であった。45本のリードで Evolution RL を使用し、全例で臨床的成功が得られ、24名、55本のリードで完全な抜去に成功し、主要合併症は認めなかった。
2. 植え込み期間が10年以上のリードにおいても、手術成功率には差がなく、Evolution RL の使用率や、口径の大きい11Fr, 13Fr シースの使用率が有意に高く、シースの先端を固定する補助シースである Steady sheath の使用率も有意に高かった。以上により、日本の2つの TLE センターにおける、

Evolution RL の、特に長期植え込みリードに対する有効性と安全性が示された。日本における TLE の症例数は年々増加しており、更に非感染性の適応で TLE を必要とする潜在的な患者は依然多いとされている。本研究で示された Evolution RL の有効性と安全性は、従来のデバイスが高価なためこれまで TLE が施行できなかった施設や地域でも Evolution RL を用いて安全に抜去が行えることを示唆しており、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として価値があるものとして認めた。

Detection of cognitive decline by spinal posture assessment in health exams of the general older population（一般高齢者の健康診断における脊椎姿勢評価による認知機能低下の検出）

西 村 輝

（論文の内容の要旨）

【背景と目的】 高齢者の認知機能低下は同時に起こってくる身体機能低下、社会的役割の消失などと結びついて健康を損ない要介護になりやすい高齢者特有の状態「フレイル」の要素であると考えられている。軽度認知障害は健康な状態と認知症の間の状態であり、高齢者の1-2割が発症していると推定されている。この状態は健康な状態に回復することもあるため、軽度認知障害であるかどうかを確認することは将来の認知症予防にとって重要である。しかしながら、軽度認知障害は見過ごされがちでもある。2014年に開始されたおぶセスタディでは住民の運動器検診を行っている。おぶセスタディにて我々は過去の研究で高齢者では運動機能低下が認知機能低下とともに起こってくること、運動機能低下が姿勢の変化として表在化してくることを明らかにしてきた。そこで、今回の研究は、高齢者特有の姿勢変化をとらえることで認知機能低下をスクリーニングできるのではという仮説を立て検証した。

【対象・方法】 おぶセスタディ協力自治体の住民基本台帳から無作為抽出された50～89歳の住民411人（男性202人、女性209人）が本研究に登録され、認知機能と姿勢が評価された。認知機能は、Montreal Cognitive Assessment (MoCA) のスコアリングにて評価した。MoCA は30点満点で25点以下の場合、軽度認知障害を検出する性能が高いとされる。本研究では MoCA25点以下を認知機能低下と定義した。姿勢は全脊椎立位単純X線写真側面像を用いて、Sagittal Vertical Axis (SVA) を計測し矢状面脊柱バランスを評

価した。SVA は全脊椎立位単純X線写真側面像で第7頸椎椎体中央からの重心線と仙骨椎体後上縁との水平距離で定義される。姿勢のバランスがとれている場合、第7頸椎椎体中央は仙骨椎体後上縁の直上付近に位置するため SVA は0 cm 付近となるが、加齢とともに背中が前傾してくると徐々に頭部が前方に移動し SVA は5 cm, 10 cm と大きくなっていく。方法は、男女別に各年齢（50代、60代、70代、80代）における認知機能評価のスコアと矢状面脊柱バランスの分布を分析し、矢状面脊柱バランスの不良によって認知機能低下を検出できるかを調べた。

【結果】 男性では、50歳以上かつ SVA 100 mm 以上、70歳以上かつ SVA 90 mm 以上、80歳以上かつ SVA 70 mm 以上の場合、認知機能低下が起こっている可能性が高いことが明らかとなった。また、女性では50歳以上では年齢にかかわらず SVA 70 mm 以上の場合、やはり認知機能低下が起こっている可能性が高いことが明らかとなった。

【結論】 50歳以上の住民の矢状面脊柱バランスの前方位を評価することにより、潜在的な認知機能低下を検出することができる。

（論文審査の結果の要旨）

軽度認知障害は健康な状態と認知症の間の状態であり、高齢者の1-2割が発症していると推定されている。この状態は健康な状態に回復することもあるため、軽度認知障害であるかどうかを確認することは将来の認知症予防にとって重要である。しかしながら、軽度認知障害は見過ごされがちでもある。そこで、今回の

研究は、高齢者特有の姿勢変化をとらえることで認知機能低下をスクリーニングできるのではという仮説を立て検証した。

おぶセスタディ協力自治体の住民基本台帳から無作為抽出された50～89歳の住民411人（男性202人，女性209人）が本研究に登録され，認知機能と姿勢が評価された。認知機能は，Montreal Cognitive Assessment (MoCA) のスコアリングにて評価した。姿勢は全脊椎立位単純X線写真側面像を用いて，Sagittal Vertical Axis (SVA) を計測し矢状面脊柱バランスを評価した。方法は，男女別に各年齢（50代，60代，70代，80代）における認知機能評価のスコアと矢状面脊柱バランスの分布を分析し，矢状面脊柱バランスの不良によって認知機能低下を検出できるかを調べた。

その結果，西村は次の結論を得た。

1. 年齢と SVA の間には中等度の正の相関を認めた。
2. 認知機能テストのスコアは男女ともに年齢とともに

に減少する傾向があり，認知機能低下の有病率は，50代の男性と女性のそれぞれ28%と15%で，70代では半分以上，80代では80%以上に認められた。

3. 多変量解析の結果，男性は年齢と SVA が，女性では年齢が認知機能低下と有意な関連を認めた。
4. 男性では，50歳以上かつ SVA 100 mm 以上，70歳以上かつ SVA 90 mm 以上，80歳以上かつ SVA 70 mm 以上の場合，認知機能低下が起こっている可能性が高いことが明らかとなった。女性では50歳以上では年齢にかかわらず SVA 70 mm 以上の場合，認知機能低下が起こっている可能性が高いことが明らかとなった。

これらの結果より，50歳以上の住民の矢状面脊柱バランスの前方化を評価することにより，潜在的な認知機能低下を検出することができることを明らかにした。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。

Autologous Bilayered Adipose-Derived Mesenchymal Cell-Gelatin Sheets Reconstruct Ureters in Rabbits (脂肪由来間葉系幹細胞から作製した積層細胞シートを用いたウサギ尿管再生の試み)

小川典之

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 泌尿器科領域において，尿管狭窄や尿管損傷に対する根治治療として外科的治療が行われる。狭窄や損傷の部位に応じて，尿管端々吻合術，psoas hitch 法，Boari-flap 法などが行われる。しかし，術後の吻合部狭窄，吻合部からの尿溢流などによって，再手術に至る症例が多いことが臨床的課題である。本研究は，脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose-derived mesenchymal cell: AMC) から作製した積層型細胞シートを利用して，尿管の病変部位に依存せず，術後の吻合部狭窄や尿溢流などのリスクを回避できる尿管再生が可能であるかどうか検討した。

【方法】 10週齢雌ウサギの下腹部の脂肪組織から分離した細胞をコラーゲンコート培養皿上で初代培養を行い，接着，増加した細胞を AMC とした。コンフルエントに達した後，移植後の AMC を検出するために PKH26 で細胞標識処理をした。標識した AMC を温度応答性培養皿に継代培養した。オーバーコンフルエントに達した後，温度応答性培養皿の温度を低下させて，単層状に浮遊した細胞をゼラチン繊維基材に付着させ回収した。この細胞シートを2枚作製して，細胞

同士が接着するように積層して，2日間培養を行ったものを積層細胞シートとした。ゼラチン繊維基材のみを2枚重ねたものを無細胞シートとした。ウサギの尿管を約1cm部分切除した後，尿管内にポリエチレンチューブを挿入して，切除断端を含むように巻き付ける形で積層細胞シートを自家移植した (積層細胞シート群: n=9)。また，無細胞シートを用いて同様な手術を行ったものを対照群 (n=9) とした。移植4週間後 (積層細胞シート群 n=7，対照群 n=6)，および，移植4週間後にポリエチレンチューブを抜去して，さらに4週間飼育した後 (積層細胞シート群 n=2，対照群 n=3)，移植部位を含む尿管を摘出して，4%PFA 固定，脱灰処理，パラフィン包埋した。HE 染色，マッソン染色，免疫組織二重染色の組織学的解析により，尿管再生について検討を行った。

【結果】 積層細胞シートでは，2層のゼラチン繊維基材の間に間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 抗体陽性な AMC が存在していた。それらの細胞は，細胞接着因子である Integrin $\beta 1$ や N-cadherin を発現する細胞活性を示した。移植4週間後，両群において，目視下では腹腔内への尿溢流を認めない尿管組織が再構

築された。対照群では、シート移植部位より腎側の尿管が著しく蛇行、および拡張していたが、積層細胞シート群では、著しい蛇行や拡張を呈さない尿管が再構築されていた。再構築された尿管部位において、対照群では、粘膜層と尿管筋層の間に線維化した層を認めたが、積層細胞シート群では、AMCの抗線維化作用などにより線維化が抑制されていた。積層細胞シート群では、シート移植部位における尿管筋層の厚みは、対照群と比較して有意に増大した。移植8週間後（ポリエチレンチューブ抜去4週間後）、対照群のシート移植部位では、粘膜層と尿管筋層の間の線維化が進行し、内腔が狭窄していたが、積層細胞シート群では、粘膜層下の線維化や内腔の狭窄を認めなかった。積層細胞シート群では、PKH26で標識されたAMCの生着を認めるとともに、その一部は、Pax7陽性筋芽細胞、Desmin陽性未熟平滑筋細胞やSMA陽性成熟平滑筋細胞へと段階的に分化していた。尿管組織の再構築の機序として、断端部からゼラチン繊維基材に沿って線維芽細胞が遊走して薄い層構造を形成したところに、移植したAMCがTGFシグナル経路などを経て平滑筋細胞に分化する、あるいは、断端部から平滑筋細胞が遊走して、尿管筋層を形成することが考えられた。

【結論】 本研究では、尿管の一部を摘除した欠損部に無細胞シート、あるいは、積層細胞シートを移植すると、尿管組織が再構築されることを示した。再構築された尿管において、対照群では、著しい蛇行や拡張を認めたが、積層細胞シート群では、蛇行や拡張を認めなかった。また、積層細胞シート群では、対照群よりも尿管筋層の厚みが有意に増大しており、線維化による内腔の狭窄が抑制されていた。尿管組織の再構築の機序として、AMCの平滑筋細胞への分化、断端部からの線維芽細胞の遊走などを示した。したがって、積層型脂肪由来間葉系幹細胞シートを利用することによって、尿管の病変部位に依存せず、術後の吻合部狭窄や尿溢流などのリスクを回避できる尿管再生が可能であると結論づけた。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、脂肪由来間葉系幹細胞から作製した積層型細胞シートを利用して、尿管の病変部位に依存せず、術後の吻合部狭窄や尿溢流などのリスクを回避できる尿管再生について検討した。

10週齢雌ウサギの下腹部の脂肪組織から分離した細胞をコラーゲンコート培養皿上で初代培養を行い、脂

肪由来間葉系幹細胞を得た。細胞標識処理した後、温度応答性培養皿に継代培養をし、ゼラチン繊維基材を利用して細胞をシート状に回収した。これを2枚作製し、細胞同士が接着するように積層して、積層細胞シートとした。ゼラチン繊維基材のみを2枚重ねたものを無細胞シートとした。尿管を約1cm部分切除した後、尿管内にポリエチレンチューブを挿入して、これに巻き付ける形で積層細胞シートを自家移植した(積層細胞シート群; n=9)。また、無細胞シートを用いて同様な手術を行ったものを対照群(n=9)とした。移植4週間後(積層細胞シート群 n=7, 対照群 n=6)、および、移植8週間後(ポリエチレンチューブ抜去4週間後、積層細胞シート群 n=2, 対照群 n=3)、尿管を摘出して、組織学的解析を行った。

その結果、小川典之は次の結論を得た。

1. 両群において、移植4週間後に目視下では腹腔内への尿溢流を認めない尿管組織が再構築された。
2. 対照群では、著しい尿管の拡張や尿管狭窄を認めたが、積層細胞シート群では、著しい拡張や狭窄を認めなかった。
3. 積層細胞シート群では、対照群より厚い尿管筋層が形成された。
4. 対照群では、線維化による内腔狭窄を認めたが、積層細胞シート群では、線維化の抑制により狭窄が認められなかった。
5. 生着した脂肪由来間葉系幹細胞が平滑筋細胞へと段階的に分化した。
6. 積層細胞シート群の移植部位では、断端部からゼラチン繊維基材に沿って線維芽細胞が遊走して、層構造を形成した。
7. 脂肪由来間葉系幹細胞から分化した平滑筋細胞と、断端部から遊走してきた平滑筋細胞によって尿管筋層が再構築された。

これらの結果より、積層型脂肪由来間葉系幹細胞シートを利用することによって、尿管の病変部位に依存せず、術後の吻合部狭窄や尿溢流などのリスクを回避できる尿管再生が可能であると結論づけた。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。

Autologous antigen-presenting cells efficiently expand piggyBac transposon chimeric antigen receptor T cells with predominant memory phenotype (自己末梢血由来遺伝子改変フィーダー細胞は、メモリー機能を保持したピギーバクトランスポゾン遺伝子改変キメラ抗原受容体T細胞の増殖に寄与する)

中村 加世子

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、悪性腫瘍に対する有望な治療法として遺伝子改変キメラ抗原受容体T (CAR-T) 細胞療法が注目されている。CAR-T 細胞とは、患者自身のT細胞に腫瘍抗原を特異的に認識し、T細胞を活性化させることのできる人工キメラタンパク質を発現させた細胞である。体外で培養したCAR-T細胞が患者へ投与されると、CAR-T細胞が腫瘍抗原を特異的に認識し、シグナル伝達ドメインを介して自ら活性化し、細胞質内に蓄えられたパーフォリン・グランザイムなどの細胞傷害性タンパクを放出することで、腫瘍細胞の細胞死が誘導される。CAR-T細胞療法では、メモリーT細胞分画が高く免疫疲弊因子の発現が低い製剤で臨床効果が高いと報告されている。そのため、細胞製剤製造中のT細胞分化や免疫疲弊を惹起せず、かつ種々のCAR-T細胞に応用可能な、汎用性の高い培養法の開発が必須である。我々は、HER2抗原を標的としたCAR-T細胞製剤を開発するにあたり、ピギーバクトランスポゾン (PB) 法を用いて、製造効率、汎用性、かつ抗腫瘍効果に優れたCAR-T細胞製造法を開発した。

【材料および方法】CAR遺伝子として、HER2抗原を特異的に認識する一本鎖抗体と、共刺激分子のCD28シグナルドメイン、T細胞受容体のCD3 ζ シグナルドメインをインフレーションに結合させたHER2-CARコンストラクトを作製し、ピギーバクトランスポゾンベクターにクローニングした (PB-HER2-CAR)。フィーダー遺伝子として、HER2抗原と共刺激分子のCD80, 4-1BBL (CD137L) をコードする遺伝子も同様にクローニングした。

ヒト末梢血単核球に対して、CAR遺伝子とピギーバクトランスポザーゼ遺伝子をエレクトロポレーション法で遺伝子導入しCAR-T細胞を作製した。遺伝子改変フィーダー細胞は、フィーダー遺伝子のみを遺伝子導入した。培養1日目に、UV照射で不活化させたフィーダー細胞とCAR-T細胞を共培養し、サイトカイン添加下で14日間培養した。さらに、作製した

PB-HER2-CAR-T細胞の細胞増殖率、特性、抗腫瘍効果の評価を行った。

【結果】CAR-T細胞を培養開始1日目にフィーダー細胞と共培養することでCAR陽性率は飛躍的に改善し、14日目の細胞増殖率は 8.6 ± 1.1 倍、CAR陽性率は $60.5 \% \pm 9.0 \%$ であった。この細胞は、CD8優位で、CD45RA, CD45RO, CD28, CD95陽性で規定されるStem Cell Memory分画が優位であり、PD-1発現率が極めて低い特性を示した。PB-HER2-CAR-T細胞は、骨肉腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、滑膜肉腫に対して強力な抗腫瘍効果を示した。また、連続した腫瘍細胞刺激でも免疫疲弊による殺細胞効果の減弱なく持続した抗腫瘍効果を示し、共培養後のPB-HER2-CAR-T細胞におけるPD-1発現率も低値であった。In vivoにおいても、PB-HER2-CAR-T細胞投与群で強い抗腫瘍効果を認めた。PB-HER2-CAR-T細胞投与群では末梢血中にCAR-T細胞は長期間残存し、腫瘍の再移植を行っても生着せず、抗腫瘍効果が長期に渡って持続した。さらに、同製造法を用いて、CD19を始めとする種々のCAR-T細胞製造に成功し、抗腫瘍効果の高い特性を持っていた。

【結語】遺伝子改変フィーダー細胞を用いて作製したPB-HER2-CAR-T細胞は、良好な細胞増殖、安定したCAR発現、抗腫瘍効果と関連するメモリーT細胞優位であり、PD-1発現が低い特性を示した。また、担がんマウスモデルにおいて強力かつ、長期に渡る抗腫瘍効果を示した。がん種を問わず、臨床効果に優れたCAR-T細胞療法を可能にする製造法であることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子改変キメラ抗原受容体T細胞 (CAR-T細胞) 療法では、メモリーT細胞が多く、免疫疲弊因子発現の低いCAR-T細胞製剤で臨床的效果が高いことがわかってきた。そのため、細胞製剤製造中のT細胞分化や免疫疲弊を惹起せず、様々なCAR-T細胞に応用可能な、汎用性の高い培養法の開発が必須である。今回、固形腫瘍に対するHER2-CAR-T細胞療法を

目的とし、ピギーバックトランスポゾン (PB) を用いた、製造効率、汎用性、かつ抗腫瘍効果に優れた製造法を検討した。

PB-HER2-CAR プラスミド (HER2抗原を特異的に認識する第2世代 CAR) と PB トランスポザーゼプラスミドをエレクトロポレーション法により自己末梢血単核球 (PBMC) へ導入し、PB-HER2-CAR-T 細胞を作製した。先行研究と同様に、PBMC や活性化 T 細胞をフィーダー細胞に用いた培養方法を試みたが、PB-HER2-CAR-T 細胞の増殖は認められなかった。そこで生理的な T 細胞の活性化である、MHC/TCR 複合体と共刺激因子による免疫シナプスの形成を人工的に再現することにより、PB-HER2-CAR-T 細胞の拡大培養を検討した。PB-HER2-CAR-T 細胞と同様に、HER2抗原と共刺激因子プラスミドをヒト PBMC へ導入し、遺伝子改変フィーダー細胞を作製した。遺伝子導入翌日に、UV 照射により不活化させたフィーダー細胞を CAR-T 細胞と共培養し、サイトカイン添加下で14日間培養した。さらに、作製した PB-HER2-CAR-T 細胞の細胞増殖率、特性、抗腫瘍効果の評価を行った。

PB-HER2-CAR-T 細胞を遺伝子改変フィーダー細胞と共培養することで CAR 陽性率は飛躍的に改善し、14日目の細胞増殖率は 8.6 ± 1.1 倍、CAR 陽性率は $60.5 \% \pm 9.0 \%$ であった。この細胞は、CD8優位で、

CD45RA, CCR7, CD28, CD95陽性で規定される Stem Cell Memory 分画が優位であり、PD-1発現率が極めて低い特性を示した。PB-HER2-CAR-T 細胞は、骨肉腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、滑膜肉腫細胞に対して強力な抗腫瘍効果を示した。また、腫瘍細胞からの連続した抗原刺激でも、免疫疲弊による殺細胞効果の減弱なく持続した抗腫瘍効果を示し、PB-HER2-CAR-T 細胞における PD-1発現率も低値であった。In vivo においても PB-HER2-CAR-T 細胞投与群で強い抗腫瘍効果を認め、腫瘍細胞の再移植を行っても生着せず、抗腫瘍効果が長期に渡って持続した。さらに遺伝子改変フィーダー細胞による製造法を用いて、CD19やGD2を始めとする種々の CAR-T 細胞製造に成功した。

これらの結果より、自己由来遺伝子改変フィーダー細胞を用いて作製した PB-HER2-CAR-T 細胞は、良好な細胞増殖、安定した CAR 発現、強力かつ持続的な抗腫瘍効果を発揮できる特性を持っていた。この遺伝子改変フィーダー細胞法は、種々の抗原に対する CAR-T 細胞の製造に応用可能な、汎用性の高い培養法であった。固形腫瘍を標的とする CAR-T 細胞の問題点を克服し、臨床効果の高い CAR-T 細胞療法を可能にする製造方法であった。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。

The usefulness of combination of age, body mass index, and blood urea nitrogen as prognostic factors in predicting oxygen requirements in patients with coronavirus disease 2019 (年齢, BMI, 血清 BUN 値は新型コロナウイルス感染症患者の酸素投与の必要性の予測に有用である)

後藤 憲彦

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) によって引き起こされる感染症で、世界中で拡大している。COVID-19感染症は時に重症化し、特に高齢者や肥満、高血圧症や糖尿病を有する患者で重症化する可能性が指摘されている。そのため、医療者は重症化が予想される患者を迅速に選別し、適切な治療方法を決定する必要がある、より簡便な重症化予測モデルの確立が望まれる。本研究では診断時に得られる臨床的特徴から、酸素投与が必要になる患者をトリアーgerするための予測モデルについて検討した。

【方法】2020年2月16日から2021年3月21日の間に研

究参加医療機関に入院した COVID-19入院患者84例のデータを収集し、後方視的に検討した。入院後に酸素投与を必要とした患者群 (酸素投与群) と酸素投与を必要としなかった患者群 (酸素非投与群) に分け、年齢・身体情報、既往歴、初診時バイタル所見、血液検査所見、画像所見を2群間で比較した。また、先行研究で報告されているリスクスコア [Modified Warning Score (MEWS), quick COVID-19 Severity Index (qCSI), CURB-65, A-DROP, 4C mortality score] を用いて酸素投与の有無に対する感度および特異度を計算し、ROC 曲線の Area Under the Curve (AUC) を比較した。単変量・多変量ロジスティック回帰分析を行い、酸素投与が必要となる COVID-19患者のり

スク因子を検討し、多変量解析の結果に基づくノモグラムの作成を行った。

【結果】 84例中35例が酸素投与群、49例が酸素非投与群であった。患者背景としては酸素投与群では酸素非投与群と比較して高齢で、BMI および喫煙指数が高値であった。また、高血圧症と糖尿病の合併が多く、初診時の症状としては発熱、倦怠感、呼吸困難が有意に多かった。バイタルサインでは酸素投与群で経皮的動脈血酸素飽和度 (SpO₂) が低値であった。血液検査所見では、酸素投与群で血中リンパ球数とアルブミン値が低値で、LDH, BUN, クレアチニン, CRP, KL-6が高値であった。画像所見では酸素投与群において浸潤影を認める割合が高かった。初診時のバイタルサインによるリスク評価では酸素投与群において、4C mortality score が酸素非投与群と比較して有意に高値であった。単変量ロジスティック回帰分析では高齢、高BMI、リンパ球数低値、アルブミン低値、LDH 高値、BUN 高値、CRP 高値が酸素必要性のリスク因子であった。多変量回帰分析では年齢、BMI、BUN がリスク因子として抽出され、これら3因子を合わせたAUCは0.88と高く、これらのリスク因子を用いて酸素投与の必要性を予測するノモグラムを作成した。

【考察】 先行研究において、BMI、喫煙指数、高血圧症と糖尿病の有病率は重症化群で有意に高いことが報告されている。本検討では単変量解析で年齢、BMI、LDH、BUN、CRP が酸素投与群において有意に高値であった。D-dimer やリンパ球数などの血液検査所見もリスク因子として注目されているが、年齢はCOVID-19の重症化や死亡について重要なリスク因子である。SARS-CoV-2は腎臓でのBUNの再取り込みを引き起こすことから、BUNはCOVID-19による脱水や腎機能障害のバイオマーカーとなる可能性がある。また、本検討ではBMIも独立したリスク因子であったが、既報でも肥満によってCOVID-19が重症化することが知られている。

【結論】 年齢、BMI、血清BUN値はCOVID-19患者の酸素投与の必要性を予測しうると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

2020年2月から2021年3月までに長野県内医療機関へ受診したCOVID-19患者84例を対象として、質問票による症例データを収集した。症例を酸素投与を必要とした群(酸素投与群)と必要としなかった群(酸素非投与群)に群分けし、2群間で統計学的解析を行

い、COVID-19患者の酸素投与の必要性を予測するリスク因子について後方視的に検討した。

その結果、後藤は次の結論を得た。

1. 酸素投与群では酸素非投与群と比較して、高齢で、BMI および喫煙指数 (Brinkman Index) が有意に高かった。
2. 酸素投与群では酸素非投与群と比較して、高血圧、糖尿病を有する症例が有意に多かった。
3. 酸素投与群では酸素非投与群と比較して、発熱、倦怠感、呼吸困難の症状を有する症例が有意に多かった。
4. 酸素投与群では酸素非投与群と比較して、血液検査では白血球数、リンパ球数、血中アルブミン値が低値であり、AST、ALT、LDH、BUN、クレアチニン、CRP、KL-6が有意に高値であった。
5. 酸素投与群では酸素非投与群と比較して、抗ウイルス療法 (レムデシビル) とステロイド治療 (デキサメサゾン) を受けた症例が多かった。
6. 酸素投与群では酸素非投与群と比較して、画像所見では浸潤影を認める割合が高かった。
7. 酸素投与群では酸素非投与群と比較して、初診時のバイタルサインではSpO₂が有意に低値であった。
8. 各因子について単変量ロジスティック回帰分析を行ったところ、年齢、BMI、喫煙指数、アルブミン、LDH、BUN、CRP がリスク因子の候補と考えられた。
9. 上記因子について多変量ロジスティック回帰分析を行ったところ、年齢、BMI、BUNが独立したリスク因子と考えられた。
10. 多変量解析で得られた年齢、BMI、BUNの3因子を組み合わせて判別分析を行うとAUC 0.88と高値であった。
11. 年齢、BMI、BUNの3因子を用いて酸素投与の必要性を予測するノモグラムを作成した。

これらの結果から、年齢、BMI、BUNがCOVID-19患者における酸素投与の必要性を予測しうると考えられた。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。

Immunohistochemical investigation of biomarkers for predicting adipose tissue invasion in oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌の脂肪浸潤予見因子の免疫組織化学的研究)

HAN YI BING

(論文の内容の要旨)

【Introduction】 It is difficult to completely remove tumors with appropriate surgical margins due to anatomical limitations in OSCC. Barrier approaches which targeting anatomical and pathological defensive structures. The aim of this study was to identify a biomarker that could be used to predict adipose tissue invasion in OSCC. If such a marker were found, it may be possible to use the fatty layer as a barrier during tumor resection in appropriate cases of OSCC.

【Material and method】 The immunohistochemistry (IHC) staining of 30 primary OSCC patients whose surgical specimens was performed. Seven molecules as candidate predictive markers of fatty infiltration including MMP11, Collagen VI, E-cadherin, N-cadherin, α -SMA, FABP4 and IL6 were used for IHC. Adipose tissue invasion was assessed HE stained sections. The relationship between the tumor surface and tumor-adipose tissue contact area was also examined. On the bases of staining results, Correlation of IHC activity between tumor surface and tumor-adipose tissue contact area was compared by correlation coefficient. Differences in IHC activity between the tumors with and without adipose tissue invasion was examined by median test.

【Results】 In the tumor with fat invasion, strong expression of E-cadherin was evident in tumor surface, strong expression of α -SMA in the tumors of invasion front and surrounding connective tissues, and FABP4 only in connective tissues. On the other hand, Collagen VI immunoreactivity disappeared in the OSCC with fat invasion. From the comparison of H-Score at tumor surface and tumor-fat contact area, with the exception of IL-6, H-Scores were significantly correlated in the superficial and infiltrated areas. Except for E-Cadherin, the H-Score was higher in the infiltrated area. The result of the comparison of IHC reactivity on the tumor surface with and without fat invasion shown N-cadherin expression showed a ten-

dency to be associated with buccal fat pad invasion. The result of the comparison of IHC reactivity on the Tumor-adipose tissue contact area with and without fat invasion are shown a tendency for the expression of α -SMA and FABP4 to be more frequent in cases of fatty infiltration. Significantly less Collagen VI was observed in fatty infiltration cases.

【Conclusion】 The expression levels of α -SMA and FABP4 at connective tissue at tumor invasion area may be useful biomarkers for predicting adipose tissue invasion in OSCC. It would be possible to determine the optimal excision range using the fat layer as an anatomical barrier. Information about the expression of these biomarkers may be not available to surgeons during the preoperative period (preoperative biopsy). Further studies to identify more effective biomarkers are required.

(論文審査の結果の要旨)

It is difficult to completely remove tumors with appropriate surgical margins due to anatomical limitations in OSCC. Barrier approaches which targeting anatomical and pathological defensive structures. The aim of this study was to identify a biomarker that could be used to predict adipose tissue invasion in OSCC.

The immunohistochemistry (IHC) staining of 30 primary OSCC patients whose surgical specimens was performed. Seven molecules as candidate predictive markers of fatty infiltration including MMP11, Collagen VI, E-cadherin, N-cadherin, α -SMA, FABP4 and IL6 were used for IHC. Adipose tissue invasion was assessed HE stained sections. The relationship between the tumor surface and tumor-adipose tissue contact area was also examined.

As a result, Han Yi Bing obtained the following results.

1. In the tumor with fat invasion, strong expression of E-cadherin was evident in tumor surface, strong expression of α -SMA in the tumors of invasion front

- and surrounding connective tissues, and FABP4 only in connective tissues. On the other hand, Collagen VI immunoreactivity disappeared in the OSCC with fat invasion.
2. From the comparison of H-Score at tumor surface and tumor-fat contact area, with the exception of IL-6, H-Scores were significantly correlated in the superficial and infiltrated areas. Except for E-Cadherin, the H-Score was higher in the infiltrated area.
 3. The result of the comparison of IHC reactivity on the tumor surface with and without fat invasion shown N-cadherin expression showed a tendency to be associated with buccal fat pad invasion.
 4. The result of the comparison of IHC reactivity on the Tumor-adipose tissue contact area with and without fat invasion are shown a tendency for the expression of α -SMA and FABP4 to be more fre-

quent in cases of fatty infiltration. Significantly less Collagen VI was observed in fatty infiltration cases. From these results, the expression levels of α -SMA and FABP4 at connective tissue at tumor invasion area may be useful biomarkers for predicting adipose tissue invasion in OSCC. It would be possible to determine the optimal excision range using the fat layer as an anatomical barrier.

In reviewing the thesis, there were some corrections to the figures in the tables in the thesis, but we confirmed that they were within the acceptable range in terms of content. The primary and secondary reviewers unanimously approved the thesis as a valuable thesis.

