

## 学位論文要旨および審査要旨

## 杏林大学学位論文要旨および審査要旨

〔博士（医学）〕

氏名 中里徹矢

〔学位〕	種 類	博士（医学）	論 文 項 目	膵管内乳頭粘液性腫瘍における遺伝子メチル化異常の解析
	授与番号	博甲医 第409号	論文審査委員	主査 近藤晴彦 副査 大倉康男 高橋信一 高山信之 松村譲児
	授与年月日	平成26年5月21日		
	授与の要件	学位規程第5条		

## 学位論文の要旨

【緒言】膵管内乳頭粘液性腫瘍（intraductal papillary mucinous neoplasm：IPMN）は組織学的に腺腫から上皮内癌まで進展し幅広い組織異型を有する腫瘍であり、浸潤癌に進展することがある。IPMNが腺腫から非浸潤癌、浸潤癌へと進行する分子生物学的背景については明らかではない。多くの悪性腫瘍の発癌・進展に遺伝子のメチル化など、いわゆるepigenetic異常の蓄積が関与している。これまでに網羅的な遺伝子のメチル化解析の報告がある。しかし、個々の遺伝子メチル化が癌の発癌や進展にどのように関連するのか、また腫瘍の型分類や組織型などの臨床病理学的因子との関連性については未だ多くが検討されていない。IPMNにおける各種癌関連遺伝子のメチル化状態と腫瘍の進展や悪性度などとの関連性を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】IPMN 37例を対象とした。MGMT, CDKN2A (p16), repressoの各遺伝子についてmethylation specific PCR (MSP)法にてメチル化解析を行った。また、represso蛋白発現について免疫組織化学染色により評価した。腫瘍の異型度や組織型などとの関連について検討した。

【結果】組織型は腺腫29例、腺癌8例で、腺腫の異型度は軽度異型が18例、中等度異型が10例、高度異型が1例であった。MGMTのメチル化は2例（5%）、CDKN2A (p16)のメチル化は3例（8%）に認められた。MGMTのメチル化陽性例2例はいずれもMUC2陽性であった。repressoのメチル化は16例（43%）に認められた。軽度異型 / 中等度異型と高度異型 / 腺癌に分けると、高度異型 / 腺癌において9例中7例（78%）でrepressoのメチル化を認め、軽度異型 / 中等度異型の28例中9例（32%）と比較し高頻度にメチル化を認めた（ $p = 0.016$ ）。免疫組織化学染色でのrepresso蛋白陽性例は25例（68%）に認められた。軽度異型14例（78%）、中等度異型9例（90%）、高度異型1例（100%）、腺癌1例（13%）において陽性であり、軽度異型 / 中等度異型と高度異型 / 腺癌の2群に分けると、軽度異型 / 中等度異型で有意にrepresso蛋白の発現頻度が高い結果であった（ $p = 0.002$ ）。

【結論】represso遺伝子プロモーター領域のメチル化によるrepresso蛋白発現低下は、IPMNの組織異型度が進展するにつれ高頻度にみられた。represso遺伝子のメチル化がIPMNの進展に関与することが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

【背景】膵管内乳頭粘液性腫瘍（intraductal papillary mucinous neoplasm：IPMN）は組織学的に腺腫から上皮内癌まで進展し幅広い組織異型を有する腫瘍であり、浸潤癌に進展することがある。IPMNが腺腫から非浸潤癌、浸潤癌へと進行する分子生物学的背景については明らかではない。多くの悪性腫瘍の発癌・進展に遺伝子のメチル化など、いわゆるepigenetic異常の蓄積が関与している。これまでに網羅的な遺伝子のメチル化解析の報告はあるが、個々の遺伝子メチル化が癌の発癌や進展にどのように関連するのか、また腫瘍の肉眼型や組織型などの臨床病理学的因子との関連性については未だ多くが検討されていない。IPMNにおける各種癌関連遺伝子のメチル化状態と腫瘍の進展や悪性度などとの関連性を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】IPMN 37例を対象とし、MGMT, CDKN2A (p16), repressoの各遺伝子についてmethylation specific PCR (MSP)法にてメチル化解析を行った。また、represso蛋白発現について免疫組織化学染色により評価し、腫瘍の異型度や粘液形質などとの関連について検討した。

【結果】組織型は腺腫29例、腺癌8例で、腺腫の異型度は軽度異型が18例、中等度異型が10例、高度異型が1例であった。

MGMTのメチル化は2例（5%）、CDKN2A (p16)のメチル化は3例（8%）に認め、repressoのメチル化は16例（43%）に認められた。軽度異型 / 中等度異型と高度異型 / 腺癌に分けると、高度異型 / 腺癌において9例中7例（78%）でrepressoのメチル化を認め、軽度異型 / 中等度異型の28例中9例（32%）と比較し高頻度にメチル化を認めた（ $p = 0.016$ ）。免疫組織化学的染色でのrepresso蛋白陽性例は25例（68%）に認められた。軽度異型14例（78%）、中等度異型9例（90%）、高度異型1例（100%）、腺癌1例（13%）において陽性であり、軽度異型 / 中等度異型と高度異型 / 腺癌の2群に分けると、軽度異型 / 中等度異型で有意にrepresso蛋白の発現頻度が高い結果であった（ $p = 0.002$ ）。

【結論】represso遺伝子プロモーター領域のメチル化によるrepresso蛋白発現低下は、IPMNの組織異型度が進展するにつれ高頻度にみられた。represso遺伝子のメチル化がIPMNの進展に関与することが示唆された。

審査の結果、本研究はrepresso遺伝子のメチル化がIPMNの組織異型度、悪性化と関連することをはじめて明らかにしたものであり、従来は画像のみでは困難であったIPMNの悪性度の判定、治療適応の判断に寄与する可能性があり、学位論文として価値あるものと考えられた。

氏名 坂本 仁 美

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論文項目	Clinicopathological significance of somatic <i>RNF43</i> mutation and aberrant <i>RNF43</i> expression in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas (膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) における <i>RNF43</i> 変異と発現異常の臨床病理学的意義)
	授与番号	博甲医 第410号	論文審査委員	主査 大倉康男 副査 古瀬純司 川上速人 井本 滋 菲澤融司
	授与年月日	平成26年9月30日		
	授与の要件	学位規程第5条		

### 学位論文の要旨

【背景・目的】 *RNF43* はユビキチン E3 リガーゼである ring finger protein 43 (*RNF43*) をエンコードする遺伝子である。最近の研究で膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) において *RNF43* 遺伝子に体細胞性突然変異が認められることが報告された。また、*GNAS* は、IPMN の約半数に変異が認められており、G-protein シグナルの活性化、粘液産生に関係すると考えられている。本研究は IPMN における *RNF43* 遺伝子変異と *RNF43* 蛋白発現の異常の性状、頻度と他の分子病理学的因子や臨床病理学的因子との関連について明らかにすることを目的とした。

【方法】 対象は 2001 年から 2010 年の間に東京女子医科大学で手術を行った IPMN 176 症例である。それらのうち凍結標本が得られた 57 症例で次世代シーケンサーを用いた *RNF43* の全エクソン解析を行った。また、全 176 症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて免疫組織化学法により *RNF43* の発現解析を行った。次世代シーケンサーにより検出された変異はサンガーシーケンスにより検証を行った。*RNF43* 変異および *RNF43* 発現異常と *GNAS* 変異、*KRAS* 変異、SMAD4 蛋白発現消失、TP53 蛋白の過剰発現、腫瘍の異型度、組織学的亜型、壁在結節の有無、肉眼的亜型、病期、再発、生存との関連について統計的に評価した。

【結果】 *RNF43* 変異は 57 症例中 8 例 (14%) に認められ、その内訳は、フレームシフト変異が 5 例 (p.F69fs, p.S264fs, p.L311fs, p.R363fs, p.V490fs)、ナンセンス変異が 1 例 (p.Q153X)、ミスセンス変異が 2 例 (p.I164N and p.P310A) であった。*RNF43* 発現は、176 症例中 52 症例 (29.5%) において発現減弱が認められた。*RNF43* 変異は *RNF43* 発現減弱 ( $p = 0.011$ )、*GNAS* 変異 ( $p = 0.020$ )、壁在結節の有無 ( $p = 0.038$ ) と有意に関連していた。*RNF43* 発現減弱は *RNF43* 変異との関連を除いて、分子病理学的・臨床病理学的因子との有意な関連は認められなかった。

【結語】 以上の結果より、*RNF43* 変異は *RNF43* の発現低下と関連していること、また、*GNAS* 変異と関連して一部の IPMN の病態に関与していると考えられた。

### 論文審査結果の要旨

【背景・目的】 *RNF43* はユビキチン E3 リガーゼである ring finger protein 43 (*RNF43*) をエンコードする遺伝子である。最近の研究で膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) において *RNF43* 遺伝子に体細胞性突然変異が認められることが報告された。また、*GNAS* は、IPMN の約半数に変異が認められており、G-protein シグナルの活性化、粘液産生に関係すると考えられている。本研究は IPMN における *RNF43* 遺伝子変異と *RNF43* 蛋白発現の異常の性状、頻度と他の分子病理学的因子や臨床病理学的因子との関連について明らかにすることを目的とした。

【方法】 対象は 2001 年から 2010 年の間に東京女子医科大学で手術を行った IPMN 176 症例である。それらのうち凍結標本が得られた 57 症例で次世代シーケンサーを用いた *RNF43* の全エクソン解析を行った。また、全 176 症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて免疫組織化学法により *RNF43* の発現解析を行った。次世代シーケンサーにより検出された変異はサンガーシーケンスにより検証を行った。*RNF43* 変異および *RNF43* 発現異常と

*GNAS* 変異、*KRAS* 変異、SMAD4 蛋白発現消失、TP53 蛋白の過剰発現、腫瘍の異型度、組織学的亜型、壁在結節の有無、肉眼的亜型、病期、再発、生存との関連について統計的に評価した。

【結果】 *RNF43* 変異は 57 症例中 8 例 (14%) に認められ、その内訳は、フレームシフト変異が 5 例 (p.F69fs, p.S264fs, p.L311fs, p.R363fs, p.V490fs)、ナンセンス変異が 1 例 (p.Q153X)、ミスセンス変異が 2 例 (p.I164N and p.P310A) であった。*RNF43* 発現は、176 症例中 52 症例 (29.5%) において発現減弱が認められた。*RNF43* 変異は *RNF43* 発現減弱 ( $p = 0.011$ )、*GNAS* 変異 ( $p = 0.020$ )、壁在結節の有無 ( $p = 0.038$ ) と有意に関連していた。*RNF43* 発現減弱は *RNF43* 変異との関連を除いて、分子病理学的・臨床病理学的因子との有意な関連は認められなかった。

【結語】 以上の結果より、*RNF43* 変異は *RNF43* の発現低下と関連していること、また、*GNAS* 変異と関連して一部の IPMN の病態に関与していると考えられた。

本研究は、IPMN の病態における *RNF43* 遺伝子変異の役割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。

## 学位論文要旨および審査要旨

氏名 小沼裕寿

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	The glucagon-like peptide 1 receptor agonist enhances intrinsic peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ activity in endothelial cells (GLP-1受容体作動薬は、血管内皮細胞における内因性PPAR $\gamma$ 活性を上昇させる)
	授与番号	博甲医 第411号	論文審査委員	主査 佐藤 徹 副査 窪田 博 後藤田貴也 丑丸 真 要 伸也
	授与年月日	平成26年9月30日		
	授与の要件	学位規程第5条		

## 学位論文の要旨

消化管ホルモンであるインクレチン (GLP-1) は、細胞膜上の特異的なGLP-1受容体と結合し、cAMPを上昇させ、下流シグナルであるProtein Kinase A (PKA) の活性化を介して、 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌促進作用などの種々の作用を、標的臓器に対して発揮する。インクレチンの睥外作用の1つとして、血管内皮細胞に対する抗動脈硬化作用があると考えられているが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。

本研究では、血管内皮培養細胞HUVECにおいて、VCAM-1やICAM-1などの炎症性接着分子が、核内受容体PPAR $\gamma$ アゴニストであるピオグリタゾンによって発現が強力に抑制され、また、GLP-1受容体作動薬Exendin-4によっても、有意に発現抑制されること、さらに、このExendin-4による接着因子の発現抑制が、PPAR $\gamma$ 抑制剤GW9662によって解除されることを示した。PPAR $\gamma$ の活性化により、NF $\kappa$ Bなどの炎症性関連転写因子の発現抑制することが既に知られていることから、Exendin-4による接着分子の発現抑制機構が、PPAR $\gamma$ の活性化を介して発揮されている可能性が示唆された。そこでExendin-4を0.2pg/ml, 2pg/ml投与下 (0.2pg/mlがExendin-4の糖尿病治療域濃度) において、HUVECにおける内因性PPAR $\gamma$ 活性をルシフェラーゼアッセイにて測定したところ、コントロールに比して、Exendin-4濃度依存性に、約20%の活性上昇を示した。Exendin-4投与によってPPAR $\gamma$ 発現量に影響を与えないことから、この活性化は、内因性PPAR $\gamma$ 転写活性を亢進させていることが示唆された。また、この活性化は、投与後6時間から有意な上昇を示し、12時間の時点でピークに達した。Exendin-4によるPPAR $\gamma$ 活性化は、PKA抑制剤であるH89にて消失することから、GLP-1シグナル下流のPKAシグナル活性化を介してPPAR $\gamma$ を活性化することもわかった。

これらの結果から、血管内皮細胞において、GLP-1が持つ抗炎症作用や抗動脈硬化作用は、少なくともGLP-1による直接的なPPAR $\gamma$ 転写促進作用が関与していることがわかり、本研究結果は、動脈硬化のリスクの高い2型糖尿病患者におけるGLP-1受容体作動薬の臨床的意義を説明する上で重要な知見と考えられる。

## 論文審査結果の要旨

消化管ホルモンであるインクレチン (GLP-1) は、細胞膜上の特異的なGLP-1受容体と結合し、cAMPを上昇させ、下流シグナルであるProtein Kinase A (PKA) の活性化を介して、 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌促進作用などの種々の作用を、標的臓器に対して発揮する。インクレチンの睥外作用の1つとして、血管内皮細胞に対する抗動脈硬化作用があると考えられているが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。

本研究では、血管内皮培養細胞HUVECにおいて、VCAM-1やICAM-1などの炎症性接着分子が、核内受容体PPAR $\gamma$ アゴニストであるピオグリタゾンによって発現が強力に抑制され、また、GLP-1受容体作動薬Exendin-4によっても、有意に発現抑制されること、さらに、このExendin-4による接着因子の発現抑制が、PPAR $\gamma$ 抑制剤GW9662によって解除されることを示した。PPAR $\gamma$ の活性化により、NF $\kappa$ Bなどの炎症性関連転写因子の発現抑制することが既に知られていることから、Exendin-4による接着分子の発現抑制機構が、PPAR $\gamma$ の活性化を介して発揮され

ている可能性が示唆された。そこでExendin-4を0.2pg/ml, 2pg/ml投与下 (0.2pg/mlがExendin-4の糖尿病治療域濃度) において、HUVECにおける内因性PPAR $\gamma$ 活性をルシフェラーゼアッセイにて測定したところ、コントロールに比して、Exendin-4濃度依存性に、約20%の活性上昇を示した。Exendin-4投与によってPPAR $\gamma$ 発現量に影響を与えないことから、この活性化は、内因性PPAR $\gamma$ 転写活性を亢進させていることが示唆された。また、この活性化は、投与後6時間から有意な上昇を示し、12時間の時点でピークに達した。Exendin-4によるPPAR $\gamma$ 活性化は、PKA抑制剤であるH89にて消失することから、GLP-1シグナル下流のPKAシグナル活性化を介してPPAR $\gamma$ を活性化することもわかった。

これらの結果から、血管内皮細胞において、GLP-1が持つ抗炎症作用や抗動脈硬化作用は、少なくともGLP-1による直接的なPPAR $\gamma$ 転写促進作用が関与していることがわかり、本研究結果は、動脈硬化のリスクの高い2型糖尿病患者におけるGLP-1受容体作動薬の臨床的意義を説明する上で重要な知見と考えられ、学位論文として価値あるものと認められた。

氏名 峯 尾 松一郎

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	妊娠中のマラリアの実験動物モデル作出と病態発症機序の解明
	授与番号	博甲医 第412号	論文審査委員	主査 岩下光利 副査 今泉美佳 大倉康男 河合 伸 滝澤 始
	授与年月日	平成26年9月30日		
	授与の要件	学位規程第5条		

## 学位論文の要旨

妊婦はマラリア原虫に対する抵抗性が低下していることから、マラリアの病態が重症化しやすい。また、マラリア原虫に感染した妊婦では流産や死産、胎児の発育遅延が頻発することが知られている。妊娠中のマラリアにおける病態生理や病態発症機序は未解明な部分が多い。本研究では、マラリア流行地に住む女性が妊娠し、マラリア原虫に感染した場合の症状を反映する実験動物モデルを作出し、妊娠中のマラリアにおける病態発症機序を明らかにすることを目的とした。

