

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成22年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目 次

平成22年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第422号	松本 隆 司	Expression of ADAMTS-5 in deformed human temporomandibular joint discs (変形したヒト顎関節関節円板におけるADAMTS-5の発現) ……	1
博(医)甲第423号	柴田 真 希	Reduced expression of perlecan in the aorta of Secondary hyperparathyroidism model rats with medial calcification (中膜石灰化病変を伴う副甲状腺機能亢進症モデルラットの大動脈におけるパールカン発現の減少) ……	3
博(医)甲第424号	小上 真 史	A Comparison of Conventional and Molecular Microbiology in Detecting Differences in Pneumococcal Colonization in Healthy Children and Children with Upper Respiratory Illness (健康児と上気道感染症児の肺炎球菌細菌叢の検出における従来の培養法と分子学的検出法の比較) ……	5
博(医)甲第425号	木村 文 子	Influence of trichloroacetic acid peeling on the skin stress response system (トリクロロ酢酸 (TCA) のSkin Stress Response System (SSRS) に及ぼす影響) ……	7
博(医)甲第426号	藤井 啓 介	Sevoflurane does not alter norepinephrine-induced intracellular Ca ²⁺ changes in the diabetic rat aorta (セボフルランは糖尿病ラット大動脈標本におけるノルエピネフリン惹起細胞内カルシウムイオン濃度変化に影響しない) ……	10
博(医)甲第427号	岡本 昌 典	Calcium oxalate crystal deposition in metabolic syndrome model rat kidneys (メタボリックシンドロームモデルラットにおける腎結石形成についての検討) ……	12
博(医)甲第428号	西岡 亮 平	SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo. (SNAIL遺伝子はヒト膵癌細胞株(BxPC3)の上皮間葉移行を誘導し、生体における癌の転移・浸潤を増強する) ……	14
博(医)甲第429号	下雅意 学	The cellular mechanisms underlying the inhibitory effects of isoflurane and sevoflurane on arginine vasopressin-induced vasoconstriction (バゾプレッシンによる血管収縮と平滑筋細胞内Ca ²⁺ 濃度変化およびRhoキナーゼに対する吸入麻酔薬の影響) ……	16
博(医)甲第430号	盖 志 博	Trps1 Functions Downstream of Bmp7 in Kidney Development (腎発生においてTrps1はBmp7の下流で機能する) ……	18
博(医)甲第431号	池島 英 之	Upregulation of Fractalkine and Its Receptor, CX3CR1, is Associated With Coronary Plaque Rupture in Patients With Unstable Angina Pectoris (フラクタルカインおよびその受容体であるCX3CR1は不安定狭心症患者において冠動脈プラーク破裂に関連している) ……	21

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第432号	Mohammad Eliusur Rahman Bhuiyan	Complex cardiovascular actions of α -adrenergic receptors expressed in the nucleus of solitary tract of rats (ラット孤束核内 α アドレナリン受容体の循環調節に対する多様の効果) ……………	24
博(医)甲第433号	木 賀 紀 文	Expression of lumican related to CD34 and VEGF in the articular disc of the human temporomandibular joint (ヒト顎関節円板におけるCD34とVEGFに関連したルミカンの発現) ……………	27
博(医)甲第434号	中 田 耕 平	1) Bone marrow nails created by percutaneous osteoplasty for long bone fracture : comparisons among acrylic cement alone, acrylic-cement-filled bare metallic stent, and acrylic-cement-filled covered metallic stent 2) Percutaneous osteoplasty with a bone marrow nail for fractures of long bones-experimental study (長管骨骨折に対する経皮的髄内釘作成術の基礎的検討) ……………	29
博(医)甲第435号	劉 志 艶	Encapsulated follicular thyroid tumor with equivocal nuclear changes, so-called well-differentiated tumor of uncertain malignant potential, a morphological, immunohistochemical, and molecular appraisal (乳頭癌の核所見をもつ被包性甲状腺濾胞細胞腫瘍 ーいわゆるWDT-UMPの形態的、免疫組織化学的、分子病理学的評価ー) ……	32
博(医)甲第436号	・ 本 周 子	Endogenous TNF α Suppression of Neovascularization in Corneal Stroma in Mice (角膜実質血管新生における内因性の腫瘍壊死因子 α の役割) ……	34
博(医)甲第437号	神 埜 聖 治	Aberrant expression of the P2 promoter-specific transcript Runx1 in epiphyseal cartilage of Trps1-null mice (Trps1遺伝子ノックアウトマウスの骨端軟骨におけるP2プロモーター特異的Runx1転写産物の異常発現) ……………	36
博(医)甲第438号	齐 峰	Volatile Anesthetics Inhibit Angiotensin II-Induced Vascular Contraction by Modulating Myosin Light Chain Phosphatase Inhibiting Protein, CPI-17 and Regulatory Subunit, MYPT1 Phosphorylation (揮発性麻酔薬はCPI-17, MYPT1リン酸化を修飾することにより、Angiotensin II惹起血管収縮を抑制する) ……	39
博(医)甲第439号	谷 口 亘	In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord (脊髄膠様質ニューロンにおけるドパミン作動神経系疼痛抑制作用のin vivoパッチクランプ法を用いた解析) ……………	41
博(医)甲第440号	高 橋 紀 代	Local heat application to the leg reduces muscle sympathetic nerve activity in human (下肢の局所加温が健常者の筋交感神経活動 (muscle sympathetic nerve activity: MSNA) に与える影響) ……………	43
博(医)甲第441号	倉 本 朋 未	IL-23 gene therapy for mouse bladder tumor cell lines (IL-23遺伝子導入によるマウス膀胱癌細胞株に対する免疫療法)	45
博(医)甲第442号	魚 崎 操	Antiviral effects of dehydroascorbic acid (デヒドロアスコルビン酸の抗ウイルス作用) ……………	48

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第850号	永 松 晃	Use of ¹⁸ F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for diagnosis of uterine sarcomas (子宮肉腫の診断における ¹⁸ F-FDG-PETの有用性) ……………	51
博(医)乙第851号	田 中 和 東	Impact of 3D ultrasonography and power Doppler angiography in the management of cervical cancer (子宮頸癌の診断及び治療効果判定における3次元超音波診断と3次元パワードップラー法の役割) ……………	54
博(医)乙第852号	山 田 和 子	Status of Suicidal Thoughts and Related Factors in Workers (労働者の自殺念慮の実態とその関連要因) ……………	57
博(医)乙第853号	佐 原 伸 也	Effects of Hepatic Artery Chemoembolization Using Cisplatin-lipiodol Suspension with Gelatin Sponge Particles on Swine Liver (シスプラチン-リピオドール懸濁液とゼラチンスポンジ細片を用いた肝動脈化学塞栓療法の正常豚肝組織に及ぼす影響について) ……………	60
博(医)乙第854号	高 坂 功	A new Solule Gelatin Sponge for Transcatheter Hepatic Arterial Embolization (肝動脈塞栓術に用いる可溶性ゼラチンスポンジの作製と有用性に関する基礎的検討) ……………	62
博(医)乙第855号	森 田 修 平	Autophagy protects against human islet amyloid polypeptide-associated apoptosis (オートファジーはヒト膵ラ氏島アミロイド蛋白に関連したアポトーシスに対し保護的に働く) ……………	65
博(医)乙第856号	松 村 永 秀	The prognostic significance of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression in metastatic bladder cancer patients treated with gemcitabine - cisplatin based combination chemotherapy (ゲムシタピンとシスプラチンを含む併用化学療法を施行した転移性膀胱癌患者の生存に関するhuman equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1)発現の意義) ……………	67
博(医)乙第857号	田 中 才 一	Suppression of injury-induced epithelial-mesenchymal transition in a mouse lens epithelium lacking tenascin-C (水晶体外傷後のテネシシン欠損マウスにおける上皮間葉系移行の抑制の役割) ……………	69
博(医)乙第858号	箕 西 利 之	Differential vasodilation response to olprinone in rabbit renal and common carotid arteries (ウサギの腎動脈と総頸動脈に対するオルプリノンの血管拡張作用の違いについて) ……………	72
博(医)乙第859号	富 岡 恵 子	The Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid in Cerebral Arteriolar Constriction and the Inhibitory Effect of Propofol (20-HETEが脳実質内細動脈へ及ぼす作用とプロポフォルによる修飾効果に関する研究) ……………	74
博(医)乙第860号	岩 崎 博	Efficacy and limitations of current methods of intraoperative spinal cord monitoring (現在用いられている術中脊髄機能モニタリングの有用性とその限界) ……………	77

(学位記番号)	(氏名)	(論文題目)	(頁)
博(医)乙第861号	島友子	Disappearance of glomerular IgA deposits in childhood IgA nephropathy showing diffuse mesangial proliferation after 2 years of combination/prednisolone therapy. (2年間のプレドニゾロン、カクテル治療後にメサンギウムIgA沈着が消失したびまん性メサンギウム増殖を示す重症小児IgA腎症の臨床病理学的意義の検討)	78
博(医)乙第862号	峠弘	Angiogenesis in renal cell carcinoma : The role of tumor-associated macrophages. (腎細胞癌における血管新生 : 腫瘍関連マクロファージの役割)	81
博(医)乙第863号	西林宏起	Cortically Evoked Responses of Human Pallidal Neurons Recorded during Stereotactic Neurosurgery (定位脳手術における皮質刺激による淡蒼球神経細胞応答に関する研究)	83
博(医)乙第864号	羽場政法	Beneficial Effect of Propofol on Arterial Adenosine Triphosphate-sensitive K ⁺ Channel Function Impaired by Thromboxane (プロポフォールはトロンボキサンで障害された血管平滑筋ATP感受性カリウムチャンネル機能を回復させる)	85
博(医)乙第865号	中村信男	Electrocardiographic Strain and Endomyocardial Radial Strain in Hypertensive Patients (高血圧患者における心電図ストレイン波形と心内膜側ラディアルストレインとの関係)	89
博(医)乙第866号	北端宏規	Coronary Microvascular Resistance Index Immediately After Primary Percutaneous Coronary Intervention as a Predictor of the Transmural Extent of Infarction in Patients With ST-Segment Elevation Anterior Acute Myocardial Infarction (ST上昇型前壁急性心筋梗塞患者における梗塞の壁深達度を予測する因子としての冠微少血管抵抗指数)	91
博(医)乙第867号	谷本貴志	Bedside Assessment of Myocardial Viability Using Transmural Strain Profile in Patients With ST Elevation Myocardial Infarction: Comparison With Cardiac Magnetic Resonance Imaging (ST上昇型急性心筋梗塞患者におけるストレインプロファイルを用いた心筋バイアビリティー評価 : 心臓MRIとの比較)	93
博(医)乙第868号	川勝基久	Loss of Smad3 gives rise to poor soft callus formation and accelerates early fracture healing (Smad3の欠損が軟骨性仮骨の低形成の誘因となり早期の骨折治癒過程を促進する)	95
博(医)乙第869号	正山勝	Brain activity during clock drawing test: multichannel near-infrared spectroscopy study (近赤外線分光法による時計描画課題中の脳神経活動計測に関する研究)	97

学位記番号	博(医)甲第422号		
学位授与の日	平成22年4月13日		
氏名	松本隆司		
学位論文の題目	Expression of ADAMTS-5 in deformed human temporomandibular joint discs (変形したヒト顎関節関節円板における ADAMTS-5 の発現)		
論文審査委員	主査	教授 前田正信	
	副査	教授 鶴尾吉宏	教授 藤田茂之

論文内容の要旨

背景と目的

咀嚼機能は日常生活を営む上で最も基本的かつ不可欠な機能である。咀嚼機能の中心的役割をしている顎関節は人体で唯一の左右一対軸移動性の関節である。ヒトの顎関節は下顎頭が回転して蝶番運動をするだけでなく、関節腔内で滑走運動する。これに伴って顎関節関節円板も滑走する。このため効率の良い開口が可能となっただけでなく、食物の咬断、粉碎のほかに臼磨運動が可能になった。その代わりに肉食動物の顎関節に比較して関節が不安定になり、それだけこれを維持安定する筋肉の負担が増大し、過緊張になりやすく顎関節症をおこしやすいという弱点を持っている。

顎関節症は、顎関節や咀嚼筋の疼痛、関節雑音、開口障害または顎運動異常を主徴候とする疾患である。その中でも関節円板の変形、破壊を伴った重篤な顎関節症は未だその病因のメカニズムは不明であるが、顎関節の組織破壊におけるメカニズムとして、関節内の低酸素状態や炎症状態が組織破壊を引き起こすという説が提唱されている。近年、重篤な顎関節症患者の滑液中においてinterleukin-1(IL-1) β とaggrecanaseが共に増加していることが報告された。

Aggrecanaseの中でa disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (ADAMTS-5)は変形性関節症の軟骨基質を破壊する主要因子として示唆されている。

本研究では、関節円板の変形、破壊の原因が基質分解酵素合成の亢進によるものと考えた。この基質分解酵素合成の亢進の環境因子として低酸素、炎症が関わり、ADAMTS-5の合成を亢進しているとの仮説を立て、関節円板細胞、円板組織を用い検討を行った。

方法

1. 顎関節関節円板細胞を用いた実験

手術により摘出したヒト顎関節関節円板組織をコラゲナーゼ処理し、継代培養を行った。実験には6-12代のものを用いた。本実験で用いた顎関節関節円板細胞の特性をRT-PCR法(Collagen I, Collagen II, Aggrecan)及び細胞免疫組織化学的染色(Vimentin, CD68)にて調べた。通常酸素及び低酸素下でIL-1 β を添加し3,6,12,24時間培養を行った後にRNAを回収しRT-PCR法にてADAMTS-5のmRNAの発現を調べた。

2. 臨床組織検体を用いた実験

手術により摘出したヒト顎関節円板組織11例に対しADAMTS-5抗体による免疫組織化学的染色を行った。染色の範囲を陰性、間質のみに陽性、軟骨細胞様細胞に陽性の3群に分類し、染色の強さを陰性、弱陽性、陽性、強陽性の4群に分類した。判定は顎関節症の研究に従事する3人で個々に行った。

結果

1. 顎関節関節円板細胞の特性

線維芽細胞のマーカーであるVimentinは陽性、MacrophageのマーカーであるCD68は陰性であった。

RT-PCR法ではCollagen Iの発現が一番強かった。Aggrecanの発現は中等度でCollagen IIは発現が弱かった。このことから本実験で用いた細胞は滑膜を含まず線維軟骨細胞の特性を有していることが確認された。また、継代培養による脱分化の影響はなかった。

顎関節関節円板細胞におけるADAMTS-5の発現

ADAMTS-5は低酸素下IL-1 β 添加で3時間培養した際に有為上昇した。

2. 顎関節関節円板組織におけるADAMTS-5の発現

ADAMTS-5は間質と軟骨細胞様細胞の両方に陽性反応を示し、染色の強さは陽性から強陽性反応が

多かった。また変形部位や穿孔部位に強く陽性反応を示した。

結論

ヒト顎関節円板細胞は低酸素環境下でIL-1 β を添加し培養するとADAMTS-5のmRNAの発現が上昇した。重篤な顎関節症のヒト顎関節円板組織では円板の変形、破壊を伴った部分にADAMTS-5の発現が強く出た。このことから、関節円板の変形、破壊にADAMTS-5が影響を及ぼす可能性が考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年3月19日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

顎関節症は、顎関節や咀嚼筋の疼痛、関節雑音、開口障害または顎運動異常を主徴候とする疾患である。その中でも関節円板の変形、破壊を伴った重篤な顎関節症は未だその病因のメカニズムは不明であるが、顎関節の組織破壊におけるメカニズムとして、関節内の低酸素状態や炎症状態が組織破壊を引き起こすという説が提唱されている。近年、重篤な顎関節症患者の滑液中においてIL-1 (interleukin-1) β と aggrecanase が共に増加していることが報告されている。さらにaggrecanaseの中でADAMTS-5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5)は変形性関節症の軟骨基質を破壊する主要因子として注目されている。

本論文は、関節円板の変形、破壊の原因が基質分解酵素合成の亢進によるものと考え、この基質分解酵素合成の亢進の環境因子として低酸素、炎症が関わり、ADAMTS-5の合成を亢進しているとの仮説を立て、ヒト顎関節円板細胞、顎関節円板組織を用いた検討を行った。その手法は、ヒト培養顎関節円板細胞を用い、通常酸素濃度 (IL-1 β 添加、無添加)、低酸素濃度 (IL-1 β 添加、無添加) の条件で培養し、ADAMTS-5の発現をRT-PCRで解析し、さらに顎関節症患者の摘出顎関節円板組織におけるADAMTS-5の発現を免疫組織化学的に検討したものである。

その結果、

1)ヒト顎関節円板細胞におけるADAMTS-5のmRNAはIL-1 β を添加した低酸素条件下で最も強く発現していた。

2)顎関節円板組織における免疫組織化学的検討においては、重篤な顎関節症患者の顎関節円板では正常顎関節円板に比較して変形、穿孔部位にADAMTS-5の顕著な発現が認められた。

以上の結果より、炎症を伴う重篤な顎関節症の関節円板において低酸素の影響によりADAMTS-5 が誘導されることが確認され、誘導された ADAMTS-5 は関節円板内で重篤な顎関節症の病態形成に関与しているものと推察された。本論文はヒト顎関節円板の変形、破壊のメカニズムに関して重要な情報を提供するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第423号		
学位授与の日	平成22年5月11日		
氏名	柴田真希		
学位論文の題目	Reduced expression of perlecan in the aorta of Secondary hyperparathyroidism model rats with medial calcification. (中膜石灰化病変を伴う副甲状腺機能亢進症モデルラットの大動脈におけるパールカン発現の減少)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 赤阪隆史	教授 重松 隆

論文内容の要旨

背景：透析患者では、全身の血管に高度な石灰化が発症することは良く知られており、石灰化した血管は灌流臓器の虚血や心負荷を助長するため、透析患者の死因の約半数を占める心血管病と深く関わっている。血管石灰化の危険因子としては、加齢や糖尿病、高血圧、さらに透析患者特有のものとして二次性副甲状腺機能亢進症、および高リン血症があげられるが、その詳細な分子メカニズムはいまだわかっていない。

目的：副甲状腺機能亢進症発症血管石灰化モデルラットを作成し、マイクロアレイ法を用いて血管石灰化病変で特異的に変動する遺伝子の探索を行う。

方法：5/6 腎摘出術と高リン・低カルシウム食で8週間飼育することにより、高リン血症と二次性副甲状腺機能亢進症を有する血管石灰化モデルラットを作製した。対照群として5/6 腎摘出術を施行後、普通食で飼育したラットを作製した。血管石灰化が認められた副甲状腺機能亢進群および腎摘群の大動脈からえられたRNAをマイクロアレイ法、およびリアルタイムPCR法にて比較し、血管石灰化病変で特異的に変動する遺伝子を探索した。

結果：

二次性副甲状腺機能亢進症を有する血管石灰化モデルラット

高リン・低カルシウム食で二次性副甲状腺機能亢進症を誘導したラット(HPT)の大動脈では、42匹中12匹で中膜石灰化が認められた。対照群である、腎摘出術のみを行い、普通食で飼育したラット(Nx)では、石灰化は認められなかった。血液データでは、HPTラットのほうが有意に体重が少なく、カルシウムが低くリンが高く、iPTHの値が高値となった。NxとHPTの間で腎障害の程度には差はみられなかった。

血管石灰化病変にて変動する遺伝子の検索

マイクロアレイ法では、HPT群の石灰化血管において、42種類の遺伝子の発現増加と68種類の遺伝子の発現減少が認められた。われわれはPerlecanの発現減少に着目し、リアルタイムPCR法による確認を行ったところ、マイクロアレイの結果と同じようにPerlecanの発現減少が確認された。また免疫染色においても同様に、大動脈基底膜におけるPerlecanの発現減少が確認された。

考察：Perlecanはヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つであり、軟骨の細胞外基質や全身の基底膜に広く存在している。動脈においては、基底膜の主要な構成成分の一つであり、役割としては、①動脈構造の維持に働く②基底膜の構成成分として、バリアとして働く③種々の増殖因子の作用を修飾し、平滑筋細胞の形質の維持に働く④ヘパラン硫酸が局所の抗凝固作用を及ぼす等があげられる。これらの作用からPerlecanは動脈硬化の進行抑制に働くとされており、動脈硬化病変や、糖尿病を有する動脈でも、Perlecanの発現が減少していることはすでに報告されている。また、ヘパラン硫酸鎖には骨形成を抑制する作用があることが知られており、ヘパラン硫酸/ヘパリンは血管石灰化をin vitroで抑制することも報告されている。今回われわれは、血管石灰化病変でPerlecanが減少していることを報告したが、それが直接的に石灰化の促進に関わるか否かを証明するためにはさらなる研究が必要である。しかし、Perlecanのもつ生物学的特性を考えると、ヘパラン硫酸鎖が血管石灰化防御因子として働く可能性は十分に考えられ、HPTラットにおけるPerlecanの減少は、血管石灰化をさらに悪化させる方向へ働く可能性があると思われる。

結論：高リン血症および二次性副甲状腺機能亢進症によって誘導した血管石灰化を有する大動脈に

において、動脈の主要なヘパラン硫酸プロテオグリカンである **Perlecan** の発現が特異的に減少していることをマイクロアレイ法および **real time PCR** 法で証明した。ヘパラン硫酸鎖は、血管平滑筋細胞を種々の石灰化促進因子から防御している可能性があり、動脈における **Perlecan** の発現減少は血管石灰化の危険因子である可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年4月8日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。透析患者では、全身の血管に高度な石灰化が発症することは良く知られており、石灰化した血管は灌流臓器の虚血や心負荷を助長するため、透析患者の死因の約半数を占める心血管病と深く関わっている。血管石灰化の危険因子としては、加齢や糖尿病、高血圧、さらに透析患者特有のものとして二次性副甲状腺機能亢進症、および高リン血症があげられるが、その詳細な分子メカニズムはいまだわかっていない。

そこで、本研究では、SDラットに5/6腎摘出術を施行したのち、低カルシウム・高リン食で8週間飼育することにより二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットを作成し、同時に発症する血管石灰化病変につき検討を行った。マイクロアレイ法を用いて血管石灰化病変で特異的に変動する遺伝子の探索を分子生物学的に行い、得られた変動遺伝子の血管石灰化病変における病的意義について考察を加えた。

これらの実験により

- ①二次性副甲状腺機能亢進症モデルラットにおいて血管石灰化がどのように発生するか、
- ②このモデルの血管石灰化病変における変動遺伝子は何か、について検討した。さらに、
- ③変動遺伝子の血管石灰化病変における病的意義について、文献的に考察を加えた。

その結果、

- ① 5/6腎摘および低カルシウム高リン食により二次性副甲状腺機能亢進症を発症させたラットの動脈において、おもに中膜に血管石灰化が確認された。
- ② マイクロアレイ法、リアルタイムPCR法、および免疫染色法により、血管石灰化病変において、**perlecan**の発現減少が確認された。
- ③ **Perlecan**およびヘパラン硫酸鎖はその分子構造的な特徴から、血管をさまざまな血管石灰化促進因子から防御している可能性が示唆され、血管石灰化病変における**perlecan**の減少は、血管石灰化の増悪因子となる可能性が考えられた。

以上より、本論文は、副甲状腺機能亢進症発症血管石灰化モデルラットを用いて、血管石灰化病変における **perlecan** の特異的な減少を示したものであり、学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第424号		
学位授与の日	平成22年6月8日		
氏名	小上真史		
学位論文の題目	A Comparison of Conventional and Molecular Microbiology in Detecting Differences in Pneumococcal Colonization in Healthy Children and Children with Upper Respiratory Illness (健常児と上気道感染症児の肺炎球菌細菌叢の検出における従来の培養法と分子学的検出法の比較)		
論文審査委員	主査	教授 秋本 茂	
	副査	教授 吉川 徳茂	教授 山中 昇

論文内容の要旨

(背景)

鼻咽腔に定着している肺炎球菌は幼児において高率に検出され、中耳炎や鼻副鼻腔炎などの上気道感染時には検出率が増加することから、上気道感染症における重要な起炎菌となると考えられている。従来、鼻咽腔定着菌の検討は培養法や定性的 PCR 法を主体とした、半定量法および検出率のみを用いて行われてきた。今回我々は定量的リアルタイム PCR 法による鼻咽腔肺炎球菌および各血清型肺炎球菌の定量的解析を行い、従来の培養法との比較および定着量の年齢的な変化および複数血清型肺炎球菌の同時定着について評価した。

(方法)

対象は健常児 136 名、急性中耳炎および急性鼻副鼻腔炎と診断された上気道感染症児 79 名とした。鼻咽腔よりスワブにて検体を採取し、従来の培養法および血清型判定法と定量的リアルタイム PCR 法による肺炎球菌の検出および血清型の判定を行った。定量的リアルタイム PCR 法では本邦で検出される頻度の高い血清型 3,6A,6B,14,19F,23F を検索対象とした。

(結果)

定量的リアルタイム PCR 法による肺炎球菌全体の検出率は培養法と比較して、健常児群では約 2 倍と高感度であった。定量的な検討では、上気道感染症群において健常児群よりも有意に鼻咽腔における肺炎球菌菌量が増加していた。血清型の検討でも定量的リアルタイム PCR 法では健常児群、上気道感染症群ともに検出率が増加し、それぞれ培養法の約 2.3 倍、約 1.5 倍であった。複数血清型の検討において、定量的リアルタイム PCR 法では健常児群で 7.4%、上気道感染症群で 13.9%において複数血清型の同時定着を認めたが、培養法では検出不能であった。肺炎球菌菌量の年齢的検討では、鼻咽腔における各血清型の肺炎球菌菌量が年齢と逆相関して減少することが判明した。

(考察)

定量的リアルタイム PCR 法は従来の培養法と比較して高い感度を示し、培養法では検出できなかった複数の血清型の検出も有意に高率に行うことができた。さらに、鼻咽腔の肺炎球菌の定量化に成功し、年齢と鼻咽腔肺炎球菌の菌量が逆相関していることや上気道感染時には菌量が増加していることも示すことができた。これらのことから、肺炎球菌の定着の評価において定量的リアルタイム PCR は極めて有用な検索手段となることが示され、小児上気道肺炎球菌感染症の研究において、従来の培養法だけでなく、定量的リアルタイム PCR 法を組み合わせることにより、病態解明および治療に関する多くの重要な情報を得ることができると考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 22 年 5 月 26 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

鼻咽腔に定着している肺炎球菌は幼児において高率に検出され、中耳炎や鼻副鼻腔炎などの上気道感染時には検出率が増加することから、上気道感染症における重要な起炎菌となると考えられている。従来、鼻咽腔定着菌の検討は培養法や定性的 PCR 法を主体とした、半定量法および検出率のみを用いて行われてきた。本論文は定量的リアルタイム PCR 法を用いて、鼻咽腔における各血清型の

肺炎球菌および複数血清型の同時定着を評価し、年齢的な変動および感染症における変化を検討したものである。

ワクチン接種対象者で、中耳・鼻腔・咽頭に異常所見を認めない136名の小児を健常児群、急性中耳炎または急性鼻副鼻腔炎と診断された79名の小児を上気道感染症群として、鼻咽腔スワブを検体とし従来の培養法および定量的リアルタイムPCR法を用い、肺炎球菌の検出および定量を行った。肺炎球菌のリアルタイムPCR法による検討では、*wzg* 遺伝子をターゲットとし、血清型は本邦で検出される頻度の高い血清型3,6A,6B,14,19F,23Fを検討対象とした。リアルタイムPCR法による肺炎球菌全体の検出率は培養法と比較して、健常児群では約2倍と高感度であった。しかし、定量的な検討では、上気道感染症群において健常児群よりも有意に菌量が増加していた。血清型の検討でもリアルタイムPCR法では健常児群、上気道感染症群ともに検出率が増加し、それぞれ培養法の約2.3倍、約1.5倍であった。複数血清型の検討では培養法では検出不能であったが、リアルタイムPCR法では健常児群で7.4%、上気道感染症群で13.9%において複数血清型の同時定着を認めた。肺炎球菌菌量の年齢的検討では、鼻咽腔における各血清型の肺炎球菌菌量が年齢と逆相関して減少することが判明した。

本論文は、鼻咽腔における各血清型肺炎球菌の定量的検討を行い、小児における鼻咽腔細菌叢のダイナミズムを明らかにするとともに、上気道感染症の発症における鼻咽腔肺炎球菌の重要な役割を解明し、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第425号		
学位授与の日	平成22年9月14日		
氏名	木村文子		
学位論文の題目	Influence of trichloroacetic acid peeling on the skin stress response system (トリクロロ酢酸 (TCA) の Skin Stress Response System(SSRS)に及ぼす影響)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔和	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 古川 福実

論文内容の要旨

緒言

トリクロロ酢酸 (TCA) は光老化皮膚の若返りを目的としたケミカルピーリングに用いられる代表的な薬剤である。TCA は真皮乳頭層まで浸達し、このレベルで皮膚を剥離する。そのため、表皮のターンオーバー促進のみでなく、間接的に真皮線維芽細胞にも作用し真皮浅層のリモデリングを引き起こすと考えられている。しかし、現在のところその生物学的機序は明らかではない。一方、skin stress response system (SSRS) は皮膚独自のストレス応答システムである。皮膚に直接加わった局所性ストレス (外傷、紫外線、感染など) や TNF α 、IL-1 や IL-6 などのサイトカイン) に反応して、皮膚局所で corticotropin releasing hormone (CRH) や proopiomelanocortin (POMC) 分解産物である adrenocorticotrophic hormone (ACTH),

α -melanocyte stimulating hormone (MSH)、 β -endorphin などの種々のホルモンが産生され、恒常性を維持する機能を発揮していると考えられている。本研究では TCA ピーリングによる SSRS への活性化の可能性につき検討した。

材料と方法

1) 培養細胞

5%FBS 含有 DMEM 培地で培養しているマウス表皮細胞株 (Pam212) に、TCA 濃度が 0.05%、0.5%、1% となるように TCA を培養液に添加し培養し、3 時間、9 時間、21 時間後に細胞を回収し、RNA を採取した。

2) マウス皮膚組織採取

C57BL/6 mice (8 週令雌マウス) の足底に 40% TCA 水溶液を外用し、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に同部位の皮膚を採取した。標本は半割し、一方を固定し免疫染色に、もう一方を凍結し RNA 採取のために使用した。

3) ヒト皮膚組織標本

インフォームドコンセントを得た 50 歳代女性の下腹部に、40% TCA 水溶液を外用し、3 時間、9 時間、21 時間後に 8mm トレパンで皮膚採取した。標本は半割し、一方を固定し免疫染色に、もう一方を凍結し RNA 採取のために使用した。

4) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

採取した Pam212、マウス・ヒト皮膚における POMC、melanocortin receptor 1 (MC1R)、CRH、CRH receptor 1 (CRHR1) の mRNA の発現を RT-PCR にて解析した。

5) 免疫組織学的染色

採取したマウス・ヒト皮膚標本からパラフィン切片を作成し、CRH、CRHR1、POMC、MC1R と POMC 分解産物である α -MSH、ACTH、 β -endorphin に対する一次抗体を使用し、Catalyzed Signal Amplification System (CSA 法) にて免疫組織染色を施行し、各蛋白の発現を評価した。

結果

1) TCA 処理 Pam212 での POMC、MC1R、CRH、CRHR1 の mRNA の発現

Pam212 では、POMC、MC1R、CRH、CRHR1 の mRNA の発現がみられ、0.5% TCA 処理で POMC、MC1R の mRNA の一過性の発現上昇がみられた。これらに対し、CRH は TCA 処理により発現に変化はみられず、CRHR1 は全ての濃度で一過性の発現上昇がみられた。

2) TCA外用後マウス皮膚における POMC、 α -MSH、ACTH、 β -endorphin、MC1R、CRH、CRHR1の発現

マウス足底皮膚で、POMCとMC1RはmRNA、蛋白ともに発現しており、TCA処理にて、POMCとMC1RはmRNAの発現誘導に伴った蛋白発現がみられた。一方、POMC分解産物である α -MSHは表皮で発現はみられず、ACTHと β -endorphinの発現はみられたが、いずれもTCA処理にて発現誘導はみられなかった。

CRHはTCA未処理ではmRNAの発現がみられたが蛋白発現は認められなかった。

CRHR1はTCA未処理でmRNAと蛋白の発現が認められた。CRHとCRHR1はTCA処理にてmRNA、蛋白ともに発現に変化はみられなかった。

3) TCA外用後ヒト皮膚における POMC、 α -MSH、ACTH、 β -endorphin、MC1R、CRH、CRHR1の発現

ヒト皮膚では、POMCはmRNA、蛋白ともに発現しており、TCA処理にてmRNAの発現誘導に伴った蛋白発現がみられた。MC1RはTCA未処理ではmRNAの発現がみられないものの蛋白発現は認められ、これらはいずれもTCAによって発現が誘導された。これに対し、POMC分解産物である α -MSHの発現はみられず、ACTHと β -endorphinは軽度発現がみられるものの、いずれもTCAによる発現誘導はみられなかった。

CRHはTCA未処理ではmRNAの発現がみられないものの蛋白発現は認められた。TCA処理にてこれらのmRNAの誘導がみられたが、蛋白発現に変化はなかった。

CRHR1はTCA未処理でmRNA、蛋白の発現が認められたが、TCA処理にて変化はなかった。

結語

- 1) マウス・ヒト皮膚へのTCA処理にて、POMCとMC1RのmRNAの一過性の発現増強と、これに続く表皮での蛋白発現がみられた。CRHはヒトにおいてmRNAが一過性に発現増強みられたが、マウスではみられず、いずれも蛋白発現の増強はみられなかった。これらから、TCAはSSRSの中でもPOMCの発現を直接誘導している可能性が示唆された。
- 2) POMC分解産物である α -MSH、ACTH、 β -endorphinのうち、 α -MSHは表皮に発現がみられず、ACTHと β -endorphinの発現がみられたものの、いずれもTCAにて発現増強は誘導されなかった。これらより、TCAによるSSRSの活性化において、生物学的活性を示すホルモンとしてPOMC蛋白の誘導とその作用が重要であることが示唆された。POMCの作用は現在明らかではないが、POMC分解産物の作用として、抗炎症作用、免疫抑制作用、表皮細胞や線維芽細胞の増殖、表皮ターンオーバーの亢進などが報告されており、POMC蛋白も同様の作用を有する可能性がある。TCAによって誘導されるPOMCがどのような生物学的作用があるか、今後検討が必要である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年8月20日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

Skin stress response system (SSRS)は皮膚独自のストレス応答システムであり、皮膚への直接的局所性ストレスや皮膚局所で産生されたIL-1、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインに反応して、皮膚局所でcorticotropin releasing hormone (CRH)やproopiomelanocortin (POMC)の分解産物であるadrenocorticotropic hormone (ACTH)、 α -melanocyte stimulating hormone (MSH)、 β -endorphinなどのホルモンが産生され、恒常性を維持する機能を発揮していると考えられている。一方、トリクロロ酢酸 (TCA)はケミカルピーリングに用いられる代表的な薬剤であり、真皮乳頭層まで浸達し、このレベルで皮膚を剥離する。そのため、表皮のターンオーバー促進のみでなく、表皮全層と真皮浅層のリモデリングによってrejuvenation (若返り) 効果を引き起こすと考えられている。本研究はTCAピーリングのSSRSへの関与につき検討したものである。

C57BL/6Jマウスとヒト皮膚を用いた研究結果は下記の通りである。

- 1) TCA塗布後のマウス皮膚とヒト皮膚において、POMCとその受容体であるmelanocortin receptor 1 (MC1R)の一過性の発現誘導とこれに伴う表皮全層細胞での蛋白

発現がみられた。

2) 同処置のマウスとヒト皮膚において、POMC 分解産物である α -MSH、ACTH、 β -endorphin の発現誘導はみられなかった。

3) CRH については、ヒト皮膚では TCA 塗布によって mRNA の一過性の発現誘導がみられたが、表皮での蛋白発現の増強はみられず、マウス皮膚では mRNA、蛋白とも発現に変化はみられなかった。

これらの結果から、TCA は SSRS の中でも CRH を介さずに POMC の発現を誘導することが示唆された。また、POMC 蛋白は関連ペプチドに分解されることなく生物学的活性を示している可能性があり、その具体的な解明が今後の課題として残された。

以上、本研究は、TCA ピーリングと SSRS の関連の一端を明らかにし、皮膚のリモデリングにおける免疫・内分泌系の関与を示したもので、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第426号		
学位授与の日	平成22年11月9日		
氏名	藤井啓介		
学位論文の題目	Sevoflurane does not alter norepinephrine-induced intracellular Ca^{2+} changes in the diabetic rat aorta (セボフルランは糖尿病ラット大動脈標本におけるノルエピネフリン惹起細胞内カルシウムイオン濃度変化に影響しない)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡史郎	
	副査	教授 岡村吉隆	教授 畑埜義雄

論文内容の要旨

緒言

糖尿病は世界中で増えつつある疾患である。糖尿病患者では血行動態が不安定になることや手術をうける糖尿病患者が増加していることから、麻酔科医は、糖尿病患者での心血管系における変化の病態生理を理解する必要がある。糖尿病患者では、心血管系の合併症が多く、患者の予後を規定する因子であり、それらの合併症は、糖尿病血管の異常な反応性が原因のひとつであるとされる。

糖尿病血管の異常な反応性については、これまで主にストレプトゾトシンによって導入された糖尿病モデルで検証されてきた。しかしこれはコントロール不良な1型糖尿病モデルでの検証である。1型糖尿病と2型糖尿病では、心血管系機能の障害が、質的にも量的にも異なることが報告されている。

以前我々は、セボフルランを用いた麻酔導入では、2型糖尿病患者よりも非糖尿病患者で皮膚温が上昇しやすいことを報告した。よって、糖尿病患者では吸入麻酔薬に対する血管の反応性が異なることが推察されるが、その機序については未だ明らかになっていない。

本研究は、自然発症2型糖尿病モデルラットを用いて、ノルエピネフリン (NE) による血管収縮反応および細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化に対しセボフルランが及ぼす影響について検討することを目的とした。

方法

自然発症2型糖尿病の遺伝的モデルとして OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットと、その対象群として LETO (Long-Evans Tokushima) ラットを用いた。

OLETF ラットおよび LETO ラットより単離した内皮除去下行大動脈標本を用いて、セボフルラン存在 (1.7%および3.4%) 非存在下で KCl 30mM および NE 10^{-6} M 適用時の等尺性張力変化及び $[Ca^{2+}]_i$ 変化を観察した。

結果は全て、KCl 30mM によるそれぞれの変化に対する百分率で表記し、平均値[95%信頼区間]で示した。NE 惹起血管収縮反応と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に対する異なる濃度のセボフルランの影響を比較検討するために、1 要因分散分析を用いて解析し、post hoc test として Games-Howell-test を用いた。ラットの種類とセボフルラン濃度の交互作用は、2 要因分散分析を用いて評価した。すべての P 値は 0.05 未満をもって統計学的に有意とした。

結果

OLETF ラットのうち 90%以上が糖尿病と診断され、ほとんどの LETO ラットが非糖尿病と診断された。

いずれのラット大動脈標本も、KCl 30mM も NE 10^{-6} M に対し迅速かつ持続する収縮反応および $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を示した。LETO および OLETF ラットにおける KCl 惹起血管収縮反応はそれぞれ、1.6 g [1.1–2.1 g] および 1.7 g [1.0–2.4 g] であった (n=5)。LETO および OLETF ラットにおける NE 惹起血管収縮反応はそれぞれ、KCl 惹起収縮反応の 46.4% [39.0–53.7%] および 54.8% [36.9–72.6%] であった (n=5)。LETO ラットと OLETF ラット間で、KCl (P=0.82) および NE 惹起収縮反応 (P=0.46) に有意差はなかった。

セボフルランは LETO ラットにおける NE 惹起収縮反応を用量依存性に抑制したが OLETF ラット

ではその作用を認めなかった。LETO ラット (9.4% [6.3 - 12.6%]) と OLETF ラット (43.6% [28.3 - 58.9%]) 間で、セボフルラン 3.4%の抑制作用に有意差を認めた ($P=0.022$)。2 要因分散分析により、ラットの種類とセボフルラン濃度の交互作用が有意であることが示された ($P=0.020$)。同様に、セボフルランは LETO ラットにおける NE 惹起 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を抑制した (セボフルラン非存在下, 53.8% [46.9 - 60.7%]; 1.7%, 36.9% [29.8 - 44.0%]; 3.4%, 33.3% [27.4 - 39.2%]; $n=5$) が、OLETF ラットではその作用を認めなかった (セボフルラン非存在下, 58.8% [51.5 - 66.1%]; 1.7%, 55.2% [45.5 - 64.8%]; 3.4%, 60.5% [56.3 - 64.8%]; $n=5$)。セボフルランの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に対する抑制作用は、OLETF ラットよりも LETO ラットで著明に認められた (1.7%, $P=0.022$; 3.4%, $P<0.001$)。ラットの種類とセボフルラン濃度間に有意な交互作用が認められた ($P=0.002$)。

