

博 士 学 位 論 文

内 容 の 要 旨

お よ び

審 査 結 果 の 要 旨

平成30年度

和 歌 山 県 立 医 科 大 学

目 次

平成30年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第575号	栗 山 幸 大	Enforced expression of MIR142, a target of chromosome translocation in human B-cell tumors, results in B-cell depletion. (ヒト B 細胞性腫瘍における染色体転座標的遺伝子 MIR142 は、B 細胞分化を抑制する) ……………	1
博(医)甲第576号	峯 玉 賢 和	A comparative study of 2-year follow-up outcomes in lumbar spinal stenosis patients treated with physical therapy alone and those with surgical intervention after less successful physical therapy (腰部脊柱管狭窄症に対する理学療法後に手術を受けなかった患者と改善が得られず手術を受けた患者の2年間の予後の比較) ……………	4
博(医)甲第577号	佐々木 貴 英	MRI-defined paraspinal muscle morphology in Japanese population: The Wakayama Spine Study (日本人の MRI による脊柱周囲筋の形態的評価 - The Wakayama Spine Study -) ……………	7
博(医)甲第578号	北 谷 純 也	Cancer Vaccine Therapy Using Carcinoembryonic Antigen - expressing Dendritic Cells generated from Induced Pluripotent Stem Cells (CEA 遺伝子導入人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法の基礎研究) …	8
博(医)甲第579号	細 川 万 生	Superficial siderosis associated with duplicated dura mater detected by CISS reverse MRI (脳表へモジデリ沈着症と CISS 反転法を用いて検出された二重硬膜との関連) ……………	12
博(医)甲第580号	溝 口 美 佳	Prevention of lipopolysaccharide-induced preterm labor by the lack of CX3CL1-CX3CR1 interaction in mice. (CX3CL1-CX3CR1 システムの欠損によりマウスで LPS 誘導早産を予防することができる) ……………	14
博(医)甲第581号	八 幡 環	PD-L1 disruption by CRISPR/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression (CRISPR/Cas9 ゲノム編集による PD-L1 欠損は抗腫瘍免疫を促進し、卵巣癌の進展を抑制する) ……………	17

目 次

平成30年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)甲第582号	岩 下 裕 子	Dietary changes involving <i>Bifidobacterium longum</i> and other nutrients delays CKD progression. (慢性腎臓病モデルラットにおいて、グルタミン、食物繊維、オリゴ糖、ビフィズス菌の投与が腎障害の進行を遅らせる)	20
博(医)甲第583号	浦 木 進 丞	Reduced expression of mismatch repair genes MSH6/MSH2 directly promotes pituitary tumor growth via the ATR-Chk1 pathway. (ミスマッチ修復遺伝子 MSH6,MSH2 発現低下は細胞周期調節機構 ATR-Chk1 経路を介して直接的に下垂体腫瘍増殖を促進する)	23
博(医)甲第584号	二出川 裕 香	Impaired healing of cornea incision injury in a TRPV1-deficient mouse (マウスでの TRPV1 遺伝子欠失の角膜実質創傷治癒への影響)	26
博(医)甲第585号	岩 橋 尚 幸	Calreticulin regulates syncytialization through control of the synthesis and transportation of E-cadherin in BeWo cells (カルレティキュリンはヒト絨毛癌細胞株である BeWo 細胞において E-カドヘリンの合成と輸送をコントロールしシンシチウム化を調節する)	28
博(医)乙第973号	和 田 輝 明	Coronary flow velocity reserve in 3 major coronary arteries by transthoracic echocardiography for the functional assessment of coronary artery disease: a comparison with fractional flow reserve (冠動脈疾患の機能的評価における経胸壁心エコーによる主要三枝冠動脈の冠血流予備能(CFVR)と心筋血流予備量比(FFR)の比較)	31
博(医)乙第974号	西 利 男	Lansoprazole prevents the progression of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats (ランソプラゾールは非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットにおいて、肝線維化の進行を抑制する)	34

目 次

平成30年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第975号	宮 本 恭 兵	Effect of Dexmedetomidine on Lactate Clearance in Patients with Septic Shock A Sub-Analysis of a Multicenter Randomized Controlled Trial (デクスメデトミジンが敗血症性ショック患者の乳酸クリアランスに与える影響の検討) ……………	37
博(医)乙第976号	西 川 泉	Nodular gastritis in association with gastric cancer development before and after <i>Helicobacter pylori</i> eradication (鳥肌胃炎におけるヘリコバクター・ピロリ除菌前後の発癌について) ……………	40
博(医)乙第977号	城 道 久	Perinatal outcome of vaginal delivery with epidural analgesia initiated at the early or late phase of labor period: a retrospective cohort study in the Japanese population. (硬膜外麻酔を早期または後期に導入した経膈分娩例の周産期予後に関する、日本人集団における後ろ向きコホート研究) ……………	43
博(医)乙第978号	前 田 孝 浩	Factors associated with lumbar spinal stenosis in a large-scale, population-based cohort: The Wakayama Spine Study (大規模住民コホートにおける腰部脊柱管狭窄症の発症関連因子 The WakayamaSpine Study-) ……………	46
博(医)乙第979号	津 野 香奈美	Workplace bullying and psychological distress: a longitudinal multilevel analysis among Japanese employees (職場のいじめと心理的ストレス反応：日本人従業員における縦断的マルチレベル分析) ……………	49
博(医)乙第980号	奴 田 絢 也	Kupffer Imaging by Contrast-Enhanced Sonography With Perfluorobutane Microbubbles Is Associated With Outcomes After Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma (ソナゾイド造影エコークッパーイメージと RFA 後の再発・予後との関連性について) ……………	52

目 次

平成30年度

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
博(医)乙第981号	馬 庭 直 樹	Value of tissue-tracking tricuspid annular plane by speckle-tracking echocardiography for the assessment of right ventricular systolic dysfunction (スペックルトラッキング心エコー図法を用いた三尖弁輪移動距離における右室収縮不全症例検出の有効性に関する検討)	54

学位記番号	博(医)甲第575号		
学位授与の日	平成30年7月17日		
氏名	栗山 幸大		
学位論文の題目	Enforced expression of MIR142, a target of chromosome translocation in human B-cell tumors, results in B-cell depletion. (ヒト B 細胞性腫瘍における染色体転座標的遺伝子 MIR142 は、B 細胞分化を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 森川 吉博	教授 園木 孝志

論文内容の要旨

【緒言】

B 細胞性腫瘍にみられる染色体転座切断点近傍には B 細胞の細胞死・増殖・分化・細胞周期・シグナル伝達に関わる重要な「機能分子」が存在している。これらの「生体内機能分子」の発現が染色体転座によって攪乱され「発ガン」に関与している。私達は、急激に進行したびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫に t(8;17)(q24;q22)を見つけ、17q22 転座切断点近傍に *MIR142* を同定した。B 細胞性腫瘍において *MIR142* の塩基配列変異や発現異常が報告されているものの、腫瘍発生における *MIR142* の役割は未だ明確ではない。今回、骨髄移植(BMT)マウスとトランスジェニック(TG)マウスを用いて腫瘍発生における *MIR142* 過剰発現の役割を検討した。

【方法】

患者

患者は 63 歳、女性。自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) 発症 4 年後に急激な経過をたどったびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫を発症した。腫瘍細胞には、従来の核型解析では *MYC*8q24 再構成は認めなかったが、サザンブロット法や FISH (fluorescence *in situ* hybridization) では *MYC*8q24 再構成を認めた。先行研究において、本腫瘍細胞には t(6; 14)(p21;q32) が同定され、*CCND3* 過剰発現が確認されている。

*MYC*8q24 転座切断点の解析

患者腫瘍細胞から抽出した DNA を *EcoRI* で消化しサザンブロット解析を行った。*MYC* の exon 1 を認識するプローブ (*MYC*-I) と *MYC* の intron 1 及び exon 2 を認識するプローブ (*MYC*-SS) を用いた。再構成バンドをインバース PCR 法にて遺伝子単離し、塩基配列を決定した。

MYC の発現解析

MYC-I プローブと *MYC* の exon 2 を認識するプローブ (*MYC*-II) を用いて、RNA ブロット解析を行った。また、腫瘍細胞にみられた exon1 欠損 *MYC* mRNA の上流を 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法を用い塩基配列を決定した。

17q22 転座切断点の分子学的検討

17q22 転座切断点近傍の転写物を同定するために、HL60 細胞株から得た cDNA を鋳型として、3' RACE 法を行った。得られた 3'RACE 産物をプローブとした RNA ブロット解析を行い、患者腫瘍細胞や各臓器における遺伝子発現を検討した。

t(6;14)(p21;q32) と t(8;17)(q24;q22) の発生時期の検討

染色体転座切断点近傍に設定したプライマーで Nested PCR 法を行い、転座結合部塩基配列を増幅した。Nested PCR の鋳型として AIHA 診断時の骨髄スメアから抽出した DNA と、リンパ腫診断時の腫瘍細胞 DNA を用いた。

BMT マウスの検討

C57BL/6 系マウスの骨髄細胞に、GFP と *miR142* を含むレトロウイルスを感染させた。感染させた骨髄細胞 ($3\cdot5\times 10^5$) を放射線照射した同系マウスに骨髄移植した。その後、継時的に末梢血細胞をフローサイトメトリー (FCM) で検討した。

Eu/mir142 トランスジェニックマウスの検討

免疫グロブリン遺伝子発現調節領域に *miR142* を組み込んだ DNA を用い、2系統のトランスジェニック (TG) マウス (TG921 系と TG661 系) を作成した。TG マウスの脾臓細胞を B220 (fluorescein isothiocyanate: FITC) と IgM (phycoerythrin: PE) で染色し、FCM で検討した。IgM Ab-conjugated magnet beads を用いて、IgM 陽性細胞を純化した。純化した IgM 陽性細胞から RNA を抽出し、BAFF-R, IL-6ST, RAG, TGFBR1, WASL, VPRESB1 の発現を qRT-PCR で調べた。脾臓細胞を Lipopolysaccharide (LPS) $1\mu\text{g/mL}$ で 24 時間培養した後、B220 (FITC) と IgM (PE) で染色し、IgM 発現程度により、B220+/IgM^{Low}, B220+/IgM^{Med}, B220+/IgM^{High} に分け、TG と WT で比較した。

【結果】

MYC/8q24 転座切断点の解析 (付図 1)

サザンブロットで 9.4kb、5.4kb、4.2kb の再構成バンドを認め、各々、インバース PCR 法で遺伝子単離を行った。塩基配列を決定したところ、*MYC* /8q24 と *MIR142* /17q22 が逆位を伴って相互転座していることがわかった。

MYC の発現解析 (付図 2)

腫瘍細胞は、exon 1 を欠如し 17 番染色体由来塩基配列とキメラを作った *MYC* を発現していた。*MYC* 蛋白発現は t(8;14)(q24;q32) を示すバーキットリンパ腫と同様のレベルであった。

17q22 転座切断点近傍における転写物の同定と発現解析 (付図 3 A, B)

3'RACE 法で 17q22 転座切断点近傍の転写物を同定した。この転写物は non-coding RNA で、*MIR142* を含んでおり *pri-MIR142* と考えられた。腫瘍細胞は *pri-MIR142* と mature *MIR142* (5p と 3p) を過剰発現していた。*Pri-MIR142* は、胸腺・脾臓組織・末梢血に検出され、造血器に特異的に発現していた。

t(6;14)(p21;q32) と t(8;17)(q24;q22) の発生時期の検討 (付図 4)

AIHA 診断時の DNA に、t(6;14)(p21;q32) 結合部塩基配列は検出されたが、t(8;17)(q24;q22) 結合部塩基配列は検出されなかった。一方、リンパ腫細胞では両方の転座結合部塩基配列が検出された。このことから t(8;17)(q24;q22) は t(6;14)(p21;q32) の続発変異であることがわかった。

BMT マウスの検討 (付図 5 A, B, C)

レトロウイルスベクターにより *miR142* を強制発現した血球は、コントロールに比較して減少していた。特に B 細胞の減少が著しかった。2 年間観察したが、明らかな疾患を発症しなかった。

Eu/mir142 トランスジェニックマウスの検討 (付図 6)

TG マウスでは WT に比較して脾臓 IgM 陽性細胞が減少していた。*miR142* 欠損マウスを用いた先行研究で、発現が上昇したと報告された遺伝子群 (BAFF-R, IL-6ST, RAG, TGFBR1, WASL, VPRESB1) は、WT に比較し TG で発現が低下している傾向にあった。TG マウスの脾臓細胞は野生型脾臓細胞と比較して、LPS 刺激後の B220+/IgM^{High} 分画が少なかった。

【考察】

私達は、急激に進行したびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫患者に t(8;17)(q24;q22) を見つけ、17q22 転座切断点近傍に *MIR142* を同定した。本転座の報告は世界で第二例目である。今回、BMT マウスと TG マウスを用いて *miR142* 過剰発現の生物学的影響を解析し、「発ガン」における役割を検討した。得られた結果から、私達は *miR142* が細胞の分化・成熟を負に制御していると推察した。

miR142 の単独過剰発現は、成熟阻害による細胞死をもたらす、細胞減少に結びついていたのではないかと考えた。実際の患者腫瘍細胞では、*MIR142* 過剰発現に加え、*CCND3* や *MYC* の発現異常がみられている。これらの異常が *MIR142* 過剰による成熟阻害・細胞死のオーバーカムを起し、分化停止した細胞の腫瘍化をもたらしているのではないかと推論した。今回の研究は、*miR142* が関わる新たな発ガン機序を検討したものである。種々の悪性リンパ腫細胞で *MIR142* の塩基配列変異や発現異常が報告されており、*MIR142* 異常と臨床所見との関連をさらに検討していきたい。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成30年6月29日および7月2日、論文審査委員は学位請求者の出席を求め、上記論文について審査を行った。

びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）の症例からt(8;17)(q24;q22)に関する転座を見出し、17q22転座切断点近傍に*MIR142*を同定した。本論文の目的は、骨髄移植(BMT)マウスとトランスジェニック(TG)マウスを用いて腫瘍発生における*MIR142*過剰発現の機能的役割を検討する点にある。

患者は63歳、女性。自己免疫性溶血性貧血(AIHA)発症4年後に急激な経過をたどったDLBCLを発症した。腫瘍細胞には、サザンブロット法やFISH (fluorescence *in situ* hybridization)で*MYC*/8q24再構成を認めた。本腫瘍細胞にはt(6;14)(p21;q32)転座が同定され、*CCND3*過剰発現が確認されている。*MYC*のexon 1を認識するプローブ(MYC-I)と*MYC*のintron 1及びexon 2を認識するプローブ(MYC-SS)を用いて、患者腫瘍細胞のサザンブロット解析を行った。*MYC*/8q24と*MIR142*/17q22が逆位を伴って相互転座していた。腫瘍細胞はexon 1を欠如し17番染色体由来塩基配列とキメラを作った*MYC*を発現していた。3'RACE法で17q22転座切断点近傍の転写物を同定した。この転写物はnon-coding RNAで、*MIR142*を含んでおり*pri-MIR142*と考えられた。腫瘍細胞は*pri-MIR142*とmature *MIR142* (5pと3p)を過剰発現していた。*Pri-MIR142*は、胸腺・脾臓組織・末梢血に検出され、造血器に特異的に発現していた。またAIHA診断時のDNAには、t(6;14)(p21;q32)結合部塩基配列は検出されたが、t(8;17)(q24;q22)結合部塩基配列は検出されなかった。一方、腫瘍細胞では両方の転座結合部塩基配列が検出された。以上の点を総合してt(8;17)(q24;q22)はt(6;14)(p21;q32)の続発変異であることが判明した。

C57BL/6系マウスの骨髄細胞に、GFPと*miR142*を含むレトロウイルスを感染させた。同骨髄細胞(3-5×10⁵)を放射線照射したマウスに骨髄移植し、末梢血細胞をフローサイトメトリーで検討した。レトロウイルスベクターにより*miR142*を強制発現した血球は、コントロールに比較して減少し、特にB細胞の減少が著しかった。免疫グロブリン遺伝子発現調節領域に*miR142*を組み込んだDNAを用い、2系統のTGマウス(TG921系とTG661系)を作成した。同マウスではWTに比較して脾臓IgM陽性細胞が減少していた。*miR142*欠損マウスを用いた先行研究で、発現の上昇が報告された遺伝子群(BAFF-R, IL-6ST, RAG, TGFBR1, WASL, VPREB1)は、TGでqRT-PCRの発現が低下している傾向にあった。TGマウスの脾臓細胞は野生型脾臓細胞と比較して、LPS刺激後のB220⁺/IgM^{High}分画が少ないことが判明した。

以上の結果から、*miR142*が細胞の分化・成熟を負に制御していると推察した。*miR142*の単独過剰発現は、成熟阻害による細胞死をもたらす、細胞減少に結びついた可能性が考えられた。実際の患者腫瘍細胞では、*MIR142*過剰発現に加え、*CCND3*や*MYC*の発現異常がみられている。この異常が*MIR142*過剰による成熟阻害・細胞死に関する一種のオーバーカムを起し、分化停止した細胞の腫瘍化をもたらしている可能性を考えた。本論文は、*miR142*が関わる新たな発ガン機序を検討したものであり、転座に関する腫瘍バイオロジーについて重要な知見を提供し、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第576号		
学位授与の日	平成30年9月25日		
氏名	峯玉 賢和		
学位論文の題目	A comparative study of 2-year follow-up outcomes in lumbar spinal stenosis patients treated with physical therapy alone and those with surgical intervention after less successful physical therapy (腰部脊柱管狭窄症に対する理学療法後に手術を受けなかった患者と改善が得られず手術を受けた患者の2年間の予後の比較)		
論文審査委員	主査	教授 田島 文博	
	副査	教授 山田 宏	教授 川上 守

論文内容の要旨

【緒言】

腰部脊柱管狭窄症(以下 LSS)患者に対する保存療法と手術療法の比較では、手術療法の方が痛みや機能障害、QOL に対して改善効果大きいことが報告されている。しかし、ここでの保存療法は、薬物療法、ブロック療法、理学療法、装具療法等、様々な治療が含まれており、系統的な理学療法は必ずしも実施されていない。保存療法と手術療法を比較した最も大規模な RCT でも保存療法群の 37% にしか理学療法が実施されておらず、理学療法を実施した群は、より高い改善を自覚し、手術への移行率が低いことが示されている。一方、理学療法の有効性に関する報告は散見されているが、追跡期間が 2 年未満と短く、理学療法後、手術に至った症例の予後は不明である。本研究の目的は、LSS 患者に対して 6 週間の理学療法を実施し、2 年の追跡調査を行うことにより、手術を回避できた症例と手術に至った症例の予後を検討することである。

【対象・方法】

対象は、歩行にて両足の痛みやしびれ、または脱力が出現し、休息によって症状が軽減する神経性間欠跛行を呈し、MRI もしくは CT にて中心性の脊柱管狭窄症と診断され、3 か月以上の薬物療法で効果が得られない LSS 患者とした。除外項目は、膀胱直腸障害を有する症例、3mm 以上の腰椎すべり症、神経ブロック療法併用例、脊椎手術既往例、糖尿病、末梢動脈疾患、精神科受診既往・加療中の者、理学療法を希望しない患者とした。理学療法は、週 1 回 6 週間のストレッチ、腰痛体操、体重免除トレッドミル歩行とホームエクササイズとして腰痛体操と歩行を実施した。調査項目は、年齢、性別、BMI、罹病期間、MRI 所見、チューリッヒ跛行質問票 (ZCQ)、腰痛、下肢痛、下肢のしびれの Visual analogue scale (VAS)、日整会腰痛質問票 (JOABPEQ)、36-Item Short-Form Survey (SF-36)、Roland-Morris Disability Questionnaire (RDQ)、東邦大式抑うつ尺度 (SRQ-D) とし、ホームエクササイズの順守はアンケートにて実施状況を確認した。6 週の理学療法後、2 年間手術を実施しなかった症例を手術なし群、手術を希望し、受けた者を手術あり群とし、統計学的に比較検討を行った。有意水準は 5% とした。なお、本研究は和歌山県立医科大学倫理審査委員会の承認を得た上でを行い、全ての患者に研究の内容を説明し、同意を得た上で行った。

【結果】

選択基準と除外基準を満たした 38 例が研究に参加した。6 週の理学療法後、8 例が手術を受け、2 年後のアンケートによる追跡調査を行えた 28 例、手術なし群 21 例 (男性 9 例、平均年齢 71.5 歳) と手術あり群 7 例 (男性 1 例、平均年齢 65.7 歳) が解析の対象となった。

治療前の 2 群の比較において、BMI が手術あり群で有意に高かった (手術なし群: 21.8 kg/m² vs. 手術あり群: 25.3 kg/m², P = 0.02) が、年齢、性別、罹病期間、MRI 所見、ZCQ、VAS、JOABPEQ、SF-36、RDQ、SRQ-D に有意差はなかった。

6 週の理学療法後、手術なし群では、SF-36 身体機能、体の痛み、RDQ で有意な改善が得られてい

た($P < 0.05$)が、手術あり群では有意な改善は得られていなかった。6 週後の各群の比較に関しては、ZCQ 重症度、身体機能、JOABPEQ 疼痛関連障害、歩行機能障害獲得点数、SF-36 身体機能、体の痛み、RDQ で手術なし群が、手術あり群に比べ、有意に良好な値を示していた ($P < 0.05$)。2 年後の各群の比較に関しては、ZCQ 身体機能で手術あり群が有意に大きな改善を示していたが、その他の値に有意差はなかった ($P < 0.05$)。6 週後のホームエクササイズの順守に関しては、各群に有意差はなく、ほぼ毎日実施されていた。2 年後は、手術なし群の 86%が週 3 回以上、運動を実施していた。

【考察】

本研究において、6 週の理学療法後、2 年間手術を回避できた症例では、6 週の理学療法で効果が得られ、2 年後もその効果を維持できていた。一方、手術に至った症例では、BMI が高値で、6 週間の理学療法で効果が得られていなかった。2 年後の比較においては、ZCQ 身体機能の改善を除き、手術を回避できた症例と手術に至った症例で同等の予後であった。これまでの報告では、手術療法のほうが保存療法よりも予後が良好と言われていたが、保存療法の中に必ずしも系統的な理学療法は含まれておらず、理学療法と手術療法を比較した報告はなかった。本研究において、6 週の理学療法で 2 年間手術を回避できれば、手術と同等の予後が得られる結果となり、理学療法の有用性が示された。手術を回避できた症例の 86%が、2 年後の時点で週 3 回以上の運動を継続できており、6 週の理学療法で運動習慣をつけられたことが、理学療法の効果を維持できた要因である可能性がある。一方、手術に至った症例は、BMI が高値で 6 週の理学療法で効果が得られていなかった。したがって、BMI が高値の症例に対しては、栄養指導も含めた減量に対する介入が必要であると考えられる。

