

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

及 び

審 査 の 結 果 の 要 旨

第 30 集

平成25年 6 月

愛 知 医 科 大 学

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

及 び

審 査 の 結 果 の 要 旨

第 30 集

平成25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24年4月から平成25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 目	頁
〔1〕	甲第393号	赤 尾 真知子	変形性膝関節症における薬物治療の効果と疼痛・炎症関連因子	… 1
〔2〕	甲第394号	菅 憲 広	Differential diagnosis of localized and systemic amyloidosis based on coagulation and fibrinolysis parameters (凝固線溶系マーカーを用いた全身性アミロイドーシスと限局性アミロイドーシスの鑑別)	… 4
〔3〕	甲第395号	長 岡 史 晃	Visual detection of filaria-specific IgG4 in urine using red-colored high density latex beads (赤色高比重ラテックスビーズを用いたフィラリア特異的尿中IgG4抗体の目視判定法)	… 7
〔4〕	甲第396号	大 木 恵美子	Relationship between the clinical efficacy and AUC/MIC of intravenous ciprofloxacin in Japanese patients with intra-abdominal infections (日本人腹腔内感染症患者における注射用シプロフロキサシンの臨床効果とAUC/MIC値の関係)	… 9
〔5〕	甲第397号	木 村 千 晴	The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset preeclamptic women and fetal growth restriction (早発型妊娠高血圧症候群妊婦の胎盤における低酸素変化と酸化的DNA障害の重症度と胎児発育遅延)	… 13

掲載順位	学位授与番号	氏 名	論 文 題 目	頁
[6]	甲第398号	高 橋 美裕希	Arsenic trioxide prevents nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 by inhibiting a TRIF-dependent pathway (三酸化ヒ素はTRIF依存性経路を阻害することによりLPS刺激後のRAW264.7からのNO産生を抑制する)	… 17
[7]	甲第399号	恒 川 幸 司	Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 (WDR35) stimulated by domoic acid in rat hippocampus: involvement of reactive oxygen species generation and p38 mitogen-activated protein kinase activation (ドウモイ酸投与ラットの海馬におけるWD repeat-containing protein 35 (WDR35) の発現増強: 活性酸素の産生およびp38MAPKの活性化との関連)	… 20
[8]	甲第400号	西 川 源 也	Prostatic penetration of meropenem in humans, and dosage considerations for prostatitis based on a site-specific pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation (ヒト前立腺組織におけるmeropenem移行性の検討および部位特異的薬物動態/薬力学に基づいた前立腺炎に対するmeropenem投与法の評価)	… 23

掲載順位	学位授与番号	氏名	論文題目	頁
[9]	甲第401号	間瀬 明人	Active ingredients of traditional Japanese (kampo) medicine, inchinkoto, in murine concanavalin A-induced hepatitis (漢方薬インチンコウ湯 (ICKT) のコンカナバリンA惹起マウス肝炎モデルにおける抑制作用：活性成分の同定とその薬理学的作用機序の研究)	… 26
[10]	甲第402号	森本 温子	Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats (トレッドミル運動およびスタティックストレッチはラットのギプス固定後に長期に続く痛覚過敏および関節可動域制限, 筋萎縮を改善した)	… 29
[11]	甲第403号	Md. Abedul Haque	An ADP ribosylation factor-GTPase activating protein negatively regulates the production of proinflammatory mediators in response to lipopolysaccharide (ADPリボシル化因子GTPアーゼ活性化タンパクはリポ多糖体応答における炎症性メディエーター産生を負の制御をする)	… 32
[12]	甲第404号	片平 信行	Diluted gadoteridol (ProHance™) causes mild ototoxicity in cochlear outer hair cells (希釈したガドテリドール (プロハンス®) は蝸牛外有毛細胞にマイルドな耳毒性を引き起こす)	… 35

掲載順位	学位授与番号	氏名	論文題目	頁
[13]	甲第405号	土屋吉正	機能性p16ペプチドを用いた頭頸部扁平上皮がんに対する細胞内分子標的治療法の検討	… 38
[14]	甲第406号	山田朋美	小児リンパ性白血病におけるIg/TCR遺伝子再構成のパターンとRQ-PCRによるMRD定量への適応性	… 41
[15]	甲第407号	加藤隆寛	Recombinant human soluble thrombomodulin administration improves sepsis-induced disseminated intravascular coagulation and mortality:a retrospective cohort study (リコンビナントトロンボモジュリン投与は敗血症における播種性血管内凝固症候群および死亡率を改善する：後方視的コホート研究)	… 44
[16]	甲第408号	原戸美佐子	Bupivacaine-induced apoptosis independently of WDR35 expression in mouse neuroblastoma Neuro2a cells (マウス神経芽細胞腫Neuro2a細胞におけるブピバカインによって誘導されたアポトーシスとWDR35の発現について)	… 47
[17]	甲第409号	一ノ橋祐子	Dexamethasone administration to the neonatal rat results in neurological dysfunction at the juvenile stage even at low doses (生後早期ラットへのデキサメサゾン投与が少量でも長期的に神経発達障害をもたらす)	… 50

掲載順位	学位授与番号	氏名	論文題目	頁
[18]	乙第347号	小林 佑次	Serum Tumor Antigen REG4 as a Useful Diagnostic Biomarker in Gastric Cancer (胃癌のスクリーニング検査としての新規血清マーカー REG4の臨床的有用性の検討)	… 53
[19]	乙第348号	土方 康孝	Endoscopic Submucosal Dissection with Sheath-Assisted Counter Traction Using a Novel Sheath for Early Gastric Cancers (薬品加工シースを用いたシースアシスト法による早期胃癌ESDの有用性)	… 56
[20]	乙第349号	安藤 景一	Laparoscopic Surgery in the Management of Hypersplenism and Esophagogastric Varices: Our Initial Experiences (脾機能亢進症と食道胃静脈瘤の腹腔鏡下手術操作～我々の初期の経験～)	… 59
[21]	乙第350号	吉田 美和	Loss of heterozygosity on chromosome 16q suggests malignancy in core needle biopsy specimens of intraductal papillary breast lesions (Core needle biopsy (CNB) 検体における16qLOH解析を応用した乳管内乳頭状病変の良悪性の鑑別)	… 62
[22]	乙第351号	松浦 雅代	Prolongation of QT Interval Induced by Electroconvulsive Therapy is Attenuated by Landiolol (ECTにより引き起こされたQT間隔の延長は塩酸ランジオロールにより減弱する)	… 65

掲載順位	学位授与番号	氏名	論文題目	頁
[23]	乙第352号	徳留 健太郎	Efficacy of endoluminal gastroplication in Japanese patients with proton pump inhibitor-resistant, non-erosive esophagitis (日本人におけるプロトンポンプインヒビター抵抗性非びらん性胃食道逆流症に対する内視鏡的噴門縫縮術の有用性に関する研究)	… 68

氏 名	赤尾真知子 <small>あか お まちこ</small>
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第393号
学位授与年月日	平成24年5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	変形性膝関節症における薬物治療の効果と疼痛・炎症関連因子
論文審査委員	(主査) 教授 佐藤 啓二 教授 岡田 尚志郎 教授 藤原 祥裕 教授 横尾 和久

学位論文内容の要旨

【緒言】

変形性膝関節症は、関節疾患の中でも発生頻度が高く中高年に多く認められる、関節軟骨の変性・消失を特徴とする慢性の関節炎を伴う疾患である。この関節軟骨の変性・消失には炎症性サイトカインやそれらに誘導されたタンパク分解酵素が関与しているとされ、近年これらをターゲットとした病態の解明や有効な治療法の研究が進められている。

本研究は、変形性膝関節症の疼痛治療にワクシニアウイルス接種家兎炎症皮膚抽出液(以下ノイロトロピン[®]=NTP)を使用し、関節水症が改善するという臨床経験に基づき、NTP投与群とロキソプロフェン(以下LOX)投与群と比較することで、変形性膝関節症の症状と炎症関連因子の関係および薬剤投与による炎症抑制効果の有用性を究明することである。

【対象・方法】

対象は変形性膝関節症と診断され、関節水症を伴う症例を対象とした。外来診療においてインフォームドコンセントが得られた症例に対し、無作為にNTPあるいはLOXを投与し、関節液が得られた症例を抽出した。NTP投与群はNTP 1日4錠(1錠4ノイロトロピン単位)を朝夕食後2錠ずつ、LOX投与群はLOX 1日3錠(1錠60mg)を毎食後1錠ずつそれぞれ4週間内服投与した。研究に供した症例の内訳は、NTP投与群19例(男性10例、女性9例)、平均年齢71.4歳(60～89歳)、LOX投与群5例(男性3例、女性2例)、平均年齢69.7歳(54～73歳)で、年齢、性別において群間差はなかった。投与前・投与後2週・投与後4週に問診及び関節穿刺を行い、各時点でのVAS score、

穿刺関節液量、炎症関連因子を測定した。炎症関連因子は、炎症促進因子として interleukin (以下IL) -6, matrix metalloproteinase (以下MMP) -1, MMP-3, TNF- α , 炎症抑制因子としてIL-10, IL-13, IL-4, tissue inhibitor of metalloproteinase (以下TIMP) -1, TIMP-2について、ELISA法を用いて吸光度を測定した。

【結果・考察】

関節液量とVAS scoreの間に相関性は認めなかった。VAS scoreおよび関節液量と相関関係を示した炎症関連因子はIL-6, TIMP-1であった。また薬剤投与による吸光度の変化では、LOX投与群のみで投与後2週4週ともIL-6が有意に低下していた。NTP投与群ではすべての炎症関連因子において薬剤投与期間による変化に有意差は認めなかった。薬剤投与期間による関節液量の変化はNTP投与群、LOX投与群ともに有意差は認めなかった。薬剤投与期間とVAS scoreの変化では、投与後4週のNTP群のみに有意差が認められた。投与前に対する投与後のADLの変化は、LOX投与群は活動量、階段昇降ともに100%改善し、NTP投与群は活動量58%、階段昇降46%で改善を認めた。

VAS score および関節液量と関節腔内のIL-6, TIMP-1が相関することから、IL-6, TIMP-1は、変形性膝関節症の症状を反映する可能性が示唆された。またLOX投与群でのみIL-6の有意な低下を認めており、炎症抑制効果はLOX投与群の方が高いと考える。しかしながらNTP投与群においてVAS scoreの改善が認められていることから、NTP投与群においても何等かの神経薬理学的作用が推察された。

【結語】

関節水症を伴う変形性膝関節症に対するNTPの効果とLOXと比較検討した。関節腔内のIL-6, TIMP-1の濃度は変形性膝関節症の症状を反映する可能性が示唆された。LOX投与群にIL-6の有意な低下が認められた。NTP投与群にVAS scoreの有意な改善が認められた。炎症関連因子の変化は認めなかったが、NTPには何らかの抗炎症作用が期待できると考えた。

論文審査の結果の要旨

変形性膝関節症の発症要因は、軟骨細胞壊死・軟骨組織欠損による軟骨組織の荷重分散機構が破綻し、軟骨下骨への過負荷が生じる事、関節不安定性に基づく関節包・滑膜組織の伸張等が考えられている。しかし詳細な病態解明は十分でなく治療法の選択についてもさらなる研究が必要である。

本研究は、臨床効果の明らかな2剤、NSAIDsであるロキソプロフェンナトリウム(LOX)とワクシニアウイルス接種家兎炎症皮膚抽出液(NTP)を、関節水症を伴った変形性膝関節症患者に投与し、関節液量、炎症関連因子、ADL評価、VAS scoreの経時の変化を検討して、病態解明と適切な治療法選択に結び付けようとするものである。

対象はNTP群19例（男性10例，女性9例）平均年齢71.4歳，NTP 2錠を朝夕投与，LOX群5例（男性3例，女性2例）平均年齢69.7歳，毎食後1錠服用とした。両群とも投与前，投与2週後，4週後に同一側膝関節液を採取し，IL-4，-6，-10，-13，MMP-1，MMP-3，TIMP-1，TIMP-2，TNF- α につき，R&D社製Human ELISA Kitを用いて，吸光度測定を行い，基準値を定めた上で，変化率を算出した。変形性膝関節症治療成績判定基準に基づき，日常生活活動量と階段昇降動作を改善・不変・増悪の3段階で評価すると共に，VASスコア評価を行った。

投与前では，VASスコアとIL-6 ($r=0.510$)，TIMP-1 ($r=0.372$)，関節液量とIL-6 ($r=0.299$)，TIMP-1 ($r=0.369$) がそれぞれ相関を示したが，関節液量とVASスコアは相関を示さなかった。経時的变化に関し，LOX群では炎症関連因子の中でIL-6の相対的濃度が投与後2週4週で有意に低下 ($p=0.0001$) した。NTP群はIL-6についても有意差を認めなかった。一方NTP群では投与4週後のVASスコアが有意に改善 ($p=0.03$) したが，LOX群では有意な変化を認めなかった。VASスコアの改善率30%以上と以下の2群で検討したが，IL-6，TIMP-1においては，両群とも有意な変化を認めなかった。関節液量については，両群とも有意な経時的变化を示さなかった。ADL評価に関し，LOX群で活動量・階段昇降動作ともに100%改善を示したが，NTP群は活動量58%，階段昇降動作46%の改善に留まった。

LOXにより関節液中の起炎物質であるIL-6とTIMP-1が有意に減少した事より，急性炎症が抑制された結果，関節液量に関係なくADLが改善する結果を示した。NTPは急性炎症を抑制する経路ではなく，下行性疼痛抑制系神経の賦活化により疼痛の二次神経への伝達を抑制する作用により，VASスコアの改善を示した可能性がある。

本研究結果は，関節水症を伴った変形性膝関節症について，IL-6，TIMP-1に示される急性炎症が主要な病態である事，関節液量とは無関係に炎症関連因子濃度を低下させる事により十分なADLの改善が得られる事，中枢神経由来の疼痛抑制回路を賦活化させる事により，VASスコアの改善が得られる事を示した。変形性膝関節症の病態解明と適切な治療方法選択に新しい知見を与え，学位を授与するに値する論文であると判定した。

氏 名	菅 憲 広
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第394号
学位授与年月日	平成24年 6 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	Differential diagnosis of localized and systemic amyloidosis based on coagulation and fibrinolysis parameters (凝固線溶系マーカーを用いた全身性アミロイドーシスと限局性アミロイドーシスの鑑別)
論文審査委員	(主査) 教授 今 井 裕 一 教授 岡 田 忠 教授 仁 田 正 和 教授 道 勇 学

学位論文内容の要旨

【背景】

アミロイドーシスは、線維構造を有するアミロイド蛋白が沈着することによって臓器障害を引き起こす疾患群である。それらは、全身諸臓器にアミロイドが沈着する全身性アミロイドーシスと、1臓器に限局した沈着を示す限局性アミロイドーシスとに分類される。さらに前駆蛋白による分類もなされている。限局性アミロイドーシスでは全身性に移行する頻度も4%と極めて低く、生命予後も良好である。一方、全身性では進行性であり治療が必要となる。限局性アミロイドーシスと全身性アミロイドーシスの鑑別が簡単にできれば、無用な検査を重ねる必要がなくなり、臨床上非常に有用である。これまで全身性アミロイドーシスにおいて、線溶系異常による出血傾向や全身性AL型アミロイドーシスではプラスミン- α 2プラスミンインヒビター複合体(以下PIC)が上昇することが報告されている。そこで今回、凝固線溶系検査により限局性アミロイドーシスと全身性アミロイドーシスを鑑別できるかどうかを検討した。

【方法】

2009年4月から2011年3月まで愛知医科大学病院に入院したアミロイドーシス患者36名中、深部静脈血栓症などの凝固線溶異常となる病態を認めない21名を対象とした。活動性の全身性アミロイドーシス(A群;9名)、完全寛解した全身性アミロイドーシス(B群;6名)、限局性アミロイドーシス(C群;6名)、単クローン性ガンマグロブリン血

症（D群；5名）、蛋白尿を伴った慢性糸球体腎炎（E群；22名）、完全寛解した慢性糸球体腎炎（F群；11名）において凝固線溶系検査を施行した。

【結果】

PT-INR, APTT, ATⅢ, プラスミノーゲンに関しては、A群と他の群間において有意差を認めなかった。Thrombin-antithrombin complexes (TAT), フィブリノーゲン, FDP-Dダイマー, PICの各値はA群において有意に上昇していた。TAT値 >4.2 ng/mL, フィブリノーゲン値 >399 mg/dL, PIC値 >1.4 μ g/mLでは、全例A群であった。一方、限局性アミロイドーシス（C群）の全ての患者において、TAT値は3.6 ng/mL, フィブリノーゲン値は355 mg/dL, PIC値は0.9 μ g/mLより低い値を示した。

【考察】

全身性アミロイドーシス（A群）と蛋白尿を伴った慢性糸球体腎炎（E群）と比較しても、ATⅢに有意な差はないことから、全身性アミロイドーシス（A群）でTAT値やフィブリノーゲン値が上昇している原因は、ネフローゼ症候群によるものではなく全身性アミロイドーシスに起因するものと考えられた。寛解したB群において、PIC値やTAT値, フィブリノーゲン値が正常化していることからTAT値, フィブリノーゲン値, PIC値は治療の評価にも使用できる可能性がある。

【結論】

TAT値, フィブリノーゲン値, PIC値により、限局性アミロイドーシスと全身性アミロイドーシスを鑑別することが可能である。活動性（進行性）全身性アミロイドーシスでは、凝固と線溶が同時に亢進していることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、原因不明の難病であるアミロイドーシスにおける凝固・線溶系に関する臨床研究である。