結語

NE は、非糖尿病ラットと同等に 2 型糖尿病ラットの大動脈平滑筋を収縮させ、また $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる。これらの反応は非糖尿病ラットでは臨床濃度のセボフルランにより抑制されるが、糖尿病ラットでは抑制されない。血管平滑筋におけるセボフルランによる血管拡張作用機序は、糖尿病では変化している可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年11月2日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

糖尿病は世界中で急速に増えつつある疾患であり、糖尿病を合併する手術患者が増加している。糖尿病患者は心血管系の合併症を有し、周術期の循環動態が不安定になることが知られている。実験動物を用いた研究では、糖尿病血管の異常な収縮性およびそれに及ぼす麻酔薬影響について数多く報告されている。しかし、その多くはインスリン依存性1型糖尿病モデルでの報告であり、インスリン非依存性2型糖尿病モデルで麻酔薬の作用を検証した報告はない。1型糖尿病と2型糖尿病の心血管合併症は質的にも量的にも異なることが報告されていることから、2型糖尿病における吸入麻酔薬の血管収縮に対する作用について検証する必要がある。本研究は、自然発症2型糖尿病ラット (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats, OLETF rats) および対照ラット (Long-Evans Tokushima Otsuka rats, LETO rats) を用い、大動脈内皮除去標本におけるノルエピネフリン (NE) 惹起血管収縮変化と細胞内カルシウム濃度変化について検討した。その結果、

- 1) 摘出ラット内皮除去大動脈標本において、塩化カリウム (KCl, 30mM) およびNE ($10^{-6}M$) により、LETOとOLETFラットではほぼ同等の収縮性が認められた。
- 2) NE ($10^{-6}M$) 適用時、LETOおよびOLETFラットのいずれの血管においても、細胞内カルシウム濃度が上昇した。
- 3) セボフルラン (1.7%および3.4%) 暴露により、LETOラットのNE ($10^{-6}M$) 惹起血管収縮は用量依存性に抑制されたが、OLETFラットの血管収縮は抑制されなかった。
- 4) NE ($10^{-6}M$) 惹起細胞内カルシウム濃度上昇は、セボフルラン (1.7%および3.4%) 暴露により、LETOラットでは用量依存性に有意に抑制されたが、OLETFラットでは抑制されなかった。

以上より本論文は、2型糖尿病血管のNEによる血管収縮と細胞内カルシウム濃度の上昇に対する麻酔薬セボフルランの特性を明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第427号		
学位授与の日	平成22年12月14日		
氏名	岡本昌典		
学位論文の題目	Calcium oxalate crystal deposition in metabolic syndrome model rat kidneys (メタボリックシンドロームモデルラットにおける腎結石形成についての検討)		
論文審査委員	主査	教授 三家 登喜夫	
	副査	教授 原 勲	教授 重松 隆

論文内容の要旨

【緒言】

尿路結石症は遺伝的要因と環境要因の両者が関与する多因子疾患であることは以前から指摘されていたが、最近では「尿路結石症は生活習慣病あるいはメタボリックシンドロームの1疾患である」との考え方が提唱されている。実際、男性のカルシウム含有上部尿路結石患者は対照に比較して有意に肥満度が高く、特に再発患者で肥満傾向の強いこと、尿路結石患者では糖尿病および高血圧の発生率が高いことが報告されている。こうした疫学的知見は、尿路結石症が他の生活習慣病と共通の発症メカニズムを有している可能性を示唆している。本研究では、メタボリックシンドロームモデルラットを用いて、肥満度と尿路結石の関連および炎症性サイトカインやケモカインの尿路結石形成に及ぼす影響についての検討を行った。

【方法】

過食による内臓脂肪蓄積型肥満から高トリグリセライド血症、2型糖尿病、高血圧を引き起こし、ヒトのメタボリックシンドロームに類似した病態を呈する8週齢 OLETF(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)ラットと耐糖能異常を発症しない対照のLETO(Long-Evans Tokushima Otsuka)ラットに、尿酸の前駆物質であるエチレンジグリコール (EG) を14日間投与し、以下の比較検討を行った。

- (1) 体重、飲水量、血液検査、24時間尿検査
- (2) 腎組織学的評価 (H-E 染色での尿細管腔内に結晶沈着したカルシウムの石灰化スコアならびに、Osteopontin 免疫染色のスコア化)
- (3) 腎組織内カルシウム含有量 (原子吸光分析機で測定)
- (4) 腎組織内 osteopontin(OPN)mRNA 発現、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)mRNA 発現

【結果】

(1) OLETF ラットの体重は8週齢、10週齢ともに、LETO ラットに比較して有意に高値であった。体重100gあたり1日飲水量の実験期間中の平均値は、LETO と OLETF の間に差はみられなかった。EG 投与により、OLETF では軽度の腎機能障害がみられたが、LETO では有意な変化は認められなかった。血清インスリン値は、LETO に比べ、OLETF の方が高値を示した。尿中尿酸排泄はLETO、OLETF とともにEG投与により著明に増加していたが、他の物質の排泄量については一定の傾向を認めなかった。(2) EGを14日間投与したラットでは、いずれも腎結晶沈着がみられた。腎石灰化スコアはLETO 1.23±0.36 に対してOLETF 1.61±0.59 と、OLETFにより多くみられる傾向にあった(p=0.101)。OPNの免疫染色では、結晶沈着に一致して尿細管細胞およびその周囲の間質にOPNの発現がみられ、LETOに比べOLETFは有意にOPNのスコアが高値であった(2.47±0.41 vs 2.93±0.39, P<0.05)。(3) 腎組織内カルシウム含有量は、OLETFでは平均13.5±4.6mg/g・tissueであり、LETOの8.1±5.3mg/g・tissueに比較して有意に高かった(P<0.05)。(4) GAPDHを内部標準として定量化したOPNmRNA発現は、両ラットにおいてEG投与により増加したが、有意差は認められなかった(P=0.53)。MCP-1 mRNA発現は両ラットにおいてEG投与により増加し、LETOに比べOLETFでより有意に発現していた(P<0.05)。

【結論】

(1)メタボリックシンドロームのモデルラットでは、蔘酸前駆物質であるエチレングリコールを投与することにより腎石灰化スコア及び組織内カルシウム含有量が対照に比較して増加していたことから、メタボリックシンドロームが蔘酸カルシウム結石形成を促進することが示唆された。(2)メタボリックシンドロームのモデルラットでは、尿細管細胞およびその周囲の間質における OPN の免疫染色スコア、腎組織内 MCP-1 発現が有意に高値を示したことから、メタボリックシンドロームによる腎結石形成には、OPN、MCP-1 による炎症反応への影響が関与しているものと考えられた。(3)今回の結果から、尿路結石症をメタボリックシンドロームの1疾患として捉え再発予防に取り組むという考え方の科学的根拠が示された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年11月16日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。尿路結石症は遺伝的要因と環境要因の両者が関与する多因子疾患であることは以前から指摘されていたが、最近では「尿路結石症は生活習慣病あるいはメタボリックシンドロームの1疾患である」との考え方が提唱されている。実際、男性のカルシウム含有上部尿路結石患者はコントロールに比較して有意に肥満度が高く、特に再発患者で肥満傾向の強いことが報告されている。こうした疫学的知見は、尿路結石症が他の生活習慣病と共通の発症メカニズムを有している可能性を示唆している。本研究では、メタボリックシンドロームモデルラットと耐等能異常を発症しない対照ラットに対して、蔘酸の前駆物質であるエチレングリコールを投与し、血液・尿生化学検査、腎組織学的評価、腎組織内カルシウム含有量、腎組織内 osteopontin(OPN)mRNA 発現、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)mRNA 発現を比較することで、肥満度と尿路結石の関連および炎症性サイトカインやケモカインの尿路結石形成に及ぼす影響について検討した。

その結果、

- ①メタボリックシンドロームのモデルラットでは、蔘酸前駆物質であるエチレングリコールを投与することにより腎石灰化スコア及び組織内カルシウム含有量が対照に比較して増加していたことから、メタボリックシンドロームが蔘酸カルシウム結石形成を促進することが示された。
- ②メタボリックシンドロームのモデルラットでは、尿細管細胞およびその周囲の間質における OPN の免疫染色スコア、腎組織内 MCP-1 発現が有意に高値を示したことから、メタボリックシンドロームによる腎結石形成には、OPN、MCP-1 による炎症反応への影響が関与しているものと考えられた。

以上より、本論文は、尿路結石症をメタボリックシンドロームの1疾患として捉え、生活・食事指導を活用しつつ、結石の再発予防に取り組むという考え方の科学的根拠を示唆しており、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第428号		
学位授与の日	平成23年1月11日		
氏名	西岡亮平		
学位論文の題目	SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo. (SNAIL 遺伝子はヒト膵癌細胞株(BxPC3)の上皮間葉移行を誘導し、生体における癌の転移・浸潤を増強する)		
論文審査委員	主査	教授 近藤稔和	
	副査	教授 村垣泰光	教授 山上裕機

論文内容の要旨

Snail は、E-cadherin 転写抑制因子として働き、上皮細胞の上皮間葉移行

(epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) の誘導に重要な役割を果たす。EMT は、規則正しく配列している上皮細胞が、その極性と細胞間の接着を喪失し、紡錘形に形態変化し、周囲へ分散、移動する現象である。EMT を起こした細胞では、E-cadherin などの細胞接着因子の発現が低下し、間葉系の細胞骨格へ再編成されるのに伴い、vimentin などの間葉系の分子の発現が認められるようになる。ヒトのある種の癌において、EMT が癌の進展に関与することが示されているが、膵癌では、EMT が vivo において癌の進展にどの程度の役割を果たすかは現在のところ不明である。vitro では EMT がヒト膵癌細胞の浸潤能を増強することが証明されているが、膵癌の EMT に関する研究で最も汎用されているヒト膵癌細胞株は Panc-1 であり、これを含めて EMT を起こすとされる膵癌細胞株はきわめて少ない。

Panc-1 は、TGF-β1 添加により EMT を起こすことが知られている。Panc-1 では、Snail 遺伝子が強く発現しており、vimentin の発現が強く、E-cadherin の発現が微弱である。一方、ヒト膵癌細胞株 BxPC3 では Snail 遺伝子の発現が認められず、Panc-1 に比べて、E-cadherin の発現が強く、vimentin の発現が微弱である。TGF-β1 添加後、Panc-1 は、E-cadherin 発現レベルがさらに減弱し、形態変化を起こすが、BxPC3 では変化を認めない。ところが、Snail 遺伝子を BxPC3 に導入したところ、growth factor を添加しなくても、形態変化を起こし、E-cadherin の発現が低下、vimentin の発現が増強した。さらに、SCID マウスを用いた orthotopic transplantation model において、BxPC3 の Snail 発現株は、Snail 非発現株に比べて、著明な腫瘍進展を示した。形成された膵腫瘍組織を解析したところ、Snail 発現株由来の腫瘍組織の腫瘍先進部位において、EMT を示唆する変化が認められた。

ヒト膵癌細胞株 BxPC3 に Snail 遺伝子を導入すると EMT が誘導され、vivo における転移・浸潤能が増強した。Snail を介した EMT の誘導が、ヒト膵癌の進展に関与している可能性があり、Snail は膵癌治療の分子標的となりうる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 22 年 11 月 26 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

Snail は、E-cadherin 転写抑制因子として働き、上皮細胞の上皮間葉移行 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT) の誘導に重要な役割を果たす。EMT は、規則正しく配列している上皮細胞が、その極性と細胞間の接着を喪失し、紡錘形に形態変化し、周囲へ分散、移動する現象である。EMT を起こした細胞では、E-cadherin などの細胞接着因子の発現が低下し、間葉系の細胞骨格へ再編成されるのに伴い、vimentin などの間葉系の分子の発現が認められるようになる。ヒトのある種の癌において、EMT が癌の進展に関与することが示されているが、膵癌では、EMT が vivo において癌の進展にどの程度の役割を果たすかは現在のところ不明である。vitro では EMT がヒト膵癌細胞の浸潤能を増強することが証明されているが、膵癌の EMT に関する研究で最も汎用されているヒト膵癌細胞株は Panc-1 であり、これを含めて EMT を起こすとされる膵癌細胞株はきわめて少

ない。

Panc-1 は、TGF- β 1 添加により EMT を起こすことが知られている。Panc-1 では、Snail 遺伝子が強く発現しており、vimentin の発現が強く、E-cadherin の発現が微弱である。一方、ヒト膵癌細胞株 BxPC3 では Snail 遺伝子の発現が認められず、Panc-1 に比べて、E-cadherin の発現が強く、vimentin の発現が微弱である。TGF- β 1 添加後、Panc-1 は、E-がくいがが gass が gaga がっがあ cadherin 発現レベルがさらに減弱し、形態変化を起こすが、BxPC3 では変化を認めない。ところが、Snail 遺伝子を BxPC3 に導入したところ、growth factor を添加しなくても、形態変化を起こし、E-cadherin の発現が低下、vimentin の発現が増強した。さらに、SCID マウスを用いた orthotopic transplantation model において、BxPC3 の Snail 発現株は、Snail 非発現株に比べて、著明な腫瘍進展を示した。形成された膵腫瘍組織を解析したところ、Snail 発現株由来の腫瘍組織の腫瘍先進部位において、EMT を示唆する変化が認められた。

以上、本研究は、ヒト膵癌細胞株 BxPC3 に Snail 遺伝子を導入すると EMT が誘導され、*vivo* における転移・浸潤能が増強することを明らかにした。これは、Snail を介した EMT の誘導が、ヒト膵癌の進展に関与しており、Snail が膵癌治療の分子標的となりうることを示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第429号		
学位授与の日	平成23年2月8日		
氏名	下雅意 学		
学位論文の題目	The cellular mechanisms underlying the inhibitory effects of isoflurane and sevoflurane on arginine vasopressin-induced vasoconstriction (バゾプレッシンによる血管収縮と平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度変化および Rho キナーゼに対する吸入麻酔薬の影響)		
論文審査委員	主査	教授 岸 岡 史 郎	
	副査	教授 赤 阪 隆 史	教授 畑 埜 義 雄

論文内容の要旨

緒言

アルギニンバゾプレッシン(AVP)は、 $[Ca^{2+}]_i$ と細胞内カルシウム感受性の増加をもたらす血管作動性ペプチドホルモンである。AVPは生理的・病態生理学的に体血圧を維持する重要な役割を果たしている。さらに、全身麻酔中のAVPの低用量静脈投与が人工心肺後の血管拡張性ショックやアナフィラキシーショックの治療に用いられている。しかし、AVP惹起性血管収縮における揮発性麻酔薬の影響については報告がない。

本研究では、セボフルランやイソフルランによる血管弛緩反応の機序を調査し、カルシウム感受性を調節している Ca^{2+} 依存性の経路と Ca^{2+} 非依存性の経路の両方における麻酔薬の役割を明らかにすることを目的とした。

方法

本研究は、和歌山県立医科大学における動物実験委員会の承認を受けて行われた。

Wistar雄性ラットの内皮除去胸部下行大動脈標本を用いて、イソフルラン(1.2%、2.3%)とセボフルラン(1.7%、3.4%)存在下、非存在下でKCl 30mMおよびAVP 10^{-7} M適用時の等尺性張力変化及び $[Ca^{2+}]_i$ 変化を観察した。結果は全てKCL 30mMに対するそれぞれの薬剤に対する反応の百分率で表現した。

AVP惹起血管収縮反応に対する様々な蛋白キナーゼの関与を調べるために、PKC阻害薬(GF 109203X 10^{-6} M)、MAPK阻害薬(PD 98059 10^{-5} M)、RhoK阻害薬(Y 27632 10^{-6} M)といった蛋白特異的阻害薬の存在下、非存在下でのAVP惹起収縮反応を観察した。その結果、AVP惹起血管収縮反応は、PKC阻害薬とMAPK阻害薬よりも、RhoK阻害薬であるY27632で抑制されることが判明した。このことから、ラット大動脈ではRho-Rhoキナーゼ系の関与が示唆されたため、我々はウエスタンブロット法を用いてRho活性を測定した。

標本を(1)コントロールとして生理食塩水のみ、(2)陰性コントロールとしてguanosine diphosphate (GDP 10^{-4} M)、(3)guanosine 50- $[\gamma$ -thio] triphosphate (GTP γ S 10^{-4} M; Rho-Rhoキナーゼ系の強力なアゴニスト)(4)イソフルラン(2.3%)、(5)セボフルラン(3.4%)、(6)麻酔薬も阻害薬も適用しないものに無作為に分けた。各々の薬剤を15分間適用後、(4)から(6)のグループにはAVP(10^{-7})を5分間適用し、(1)から(3)のグループには適用しなかった。その後直ちにドライアイスで急速凍結し、EZ-Detect Rho activation Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてRho活性を蛍光免疫法で測定した。Rho活性はコントロール群に対する百分率で表現した。

データは中央値と25-75%値で表した。統計は多重比較にMann-WhitneyのU-testを行った後、Newman-Keuls検定を行った。P値が0.05未満をもって統計学的に有意であるとした。

結果

AVP(10^{-7} M)によってラット大動脈平滑筋では急速に一過性の収縮が見られ、そして静止張力に向かって漸減した。AVPに対する最大収縮反応はKCL(30mM)に対して96%(88-101%)であった。AVP適用後およそ5分後であった。イソフルランとセボフルランは共にAVP惹起収縮反応を濃度依存性に抑制した(n=6)。

AVP(10^{-7}M)は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を一過性に上昇させ、ピークはKCL(30mM)に対し120%(116-127%)であった。イソフルランとセボフルランは同程度にAVP惹起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制した (n=6)。

GTP γ S(10^{-4}M)はRho活性を上昇させた。AVP(10^{-7}M)もまたGTP γ Sと同程度にRho活性を上昇させた。セボフルラン(3.4%)はAVP惹起性のRho活性を有意に抑制($p<0.05$)したが、等力価のイソフルラン(2.3%)ではRho活性を抑制しなかった (n=6)。

結語

AVPはラット大動脈平滑筋を収縮させ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇とRhoの活性化を伴う。臨床使用濃度でのイソフルランとセボフルランはAVP惹起血管収縮を抑制する。セボフルランは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を介した機構とRho-Rhoキナーゼ経路による Ca^{2+} 感受性を共に抑制するが、イソフルランは主に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の抑制によるものであり、同じ吸入麻酔薬であるが作用機序が異なる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成23年1月28日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

アルギニンバソプレシン(AVP)は、細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇と収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性の増加により血管収縮を来すペプチドホルモンである。AVP は生理的・病態生理学的に体血圧の維持に重要な役割を果たしている。また、全身麻酔中の AVP の低用量静脈投与が人工心肺後の血管拡張性ショックやアナフィラキシーショックの治療に用いられているが、AVP 惹起性血管収縮に及ぼす揮発性麻酔薬の影響については報告がない。本研究は構造が極めて類似するセボフルランとイソフルランを用いて AVP 惹起性血管収縮に対する揮発性麻酔薬の作用を明らかにし、さらにその機序を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定と Ca^{2+} 感受性に大きな役割を果たしている Rho 活性を測定することにより解明することを目的とした。

その検討の結果、

- ① 摘出ラット内皮除去大動脈標本において、イソフルランとセボフルランは AVP(10^{-7}M)惹起収縮反応を濃度依存性に抑制した。また、イソフルランとセボフルランは MAC レベルで比較すると同程度に AVP 惹起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を抑制した。
- ② AVP 惹起血管収縮反応は、PKC 阻害薬および MAPK 阻害薬では抑制されず、RhoK 阻害薬で抑制された。
- ③ ウェスタンブロッティング法により測定した Rho 活性は、AVP(10^{-7}M)により有意に上昇し、その程度は Rho の直接刺激薬である GTP γ S(10^{-4}M)による上昇と同程度であった。
- ④ セボフルランは AVP による Rho 活性を有意に抑制したが、イソフルランは Rho 活性を抑制しなかった。

以上より、本論文は AVP による血管収縮機構に対する抑制作用の特異性を初めて明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第430号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	盖志博		
学位論文の題目	Trps1 Functions Downstream of Bmp7 in Kidney Development (腎発生において Trps1 は Bmp7 の下流で機能する)		
論文審査委員	主査	教授 重松 隆	
	副査	教授 吉川徳茂	教授 村垣泰光

論文内容の要旨

Introduction

Mutations of the TRPS1 gene were initially discovered in patients with a genetic disease named tricho-rhino-phalangeal syndrome (TRPS), which is characterized by craniofacial and skeletal malformations. Although the phenotypic expression of TRPS in human is limited to skeletal tissues and hair follicles, Trps1 is expressed not only in cartilage, joints and hair follicles, but also in the mesenchyme of the developing lungs, gut, kidneys and other tissues during murine embryonic development. To examine the role of Trps1 in developing organs, we generated Trps1-deficient (KO) mice. During analysis of KO mice we have observed substantial morphologic abnormalities of the kidneys in newborn homozygous animals. In a previous study, we demonstrated that Trps1 is regulated by growth and differentiation factor 5 (Gdf5), another BMP that shares the same receptor with Bmp7, in ATDC5 chondrogenic cells. This finding immediately raised the possibility that Trps1 may also act downstream of Bmp7 on metanephric mesenchymal cells during early kidney development. The purpose of this study is to analyze the function of Trps1 and identify the potential signaling pathway in which Trps1 is involved during renal development.

Materials and Methods

Animals and Tissues

Heterozygous Trps1 null mice were mated and the date of the vaginal plug was defined as embryonic day 0.5 (E0.5). Kidneys from E12.5 to E14.5 embryos and newborn mice were used for experiments.

Immunohistochemistry

For immunostaining, tissues or cells were incubated with antibodies against Trps1, Pax2, WT1, vimentin, cytokeratin, E-cadherin, Pax8, and cited1. Then the slides were washed in PBS, incubated with secondary antibodies, and finally mounted with DAPI or counterstained by hematoxylin.

Primary culture of metanephric mesenchymal cells

Kidneys were isolated from E13.5 rat embryos and the metanephric mesenchyme were dissected, suspended, and cultured with DMEM, 10% FCS, FGF2 (50 ng/ml) and TGF- α (10 ng/ml). For the inhibition assay, cells were pretreated with SB203580 (30 μ M) for 2 h or with Trps1 siRNA (5 nM) for 24 h before Bmp7 treatment (60 ng/ml).

Whole-mount in situ hybridization

E14.5 kidneys were fixed overnight in 4% PFA at 4 °C and dehydrated in ethanol. Hybridized samples were developed with NBT/BCIP solution.

Glomerular count and estimation of interstitial area

Kidneys were isolated from newborn mice and homogenized by 6 M HCl. Glomeruli were counted in a counting dish and the total number was calculated from the mean number of five counts in 1 ml. The volume density of interstitium was measured following Cochrane's method.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD. Unpaired *t* test and an analysis of multiple variance by Scheffe method were used for statistical comparison. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

1. Trps1 is required for normal nephrogenesis

Histological examination of newborn Trps1 KO mice revealed that the number of tubules and glomeruli were obviously smaller and the interstitium in renal cortex was wider in KO kidneys than in WT. The interstitial cells were vimentin positive but α -SMA negative, suggesting that these cells were metanephric mesenchymal cells rather than myofibroblast cells, and they could not transform into epithelial cells. Trps1 was probably involved in this process.

2. Differentiation of metanephric mesenchymal cells is perturbed in KO kidneys

Examination of nephron formation in KO kidneys during early renal development revealed that the renal vesicles were obviously less at E13.5 and less mesenchymal cells underwent mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Our data shows that loss of Trps1 impairs the transition of mesenchyme to epithelial cells.

3. Trps1 is coexpressed with Bmp7 during nephrogenesis

At E15.5, Trps1 was strongly positive in the cells of ureteric buds, renal vesicles, and cap mesenchymes, where Bmp7 was also expressed. However, Trps1 was virtually absent in the Bmp7 null kidneys, suggesting that Trps1 is a molecule located downstream of Bmp7.

4. Reduced expression of Pax2 and WT1 in KO kidneys

Pax2 and WT1 are key molecules for regulating MET and the markers for cells underwent MET. In Trps1 KO kidneys, the expression of Pax2 and WT1 was obviously reduced. From these results, it was concluded that absence of Trps1 affects the expression of Pax2 and WT1, suggesting that the differentiation of mesenchymal cells to epithelial renal vesicles was disturbed by lack of Trps1.

5. MET is mediated via Bmp7/p38MAPK/Trps1 signaling

To investigate further whether Trps1 acts downstream of Bmp7 in the process of MET, we treated normal rat metanephric mesenchymal cells with Bmp7, Trps1 siRNA, and SB203580, a p38MAPK inhibitor. Trps1 expression was induced and mesenchymal cells were transformed into epithelial cells after Bmp7 treatment. However, no significant changes of vimentin or E-cadherin were observed after Bmp7 treatment when cells were pretreated with SB203580 or Trps1 siRNA, both of which virtually abolished the expression of Trps1. These data suggest that Bmp7 induces the differentiation of mesenchymal cells to epithelial cells via p38 MAPK and Trps1.

6. Branching growth of ureteric bud (UB) is elongated by loss of Trps1

Two members of the Wnt family, Wnt9b and Wnt4, play a central role during the initial stages of tubulogenesis. To examine whether Trps1 affects the expression of Wnt9b and Wnt4, we performed whole-mount in situ hybridization. Wnt4 and Wnt9b mRNA was seen in the cap mesenchyme and UB, respectively. There were significant differences in the branching of UB and the density of cap mesenchyme between WT and KO kidneys. Quantification of the length

of UB and the number of cap mesenchyme made it clear that each branch of the ureteric bud was longer in KO compared with WT kidneys, and the density of each cap mesenchyme was significantly reduced. From these results, it is concluded that *Trps1* does not affect the expression of *Wnt9b* and *Wnt4* mRNA but still regulates ureteric branching.

Conclusions

1. *Trps1* is expressed not only in the cap mesenchyme and renal vesicles but also in ureteric bud.
2. *Trps1* regulates mesenchymal to epithelial transition (MET) in cap mesenchyme and the branching of ureteric buds during early renal development.
3. *Trps1* functions downstream of *Bmp7* during the process of MET.

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年4月19日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。

腎尿細管は発生学的に後腎間葉細胞と尿管芽上皮細胞との相互作用により、後腎間葉細胞が間葉-上皮移行(Mesenchymal-Epithelial Transition:MET)を起こすことにより形成される。このMETの分子機構として種々の分子の関与が報告されているが、発生期腎臓で発現しGATA型転写因子の一つである*Trps1*の関与を考えた。学位申請者らのこれまでの研究により、*Trps1*が正常の腎臓発生に必須である骨形成蛋白7(*Bmp7*)の下流で働く可能性を考え研究を行った。

本論文では *Trps1* および *Bmp7* ノックアウト(KO)マウスを用いて、腎発生初期における *Trps1* の果たす役割を検索するため、組織学的な解析を行った。新生児 *Trps1* KO マウスの腎臓では野生型マウスと比較して尿細管および糸球体の数が著明に減少しており、それと対照的に腎間質の占める面積が増加していたことから、胎児期早期の腎組織について免疫組織学的検索を行った。また、培養後腎間葉細胞を用いて *Bmp7* と *Trps1* シグナルにより MET が誘導されるかどうかを検索した。さらに、尿管芽上皮細胞と後腎間葉細胞の凝集体(cap mesenchyme: CP)のマーカーである *Wnt9b* および *Wnt4* プロンプをそれぞれ用いた whole-mount in situ hybridization(WISH)を行った。その結果：

- 1.*Trps1* は腎発生初期において尿管芽上皮細胞と CP および腎小胞(renal vesicle)に発現し、*Bmp7* KO マウスではその発現はほとんど見られなかった。
- 2.*Trps1* KO マウスでは凝集間葉細胞のマーカーである *Pax2* および *Wtl* 発現が低レベルであり、*Trps1* の欠損により CP から腎小胞への分化が障害されることが示唆された。
- 3.培養後腎間葉細胞で *Bmp7* は *Trps1* と E-cadherin を誘導し、siRNA を用いた *Trps1* のノックダウンにより *Bmp7* で誘導される MET が阻害された。
- 4.*Wnt9b* および *Wnt4* の WISH により *Trps1* KO では尿管芽の枝が延長し CP の形成が低下することが示された。

以上より本論文は、*Trps1* は腎発生において *Bmp7* の下流で働き、後腎間葉細胞の MET と尿管芽の枝分かれの分子機構に関与することにより正常ネフロン形成に必須であることを示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第431号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	池島英之		
学位論文の題目	Upregulation of Fractalkine and Its Receptor, CX3CR1, is Associated With Coronary Plaque Rupture in Patients With Unstable Angina Pectoris (フラクタルカインおよびその受容体である CX3CR1 は不安定狭心症患者において冠動脈プラーク破裂に関連している)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

緒言

急性冠症候群の発症基盤として冠動脈プラークの表面を覆う線維性被膜の脆弱化及びその破綻が重要であることが指摘されている。冠動脈プラーク内には単球・マクロファージやリンパ球などの免疫細胞が集積し、その破綻機序に深く関与している。さらに、これらの免疫細胞の冠動脈プラーク内への動員には接着因子及びケモカインが重要であると報告されている。

種々のケモカインの中でフラクタルカインとその受容体 (CX3CR1) はアテローム性動脈硬化病変に強い発現が見られ、急性冠症候群との関連が推察されている。フラクタルカインは、活性化内皮細胞上に発現する細胞膜結合型ケモカインである。その受容体である CX3CR1 は、単球および NK 細胞や cytotoxic effector T 細胞などの細胞傷害性リンパ球に発現している。CX3CR1 を介した細胞接着や細胞傷害活性により内皮細胞が破壊され、不安定プラークの破壊が生じる可能性が示唆されているが、詳細は明らかではない。

一方、最近開発された Optical coherence tomography (OCT) は、臨床の場において、詳細な冠動脈プラークの性状診断を可能にした。OCT は従来の血管内超音波 (IVUS) に比し 10 倍の解像度を有しており、プラークの組織性状診断、線維性被膜の薄いプラークやプラークの破綻、血栓の同定などが可能である。

本研究では急性冠症候群患者において、CX3CR1 を発現する循環血中単球・リンパ球の量的・質的变化は、冠動脈プラークの不安定化に関連するという作業仮説に基づき、CX3CR1 を発現する免疫細胞の増加およびその細胞傷害性と冠動脈プラークの破綻との関連性について OCT を用いて検討した。

対象および方法

1) 冠動脈プラーク性状と単球・リンパ球のサブセットの量的・質的な差異の検討

冠動脈形成術 (PCI) 施行予定患者 (不安定狭心症患者 46 名、安定狭心症患者 30 名) を対象に冠動脈プラークの破綻と CX3CR1 を発現する単球・リンパ球数及びそれらの活性化によって放出されるフラクタルカインとの関連性を検討した。

OCT による冠動脈プラークの評価は、我々の既報論文 (J Am Coll Cardiol 2007;50:933) と同様の方法で施行した。OCT 画像で得られた冠動脈プラークの性状解析を行い、プラーク破裂、血栓、thin-cap fibroatheroma (線維性被膜厚 < 65 μ m) の有無を解析した。さらに OCT を用いて、不安定狭心症患者 (n=46 名) を責任冠動脈のプラーク破裂の有無から、破裂群 (n=27 名) と非破裂群 (n=19 名) に分類し検討を行った。PCI 施行直前の末梢血を採取し、直ちにフローサイトメトリー法を施行し、単球数、単球サブセット、全リンパ球数、リンパ球サブセットを測定した。さらに PCI 施行直前の末梢血から血清を分離し、血清中の可溶性フラクタルカインを ELISA 法により測定した。

単球サブセットは、抗 CD14 抗体、抗 CD16 抗体、抗 CX3CR1 抗体を用い、リンパ球サブセットは、抗 CD3 抗体、抗 CD16 抗体、抗 CX3CR1 抗体を用いて分類した。

2) 高感度 CRP と CX3CR1 を発現する単球・リンパ球系細胞の量的・質的差異との関連性の検討
従来の急性冠症候群の血中バイオマーカー（高感度 CRP）と CX3CR1 を発現する単球・リンパ球を含む多変量解析を用いて、冠動脈プラーク破裂に独立に関連する因子を検出した。
統計学的検定にはカイ 2 乗検定、分散分析、多重ロジスティック回帰分析を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果

1) 冠動脈プラーク性状と単球・リンパ球のサブセットの量的・質的な差異の検討

不安定狭心症患者群において、冠動脈プラーク破裂群は、非破裂群に比し、CX3CR1 陽性単球および CX3CR1 陽性リンパ球の細胞数は共に、有意に高値であった。
可溶性フラクタルカインは、冠動脈プラークの破裂を有する冠動脈疾患患者において有意に上昇していた。

2) 高感度 CRP と CX3CR1 を発現する単球・リンパ球系細胞の量的・質的差異との関連性の検討

高感度 CRP は破裂群で有意に高値であった。冠動脈プラーク破裂に対する高感度 CRP の crude OR は 1.375 (95% confidence interval [CI]: 1.057 to 1.788) であった。
また、高感度 CRP と可溶性フラクタルカインは互いに有意な正の相関を認めた。一方、CX3CR1 陽性単球数および CX3CR1 陽性リンパ球数はそれぞれ高感度 CRP とは有意な相関を認めなかった。
CX3CR1 陽性単球数および CX3CR1 陽性リンパ球数に関して、高感度 CRP で補正した多変量解析を行った結果、CX3CR1 陽性単球および CX3CR1 陽性リンパ球は冠動脈プラーク破裂の独立した予測因子であった。

考察

1) 冠動脈プラーク性状と単球・リンパ球のサブセットの量的・質的な差異の検討

フラクタルカインおよび CX3CR1 陽性単核球の上昇は不安定狭心症患者において、冠動脈プラークの破綻に関連していることが明らかとなった。apoE ノックアウトマウスを用いた研究では、動脈硬化病変においてフラクタルカインの発現が亢進しており、apoE および CX3CR1 のダブルノックアウトマウスでは動脈硬化病変の形成が抑制されたと報告されている。本研究では、冠動脈疾患において、フラクタルカイン、CX3CR1 陽性細胞は上昇していることが明らかとなり、フラクタルカインーCX3CR1 系は冠動脈硬化から冠動脈プラークの破綻までの連鎖にかかわっている可能性が考えられた。

2) 高感度 CRP と CX3CR1 を発現する単球・リンパ球系細胞の量的・質的差異との関連性の検討

冠動脈プラーク破裂を有する不安定狭心症群では高感度 CRP とフラクタルカイン、CX3CR1 陽性単核球数は安定狭心症患者と比べ、有意に上昇していたが、CX3CR1 陽性単核球と高感度 CRP との間に有意な相関関係は見られなかった。このことから、冠動脈プラークの破裂自体が炎症反応だけでなく、フラクタルカインーCX3CR1 系を介した反応と関連がある可能性があると考えられた。

これらの結果より、フラクタルカインーCX3CR1 系は冠動脈疾患の発症・進展に重要な働きを担っており、特に CX3CR1 陽性単球および CX3CR1 陽性リンパ球は冠動脈プラーク破裂に密接に関わっている可能性が考えられた。推定される機序の要因として、CX3CR1 陽性単球の増加は炎症性プラーク内の単球・マクロファージの活性化を引き起こし、冠動脈プラークの破裂につながる事が考えられる。さらに、T リンパ球から放出される IFN- γ によって単球が活性化されるという従来の報告と併せて、CX3CR1 陽性リンパ球は責任病変でのプラーク内の単球・マクロファージの活性化に寄与している可能性が想定された。

結語

循環血中の単球およびリンパ球はフラクタルカイン受容体 (CX3CR1) を介して冠動脈プラーク内に浸潤し、プラーク破裂に関与している可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 4 月 26 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文について審査を行った。急性冠症候群の発症基盤として冠動脈プラークの表面を覆う線維性被膜の脆弱化及びその破綻が重要であることが指摘されている。冠動脈プラーク内には単球・マクロファージやリンパ球などの免疫細胞が集積し、その破綻機序に深く関与している。フラクタルカインとその受容体（CX3CR1）はアテローム性動脈硬化病変に強い発現が見られ、急性冠症候群との関連が推察されているが、CX3CR1 を介した細胞接着や細胞傷害活性により冠動脈プラークの破壊が生じるかどうかに関して、詳細は明らかではない。免疫細胞の冠動脈プラーク内への動員には接着因子及びケモカインが重要であると報告されており、冠動脈プラークとフラクタルカインおよびその受容体（CX3CR1）との関連を調べることは急性冠症候群の病態解明に有用と考えられる。

本論文は冠動脈プラークの不安定化との関連を調べる観点から、冠動脈疾患患者において、CX3CR1 を発現する免疫細胞の増加およびその細胞傷害性と冠動脈プラークの破綻との関連性を明らかにしたものである。その結果、可溶性フラクタルカインは、冠動脈プラークの破裂を有する冠動脈疾患患者において有意に上昇していた。特に不安定狭心症患者群においては、冠動脈プラーク破裂群は非破裂群に比し、CX3CR1 陽性単球およびリンパ球の細胞数は共に有意に高値であり CX3CR1 陽性単球およびリンパ球は冠動脈プラーク破裂の独立した予測因子であることが明らかになった。

以上、本論文は CX3CR1 を発現する免疫細胞の増加およびその細胞傷害性と冠動脈プラークの破綻との関連性を初めて報告したものであり、CX3CR1 陽性細胞数の増加が急性冠症候群発症予測に有用となりうる可能性を提示したものとして、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第432号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	Mohammad Eliusur Rahman Bhuiyan		
学位論文の題目	Complex cardiovascular actions of α -adrenergic receptors expressed in the nucleus of solitary tract of rats. (ラット孤束核内 α アドレナリン受容体の循環調節に対する多様の効果)		
論文審査委員	主査	教授 羽野卓三	
	副査	教授 岸岡史郎	教授 前田正信

論文内容の要旨

Introduction

The nucleus of the solitary tract (NTS) is a primary central termination site for arterial baro- and chemoreceptor afferents. Anatomical studies have shown that the dorsomedial portion of the NTS receives dense innervation from baroreceptors, while the midline area caudal to the calamus scriptorius (CS) has been identified as a primary central termination site for arterial chemoreceptor afferents. Accordingly, the NTS is a vital central site for cardiovascular regulation.

Although both α_1 - and α_2 -adrenergic receptors (ARs) are known to be expressed in the NTS, including barosensitive area (baro-NTS) and chemosensitive area (chemo-NTS), the functional significance of these receptors is still not fully established. In this study, we attempted to identify the functional roles involving α -ARs in the baro- and chemo-NTS by examining the cardiovascular effects in response to α -AR activation. In addition to the functional examinations, gene and protein expression levels and the cellular localization of α_1 - and α_2 -ARs in the NTS were also studied to expand our understanding of α -ARs expressed in the NTS.

Materials and Methods

General Procedures for functional studies

Male Wistar rats (280-350 g) were anesthetized with urethane (1.45 g/kg; i.p.). A polyethylene catheter was inserted into the right femoral artery to record pulsatile arterial pressure (AP), mean AP (MAP) and heart rate (HR) continuously. Microinjections of α -AR agonists, antagonists, or vehicle (100 nl) were made unilaterally or bilaterally into the two different locations of NTS (i.e. baro- and chemo-NTS). After completion of the experiment, the microinjection sites were marked using 50 nl of India ink and injection sites were identified under a microscope.

Gene expression profiles of α_1 - and α_2 -ARs in the NTS

Quantitative reverse transcription (RT)-PCR targeting β -actin, α_{1A} - and α_{2A} -ARs genes were performed in this study. Real-time RT-PCR reactions were carried out using an iCycler Thermal Cycler and the QuantiFast SYBR Green RT-PCR kit.

Immunohistochemistry for α_1 - and α_2 -ARs

Serial sections (30 μ m thick) through the NTS were incubated with either an α_{1A} -AR antibody or α_{2A} -AR antibody and then incubated with biotinylated horse anti-goat IgG, followed by streptavidin conjugated Alexa-Fluor 488. Sections were photographed using a scanning laser confocal microscope.

