

## 〔博士（医学）〕

氏名 ZAMAN MST. CYNTHIA

〈学位〉	種 類 博士（医学）	論 文 項 目	Study on microbial ecology between <i>Helicobacter pylori</i> and gastric bacteria of Mongolian gerbils (スナネズミ胃内細菌とヘリコバクター・ピロリとの微生物生態学に関する研究)
	授与番号 博甲医 第381号		
	授与年月日 平成23年6月30日		
	授与の要件 学位規程第5条	論文審査委員	主査 高橋信一 副査 竹中 均 林 潤一 正木忠彦 松田宗男

## 学位論文の要旨

スナネズミは *Helicobacter pylori* 感染による胃炎、消化性潰瘍、胃癌などの研究に頻用される。これまでに *H. pylori* に抑制的に作用する各種細菌の存在が報告されている。本研究では *H. pylori* 感染時のスナネズミ胃粘膜における *H. pylori* と胃内細菌間の微生物生態学の解析を行なった。加えて、胃粘膜より分離培養された細菌株について、*H. pylori* の胃上皮細胞への付着ならびに *in vitro* での増殖に及ぼす効果を調べた。

*H. pylori* TK1402株を使用し、BHIおよびBrucella培地により微好気培養を行なった。*H. pylori* のウレアーゼ遺伝子 (*ureA*) をPCR法にて検出することにより、糞便内での本菌の存在を確認した。胃内細菌は好気および嫌気培養法により分離し、その同定はAPIキットおよびPCR法・ゲノムシーケンシング法により行なった。

実験1では、*H. pylori* 感染スナネズミ糞便中の *H. pylori* 検出頻度により、感染スナネズミを3群（高頻度、中頻度、低頻度検出群）に分けた。高頻度検出群および低頻度検出群に特異的にそれぞれ *Eubacterium limosum* および *Lactobacillus* spp. が分離培養された。実験2では実験1での *H. pylori* 陰性および陽性スナネズミの胃粘膜材料をそれぞれ5匹（グループ1）および6匹（グループ2）のスナネズミに経口投与し、その後 *H. pylori* の感染を行なった。グループ1および2のスナネズミにおける *H. pylori* の定着率はそれぞれ40%および67%であった。グループ1の胃粘膜材料は *H. pylori* の *in vitro* での増殖を抑制した。両群のスナネズミから嫌気培養により *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii* および *Lactobacillus murinus* が分離された。これらの *Lactobacillus* は *H. pylori* の胃上皮細胞への付着を抑制しなかったが、*L. murinus* は *H. pylori* の *in vitro* 増殖を完全に抑制した。

本研究結果より、スナネズミ胃粘膜には *H. pylori* の定着および増殖を調節する細菌群が存在していることが明らかになった。加えて、分離胃内細菌のうち *L. murinus* が *H. pylori* に対する強い増殖抑制効果をもつことが明らかとなり、新たなプロバイオティクスの候補菌株であることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

スナネズミは数少ない *Helicobacter pylori* 感染実験モデルとして知られているが、その胃内には *H. pylori* 感染に抑制的に働く各種細菌が存在する。本研究では、これら細菌の実態と作用を解析するため、実験1：*H. pylori* 感染時のスナネズミ胃内細菌叢の分析、実験2：*H. pylori* 感染阻止細菌の特定、実験3：*lactobacilli* による *H. pylori* の胃上皮細胞への定着阻止能の評価、実験4：*lactobacilli* による *H. pylori* の増殖阻止能の評価を、連続的に行なった。

【方法と結果】*H. pylori* TK1402株を使用し、BHIおよびBrucella培地により微好気培養を行った。糞便中の本菌は、*H. pylori* ウレアーゼ遺伝子 (*ureA*) をPCR法にて検出した。胃内細菌は好気および嫌気培養法により分離し、その同定はAPIキットおよびPCR法・ゲノムシーケンシング法により行なった。実験1：*H. pylori* 感染スナネズミ糞便中の *H. pylori* 検出頻度により、感染スナネズミを3群（高頻度、中頻度、低頻度群）に分けた。高頻度検出群から *Eubacterium limosum* が、低頻度検出群から

*Lactobacillus* spp. がそれぞれ特異的に胃内から分離培養された。実験2：実験1での *H. pylori* 陰性および陽性スナネズミの胃粘膜材料をそれぞれ5匹（group 1）および6匹（group 2）のスナネズミに経口投与し、その後 *H. pylori* を感染させた。*H. pylori* の定着は、group 1（40%）が group 2（67%）に比べ低率であった。両群のスナネズミ胃内より *L. reuteri*, *L. johnsonii* が、group 1 より *L. murinus* が分離された。実験3：これら *Lactobacillus* の培養上清は、*H. pylori* の AGS cell への定着を阻止しなかった。実験4：*L. murinus* の培養上清は *in vitro* において *H. pylori* の増殖を完全に抑制した。

本研究結果より、スナネズミ胃粘膜には *H. pylori* の増殖を調節する細菌が存在していることが明らかとなった。このうち、*L. murinus* は、*H. pylori* に対する強い増殖抑制効果を示し、新たなプロバイオティクスの候補菌株であると考えられた。*H. pylori* において、各種抗生剤に対する薬剤耐性菌が増加する中、臨床的に大変重要な知見が示された。審査の結果、学位論文として相応しいものと認めた。

氏名 渡 会 理 映 子

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	Changes in QOL with dental implant by General Health Questionnaire (GHQ) and Health Utilities Index (HUI) (歯科インプラント治療によるQOLの変化 —GHQとHUIを用いた検討から—)
	授与番号	博甲医 第382号	論文審査委員	主査 古賀良彦 副査 武見李子 林 潤一 平形明人 松村譲児
	授与年月日	平成24年1月18日		
	授与の要件	学位規程第5条		

### 学位論文の要旨

QOL (Quality of Life) を測定するという事は、医療行為のアウトカムの評価において重要なカギの一つとなる。医療介入の評価というのは、生命を脅かす様な疾病から審美面や栄養摂取機能まで幅広く目を向けられるようになってきた。従来、歯科治療の効果の指標として全身的な評価を用いることは稀であったが、老後の生活機能向上の視点からは、歯科口腔衛生がQOLに寄与する割合も強く認識されるようになってきた。栄養の経口摂取の可否は全身状態の健康、とりわけ残存自歯の減った高齢者には大きく影響を与えることが知られている。歯科治療や歯科インプラントによってQOLは向上することが報告されているが、口腔内の健康状態が全身健康状態へ与えるインパクトを、健康効用値を用いて科学的に報告した論文は少ない。

本研究では、歯科インプラント治療の医療行為の有効性、HRQOLの有効性を評価し、従来式の治療と比較検討した。

協力の得られたインプラント治療技術を持つ歯科医師11名と各医院スタッフによる配布・説明を行い、インフォームドコンセントが得られた患者のみ、治療前後にそれぞれ自己記入式質問票調査を行った。

歯牙欠損者計111名、インプラント治療群63名、義歯群48名において、インプラント処置群、従来処置群に分け、30～59歳グループと60歳以上のグループごとに、口腔アメニティ、日本語版HUI3、GHQ12を用いて、治療の前後における健康効用レベル、精神的健康度、特異的な口腔内状況レベルの変化の評価を前向きに比較した。

30～59歳のグループでは、口腔アメニティについてインプラント処置群、従来処置群共に、処置後の値が有意に改善し、GHQ12においてインプラント処置群にのみ有意に改善が見られた。60歳以上では、インプラント処置群、従来処置群共に、口腔アメニティの異物感と見た目が改善され、同時にメンタルヘルス、HUIグローバルスコアの改善がみられた。

口腔内の状況は全身に影響すると考えられ、また歯科インプラント治療は、審美的な外観、咬合回復、摂取機能や痛み、不快感を治すことでメンタルヘルスレベルにも大きく影響し、高齢者の生活習慣にも寄与し、HRQOLレベルを向上させ、全身的にも確かな効果があると考えられる。

### 論文審査結果の要旨

栄養の経口摂取の良否は、全身状態の健康、とりわけ残存自歯の減った高齢者には大きく影響することが知られている。歯科治療や歯科インプラントによるQuality of Life (QOL) の向上が報告されているが、口腔内の健康状態が全身健康状態へ与える影響について健康効用値を用いて詳細に調査した報告は少ない。

本研究では、歯科インプラント治療の医療行為による全身健康状態の変化、精神健康度の変化、HRQOLの変化を評価し、従来式の治療と比較検討した。

協力の得られたインプラント治療技術を持つ歯科医師11名により患者に説明を行い、同意が得られたものに対し、治療前後にそれぞれ自己記入式質問票調査を施行した。

インプラント治療グループ53例、従来処置グループ38例の歯牙欠損患者91例を30～59歳グループと60歳以上のグループに分け、咬合圧測定とともに口腔アメニティ、日本語版HUI3、GHQ12を用いて、治療の前後における健康効用レベル、精神的

健康度、特異的な口腔内状況レベルの変化の評価と比較した。

30～59歳のグループでは、インプラント処置群では処置後に咬合圧、口腔アメニティ、審美、異物感、咬み心地、GHQ12で有意な改善がみられた。一方従来処置群では、口腔アメニティと咬み心地についてのみ有意の改善がみられた。

60歳以上のグループでは、インプラント群では、咬合圧、睡眠、口腔アメニティ、審美、異物感、咬み心地、GHQ12、HUI3のグローバルスコアおよび痛みのシングルスコアに有意の改善がみられた。従来処置群では、HUI3の痛みのみ有意の改善がみられた。

この結果は、インプラント治療により顕著な咬合力の改善が得られることによって、口腔の健康が保持されるばかりでなく、食事や会話を楽しむなど、豊かな人生を送るためのメンタルヘルスや、QOLの向上も得られることを示唆するものである。

本論文は、インプラント治療の効果を身体的ならびに精神面について仔細に調査し、同治療法の有用性を具体的に示したものであり、審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 網 脇 智 法

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	Hypoxia alters amounts and phosphorylation status of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 (IGFBP-1) and attenuates biological activities of IGF-I in HepG2 cell cultures. (低酸素はIGFBP-1の発現およびリン酸化の状態を変化させ、IGF-Iの生物学的作用を減弱する)
	授与番号	博甲医 第383号		
	授与年月日	平成24年2月27日		
	授与の要件	学位規程第5条		
			論文審査委員	主査 岡 明 副査 高橋信一 山口芳裕 竹中 均 赤川公朗

## 学位論文の要旨

【目的】 インスリン様成長因子結合蛋白-1 (IGFBP-1) は胎児においては主に肝臓で産生されるが、インスリン様成長因子-I (IGF-I) の作用を抑制し、胎児発育に対し抑制的に働くことが報告されている。胎児は低酸素状態において発育が抑制されることから、低酸素環境下でのIGFBP-1の動態と生物学的意義を知るためIGFBP-1を産生するヒト肝臓癌細胞株 (Hep G2細胞) を用いて解析した。

【方法】 Hep G2細胞を無血清培地にて24時間、20%酸素 (酸素群) または2%酸素 (低酸素群) 下で培養した後IGF-Iで刺激し、IGF-I受容体およびその下流のdocking proteinであるIRS-1のチロシンリン酸化をSDS-PAGE後にimmunoblottingにて解析した。また、Hep G2細胞の培養上清中のIGFBP-1総量をSDS PAGE後にimmunoblottingを用いて、IGFBP-1リン酸化異性体はnative PAGE後にimmunoblottingにて解析した。Hep G2細胞の増殖はWST-1の取り込みを指標に測定した。

【成績】 IGF-I刺激にてIGF-I受容体、IRS-1ともにチロシン残基はリン酸化されたが、低酸素群では酸素群に比較し減弱していた。また、培養上清中のIGFBP-1は低酸素群で増加していたが、特に、リン酸化IGFBP-1が増加していた。細胞増殖はIGF-I添加では酸素群に比較し低酸素群では優位に抑制されたが、IGF受容体に結合するがIGFBP-1には結合しないLR3IGF-I添加では差は認められなかった。

【考察】 低酸素状態においてIGF-Iに親和性の高いリン酸化IGFBP-1の産生が増加していたためIGF-I受容体およびその下流のIRS-1のチロシン残基のリン酸化が減弱し、このため低酸素状態においてIGF刺激による細胞増殖は抑制されたと考えられた。これらより、低酸素状態ではIGF-Iによる胎児発育は抑制されていると推測された。

## 論文審査結果の要旨

インスリン様成長因子結合蛋白-1 (IGFBP-1) は胎児においては主に肝臓で産生されるが、インスリン様成長因子-I (IGF-I) の作用を抑制し、胎児発育に対し抑制的に働くことが報告されている。胎児は低酸素状態において発育が抑制されることから、低酸素環境下でのIGFBP-1の動態と生物学的意義を知るためIGFBP-1を産生するヒト肝臓癌細胞株 (Hep G2細胞) を用いて解析した。

Hep G2細胞を無血清培地にて24時間、20%酸素 (酸素群) または2%酸素 (低酸素群) 下で培養した後IGF-Iで刺激し、IGF-I受容体およびその下流のdocking proteinであるIRS-1のチロシンリン酸化を解析した。IGF-I刺激にてIGF-I受容体、IRS-1ともにチロシン残基はリン酸化されたが、低酸素群では酸素群に比較し減弱していた。また、Hep G2細胞の培養上清中のIGFBP-1

総量およびIGFBP-1リン酸化異性体を解析したところ、培養上清中のIGFBP-1は低酸素群で増加しており、特にリン酸化IGFBP-1が増加していた。IGF-I添加によるHep G2細胞の増殖は、酸素群に比較し低酸素群では優位に抑制されたが、IGF受容体に結合するがIGFBP-1には結合しないLR<sup>3</sup>IGF-I添加では差は認められなかった。

低酸素状態においてIGF-Iに親和性の高いリン酸化IGFBP-1の産生が増加していたためIGF-I受容体およびその下流のIRS-1のチロシン残基のリン酸化が減弱し、このため低酸素状態においてIGF刺激による細胞増殖は抑制されたと考えられた。この機序を介して、胎児の低酸素状態ではIGF-Iによる胎児発育は抑制されていると推測され、本研究により胎児発育不全の病態に関する新たな知見が示された。

審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 真山麗子

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Attenuation of Insulin Sensitivity reduces Insulin-like Growth Factor-I effects on Extravillous Trophoblast Cell Migration. (Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) による Extravillous trophoblast (EVT) 遊走に対するインスリン抵抗性の影響)
	授与番号	博甲医 第384号		
	授与年月日	平成24年2月28日		
	授与の要件	学位規程第5条		
			論文審査委員	主査 石田 均 副査 井本 滋 永松信哉 松村譲児 吉野秀朗

### 学位論文の要旨

【諸言】 栄養膜細胞層は栄養膜細胞と絨毛膜外栄養細胞 (EVT) に分化する。妊娠初期に EVT は母体脱着膜へ侵入し、胎盤のらせん動脈の内皮細胞や平滑筋を置換する。らせん動脈の置換により子宮胎盤の血管抵抗は減少し、血流が増加する。インスリン抵抗性が亢進した状態では、EVT の侵入が不十分で流産や妊娠高血圧症候群 (PIH)、胎児発育不全 (FGR) の発症頻度が上昇することが報告されている。インスリン様成長因子-I (IGF-I) は胎児・胎盤発育に重要な役割を演じていることから、インスリン抵抗性およびその改善が IGF-I の細胞内情報伝達系と EVT 遊走にどのように影響を及ぼすか検討した。【材料と方法】 妊娠6-10週に、人工妊娠中絶を施行した患者からインフォームドコンセントを得た上で絨毛組織を採取し、EVT を分離培養した。EVT は30nM インスリン存在下に48時間培養し、インスリン抵抗性を確立した。インスリン抵抗性改善のために、10  $\mu$ M ピオグリタゾン (PPAR  $\gamma$  アゴニスト) を添加または非添加で同様の実験を行った。細胞内情報伝達は無血清培養液に IGF-I を添加し、免疫沈降法、SDS PAGE および Western immunoblotting にて解析した。細胞遊走は razor blade を用いた cell migration assay にて解析した。【結果】 30nM インスリンの前投与にて EVT のインスリン受容体は減少し、インスリンによる受容体リン酸化も低下した。インスリン前投与により、IGF-I による IGF-I 受容体と insulin receptor substrate-1 (IRS-1)、Akt のリン酸化は減弱したが、ピオグリタゾンの共添加により改善した。IGF-I は EVT の細胞遊走を増加させたが、インスリン前投与ではこの増加は抑制された。しかし、インスリンと共にピオグリタゾンを添加すると IGF-I による細胞遊走は改善した。【考察】 インスリンの感受性低下により IGF-I による EVT 遊走は抑制され、この低下はピオグリタゾンの添加により改善した。このことより、インスリン抵抗性の改善は子宮胎盤血流に重要な役割を果たし、流産や PIH、FGR の予防につながる可能性が示唆された。