(審査にあたって論文中の表の数字の訂正があったが、内容的に問題ない範囲であることを確認した。主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値あるものと認めた。)

NanoSPECT imaging reveals the uptake of ^{123}I -labeled oxidized low-density lipoprotein in the brown adipose tissue of mice via CD36 (NanoSPECT イメージングによるマウス褐色脂肪組織における CD36 を介した ^{123}I 標識酸化 LDL 取込みの発見)

細見謙登

(論文の内容の要旨)

【目的】褐色脂肪組織 (BAT) 等の熱産生脂肪組織の抗動脈硬化作用が知られるようになっているが、そのメカニズムは不明である。また、脂肪蓄積ではなく、脂肪燃焼により熱産生を行うという、その特異な生理作用と疾病予後との関連から、BAT のイメージングを的確に行うことが強く望まれている。一方、循環血液中からの酸化 LDL の除去を行うのは、肝臓が主要な臓器であるとされていた。

そこで本研究では、 ^{123}I 標識酸化 LDL を用い酸化 LDL の生体内での行方のイメージングを最新の手法により改めて行い、同時に酸化 LDL の臓器への蓄積メカニズムについても解析した。

【方法と結果】無麻酔のマウスに ^{123}I 標識酸化 LDL あるいは ^{123}I 標識 LDL を静注し、10分後に固定したうえで、高分解能 nanoSPECT/CT で撮像を行い、組織分布を解析した。 ^{123}I 標識 LDL が、これまで知られている通り、ほとんど肝臓へ集積するのが検出されたのに対し、 ^{123}I 標識酸化 LDL は、肝臓への集積と同程度の強さで、BAT への集積が検出された。

BAT の交感神経活動制御と一致して、 ^{123}I 標識酸化 LDL の BAT への集積は、マウスを麻酔するとほぼ完全に消失し、 β_3 アゴニストの投与により回復した。一方、肝臓への ^{123}I 標識酸化 LDL の分布は、麻酔に影響されなかった。さらに、摂氏 4 度の寒冷刺激にマウスを暴露すると、25 度での飼育時よりも、 ^{123}I 標識酸化 LDL の BAT への集積は有意に促進された。

^{123}I による酸化 LDL の標識は、酸化 LDL の蛋白質部分を標識しているため、酸化 LDL の脂質部分を DiI-C18 により蛍光標識した酸化 LDL を用いてさらに実験を行ったところ、やはり同様の結果を得たことから、蛋白質と脂質からなる酸化 LDL の粒子全体が BAT に取り込まれることが示唆された。

次に、BAT で酸化 LDL を取り込む受容体を同定するために、培養褐色脂肪細胞株 HB2 および初代培養褐色脂肪細胞を用いた解析を行った。HB2 の分化誘導処置により、脂肪様細胞への分化が確認され、同時に脂肪細胞マーカーの *Fabp4*, *Pparg*, および、褐色脂肪細胞マーカーの *Ucp1*, *Cidea* の遺伝子発現が誘導された。この際、未分化の状態で見られなかった

DiI-oxLDL 取込みが、分化 HB2 で明確に確認された。そこで、oxLDL 取込みに関与する受容体、CD36、SR-B1 (*Scarb1*)、SR-A1 (*Msr1*)、LOX-1 (*Olr1*) の分化前後での発現変化を解析すると、CD36 は他の受容体よりもはるかに大きい約 4 万倍の発現上昇が見られた。さらに Western blotting により蛋白質レベルでの発現を解析すると、CD36 の発現は分化とともに顕著に増加し、未分化時に比べ分化 day 6 で、60 倍以上の発現上昇が確認された。また、分化 HB2 での DiI-oxLDL 取込みと、CD36 の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、DiI-oxLDL と CD36 の細胞膜上での co-localization が確認された。そこで、分化 HB2 で、CD36 の siRNA 処置を行うと、CD36 発現が抑制されるとともに、DiI 標識酸化 LDL の取込みも有意に抑制された。また、抗 CD36 中和抗体の培地への添加は濃度依存的に DiI 標識酸化 LDL の取込みを抑制した。このように、分化 HB2 での oxLDL 取込みには CD36 が関わっていることが証明された。

そこで、マウスから調整した初代培養褐色脂肪細胞を用い、CD36 と oxLDL 取込みの関係を解析した。初代培養褐色脂肪細胞を分化誘導処置すると、脂肪滴の形成、脂肪細胞および褐色脂肪細胞マーカー遺伝子の発現が誘導され、DiI 標識酸化 LDL の細胞への取込みが観察された。この DiI-oxLDL 取込みはやはり、siRNA を用いた CD36 ノックダウンおよび抗 CD36 中和抗体処置により抑制された。このように褐色脂肪細胞での酸化 LDL 取込みは CD36 が主に媒介していることが明らかとなった。

さらに、CD36 の個体レベルでの役割を CD36 ノックアウトマウス (CD36KO) を用いて解析した。¹²³I 標識酸化 LDL 静注後の nanoSPECT/CT イメージングで、野生型マウスで見られた BAT への¹²³I 標識酸化 LDL 集積は、CD36KO では完全に消失した。一方、肝臓への¹²³I 標識酸化 LDL の集積は、CD36KO でも明確に検出された。

同様に酸化 LDL の脂質部分に蛍光標識した DiI 標識酸化 LDL の静注後の取込みを組織切片で解析した。BAT では野生型マウスで CD36 発現とともに DiI 標識酸化 LDL 集積が見られたが、CD36KO では、CD36 発現の消失とともに DiI 標識酸化 LDL 集積も消失した。蛍光強度の定量でも、CD36KO では、DiI 標識酸化 LDL 取込みは消失が確認された。このように BAT への酸化 LDL 取込みは、CD36 によることが個体レベルで証明された。

【結論】BAT に酸化 LDL が集積し、これが CD36 を介していることをマウスで初めて明らかにした。BAT は循環血液中から動脈硬化惹起性の LDL を除去することで動脈硬化機能を発揮している可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

褐色脂肪組織 (BAT) 等の熱産生脂肪組織の抗動脈硬化作用が知られるようになっているが、そのメカニズムは不明である。また、脂肪蓄積ではなく、脂肪燃焼により熱産生を行うという、その特異な生理作用と疾病予後との関連から、BAT のイメージングを的確に行うことが強く望まれている。一方、循環血液中からの酸化 LDL の除去を行うのは、長年、肝臓が主要な臓器であるとされていた。

これに対し、細見は、静注した酸化 LDL の臓器への分布メカニズムについて、マウスを用いた個体レベルのイメージングを行い、さらに組織・細胞レベルの解析を行うことにより、次の結論を得た。

1. 無麻酔のマウスで、静注した¹²³I 標識酸化 LDL は BAT へ、肝臓への集積と同程度の強さで集積した。
2. 無麻酔のマウスで¹²³I 標識 LDL を静注すると、これまで知られている通り、ほとんど肝臓へ集積した。
3. マウスを麻酔すると¹²³I 標識酸化 LDL の BAT への集積は、ほぼ完全に消失し、 β_3 アゴニストの投与により有意に回復した。
4. マウスの寒冷刺激により、¹²³I 標識酸化 LDL の BAT への集積は有意に促進された。
5. 酸化 LDL の脂質部分を DiI-C18 で蛍光標識した酸化 LDL (DiI 酸化 LDL) の静注でも、肝臓と同程度の BAT への DiI 酸化 LDL の集積が見られた。
6. 培養褐色脂肪細胞株 HB2 の分化誘導により、脂肪細胞マーカーおよび褐色脂肪細胞株マーカーの発現とともに、酸化 LDL 受容体の 1 つである CD36 の顕著な発現増加が起き、未分化では見られない DiI 酸化 LDL の取込みが見られるようになった。
7. 培養 HB2 での DiI 酸化 LDL の取込みは、CD36 に対する siRNA および中和抗体の処置により有意に抑制された。
8. 培養初代培養褐色脂肪細胞での DiI 酸化 LDL 取込みも、CD36 に対する siRNA および中和抗体の処置により有意に抑制された。
9. CD36 ノックアウトマウスに、無麻酔で¹²³I 標識酸化 LDL を静注すると、野生型でみられる¹²³I 標識酸化 LDL の BAT への集積は消失し、肝臓への集積はむしろ増加した。

10. DiI 酸化 LDL の CD36ノックアウトマウスへの静注でも同様に, DiI 酸化 LDL の BAT への集積は消失し, 肝臓への集積は増加した。

これらの結果から, BAT が動脈硬化惹起性 LDL の除去機能を持つことにより, 抗動脈硬化機能を発揮

する可能性が示唆された。また, BAT のイメージングの新たな手法も開発された。

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

CD8+ lymphocyte infiltration is a specific feature of colitis induced by immune checkpoint inhibitors (CD8陽性リンパ球の浸潤は免疫チェックポイント阻害薬による腸炎に特異的な所見である)

高橋 芳之

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は免疫チェックポイント分子もしくはそのリガンドに結合して免疫抑制シグナルの伝達を阻害することで, 抗腫瘍効果を発現する。一方で, 全身臓器に出現する免疫関連有害事象 (irAE) は治療継続の妨げとなり臨床問題となる。ICI によって誘発される irAE 大腸炎の臨床的特徴および病理学的特徴は, 炎症性腸疾患, 特に潰瘍性大腸炎 (UC) と酷似しており, 鑑別が困難である症例が多い。irAE 発症の機序は未だ不明であるが, 様々な臓器への CD8陽性リンパ球浸潤と関連していることが報告されている。本研究では, irAE 大腸炎における CD8陽性リンパ球の組織学的浸潤と臨床学的特徴を他の大腸炎と比較検討した。

【方法】2010年7月から2020年6月に信州大学医学部附属病院で大腸炎と診断された102人を対象として後方視的に検討した。全例で下部消化管内視鏡検査が施行され, 大腸の最も炎症の強い部位から生検が施行されている。顕微鏡視野で CD4陽性リンパ球および CD8陽性リンパ球の浸潤数と CD8陽性リンパ球/CD4陽性リンパ球比を測定して, 病態ごとに比較検討した。

【結果】症例の内訳は irAE 大腸炎12人, UC37人, クロウン病 (CD) 22人, 虚血性大腸炎 (IC) 31人であった。irAE 大腸炎では, CD8陽性リンパ球浸潤数は CD4陽性リンパ球浸潤数より有意に高値であった ($p < 0.01$)。CD8陽性リンパ球浸潤数は, UC ($p < 0.05$), CD ($p < 0.05$), および IC ($p < 0.01$) と比較して irAE 大腸炎で有意に高値であった。CD8陽性リンパ球/CD4陽性リンパ球比は, irAE 大腸炎で有意に高値であった (それぞれ, UC, CD, および IC に対して $p < 0.01$)。ROC 解析を行うと, irAE 大腸炎を診断するための最適な CD8陽性リンパ球浸潤数のカットオフは, 102個/視野 (感度: 75%, 特異度: 81%), CD8陽性リン

パ球/CD4陽性リンパ球比は1.17であった (感度: 83%, 特異度: 84%)。

【結論】CD8陽性リンパ球浸潤数と CD8陽性リンパ球/CD4陽性リンパ球比は, irAE 大腸炎を他の形態の大腸炎と区別するための有用な指標となる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は免疫チェックポイント分子もしくはそのリガンドに結合して免疫抑制シグナルの伝達を阻害することで, 抗腫瘍効果を発現する。一方で, 全身臓器に出現する免疫関連有害事象 (irAE) は治療継続の妨げとなり臨床問題である。ICI によって誘発される irAE 大腸炎の臨床的特徴および病理学的特徴は, 炎症性腸疾患, 特に潰瘍性大腸炎と酷似しており, 鑑別が困難である症例が多い。irAE 発症の機序は未だ不明であるが, 様々な臓器への CD8陽性リンパ球浸潤と関連していることが報告されている。本研究では, irAE 大腸炎12人, 潰瘍性大腸炎37人, クロウン病22人, 虚血性大腸炎31人を対象とした。大腸の最も炎症の強い部位から生検された組織標本を用いて CD4, CD8の免疫組織化学染色を行い, 顕微鏡視野で CD4陽性リンパ球および CD8陽性リンパ球の浸潤数と CD8陽性リンパ球/CD4陽性リンパ球比を計測して, 病態ごとに比較検討した。

その結果, 高橋は以下の結論を得た。

1. 炎症性腸疾患に比べて irAE 大腸炎では大腸における CD8陽性リンパ球の浸潤が高度であった。
2. irAE 大腸炎の診断において大腸に浸潤する CD8陽性リンパ球数102/HPF と CD8陽性リンパ球/CD4陽性リンパ球比1.17がカットオフ値として有用であった。
3. irAE 大腸炎の疾患重症度は大腸の CD8陽性リンパ球浸潤数と相関を認めなかった。
4. irAE 大腸炎では大腸上皮内に CD8陽性リンパ球

が多く浸潤する傾向にあった。

これらの結果より、irAE 大腸炎は大腸に浸潤している CD8陽性リンパ球数と CD8陽性リンパ球/CD4陽性リンパ球比が高値となることが示された。さらに、CD8陽性リンパ球の浸潤部位は大腸上皮内に多いことが特徴であった。本研究結果は、CD8陽性リンパ球浸

潤数と CD8陽性リンパ球 /CD4陽性リンパ球比は、irAE 大腸炎を他の形態の大腸炎と区別するための有用な指標となる可能性を示した。

主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値の高い研究であるものと認めた。

Distribution and progression of cerebral amyloid angiopathy in early-onset V30M (p.V50M) hereditary ATTR amyloidosis (若年発症 V30M 変異型遺伝性 ATTR アミロイドーシス患者における脳アミロイド血管症の進展および分布)

高橋 佑介

(論文の内容の要旨)

【背景】 遺伝性 ATTR (ATTRv) アミロイドーシスは、変異トランスサイレチン (TTR) を主たる構成成分とするアミロイド線維が全身臓器に沈着することにより惹起される常染色体顕性遺伝の致死性の疾患である。近年、肝移植や TTR 四量体安定化薬、核酸医薬などの疾患修飾薬の開発によって本症の予後が劇的に改善している。しかし、これらの治療は肝臓で産生され血中に分泌される TTR を標的としているため、脈絡叢で産生された変異 TTR が脳血管に沈着する脳アミロイド血管症 (CAA) に対する効果は限定的である。よって、本症の長期生存者において CAA が最も深刻な合併症になると予想される。このような背景から、ATTRv アミロイドーシス患者の CAA の自然経過を明らかにし、有用なバイオマーカーを開発することが求められている。

【対象・方法】 対象は、全身撮影において¹¹C-PiB-PET 陽性の ATTRv アミロイドーシス患者34名 (男性22名、女性12名)。全例が TTR 遺伝子の V30M (p.V50M) 変異を有していた。32名が若年 (50歳未満) 発症、2名が高齢 (50歳以上) 発症。平均発症年齢は34.0歳、研究時平均年齢は48.9歳。22名が肝移植後、14名が疾患修飾薬を使用、2名は PiB-PET 撮影時に未治療であった。全例で中枢神経症状の解析と PiB-PET を実施。15名では PiB-PET のフォローアップ撮影を実施した。PiB-PET SUVR 画像は橋を基準として作成し、各脳領域の SUVR 定量解析および zスコア画像の解析を行った。

【結果】 CAA に関連した中枢神経症状は8名 (男性2名、女性6名) でみられ、Transient focal neurologic episodes (TFNEs) が7名、小脳出血と認知機能低下がそれぞれ2名で認められた。TFNEs の症状は運

動性失語、片側脱力、感覚障害、意識障害であった。アミロイドーシス発症から中枢神経症状出現までの期間は平均17.0年で、PiBの集積は罹病期間に比例して増加し (相関係数=0.67, P<0.001)、SUVR の増加率は女性で有意に高かった (P=0.046)。フォローアップ撮影では初回と比較し SUVR の有意な上昇を認めた (P=0.002)。3D-SSP z-score 画像では、アミロイド沈着は発症約10年後に小脳上面から始まり、15年後には小脳表面全体、シルビウス裂、大脳縦裂前部へと拡大した。発症25年後には大脳表面全体にアミロイド沈着を認めた。

【考察】 本研究で ATTRv アミロイドーシス患者における CAA の特徴的な分布と進行様式が明らかになった。なぜ本症において小脳上部、シルビウス裂、大脳縦裂前部からアミロイド沈着が始まるのかは不明だが、これらの狭いスペースでは脳脊髄液が停滞するためアミロイドが沈着しやすい可能性が考えられる。また本研究により、罹病期間に加え女性も CAA 発症の危険因子である可能性が明らかになった。さらに PiB-PET が ATTR 型 CAA の早期診断と治療評価のための有用なバイオマーカーになる可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝性 ATTR (ATTRv) アミロイドーシスは、変異トランスサイレチン (TTR) を主たる成分とするアミロイドが全身臓器に沈着することにより惹起される致死性の疾患である。近年、肝移植や TTR 四量体安定化薬、核酸医薬などの疾患修飾薬により本症の予後が劇的に改善した。しかし、これらの治療は肝臓で産生され血中に分泌される TTR を標的としており、脈絡叢で産生された変異 TTR が脳血管に沈着する脳アミロイド血管症 (CAA) に対する効果は限定的である。よって、本症の長期生存者では CAA が深刻な

合併症になると予想される。このような背景から、本症患者のCAAの自然経過を明らかにし、有用なバイオマーカーを開発することが求められている。

対象は、PiB-PET陽性のATTR ν アミロイドーシス患者34名(男性22名,女性12名)。全例がTTR遺伝子のV30M変異を有していた。32名が若年(50歳未満)発症,2名が高齢(50歳以上)発症。平均発症年齢は34.0歳,研究時平均年齢は48.9歳。全例で中枢神経症状の解析とPiB-PETを実施。15名ではPiB-PETのフォローアップ撮影を実施。各脳領域のSUVR定量および3D-SSP z スコア画像の解析を行った。

その結果,高橋は次の結論を得た。

1. CAAに関連した中枢神経症状は8名でみられ, Transient focal neurologic episodes (TFNEs)が7名,小脳出血と認知機能低下をそれぞれ2名で認めた。アミロイドーシス発症からCNS症状出現までの期間は平均17.0年で, PiBの集積は罹病期間に比

例して増加し, SUVRの増加率は女性で有意に高かった。

2. フォローアップ撮影では初回と比較しSUVRの有意な上昇を認めた。

3. z スコア画像では,アミロイド沈着は発症約10年後に小脳上面から始まり,15年後には小脳表面全体,シルビウス裂,大脳縦裂前部へと拡大した。発症25年後には大脳表面全体にアミロイド沈着を認めた。

これらの結果より,ATTR ν アミロイドーシス患者におけるCAAの特徴的な分布と進行様式が明らかになった。また罹病期間に加え女性もCAA発症の危険因子である可能性が明らかになった。PiB-PETが本症患者のCAAの早期診断と治療評価のための有用なバイオマーカーになる可能性が示された。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。

Clinically Relevant Dose of Pemafibrate, a Novel Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Modulator (SPPARM α), Lowers Serum Triglyceride Levels by Targeting Hepatic PPAR α in Mice (臨床投与相当量の新規選択的PPAR α モジュレーター・ペマフィブラートをマウスに投与すると,肝臓のPPAR α に作用して血中の中性脂肪値が低下する)

ZHANG ZHE

(論文の内容の要旨)

【Introduction】 Pemafibrate (PEM) is a novel lipid-lowering drug classified as a selective peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) modulator whose binding efficiency to PPAR α is superior to that of conventional fibrates. This agent is also useful for non-alcoholic fatty liver disease and primary biliary cholangitis with dyslipidemia. However, it remains unclear on how PEM exerts lipid-lowering action in the clinical setting.

【Methods】 PEM at a clinically relevant dose (0.1 mg/kg/day) or relatively high dose (0.3 mg/kg/day) was administered to male C57BL/6J mice for 14 days. In this study, histopathological analysis of several organs such as liver, heart, kidney and adipose tissue, biochemical analysis, quantitative polymerase chain reaction, Western blot, and enzyme-linked immunosorbent assay were conducted.

【Results】 Clinical dose PEM efficiently lowered circulating triglyceride (TG) levels without apparent hep-

atotoxicity in mice, likely due to hepatic PPAR α stimulation and the enhancement of fatty acid uptake and β -oxidation in addition to a concomitant increase in microsomal triglyceride transfer protein. Interestingly, PEM activated PPAR α only in the liver, but not in the heart, kidney, or adipose tissue. The clinical dose of PEM also increased serum/hepatic levels of fibroblast growth factor 21 (FGF21) without enhancing hepatic lipid peroxide 4-hydroxynonenal or inflammatory signaling.

【Conclusion】 A clinically relevant dose of PEM could efficiently and safely reduce serum TG and increase FGF21 targeting hepatic PPAR α in mice. These findings may help explain the precise mechanism of how PEM attenuates circulating TG in humans.

(論文審査の結果の要旨)

Pemafibrate (PEM) is a novel lipid-lowering drug classified as a selective peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) modulator whose binding efficiency to PPAR α is superior to that of conven-

tional fibrates. This agent is also useful for non-alcoholic fatty liver disease and primary biliary cholangitis with dyslipidemia. However, it remains unclear on how PEM exerts lipid-lowering action in the clinical setting.

PEM at a clinically relevant dose (0.1 mg/kg/day) or relatively high dose (0.3 mg/kg/day) was administered to male C57BL/6J mice for 14 days. In this study, histopathological analysis of several organs such as liver, heart, kidney and adipose tissue, biochemical analysis, quantitative polymerase chain reaction, Western blot, and enzyme-linked immunosorbent assay were conducted.

「ZHANG ZHE」 obtained the following conclusions.

1. Clinical dose of PEM efficiently lowered circulating triglyceride (TG) levels without apparent hepatotoxicity in mice, likely due to hepatic PPAR α

stimulation and enhanced fatty acid uptake and β -oxidation in the liver.

2. Hepatic microsomal triglyceride transfer protein was increased by clinical dose of PEM.
3. PEM activated PPAR α only in the liver, but not in the heart, kidney, or adipose tissue.
4. Clinical dose of PEM increased serum/hepatic levels of fibroblast growth factor 21 (FGF21) without enhancing hepatic lipid peroxide 4-hydroxynonenal or inflammatory signaling.

A clinically relevant dose of PEM could efficiently and safely reduce serum TG and increase FGF21 targeting hepatic PPAR α in mice. These findings may help explain the precise mechanism of how PEM attenuates circulating TG in humans.

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。

IQSEC2 Deficiency Results in Abnormal Social Behaviors Relevant to Autism by Affecting Functions of Neural Circuits in the Medial Prefrontal Cortex (IQSEC2の欠損は内側前頭前皮質の神経回路機能に影響を与え自閉症に関連した社会行動の異常をきたす)

Mehta Anuradha

(論文の内容の要旨)

【Background and Aims】 Lately, genes located on the sex chromosome have been associated immensely to the etiologies of a wide variety of developmental psychiatric disorders. Aberrant crosstalk at the level of synapse is presumably the major culprit underlying the pathophysiology of such neurological conditions manifested collectively in learning, memory, and behavioral abilities. One such potential candidate, the gene encoding IQ Motif and Sec7 Domain 2 (IQSEC2), located on the X-chromosome, has been linked to neurodevelopmental disorders, like intellectual disability, epilepsy, and certain forms of autism spectrum disorders (ASDs). We seek to elucidate the role of this molecule in physiology at the level of synaptic crosstalk, in relevance to ASDs.

【Materials and Methods】 We used a global and local approach to justify our hypothesis by generating the CRISPR/Cas9-mediated knockout (KO) mouse model and shRNA mediated knockdown (KD) of IQSEC2 respectively. Major methodologies include patch-

clamp recording from acute brain slices for quantifying the synapse physiology; in-utero electroporation for selective knockdown of IQSEC2 in pyramidal neurons; and stereotactic viral injection for expressing IQSEC2 isoform1 in the medial prefrontal cortex (mPFC) of mouse brain.

【Results】 We have shown the involvement of this post synaptic molecule in relevance to the phenotypic manifestation of autism, more specifically the social behavioral aspect. Up-regulation of c-Fos expression in the mPFC by social stimulation was attenuated in IQSEC2 KO mice, implicating the significance of this brain region in IQSEC2 associated phenotypes. The AMPAR, NMDAR, and GABAR-mediated synaptic transmissions were also found to be impaired in the pyramidal neurons of mPFCs in IQSEC2 KO mice, with a more robust deficit in AMPAR mediated synaptic transmission. The KD approach recapitulated the synaptic impairments, attributing the synaptic deficits to the postsynaptic deletion of IQSEC2. Most importantly, the social behavioral deficits and synap-

tic impairments were successfully abolished when we reconstituted the longest isoform of IQSEC2 to the mPFC, of the KO mice by an adeno-associated viruses (AAV)-mediated gene delivery system.

【Conclusion】 We generated IQSEC2 KO mice and studied their behavior and electrophysiological properties focusing on the mPFC. The IQSEC2 KO mice exhibited overgrooming and social deficits reminiscent of the symptoms of autism. AMPAR, NMDAR, and GABAR-mediated synaptic transmissions were impaired in pyramidal neurons in layer 5 of the mPFC in IQSEC2 KO mice. Re-expression of IQSEC2 in the mPFC rescued both synaptic and social behavioral phenotypes, suggesting that an impairment in the neural function in the mPFC may be responsible for social deficits in IQSEC2 KO mice.

(論文審査の結果の要旨)

The gene encoding IQ Motif and Sec7 Domain 2 (IQSEC2), located on the X-chromosome, has been linked to neurodevelopmental disorders, like intellectual disability, epilepsy, and certain forms of autism spectrum disorders (ASDs). IQSEC2 is a PSD-95 binding molecule and an ADP-ribosylation factor 6 (ARF6)-Guanidine Exchange Factor (Arf6-GEF) in the excitatory post synapse, where it contributes to receptor

trafficking. Having generated a CRISPR/Cas9 system-based knockout (KO) mouse model of IQSEC2, I attempted to elucidate its function in behavior and synapse physiology. I observed the following major findings:

1. IQSEC2 KO mice exhibited autistic behaviors, including overgrooming, decreased social interaction, social preference, and social novelty preference.
2. Up-regulation of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex (mPFC) by social stimulation was attenuated in IQSEC2 KO mice.
3. AMPAR, NMDAR, and GABAR-mediated synaptic transmissions were decreased in the pyramidal neurons in layer 5 of the mPFC in IQSEC2 KO mice.
4. The above synaptic phenotypes were attributable to the postsynaptic deletion of IQSEC2 from the result of cell type specific IQSEC2 KD using in utero electroporation.
5. Re-expression of IQSEC2 isoform 1 in the mPFC rescued the electrophysiological and behavioral phenotypes in IQSEC2 KO mice.

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

Role of adrenomedullin-2/intermedin in the pathogenesis of neovascular age-related macular degeneration (滲出型加齢黄斑変性症の病態におけるアドレノメデュリン2/インターメディンの役割)

柿原伸次

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 本邦の中途失明原因の上位を占める糖尿病網膜症や滲出型加齢黄斑変性 (nAMD) においては、各々、病的網膜新生血管、脈絡膜新生血管 (CNV) が眼内に発生し、これらが浮腫、出血、線維化などを引き起こして、視機能低下を生じる。現在、これらの疾患群に対して、抗 VEGF 薬の硝子体注射が行われているが、反復投与による治療抵抗性や高額な薬剤費が問題となっており、VEGF 以外の血管制御分子に着目した治療法が求められている。我々はこれまで、アドレノメデュリン (AM) が、眼内病的血管新生の治療標的となる可能性を報告してきた。アドレノメデュリン2/インターメディン (AM2/IMD) は、AM と

同じく、カルシトニンスーパーファミリーの1つとして発見された生理活性ペプチドであるが、眼内病的血管新生における意義は不明である。

本研究では、眼内血管新生における AM2 の病態生理学的意義を、AM2 ノックアウト (AM2^{-/-}) マウスを用いて検討した。

【材料および方法】 1) 野生型 (WT), AM2^{-/-} マウスに、酸素誘発網膜症 (OIR) を誘導し、出生 7, 12, 17 日目に眼から網膜展開標本を作製し、網膜血管について WT と AM2^{-/-} マウスで比較した。また、PBS, AM, AM2 の局所投与が、OIR の病的網膜新生血管に与える影響を検討した。

2) レーザー誘導脈絡膜新生血管 (LI-CNV) を、9-

12週齢の雄マウスの眼に誘導し、7日後に脈絡膜展開標本を作成し、CNVや網膜下線維化の面積、マクロファージ浸潤を評価した。さらに、各種遺伝子発現をqPCR法で確認し、WT、AM2^{-/-}マウス間で比較した。

3) LI-CNV誘導直後に、浸透圧ポンプを用いてPBS、AM、AM2のいずれかを持続投与し、2)同様に比較した。

4) フルオレセイン蛍光眼底造影によって、LI-CNVからの漏出に対するAM2の影響を検討した。また、網膜血管内皮細胞(TR-iBRB)に対して、VEGF単独あるいはAM2との共投与を行い、血管透過性と電気抵抗に与える影響を評価した。

5) ヒト網膜色素上皮細胞(ARPE19)に対して、TGF- β 2+TNF- α による刺激を行い、上皮間葉転換(EMT)を誘導し、AM2投与の有無によるEMTへの影響を、免疫染色およびqPCR法にて検討した。

6) 3)と同様のサンプルを用いて、トランスクリプトーム解析を行い、LI-CNVにおけるAM2の効果への関与が考えられる候補遺伝子について、qPCR法によって遺伝子発現を確認した。

7) 脈絡膜複合体におけるMeox2の遺伝子発現・タンパク質の発現を、qPCR法・免疫染色で確認した。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対してMeox2 siRNAによるノックダウン実験を行い、内皮間葉転換(EndMT)やNF- κ Bシグナルに与える影響を検討した。

【結果】 1) WT、AM2^{-/-}新生仔マウス間で、生理的網膜血管新生、無血管領域、病的網膜新生血管領域には有意差を認めなかった。また、AM2の局所投与は病的網膜新生血管に明らかな変化を生じなかった。

2) AM2^{-/-}マウスでは、WTマウスに比べて、CNVは拡大し、網膜下線維化やマクロファージ浸潤の亢進を認めた。さらに、脈絡膜複合体でのVegfa、Kdr、Cd68、Cyba、Ncf1、Tgfb1、Ccn2、Serpine1の遺伝子発現はAM2^{-/-}マウスにおいて有意な亢進を認めた。

3) 逆に、AM2の投与は、CNV形成、網膜下線維化やマクロファージ浸潤を抑制した。また、AM2投与により、脈絡膜複合体でのVegfa、Kdr、Cd68、Cyba、Ccn2の有意な発現低下を認めた。

4) CNVからのフルオレセインの漏出は、AM2^{-/-}マウスで増加し、AM2投与で減弱した。培養血管内皮細胞において、VEGFによって惹起された血管透過

性の亢進および電気抵抗の減少は、AM2の投与で抑制された。

5) ARPE19に対するTGF- β 2+TNF- α 刺激は、上皮系マーカーの発現低下と間葉系マーカーの発現亢進を生じたが、AM2の投与によりそれらは抑制された。また、TGF- β 2+TNF- α 刺激により、ARPE19において有意なAM2の発現亢進を認めた。

6) トランスクリプトーム解析にて、2倍以上もしくは1/2以下の有意な発現変化が認められた遺伝子は、コントロールと比べて、AM投与で113遺伝子、AM2投与で82遺伝子認められた。そのうち、AMとAM2で同様な発現変化を認めた遺伝子はMeox2を含む15遺伝子であった。

7) マウス脈絡膜複合体におけるMeox2の遺伝子発現は、レーザー照射後1日目に約1/2に低下し、1週間後にはレーザー照射前と同等のレベルまで戻った。レーザー照射後1日目の、脈絡膜複合体におけるMeox2の発現は、AM2の投与で有意に亢進し、AM2^{-/-}マウスで有意に低下した。AM2^{-/-}でのMeox2の発現低下を免疫染色で確認した。さらに、HUVECにおいてTGF- β 2+TNF- α によって惹起されるEndMTは、AM2の投与で抑制されたが、siRNAによるMeox2のノックダウンによりAM2の効果はキャンセルされた。同様に、TNF- α によって即時に惹起されるNF- κ Bの活性化は、AM2の投与で抑制されたが、Meox2のノックダウンによりAM2の効果はキャンセルされた。

【結論】 AM2は、血管透過性抑制、酸化ストレス抑制に加えて、Meox2発現亢進を介した抗線維化作用や、抗炎症作用などを介して、nAMDの病態を改善させる。

(論文審査の結果の要旨)

加齢黄斑変性(nAMD)は失明原因の上位を占める眼疾患であり、脈絡膜新生血管(CNV)が原因となり浮腫、出血、線維化を招き、視機能低下を生じる。実臨床では、抗VEGF薬による治療が行われているが、問題点も多く、VEGF以外の血管制御分子に着目した治療法が求められている。柿原は、多彩な生理活性を有するペプチドであるアドレノメデュリン2(AM2)に着目し、nAMDをはじめとする眼内血管新生疾患におけるAM2の病態生理学的意義を、AM2ノックアウト(AM2^{-/-})マウスを用いて検討した。

その結果、柿原伸次は次の結論を得た。

1. 野生型マウスとAM2ノックアウトマウス(AM2^{-/-})

- /-) 新生仔マウス間の比較や, AM2の硝子体投与による検討では, 網膜血管新生に対する明らかな影響を認めなかった。
2. レーザー誘導脈絡膜血管新生 (LI-CNV) をマウスに誘導すると, AM2^{-/-} マウスでは野生型マウスに比べて, CNV 拡大・網膜下線維化拡大・マクロファージ浸潤の亢進を認めた。逆に, AM2の投与はこれらを抑制した。同様に, AM2^{-/-} マウスでは, 脈絡膜複合体での Vegfa, Kdr, Cd68, Cyba, Ccn2の発現上昇を認め, AM2投与はこれらの発現を抑制した。
3. 網膜色素上皮細胞 ARPE19に対する TGF- β 2+TNF- α 刺激は, 上皮間葉転換を誘導し, 上皮系マーカーの発現減少と間葉系マーカーの発現亢進をもたらしたが, AM2の投与によりそれらは抑制された。また, TGF- β 2+TNF- α 刺激は, ARPE19における AM2発現亢進を惹起した。
4. AM2は, in vivo および in vitro で血管内皮からの透過性亢進を抑制した。

5. トランスクリプトーム解析から AM2の CNV 改善効果に関連することが予想されるホメオボックス遺伝子 Meox2を同定した。
6. 脈絡膜複合体における Meox2の発現は, AM2投与で亢進し, AM2^{-/-} で減弱した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において TGF- β 2+TNF- α によって惹起される内皮間葉転換は, AM2の投与で抑制されたが, siRNA による Meox2のノックダウンにより AM2の効果はキャンセルされた。同様に, TNF- α によって即時に惹起される NF- κ B の活性化は, AM2の投与で抑制されたが, Meox2のノックダウンにより AM2の効果はキャンセルされた。
- 以上の結果から, 柿原伸次は, AM2は, 血管透過性抑制, 酸化ストレス抑制に加えて, Meox2発現亢進を介した抗線維化作用や, 抗炎症作用などを介して, nAMD の病態を改善させることを示し, AM2が nAMD の有望な治療標的となる可能性を示した。
- 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。

Adjacent segment pathology following posterior lumbar interbody fusion for lumbar degenerative spondylolisthesis : a comparison between minimally invasive and conventional open approach (腰椎変形すべり症に対する腰椎後方椎体間固定術後の隣接椎間障害：低侵襲アプローチと従来アプローチの比較)

三 村 哲 彦

(論文の内容の要旨)

【背景】 脊椎固定術後の隣接椎間障害の発症には生体力学的因子が重要な役割を果たす。そのため, 傍脊柱筋損傷の少ない低侵襲 (MI) アプローチを用いた腰椎後方椎体間固定術 (PLIF) は, 従来の open PLIF (O-PLIF) よりも隣接椎間障害の出現が少ない可能性がある。本研究の目的は, MI-PLIF 後の隣接椎間障害の発症率を検討することである。

【対象と方法】 腰椎変形すべり症に対して L4/5レベルの単椎間 PLIF を受けた患者100名を対象とした (MI-PLIF 群68名, O-PLIF 群32名, 平均追跡期間100.5か月)。隣接レベルの病変による再手術を必要とした場合を, 手術が必要な隣接椎間障害と定義した。各群の生存曲線を推定し, 統計的に比較した。また, Cox 比例ハザードモデルを用いて, 患者情報の交絡を調整した。臨床転帰として, 術前および最終診察時の JOA スコアを評価した。

【結果】 両群の患者情報, 術前の椎間板変性, sagittal

alignment, 骨癒合率, 椎間関節の損傷に有意差は認められなかった。MI-PLIF 群68例中4例 (5.9%), O-PLIF 群32例中6例 (18.8%) で手術が必要な隣接椎間障害を発症した。Kaplan-Meier 解析では, 5年後の無イベント生存率は MI-PLIF 群で98.5% (95% confidence interval [CI]: 95.5%-100%), O-PLIF 群で90.6% (95% CI: 81.1%-100%), 10年後の無イベント生存率は MI-PLIF 群で93.7% (95% CI: 86.8%-100%), O-PLIF 群で71.8% (95% CI: 52.9%-97.5%) であり, MI-PLIF は O-PLIF よりも有意に手術が必要な隣接椎間障害の発生が少なかった (P=0.04)。多変量 Cox 比例ハザードモデルにおいて, O-PLIF が独立した隣接椎間障害の危険因子であった (オッズ比3.97, 95% CI: 1.02-15.48, P=0.04)。MI-PLIF 群は O-PLIF 群に比べて JOA スコアの改善率が有意に高かった (79.8% vs. 61.1%, P<0.01)。

