

# 博士學位論文

内容の要旨

及び

審査の結果の要旨

第 34 集

平成 29 年 6 月

愛知医科大学

## は し が き

本集は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、平成28年4月から平成29年3月までに本学で博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び審査の結果の要旨を収録したものである。

————— 目 次 —————

掲載順位	学位授与番号	氏 名	論 文 題 名	頁
[1]	甲第 471 号	鈴木 隆 佳	The association among ferruginous body, uncoated fibers, asbestos and non-asbestos fibers in lung tissue in terms of length (肺内の含鉄小体及び非被覆繊維濃度と石綿・非石綿繊維の長さ別濃度との関係)	… 1
[2]	甲第 472 号	星 野 哲 朗	Polysomnographic parameters during non-rapid eye movement sleep predict continuous positive airway pressure adherence (終夜ポリソムノグラフィー検査で測定されるノンレム睡眠中のパラメーターは持続気道陽圧療法のアドヒアランスを予測する)	… 5
[3]	甲第 473 号	山 本 貴和子	Caregivers of children with no food allergy-their experiences and perception of food allergy (食物アレルギーのない子どもをもつ養育者-食物アレルギーの経験と認識について)	… 8
[4]	甲第 474 号	中 井 葉 月	Prevalence and risk factors of infections caused by extended-spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL) -producing Enterobacteriaceae (基質拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生腸内細菌科細菌による感染症の疫学とリスク因子)	… 11
[5]	甲第 475 号	伊 藤 邦 弘	Inhibition of Nox1 induces apoptosis by attenuating the AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines (口腔扁平上皮癌細胞株における Nox1 の阻害は AKT シグナル伝達経路を阻害し, アポトーシスを誘導する)	… 14

掲載順位	学位授与番号	氏 名	論 文 題 名	頁
[6]	甲第 476 号	宇 梶 珠 未	Inhibition of IGF-1-Mediated Cellular Migration and Invasion by Migracin A in Ovarian Clear Cell Carcinoma Cells (明細胞卵巣がんにおける migracin A の IGF-1 を介した細胞遊走および浸潤の抑制)	… 17
[7]	甲第 477 号	河 南 勝 久	Effect of Denosumab Administration on Lumbar Vertebral Strength of Patients with Vertebral Bony Metastases: Preliminary Study (転移性脊椎腫瘍に対する抗 RANKL 抗体投与前と投与後の骨強度評価)	… 20
[8]	甲第 478 号	Sidthipong Kulrawee	Rational design, synthesis and <i>in vitro</i> evaluation of novel <i>exo</i> -methylene butyrolactone salicyloylamide as NF- $\kappa$ B inhibitor (NF- $\kappa$ B 阻害剤 exomethylene butyrolactone salicyloylamide の分子デザイン, 合成と <i>in vitro</i> 活性の評価)	… 23
[9]	甲第 479 号	田 村 泰 弘	Pathophysiology of functional heartburn based on Rome III criteria in Japanese patients (Rome III 診断基準に基づいた日本人の機能性胸やけの病態の検討)	… 26
[10]	甲第 480 号	平 澤 敦 彦	The prevalence of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis in Japan - the first report of measurement by CT and review of the literature (本邦におけるびまん性特発性骨増殖症の有病率 - CT を用いて調査した世界初の報告と過去の論文の再考察 -)	… 29

掲載順位	学位授与番号	氏 名	論 文 題 名	頁
[11]	甲第 481 号	安 田 吉 孝	High oxygen modifies vasodilator effect of cysteine via enhanced oxidative stress and thromboxane production in the rat mesenteric artery (高濃度酸素は酸化ストレスとトロンボキサン産生を介してシステインによるラット腸間膜動脈血管拡張を抑制する)	… 31
[12]	甲第 482 号	山 口 純 治	Association of Intestinal Microbiota with Metabolic Markers and Dietary Habits in Patients with Type 2 Diabetes (2型糖尿病患者における代謝マーカー・食習慣・腸内細菌叢の関連性)	… 34
[13]	甲第 483 号	山 本 康 博	Intermittent local periodontal inflammation causes endothelial dysfunction of the systemic artery via increased levels of hydrogen peroxide concomitantly with overexpression of superoxide dismutase (間欠的な局所の歯周組織炎症はスーパーオキシドディスムターゼを過剰発現することで過酸化水素を産生し全身的な動脈の内皮機能障害を引き起こす)	… 37
[14]	甲第 484 号	李 佳 政	Propofol reduces liver dysfunction caused by tumor necrosis factor- $\alpha$ production in Kupffer cells(プロポフォルはクッパー細胞から産生された腫瘍壊死因子- $\alpha$ による肝機能障害を軽減させる)	… 41
[15]	甲第 485 号	若 山 沙 代 里	Lipopolysaccharide impairs insulin sensitivity via activation of phosphoinositide 3-kinase in adipocytes (エンドトキシンは脂肪細胞のホスファチジルイノシトール 3-キナーゼを活性化し、インスリン感受性を障害する)	… 45

掲載順位	学位授与番号	氏 名	論 文 題 名	頁
[16]	甲第 486 号	上 野 大 樹	Role of adiponectin and leptin in non-diabetic, non-obese patients with endometrial cancer (非糖尿病, 非肥満患者の子宮体癌患者におけるアディポネクチンとレプチンの役割)	… 48
[17]	甲第 487 号	丸 橋 佑 基	Morphological analyses in fragility of pili torti with Björnstad syndrome (ブヨルンスタッド症候群の捻転毛における裂毛に関する形態学的解析)	… 51
[18]	甲第 488 号	富 野 敦 稔	Increased PD-1 Expression and Altered T Cell Repertoire Diversity Predict Mortality in Patients with Septic Shock: A Preliminary Study (敗血症性ショック患者におけるリンパ球 PD-1 発現と T 細胞受容体の多様性障害が予後に及ぼす影響)	… 53
[19]	甲第 489 号	菊 池 徳 昌	Perceived Stress and Colorectal Cancer Incidence: The Japan Collaborative Cohort Study (ストレスと大腸癌罹患の関連研究)	… 56
[20]	甲第 490 号	澤 田 孝 之	The influence of personality and perceived stress on the development of breast cancer : 20-year follow-up of 29,098 Japanese women (心理学的要因と乳癌罹患の関連)	… 59

掲載順位	学位授与番号	氏名	論文題名	頁
[21]	甲第 491 号	榊原 健介	Kynurenine causes vasodilation and hypotension induced by activation of KCNQ-encoded voltage-dependent K <sup>+</sup> channels (キヌレニンは KCNQ 電位依存性カリウムチャネルを開口し、血管拡張と低血圧を引き起こす)	… 61
[22]	甲第 492 号	村松 由崇	Pulsed electromagnetic Field Stimulation Promotes Anti-cell Proliferative Activity in Doxorubicin-treated Mouse Osteosarcoma Cells (パルス電磁場刺激のマウス骨肉腫細胞におけるドキソルビシンの抗腫瘍効果促進作用の検討)	… 64
[23]	甲第 493 号	笠置 智道	Acid-base disturbances in nephrotic syndrome: Analysis using the CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> method (traditional Boston model) and the physicochemical method (Stewart model) (ネフローゼ症候群の酸塩基平衡異常: CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> 法 (ボストンモデル) と物理化学法 (スチュワートモデル) による解析)	… 67
[24]	甲第 494 号	河井 啓	<i>In vitro</i> efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non- <i>albicans</i> <i>Candida</i> species biofilms (Non- <i>albicans</i> カンジダ属によるバイオフィルムに対するアムホテリシン B リポソーム製剤, ミカファンギンおよびフルコナゾールの <i>in vitro</i> 効果)	… 70
[25]	甲第 495 号	白石 洋輔	Simultaneous quantification of batrachotoxin and epibatidine in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS を用いた血漿中 batrachotoxin および epibatidine 濃度の同時定量)	… 74

掲載順位	学位授与番号	氏 名	論 文 題 名	頁
[26]	甲第 496 号	伊 藤 剛	Is a fourth-line antiepileptic drug regimen truly ineffective for all types of epilepsy? Reappraisal of pharmacoresistance as related to epilepsy type in adult patients (抗てんかん薬の第四レジメンはすべてのてんかんに対して本当に無効なのか? 薬物抵抗性の成人てんかん患者で再検討を行った)	… 77
[27]	乙第 380 号	木 村 行 宏	Circulating antibodies to $\alpha$ -enolase and phospholipase A2 receptor and composition of glomerular deposits in Japanese patients with primary or secondary membranous nephropathy (膜性腎症における抗 $\alpha$ -enolase 抗体, 抗 phospholipase A2 receptor 抗体と抗原蛋白の糸球体内局在についての検討)	… 80
[28]	乙第 381 号	櫻 井 慎一郎	Influence of plaque characteristics on fractional flow reserve for coronary lesions with intermediate to obstructive stenosis: insights from integrated-backscatter intravascular ultrasound analysis (冠動脈のプラーク性状が冠血流予備量比 (FFR) に与える影響についての検討)	… 84
[29]	乙第 382 号	篠 田 貢 一	Structural Comparison between the Right and Left Atrial Appendages Using Multidetector Computed Tomography (多検出器型 CT 装置を用いた右心耳・左心耳の構造比較)	… 87
[30]	乙第 383 号	野 畑 宏 信	Hypocalcemia immediately after renal transplantation (腎移植直後の低カルシウム血症)	… 90



氏名	すずき たかよし 鈴木 隆佳
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 471 号
学位授与年月日	平成 28 年 5 月 12 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	The association among ferruginous body, uncoated fibers, asbestos and non-asbestos fibers in lung tissue in terms of length (肺内の含鉄小体及び非被覆繊維濃度と石綿・非石綿繊維の長さ別濃度との関係)
論文審査委員	(主査) 教授 山口悦郎 教授 細川好孝 教授 池田洋 教授 高見昭良

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

石綿は、耐久性、耐熱性などの特性から広く使用されてきたが、その曝露により石綿肺や中皮腫などの石綿関連疾患が引き起こされることが判明し、石綿曝露評価として肺内石綿濃度の計測が必要とされてきた。肺内石綿濃度の評価には、電子顕微鏡を用いた肺内石綿繊維の計測と、位相差顕微鏡を用いた含鉄小体の計測がある。含鉄小体とは、繊維の周りを鉄蛋白でコーティングされた構造で、位相差顕微鏡ではゴールドエイローで表現されるような色で観察される。

しかし、含鉄小体濃度と肺内石綿繊維濃度との相関についての報告はごく少数であり、石綿曝露評価の有用性についての詳細な検討が必要とされている。また、位相差顕微鏡で、含鉄小体計測時に同時に観察されるコーティングされていない繊維（非被覆繊維）濃度と電子顕微鏡で観察される肺内繊維濃度との関係を見た報告は我々が調べる限りでは無い。本研究では、含鉄小体濃度及び非被覆繊維濃度を計測し、肺内石綿・非石綿繊維濃度との相関を検討した。

### 【方法】

日本人 18 例（男性 12 例、女性 6 例、平均年齢 62.3 歳）、韓国人 39 例（男性 33 例、女性 6 例、平均年齢 38.4 歳）の剖検肺を対象とした。含鉄小体及び非被覆繊維の計測は、肺組織をアルカリ溶液によって消化処理し、位相差顕微鏡を用いて計測した。石綿・非石綿繊維の計

測は、低温灰化法で肺組織を処理し、透過型分析電子顕微鏡を用いて計測した。

### 【結果】

対象 57 例のうち、含鉄小体、非被覆繊維、石綿・非石綿繊維が検出された例数は、日本人では含鉄小体 16 例、非被覆繊維 18 例、石綿繊維 18 例（クリソタイル 18 例、角閃石系石綿 15 例）、非石綿繊維 18 例であった。韓国人では含鉄小体 22 例、非被覆繊維 39 例、石綿繊維 32 例（クリソタイル 23 例、角閃石系石綿 20 例）、非石綿繊維 39 例であった。日本人と韓国人の各濃度を比較した結果、日本人が全ての濃度で有意に高値 ( $p < 0.01$ ) であった。

含鉄小体濃度、非被覆繊維濃度と石綿・非石綿繊維濃度との相関は、含鉄小体濃度、非被覆繊維濃度ともに、石綿・非石綿繊維濃度と有意な相関を認めた ( $p < 0.05$ )。石綿・非石綿繊維を長さ  $1\mu\text{m}$  未満と以上に分けて、含鉄小体濃度、非被覆繊維濃度と同様に相関を検討した結果、角閃石系石綿繊維濃度とは含鉄小体濃度、非被覆繊維濃度ともに有意な相関を認めなかったが、その他の繊維濃度とは含鉄小体濃度、非被覆繊維濃度ともに有意な相関を認めた ( $p < 0.05$ )。

### 【考察】

日本人と韓国人の死亡時年齢には、平均値で 20 歳以上の差があることから、年齢依存的な肺内繊維蓄積量を考慮する必要があると思われるが、日本は韓国よりも石綿の使用が 20 年早く始まっており、またその輸入量にも大きな差があったこと、日本の空気中の石綿・非石綿繊維濃度が韓国に比べて有意に高値であるとの報告があることから、環境中の石綿・非石綿繊維濃度の差によって生じた肺内石綿・非石綿繊維濃度の差を、含鉄小体濃度が反映しているものと思われる。

含鉄小体濃度、非被覆繊維濃度は、石綿・非石綿繊維濃度と概ね有意な相関が得られたが、含鉄小体濃度においては、含鉄小体の芯になりやすいとされている角閃石系石綿濃度とは有意な相関が得られなかった。これは、今回の対象では角閃石系石綿検出例数が少なかったこと、また検出された濃度が低かったことが結果に影響している可能性があると考えられた。

これまで非被覆繊維濃度の有用性について詳細に検討された報告は見当たらない。本研究における含鉄小体濃度と非被覆繊維濃度の肺内繊維濃度との相関を比較すると、非被覆繊維濃度との相関が含鉄小体濃度との相関よりも強いことが確認された。石綿曝露が比較的少ない今回の対象例では、非被覆繊維を計測することにより、より正確な曝露評価が可能になると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景】

石綿は、耐久性、耐熱性などの特性から広く使用されてきたが、その曝露により石綿肺

や中皮腫などの石綿関連疾患が引き起こされることが判明し、石綿曝露評価として肺内石綿濃度の計測が必要とされてきた。肺内石綿濃度の評価には、電子顕微鏡を用いた肺内石綿繊維の計測と、位相差顕微鏡を用いた含鉄小体の計測がある。含鉄小体とは、繊維の周りを鉄蛋白でコーティングされた構造で、位相差顕微鏡ではゴールドイエローで表現されるような色で観察される。

しかし、含鉄小体濃度と肺内石綿繊維濃度との相関についての報告はごく少数であり、石綿曝露評価の有用性についての詳細な検討が必要とされている。また、位相差顕微鏡で、含鉄小体計測時に同時に観察されるコーティングされていない繊維（非被覆繊維）濃度と電子顕微鏡で観察される肺内繊維濃度との関係を見た報告は我々が調べる限りでは無い。本研究では、含鉄小体濃度及び非被覆繊維濃度を計測し、肺内石綿・非石綿繊維濃度との相関を検討した。

### 【方法】

日本人 18 例（男性 12 例，女性 6 例，平均年齢 62.3 歳），韓国人 39 例（男性 33 例，女性 6 例，平均年齢 38.4 歳）の剖検肺を対象とした。含鉄小体及び非被覆繊維の計測は、肺組織をアルカリ溶液によって消化処理し、位相差顕微鏡を用いて計測した。石綿・非石綿繊維の計測は、低温灰化法で肺組織を処理し、透過型分析電子顕微鏡を用いて計測した。

### 【結果】

対象 57 例のうち、含鉄小体、非被覆繊維、石綿・非石綿繊維が検出された例数は、日本人では含鉄小体 16 例、非被覆繊維 18 例、石綿繊維 18 例（クリソタイル 18 例、角閃石系石綿 15 例）、非石綿繊維 18 例であった。韓国人では含鉄小体 22 例、非被覆繊維 39 例、石綿繊維 32 例（クリソタイル 23 例、角閃石系石綿 20 例）、非石綿繊維 39 例であった。日本人と韓国人の各濃度を比較した結果、日本人が全ての濃度で有意に高値 ( $p < 0.01$ ) であった。

含鉄小体濃度及び非被覆繊維濃度と総石綿・総非石綿繊維濃度との相関は、いずれも有意 ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) であったが、含鉄小体濃度より非被覆繊維濃度との相関係数が高かった。また、石綿・非石綿繊維濃度を、繊維の長さで 3 群（ $1\mu\text{m}$  未満， $1\mu\text{m}$  以上， $5\mu\text{m}$  以上）に分けて検討すると、含鉄小体濃度および非被覆繊維濃度ともに、いずれの長さの石綿繊維数とも有意な相関を認めた。しかし、石綿繊維をその成分からクリソタイルと角閃石系石綿の 2 群に分けると、繊維長  $5\mu\text{m}$  以上の群では含鉄小体濃度および非被覆繊維濃度のいずれとも有意な相関は得られなかった。また含鉄小体濃度はいずれの長さの角閃石系石綿濃度とも相関を認めなかった。

### 【考察】

日本人と韓国人の死亡時年齢には、平均値で 20 歳以上の差があることから、年齢依存的な肺内繊維蓄積量を考慮する必要があると思われるが、日本は韓国よりも石綿の使用が 20 年早く始まっており、その輸入量にも大きな差があったこと、日本の空気中の石綿・非石綿繊維濃度が韓国に比べて有意に高値であるとの報告があることから、環境中の石綿・非

石綿繊維濃度の差によって生じた肺内石綿・非石綿繊維濃度の差を，含鉄小体濃度，非被覆繊維濃度が反映しているものと思われる。

含鉄小体濃度，非被覆繊維濃度は，石綿・非石綿繊維濃度と概ね有意な相関が得られたが，含鉄小体の芯になりやすいとされている角閃石系石綿の長さによる群分けでは，3群とも含鉄小体濃度と有意な相関が得られなかった。本研究の対象では角閃石系石綿検出例数が少なかったこと，また検出された濃度が低かったことが結果に影響している可能性が考えられた。

本研究における含鉄小体濃度と非被覆繊維濃度の肺内繊維濃度との相関を比較すると，非被覆繊維濃度との相関が含鉄小体濃度との相関よりも強いことが確認された。石綿曝露が比較的少ない今回の対象例では，非被覆繊維を計測することにより，より正確な曝露評価が可能になると考えられた。

以上の審査結果により，学位を授与するに値する論文であると判定した。

氏名	ほし の てつ ろう 星 野 哲 朗
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 472 号
学位授与年月日	平成 28 年 7 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Polysomnographic parameters during non-rapid eye movement sleep predict continuous positive airway pressure adherence (終夜ポリソムノグラフィー検査で測定されるノンレム睡眠中のパラメーターは持続気道陽圧療法のアドヒアランスを予測する)
論文審査委員	(主査) 教授 兼 本 浩 祐 教授 菊 地 正 悟 教授 天 野 哲 也 教授 風 岡 宜 暁

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背景】

閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) に対する持続気道陽圧 (CPAP) 療法は根治的な治療ではなく長期継続かつ良好な使用状況が必要となる対症療法である。そこで良好なアドヒアランスの維持が最大の課題となる。これまで、CPAP 療法のアドヒアランスに関わる様々な臨床的予測因子が報告されてきた。しかし、我々が検索した範囲では REM 期、NREM 期という基本的な睡眠構造に着目した CPAP アドヒアランスの予測因子についての検討は認められない。

### 【目的】

OSAS 診断時、終夜ポリグラフ検査 (PSG) により測定された REM 期および NREM 期に区別されたパラメーターを用いて CPAP アドヒアランスの新たな予測因子を明らかにする。

### 【対象と方法】

2008 年 1 月～2011 年 5 月に当院で PSG を施行、Respironics REMstar M Series AUTO CPAP を処方した 173 名が本研究に登録された。登録患者をアドヒアランス良好群 (1 日平均使用 4 時間以上、使用率 70% 以上で 6 ヶ月を超えて使用)、アドヒアランス不良群 (6 ヶ月以上継続使用しているがアドヒアランス良好群の定義を満たさない) に分け 2 群を比較



検討した。

### 【結果】

単変量解析の結果、NREM 期 無呼吸低呼吸指数 (AHI) [アドヒアランス良好群  $36.5 \pm 10.9$  回/時間, アドヒアランス不良群  $32.9 \pm 13.1$  回/時間,  $P=0.043$ ], NREM 期 酸素飽和度低下指数 [アドヒアランス良好群  $32.8 \pm 11.9$  回/時間, アドヒアランス不良群  $28.3 \pm 13.7$  回/時間,  $P=0.011$ ], NREM 期  $SpO_2 < 90\%$ となる時間の割合 (CT90) [アドヒアランス良好群  $4.8 \pm 7.0\%$ , アドヒアランス不良群  $1.6 \pm 4.2\%$ ,  $P < .001$ ] の3項目で有意差を認めた。

Logistic 回帰分析の結果、NREM 期 CT90 (OR:0.693, 95% CI:0.582-0.824,  $p < 0.0001$ ) が唯一の予測因子として抽出された。

単変量解析にて有意差を認めた3項目において ROC 解析を行った結果、NREM 期 CT90 の曲線下面積 (0.823, 95% CI:0.745-0.901) が最大であった。

### 【考察】

本研究で、NREM 期 CT90 が CPAP アドヒアランスの有意な予測因子として抽出された。これまでの報告から CPAP アドヒアランスを予測するために疾患重傷度を評価することが必要であるが、NREM 睡眠中の重症度評価、特に CT90 を用いた重症度の評価が重要である。

今後、OSAS 患者における CPAP アドヒアランスの予測因子としての NREM 期 CT90 についてさらなる検討が望まれる。

## 論文審査の結果の要旨

### 【目的】

閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (OSAS) に対する持続気道陽圧 (CPAP) 療法は根治的な治療ではなく長期継続かつ良好な使用状況が必要となる対症療法である。そこで良好なアドヒアランス (継続使用および使用頻度の状況) の維持が最大の課題となる。これまで、CPAP 療法のアドヒアランスに関わる様々な臨床的予測因子が報告されてきた。しかし、REM 期、NREM 期に分けて検討した CPAP アドヒアランスの予測因子についての報告はない。そこで今回 OSAS 診断時、終夜ポリグラフ検査 (PSG) により測定され分類された REM 期および NREM 期について各期別に CPAP アドヒアランスのより有効な予測因子がないか後方視的に検討した。

### 【対象と方法】

2008 年 1 月～2011 年 5 月に当院で PSG を施行し、20 歳以上で他睡眠障害がなく、Respironics REMstar M Series AUTO CPAP を処方した 173 名を対象とした。対象患者をアドヒアランス良好群 (1 日平均使用 4 時間以上、使用率 70% 以上で 6 ヶ月を超えて使用) 44 名、アドヒアランス不良群 (6 ヶ月以上継続使用しているがアドヒアランス良好群の定義を満たさない) 129 名に分け 2 群を統計学的に比較検討した。

## 【結果】

単変量解析の結果、NREM 期において①無呼吸低呼吸指数 (AHI) [アドヒアランス良好群  $36.5 \pm 10.9$  回/時間, アドヒアランス不良群  $32.9 \pm 13.1$  回/時間,  $P=0.043$ ], ②酸素飽和度低下指数 [アドヒアランス良好群  $32.8 \pm 11.9$  回/時間, アドヒアランス不良群  $28.3 \pm 13.7$  回/時間,  $P=0.011$ ], ③  $SpO_2 < 90\%$  となる時間の割合 (CT90) [アドヒアランス良好群  $4.8 \pm 7.0\%$ , アドヒアランス不良群  $1.6 \pm 4.2\%$ ,  $P < .001$ ] の 3 項目で有意差を認めた。

Logistic 回帰分析の結果、NREM 期 CT90 (OR:0.693, 95% CI:0.582-0.824,  $p < 0.0001$ ) が唯一の予測因子として抽出された。すなわち、有意にアドヒアランス良好群が高い値を示した。

単変量解析にて有意差を認めた 3 項目において ROC 解析を行った結果、NREM 期 CT90 の曲線下面積 (0.823, 95% CI:0.745-0.901) が最大であった。

以上より NREM 期の CT90 の測定が CPAP アドヒアランスの予測に有効であることが示された。

## 【考察及びまとめ】

これまでの報告から CPAP アドヒアランスを予測するために疾患重症度を評価することも必要であるが、加えて NREM 期の CT90 測定が CPAP アドヒアランスの有効な予測因子として使用可能なことが示唆された。

以上より、NREM 期 CT90 が CPAP アドヒアランスの予測因子となりうる可能性を示した貴重な論文であり学位に値すると判断する。

氏名	山本貴和子
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第473号
学位授与年月日	平成28年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Caregivers of children with no food allergy-their experiences and perception of food allergy (食物アレルギーのない子どもをもつ養育者 - 食物アレルギーの経験と認識について)
論文審査委員	(主査) 教授 奥村彰久 教授 高村祥子 教授 山口悦郎 教授 若槻明彦