Semi-quantitative Western blotting for α_1 - and α_2 -ARs in the NTS

Frozen brain tissues were homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing a protease Inhibitor Cocktail. Protein extracts were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to Immobilon-P Polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was incubated with α_{1A} -AR antibody, α_{2A} -AR antibody or β -actin antibody, followed by horseradish peroxidase-link secondary antibody. Immunoreactive proteins were visualized using the Pierce enhanced chemiluminescence reagents and the Light Capture cooled CCD camera system.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by using one-way analysis of variance (ANOVA)

followed by Scheffe's test or Student's paired t-test. The criterion for statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Effects of α -AR agonist microinjection into the baro- and chemo-NTS on cardiovascular parameters

Bilateral microinjection of α_1 -AR agonist phenylephrine into the baro-NTS significantly increased both MAP and HR, whereas unilateral injection into the chemo-NTS produced opposite responses, i.e. both MAP and HR significantly decreased. Pretreatment with the nonspecific α -AR antagonist phentolamine into the NTS inhibited the phenylephrine-induced cardiovascular responses. In contrast, microinjection of the α_2 -AR agonist clonidine into either the baro-NTS or chemo-NTS decreased MAP and HR; they were also inhibited by the α_2 -adrenergic antagonist yohimbine.

Gene expression profiles of α_{1A} - and α_{2A} -ARs in the NTS

Gene expression of both types of ARs was found in the NTS. The level of α_{2A} -AR mRNA was shown to be significantly higher than that of α_{1A} -AR mRNA.

Localization of α_{1A} - and α_{2A} -ARs within the NTS

We found that both types of receptor were widely distributed; however, α_{1A} -ARs were found dominantly in NTS neurons while α_{2A} -ARs were found dominantly on astrocytes.

Protein expression profiles of α_{1A} - and α_{2A} -ARs in the NTS

Protein expression of both types of ARs was clearly identified in the NTS, but the signal level of α_{1A} -AR protein was relatively weak compared to the α_{2A} -ARs.

Discussion

We found that pharmacological activation of α_1 -ARs in the NTS with direct microinjection of phenylephrine into two distinct locations produced opposing cardiovascular responses. Phenylephrine microinjected into the baro-NTS produced hypertension and tachycardia, while hypotensive and bradycardiac effects were induced when the chemo-NTS was targeted. With regard to α_2 -ARs, only hypotensive and bradycardiac effects were observed when the α_2 -AR agonist was microinjected into the baro- or chemo NTS.

We immunohistochemically confirmed that α_{1A} -ARs are mainly expressed in neurons in the baro-NTS. If they are barosensitive neurons, bilateral injection of phenylephrine into the baro-NTS area might postsynaptically inhibit NTS neurons, which receive input signals from baroreceptor afferents. Since these neurons are tonically active, inhibiting vasomotor/cardiac sympathetic outflow and enhancing cardiac vagal outflow, the inhibitory effect on NTS neurons may lead to an increase in peripheral vascular resistance and tachycardiac effects.

With regard to the chemo-NTS, phenylephrine microinjected into chemo-NTS might attenuate the neuronal activities of chemosensitive neurons as we also found α_{1A} -ARs expressed in the chemo-NTS neurons. The inhibitory effects of the chemo-NTS neurons may decrease the activity of rostral ventrolateral medulla neurons, and subsequently decrease the excitatory input to sympathetic preganglionic neurons located in the intermediolateral cell column of the spinal cord. As a result, the vasomotor/cardiac sympathetic outflow may be decreased.

Our immunohistochemistry study showed that α_{2A} -ARs were found dominantly in the astrocytes in both baro- and chemo-NTS. Since it has been reported that astrocytes may modulate neuronal activities via similar mechanisms to neurotransmission, α_2 -AR agonist microinjected into the NTS might therefore affect neuronal functions via activation of α_2 -ARs on astrocytes. Considering the cardiovascular effects of chemo- and baro-NTS stimulation, α_2 -AR activation may inhibit neural activities of chemosensitive neurons, while facilitating neural activities of barosensitive neurons, inducing hypotensive and bradycardiac effects in both cases.

Conclusion

1. α_1 - adrenergic agonist injected into the two different sites of the NTS demonstrated opposing cardiovascular effects, while α_2 - adrenergic agonist injected into those areas showed the same pattern.
2. The cardiovascular responses induced by α_1 - ARs may be mediated by NTS neurons while those by α_2 - ARs may be mediated by astrocytes located in the barosensitive and chemosensitive areas of the NTS.

3. Both types of α -ARs expressed in the NTS may be involved in regulating cardiovascular homeostasis via modulation of input signals from baroreceptor and chemoreceptor afferents; however, cardiovascular responses produced by stimulations of α_1 -ARs are strictly location specific within the NTS.

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年6月14日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

循環調節中枢内には様々な神経伝達物質や神経調節因子、およびそれらの受容体の発現が見られる。しかしこれらの循環調節に対する作用については不明なものが多い。本研究の目的は、圧受容器や化学受容器からの脳内ターミナルである延髄孤束核（NTS: nucleus tractus solitarius）において、カテコールアミン受容体の一つである α アドレナリン受容体の中枢性循環調節に対する作用を検討することである。また、その作用機序を調べる一助として、孤束核内 α アドレナリン受容体の遺伝子・蛋白質発現レベルや発現局在についても併せて調べた。ウレタン麻酔下ラットを用いて、NTSのうち、末梢化学受容器からの入力を主として受けている場所（chemo-NTS）と、圧受容器からの入力を主として受けている場所（baro-NTS）に α_1 アドレナリン受容体選択的アゴニスト（フェニレフリン）および α_2 アドレナリン受容体選択的アゴニスト（クロニジン）を微量注入し、動脈圧および心拍数の変化を観察した。また、各受容体の遺伝子発現レベルを定量的RT-PCRにより、また蛋白質発現レベルをウェスタンブロッティング法により調べ、さらに神経細胞およびグリア細胞のマーカーを用いた免疫組織化学的手法により各受容体発現の局在についても調べた。結果は以下のように要約された。

- 1) フェニレフリンのbaro-NTSへの微量注入は、血圧および心拍数を増加させた。
- 2) フェニレフリンのchemo-NTSへの微量注入は、血圧および心拍数を減少させた。
- 3) クロニジンのbaro-NTSへの微量注入は、血圧および心拍数を減少させた。
- 4) クロニジンのchemo-NTSへの微量注入は、血圧および心拍数を減少させた。
- 5) 以上の反応は各アンタゴニストにより抑制された。
- 6) NTSでは α_1 および α_2 アドレナリン受容体の遺伝子・蛋白質発現が確認されたが、共に α_2 アドレナリン受容体の発現の方が大であった。
- 7) NTSでは α_1 アドレナリン受容体は主として神経細胞に、 α_2 アドレナリン受容体は主としてアストロサイトに発現していた。

これらの結果から、本研究により、NTSに発現している α アドレナリン受容体は圧受容器や化学受容器からの入力情報を調節することによって循環動態の恒常性維持に関与している可能性が示された。その生理作用は主としてアストロサイトに発現している α_2 アドレナリン受容体を介した降圧・徐脈促進作用であると考えられた。

本研究は、NTSにおける α アドレナリン受容体の中枢性循環調節作用の詳細を明らかにしたものであり、中枢性循環調節の仕組みについて理解を一層深めたものである。以上により本研究は、学位論文として価値があるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第433号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	木賀紀文		
学位論文の題目	Expression of lumican related to CD34 and VEGF in the articular disc of the human temporomandibular joint (ヒト顎関節円板における CD34 と VEGF に関連したルミカンの発現)		
論文審査委員	主査	教授 雑賀 司珠也	
	副査	教授 仙波 恵美子	教授 藤田 茂之

論文内容の要旨

【緒言】

細胞外マトリックスは、顎関節円板内で主にコラーゲン線維とプロテオグリカンから構成されている。サイトカインによる化学的ストレスや異常咬合による物理的ストレスは顎関節内障、変形性顎関節症の主な原因と考えられている。

顎関節円板の研究の中で破壊に対する細胞外マトリックスの変化は報告されているが、修復については報告されていないのが現状である。近年、角膜、椎間板、腱などの結合組織でコラーゲンの修復や調整にルミカンが関与しているとの報告がみられる。今回、顎関節内障や変形性顎関節症により顎関節円板内でどのような変化が起こり、顎関節内障、変形性顎関節症をもつヒトの顎関節円板内でのルミカンの発現が修復に関与しているかどうか検証するため組織化学的、免疫組織化学的に実験を行った。

【実験材料と方法】

13人の顎関節円板（10人は顎関節内障と変形性顎関節症を伴う患者、3人は正常）を実験に使用した。患者の年齢は20~72歳で平均43.8歳。MRIにてすべての患者で復位を伴わない円板の前方転位を示した。10人の患者は顎関節に外傷の既往がなく、顎関節強直症もなかった。正常な顎関節円板の標本は顎関節症の臨床的既往のない3人の女性の病理解剖から得られた（平均年齢56.7歳）。彼らの死因は顎関節とは関連性がなかった（舌癌、胃癌、肺癌）。また、顎関節円板の前方転位や変形がないことを確認した。すべての標本は矢状断にて切断され、すぐに4%パラホルムアルデヒド含むリン酸緩衝液(PBS)にて一晩浸漬固定した後、パラフィンにて包埋し厚さ5 μ mで矢状断の薄切標本を作成した。

免疫組織化学的染色法

免疫組織学的染色のため脱パラフィン後、PBS水洗し内因性ペルオキシダーゼの活性阻止（0.3%過酸化水素添加メタノール）を行った。その後PBS水洗、3%スキムミルクにて60分ブロックした後、一次抗体としてLumican（Wakayama Medical Universityより提供）を一晩反応させた。

PBSにて水洗したあと、二次抗体HRP標識、Anti-rabbit (DAKO, Glostrup, Denmark)を60分反応させた。発色はマイヤーのヘマトキシリンを対比染色としDABを用いて発色させた。CD34(Nichirei, Tokyo, Japan)、VEGF(Takara, Shiga, Japan)の免疫組織学的染色には、1:5、1:3000希釈で使用した。

組織化学的染色法

組織化学的染色は、トルイジンブルーを用いて遂行された。切片はキシレンにて脱パラフィン後、アルコールにて脱水した。蒸留水で洗浄後に0.05%トルイジンブルーを1分間染色した。

【結果】

正常円板と変形した円板にルミカン発現が検出された。正常円板では、ルミカンが円板周囲の結合組織、円板表層に発現し、円板内では弱い染色であった。しかしながら変形した円板では円板内に広範囲の強い発現を認めた。トルイジンブルー染色では正常円板内、変形した顎関節円板内でルミカンの染色が弱い部位でメタクロマジーが陽性であり、ルミカン発現が強い部分ではメタクロマジーが陰性であった。変形した顎関節円板内ではルミカン発現の強い部分で線維芽細胞様細胞が豊富に存在することが明らかとなった。CD34とVEGF染色陽性が変形した顎関節円板内に観察され、正常円板では軽度の染色であった。

【考察】

顎関節円板内には大型のプロテオグリカンであるアグリカンが存在し、コアプロテインに100以上のグリコサミノグリカン (GAGs) を持っている。現在確認されているルミカンの GAGs の結合部位は4つである。変形により円板内の GAGs を豊富に含む大型のプロテオグリカンが減少し、GAGs に乏しいルミカンが細胞外基質の変化に伴い上昇したものと考えられた。それゆえにルミカンとメタクロマジーの陽性部分で違いが現れた。またルミカンと円板細胞の関係からルミカンの発現が顎関節円板の線維芽細胞様細胞の増減に関係があると示唆され、CD34 と VEGF の発現では変形した円板の内部にまで及ぶ陽性部分を確認した。このことからルミカンが血管形成に関与している可能性が示唆された。

まとめとしてルミカンの発現は線維芽細胞様細胞による新しいコラーゲンネットワークの構築の鍵の役割を担っている可能性が考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年12月22日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

顎関節内障は、関節包内における関節の移動を障害するような異常であり、その病態についての研究は顎関節円板の細胞外基質の分解までの過程が明らかとなってきたが細胞外基質の修復、調整に関して研究報告がなされていないのが現状である。

本研究では、各分野で細胞外基質の修復、調整、線維化などに機能していると報告されているルミカンに着眼し、ヒト顎関節円板内での存在を確認すること、そして顎関節円板の変化に対し調整、再構築の役割を担っている可能性について免疫組織化学的に検討したものである。

学位申請者はヒト顎関節内障患者の顎関節円板と正常顎関節円板を用いて免疫組織学的染色 (ルミカン、CD34、VEGF)、組織学的染色 (トルイジンブルー) にて分析を行った。

その結果、正常顎関節円板と変形した顎関節円板にルミカンの発現が検出された。正常顎関節円板では、ルミカンが顎関節円板周囲の結合組織、円板表層に発現し、円板内部では弱い発現であった。しかしながら変形した顎関節円板では内部に広範囲の強い発現を認めた。トルイジンブルー染色では正常顎関節円板内部と変形した顎関節円板内部のルミカンの染色が弱い部位でメタクロマジーが陽性であり、ルミカンの発現が強い部分ではメタクロマジーが陰性であった。変形した顎関節円板内ではルミカンの発現の強い部分で線維芽細胞様細胞が豊富に存在することが明らかとなった。CD34 と VEGF 染色陽性が変形した顎関節円板内に観察され、正常顎関節円板では弱陽性があった。これらのことからルミカンの発現は線維芽細胞様細胞による新しいコラーゲンネットワークの構築の鍵の役割を担っている可能性が示唆された。

以上のように学位申請者は、顎関節領域で臨床上問題となっている顎関節内障、特に顎関節円板においてルミカンが細胞外基質の変化に関与しており、病態を解明する上で新しい視点を導きだした点において学位論文にふさわしい価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第434号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	中田耕平		
学位論文の題目	1) Bone marrow nails created by percutaneous osteoplasty for long bone fracture : comparisons among acrylic cement alone, acrylic-cement-filled bare metallic stent, and acrylic-cement-filled covered metallic stent 2) Percutaneous osteoplasty with a bone marrow nail for fractures of long bones-experimental study (長管骨骨折に対する経皮的髄内釘作成術の基礎的検討)		
論文審査委員	主査	教授 吉田宗人	
	副査	教授 川上守	教授 佐藤守男

論文内容の要旨

【緒言】

現在、四肢の長管骨への転移性骨腫瘍による病的骨折や超高齢者の四肢長管骨の骨折に対する治療法として、髄内釘挿入、創外固定などの整形外科的治療が確立されているが、種々の理由で手術が行われず、装具固定や薬物療法で経過観察されている患者が存在する。

経皮的骨形成術は、骨溶解性の転移性腫瘍や骨粗鬆症による椎体の圧迫骨折で行われ、良好な成績が報告されている。椎体以外では、放射線治療や麻薬にて疼痛コントロールの困難な骨盤骨や肋骨、仙骨の転移性骨腫瘍に対して単独にあるいはラジオ波焼灼療法(Radiofrequency ablation: RFA)と併用され鎮痛効果が得られている。しかし、長管骨の病的骨折に対して経皮的骨形成術による治療例は報告されていなかった。

我々は、手術適応外とされた多発肺転移を伴う上腕骨病的骨折例に、経皮の手技により、胆管用PTCDチューブと骨セメントを用いて髄内釘を作成しQOLの向上を得た症例を経験した。この経験をもとにより洗練された経皮の手技の開発する必要性を痛感した。

本研究の目的は、生体豚を用いて長管骨骨折に対する経皮的髄内釘作成術を開発し、有用性、安全性を評価することである。

【対象と方法】

まず生体豚を用いて手技的な可能性、安全性を検討した。次に摘出豚長管骨(脛骨)を用いて作成した髄内釘形成後の長幹骨の強度と正常長管骨の強度を比較、検討した。

1) 生体豚を用いた検討

対象は、三種交配種の健全な豚3頭(生後約3カ月、体重平均39.2kg)を用いて、1頭当たり左右の豚脛骨(計6本)に髄内釘形成術を行った。

全身麻酔下、無菌操作の透視下で、豚脛骨近位骨幹端を11Gの骨生検針で穿刺し、0.035inchのガイドワイヤを骨髓内へ挿入し、8mm径×40mmのカバースtentを留置し、8mm径×40mmのバルーンカテーテルでstentを拡張する。その後4Frカテーテルを骨髓内に挿入し、stent遠位端から内腔、近位端へ用手的に骨セメントを注入し、骨セメント製髄内釘を作成した。

そして以下の項目について検討した。

- ・手技的成功率・所要時間
- ・直後、1日後、3日後の血液検査(WBC、CRP、RBC、Ca、IP)、直腸温、酸素飽和度。
- ・直後、1日後、3日後の生体豚の活動性。
- ・髄内釘の固定性(直後、1日後、3日後の単純レントゲン写真および摘出後の肉眼的評価)。

2) 摘出豚脛骨を用いた検討

次に別の三種交配種の健全な豚6頭(生後約3カ月、体重平均39.8kg)を犠牲死させ、左右豚脛骨を摘出し、In vitroの実験を行った。

まず摘出豚脛骨に人工的に鋸を用いて全周1cmを残して骨折線を作成した。次に経皮的に以下の3種の髄内釘作成を行った。即ち、

骨セメント単独群：骨セメント単独注入

ベアステント併用群：ベアステント(10mm 径×40mm)留置後骨セメント注入、

カバーステント併用群：カバーステント(10mm 径×40mm)留置後骨セメント注入

の3群である。

そして、成功率、骨セメントの分布、骨セメント量、髓内釘径、曲げ強度を各群で測定し、比較検討した。

前述の如く、まず骨生検針を用いて、ガイドワイヤを骨髓内に挿入し、骨折部にカバーステントあるいはベアステントを留置し、バルーンカテーテルでステントを拡張する。次に骨折部を中心に遠位側から近位側へカテーテルを用いて手動的に骨髓内に注入困難となる時点まで骨セメントを注入し、3種の髓内釘を作成した。この3種と摘出豚脛骨(コントロール群)に対して3点曲げ試験を行い、曲げ強度を比較検討した。

【結果】

1) 生体豚を用いた検討

① 手技的成功率・所要時間

3頭(計6本)全例にカバーステントを用いた髓内釘を作成し、成功した。髓内釘作成の所要時間は1本当たり 35 ± 11.96 分であった。

② 血液検査、直腸温、酸素飽和度

術直後、1日後、3日後ともに術前と比較して有意な変化は認められなかった。

③ 術後の生体豚の活動性

術直後、1日後、3日後ともに術前と変化なく走行可能であり、活動性の低下も認められなかった。

④ 髓内釘の固定性

単純X線写真上、術直後、1日後、3日後ともに術前と比較して髓内釘の移動は認められなかった。摘出後の切断面を肉眼的に評価すると髓内釘はステント両端の骨セメントにより強固に固定されていた。

2) 摘出豚脛骨を用いた検討

① 手技的成功率、所要時間

3種類の髓内釘の作成(各3本、計9本)に全例成功した。髓内釘作成の所要時間は骨セメント単独群 13.7 ± 1.5 分、ベアステント併用群 19.5 ± 2.7 分、カバーステント併用群 19.0 ± 2.6 分であり、骨セメント単独群とベアステント併用群、カバーステント併用群に有意差がみられた。ステント群間には有意差が認められなかった。

② 骨セメント分布

骨セメント注入単独群、ベアステント併用群では骨折面に骨セメントの分布が認められたがカバーステント併用群では認められなかった。

③ 骨セメント注入量

骨セメント注入量に骨セメント注入単独群(1.7 ± 0.26 cc)とベアステント併用群(3.17 ± 0.35 cc)、カバーステント併用群(2.90 ± 0.44 cc)に有意差が認められたが、ベアステント併用群とカバーステント併用群には有意差が認められなかった。

④ 髓内釘径

髓内釘径は、ベアステント併用群(10.26 ± 0.33 mm)、カバーステント併用群(9.57 ± 0.32 mm)、骨セメント単独群(3.57 ± 0.99 mm)の順に太く作成でき、3群間に有意差が認められた。

⑤ 曲げ強度(3点曲げ試験)

最大試験力は、骨セメント単独群 0.21 ± 0.046 KN、ベアステント併用群 0.46 ± 0.06 KN、カバーステント併用群 0.23 KN(3例中2例が測定不能)であった。骨セメント単独群の曲げ強度は、 5.88 ± 3.86 N/mm²、カバーステント群の曲げ強度は、 8.56 N/mm²、ベアステント群の曲げ強度は、 14.29 ± 1.26 N/mm²であり、ベアステント併用群が最大試験力、曲げ強度の測定でもっとも頑丈であった。一方、正常豚脛骨の曲げ強度は 62.2 ± 12.6 N/mm²であった。髓内釘治療モデル群の曲げ強度は、それぞれ正常群の0.095倍、0.14倍、0.23倍であった。

また、骨セメント併用群、ベアステント併用群は、測定終了時に髓内釘も切断されていたが、カバーステント併用群では3例中2例において測定終了前に髓内釘の移動が認められた。

【結語】

In vivo の研究では、胆管用カバーステントを骨髄内に留置し、ステント内に骨セメントを注入することで、経皮的に骨セメント製髓内釘を作成することができた。またステント両端に骨セメントを充填することで髓内釘の安定性の増強が認められた。手技的にも骨 1 本当たり 1 時間以内に完了し、3 日間の観察期間であるが急性期の合併症や副作用は認められなかった。感染や肺塞栓を引き起こすことなく安全に生体内で経皮的に髓内釘を作成することが可能であった。

そこで In vitro で骨折線を作成し、骨セメント単独群、ベアステント併用群、カバーステント併用群の 3 種で経皮的に髓内釘の作成を行った。いずれも髓内釘の作成が可能であった。骨折線へのセメント移行は骨セメント単独群、ベアステント併用群で認められた。また骨セメント注入量、髓内釘径、最大試験力、曲げ強度においてもベアステント併用群が 3 群の中で有意に高値であった。以上より 3 群の中ではベアステント併用群が有用な髓内釘と考えられた。

しかし、今回開発した経皮的髓内釘群の強度は、最大で正常群の 0.23 倍であった。未だ正常骨の強度を達成するに至らず荷重のかかる大腿骨等には不十分かもしれない。ただ、正常若年豚群との比較であり、全身状態の悪い担癌患者や超高齢者の正常骨との比較であればもっと良好な成績が残せたと予想される。今後は骨セメント製髓内釘の径を太く、あるいは骨セメント自体の強度を高める工夫が必要である。また、注入した骨セメントによる長期的な全身や局所の影響も検討する必要があると思われる。

経皮的髓内釘作成術は、手技的にも容易で、低侵襲的な治療であり、さらに強度を高めることで手術不応の担癌患者や超高齢者の長管骨病的骨折に対する治療法の一つになりうる可能性のあることが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年12月28日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

二つの論文は、四肢の長管骨の転移性腫瘍による病的骨折や超高齢者の骨折に対する新たな治療法としての経皮的髓内釘作成術の開発とその基礎的検討について述べたものである。肺機能低下や全身状態の悪化などの理由で全身麻酔が困難で整形外科的髓内釘作成術の提供できない症例を対象とする治療法である。従来経皮的骨形成術は、骨溶解性の転移性腫瘍や骨粗鬆症による椎体の圧迫骨折で行われてきたが、長管骨の病的骨折に対して経皮的骨形成術による治療例は報告されていなかった。長管骨の骨折患者に対する低侵襲治療法として経皮的骨形成術の開発に伴い、その有用性、安全性が検討された。その結果、

In vivo の研究では胆管用カバーステントを豚の骨髄内に留置し、ステント内に骨セメントを注入することで、経皮的に骨セメント製髓内釘を作成し得た。またステント両端に骨セメントを充填することで髓内釘の安定性の補強がなされた。手技的にも 60 分以内に完了し、3 日間の観察期間であるが急性期の感染や肺塞栓を引き起こすことなく安全に生体内で経皮的に髓内釘を作成しうることを示した。

In vitro の研究では長管骨に骨折線を作成し、骨セメント単独群、ベアステント併用群、カバーステント併用群の 3 種で経皮的に髓内釘の作成を行った。いずれも髓内釘の作成が可能であった。骨折線へのセメント移行は骨セメント単独群、ベアステント併用群で認められた。また骨セメント注入量、髓内釘径、最大試験力、曲げ強度においてベアステント併用群が 3 群の中で有意に高値であった。以上より 3 群の中ではベアステント併用群が有用な髓内釘と考えられた。

以上の結果より、ステントを用いた経皮的髓内釘作成術の安全性、有用性が示された。今後の長管骨病的骨折に関する臨床研究の基盤となるもので、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第435号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	劉志艶		
学位論文の題目	Encapsulated follicular thyroid tumor with equivocal nuclear changes, so-called well-differentiated tumor of uncertain malignant potential, a morphological, immunohistochemical, and molecular appraisal (乳頭癌の核所見をもつ被包性甲状腺濾胞細胞腫瘍——いわゆるWDT-UMPの形態的、免疫組織化学的、分子病理学的評価)		
論文審査委員	主査	教授 村垣泰光	
	副査	教授 赤水尚史	教授 覚道健一

論文内容の要旨

Introduction

Papillary thyroid carcinoma type nuclear changes (PTC-N) are the most reliable morphological features in the diagnosis PTC. In the literatures and text books, PTC-N are diagnostic criteria for malignancy in thyroid tumor, whether it has capsule or not, invasive or not and papillary growth pattern or not. However, the distinctions among follicular-patterned thyroid tumors are not always clear-cut. Therefore, Williams proposed a new diagnostic terminology of well-differentiated tumor uncertain malignant potential (WDT-UMP) to cover this problematic entity of tumors. The purpose of this study was to reappraise the clinicopathological, immunohistochemical and molecular features of WDT-UMP and to establish a new viewpoint on this controversial entity.

Materials and methods

The pathology files of 2648 cases with thyroid lesions were reviewed with attention to PTC-N. Thirty cases were selected as WDT-UMPs according to the modified Williams criteria. Follicular adenoma, follicular carcinoma, hyalinizing trabecular adenoma and PTC were included as control tumors. Immunostaining for HBME-1, GAL-3 and CK19 were performed for both WDT-UMP and the controls using LSAB system. BRAF^{V600E} mutation and RET/PTC1 rearrangement were analyzed for all the cases of WDT-UMP. The data were analyzed by SPSS for windows. Associations between categorical variables were evaluated by the Chi-Square or Fisher's exact tests. Probability values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

The WDT-UMP ranged in size from 1.0 to 4.6 cm, with an average size of 2.0 ± 0.9 cm (mean \pm SD). Ten cases were originally diagnosed as adenomatous nodule, 20 cases as FTA, and only simple excision or lobectomy was done and lymph node dissection was not carried out. No invasion to thyroid parenchyma or lymph node metastasis was identified in any of the cases at surgery. Twenty cases were available for follow-up analyses at an average of 81 months, and all of them were alive at latest follow-up without recurrence. All WDT-UMPs had an intact capsule. The nuclei size was 2~4 times of that of normal thyroid follicular cells. Nuclear grooves were observed in 1~3% of the tumor cells. Pseudoinclusions are rare or absent in all cases. In WDT-UMPs, 12 (40%) cases showed positive reaction with HBME-1, 10 (33.3%) cases for CK19, and 11 (36.7%) cases for GAL-3. According to the positivity of immunoreaction of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3, significant differences were obtained between WDT-UMP and C-PTC ($P=0.030$, 0.009 and 0.004 , respectively), IFV-PTC ($P=0.020$, 0.008 and 0.026 , respectively) and C-PTC ($P=0.022$, 0.024 and 0.005 , respectively), but not between WDT-UMP and FTA or FTC. BRAF^{V600E} mutation was absent but RET/PTC1 rearrangement was found in

only 2 (6.7%) of 30 cases of WDT-UMP.

Conclusions

In conclusion, we first introduce details of histological criteria of WDT-UMP, which included focal PTC-N tumor group in addition to the tumor with diffuse but equivocal PTC-N. WDT-UMP has a favorable outcome and shows distinct morphological, immunohistochemical and molecular features from C-PTC. We rename both WDT-UMP and non-invasive encapsulated follicular patterned thyroid tumors with focal PTC-N as a borderline tumor of “WDT-UB”, which share PTC-N in a certain extent.

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 1 月 14 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文審査を行った。

乳頭癌の核所見（PTC-N）は甲状腺乳頭癌の診断基準である。しかし、PTC-Nが所見不完全な時、診断の不一致がおこることが知られている。このような病変をWilliamsはWDT-UMP（well differentiated tumor of uncertain malignant potential）と命名した。本研究の目的は、WDT-UMPの臨床病理学的、免疫組織化学的および分子病理学的特徴を明らかとし、この病変の新たな視点を確立することを目的とする。

本論文では和歌山県立医科大学病理学第二教室で診断された 2648 例の再顕鏡により、30 例の WDT-UMP を同定した。濾胞腺腫（FTA）、濾胞癌（FTC）、硝子索状腺腫（HTA）、乳頭癌（PTC の亜型：被包通常型（EC-PTC）、浸潤通常型（C-PTC）、被包濾胞性（EFV-PTC）、浸潤濾胞性（IFV-PTC））を対照とした、ホルマリン固定、パラフィン切片を用い、HBME-1、GAL-3 および CK19 免疫染色を行った。WDT-UMP の 30 例パラフィンブロックより RNA と DNA を抽出し、BRAF^{V600E} 変異と RET/PTC-1 rearrangement について分析した。

結果：

- 1) WDT-UMP は手術時リンパ節転移を認めない。
- 2) 平均 81 ケ月経過を観察した 20 例では術後再発、転移を認めない。
- 3) HBME-1, GAL-3, CK19 の免疫染色結果は乳頭癌ではいずれもほとんどの細胞が強く陽性であるのに対し、WDT-UMP では陽性細胞は少数であった（40.0%, 36.7%, 33.3%）。その差は統計学的に有意であった。
- 4) FTA と FTC は、陽性頻度は低く、WDT-UMP と近似した。
- 5) WDT-UMP の分子病理学的特色は、RET/PTC-1 rearrangement を 2 例(6.7%)に認めたが、BRAF^{V600E} 変異は検出できなかった。

以上より本論文は WDT-UMP の免疫組織化学的特色と、分子病理学的特色を明らかとし、通常型乳頭癌と大きく異なることを明らかにした。甲状腺腫瘍分類における新腫瘍概念の特色を明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第436号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	・本周子		
学位論文の題目	Endogenous TNF α Suppression of Neovascularization in Corneal Stroma in Mice (角膜実質血管新生における内因性の腫瘍壊死因子 α の役割)		
論文審査委員	主査	教授 井原 義人	
	副査	教授 仙波 恵美子	教授 雑賀 司珠也

論文内容の要旨

緒言

血管新生は虚血による生理活性物質の発現や炎症組織での炎症細胞の発現するサイトカインなどの働きで誘導される。血管新生は一般には生体反応として恒常性維持に貢献するが、眼組織では一般に様々な合併症を惹起し視力低下につながる。たとえば、角膜創傷治癒過程での角膜血管新生は角膜混濁を生じ、虚血網膜では血管新生とともに増殖膜を形成し硝子体出血や牽引性網膜剥離を起こしうる。また隅角での新生血管を生じ難治性の血管新生緑内障に至る。これらすべての病態による視力低下は重篤で失明の原因となる。従って眼科診療では、血管新生を制御することが重要な課題となっている。

一般に創傷治癒では、種々の炎症性サイトカインが、それぞれの局面で重要な役割を担っている。血管新生には血管内皮細胞成長因子 (VEGF)、 トランスフォーミング成長因子 β 1 (TGF β)、などのサイトカインが関与しているとされており、それらの機能は複雑なシグナル伝達クロストークにより制御されている。

当教室では、以前にマウス角膜アルカリ外傷後の創傷治癒過程の後期で内因性腫瘍壊死因子 α (TNF α) が TGF β /Smad を抑制することで、角膜の線維、癩痕化を抑制しているということを報告した。この時、角膜での好ましくない血管新生も TNF α 欠損マウスでは促進されていた。しかし、血管新生形成過程における TNF α の役割は充分解明されていない。本研究では、TNF α 欠損(KO)マウスでの角膜血管新生モデルと培養細胞を用いて角膜血管新生過程における TNF α の役割を検討した。

方法

1. 眼線維芽細胞での VEGF 発現誘導に対する内因性 TNF α の役割

マウス眼組織線維芽細胞での VEGF 発現誘導における内因性 TNF α の効果を調べるために生後 2 日の野生型 (C57BL/6, WT) マウスの眼球から得られた線維芽細胞を培養し、2.0 ng/ml TGF β 1 添加と、5.0 または 1.0 ng/ml の TNF α 添加後 24 時間で RNA を抽出し、VEGF mRNA をリアルタイム PT-PCR で測定した。

2. 培養ヒト臍静脈内皮細胞による *in vitro* 管腔形成での TNF α の役割

ヒト皮膚線維芽細胞上に播種されたヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を 11 日間共培養することで、CD31 による免疫染色陽性の血管様の管腔が形成されるモデルを血管新生活性の評価に用いた。TGF β 1 添加、TNF α 添加、TGF β 1 及び TNF α 添加、VEGF 添加による管腔形成の変化を観察した。

3. マウス角膜中央部の焼灼による周辺部角膜への血管新生 (血管侵入) の誘導

WT 及び TNF α (KO)マウスそれぞれについて、角膜中央部をパクレンで電熱焼灼し、創傷治癒反応として角膜輪部から誘導される新生血管を観察した。焼灼後 3、7、14 日に屠殺して摘出されたマウス眼から凍結切片を作成し、CD31, TGF β 1, VEGF による免疫組織化学染色を行い角膜輪部から角膜中央部へ伸展した血管を観察した。同様に、WT 及び KO マウスそれぞれについて、角膜中央部をパクレンで電熱焼灼し、焼灼後 3、7、14 日に屠殺して摘出されたマウス眼から TGF β 1, VEGF の mRNA の発現を real time RT-PCR 及び免疫染色で検討した。

結果

1. 眼線維芽細胞での VEGF 発現誘導に対する内因性 TNF α の役割

TGF β 1 添加した眼線維芽細胞では VEGF の mRNA 発現が促進されたが、TNF α 添加した眼線維芽細胞では TGF β 1 による VEGF mRNA の発現促進の抑制が見られた。

2, 培養ヒト臍静脈内皮細胞による *in vitro* 管腔形成での TNF α の役割

ヒト血管内皮細胞と皮膚線維芽細胞の共培養では、TGF β 1 添加群と VEGF 添加群で血管様管腔形成がみられたが、TNF α を添加することによって、TGF β 1 及び VEGF の添加の有無に拘らず、血管様管腔形成が阻害された。

3, マウス角膜中央部の焼灼による周辺部角膜への血管新生 (血管侵入) の誘導

角膜輪部から焼灼部位に伸展する新生血管は、CD31 に対する免疫染色では、7 日目で WT 比べて TNF α では強く認められた。TGF β 1, VEGF の発現は WT よりも KO で強く認めた。

TGF β 1, VEGF の mRNA の発現は real time RT-PCR で測定したところ、焼灼後 1 4 日後にピークが見られ、焼灼後 2 1 日目で WT よりも KO で優位に mRNA の発現抑制がみられた。

考察

内因性の TNF α は、角膜血管新生を抑制していると考えられた。その機序には、TNF α による TGF β 1 および VEGF の血管内皮細胞の血管新生促進効果の抑制が含まれている可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 23 年 2 月 22 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。血管新生は虚血による生理活性物質の発現や、炎症組織において炎症細胞の発現するサイトカインなどの働きで誘導される。血管新生は一般的には生体反応として組織の恒常性維持に貢献するが、眼組織では一般に様々な合併症を惹起し視力低下につながる。たとえば、角膜創傷治癒過程での角膜血管新生は角膜混濁を生じ、虚血網膜では血管新生とともに増殖膜を形成し、硝子体出血や牽引性網膜剥離を起こしうる。また隅角での新生血管の形成は難治性の血管新生緑内障を引き起こす。これらすべての病態による視力低下は重篤で失明の原因となる。従って眼科診療では、血管新生を制御することが重要な課題となっている。

マウス角膜アルカリ外傷後の創傷治癒過程の後期で、内因性腫瘍壊死因子 α (TNF α) がトランスフォーミング増殖因子(TGF) β /Smad を抑制することで、角膜の線維、癒痕化を抑制しているということがこれまでに報告された。この時、角膜での好ましくない血管新生も TNF α 欠損(KO)マウスでは促進されていた。しかし、血管新生形成過程における TNF α の役割は充分解明されていない。本研究では、TNF α KO マウスを用いた角膜血管新生モデルと培養細胞の解析を通じて角膜血管新生過程における TNF α の役割を検討して以下の結果を得た。

1) TGF β 1 を添加した眼線維芽細胞では血管内皮増殖因子(VEGF)の mRNA 発現が促進されたが、TNF α を添加した眼線維芽細胞では TGF β 1 による VEGF mRNA の発現促進の抑制がみられた。

2) ヒト血管内皮細胞と皮膚線維芽細胞の共培養では、TGF β 1 添加群と VEGF 添加群で血管様管腔形成がみられたが、TNF α を添加することによって、TGF β 1 及び VEGF の添加の有無に関わらず、血管様管腔形成が阻害された。

3) TNF α KO マウスを用いた角膜血管新生モデル実験において、焼灼後 7 日目に角膜輪部から焼灼部位に伸展する新生血管の CD31 陽性像が免疫組織染色で観察されたが、それは WT 群に比べて KO 群で顕著に認められた。同様に TGF β 1, VEGF の発現は WT 群よりも KO 群で強く認められた。TGF β 1, VEGF の mRNA の発現については real time RT-PCR でも解析したところ、焼灼後 1 4 日目に発現のピークが見られ、焼灼後 2 1 日目で WT 群よりも KO 群で優位にその発現抑制がみられた。以上の知見より、本研究論文は内因性の TNF α が角膜血管新生を抑制することを示し、その機序として TGF β 1 および VEGF を介した血管新生促進効果の TNF α による抑制という新たな分子機構の存在を示唆しており、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第437号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	神 埜 聖 治		
学位論文の題目	Aberrant expression of the <i>P2</i> promoter-specific transcript <i>Runx1</i> in epiphyseal cartilage of <i>Trps1</i> -null mice (<i>Trps1</i> 遺伝子ノックアウトマウスの骨端軟骨における <i>P2</i> プロモーター特異的 <i>Runx1</i> 転写産物の異常発現)		
論文審査委員	主 査	教授 岸 岡 史 郎	
	副 査	教授 村 垣 泰 光	教授 吉 田 宗 人

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

毛髪鼻指節異形成症 I 型 (TRPS I: Tricho-rhino-phalangeal syndrome type 1) は、顔貌や四肢の骨格に異常をきたす *TRPS1* 遺伝子の変異により発症する常染色体優性の遺伝形式をとる骨系統疾患である。TRPS1 は GATA 配列に結合する転写因子で下流遺伝子の発現を抑制する働きを持つ。マウスの胎生期において関節軟骨や長管骨の成長軟骨に発現しており、*Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスは気管軟骨の形成不全により出生直後から呼吸不全となる。これらのことから TRPS1 は軟骨分化や軟骨形成を調節していると考えられる。

これまで我々は軟骨由来の培養細胞株である ATDC5 細胞の軟骨分化過程において、GDF5 (growth and differentiation factor 5) の下流で TRPS1 が働くことを報告している。本研究では、TRPS1 の下流遺伝子を検索することを目的として、TRPS1 発現を調節した ATDC5 細胞を用いて DNA マイクロアレイを行った。その結果をもとに TRPS1 の下流候補遺伝子として *Runx1* 遺伝子に注目し、TRPS1 との関係について解析を行った。

【方法】

1. DNA マイクロアレイ
Trps1 遺伝子高発現株の ATDC5 細胞と *Trps1* siRNA 処理した ATDC5 細胞をそれぞれインスリン添加培養液で培養し、軟骨細胞に分化誘導した後に RNA を抽出した。cDNA を作製し、マウスゲノムチップにより DNA マイクロアレイを行った。
2. ウェスタンブロッティング
Trps1 遺伝子高発現株の ATDC5 細胞と *Trps1* siRNA 処理した ATDC5 細胞から得たタンパクから *Trps1* 抗体を用いてタンパク解析を施行した。
3. RT-PCR
Trps1 遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスの膝骨端軟骨、および軟骨分化を誘導した ATDC5 細胞から *Runx1*、*Trps1* 発現を解析した。
4. ルシフェラーゼアッセイ
Runx1 遺伝子の 2 つ (近位 *P2* および遠位 *P1*) のプロモーター配列をそれぞれ組み込んだルシフェラーゼベクターを用いて *Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスの骨端軟骨から得た初代培養細胞にそれぞれトランスフェクトし、24 時間培養した後にルシフェラーゼ活性を測定した。
5. クロマチン免疫沈降法
Trps1 遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスの骨端軟骨細胞から DNA 断片を取り出し、*Trps1* 抗体およびプロテイン G で処理して免疫複合体を沈降させた。*Runx1 P1* および *P2* プロモーター配列特異的なプライマーを用いて、沈降させた DNA を鋳型として複製した。
6. *In situ* ハイブリダイゼーション
18.5 日齢の胎児マウスの脛骨を 4%パラホルムアルデヒドで 3 日間固定し、切片を作製した。ジゴキシゲニンでラベルした *Runx1* と *Trps1* の cRNA プローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行い、アルカリフォスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体で浸透し、NBT/BCIP で発色