【結論】 MI-PLIF の後, 手術が必要な隣接椎間障害の発症率は5年後に1.5%, 10年後に6.3%と予測され

た。MI-PLIF は O-PLIF に比べて手術が必要な隣接椎間障害の発症率が低く、良好な臨床転帰を示した。PLIF における MI アプローチは、手術が必要な隣接椎間障害発症のリスクを低下させる。

(論文審査の結果の要旨)

脊椎固定術後の隣接椎間障害の発症には生体力学的因子が重要な役割を果たす。そのため、傍脊柱筋損傷の少ない低侵襲 (MI) アプローチを用いた腰椎後方椎体間固定術 (PLIF) は、従来の open PLIF (O-PLIF) よりも隣接椎間障害の出現が少ない可能性がある。本研究の目的は、MI-PLIF 後の隣接椎間障害の発症率を検討することである。

本研究では、腰椎変性すべり症に対して L4/5 レベルの単椎間 PLIF を受けた患者を後ろ向きで検討し、MI-PLIF 群と O-PLIF 群の 2 群に分けて隣接椎間障害の発生を比較した。隣接レベルの病変による再手術を必要とした場合を、手術が必要な隣接椎間障害と定義した。各群の生存曲線を推定した。また、隣接椎間における画像学的な隣接椎間障害として、椎間板の高さの減少、椎体すべりの増加、椎間の後方開大の増加を検討した。また、臨床転帰として、術前および最終診察時の日本整形外科学会腰痛疾患治療成績判定基準

(JOA スコア) を評価した。

その結果、三村らは次の結論を得た。

1. 手術が必要な隣接椎間障害の発生率は 5 年で MI-PLIF 1.5 %, O-PLIF 9.4 %, 10 年でそれぞれ 6.3 %, 28.1 % であり、MI-PLIF は O-PLIF と比較して発生率が低かった。
2. 患者の背景因子を含めた多変量解析においても O-PLIF は MI-PLIF に対して有意な手術が必要な隣接椎間障害のリスク因子であり、その発生率は 3.97 倍であった。
3. 画像学的な隣接椎間障害として、L3/4 椎間の後方開大の増加が O-PLIF の方が多く、O-PLIF は MI-PLIF よりも上位の隣接椎間で不安定性が増している可能性を示唆していた。

これらの結果により、MI-PLIF は O-PLIF よりも手術が必要な隣接椎間障害の発生が少ないことを示した。MI-PLIF は傍脊柱筋の損傷が O-PLIF より少なく不安定性を起しにくく、隣接椎間障害の発生を減少させたと考えられる。今後はサンプルサイズの大きな前向き研究が必要である。

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。

Cancer among children, adolescents and young adults in the Hokushin region, Japan, between 2010 and 2015 (2010~2015年の北信地域における小児・AYA 世代のがん罹患の実態)

大 倉 絵 梨

(論文の内容の要旨)

【緒言】14歳以下の小児がんは、臨床研究の推進により治癒率は向上しているものの、依然として難治症例も存在することから、十分な診療体制の構築とともに診断時から晩期合併症への対応が必要である。15歳以上39歳以下の思春期・若年成人 (adolescent and young adult; AYA) 世代のがんは、ほぼすべてが希少がん (人口10万人あたり6人未満の発症) に含まれ、小児がん (14歳以下) や成人がん (主要五大がん) と比較して専門医の診療を受ける機会や標準治療が乏しく5年生存率が低い。また、就学・就労・結婚・出産・育児などの多彩なライフイベントへの影響が不可避であり、新規治療法・薬物の開発が滞っている。そのため、AYA 世代のがんについては、治療成績の向上のみならず、精神的・社会的問題のサポートも含めた AYA 世代に適切な診療体制を早急に構築する必要がある。小児期から AYA 世代にかけて、がんの種類の内訳は

大きく変化し、がん種とライフステージにより、具体的な対応のニーズが異なる可能性があるため、それらに応じた関わり方や理解の促進、環境整備などが必要である。しかし、本邦における小児・AYA 世代のがん罹患の疫学情報は未だ乏しく、十分な把握がされていない現状がある。2019年10月に国立がん研究センター・国立成育医療研究センターから発表された全国調査の報告により、その実態や予後も少しずつ明らかになってきているものの、地域ごとの実態や問題点・課題などの現状は把握されておらず、地域のがん医療に十分活用できていない可能性がある。

本研究では、隣接する4県 (北信地域:長野県、富山県、石川県、福井県) のデータベースを活用し、同地域の小児・AYA 世代のがん罹患の状況を正確に把握し、全国調査の結果と比較することにより、地域の小児・AYA 世代がんの実態を明らかにした。

【対象と方法】2010年1月から2015年12月までにかん

(上皮内がんを含める)と診断され、北信地域のがん診療を担当する主要病院20施設で院内がん登録され、北信がんプロ・地域がんデータベースにデータ提供された症例のうち、0～39歳の男女例のデータを使用した。データ使用にあたり、各医療施設の倫理審査委員会で承認を受けた。0～39歳の経年推移を年齢・性別・県毎に集計し、同時期の県毎の人口動態から小児・AYA世代の人口10万人に対する推定罹患率を算出し、過去の報告と比較、がん罹患における地域性の有無も検討した。

【結果】 該当データは計5,718例で、がん発症率(人口10万人あたりの粗罹患率)は0～14歳、15～19歳、20～29歳、30～39歳において各々13.4、14.5、44.0、101.5であった。がん種の割合において、0～14歳は非癌腫がそのほとんどを占め、15歳以降から段階的に癌腫が増えていく傾向は、本データベースにおいても全国調査と一致した。0～19歳の男女比は1.3:1と男性の罹患数が多かったが、20歳以降は女性の罹患数が顕著に増加し、年齢を追うごとに男女比の差が拡大した。20歳以降の男女比の逆転とその後の男女比の拡大は全国調査と同様の傾向であった。

【考察】 AYA世代の女性のがん発症率が全国調査よりも高かったことに関しては、地域性に伴う環境要因や遺伝学的背景というよりは、本データベースが若年成人のがん診療を行うほとんどの施設を網羅していることから、抽出データを基とする全国調査よりも正確な情報を導き出せた可能性が示唆された。0～14歳のがん種の割合において、神経芽腫の割合が全国調査よりも高かったことに関しては、神経芽腫は集学的治療が困難な地域においては近隣県や遠方の大都市圏で医療が提供されることが少なくないが、本データベースでは4県すべての小児がん診療施設が参加していたことから、地域全体の神経芽腫発症率がより正確に算出された可能性が考えられた。本データベースの調査結果を全国の現状を示す結果と判断するためには、環境要因や遺伝学的背景の影響の有無も考慮したさらなるデータの集積が必要であるが、現存する小児・AYA

世代がんのデータベースの中では、正確性、カバー率、細分類および更新スピードの点で有用ではないかと考えられた。今後、4県の地域はもとより全国の小児・AYA世代の診療体制の整備に利用されることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

2010年1月から2015年12月までに北信がんプロ・地域がんデータベースのデータ提供された0～39歳の男女例、計5,718例を集計、解析を行い、過去の全国調査の結果と比較した。がん種の割合において、0～14歳は非癌腫がそのほとんどを占め、15歳以降から段階的に癌腫が増えていく傾向は、本データベースにおいても全国調査と一致した。

小児の白血病・悪性リンパ腫が3割を占めるというデータは、全国調査と一致した。これらの疾患は専門病院での治療が集約している疾患であり、本データには小児がん専門病院である長野県立こども病院のデータが含まれており、4県すべての小児がん診療施設が参加していたことから、小児期のがん発症率としてより正確な現実に即したデータであることと考えられた。

AYA世代のうち、20代の女性のがん発症率が全国調査よりも高かったことに関しては、地域性に伴う環境要因や遺伝学的背景というよりは、本データベースが若年成人のがん診療を行うほとんどの施設を網羅していることから、抽出データを基とする全国調査よりも正確な情報を導き出せた可能性が示唆された。本データベースの調査結果を全国の現状を示す結果と判断するためには、環境要因や遺伝学的背景の影響の有無も考慮したさらなるデータの集積が必要であるが、現存する小児・AYA世代がんのデータベースの中では、正確性、カバー率、細分類および更新スピードの点で有用ではないかと考えられた。今後、4県の地域はもとより全国の小児・AYA世代の診療体制の整備に利用されることが期待される。

よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Predictors of a Non-response to Prophylactic Indomethacin for Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants (早産児における動脈管開存症に対するインドメタシン予防投与への不応予測因子の検討)

内 海 雅 史

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】動脈管 (DA) は胎児が母胎内で正常発達するために主肺動脈から大動脈へのバイパス血管と機能する胎児循環の重要な要素であるが、出生後は不要となり早期に閉鎖する必要がある。しかし妊娠28週未満で出生した早産児の50-70%でDAが閉鎖しない状態が持続することがある。DAが開存している場合、肺血管抵抗の減少に伴いDAを介して大動脈から肺動脈へのシャント血流が増加し、肺血流の増加と全身血流の低下を招く。そのため、早産時の動脈管開存症 (PDA) は心不全、肺鬱血、肺出血、壊死性腸炎 (NEC) を合併し新生児死亡率に強く関連する。通常、母胎内では胎盤から供給されるプロスタグランジン (PGE2) と DA 自身で生成する PGE2 により開存を維持するが、出生後、胎盤からの PGE2 供給が停止し DA は閉鎖する。早産児に対して出生後早期にインドメタシン (IND) やイブプロフェンなどの非選択的シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤を投与することは PGE2 の作用を抑制して DA 閉鎖を促し、PDA 及び PDA 関連合併症の予防に効果があることが知られている。本邦では妊娠26週未満で出生した新生児及び呼吸急迫症候群 (RDS) による肺サーファクタント治療を受けた妊娠28週未満の早産児に PIND が行われている。一方で一部の早産児には予防的 IND 予防投与 (PIND) に抵抗性があり外科的治療による DA 閉鎖が必要になる症例が存在する。本研究では早産児における PIND に対する周産期不応予測因子を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】2009年から2019年に信州大学医学部附属病院で PIND が実施された妊娠週数28週未満の早産児についてカルテ記載を基に後方視的に検討した。PIND は出生後24時間以内に開始され IND (0.1 mg/kg/回) を6時間かけて持続投与され DA の閉塞が得られるまで、24時間毎に最大3回まで行われた。対象者は PIND への反応に対して「反応群」と「不応群」に分類した。評価項目は対象新生児について「性別」、「妊娠週数」、「出生体重」、「アプガースコア」、「RDS 治療歴」、「子宮内感染症」、「肺出血」、「慢性肺疾患 (CLD)」

「頭蓋内出血」、「脳室周囲白質軟化症 (PLV)」、「壊死性腸炎」、「敗血症」、「抗生剤投与」に加え、母体因子として「母体年齢」、「出産回数」、「妊娠契機」、「胎児数 (単胎・多胎)」、「母体合併症 (妊娠糖尿病、妊娠高血圧症、母体感染症)」を検討した。

【結果と考察】選択基準を満たした早産児は76例 (反応群42例、不応群34例) であった。反応群と不応群の間で、「多胎妊娠」と「子宮内感染症」で有意差が確認された。多胎例で不応群が反応群に比して有意に高かった (3例 [7.1%] vs 9例 [26.5%]; $P=0.029$)。子宮内感染症例についても PIND 不応群が有意に高い結果となった (2例 [4.8%] vs 8例 [23.5%]; $P=0.038$)。単変量ロジスティック回帰解析では多胎妊娠と子宮内感染症は PIND 不応と有意に相関し、多変量ロジスティック回帰分析において有意かつ独立した不応予測因子であった (OR 5.45, 95%CI 1.05-29.2, $P=0.044$)。伊藤らの報告では双胎羊の早産児において単胎羊と比較して DA 閉鎖に必要な内膜肥厚が遅いことを報告しており、今回得た結果を支持する結果となっている。また早産時の全身感染症は血中 PGE2 濃度を上昇させることが知られており、PIND 不応のリスクになっていると考えられる。

【結論】本研究の結果より、多胎妊娠は PIND 不応因子になることが示唆された。また子宮内感染症も PIND 不応因子なることが示唆され、これらのリスクを要する早産児に対しては早期に治療介入することが望ましいと考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

動脈管 (DA) は胎児が母胎内で正常発達するために主肺動脈から大動脈へのバイパス血管と機能する胎児循環の重要な要素であるが、出生後は不要となり早期に閉鎖する必要がある。しかし妊娠28週未満で出生した早産児では閉鎖しない状態が持続することがあり、肺血管抵抗の減少に伴い DA を介して大動脈から肺動脈へのシャント血流が増加し、心不全、肺鬱血、肺出血、壊死性腸炎 (NEC) を合併し新生児死亡率に強く関連する。本邦では妊娠26週未満で出生した新生児及び呼吸急迫症候群 (RDS) による肺サーファク

ント治療を受けた妊娠28週未満の早産児にPINDが行われている。一方で一部の早産児には予防的IND予防投与（PIND）に抵抗性があり外科的治療によるDA閉鎖が必要になる症例が存在する。本研究では早産児におけるPINDに対する周産期不応予測因子を調べた。

2009年から2019年に信州大学医学部附属病院でPINDが実施された76症例についてカルテ記載を基に後方視的に検討した。PINDへの反応に対して「反応群」と「不応群」に分類し、「性別」,「妊娠週数」,「出生体重」,「アプガースコア」,「RDS治療歴」,「子宮内感染症」,「肺出血」,「慢性肺疾患（CLD）」,「頭蓋内出血」,「脳室周囲白質軟化症（PLV）」,「壊死性腸炎」,「敗血症」,「抗生剤投与」に加え、母体因子として「母体年齢」,「出産回数」,「妊娠契機」,「胎児数（単胎・多胎）」,「母体合併症（妊娠糖尿病, 妊娠高血圧症, 母体感染症）」を検討した。

その結果、内海は次の結論を得た。

1. 「多胎妊娠」で不応群が反応群に比して有意に高かった。
2. 「子宮内感染症」についてもPIND不応群が有意に高かった。
3. 「慢性肺疾患」については反応群の方が有意に高く、前2項目と反対の結果であった。
4. 「多胎妊娠」と「子宮内感染症」は有意かつ独立した不応予測因子であった。

本研究の結果より、多胎妊娠はPIND不応因子になることが示唆された。また子宮内感染症もPIND不応因子になることが示唆され、臨床においてこれらのリスクを要する早産児に対しては早期に治療介入することが必要であることが示唆された。慢性肺疾患に対する嚴重な全身管理の結果PDA閉鎖に関与したことが考えられた。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。

Clinical and molecular features of patients with *COL1*-related disorders: Implications for the wider spectrum and the risk of vascular complications (*COL1*関連症候群における分子遺伝学的・臨床的検討)

武田 良 淳

(論文の内容の要旨)

【背景】 I型コラーゲンは $\alpha 1$ 鎖2本と $\alpha 2$ 鎖1本のヘテロ三量体によるtriple helix構造によって構成され、骨・軟骨、皮膚、心筋、血管壁などの結合組織に広く分布する。 $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖はそれぞれ*COL1A1*, *COL1A2*によりコードされ、転写、翻訳、翻訳後修飾の過程を経て成熟コラーゲン繊維を形成する。*COL1A1*, *COL1A2*変異により骨脆弱性を主徴とする骨形成不全症(OI)、皮膚脆弱性や関節過伸展を主徴とするEhlers-Danlos症候群(EDS)、OIとEDSの中間的な疾患概念である*COL1*-related overlap disorder(CIROD)など複数の先天性結合組織異常症を発症する。本研究では、臨床的にOIまたはEDSが疑われ、*COL1A1*または*COL1A2*に病的バリエーションを検出し確定診断した*COL1*関連症候群の臨床像および遺伝学的特徴を検討した。

【対象と方法】 臨床的にOIまたはEDSが疑われ、次世代シーケンサーを用いた*COL1A1*/*COL1A2*遺伝子解析で病的バリエーションを検出した15家系23症例を対象とした。末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーおよび結合組織疾患パネルによる解

析とPCRダイレクトシーケンス法によりバリエーションを検出、ACMG/AMPガイドラインによる評価でpathogenicまたはlikely pathogenicを病的バリエーションと判定した。

【結果】 <症例>性別は男性8例(35%)、女性15例(65%)、年齢分布は3歳から67歳(中央値26)で、20歳未満の小児例は10例(43%)、20歳以上の成人例は13例(57%)であった。臨床診断は骨脆弱性を主徴とするOI群が18例(78%)、関節・皮膚症状を主徴とするEDS群が5例(22%)で、EDSのサブタイプは多発関節弛緩型(aEDS)2例、古典型(cEDS)1例、血管型(vEDS)1例、vEDSまたはOIが1例であった。遺伝子解析による確定診断は、OI type Iまたは分類不能型OIが17例、4例がCIROD、1例が*COL1*関連cEDSであった。臨床像は極めて多彩であり、同一家系内においても多発骨折および青色強膜からOIと臨床診断される場合や先天性股関節脱臼や関節過伸展からaEDSと臨床診断される場合が認められた。

<*COL1A1*/*COL1A2*遺伝子解析>

15家系中11家系が*COL1A1*のミスセンス・ナンセ

ンス／フレームシフト・スプライスバリエント，4家系が *COLIA2* のミスセンス・スプライス・4塩基欠失バリエントであり，全て triple helical domain 内に位置していた。*COLIA1* の7家系と *COLIA2* の3家系は既報バリエントであり，このうち *COLIA1* の2家系と *COLIA2* の1家系は既報とは異なる臨床像を示していた。＜心臓・血管合併症＞心臓・血管合併症は23例中7例（22％）に合併し，1例が死亡した。脳動脈瘤，くも膜下出血，脳動脈解離，腹部大動脈瘤，心臓弁疾患，動静脈奇形と多彩であり，発症年齢は全例が20歳以上であった。

【考察】 *COLI* 関連症候群は，骨脆弱性を主徴とするOI，関節・皮膚症状を主徴とする *COLI* 関連EDS，両者の中間的な症状をもつCIRODと幅広い表現型を示した。*COLI* 関連EDSとCIRODのEDS群はOI群と比較して皮膚症状が顕著な傾向を示したが，OI群では骨折歴を除いてEDS群と大きな差を認めなかった。同一家系内でも臨床像は極めて多彩であり，骨折回数や心臓血管合併症などの年齢依存性の症状や，初発症状など年齢被依存性の症状の多様性を認めた。

CIRODで確認された3つのバリエントはすべて triple helical domain 内のN末端アンカー領域に位置し，同部位に生じる病的バリエントの結果，triple helix 構造の安定化や蛋白 folding が阻害されCIRODの症状を呈すると考えられた。CIRODにおける遺伝型—表現型相関は低く，epigenetic などさまざまな修飾因子が影響する可能性が考えられた。

I型コラーゲンは，心臓弁や動脈壁に高度に発現し，壁の構造と引張強度の維持に極めて重要である。脳動脈瘤において壁内に分布するI型コラーゲンのリモデリングが促進していること，OIに合併する大動脈解離において組織学的に嚢胞性内膜変性を認めることから，血管合併症の発症にI型コラーゲンの障害が関与している可能性が示唆された。今回の検討では確認されなかったが，*COLI* 関連cEDSにおいても重篤な血管合併症を発症することが報告されている。また，脳動脈瘤の合併頻度は31％（4/13例）と一般成人集団コホートにおける未破裂動脈瘤の有病率である0.5～3％と比較して有意に高値であった。これらの所見より，*COLI* 関連症候群におけるI型コラーゲンの生合成障害が血管合併症の発生に強く関与する可能性が考えられた。

β -blocker は心拍出量の減少による降圧効果に加え，動脈壁に対する脈動性ストレスを緩和させ動脈瘤や解

離の形成と進展を抑制する。同じ結合組織異常症である Marfan 症候群や Loyes-Diez 症候群，vEDS の血管合併症に対して β -blocker の有効性が報告されており，*COLI* 関連症候群の血管合併症に対しても有効である可能性が考えられた。

【結語】本研究では，CIRODを含む *COLI* 関連症候群の新規症例を報告し，OIおよび *COLI* 関連EDSとの臨床的・分子遺伝学的オーバーラップと同一家系内における表現度の多様性を示した。背景とする表現型に関わらず重篤な血管合併症を発症する可能性があるため，生涯にわたるサーベイランスおよび適切な治療介入が必要と考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

I型コラーゲン分子をコードする *COLIA1*，*COLIA2* 変異は，先天性結合組織異常症である骨形成不全症（OI），および Ehlers-Danlos 症候群（EDS）の4つの病型（古典型，血管型，多発関節弛緩型，心臓弁型）の原因である。近年，OIとEDSの中間的な疾患概念である *COLI*-related overlap disorder（CIROD）の概念が新たに提唱された。今回，*COLIA1* または *COLIA2* に病的バリエントを検出し確定診断した *COLI* 関連症候群の臨床像，遺伝学的特徴について検討した。

臨床的にOIまたはEDSが疑われ，*COLIA1*/*COLIA2* 病的バリエントを検出した症例の臨床症状，遺伝子解析結果，合併症に関するデータを収集した。

その結果，武田らは次の結論を得た。

1. 対象は15家系23症例，20歳未満の小児例は10例（43％），20歳以上の成人例は13例（57％）であった。臨床診断はOI群が18例（78％），EDS群が5例（22％）で，遺伝子解析による確定診断は，OI type I または分類不能型OIが17例，4例がCIROD，1例が *COLI* 関連古典型EDSであった。同一バリエント保有者の家系内において，臨床診断は父親がOI，長女および長男が多発関節弛緩型EDSと異なっていた。
2. 15家系中11家系が *COLIA1* のミスセンス・ナンセンス／フレームシフト・スプライスバリエント，4家系が *COLIA2* のミスセンス・スプライス・4塩基欠失バリエントであり，すべて triple helical domain 内に位置していた。CIRODのバリエントはすべて triple helical domain 内のN末端アンカー領域に位置していた。
3. 脳動脈瘤，くも膜下出血，脳動脈解離，脳梗塞，腹部大動脈瘤，大動脈解離，心臓弁疾患，動静脈奇

形などの心臓・血管合併症は23例中7例(22%)にみられ、全例が20歳以上での発症であった。脳動脈瘤は成人13例中4例(31%)にみられ、一般成人集団コホートにおける未破裂動脈瘤の有病率(0.5~3%)と比較して有意に高値であった。

これらの結果より、COL1関連症候群における臨床的・分子遺伝学的オーバーラップと同一家系内におけ

る表現度の多様性、遺伝学的診断の重要性が示された。背景とする表現型に関わらず重篤な血管合併症を発症する可能性があり、生涯にわたるサーベイランスおよび適切な治療介入が必要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。

Usefulness of breath-hold fat-suppressed T2-weighted images with deep learning-based reconstruction of the liver: comparison to conventional free-breathing turbo spin echo (深層学習再構成を用いた肝の呼吸停止下 T2強調画像の有用性：自由呼吸下高速スピネコー法との比較)

一 戸 記 人

(論文の内容の要旨)

【背景】肝の T2 強調画像は、自由呼吸下(呼吸同期)または複数の呼吸停止下で高速スピネコー法(turbo spin echo, TSE)等の multi-shot technique により撮像されることが多い。この撮像法は撮像時間が長く、モーションアーチファクトに弱いという短所がある。一方、超高速スピネコー法(half Fourier acquisition single-shot turbo spin echo, HASTE)等の single-shot technique が用いられることもある。この撮像法は、撮像時間が短く、モーションアーチファクトに強いという長所があるが、T2 blurring によりコントラストが低下するという短所がある。近年、アンダーサンプリングされた k 空間から deep learning (DL) を用いて MR 画像を再構成する方法が開発され、肝の T2 強調画像の撮像時間を短縮し、画質を向上させられることが報告されている。しかし、多くの報告では DL 再構成を用いた呼吸停止下 single-shot technique を評価しており、以下の2点が明らかにされていない：(1)従来法の自由呼吸下 multi-shot technique と比較して、DL 再構成を用いた呼吸停止下 multi-shot technique は有用か、(2)DL 再構成を用いた呼吸停止下 single-shot technique と DL 再構成を用いた呼吸停止下 multi-shot technique のいずれが有用であるか。本研究の目的は、従来法の自由呼吸下 TSE 法 (FB-TSE)、DL 再構成を用いた呼吸停止下 TSE 法 (BH-DL-TSE)、DL 再構成を用いた呼吸停止下 HASTE 法 (BH-DL-HASTE) の撮像時間や画質を比較することで、BH-DL-TSE や BH-DL-HASTE の有用性を評価することである。

【方法】2022年4月から5月に当院にて、肝疾患が疑われて3-T の撮像機器で T2 強調画像を撮像した111

症例を対象とした。また、これらの症例に認めた10 mm 以上の充実性病変58個も対象とした。FB-TSE、BH-DL-TSE、BH-DL-HASTE に関して、撮像時間と画質を比較した。画質評価は、2名の放射線科医の合議による5段階の定性評価、病変一肝信号比の定量評価を行った。3つの撮像法の画質に有意差があるか、Friedman 検定及びDunn の多重比較による統計解析を行った。

【結果】撮像時間は、FB-TSE で4分43秒±1分21秒(95%信頼区間4分28秒—4分58秒)、BH-DL-TSE で40秒、BH-DL-HASTE で20秒であった。肝の呼吸アーチファクトは、BH-DL-HASTE で、FB-TSE とBH-DL-TSE より有意に少なかった($p < 0.0001$)。FB-TSE とBH-DL-TSE は、BH-DL-HASTE と比較して、motion-related signal loss (MRSL) が有意に少なく、肝内脈管も明瞭であった($p < 0.0001$)。肝左葉辺縁(肝と胃の境界)の描出は、BH-DL-HASTE で最も良好で($p < 0.0001$)、BH-DL-TSE はFB-TSE より良好であった($p = 0.0290$)。肝右葉辺縁の描出、病変の明瞭性、病変一肝信号比では、3つの撮像法間で有意差を認めなかった($p = 0.1290, 0.5292, 0.6026$)。

【結語】BH-DL-TSE は、FB-TSE と比較して撮像時間が短く、画質も同等以上であり、従来法のFB-TSE を代替できる可能性がある。BH-DL-TSE とBH-DL-HASTE はそれぞれの長所があり、相補的に用いるべきと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

対象は、2022年4月から5月に当院にて肝疾患が疑われて3-T の撮像機器で T2 強調画像を撮像した111

症例である。また、これらの症例に認めた10 mm以上の充実性病変58個も対象とした。肝の脂肪抑制 T2強調画像の撮像に関して、従来法の自由呼吸下 TSE法 (FB-TSE)、Deep Learning (DL) 再構成を用いた呼吸停止下 TSE法 (BH-DL-TSE) および DL再構成を用いた呼吸停止下 HASTE法 (BH-DL-HASTE) の撮像時間や画質を比較した。画質評価は、2名の放射線科医の合議による5段階の定性評価、病変一肝信号比の定量評価を行った。3つの撮像法の画質に有意差があるか、Friedman 検定及び Dunn の多重比較による統計解析を行った。

撮像時間は、FB-TSEで4分43秒±1分21秒(95%信頼区間4分28秒—4分58秒)、BH-DL-TSEで40秒、BH-DL-HASTEで20秒であった。肝の呼吸アーチファクトは、BH-DL-HASTEで、FB-TSEとBH-DL-TSEより有意に少なかった ($p < 0.0001$)。FB-TSEとBH-DL-TSEは、BH-DL-HASTEと比較して、motion-related signal loss (MRSL) が有意に少なく、肝内脈管も明瞭であった ($p < 0.0001$)。肝左葉辺縁(肝と胃の境界)の描出は、BH-DL-HASTEで最も良好で ($p < 0.0001$)、BH-DL-TSEはFB-TSEより良好であった ($p = 0.0290$)。肝右葉辺縁の描出、病変の明瞭性、全病変一肝信号比、血管腫一肝信号比、非血管腫病変一肝信号比では、3つの撮像法間で有意差を認めなかった ($p = 0.1290, 0.5292, 0.6026, 0.9260, 0.5439$)。

その結果、一戸は次の結論を得た。

1. FB-TSEと比較して、BH-DL-TSEとBH-DL-HASTEの撮像時間は短かった。BH-DL-TSEはBH-DL-HASTEより撮像時間が長い、20秒の呼吸停止が1回多いだけの違いであり臨床的に許容範囲内である。
2. 肝の呼吸アーチファクトや肝左葉辺縁の描出の評価結果から、BH-DL-HASTEがモーションアーチファクトに最も強く、BH-DL-TSEはFB-TSEより呼吸以外のモーションアーチファクトに強いと考えられた。これは撮像時間の違いのためと推測される。
3. BH-DL-HASTEでMRSLが多く、脈管が不明瞭である要因としては、併用される variable flip angleに含まれる low flip angleが考えられた。
4. 肝病変のコントラストは、今回の撮像条件において3つの撮像法間では、定性的にも定量的にも同等であった。

これらの結果より、BH-DL-TSEは、FB-TSEと比較して撮像時間が短く、画質も同等以上で、従来法のFB-TSEを代替し検査時間を短縮できる可能性がある。また、BH-DL-TSEとBH-DL-HASTEはそれぞれの長所があり、相補的に用いることが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。

Histopathologically defined intestinal metaplasia in lesser curvature of corpus prior to *Helicobacter pylori* eradication is a risk factor for gastric cancer development (ヘリコバクター・ピロリ除菌療法前の胃体部小弯の組織学的腸上皮化生は除菌後胃癌のリスク因子である)

原 大 地

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染は胃癌発症のリスク因子である。*H. pylori* に対する除菌療法を施行することでわが国における胃癌の罹患率と死亡率は低下傾向である。しかし、除菌成功後も一定の割合で胃癌が発生するため、除菌後胃癌は臨床的に問題となっている。よって、発症のリスク因子を明らかにすることは重要な課題である。現在、リスク因子の一つとして除菌療法前の組織学的腸上皮化生の存在が報告されているが、腸上皮化生の分布や程度については明らかになっていない。本研究では、除菌後胃癌における除菌療法前の組織学的リスク因子を明らか

にすることを目的とした。

【対象と方法】 2004年から2018年までに信州大学医学部附属病院で、除菌療法前に updated Sydney System (USS) に基づき、胃より5点生検(前庭部小弯、前庭部大弯、胃角部小弯、体部小弯、体部大弯)もしくは培養目的の2点生検(前庭部大弯、体部大弯)を行い *H. pylori* 感染と診断し、その後除菌に成功した692例を対象とした。除菌時に40歳未満であった症例、除菌後12か月以上の経過観察ができていない症例、胃癌既往がある症例を除外した247例を解析した。除菌後胃癌は除菌後12か月以上経過した後に新規に診断したものと定義し、発症の有無で除菌後胃癌群と非胃癌

群に分類し、臨床病理学的特徴を比較検討した。組織学的評価は、USSに基づき各生検部位毎の萎縮スコアおよび化生スコアを評価し、また組織学的スコアと分布でステージングを行う The operative link on gastritis (OLGA), The operative link on gastric intestinal metaplasia (OLGIM) も評価した。

【結果】全247例中11例(4.5%)に除菌後胃癌を認めた。全症例の観察期間中央値は64か月(12-181か月)で、除菌後胃癌群11例(男性6例、年齢中央値67歳、観察期間中央値75か月)、非胃癌群236例(男性98例、年齢中央値63歳、観察期間中央値63か月)であった。内視鏡的高度萎縮は、除菌後胃癌群で90.9%(10/11例)に認めており、非胃癌群45.8%(108/236例)と比較して有意に高率($P<0.01$)であったが、USSによる各部位の組織学的萎縮スコアおよびOLGA III/IVの割合は両群で有意差を認めなかった。一方、組織学的化生スコアは除菌後胃癌群で全部位において有意に高値であり(いずれも $P<0.05$)、OLGIM III/IVの割合も除菌後胃癌群で有意に高率であった($P<0.05$)。各部位のUSS化生スコアおよびOLGIMが除菌後胃癌発症の予測に有効であるかROC解析を施行すると体部小彎のAUCが0.82と5点の中で最も高く、OLGIMのAUC(0.82)と相違なかった。体部小彎におけるUSS化生スコアのカットオフ値を2とした場合、スコア2以上の症例は2未満の症例と比較して有意に除菌後胃癌発症が多く、感度81.8%、特異度71.6%、オッズ比11.4であった。

【結論】除菌療法前の組織学的腸上皮化生は除菌後胃癌のリスク因子であった。特に体部小彎にUSSスコア2以上の化生を認める症例は除菌後胃癌のリスクが高く、除菌療法後も慎重な経過観察を行う必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) に対する除菌療法を施行することで、わが国における胃癌の罹患率と死亡率は低下傾向である。しかし、除菌成功後も一定の割合で胃癌が発生するため、除菌後胃癌は臨床的に問

題となっている。そのため、除菌後胃癌のリスク因子を明らかにすることは重要な課題である。そこで、除菌後胃癌における除菌療法前の組織学的リスク因子を検討した。信州大学医学部附属病院で、除菌療法前にupdated Sydney System (USS)に基づき、胃より5点生検(前庭部小彎、前庭部大彎、胃角部小彎、体部小彎、体部大彎)が施行された247例を解析した。除菌後胃癌は除菌後12か月以上経過した後に新規に診断したものと定義し、発症の有無で除菌後胃癌群と非胃癌群に分類し、臨床病理学的特徴を比較検討した。

その結果、原は次の結論を得た。

1. 全247例中11例(4.5%)に除菌後胃癌を認めた。
2. 内視鏡的高度萎縮は、除菌後胃癌群で90.9%(10/11例)に認めており、非胃癌群45.8%(108/236例)と比較して有意に高率($P<0.01$)であったが、USSによる各部位の組織学的萎縮スコアおよびOLGA III/IVの割合は両群で有意差を認めなかった。
3. 組織学的化生スコアは除菌後胃癌群で全部位において有意に高値であり(いずれも $P<0.05$)、OLGIM III/IVの割合も除菌後胃癌群で有意に高率であった($P<0.05$)。
4. 各部位のUSS化生スコアおよびOLGIMが除菌後胃癌発症の予測に有効であるかROC解析を施行すると体部小彎のAUCが0.82と5点の中で最も高く、OLGIMのAUC(0.82)と相違なかった。
5. 体部小彎におけるUSS化生スコアのカットオフ値を2とした場合、スコア2以上の症例は2未満の症例と比較して有意に除菌後胃癌発症が多く、感度81.8%、特異度71.6%、オッズ比11.4であった。