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

食物アレルギー (FA) は小学生においても最も重要な健康問題の一つである。アナフィラキシーが起こる場所として多いのが友人の自宅であるが、食物アレルギーのない子どもをもつ養育者の食物アレルギーに対する認識や経験については明らかになっていない。

### 【方法】

横断調査として無記名の自記式アンケート調査を実施した。対象者は、東京都の公立小学校に通学する食物アレルギーをもたない子どもをもつ養育者 (non-FA 養育者) と成育医療研究センターアレルギー科へ通院している食物アレルギーをもつ子どもをもつ養育者 (FA 養育者) とした。原因食物による即時型反応やヒアリハットを経験したことのない non-FA 養育者を Group1, 即時型反応やヒアリハットを経験している non-FA 養育者を Group2, 食物アレルギーの子どもをもつ FA 養育者を Group3 とし、養育者の認識と経験を 3 群比較評価した。

### 【結果】

エピネフリン自己注射は 43.6% の non-FA 養育者のみが知っていた。食物アレルギーによるいじめ、ハラスメント、不登校などを経験している子どもをみたことがある non-FA 養育者は 2.8% にすぎなかった。Group1 から 3 で比較すると、Group1 に比べて Group2 は、原因食物による即時型反応が子どもに起こることをみた場合、よりの確に適切な行動ができると考えていた ( $p < 0.05$ )。すべてのグループの養育者が食物アレルギーに関する即時型



反応に対して不安を同じていた。

### 【考察】

non-FA 養育者は FA 養育者と比較しても食物アレルギーの経験や認識が低いことが明らかとなった。また、ヒアリハットや事故を減らすためには non-FA 養育者への教育も必要ではないかと考える。

### 【結論】

non-FA 養育者では食物アレルギーの経験も少なく、認識も低い。食物アレルギーの子どもたちの生活の質を改善するためには、non-FA 養育者への教育をすることも重要である。

## 論文審査の結果の要旨

### 【目的】

食物アレルギー（FA）は小学生において最も重要な健康問題の一つである。アナフィラキシーが起こる場所として多いのが友人の自宅であるが、FA のない子どもを持つ養育者の FA に対する認識や経験については明らかになっていない。

### 【方法】

横断調査として無記名の自記式アンケート調査を実施した。対象者は、東京都の公立小学校に通学する FA を持たない子どもを持つ養育者（non-FA 養育者）と成育医療研究センターアレルギー科へ通院している FA をもつ子どもを持つ養育者（FA 養育者）とした。原因食物による即時型反応やヒアリハットを経験したことのない non-FA 養育者を Group1、即時型反応やヒアリハットを経験している non-FA 養育者を Group2、FA の子どもを持つ FA 養育者を Group3 とし、養育者の認識と経験を 3 群比較評価した。

### 【結果】

エピネフリン自己注射は non-FA 養育者の 43.6% のみが知っていた。FA によるいじめ、ハラスメント、不登校などを経験している子どもをみたことがある non-FA 養育者は 2.8% にすぎなかった。3 群で比較すると、Group1 に比べて Group2 は原因食物による即時型反応が子どもに起こることを見た場合、よりの確に適切な行動ができると考えていた ( $p < 0.05$ )。すべてのグループの養育者が食物アレルギーに関する即時型反応に対して不安を感じていた。

### 【考察】

non-FA 養育者は FA 養育者と比較しても FA の知識や認識が低いことが明らかとなった。また、ヒアリハットや事故を減らすためには non-FA 養育者への教育も必要ではないかと考える。

### 【結論】

non-FA 養育者では FA の経験も少なく、認識も低い。FA の子どもたちの生活の質を改

善するためには、non-FA 養育者への教育をすることも重要である。

本研究は、一般の小学生の養育者の FA に対する認識を日本で始めて調査した研究である。調査対象となった保護者の数も多く、質問紙調査としては良好な回答率が得られており、質の高い研究である。本研究の結果から、FA の子どもを持たない養育者は十分な FA の知識を持っていないことが明らかになり、今後の FA の対策を考える上で重要な知見を得ることができ意義深い結果であると考ええる。

以上のことから本論文は、学位を授与するに値すると判断した。

氏名	なか い は つき 中 井 葉 月
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 474 号
学位授与年月日	平成 28 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Prevalence and risk factors of infections caused by extended-spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL) -producing Enterobacteriaceae (基質拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生腸内細菌科細菌による感染症の疫学とリスク因子)
論文審査委員	(主査) 教授 中 川 隆 教授 高 村 祥 子 教授 松 浦 克 彦 教授 住 友 誠

## 学位論文内容の要旨

### 【目的】

近年、拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌による感染者数の増加が報告されている。ESBL 産生をコードする遺伝子は、プラスミド伝達により菌種を越えた耐性因子の拡散をきたす可能性があるため院内感染対策上も重要である。また、ESBL は、ほとんどのペニシリン系やセファロスポリン系抗菌薬を失活させる上に、ESBL 産生菌はアミノグリコシド系やフルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性遺伝子も保持することも多く、その治療薬は限られることが多い。また、初期治療の是非が患者の予後につながることや感染拡大を防ぐための接触予防策などの対策が早期に必要なため、本研究は、ESBL 産生 Enterobacteriaceae に感染するリスク因子について調査した。

### 【方法】

2010 年から 2013 年に愛知医科大学病院で Enterobacteriaceae (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*) に感染もしくはコロナイゼーションを確認した症例を対象にして、後方視的に患者の感染経路、合併症、過去使用抗菌薬などを調査した。また、調査した結果から多変量ロジスティック回帰分析を用い、ESBL 産生 Enterobacteriaceae による感染(コロナイゼーション) のリスク因子の探索を行った。

### 【結果】

検出された ESBL 産生 Enterobacteriaceae を認めた患者の内訳は *E. coli* (n=113),

*K. pneumoniae* (n=41), *K. oxytoca* (n=46), *P. mirabilis* (n=12) であり, ESBL 産生 Enterobacteriaceae による院内感染, 院外での感染 (医療関連感染/市中感染) はそれぞれ 60.4%と 39.6% (17.9%/ 21.7%) であった。多変量ロジスティック回帰分析の結果, 男性, 脳血管疾患の既往があること, 気管挿管もしくは気管切開の既往, 60 日以内に外科的手術を行っていること, 60 日以内にアミノグリコシド系薬, オキサゾリジノン系薬, テトラサイクリン系薬, フルオロキノロン系薬, 第 2 世代セファロスポリン系薬, 第 4 世代セファロスポリン系薬の抗菌薬を 4 日以上使用していることが ESBL 産生菌感染のリスク因子であったが, 感染場所はリスク因子として選択されなかった。

### 【結語】

ESBL 産生 Enterobacteriaceae による感染 (コロニゼーション含む) は市中・院内感染では, その検出率に有意差は認められなかった。また, 脳血管疾患や長期の人工呼吸器の装着は ESBL 産生菌による感染 (コロニゼーション含む) のリスク因子になることが明らかになった。さらに, 抗菌薬の使用歴では, 特に第 2 もしくは第 4 セファロスポリン系薬の使用歴が ESBL 産生菌感染のリスクとなり得ることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

近年, 拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌による感染者数の増加が報告されている。ESBL 産生をコードする遺伝子は, プラスミド伝達により菌種を越えた耐性因子の拡散をきたす可能性があるため院内感染対策上も重要である。また, ESBL は, ほとんどのペニシリン系やセファロスポリン系抗菌薬を失活させる上に, ESBL 産生菌はアミノグリコシド系やフルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性遺伝子も保持することも多く, その治療薬は限られることが多い。また, 初期治療の是非が患者の予後につながることや感染拡大を防ぐための接触予防策などの対策が早期に必要である。そのため, 本研究は, ESBL 産生腸内細菌科細菌に感染するリスク因子について調査した。

2010 年から 2013 年に愛知医科大学病院で腸内細菌科細菌 (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*) に感染もしくはコロニゼーションを確認した症例を対象にして, 後方視的に患者の感染経路, 合併症, 過去使用抗菌薬などを調査した。

対象症例は全部で 2031 例となった。これらのうち, ESBL 産生菌であった症例は 212 例, そうでなかった症例は 2089 例で, ESBL の検出率は 9.2%となった。ESBL 産生腸内細菌科細菌による感染 (コロニゼーション含む) は市中・院内感染では, その検出率に有意差は認められなかった。また, 脳血管疾患や長期の人工呼吸器の装着は ESBL 産生菌による感染 (コロニゼーション含む) のリスク因子になることが明らかになった。さらに, 抗菌薬の使用歴では, 特に第 2 もしくは第 4 セファロスポリン系薬の使用歴が ESBL 産生菌感染のリスクとなり得ることが示唆された。

この論文は「Journal of Infection and Chemotherapy (2016;22 (5):319-326)」に掲載され、学位を授与するに値すると判断した。

氏名	伊藤邦弘
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第475号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Inhibition of Nox1 induces apoptosis by attenuating the AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines (口腔扁平上皮癌細胞株における Nox1 の阻害は AKT シグナル伝達経路を阻害し、アポトーシスを誘導する)
論文審査委員	(主査) 教授 高見昭良 教授 佐藤元彦 教授 中野正吾 教授 三嶋秀行

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

NADPH oxidase (Nox) は、活性酸素 (Reactive oxygen species : ROS) を産生し様々な生理機能を果たしており、腫瘍の増殖過程への関与が報告されている。しかし、頭頸部扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma : OSCC) に対する Nox の作用の報告はない。今回、OSCC 細胞株に対する Nox 及び AKT の関与について研究を行った。

### 【方法】

1. OSCC 細胞株 HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, OSC-19 を用いて, *Nox* family (*Nox1*, *Nox2*, *Nox3*, *Nox4*, *Nox5*, *Duox1*, *Duox2*) の阻害剤または抗酸化剤が細胞生存に与える影響を解析した。
2. OSCC 細胞株における *Nox* family の遺伝子発現について解析した。
3. *Nox* family 阻害剤を用いた OSCC 細胞株のアポトーシスの解析を行った。
4. *Nox1* knockdown における OSCC 細胞株の細胞生存率・アポトーシスの解析を行った。
5. OSCC 細胞における AKT リン酸化レベルと AKT 阻害剤が増殖に与える影響を解析した。
6. *Nox1* knockdown における AKT リン酸化レベルの変化について解析した。
7. 最後に, *Nox1* knockdown, AKT 阻害剤と Cisplatin による併用療法の可能性を検

討した。

### 【結果】

1. MTT assay の結果, Nox 阻害剤である DPI, 抗酸化剤である PDTC, NAC はすべての細胞株において濃度依存的に細胞生存率を低下させた。
2. 逆転写 PCR 法の結果, HSC-2, HSC-3 において *Nox1*, *Nox4* が高発現していた。
3. DPI を用いたフローサイトメトリーによる計測の結果, HSC-2, HSC-3 において DPI 濃度に依存しアポトーシスの増加を認めた。
4. RNA 干渉法による *Nox1* knockdown の結果, HSC-2, HSC-3 とともに細胞生存率の有意な低下とアポトーシスの増加を認めた。
5. ウェスタンブロット法の結果, すべての OSCC 細胞株において AKT (Ser473) のリン酸化が確認された。そこで, AKT 阻害剤 Perifosine が OSCC 細胞株の生存に与える影響を解析したところ, すべての細胞株において細胞生存率の低下を認めた。
6. HSC-2, HSC-3 の *Nox1* を knockdown させウェスタンブロットにより計測した結果, リン酸化 AKT (Ser473) が減少した。
7. Cisplatin の併用は, *Nox1* knockdown によるアポトーシスを有意に増強した。

### 【考察】

本研究において, 高レベルの *Nox1* 発現と *Nox1* knockdown による生存率の減少を確認したことから OSCC 細胞の細胞増殖・生存には *Nox1* が密接に関与していると考えられる。さらに, *Nox1* knockdown が AKT のリン酸化レベルを低下させたことから, OSCC 細胞の増殖には AKT のシグナル伝達経路が関与しており, *Nox* family 特に *Nox1* との関与の可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景と目的】

NADPH oxidase (Nox) は, 活性酸素 (Reactive oxygen species : ROS) を産生するだけでなく, 腫瘍増殖への関与も知られている。ただし, 頭頸部扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma : OSCC) への影響はよくわかっていない。これを検証するため, Nox と AKT が OSCC 細胞株に及ぼす影響が解析された。

### 【対象と方法】

OSCC 細胞株 HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, OSC-19 を用い, (1) *Nox* family (*Nox1*, *Nox2*, *Nox3*, *Nox4*, *Nox5*, *Duox1*, *Duox2*) の阻害剤・抗酸化剤が細胞生存に与える影響, (2) *Nox* family の遺伝子発現, (3) *Nox* family 阻害剤によるアポトーシスへの影響, (4) *Nox1* knockdown による細胞生存率・アポトーシスへの影響, (5) AKT リン酸化レベルと AKT 阻害剤が細胞増殖に与える影響, (6) *Nox1* knockdown による AKT リン酸化レベルの変化,



(7) *Nox1* knockdown, AKT 阻害剤と cisplatin の併用の影響が解析された。

### 【結果】

全細胞株において、Nox 阻害剤 DPI, 抗酸化剤 PDTC, NAC は、濃度依存性に細胞生存率を低下させた。HSC-2, HSC-3 では *Nox1*, *Nox4* の高発現がみられた。HSC-2, HSC-3 は DPI 濃度依存性にアポトーシスを誘導した。HSC-2, HSC-3 はいずれも、*Nox1* knockdown により、細胞生存率の低下とアポトーシス誘導がみられた。全 OSCC 細胞株で AKT (Ser473) のリン酸化が確認された。AKT 阻害剤 Perifosine が OSCC 細胞株の生存に与える影響を解析したところ、全細胞株で細胞生存率の低下がみられた。HSC-2, HSC-3 の *Nox1* を knockdown させると、リン酸化 AKT (Ser473) が抑制された。Cisplatin の併用は、*Nox1* knockdown によるアポトーシス誘導に相加的に作用した。

### 【考察】

*Nox1* 高発現と *Nox1* knockdown が頭頸部扁平上皮癌細胞株 (OCSS) の生存率を低下させたことから、OSCC 細胞の細胞増殖・生存に *Nox1* が密接に関与していると考えられた。さらに、*Nox1* knockdown が AKT のリン酸化レベルを低下させたことから、OSCC 細胞の増殖に AKT のシグナル伝達経路が関与し、*Nox* family, 特に *Nox1* の関与が示唆された。これらの結果は、頭頸部扁平上皮癌に対する新たな分子標的治療法や併用療法の可能性を示唆している。以上より、学位を授与するに十分な価値のある論文と判定した。



氏名	宇 梶 珠 未 う かじ たま み
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 476 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Inhibition of IGF-1-Mediated Cellular Migration and Invasion by Migracin A in Ovarian Clear Cell Carcinoma Cells (明細細胞卵巣がんにおける migracin A の IGF-1 を介した細胞遊走および浸潤の抑制)
論文審査委員	(主査) 教授 池 田 洋 教授 細 川 好 孝 教授 渡 辺 秀 人 教授 若 槻 明 彦

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背景】

私たちは以前までにがん細胞の遊走抑制を目的とした放線菌サンプルのスクリーニングを行い、新規構造を有する遊走阻害剤 migracin A および B を見出した。Migracin A と B は同程度の遊走阻害活性がある。

一方、卵巣がんは肺や肝臓、腹腔等に転移する悪性度の高いがんの一つである。そのなかでも予後の悪い明細胞腺がんに着目し、migracin A の転移阻害活性およびそのメカニズムについて調べた。

### 【方法】

明細胞腺がんは浸潤能の非常に高い ES-2 細胞および JHOC-5 細胞を用いた。遊走および浸潤は Wound healing assay および Matrigel chamber assay で測定した。Migracin A の阻害活性の分子メカニズムを調べるために、Protein array および PCR array を行った。

また、抗血管新生活性として HUVEC の tube formation についても評価を行った。

### 【結果】

Migracin A は ES-2 細胞において毒性のない濃度で細胞の遊走および浸潤を抑制した。そのメカニズムとして migracin A は IGF-1 の発現を低下させ、その下流の IGF-1R/Akt シグナルを抑制していることがわかった。

また、soft agar を用いた colony formation assay では高濃度でも阻害活性はなかった。

## 【考察】

Migracin A は放線菌代謝産物から単離された新規構造を有する低分子化合物である。構造は既知の Luminacin C と類似であり、同様に血管新生阻害活性があるが、メカニズムは異なり migracin A は Src 阻害や MEK 阻害の活性はなかった。

一方で、血管新生阻害たんぱく質 vasohibin-1 の発現上昇や増殖因子 IGF-1 の発現抑制が見出された。Vasohibin-1 の発現誘導は肺の線維化や網膜血管新生の抑制、IGF-1 の発現低下は内分泌疾患の抑制等、がんの転移のみならず他の疾患の治療にも有効である可能性がある。

## 【結論】

本研究では migracin A が卵巣がん細胞において IGF-1 の発現を抑制することで細胞の遊走と浸潤を抑制することを見出した。また、migracin A は直接的な抗がん活性がないことから、副作用の少ない抗転移物質として期待できる。

# 論文審査の結果の要旨

## 【背景】

これまでにがん細胞の遊走抑制を目的とした放線菌サンプルのスクリーニングを行い、新規構造を有する遊走阻害剤 migracin A および B を見出した。migracin A と B は同程度の遊走阻害活性がある。

一方、卵巣がんは肺や肝臓、腹腔等に転移する悪性度の高いがんの一つである。本研究ではそのなかでも予後の悪い明細胞卵巣がんの細胞株を選び、migracin A の転移阻害活性およびそのメカニズムについて調べた。

## 【方法】

浸潤能の高い明細胞卵巣がん ES-2 細胞および JHOC-5 細胞を用いた。遊走および浸潤は wound healing assay および Matrigel chamber assay を用いて測定した。Migracin A の浸潤阻害活性の機構を調べるために、Protein array および PCR array を行った。

また、血管新生の阻害を調べるため HUVEC の tube formation についても評価を行った。

## 【結果】

Migracin A は ES-2 細胞において毒性のない濃度で細胞の遊走および浸潤を抑制した。その機構として migracin A は IGF-1 の発現を低下させ、その下流の IGF-1R/Akt シグナルを抑制していることがわかった。

また、直接的抗がん活性の指標になる soft agar を用いた colony formation assay では高濃度でも阻害活性はなかった。

## 【考察】

Migracin A は放線菌代謝産物から単離された新規構造を有する低分子化合物である。構

造は既知の luminacin C と類似であり、同様に血管新生阻害活性があるが、作用機構は異なり migracin A は Src 阻害や MEK 阻害の活性はなかった。

一方で、血管新生阻害たんぱく質 vasohibin-1 の発現上昇や増殖因子 IGF-1 の発現抑制が見出された。Vasohibin-1 の誘導は肺の線維化や網膜血管新生を抑制し、IGF-1 の発現低下は一部の内分泌疾患の抑制に有用なため、migracin A はがんの転移のみならず他の疾患の治療にも有効である可能性がある。

#### **【結論】**

本研究では migracin A が卵巣がん細胞において IGF-1 の発現を抑制することで細胞の遊走と浸潤を抑制することを見出した。また、migracin A は直接的な抗がん活性がないことから、副作用の少ない抗転移物質として期待できる。

本研究は、migracin A の転移阻害活性およびそのメカニズムを明らかとし、がんの治療という観点から、今後の研究の発展が大いに期待される優れた研究である。学位を授与するに値する論文であると判定した。

氏名	かわ なみ かつ ひさ 河 南 勝 久
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 477 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	<b>Effect of Denosumab Administration on Lumbar Vertebral Strength of Patients with Vertebral Bony Metastases: Preliminary Study (転移性脊椎腫瘍に対する抗 RANKL 抗体投与前と投与後の骨強度評価)</b>
論文審査委員	(主査) 教授 三 嶋 秀 行 教授 高 村 祥 子 教授 渡 邊 大 輔 教授 牛 田 享 宏

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

近年各種癌に対する集学治療の発展により癌患者の生命予後は改善している。しかし癌患者の終末期における転移椎体圧潰関連の有害事象 (SRE) による QOL 低下は深刻で、治療指針策定は喫緊の課題である。しかし SRE 発生を予見しうる客観的指標は存在しない。そこで我々は、SRE 予防介入法である抗 RANKL 抗体 (denosumab) 投与による罹患および隣接正常椎体の骨強度変化を、有限要素解析法 (FEM) を用い経時的に評価し、SRE 予防介入治療の有益性と評価の妥当性を検討した。

### 【対象と方法】

対象は 2012 年以降当院 cancer board に登録され当科で治療した転移性脊椎腫瘍のうち、denosumab 介入前後の CT 有限要素法による骨強度評価、骨代謝マーカー (TRAP-5b and urinary NTx)、疼痛評価を半年間追跡しえた症例とした。方法は、有限要素解析ソフト (計算力学センター社製: Mechanical finder Version3.5) を用いて有限要素モデルを作成、力学解析を行い客観的に骨強度評価した。治療法に関わらず denosumab 介入前、後 1, 3, 6 ヶ月の 4 時点で CT 評価、骨代謝マーカー評価、NRS 評価を行った。骨強度評価は組織学的に脊椎転移が実証された転移脊椎椎体および隣接正常椎体で行った。統計解析は repeated measure ANOVA を用いた。

## 【結果】

対象は6例（平均年齢56歳，男性4例女性2例）であった。原発は乳腺2，腎2，肺1，直腸1例であった。FEM解析の結果，罹患椎体の骨強度は介入前平均が7800N，介入後6ヶ月で10600N，6例中5例で骨強度上昇を認め，経時的変化は有意であった。正常椎体の骨強度推移に有意性はなかった。骨代謝マーカーは全症例で骨代謝抑制を示し，全症例でNRSの改善を認めた。経過観察期間中に死亡・SRE症例はなかった。

## 【考察・結論】

癌骨転移症例に対するdenosumab介入によって継続的に転移椎体の骨強度上昇効果が認められたこと，正常椎体では骨強度に有意な変化を認めなかったことは，FEMによる脊椎転移巣骨強度評価法の臨床応用可能性を示唆する。本研究にはlimitationがある。まとめると①転移性骨腫瘍でvalidationが取れていないこと②症例群の癌背景・治療背景が大きくことなり，治療介入薬であるDenosumabの効果であるか，あるいは他の要素の効果であるか実証ができないこと③材料特性の吟味がされていないこと④症例数が少ないことである。本研究は有限要素解析を転移性骨腫瘍に応用した初めての論文である。その結果の信頼性については一定の改善の余地があるが，癌stageIV症例に対するデノスマブ介入による経時的な骨強度上昇効果と，その裏付けとなる骨代謝マーカーの抑制および自覚症状の改善は，癌末期におけるQOL向上を目指すうえで非常に有用な評価方法となる可能性を内包している。

# 論文審査の結果の要旨

## 【背景】

転移性脊椎腫瘍による椎体圧潰関連の有害事象（SRE）は，癌患者のQOLを低下させる。椎体強度の変化を評価し，SRE発生を予見しうる客観的な指標は存在しない。

## 【目的】

骨粗鬆症の骨強度の評価指標として用いられている有限要素解析法（FEM）がdenosumabが投与された転移性脊椎腫瘍の骨強度変化の評価に応用可能かどうか検討する。

## 【対象と方法】

愛知医大のcancer boardで検討され，整形外科で治療した転移性脊椎腫瘍のうち，6ヶ月間追跡しえた症例を対象とした。denosumab投与前，後1，3，6ヶ月の4時点でCT検査，骨代謝マーカー（TRAP-5b and urinary NTx）測定，疼痛の評価（NRS）を行った。組織学的に脊椎転移が確認された転移脊椎椎体および隣接正常椎体の骨強度を，有限要素解析ソフト（計算力学センター社製：Mechanical finder Version 3.5）を用いて有限要素モデルを作成し，力学解析を行い客観的に評価した。統計解析はrepeated measure ANOVA

を用いた。院内 IRB の承認を得た。

### 【結果】

対象は 6 例（平均年齢 56 歳，男性 4 例女性 2 例）であった。原発は乳腺 2，腎 2，肺 1，直腸 1 例であった。転移椎体の骨強度は介入前平均が 7800N，介入後 6 ヶ月で 10600N であり，6 例中 5 例で上昇した。骨強度の経時的変化は，転移椎体で有意だったが正常椎体では有意でなかった。骨代謝マーカーは全例で骨代謝抑制を示し，全例で NRS の改善を認めた。観察中に死亡・SRE 例はなかった。

### 【考察】

骨転移に denosumab を投与することによって継続的に転移椎体の骨強度上昇が認められたこと，正常椎体では骨強度に有意な変化を認めなかったことは，FEM による脊椎転移巣骨強度評価法の臨床応用可能性を示唆する。本研究の limitation は，1) 転移性骨腫瘍で validation が取れていない 2) 症例の背景が異なり，Denosumab の効果であるか実証できない 3) 症例数が少ないことである。