本研究の限界は、ランダム化比較試験ではないこと、コントロール群がないこと、追跡率が悪く、症例数が少ないことが挙げられ、結果の解釈に注意が必要である。

【結語】

LSS 患者に対して 6 週の理学療法を実施後、手術の希望がなく 2 年間手術を回避できれば、2 年後は理学療法後、手術に至った症例とほぼ同等の予後であった。適切な理学療法を行えば相当な治療効果が得られることを前提に考えると、手術の適応は系統的な理学療法を行ってから慎重に判断すべきである。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 30 年 5 月 11 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め上記論文の審査を行った。

腰部脊柱管狭窄症(以下 LSS)患者に対する保存療法と手術療法の比較では、手術療法の方が痛みや機能障害、QOL に対して改善効果が大きいことが報告されている。しかし、ここでの保存療法は、薬物療法、ブロック療法、理学療法、装具療法等、様々な治療が含まれており、系統的な理学療法は必ずしも実施されていない。保存療法と手術療法を比較した最も大規模な RCT でも保存療法群の 37% にしか理学療法が実施されておらず、理学療法を実施した群は、より高い改善を自覚し、手術への移行率が低いことが示されている。一方、理学療法の有効性についての報告は散見されているが、追跡期間が 2 年未満と短く、理学療法後、手術に至った症例の予後は不明である。

本論文では、LSS 患者に対して 6 週間の理学療法を実施し、2 年の追跡調査を行うことにより、手術を回避できた症例と手術に至った症例の予後を検討した。

対象は、歩行にて両足の痛みやしびれ、または脱力が出現し、休息によって症状が軽減する神経性間欠跛行を呈し、MRI もしくは CT にて中心性の脊柱管狭窄症と診断され、3 か月以上の薬物療法で効果が得られない LSS 患者とした。除外項目は、膀胱直腸障害を有する症例、3mm 以上の腰椎すべり症、神経ブロック療法併用例、脊椎手術既往例、糖尿病、末梢動脈疾患、精神科受診既往・加療中の者とした。理学療法は、週 1 回 6 週間のストレッチ、腰痛体操、体重免荷トレッドミル歩行とホームエクササイズとして腰痛体操と歩行を実施した。調査項目は、年齢、性別、BMI、罹病期間、MRI 所見、チューリッヒ跛行質問票 (ZCQ)、腰痛、下肢痛、下肢のしびれの Visual analogue scale (VAS)、日整会腰痛質問票 (JOABPEQ)、36-Item Short-Form Survey (SF-36)、Roland-Morris Disability

Questionnaire (RDQ)、東邦大式抑うつ尺度 (SRQ-D)とした。6 週の理学療法後、2 年間手術を実施しなかった手術なし群 21 例 (男性 9 例、平均年齢 71.5 歳)と手術を希望し、受けた手術あり群 7 例 (男性 1 例、平均年齢 65.7 歳)に分け、有意水準を 5%とし、比較検討を行った。

結果は、治療前の 2 群の比較において、BMI が手術あり群で有意に高かった (手術なし群: 21.8 kg/m² vs. 手術あり群: 25.3 kg/m², P = 0.02)が、その他の項目に有意差はなかった。6 週の理学療法後、手術なし群では、SF-36 身体機能、体の痛み、RDQ で有意な改善が得られていた(P < 0.05)が、手術あり群では有意な改善は得られていなかった。2 年後の各群の比較に関しては、ZCQ 身体機能で手術あり群が有意に大きな改善を示していたが(P = 0.04)、その他の値に有意差はなかった。

本論文は、LSS 患者に対して 6 週間の理学療法を行い、2 年間手術を回避できれば、2 年後は理学療法後に手術に至った症例とほぼ同等の予後であることを示し、理学療法士が介入する理学療法の有効性を明らかにしたものであり、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第577号		
学位授与の日	平成30年9月25日		
氏名	佐々木 貴英		
学位論文の題目	MRI-defined paraspinal muscle morphology in Japanese population: The Wakayama Spine Study (日本人の MRI による脊柱周囲筋の形態的評価 - The Wakayama Spine Study -)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 中尾 直之	教授 山田 宏

論文内容の要旨

腰痛は本邦において最も多い愁訴の一つであるが、脊柱周囲筋の加齢性変化と腰痛の関連が注目されている。しかし脊柱周囲筋に対する画像評価方法は確立されておらず、脊柱周囲筋の横断面積、脂肪変性領域割合についての性別、年代別平均値も明らかになっていない。①一般地域住民における脊柱周囲筋(脊柱起立筋・多裂筋・大腰筋)の横断面積、脂肪変性領域割合の性別、年代別平均値、②脊柱周囲筋の状態と腰痛との関連、を明らかにすることを目的に、一般住民コホートをを用いた横断研究を行った。

The Wakayama Spine Study population-based cohort に参加した一般住民ボランティア 796 名を対象とした。腰椎 MRI の T2 強調横断像を用いて、脊柱起立筋、多裂筋(Th12/L1-L4/5 の 5 椎間)、大腰筋(L4/5 の 1 椎間)の横断面積および脂肪変性領域割合を測定した。また腰痛の有無を問診にて確認した。統計解析は、各脊柱周囲筋の横断面積、脂肪変性領域割合の性別、年代別平均値を算出し、各脊柱周囲筋の横断面積・脂肪変性領域割合と年齢との関連を検討した。また腰痛の有無を目的変数、各脊柱周囲筋の脂肪変性領域割合を説明変数、性、年齢、BMI を調整変数とした多重ロジスティック回帰分析を行った。

横断面積は全ての脊柱周囲筋、年代、椎間で男性が女性よりも大きく、女性の Th12/L1、L1/2 の脊柱起立筋を除く全ての脊柱周囲筋、椎間で男女ともに、年代の上昇とともに減少する傾向を示した。また横断面積の減少の程度は、L3/4、L4/5 の多裂筋を除き、女性が男性に比べ緩やかだった。脂肪変性領域割合は、70 歳代の Th12/L1 の多裂筋と 50 歳未満の大腰筋を除き、全ての脊柱周囲筋、年代、椎間で女性が男性よりも大きく、脂肪変性領域割合は全ての脊柱周囲筋、椎間で男女ともに、年代の上昇とともに増加する傾向を示した。脂肪変性領域割合の増加の程度は、L4/5 の脊柱起立筋と Th12/L1、L1/2 の多裂筋を除き、男性が女性に比べ緩やかだった。また多重ロジスティック回帰分析にて、L1/2、L2/3 の脊柱起立筋の脂肪変性領域割合の増加と腰痛の有病に有意な関係を認めた。本研究では、地域一般住民を対象にした大規模コホートにて、脊柱周囲筋の横断面積および脂肪変性領域割合の性別、年代別平均値を提示し、その加齢変性のパターンが性、筋肉により異なることを明らかにした。それらは今まで明らかにならなかった脊柱周囲筋の自然経過を反映していると考えられる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 30 年 8 月 27、28 日 論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。本論文は、世界的にも稀な全脊柱 MRI を用いた地域一般住民を対象にした大規模コホートにより、今までほとんど知られていなかった脊柱周囲筋の自然経過を明らかにしたものである。脊柱周囲筋の MRI 評価の reference value となりえ、今後の脊柱周囲筋の研究に大きく貢献する意義深い研究であり、学位論文として価値のあるものであると認めた。

学位記番号	博(医)甲第578号		
学位授与の日	平成30年10月16日		
氏名	北谷 純也		
学位論文の題目	Cancer Vaccine Therapy Using Carcinoembryonic Antigen - expressing Dendritic Cells generated from Induced Pluripotent Stem Cells (CEA 遺伝子導入人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来樹状細胞を用いた癌ワクチン療法の基礎研究)		
論文審査委員	主査	教授 改正 恒康	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 山上 裕機

論文内容の要旨

【緒言】

樹状細胞 dendritic cells (DCs) は、T 細胞への最も効果的な抗原提示能力を担う免疫細胞である。これまでわれわれの教室では、多くの DCs ワクチン療法に関する研究を行ってきた。しかしながら、臨床的に用いる場合、担癌患者から誘導した DCs は成熟能が低く、さらに抗原提示能が低いとされる。われわれは、iPS 細胞 induced pluripotent stem cells (iPSCs) が癌免疫療法に用いる DCs を作製する材料として有用ではないかと考えた。当教室は、これまでマウス iPSDCs は、bone marrow-derived DCs (BMDCs) と同等の樹状細胞としての機能及び抗原提示能を有していることを報告した。iPSDCs を消化器固形癌に対して臨床応用するべく、本研究において、ヒト iPS 細胞からヒト iPSDCs の分化誘導を行い、機能に関してヒト monocyte-derived DCs (MoDCs) と比較した。さらに胃癌・大腸癌に高率に発現する carcinoembryonic antigen (CEA) 遺伝子導入 iPSDCs を作成し、*in vitro* での cytotoxic T lymphocytes (CTLs) 誘導能を検討した。また、実際の *in vivo* でのワクチン効果を確認するべく、CEA transgenic mice 大腸癌モデルを用いて CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs の抗腫瘍効果を検討した。

【方法】

実験 I. ヒト iPSDCs の分化誘導

3名の健常人ドナー (HLA-A24/02, HLA-A24/02, HLA-A24/11) の皮膚組織から線維芽細胞の初代培養を行い、センダイウイルスベクター (DNAMEC Corporation) にて山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞の樹立を行った。得られた iPS 細胞を Matrigel コートした dish でフィーダーレス培養を行い、その後 5 ステップ法で分化誘導を行った。第 1 に bone morphogenetic protein (BMP) 4 を添加し 4 日間培養した。第 2 に vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), stem cell factor (SCF) を添加した StemPro-34 (Thermo Fisher Scientific) に置き換え 2 日間培養した。第 3 に SCF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), thrombopoietin (TPO), Fms-related tyrosine kinase (Flt) -3 ligand, interleukin (IL) -3 を添加した StemPro-34 に変更し、7 日間培養した。第 4 に M-CSF, Flt-3 ligand, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) を添加した StemPro-34 に変更し、3 日間培養した。浮遊してくる細胞を CD14 抗体で標識し、auto MACS Pro (Miltenyi Biotec) にて分離した。第 5 に回収した細胞を GM-CSF, IL-4 を加え 5 日間培養し、その後 maturation cocktail として prostaglandin E2 (PGE2), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) - α を添加し 2 日間培養後に浮遊細胞を回収した。

実験 II. ヒト iPSDCs とヒト MoDCs の APC としての機能の評価

1. 成熟能の比較検討

ヒト iPSDCs とヒト MoDCs の成熟能を比較検討するためにそれぞれの未成熟、成熟 DCs にて表面マーカーの発現 (CD11c, CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-ABC, HLA-DR) を flow cytometry にて比較検討した。

2. サイトカイン分泌能の比較検討

ヒト iPSCs とヒト MoDCs のサイトカイン分泌能を比較検討するためそれぞれの未成熟、成熟 DCs にてサイトカインの分泌 (IFN- γ , IL-12p70) を ELISA 法にて比較検討した。

3. 遊走能の比較検討

8.0 μ m pore transwell plate (Corning) の lower chamber に 100ng/ml macrophage inflammatory protein (MIP) -3 β を添加した AIM-V medium を 1 ml 加えた。未成熟、成熟ヒト iPSCs または、ヒト MoDCs を 1.5x10⁶ cells/ml の細胞濃度で AIM-V medium に suspend し、0.1ml を upper chamber に添加した。37°C, 5% CO₂ で 2 時間インキュベートし、lower chamber 内に遊走してきた DCs を cell count し、それぞれ比較検討した。さらに、flow cytometry を用いて CCR7 の発現をそれぞれ検討した。

実験 III. CEA 遺伝子導入ヒト iPSCs による *in vitro* における細胞傷害活性誘導能の検討

回収した未成熟ヒト iPSCs と CEA 発現 adenovirus vector を 100MOI で混合させ、37°C, 2000g にて 2 時間遠心して感染後、maturation cocktail にて 48 時間 maturation させた。responder を自己の PBMCs, stimulator を CEA 遺伝子導入ヒト iPSCs とし、20:1 の割合で 1 週毎に 3 回刺激した。得られた細胞から auto MACS Pro にて CD8 (+) CTLs を抽出した。ターゲット細胞として、自己リンパ球から誘導した lymphoblastoid cell lines (LCLs) に CEA を発現させた LCLs-CEA、HLA-A24 拘束性 peptide である CEA652 peptide をパルスした LCLs-CEA652 peptide, そして Lac Z 遺伝子を導入した LCLs-LacZ を用い、⁵¹Cr-release assay にて特異的細胞傷害活性を解析した。また、HLA-A24 陽性で、かつ CEA を発現する胃癌細胞株である MKN45, 大腸癌細胞株である HT29、CEA を発現していない胃癌細胞株である MKN1 についても特異的細胞傷害活性を示すかどうかとも検討した。

実験 IV. CEA transgenic mouse 用いた CEA 遺伝子導入マウス iPSCs の抗腫瘍効果の検討

1. CEA 遺伝子導入マウス iPSCs ワクチンによる特異的 CTLs の誘導

CEA 遺伝子導入マウス iPSCs を投与した際の CEA 特異的 CTLs の誘導能を比較検討するために、CEA 遺伝子導入マウス iPSCs を CEA transgenic mouse に皮下投与し、14 日後に脾臓を回収した。そして抽出した脾細胞を MC38-CEA と 3 日間共培養した。これにより得られた細胞を tetramer assay で解析した。さらに脾細胞から auto MACS Pro にて CD8 (+) CTLs を注出した。これを MC38-CEA, MC38 をターゲットとし ⁵¹Cr-release assay にて CEA 特異的細胞傷害活性を解析した。

2. 皮下腫瘍モデルにおける腫瘍増殖抑制効果の検討

CEA 遺伝子導入マウス iPSCs をワクチン投与した際の腫瘍増殖抑制効果を比較検討するため、CEA 遺伝子導入マウス iPSCs を、MC38-CEA および MC38 皮下腫瘍モデルに 1 回皮下投与し、皮下腫瘍の大きさを継時的に測定し解析した。

【結果】

実験 I. ヒト iPSCs の分化誘導

3 名の健康人ドナーの皮膚線維芽細胞からいずれも iPSC 細胞の樹立が可能であり、分化開始後 23 日目で成熟したヒト iPSCs が分化誘導された。第 1 ステップでは、平坦で粗なコロニーとなり、第 2 ステップでは血管内皮様の紡錘形の細胞集塊を形成した。第 3 ステップの後半になると、ドーム状の CD45 陽性細胞からなる細胞集塊を認め、第 4 ステップでは単球様の小円形の浮遊細胞を多数認めた。これらのほとんどは CD14 陽性細胞であった。第 5 ステップでは、樹状突起を持つ淡明な細胞が現れ、maturation によりその数も多くなった。形態をヒト MoDC と比較すると樹状突起の数や長さ、細胞サイズは類似するものであった。

実験 II. ヒト iPSCs とヒト MoDCs の APC としての機能の評価

1. 成熟能の比較検討

ヒト iPSCs はヒト MoDCs と同様に maturation cocktail にて成熟し、表面マーカーである CD11c、CD80、CD83、CD86、CD40、HLA-ABC、HLA-DR の同程度の発現を認めた。

2. サイトカイン分泌能の比較検討

ヒト iPSDCs、ヒト MoDCs いずれも、未成熟な DCs では、ほとんど IFN- γ や IL-12p70 の産生を認めなかったが、成熟した DCs では、IFN- γ 、IL-12p70 は共に高い産生を認めた ($P < 0.01$)。また、その程度はヒト iPSDCs とヒト MoDCs で同等であった。

3. 遊走能の比較検討

in vitro での遊走能の評価では、ヒト iPSDCs、ヒト MoDCs はいずれも未成熟な DCs ではほとんど遊走を認めなかったが、成熟した DCs では高い遊走能を認めた ($P < 0.01$)。また、その程度は、ヒト iPSDCs とヒト MoDCs で同等であった。さらに、CCR7 の発現を flow cytometry で評価したところ、ヒト iPSDCs、ヒト MoDCs はいずれも未成熟な DCs では CCR7 の発現は認めなかったが、成熟した DCs では同等の発現を認めた (ヒト MoDCs vs ヒト iPSDCs : 37% vs 49%)。

実験 III. CEA 遺伝子導入ヒト iPSDCs による *in vitro* における細胞傷害活性誘導能の検討

3名の健常人ドナーから CEA 遺伝子導入ヒト iPSDCs を作成した。いずれのドナーにおいても CEA 遺伝子導入ヒト iPSDCs での刺激により誘導された CTLs は自己仮想ターゲットである、LCLs-CEA、LCLs-CEA652 peptide に対し、細胞傷害活性を認めたが、LCLs-LacZ に対しては認めなかった。また、CEA を内在性に発現している cell line である MKN45、HT29 に対しても、同様に細胞傷害活性を認めたが、CEA を発現していない MKN1 に対しては認めなかった。以上より、CEA 遺伝子導入ヒト iPSDCs は、CEA 特異的に細胞傷害活性誘導能を示すことを証明した。

実験 IV. CEA transgenic mouse 用いた CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs の抗腫瘍効果の検討

1. CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs ワクチンによる特異的 CTLs の誘導

tetramer assay では、マウス iPSDCs-CEA 投与群において 4.31% と高い tetramer の陽性率を示したが、コントロール群では、0.66% とほとんど認めなかった。また、⁵¹Cr-release assay では、マウス iPSDCs-CEA 投与群では、コントロール群と比較し MC38-CEA に対し高い細胞傷害活性を示した ($P < 0.01$)。しかし、CEA の発現のない MC38 に対しては、いずれの群においても全く細胞傷害活性は認めなかった ($P > 0.05$)。このことから、マウス iPSDCs-CEA を投与し誘導された CTLs は、CEA 特異的に細胞傷害活性を示すことが証明された。

2. 皮下腫瘍モデルにおける腫瘍増殖抑制効果の検討

マウス iPSDCs-CEA を投与した群では、コントロール群と比較し、MC38-CEA に対し有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた ($P < 0.01$)。しかし、CEA の発現のない MC38 に対しては、いずれも腫瘍増殖抑制効果は認めなかった ($P > 0.05$)。iPSDCs-CEA ワクチンにより、CEA 特異的な腫瘍増殖抑制を示したことが、CEA transgenic mouse model において証明された。

【考察】

今回のわれわれの研究により、ヒト iPSDCs は、MoDCs と同等の成熟能、サイトカイン産生能、遊走能を有することが立証された。また、多くの消化器固形癌で発現している腫瘍関連抗原遺伝子である CEA 遺伝子を導入したヒト iPSDCs により誘導された CTLs は、CEA 特異的細胞傷害活性を誘導することが証明された。また、CEA transgenic mouse model において、CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs ワクチンは、CEA 特異的な CTLs の誘導が可能であり、さらに皮下腫瘍モデルを用いた検討において、CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs ワクチンは、MC38-CEA に対する腫瘍増殖抑制効果を認めた。

近年、immune check point inhibitor の登場により、癌免疫治療の有用性は明らかとなったが、それでも有効な症例は限られている。抗原特異的な抗原提示の強化による陽性の癌免疫療法の適応が必要である。われわれは、iPS 細胞は、癌免疫治療の分野において有用な材料であると考えられる。iPSDCs 癌ワクチン療法は、臨床応用されれば、癌免疫療法においてこれまでの DC ワクチン療法の問題点を克服するものと確信している。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 30 年 8 月 28 日, 29 日, 30 日に論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

樹状細胞 dendritic cells (DCs) は、T 細胞への最も効果的な抗原提示能力を担う免疫細胞である。しかしながら、担癌患者から誘導した DCs は成熟能が低く、さらに抗原提示能が低いとされる。われわれは、iPS 細胞 induced pluripotent stem cells (iPSCs) が癌免疫療法に用いる DCs を作製する材料として有用ではないかと考え、これまでマウス iPSDCs が、bone marrow-derived DCs (BMDCs) と同等の樹状細胞としての機能及び抗原提示能を有していることを報告した。本研究では、iPSDCs を消化器固形癌に対して臨床応用するべく、ヒト iPS 細胞からヒト iPSDCs の分化誘導を行い、DCs の機能に関してヒト monocyte-derived DCs (MoDCs) と比較検討した。さらに、胃癌・大腸癌に高率に発現する carcinoembryonic antigen (CEA) 遺伝子導入 iPSDCs を作成し、*in vitro* での cytotoxic T lymphocytes (CTLs) 誘導能を検討した。また、実際の *in vivo* でのワクチン効果を確認するべく、CEA transgenic mouse 大腸癌モデルを用いて CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs の抗腫瘍効果を検討した。

その結果、(1) 3 名の健常人ドナーの皮膚線維芽細胞からいずれも iPS 細胞の樹立が可能であり、分化開始後 23 日目で成熟したヒト iPSDCs が分化誘導された。このヒト iPSDCs は、MoDCs と同等の成熟能 (CD11c, CD80, CD83, CD86, CD40, HLA-ABC, HLA-DR の発現)、サイトカイン産生能 (IFN- γ , IL-12p70), 遊走能を有することを立証した。(2) また、CEA 遺伝子を導入したヒト iPSDCs により誘導された CTLs は、CEA の発現を認める仮想 target や cell line に対し CEA 特異的に細胞傷害活性を誘導することを証明した。(3) さらに、CEA transgenic mice model において、CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs ワクチンは、CEA 特異的な CTLs の誘導が可能であり、皮下腫瘍モデルを用いた検討においても、CEA 遺伝子導入マウス iPSDCs ワクチンは、CEA を発現するマウス大腸癌細胞株である MC38-CEA に対する腫瘍増殖抑制効果を認めた。これらの結果から、CEA 遺伝子導入 iPSDCs は、*in vitro* における human モデルおよび CEA transgenic mouse を用いた *in vivo* での検討でも抗腫瘍効果が証明された。

以上より、本論文の検討の結果、iPSDCs 癌ワクチン療法は、抗原特異的な抗原提示の強化による陽性の癌免疫療法として、これまでの DC ワクチン療法の問題点を克服する可能性が示唆され、学位論文として価値あるものと認められた。

学位記番号	博(医)甲第579号		
学位授与の日	平成30年11月20日		
氏名	細川 万生		
学位論文の題目	Superficial siderosis associated with duplicated dura mater detected by CISS reverse MRI (脳表ヘモジデリン沈着症と CISS 反転法を用いて検出された二重硬膜との関連)		
論文審査委員	主査	教授 川上 守	
	副査	教授 森川 吉博	教授 伊東 秀文

論文内容の要旨

【背景】

脳表ヘモジデリン沈着症 (superficial siderosis SS) はくも膜下腔への持続的あるいは反復出血により脳脊髄軟膜下や上衣下に赤血球中の鉄がヘモジデリンとして沈着し、感音性難聴、小脳失調、錐体路障害を三徴とし様々な神経徴候を呈するまれな疾患である。SS の原因としては外傷・腫瘍・血管障害 (動静脈奇形を含む) など続発性が多いが、原因不明のものも 35%程度ある。

【目的】

脳表ヘモジデリン沈着症の臨床症状と画像を検討し、本症の病態機序を解明する

【対象】

頭部 MRI にて脳表ヘモジデリン沈着症と診断された 7 例 (男性 3 名、女性 4 名、平均年齢 62.7 ± 10.7 歳)