弱毒株のマウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* (Pb) XAT に感染後治癒したマウスは、強毒株の Pb NK65 に対する防御免疫を獲得する。そこで本研究では、Pb XAT の感染・治癒により Pb NK65 に対する免疫を賦与した雌マウスを非感染雄マウスと一晩交配させた後、Pb NK65 を感染させ、まず、その感染動態について調べた。マラリア原虫に対する免疫を賦与した非妊娠マウスに Pb NK65 を感染させると、原虫血症は低レベルで推移し、最終的にマウスは自然治癒した。一方、免疫を賦与した妊娠マウスに Pb NK65 を感染させると、マウスは妊娠後期において原虫血症の増悪および貧血を示すことを見出した。この Pb NK65 を感染させた妊娠マウスでは、抗炎症性サイトカインである IL-10 が著しく増加したことから、妊娠によるマラリア原虫抵抗性の低下には IL-10 が関与している可能性が考えられた。また、この妊娠マウスでは非感染の妊娠マウスと比較して死産仔が高率に認められ、胎盤にはヒトの妊娠中のマラリアで典型的な病態である多数の感染赤血球の蓄積と胎盤絨毛構造の異常が認められた。さらに、この妊娠マウスは妊娠後期に肝細胞内に脂肪蓄積を伴う重度の肝障害を発症することを見出した。肝障害を発症した妊娠マウスの血漿中の IFN- $\gamma$  および一酸化窒素 (NO) を測定したところ、非妊娠マウスと比較して有意な増加が認められた。そこで、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase ; iNOS) 欠損マウスを用いて NO と肝障害の関係について解析したところ、妊娠した iNOS 欠損マウスでは肝細胞中の脂肪蓄積が抑制されていた。このことから、妊娠中のマラリア原虫感染における肝細胞中の脂肪の蓄積には、NO が重要な役割を担っていることが示された。本研究によって妊娠中のマラリアの新規のマウスモデルが作出され、妊娠中のマラリアにおける病態、特に肝障害の発症機序の一端を明らかにすることが出来た。

## 論文審査結果の要旨

妊婦がマラリアに感染すると重症化しやすく、流産、死産、胎児発育不全が頻発することが知られている。本論文は妊娠マウスをモデルに、妊娠中のマラリア感染の病態生理を明らかにすることを目的とした。弱毒株マウスマラリア原虫の pb XAT に感染させた雌マウス (以下 IM 群) と pb XAT に続いて強毒株の pb NK65 に感染させた雌マウス (以下 IM + NK 群) につき、妊娠群と非妊娠群に分け感染動態の解析を行った。Pb XAT に感染したマウスは強毒株の pb NK65 に対する免疫を獲得し、IM + NK 群の非妊娠マウスではマラリア原虫血症は低レベルで推移し、最終的に自然治癒した。一方、IM + NK 群の妊娠マウスではマラリア原虫血症の増悪および貧血が見られた。妊娠マウスでは免疫能を抑制する IL-10 が増加するが、マラリア原虫特異的 IgG も減少しており、妊娠による IL-10 の増加がマラリア原虫特異的 IgG 減少に関与していると推測された。IM 群の妊娠マウスは非感染の妊娠マウスと胎仔数ならびに胎仔重量は同じであったが、IM + NK 群の妊娠マウスでは胎仔数と胎仔重量が有意に減少した。IM + NK 群の妊娠マウスの胎盤を病理組織学的に解析すると、非感染マウスや IM 群の妊娠マウスと比較し、絨毛構造が破壊され絨毛血管内に多数の感染赤血球の集合所見が見られ、熱帯熱マラリア原虫に感染したヒト胎盤と同様な病理組織学的所見を呈してお

り、胎盤機能不全から流産、胎児発育不全、死産などを引き起こすことが推測された。妊婦が熱帯熱マラリアに感染すると HELLP 症候群様の肝障害を引き起こされることが知られているが、本研究でも非感染妊娠マウスや IM 群の妊娠マウスに比較し、IM + NK 群の妊娠マウスでは高頻度に肝機能障害が認められ、病理組織学的解析でも広範囲に肝細胞の壊死および肝細胞内への脂肪蓄積が認められた。マラリア原虫感染における肝障害は炎症性サイトカインである interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) の増加によることが報告されているが、IM + NK 群の妊娠マウスでは IM 群や非感染の妊娠マウスに比較し、著しく血漿中 IFN- $\gamma$  が増加していた。IFN- $\gamma$  は iNOS を介した NO 産生を促進するが、IM + NK 群の妊娠マウスでは血漿中 NO が非妊娠マウスや非感染妊娠マウスより高かった。一方、iNOS をノックアウトした IM + NK 群の妊娠マウスでは肝細胞壊死や肝細胞内への脂肪蓄積は見られなかった。しかし、IM + NK 群の妊娠マウスでも胎盤組織の構造異常や胎仔数の減少と胎仔体重の減少が観察され、マラリア原虫感染における妊婦の肝障害には IFN- $\gamma$  と NO の増加が関与するが、胎盤の機能障害には関与しないと考えられた。

本研究は、妊娠におけるマラリア原虫感染の病態の一端を明らかにすることに貢献し、学位論文として価値あるものと認められた。

## 学位論文要旨および審査要旨

氏名 炭谷由計

〈学位〉	種 類	博士（医学）	論 文 項 目	携帯型脈拍計を活用した糖尿病運動療法が血糖コントロールに及ぼす臨床的効果の検討
	授与番号	博甲医 第413号	論文審査委員	主査 林 潤一 副査 古賀良彦 木崎節子 岩下光利 丑丸 真
	授与年月日	平成26年12月17日		
	授与の要件	学位規程第5条		

## 学位論文の要旨

糖尿病における運動療法では、従来より運動強度として心拍数を指標とすることが推奨されている。しかしながら、わが国の日常臨床では現在のところ心拍数に基づいた運動療法の手段がないことから、最適な運動強度を維持するため、臨床の場において脈拍数の目安となるツールが求められている。この研究の目的は、食事療法および経口血糖降下薬により治療されている2型糖尿病男性患者23名を対象として、自己の脈拍数を指標として採用のうえ、携帯型脈拍計を活用した継続的な運動療法が、血糖コントロール、血管内皮機能、骨代謝に与える影響を臨床的に評価することである。被験者に対し、事前に心肺運動負荷試験を行い、嫌気性代謝閾値レベルの脈拍数（目標脈拍数）を設定した。さらに脈拍数を表示する携帯型脈拍計を活用して運動を行う群（脈拍表示群）、ならびに脈拍数を表示しない脈拍計を使用して運動を行う群（脈拍非表示群）の2群に無作為に振り分け、それぞれの群で1カ月間の運動療法を施行した。脈拍表示群では、脈拍計に表示された脈拍数を意識しながら目標脈拍数に達するような運動を常に行うよう指導した。一方、脈拍非表示群では、従来から行っていたボルグ指数や自己脈測定を行いながら、目標脈拍数に達するように指導した（従来法）。この研究に参加した被験者は、平均年齢 $55.5 \pm 11.0$ 歳、BMI $26.2 \pm 3.6$ kg/m<sup>2</sup>であった。携帯型脈拍計の記録データから、目標脈拍数に達した平均歩行時間は、脈拍表示群 $28.0 \pm 16.1$ 分/日、脈拍非表示群 $8.2 \pm 4.7$ 分/日であり脈拍表示群において有意に増加した（ $p < 0.01$ ）。さらに2群間比較では、脈拍表示群においてグリコアルブミンおよび1.5AGの有意な改善効果を認め（いずれも $p < 0.01$ ）、一方、オステオカルシンは、脈拍表示群においてより増加する傾向を示した（ $p = 0.06$ ）。その他、BMI、空腹時血糖値、高感度CRP、血管内皮機能については、いずれも有意な変化を示さなかった。携帯型脈拍計を活用した糖尿病運動療法は、従来法と比べて目標脈拍数に達する時間を増やし、血糖コントロールを有意に改善させた。このことから糖尿病運動療法における携帯型脈拍計を活用することは、細小血管症だけでなく大血管症の発症・進展予防にも有用性が高い可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

糖尿病運動療法の効果は適切な運動強度を維持しつつ運動を継続して行えるか否かで異なってくる。糖尿病患者個々の最適な運動強度の指標としては運動時の脈拍数が有用とされてきたが、運動療法実施中に自己脈測定を行う従来法での運動療法の有効性は限られていた。本論文は、携帯型脈拍計を活用した継続的な運動療法が従来法に勝る効果を得られるかについて、血糖コントロール、血管内皮機能、骨代謝への影響を評価して、その有用性を検討したものである。

対象は食事療法単独あるいは経口血糖降下薬の併用にて3ヶ月以上外来通院加療の2型糖尿病患者の男性23例。全例に心肺運動負荷試験を行い、得られた嫌気性代謝閾値脈拍数プラス20%をもって目標脈拍数とした。登録順に2対1の割合で脈拍表示群と非表示群へ割り付けた単一施設非盲検無作為化比較対照試験を実施した。脈拍表示群（ $n = 15$ ）には携帯型脈拍計を装着し窓に表示される目標脈拍数を維持するよう歩行速度を調整しながらウォーキングするよう指導した。脈拍非表示群（ $n = 8$ ）には窓に脈拍数を表示しない同型携帯型脈拍計を装着し目標脈拍数の維持には自己脈の測定と自覚的な体感から運動強度を推定する方法（ボルグスケール）にて歩行速度を調整しながらウォーキングするよう指導した。全例に運動療法を実施した1ヶ月間において外

出時は必ず携帯型脈拍計を装着するよう指導した。

両群間に運動療法前の臨床的指標（年齢・BMI・血圧・脂質・高感度CRP・eGFR・グリコアルブミン・1.5-AG・オステオカルシン・アディポネクチン）に有意差はなかった。運動療法1ヶ月間の携帯型脈拍計の記録データを解析した。平均装着時間と平均活動時間には両群間に有意差を認めなかったが、目標脈拍数に達した平均歩行時間は脈拍表示群 $28.0 \pm 16.1$ 分/日、脈拍非表示群 $8.2 \pm 4.7$ 分/日と脈拍表示群において有意に増加した（ $p < 0.01$ ）。血糖コントロールの指標としてのグリコアルブミンは脈拍表示群において運動療法後に有意に低下（ $17.9 \pm 2.9\%$  vs  $16.9 \pm 2.5\%$ 、 $p < 0.01$ ）し、1.5-AGも有意に改善した（ $p < 0.01$ ）が、脈拍非表示群ではいずれも有意な改善を認めなかった。その他の臨床的指標、血管内皮機能、骨代謝マーカーは両群とも有意な変化を認めなかった。

糖尿病治療における運動療法の重要性は指摘されているが、目標脈拍数に基づく運動強度を維持する効果的な手段に乏しく、日常臨床において目標脈拍数を維持できるツールが求められていた。本論文は、携帯型脈拍計の装着により目標脈拍数に達する運動時間数を増やしうることを明らかにし、糖尿病運動指導において携帯型脈拍計の活用が血糖コントロールの有用な手段となることを示すものとして高く評価され、審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 北 条 史

〈学位〉	種 類 博士 (医学)	論 文 項 目	<i>Helicobacter pylori</i> と原生動物の相互作用に関する研究
	授与番号 博甲医 第414号	論文審査委員	主査 高橋信一
	授与年月日 平成27年3月31日		副査 粟崎 健 河合 伸 木崎節子 楊 國昌
	授与の要件 学位規程第5条		

### 学位論文の要旨

*Helicobacter pylori*は急性・慢性胃炎および胃十二指腸潰瘍の起因菌であり、胃癌のリスクファクターとしても知られ、世界的な感染症として注目されてきた。しかしながら、その病態、治療に関する多数の研究報告に比較し、本菌の感染経路に関する研究報告は少なく、全容が解明されていない。一方で環境中に広く分布している自由生活性アメーバ等の原生動物は病原細菌の生存をサポートしていると考えられている。*H. pylori*もまた環境中における他の生物種と相互作用をして生存している可能性は否定できない。本研究では*H. pylori*の感染経路の一端を明らかにすることを目的として、自由生活性アメーバと本菌の相互作用について検討し、本菌の生存に対するアメーバの役割を明らかにするために解析を行った。蛍光標識した*H. pylori*と自由生活性アメーバである*Acanthamoeba castellanii*を共培養して細胞内への移行性を観察した結果、*H. pylori*が*A. castellanii*の細胞内に局在していることが明らかになった。共培養系を透過型電子顕微鏡で観察した結果、*A. castellanii*の細胞内ファゴソーム内に*H. pylori*菌体を確認し、*A. castellanii*が*H. pylori*を貪食していることが明らかになった。*H. pylori*細胞内での生存性を培養法によって検討したところ、培養開始後7時間まで*H. pylori*の生存性を確認したが、24時間後に*A. castellanii*内における*H. pylori*は検出できなかった。尿素添加や低温条件下で本菌の生存性の向上は確認されなかったが、微好気条件下に培養条件を変更すると*A. castellanii*細胞外に*H. pylori*の凝集塊が確認された。共培養系内での*H. pylori*の生存性を培養法で検討したところ、*H. pylori*単独培養系と比較して有意に生存性が向上した。*A. castellanii*と*H. pylori*の接触を阻害した場合や蛋白質を吸着して共培養を行った場合は*H. pylori*の生存性の向上が制限され、本菌の生存性の向上に*A. castellanii*との接触や蛋白質が関与している可能性が示唆された。また*A. castellanii*培養上清を用いて培養を行った場合、本菌の生存性の向上は部分的であり、生きたアメーバの存在も共に必要であることが示唆された。*A. castellanii*との共培養系内における*H. pylori*の蛋白質発現についてSDS-PAGE解析を行った結果、*H. pylori*単独培養系と比較して共培養において強発現する蛋白質が存在することが明らかになった。RNA シークエンスによって強発現した遺伝子を解析した結果、外膜蛋白質遺伝子の発現量が最も多いことが明らかになった。本研究により*A. castellanii*が*H. pylori*の生存に関与している可能性が示唆され、本菌の感染経路の解明の一助となる知見が得られた。

### 論文審査結果の要旨

*Helicobacter pylori*は小児期に経口感染して、その後排除されること無く長期感染となり、慢性胃炎を背景として胃潰瘍や胃がんを始め種々の疾患を発症させる細菌である。本菌については、基礎的・臨床的研究が世界的に進められているが、自然界にどのようにして生存し、ヒトに感染してくるのかについては詳しく知られていない。

一方、環境中に広く分布している自由生活性アメーバなどの原生動物が細菌の生存をサポートしているとする報告がある。そこで本研究では、*H. pylori*の感染経路の一端を明らかにすることを目的として、自由生活性アメーバが*H. pylori*の生存を助けているとの作業仮説を立て、*H. pylori*と自由生活性アメーバである*Acanthamoeba castellanii*とを共培養し、以下の結果を得た。

「検討1」アメーバ体内での*H. pylori*の生存性：「結果1」①*A. castellanii*体内に蛍光標識した*H. pylori*を認めた。②透過型電子顕微鏡で、*A. castellanii*の体内ファゴソーム内に*H. pylori*菌体を確認し、*A. castellanii*が*H. pylori*を貪食していることが明らかとなった。③*H. pylori*の*A. castellanii*体内での生存性を培養法によって検討したところ、培養開始後7時間まで*H. pylori*の生存性を確認したが、24時間後には検出できなかった。

「検討2」アメーバ体外での*H. pylori*の生存性：「結果2」①微好気培養条件下では、*A. castellanii*体外に*H. pylori*の凝集塊が確認された。②共培養系での*H. pylori*の生存性を培養法で検討したところ、*H. pylori*単独培養系と比較して有意に生存性が向上した。③*A. castellanii*と*H. pylori*の接触を阻害した場合や、培養液中の蛋白質を吸着して共培養を行った場合は、*H. pylori*の生存性の向上が共培養と比較して制限され、*A. castellanii*との接触や蛋白質が生存性の向上に関与している可能性が示唆された。また*A. castellanii*培養上清を用いて培養を行った場合、本菌の生存性の向上は部分的であり、生きたアメーバの存在も共に必要であることが示唆された。

「検討3」*H. pylori*の遺伝子発現解析：「結果3」①*A. castellanii*との共培養系内における*H. pylori*の蛋白質発現についてSDS-PAGE解析を行った結果、*H. pylori*単独培養系と比較し強発現する蛋白質が存在することが明らかになった。②RNA シークエンスによって強発現した遺伝子を解析した結果、外膜蛋白質遺伝子の発現量が最も多いことが明らかになった。

本研究により*A. castellanii*が*H. pylori*の生存に関与している可能性が示唆され、本菌の感染経路の解明の一助となる知見が得られた。審査の結果、学位論文として相応しいものと認めた。

## 学位論文要旨および審査要旨

氏名 村上 華奈子

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	MPO-ANCA 関連血管炎患者好中球の好中球細胞外トラップ (NETs) 放出は抗MPO抗体刺激により増加し免疫抑制療法により減少する
	授与番号	博甲医 第415号	論文審査委員	主査 高橋信一 副査 神谷 茂 狩野葉子 櫻井裕之 奴田原紀久雄
	授与年月日	平成27年3月31日		
	授与の要件	学位規程第5条		