アミロイドーシスは、前駆蛋白質の β シート構造部分が結合し線維を形成し、組織に沈着する疾患である。現在、前駆蛋白質の種類により約20種類に分類されている。また、沈着臓器が1つのものを限局性、2臓器以上に及ぶものを全身性と定義している。限局性ではわずか数%しか全身性に進行しないこと、一方、全身性の予後は数年ときわめて不良であり、両者を簡単に区別できる方法が必要である。全身性アミロイドーシスでは、出血傾向や凝固異常が生じることが報告されてきている。今回、全身性と限局性の鑑別に凝固・線溶系マーカーが有用かどうかを明らかにするために研究を行なった。

【目的】

全身性と限局性の鑑別に凝固・線溶系マーカーが有用かどうか明らかにする。

【対象と方法】

2009年4月から2011年3月まで愛知医科大学病院に入院したアミロイドーシス患者36名中、深部静脈血栓症などの凝固線溶異常となる病態は認めない21名を対象とした。活動性の全身性アミロイドーシス（A群；9名）、完全寛解した全身性アミロイドーシス（B群；6名）、限局性アミロイドーシス（C群；6名）、単クローン性ガンマグロブリン血症（D群；5名）、蛋白尿を伴った慢性糸球体腎炎（E群；22名）、完全寛解した慢性糸球体腎炎（F群；11名）に対して凝固線溶系検査を施行した。

【結果】

A群と他の群間において、PT-INR, APTT, AT-Ⅲ, プラスミノーゲンの有意な差を認めなかった。Thrombin-antithrombin complexes (TAT) やフィブリノーゲン, FDP-Dダイマー, PICの各値はA群において有意に上昇していた。A群の全ての患者において、TAT値は4.2 ng/mL, フィブリノーゲン値は399 mg/dL, PIC値は1.4 μ g/mLよりも大きい値を示した。限局性アミロイドーシス（C群）の全ての患者において、TAT値は3.6 ng/mL, フィブリノーゲン値は355 mg/dL, PIC値は0.9 μ g/mLより低い値を示した。

【考察】

全身性アミロイドーシス（A群）で蛋白尿を伴った慢性糸球体腎炎（E群）と比べ、AT-Ⅲに有意な差はなく、TAT値やフィブリノーゲン値は高いのは、ネフローゼではなく全身性アミロイドーシスの影響と考えられた。寛解したB群において、PIC値やTAT値、フィブリノーゲン値が低下していることから、これらの数値は治療評価にも使用できる可能性がある。

【結論】

TAT値、フィブリノーゲン値、PIC値を使って、限局性アミロイドーシスと全身性アミロイドーシスを鑑別することができる。

本研究により、（進行性）全身性アミロイドーシスでは、TAT値、フィブリノーゲン値の有意な上昇があり凝固系が亢進していることと、PIC値の有意な上昇を認め線溶系も同時に亢進していることが明らかになった。TAT値、フィブリノーゲン値、PIC値は限局性と全身性の鑑別に有用であることが明らかになった。今後の臨床研究に大きく寄与するものがあり、学位授与に値する論文であると判断した。

氏 名	なが おか ふみ あき 長 岡 史 晃
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第395号
学位授与年月日	平成24年12月27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	Visual detection of filaria-specific IgG4 in urine using red-colored high density latex beads (赤色高比重ラテックスビーズを用いたフィラリア特異的尿中IgG4抗体の目視判定法)
論文審査委員	(主査) 教授 横 地 高 志 教授 池 田 洋 教授 菊 地 正 悟 教授 米 田 政 志

学位論文内容の要旨

リンパ系フィラリア症 (lymphatic filariasis : LF) は蚊によって媒介される寄生虫疾患で、1億人を超える患者がいると推定される。現在WHOが中心となり流行地域住民を対象とした薬剤集団投与による世界規模の征圧計画が進行中である。

LFの診断には、一般的に末梢血中のミクロフィラリア (mf) の検出や、免疫クロマトグラフィーテスト (ICT) 診断キットによる血中のフィラリア由来抗原の検出法が用いられている。mf検出法は夜間に採取した血液が必要であり、検出率も低い。その点ICT診断キットは昼間に採った血液でも短時間で感度良く感染の有無を判定できる。しかし、いずれの方法も血液検体を必要とするため検体採取に困難を伴う。

そこで血中抗原を検出する代わりに、尿中の抗フィラリア特異抗体を検出する酵素抗体法 (ELISA) が開発された。尿ELISA法は感度も高く、多数の検体を処理でき、大変有用であるが、測定にプレートリーダーが必要となるため、設備の整っていない途上国では実施できないという欠点があった。そこで、我々は赤色高比重ラテックスビーズを用い、目視にて判定が可能な尿中抗フィラリアIgG4抗体測定法 (ビーズ法) を開発し、LF流行地からの尿検体を用いて、この方法の有用性を検討した。

尿中検出抗体として、フィラリア感染に特に上昇するIgG4特異抗体を検出する凝集反応を作製した。マウス抗ヒトIgG4抗体を吸着させた96穴丸底プラスチックプレートに、尿検体を加え、さらに、フィラリア由来蛋白抗原を結合したビーズを加え、そのビーズの凝集により陽性陰性を判定した。測定結果は、バングラデシュのLF流行地で得られ

た血中抗原とmfが共に陽性であった住民の尿31検体のうち29検体(93.5%)がビーズ法による目視判定で陽性となった。また、血中抗原が陽性でmf陰性者の尿74検体では59検体(79.7%)が陽性であった。同様にLF流行地のスリランカから得られた血中抗原陽性者尿51検体では48検体(94.1%)が陽性であった。ELISA法にて尿中抗体陽性者の尿194検体中、169検体(87.1%)が陽性となった。他方、日本とバングラデシュのLF非流行地域で採取した尿を用いた場合、それぞれ130検体、104検体すべてが陰性となった。またスリランカのLF流行地域で得られた他の検査法(血中フィラリア由来抗原と尿ELISA)陰性者の尿検体では1,066検体中1,030検体(96.6%)が本法で陰性となった。以上の結果よりビーズ法は感度、特異度ともに血中抗原検出法やmf検出法より優れており、尿中ELISA法にほぼ匹敵する感度をもつことが明らかとなった。

尿検体は非侵襲的に採取できるため、無症状の流行地域住民に受け入れられやすく、疫学調査をおこなう上では大きな利点を持つ。また、感度も高く、特異性にも優れ、装置も必要とせず、多数の検体処理も可能であり、LF診断方法として有用と考えられた。

論文審査の結果の要旨

リンパ系フィラリア症の診断には一般的に末梢血中のマイクロフィラリアの検出や血中フィラリア抗原の検出が用いられている。しかしながら、いずれの方法も血液検体を必要とするため、その診断に困難を伴う。

本論文は、リコンビナントフィラリア抗原を吸着させた高比重ラテックスビーズを用いて尿中の特異抗体を検出する方法を新たに開発し、その有効性を検討したものである。本方法は血中抗原陽性者尿の90%以上に特異抗体を検出した。また、リンパ系フィラリア非流行地域の尿はすべて陰性であった。

以上のことから、フィラリア抗原を吸着させた高比重ラテックスビーズを用いた尿中特異抗体検出法がリンパ系フィラリア症の診断に十分な感度と特異性をもち、多数の検体を同時に処理することに優れ、特別な装置を必要としない簡便な測定法であることが明らかとなった。本論文は、リンパ系フィラリア症の疫学調査などに極めて有効な尿中特異抗体検出法を新たに確立したことから、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	おお き えみ こ 大 木 恵美子
学位の種類	博 士 (医 学)
学位授与番号	甲 第396号
学位授与年月日	平成25年 3 月 2 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	Relationship between the clinical efficacy and AUC/MIC of intravenous ciprofloxacin in Japanese patients with intra-abdominal infections (日本人腹腔内感染症患者における注射用シプロフロキサシンの臨床効果とAUC/MIC値の関係)
論文審査委員	(主査) 教授 三 鴨 廣 繁 教授 横 地 高 志 教授 松 浦 克 彦 教授 住 友 誠

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【背景】

医療施設における耐性菌をコントロールする具体的な方策の一つとして、pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) ならびにantibiotic heterogeneityを考慮した抗菌薬の使用が有用であることが報告されている。注射用 β -ラクタム系薬は、有効性のみならず安全性の観点からも使いやすいため歴史的に従来から汎用されてきたが、antibiotic heterogeneityを考慮した場合、注射用 β -ラクタム系薬の代替薬として注射用キノロン系薬を上手に使用することも重要である。一方、キノロン系薬の効果を予測するPK-PDパラメータとしてAUC/MIC値が有用であることが確認されている。したがって、臨床的ブレイクポイントとして目標AUC/MIC値の設定が期待されてきた。キノロン系薬の目標AUC/MIC値は病態や原因菌により異なると考えられており、これまで呼吸器感染症についての検討が基礎的・臨床的に進められてきた。しかし、注射用キノロン薬は緑膿菌などのグラム陰性感染が原因となる外科系感染症、特に、腹膜炎患者が良い対象疾患となることから対象とした腹膜炎患者における目標AUC/MIC値を設定するべく、代表的な注射用キノロン薬であるシプロフロキサシン (CPFX) について検討を実施した。

【目的】

腹膜炎患者における注射用CPFXの体内動態および臨床効果を確認し、腹膜炎患者に

におけるCPFEXの目標AUC/MIC値を設定することを目標とした。

【方法】

1次性および2次性腹膜炎の患者16例〔平均年齢：60.3歳（範囲46～72歳）〕を対象として、注射用CPFEX、1回300mgを1日2回、7日間点滴静注した。CPFEX投与前、CPFEX初回投与1時間後、5回目のCPFEX投与2時間後および5時間後に血液を採取し、バイオアッセイ法にてCPFEX濃度を測定した。PK-PDパラメータAUC₀₋₂₄値は、ノンコンパートメント解析により算出した。一方、CPFEX投与前に腹水を採取し、腹膜炎の原因菌を同定し、原因菌に対するCPFEXの最小発育阻止濃度（MIC値）を測定した。CPFEXの臨床効果は、CPFEX投与7日後の臨床症状から有効、無効（Responder, Non-Responder）を判定した。

【結果】

CPFEXを7日間投与時の有効率（Responder）は56%（9/16例）であった。Responder（9例）のAUC₀₋₂₄/MIC値は95.3～3628.4（geometric mean：521.6）、Non-Responder（7例）は7.0～45.2（geometric mean：16.5）であり両群間に統計学的な有意差が認められた（ $p=0.0001$ by Mann-Whitney U test）。

【考察】

今回の検討でCPFEXのResponderのAUC₀₋₂₄/MIC値は95以上、Non-Responderは45以下であったことより、腹膜炎を対象としたCPFEX投与時の目標AUC/MIC値は45～95であると推定された。

【研究の意義】

本研究は、腹膜炎患者におけるCPFEXの目標AUC/MIC値を検討した世界初のプロスペクティブ研究である。本試験で検討したCPFEXの目標AUC/MIC値は、腹膜炎患者に対して注射用キノロン薬を使用する際の重要な指標となると考えられる。さらに、腹膜炎患者に対しては、カルバペネム系薬が使用される傾向が強い中、antibiotic heterogeneityを考慮した抗菌薬の使用を目指してキノロン系薬を推奨する上でも重要なエビデンスになると考えられる。また、キノロン耐性菌の増加が臨床的な問題になりつつある現状を考慮すると、PK-PDを考慮した抗菌薬の使用を促進することは薬剤耐性菌抑制に繋がるため、本研究の成果は薬剤耐性菌制御にも貢献するものと考えられる。以上より、本研究の成果は、耐性菌時代における抗菌化学療法のあり方を考える上で医療の質の向上に少なからず貢献するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

【背景】

医療施設における耐性菌をコントロールする具体的な方策の一つとして、

pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK-PD) ならびにantibiotic heterogeneityを考慮した抗菌薬の使用が有用であることが報告されている。注射用 β -ラクタム系薬は、有効性のみならず安全性の観点からも使いやすいため歴史的に従来から汎用されてきたが、antibiotic heterogeneityを考慮した場合、注射用 β -ラクタム系薬の代替薬として注射用キノロン系薬を上手に使用することも重要である。一方、キノロン系薬の効果を予測するPK-PDパラメータとしてAUC/MIC値が有用であることが確認されている。したがって、臨床的ブレイクポイントとして目標AUC/MIC値の設定が期待されてきた。キノロン系薬の目標AUC/MIC値は病態や原因菌により異なると考えられており、これまで呼吸器感染症についての検討が基礎的・臨床的に進められてきた。しかし、注射用キノロン薬は緑膿菌などのグラム陰性感染が原因となる外科系感染症、特に、腹膜炎患者が良い対象疾患となることから対象とした腹膜炎患者における目標AUC/MIC値を設定するべく、代表的な注射用キノロン薬であるシプロフロキサシン (CPF_X) について検討を実施した。

【目的】

腹膜炎患者における注射用CPF_Xの体内動態および臨床効果を確認し、腹膜炎患者におけるCPF_Xの目標AUC/MIC値を設定することを目標とした。

【方法】

1 次性および2 次性腹膜炎の患者16例〔平均年齢：60.3歳（範囲46～72歳）〕を対象として、注射用CPF_X、1回300mgを1日2回、7日間点滴静注した。CPF_X投与前、CPF_X初回投与1時間後、5回目のCPF_X投与2時間後および5時間後に血液を採取し、バイオアッセイ法にてCPF_X濃度を測定した。PK-PDパラメータAUC₀₋₂₄値は、ノンコンパートメント解析により算出した。一方、CPF_X投与前に腹水を採取し、腹膜炎の原因菌を同定し、原因菌に対するCPF_Xの最小発育阻止濃度（MIC値）を測定した。CPF_Xの臨床効果は、CPF_X投与7日後の臨床症状から有効、無効（Responder, Non-Responder）を判定した。

【結果】

CPF_Xを7日間投与時の有効率（Responder）は56%（9/16例）であった。Responder（9例）のAUC₀₋₂₄/MIC値は95.3～3628.4（geometric mean：521.6）、Non-Responder（7例）は7.0～45.2（geometric mean：16.5）であり両群間に統計学的な有意差が認められた（ $p=0.0001$ by Mann-Whitney U test）。

【考察】

今回の検討でCPF_XのResponderのAUC₀₋₂₄/MIC値は95以上、Non-Responderは45以下であったことより、腹膜炎を対象としたCPF_X投与時の目標AUC/MIC値は45～95であると推定された。

本論文は、耐性菌時代における抗菌化学療法のあり方を考える上で医療の質の向上に少なからず貢献するものと考えため、学位を授与するのに相応しい論文であると判断した。

氏 名	木 村 千 晴
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第397号
学位授与年月日	平成25年3月2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 severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset preeclamptic women and fetal growth restriction (早発型妊娠高血圧症候群妊婦の胎盤における低酸素変化と酸化的DNA障害の重症度と胎児発育遅延)
論文審査委員	(主査) 教授 若 槻 明 彦 教授 天 野 哲 也 教授 住 友 誠 教授 牛 田 享 宏

学位論文内容の要旨

【目的】

妊娠高血圧症候群 (PIH) は、妊娠20週以降、分娩後12週まで高血圧 (BP140/90mmHg以上) が認められる、または、高血圧に蛋白尿を伴う疾患である。我々はこれまで、PIH妊婦において、活性酸素の産生が増加することにより酸化ストレスが亢進し、PIHの基本病態である血管内皮機能障害の原因となり、血圧上昇などが発症することを報告してきた。一方、PIHにはしばしば胎児発育遅延 (FGR) を合併することから、PIH妊婦で起こる酸化ストレスの亢進は、二次的に胎児、胎盤系にも影響をおよぼしている可能性がある。特に、早発型PIH (妊娠32週以前に発症するPIH) 妊婦は遅発型PIH (妊娠32週以降に発症するPIH) 妊婦と比較し、FGRを合併する頻度が高いことから、酸化ストレスによる高度の胎盤の血流や組織障害をきたしている可能性が考えられるが、現在詳細な報告はされていない。そこで今回、酸化ストレスによる早発型PIH妊婦の胎盤における血流や組織障害を検討する目的で、胎盤における低酸素性変化と酸化的DNA障害の重症度とFGRとの関連性について、正常妊婦、遅発型PIH妊婦と比較検討した。

【方法】

2010年4月から2012年3月までに、患者の同意を得た、陣痛発来以前に帝王切開術を施行した正常妊婦 (正常群) 10例と、早発型PIH妊婦 (早発型PIH群) 13例、遅発型PIH妊婦 (遅発型PIH群) 12例を対象とした。

- (1) 分娩前の母体血中活性酸素代謝物 (d-ROMs) を測定した。
- (2) 分娩時の臍帯動脈血中d-ROMsおよびpHを測定した。
- (3) 胎盤絨毛組織での酸化的DNA障害の指標として、胎盤絨毛組織のトロホプラストの核における8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を免疫染色し、核の陽性率を測定した。
- (4) 胎盤絨毛組織での酸化的DNA障害の修復因子であるredox factor-1 (ref-1) を免疫染色し、核の陽性率を測定した。
- (5) 胎盤絨毛組織での低酸素状態の指標として、Hypoxia-induced factor-1 α (HIF-1 α) を免疫染色し、核の陽性率を測定した。

【成績】

対象背景においては、BMI、年齢ともに3群間で有意差を認めなかった。一方、早発型PIH群は、遅発型PIH群に比較し、FGR合併率が有意に高値であった。

- (1) 母体血中d-ROMsは、PIH両群で有意の高値を認めた。
- (2) 臍帯動脈血中d-ROMsは、PIH両群で有意の高値を認めた。臍帯動脈血中pHは、早発型PIH群で有意の低値を認めた。
- (3) 8-OHdGの核の陽性率は、正常群に比較し遅発型PIH群で有意の高値を認め、早発型PIH群でさらに有意の高値を認めた。
- (4) ref-1の核の陽性率は、正常群に比較し遅発型PIH群で有意の高値を認めた。
- (5) HIF-1 α の核の陽性率は、PIH両群で有意の高値を認め、早発型PIH群は、遅発型PIH群に比較し、さらに高値である傾向を認めた。