本研究は，有限要素解析を転移性脊椎腫瘍に応用した初めての論文である。椎体強度の変化を客観的に評価する指標が確立すれば，早期の介入が可能になり，新薬の開発や患者の QOL 向上に寄与すると期待される。

以上より，学位を授与するに値する論文であると判定した。



氏名	していほんくろういー Sidthipong Kulrawee
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 478 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Rational design, synthesis and <i>in vitro</i> evaluation of novel <i>exo</i> -methylene butyrolactone salicyloylamide as NF- $\kappa$ B inhibitor (NF- $\kappa$ B 阻害剤 <i>exomethylene butyrolactone salicyloylamide</i> の分子デザイン, 合成と <i>in vitro</i> 活性の評価)
論文審査委員	(主査) 教授 武内 恒成 教授 佐藤 元彦 教授 高村 祥子 教授 米田 政志

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

NF- $\kappa$ B の過剰な活性化は炎症やがんの促進要素となる。そこで、NF- $\kappa$ B は医薬の探索において重要な標的と考えられる。DHMEQ は NF- $\kappa$ B 阻害剤として見出され、既に多くの動物実験に用いられ、多くの疾患モデルに抗炎症および抗がん活性が報告されている。作用機構として NF- $\kappa$ B を構成するタンパク質の特異的システインに共有結合して DNA への結合を阻害する。一方、DHMEQ は epoxide を有するため非特異的結合が懸念される。そこで、epoxide のない DHMEQ 誘導体のデザインを試み、その化合物の抗炎症・抗がん活性と安定性を調べた。

### 【方法】

マウス単球白血病 RAW264.7 細胞をマクロファージ様細胞として、リポ多糖 (LPS) で刺激して NF- $\kappa$ B, iNOS の発現や各種サイトカイン分泌を活性化した。NF- $\kappa$ B への阻害活性は p65 の *in vitro* 阻害および細胞内阻害を測定キットを用いて調べた。各種サイトカインおよび MMP-2 の分泌には ELISA を用いた。細胞遊走は Radius 96-well 法で、細胞浸潤は Matrigel chamber 法で測定した。

### 【結果】

epoxide のかわりに、やはりシステインの SH と結合すると考えられる *exomethylene carbonyl* 構造を導入した。そのほかの部分には DHMEQ に近い構造にした。このような構

造の化合物を合成し、構造名 (S)- $\beta$ -salicyloylamino- $\alpha$ -exo-methylene- $\gamma$ -butyrolactone を略して SEMBL と命名した。SEMBL は in vitro で DHMEQ と同等に p65 と DNA への結合を阻害した。さらに RAW264.7 細胞において、LPS に誘導される NF- $\kappa$ B 活性化を DHMEQ より低濃度で阻害した。LPS に誘導される iNOS 発現、およびその産物の NO 産生も阻害した。LPS は IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の分泌も誘導し、SEMBL はこれらの分泌を阻害した。卵巣がん ES-2 細胞を用いた実験では、定常的に活性化している NF- $\kappa$ B を DHMEQ より低濃度で阻害した。さらに ES-2 細胞の遊走と浸潤を毒性のない濃度で阻害した。一方、PBS 中の安定性を DHMEQ と比較して調べたところ、残存量を HPLC で調べた場合と残存活性を生物活性で調べた場合のどちらも SEMBL の方が明らかに安定であった。

### 【考察】

DHMEQ に比べて epoxide のない誘導体 SEMBL は生体物質との非特異的な結合が少ないので、特異性が向上すると考えられる。又、epoxide は安定性が低く、SEMBL の水溶液中における安定性が確認された。さらに、疎水性の指標になる cLogP を計算したところ、DHMEQ は 0.871, SEMBL は 1.659 であり、SEMBL の方が、より細胞膜透過性が高いことが示唆された。DHMEQ は現在、皮膚炎症に対する軟膏と腹腔内投与による抗がん剤として開発が進んでいるが、SEMBL は第 2 世代 DHMEQ として有用と考えられる。

### 【結論】

epoxide のない DHMEQ 誘導体 SEMBL をデザイン・合成した。SEMBL は DHMEQ と同等あるいはより強い NF- $\kappa$ B 阻害活性と培養細胞における抗炎症・抗転移活性を示し、より安定であることがわかった。

## 論文審査の結果の要旨

がんを対象とした創薬においてはさまざまな標的分子を対象に研究が繰り返されているが、なかでも NF- $\kappa$ B を創薬標的とした研究は、多く進められてきた。NF- $\kappa$ B は、転写因子のうちでも多様なカスケードの制御に関わる分子であり、炎症制御や細胞接着など多様な細胞機能に関与する。NF- $\kappa$ B の活性化は炎症やがんの促進に繋がることも広く知られており、NF- $\kappa$ B は医薬の探索において重要な標的と考えられてきた。論文提出者のグループではこれまで、DHMEQ を NF- $\kappa$ B 阻害剤として見出し、既に動物疾患モデルから抗炎症および抗がん活性について数多く報告されている。DHMEQ は作用機序としては、NF- $\kappa$ B タンパク質のシステイン基に特異的な共有結合を形成し、その転写因子としての機能を阻害するとされる。しかし DHMEQ はエポキシ基を持っており、これが非特異的な結合を形成する可能性が示唆されていた。本研究では新規化学合成により、エポキシ基のない DHMEQ 誘導体のデザインを試み、合成が行われた。新しい合成スキームを経た新規化合物を用い、抗炎症・抗がん活性および安定性が調べられた。



DHMEQ 誘導体のデザインとしては、骨格であるベンズアミド環は維持したまま、エポキシ基に変えて exomethylene carbonyl 構造を導入した。これはエポキシ基による非特異的結合を排除しつつも、DHMEQ と同様にシステインの SH 基に結合することが期待された。この構造化合物の合成体は、構造名 (S)- $\beta$ -salicyloylamino- $\alpha$ -exo-methylene- $\gamma$ -butyrolactone から、略して SEMBL と命名した。

抗炎症・抗がん活性をみるための *in vitro* の実験系としては、LPS で炎症性と NF- $\kappa$ B 活性を誘導したマウス単球白血病 RAW264.7 細胞、および定常的に高い NF- $\kappa$ B 発現活性を有する卵巣がん ES-2 細胞を用いて評価された。

SEMBL は、*in vitro* で DHMEQ と同等に p65 とその標的 DNA 配列への結合を阻害した。SEMBL はさらに、RAW264.7 細胞においては、LPS に誘導される NF- $\kappa$ B 活性化を DHMEQ より低濃度で阻害し、LPS に誘導される iNOS 発現とともに NO 産生も阻害した。この系では、LPS で誘導される IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の分泌も SEMBL は阻害することができた。ES-2 細胞においては、SEMBL は DHMEQ より低濃度によって定常的に活性化する NF- $\kappa$ B を阻害し、細胞の遊走と浸潤も毒性のない濃度で抑えることを確認した。薬剤の安定性においても、PBS 中での安定性を DHMEQ と比較した。残存量を HPLC で定量化、および残存活性を調べた場合いずれも DHMEQ よりも SEMBL の方が安定であった。cLogP による疎水性指標からも、SEMBL は 1.659 で DHMEQ は 0.871 よりも疎水性が高く、SEMBL の方がさらに細胞膜透過性が高いことも示唆されている。

DHMEQ もがんおよび炎症に対する創薬として非常に期待の持てるリード化合物であるが、その誘導体 SEMBL はさらにその薬剤非特異性が下がり、安定性も高くなったことから創薬としてのさらなる可能性は広がっている。DHMEQ 誘導体 SEMBL は、第 2 世代 DHMEQ として有用と考えられ、その基本データを示した当該論文と研究内容の価値は十分に認められる。

以上から、上記論文について学位を授与するに値するものであると判断した。

氏名	田村泰弘
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第479号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Pathophysiology of functional heartburn based on Rome III criteria in Japanese patients (Rome III 診断基準に基づいた日本人の機能性胸やけの病態の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 植田 広海 教授 塩見 利明 教授 藤原 祥裕 教授 風岡 宜暁

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

機能性消化管障害の国際分類である Rome III 基準では機能性胸やけ (Functional Heartburn: FH) は、胸骨後方の灼熱感伴う不快感または痛みが存在するが、病理組織学的に確認できる運動障害や内視鏡検査などで異常を認めないものと定義されている。一方、実地診療においてはプロトンポンプ阻害薬 (proton pump inhibitor: PPI) 不応性非びらん性胃食道逆流症 (non-erosive reflux disease: NERD) を広義の FH として扱うことが多い。われわれは、PPI 不応性 NERD 患者を対象に、背景因子や症状および食道機能検査により厳密な Rome III 診断基準による FH の診断が可能かを検討した。

### 【対象と方法】

上部消化管内視鏡検査にて明らかな異常を認めない患者で、常用量の PPI を 8 週間内服し続けたにもかかわらず、症状の改善がみられない患者 111 名を対象とした。食道内圧測定で一次蠕動および下部食道括約筋機能の評価をおこない、24 時間胃食道 pH・インピーダンスモニタリング (24MII-pH) で逆流動態および逆流と症状との関連の評価をおこなった。食道運動障害群と食道酸暴露時間の延長を示す群 (pH-POS 群)、食道酸暴露時間は正常で逆流関連症状発現率陽性の群 (hypersensitive esophagus: HE 群)、症状発現と逆流に関連のない群 (Functional Heartburn: FH 群) に分類し、食道運動障害群を除いた 3 群間で患者背景因子、症状頻度、社会的背景と他の消化管症状の QOL、神経症圏の有無について比較検討をおこなった。また、胃食道逆流回数・胃酸分泌動態は 24MII-pH より算出

し比較検討をおこなった。

### 【結果】

PPI 不応性 NERD 患者 111 名は食道運動障害群 33 名 (29.7%), pH-POS 群 22 名 (19.8%), HE 群 34 名 (30.6%), FH 群 22 名 (19.8%) に分類された。食道運動障害群を除いた 3 群間の比較検討では、患者背景因子、症状頻度、社会的背景と他の消化管症状の QOL、神経症の有無に差を認めなかった。24MII-pH による胃食道逆流回数・胃酸分泌動態の検討では、pH-POS 群は有意に逆流回数が高値であった ( $p < 0.01$ ) が、胃酸分泌 (24 時間 pH4 未満時間比率) は 3 群間に差は認めなかった。

### 【結論】

これまでの臨床研究において一般的に FH として扱われてきた PPI 不応性 NERD の日本人患者には、様々な病態が混在しており、Rome III 診断基準により厳密に FH と定義されたものは低率であった。PPI 不応性 NERD に含まれる FH には特異的な背景や症状は存在しないため、その診断には食道内圧測定および 24MII-pH 検査を行う必要があった。

## 論文審査の結果の要旨

### 【目的】

機能性胸やけ (Functional Heartburn: FH) は、胸骨後方の灼熱感を伴う不快感または痛みがあるが胃酸逆流や食道運動障害がなく 6 ヶ月以上長期にわたる症状がある疾患と Rome III 診断基準では定義されている。今回、同様の症状を呈し、日本では広義の FH と扱われているプロトンポンプ阻害薬 (proton pump inhibitor: PPI) 不応性非びらん性胃食道逆流症 (non-erosive reflux disease: NERD) 患者を対象に、FH を厳密に診断し、PPI 不応性 NERD 患者の他の病態との比較検討を行った。

### 【方法と結果】

2007 年から 2014 年までに、愛知医科大学を受診し 6 ヶ月以上週少なくとも 2 回胸やけを訴えて、胃内視鏡で異常がないにも関わらず 8 週間 PPI を投与されても症状の改善しない患者 111 名を対象とした。食道内圧測定を行い、一次蠕動および下部食道括約筋機能の評価を行い、これらの障害のある患者 (食道運動障害群 33 名) を除外した。残りの 78 名に対し 24 時間胃食道 pH・インピーダンスモニタリング (24MII-pH) で逆流動態および逆流と症状の関連の評価を行った。まず、症状発現と逆流に関連のある群と逆流に関連のない群に分類した。症状発現と逆流に関連のある群 56 名を更に、食道酸逆流暴露時間の延長を示す群 (pH-POS 群 22 名) と食道酸逆流暴露時間は正常であるが逆流関連症状発現率陽性の群 (HE 群 34 名) に分類した。症状発現と逆流に関連のない群を機能性胸やけ群 (FH 群 22 名) とした。この 3 群間で、患者背景因子、症状頻度、社会的背景と他の消化管症状の QOL、神経症の有無、胃食道逆流回数、胃酸分泌動態について比較検討した。その結

果, 3群間で患者背景因子, 症状頻度, 社会的背景と他の消化管症状のQOL, 神経症の有無に有意差を認めなかった。24MII-pHによる胃食道逆流回数・胃酸分泌動態の検討では, pH-POS群は有意に逆流回数が高値であった。

#### **【結論】**

今回の研究で, これまで臨床において, 一般的にFHとして扱われてきたPPI不応性NERDの日本人患者には, 様々な病態が混在しており, 厳密にFHと定義されたものは低率であることが示された。PPI不応性NERDに含まれるFHには特異的な背景や症状は存在しなかった。以上より, 日本人のPPI不応性NERDの患者にはFHのみならず様々な病態が存在し, その診断には食道内圧測定および24MII検査が必須であることを示した貴重な論文であり, 学位授与に値すると判断する。

氏名	平 澤 敦 彦 ひら さわ あつ ひこ
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 480 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	The prevalence of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis in Japan - the first report of measurement by CT and review of the literature (本邦におけるびまん性特発性骨増殖症の有病率 - CT を用いて調査した世界初の報告と過去の論文の再考察 -)
論文審査委員	(主査) 教授 高 安 正 和 教授 中 野 隆 教授 高 村 祥 子 教授 牛 田 享 宏

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### **Background**

びまん性特発性骨増殖症（以下 DISH）は保存加療に抵抗する椎体骨折を合併する傾向にあり，外科的治療が必要となる場合がある。DISH のこの特徴は十分に医療者には認知されてはおらず，この疾患の詳細な病因は未だ不明である。そこで，この研究は DISH の有病率を調査することと CT 評価が妥当であるかどうか調査することを目的とした。

### **Methods**

対象は 2011 年 8 月から 2012 年 7 月までに胸腹部 CT と胸腹部 X 線を同時に撮影された 558 例（男性 300 例，女性 258 例）である。X 線と同様に CT でも Resnick の診断基準に従って連続して癒合した椎体の有無を読影した。両検査で全対象における有病率を算出し，ランダムに抽出した 107 例に対し，検者内誤差（Cohen カッパ），検者間誤差（Fleiss カッパ）を計算し，癒合椎間高位を調査した。

### **Results**

DISH と診断された対象は X 線で 558 例中 98 例（17.6%），CT で 152 例（27.2%）であった。男性のみでは X 線で 300 例中 70 例（23.3%），CT では 116 例（38.7%），女性のみでは X 線で 258 例中 28 例（10.9%），CT では 36 例（14.0%）であった。X 線読影における癒合椎間高位は胸椎から腰椎まで，特に中下位胸椎に認められた。Cohen カッパは X 線では 0.587，CT では 0.825 であった。Feiss カッパは X 線では 0.552，CT では 0.643 であった。

## **Conclusions**

CTによるDISHの有病率は27.1%とX線より高かった。加えて、CTによる検者内誤差、検者間誤差はX線より少ない結果であった。CTによる評価はDISHの状態を正確に理解するためにより有用な方法である。

## 論文審査の結果の要旨

### **Background**

びまん性特発性骨増殖症（以下DISH）は保存加療に抵抗する椎体骨折を合併する傾向にあり、外科的治療が必要となる場合がある。DISHのこの特徴は十分に医療者には認知されておらず、この疾患の詳細な病因は未だ不明である。そこで、この研究はDISHの有病率を調査することとCT評価が妥当であるかどうか調査することを目的とした。

### **Methods**

対象は2011年8月から2012年7月までに胸腹部CTと胸腹部X線を同時に撮影された558例（男性300例、女性258例）である。X線と同様にCTでもResnickの診断基準に従って連続して癒合した椎体の有無を読影した。両検査で全対象における有病率を算出し、ランダムに抽出した107例に対し、検者内誤差（Cohenカッパ）、検者間誤差（Fleissカッパ）を計算し、癒合椎間高位を調査した。

### **Results**

DISHと診断された対象はX線で558例中98例（17.6%）、CTで152例（27.2%）であった。男性のみではX線で300例中70例（23.3%）、CTでは116例（38.7%）、女性のみではX線で258例中28例（10.9%）、CTでは36例（14.0%）であった。X線読影における癒合椎間高位は胸椎から腰椎まで、特に中下位胸椎に認められた。CohenカッパはX線では0.587、CTでは0.825であった。FeissカッパはX線では0.552、CTでは0.643であった。

### **Conclusions**

CTによるDISHの有病率は27.1%とX線より高かった。加えて、CTによる検者内誤差、検者間誤差はX線より少ない結果であった。CTによる評価はDISHの状態を正確に理解するためにより有用な方法である。

以上より本研究はDISHの有病率をより診断精度の高いCTに基づき初めて調査したものでDISHの疫学の理解に有益な情報をもたらした。本論文はJournal of Orthopaedic Science誌に搭載され、その内容も優れていることから学位を授与するに十分な価値のある論文と判定した。



氏名	やす だ よし たか 安 田 吉 孝
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 481 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	High oxygen modifies vasodilator effect of cysteine via enhanced oxidative stress and thromboxane production in the rat mesenteric artery (高濃度酸素は酸化ストレスとトロンボキサン産出を介してシステインによるラット腸間膜動脈血管拡張を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 増 渕 悟 教授 天 野 哲 也 教授 松 山 克 彦 教授 石 橋 宏 之

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

61%以上の酸素濃度で人工呼吸を行うと肺組織障害を起こすという報告があるが、100%に近い濃度と60%以下の濃度で内臓血管に及ぼす影響は不明である。硫化水素はL-cysteineから生体内で作られ、ATP感受性K<sup>+</sup>(KATP)チャネルを開口させ血管平滑筋を弛緩させる。動脈硬化病変をもつ患者では、L-cysteine血漿濃度が高値となるが、その病的意義は不明である。本研究では、L-システインが内臓血管拡張を引き起こす作用に酸素濃度依存性があるか、その違いに酸化ストレスの関与があるかを明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

内皮温存、非温存ラット腸間膜動脈で以下の実験を行った。フェニレフリンで血管収縮を惹起後95%酸素群と50%酸素群に分けL-システイン、NaHSを累積適用し用量作用曲線をえた。また、ジヒドロエチジウムによる赤色蛍光染色で血管内活性酸素を、免疫組織学的分析でニトロタイロシンレベル、トロンボキサンB2レベルを評価した。ウエスタンブロッティングによるNADPHオキシダーゼサブユニットタンパクの細胞膜発現を評価した。データは平均±標準偏差で示し、分散分析後post-hocテストとしてScheffe's testを用いた。

## 【結果】

L-システインは、内皮温存 95%酸素存在下のもののみ収縮反応を惹起した（各 n=5）。NaHS はいずれの酸素濃度でも収縮した（各 n=5）。内皮温存 95%酸素存在下ではトロンボキサン受容体阻害剤 SQ29548, シクロオキシゲナー阻害薬 インドメタシンを適用した血管では, L-システインによる収縮は消失した（各 n=5）。内皮温存 95%酸素存在下ではスーパーオキシド拮抗薬 Tiron および NADPH オキシダーゼ阻害薬 gp91ds-tat は, L-システインによる血管収縮反応を拡張へ転じた（各 n=5）。一方, KATP チャネル拮抗薬グリベンクラミド, シスタチオン $\gamma$ -リアーゼ拮抗薬 DL-プロパルギルグリシンは, Tiron による拡張反応を完全に抑制した（各 n=5）。L-システインは, Tiron および gp91ds-tat で抑制される血管内活性酸素レベル増大, あるいは, Tiron および一酸化窒素合成酵素阻害薬 L-NAME で抑制される血管内ニトロタイロシンレベル増大を惹起した（各 n=5）L-システインは, インドメタシンで抑制されるトロンボキサン B2 レベル増大を惹起した（n=6）内皮温存 95%酸素存在下の血管では, NADPH オキシダーゼサブユニット p47phox の細胞膜発現の増大を認めた（各 n=5）。

## 【結論】

高濃度酸素下では, L-システインは強く NADPH オキシダーゼを活性化させ, 活性酸素, ペロキシナイトライト, トロンボキサンを産生して血管拡張反応を抑制する。サプリメントで L-システイン内服中の患者, 動脈硬化を持つ患者が高濃度酸素に曝露されると酸化ストレスで内因性硫化水素による内臓血管拡張反応を障害する可能性がある。

# 論文審査の結果の要旨

## 【目的】

61%以上の酸素濃度で人工呼吸を行うと肺組織障害を起こすという報告があるが, 100%に近い濃度と 60%以下の濃度で内臓血管に及ぼす影響は不明である。硫化水素は L-cysteine から生体内で作られ, ATP 感受性 K<sup>+</sup>(KATP)チャネルを開口させ血管平滑筋を弛緩させる。動脈硬化病変をもつ患者では, L-cysteine 血漿濃度が高値となるが, その病的意義は不明である。本研究では, L-システインが内臓血管拡張を引き起こす作用に酸素濃度依存性があるか, その違いに酸化ストレスの関与があるかを明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

内皮温存, 非温存ラット腸間膜動脈で以下の実験を行った。フェニレフリンで血管収縮を惹起後 95%酸素群と 50%酸素群に分け L-システイン, NaHS を累積適用し用量作用曲線をえた。また, ジヒドロエチジウムによる赤色蛍光染色で血管内活性酸素を, 免疫組織学的分析でニトロタイロシンレベル, トロンボキサン B2 レベルを評価した。ウエスタンブ



ロツティングによる NADPH オキシダーゼサブユニットタンパクの細胞膜発現を評価した。データは平均±標準偏差で示し,分散分析後 post-hoc テストとして Scheffe's test を用いた。

### 【結果】

L-システインは, 内皮温存 95%酸素存在下のもののみ収縮反応を惹起した (各 n=5)。NaHS はいずれの酸素濃度でも収縮した (各 n=5)。内皮温存 95%酸素存在下ではトロンボキサン受容体阻害剤 SQ29548, シクロオキシゲナー阻害薬 インドメタシンを適用した血管では, L-システインによる収縮は消失した (各 n=5)。内皮温存 95%酸素存在下ではスーパーオキシド拮抗薬 Tiron および NADPH オキシダーゼ阻害薬 gp91ds-tat は, L-システインによる血管収縮反応を拡張へ転じた (各 n=5)。一方, KATP チャンネル拮抗薬グリベンクラミド, シスタチオン $\gamma$ -リアーゼ拮抗薬 DL-プロパルギルグリシンは, Tiron による拡張反応を完全に抑制した (各 n=5)。L-システインは, Tiron および gp91ds-tat で抑制される血管内活性酸素レベル増大, あるいは, Tiron および一酸化窒素合成酵素阻害薬 L-NAME で抑制される血管内ニトロタイロシンレベル増大を惹起した (各 n=5) L-システインは, インドメタシンで抑制されるトロンボキサン B2 レベル増大を惹起した (n=6) 内皮温存 95%酸素存在下の血管では, NADPH オキシダーゼサブユニット p47phox の細胞膜発現の増大を認めた (各 n=5)。

### 【結論】

高濃度酸素下では, L-システインは強く NADPH オキシダーゼを活性化させ, 活性酸素, ペロキシナイトライト, トロンボキサンを産生して血管拡張反応を抑制する。サプリメントで L-システイン内服中の患者, 動脈硬化を持つ患者が高濃度酸素に曝露されると酸化ストレスで内因性硫化水素による内臓血管拡張反応を障害する可能性がある。

本研究論文は, L-システインの血管拡張反応が高濃度酸素により阻害される現象のメカニズムを一連の実験により明らかにした非常に優れたものであり, 学位授与に値すると評価された。

氏名	やまぐちよしはる 山口純治
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第482号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Association of Intestinal Microbiota with Metabolic Markers and Dietary Habits in Patients with Type 2 Diabetes (2型糖尿病患者における代謝マーカー・食習慣・腸内細菌叢の関連性)
論文審査委員	(主査) 教授 中村二郎 教授 高村祥子 教授 前川正人 教授 都築豊徳