### 論文審査結果の要旨

栄養膜細胞層より分化した絨毛膜外栄養細胞 (EVT) は、妊娠初期に母体脱着膜へと侵入し、胎盤のらせん動脈の内皮細胞や平滑筋を置換する。その結果、子宮胎盤での血管抵抗は減少し血流が増加する。一方で生体内においてインスリン抵抗性が亢進した状態では、EVT の侵入が不十分で流産や妊娠高血圧症候群 (PIH)、胎児発育不全 (FGR) の発症頻度が上昇することが報告されている。従来よりインスリン様成長因子-I (IGF-I) は、胎児・胎盤発育に重要な役割を演じていると報告されていることから、申請者らはインスリン感受性の低下およびその改善が、IGF-I の細胞内情報伝達系と EVT 遊走にどのように影響を及ぼすかを、今回 *in vitro* の系を用いて検討している。方法としては妊娠6-10週に、人工妊娠中絶を施行した患者からインフォームドコンセントを得た上で絨毛組織を採取し、EVT を分離培養した。EVT を30nM インスリン存在下に48時間培養 (前投与) し、インスリン感受性の低下状態を再現化した。次にインスリン感受性の改善のために、10  $\mu$ M ピオグリタゾン (PPAR  $\gamma$  アゴニスト) を共に添加し、同様の実験を行った。細胞内情報伝達は無血清培養液に

IGF-I を添加し、免疫沈降法、SDS-PAGE および Western immunoblotting にて解析した。細胞遊走能の定量については razor blade を用いた cell migration assay にて解析した。まず、EVT に PPAR  $\gamma$  が機能的に発現していることを確認した。高濃度のインスリンの前投与により、EVT でのインスリン急性刺激によるインスリン受容体リン酸化が減弱した。さらに IGF-I 急性刺激による IGF-I 受容体と insulin receptor substrate-1 (IRS-1)、Akt のリン酸化も減弱したが、ピオグリタゾンの共添加によりこれらの改善を認めた。IGF-I 刺激は EVT の細胞遊走能を増加させたが、インスリン前投与の条件下ではこの増加は抑制された。しかし、インスリン前投与の際にピオグリタゾンを共に添加すると、IGF-I による細胞遊走能は改善を示した。以上の成績より、インスリン感受性の低下にともない IGF-I による EVT 遊走能は抑制され、この抑制はピオグリタゾンの添加により改善することが示された。したがって生体内でのインスリン抵抗性の改善は、子宮胎盤での血流の増加に重要な役割を果たし、妊娠経過中の流産や PIH、FGR の予防につながる可能性が示唆された。審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 安 武 哲 生

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	ヒト肺胞上皮細胞のIL-8発現におけるヒストンアセチル化の役割の検討
	授与番号	博甲医 第385号	論文審査委員	主査 高橋信一 副査 赤木美智男 神谷 茂 松村譲児 山本 実
	授与年月日	平成24年2月28日		
	授与の要件	学位規程第5条		

### 学位論文の要旨

ヒト肺胞上皮細胞において、炎症性サイトカインIL-8発現におけるヒストンアセチル化の役割を検討するために、上皮細胞株A549を用いて、LPS刺激下でのヒストンのアセチル化をクロマチン免疫沈降法により調べた。IL-8などのサイトカインはNF- $\kappa$ Bなどの転写因子がDNAに結合することにより転写が開始され産生される。この転写因子がDNAに結合する際の制御機構として、ヒストンのアセチル化などのヒストン修飾が関与している。ヒストンのアセチル化は転写の亢進、脱アセチル化は転写の抑制に関与している。

A549細胞において、LPS刺激によりIL-8が発現する際に、1時間をピークとするヒストンH4のアセチル化が有意に示された。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) はヒストンのアセチル化を抑制し、転写活性が抑制されると考えられる。HDAC阻害剤の一つであるTSAは、NF- $\kappa$ Bの活性を増強し遺伝子発現を亢進する。ヒト肺胞上皮細胞株A549において、TSA投与下のLPSによるIL-8発現の影響を確認すると、TSAはLPSによるIL-8の産生を有意に亢進させた。一方、ヒストンアセチル化酵素(HAT)は、ヒストンのアセチル化を促進し遺伝子の転写を活性化する。ヒストンアセチル化阻害剤であるanacardic acidはヒト肺胞上皮細胞株A549においてLPSによるIL-8発現を抑制した。以上の結果は、ヒト肺胞上皮細胞のIL-8発現制御において、ヒストンのアセチル化が関与しており、anacardic acidは過剰なIL-8産生を調節する可能性が示唆された。

ヒストン修飾はアセチル化を始め、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化など、修飾を受けるヒストンテールに存在するアミノ酸残基の種類や数によりさまざまな組み合わせが存在する。1つのヒストン修飾が単独で転写作用を制御するのではなく、いくつかの修飾が組み合わさって転写が制御されていると考えられている。今回検証したのは、ヒストン修飾の一部にすぎない。しかしながら、IL-8発現産生調節におけるヒストンのアセチル化の意義を明らかにすることは、新規の炎症性疾患治療薬開発につながる可能性があると考えられる。

### 論文審査結果の要旨

炎症性疾患においてサイトカインIL-8の発現機序を明らかにすることは、炎症の制御に繋がる可能性があり、重要な課題である。本研究では、ヒト肺胞上皮細胞におけるIL-8発現について、ヒストンアセチル化に注目し、その役割を検討した。すなわち、サイトカインはNF- $\kappa$ Bなどの転写因子がDNAに結合することにより転写が開始され産生されるが、その際の制御機構として、ヒストン修飾が知られている。そこでヒト肺胞上皮細胞株A549を用いて、LPS (lipopolysaccharides) 刺激下でのヒストンのアセチル化をクロマチン免疫沈降法により測定した。

〔結果〕1) A549細胞において、LPS刺激によりIL-8が発現する

際に、1時間をピークとするヒストンH4のアセチル化が有意に示された。2) A549細胞において、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC: histone deacetylase) 阻害薬であるTSA (trichostatin A) はLPSによるIL-8の産生を有意に亢進させた。3) A549細胞において、ヒストンアセチル化阻害薬であるanacardic acidはLPSによるIL-8発現を抑制した。

以上の結果は、ヒト肺胞上皮細胞のIL-8発現制御において、ヒストンのアセチル化が関与しており、anacardic acidは過剰なIL-8産生を調節している可能性が示唆された。

IL-8発現産生調節におけるヒストンのアセチル化の意義を明らかにすることは、新規の炎症性疾患治療薬開発につながる可能性があり、審査の結果、学位論文として相応しいものと認めた。

氏名 檜垣 学

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目 Interleukin-10 resolves pulmonary inflammation induced by cigarette smoke exposure. (喫煙による気道炎症におけるInterleukin-10の抗炎症作用の検討)
	授与番号 博甲医 第386号	
	授与年月日 平成24年3月1日	
	授与の要件 学位規程第5条	論文審査委員 主査 神崎恒一 副査 呉屋朝幸 大倉康男 林 潤一 松田宗男

## 学位論文の要旨

### 【背景と目的】

喫煙はChronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)などの呼吸器疾患の主要な原因となる。当教室では短期タバコ煙暴露による肺障害マウスのモデル(タバコ煙暴露マウス)を作成し、喫煙による気道炎症のメカニズムを解析してきた。Interleukin-10 (IL-10)は気道炎症を抑制する作用があると考えられている。そこで、本研究ではタバコ煙暴露マウスを用いて喫煙による気道炎症に対するIL-10の抗炎症作用を検討した。

### 【方法】

- 1) 野生型マウスおよびIL-10遺伝子欠損(KO)マウスより採取した腹腔マクロファージを用いた検討:lipopolysacchride (LPS)で刺激し炎症性サイトカインの産生を検討した。さらにrecombinant mouse (rm) IL-10を投与し、抗炎症作用を検討した。
- 2) タバコ煙暴露マウスを用いた検討:野生型マウスとIL-10 KOマウスにタバコ煙を曝露し比較した。さらに、野生型マウスにタバコ煙を曝露し、rIL-10を投与した。上記マウスから気管支肺胞洗浄液(BALF)および肺組織を採取し、BALF中の細胞数とその分画、BALF上清中の炎症性サイトカイン濃度の定量、肺組織内のmRNA発現量の定量、炎症細胞浸潤の組織学的検討を行った。

### 【結果】

- 1) LPS刺激により腹腔マクロファージからのtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , keratinocyte-derived chemokine (KC), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)の産生は有意に増加した。IL-10 KOマウス由来マクロファージでは、TNF- $\alpha$ とKCの産生が野生型と比較して有意に増加していた( $p < 0.01$ )。TNF- $\alpha$ , KC, GM-CSF, MMP-9はrmIL-10の投与により有意に抑制された。
- 2) タバコ煙暴露マウスでは、肺への好中球遊走とTNF- $\alpha$ , KC, GM-CSF, MMP-9のmRNA発現は5-8日目に最大となり、以後減少した。IL-10のmRNA発現は5日目以降に増加し12日目に最大となった。IL-10 KOマウスは野生型と比較して、肺への好中球遊走、TNF- $\alpha$ のmRNA発現が有意に増加していた( $p < 0.05$ )。また、免疫組織学的染色でMMP-9陽性細胞が有意に増加していた( $p < 0.05$ )。野生型マウスにrmIL-10の投与を行うと肺への好中球遊走が有意に減少した( $p < 0.001$ )。

### 【結論】

IL-10はタバコ煙暴露マウスにおいて好中球遊走と、それによるTNF- $\alpha$ やMMP-9の発現を抑制し、抗炎症作用を示すことが明らかになった。

## 論文審査結果の要旨

【背景と目的】喫煙はChronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)など呼吸器疾患の重要な原因となる。本論文では、喫煙による気道炎症の機序ならびにinterleukin-10 (IL-10)による炎症抑制作用を検討するために、短期タバコ煙暴露による肺障害マウス(タバコ煙暴露マウス)を用いて以下の研究を行った。

【方法】1. 腹腔マクロファージを用いた検討:野生型マウスおよびIL-10遺伝子欠損(KO)マウスより腹腔マクロファージ(M $\Phi$ )を採取し、lipopolysacchride (LPS)で刺激後、炎症性サイトカインであるtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , 好中球遊走因子であるkeratinocyte-derived chemokine (KC), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), 肺組織のリモデリングに重要なmatrix metalloproteinase-9 (MMP-9)の産生を検討した。さらに本実験系に対してrecombinant mouse (rm) IL-10を投与し抗炎症作用を検討した。

2. タバコ煙暴露マウスを用いた検討:野生型マウスとIL-10 KOマウスにタバコ煙を曝露し、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細

胞数とその分画、TNF- $\alpha$ , KC, GM-CSF, MMP-9蛋白濃度の定量、肺組織内のTNF- $\alpha$ , KC, GM-CSF, MMP-9mRNAの定量、炎症細胞浸潤の組織学的検討を行った。また、同マウスに対して経気道的にrmIL-10を投与し抗炎症作用を検討した。

【結果】1. LPS刺激により腹腔M $\Phi$ からTNF- $\alpha$ , KC, GM-CSF, MMP-9の産生が有意に増加した。TNF- $\alpha$ とKCの産生は野生型と比較してIL-10 KOマウスM $\Phi$ で有意に増加していた( $p < 0.01$ )。TNF- $\alpha$ , KC, GM-CSF, MMP-9はいずれもrmIL-10の投与により有意に抑制された。

2. タバコ煙暴露マウスでは、IL-10mのRNA発現は5日目以降に増加し12日目に最大となった。一方、肺への好中球遊走とTNF- $\alpha$ , KC, GM-CSF, MMP-9のmRNA発現は5-8日目に最大となり、以後減少した。IL-10 KOマウスは野生型と比較して、肺への好中球遊走、TNF- $\alpha$ のmRNA発現が有意に増加していた( $p < 0.05$ )。また、免疫組織染色でMMP-9陽性細胞が有意に増加していた( $p < 0.05$ )。野生型マウスにrmIL-10を投与した結果、肺への好中球遊走は有意に減少した( $p < 0.001$ )。

【結論】IL-10はタバコ煙暴露マウスにおいて好中球遊走と、そ

学位論文要旨および審査要旨

れに伴う TNF- $\alpha$ , MMP-9 の発現を抑制し, 抗炎症作用を示すことが明らかになった。  
以上, 審査の結果, 学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 高木 永

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論文項目	Role of Ubiquitin Specific Protease 40 in the Developing Glomerulus
	授与番号 博甲医 第387号		糸球体の発生におけるユビキチン特異的プロテアーゼ40の役割についての研究
	授与年月日 平成24年3月5日		
	授与の要件 学位規程第5条	論文審査委員	主査 大倉康男 副査 有村義宏 大野秀樹 狩野葉子 奴田原紀久雄

### 学位論文の要旨

【背景と目的】最近の網羅的 mRNA 解析により、約300の新規糸球体特異的転写産物が報告され、その1分子として脱ユビキチン化酵素であるユビキチン特異的プロテアーゼ40 (USP40) が同定された。USP40の mRNA は広く生体内に発現すると報告されているが、その蛋白機能は未解明である。本研究は、糸球体発生における USP40 の機能的役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】腎 cDNA ライブラリーから USP40 を単離し、は乳類細胞用、大腸菌用、酵母用感染ベクターに導入後、USP40 発現細胞株、リコンビナント USP40、酵母 two-hybrid 法用 bait、リコンビナント USP40 を抗原とする抗体を作成した。発現細胞株とマウス成熟腎での USP40 の細胞内局在を免疫電顕法にて観察し、発現細胞株とマウス単離糸球体を材料に Western blot 法および RT-PCR 法を行った。マウス胎児腎と成熟腎を材料に、ポドサイトマーカー、血管内皮マーカーとの2重免疫蛍光染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。USP40 ノックダウンゼブラフィッシュを作成し、形態観察と糸球体濾過アッセイを行った。酵母 two-hybrid 法と発現細胞を用いた免疫沈降法にて USP40 の基質蛋白を検索した。同定された histidine triad nucleotide-binding protein1 (HINT1) について、USP40 発現細胞株と培養ポドサイトを材料に Western blot 法、USP40 発現細胞株とマウス新生児腎を材料に免疫蛍光染色を行った。

【結果】USP40 は糸球体優位に発現する 140kD の細胞質内蛋白であり、成熟糸球体ではポドサイトに強く、胎児腎では capillary-loop stage において内皮に強く発現していた。USP40 ノックダウンゼブラフィッシュは虚脱糸球体を呈し、内皮の有窓化障害と濾過機能の破綻がみられたが、ポドサイトの形態は保持された。USP40 と相互作用する蛋白としては HINT1 が同定され、免疫蛍光染色により発生腎における局在様式は USP40 と同様に観察された。また USP40 存在下で細胞質における発現が強くなることも確認された。培養ポドサイトでは、37℃で増殖停止した細胞で HINT1 および USP40 の発現が強くなった。

【考察と結論】USP40 は HINT1 を基質蛋白とする脱ユビキチン化酵素と考えられる。従来報告から、HINT1 はサイクリン依存性キナーゼ阻害分子 p27<sup>KIP1</sup> の分解抑制により細胞周期を抑制すること、一方 p27<sup>KIP1</sup> は胎生期を通して糸球体ではポドサイトのみに発現し内皮細胞には発現しないことが判明している。今回の結果は、1) USP40 が糸球体形成過程の内皮細胞発生において必須な役割を果たす新規分子であること、2) その機能は HINT1 の分解抑制により発揮される可能性があること、を示した。しかし内皮細胞における USP40-HINT1 の蛋白相互作用のさらなる機能発現分子は、ポドサイトにおける p27<sup>KIP1</sup> とは異なる細胞周期関連分子であることが推測された。

### 論文審査結果の要旨

網羅的な mRNA の解析で、約300の糸球体特異的転写産物が報告され、その1分子として脱ユビキチン化酵素であるユビキチン特異的プロテアーゼ40 (USP40) が同定されている。USP40 の糸球体発生における機能的役割を明らかにすることを目的とした研究である。

1) 腎 cDNA ライブラリーから USP40 を単離し、リコンビナント USP40 を抗原とする抗体を作成し、Western blot 法、RT-PCR で USP40 が糸球体に発現することを確認した。マウス成熟腎での USP40 の細胞内局在を免疫電顕法等で観察した。さらに、マウス胎児腎と成熟腎を用いて、糸球体の形成過程での USP40 の細胞内局在を検索した。2) USP40 ノックダウンゼブラフィッシュを作成し、形態観察と糸球体濾過アッセイを行った。3) USP40 と相互作用する蛋白として同定された histidine triad nucleotide-binding protein1 (HINT1) について、糸球体の形成過程での局在様式を観察した。

1) USP40 は糸球体優位に発現する 140kD の細胞質内蛋白であり、胎児腎では capillary-loop stage において内皮細胞に、成熟糸

球体ではポドサイトに強く発現した。2) USP40 ノックダウンゼブラフィッシュは虚脱糸球体を呈し、内皮の有窓化障害と濾過機能の破綻がみられたが、ポドサイトの形態は保持された。3) HINT1 の発生腎における局在は USP40 と同様であり、USP40 存在下で細胞質における発現が強くなることが確認された。培養ポドサイトでは、37℃で増殖停止した細胞で HINT1 および USP40 の発現が強くなった。