【方法】

脳表ヘモジデリン沈着症 7 症例について画像所見、検査結果、臨床症状を検討した。そのうち 3 例に対しては硬膜修復術を行い、治療の効果判定を行った。効果判定には臨床症状、画像のほか髄液タウ、フェリチン、Fe 値の変化を比較した。

【結果】

全例で感音性難聴、小脳失調を認め、その他の症状に錐体路徴候 (4 例)、認知症状 (1 例) を認めた。5 人の患者 (Patient # 1-5) に FFC (fluid-filled collections 脳脊髄液貯留) があり、そのうちの 3 人 (Patient # 1-3) に CISS 反転画像にて硬膜欠損部位を同定した。また術中所見で同部位に硬膜欠損を認め、硬膜修復術を行った。手術後の MRI は FFC の消失を認め、髄液ではタンパク、タウ、フェリチン、Fe の低下が認められた。

【考察】

脳表ヘモジデリン沈着症は原因の 65%は外傷・腫瘍・血管障害 (動静脈奇形含む) などの続発性であるが、35%は原因不明である。ヘモジデリン沈着およびフリーラジカルの神経組織への連続的な曝露は、不可逆性および進行性の神経障害をもたらす。またヘモグロビンやヘモジデリンに含まれる鉄が、フリーラジカルにより酸化する。酸化ストレスにより鉄イオンが増加することで神経変性が進み、鉄蓄積による酸化ストレスは二次的にタウのリン酸化を招くといわれている。近年、本疾患の原因として硬膜異常が注目されており、FFC の存在が、脳表ヘモジデリン沈着症の病態に寄与する可能性があると考えられている。髄液は硬膜孔を介して FFC とくも膜下腔との間を交通するため、FFC は硬膜欠損部の存在を示唆している。硬膜欠損の原因は外傷および椎間板ヘルニアが主要な原因であるが特発性も多い。硬膜は線維芽細胞と多量のコラーゲンで構成されている。Dural border cell 層は線維芽細胞のみで構成され、細胞内コラーゲンを伴わない。したがってくも膜と硬膜の間に「硬膜下腔」

が形成される可能性がある。硬膜の表面に小さな裂け目が形成されると、髄液は内腔の空間に流れ込み、髄液が充填され FFC になると考える。CISS 反転 MRI により、FFC が硬膜に取り囲まれていることを示した。くも膜下腔の外側に 2 つの硬膜層があり、外層は FFC と硬膜外腔を分離し、内層は FFC とくも膜下腔を分離している。これらの 2 つの層は 1 つの硬膜になり、神経根の周囲の神経鞘となる。出血の原因として、以下のように推測する。Monro-Kellie 仮説によれば、頭蓋内の容積は一定で、脳+髄液+血液=一定である。FFC への髄液移行は、血液量の増加を起し、その結果脊髄静脈が拡大する。FFC とくも膜下腔との間の髄液の流れにより生じる圧格差により硬膜欠陥部に隣接している脆弱血管からの微小出血を誘発する可能性がある。患者 7 例のうち 5 例にて特発性の脳脊髄液貯留 (FFC) を認めた。うち 3 例では CISS 反転画像撮影にて硬膜欠損部位が同定でき、術中所見にて同部位の硬膜欠損が確認した。硬膜欠損閉鎖術後 FFC の消失を認め、髄液中のリン酸化タウ、フェリチンの減少がみられた。臨床症状の改善は明らかではなかったが、症状の進行は停止した。出血部位が明らかでない場合は止血剤やキレート剤投与など様々な治療がなされているが効果は一定しない。硬膜欠損閉鎖術により頭痛や歩行の改善等、症状の改善を認めた例や症状が改善しなくても進行は停止している例も多く、手術による治療の効果は期待できる。症状が進行し神経変性が進んだ状態では改善が困難であり、硬膜破綻部位を CISS 反転法で同定することは SS の早期治療を行う上で重要である。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 30 年 10 月 23 日、30 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。脳表へモジデリン沈着症 (superficial siderosis SS) はくも膜下腔への持続的あるいは反復出血により脳脊髄軟膜下や上衣下に赤血球中の鉄がへモジデリンとして沈着し、感音性難聴、小脳失調、錐体路障害を三徴とし様々な神経徴候を呈する疾患である。特発性の SS で脳脊髄液貯留 (fluid-filled collections FFC) を認めるものがあり、FFC は硬膜欠損の存在を示唆している。硬膜欠損の閉鎖は SS の有効な治療法であるが、従来の MRI では、硬膜欠損を十分に検出することができない。硬膜欠損の確実な検出のため 7 例の SS 患者に対して CISS (constructive interference in steady-state) 反転 MRI を実施し、臨床症状、画像所見、検査結果画像を検討した。

全例で感音性難聴、小脳失調を認め、その他の症状として錐体路徴候、認知症状を認めた。5 人の患者に FFC があり、そのうちの 3 人で CISS 反転 MRI にて硬膜欠損部位が同定でき、硬膜欠損閉鎖術を行った。術中所見で同部位に硬膜欠損を認めた。手術後の MRI では FFC の消失を認め、髄液所見中高値であった鉄、リン酸化タウも術後に改善した。臨床症状の改善は明らかではなかったが、症状の進行は停止した。

さらに CISS 反転 MRI 画像を詳細に検討したところ、FFC が硬膜に取り囲まれていることが判明した。硬膜の最内層にある Dural border cell 層は、コラーゲンを伴わないため構造上脆弱である。何らかの原因で硬膜に小さな裂け目が形成されると、髄液が硬膜内に流入し、FFC が形成されると推測した。また SS を引き起こす出血の原因を Monro-Kellie 仮説から推測した。FFC とくも膜下腔との間の髄液の流れによって圧格差が生じ、FFC への髄液移行に伴う脳や脊髄の血液量の増加が、脊髄静脈を拡大させ、脆弱血管からの微小出血を誘発し、SS が発症する可能性があると考えた。

SS 患者において手術による治療効果が期待できるため、硬膜欠損部位を CISS 反転 MRI で同定することは SS の早期治療を行う上で重要である。

以上より本論文は脳表へモジデリン沈着症の早期治療を行なう上で、CISS 反転 MRI が FFC ならびに硬膜欠損部位の同定に有用であることを示しており、学位論文として価値があるものとして認めた。

学位記番号	博(医)甲第 580 号		
学位授与の日	平成 31 年 1 月 15 日		
氏名	溝口 美佳		
学位論文の題目	Prevention of lipopolysaccharide-induced preterm labor by the lack of CX3CL1-CX3CR1 interaction in mice. (CX3CL1-CX3CR1 システムの欠損によりマウスで LPS 誘導早産を予防することができる)		
論文審査委員	主査	教授 改正 恒康	
	副査	教授 近藤 稔和	教授 井筒 一彦

論文内容の要旨

【緒言】

わが国の早産の頻度は約 5%であるものの、2005 年以降低下を認めていない。早期早産児の死亡率は未だに高く、周産期死亡の大きな原因である。早産児の長期予後には、脳質周囲白質軟化症、未熟児網膜症、壊死性腸炎等さまざまな問題が指摘され、これらの児の予後を改善するためには、早産そのものを減少させることが重要である。現在の早産治療の中心である子宮収縮抑制剤は分娩を延長させるという十分なエビデンスに乏しく、使用において塩酸リトドリンによる肺水腫や無顆粒球症、硫酸マグネシウムによる呼吸筋麻痺など重篤な副作用に留意しなければならない。また長期間の使用においては、心不全、呼吸障害、筋緊張低下、腸管麻痺及び腸閉塞が新生児に生じる可能性があり出生後の新生児管理にも影響を及ぼす。したがって、早産に対するさらなる病態解明と新規治療法の開発が必須である。

分娩の機序において、子宮収縮に先立って脱落膜、羊膜、子宮頸管など妊娠組織に好中球やマクロファージを主体とする炎症細胞が浸潤することは知られている。ケモカインは細胞に対して走化性を有するサイトカインの総称であり、前述のような炎症細胞の浸潤を制御している。すなわち、分娩に先立つ妊娠組織への炎症細胞浸潤を抑制することは早産の抑制につながると考えられる。ケモカインの中でも、CXCL8 及び CCL2 は分娩中のヒト子宮筋、脱落膜、羊膜及び頸管に発現している。さらにその他のケモカインも早産を含む分娩中の妊娠組織、羊水及び母体血中に発現していることは報告されているが、その役割は十分に解明されていない。単球・マクロファージに強発現しているケモカインレセプター CX3CR1 及びそのリガンドである CX3CL1 (Fractalkine) は妊娠高血圧腎症と妊娠糖尿病で血中濃度が高値を示すという報告はあるが、早産との関与についての報告は全く認めない。そこで、本研究では CX3CR1 ノックアウト (KO) マウスを用いて LPS 誘導早産における CX3CL1 (Fractalkine)-CX3CR1 システムの役割について検討した。

【方法】

1. 妊娠過程における CX3CL1 の発現

倫理委員会の承認を得て、当院で分娩した妊婦から血液を採取し血清を分離した。①早産群、②正常産帝王切開群、③正常産陣痛発来群及び④早産群と同妊娠週数で採血し最終的に正常分娩となった群の 4 群に分け、ELISA を用いて CX3CL1 を測定し、比較・検討した。マウスでも各妊娠日齢と LPS 投与 6 時間後に採血を行い、血中 CX3CL1 を比較・検討した。また早産症例の胎盤において CX3CL1 の免疫組織化学染色を行った。

2. LPS 誘導早産マウスモデルの確立と早産率の比較

同遺伝子型マウスで交配し、vaginal plug の同日を gestational day (gd) 0.5 と決定した。gd15.5 に LPS25 μ g を腹腔内投与し、分娩まで観察し早産率を野生型 C57BL/6 (WT) と KO マウスで比較した。

3. 脱落膜における炎症細胞浸潤の検討

WT 及び KO マウスで LPS 投与 6 時間後に羊膜、胎盤、子宮、羊水及び血清を採取した。各組織において抗 MPO 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD3 抗体及び抗 pan-NK 細胞抗体を用いて免疫組織化学染色を行い遊走免疫細胞数の比較検討を WT と KO マウスで行った。また蛍光二重免疫染色を行い、CX3CR1 陽性細胞とマクロファージのサブセット (M1/M2 マクロファージ) を同定した。

4. 妊娠子宮における炎症性サイトカイン及びケモカインの遺伝子発現の比較

RT-PCR を用いて脱落膜を含む子宮における炎症性サイトカイン及びケモカイン等の遺伝子発現を比較した。蛍光二重免疫染色も行い脱落膜における炎症性サイトカインの産生細胞を同定した。

5. 腹腔内マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現

WT マウスの腹腔内にチオグリコレートを投与して、3 日後にマクロファージを単離した。

単離したマクロファージを CX3CL1 (0, 0.1, 1, 10, 100ng/ml) と培養した後、RT-PCR にて炎症性サイトカインの発現を検討した。

6. 抗 CX3CL1 抗体の治療効果の検討

妊娠 15.5 日目の WT マウスに LPS 投与した 3 時間後に治療群は抗 CX3CL1 中和抗体 200 μ g、非治療群にはコントロールマウス IgG を腹腔内投与し分娩まで観察し治療群と非治療群で早産率を比較した。

【結果】

1. 早産での CX3CL1 の発現

早産妊婦では他群と比較して血中 CX3CL1 が有意に上昇していた。マウス血中 CX3CL1 は妊娠日齢の推移では有意な変化は認めなかったが、LPS 投与により有意に上昇した。早産症例の胎盤の免疫組織化学染色より羊膜上皮細胞と絨毛の合胞体栄養膜細胞に CX3CL1 の発現を認めた。これらのことから早産における CX3CL1 の関与が示唆された。

2. LPS 誘導早産率の比較

gd15.5 に LPS を投与された WT マウスは 24 時間以内に分娩となり、KO マウスでは WT マウスと比較して、有意に早産が抑制されていた (WT85.7 (7/8) %, KO12.5 (1/8) % $P=0.017$)。

3. 脱落膜における炎症細胞浸潤の検討

妊娠 WT マウスにおいて好中球、マクロファージ及び T 細胞は LPS 投与により脱落膜への炎症細胞浸潤を認めた。NK 細胞は LPS を投与しても脱落膜の細胞数はほとんど変化しなかった。WT と KO マウスの比較では、脱落膜へのマクロファージの遊走は KO マウスで有意に抑制されていた。好中球及び T 細胞も KO マウスで細胞浸潤の抑制傾向は認めるも有意差は認められなかった。LPS 投与後の脱落膜において、CX3CR1 陽性細胞の遊走を認め、蛍光二重免疫染色より CX3CR1 陽性細胞は M1 マクロファージであることが同定された。

4. 子宮における炎症性サイトカイン及びケモカインの遺伝子発現の比較

脱落膜を含む子宮における RT-PCR では *Il1b*, *Il6*, *Il10*, *Tnfa*, *Ifng*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Nos2*, *Ptgs2* の遺伝子発現が KO マウスで有意に抑制されていた。蛍光二重免疫染色では脱落膜マクロファージより上記サイトカインが分泌されていることが同定された。

5. 腹腔内マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現

腹腔内マクロファージに CX3CL1 を添加したところ、容量依存的に炎症性サイトカインを産生した。

6. 抗 CX3CL1 中和抗体の治療効果の検討

抗 CX3CL1 中和抗体の投与により早産率が約 50%減少した (無治療群 87.5 (7/8) %, 治療群 37.5 (3/8) % $P=0.039$)。

【考察・結語】

LPS 誘導早産において CX3CL1-CX3CR1 システムが脱落膜へのマクロファージの遊走に関与し、早産を惹起するメカニズムを解明した。LPS 誘導早産マウスモデルにおいて抗 CX3CL1 中和抗体が治療効果を示し、CX3CL1-CX3CR1 システムが新規標的治療の候補分子になる可能性が示唆された。抗 CX3CL1 中和抗体の関節リウマチ及びクローン病での臨床試験はすでに日本でも開始されており、早産に対しても CX3CL1-CX3CR1 システムをターゲットとする新たな治療戦略が期待される。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成30年12月27日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文についての審査を行った。早産は周産期死亡及び脳質周囲白質軟化症など合併症の原因であり、早産児の予後を改善するためには、早産そのものを減少させることが重要である。しかし、早産治療の中心である子宮収縮抑制薬は分娩を延長させるという十分なエビデンスに乏しく新規治療法の開発が必須である。分娩において、妊娠組織に好中球やマクロファージを主体とする炎症細胞が浸潤することが知られている。本研究では、炎症細胞浸潤を制御するケモカインを抑制することが早産の抑制につながると考え、ケモカインレセプターのひとつであるCX3CR1のノックアウト (KO) マウスを用い、LPS誘導早産におけるCX3CL1 (Fractalkine)-CX3CR1システムの役割について検討した。

- ① 当院で分娩した妊婦の血清を、1) 早産期コントロール群 (preterm cont)、2) 正期産帝王切開群 (TNL)、3) 正期産陣痛発来群 (TIL)、4) 早産群 (PTL) の4群に分け、ELISAを用いてCX3CL1を測定し比較・検討した。早産群において有意にCX3CL1の上昇を認めた。
- ② 同遺伝子型マウスで交配させ、gestational day (gd) 15.5 に LPS25 μ g を腹腔内投与する早産モデルを確立した。野生型 C57BL/6 (WT) と KO マウスで早産率、妊娠組織での遊走免疫細胞数、炎症性サイトカインの発現を比較した。早産率はWT 85.7 (7/8) %、KO 12.5 (1/8) % と KO マウスで有意に早産が抑制されていた。遊走免疫細胞数は、子宮へのマクロファージの遊走が KO マウスで有意に抑制されており、蛍光二重免疫染色より CX3CR1 陽性細胞はマクロファージであることが同定された。子宮における RT-PCR では *I11b*, *I16*, *Tnfa*, *Ptgs2* の遺伝子発現が KO マウスで有意に抑制されており、蛍光二重免疫染色より子宮に浸潤したマクロファージから炎症性サイトカイン及び COX-2 が分泌されていることが同定された。
- ③ 治療群にはLPSを投与した3時間後に抗CX3CL1中和抗体200 μ g、非治療群にはコントロールIgGを腹腔内投与し治療群と非治療群で早産率を比較した。早産率は治療群 85.7 (7/8) %、未治療群 37.5 (3/8) % と抗CX3CL1中和抗体の投与が有意に早産率を抑制した。
- ④ WTマウスの腹腔内からマクロファージを単離し、CX3CL1 (0, 0.1, 1, 10ng/ml) と培養しRT-PCRで炎症性サイトカインの発現を検討した。容量依存的に *I11b*, *I16*, *Tnfa*, *Ptgs2* の遺伝子発現が増強し、CX3CL1により炎症性サイトカインの産生が調節されていることが同定された。

CX3CL1-CX3CR1 システムは子宮へのマクロファージの遊走に関与し、そのマクロファージからの炎症性サイトカインの産生を促進し早産を惹起するメカニズムを解明した。CX3CR1 のノックアウト及び抗 CX3CL1 中和抗体が早産を抑制したことから、CX3CL1-CX3CR1 システムが新規標的治療の候補分子になる可能性が示唆され、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第581号		
学位授与の日	平成31年3月5日		
氏名	八幡 環		
学位論文の題目	PD-L1 disruption by CRISPR/Cas9-genome editing promotes antitumor immunity and suppresses ovarian cancer progression (CRISPR/Cas9 ゲノム編集による PD-L1 欠損は抗腫瘍免疫を促進し、 卵巣癌の進展を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授	山上 裕機
	副査	教授	村垣 泰光
		教授	井筒 一彦

論文内容の要旨

【緒言】

卵巣癌はその半数以上が初回手術時に腹膜播種を伴う進行症例である。進行症例に対する治療は腫瘍減量手術と化学療法が主となるが、長期予後は不良であり、予後改善のためには新規標的治療の確立が必要である。免疫システムは癌を制御する上で重要な役割を果たすが、腫瘍は複数の機序により宿主の免疫監視から逃避できることが知られている。この免疫寛容システムの存在が従来の免疫療法の効果が不十分な原因と考えられており、化学療法や免疫療法の有効性を高めるには、腫瘍免疫系を活性化すると同時に、腫瘍自身の誘導する免疫寛容システムの打破が必須である。近年、免疫チェックポイント分子のひとつである Programmed cell death ligand 1 (PD-L1)/ Programmed cell death 1 (PD-1)経路により腫瘍細胞上の PD-L1 が T 細胞上の PD-1 と結合することで、T 細胞活性を抑制し、この共抑制シグナルが腫瘍免疫寛容にとって重要な構成要素のひとつであることが明らかとなり、これらをターゲットとする標的治療や抗体療法が脚光を浴びている。これまで、卵巣癌細胞の PD-L1 を shRNA で抑制することで、T 細胞活性が促進され、腫瘍増殖が抑制されたという報告があるが、卵巣癌進展における PD-L1 の機能的役割は十分に解明されていない。加えて、shRNA を用いた遺伝子制御では PD-L1 の機能を十分に実証できていない可能性がある。本研究では、それらを克服するための新たなゲノム編集技術である Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9) system を用いて、PD-L1 遺伝子欠損マウス卵巣癌細胞株を作製し、卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、癌微小環境下における癌細胞由来の PD-L1 の分子病理学的役割を検討した。

【目的】

卵巣癌進展における腫瘍細胞上の PD-L1 の機能的役割を解明する。

【方法】

1. PD-L1 遺伝子組み換えマウス卵巣癌細胞の作製

PD-L1 遺伝子改変細胞作製用ベクターを構築し、マウス卵巣癌細胞株である ID8 にトランスフェクトし、PD-L1 欠損細胞株 (PD-L1-KO ID8)を樹立した。そして control vector を導入した細胞株 (Control ID8)と比較し、蛋白レベルでの PD-L1 の発現を確認した。また PD-L1 遺伝子標的領域における遺伝子変異を評価した。さらに In vitro における腫瘍増殖能および遊走能を比較検討した。

2. マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける腫瘍進展の比較

PD-L1-KO ID8 および Control ID8 (2.5×10^6 cells/mouse)を C57BL/6 マウスに腹腔内移植後、腫瘍増殖能と生存期間を比較検討した。

3. 腫瘍微小環境下の腫瘍浸潤リンパ球数およびサイトカイン・ケモカイン発現の比較

得られた腫瘍組織の免疫組織化学的染色を行い、腫瘍浸潤リンパ球数を PD-L1-KO ID8 移植マウス

と Control ID8 移植マウスで比較した。また蛍光二重免疫染色を行い、腫瘍内のマクロファージのサブセット (M1/M2) を比較した。さらに腫瘍組織から mRNA を抽出後、real time RT-PCR を行い、サイトカイン・ケモカインの発現を比較検討した。

【結果】

1. PD-L1 遺伝子組み換えマウス卵巣癌細胞の作製

PD-L1-KO ID8 においてタンパクレベルでの PD-L1 の発現を認めなかった。また PD-L1 遺伝子の標的領域において両アレルでの遺伝子変異を認めた。さらに In vitro における PD-L1-KO ID8 の腫瘍増殖能および遊走能は Control ID8 と比較して、有意差を認めなかった。

2. マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおける腫瘍進展の比較

PD-L1-KO ID8 移植マウスは Control ID8 移植マウスと比較して、生存期間は有意に延長した。加えて、PD-L1-KO ID8 移植マウスにおいて、腹腔内移植後 70 日目の播種腫瘍重量、腹水量は Control ID8 移植マウスと比べて有意に減少した。

3. 腫瘍微小環境下の腫瘍浸潤リンパ球数およびサイトカイン・ケモカイン発現の比較

免疫組織化学的染色において、PD-L1-KO ID8 移植マウスでは Control ID8 移植マウスと比較して、腫瘍内の CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞および NK 細胞の数は有意に増加し、一方で Treg 細胞の数は有意に減少していた。また蛍光二重免疫染色において、PD-L1-KO ID8 移植マウスの腫瘍内では M2 マクロファージと比べて M1 マクロファージが有意に増加していた。さらに PD-L1-KO ID8 移植マウスでは Control ID8 移植マウスと比較して、腫瘍内の IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12a、CXCL9、CXCL10 の mRNA 発現は有意に増加し、IL-10、CXCL1、CXCL2 の mRNA の発現は有意に減少していた。

【考察・結語】

CRISPR/Cas9 system を介したゲノム編集技術を用いて、腫瘍細胞上の PD-L1 遺伝子を欠損させることで、腫瘍微小環境において、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、NK 細胞、および M1 マクロファージが増加し、一方で、Treg 細胞、および M2 マクロファージが減少し、さらに、種々のサイトカイン、ケモカインが調節されることで、抗腫瘍免疫が促進され、腫瘍増殖が抑制されることが示された。これらの結果は、CRISPR/Cas9 system を用いた PD-L1 遺伝子を標的とする治療が、卵巣癌の新たな治療戦略となり得る可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 31 年 2 月 22 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