## 学位論文内容の要旨

### 【学術的背景と目的】

腸管には全身の免疫担当細胞の8割が存在し免疫を司る一方、多彩なホルモンを分泌する内分泌臓器としての役割も有しており、食欲や血糖・脂質を始めとする代謝機能に大きな役割を果たしている。近年、腸内細菌叢がこれら栄養や代謝など宿主の生態系と複雑に関連し、肥満・代謝機能不全及び糖尿病や精神疾患などと密接な関係にあることが報告されている。この機序として、細菌自体による直接作用や食物繊維を腸内細菌が発酵する際に作り出される短鎖脂肪酸による、エネルギー代謝や腸管免疫への作用が示唆されている。一方、糖尿病の発症や進展のメカニズムには遺伝子の多型や変異などの遺伝因子のみではなく、運動不足や動物性脂肪の摂取過剰に代表されるような不健康な生活習慣の積み重ねが後天的に遺伝子の読み取りパターンを変えてしまうエピゲノムのメカニズムや腸内細菌の環境バランスの異常による Dysbiosis などの環境因子が報告されている。また、腸内細菌によるエピゲノムへの影響も指摘されており、その病態的意義の解明が、今後の2型糖尿病診療のブレークスルーになる可能性が期待される。そこで今回、2型糖尿病患者における腸内細菌叢と食習慣、血清代謝マーカー、便中短鎖脂肪酸の関連について検討した。

### 【研究方法】

2型糖尿病患者59名(男性25名、女性34名)空腹時採血ならびに糞便を採取した。腸内細菌叢の解析はT-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) 法を、食生活調査は自己記入式問診票を用いた。血中代謝マーカー(血糖、血中インスリン、イ

ンスリン抵抗性指数である HOMA-IR, 脂質, 肝機能), 腸内細菌叢, 便中短鎖脂肪酸ならびに食生活の関連性について Spearman の相関解析を用いて検討した。

### 【結果】

総エネルギー摂取量は  $1692 \pm 380$  kcal/日であった。炭水化物, 脂肪, および蛋白質摂取量は, それぞれ,  $57.5 \pm 5.2\%$ ,  $23.2 \pm 5.3\%$ ,  $13.2 \pm 2.2\%$  であった。炭水化物摂取は, *Clostridium* clusters IV と正の相関を, *Bifidobacterium* spp. と負の相関を示した。脂肪摂取は *Clostridium* clusters XI と正の相関を, *Clostridium* clusters IV と負の相関を示した。蛋白質摂取は *Clostridium* clusters XI と正の相関を, *Lactobacillales* 目と負の相関を示した。また蛋白質摂取は便中の総短鎖脂肪酸ならびに酢酸と負の相関を示した。総短鎖脂肪酸・プロピオン酸・酢酸は血中インスリンと HOMA-IR と負の相関を示した。

### 【考察】

今回 2 型糖尿病患者においてプロピオン酸や酢酸のような腸管内の短鎖脂肪酸が耐糖能の改善に有益であることが証明された。また低蛋白・低炭水化物食は酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸レベルの上昇に伴う健康的な腸管環境 (*Bifidobacterium* spp. と *Lactobacillales* 目の増加や *Clostridium* clusters XI の減少) 形成に寄与すると考えられた。

### 【結語】

低蛋白・低炭水化物食は腸内環境を改善することで, 糖尿病患者の耐糖能の向上に寄与する可能性が示された。今後, 2 型糖尿病の治療や予防における腸内細菌叢の観点からのアプローチが重要である。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景】

腸管には全身の免疫担当細胞の 8 割が存在し免疫を司る一方, 多彩なホルモンを分泌する内分泌臓器としての役割も有しており, 食欲や血糖・脂質を始めとする代謝機能に大きな役割を果たしている。近年, 腸内細菌叢がこれら栄養や代謝など宿主の生態系と複雑に関連し, 肥満・代謝機能不全及び糖尿病や精神疾患などと密接な関係にあることが報告されている。この機序として, 細菌自体による直接作用や食物繊維を腸内細菌が発酵する際に作り出される短鎖脂肪酸による, エネルギー代謝や腸管免疫への作用が示唆されている。一方, 糖尿病の発症や進展のメカニズムには遺伝子の多型や変異などの遺伝因子のみではなく, 運動不足や動物性脂肪の摂取過剰に代表されるような不健康な生活習慣の積み重ねが後天的に遺伝子の読み取りパターンを変えてしまうエピゲノムのメカニズムや腸内細菌の環境バランスの異常による Dysbiosis などの環境因子が報告されている。また, 腸内細菌によるエピゲノムへの影響も指摘されており, その病態的意義の解明が, 今後の 2 型糖尿病診療のブレークスルーになる可能性が期待される。

## 【目的】

2型糖尿病患者における腸内細菌叢と食習慣，血清代謝マーカー，便中短鎖脂肪酸の関連について検討した。

## 【方法】

2型糖尿病患者 59 名（男性 25 名，女性 34 名）空腹時採血ならびに糞便を採取した。腸内細菌叢の解析は T-RFLP（terminal-restriction fragment length polymorphism）法を，食生活調査は自己記入式問診票を用いた。血中代謝マーカー（血糖，血中インスリン，インスリン抵抗性指数である HOMA-IR，脂質，肝機能），腸内細菌叢，便中短鎖脂肪酸ならびに食生活の関連性について Spearman の相関解析を用いて検討した。

## 【結果】

総エネルギー摂取量は  $1692 \pm 380$  kcal/日であった。炭水化物，脂肪，および蛋白質摂取量は，それぞれ， $57.5 \pm 5.2\%$ ， $23.2 \pm 5.3\%$ ， $13.2 \pm 2.2\%$  であった。炭水化物摂取は，*Clostridium* clusters IV と正の相関を，*Bifidobacterium* spp. と負の相関を示した。脂肪摂取は *Clostridium* clusters XI と正の相関を，*Clostridium* clusters IV と負の相関を示した。蛋白質摂取は *Clostridium* clusters XI と正の相関を，*Lactobacillales* 目と負の相関を示した。また蛋白質摂取は便中の総短鎖脂肪酸ならびに酢酸と負の相関を示した。総短鎖脂肪酸・プロピオン酸・酢酸は血中インスリンと HOMA-IR と負の相関を示した。

## 【考察】

今回 2 型糖尿病患者においてプロピオン酸や酢酸のような腸管内の短鎖脂肪酸が耐糖能の改善に有益であることが証明された。また低蛋白・低炭水化物食は酢酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸レベルの上昇に伴う健康的な腸管環境（*Bifidobacterium* spp. と *Lactobacillales* 目の増加や *Clostridium* clusters XI の減少）形成に寄与すると考えられた。

低蛋白・低炭水化物食は腸内環境を改善することで，糖尿病患者の耐糖能の向上に寄与する可能性を示す優れた論文であり，学位を授与するに十分な価値のある論文であると判定した。

氏名	やま もと やす ひろ 山 本 康 博
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第483号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Intermittent local periodontal inflammation causes endothelial dysfunction of the systemic artery via increased levels of hydrogen peroxide concomitantly with overexpression of superoxide dismutase (間欠的な局所の歯周組織炎症はスーパーオキシドディスムターゼを過剰発現することで過酸化水素を産生し全身的な動脈の内皮機能障害を引き起こす)
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤元彦 教授 内藤宗和 教授 天野哲也 教授 石橋宏之

## 学位論文内容の要旨

### 【目的】

歯周病は各種サイトカインを産生する口腔内の局所炎症である。歯周病は冠動脈疾患を含む動脈硬化性心疾患発症の要因といわれている。重度の歯血症動物モデルでは血管での酸化ストレスが増大するといわれている。また、炎症性サイトカインは各種細胞でNADPH オキシダーゼの活性化により活性酸素を過剰産生するといわれているが、歯周組織の炎症が血管内皮機能に及ぼす影響とその機序は依然不明である。

本研究では、間欠的歯周炎症ラットモデルで血管内皮機能を評価し、その変化に活性酸素種が関与するかを明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

間欠的歯周炎症ラットモデルとして、LPS 150  $\mu$ gを生後8週で腹腔内に単回投与し各回LPS 1500  $\mu$ gを生後11週まで1週間隔で歯肉局注するLPS群ラット、LPS 150  $\mu$ gを生後8週で腹腔内に単回投与するSham群ラット、LPS群と同量の生理食塩水を投与したNormal群ラットをそれぞれ作製した。

それぞれの下顎骨を薬剤歯肉局注3日後および7日後で摘出し、病理標本作製のために局所の炎症を評価した。



循環動態評価として、毎週イソフルラン 3%吸入下で非観血的平均動脈圧および脈拍数を記録した。

等尺性張力変化測定として、生後 12 週で摘出した胸部大動脈の内皮温存リング標本を製し、フェニレフリン ( $3 \times 10^{-7}$  mol/L) で収縮させ、アセチルコリン ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  mol/L) による拡張反応を評価した。一酸化窒素合成酵素阻害薬 L-NAME ( $3 \times 10^{-4}$  mol/L), 一酸化窒素ドナー NOC-7 を投与し一酸化窒素の血管拡張反応への関与を評価した。同様に、NADPH オキシダーゼ阻害薬 gp91ds-tat ( $10^{-6}$  mol/L), 活性酸素阻害薬 Tiron (10 mmol/L), 過酸化水素分解酵素 PEG Catalase (200 U/mL) を投与し、それぞれの薬剤が血管の拡張反応に与える影響を評価した。

蛍光色素測定を用いて、DCF-DA ( $10^{-5}$  mol/L) による血管の活性酸素種レベルを測定した。

ウェスタンブロッティングにて、NADPH オキシダーゼおよびサブユニットタンパクの細胞膜発現を評価した。データは平均 ± 標準偏差で示し、分散分析後 post-hoc テストで Scheffé's test を用いた。

### 【結果】

8-12 週まで平均動脈圧、脈拍数に群間差はなかった (各 n=7)。LPS 群の血管では、アセチルコリンによる拡張反応が有意に抑制された。一酸化窒素合成酵素阻害薬 (L-NAME) はすべての群のこれら拡張反応を完全に抑制した (各 n=5)。NADPH オキシダーゼ阻害薬 (gp91ds-tat) と過酸化水素分解酵素 (PEG Catalase) は、LPS 群の抑制された拡張反応を改善した (各 n=7)。DCF-DA にて LPS 群の血管で活性酸素種の発現を認めた。歯周組織の炎症細胞浸潤は、LPS 投与 3 日後には認めたが投与 7 日後には認めなかった (各 n=5)。LPS 群の血管では、Catalase により抑制される活性酸素種レベルの上昇および NADPH オキシダーゼサブユニット p47phox, 過酸化水素合成酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (Cu/Zn SOD) の細胞膜発現の増大を認めた (各 n=5)。

### 【結論】

間欠的歯周炎症ラットモデルでは、一酸化窒素合成酵素を介する内皮依存性血管拡張反応が減弱する。この内皮機能の抑制には過酸化水素の過剰産生が関与している。過酸化水素の過剰産生には、NADPH オキシダーゼの活性化および細胞膜に存在するスーパーオキシドディスムターゼが関与している。

口腔内の炎症制御は、血管内皮機能温存のために重要である。

## 論文審査の結果の要旨

歯周病は各種サイトカインを産生する口腔内の局所炎症である。歯周病は冠動脈疾患を含む動脈硬化性心疾患発症の要因といわれている。重度の歯血症動物モデルでは血管での酸化ストレスが増大するといわれている。また、炎症性サイトカインは各種細胞で



NADPH オキシダーゼの活性化により活性酸素を過剰産生するといわれているが、歯周組織の炎症が血管内皮機能に及ぼす影響とその機序は依然不明である。本研究は、間欠的歯周炎症ラットモデルにおける血管内皮機能の変化を評価し、活性酸素種が関与する可能性を検討した。

間欠的歯周炎症ラットモデルとして、Lipopolysaccharide (LPS) 150  $\mu\text{g}$ を生後8週で腹腔内に単回投与し各回 LPS 1500  $\mu\text{g}$ を生後11週まで1週間隔で歯肉局注する LPS 群ラット、LPS 150  $\mu\text{g}$ を生後8週で腹腔内に単回投与する Sham 群ラット、LPS 群と同量の生理食塩水を投与した正常対照群ラットをそれぞれ作製した。それぞれの下顎骨を薬剤歯肉局注3日後および7日後で摘出し、病理標本を作製したのちに局所の炎症を評価した。また、循環動態評価として、毎週イソフルラン3%吸入下で非観血的平均動脈圧および脈拍数を記録した。

血管内皮機構は胸部大動脈リング標本の等尺性張力変化測定することにより検討した。生後12週のラットモデルより胸部大動脈の内皮温存リング標本を作製し、フェニレフリン ( $3 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ ) で収縮させ、アセチルコリン ( $10^{-9}$ - $10^{-5} \text{mol/L}$ ) による拡張反応を評価した。一酸化窒素合成酵素阻害薬 L-NAME ( $3 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ )、一酸化窒素ドナー NOC-7 を投与し一酸化窒素の血管拡張反応への関与を評価した。同様に、NADPH オキシダーゼ阻害薬 gp91ds-tat ( $10^{-6} \text{mol/L}$ )、活性酸素阻害薬 Tiron (10mmol/L)、過酸化水素分解酵素 PEG Catalase (200U/mL) を投与し、それぞれの薬剤が血管の拡張反応に与える影響を評価した。さらに、蛍光色素測定を用いて、DCF-DA ( $10^{-5} \text{mol/L}$ ) による血管の活性酸素種レベルを測定した。また、ウエスタンブロッティングにて、NADPH オキシダーゼおよびサブユニットタンパクの細胞膜発現を評価した。データは平均 $\pm$ 標準偏差で示し、分散分析後 post-hoc テストで Scheffe's test を用いた。

8-12週まで平均動脈圧、脈拍数に群間差はなかった (各 n=7)。LPS 群の血管では、アセチルコリンによる拡張反応が有意に抑制された。一酸化窒素合成酵素阻害薬 (L-NAME) はすべての群のこれら拡張反応を完全に抑制した (各 n=5)。NADPH オキシダーゼ阻害薬 (gp91ds-tat) と過酸化水素分解酵素 (PEG Catalase) は、LPS 群の抑制された拡張反応を改善した (各 n=7)。DCF-DA にて LPS 群の血管で活性酸素種の発現を認めた。歯周組織の炎症細胞浸潤は、LPS 投与3日後には認めたが投与7日後には認めなかった (各 n=5)。LPS 群の血管では、Catalase により抑制される活性酸素種レベルの上昇および NADPH オキシダーゼサブユニット p47phox、過酸化水素合成酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (Cu/Zn SOD) の細胞膜発現の増大を認めた (各 n=5)。

間欠的歯周炎症ラットモデルでは、一酸化窒素合成酵素を介する内皮依存性血管拡張反応が減弱していた。この内皮機能の低下には、過酸化水素の過剰産生が関与していると考えられた。

口腔内の炎症は、動脈硬化性心疾患等多くの疾病に関与するとして注目されている。本

論文は、LPSによる歯周炎症が、大動脈の内皮依存性拡張能に影響を与えることを示すものである。本研究の結果は、血管内皮機能保持の観点から口腔内炎症制御の重要性を示唆するものであり、疾病予防において有益な知見を与えるものである。以上より、本論文は学位を授与するに値すると判断した。

氏名	李 佳 政
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第484号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Propofol reduces liver dysfunction caused by tumor necrosis factor- $\alpha$ production in Kupffer cells (プロポフォールはクッパー細胞から産生された腫瘍壊死因子- $\alpha$ による肝機能障害を軽減させる)
論文審査委員	(主査) 教授 高村祥子 教授 米田政志 教授 武山直志 教授 三嶋廣繁

## 学位論文内容の要旨

### Background and purpose

Inflammatory triggers such as lipopolysaccharide (LPS) activate Kupffer cells, which exist within the liver sinusoids.

Activated Kupffer cells produce cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , which appears crucial in the pathogenesis of LPS-induced liver dysfunction since the plasma level of this cytokine correlates well with the severity of liver injury.

An intravenous anesthetic propofol is capable of attenuating liver injury mediated by oxidative stress-triggered pathogenesis in vitro. In the in vivo studies, large doses of propofol were protective against oxidative stress-induced, inflammatory and / or pharmacological liver injury,

The present study, conducted in rats, investigated whether propofol attenuates lipopolysaccharide (LPS) -triggered liver dysfunction via regulation of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  production in activated Kupffer cells.

### Methods

1. Rats were allocated randomly to six groups, including Intralipid, Propofol, Intra + LPS, Prop + LPS, gadolinium chloride (GdCl<sub>3</sub>), GdCl<sub>3</sub> + LPS group, respectively.

2. The serum levels of ALT and AST, TNF- $\alpha$  mRNA and protein expression, caspase-3 activation and apoptosis were evaluated in hepatocytes.
3. Immunofluorescence staining was expressed using Anti-CD68 antibody and TNF- $\alpha$  in Kupffer cells.

## Results

1. There were no differences in the baseline serum levels of ALT or AST among the Intralipid, propofol, and GdCl<sub>3</sub> groups. ALT and AST levels increased approximately four-fold in serum from LPS-exposed rats (Intra + LPS) 6 hours after the LPS administration, compared with levels in animals treated by Intralipid without LPS. Propofol or GdCl<sub>3</sub> reduced the LPS-induced increases in ALT and AST levels.
2. TNF- $\alpha$  mRNA and protein expression increased in the liver one hour after LPS injection, after which it decreased time-dependently. Expression of TNF- $\alpha$  protein was, however, undetectable in livers from the rats treated with Intralipid™ (Intra) or propofol (Prop). GdCl<sub>3</sub>, similarly to propofol, attenuated the LPS-induced changes in both TNF- $\alpha$  mRNA and protein levels in livers.
3. TNF- $\alpha$  immunoreactivity was detectable in the livers treated with the 1 hour LPS exposure (Intra + LPS), but not from rats treated with Intralipid™ (Intra), propofol (Prop) or GdCl<sub>3</sub> (GdCl<sub>3</sub>). Most of the CD68-positive Kupffer cells in the LPS-treated rat livers (Intra + LPS) were also immunoreactive for TNF- $\alpha$ . Propofol and GdCl<sub>3</sub> similarly and efficiently attenuated both the TNF- $\alpha$  and CD68 expression in the livers of rats received the LPS treatment.
4. LPS enhanced caspase-3 activity in the liver 6 hours after exposure (Intra + LPS), whereas propofol significantly reduced this effect (Prop + LPS). LPS increased the number of TUNEL-positive cells in the liver 6 hours after exposure (Intra + LPS), whereas propofol and GdCl<sub>3</sub> each reduced this increase (Prop + LPS and GdCl<sub>3</sub> + LPS). By calculating the ratio of TUNEL-positive cells to the total cell number per field, revealed that propofol and GdCl<sub>3</sub> each significantly inhibited LPS-induced hepatocyte apoptosis.

## Conclusion

Propofol maintained liver function in rats treated with LPS, via reduction of TNF- $\alpha$  induced hepatocyte apoptosis. Inhibition of Kupffer cell production of TNF- $\alpha$  mediates this beneficial effect of propofol. The clinical use of propofol may have a protective impact on hepatocyte injury provoked by TNF- $\alpha$  released from Kupffer cells.

## 論文審査の結果の要旨

### 【研究背景と目的】

LPSによる肝障害において、活性化されたクッパー細胞はTNF- $\alpha$ などのサイトカインの発現を誘導し、過剰な免疫応答を惹起し、肝細胞アポトーシスを促進することで、本病態発生に重要な役割を果たしている。本研究では静脈麻酔薬である propofol が、LPSによる肝障害に及ぼす影響を調べるとともに、その発生機序について検討した。

### 【実験内容及び方法】

#### 1. LPS 誘導性肝障害ラットモデルの作製

麻酔をしたラットの大腿静脈からLPSを投与し、肝障害を誘導した。LPS投与前に、propofolあるいはクッパー細胞の活性化阻害剤である塩化ガドリニウム（以下GdCl<sub>3</sub>）を投与し、その影響を調べた。

#### 2. 血清ALTとASTレベル

LPSを投与したラットから経時的に血液を採集し、血清中のAST、ALTの量を測定し、肝機能障害の程度を評価した。

#### 3. 肝臓におけるTNF- $\alpha$ mRNA及び蛋白質の発現

肝臓からtotal RNAと蛋白質を抽出し、real PCRとwestern blot法を用いてTNF- $\alpha$ 発現の変化を経時的に調べ、肝障害の発生においてその役割を検討した。

#### 4. 蛍光免疫染色

抗TNF- $\alpha$ 抗体と抗CD68抗体（マクロファージのマーカー）を用いて、蛍光二重染色を行い、肝臓においてTNF- $\alpha$ の発現細胞を同定すると同時にその発現変化を調べた。

#### 5. Caspase-3の活性化及び肝細胞アポトーシス発生

肝臓から抽出した蛋白質を用いて、Caspase-3の活性を測定した。さらに、TUNEL法を用いて、肝細胞アポトーシスの発生を調べた。

### 【結果】

1. LPS投与6時間後に血清中のALTとASTの活性が共に上昇した。これに対して、propofolやGdCl<sub>3</sub>の前投与はこれらの増加を有意に抑制した。
2. LPS投与1時間後にTNF- $\alpha$ のmRNAとproteinの発現が急激に上昇しピークを呈した後、速やかに減少した。Propofol前投与はLPSによって誘導されたTNF- $\alpha$ の発現を有意に抑制した。GdCl<sub>3</sub>前投与でも同様な結果を得られた。
3. 蛍光二重染色を行った結果は、CD68の陽性細胞であるクッパー細胞がTNF- $\alpha$ を発現することを確認した。さらに、PropofolあるいはGdCl<sub>3</sub>前投与はそれぞれLPSによって増加したTNF- $\alpha$ を抑制した。
4. LPSを投与したラット肝臓においてCaspase-3が活性化され、肝細胞アポトーシスが促進されたが、PropofolあるいはGdCl<sub>3</sub>前投与はこれらの増加を抑制した。

## 【結論】

LPS を投与したラットにおいて、活性化されたクッパー細胞は TNF- $\alpha$  を遊離し、肝細胞の caspase-3 活性化とアポトーシスを増加させることが明らかとなった。Propofol はクッパー細胞において TNF- $\alpha$  発現を抑制し、肝細胞の caspase-3 活性化とアポトーシスを阻害することを介して、肝機能を保護する可能性が示唆された。

本研究は propofol による肝障害抑制効果をクッパー細胞機能に着目して解明した論文であり、今後の静脈麻酔薬使用における生体反応の解明においても役立つものと考えられる。以上より学位授与に値する論文であると判定した。



氏名	わか やま さよりの 若山 沙代里
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第485号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Lipopolysaccharide impairs insulin sensitivity via activation of phosphoinositide 3-kinase in adipocytes (エンドトキシンは脂肪細胞のホスファチジルイノシトール 3-キナーゼを活性化し、インスリン感受性を障害する)
論文審査委員	(主査) 教授 高村 祥子 教授 佐藤 元彦 教授 池田 洋 教授 中村 二郎

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

インスリンシグナル経路は、まずインスリンがインスリン受容体と結合し、Insulin receptor substrates (IRS) のチロシンリン酸化が起こる。IRS1/2の不活性化は、Phosphoinositid-3 kinase (PI3K)/Aktの活性化を抑制し、さらにグリコーゲン合成の抑制因子である glycogen synthase kinase 3 (GSK3) のリン酸化抑制を導く。GSK3の障害は glycogen synthase (GS) の不活性化を生じ、グリコーゲン合成を阻害する。これがインスリン抵抗性の分子メカニズムと考えられている。

インスリン抵抗性は、肥満、代謝疾患、ストレスなどで起こることが知られており、感染、敗血性ショック、エンドトキシンショックにおいてもインスリン抵抗性が生じ、高血糖はエンドトキシンショック時の病態の特徴としてよく知られている。

またエンドトキシン（以降 LPS）は PI3K を活性化することが知られており、インスリン刺激による PI3K/Akt 活性化に影響を及ぼすことが推測される。

よって今回は、分化誘導された 3T3-L1 脂肪細胞を LPS で刺激し、その細胞内シグナルを調べることで、インスリン抵抗性の誘導メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

3T3-L1 細胞を分化させ使用した。LPS による細胞毒性は細胞増殖・細胞死を評価する MST 法、サイトカインの産生は酵素結合免疫吸着法 ELISA 法、タンパク発現、シグナル

分子のリン酸化は免疫ブロット法で調べた。

### 【結果】

- ① LPS は GS をリン酸化（不活性化）した。
- ② LPS はインスリンによる GSK3 $\alpha\beta$ リン酸化を抑制した。
- ③ LPS はインスリンによる IRS1/2 リン酸化を抑制した。
- ④ LPS は Akt リン酸化を抑制した。
- ⑤ LPS は脂肪細胞の PI3K のリン酸化を誘導した。
- ⑥ LPS は脂肪細胞に微量のサイトカイン産生を誘導したが、IRS1/2 の活性化を抑制する suppressor of cytokine signaling 3(SOCS3) の発現は誘導しなかった。

### 【考察】

LPS はインスリンと同様に PI3K/Akt シグナル経路を利用する。そのため、LPS によって先に PI3K が活性化されてしまうとインスリンは PI3K を活性化できず、その下流のシグナルが抑制され、インスリン抵抗性を生じると考えられた。

しかし、今回 LPS 前処理により PI3K の上流の IRS のリン酸化も抑制され、PI3K よりさらに上流のシグナルをターゲットとしていることも示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景】