させた。

【結果】

1. DNA マイクロアレイによる *Trps1* 下流候補遺伝子の同定
ウエスタンブロッティングでは、*Trps1* 遺伝子高発現株の ATDC5 細胞では多量の *Trps1* タンパクが同定されたが、*Trps1* siRNA 処理した ATDC5 細胞では *Trps1* タンパクは同定できなかった。この結果をもとに DNA マイクロアレイを解析し、*Trps1* 発現を抑制することにより発現が増加した遺伝子の中から、転写因子をコードする遺伝子に着目した。
2. *P2* プロモーターによる *Runx1* 発現は *Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスの骨端軟骨で検出され、軟骨分化誘導した ATDC5 細胞では減少する。
DNA マイクロアレイの結果、*Runx1* 発現は *Trps1* により調節されることが分かったが、さらに *Trps1* siRNA 処理した ATDC5 細胞内で *Runx1* 発現は増加していた。*Runx1* は骨格発達段階で発現していることが知られており、*Trps1* による軟骨での *Runx1* 発現の変化に注目した。*Runx1* には *P1* と *P2* プロモーターにより転写・翻訳される 2 つのアイソフォームがある。*Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスの骨端軟骨では *P2* プロモーターから転写されるアイソフォームだけが有意に発現していた。また ATDC5 細胞では軟骨分化に従ってどちらのアイソフォームも発現が低下しており、特に *P1* の発現が *P2* よりも低かった。
3. *Trps1* は特異的に *P2* プロモーター転写を抑制する。
ルシフェラーゼアッセイでは、野生型マウス軟骨細胞に比べて *Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスの軟骨細胞では *P2* プロモーター発現が有意に増加していた。また *P1* プロモーター発現はどちらの細胞においても非常に少なかった。
4. *Trps1* は *P2* プロモーター内の GATA 部位に結合する。
クロマチン免疫沈降法により野生型マウス軟骨を *Trps1* 抗体で処理したのから *P2* プロモーター領域を持つ免疫複合体が唯一検出された。
5. *Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスの成長軟骨細胞で *P2* プロモーターを介する *Runx1* 転写が亢進する。
In situ ハイブリダイゼーションから *P2* プロモーターでの *Runx1* 転写は *Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスでは増殖軟骨、前肥大軟骨、静止軟骨で発現し、それは野生型マウスでの *Trps1* 発現部位と一致した。

【考察・結論】

Runx1 は造血細胞の分化に不可欠な転写因子をコードするとともに白血病の発症に関与する遺伝子であることが知られているが、今回の研究で軟骨分化に関与する *Trps1* の下流で働く遺伝子の一つであることを示した。これまでも *Runx1* は軟骨分化の初期に働くことが報告されており、四肢および気管での軟骨分化の初期段階における *Runx1* 発現を *Trps1* が調節している可能性が示唆された。また軟骨細胞内では 2 つのプロモーターの内、*P2* プロモーターの GATA 配列にのみ *Trps1* は結合し、*P2* プロモーターによる *Runx1* 転写産物のみが骨端軟骨で発現することがわかった。これらのことから *Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスの骨端軟骨で認められる増殖層の延長は、*P2* プロモーター特異的な *Runx1* の過剰な発現が原因であると考えられた。以上のことから、*Trps1* は胎児期の骨成長板軟骨で *Runx1* の *P2* プロモーターに働くことにより *Runx1* 遺伝子発現を抑制的に調節しており、*Runx1* 遺伝子発現の異常な上昇が *Trps1* 遺伝子ノックアウトマウスの軟骨細胞の増殖・分化を障害することにより骨格異常をきたすと考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 2 月 18 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。
毛髪鼻指節異形成症 I 型 (TRPS I: Tricho-rhino-phalangeal syndrome type 1) は、顔貌や四肢の骨格に異常をきたす TRPS1 遺伝子の変異により発症する常染色体優性の遺伝形式をとる骨系統疾患である。TRPS1 は GATA 配列に結合する転写因子で下流遺伝子の発現を抑制する働きを持つ。マウスの胎生期において関節軟骨や長管骨の成長軟骨に発現しており、*Trps1* 遺伝子ノックアウト (KO) マウスは気管軟骨の形成不全により出生直後から呼吸不全となり 24 時間以内に死亡する。これらのことから TRPS1 は軟骨分化や軟骨形成を調節する転写因子であると考えられる。本論文では、TRPS1 の

下流で軟骨分化に働く遺伝子を検索することを目的として、TRPS1 発現を亢進または抑制させた 2 種類の ATDC5 細胞を用いて DNA マイクロアレイを行い、その結果をもとに TRPS1 の下流候補遺伝子として *Runx1* 遺伝子に注目し、TRPS1 との関係について解析を行った。その結果、

1. DNA マイクロアレイにより *Trps1* の下流で働く候補遺伝子として *Runx1* を同定した。
2. *Runx1* 遺伝子には *P1* と *P2* プロモーターが存在し、ATDC 細胞では、それぞれのプロモーターによる転写産物が検出された。
3. *P2* プロモーターによる *Runx1* 発現は *Trps1* KO マウスの骨端軟骨で検出されるが、軟骨分化誘導した ATDC5 細胞では減少している。
4. ルシフェラーゼアッセイにより *Trps1* は特異的に *P2* プロモーター転写を抑制することを示した。
5. クロマチン免疫沈降法により *Trps1* は *P2* プロモーター内の GATA 部位に結合することを示した。
6. *Trps1* KO マウスの骨端軟骨において *P2* プロモーターによる *Runx1* 転写産物が異常に発現することを示した。

以上より、*Trps1* は胎児期の骨成長板軟骨で *Runx1* の *P2* プロモーターに働くことにより *Runx1* 遺伝子発現を抑制的に調節しており、*Runx1* 遺伝子発現の異常な上昇が *Trps1* KO マウスの軟骨細胞の増殖・分化を障害することにより骨格異常をきたすことが考えられた。

本論文は、骨系統疾患 TRPS I の骨格異常、特に長管骨での異常をきたす機序を解明したという点において意義があり、また他疾患における骨格異常の遺伝子発現変化を検索する上でも発展性が高いと考えられることより、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第438号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	齐 峰		
学位論文の題目	Volatile anesthetics inhibit angiotensin II-induced vascular contraction by modulating myosin light chain phosphatase inhibiting protein, CPI-17 and regulatory subunit, MYPT1 phosphorylation. (揮発性麻酔薬はCPI-17, MYPT1リン酸化を修飾することにより、Angiotensin II惹起血管収縮を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡史郎	
	副査	教授 近藤稔和	教授 畑埜義雄

論文内容の要旨

【Introduction】

Vascular contraction is regulated by myosin light chain (MLC) phosphorylation. Inhibition of MLC phosphatase (MLCP) increases MLC phosphorylation for a given Ca^{2+} concentration, and results in promoting myofilament Ca^{2+} sensitivity. MLCP activity is mainly determined protein kinase C (PKC) and Rho kinase through the phosphorylation of both PKC-potentiated inhibitory protein (CPI-17) and myosin phosphatase target subunit (MYPT1). We have previously demonstrated that sevoflurane inhibited PKC phosphorylation and membrane translocation of Rho kinase. If volatile anesthetics could modulate PKC or Rho kinase activity, these drugs would be expected to influence the activity of their downstream effectors, CPI-17 and MYPT1. However, there is no information available as to the effect of anesthetics on MLCP activity. We hypothesized that volatile anesthetics inhibit agonist-induced vasoconstriction by suppressing MLCP activity. The purpose of our study was designed to investigate the effects of sevoflurane and isoflurane on CPI-17, MYPT1, and MLC phosphorylation in response to Angiotensin II (Ang II) in rat aortic smooth muscle and to elucidate the cellular mechanisms of volatile anesthetic-induced vasodilation.

【Materials and methods】

Male Wistar rat descending thoracic aortic rings or strips were prepared. The effects of sevoflurane and isoflurane (1–3 minimum alveolar concentration, MAC) on vasoconstriction and phosphorylation of MLC, CPI-17, MYPT1 at Thr853 and MYPT1 at Thr696 in response to Angiotensin II (10^{-7} M) were investigated using isometric force transducer and Western blotting, respectively.

Dunnett test after analysis of variance was used for the time course study of protein phosphorylation. Mann-Whitney U-test was used for observations between groups, and Kruskal–Wallis followed by Newman–Keuls test for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

【Results】

1. Both sevoflurane (1.7%, 3.4% and 5.1%) and isoflurane (1.2%, 2.3% and 3.5%) attenuated Ang II (10^{-7} M)-induced contraction in a concentration-dependent manner. There was no statistical difference between the inhibitory effect of sevoflurane and isoflurane on VSM contraction compared at equipotent concentrations.
2. Ang II (10^{-7} M)-induced contraction of rat aortic smooth muscle was associated with the increases in CPI-17, MYPT1/Thr853, MYPT1/Thr696, and MLC phosphorylation.
3. Sevoflurane, at clinically relevant concentrations, inhibited Ang II-induced increases in both CPI-17 and MYPT1/Thr853 phosphorylation, which results in the MLC dephosphorylation that induces vasodilation.

4. Isoflurane inhibited vascular contraction and MLC phosphorylation was mediated, at least in part, by suppression of MYPT1/Thr853, but not CPI-17 phosphorylation.
5. Neither sevoflurane nor isoflurane inhibited MYPT1/Thr696 phosphorylation in response to Ang II.

【Conclusions】

Although both sevoflurane and isoflurane inhibit Ang II-induced vasoconstriction and MLC phosphorylation to similar extent, the mechanisms behind the inhibitory effects of each anesthetic on MLCP activity appear to differ.

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成23年2月14日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

血管平滑筋の収縮は細胞内ミオシン軽鎖（MLC）のリン酸化により調節されている。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は MLC リン酸化酵素（MLCK）を活性化し、MLC をリン酸化することにより血管収縮を来す。一方、MLC 脱リン酸化酵素（MLCP）により MLC は脱リン酸化され、平滑筋は弛緩する。MLCP の抑制は MLC リン酸化を持続させ、一定の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により生じる平滑筋収縮を増強する、所謂収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性亢進現象が生じる。この MLCP 活性は Protein kinase C（PKC）、Rho kinase により調節されている。PKC は CPI-17 をリン酸化することにより、また Rho kinase は MLCP のサブユニットである MYPT1 のリン酸化を介して MLCP 活性を調節している。揮発性麻酔薬であるセボフルランは PKC や Rho kinase 活性を抑制することにより、血管収縮を抑制することは証明されているが、CPI-17 と MYPT1 活性に及ぼす影響に関しては不明である。本研究ではラット大動脈平滑筋を用い、 Ca^{2+} 感受性亢進を来す受容体刺激薬である Angiotensin II（Ang II）による、MLC、CPI-17、MYPT1 活性への揮発性麻酔薬であるセボフルラン、イソフルランの影響を検討することにより、揮発性麻酔薬の血管平滑筋拡張作用の機序の解明を目的とした。その結果、

- 1) Ang II (10^{-7} M) は摘出Wistarラット内皮除去大動脈標本を収縮させた。セボフルラン（1.7%、3.4%および5.1%）、イソフルラン（1.2%、2.3%および3.5%）は濃度依存性にAng II収縮を抑制した。収縮抑制の程度は2種類の麻酔薬で有意差は無かった。
- 2) Ang II (10^{-7} M)はMLC、CPI-17、MYPT1/Thr853、MYPT1/Thr696のリン酸化を促進した。その作用はAng II適用後5分でピークに達した。
- 3) セボフルラン（1.7%、3.4%および5.1%）は濃度依存性にAng II惹起、MLC、CPI-17、MYPT1/Thr853のリン酸化を抑制した。
- 4) イソフルラン（1.2%、2.3%および3.5%）はMLC、MYPT1/Thr853のリン酸化を抑制したが、CPI-17のリン酸化を抑制しなかった。
- 5) MYPT1/Thr696リン酸化はセボフルランおよびイソフルランでは抑制されなかった。

以上より本論文は、揮発性麻酔薬は Ang II による収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性亢進を抑制することにより血管収縮を抑制することを証明し、同様の血管拡張作用と MLC リン酸化抑制作用を有していても、セボフルランとイソフルランは異なった機序を有していることを初めて明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第439号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	谷口 亘		
学位論文の題目	In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord (脊髓膠様質ニューロンにおけるドパミン作動神経系疼痛抑制作用の in vivo パッチクランプ法を用いた解析)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 智善	
	副査	教授 前田 正信	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

【目的】

中枢のドパミン作動性神経系として、黒質線条体路、中脳辺縁路、視床下部下垂体路、視床下部脊髓路の四経路が知られている。視床下部脊髓路は視床下部の後部 A11 ニューロンより起始し、脊髓に投射するが、他の経路と違って殆ど注目されず、その機能的役割は不明である。また、同じアミン類のノルアドレナリンやセロトニン作動性神経系は下行性疼痛抑制系を有することが知られているが、ドパミン作動性神経系が同様に作用するかどうかは未知である。今回、成熟ラットの脊髓膠様質ニューロンに in vivo パッチクランプ法を適用し、脊髓後角におけるドパミンの作用を解析し、ドパミン作動性神経系が下行性疼痛抑制系としての作用を有するかを検討した。

【方法】

5~7 週齢のラットをウレタン腹腔内麻酔下に椎弓切除術を行い、脊髓膠様質ニューロンに in vivo パッチクランプ法を適用した。ドパミン及び関連薬物を灌流液中に投与し、脊髓レベルでの薬理学的検討を行った。また、記録細胞の受容野に触・疼痛刺激試験を行うと興奮性シナプス後電流 (EPSC) が激しく連続的に出現するが、ドパミン投与下によって触・疼痛刺激誘起応答に変化があるか検討した。さらに、ドパミン作動性神経系の起始核である視床下部 A11 を電気刺激し、脊髓後角の記録ニューロンにどのような影響を与えるか検討した。

【結果】

電圧固定法により記録膜電位を -70mV に固定した。ドパミン (100 μ M) を 2 分間灌流投与すると、外向き電流の発生ならびに EPSC の頻度・振幅の減少が観察された。外向き電流は記録した 219 ニューロン中 155 ニューロン (70.8%) で認め、平均振幅は 19.5 ± 1.6 pA ($n = 64$) であった。この作用機序としては、脊髓膠様質ニューロンに D2-like 受容体が発現しており、その活性化により細胞膜 G タンパク質を介して K チャネルが開き、膠様質ニューロンの膜が過分極することが薬理学的解析により判明した。また、ドパミンは神経終末部にも作用し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を抑制していることが判明した。

次に、ドパミン存在下に記録ニューロンの受容野に触・疼痛刺激を加え、ドパミン非存在下での誘起応答と比較した。触刺激は圧刺激装置を使用し、一定の圧で 5 秒間空気を吹き付けることで定量化した。ドパミン存在下では非存在下と比較して触刺激による EPSC の発生頻度、基線と EPSC 波形の形成する面積は有意に減少した (18 ニューロン中 14 ニューロン)。また、疼痛刺激を定量的に行うために有鉤鉗子で 5 から 10 秒間挟んだ。触刺激と同様にドパミン存在下では非存在下と比較して有意に減少した (6 ニューロン中 4 ニューロン)。また、電流固定法で疼痛刺激による活動電位の発生を観察すると、ドパミン存在下では非存在下と比較して興奮性シナプス後電圧 (EPSP) および活動電位は発生頻度ならびに面積は有意に減少した (6 ニューロン中 4 ニューロン)。

さらに、視床下部 A11 を電気刺激するとドパミンを脊髓に灌流したときと同様に外向き電流の発生 (50 ニューロン中 36 ニューロン (72%)、平均振幅 7.5 ± 1.6 pA) ならびに EPSC の頻度・振幅の減少 (46 ニューロン中 39 ニューロン (84.7%)、コントロール比 61.9 ± 3.0 %) が観察された。これらの刺激効果は D2-like 受容体拮抗薬にて阻害された。

【考察】

既知の下行性疼痛抑制系として橋レベルの青斑核由来のノルアドレナリン作動性神経系、延髄レベ

ルの大縫線核由来のセロトニン作動性神経系が確立している。近年、視床下部A11 電気刺激で鎮痛効果が得られることや、ドパミンあるいはドパミン作動薬の髄腔内投与での鎮痛効果が行動学的に報告されていることから、同じアミン類のドパミンにも下行性疼痛抑制系としての作用があると推測されるが、そのメカニズムについては解明されていなかった。今回、*in vivo* パッチクランプ法にてドパミンは脊髄感覚ニューロンの膜を過分極させる作用を有することを確認した。薬理的な解析により、脊髄後角感覚ニューロンには D2-like 受容体が発現していて、ドパミンによって活性化されると細胞膜Gタンパク質の活性化を介してカリウムチャンネルが開くことで細胞膜が過分極することが判明した。このように、ドパミンによる膜過分極応答はシナプス後性作用であるが、EPSC の振幅も抑制されたことからシナプス前性にもドパミンは作用していることが判明した。すなわち、ドパミンは神経終末部に作用し、興奮性伝達物質であるグルタミン酸の放出を抑制していることが示唆された。さらに、ドパミンは脊髄レベルにおいて実際の皮膚侵害・非侵害刺激に対して抑制作用を有することが今回の *in vivo* 実験において証明された。

ドパミンは脊髄、後根神経節において産生されないことから、脊髄に投射するドパミン作動性神経系としては視床下部脊髄路が示唆されたが、未だ不明のままであった。今回、本研究において視床下部A11 を電気刺激するとドパミンを脊髄に灌流したときと同様の応答が観察された。これらの結果から、末梢皮膚刺激が後根神経節を經由して後角感覚ニューロンに伝わるが、その刺激は視床下部A11 ニューロンから投射されるドパミンによってシナプス前性・後性に制御を受けている、つまり、ドパミン作動性神経系は下行性疼痛抑制系として機能していることが本研究により明らかになった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成23年2月25日論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

ドパミンは脳内に広範囲に分布する主要な神経伝達物質であるが、脊髄レベルでのドパミン作動性神経系の疼痛に関する役割については依然不明な点が多い。脊髄内のドパミンは視床下部後部A11 ニューロンより投射されるが、この経路が同じアミン類のノルアドレナリンやセロトニン作動性神経系と同様に下行性疼痛抑制系を有する可能性がある。今回、学位請求者は成熟ラットの脊髄膠様質ニューロンに*in vivo* パッチクランプ法を用い、脊髄後角におけるドパミンの作用を解析し、ドパミン作動性神経系が下行性疼痛抑制系としての作用を有するかを検討した。その結果、ドパミンを灌流投与すると、細胞膜の過分極を示す外向き電流の発生ならびに興奮性シナプス後電流の頻度・振幅が減少することを明らかにした。この作用機序は、①脊髄膠様質細胞にドパミン受容体サブタイプのD2-like受容体が発現しており、その活性化により細胞膜Gタンパク質を介してKチャンネルが開く、膠様質細胞の膜が過分極すること、②ドパミンは神経終末部にも作用し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を抑制している事を明らかにした。また、ドパミンを脊髄内灌流時に記録細胞の受容野に触・疼痛刺激を加えると刺激応答はコントロールと比べ有意に抑制すること、さらに視床下部A11を電気刺激するとドパミンを脊髄に灌流したときと同様に外向き電流の発生ならびに興奮性シナプス後電流の頻度・振幅が減少することを明らかにした。

以上、学位請求者の論文はドパミンが脊髄内で鎮痛作用を有し、その効果は末梢刺激に対しても有効であること、さらに視床下部A11 電気刺激の結果からドパミン作動性神経系が下行性疼痛抑制系を形成していることを電気生理学的に証明した最初の論文である。本論文はドパミン作動性神経系を用いた鎮痛方法が神経障害性疼痛などの難治性慢性疼痛に対する新たな治療法になり得る可能性を示唆するものであり、学位論文として十分に価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第440号		
学位授与の日	平成23年3月15日		
氏名	高橋紀代		
学位論文の題目	Local heat application to the leg reduces muscle sympathetic nerve activity in human. (下肢の局所加温が健常者の筋交感神経活動 (muscle sympathetic nerve activity: MSNA) に与える影響)		
論文審査委員	主査	教授 古川福実	
	副査	教授 仙波恵美子	教授 田島文博

論文内容の要旨

【緒言】

日常診療において、局所温熱療法(ホットパック)は多用されている。しかし、その作用は主に皮膚までは判明しているが、骨格筋への影響は不明である。complex regional pain syndrome(CRPS)のように交感神経が亢進している病態に対して、局所温熱療法を行うことにより、難治性疼痛が緩和することがあるが、その機序も解っていない。

局所温熱療法の最も一般的な生理学的効果は、局所の血流を増やすことである。局所血流の増加は、加温される熱の直接効果と、反射のメカニズムによって生じる細動脈と毛細血管の拡張による。表在性温熱療法は、局所の皮膚血管において、より顕著な血管拡張をもたらし、そこで最大の温度変化を引き起こす。これまでの研究では、局所加温は、筋血流ではなく皮膚血流を増加させると報告されていたが、しかし、最近、筋血流に明らかな影響を与えるとの新たな報告があった。

また、熱刺激は皮膚交感神経活動も筋交感神経活動 (muscle sympathetic nerve activity :MSNA)も亢進するという報告がある。MSNAは、主として骨格筋の血管を支配し、局所の血流および動脈圧の調節に重要な役割を果たしている交感神経節後繊維の活動を主に表すとされている。今までに、全身加温中のMSNAの測定や、上肢に加温し、腓骨神経のMSNAを測定した報告はあるが、血圧や深部温の変動を伴わない、穏やかな局所加温の効果と同部位のMSNAとの関係は報告されていない。本研究では、下腿に温熱負荷(local heating :LH)を加えた状態での腓骨神経のMSNAを直接記録できるmicroneurographyの方法を用いて観察し、下肢血流(leg blood flow :LBF)を測定することで、局所温熱中の皮膚温(skin temperature :TSK)がMSNAに与える影響と局所血流にMSNAがどのように影響しているのかを検討した。

【方法】

対象は若年健常者 男性9名。

1. 腓骨神経MSNA測定実験：左腓骨神経幹内に微小電極を刺入し、MSNAを導出した。MSNA記録中は、血圧(mean blood pressure :MBP)、脈拍(heart rate :HR)、TSK(左大腿、左下腿、左足部)、口腔内温を測定した。また、MSNAはバースト数と総MSNA(平均振幅とバースト数の積)を計測した。

2. 下肢血流(LBF)測定実験：プレシスモグラフィを用いて、左側のLBFを測定した。

両実験とも、10分間安静仰臥位(Control)の後、62°Cに温めたホットパックをタオルに4重にくるみ、15分間、左下腿と足部に置き加温(LH)した。LH終了後、20分間安静(Recovery)を継続した。

統計には、Mann-Whitney U test を用い、Controlと1分毎に計測した値との有意差を検討した。

【結果】

1. 腓骨神経MSNA測定実験：LH直後より、下腿と足部のTSKは上昇し、ホットパック除去直後に温度は急激に低下したが、Recovery中、LH前の温度には戻らなかった。計測期間中、HRとMBPは大きな変動を認めなかった。LH中は、バースト数は減少したが、LHを終了すると、すぐにControlレベルに回復した。総MSNAはLH中、上下に変動しながらも、徐々に減少し、ホットパックを除去した後は増加し、Controlと有意差を認めなくなった。総MSNAの変化は左下腿のTSKの変化と相関が高かった。

2. 下肢血流測定実験

LBFはLH直後より増加し、ホットパック除去後、LBFは減少したが、Recoveryの20分間では、

Control レベルに戻らなかった。

【考察】

本実験は、皮膚の局所加温による、MSNA と局所血流の関与を調べるために計画した。

今回の結果は、MSNA が LH 中に LBF を完全に調節するわけではないが、TSK は LH 中、下肢の MSNA の調節の重要な役割を担っているということを示唆している。

先行研究より、LH 中の MSNA 減少は、受動的な血管拡張を誘発することが示唆されており、LH 中 MSNA は減少し、LBF は増加した今回の結果を裏付ける。一方、LH 後、MSNA は、control レベルに戻ったが、LBF は、計測中、上昇したままで control レベルに戻らなかった。これらの結果は、LH は反応の早い軸索反射を介するものと、反応の遅い一酸化窒素の局所産生に調節されるシステムにより血管拡張を促すという説を裏付けている。今回、HR が一定にも関わらず、LH 中に MSNA が低下した。このことは MSNA の変化は HR ではなく、TSK の変化に誘発されたことを示唆する。今回、LH 中に一定の MBP と減少した MSNA は、局所の MSNA の減少は全身血圧に影響しなかったことを示した。よって、LH 中の MSNA の減少は全身性に誘発されたものではないことを示唆する。

【結論】

本研究により、臨床で使用されている程度の局所加温は筋交感神経活動を減少させることがはじめて明らかになった。この MSNA の低下は TSK と関連しているため、TSK が調整している可能性が高いが、LBF と関連していないため、MSNA の減少が LBF を上昇させていないことが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 2 月 28 日、審査担当者は学位請求者の出席を求め論文審査を行った。

日常診療において、ホットパックは局所温熱療法として経験的に使用されている。例えば、complex regional pain syndrome のように交感神経が亢進している病態に、疼痛緩和目的に使用するが、交感神経にどのように影響しているか不明である。近年、末梢神経に微小電極を刺入し、microneurography の方法を用いて筋交感神経活動 (muscle sympathetic nerve activity; MSNA) を直接観察出来るようになった。本実験の目的は、その手法を用いて局所温熱療法が筋交感神経に与える影響を明らかにする事である。被験者は若年男性健常者 9 名で、ホットパックにより左下腿に 15 分間温熱負荷(local heating; LH)を加え、左下腿皮膚温、左下腿血流と左腓骨神経から MSNA を測定した。その結果、LH は心拍数と血圧を変化させず、MSNA の発現率は、 15.9 ± 0.7 bursts/min から 9.0 ± 1.5 bursts/min に有意 ($P < 0.05$) に減少した。LH を終了すると同時にそれらは、前値と同様な 16.5 ± 2.7 bursts/min に回復した。筋交感神経の積分値(総 MSNA)も同様に LH 直後から減少し、LH の終了と同時に回復していた。計測中、左下腿皮膚温と総 MSNA の変化率は 1 次相関係数で $R = 0.62$ と有意な相関 ($P < 0.01$) を認めた。下腿血流は LH 直後より有意に増加し ($P < 0.05$)、LH 終了後 20 分間は、前値に戻らなかった。今回の結果は、LH による皮膚温上昇が MSNA を抑制することを示した。しかし、MSNA 抑制が LH 中の下腿血流量を完全に調節していない事も判明した。したがって、局所温熱療法の生理的作用は、皮膚温上昇による MSNA 抑制と、何らかの血管拡張因子の局所的産生である事が示唆された。本研究により、一般臨床で使用されている局所温熱療法は MSNA を減少させることがはじめて明らかになった。さらに、これらの知見は、特に交感神経が亢進した病態の治療法として局所温熱療法が有効である論拠を見出したものといえ、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第441号		
学位授与の日	平成23年3月22日		
氏名	倉本朋未		
学位論文の題目	IL-23 gene therapy for mouse bladder tumour cell lines (IL-23 遺伝子導入によるマウス膀胱癌細胞株に対する免疫療法)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 吉川徳茂	教授 原 勲

論文内容の要旨

【緒言】従来、進行性あるいは転移を有する尿路上皮癌に対する治療は、シスプラチンを主体とする多剤併用抗癌化学療法で、シスプラチン、アドリアシン、ビンブラスチン、メトトレキサートを用いた MVAC 療法が治療の主体であったが近接効果においては比較的良好な成績であるものの、長期にわたって完全寛解を示す症例は非常に少ないことがわかってきた。近年では新しい併用化学療法としてゲムシタビンとシスプラチンを用いた GC 療法が報告されている。MVAC 療法と比較した報告では骨髄抑制等の有害事象に関しては GC 療法の方が軽微であるとされているものの抗腫瘍効果においては両者の間で統計学的な有意差はなかったとされている。そのため転移を有する膀胱癌に対する新たな治療法の確立が望まれているのが現状である。膀胱癌に対する免疫療法としては高リスク表在性膀胱癌に対する BCG 膀胱内注入療法が有名であり、実臨床においても優れた抗腫瘍効果を示している。こうした点から浸潤性膀胱癌に対しても免疫学的なアプローチを試みる価値はあると思われる。我々はこうした観点から新しいサイトカインである IL-23 を用いた免疫遺伝子治療の導入を発案した。IL-23 は p19 サブユニットと IL-12 の p40 サブユニットからなるヘテロダイマーで、活性化した樹状細胞から分泌される。現在様々な生理活性が明らかにされており、*in vitro* におけるメモリー T 細胞の増殖や活性化に関与している。また活性化 T 細胞からの IFN- γ 分泌促進が知られており、effector T 細胞の免疫記憶の維持に働くと考えられている。今回、IL-23 遺伝子をマウス膀胱癌細胞株に導入することにより抗腫瘍効果のメカニズムの解析および腫瘍ワクチンとしての可能性につき検討した。

【方法】

実験 I. IL-23cDNA を含む発現ベクターの作成：マウス脾細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて IL-23cDNA を増幅し、得られた PCR 産物をほ乳類発現ベクター p3xFLAG-CMV-mscIL-23 (東京医科大学難治性免疫疾患研究センターより供与) に組み込んだ。

実験 II. マウス膀胱癌細胞株への遺伝子導入：IL-23cDNA を組み込んだ発現ベクターを lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてマウス膀胱癌細胞株(MBT2)に遺伝子導入した。Geneticin による薬剤選択を行ない、得られたクローンに関し培養上清中の IL-23 濃度を Sandwich ELISA 法を用いて測定した。

実験 III. 同系マウスにおける腫瘍増殖曲線： 1×10^6 個の MBT2 もしくは IL-23 分泌 MBT2 (MBT2/IL-23) を同系マウスである C3H マウスの背側皮下に接種し、経時的に腫瘍サイズを測定した。また MBT2/IL-23 を完全拒絶したマウスの対側皮下に母細胞である MBT2 を接種し腫瘍免疫を獲得したか否かにつき検討した。

実験 IV. ワクチン効果に関する検討：MBT2/IL-23 に関し増殖能を欠失させる目的で、mytomycin C (MMC) で処理し、 5×10^6 個ずつ C3H マウスと CD25 を欠損させた C3H マウスの皮下に接種した。1 週間後に無処理の MBT2 を 1×10^6 個ずつ対側の皮下に接種し、経時的に腫瘍径を測定し MMC で処理した MBT2/IL-23 が後に接種した MBT2 の腫瘍増殖を抑制できるかどうか (ワクチン効果) について検討した。

実験 V. 各種免疫不全マウスを用いた抗腫瘍効果メカニズムに関する検討：各種免疫担当細胞に対する抗体 (NK 細胞：anti-asialo GM1、CD4：GK1.5 mAb、CD8：53.6 mAb) をマウスに投与することによりそれぞれの免疫担当細胞の欠失したマウスを作成した。MBT2/IL-23 を上記と同様に皮下接種し抗腫瘍効果が減弱するかどうかを観察することにより抗腫瘍効果に関連する免疫担当細胞の検討を行なった。

実験 VI. 免疫組織学的検討：MBT2 を 1×10^6 、MBT2/IL-23 を 1×10^6 ずつ混合したものを C3H マウ

スの皮下に接種し 10 日後に腫瘍接種部位の凍結切片を作成した。1 次抗体として抗 CD4 T cell (GK1.5 mAb) および抗 CD8 T cell (53.6 mAb) を用いペルオキシダーゼ標識 2 次抗体、diaminobenzidine peroxidase (Nichirei, Tokyo, Japan) にて発色させた。

【結果】

I. マウス膀胱癌細胞株への遺伝子導入：培養上清液中に IL-23 を分泌するクローン (MBT2/IL-23) を陽性クローンとして以下の実験に用いた。

II. 同系マウスにおける腫瘍増殖曲線：MBT2/IL-23 は母細胞 (MBT2/P) と比べ著明な腫瘍増殖抑制を示した。また、MBT2 /IL-23 を拒絶したマウスの対側皮下に母細胞の MBT2 を再接種しても拒絶されたことより母細胞に対する腫瘍免疫が獲得されていることが示された。

III. ワクチン効果に関する検討：MMC 処理した MBT2/IL-23 は対側に接種した MBT2 の腫瘍増殖を抑制した。また CD25 欠損マウスでは腫瘍は完全に拒絶された。

IV. 各種免疫不全マウスを用いた抗腫瘍効果メカニズムに関する検討：まず、各種抗体処理により、目的とする T cell population が欠失したマウスを作成できているか否かにつき確認した。各種免疫担当細胞を欠失させたマウスにおける検討より MBT2/IL-23 の抗腫瘍効果は、早期では CD8 T cell、CD4 T cell および NK cell、後期では CD8 T cell に依存していることが示された。

V. 免疫染色結果：腫瘍接種部位における免疫組織学的検討より CD8 T cell の浸潤の程度は MBT2 と比べ、MBT2/IL-23 の方がより強く浸潤していることが示された。

【考察】 今回の膀胱癌細胞株を用いた検討では、主として CD8 T cell、早期では CD4 T cell および NK cell が effector 細胞として機能していることが示された。現在までの IL-23 遺伝子導入の報告では、effector 細胞は主として CD8 T cell であるが、CD4 や NK cell、IFN- γ の関与も報告されている。以上より導入された腫瘍細胞自体の持つ免疫学的な特質やマウスの種別による差異などにより effector 細胞は微妙に異なることが推測された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成23年3月15日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め上記学位論文の審査を行った。IL-23 遺伝子をマウス膀胱癌細胞株に導入することにより、抗腫瘍効果のメカニズムの解析および腫瘍ワクチンとしての可能性につき検討した。

マウス膀胱癌細胞株(MBT2)に IL-23 遺伝子を導入し、培養上清を用いた Sandwich ELISA 法にて IL-23 産生株を選択した(MBT2/IL-23)。 MBT2 および MBT2/IL-23 を同系マウス(C3H)に皮下接種し抗腫瘍効果を検討した。またワクチンとしての効果を調べるため Mytomycin C(MMC)処理した MBT2 および MBT2/IL-23 を C3H マウスと CD25 を欠損させた C3H マウスの皮下に接種した。接種 1 週間後に対側の側腹部に MBT2 を皮下接種し抗腫瘍効果を比較した。さらに抗腫瘍効果について effector cell に関する検討を行うために各種免疫担当細胞 (CD4+, CD8+, NK cell) 欠損マウスを作製し、MBT2/IL-23 を皮下接種し経時的に腫瘍径を測定、immunocompetent マウスで認められた抗腫瘍効果が減弱するかどうかにより effector cell の同定を行った。また MBT2、MBT2/IL-23 を 1×10^6 ずつ混合したものを C3H マウスの皮下に接種し腫瘍接種部位の凍結切片を作成し免疫組織学的検討を行った。

結果について、MBT2/IL-23 は培養上清中に 30ng/ml の IL-23 を分泌していた。同系マウスに皮下接種された MBT2/IL-23 は母細胞と比べ著明な増殖抑制を示した ($P < 0.01$)。MMC 処理した MBT2/IL-23 は対側に接種した MBT2 の腫瘍増殖を抑制した。また CD25 欠損マウスでは腫瘍は完全に拒絶された ($P < 0.05$)。

各種抗体処理により、目的とする T cell population が欠失したマウスを作成できているか否かにつき確認した。各種免疫担当細胞を欠失させたマウスにおける検討より MBT2/IL-23 の抗腫瘍効果は早期では CD8 T cell、CD4 T cell および NK cell、後期では CD8 T cell に依存していることが示された。腫瘍接種部位における免疫組織学的検討より CD8 T cell の浸潤の程度は MBT2 と比べ、MBT2/IL-23 の方がより強く浸潤していることが示された ($P < 0.01$)。今回の膀胱癌細胞株を用いた検討では、主として CD8 T cell、早期では CD4 T cell および NK cell が effector 細胞として機能していることが示された。現在までの IL-23 遺伝子導入の報告では、effector 細胞は主として CD8 T cell であるが、CD4 や NK cell、IFN- γ の関与も報告されている。以上より導入された腫瘍細胞自体の持つ免疫学的な特

質やマウスの種別による差異などにより effector 細胞は微妙に異なることが推測された。

以上より本論文は、IL-23 遺伝子のマウス膀胱癌細胞株に対する抗腫瘍効果を明らかにしたものであり学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第442号		
学位授与の日	平成23年3月22日		
氏名	魚崎 操		
学位論文の題目	Antiviral effects of dehydroascorbic acid (デヒドロアスコルビン酸の抗ウイルス作用)		
論文審査委員	主査	教授 岩橋 秀夫	
	副査	教授 井原 義人	教授 小山 一

論文内容の要旨

【緒言】

我々は没食子酸オクチルを始め、植物に含まれる種々の物質やその誘導体のもつ *in vitro* での抗ウイルス作用について解析してきた。その過程でアスコルビン酸(ビタミンC)がさまざまなDNAウイルスおよびRNAウイルスの増殖を抑制することを見出した。アスコルビン酸は培養液中に Fe^{+++} イオンが存在するとヒドロキシルラジカルを形成して細胞を傷害することから、アスコルビン酸の抗ウイルス作用はその細胞障害作用の二次的な結果とも考えられた。抗ウイルス治療薬としての応用を考える時、細胞障害作用はできるだけ少ない方が望ましい。そこで、ヒドロキシルラジカル生成のない酸化型アスコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸について、その抗ウイルス作用ならびに細胞障害活性を調べるとともにこの化合物の抗ウイルス作用様式を明らかにするべく実験を行った。

【材料】

1. 試薬

デヒドロアスコルビン酸は温めた蒸留水で溶解し、1 N水酸化ナトリウムでpHを中和したものを濾過滅菌して用いた。

2. 細胞およびウイルス

細胞としてはMDCK、HEp-2、Veroの各細胞を用いた。これらは5%ウシ胎児血清(FBS)を含むMEM(Eagleの最小必須培地)で培養した。ウイルスとしては、ウイルス粒子構造も増殖様式も異なっている3種類のウイルス、単純ヘルペスウイルス1型F株(HSV-1)、インフルエンザウイルスA型Aichi株(H_3N_2)、ポリオウイルス1型セービン生ワクチン株を用いた。前2者はエンベロープウイルスであり、ポリオウイルスはエンベロープを持たない。また、HSV-1はゲノム核酸としてDNAを持つが、後2者はRNAをもつ。しかし、ポリオウイルスは感染細胞の細胞質で増殖するが前2者は核内で転写・複製を行う。

【方法】

1. ウイルスの増殖と定量

HSV-1およびポリオウイルスはVero細胞を用いて0.5%FBS加MEM中で感染細胞を培養し、増殖完了後に感染細胞を培養液とともに凍結融解して子孫ウイルスを得た。インフルエンザウイルスはMDCK細胞を用いて0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)加MEMにアセチルトリプシン(4 μ g/ml)を加えた培養液中で感染細胞を培養し、増殖完了後に培養液を採取して子孫ウイルスを調製した。

2. 細胞変性効果(CPE)および細胞死の定量

密な単層に培養したHEp-2細胞をさまざまな濃度の試薬を加えた0.1%BSAを含むMEM中で37°C 24時間培養した後、細胞の状態を位相差顕微鏡で観察した。

細胞死の程度の判定には、単層培養細胞をトリプシン処理により単一細胞にまで分散した後、5%FBSを含むMEMを加えることによりトリプシンを中和するとともに細胞懸濁液中の細胞を安定化させ、その後、生細胞と死細胞の数をトリパンブルー色素排除試験により定量した。

【結果および考察】

1. デヒドロアスコルビン酸はHSV-1、インフルエンザウイルスA型およびポリオウイルスの3種類の

ウイルスの増殖を抑制し、濃度依存的にウイルス収量が減少した。その中ではインフルエンザウイルス A型が最も感受性が高く、次いで、HSV-1、ポリオウイルス 1 型の順であった。したがって、デヒドロアスコルビン酸はゲノム核酸の種類や増殖様式の異なるウイルスを幅広く増殖抑制できる。

さらに、この実験ではインフルエンザウイルスの増殖にはイヌ腎細胞由来の MDCK 細胞を、HSV-1 およびポリオウイルスにはヒト子宮頸がん由来の HEp-2 細胞を使用していることより、デヒドロアスコルビン酸の抗ウイルス作用は細胞のタイプに依存していないと考えられる。

2. デヒドロアスコルビン酸による直接的なウイルス不活化作用を調べるため、エンベロープを持つ HSV-1 と持たないポリオウイルスを種々の濃度のデヒドロアスコルビン酸と保温した。しかし、両ウイルスとも 10 mM の試薬存在下でも感染価の変化はみられず、生理的な濃度内ではデヒドロアスコルビン酸によるウイルス不活化はないと考えられる。