癌の増殖進展には、腫瘍微小環境内の癌細胞が特異的に誘導する免疫寛容システムが必須であり、この機構の存在が従来の免疫療法の効果が不十分な原因と考えられている。近年、免疫チェックポイント分子の 1 つである Programmed cell death ligand 1 (PD-L1)/Programmed cell death 1 (PD-1) 経路による共抑制シグナルが腫瘍免疫寛容にとって重要な構成要素であることが明らかとなり、これらを標的とする治療が脚光を浴びているが、卵巣癌における詳細な機能は明らかではない。本論文では、ゲノム編集技術である Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9 (CRISPR/Cas9) system を用いて、卵巣癌細胞の PD-L1 遺伝子を欠損させ、マウス卵巣癌腹膜播種モデルにおいて、卵巣癌進展における腫瘍細胞上の PD-L1 の機能的役割を解明した。はじめに CRISPR/Cas9 system を用いて、マウス卵巣癌細胞株である ID8 の PD-L1 遺伝子欠損細胞株 (PD-L1-KO ID8) を樹立し、実験に用いた。PD-L1-KO ID8 および Control ID8 を C57BL/6 マウスに腹腔内移植後、腫瘍増殖能と生存期間を比較検討したところ、PD-L1-KO ID8 移植マウスは Control ID8 移植マウスと比較して、生存期間が有意に延長した。加えて、PD-L1-KO ID8 移植マウスは Control ID8 移植マウスと比較して、腹腔内移植後 70 日目の播種腫瘍重量、および腹水量が有

意に減少した。また免疫組織化学的検討では、PD-L1-KO ID8 移植マウスにおいて、Control ID8 移植マウスと比べて、腫瘍内の CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、NK 細胞、および M1 マクロファージの数は有意に増加し、一方で Foxp3⁺ Treg 細胞、M2 マクロファージの数は有意に減少していた。さらに PD-L1-KO ID8 移植マウスでは Control ID8 移植マウスと比較して、腫瘍内の IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12a、CXCL9、CXCL10 の mRNA 発現は有意に増加し、IL-10、CXCL1、CXCL2 の mRNA の発現は有意に減少していた。本研究において、CRISPR/Cas9 system を介したゲノム編集技術を用いて、腫瘍細胞上の PD-L1 遺伝子を完全に欠損させることで、腫瘍微小環境において、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、NK 細胞、および M1 マクロファージが増加し、一方で、Treg 細胞が減少し、さらに、種々のサイトカイン・ケモカインが調節されることで、抗腫瘍免疫が促進され、腫瘍増殖が抑制されることが示された。これらの結果は、卵巣癌における PD-L1 の機能的役割を解明すると共に、PD-L1 を標的とする治療が、卵巣癌の新たな治療戦略となり得る可能性が示唆され、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第582号		
学位授与の日	平成31年3月15日		
氏名	岩下 裕子		
学位論文の題目	Dietary changes involving <i>Bifidobacterium longum</i> and other nutrients delays CKD progression. (慢性腎臓病モデルラットにおいて、グルタミン、食物繊維、オリゴ糖、ビフィズス菌の投与が腎障害の進行を遅らせる)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 藤井 隆夫	教授 重松 隆

論文内容の要旨

【緒言】

慢性腎臓病 (CKD : chronic kidney disease) は日本で成人の8人に1人が発症していると推定される国民病である。CKD は心血管イベントの危険因子であり、CKD 進行を抑制する新しい治療の確立は社会的急務である。近年、腸内細菌叢が様々な病態に関与していることが明らかになり、腎臓病との関連も報告されている。プロバイオティクスやプレバイオティクス、シンバイオティクスで腸内環境を是正することが新しい治療になると期待されている。プロバイオティクスとは人体により影響を与える腸内細菌、またそれらを含む製品や食品のことで、プレバイオティクスは生体に有益な腸内細菌叢の増殖を促進させる作用を持つ難消化性食品成分 (食物繊維など) を指し、シンバイオティクスは両者を投与することである。今回我々は、ラットの CKD モデルを用いて、シンバイオティクスが腸内環境を変え、腎機能を改善するかを調べた。さらに、腸管で多く産生される尿毒素と CKD に伴う骨・ミネラル代謝異常 (CKD-MBD : CKD-related mineral and bone disorder) との関連が報告されているため、シンバイオティクスと二次性副甲状腺機能亢進症に関連があるかを検討した。

【方法】

7週齢の雄SDラットを使用した。CKDモデルとして5/6腎摘ラット (Nx) (n=20)、コントロールとして偽手術ラット (sham) (n=10) を用いた。高リン (1.4%) に調整したマウス・ラット標準精製飼料 (AIN-93G) にグルタミン、食物繊維、オリゴ糖 (GFO®)、1% *Bifidobacterium longum* (BB536®) を添加した食事を GFOB 食、添加していない食事をコントロール (CON) 食とした。ラットを Nx GFOB (n=10)、Nx CON (n=10)、sham GFOB (n=5)、sham CON (n=5) の4群に分けた。1~2週毎に血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre) を測定、8週間後に採血、採便後に解剖し、生化学検査、組織学検査、腸内細菌叢の解析を行った。

【結果】

1) 腎機能への効果

Nx GFOB 群では、BUN、Cre が Nx CON 群より有意に低値であった。

2) 組織学検査

尿細管間質障害は Nx の有無、GFOB 食の有無において有意に障害の軽減が認められた。

3) インドキシル硫酸と Cre の関連

インドキシル硫酸は Cre と正の相関関係にあり、Nx GFOB 群では、インドキシル硫酸が Nx CON 群より低い傾向が認められた。

4) 腸内細菌叢の解析

Bifidobacterium、*Ruminococcus* は Nx CON 群と比較して Nx GFOB 群で有意に増加した。*Clostridium*、*Turicibacter* は sham CON 群と比較して Nx CON 群で有意に増加し、Nx CON 群と比較して Nx GFOB 群で有意に減少した。

5) 血清リン (Pi) と副甲状腺ホルモン (iPTH)

Nx GFOB 群では、Pi と iPTH が Nx CON 群より有意に低値であった。

【考察】

腸内環境を改善することで、腸管由来の尿毒素が減少し、腎機能が改善することがヒトや動物実験でこれまでに報告されているが、腸内細菌叢と腎臓病の関連についてはまだ完全には解明されていない。今回 CKD モデルとして 5/6 腎摘ラットを用い、シンバイオティクス (GFOB 食) の効果を検討し、インドキシル硫酸の減少、腎機能改善が示された。また組織学検査より、尿細管間質障害の改善に由来することが示唆された。尿毒症は腸内細菌叢を変化させること、また腸内環境改善により Pi が低下することが報告されている。今回の実験で採取された便においても腸内細菌叢の変化が確認でき、また GFOB 介入食で Pi、iPTH が低下することが分かった。腸内環境が改善すると大腸細胞の栄養源となる短鎖脂肪酸を産生する細菌が増え、腸管内 pH が低下する。それを受けて腸管内のイオン化 Ca が増加し、Pi と結合して排泄され結果的に Pi が低下すると考えられている。Pi が低下したことにより今回 iPTH も低下したと考えられ、腸管環境を改善する治療が二次性副甲状腺機能亢進症の治療の選択肢の一つになると考えられた。ビタミン D 製剤、リン吸着薬、カルシウム受容体作動薬が、二次性副甲状腺機能亢進症の治療として広く利用されているが、多くの副作用を抱えている。今回の実験結果より、シンバイオティクスによる腸内環境改善が、腎機能低下進行及び二次性副甲状腺機能亢進症改善につながることを示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成30年6月1日及び6月4日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。近年、腸内細菌叢が様々な病態に関与していることが明らかになり、腎臓病との関連も報告されている。腸内環境を是正することが新しい治療になると期待されている。プロバイオティクスとは人体によい影響を与える腸内細菌、プレバイオティクスは生体に有益な腸内細菌の増殖を促進させる作用を持つ難消化性食品成分 (食物繊維など) を指し、シンバイオティクスは両者を投与することである。今回我々はCKDモデルラットを用いて、シンバイオティクスが腸内環境を変え、腎機能を改善するかを調べた。さらに、腸管で多く産生される尿毒素とCKDに伴う骨・ミネラル代謝異常との関連が報告されているため、シンバイオティクスと二次性副甲状腺機能亢進症に関連があるかを検討した。7週齢の雄SDラットにおいて、5/6腎摘 (Nx) (n=20)、偽手術 (sham) (n=10) ラットを用意した。高リン (1.4%) に調整した標準精製飼料 (AIN-93G) にグルタミン、食物繊維、オリゴ糖 (GFO®)、1% *Bifidobacterium longum* (BB536®) を添加した食事をGFOB食、添加していない食事をコントロール (CON) 食とした。ラットをNx GFOB (n=10)、Nx CON (n=10)、sham GFOB (n=5)、sham CON (n=5) の4群に分け、8週間食事介入した。1~2週毎に血中尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre) を測定、8週間後に採血、採便後に解剖し、生化学検査、組織学検査、腸内細菌叢の解析を行った。結果は、Nx GFOB群では、BUN、CreがNx CON群より有意に低値であった。尿細管間質障害はNxの有無、GFOB食の有無において有意に障害の軽減が認められた。インドキシル硫酸はCreと相関関係にあり、Nx GFOB群では、インドキシル硫酸がNx CON群より低い傾向が認められた。*Bifidobacterium*、*Ruminococcus*はNx CON群と比較してNx GFOB群で有意に増加した。*Clostridium*、*Turicibacter*はsham CON群と比較してNx CON群で有意に増加し、Nx CON群と比較してNx GFOB群で有意に減少した。

Nx GFOB 群では、Pi と iPTH が Nx CON 群より有意に低値であった。シンバイオティクス (GFOB 食) 介入により、インドキシル硫酸の減少、腎機能改善が示された。また組織学検査より、尿細管間質障害の改善に由来することが示唆された。尿毒症は腸内細菌叢を変化させること、また腸内環境改善により Pi が低下することがこれまでに報告されている。今回の実験で採取された便においても腸内細菌叢の変化が確認でき、また GFOB 食介入で Pi、iPTH が低下することが分かった。腸内環境が改善すると大腸細胞の栄養源となる短鎖脂肪酸を産生する細菌が増え、腸管内 pH が低下する。それを受けて腸管内のイオン化 Ca が増加し、Pi と結合して排泄され結果的に Pi が低下すると考えられている。Pi が低下したことにより今回 iPTH も低下したと考えられ、腸管環境を改善することが二次性副甲

腺機能亢進症の治療の選択肢の一つになると考えられた。本論文は、シンバイオティクスによる腸内環境改善が、腎機能障害進行の遅延並びに二次性副甲状腺機能亢進症の改善につながることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第583号		
学位授与の日	平成31年3月15日		
氏名	浦木 進丞		
学位論文の題目	Reduced expression of mismatch repair genes MSH6/MSH2 directly promotes pituitary tumor growth via the ATR-Chk1 pathway. (ミスマッチ修復遺伝子 MSH6,MSH2 発現低下は細胞周期調節機構 ATR-Chk1 経路を介して直接的に下垂体腫瘍増殖を促進する)		
論文審査委員	主査	教授 伊東 秀文	
	副査	教授 中尾 直之	教授 赤水 尚史

論文内容の要旨

【背景】

下垂体腺腫(PA)の増殖機序は不明な点が多い。DNA ミスマッチ修復(MMR)遺伝子は、DNA 複製時などに生じる塩基の誤対合や誤挿入などを校正する DNA 修復機構に関与する。また、ゲノム中には microsatellite(MS)と呼ばれる 1~6 塩基対の繰り返し配列が存在する。この部位は複製エラーに対する感受性が高く、MMR 機構の異常により遺伝子変異が起こりやすいとされている(microsatellite instability:MSI)。この MMR 遺伝子の生殖細胞系列変異によって MMR 機構に異常が生じると、種々の遺伝子変異が蓄積し若年性に大腸癌をはじめとした様々な腫瘍が高頻度に発生する。この疾患群は Lynch 症候群と呼ばれている。

これまで Lynch 症候群と下垂体腫瘍の関連の報告はなかったが、我々は、MMR 遺伝子の生殖細胞系列変異 (MLH1 遺伝子変異) を有する Lynch 症候群患者に発生した浸潤性 PA を経験した。一般的に PA の腫瘍体積倍化時間(TVDT)が 3~5 年程度と報告されているが(Tanaka Y, et al. J Neurosurg 2003)、この PA の TVDT は約 2 ヶ月と非常に高い増殖能を有していた。我々は、この浸潤性 PA が Lynch 症候群に関連しているのかという点に関して遺伝子・免疫組織学的解析により解明することとした。

その結果、PA では体細胞レベルで下垂体腫瘍発生に関与する MEN1 遺伝子変異 (p.Arg516ProfsX15)、ならびに MMR 遺伝子 MLH1 に加え他の MMR 遺伝子(MSH6)の変異 (p.Phe1088LeufsX5)が MS 領域で認められた。また、免疫組織学的解析では遺伝子解析の結果を反映して腫瘍部分での MEN1 遺伝子のコード蛋白の Menin、ならびに MMR 蛋白の MLH1、MSH6 の発現低下を認めた。以上のように、Lynch 症候群に関連して下垂体腫瘍が発生することを初めて示した(Endocr J. 2017 30:64(9):895-906.)。近年、MLH1 や MSH6 などの MMR 遺伝子は、浸潤性 PA・下垂体癌の発生(Bengtsson D, et al. JCEM 2017, Hirohata T, et al. JCEM 2013)、膵内分泌腫瘍に対する薬剤反応性(Mei M, et al. JCEM 2009)、副腎癌の発生(Challis BG, et al. JCEM 2016)など神経内分泌腫瘍への関与が示唆されている。これらの知見をふまえ、MMR 遺伝子が直接下垂体腫瘍増殖に関与しているのではないかとする仮説に至った。

【目的】

本研究では、PA の増大機序を明らかにする為に 8 種の MMR 遺伝子 (MSH6,MSH2,MLH1,PMS2,MLH3,MSH3,PMS1,EPCAM)と PA の増殖の関わりを検討した。

【対象】

2013年9月~2016年9月に当院で得られた PA 摘出組織 47 例、ならびに 2016年2月~9月に虎の門病院で得られた PA 摘出組織 46 例を対象とした。

【方法】

<ヒト PA 組織を用いた検討>

① MMR 遺伝子・蛋白の発現量と臨床計測値の相関解析

MMR 遺伝子(MLH1, MSH6, MSH2, PMS2, MLH3, MSH3, PMS1, EPCAM)の発現量を Real-time PCR で定量(GAPDH で補正)。定量値と術前腫瘍体積, knosp grade, MIB-1 LI, また術後 2 時点に撮影した MRI より算出できる TVDT との相関を単相関解析した(上記当院のみのサンプルで解析)。また、有意相関が得られた MMR 遺伝子に関してはコードする蛋白発現量を免疫組織化学染色で算出し相関を解析した。

② MMR 遺伝子と細胞周期調節因子の検討

次に、HeLa 細胞を用いた過去の検討によると、MSH2/MSH6 遺伝子蛋白質の複合体である MutSa は DNA damage に対し sensor として働き、細胞周期調節機構における ATR-Chk1 経路の活性化すると報告されている(Yoshioka K, et al. Mol Cell. 2006)。そこで ATR 遺伝子発現量を Real-time PCR で定量(GAPDH で補正)し、検討①で有意な結果を得た MMR 遺伝子発現量との相関を単相関解析した(上記当院と虎の門病院のサンプルで解析)。

<下垂体培養細胞系 AtT-20ins を用いた検討>

③ 下垂体腫瘍培養細胞系 AtT-20ins を用いた MMR 遺伝子発現量と細胞増殖能の検討

AtT-20ins において上記検討①,②で有意な結果を得た MMR 遺伝子に関して siRNA(QIAGEN)を用いて各遺伝子発現量を低下させた場合の細胞増殖能を確認(Cell Counting Kit-8, Dojindo, Rockville, MD を使用)した。また、ATR 遺伝子に関しても siRNA(QIAGEN)を用いて遺伝子発現量を低下させた場合の細胞増殖能を確認し、さらにその時の MMR 遺伝子発現量の変化を検討した。

<ヒト PA 初代培養を用いた検討>

④ ヒト PA 初代培養を用いた MSH6 発現量と細胞増殖能の検討

既報(Yagnik G, et al. Mol Cell Endocrinol 2017)に従い 2 例のヒト非機能性 PA 初代培養を行い、siRNA で MSH6 遺伝子発現量を低下させた場合の ATR 遺伝子発現量と細胞増殖能の変化について検討した。

【結果】

1. ヒト PA の MSH6, MSH2 遺伝子・蛋白発現量は腫瘍体積倍加時間(TVDT)と有意な正相関を示す

MMR 遺伝子の発現量を Real-time PCR で定量、術後 2 時点の MRI より算出したヒト PA 31 例の TVDT との相関を解析した。TVDT と MSH6, MSH2 遺伝子発現量との単相関解析で、有意な正相関を認め(n=31, 各 R=0.52, P=0.003, および R=0.44, P=0.01)、MSH6, MSH2 遺伝子発現量が低下した症例は TVDT が短縮し、腫瘍増殖が促進していた。その他 6 種の MMR 遺伝子発現量と TVDT に同様の相関は認めなかった。また、免疫組織化学染色法により MSH6, MSH2 の蛋白発現量を定量し同様に TVDT との相関を検討した所、有意な正相関を認めた(n=31, 各 R=0.51, P=0.004, および R=0.48, P=0.006)。しかし、MSH6, MSH2 以外の MMR 遺伝子発現量と TVDT には有意相関は認めなかった。また、MMR 遺伝子発現量と術前の腫瘍体積、MIB-1 LI にも有意な相関は認めなかった。

2. ヒト PA の MSH6, MSH2 遺伝子発現量は細胞周期調節機構 ATR-Chk1 経路における ATR 遺伝子発現量と有意な正相関を示す

ヒト PA における ATR 遺伝子発現量を Real-time PCR で定量し、MSH6, MSH2 遺伝子発現量との相関を解析した所、単相関解析で有意な正相関を認めた(n=93, 各 R=0.47, P<0.001, および R=0.49, P<0.001)。

3. AtT-20ins において MSH6, MSH2 遺伝子発現量低下は ATR 遺伝子発現量低下を介して細胞増殖を促進する

AtT-20ins cell line を用いて、siRNA で MSH6, MSH2 遺伝子発現量を各 54%, 72% 低下させ 48 時間培養後の細胞数を解析した所、control に比して細胞数は各 1.58 倍, 1.31 倍に上昇した(各 P<0.001)。また、MSH6, MSH2 遺伝子発現量を同時に低下させると有意な ATR 遺伝子発現量低下(P<0.05)を伴って、単独低下時よりも細胞増殖が促進された。さらに、直接 ATR 遺伝子発現量を低下させると細胞増殖は促進されるが、MSH6, MSH2 遺伝子発現量に有意な変化は認めなかった。

4. ヒト PA 初代培養においても MSH6 遺伝子発現量低下は同機序で細胞増殖を促進する

2 例のヒト非機能性 PA 初代培養において、siRNA で MSH6 遺伝子発現量を低下させた所、ATR

遺伝子発現量の低下を伴って有意に細胞増殖が促進された(P<0.001)。

【考察】

MSH6,MSH2 遺伝子発現量の低下は、間接的な遺伝子変異の蓄積を増加させるだけでなく、ATR-Chk1 経路の機能低下を引き起こし、直接的に PA 増殖を促進することが示唆された。その分子機構として、ATR-Chk1 経路の機能低下によって細胞周期停止や apoptosis 誘導が十分に機能しなかった可能性を推定している。

【結論】

本研究によって、PA の新たな腫瘍増殖メカニズムの一端が解明された。現在のところ、PA の増殖を予測する因子は少ないが、今後 MSH6,MSH2 の発現量が PA 増殖を予測するサロゲートマーカーとして用いることができるか否か更なる検討を行なっていく予定である。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成30年8月13,20,23日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、学位論文の審査を行った。

一般的に下垂体腫瘍の増殖は比較的緩やかであることが多い一方で、再発を繰り返す症例や一部に浸潤性の高い下垂体腺腫や下垂体癌に進展する症例が存在し、その治療は臨床的に非常に困難となる。下垂体腫瘍診療において、解剖学的に外科的治療が困難であること、有効な薬物・放射線療法が十分確立していないこと、腫瘍再発・増大を予測する因子が少ないと言った課題を克服するには、下垂体腫瘍の増殖機序を解明することが重要である。本論文では、学位申請者が経験したミスマッチ修復遺伝子異常によるLynch症候群に発生した浸潤性下垂体腺腫の解析と既報を通じて、下垂体腫瘍増殖とミスマッチ修復遺伝子との直接的な関わりを明らかにすることを目的としている。

方法は、ヒト下垂体腫瘍組織におけるミスマッチ修復遺伝子・蛋白発現と腫瘍増殖に関与する臨床データを解析し、有意相関を示した遺伝子についてはミスマッチ修復遺伝子との関連が報告されている細胞周期調節機構ATR-Chk1経路におけるATR遺伝子発現との解析を行った。さらに、得られた知見をマウス下垂体腫瘍細胞系AtT-20insを用いてin vitroで検討し、最後にヒト下垂体腫瘍初代培養細胞においても検証を行なった。

その結果、①ヒト下垂体腺腫のMSH6,MSH2遺伝子・蛋白発現量は腫瘍体積倍加時間(TVDT)と有意な正相関を示す：MSH6,MSH2遺伝子・蛋白発現量の低下は腫瘍増殖を促進させる、②ヒト下垂体腺腫のMSH6,MSH2遺伝子発現量は細胞周期調節機構ATR-Chk1経路におけるATR遺伝子発現量と有意な正相関を示す：MSH6,MSH2遺伝子発現量の低下は細胞周期調節機構ATR-Chk1経路の機能低下に関与する、③AtT-20insにおいてMSH6,MSH2遺伝子発現量の低下はATR遺伝子発現量低下を介して有意に細胞増殖を促進する、④AtT-20insにおいてATR遺伝子発現量の低下は有意に細胞増殖を促進するが、MSH6,MSH2遺伝子発現量に有意な変化は認めない、⑤ヒト下垂体腺腫初代培養においてもMSH6遺伝子発現量低下はATR遺伝子発現量低下を介して有意に細胞増殖を促進する

以上の結果から、下垂体腫瘍においてミスマッチ修復遺伝子 MSH6,MSH2 の発現低下が細胞周期調節機構 ATR-Chk1 経路を介して直接的に腫瘍増殖を促進するという新たな下垂体腫瘍増殖メカニズムの一端が解明された。本論文は、新たな下垂体腫瘍増殖メカニズムの解明だけでなく、現在の所、下垂体腫瘍増殖を予測する因子が少なく、臨床的に下垂体腫瘍の増殖・再発予測が困難である中、MSH6,MSH2 の発現量が下垂体増殖を予測するサロゲートマーカーとなる可能性も示唆しており、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第584号		
学位授与の日	平成31年3月15日		
氏名	二出川 裕香		
学位論文の題目	Impaired healing of cornea incision injury in a TRPV1-deficient mouse (マウスでの TRPV1 遺伝子欠失の角膜実質創傷治癒への影響)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 平井 秀一	教授 雑賀 司珠也

論文内容の要旨

【緒言】

角膜では外傷後の治癒過程で線維・癒痕化は透明性の低下と形状異常を惹起し、視機能を低下させる。角膜全層穿孔外傷や全層角膜移植後では、角膜実質の混濁や形状異常による視機能への影響は大きく、そのため速やかな創傷治癒による炎症軽減と線維癒痕化抑制が透明性の維持に必須である。