以上より、除菌療法前の組織学的腸上皮化生の存在は除菌後胃癌のリスク因子であり、特に体部小彎にUSSスコア2以上の化生を認める症例は除菌後胃癌のリスクが高いことを示した。本研究は、体部小彎1点の生検評価で除菌後胃癌リスクを評価できる可能性を示唆した。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。

Development of the rabbit NASH model resembling human NASH and atherosclerosis (ヒトNASHおよび動脈硬化を模したウサギNASHモデルの作出)

林 桃子

(論文の内容の要旨)

【背景及び目的】非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に対する有効な治療法は未だ確立されておらず、治療

薬の探索が急務である。これまで、ヒトNASHの研究にはマウスやラットなどのげっ歯類がモデル動物として多用されてきた。しかし、ヒトとこれらのげっ歯

類の間には様々な種差が存在しており、特に NASH の発症・進展に関与するリポタンパク質の動態および肝臓からのコレステロール排出に寄与する胆汁酸の組成、代謝についての差異は、モデル動物で得られた知見のヒトへの外挿性に大きな障壁となっていると考えられる。一方、心血管疾患 (CVD) は NASH 患者の主な死因の一つであり、CVD のリスク要因である動脈硬化は NASH 患者で有病率が高いことから、NASH と動脈硬化の両方に有効な治療法の開発が求められている。本研究では、リポタンパク質の動態ならびに胆汁酸の組成がげっ歯類に比べてヒトに近似するウサギを用いて、動脈硬化との同時評価が可能な NASH モデルの作出を目的とした。

【方法】 日本白色ウサギ (Kbs: JW) に特殊飼料 high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) を16週間給餌し、肝臓・大動脈の組織学的解析、血清・肝臓の生化学的指標による病態評価を行った。また、経時的な病態変化を検討するために HFHCD を 4, 8, 14 週間給餌した際と同評価項目および real-time PCR 法による肝臓の遺伝子発現解析を行った。

【結果】 HFHCD を給餌したウサギでは、血清の脂質異常および肝臓の顕著なコレステロール増加を認めた。肝組織像では、脂肪肝から肝細胞の膨化および炎症細胞の浸潤を伴う NASH, そして肝線維化に至る NASH の進展を示した。加えて、HFHCD 給餌 8 週目には大動脈における動脈硬化病変の形成が見られた。遺伝子解析では肝臓のコレステロールの取り込みおよび加水分解、炎症並びに線維化関連遺伝子の増加を認めた。加えて、ER ストレス、リポアポトーシスに関連する遺伝子発現の増加がみられたが、脂質過酸化マーカーである 4-HNE の有意な増加は認められなかった。

【結論】 本研究における HFHCD 投与ウサギ NASH モデルは、コレステロール優位の NASH 病態ならびに動脈硬化病変を呈した。本モデルはヒトの NASH および動脈硬化に対する治療法の探索に有用であると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に対する有効な治療法の探索のため、ヒト NASH の研究にはマウスやラットなどのげっ歯類がモデル動物として多用されてきた。しかしヒトとこれらのげっ歯類の間には NASH の発症・進展に関与するリポタンパク質の動態や肝臓からのコレステロール排出に寄与する胆汁酸の代謝に関わる種差が存在することから、げっ歯類の

NASH モデル動物で得られた知見のヒトへの外挿性に大きな障壁となっていると考えられる。一方、心血管疾患 (CVD) は NASH 患者の主な死因の一つであり、CVD のリスク要因である動脈硬化や高血圧は NASH 患者で有病率が高いことや CVD イベントの有意な増加が報告されていることから、NASH と動脈硬化を同時に治療法できる方法が必要となる。本研究では、リポタンパク質の動態ならびに胆汁酸の組成がげっ歯類に比べてヒトに近似するウサギを用いて、動脈硬化との同時評価が可能な NASH モデルの作出について検討した。

日本白色ウサギ (Kbs: JW) に特殊飼料 high-fat high-cholesterol diet (HFHCD) を16週間給餌し、肝臓・大動脈の組織学的解析、血清・肝臓の生化学的指標による病態評価を行った。また、経時的な病態変化を検討するために HFHCD を 4, 8, 14 週間給餌した際と同評価項目および real-time PCR 法による肝臓の遺伝子発現解析を行った。

その結果、林 桃子は次の結論を得た。

1. HFHCD によって血清の AST/ALT の上昇および脂質異常を呈した。肝臓ではコレステロール、総胆汁酸が顕著に増加した。
2. HFHCD は肝組織像において脂肪肝から肝細胞の膨化および炎症細胞の浸潤を伴う NASH, そして肝線維化に至る NASH の進展を示した。
3. HFHCD 8 週目には大動脈におけるプラークの形成を認め、14 週ではプラークの肥厚および泡沫細胞の集積を生じた。
4. 肝臓の遺伝子発現解析により、HFHCD では肝臓のコレステロールの取り込みおよび分解酵素の遺伝子発現が増加した。
5. HFHCD では炎症・線維化関連遺伝子、ER ストレスやリポアポトーシスに関連する遺伝子発現の増加がみられたが、脂質過酸化マーカーである 4-HNE の有意な増加は認められなかった

これらの結果より、本研究における HFHCD 投与ウサギ NASH モデルはコレステロール優位の NASH 病態ならびに動脈硬化病変を呈することから、本モデルはヒトの NASH および動脈硬化に対する治療法の探索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。

Correlations between the properties of saliva and metabolic syndrome: A prospective observational study (唾液性状とメタボリックシンドロームの関係性：前向き研究)

鈴木 大介

(論文の内容の要旨)

【目的】 歯周病とメタボリックシンドローム (以下 MetS) の間には密接な関連があると報告されている。歯周病などの口腔疾患は、唾液検査により低侵襲で容易に検査することが可能であり、MetS などの全身疾患との関連性が指摘されている。今回我々は、特定健診に加えて行う歯科検診に唾液検査を導入することにより、唾液性状の変化と MetS の構成要素の変化を横断的、縦断的に検討したので、その概要を報告する。

【対象および方法】 2017年と2018年に長野県塩尻市、安曇野市の特定健診と歯科検診の受診者を対象とした。特定健診は厚生労働省により示された標準プログラムに沿って行われた。唾液検査は、Salivary Multi Test (ライオン株式会社、以下 SMT) を使用し、唾液緩衝能、唾液 pH、唾液中の白血球、タンパク、潜血、アンモニア、齲蝕原因菌数について検査した。特定健診は、喫煙習慣や飲酒などの生活習慣の調査および高血圧、脂質異常、糖尿病治療薬の投薬の有無、身長、体重、腹囲、血圧、トリグリセリド、LDL/HDL コレステロール、HbA1c、クレアチニンについて検査が行われた。唾液検査結果の推移と MetS の構成要素の変化を統計的に検討した。

【結果】 特定健診受診者は2017年が7,848人、2018年が7,084人で、そのうち歯科健診受診者数は2017年が1,887人、平均年齢64.8歳、2018年が2,279人、平均年齢67.6歳であった。横断研究では、唾液緩衝能と HbA1c およびクレアチニンとの間に有意な関連を認めた。縦断研究では、唾液タンパクと HbA1c および高血圧との間に有意な関連を認め、唾液緩衝能とトリグリセリドとの間にも有意な関連を認めた。

【考察】・高血圧：唾液タンパクと高血圧には、有意な関連性を認めていた。前向き研究で、唾液タンパクの増加、歯周病と血圧の上昇は関連があるとの報告があり、歯周病と高血圧とのメカニズムははっきりしていないが、心疾患で増加する CRP や動脈硬化に関連する内皮マイクロパーティクルが寄与している可能性がある。

1. 糖尿病：縦断と横断研究で、唾液タンパクと HbA1c 値には有意な関連があり、唾液タンパクの上昇は唾液

分泌の減少や、歯周病の増加による炎症の増加によるものと考えられた。糖尿病患者では、有用な指標になると考えた。

2. 腎障害：血漿クレアチニンの上昇に伴い、pH の上昇と唾液緩衝能の上昇する相関関係を認めた。慢性腎不全の患者では唾液分泌の低下、唾液 pH、緩衝能が上昇していた。口腔内細菌による窒素化合物の分解はアンモニウムイオン、ひいてはアルカリ環境の増加を招いたのかもしれない。

3. メタボリックシンドローム：唾液緩衝能とトリグリセリドに相関関係を認めた。MetS の構成要素が増加するにつれて、pH が低下すると報告があり、唾液の緩衝能は、酵素や重炭酸、尿素、タンパクに影響を受ける。

4. SMT：SMT は、短時間で唾液検査項目を効率よく検査が可能であった。特定健診を利用することで、初めて大規模に、唾液検査が歯周病だけでなく、MetS のスクリーニングに利用できることを示すことができた。

【結論】 唾液性状と MetS の構成要素との間に有意な関連を認め、特定健診に唾液検査が有効である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

以前より、歯周病とメタボリックシンドローム (以下 MetS) の間には密接な関連があると報告されている。歯周病などの口腔疾患は、唾液検査により低侵襲で容易に検査することが可能であり、歯周病は MetS などの全身疾患との関連性が指摘されている。本研究の目的は、特定健診に加えて行う歯科検診に唾液検査を導入することにより、唾液性状と MetS の構成要素の関係について評価検討することである。

本研究では、2017年と2018年に長野県塩尻市、安曇野市の特定健診と歯科検診の受診者を対象とした。特定健診受診者は2017年が7,848人、2018年が7,084人で、そのうち歯科健診受診者数は2017年が1,887人、平均年齢64.8歳、2018年が2,279人、平均年齢67.6歳であった。横断研究は2017年に特定健診、歯科検診を受診した方を対象とした。縦断研究は2017、2018年に特定健診、歯科検診を受診した方を対象とし、781人平均年齢

65歳であった。唾液検査項目（唾液緩衝能、唾液 pH、唾液中の白血球、タンパク、潜血、アンモニア、齲蝕原因菌数）と特定健診項目および MetS の構成要素（喫煙習慣や飲酒などの生活習慣の調査および高血圧、脂質異常、糖尿病治療薬の投薬の有無、身長、体重、腹囲、血圧、トリグリセリド、LDL/HDL コレステロール、HbA1c、クレアチニン）の結果および変化を統計学的に検討した。

その結果、鈴木大介は次の結論を得た。

1. 高血圧：縦断研究にて、唾液タンパクと高血圧には、有意な関連性を認めた。
2. 糖尿病：縦断と横断研究で、唾液タンパクと HbA1c 値には有意な関連を認めた。
3. 腎障害：血漿クレアチニンの上昇に伴い、pH の

上昇と唾液緩衝能の上昇する相関関係を認めた。

4. メタボリックシンドローム：唾液緩衝能とトリグリセリドに相関関係を認めた。

5. 唾液検査に使用した Salivary Multi Test（ライオン株式会社、以下 SMT）：SMT は、5分という短時間で多数の唾液検査項目を効率よく網羅できた。特定検診を利用することで、初めて大規模に、唾液検査が歯周病だけでなく、MetS のスクリーニングに利用できることを示すことができた。

これらの結果により、唾液性状と MetS の構成要素との間に有意な関連を認め、特定検診に唾液検査が有効であ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。

Biocompatibility Evaluation of Carbon Nanohorns in Bone Tissues (Carbon nanohorns に対する骨組織での生体応答性評価)

上 田 勝 也

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Nanotechnology の進歩に伴い、Drug delivery system (DDS) キャリアとしての Nanoparticles に大きな関心が寄せられている。Carbon nanohorns (CNHs) は毒性が低く、表面修飾の容易性や薬剤内包の特徴的機構を持っている。我々は骨疾患に対する新規治療法の DDS キャリアとして CNHs を応用することを目標にしている。一方で CNHs 単独での骨組織に対する生物学的特性を評価した報告が少ないため、我々は同じ様な粒子径で表面、立体形状が異なる Carbon blacks (CBs) を比較対照に、骨関連細胞での *in vitro* 実験、*in vivo* 実験で生体応答性を評価した。

【材料及び方法】 滅菌済み CNHs と CBs を Bovine serum albumin と Hanks' balanced salt solution との分散剤下で 10 mg/mL となるように調製し、60分間超音波処理にて高分散溶液を作製し、*in vitro* 実験、*in vivo* 実験でベースサンプルとして使用した。*in vitro* 実験ではマウスマクロファージ様細胞株 Raw264細胞を破骨細胞に誘導し、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (骨芽細胞) と共に、細胞毒性や細胞内取り込みを評価した。更に細胞内への取り込みによる酵素活性や遺伝子発現への影響を評価した。加えて、骨芽細胞では石灰化機能への影響も評価した。*in vivo* 実験では、ウイスター系10週齢の雄性ラットの脛骨に

骨孔を作製し、CNHs と CBs を注入し12週後の骨再生を骨組織標本で評価した。

【結果】 *in vitro* 実験の細胞毒性評価では CNHs と CBs はどちらも破骨細胞、骨芽細胞の両細胞でシビアな細胞毒性を示さなかった。また細胞内取り込み評価では両細胞内で CNHs と CBs とともに Lysosome に取り込まれていた。そして、興味深い事に細胞毒性が見られない濃度において、CNHs 群でのみ破骨細胞の Tartrate-resistant acid phosphatase 活性および分化マーカー遺伝子の発現を低下させた。一方で、骨芽細胞では CNHs 群だけが Alkaline phosphatase 活性と分化マーカー遺伝子の発現を上昇させた。更に骨芽細胞の石灰化条件下では、CNHs は石灰化結節を増加させ、細胞内外の石灰化小胞に取り込まれ結晶核となっている状態を確認した。CBs 群では両細胞において酵素活性や分化マーカーに影響を及ぼさなかった。また *in vivo* 実験では CNHs 群でのみ骨再生が有意に促進しており、CNHs が骨基質や骨小腔内に局在している状態が見られた。

【結論】 これらの結果は、エストロゲン低下やがん細胞由来の炎症性物質により破骨細胞の増殖、活性化による骨溶解を主体とした骨粗鬆症やがん骨転移などの骨疾患に対して、破骨細胞の抑制、骨芽細胞の成熟促進による骨再生などの副次的な効果をもつ新規治療法の DDS キャリアとして応用できる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

骨疾患に対する新規治療法の Drug delivery system (DDS) キャリアとして Carbon nanohorns (CNHs) を応用することを目標としている。一方で CNHs 単独での骨組織に対する生物学的特性を評価した報告が少ないため、同じ様な粒子径で表面、立体形状が異なる Carbon blacks (CBs) を比較対照に、骨関連細胞での *in vitro* 実験、*in vivo* 実験で生体応答性を評価した。

評価項目は、*in vitro* 実験で細胞毒性や細胞内取り込み、CNHs や CBs の取り込みによる酵素活性や遺伝子発現への影響、石灰化機能を評価した。更に *in vivo* 実験でラット脛骨での CNHs や CBs 暴露による、12週後の骨再生を評価した。

その結果、上田は次の結論を得た。

1. 細胞毒性評価では CNHs と CBs はどちらも破骨細胞、骨芽細胞の両細胞でシビアな細胞毒性を示さなかった。
2. 細胞内取り込み評価では CNHs と CBs は両細胞の Lysosome に蓄積していた。
3. 細胞毒性が見られない濃度では、CNHs 群で破骨細胞の Tartrate-resistant acid phosphatase 活性お

よび分化マーカー遺伝子の発現を低下させた。一方で、骨芽細胞では CNHs 群だけが Alkaline phosphatase 活性と分化マーカーの発現を上昇させた。加えて、CBs 群では両細胞では酵素活性や分化マーカーに影響を及ぼさなかった。

4. 骨芽細胞の石灰化条件下では、CNHs は石灰化結節を増加させ、細胞内外の石灰化小胞に取り込まれ結晶核の生成が起きていた。

5. *in vivo* 実験では CNHs 群でのみ骨再生が有意に促進しており、CNHs が骨基質や骨小腔内に局在した状態が見られた。

以上の結果から、CNHs は医療応用に対する重要な細胞毒性を示さず、*in vivo* 実験では創傷治癒を促進した。更に *in vitro* 実験では CNHs は破骨細胞の分化を抑制し、骨芽細胞の分化、石灰化を促進した。これらのことから、CNHs は骨組織への生体適合性が高く、破骨細胞による骨溶解が促進される骨疾患において、骨再生を促進する様な付加価値を有する DDS キャリアとして開発できる可能性が明らかとなった。よって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Cold stress-induced bladder overactivity in type 2 diabetic mellitus rats is mitigated by the combination of a M_3 -muscarinic antagonist and a β_3 -adrenergic agonist (冷えストレスに起因する 2 型糖尿病ラット排尿筋過活動に対する M_3 ムスカリン受容体拮抗薬と β_3 アドレナリン受容体作動薬の併用による抑制効果)

原 寛 彰

(論文の内容の要旨)

【背景・目的】 過活動膀胱 (OAB) は、尿意切迫感を主とした症状症候群であり頻尿をともなう下部尿路症状のひとつである。OAB に対する治療は、排尿筋収縮を抑制するムスカリン受容体拮抗薬 (以下、抗コリン薬)、あるいは、排尿筋弛緩を促進する β_3 アドレナリン受容体作動薬 (以下、 β_3 作動薬) を中心とした薬物療法が行われる。しかし、抗コリン薬は、口渇や便秘などの副作用から、 β_3 作動薬は、OAB 抑制機序について十分に解明されていないことから、それぞれ長期投与や増量が制限される場合が多い。そこで、低用量での抗コリン薬と β_3 作動薬との併用療法は、副作用を低減させるとともに長期間の治療が可能と考えられる。

2 型糖尿病患者の約 20 % が OAB 症状を有するこ

とが知られている。また、薬物治療に抵抗性を呈するため、治療に難渋する症例が多く、一過性の要因、例えば、寒冷季節などにおける「冷えストレス」によっても増悪する。糖尿病患者の OAB 症状に対して、低用量での抗コリン薬と β_3 作動薬との併用療法は、非常に有効だと考えられる。本研究では、2 型糖尿病モデルラット (Goto-Kakizaki : GK ラット) を用いて、抗コリン薬と β_3 作動薬との併用療法は、冷えストレスを模倣した急激な低温への暴露によって起因する排尿筋過活動を緩和できるかを検討した。

【方法】 10 週齢雌 GK ラットを 4 週間高脂肪飼料で飼育した。飼育後、膀胱内圧測定 2 日前に、内圧測定用のカテーテルを膀胱に、薬物投与用カテーテルを腹腔内にそれぞれ留置して、対照薬投与群、0.1、または、1.0 mg/kg 抗コリン薬 (ソリフェナシン) 単剤投与

群, 0.1, または, 1.0 mg/kg β_3 作動薬 (ミラベグロン) 単剤投与群, 0.1 mg/kg ソリフェナシンとミラベグロン併用投与群, あるいは, 1.0 mg/kg ソリフェナシンとミラベグロン併用投与群に分けた (各群 n = 6)。膀胱内圧測定は, 内圧測定用のカテーテルを介して定時速度 (10 ml/hr) の生理食塩水を連続的に膀胱内注入して, 蓄尿時膀胱基底圧, 排尿時膀胱収縮圧, 排尿間隔時間, 一回排尿量を記録した。最初に, 室温 (27 ± 2 °C) 下で膀胱内圧測定を行った後, 薬物投与用カテーテルから各薬剤を腹腔内投与した。投与10分後に測定を再開して薬剤投与後の膀胱機能を記録した。続いて, ラットを低温環境 (4 ± 2 °C) に速やかに移して, 40分間の膀胱内圧測定を行った。ラットを再び室温に戻して測定を終了した。その後, 膀胱を摘出して M₃ムスカリン受容体, および, β_3 アドレナリン受容体の組織学的解析を行った。また, 4週間高脂肪飼料で飼育した別の GK ラット (n = 12) の膀胱で M₃ムスカリン受容体, および, β_3 アドレナリン受容体の遺伝子発現解析を行った。

【結果】 室温下では, 各薬剤投与による膀胱機能の変化が認められなかった。対照薬群, ソリフェナシン単剤投与, ミラベグロン単剤投与, あるいは, 低用量併用群では, 室温から低温下へ移行すると排尿間隔時間の短縮と膀胱容量の減少を呈する排尿筋過活動が認められた。しかし, 高用量併用群では, 低温下へ移行したとき, 排尿間隔時間の短縮 (約 -15 %) と膀胱容量の減少 (約 -7 %) は, 対照薬群の排尿間隔時間の短縮 (約 -46 %) と膀胱容量の減少 (約 -42 %), および, 低用量併用群の排尿間隔時間の短縮 (約 -55 %) と膀胱容量の減少 (約 -46 %) と比較して有意に抑制されており, 排尿筋過活動の一部が抑制された。

GK ラットの膀胱組織内において, M₃ムスカリン受容体と β_3 アドレナリン受容体の発現は, ウロプラキンⅢ陽性尿路上皮層, α 平滑筋アクチン陽性排尿筋層, カルシトニン遺伝子関連ペプチド陽性求心性神経細胞での発現が認められた。また, M₃ムスカリン受容体 mRNA は, β_3 アドレナリン受容体 mRNA よりも高い発現量を示した。

【考察】 健常 Sprague Dawley ラットと 4週間高脂肪飼料飼育の健常 Wister Kyoto ラットの冷えストレス排尿筋過活動は, 抗コリン薬によって抑制されないが, β_3 作動薬によって抑制される。つまり, 健常ラットでの冷えストレス排尿筋過活動の機序では, M₃ムスカリン受容体を介する排尿反射経路よりも β_3 アドレナ

リン受容体を介する排尿反射経路の関与が示唆されている。一方で, 病態モデル動物の一つである自然高血圧発症ラットでは, GK ラットで効果が認められなかった低用量の抗コリン薬と β_3 作動薬との併用投与により冷えストレス排尿筋過活動が抑制される。したがって, 冷えストレス排尿筋過活動は, 末梢神経障害などによる神経原性要因, 膀胱血流障害などによる筋原性要因など基礎疾患に影響を受ける複数の機序が存在すると考えられた。

抗コリン薬による薬物治療を受けている OAB 患者の約 80 % が副作用を訴えると報告されている。抗コリン薬と β_3 作動薬の併用療法は, 副作用を低減, 回避しながら長期投与を可能にして, 患者の QOL を向上, 改善させることが期待できる。

【結語】 GK ラットの冷えストレス排尿筋過活動は, 1.0 mg/kg 抗コリン薬と 1.0 mg/kg β_3 作動薬との併用投与によって, 一部抑制されることが示された。GK ラットの膀胱内において, M₃ムスカリン受容体, β_3 アドレナリン受容体は, 尿路上皮層, 平滑筋層, 求心性神経細胞での発現を認めるとともに, M₃ムスカリン受容体は, β_3 アドレナリン受容体よりも高発現であることを示した。

(論文審査の結果の要旨)

過活動膀胱 (OAB) 症状に対しては, ムスカリン受容体拮抗薬 (以下, 抗コリン薬) や β_3 アドレナリン受容体作動薬 (以下, β_3 作動薬) を中心とした薬物治療が行われる。しかし, 各薬剤の増量や長期投与には, 副作用などにより制限が生じる場合がある。そこで, 低用量での抗コリン薬と β_3 作動薬の併用療法は, 副作用を低減させるとともに長期間の治療が可能と考える。2型糖尿病患者の約 20 % が OAB 症状を有しているとの報告がある。また, 薬物治療に抵抗性を呈するため, 治療に難渋する症例が多い。実臨床において, 寒冷刺激 (冷えストレス) によって糖尿病患者の OAB 症状が増悪することをしばしば経験する。糖尿病患者の OAB 症状に対して, 低用量での抗コリン薬と β_3 作動薬との併用療法は, 非常に有効であると考えられる。本研究では, 2型糖尿病モデルラット (Goto-Kakizaki : GK ラット) を用いて, 抗コリン薬と β_3 作動薬との併用療法は, 冷えストレスに起因する排尿筋過活動を緩和できるかを検討した。

10週齢の雌 GK ラットを高脂肪飼料で 4週間飼育した後, 膀胱内圧測定を実施した。まず, 室温 (27 ± 2 °C) 下で測定を開始して投薬前の膀胱機能を記録し,

対照薬, 抗コリン薬 (0.1, または, 1.0 mg/kg ソリフェナシン), β_3 作動薬 (0.1, または, 1.0 mg/kg ミラベグロン), あるいは, ソリフェナシンとミラベグロンの併用薬 (それぞれ0.1 mg/kg 併用と1.0 mg/kg 併用) を腹腔内投与した (各 n = 6)。投与10分後に室温下で測定を再開して投薬後の膀胱機能を記録した後, ラットを低温 ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) に速やかに移して膀胱機能の測定を継続した。膀胱内圧測定後に膀胱を摘出して M_3 ムスカリン受容体および β_3 アドレナリン受容体の発現を解析した。

その結果, 原は次の結論を得た。

1. 低温下へ移行後, 対照薬投与群, ソリフェナシン単剤投与群, ミラベグロン単剤投与群, または, 低用量ソリフェナシンとミラベグロン併用投与群では, 排尿間隔時間の短縮, および, 膀胱容量の減少を呈する排尿筋過活動を示した。
2. 高用量でのソリフェナシンとミラベグロンを併用投与した GK ラットは, 低温下へ移行後, 排尿間隔

時間の短縮, および, 膀胱容量の減少は, 対照薬投与群と低用量併用薬投与群より抑制されており, 排尿筋過活動の一部抑制を示した。

3. 膀胱内の尿路上皮層, 平滑筋層, 求心神経細胞において, M_3 ムスカリン受容体, β_3 アドレナリン受容体の発現を示した。
4. GK ラットの膀胱内において, M_3 ムスカリン受容体は, β_3 アドレナリン受容体よりも高い発現量を示した。

これらの結果から, 2型糖尿病モデルラットの冷えストレスに起因する排尿筋過活動は, 単剤でのソリフェナシンとミラベグロンで抑制されないが, それら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。抗コリン薬と β_3 作動薬との併用療法は, 副作用を低減するとともに長期間の治療が可能である有効な治療になると結論を得た。よって, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文としての価値があるものと認めた。

Analysis of the effect of brexpiprazole on sleep architecture in patients with schizophrenia: a preliminary study (統合失調症患者の睡眠構築に対するブレクスピプラゾールの効果の分析: 予備研究)

荒井 勇 輔

(論文の内容の要旨)

【背景】非定型抗精神病薬ブレクスピプラゾールは日本では統合失調症の治療薬として広く用いられている。これまでの研究で, いくつかの抗精神病薬の睡眠変数に対する治療効果が検討されているが, 我々の知る限り, ブレクスピプラゾールの睡眠変数に対する影響は, 統合失調症患者において検討されていない。この研究の目的は, 統合失調症患者において, 睡眠ポリグラフで測定した睡眠変数に対するブレクスピプラゾールの影響を探索的に検討することであった。

【方法】この研究の対象は, もともとハロペリドール単独で治療を受けていた統合失調症患者10名であった。参加者の睡眠変数はポリソムノグラフィーを用いて測定された。研究基準に合致しない患者を除外した後, 7名 (男性5名, 女性2名, 平均年齢 [標準偏差]: 59.0 [10.0] 歳) がさらなる分析に適格であった。ポリソムノグラフィーは, 参加者がハロペリドールに加えてブレクスピプラゾールを処方された4週間後に繰り返された。ポリソムノグラフィーを用いて測定した参加者の睡眠変数を, ブレクスピプラゾール服用前と

服用後で比較した。

【結果】ブレクスピプラゾールの追加投与は, $P < 0.05$ の名目上の有意水準において, 急速眼球運動潜時を有意に延長し, N2期およびN3期の睡眠時間および割合 (分, %) を増加させ, 急速眼球運動期の睡眠時間および割合 (分, %) を減少させた。

【結論】多重比較の補正後では有意ではなかったが, 今回の結果から, ブレクスピプラゾールの上乘せは統合失調症患者の睡眠構造を変化させる可能性があることが示された。今後, これらの結果を再現し, ブレクスピプラゾールが睡眠に及ぼす有益な影響についてさらに検討することが望まれる。

(論文審査の結果の要旨)

非定型抗精神病薬ブレクスピプラゾールは日本では統合失調症の治療薬として広く用いられている。これまでの研究で, いくつかの抗精神病薬の睡眠変数に対する治療効果が検討されているが, 我々の知る限り, ブレクスピプラゾールの睡眠変数に対する影響は, 統合失調症患者において検討されていない。本研究では統合失調症患者の睡眠構築に対するブレクスピプラ

ゾールの影響を探索的に検討した。

被験者はハロペリドール単独で治療を受けていた統合失調症患者10名とした。研究の適格基準を満たした7例（男性5名，女性2名，平均年齢 [SD] 59.0 [10.0] 歳）に対し，プレクスピプラゾールを4週間上乗せ投与した。プレクスピプラゾール服用前と服用後の終夜睡眠ポリグラフを測定し，睡眠構築を比較した。また，全ての終夜睡眠ポリグラフは2夜連続して行い，第2夜のデータを検定の対象とした。

その結果，プレクスピプラゾール上乗せ後の睡眠構築の変化は以下のとおりであった。

1. REM 潜時の延長
2. Stage N2および N3の時間と割合の増加
3. Stage REM の時間と割合の減少

多重比較の補正後では有意ではなかったが，今回の結果から，プレクスピプラゾールの上乗せは統合失調症患者の睡眠構築を変化させる可能性があることが示された。これは，プレクスピプラゾールが統合失調症患者の睡眠にポジティブな影響を与える可能性を示唆しており，臨床精神医学での薬物療法に有益な示唆を与えうる。よって，主査，副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Assessment of Left Atrial Deformation in Patients with Total Anomalous Pulmonary Venous Connection by Two-Dimensional Speckle-Tracking Echocardiography (2D speckle tracking 法を用いた総肺静脈還流異常症の左房機能解析)

沼田 隆 佑

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 総肺静脈還流異常症（以下，TAPVC）は先天性心疾患の約1-3%に発生する稀な先天性心疾患である。既報では，左心系の発育異常や左室拡張能異常を生じると報告されている。我々は，TAPVC患者が，出生前から左心系への血流が減少することにより，左房の発育のみならず左房機能にも影響を与えると仮定した。今回，我々はTAPVC患者の左房機能を経胸壁心エコーの2D speckle tracking 法を用いて解析し，経年的な変化も踏まえ検討を行った。

【方法】 2009年1月1日から2022年1月1日の間に当院で新生児期に手術を行った孤立性TAPVC患者を対象に，単一施設の後ろ向きコホート研究を実施した。TAPVC患者の左房機能を手術前（n=28），フォローアップとして1-2歳（n=24），5-7歳（n=13）の3群それぞれで解析し，年齢をマッチさせた健常対象者（2009年1月～2022年1月）の左房機能と比較検討した。左房機能はストレイン（=歪み）の解析としてQLAB[®]を用いてreservoir, conduit, contractile 機能に分けそれぞれを評価した。また，左房圧に関しては術後の定期心臓カテテル検査で評価した。

【結果】 TAPVC患者はコントロール群に比し，術前の左房最大容積が有意に小さかった。また，TAPVC患者は術後経年的に左房最大容積が正常に復し，左房最小容積はコントロール群よりも有意に増大した。2D speckle tracking 法で求めた左房機能（ストレイン）はすべての時点で，コントロール群に比しreservoir,

conduit, contractile 機能が全て低下していた（TAPVC患者群 vs コントロール群, reservoir, conduit, and contractile 機能の中央値；術前：17.0% vs. 26.0%, 12.9% vs. 15.9%, and 6.3% vs. 10.4%；1-2歳：30.0% vs. 45.7%, 23.2% vs. 29.6%, and 6.1% vs. 16.3%；5-7歳：31.2% vs. 43.1%, 25.0% vs. 31.2%, and 5.2% vs. 10.8%；p<.05）。修復術により左心系への血流が適正化された後も，contractile 機能は経年的に有意な改善が得られなかった（contractile 機能の中央値；6.0%→5.9%）。また，出生時に肺静脈閉塞を来していた患者は，そうでない患者に比し，reservoir および conduit 機能が有意に低下しており，左房圧も有意に高かった。

【結論】 TAPVC患者は生まれつき左房機能が低下しており，修復後も持続する事が明らかとなった。特に，左房最大容積が正常に復したにも関わらず，左房機能の特に contractile 機能の低下が出生時から修復後まで持続することが示された。このような患者群は加齢に伴い，「収縮性が保たれた拡張機能低下による心不全（=Heart failure with preserved ejection fraction）」へ早期に進行することが懸念される。

(論文審査の結果の要旨)

総肺静脈還流異常症（TAPVC）は左心系の発育異常や左室拡張能異常を生じると報告されている。肺静脈が左房に接続しないことに起因する胎児期の左心系への血流減少が原因で，左房の発育のみならず左房機能にも影響を与えると仮定した。今回，我々はTAPVC患

者の左房機能を経胸壁心エコーの2D speckle tracking法を用いて詳細に解析した。

2009年1月1日から2022年1月1日の間に当院で新生児期に手術を行った孤立性 TAPVC 患者の左房機能を、手術前 (n=28), フォローアップとして1-2歳 (n=24), 5-7歳 (n=13) の3群に分け、年齢をマッチさせた健常対象者の左房機能と比較検討した。

その結果、沼田らは次の結論を得た。

1. TAPVC 患者は正常コントロール群に比し、術前の左房最大容積係数および左房最小容積係数が有意に小さかった。TAPVC 患者は、術後に経年的に左房最大容積係数が正常にまで復した。
2. 2D speckle tracking 法で求めた左房機能の reservoir, conduit, contractile 機能は、全て TAPVC 群で正常コントロールに比し有意に低下していた。
3. TAPVC 患者は術後、reservoir, conduit 機能は