## 学位論文の要旨

【目的】 ANCA関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis: AAV) は、血管炎のうち多臓器の小血管に血管炎をきたす難治性希少疾患で、ANCAの対応抗原により主にMPO-ANCA関連血管炎 (MPO-AAV)、PR3-ANCA関連血管炎 (PR3-AAV) に分けられる。最近、病態へのNeutrophil extracellular traps (NETs) の関与が報告されているが、MPO-AAV患者の多形核好中球 (Polymorphonuclear neutrophil: PMN) の放出するNETsについてはこれまで十分な検討がされていない。そこで我々は、MPO-AAVを対象とし、治療前の患者PMNのNETs放出能、抗MPO抗体の関与、NETsの形態および治療による変化、臨床所見との関連につき検討した。

【対象・方法】 対象は治療前にPMNを採取できたMPO-AAV患者6名、そのうち治療後のPMNも採取できたのは4名であった。対照は健常人13名とした。PMNを培養液のみで培養したもの、培養液 + PMA、さらに抗MPO抗体または抗PR3抗体でそれぞれ刺激した4種類の条件で誘導されるNETsを観察し、NETsの放出量を測定した。治療後のMPO-AAV患者では治療による変化も検討した。

【結果】 健常人、MPO-AAV患者ともにfiber状の構造物 (fiber-NETs) と細胞全体が膨張するような形態 (round-NETs) の二種類のNETosisを認めた。fiber-NETsはMPO-AAV患者では健常人と比し大きな網状を呈し、全細胞に対するfiber-NETs放出細胞の割合 (% fiber-NETs cell) はPMA、PMA + 抗体のいずれの条件でも有意に増加していた。また、MPO-AAV患者PMNでは抗MPO抗体を加えた群で% fiber-NETs cellが増加した。治療により網状のfiberは消失し、ANCA値改善とともに% fiber-NETs cellも低下した。

【考察】 MPO-AAV患者PMNは健常人と異なる形態のNETsを放出し、% fiber-NETs cellは有意に増加し、治療により低下したことから、fiber-NETsがMPO-AAVの病態へ関与していることが示唆された。MPO-AAV患者生体内では、易刺激状態であるPMNがMPO-ANCAによりさらに活性化され、過剰なfiber-NETsを放出し、血管を障害する機序が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

ANCA (抗好中球細胞質抗体; anti-neutrophil cytoplasmic antibody) 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis: AAV) は多臓器障害性の小型血管炎で、対応抗原別に本邦に多いMPO (myeloperoxidase)-ANCA関連血管炎 (MPO-AAV) と欧米に多いPR3 (proteinase 3)-ANCA関連血管炎 (PR3-AAV) に分けられる。最近AAVの病態にANCAによる多形核白血球 (PMN: polymorphonuclear neutrophil) 活性化およびPMNより放出されるNETs (Neutrophil extracellular traps) の関与が注目されている。しかし、AAVは希少性難治性疾患で、患者自身のPMNを用いたNETs研究は1報告 (PR3-AAV3例、MPO-AAV1例) のみで、患者生体内におけるNETsの役割は明らかでない。本研究では我が国に多いMPO-AAVにつき、患者PMNを用いたNETs放出能、抗MPO抗体の関与、NETsの形態および免疫抑制治療との関連につき検討した。

【対象・方法】 対象はMPO-AAV患者6例で4例は治療前と治療後で経時的に検討した。健常人13名を対照とし、末梢血より採取したPMNを①; 培養液、②; 培養液 + PMA (phorbol myristate acetate: NETs誘導物質)、③; ② + 抗MPO抗体、④; ② + 抗PR3抗体、の4種類の条件下で培養し、誘導されるNETsの放出量や形態を検討した。

【結果】 ①; 健常人、MPO-AAV患者のPMNはともに培養液のみではNETs放出は認めなかった。②; 健常人、MPO-AAV患者のPMNはともに、PMAおよびPMAと抗MPO抗体または抗PR3抗体刺激で、fiber状の構造物 (fiber-NETs) と細胞全体が膨張するような形態 (round-NETs) の二種類のNETosisを認めた。③; MPO-AAV患者PMNは健常人PMNに比し、PMA、PMA + 抗MPO抗体のいずれの条件でも、全細胞に対するfiber-NETs放出細胞の割合 (% fiber-NETs cell) が有意に増加していた。この% fiber-NETs cellは、PMA + 抗MPO抗体刺激で最も増加した。④; MPO-AAV患者PMNはPMA + 抗PR3抗体刺激では、PMA単独に比し有意な% fiber-NETs cell増加を認めなかった。⑤; MPO-AAV患者PMNからのfiber-NETsは健常人のfiber-NETsに比し大きな網状形態を呈した。⑥; 免疫抑制治療で網状fiber NETsは消失し、% fiber-NETs cellはANCA値低下と共に減少し、ANCA値再上昇時に増加した。

これからMPO-AAVでは、易刺激状態にあるPMNがMPO-ANCAにより活性化され、大きな網状の形態を有する過剰なfiber-NETsを放出し血管を障害する機序が推測された。

本研究はMPO-AAVの病態にMPO-ANCA刺激によるNETs放出が関与することを、MPO-AAVの患者好中球を用いて明らかにした価値ある研究であり、審査の結果、学位論文として相応しいものと認めた。

## 学位論文要旨および審査要旨

氏名 横 矢 重 臣

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	線維性被膜及びその周辺の細胞外マトリックス分解酵素の発現強度が頸動脈プラークの臨床症候に関与する
	授与番号 博甲医 第416号	論文審査委員	主査 佐藤 徹
	授与年月日 平成27年3月31日		副査 川上速人 後藤田貴也 平野照之 布川雅雄
	授与の要件 学位規程第5条		

### 学 位 論 文 の 要 旨

アテローム動脈硬化性病変である頸動脈の不安定プラークは塞栓をきたし脳梗塞を誘発することが知られている。不安定プラークの組織学的特徴は線維性被膜の菲薄化やプラーク内血管新生などが挙げられ、プラーク不安定化に関連する物質として細胞外マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMPs)が重要な役割を担っているとされている。しかし、MMPsの発現局在と臨床症候の関係に関しては、未だはっきりしていない。本研究の目的はMMPsの発現局在と頸動脈プラークの臨床症候の関連を検証することである。

頸動脈内膜剥離術(Carotid Endarterectomy: CEA)が施行された内頸動脈狭窄症41症例(症候性21例、無症候性20例)から得られた摘出プラークを対象とし、病理学的所見の検討およびMMP関連酵素や血管新生のマーカであるVEGF, MMPs, TIMPs, CD31(PECAM)に対する免疫染色を施行し、虚血イベント発症との関連について検討した。

プラーク全体について測定したMMPs, CD31の発現強度は症候性プラークと無症候性プラークにおいて有意差はなかった。一方、無症候性プラークと比較して症候性プラークにおいては、線維性被膜は薄い傾向があったが、線維性被膜及びその周辺部のMMP-9発現強度は有意に高かった( $p = 0.003$ )。また、MMP-9に対する免疫電顕では一部の泡沫細胞内のゴルジ装置や顆粒状構造に陽性を示した。プラーク内における部位ごとのMMP-9発現強度と血管新生との間には相関が認められなかった。

本研究にて、線維性被膜とその周辺部のMMP-9の発現強度増大が、頸動脈プラークの臨床症候に関与している可能性が示された。

### 論 文 審 査 結 果 の 要 旨

アテローム動脈硬化性病変である頸動脈の不安定プラークは塞栓をきたし脳梗塞を誘発することが知られている。不安定プラークの組織学的特徴として線維性被膜の菲薄化やプラーク内血管新生などが挙げられ、プラーク不安定化に関連する物質として細胞外マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMPs)が重要な役割を担っているとされている。しかし、MMPsの発現局在と臨床症候の関係に関しては、未だはっきりしていない。本研究の目的はMMPsの発現局在と、頸動脈プラークによる臨床症候との関連を検証することである。

頸動脈内膜剥離術(Carotid Endarterectomy: CEA)が施行された内頸動脈狭窄症41症例(症候性21例、無症候性20例)から得られた摘出プラークを対象とし、病理学的所見の検討および

MMP関連酵素や血管新生のマーカであるVEGF, MMPs, TIMPs, CD31(PECAM)に対する免疫染色を施行し、虚血イベント発症との関連について検討した。

プラーク全体について測定したMMPs, CD31の発現強度は症候性プラークと無症候性プラークにおいて有意差はなかった。一方、無症候性プラークと比較して症候性プラークにおいては、線維性被膜は薄い傾向にあり、線維性被膜及びその周辺部のMMP-9発現強度は有意に高かった( $p = 0.003$ )。また、MMP-9に対する免疫電顕では一部の泡沫細胞内のゴルジ装置や顆粒状構造に陽性を示した。プラーク内における部位ごとのMMP-9発現強度と血管新生との間には相関が認められなかった。

本研究にて、線維性被膜とその周辺部のMMP-9の発現強度増大が、頸動脈プラークの臨床症候に関与している可能性が示された。審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 李 政 勳

〈学位〉	種 類 博士 (医学)	論 文 項 目 中枢神経系原発悪性リンパ腫の予後因子に関する検討
	授与番号 博甲医 第417号	論文審査委員 主査 高山信之
	授与年月日 平成27年3月31日	副査 菅間 博 高山 誠 古瀬純司 松村讓兒
	授与の要件 学位規程第5条	

## 学位論文の要旨

中枢神経系原発悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma ; PCNSL) は稀少腫瘍であるが、近年高齢者を中心に増加傾向を認める予後不良な疾患である。PCNSLの予後因子として年齢と performance status は広く支持されているが、他に確立した予後因子はなく、また組織学的因子や新たな因子の検討は十分にされていない。今回、われわれはPCNSLの予後因子を検索するため、臨床的ならびに組織学的因子を用いて後方視的に解析を行った。当科でPCNSLと診断され、主として high-dose methotrexate (MTX) 療法と全脳照射を行った41症例 (男性25例, 女性16例, 平均年齢62.8歳) を対象にした。臨床的検討因子として性別, 年齢, Karnofsky performance status (KPS), 病変部位 (深部病巣, 脳弓前半部, 中脳被蓋・上髄帆), 病変数, 治療法を用い, 組織学的検討因子としてMTX代謝関連因子 (dihydrofolate reductase ; DHFR, multidrug resistance protein ; MRP, lung resistance protein ; LRP), B細胞subtype関連因子 (CD10, BCL6, MUM1, CD138, GCET1, FOXP1), 細胞周期関連因子 (Ki67, p27), 癌遺伝子産物 (BCL2, cMYC, pSTAT3), 薬剤耐性因子 ( $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase ; MGMT, mismatch repair ; MMR 蛋白) を免疫染色法で評価し, 無増悪生存期間 (progression-free survival ; PFS), 全生存期間 (overall survival ; OS) を基に予後因子を検索した。観察期間中央値は23ヶ月, PFSの中央値は29ヶ月, OS中央値は73ヶ月であった。検討因子間では年齢とKPSは逆相関 ( $P = 0.002$ ) を示し, Ki67と癌遺伝子産物 (BCL2, cMYC, pSTAT3) は正相関 ( $P < 0.028$ ) を, MMR 蛋白 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) 間で正相関 ( $P < 0.012$ ) を示した。多変量解析の結果, 独立した予後因子としてPFSでは病変数 ( $P = 0.018$ ), 中脳被蓋・上髄帆病変 ( $P = 0.024$ ), 地固め療法 ; high-dose cytarabine 療法 ( $P = 0.024$ ), p27発現 ( $P = 0.010$ ), BCL6発現 ( $P = 0.057$ ), MSH2発現 ( $P = 0.023$ ) を認め, OSでは脳弓前半部病変 ( $P = 0.037$ ), 中脳被蓋・上髄帆病変 ( $P = 0.050$ ), MSH2発現 ( $P = 0.037$ ) を認めた。また単変量解析で予後に影響する因子としてOSにBCL6 ( $P = 0.055$ ) とcMYC ( $P = 0.046$ ) を認めた。本研究の結果, 以下の知見が得られた。①従来予後不良と報告された深部病変に比べ, 新たな検討項目とした脳弓前半部および中脳被蓋・上髄帆病変は有意な予後不良因子であった。これらの部位はより限局かつ脳室に近い病変であり, 上衣下浸潤しやすいことが予後不良の原因と考えられた。②PCNSLでは全身性diffuse large B cell lymphoma と比べ, 予後不良とされるnon-GCB typeの割合が多かったが, 予後との関連は明らかではなかった。一方, GCB typeのマーカーであるBCL6発現は予後良好傾向を示し, PCNSLの予後因子である可能性が考えられた。③今回初めてMMR 蛋白がPCNSLの予後因子であることが示された。MMR 蛋白発現低下はMTX薬剤耐性に影響したため, 予後不良の結果にも影響したと考えられた。これら研究結果は今後さらに前向き試験にてその意義を検証する予定である。

## 論文審査結果の要旨

中枢神経系悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma ; PCNSL) は, 稀少腫瘍であるが, 近年高齢者を中心に増加傾向を認める予後不良の疾患である。PCNSLの予後因子として, 年齢と Performance status は広く支持されているが, 他の予後因子については不明な点が多い。本研究は, PCNSLにおける様々な臨床的, 組織学的予後因子について, 自験例を基に包括的に検討したものである。

対象は, 杏林大学医学部付属病院脳神経外科にてPCNSLと診断され, 主として high-dose methotrexate (MTX) 療法および全脳照射を行った41例 (男性25例, 女性16例)。臨床的検討因子として, 性別, 年齢, Karnofsky performance status (KPS), 病変部位 (深部病巣, 脳弓前半部, 中脳被蓋・上髄帆), 病変数, 治療法を, 組織学的検討因子としてMTX代謝関連因子 (dihydrofolate reductase ; DHFR, multidrug resistance protein ; MRP, lung resistance protein ; LRP), B細胞subtype関連因子 (CD10, BCL6, MUM1, CD138, GCET1, FOXP1), 細胞周期関連因子 (Ki67, p27), 癌遺伝子 (*BCL2*, *cMYC*, *pSTAT3*), 薬剤耐性因子 ( $O^6$ -methylguanine-DNA methyltransferase ; MGMT, mismatch repair ; MMR 蛋白) を免疫染色法で評価し, Progression-free survival (PFS), Overall survival (OS) に影響を及ぼす予後因子となり得るか否かについ

て検討した。更に, 標準治療薬であるMTXの耐性に影響を及ぼす因子についても検討した。

多変量解析の結果, PFSの独立した予後不良因子として, 病変数 ( $P = 0.018$ ), 中脳被蓋・上髄帆病変 ( $P = 0.024$ ), 地固め療法として high-dose cytarabine の施行なし ( $P = 0.024$ ), p27低発現 ( $P = 0.010$ ), MMR 蛋白の一つであるMSH2低発現 ( $P = 0.023$ ) が認められた。また, BCL6低発現は, 予後不良となる傾向を示した ( $P = 0.057$ )。一方, OSの独立した予後因子として, 脳弓前半部病変 ( $P = 0.037$ ), 中脳被蓋・上髄帆病変 ( $P = 0.050$ ), MSH2発現低下 ( $P = 0.046$ ) が認められた。更に, MTX耐性因子を多変量解析で検討したところ, MMR 蛋白の一つであるPMS2の発現の低下が有意に予後と相関した ( $P = 0.022$ )。脳弓前半部および中脳被蓋・上髄帆は, 脳室に近く, 上衣下浸潤しやすいことが予後不良となる原因である可能性が考えられた。また, MMR 蛋白の発現低下は, DNA mismatch領域が修復されずに残ることが, MTX抵抗性と関連して予後不良となる可能性が考えられた。

今回の研究により, PCNSLの予後因子について包括的理解が進み, 特に, 臨床的因子として脳弓前半部および中脳被蓋・上髄帆病変が, 組織学的因子としてMMR 蛋白の発現低下が, PFS, OSの予後不良因子であると同定されたことは, 新たな知見として意義ある結果であった。審査の結果, 学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 牛 込 悠 紀 子

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	重症薬疹における patrolling monocytes (pMOs) と regulatory T cells (Tregs) の相互作用
	授与番号 博甲医 第418号	論文審査委員	主査 神谷 茂 副査 木崎節子 高橋信一 滝澤 始 山田昌和
	授与年月日 平成27年3月31日		
	授与の要件 学位規程第5条		

## 学 位 論 文 の 要 旨

重症薬疹の中でも、スティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome : SJS) / 中毒性表皮壊死症 (Toxic epidermal necrolysis : TEN) と薬剤性過敏症症候群 (drug-induced hypersensitivity syndrome : DiHS) はその病態が極めて対照的である。Regulatory T cells (Tregs) の機能低下により生じ、著明な表皮障害を生ずる SJS / TEN に対し、DiHS では急性期に免疫抑制機能を有する Tregs の増大に伴うヘルペスウイルスの再活性化を生じるが、回復期には一転して増大していた Tregs が機能低下に陥り、自己抗体産生の増強を認めるようになる。しかし、多くの研究は急性期だけの解析に終始しており、回復期まで検討した報告はない。我々は本研究において、重症薬疹、とくに DiHS におけるこのような経時的な Tregs の動態の変化をもたらす要因として末梢血中の単球分画に注目し、この分画が薬疹の経過中にどのように変化し、それが Tregs の機能にどのような影響を与えるかを検討した。単球の分画において、ウイルス感染の検知に関与する CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> patrolling monocytes (pMOs) が DiHS の急性期には選択的に消失することにより、CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> classical monocytes (cMOs) の相対的増加を招き、cMOs からの IL-10 が Tregs の増大をもたらすことが分かった。末梢血中の pMOs は、DiHS の急性期が過ぎるとともに急速に回復するが、この回復した pMOs から産生される IL-6 は Tregs の機能低下をもたらす一方、IL-17 産生性 CD4<sup>+</sup> 細胞 (Th17) の増加をもたらした。このように、pMOs と Treg / Th17 の相互作用が薬疹の臨床型と予後に大きな影響を与えていることが分かった。