インスリンシグナル経路は、まずインスリンがインスリン受容体と結合し、Insulin receptor substrates (IRS) のチロシンリン酸化が起こる。IRS1/2 の不活性化は、Phosphoinositid-3 kinase(PI3K)/Akt の活性化を抑制し、さらにグリコーゲン合成の抑制因子である glycogen synthase kinase3 (GSK3) のリン酸化抑制を導く。GSK3 の障害は glycogen synthase (GS) の不活性化を生じ、グリコーゲン合成を阻害する。これがインスリン抵抗性の分子メカニズムと考えられている。

エンドトキシンショックにおいて、インスリン感受性が障害され高血糖となり、インスリン耐性になることはよく知られている。

またエンドトキシン（以降 LPS）は PI3K を活性化することが知られており、インスリン刺激による PI3K/Akt 活性化に影響を及ぼすことが推測される。

よって今回は、分化誘導された 3T3-L1 脂肪細胞を LPS で刺激し、その細胞内シグナルを調べることで、インスリン抵抗性の誘導メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

3T3-L1 細胞を分化させ使用した。LPS による細胞毒性は細胞増殖・細胞死を評価する MST 法、サイトカインの産生は酵素結合免疫吸着法 ELISA 法、タンパク発現、シグナル分子のリン酸化は免疫ブロット法で調べた。

## 【結果】

- ① LPS は GS をリン酸化（不活性化）した。
- ② LPS はインスリンによる GSK3 $\alpha\beta$ リン酸化を抑制した。
- ③ LPS はインスリンによる IRS1/2 リン酸化を抑制した。
- ④ LPS は Akt リン酸化を抑制した。
- ⑤ LPS は脂肪細胞の PI3K のリン酸化を誘導した。
- ⑥ LPS は脂肪細胞に微量のサイトカイン産生を誘導したが、IRS1/2 の活性化を抑制する suppressor of cytokine signaling 3(SOCS3) の発現は誘導しなかった。

LPS はインスリンと同様に PI3K/Akt シグナル経路を利用する。そのため、LPS によって先に PI3K が活性化されてしまうとインスリンは PI3K を活性化できず、その下流のシグナルが抑制され、インスリン抵抗性を生じると考えられた。

本論文は、脂肪細胞において LPS がインスリンシグナルの一部を前もって活性化することでインスリンシグナルが障害され、インスリン抵抗性となることを見出した。

本研究は脂肪細胞における LPS（エンドトキシン）によるインスリン抵抗性の発生メカニズムを解析したものであり、臨床でのインスリン抵抗性治療に対しても有用な情報を提供すると考えられる。以上より学位を授与するに値する論文であると判定した。

氏名	上野大樹
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第486号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Role of adiponectin and leptin in non-diabetic, non-obese patients with endometrial cancer (非糖尿病, 非肥満患者の子宮体癌患者におけるアディポネクチンとレプチンの役割)
論文審査委員	(主査) 教授 春日井 邦 夫 教授 武 内 恒 成 教授 高 見 昭 良 教授 三 嶋 秀 行

## 学位論文内容の要旨

### 【目的】

子宮体癌における adiponectin と leptin の役割を明らかにするために、非糖尿病、非肥満の子宮体癌患者における血中 Adiponectin 濃度、血中 leptin 濃度および Adiponectin receptor (AdipoR-1 と AdipoR-2)、leptin receptor (ObR) の腫瘍内発現と臨床的諸因子との関連性を明らかにすることを目的とした。

### 【材料と方法】

空腹時血糖 120mg/dl 未満・BMI30 未満の子宮体癌 50 人と健常女性 49 人の血清とパラフィン包埋組織を材料とした。血中総 AdpN、高分子 AdpN、leptin はそれぞれ利用可能なキットを用いて免疫測定法で測定した。AdpNR type 1 (AdpNR-1)、AdpNR type 2 (AdpNR-2)、ObR の腫瘍内発現は免疫組織化学的染色にて検討した。

### 【結果】

1. 健常女性群に比較し子宮体癌群の血中総 AdpN、高分子 AdpN は有意に低く、血中 leptin は有意に高かった。
2. 50 人の子宮体癌患者において、血中総 AdpN は、G3 群と比較して G1・G2 群で有意に高く、脈管侵襲陽性群に比較し陰性群で有意に高かった。血中高分子 AdpN は G3 群と比較して G1 群または G2 群で有意に高く、血中 leptin はいずれの病理組織学的因子による差を認めなかった。
3. 血中総 AdpN、高分子 AdpN、leptin は、AdpNR-1、AdpNR-2、ObR の発現別に差が

なかった。

4. AdpNR-1 の発現陽性率は、G3 群に比較し G1・G2 群で有意に高かった。32 人の AdpNR-1 発現陽性患者において血中総 AdpN、高分子 AdpN、leptin は、いずれの病理組織学的因子による差を認めなかった。
5. しかし、18 人の AdpNR-1 発現陰性患者において血中総 AdpN は、G3 群に比較し G1・G2 群で有意に高く、脈管侵襲陽性群に比較し陰性群で有意に高かった。また、血中高分子 AdpN は G3 群に比較し G1・G2 群で有意に高かった。
6. 単回帰分析の結果、高い組織学的悪性度、腹水細胞診陽性、脈管侵襲陽性、AdpNR-1 発現陰性、血中 AdpN 低値は低い無病生存率と関連していた。
7. 無病生存率は、AdpNR-1 発現陽性患者に比較し AdpNR-1 発現陰性患者で低かった。
8. 血中総 AdpN 値  $11\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満群と  $11\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上群で、無病生存率は有意差を認めなかった。
9. AdpNR-1 発現陰性患者において、無病生存率は血中総 AdpN 値  $11\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の症例に比較して血中総 AdpN 値  $11\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の症例で有意に低かった。

#### 【結論】

子宮体癌患者において、血中総 AdpN 低値と腫瘍内 AdpNR-1 発現陰性は、高い組織学的悪性度、脈管侵襲に関連し、予後に影響する。

## 論文審査の結果の要旨

#### 【目的】

子宮体癌における adiponectin と leptin の役割を明らかにするために、非糖尿病、非肥満の子宮体癌患者における血中 Adiponectin 濃度、血中 leptin 濃度および Adiponectin receptor (AdipoR-1 と AdipoR-2)、leptin receptor (ObR) の腫瘍内発現と臨床的諸因子との関連性を明らかにすることを目的とした。

#### 【材料と方法】

空腹時血糖  $120\text{mg}/\text{dl}$ 未満・BMI30未満の子宮体癌50人と健常女性49人の血清とパラフィン包埋組織を材料とした。血中総 AdpN、高分子 AdpN、leptin はそれぞれ利用可能なキットを用いて免疫測定法で測定した。AdpNR type 1(AdpNR-1)、AdpNR type 2(AdpNR-2)、ObR の腫瘍内発現は免疫組織化学的染色にて検討した。

#### 【結果】

1. 健常女性群に比較し子宮体癌群の血中総 AdpN、高分子 AdpN は有意に低く、血中 leptin は有意に高かった。
2. 50 人の子宮体癌患者において、血中総 AdpN は、G3 群と比較して G1・G2 群で有意に高く、脈管侵襲陽性群に比較し陰性群で有意に高かった。血中高分子 AdpN は G3

群と比較して G1 群または G2 群で有意に高く、血中 leptin はいずれの病理組織学的因子による差を認めなかった。

3. 血中総 AdpN, 高分子 AdpN, leptin は, AdpNR-1, AdpNR-2, ObR の発現別に差がなかった。
4. AdpNR-1 の発現陽性率は, G3 群に比較し G1・G2 群で有意に高かった。32 人の AdpNR-1 発現陽性患者において血中総 AdpN, 高分子 AdpN, leptin は, いずれの病理組織学的因子による差を認めなかった。
5. しかし, 18 人の AdpNR-1 発現陰性患者において血中総 AdpN は, G3 群に比較し G1・G2 群で有意に高く, 脈管侵襲陽性群に比較し陰性群で有意に高かった。また, 血中高分子 AdpN は G3 群に比較し G1・G2 群で有意に高かった。
6. 単回帰分析の結果, 高い組織学的悪性度, 腹水細胞診陽性, 脈管侵襲陽性, AdpNR-1 発現陰性, 血中 AdpN 低値は低い無病生存率と関連していた。
7. 無病生存率は, AdpNR-1 発現陽性患者に比較し AdpNR-1 発現陰性患者で低かった。
8. 血中総 AdpN 値  $11\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満群と  $11\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上群で, 無病生存率は有意差を認めなかった。
9. AdpNR-1 発現陰性患者において, 無病生存率は血中総 AdpN 値  $11\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の症例に比較して血中総 AdpN 値  $11\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の症例で有意に低かった。

#### **【結論】**

子宮体癌患者において, 血中総 AdpN 低値と腫瘍内 AdpNR-1 発現陰性は, 高い組織学的悪性度, 脈管侵襲に関連し, 予後に影響する。

本研究は血中アディポネクチン濃度と受容体の腫瘍内発現率が子宮体癌の悪性度や予後に関係することを明らかにした。この成果は, 迅速に臨床応用可能であり, 学位を授与するに値すると判定した。



氏名	まる ばし ゆう き 丸 橋 佑 基
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第487号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Morphological analyses in fragility of pili torti with Björnstad syndrome (ブヨルンスタッド症候群の捻転毛における裂毛に関する形態学的解析)
論文審査委員	(主査) 教授 中野 隆 教授 佐藤 元彦 教授 奥村 彰久 教授 横尾 和久

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

捻転毛は繊維軸方向に180°回転した毛髪のことであり、特定の先天性遺伝子疾患患者の毛髪で観察される稀な表現型である。また、捻転毛は裂毛を生じやすいために、捻転毛を有する患者の頭髪は一定以上の長さに伸びることができない。しかしながら、捻転毛の裂毛原因は未だ明らかになっていない。そこで、本研究ではブヨルンスタッド症候群の捻転毛に着目し、健常毛と捻転毛との物理学的特性や形態学的特性を比較することで、捻転毛の裂毛の原因究明を試みた。

### 【方法】

2歳3か月のブヨルンスタッド症候群の捻転毛と1歳11か月の健常者の毛髪を提供いただいた。これらのサンプルの毛髪径を計測し、引張試験機を用いて繊維軸方向へ応力を負荷させて、ヤング率を算出した。次に、捻転毛と健常毛とを樹脂包埋し、100nmの切片を調製した後、アンモニア性硝酸銀水溶液にて電子染色した。これらの切片を透過型電子顕微鏡(JEM-1400, JEOL社製)により観察した。さらに得られた観察像より、コルテックス中の中間径フィラメント(IF)の大きさを計測した。

### 【結果】

捻転毛と健常毛とを比較すると、捻転毛の毛髪径は細く、ヤング率は低かった。透過型電子顕微鏡にて観察した結果、捻転毛ではキューティクル1枚の厚さが異なっており、キューティクルの形状も波状を呈していた。また、コルテックス中のIFを計測した結果、

捻転毛のIFは健常毛のIFよりも大きかった。

### 【考察】

毛髪強度はヤング率と毛髪の断面積の積で表せることより、捻転毛は健常毛よりも毛髪強度が約2.1倍脆弱であることが明らかになった。捻転毛の裂毛には、毛髪径が細いことと毛髪強度の脆弱性が寄与していると考えられる。

キューティクル層は毛包中の角化帯にて形成されるため、キューティクルの形状が波状を呈していることは毛包下での形成異常があったことが示唆される。一方、コルテックス中のIFはパーマネントウェーブ処理をしてジスルフィド結合を切断することで形態変化が生じることが報告されている。よって、捻転毛においてIFが緩んでいることは、角化帯においてIFのジスルフィド結合の形成不全が生じたことを示唆している。

### 【結論】

捻転毛の裂毛の原因は、毛髪径が細いことと毛髪強度の脆弱性が寄与していると考えられる。さらに、毛髪強度の脆弱性においては、ジスルフィド結合の形成不全によってIFの構造が緩んでいることに起因しているとし唆される。

## 論文審査の結果の要旨

ブヨルンスタッド症候群は、感音性難聴と捻転毛を特徴とする、きわめて稀な先天性疾患である。捻転毛は、裂毛を生じやすく一定以上の長さに伸びることができないが、裂毛を生じる原因は明らかではない。本研究は、ブヨルンスタッド症候群の捻転毛に着目し、健常毛と捻転毛の物理学的特性や形態学的特性を比較することによって、捻転毛における裂毛の原因究明を試みたものである。

捻転毛は、健常毛に比べて毛髪径が細く、引張試験においてヤング率が低かった。そのため、捻転毛は健常毛よりも脆弱なことが明らかになった。

透過型電子顕微鏡による微細構造の観察において、捻転毛のキューティクルは1枚ごとに厚さが異なり、波状を呈していた。キューティクル層は毛包中の角化帯にて形成されるため、毛包下における形成異常の存在が示唆された。また、コルテックス中のIFは、健常毛のIFよりも大きかった。IFは、パーマネントウェーブ処理でジスルフィド結合を切断することによって形態変化が生じることが報告されている。したがって、捻転毛のIFが緩んでいることは、角化帯におけるIFのジスルフィド結合の形成不全が示唆された。

本論文は、捻転毛における裂毛の原因について、物理学的特性および形態学的特性の両面において、解明したものである。Journal of Dermatologyに掲載され、その内容も優れていることから、学位を授与するに値するものと判定した。

氏名	とみ の あつ とし 富 野 敦 稔
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第488号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Increased PD-1 Expression and Altered T Cell Repertoire Diversity Predict Mortality in Patients with Septic Shock: A Preliminary Study (敗血症性ショック患者におけるリンパ球 PD-1 発現と T 細胞受容体の多様性障害が予後に及ぼす影響)
論文審査委員	(主査) 教授 高 見 昭 良 教授 渡 辺 秀 人 教授 佐 野 力 教授 三 嶋 廣 繁

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

敗血症は、自然免疫、獲得免疫ともに障害される免疫麻痺をはじめとした複合的な病態である。免疫能が障害されることで、初期感染が制御できず、さらに潜在性ウイルス感染の再活性化や2次感染も引き起こす。獲得免疫障害に関しては、アポトーシス亢進によるリンパ球の量的減少が報告されているが、リンパ球の質的機能障害と不顕性ウイルス感染の再活性化の関係については明らかにされていない。今回、

- 1) 敗血症性ショックおよび不顕性サイトメガロウイルス (cytomegalo virus : CMV) 感染患者における、リンパ球機能障害と、CMV 再活性化および死亡率との関与
- 2) 敗血症時のリンパ球機能回復における、T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) の多様性および抑制因子である PD-1 発現の変化

を明らかにするために研究を行った。

### 【方法】

2013年10月から2015年11月の間にICUで管理した敗血症性ショック患者を対象とした。ヘパリン化全血(10ml)はICU入室1, 3, 7病日に採取した。Ficollによる濃度勾配遠心分離法で単核細胞を分離し、そこからTCR遺伝子を抽出し、TCR多様性を測定した。PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>リンパ球数はFACSで解析した。CMV DNAはリアルタイムPCR kitを、CMV-IgGはELISAキットを用いて測定した。

## 【結果】

25人の敗血症患者のうち不顕性CMV感染者（CMV-IgG陽性）18人と、対照として健常者10人で検討した。CMV-IgG陽性敗血症患者のうち3人は経過中に再活性化を認め、3人とも死亡した。健常者と比べ敗血症患者では1, 3病日で全例TCR多様性の低下とPD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>リンパ球の増加を認めた。また、1病日に単球におけるHLA-DR発現の有意な低下を認めた。生存群では7病日にTCR多様性の増加、PD-1の低下を認めたが、CMV再活性化し死亡した3例は、7病日においてもTCR多様性の低下を認めた。

## 【考察】

単球-リンパ球間の抗原提示に必須であるHLA-DRの低下や、TCRの多様性障害を1病日から認めたことから、敗血症性ショックでは早期からT細胞への抗原情報伝達障害の生じている事が示唆された。さらに、抗原情報の受け取り抑制因子であるT細胞上PD-1の増加も1病日から認めたことより、リンパ球の質的機能障害は、敗血症末期の合併症ではなく、敗血症早期から生じているものと考えられる。7病日にTCR多様性は生存群では回復していたが、死亡群では低値のまま推移し、CMVの再活性化を認めた。持続するリンパ球機能障害はウイルス再活性化、二次感染を惹起し予後を悪化させるため、敗血症性ショックからの離脱にはリンパ球機能の正常化が必要である。

# 論文審査の結果の要旨

## 【背景と目的】

敗血症の本態は、感染に伴う制御不能な生体反応と臓器障害である。敗血症では、獲得免疫機能障害により、初期感染の制御不能のみならず、ウイルス再活性化や2次感染も起こる。リンパ球はアポトーシスの亢進により減少する。一方、リンパ球の質的機能障害の臨床動態や不顕性ウイルス感染再活性化との関連は明らかにされていない。本研究では、(1)敗血症性ショック・不顕性サイトメガロウイルス（cytomegalo virus : CMV）感染患者を対象に、リンパ球機能障害とCMV再活性化、死亡率との関連を検討した。さらに、(2)敗血症時リンパ球機能回復におけるT細胞受容体（T cell receptor : TCR）の多様性と抑制因子PD-1発現動態を解析した。

## 【対象と方法】

対象は、2013年10月から2015年11月ICU管理の敗血症性ショック患者。ヘパリン化全血（10ml）をICU入室1, 3, 7病日に採取した。Ficollを用い濃度勾配遠心分離法で単核細胞を分離した。さらに、TCR遺伝子を抽出後TCR多様性を測定した。PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>の各リンパ球数は、フローサイトメトリー法で解析した。CMV DNAはリアルタイムPCRキットを、CMV-IgGはELISAキットを用いて測定した。

## 【結果】

敗血症患者 25 例中不顕性 CMV 感染者 (CMV-IgG 陽性) 18 例と、健常対象 10 例を解析した。CMV-IgG 陽性敗血症患者の 3 例は経過中に CMV 再活性化を来し、全例が死亡した。敗血症患者では、健常対象と比較し、1, 3 病日において全例で TCR 多様性の低下と PD-1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>リンパ球の増加がみられた。また、1 病日の単球中 HLA-DR 発現の有意な低下がみられた。生存群では 7 病日に TCR 多様性の増加, PD-1 発現低下がみられた。一方, CMV 再活性化後死亡した 3 例は、7 病日においても TCR 多様性の低下がみられた。

## 【考察】

本研究結果から、単球-リンパ球間の抗原提示に必要な HLA-DR の発現低下とともに、TCR の多様性障害が 1 病日から生じることがわかった。これらは、敗血症性では、早期から T 細胞への抗原情報伝達障害が生じることが示唆している。さらに、抗原情報伝達の抑制因子 T 細胞上 PD-1 の増加も 1 病日からみられ、リンパ球の質的機能障害は、敗血症末期の合併症ではなく、敗血症早期から生じることがわかった。7 病日 TCR 多様性は生存群では回復がみられたが、死亡群では低値が遷延化し、CMV 再活性化と関連していた。リンパ球機能障害が続くと、ウイルス再活性化や 2 次感染が起こり、致死的経過をたどる恐れがある。敗血症からの離脱には、リンパ球機能の回復が必要である。本研究では、敗血症におけるリンパ球 PD-1 発現と T 細胞受容体の多様性障害が予後に及ぼす影響を解明した点で臨床上有意義である。以上より、学位を授与するに十分な価値のある論文と判定した。



氏名	菊池徳昌 <small>きくちのりまさ</small>
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第489号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Perceived Stress and Colorectal Cancer Incidence: The Japan Collaborative Cohort Study (ストレスと大腸癌罹患の関連研究)
論文審査委員	(主査) 教授 鈴木孝太 教授 春日井邦夫 教授 兼本浩祐 教授 三嶋秀行

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

大腸癌は世界で3番目に多い癌であり、公衆衛生上の大きな課題である。これまでに、大腸癌のリスク因子として、大腸癌の家族歴、Body Mass Index (BMI)、喫煙、飲酒、緑色葉野菜摂取、身体活動、便秘などが確認された。一方、ストレスが大腸癌のリスク因子であるかについては、様々な意見が出されるものの、いまだ確認されていない。これまでに、ストレスと大腸癌罹患について調べたコホート研究は1つしかないが、この研究ではストレスと大腸癌との関連について、一貫した関連が認められなかった(ストレス強度は、男性の直腸癌とだけ関連があり、ストレス頻度は女性の結腸癌とだけ関連があった)。さらに、日本の大規模多施設共同コホート研究である Japan Collaborative Cohort Study (JACC 研究)の1999年までの追跡調査データを用いて、ストレスと大腸癌による死亡との関連を調べた先行研究では、女性の結腸癌死のみストレスと有意な関連を認めた。しかし、大腸癌の罹患ではなく大腸癌による死亡をアウトカムにとった場合、アウトカムと関連のある因子がリスク因子であるか予後因子であるかを区別できない。そこで、本研究ではJACC研究の2009年までの最終追跡データを用いて、大腸癌罹患をアウトカムとした場合のストレスとの関連を検討した。

### 【方法】

JACC 研究では40～79歳の計110,585人にベースライン調査を行い、以後最長21年間にわたり死亡および癌罹患の追跡調査を行った。ベースライン調査で測定された項目の



うち、本研究では上述した大腸癌の既知のリスク因子および、各被験者が感じたストレス (perceived stress) 強度を独立変数とし、大腸癌罹患およびそれまでの期間を従属変数とした Cox 比例ハザード回帰分析を行った。

### 【結果】

大腸癌の既往歴がなく、ストレスの質問項目に答えた全 61,563 人 (男性 25,018 人、女性 36,545 人) を本研究対象者とし、その後の大腸癌への罹患を調べたところ、結腸癌は 680 人、直腸癌は 330 人が罹患した (両癌とも平均追跡期間は 13.0 年であった)。共変量の異なる 3 つの解析を行ったところ、表に示すようにストレスと結腸癌罹患には関連が見られなかったものの、直腸癌とは男女ともに有意な関連が認められた。

### 【考察】

同じ JACC 研究データを用いた先行研究では、女性においてのみ結腸癌による死亡とストレスとに有意な関連が認められた。しかし、癌による死亡ではなく癌罹患をアウトカムとした本研究では、男女ともに直腸癌とストレスとの関連が認められ、結腸癌とは関連が認められなかった。これは、この先行研究が大腸癌による死亡をアウトカムに用いたせいで、危険因子と予後因子の両方が混在したせいだと考えられた。また、この研究テーマを扱ったこれまでで唯一のコホート研究の結果は解釈が困難であり、決定的な結論を得るには至らなかった。今回、これまでで最大規模のコホート研究データを用いて、大腸癌罹患をアウトカムとしてストレスとの関連を検討したところ、直腸癌にだけストレスとの関連が見られた。今後、この所見を確実なものにするためには、同じテーマを扱う大規模コホート研究による確証が望まれる。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景】

大腸癌は世界で 3 番目に多い癌であり、公衆衛生上の大きな課題である。これまでに、さまざまな大腸癌のリスク因子が確証された。一方、ストレスが大腸癌のリスク因子であるかについては、様々な意見が出されるものの、いまだ確証されていない。これまでに、ストレスと大腸癌罹患について調べたコホート研究は 1 つしかないが、この研究ではストレスと大腸癌との関連について、一貫した関連が認められなかった。さらに、日本の大規模多施設共同コホート研究である Japan Collaborative Cohort Study (JACC 研究) の 1999 年までの追跡調査データを用いて、ストレスと大腸癌による死亡との関連を調べた先行研究では、女性の結腸癌死のみストレスと有意な関連を認めた。しかし、大腸癌の罹患ではなく大腸癌による死亡をアウトカムにとった場合、アウトカムと関連のある因子がリスク因子であるか予後因子であるかを区別できない。そこで、本研究では JACC 研究の 2009 年までの最終追跡データを用いて、大腸癌罹患をアウトカムとした場合のストレスとの関連

を検討した。

### 【方法】

JACC 研究では 40～79 歳の計 110,585 人にベースライン調査を行い、以後最長 21 年間にわたり死亡および癌罹患の追跡調査を行った。ベースライン調査で測定された項目のうち、本研究では上述した大腸癌の既知のリスク因子および、各被験者が感じたストレス (perceived stress) 強度を独立変数とし、大腸癌罹患およびそれまでの期間を従属変数とした Cox 比例ハザード回帰分析を行った。

### 【結果】

大腸癌の既往歴がなく、ストレスの質問項目に答えた全 61,563 人 (男性 25,018 人、女性 36,545 人) を本研究対象者とし、その後の大腸癌への罹患を調べたところ、結腸癌は 680 人、直腸癌は 330 人が罹患した (両癌とも平均追跡期間は 13.0 年であった)。共変量の異なる 3 つの解析を行ったところ、ストレスと結腸癌罹患には関連が見られなかったものの、直腸癌とは男女ともに有意な関連が認められた。