【結論】

PIH両群で、胎盤絨毛組織での低酸素状態が認められ、酸化的DNA障害も認められた。また、その程度は、遅発型PIH群に比較し、早発型PIH群で高度であることが明らかになった。さらに、酸化的DNA障害の修復機構は、遅発型PIH群では保たれているが、早発型PIH群では破綻していることが明らかになった。一方、胎児においては、臍帯動脈血中のd-ROMsはPIH両群で高値であり、臍帯動脈血中pHは、早発型PIH群でのみ低値であることから、PIHの胎児においても、母体同様に酸化ストレスが生じており、特に早発型PIHでは、胎児の低酸素やアシドーシス傾向が形成されているものと推測された。以上のことから、PIHで亢進する酸化ストレスは、母体のみならず胎盤の血流および組織障害にも影響を及ぼし、胎児発育にも悪影響を及ぼすことが明らかになった。特に、早発型PIHでは、胎盤における障害の程度は高度であり、胎児発育に対する影響も高度であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

【目的】

妊娠高血圧症候群（PIH）は、妊娠20週以降、分娩後12週まで高血圧（BP140/90mmHg以上）が認められる、または、高血圧に蛋白尿を伴う疾患である。我々はこれまで、PIH妊婦において、活性酸素の産生が増加することにより酸化ストレスが亢進し、PIHの基本病態である血管内皮機能障害の原因となり、血圧上昇などが発症することを報告してきた。一方、PIHにはしばしば胎児発育遅延（FGR）を合併することから、PIH妊婦で起こる酸化ストレスの亢進は、二次的に胎児、胎盤系にも影響をおよぼしている可能性がある。特に、早発型PIH（妊娠32週以前に発症するPIH）妊婦は遅発型PIH（妊娠32週以降に発症するPIH）妊婦と比較し、FGRを合併する頻度が高いことから、酸化ストレスによる高度の胎盤の血流や組織障害をきたしている可能性が考えられるが、現在詳細な報告はされていない。そこで今回、酸化ストレスによる早発型PIH妊婦の胎盤における血流や組織障害を検討する目的で、胎盤における低酸素性変化と酸化的DNA障害の重症度とFGRとの関連性について、正常妊婦、遅発型PIH妊婦と比較検討した。

【方法】

2010年4月から2012年3月までに、患者の同意を得た、陣痛発来以前に帝王切開術を施行した正常妊婦（正常群）10例と、早発型PIH妊婦（早発型PIH群）13例、遅発型PIH妊婦（遅発型PIH群）12例を対象とした。

- (1) 分娩前の母体血中活性酸素代謝物（d-ROMs）を測定した。
- (2) 分娩時の臍帯動脈血中d-ROMsおよびpHを測定した。
- (3) 胎盤絨毛組織での酸化的DNA障害の指標として、胎盤絨毛組織のトロホブラストの核における8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（8-OHdG）を免疫染色し、核の陽性率を測定した。
- (4) 胎盤絨毛組織での酸化的DNA障害の修復因子であるredox factor-1（ref-1）を免疫染色し、核の陽性率を測定した。
- (5) 胎盤絨毛組織での低酸素状態の指標として、Hypoxia-induced factor-1 α （HIF-1 α ）を免疫染色し、核の陽性率を測定した。

【成績】

対象背景においては、BMI、年齢ともに3群間で有意差を認めなかった。一方、早発型PIH群は、遅発型PIH群と比較し、FGR合併率が有意に高値であった。

- (1) 母体血中d-ROMsは、PIH両群で有意の高値を認めた。
- (2) 臍帯動脈血中d-ROMsは、PIH両群で有意の高値を認めた。臍帯動脈血中pHは、早発型PIH群で有意の低値を認めた。

- (3) 8-OHdGの核の陽性率は、正常群に比較し遅発型PIH群で有意の高値を認め、早発型PIH群でさらに有意の高値を認めた。
- (4) ref-1の核の陽性率は、正常群に比較し遅発型PIH群で有意の高値を認めた。
- (5) HIF-1 α の核の陽性率は、PIH両群で有意の高値を認め、早発型PIH群は、遅発型PIH群に比較し、さらに高値である傾向を認めた。

【結論】

PIH妊婦では、胎盤組織の低酸素性変化、酸化了的DNA障害をきたしていることが明らかとなった。さらに、早発型PIH妊婦では、その障害はより高度であり、酸化了的DNA障害に対する修復機構も破綻し、胎児の成長障害の原因となっている可能性が示唆された。また、PIHの胎児においても、母体同様に酸化ストレスが亢進しており、特に早発型PIH妊婦の胎児においては、低酸素状態が形成されているものと推測された。

以上より、本研究はPIH妊婦の病態解明に極めて有益な情報を提示するものであり、学位を授与するに値すると判断した。

氏 名	高橋美裕希 <small>たか はし み ゆ き</small>
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第398号
学位授与年月日	平成25年 3月 2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	Arsenic trioxide prevents nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 by inhibiting a TRIF-dependent pathway (三酸化ヒ素はTRIF依存性経路を阻害することによりLPS刺激後のRAW264.7からのNO産生を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 細川好孝 教授 岡田尚志郎 教授 池田洋 教授 三鴨廣繁

学位論文内容の要旨

【背景】

三酸化ヒ素 (Arsenic Trioxide : ATO) は急性前骨髄球性白血病の治療薬として優れた抗腫瘍効果を示すことで近年注目されている。ATOの抗腫瘍効果に関しては多くの研究がなされてきているが、抗炎症効果については不明な点が多い。

我々はマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) をLipopolysaccharide (LPS) で刺激し炎症を惹起すると、炎症メディエーターの一つである一酸化窒素 (NO) の産生は上昇するが、ATOで前処理した細胞株ではNOの産生が有意に抑制されることを見出した。さらにATOによるNO産生の抑制に関わる分子機構を詳細に解析した。

【方法】

- ① RAW264.7をATO (1 μ M) で90分間前処理した後、LPSで刺激し24時間培養した細胞のNO産生量を定量した。NOの測定にはGriess法を用いた。
- ② iNOSとIFN- β のmRNAの定量をreal-time PCRを用いて行った。
- ③ 細胞表面のCD14とCD284 (TLR4) /MD2複合体の発現をフローサイトメトリーで評価した。
- ④ NF- κ Bの転写活性をレポーターアッセイで解析した。
TNF- α タンパク質量はELISA法を用いて定量した。

- ⑤ iNOS, NF- κ B, phospho-p65, I κ B α , phospho-I κ B α , JNK/SAPK, Erk1/2, p38, IFN- β , IRF3, STAT1 α/β , phospho-STAT1 α/β のタンパク質量をウエスタンブロット法を用いて解析した。

【結果】

- ① ATOはLPS刺激後RAW264.7におけるNO産生を濃度依存的に抑制した。
- ② ATOはLPS刺激によるiNOSのmRNA量及びタンパク質量の増加を抑制した。
- ③ ATOは細胞表面のCD14やTLR4の発現量に影響を及ぼさなかった。
- ④ ATOはNF- κ Bの活性及びTNF- α 産生量に影響を及ぼさなかった。
- ⑤ ATOは主要なMAPKのJNK/SAPK, Erk1/2, p38の活性に影響を及ぼさなかった。
- ⑥ ATOはTRIF依存性シグナル経路のIFN- β の発現や, IRF3とiNOSの転写因子であるSTAT1の活性化を抑制した。RNA干渉法を利用してSTAT1をノックダウンすると, LPS刺激によるNO産生は有意に抑制された。

【結語】

ATOはLPS刺激後のRAW264.7からのNO産生を抑制した。この分子機構にはATOによるTRIF依存性シグナル経路におけるSTAT1活性化の阻害が関与することが示唆された。以上よりATOはTRL4を介した自然免疫において抗炎症作用も有する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【目的】

三酸化ヒ素 (Arsenic Trioxide : ATO) は急性前骨髄球性白血病の治療薬として優れた抗腫瘍効果を示すことで近年注目されている。ATOの抗腫瘍効果に関しては多くの研究がなされてきているが, 抗炎症効果については不明な点が多く, 今回その分子基盤を明らかにすることを目的とした。我々はマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) をLipopolysaccharide (LPS) で刺激し炎症を惹起すると, 炎症メディエーターの一つである一酸化窒素 (NO) の産生は上昇するが, ATOで前処理した細胞株ではその産生が有意に抑制されることを見出した。さらに, ATOによるNO産生の抑制に関わる分子機構を詳細に解析した。

【方法】

- 1) RAW264.7をATO (1 μ M) で90分間前処理した後, LPSで刺激し24時間培養した細胞のNO産生量を定量した。NOの測定にはGriess法を用いた。
- 2) iNOSとIFN- β のmRNAの定量をreal-time PCRを用いて行った。
- 3) 細胞表面のCD14とCD284 (TLR4) /MD2複合体の発現をフローサイトメトリーで評価した。

4) NF- κ Bの転写活性をレポーターアッセイで解析した。

TNF- α タンパク質量はELISA法を用いて定量した。

5) iNOS, NF- κ B, phospho-p65, I κ B α , phospho-I κ B α , JNK/SAPK, Erk1/2, p38, IFN- β , IRF3, STAT1 α/β , phospho-STAT1 α/β , STAT1のタンパク質量をウエスタンブロット法を用いて解析した。

【結果】

1) ATOはLPS刺激後RAW264.7におけるNO産生を濃度依存的に抑制した。

2) ATOはLPS刺激によるiNOSのmRNA量及びタンパク質量の増加を抑制した。

3) ATOは細胞表面のCD14やTLR4の発現量に影響を及ぼさなかった。

4) ATOはNF- κ Bの活性及びTNF- α 産生量に影響を及ぼさなかった。

5) ATOは主要なMAPKのJNK/SAPK, Erk1/2, p38の活性に影響を及ぼさなかった。

6) ATOはTRIF依存性シグナル経路のIFN- β の発現や, IRF3とiNOSの転写因子であるSTAT1の活性化を抑制した。RNA干渉法を利用してSTAT1をノックダウンすると, LPS刺激によるNO産生は有意に抑制された。

【結語】

ATOはLPS刺激後のRAW264.7からのNO産生を抑制した。この分子機構にはATOによるTRIF依存性シグナル経路におけるSTAT1活性化の阻害が関与することが示唆された。以上よりATOはTLR4を介した自然免疫において抗炎症作用も有することが示唆された。

本研究は, 急性前骨髄球性白血病の治療に使用されているATOが, TLR4を介した自然免疫経路に影響を及ぼし, その結果として抗炎症作用を有することを示した。ATOの新たな作用機序を解明し, その成果は臨床的意義も高く, 学位を授与するに値すると判断した。

氏 名	恒 川 幸 司
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第399号
学位授与年月日	平成25年 3 月 2 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	Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 (WDR35) stimulated by domoic acid in rat hippocampus: involvement of reactive oxygen species generation and p38 mitogen-activated protein kinase activation (ドウモイ酸投与ラットの海馬におけるWD repeat-containing protein 35 (WDR35) の発現増強：活性酸素の産生およびp38MAPKの活性化との関連)
論文審査委員	(主査) 教授 岡 田 尚志郎 教授 渡 辺 秀 人 教授 妹 尾 洋 教授 道 勇 学

学位論文内容の要旨

ドウモイ酸 (DA) は、一過性健忘をきたすカイニン酸 (KA) 類似の興奮性アミノ酸である。DAは、グルタミン酸受容体の活性化を介して、特に海馬において神経細胞死を引き起こすと推測されている。近年、*in vitro*の実験系においてDAは活性酸素(ROS)産生を誘発し、p38 MAPKの活性化を介してアポトーシスを誘導することが示されているが、*in vivo*におけるROS、p38 MAPKの関与については未だ明らかではない。ところで、我々はWD repeat containing proteinの一種であるWDR35 (別名naofen)を見だし、いくつかの動物モデルでアポトーシスに関連する可能性があることを報告している。そこで本研究では、*in vivo*投与したDAによる海馬の神経細胞傷害に、グルタミン酸受容体、ROS、p38 MAPKおよびWDR35が関与するか否かを検証するために、以下の実験を行った。DAをラットに腹腔内投与後、ラット全脳におけるDAの同定・定量、海馬における組織学的および生化学的解析を行った。

LC-MS/MSによりドウモイ酸の脳内分布を同定した。その濃度は約20 pmol/g tissueであり、先行研究における脳内濃度と同程度であった。海馬の組織学的解析において、腹腔内に投与したDAは、海馬のCA1領域におけるアポトーシスを含む神経変性所見と

WDR35の発現増強を引き起こした。生化学的解析においても、DAは海馬におけるWDR35のmRNAおよびタンパク質発現を用量および時間依存的に増加させた。グルタミン酸受容体拮抗薬の前投与実験において、NBQX（AMPA/KA受容体拮抗薬）の前投与は、DAによって増加したWDR35のタンパク質発現を有意に減少させたが、MK-801（NMDA受容体拮抗薬）の前投与は有意な変化を認めなかった。さらにラジカルスカベンジャーであるエダラボンの前投与は、DAによって亢進したp38 MAPKのリン酸化を有意に減少させた。

以上の実験成績から、DAは*in vivo*でAMPA/KA受容体を活性化し、ROSの産生およびp38 MAPKのリン酸化を亢進させ、WDR35の発現の増加をもたらすことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

ドウモイ酸（DA）は、一過性健忘をきたすカイニン酸（KA）類似の興奮性アミノ酸である。DAは、グルタミン酸受容体の活性化を介して、特に海馬において神経細胞死を引き起こすと推測されている。近年、*in vitro*の実験系においてDAは活性酸素(ROS)産生を誘発し、p38 MAPKの活性化を介してアポトーシスを誘導することが報告されているが、*in vivo*におけるROS、p38 MAPKの関与については未だ明らかではない。ところで、我々はWD repeat containing proteinの一種であるWDR35（別名naofen）を見だし、いくつかの動物モデルでアポトーシスに関連する可能性があることを報告している。そこで本研究では、*in vivo*投与したDAによる海馬の神経細胞傷害に、グルタミン酸受容体、ROS、p38 MAPKおよびWDR35が関与するか否かを検証するために、以下の実験を行った。DAをラットに腹腔内投与後、ラット全脳におけるDAの同定・定量、海馬における組織学および生化学的解析を行った。

LC-MS/MSによりドウモイ酸の脳内分布を同定した。その濃度は約20 pmol/g tissueであり、先行研究における脳内濃度と同程度であった。海馬の組織学的解析において、腹腔内に投与したDAは、海馬のCA1領域におけるアポトーシスを含む神経変性所見とWDR35の発現増強を引き起こした。生化学的解析においても、DAは海馬におけるWDR35のmRNAおよびタンパク質発現を用量および時間依存的に増加させた。グルタミン酸受容体拮抗薬の前投与実験において、NBQX（AMPA/KA受容体拮抗薬）の前投与は、DAによって増加したWDR35のタンパク質発現を有意に減少させたが、MK-801（NMDA受容体拮抗薬）の前投与は有意な変化を認めなかった。さらにラジカルスカベンジャーであるエダラボンの前投与は、DAによって亢進したp38 MAPKのリン酸化を有意に減少させた。

以上の実験成績から、DAは*in vivo*でAMPA/KA受容体を活性化し、ROSの産生およ

びp38 MAPKのリン酸化を亢進させ、WDR35の発現の増加をもたらすことが明らかとなった。

本論文の内容は、DAが*in vivo*でAMPA/KA受容体を活性化し、ROSの産生およびp38 MAPKのリン酸化を亢進させ、WDR35の発現の増加をもたらすという機序を明らかにしたことにより、DAによる神経細胞傷害発症機序に新たな基礎的情報を提供するものであり、学位を授与するに値する論文と判定した。

氏 名	にし かわ げん や 西 川 源 也
学位の種類	博 士 (医 学)
学位授与番号	甲 第400号
学位授与年月日	平成25年 3 月 2 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	Prostatic penetration of meropenem in humans, and dosage considerations for prostatitis based on a site-specific pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation(ヒト前立腺組織におけるmeropenem移行性の検討および部位特異的薬物動態／薬力学に基づいた前立腺炎に対するmeropenem投与法の評価)
論文審査委員	(主査) 教授 住 友 誠 教授 横 地 高 志 教授 松 浦 克 彦 教授 三 嶋 廣 繁

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

カルバペネム系抗菌薬であるmeropenemは前立腺炎治療に用いられることがあるが、標的部位である前立腺組織への詳細な移行性の検討および薬物動態－薬力学（PK-PD）解析は行われていない。本研究は、ヒト前立腺組織へのmeropenemの移行性を検討するとともに、3-コンパートメントモデル解析に基づいた部位特異的PK-PD解析を行い、前立腺炎に対するmeropenemの投与法の妥当性を評価した。

【方法】

前立腺肥大症患者49例を対象とし、経尿道的前立腺切除術前にmeropenemを30分点滴静注（n=20, 250mg meropenem; n=29, 500mg meropenem）。経時的に血漿検体（投与開始後30分, 60分, 90分, 3時間, 5時間）、前立腺検体（投与開始後30分, 60分, 90分）を採取した。各々のmeropenem濃度は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて測定した。解析結果により得られたPKパラメーター49例の平均値を用いて、meropenemの成人における投与法について、モンテカルロシミュレーションを行った。