近年、侵害刺激受容に関わるイオンチャンネル型受容体の機能が明らかにされつつある。その中心的な分子群が transient receptor potential (TRP) チャンネルである。TRP チャンネルは 1989 年にシヨウジョウバエの光受容器異常異変株の原因遺伝子として同定され、その後、7つのサブファミリー (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPP, TRPA, TRPML) に分類された。TRPV1 は Ca²⁺透過性の高い非選択性陽イオンチャンネルであり、カプサイシン、プロトン、熱などの侵害刺激によって活性化する。カプサイシンレセプターである TRPV1 は各種の炎症関連メディエーターの代謝型受容体と機能関連し、炎症性疼痛発生の新しい分子機構として注目を浴びている。

TRPV1-ノックアウトマウスを用いた当教室の過去の研究で、角膜アルカリ外傷モデルでの炎症性癒痕化の抑制、角膜上皮欠損モデルでの上皮治癒の遅延、角膜熱凝固モデルでの血管新生の抑制が報告されている。本研究では、高度な炎症を伴う全層切開モデルでのすみやかな治癒かつ線維癒痕化の抑制のため、TRPV1 をどう制御することが望ましいかということに着目し、TRPV1-ノックアウト (KO) マウスを用いて、角膜実質切開創の創傷治癒 (癒合) に及ぼす TRPV1 の役割を検討した。

【方法】

- 1 KO マウス及び野生型 C57BL/6 マウス (WT) を用い、マイクロサージカルナイフで片眼の角膜中央部に幅 1.8mm の角膜全層切開モデルを作成した。5 日後、10 日後に眼球摘出、パラフィン切片を作成し角膜創傷治癒を組織学的、免疫組織学的 (α -smooth muscle actin (α SMA), myeloperoxidase (MPO), F4/80, Fibronectin, transforming growth factor β 1 (TGF β 1)) に検討した。
- 2 上記マウスのヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色切片を顕微鏡下で観察し、角膜実質治癒を評価、また線維芽細胞の主な出現部位 (実質浅層部 or 実質深層部) を WT 角膜と KO 角膜で比較した。
- 3 KO マウス及び野生型 C57BL/6 マウス (WT) を用い、角膜全層切開モデルを作成 3 日後に角膜摘出、RNA 抽出し α SMA, collagen1a1, F4/80 を real-time RT-PCR 法で評価した。
- 4 KO マウス及び野生型 C57BL/6 マウス (WT) を用い、それぞれ角膜切開創なしと角膜全層切開 5 日後の角膜を摘出し、透過型電子顕微鏡で角膜組織を観察した。

【結果】

- 1 KO マウスは WT マウスと比較し、5 日後で角膜実質の癒合治癒が抑制されていた。免疫組織学的に 5 日後 10 日後の KO 角膜で筋線維芽細胞の出現が抑制されていた。活性型 TGF β 1 発現は、5 日後の KO 角膜で抑制されていたが、10 日後では、WT 角膜より KO 角膜で発現が増強していた。
- 2 KO 角膜での実質の創傷治癒遅延は一過性であり、線維芽細胞の分布は、WT 角膜では実質浅層部に、KO 角膜では実質深層部に集積している傾向があった。
- 3 角膜全層切開 3 日後の角膜で real-time RT-PCR 法より α SMA mRNA と collagen1a1 mRNA 発

現が KO マウス角膜で抑制されていた。

4 角膜切開創の有無にかかわらず、KO 角膜では小胞体が拡張していた。この傾向は創傷後 5 日後でより顕著であった。

【考察】

角膜全層切開モデルの TRPV1KO マウス角膜では、角膜実質の癒合治癒が遅延していた。また免疫組織学的には KO マウス角膜で筋線維芽細胞の出現が抑制され、治癒過程で活性型 TGFβ1 が KO マウス角膜で遅れて発現していた。このことより KO マウス角膜では、TGFβ1 の発現が遅れ、筋線維芽細胞の抑制と創傷治癒の遅延をおこす可能性が考えられた。

線維芽細胞の分布は、WT マウス角膜では実質浅層部に、KO 角膜では実質深層部に集積している傾向があり、WT マウス角膜では上皮の治癒と実質の治癒が同時期にすすむが、KO マウス角膜では上皮の治癒が実質の治癒に先行し、実質治癒は遅延していると考えられた。

Real-time RT PCR 法の検討では KO マウス角膜でαSMA や collagen1a1 が抑制されていたことより TRPV1 は角膜全層切開モデルにおいても角膜線維癒痕化に関与すると考えられた。

TRPV1KO マウス角膜では、角膜実質治癒過程での TGFβ1 発現の抑制により、筋線維芽細胞やコラーゲンの発現が抑制されることが考えられ、TRPV1 は角膜実質での創傷治癒促進・線維癒痕化に関わる因子である可能性が示唆された。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 30 年 8 月 16 日、29 日、30 日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記学位論文の審査を行った。

角膜では外傷後の治癒過程で線維・癒痕化は透明性の低下と形状異常を惹起し、視機能を低下させる。角膜全層穿孔外傷や全層角膜移植後では、角膜実質の混濁や形状異常による視機能への影響は大きく、そのため速やかな創傷治癒による炎症軽減と線維癒痕化抑制が透明性の維持に必須である。

近年、侵害刺激受容に関わるイオンチャンネル型受容体の機能が明らかにされつつあり、その中心的な分子群が transient receptor potential (TRP) チャンネルである。本研究では TRP チャンネルのサブファミリーのうちカプサイシンレセプターである TRPV1 に着目し、TRPV1・ノックアウト(KO)マウスを用いて、角膜実質切開創の創傷治癒（癒合）に及ぼす TRPV1 の役割を検討した。角膜全層切開モデルの同 KO マウス角膜では、角膜実質の癒合治癒が遅延していた。また免疫組織学的には KO マウス角膜で筋線維芽細胞の出現が抑制され、治癒過程で活性型 TGFβ1 が KO マウス角膜で遅延して発現していた。このことより KO マウス角膜では、TGFβ1 の発現が遅れ、筋線維芽細胞の抑制と創傷治癒の遅延をおこす可能性が考えられた。線維芽細胞の分布は、正常(WT)マウス角膜では実質浅層部に、KO 角膜では実質深層部に集積している傾向があり、WT マウス角膜では上皮の治癒と実質の治癒が同時期に進行するが、KO マウス角膜では上皮の治癒が実質の治癒に先行し、実質の治癒は遅延していると考えられた。Real-time RT PCR 法の検討では KO マウス角膜でαSMA や collagen1a1 の発現が抑制されていたことより TRPV1 は、角膜線維癒痕化に関与すると考えられた。また透過型電子顕微鏡で角膜組織を観察すると、角膜切開創の有無にかかわらず、KO マウス角膜では小胞体が拡張し、この傾向は創傷後 5 日後でより顕著であった。

以上のように、TRPV1 は角膜実質での創傷治癒促進・線維癒痕化に関わる因子である可能性が本論文により初めて示唆された。本論文は、TRPV1 の制御が角膜透明治癒に結びつくことを示し、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)甲第 585 号		
学位授与の日	平成 31 年 3 月 15 日		
氏名	岩橋 尚幸		
学位論文の題目	Calreticulin regulates syncytialization through control of the synthesis and transportation of E-cadherin in BeWo cells (カルレティキュリンはヒト絨毛癌細胞株である BeWo 細胞において E-カドヘリンの合成と輸送をコントロールしシンシチウム化を調節する)		
論文審査委員	主査	教授 山田 源	
	副査	教授 村垣 泰光	教授 井篁 一彦

論文内容の要旨

【緒言】

胎盤は母体と胎児を結び、児の生命を維持する非常に重要な臓器である。胎盤絨毛形成の過程において、細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast; CTB) から合胞体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast; STB) への細胞融合・多核化 (シンシチウム化) が非常に重要な役割を果たす。妊娠初期のシンシチウム化が不十分であると胎盤形成不全となり、妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの疾患をきたすと言われている。また、シンシチウム化の際の CTB の細胞間接着において、細胞間接着蛋白である E-カドヘリンの細胞表面での発現が重要であることが知られている。CTB の適切な細胞間接着によりシンシチウム化が進むと、胎盤形成および妊娠維持に必須となる β -hCG の分泌が促される。 β -hCG は実臨床における妊娠の診断や、基礎研究におけるシンシチウム化・絨毛形成の指標として用いられている。近年、ヒト妊娠において、小胞体の分子シャペロンであるカルレティキュリン (CRT) が、妊婦の胎盤や血液中で高発現し、妊娠高血圧症候群の妊婦の血液中でレベルの上昇する分子として報告されている。CRT は小胞体における Ca^{2+} イオンの貯蔵と糖タンパク質のフォールディング・品質管理に関わり、様々な細胞の機能にも関わる事が報告されているが、胎盤におけるその機能や生理的意義については未だ明らかではない。

【目的】

小胞体シャペロンである CRT が胎盤形成の元となるシンシチウム化に果たす機能的役割について、E-カドヘリンの合成や輸送に着目し、そのメカニズムについて解明することを目的とした。

【方法】

インフォームドコンセントの下に得られたヒト胎盤組織において、CRT の発現を Western blotting 法もしくは免疫組織化学染色を用いて検討した。ヒト絨毛癌細胞株である BeWo 細胞に CRT-shRNA 発現ベクターを遺伝子導入し、CRT 低発現安定細胞株を作製した。CRT の発現抑制の影響について、cAMP 誘導剤である forskolin 誘導性のシンシチウム化能や β -hCG の合成・分泌能、E-カドヘリンの合成能や局在、細胞間の接着能の変化について比較検討した。

【結果】

1. ヒト胎盤組織における CRT の発現の検討

Western blotting 法で、ヒト胎盤組織において CRT が高発現していたが、胎児発育不全の胎盤において有意な CRT 発現の低下を認めた。免疫組織化学染色法において STB に CRT の強い発現を認め、胎児発育不全の胎盤において Western blotting 法と同様に有意な CRT 発現の低下を認めた。

2. CRT 発現抑制株の作製

CRT-shRNA 発現ベクターの遺伝子導入により CRT 発現抑制安定細胞株を作製した。mRNA とタンパクレベルで CRT の発現が抑制されていることを確認した。

3. CRT 発現抑制による forskolin 誘導性のシンシチウム化能や β -hCG の合成・分泌能への影響についての検討

CRT 発現抑制株において、免疫蛍光染色法により forskolin 誘導性のシンシチウム化の有意味な抑制を認めた。同時に、CRT 発現抑制により細胞内の β -hCG の発現 (real-time RT-PCR 法) および細胞上清中の β -hCG 分泌 (ELISA 法) が有意に低下した。

4. CRT 発現抑制による E-カドヘリンの合成と局在の変化

Western blotting 法で CRT 低発現細胞において E-カドヘリンの発現が低下していた。CRT 発現抑制株において、免疫蛍光染色では E-カドヘリンの細胞表面の発現低下および細胞内での集積を認めた。CRT 発現抑制株における細胞表面 E-カドヘリンの発現低下を、細胞表面ビオチン化法およびシヨ糖密度勾配遠心法においても確認した。

5. CRT 発現抑制による細胞間接着能の変化

細胞表面の E-カドヘリンの阻害抗体である ECCD-2 を添加し、凝集アッセイにより細胞間接着能の変化を検討した。Control 細胞株では ECCD-2 の濃度依存的に細胞間接着が阻害されたが、CRT 発現抑制株では細胞間接着能が定常状態でも低く、ECCD-2 の影響は受けなかった。

【考察・結語】

ヒト絨毛癌細胞株である BeWo 細胞において、CRT 発現抑制は forskolin 誘導性のシンシチウム化および β -hCG 分泌を低下させた。CRT 発現抑制により E-カドヘリンの合成および細胞表面への輸送が妨げられていることから、細胞間接着不全を引き起こし、シンシチウム化が低下すると推察された。胎盤形成不全を基盤とする妊娠高血圧腎症や胎児発育不全の病態に小胞体シャペロンである CRT が関与している可能性が示唆された。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 31 年 1 月 23 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

胎盤絨毛形成の過程において、細胞性栄養膜細胞 (Cytotrophoblast; CTB) から合体栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast; STB) への細胞融合・多核化 (シンシチウム化) が非常に重要な役割を果たす。妊娠初期のシンシチウム化が不十分であると胎盤形成不全となり、妊娠高血圧腎症や胎児発育不全などの疾患をきたすと言われている。近年、妊娠とともに血中濃度が増加する分子として、小胞体の分子シャペロンであるカルレティキュリン (CRT) が報告されているが、胎盤におけるその機能や生理的意義については未だ明らかではない。本論文では CRT が胎盤形成の元となるシンシチウム化に果たす機能的役割について検討した。

はじめに、同意が得られた正常妊婦の胎盤組織および絨毛細胞株における CRT の発現の有無を確認した。正常ヒト胎盤組織において Western blotting 法では CRT が高発現しており、免疫組織化学染色では主に STB 細胞への局在を認めたが、胎児発育不全の胎盤において有意な CRT 発現の低下を認めた。次に絨毛細胞の分化モデルとして用いられる、ヒト絨毛癌細胞株である BeWo 細胞にヒト CRT-shRNA 発現ベクターを導入し、CRT 低発現細胞株を作製した。BeWo 細胞において CRT 発現抑制は forskolin 誘導性のシンシチウム化能および β -hCG 分泌能を低下させた。CRT 低発現細胞において、Western blotting 法では E-カドヘリンの発現が低下しており、免疫蛍光染色およびシヨ糖密度勾配遠心法では E-カドヘリンの細胞表面の発現低下およびゴルジ複合体への集積を認めた。また CRT 低発現細胞において細胞表面の E-カドヘリン依存性の細胞間接着能が低下していた。

BeWo 細胞において CRT 発現抑制はシンシチウム化能を低下させた。CRT は糖タンパク質の品質管理に関わる分子シャペロンであり、E-カドヘリンの合成と輸送への関与を介して BeWo 細胞のシンシチウム化能を調節している可能性が示唆された。

以上より小胞体の分子シャペロンである CRT が妊娠初期胎盤形成におけるシンシチウム化に促進的な役割を果たしていると考えられた。またシンシチウム化不全を基盤とする胎盤形成不全の病態に CRT が関与している可能性が示唆され、学位論文として価値のあるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第973号		
学位授与の日	平成30年4月10日		
氏名	和田 輝明		
学位論文の題目	Coronary flow velocity reserve in 3 major coronary arteries by transthoracic echocardiography for the functional assessment of coronary artery disease: a comparison with fractional flow reserve (冠動脈疾患の機能的評価における経胸壁心エコーによる主要三枝冠動脈の冠血流予備能 (CFVR) と心筋血流予備量比 (FFR) の比較)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 西村 好晴	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

冠血流予備能(coronary flow velocity reserve; CFVR)は冠動脈微小血管の機能を反映する指標であり、経胸壁心エコーによる主要三枝冠動脈のCFVR測定は、心筋虚血検出に有用な非侵襲的方法である。一方、心筋血流予備量比(fractional flow reserve; FFR)は圧ワイヤーにて計測する冠動脈の機能的狭窄度を評価する指標であり、冠動脈の狭窄診断に広く用いられている。本研究では、経胸壁心エコーで求められたCFVRとFFRを比較し、CFVRの機能的狭窄診断に対する有用性を検討した。

【方法】

1. 対象

2009年1月～2012年7月に胸痛を主訴に当院を受診した連続348例に対して冠動脈CT検査を施行した。冠動脈CT検査で主要冠動脈のうち少なくとも一枝に目視で50%以上の狭窄を有する安定狭心症患者179例のうち、心筋梗塞後3か月以内、冠動脈バイパス術の既往、高度房室ブロック、心房細動、左室機能不全、左主幹部病変、慢性完全閉塞、高度大動脈弁狭窄症、造影剤の使用禁忌、ステロイド治療を要する慢性閉塞性肺疾患、慢性腎臓病(eGFR<60mL/min/1.73m²)の症例を除外し、147例、172血管を対象とした。

2. 経胸壁心エコー検査によるCFVR測定方法

冠動脈造影検査、FFR測定の施行前48時間以内に経胸壁心エコー検査でCFVR測定を行った。経胸壁心エコー検査は全例Vivid E9 (GE Healthcare, Horten, Norway)を用いて行った。冠動脈左前下行枝、左回旋枝、右冠動脈末梢の冠動脈血流速(coronary flow velocity; CFV)を測定し、5心拍以上の平均値を基準のbaseline CFVとした。続いて2分間のアデノシン三リン酸の持続点滴中に同部位でのCFVの測定を行った。持続点滴の速度を0.14mg/kg/minとし、持続点滴下の5心拍以上の平均値を最大冠充血時のhyperemia CFVとした。CFVRはhyperemia CFVをbaseline CFVで除したものと定義した。

3. 冠動脈造影検査

冠動脈造影検査は、橈骨動脈または大腿動脈アプローチで標準的方法を用いて行った。冠動脈の狭窄度判定は、多方向からの撮影で、quantitative coronary angiographic software programを用いて解析を行った。ガイディングカテーテル径を基準とし、reference diameter, minimal luminal diameter, percentage diameter stenosis (DS)の計測を行った。

4. FFR測定方法

ガイディングカテーテルで大動脈圧(Pa)を測定し、0.014-inchのプレッシャーワイヤー(PressureWire™ Certus, St. Jude Medical St. Paul, MN)で冠動脈圧(Pd)を測定した。ワイヤーをカテーテル内に挿入し、カテーテル内のPaと等しくした後、それを狭窄部の遠位の少なくとも3～4cm

のところに配置し、最適で安定した速度信号が得られるまで操作した。ワイヤー先端の位置は透視で確認した。Pa、Pd、瞬間最高速度および心電図は、ベースライン時およびアデノシン三リン酸持続静注を 0.14mg/kg/min で 2 分間持続静注を行って誘発した最大充血時に得た。FFR の異常値は 0.75 以下または 0.8 以下とした。FFR 測定中は心拍数、冠動脈圧、大動脈圧を連続的に記録した。

5. 統計学的解析

解析は全て SPSS を用いて行った。連続変数は、平均±標準偏差と定義した。カテゴリー変数は数値とパーセントで表示した。感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を算出し、FFR と CFVR の冠動脈狭窄の診断能力を予測した。FFR ≤0.75 に対する CFVR のカットオフ値を ROC 曲線により算出した。P <0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。

【結果】

FFR ≤0.75 (n = 79) の冠動脈における CFVR は 1.86±0.36、FFR >0.75 (n = 93) の冠動脈における CFVR は 2.54±0.48 であり、FFR >0.75 (n = 93) の冠動脈の方が有意に CFVR 高値であった (p <0.0001)。ROC 曲線で算出した主要三枝冠動脈における FFR ≤0.75 を予測する CFVR のカットオフ値は 2.2 であり、感度 85%、特異度 79%であった。各血管における感度、特異度はそれぞれ、左前下行枝 85%、78%、右冠動脈 94%、83%、左回旋枝 88%、88%であった。CFVR は FFR (r = 0.56, p <0.0001)、percent DS (r = 0.26, p = 0.0008) と有意な相関関係を認めた。

【考察】

安定狭心症患者の予後は、機能的有意狭窄の有無と密接に関連することが示されており、FFR は機能的有意狭窄の判定に有用であると報告されている。これまで左前下行枝の CFVR と FFR を比較した報告はあるが、カットオフ値は決定されておらず、本研究では、経胸壁心エコー検査で測定した主要三枝冠動脈の CFVR の FFR に対するカットオフ値を決定した。少数例ではあるが、右冠動脈および左回旋枝の CFVR を測定できなかった症例もあり、今後、全症例の主要三枝冠動脈血流を正確に検出するためには、経胸壁心エコー検査の技術および機器性能の向上が必要であると考えられた。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 30 年 3 月 19 日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

安定狭心症患者の予後は、機能的有意狭窄の有無と密接に関連すると報告されている。心筋血流予備量比(fractional flow reserve; FFR)は圧ワイヤーにて計測する冠動脈の機能的狭窄度を評価する指標であり、冠動脈の治療適応の決定に広く用いられている。

FFRは冠動脈造影や血管内超音波法などの解剖学的評価では気付かれない病変や正しく評価されなかった心筋虚血を誘発する病変を正確に評価することができるかと報告されている。

FFR ≤0.75または≤0.8は、有意冠動脈狭窄を表す指標である。一方、冠血流予備能(coronary flow velocity reserve; CFVR)は心外膜冠動脈と冠微小循環を含めた機能を反映する指標であり、経胸壁心エコーによる主要三枝冠動脈のCFVR測定は、心筋虚血検出に有用な非侵襲的方法である。

本論文では、経胸壁心エコーで求められた主要三枝冠動脈のCFVRとFFRを比較し、CFVRの機能的狭窄診断に対する有用性を検討した。

2009年1月～2012年7月に胸痛を主訴に当院を受診した連続348例に対して冠動脈CT検査を施行した。冠動脈CT検査で主要冠動脈のうち少なくとも一枝に目視で50%以上の狭窄を有する安定狭心症患者179例のうち、心筋梗塞後3か月以内、冠動脈バイパス術の既往、高度房室ブロック、心房細動、左室機能不全、左主幹部病変、慢性完全閉塞、高度大動脈弁狭窄症、造影剤の使用禁忌、ステロイド治療を要する慢性閉塞性肺疾患、慢性腎臓病(eGFR <60mL/min/1.73m²)の症例を除外し、147例、172血管を対象とした。

結果は、FFR ≤0.75 (n =79)の冠動脈におけるCFVRは1.86±0.36、FFR >0.75 (n =93)の冠

動脈におけるCFVRは 2.54 ± 0.48 であり、FFR > 0.75 (n =93)の冠動脈の方が有意にCFVR高値であった ($p < 0.0001$)。ROC曲線で算出した主要三枝冠動脈におけるFFR ≤ 0.75 に対するCFVRのカットオフ値は2.2であり、感度85%、特異度79%であった。各血管における感度、特異度はそれぞれ、左前下行枝85%、78%、右冠動脈94%、83%、左回旋枝88%、88%であった。またFFR ≤ 0.8 に対するCFVRのカットオフ値は2.3であり、感度75%、特異度71%であった。CFVRはFFR ($r = 0.56$, $p < 0.0001$)、径狭窄率 ($r = 0.26$, $p = 0.0008$)と有意な相関関係を認めた。

本論文は、経胸壁心エコーによるCFVR測定が、主要三枝冠動脈の機能的有意狭窄の判定に有用な方法であることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第974号		
学位授与の日	平成30年6月19日		
氏名	西 利男		
学位論文の題目	Lansoprazole prevents the progression of liver fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats (ランソプラゾールは非アルコール性脂肪性肝炎モデルラットにおいて、肝線維化の進行を抑制する)		
論文審査委員	主査	教授 岸岡 史郎	
	副査	教授 北野 雅之	教授 村垣 泰光

論文内容の要旨

【緒言】

転写因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は酸化ストレスの生体防御機構のキーとなる転写因子で、酸化ストレスに曝されると、Nrf2 が核内移行し、Heme Oxygenase 1 (HO-1) などの抗酸化ストレス遺伝子群を誘導し、抗ストレス作用を発揮することが知られている。