以上の結果から、1) USP40 が糸球体の形成過程における内皮細胞の発生に重要な役割を果たす新規分子であること、2) その機能は HINT1 の分解抑制により発揮される可能性があること、が明らかにされた。さらに、HINT1 はサイクリン依存性キナーゼ阻害分子 p27<sup>KIP1</sup> の分解抑制により細胞周期を抑制すること、p27<sup>KIP1</sup> は胎生期を通して糸球体ではポドサイトのみに発現し内皮細胞には発現しないことから、内皮細胞における USP40-HINT1 の蛋白相互作用の機能発現分子は、ポドサイトにおける p27<sup>KIP1</sup> とは異なる細胞周期関連分子であることが推測された。

以上のように、本論文は糸球体発生における USP40 の機能的役割を明らかにした研究であり、審査の結果、学位論文として価値あるものと認められた。

氏名 島崎 真希子

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Cerebral white matter injury due to lipopolysaccharides in immature rat brains: A model of periventricular leukomalacia by neonatal sepsis
	授与番号	博甲医 第388号		(リポ多糖投与による幼弱ラット大脳白質病変：新生児敗血症による脳室周囲白質軟化症モデル)に関する研究
	授与年月日	平成24年3月7日	論文審査委員	主査 岩下光利
	授与の要件	学位規程第5条		副査 岡島康友 川上速人 小林富美恵 千葉厚郎

### 学位論文の要旨

周産期医療の進歩によって早産低出生体重児の生命予後は著明に改善してきているが、生存した児の中での神経後遺症は今日も大きな課題であり、主に脳室周囲白質軟化症等の大脳白質病変(WMI)によるものであることが明らかになっている。WMIは、脳虚血による脳室周囲白質への循環不全が主な原因とされているが、臨床的には周産期に明らかな脳虚血のエピソードがないにもかかわらず発症するケースも多く、近年、感染機転がその原因として注目を集めている。疫学的研究では早産児での出生後の敗血症との関連が注目されてきている一方で、感染による動物実験モデルは主に子宮内感染モデルが用いられてきており、出生後の感染機転による動物モデルの報告は少ない。

今回我々は新生児敗血症モデルとして、生後3日のラットに対し大腸菌由来のリポ多糖(LPS)を腹腔内に投与し、生後10日に麻酔下で脳を採取し凍結切片にて大脳病変を組織学的に検討した。LPS投与量は高用量(25  $\mu$ g)と低用量(12.5  $\mu$ g)の2群に分け、正常対照には生食を投与した。

LPS投与群では、高容量、低用量群とも脳室周囲大脳白質に基質の非薄化と軽度の細胞浸潤を伴う病変が一部に認められた他は、典型的な脳室周囲白質軟化症に見られる様な壊死像や嚢胞形成は見られなかった。免疫組織化学での検討では、神経系の炎症性細胞である活性化ミクログリアとマクロファージの増加傾向が大脳白質に局限して認められた。

興味深いことに、LPS投与群では脳室周囲大脳白質でのオリゴデンドロサイト(OL)の減少が認められ、その密度を計測したところ白質全体でOLの密度は有意に低下していた。またOLによって産生される髄鞘構成成分であるミエリン塩基性蛋白の発現の低下も認められ、発現面積を計測し比較したところコントロール群と比較し有意に減少していた。またLPS投与群では白質、特に脳梁においてその厚さが有意に低下していた。なお、大脳白質に存在する同じグリア系細胞であるアストロサイトの密度にコントロール群と比較し変化は認められず、こうした変化はOLに特異的であった。

今回我々の実験で、LPSが強い壊死性変化などを介さずに、OLの減少と髄鞘化形成不全から大脳白質の低形成が惹起されるということが示された。敗血症は早産低出生体重児では高頻度に見られる合併症であり、感染機転によるWMIは発達障害等の神経後遺症に関連し臨床的にも重要であると考えられた。

### 論文審査結果の要旨

〔目的〕 周産期医療の進歩によって早産児の生命予後は大幅に改善されてきたが、合併する大脳白質病変(以下WMI)による神経学的後障害の予防はいまだに確立していない。WMIの発症機転として脳虚血はよく知られているが、近年、児の感染、ことに早産児の出生後敗血症の関与が注目されてきた。本研究では、ラット新生仔にリポ多糖を腹腔内投与し新生児敗血症のモデルとし、大脳への影響を組織学的に解析することで、WMIの病態を解明することを目的とした。

〔方法〕 生後3日目のラット新生仔に大腸菌由来のリポ多糖(LPS) 12.5  $\mu$ gまたは25  $\mu$ gを腹腔内投与し、生後10日目に脳組織を採取、HE染色と免疫組織染色でLPS投与の影響を解析した。

〔結果〕 LPS投与群では脳室周囲大脳白質の基質の非薄化が見られ、免疫組織染色では大脳白質に活性化ミクログリアとマクロファージの局在が見られたが、典型的な脳室周囲白質軟化症

(PVL)に見られる壊死像や嚢胞形成は見られなかった。LPS投与群で活性化ミクログリアとマクロファージが大脳白質に局限して増加する傾向が見られ、オリゴデンドロサイトの減少が認められ、大脳白質全体でアストロサイトの密度に変化はないがオリゴデンドロサイトの密度が有意に減少していた。また、LPS投与群では脳梁の厚さが有意に低下しており、髄鞘構成タンパクであるミエリン塩基性タンパク(MBP)の発現低下も見られ、髄鞘形成不全が示唆された。

〔考察〕 LPS投与により、PVLに特有の所見は見られなかったものの、オリゴデンドロサイトの減少と髄鞘形成不全が認められたことから、WMIの病態生理に明かに関与していることが示唆された。WMIは新生児の神経学的障害の主因であるが、敗血症などの児の感染もWMIの原因となることが示された意義は大きく、学位論文として価値あるものと認められた。

氏名 上原 一朗

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Circulating levels of uric acid in mother and fetus are not controlled by placental uric acid transporters (尿酸の母体胎児循環に尿酸トランスポーターは関与しない)
	授与番号	博甲医 第389号	論文審査委員	主査 山田 明 副査 川上速人 大野秀樹 奴田原紀久雄 荻澤融司
	授与年月日	平成24年3月8日		
	授与の要件	学位規程第5条		

### 学位論文の要旨

尿酸はヒトにおけるプリン体の最終代謝産物である。体内で合成された尿酸は約70%が腎臓から排泄されるため、主要排泄器官である腎臓での尿酸輸送の研究が発展してきたが、胎盤を含む他臓器における尿酸代謝は未だ不明な点が多い。妊娠高血圧症候群(PIH)や多胎妊娠では母体血清尿酸値が上昇することが報告されているが、その詳細な機序は不明である。本研究では、母体と胎児での血清尿酸値を測定し、また、胎盤での尿酸輸送担体の発現をRT-PCRと免疫組織染色で解析し、さらに、絨毛培養細胞を用いて放射標識尿酸の取り込みを解析することにより、母体・胎児間の尿酸輸送を明らかにすることを目的とした。

母体血清尿酸値は正常単胎妊娠群(n=50)より双胎群(n=21)とPIH群(n=13)の方が高値であった。母体と胎児の血清尿酸値はほとんど差が見られず、強い正の相関を認めた( $r=0.881$ ,  $p<0.001$ )、また、臍帯動静脈間の血清尿酸値にも差は見られず強い正の相関を認めた( $r=0.999$ ,  $p<0.001$ )。RT-PCRの結果から、胎盤には尿酸輸送担体のうち、OAT4, OAT10, URATv1, ABCG2が発現しており、さらに絨毛培養細胞ではそれらに加えてMRP4の発現を認めた。免疫組織染色ではOAT4は合胞体栄養膜細胞の基底膜側に、OAT10は合胞体栄養膜細胞の絨毛間腔側と基底膜側に局在し、ABCG2は合胞体栄養膜細胞の絨毛間腔側に局在し、URATv1-shortが合胞体栄養膜細胞の絨毛間腔側と血管内皮細胞に、URATv1-longは血管内皮細胞に局在を認めた。しかしながら、培養絨毛細胞では放射標識尿酸の取り込み活性が見られなかった。これらのことより、母体・胎児間の尿酸輸送は迅速に行われているが、paracellular輸送など、胎盤の尿酸輸送担体を介さない機序が示唆された。

### 論文審査結果の要旨

尿酸はヒトにおけるプリン体の最終代謝産物である。体内で合成された尿酸は約70%が腎臓から排泄されるため、主要排泄器官である腎臓での尿酸輸送の研究が発展してきたが、胎盤を含む他臓器における尿酸代謝は未だ不明な点が多い。妊娠高血圧症候群(PIH)や多胎妊娠では母体血清尿酸値が上昇することが報告されているが、その詳細な機序は不明である。本研究では、母体と胎児での血清尿酸値を測定し、また、胎盤での尿酸輸送担体の発現をRT-PCRと免疫組織染色で解析し、さらに、絨毛培養細胞を用いて放射標識尿酸の取り込みを解析することにより、母体・胎児間の尿酸輸送を明らかにすることを目的とした。

母体血清尿酸値は正常単胎妊娠群(n=50)より双胎群(n=21)とPIH群(n=13)の方が高値であった。母体と胎児の血清尿酸値はほとんど差が見られず、強い正の相関を認めた( $r=$

$0.881$ ,  $p<0.001$ )、また、臍帯動静脈間の血清尿酸値にも差は見られず強い正の相関を認めた( $r=0.999$ ,  $p<0.001$ )。RT-PCRの結果から、胎盤には尿酸輸送担体のうち、OAT4, OAT10, URATv1, ABCG2が発現しており、さらに絨毛培養細胞ではそれらに加えてMRP4の発現を認めた。免疫組織染色ではOAT4は合胞体栄養膜細胞の基底膜側に、OAT10は合胞体栄養膜細胞の絨毛間腔側と基底膜側に局在し、ABCG2は合胞体栄養膜細胞の絨毛間腔側に局在し、URATv1-shortが合胞体栄養膜細胞の絨毛間腔側と血管内皮細胞に、URATv1-longは血管内皮細胞に局在を認めた。しかしながら、培養絨毛細胞では放射標識尿酸の取り込み活性が見られなかった。これらのことより、母体・胎児間の尿酸輸送は迅速に行われているが、paracellular輸送など、胎盤の尿酸輸送担体を介さない機序が示唆された。

本論文は母体・胎児間の尿酸輸送機構に関し新たな知見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る。

氏名 吉田 勤

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目 小型肺腺癌におけるGOLM1遺伝子の異常発現
	授与番号 博甲医 第390号	
	授与年月日 平成24年7月2日	論文審査委員 主査 古瀬純司
	授与の要件 学位規程第5条	副査 菅間 博 塩川芳昭 永松信哉 望月一男

### 学位論文の要旨

【背景】原発性肺癌において、腺癌は最も頻度の高い組織型である。野口らは小型肺腺癌において、既存の肺胞構造を置換性に増殖する腫瘍をType A, B, Cに、既存の肺胞構造を破壊性に増殖する腫瘍をType D, E, Fに分類し、悪性度に従った分類法として提案した(野口分類)。以前に我々は肺腺癌において、野口分類Type CおよびType A症例から差次的に発現する遺伝子をスクリーニングし、7種類の機能不明な遺伝子を同定した。その一つがGOLM1であった。GOLM1は一部の癌腫で高発現が報告されている。本研究の目的は、GOLM1遺伝子の発現と肺腺癌の進行の関係を解明することである。

【対象と方法】長径2cm以下の肺腺癌外科切除症例、計174例を対象とした。各腫瘍は病理学的にWHO組織分類、野口分類により分類し、肺腺癌組織におけるGOLM1の発現を、免疫組織化学的に解析した。GOLM1の免疫組織染色において、画像解析ソフトを用いた定量的評価を試み、加えてGOLM1高発現症例を電子顕微鏡下に観察した。統計解析にはSPSSを使用し、生存曲線はKaplan-Meier法を用いた。

【結果】肺腺癌野口分類Type A症例に比較し、Type C症例で高発現を認めたGOLM1は、免疫組織化学的にも高発現が確認された。免疫組織化学的染色において、GOLM1は正常肺組織の気管支上皮細胞で核周囲に均一で粗大な顆粒状に染色され、反応性過形成性肺胞上皮では核周囲に大小不同の顆粒状に染色された。一方肺癌細胞では核周囲に大小不同の顆粒状に染色され、反応性過形成性肺胞上皮と比較して、135例でGOLM1高発現、39例で同等もしくは低発現を認めた。多変量解析の結果、病理学的に浸潤癌と非浸潤癌で有意差を認めた。生存解析ではGOLM1高発現群に比し、低発現群は予後良好な傾向が見られたが、有意差は認められなかった。肺癌組織の免疫組織標本におけるGOLM1陽性信号面積を、画像解析ソフトを用いて解析した結果、GOLM1陽性信号面積は免疫組織化学的染色の染色強度に比例していた。GOLM1高発現肺腺癌症例を電子顕微鏡的に観察した結果、腫瘍細胞内におけるゴルジ体、粗面小胞体および分泌小胞が多数確認された。

【結語】肺腺癌におけるGOLM1遺伝子発現は、免疫染色でも確認された。GOLM1低発現症例は非浸潤肺腺癌にみられ、予後良好な傾向が見られた。肺腺癌細胞では、ゴルジ体を含む細胞内小器官に、形態学的変化を来している可能性が示唆された。

### 論文審査結果の要旨

原発性肺癌において、腺癌は最も頻度の高い組織型である。さらに小型肺腺癌の悪性度に従い、既存の肺胞構造を置換性に増殖する腫瘍をType A, B, C、既存の肺胞構造を破壊性に増殖する腫瘍をType D, E, Fに分類する野口分類が汎用されている。これまで肺腺癌において、野口分類Type CおよびType A症例に発現する遺伝子をスクリーニングし、GOLM1を含む7種類の機能不明な遺伝子を同定した。本研究の目的は、GOLM1遺伝子の発現と肺腺癌の進行度との関係を明らかにすることである。

対象は長径2cm以下の肺腺癌で外科切除を行った174例である。各腫瘍は病理学的にWHO組織分類および野口分類により分類し、肺腺癌組織におけるGOLM1の発現を、免疫組織化学的に解析した。GOLM1の免疫組織染色において、画像解析ソフトを用いた定量的評価を試み、加えてGOLM1高発現症例を電子顕微鏡下に観察した。統計解析にはSPSSを使用し、生存曲線はKaplan-Meier法を用いて作成した。

肺腺癌の野口分類Type A症例に比較し、Type C症例でGOLM1の高発現を認めた。免疫組織化学的染色において、GOLM1は正常肺組織の気管支上皮細胞では核周囲に均一で粗大な顆粒状に染色された。一方、反応性過形成性肺胞上皮および肺癌細胞では核周囲に大小不同の顆粒状に染色されたが、肺癌細胞の135例(77.6%)においてGOLM1の高発現を認めた。GOLM1の発現程度に関して多変量解析を行った結果、浸潤癌と非浸潤癌で有意差を認めた。生存解析ではGOLM1高発現群に比し、低発現群で予後良好な傾向がみられた。肺癌組織の免疫組織標本におけるGOLM1陽性信号面積を解析したところ、同面積は免疫組織化学的染色の染色強度に比例していた。また、GOLM1高発現肺腺癌症例を電子顕微鏡的に観察した結果、腫瘍細胞内におけるゴルジ体、粗面小胞体および分泌小胞が多数確認された。

本研究は、小型肺腺癌におけるGOLM1遺伝子発現の免疫染色による確認、電子顕微鏡的での特徴、ならびに予後との関連を初めて報告したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 高 和 正

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	Histone Lysine Methyltransferase SETD8 Promotes Carcinogenesis by Deregulating PCNA Expression. (ヒストンリジンメチルトランスフェラーゼSETD8は、PCNAのメチル化を介し癌形成を促進させる)
	授与番号 博甲医 第391号		
	授与年月日 平成24年7月11日		
	授与の要件 学位規程第5条	論文審査委員	主査 井本 滋 副査 菅間 博 永松信哉 楊 國昌 渡邊 卓

### 学位論文の要旨

【背景】ヒストンメチル化酵素・脱メチル化酵素により、ヒストンのリジン残基のメチル化が調節され、翻訳後修飾されていることはよく知られている。また、多くの癌組織でヒストンメチル化酵素・脱メチル化酵素の発現が亢進していることが報告されつつある。しかし、これらの酵素によるノンヒストンタンパク質修飾の意義、特にヒト癌形成における役割に関しては殆ど解明されていない。

【方法】癌治療の標的となりうるヒストンメチル化酵素の新たな基質を探索すべく、結合タンパク質を免疫沈降法にて同定する。同定されたタンパク質に関して、質量分析法を用いてメチル化の有無及びメチル化部位の探索を行う。メチル化部位が確定された基質は、メチル化タンパク質特異的抗体を作製後、ウエスタンブロット法、免疫組織学的染色などにより機能解析を行う。