## 論 文 審 査 結 果 の 要 旨

重症薬疹のうち、スティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome : SJS) / 中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis : TEN) と薬剤性過敏症症候群 (drug-induced hypersensitivity syndrome : DiHS) はその病態が異なることが知られている。SJS / TEN では制御性 T 細胞 (Tregs) の機能低下により表皮障害が生ずるのに対して、DiHS では Treg の増大が認められる。IL-17 産生性 CD4<sup>+</sup> 細胞 (Th17) は自己免疫疾患発症に重要な役割をしていることが知られる。また CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> patrolling monocytes (pMOs) はウイルス感染免疫応答の中心的役割をする他、自己免疫疾患の発症にも関与することが知られている。本研究では重症薬疹の急性期および回復期での Tregs, Th17 および pMOs の動態を解析し、同疾患の病態への関連性を解析した。

杏林大学医学部付属病院皮膚科で入院加療を受けた DiHS 患者 52 例 (急性期 31 例, 回復期 21 例), SJS 患者 22 例 (急性期 12 例, 回復期 10 例), TEN 患者 11 例 (急性期 6 例, 回復期 5 例), 健常人 17 例から末梢血リンパ球を採取して実験を行った。リンパ球の CD 抗原等は特異抗体を用いたフローサイトメトリーにより解析した。pMOs および cMOs (classical CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes) は磁気細胞分離システムおよびセルソーターにより分取した。DiHS, SJS / TEN 急性期患者の皮疹部を生検して免疫組織染色により pMOs が発現する CD16 および PILR- $\alpha$  (paired immuno-

globulin-like type 2 receptor  $\alpha$ ) を調べた。

DiHS 急性期では回復期, SJS / TEN 急性期, 回復期, 健常人と比べて Tregs の割合が増大していた。増加した Tregs は iTregs (induced Tregs) のサブポピュレーションであった。一方, Th17 は DiHS 回復期に有意な増加を示した。重症薬疹における pMOs の変動を調べた結果, DiHS 急性期にはほぼ消失しており, 回復期では SJS / TEN 急性期, 回復期, 健常人と同レベルに回復していた。cMOs については上記群間で有意な差は認められなかった。また DiHS 急性期の皮疹部での pMOs の消失が免疫組織染色により確認された。DiHS 症例における Tregs, pMOs, Th17 の経時的変動を検討した結果, 急性期の Tregs 増加, pMOs 消失, Th17 減少と回復期の Tregs 減少, pMOs 増加, Th17 増加が認められた。加えて DiHS 急性期の cMOs 由来 IL-10 による Tregs の増加ならびに DiHS 回復期の pMOs 由来 IL-6 による Th17 の増加が共培養実験により明らかにされた。

本研究により DiHS と SJS / TEN の病態変化に pMOs, Tregs, Th17 が密接に関連していることが明らかにされた。すなわち DiHS の急性期においては pMOs の選択的消失の結果としての cMOs の相対的増加が iTregs を増加させる一方, DiHS の回復に伴い出現した pMOs が CD4<sup>+</sup> 細胞の分化を Tregs から Th17 に向けさせる可能性が提起された。これらの結果は重症薬疹の発症病態の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た。

## 学位論文要旨および審査要旨

氏名 小松 由莉江

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	アトピー性皮膚炎の病態形成における発汗障害の関与
	授与番号 博甲医 第419号	論文審査委員	主査 永松信哉
	授与年月日 平成27年3月31日		副査 山本 実 石田 均 小林富美恵 多久嶋亮彦
	授与の要件 学位規程第5条		

## 学位論文の要旨

汗はアトピー性皮膚炎(AD)の悪化因子のひとつとして以前より注目されていたが、汗には水分に加え保湿因子や抗菌ペプチドなどが含まれ、皮膚の水分の保持に重要な役割を果たしている。我々はむしろ適切な発汗ができないことがADの病態を進行させているのではないかと考えた。ADの発汗反応に関する過去の検討結果は低下、正常、亢進のいずれの報告もある。その理由として、過去の報告では発汗反応の客観的で定量的な測定法が確立していなかったこと、ADの病態の進行による発汗機能の経時的な変化を評価していなかったこと等が挙げられる。本研究において、個々の汗腺・汗管からの発汗反応を定量的に評価するimpression mold(IM)法を用いて、ADにおける発汗反応が皮疹の変化に関連してどのように変化するかを測定し、発汗障害がADの病態形成にどのように影響するかを明らかにしようと考えた。

健常人とAD患者に足浴による温熱負荷を行い、15分後、30分後の発汗反応をIM法を用いて測定し、発汗滴の分布、大きさを計測した。対象患者は発症からの期間が5年以下の群をacute AD、5年以上の群をchronic ADとし、各々がどのような発汗パターンを示すかを比較検討した。

健常人では温熱負荷前、後ともに皮溝からの発汗が優位に見られるが、負荷後には皮丘からの発汗も増加し、皮溝からの発汗を補っている可能性が考えられた。Acute ADでは、負荷後の皮溝からの発汗が減少する一方で、代償性発汗と考えられる発汗滴が皮丘に見られた。Chronic ADでは、発汗滴数が著明に減少するとともに発汗量の少ない汗管が増加し、代償性発汗も見られなくなった。Acute ADでは発汗滴数が増えるほど皮疹の重症度であるSCORADも高い傾向を示す一方、chronic ADでは発汗滴数が減少する程SCORADが増加し、発汗の減少による乾燥が皮疹の増悪をもたらすと考えられた。免疫組織学的検討では、ADでは汗に含まれる抗菌ペプチドであるdermcidinが、汗管周囲の真皮に強く発現し、真皮内の汗の漏出と考えられた。この所見は、尋常性乾癬では見られず、ADの炎症の増悪に関与する可能性が考えられた。

ADの発汗障害は皮溝からの発汗低下から始まり、急性期は皮丘からの代償性発汗が生じるものの、徐々に全身性の発汗障害へ進展し、慢性期のADの病態をもたらすと考えられた。

## 論文審査結果の要旨

汗はアトピー性皮膚炎(AD)の悪化因子の一つである。汗には水分に加え保湿因子や抗菌ペプチドなどが含まれ、皮膚の水分保持に重要な役割を果たしているが、ADの発汗反応に関しては、客観的かつ定量的な測定法が確立していなかったため、現在まで低下、正常、亢進なのか、一定の見解は得られていなかった。従って、本研究においては、発汗反応を定量的に評価するimpression mold(IM)法を用いることにより、ADの病態形成における発汗障害の役割を明らかにすることを試みた。

健常人とAD患者に足浴による温熱負荷を行い、15分後、30分後の発汗反応をIM法を用いて測定し、発汗滴の分布、大きさを計測した。対象患者は発症からの期間が5年以下の群をacute AD、5年以上の群をchronic ADとし、各々がどのような発汗パターンを示すかを比較検討した。その結果、acute ADでは負荷後の皮溝からの発汗が減少する一方で、代償性発汗と考えられる

発汗滴が皮丘に観察された。Chronic ADでは、発汗滴数が著明に減少するとともに発汗量の少ない汗管が増加し、代償性発汗も観察されなかった。又、acute ADで観察された皮膚紋理の破壊がchronic ADでは更に進んでいることが明らかとなった。免疫組織学的検討では、ADでは汗に含まれる抗菌ペプチドであるdermcidinが、汗管周囲の真皮に強く発現していたことから、真皮内へ汗が漏出し、又、この所見は尋常乾癬では見られないため、ADの炎症の増悪に関与していることが示唆された。すなわち、ADの発汗障害は皮溝からの発汗低下から始まり、急性期には皮丘からの代償性発汗が生じるものの、徐々に全身性の発汗障害へ進展し、慢性的なADの病態をもたらすことが強く示唆された。

本研究は、ADの病期と発汗障害のパターンとの関連を明らかにしたものであり、このことはADの治療法の開発に結びつく重要な知見を示したものであることから、学位論文として価値あるものと評価した。

氏名 横山 政明

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Molecular analysis of biliary tract cancers identified <i>KRAS</i> mutation as a potential prognostic biomarker
	授与番号	博甲医 第420号		(胆道癌における <i>KRAS</i> 変異の予後予測バイオマーカーとしての可能性)
	授与年月日	平成27年3月11日	論文審査委員	主査 高橋信一 副査 狩野葉子 菅間 博 近藤晴彦 佐藤喜宣
	授与の要件	学位規程第5条		

### 学位論文の要旨

#### 【目的】

胆道癌に対する分子標的治療薬のターゲットとなる可能性のあるシグナル伝達系及び細胞周期関連分子の変異、蛋白発現について明らかにする。

#### 【対象】

2005年～2011年の間に当院で手術を受け、病理組織学的に胆道癌と診断された患者63例(男/女=38/25, 胆嚢癌23例, 肝内胆管癌7例, 肝外胆管癌29例, 乳頭部癌4例)。

#### 【方法】

胆道癌63例において、*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *FBXW7*の変異の有無、およびEGFR, TP53の過剰発現の有無をダイレクトシーケンスおよび免疫染色により評価し、分子学的特徴と臨床病理学的特徴との関連を後方視的に調査した。

#### 【結果】

*KRAS*変異は9例(14%)に認められたが、*BRAF*, *PIK3CA*, 及び*FBXW7*には変異は認められなかった。EGFRは5例(8%)に、またTP53は30例(48%)に過剰発現が認められた。*KRAS*変異症例は野生型よりも有意に全生存期間が短く( $P=0.005$ ), 多変量解析により*KRAS*変異( $P=0.004$ ), リンパ節転移例( $P=0.015$ )が、全生存期間を有意に短縮する因子として抽出された。

#### 【結論】

*KRAS*変異は胆道癌患者において予後予測因子になる可能性が示唆された。

### 論文審査結果の要旨

胆道癌の多くは診断時すでに手術適応でない進行癌であることが多く、そのため分子標的治療薬の開発が期待されている。本研究では、この胆道癌に対する分子標的治療薬のターゲットとなる可能性のあるシグナル伝達系および細胞周期関連分子の変異、蛋白発現について、さらに胆道癌の予後予測因子について検討した。

#### 【対象】

2005年から2011年の間に杏林大学付属病院で手術を受け、病理組織学的に胆道癌と診断された患者63例(男/女=38/25, 胆嚢癌23例, 肝内胆管癌7例, 肝外胆管癌29例, 乳頭部癌4例)である。

#### 【方法】

胆道癌63例において、*KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *FBXW7*の変異の有無、およびEGFR, TP53の過剰発現の有無をダイレク

トシーケンスおよび免疫染色により評価し、分子学的特徴と臨床病理学的特徴との関連を後方視的に調査した。

#### 【結果】

- 1) *KRAS*変異は9例(14%)に認められたが、*BRAF*, *PIK3CA* および*FBXW7*には変異は認められなかった。
- 2) EGFRは5例(8%)に、またTP53は30例(48%)に過剰発現が認められた。
- 3) *KRAS*変異症例は野生型よりも有意に全生存期間が短かった( $P=0.005$ )。
- 4) 多変量解析により*KRAS*変異( $P=0.004$ ), リンパ節転移例( $P=0.015$ )が、全生存期間を有意に短縮する因子として抽出された。

本研究により*KRAS*変異は胆道癌患者において予後予測因子になる可能性が示唆された。今後、胆道癌に対して臨床応用される分子標的治療薬の選択において重要な新知見であり、審査の結果、学位論文として相応しいものと認めた。

## 学位論文要旨および審査要旨

氏名 大石 知瑞子

〈学位〉	種類 博士(医学)	論文項目	A NEW PITFALL IN A SENSORY CONDUCTION STUDY OF THE LATERAL ANTEBRACHIAL CUTANEOUS NERVE: SPREAD TO THE RADIAL NERVE.
	授与番号 博乙医 第561号		(外側前腕皮神経の神経伝導検査における新たなpitfall, 橈骨神経への波及に対する研究)
	授与年月日 平成26年4月16日		
	授与の要件 学位規程第6条	論文審査委員	主査 岡島康友 副査 市村正一 大木 紫 塩川芳昭 松村譲児

## 学位論文の要旨

【背景】外側前腕皮神経(LAC)の感覚神経伝導検査(SCS)は腕神経叢障害の評価に用いられるが、感覚神経活動電位(SNAP)振幅には個人差、左右差が大きく、診断的価値が問題視されている。本神経のSCSの個人差・左右差の原因を明らかにし、それに対応することが求められている。【目的】健常者を対象にLACのSCSにおける肘部刺激が橈骨神経浅枝(SR)に波及する頻度と検査結果への影響を明らかにする。【方法】健常者80例(男性39例,女性41例,24-82歳)の両腕を検査した。肘部で刺激し12cm遠位の前腕部で記録するルーチンLAC SCSに加え、遠位で橈骨神経SNAPを記録した。刺激の波及の生じ方によって以下の3パターンに分類した。Pattern Aは橈骨神経へ刺激の波及が生じないタイプ。Pattern Bは弱い刺激で純粋なLAC SNAPが記録されるが、刺激を強くすると橈骨神経へ刺激が波及するタイプ。Pattern Cは弱刺激から橈骨神経へ刺激の波及が生じるために、純粋なLAC SNAPが同定できないタイプである。SNAP振幅の正常値と左右差を検討した。また、LAC SNAP振幅が最大となるのに必要な刺激強度と、橈骨神経へ刺激の波及が生じる刺激強度も検討した。Pattern Cの3例で、両神経の分離刺激が不可能な理由を、筋皮神経及び橈骨神経の近位部刺激を行って検討した。【結果】Pattern A, B, Cは、それぞれ160肢中87, 63, 10肢で見られた。見かけ上のLAC SNAPは、真のLAC SNAPの最大6.7倍にまで増大する例があった。LAC SNAP振幅が最大となる刺激強度は $4.7 \pm 1.7$  mA (1.6-11.0)であったが、SRへ刺激の波及は63%の被検肢では10mA以下の弱い刺激で生じた。真のLAC SNAP振幅は $28.3 \pm 14.7$   $\mu$ V (5.4-98.0)で、個人差が大きかった。またその左右差は(両側ともPattern AないしBの71例で測定可能)  $26.8 \pm 18.1$  % (0.4-76.3%)であり、8例(11%)では通常用いられる左右差判定基準の50%を超えていた。Pattern Cの少なくとも1例はSRの欠如による解剖学的変異、もう1例は、LACとSRが肘部で極めて近接して走行しているためであった。【結論】本報告はLACのSCSにおける刺激波及の影響を示した初めての報告である。刺激波及によってSRから混入したSNAPを誤ってLAC SNAPと解釈する可能性が高く、その確認のためには遠位での橈骨神経記録を行なう必要がある。なお、本報告はSRが欠如する変異を電気生理学的に証明し得た初の報告でもある。

## 論文審査結果の要旨

【背景】外側前腕皮神経(LAC)の感覚神経伝導検査(SCS)は腕神経叢障害の評価に用いられるが、感覚神経活動電位(SNAP)振幅には個人差、左右差が大きく、診断的価値が問題視されている。本神経のSCSの個人差・左右差の原因を明らかにし、それに対応することが求められている。【目的】健常者を対象にLACのSCSにおける肘部刺激が橈骨神経浅枝(SR)に波及する頻度と検査結果への影響を明らかにする。【方法】健常者80例(男性39例,女性41例,24-82歳)の両腕を検査した。肘部で刺激し12cm遠位の前腕部で記録するルーチンLAC SCSに加え、遠位で橈骨神経SNAPを記録した。刺激の波及の生じ方によって以下の3パターンに分類した。Pattern Aは橈骨神経へ刺激の波及が生じないタイプ、Pattern Bは弱い刺激で純粋なLAC SNAPが記録されるが、刺激を強くすると橈骨神経へ刺激が波及するタイプ、Pattern Cは弱刺激から橈骨神経へ刺激の波及が生じるために、純粋なLAC SNAPが同定できないタイプとして、SNAP振幅の正常値と左右差を検討した。また、両神経の分離刺激が不可能なPattern Cの3例では、その原因を筋皮神経及び橈骨神経の近位部刺激を行って詳細に検証した。【結果】Pattern A, B, Cは、

それぞれ160肢中87, 63, 10肢で見られた。見かけ上のLAC SNAPは、真のLAC SNAPの最大6.7倍にまで増大する例があった。LAC SNAP振幅が最大となる刺激強度は $4.7 \pm 1.7$  mA (1.6-11.0)であったが、SRへ刺激の波及は63%の被検肢では10mA以下の弱い刺激で生じた。真のLAC SNAP振幅は $28.3 \pm 14.7$   $\mu$ V (5.4-98.0)で、個人差が大きかった。またその左右差は $26.8 \pm 18.1$  % (0.4-76.3%)であり、8例(11%)では通常用いられる左右差判定基準の50%を超えていた。Pattern Cの少なくとも1例はSRの欠如による解剖学的変異、もう1例は、LACとSRが肘部で極めて近接して走行しているためであった。【結論】本報告はLACのSCSにおける刺激波及の影響を示した初めての報告である。刺激波及によってSRから混入したSNAPを誤ってLAC SNAPと解釈する可能性が高く、その確認のためには遠位での橈骨神経記録を行なう必要がある。なお、本報告はSRが欠如する変異を電気生理学的に証明し得た初の報告でもある。