【結果】

前立腺/血漿比は、最大薬物濃度で16.6%であり、薬物時間曲線をもとにした面積から

の算出では17.7%であった。meropenemの前立腺組織中濃度は、血漿中濃度と同様に、濃度依存的に増加した。前立腺炎の起炎菌の大半を占める*E. coli*, *Klebsiella species*に対しては、meropenem 250mg 1日3回投与または500mg 1日2回投与が最適な投与方法であった。一方で*Pseudomonas aeruginosa* isolatesに対しては、いかなる投与方法も十分な治療効果は期待できなかった。

【結語】

血漿中および前立腺組織中meropenem濃度の経時的なモニタリングによって、meropenemのヒト前立腺組織への移行性を検討でき、部位特異的PK-PD解析にて前立腺炎に対するmeropenem投与方法の妥当性を評価できた。

論文審査の結果の要旨

【目的】

カルバペネム系抗菌薬であるmeropenemは前立腺炎治療に用いられることがあるが、標的部位である前立腺組織への詳細な移行性の検討および薬物動態-薬力学(PK-PD)解析は行われていない。本研究は、ヒト前立腺組織へのmeropenemの移行性を検討するとともに、3-コンパートメントモデル解析に基づいた部位特異的PK-PD解析を行い、前立腺炎に対するmeropenemの投与方法の妥当性を評価した。

【方法】

前立腺肥大症患者49例を対象とし、経尿道的前立腺切除術前にmeropenemを30分点滴静注(n=20, 250mg meropenem; n=29, 500mg meropenem)。経時的に血漿検体(投与開始後30分, 60分, 90分, 3時間, 5時間), 前立腺検体(投与開始後30分, 60分, 90分)を採取した。各々のmeropenem濃度は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて測定した。解析結果により得られたPKパラメーター49例の平均値を用いて、meropenemの成人における投与方法について、モンテカルロシミュレーションを行った。

【結果】

前立腺/血漿比は、最大薬物濃度で16.6%であり、薬物時間曲線をもとにした面積からの算出では17.7%であった。meropenemの前立腺組織中濃度は、血漿中濃度と同様に、濃度依存的に増加した。前立腺炎の起炎菌の大半を占める*E. coli*, *Klebsiella species*に対しては、meropenem 250mg 1日3回投与または500mg 1日2回投与が最適な投与方法であった。一方で*Pseudomonas aeruginosa* isolatesに対しては、いかなる投与方法も十分な治療効果は期待できなかった。

【結語】

血漿中および前立腺組織中meropenem濃度の経時的なモニタリングによって、meropenemのヒト前立腺組織への移行性を検討でき、部位特異的PK-PD解析にて前立

腺炎に対するmeropenem投与方法の妥当性を評価した独創性の高い研究であり，学位授与に値するものと判定した。

氏 名	間 瀬 明 人 ま せ あき ひと
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第401号
学位授与年月日	平成25年3月2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	Active ingredients of traditional Japanese (kampo) medicine, inchinkoto, in murine concanavalin A-induced hepatitis (漢方薬インチンコウ湯 (ICKT) のコンカナバリン A 惹起マウス肝炎モデルにおける抑制作用：活性成分の同定とその薬理学的作用機序の研究)
論文審査委員	(主査) 教授 松 浦 克 彦 教授 岡 田 尚志郎 教授 横 地 高 志 教授 米 田 政 志

学位論文内容の要旨

【目的】

インチンコウ湯は黄疸や胆汁鬱滞などの肝疾患によく用いられる漢方薬であり, *in vivo*, *in vitro*の肝細胞アポトーシスを強く抑制することが知られている。我々は, インチンコウ湯がマウスにおけるconcanavalin A (con A) 肝障害モデルを500, 1000, 2000mg/kgの経口投与で用量依存的かつ有意に抑制すること, その際血清中のIL-2, IL-12, IFN- γ の増加も抑制することから, この薬剤が, 本肝炎モデルにおけるTh1 typeの免疫応答を抑制することにより障害を抑制する可能性を示唆した。今回の研究はインチンコウ湯の作用を担う有効成分の同定と, その有効成分の薬理学的プロファイルを*in vivo*, *in vitro*で明らかにし, インチンコウ湯の作用機序についてさらに詳細な解析を行った。

【方法】

In vivo: con A誘発肝炎に対する有効性を指標に, インチンコウ湯の構成生薬のインチンコウ, サンシシ, ダイオウ, 各生薬の分画画分(および主要成分3種)をスクリーニングした。最も有効性の高い成分についてはさらに用量依存性を検討した。*In vitro*: マウスのsplenocyteにcon Aで, peritoneal macrophage にIFN- γ で, 各種のサイトカインおよび一酸化窒素(NO)を誘導する系を用い, インチンコウ活性成分,

capillarisinおよびサンシシ活性成分genipinがそれらに与える影響をBio-Plexおよびnitrite測定キットにて測定した。

【結果】

インチンコウ湯はcon A肝炎モデルを顕著に抑制した。インチンコウ湯の構成生薬の中でインチンコウがもっとも強く、次いでサンシシが肝障害および血中IFN- γ の増大を抑制した。インチンコウおよびサンシシの分画画分のcon A肝炎モデルに及ぼす影響を検討した結果、インチンコウの100M分画（主要含有成分capillarisin, dimethylescuretin）が強く抑制した。また血清IFN- γ , IL-12p70をサンシシ50M分画（主要成分genipin前駆体）が強く抑制した。capillarisinは腹腔内投与でcon A肝炎モデルを用量依存的に抑制し、in vitroでも有意にIFN- γ およびnitriteを抑制した。genipinはin vitro splenocyteの系で高濃度ではあるがIL-1 β , IL-6およびIL-12p70を用量依存的かつ有意に抑制した。またnitriteを低濃度から有意に抑制した。

【考察】

血中サイトカイン抑制作用はサンシシ50M分画由来のgenipinが最も強かったが、肝障害抑制作用はむしろインチンコウやその成分capillarisinに最も強く認められた。インチンコウ成分の有する肝細胞アポトーシス抑制作用が関与していると推定されるが、Th1タイプの炎症に中心的な役割を果たすIFN- γ に対してはインチンコウおよびその成分も強い抑制効果を示しており、インチンコウ、サンシシによる血中サイトカイン、NOの抑制作用も、インチンコウ湯の肝障害抑制作用に関与していると推察された。

論文審査の結果の要旨

これまで多くの漢方薬が経験的に使用されてきたが、近年、漢方薬の有効成分や作用機序が徐々に明らかにされつつある。インチンコウ湯は黄疸や胆汁鬱滞などの肝疾患によく用いられる漢方薬で、in vivoおよびin vitroにおいて肝細胞アポトーシスを強く抑制することが知られている。間瀬らは、これまでにマウスを用いたconcanavalin A (con A) で誘発した肝障害に対してインチンコウ湯の経口投与が用量依存的かつ有意に血清中のIL-2, IL-12, IFN- γ の増加を抑制することによって肝障害を抑制する可能性を報告してきた。今回の研究ではインチンコウ湯の作用を担う有効成分の同定と、その有効成分の薬理学的プロファイルをin vivoおよびin vitroで明らかにし、インチンコウ湯の作用機序についてさらに詳細な解析を行った。

in vivoの試験ではインチンコウ湯、その構成生薬であるインチンコウ、サンシシ、ダイオウおよび各生薬の分画画分（水抽出：W分画、50%メタノール抽出：50M分画、メタノール抽出：100M分画）ならびにその主要成分3種（capillarisin, dimethylescuretin, genipin前駆体）を用いてBALB/cマウスにおけるcon A誘発肝炎に対する有

効性 (AST, ALT, LDH) およびサイトカイン (IFN- γ , IL-12) ならびに一酸化窒素 (NO) の産生への影響を評価した。in vitroの試験ではマウスのsplenocyteにcon Aで刺激した系とperitoneal macrophage にIFN- γ で刺激した系において, capillarisinおよびgenipinのサイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4, IL-12, IFN- γ) およびNOの産生への影響を評価した。これらの測定はBio-Plexおよびnitrite測定キットを用いた。

インチンコウ湯はin vivoの試験においてcon A誘発肝炎を顕著に抑制した。構成生薬の中ではインチンコウ, サンシシの順で肝障害および血中IFN- γ の増大を抑制した。各生薬の分画画分の影響を検討した結果, インチンコウの100M分画およびその主要成分であるcapillarisinがcon A誘発肝炎を強く抑制した。また, サンシシの50M分画およびその主要成分であるgenipinが血清IFN- γ , IL-12を強く抑制した。in vitro splenocyteの系においてcapillarisinがINF- γ 産生およびIFN- γ で刺激したマクロファージの系においてNOの産生を有意に抑制した。genipinはin vitro splenocyteの系においてIL-1 β , IL-6, IFN- γ およびIL-12を用量依存的かつ有意に抑制し, またIFN- γ 刺激によるNO産生を有意に抑制した。

以上の結果よりインチンコウ湯によるcon A誘発肝炎抑制作用はその構成生薬であるインチンコウおよびサンシシによるものであり, さらにその主要活性成分がインチンコウに含まれるcapillarisinおよびサンシシに含まれるgenipinであることが示唆された。また, インチンコウ (主要活性成分capillarisin) の作用機序はIFN- γ およびNOの産生抑制によるものであること, およびサンシシ (主要活性成分genipin) の作用機序はIL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-12およびNOの産生抑制によるものであることが示唆された。

本論文の内容はこれまで不明であったインチンコウ湯の活性成分およびその作用機序を明らかにすることによって漢方薬の有効性を科学的に評価したもので, 臨床でインチンコウ湯を使用する上での有用な基礎的情報を提供する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	もり もと あつ こ 森 本 温 子
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第402号
学位授与年月日	平成25年3月2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	Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats (トレッドミル運動およびスタティックストレッチはラットのギプス固定後に長期に続く痛覚過敏および関節可動域制限, 筋萎縮を改善した)
論文審査委員	(主査) 教授 岡 田 忠 教授 佐 藤 元 彦 教授 岡 田 尚志郎 教授 藤 原 祥 裕

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

四肢関節の不動化に伴う廃用は慢性痛の一因となり、その治療戦略として運動療法が選択されることが多い。近年になって、神経障害性疼痛や炎症性疼痛に対する運動療法の鎮痛効果が基礎的研究にて示されつつあるが、不動化や廃用後に出現する疼痛への運動効果は検証されていない。そこで、本研究では当大学にて開発した後肢のギプス固定後に長期的な機械的痛覚過敏を呈する疼痛モデルラット（Chronic Post Cast Pain; CPCP）を用い、トレッドミル運動およびストレッチの二種類の運動負荷が及ぼす影響を検討する。

【方法】

雄性SDラット27匹を用い、体幹から左後肢を石膏ギプスにて2週間固定することで疼痛モデルを作成した。実験①：MRI撮像にてギプス固定除去後のラット後肢における炎症や浮腫の有無を確認し、運動開始時期を決定した。MRI撮像には1.5テスラー小動物用MRI装置を用い、マルチスライス法にて（A）T1強調画像、（B）T2強調画像、（C）ガドリニウム（以下Gd）静注後T1強調画像を撮像した。実験②：非運動群（CPCP群, n= 8）、トレッドミル運動群（CPCP+TR群, n= 9）、ストレッチ群（CPCP+SS群, n= 8）に振り分け、CPCP+TR・CPCP+SS群にはギプス固定を除去した後に2週間

の運動負荷を行った。疼痛行動は、下腿皮膚・足底のvon-Frey testおよび腓腹筋部圧痛閾値測定にてギプス固定除去後（以下po）7週まで評価した。後肢の末梢変化について、po 7週までの膝・足関節可動域および下腿幅の変化を計測した。

【結果】

実験①：CPCP群の後肢MRI画像では、T2強調画像およびGd静注後T1強調画像にて固定除去直後から皮膚や血管周囲に浮腫の出現を示唆する高輝度変化が認められた。これらの変化はpo 3日以内に正常化したことから、CPCP+TRおよびCPCP+SS群の運動負荷開始時期をpo 3日とした。実験②：CPCP群は全ての計測部位でpo 7週まで有意な痛覚過敏を呈した。一方、CPCP+TRおよびCPCP+SS群では痛覚過敏が抑制されpo 1～4週よりCPCP群と比し有意な改善を示した。また、CPCP群ではpo7週まで有意な関節可動域制限を認めたが、CPCP+TRおよびCPCP+SS群ではpo 1週より有意な改善を示した。下腿幅はCPCP群においてpo 3週まで有意に減少したが、CPCP+TRおよびCPCP+SS群ではCPCP群より早期に回復を示した。

【考察】

今回行ったトレッドミル運動およびストレッチは、ラット後肢ギプス固定後に生じた疼痛および関節可動域制限、筋萎縮を改善した。一方、我々はこれまでに、ギプス固定が惹起する痛覚過敏の機序について、ギプス固定除去後早期の局所における活性酸素種の増加や脊髄グリア細胞の変容などが関与した可能性を確認している（Ohmichi Y et al, IASP 2012）。以上より、今回行った運動は、末梢に対する抗酸化・抗炎症作用（Golbidi S et al, 2012）や内因性鎮痛系の賦活化（Koltyn KF, 2000）などの機序を介して効果をもたらした可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

近年、神経障害性疼痛や炎症性疼痛などの慢性痛に対して運動療法が鎮痛効果を示すことが示されつつあるが、四肢関節の不動化や廃用後に出現する疼痛への運動の効果は検証されていない。本研究では研究者らが独自に開発した、ラット後肢のギプス固定後に長期的に機械的痛覚過敏を呈する疼痛モデル（Chronic Post Cast Pain; CPCP）を用いて、トレッドミル運動およびストレッチの二種類の運動負荷の効果を検討した。

雄性SDラット27匹を用い、体幹から左後肢を石膏ギプスにて2週間固定することで疼痛モデルを作成し、ギプス固定を除去した後に2週間の運動負荷を行った。非運動群（CPCP群, n= 8）、トレッドミル運動群（CPCP+TR群, n= 9）、ストレッチ群（CPCP+SS群, n= 8）について、MRI撮像にてギプス固定除去後のラット後肢における炎症や浮腫の有無を確認し、運動開始時期を決定した。MRI撮像には1.5テスラー小動物用MRI装置を用い、マルチスライス法にてT1強調画像、T2強調画像、ガドリニウム（以

下Gd) 静注後T1強調画像を撮像した。下腿皮膚・足底のvon-Frey testおよび腓腹筋部圧痛閾値を測定して、ギプス固定除去後(以下po) 7週まで疼痛行動を評価した。更にpo 7週まで、膝・足関節可動域および下腿幅の変化を計測して、運動の効果を検討した。

この結果、CPCP群の後肢MRI画像では、T2強調画像およびGd静注後T1強調画像にて固定除去直後から皮膚や血管周囲に高輝度変化が認められ、浮腫の出現が示唆された。これらの変化はpo 3日以内に正常化したことから、CPCP+TRおよびCPCP+SS群の運動負荷開始時期をpo 3とした。CPCP群は全ての計測部位でpo 7週まで有意な痛覚過敏を呈した。一方、CPCP+TRおよびCPCP+SS群では痛覚過敏が抑制され、po 1～4週よりCPCP群と比し有意な改善を示した。また、CPCP群ではpo 7週まで有意な関節可動域制限を認めたが、CPCP+TRおよびCPCP+SS群ではpo 1週より有意な改善を示した。下腿幅はCPCP群においてpo 3週まで有意に減少したが、CPCP+TRおよびCPCP+SS群ではCPCP群より早期に回復することが示された。

これまでの研究から、ギプス固定が惹起する痛覚過敏の機序について、ギプス固定除去後早期に認められる局所の活性酸素種の増加や、脊髄グリア細胞の変容などが関与している可能性が考えられ、運動はこれらの炎症性の病態を改善するものと推察される。

本論文はCurrent Contentに引用されている欧文誌Neuroscience Lettersに掲載予定であり、慢性痛の緩和に運動療法が有用なことを基礎研究で示したことで今後の臨床応用が期待され、学位を授与するに十分な価値のある論文であると評価した。

氏 名	<small>むはまど あぶどる はく</small> Md. Abedul Haque
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第403号
学位授与年月日	平成25年3月2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	An ADP ribosylation factor-GTPase activating protein negatively regulates the production of proinflammatory mediators in response to lipopolysaccharide (ADPリボシル化因子GTPアーゼ活性化タンパクはリポ多糖体応答における炎症性メディエーター産生を負の制御をする)
論文審査委員	(主査) 教授 横 地 高 志 教授 佐 藤 元 彦 教授 細 川 好 孝 教授 横 井 豊 治

学位論文内容の要旨

Introduction

An ADP ribosylation factor (Arf)-GTPase activating protein (ASAP1) is highly expressed in a variety of tumor cells and is involved in the cell motility, invasion and metastasis. ASAP1 functions on membrane surfaces to catalyze the hydrolysis of GTP bound to Arf. ASAP1 plays a role in the regulation of membrane remodeling and cytoskeletal organization as well as cellular migration, and tumor invasion and metastasis. Lipopolysaccharide (LPS) is a component of the outer membrane of gram-negative bacteria that is recognized by toll-like receptor (TLR) 4, and triggers the activation of series of signaling pathways that leads to the production of a number of proinflammatory mediators, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), nitric oxide (NO), and interleukins (ILs). Excessive production of proinflammatory mediators causes systemic inflammatory response syndrome, endotoxic shock, and multiorgan failure. In the present study, we studied the involvement of ASAP1 in the regulation of LPS-induced proinflammatory mediators production in RAW 264.7 macrophage-like cells.

Materials and Methods

The murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, was cultured with in the presence or absence of LPS from *Escherichia coli* O55. ASAP1-specific or nontargeting small interfering RNA was transfected into the cells. The expression of ASAP1 protein and mRNA was determined by immunoblotting and reverse transcription-polymerase chain reaction, respectively. The phosphorylation and expression of various signaling molecules were analyzed with immunoblotting. The production of cytokines and NO was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay and the Griess method, respectively.