【結果】ヒストンメチル化酵素の一つであるSETD8は様々な癌において高発現し、癌細胞の増殖制御に関わっていた。また、SETD8がPCNAタンパク質の248番目のリジンをメチル化し、PCNAの機能調節を行っていた。248番目リジンの置換によってSETD8によるPCNAのメチル化は観察されず、SETD8によるPCNAメチル化がPCNAタンパク質の安定性に寄与していることを証明した。免疫沈降や免疫染色の結果、この248番目リジンのメチル化がPCNAタンパク質とフラップエンドヌクレアーゼ(FEN1)タンパク質の結合に影響を与えていた。PCNAタンパク質の248番目リジンのメチル化の欠如により、岡崎フラグメント成熟の遅延、DNAの複製の遅れが生じ、DNA障害が引き起こされた。メチル化PCNAの増加は癌細胞で多くみられ、癌組織標本でもSETD8とPCNAの発現はタンパク質レベルで強い相関が見られた。

【考察】ノンヒストン蛋白のメチル化の報告は限られており、PCNAのメチル化の報告は世界初である。癌細胞においてSETD8とPCNAのタンパク質レベルの発現には相関がみられ、いずれも細胞周期S期で重要な役割を果たし、PCNAのメチル化の欠如はその安定性に寄与していた。また、PCNAの結合タンパク質の一つであるFEN1は、PCNAのメチル化の有無によりその機能に影響があり、メチル化の欠如はFEN1の結合を低下させDNA複製に影響を与えていた。PCNAはDNAの複製、修復に重要な役割を果たしており、今回の機能解析の結果、SETD8によるメチル化が癌形成に深く寄与していることが分かった。さらに、SETD8は癌で高発現し、正常細胞での発現が低レベルであることから、癌治療の良い標的となりうると思われる。

【結語】本研究により、PCNAタンパク質の機能がメチル化酵素SETD8により制御され、ヒト発癌に寄与している事が証明された。これは、ノンヒストンタンパク質であるPCNAのメチル化異常がヒト発癌に寄与するという新しい概念を提出したことにもなり、今後の癌研究発展にも大きく貢献する成果である。

### 論文審査結果の要旨

【背景】ヒストンのメチル化酵素と脱メチル化酵素により、ヒストンのリジン残基、アルギニン残基のメチル化が調節され翻訳後修飾がなされている。癌において同酵素群の発現亢進が報告されているが、非ヒストン蛋白質の修飾については不明であった。高和らはヒストンリジンメチル化酵素SETD8がPCNA (proliferation cell nuclear antigen) をメチル化することに注目して癌の細胞増殖等に及ぼす影響を検討した (Cancer Res, 72, 2012)。【方法】癌細胞株および肺癌などの臨床検体におけるSETD8の発現をcDNA microarrayおよび免疫組織染色にて確認した。また、siRNAによりSETD8をノックダウンした細胞株における細胞周期の変化を観察した。免疫沈降法にてSETD8に結合する蛋白質を同定した。Methyltransferase assayにて結合蛋白質のメチル化の有無を検討し、質量分析法にてメチル化部位を同定した。同定された結合蛋白質のメチル化特異的抗体を作製し、Western blot, 免疫染色にて機能解析を行った。メチル化部リジンをアラニンに変換した組換え遺伝子を導入した細胞株を用いて野生株と比較検討した。さらに、フラップエンドヌクレアーゼ

(FEN1)蛋白質におけるSETD8の結合蛋白質のメチル化の意義を増殖試験、ユビキチン化修飾試験、岡崎フラグメント成熟法にて検討した。【結果】SETD8は種々の癌細胞株と肺癌他の腫瘍組織で高発現が認められた。SETD8はPCNAに結合し、その248番目のリジン残基をメチル化することを確認した。このリジンをアラニンに置換したPCNAでは、SETD8によるメチル化が起こらず不安定化し、ポリユビキチン化され分解された。このことから、SETD8によるメチル化がPCNAの安定性に寄与していることが示唆された。メチル化したPCNAはFEN1と結合し、核内に共局在していた。また、PCNAの248番目リジン残基のメチル化の欠如によって、岡崎フラグメント成熟の遅延、DNAの複製の遅れが生じ、DNAに障害が引き起こされた。さらに、肺癌手術検体においてSETD8とPCNAの蛋白レベルの発現には強い正の相関を認められた。【考察】本研究は、SETD8による非ヒストン蛋白質であるPCNAのメチル化とその制御機能に関する初めての報告である。S期においてSETD8によるPCNAのメチル化がその安定性とDNA複製に重要な役割を果たすことが示唆された。SETD8は癌細胞株や腫瘍組織で高発現し正常組織ではほとんど発現がみられないことから、腫瘍の増殖に関与する因子とし

学位論文要旨および審査要旨

て新たな癌治療の標的となりうることが示唆された。

審査の結果、本研究はSETD8がメチル化を介してPCNA蛋白質の機能を制御し、癌の細胞増殖に重要な役割を果たすことを解明するとともに、新たな癌治療の発展にも寄与すると考えられることから、学位論文として価値あるものと認められた。

氏名 渡邊 交 世

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	High mobility group box protein-1 in experimental autoimmune uveoretinitis
	授与番号	博乙医 第529号		(実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) における眼内high mobility group box protein-1 (HMGB-1) の発現に関する研究)
	授与年月日	平成23年3月28日		
	授与の要件	学位規程第6条	論文審査委員	主査 神谷 茂 副査 有村義宏 狩野葉子 松田宗男 萬 知子

### 学位論文の要旨

HMGB (High Mobility Group Box Protein) -1は全ての真核細胞に発現している分子量約30kdの核内蛋白質であり、ヌクレオゾームの安定化に関わる。最近では単球などの炎症性細胞からHMGB-1が能動的に分泌され、proinflammatory cytokineとしての役割も注目されている。今回、実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) の病態におけるHMGB-1の関与について検討した。

まず前房水中のHMGB-1の濃度について検討したところEAU発症群では炎症極期で急激なHMGB-1濃度の上昇がみられ、前房水中のTNF- $\alpha$ 濃度と相関していた。免疫組織染色にて正常眼およびEAU発症眼の虹彩・毛様体・網膜にHMGB-1の発現が確認され、さらにEAU群ではHMGB-1陽性、CD68陽性細胞の前房、網膜下への浸潤がみられた。またIn vitroの系においてEAU発症ラットから採取したリンパ節細胞をHMGB-1の存在下でラット網膜由来の合成ペプチドであるR14にて抗原刺激すると、非存在下に比べてリンパ球の増殖反応が有意に増強した。

これらの結果からHMGB-1が眼局所において、ぶどう膜炎の領域における新たなproinflammatory cytokineとして病態に関与している可能性が示唆された。

### 論文審査結果の要旨

High mobility group box protein-1 (HMGB-1)はヌクレオゾームの安定化や遺伝子転写に関与する核蛋白質である。近年HMGB-1が新規の炎症性サイトカインおよび内毒素の病原性発現のlate mediatorとして作用することが明らかとなった。実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (experimental autoimmune uveoretinitis: EAU) はヒトにおけるベーチェット病、サルコイドーシスなどのぶどう膜網膜病変の類似モデルとなる。本論文ではEAUにおけるHMGB-1の発現および生物学的意義について検討が行われた。

Lewisラットにウシ網膜由来のIRBP (interphotoreceptor retinoid binding protein) ペプチドR14 (0.5  $\mu$ g) をフロイント完全アジュバンドとともに皮下注射してEAUモデルを誘導した。眼症状を臨床スコアリングにより評価し、眼組織におけるHMGB-1およびRAGE (receptor for advanced glycation end products) 発現は免疫組織染色法により検出した。前房水および血清中のHMGB-1の定量はELISA法に依った。EAUモデルラッ

トよりリンパ節細胞を採取し、細胞増殖試験に供した。3% thioglycolateを腹腔内投与されたラットの腹腔内マクロファージを採取後、培養を行ないHMGB-1添加後のTNF $\alpha$ 産生量をELISA法にて測定した。

EAU発症ラットでは抗原投与14日目に眼症状スコアが最大となり、前房水中にHMGB-1およびTNF $\alpha$ が検出された。免疫組織染色にて正常眼およびEAU発症眼の虹彩・毛様体・網膜にHMGB-1の発現が認められた。また、EAU群ではHMGB-1陽性、RAGE陽性、CD68陽性細胞の前房、網膜下への浸潤がみられた。HMGB-1はマクロファージからのTNF $\alpha$ の産生を誘導した。R14投与はEAU発症ラットリンパ節由来のリンパ球の増殖反応を有意に増強した。

これらの研究結果より、HMGB-1はEAU発症モデルにおける病態発現に関与するとともに、新規の炎症性サイトカインとして作用し、眼組織での炎症の増強を引き起こす可能性が示唆された。本研究はぶどう膜網膜炎の病態解明に新たな知見を提示するものであり、審査の結果学位論文として価値あるものと認められた。

氏名 五十嵐 一 峰

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	Functional assessment of proximal arm muscles by target-reaching movements in patients with cervical myelopathy
	授与番号 博乙医 第530号		腕のリーチング運動を用いた頸髄症患者の上肢近位筋の機能評価
	授与年月日 平成23年5月23日		
	授与の要件 学位規程第6条	論文審査委員	主査 千葉厚郎 副査 木崎節子 古賀良彦 塩川芳昭 平井直樹

### 学位論文の要旨

【目的】頸髄症は頸髄の圧迫により神経変性が引き起こされ、上下肢の感覚・運動障害、排尿障害等を生じる。上肢の病勢評価として整形外科領域では、日本整形外科学会の頸髄症評価基準（JOAスコア）、手の10秒テスト（手を握る/開くを10秒間に素早く繰り返す）、遠位筋や近位筋に対する徒手筋力テスト（MMT）等を用いている。しかしMMT以外は手の巧緻運動障害評価が主であり、近位筋運動を定量的に評価する検査法は確立されていない。動物実験で頸髄の側索伝導路を損傷すると、遠位筋運動と近位筋運動が個別に障害される。従って頸髄症の包括的な評価には、上肢近位筋運動評価が必要である。本研究では上肢近位筋運動として、対象に向かって腕を伸ばすリーチング運動を利用した運動解析法を考案し、臨床の有効性を検討した。

【方法】圧迫除去手術前の頸髄症患者28名（64±11歳）とage-matchした健常者15名（65±10歳）を対象とした。18名の患者は、術後（2週-1年）にも検査を行った。リーチング運動検査として、音刺激を合図に正面LEDに腕を伸ばし、できるだけ速くかつ正確に点灯するLEDに触れる運動を行わせた。運動開始後、At randomに点灯するLEDを左もしくは右のLEDに切り替え、素早い運動修正を観察した。運動中の示指の位置を3次元位置計測システムで記録した。患者には、JOAスコア、MMT、10秒テスト、経頭蓋磁気刺激による運動誘発電位検査も実施した。

【結果】患者は遠位筋MMT、JOAスコア、10秒テストに低下を示した。近位筋MMT低下は顕著ではなかった。運動誘発電位の潜時は、遠位筋・近位筋とも延長していた。リーチング運動検査では、運動修正潜時延長と到達位置誤差増大を示した。運動修正潜時と到達位置誤差は、従来の検査結果（JOAスコア等）とは相関しなかった。手術施行後、運動誘発電位を除くすべての検査結果に改善が認められた。しかし改善のタイミングは多少異なり、リーチングは術直後に、従来の検査結果は術後数か月の間に徐々に改善した。術後の修正時間とJOAスコアの改善は相関を示し、修正時間を加えることによりJOAスコアの予後予測を改善できた。

【結論】頸髄症患者に対するリーチング運動検査は、従来の検査では評価できない近位筋運動障害を検出できた。JOAスコアの予後予測改善は、リーチング運動に関わる神経回路が巧緻運動回復に関与する可能性を示唆した。

### 論文審査結果の要旨

整形外科領域における頸髄症患者の上肢機能の臨床評価として、日本整形外科学会の頸髄症評価基準（JOAスコア）、手を握る/開くを10秒間に素早く繰り返す「10秒テスト」、遠位筋や近位筋に対する徒手筋力テスト（MMT）等がこれまで用いられてきた。しかしMMT以外の評価尺度は手（遠位筋）の運動障害評価が主であり、近位筋の運動障害を定量的に評価する検査法は確立されていなかった。頸髄損傷の動物実験からは、上肢の遠位筋運動と近位筋運動は別のシステムによって制御されていることが示唆されており、頸髄症の包括的な評価には上肢近位筋運動障害の評価法が必要と考えられる。本研究では、対象に向かって腕を伸ばすリーチング運動を利用した上肢近位筋の運動解析法を考案し、その臨床の有効性を検討した。

圧迫除去手術前の頸髄症患者28名（64±8歳）とage-matchした健常者15名（67±10歳）を対象とした。リーチング運動検査として、音刺激を合図に腕を伸ばし、到達目標にできるだけ速くかつ正確に触れる運動を行わせ、運動中の示指の位置を3次元位置計測システムで記録した。運動開始後、到達目標の位置を無作為に変化させ、素早い運動修正を観察した。患者には、JOAスコア、MMT、10秒テスト、経頭蓋磁気刺激による運動誘発電位

検査も実施した。18名の患者は、術後（2週-1年）にも検査を行い経時的変化を観察した。

術前の患者は遠位筋MMT、JOAスコア、10秒テストに低下を示した。近位筋MMT低下は顕著ではなかった。運動誘発電位の潜時は、遠位筋・近位筋とも延長していた。リーチング運動検査では、運動修正時間の延長と到達位置誤差の増大がみられたが、この機能低下は従来の検査結果（JOAスコア等）とは相関しなかった。手術施行後、運動誘発電位を除くすべての検査結果に改善が認められたが、改善のタイミングは多少異なり、リーチングは術直後に、従来の検査結果は術後数か月の間に徐々に改善した。リーチング運動検査における術後の運動修正時間とJOAスコアの改善は相関を示し、術前・術直後のJOAスコアにリーチング運動検査の運動修正時間を加えることによって、JOAスコアで評価される術後の長期的機能予後の予測精度が向上した。

本研究は、頸髄症患者において従来の検査では評価できない近位筋の運動障害の新たな評価方法を示し、また、それが長期的な上肢運動回復の予測にも有用であることを示した。本検査法は今後、頸髄障害患者の病態評価や予後予測のための新たな検査手段として臨床応用出来る可能性がある。審査の結果、本論文は学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 池田俊貴

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Serum pentosidine, an advanced glycation end product, indicates poor outcome after acute ischemic stroke (終末糖化産物ペントシジンの血清濃度と虚血性脳血管障害患者の短期予後との因果関係)
	授与番号	博乙医 第531号		
	授与年月日	平成23年5月27日		
	授与の要件	学位規程第6条	論文審査委員	主査 神崎恒一 副査 千葉厚郎 永松信哉 林 潤一 角田 透

### 学位論文の要旨

【目的】近年、終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) は糖尿病や腎機能障害のみならず、心血管系疾患や動脈硬化の発症や進展に関与している事が明らかとなっている。しかし、脳梗塞とAGEsに関する研究は少なく、AGEsの一つであるペントシジンに関する報告はない。今回、ペントシジンの濃度が虚血性脳血管障害患者における短期予後と関連するか検討した。【方法】対象は急性期虚血性脳血管障害患者83例で、入院時の血清ペントシジン濃度を測定し、入院後30日の時点でmodified Rankin Scale (mRS) を用いて臨床所見の評価を行った。血清ペントシジン濃度と予後との関連を、単変量/多変量ロジスティック回帰分析を用いて評価を行った。【結果】単変量ロジスティック回帰分析では、高血清ペントシジン濃度 ( $p=0.001$ )、病型 ( $p=0.045$ )、高齢 ( $p=0.03$ )、男性 ( $p=0.04$ )、脂質異常症のないもの ( $p=0.02$ )、梗塞部位 ( $p=0.001$ )、梗塞サイズ ( $p=0.001$ ) が、入院後30日のmRS  $>2$  と有意に関連していた。また、高血清ペントシジン濃度 ( $p=0.001$ )、高血清クレアチニン値 ( $p=0.001$ )、梗塞部位 ( $p=0.04$ ) が、mRS悪化と有意に関連していた。多変量ロジスティック回帰分析では、高血清ペントシジン濃度のみが ( $p=0.018$ ,  $p=0.003$ )、入院後30日のmRS  $>2$ 、mRS悪化ともに有意に関連していた。【結論】高血清ペントシジン濃度は急性期虚血性脳血管障害の発症30日後の予後不良または悪化に関連する有用な指標であることが判明した。この新たなバイオマーカーは急性期虚血性脳血管障害患者のリスク階層化に有用である。

### 論文審査結果の要旨

終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGE) は血管障害疾患の発症と関連するとの報告を背景として、本研究では虚血性脳血管障害のため入院した患者の30日後の身体機能障害とAGEのひとつであるペントシジンの血中濃度との関係について検討を行った。

公立阿伎留医療センターに入院した急性期虚血性脳血管障害患者83例 (男性48名、女性35名、平均年齢75歳) を対象として、入院時の血清ペントシジン濃度と入院後30日の時点での身体機能 (modified Rankin Scale: mRS, 0-6段階で評価) との関係を単変量ならびに多変量ロジスティック回帰分析で評価した。単変量回帰分析では、入院後30日の時点でのmRS  $>2$  (中等度以上の機能障害) と有意な関連を示した因子は、血清ペントシジン濃度高値 ( $p=0.001$ )、梗塞部位 ( $p=0.001$ )、梗塞サイズ ( $p=0.001$ )、非塞栓性梗塞 ( $p=0.045$ )、高齢 ( $p=0.02$ )、男性 ( $p=0.04$ )、脂質異常症がないこと ( $p=0.02$ ) であった。これらの因子のうち、