本研究は通常の臨床神経生理検査で行われているLAC SNAP振幅の評価の問題点を定量的に示し、その原因を探索・分類し、問題点への対処法を提案している。LACの神経伝導検査の臨床診断的価値を高める内容であり、審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 辻 直子

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Effect of prolonged ischaemic time on muscular atrophy and regenerating nerve fibres in transplantation of the rat hind limb.
	授与番号	博乙医 第562号		(ラット後肢移植における虚血時間の遷延が筋肉の萎縮と再生神経線維に及ぼす影響)
	授与年月日	平成26年5月21日		
	授与の要件	学位規程第6条	論文審査委員	主査 市村正一 副査 赤川公朗 佐藤喜宣 千葉厚郎 渡邊 卓

### 学位論文の要旨

四肢切断後の再接着は術後の機能的障害が問題となることも多く、再接着までの虚血時間が長くなると機能的な成績も悪くなることが知られている。肢再接着における筋機能低下の理由である筋萎縮と神経再生について、切断し冷保存したラットの後肢を再接着する実験を行い虚血時間との関係を組織学的及び電気生理学的に検討した。

【方法】 実験には、Wild type (野生型) と GFP-Tg (緑色蛍光蛋白遺伝子導入) の Lewis ラット (雄, 8-10 週, 250-320g) を用いた。Wild type ラットの後肢を大腿中央で切断し、切断肢を 0, 1, 8, 12, 24, 48, 72 時間 4℃ で保存した後に再接着した虚血後再接着モデル (Group A, 各 n = 3), 大腿動脈とその枝を結紮した動脈虚血肢モデル (Group B, n = 3), 坐骨神経を切断した脱神経モデル (Group C, n = 3) を作成した。さらに GFP-Tg Lewis ラットに Wild type ラットの後肢を 0, 12 時間の冷却保存後に移植した (Group D, 各 n = 3)。またコントロールとして非手術群の Wild type ラット (Group E, n = 3) と GFP-Tg ラット (Group F, n = 3) を用いた。評価は Group A, B, C の手術後 2, 3, 4, 8 週時に手術側の腓腹筋の誘発筋電図を測定し、8 週目に腓腹筋を採取して組織学的に筋線維の横断径を測定した。Group D は再接着後 2 週目に縫合部を含む坐骨神経を採取し、蛍光顕微鏡で縫合部より 5mm 遠位部の横断面を観察し、発光している細胞数をカウントし再生神経線維数を評価した。

【結果】 Group A の虚血後再接着モデルでは虚血時間が 8 時間を超えると筋線維の横径が短縮し、さらに筋線維の壊死像を認めた。これらの所見は虚血が長時間に及ぶほど顕著となった。Group B では明らかな筋壊死、萎縮を認めなかった。Group C の脱神経モデルでは筋細胞の壊死像は認めないが一樣に筋線維の著明な萎縮を認めた。誘発筋電図を用いた電気生理学的評価では、Group A で 8 時間以上の虚血群において 3 週目の潜時が延長しており、8 週目においても回復しなかった。Group D では坐骨神経 1 本あたりの伸長した神経線維数は 12 時間虚血群で 10.7 個であり 0 時間虚血群の 96 個と比較し有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。

【考察】 一般に四肢の再接着は冷保存で 12-24 時間であれば可能とされている。しかし本実験より、8 時間以上の虚血後の切断四肢再接着は筋線維の萎縮と壊死をもたらす、その程度は虚血時間に比例していた。また、12 時間虚血後の再接着では神経の再生数が減少しており、長時間虚血後の筋萎縮は筋線維への侵襲によるものだけでなく、神経再生の遅れや減少による神経原性の筋萎縮も加わっていることが明らかになった。以上から再接着後の四肢機能のためには 8 時間以内の血行再開が望ましいことが示唆された。

### 論文審査結果の要旨

四肢切断後の再接着の機能低下の主因である筋萎縮について、冷保存したラットの後肢を再接着する実験を行い虚血時間との関係を組織学的及び電気生理学的に検討した。

【方法】 Wild type と GFP-Tg (緑色蛍光蛋白遺伝子導入) の Lewis ラットを用いた。Wild type ラットの後肢を大腿中央で切断し、切断肢を 0, 1, 8, 12, 24, 48, 72 時間 4℃ で保存した後に再接着した虚血後再接着モデル (Group A, 各 n = 3), 大腿動脈を結紮した動脈虚血肢モデル (Group B, n = 3), 坐骨神経を切断した脱神経モデル (Group C, n = 3) を作成した。さらに GFP-Tg Lewis ラットに Wild type ラットの後肢を 0, 12 時間の冷却保存後に移植した (Group D, 各 n = 3)。コントロールは非手術群の Wild type ラット (Group E, n = 3) と GFP-Tg ラット (Group F, n = 3) を用いた。評価は Group A, B, C の手術後 2, 3, 4, 8 週時に手術側の腓腹筋の誘発筋電図を測定し、8 週目に腓腹筋を採取して筋線維の横断径を測定した。Group D は再接着後 2 週目に坐骨神経を採取し、縫合部より 5mm 遠位の横断面を蛍光顕微鏡で観察し、S100 蛋白陽性の発光している細胞を再生神経線維として測定した。

【結果】 Group A では虚血時間が 8 時間を超えると筋線維の横径

が短縮し、さらに筋細胞の壊死像を認め、虚血が長時間に及ぶほど顕著であった。Group B では明らかな筋壊死、萎縮を認めなかった。Group C では筋線維の著明な萎縮を認めた。誘発筋電図では、Group A で 8 時間以上の虚血群において 3 週目の潜時が延長しており、8 週目においても回復しなかった。Group D では坐骨神経あたりの伸長した神経線維数は 12 時間虚血群で 10.7 個であり 0 時間虚血群の 96 個と比較し有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。

【考察】 一般に四肢の再接着では冷保存で 12-24 時間以内であれば可能とされている。しかし、本実験より 8 時間以上の虚血後の再接着は筋線維の萎縮と壊死をきたし、その程度は虚血時間が長い程著明であった。また、12 時間虚血後の再接着では再生神経数が有意に減少しており、長時間虚血後の筋萎縮は筋線維への侵襲だけでなく、神経再生の遅れや減少による神経原性の筋萎縮も加わっていることが明らかになった。以上から、再接着後の四肢機能の温存には 8 時間以内の血行再開が望ましいことが示唆された。

本研究は再接着肢の機能低下の主因である筋萎縮には、筋自体の侵襲の他に神経障害が関与していることを明らかにし、さらに虚血時間も検討した結果冷保存でも 8 時間以内の再接着が望ましいことを証明したものであり、学位論文として価値あるものと認められた。

学位論文要旨および審査要旨

氏名 宮内 洋

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	微小神経電図法による血管周囲微小活動電位に関する研究
	授与番号	博乙医 第563号	論文審査委員	主査 市村正一 副査 塩川芳昭 千葉厚郎 遠山 満 大木 紫
	授与年月日	平成26年9月17日		
	授与の要件	学位規程第6条		

学位論文の要旨

救命救急センターに入室し、集中治療が必要な患者においては、血圧の変動や不整脈などの自律神経系が関与する循環器系の合併症が予後を左右することが多く、疾患の自律神経系への影響を明らかにすることは臨床的に重要な課題である。各疾患が原因となって生じた自律神経の失調をモニターする新たな手法を考案する目的で研究を行った。【対象と方法】健康ボランティア10名と著者3名、合わせて13名(男性11名, 女性2名, 年齢は26歳から50歳, 平均35.3歳)を対象とした。被験者に十分実験の内容を説明し同意を得たあと、動脈の走行を確認し、Allen testにより血行障害や出血傾向などの問題がないことを確認した。被験者の手関節部掌側に皮下浸潤麻酔を行ったあと、観血的動脈圧モニターを留置する際の手技に準じて24ゲージの太さの微小電極を刺入し、研究者が保持し電極の先端を橈骨動脈壁に接触させ、微小な活動電位を検出した。被験者にValsalva maneuver, Tilt testを行うことで誘発される電位変化を記録した。また橈骨尺骨動脈周囲に肉眼解剖で確認可能な自律神経線維分布があるか解剖実習体によるSihler染色を用い検討した。【結果】実験を行った12名中8名で、安静時の微小な活動電位が検出された。高速フーリエ変換(Fast Fourier Transform, 以下FFT)波形では低周波数にピークがあり整数倍に漸減してゆく交感神経活動に特徴的な波形パターンが観察された。Valsalva maneuverまたはTilt testで7名に明らかに活動電位の振幅が増強した。これらの結果から今回検出された活動電位は、血管周囲の交感神経活動を検出した可能性が高いと考えられた。なお、施行後明らかな合併症の発生はなかった。橈骨尺骨動脈周囲の神経の走行は各々橈骨神経尺骨神経より分枝し、一方、解剖実習体による検討では、橈骨尺骨動脈周囲を伴走、実体顕微鏡ではその周囲で末梢神経が放散あるいは網目状に分布することが確認できた。【結語】臨床現場では、観血的動脈圧モニターの挿入・留置に橈骨動脈が汎用されるが、その血管周囲で交感神経活動と考えられる微小電位の検出に成功した。今後、自律神経系モニターの一つとして応用できる可能性を示唆した。

論文審査結果の要旨

救命救急で集中治療が必要な患者では、血圧の変動や不整脈などの自律神経系が関与する循環器系の合併症が予後を左右することが多く、重症患者における自律神経系の活動状況を明らかにすることは臨床的に重要な課題である。本研究の目的は自律神経の活動をモニターする新たな手法を確立することである。

【対象と方法】健康人13名(男11名, 女2名, 平均年齢35.3歳(26~50歳))を対象とした。被験者の橈骨動脈の走行や血行障害などの問題がないことを確認した後、手関節部掌側に皮下麻酔を行い、観血的動脈圧モニターを留置する際の手技に準じて24ゲージの太さの微小電極を刺入し、電極の先端を橈骨動脈壁に接触、保持し、血管周囲の自律神経の微小な活動電位を検出・記録した。さらに、Valsalva法, Tilt testで誘発される電位変化を調べた。また、橈骨および尺骨動脈周囲に肉眼解剖で確認可能な自律神経線維の存在をSihler染色により解剖実習体を用いて実体顕微鏡で検討した。

【結果】不整脈のため1名を除いた12名中8名で、安静時の微小活動電位が検出された。その高速フーリエ変換波形では、低周波

数にピークがあり整数倍に漸減してゆく交感神経活動に特徴的な波形パターンが観察された。Valsalva法で6名に、Tilt testで7名に活動電位の振幅が増強し、同時に記録した指尖脈波の振幅が減少した。以上の結果から本研究で検出された活動電位は、血管周囲の交感神経活動を検出したものと考えられた。また、検査後のしびれ等の合併症は観察されなかった。一方、解剖実習体による検討では、橈骨および尺骨動脈周囲の神経は、それぞれ橈骨と尺骨神経より分岐、動脈に沿って伴走し、その周囲で放散あるいは網目状に分布していることが確認できた。

【結語】本研究では、観血的動脈圧モニターの挿入・留置に汎用される橈骨動脈の血管周囲で、交感神経活動と考えられる微小電位の検出に成功した。従来の神経への直接穿刺法に比べCRPS(複合性局所疼痛症候群)の発生リスクが少なく、今後自律神経系モニターの一つとして安全に臨床応用できる可能性が示唆された。

本論文は臨床現場における自律神経系のモニターとして、橈骨動脈周囲の交感神経活動電位の検出を著者らが開発した安全な微小神経電図法で証明したものであり、学位論文として価値あるものと認められた。

氏名 加賀谷 優

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	‘Real Angiosome’ assessment from peripheral tissue perfusion using tissue oxygen saturation (StO <sub>2</sub> ) foot-mapping in patients with critical limb ischemia (重症下肢虚血患者における組織酸素飽和度足部マッピングを用いた末梢軟部組織血流による[real angiosome]評価)
	授与番号 博乙医 第564号		
	授与年月日 平成26年10月15日		
	授与の要件 学位規程第6条		
		論文審査委員	主査 窪田 博 副査 石田 均 松村讓児 狩野葉子 遠山 満

### 学位論文の要旨

#### 【目的】

重症下肢虚血(critical limb ischemia以下CLI)は下肢動脈に動脈硬化性の狭窄、閉塞が起こる病態で予後不良の疾患である。CLIでは他の動脈硬化性病変と同様に血流評価を行い、早期にCLIの診断を行うことが重要である。現在、足部の非侵襲的血流評価法として足関節上腕血圧比や皮膚灌流圧などが行われているが、一長一短があり、足部の正確な血流が評価できるわけではない。そこで、救急や形成外科領域などで末梢血流評価に利用されている、組織酸素飽和度(tissue oxygen saturation以下StO<sub>2</sub>)を計測し、軟部組織灌流の見地からCLIの血流評価および診断が可能であるかを検討した。

#### 【方法】

CLI群20例と健常群20例を対象とし、足部の約60箇所においてStO<sub>2</sub>値を計測し、StO<sub>2</sub>値によって(1)0-30%、(2)30-50%、(3)50-70% (4)70-100%の4領域に分類するStO<sub>2</sub>足部マッピング法によって、CLIと健常群を比較した。なお、この分類は過去のStO<sub>2</sub>による末梢血流評価に関する文献を参考に設定した。さらにStO<sub>2</sub>によって同定された虚血領域と創傷の位置との一致率と、血管造影とangiosomeモデル(足部各主要血管の軟部組織血行支配モデル)から推測した虚血領域と創傷の一致率との間に差があるかを検討した。従来CLIの虚血領域の評価には、血管造影とangiosomeモデルからの評価が広く用いられ、精度が高いとされてきた。

#### 【結果】

(1)~(4)の各StO<sub>2</sub>値領域の足部面積占有率を算出し、CLI群と健常群で比較すると(1)(2)のStO<sub>2</sub>値領域(StO<sub>2</sub><50%)において、面積占有率はCLI患者で有意に高く、健常群はほぼ0%であり、虚血と健常組織の閾値としてStO<sub>2</sub>値50%を設定した。設定したStO<sub>2</sub>閾値を利用し評価した結果、創傷の位置とStO<sub>2</sub>足部マッピング法における虚血領域と87.5%(14/16)で一致した。創傷の位置と血管造影・angiosomeモデルから評価した虚血領域とは68.8%(11/16)で一致した。

#### 【結論】

StO<sub>2</sub>足部マッピング法によってCLIの虚血領域を軟部組織の酸素飽和度の点から正確に評価することができた。本法は、従来から行われてきた血管造影とangiosomeモデルによる評価よりも精度が高いことが明らかになり、非侵襲的に「real angiosome(主要血管ではなく末梢微小血流により決定される、CLI患者足部における真の末梢組織血流分布)」の作成評価が可能であった。我々が提案する「real angiosome」は、重症下肢虚血(CLI)の診断と治療に新しい概念をもたらすと考える。

### 論文審査結果の要旨

【目的】重症下肢虚血(critical limb ischemia以下CLI)は下肢動脈に動脈硬化性の狭窄、閉塞が起こる病変で予後不良の疾患である。CLIでは他の動脈硬化性病変と同様に血流評価を行い、早期にCLIの診断を行うことが重要である。現在、足部の非侵襲的血流評価法として足関節上腕血圧比や皮膚灌流圧などが行われているが、一長一短があり、足部の正確な血流が評価できるわけではない。そこで、救急や形成外科領域などで末梢血流評価に利用されている、組織酸素飽和度(tissue oxygen saturation以下StO<sub>2</sub>)を計測し、軟部組織灌流の見地からCLIの血流評価および診断が可能であるかを検討した。

【方法】CLI群20例と健常群20例を対象とし、足部の約60箇所においてStO<sub>2</sub>値を計測し、StO<sub>2</sub>値によって(1)0-30%、(2)30-50%、(3)50-70% (4)70-100%の4領域に分類するStO<sub>2</sub>足部マッピング法によって、CLIと健常群を比較した。なお、この分類は過去のStO<sub>2</sub>による末梢血流評価に関する文献を参考に設定した。さらにStO<sub>2</sub>によって同定された虚血領域と創傷の位置との一致率と、血管造影とangiosomeモデル(足部各主要血管の軟部組織血行支配モデル)から推測した虚血領域と創傷の一致率との間に差があるかを検討した。従来CLIの虚血領域の評価には、血管造影とangiosomeモデルからの評価が広く用いられ、精度が高いとされてきた

【結果】(1)~(4)の各StO<sub>2</sub>値領域の足部面積占有率を算出し、CLI群と健常群で比較すると(1)(2)のStO<sub>2</sub>値領域(StO<sub>2</sub><50%)において、面積占有率はCLI患者で有意に高く、健常群はほぼ0%であり、虚血と健常組織の閾値としてStO<sub>2</sub>値50%を設定した。設定したStO<sub>2</sub>閾値を利用し評価した結果、創傷の位置とStO<sub>2</sub>足部マッピング法における虚血領域と87.5%(14/16)で一致した。創傷の位置と血管造影・angiosomeモデルから評価した虚血領域とは68.8%(11/16)で一致した。