ランソプラゾールは、胃の壁細胞にある K^+/H^+ -ATPase を阻害するプロトンポンプインヒビター (PPI) として、胃・十二指腸潰瘍や逆流性食道炎の治療薬として用いられているが、Yoda らは、ランソプラゾールがラット小腸において HO-1 蛋白質の発現を誘導すると報告した。我々は、ランソプラゾールの肝臓での影響について解析を行ったところ、ラット肝臓において Nrf-2 および HO-1 遺伝子・蛋白質を誘導し、ランソプラゾールの前投与がこの Nrf2-HO-1 パスウェイなどを介して、チオアセトアミド (TAA) による急性肝障害を軽減することを見出した。しかし、この Nrf2 誘導能が PPI 作用に起因しているかまで明らかにできなかった。

近年患者数が増加している非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は脂肪肝を有した患者の一部で肝炎を引き起こし、修復機構による肝線維化を経て、肝硬変や肝がんを引き起こすことが報告されている。このため、NASH において肝炎治療薬の開発は、肝硬変や肝がんのリスクを軽減できるため、非常に重要である。

本研究では、ランソプラゾールの Nrf2 誘導能について、その作用が PPI 作用と独立しているか検討を行った。更に、ランソプラゾールのラット肝臓における Nrf2 誘導能が、NASH モデル動物において、抗酸化効果による肝炎治療効果を示し、NASH 治療薬になり得るか検討を行った。

【材料と方法】

1. K^+/H^+ -ATPase 阻害薬におけるラット肝臓での Nrf2 誘導能および転写活性についての検討

ランソプラゾールのラット肝臓における Nrf2 誘導作用が、PPI 作用と独立しているか検討するため 6 週齢の Wistar 雄ラットを 24 匹用意し、ランソプラゾール 30 mg/kg 投与群、オメプラゾール 30 mg/kg 投与群、ボノプラザン 4 mg/kg 投与群、コントロール群の 4 群 (各群 6 匹) に分け、各薬剤を経口投与し、3 時間後に肝臓の組織を採取した。肝臓の組織より mRNA を抽出し、肝臓に発現する Nrf2 および HO-1 遺伝子の発現解析を行った。

2. NASH モデルラットにおけるランソプラゾールの肝保護効果についての検討

ランソプラゾールの肝保護効果が、NASH モデルラットにおいて有効かどうかを明らかにするため、コリン欠乏メチオニン制限 (CDAA) 食を用いてラット NASH モデルを作製した。6 週齢の Wistar 雄ラット 26 匹用意し、CDAA 食で 5 週間飼育した群 (n=7) (CDAA5w)、CDAA 食で 5 週間飼育し、2 週目よりランソプラゾール 30 mg/kg/day の用量で皮下投与を行った群 (n=7) (CDAA 5w+lansoprazole)、普通餌で 4 週間飼育後に最後の 1 週間 CDAA 食で飼育した群 (n=6) (CDAA1w)、普通餌で 5 週間飼育した群 (n=6) (コントロール群) に分けた。11 週齢の時点で肝臓および血液を採取し、採取した肝臓組織から RNA と蛋白質を抽出し遺伝子およびタンパク質の発現解析を行った。採取した肝臓組織の一部は 4% パラホルムアルデヒド液で化学固定を行い、パラフィン包埋し、組織切片を作成した。組織切片は、

HE 染色、Oil Red O 染色、ピクロシリウスレッド染色を行い、組織学的解析を行った。採取した血清は、AST と ALT を測定し解析した。

3. 統計解析

肝線維化スコアの解析は Mann-Whitney' s U-test を用いて行い、残りの統計解析は one-way ANOVA と Tukey-HSD 法を用いた post-hoc test により解析を行った。全ての統計解析の有意水準は $p = 0.05$ とした。

【結果】

ランソプラゾールの Nrf2 誘導能が PPI 作用によるものか検討を行うため、ランソプラゾールと PPI の一つであるオメプラゾールおよびカリウム競合型アシッドブロッカーのボノプラザンをラットで制酸作用を示す用量を経口投与し、肝臓における Nrf2 と HO-1 遺伝子の発現解析を行ったところ、ランソプラゾール投与群のみで両遺伝子の発現量がコントロール群に比べ有意に増加することを認めた。

次に、CDAA 食を用いた NASH モデルを作製し、ランソプラゾール皮下投与による肝保護能を組織学的に検討したところ、脂肪肝の程度や炎症所見について、明確な差を認めなかったが、CDAA 5w 群の 7 例中 6 例で認めた架橋線維化は CDAA5w+lansoprazole 群では 7 例中 1 例しか認めず、肝線維化スコアについてランソプラゾール投与により有意に進行を抑制することを見出した。また、CDAA5w で有意に増加する血清 AST および ALT についてランソプラゾール投与により AST は有意に抑制し、ALT は抑制傾向を示すことを明らかにした。

NASH モデルラットにおけるランソプラゾールの肝保護作用について分子メカニズムを解析するため、Nrf2 および抗酸化ストレスタンパク質の遺伝子の発現を解析したところ、Nrf2 はランソプラゾール投与により有意に発現増加したが、HO-1、Glutathione S-transferase A2 (Gsta2)、NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (Nqo1)、UDP glucuronosyltransferase 1 family polypeptide A6 (Ugt1a6) 遺伝子の発現に変化を認めなかった。また、Nrf2 タンパク質の発現増加も認めており、NASH モデルにおけるランソプラゾールの肝保護効果は抗酸化ストレスタンパク質以外のメカニズムによるものと考えられる。

そこで、肝線維化に関するサイトカインをコードする遺伝子の発現を解析したところ、Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (Timp1)、Collagen type 1 alpha 1 chain (Colla1)、Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) 遺伝子でランソプラゾール投与による発現に差を認められなかったが、ランソプラゾール投与により活性化 TGF- β 蛋白質の発現量が有意に減少していることを認めた。

我々は、以前にラットにランソプラゾールを 100 mg/kg の用量で経口投与し、3 時間後の肝臓より抽出された RNA サンプルをマイクロアレイにより遺伝子発現解析しており、発現変化した遺伝子群について、再度 Ingenuity Pathway Analysis を用いてネットワーク解析を行ったところ、炎症性サイトカインの Interferon γ (IFN- γ) と Interleukin-6 (IL-6) をハブ遺伝子としたネットワークを特定した。そこで炎症性サイトカインに着目し、IL-1 β と IL-6、TNF- α および IFN- γ 遺伝子の発現について発現解析を行ったところ、IL-6 遺伝子について CDAA5w 群と比較し CDAA5w+lansoprazole 群で有意な発現減少を認め、更に IL-6 蛋白質においても同様の発現減少を認めた。

【考察】

ランソプラゾールのラット肝臓における Nrf2 遺伝子の発現誘導能は、オメプラゾールやボノプラザンには認められないため、このメカニズムは、PPI 効果とは独立した、ランソプラゾールの構造特異的な作用であることを明らかにした。

ランソプラゾールは CDAA 食による NASH モデルラットにおいて、肝線維化の進展を抑制することを明らかにした。この分子メカニズムは、以前のランソプラゾールの薬剤性肝炎における肝保護効果についての検討と同様に Nrf2 誘導を介した抗酸化ストレスタンパク質の発現誘導によるものと考えたが、Nrf2 の発現誘導を認めたが、抗酸化ストレスタンパク質の発現誘導を認めなかった。近年、Kobayashi らは Nrf2 が IL-1 β および IL-6 の発現を抑制することを見出しており、本研究でもランソプラゾール投与で IL-6 の発現誘導を抑制したため、この発現抑制は Nrf2 を介したものである可能性が考えられる。

さらに、NASH モデルラットにランソプラゾール投与を行うことで肝線維化に関与する遺伝子群の発

現変化を認めなかったが TGF- β の活性化を抑制することを見出した。この結果については Nrf2 を介したものかどうか証明するに至らなかったため、ノックアウトラットを用いた更なる解析が必要である。

本研究成果より、ランソプラゾールは NASH 治療薬になる可能性を見出した。今後、血栓予防で低用量アスピリンと PPI を併用している NASH 患者を対象に、ランソプラゾール特異的な肝保護効果について後ろ向き研究を行い、本研究の結果についてヒトでのエビデンスを集める必要がある。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 30 年 4 月 26 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。

転写因子 Nrf2 は酸化ストレスの生体防御機構の鍵となる転写因子で、酸化ストレスに曝されると、Nrf2 が核内移行し、HO-1 などの抗酸化ストレス遺伝子群を誘導し、抗ストレス作用を発揮することが知られているが、プロトンポンプインヒビター(PPI)のランソプラゾールがラット肝臓において Nrf2 および HO-1 遺伝子・蛋白質を誘導し、薬剤性肝障害を軽減することを報告してきた。本研究では、ランソプラゾールの Nrf2 誘導能が、PPI 作用と独立しているか検討を行い、ランソプラゾールのラット肝臓における Nrf2 誘導能が、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)治療薬になり得るか検討を行った。

Wistar 系雄 6 週齢ラットに各種 PPI を経口投与し、3 時間後の肝臓における Nrf2 および HO-1 遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。次に、Wistar 系雄 6 週齢ラットにコリン欠乏メチオニン制限食を 5 週間与え続けることによる NASH モデルを用いて、ランソプラゾールの皮下投与が、NASH 病態の進行を抑制するか、血清および肝組織より生化学的および分子生物学的解析を行った。

ランソプラゾール群の正常ラット肝臓における Nrf2 および HO-1 遺伝子の発現増加は、オメプラゾール投与群、ボノプラザン投与群では認めなかった。NASH モデル動物の肝臓において 7 例中 6 例で認められる架橋線維化は、ランソプラゾール投与群では 7 例中 1 例しか認めず、肝線維化スコアの進行がランソプラゾール投与により有意に抑制されることを見出した。また、NASH モデル動物で上昇する血清 AST はランソプラゾール投与により有意に抑制された。しかし、NASH モデル動物の肝臓において、ランソプラゾール投与により Nrf2 遺伝子・蛋白質は発現増加したが、HO-1、Gsta2、Nqo1、Ugt1a6 などの抗酸化遺伝子群の発現に変化を認めなかった。そこで、線維化および炎症に関するサイトカインに着目したところ、ランソプラゾール投与により活性化 TGF- β 蛋白質と IL-6 遺伝子・蛋白質が発現減少することを認めた。

以上より、NASH モデルにおけるランソプラゾールの肝保護効果は TGF- β 活性化抑制および IL-6 発現抑制が関与しているものと考えられる。本研究成果より、ランソプラゾールは PPI 作用と異なる機序により NASH 治療薬になる可能性を示唆し、学位論文として価値のあるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第975号		
学位授与の日	平成30年6月19日		
氏名	宮本 恭兵		
学位論文の題目	Effect of Dexmedetomidine on Lactate Clearance in Patients with Septic Shock A Sub-Analysis of a Multicenter Randomized Controlled Trial (デクスメドミジンが敗血症性ショック患者の乳酸クリアランスに与える影響の検討)		
論文審査委員	主査	教授 川股 知之	
	副査	教授 赤阪 隆史	教授 加藤 正哉

論文内容の要旨

【緒言】

血中乳酸値は敗血症の重要な予後規定因子の一つであり、敗血症性ショックの定義にも含まれる。血中乳酸値の低下割合（乳酸クリアランス）を指標とし乳酸クリアランスを増加させるような敗血症蘇生プロトコルを適用することで従来の蘇生に比べて死亡率を改善させようという報告がある。

デクスメドミジンは中枢のアドレナリン α 2受容体を刺激することによる鎮静作用に加え、敗血症では臓器保護作用を持つことが示唆されている。本研究の基となった **DESIRE trial** (**D**Exmedetomidine for Sepsis in ICU Randomized Evaluation trial)は敗血症を対象としデクスメドミジンの死亡率低下作用を検討した多施設ランダム化比較試験であるが、より重症のサブグループにおいてデクスメドミジンが死亡率を低下させていた。

過去の動物実験ではデクスメドミジンは臓器保護作用により乳酸クリアランスを増加させることが示唆されており、**DESIRE trial** で示された死亡率改善の機序として乳酸クリアランスの増加が関与している可能性がある。しかしながら、敗血症においてデクスメドミジンが乳酸クリアランスに与える影響を検討した臨床研究は行われておらず、十分に解明されていない。

【目的】

敗血症患者においてデクスメドミジンが乳酸クリアランスに与える影響を明らかにする。

【方法】

1. **DESIRE trial** の概要

DESIRE trial は2013年2月から2016年1月にかけて日本の8つのICUでおこなわれ、48時間以上の人工呼吸管理を受けることが見込まれる敗血症患者を対象としてデクスメドミジンを用いる鎮静戦略(**DEX group**)とデクスメドミジンを用いない鎮静戦略(**non-DEX group**)にランダム割付をおこない比較した試験である。**DEX**群では割付後速やかにデクスメドミジンの投与を開始し、両群ともに一定の鎮静深度(**Richmond Agitation Sedation Scale** で日中は0 [落ち着いて覚醒している]、夜間は-2 [軽く鎮静されている])を目標とし必要に応じてプロポフォール、ミダゾラムの投与量の調整をおこなった。

2. 対象

本研究は**DESIRE trial** のサブ解析であり、**DESIRE trial** に組み込まれた201人の敗血症患者のうち112人の敗血症性ショック患者を対象とした。敗血症性ショックは中等度以上の昇圧薬投与かつ血中乳酸値が2 mmol/Lより大きいことと定義した。割付時の血中乳酸値が測定されていなかった1例は除外した。

3. 評価項目

主要評価項目は割付後6時間における乳酸クリアランスとした。乳酸クリアランスは([割付時の乳

酸値 - 6 時間後の乳酸値] / 割付時の乳酸値) x 100 で計算した。割付時から 6 時間後までに複数回の乳酸値測定が行われていた場合は 6 時間に最も近い時点で測定された値を採用した。副次評価項目は割付後 12 時間、24 時間、48 時間における乳酸クリアランス、48 時間以内の心拍数と平均血圧、輸液量、ICU 入室期間、28 日死亡とした。

3. 統計解析

両群の比較においてカテゴリ変数では chi-squared test、連続変数では t test もしくは Wilcoxon rank sum test をおこなった。乳酸クリアランスは割付時の乳酸値の影響を大きく受けるため、乳酸クリアランスの比較においては重回帰分析を用いて割付時乳酸値の調整を追加した。

【結果】

DEX 群(n = 60)と non-DEX 群(n = 51)における年齢は 70.0 ± 14.3 歳、72.1 ± 12.3 歳 (P = 0.43)、入室時の APACHE II スコアは 23 点 (19 - 29)、27 点 (20 - 32) (P = 0.19)と明らかな差を認めなかった。割付時の血中乳酸値は 4.0 (2.8 - 6.4)、4.8 (3.4 - 8.0) mmol/L (P = 0.053)と non-DEX 群で高い傾向を認めた。

主要評価項目の 6 時間の乳酸クリアランスは DEX 群の 57 人(95%)、non-DEX 群の 48 人(94%)で評価可能だった。DEX 群と non-DEX 群での乳酸クリアランスは 23.3 ± 29.8、11.1 ± 54.4 (mean difference 12.2; -4.4 to 28.8, P = 0.15)と差を認めなかったが、割付時の血中乳酸値での調整をおこなったところ DEX 群での有意な増加を認めた (adjusted mean difference 18.5; 2.2 to 34.9, P = 0.03)。同様に副次評価項目である 12 時間の乳酸クリアランスでも DEX 群での有意な増加を認めた。

他の副次評価項目について、48 時間以内の心拍数と平均血圧の推移、輸液量は両群で明らかな差を認めなかった。DEX 群と non-DEX 群の ICU 滞在期間は 8 日(3 - 10)、7 日(3 - 13) (P = 1.00)で明らかな差を認めなかった。28 日死亡は 13 例(22%)、18 例(35%) (P = 0.11)であり、DEX 群で少ない傾向を認めたものの有意差はなかった。

【考察・結語】

乳酸アシドーシスは乳酸産生の増加もしくは代謝の減少によってもたらされる。乳酸産生増加の機序は臓器虚血による嫌氣的産生と交感神経の過剰刺激による好氣的産生に分けられるが、デクスメデトミジンは交感神経抑制作用があるため後者を抑制して乳酸クリアランスを増加させる可能性がある。また、乳酸代謝は主に肝臓でおこなわれるが、デクスメデトミジンは敗血症モデルのラットにおいて肝障害を減少させることが示されており、敗血症による肝障害を改善することにより乳酸クリアランスが増加させる可能性がある。

今回の研究では有意ではないものの 28 日死亡率は 13%低下しており、乳酸クリアランスの増加をもたらす上述の臓器保護作用が予後改善に関連した可能性がある。ただし、本研究は臓器保護作用を評価するためにおこなわれた試験ではなく、詳細な機序については不明であり今後の研究で評価する必要がある。今回の研究を契機として将来的にデクスメデトミジンの有用性が証明された場合、敗血症患者の治療の進歩に大きく寄与することができる。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 30 年 5 月 31 日及び 6 月 4 日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め論文審査を行った。

集中治療領域で広く用いられている中枢のアドレナリン α 2 受容体刺激性鎮静薬デクスメデトミジンは敗血症で臓器保護作用を有することが報告されているがその機序は十分に解明されておらず、その死亡率低下作用を検討する目的で、DESIRE (DExmedetomidine for Sepsis in Intensive care unit Randomized Evaluation) trial が行われた。DESIRE trial は、日本の 8 施設で人工呼吸管理を要する敗血症患者 201 例を対象としておこなわれたランダム化比較試験で、デクスメデトミジンを用いた鎮静戦略とデクスメデトミジンを用いなかった鎮静戦略を比較しデクスメデトミジンを用いた鎮静戦略により鎮静の質が向上し、さらに 28 日死亡が低下する可能性を報告している。

本研究では、乳酸が敗血症性ショックの患者の予後予測において有用な指標であり、その相対的な変化である乳酸クリアランスは予後予測だけでなく治療の指標としても用いられている事を背景として、デクスメデトミジンが乳酸クリアランスに与える影響を明らかにすることを目的とした **DESIRE trial** に組み込まれた対象症例のサブ解析を行った。対象となったのは **DESIRE trial** に組み込まれた患者のうちショックを呈していた 111 人でそのうち 60 人はデクスメデトミジンを用いた鎮静戦略により治療され、51 人はデクスメデトミジンを用いない鎮静戦略で治療されていた。デクスメデトミジン群と非デクスメデトミジン群における乳酸クリアランスは 23.3 ± 29.8 vs. 11.1 ± 54.4 (平均差 12.2 ; 95%信頼区間 -4.4 to 28.8) だった。乳酸クリアランスは初期乳酸値の影響を大きくうけるため、初期乳酸値で調整したところ乳酸クリアランスの調整平均差は 18.5 (95%信頼区間 2.2 to 34.9) と有意な差を認めた。よって、敗血症性ショックにおけるデクスメデトミジンは乳酸クリアランスの改善と関連することが示された。

本論文はデクスメデトミジンが乳酸クリアランスに与える影響を敗血症性ショックの患者で検討した初めての論文である。デクスメデトミジンによる予後改善効果の機序を考察するうえで意味があり、将来の検討の基礎的な知見となることが期待される点で学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第976号		
学位授与の日	平成30年7月17日		
氏名	西川 泉		
学位論文の題目	Nodular gastritis in association with gastric cancer development before and after <i>Helicobacter pylori</i> eradication (鳥肌胃炎におけるヘリコバクター・ピロリ除菌前後の発癌について)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 村田 晋一	教授 北野 雅之

論文内容の要旨

【緒言】

鳥肌胃炎は、上部消化管内視鏡検査で胃前庭部を中心とする粘膜に均一な白色小隆起が密集して存在し、俗にいう皮膚に見られる「鳥肌」に似た像を呈する胃炎である。組織学的には高度な炎症細胞の浸潤とリンパ濾胞の過形成を特徴とする。従来、小児に多い生理的な現象と考えられていたが、最近、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*; *H. pylori*) との関連が明らかとなり成人とくに若年女性にも多く認められることが認識されるようになった。さらに近年、胃癌とくに未分化型胃癌の合併例が多数報告されており、胃癌発生の高危険群として注目されている。しかし、鳥肌胃炎の詳細は未だ明らかではなく、治療戦略も十分に確立されていない。

本研究は、鳥肌胃炎症例を *H. pylori* 陽性の非鳥肌胃炎症例と比較して疫学的かつ臨床的に後ろ向きに検討することにより、鳥肌胃炎の詳細を究明し胃癌リスクに関して検討することを目的とした。

【対象と方法】

1. 対象症例

2006年1月から2014年12月までに日高総合病院で上部消化管内視鏡検査を施行した症例について後ろ向きに検討した。対象は初めての内視鏡検査時に *H. pylori* 陽性と診断された20歳以上の症例である。除外基準は胃の手術歴や *H. pylori* 除菌歴、胃腸機能に影響を及ぼす薬剤の内服歴(プロトンポンプ阻害薬やヒスタミンH2受容体拮抗薬、コルチコステロイド、非ステロイド性消炎鎮痛薬)である。

2. *H. pylori* の診断と除菌治療

H. pylori の検査は消化性潰瘍や胃癌、萎縮性胃炎、腸上皮化生、鳥肌胃炎等の *H. pylori* 感染を疑う所見を認める症例と検査を希望した症例に施行した。*H. pylori* の診断は血清 *H. pylori* IgG抗体や尿素呼気試験、迅速ウレアーゼ試験、検鏡法、培養法のいずれかで陽性を示すことで行った。*H. pylori* の除菌治療は全症例に勧め患者の希望に従い施行した。治療はクラリスロマイシン 200mg、アモキシシリン 750mg、プロトンポンプ阻害薬(ランソプラゾール 30mg、オメプラゾール 20mg またはラベプラゾール 10mg)を1日2回の7日間投与を一次除菌レジメンとした。除菌判定はレジメンの6~8週間後に尿素呼気試験により行った。一次除菌が成功しなかった場合はクラリスロマイシンの代わりにメトロニダゾール(500mg/日)を用いた二次除菌レジメンによる治療を施行した。二次除菌治療に成功しなかった場合はそれ以上の治療を行わなかった。

3. 内視鏡による評価

鳥肌胃炎の診断は上部消化管内視鏡検査により観察されるびまん性の白色小隆起に特徴付けられる前庭部胃炎で行い、内視鏡的に診断が困難な症例に対しては生検による病理組織検査を施行して粘膜表層のリンパ濾胞の存在により診断した。また、鳥肌胃炎所見の有無に加えて、胃癌や消化性潰瘍、過形成性ポリープ、萎縮性胃炎等の所見について注目した。さらに、鳥肌胃炎症例の一部で胃体部小彎に小白斑を多数認める症例がありこの所見についても注目した。