多変量ロジスティック回帰分析で有意な関連要因として残ったものは血清ペントシジン濃度高値 ( $p=0.02$ )、男性 ( $p=0.02$ )、脂質異常症がないこと ( $p=0.01$ ) の3つであった。次に、mRSが入院時に比べて悪化していたことと有意な関連を示した因子は、血清ペントシジン濃度高値 ( $p=0.003$ )、血清クレアチニン高値 ( $p=0.02$ )、梗塞部位 ( $p=0.04$ ) であった。これらの因子のうち、多変量ロジスティック回帰分析で有意な関連要因として残ったものは血清ペントシジン濃度高値 ( $p=0.003$ )、血清クレアチニンの高値 ( $p=0.01$ ) の2つであった。さらにROC解析によってmRS悪化を予測しうる血清ペントシジン濃度は  $0.055 \mu\text{g/ml}$  (感度62.5%、特異度80.4%) であると判明した。

以上、本論文は、血清ペントシジン濃度高値が入院30日後の急性期虚血性脳血管障害患者の身体機能の不良もしくは悪化の予測に役立つ指標であることを見出した臨床的価値のある論文であり、審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 丸野 秀人

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	家兔骨延長モデルにおけるPTH間歇投与の仮骨への影響
	授与番号 博乙医 第532号	論文審査委員	主査 神崎恒一
	授与年月日 平成23年6月29日		副査 似鳥俊明 石田 均 遠山 満 赤川公朗
	授与の要件 学位規程第6条		

### 学位論文の要旨

〔目的〕 仮骨延長法は長管骨の粉碎骨折や、骨腫瘍切除後の骨欠損などによる短縮肢の延長に中広く臨床応用されているが、仮骨の成熟に延長期間の2~3倍の時間を要し創外固定器の装着期間が長期に及ぶことが問題点である。副甲状腺ホルモン（以下PTH）は、間歇的に投与すると骨形成促進作用があり骨粗鬆症に臨床応用されている。今回、ヒトと同じリモデリング動物である家兔の仮骨延長モデルを作成し、PTHの仮骨形成への促進的な作用について画像と力学的検討から明らかにするために、以下の基礎的検討を行った。

〔材料と方法〕 日本白色家兔（体重2.2~2.6kg）15羽を用い、静脈麻酔下に後脚小腿にヒト短管骨用創外固定器を装着後、脛骨を骨切りし、仮骨延長モデルを作成した。術後7日間待機した後、1回0.375mmの骨延長を12時間毎に連続14日間、計28回施行した（総延長距離は10.5mm）。PTH10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群（以下P10群）、30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群（以下P30群）、対照の生理食塩水群（以下N群）の3群（各群5羽）に分け、延長開始と同時にPTHあるいは生理食塩水を一日1回隔日に4週間皮下注投与した。術後8週で屠殺し下腿骨を採取し、仮骨に対して、単純X線像、骨密度、pQCTによる仮骨部断面積、皮質骨断面積測定、microCTによる骨微細構造測定、および3点曲げによる力学試験を行った。力学試験では①吸収エネルギー（Nmm）、②最大点荷重（N）、③剛性（MPa）を測定した。統計処理にはJMP統計ソフトを用い、Wilcoxon検定で $p < 0.05$ を有意差ありとした。

〔結果〕 単純X線像では全例に骨癒合を得られた。特徴として、P30群では術後4週の時点ですでにリモデリング像が出現し、術後8週では仮骨幅の増大が観察され、他の2群より仮骨のリモデリングが促進していた。また仮骨部全骨断面積において、P30群はN群よりも平均24%増大するなど、他の2群よりも有意に大きかった。骨微細構造では、P30群の骨梁数は最大であったが、単位体積あたりの骨量、骨梁幅は他の2群よりも有意に小さかった。一方、力学試験における最大点荷重は、有意差はないもののP30群が最大であり、剛性はN群がPTH投与群より大きかった。平均吸収エネルギーは、N群が170、P10群が240、P30群が586とPTH容量依存的に大きくなり、P30群はN群の約3倍、P10群の約2.5倍と他の2群よりも有意に大きかった。

〔結論〕 PTHの間歇投与は、家兔の仮骨延長モデルにおいて骨微細構造のリモデリングを促進し、また外骨膜性の骨形成により仮骨の横断面積を増大させ仮骨の外周径を大きくすることで仮骨強度を増強するなど、仮骨形成に促進的に働くことが示された。

### 論文審査結果の要旨

仮骨延長法は長管骨の粉碎骨折や、骨腫瘍切除後の骨欠損などによる短縮肢の延長に対して幅広く臨床応用されている。本論文は、家兔の仮骨延長モデルを用いて、副甲状腺ホルモン（PTH）の仮骨形成への促進効果について、画像と力学的な点から検討した研究である。

〔方法の概略〕 日本白色家兔15羽の後脚脛骨を骨切りし、術後14日間に渡って1回0.375mmの骨延長を12時間毎に計28回行った。同時にPTH10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （P10群）、30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （P30群）、生理食塩水（対照群）を隔日で皮下投与した。術後8週で屠殺、下腿骨を採取し、単純X線像、骨密度、pQCTによる仮骨部断面積、皮質骨断面積の測定、microCTによる骨微細構造評価、3点曲げによる力学試験（①吸収エネルギー（Nmm）、②最大点荷重（N）、

③剛性（MPa）を測定）を行った。

〔結果〕 単純X線像では全例に骨癒合が認められた。P30群では術後4週時でリモデリングが始まり、pQCTによる評価で仮骨幅の増大、仮骨部全骨断面積の増大（N群に対して24%）、microCTによる骨微細構造評価で骨梁数の増大、最大点荷重の増大傾向、剛性の低下（P30群の骨は柔軟）、平均吸収エネルギーの増大（P30群はN群の約3倍、P10群の約2.5倍）が観察された。〔結論〕 家兔の仮骨延長モデルを用いた多面的な検討により、PTHの間歇投与は骨微細構造のリモデリングを促進し、仮骨の外周径を増大することで強度を増強することが示された。

以上、本論文は仮骨延長法に対してPTHが仮骨形成促進効果があることを示した臨床的価値の高い論文と考え、論文審査委員会での審査の結果、学位論文としてふさわしいと判断した。

氏名 喜多秀文

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	The influence that postoperative serum Interleukin-6 gives the recurrence after curative pulmonary resection of lung cancer (術後の血清Interleukin-6が肺癌根治切徐後の再発に及ぼす影響)
	授与番号	博乙医 第533号		
	授与年月日	平成23年7月7日		
	授与の要件	学位規程第6条		
			論文審査委員	主査 古瀬純司 副査 望月一男 永松信哉 角田 透 江口研二

### 学位論文の要旨

【目的】手術侵襲によって術後一過性に生体内で高度に濃度上昇したInterleukin-6 (IL-6) は、腫瘍の成長に有利に作用することで術後再発のリスクを高くする可能性が考えられる。一方、これについて肺癌症例を対象とした検討は未だ成されていない。今回我々は術後の血清IL-6値と肺癌根治切徐症例の再発との関係について検討した。

【対象と方法】2007年11月から2008年6月にかけて杏林大学医学部付属病院およびその関連施設にて根治的肺葉切徐を施行した非小細胞肺癌107例を対象とした。全症例に対して術前、術後0日目(0POD)、術後1日目(1POD)、術後2日目(2POD)に血清IL-6値を測定した。最後に症例を登録してから2年後に予後調査を行った。全症例の観察期間を2年間に均一化し、再発を主要評価項目としてKaplan-Meier法ならびにlog rank testにて生存曲線を解析した。

【結果】全対象の2年無再発生存率は71.0%で、107症例中31例に再発を認めた。単変量解析において、再発群と非再発群間の比較にて再発群は非再発群より有意に病理病期が進行した症例が多く、1PODの血清IL-6値が有意に高値であった( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ )。また、胸腔鏡補助下手術(VATS)症例と開胸手術症例の比率、手術時間においても有意に再発群のほうが高値であった( $p = 0.010$ ,  $p = 0.003$ )。一方、両群間の年齢、性別、組織型、上縦隔リンパ節郭清の施行症例と無施行症例の比率、1POD以外(術前、0POD、2POD)の血清IL-6値においては有意差を認めなかった。両群間に有意差を認めた4因子(病理病期、1PODの血清IL-6値、胸腔鏡手術に対する開胸手術の比率、手術時間)を共変数としてCox回帰分析を検定した結果、病理病期と1PODの血清IL-6値はそれぞれ独立した有意な術後再発の予後因子であった( $p < 0.001$ ,  $p = 0.004$ )。

【結論】肺癌症例に対して根治的切徐が成されたとしても、術後早期に血清IL-6値が高くなるほど再発リスクが高くなることが示唆された。今後、一過性に生じる血清IL-6値の上昇と術後再発との直接の因果関係についてさらに検討する必要があるとともに、手術の低侵襲化によるIL-6の上昇の軽減が再発リスクの抑制につながることを期待される。

### 論文審査結果の要旨

手術侵襲によって術後一過性に生体内で高度に濃度上昇したInterleukin-6 (IL-6) は、腫瘍の成長に有利に作用することで術後再発のリスクを高くする可能性が考えられる。一方、これについて肺癌症例を対象とした検討は未だ成されていない。今回我々は術後の血清IL-6値と肺癌根治切徐症例の再発との関係について検討した。

2007年11月から2008年6月にかけて杏林大学医学部付属病院およびその関連施設にて根治的肺葉切徐を施行した非小細胞肺癌107例を対象とし、術前、術後0日目(0POD)、術後1日目(1POD)、術後2日目(2POD)に血清IL-6値を測定した。最後に症例を登録してから2年後に予後調査を行った。観察期間を2年間、再発を主要評価項目としてKaplan-Meier法ならびにlog rank testにて生存曲線を解析した。

全対象の2年無再発生存率は71.0%であり、107症例中31例に再発を認めた。単変量解析において、再発群は非再発群より有意に病理病期が進行した症例が多く、1PODの血清IL-6値が有意に

高値であった( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ )。また、胸腔鏡補助下手術(VATS)症例と開胸手術症例の比率および手術時間は再発群で有意に高値であった( $p = 0.010$ ,  $p = 0.003$ )。一方、1POD以外(術前、0POD、2POD)の血清IL-6値およびその他の因子には有意差を認めなかった。両群間に有意差を認めた4因子(病理病期、1PODの血清IL-6値、胸腔鏡手術に対する開胸手術の比率、手術時間)を共変数とするCox回帰分析の結果、病理病期と1PODの血清IL-6値がそれぞれ独立した有意な術後再発の予後因子であった。

肺癌症例に対して根治的切徐が成されたとしても、術後早期に血清IL-6値が高くなるほど再発リスクが高くなることが示唆された。今後、一過性に生じる血清IL-6値の上昇と術後再発との直接の因果関係についてさらに検討する必要があるとともに、手術の低侵襲化によるIL-6の上昇の軽減が再発リスクの抑制につながることを期待される。本研究は、予後不良の肺癌切除例における血清IL-6値の上昇と再発との関係を初めて詳細に検討したものであり、今後再発抑制につながることを期待される。本研究は、審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 布川雅雄

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	腹部大動脈瘤発生と進展に関する研究 高齢者剖検例と切除標本を用いた計量組織学的検討
	授与番号	博乙医 第534号	論文審査委員	主査 吉野秀朗 副査 大倉康男 神崎恒一 斐澤融司 松村讓兒
	授与年月日	平成23年11月1日		
	授与の要件	学位規程第6条		

## 学位論文の要旨

目的：腹部大動脈瘤の発生進展に関連が深いとされる中膜弾性線維層の減少と瘤の初期段階の関連を明らかにすること。

方法：瘤の初期段階では軽度の内周の拡大が生じていると予想されたため、連続病理解剖例242例中伸展標本の検討に不向きな症例を除いた高齢者群121例（男性69例，女性52例，平均年齢 $80.1 \pm 8.4$ （61-101）歳）を対象に，大動脈内周長を弓部直後（A点）と胸部大動脈中央（B点），腹部大動脈腎動脈分岐部直下（C点），瘤の好発部位である腹部大動脈中央（D点）の4か所で計測し，同時に動脈硬化度も評価し重要な影響因子とした。動脈硬化の軽い若年者群43例（男性25例，女性18例，平均年齢 $38.4 \pm 19.8$ （12-59）歳）でも同様に計測し，これを対照群とした。

高齢者群ではC点とD点において大動脈内周にわたる組織標本を作成し，画像解析装置を用いて計量組織学的に中膜弾性線維層を計測し，大動脈壁の菲薄化や弾性線維層減少のパターンを評価した。C，D点間で，内周長の変化に相応した弾性線維層の厚さの変化を想定し，実際の計測値との隔たりを乖離度とした。

弾性線維層菲薄化が大動脈壁において生ずる形態を内周全周にわたって観察するために，一塊摘出標本を作成した。

結果：対照群では，D点ではその近位側のC点に比して有意に狭小化し遠位側の狭小化を認めたが，高齢者群ではC，D点間の有意差はなかった。高齢者群の高度動脈硬化症例では軽度動脈硬化症例に比し，A～C点で周長の拡大がみられたがD点ではその傾向はみられなかった。

内周長と弾性線維層の厚さとの関係では，C点では負の相関の傾向を認めたがD点ではその傾向はなかった。動脈硬化度で分けると，他の群に比して高度硬化群ではD点で弾性線維層は有意に菲薄化し，乖離度が想定よりも減少の方向にはずれ著しく菲薄化した症例が多く，そのような症例ではD点での内周の拡大傾向がみられた。

菲薄化の高度な症例ほど線維層の部分的欠損割合が多く，線維層の欠損と内周の拡大＝拡張の関連が示唆された。拡張症例の一塊摘出標本では拡張部分に一致した弾性線維層の高度な減少が示された。

結論：腹部大動脈拡張の早期段階では，高度動脈硬化病変では，弾性線維層の菲薄化が生じ，同時に，部分的な高度欠損が存在し，壁の部分的脆弱化が生じている可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

腹部大動脈瘤の発生進展のメカニズムは，未だ十分に解明されていない。本論文は，腹部大動脈瘤の発生進展に関連する因子を解明するために，多数の病理標本を用いて，瘤発生の初期段階の病態を解明することを目的として以下に行われた研究をまとめたものである。

連続病理解剖例242例中伸展標本の検討に可能な高齢者群121例〔男性69例，女性52例，平均年齢 $80.1 \pm 8.4$ （61-101）歳〕を対象に，大動脈内周長を弓部直後（A点）と胸部大動脈中央（B点），腹部大動脈腎動脈分岐部直下（C点），瘤の好発部位である腹部大動脈中央（D点）の4か所で計測し，同時に動脈硬化度も評価した。対照群として，動脈硬化の軽い若年者群43例〔男性25例，女性18例，平均年齢 $38.4 \pm 19.8$ （12-59）歳〕でも同様に計測した。次に，高齢者群ではC点とD点において大動脈内周にわたる組織標本を作成し，画像解析装置を用いて計量組織学的に中膜弾性線維層を計測し，大動脈壁の菲薄化や弾性線維層減少のパターンを評価した。さらに，一塊摘出標本を用いて弾性線維層菲薄化が大動脈壁において生ずる形態を内周全周にわたって観察した。大動

脈内周長は，対照群では，A点から順次D点へと遠位ほど小さくなるのに対し，高齢者群では，A点，B点，C点では順次小さくなったが，D点における内周長には減少がみられなかった。また，高齢者群の中で動脈硬化高度群では，内周長は，軽度群に比して，いずれの点でも拡大していたが，D点においては差を認めなかった。画像解析装置を用いた計量組織学的検討では，C点では内周長と中膜弾性線維層厚とは負の相関傾向を認めたが，D点ではその傾向はなくバラツキが多かった。また，軽度動脈硬化群に比べ高度群ではD点の弾性線維層が有意に菲薄化しており，平均厚が菲薄化するほど弾性線維層の脱落が顕著であった。大動脈壁において生ずる弾性線維層菲薄化を全周にわたって形態観察するために作成した軽度拡張病変の一塊摘出標本では，拡張部分に一致した弾性線維層の高度な欠落が認められた。

本研究の結果，高度動脈硬化病変にみられる腹部大動脈拡張では，早期段階から弾性線維層の菲薄化と同時に高度欠損が局所的に存在し，壁の部分的脆弱化を生じることが示唆された。

本研究は，腹部大動脈瘤の発生伸展過程における初期段階の病態を解明する重要な研究であり，学位論文として価値あるものと考えられる。

氏名 比嘉晃二

〈学位〉	種類 博士(医学)	論文項目	高齢者出血性消化性潰瘍に対する内視鏡止血術の検討		
	授与番号 博乙医 第535号	論文審査委員	主査	杉山政則	
	授与年月日 平成24年1月11日		副査	大倉康男 神崎恒一 佐藤喜宣 山口芳裕	
	授与の要件 学位規程第6条				