Results

ASAP1 was constitutively expressed in RAW 264.7 cells and the expression was augmented by LPS stimulation. ASAP1 was also expressed in physiological peritoneal macrophages. Silencing of ASAP1 with small interfering RNA enhanced the production of TNF- α , IL-6, interferon- β and NO in response to LPS. ASAP1 silencing augmented the activation of nuclear factor (NF)- κ B, p38 and stress-activated protein kinases. Their upstream molecules, such as IRAK4 and TRAF6, were not altered by ASAP1 silencing. A series of TLR ligands as well as LPS augmented the ASAP1 expression.

Conclusion

In the present study, we have demonstrated that ASAP1 negatively regulates LPS-induced proinflammatory mediators production in macrophage-like cells via downregulation of NF- κ B and mitogen-activated protein kinases activation. Further, ASAP1 is constitutively expressed in macrophages and augmented by LPS stimulation, ASAP1 is suggested to negatively regulate inflammatory responses in response to a variety of stimuli including TLR ligands.

Summary

ASAP1 is suggested to negatively regulate an excessive production of proinflammatory mediators via downregulation of LPS signaling. LPS-induced ASAP1 expression might be a feedback mechanism in LPS-induced inflammatory response. ASAP1 might be a putative target for prevention of LPS-mediated cell injury or tissue damages.

論文審査の結果の要旨

ADP ribosylation factor-GTPase activating protein (ASAP1)は様々な腫瘍細胞に高

率に発現されており，腫瘍細胞の運動性，侵入，転移に関与しているがん関連遺伝子である。本論文は，small interfering RNA (siRNA) を用いてASAP1遺伝子の抑制をし，リポ多糖体（LPS，エンドトキシン）による炎症性メディエーターの産生に及ぼす影響を検討したものである。ASAP1タンパクはRAW 264.7マクロファージ細胞に恒常的に発現されており，エンドトキシン刺激によりその発現は増強する。ASAP1遺伝子の抑制は，LPSによる腫瘍壊死因子，インターロイキン6，インターフェロン β ，一酸化窒素の産生を亢進する。また，ASAP1遺伝子の抑制は，NF- κ B，mitogen-activated protein kinasesの活性化を促進する。さらに，LPS以外のtoll-like receptorリガンドもASAP1タンパクの発現を増強する。以上のことから，本論文はASAP1遺伝子がエンドトキシンなどの自然免疫刺激物質のシグナル伝達を阻害し，炎症性メディエーターの産生を抑制していることを初めて明らかにした。がん関連遺伝子が炎症の制御にも作用していることを見出したことから，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	かた ひら のぶ ゆき 片 平 信 行
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第404号
学位授与年月日	平成25年 3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	Diluted gadoteridol(ProHance™) causes mild ototoxicity in cochlear outer hair cells (希釈したガドテリドール (プロハンス®) は蝸牛外有毛細胞にマイルドな耳毒性を引き起こす)
論文審査委員	(主査) 教授 植 田 広 海 教授 岡 田 尚志郎 教授 渡 邊 大 輔 教授 岩 城 正 佳

学位論文内容の要旨

【目的】

近年、鼓室内にガドリニウム系造影剤を注入後、3テスラMRIを使用し、メニエール病患者の内リンパ水腫描出に成功したとの報告がなされた。しかし、ガドリニウム系造影剤の鼓室内投与が蝸牛外有毛細胞に与える影響については、はっきりしていない。

本研究では、ガドリニウム系造影剤の1つであるガドテリドール (プロハンス®) が蝸牛外有毛細胞に与える形態学および生理学的影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

① 造影剤が耳音響放射 (DP-OAE) に与える影響について検討。

実験には体重300～500グラムの有色モルモットを使用。8倍に希釈ならびに16倍したガドテリドール溶液を鼓室内注入し、鼓室内投与前と投与1, 2, 4週後にDPOAEの測定を行った。コントロールには生食を使用した。

② 造影剤が単離外有毛細胞形態に与える直接的影響について検討。

実験には体重300～500グラムの有色モルモットを使用。断頭し、側頭骨を取り出した後、蝸牛を摘出。コラゲナーゼにて20分間処理後、チャンバー上で蝸牛外有毛細胞を機械的単離した。ガドテリドール溶液ならびに塩化ガドリニウムを負荷し、形態学的変化を観察した。コントロールには生食を使用した。

【結果】

- ① 8倍希釈したガドテリドール投与群では生食群に比較して高周波域（F2=12000Hz）においてDPレベルが優位に低下していた。
- ② 8および16倍希釈溶液ではそれぞれ24%（6/25）、3%（1/33）の細胞で形態変化が見られた。生食負荷群は8倍希釈したガドテリドール投与群に比して形態変化は優位に低く、16倍希釈したガドテリドール投与群は8倍希釈群よりも低かった。塩化ガドリニウム負荷群では80%（8/10）の高頻度で形態変化が認められた。

【総括】

ガドテリドール希釈液の鼓室内投与は、蝸牛外有毛細胞にマイルドな毒性を引き起こす可能性がある。

論文審査の結果の要旨

【目的】

メニエール病の病態として内リンパ水腫が世界的に認められているが、最近まではヒトにおいて画像で確認することは困難であった。近年、鼓室内にガドリニウム系造影剤を注入後、3テスラMRIを使用しメニエール病患者の内リンパ水腫描出に成功したとの報告がなされた。しかしながら、ガドリニウム系造影剤の鼓室内投与が蝸牛外有毛細胞に与える影響については、明確にされていない。そこで今回、ガドリニウム系造影剤の1つであるガドテリドール（プロハンス[®]）が蝸牛外有毛細胞にあたえる影響について *in vivo*（生理学的影響）と *in vitro*（形態学的影響）の実験を行い、蝸牛外有毛細胞への安全性について検討した。

【対象と方法】

実験①外有毛細胞機能を反映する歪成分耳音響放射（DPOAE）に与える影響についての検討

体重300～500gの有色モルモットを使用し、8倍ならびに16倍希釈したガドテリドール溶液を鼓室内に注入し、投与前と投与1, 2, 4週間後にDPOAEの測定を行った。コントロールには生理食塩水を使用した。

実験②単離外有毛細胞形態に与える直接的影響についての検討

体重300～500gの有色モルモットを使用し、断頭後蝸牛を摘出しコラゲナーゼにて20分間処理後、チャンバー上で蝸牛外有毛細胞を機械的単離した。8倍あるいは16倍希釈したガドテリドール溶液、塩化ガドリニウム液のどれかを負荷し、形態学的変化を観察した。コントロールには生理食塩水を使用した。

【結果】

実験①において、DPOAEは8倍希釈したガドテリドール投与群の1例において4週

間後に 8 kHz帯域で低下がみられた。また、平均値の比較では生食群に比して投与 4 週後に高周波数域 (F2=12000Hz) において有意に低下していた。

実験②において、8 倍ならびに16倍希釈したガドテリドール溶液群においてそれぞれ 24% (6/25)、3% (1/33) の細胞で形態変化が見られた。塩化ガドリニウム負荷群では80% (8/10) の高頻度で形態変化が見られた。

【考察およびまとめ】

今回の結果で、モルモットにおいて高濃度のガドテリドールは内耳外有毛細胞に障害を与えることが示唆された。また、希釈液の鼓室内投与でもマイルドな障害を蝸牛外有毛細胞に与える可能性が示唆され、ヒトでの鼓室内投与の際には希釈濃度に注意するなどの注意が必要であると考えられた。

以上より、内リンパ水腫の画像診断に有用なガドリウム造影剤の鼓室内投与の際の蝸牛外有毛細胞への安全性に関して言及した貴重な基礎的研究論文であり、学位に値すると判断する。

氏 名	つち や よし まさ 土 屋 吉 正
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第405号
学位授与年月日	平成25年 3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	機能性p16ペプチドを用いた頭頸部扁平上皮がんに対する細胞内分子標的治療法の検討
論文審査委員	(主査) 教授 植 田 広 海 教授 菊 地 正 悟 教授 福 富 隆 志 教授 風 岡 宜 暁

学位論文内容の要旨

【目的】

頭頸部がんの特徴としてp16^{INK4a}欠損例は予後不良、ヒトパピローマウイルス陽性/p16^{INK4a}発現症例は予後良好などがある。シスプラチンは頭頸部扁平上皮がんにおいて抗癌剤の第一選択薬として用いられているが、治療早期や臨床上著効を得つつある過程から、癌細胞自身がシスプラチンに対し耐性を示すことが隘路となることがある。今回、ペプチド/タンパク導入システムを用いて、p16^{INK4a}の一部をコードする機能性ペプチド(r9-p16 MIS)を細胞内に導入し、p16^{INK4a}の機能回復にて細胞増殖抑制を試み、さらに機能回復した細胞にシスプラチンを投与することによる細胞増殖抑制効果について検討したので報告する。

【対象と方法】

細胞株はUM-SCC-23, その獲得耐性株であるUM-SCC-23;CDDP-R (シスプラチン繰り返し投与により作成), UM-SCC-6, UM-SCC-81Bを用いた。p16^{INK4a}やその関連分子の発現をWestern blot 法, RT-PCRにて調べた。ペプチド/タンパク導入システム(Wr-T)を用いて、r9-p16 MISを細胞内に導入し、細胞増殖抑制効果をWST-1 assayにて測定した。また同様の方法にてr9-p16 MIS導入後、シスプラチンを投与し、その細胞増殖抑制効果を測定した。細胞のアポトーシスについてフローサイトメトリーにて計数した。

【結果】

今回用いた細胞株ではp16^{INK4a}の発現は認めなかった。これらの細胞株にr9-p16 MISを導入することにより、およそ20%～50%の細胞増殖の抑制がされた。さらに、これ

ら細胞株にシスプラチンを投与し、シスプラチン単独投与した細胞株と比較してr9-p16 MISを導入した細胞株ではシスプラチンのID₅₀の顕著な低下を認めた。そして、これら増殖抑制された細胞はアポトーシスに誘導されていた。

【考察】

頭頸部扁平上皮癌細胞株のp16^{INK4a}欠損細胞におけるp16^{INK4a}の機能回復は細胞の増殖抑制およびアポトーシスを誘導する。さらにp16^{INK4a}の機能回復にてシスプラチンへの感受性が増強される可能性が示唆された。したがって、頭頸部扁平上皮癌においてr9-p16 MISを用いた分子標的治療やシスプラチン耐性症例でのr9-p16 MISとシスプラチンの併用は、有用な治療となりうる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

【目的】

頭頸部癌の特徴として癌抑制遺伝子であるp16^{INK4a}欠損例が多く欠損例は予後不良であること、ヒトパピローマウイルス陽性でかつp16^{INK4a}発現例は予後良好であることなどが知られている。一方シスプラチンは頭頸部扁平上皮癌において抗癌剤の第一選択薬として用いられているが、治療早期から臨床上著効が得られる症例からシスプラチンに対して耐性を示す症例まで癌細胞に個体差が存在する。治療効果を高めるためにはこの耐性を示す癌細胞に対していかに細胞増殖を抑制し更に抗癌剤の感受性を高めるかの工夫が重要である。今回、ペプチド／タンパク導入システムを用いてp16^{INK4a}の一部をコードする機能性ペプチド（r9-p16 MIS）を細胞内に導入し、p16^{INK4a}の機能回復による細胞増殖抑制を試み、更に機能回復した細胞にシスプラチンを投与することによる細胞増殖効果について検討した。

【対象と方法】

細胞株はUM-SCC-23、その獲得耐性株であるUM-SCC-23;CDDP-R（シスプラチン繰り返し投与により作成）、UM-SCC-6、UM-SCC-81Bを用いた。p16^{INK4a}やその関連分子の発現をWestern blot法、RT-PCRにて調べた。ペプチド／タンパク導入システム（WRT）を用いて、r9-p16最小機能性配列（MIS）を細胞内に導入し、細胞増殖抑制効果をWST-1 assayにて測定した。また、同様の方法にてr9-p16 MIS導入後、シスプラチンを投与し、その細胞増殖抑制効果を測定した。更に細胞のアポトーシスの発現についてフローサイトメトリーにて計測した。

【結果】

今回用いた細胞株ではp16^{INK4a}の発現は認めなかった。これらの細胞株にr9-p16 MISを導入することにより、およそ20～50%の細胞増殖の抑制が観察された。更に、これら細胞株にシスプラチンを投与しシスプラチン単独投与した細胞株と比較してr9-p16

MISを導入した細胞株ではシスプラチンのID₅₀の顕著な低下を認めた。これら増殖抑制された細胞はアポトーシスに誘導されていたことが確認された。

【考察およびまとめ】

今回の結果で、頭頸部扁平上皮癌細胞株のp16^{INK4a}欠損細胞においてp16^{INK4a}機能回復により細胞の増殖抑制が促進されアポトーシスが誘導されることが確認できた。更に同じくp16^{INK4a}の機能回復により、シスプラチンに対する感受性が増強されることも確認できた。したがって、頭頸部扁平上皮癌において、r9-p16 MISを用いた分子標的療法やシスプラチン耐性症例でのr9-p16 MISとシスプラチンの併用は有用な治療法となる可能性が示唆された。

以上よりこの論文は、頭頸部癌治療における化学療法の効果を更に増強できる手法を確立できる可能性を示唆した画期的な基礎研究であり学位に値すると判断する。

氏 名	山 田 朋 美 <small>やま だ とも み</small>
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第406号
学位授与年月日	平成25年 3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	小児リンパ性白血病におけるIg/TCR遺伝子再構成のパターン とRQ-PCRによるMRD定量への適応性
論文審査委員	(主査) 教授 鶴 澤 正 仁 教授 渡 辺 秀 人 教授 仁 田 正 和 教授 住 友 誠

学位論文内容の要旨

【背景】

小児急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)の予後と治療早期の微小残存病変(minimal residual disease, MRD)との相関については数多くの報告がある。日本でもChildren's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG)で、Immunoglobulin (Ig) /T-cell receptor(TCR)遺伝子再構成をターゲットとした、nested-PCRによるMRD定量の結果に基づく治療の層別化を2000年代初めより行ってきたが、nested-PCR法はヨーロッパを中心として現在主流となっているrealtime-quantitative PCR(RQ-PCR)法に比べ精度的に十分とは言えなかった。今回我々は、RQ-PCR法の導入を中心としたMRD定量技術の標準化を試み、Ig/TCR遺伝子再構成の検出と、その適応性について検討した。

【対象と方法】

小児ALL219例 (B-cell precursor(BCP)-ALL180例, T-ALL39例) について、Screening PCRによりIg/TCR遺伝子再構成の検出を行い、その塩基配列を解析した。得られた塩基配列から設計した症例特異的プライマーを用いて、RQ-PCRによるMRD定量を行った。各ターゲットにおける定量感度を $10^{-1} \sim 10^{-5}$ の5段階で評価した。

【結果】

全体では94% (206/219), BCP-ALLで96% (173/180), T-ALLで85% (33/39) の症例で少なくとも一つの再構成が検出できた。また、sensitiveとされる感度 $\leq 10^{-4}$ を示すターゲットを少なくとも一つ有し、MRD定量が可能であった症例は全体で91%

(199/219), BCP-ALL93% (167/180), T-ALL82% (32/39) であった。BCP-ALLではIgH (76%), T-ALLではTCR γ (67%) が最も検出頻度が高かった。再構成別の定量感度では、感度 $\leq 10^{-4}$ のターゲットの割合は、BCP-ALLではIgHが最も高く91%であった。T-ALLではSIL-TAL1が100%, 続いてTCR δ (92%) となった。

【考察】

今回の結果を先行するヨーロッパからの報告と比較すると、BCP-ALL, T-ALLともに各遺伝子再構成の検出頻度が低い傾向が認められた。特にT-ALLにおけるTCR γ は10%以上低い結果となり、今後の検討が必要と考えられた。しかしながら定量感度については、感度 $\leq 10^{-4}$ を示すターゲットの割合が、いずれの遺伝子もおしなべて高い数値を示しており、十分な精度が得られていると考えられた。また、再構成を検出できなかった症例は全体の6% (13/219) であり、先行する報告 (3%, 4%) には及ばなかったものの、感度 $\leq 10^{-4}$ のsensitive targetを持ちMRD定量が可能であった症例は全体の91%と、先行する報告 (91%, 87%) と同等の結果が得られた。これにより、ヨーロッパと同等の水準でMRD定量が可能となったことが示唆され、小児ALLの治療研究において、新たなエビデンスの創出に貢献する研究基盤の整備を達成できたものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

小児急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)の予後と治療早期の微小残存病変 (minimal residual disease, MRD) との相関については数多くの報告がある。日本でもChildren's Cancer and Leukemia Study Group (CCLSG) で, Immunoglobulin (Ig) /T-cell receptor (TCR) 遺伝子再構成をターゲットとした, nested-PCRによるMRD定量の結果に基づく治療の層別化を2000年代初めより行ってきたが, nested-PCR法はヨーロッパを中心として現在主流となっているrealtime-quantitative PCR(RQ-PCR)法に比べ精度的に十分とは言えなかった。今回我々は, RQ-PCR法の導入を中心としたMRD定量技術の標準化を試み, Ig/TCR遺伝子再構成の検出と, その適応性について検討した。

小児ALL219例 (B-cell precursor(BCP)-ALL180例, T-ALL39例) について, Screening PCR によりIg/TCR遺伝子再構成の検出を行い, その塩基配列を解析した。得られた塩基配列から設計した症例特異的プライマーを用いて, RQ-PCRによるMRD定量を行った。各ターゲットにおける定量感度を $10^{-1} \sim 10^{-5}$ の5段階で評価した。