3. デヒドロアスコルビン酸の細胞障害作用について HEp-2 細胞を用いて調べた。種々の濃度のデヒドロアスコルビン酸存在下で単層培養細胞を保温したところ、12 mM までの濃度では死細胞の割合に増加は見られないが、16 mM では死細胞数が増加しはじめ、20 mM では約 70% も死細胞が観察された。MDCK 細胞を用いても同様の結果が得られており、デヒドロアスコルビン酸がアスコルビン酸より極めて弱い細胞障害作用しか示さないことを確認するとともにデヒドロアスコルビン酸の抗ウイルス作用は細胞障害作用の副次的な結果ではなく、感染細胞でのウイルス増殖過程に対する試薬の作用の結果であることを示唆している。

4. HSV-1 を用いてデヒドロアスコルビン酸の抗ウイルス作用機構について解析した。最初にウイルス感染開始後に試薬添加のタイミングをずらせた時のウイルス収量を比較した (time of addition 実験)。子孫ウイルス収量は、HSV-1 増殖過程の終盤段階である感染後 10 または 12 時間目での試薬添加でも抑制され、デヒドロアスコルビン酸は少なくとも感染後期過程にも試薬作用の標的を持つことが明らかとなった。

続いて、上の結果を確認するために一段増殖実験を行った。HSV-1 感染細胞をデヒドロアスコルビン酸存在下 (培養開始時に試薬添加) で培養すると感染性子孫ウイルスの出現がおくれ (潜伏期の延長)、子孫ウイルスの最終収量も減少した。試薬添加を感染 8 時間後に行うと子孫ウイルスの形成は試薬添加後 2 時間はほぼ正常に継続し、その後完全に停止した。この結果は、感染細胞ゴルジ体におけるウイルス粒子の組立て段階での増殖阻害の時の子孫ウイルス形成のカイネティックスと一致し、(1) デヒドロアスコルビン酸がウイルス DNA 複製 (およそ感染 6 時間目) 完了後もウイルス増殖を阻害できること、(2) おそらく、子孫ウイルスの形成段階でデヒドロアスコルビン酸がウイルス増殖を阻害することを示している。

【結語】

デヒドロアスコルビン酸は幅広く異なる複製様式をとるウイルスの増殖を抑制することが明らかになった。アスコルビン酸の抗ウイルス作用が試薬による細胞障害作用の二次的な結果と考えられたのに対し、デヒドロアスコルビン酸の抗ウイルス作用は細胞障害作用の二次的作用ではなかったことから、ウイルス増殖過程に対する特異的干渉であると考えられた。HSV-1 に対しては、デヒドロアスコルビン酸はウイルス DNA 複製完了後おそらくヌクレオカプシドのエンベロープ獲得段階 (子孫ウイルス粒子の組立て) でウイルス増殖を阻害すると推測される。デヒドロアスコルビン酸にはタンパク質と結合する能力がありある種のキナーゼや酵素を抑制することから、おそらく、ウイルス粒子の組立て段階に関するウイルスタンパク質または細胞タンパク質への結合のためであろうと考えている。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 23 年 3 月 10 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

アスコルビン酸 (ビタミン C) はさまざまな種類のウイルス増殖を抑制するが、その抗ウイルス作用はヒドロキシルラジカルによる細胞障害作用を介する二次的な結果とも考えられた。そこでヒドロキシルラジカルを生成しない酸化型アスコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸について、その細胞障害活性および抗ウイルス作用とその作用機序について検討を行った。その結果、

(1) デヒドロアスコルビン酸はゲノム核酸の種類や増殖様式の異なるウイルス (HSV-1、インフルエンザウイルスA型、ポリオウイルス) の増殖を抑制し、それは細胞タイプに依存しなかった。(2) デヒドロアスコルビン酸はエンベロープを持つ HSV-1 と持たないポリオウイルスに対して直接的なウイルス不活化作用を生理的な濃度内 (10 mM) では示さなかった。

(3) デヒドロアスコルビン酸の細胞障害作用は、アスコルビン酸に比べて極めて弱かった。このことより、デヒドロアスコルビン酸による抗ウイルス作用は細胞障害作用を介する二次的な結果ではなく、感染細胞内でのウイルス増殖過程に対するデヒドロアスコルビン酸の作用の結果であると考えられる。

(4) デヒドロアスコルビン酸は、感染初期過程 (潜伏期の延長) と感染後期過程 (感染 10~12 時間目) とともに HSV-1 に対する抗ウイルス作用を発揮した。これはおそらく、子孫ウイルスの形成段階 (エンベロープ獲得段階) でデヒドロアスコルビン酸がウイルス増殖を阻害するものと思われる。

本論文は、ヒドロキシルラジカルを生成しないデヒドロアスコルビン酸が細胞障害作用を介さず抗ウイルス作用を示すことを明らかにし、またその抗ウイルス作用の機序を解明したので学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第850号		
学位授与の日	平成22年5月11日		
氏名	永松 晃		
学位論文の題目	Use of ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography for diagnosis of uterine sarcomas (子宮肉腫の診断における ^{18}F -FDG-PET の有用性)		
論文審査委員	主査	教授 佐藤 守男	
	副査	教授 覚道 健一	教授 三家 登喜夫

論文内容の要旨

緒言

子宮体部腫瘍は良性の子宮筋腫（筋腫）と悪性の子宮内膜癌（内膜癌）や子宮肉腫（肉腫）からなる。さらに肉腫は主として癌肉腫、内膜間質肉腫、および平滑筋肉腫に分けられる。これらのうち内膜癌では内膜細胞診および内膜組織診で診断が可能であり診断に苦慮することは少ない。一方多くの肉腫ではこれらの診断法は無効である。そのためこれらと筋腫との鑑別は主として MRI が用いられているが診断精度は低い。

近年筋腫はできるだけ温存する方向の治療が行われており、悪性腫瘍との鑑別がより重要になってきている。特に肉腫は予後が不良であるため、筋腫として放置されると大きな問題となる。

ところで最近 ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography (^{18}F -FDG-PET) が新たな画像診断法として導入され、これは従来の形態からみる画像診断とは異なり、糖代謝が活発な部位を、すなわち悪性を発見できる方法として注目され、肉腫の診断にも役立つと推察されている。そこで臨床的に肉腫の可能性も推察される筋腫例と肉腫例で

^{18}F -FDG の取り込みを検討し、その有用性を明らかとする目的で本研究を企画した。また参考までに子宮体癌症例においても ^{18}F -FDG の取り込みを検討した。さらにこれらの中で最も鑑別が困難な子宮平滑筋肉腫と筋腫においては、 ^{18}F -FDG の取り込みを示す SUV 値と血清 LDH 値を併用することにより診断精度が上昇するか検討を加えた。また肉腫はまれな疾患であることから、これらのデータを補助するため、さらに詳細に考察を加えるため ^{18}F -FDG の取り込みに関係すると考えられている glucose transporter-1 (Glut-1) の発現を免疫組織で検討した。

対象および方法

1. 対象

臨床上肉腫と鑑別が必要な筋腫 (A 群)、および肉腫の可能性が極めて低い筋腫 (B 群) を対照とした。A 群 15 例、B 群 9 例である。

対象は肉腫症例 10 例で、その内訳は癌肉腫 5 例、平滑筋肉腫 4 例、および内膜間質性肉腫 1 例である。参考までに内膜癌 19 例も検討対象とした。

Glut-1 の発現を検討したのは筋腫 9 例(通常筋腫 7 例 異型平滑筋腫 1 例、悪性度不明の平滑筋腫 1 例)、内膜癌 6 例、肉腫 17 例(癌肉腫 7 例、平滑筋肉腫 7 例、内膜間質性肉腫 3 例)である。

2. ^{18}F -FDG-PET の測定方法

FDG にポジトロン放出核種として ^{18}F を標識した放射性薬剤を用い PET 検査を行った。 ^{18}F -FDG の取り込みの結果は SUV (the standardized uptake value) で示した。なお SUV は組織の放射線量 (Bq/g) / {投与量 (Bq) / 体重 (kg)} で示される。また多くの症例では病変部の確定のため PET-CT 検査が行われた。

3. Glut-1 の発現の検討

Glut-1 の発現はホルマリン固定パラフィンブロックを用い、免疫組織学的に検討した。

なお Glut-1 発現度スコアは染色強度 X 染色陽性細胞の割合により求めた。

統計解析法

2 群間の比較は unpaired-t test で、3 群間の比較は one-way Factorial ANOVA and multiple Comparison tests を用いておこなった。また 2 群の相関性の検討はピアソンの相関係数を用いた。平滑筋肉腫の cut-off 値は ROC 曲線を用いて決定した。

結果

1. ^{18}F -FDG の取り込みの検討

1) 筋腫の所見の有無による ^{18}F -FDG の取り込みの比較

所見の有無による ^{18}F -FDG の取り込みに有意傾向($p=0.09$)が認められた。

2) 筋腫、内膜癌および肉腫での ^{18}F -FDG の取り込みの比較

筋腫 (A 群) と内膜癌、筋腫 (A 群) と肉腫の間に各々 $p=0.0003$ および $p=0.0071$ の有意差が認められた。しかし内膜癌と肉腫に有意差は認められなかった。

3) 内膜癌、および各肉腫間での ^{18}F -FDG の取り込みの比較

内膜癌、癌肉腫、平滑筋肉腫の間に ^{18}F -FDG の取り込みに差は認められなかった。

4) 内膜癌における組織分化度および病変の浸潤程度と ^{18}F -FDG の取り込み

内膜癌における組織分化度および病変の浸潤程度を分化度 1 と 2 で浸潤度 a,b 群と、分化度 3 または浸潤度 c 群の 2 群にわけ、その ^{18}F -FDG の取り込みを比較したところ、後者の群において有意 ($p<0.0001$) に ^{18}F -FDG の取り込みが高かった。

5) 筋腫と平滑筋肉腫での ^{18}F -FDG の取り込みの比較

筋腫と平滑筋肉腫の間には $p=0.029$ の有意差が認められた。

2. 内膜癌、および各肉腫間での血清 LDH 値および CA 125 値の比較

LDH 値において内膜癌と癌肉腫の間には $p=0.0018$ で有意差がみとめられた。しかし CA-125 値において有意差は認められなかった。

3. 筋腫と平滑筋肉腫の鑑別診断における SUV 値単独、LDH 値単独、および両者の併用の診断精度の比較

診断精度は SUV 値単独 79%, LDH 値単独 87%、および両者の併用 100%で両者を併用することにより診断精度が向上した。

4. Glut-1 の発現について

1) Glut-1 の染色度スコアと ^{18}F -FDG の取り込み (SUV) との相関性について

Glut-1 染色スコアと SUV の間に $r^2=0.777$ で有意 ($p<0.001$) の相関が認められた。

2) 筋腫、肉腫および内膜癌における Glut-1 染色度スコアの比較

筋腫と肉腫の間 ($p<0.0001$)、および筋腫と内膜癌の間 ($p<0.0001$) に有意差が認められた。又筋腫と平滑筋肉腫との間 ($p<0.0001$)、筋腫と癌肉腫の間 ($p<0.0001$)、筋腫と内膜間質性肉腫との間 ($p=0.0051$) に有意差が認められた。

3) 異型平滑筋腫および、悪性度不明の平滑筋腫の Glut-1 染色スコア、

悪性度不明の平滑筋腫において染色度スコアが高値を示した。

考察

筋腫 A 群と筋腫 B 群の間に有意傾向が認められたため、対照を筋腫 A 群のみとした。子宮筋腫と内膜癌、および肉腫の間には ^{18}F -FDG の取り込みに著明な有意差が認められた。内膜癌においては組織の分化度、筋層浸潤度を 2 つに分けて検討すると、悪性度の高い群に ^{18}F -FDG の取り込みが有意に高値である事が認められた。また内膜癌と癌肉腫は両者とも ^{18}F -FDG の取り込みが高かったが、両者の血清 LDH 値を比較すると、癌肉腫では有意に LDH 値が高く、両者の鑑別に有効と推察された。癌肉腫では内膜細胞診で癌成分が発見される事もあるが、通常は肉腫成分が発見される事は少なく、内膜細胞診で異常が発見されたとき、同時に LDH を測定し、これが高値であれば、癌肉腫の可能性も考え治療に臨む必要があり、治療法の選択にも役立つ。

次に本研究においてもっとも重要な課題である筋腫と平滑筋肉腫との鑑別が PET で可能か考察する。筋腫と平滑筋肉腫の両者の比較において ^{18}F -FDG の取り込みにおいて両者間において有意差が認められた。しかし実際の臨床では cut-off 値を決定し、それで鑑別する必要がある。そこで ROC 曲線を用いて筋腫と平滑筋肉腫の鑑別の cut-off 値を求めると SUV 値が 3.0 となった。そこでこの値をもとに両者の鑑別の感度、特異度、診断精度を求めると各々 100%、特異度 73%、診断精度 79%と満足できるものではなかった。そこで肉腫の患者で有意に高値を示す血清 LDH 値を併用する意義につき検討を加えた。その結果感度、特異度、診断精度は各々 100%、100%、100%となり、筋腫と平滑筋肉腫の鑑別診断に PET 検査と血清 LDH 値を併用することが有効であることが明らかとなった。

今回対象とした肉腫症例は希な疾患であり、症例数も少ないため最後に PET 検査が肉腫の診断に有効であることを傍証するため、SUV 値と相関すると報告されている Glut-1 の染色度スコアを筋腫

および肉腫症例で検討した。その結果、我々の検討においても SUV 値と Glut-1 染色度スコアとは密なる相関が認められ、また肉腫症例では全例が Glut-1 染色度スコアが高値を示した。この結果からも肉腫では ^{18}F -FDG の取り込みが高くなることを確証できた。

また Glut-1 染色度を検討することが PET 検査での ^{18}F -FDG の取り込みを予想する手段となり得、まれな疾患での PET 検査の予測に利用できるものと推察された。

結論

1. 肉腫において筋腫と比較し有意に ^{18}F -FDG の取り込みが高かった。
2. 筋腫と平滑筋肉腫の鑑別診断に SUV の cut-off 値を 3.0、血清 LDH 値陽性の 2 つの指標を用いると診断精度が 100%となった。
3. Glut-1 染色度スコアと SUV 値との間に密なる相関性が認められ、また肉腫症例ではいずれも Glut-1 染色度スコアが高かったことより、肉腫では ^{18}F -FDG の取り込みが高いことが傍証された。

以上本研究では各種肉腫の診断における ^{18}F -FDG-PET の有効性、さらに平滑筋肉腫の診断における PET と血清 LDH 値併用の有効性を初めて示すことが出来た。また肉腫において Glut-1 の発現が高いことも初めて示した。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 4 月 22 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。子宮体部の間葉系腫瘍は良性の子宮筋腫（筋腫）と悪性の子宮肉腫（肉腫）からなる。近年筋腫は温存治療が選択されることが多く、両者の鑑別診断、特に子宮平滑筋肉腫（平滑筋肉腫）との鑑別診断が極めて重要な課題となっている。それには現在 MRI が用いられているが診断精度は低い。本研究では予後が極めて不良にもかかわらず、有効な診断法が無い肉腫の診断に対する ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography (^{18}F -FDG-PET) の有効性を検討したものである。特に筋腫との鑑別が困難な平滑筋肉腫の診断においては、PET 所見 (standardized uptake value: SUV) に血清 LDH 値を併用することが診断精度を向上させ得るか検討された。また肉腫は希な疾患であることから、これらのデータを補助するため、さらに詳細に考察を加えるため ^{18}F -FDG の取り込みに関係すると考えられている glucose transporter-1 (GLUT-1) の発現を抗 GLUT-1 抗体を用い免疫組織学的にも検討された。なお FDG-PET は筋腫 24 例、肉腫 10 例に施行された。また GLUT-1 の発現は筋腫 9 例、肉腫 17 例で検討された。また筋腫と平滑筋肉腫の鑑別のための SUV は ROC 曲線を用い検討され 3.0 とされた。GLUT-1 の発現は、最高染色強度 x 染色陽性細胞占有率でもとめた染色度スコアで示された。その結果

1. ^{18}F -FDG の取り込みの検討において筋腫の SUV は 2.75 ± 0.61 、肉腫の SUV は 6.31 ± 2.71 、平滑筋肉腫の SUV は 4.26 ± 1.31 で筋腫と肉腫の間、および筋腫と平滑筋肉腫の間には各々 $p=0.0071$ および $p=0.029$ の有意差が認められた。
2. 筋腫と平滑筋肉腫の鑑別診断において SUV 単独、LDH 値単独、および両者併用の診断精度の比較において SUV 単独では 79%、LDH 値単独では 87%、および両者の併用では 100% となりで両者を併用することにより診断精度が向上した。
3. GLUT-1 染色度スコアと SUV の間に $r^2=0.777$ で有意 ($p<0.001$) の相関が認められた。筋腫と肉腫の GLUT-1 染色度スコアの比較では筋腫と肉腫の間に有意差 ($p<0.0001$)、が認められた。又筋腫と平滑筋肉腫との間、筋腫と癌肉腫の間、筋腫と内膜間質性肉腫との間に各々 $p<0.0001$ 、 $p<0.0001$ 、 $p=0.0051$ の有意差が認められた。

本研究では各種肉腫の診断における ^{18}F -FDG-PET の有用性、さらに平滑筋肉腫の診断における SUV の cut-off 値、および PET 所見と血清 LDH 値併用の有効性が初めて示された。また肉腫において GLUT-1 の発現が高いことも初めて示され、GLUT-1 が肉腫において FDG の取り込みに密接に関与していること、また GLUT-1 の検討が今後希少症例での FDG-PET の有用性を推察する手段となる事も示唆された。以上より本論文は学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第851号		
学位授与の日	平成22年6月8日		
氏名	田中和東		
学位論文の題目	Impact of 3D ultrasonography and power Doppler angiography in the management of cervical cancer (子宮頸癌の診断及び治療効果判定における3次元超音波診断と3次元パワードップラー法の役割)		
論文審査委員	主査	教授 佐藤守男	
	副査	教授 三家登喜夫	教授 覚道健一

論文内容の要旨

【緒言】

子宮頸癌の画像診断には、軟部組織の分解能に優れているMRI (magnetic resonance imaging) が選択される場合が多いが、経済性及び利便性に問題がある。また腫瘍内の血流は、腫瘍の悪性度、治療に対する感受性などの指標となることが報告され、組織を用いた腫瘍内血管密度、腫瘍内毛細管径の測定及びVEGF (vascular endothelial growth factor) の同定などが行われているが、いまだ問題点も多い。近年、3次元超音波診断装置が開発され、腫瘍の体積が即時に測定可能になり、また生体内での腫瘍内血流が測定及び定量化できるようになった。そこで子宮頸癌を対象として、3次元超音波を用いて腫瘍の体積や腫瘍内血流を種々のパラメーターにて測定を行い、MRIとの比較による体積の推定に対する有効性、病態の把握に有効な血流指数の抽出、診断及び治療予測に対する有効性を検討した。

【対象と方法】

対象

子宮頸癌症例30例とcontrolとして正常子宮頸部35例を対象とした。子宮頸癌症例30例のうち、手術療法が行われた19例に対しては治療前に、化学療法及び放射線療法を行われた残りの11例に対しては、治療前、治療1ヵ月後、治療2ヵ月後に、3次元経腔超音波検査、MRI検査、血清腫瘍マーカー検査を施行した。

3次元超音波データの測定、保存及び3次元血流指数の算出

Voluson 730 Expert 及び3次元経腔プローベ (5-9MHz) を用いて測定した。1人の測定者で、3次元経腔パワードップラー超音波検査を行い、3次元超音波データをハードディスクに保存した。3次元データは、VOCAL (Virtual Organ Computer Aided Analysis) プログラムを使用して解析した。測定部位の長軸を中心として、辺縁を手動でトレースし、自動的に30°ずつ回転させ、子宮頸部および子宮頸癌病変を3次的に描出した。VOCALプログラムにて体積を自動的に算出し、3次元血流指数は、ヒストグラム機能を使用して算出した。3次元血流指数の定義は以下の通りである。Vascularization Index (VI) は、単位体積におけるカラー・ボクセルの割合を測定し、組織における血管密度を想定した数値である。Flow Index (FI) はカラー・ボクセルの平均強度を測定し、組織における血流の平均量を想定した数値である。Vascularization flow index (VFI) は単位体積におけるカラー・ボクセルの割合に信号強度を加味して測定し、血流量または組織灌流を想定した数値である。

統計分析

Welch *t*-test、単回帰分析、ROC (Receiver Operating Characteristic) 分析を行った。 $P<0.05$ をもって、有意差ありと判定した。

【結果】

子宮頸癌における体積及び3次元血流指数

3次元超音波検査所見上、すべての子宮頸癌症例で腫瘍内に血流を認めた。VOCAL分析では、子宮頸癌症例では、正常子宮頸部と比較して、VI及びVFIにおいて有意な(VI; $P<0.0001$, VFI; $P<0.0005$) 上昇を認めた。また、VIにおいてはIb期症例では正常子宮頸部より有意な($P<0.05$) 上昇を認め、IIa期-IVb期症例では正常子宮頸部及びIb期症例より有意な(正常子宮頸部; $P<0.001$, Ib期症例; $P<0.01$) 上昇を認めた。VFIにおいては、IIa期-IVb期症例では正常子宮頸部及びIb期症例

より有意な（正常子宮頸部； $P<0.0005$ ，Ib 期症例； $P<0.005$ ）上昇を認めた。治療前の腫瘍体積と VI（ $r=0.46$ ， $P<0.05$ ）及び VFI（ $r=0.38$ ， $P<0.05$ ）に相関を認めたが、FI には相関を認めなかった。

子宮頸癌における 3 次元血流指数の鑑別診断能

子宮頸癌全症例と正常子宮頸部における 3 次元血流指数の診断能を ROC 分析した結果、VI と VFI の ROC 下面積はそれぞれ、0.899、0.874 と有用性が示唆され、FI よりも有意に（ $P<0.0001$ ）高値を示した。また、ROC 分析法から推定した最適なカットオフ値は、VI では 5.27、VFI では 1.69 であった。そのカットオフ値における VI の感度 73.3%、特異度 94.3%で、VFI の感度 73.3%、特異度 91.4%であった。さらに子宮頸癌 Ib 期症例と正常子宮頸部における 3 次元血流指標の診断能を ROC 分析した結果、VI と VFI の ROC 下面積はそれぞれ、0.82、0.8 と有用性が示唆され、FI よりも有意に（ $P<0.01$ ， $P<0.01$ ）高値を示した。また、ROC 分析法から推定した最適なカットオフ値は、VI では 5.27、VFI では 1.76 であった。そのカットオフ値における VI の感度 63.6%、特異度 94.3%で、VFI の感度 63.6%、特異度 91.4%であった。

治療に伴う体積及び 3 次元血流指数の変化と MRI との比較

体積、VI、VFI は治療経過とともに、有意に低下を認めた。

治療前後に測定した 3 次元超音波の腫瘍体積と MRI で計算した体積は非常に強い相関（ $r=0.91$ ， $P<0.0001$ ）を認めた。

治療効果予測因子としての 3 次元血流指数の役割

治療 1 ヶ月後の 3 次元血流指数の変化率と、1-2 ヶ月後の腫瘍体積の変化率においてすべて相関を認めた。VI 変化率においては有意な相関（ $r=0.62$ ， $P<0.05$ ）を認め、VFI 変化率においても有意な相関（ $r=0.67$ ， $P<0.05$ ）を認めた。FI 変化率においては強い相関（ $r=0.88$ ， $P<0.0005$ ）を認めた。さらに化学療法症例 6 例のみ同様に検討したところ、FI 変化率においてのみ強い相関（ $r=0.83$ ， $P<0.05$ ）を認めた。

【結論】

本研究により 3 次元超音波検査は、子宮頸癌の鑑別診断及び臨床進行期の推定において VI 及び VFI は有用で、腫瘍体積を MRI と同等に診断できることが明らかとなった。加えて子宮頸癌の治療効果予測指標としてすべての 3 次元血流指数が有用であるが特に FI の変化率は有用であることが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 5 月 17 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

進行子宮頸癌では、手術療法が不可能で、放射線療法もしくは同時併用化学放射線療法を選択せざるを得ない。しかし近年化学療法の有効性が高まり、これらの症例に主治療前化学療法（NAC: neoadjuvant chemotherapy）が行われ、腫瘍の縮小をはかり手術療法が行える症例もあり、これらの症例では予後良好となる。しかし化学療法が無効な症例では、放射線療法等の主治療が遅れ、むしろ予後不良となる。そこで、化学療法施行前にその有効性の予測が必要とされている。また手術療法を施行する時期を決定するために、その効果を即時的に把握することも望まれる。

本論文は子宮頸癌を対象とし、3 次元超音波を用いて腫瘍の体積と、腫瘍内血流を 3 次元血流指数として測定し、MRI との比較による体積の推定に対する有効性、病態の把握に有効な血流指数の抽出、診断及び治療予測に対する有効性を検討したものである。

その結果、子宮頸癌症例では、正常子宮頸部と比較して、VI 及び VFI において有意な上昇を認め、より臨床進行期が進むにつれて上昇することを認めた。また治療前の腫瘍体積と VI 及び VFI に相関を認めた。次に ROC 分析の結果、子宮頸癌 Ib 期症例と正常子宮頸部とを鑑別する最適なカットオフ値は VI では 5.27 であることが示され、そのカットオフ値における VI の感度 63.6%、特異度 94.3%であった。さらに治療前後に測定した 3 次元超音波の腫瘍体積と MRI で計算した体積は非常に強い相関（ $r=0.91$ ， $P<0.0001$ ）を認めた。加えて治療 1 ヶ月後の 3 次元血流指数の変化率と、1-2 ヶ月後の腫瘍体積の変化率においてすべて相関を認め、特に FI 変化率においては強い相関（ $r=0.88$ ， $P<0.0005$ ）を認めた。次に化学療法症例 6 例のみ同様に検討したところ、FI 変化率においてのみ強い相関（ $r=0.83$ ， $P<0.05$ ）を認めた。

以上、本論文は子宮頸癌の治療効果予測指標としてすべての 3 次元血流指数が有用で、特に FI

の変化率は有用である可能性をはじめて示したものであり、3次元超音波検査での子宮頸癌の鑑別診断、臨床進行期の推定、腫瘍体積の計測及び治療効果予測における有用性を提示したものとして、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第852号		
学位授与の日	平成22年7月20日		
氏名	山田和子		
学位論文の題目	Status of Suicidal Thoughts and Related Factors in Workers (労働者の自殺念慮の実態とその関連要因)		
論文審査委員	主査	教授 宮下和久	
	副査	教授 竹下達也	教授 篠崎和弘

論文内容の要旨

[緒言]

日本における自殺死亡者数は、1997年の約23,000人から1998年には約33,000人と急増し、2009年も32753人(暫定値)と12年連続して3万人を超えている。特に近年の自殺者の特徴は、中高年男性の急増であり、これらの背景には長引く経済不況とそれに伴うリストラや配置転換によるストレスがあるといわれている。日本での自殺予防対策は危機介入が中心であり、事前教育、事後対応に相当する対策は少なく、自殺者が急増する中、危機介入だけでなく、事前教育、事後介入の対策の必要性がいわれている。

そこで、本研究は、自殺念慮という難しい調査であるが、S総合健康保険組合(以下、「S組合」とする)の協力が得られ、同一職域で、男女ともに比較的多くの人数を対象として、現代の課題である自殺予防対策に資するために、自殺念慮の実態とそれに関連する要因を明らかにすることを目的とした。

[方法]

S組合傘下の事業場で、協力の得られた6事業場の6,017人の労働者を対象とした。

調査は、無記名による自記式質問紙調査法により行った。調査期間は平成13年12月から平成14年1月とし、調査票は事業場の健康管理部門に一括送付し、担当者が職制を通じて各個人に配布し、各自専用の封筒で密封した状態で回収した。調査実施にあたっては、調査票に調査目的及びプライバシーの保護について明記し、回収には個人が特定できないように各自専用の封筒を用いた。

対象者6,017人の内、5,322人(回収率84.7%)から回答を得た。このうち、性、年齢、自殺念慮の有無、SDS項目のうち3項目以上の未記入者を除外し、さらに、対象者が少ない10代、60代を除外した結果、分析対象者は4,356人(有効回答率72.4%)であった。

調査項目は個人の属性、自殺念慮の有無、自殺念慮の原因、自殺念慮を克服できた理由とした。自殺念慮に関連する諸要因については最近1か月間の健康状態、最近の抑うつ状態としてZungの自己評価式抑うつ尺度(以下、「SDS」とする)、最近の身体症状として3項目(頭痛・頭重感があるか、肩こり・腰痛があるか、胃痛・むかつきがあるか)、現在の生活習慣として6項目(普段の運動、睡眠時間、朝食の摂取、入眠のために眠剤・安定剤の使用、飲酒、喫煙)とした。

自殺念慮に関する回答で「いつもある」「しばしばある」「時々ある」を「自殺念慮あり」群、「ほとんどない」を「自殺念慮なし」群とし、関連する諸要因を説明変数として粗オッズ比(95%信頼区間)を求め、さらに、ロジスティック回帰分析を用いて解析を行った。

[結果]

I. 対象者の属性

分析対象者の性別と年齢、従事している業務、管理職の3項目に有意差がみられ、具体的には、女性に「20代」、「事務職」、「非管理職」が有意に多かった。

II. 自殺念慮の実態

自殺念慮ありの割合は、男性291人(10.2%)、女性196人(13.0%)で、女性の方が多かった($p < 0.01$)。女性では、年齢の上昇とともに、自殺念慮の割合が減少する傾向がみられたが、男性では40代が最も多かった。しかし、男女とも年齢と自殺念慮の割合には有意差はみられなかった。

III. 自殺念慮と諸要因との関連

男性の自殺念慮と諸要因について有意な関連があった要因は、「管理職」、「健康状態」、「SDS」、「睡眠剤の使用」、「睡眠時間」、「朝食の摂取」、「肩こり・腰痛」、「頭痛・頭重感」、「胃痛・むかつき」で、

調整を行った後にオッズ比 2 以上の有意な関連があった要因は、「健康状態」、「SDS」、「睡眠剤の使用」であった。

女性の自殺念慮と諸要因について有意な関連があった要因は、「健康状態」、「SDS」、「睡眠剤の使用」、「朝食の摂取」、「肩こり・腰痛」、「頭痛・頭重感」、「胃痛・むかつき」で、調整を行った後にオッズ比 2 以上の有意な関連があった要因は、「健康状態」、「SDS」であった。調整後のオッズ比で自殺念慮に関連する要因として、男女とも共通して抑うつ状態がある者、最近 1 か月間の健康状態が不良な者が示唆された。

IV. 自殺念慮の原因、克服できた理由

自殺念慮について、仕事関連の原因は、男性では「仕事の内容・責任」が最も多く、次いで「人間関係」、「仕事の量・作業時間」の順で、女性では「人間関係」が最も多く、次いで「仕事の内容・責任」、「仕事の量・作業時間」の順であった。家庭生活関連の原因は、男性では「家族」のことが最も多く、次いで「経済的なこと」、「家族・自分の健康・病気・介護」の順で、女性でも「家族」のことが最も多く、次いで「家族・自分の健康・病気・介護」、「経済的なこと」の順であった。

自殺念慮を克服できた理由は、男性では「時間が解決してくれた」が最も多く、次いで「自分なりに気分転換を図った」で、女性では「自分なりに気分転換を図った」が最も多く、「時間が解決してくれた」、「相談者・支援者がいた」が続いていた。

[考察]

本研究は総合健康保険組合の一つである S 組合の労働者を対象にした調査である。S 組合は専門職も多く、雇用が比較的安定した職場であり、自殺念慮に関して特別な集団であるとは考えられない。回答がしにくい自殺念慮に関する大規模な調査にもかかわらず 84.7%と回収率が高く、かつ男女合わせて 4,000 人以上と分析対象者数が充分あり、自殺念慮と各要因との関連性について、有意な結果が得られたと考える。

本調査では自殺念慮について、「あなたは、最近死にたいと思ったことがありますか」と質問し、その結果、自殺念慮の割合は、男女とも 1 割で、少し女性の方が多かった。渡辺らが実施した自記式質問紙による調査では、自殺念慮について「この 1 か月間の間に死にたいと思ったことがありますか」の質問を用い、その結果「あった」と「少しあった」を合わせると 12.3%で、川上らによる面接法による調査では、自殺念慮について「過去 12 か月間に自殺を真剣に考えたことがありますか」の質問を用い、その結果、男性 1.7%、女性 1.4%であった。自記式質問紙法で実施した本調査と渡辺らの調査の自殺念慮者の割合は約 1 割と同程度であったが、面接調査で実施した調査とはかなり異なり、自殺念慮の調査は調査方法、質問の仕方により結果が異なることが示唆された。

自殺念慮に関連する要因として、男女とも共通して抑うつ状態がある者、最近 1 か月間の健康状態が不良な者が示唆された。しかし、生活習慣、肩こり・腰痛などの自覚症状、管理職の有無は関連がなかったが、男性だけに睡眠時間、睡眠剤の使用が関連していた。

抑うつ状態については、多くの先行研究においても自殺の要因としてあげられている。特に中高年ではうつ病が関係している場合が多く、また玉腰らの労働者へのコホート調査から抑うつ状態は自殺死亡リスクが 9.95 倍、黒木らの自殺未遂者の調査から労働者は非労働者と比較して気分障害が多いとされている。自殺念慮者も自殺者、自殺未遂者と同様に抑うつ状態と強く関連していると考えられる。

主観的な健康状態は自殺念慮に最も影響力を持っていることや自覚的な健康状態が悪い人では自殺の危険度が増加することが明らかになっている。さらに、男性において自殺念慮に関連する要因として睡眠剤の使用があげられる。男性労働者を対象にした調査では、睡眠時間が 9 時間未満では自殺死亡リスク 11.49 倍と高かったとの報告がある。

自殺念慮の原因、克服できた理由については複数回答であり、統計的な検討はできなかったが、原因については男性では仕事の内容、経済的なこと、女性では人間関係、家族のこと、克服できた理由では女性に相談者・支援者がいたとの回答が多く、男女による差がうかがわれた。

自殺率が男性に高い理由の一つとして、男性は問題を抱えても、自分一人で問題を抱え、他人に相談すべきでないという傾向が根強いこと、一方女性は感情を他者と共有することや助けを求めることに抵抗が少なく、問題を抱えたとき情緒的支援や社会的サポートを受け入れやすいことがあげられる。こころの問題を抱えた時の受診行動も、男性よりも女性の方が抵抗なく医学的、精神科的援助が受け入れやすく、今後はサポートを受けにくい男性に着目した支援対策を考えることが、自殺予防対策を考える上で重要と考える。

[結 語]

自殺念慮の実態、および自殺念慮に関連する要因を明らかにするために、総合健康保険組合傘下の労働者 6,017 人で、男女とも 1,500 人を超える対象に調査を実施し、有効回答率 72.4%であった。

1. 自殺念慮ありの割合は、男性 291 人(10.2%)、女性 196 人 (13.0%) であった。

2. ロジスティック回帰分析の結果、自殺念慮に関連する要因として、男女ともに関連していた要因は自覚的な健康状態が不良であること、抑うつ状態であること、胃痛・むかつきがあることであった。さらに男性では睡眠時間が 5 時間以下であること、睡眠剤の服用、肩こり・腰痛があること、女性では朝食回数が少ないこと、頭痛・頭重感があることであった。

3. これらの要因から自殺予防対策の対象をスクリーニングすることが可能となり、スクリーニングした対象へ相談、支援を強化することにより、自殺予防につながると思われる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 22 年 7 月 12 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

日本における自殺死亡者数は、1998 年に約 3 万 3 千人に急増して以来、12 年連続して 3 万人を超えている。特に近年の自殺者の特徴は、中高年男性の急増であり、これらには長引く経済不況とそれに伴うリストラや配置転換によるストレスがあるといわれている。日本での自殺予防対策は危機介入が中心であり、事前教育、事後対応に相当する対策は少なく、自殺者が急増する中、危機介入だけでなく、事前教育、事後介入の対策の必要性が指摘されている。

そこで、本研究は喫緊の課題である自殺予防対策に資するために、労働者における自殺念慮の実態とそれに関連する要因を明らかにすることを目的として実施した。対象者は某健康保険組合傘下の 6 事業場の 6,017 人の労働者で、無記名自記式質問紙調査法により調査を行い、5,322 人より回答を得た (回答率 84.7%)。記入が不十分な者、対象者が少ない 10 歳代、60 歳代を除外し 4,356 人(有効回答率 72.4%) を分析対象とした。質問紙では、自殺念慮の有無、最近の健康状態、Zung の自己評価式抑うつ尺度、身体症状、生活習慣などの項目について情報を得た。

その結果、①自殺念慮ありの割合は、男性 291 人(10.2%)、女性 196 人 (13.0%) で、女性の方が多かった ($p < 0.01$)。女性では年齢の上昇とともに、自殺念慮の割合が減少する傾向がみられたが、男性では 40 歳代が最も多かった。②ロジスティック回帰分析の結果、自殺念慮に関連する要因として、男女ともに関連していた要因は、自覚的な健康状態が不良であること、抑うつ状態であること、胃痛・むかつきがあることであった。さらに男性では睡眠時間が 5 時間以下であること、睡眠剤の服用、肩こり・腰痛があること、女性では朝食回数が少ないこと、頭痛・頭重感があることであった。③これらの要因から自殺予防対策の対象をスクリーニングすることが可能となり、スクリーニングした対象へ相談、支援を強化することにより、自殺予防の事前教育につながると思われた。

以上、本論文は自殺念慮という難しい課題に対して、横断的研究および自記式質問紙法という限界はあるものの、同一職域で男女ともに 1,500 人を超える多人数を対象に調査を実施し、自殺念慮の実態およびその関連要因を明らかにしたもので、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第853号		
学位授与の日	平成22年8月3日		
氏名	佐原伸也		
学位論文の題目	Effects of Hepatic Artery Chemoembolization Using Cisplatin-lipiodol Suspension with Gelatin Sponge Particles on Swine Liver (シスプラチン-リピオドール懸濁液とゼラチンスポンジ細片を用いた肝動脈化学塞栓療法の正常豚肝組織に及ぼす影響について)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 覚道健一	教授 佐藤守男

論文内容の要旨

【緒言】

シスプラチン(cis-diamminedichloroplatinum, CDDP)は様々な悪性腫瘍に対して、幅広く利用される効果的な薬剤である。2005年にCDDPの肝動注用粉末製剤が製造販売され、現在シスプラチン・リピオドール懸濁液(CLS)として肝動脈塞栓術(HACE)の際に使用されている。CLSの肝動脈注入は認可されているが、HACEの際には、ゼラチンスポンジが併用される。肝細胞癌に対するCLSを用いたHACEの壊死効果の有用性についての報告は多数認められるが、正常肝組織への影響や安全性についての基礎的な検討は極めて少ない。本研究の目的は、CLSを用いたHACEを豚肝動脈に行い、正常な豚肝組織に及ぼす影響を肉眼的、病理学的に検討し、正常な豚肝組織の耐容可能なシスプラチンの濃度を推定することである。

【対象と方法】

対象は三種交配種の健全な豚12頭(体重平均39.2kg)である。全身麻酔下無菌操作で豚の右大腿動脈を剥離露出して5Frシースを介して、5Frコブラ型カテーテルを腹腔動脈に挿入し、腹腔動脈造影を行った。血液サンプリング用として、肝静脈に5Frコブラ型カテーテル留置を行った。次に、2.8Frマイクロカテーテルを固有肝動脈に挿入し、同動脈造影を行った。固有肝動脈に挿入したカテーテルを通じて、リピオドール(LPD)とゼラチンスポンジを用いて塞栓を行ったが、LPDに混和するCDDP粉末製剤の濃度によって、対象を以下の4群に区分した。

A群：LPD単独+ゼラチンスポンジ細片

B群：LPD1mlに対しCDDP10mgの濃度のsuspension+ゼラチンスポンジ細片

C群：LPD1mlに対しCDDP20mgの濃度のsuspension+ゼラチンスポンジ細片

D群：LPD1mlに対しCDDP30mgの濃度のsuspension+ゼラチンスポンジ細片

LPDあるいはsuspensionの注入量が0.1ml/kgに到達後、造影剤を染み込ませたゼラチンスポンジ細片を用いてゆっくりと塞栓し、術後の造影で肝動脈血流の途絶を確認した。

以上の操作をA群、B群、C群、D群各豚3頭で行い、以下の項目について検討した。

1. 肝静脈中のプラチナ濃度の経時的变化

suspension 注入直後、5、10、30分後、1時間後の肝静脈中血漿プラチナ濃度と半減期の算出

suspension 注入直後、30分後、1時間後の肝静脈中血漿蛋白非結合型プラチナ濃度と半減期の算出

2. 肝腎機能の経時的变化

術前、術後1日、3日、7日の末梢血中の総ビリルビン値、AST値、 γ GTP値、クレアチニン値

3. 摘出肝の病理学的検討

術後7日目に屠殺後、摘出肝を1cm毎に切離し、各切断面での壊死巣の大きさと数を肉眼的に検索し、全肝に対する壊死単体積率を検討した。次いで10%ホルマリン液で固定後、HE染色を行い、壊死巣の拡がり組織学的に検討した。統計学的分析はStudent's t検定を用い、統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