### 【考察】

同じ JACC 研究データを用いた先行研究では、女性においてのみ結腸癌による死亡とストレスとに有意な関連が認められた。しかし、癌による死亡ではなく癌罹患をアウトカムとした本研究では、男女ともに直腸癌とストレスとの関連が認められ、結腸癌とは関連が認められなかった。これは、この先行研究が大腸癌による死亡をアウトカムに用いたせいで、危険因子と予後因子の両方が混在したせいだと考えられた。また、この研究テーマを扱ったこれまでで唯一のコホート研究の結果は解釈が困難であり、決定的な結論を得るには至らなかった。今回、これまでで最大規模のコホート研究データを用いて、大腸癌罹患をアウトカムとしてストレスとの関連を検討したところ、直腸癌にだけストレスとの関連が見られた。

以上の研究結果は、大腸癌罹患におけるストレスとの関連が直腸癌にのみ観察されることを明らかにし、大腸癌予防に貢献する可能性を示したことから、学位授与に値する論文であると評価された。

氏名	澤田孝之 <small>さわ たか ゆき</small>
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第490号
学位授与年月日	平成29年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	The influence of personality and perceived stress on the development of breast cancer : 20-year follow-up of 29,098 Japanese women (心理学的要因と乳癌罹患の関連)
論文審査委員	(主査) 教授 兼 本 浩 祐 教授 鈴木 孝 太 教授 中 野 正 吾 教授 三 嶋 秀 行

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

乳癌は女性において日本を含め世界的に公衆衛生の重要な問題である。ほぼ確立した乳癌罹患の危険因子として、内分泌物質として女性ホルモンであるエストロゲンが関与する初経年齢／閉経年齢，肥満や身長などの体格，身体活動，食事・栄養素，家族既往が指摘されている。心理的要因が乳がん発生に関係するとの考えは昔から提唱されているが，両者の関係について疫学研究では一致した結果が得られていない。また，これらの危険因子の多くは欧米の疫学研究から明らかになったものであるが，心理的要因は文化的な影響を強く受けるために，日本人を対象とした疫学研究からのエビデンスが重要となる。そのため，我々は Non western な large study として Japan Collaborative Cohort Study (JACC) の最終フォローアップのデータを用いて，心理的要因と乳癌罹患の関連に研究した。

### 【方法】

JACC は多施設共同前向きコホート研究である。1988～90年に全国23地区で40～79歳の男女110,585人が参加し，ベースライン時に心理的要因や生活習慣などを自記式質問表で調査した。心理的要因は，「生きがいがある」，「判断が早い」，「ストレスが多い」，「腹が立ちやすい」とした。追跡調査として地域のがん登録や主要病院への照会などにより癌の罹患情報を把握した。乳癌の罹患をイベントとして，コックス比例ハザード方法でリスクを検討した。

## 【結果】

女性に限定し、罹患未調査の地域を除外し、乳癌の既往と心理学的要因に無回答を除外したところ、29,098人が解析対象となった。追跡期間は最長21年、平均12.8年で、209人が乳癌を罹患していた。先行研究などで指摘されている共変量で調整したハザード比で統計学的に有意な項目はなかった。

## 【考察】

このJACC Studyでは、乳癌と日本独特の考え方である「生きがい」などを含めた心理的要因との関連がなかった。この研究のLimitationとしては質問内容の妥当性が確保できていない、ベースラインのみの調査であり経時的な心理学的要因の変化が捉えられていない、乳癌罹患の情報が一定していなかったことによる系統的な誤差の影響が考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

発表内容はScientific reportsに掲載された論文、The influence of personality and perceived stress on the development of breast cancerを基にした。

研究背景は、心理学的要因が乳癌罹患に関与すると提唱されているが、疫学研究では一致した結果が得られていないこと、また、心理学的要因は文化的な影響を強く受けるため、日本人のエビデンスが必要であることが挙げられる。

用いたデータは多施設共同前向きコホート研究であるJACC (Japan Collaborative Cohort Study) の最終追跡のデータである。JACCには1988～90年に全国23地区で40～79歳の男女110,585人が参加した。罹患情報は地域がん登録と主要病院への問い合わせにより把握した。2009年に追跡調査を終了した。心理学的要因は、「生きがいがある」、「判断が早い」、「ストレスが多い」、「腹が立ちやすい」とした。統計解析は乳癌罹患をイベントとしてコックス比例ハザード方法を用いた。モデルは先行研究などで挙げられている因子で調整した。

解析対象は、女性に限定し、罹患未調査の地域を除外し、乳癌の既往と心理学的要因に無回答を除外したところ、29,098人となった。追跡期間は最長21年、平均12.8年で、209人が乳癌を罹患していた。調整したハザード比で統計学的に有意な項目はなかった。

考察としては、この質問票の妥当性が十分でなかったこと、ベースラインのみの調査であり経時的な心理学的要因の変化が捉えられていないこと、乳癌罹患の把握の精度に地域差があったことが挙げられる。また先行研究との結果の不一致としては、回答肢の処理方法の違いが主な要因と考えられる。

このJACC Studyでは、乳癌と日本独特の考え方である「生きがい」などを含めた心理的要因との関連がなかった。

上記論文について、学位授与に値する論文であると認められる。

氏名	さかき ばら けん すけ 榊原健介
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第491号
学位授与年月日	平成29年2月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Kynurenine causes vasodilation and hypotension induced by activation of KCNQ-encoded voltage-dependent K <sup>+</sup> channels (キヌレニンがKCNQ電位依存性カリウムチャネルを開口し、血管拡張と低血圧を引き起こす)
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤元彦 教授 春日井邦夫 教授 佐野力 教授 小林孝彰

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

必須アミノ酸の一つ、トリプトファン代謝産物であるキヌレニンは、sepsisで引き起こされる致命的な低血圧に関与していることが分かっている。すなわち、キヌレニン経路にてトリプトファンからキヌレニンへと変換する際の律速酵素であるインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) が、サイトカインやエンドトキシンによって血管内皮細胞上に発現することでキヌレニンが産生される。sepsisの患者ではIDOの活性化に伴い、血清キヌレニン濃度の上昇を認める。過去の研究で、キヌレニンによるグアニル酸シクラーゼ、アデニル酸シクラーゼを介した血管平滑筋弛緩作用について報告されているが、詳細は依然として不明である。

血管平滑筋の張力は、血管平滑筋上の電位依存性カリウムチャネルによって制御されている。KCNQカリウムチャネルであるKv7チャネルはヒト血管平滑筋細胞に存在していることから、Kv7チャネルは血管拡張反応に寄与している可能性がある。

本論文は、キヌレニンの血管拡張反応は血管平滑筋細胞のKv7チャネルを介するか、また、キヌレニンによって引き起こされた低血圧はKv7チャネルの制御によって改善するかを研究したものである。

### 【方法】

ラット大動脈、腸間膜動脈そして胃がん手術患者より摘出したヒト大動脈の



血管内皮を除去し、長さ 2.5mm のリング状標本を作成した。この標本を用いて、L-kynurenine (10 $\mu$ mol/L-1mmol/L) による血管拡張反応を観察した。

3mol/L の KCl で満たしたガラス電極を摘出血管に刺入し、現有のアンプ、レコーダを用いて平滑筋膜電位を測定した。キヌレニン (1mmol/L) による過分極反応とそれに及ぼす Kv7 チャンネル阻害薬リノピルディン (10 $\mu$ mol/L) の影響を観察した。

ラット大腿動静脈にそれぞれ動脈圧ライン、輸液ラインを挿入し、キヌレニン (1mmol/L) 静注による血圧の変化を測定した。

### 【結果】

各血管共に、キヌレニン (10 $\mu$ mol/L-1mmol/L) による濃度依存性の血管平滑筋弛緩反応を認めた。その反応はリノピルディン (10 $\mu$ mol/L) によって緩和された。

ラット腸間膜動脈を用いた膜電位測定では 1mmol/L のキヌレニンは過分極を引き起こし、その過分極反応はリノピルディン (10 $\mu$ mol/L) によって抑制された。

ラットへのキヌレニン (1mmol/L) の静注により平均血圧は有意に低下し、リノピルディン (10 $\mu$ mol/L) の静注後に平均血圧は回復した。

### 【考察】

キヌレニンはラットの腸間膜動脈、大動脈、ヒト大網動脈を拡張させ、その作用機序には平滑筋細胞に存在する Kv7 チャンネルが関与していることが示唆される。すなわち、キヌレニンは動脈の拡張による低血圧を起し、Kv7 チャンネルの制御がその低血圧の治療に重要であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

必須アミノ酸の一つ、トリプトファン代謝産物であるキヌレニンは、sepsis で引き起こされる致死的な低血圧に関与していることが分かっている。すなわち、キヌレニン経路にてトリプトファンからキヌレニンへと変換する際の律速酵素であるインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) が、サイトカインやエンドトキシンによって血管内皮細胞上に発現することでキヌレニンが産生される。sepsis の患者では IDO の活性化に伴い、血清キヌレニン濃度の上昇を認める。過去の研究で、キヌレニンによるグアニル酸シクラーゼ、アデニル酸シクラーゼを介した血管平滑筋弛緩作用について報告されているが、詳細は依然として不明である。

血管平滑筋の張力は、血管平滑筋上の電位依存性カリウムチャンネルによって制御されている。KCNQ カリウムチャンネルである Kv7 チャンネルはヒト血管平滑筋細胞に存在していることから、Kv7 チャンネルは血管拡張反応に寄与している可能性が考えられた。

本論文は、キヌレニンの血管拡張反応は血管平滑筋細胞の Kv7 チャンネルを介するか、また、キヌレニンによって引き起こされた低血圧は Kv7 チャンネルの制御によって改善するかを検



討している。

はじめに、ラット大動脈および腸間膜動脈、またヒト大網動脈より内皮除去リング状標本を作製し、L-kynurenine ( $10\mu\text{mol/L} \sim 1\text{mmol/L}$ ) による血管拡張反応を観察した。 $3\text{mol/L}$  の KCl で満たしたガラス電極を摘出血管に刺入し、現有のアンプ、レコーダを用いて平滑筋膜電位を測定した。また、キヌレニン ( $1\text{mmol/L}$ ) による過分極反応とそれに及ぼす Kv7 チャンネル阻害薬リノピルディン ( $10\mu\text{mol/L}$ ) の影響を観察した。さらに、ラット大腿動静脈にそれぞれ動脈圧ライン、輸液ラインを挿入し、キヌレニン ( $1\text{mmol/L}$ ) 静注による血圧の変化を測定した。

結果、各血管でキヌレニン ( $10\mu\text{mol/L} \sim 1\text{mmol/L}$ ) による濃度依存性の血管平滑筋弛緩反応を認めた。その反応はリノピルディン ( $10\mu\text{mol/L}$ ) によって減弱した。また、ラット腸間膜動脈を用いた膜電位測定では  $1\text{mmol/L}$  のキヌレニンは過分極を引き起こし、その過分極反応はリノピルディン ( $10\mu\text{mol/L}$ ) によって抑制された。さらに、ラットへのキヌレニン ( $1\text{mmol/L}$ ) の静注により平均血圧は有意に低下し、リノピルディン ( $10\mu\text{mol/L}$ ) の静注後に平均血圧は回復した。

キヌレニンはラットの腸間膜動脈、大動脈、ヒト体網動脈を拡張させ、その作用機序には平滑筋細胞に存在する Kv7 チャンネルが関与していることが示唆された。すなわち、キヌレニンは動脈の拡張による低血圧を起こし、Kv7 チャンネルの制御がその低血圧の治療に重要であると考えられた。

ヒトでは摂取されたトリプトファンの多くがキヌレニン経路により代謝され、その代謝産物は神経変性疾患、精神疾患との関連が報告されている。また、キヌレインは敗血症でも血中濃度が上昇するとされている。本研究はキヌレニンが電位依存性カリウムチャンネルを介して血管拡張をもたらすことを、複数の研究手法を用いて明示したものであり、敗血症による血圧低下機序についても興味深い知見を加えている。新規性の高い血管調節機序を報告した研究であり、学位授与に値すると判断した。

氏名	むら まつ よし たか 村 松 由 崇
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第492号
学位与年月日	平成29年2月23日
学位与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Pulsed electromagnetic Field Stimulation Promotes Anti-cell Proliferative Activity in Doxorubicin-treated Mouse Osteosarcoma Cells (パルス電磁場刺激のマウス骨肉腫細胞におけるドキソルビシンの抗腫瘍効果促進作用の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 三 嶋 秀 行 教授 細 川 好 孝 教授 天 野 哲 也 教授 牛 田 享 宏

## 学位論文内容の要旨

### 【背景・目的】

近年パルス電磁場 (PEMF) 刺激は骨折の治療だけではなく、抗腫瘍効果についても検討されており、我々の研究室も PEMF 刺激が骨肉腫細胞株に影響を及ぼすことを示してきた。今回マウス骨肉腫細胞 (LM8 細胞) を用いて、PEMF 刺激とドキソルビシン (DOX) の併用療法の相乗効果について検討した。

### 【方法】

PEMF (5mT,200Hz) の強度で刺激し、細胞増殖活性を MTT-assay で測定した。アポトーシスを検討するため、細胞周期、ミトコンドリア膜電位、カスパーゼ 3/7 活性を FACS や各キットで測定した。更に細胞内シグナル伝達分子の変化を protein array kit を使用した網羅的解析と、情報伝達分子である細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を蛍光法により測定した。

### 【結果】

PEMF と DOX の併用療法は DOX の  $IC_{50}$  値を優位に低下させた。アポトーシス関連因子の内、カスパーゼ 3/7 活性において刺激後 12 時間では併用療法群がわずかに増加し、刺激後 24 時間では併用療法群が DOX 単独療法群より低下していた。細胞内シグナル伝達分子においては、リン酸化 BAD の発現を PEMF 刺激はさらに抑制させる傾向があり、また一方で total I $\kappa$ B やリン酸化 CHK1 の発現の増加を減少させる傾向があった。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は、PEMF 単独刺激および PEMF と DOX の併用療法群で増加した。

## 【考察】

PEMF が DOX の取り込みを促進させ細胞増殖抑制効果を増強した可能性があり、この現象が DOX のアポトーシス誘導に関連するのではないかと仮定し検討した所、アポトーシス関連因子の内、カスパーゼ 3/7 活性は PEMF と DOX の併用療法において、刺激後 12 時間と 24 時間の間に活性のピークが存在する可能性があった。また、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の変化は DOX による影響はないことが示唆された。今回、アポトーシスに絞って網羅的なタンパク質発現解析を実施したところ、PEMF 刺激がリン酸化 BAD 発現をさらに抑制し、BAD の細胞死抑制因子 Bcl-2 の制御作用を促進する可能性が示唆され、total I $\kappa$ B やリン酸化 CHK1 の変化から細胞増殖にも影響を与える可能性が考えられた。

## 【結論】

PEMF と DOX の併用療法が、リン酸化 BAD 発現の変化などを介して骨肉腫細胞の増殖抑制を誘発すると考えられ、骨肉腫の治療戦略の 1 つになり得る可能性を示した。

# 論文審査の結果の要旨

## 【背景・目的】

パルス電磁場 (PEMF) 刺激は骨折の治療に用いられているが、近年抗腫瘍効果についても注目されている。我々は PEMF 刺激が骨肉腫細胞株に影響を及ぼすことを報告してきた。今回マウス骨肉腫細胞 (LM8 細胞) を用いて、PEMF 刺激とドキソルビシン (DOX) 併用療法の相乗効果について検討した。

## 【方法】

PEMF を (5mT,200Hz) の強度で刺激し、細胞増殖活性を MTT-assay で測定した。細胞周期、ミトコンドリア膜電位、カスパーゼ 3/7 活性を測定し、アポトーシスへの影響を検討した。Protein array kit を使用した網羅的解析と、情報伝達分子である細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を蛍光法により測定し、細胞内シグナル伝達分子の変化を検討した。

## 【結果】

PEMF と DOX の併用療法は DOX の IC<sub>50</sub> 値を有意に低下させた。アポトーシス関連因子であるカスパーゼ 3/7 活性は、刺激後 12 時間で併用療法群が DOX 単独療法群よりわずかに増加し、刺激後 24 時間で併用療法群が低下していた。PEMF 刺激はリン酸化 BAD の発現をさらに抑制させる傾向があり、一方で total I $\kappa$ B やリン酸化 CHK1 発現の増加を減少させる傾向があった。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、PEMF 単独刺激および PEMF と DOX の併用療法群で増加し、DOX による影響はなかった。

## 【考察】

PEMF が DOX の取り込みを促進させ細胞増殖抑制効果を増強した可能性が考えられた。PEMF 刺激がリン酸化 BAD 発現をさらに抑制し、BAD の細胞死抑制因子 Bcl-2 の制御作

用を促進する可能性が示唆され、total I $\kappa$ B やリン酸化 CHK1 の変化から細胞増殖にも影響を与える可能性が考えられた。

#### **【結論】**

PEMF と DOX の併用療法が、リン酸化 BAD 発現の変化などを介して骨肉腫細胞の増殖抑制を誘発すると考えられ、骨肉腫の治療戦略の 1 つになり得る可能性を示した。

本研究はパルス電磁場とドキソルビシン併用療法の相乗効果について検討したものである。アポトーシスへの影響が示唆され、今後の骨肉腫の治療戦略の 1 つになり得る可能性を示したことより学位授与に値する論文である。

氏名	笠置智道
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第493号
学位授与年月日	平成29年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Acid-base disturbances in nephrotic syndrome : Analysis using the CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> method (traditional Boston model) and the physicochemical method (Stewart model) (ネフローゼ症候群の酸塩基平衡異常 : CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> 法 (ボストンモデル) と物理化学法 (スチュワートモデル) による解析)
論文審査委員	(主査) 教授 小林孝彰 教授 佐藤元彦 教授 中村二郎 教授 武山直志

## 学位論文内容の要旨

### 【はじめに】

酸塩基平衡解析には、①最も標準的なCO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub>中心のステップ法 (traditional method) (Boston法)、②base excess (BE)法、③physicochemical method (Stewart法)がある。ネフローゼ症候群では陰性帯電のアルブミン (Alb) の喪失に起因する酸塩基平衡異常が生じる可能性が高いが、Boston法ではAlbは重視されず、十分に評価できない。今回、Boston法およびStewart法でネフローゼ症候群の酸塩基平衡異常を検討し、両モデルの違いを明らかにする。

### 【方法】

2014年～2015年にネフローゼ症候群で愛知医科大学病院に入院した患者29名 (男女14:15)、および健常者6名を対象に、血液ガス、レニン活性、アルドステロン濃度を含む血液・尿検体を全て治療前に同時採取した。患者年齢中央値は71歳、尿蛋白7.0g/日、Alb 1.8g/dL、Cr 1.2mg/dL、腎生検施行16例 (MCNS7例、FSGS2例、MN3例など)であった。Stewart法は、Agrafiotisらの報告を用いて、the total concentration of non-volatile weak acids (A<sub>TOT</sub>)、apparent strong ion difference (SID<sub>a</sub>)、effectiveSID (SID<sub>e</sub>)、strong ion difference (SIG)を下記の公式で算出した。

$$A_{TOT}(\text{mEq/L}) = [\text{Alb}(\text{g/dL})] \times 10 \times (0.1204 \times \text{pH} - 0.625) + [\text{P}(\text{mg/dL})] \times 0.3229 \times (0.309 \times \text{pH} - 0.469)$$

$$\text{SIDa (mEq/L)} = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-]$$

$$\text{SIDE (mEq/L)} = [\text{HCO}_3^-] + \text{ATOT} = [0.0301 \times \text{PCO}_2 \times 10 (\text{pH} - 6.1)] + \text{A}_{\text{TOT}}$$

$$\text{SIG (mEq/L)} = \text{SIDa} - \text{SIDE}$$

### 【結果】

Boston 法ではネフローゼ患者の 25 名 (90%) がアルカレミアを示し, 18 名に呼吸性アルカローシス, 11 名に代謝性アルカローシスがあり, 4 名は両者であった。高レニン高アルドステロン血症を示したのは 3 名だけであった。Stewart 法では PaCO<sub>2</sub> 低下による呼吸性アルカローシス, さらに全例に A<sub>TOT</sub> 及び SIDa 低下があり, 弱イオン性アルカローシスと強イオン性アシドーシスの合併と判定した。それぞれ低 Alb 血症, 高 Cl 血症が原因と考えられた。

### 【考察】

4 つの発見があった。①ネフローゼ症候群では低 Alb 血症による肺間質浮腫から A-aDO<sub>2</sub> 開大を伴った呼吸性アルカローシスを生じる。②  $\Delta \text{A}_{\text{TOT}} - \Delta \text{SIDa}$  で AG 正常代謝性因子の判定ができ, SIG の増減で AG 開大代謝性アシドーシスの判定が可能である。③血清 Alb, (Na + K-Cl), Alb 補正 AG からそれぞれ A<sub>TOT</sub>, SIDa, SIG が推定できる。④ 90% のネフローゼ患者ではレニン-アルドステロン系は抑制されている。このような複雑な酸塩基平衡異常の解析には, 従来の Boston 法に加えて Stewart 法を組み合わせることで有効である。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景】

酸塩基平衡解析には, ①最も標準的な CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub> 中心のステップ法 (traditional method) (Boston 法), ② base excess (BE) 法, ③ physicochemical method (Stewart 法) がある。ネフローゼ症候群では陰性帯電のアルブミン (Alb) の喪失に起因する酸塩基平衡異常が生じる可能性が高いが, Boston 法では Alb は重視されず, 十分に評価できない。今回, Boston 法および Stewart 法でネフローゼ症候群の酸塩基平衡異常を検討し, 両モデルの違いを明らかにする。

### 【方法】

2014 年～2015 年にネフローゼ症候群で愛知医科大学病院に入院した患者 29 名 (男女 14 : 15), および健常者 6 名を対象に, 血液ガス, レニン活性, アルドステロン濃度を含む血液・尿検体を全て治療前に同時採取した。患者年齢中央値は 71 歳, 尿蛋白 7.0g/日, Alb 1.8g/dL, Cr 1.2mg/dL, 腎生検施行 16 例 (MCNS 7 例, FSGS 2 例, MN 3 例など) であった。Stewart 法は, Agrafiotis らの報告を用いて, the total concentration of non-volatile weak acids (A<sub>TOT</sub>), apparent strong ion difference (SIDa), effectiveSID (SIDE), strong ion



difference (SIG) を下記の公式で算出した。

$$A_{TOT}(\text{mEq/L}) = [\text{Alb}(\text{g/dL})] \times 10 \times (0.1204 \times \text{pH} - 0.625) + [\text{P}(\text{mg/dL})] \times 0.3229 \times (0.309 \times \text{pH} - 0.469)$$

$$\text{SIDa}(\text{mEq/L}) = [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-]$$

$$\text{SIDe}(\text{mEq/L}) = [\text{HCO}_3^-] + \text{ATOT} = [0.0301 \times \text{PCO}_2 \times 10 (\text{pH} - 6.1)] + A_{TOT}$$

$$\text{SIG}(\text{mEq/L}) = \text{SIDa} - \text{SIDe}$$

### 【結果】

Boston 法ではネフローゼ患者の 25 名 (90%) がアルカレミアを示し、18 名に呼吸性アルカローシス、11 名に代謝性アルカローシスがあり、4 名は両者であった。高レニン高アルドステロン血症を示したのは 3 名だけであった。Stewart 法では PaCO<sub>2</sub> 低下による呼吸性アルカローシス、さらに全例に A<sub>TOT</sub> 及び SIDa 低下があり、弱イオン性アルカローシスと強イオン性アシドーシスの合併と判定した。それぞれ低 Alb 血症、高 Cl 血症が原因と考えられた。

### 【考察】

4 つの発見があった。①ネフローゼ症候群では低 Alb 血症による肺間質浮腫から A-aDO<sub>2</sub> 開大を伴った呼吸性アルカローシスを生じる。②  $\Delta A_{TOT} - \Delta \text{SIDa}$  で AG 正常代謝性因子の判定ができ、SIG の増減で AG 開大代謝性アシドーシスの判定が可能である。③血清 Alb, (Na + K-Cl), Alb 補正 AG からそれぞれ A<sub>TOT</sub>, SIDa, SIG が推定できる。④ 90% のネフローゼ患者ではレニン-アルドステロン系は抑制されている。このような複雑な酸塩基平衡異常の解析には、従来の Boston 法に加えて Stewart 法を組み合わせることで有効である。

本研究は、ネフローゼ症候群の患者を用い、酸塩基平衡解析における Stewart 法の意義を示した最初の報告である。低 Alb 血症が呼吸性アルカローシスを引き起こすメカニズムを明らかにし、今後のネフローゼ患者の病態の把握および治療の向上に寄与するものと考えられる。よって、学位を授与するに値するものと判断した。