経年的に改善傾向となるが、contractile 機能のみ有意な改善を認めなかった。

4. 出生時に肺静脈閉塞を来した患者は、そうでない患者に比し、reservoir, conduit 機能が有意に低下しており、左房圧も有意に高かった。

これらの結果より、TAPVC 患者は生まれつき左房固有の機能が低下しており、修復後も持続することが明らかとなった。左房容積が正常に復したにも関わらず、左房機能の特に contractile 機能の低下が修復後まで持続することが示された。このような患者群は「収縮性が保たれた拡張能低下による心不全 (=Heart failure with preserved ejection fraction)」の患者特性と類似しており、加齢に伴い早期に同様の病態へ進行することが懸念される。よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Role of advanced glycation end products in the longitudinal association between muscular strength and psychotic symptoms among adolescents (思春期の筋力と精神病症状の縦断関連における最終糖化産物の意義)

鈴木 一 浩

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】統合失調症は思春期から青年早期に発症し、思考障害を生じて幻覚や妄想といった陽性症状、意欲の減退や集中力の低下といった陰性症状を呈する疾患である。ひとたび発症すると再燃を繰り返しつつ進行し、認知機能低下をきたすことから長期予後改善のために早期介入が重要と考えられているが、発症の好発期である思春期に発症の兆候を捉えることは容易ではない。抗精神病薬が開発される以前から、統合失調症患者にはやせ型が多いことが報告されている。さらに、近年これを裏付けるように徴兵時から24年間追跡した100万人規模のコホート研究により、10代後半の低筋力はその後の統合失調症の発症リスクとなること、後の人生の自殺リスクを有意に上昇させることが報告されている。しかしながら、これまでに低筋力と精神疾患の発症を繋ぐ生物学的なメカニズムについてはっきりとしたことはわかっていない。

これまでに統合失調症患者の中で、血中の終末糖化産物 (Advanced glycation end products: AGEs) が増加する一群が存在し、これらの群では抗精神病薬への治療反応が乏しく治療抵抗性であることが示されている。AGEs はグルコース代謝により生じる反応性カ

ルボニル化合物 (Reactive carbonyl compounds: RCOs) とタンパク質や脂質、DNA などの非酵素的なメイラード反応により生じる物質であり、一度形成されると不可逆的で糖尿病合併症や骨粗鬆症、認知症といった全身性の多様な機能障害を生じさせることが知られ、統合失調症の病態においても AGEs が関与する可能性があると考えられている。

筋組織は肝臓とならび生体内における最大のグルコース吸収器官であり、同時に RCOs を解毒代謝することで抗糖化作用を有するビタミン B6 の最大の貯蔵器官である。これまで成人において低筋力と AGEs 上昇が横断的に関連することは報告されているが、縦断的な調査はほとんど報告されていない。以上の背景のもと、本論文では思春期における低筋力が AGEs の上昇を引き起こし、それが精神病発症に関与するのではないかという仮説について、縦断疫学的な関連性について検討を行った。

【方法と結果】本研究は、世田谷、三鷹、調布の3都市にて実施されている10歳時点からの成長発達を追う人口集団出生コホート研究である東京ティーンコホート調査を用いた。10歳時点で参加した3,171人のうち、12歳・14歳時に尿検体を採取した1,542人の児童を対

象とした。まず、12歳時と14歳時の2時点において、全身の筋力の指標として握力を、生体内の AGEs 指標として早朝第一尿中のペントシジン値を測定した。握力と尿中ペントシジン値についての交差的時間差相関分析を行い縦断的、因果的方向性を検討した結果、BMI の影響とは別に、12歳時の筋力が低いほど14歳時の AGEs が上昇していた ($\beta = -0.20$, $p < 0.001$)。一方で、12歳時の AGEs と14歳時の筋力との縦断的関連性は認められなかった ($\beta = 0.04$, $p = 0.062$)。本結果より、低筋力が持続することにより AGEs が上昇するという縦断的関連が示唆された。次に、12歳・13歳・14歳の3時点においてデータを採取したサブサンプルの256人において、12歳時の低筋力が13歳時の AGEs 上昇を介して14歳時の精神病症状を生じるといふ仮説についてパス解析を行った。精神病症状は、親に対する質問紙である Child behavior checklist を調査し、後の精神病症状発症との関連が示されている下位項目である思考の問題を本研究におけるアウトカムとして検討を行った。結果、12歳時の低筋力と14歳時の精神病症状の間に媒介因子として13歳時の AGEs が関与する可能性があるという仮説についての十分に説明可能なモデル適合が得られた (CFI=0.971, RMSEA=0.057)。これらの結果から、これまでに繰り返し報告されている低筋力と統合失調症の関連性には、低筋力が AGEs の上昇を生じることで後の精神病症状と引き起こす可能性があると考えられた。

【結論】 思春期はライフステージの中でも神経発達が最も活発な時期であり、この時期の神経発達の障害は後の生涯を通じて長期的な影響を及ぼす。精神疾患は早期介入と早期からの社会的支援が予後において最も重要である。本研究結果より、早期発見のためには低筋力の児童を注意深く見守る必要性が高いと考えられた。

また、本報告は統合失調症と低筋力を結び付け、その生物学的メカニズムとしての AGEs の役割を検討した初めての研究である。統合失調症患者における AGEs 上昇は、これまで抗精神病薬の内服により糖代謝異常が生じた影響と考えられていたが、発症前からの変化を捉えた本研究の結果より、発症に先行し AGEs が上昇する可能性が示された。病態進行予防の観点からも AGEs は有効な治療標的となりうることから、今後さらなる研究が必要になると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

10歳時点からの成長発達を追う世田谷、三鷹、調布の3都市にて実施されている人口集団出生コホート研究の東京ティーンコホート調査を用いた。10歳時点で参加した3,171人のうち、12歳・14歳時に尿検体を採取した1,542人の児童を対象とし、12歳時と14歳時の2時点において、全身の筋力の指標として握力を、生体内の AGEs 指標として早朝第一尿中のペントシジン値を測定した。

まず、握力と尿中ペントシジン値についての交差的時間差相関分析を行い縦断的、因果的方向性を検討した結果、BMI の影響とは別に、12歳時の筋力が低いほど14歳時の AGEs が上昇していた ($\beta = -0.20$, $p < 0.001$)。一方で、12歳時の AGEs と14歳時の筋力との縦断的関連性は認められなかった ($\beta = 0.04$, $p = 0.062$)。本結果から、12歳から14歳の時期においては、低筋力が AGEs を上昇させるという縦断的関連性が示唆された。

次にこの結果をもとに、12歳・13歳・14歳の3時点においてデータを採取したサブサンプル256人において、12歳時の低筋力が13歳時の AGEs 上昇を介して14歳時の精神病症状を生じるといふ仮説を立ててパス解析を行った。精神病症状は、親に対する質問紙である Child behavior checklist を調査し、後の精神病症状発症との関連が示されている下位項目の思考の問題をアウトカムとした。結果、12歳時の低筋力と14歳時の精神病症状の間に、媒介因子として13歳時の AGEs が関与する可能性について、十分に説明可能なモデル適合が得られた (CFI=0.971, RMSEA=0.057)。

これらの結果から、鈴木は、これまでに繰り返し報告されている低筋力と統合失調症の関連は、低筋力が AGEs の上昇を生じさせ、それによって後の精神病症状と引き起こす可能性があるという結論を得た。

本報告は統合失調症と低筋力を結び付け、その生物学的メカニズムとしての AGEs の役割について検討した初めての疫学研究であり、統合失調症患者における AGEs 上昇が発症に先行して生じる可能性を示唆するものである。病態進行予防の観点からも AGEs は有効な治療標的となりうると思われる。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。

Early phase increase in serum TIMP-1 in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (遅発性拡散低下を伴う二相性急性脳症患者における急性期血清 TIMP-1値の上昇)

河西 彩香

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 遅発性拡散低下を伴う二相性急性脳症 (AESD) は日本で最も多い急性脳症症候群で、発症率は100~200人/年と報告されている。生命予後は良好であるものの、約60%の患者で神経学的後遺症を残す重篤な病型である。AESDの初発症状は発熱当日または翌日に出現するけいれんで、多くは重積する(一相目)。意識状態は一旦改善するものの、第3~7病日に再度けいれんや意識障害を認め、頭部MRI検査にて拡散能低下所見を認める(二相目)。AESDの病態の中心は、けいれん毒性に伴う遅発性神経細胞死と考えられているが、詳細は不明である。

Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) は細胞外マトリックスを分解するメタロプロテアーゼの一種で、好中球、マクロファージ、血管内皮細胞などから産生される。MMP-9は血液脳関門の血管基底膜を障害するため、血液脳関門に対する攻撃因子として知られている。Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) は、血管内皮細胞、神経芽細胞、滑膜細胞、CD4陽性T細胞、マクロファージなどから産生される糖タンパク質である。TIMP-1はMMP-9の内因性阻害因子として知られており、MMP-9による血液脳関門の障害を抑制するため、血液脳関門に対する防御因子と考えられている。種々の急性脳炎・脳症では、血清MMP-9/TIMP-1比の上昇、およびそれに伴う血液脳関門の破綻が病態に関与している可能性が報告されているが、AESDでの報告はほとんどない。

AESDの病態に対するMMP-9、TIMP-1、およびそれらに関連するサイトカインの関与を明らかにすることを目的とし、AESDの一相目と二相目の患者、および比較対照として良性疾患である熱性けいれん重積(PFs)患者を対象として、血清・髄液中のMMP-9、TIMP-1、およびサイトカイン値を検討した。

【対象・方法】 2014年4月4日~2020年7月9日の期間に長野県立こども病院で治療を受けたAESD患者17名(一相目7名、二相目10名)、およびPFs患者8名を対象とした。血清、髄液中のTIMP-1およびMMP-9をEnzyme-Linked Immunosorbent Assay法

で、7種のサイトカイン(Interleukin-1 β , -2, -4, -10, -17A, -21, Macrophage inflammatory protein-1 α)をCytometric Bead Array法で測定した。

【結果】 血清TIMP-1は、AESD二相目群と比較して一相目群が有意に高値であった。血清MMP-9やMMP-9/TIMP-1比の上昇は見られなかった。三群全体での検討では、血清TIMP-1とMMP-9との間に有意な正の相関を認めた。髄液TIMP-1、MMP-9および血清・髄液サイトカイン値は三群間で有意差は見られなかった。

【考察】 AESD二相目群と比較して一相目群で血清TIMP-1が高値で、かつ血清MMP-9およびMMP-9/TIMP-1比の上昇を伴わなかった点が、本研究が初めて明らかにした知見である。AESD患者においてMMP-9とTIMP-1について報告した研究は一編のみで、AESD患者と健常対照とを比較して血清MMP-9高値、TIMP-1低値であったことが報告されており、我々の研究とは矛盾する結果である。しかし、この研究ではAESD患者の検体採取時期が一相目なのか二相目なのか区別されていなかった。我々は一相目と二相目を分けることで、AESDの超急性期である一相目に血清MMP-9の上昇を伴わない血清TIMP-1の上昇が見られることを明らかにした。この血清TIMP-1の単独上昇は、脳梗塞やHHV-6脳炎など複数の中枢神経疾患で報告されているがAESDでの報告はなく、また、血清TIMP-1の主な分泌細胞や病態との具体的な関連は不明である。AESD患者のサイトカインプロファイルに関する研究やTIMP-1分泌細胞に関する既報告を基に、今回7種のサイトカインを血清・髄液で測定したが、いずれも有意な関連性は見いだせなかった。また、血清MMP-9やMMP-9/TIMP-1比の上昇はなく、両者の間に有意な正の相関を認めたため、血清TIMP-1が血清MMP-9の上昇と連動している可能性も示唆された。これまでの報告とは別のTIMP-1とMMP-9の関連性や、血液脳関門の破綻とAESDの病態との関連に関して今後の検討を進めるための研究結果であると考えた。今後より多くの患者およびサイトカインで解析し、検討する必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

遅発性拡散低下を伴う二相性急性脳症 (AESD) は小児の急性脳症のうち最頻度に起こり、約2/3の患者で神経学的後遺症を残す脳症である。AESDの初発症状は、発熱当日または翌日にけいれんで発症する(一相目けいれん)。意識状態は一旦改善するものの、第3～7病日に再度けいれんや意識障害を認め、頭部MRI検査にて拡散能低下所見を認める(二相目けいれん)。AESDの病態の中心は、けいれん毒性に伴う遅発性神経細胞死と考えられているが、詳細は不明である。Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) は細胞外マトリックスを分解するメタロプロテアーゼの一種で、血液脳関門の血管基底膜を障害するため、血液脳関門に対する攻撃因子として知られている。Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) はMMP-9の内因性阻害因子として知られており、MMP-9による血液脳関門の障害を抑制するため、血液脳関門に対する防御因子と考えられている。種々の急性脳炎・脳症では、血清MMP-9/TIMP-1比の上昇、およびそれに伴う血液脳関門の破綻が病態に関与している可能性が報告がされているが、AESDでの報告はほとんどない。

AESDの病態に対するMMP-9、TIMP-1、およびそれらに関連するサイトカインの関与を明らかとすることを目的とし、AESDの1相目と2相目の患者、および比較対照として良性疾患である熱性けいれん重積 (PFs) 患者を対象として、血清・髄液中のMMP-

9、TIMP-1、およびサイトカイン値を検討した。2014年4月～2020年7月の期間に長野県立こども病院で治療を受けたAESD患者17名(一相目7名、二相目10名)、およびPFs患者8名を対象とした。血清、髄液中のTIMP-1およびMMP-9をEnzyme-Linked Immunosorbent Assay法で、7種のサイトカイン(Interleukin-1 β , -2, -4, -10, -17A, -21, Macrophage inflammatory protein-1 α)をCytometric Bead Array法で測定した。

その結果、河西彩香は次の結論を得た。

1. 血清TIMP-1は、AESD患者の二相目群と比較して一相目群が有意に高値であった。
2. 血清MMP-9やMMP-9/TIMP-1比の上昇は見られなかった。
3. 三群全体での検討では、血清TIMP-1とMMP-9との間に有意な正の相関を認めた。
4. 髄液TIMP-1、MMP-9および血清・髄液サイトカイン値は三群間で有意差は見られなかった。

AESD二相目群と比較して一相目群で血清TIMP-1が高値で、かつ血清MMP-9およびMMP-9/TIMP-1比の上昇を伴わなかった点が、本研究が初めて明らかにした知見である。これまでの報告とは別のTIMP-1とMMP-9の関連性や、血液脳関門の破綻とAESDの病態との関連に関して今後の研究につながる成果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。

Clinical study of pollen-food allergy syndrome estimated by double-blind, placebo-controlled food challenges of ten apple cultivars (リンゴ花粉—食物アレルギー症候群患者に対する10品種のリンゴを用いた二重盲検プラセボ対照食物負荷試験による臨床的特徴の検討)

小池由美

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】近年、日本を含め世界的に花粉症患者の増加がみられ、それに伴い花粉—食物アレルギー症候群 (PFAS: Pollen-Food Allergy Syndrome) の患者が増加している。PFASの代表的な例はシラカバ花粉症患者がバラ科の果物を摂取した際にみられる口腔粘膜症状であり、特にリンゴはPFASの中でも主要な原因食物である。リンゴPFAS患者の症状を誘発する主要な原因タンパク質の一つはMal d 1であり、シラカバ花粉のBet v 1との交差抗原性により症状を誘発する。PFASの診断における課題は、皮膚テスト

の有用性が報告によって異なること、出現症状がリンゴの品種により異なること、また出現する症状が主観的であるため、シングルブラインドの食物経口負荷試験では評価が難しい点があり、精度の高い診断のためにはより多くのリンゴ品種で二重盲検負荷試験 (DBPCFC: Double Blind Placebo Control Test) を行い、患者の主観的な症状を視覚連続尺度 (VAS: visual analog scale) を用いて数値化することで評価する必要がある。しかしDBPCFCの実施には労力を要し、症状を誘発させるリスクがあるため、より低侵襲の補助検査が必要である。

【目的】 リンゴ PFAS 患者に対してリンゴの品種別に DBPCFC を施行し、皮膚テストおよび特異的 IgE 値との関連性について解析することにより、補助的な検査の有用性について検討し、同時に、品種による症状発現の差異を明らかにすることを目的とする。

【対象と方法】 2019年9月から2020年1月の間に長野県立こども病院を受診した患者で、生リンゴの摂取による口腔粘膜症状を複数回きたした既往があり、文書による同意を得ているリンゴ PFAS 患者を対象とした。対象に対して10品種のリンゴを用いて DBPCFC を施行し、症状の程度を VAS で評価した。VAS は患者が感じた症状の強さを 0～100 で評価し、>0 を陽性とした。対象者の Mal d 1 と Bet v 1 に対する特異的 IgE 値の測定及びリンゴの品種ごとに皮膚テストを施行した。全症例における、VAS と皮膚テストの関連についての検討にはカイ二乗検定を行い、各対象者で VAS 陽性となったリンゴの VAS 平均値と各種特異的 IgE 値の評価にはスピアマンの順位相関係数を用いて検定した。

【結果】 対象 6 名（すべて女性、年齢中央値 24.5 歳、範囲 10～45 歳）のうちリンゴ 2 品種で VAS 陽性となったのが 3 名（50%）、3、4、5 品種で陽性となったのがそれぞれ 1 名（17%）であった。VAS 陽性となったリンゴの品種は、症例毎に異なっていた。全症例における VAS と皮膚テストの関連については、VAS 陽性（18 件）中の皮膚テスト陽性は 12 件、VAS 陰性（37 件）中の皮膚テスト陰性は 21 件で、VAS と皮膚テストとの間に有意差を認めなかった ($p=0.103$)。各対象者の VAS 平均値と Mal d 1 および Bet v 1 特異的 IgE 値とは、それぞれ正の相関を認めた ($r=0.5$, $r=0.84$)。

【考察】 本検討ではシングルブラインドではなく DBPCFC を行うことで結果の信頼性を高めることができた。また 10 品目という多くのリンゴ品種で DBPCFC 行うことで、リンゴ品種間による症状出現の差を明らかにすることができた。特異的 IgE 値と VAS との関連については、リンゴ PFAS の診断の一助として Bet v 1 特異的 IgE 値が有用である可能性があり、今後の PFAS の診断基準作りとしては、皮膚テストは基準とはなりにくく、多品種のリンゴ負荷試験を施行することを盛り込む必要があることが、今回の検討より示唆された。

【結語】 リンゴ PFAS の診断に皮膚テストは有用ではなかった。Bet v 1 特異的 IgE 値は診断の一助となる

可能性がある。複数の品種のリンゴで DBPCFC を行うことで、リンゴ PFAS 患者でも品種により出現症状の差異があることを明らかにすることができた。

（論文審査の結果の要旨）

花粉—食物アレルギー症候群（PFAS）の代表例はシラカバ花粉症患者のバラ科の果物の摂取による口腔粘膜症状であり、リンゴは主要な原因食物である。リンゴに含まれる原因タンパク質は Mal d 1 であり、シラカバ花粉の Bet v 1 との交差抗原性により症状を誘発する。PFAS の診断の課題は、皮膚テストの有用性が報告によって異なること、出現症状がリンゴの品種により異なること、また出現する症状が主観的であるため、精度の高い診断にはより多くのリンゴ品種で二重盲検負荷試験（DBPCFC：Double Blind Placebo Control Test）を行い、主観的な症状を視覚連続尺度（VAS：visual analog scale）を用いて数値化することで評価する必要がある。

2019年9月から2020年1月の間に長野県立こども病院を受診したリンゴ PFAS 患者を対象とし 10 種類の長野県産リンゴを用いて DBPCFC を行った。

その結果、小池らは次の結論を得た。

1. 対象は 6 名（すべて女性、年齢中央値 24.5 歳、範囲 10～45 歳）、リンゴ 2 品種で VAS 陽性となったのが 3 名（50%）、3、4、5 品種で陽性となったのがそれぞれ 1 名（17%）であった。
2. VAS 陽性となったリンゴの品種は症例毎に異なり、リンゴ品種の掛け合わせの元となる品種毎での VAS に差はみられなかった。
3. 全症例における VAS と皮膚テストの関連は、VAS 陽性（18 件）中の皮膚テスト陽性は 12 件、VAS 陰性（37 件）中の皮膚テスト陰性は 21 件で VAS と皮膚テストとに有意差を認めなかった ($p=0.103$)。
4. 各対象者の VAS 平均値と Mal d 1 および Bet v 1 特異的 IgE 値とは、それぞれ正の相関を認めた ($r=0.5$, $r=0.84$)。

これらの結果より、皮膚テストは基準とはなりにくく、今後の PFAS の診断基準作りでは複数種のリンゴ負荷試験を施行することを盛り込む必要があることが示唆された。本検討ではシングルブラインドではなく 10 品目という多くの品種を用い DBPCFC で行うことで、結果の信頼性を高めることができ、リンゴ品種間による症状出現の差を明らかにすることができた。リンゴ PFAS の診断の一助として Bet v 1 特異的 IgE 値が有用である可能性がある。

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。

Prognostic utility of albumin-bilirubin grade in Japanese patients with primary biliary cholangitis (日本人原発性胆汁性胆管炎におけるアルブミン-ビリルビングレードによる予後予測の有用性)

山下 裕 騎

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 原発性胆汁性胆管炎 (PBC) は、病態に自己免疫学的機序が想定される慢性進行性の胆汁うっ滞性肝疾患である。ウルソデオキシコール酸 (UDCA) が第一選択薬であり、約70%の症例ではUDCA治療が奏功し、長期予後は良好である。しかし、無治療例、あるいは治療が行われても反応不良な症例では、肝硬変から肝不全を呈し、肝移植を行わないと救命できない。よって、診断時に予後を正確に予測することは临床上重要である。アルブミン-ビリルビン (ALBI) グレードはアルブミン値と総ビリルビン値のみから算出可能であり、肝細胞癌の患者における肝予備能を正確に評価する数値として開発された。現在までに様々な慢性肝疾患の臨床的意義が検討されており、PBCでも予後を予測する可能性が報告されている。本研究では厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班PBC分科会による全国調査の大規模データを用いてALBIグレードが、PBCの組織学的ステージや予後予測に有用かどうかを検討した。

【対象と方法】 1980年から2016年の間に全国469施設から登録されたPBCの診断基準を満たし、かつALBIグレードが算出可能であった8,768例を解析対象とした。ALBIグレードと患者背景、肝病理学的所見の関連について検討し、予後(全死亡、肝移植、肝関連死)を予測し得るかどうか統計学的解析を行った。

【結果】 年齢の中央値は57歳、女性は86%であり、組織学的ステージ(Scheuer分類)は1期:35%、2期:23%、3期:10%、4期:3%であった。ALBIグレードはグレード1:63%、グレード2:33%、グレード3:4%であった。観察期間中央値5.3年中、1,227例(肝関連死は789例)が死亡し、113例が肝移植を受けた。ALBIグレードは組織学的ステージと有意に関連していた($p < 0.0001$)。ALBIグレード2または3であることは、全死亡または肝移植の予後に有意に関連していた(ハザード比:3.453, $p < 0.0001$)。同様に、肝関連死または肝移植の予後に有意に関連していた

(ハザード比:4.242, $p < 0.0001$)。5年時の無移植生存率は、全ALBIグレード間で有意差を認めた(グレード1:97.2%、グレード2:82.4%、グレード3:38.8%, $pc < 0.0001$, log-rank test)。また同様に5年時の非肝関連生存率についても、全ALBIグレード間で有意差を認めた(グレード1:98.1%、グレード2:86.0%、グレード3:42.0%, $pc < 0.0001$, log-rank test)。

【結論】 本邦の全国調査を用いた検討によって、PBC診断時のALBIグレードは予後を非侵襲的に予測しうることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

原発性胆汁性胆管炎 (PBC) は病因に自己免疫学的機序が想定される慢性進行性の胆汁うっ滞性肝疾患である。ウルソデオキシコール酸 (UDCA) が第一選択薬であり、約70%の症例ではUDCA治療が奏功し、長期予後は良好である。しかし、治療不応例では、病態が進展し、肝硬変や肝不全に至る予後不良例が存在する。よって、診断時に予後を正確に予測することができる方法は临床上必要とされている。アルブミン-ビリルビン (ALBI) グレードはアルブミン値と総ビリルビン値のみから算出可能であり、肝細胞癌の患者における肝予備能を正確に評価する数値として開発された。現在までに様々な慢性肝疾患の臨床的意義が検討されており、PBCでも予後を予測する可能性が報告されている。そこで、本研究では厚生労働省「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」班において1980年から2016年に施行された全国調査の大規模データから8,768例のPBC患者の診断時のデータを用いてALBIグレードを決定し、PBCの組織学的ステージや予後予測に有用かどうかを検討した。

その結果、山下は次の結論を得た。

1. ALBIグレードはPBCの組織学的ステージと有意に関連している。
2. ALBIグレード2以上では、全死亡または肝移植の予後と肝関連死または肝移植の予後と有意に関連している。

3. 5年時の無移植生存率および非肝関連生存率は全ALBIグレード間で有意差を認める。

全国調査の検討により、PBCにおける診断時のALBIグレードはPBCの簡便な予後予測の指標になりうることを明らかにした報告である。現在、UDCA治療不応例が約30%存在し、予後が不良であること

が報告されていることから、診断時にALBIグレード2以上の症例においては治療開始時からUDCAに2nd lineの治療を併用するという治療選択を提唱できる可能性がある。

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。

Serum positivity of tTG-IgA in Japanese Children with IBD (日本人小児IBD患者における血清抗組織トランスグルタミナーゼIgA抗体の陽性率に関する検討)

倉 沢 伸 吾

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】炎症性腸疾患 (IBD) は、消化管の慢性的な炎症を起こす原因不明の疾患である。近年、日本人小児IBDの患者数は増加傾向にあり、動物性脂肪の摂取量の増加、魚油や米の摂取量の減少を特徴とする食生活の欧米化は、小児IBD患者数の増加傾向と一致している。IBDの治療には、栄養療法、5-アミノサリチル酸 (5-ASA)、副腎皮質ホルモン、免疫調整剤、生物学的製剤が一般的に推奨されている。セリアック病 (CeD) は、小麦に含まれるグルテンおよびその代謝産物に対する免疫反応によって引き起こされる慢性消化器疾患で、腹痛、下痢、成長障害などの症状を引き起こす。海外の診療ガイドラインでは、CeDを疑った場合のスクリーニング検査として血清抗組織トランスグルタミナーゼIgA抗体 (tTG-IgA) が推奨されている。CeDの治療法は、グルテンフリー食である。日本人におけるCeDの有病率は低く、その主な要因として遺伝学的な背景と、日本人の食生活が欧米と比較して一般的に小麦の摂取量が少ないことが挙げられる。しかしライフスタイルの欧米化に伴い、これまで日本にはほとんど存在しないと考えられていたCeDが、今後増加することが予想される。IBDとCeDでは治療法が異なるため、IBDとCeDを合併した場合、不適切な医療が行われる可能性があり、両疾患を適切に診断することが重要である。しかし、日本人小児IBDについてtTG-IgAやCeDを評価した報告はない。本研究では日本人小児におけるtTG-IgA抗体の陽性率、IBDとCeDの合併の有無について調査することを目的とした。

【対象と方法】本研究は後方視的研究である。信州大学医学部附属病院の倫理委員会より承認を得て実施した (承認番号5013)。2021年の1月27日から12月31日までに信州大学医学部附属病院小児科を受診し、消化

器症状の精査として上部消化管内視鏡検査および十二指腸粘膜の生検組織検査を実施された18歳以下の例で、過去一年以内に採取された血清が -30°C で保存されていた例を対象とした。診断時年齢、性別、症状 (腹痛、吐き気、下痢、血便、体重減少)、血液検査 (WBC、Hb、Alb、CRP、IgA)、診断名、治療内容 (5-ASA、コルチコステロイド、アザチオプリン、生物学的製剤) を診療録から抽出した。分類不能型IBD、monogenic IBD、IgA欠損症 (IgA $<7\text{ mg/dl}$)、IBD疑いの例を除外した。全例が、小児消化器疾患を専門とする医師により内視鏡検査が実施され、消化器疾患に精通した病理医により病理組織学診断を受けた。残血清を用いてELIZAキット (ORGENTEC社, Germany) でtTG-IgAを測定し、10 U/ml以上を陽性とした。潰瘍性大腸炎 (UC) およびクローン病 (CD) の診断基準を満たす例をIBD群、UCおよびCDの診断基準を満たさない例を非IBD群とした。非IBD群の中で、Roma IV分類の診断基準を満たす例を機能性消化管疾患 (FGID) 群と定義した。IBD群とFGID群で、tTG-IgAの中央値についてIBM SPSS Statistics 27を用いてMann-Whitney Uの検定で比較した。

【結果と考察】IBD群31例と非IBD群53例を対象とした。FGID群は22例だった。tTG-IgAの陽性率は全体で5.7% (5/84例)、IBD群で3.2% (1/31例)、非IBD群で7.1% (4/53例)、FGID群で4.5% (1/22例) だった。本研究のIBD群の陽性率は海外で複数報告されている小児IBD例のtTG-IgA陽性率とほぼ同等の結果だった。tTG-IgAの陽性率についてIBD群とFGID群で統計学的な有意差を認めなかった ($p=0.66$)。tTG-IgA陽性群と陰性群とで、年齢、性別、症状と血液検査に統計学的有意差はなかった。IBD群の1例と非IBD群の1例はtTG-IgA陽性かつ小麦摂取後の腹痛または体重増加不良の症状を有して

いた。全例で十二指腸球部と下行脚から1か所ずつ生検が実施され、組織学的にCeDと診断された症例はなかった。海外の報告でtTG-IgA陽性かつCeDの組織学的な特徴がない例を潜在性CeD(PCeD)とする概念が提唱されている。本研究の2例もPCeDである可能性が考えられる。

【結論】日本人小児IBDの集団にもtTG-IgA陽性の症例が存在した。tTG-IgA陽性かつ小麦摂取後の症状を有する症例ではPCeDの可能性を考慮したフォローアップを要する。本研究のLimitationとして、単一施設の検討であること、サンプルサイズが小さいこと、後方視的な検討であるためHLA検査の検討がないことなどが挙げられる。日本人小児のIBDとCeD合併について更なる症例の集積が必要である。

(論文審査の結果の要旨)

近年日本人小児の炎症性腸疾患 (IBD) の患者数は増加傾向で、食生活の欧米化がその傾向と一致している。IBDの治療には栄養療法、5-アミノサリチル酸、副腎皮質ホルモン、免疫調整剤、生物学的製剤などがある。セリアック病 (CeD) は、グルテン摂取による免疫反応に起因する慢性消化器疾患である。海外の診療ガイドラインでは、CeDの初期スクリーニング検査として血清抗組織トランスグルタミナーゼIgA抗体 (tTG-IgA) が推奨されており、治療法はグルテン除去食である。日本人は遺伝学的な背景や食生活からCeDの有病率は低いとされていたが、ライフスタイルの欧米化に伴いCeDが今後増加することが予想される。IBDとCeDでは治療法が異なるため、両疾患の合併の有無は治療方針を決定するために重要である。本研究では日本人小児のtTG-IgA抗体の陽性率、

IBDとCeDの合併の有無について調査することを目的とした。

2021年1月27日から12月31日までに信州大学医学部附属病院小児科を受診し、消化器症状のため上部消化管内視鏡検査および十二指腸粘膜の生検組織検査を実施された18歳以下の例で、過去一年以内の残血清が-30℃で保存されていた例を対象とした。残血清でtTG-IgAを測定し、10 U/ml以上を陽性とした。IBD群と機能性消化器疾患 (FGID) 群とでtTG-IgAを比較した。

その結果、倉沢は次の結論を得た

1. tTG-IgAの陽性率は全体で5.9% (5/84例)、IBD群で3.2% (1/31例)、非IBD群で7.1% (4/53例)、FGID群で4.5% (1/22例)であった。
2. tTG-IgA陽性5例中2例は小麦摂取による症状を有していたがCeDの組織学的特徴を有する例はなかった。
3. IBD群とFGID群にtTG-IgAの有意差はなかった。

日本人小児IBD集団にもtTG-IgA陽性例が存在したが組織学的なCeD診断例がなかった。理由としてtTG-IgAの偽陽性、十二指腸生検の個数、潜在性CeDの可能性が考えられた。本研究は日本人小児IBD集団に対しtTG-IgAを測定しCeDの合併について検討した最初の報告である。今後日本人小児IBDのtTG-IgAとCeDの有病率についてさらに大規模な検討が必要であると結論付けられた。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。

Anti-tumor effect of Wasabi component, 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate, against endometrial carcinoma cells (ワサビ成分6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanateの子宮内膜癌細胞に対する抗腫瘍効果)

小野元紀

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】本邦において子宮体がん (EMC: endometrial carcinoma) 患者は急速に増加しており、予後は一般的に良好であるが、進行例や再発例では依然として不良である。近年、再発例に対する多標的チロシンキナーゼ阻害薬 Lenvatinib や免疫チェックポイント阻害薬 Pembrolizumab の有用性が報告されているが、同時に深刻な副作用 (AE: adverse effect)

も報告されており、安全性の高い新規治療薬が望まれる。そこで我々は長野県の特産品であり、古くから食材として親しまれているワサビに注目した。ワサビは抗菌作用を持つことで知られていたが、近年、カラシなどに含まれる allyl isothiocyanate (AITC)、ブロッコリーに含まれる sulforaphane (4-MITC) などのイソチオシアネート類 (ITCs) の様々な作用が報告されており、ワサビの主要化合物である6-(methylsulfinyl)

hexyl isothiocyanate (6-MITC) についても抗炎症作用など様々な機能が報告されてきた。6-MITC の抗腫瘍効果は乳癌や皮膚癌、膵癌、大腸癌、血液腫瘍などで報告されているが、EMC に対する報告はないことから、本研究では、6-MITC の EMC 細胞株に対する抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