1. 肝静脈中のプラチナ濃度の経時的变化

血漿プラチナ濃度と蛋白非結合型プラチナ濃度はそれぞれ、B群では6.1と5.1 μ g/mlで、C群では3.0と2.3 μ g/ml、D群では1.2と0.8 μ g/mlであった。連続データから、時間-濃度の近似曲線を推定

し、血漿プラチナ濃度と蛋白非結合型プラチナ濃度の半減期を算出した。血漿プラチナ濃度と蛋白非結合型プラチナ濃度の半減期は、それぞれ、B群では49.6と39.3分で、C群では48.7と39.9分で、D群では45.6と40.0分であった。

2. 肝腎機能の経時的変化

総ビリルビン値は、3日後のAとD群、7日後のAとC群とAとD群の間に有意差が存在し、AとB群の間に有意差は存在しなかった。AST値は、各群とも1日後には上昇したが、3日後、7日後には低下した。γ-GTP値は、各群とも著明な変化を認めなかった。クレアチニン値は、A、B、C群では有意な上昇はみられなかったが、D群では3日後と7日後に有意な上昇が認められた。

3. 摘出肝の病理学的検討

A、B、CとDの肝臓の壊死巣体積率は、 $0.832 \pm 0.334\%$ 、 $2.324 \pm 1.126\%$ 、 $8.056 \pm 3.276\%$ と $11.82 \pm 4.921\%$ であった。A群とC群、A群とD群、B群とC群、B群とD群との間に有意差がみられたが、A群とB群間では、有意差がみられなかった。

【結語】

正常な豚肝組織において、LPD1mlに対しCDDP10mgの濃度のsuspension+ゼラチンスポンジ細片を用いた肝動脈塞栓術は、障害が軽度であり、CDDPを用いない肝動脈塞栓術と同程度である。正常な豚肝組織に対する肝動脈塞栓術では、CDDP容量が増加するにつれて、肝障害が増加する。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年7月2日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。本論文は、肝細胞癌に対する肝動脈塞栓療法において、シスプラチンの肝動注粉末製剤をリピオドールと懸濁させ、その懸濁液の濃度を変更することにより、豚正常肝組織への影響や安全性について検討したものである。対象群としてリピオドール単独投与群（A群）を設定し、懸濁液の濃度をリピオドール1mlに対して、各々シスプラチン10mg（B群）、シスプラチン20mg（C群）、シスプラチン30mg（D群）の4群に区分した。①各々の肝静脈中のプラチナ濃度の経時的変化②肝腎機能の経時的変化③摘出肝の病理学的研究について比較検討した。その結果、①肝静脈中の血漿プラチナ濃度と蛋白非結合型プラチナ濃度は懸濁液の濃度が高いほど高く、血漿プラチナ濃度の半減期は45.6-49.6分で、蛋白非結合型プラチナ濃度の半減期は39.3-40.0分であった。②総ビリルビンは3日後のA群とD群、7日後のA群とC群、A群とD群に有意差を認めた。AST値は3日後のA群とB群、A群とC群、A群とD群、7日後のA群とC群、A群とD群に有意差を認めた。γ-GTP値は各群とも有意な上昇を認めなかった。クレアチニン値は、A群、B群、C群で有意な上昇を認めなかったが、D群では3日後と7日後に有意な上昇を認めた。③摘出肝の壊死巣体積率はA群とC群、A群とD群、B群とC群、B群とD群との間に有意差を認めたが、A群とB群の間に有意差を認めなかった。豚正常肝組織において、リピオドール1mlに対してシスプラチン10mgの濃度の懸濁液を用いた肝動脈化学塞栓療法はリピオドールを用いた肝動脈塞栓療法と同様に肝障害が軽微であった。以上の結果により、本論文はシスプラチン粉末製剤の豚正常肝組織に影響が少ない投与濃度が同定でき、肝細胞癌に対する肝動脈化学塞栓療法におけるシスプラチン粉末製剤の肝組織温存を考慮した投与濃度の推定に有用であり、今後の肝細胞癌の肝動脈塞栓療法の治療指針に寄与するものと考えられ、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第854号		
学位授与の日	平成22年11月9日		
氏名	高坂 功		
学位論文の題目	A New Soluble Gelatin Sponge for Transcatheter Hepatic Arterial Embolization (肝動脈塞栓術に用いる可溶性ゼラチンスポンジの作製と有用性に関する基礎的検討)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕 機	
	副査	教授 一瀬 雅 夫	教授 佐藤 守 男

論文内容の要旨

【緒言】

肝細胞癌の多くは多血性の悪性腫瘍であり、同時或いは異時に多発性に発育する。肝動脈塞栓術 (TACE) は肝細胞癌に対する主要な治療の一つである。繰り返し TACE を必要とする症例が多いが、TACE を繰り返すことにより、塞栓動脈枝の再開通までに時間を要し、再開通しない場合もある。下横隔動脈や腰動脈、胃大網動脈、内胸動脈などの側副血行路が発達する可能性が高まる。側副血行路からの TACE は困難である場合や動脈損傷などの合併症の危険がある。

TACE で用いられるゼラチンスポンジは異物に対する生体反応として、吸収及び、動脈壁に付着すると報告されている。この結果、動脈が再開通しても、狭小化の原因となる。適切な塞栓時間を有する可溶性ゼラチンスポンジの開発は、腫瘍に虚血を起こしつつ、肝動脈の狭小化、側副血行路の発達を抑制できると考えられる。

ゼラチンは生体のコラーゲンから抽出される液体の蛋白である。エンドトキシンなどの有害物質をろ過し、再生医療の分野で用いられるゼラチンが本邦で 2007 年に開発された。乾熱滅菌の温度によりゼラチンへの熱架橋の程度が決定される。熱架橋の程度により、ゼラチンスポンジの可溶性が調節される。

本研究の目的は可溶性ゼラチンスポンジを作製し、肝動脈塞栓術を施行するあたり、側副血行路の発達を防止するゼラチンスポンジを求めることである。

【対象と方法】

1) 可溶性ゼラチンの作製

2つの異なる分子量、50 キロダルトン (kDa)、100kDa の低エンドトキシゼラチン (RM-G) を使用した。用いたゼラチンは薄膜を用いて抗原、エンドトキシンをろ過し、取り除いたゼラチンである (JELLICE, Sendai, Japan)。まず 48 時間凍結乾燥を行い、 -80°C まで急速冷凍しスポンジ (RM-GS) を作成した。その後熱架橋を施すため、乾熱滅菌を行った。 100°C 以下では熱架橋はなされない。 50kDa の RM-G を 110°C 、 130°C 、 135°C 、 100kDa の RM-G を 110°C 、 120°C 、 125°C 、 130°C 、 135°C で熱架橋を施した (8 群)。その後メス刃、眼科剪刀を用い、 $1\text{-}2\text{mm}$ 角細片 (RM-GSP) にした。

2) In vitro での溶解時間の検討

RM-GSP20 粒を生理食塩水 10ml の入った試験管内に入れた。 37°C 恒温槽、振盪下にて、3、6、12 時間後および以後 12 時間ごとに 2 週間観察した。各群は、試験管 4 本を使用し、対照として現在臨床で肝動脈塞栓術で使用されているジェルパート (G-GSP, Nihonkayaku, Tokyo, Japan) 細片を用いた。

3) In vivo での再開通時間の検討

in vitro で 48 時間以上の溶解時間を有する RM-GSP : RM-GS50kDa に 135°C の熱架橋を施した群 ($135^{\circ}\text{C}/50\text{RM-GS}$)、RM-GS100kDa に 125°C の熱架橋を施した群 ($125^{\circ}\text{C}/100\text{RM-GS}$)、RM-GS100kDa に 130°C の熱架橋を施した群 ($130^{\circ}\text{C}/100\text{RM-GS}$)、及び対照として G-GSP を使用した。

対象は生体豚 9 頭。いずれもメス、生後 6 ヶ月、体重は 50kg から 60kg、平均 56.8kg であった。 $135^{\circ}\text{C}/50\text{RM-GS}$ に 1 頭、 $125^{\circ}\text{C}/100\text{RM-GS}$ に 2 頭、 $130^{\circ}\text{C}/100\text{RM-GS}$ に 3 頭、G-GSP に 3 頭割り当てた。

全身麻酔下に右大腿動脈を穿刺し、4Fr RC 型 catheter (MEDIKIT) を総肝動脈に進めた。総肝動脈造影を施行した後、microcatheter を使用して、左肝動脈、内側枝、外側枝動脈に進めた。1-2 mm 角の GS 細片を造影剤(Iopamidol 370, Bracco, Milano, Italy)に浸したものを塞栓物質とした。血流の完全な途絶を確認するまで塞栓した。観察期間は6日で、塞栓前後、4時間後、1日後、3日後、5日後、6日後に肝動脈の開存を総肝動脈造影で確認した。再開通は左肝動脈、内側枝、外側枝の本幹に血流を認め、内部にGSの遺残を示唆する欠損像が無いこととした。

塞栓前後、1、3、5日後に血液検査(血算、CRP、総ビリルビン、AST、ALT、rGTP、クレアチニン)を施行し、変化の有無を確認した。

全例6日後にと殺、肝摘出を行い、塞栓の影響を確認するため、組織学的検討を行った。肝組織は10mm厚切片とし、ホルマリン固定を行った。顕微鏡的観察のため、HE染色を施行した。動脈内へのGSPの遺残、及び肝障害の有無を、肉眼的、組織学的に検討した。

【結果】

・in vitro における RM-GSP の溶解時間

110°Cから135°Cで加熱したRM-GSPはいずれも溶解した。平均溶解時間は高い温度で加熱するほど長い傾向を示した。150度で加熱したRM-GSP、及びG-GSPは14日間の観察期間内で溶解しなかった。HCCを壊死させるために必要な虚血時間は48時間程度と考え、in vivoでの評価に135°C/50RM-GS、125°C/100RM-GS、130°C/100RM-GSを選択した。

・RM-GSP での塞栓による豚肝動脈の再開通時間

5G-GSP群(in vitroで14日間不溶)での塞栓では肝動脈はいずれも6日間再開通しなかった。3日後の造影で微小な側副血行路の発達が見られた。130°C/100RM-GS群(in vitroで10.6日後に溶解)は2日後に再開通した。側副血行路の発達は見られなかった。135°C/50RM-GS群(in vitroで2.4日後に溶解)は3本全ての動脈がいずれも1日後に再開通していた。125°C/100RM-GS群(in vitroで2.4日後に溶解)は9本全てが4時間後の造影では血管閉塞がみられたが、1日後の造影で再開通がみられた。明らかな側副血行路の発達はみられなかった。

・副作用

いずれの豚にも発熱や死亡といった副作用は見られなかった。白血球を含む血算、およびCRP、総ビリルビン、AST、ALT、rGTP、クレアチニンに明らかな異常や著明な数値の変動は見られなかった。

・組織学的検討

G-GSP群では肝動脈内に赤色血栓を伴うGSPの遺残が見られた。130°C/100RM-GSP群では末梢の動脈枝に血管造影で同定できないような微小なGSPの遺残が存在した。135°C/50RM-GSP、125°C/100RM-GSPの各群では血管内にGSPの遺残は認められなかった。肉眼的、顕微鏡的に肝実質に明らかな異常は見られなかった。

【結語】130°C/100RM-GSPはin vitroでの溶解時間は10.6日、in vivoでの再開通時間は2.4日で肝動脈塞栓術の際、側副血行路の発達を抑制する可溶性GSと考えられた。

審査の要旨(審査の日、方法、結果)

平成22年9月29日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

本論文は、肝細胞癌に対する肝動脈塞栓術のための新たな塞栓物質である溶解性ゼラチンスポンジに関する開発、検討について述べたものである。従来のゼラチンスポンジは非溶解性であった。このため血管壁に吸収されるのに1-2週間を要し、血管の狭小化、閉塞をみる。このため繰り返す塞栓療法を行う場合に、細い側副血行路へのカテーテル操作を必要とした。溶解性ゼラチンスポンジでは生体の血管反応の抑制が期待される。ゼラチンスポンジは熱架橋の程度により、種々の溶解時間のゼラチンスポンジが作成できる。この事を利用して肝動脈塞栓術に至適なゼラチンスポンジの開発を行った。

In vitroでは平均溶解時間は110°C以上の高い温度で熱架橋を施した群ほど長くなる傾向を示し、150°C以上では非溶解性ゼラチンスポンジが作成された。In vivoではブタの肝動脈造影において対照群としての非溶解性ゼラチンスポンジは6日間の観察期間内で肝動脈の再開通が確認されず、塞栓3日後より胆管周囲動脈と思われる側副血行路の発達をみた。溶解性ゼラチンスポンジ1日以内肝動

脈再開通群、1-2日以内肝動脈再開通群で側副血行路の発達は認められなかった。使用したブタに発熱や死亡といった有害事象は見られず、血液検査でも炎症反応は見られなかった。組織標本の検討で従来用いられているゼラチンスポンジ群と溶解性ゼラチンスポンジ群で血管内ゼラチンスポンジ細片の遺残数、ゼラチンスポンジ細片の遺残している肝動脈の血管径を検討したところ、遺残数、血管径ともに有意差を認めた。

以上の結果より、種々の溶解時間のゼラチンスポンジの作成、新たに開発された溶解性ゼラチンスポンジの安全性、既存血管の再開通性、側副血行路の発達の抑制が示された。今後の塞栓物質に関する臨床研究の基盤となるもので、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第855号		
学位授与の日	平成22年11月9日		
氏名	森田修平		
学位論文の題目	Autophagy protects against human islet amyloid polypeptide-associated apoptosis (オートファジーはヒト膵ラ氏島アミロイド蛋白に関連したアポトーシスに対し保護的に働く)		
論文審査委員	主査	教授 井原義人	
	副査	教授 村垣泰光	教授 三家登喜夫

論文内容の要旨

【緒言】

ヒト2型糖尿病の組織学的な特徴の一つに膵ラ氏島のアミロイド沈着が挙げられる。ヒト膵ラ氏島アミロイド蛋白 (Islet Amyloid Polypeptide : IAPP) は、膵β細胞で特異的に合成されインスリンとともに血中に分泌されている蛋白である。ヒト IAPP(hIAPP)は分子内にβシート構造(アミロイド源性)を有しており、2型糖尿病患者の膵島に病的に認められるアミロイドの主要構成成分であるが、現時点で真の生理作用は不明である。一方、ヒトとは異なり分子内にβシート構造を有さないげっ歯類の IAPP はアミロイド源性を有さず、膵ラ氏島のアミロイド沈着は認められない。また、*In vitro* もしくは *in vivo* にて、hIAPP では細胞障害性との関連が認められるが、ラット IAPP(rIAPP)では認められない。

オートファジーは、大規模な細胞内蛋白分解系の一つとして知られており、膵β細胞に関連するオートファジーの報告が近年相次いでいる。インスリン抵抗性存在下のβ細胞障害に対して、オートファジーが保護的に働いていることが示されており、hIAPPに伴うβ細胞障害に対するオートファジーの関与の有無が着目される。

以上のことを踏まえ、本研究は hIAPP に伴う細胞障害に対して、オートファジーが細胞保護的に働きうるのかを *in vitro* にて評価することを目的とした。

【対象と方法】

COS-1細胞にhIAPP、rIAPPを各々発現させ、生存細胞数を経時的にMTT assayにて測定した。また、電子顕微鏡検査にてhIAPP発現COS-1細胞の形態学的観察を行った。オートファジー誘発の有無については、LC3蛋白の変化にも検討を行った。また、オートファジー阻害・誘発剤、およびオートファジー誘導に関与するATG5 geneに対するsiRNAを用い、生存細胞数の変化を検討した。次に、β細胞株であるMIN-6細胞を用い、オートファジー阻害・誘発剤処理後、アポトーシス出現の指標の一つであるAnnexin-V陽性細胞数の変化をflow cytometryを用いて検討した。

【結果】

各遺伝子導入後96時間にて、生存hIAPP発現COS-1細胞数は生存rIAPP発現COS-1細胞数より有意に減少していた。hIAPP発現COS-1細胞において電子顕微鏡検査上、オートファゴソームの形成が認められ、蛋白分析にてLC3-IからLC3-IIへの変化が認められた。オートファジー阻害剤である3-Methyladenine(3-MA)を用いるとhIAPP発現COS-1細胞の生存数は有意に低下し、オートファジー誘発剤であるRapamycin(Rap)を用いると有意に増加した。siRNAを用いATG5 geneをノックダウンすると、hIAPPの生存細胞数は有意に減少した。また、MIN-6細胞に関してもhIAPP発現細胞にてAnnexin-V陽性細胞数はラットIAPP発現細胞に比し増加した。また、hIAPP発現MIN-6細胞において、無処理時に比し3-MAによりAnnexin-V陽性細胞数は増加し、Rapにより減少した。

【結語】

アミロイド源性を有するhIAPPに伴う細胞障害に対しオートファジーは防御的に働くことが示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 10 月 29 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

ヒト 2 型糖尿病の組織学的な特徴の一つに膵ラ氏島のアミロイド沈着が挙げられる。ヒト膵ラ氏島アミロイド蛋白 (Islet Amyloid Polypeptide : IAPP) は、膵β細胞で特異的に合成されインスリンとともに血中に分泌されている蛋白である。ヒト IAPP(hIAPP)は、βシート構造 (アミロイド源性) を有しないラット(rIAPP)と異なり分子内にβシート構造を有しており、2 型糖尿病患者の膵島に病的に認められるアミロイドの主要構成成分であるが、現時点で真の生理作用は不明である。一方、オートファジーは、蛋白分解系の一つとして知られており、膵β細胞に関連するオートファジーの報告が近年相次いでいる。インスリン抵抗性存在下のβ細胞障害に対して、オートファジーが保護的に働いていることが示されており、hIAPP に伴うβ細胞障害に対するオートファジーの関与の有無が着目される。以上のことを踏まえ、本研究は hIAPP に伴う細胞障害に対して、オートファジーが細胞保護的に働きうるのかを *in vitro* にて検討した。

この結果、

1) 各遺伝子導入にて、生存 hIAPP 発現 COS-1 細胞数は生存 rIAPP 発現 COS-1 細胞数より有意に減少していた。hIAPP 発現 COS-1 細胞において電子顕微鏡検査上、オートファゴソームの形成が認められ、蛋白分析にて LC3-I から LC3-II への変化が認められた。オートファジー阻害剤である 3-Methyladenine(3-MA)を用いると hIAPP 発現 COS-1 細胞の生存数は有意に低下し、オートファジー誘発剤である Rapamycin(Rap)を用いると有意に増加した。siRNA を用い ATG5 gene をノックダウンすると、hIAPP の生存細胞数は有意に減少した。

2) マウスβ細胞由来 MIN-6 細胞に関しても hIAPP 発現細胞にてアポトーシスマーカーである Annexin-V 陽性細胞数は rIAPP 発現細胞に比し増加した。また、hIAPP 発現 MIN-6 細胞において、無処理時に比し 3-MA により Annexin-V 陽性細胞数は増加し、Rap により減少した。

以上より、本論文はアミロイド源性を有する hIAPP に伴う細胞障害に対しオートファジーは防御的に働くことを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものであると認めた。

学位記番号	博(医)乙第856号		
学位授与の日	平成22年11月9日		
氏名	松村永秀		
学位論文の題目	The prognostic significance of human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) expression in metastatic bladder cancer patients treated with gemcitabine - cisplatin based combination chemotherapy (ゲムシタビンとシスプラチンを含む併用化学療法を施行した転移性膀胱癌患者の生存に関する human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1)発現の意義)		
論文審査委員	主査	教授 山上裕機	
	副査	教授 重松隆	教授 原 勲

論文内容の要旨

【緒言】 転移病巣を有する膀胱癌症例に対する全身化学療法は、近接効果においては比較的良好な成績であるものの長期にわたって完全寛解を示す症例は少ない。さらなる治療成績の向上を目指す上で、個別化治療の導入は重要な戦略の一つである。本研究では、効果予測因子としての薬学的・薬物動態学的バイオマーカーに注目した。Gemcitabine(GEM)の効果予測因子として、GEM が細胞内に取り込まれる際の Key molecule である human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1)、および CDDP の効果予測因子として耐性獲得に関連する物質とされている excision repair cross complementing1(ERCC1)の発現と臨床病理学的因子および予後との関連につき解析した。

【方法】 GEM と CDDP を含んだ多剤併用化学療法(GC療法およびGCT療法)を施行した転移病変を有する膀胱癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて膀胱腫瘍検体のパラフィン切片を作成し、hENT1 と ERCC1 に対する免疫組織化学を行った。

【結果】

1) 抗癌化学療法に対する近接効果と hENT1, ERCC1 の発現との関係

hENT1 高発現群のうち 90%において近接効果を認めたのに対し、hENT1 低発現群において近接効果を認めたのは 35%にすぎなかった($p=0.001$)。一方で ERCC1 の発現と近接効果の間には統計学的に有意差は認めなかった($p=1.0$)。

2) 抗癌化学療法後の生存期間(全生存)と hENT1, ERCC1 の発現の関係

hENT1 高発現群の全生存期間の中央値は 17.3 ヶ月であったのに対し、hENT1 低発現群は 11.6 ヶ月であった($p=0.0026$)。一方、ERCC1 低発現群の全生存期間の中央値は 17.1 ヶ月であったのに対し、ERCC1 高発現群は 13.6 ヶ月であった($p=0.178$)。

hENT1 と ERCC1 の発現を組み合わせた生存曲線では、hENT1 高発現かつ ERCC1 低発現群は全生存期間の中央値は 18.2 ヶ月であったのに対し、hENT1 低発現かつ ERCC1 高発現群は 11.6 ヶ月であった($p=0.0012$)。

3) 抗癌化学療法後の生存期間(全生存)に関する各種臨床病理学的因子による単・多変量解析

単変量解析においては、化学療法前の Performance status 良好群と hENT1 の高発現群が生存に関して統計学的に有意に良好であった($p=0.02$, $p=0.004$)。多変量解析においては hENT1 高発現のみが独立予後規定因子であった($p=0.004$)。

【考察】 膀胱癌に対する GEM 併用全身化学療法を施行する上で膀胱癌における hENT1 の発現が効果予測因子と成る可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年10月26日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め上記学位論文の審査を行った。

従来、膀胱癌患者に対する化学療法の効果予測因子としては、治療開始時のPerformance Statusや臓器転移の有無などといった大まかな臨床的因子が用いられてきた。本論文は、Gemcitabine(GEM)と Cisplatin(CDDP)を含む多剤併用化学療法を施行した評価可能病変を有する転移性膀胱癌患者40例にお

いて、GEMの効果予測因子として、GEMが細胞内に取り込まれる際のKey moleculeであるhuman equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1)、およびCDDPの効果予測因子としてCDDPに対する耐性獲得に関連する物質とされているexcision repair cross complementing1(ERCC1)の免疫組織染色を施行し、hENT1/ERCC1 の発現を含む種々の臨床病理学的因子と近接効果および予後との相関につき解析したものである。結果については、hENT1高発現群20例のうち90%において近接効果を認めたのに対し、hENT1低発現群20例において近接効果を認めたのは35%にすぎなかった($p=0.001$)。一方、ERCC1の発現と近接効果の間には統計学的に有意差は認められなかった。生存に関する解析ではhENT1高発現群の全生存期間の中央値は17.3ヵ月であったのに対し、hENT1低発現群は11.6ヵ月であった($p=0.0026$)。Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析では、化学療法前のPerformance status良好群とhENT1の高発現群が全生存に関して統計学的に有意に良好であった($p=0.02, p=0.004$)。一方でERCC1の発現と生存に関しては、統計学的な有意差は認められなかった。多変量解析においてはhENT1高発現のみが独立予後規定因子であった($p=0.004$)。

本論文は、膀胱癌患者に対するGEM併用全身化学療法を施行する上で腫瘍細胞におけるhENT1の発現が効果予測因子と成り得る可能性を示唆している。hENT1発現についての検討においてmRNAレベルやWestern blottingなどでの比較検証が未施行である事やスタディーデザインが後ろ向き研究であるなどの克服すべき課題点が残ってはいるが、薬学的・薬物動態学的バイオマーカーを導入して、膀胱癌患者に対する抗癌化学療法の個別化医療導入の可能性を模索する研究報告としては興味深いものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第857号		
学位授与の日	平成22年11月9日		
氏名	田中 才一		
学位論文の題目	Suppression of injury-induced epithelial-mesenchymal transition in a mouse lens epithelium lacking tenascin-C (水晶体外傷後のテネイシン欠損マウスにおける上皮間葉系移行の抑制の役割)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 井原 義人	教授 雑賀 司珠也

論文内容の要旨

糸者言

近年、増加の一途をたどる白内障の手術は、通常、良好な術後経過をとるが、時に手術後数週もしくは数年後に再度の視力低下を来すこともある。多くの場合、この原因は、後発白内障と言われる現象による。白内障手術では、白内障に陥った水晶体内容を除去したあと、残した水晶体嚢内に（人工）眼内レンズを移植する。この水晶体嚢の再混濁が後発白内障である。残存水晶体上皮細胞が水晶体後嚢で増殖し、筋線維芽細胞様に形態変化を起こし（上皮—間葉系移行）、水晶体嚢組織に線維化と組織収縮を惹起することが原因である。

本研究者は、高度の嚢収縮・混濁の治療目的で摘出された収縮嚢の組織学的検討を行い、収縮した嚢内に筋線維芽細胞と各種線維性細胞外マトリックス（コラーゲン I、III、IV、VI、フィブロネクチン、ルミカンやオステオポンチン、テネイシン C）を検出した。さらに本研究者は、家兎に実験的白内障手術を施行し、術後の創傷治癒過程において、水晶体嚢内で、水晶体上皮細胞の上皮—間葉系移行によって発現される細胞外マトリックスの内、長期に残存する線維性コラーゲンと異なりフィブロネクチンは後期において後嚢上で消失することを見だし、早期の創傷治癒において役割を果たしていると考えられた。さらに、本研究者の所属する講座では、上記の後発白内障に検出される細胞外マトリックスの役割をマウスに実験的水晶体外傷を作成することで上皮—間葉系移行を誘導する動物モデルを用いて検討してきた。その中で、Smad3 シグナルが、中心的役割を演じるものの、細胞外マトリックス成分のルミカンとオステオポンチンが、水晶体上皮細胞の上皮—間葉系移行に関与していることが見いだされた。しかし、matricellular protein の一つであるテネイシン C の役割については検討されていなかった。

テネイシン C は細胞外マトリックス糖蛋白質の一種であり、分子量約 25 万のポリペプチドが N 末端付近で 3 分子でコイル状に合わさり、更に 2 つのジスルフィド結合によって六量体を形成している。各ポリペプチド鎖には上皮増殖因子様ドメイン、フィブロネクチン III 様ドメイン、およびフィブリノーゲン様ドメインが含まれている。その役割はとして、組織の創傷治癒過程の再構築前期に特徴的に出現し、線維化や組織リモデリングに関与しているとされている。

その役割についてまず摘出されたヒト水晶体嚢での免疫組織学的検討を行った。

本研究では、水晶体上皮細胞の創傷治癒過程で発現されるテネイシン C の上皮—間葉系移行での役割についてテネイシン C 欠失マウスを用いて検討した。

方法

(1) ヒト後発白内障組織の免疫組織化学的検討：他の内眼手術時にやむなく摘出された後発白内障を伴う眼内レンズ挿入眼の水晶体嚢のパラフィン切片を免疫組織化学的に検討した。

2, テネイシン C 欠失マウスを用いた検討：テネイシン C の水晶体外傷時の上皮細胞の挙動に対するテネイシン C 欠失の影響を検討するために TNC ノックアウトマウスを用いた。C57BL/6 背景野生型(WT)マウス (n=50) および TNC ノックアウト(KO)マウス (n=50) を用いて検討を行った。全身麻酔下に 26G 針にて経角膜的に水晶体前嚢を穿刺し、2 日、5 日、10 日に眼球を摘出し、組織学のおよび α 平滑筋アクチン、フィブロネクチン、トランスフォーミング成長因子 b1 (TGFb1)、リン酸化 Smad2、リン酸化 adducin (Rho キナーゼシグナルのマーカー) に対する抗体を用いて免疫組織学的検討をおこなった。

結果

(1) ヒト後発白内障組織の免疫組織化学的検討：摘出された水晶体前囊下の細胞外マトリックス成分にテネイシン C の免疫学的陽性所見を認めた。 α 平滑筋アクチンの免疫染色では陽性所見を示す細胞を多数認めた。

(2) テネイシン C 欠失マウスを用いた検討：組織学的検討では、水晶体穿刺外傷後、2 日では WT マウスも KO マウスでも外傷部の水晶体上皮細胞は上皮様形態を維持していた。5 日では WT マウスでは線維芽細胞に変化を示していたが、KO マウスでは水晶体上皮細胞は上皮様形態を維持していた。10 日では両群とも水晶体上皮細胞は線維芽細胞に変化を示した。

α 平滑筋アクチンの免疫染色では 2 日では WT マウスも KO マウスでも外傷部の水晶体上皮細胞は染色されなかった。5 日では WT タイプでは α 平滑筋アクチンの発現を認めたが、KO マウスでは発現を認めなかった。10 日では両方ともに免疫染色性を求めた。フィブロネクチンも 2 日目では WT マウスも KO マウスでも外傷部の水晶体上皮細胞に検出されなかった。5 日では KO マウスでは発現を認めなかったが、WT マウスでは検出された。10 日では両方ともに免疫染色性を認めた。TGF β 1 は、2 日では、KO マウスでのみ水晶体上皮細胞は発現が見られなかったが、5 日以降では両群に差がなかった。リン酸化 Smad2 とリン酸化 adducin の免疫組織学的検討では WT マウスは 2 日以降では陽性所見を示す細胞がみられたが、KO マウスでは 5 日でも陽性所見を示す細胞はみとめなかった。

考案

水晶体上皮細胞は外傷後の創傷治癒機転として上皮—間葉系移行を起こし、筋線維芽細胞に変化するが、その過程においてテネイシン C が関与することが示された。上皮—間葉系移行の阻害によって、創傷治癒関連蛋白質の発現も低下した。テネイシン C 由来のシグナルが、上皮—間葉系移行に必須な Smad シグナルと Rho キナーゼシグナルを促進している可能性が示唆された。これまで上皮—間葉系移行に関与することが示されている細胞外マトリックス成分と併せて、後発白内障の発症機序の理解と今後の予防方法の開発への情報となる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 10 月 28 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

近年、増加の一途をたどる白内障の手術は、通常、良好な術後経過をとるが、時に手術後数週もしくは数年後に再度の視力低下を来すこともある。多くの場合、この原因は、後発白内障と言われる現象による。白内障手術では、白内障に陥った水晶体内容を除去したあと、残した水晶体嚢内に（人工）眼内レンズを移植する。この水晶体嚢の再混濁が後発白内障である。残存水晶体上皮細胞が水晶体後嚢で増殖し、筋線維芽細胞様に形態変化を起こし（上皮—間葉系移行：EMT）、水晶体嚢組織に線維化と組織収縮を惹起することが原因である。

高度の嚢収縮・混濁の治療目的で摘出された収縮嚢の組織学的検討を行い、収縮した嚢内に筋線維芽細胞と各種線維性細胞外マトリックス（コラーゲン I、III、IV、VI、フィブロネクチン、ルミカンやオステオポンチン、テネイシン C）を検出した。この細胞外マトリックスの中の一つであるテネイシン C の役割についての検討をテネイシン C 欠失マウスを用いて検討したものである

組織学的および α 平滑筋アクチン、フィブロネクチン、トランスフォーミング成長因子 β 1 (TGF- β 1)、リン酸化 Smad2、リン酸化 adducin (Rho キナーゼシグナルのマーカー) に対する抗体を用いて免疫組織学的検討を行った。その結果、

①組織学的検討では、水晶体穿刺外傷後、2 日では WT(Wild type)マウスも KO(knock out)マウスでも外傷部の水晶体上皮細胞は上皮様形態を維持していた。5 日では WT マウスでは線維芽細胞に変化を示していたが、KO マウスでは水晶体上皮細胞は上皮様形態を維持していた。10 日では両群とも水晶体上皮細胞は線維芽細胞に変化を示した。② α 平滑筋アクチンの免疫染色は 2 日では WT マウスも KO マウスでも外傷部の水晶体上皮細胞は染色されなかった。5 日では WT タイプでは α 平滑筋アクチンの発現を認めたが、KO マウスでは発現を認めなかった。10 日では両方ともに免疫染色性を認めた。③フィブロネクチンも 2 日目では WT マウスも KO マウスでも外傷部の水晶体上皮細胞に検出されなかった。5 日では KO マウスでは発現を認めなかったが WT マウスでは検出された。

10日では両方ともに免疫染色性を認めた。④TGF- β 1は、2日ではKOマウスでのみ水晶体上皮細胞は発現が見られなかったが、5日以降では両群に差がなかった。⑤リン酸化Smad2とリン酸化adducinの免疫組織学的検討では、WTマウスは2日以降では陽性所見を示す細胞がみられたが、KOマウスでは5日でも陽性所見を示す細胞をみとめなかった。

以上より、水晶体上皮細胞は外傷後の創傷治癒機転としてEMTを起こし、筋線維芽細胞に変化するが、その過程においてテネイシンCが関与することが示された。EMTの阻害によって、創傷治癒関連蛋白質の発現も低下した。テネイシンC由来のシグナルが、EMTに必要なSmadシグナルとRhoキナーゼシグナルを促進している可能性が示唆された。本論文は、これまでEMTに関与することが示されている細胞外マトリックス成分と併せて、後発白内障の発症機序の理解と今後の予防方法の開発への情報となるものであり、学位論文として価値があるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第858号		
学位授与の日	平成22年12月14日		
氏名	箕西利之		
学位論文の題目	Differential vasodilation response to olprinone in rabbit renal and common carotid arteries (ウサギの腎動脈と総頸動脈に対するオルプリノンの血管拡張作用の違いについて)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡史郎	
	副査	教授 岡村吉隆	教授 畑埜義雄

論文内容の要旨

【緒言】

オルプリノンはホスホジエステラーゼⅢ阻害薬であり、心筋細胞内や血管平滑筋細胞内における cAMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼⅢ活性を阻害し、β 受容体を介さずに cAMP の細胞内濃度を上昇させることにより心筋には強力な陽性変力作用、血管平滑筋には血管拡張作用をきたす薬剤である。周術期には、心機能改善とともに重要臓器の保護も大切である。例えば、脳、心筋、肝臓、腎臓の保護である。臓器保護のためには十分な臓器血流が必要とされ、冠拡張剤やプロスタグランジン製剤、心房性 Na 利尿ペプチド製剤などを使用することもある。また、心拍出量が一定ならば、臓器血流は臓器血管弛緩作用に依存する。一方、ホスホジエステラーゼⅢ阻害薬は単独で心筋の陽性変力作用と血管弛緩作用を併せ持ち、単剤で心機能改善と重要臓器保護両方に十分な効果を発揮することが期待される。しかし、現時点では、重要臓器血流に及ぼす作用はまだ解明されていない。臨床的には、心拍出量の増加だけでは説明できない尿量の増加やニトログリセリンのような肺動脈拡張による肺内シャントを伴うことなく心拍出量の増加を示すことが知られており、ホスホジエステラーゼⅢ阻害薬は臓器血管によりその血管拡張作用が異なる可能性示唆される。本論文では、腎動脈と総頸動脈に対するオルプリノン弛緩反応作用の比較検討を行った。

【方法】

和歌山県立医科大学動物実験倫理委員会よりこの実験に対する承認を得た。

①ハロタン麻酔下に、ウサギの腎動脈と総頸動脈を摘出し、それぞれの輪状標本を作成し、機械的に内皮を除去した。標本を至適張力下で 5%炭酸ガス、95%酸素で飽和したリンゲル液中に懸垂し、フェニレフリン ($3 \times 10^{-7} \text{M}$) で前収縮させた。収縮が安定した時点で、オルプリノン ($10^{-9} \text{M} \sim 10^{-5} \text{M}$) または、細胞膜透過性外因性 cAMP である 8-Br-cAMP ($10^{-5} \text{M} \sim 3 \times 10^{-2} \text{M}$) を累積的に適用し張力変化の測定を行った。各薬剤についてそれぞれの血管における最大弛緩 (Rmax) および最大弛緩反応の 50%を得られた濃度の対数値 ($-\log(\text{IC}_{50})$) を計算し比較した。

②①と同様に血管標本を作成し、標本を 5%炭酸ガス、95%酸素で飽和したリンゲル液内で 60 分間平衡させた。それぞれの標本にオルプリノン 10^{-7}M または、対照群として生理食塩水を 20 分間適用し、直ちに液体窒素にて凍結し、cAMP EIA Kit (Cayman Chemical) を用いて細胞内 cAMP 濃度を免疫抗体法により測定した。

③ウサギの腎動脈と総頸動脈の内皮除去血管標本を作成し、直ちに液体窒素にて凍結した。ホスホジエステラーゼⅢの特異抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、ホスホジエステラーゼⅢの発現の程度を測定した。

結果は平均±標準偏差で示し、統計学的処理は unpaired t-test または Mann-Whitney U test で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

①オルプリノンは濃度依存性に腎動脈と総頸動脈を弛緩させた。弛緩の程度は、腎動脈 > 総頸動脈であった。Rmax ($P=0.002$)、 IC_{50} ($P=0.004$)

一方、8-Br-cAMP は濃度依存性に腎動脈と総頸動脈を弛緩させたが、それぞれの弛緩の程度に差はなかった。

②オルプリノンによる細胞内 cAMP 増加の程度は、腎動脈 > 総頸動脈であった。 ($P=0.032$)

③ホスホジエステラーゼⅢの発現の程度は、総頸動脈>腎動脈であった。(P=0.008)

【考察】

①の結果より、オルプリノンによる弛緩反応が血管によって異なることが示された。一方、8-Br-cAMPによる弛緩反応に血管差がなかったことから、cAMP 上昇に伴う血管弛緩反応には血管差が無く、血管の弛緩能力自体には差がないことが考えられた。

②の結果より、血管弛緩反応に差が見られる濃度のオルプリノンを適用した時、細胞内 cAMP 増加の程度に差が見られることを発見した。

③の結果より、②の結果は血管においてホスホジエステラーゼⅢの発現の程度に差があることに起因すると考えられた。

以上より、オルプリノンの血管拡張作用の違いは、c-AMP に反応し血管拡張を来す能力の差ではなく、血管によってホスホジエステラーゼⅢの発現の程度が異なり、ホスホジエステラーゼ阻害による細胞内 c-AMP 増加作用が臓器血管によって異なることが原因であると考えられた。

【結論】

オルプリノンの血管拡張作用の臓器血管特異性について検討した。血管拡張作用の程度は、腎動脈>総頸動脈であった。これは、先に述べた臨床結果を裏付ける結果となった。また、オルプリノンの血管拡張作用の違いは、c-AMP による血管平滑筋自体の弛緩能力の差ではなく、ホスホジエステラーゼ阻害に起因する細胞内 c-AMP 増加作用の違いによることが示された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 11 月 24 日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

オルプリノンは、心筋細胞内や血管平滑筋細胞内における cAMP の分解酵素であるホスホジエステラーゼⅢ活性を阻害し、β 受容体を介さずに cAMP の細胞内濃度を上昇させる。cAMP の細胞内濃度の上昇は、心筋には強力な陽性変力作用、血管平滑筋には拡張作用を発現する。周術期には、心機能改善とともに臓器血流維持のためオルプリノンがしばしば使用されるが、オルプリノンの血管拡張作用の臓器血管特異性についての報告はない。本論文では、ウサギ摘出腎動脈と頸動脈に対するオルプリノン惹起弛緩反応の比較とその機序について検討を行った。その結果、

(1) オルプリノンは濃度依存性に、摘出ウサギ内皮除去腎動脈と総頸動脈を弛緩させた。弛緩の程度は、総頸動脈に比べ腎動脈の方が大きかった。一方、細胞膜通過型 cAMP アナログである 8-Br-cAMP による弛緩反応は腎動脈と総頸動脈で差がなかった。

(2) オルプリノン適用後に細胞内 cAMP 濃度を免疫抗体法により測定した結果、細胞内 cAMP 増加の程度は、総頸動脈に比べ腎動脈で大きかった。

(3) ホスホジエステラーゼⅢの特異抗体を用いたウェスタンブロッティング法により測定したホスホジエステラーゼⅢの発現の程度は、腎動脈に比べ総頸動脈の方が大きかった。