### 学位論文の要旨

【目的】本邦における高齢者出血性消化性潰瘍に対する内視鏡止血術後の再出血および死亡の危険因子を明らかにした検討は少ない。今回出血性消化性潰瘍の診断で内視鏡止血術を施行した70歳以上の高齢潰瘍患者において、術後再出血および死亡に対する危険因子を検討した。さらにその検討で得られた全ての危険因子をもつ高齢潰瘍患者をハイリスク患者と位置づけ、治療戦略によりハイリスク高齢潰瘍患者の術後再出血および死亡をどこまで減少させるか検討した。

【方法】〈検討1〉1994年1月から2004年10月までに当科にて内視鏡止血術を行った出血性潰瘍676例のうち、70歳以上の高齢者を高齢者群、69歳以下を非高齢者群とし、患者背景、内視鏡治療成績を比較検討し、更に高齢者群の術後再出血、死亡の危険因子を抽出するため多変量解析を行った。〈検討2〉2004年10月から、検討1にて得られた術後再出血、死亡の危険因子を全てもつハイリスク高齢者潰瘍に対し、全例内視鏡止血法の複数併用、止血後24時間以内のsecond lookの徹底と必要に応じた内視鏡治療の追加、迅速なIVRのバックアップ体制、担当科への周知とより慎重な術後管理を行い、術後再出血および死亡を減少させるか検討した。

【結果】〈検討1〉高齢者群は200例で、患者背景では女性の頻度が高く、NSAIDsや抗凝固薬の関与、基礎疾患の合併、初回内視鏡治療時の大量輸血症例が有意に多かった。内視鏡治療成績は、非高齢者群と比較し術後再出血率15.5% (31例)、死亡率7.5% (15例)が有意に高率であった ( $p < 0.01$ )。多変量解析における再出血の危険因子は、3cm以上の潰瘍、単発潰瘍、shock、初回内視鏡治療時の大量輸血であり、死亡の危険因子は、基礎疾患および入院患者であった。〈検討2〉2004年10月からの6年間で、70歳以上の出血性消化性潰瘍146例のうち、再出血、死亡の危険因子を全てもつハイリスク患者は45例で、検討2の方法を用いて治療成績を比較した。その結果検討1におけるハイリスク患者と比べ、再出血率 (18.4% vs 4.4%)、死亡率 (18.4% vs 2.2%)といずれも有意な改善が得られた ( $p < 0.01$ )。

【結論】ハイリスク高齢者潰瘍において、再出血および死亡の危険因子を認識し、複数の内視鏡止血法の併用やsecond lookの徹底、迅速なIVRのバックアップ体制や慎重な術後管理での治療戦略で、再出血率、死亡率を改善させる可能性が示唆された。

### 論文審査結果の要旨

本邦における高齢者出血性消化性潰瘍に対する内視鏡止血術後の再出血および死亡の危険因子を明らかにした検討は少ない。今回、内視鏡止血術を施行した70歳以上の高齢潰瘍患者において、術後再出血および死亡に対する危険因子を検討した。さらにその検討で得られた全ての危険因子をもつ高齢潰瘍患者をハイリスク患者と位置づけ、治療戦略によりハイリスク高齢潰瘍患者の術後再出血および死亡をどこまで減少させるか検討した。

検討は2つに分けて行った。〈検討1〉1994年1月から2004年10月までに当科にて内視鏡止血術を行った出血性潰瘍676例を高齢者群 (70歳以上) と非高齢者群 (69歳以下) に分けて、患者背景、内視鏡治療成績を比較検討し、更に高齢者群の術後再出血、死亡の危険因子を抽出するため多変量解析を行った。〈検討2〉2004年10月から、検討1にて得られた術後再出血、死亡の危険因子を全てもつハイリスク高齢潰瘍患者に対し、全例内視鏡止血法の複数併用、止血後24時間以内のsecond lookの徹底と必要に応じた内視鏡治療の追加、迅速なIVRのバックアップ体制、担当科への周知とより慎重な術後管理を行い、術後再出血および死亡を減少させるか検討した。

検討結果は以下の通りである。〈検討1〉高齢者群は200例で、非高齢者群と比較し術後再出血率15.5%、死亡率7.5%は有意に高かった。多変量解析における再出血の危険因子は、3cm以上の潰瘍、単発潰瘍、shock、初回内視鏡治療時の大量輸血であり、死亡の危険因子は、基礎疾患および入院患者であった。〈検討2〉2004年10月からの6年間で、70歳以上の出血性消化性潰瘍146例のうち、再出血、死亡の危険因子を全てもつハイリスク患者は45例で、検討2の方法を用いて治療成績を比較した。その結果検討1におけるハイリスク患者と比べ、再出血率 (18.4% vs 4.4%)、死亡率 (18.4% vs 2.2%)といずれも有意な改善が得られた。

本研究の結果からハイリスク高齢潰瘍患者において、再出血および死亡の危険因子を認識し、複数の内視鏡止血法の併用やsecond lookの徹底、迅速なIVRのバックアップ体制や慎重な術後管理での治療戦略で、再出血率、死亡率を改善させる可能性が示唆された。

本研究はハイリスク高齢潰瘍患者を設定し、prospectiveに新しい方針で内視鏡治療を行い、従来の治療法と比べて良好な成績を得た、優れた臨床研究である。審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 金子伸幸

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Delineation of the Safe Zone in Surgery of Sylvian Insular Triangle: Morphometric Analysis and MRI Study
	授与番号	博乙医 第536号		(脳神経外科手術における島皮質と錐体路の位置関係をMRIを用いて明らかにし、島皮質上での安全領域を示した研究)
	授与年月日	平成24年2月2日		
	授与の要件	学位規程第6条		
			論文審査委員	主査 松村譲児 副査 千葉厚郎 平井直樹 渡邊 卓 古賀良彦

### 学位論文の要旨

目的：脳神経外科手術において、頻用される pterional-transsylvian approach では、sylvian fissure を大きく開放する手技が行われ、insula は、必ず露出される極めて重要な構造物の一つである。Insula は、内臓や体性感覚に関する機能を有し、切開時の合併症として、心臓への影響や優位半球前方では運動性失語、後方では視野障害や片麻痺を生じる事が知られている。このうち、特に重要な片麻痺を生じる錐体路障害は、insula と錐体路の位置関係が術中に把握されず、損傷することから生じる。本研究は、insula の表面から錐体路の走行を把握して温存することを目的に行った。

方法：従来知られる insula 表面を用いて、手術の際に insula 上で容易に確認が可能、かつ MRI 上でも容易に分別できる landmark を作成した。これは、従来メルクマルとされてきた anterior superior insular point, posterior superior insular point, limen insula の3点の他に、新たに posterior long insular gyrus が折れ曲がる点 (posterior inferior insular point; PIIP), central insular sulcus と superior periinsular sulcus の合点 (upper central insular point; UCIP) の2つの landmark を設定することで5点としている。錐体路は MRI での T2 weighted image で、内包後脚内部に高信号域として認められることから、insula 表面と内部構造を理解する為に、3.0 Tesla MRI を用いて詳細な画像を得ることとした。標本は、死後変化の影響を排除するため72時間以内 (21時間5分~60時間25分、平均37時間47分) に頭部を離断した22片の新鮮な死体脳を用いた。この撮像データを分析して insula 表面にある landmark と錐体路の関係、及びその距離を測定した。

結果：今回の我々の研究において新たに設定した insula 上の landmark である PIIP と UCIP の内部に錐体路は存在し、その深さはそれぞれ6.2mm と4.8mm であった。更に、insula の posterosuperior part に位置する PIIP と UCIP を結ぶように錐体路が走行することを明らかにした。

結論：本研究により、insula を切開する手術手技において、錐体路の3次元的な走行を手術中に容易に予想する簡便な landmark を明らかにすることができた。これは、今後の脳神経外科手術において、錐体路損傷による片麻痺合併症の減少に寄与しうる。

### 論文審査結果の要旨

脳神経外科手術における pterional-transsylvian approach は、sylvian fissure から島 insula の深部に到達する手技である。このため、島とその内部構造の位置関係は手術合併症を回避するうえできわめて重要な情報である。島は種々の感覚と関連をもち、さらにその深部を錐体路が走るため、手術時合併症として、心臓への影響、運動性失語 (優位半球の島前部損傷)、視野障害 (島後部損傷)、片麻痺 (錐体路損傷) などが知られる。本研究は、とくに錐体路の機能温存を目的に、従来、不明確とされる島と錐体路との位置関係を把握するために有用な landmark を設定し、手術時の安全領域について検討したものである。

本研究に使用した終脳半球は、肉眼観察ならびに MRI 撮像における死後変化の影響を可能な限り排除するため、死後72時間以内 (21時間5分~60時間25分、平均37時間47分) の遺体から頭部離断によって得た11体22側である。

検討にあたっては、術野においても MRI 上でも同定可能な landmark を設定した。すなわち、従来用いられている anterior

superior insular point (ASIP), posterior superior insular point (PSIP), limen insulae (li; AIP) に加え、posterior inferior insular point (PIIP; inferior periinsular gyrus の屈曲点), upper central insular point (UCIP; superior periinsular sulcus と central insular sulcus の交点) を新たな landmark とした。

一方、錐体路は MRI の T2 強調画像において内包後脚の高信号域として認められる。本研究では 3.0T MRI によって得た撮像データから、島皮質下を走る錐体路の深さおよび各 landmark 間の距離を計測し、島と錐体路の位置関係を詳細に検討した。その結果、錐体路は新たに設定した PIIP と UCIP を結ぶ線の深層を走行しており、PIIP の位置では島表面より6.2mm、UCIP の位置では4.8mm の深さに位置することが判明した。これにより、PIIP と UCIP は pterional-transsylvian approach 施行の際、術野において錐体路の走行を推定するための landmark として有用であり、両者を結ぶ線が安全領域の後縁をなすことが明らかになった。

本研究は、脳神経外科手術における錐体路損傷を防止するうえで貴重な基準を提示したものであり、審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 吉松 貴史

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Effect of fentanyl on the pain perception in a rat neuropathic pain model, assessed by the mechanical paw withdrawal threshold, spontaneous behavior and the mu-opioid receptor expression. (ラット神経障害性疼痛モデルへのフェンタニル投与による効果——機械的刺激に対する疼痛回避行動, 自発行動およびミューオピオイドレセプター発現による評価)
	授与番号	博乙医 第537号		
	授与年月日	平成24年2月29日		
	授与の要件	学位規程第6条		
			論文審査委員	主査 平井直樹 副査 櫻井裕之 市村正一 古賀良彦 千葉厚郎

### 学位論文の要旨

〔目的〕 本研究は、坐骨神経結紮によるラット神経障害性疼痛モデルを使用し、フェンタニルの鎮痛効果を、疼痛回避行動誘発閾値・ビデオによる自発行動時間の計測および関連髄節の後根神経節ニューロンで免疫組織学的にオピオイドレセプター(MOR)を発現する細胞数を計測することを組み合わせて、多面的アプローチによる評価を行った。

〔方法〕 坐骨神経結紮群ラットをL群、非結紮群をS群とした。L群はフェンタニルを10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与したLF10群、30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与したLF30群、コントロールとして生理食塩水を投与したLS群に分け、S群は生理食塩水を投与して(SS群)調べた(各群N=6)。薬剤は週3回のペースで4週間投与を行った。疼痛閾値の測定(von Freyテスト)は週1回のペースで、また、ビデオによる非刺激下の行動観察(患肢舐め行動、活動時間の測定)は週2回のペースで27日まで行った。実験終了後脊髄後根神経節を摘出し免疫染色を行いMOR陽性神経節ニューロン数の群間比較を行った。

〔結果〕 後根神経節でMORが発現したニューロン数はLS群とLF30群で有意な増加が認められた。患肢舐め行動はLS群において観察13日目にまた、活動性の亢進はLF30群において観察6日目に有意に認められた。しかし、フェンタニル投与量との関連性は明確でなかった。機械的刺激に対する疼痛閾値はSS群と比較し、LF10群では観察期間を通じて有意な差がなく鎮痛効果が認められた。一方、高容量群LF30群ではLS群と同程度の疼痛閾値の低下があり、鎮痛効果は認められなかった。後根神経節でのMOR陽性細胞の割合は機械的刺激による疼痛閾値と逆の相関関係にあった。

〔結論〕 本研究では神経障害性疼痛に対し、フェンタニルが高容量では鎮痛効果が認められなかったのに対して、至適投与量(50%効果量)より低容量では、耐性形成もなく鎮痛効果が持続したことが明らかになった。これらの結果よりフェンタニルの特異的な容量調整が神経障害性疼痛への効果的治療にとって必要であることが示唆された。

### 論文審査結果の要旨

神経障害性疼痛に対するオピオイドの有効性の報告は様々である。そこで本研究は、慢性神経障害性疼痛を誘発させる坐骨神経結紮ラットモデルを使用し、オピオイド製剤フェンタニルの効果を、機械的刺激に対する応答閾値、非刺激下での自発活動の観察および脊髄後根神経節ニューロンでの免疫組織学的評価(オピオイドレセプター:MORの発現)を組み合わせた多面的アプローチによる評価を行った。

坐骨神経結紮ラットをBennettとXie(1988年)による方法で作成し、フェンタニルを10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与する群(LF10群, N=6)、30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与する群(LF30群, N=6)、コントロールとして生理食塩水を投与する群(LS群, N=6)に加え、坐骨神経結紮を施行せず生理食塩水を投与する群(SS群, N=6)を作成した。フェンタニルおよび生理食塩水は週3回、4週間間欠的に投与し、その間、機械的刺激による逃避行動閾値(von Freyテスト)を測定、ビデオレコーダで自発活動を記録し、lickingおよびlocomotive activityの時間を計測した。さらに、28日目に第4-6腰髄後根神経節を摘出し、免疫組織学的染色により各群のMOR陽性神経節ニューロン数の比較を行った。

機械的刺激に対する逃避行動を誘発する閾値は、LS(結紮・

生食投与)群で全期間通してSS(無処置)群より有意に低下した。このことは、本研究で使用した坐骨神経結紮標本で疼痛が誘発されたことを示している。フェンタニル低容量群(LF10群)では、全期間で無処置SS群と有意な差は見られず、鎮痛効果が認められた。一方、高容量群(LF30群)ではLS群と有意な差は無く鎮痛効果は確認出来なかった。特に、12日目のLF30群での閾値の低下はLF10群と有意な差があり両者間での効果に乖離があった。後根神経節ニューロンでのMORの発現はLS群とLF30群で強く認められ、全標本(N=30)でのMOR陽性細胞の割合は機械的刺激による疼痛閾値と有意な逆相関を示した( $p < 0.001$ )。しかし、フェンタニル投与量の違いと自発活動時間との間に一定した関連性は見られなかった。

本研究は、フェンタニルの神経障害性疼痛に対する作用を検討し、今回の容量設定において低容量で認められた鎮痛効果が高容量では認められないなど、投与量により効果が異なることを示唆している。オピオイドの神経障害性疼痛に対する作用効果の報告は従来様々であったが、ED<sub>50</sub>相当の低容量フェンタニル反復投与により鎮痛効果が持続することを示した本報告は、神経障害性疼痛のオピオイド治療への新知見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。

氏名 佐藤 行紀

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	3次元X線画像による日本人の膝関節形態と人工膝関節の開発			
	授与番号	博乙医 第538号					
	授与年月日	平成24年3月5日	論文審査委員	主査	松村讓兒		
	授与の要件	学位規程第6条	副査	岡島康友 似鳥俊明 多久嶋亮彦 佐藤喜宣			

### 学位論文の要旨

日本人膝の3次元形態計測を行い、人工膝関節開発のための基準値を検討し、これをもとに日本人に適合する人工膝関節を開発した。膝関節手術を行った124例について、SIEMENS社製ARCADIS Orbic 3Dで撮像し、K. G. T社製INTAGE REALIA PROで3次元画像化した後、人工膝関節置換術における骨切断面を画像上で形成、計測した。

大腿骨顆部においては、横径と前後径・横径比との間に有意な負の相関が認められ、大きな大腿骨ほど扁平であることが確認された。一方、脛骨顆部においては、横径と前後径・横径比とは明らかな傾向を示さなかったが、その形態には男女差が認められた。

既存のインプラントの大腿骨コンポーネントはインプラントの大きさにかかわらずその扁平度は一律であり、日本人の膝関節の形態とは適合しないことが判明した。今回の計測データから日本人の膝関節の基準値が初めて得られ、日本人の膝関節に適合する新しい人工膝関節が開発された。

### 論文審査結果の要旨

近年の高齢化に伴い、本邦でも関節の変性疾患を有する患者数が増加しており、とくに変形性膝関節症の割合は高い。重症例では疼痛や可動制限によって日常生活に支障をきたす例も多く、保存療法が無効な症例に対しては人工膝関節置換術(total knee arthroplasty; TKA)が施行されている。

従来、TKAには欧米人の膝関節規格に基づいて作製された人工関節が用いられており、日本人の膝関節に対する適合性についての検討はほとんど行われていない。本研究では、日本人膝関節について3次元画像上で計測を行い、人工膝関節開発のための基準値を検討、これをもとに日本人に適合する人工膝関節の設計規格を追求した。