【方法】 EMC 細胞株 (Ishikawa, HEC265, HEC108, KLE, HEC1B) と、非癌正常細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC, 不死化正常子宮内膜細胞 EM-E6/E7-hTERT2 における、6-MITC の細胞生存率に対する作用を WST-1 アッセイにより測定し、その作用を positive control である AITC, 4-MITC と比較した。また EMC 細胞株の細胞生存に対する抗癌剤シスプラチン (CDDP) と 6-MITC の併用効果を WST-1 アッセイにより評価した。6-MITC の誘導する細胞死について、Annexin V と Ethidium Homodimer III の蛍光染色によるアポトーシス / ネクローシス / 正常細胞検出キットおよびウエスタンブロット法を用いて検討した。EMC 細胞を免疫不全ヌードマウスの右臀部 (Ishikawa), 左臀部 (HEC1B) に異種移植し、6-MITC 2 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ もしくは 4 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ を強制経口投与し、子宮体癌細胞異種移植片の腫瘍量や体重変化を経時的に計測し、実験終了時に摘出した異種移植腫瘍の Ki-67 と cleaved-caspase 3 (CC3) の免疫染色を行い、6-MITC の細胞増殖や細胞死への関与について検討した。さらに同時に摘出した脾臓よりナチュラルキラー (NK) 細胞を抽出し、NK 細胞活性を測定した。

【結果および考察】 6-MITC は全ての EMC 細胞株の増殖を抑制し、50% 阻害濃度 (IC50) は 9.6 μM (Ishikawa) から 17.6 μM (HEC1B) の間であった。一方、HUVEC や EM-E6/E7-hTERT2 に対する増殖抑制作用は乏しく、IC50 を算出できなかった。また 6-MITC による EMC 細胞の増殖抑制作用は AITC や 4-MITC より強く、特に Ishikawa で差が大きかった。CDDP との併用では、6-MITC 単独では増殖抑制効果の乏しい 5 μM の投与により、CDDP の殺細胞効果を増強し、特に HEC265 および HEC1B に対しては顕著な相乗効果を示した。蛍光染色による検討では、Ishikawa, HEC108, HEC265 では 6-MITC 用量依存的にアポトーシスが増加したが、HEC1B では有意な増加は観察されなかった。ウエスタンブロットでは、全ての EMC 細胞において 6-MITC により抗アポトーシスタンパク BCL2 の発現が抑制され、アポトーシスマー

カーである CC3 発現は Ishikawa, HEC108, HEC265 で増強したが HEC1B では発現を認めなかった。次に Ishikawa と HEC1B の異種移植マウスを用いた検討では、6-MITC を 4 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ 経口投与群で対照群と比較して移植 5 週間後に Ishikawa, HEC1B の異種移植腫瘍体積が有意に減少した ($P=0.01, 0.02$)。また、摘出した腫瘍の免疫染色では、Ki-67 発現の減少 ($P=0.28, 0.03$) と CC3 発現の増強 (どちらも $P<0.01$) を認めた。6-MITC は *in vitro* では HEC1B に CC3 発現増強を誘導しなかったが、*in vivo* では誘導したことから、ヌードマウスにも存在する NK 細胞が HEC1B のアポトーシス誘導に関与する可能性を考え、検討を行った。特に EMC 細胞の異種移植 4 週間前から 6-MITC を連日投与することで、NK 細胞活性の有意な増強が観察された ($P<0.05$)。一方、6-MITC 投与により、マウスは飲水量の低下や体重減少を認めず、明らかな AE はみられなかった。

【結論】 本研究により、6-MITC は EMC 細胞に対して抗腫瘍効果を有することが示された。一方、非癌正常細胞に対しては殺細胞性を示さず、生体内でも明らかな AE は認めないことから、安全性が高いと考えられた。6-MITC は生体内においては、直接作用だけでなく NK 細胞活性増強を介して EMC 細胞のアポトーシスを誘導する可能性が考えられた。以上のことから、6-MITC は EMC の新規治療薬候補となりうることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

本邦において子宮体がん (EMC : endometrial carcinoma) 患者は急速に増加している中で、進行例や再発例に対する治療は限られており、最近導入された免疫チェックポイント阻害薬やマルチキナーゼ阻害薬は特有の副作用が問題となる。そのため、安全性の高い新規治療薬が望まれる。そこで長野県の特産品であり、古くから食材として親しまれているワサビに注目し、その主要化合物であり、抗炎症作用など様々な機能が報告されている 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate (6-MITC) の EMC 細胞株に対する抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。

方法としては、EMC 細胞株 (Ishikawa, HEC265, HEC108, KLE, HEC1B) および正常細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC, 不死化正常子宮内膜細胞 EM-E6/E7-hTERT2 を用い、6-MITC の細胞生存率に対する作用や、抗癌剤シスプラチン (CDDP) との併用効果、アポトーシス誘導作用を検討した。また

生体内での6-MITCの作用は、ヌードマウス皮下のEMC細胞株異種移植腫瘍を用いて検討した。

その結果、小野らは次の結論を得た。

1. 6-MITCはEMC細胞に対して増殖抑制とアポトーシス誘導による細胞障害作用を有するが、正常細胞に対しての細胞障害性は低い。
2. 6-MITCはEMC細胞株のCDDPによる細胞障害作用を増強する。
3. 6-MITC経口投与は、生体内においてもEMC異種移植腫瘍に対する抗腫瘍作用を示したが、その作

用に自然免疫系であるナチュラルキラー（NK）細胞の活性化が関与する。

本研究によりワサビに含まれる6-MITCは、EMC細胞に対して抗腫瘍作用を有することが示された。既存の抗がん剤との併用効果やNK細胞活性化という新知見も示されており、副作用の少ない新規治療薬となりうる可能性が示されたことを確認できた。したがって、主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Factors affecting day-to-day variations in tacrolimus concentration among children and young adults undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (小児および若年成人における同種造血幹細胞移植時のタクロリムス血中濃度の変動に影響を与える因子の検討)

丸 山 悠 太

(論文の内容の要旨)

【背景】 タクロリムス (Tacrolimus; 以下 Tac) は同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) における移植片対宿主病 (GVHD) の予防として広く使用される免疫抑制剤である。有効血中濃度の範囲が狭く、血中濃度高値は電解質異常、高血圧、神経毒性などの副作用発生に関連し、低値はGVHDのリスクを増加させるため治療薬物モニタリングに基づく用量調節が必須である。Tacの代謝は、CYP3A4関連薬剤や免疫抑制剤の併用、年齢、患者の状態などの影響を受けることが報告されている。近年、赤血球濃縮製剤 (RCC) の輸血も Tac 血中濃度の上昇に関係することが報告されている。しかしながら、Tac 血中濃度に影響を与える因子を総合的に評価した報告は無く、それぞれの因子がどの程度 Tac 血中濃度に影響を与えるか十分には分かっていない。

【目的・方法】 本研究は allo-HSCT 後に Tac 持続点滴を受けた小児および若年成人を対象に、Tac 血中濃度の日内変動に影響を与える要因を調査することを主な目的とした。副次的な目的として、Tac 血中濃度の急激な変動 (20%以上) を引き起こす要因を特定することとした。

2009年1月から2021年12月までに信州大学医学部附属病院小児科で allo-HSCT 後に Tac 持続静注を受けた25歳未満の小児・若年成人患者123名の後ろ向きコホート研究である。allo-HSCT 後 Tac 血中濃度が7 ng/mL 以上となった初日から移植後28日目において、

Tac の投与量を変更していない連続する2日を選択し、その間の Tac 血中濃度およびヘマトクリット値と以下の項目を収集した。評価項目：発熱の出現、発熱の持続、解熱、CYP3A4関連薬剤の投与開始、免疫抑制剤の投与開始、輸血 (RCC、濃厚血小板 [PC])、Tac 投与ルートの交換。Tac 血中濃度は全血を用いて測定した。

Tac 血中濃度の変動に影響を与える要因の解析には独立 t 検定による単変量解析および重回帰分析による多変量解析を行った。Tac 血中濃度の急激な変動を引き起こす要因を特定するためにロジスティック回帰を用いた多変量解析を行った。

【結果】 Tac 投与量を変更していない計1315のポイントを解析対象として抽出した。Tac 血中濃度は、RCC 輸血 (partial regression coefficient [B]: 25.403, 95% confidence interval [CI]: 22.75-28.06, $p < 0.0001$)、メトトレキサート投与 (B: 3.732, 95% CI: 0.69-6.77, $p = 0.0162$)、発熱の持続 (B: 5.594, 95% CI: 1.64-9.55, $p = 0.0056$)、解熱 (B: 7.500, 95% CI: 3.47-11.53, $p = 0.0003$) で有意に増加していた。一方、PC 輸血 (B: -4.094, 95% CI: -5.63--2.56, $p < 0.0001$)、発熱の出現 (B: -4.674, 95% CI: -8.79--0.56, $p = 0.0261$)、Tac 投与ルートの交換 (B: -18.845, 95% CI: -29.81--7.88, $p = 0.0008$) では血中濃度が有意に低下していた。

Tac 血中濃度の急激な上昇は、低体重、RCC 輸血、メトトレキサート投与、発熱の持続、解熱と関連して

いた。一方、低体重、PC輸血、Tac投与ルートの変更は急激な血中濃度の低下と関連していた。また、タクロリムス血中濃度の変動とヘマトクリットの変動の間に、有意な相関関係を認めた ($r=0.556$, $p<0.0001$)。

【考察】RCC輸血とそれに伴うヘマトクリット値の上昇は、Tac血中濃度の上昇に強い影響を与えることが分かった。また、PC輸血がTac血中濃度の低下に関係していることが本研究で初めて明らかとなった。投与されたTacの約85%が赤血球と結合するため、全血を用いて測定されているTac血中濃度はヘマトクリット値により大きな影響を受けていると推測される。ただしヘマトクリット値の変動に伴うTac血中濃度の変動は表面上の変動であるため、ヘマトクリット値の変動を最小限にするような診療を行う必要があると考えられた。

本研究では、CYP3A4関連薬剤やステロイド投与などはTac血中濃度に有意な影響を与えていなかった。投与開始直後のためTac代謝への影響が少なかったと推測された。

【結論】RCCおよびPCの輸血、発熱、メトトレキサート投与、Tac投与ルートの変更は、Tac血中濃度の変動に影響を及ぼす独立した要因であった。上記の因子に加え低体重はTac血中濃度の急激な変動の因子であった。これらの知見はallo-HSCTにおけるTac血中濃度のより適切な管理に寄与すると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

タクロリムス (Tacrolimus; 以下 Tac) は同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) における移植片対宿主病の予防として広く使用される免疫抑制剤である。Tac血中濃度には、CYP3A 関連薬剤や免疫抑制剤の併用、年齢、患者の状態、投与ルート変更、赤血球濃縮製剤 (RCC) 輸血などの因子が影響することが報告されている。しかしながら allo-HSCT において Tac 血中濃度に影響を与える因子を総合的に評価した報告は無く、それぞれの因子がどの程度 Tac 血中濃度に影響を与えるか十分には分かっていない。

本研究は allo-HSCT 後に Tac 持続点滴を受けた小児および若年成人を対象に、Tac 血中濃度の日内変動に影響を与える因子および Tac 血中濃度の急激な変動 (20%以上) を引き起こす因子の特定を目的とした。2009年1月から2021年12月までに信州大学医学部附属病院小児科で allo-HSCT 後に Tac 持続点滴を受けた25歳未満の小児・若年成人患者123名についてカルテ記載を基に後方視的に検討した。allo-HSCT 後 Tac 血中濃度が 7 ng/mL 以上となった初日から移植後28日目において、Tacの投与量を変更していない連続する2日を選択し、その間の Tac 血中濃度およびヘマトクリット値と以下の項目を収集した。評価項目：発熱の出現、発熱の持続、解熱、CYP3A4関連薬剤の投与開始、免疫抑制剤の投与開始、輸血 (RCC、濃厚血小板 [PC])、Tac投与ルートの変更。Tac血中濃度は全血を用いて測定した。

その結果、丸山は次の結論を得た。

1. 輸血 (RCC と PC)、発熱、メトトレキサート投与、Tac投与ルートの変更は、日々の Tac 濃度の変動に独立して影響を与える因子であった。
2. 上記に加えて低体重および低年齢は Tac 濃度の急激な変動のリスク因子であった。
3. Tac 濃度とヘマトクリット値は相関関係にあった。

本研究の結果より、特にヘマトクリット値の変動により Tac 濃度の変動することが明らかとなった。この変動は必ずしも血漿中濃度、リンパ球中濃度とは一致しない可能性があり、解釈には注意が必要である。急激な Tac 濃度の変動を減らすためにはヘマトクリット値の変動を極力減らす必要があり、低体重者に対する RCC 投与量を少なめに設定するなどの工夫が有用である可能性が示された。これらの知見は allo-HSCT における Tac 血中濃度のより適切な管理に寄与すると考えられた。

よって主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

RhoA G17E/Vav1 signaling induces cancer invasion via matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer (胃癌における RhoA G17E/Vav1シグナルはマトリックスメタロプロテアーゼ-9を介したがん浸潤を誘導する)

中 村 聡

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 Rhoファミリーの低分子量 GTPase である RAS homolog family member A (RhoA) と Rhoファミリー-GTPase のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である Vav1は、アクチンなどの細胞骨格に関連する経路を活性化し、細胞の形状、接着、運動性を制御することが報告されている。一部の T cell リンパ腫では、これらの分子の相互作用が悪性腫瘍のシグナル伝達に関与していることが報告されているが、上皮性悪性腫瘍における機能は不明である。本研究では、胃癌における変異型 RhoA の存在によるシグナル変化を調べ、RhoA が上皮性がんにおいてどのような役割を果たすかを明らかにした。また、RhoA G17E/Vav1がびまん性胃癌の新規治療標的となる可能性を示した。

【方法】 RhoA 野生型 WT と RhoA 変異型 R5W, G17E, Y42C を胃癌細胞株 MKN74にレトロウイルスで導入し、RhoA 変異型が安定発現する細胞株を作成し、in vitro で形態学、増殖、遊走/浸潤試験、in vivo で腹膜異種移植試験を行った。

【結果】 RhoA 変異型 G17E および Y42C は、MKN74 に形態変化を誘導した。細胞増殖能は野生型、変異型の遺伝子導入で変化はなかったが、G17E で遊走能、浸潤能を促進することが分かった。それらの変化の原因を検索するため、RhoA シグナルの下流を検索すると、G17E で Cofilin のリン酸化が亢進していることが分かった。しかし、Cofilin のリン酸化を阻害薬にて抑制すると、遊走能は反対にさらに亢進し、浸潤能は変化しない結果であった。そのため、RhoA 下流の変化が G17E による浸潤能亢進の経路として関連付けられなかった。ほかの経路の関与を考え、Tcell リンパ腫の報告などから RhoA の活性化の調整因子である Vav1に着目した。Vav1について既存の遺伝子導入された MKN74で検討すると、G17E で Vav1の mRNA およびタンパク質レベルで発現が亢進していることが分かった。ほかの胃癌細胞 (MKN45) でも、G17E の導入で mRNA の増加を認めた。Vav1の RNA 干渉試験により、RhoA G17E は Vav1を介して癌細胞の

浸潤を促進することが明らかになった。さらに、免疫沈降法により、Vav1と RhoA G17E が特異的に結合していることが示された。Vav1と RhoA G17E の浸潤能亢進への経路は、RhoA, Vav1の下流 pathway を検索するも、証明するには至らなかったが、matrix metalloproteinase -9 (MMP9) が Vav1の RNA 干渉試験で関与を示し、RhoAG17E による浸潤能亢進は Vav1と結合することで MMP9を介して機能することが明らかになった。また、ヌードマウスの腹膜異種移植モデルにおいて、G17E は野生型 WT と比較して腹膜播種結節形成を促進することが示された。これらの腹膜播種結節形成は Vav1のノックダウンによって抑制されることも示された。

【結論】 RhoA 変異型 G17E は Vav1と結合することが示され、それらは Matrix Metalloproteinase -9を介して胃癌細胞の浸潤を促進することが示唆された。したがって、びまん性胃癌における RhoAG17E/Vav1シグナルは、治療標的として有用である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

Rhoファミリーの低分子量 GTPase である RAS homolog family member A (RhoA) と Rhoファミリー-GTPase のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である Vav1は、アクチンなどの細胞骨格に関連する経路を活性化し、細胞の形状、接着、運動性を制御することが報告されている。本研究では、胃癌における変異型 RhoA の存在によるシグナル変化を調べ、RhoA が上皮性がんにおいてどのような役割を果たすかを明らかにすることを目的とした。方法として、RhoA 野生型 WT と RhoA 変異型 R5W, G17E, Y42C を胃癌細胞株 MKN74にレトロウイルスで導入し、RhoA 変異型が安定発現する細胞株を作成し、in vitro で形態学、増殖、遊走/浸潤試験、in vivo で腹膜異種移植試験を行った。

その結果、中村らは次の結論を得た。

1. RhoA 変異型 G17E および Y42C は、胃癌細胞株 MKN74への遺伝子導入により形態的变化を誘導した。また、RhoA 変異型 G17E の遺伝子導入で

遊走能, 浸潤能が亢進した。しかし, これら浸潤能亢進の機序は RhoA 下流シグナルである RhoA ROCK pathway とは異なる経路による制御と考えられた。

2. RhoA 変異型 G17E の遺伝子導入で Rho ファミリーを活性化させるグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である Vav1 発現が亢進することが分かった。Vav1 は RhoA 変異型 G17E を遺伝子導入した胃癌細胞株における浸潤能の亢進に関与し, Vav1 は RhoAG17E に特異的に結合し, Matrix metalloproteinase-9 (MMP9) を介して浸潤能を制御していた。

3. ノードマウスの腹膜播種モデルにおいて, RhoA

変異型 G17E 導入細胞は, 野生型 WT 導入細胞と比較して腹膜播種結節形成を促進した。Vav1 をノックダウンすることで腹膜播種形成は抑制されることがわかった。

以上の結果から, RhoA 変異型 G17E は Vav1 と結合することで Vav1 発現が亢進し, それにより MM9 を介して胃癌細胞の浸潤を促進することが示唆された。したがって, RhoA 変異を持つびまん性胃がんにおいて, RhoAG17E/Vav1 シグナルは, 新規の治療標的として, また新規治療標的の検索の足掛かりとして有用である可能性が示唆された。以上から, 主査, 副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

Development of Bilayered Bone Marrow-derived Cell-Gelatin Grafts for Augmentation Cystoplasty and Reconstruction of Bladder Tissues in Rats (膀胱組織を再構築する積層型骨髓由来間葉系幹細胞グラフトの開発)

井上 貴 浩

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】神経因性膀胱, 放射線性膀胱炎, 膀胱結核, 間質性膀胱炎等により膀胱コンプライアンスが低下して, 膀胱容量の減少や高圧蓄尿が生じて腎機能低下, 尿路感染の併発などから保存的治療が困難な場合, 腸管(主に回腸)を利用した膀胱拡大術が行われる。しかし, 腸管利用のため侵襲が大きい手術であり, 術後の腸管狭窄, 尿路結石, 電解質異常など合併症が多い。そこで, 人工素材や動物由来組織を用いて膀胱拡大術に利用するグラフトの開発研究が行われている。本研究は, 骨髓由来間葉系幹細胞とゼラチン基材を用いて, 腸管利用を回避できるとともに, 膀胱組織を効果的に再構築できる新規グラフトの開発を行った。さらに, 開発したグラフトの効果について, 放射線照射で傷害を与えた膀胱モデルを用いて検討した。

【材料および方法】17週齢雄 Green Fluorescence Protein (GFP)-transfected Sprague-Dawley (SD) ラットの大腿骨から採取した細胞をコラーゲン培養皿上で初代培養を行った。接着増加した骨髓由来間葉系幹細胞を温度応答性培養皿に継代培養した。オーバーコンフルエントに達した後, 培養皿の温度を低下させて細胞間結合を維持した単層状の骨髓由来間葉系幹細胞シートをゼラチン基材で回収した。これを2枚作製し, 細胞同士が接着するように積層した(以下, 積層型細胞グラフト)。また, 対照グラフトとして, 無細胞ゼラチ

ングラフト, 細胞シートゼラチングラフト, 単層型細胞グラフトを作製した。10週齢雌 SD ラットの膀胱頂部を切開して積層細胞グラフト, あるいは, 対照グラフトを置いた(各 n=4)。さらに, 生分解性ポリグルコール酸 (PGA) 不織布を重ねて, 3, 6, 9, 12時方向でレシピエント膀胱と縫合した。移植4週間後, それぞれの群での膀胱を摘出して組織学的解析を行った。別の10週齢雌 SD ラットを用いて, 膀胱に週1回2グレイの放射線線量で5回照射した。最終照射から2週間通常飼育したものを放射線照射傷害膀胱モデルとした。放射線照射した膀胱に対して, 上述と同様に膀胱頂部に切開して, 積層型細胞グラフト (n=5), あるいは, 対照グラフトとしての無細胞ゼラチングラフト (n=7) を移植した。移植4週間後に膀胱の組織学的解析を行った。

【結果】正常膀胱への移植4週間後, 各グラフト移植群において, 膀胱頂部の切開部位が閉創されていた。閉創された膀胱頂部には, 尿路上皮層, 平滑筋層から構成される組織が再構築されていた。積層型細胞グラフト群の再構築された組織内での平滑筋層の厚みは, 各対照グラフト群と比較して有意な増大を示した。放射線照射膀胱への移植4週間後において, 正常膀胱への移植と同様に, 積層型細胞グラフト群と対照グラフト群とも再構築された尿路上皮層, 平滑筋層から構成される組織によって膀胱頂部の切開部位が閉創されて

いた。積層型細胞グラフト群の平滑筋層の厚みは、対照グラフト群と比較して有意な増大を示した。さらに、再構築された組織内で移植した GFP 陽性の骨髄由来間葉系幹細胞の生着を認めた。生着した骨髄由来間葉系幹細胞の一部は、SMA 陽性成熟平滑筋細胞、Desmin 陽性未熟平滑筋細胞、Pax7陽性筋芽細胞、あるいは、CRPG 陽性神経細胞に分化した。

【結論】本研究は、膀胱組織を効果的に再構築する積層型細胞グラフトを開発した。積層型細胞グラフトは、放射線照射によって傷害を与えた膀胱においても膀胱組織を再構築した。積層型細胞グラフトを構成している間葉系幹細胞の一部は、平滑筋細胞や神経細胞への分化を示した。本研究で開発した積層型細胞グラフトは、膀胱拡大術用のグラフトとして発展していく可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

神経因性膀胱、放射線性膀胱炎、膀胱結核、間質性膀胱炎等により膀胱コンプライアンスの低下から膀胱容量の減少、高圧蓄尿が生じて、腎機能低下、尿路感染などの併発により保存的治療が困難な場合、腸管（主に回腸）を利用した膀胱拡大術が行われる。しかし、腸管を利用した侵襲の大きい手術であり、術後の腸管狭窄、尿路結石、電解質異常など合併症が多い。そこで、人工素材や動物由来組織を用いて膀胱拡大術に利用するグラフトの開発研究が行われている。本研究は、骨髄由来間葉系幹細胞とゼラチン基材を用いて、腸管利用を回避できるとともに、膀胱組織を効果的に再構築する新規膀胱グラフトの開発を行った。さらに、開発した膀胱グラフトの効果について、放射線照射傷害膀胱モデルを用いて検討した。

17週齢雄 Green Fluorescence Protein (GFP) Sprague-Dawley (SD) ラットの大腿骨から採取した細胞をコラーゲン培養皿上で初代培養を行い、接着増殖した骨髄由来間葉系幹細胞を温度応答性培養皿に継代培養した。オーバーコンフルエントに達した後、培養皿の温度を低下させて、ゼラチン基材で単層状の骨

髄由来間葉系幹細胞を回収した。これを2枚作製し、細胞同士が接着するように積層した（以下、積層型細胞グラフト）。また、対照グラフトとして、無細胞ゼラチングラフト、細胞シートゼラチングラフト、単層型細胞グラフトを作製した。10週齢雌 SD ラットの膀胱頂部を切開して積層細胞グラフト、あるいは、対照グラフト（無細胞ゼラチングラフト）を移植した（各 n = 4）。また、別の10週齢雌 SD ラット膀胱に対して、週1回2グレイの放射線照射を5回行った。最終照射から2週間通常飼育した後、同様に積層型細胞グラフト（n = 5）、あるいは、対照として無細胞ゼラチングラフト（n = 7）を移植した。正常膀胱、あるいは、放射線照射した膀胱に移植してから4週間後、膀胱を摘出して組織学的解析を行った。

その結果、井上は次の結論を得た。

1. 正常膀胱への移植において、積層型細胞グラフト群、および、3種類の対照グラフト群において、膀胱頂部の切開部の閉創を示した。
2. 膀胱頂部の閉創部において、尿路上皮層、平滑筋層から構成される組織の再構築を示した。
3. 放射線照射した膀胱においても、尿路上皮層、平滑筋層から構成される再構築された組織によって、膀胱頂部の切開部が閉創してすることを示した。
4. 正常膀胱と放射線照射膀胱において、積層型細胞グラフト群で再構築された平滑筋層の厚みは、対照グラフト群と比較して有意に増大したことを示した。
5. 再構築された組織内で移植した GFP 陽性骨髄由来間葉系幹細胞の生着、および、一部生着細胞の平滑筋細胞、あるいは、神経細胞への分化を示した。

これらの結果から積層型細胞グラフトは膀胱組織を効果的に再構築することが示された。本研究で開発した積層型細胞グラフトは、膀胱拡大術用のグラフトとして発展していく可能性が示された。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。

Efficacy of cetylpridium chloride mouthwash compared to povidone iodine on oral flora for perioperative patient care : A randomized controlled feasibility study (周術期患者の口腔内細菌叢に対するポビドンヨードと比較した塩化セチルピリジニウムの有効性：準ランダム化比較試験)

小田切 宏樹

(論文の内容の要旨)

【研究の背景】 口腔内は肺炎や血液感染症の原因となる病原性細菌の温床とされる。本邦では、がん治療・臓器移植・心臓血管外科・整形外科手術などを受ける患者に周術期口腔管理が行われている。周術期口腔管理は誤嚥性肺炎の予防、創部感染の予防、入院期間の短縮や医療費の軽減につながるとされている。ポビドンヨード (Povidone iodine : 以下 PVP-I) 製剤は口腔内細菌の増殖の抑制が報告されており、本邦で多く使用され、当院でも周術期口腔管理で PVP-I 製剤を採用している。しかしながら、使用時の希釈や含漱の際の用法が煩わしく、1 回の使用量が 60mL と多く、希釈や唾液の添加でさらなる殺菌力の低下が確認されている。塩化セチルピリジニウム (cetylpyridinium chloride 以下 : CPC) 製剤は、両親媒性の第四級化合物で口腔衛生用品としての安全性と有効性が証明されており、歯垢形成の抑制と歯肉炎の予防に有効とされる。また 1 回の使用量は 10 mL と少なく、患者の負担を軽減することができ、希釈する必要がないため PVP-I のように、患者によって濃度が変化することはない。CPC 製剤は周術期のセルフケアにおいて、PVP-I 製剤に替わることができる可能性を考えたため、ランダム化比較試験を行い有効性について検討した。

【試験の方法】 頭頸部を除く全身麻酔下での手術を予定している患者 100 名を CPC 群 (n=51) または PVP-I 群 (n=49) に無作為に割り付けた。被験者は術前口腔ケアを受けた後、ブラッシングに加え CPC 製剤もしくは PVP-I 製剤のいずれかを併用しセルフケアを行う。手術後は可及的にセルフケアを開始する。臨床指標 (歯周ポケット深さ、歯肉出血、OHI-S、舌苔の量) 検査を術前口腔ケア前と手術 1 週間後に行い、頬粘膜と舌のスワブ検体を術前口腔ケアの前後、挿管時、抜管時、手術翌日、手術 1 週間後で採取し、唾液検体を術前口腔ケアの前後、手術翌日、手術 1 週間後に採取した。採取された検体は、リアルタイム PCR 法にて総菌数の測定が行われ、16S リボソーム RNA 解析、OTU 解析によって OTU 数、細菌叢の解析を行っ

た。

【試験の結果】 中断症例を除き 83 名 (CPC 群 42 名、PVP-I 群 41 名) の臨床指標と検体の解析を行なった。両群とも背景因子に有意差はなかった。両群とも術後 1 週間で OHI-S と BOP が有意に減少した。また、両群とも術後 1 週間で総菌数と OTU 数の改善が認められた。唾液と頬粘膜は、両群ともに手術翌日で Streptococcus 属の減少を認めた。CPC 群は手術後 1 週間後までこの菌叢が維持されたが、PVP-I 群は手術前と同程度に戻っていた。舌については細菌叢に大きな変化はなかった。両群間で特徴的な細菌属の比較を線形判別分析にて行ったところ、CPC 群では最も特徴的な細菌として Haemophilus 属が検出されたが、PVP-I 群では、Streptococcus 属が検出された。

【考察】 両群とも術後 1 週間で OHI-S と BOP が有意に減少し、総菌数と OTU 数の減少が認められたことから、PVP-I 製剤、CPC 製剤を併用した周術期口腔管理は、術後も良好な口腔内の状態を維持できることが示唆された。また、過去の報告で Streptococcus 属は術後肺炎と関連し、制御は感染予防の鍵とされているが、周術期における CPC 製剤の使用は、PVP-I 製剤と比較して抗生剤の効果を補助し、手術後の合併症のリスクを低減させる可能性が示唆された。さらに舌については細菌叢に大きな変化はなかったことから、舌への抗生剤や含漱の効果は限定的であり、舌ブラシによる清掃や抗菌ジェルやスプレー剤などの局所投与など代替アプローチが必要であることが示唆された。

【結論】 本研究は、CPC 洗口液と PVP-I うがいの口腔内細菌叢への影響を検討するランダム化比較試験の実現可能性を支持するものと考えられる。CPC 洗口液は PVP-I うがい液よりも抗菌効果を長く維持できる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

周術期口腔管理は誤嚥性肺炎の予防、創部感染の予防などに有効とされているが、周術期口腔管理の有効性を示した前向き研究はほとんどない。周術期口腔管理では専門的な口腔ケアに加え、セルフケアの補助と

して含嗽剤を併用することがある。周術期口腔管理で併用する含嗽剤の選択肢として、当院ではポビドンヨード (povidone iodine ; PVP-I) 配合剤を採用しているが、使用時の希釈や含嗽の際の用法が煩わしく、1回の使用量が60 mLと多い。また、希釈や唾液の添加で殺菌力の低下が報告されている。塩化セチルピリジニウム (cetylpyridinium chloride ; CPC) 配合剤は歯垢形成の抑制と歯肉炎の予防に有効とされ、1回の使用量は10 mLと少なく、患者の負担を軽減することができる。希釈が必要なPVP-I剤剤と比較して、患者によって濃度が変化することはないため、CPC剤剤はPVP-I剤剤に代わる可能性があると考えた。

周術期口腔管理を受ける100名をCPC剤剤使用群とPVP-I剤剤使用群にランダムに振りわけを行い、両群の唾液と頬粘膜と舌における、総菌数、OTU数(細菌の種の数)、細菌叢の経時的変化(術前口腔ケアの前後、挿管時、抜管時、手術翌日、手術1週間後)と、臨床指標(歯周ポケット深さ、歯肉出血、OHI-S、舌苔の量)の術前と術後の変化について比較検討した。

その結果、小田切宏樹は次の結論を得た。

1. 術前口腔ケア前と手術1週間後を比較し、OHI-S、BOPスコア、総菌数、OTU数が両群とも有意に減

少した。

2. 細菌叢の変化は、唾液、頬粘膜において、両群ともに抗生剤の影響を受け手術翌日でStreptococcus属の減少を認めた。CPC群においては、手術後1週間まで菌叢が維持されたがPVP-I群は手術前と同程度となった。
3. 舌については細菌叢に大きな変化はなく、抗生剤による影響も受けていなかった。

1.の結果より、PVP-I剤剤、CPC剤剤を併用した周術期口腔管理は、術後も良好な口腔内の状態を維持できることが示唆された。また、過去の報告でStreptococcus属は術後肺炎と関連し、制御は感染予防の鍵とされているが、2.の結果により、周術期におけるCPC剤剤の使用は、PVP-I剤剤と比較して抗生剤の効果を補助し、手術後の合併症のリスクを低減させる可能性が示唆された。さらに3.の結果より、舌への抗生剤や含嗽の効果は限定的であり、舌ブラシによる清掃や抗菌ジェルやスプレー剤などの局所投与など代替アプローチが必要であ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。

Prospective cohort study for postnatal CMV infection in preterm infants (早産児における後天性CMV感染に関する前向きコホート研究)

小川 亮

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】 サイトメガロウイルス (CMV) は先天性感染、後天性感染をきたし周産期に問題となるウイルスである。後天性CMV感染の感染経路としては母乳、輸血関連、産道感染が挙げられる。主な感染経路は母乳であり、感染予防のため凍結融解母乳の使用が推奨されているが、その感染予防効果は不十分とされている。後天性CMV感染症は、正期産では不顕性感染であるが、早産児、特に在胎32週以下では敗血症様症候群、肺炎、壊死性腸炎、肝腫大、肝酵素上昇、血小板減少症、好中球減少症などの症状を呈することがある。後天性CMV感染症は早産児の重要な問題だが、その疫学は十分に明らかにされていない。在胎32週以下の後天性CMV感染の感染率、リスク因子、感染を疑う臨床像を明らかにするため前向きコホート研究を行った。

【方法】 対象は2017年7月から2021年3月に長野県立

こども病院NICUに入院した在胎32週以下の早産児とした。本研究は、長野県立こども病院倫理委員会(承認番号29-11)が承認した。両親の書面による同意のもと実施した。当院のNICUに入院した対象者は、生後3週間以内と修正35週以降の2回、尿CMV核酸検査で感染の有無を評価した。生後3週間以内の陽性例を先天性感染、生後3週間以内の検査が陰性で修正35週以降で陽性例を後天性感染、2回とも陰性を感染なしとした。母乳は生後1週間までは新鮮母乳、生後1週から修正35週までは凍結融解母乳、修正35週以降は新鮮母乳もしくは凍結融解母乳を与えた。輸血は、CMV抗体陰性の血液製剤のみを使用した。診療録より周産期情報、退院までの臨床的症候、血液検査のデータを収集した。

【結果】 在胎32週以下で出生し、2回の尿CMV検査を行ったのは139例であった。先天性感染3例(2.2%)、後天性感染例7例(5.0%)、感染なし129例(92.8%)