4. 検討

・検討1

H. pylori が陽性と診断された症例 (674 例) を対象として、鳥肌胃炎所見の有無別 (鳥肌 114 例、非鳥肌 560 例) に、年齢や性、臨床症状、内視鏡所見について検討した。

・検討2

鳥肌胃炎症例において、発癌症例と非発癌症例について、年齢や性、内視鏡所見を比較して発癌の高危険因子について検討した。

・検討3

H. pylori 除菌治療が成功した症例 (鳥肌 100 例、非鳥肌 324 例) を内視鏡的に追跡調査して、除菌後の発癌に関して検討した。観察期間は除菌成功後から胃癌診断時あるいは最終内視鏡検査時までを症例ごとに計算した。

5. 統計解析

連続変数間の比較には Mann-Whitney *U*-test を、カテゴリー変数間の比較には Fisher's exact test あるいは chi-square test を用いて解析した。P<0.05 を統計的に有意であるとした。

【結 果】

・検討1

2006 年 1 月から 2014 年 12 月までに日高総合病院で上部消化管内視鏡検査を施行した 20 歳以上の症例は 8557 例であり、年齢中央値は 68 歳 (20~100 歳)、性別は男性 4457 例、女性 4100 例であった。

H. pylori 陽性は 674 例であり、114 例の鳥肌胃炎と 560 例の非鳥肌胃炎を診断した。

鳥肌胃炎 114 例の詳細は、年齢中央値は 48.5 歳 (23~78 歳) であり、女性に多く認めた (男性 35 例、女性 79 例)。性別・年齢階層別発症率の検討では、これまでの報告と同じく、男女ともに 20 歳から 30 歳代の若年層に多く認めたが、女性では比較的、年代を問わず発症する傾向を示した。さらに 70 歳代の高齢者にも鳥肌胃炎を認めた。また心窩部痛や嘔気などの消化器症状を有した症例は 82 例 (72%) であり、随伴病変として胃潰瘍 19 例 (17%)、十二指腸潰瘍 8 例 (7%)、胃癌 6 例 (5%) を認め、胃癌の 5 例が女性で、全例が未分化型癌であった。胃粘膜萎縮の程度は 70 例 (61%) が軽度であった。

一方、非鳥肌胃炎 560 例の詳細は、年齢中央値は 63 歳 (23~94 歳) であり、男性に多く認めた (男性 329 例、女性 231 例)。消化器症状を有した症例は 273 例 (49%) であり、胃潰瘍 147 例 (26%)、十二指腸潰瘍 73 例 (13%)、胃癌 19 例 (4%) の合併を認め、胃癌の 12 例が男性で、16 例が分化型癌であった。胃粘膜萎縮の程度は 380 例 (68%) が高度であった。

以上の結果から、鳥肌胃炎は非鳥肌胃炎に比べて有意に若年 (48.5 [23-78] 歳 vs 63 [23-94] 歳、 $P < 0.01$) で、女性に有意に多く認めた (69% vs 41%、 $P < 0.01$)。また消化器症状を有する割合 (72% vs 49%、 $P < 0.01$) や合併する胃癌における未分化型癌の割合 (100% vs 16%、 $P < 0.01$) が有意に多く、胃粘膜萎縮の程度が有意に軽度であった (61% vs 31%、 $P < 0.01$)。

・検討2

鳥肌胃炎において、発癌症例 6 例と非発癌症例 108 例を比較した結果、年齢や性、消化性潰瘍や過形成性ポリープの有無、胃粘膜萎縮の程度に有意な差を認めなかったが、胃体部小彎に観察される多数の白斑所見は発癌症例に有意に多く認められた (83% vs 26%、 $P < 0.01$)。この白斑は生検あるいは手術標本により病理組織学的にリンパ濾胞であることがわかった。

・検討3

H. pylori 除菌後に内視鏡で追跡し得た症例は、鳥肌胃炎 82 例、非鳥肌胃炎 220 例であり、平均 3 年以上の追跡の結果、鳥肌胃炎からの発癌は認めなかったが、非鳥肌胃炎から 7 例 (3%) に発癌を認めた (分化型癌 5 例、未分化型癌 2 例)。

【結 語】

鳥肌胃炎は *H. pylori* が陽性的高齢者にも観察され、胃体部小彎の多数の白斑所見が未分化型癌高危険群における内視鏡マーカーである可能性を見出した。*H. pylori* 除菌後の鳥肌胃炎症例に胃癌が発生しなかったことから、鳥肌胃炎は非鳥肌胃炎と比較して *H. pylori* 除菌治療の良い適応であろうと考える。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成30年6月27日、7月4日、5日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

胃癌は未だ我が国の癌関連死亡者の多くを占め、2016年度には約4.5万人が胃癌によって死亡している。ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori* ; *H. pylori*) は、1994年に世界保健機構/国際がん研究機関により胃癌発生に強く関連するとしてdefinite carcinogen (Group 1)と定義され、以降、*H. pylori*感染に起因する胃炎と胃癌罹患との関連については、多方面にわたるデータが多数報告されている。しかし、慢性胃炎が胃癌発生に果たす役割の詳細は未だ不明である。鳥肌胃炎は*H. pylori*関連胃炎の一型であり、上部消化管内視鏡検査で胃前庭部を中心とする粘膜に均一な白色小隆起が密集する所見を特徴とする。組織学的には高度な炎症細胞の浸潤とリンパ濾胞の過形成を示す。従来、*H. pylori*陽性の小児に特有の現象と考えられていたが、近年、成人とくに若年女性にも多く認められることが認識されるようになった。さらに、胃癌とくに未分化型胃癌の合併例が多数報告され、胃癌発生の高危険群として注目されている。しかし、鳥肌胃炎の臨床的意義は未だ不明な点多く、治療戦略も十分に確立されていない。そこで本論文では、鳥肌胃炎症例を、*H. pylori*陽性の非鳥肌胃炎症例と比較して疫学的かつ臨床的に後ろ向きに検討することにより、鳥肌胃炎の臨床的意義を究明するとともに、胃発癌リスクに関して検討を行った。

その結果、

- (1) 鳥肌胃炎群は非鳥肌胃炎群に比べて若年女性に有意に多く認めた。また消化器症状を有する割合や合併する胃癌における未分化型癌の割合が有意に高く、胃粘膜萎縮の程度が有意に軽度であった。
- (2) 鳥肌胃炎に合併する胃癌の特徴は、女性の胃体部に発生する未分化型胃癌であった。
- (3) 鳥肌胃炎において発癌群と非発癌群を比較した結果、年齢や性、消化性潰瘍や過形成性ポリープの有無、胃粘膜萎縮の程度に有意な差を認めなかったが、胃体部小彎に観察される多数の白斑所見は発癌症例に有意に高率に認められた。この白斑は生検あるいは手術標本により病理組織学的にリンパ濾胞であった。
- (4) *H. pylori* 除菌後に鳥肌胃炎群からの発癌を認めなかったが、非鳥肌胃炎群から3%の発癌を認めた。

以上より、本論文の検討の結果、*H. pylori* 除菌後の鳥肌胃炎症例に胃癌が発生しなかったことから、鳥肌胃炎は非鳥肌胃炎と比較して *H. pylori* 除菌治療の良い適応である可能性を示唆するとともに、胃体部小彎に観察される多数の白斑所見が、鳥肌胃炎における未分化型癌高危険群の抽出に寄与するという新しい知見を提示するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第977号		
学位授与の日	平成30年8月7日		
氏名	城 道久		
学位論文の題目	Perinatal outcome of vaginal delivery with epidural analgesia initiated at the early or late phase of labor period: a retrospective cohort study in the Japanese population. (硬膜外麻酔を早期または後期に導入した経膈分娩例の周産期予後に 関する、日本人集団における後ろ向きコホート研究)		
論文審査委員	主査	教授 鈴木 啓之	
	副査	教授 川股 知之	教授 井篁 一彦

論文内容の要旨

【緒言】

分娩時の陣痛の痛みを緩和する方法として、現在は硬膜外麻酔を併用する方法が一般的となっている。欧米では多くの分娩で硬膜外麻酔併用分娩が行われているが、日本では実施している施設は少ない。また、日本における硬膜外麻酔併用分娩の方法は、子宮収縮剤で分娩誘発を平日の日中に行う計画分娩が一般的である。しかし和歌山県立医科大学附属病院は陣痛発来後、妊婦が希望した時点で麻酔導入を24時間体制で麻酔科医の協力の元に行っている、日本では極めて少ない施設の1つである。

硬膜外麻酔を導入すると、麻酔をしない妊婦と比較し分娩時間の延長、微弱陣痛に伴う分娩促進、補助経膈分娩の割合が有意に増加することが知られている。そのため、硬膜外麻酔を早く導入すると微弱陣痛に伴う分娩促進、補助経膈分娩の割合を増加すると懸念する産科医療従事者は多い。実際は分娩進行のどの時期に麻酔を導入しても分娩の転帰に差は無いことが海外から報告されている。しかし、日本人でも同様なことが言えるのかは、自然陣痛発来後に麻酔を24時間体制で導入する施設が日本では極めて少ないため、まだ十分には明らかになっていない。

また、海外の研究では硬膜外麻酔の導入時期を Friedman 曲線に従い (Friedman EA. Bull N Y Acad Med. 1972)、分娩活動期に入る前の子宮口開大 3cm 以下の時期を early phase、子宮口開大 4cm 以上を late phase と設定し比較した研究が主である。2002 年に Zhang らが分娩活動期に入るのは現在では子宮口 6cm 以上が妥当と報告した (Zhang J et al. Obstet Gynecol. 2002) が、新しい定義 (early phase : 5cm 以下, late phase : 6cm 以上) で分類し比較した研究は報告されていない。

今回は日本人集団で硬膜外麻酔併用で経膈分娩になった症例において、従来の定義と新しい定義での周産期予後の比較に関する後ろ向きコホート研究を行った。

【方法】

2010年5月から2015年8月の間に和歌山県立医科大学附属病院で妊娠37週0日から妊娠41週6日の間に陣痛発来後、硬膜外麻酔併用で経膈分娩となった症例を対象とした。陣痛開始前に子宮収縮剤で分娩誘発を行った症例、多胎、帝王切開、子宮内胎児死亡、非頭位、重度の胎児先天奇形の症例は除外した。

本研究期間中は、麻酔科医により脊髄くも膜下麻酔と硬膜外麻酔を併用する combined spinal epidural analgesia (CSEA) 法で陣痛の緩和を行った。

本研究は和歌山県立医科大学倫理審査委員会の承認を得て実施した (No.1721)。

【結果】

研究対象期間中に 3,250 例の分娩があり、その中で本研究の条件を満たしたのは 128 例であった。128 例のうち、初産婦は 83 例、経産婦は 45 例であった。

硬膜外麻酔を early phase (子宮口 3cm 以下) に留置した群と late phase (子宮口 4cm 以上) に留置した群で比較すると初産婦の群 (n=83) では分娩第 1 期 (陣痛開始～子宮口全開までの時間) が early phase に留置した群の方が late phase に留置した群より有意に長かった (13.7 時間 vs. 10.1 時

間、 $p=0.016$)。分娩第2期の時間(子宮口全開大～児娩出までの時間)、微弱陣痛のため子宮収縮剤(オキシトシン)を使用した割合、補助経膈分娩(吸引分娩、子宮底圧迫法)の割合、帝王切開術へ移行の割合、児の短期予後(臍帯動脈血pH、Apgar Score 1 分值7点以下の割合、Apgar Score 5 分值7点以下の割合、NICU入院率)に差は無かった。経産婦の群($n=45$)ではearly phaseに留置した群とlate phaseに留置した群の比較でApgar Score 1 分值7点以下の割合(20.0% vs. 0%、 $p=0.033$)に有意差を認めたが、分娩第1期・第2期の時間、微弱陣痛のため子宮収縮剤(オキシトシン)を使用した割合、補助経膈分娩(吸引分娩、子宮底圧迫法)の割合、帝王切開術に移行した割合、臍帯動脈血pH、Apgar Score 5 分值7点以下の割合、NICUの入院率に差は無かった。

硬膜外麻酔の留置時期を新しい定義(new early phase: 5cm以下、new late phase: 6cm以上)の分類で比較すると、初産婦の群($n=78$)では分娩第1期がnew early phaseに留置した群の方がnew late phaseに留置した群より有意に長かった(13.3時間 vs. 6.9時間、 $p=0.035$)。分娩第2期の時間、微弱陣痛のため子宮収縮剤(オキシトシン)を使用した割合、補助経膈分娩(吸引分娩、子宮底圧迫法)の割合、帝王切開術に移行した割合、児の短期予後(臍帯動脈血pH、Apgar Score 1 分值7点以下の割合、Apgar Score 5 分值7点以下の割合、NICU入院率)に差は無かった。経産婦の群($n=45$)ではnew early phaseに留置した群とnew late phaseに留置した群の比較で分娩第1・2期の時間、微弱陣痛のため子宮収縮剤(オキシトシン)を使用した割合、補助経膈分娩(吸引分娩、子宮底圧迫法)の割合、帝王切開術に移行した割合、児の短期予後(臍帯動脈血pH、Apgar Score 1 分值7点以下の割合、Apgar Score 5 分值7点以下の割合、NICU入院率)に差は無かった。

硬膜外麻酔併用分娩における分娩促進、補助経膈分娩が生じる背景因子を探索するため、全症例($n=128$)において初産・経産、母体分娩時年齢(35歳以上)、分娩前後のBMI、硬膜外麻酔開始時期(early phaseまたはlate phaseで分類し、従来の定義と新しい定義でそれぞれ分析)を変数とした多変量ロジスティック回帰分析を行った。経産婦は初産婦と比較し分娩促進(OR: 0.150 [95%CI: 0.062-0.362, $p<0.001$])、吸引分娩(OR: 0.141 [95%CI: 0.046-0.429, $p=0.001$])、子宮底圧迫法(OR: 0.232 [95%CI: 0.097-0.559, $p=0.001$])が必要になるオッズ比は有意に低かった。硬膜外麻酔開始時期は、従来の定義および新しい定義どちらでの分娩促進・吸引分娩・子宮底圧迫法の頻度に影響を与える因子とはならなかった。

【考察】

硬膜外麻酔を導入することによりその後の分娩進行が緩やかになることが多いため、分娩進行をスムーズに進めるには、硬膜外麻酔の導入をより遅くした方がいいと考えている産科医療従事者は多い。しかしその点は感覚的な判断であり科学的な検証結果ではない。

本研究では、海外での報告と同様に、日本人における硬膜外麻酔併用分娩において麻酔導入の時期が(従来の定義、および新しい定義においても)周産期予後、特に分娩第2期の時間、微弱陣痛に伴う子宮収縮剤による分娩促進の頻度、補助経膈分娩(吸引分娩、子宮底圧迫法)、帝王切開の頻度に影響を与えないことが示された。またZhangらが提唱する新しい分娩進行期分類での比較においても、旧来の定義と同様に麻酔導入の時期が周産期予後に影響を与えないことが示された。

この結果は、分娩進行に関わらず妊産婦が鎮痛を希望したタイミングで硬膜外麻酔を導入することは理にかなったことであり、臨床的に意義ある結果であると考えられる。また、初産婦は経産婦と比較し、分娩促進・補助経膈分娩の割合が高くなることも、分娩管理を行う上で臨床認識すべきことであると本研究の結果から結論付けられた。

審査の要旨(審査の日、方法、結果)

平成30年7月18日、7月26日に論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の審査を行った。硬膜外麻酔併用分娩(以下無痛分娩)は欧米では数多く実施されているが、日本では2016年で6.1%と実施割合は少ない。和歌山県立医科大学では計画分娩では無く、陣痛発来後に妊婦が希望した段階で無痛分娩を24時間体制で行う、日本では数少ない施設の1つである。

無痛分娩により子宮収縮が減弱し、分娩遷延に伴う子宮収縮剤の使用、分娩停止に伴う補助経膈分

娩・帝王切開の増加が懸念される。麻酔開始時期をFriedman分類に基づく早期(子宮口開大3cm以下)後期(4cm以上)の分類による周産期予後は、欧米では差が無いと報告されている。しかし体型や人種等が異なる日本人において同一に言えるかは、陣痛発来後に麻酔を導入する施設が日本では極めて少ないため、十分には明らかになっていない。またZhangらが2002年に提唱した現代人の分娩進行曲線に基づき、早期(5cm以下)後期(6cm以上)で分類し周産期予後を研究した報告は無い。

本研究では2010年5月から2015年9月の間に脊髄くも膜下硬膜外併用麻酔(CSEA)により無痛分娩を実施した128例(初産婦83例、経産婦45例)を研究対象とした。結果、Friedmanの分類およびZhangの分類でも、初産婦では分娩第1期の時間が後期群より早期群で有意に長い結果であった(13.7 h vs 10.1 h, $p=0.016$, および 13.4 h vs 6.9 h, $p=0.035$)が、分娩第2期、オキシトシンによる分娩促進、補助経膈分娩、緊急帝王切開の割合、児の短期予後(Apgar Score 1分/5分値、臍帯動脈血pH値、NICU入院率)に差は無かった。分娩促進、吸引分娩、子宮底圧迫法をアウトカムとした多変量解析では、経産婦が初産婦と比較しそれぞれオッズ比が有意に低かった(促進: 0.150 [95%CI 0.062-0.362], $p<0.001$, 吸引分娩: 0.141 [95%CI 0.046-0.429], $p=0.001$, 子宮底圧迫法: 0.232 [95%CI 0.097-0.559], $p=0.001$)。しかし麻酔開始のタイミング(早期または後期)はアウトカムに影響を与える要因とならなかった。

本論文は日本人において無痛分娩開始のタイミングを2つの分類で評価しても周産期予後に影響を与えないことから、分娩進行の程度に関わらず妊婦が希望する時に麻酔を導入することの至適性を初めて示したものであり、学位論文として価値あるものとして認めた。

学位記番号	博(医)乙第978号		
学位授与の日	平成30年9月18日		
氏名	前田 孝浩		
学位論文の題目	Factors associated with lumbar spinal stenosis in a large-scale, population-based cohort: The Wakayama Spine Study (大規模住民コホートにおける腰部脊柱管狭窄症の発症関連因子 The Wakayama Spine Study-)		
論文審査委員	主査	教授 中尾 直之	
	副査	教授 田島 文博	教授 山田 宏

論文内容の要旨

【背景】

腰部脊柱管狭窄症(Lumbar Spinal Stenosis: LSS)は腰椎部脊柱管の狭窄により神経/血管のスペースが減少し、立位の継続/歩行により惹起される下肢の痛み・しびれあるいは間欠跛行など特徴的な症状を呈する症候群である。主な原因は加齢による椎間板・黄色靭帯・椎間関節の変性肥厚と考えられているが、加齢性変化は健常人にも多く見られる所見であること、同程度の脊柱管狭窄を有していても症状を発症する人としない人がいることから、発症メカニズムについて不明な点を多く残している。過去には、LSS患者において糖尿病(DM)や末梢動脈疾患(PAD)が高率に合併することが報告されており、これらが脊柱管狭窄症の発症に関与するものと推察されている。しかし、内科的併存疾患もまた加齢にともなって有病率が増加すること、過去の報告は患者-対照研究が殆どで選択バイアスが大きいことから、一定の結論には至っていなかった。

【目的】

腰部脊柱管狭窄症の発症に関連する要因を明らかにすること

【研究デザイン】

一般住民を対象とする横断研究

【対象】

The ROAD study のサブコホートとして 2008 年に設立した The Wakayama Spine Study ベースライン調査に参加した一般住民 1,063 名のうち、MRI 撮影の同意が得られなかった 52 名、MRI 撮影が禁忌(ペースメーカー挿入後)であった 2 名、データに欠落があった 41 名を除く計 968 名(男性 319 名、女性 649 名、平均 66.3±13.5 歳)。

【方法】

本研究においては MRI 画像上の腰部脊柱管狭窄を radiographic LSS (rLSS)、症状が発症した状態を symptomatic LSS (sLSS) と定義する。対象者全員に腰椎部 MRI を実施し、rLSS を L1/2-L5/S の各椎間高位横断像で 4 段階評価(なし、軽度、中等度、高度)した(Table 1)。sLSS については北米脊椎学会の定義に準じ、問診、身体所見、MRI 所見から整形外科専門医が診断した (Table 2)。生活習慣(飲酒・喫煙の有無など)に関する問診、身体測定、生理学的検査、血液生化学検査を同時に実施した。HbA1c \geq 6.1 を糖尿病、Ankle brachial pressure index (ABI) $<$ 0.9 を PAD と診断した。

【統計解析方法】

①過去の報告に習い sLSS 有病者と非有病者の 2 群間で性、年齢、BMI、過体重の割合、喫煙習慣・飲酒習慣の有無、DM・PAD 有病者割合、rLSS の grade を比較した。②sLSS の有無を目的変数、性・年齢・過体重の有無・喫煙/飲酒習慣の有無・糖尿病の有無・ABI(連続値)・rLSS grade を説明変数とする多重ロジスティック回帰モデルを作成した。説明変数間の多重共線性は Variance Inflation

Factor(VIF)で確認した。統計解析ソフトは JMP Pro 12.2 (SAS institute Japan: Tokyo Japan)を用い、有意水準については $p < 0.05$ を「有意」、 $0.05 \leq p < 0.1$ を「傾向あり」と定義した。

【結果】

対象者 968 名中、sLSS 有病者は 92 名 (9.5%)、DM 有病者は 81 名 (8.4%)、PAD 有病者は 18 名 (1.9%) であった(**Table 3**)。中等度以上の rLSS 有所見者は 739 名 (76.3%) であった。①sLSS 有病者と非有病者間の比較では、sLSS 群の方が有意に高齢で、DM 有病者と PAD 有病者の割合が高く、中等度から高度の rLSS を示す者の割合が高かった(**Table 4**)。②多重ロジスティック回帰の結果、sLSS の有病には ABI が有意に関連し (1SD 減少した時の有病オッズ比 1.24[95% CI: 1.06-1.52])、DM が関連する傾向を認めた (DM ありの場合有病オッズ比 1.89[0.98-3.50])。さらに、画像上中等度狭窄が存在する時の sLSS 有病オッズ比は 4.31[1.66-1.47]、高度狭窄が存在する時の sLSS 有病オッズ比 9.95[3.70-34.4]であった (回帰モデルの AUC=0.727) (**Table 5**)。

【考察】

本研究の目的は sLSS の発症に関連する因子を明らかにすることであった。その結果、sLSS の有病には MR 画像上の狭窄程度および ABI の低下が有意に関連し、また、DM が関連する傾向にあることが明らかになった。我々の知る限りこれは ABI 低下と sLSS 発症の有意な関連を示した初めての報告である。本研究の強みは選択バイアスの少ない一般住民コホートを対象としたこと、MR 画像と身体所見の双方を評価して sLSS を診断するという現時点での Gold standard を採用したこと、発症の交絡因子も考慮した上で、sLSS の発症関連因子を明らかにしたことである。

ABI 低下は閉塞性動脈硬化症の存在を示唆する。sLSS の症状発現は、姿勢の影響を受ける (腰椎伸展により悪化する) ことやプロスタグランジン E₁ 製剤により緩和されること、動物実験の結果などから、馬尾の組織学的な損傷だけでなく神経絞扼による神経内血流低下が関与するものと推察されている。本研究結果はこれらの報告と矛盾しない。