全体では94% (206/219), BCP-ALLで96% (173/180), T-ALLで85% (33/39) の症例で少なくとも一つの再構成が検出できた。また, sensitiveとされる感度 $\leq 10^{-4}$ を示すターゲットを少なくとも一つ有し, MRD定量が可能であった症例は全体で91% (199/219), BCP-ALL93% (167/180), T-ALL82% (32/39) であった。BCP-ALLでは

IgH (76%), T-ALLではTCR γ (67%) が最も検出頻度が高かった。再構成別の定量感度では、感度 $\leq 10^{-4}$ のターゲットの割合は、BCP-ALLではIgHが最も高く91%であった。T-ALLではSIL-TAL1が100%, 続いてTCR δ (92%) となった。

今回の結果を先行するヨーロッパからの報告と比較すると、BCP-ALL, T-ALLともに各遺伝子再構成の検出頻度が低い傾向が認められた。特にT-ALLにおけるTCR γ は10%以上低い結果となり、今後の検討が必要と考えられた。しかしながら定量感度については、感度 $\leq 10^{-4}$ を示すターゲットの割合が、いずれの遺伝子も高い数値を示しており、十分な精度が得られていると考えられた。また、再構成を検出できなかった症例は全体の6% (13/219) であり、先行する報告 (3%, 4%) には及ばなかったものの、感度 $\leq 10^{-4}$ のsensitive targetを持ちMRD定量が可能であった症例は全体の91%と、先行する報告 (91%, 87%) と同等の結果が得られた。これにより、ヨーロッパと同等の水準でMRD定量が可能となったことが示唆され、小児ALLの治療研究において、新たなエビデンスの創出に貢献する研究基盤の整備を達成できたものと考えられた。

本研究の成果は、今後の日本における小児ALL治療研究に貢献しうるものであり、学位を授与するに値すると判断した。

氏 名	加 藤 隆 寛 <small>か とう たか ひろ</small>
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第407号
学位授与年月日	平成25年 3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	Recombinant human soluble thrombomodulin administration improves sepsis-induced disseminated intravascular coagulation and mortality:a retrospective cohort study (リコンビナントトロンボモジュリン投与は敗血症における播種性血管内凝固症候群および死亡率を改善する：後方視的コホート研究)
論文審査委員	(主査) 教授 松 浦 克 彦 教授 岡 田 尚志郎 教授 羽生田 正 行 教授 藤 原 祥 裕

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

播種性血管内凝固症候群（DIC）に対する早期治療は患者の予後を改善することが示唆されている。厚生労働省（JMHW）およびInternational Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)においてDICの診断基準はもっともDICへの特異度の高い診断基準である。日本救急医学会による急性期DIC診断基準は、敗血症によるDICを早期に診断できる診断基準として使用されている。リコンビナントトロンボモジュリン（rhTM）は近年DICの治療薬として日本で開発され、本邦では世界に先駆けて使用されている。rhTMをJMHWおよびISTHの診断基準で診断された敗血症によるDICに対する有用性は報告されているが、JAAMの診断基準で診断されたDICへのrhTMの有用性については報告されていない。本研究ではJAAMの診断基準で診断された敗血症によるDICに対するrhTMの各凝固マーカーへの影響と治療効果を評価した。

【方法】

2008年 5 月から2011年 3 月に愛知医科大学病院高度救命救急センター ICUへ入室した患者でJAAM診断基準により敗血症によるDICと診断された患者を対象とし、rhTMを使用して治療された群をTreatment群、rhTMなしに治療された群をControl群とした。

主要評価項目として治療7日目のDICスコア，副次評価項目として28日死亡率，治療7日までの各凝固マーカーの推移を比較検討した。

【結果】

対象患者はTreatment群12名，Control群23名であった。両群において患者背景，治療に有意な差は認めなかった。7日目のDICスコアはTreatment群 3.3 ± 1.4 点，Control群 4.9 ± 1.8 点で有意に低かった($p < 0.05$)。比例ハザード分析により算出した28日死亡率はTreatment群で有意に低かった($p < 0.05$)。SOFAスコアは両群有意に低下したが，両群に差を認めなかった。投与7日目のD-dimerはTreatment群 $7.5 \pm 4.1 \mu\text{g/mL}$ ，Control群 $30.9 \pm 33.6 \mu\text{g/mL}$ で有意に低く($p < 0.05$)，アンチトロンビン(AT)Ⅲ活性はTreatment群では継時的に有意な変化がなかったのに対してControl群では有意に低下していた($p < 0.05$)。重篤な出血は両群認めなかった。

【考察】

rhTM投与によりDICスコアは有意に改善したことから，JAAM診断基準により診断したDICに対してもrhTMの投与は有効と考えられた。rhTMはSOFAスコアを改善し，死亡率が改善することを示唆した報告があるが，今回は対象症例数が少なかったためSOFAスコアに差を認めなかったと考えられる。rhTMはトロンビンと結合し，プロテインCを活性化することで抗凝固作用を発揮する。Treatment群においてATⅢ活性は保たれたことからrhTM投与はATⅢを消費せずにDICを改善させることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

これまで播種性血管内凝固症候群(DIC)の診断基準として厚生労働省(JMHW)およびInternational Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)にて発表された基準が用いられてきたが，診断感度が低いことが指摘されている。一方，DICの治療は早期診断および早期治療が患者の予後を改善することが示唆されている。日本救急医学会では敗血症によるDICを早期に診断できる急性期DIC診断基準を作成した。リコンビナントトロンボモジュリン (rhTM) は近年DICの治療薬として日本で開発された薬剤で，これまでにrhTMをJMHWおよびISTHの診断基準で診断された敗血症によるDICに対する有用性は報告されている。しかし，JAAMの診断基準で診断されたDICへのrhTMの有用性については報告されていない。本研究ではJAAMの診断基準で診断された敗血症によるDICに対するrhTMの各凝固マーカーへの影響と治療効果を評価した。

2008年5月から2011年3月に愛知医科大学病院高度救命救急センターICUへ入室した患者でJAAM診断基準により敗血症によるDICと診断された患者を対象とした。rhTMを使用した群を治療群，rhTMを使用しなかった群を対象群として治療7日目の

DICスコア, 28日死亡率, 治療7日までの各凝固マーカーの推移を比較検討した。

対象患者は治療群12名, 対象群23名であった。7日目のDICスコアは治療群 3.3 ± 1.4 点, 対象群 4.9 ± 1.8 点であった($p < 0.05$)。28日死亡率は治療群8.3%, 対象群33.3%であった($p < 0.05$)。投与7日目のD-ダイマーは治療群 $7.5 \pm 4.1 \mu\text{g/mL}$, 対象群 $30.9 \pm 33.6 \mu\text{g/mL}$ であった($p < 0.05$)。SOFAスコアは両群とも有意に低下したが, 両群間で差は認められなかった。アンチトロンビン(AT)Ⅲ活性は治療群では継時的な変化がなかったのに対して対象群では有意な低下が認められた($p < 0.05$)。その他の凝固マーカーであるPT比, 血小板数, フィブリノーゲン値については両群間で差は認められなかった。また, 両群とも重篤な出血は認めなかった。

rhTM投与によりDICスコアおよび死亡率を有意に改善したことから, JAAM診断基準により診断したDICに対してもrhTMの投与は有効と考えられた。死亡率の改善は, SOFAスコアを改善したためと考えられたが, 両群間での差は認められなかった。その原因としてretrospective studyであることおよび対象症例数が少なかったことがSOFAスコアに差を認めなかったと考えられる。rhTMはトロンビンと結合することによって抗凝固作用を発揮することからrhTM投与はATⅢを消費することなくDICを改善することが示唆された。

本論文は, DIC治療におけるrhTM製剤の有効性および安全性を示唆したものであり, 臨床で行われるDIC治療の適正化を推進する上で有用な情報になるばかりでなく, 今後, エビデンス構築を目的にprospective studyを行う際の基礎的情報を提供するものと考え学位を授与するに値する論文であると判定した。

氏 名	原 戸 美佐子
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第408号
学位授与年月日	平成25年 3月28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	Bupivacaine-induced apoptosis independently of WDR35 expression in mouse neuroblastoma Neuro2a cells (マウス神経芽細胞腫Neuro2a細胞におけるブピバカインによって誘導されたアポトーシスとWDR35の発現について)
論文審査委員	(主査) 教授 藤 原 祥 裕 教授 佐 藤 元 彦 教授 道 勇 学 教授 牛 田 享 宏

学位論文内容の要旨

【研究背景と目的】

局所麻酔薬であるブピバカインはヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yにおいて、活性酸素種(ROS)の産生を増加させ、p38MAPKの活性化を介して、アポトーシスを誘導することが報告されている。最近、我々はWD40-repeat domain (WRD)を含有する蛋白質WDR35がcaspase-3を活性化させ、TNF α により誘導したHEK293細胞のアポトーシスを促進することと、LPSによる肝障害においてミトコンドリア経路を介して肝細胞アポトーシスを引き起こすことを明らかにしてきた。本研究では、マウス神経芽細胞腫Neuro2a細胞において、ブピバカインはアポトーシスを誘導するかを調べた。さらにROS, p38MAPK及びWDR35はアポトーシス誘導との関与について検討した。

【実験内容及び方法】

1. ブピバカインを投与したNeuro2a細胞においてcaspase-3活性化とDNA断片化(DNAラダー)を解析し、細胞アポトーシスを調べた。
2. 細胞内活性酸素測定試薬DCFH-DAを用いて、ブピバカインを投与した細胞におけるROS発生を測定した。
3. Real-time PCR と Western blot法を用いて、ブピバカインのp38MAPK活性化とWDR35の発現に対する影響を調べ、アポトーシスとの関連について検討した。
4. WDR35 siRNA, EUK-8 (EUK, 抗酸化剤) とSB202190 (SB, p38MAPK阻害剤)

のブピバカインによって誘導したWDR35発現増加およびアポトーシスに対する影響を調べた。

【結果】

1. Neuro2a細胞においてブピバカインはROS産生とp38MAPK活性（リン酸化, P-p38）を増加させ、caspase-3の活性化を介して、アポトーシスを誘導した。
2. Neuro2a細胞においてブピバカインは時間依存的にWDR35発現を増加させた。
3. EUKとSBはブピバカインによって誘導したROS発生増加、caspase-3の活性化とアポトーシスを抑制したと同時に、WDR35の発現も減少させた。
4. ブピバカインを投与したNeuro2a細胞においてWDR35 siRNAの導入はWDR35蛋白質の発現を抑制したが、caspase-3の活性化とアポトーシスに影響を及ぼさなかった。

【結論】

Neuro2a細胞においてブピバカインはROS産生を増加し、p38MAPKを活性化させることを介して、アポトーシスを誘導すると同時に、WDR35の発現も増加させた。しかしながら、ブピバカインにより増加したWDR35はアポトーシスに関与しないことが示された。ブピバカインによって誘導したアポトーシスはWDR35非依存性のシグナル経路が存在することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【研究背景と目的】

局所麻酔薬であるブピバカインはヒト神経芽細胞SH-SY5Yにおいて、活性酸素種（ROS）の産生を増加させ、p38MAPKの活性化を介して、アポトーシスを誘導する。最近、原戸らはWD40-repeat domain(WDR)を含有する蛋白質WDR35がcaspase-3活性化させ、TNF α により誘導されたHEK293細胞のアポトーシスを促進すること、LPSによる肝障害においてミトコンドリア経路を介して幹細胞のアポトーシスを引き起こすことを明らかにした。本研究の目的は、マウス神経芽細胞腫Neuro2a細胞においてブピバカインによるアポトーシスへのROS、p38MAPK、ならびにWDR35の関与を調べることであった。

【実験内容および方法】

1. ブピバカインを投与したNeuro2a細胞においてcaspase-3活性化とDNA断片化を解析し、細胞アポトーシスを調べた。
2. 細胞内活性酸素測定試薬DCFH-DAを用いて、ブピバカインを投与した細胞におけるROS発生を測定した。
3. Real-time PCRとWestern blot法を用いて、ブピバカインのp38MAPK活性化とWDR35の発現に対する影響を調べ、アポトーシスとの関連について検討した。

4. ブピバカインによって誘導されたWDR35発現増加, アポトーシスに対するWDR35 siRNA, EUK-8 (抗酸化薬), SB202190 (p38MAPK阻害薬) の影響を調べた。

【結果】

Neuro2a細胞においてブピバカインはROS産生とp38MAPK活性を増加させ、caspase-3の活性化を介して、アポトーシスを誘導すると同時に、WDR35の発現も増加させた。しかしながら、ブピバカインにより増加したWDR35はアポトーシスに関与しないことが示された。ブピバカインによって誘導したアポトーシスはWDR35非依存性のシグナル経路を介することが示唆された。

【研究の意義】

本研究は、局所麻酔薬ブピバカインによる神経細胞におけるアポトーシス誘導にWDR35が関与していないことを明らかにした。この結果はLPSによる肝障害でのアポトーシスにおける結果と異なり、大変興味深いものである。いずれにしても、本研究は局所麻酔薬による神経障害の発生機序解明に大きく役立つ可能性を秘めており価値ある報告であると考えられる。よって学位を授与するに値すると判断した。

氏名	いちのはし ゆう こ 一ノ橋 祐 子
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第409号
学位授与年月日	平成25年 3月28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	Dexamethasone administration to the neonatal rat results in neurological dysfunction at the juvenile stage even at low doses (生後早期ラットへのデキサメサゾン投与が少量でも長期的に神経発達障害をもたらす)
論文審査委員	(主査) 教授 若 槻 明 彦 教授 岡 田 尚志郎 教授 道 勇 学 教授 二 村 真 秀

学位論文内容の要旨

【目的】

Dexamethasone(DEX)は、新生児において慢性肺疾患や炎症性疾患、および循環不全などに対してしばしば用いられる薬剤である。しかし高容量および長期間にわたるDEXでの神経学的障害について問題視されるようになり、現在は必要最小限の使用に限ることが多い。DEXを用いた文献は数多く存在するものの、少量投与でのin vivo, in vitroにおける文献はわずかに散見されるのみである。そこで我々は生後早期のラットに対する少量DEXの影響をin vivoでの組織学的評価、行動学的評価およびin vitroでの神経幹細胞に対する細胞増殖能や細胞死について調べた。

【方法】

生後1日目より新生仔ラットにDEX 0.2mg/kg/dayを3日間、その後0.1mg/kg/dayを4日間腹腔内投与し、対照群には同量の生理食塩水を腹腔内投与とした。生後7, 14, 36日目に4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流・固定し、抗Phospho-Histone H3 (phospho H3)抗体、抗cleaved caspase 3抗体を用いて免疫組織学的検討をおこなった。併せて生後4-6週にかけてopen-field testおよびshuttle avoidance testを用い、行動学的に及ぼす影響を評価した。

in vitroにおいては、胎齢14日のラット脳から神経幹細胞を採取し、7日間増殖させ、続いて6日間は0.1nM, 0.1 μM, 1 μM, 5 μMと濃度の異なるDEXを添加して培養し、

比較としてのCorticosterone(CORT)を同力価となるように添加した群, および対照として生理食塩水を添加した群とで, 細胞増殖能および細胞死を評価した。

【結果】

in vivoにおいて, DEX群では対照群に比し体重は有意に少なく, 長期観察でもキャッチアップしなかった。脳重量についてもDEX群では有意に少なかった。行動学的評価では, DEX群でshuttle avoidance testにおける学習障害($p < 0.05$)に加えてopen field testでは多動傾向を認めた。免疫組織学的検討では, DEX群の海馬において, cleaved caspase 3陽性細胞が有意に増加するのに対し(DEX, 97.4 ± 17.5 cells/mm²; control, 56.6 ± 16.8 cells/mm²; $p = 0.003$), phospho H3 陽性細胞が有意に減少しており(DEX, 3.37 ± 0.55 cells/mm²; control, 13.88 ± 2.28 cells/mm²; $p = 0.028$), アポトーシス誘導, 細胞新生の抑制が認められた。

in vitroにおいて, CORT群では高濃度では細胞増殖能が抑制される傾向はあるものの有意差は認めなかった。一方DEX群では低濃度でも有意に細胞数が減少した(対照群: CORT : DEX ; $5.94 \pm 0.32 \times 10^5$ cells/well : $4.66 \pm 0.33 \times 10^5$ cells/well : $2.98 \pm 0.30 \times 10^5$ cells/well)。

【考察】

未熟脳では, 少量DEX短期間投与でも, 神経幹細胞増殖能は抑制され, またアポトーシスを誘導することにより, 海馬における神経細胞の障害, 細胞新生の抑制が起こり, 学習障害などの神経学的障害を引き起こす可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

【目的】

Dexamethasone(DEX)は, 新生児において慢性肺疾患や炎症性疾患, および循環不全などに対してしばしば用いられる薬剤である。しかし長期間にわたるDEXでの神経学的障害について問題視されるようになり, 現在は必要最小限の使用に限ることが多い。DEX少量投与におけるデメリットに関する文献はわずかに散見されるのみである。そこで今回生後早期のラットに対する少量DEXの影響をin vivoでの組織学的評価, 行動学的評価およびin vitroでの神経幹細胞に対する細胞増殖能や細胞死について調べた。

【方法】

生後1日目より新生仔SDラットに対し, 現在臨床的に少量とされるDEX0.2mg/kg/dayを3日間, その後0.1mg/kg/dayを4日間腹腔内投与し, 対照群には同量の生理食塩水を腹腔内投与とした。生後7日目に4%パラホルムアルデヒドを用いて脳を灌流・固定し, 抗Phospho-Histone H3 (phospho H3)抗体, 抗cleaved caspase 3抗体を用いて免疫組織学的検討をおこなった。併せて生後4 - 6週にかけてopen-field testおよび

shuttle avoidance testを用い、行動学的評価を行った。

in vitroにおいては、胎齢14日の胎仔ラット脳から神経幹細胞を採取し、7日間増殖させ、続いて6日間は0.1nM, 0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ Mと濃度の異なるDEXを添加して培養し、比較としてのCorticosterone(CORT)を同力価となるように添加した群、および生理食塩水を添加した対照群とで、細胞増殖能および細胞死を評価した。