であった。後天性感染群では全例で凍結融解母乳が使用されていた。在胎期間は後天性感染群が感染なし群と比較し有意に短かった ($p=0.04$)。凍結融解母乳が与えられた期間は後天性感染群で有意に長かった ($p=0.03$)。母体年齢は後天性感染群で有意に高齢であった ($p=0.001$)。輸血回数は両群で有意差はなかった。後天性感染例の症状は肺炎5例が最多であった。1例で敗血症様症候群, 肺炎, 壊死性腸炎, 肝腫大を認め, 死亡した。後天性感染例で認めた血液検査の異常所見は好中球減少 ($<1500/\mu\text{L}$) 6例, CRP 上昇 ($>1.0\text{ mg/dL}$) 5例, 直接ビリルビン高値 ($>1.0\text{ mg/dL}$) 4例, 血小板減少 ($<150000/\mu\text{L}$) 2例, 肝酵素上昇 (AST $>140\text{ U/L}$, ALT $>50\text{ U/L}$) 1例であった。後天性感染群と感染なし群でオッズ比を検討したところ, 有意差があったのは肺炎 (オッズ比14.5; 95%CI, 2.62-80.1), 好中球数減少 (オッズ比8.88; 95%CI, 1.04-76.0), CRP 上昇 (オッズ比19.0; 95%CI, 3.38-107.0) であった。在胎期間を調整因子とした多変量ロジスティック解析を行ったところ, 有意差があったのは母体年齢, 肺炎, CRP 上昇であった。母体年齢を調整因子とした場合は, 有意差があったのは肺炎, CRP 上昇であった。

【結論】 在胎32週以下の早産児の後天性 CMV 感染率は5.0%であった。リスク因子は在胎期間が短いこと, 凍結融解母乳の使用期間が長いこと, 母体高齢であった。後天性感染が肺炎, 好中球数減少, CRP 上昇の原因となっている可能性がある。早産児に対する母乳の凍結融解による後天性感染予防効果は十分ではなかった。

(論文審査の結果の要旨)

サイトメガロウイルス (CMV) は先天性感染, 後天性感染をきたし周産期に問題となるウイルスである。後天性 CMV 感染の感染経路としては母乳, 輸血関連, 産道感染が挙げられる。輸血関連感染は CMV 抗体陰性血液製剤で概ね防ぐことができ, 産道感染率は極めて低いとされ, 主な感染経路は母乳と考えられている。経母乳感染予防のため凍結融解母乳の使用が推奨されているが, その感染予防効果は不十分と言われている。後天性 CMV 感染症は, 正期産では不顕性感染であるが, 早産児, 特に在胎32週以下では敗血症様症候群, 肺炎, 壊死性腸炎, 肝腫大, 肝酵素上昇, 血小板減少症, 好中球減少症などの症状を呈することがある。在胎32週以下の後天性 CMV 感染の感染率, リスク因子, 感染を疑う臨床像を明らかにするため前向きコホート

研究を行った。

対象は2017年7月から2021年3月に長野県立こども病院 NICU に入院した在胎32週以下の早産児とした。対象者は, 生後3週間以内と修正35週以降の2回, 尿 CMV 核酸検査で感染の有無を評価した。生後3週間以内の陽性例を先天性感染, 生後3週間以内の検査が陰性で修正35週以降で陽性例を後天性感染, 2回とも陰性を感染なしとした。母乳は生後1週間までは新鮮母乳, 生後1週から修正35週までは凍結融解母乳, 修正35週以降は新鮮母乳もしくは凍結融解母乳を与えた。輸血は, CMV 抗体陰性の血液製剤のみを使用した。

その結果, 小川らは次の結論を得た。

1. 在胎32週以下で出生し2回の尿 CMV 検査を行った139例のうち, 先天性感染3例 (2.2%), 後天性感染例7例 (5.0%), 感染なし129例 (92.8%) であった。
2. 後天性感染群は感染なし群と比較し, 在胎期間が有意に短く, 凍結融解母乳を与えられた期間が有意に長く, 母体年齢が有意に高齢であった。
3. 後天性感染群では肺炎を呈したのが5/7例で, いずれも気管分泌物のグラム染色で貪食像がなく, CRP 軽度上昇を認め, ウイルス感染を疑う所見であった。敗血症様症候群, 肺炎, 壊死性腸炎, 肝腫大を呈した1例は死亡した。
4. 後天性感染群は好中球数減少 ($<1500/\mu\text{L}$) を6例, CRP 上昇 ($>1.0\text{ mg/dL}$) を5例, 直接ビリルビン上昇 (1.0 mg/dL) を4例で認めた。
5. 後天性感染群と感染なし群でオッズ比を検討したところ, 有意差があったのは肺炎, 好中球減少, CRP 上昇であった。

母乳による後天性 CMV 感染が考えられ, 凍結融解母乳による感染予防効果は十分ではないと思われた。後天性感染例で敗血症様症候群を呈して1名の方が亡くなった。Real-time PCR 法を実施していないため, 後天性 CMV 感染と, 臨床症状や血液検査異常所見の因果関係が定かでないが, 後天性感染が肺炎, 好中球数減少, CRP 上昇の原因となっている可能性がある。早産児の後天性感染症の予防策の見直しが必要と考えられた。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のあるものと認めた。

Clinical and molecular features of 66 patients with musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome caused by pathogenic variants in *CHST14* (mcEDS-*CHST14*) (*CHST14*の病的バリエーションを原因とする筋拘縮型エーラスダンロス症候群 (mcEDS-*CHST14*) 66症例の臨床的および分子学的特徴)

湊川 真理

(論文の内容の要旨)

【背景と目的】筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群 (musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome : mcEDS) は、近年原因遺伝子が明らかになった新しいタイプのEDSである。mcEDSは*CHST14* (mcEDS-*CHST14*) もしくは*DSE* (mcEDS-*DSE*) の両アレール機能喪失型変異を原因とし、いずれも多発関節拘縮、皮膚脆弱性、顔貌所見を主な所見とするが、その他の合併症は多岐に渡る。mcEDSは新規稀少疾患であり、バリエーションの分布や、個々の合併症の頻度を含めた自然歴等、明らかではない。本研究は、国際共同臨床調査により、mcEDS-*CHST14*既報告例に新規報告例を加えた44家系66症例のバリエーションおよび臨床所見の詳細を体系的に分析し、mcEDS-*CHST14*のバリエーションの分布および自然歴を明らかにする。

【方法】自験例の遺伝子解析は、末梢血リンパ球からDNAを採取し、*CHST14*の直接シーケンスもしくは*CHST14*を含む結合組織関連疾患のカスタムパネルを用いた次世代シーケンスで行った。mcEDS-*CHST14*およびmcEDS-*DSE*の臨床情報とバリエーション情報は、以下の3つの方法を組み合わせて収集した。

① 臨床経過に関する質問紙への主治医による回答、② 既報論文、③ 信州大学医学部附属病院のカルテ。mcEDS-*CHST14*とmcEDS-*DSE*の合併症を比較するため、Mann-Whitney Uを算出した。mcEDSの重篤な合併症である巨大皮下血腫と関節脱臼の累積罹患率を算出した。幼少期と思春期以降の顔貌の変化を、Face2Gene (FDNA, USA) のDeepGestaltテクノロジーを用いたアプリケーションにて検証した。

【結果】mcEDS-*CHST14*の新規18症例を含む、48家系66症例(男女比1:1; 0-59歳)を分析した。日本人が27家系で最多であった。遺伝型と表現型の明確な関連は示唆されなかった。顔貌(大泉門開大と閉鎖遅延、眼瞼裂斜下、眼間開離)、骨格(特徴的な指の変形、進行性の足変形、反復性関節脱臼)、皮膚(過伸展、細かい手掌線、易出血性)、眼の所見(屈折異常)は共通所見として顕著だった(>90%)。巨大

皮下血腫、側弯、便秘、停留精巣、筋緊張低下、運動発達遅滞も多くの症例が共有していた(>80%)。mcEDS-*CHST14*の幼少期と成人期の顔貌所見を比較した受信者動作特性曲線下面積(area under the receiver operating characteristic curve; AUC)の値は0.94であり、幼少期から成人期にかけてその特徴は変化することが示唆された。関節脱臼と巨大皮下血腫の初発年齢の中央値はいずれも6歳で、多くが小児後期までに初発を経験していた。全症例中9例は既死例であり、死亡年齢の中央値は12歳で、死因はいずれも本疾患の関連合併症であった。mcEDS-*CHST14*とmcEDS-*DSE*を比較した所、mcEDS-*CHST14*の症例の方が関節や皮膚の特徴的所見を高頻度で認めた。

【考察】mcEDS-*CHST14*に関する初の国際共同臨床調査である本研究により、mcEDS-*CHST14*の詳細な自然歴が明らかになった。胎児期から内転拇指や内反足が見られ、ほぼ全例で出生時に多発関節拘縮と筋緊張低下を認める。小児期には内反足や側弯の治療を要し、特に内反足の進行による運動発達遅滞がみられることもある。小児期に共通する重篤な合併症に関節脱臼と巨大皮下血腫があり、患者のQOLを著明に低下させる。この他、小児期に認める重要な合併症に、反復性尿路感染、膀胱機能障害、難聴、緑内障、網膜剥離、屈折異常、歯列不整、便秘症がある。思春期以降は、小児期に発症し得る合併症に加え、稀ではあるが、気胸、大腸憩室、胃潰瘍、心臓弁膜症等、重篤な合併症を生じ得る。

mcEDSは特徴的な骨格所見と顔貌所見から診断可能な疾患であるが、本研究で示唆されたように幼少期から成人期にかけて顔貌の特徴は変化するため、診断に際しその理解は重要である。また、mcEDS-*DSE*よりmcEDS-*CHST14*の方が重症度は高いことが示唆され、過去の分子生物学的研究からも矛盾ないと考えられた。本研究対象者44家系中、日本人が27家系と最多であった。これは日本人が一定頻度で有している特有のバリエーションが関連する創始者効果であると推察される。

本研究により mcEDS-*CHST14* の詳細な臨床症状とバリエーションの分布が明らかになった。生涯を通して自然歴に応じた細やかで専門性の高い診療が不可欠であり、疾患について医療者間で広く共有し、各専門科が連携しながら診療する必要があると考える。

(論文審査の結果の要旨)

筋拘縮型エーラス・ダンロス症候群 (musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome : mcEDS) は、近年原因遺伝子が判明した新しいタイプの EDS である。mcEDS は *CHST14* (mcEDS-*CHST14*) もしくは *DSE* (mcEDS-*DSE*) の両アレル機能喪失型変異を原因とする。多発関節拘縮、皮膚脆弱性、顔貌所見を主な所見とし、その他の合併症は多岐に渡る。mcEDS は新規稀少疾患であり、バリエーションの分布や自然歴は明らかではない。本研究では、これらを明らかにするため、48家系66症例の mcEDS-*CHST14* の遺伝学的所見および臨床所見を体系的に分析した。以下のいずれかの方法で臨床情報とバリエーション情報を収集した。
 ① 臨床経過に関する質問紙への主治医による回答、
 ② 既報論文、
 ③ 信州大学医学部附属病院のカルテ。
 mcEDS-*CHST14* と mcEDS-*DSE* の合併症の頻度を比較するため所見毎に Mann-Whitney U を算出した。mcEDS の重篤な合併症である巨大皮下血腫と関節脱臼それぞれの累積罹患率を算出した。幼少期と思春期以降の mcEDS の顔貌を比較し、受信者動作特性曲線下面積 (area under the receiver operating characteristic curve ; AUC) を算出した。

その結果、湊川真理は次の結論を得た。

1. mcEDS-*CHST14* の病的バリエーションの種類は様々で、ミスセンス変異は sulfotransferase 2ドメイン上に集中していた。
2. 遺伝型と表現型の間には明らかな関連は示唆されなかった。
3. 顔貌、骨格、皮膚、眼、その他、症例間で共通する所見を多数認め、各所見の出現頻度が明らかになった。
4. mcEDS-*CHST14* の幼少期と成人期の顔貌を比較し、算出した AUC は0.94で差異を認めた。
5. 関節脱臼と巨大皮下血腫の初発年齢の中央値はいずれも6歳で、多くは小児後期までには初発を経験していた。
6. 既死例は9例で、死因はいずれも本疾患の合併症に関連していた。
7. mcEDS-*CHST14* は mcEDS-*DSE* より重症度が高いことが示唆された。

以上より、mcEDS-*CHST14* の詳細な臨床経過と遺伝学的事項が明らかになり、生涯を通じて自然歴に応じた細やかで専門性の高い診療の必要性が示唆された。

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。

The changes in frailty and death within six months of discharge in heart failure patients 80 years and older (80歳以上の心不全患者における退院後6か月以内の虚弱の変化と死亡)

大塚りさ

(論文の内容の要旨)

【はじめに】高齢心不全患者では、加齢に伴う様々な臓器機能の低下によって、ストレス要因への対処能力の低下状態、すなわち虚弱が生じやすい。先行研究では、心不全で虚弱があると死亡や再入院のリスクが高まることは分っているが、虚弱度の経過は調べられていない。また、高齢心不全患者の虚弱に関する研究の多くは、認知障害や歩行障害の人を除外している。このため、虚弱な高齢心不全患者にどう支援すべきかのエビデンスが少ない。そこで本研究では、高齢心不全患者の退院支援のあり方の示唆を得るため、退院6か月後の死亡や虚弱度変化と、予後に影響する要因を調べた。

【方法】対象は、単施設の循環器内科の80歳以上の心不全入院患者とし、除外基準は、入院中の死亡や他の重篤疾患の発症、同意不可とした。当該施設は、循環器外科はないが循環器疾患の地域中核病院であった。虚弱度は9段階のClinical Frailty Scale (CFS) で評価した。CFSは、医療従事者が患者の機能的状態や併存症を把握して評定するもので、所要時間が短く、虚弱の検出感度が良好なので用いた。退院時をベースラインとし、6か月後の死亡と死亡理由、虚弱度の変化(維持・改善・悪化)と悪化の理由を調べた。6か月後のCFSは、対面か電話か手紙による聴取で行った。死亡や虚弱度悪化の理由は診療録で確認した。死亡や虚弱度悪化のリスク要因の分析では、ベースライン時の属性を虚弱度維持・改善群のものと比較した。解析は単変量解析、有意水準は $p < .05$ とした。本研究は信州大学医倫理委員会の承認を得て行った。

【結果】96名を追跡した。平均年齢は 89 ± 4.3 歳、男性が52名(54.2%)、心不全初回入院が47名(49.0%)であった。心不全の原因は弁膜症75名(78.1%)や高血圧62名(64.6%)等で、併存症は心房細動、認知障害、睡眠時無呼吸症候群、糖尿病などであった。退院時のNew York Heart Association心機能分類(NYHA)は、Ⅱが12名(12.5%)、Ⅲが75名(78.1%)、Ⅳが9名(9.4%)であり、CFSは4(ごく軽度虚弱)~6(中等度虚弱)が76名(79.1%)、7(重度虚弱)~8(非常に重度虚弱)が20名(20.9%)

であった。退院6か月後に、14名(14.6%)が死亡、虚弱度は改善1名(1.1%)、維持67名(69.8%)、悪化12名(12.5%)であり、2名(2.1%)が追跡不可であった。14名の死亡理由は、心不全、老衰、腎不全、感染症であり、12名の虚弱度悪化理由は、心不全増悪、がん悪化、てんかん悪化、脳梗塞発症、認知症発症、転倒骨折であった。死亡群には、高NYHA、心不全複数回入院、低hemoglobin、低albumin、低Barthel index (BI)、低CFSの人が多く($p < .01$)、高BNP、低e-GFR($p < .05$)の人も多かった。虚弱度悪化群は、ACE-I/ARB非処方、糖尿病でない人が多かった($p < .05$)。また、ACE-I/ARB非処方の人は、入院期間が長く($p < .05$)、BMIとBIが低かった($p < .01$)。糖尿病なしの人は、低BMIであった($p < .01$)。

【考察】本研究の結果、80歳以上の心不全患者が退院6か月後に、14.6%が死亡、12.5%が虚弱度悪化に至ることが示された。この死亡率を先行研究と比べると、循環器外科のある病院より高値、循環器外科の無い病院の中では低値であり、手術適応の低い高齢心不全入院患者の実態を反映していると思われる。本研究で示された死亡のリスク要因は、重症心不全、貧血、低栄養、高度虚弱、腎機能低下など、先行研究と同様であった。一方で、虚弱度悪化のリスク要因は、不良アウトカムとして先行研究で調べられている再入院と同様に少数で、ACE-I/ARB非処方や糖尿病なしであった。ACE-I/ARBは心不全患者への有用性が示された薬剤であり、虚弱の悪化抑制に影響した可能性はあるが、本研究の非処方群は入院期間が長くBMIやBIが低く、状態不良による薬剤不耐性の影響も考えられた。糖尿病は、高齢者では心不全患者の予後不良のリスク要因でないとする報告はあるが、従来の研究とは違う結果であり、さらなる検討を要する。このように虚弱度悪化のリスク要因抽出の難しさを踏まえると、高齢心不全患者の虚弱度悪化予防には、本研究で示された虚弱度悪化理由に対処するとよいと思われる。本研究は、小サンプル、虚弱度の変化を2時点で評価、CFSの再現性が未確認といった限界はあるが、高齢心不全患者の退院支援として、①心不全や併存症の三次予防と、②転倒骨折や認知症や脳卒中の一次・

二次予防が望ましいことを示唆した。②は推奨する論文はあるが未検証であり、今後、検証したいと考えている。

(論文審査の結果の要旨)

大塚りさによる本論文は、80歳以上の心不全入院患者を対象とし、退院6か月後までの虚弱度の変化と死亡について、それぞれの関連因子を探索的に研究した論文である。超高齢社会となった我が国において、心不全パンデミックと呼ばれる心不全患者数の増加は、高齢者人口の多い地域医療では喫緊の課題となっている。特に入院による虚弱（フレイル）の進行は、介護度の上昇のみならず心不全の予後にも関わることが報告されていることから、地域医療における大きな課題であり、本研究はその課題解決に示唆を与える成果が期待された。

1. 論文の概要

本論文は臨床研究論文であり、診療科として循環器内科を有するが循環器外科のない地域中核病院において、心不全のために入院治療を要した80歳以上の高齢患者を対象として実施された。96名について退院時の評価を基準として、6か月後までの死亡と死亡理由、そして虚弱度の変化を9段階のClinical Frailty Scale (CFS) により評価し、退院時と比較したCFSの維持、改善、悪化が調査された。

対象者の平均年齢は89±4.6歳、男性が54.2%、心不全の背景疾患は、弁膜症(78.1%)、高血圧症(64.6%)、虚血性心疾患(18.8%)、そして併存疾患は、心房細動(72.9%)、認知症(48.4%)、睡眠呼吸障害(29.2%)、糖尿病(27.1%)などであり、高齢者心不全で知られている多彩な背景が示された。さらに、高齢者心不全で頻度の高い、左室駆出率が保たれた心不全(HFpEF)を60.4%に認めた。退院時のNYHA心機能分類はⅢ(78.1%)、CFSは4～6(79.1%)が主体であった。

6か月後までに14名(14.6%)に認めた死亡と関連する因子は、重症心不全(NYHA心機能分類およびBNP値が高い、複数回の心不全入院)、ヘモグロビン低値(貧血)、アルブミン低値(低栄養)、Barthel index低値(基本的日常生活動作の制限)、推算糸球体濾過率の低値(腎機能障害)などであった。一方、12名(12.5%)に認めたCFSの上昇(虚弱度悪化)と関連する因子は、レニン・アンジオテンシン系阻害薬を内服していない例、非糖尿病例であり、そして虚弱度悪化の理由となった病態として、心不全の増悪、がん・てんかんの悪化、脳梗塞および認知症の発症、

転倒・骨折があったことが確認された。

以上より本研究では、地域中核病院の実臨床における高齢者心不全の実態と、退院後6か月までの予後が示された。死亡および虚弱度悪化の関連因子に関する解析は、対象数が少なく単変量の解析に限定された点に研究の限界が存在したが、死亡と関連した因子は先行研究と一致していた。虚弱度の悪化は少数であり、退院時と退院6か月後の2時点の評価による解析の限界や、交絡因子の存在が考察された。これらの限界があるものの、本研究では、高齢心不全患者の予後改善や虚弱の進行を予防するための方策に示唆を与える結果が得られた。

2. 審査結果

審査に先立ち、大塚より本研究の概要について説明があった。高齢心不全患者の退院支援における再発予防策の重要性を明らかとし、虚弱度の変化を解析した点に本研究の独自性があり、死亡と虚弱度の上昇と関連を認めた要因について、解析結果が共有された。研究成果に基づいて、高齢心不全患者の退院支援として、心不全や併存症の三次予防と、転倒骨折や認知症の進行および脳卒中の予防が、予後の改善や虚弱の進行予防のために重要であることの説明がなされた。

最終審査では、最初に研究デザインを確認し、研究対象とした虚弱について、定義と評価方法、改善や悪化の判断基準について、質疑応答があった。大塚氏は、虚弱を評価する1～9の9段階のCFSについて、段階ごとの評価基準およびフローチャートにより判別されること等を詳しく説明した。近年トピックスとなっている心不全と虚弱の関連について、因果関係は明確ではないが、双方に共通する病態として神経内分泌や代謝の異常、炎症等が存在し、患者の予後を規定するとの先行研究があることが紹介された。

続いて虚弱評価における下肢筋力やバランス機能の評価、通院心臓リハビリテーション(外来心リハ)の利用状況、虚弱例に認める転倒骨折の原因について質問があった。確かに入院による身体機能の低下が転倒骨折等の予後に影響した可能性が存在すると考えられ、実際に研究対象例の多くで下肢筋力やバランス機能の評価が実施されていたことから、今後の研究テーマとして提起された。また、外来心リハに関して、実務の主担当は理学療法士だが、実際の退院支援において、セルフマネジメントの工夫などの心不全教育、活動量の指導などに、作業療法士がチームの一員として貢献していることが共有された。

また、本研究の対象となった高齢心不全患者の、退院後の死亡および虚弱の進行と関連するその他の因子に関して、議論が行われた。死亡と関連する因子に関して、大塚は、メタアナリシスやガイドラインにおいて、男性、年齢、左室駆出率が低下した心不全 (HFrEF)、血圧、心拍数、心房細動、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、認知障害などが報告されている事実を説明した。ただし、従来の研究の多くにおいて、本研究が対象とした超高齢者や虚弱高齢者が除外されており、超高齢社会となった我が国の高齢者心不全の予後に関わる要因に

関して、さらに研究を進展させる必要であることが共有された。

以上から、本論文は地域中核病院における高齢者心不全の実態に基づいて、診療チームによる退院支援や予後改善のための新たな視点と示唆を提供するものであり、博士論文として本研究の内容と成果は高く評価されるものである。主査および副査は、本論文が信州大学大学院医学系研究科保健学専攻の博士論文にふさわしいものであると全員一致して判断した。

The effects of visual cues from optical stimulation devices on gait disturbance in patients with Parkinson's disease (光刺激装置による視覚的キューがパーキンソン病患者の歩行障害に及ぼす影響について)

西川 良太

(論文の内容の要旨)

【目的】本研究は、パーキンソン病 (PD) 患者の歩行障害に対して、発光時間や患者個人の好みに基づいて発光条件を調整できるウェアラブルデバイスを用いた視覚的手掛かり (visual cue) が、歩行機能に与える影響を定量的に検証することを目的とした。

【参加者と方法】24名のPD患者がコントロール条件としてゴーグルタイプの視覚的手掛かり装置 (Optical Gait Analysis System, OGAS) を刺激なしで装着して約10 mを歩行した際の各被験者の歩行周期における stride duration を測定した。次に各被験者の歩行周期を元に、その10%もしくは50%の発光持続時間でLEDを点滅させるという2つの刺激条件 (LR10%条件・LR50%条件) を設定し、各条件での歩行の運動学的特性 (歩行パラメータ) を簡易歩行分析システム (HASOMED社製, RehaGait) を用いて測定した。2つの刺激条件での歩行後、どちらの刺激条件が歩きやすいかという点について口頭にて質問し、相対的に歩きやすいと感じた方の条件 (Pref条件)、歩きにくいと感じた方の条件 (N-Pref条件)、コントロール条件における歩行パラメータの比較を行った。3条件間における歩行パラメータの比較として、反復測定分散分析またはフリードマン検定を行った後に事後検定を行った。有意水準は5%とした。

【結果】視覚的手掛かりを用いた条件 (LR10%条件・LR50%条件) は、コントロール条件と比較して、有意に stride duration の平均値 ($p < 0.001$) と変動係数 (CV) ($p = 0.002$) を減少させ、ケイデンスの平均値 ($p <$

0.001) を増加させた。また、Pref条件ではN-Pref条件よりも歩行速度が有意に速くなった ($p = 0.043$)。

【結論】本研究の結果より、ゴーグルタイプのウェアラブルな視覚的手掛かり装置の使用により、PD患者の歩行における一步一步の所要時間の短縮と規則性の向上が認められるとともに、患者が歩きやすいと感じる視覚刺激の条件を設定することで、歩行速度が向上する可能性が示唆された。今後は、患者の好みやニーズに合わせて発光状況をカスタマイズできるウェアラブルデバイスの開発と製品化により、PD患者の日常生活における歩行機能の改善に貢献していきたい。

(論文審査の結果の要旨)

最初に申請者から本研究論文の概要の説明が行われた。パーキンソン病患者に対する、発光条件を調整できるゴーグルタイプのウェアラブルデバイス (視覚的手掛かり装置: Optical Gait Analysis System, 以下OGAS) を開発し、その使用条件が歩行能力に及ぼす影響を検討した内容であった。市中病院にて研究協力を求め、説明を行い同意の得たパーキンソン病患者25人が対象となった。歩行能力のうち stride duration やその変動係数、ケイデンス、そして歩行速度を指標とした。OGAS使用にあたっては歩行周期の10%と50%、LEDを発光させ左右に点滅を繰り返す条件を設定した。次に1) 装着なし、2) 10%点滅、3) 50%点滅ごとに主観的歩行評価を行い、歩行環境肯定群と歩行環境否定群に分けて、測定指標の比較を行った。

stride duration とその変動係数では、点滅なし条件との比較で10%点滅条件と50%点滅条件が有意に低

下していた。逆にケイデンスの平均値を増加させた。歩行環境否定群に比べ、歩行環境肯定群の歩行速度は増加した。

これらの発表内容と原著論文を照らし合わせて質疑が行われた。タイトルにある gait disturbance は論文内の測定指標に十分反映されていないこと、疾患の重症度分類や特に歩行障害の代表であるすくみ足の情報が不十分であること、stride duration の低下の考察が不十分であることが指摘された。一方、OGAS で開発

された歩行周期に応じた LED 発光機能は世界で初めてのものであり、患者の歩行評価や装着練習によるすくみ足現象の改善を図るといった今後の研究課題に有用である可能性が示唆された。

審査において質疑に対する申請者の応答は真摯に行われ、その説明も論理的であり、本研究の中心的役割を果たして遂行されたことが伺えた。

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

Validity of temporo-spatial characteristics of gait as an index for fall risk screening in community-dwelling older people (地域在住高齢者の転倒リスク・スクリーニングの指標としての歩行における時間的・空間的パラメータの妥当性)

馬場 孝 浩

(論文の内容の要旨)

【目的】65歳以上の地域在住高齢者が1年間に転倒する割合は約30%であり、転倒により骨折を受傷する割合は、6%または13%と報告されている。65歳以上の高齢者を対象として転倒時の状況を調査した研究では、転倒前の活動は、立位・歩行が56.5%と最も多く、転倒の原因としては、バランス/歩行の問題が61.9%を占めていたと報告している。以上の先行研究より、転倒は歩行中に頻繁に発生していることが報告されているため、本研究では地域在住高齢者の歩行機能に注目することとした。歩行機能を測定する方法としては、パフォーマンスを用いた臨床評価、3次元動作解析装置、慣性センサー、歩行路に設置する光学式センサーを用いた方法などが行われている。一般的に、3次元動作解析装置は高価で測定場所が実験室などに限られ測定時に複雑な操作が必要となることが挙げられ、歩行路に設置する光学式センサーを用いて測定する方法は、関節角度を測定することができないという問題を有している。一方、近年の科学的進歩により、慣性センサーは安価で携帯可能であり、生活する場面での歩行評価を客観的にできるよう改良されてきている。このような観点から本研究では、地域在住高齢者の歩行機能を分析するために慣性センサーを使用することとした。転倒と歩行の時間的・空間的パラメータに関するシステムティックレビューでは、歩行速度、ストライド長、ステップ長を測定することで転倒者と非転倒者の判別ができる可能性があるが、レビューした論文は測定方法、対象者選定、転倒の定義が均一ではないという問題点が含まれており、今後さ

らなる研究が必要であると報告している。そこで、本研究の目的は、転倒経験者と転倒非経験者を含む地域在住高齢者の歩行機能を慣性センサーを用いて定量的に測定し、転倒リスク・スクリーニングの指標としての歩行における時間的・空間的パラメータの妥当性を感度、特異度、カットオフ値を分析することにより検証することとした。

【方法】対象は、介護予防事業に参加している65歳以上の地域在住高齢者50名であり、本研究の内容を説明し同意を得た。採用基準は、歩行補助具を使用せずに歩行が自立している者とし、除外基準は、脳卒中、パーキンソン病、股関節や膝関節の手術後、リウマチの診断を受けた者とした。過去1年間の転倒歴の有無は問診にて聴取した。歩行機能は、裸足の状態で簡易歩行分析システム(キッセイコムテック製、RehaGait)を装着し、先行研究を参考にして16mの平地を通常で1分間の休憩をとりながら2回歩行測定した。RehaGaitは、3軸加速度、ジャイロスコプ、磁力計を含む7つのセンサーで構成されており、足部(外果下)、下腿(足関節直上)、大腿(膝関節直上)、第4・第5腰椎間にベルトで固定した。センサーのキャリブレーションは、安静時立位保持10秒と立位で足を前に出す動作により実施した。歩行の時間的パラメータ(ストライド長、速度、ケイデンス)と、空間的パラメータ(足高、ヒールストライク角度、足関節角度、膝関節角度、股関節角度)は、システム独自のソフトウェアを用いて算出した。統計解析は、転倒無し群と転倒有り群の群間比較として、各データの正規性をShapiro-Wilk検定にて解析し、正規性がある

場合は対応のない t 検定, 正規性がない場合は Mann-Whitney の U 検定を用いた。なお, 性差についてはカイ 2 乗検定を用いた。有意水準は 5% とした。さらに, 群間比較で有意差が認められた歩行の時間的・空間的パラメータは, Receiver Operating characteristic curve (ROC 曲線) を作成しカットオフ値, 感度, 特異度を決定した。

【結果】 50名 (女性43名, 男性7名) の地域在住高齢者が研究に参加した。年齢, 性別, 身長, 体重の違いを群間にて確認したが有意差は認められなかった。歩行時の時間的・空間的パラメータを転倒者と非転倒者で比較した結果, 歩行速度と左右ヒールストライク角度において有意差が認められた。歩行速度は, AUC0.686, カットオフ値0.83 m/s, 感度0.85, 特異度0.56, 左ヒールストライク角度は, AUC0.722, カットオフ値15.8度, 感度0.79, 特異度0.63, 右ヒールストライク角度は, AUC0.691, カットオフ値16.5度, 感度0.68, 特異度0.69であった。

【結語】 慣性センサーを使用して歩行速度とヒールストライク角度を測定することは, 地域在住高齢者の転倒リスク・スクリーニングとして有効な方法である可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

最初に申請者から本研究論文の概要の説明が行われた。転倒経験者と転倒非経験者を含む地域在住高齢者の歩行機能を慣性センサーを用いて定量的に測定し, 転倒リスク・スクリーニングの指標としての歩行における時間的・空間的パラメータの妥当性を感度, 特異度, カットオフ値を分析する内容であった。介護予防教室にて研究協力を求め, 参加者100人が対象となった。歩行機能は, 裸足の状態で簡易歩行分析システム (キッセイコムテック製, RehaGait) を装着し2回歩行測定した。歩行の時間的パラメータ (ストライド長,

速度, ケーデンス) と, 空間的パラメータ (足高, ヒールストライク角度, 足関節角度, 膝関節角度, 股関節角度) が算出された。転倒無し群と転倒有り群の群間比較, 群間比較で有意差が認められた歩行の時間的・空間的パラメータによる, Receiver Operating characteristic curve (ROC 曲線) を作成しカットオフ値, 感度, 特異度を求めた。

選択基準に該当する50人を解析対象者とした。50名 (女性43名, 男性7名) の分析で, 歩行速度と左右ヒールストライク角度において有意差が認められた。歩行速度は, AUC0.686, カットオフ値0.83 m/s, 感度0.85, 特異度0.56, 左ヒールストライク角度は, AUC0.722, カットオフ値15.8度, 感度0.79, 特異度0.63, 右ヒールストライク角度は, AUC0.691, カットオフ値16.5度, 感度0.68, 特異度0.69であった。TUG と比べると同等とはいえないが, ある程度予測的妥当性を検証することができた。

これらの発表内容と原著論文を照らし合わせて質疑が行われた。タイトルにある validity は論文中の測定から具体的に十分説明されていないこと, 分析対象者の特徴の情報が不十分であること, 異なる歩行条件で測定した場合の考察が不十分であること, 引用文献がやや古いことが指摘された。一方, RehaGait で分析されたヒールストライク角度が転倒と関連した結果は新規性があり, 高齢者の歩行評価や練習における改善を図るための注意点として活用できる可能性が示唆された。

審査において質疑に対する申請者の応答は真摯に行われ, その説明も論理的であり, 本研究の中心的役割を果たして遂行されたことが伺えた。

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

Reminiscence Activates the Frontal Lobe and Ameliorates Negative Mood States in Cognitively Intact Older Adults (回想は認知機能が低下していない高齢者の前頭葉を活性化し, ネガティブな気分を改善する)

小林 千世

(論文の内容の要旨)