氏名	かわいあきら 河井 啓
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第494号
学位与年月日	平成29年3月16日
学位与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	<i>In vitro</i> efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non- <i>albicans</i> <i>Candida</i> species biofilms (Non- <i>albicans</i> カンジダ属によるバイオフィルムに対するアムホテリシン B リポソーム製剤, ミカファンギンおよびフルコナゾールの <i>in vitro</i> 効果)
論文審査委員	(主査) 教授 武山直志 教授 増 渕 悟 教授 渡 邊 大 輔 教授 松 浦 克 彦

## 学位論文内容の要旨

### 【研究背景】

カンジダ血症は、近年、臨床患者において次第に増加しており、また死亡の重要な原因である。*Candida albicans* は現在も最も高頻度に分離されるカンジダ属であるが、non-*albicans* *Candida* の分離頻度は増加傾向にあり、日本でも non-*albicans* *Candida* が50%程度を占めるようになってきている。また、*Candida tropicalis* 血症は死亡率増加に関連する独立したリスクファクターであることも報告されている。カンジダ属は、中心静脈カテーテルや尿道カテーテルのような埋込型医療機器にバイオフィルムとして成長する傾向がある。そのため、カンジダ属はバイオマテリアル関連感染の原因となり、バイオフィルム形成を伴う感染病変を引き起こす。non-*albicans* *Candida* は、*C. albicans* に対する抗真菌薬抵抗性に匹敵するレベルのバイオフィルムを形成する。本研究では、*C. tropicalis*, *C. parapsilosis* および *C. glabrata* のバイオフィルム形成を評価し、これらのバイオフィルムに対するアムホテリシン B リポソーム製剤 (LAB), ミカファンギン (MFG) およびフルコナゾール (FLC) の抗真菌活性を臨床的に妥当な *in vitro* モデル系を用いて評価した。

### 【材料と方法】

2008年から2013年に愛知医科大学病院で分離された3種の non-*albicans* *Candida* 臨床分離株 (*C. tropicalis* AMTC001414, *C. parapsilosis* AMTC45867, *C. glabrata* AMTC5382)

から形成したバイオフィルムの形成能と抗真菌薬の感受性を測定した。その後、強いバイオフィルム形成能と浮遊細胞で高い抗真菌薬感受性を有するものを選択した。浮遊細胞の感受性は、CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) M27-A3 法に準じて決定した。ただし、培地については 50% FBS 添加 RPMI-1640 培地を用いた。LAB と FLC の浮遊細胞に対する MIC (最小発育阻止濃度: Minimum Inhibitory Concentration) は、薬剤無添加の対照群の成長に比較して視覚的に 50% 以上発育阻害を引き起こす最小抗真菌薬濃度を測定した。MFG の浮遊細胞に対する MIC は、真菌成長が観察できない抗真菌薬濃度を測定した。バイオフィルムの感受性は XTT 還元アッセイを用いて測定した。バイオフィルム形成は、well 底面の真菌の形態により視覚的に確認した後、Concanavalin A と Fun-1 染色により共焦点レーザー顕微鏡を用いて視覚化した。各抗真菌薬の 2 倍希釈系列濃度にて 37°C で 24 時間曝露した後、XTT-メナジオン溶液で 37°C にて 4 時間作用させ、プレートから培地を回収し、6000×g で 10 分間、懸濁細胞と破片のペレットを遠心分離した後、分光光度計を使って 492nm で上清を測定した。薬剤無添加の対照群と比較してバイオフィルムの代謝活性が 50% 減少した抗真菌薬濃度を Sessile MIC (SMIC<sub>50</sub>) とし、80% 減少した抗真菌薬濃度を SMIC<sub>80</sub> とした。

## 【結果】

*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* の浮遊細胞に対する LAB, MFG, FLC の抗真菌薬の感受性および XTT 還元アッセイで測定した non-*albicans Candida* の 3 菌種の分離株から形成されたバイオフィルムに対する主要な抗真菌薬の SMIC 値を測定した。LAB は *C. tropicalis* のバイオフィルムに対して高い効果を示した。一方、MFG と FLC は *C. tropicalis* のバイオフィルムに対する SMIC<sub>50/80</sub> 値はどちらも 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上を示した。*C. parapsilosis* のバイオフィルムに対しては、すべての抗真菌薬が高い SMIC<sub>50</sub> 値を示し、LAB では最低の SMIC<sub>50</sub> 値を示した。*C. glabrata* のバイオフィルムに対して LAB と MFG は FLC より抗バイオフィルム活性が高く、MFG では SMIC<sub>50</sub> 値が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と最も低かった。FLC は試験したすべての菌株に対して活性が認められなかった。LAB では *C. tropicalis* のバイオフィルムの代謝活性が濃度依存的に減少した。これに対し、*C. tropicalis* のバイオフィルムは、MFG 濃度が 0.5-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の時よりも SMIC<sub>50</sub> 値以上の濃度 (8-64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で、感受性が低下する paradoxical growth effect を示した。FLC は *C. tropicalis* のバイオフィルムにはほとんど効果がなかった。LAB は *C. parapsilosis* のバイオフィルムに対しても代謝活性を濃度依存的に減少させたが、MFG と FLC では *C. parapsilosis* バイオフィルムに対してほとんど効果が認められなかった。FLC は *C. parapsilosis* のバイオフィルムに対して低濃度で成長阻止したが MIC 以上の高濃度では paradoxical growth effect を示した。*C. glabrata* のバイオフィルムでも LAB の濃度依存的な作用が示された。MFG はすべての濃度で著しい効果が認められた。これに対して、FLC は *C. glabrata* のバイオフィルムに対して無効であった。

## 【結語】

non-*albicans Candida* のバイオフィルム形成株に対して、LAB は用量依存的に抗真菌活性を認めた。臨床上カテーテルを留置せざるを得ない状況下において、バイオフィルムを形成しやすい non-*albicans Candida* による感染症に対して LAB は有用な治療選択肢の一つとなる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 【研究背景】

カンジダ血症は、近年、増加傾向で、死亡原因としても重要である。カンジダ属では、*Candida*(*C.*) *albicans* が最も高頻度に分離される。最近、我が国では、non-*albicans Candida* がカンジダ属の 50% 程度を占めるまで増加している。カンジダ属は、中心静脈カテーテルや尿道カテーテルのような埋込型医療機器にバイオフィルム形成を伴い増殖する傾向がある。本研究では、non-*albicans Candida* である *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* および *C. glabrata* のバイオフィルム形成を評価し、バイオフィルム存在下におけるアムホテリシン B リポソーム製剤 (LAB), ミカファンギン (MFG) およびフルコナゾール (FLC) の抗真菌活性を評価した。

### 【材料と方法】

2008 年から 2013 年に愛知医科大学病院で分離された 3 種の non-*albicans Candida* 臨床分離株 (*C. tropicalis* AMTC001414, *C. parapsilosis* AMTC45867, *C. glabrata* AMTC5382) のバイオフィルムの形成能と抗真菌薬に対する感受性を測定した。浮遊細胞の感受性は、Clinical Laboratory Standard Institute-M27-A3 法に準じて決定した。LAB, MFG, FLC の浮遊細胞に対する Minimum Inhibitory Concentration (MIC) は、薬剤無添加の対照群の成長と比較して視覚的に 50% 以上発育阻害を引き起こす最小抗真菌薬濃度を用いた。バイオフィルム存在下における抗真菌薬に対する感受性は XTT 還元法を用いて測定した。バイオフィルム形成は、Fun-1 染色により共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認した。各抗真菌薬の 2 倍希釈系列濃度にて 37°C, 24 時間曝露した後、XTT-メナジオン溶液を 37°C, 4 時間作用させ、プレートから培地を回収し、6000×g で 10 分間、遠心分離した後、492nm で上清の色調変化を測定した。薬剤無添加の対照群と比較してバイオフィルム存在下における真菌増殖率が 50% 減少した抗真菌薬濃度を Sessile MIC (SMIC<sub>50</sub>) とし、80% 減少した抗真菌薬濃度を SMIC<sub>80</sub> とした。

### 【結果】

*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* の浮遊細胞に対する LAB, MFG, FLC の抗真菌薬に対する感受性および non-*albicans Candida* の 3 菌種の分離株から形成されたバイオフィルム存在下における真菌増殖に対する主要な抗真菌薬の SMIC 値を測定した。そ

の結果, LABはバイオフィルム存在下で *C. tropicalis* に対して高い効果を示した。一方, MFGとFLCはバイオフィルム存在下で *C. tropicalis* に対する SMIC<sub>50/80</sub> 値はどちらも 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上を示した。バイオフィルム存在下で *C. parapsilosis* は, すべての抗真菌薬が高い SMIC<sub>50</sub> 値を示したが, LABはその中で最も低い SMIC<sub>50</sub> 値を示した。バイオフィルム存在下で *C. glabrata* は, LABとMFGはFLCより抗真菌活性が高く, MFGでは SMIC<sub>50</sub> 値が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と最も低かった。FLCは検討したすべての菌株に対して成長阻止効果を認めなかった。LABはバイオフィルム存在下で *C. tropicalis* の成長阻止効果を濃度依存的に示した。これに対し, バイオフィルム存在下における *C. tropicalis* は, MFG濃度が 0.5-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の時よりも SMIC<sub>50</sub> 値以上の濃度 (8-64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で, 成長阻止効果が減弱する paradoxical growth effect を示した。FLCはバイオフィルム存在下で *C. tropicalis* に対し効果を認めなかった。LABはバイオフィルム存在下で *C. parapsilosis* の成長を濃度依存的に抑制したが, MFGとFLCはバイオフィルム存在下で *C. parapsilosis* の成長抑制効果を認めなかった。FLCはバイオフィルム存在下で *C. parapsilosis* に対して低濃度で成長を阻止したがMIC以上の高濃度では paradoxical growth effect を示した。LABは, バイオフィルム存在下で *C. glabrata* の成長を濃度依存的に阻止した。MFGはすべての濃度で強い成長阻止効果を認めた。一方, FLCはバイオフィルム存在下で *C. glabrata* に対して無効であった。

#### 【結語】

non-*albicans Candida* のバイオフィルム形成株に対して, LABは用量依存的に抗真菌活性を認めた。臨床上カテーテルを留置せざるを得ない状況下において, バイオフィルムを形成しやすい non-*albicans Candida* による感染症に対してLABは治療選択肢となる可能性が示唆された。よって学位授与に値する論文であると判断した。



氏名	白 石 洋 輔
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第495号
学位授与年月日	平成29年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Simultaneous quantification of batrachotoxin and epibatidine in plasma by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MSを用いた血漿中 batrachotoxin および epibatidine 濃度の同時定量)
論文審査委員	(主査) 教授 松 浦 克 彦 教授 佐 藤 元 彦 教授 細 川 好 孝 教授 武 山 直 志

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

動植物の中には体内に毒成分（自然毒）を含むものが数多く知られており、それらは法中毒領域における重要な分析対象である。一部のカエルの皮膚分泌物に含まれる化合物も致死性が高い毒物であることが知られている。しかし、その中でも batrachotoxin および epibatidine の LC-MS-MS を用いた定量法は報告されていない。そこで本研究では、UPLC-MS-MS を用いた血漿中の batrachotoxin および epibatidine 濃度の同時定量法を検討した。

### 【方法】

血漿 200  $\mu$ L にメタノール 200  $\mu$ L, 内部標準溶液 (2  $\mu$ g/mL midazolam-D<sub>4</sub> メタノール溶液) 100  $\mu$ L, アセトニトリル 600  $\mu$ L を添加し、遠心後、上清を遠心エバポレーターで乾固した。その残渣を初期移動相に溶解し、分析を行った。測定は LC-MS-MS である Acquity™ UPLC-TQD (Waters) を用い、分離カラムとして Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (50  $\times$  2.1mm i.d., particle size 1.7  $\mu$ m; Waters) を用いた。移動相は (A) 0.1%ギ酸, (B) 0.1%ギ酸添加アセトニトリルの2種類を用い、グラジエント条件は 90% A  $\rightarrow$  50% A (0-3min), 50% A  $\rightarrow$  5% A (3-4min), 5% A (4-6min), 90% A (6-7min) とした。流速は 0.5mL/min とし、カラム温度は 40°C とした。検出は ESI ポジティブモードで行った。また、雄性 Wistar ラットに batrachotoxin および epibatidine を単回腹腔内投与し、投与 10 分後に採



血し，血漿中濃度を測定した。

### 【結果】

Batrachotoxin および epibatidine とともに，2.5-250ng/mL の範囲で検量線は良好な直線性を示し，相関係数は 0.99 以上であった。日内および日間変動は，真度では 94.7-102.3%，精度では 1.0-10.3% であった。回収率は 69.6-98.2% であり，マトリックス効果は 92.7-97.3% であった。ラットの腹腔内に投与（各 10  $\mu$ g/kg）された batrachotoxin および epibatidine の血漿中濃度は，それぞれ  $4.9 \pm 1.1$ ng/mL (n=5)， $5.8 \pm 2.6$ ng/mL (n=5) であった。

### 【考察】

UPLC-MS-MS を用いた血漿中の batrachotoxin および epibatidine 濃度の同時定量法を確立した。本法により，ラットの腹腔内に投与された batrachotoxin および epibatidine の血漿中濃度を測定することが可能であった。

## 論文審査の結果の要旨

### 【目的】

自然界には体内に有毒な成分を有する動植物が数多く知られている。batrachotoxin および epibatidine はカエルの皮膚分泌物に含まれる化合物で非常に致死性が高い毒物であることが知られている。これらの毒物に暴露した場合，血漿中濃度を測定することは診断および治療するにおいて有用な基礎的情報を得ることが可能となる。しかし，これまでにこれらの毒物を高感度かつ迅速に測定する方法は報告されていない。そこで本研究では，UPLC-MS-MS を用いて血漿中の batrachotoxin および epibatidine 濃度の同時定量法を確立するとともにその妥当性について検討した。

### 【方法】

血漿 200  $\mu$ L にメタノール 200  $\mu$ L，内部標準溶液 (2  $\mu$ g/mL midazolam-D<sub>4</sub> メタノール溶液) 100  $\mu$ L，アセトニトリル 600  $\mu$ L を添加し，遠心後，上清を遠心エバポレーターで乾固した。その残渣を初期移動相に溶解し，分析を行った。測定は LC-MS-MS である Acquity™ UPLC-TQD (Waters) を用い，分離カラムとして Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (50 $\times$ 2.1mm i.d., Particle size 1.7  $\mu$ m ; Waters) を用いた。移動相は (A) 0.1%ギ酸，(B) 0.1%ギ酸添加アセトニトリルの 2 種類を用い，グラジエント条件は 90% A  $\rightarrow$  50% A (0-3min)，50% A  $\rightarrow$  5% A (3-4min)，5% A (4-6min)，90% A (6-7min) とした。流速は 0.5mL/min とし，カラム温度は 40 $^{\circ}$ C とした。検出は ESI ポジティブモードで行った。また，雄性 Wistar ラットに batrachotoxin および epibatidine をそれぞれ 10  $\mu$ g/kg 単回腹腔内投与し，投与 10 分後に採血し，血漿中濃度を測定した。

### 【結果】

Batrachotoxin および epibatidine の検量線 (2.5-250ng/mL) は良好な直線性を示し，相

関係数は 0.99 以上であった。日内および日間変動は、真度では 94.7-102.3%，精度では 1.0-10.3%であった。回収率は 69.6-98.2%であり、マトリックス効果は 92.7-97.3%であった。ラットの腹腔内に投与した時の batrachotoxin および epibatidine の血漿中濃度は、それぞれ  $4.9 \pm 1.1\text{ng/mL}$  (n=5),  $5.8 \pm 2.6\text{ng/mL}$  (n=5) であった。

#### **【考察】**

今回はじめて UPLC-MS-MS による血漿中の batrachotoxin および epibatidine 濃度の同時定量法を確立し、ラットを用いて各毒物の血漿中濃度を測定することが可能であることを示した。

batrachotoxin および epibatidine は研究室等でも使用されている物質であり、また、昨今の社会情勢を踏まえると生物兵器として使用される可能性のある物質でもある。本研究は、これらの物質の血漿中濃度を高感度かつ迅速に分析することを可能し、今後これらの毒物に暴露した際の診断や治療に貢献する可能性があることから、学位を授与するに値する論文と評価した。

氏名	伊藤 剛
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第496号
学位与年月日	平成29年3月16日
学位与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Is a fourth-line antiepileptic drug regimen truly ineffective for all types of epilepsy? Reappraisal of pharmaco-resistance as related to epilepsy type in adult patients (抗てんかん薬の第四レジメンはすべてのてんかんに対して本当に無効なのか？薬物抵抗性の成人てんかん患者で再検討を行った)
論文審査委員	(主査) 教授 奥村 彰久 教授 池田 洋 教授 大竹 千生 教授 高安 正和

## 学位論文内容の要旨

昨今の調査によると適切な一剤目・二剤目の抗てんかん薬の選択が行われた場合、未治療のてんかん患者の2/3が発作消失を得られる事がわかってきているが三剤目の抗てんかん薬になると発作消失は顕著に減少し、四剤目の効能ははっきりしていない。全般性てんかんの代表疾患である若年性ミオクロニーてんかん（以下JME）は比較的薬物治療に効果的であるが部分てんかんの代表疾患である側頭葉てんかん（以下TLE）は難治性である事が非常に多い。しかしながらJMEとTLEを直接比較した先行研究は乏しく両者の薬剤有効性の違いは明確になっていない。

2001年から2013年の間で愛知医大及びメディカルクリニックの精神科に通院及び内服加療を行った経過のある15歳以上の「てんかん」患者を1396名抽出し、1年以上の通院歴がある468名リストアップした。さらに、JME、TLE、非側頭葉てんかん（以下non-J-non-T）の3群に分けた。

104名（22.2%）は当院にて「てんかん」と診断を初めて受け、残りの364名（77.8%）は他院からの紹介例であった。性別比・初発発作時年齢・調査時年齢・調査時レジメン・発作消失レジメンの比較をコルモゴロフ・スミノフ検定を行った結果非正規分布をしていた為、Kruskal-Wallis検定、Wilcoxon検定を使って3群比較した。

初発発作年齢、当院受診までの服薬期間、当院初診後の通院期間は3群で有意差を認め

なかった。TLE 群では第一レジメン及び第二レジメンの発作消失率 ( $p < 0.001$ ) に有意差があり, 続いて第二レジメン及び第三レジメン ( $p < 0.001$ ), 第三レジメン及び第四レジメン ( $p < 0.001$ ) においても有意差があった。また, non-J-non-T 群においては第一レジメン及び第二レジメン ( $p < 0.001$ ), 第二レジメン及び第三レジメン ( $p < 0.001$ ) で有意差があったが, 第三レジメン及び第四レジメンでは有意差は認めなかった。JME 群においてはレジメン数と発作消失率に有意な関係は認めなかった。

初回レジメンにおいて有意に発作消失を得ている JME に対し TLE では四剤目の抗てんかん薬においても発作消失率に寄与している事が分かった。海馬硬化などの明らかな MRI 所見の無い TLE 患者をてんかん手術目的にてんかんセンターへ紹介する前に四剤目の薬物治療を行う有用性を指摘する事ができた。

## 論文審査の結果の要旨

昨今の調査によると適切な一剤目・二剤目の抗てんかん薬の選択が行われた場合, 未治療のてんかん患者の 2/3 が発作消失を得られる事がわかってきているが三剤目の抗てんかん薬になると発作消失は顕著に減少し, 四剤目の効能ははっきりしていない。全般性てんかんの代表疾患である若年性ミオクロニーてんかん (以下 JME) は比較的薬物治療に効果的であるが部分てんかんの代表疾患である側頭葉てんかん (以下 TLE) は難治性である事が非常に多い。しかしながら JME と TLE を直接比較した先行研究は乏しく両者の薬剤有効性の違いは明確になっていない。

2001 年から 2013 年の間で愛知医大及びメディカルクリニックの精神科に通院及び内服加療を行った経過のある 15 歳以上の「てんかん」患者を 1396 名抽出し, 1 年以上の通院歴がある 468 名リストアップした。さらに, JME, TLE, 非側頭葉てんかん (以下 non-J-non-T) の 3 群に分けた。

104 名 (22.2%) は当院にて「てんかん」と診断を初めて受け, 残りの 364 名 (77.8%) は他院からの紹介例であった。性別比・初発発作時年齢・調査時年齢・調査時レジメン・発作消失レジメンの比較をコルモゴロフ・スミノフ検定を行った結果非正規分布をしていた為, Kruskal-Wallis 検定, Wilcoxon 検定を使って 3 群比較した。

初発発作年齢, 当院受診までの服薬期間, 当院初診後の通院期間は 3 群で有意差を認めなかった。TLE 群では第一レジメン及び第二レジメンの発作消失率 ( $p < 0.001$ ) に有意差があり, 続いて第二レジメン及び第三レジメン ( $p < 0.001$ ), 第三レジメン及び第四レジメン ( $p < 0.001$ ) においても有意差があった。また, non-J-non-T 群においては第一レジメン及び第二レジメン ( $p < 0.001$ ), 第二レジメン及び第三レジメン ( $p < 0.001$ ) で有意差があったが, 第三レジメン及び第四レジメンでは有意差は認めなかった。JME 群においてはレジメン数と発作消失率に有意な関係は認めなかった。

初回レジメンにおいて有意に発作消失を得ている JME に対し TLE では四剤目の抗てんかん薬においても発作消失率に寄与している事が分かった。海馬硬化などの明らかな MRI 所見の無い TLE 患者をてんかん手術目的にてんかんセンターへ紹介する前に四剤目の薬物治療を行う有用性を指摘する事ができた。

氏 名	木 村 行 宏 きむら ゆきひろ
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第380号
学位授与年月日	平成28年5月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Circulating antibodies to $\alpha$ -enolase and phospholipase A2 receptor and composition of glomerular deposits in Japanese patients with primary or secondary membranous nephropathy (膜性腎症における抗 $\alpha$ -enolase 抗体, 抗 phospholipase A2 receptor 抗体と抗原蛋白の糸球体内局在についての検討)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 孝 彰 教授 池 田 洋 教授 高 村 祥 子 教授 高 見 昭 良

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背景】

膜性腎症 (MN) は成人ネフローゼ症候群の主要な疾患であり, IgG4 が糸球体基底膜に沈着する特徴がある。合併症のないものを一次性, あるものを二次性と呼んでいる。MN の原因抗原として, これまで  $\alpha$ -enolase, phospholipase A2 receptor (PLA2R), Neutral endo-peptidase, aldose reductase, superoxide dismutase<sup>2</sup>, anti-thrombospondine type1 domain-containing 7A などが候補としてあげられている。抗  $\alpha$ -enolase 抗体は Wakui らによって報告されたが, 一次性・二次性 MN の両方で認められる。一方, 抗 PLA2R 抗体は Beck らによって報告され, 一次性 MN 患者でのみ存在する抗体である。今回我々は日本人の一次性・二次性 MN における抗  $\alpha$ -enolase 抗体・抗 PLA2R 抗体の抗体保有と糸球体内の沈着, さらに治療による変化を検討した。

### 【方法】

対象: 2003 年～2011 年に愛知医科大学病院および関連病院に入院し, 腎生検にて MN と診断された一次性 MN25 例, 二次性 MN20 例 (ループス腎炎 V 型 13 名, ブシラミン腎症 7 名), 60 名の非 MN 患者 (微小変化群, IgA 腎症, 巣状糸球体硬化症, 膜性増殖性糸球体腎炎, 糖尿病性腎症, 尿細管間質性腎炎から各 10 名) および 44 名の膠原病性疾患ないし感染症患者, 20 名の腎炎を有さない健常者血清を用いた。



- 方法：① 遺伝子工学で作成した  $\alpha$ -enolase を使用した dot blot 法を用い、希釈血清を反応させ、二次抗体として酵素標識抗ヒト IgG 抗体と抗ヒト IgG サブクラス抗体を用いた。
- ② 抗 PLA2R 抗体については培養細胞を用いた蛍光抗体法により測定した。
- ③ 患者腎病理標本を用いて蛍光免疫染色法により  $\alpha$ -enolase および PLA2R の腎組織での局在を検討した。
- ④ 一次性 MN・二次性 MN で、治療前後の血清を用い抗  $\alpha$ -enolase 抗体の変化を検討した。

### 【結果】

- ① 抗  $\alpha$ -enolase 抗体は一次性 MN で 25 名中 19 名 (76%)、二次性 MN ではループス腎炎 V 型 13 名中 9 名 (69%)、ブシラミン腎症 7 名中 6 名 (86%) で陽性であった。IgG のサブクラスでは、一次性 MN では、IgG1 と IgG4 が主体であった (72%)。二次性 MN では IgG1 と IgG3 が主体であった (75%)。
- ② 抗 PLA2R 抗体は、一次性 MN のみ 12/25 (48%) で陽性であったが、二次性 MN では全く認めなかった。抗 PLA2R 抗体陽性患者 12 名のうち 8 名は抗  $\alpha$ -enolase 抗体も陽性であった。
- ③ 組織学的には PLA2R は一次性 MN の基底膜上皮側に存在し IgG の分布と一致していた。しかし、 $\alpha$ -enolase は一次性 MN・二次性 MN ともに基底膜には存在せず、軽度に内皮・上皮細胞に散在し、尿細管上皮細胞が陽性であった。
- ④ 治療により完全寛解した MN5 名において、陽性であった抗  $\alpha$ -enolase 抗体は、治療後に全ての患者で消失した。不完全寛解 4 名では、抗  $\alpha$ -enolase 抗体の反応は治療により 1 名が完全に消失、2 名が減弱し、1 名は不変であった。