以上より、本論文は、オルプリノンの血管拡張作用には臓器特異性が存在し、その原因は c-AMP に対する臓器血管の反応性の違いではなく、ホスホジエステラーゼⅢの発現の程度によることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第859号		
学位授与の日	平成22年12月14日		
氏名	富岡恵子		
学位論文の題目	The Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid in Cerebral Arteriolar Constriction and the Inhibitory Effect of Propofol (20-HETE が脳実質内細動脈へ及ぼす作用とプロポフォールによる修飾効果に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡史郎	
	副査	教授 近藤稔和	教授 畑埜義雄

論文内容の要旨

背景

20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (20-HETE) はチトクローム P450 によってアラキドン酸より合成される強力な脳血管収縮物質であり、脳血流の調節に関わっている。しかし、この内因性物質が、神経活動に伴う脳微小血管収縮に役割を果たしているか、また、NADPH オキシダーゼを介する酸化ストレスが本物質による脳血管反応性制御に関与するかについては明らかでない。一方、プロポフォールはビタミン E と化学構造が類似しており、フリーラジカル捕捉作用によって酸化ストレスを減弱させる可能性が示唆されているが、プロポフォールが脳血管で活性酸素制御に寄与するか否かは検討されていない。

本研究では、1) 神経伝達を介して放出された内因性 20-HETE あるいは直接適用した 20-HETE が脳実質内微小血管を収縮させるかどうか、2) その収縮反応が NADPH オキシダーゼを介する活性酸素産生によって引き起こされるかどうか、3) 臨床使用濃度のプロポフォールが 20-HETE による脳血管収縮反応を抑制するかどうか、4) プロポフォールが 20-HETE 適用で増大した脳スライス中の活性酸素レベルを減弱させるかどうか、5) プロポフォール が活性酸素レベルを減少させる機序は、NADPH オキシダーゼ活性抑制を介するか、あるいは活性酸素の直接捕捉によるのか、について明らかにすることを目的とした。

対象と方法

血管径変化の観察

ハロタン麻酔下に雄ウイスターラット(16-20週)の脳を摘出し、組織スライサー(LEICA VT1000S, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany)を用い、厚さ約150µmの新皮質を含む脳スライス標本を作成した。スライス標本を観察用の容器に入れ、酸素93%+炭酸ガス7%(コントロール:PCO₂=40mmHg、pH=7.4)で飽和した人工脳脊髄液(NaCl 119, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.17, KH₂PO₄ 1.18, NaHCO₃ 25, glucose 5.5 mmol/L)で持続灌流した。コンピュータに接続した顕微鏡で新皮質内の細動脈(内径4.9-12.5µm)を観察し、血管径の変化をコンピュータ上で専用の画像解析ソフト(Physio-Tech)を用いて測定した。

微小電極を脳スライスに刺入後、電気刺激(100、400、800µAで20秒間)を行い動脈の収縮反応を観察した。あるいは、20-HETE(10⁻⁸-10⁻⁶mol/L)を累積適用し脳実質内細動脈を収縮させた。さらに、Na⁺チャンネル拮抗薬テトロドトキシン(10⁻⁶mol/L)、20-HETE合成酵素阻害薬HET0016(10⁻⁶mol/L)、活性酸素捕捉剤Tiron(10mmol/L)、NADPHオキシダーゼ阻害薬DPI(10⁻⁶mol/L)あるいはプロポフォール(3×10⁻⁷, 10⁻⁶mol/L)処置が、これらの血管反応に及ぼす影響を検討した。

活性酸素産生量の測定

ヒドロエチジン(2×10⁻⁶mol/L)をpH7.4の37°Cリン酸緩衝液に溶解し脳スライス標本に20分間適用後、共焦点顕微鏡(オリンパス社製FLUOVIEW FV300、585-nm long-pass filter)を用いて、活性酸素が核内に捕捉され発生した赤色の蛍光強度を測定した。

20-HETE(10⁻⁶mol/L)20分間適用で産生される活性酸素量の測定のほか、活性酸素捕捉剤Tiron(10mmol/L)、NADPHオキシダーゼ阻害薬gp91ds-tat(10⁻⁶mol/L)、gp91de-tatのネガティブコントロール薬sgp91ds-tat(10⁻⁶mol/L)、あるいはプロポフォール(10⁻⁶mol/L)の追加適用が20-HETE(10⁻⁶mol/L)で産生される活性酸素量に及ぼす影響を検討した。活性酸素量は、ヒドロエチジン(2×10⁻⁶

mol/L) と Tiron (10 mmol/L) をスライス標本に適用した時に発生する蛍光強度を分母とした比で表現した。

Cell-free(無細胞実験系)活性酸素産生システムを用いた活性酸素捕捉作用の評価

キサランチン (10^{-4} mol/L) にキサランチンオキシダーゼ (0.02 U/ml) 適用後に産生される活性酸素をチトクローム c (5×10^{-5} mol/L) 還元法 (酸化型および還元型の吸光度変化を使用) により測定した。活性酸素産生率は活性酸素分解酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (1500 U/ml) の存在下あるいは非存在下の差を調べた。プロポフォル (3×10^{-7} 、 10^{-6} 、 3×10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) を適用し、活性酸素産生率に及ぼす影響を検討した。

結果

脳実質内細動脈は、400 μ A での電気刺激中最大 8%収縮した。テトロドトキシン、HET0016、Tiron、DPI、およびプロポフォルは電気刺激中の収縮反応を抑制した。また、20-HETE による脳実質内細動脈の収縮は、Tiron、DPI およびプロポフォルで抑制された。

脳スライスの活性酸素産生は、Tiron、gp91ds-tat およびプロポフォルで抑制された。Cell-free 活性酸素産生システムにおいてプロポフォルは活性酸素の産生率を変化させなかった。

考察

Na⁺チャンネル拮抗薬テトロドトキシンあるいは 20-HETE 合成酵素阻害薬 HET0016 処置により、脳スライスの電気刺激による脳実質内細動脈収縮反応は抑制された。したがって、神経伝達を介して収縮反応が引き起こされることが示唆された。

脳スライスの電気刺激 (内因性 20-HETE と考えられる) あるいは 20-HETE 累積適用 (外因性 20-HETE) による脳実質内細動脈収縮反応は、活性酸素捕捉剤 Tiron、NADPH オキシダーゼ阻害剤 DPI によって抑制された。また、脳スライスでは、20-HETE により活性酸素が増加し、この増加は Tiron、NADPH オキシダーゼ阻害剤 gp91ds-tat によって同様に抑制された。したがって、20-HETE は NADPH オキシダーゼを介して活性酸素を産生させ、脳実質内細動脈を収縮させることが示唆された。

プロポフォルは、Tiron や DPI と同様、内因性および外因性 20-HETE による血管収縮反応を減弱させた。本静脈麻酔薬は、脳スライスでは 20-HETE 適用による活性酸素レベルを抑制したが、Cell-free システムで活性酸素産生率を変化させなかった。したがって、プロポフォルは活性酸素捕捉ではなく、NADPH オキシダーゼ酵素活性を減弱させる結果、活性酸素産生を低下させ、20-HETE による収縮反応を抑制すると考えられる。

結論

20-HETE は NADPH オキシダーゼを介して活性酸素を産生させ、脳実質内細動脈を収縮させることが明らかになった。臨床使用濃度のプロポフォルは、NADPH オキシダーゼ抑制を介し活性酸素産生を低下させることで、20-HETE による収縮反応を減弱することが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 22 年 11 月 19 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。

20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) はチトクローム P450 によってアラキドン酸より合成される強力な脳血管収縮物質であり、脳血流の調節に関わっている。20-HETE は肺血管内皮細胞で NADPH オキシダーゼにより活性酸素を産生させることが報告されているが、この内因性物質が、神経活動に伴う脳微小血管収縮に役割を果たしているか、また、NADPH オキシダーゼを介する酸化ストレスが本物質による脳血管反応性制御に関与するかについては明らかでない。一方、プロポフォルはビタミン E と化学構造が類似しており、フリーラジカル捕捉作用によって酸化ストレスを減弱させることが示唆されているが、プロポフォルが脳血管で活性酸素を低下させるか否かは明らかでない。

本研究では、厚さ約 150 μ m の新皮質を含む脳スライスを用い、脳実質内細動脈の内径変化および活性酸素量の測定を行った。また、Cell-free(無細胞実験系)活性酸素産生システムを用い、プロポフォルの活性酸素捕捉作用の評価を行った。

その結果、

1. 脳実質内細動脈は、400 μ Aでの電気刺激により収縮した。この収縮反応はNa⁺チャンネル拮抗薬テトロドトキシン、20-HETE合成酵素阻害薬 HET0016、活性酸素捕捉剤 Tiron、NADPH オキシダーゼ阻害剤 DPIにより完全に抑制された。また、20-HETE 直接適用による脳実質内細動脈の収縮は、Tiron および DPI によって完全に抑制された。プロポフォル (3 \times 10⁻⁷、10⁻⁶mol/L) は電気刺激 (内因性) および 20-HETE 直接適用 (外因性) による収縮反応を濃度依存性に有意に抑制した。
2. 脳スライスの活性酸素産生は、Tiron、NADPH オキシダーゼ阻害剤 gp91ds-tat およびプロポフォルで有意に抑制された。Cell-free 活性酸素産生システムにおいてプロポフォルは活性酸素の産生率を変化させなかった。

以上の結果より、20-HETE は NADPH オキシダーゼを介して活性酸素を産生させ、脳実質内細動脈を収縮させることが明らかになった。臨床使用濃度のプロポフォルは、NADPH オキシダーゼ抑制を介し活性酸素産生を低下させることで、20-HETE による収縮反応を減弱することが明らかにされた。本論文は 20-HETE による脳微小血管収縮の機序を解明したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第860号		
学位授与の日	平成22年12月14日		
氏名	岩崎 博		
学位論文の題目	Efficacy and limitations of current methods of intraoperative spinal cord monitoring (現在用いられている術中脊髄機能モニタリングの有用性とその限界)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 智善	
	副査	教授 金桶 吉起	教授 吉田 宗人

論文内容の要旨

脊椎脊髄手術に際し、脊髄障害を未然に防ぐ目的で術中脊髄機能モニタリングが広く用いられている。脊髄誘発電位および複合筋活動電位を用いた現在のモニタリング法の有用性およびその限界を評価する目的で、当科で行った15年間716例の術中脊髄機能モニタリング症例を後ろ向きに検討した。

1、モニタリング不能症例

刺激強度不足や technical failure は現時点では改善され、モニタリング可能となる可能性が高く、モニタリング不能症例は716例中重症例の18例2.5%と考えられる。FrankelBの脊髄損傷や日本整形外科学会頸髄症治療成績判定基準の下肢運動および知覚機能点数が0点である重症例は、現在の刺激および記録条件を用いたモニタリング方法の限界であった。

2、False negative, False positive 症例

脊髄砂時計腫の False negative 症例からは、脊髄神経根や脊髄実質が選択的に障害される可能性がある際には、索路を反映する電位はもとより Br(E)-MsEP (頭蓋刺激末梢筋記録) も神経根の障害を的確に表現できない場合があり、脊髄神経根や脊髄実質に対する選択的な障害のモニタリングが限界点と考えられた。

髄内腫瘍の False negative 症例では、単一のモニタリング方法だけを用いるのではなく、障害の生じる可能性のある脊髄内神経組織をできるだけ多く監視するために、複数のモニタリング方法を組み合わせて用いること (multimodality monitoring) が重要であることが判明した。

False positive の結果を示した症例では、単一の脊髄誘発電位のみでのモニタリングや同一記録電極から導出した脊髄誘発電位を用いてモニタリングを施行していたため、電位低下が technical error であるか否か判断不能であった。

3、モニタリングにより術中脊髄障害を回避できた症例

True negative 症例中明らかな術中電位変化に対処することにより新たな脊髄障害を防ぐことが可能であった True negative 症例は652例中7例であった。予防し得たこの7例中6例は2種類以上の方法を組み合わせた multimodality monitoring を行うことにより、障害を早期に発見しえた。また、脊髄障害を検知し得たモニタリング方法も、症例やその際の手術操作により異なっていた。

2.3の結果より、電位変化が technical error であるか否かの判断・障害の生じる可能性のある脊髄内神経組織の監視・脊髄障害早期発見のために multimodality monitoring が重要であることが判明した。

4、モニタリング成績

本研究におけるモニタリング成績は True negative97.0%, True positive1.8%, False negative0.6%, False positive0.6%, Sensitivity75.0%, Specificity99.4%, Negative predict value99.4%であった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成22年11月26日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

今回の研究のように多数の症例において、脊髄誘発電位を用いた術中脊髄機能モニタリングの成績を詳細に検討した報告はみられない。今回の結果より脊髄誘発電位および複合筋活動電位を用いた現在の術中脊髄機能モニタリング法の有用性およびその限界ならびに注意点が明らかとなり、術中脊髄機能モニタリングを施行することにより今後さらに安全に脊椎・脊髄手術を行うことが可能となることを示唆したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第861号		
学位授与の日	平成22年12月14日		
氏名	島 友子		
学位論文の題目	Disappearance of glomerular IgA deposits in childhood IgA nephropathy showing diffuse mesangial proliferation after 2 years of combination/prednisolone therapy. (2年間のプレドニゾロン、カクテル治療後にメサンギウム IgA 沈着が消失したびまん性メサンギウム増殖を示す重症小児 IgA 腎症の臨床病理学的意義の検討)		
論文審査委員	主査	教授 村 垣 泰 光	
	副査	教授 重 松 隆	教授 吉 川 徳 茂

論文内容の要旨

【緒言】

IgA 腎症は 1968 年にフランスの Berger と Hinglais により初めて報告された IgA が糸球体メサンギウム領域に沈着することを特徴とする糸球体腎炎である。小児、成人において最も頻度の高い慢性糸球体腎炎であり、末期腎不全の主要原因となっている。

これまで、小児期発症 IgA 腎症の予後は良好であると考えられてきたが、近年長期予後は不良であることが明らかになってきた。予後不良因子は、初回腎生検時の高度蛋白尿、腎生検組織におけるメサンギウム増殖の程度の強いもの（びまん性メサンギウム増殖）である。

本邦では小児領域においては 1990 年頃から積極的に治療がなされ、巣状メサンギウム増殖を示す軽症 IgA 腎症にはアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン II 受容体拮抗薬が使用され、びまん性メサンギウム増殖を示す重症 IgA 腎症においては 2 年間のプレドニゾロン単独又はプレドニゾロン＋免疫抑制薬（アザチオプリンまたはミゾリビン）＋ワーファリン＋ジピリダモールを用いた多剤併用治療が施行されるようになった。

成人においては治療後メサンギウムの IgA 沈着が消失した例はほとんどないとされるが、プレドニゾロン単独または多剤併用治療を行った重症小児 IgA 腎症では治療後メサンギウムの IgA 沈着が消失する例がしばしばみられる。しかし、その頻度や臨床病理学的意義については不明である。

【目的】

重症 IgA 腎症におけるメサンギウムの IgA 沈着消失の臨床病理学的意義を明らかにする。

【対象及び方法】

1990 年 1 月から 2004 年 10 月の間に 1) 初回腎生検時 18 歳未満、2) びまん性メサンギウム増殖を示す新規重症小児 IgA 腎症と診断、3) 2 年間のプレドニゾロン単独もしくは多剤併用治療を施行、4) 2 年治療後再生検施行、の全ての基準を満たした 124 名について後方視的に検討を行った。

初回腎生検の適応は血尿を伴う蛋白尿（早朝尿蛋白/クレアチニン比 0.2g/g 以上）が持続する症例で、エコーガイド下で経皮的に施行し、2 年治療後の腎生検も行った。

IgA 腎症の診断は全身疾患を除外後、糸球体メサンギウムへの IgA の単独もしくは優位な沈着をもって診断した。びまん性、巣状の区別は WHO の診断基準に則った。びまん性メサンギウム増殖とは中等度から高度のメサンギウム増殖を示す糸球体比率が 80%を超えるものと定義した。診断は 1 名の病理医が同じ診断基準に沿って診断した。

治療はプレドニゾロン単独もしくは多剤併用治療（プレドニゾロン＋アザチオプリン、または、ミゾリビン＋ワーファリン＋ジピリダモール）のどちらかの治療を行った。

統計解析には JMP Ver.7 を使用した。

【結果】

- 1) 124 名中 IgA 沈着が消失した例は 27 名(21.8%)であった。
- 2) 治療前の臨床所見で両群に有意差は認めなかった。
- 3) 治療前病理所見では IgA 消失群において有意に半月体、硬化糸球体比率が少なく、IgA 消失群の方が組織学的に軽症であると言える。

- 4) 2年治療の効果については、臨床所見、病理所見の何れも両群で有意に軽快し有効であった。
- 5) 2年治療後の臨床所見の比較では、IgA 消失群において蛋白尿、血尿が有意に少なく、同じ治療に対しても改善度が高いと言える。
- 6) 2年治療後の病理所見の比較では、IgA 消失群において、硬化糸球体、半月体、癒着糸球体が有意に少なかった。
- 7) IgA 沈着消失に関与する因子は単変量、多変量共に2年治療終了時の尿蛋白の程度が最も有意であった。
- 8) 長期予後に関しては、IgA 消失群において有意に蛋白尿消失維持期間が長く、蛋白尿消失維持期間を規定する因子は単変量、多変量共にIgA 沈着消失が有意であった。

【考察】

これまでIgA腎症患者ではメサンギウムIgA沈着の消失はないとされてきたが、小児においては約21.8%の患児において認められた。これまでの自験例では、ワーファリンとジピリダモールのみでプレドニゾロンや免疫抑制薬を使用しない症例ではIgA消失例はないので、プレドニゾロン及び多剤併用治療を受けた為に消失したと考えられる。

同じびまん性メサンギウム増殖を示す重症IgA腎症患者においても、IgA消失群はより軽症であり、蛋白尿消失維持期間と有意な相関があり、予後が良いと考えられる。

しかし一旦IgA沈着が消失した患児の長期観察では、消失したIgA沈着が再沈着する症例もみられ、本疾患の再燃を考えるうえで興味深い。

【結論】

2年間のプレドニゾロンまたは多剤併用治療後、重症小児IgA腎症症例の21.8%においてIgA沈着消失を認めた。IgA消失群は同じびまん性メサンギウム増殖を示す重症小児IgA腎症でも臨床病理学的に軽症で予後良好であった。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成22年11月29日、学位審査担当者は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

IgA腎症は1968年にフランスのBergerとHinglaisによりIgAが糸球体メサンギウム領域に沈着することを特徴とする腎炎として初めて認識され、小児、成人において最も頻度の高い慢性糸球体腎炎であり、成人では末期腎不全の主要原因となっている。

小児期発症IgA腎症の予後は良好であると考えられてきたが、近年長期予後は不良であることが明らかになっており、その予後不良因子は、初回腎生検時の高度蛋白尿、腎生検組織所見ではメサンギウム増殖の程度の強いもの（びまん性メサンギウム増殖）である。

1990年より日本では主に小児領域で、巣状メサンギウム増殖を示す軽症IgA腎症症例にACEI及びARBを、びまん性メサンギウム増殖を示す重症IgA腎症症例に2年間のプレドニゾロン単独又はプレドニゾロン+免疫抑制剤（アザチオプリンやミゾリビン）+ワーファリン+ジピリダモールを用いたカクテル治療を行っている。成人において、治療後メサンギウムのIgA沈着が消失した例は殆どないとされるが、プレドニゾロン単独またはカクテル治療を行った重症小児IgA腎症症例では治療後メサンギウムのIgA沈着が消失する例がしばしば見受けられる。しかし、その頻度や臨床病理学的意義については未だ不明であるため、1990年1月から2004年10月の間に1)初回腎生検時18歳未満、2)びまん性メサンギウム増殖を示す新規重症小児IgA腎症と診断、3)2年間のプレドニゾロン単独もしくはカクテル治療を施行、4)2年治療後再生検、の全ての基準を満たした124名について後方視的に検討を行った。

今回の検討で、小児IgA腎症患者においては21.8%の患児においてメサンギウムのIgA沈着消失が認められた。これまでの経験から、ワーファリン、ジピリダモール等のPSLや免疫抑制剤を使用しない症例では消失例はないので、PSL及びカクテル治療を受けた為に消失したと考えられた。

同じびまん性メサンギウム増殖を示す重症小児IgA腎症患者において、IgA消失群は治療前臨床所見に差はないものの、病理所見における硬化糸球体、半月体が非消失群に比べて有意に少ないことから、より軽症であり、蛋白尿消失期間が有意に長く予後が良いと考えられた。

しかし一旦IgA沈着が消失した患児の長期観察では、消失したIgA沈着が再沈着する症例も確認されており、IgA沈着消失が必ずしもIgA腎症の完治を意味するものではないと言う事も認識しておくべきである。

以上より本論文は小児IgA腎症におけるメサンギウムIgA沈着消失の臨床病理学的意義を検討した初めての論文であり、学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第862号		
学位授与の日	平成23年1月11日		
氏名	峠 弘		
学位論文の題目	Angiogenesis in renal cell carcinoma : The role of tumor-associated macrophages (腎細胞癌における血管新生：腫瘍関連マクロファージの役割)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 山上 裕機	教授 原 勲

論文内容の要旨

【緒言】 hypervascular tumor である腎細胞癌の再発予後と血管新生因子の関係を検討し、再発予測因子を検証するために、腎摘除組織内の血管新生因子の関与について検討した。

【方法】 組織学的に腎細胞癌と確認された 51 例を対象に血管新生因子に関して、pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase)、血管内皮増殖因子 (VEGF) を測定し再発予後との関係を検討した。微小血管密度 (MVD) に関しては血管マーカーである第Ⅷ因子と CD34 を免疫染色し、腫瘍組織内に発生した微小血管と再発予後との関係を検討した。また、腫瘍血管新生に腫瘍関連マクロファージ (TAM) の浸潤が関与し、予後にも影響していると報告されていることから、マクロファージを CD68 で免疫染色してその存在を検証し、PyNPase・VEGF、MVD との相互の関係についても検討した。

【結果】

(1)PyNPase は血管造影所見で有意に上昇し($p < 0.05$)、VEGF は診断契機 (症候性) ・成長タイプ (inter/rapid stype) ・血管造影所見 (hypervascularity) ・腫瘍最大径 (7 cm 以上) ・異型度 (grade 3) ・腫瘍浸潤様式 (INF8) で有意な高値を示した($p < 0.05$)。

(2)腎細胞癌組織内の第Ⅷ因子の MVD が有意に上昇していた臨床的因子や組織学的因子はみられなかったが、腫瘍最大径 (7 cm 以上) ($p = 0.06$) ・細胞型 (淡明細胞) ($p = 0.06$) では MVD の増加傾向がみられた。CD34 の MVD では診断契機 (症候性) ・細胞型 (淡明細胞) ・構築型 (胞巢型) ・異型度 (grade 3) ・pT stage (pT3/4) ・腫瘍浸潤様式において MVD 有意に低下した($p < 0.05$)。

(3)TAM は診断契機 (症候性) と腫瘍最大径 (7 cm 以上) ・pT stage (pT3/4) で有意に増加し($p < 0.05$)、成長タイプ (inter/rapid stype) で TAM の増加傾向がみられた($p = 0.08$)。

(4)再発に関して血管新生因子・MVD・TAM で検討した結果、VEGF および TAM が有意に高値であった($p < 0.05$)。Kaplan-Meier 法で非再発曲線を算定し、log-rank 検定を行った結果、ともに有意な結果であった($p < 0.05$)が、多変量解析を行った結果、有意な因子は確認されなかった。

(5)これらの因子の相関に関して検討した結果、TAM と第Ⅷ因子で有意な相関が確認された。また、VEGF と PyNPase、CD34 と TAM、第Ⅷ因子と CD34、VEGF と第Ⅷ因子で相関傾向がみられた。一方、VEGF と CD34 および TAM において相関は確認されなかった。

【考察】 腎癌が進展していく上で血管新生因子が重要であり、血管新生において腫瘍血管が幼弱な血管から成熟していく過程が認められ、その過程で TAM の役割が重要であり、再発に強く影響していることが示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 22 年 12 月 6 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。hypervascular tumor である腎細胞癌の再発予後と血管新生因子の関係を検討し、再発予測因子を検証するために、腎摘除組織内の血管新生因子の関与について検討した。組織学的に腎細胞癌と確認された 51 例を対象に血管新生因子に関して、pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase)、血管内皮増殖因子 (VEGF) を測定し再発予後との関係を検討した。微小血管密度 (MVD) に関しては血管マーカーである第Ⅷ因子と CD34 を免疫染色し、腫瘍組織内に発生した微小血管と再発予後との関係を検討した。また、腫瘍血管新生に腫瘍内マクロファージ (TAM) の浸潤が関与し、予後にも

影響していると報告されていることから、マクロファージを CD68 で免疫染色してその存在を検証し、PyNPase・VEGF、MVD との相互の関係についても検討した。

結果は PyNPase は血管造影所見で有意に上昇し ($p < 0.05$)、VEGF は診断契機 (症候性) ・成長タイプ (inter/rapid stype) ・血管造影所見 (hypervascularity) ・腫瘍最大径 (7 cm 以上) ・異型度 (grade 3) ・腫瘍浸潤様式 (INF8) で有意な高値を示した ($p < 0.05$)。腎細胞癌組織内の第 VIII 因子の MVD が有意に上昇していた臨床的因子や組織学的因子はみられなかったが、腫瘍最大径 (7 cm 以上) ($p = 0.06$) ・細胞型 (淡明細胞) ($p = 0.06$) では MVD の増加傾向がみられた。CD34 の MVD では診断契機 (症候性) ・細胞型 (淡明細胞) ・構築型 (胞巣型) ・異型度 (grade 3) ・pT stage (pT3/4) ・腫瘍浸潤様式において MVD 有意に低下した ($p < 0.05$)。TAM は診断契機 (症候性) と腫瘍最大径 (7 cm 以上) ・pT stage (pT3/4) で有意に増加し ($p < 0.05$)、成長タイプ (inter/rapid stype) で TAM の増加傾向がみられた ($p = 0.08$)。再発に関して血管新生因子・MVD・TAM で検討した結果、VEGF および TAM が有意に高値であった ($p < 0.05$)。Kaplan-Meier 法で非再発曲線を算定し、log-rank 検定を行った結果、ともに有意な結果であった ($p < 0.05$) が、多変量解析を行った結果、有意な因子は確認されなかった。これらの因子の相関に関して検討した結果、TAM と第 VIII 因子で有意な相関が確認された。また、VEGF と PyNPase、CD34 と TAM、第 VIII 因子と CD34、VEGF と第 VIII 因子で相関傾向がみられた。一方、VEGF と CD34 および TAM において相関は確認されなかった。

本論文は、腎癌が進展していく上で血管新生因子が重要であり、血管新生において腫瘍血管が幼弱な血管から成熟していく過程を示唆している。また、その過程で TAM の役割が重要であり、再発に強く影響していることが示唆されている。今日の腎癌に対する分指標的治療薬の効果の基礎をなす報告であり、さらに腎癌における TAM の影響を検討した研究報告としては興味深いものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第863号		
学位授与の日	平成23年1月11日		
氏名	西林宏起		
学位論文の題目	Cortically Evoked Responses of Human Pallidal Neurons Recorded during Stereotactic Neurosurgery (定位脳手術における皮質刺激による淡蒼球神経細胞応答に関する研究)		
論文審査委員	主査	教授 近藤智善	
	副査	教授 仙波恵美子	教授 板倉徹

論文内容の要旨

【緒言】大脳基底核は入力核の線条体、淡蒼球外節・内節(external segment of globus pallidum: GPe, internal segment of globus pallidum: GPi)を含む神経回路を形成して運動調節に関係している。GPiからの出力は視床を介して大脳皮質運動野に伝達され、再び大脳基底核にフィードバックされる。不随意運動に対して、GPiや視床下核(subthalamic nucleus: STN)を標的核とした脳深部刺激術(deep brain stimulation: DBS)が適用されている。GPiはSTNと比べて大きな核であり、運動関連領域の他に眼球運動、前頭前野、辺縁系などの体性局在が存在するといわれている。サルでは大脳皮質運動野電気刺激により、GPiにおいて大脳皮質-STNのhyperdirect pathwayによる興奮性入力、次いでdirect pathwayによる抑制性入力、さらに興奮性入力へと続く三相性の応答を示すことが確かめられている。著者は、この手法を不随意運動の定位脳手術に応用し、皮質運動野刺激に応答を示す淡蒼球運動関連細胞を同定することで他の回路に影響を及ぼさない、より精密なtargetingが得られるかを検討した。また、記録された淡蒼球神経細胞の応答様式について、パーキンソン病と痙性斜頸について比較検討を行い、不随意運動の発現機序およびDBSの作用機序について考察した。

【対象と方法】GPi-DBSを施行したパーキンソン病10例、痙性斜頸1例を対象とした。局所麻酔下に患者に定位手術用フレームを装着し、CT、MRI画像融合あるいは脳室造影によってtentative targetを後腹側淡蒼球内節に設定した。穿頭孔から硬膜下電極を一次運動野(primary sensorimotor area: MI)の手の領域を目標に滑り込ませ、対側上肢にtwitchが出現しやすい電極、極性を選択し、MI刺激用の双極電極とした。刺激条件を1 Hz、1.0 msecの単発刺激とし、刺激強度を4-16 mAに設定した。同一の穿頭孔より微小電位記録用電極を刺入し、淡蒼球の単一神経活動電位が出現するごとにMI刺激を少なくとも20回(平均43回)施行した。刺激前後のヒストグラムを作成し、淡蒼球神経細胞の応答様式を検討した。また、自然発射の平均発射頻度、発射パターンを分析した。この方法については和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得た。

【結果】11症例27trackにおいて137個(GPe: 56, GPi: 81)の淡蒼球単一神経活動電位を記録した。そのうち、49個(GPe: 22/56, GPi: 27/81)で皮質刺激応答を認めた。三相性の興奮・抑制・興奮以外に、単相性の抑制、単相性の興奮、二相性の抑制・興奮あるいは興奮・抑制などの亜型を認めた。皮質刺激に応答を示す神経細胞は主にGPeの腹側、GPiの背側、腹側部に認められた。痙性斜頸においてパーキンソン病に比して有意なGPi抑制の潜時延長($P < 0.01$, t -test)、GPe、GPi抑制の持続時間の延長($P < 0.05$, t -test)を認めた。自然発射が記録された淡蒼球神経細胞71個(GPe: 28, GPi: 43)の検討の結果、平均発射頻度はGPe、GPiともにパーキンソン病において有意に高く($P < 0.05$, t -test)、burstもしくはoscillatory burstの発射パターンがパーキンソン病のGPeで94%、GPiで68%、痙性斜頸のGPeで100%、Gpiで78%を占めた。GPi-DBS後、パーキンソン病におけるunified Parkinson's disease rating scale III and IV(item 18-35) scoreは全例で改善し、特に4例でscore 10以上の顕著な改善を示した。また、痙性斜頸においても斜頸の改善を認めた。症状改善に最も有効な刺激電極は皮質刺激に応答する神経細胞が記録された部位の近傍であった。

【考察】不随意運動症患者のGPi-DBSにおいて、淡蒼球運動関連細胞を記録する手法で至適targetを同定できる可能性が示唆された。パーキンソン病と痙性斜頸にみられる皮質刺激応答の抑制時間の相違は、パーキンソン病におけるGPiへのdirect pathwayを介した抑制の低下、および痙性斜頸における線条体の機能亢進を示唆するものと考えられた。異なる両疾患でDBSが効果を示す機序として、Gpiの発射頻度の抑制以外に発射パターンの修飾が考えられた。

【結論】 GPi-DBS における GPi の至適 target を同定する方法として、一次運動野刺激による淡蒼球神経応答を指標とする新たな手法を開発した。この手法によって得られる結果から、さらに不随意運動発現のメカニズムが解明されることが期待できる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 22 年 12 月 21 日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、論文内容について審査を行った。

不随意運動症に対する定位脳手術は、脳深部組織の破壊を極力少なくする電気刺激療法に移行している。げっ歯類や霊長類において、皮質刺激による大脳基底核神経細胞の応答に関する研究があり、大脳基底核には運動系、眼球運動系、辺縁系などの機能単位で神経回路が構築されており、その体性局在も確認されている。本研究では、不随意運動症患者の大脳基底核の運動回路を同定して、より効果的な脳深部電気刺激術を行うことを目的とし、ヒトで初めて一次運動野電気刺激に対する淡蒼球神経細胞の応答を記録した。その応答様式や記録された部位、刺激電極との関係、臨床効果をパーキンソン病と痙性斜頸について検討し、以下の結果を得た。

皮質刺激による応答様式として、三相性の興奮・抑制・興奮などが認められた。応答が記録された部位は GPe の腹側、GPi の背側、腹側であった。痙性斜頸ではパーキンソン病に比して GPe、GPi 抑制の持続時間が有意に延長していた。自然発射については、痙性斜頸に比してパーキンソン病で有意に平均発射頻度が高く、両者において burst もしくは oscillatory burst の群発放電を示すものが大半を占めた。GPi-DBS 後、パーキンソン病および痙性斜頸の臨床症状は改善した。症状改善に最も有効な刺激電極は、皮質刺激に応答する神経細胞が記録された部位に隣接する傾向がみられた。

以上の結果より、ヒトにおいても動物実験で示されているような大脳皮質-大脳基底核を介した運動回路を介して、淡蒼球神経細胞に興奮や抑制性入力時間が時間差をもってもたらされることが明らかにされた。応答が記録された神経細胞の局在が淡蒼球内節背側、腹側に認められたことは、DBS の効果が淡蒼球内節背側と腹側で高いことを裏付ける所見といえる。パーキンソン病と痙性斜頸にみられる皮質刺激応答の抑制時間の相違は、パーキンソン病における GPi への direct pathway を介した抑制の低下、および痙性斜頸における線条体機能の亢進を示唆し、各不随意運動の発現メカニズムに更なる知見をもたらした。GPi 神経細胞の平均発射頻度が増加するパーキンソン病と、低下する痙性斜頸の両方に DBS が効果をもたらす機序として、発射頻度の rate control だけでなく、burst や oscillatory burst などの群発放電を修飾する機序が考えられた。

以上の結果は、不随意運動症に対する脳深部刺激術の機序として新しい知見を提供したものであり、学位論文として価値あるものと認定された。

学位記番号	博(医)乙第864号		
学位授与の日	平成23年2月8日		
氏名	羽場 政法		
学位論文の題目	Beneficial effect of propofol on arterial adenosine triphosphate-sensitive K ⁺ channel function impaired by thromboxane. (プロポフォールはトロンボキサンで障害された血管平滑筋 ATP 感受性カリウムチャンネル機能を回復させる。)		
論文審査委員	主査	教授 近藤 稔和	
	副査	教授 岸岡 史郎	教授 畑 埜 義雄

論文内容の要旨

[背景]

ATP 感受性カリウムチャンネルは炎症時の血管拡張反応に関与することが知られている。炎症時に遊離される生理活性物質の一つであるトロンボキサンが、血管平滑筋 ATP 感受性カリウムチャンネル機能を変化させるかどうかは未だ明らかでない。NADPH オキシダーゼは血管平滑筋での活性酸素産生機序として重要なものの一つである。しかし、トロンボキサンが血管平滑筋の NADPH オキシダーゼ活性を介して活性酸素を産生させるか否か、また、そのとき産生された活性酸素が血管平滑筋 ATP 感受性カリウムチャンネル機能を変化させるか否かについては知見がない。プロポフォールはその構造がビタミン E と類似し、活性酸素以外の活性酸素種に対して捕捉作用があることが示唆されている。しかし、プロポフォールが血管で発生した酸化ストレス反応を抑制する作用の機序については不明な点が多い。さらに、この静脈麻酔薬が、NADPH オキシダーゼ活性により抑制された ATP 感受性カリウムチャンネル機能を回復させる否かは検討されていない。本研究では、トロンボキサン受容体刺激が活性酸素産生を介して血管平滑筋 ATP 感受性カリウムチャンネル機能を抑制するか否か、このチャンネル機能抑制に NADPH オキシダーゼ活性が関与するか否か、プロポフォールがこれらの酸化ストレスを軽減し ATP 感受性カリウムチャンネル機能を回復させるか否か、さらに、そのプロポフォールに NADPH オキシダーゼ活性抑制作用があるか否かを明らかにすることを目的とした。

[対象と方法]

Wistar ラット (雄 16-20 週) をハロタン 3% 吸入 (100% 酸素 3 L/分) で麻酔下に脱血死させ、速やかに胸部下行大動脈を摘出した。以下、大動脈の血管内皮を機械的に除去して全ての実験に用いた。張力変化測定、膜電位測定、活性酸素量測定および Western blotting 法で、それぞれ、2.5mm 長のリング状標本、5 mm 長の切り開いた標本、スライサーで凍結血管から作成した厚さ 20 μm のリング状標本および 30 mm 長の冊状標本を用いた。

(1) 等尺性張力変化の測定

酸素 95% および 炭酸ガス 5% で飽和した 37°C に加温したリンゲル液 (NaCl 118.2 mmol/L、KCl 4.6 mmol/L、NaHCO₃ 24.8 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、MgSO₄ 1.2 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、dextrose 10 mmol/L) で満たしたマグヌス管内で、リング状標本を張力トランスデューサーに接続し 1.5g の静止張力を付加した。最大張力のおよそ 80% の収縮反応を引き起こす α 受容体作動薬フェニレフリンおよびトロンボキサン受容体刺激薬 U46619 の濃度を予備実験により明らかにした (それぞれ、 3×10^{-7} mol/L あるいは 3×10^{-8} mol/L であった)。これらのうちいずれかを適用し収縮反応が平衡に達したところで KATP 開口薬レブクロマカリムを 10^{-8} から 3×10^{-6} mol/L まで累積的に適用し血管弛緩反応を観察した。KATP 阻害薬グリベンクラミド (10^{-6} mol/L)、活性酸素捕捉剤 Tiron (10 mmol/L)、過酸化水素捕捉剤カタラーゼ (1200 U/ml)、キサンチンオキシダーゼ阻害薬アロプリノール (10^{-4} mol/L)、NADPH オキシダーゼ阻害薬アポシニン (1 mmol/L)、静脈麻酔薬プロポフォール (10^{-6} 、 3×10^{-7} mol/L) による前処置 (収縮薬適用の 20 分前) がレブクロマカリムによる弛緩反応に及ぼす影響を検討した。

(2) 膜電位の測定

観察チャンバー内に切り開いた血管の内腔側を上にして固定し、酸素 95% および炭酸ガス 5% で

飽和した37°Cリンゲル液で灌流した。3 mol/L の KCl で満たしたガラス電極 (チップ抵抗 40 から 80 MW) を血管平滑筋に刺入し膜電位を測定した。この際、アンプは Electro 705 (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL) を用い、電位はレコーダー (SS-250F-1, SENKONIC Inc., Tokyo, Japan) で記録した。レブクロマカリム (10^{-7} mol/L) と U46619 (3×10^{-8} mol/L) あるいはフェニレフリン (3×10^{-7} mol/L) 同時適用時の膜電位を測定した。また、この膜電位に及ぼすグリベンクラミド (10^{-6} mol/L)、Tiron (10 mmol/L)、アポシニン (1 mmol/L) あるいはプロポフォール (10^{-6} mol/L) 同時適用による影響を検討した。

(3) 活性酸素量の測定

ヒドロエチジン (2×10^{-6} mol/L) を pH 7.4 の 37°C リン酸緩衝液に溶解し血管スライス標本に 20 分間適用した。ヒドロエチジンをリン酸緩衝液で洗浄後、共焦点顕微鏡 (オリンパス社製 FLUOVIEW FV300, 585-nm long-pass filter) を用いて、活性酸素が核内に捕捉され発生した赤色の蛍光強度を評価した。フェニレフリン (3×10^{-7} mol/L) あるいは U46619 (3×10^{-10} 、 3×10^{-9} 、 3×10^{-8} 、 3×10^{-7} mol/L) 20 分間適用で発生する活性酸素量の評価のほか、Tiron (10 mmol/L)、アポシニン (1 mmol/L)、TX 受容体阻害薬 SQ29548 (10^{-6} mol/L)、アロプリノール (10^{-6} mol/L) あるいはプロポフォール (3×10^{-7} 、 10^{-6} 、 3×10^{-6} mol/L) の追加適用が U46619 (3×10^{-8} mol/L) で発生する活性酸素量に及ぼす影響を検討した。活性酸素量は、ヒドロエチジン (2×10^{-6} mol/L) と Tiron (10 mmol/L) をスライス標本に適用した時に発生する蛍光強度を分母とした比で表現した。