1. Introduction : 老化は身体的・認知的機能の低下を引き起こし, 加齢への適応や高齢者の自立, 生活の質に影響を与える。高齢化が進む現在, 高齢者の身体的・認知的機能低下を予防・改善する支援が重要とな

る。加齢に伴う認知機能低下予防法には薬物療法や非薬物療法がある。非薬物療法である回想法は高齢者の認知状態を改善する効果が報告されているが, 生理学的メカニズムは検証されていない。本研究では皮質領域の Oxy-Hb 濃度や Deoxy-Hb 濃度により脳活動を

評価可能な非侵襲的光学的手法である近赤外分光法 (NIRS) を用いて健康な高齢者の回想中の前頭葉活動を評価するとともに、心拍変動、POMS 得点、主観的健康観を測定し、回想の認知機能への影響とその基盤となる生理学的な変化を明らかにすることを目的とした。

2. Materials and Methods : 研究参加者は平均年齢 70.1 ± 4.7 歳の 21 名 (男性 6 名, 女性 15 名)。全員右利きで、平均 MMSE 得点は 29.2 ± 1.0 点である。回想は担当者が「子供時代の楽しかったことを思い出し、その内容を話してください」と促し、子供のころの楽しかった記憶を想起する Recalling と、想起した内容を説明する Storytelling で構成された。回想効果の評価指標として、前頭葉活動は左右前頭葉の Oxy-Hb 濃度・Deoxy-Hb 濃度、気分状態は Profile of Mood States (POMS) 得点と主観的健康観得点、自律神経活動 R-R 間隔を測定した。R-R 間隔は周波数解析を行った。データは Baseline と Recalling または Storytelling、回想前・後で比較した。

3. Results : 回想中に右前頭葉の Oxy-Hb 濃度は Baseline よりも Recalling および Storytelling の方が有意に高く ($p < 0.01$)、Deoxy-Hb 濃度は Baseline よりも Storytelling の方が有意に低かった ($p < 0.01$)。左前頭葉の Deoxy-Hb 濃度は Recalling および Storytelling が Baseline よりも有意に低く ($p < 0.001$)、Oxy-Hb 濃度は Recalling および Storytelling とともに有意な上昇は認められなかった。Recalling および Storytelling 中は左右ともに継続して Oxy-Hb 濃度の平均値が上昇傾向を示し、Deoxy-Hb 濃度の平均値は低下傾向を示した。気分状態は POMS のネガティブな気分得点が回想後に有意に低く (A-H : $p < 0.001$, C-B : $p < 0.05$, D-D : $p < 0.001$, T-A : $p < 0.001$, TMD : $p < 0.001$)、主観的健康観得点は回想後に有意に高くなった ($p < 0.01$)。自律神経機能を示す HF/LF/HF に有意な差は認められなかった。

4. Discussion : 認知機能が低下していない高齢者の前頭葉は、左右前頭葉の Oxy-Hb 濃度と Deoxy-Hb 濃度の変化から回想中に活性化されること、回想中の前頭葉の活性化に左右差がないことや、過去の楽しい記憶を想起するだけでなく、想起した内容を言葉にすることが活性化に有効であることが示唆された。また、回想することでネガティブな気分得点の改善や主観的健康観は向上することからネガティブな感情が改善すること考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

高齢者の認知機能の低下を予防することは高齢者の健康維持のために重要であるが、その方法の一つに回想法がある。認知機能に障害のない高齢者に対する回想法介入のポジティブな効果が報告されているが、回想法中および回想法後の前頭葉への効果の基盤となる生理学的メカニズムは十分に理解されていない。本研究は回想法を施行中の近赤外分光法近赤外線分光法 (Near-infrared spectroscopy : NIRS) による、両側前頭葉の血流、酸素代謝変化及び心拍変動による自律神経活動の変動、また施行前後での気分と主観的健康観の変化を測定し、回想法による影響を検討したものである。

実験手続きとして、回想法の手順は事前に対象となる参加者の年代を考慮して予備実験をもとに設計され各 2 分の Baseline 期、Recalling 期、Storytelling 期とされた。評価項目として試行中の NIRS の Oxy-Hb、Deoxy-Hb 濃度、Heart Rate Variability の HF 及び LF/HF、試行前後に、Profile of Mood States (POMS) 2 短縮版の各因子、主観的健康観が測定された。

21 名のサンプルに対して実験が行われ、平均年齢 70.1 ± 4.7 歳で全員 Mini Mental State Examination で認知機能異常がないことが確認された。結果として、Oxy-Hb は右側頭葉で $\text{Baseline} < \text{Recalling}$, $\text{Baseline} < \text{Storytelling}$ であり、Deoxy-Hb は右側頭葉で $\text{Baseline} > \text{Storytelling}$, 左側頭葉では $\text{Baseline} > \text{Recalling}$, $\text{Baseline} > \text{Storytelling}$ に統計学的に有意な変化を認めた。また、試行中 Oxy-Hb 平均値は上昇傾向を示し、Deoxy-Hb の平均値は下降傾向を示した。POMS では anger-hostility, confusion-bewilderment, depression-dejection, tension-anxiety, total mood disturbance で有意に改善を認めた。主観的健康観も試行後に有意な上昇を認めた。HRV には変化を認めなかった。

この結果から本研究は回想法に基づく介入が前頭葉を活性化し、認知機能に異常のない高齢者参加者のネガティブな気分を改善することを明らかにした。これらの知見は、臨床実践へのエビデンスを与える新規性の高いものであり、高齢者の QOL の向上に寄与する可能性のあるものである。

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。

Relative and absolute reliability of gait variables obtained from gait analysis with trunk acceleration in community-dwelling individuals with chronic stroke : a pilot study (地域在住の慢性期脳卒中患者の体幹加速度を用いた歩行分析から得られる歩行変数の相対・絶対信頼性：予備研究)

藤 本 知 宏

(論文の内容の要旨)

【はじめに】脳卒中のリハビリテーションは主に歩行の評価と治療に焦点が置かれており、歩行分析は患者の歩行能力を理解するうえで重要となる。近年、体幹加速度を計測する3軸加速度計を用いた歩行分析 Acceleration-based gait analysis (AGA) が行われている。AGAにより、歩行の安定性や対称性、円滑さの変数を表すことができ、慢性期脳卒中患者の転倒リスクとの関連、立位バランスやADL動作との関連が示されている。先行研究ではAGAの検者内信頼性は高いと報告されているが、慢性期脳卒中患者を対象としたものは少なく、minimal detectable change (MDC)を用いた絶対信頼性について検証した研究はない。またいずれの先行研究の歩行速度条件は快適歩行速度のみであり、最大歩行速度で信頼性を検討していない。最大歩行速度での歩行評価は運動学、運動力学的に快適歩行速度と異なり、運動障害や転倒恐怖感などの理解にもつながる。本研究の目的は、慢性期の脳卒中患者を対象としたAGAによる歩行変数の相対信頼性、絶対信頼性を快適歩行速度、最大歩行速度から検討することである。

【方法】参加者は25名の発症から6か月以上経過し、片側の麻痺である地域在住の慢性期脳卒中患者である(年齢 74.0 ± 6.6 歳；身長 161.2 ± 9.4 cm；体重 61.1 ± 10.7 kg)。参加者の基準は補装具の有無に関わらず介助なしで歩行可能、指示入力可能、歩行に影響を与えないような整形疾患、神経疾患、高次脳機能障害がない、バイタルサインが安定しているものとした。歩行評価は、1週間空けた2日間実施し、同じ検者が同じ時間に行った。歩行路は、加減速距離を6 m含む16 mとした。参加者は第3腰椎の高さに3軸加速度計を装着し、歩行時の前後、側方、垂直方向の加速度をサンプリング周波数100Hzで計測した。事前に練習後、快適、最大歩行速度の2つの歩行条件を1日に2回ずつランダムに実施し、2日間で計8回の歩行評価を行った。この際、歩行補助具や装具の使用を許可した。また参加者の体幹には転倒防止用のベルトを装着して評

価を行った。3軸加速度計から得られた前後、側方、垂直方向の体幹加速度から normalized Root Mean Square (nRMS)、Autocorrelation coefficientによる step regularity と stride regularity, improved harmonic ratio (iHR) を算出した。歩行速度、歩幅は、10 m歩行テストから算出した。統計はR (ver4.02)を使用した。各変数の正規性の確認後、検者内信頼性の確認に級内相関係数：ICC (1,1)、絶対信頼性の確認にBland-Altman分析を行い、standard error of measurement, MDC, MDC%を算出した。

【結果】AGAによる歩行変数のICCは、快適歩行速度、最大歩行速度ともに0.70-0.99であった。Bland-Altman分析からいずれの条件の変数で系統誤差は認めなかった。MDCは、nRMSが $0.06-0.25$ g, step regularity が $0.09-0.20$, stride regularity が $0.09-0.20$, iHR が $7.90-25.20$ であった。多くの変数で最大歩行速度の方が快適歩行速度よりもICCは高く、MDCは小さくなった。

【考察】本研究は、慢性期の脳卒中患者を対象としAGAによる歩行変数の相対信頼性、絶対信頼性を快適歩行速度と最大歩行速度で検討した。相対信頼性は、ICCの結果から慢性期の脳卒中患者を対象とした先行研究と同様に一定の信頼性を得た。絶対信頼性はAGAによる測定に系統誤差はなく、信頼性があるといえる。MDCは健常者よりも大きい結果であり、これは脳卒中患者が健常者と異なる運動学的、運動力学的な歩行パターンや歩行戦略を有していることに起因すると考える。また、快適歩行速度と比較して最大歩行速度条件では、歩行補助具の使用に関わらず、多くの変数でICCが高く、MDCが小さかった。脳卒中患者が最大歩行速度で歩行することで、歩行パターンや代償戦略のばらつきを減少させることが報告されており、このことはAGAのICCとMDCに関する我々の知見を支持する。本研究より慢性期脳梗塞患者におけるAGAによる歩行変数の相対信頼性と絶対信頼性が確認され、最大歩行速度での測定がより高い信頼性を得ることができると示唆された。本研究で得られた知

見は、今後より大きなサンプルサイズを用いた研究の基礎となり得る。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、慢性期の脳卒中片麻痺患者の歩行時の体幹加速度を3軸加速度計を用いて分析(Acceleration-based gait analysis (AGA))した際の歩行変数の相対信頼性、絶対信頼性を快適歩行速度、最大歩行速度から検討することを目的とした研究である。内容として、25名の発症から6か月以上経過し、片側の麻痺である地域在住の慢性期脳卒中患者を対象として、第3腰椎の高さに3軸加速度計を装着し、快適、最大歩行速度における歩行時の前後、側方、垂直方向の加速度をサンプリング周波数100Hzで計測し、2つの歩行条件を1日に2回ずつランダムに実施し、2日間で計8回の歩行評価を行った。3軸加速度計から得られた前後、側方、垂直方向の体幹加速度から normalized Root Mean Square (nRMS)、Autocorrelation coefficient による step regularity と stride regularity, improved harmonic ratio (iHR) を算出し、歩行速度、歩幅は、10 m歩行テストから算出した。その結果、AGAによる歩行変数の ICC は、快適歩行速度、最大歩行速度ともに0.70-0.99で、Bland-Altman 分析からいずれの条件の変数で系統誤差は認めなかったとしている。MDC は、nRMS が0.06-0.25 g, step regularity が0.09-0.20, stride regularity が0.09-0.20, iHR が7.90-25.20で、多くの変数で最大歩行速度の方が快適

歩行速度よりも ICC は高く、MDC は小さくなったとしている。

これらの結果から、慢性期の脳卒中患者を対象とした AGA による歩行変数の相対信頼性は、ICC の結果から慢性期の脳卒中患者を対象とした先行研究と同様に一定の信頼性を示し、絶対信頼性は AGA による測定に系統誤差はなく、信頼性があると述べている。また、MDC は健常者よりも大きい結果であり、これは脳卒中患者が健常者と異なる運動学的、運動力学的な歩行パターンや歩行戦略を有していることに起因すると考えられると考察している。さらに、快適歩行速度と比較して最大歩行速度条件では、歩行補助具の使用に関わらず、多くの変数で ICC が高く、MDC が小さかったことなどから、脳卒中片麻痺患者が最大歩行速度で歩行することで、歩行パターンや代償戦略のばらつきを減少させている可能性を推察した。

これらの研究成果は、従来観察による定性的歩行分析が中心であった脳卒中片麻痺患者の歩行分析に加えて、客観的で定量的な歩行分析を実施していくことの重要性を提言する貴重な指針になったものと考えられる。審査会では、主査・副査からの質問に対して、データや自身の考えを織り交ぜながら適確な回答を述べることができた。

以上より、主査・副査は一致して、本論文を博士の学位論文として価値のあるものであると判断した。

Immature Platelet Fraction and its Kinetics in Neonates (新生児における未成熟血小板分画とその動態)

小林 純

(論文の内容の要旨)

【背景】巨核球から放出された直後の RNA を多く含む血小板は網血小板 (RP) と呼ばれ、骨髄での血小板産生能を反映するとされている。RP の測定手技は煩雑であり、従来は臨床現場での測定はほとんど行われていなかったが、近年、Sysmex 社の多項目自動血球分析装置 XN アナライザを用いて RP を未成熟血小板分画 (IPF) として測定する方法が開発された。IPF は血小板減少症の鑑別を始めとした種々の病態の評価に用いられている。

血小板減少症は新生児に一般的に見られる血液異常である。IPF は末梢血検体で測定でき、血小板造血を比較的簡便に評価する指標となりうるが、新生児にお

けるデータはほとんどない。本研究では、新生児における IPF を臨床的に評価するために、出生時における IPF の基準範囲 (RI) を定義し、IPF に影響を与える要因を評価するとともに出生後の IPF の動態を分析した。

【方法】2018年10月から2020年2月に出生し、長野県立こども病院または信州大学医学部附属病院にて IPF を含む血球数算定が実施された新生児を対象に、出生時、生後14日、28日のデータを収集した。IPF を含む血球数算定には XN-1000または XN-9000を使用し、核酸染色色素である oxazine を用いた血小板測定専用チャンネル (PLT-F) において、前方散乱光と側方蛍光からなる二次元プロット上で成熟血小板と未成熟血小

板を区別し、全血小板に対する未成熟血小板の割合を IPF% として算出した。IPF 絶対数 (A-IPF) は、血小板数 (PLT) × IPF% から算出した。

本研究の対象は様々な臨床的背景を有する新生児例であるため、出生時の PLT が RI 内 ($150\text{--}350 \times 10^9/\text{L}$) の新生児について、多変量解析にて在胎週数、出生体重、性別に加え、在胎不当過小児、前期破水、新生児仮死、子宮内感染、染色体異常、呼吸障害、先天性心疾患の有無が IPF% に影響するかを評価した後、本解析にて抽出された因子を有さない症例から IPF% および A-IPF の RI を算出した。さらに、出生後、生後14日、28日の PLT と IPF の変動を解析し、ヘモグロビン濃度 (Hb)、網赤血球 (RET) の変動と比較した。

【結果】 533人の新生児から得られた合計822の血液サンプルを分析し、その内訳は出生時が423、生後14日が203、生後28日が196であった。出生時の PLT は330例が RI 内であり、46例は RI 未満、47例は RI を超えていた。多変量解析の結果、IPF% に影響を与える独立した因子として早産、新生児仮死、子宮内感染、染色体異常、呼吸障害が抽出された。これらの因子を有さない92例から算出した IPF%、A-IPF の RI はそれぞれ1.3~5.7%、 $3.2\text{--}14.5 \times 10^9/\text{L}$ であった。血小板減少症のない新生児では、生後14日および28日の PLT は出生時に比べて有意に増加していた。IPF% と A-IPF は生後14日でピークに達し、生後28日では低下したが出生時よりも高値であった。出生時および生後14日、28日の3ポイントのデータが揃っている26例の新生児において、個人内でも同様の変動が認められ、生後14日目には IPF% は出生時の約2倍、A-IPF は約3.3倍まで増加した。一方、Hb は出生後連続的に減少し、RET は生後14日に最低値を示し、その後増加した。出生時の PLT が $100 \times 10^9/\text{L}$ 未満の血小板減少症例19例のうち、16例では IPF% が RI を超えており、免疫関連血小板減少症2例では IPF% が18.7%、26.3%と著明に高値であった。

【考察】 本研究で定義した新生児の RI は、XN アナライザを用いた成人の IPF% の RI 上限を5.8%、7.3% とする報告と比較して臨床的判断に影響を与える程の差はなく、出生時の IPF は成人と同等の基準で評価可能であることが示唆された。ただし、新生児では生後2週間程度は一過性に増加する変動が認められる点に注意を要する。このような新生児期における血小板パラメータの変動は、出生後のトロンボポエチン (TPO) 濃度の増加、巨核球系前駆細胞の TPO に対

する感受性の上昇などが関係している可能性がある。出生後の Hb および RET は PLT、IPF とは異なる変動を示しており、生後1か月程度の新生児では血小板造血と赤血球造血は異なる動態を示すことが示唆された。新生児期においても免疫関連血小板減少症などの病態を反映して IPF% が変動することが確認されたが、分娩、臨床的背景、免疫状態などに関する様々な要因が新生児の血小板造血と IPF に影響を与えている可能性が示唆された。

本研究で得られた知見から、IPF は新生児の血小板造血や血小板減少症を評価するための有用なツールとなりうると思われる。

(論文審査の結果の要旨)

巨核球から放出された直後の mRNA を多く含む血小板は網血小板 (RP) と呼ばれ、骨髄での血小板産生能を反映する。近年、Sysmex 社の多項目自動血球分析装置 XN シリーズにて、RP を未成熟血小板分画 (IPF) として測定する方法が開発された。IPF は血小板減少症の鑑別を始めとした種々の病態の評価に用いられるが、新生児での検討は十分でない。本研究では、新生児の出生時における IPF の基準範囲 (RI) を定義し、IPF に影響を与える要因を評価するとともに出生後の IPF の動態を分析することで、新生児における IPF の臨床的有用性を検討した。

本研究では2施設の533人の新生児から出生時、生後14日、生後28日の合計822のデータを収集した。対象は様々な臨床的背景を有する新生児例であるため、IPF の RI 算出にあたっては、単変量および多変量解析にて抽出された IPF% に影響を与える因子を有さない症例を対象とした。IPF% に影響を与える独立した因子として、在胎週数37週未満の早産、新生児仮死、子宮内感染、染色体異常、呼吸障害が抽出された。これらの因子を有さず、血小板数が $150\text{--}350 \times 10^9/\text{L}$ であった新生児92例から算出した IPF% と IPF 実数の基準範囲はそれぞれ1.3-5.7%、 $3.2\text{--}14.5 \times 10^9/\text{L}$ であった。これは既報の成人の基準範囲と比較して臨床的判断に影響する程の差異はないと考えられた。また、血小板減少症のない新生児における経時的な変動の解析では、生後14日および28日の血小板数は出生時に比べて有意に高値であった。IPF% と IPF 実数は生後14日でピークに達し、生後28日では低下したが出生時よりも高値であり、個人内においても同様の変動を認めた。一方、ヘモグロビン濃度は出生後から生後28日まで継続的に減少し、網赤血球は生後14日に最低値を示

しており、生後1か月における新生児の血小板造血と赤血球造血の動態は異なることが示された。様々な背景因子を有する血小板減少症例でIPF%は増加したが、特に免疫関連血小板減少症ではその病態メカニズムを反映してIPF%は著明に高値であった。

本学位論文では、健常データを得ることが困難な新生児において、統計学的手法を用いて新生児の出生時

におけるIPFの基準範囲を設定し、出生後の動態を明らかにするとともに、実臨床での利用の可能性を示した点で今後の研究への発展性も含めて評価できる。研究は適切に行われており、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。

Preexisting brain lesions in patients with post stroke pusher behavior and their association with the recovery period: A one year retrospective cohort study in a rehabilitation setting (脳卒中患者の既往病変がpusher現象の回復過程に与える影響：回復期リハビリテーション病棟における1年間の後ろ向きコホート研究)

須江慶太

(論文の内容の要旨)

【緒言】 Pusher 現象 (Pusher behavior: PB) は脳卒中後に生じる姿勢異常の一つで、あらゆる姿勢で麻痺側に傾斜し、自らの非麻痺側上下肢で床や座面を押し、姿勢を正中位にしようとする他者の修正に対し抵抗する特徴を持つ。この現象は脳卒中発症後早期に消失していくとされが、右半球損傷では回復遅延することが報告されている。回復が遅延する場合、日常生活動作 (Activities of daily living: ADL) の回復が不良で入院期間が延長することが報告されている。そのため損傷側以外の回復遅延要因を明らかにすることは、入院期間の設定などリハビリテーションゴールの設定に重要となる。脳卒中の既往や、無症候性脳梗塞、大脳白質病変、脳微小出血そして血管周囲腔拡大といった脳小血管病 (Cerebral small vessel disease: cSVD) の存在は、新規脳卒中発症後の機能予後の不良要因とされる。これまで Pusher 現象の回復遅延要因について検討した報告の多くは初発脳卒中患者を対象にしており、これらの影響について十分に検討されていない。本研究では、過去の脳卒中の既往病変や cSVD の存在が PB の回復期間に影響するか明らかにすることを目的とした。

【方法】 研究デザインは後ろ向きコホート研究とし、対象は回復期リハビリテーション病棟へ入院した脳卒中患者のうち、適合基準である1) 20歳以上、2) 入院時に pusher 現象がある、3) 入院前の生活が自立、4) 発症前に精神疾患や認知症がない、5) データ欠損がないもの、とした。基本情報として年齢、性別、損傷側 (右/左)、脳卒中のタイプ (出血性/梗塞性) の情報を収集した。また身体機能評価として入退院

時の Stroke Impairment Assessment Set (SIAS)、ADL 能力として入退院時の Functional Independence Measure (FIM) の情報を収集した。PB の有無と重症度は Scale for Contraversive Pushing (SCP) で評価され、入院後1週間毎に評価した情報を収集した。SCP が各下位項目 > 0 の場合に消失したとして扱い、脳卒中発症から PB の回復に要した期間 (日) を算出した。脳卒中の既往病変ならびに cSVD の有無は医師により電子カルテの既往情報、放射線読影レポートならび、Magnetic Resonance Imaging で評価した。各既往病変の有無をもとに、既往病変スコア (0点~5点) を算出した。統計解析は先行研究に基づき、既往病変スコアの中央値から、患者を2群 (既往病変スコア < 2群, 既往病変スコア ≥ 2群) に分類した。次いでデータの正規分布に基づき基本データの群間比較を実施した。また両群間の PB の回復を Kaplan-Maier 曲線を描き、Log-rank テストにて群間比較を行った。最後に先行研究で PB の遅延要因と報告されている損傷側と既往病変スコアを共変量として、PB から回復するまでに要した期間を Cox 比例ハザード比解析で検討した。統計解析は SPSS ver 25 を用い、有意水準は 5% 未満とした。

【結果】 期間内に入院した脳卒中患者435名の患者のうち、21名 (4.83%) に PB を認めた。データ欠損があった2名を除いた19名 (平均年齢74.4±7.5) を解析対象とした。脳卒中の既往、無症候性脳梗塞、大脳白質病変、脳微小出血そして血管周囲腔拡大を有するものの割合はそれぞれ21.1%, 47.4%, 47.4%, 31.6%, 0.0%であった。既往病変スコアの中央値をもとに分類した2群間の基本データに群間差は認めな

かった。PB からの回復期間の中央値は既往病変スコア < 2 群で62日、既往病変スコア ≥ 2 群で94日であり、Log-rank テストで既往病変スコア ≥ 2 群で回復が有意に遅延した (P=0.029)。Cox 比例ハザード解析の結果では、既往病変スコアはハザード比0.458 (P=0.036) と有意にPB からの回復期間に影響を与えていた。一方で損傷側のハザード比は0.669 (P=0.467) で有意差は認めなかった。

【考察】 先行研究では、既往脳卒中病変や cSVD の存在は機能予後に影響を与えることが報告されているが、本研究ではこれらがPB の回復過程にも影響を及ぼすことを初めて明らかにした。脳卒中の重症度に対する保護因子の一つに脳容量が挙げられるが、既往脳卒中が場合は脳容量が低下することも報告されている。そのため既往病変が多いPB を有する患者では、保護因子が乏しい結果、その回復に影響を及ぼす可能性がある。また、cSVD を有する地域在住高齢者やラクナ梗塞患者はバランス能力が低いとの報告もなされている。cSVD など有し、元々バランス能力が低いものが脳卒中発症後にPB を呈した場合には、残存機能によるバランスの機能の代償が困難となり、PB からの回復が遅延する可能性がある。本研究では、PB の回復に脳損傷側の影響に有意差はなかった。これはサンプルサイズの小ささが影響した可能性がある。一方で、先行研究で既往脳卒中患者も含み回復過程の検討を行った研究では、損傷側の影響がないことが報告されている。そのため、既往病変を有する患者では、初発脳卒中患者とはPB の回復過程が異なる可能性がある。今後は大規模調査や多施設共同研究により、サンプルサイズを確保した上で既往病変の影響度をさらに検討してい

く必要がある。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、リハビリテーション施設における脳卒中後の患者を対象に、既存の脳病変とプッシャー症状からの回復時間の関連性を検討した結果、脳病変が多い患者ほど回復時間が遅延することを明らかにした内容で、社会的意義が高く、有用な研究と思われる。

審査会では論文の内容に沿って主査、副査よりそれぞれ質疑が行われた。特に、プッシャー症状を呈した患者数の少なさについては2名の副査から質問があったが、所属施設の特色上、急性期病院と異なり有病率が低いことなどが説明された。また、既往病変スコアが低いグループと高いグループ間でStroke Impairment Assessment Set (SIAS) やFunctional Independence Measure (FIM) に差がなかった結果について、プッシャー症状の残存が影響しているのではないかという指摘が挙げられたことについては、スコアが高かった患者群の中に回復が遅延したケースが複数あったことなどが説明された。

このように、特に複数の審査員から同様の質疑があった点や、呈示されたデータからは分かりにくい現象があったことは、審査員だけでなく多くの読者が疑問に持つ点と思われたが、これらを含むすべての質疑に対して、学生はデータに沿って明確かつ適切に回答することができた。

さらに、論文自体も結果の解釈を丁寧に考察されており、将来性が期待できる内容であることが確認できた。

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

Genomic traits associated with virulence and antimicrobial resistance of invasive group B *Streptococcus* isolates with reduced penicillin susceptibility from elderly adults (高齢患者由来侵襲性ペニシリン低感受性B群レンサ球菌の病原性・薬剤耐性に関わるゲノム特性)

小 出 将 太

(論文の内容の要旨)

【背景】 B群レンサ球菌 (group B *Streptococcus*, GBS) は新生児侵襲性感染症の主要な原因菌である。また、近年ではGBSによる高齢者や基礎疾患を有する成人の侵襲性感染症事例も増加してきている。特に65歳以上では原発性血流感染症が優位で高い死亡率をもたらす。ペニシリン系薬剤が感染症治療及び分娩時予防投与の第一選択薬であるが、2008年に長野らの研究グ

ループがペニシリン低感受性GBS (GBS with reduced penicillin susceptibility, PRGBS) を初めて報告して以降、米国をはじめ諸外国でPRGBSの報告が相次いでいる。国内のGBS臨床分離株におけるペニシリン非感受性の割合は2008年の4.8%から2020年の5.8%と増加傾向にある。しかしながら、PRGBSの臨床的意義については未だ不明であり、成人侵襲性感染症由来PRGBSのゲノムレベルでの分子学的特性は

解明されていないことから、本研究では侵襲性 PRGBS 株の病原性、薬剤耐性に関する特性解析を行った。

【材料と方法】 同一医療機関の予後不良事例に由来する血清型 Ia で sequence type (ST) 1 の 4 株と、他の複数医療機関で収集した血清型 III-ST1 の 2 株、Ib ST10 及び III-ST464 の各 1 株の血液由来多剤耐性 PRGBS 8 株を対象に全ゲノム解析を実施した。また、NCBI 登録のヒト、動物、魚類などに由来する PRGBS とペニシリン感受性 GBS を含む 92 株のゲノム配列を加えた比較解析を行った。

【結果と考察】 ゲノム配列間の OrthoANI に基づく ANI 値は PRGBS 8 株で $\geq 98.02\%$ 、さらに同一医療機関の血清型 Ia-ST1 の 4 株の間では $99.96-99.98\%$ 、これらと他施設の III-ST1 の 2 株の間では $\geq 98.43\%$ であった。PRGBS 8 株の pan-genome の総遺伝子数は 3,531 個で、そのうち core-genome 遺伝子数は 1,694 個であった。Pan-genome のサイズはゲノムの添加に伴い継続的に増加していき、べき指数 (power-law exponent) 0.210 をもってオープンパンゲノムの特性を示したことから水平伝播による遺伝子獲得事象が高頻度に存在する可能性が示唆される。アクセサリ-遺伝子には株間で多様性が認められたが、血清型 Ia-ST1 の 4 株はほとんどのアクセサリ-遺伝子を共有していた。また、アクセサリ-遺伝子の clusters of orthologous groups (COGs) 分類では COG 機能カテゴリー [L] Replication, recombination, and repair と [K] Transcription に属する蛋白が多く分布していたが、これは GBS における既報の知見と類似していた。

PRGBS 8 株はペニシリン結合蛋白 (PBPs) に既報のアミノ酸置換を有し、ペニシリンの MIC は $0.25-1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で他系統の薬剤にも耐性を示した。また、1 株で PBP2A のヌクレオチド位 567 への 1 塩基挿入によるフレームシフト変異に起因する未熟終止コドンが生じていたが、増殖能に影響はなかった。本研究の PRGBS 株は多剤耐性であったが、薬剤耐性遺伝子 *tet(M)*, *erm(B)*, *mef(A)-msr(D)* の保有に加え、GBS では極めて稀なアミノグリコシド高度耐性遺伝子 *aac(6')-aph(2'')* が 1 株で確認された。また、キノロン耐性の 6 株ではキノロン耐性決定領域にアミノ酸置換を認めた。

PRGBS 株は主要な病原遺伝子群 (*bibA*, *fbxA/-B/-C*, *cspA*, *cfb*, *hylB*, *scpB*, *lmb*, and the *cyl* operon) を保有し、侵襲性 GBS と同等の病原性を有する可能性が示唆される。さらに ST1 に特異的な

AlpST-1 付着因子遺伝子が Ia-ST1 株で確認された。

PRGBS 8 株を含む全 100 株のゲノムの Gubbins 解析で得られた core SNPs 系統樹で、本報の血清型 Ia-ST1 及び III-ST1 の PRGBS 株は組換え変異率 3.97 で一つの独立したクレードに属した。この変異率はヒト血液由来株が優位な V-ST1 GBS が形成するクレードの組換え変異率 0.11 より 36 倍高値であった。血清型 Ia や III は ST1 GBS 株では非常に稀である。よって、Ia-ST1 及び III-ST1 の PRGBS 株の遺伝系統は ST1 の集団の中から組み換えにより出現してきた可能性が考えられる。

本研究知見は、侵襲性 PRGBS 株が GBS で報告されている主要な病原因子遺伝子群を保有し、さらには多剤耐性であることから早期診断、早期治療の重要性を強調している。

(論文審査の結果の要旨)

B 群レンサ球菌 (group B *Streptococcus*, GBS) は新生児侵襲性感染症の主要な原因菌である。また、近年では GBS による高齢者や基礎疾患を有する成人の侵襲性感染症事例も増加してきており、特に 65 歳以上では原発性血流感染症が優位で高い死亡率をもたらす。ペニシリン系薬剤が感染症治療及び分娩時予防投与の第一選択薬であるが、2008 年に Nagano らがペニシリン低感受性 GBS (PRGBS) を初めて報告して以降、米国をはじめ諸外国で PRGBS の報告が相次いでいる。国内の GBS 臨床分離株におけるペニシリン低感受性の割合は 2008 年の 4.8% から 2020 年の 5.8% と増加傾向にある。しかしながら、PRGBS の臨床的意義については未だ不明である。本学位論文はこれまで報告のない成人侵襲性感染症由来 PRGBS 株を対象に病原性、薬剤耐性に関する特性を解明したものである。PRGBS 8 株の pan-genome の総遺伝子数は 3,531 個で、うち core-genome 遺伝子数は 1,694 個であった。Pan-genome のサイズはゲノムの添加に伴い継続的に増加していき、べき指数 (power-law exponent) 0.210 をもってオープンパンゲノムの特性を示したことから水平伝播による遺伝子獲得事象が高頻度に存在する可能性が示唆される。PRGBS 8 株はペニシリン結合蛋白 (PBPs) に既報のアミノ酸置換を有し、ペニシリンの MIC は $0.25-1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で他系統の薬剤にも耐性を示した。これらの多剤耐性 PRGBS 株は薬剤耐性遺伝子 *tet(M)*, *erm(B)*, *mef(A)-msr(D)* の保有に加え、GBS では極めて稀なアミノグリコシド高度耐性遺伝子 *aac(6')-aph(2'')* が 1 株で確認された。また、キノロン

耐性の6株ではキノロン耐性決定領域にアミノ酸置換を認めたと。さらに主要な病原遺伝子群 (*bibA*, *ftsA*/-B/-C, *cspA*, *cfb*, *hylB*, *scpB*, *lmb*, and the *cyl* operon) を保有し、侵襲性 GBS と同等の病原性を有する可能性が示唆される。ST1 に特異的な AlpST-1 付着因子遺伝子が Ia-ST 1 株で確認された。PRGBS 8 株を含む全100株の Gubbins 解析による core SNPs 系統樹で、本報の血清型 IaST1 及び III ST1 の PRGBS 株は組換え変異率3.97で一つの独立したクレードに属した。この変異率はヒト血液由来株が優位な V ST1 GBS が形成するクレードの組換え変異率0.11より36倍高値であっ

た。血清型 Ia や III は ST1 GBS 株では非常に稀である。よって、Ia ST1 及び III ST1 の PRGBS 株の遺伝系統は ST1 の集団の中から組み換えにより出現してきたと考えられる。以上の研究知見は、侵襲性 PRGBS 株が GBS が保有する主要な病原因子遺伝子群を保有し、さらには多剤耐性であることから早期診断、早期治療の重要性を強調している。

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。