対象は2006～2008年に杏林大学で膝関節手術を施行された124症例(左68例、右56例)で、測定目的について同意を得たうえで3次元画像を撮像、画像上計測を行った。方法は画像上でTKAと同等の骨切断面を作成、大腿骨および脛骨の横径・前後径を計測するとともに、冠状面ならびに矢状面画像で内・外顆の幅、後顆の高さ、関節面の曲率を計測、さらに膝蓋骨溝の傾き、

髓腔中央の位置を数値化した。なお、モデルボーン3体でTKAの模擬手術を行って同一項目を計測し、実測値と画像上計測値の近似を確認した。

計測の結果、大腿骨顆部において、横径と前後径・横径比との間に負の相関が認められ、大腿骨が大きいほど扁平であることが判明した。しかしながら、従来の人工膝関節の前後径・横径比はほぼ一定であり、本邦でみられる扁平化が考慮されていないため、インプラントと患者骨との間に不適合が生じることが示唆された。さらに、扁平率が適合していない人工膝関節では、屈曲・伸展時に大腿骨・脛骨間の間隙(屈曲・伸展ギャップ)が変動するため可動性が不安定となり、これが従来問題とされていたTKA術後不安定性など長期術後成績不良の要因と考えられた。

本研究は、日本人膝関節において初めて3次元計測を行ったものであり、これにより日本人膝関節の形態学的特性を反映した基準値を得た。この基準値はTKAに用いる人工関節の選定に際して重要であるとともに、日本人に適合する人工膝関節開発の規格として、その実用化に大きく寄与するものである。審査の結果、本研究を学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 荒井 孝

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論文項目	An Analysis of Genomic Rearrangements in Japanese X-linked Chronic Granulomatous Disease Using Array Comparative Genomic Hybridization (比較ゲノムハイブリダイゼーション法による日本人X連鎖慢性肉芽腫症のゲノム配列変化の解析)
	授与番号 博乙医 第539号		
	授与年月日 平成24年2月20日		
	授与の要件 学位規程第6条	論文審査委員	主査 櫻井裕之 副査 塩原哲夫 高山信之 松田宗男 楊 國昌

### 学位論文の要旨

【目的】慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease: CGD) はNADPH oxidase complexの欠損により引き起こされ、自然免疫系の食細胞の殺菌能を障害する原発性免疫不全症である。NADPH oxidaseを構成する6つのどのsubunitの遺伝子突然変異もCGDの原因となるが、CGD症例のほぼ2/3はNAD(P)H oxidase 2 (Nox2) とも呼ばれているX連鎖CYBB遺伝子の突然変異が原因である。わが国では260名以上のCGD患者の報告がある。CYBB遺伝子変異のうち92症例で遺伝子解析が行われた。上記の報告と同様の変異が認められたが、欠失を呈した16名中5名では1kb以上の大きな欠失が推定され、5名中の2名の詳細が明らかにされた。本研究ではarray comparative genomic hybridization (aCGH) analysisを使用してX連鎖CGDのgenomic rearrangementsを解析し、欠失遺伝子の種類と範囲を明らかにした。

【対象・方法】対象は、CYBB遺伝子に1kb以上の大きな塩基欠失が推定されたX連鎖CGD患者5名(男性4名、女性1名)と母親4名である。検体は、末梢血から末梢血単核球を分離し用いた。PCR法によって、CYBB および隣接遺伝子であるX連鎖Kx blood関連XK遺伝子を増幅した。aCGH法はHuman Genome CGH microarray 244Aを用いた。2症例における切断点は、PCR法により増幅後蛍光自動DNAシーケンサーで解析した。また、通常のPCR法で切断点が確定できなかった症例は、DNAwalking法を使用し解析を行った。

【結果】患者5名は、ほぼCYBB遺伝子のみの欠失を呈するものから広範なDNA欠失を呈するものにわたった。そのうち、DMDやCGD表現系を顕在化させた女性例を明らかにした。他の3名中2名は、CYBB, XK, DYNLT3遺伝子の欠失を呈した。残りの1名は、intron2以降のCYBB領域以降とDYNLT3遺伝子を含む欠失を呈するとともに、DYNLT3のcentromere側領域の重複が逆位として欠失領域に挿入された複雑なコピー数変化を呈する症例であった。

【結論】CGD女性例は、欠失を呈した遺伝子のskewed lyonizationによる著しい偏りによって発症した。さらに、欠失・逆位・重複を伴う複雑な構造異常は、fork stalling and template switching (FoSTeS) /microhomology-mediated break-induced replication (MMBIR) を介したメカニズムにより生じた可能性が推測された。

### 論文審査結果の要旨

慢性肉芽腫症 (CGD) は、NADPH酸化酵素複合体の異常により、食細胞の殺菌能が低下する原発性免疫不全症である。そのおよそ2/3は、酸化酵素複合体のNADPH oxidase 2をコードするX染色体上のCYBB遺伝子の変異による。CYBB遺伝子近傍には他の疾患関連遺伝子があり、X-linked CGDの中でも大きな遺伝子欠失を伴うものでは、典型的なCGHに加え、他の臨床症状を示す可能性がある。本研究では、CYBB遺伝子に1kb以上の大きな欠失が推定されているX-linked CGDの患者5例(男4、女1)のゲノムを、高分解能解析が可能なarray comparative genome hybridization (aCGH) 法により解析し、さらにPCR法やDNA walking法により遺伝子の切断点を明らかにした。切断点は5例ですべて異なっていた。男性1例ではCYBB遺伝子のみの欠失であったが、他の4例は、機能の明らかでないDYNLT3遺伝子の

欠失も伴っていた。さらに男性2例では、それに加え、XK遺伝子を欠失し、この遺伝子が原因疾患であるMcleod症候群によると思われる症候を呈していた。女性1例では、CYBB, DYNLT3, XKに加え、Duchenne muscular dystrophy (DMD) 遺伝子の一部(1-49/79 exons)におよぶ欠失があり、無症状の母親にも同じ変異が見つかったが、患者でのみ父親由来のX遺伝子が選択的に不活性化(lyonization)されていた。男性の1例では、CYBB, DYNLT3の欠失と、DYNLT3遺伝子の一部が逆位として欠失領域に挿入され、コピー数の増幅とが認められる複雑な構造異常を呈していた。このように、X-linked CGDには、原因遺伝子とされるCYBBだけでなく、隣接遺伝子の欠失を伴う症例もあり、欠失のメカニズムも単一ではないと考えられた。本研究はX-linked CGDのゲノム変異の多様性を明らかにした点で先駆的なものであり、審査の結果、学位論文として価値あるものと思われた。

氏名 岡 健太郎

〈学位〉	種 類	博士(医学)	論文項目	Molecular and microbiological characterization of <i>Clostridium difficile</i> isolates from single, relapse, and re-infection cases.
	授与番号	博乙医 第540号		(単発、再発及び再感染症例から分離された <i>Clostridium difficile</i> の分子学的及び微生物学的解析)
	授与年月日	平成24年3月7日		
	授与の要件	学位規程第6条	論文審査委員	主査 高橋信一 副査 角田 透 杉山政則 萬 知子 赤川公朗

## 学位論文の要旨

*Clostridium difficile* は抗菌薬関連下痢症 (AAD) および偽膜性大腸炎 (PMC) の原因菌であり、近年院内感染症起因菌としての重要性が認識されている。本菌臨床分離株の微生物学的特徴と *C. difficile* 関連症 (CDAD) の再発の有無との関連性について検討を行った。単発症例由来の *C. difficile* 20株 (20症例) 及び再発症例由来の53株 (20症例) について、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) 及びPCRリボタイピングによる解析を行い、さらに分離株の細胞毒性 (toxin A, toxin B)、抗菌薬感受性、芽胞形成率及び発芽率を測定した。再発症例はDNAタイピングの結果に基づき、同一菌株による再発症例と異なる菌株による再感染症例に分けて評価した。

*C. difficile* 73株中、toxin A+, B+株は67株 (91.8%)、A-, B+株は2株 (2.7%)、A-, B-株は4株 (5.4%) であった。再発症例20例の内、同一菌株による再発は16例 (80%)、異なる菌株による再感染は4例 (20%) であることが明らかにされた。評価した73株全てがvancomycinとmetronidazoleに感受性であったが、clindamycin, ceftriaxone, erythromycin及びciprofloxacinに対しては、それぞれ、87.7%、93.2%、87.7%、100%の菌株が耐性を示した。DNAタイピンググループ、細胞毒性及び芽胞形成率と再発の有無 (単発症例、同一菌株による再発症例、異なる菌株による再感染症例) の間に関連性は認められなかった。一方、同一菌株による再発症例から分離された菌株は、発芽促進剤であるタウロコール酸ナトリウムを含まない培地において、有意に高い発芽率を示した。

本研究により我が国のCDAD患者由来 *C. difficile* 菌株の微生物学的性状の一端を明らかにすることができた。加えて、本研究の結果は *C. difficile* の発芽能力がCDADの再発の潜在的なリスクファクターである可能性を示唆している。

## 論文審査結果の要旨

*Clostridium difficile* は、*C. difficile* 関連症 (CDAD) と呼ばれる抗菌薬関連下痢症や偽膜性大腸炎を引き起こし、また院内感染起因菌としても知られている。CDADは再発が多く臨床的に問題であるが、その患者側再発因子に比べ、菌側再発因子の検討は少ない。そこで、本菌臨床分離株の微生物学的特徴とCDAD再発との関連性について検討を行った。単発 (非再発) 症例由来の *C. difficile* 20株 (20症例) 及び再発症例由来の53株 (20症例) について、パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) 及びPCRリボタイピングによる解析を行い、さらに分離株の細胞毒性 (toxin A, toxin B)、抗菌薬感受性、芽胞形成率及び発芽率を測定した。再発症例はさらにDNAタイピングにより、同一菌株による再発症例 (16例) と異なる菌株による再感染症例 (4例) に分けて評価した。

「結果」①DNAタイピンググループと再発は無関係であった。② *C. difficile* 73株中、toxin A+, B+株は67株 (91.8%)、A-, B+株は2株 (2.7%)、A-, B-株は4株 (5.5%) であった。細胞毒性と再発は無関係であった。③全ての株がvancomycinとmetronidazoleに感受性であったが、clindamycin, ceftriaxone, erythromycin及びciprofloxacinに対しては、それぞれ、87.7%、93.2%、87.7%、100%の菌株が耐性を示した。薬剤感受性と再発は無関係であった。④芽胞形成率と再発は無関係であった。⑤再発症例から分離された菌株は、発芽促進剤であるタウロコール酸ナトリウムを含まない培地においても、有意に高い発芽率を示した。

本研究により、CDAD患者由来 *C. difficile* 菌株の微生物学的性状が明らかとなり、本菌の発芽能力がCDADの再発の潜在的なリスクファクターである可能性が示された。重要な知見であり、審査の結果、学位論文として相応しいものと認めた。

氏名 皿谷 健

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論文項目	Identification of a mechanism for lung inflammation caused by <i>Mycoplasma pneumoniae</i> using a novel mouse model (新たなマウスモデルによる <i>Mycoplasma pneumoniae</i> 肺炎の炎症機序の解明)
	授与番号 博乙医 第541号		
	授与年月日 平成24年5月14日		
	授与の要件 学位規程第6条		
		論文審査委員	主査 楊 國昌 副査 渡邊 卓 菅間 博 佐藤 徹 木崎節子

### 学位論文の要旨

【目的】 *Mycoplasma pneumoniae* (MP) 肺炎の病態には下気道での特有な免疫応答の関与が推測されているが、その詳細は明らかでない。加えて、MP肺炎の病理像の特徴である急性期以降の気管支と血管周囲への形質細胞浸潤を再現したマウスモデルはない。本研究の目的は、1) MP肺炎の特徴的病理像を呈するマウスモデルを新規に樹立する、2) 1) を用いてMP肺炎の病態に関わる免疫応答の仕組みを解明することである。

【方法】 MP菌塊を超音波で破碎しMP抗原 (MP Ag) を作成した。BALB/cマウスにTh2アジュバント (alum) 単独またはalum+MP Agを週1回で計2回腹腔感作する2群を作成し、その後、両群にMP Agを経気管支的に単回投与した。その後、経時的に気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の各種細胞数と肺病理所見を比較検討した。また、急性期のBALF上清の炎症性サイトカイン濃度をELISAで測定し、BALF中のリンパ球上の表面マーカーをフローサイトメトリーで解析した。さらにBALF中の単核球のMP Agによる増殖能を検討した。腹腔感作後 (経気管投与前) の両群のAM (alveolar macrophage) におけるToll-like receptor2 (TLR-2) の発現について、肺組織を用いた酵素抗体法で蛋白発現を、BALF検体を用いた定量RT-PCRでmRNA発現を比較検討した。

【結果と考察】 MP肺炎の初期病変である肺胞腔内の好中球浸潤は急性期の両群でみられたが、亜急性期の気管支と血管周囲への形質細胞浸潤はalum+MP Ag群で顕著かつ有意に観察され、ヒトMP肺炎のモデルを確かに樹立したと結論した。このモデルの急性期のBALF中のT細胞は殆どがnaïve Tであり、MP Agにも増殖反応を示さなかった。一方、alum+MP Ag群において、BALF上清中で有意な高値を示したサイトカイン (IL-6, RANTES) は、MP Ag刺激によるAMでも同様に産生亢進があり、MP肺炎の急性期におけるAMの活性化の存在が明らかになった。このAMのTLR-2の蛋白とmRNAの発現は、alum+MP Ag群において顕著に増加していた。以上のことから、MP肺炎の成立には、急性期のAMにおける自然免疫の活性化がまず契機となり、これに引き続く肺局所でのサイトカインによる炎症の惹起や、形質細胞の関与を含む獲得免疫の成立が、さらに特徴的なMP肺炎の特徴的病理像を形成することが判明した。

【結論】 ヒトのマイコプラズマ肺炎に類似したマウスモデルを確立した。(1) 肺炎の重症度はAMのTLR-2の表出を介したinnate immunityの増強が示唆された。(2) 気管支血管周囲へのTリンパ球、形質細胞浸潤の形成にはTh2優位な宿主の応答が必要であると考えられた。

### 論文審査結果の要旨

【目的】 *Mycoplasma pneumoniae* (MP) 肺炎の病態に関わる免疫応答の詳細は未だ明らかでない。また、MP肺炎の病理像の特徴である急性期以降の気管支と血管周囲への形質細胞浸潤を再現した動物モデルもない。本研究の目的は、1) MP肺炎の特徴的病理像を呈するマウスモデルを新規に樹立する、2) 1) を用いてMP肺炎の病態に関わる免疫応答の仕組みを解明することである。

【方法】 作成したMP抗原 (MP Ag) を用いて、BALB/cマウスにTh2アジュバント (alum) 単独またはalum+MP Agを週1回で計2回腹腔感作する2群を作成し、その後両群にMP Agを経気管支的に単回投与した。2群について、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の各種細胞数と肺病理所見の比較、ELISAによるBALFの炎症性サイトカイン濃度の測定、フローサイトメトリーによるBALF中リンパ球の表面マーカーの解析、BALF中の単核球のMP Agによる増殖能を検討した。腹腔感作後 (経気管投与前) の両群のAM (alveolar macrophage) を用いて、MP Ag刺激によるサイトカイン産生能を検討し、さらにToll-like receptor2の発現について、肺組織を用いた酵素抗体法で蛋白発

現を、BALF検体を用いた定量RT-PCRでmRNA発現を比較検討した。

【結果と考察】 MP肺炎の初期病変である肺胞腔内の好中球浸潤は急性期の両群でみられたが、亜急性期の気管支と血管周囲への形質細胞浸潤はalum+MP Ag群で有意に観察され、ヒトMP肺炎のモデルを樹立できたと考えた。このモデルの急性期のBALF中のT細胞は殆どがnaïve Tであり、MP Agにも増殖反応を示さなかった。一方、alum+MP Ag群において、BALFで有意な高値を示したサイトカイン (IL-6, RANTES) は、MP Ag刺激によるAMでも同様に産生亢進があり、MP肺炎の急性期でのAMの活性化が判明した。このAMのToll-like receptor2の蛋白とmRNAの発現は、alum+MP Ag群において顕著に増加していた。以上のことから、MP肺炎の成立には、急性期のAMにおける自然免疫の活性化が契機となり、これに続くサイトカインによる炎症の惹起や、形質細胞の関与を含むTh2優位な獲得免疫の発生がMP肺炎の特徴的病理像を形成することが考えられた。

本研究は新規モデルの樹立により、ヒトマイコプラズマ肺炎の成立機序に関わる自然免疫の関与を明らかにしたものであり、審査の結果、学位論文として相応しいものと認めた。

氏名 阿部 浩之

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	UVB irradiation down-regulates type XVI collagen expression in mouse and human skin (皮膚XVI型コラーゲンと紫外線に関する研究)
	授与番号 博乙医 第542号	論文審査委員	主査 神谷 茂 副査 有村義宏 川上速人 多久嶋亮彦 平形明人
	授与年月日 平成24年6月25日		
	授与の要件 学位規程第6条		