【結論】StO<sub>2</sub>足部マッピング法によってCLI患者の虚血領域を軟部組織の酸素飽和度の点から正確に評価することができた。本法は、従来から行われてきた血管造影とangiosomeモデルによる評価よりも精度が高いことが明らかになり、非侵襲的に「Real angiosome(主要血管ではなく末梢微小血流により決定される、CLI患者足部における真の末梢組織血流分布)」の作成評価が可能であった。本法を用いて作成された「Real angiosome」は、重症下肢虚血(CLI)の診断と治療に新しい概念をもたらすと考える。

本論文は、末梢組織灌流指標として従来用いられてきたtcPO<sub>2</sub>やSPPに代わり、StO<sub>2</sub> foot-mappingがその精度と簡便性において優っており、より「真の末梢微小血流」の表象に近いものが得られるとした。本法は臨床に即応用できる有用かつ発展性のある方法であり、救肢、救趾治療方針の決定に際する重要な指標になると考えられ、学位論文として価値あるものと認められた。

学位論文要旨および審査要旨

氏名 小野崎 正 修

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	Detection and identification of genotypes of <i>Prototheca zopfii</i> in clinical samples by quantitative PCR analysis (定量PCR法による <i>Prototheca zopfii</i> 感染症の診断と遺伝子型の同定)
	授与番号	博乙医 第565号		
	授与年月日	平成26年12月17日		
	授与の要件	学位規程第6条	論文審査委員	主査 永松信哉 副査 赤川公朗 塩原哲夫 河合 伸 渡邊 卓

学位論文の要旨

*Prototheca* 属は、葉緑体が退縮した藻類であり、真菌症に似たプロトテカ症を引き起こす病原藻類として知られている。その一種である *Prototheca zopfii* には、genotype 1 および genotype 2 の遺伝子型があり、genotype 1 による感染例は報告がない。一方、genotype 2 はヒトの皮膚および全身播種性の疾患やウシの乳房炎などを引き起こすことが知られている。現在、増加傾向にある本症は、治療にも難渋する為、早期の診断と抗真菌薬による治療を行うことが臨床上重要とされている。

そこで、我々は、*Prototheca* 属及び *Chlorella* 属の rDNA 各塩基配列のアラインメントに基づいて以前報告した *P. zopfii* 特異的プライマー対 “18PZF1 と 18PZR1” の増幅領域内側に、新規に TaqMan<sup>®</sup>MGB プローブ “PZP1” を設計し、定量性を持った遺伝子診断法を研究・開発した。さらに、その増幅産物を用いた熱解離曲線解析を行うことで、*P. zopfii* 遺伝子型の鑑別も可能とした。本法の評価の為、本藻の近縁種を含めた標準株28株と家畜臨床分離株140株、および家畜臨床検体92検体、さらに免疫抑制患者からの臨床検体1検体を研究に用いた。また、一部の代表菌株を用い薬剤感受性試験の検討も行った。

本法により、本藻標準株6株と家畜臨床分離株135株、および家畜臨床検体24検体に加え、ヒト臨床検体1検体が *P. zopfii* genotype 2 と確認された。本結果は、シーケンス解析による同定結果とすべて一致した。また、本研究に於いて、ヒト症例が、*P. zopfii* genotype 2 を起因藻とした本邦初のプロトテカ症であると診断されたが、その感染経路は不明であった。さらに、薬剤感受性試験の結果において、アムホテリシンBが特に良好な感受性を示すことが確認された。

以上の結果から、病原藻類 *P. zopfii* genotype 2 による感染症の診断法として、本法の良好な感度と特異性が確認された。これにより、抗真菌薬の早期の選択が可能になると考えられた。従来 of 検査法を補完する希少藻類感染症：*P. zopfii* genotype 2 の迅速診断・同定システムとしての活用が期待される。

論文審査結果の要旨

*Prototheca* 属は、葉緑体が退縮した藻類であり、真菌症に似たプロトテカ症を引き起こす病原藻類として知られている。その一種である *Prototheca zopfii* には、genotype 1 および genotype 2 の遺伝子型があり、genotype 2 はヒトの皮膚および全身播種性の疾患やウシの乳房炎などを引き起こすことが知られている。本研究では、*Prototheca* 属及び *Chlorella* 属の rDNA 各塩基配列のアラインメントに基づいて、*P. zopfii* 特異的プライマー対 “18PZF1 と 18PZR1” の増幅領域内側に、新規に TaqMan<sup>®</sup>MGB プローブ “PZP1” を設計し、定量性を持った遺伝子診断法を開発した。又、増幅産物を用いた熱解離曲線解析を行うことで、*P. zopfii* 遺伝子型の鑑別も可能とした。

本法により、本藻標準株6株と家畜臨床分離株135株、および

家畜臨床検体24検体に加え、ヒト臨床検体1検体が *P. zopfii* genotype 2 と確認され、本結果はシーケンス解析による同定結果と一致した。又、このヒト症例は、*P. zopfii* genotype 2 を起因藻とした本邦初のプロトテカ症であると診断され、薬剤感受性試験の結果から、アムホテリシンBが特に良好な感受性を示すことが確認された。

本研究で開発したとされる PCR 診断法は、独創的とはいえないものの、従来の検査法を補完する希少藻類感染症：*P. zopfii* genotype 2 の迅速診断・同定システムとしての活用、すなわち、畜産業を中心とした新興感染症として発現した場合の重要なツールとして期待されること、これにより抗真菌薬の早期の選択が可能になること、更に本邦初のヒトにおけるプロトテカ症を診断したことから、学位論文として価値あるものと評価した。

氏名 上 田 明 子

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	Histological Changes in Patients with Congenital Heart Disease: Impact of Overload Duration and Age on Structural Remodelling
	授与番号	博乙医 第566号		(先天性心疾患における組織学的変化：負荷の期間と年齢の構造的リモデリングへの影響)
	授与年月日	平成26年12月17日	論文審査委員	主査 窪田 博 副査 菅間 博 近藤晴彦 秋元義弘 岡本 晋
	授与の要件	学位規程第6条		

## 学 位 論 文 の 要 旨

### 【緒言】

心房細動をはじめとする心房性不整脈は、心房の電氣的・構造的リモデリングを基質として発生する。このうち、特に構造的リモデリングの過程に対して、心負荷暴露の期間と年齢が及ぼす影響については、議論がある。その一因として、年齢と構造的リモデリングの関係を調査した過去の報告の多くが、後天的心疾患患者の組織学的解析に基づいており、年齢を心負荷暴露期間の代替としているものの、正確な期間の同定は実際には困難であることが挙げられる。

心負荷暴露期間及び年齢が、ヒト心房の不整脈基質に及ぼす影響について検討するため、年齢と負荷の期間とが一致すると考えられる、先天性心疾患患者において心房の組織学的解析を行った。

### 【材料と方法】

先天性心疾患に対する初回の心臓手術を行った患者65例（中央値18歳；患者群）を対象とした。左房負荷が主体となる疾患の患者は除外し、心房中隔欠損症、エプスタイン奇形など右房負荷に長期間暴露された症例を登録した。術中切除した右房心筋を用い、組織学的・免疫組織学的解析により、年齢をマッチさせた正常心（22例、中央値22歳；対照群）検体との比較を行った。また患者群の術前の心房性不整脈の既往、心臓超音波検査所見を調査した。構造的リモデリング指標として、心房線維化・心筋細胞径・脈管分布を計測するとともに、炎症の関与を調べるため炎症細胞浸潤を計測した。

### 【結果】

術前に心房性不整脈のある患者群で、最も高度に心筋線維化・細胞径拡大・炎症細胞浸潤が観察され、脈管は最も粗に分布した。次いで、心房性不整脈のない患者群、対照群が続いた。患者群では、全ての構造的リモデリング指標は年齢と相関したが、対照群では細胞径以外の指標は相関しなかった。患者群では右房径、面積は組織学的変化と相関を示した。

### 【結論】

先天性心疾患による慢性的な右房負荷は、経時的な組織学的リモデリングに関連し、心房性不整脈の基質となったと考えられた。対照群では年齢による心房リモデリングは観察されなかった点から、年齢よりむしろ、負荷の暴露期間が、心房の変性を来す主要因である可能性が示唆された。

## 論 文 審 査 結 果 の 要 旨

心房細動をはじめとする心房性不整脈は、心房の電氣的・構造的リモデリングを基質として発生する。このうち、特に構造的リモデリングの過程に対して、心負荷暴露の期間と年齢が及ぼす影響については、議論がある。その一因として、年齢と構造的リモデリングの関係を調査した過去の報告の多くが、後天的心疾患患者の組織学的解析に基づいており、年齢を心負荷暴露期間の代替としているものの、正確な期間の同定は実際には困難であることが挙げられる。

本論文は、心負荷暴露期間及び年齢が、ヒト心房の不整脈基質に及ぼす影響について検討するため、年齢と負荷の期間とが一致すると考えられる先天性心疾患患者において心房の組織学的解析を行ったものである。

先天性心疾患に対する初回の心臓手術を行った患者65例（中央値18歳；患者群）を対象とした。左房負荷が主体となる疾患の患者は除外し、心房中隔欠損症、エプスタイン奇形など右房負荷に長期間暴露された症例を登録した。術中切除した右房心筋を用い、組織学的・免疫組織学的解析により、年齢をマッチさせた正常心（22例、中央値22歳；対照群）検体との比較を行った。

また患者群の術前の心房性不整脈の既往、心臓超音波検査所見を調査した。構造的リモデリング指標として、心房線維化・心筋細胞径・脈管分布を計測するとともに、炎症の関与を調べるため炎症細胞浸潤を計測した。

その結果、術前に心房性不整脈のある患者群で、最も高度に心筋線維化・細胞径拡大・炎症細胞浸潤が観察され、脈管は最も粗に分布した。次いで、心房性不整脈のない患者群、対照群が続いた。患者群では、全ての構造的リモデリング指標は年齢と相関したが、対照群では細胞径以外の指標は相関しなかった。患者群では右房径、面積は組織学的変化と相関を示した。

結果より、先天性心疾患による慢性的な右房負荷は、経時的な組織学的リモデリングに関連し、心房性不整脈の基質となったと考えられた。対照群では年齢による心房リモデリングは観察されなかった点から、年齢よりむしろ負荷の暴露期間が、心房の変性を来す主要因である可能性が示唆された。

本論文は、心房性不整脈の成因の一つである心負荷暴露期間が、心房の組織学的リモデリングに与える影響を明瞭にした点で優れた研究である。審査の結果、学位論文として価値あるものと認められた。

学位論文要旨および審査要旨

氏名 金井 理一郎

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	Impact of immunoreactive substances contained in apheresis platelet concentrate on postoperative respiratory function in surgical patients receiving platelet transfusion: a prospective cohort study (血小板輸血を受けた手術患者における術後の呼吸機能に対するアフェレーシス血小板濃厚液製剤に含まれる免疫活性物質の影響：前向きコホート研究)
	授与番号	博乙医 第567号		
	授与年月日	平成27年1月21日		
	授与の要件	学位規程第6条		
			論文審査委員	主査 木崎節子 副査 高山信之 岩下光利 粟崎 健 平野浩一

学位論文の要旨

【背景・目的】輸血関連急性肺障害 (transfusion-related acute lung injury : TRALI) は最も致命的な輸血合併症であり、血液製剤に含まれる抗ヒト白血球抗体や抗顆粒球抗体といった免疫活性物質が発症の大きな原因の一つとされる。赤血球液 (red blood cell : RBC) に比べ、血漿成分を多く含む新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma : FFP) や血小板濃厚液 (platelet concentrate : PC) で発症の危険性が高い。これらの免疫活性物質は主に女性ドナー由来の血液製剤に含まれるため、FFPは基本的に男性ドナー由来となっている。一方で、PCは本邦では全て成分献血によりアフェレーシスで製造しており、安定した供給のために現状では女性ドナーを除外することができない。そこで本研究では、免疫活性物質を多く含むとされる女性ドナー由来のPCの危険性を明らかにして改善策へと繋げる事を目的とし、PC投与患者の術後肺傷害と免疫活性物質の関係を検討した。

【方法】手術室もしくは集中治療室でPC投与を受ける86人 (男性56人、女性30人) の手術患者を対象とした。PC投与後6時間以内に得られた血液ガス分析結果から、54人が術後に呼吸不全 (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> < 300 mmHg) の基準に至った。更に、呼吸不全を胸部X線所見と循環動態から、possible TRALI、輸血関連循環過負荷 (transfusion-associated circulatory overload : TACO)、明確な原因を認めない呼吸不全 (無気肺など) の3つに分類した。

【結果】5人がpossible TRALIと診断され、23人がTACOと診断された。多変量ロジスティック回帰分析では抗顆粒球抗体の存在がpossible TRALIの有意な予測因子として同定された (P = 0.023 ; odds ratio (OR) ; 13.0)。また、TACOの有意な独立した予測因子としては抗ヒト白血球抗体class IIが同定された (P = 0.010 ; OR ; 18.4)。

【考察・結語】今回の解析で、PC製剤に含まれる抗顆粒球抗体がTRALIの予測因子として、また、抗ヒト白血球抗体class IIがTACOの予測因子として抽出された。しかし、TACOと免疫活性物質との関連を示した報告はなく、本研究対象患者は水分過多となった重篤な手術症例が多かったためTACOと診断された症例にTRALIが含まれている可能性が考えられる。本研究結果から、PC製剤に含まれる抗顆粒球抗体抗と抗ヒト白血球抗体class IIがTRALIの発症に関連があり、PC輸血後の呼吸機能の悪化に寄与していることが示唆された。従って、PC投与後の肺障害を予防するために、PCを製剤化する際には抗体スクリーニングを行う意義が認められた。

論文審査結果の要旨

【背景・目的】輸血関連急性肺障害 (transfusion-related acute lung injury : TRALI) は最も致命的な輸血合併症であり、血液製剤に含まれる抗ヒト白血球抗体や抗顆粒球抗体といった免疫活性物質が発症の大きな原因の一つとされる。赤血球液 (red blood cell : RBC) に比べ、血漿成分を多く含む新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma : FFP) や血小板濃厚液 (platelet concentrate : PC) で発症の危険性が高い。これらの免疫活性物質は主に女性ドナー由来の血液製剤に含まれるため、FFPは基本的に男性ドナー由来となっている。一方で、PCは本邦では全て成分献血によりアフェレーシスで製造しており、安定した供給のために現状では女性ドナーを除外することができない。そこで本研究では、免疫活性物質を多く含むとされる女性ドナー由来のPCの危険性を明らかにして改善策へと繋げる事を目的とし、PC投与患者の術後肺傷害と免疫活性物質の関係を検討した。

【方法】手術室もしくは集中治療室でPC投与を受ける86人 (男性56人、女性30人) の手術患者を対象とした。PC投与後6時間以内に得られた血液ガス分析結果から、54人が術後に呼吸不全 (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> < 300 mmHg) の基準に至った。更に、呼吸不全を胸部X線所見と循環動態から、possible TRALI、輸血関連循環過負荷 (transfusion-associated circulatory overload : TACO)、

明確な原因を認めない呼吸不全 (無気肺など) の3つに分類した。

【結果】5人がpossible TRALIと診断され、23人がTACOと診断された。多変量ロジスティック回帰分析では抗顆粒球抗体の存在がpossible TRALIの有意な予測因子として同定された (P = 0.023 ; odds ratio (OR) ; 13.0)。また、TACOの有意な独立した予測因子としては抗ヒト白血球抗体class IIが同定された (P = 0.010 ; OR ; 18.4)。

【考察・結語】今回の解析で、PC製剤に含まれる抗顆粒球抗体がTRALIの予測因子として、また、抗ヒト白血球抗体class IIがTACOの予測因子として抽出された。しかし、TACOと免疫活性物質との関連を示した報告はなく、本研究対象患者は水分過多となった重篤な手術症例が多かったためTACOと診断された症例にTRALIが含まれている可能性が考えられる。本研究結果から、PC製剤に含まれる抗顆粒球抗体抗と抗ヒト白血球抗体class IIがTRALIの発症に関連があり、PC輸血後の呼吸機能の悪化に寄与していることが示唆された。従って、PC投与後の肺障害を予防するために、PCを製剤化する際には抗体スクリーニングを行う意義が認められた。

本研究は、PC製剤に含まれる抗体と術後肺傷害の関連を明らかにしたものであり、PC投与後の肺障害を予防するための改善策へと繋げる貴重な知見を提供し、審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 藤田直之

〈学位〉	種 類	博士 (医学)	論 文 項 目	Serum level and immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor for the prediction of postoperative recurrence in renal cell carcinoma (腎細胞癌における術後再発の予測に対する血清VEGFと免疫組織化学的VEGF発現の比較に関する研究)
	授与番号	博乙医 第568号		
	授与年月日	平成27年2月18日		
	授与の要件	学位規程第6条		
			論文審査委員	主査 正木忠彦 副査 丑丸 真 川上速人 楊 國昌 吉野秀朗