### 【考察】

MN 患者では、一次性、二次性両群で抗  $\alpha$ -enolase 抗体が約 70% で陽性となることが示された。これは、Wakui らの成績と一致している。ただ、サブクラスの検討では、一次性 MN では IgG1 と IgG4、二次性 MN では IgG1 と IgG3 が主体であり、この点は Wakui らの結果と異なっている。使用した抗原とサブクラス抗体の違いによる可能性が高い。

抗 PLA2R 抗体の陽性率は一次性 MN で約 50% であったが、我が国の他施設 Akiyama らの成績も 53% であり、欧米中国からの報告にある約 70% と比べ明らかに低い成績である。これは人種差による影響と考えられる。また MN の治療により、抗  $\alpha$ -enolase 抗体の反応は低下ないし消失することがわかった。

組織への抗原の沈着を検討すると、PLA2R は一次性 MN の糸球体係蹄壁に存在した。しかし、 $\alpha$ -enolase は血中抗体価が存在しているにも関わらず糸球体には存在しなかった。 $\alpha$ -enolase は、細胞内の糖代謝に関与する酵素であり、ストレス下で細胞表面に移動することが明らかになっている。MN の発症機序として、最初に抗  $\alpha$ -enolase 抗体が、内皮細胞あ

るいは上皮細胞に影響を与え、基底膜の透過性が変化した後に免疫複合体が形成されるメカニズム (two step theory) の可能性が示唆された。

### 【結論】

抗  $\alpha$ -enolase 抗体は一次性・二次性膜性腎症の約 70% で陽性になることから、診断・治療マーカーとして有用であることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

### 【背景】

膜性腎症 (MN) は成人ネフローゼ症候群の主要な疾患であり、IgG4 が糸球体基底膜に沈着する特徴がある。合併症のないものを一次性、あるものを二次性と呼んでいる。MN の原因抗原として、これまで  $\alpha$ -enolase, phospholipase A2 receptor (PLA2R), Neutral endo-peptidase, aldose reductase, superoxide dismutase<sup>2</sup>, anti-thrombospondine type1 domain-containing 7A などが候補としてあげられている。抗  $\alpha$ -enolase 抗体は Wakui らによって報告されたが、一次性・二次性 MN の両方で認められる。一方、抗 PLA2R 抗体は Beck らによって報告され、一次性 MN 患者でのみ存在する抗体である。今回我々は日本人の一次性・二次性 MN における抗  $\alpha$ -enolase 抗体・抗 PLA2R 抗体の抗体保有と糸球体内の沈着、さらに治療による変化を検討した。

### 【方法】

対象：2003 年～2011 年に愛知医科大学病院および関連病院に入院し、腎生検にて MN と診断された一次性 MN 25 例、二次性 MN 20 例 (ループス腎炎 V 型 13 名、ブシラミン腎症 7 名)、60 名の非 MN 患者 (微小変化群、IgA 腎症、巣状糸球体硬化症、膜性増殖性糸球体腎炎、糖尿病性腎症、尿細管間質性腎炎から各 10 名) および 44 名の膠原病性疾患ないし感染症患者、20 名の腎炎を有さない健常者血清を用いた。

- 方法：① 遺伝子工学で作成した  $\alpha$ -enolase を使用した dot blot 法を用い、希釈血清を反応させ、二次抗体として酵素標識抗ヒト IgG 抗体と抗ヒト IgG サブクラス抗体を用いた。
- ② 抗 PLA2R 抗体については培養細胞を用いた蛍光抗体法により測定した。
- ③ 患者腎病理標本を用いて蛍光免疫染色法により  $\alpha$ -enolase および PLA2R の腎組織での局在を検討した。
- ④ 一次性 MN・二次性 MN で、治療前後の血清を用い抗  $\alpha$ -enolase 抗体の変化を検討した。

### 【結果】

- ① 抗  $\alpha$ -enolase 抗体は一次性 MN で 25 名中 19 名 (76%)、二次性 MN ではループス腎炎 V 型 13 名中 9 名 (69%)、ブシラミン腎症 7 名中 6 名 (86%) で陽性であった。IgG の

サブクラスでは、一次性 MN では、IgG1 と IgG4 が主体であった (72%)。二次性 MN では IgG1 と IgG3 が主体であった (75%)。

- ② 抗 PLA2R 抗体は、一次性 MN のみ 12/25 (48%) で陽性であったが、二次性 MN では全く認めなかった。抗 PLA2R 抗体陽性患者 12 名のうち 8 名は抗  $\alpha$ -enolase 抗体も陽性であった。
- ③ 組織学的には PLA2R は一次性 MN の基底膜上皮側に存在し IgG の分布と一致していた。しかし、 $\alpha$ -enolase は一次性 MN・二次性 MN ともに基底膜には存在せず、軽度に内皮・上皮細胞に散在し、尿細管上皮細胞が陽性であった。
- ④ 治療により完全寛解した MN5 名において、陽性であった抗  $\alpha$ -enolase 抗体は、治療後に全ての患者で消失した。不完全寛解 4 名では、抗  $\alpha$ -enolase 抗体の反応は治療により 1 名が完全に消失、2 名が減弱し、1 名は不変であった。

### 【考察】

MN 患者では、一次性、二次性両群で抗  $\alpha$ -enolase 抗体が約 70% で陽性となることが示された。これは、Wakui らの成績と一致している。ただ、サブクラスの検討では、一次性 MN では IgG1 と IgG4、二次性 MN では IgG1 と IgG3 が主体であり、この点は Wakui らの結果と異なっている。使用した抗原とサブクラス抗体の違いによる可能性が高い。

抗 PLA2R 抗体の陽性率は一次性 MN で約 50% であったが、我が国の他施設 Akiyama らの成績も 53% であり、欧米中国からの報告にある約 70% と比べ明らかに低い成績である。これは人種差による影響と考えられる。また MN の治療により、抗  $\alpha$ -enolase 抗体の反応は低下ないし消失することがわかった。

組織への抗原の沈着を検討すると、PLA2R は一次性 MN の糸球体係蹄壁に存在した。しかし、 $\alpha$ -enolase は血中抗体価が存在しているにも関わらず糸球体には存在しなかった。 $\alpha$ -enolase は、細胞内の糖代謝に関与する酵素であり、ストレス下で細胞表面に移動することが明らかになっている。MN の発症機序として、最初に抗  $\alpha$ -enolase 抗体が、内皮細胞あるいは上皮細胞に影響を与え、基底膜の透過性が変化した後に免疫複合体が形成されるメカニズム (two hit theory) の可能性が示唆された。

### 【結論】

抗  $\alpha$ -enolase 抗体は一次性・二次性膜性腎症の約 70% で陽性になることから、診断・治療マーカーとして有用であることが示された。

本研究によって抗  $\alpha$ -enolase 抗体は一次性・二次性膜性腎症における診断・治療マーカーとして有用である可能性が明らかにされた。

本研究で得られた知見は、今後の膜性腎症の診断・治療の発展に寄与するものと考えられる。よって、学位を授与するに値するものと判断した。

氏名	さくら い しんいちろう 櫻井 慎一郎
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第381号
学位与年月日	平成29年2月9日
学位与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Influence of plaque characteristics on fractional flow reserve for coronary lesions with intermediate to obstructive stenosis : insights from integrated-backscatter intravascular ultrasound analysis (冠動脈のプラーク性状が冠血流予備量比 (FFR) に与える影響についての検討)
論文審査委員	(主査) 教授 松山克彦 教授 内藤宗和 教授 佐藤元彦 教授 石橋宏之

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

冠動脈病変の重症度評価においては形態的評価として血管内超音波 (IVUS) があり, 機能的評価として冠血流予備量比 (FFR) が一般的に普及している。

以前より IVUS で計測できる各因子と FFR 値との関連について検討はされているが, 多くは2次的に最小血管径 (MLA) と FFR 値との関連性を検討したものであった。

近年 VH-IVUS を用いたプラーク性状と FFR 値との検討では, 2次元でのプラーク性状に FFR との関連性は認められなかった。しかしながら病変全体を考慮した3次元での IVUS パラメータと FFR 値の関連性は明らかにされていない。

### 【目的】

この研究の目的は冠動脈病変において血管内超音波でのプラークの組織性状を含めた3次元解析と FFR の関連について検討することである。

### 【方法】

冠動脈造影で視認上 50%以上の狭窄を有する安定狭心症患者 107 症例 114 病変に対して, アデノシン (ATP) 静注による FFR 計測と IB-IVUS による観察した。IVUS 解析においては病変全体の組織性状評価を含めた3次元 IB-IVUS 解析を行った。

## 【結果】

全 114 病変において冠動脈造影上の径狭窄率は  $61.7 \pm 9.3\%$ 、平均の FFR 値は  $0.70 \pm 0.11$  であり、97 病変において  $FFR < 0.80$  を認めた。

脂質性プラークの絶対量 (lipid volume) ( $r = -0.24$ ;  $p = 0.01$ ) と脂質性プラークの量を全プラーク量で除した脂質性プラーク率 (% lipid volume) ( $r = -0.40$ ;  $p < 0.01$ ) とともに FFR と顕著な相関が得られ、多変量解析において FFR の独立した予測因子であった。

## 【結語】

冠動脈の中等度から高度狭窄病変においては、最小血管内腔面積のみならず病変長、プラーク容積やプラーク性状の違いが FFR の値に寄与する可能性が示唆された。

通常の血管内超音波による 2 次元的な解析と比較して、IB-IVUS による 3 次元的な解析の方が冠動脈プラーク性状と FFR の相関により有用であると考えられた。

# 論文審査の結果の要旨

## 【背景】

冠動脈病変の重症度評価においては形態的評価として血管内超音波 (IVUS) があり、機能的評価として冠血流予備量比 (FFR) が一般的に普及している。

以前より IVUS で計測できる各因子と FFR 値との関連について検討はされているが、多くは 2 次元的に最小血管径 (MLA) と FFR 値との関連性を検討したものであった。

近年 VH-IVUS を用いたプラーク性状と FFR 値との検討では、2 次元でのプラーク性状に FFR との関連性は認められなかった。しかしながら病変全体を考慮した 3 次元での IVUS パラメータと FFR 値の関連性は明らかにされていない。

## 【目的】

この研究の目的は冠動脈病変において血管内超音波でのプラークの組織性状を含めた 3 次元的な解析と FFR の関連について検討する。

## 【方法】

冠動脈造影で視認上 50% 以上の狭窄を有する安定狭心症患者 107 症例 114 病変に対して、アデノシン (ATP) 静注による FFR 計測と IB-IVUS による観察した。IVUS 解析においては病変全体の組織性状評価を含めた 3 次元 IB-IVUS 解析を行った。

## 【結果】

全 114 病変において冠動脈造影上の径狭窄率は  $61.7 \pm 9.3\%$ 、平均の FFR 値は  $0.70 \pm 0.11$  であり、97 病変において  $FFR < 0.80$  を認めた。脂質性プラークの絶対量 (lipid volume) ( $r = -0.24$ ;  $p = 0.01$ ) と脂質性プラークの量を全プラーク量で除した脂質性プラーク率 (% lipid volume) ( $r = -0.40$ ;  $p < 0.01$ ) とともに FFR と顕著な相関が得られ、多変量解析において FFR の独立した予測因子であった。



## 【結語】

冠動脈の中等度から高度狭窄病変においては、最小血管内腔面積のみならず病変長、プラーク容積やプラーク性状の違いがFFRの値に寄与する可能性が示唆された。

通常血管内超音波による2次元解析と比較して、IB-IVUSによる3次元解析の方が冠動脈プラーク性状とFFRの相関により有用であると考えられた。

冠動脈において同じ狭窄率であっても、内膜の性状、血管壁の弾力性が関与するものと思われるが、血管壁内脂質性プラーク量の多寡により、冠血流予備量比が異なることを初めて明らかにした論文である。一般臨床においては脂質性プラークを減らすことの重要性が再認識され、心筋梗塞、狭心症の予防のひとつとして重要な知見となる。よって学位授与に値する論文であると判断した。



氏名	篠田 貢一 <small>しの だ こう いち</small>
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第382号
学位授与年月日	平成29年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	<b>Structural Comparison between the Right and Left Atrial Appendages Using Multidetector Computed Tomography (多検出器型 CT 装置を用いた右心耳・左心耳の構造比較)</b>
論文審査委員	(主査) 教授 内藤 宗和 教授 増 渕 悟 教授 天 野 哲也 教授 石 口 恒 男

## 学位論文内容の要旨

### 【背景】

心房血栓は、心房細動などの合併症として重要で、とくに左心耳に高頻度に形成される。一方、左心耳と同様の形態を呈する右心耳に形成されることは稀である。心房細動においては、心房収縮の減弱による血流停滞によって血栓が形成されることが知られている。しかし、左右の心房が同時に細動を起こしているにも関わらず、左心耳に血栓が形成されやすい理由は、明らかではない。また心房細動患者では、経食道心エコー所見において左心耳の拡張が報告され、血栓形成との関連が指摘されている (Subramaniam et al)。しかし、心耳の血液流入・流出に影響し血流停滞と関係が深いと考えられる心耳入口部 (以下、neck) の面積や心耳の容積などをエコーによって計測することは困難である。今回、解剖実習体から摘出した両心耳を肉眼的に観察した後、鋳型標本を作製し MD-CT で撮影して 3次元解析を行い、両心耳の形態を比較した。

### 【対象と方法】

愛知医科大学医学部において研究に供された解剖実習体 34 体 (男性 11 体, 女性 23 体: 平均死亡年齢  $84 \pm 8.4$  歳) から摘出した心耳について、肉眼的観察を行った後、シリコンを注入して鋳型標本を作製した。標本を MD-CT で撮影して 3次元画像を構築し、neck 面積、心耳容積、表面積を計測した。さらに、心耳容積に対する neck 面積の比 (neck 面積/心耳容積) と心耳容積に対する表面積の比 (表面積/心耳容積) を算出した。また、心耳本体と櫛状筋部分を分離することにより、櫛状筋量を計測した。

## 【結果】

右心耳では隣接する橈状筋同士に交通が認められたのに対して、左心耳には交通がなかった。心耳容積は、右心耳が  $2685 \pm 1610 \text{ mm}^3$ 、左心耳が  $4375 \pm 2507 \text{ mm}^3$  で、右心耳が優位に小さく ( $p < 0.01$ )、正の相関が認められた ( $r=0.47$ )。neck 面積は、右心耳が  $425 \pm 313 \text{ mm}^2$ 、左心耳が  $238 \pm 145 \text{ mm}^2$  で、右心耳が優位に大きく ( $p < 0.01$ )、正の相関が認められた ( $r=0.63$ )。また neck 面積/心耳容積は、右心耳が  $0.016 \pm 0.005 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ 、左心耳が  $0.013 \pm 0.005 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  で、右心耳が優位に大きかった ( $p=0.02$ )。表面積/心耳容積は、右心耳が  $0.999 \pm 0.279 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ 、左心耳が  $1.283 \pm 0.295 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  で、右心耳で優位に小さかった ( $p < 0.01$ )。橈状筋量は、右心耳が  $444 \pm 166 \text{ mm}^3$ 、左心耳が  $514 \pm 217 \text{ mm}^3$  で、左心耳で優位に多く ( $p=0.02$ )、正の相関が認められた ( $r=0.62$ )。

## 【結論】

肉眼解剖所見と鋳型標本の3次元解析によって、両心耳の形態的特徴を比較した。その結果、両心耳には形態的な相違が認められた。右心耳は、左心耳に比べて血流が停滞しにくい構造を有しており、血栓が形成されにくい原因の一つであると考えられた。

# 論文審査の結果の要旨

## 【背景】

心房細動においては、心房収縮の減弱による血流停滞によって血栓が形成されることが知られている。しかし、左右の心房が同時に細動を起こしているにも関わらず、左心耳に血栓が形成されやすい理由は、明らかではない。また心房細動患者では、経食道心エコー所見において左心耳の拡張が報告され、血栓形成との関連が指摘されている (Subramaniam et al)。しかし、心耳の血液流入・流出に影響し血流停滞と関係が深いと考えられる心耳入口部 (以下、neck) の面積や心耳の容積などをエコーによって計測することは困難である。本研究の目的は、遺体を用いて両心耳の形態を3次元解析することである。

## 【対象と方法】

愛知医科大学医学部において研究に供された遺体34体 (男性11体、女性23体：平均死亡年齢  $84 \pm 8.4$  歳) から摘出した心耳について、肉眼的観察を行った後、シリコンを注入して鋳型標本作製した。標本をMD-CTで撮影して3次元画像を構築し、neck面積、心耳容積、表面積を計測した。さらに、心耳容積に対するneck面積の比 (neck面積/心耳容積) と心耳容積に対する表面積の比 (表面積/心耳容積) を算出した。また、心耳本体と橈状筋部分を分離することにより、橈状筋量を計測した。

## 【結果】

右心耳では隣接する橈状筋同士に交通が認められたのに対して、左心耳には交通がなかった。心耳容積は、右心耳が優位に小さく ( $p < 0.01$ )、正の相関が認められた ( $r=0.47$ )。

neck 面積は，右心耳が優位に大きく ( $p < 0.01$ )，正の相関が認められた ( $r=0.63$ )。また neck 面積／心耳容積は，右心耳が優位に大きかった ( $p=0.02$ )。表面積／心耳容積は，右心耳で優位に小さかった ( $p < 0.01$ )。橈状筋量は，左心耳で優位に多く ( $p=0.02$ )，正の相関が認められた ( $r=0.62$ )。

## 【結論】

肉眼解剖所見と鋳型標本の3次元解析によって，両心耳の形態的特徴を比較した。その結果，両心耳には形態的な相違が認められた。左心耳は，右心耳に比べて血流が停滞しやすい構造を有しており，血栓が形成されやすい原因の一つであると考えられた。

本論文は，肉眼解剖所見と鋳型標本の3次元解析によって，両心耳の形態的特徴を比較し，左心耳は，右心耳に比べて血流が停滞しやすい構造を有していることを明らかにしたものであり，臨床において左心房に比べて右心房に血栓が形成されやすい原因の一つ示したものであることから学位を授与するに値する論文であると判定した。

氏名	野 畑 宏 信 の ぼた ひろ のぶ
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第383号
学位授与年月日	平成29年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Hypocalcemia immediately after renal transplantation (腎移植直後の低カルシウム血症)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 孝 彰 教授 池 田 洋 教授 大 竹 千 生 教授 高 見 昭 良

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背景】

腎移植後には、副甲状腺機能亢進症の遷延などによって高Ca血症なると想定されるが、腎移植直後においては、一過性に低Ca血症となることがあり、その機序は知られていない。

### 【方法】

21名の血液型適合生体腎移植を受けた患者において、血清Ca, P, intact PTH, 1,25-dihydroxyvitamin D値, 血中タクロリムス濃度と、尿中CaとPの排泄量を、移植後3週間に経時的に測定した。移植後の免疫抑制剤は、副腎皮質ステロイド剤、カルシニューリン阻害薬(タクロリムス)、代謝拮抗薬の3剤併用である。

### 【結果】

血清Ca値は移植直後に有意に低下した。尿中Ca排泄量は、移植直後は増加していたが、次第に減少し、おおよそ1週間後に血清Ca値も正常範囲内へと上昇した。尿中Ca排泄量は、血清intact PTH値や血中タクロリムス濃度とは相関していなかった。

### 【考察】

本研究において、3つの主要な現象が観察された。1つ目は、腎移植直後には血清Ca値が低下すること。2つ目は、低Ca血症は尿中Ca排泄の亢進によって起きていること。3つ目は、尿中Ca排泄量は、移植前・移植後の血清intact PTH値や血清タクロリムス濃度とも相関していなかったことである。

腎移植後の尿中Ca排泄に関与する因子として、血中のintact PTH, vitamin D, FGF23といったホルモン、そしてカルシニューリン阻害薬やステロイドなどの薬剤の影響が考え

られる。

体重 60kg で血清 Ca 値が 9.0mg/dL, 尿中 Ca 排泄量が 100mg/日の場合を想定すると, 血清 Ca 値は 8.2mg/dL へと 8.9% の減少が推測される。腎移植術前の平均血清 Ca 値は 9.5mg/dL で, 移植直後の平均血清 Ca 値は 8.7mg/dL へと約 7.0% 低下していた。平均尿中 Ca 排泄量は 100mg/日であったことから推測値の大部分を占めており, 低 Ca 血症の主要な因子は尿中 Ca 排泄であると考えられた。尿中 Ca 排泄が相対的に増加し, Ca が負のバランスになっていることが証明された。

ステロイドが尿中 Ca 排泄を亢進させる機序として, 腎血流の増加によって Ca 排泄量が増加することや, Ca 再吸収を阻害することが過去に報告されている。

### **【結論】**

腎移植直後には, 血清 intact PTH 値や血中タクロリムス濃度とは相関せずに, 一過性に尿中 Ca 排泄が亢進することで, 低 Ca 血症が起きる。この不適切な尿中 Ca 排泄の原因の一つとして副腎皮質ステロイド剤が関与していると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

### **【背景】**

腎移植後には, 副甲状腺機能亢進症の遷延などによって高 Ca 血症なると想定されるが, 腎移植直後においては, 一過性に低 Ca 血症となることがあり, その機序は知られていない。

### **【方法】**

21 名の血液型適合生体腎移植を受けた患者において, 血清 Ca, P, intact PTH, 1,25-dihydroxyvitamin D 値, 血中タクロリムス濃度と, 尿中 Ca と P の排泄量を, 移植後 3 週間に経時的に測定した。移植後の免疫抑制剤は, 副腎皮質ステロイド剤, カルシニューリン阻害薬 (タクロリムス), 代謝拮抗薬の 3 剤併用である。

### **【結果】**

血清 Ca 値は移植直後に有意に低下した。尿中 Ca 排泄量は, 移植直後は増加していたが, 次第に減少し, おおよそ 1 週間後に血清 Ca 値も正常範囲内へと上昇した。尿中 Ca 排泄量は, 血清 intact PTH 値や血中タクロリムス濃度とは相関していなかった。

### **【考察】**

本研究において, 3 つの主要な現象が観察された。1 つ目は, 腎移植直後には血清 Ca 値が低下すること。2 つ目は, 低 Ca 血症は尿中 Ca 排泄の亢進によって起きていること。3 つ目は, 尿中 Ca 排泄量は, 移植前・移植後の血清 intact PTH 値や血清タクロリムス濃度とも相関していなかったことである。腎移植後の尿中 Ca 排泄に関与する因子として, 血中の intact PTH, vitamin D, FGF23 といったホルモン, そしてカルシニューリン阻害薬やステロイドなどの薬剤の影響が考えられる。

体重 60kg で血清 Ca 値が 9.0mg/dL, 尿中 Ca 排泄量が 100mg/日の場合を想定すると, 血清 Ca 値は 8.2mg/dL へと 8.9% の減少が推測される。腎移植術前の平均血清 Ca 値は 9.5mg/dL で, 移植直後の平均血清 Ca 値は 8.7mg/dL へと約 7.0% 低下していた。平均尿中 Ca 排泄量は 100mg/日であったことから推測値の大部分を占めており, 低 Ca 血症の主要な因子は尿中 Ca 排泄であると考えられた。尿中 Ca 排泄が相対的に増加し, Ca が負のバランスになっていることが証明された。

ステロイドが尿中 Ca 排泄を亢進させる機序として, 腎血流の増加によって Ca 排泄量が増加することや, Ca 再吸収を阻害することが過去に報告されている。

### **【結論】**

腎移植直後には, 血清 intact PTH 値や血中タクロリムス濃度とは相関せずに, 一過性に尿中 Ca 排泄が亢進することで, 低 Ca 血症が起きる。この不適切な尿中 Ca 排泄の原因の一つとして副腎皮質ステロイド剤が関与していると考えられた。

本研究によって, 腎移植直後には尿中 Ca 排泄亢進による低 Ca 血症が起きうるということが明らかにされ, グルココルチコイドの作用がその原因として示唆された。本研究で得られた知見は, 臨床腎移植における周術期の患者管理に重要な情報を提供すると考えられる。よって, 学位を授与するに値するものと判断した。



博 士 学 位 論 文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第 34 集

平成 29 年 6 月

発行年月日 平成 29 年 6 月 20 日

発 行 愛 知 医 科 大 学

連 絡 先 〒480-1195

愛知県長久手市岩作雁又 1 番地 1

愛知医科大学医学部事務部庶務課

電話 (0561) 61-5396 (ダイヤルイン)