### 学位論文の要旨

【研究の背景】 XVI型コラーゲンは線維性コラーゲン結合性コラーゲンの一種であるが、皮膚での作用や代謝は不明である。

【目的】 XVI型コラーゲン発現における紫外線 (UVB) や光老化の影響について検討した。

【方法】 ケラチノサイト, 線維芽細胞, 真皮血管内皮細胞, 3次元培養皮膚, マウス皮膚にUVBを照射しRNAを抽出したほか, ヒト皮膚からもRNAを抽出しそれぞれリアルタイムPCR法によりXVI型コラーゲンmRNAの発現レベルを検討した。さらに抗XVI型コラーゲン抗体を用いた免疫組織化学染色にて健常ヒト皮膚における反応を検討した。

【結果】 紫外線照射の結果, ケラチノサイトでのXVI型コラーゲンmRNA発現は容量依存的に抑制された。同様に線維芽細胞, 3次元培養皮膚, マウス皮膚における発現もそれぞれ抑制された。非露光部のヒト皮膚におけるmRNA発現量は, 露光部での発現量より高かった。抗XVI型コラーゲン抗体による免疫組織化学染色では, 非露光部および若年者の露光部皮膚の表皮下で陽性を示していたが, 高齢者の露光部皮膚では陰性であった。

【考察・結論】 紫外線によりXVI型コラーゲンの発現は抑制され, 光老化における細胞外基質変化に関連することが示唆された。

### 論文審査結果の要旨

XVI型コラーゲンはフィブリル関連コラーゲンの一種であり, 皮膚, 心臓, 腎臓, 腸管, 血管壁など様々な臓器に存在している。XVI型コラーゲンは角化細胞および皮膚線維芽細胞により合成されているが, その作用および機能については十分解明されていない。本研究では培養ヒト角化細胞, ヒト皮膚線維芽細胞, ヒト皮膚血管内皮細胞(HDMEC), マウスおよびヒトの皮膚を用いて, 紫外線B波(UVB)のXVI型コラーゲン発現への影響を調べた。

UVB照射した各種培養細胞, マウス皮膚およびヒト健常皮膚(露光部および非露光部)からRNeasy Mini kitを用いてmRNAを抽出し, リアルタイムRT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)によりXVI型コラーゲンmRNAの発現を評価した。合成XVI型コラーゲンペプチドを用いてポリクローナル抗XVI型コラーゲン抗体を作製して免疫組織化学染色法により露光部および非露光部健常ヒト皮膚での染色性を調べた。

UVB照射は角化細胞, 線維芽細胞におけるXVI型コラーゲンmRNAの発現量を抑制したが, 皮膚の終末分化マーカーであるinvolucrinおよびkeratin 10のmRNAの発現量を亢進させた。本

結果よりUVB照射によるXVI型コラーゲン発現の抑制は終末分化とは関連しないことが明らかにされた。同様な結果が角化細胞・線維芽細胞の共培養系, マウス皮膚においても認められた。UVB照射はHDMECにおけるXVI型コラーゲンのmRNA発現量に影響を及ぼさなかったが, IL-1 $\beta$ により誘導されたXVI型コラーゲンのmRNA発現量を抑制した。また, 露光部健常皮膚におけるXVI型コラーゲンのmRNA発現量は, 非露光部のそれにおける発現量に比べ有意に低値であった。免疫組織化学染色の結果, 非露光部健常ヒト皮膚ならびに若年者露光部健常皮膚の乳頭層においてXVI型コラーゲンが検出されたが, 高齢者露光部健常ヒト皮膚では検出されなかった。

本研究によりUVB照射が角化細胞, 線維芽細胞などの皮膚細胞におけるXVI型コラーゲンmRNAの発現を抑制することや露光部皮膚でのXVI型コラーゲンの発現が低下していることなどが明らかにされた。本論文はXVI型コラーゲンがelastinやfibrillinなどのphotoaging markerとして臨床的に新たに評価される可能性を提示しており, 審査の結果学位論文として価値あるものと認めた。

## 〔博士（保健）〕

氏名 浅沼奈美

〈学位〉	種類	博士（保健学）	論文項目	神経症性障害の当事者活動における日記指導の有用性に関する研究
	授与番号	博乙保 第44号		
	授与年月日	平成23年7月13日	論文審査委員	主査 照屋浩司 副査 今留 忍 副島昭典 塩路理恵子
	授与の要件	学位規程第6条		

## 学位論文の要旨

神経症性障害の当事者活動における日記指導の有用性を明らかにするため、森田療法の相互啓発型の学習団体である神経症性障害の当事者活動の生活の発見会で実施されている、基準型学習会の日記指導を受けた12名と、日記指導を行った8名にインタビュー調査を実施した。神経症性障害の当事者活動による日記指導では、日記の書き手には、深く人間関係を築く経験、人に受容される経験、同じ仲間の共感を得る経験、あるがままの自分を受け入れる経験、自己肯定感の獲得などが経験できていた。また日記指導者には、日記指導を行うこと自体が自己治癒の過程となっていた。そして、同じ病や苦しみをもつ仲間と日記を仲立ちとした結びつきという絆が獲得でき、森田理論に基づく生活の中での知恵を後輩に伝承する行為になっていた。

次に、日記指導の実際の日記内容を基準型学習会の期間の9週間を、3事例で分析した結果、3事例とも共感期から能動的あるがまま期に到達していた。日記指導のコメントは、「支持」、「肯定的評価」、「共感」、「明確化」、「認知の切り替え」、「森田理論」、「経験からのアドバイス」、「自己開示」、「仲間意識」の9機能が存在していた。中でも、同じ悩みをもつ者の自らの「経験からのアドバイス」や、「自己開示」による「仲間意識」を示す内容のコメントは、当事者による日記指導ならではの機能であった。さらに日記指導のコメントの特徴は、本人の努力に着目した「肯定的評価」のコメントが、3事例ともほぼ同じ割合で、低い自己評価を傷つけないよう意識的にコメントされていた。この肯定的評価をフィードバックすることは、現実の自己への直面化を可能にし、自己内省を深化させ進展させていく過程を促進する。特に、森田理論の回復期の「受動的あるがまま期」では、症状に苦しみながら行動し、落ち込む対象者を支持し、自己対話からの脱落を防ぐなど、自己フォーカスのプロセスを促進する役割をもつ。さらに3事例とも悪循環を断ち切る「認知の切り替え」のコメントも1割を超え、日常生活に即した「森田理論」のコメントが1割前後と存在し、日記指導には森田理論を生活の中に浸透させていく過程で偏った認知を修正し具体的な生活方法を、当事者の立場から示し支援する伴走者の役割が存在した。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、神経症性障害の当事者活動である自助グループにおいて、森田療法理論を基盤とする取り組み、とくに日記療法に焦点を当て、日記指導を受けた者、日記指導を行った者を対象とした面接聞き取り調査により、日記指導の構造、また、その機能と役割を明らかにしようとするものである。

この領域における先行的な資料は、治療者からみたレクチャー的な内容、自助グループの活動報告的な内容がほとんどであり、有用性についての評価も症例報告的な手法に限られている。本研究は、第三者の立場として自助グループにおける活動を研究対象として取り上げた点でユニークであり、自助グループにおける日記指導に焦点を当てたことも興味深い。

著者は、丁寧な取り組みにより、日記のコメントの機能として、具体的に9つの機能（支持、肯定的評価、共感、明確化、認知の切り替え、森田理論、経験からのアドバイス、事故開示、仲間意

識）を抽出し、とくに、「経験からのアドバイス」、「自己開示による仲間意識」を、当事者による日記指導ならではの機能として挙げている。

また日記が、日記指導を受ける側の書き手にとってさまざまな経験を得る手段であるだけでなく、日記指導者にとっても日記指導を行うこと自体が自己治癒の課程となることが示されている点は、医療者ではなく当事者による日記指導についての研究成果と言えよう。

本研究は、対象者の選択基準からみて比較的軽症な者に限定されるであろう点、また、具体的な指標を用いて症状の程度の変化を捉えて評価するような手法の研究ではない点などが限界として挙げられるが、精神科領域における自助グループの機能の一面を明確にした点、自助グループ参加者に、よりフォーカスされた活動に役立ち更なる発展が遺体で切る点で保健学的に有意義であり、審査の結果、本論文を保健学領域における博士論文として価値あるものと認めた。

氏名 新 江 賢

〈学位〉	種 類 博士(保健学)	論 文 項 目	IgE及びTh2サイトカイン産生に対するシメチジンの効果に関する研究
	授与番号 博乙保 第45号		
	授与年月日 平成24年4月18日	論文審査委員	主査 藤井雅彦
	授与の要件 学位規程第6条		副査 四倉正之 石井和夫

### 学位論文の要旨

ヒスタミンは、化学伝達物質として様々なアレルギー性疾患における炎症誘導に関わる一方で、免疫応答に対して多面的な効果を誘導することが知られている。ヒスタミン受容体タイプ2 (HR2) 拮抗薬が、胃酸分泌抑制作用を介して食物アレルギーの発症を増強することはよく知られるが、HR2の拮抗薬であるシメチジンのTh2型免疫応答に対する免疫学的な効果について詳細な検討がなされていない。そこで本研究では、シメチジンのTh2型免疫応答に対する効果についてマウスを用いて検討した。BALB/cマウスに鶏卵白アルブミン (OVA) を単独、もしくはシメチジンと同時に腹腔内投与することにより感作した。血清中のtotal IgE抗体量及びOVA特異的IgE, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>抗体量をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。その結果、シメチジン投与は、血清中のOVA特異的IgE, IgG<sub>1</sub>及びIgG<sub>2a</sub>抗体産生を有意に増強した。一方で、total IgEの血清レベルには影響しなかった。また、感作マウスより得られた脾臓細胞をOVA存在下で4日間培養した培養上清中のサイトカイン量をELISA法で測定した。その結果、シメチジン投与は、OVA刺激脾臓細胞によるTh2サイトカイン産生を有意に増強した。一方でシメチジンは、脾臓細胞によるOVA特異的なTh1サイトカイン及びTh17サイトカイン産生には影響しなかった。次に、アレルギー性気道炎症に対するシメチジンの効果を検討した。OVA及びシメチジンの腹腔内投与により感作したマウスにOVAを吸入させ、肺胞洗浄液 (BALF) 中の浸潤細胞数及びサイトカイン量を測定した。OVA吸入によりBALF中の好酸球、好中球、リンパ球及びマクロファージ数は増加したが、感作フェーズにおけるシメチジン投与は、いずれの細胞数にも影響しなかった。また、OVA吸入によりBALF中のTh2サイトカイン量は増加したが、シメチジンの腹腔内投与は、BALFにおけるTh2サイトカイン産生に影響しなかった。これらの結果は、シメチジンがTh2型免疫応答を増強することを示しており、シメチジン投与がアレルギー性疾患におけるIgE産生に関与していることを示している。

### 論文審査結果の要旨

ヒスタミン受容体タイプ2 (HR2) 拮抗薬のシメチジンは、胃酸分泌抑制作用から抗潰瘍薬として広く使用されているが、細胞性免疫応答やTh1応答の増強など、免疫応答に対しても様々な効果を持つことが知られている。しかし、IgE産生やアレルギー応答などのTh2応答に対するシメチジンの効果についてはほとんど知られていない。本論文において、著者は抗原特異的IgE産生及びTh2サイトカイン産生などのTh2応答へのシメチジンの効果についてマウスを用いて検討した。

BALB/cマウスに鶏卵白アルブミン (OVA) を単独、もしくはシメチジンと同時に腹腔内投与することにより感作し、感作後、血清中のtotal IgE抗体量及びOVA特異点IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>ならびにIgE抗体量をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。また、感作マウスより得られた脾臓細胞をOVA存在下で培養し、培養上清中のサイトカイン量を測定した。その結果、OVA感作マウスへのシメチジンの同時投与は、血清中の

OVA特異的IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgE抗体産生、及びOVA刺激脾臓細胞によるTh2サイトカインの産生を増強させること、血清中のtotal IgEや脾臓細胞によるOVA特異的なTh1サイトカインやTh17サイトカイン産生には影響を及ぼさないことを明らかにした。

次に著者は、アレルギー性気道炎症に対するシメチジンの効果を検討するため、OVA及びシメチジンの腹腔内投与により感作したマウスにOVAを吸入させ、肺胞洗浄液 (BALF) 中のサイトカイン量及び浸潤細胞数を測定した。OVA吸入によりBALF中のTh2サイトカイン量や好酸球を含む浸潤細胞数は増加したが、シメチジン腹腔内投与はBALFにおけるサイトカイン産生や浸潤細胞数には影響を及ぼさないことを明らかにした。このことについては、論文中で深く考察している。

以上の結果は、シメチジン投与がIgE産生及びTh2型免疫応答の増強を介して、様々なアレルギー性疾患の病態形成に関わっている可能性を示唆するものであり、博士論文として十分に価値あるものと認めた。

氏名 倉 林 準

〈学位〉	種 類 博士(保健学)	論 文 項 目 動作解析による変形性膝関節症患者における歩行の特性
	授与番号 博乙保 第46号	
	授与年月日 平成24年4月18日	論文審査委員 主査 齋藤昭彦
	授与の要件 学位規程第6条	副査 照屋浩司 森田千晶

### 学位論文の要旨

#### 【目的】

本研究は、肉眼的には観察しにくい軽症例の変形性膝関節症(OA)患者における歩行の特性を明確にすることを目的とした。

#### 【対象】

対象はOA患者98名、健常者10名であった。

#### 【方法】

非荷重下でのX線画像データから、Kellgren-Lawrence分類の変法を用いてOA患者を2群に分類した(GI:Grade I 70名, GII:Grade II 28名)。マーカはHelen Hays marker setとして、VICON MXと床反力計を用いて歩行解析を行った。OA患者の臨床データとして、日本整形外科学会膝関節機能判定基準、Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index、関節角度、10m最速歩行の所要時間を収集した。

#### 【結果】

OA群(GIGII)は、歩行時の下肢関節運動および床反力垂直成分に特徴的な変化がみられた。OA群は股関節および膝関節の伸展方向の動きが減少し、足関節の背屈一底屈方向の動きが減少していた。GIIは踵接地期の膝関節伸展運動で有意に制限されていた。

OA群の床反力垂直成分の波形は、正常歩行の2峰性の波形とは異なった特徴的な波形がみられた。GIは正常歩行でみられる2峰性の波形に類似した波形を示したが、立脚中期の荷重量減少が十分でなく、やや平坦化した波形となった。GIIは2峰とも低く、立脚中期の荷重量減少も十分でなく、GIよりもさらに平坦な波形となった。

#### 【考察】

歩行時の運動は、膝関節における運動障害が二次的に各関節へ影響したと考えられた。とくに立脚後期の股関節伸展運動、足関節底屈運動の減少は、爪先離地時にpush-offが十分でないことを示唆していた。

OA群にみられる膝関節伸展運動の減少は、生体の荷重制限、疼痛による逃避パターンを反映したと考えられた。GIIは、関節可動域測定に反映されない関節のこわばりjoint stiffnessによる関節運動の円滑さの欠如、筋によるモーターコントロールの変化が反映されている可能性があった。

GIIはGIにみられる抜重期での膝関節コントロールの不足に加え、踵接地から立脚前期、立脚後期の荷重量が不足しているため、この時期に対する評価・治療がポイントと考えられ、関節モビライゼーション、足底板、物理療法などを用いた疼痛に対する処置に加え、この時期における動的な荷重トレーニングが重要と考えられた。

### 論文審査結果の要旨

本研究は変形性膝関節症患者98名および健常者10名に対して、3次元動作解析システムを用いて10m歩行路を自由歩行した時の歩行を分析している。変形性関節症患者をケルグレンとローレンスの分類(Kellgren-Lawrence scale)に基づきGrade I群(70名)、Grade II群(28名)の2群に分類し、日本整形外科学会膝関節機能判定基準、Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index、膝関節屈曲角度・伸展角度、10m最速歩行時の所要時間などの臨床データとともに考察している。

分析の結果、以下に示すような変形性膝関節症患者の歩行の特性が明らかにされている：

- ①変形性膝関節症患者では、正常群より股関節・膝関節の伸展方向の動きが減少し、足関節の背屈一底屈方向の動きが減少する。
- ②Grade II群の踵接地期の膝関節伸展方向の運動は正常群よりも

有意に制限されている。

- ③Grade I群の床反力垂直成分の波形は、正常歩行でみられる2峰性の波形に類似しているが、立脚中期(抜重期)の荷重量の減少が不十分で、平坦化した波形となる。Grade II群ではGrade I群の特徴に加え、2峰が低く、さらに平坦化した波形となる。

本研究では変形性膝関節症患者の筋力などの臨床データと歩行解析を結び付け、リハビリテーションにおける効果的な運動療法を明確化するまでには至らなかったが、肉眼的観察ではとらえにくい変形性膝関節症患者における歩行時の関節運動や床反力の特性を明らかにした点は独創的であり、評価に値する。

本研究は、変形性膝関節症患者の評価および治療に貢献できるものであり、審査の結果、本論文は保健学領域における博士論文として価値あるものと認めた。