【結果】

行動実験では、DEX群でshuttle avoidance testでの学習障害($p < 0.05$)に加えてopen field testで多動傾向を認めた。免疫組織学的検討では、DEX群の海馬において、cleaved caspase 3陽性細胞が有意に増加するのに対し(DEX, 97.4 ± 17.5 cells/ mm^2 ; control, 56.6 ± 16.8 cells/ mm^2 ; $p = 0.003$), phospho H3 陽性細胞が有意に減少しており(DEX, 3.37 ± 0.55 cells/ mm^2 ; control, 13.88 ± 2.28 cells/ mm^2 ; $p = 0.028$), アポトーシス誘導、細胞新生の抑制が認められた。

in vitroにおいて、CORT群では高濃度では増殖能抑制傾向はあるものの有意差までは至らなかった。一方DEX群では低濃度でも有意に細胞数が減少した(対照群 : CORT : DEX ; $5.94 \pm 0.32 \times 10^5$ cells/well : $4.66 \pm 0.33 \times 10^5$ cells/well : $2.98 \pm 0.30 \times 10^5$ cells/well)。細胞死(LDH)については3群間で有意差を認めなかった。

【考察】

未熟脳では、少量DEX短期間投与でも、神経幹細胞増殖能は抑制され、分化過程における細胞へのアポトーシスを誘導することにより、神経学的障害を引き起こす可能性が示唆された。これらの結果を踏まえ、臨床での使用については他剤への変更、もしくは避けられない場合には必要最小限の投与量に限ることが望ましい。

本論文は、論文審査委員会を経て、学位授与に値すると判断する。

氏 名	小林 佑次
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第347号
学位授与年月日	平成24年6月14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	Serum Tumor Antigen REG4 as a Useful Diagnostic Biomarker in Gastric Cancer (胃癌のスクリーニング検査としての新規血清マーカー REG4の臨床的有用性の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 政志 教授 岡田 尚志郎 教授 菊地 正悟 教授 山口 悦郎

学位論文内容の要旨

【緒言・目的】

現在、胃癌のスクリーニングのための血清マーカーとしてはペプシノゲンが用いられているがペプシノゲンそのものは胃粘膜萎縮のマーカーであり、胃癌のスクリーニング検査としては間接法である。一方、新規の悪性腫瘍血清マーカーであるregenerating islet-derived 4 (REG4)は膀胱癌での診断における有用性が報告されており、胃癌においても有用性が検討されつつあるが、いまだ十分な解析が行われていない。今回申請者は胃癌診断、特に早期胃癌に着目し、血清REG4蛋白量測定の臨床的有用性について検討した。

【対象と方法】

対象は、2004年11月から2006年12月に愛知県がんセンター中央病院で確定診断が得られ、かつ文書による同意が得られた胃癌患者74例(早期癌51例、進行癌23例)、および上部消化管内視鏡で胃癌を認めなかった非胃癌患者106例とした。REG4蛋白量は、患者の血清からMBL116キット(医学生物学研究所、名古屋)を用いてstandard sandwich ELISA法で測定し、また同時に血清ペプシノゲン値も測定した(EIA法)。血清REG4蛋白測定の胃癌に対するスクリーニングマーカーとしての有用性を血清ペプシノゲン測定と比較検討した。またReceiver Operating Characteristics (ROC)曲線を参考にしたcut-off値を用いて、2008年8月から2009年8月までの、胃癌患者37例及び非胃癌患者44例に対してvalidation studyを行った。

【結果】

血清REG4蛋白量は、胃癌、非胃癌において中央値(範囲)は、各々 9.76(2.97 ~ 424.35), 5.01(1.14 ~ 25.53)であり、胃癌と非胃癌の間に血清REG4蛋白量は有意差($p<0.0001$)を認めた。また早期癌および進行癌の中央値は各々 8.42(2.97 ~ 19.37), 13.12(3.89 ~ 424.35)であり、各群間に有意差($p<0.02$)を認めた。さらに血清REG4蛋白量は早期癌および進行癌は各々非胃癌との間にも有意差($p<0.0001$)を認めた。cut-off値を6.67ng/mlと設定したところ、胃癌診断におけるREG4の感度・特異度・正診率は各々 73.0%, 70.8%, 71.8%であり、ペプシノゲンは各々 55.4%, 68.9%, 63.3%であった。早期胃癌に対する血清REG4蛋白量測定 of 感度・特異度・正診率は、それぞれ68.6%, 70.8%, 70.1%であった。validation studyを行った結果、胃癌に対する感度は94.5%, 特異度31.8%, 正診率60.5%であった。

【結論】

REG4は、ペプシノゲンと比して感度が高く、また早期癌において有意な上昇を認めるため、早期胃癌のスクリーニング検査としての有用性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

現在、胃癌のスクリーニングのための血清マーカーとしてはペプシノゲンが用いられているがペプシノゲンそのものは胃粘膜萎縮のマーカーであり、胃癌のスクリーニング検査としては間接法である。一方、新規の悪性腫瘍血清マーカーであるregenerating islet-derived 4 (REG4)は腺癌での診断における有用性が報告されており、胃癌においても有用性が検討されつつあるが、いまだ十分な解析が行われていない。今回申請者は胃癌診断、特に早期胃癌に着目し、血清REG4蛋白量測定の臨床的有用性について検討した。

対象は、2004年11月から2006年12月に愛知県がんセンター中央病院で確定診断が得られ、かつ文書による同意が得られた胃癌患者74例（早期癌51例，進行癌23例），および上部消化管内視鏡で胃癌を認めなかった非胃癌患者106例とした。REG4蛋白量は、患者の血清からMBL116キット（医学生物学研究所，名古屋）を用いてstandard sandwich ELISA法で測定し，また同時に血清ペプシノゲン値も測定した（EIA法）。血清REG4蛋白測定の胃癌に対するスクリーニングマーカーとしての有用性を血清ペプシノゲン測定と比較検討した。またReceiver operating Characteristics (ROC)曲線を参考にしたcut-off値を用いて，2008年8月から2009年8月までの，胃癌患者37例及び非胃癌患者44例に対してvalidation studyを行った。その結果，血清REG4蛋白量は，胃癌，非胃癌において中央値（範囲）は，各々 9.76（2.97 ~ 424.35），5.01（1.14 ~ 25.53）であり，胃癌と非胃癌の間に血清REG4蛋白量は有意差（ $p<0.0001$ ）を認めた。また早期癌およ

び進行癌の中央値は各々 8.42 (2.97 ~ 19.37), 13.12 (3.89 ~ 424.35) であり, 各群間に有意差 ($p < 0.02$) を認めた。さらに血清REG4蛋白量は早期癌および進行癌は各々非胃癌との間にも有意差 ($p < 0.0001$) を認めた。cut-off値を6.67ng/mlと設定したところ, 胃癌診断におけるREG4の感度・特異度・正診率は各々 73.0%, 70.8%, 71.8%であり, ペプシノゲンは各々 55.4%, 68.9%, 63.3%であった。早期胃癌に対する血清REG4蛋白量測定の感度・特異度・正診率は, それぞれ68.6%, 70.8%, 70.1%であった。validation studyを行った結果, 胃癌に対する感度は94.5%, 特異度31.8%, 正診率60.5%であった。

以上の研究結果よりREG4は, ペプシノゲンと比して感度が高く, また早期癌において有意な上昇を認めるため, 早期胃癌のスクリーニング検査としての有用性が示唆された。

本研究は, 早期胃癌スクリーニングにおける血清REG4タンパク量測定の意義を明らかにしたものであり, 今後の胃癌早期診断に貢献するものと考えられ, 学位を授与するに値すると判断した。

氏 名	ひじ かた やす たか 土 方 康 孝
学位の種類	博 士 (医 学)
学位授与番号	乙 第348号
学位授与年月日	平成24年 6 月14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	Endoscopic Submucosal Dissection with Sheath-Assisted Counter Traction Using a Novel Sheath for Early Gastric Cancers (薬品加工シースを用いたシースアシスト法による早期胃癌ESDの有用性)
論文審査委員	(主査) 教授 春日井 邦 夫 教授 中 野 隆 教授 羽生田 正 行 教授 植 田 広 海

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【背景/目的】

近年、胃の腫瘍性病変や早期胃癌に対して、しばしば内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) が行われている。しかしESDによる穿孔や出血などの偶発症は増加傾向にあり、また、手技的にも難しく通常の内視鏡的粘膜切除術 (EMR) と比較して術時間を要することが多い。そこで我々は以前からESDに対して簡単な道具で、切開ラインの良好な視野を得る方法としてシースアシスト法を考案してきた。さらに今回我々は、シースアシスト法による粘膜下層へのカウンタートラクションにおいて、滑りを少なくし、トラクションを保てるような特殊な薬品加工を施したシースを開発した。そしてESDにおける薬品加工シースの有用性について検討した。

【方法】

対象は2008年 4 月から2008年12月までの通常のESDで治療した43人の早期胃癌患者と2009年11月から2010年 5 月までの薬品加工シースを用いてESDを行った25人の早期胃癌患者を比較検討した。腫瘍径と部位別にESDの術時間について検討を行い、また偶発症についてもそれぞれ検討を行った。

【結果】

2群間で年齢、性別に有意差はなく、切除されたすべての病変は粘膜内癌で、切除断端は陰性、リンパ管、脈管浸潤も認められなかった。また、腫瘍の部位や組織分化度、

切除標本の大きさ、一括切除率にも2群間で有意差は認められなかった。今回の検討で、すべての病変において薬品加工群で術時間の短縮を認めた (75.0 ± 40.0 vs 108.1 ± 38.1 min, $p < 0.05$)。特に、病変の直径が20mm以上の病変において薬品加工群で有意に術時間の短縮を認めた。部位別での腫瘍径に差は認められなかったが、どの部位においても薬品加工群で術時間の短縮を認めた。また、穿孔は通常のESDでは2人(4.7%)、後出血は3人(7.0%)に認められたが、薬品加工群では一例も認められなかった。

【結論】

薬品加工シースを用いたシースアシスト法によるESDは技術的にも容易で非侵襲的であり、病変部位に関係なく術時間の短縮を認め、特に直径20mm以上の病変で術時間を有意に短縮させた。あらゆる技術レベルの内視鏡医において安全で効率的な早期胃癌の完全切除が遂行できると思われ、薬品加工シースを用いたトラクションESDは標準的ESD手技として多くの施設で導入可能な手技と考えられた。

論文審査の結果の要旨

近年、早期胃癌に対する標準的治療として内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)が広く普及してきた。しかし、ESDは内視鏡的粘膜切除術(EMR)と比較して高度な手技を必要とし、術時間も長く、穿孔や出血などの偶発症の頻度も高い。そこで我々は簡単な道具で、安全で確実なESDを施行する方法としてシースアシスト法を考案し実用化してきた。さらに今回我々は、シースアシスト法による粘膜下層へのカウンタートラクションにおいて、滑りを少なくし、良好なトラクションを保てるよう特殊な薬品加工を施したシースを開発しその有用性について検討を行った。

2008年4月から2008年12月までの通常のESDで治療した43人の早期胃癌患者と2009年11月から2010年5月までの薬品加工シースを用いてESDを行った25人の早期胃癌患者につき一括切除率、術時間、偶発症を比較検討した。さらに腫瘍径と部位別の術時間についても検討を行った。

両群間で年齢、性別に有意差はなく、切除されたすべての病変は粘膜内癌で、切除断端は陰性であり、リンパ管、脈管浸潤も認められなかった。また、腫瘍の部位や組織分化度、切除標本の大きさ、一括切除率にも両群間で有意差は認められなかった。今回の検討で、すべての病変において薬品加工群で術時間の短縮を認めた (75.0 ± 40.0 vs 108.1 ± 38.1 min, $p < 0.05$)。特に、腫瘍の直径が20mm以上の病変において薬品加工群で有意に術時間の短縮を認めた。両群間で部位別での腫瘍径に差は認められなかったが、すべての部位において薬品加工群で術時間の短縮を認めた。また、穿孔は通常のESDでは2人(4.7%)、後出血は3人(7.0%)に認められたが、薬品加工群では一例も認められなかった。

以上の結果より薬品加工シースを用いたシースアシスト法によるESDは技術的にも容易で非侵襲的であり，病変部位に関係なく術時間の短縮を認め，特に直径20mm以上の病変で術時間を有意に短縮させた。あらゆる技術レベルの内視鏡医において安全で効率的な早期胃癌の完全切除が遂行できると思われ，薬品加工シースを用いたトラクションESDは標準的ESD手技として多くの施設で導入可能な手技と考えられた。

本研究は，薬品加工シースを用いたシースアシスト法の有用性を証明し，その成果は早期胃癌に対する標準的ESD手技としての臨床応用が期待され，学位を授与するに値すると判定した。

氏 名	安 藤 景 一 <small>あん どう けい いち</small>
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第349号
学位授与年月日	平成24年 8月23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	Laparoscopic Surgery in the Management of Hypersplenism and Esophagogastric Varices: Our Initial Experiences (脾機能亢進症と食道胃静脈瘤の腹腔鏡下手術操作～我々の初期の経験～)
論文審査委員	(主査) 教授 野 浪 敏 明 教授 池 田 洋 教授 米 田 政 志 教授 石 口 恒 男

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【背景】

門脈圧亢進症の治療は内視鏡治療やIVRが主流ではあるがHassab手術や脾摘術は現在でも胃静脈瘤や難治性食道静脈瘤、脾機能亢進症等で有効な外科的治療法として重要な役割を持っている。

我々の門脈圧亢進症に対する治療方針はHassab手術や脾摘術を主体とし、これらに内視鏡治療を組み合わせ良好な成績を得ている。

今回我々はこれらの手術に腹腔鏡下手術を導入しその安全性、優位性についてretrospectiveに検討した。

【方法】

1999年8月から2010年8月までの期間に、当科では門脈圧亢進症に対する脾摘出術またはHassab手術を110例に実施した。このうち、同時に他の大手術（肝切除術、胃切除術など）を併施した56例を除外し、残りの54例を研究対象とした。対象のうち38例には開腹で、16例には腹腔鏡下で手術を施行した。脾摘術は15例に施行し、開腹にて5例、腹腔鏡下にて10例に施行した。Hassab手術は39例に施行し、開腹にて33例、腹腔鏡下にて6例に施行した。それぞれの術式について開腹群と腹腔鏡下群の術前ならびに周術期のデータを比較した。

【結果】

腹腔鏡下に脾摘術が完遂できた症例は9例であった。1例では視野不良のため腹腔鏡下手術から用手補助下腹腔鏡下手術（HALS）に変更した。脾摘術における腹腔鏡下群の手術時間は開腹群と比べ有意に長かった。術後在院日数は腹腔鏡下群の方が短かった。Hassab手術における腹腔鏡下手術を実施した6例はすべてHALSで施行でき、開腹手術に移行した症例はなかった。Hassab手術の腹腔鏡下群の手術時間は開腹群と比較して有意に長かった。しかし、術後合併症の発生率は腹腔鏡下群の方が有意に低く、術後在院日数も有意に短かった。

【結論】

門脈圧亢進症に対する腹腔鏡下手術は、手術時間は長いが術後在院日数が短く、低侵襲性の観点からも安全に施行可能で、今後進められるべき方法と考えられた。

論文審査の結果の要旨

【背景】

門脈圧亢進症の治療は内視鏡治療やIVRが主流ではあるがHassab手術や脾摘術は現在でも胃静脈瘤や難治性食道静脈瘤、脾機能亢進症等で有効な外科的治療法として重要な役割を持っている。

我々の門脈圧亢進症に対する治療方針はHassab手術や脾摘術を主体とし、これらに内視鏡治療を組み合わせ良好な成績を得ている。

今回我々はこれらの手術に腹腔鏡下手術を導入しその安全性、優位性についてretrospectiveに検討した。

【方法】

1999年8月から2010年8月までの期間に、消化器外科では門脈圧亢進症に対する脾摘出術またはHassab手術を110例に実施した。このうち、同時に他の大手術(肝切除術、胃切除術など)を併施した56例を除外し、残りの54例を研究対象とした。対象のうち38例には開腹で、16例には腹腔鏡下で手術を施行した。脾摘術は15例に施行し、開腹にて5例、腹腔鏡下にて10例に施行した。Hassab手術は39例に施行し、開腹にて33例、腹腔鏡下にて6例に施行した。それぞれの術式について開腹群と腹腔鏡下群の術前ならびに周術期のデータを比較した。

【結果】

腹腔鏡下に脾摘術が完遂できた症例は9例であった。1例では視野不良のため腹腔鏡下手術から用手補助下腹腔鏡下手術(HALS)に変更した。脾摘術における腹腔鏡下群の手術時間は開腹群と比べ有意に長かった。術後在院日数は腹腔鏡下群の方が短かった。

Hassab手術における腹腔鏡下手術を実施した6例はすべてHALSで施行でき、開腹手術に移行した症例はなかった。Hassab手術の腹腔鏡下群の手術時間は開腹群と比較して有意に長かった。しかし、術後合併症の発生率は腹腔鏡下群の方が有意に低く、術後在院日数も有意に短かった。

【結論】

門脈圧亢進症に対する腹腔鏡下手術は、手術時間は長いが術後在院日数が短く、低侵襲性の観点からも安全に施行可能で、今後進められるべき方法と考えられた。

本研究は、門脈圧亢進症の外科治療に腹腔鏡の手技を導入した最新の治療を提供するものであり、外科学の進歩に貢献するものである。よって、学位を授与するに値するものであると判断した。