### 学位論文の要旨

淡明型腎細胞癌では、von Hippel-Lindau 遺伝子の不活性化から低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor) の分解が阻害され、恒常的に血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; 以降、VEGF と記す) が誘導されることで、癌細胞の増殖、血管新生に関与していることが報告されている。免疫組織学的検討や血清での検討で、腫瘍組織での VEGF 過剰発現や血液中 VEGF 値の上昇、また両者ともに予後予測に有用であることが報告されている。しかし、免疫組織学的検討と血清での検討について比較した研究は少数であり、さらに転移のない淡明型腎細胞癌 (以降、限局性淡明型腎細胞癌と記す) における術後再発の予測について両者を比較した報告はない。本研究では、限局性淡明型腎細胞癌における根治的腎摘出術後の再発の予測について両者の比較検討を行った。血清 VEGF 値が限局性淡明型腎細胞癌において術後再発の予測に有用であることを示した。

83名の限局性淡明型腎細胞癌患者の手術前に採取された血清検体を用いて VEGF 値を測定し、摘出された検体を用いて VEGF の免疫組織化学染色を行った。12例 (14.5%) で術後再発を認めた。再発例の血清 VEGF 値は非再発例に比較して有意に高値であった ( $P = 0.038$ )。血清 VEGF 値のカットオフ値を ROC 曲線により 416pg/ml と設定して検討した。VEGF 高値群における非再発生存率は VEGF 低値群に比べ有意に低かった ( $P = 0.003$ )。26例 (31.3%) は免疫組織学的染色で陽性と判定された。免疫組織学的染色の発現度と、血清 VEGF 値には関連を認めなかった ( $P = 0.378$ )。免疫組織学的染色陽性群における非再発生存率は免疫組織学的染色陰性群に比べ有意に低かった ( $P = 0.044$ )。T分類、組織学的グレード、静脈浸潤、腫瘍壊死、UCLA Integrated Staging System リスク分類、性別、貧血、CRP を加えて多変量解析を行ったところ、性別 ( $P = 0.004$ )、術前の血清 VEGF 値 ( $P = 0.013$ ) が独立した術後再発予測因子であった。術前の血清 VEGF 値は、術後の免疫組織学的発現度と比較して、限局性淡明型腎細胞癌の術後再発においてより有用な予測因子となる可能性が示唆された。

### 論文審査結果の要旨

淡明型腎細胞癌では、von Hippel-Lindau 遺伝子の不活性化から低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor) の分解が阻害され、恒常的に血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; 以下 VEGF) が誘導されることで、癌細胞の増殖、血管新生に関与していることが報告されている。免疫組織化学的検討や血清での検討で、腫瘍組織での VEGF 過剰発現や血液中 VEGF 値の上昇、また両者ともに予後予測に有用であることが報告されている。しかし、免疫組織化学的検討と血清での検討について比較した研究は少数であり、さらに転移のない淡明型腎細胞癌 (以降、限局性淡明型腎細胞癌と記す) における術後再発の予測について両者を比較した報告はない。本研究は、限局性淡明型腎細胞癌に対する根治的腎摘出術後の再発の予測について両者の比較検討を詳細に行った点が独創的である。

83名の限局性淡明型腎細胞癌患者の手術前に採取された血清検体を用いて VEGF 値を測定し、摘出された検体を用いて VEGF の免疫組織化学染色を行った。12例 (14.5%) で術後再発を認め

た。再発例の血清 VEGF 値は非再発例に比較して有意に高値であった ( $P = 0.038$ )。血清 VEGF 値のカットオフ値を ROC 曲線により 416pg/ml と設定して検討したところ、VEGF 高値群における非再発生存率は VEGF 低値群に比べ有意に低かった ( $P = 0.003$ )。26例 (31.3%) は免疫組織化学的染色で陽性と判定され、免疫組織化学的染色陽性群における非再発生存率は陰性群に比べ有意に低かった ( $P = 0.044$ )。なお、免疫組織化学的染色の発現度と血清 VEGF 値には関連性を認めなかった ( $P = 0.378$ )。T分類、組織学的グレード、静脈浸潤、腫瘍壊死、UCLA Integrated Staging System リスク分類、性別、貧血、CRP を加えて多変量解析を行ったところ、性別 ( $P = 0.004$ ) と術前の血清 VEGF 値 ( $P = 0.013$ ) が独立した術後再発予測因子であった。以上の検討により、術前の血清 VEGF 値は限局性淡明型腎細胞癌の術後再発予測因子として免疫組織化学的発現度より有用である可能性が示唆された。本研究の結果は、根治手術が施行された限局性淡明型腎細胞癌患者の術後管理に大いに利するものであり、審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

## 学位論文要旨および審査要旨

氏名 岡村 耕一

〈学位〉	種 類 博士(医学)	論 文 項 目	フリーラジカルスカベンジャー, エダラボンを使った出血性梗塞抑制効果-高血糖ラットを用いて
	授与番号 博乙医 第569号	論文審査委員	主査 佐藤 徹 副査 石田 均 川上速人 櫻井裕之 山田達也
	授与年月日 平成27年2月18日		
	授与の要件 学位規程第6条		

## 学位論文の要旨

【背景】脳梗塞の治療においては、脳梗塞と虚血再灌流後の出血を抑制する脳保護治療の開発が待望されている。虚血再灌流後の出血は、脳虚血時に、内皮細胞、基底膜や周囲アストロサイトが破綻し、血液脳関門（生体内で特殊な毛細血管の形態を有する構造物）の機能である微小循環の透過性制御能力が障害されて発生する。この時増加するフリーラジカルはマトリックスメタロプロテアーゼの活性化を引き起こし、基底膜のコラーゲンを破壊する。それを防止するためフリーラジカルスカベンジャーの使用が行なわれ、そのひとつであるエダラボンは出血性梗塞を抑制できる可能性があるのではないかと考えられている。実臨床で生ずる短時間虚血後の出血性梗塞を実験的に発現させることは難しいが、我々が作成に成功した高血糖ラットモデルにおいてはフリーラジカルの増加を助長させ、高い確率で出血性梗塞を作成しうる。

【目的】高血糖ラットモデルを使って作成した出血性梗塞に対して、エダラボンで脳梗塞および出血性梗塞の抑制ができるかを検討した。

【方法】高血糖ラットにグルコースを腹腔内投与し、中大脳動脈を1.5時間遮断した。エダラボンを中大脳動脈遮断直後、再灌流直後、再灌流1時間後に投与し、再灌流24時間後にラット脳の観察を行った。エダラボン投与群（12匹）とコントロール群（12匹）を比較した。TTC染色を行い（各群10匹）、梗塞体積と出血性梗塞体積を比較した。また、梗塞部位と出血性梗塞部位の脳の採取を行い（各群2匹）、各ラットにつき毛細血管を無作為に3箇所ずつ選定し、電子顕微鏡にて毛細血管における基底膜、内皮細胞の観察を行った。

【結果】梗塞部と出血性梗塞部の体積が、コントロール群に比べエダラボン群でそれぞれ有意に減少していた。出血性梗塞 / 梗塞体積の割合を比較しても、エダラボン群で有意に減少していた。電子顕微鏡での観察では、内皮細胞の障害程度に違いはみられなかったが、エダラボン群脳梗塞部で基底膜の形態損傷が少ない傾向であった。

【結論】エダラボンは、急性高血糖状態において脳梗塞および出血性梗塞の発現を抑制した。電子顕微鏡による観察で、血液脳関門の基底膜保護効果がある可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

脳梗塞の治療では、脳梗塞と虚血再灌流後の出血を抑制する脳保護治療の開発が待望される。再灌流後の出血は、脳虚血時に、内皮細胞、基底膜や周囲アストロサイトが破綻し、血液脳関門の機能である微小循環の透過性制御能力が障害されて発生する。この時フリーラジカルが増加し、マトリックスメタロプロテアーゼを活性化して基底膜のコラーゲンを破壊するため、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが有効な可能性がある。実臨床で生ずる短時間虚血後の出血性梗塞を実験的に発現させるため、高血糖ラットモデルを使って作成した出血性梗塞に対して、エダラボンの効果があるか否かを検討した。

高血糖ラットにグルコースを腹腔内投与し、中大脳動脈を1.5時間遮断した。エダラボンを中大脳動脈遮断直後、再灌流直後、再灌流1時間後に投与し、エダラボン投与群（12匹）とコントロール

群（12匹）に対して再灌流24時間後にラット脳をTTC染色し（各群10匹）、梗塞体積と出血性梗塞体積を比較した。また、梗塞部位と出血性梗塞部位の脳の採取を行い（各群2匹）、各ラットにつき毛細血管を無作為に3箇所ずつ選定し、電子顕微鏡にて毛細血管における基底膜、内皮細胞の観察を行った。

梗塞部と出血性梗塞部の体積、出血性梗塞 / 梗塞体積の割合が、コントロール群に比べエダラボン群で有意に減少していた。電子顕微鏡での観察では、内皮細胞の障害程度に違いはなかったが、エダラボン群脳梗塞部で基底膜の形態損傷が少なかった。

本研究により、エダラボンは、急性高血糖状態において脳梗塞および出血性梗塞の発現を抑制し、電子顕微鏡による観察で血液脳関門の基底膜保護効果が示唆されたことより、今後脳梗塞・再灌流後の出血を抑制する有望な薬剤となり得る可能性が示された。審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

氏名 滝本 見吾

〈学位〉	種類	博士(医学)	論文項目	Sedation with dexmedetomidine hydrochloride during endoscopic submucosal dissection of gastric cancer (早期胃癌ESD時にデクスメドミジン塩酸塩を用いた鎮静法)
	授与番号	博乙医 第570号		
	授与年月日	平成27年3月11日		
	授与の要件	学位規程第6条	論文審査委員	主査 杉山政則 副査 赤川公明 有村義宏 大倉康男 山田達也

### 学位論文の要旨

【目的】早期胃癌に対する治療として内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)は広く実施されているが、いまだ標準的な内視鏡治療時の麻酔法は確立されていない。我々は、ESDにおける鎮静薬の有効性及び安全性を評価するため、デクスメドミジン(DEX)、プロポフォール(PF)及びミダゾラム(MDZ)の3剤を比較したprospective randomized studyを行った。

【方法】ESDを施行する胃癌患者を3群に分け、それぞれDEX(n=30)、プロポフォール(n=30)、ミダゾラム(MDZ)(n=30)を用いて鎮静を行った。不穏出現時には適宜MDZを1mg投与した。検討項目は血圧、SpO<sub>2</sub>、不穏発生率、追加MDZ量、適正鎮静率、一括切除率、治療時間、穿孔率とした。

【結果】DEX群において血圧上昇は30例中2例(6.7%)、血圧低下は5例(17%)で、PF群、MDZ群と同等であった。SpO<sub>2</sub> ≤ 90%は、PF群(8例、27%)、MDZ群(4例、13%)と比較してDEX群(0例)で顕著に低かった(P < 0.001)。不穏発生率は、PF群、MDZ群と比較してDEX群で有意に低く(P = 0.045)、MDZ平均追加投与量は、MDZ群に比べてDEX群で有意に少なかった(P = 0.001)。適正鎮静レベルを維持した割合はMDZ群、PF群と比べてDEX群で有意に高かった(P = 0.0021 vs. MDZ群、P = 0.014 vs. PF群)。ESDの平均施行時間は、DEX群で65分であり、MDZ群(80分)、PF群(90分)と比べて有意に短かった(ANOVA, P = 0.04)。DEX群では重大な術中偶発症は認められなかった。

【考察】ESD施行中の鎮静は、患者の苦痛を抑えるため深い鎮静が好まれる傾向にあるが、術後の麻酔管理を十分に行う体制が整わない施設では再鎮静、バイタルサイン変化などのリスクを伴う。本試験においてDEXによる鎮静管理は、意識下鎮静で安定した呼吸と循環動態を維持することが可能であった。また、術中の偶発症も認められなかったことから、小規模から中規模の施設においても胃癌患者のESDにおける鎮静法として有用であると考えられる。

【結論】ESDの鎮静管理において、DEXによる鎮静は有効かつ安全であることが示唆された。

### 論文審査結果の要旨

早期胃癌の治療法の1つである内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)は、治療に長時間を要するため鎮静が必要であるが、標準的な鎮静法は確立されていない。従来広く行われてきたプロポフォール(PF)やミダゾラム(MDZ)による鎮静法は呼吸循環抑制や不穏出現などの有害事象が多い。近年開発されたデクスメドミジン(DEX)は優れた鎮静効果と有害事象軽減が期待されていたが、内視鏡施行時の鎮静に用いた報告では必ずしもその有用性が示されていないかった。

本研究ではESD施行時のDEX投与方法を新たに考案し、その有用性を検証するために、PF群とMDZ群を含めた3群で無作為比較試験(RCT)を行った。ESDを施行した胃癌90例を対象に、30例ずつ3群に分けた。DEX群では初回に0.5µg/kg/10分を投与した(従来の報告例では1µg/kg/10分の投与方法が多かった)。3群とも不穏出現時にMDZ 1mgを投与した。各群の鎮静状態、有害事象発生率とESD治療成績を比較した。本試験は当該施設の倫理委員会で承認を得た。

適正鎮静レベル(Ramsay 2-3点)を維持した症例は、DEX群(93%)ではPF群(60%)、MDZ群(40%)よりも有意に多かつ

た。不穏出現率はDEX群(3%)ではPF群(10%)、MDZ群(27%)よりも有意に低かった。血圧低下の頻度は3群間で差はなかったが(13-27%)、血液酸素飽和度低下例はDEX群(0%)ではPF群(27%)、MDZ群(13%)よりも有意に低かった。ESD施行時間はDEX群(65分)ではPF群(80分)、MDZ群(90分)よりも有意に短かった。

ESD施行時の鎮静法として、DEXはPF、MDZと比べ、適正な鎮静レベルが得られ、不穏出現が少なく、呼吸循環抑制が少ないため、高い質のESDを施行できて治療時間の短縮につながった。DEXはESD施行時の鎮静法として有用であることが示された。

本研究の内容が2011年に発表された時点では、内視鏡施行時の鎮静法としてのDEXをRCTで評価した既報告は海外からの2つのみであり、いずれもDEXの有用性が認められなかった。本研究ではDEX投与方法を修正しRCTにより初めてDEXの有用性を証明した。本研究の発表後、内視鏡施行時の鎮静法としてDEXが国内外で広く用いられるようになった。本研究は高い臨床的意義を持つ重要な研究と考えられる。審査の結果、学位論文として価値あるものと認めた。

## 〔博士（保健学）〕

氏名 中村 淳 史

〔学位〕	種 類	博士（保健学）	論 文 項 目	電解気泡法による人工心肺回路内における微小気泡の基本的変動
	授与番号	博乙保 第51号	論文審査委員	主査 嶋津秀昭 副査 村椿春博 小泉健雄 石山陽事
	授与年月日	平成27年5月20日		
	授与の要件	学位規程第6条		

## 学位論文の要旨

人工心肺（cardiopulmonary bypass：CPB）の生体への侵襲の一つにガス状微小塞栓（gaseous microemboli：GME）があり、生体への影響は未だ懸念事項である。CPB回路の気泡捕捉能を評価し、その性能の向上を図るためには、回路内における微小気泡の基本的変動を明確にしておくことが重要と考えられるが、これらについての報告は見られない。そこで、本研究ではCPB回路内における気泡の変動について詳細な検討を行った。

通常、空気による気泡は、その大きさを制御することは困難であるため、回路内圧や温度、灌流量などの様々な条件下において微小気泡の基本的変化を明確にすることや、CPB回路の気泡捕捉能の定量的な評価は困難である。そこで、本研究はCPB回路内を流れる灌流液を電気分解させ灌流液中の水分子を電気分解することで、水素および酸素の微小気泡を回路内に発生させ、任意のサイズの気泡群を発生させることのできる気泡発生器を作製した。気泡発生器により灌流液を電気分解して発生させた気泡（Electrolysis Bubble：EB）と通常の空気による気泡（Air Bubble：AB）は、その成分の違いにより、回路内における気泡の収縮速度などが異なる可能性があるため、内径3/8inchのCPB回路内にEBとABの気泡群を発生させ、両者の気泡の収縮率の差について比較検討した。次にEBを用いて、異なる気泡サイズ、距離、温度、回路内圧時における、微小気泡の変動について検討した。

EB、AB両者ともCPB回路内において気泡は収縮し、同様な気泡径の減衰傾向が見られ、EB、ABのCPB回路内における気泡径の変動には差がないことが判明した。次にEBによる検討では気泡は小さくなる程、収縮速度が遅くなった。また、温度による気泡への影響は小さく、回路内圧が高い程、気泡の収縮速度が高くなる結果を得た。

本研究により今まで詳細な報告のなかったCPB回路内における微小気泡の基本的変動を把握することができた。その結果、CPB回路の気泡捕捉能の検討や設計を行う上では、気泡の大きさ、気泡の移動距離（血液流路長）、気泡の滞在時間、そして回路内圧による気泡の変動を考慮した設計・評価が重要であることが示唆された。また、EB法は任意の大きさの気泡群の発生が可能であり、CPB回路の気泡捕捉能の検討において有用な手法であることが確認された。