(4) Western blotting 法による蛋白測定

酸素 95% および炭酸ガス 5% で飽和した 37°C リンゲル液で灌流した血管冊状標本をそれぞれ、フェニレフリン (3×10^{-7} mol/L)、U46619 (3×10^{-8} mol/L) あるいは U46619 (3×10^{-8} mol/L) + プロポフォール (10^{-6} mol/L) に 20 分間暴露後 -8°C で凍結した。液体窒素下に血管を粉碎し、0.1% Toriton X-100 を含む水冷無菌水 (1ml) に溶解した。溶解液は 600G、15 分、4°C で遠心分離を行い、上澄み液を全タンパク量測定に使用した。上澄み液の一部は 100000G、30 分、4°C で遠心分離を行い、その沈殿物を膜分画に使用した。使用した抗体は以下の通りである。すなわち、anti-NOX1、anti-NOX2、anti-NOX4、anti-p47phox (Upstate Cell Signaling, Lake Placid, NY)、anti-p22phox (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、anti-adaptin (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) ($1 \mu\text{g/ml}$) である。結果は、化学発光検知器 (Amersham GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) および NIH 画像ソフトにより解析した。

(5) 統計学的処理

繰り返し測定による群間の有意差検定には repeated measures ANOVA を用い、有意な場合、post-hoc テストとして Student-Newman-Keuls test を用いた。

[結果]

(1) 等尺性張力変化

フェニレフリン (3×10^{-7} mol/L) あるいは U46619 (3×10^{-8} mol/L) で収縮した血管をレブクロマカリムは濃度依存性に弛緩させ、グリベンクラミド (10^{-6} mol/L) はこれらの弛緩反応をほぼ完全に抑制した。レブクロマカリムによる弛緩反応は、フェニレフリン収縮血管と比べ U46619 収縮血管では減弱した。Tiron (10 mmol/L) は、レブクロマカリムによる血管弛緩反応を U46619 収縮血管で増強したが、フェニレフリン収縮血管では変化させなかった。カタラーゼ (1200 U/ml) は、U46619 およびフェニレフリン収縮血管いずれにおいてもこれらの弛緩反応に影響しなかった。プロポフォール (10^{-6} 、 3×10^{-7} mol/L) は、U46619 収縮血管では濃度依存性にレブクロマカリムによる血管弛緩反応を増強したが、フェニレフリン収縮血管ではこれを変化させなかった。アポシニン (1 mmol/L) は、U46619 収縮血管でのレブクロマカリムによる血管弛緩反応を増強したが、アロプリノール (10^{-4} mol/L) は変化させなかった。

(2) 静止膜電位

レブクロマカリム (10^{-7} mol/L) 存在下での膜電位はフェニレフリン (3×10^{-7} mol/L) 適用血管に対し、U46619 (3×10^{-8} mol/L) 適用血管で有意に高値であった ($-48.8 \pm 2.0\text{mV}$ 、 $-40.8 \pm 1.9\text{mV}$)。グリベンクラミド (10^{-6} mol/L) はフェニレフリンあるいは U46619 適用血管のいずれも同様に脱分極させた ($-34.8 \pm 1.3\text{mV}$ 、 $-36.2 \pm 1.1\text{mV}$)。レブクロマカリム (10^{-7} mol/L) 存在下での U46619 (3×10^{-8} mol/L) 適用血管の膜電位は、Tiron (10 mmol/L)、アポシニン (1 mmol/L)、プロポフォー

ル (10^{-6} mol/L)処置により過分極した。

(3) 活性酸素量

血管平滑筋内の活性酸素量は、フェニレフリン (3×10^{-7} mol/L) あるいは U46619 (3×10^{-10}) 適用標本と比較して、U46619 適用で濃度依存性 (3×10^{-9} 、 3×10^{-8} 、 3×10^{-7} mol/L) に増大した (Fig.6)。U46619 (3×10^{-8} mol/L) 適用血管では、Tiron (10 mmol/L)、アポシニン (1 mmol/L)、TX 受容体阻害薬 SQ29548 (10^{-6} mol/L) 処置は活性酸素量を減少させたが、アロプリノール (10^{-6} mol/L) はこれを変化させなかった。U46619 (3×10^{-8} mol/L) 適用血管では、プロポフォール (3×10^{-7} 、 10^{-6} 、 3×10^{-6} mol/L) は投与濃度依存性に活性酸素量を減少させた。

(4) Western blotting 法による蛋白発現

NADPH オキシダーゼサブユニット (p47phox、p22phox、NOX2、NOX1、NOX4) の細胞膜蛋白発現量は、フェニレフリン (3×10^{-7} mol/L) 適用血管では変化をしなかったが、U46619 (3×10^{-8} mol/L) 適用血管では p47phox の膜分画の発現が増大した。また、この p47phox の発現増大はプロポフォール (10^{-6} mol/L) 適用により抑制された。

[考察]

本研究では、Tiron (活性酸素捕捉剤) あるいはアポシニン (NADPH オキシダーゼ阻害薬) 処置により血管平滑筋での活性酸素産生は抑制され、ATP 感受性カリウムチャンネル機能は改善した。一方で、カタラーゼ (過酸化水素捕捉剤) およびアロプリノール (キサンチンオキシダーゼ阻害薬) は、ATP 感受性カリウムチャンネル機能を改善させなかった。したがって、トロンボキサン受容体刺激は、血管平滑筋の活性酸素レベルを増大させ、ATP 感受性カリウムチャンネル活性を抑制することが明らかとなった。また、トロンボキサン受容体刺激による血管平滑筋でのスーパーオキシド産生に NADPH オキシダーゼが関与していると考えられた。NOX2 タイプの NADPH オキシダーゼ活性化には、細胞基質サブユニットである p47phox が細胞膜上サブユニットである NOX2 および p22phox と結合することが必要である。本研究では、トロンボキサン受容体刺激により p47phox の血管平滑筋細胞膜への移動が認められ、すなわち、NOX2 タイプの NADPH オキシダーゼの活性化が示唆された。

本研究では、臨床使用濃度のプロポフォールが、トロンボキサン受容体刺激による ATP 感受性カリウムチャンネル機能不全を濃度依存性に回復させ、活性酸素量を減少させた。さらに、プロポフォールは、p47phox の平滑筋細胞膜への移動を完全に抑制した。これらの結果より、本血管モデルでは、臨床使用濃度内のプロポフォールは NOX2 タイプの NADPH オキシダーゼ阻害作用を持つものと考えられる。

[結語]

トロンボキサン受容体刺激は、血管平滑筋の NADPH オキシダーゼサブユニット p47phox を介して活性酸素を産生し ATP 感受性カリウムチャンネル機能を障害する。また、臨床使用濃度のプロポフォールは、p47phox 活性を阻害して、トロンボキサンで障害された ATP 感受性カリウムチャンネル機能を回復させる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成23年1月22日、論文審査担当者は学位請求者の出席を求め、上記学位論文について審査を行った。生理活性物質の一つであるトロンボキサンは強い血管平滑筋収縮作用を有している。トロンボキサンは培養肺動脈上皮や培養海綿体において活性酸素を産生することが知られ、また、活性酸素は血管拡張機構に影響していることが知られている。今回、われわれは、ラット大動脈摘出内皮除去標本を、トロンボキサン前処置し、KATP 開口薬レボクロマカリム惹起拡張作用に対する活性酸素の影響とその機構について検討した。また、静脈麻酔薬プロポフォールの影響についても検討した。方法として、①等尺性張力変化の測定②膜電位の測定③血管平滑筋内活性酸素量の測定④NADPH オキシターゼサブユニット蛋白量の測定を行った。その結果、(1)トロンボキサン前収縮血管において、活性酸素捕捉剤 Tiron、NADPH オキシターゼ阻害薬アポシニン、静脈麻酔薬プロポフォールは KATP チャンネル開口薬レボクロマカリム惹起拡張作用を増強した。(2)トロンボキサン前処置血管において、Tiron、アポシニン、プロポフォールは膜電位を過分極させた。(3)トロンボキサン処置は、血管平滑

筋の活性酸素レベルを濃度依存性に増大させ、Tiron、アポシニン、プロポフォルはその活性酸素量の増大を抑制した。(4)細胞膜分画でのNADPH オキシターゼサブタイプであるp47phox 蛋白はトロンボキサン投与によって有意に増加し、この増加をプロポフォルは抑制した。以上より、本論文は、トロンボキサン受容体刺激によるNADPH オキシターゼを介する活性酸素産生がATP 感受性カリウムチャンネル機能を障害すること、プロポフォルは、NADPH オキシターゼ活性を阻害して、トロンボキサンで障害されたATP 感受性カリウムチャンネル機能を回復させることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第865号		
学位授与の日	平成23年2月8日		
氏名	中村信男		
学位論文の題目	Electrocardiographic strain and endomyocardial radial strain in hypertensive patients (高血圧患者における心電図ストレイン波形と心内膜側ラディアルストレインとの関係)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 重松 隆	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

局所心筋機能を表す指標としてストレイン（歪み）があり、これは、ものが外力を受けて変形したときのその変形の度合いを表し、「変化した長さ/元の長さ」で計算される。近年開発された 2D Tissue Tracking (2DTT)法は、心エコーBモード動画像上で任意の局所心筋を連続的に追跡（Tracking）する方法であり、局所心筋のストレインを定量評価することができる。

高血圧患者において出現する心電図 ST-T 部のストレイン波形は、解剖学的左心室肥大の進行を示す指標であり、心電図ストレイン波形を有する症例は有しない症例と比較して、その予後は不良である。心電図ストレイン波形は、左心室重量の増加及び壁厚増加に伴って生じる心内膜側の線維化や虚血により出現すると考えられるが、心電図ストレイン波形の出現に伴った心内膜側局所心筋機能の変化については、いまだ検討されていない。

本研究では、高血圧患者における左室収縮時の壁厚増加を、ラディアルストレイン値として心内膜側、心外膜側それぞれの局所で評価し、心電図ストレイン波形の有無との関係について検討した。

【対象及び方法】

器質的心疾患を有しない、心駆出率 50%以上の、非高血圧例 9 名（コントロール群、A 群）及び高血圧例 42 名を対象とし、高血圧例は心電図ストレイン波形を有しない高血圧例 26 名（B 群）と心電図ストレイン波形を有する高血圧例 16 名（C 群）に分類した。従来からの標準的 2D 心エコー検査による評価に加えて、2DTT 法を用いて左室後壁の心内膜側ラディアルストレイン値および心外膜側ラディアルストレイン値の測定を行い、心外膜側ラディアルストレイン値に対する心内膜側ラディアルストレイン値の比（ラディアルストレイン比）を求めた。3 群間での比較により、心電図ストレイン波形の有無と心内膜側及び心外膜側ラディアルストレインとの関連性について検討を行なった。

【結果】

左心室壁厚、左心室重量及び心電図 SV1 + RV5 値は、A 群及び B 群と比較して、C 群で有意に大きかった。心外膜側ラディアルストレイン値は 3 群間で有意な差を認めなかったが、心内膜側ラディアルストレイン値(A 群 63.7±34.7% vs B 群 53.8±20.9% vs C 群 34.0±16.7%)及びラディアルストレイン比(2.5±0.5 vs 2.5±1.4 vs 1.4±0.6)は、C 群において、他の 2 群と比較して有意に低下していた。ラディアルストレイン比の低下(<1.6)と有意な相関を示した因子は、心電図ストレイン波形の存在であった(OR 9.28, p=0.01)。

【考察及び結語】

2DTT 法を使用して、高血圧患者の心内膜側及び心外膜側局所心筋収縮機能の評価を行った。心電図ストレイン波形を有する高血圧例では、心電図ストレイン波形を有しない例と比較して、心内膜側ラディアルストレイン値およびラディアルストレイン比の低下を認めた。ラディアルストレイン比の低下に有意な相関を示した因子は心電図ストレイン波形の存在であった。高血圧患者における心電図ストレイン波形の出現は、解剖学的左心室肥大の進行を示す指標であるとともに、心内膜側局所心筋収縮機能の低下を示唆していると考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成23年1月20日論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

高血圧患者において出現する心電図ST-T部のストレイン波形は、解剖学的左心室肥大の進行を示す指標であり、心電図ストレイン波形を有する症例は有しない症例と比較して、その予後は不良である。心電図ストレイン波形は、左心室重量の増加及び壁厚増加に伴って生じる心内膜側の線維化や虚血により出現すると考えられるが、心電図ストレイン波形の出現に伴った心内膜側局所心筋機能の変化については、いまだ検討されていない。本論文では、心エコーBモード動画像上での連続的な追跡（Tracking）にて局所心筋ストレインを定量評価できる2D Tissue Tracking法を用いることにより、高血圧患者における左室収縮時の壁厚増加を、ラディアルストレイン値として心内膜側、心外膜側それぞれの局所で測定した。さらには心外膜側ラディアルストレイン値に対する心内膜側ラディアルストレイン値の比（ラディアルストレイン比）を求め、心電図ストレイン波形の有無との関係について検討した。

その結果、心電図ストレイン波形を有する高血圧例では有しない高血圧例と比較して、①左心室壁厚、左心室重量及び心電図SV1 + RV5値が有意に増大し、②心外膜側ラディアルストレイン値の有意な変化はなかったが、心内膜側ラディアルストレイン値及びラディアルストレイン比が、有意に低下していた。ラディアルストレイン比の低下(<1.6)と有意な相関を示した因子は、心電図ストレイン波形の存在であった(OR 9.28, p=0.01)。

以上より、本論文は、高血圧患者における心電図ストレイン波形の出現が、解剖学的左心室肥大の進行を示す指標であるとともに、心内膜側局所心筋収縮機能の低下を示唆することを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第866号		
学位授与の日	平成23年2月8日		
氏名	北端宏規		
学位論文の題目	Coronary Microvascular Resistance Index Immediately After Primary Percutaneous Coronary Intervention as a Predictor of the Transmural Extent of Infarction in Patients With ST-Segment Elevation Anterior Acute Myocardial Infarction (ST 上昇型前壁急性心筋梗塞患者における梗塞の壁深達度を予測する因子としての冠微小血管抵抗指数)		
論文審査委員	主査	教授 岡村吉隆	
	副査	教授 村垣泰光	教授 赤阪隆史

論文内容の要旨

「緒言」

急性心筋梗塞(AMI)における primary percutaneous coronary intervention (PPCI)は確立された再灌流療法であり、予後を改善することが報告されてきた。しかし、梗塞責任心外膜冠動脈レベルの再灌流が良好であっても心筋の組織レベルでは再灌流が得られていない症例が存在し、このような症例の遠隔期予後は不良であることが明らかになっている。そのため、AMI に対する治療目的は、心外膜冠動脈レベルのみならず、冠微小循環レベルでの再灌流を得ることである。しかしながら、冠微小循環を評価する有用な方法は十分に解明されていない。

最近、1本のワイヤーで冠内圧と冠血流速度が同時に計測できる dual sensor guidewire が臨床使用可能となり、これにより、冠微小循環障害の程度を定量評価することが可能となった。

AMI 後の心筋壊死は、ウェーブフロント現象として心内膜から心外膜に進行する。遅延造影 MRI は高い空間分解能をもって心内膜梗塞と貫壁性梗塞を鑑別することができ、遅延造影 MRI から同定した梗塞の壁深達度の程度から遠隔期の梗塞領域における心収縮力の回復、すなわち心筋バイアビリティーを予測できることが報告されている。

そこで、今回我々は、急性前壁心筋梗塞症例において再灌流療法直後に測定した冠微小血管抵抗指数 (MVRI) がこれまで冠微小循環を評価するとされてきた様々な指標と比較して遅延造影 MRI から同定した壁深達度を予測することができるかを検討した。

「方法」

対象：発症から 12 時間以内に当院を受診した初回の急性前壁心筋梗塞患者 27 例を対象とした。心筋梗塞の既往、左冠動脈主幹部病変、慢性腎不全 (クレアチニン>1.5mg/dl)、心原性ショックを持つ患者は除外した。また、MRI に禁忌 (ペースメーカー、心房細動、閉所恐怖症など) を持つ患者も除外した。

プロトコール：心臓カテーテル検査は 6 F のガイディングカテーテルを用いて経大腿動脈より行った。検査開始前にアスピリン 162mg を内服後、活性型全血凝固時間を 250 秒以上に維持するようにヘパリン 100IU/kg を経静脈的に投与した。血栓吸引後、バルーンによる拡張を行いベアメタルステントを留置した。手技成功は責任病変で 30%未満の残存狭窄と定義した。また、入院時と発症から 24 時間は 3 時間ごとに採血を行い最大クレアチンキナーゼ (CK) 値と最大 CK-MB 値を決定した。

冠生理学的指標の測定と解析：PPCI 直後に dual-sensor guidewire を用いて、責任病変の遠位部で冠内圧 (Pd) と冠血流速度を同時に測定した。また、大動脈圧 (Pa) をガイディングカテーテル先端で測定した。安静時と ATP(150µg/kg/min)の持続静脈投与による最大充血中に、Pa、Pd と冠血流速度を記録した。この結果から冠血流予備能 (CFR) と冠血流拡張期波の減衰時間 (DDT) を算出し、さらに、冠内圧-冠血流速関係曲線より zero flow pressure (Pzf) を算出した。MVRI は、最大充血時の平均最大冠血流速度に対する平均 Pd の比として算出した。

心臓 MRI 検査のプロトコールと解析：遅延造影 MRI を発症から 2 週間後に施行した。遅延造影 MRI による壁深達度は以下の 4 つのグレードに分類した (付図 1)。グレード 1: 梗塞部左室壁厚の 0-25%、グレード 2: 26-50%、グレード 3: 51-75%、グレード 4: 76-100%。もっとも高いグレードを各症例

の壁深達度とした。また、梗塞サイズを総左室心筋体積に占める総遅延造影領域の割合 (%) として算出した。

「結果」グレード4の壁深達度を示すものを貫壁性梗塞と定義し、貫壁性梗塞群(8症例)と非貫壁性梗塞群(19症例)の2群に分け検討を行った。年齢、性別などに関しては、両群間で差を認めなかったが、最大CK値、最大CK-MB値と梗塞サイズに関しては貫壁性梗塞群で有意に大きかった。CFRは貫壁性梗塞群で有意に低く、DDTは貫壁性梗塞群で有意に短かった。MVRI、Pzfに関しても貫壁性梗塞群で有意に高かった。MVRI、CFR、DDT、Pzfそれぞれが最大CK-MB値、梗塞サイズと有意な相関関係を示した。さらに、MVRIとCFR、DDT、Pzfとの間には良好な相関関係が認められた。また、受信者操作特性曲線を用いて求めた貫壁性梗塞を予測するためのMVRIの閾値は $3.14 \text{ mmHg} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}$ で、感度と特異度はそれぞれ75%、89%であった。しかし、診断能に関しては、MVRIと他の3つの変数の間に差は認められなかった。さらに、MVRIと壁深達度グレードは正の相関を示した。

「考察」梗塞サイズの大きなものはより高度な冠微小循環障害を有していると考えられるが、急性期の心エコーや左室造影では気絶心筋などの影響により真の梗塞サイズや心筋バイアビリティーを評価することは困難である。そのため、心臓カテーテル検査室でreal timeにMVRIなどの冠微小循環障害を定量評価することができれば、再灌流直後に梗塞サイズや心筋バイアビリティーを予測することができる可能性がある。したがって、再灌流療法直後のMVRIを定量評価することで、PPCIに心筋保護のための薬物的補助療法が必要な症例を選別することが可能となる。また、これらの薬物療法前後でMVRIの改善を確かめることで、それらの薬物の有効性の評価も可能となることが考えられる。

「結語」PPCI直後に測定したMVRIは急性前壁心筋梗塞症例において梗塞の壁深達度を予測する有用な指標である。

審査の要旨(審査の日、方法、結果)

平成23年1月24日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

急性心筋梗塞(AMI)患者では、梗塞責任心外膜冠動脈レベルの再灌流が良好であっても心筋組織レベルでは再灌流が得られていない症例が存在し、遠隔期予後不良因子の一つと考えられている。そのため、AMIに対する治療目的は、心外膜冠動脈レベルのみならず、冠微小循環レベルでの再灌流を得ることである。しかしながら、冠微小循環を評価する有用な方法は十分に解明されていない。本論文は、dual sensor guidewireを用いて再灌流療法直後に測定した冠微小血管抵抗指数(MVRI)がこれまで冠微小循環を評価するとされてきた様々な指標と比較して遅延造影MRIから同定した壁深達度を予測することができるかを検討したものである。

その結果、冠血流予備能(CFR)は貫壁性梗塞群で有意に低く、冠血流拡張期波の減衰時間(DDT)は貫壁性梗塞群で有意に短く、また、MVRI、冠内圧-冠血流速関係曲線よりzero flow pressure(Pzf)に関しても貫壁性梗塞群で有意に高かった。受信者操作特性曲線を用いて求めた貫壁性梗塞を予測するためのMVRIの閾値は $3.14 \text{ mmHg} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}$ で、感度と特異度はそれぞれ75%、89%であった。貫壁性梗塞の診断能に関しては、MVRIと他の3つの変数の間に統計学的な差は認められなかったが、MVRIと壁深達度グレードの間には良好な正の相関が認められた。

以上の結果より、MVRIが高くなればなるほど壁深達度が深くなることが確認された。つまり、MVRIは急性前壁心筋梗塞症例において梗塞の壁深達度を予測する有用な指標であり、心臓カテーテル検査室で再灌流療法直後にMVRIを測定することにより心筋バイアビリティーをreal timeに予測することができる可能性があることを示唆した論文であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第867号		
学位授与の日	平成23年2月8日		
氏名	谷本貴志		
学位論文の題目	Bedside Assessment of Myocardial Viability Using Transmural Strain Profile in Patients with ST Elevation Myocardial Infarction: Comparison with Cardiac Magnetic Resonance Imaging (ST 上昇型急性心筋梗塞患者におけるストレインプロファイルを用いた心筋バイアビリティー評価: 心臓MRI との比較)		
論文審査委員	主査	教授 岡村 吉隆	
	副査	教授 重松 隆	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

左室収縮における壁厚増加に関して、心室壁内の壁厚増加率は一様でなく心内膜側の方が心外膜側よりも高いことが超音波クリスタルを用いた動物実験で示されており、これは心室壁筋層内不均一性 (heterogeneity) と呼ばれている。

心エコー図法は非侵襲的に心形態、心機能を評価できる方法であり、現在広く臨床応用されているが、従来の 2D エコーを用いた壁運動の評価は心内膜面の動きに注目したものであり、heterogeneity の評価には限界がある。

局所心筋の機能を表す指標としてストレイン (歪み) があり、これは、ものが外力を受けて変形したときのその変形の度合いを表し、「変化した長さ/元の長さ」で計算される。近年、組織ドプラー法の開発により任意の断面における壁運動速度の計測が可能となり、速度情報をもとに局所心筋のストレインを定量評価出来るようになった。具体的には断層心エコー図上で局所心筋のストレインをカラー表示するのみならず、任意の時相での左室壁各層のストレイン分布をストレインプロファイルとしてグラフで表すことが出来る。しかしこれらは動物を用いて得られた知見であり、生体での応用は限られている。

ガドリニウム造影剤を用いた遅延造影 MRI では梗塞部が高信号として描出される。遅延造影 MRI による心筋梗塞の評価は病理組織学所見との比較から、心筋壊死の検出ならびに壁内深達度評価の gold standard とされている。

以上の背景を踏まえ、本研究では健常者において左室壁内ストレインプロファイルを求めるとともに、急性心筋梗塞患者において心筋壊死の壁内深達度を心臓 MRI で定量評価し、壁深達度とストレインプロファイルとの関連を検討した。

【方法】

急性期に再灌流療法を行った急性下壁心筋梗塞 36 名において、発症 2 週目に組織ドプラー心エコー図と遅延造影 MRI を行った。

心筋壊死の壁内深達度は遅延造影 MRI を用い 4 段階に分類した。組織ドプラー心エコー図にて下壁領域のストレインプロファイルを求めた。また年齢をマッチさせた健常者 15 名にて組織ドプラー心エコー図を行い、ストレインプロファイルを求めた。

ストレインプロファイルの解析では①ストレインの最大値、②ストレインが最大となる位置 (心内膜からの距離を%表示; 0%: 心内膜、100%: 心外膜) を求め、遅延造影 MRI で求めた壁深達度との関連性について検討を行った。

【結果】

- 1) 健常者におけるストレインプロファイルの解析では、ストレインは心内膜下で最大となり、心外膜に向かうにつれて小さくなるというストレイン勾配を呈した。
- 2) 心筋梗塞患者においては、MRI で求めた壁内深達度が大きいほどストレインの最大値は小さく、最大となる位置はより心外膜側に位置していた。すなわち、ストレインの最大値は壁内深達度と負の相関を、最大ストレインの位置は壁内深達度と正の相関を示した。
- 3) ストレインプロファイルから得られるこれら 2 つの指標を組み合わせることで、心筋バイアビ

リティーを評価できた。

【考察および結語】

以上の結果より、健常人ではストレインプロファイルは心内膜側でストレイン値が最大となり、心外膜側に向けてストレイン値が小さくなるという **heterogeneity** をヒトにおいても確認できた。心筋梗塞患者においてはストレイン勾配が変化し、心室壁内深達度が深いほどストレインの最大値は小さく、最大となる位置は心外膜側に位置していた。ストレインプロファイルを用いることで梗塞部の心筋バイアビリティーを非侵襲的に、かつベッドサイドで定量評価出来る可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 1 月 28 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

左室収縮における壁厚増加に関して、心室壁内の壁厚増加に関する寄与は一様でなく心内膜側の方が心外膜側よりも高いことが知られており、これは心室壁筋層内不均一性 (**heterogeneity**) と呼ばれている。従来の 2D エコーを用いた壁運動の評価は心内膜面の動きに注目したものであり、壁内の **heterogeneity** の評価には限界がある。近年、組織ドプラー法の開発により任意の断面における壁運動速度の計測が可能となり、速度情報をもとに局所心筋のストレイン（歪み）を定量評価出来るようになった。しかしこれらは動物を用いて得られた知見であり、生体での応用は限られている。本研究では健常人において左室壁内ストレインプロファイルを求めるとともに、急性心筋梗塞患者において心筋壊死の壁内深達度を心臓 MRI で定量評価し、壁深達度とストレインプロファイルとの関連を検討した。

その結果、健常人におけるストレインプロファイルの解析では、ストレインは心内膜下で最大となり、心外膜側に向かうにつれて小さくなるというストレイン勾配を呈した。心筋梗塞患者においては、ストレインの最大値は MRI で求めた壁内深達度と負の相関を、最大ストレインの位置は壁内深達度と正の相関を示した。また、ストレインプロファイルから得られるこれら 2 つの指標を組み合わせることで、心筋バイアビリティーを評価できた。

以上の結果より、健常人ではストレインプロファイルは心内膜側でストレインが最大となり、心外膜側に向けてストレイン値が小さくなるという **heterogeneity** をヒトにおいても確認できた。心筋梗塞患者においてはストレイン勾配が変化し、心室壁内深達度が深いほどストレインの最大値は小さく、最大となる位置は心外膜側に位置していた。ストレインプロファイルを用いることで梗塞部の心筋バイアビリティーを非侵襲的に、かつベッドサイドで定量評価出来ることを示唆した論文であり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第868号		
学位授与の日	平成23年3月8日		
氏名	川勝基久		
学位論文の題目	Loss of Smad3 gives rise to poor soft callus formation and accelerates early fracture healing (Smad3 の欠損が軟骨性仮骨の低形成の誘因となり早期の骨折治癒過程を促進する)		
論文審査委員	主査	教授 近藤稔和	
	副査	教授 鶴尾吉宏	教授 村垣泰光

論文内容の要旨

[緒言]

骨折の治癒過程は、炎症期、修復期、再造成骨期に大きく別れる。特に修復期は、軟骨や骨形成を経て、内軟骨性骨化を含む重要な過程で、その分子生物学機序について多くの報告はあるが、未だ十分にはわかっていない。TGF- β シグナルは主に Smad3 を介して細胞核内に伝達し、創傷治癒、発生、免疫システム、上皮-間葉転換などに作用すると考えられており、骨折治癒においても仮骨増殖作用の報告がある。しかし一連の骨折治癒過程の役割については未だ十分にわかっていない。一方、Smad3 欠損マウスの *in vitro* での実験から、Smad3 の欠損が修復期の骨折治癒を促進させるのではないかと示唆する報告がある。本研究の目的は、Smad3 欠損マウスを用いて開放性骨折のモデルを作成し、その一連の骨折治癒過程を検討することで、TGF- β /Smad3 シグナルの役割および Smad3 の欠損が骨折治癒を促進するかを検討した。

[方法]

ヘテロ Smad3 欠損マウスを交配し、その DNA 解析から Smad3 の野生型(WT)マウスとノックアウト(KO)マウスに分ける。これらのマウスの中で、10 週令の WT マウスと KO マウスの脛骨を骨鋸にて横骨折させた後、髓内釘で固定し開放性骨折モデルを作成した。骨折後 5 日、7 日、10 日、14 日、21 日の WT マウスと KO マウスそれぞれ 5 匹の骨折部を採取した。脱灰後パラフィン包埋し、4 μ m の組織切片を数十枚作製した。骨折部で形成された仮骨の中央部に焦点を当て、(1) 骨軟骨の染色(シリウスレッド、アルシアンブルー染色)、(2) 骨軟骨の分化染色(ALP 染色)、(3) 破骨細胞の染色(TRAP 染色)、(4) TUNEL 染色、(5) 免疫染色(Sox9)を行った。仮骨および骨、軟骨の大きさについては、染色されたそれぞれの組織切片を用いて計測した。また ALP positive cell および TRAP positive cell については仮骨面積中の数を、TUNEL positive cell については仮骨のすべての細胞中の数で表示した。さらに、組織標本とは別に骨折後 5 日、7 日、10 日、14 日、21 日の WT マウスと KO マウスそれぞれ 5 匹の骨折部の組織から total RNA を抽出し、RT-PCR で骨、軟骨形成に関連する遺伝子発現の解析をした。

[結果]

- 骨折治癒過程における仮骨形成、および軟骨、骨形成
KO マウスでは仮骨形成量が WT マウスより少ないが、WT マウスでは 21 日間かかかって内軟骨性骨化が終了しているのに比べて、KO マウスでは 14 日間で終了した。また KO マウスでは WT マウスに比べて有意に仮骨中の軟骨の占める割合が低かった。
- 骨折治癒過程における軟骨細胞および骨芽細胞の分化
KO マウスにおいては WT マウスに比べて、特に仮骨形成の初期(骨折後 5 日、7 日)に有意に分化が進んでいた。
- 骨折治癒過程における破骨細胞の活性
KO マウスでは内軟骨性骨化終了期(骨折後 14 日)に WT マウスに比べて有意に破骨細胞が増加していた。
- 骨折治癒過程における細胞死
KO マウスにおいては内軟骨性骨化終了期(骨折後 14 日)に WT マウスに比べて有意に細胞死が増加していた。

5. 骨折治癒過程における遺伝子発現

Sox9, aggrecan の発現は、KO マウスで WT マウスに比べ骨折後初期の時期つまり軟性仮骨（軟骨）形成期に低下していた。一方、Runx2 および ALP の発現は KO マウスでは内軟骨骨化が終了するまで減弱しなかったが、WT マウスでは仮骨形成後、内軟骨骨化が終了するまでの間、減弱していた。Sox9 の発現については免疫染色でも同様なことが示された。

[考察]

我々が行った開放性骨折のモデルにおいては、KO マウスが WT マウスに比べて、有意に軟骨形成を抑制し、軟骨細胞および骨芽細胞の分化、破骨細胞の活性化、アポトーシスを促進しながら、7 日間早く骨折の修復期を終了させていた。このことは、Smad3 の働きを遮断することが骨折治癒を促進させる可能性を示唆した。さらに、骨や軟骨の分化に関与する転写因子である Sox9 と Runx2 が、TGF- β /Smad3 シグナルの下流で働きながら、一連の骨折治癒過程を制御していると考えられた。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成23年2月18日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文審査を行った。

骨折の治癒過程は炎症期、修復期、再造成骨期に大きく別れ、特に修復期は軟骨や骨形成を経て内軟骨性骨化に至る重要な過程である。TGF- β シグナルは主に Smad3 を介して細胞核内に伝達し、修復期の仮骨を増殖させる報告があるが、一連の骨折治癒過程の役割については未だ十分にわかっていない。一方、Smad3 欠損マウスの *in vitro* での実験から、Smad3 の欠損が修復期の骨折治癒を促進させるのではないかと示唆する報告がある。本研究の目的は、Smad3 欠損マウスを用いて開放性骨折モデルを作成し、その一連の骨折治癒過程を解析することにより、TGF- β /Smad3 シグナルの役割および Smad3 の欠損が骨折治癒を促進するかを検討することである。

実験モデルとして、10 週令の Smad3 野生型(WT)マウスとノックアウト(KO)マウスを用いて脛骨の開放性骨折モデルを作成した。骨折後 5 日、7 日、10 日、14 日、21 日の WT マウスと KO マウスの骨折部を採取して固定、脱灰後パラフィン切片を作成し、(1)骨軟骨の染色(シリウスレッド、アルシアンブルー染色)、(2)骨軟骨の分化染色 (ALP 染色)、(3)破骨細胞の染色(TRAP 染色)、(4) TUNEL 染色、(5) Sox9 の免疫染色をそれぞれ行った。また、それぞれの染色組織切片を用いて組織形態と染色細胞数の計測を行った。さらに、組織標本とは別に WT マウスと KO マウスの骨折部の組織から RNA を採取し、RT-PCR で骨軟骨形成に関連する遺伝子発現の解析を行った。その結果、

1. KO マウスが WT マウスに比べて 7 日間早く骨折の修復期が終了していた。
2. 骨折治癒過程において、KO マウスが WT マウスに比べて有意に軟骨形成を抑制し、軟骨細胞および骨芽細胞の分化、破骨細胞の活性化、アポトーシスを促進していた。
3. TGF- β /Smad3 シグナルが骨や軟骨の分化に関与する転写因子である Sox9 および Runx2 に働くことにより骨折治癒過程を制御していた。

以上より、本論文は、一連の骨折治癒過程における TGF- β /Smad3 シグナルの分子生物学的機能の一端を明らかにするとともに、Smad3 の働きを遮断することが骨折治癒を促進させる可能性を示唆したという点で意義深いものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第869号
学位授与の日	平成23年3月8日
氏名	正山 勝
学位論文の題目	Brain activity during clock drawing test: multichannel near-infrared spectroscopy study (近赤外線分光法による時計描画課題中の脳神経活動計測に関する研究)
論文審査委員	主査 教授 近藤 智善 副査 教授 仙波 恵美子 教授 篠崎 和弘

論文内容の要旨

【緒言】

時計描画課題 (clock drawing task : CDT)は認知症のスクリーニング検査として幅広く使用されている神経心理学的検査である。CDTは、右頭頂葉の異常を反映する視空間課題と考えられている。一方、実行機能などの前頭葉機能の関与が指摘されているにもかかわらず、時計描画課題中の機能画像的な裏付けは十分になされてこなかった。従来の機能的MRIによる検討では、前頭-頭頂部の神経回路の関与を指摘したものもあるが、体動の制限や装置の問題からイメージ課題などを代用せざるを得なかった。本研究では、自然な状態での脳賦活反応性の測定が可能な近赤外線分光法 (near-infrared spectroscopy:NIRS) を使用して、実際の臨床場面に近い形で CDT 遂行中の脳賦活反応を計測した。

【方法】

52チャンネル型NIRS (Hitachi ETG-4000 : 日立メディカル)を使用して、前頭前野から側頭部表面の領域での計測を行った。被験者を静穏な部屋でA4用紙2枚と鉛筆を設置した机の前に自然な姿勢で座らせ、測定ホルダを前頭前野領域を中心に左右対称に前頭部から側頭部にかけて、国際10-20システムにおけるFp1-Fp2を結ぶラインを基準に装着した。ホルダ上に配列された17個の出力プローブから695nmと830nmと二つの波長の近赤外光を照射し、散乱・反射された光を16個の検出プローブで検出し、プローブ間の各測定領域(チャンネル)でBeer-Lambert法則に基づいて酸素化ヘモグロビン(Oxy Hb)濃度を算出した。時間解像度は0.1秒に設定した。CDT課題はFreedmanら(1994)の方法に準じ、6時45分の時計を20秒以内に描画し続けるように口頭で指示した。1個の時計を描き終わる時間を課題遂行時間とした。手の動きの影響を除外するために、単純な円を描き続ける対照課題をCDTの前後30秒間に設けた。CDT課題中をtask period、CDT前後の対照課題の区間をpre task period、post task periodとしてそれぞれのOxy Hb変化量の平均値を全ての被験者で各チャンネル毎に算出した。37名の健常ボランティア(右利き、男性21名、女性16名:平均年齢 28 ± 6.7 歳)から得られたデータを解析した。

【結果】

- ①全体の平均加算波形では、前頭前野領域は側頭部と異なる波形を示し、課題遂行中のoxy-Hbは二峰性の増加パターンを認めた。
- ②平均oxy-Hb変化量のt検定比較では、task periodにおけるoxy-Hb濃度の有意な増加が96.2%のチャンネルで認められた(false discovery rate (FDR)-corrected; $P < 0.025$)。
- ③二元配置分散分析では課題区間とチャンネルの主効果、交互作用を認めた。
- ④課題遂行時間とoxy-Hb変化量は、前頭前野の領域において負の相関を示した($r = -0.529$, $p = 0.002$)。
- ⑤課題遂行中のoxy-Hb濃度変化の平均値は20名(54%)の被験者で左半球優位で、17名(46%)の被験者で右半球優位であった。

【考察】

前頭から側頭部にかけて広範囲でのoxy-Hbの増加を認めた(②)が、前頭前野領域は側頭部とは異なる波形を示した。前頭前野領域に特有な二峰性の増加パターンは円や数字、針の配置などの時計の描画に関する各要素を反映したものと考えられた(①)。また、分散分析、相関分析の結果(③、④)は、前頭前野の特異的な神経活動を示唆する所見と考えられた。また、半球優位性の個人差は他の前頭葉課題でも示されており、構成や実行機能などの異なる要因からなるCDTの多面性を示唆する結果と考えられた(⑤)。CDTに関わる前頭前野領域の特異的な活動の存在は、実行機能などのCDT

の前頭葉機能検査としての側面を支持する所見と考えられた。NIRS は皮質表面の神経活動を日常動作に近い形で高い時間分解能で直接的に測定できる利点を有しており、これまで測定が困難であった臨床場面に近い形で時計描画遂行中の神経活動を捉えることができた。今回の研究の limitation は頭頂葉領域の測定が含まれなかったことであり今後の検討課題である。前頭葉の障害は認知症の重症度や疾患の鑑別に関わる指標となりうるが、CDT 単独でのスクリーニングでは限界も生じる。NIRS を併用することで、スクリーニングの段階で脳賦活反応の動態をリアルタイムに測定し、CDT 単独では判定しにくい認知症の鑑別や重症度を判定できる可能性がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 23 年 3 月 1 日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、学位論文について審査を行った。時計描画課題（clock drawing task : CDT）は認知症のスクリーニング検査として幅広く使用されている神経心理学的検査である。CDT は、右頭頂葉の異常を反映する視空間課題と考えられている。一方、実行機能などの前頭葉機能の関与が指摘されているにもかかわらず、時計描画課題中の機能画像的な裏付けは行われておらず、前頭葉機能検査としての位置づけが十分になされてこなかった。従来の報告では、機能的 MRI による検討で、前頭-頭頂部の神経回路の関与を指摘したものもあるが、体動の制限や装置の問題からイメージ課題などを代用せざるを得なかった。本研究では、自然な状態での脳賦活反応性の測定が可能な近赤外線分光法（near-infrared spectroscopy: NIRS）を使用して、37 名の健常成人（右利き、男性 21 名、女性 16 名：平均年齢 28±6.7 歳）で、実際の臨床場面に近い形で時計描画課題遂行中の脳賦活反応を計測した。

その結果、

①全体の平均 oxy-Hb 変化量では、課題遂行中における oxy-Hb 濃度の有意な増加が 96.2%のチャンネルで認められ、前頭前野領域は側頭部と異なる波形を特異的に示し、CDT に関する前頭前野領域の神経活動を捉えた所見と考えられた。

②課題遂行時間と oxy-Hb 変化量は、前頭前野の領域において負の相関を示し、NIRS で計測される前頭前野の血流変化は認知機能の指標となりうることが示された。

③課題遂行中の oxy-Hb 濃度変化の平均値 は 20 名(54%)の被験者で左半球優位で、17 名(46%)の被験者で右半球優位であった。CDT が言語、構成、意味記憶などの多様なプロセスを反映する課題であることを示唆した。

以上より、本論文は、NIRS により CDT の前頭葉機能検査としての側面を機能画像的検討により明らかにしたはじめての論文であり、認知症などへの臨床応用が期待できる点も含めて、学位論文として価値あるものと認めた。