氏 名	吉 田 美 和 <small>よし だ み わ</small>
学位の種類	博 士 (医 学)
学位授与番号	乙 第350号
学位授与年月日	平成24年 8 月23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	Loss of heterozygosity on chromosome 16q suggests malignancy in core needle biopsy specimens of intraductal papillary breast lesions (Core needle biopsy(CNB)検体における16qLOH解析を応用した乳管内乳頭状病変の良悪性の鑑別)
論文審査委員	(主査) 教授 福 富 隆 志 教授 細 川 好 孝 教授 住 友 誠 教授 横 井 豊 治

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

乳腺腫瘍の中で独特な一群として、拡張した乳管内にポリープ状に発育する乳管内乳頭状腫瘍群がある。これらの病変は良性の乳管内乳頭腫(Intraductal papilloma)と悪性の非浸潤性乳管癌-乳頭型(Ductal Carcinoma in Situ (DCIS), papillary type)に大別される。乳管内乳頭腫との鑑別が問題になる非浸潤性乳管癌-乳頭型は高分化な癌が多く、術前のコア針生検(Core needle biopsy (CNB))による組織診では、乳管内乳頭状病変の良悪性の鑑別が困難なことが多い。近年の分子生物学的手技を用いた遺伝子異常の検索により、第16染色体長腕(16q)のヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity (LOH))の頻度は非浸潤性乳管癌-乳頭型と乳管内乳頭腫との間で大きく異なることが知られている。これまでに報告されているLOH解析は一般的に新鮮凍結標本または切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出した比較的多量のDNAを用いているが、これらの手法を応用し、今回われわれは乳管内乳頭状腫瘍のCNB検体から抽出した少量のDNAを用いた16qLOH解析が術前の乳管内乳頭状腫瘍の良悪性の鑑別診断において有用であるかどうかを検討した。

【対象と方法】

2005～2008年に術前CNBで組織学的に鑑別困難または悪性の疑いと判定され、組織

診断確定のために切除生検が施行された乳管内乳頭状病変21例およびpositive controlとして術前CNBで非浸潤性乳管癌－乳頭型と診断された4例を対象とした。CNB検体(ホルマリン固定パラフィン包埋切片)より腫瘍細胞を採取(microdissection), DNAを抽出し, 16q上に位置する(AC)n領域の一つであるD16S419領域とD16S514領域をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅し, ABI3130 sequencerで16qLOHの有無を解析した。CNB標本のLOH解析の結果と切除生検標本の最終組織診断の結果とを比較検討した。

【結果】

術前CNBで組織学的に鑑別困難または悪性の疑いと判定された乳管内乳頭状病変21例のうち, 切除標本の最終組織診断で11例が良性, 10例が悪性と診断された。CNB検体からLOHの情報が得られたのは11例の良性腫瘍のうち8例, 10例の悪性腫瘍のうち7例, positive control 4例のうち2例だった。LOHの情報が得られた8例の良性腫瘍はすべて16qLOH陰性。positive controlを含む9例の悪性腫瘍のうち6例(67%)が16qLOH陽性であった。乳管内乳頭状腫瘍のCNB検体から抽出したDNAを用いたLOH解析においても, 新鮮凍結標本または切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片から抽出したDNAを用いたときと同様, 悪性腫瘍において16qLOHが有意に高頻度にみられることが示された($P=0.007$)。

【結論】

乳管内乳頭状病変の良悪性の鑑別にCNB検体から抽出したDNAを用いた16qLOH解析は術前組織診断の補助的ツールとして有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【背景】

乳管内乳頭状腫瘍は, 良性の乳管内乳頭腫(Intraductal papilloma)と悪性の非浸潤性乳管癌－乳頭型(Ductal Carcinoma in Situ (DCIS), papillary type)とに大別される。非浸潤性乳管癌－乳頭型は高分化な癌が多く, コア針生検(Core needle biopsy (CNB))による確定診断が困難なことが多い。分子生物学的手技を用いた遺伝子異常の検索により, 第16染色体長腕(16q)のヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity (LOH))の頻度は非浸潤性乳管癌－乳頭型と乳管内乳頭腫とで大きく異なることが知られている。乳管内乳頭状腫瘍のCNB検体から抽出したDNAを用いた16qLOH解析が術前の乳管内乳頭状腫瘍の良悪性の鑑別診断において有用であるかどうか検討した。

【対象と方法】

術前CNBで組織学的に鑑別困難または悪性の疑いと判定され, 切除生検が施行された乳管内乳頭状病変21例およびpositive controlとして術前CNBで非浸潤性乳管癌－乳頭型と診断された4例を対象とした。CNB検体(ホルマリン固定パラフィン包埋切片)よ

り腫瘍細胞を採取(microdissection), DNAを抽出し, D16S419領域とD16S514領域をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅し, ABI3130 sequencerで16qLOHの有無を解析した。CNB標本のLOH解析の結果と切除生検標本の最終組織診断の結果とを比較検討した。

【結果】

術前CNBで組織学的に鑑別困難または悪性の疑いと判定された乳管内乳頭状病変21例のうち, 切除標本の最終組織診断で11例が良性, 10例が悪性と診断された。CNB検体からLOHの情報が得られたのは11例の良性腫瘍のうち8例, 10例の悪性腫瘍のうち7例, positive control 4例のうち2例だった。LOHの情報が得られた8例の良性腫瘍はすべて16qLOH陰性, positive controlを含む9例の悪性腫瘍のうち6例(67%)が16qLOH陽性であった。乳管内乳頭状腫瘍のCNB検体から抽出したDNAを用いたLOH解析において, 悪性腫瘍で16qLOHが有意に高頻度にみられた($P=0.007$)。

【結論】

乳管内乳頭状病変の良悪性の鑑別にCNB検体から抽出したDNAを用いた16qLOH解析は術前組織診断の補助的ツールとして有用であることが示唆された。

本研究は, 従来の針生検標本における組織診断では困難とされる乳管内乳頭状病変の良悪性の鑑別において, 16qLOH解析の客観的補助的ツールとしての有用性を示した論文であり, 学位を授与するに値すると判断した。

氏 名	まつ うら まさ よ 松 浦 雅 代
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第351号
学位授与年月日	平成25年1月10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	Prolongation of QT Interval Induced by Electroconvulsive Therapy is Attenuated by Landiolol(ECTにより引き起こされたQT間隔の延長は塩酸ランジオロールにより減弱する)
論文審査委員	(主査) 教授 藤 原 祥 裕 教授 岡 田 尚志郎 教授 天 野 哲 也 教授 兼 本 浩 祐

学位論文内容の要旨

電気痙攣療法(以下ECT)を受ける患者は通常抗うつ薬や抗精神病薬を内服しているが、これらの薬剤は心電図QT間隔(以下QT)を延長する。ECT施行時に投与されるスキサメトニウムやECT自体にもQTを延長する作用があると報告されており、ECTに対する麻酔においてはQTの延長が懸念される。

本研究の目的は、ECTにより引き起こされたQT延長に対し、先天性QT延長症候群の主な治療法である β 遮断薬の効果を調べることである。

【方法】

ECTを受ける予定の患者15名を対象とした。複数回のECT治療のうち2回を抽出し、短時間作用型 β 1選択的遮断薬(塩酸ランジオロール)を持続的に投与する場合(treatment L)と投与しない場合(treatment C)に振り分けた。患者入室後、静脈ラインを確保し、酸素、プロポフォールの持続投与を開始した。意識消失後、スキサメトニウムを投与し、マスク換気後、ECTを施行した。treatment Lでは $40\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ の塩酸ランジオロールをプロポフォール投与開始から痙攣が終了するまで持続投与した。補正QT間隔(以下QTc)の計算にはFridericiaの式を用いた。

【結果】

treatment Cではサクシニルコリン、ECTの両方とも著明に心拍数を増加させた。treatment Lではプロポフォール投与後、心拍数はベースラインより著明に低くなり、ECT後の心拍数はベースラインに復帰した。両グループでプロポフォール投与はQTc

に影響を与えなかったが、スキサメトニウムとECTの投与はQTcを著明に延長した。しかし、すぐに治療前の値に戻った。スキサメトニウムとECTにより引き起こされた心拍数、QTcの増加はtreatment Lで著明に低かった。

【考察】

QTの延長は心室の再分極異常により引き起こされる。心筋細胞の遅延整流カリウムチャンネルは心臓の再分極の主な決定因子で、 β 1アドレナリン受容体の活性化はそれを抑制すると報告されている。我々はECTやスキサメトニウムの投与により引き起こされた血中カテコラミン濃度の上昇が β 1アドレナリン受容体を刺激しQT延長を生じ、塩酸ランジオロールは β 1アドレナリン受容体を遮断することでQT延長を抑制したと推察する。本研究を通じてECT前にQT延長が危険レベルにあった患者はおらず、両グループで有害な不整脈を経験した患者もいなかった。塩酸ランジオロールの投与が臨床的に有益だと結論づけることはできなかった。

【結論】

サクシニルコリンやECTは著明なQT延長を引き起こした。塩酸ランジオロールはサクシニルコリンやECTによる心拍数、QT延長を抑制した

論文審査の結果の要旨

電気痙攣療法(Electroconvulsive Therapy; 以下ECT)は、うつ病、統合失調症などの精神疾患の治療に有効であり、頻繁に行われている治療法である。ECTにより心電図QT間隔が延長するという報告があるのに加え (J ECT 2010;26:41-6), ECTの適応となる疾患にしばしば使用される向精神病薬もQT間隔を延長する (Am J Psychiatry 2001; 158: 1774-82) といわれている。QT間隔の延長はTorsades de Pointesなどの重篤な不整脈を惹起する可能性があり、ECT施行時のTorsades de Pointes、心静止の発生も報告されている (Am J Psychiatry 2010; 167: 127-32)。一方で、先天性QT延長症候群の患者では β 遮断薬が致死的不整脈発生の予防に有効であるとされている (Circulation 2000; 101: 616-23)。ECT施行時には、痙攣の誘発に伴い血圧・心拍数の急激な変動が認められ、しばしば心拍数のコントロールのため、短時間作用型 β 遮断薬が投与される。本研究の目的は、ECTによるQT間隔延長に対して短時間作用型 β 1選択的遮断薬である塩酸ランジオロールがどのような影響を及ぼすか調べることである。

ECTを受ける36～71歳(ASA1～2)のうつ病の15名を対象とし、プロポフォール(2～2.5 μ g/ml)で投与、就眠後に左大腿部のターニケットを250～300mmHgで加圧した後、スキサメトニウム(以下SUX)(1mg/kg)を投与し、ECTを行った。塩酸ランジオロール40 μ g/kg/min投与下のECT時(処置L)、非投与下のECT時(処置C)において、麻酔モニターより心電図波形をパーソナルコンピュータに取り込み、循環動態波形・ゆらぎ解析ソフ

トウェア (Fluclet, 大日本住友製薬社) を用いて, HR, QT間隔, QTc間隔を算出した。

処置C時にはSUX, ECTによって心拍数はそれぞれ, 29.9 ± 14.5 , 13.8 ± 4.4 bpm上昇し, QTcはそれぞれ 36.8 ± 14.5 , 72.3 ± 23.1 msec延長した。一方, 処置L時ではSUX, ECTによる心拍数上昇はそれぞれ 16.0 ± 7.0 , 4.7 ± 2.8 , QTc延長はそれぞれ 17.9 ± 6.5 , 54.6 ± 17.9 msecに留まり, 処置C時に比べいずれも有意に減少していた。処置L時はECTによる血圧上昇も有意に抑制したが, SUXによる血圧上昇には影響を与えなかった。ECTによって誘発される痙攣の持続時間も両処置間に有意差を認めなかった。

本研究の間, 致死的不整脈の発生や, それを危惧するようなQT間隔の延長を示した患者はいなかったため, 塩酸ランジオロールが致死的不整脈発生予防の観点から臨床上有用であるか否かを議論することは出来ないが, QT間隔の延長を抑制したことはその可能性を十分に示唆するものである。また, ECT, SUXによる循環変動を塩酸ランジオロールは抑制するため, 心機能低下症例, 虚血性心疾患合併症例における有用性も期待されると考えられた。

以上の論文内容は, 電気痙攣療法中の麻酔管理において重要な知見を与えるものであり, 学位の授与にふさわしいものであると判定した。

氏 名	とく どめ けんたろう 徳 留 健太郎
学位の種類	博 士 (医 学)
学位授与番号	乙 第352号
学位授与年月日	平成25年 2月21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	Efficacy of endoluminal gastroplication in Japanese patients with proton pump inhibitor-resistant, non-erosive esophagitis (日本人におけるプロトンポンプインヒビター抵抗性非びらん性胃食道逆流症に対する内視鏡的噴門縫縮術の有用性に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 春日井 邦 夫 教授 岡 田 忠 教授 野 浪 敏 明 教授 風 岡 宜 暁

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【背景と目的】

非びらん性逆流症 (Non-erosive reflux disease: NERD) は粘膜傷害を認めないが胸やけ症状を呈し, その頻度は胃食道逆流症 (Gastro-esophageal reflux disease: GERD) の半数以上を占め, GERD治療薬のプロトンポンプ阻害薬 (PPI) の有効率は50%程度と低く, 内科的治療に難渋する場合が多い。NERDの外科的治療の有効性を示す報告はあるが, PPI抵抗性NERDの内視鏡治療の有用性は検討されていない。PPI抵抗性NERD患者に内視鏡的噴門縫縮術(Endoluminal gastroplication: ELGP)を施行しその有効性, 安全性と長期経過を検討した。

【対象・方法】

PPIを 8 週以上服用しても症状が続く「PPI抵抗性NERD」患者19名を対象とし, ELGPの前後で問診票により症状(FSSG)とQOL(SF-36)を, 24時間食道内pHインピーダンスモニタリングにより症状インデックスと症状感度インデックスを, さらに皺襞(plication)数と服薬量を比較検討した。

【結果】

FSSGはELGP前 19.1 ± 10.5 , 3ヵ月後 10.3 ± 7.4 , 12ヵ月後 9.3 ± 9.9 ($P < 0.05$)と有意に改善した。ELGP前のSF-36スコアはいずれも国民標準値を下回っていたが, 3ヵ月後に

は身体機能, 全体的健康観が有意に改善した。plication数は前 2.4 ± 0.2 , 3ヵ月後 1.2 ± 0.2 , 12ヵ月後 0.8 ± 1.0 と自然脱落が存在した。逆流回数と逆流症状インデックスは3ヵ月後で差はないが, 症状感度インデックスは有意に減少した(前 16.1 ± 12.9 , 3ヵ月後 3.9 ± 8.3 , $P < 0.01$)。3ヵ月後, 6例(31.6%)はPPI服薬量を50%以上減量し, 11例(57.9%)は中止できた。さらに12ヵ月後の服薬量は 1.6 ± 1.2 (%)($P < 0.01$)とさらに減量可能であった。重篤な合併症は認めなかった。

【結論】

ELGPはPPI抵抗性NERDに対し, 有用かつ安全な治療法と考えられた。

論文審査の結果の要旨

非びらん性逆流症 (Non-erosive reflux disease: NERD) は粘膜傷害を認めないが胸やけ症状を呈し, その頻度は胃食道逆流症 (Gastro-esophageal reflux disease: GERD) の半数以上を占め, GERD治療薬のプロトンポンプ阻害薬 (PPI) の有効率は50%程度と低く, 内科的治療に難渋する場合が多い。NERDに対する外科的治療の有効性を示す報告はあるが, PPI抵抗性NERDの内視鏡治療の有用性は検討されていない。そこで, 今回われわれは, PPI抵抗性NERD患者に管腔内内視鏡治療として内視鏡的噴門縫縮術 (Endoluminal gastroplication: ELGP) を施行しその有効性, 安全性と長期経過を検討した。

【対象・方法】

PPIを8週以上服用しても胸やけ症状が続く「PPI抵抗性NERD」患者19名を対象とし, ELGPの前後で問診票により症状 (FSSG) とQOL (SF-36) を, 24時間食道内pHインピーダンスモニタリングにより症状インデックスと症状感度インデックスを, さらに皺襞 (plication) 数と服薬量を比較検討した。また, ELGPにともなう合併症についても検討した。

【結果】

FSSGはELGP前 19.1 ± 10.5 , 3ヵ月後 10.3 ± 7.4 , 12ヵ月後 9.3 ± 9.9 ($P < 0.05$) と有意に改善した。ELGP前のSF-36スコアはいずれも国民標準値を下回っていたが, 3ヵ月後には身体機能, 全体的健康観が有意に改善した。plication数は前 2.4 ± 0.2 , 3ヵ月後 1.2 ± 0.2 , 12ヵ月後 0.8 ± 1.0 と自然脱落が存在した。逆流回数と逆流症状インデックスは3ヵ月後で差はないが, 症状感度インデックスは有意に減少した (前 16.1 ± 12.9 , 3ヵ月後 3.9 ± 8.3 , $P < 0.01$)。3ヵ月後, 6例(31.6%)はPPI服薬量を50%以上減量し, 11例(57.9%)は中止できた。さらに12ヵ月後の服薬量は 1.6 ± 1.2 (%) ($P < 0.01$) とさらに減量可能であった。ELGPにともなう重篤な合併症は認めなかった。

【結論】

ELGPはPPI抵抗性NERDに対し、有用かつ安全な治療法と考えられた。

本研究は、内服治療が困難なPPI抵抗性NERD患者に対する内視鏡的噴門縫縮術の有用性と安全性を証明し、その成果はNERDに対する内科治療と外科治療の橋渡しとしての臨床応用が期待され、学位を授与するに値すると判定した。

博 士 学 位 論 文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第30集

平成25年 6 月

発行年月日 平成25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)