## 論文審査結果の要旨

本論文は人工心肺を利用した手術時に発生する合併症の原因となるガス性塞栓の問題を解決するために必要となる重要な基礎研究である。論文では人工心肺装置回路内における微小気泡の基本的変動の解析を目的として、還流液流路内に電気分解によって任意のサイズの気泡群を発生させることのできる気泡発生器を作製し、気泡サイズ、移動距離、温度、回路内圧をパラメータとした微小気泡の変動について詳細に検討されている。実験は本法によって作成した気泡と空気による気泡の両者で同様の振る舞いをすることを確認し、本法により発生する気泡群の平均気泡径が50 $\mu$ m、150 $\mu$ m、250 $\mu$ m、350 $\mu$ mとなるようにサイズを変えて詳細な分析を行っている。気泡の個数と気泡径の計測は2MHzの周波数の超音波パルスを用いたBubble Counterを用いて、気泡径が直径5.0～500 $\mu$ mの範囲、毎秒200個までの気泡をカウントできる。

実験の結果、回路内に流れ出す気泡は次第に気泡径を減衰させながら縮小するが、気泡が小さくなる程、収縮速度は遅くなった。

また、還流液の温度による気泡への影響は小さく、回路内圧が高い程、気泡の収縮速度が高くなる結果を得た。本研究の結果より、気泡が時間経過と共に収縮するため、回路内のフィルタでトラップされた気泡は縮小した後に動脈フィルタを通過してしまうことが懸念され、空気塞栓を予防するためには、静脈リザーバに気泡を混入させないことが第一であることに加え、微小気泡が動脈フィルタのポアサイズ以下となる前に捕捉して除去を行うか、または微小気泡を集合させ、比較的大きな気泡として動脈フィルタで捕捉させる必要があることが指摘できた。

本研究により今まで詳細な報告のなかった人工心肺装置回路内における微小気泡の基本的変動を把握することができた。回路内の気泡捕捉能の考慮した設計には気泡の大きさ、気泡の移動距離（血液流路長）、気泡の滞在時間、回路内圧による気泡の変動を考慮した評価が重要であることが示唆され、本法による任意の大きさの気泡群の発生方法が有用な手法であることが確認された。

以上より、慎重な審査の結果、保健学領域の博士論文として価値あるものと認めた。

杏林大学学位論文要旨および審査要旨

〔博士（保健学）〕

氏名 大 貫 雅 也

〔学位〕	種 類	博士（保健学）	論 文 項 目	完全人工心臓用カスケード血液ポンプのインペラに作用する偏心力の軽減に関する研究
	授与番号	博甲保 第43号	論文審査委員	主査 四倉正之
	授与年月日	平成27年2月18日	副査	村椿春博 森田耕司 石山陽事
	授与の要件	学位規程第5条		

学位論文の要旨

本研究では、完全人工心臓用ポンプとして拍動流発生能力の高いカスケードポンプを応用することを目指している。カスケードポンプは、多数の小さな羽根の付いた円盤状のインペラを回転させることで、馬蹄形の流路に沿って渦を発生させながら、繰り返し加圧・移送するポンプである。ポンプ内の流体には多段的にエネルギーが付加されるため、流入口から流出口に向けて圧力を上昇させることができる。一方で、流入口と流出口の間に切欠き部を有するため、流路に沿って生じる不均衡な圧力分布により、インペラの回転軸を流出側から流入側に偏心させる力が働く。この偏心力は、軸受の耐久性を著しく低下させる要因となると考えられる。

そこで本研究では、偏心力低減のために、インペラ中央を中心点としたときXYZ軸すべての方向で圧力がバランスするようなポンプ形状を提案し、ポンプの試作を行った。試作したポンプは、一つの流入口から流入した流れを4本の流路（channel）に分割し、インペラ中央を基点として広がる圧力分布が3軸方向すべてで対称となるように配置することによって、径方向に作用する偏心力の相殺を狙ったものである（4-channelカスケードポンプ）。ポンプの外径はモータ込みで70mm、厚み27mm、流入・流出口の直径は20mmとした。また、ポンプの圧-流量特性として、回転数2,000rpmにおいて、揚程100mmHg、流量5L/minを達成できることを確認した。

想定通りにインペラの回転軸に加わる偏心力を低減させられているかを確認するために、ポンプ駆動中に回転軸に加わる偏心力の測定を試みた。中心軸をポンプ外まで延長し、二つのロードセルを使用して、中心軸に加わる力を測定した。中心軸は回転させずにポンプ外部のX-Yステージに固定し、ボールベアリングを介してインペラを支持した。インペラにはローダを内蔵させ、外周部のステータによって回転させた。貫通部からの液漏れ防止のために酢酸ビニル樹脂を用いた。4-channelカスケードポンプに模擬循環回路を接続し、圧力、流量を変化させたときに軸に加わる偏心力を測定した。偏心力を比較するため、4本の流路のうちの2本を閉塞することで圧力分布の対称性を崩したポンプ（Semi-occludedポンプ）を用いて同様の測定を行った。

Semi-occludedポンプでは揚程の増加とともに偏心力が増加した。一方で、4-channelカスケードポンプでは軸に加わる力は常に低値を示した。回転数2,500rpm、揚程150mmHgにおいて、Semi-occludedポンプの偏心力は5.9N、4-channelカスケードポンプの偏心力は0.6Nであった。このことから、流路を対称的に配置することで圧力分布に起因する偏心力が相殺され、インペラに加わる偏心力を約1/10に低減できることが示唆された。

論文審査結果の要旨

自己心を摘出しその機能代行として植込む完全人工心臓はすでに数機種が開発されているが、まだ改良の余地は多い。特に心臓移植が極端に少ない本邦においては完全人工心臓の果たす役割は極めて大きく、長期間の実用に耐え得る完全人工心臓の開発は急務である。

本論文は、今まで人工心臓には用いられていないが構造上容易に拍動流を発生させることができると考えられているカスケードポンプに着目し、これを完全人工心臓に応用することを試みた。その際の問題点のひとつに回転軸に加わる偏心力があるが、これを軽減させる方法として4-channel構造のカスケードポンプを考案、作成し、その性能および偏心力軽減について評価を行った。またその過程において偏心力測定装置も新規に作成した。

まず、アクリル樹脂を切削加工して4-channelカスケードポンプを作成した。大きさは外径70mm厚さ27mmで、インペラは30枚羽根とし、駆動には3相36スロット24ボールのインナーローター型ブラシレスDCモータを使用した。次いで模擬循環回路を用いて作成した4-channelカスケードポンプの水力学的特性を評価した。その結果、4-channelカスケードポンプはすでに臨

床応用されている遠心血液ポンプと同等の機能を有していた。すなわち血圧120mmHgで10L/minの流量を回転数2500-3000/minで得ることができた。さらに遠心血液ポンプより後負荷の変動に対して流量の変化が少ないという臨床応用に有利な特性を有していることが判明した。シミュレーション解析では4-channelカスケードポンプは2-channelカスケードポンプより偏心力が極めて少ないことが示された。また考案自作した偏心力測定装置により、作成した4-channelカスケードポンプの偏心力を実測した。その結果はシミュレーション解析と同じく偏心力は0.6Nと極めて低値であり、従来のカスケードポンプの1/10に軽減されていることが判明した。

本研究により新たに開発した4-channelカスケードポンプは完全人工心臓として使用できる十分な性能を有していることが示され、また4-channel化により偏心力の問題も克服できることが判明した。臨床応用に至るまでにはまだいくつかの課題が存在するが、4-channel化というアイデアによりカスケードポンプを完全人工心臓に応用可能なことを示し、さらに偏心力の問題を解決したことは高く評価できる。

慎重な審査の結果、本論文は博士論文としての価値を有していると認めた。

## 学位論文要旨および審査要旨

氏名 木 暮 英 輝

〈学位〉	種 類 博士（保健学）	論 文 項 目 肺分画換気動態のモニタリングシステムと評価
	授 与 番 号 博甲保 第44号	論文審査委員 主査 川澄岩雄
	授与年月日 平成27年2月18日	副査 安井英明 丘島晴雄 石山陽事
	授与の要件 学位規程第5条	

## 学位論文の要旨

呼吸管理において患者の病態把握には換気機能の評価が重要である。換気機能はスパイロメータなどの一般的な生理検査でも評価できるが、自発呼吸、人工呼吸のいずれにおいてもベッドサイドでのリアルタイム評価が有用である。また、肺全体の機能としてではなく、肺の分画に応じた機能分析ができる方法や測定装置が、臨床で現れる種々の呼吸器疾患の病態把握、治療効果の分析などに役立つことは明らかであり、このようなシステムの開発が強く望まれている。本研究では、生体電気インピーダンス/アドミタンス法を利用して、肺を部分毎に分画した換気動態を簡便に取得できる実用的な計測システムを開発した。装置の試作と同時に肺分画毎の肺換気量の測定原理と電極の配置などを確立し、人工呼吸管理下の患者を想定して各種の呼吸モードでの実測結果に基づいて測定精度および実用性を実験的に検討した。

本法では4チャンネルの胸郭伝達インピーダンス ( $Z$ ) / アドミタンス ( $Y$ ) を計測し、呼吸に伴う変化量 ( $\Delta Z/\Delta Y$ ) から肺各部の肺内気量の変化を計測する。システムはインピーダンス/アドミタンス計と絶対値較正用の呼吸流量計、dsPIC<sup>®</sup>を用いた計測パッケージを持つ本体、およびインターフェースと表示のためのパーソナルコンピュータにより構成される。電極配置の選択により、肺を4部位に分画して肺内気量を反映する  $Z$ ,  $Y$  を取得して実測の呼吸流量と共にモニタ上に表示できる。

システムの評価を目的として健常者を対象に計測を行い、呼吸に伴う  $Z$ ,  $Y$  の変化量 ( $\Delta Z/\Delta Y$ ) と実測換気量 ( $V_T$ ) の相関性、再現性を検討した。実験は自発呼吸下で行い、肺を分画する電極配置を決定し、不均等換気を模擬する種々の姿勢で計測を行った。さらに、人工呼吸器を用いて呼气終末陽圧 (PEEP) の負荷を与え、計測値が肺を分画した換気動態を反映していることを検証した。

実験の結果、肺各部で得られた  $\Delta Z$  および  $\Delta Y$  は、 $V_T$  と高い直線相関を示し、全肺の換気量を誤差10-20%以内で計測できた。計測値から得られる換気比率は標準的な局所換気動態や体位変換に伴う不均等換気を反映していることを確認した。さらに、PEEPの負荷に伴う機能的残気量の変化も良好に捉えられた。これらの結果は、本法による換気動態の計測が肺を分画した機能として把握することが可能であることを意味し、本研究における計測システムはベッドサイドで使用可能な呼吸機能評価装置として有用な指標を提供できると考えている。

## 論文審査結果の要旨

呼吸管理下にある患者の病態把握を行うには、病床にある患者の換気機能をリアルタイムに評価するためにモニタリングできる計測システムが有用である。また、肺を前後左右、上下などの部分毎に分画して呼吸機能を分析することができる測定方法や測定装置があれば、種々の呼吸器疾患の病態把握、治療効果の分析などに役立つ。このような計測システムの開発が強く望まれている。

そこで本研究では、生体電気インピーダンス/アドミタンス法を利用して、肺を部分毎に分画した換気動態を簡便に取得・モニタリングできる実用的な計測システムを開発するとともに、肺分画毎の肺換気量の測定原理と電極の配置などを確立している。さらに、人工呼吸管理下の患者を想定した各種の呼吸モードにおける実測結果に基づいて、開発した計測システムによる測定精度、およびその実用性を実験的に検討している。

開発した計測システムは、4電極法を利用したインピーダンス/アドミタンス計、絶対値較正用の呼吸流量計、Peripheral Interface Controller (PIC) を用いた計測パッケージを持つ本体、およびインターフェースと表示のためのパーソナルコンピュータにより構成されている。また、肺を4部位に分画して肺内気量を反映する胸郭伝達インピーダンス  $Z$ , その変化量  $\Delta Z$ , およびアドミタンス  $Y$ , その変化量  $\Delta Y$  を同時に独立して取得し、これら

を実測した呼吸流量と共にモニタ上に表示できるようにするため、4部位の測定用各チャンネルにはアイソレーションアンプ、およびアイソレーション電源を設けている。

開発した計測システムを使用して測定した健常者の呼吸に伴う胸郭伝達インピーダンスの変化量  $\Delta Z$ , およびアドミタンスの変化量  $\Delta Y$  と換気量  $V_T$  の間には高い直線相関があり、全肺の換気量を誤差10-20%以内で計測できることを示している。また、計測値から得られる換気比率は、標準的な局所換気動態や体位変換に伴う不均等換気を反映していることが確認でき、補助換気機能を付加した場合は、呼气終末陽圧 (PEEP) の負荷に伴う機能的残気量の増加を明瞭に捉えることができている。

これらの結果は、開発した計測システムによる換気動態の計測が、肺を分画して機能を把握することが可能であることを意味し、本計測システムはモニタリングするためにベッドサイドで使用可能な呼吸機能評価装置として有用な指標を提供できることを示している。

以上のことから、本研究は、開発された計測システムの実用には、この計測システムを用いた臨床データの取得、解析等による精査・検討が必要であるが、簡便、非侵襲な肺分画換気動態のモニタリングの実用化の可能性を示したもので、博士（保健学）の学位を授与するに値する。

氏名 藤 澤 祐 基

〈学位〉	種 類	博士（保健学）	論 文 項 目	三次元位置センサを用いた小脳性運動失調症の書字特性に関する研究		
	授与番号	博甲保 第45号	論文審査委員	主査	森田千晶	
	授与年月日	平成27年2月18日	副査	黒木一典 大嶺智子 石黒友康		
	授与の要件	学位規程第5条				

## 学位論文の要旨

書字運動は巧緻運動であるとともに、長年繰り返された結果、獲得された習熟運動でもある。なかでも小脳は巧緻運動学習の首座であり feed forward 運動の制御の中核と考えられているが、その障害による運動失調症状の運動メカニズムは解明されていない。運動制御と小脳の関係についての先行研究は巧緻性、すなわち target pointing 運動や動的視標追跡運動における運動誤差（ズレ）に着目したものが多く、多評点の三次元解析した報告、とくに feed forward 運動としての書字運動で検証した報告は見当たらない。本研究は、巧緻運動学習の首座をなすと考えられる小脳の障害を対象に、習熟運動の代表例として書字運動に着目し、運動失調症の本態を明らかにし、多関節巧緻運動の運動学習、リハビリテーションに資することを目標とした。右利きの小脳性運動失調症患者8名の失調症群と17名の対照群を対象とした。Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) を用いて運動失調症の臨床的重症度を判定した。左右の手の書字運動について観察し、書字に要する時間、個人の書字の速度プロフィールと形態の均一性、ペン先と他の評点との運動方向、速度プロフィール、軌跡形態の関係性を失調症患者と対照群との2群間で比較した。結果、利き手である右手書字では左手書字に比べて書字時間が短く、相関係数の平均値によって表されるペン先速度プロフィールの均一性と軌跡形態の均一性は高かった。さらに、右手書字ではペン先速度プロフィールは示指/手首の速度プロフィールとは有意に異なっていた。すなわち、利き手書字は速度の割にノイズが少なく、ペン先が指/手首に対して独立して動くことを示唆するものと考えた。失調症群では対照群と比較して書字時間は延長し、ペン先の速度プロフィールと軌跡形態は有意に不均一になった。加えて、失調症群ではペン先の運動方向は示指/手首の運動方向から逸脱し、ペン先の軌跡形態は示指/手首の軌跡形態とは有意に異なっていた。SARAにより示した上肢の運動失調症状の臨床的重症度はペン先と示指の方向変位の指標、ペン先と示指の運動軌跡の相似性指標と有意に相関した。とくに失調症の書字は示指/手首に対するペン先の一様でない不規則な動きが特徴的で、この近位部に対する無秩序な遠位の動きが運動失調症の臨床的重症度を表すものと考えた。四肢の運動失調症の運動障害のメカニズムとして、近位部と遠位部の運動の連係性の喪失が重要な要素と考えられた。

## 論文審査結果の要旨

本論文は小脳性運動失調症患者の書字運動に着目し、小脳性運動失調における書字特性をあきらかにしたものである。書字動作分析の先行研究で確認されている書字時の書字時間、ペン先の速度プロフィールと軌跡形態それぞれの特徴と均一性、および運動学的指標としてのペン先（指先）と手関節の分離性指標について、小脳性運動失調症患者と対照群（健常者）の2群間で比較を行い、さらに小脳性運動失調症患者群では小脳性運動失調症の重症度を判定する Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) を用いて分類した臨床的重症度との関係性について検討をした。結果、小脳性運動失調症患者は対照群と比較して書字

時間では延長、軌跡形態では不均一性、分離指標での運動方向の逸脱性を示し統計的に確認された。また、臨床的重症度と軌跡形態および分離指標との相関を認めた。書字動作分析のペン先の速度プロフィールと軌跡形態それぞれの特徴と均一性、および運動学的指標としてのペン先（指先）と手関節の分離性指標から小脳性運動失調症患者の書字動作特性を明確にすることができた。

症例数およびSARAの評価項目との関係性に課題はあるものの、確認された特性は本邦では初めてであり新規性に優れており、今後、小脳性運動失調症患者のリハビリテーションにおいて発展性の高い研究であると考え、博士論文として価値のあるものと判断する。