これまで sLSS と PAD は鑑別すべき疾患とされ、それらが併存することによる臨床症状への影響は殆ど議論されてこなかった。本研究は横断的デザインのため原因-結果の因果関係を確定できないことや、腰椎の動的因子が評価されていないなどの制約が存在する。しかし、本研究結果は腰部脊柱管狭窄症の発症メカニズム研究ひいては予防や治療法の発展に寄与するものと考えられる。

【結論】

一般住民コホートの横断研究により、LSS の発症には画像上の狭窄程度とともに ABI 低下が有意に関連することが明らかとなった。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成 30 年 9 月 3 日・5 日、論文審査担当者は学位申請者の出席を求め、論文審査を行った。

【背景と目的】

腰部脊柱管狭窄症(Lumbar Spinal Stenosis: LSS)は腰部脊柱管の狭窄により神経/血管のスペースが減少し、立位の継続/歩行により惹起される下肢の痛み・しびれあるいは間欠跛行など特徴的な症状を呈する症候群である。主な原因は加齢による椎間板・黄色靭帯・椎間関節の変性肥厚と考えられているが、加齢性変化は健常人にも多く見られる所見であること、同程度の脊柱管狭窄を有していても症状を発症する人としない人がいることから、発症メカニズムについて不明な点を多く残している。過去には、LSS 患者において糖尿病(DM)や末梢動脈疾患(PAD)が高率に合併することが報告されており、これらが脊柱管狭窄症の発症に関与するものと推察されている (本研究では PAD の診断に Ankle brachial index: ABI を用いて評価した)。しかし、内科的併存疾患もまた加齢にともなって有病率が増加すること、過去の報告は患者-対照研究が殆どで選択バイアスが大きいことから、一定の結論には至っていなかった。申請者は腰部脊柱管狭窄症の発症に関連する要因を明らかにした。

【結果】

対象者 968 名中、LSS 有病者は 92 名 (9.5%)、DM 有病者は 81 名 (8.4%)、PAD 有病者は 18 名 (1.9%) であった。中等度以上の画像上狭窄の有所見者は 739 名 (76.3%) であった。①LSS 有病者と非有病者間の比較では、LSS 群の方が有意に高齢で、DM 有病者と PAD 有病者の割合が高く、中等度から高度の画像上狭窄を示す者の割合が高かった。②多重ロジスティック回帰の結果、LSS の有病には ABI が有意に関連し (1SD 減少した時の有病オッズ比 1.24[95% CI: 1.06-1.52])、DM が関連する傾向を認めた (DM ありの場合有病オッズ比 1.89[0.98-3.50])。さらに、画像上中等度狭窄が存在する時の LSS 有病オッズ比は 4.31[1.66-1.47]、高度狭窄が存在する時の LSS 有病オッズ比は 9.95[3.70-34.4]であった (回帰モデルの AUC=0.727)。

【考察・結論】

本研究の目的は LSS の発症に関連する因子を明らかにすることであった。その結果、LSS の有病には MR 画像上の狭窄程度および ABI の低下が有意に関連し、また、DM が関連する傾向にあることが明らかになった。我々の知る限りこれは ABI 低下と LSS 発症の有意な関連を示した初めての報告である。本研究の強みは選択バイアスの少ない一般住民コホートを対象としたこと、MR 画像と身体所見の双方を評価して LSS を診断するという現時点での Gold standard を採用したこと、発症の交絡因子も考慮した上で、LSS の発症関連因子を明らかにしたことである。

ABI 低下は PAD の存在を示唆する。LSS の症状発現は、姿勢の影響を受ける (腰椎伸展により悪化する) ことやプロスタグランジン E₁ 製剤により緩和されること、動物実験の結果などから、馬尾の組織学的な損傷だけでなく神経絞扼による馬尾血流低下が関与するものと推察されている。本研究結果はこれらの報告と矛盾しない。

これまで LSS と PAD は鑑別すべき疾患とされ、それらが併存することによる臨床症状への影響は殆ど議論されてこなかった。本研究は横断的デザインのため原因-結果の因果関係を確定できないことや、腰椎の動的因子が評価されていないなどの制約が存在する。しかし、本研究結果は腰部脊柱管狭窄症の発症メカニズム研究ひいては予防や治療法の発展に寄与するものと考えられる。一般住民コホートの横断研究により、LSS の発症には画像上の狭窄程度とともに ABI 低下が有意に関連することが明らかとなった。

本論文は、腰部脊柱管狭窄症の発症に関連する要因を明らかにした点で意義深いものであり、学位論文として価値のあるものであると認めた。

学位記番号	博(医)乙第979号		
学位授与の日	平成30年10月16日		
氏名	津野 香奈美		
学位論文の題目	Workplace bullying and psychological distress: a longitudinal multilevel analysis among Japanese employees (職場のいじめと心理的ストレス反応： 日本人従業員における縦断的マルチレベル分析)		
論文審査委員	主査	教授 竹下 達也	
	副査	教授 鵜飼 聡	教授 村田 顕也

論文内容の要旨

【緒言】

職場のいじめは、職場の心理社会的ストレス要因の中でも顕著なものの一つである。職場のいじめは同じ職場の上司や同僚から一定期間、繰り返し敵対的・攻撃的な言動に曝される状況であると定義され、横断研究においても縦断研究においても職場のいじめが健康に被害をもたらすことが報告されており、例えば心理的ストレス反応、うつ病、心的外傷後ストレス障害、そして虚血性心疾患との関連が報告されている。また、離職も職場のいじめの代表的な組織的アウトカムの一つである。多くの研究が職場のいじめと離職意思、離職、転職との関連を報告しており、職場のいじめを原因とする配置転換、休職、新規採用に関わる費用は組織にとっても大きな負担となっている。

職場のいじめは被害者本人だけでなく、その周囲の従業員にも影響をもたらすことが複数の研究で報告されている。しかしながら近年では、自分自身がいじめを受けたかどうかを調整すると、いじめの目撃と心理的ストレス反応との間に有意な関連を見られなくなったとする報告もあり、議論を呼んでいる。これらの方法論的問題を解決するためには、職場にいじめが存在するかどうか、その職場の従業員の精神健康や離職意思にどのように影響を与えるのか（文脈効果）をマルチレベル分析を用いて検討することが有効と言える。なおかつ、個人の職場のいじめへの曝露を調整した上でこれらの関連を見るのが重要である。

これらを踏まえ、本研究では部及び課における職場のいじめの存在と、将来の従業員個人の心理的ストレス反応及び離職意思との関連を調べることを目的とし、縦断的マルチレベル分析によって検討を行った。

【対象および方法】

関東地方の自治体職員 3,242 名に調査票への回答を依頼し、そのうちベースライン調査に回答した 2,638 名（回答率 83.9%）を対象として 1 年間の追跡を行った。

調査項目は、(1) 職場のいじめ：Negative Acts Questionnaire-Revised (NAQ-R)、(2) 心理的ストレス反応：K6、(3) 離職意思、(4) 個人属性・職業特性：性別、年齢、学歴、婚姻状況、職種、職位、交代勤務の有無、慢性疾患の有無、追跡期間中のライフイベントの有無、とした。

統計解析には SPSS 23.0J for Windows を使用した。個人が課 (n=100)、さらに部 (n=24) にネストされる 3 階層構造を考慮し、課レベルの職場のいじめが個人レベルの心理的ストレス反応及び離職意思にもたらす影響（文脈効果）を明らかにするため、一般線形混合効果モデルによるマルチレベル分析を行った。個人レベルの連続変数は課平均で中心化、課レベルの連続変数は全体平均で中心化し、個人レベルのカテゴリカル変数に関してはダミー変数を作成した。なお統計的有意水準は 5% とした。

【結果および考察】

2,037 名が 1 年後の追跡調査に回答した（追跡率：77.2%）。調査回答者の平均年齢は 42.8 歳、男性がやや多く、大多数が大卒又は院卒、既婚、事務職、交代勤務のないフルタイムの非管理職であった。

変数効果を持つ切片のみを仮定した混合効果モデル (Model 1) において、課レベルの変数効果が確認され、調整変数を投入しないモデル (Model 2)、個人属性・職業特性を調整後のモデル (Model

3) においても、課レベルの職場のいじめは1年後の個人の心理的ストレス反応と関連していた。追加で個人の職場への曝露 (Model 4) あるいはベースライン時の個人の心理的ストレス反応 (Model 5) を投入した際にも、課レベルの職場のいじめと1年後の個人の心理的ストレス反応との間の関連は有意なままであった。一方で、課レベルの職場のいじめを投入したモデルにおいて、個人の職場のいじめへの曝露と個人の心理的ストレス反応との間に有意な関連は確認されなかった。その他の個人レベル変数では、女性、若者、非婚者、病院勤務の看護師/助産師、追跡期間中に何らかのライフイベントを経験した者、ベースライン時に心理的ストレス反応を持っていたことも、1年後の個人の心理的ストレス反応の予測因子であった。

同様の結果が、離職意思に関しても確認された。課レベルの職場のいじめは、個人属性・職業特性を投入したモデル (Model 3) においても、1年後の個人の離職意思と有意に関連していた。また、心理的ストレス反応の結果と同様に、個人の職場への曝露 (Model 4) あるいはベースライン時の心理的ストレス反応 (Model 5) を投入した後でも、これらの関連は有意なままであった。一方でやはり、課レベルの職場のいじめを投入したモデルにおいて、個人の職場のいじめへの曝露と個人の離職意思との間に有意な関連は確認されなかった。その他の個人レベル変数では、病院勤務の看護師/助産師、追跡期間中に何らかのライフイベントを経験した者、ベースライン時に高い離職意思得点を持っていた者は、1年後により強い離職意思を感じる傾向にあった。

これらのことから、職場においていじめ行為が存在すること自体が、個人がいじめを受けているかどうかに関係なく、従業員のメンタルヘルス不調にさせる、あるいは辞めたいという意思を促進させる強い予測指標となることが示唆された。所属部署にいじめ行為が存在することは、その従業員個人がいじめを受けているか目撃したかどうかに関わらず、何らかの非尊重的な対人関係や職場風土をその従業員が経験していることを意味する。特にいじめは段々とエスカレートする性質のある行為であることから、次のターゲットになることを恐れて、従業員が委縮し、ストレスを感じたり離職を考えたりすることに繋がりやすい。つまり、職場のいじめは加害者―被害者間の個人的な問題ではなく、職場を安全でない環境にする行為であり、他の従業員に対しても負の波及効果をもたらす可能性があると言える。そのため、職場のいじめが発生した際、被害者本人もしくは周囲の目撃者のみにカウンセリング等のサポートを提供することは十分とは言えない可能性があり、より多くの従業員の健康と生産性を守るためには、職場のいじめを拡大化させない、初期の段階で止めさせる等の職場への介入を行う必要があると考えられる。

【結語】

職場のいじめの心理的ストレス反応・離職意思に対する文脈効果が確認できた。職場のいじめを防止することは、直接の被害を受けない従業員にとってもメンタルヘルス不調や離職の防止に繋がる可能性がある。

審査の要旨 (審査の日、方法、結果)

平成30年10月2日、論文審査委員は学位申請者の出席を求め、上記論文の口頭審査を行った。

職場のいじめは、職場の心理社会的ストレス要因の中でも顕著なものの一つである。職場のいじめは被害者本人だけでなく、その周囲の従業員にも影響をもたらすことが複数の研究で報告されている。そこで、本研究では部及び課における職場のいじめの存在と、将来の従業員個人の心理的ストレス反応及び離職意思との関連を調べることを目的とし、縦断的マルチレベル分析によって検討を行った。

関東地方の自治体職員3,242名に調査票への回答を依頼し、そのうちベースライン調査に回答した2,638名 (回答率83.9%) を対象として1年間の追跡を行い、回答が得られた2,037名 (平均年齢42.8歳) を解析対象としたところ、以下のことが明らかになった。

変量効果を持つ切片のみを仮定した混合効果モデル (Model 1) において、課レベルの変量効果が確認され、調整変数を投入しないモデル (Model 2) 、個人属性・職業特性を調整

後のモデル (Model 3) においても、課レベルの職場のいじめは1年後の個人の心理的ストレス反応と関連していた。追加で個人の職場への曝露 (Model 4) あるいはベースライン時の個人の心理的ストレス反応 (Model 5) を投入した際にも、課レベルの職場のいじめと1年後の個人の心理的ストレス反応との間の関連は有意なままであった。同様の結果が、離職意思についても確認された。課レベルの職場のいじめは、個人属性・職業特性を投入したモデル (Model 3) においても、1年後の個人の離職意思と有意に関連していた。また、心理的ストレス反応の結果と同様に、個人の職場への曝露 (Model 4) あるいはベースライン時の心理的ストレス反応 (Model 5) を投入した後でも、これらの関連は有意なままであった。

以上の結果から、職場においていじめ行為が存在すること自体が、個人がいじめを受けているかどうかに関係なく、従業員のメンタルヘルス不調にさせる、あるいは辞めたいという意思を促進させる強い予測指標となることが示唆された。このことから、職場のいじめを防止することは、直接の被害を受けない従業員にとってもメンタルヘルス不調や離職の防止に繋がる可能性があると考えられた。

本論文は、職場要因と精神保健との関係を明らかにすることで、労働者における精神疾患リスク低減に有用である可能性を示したものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第980号		
学位授与の日	平成30年11月20日		
氏名	奴田 絢也		
学位論文の題目	Kupffer Imaging by Contrast-Enhanced Sonography With Perfluorobutane Microbubbles Is Associated With Outcomes After Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma (ソナゾイド造影エコークッパーイメージと RFA 後の再発・予後との関連性について)		
論文審査委員	主査	教授 山上 裕機	
	副査	教授 園村 哲郎	教授 北野 雅之

論文内容の要旨

【緒言】

肝細胞癌の肉眼型と悪性度には強い関連性があり、最適な治療方針を決定する上で、肉眼型を正確に評価することは重要である。超音波造影剤ソナゾイドはクッパーイメージを撮像でき、クッパー細胞のない腫瘍は、境界明瞭な欠損像として描出されるため、クッパーイメージは肉眼型を正確に評価可能であると報告されているが、ラジオは焼灼療法(radiofrequency ablation: RFA)後の再発・予後との関連性については未だ明らかではない。本研究の目的は、造影エコーのクッパーイメージと RFA 後の再発・予後との関連性を検討することである。

【方法】

2007年1月から2011年10月の間に、RFA前にソナゾイドを用いて造影エコーを施行した初発多血性肝細胞癌257例の内、超音波の死角や深部のため腫瘍を同定できなかった31例を除外した226例を解析の対象とした。造影エコークッパー相における腫瘍欠損像の輪郭が不整であるものを不整欠損、腫瘍欠損を認めない、もしくは不整でないものを非不整欠損と定義し、対象を2群に分類した。4個以上の肝内再発、脈管浸潤、播種、遠隔転移といった根治が困難な再発を危機的再発と定義し、不整欠損群と非不整欠損群の全再発率、危機的再発率、生存率、癌死率をKaplan Meier法を用いて比較した。また、これらの再発・予後に寄与する因子についてCox回帰分析を用いて解析した。

【結果】

累積5年危機的再発率は、不整欠損群、非不整欠損群でそれぞれ49%と17%であり有意差を認めた($P<0.001$)。累積5年生存率はそれぞれ46%と61%、累積5年癌死率はそれぞれ33%と7%であり、不整欠損群のほうが生存率が有意に低く($p<0.001$)、癌死率が有意に高かった($p=0.001$)。危機的再発に寄与する単変量解析では、腫瘍径、C型肝炎ウイルス感染の有無、lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein level (AFP-L3 分画)、TACE および不整欠損像が有意な因子であったが、多変量解析では腫瘍径、AFP-L3 分画、不整欠損像が独立因子であった。生存に寄与する因子の単変量解析では、腫瘍径、Child 分類、AFP-L3 分画および不整欠損像が有意な因子であり、多変量解析では、それらすべてが独立因子であった。癌死に寄与する因子の単変量解析では、腫瘍径、AFP-L3 分画、TACE および不整欠損像が有意な因子であったが、多変量解析では TACE と不整欠損像が独立因子であった。

【考察】

造影エコークッパー相において不整欠損像を呈する肝細胞癌は、単純結節周囲増殖型や多結節融合型といった悪性度の高い肝細胞癌を反映していると考えられる。そのような肝細胞癌は治療前にすでに顕微鏡的な脈管浸潤、微小肝内転移を来している頻度が高く、RFA後の早期の危機的再発および癌死につながり、予後不良の原因になると思われる。それ故、造影エコークッパー相において不整欠損像を呈する肝細胞癌に対するRFAの適応は、慎重に考えるべきである。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成 30 年 10 月 26 日、10 月 30 日、11 月 5 日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

ラジオ波焼灼療法（radiofrequency ablation: RFA）は、切除不適小肝細胞癌に対して開発された局所療法の一つであり、切除に比べ低侵襲で、かつ繰り返し根治的治療が行える利点がある。しかし、RFA 後に転移や脈管浸潤、播種など、根治が困難となる危機的な再発を来すことがあり、癌死に繋がる悩ましい問題である。組織学的に低分化な肝細胞癌は、すでに顕微鏡的脈管浸潤や肝内微小転移を来している頻度が高いと報告されている。また、肝細胞癌の肉眼型と悪性度との間には強い関連性があり、単純結節型より多結節癒合型や単純結節周囲増殖型のほうが分化度が低く、脈管浸潤の頻度が高いと報告されている。それ故、最適な治療方針を決定する上で、肉眼型を正確に評価することは重要である。

超音波検査は、肝腫瘍診断における最も空間分解能の高い画像検査であり、腫瘍の肉眼型を最も詳細に反映すると考えられる。ペルフルブタンマイクロバブル（ソナゾイド、第一三共）は、クッパー細胞に取り込まれる性質をもつ超音波造影剤であり、腫瘍血流の評価のみならず、クッパーイメージも撮像でき、クッパー細胞のない腫瘍は、境界明瞭な欠損像として描出される。造影エコーのクッパーイメージは、肉眼型を正確に評価可能であると報告されているが、RFA 後の再発・予後との関係については未だ明らかではない。そこで、本論文では、造影エコーのクッパーイメージと RFA 後の再発・予後との関連性について検討を行った。

まず、造影エコークッパー相における腫瘍欠損像の輪郭が不整であるものを不整欠損、腫瘍欠損を認めない、もしくは不整でないものを非不整欠損と定義し、対象を 2 群に分類した。検討した結果、

(1) RFA 後の全再発率を 2 群で比較しても有意差を認めなかったが、累積 5 年危機的再発(4 個以上の肝内再発、脈管浸潤、播種、遠隔転移といった根治が困難な再発を危機的再発と定義)率は、不整欠損群、非不整欠損群でそれぞれ 49%と 17%であり有意差を認めた。累積 5 年生存率はそれぞれ 46%と 61%、累積 5 年癌死亡率はそれぞれ 33%と 7%であり、不整欠損群のほうが生存率が有意に低く、癌死亡率が有意に高かった。

(2) 危機的再発に寄与する単変量解析では、腫瘍径、C 型肝炎ウイルス感染の有無、lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein level (AFP-L3 分画)、TACE および不整欠損像が有意な因子であったが、多変量解析では腫瘍径、AFP-L3 分画、不整欠損像が独立因子であった。生存に寄与する因子の単変量解析では、腫瘍径、Child 分類、AFP-L3 分画および不整欠損像が有意な因子であり、多変量解析では、それらすべてが独立因子であった。癌死に寄与する因子の単変量解析では、腫瘍径、AFP-L3 分画、TACE および不整欠損像が有意な因子であったが、多変量解析では TACE と不整欠損像が独立因子であった。

以上より、造影エコークッパーイメージと RFA 後の再発・予後との関連性を検討した結果、以下の結論が得られた。

(1) 造影エコークッパー相において不整欠損像を呈する肝細胞癌は、RFA 後早期に危機的再発を来すため、癌死亡率が高く、予後不良である。(2) 造影エコークッパーイメージは、RFA 後の危機的再発、予後に寄与する独立因子である。

本論文は肝細胞癌に対する RFA の適応に関して新しい知見を提示するものであり、学位論文として価値あるものと認めた。

学位記番号	博(医)乙第981号		
学位授与の日	平成31年3月5日		
氏名	馬庭 直樹		
学位論文の題目	Value of tissue-tracking tricuspid annular plane by speckle-tracking echocardiography for the assessment of right ventricular systolic dysfunction (スペックルトラッキング心エコー図法を用いた三尖弁輪移動距離における右室収縮不全症例検出の有効性に関する検討)		
論文審査委員	主査	教授 村垣 泰光	
	副査	教授 川股 知之	教授 赤阪 隆史

論文内容の要旨

【緒言】

右室収縮不全は様々な心肺疾患において予後規定因子であることが報告されている。右室駆出率 (right ventricular ejection fraction; RVEF) は右室収縮不全の代表的な指標とされ、心臓MRI (CMR) による計測値がそのゴールドスタンダードとされている。しかし、CMRは非簡便であり、高額な検査であることため、日常臨床では、簡便に施行できる心エコー図での評価が望まれる。近年の技術の進歩により、三次元 (3D) 心エコー図でのRVEF評価可能となっているが、エコーウィンドウの制限などから全例での施行は困難である。現在までに多くの簡易的指標がRVEFのサロゲートマーカーとして提唱されてきた。三尖弁輪収縮期移動距離 (tricuspid annular plane systolic excursion; TAPSE)、組織ドプラ法を用いた三尖弁輪側壁移動速度 (doppler tissue imaging-derived tricuspid lateral annular systolic velocity; S')、断面図からの右室面積変化率 (right ventricular fractional area change; RVFAC)、スペックルトラッキング法を用いた右室自由壁長軸ストレイン (right ventricular free wall longitudinal strain; free-RVLS) などがその代表として挙げられる。しかし、1) TAPSEやS'は角度依存性や右室側壁のみの評価方法であること、2) RVFACは描出画像に大きく依存すること、3) free-RVLSは右室側壁のみの評価方法であり、描出画像に依存することが問題点であった。

一方、スペックルトラッキング法を用い、僧帽弁輪の両端ならびに心尖部に関心領域 (ROI) を設定することで、僧帽弁輪間の midpoint の左室長軸移動距離を自動計測可能である。この技術を用いることで、角度や描出画像への影響を少なく、容易に左室長軸方向の収縮を評価できることが報告されている。本技術を三尖弁輪に応用し、三尖弁輪間の midpoint の右室長軸移動距離、ならびに拡張期右室長軸径に対する比率 (the percentage of Mid-point between Tricuspid Annular plane Displacement; MTAD) を測定することで、角度や描出画像への影響を少なくし、右室側壁と中隔側を含めた右室全体の長軸方向の収縮を評価することが可能となり、簡便なRVEF低下の検出方法として期待される。そこで本研究では、MTADによるRVEF低下の検出精度を検討し、従来指標と比較することで、右室収縮不全検出におけるMTADの有用性を検討した。

【方法】

1. 対象

2016年から2017年まで和歌山県立医科大学附属病院で3D心エコー図が施行され、不整脈、心筋梗塞の既往や心臓手術の既往がない81例のうち、画像の描出が不良で3D心エコー図による計測が困難な20例を除いた61例を対象とした。

2. 標準的な心エコー図評価

EPIQ ultrasound system (Philips Medical Systems) を用いて、TAPSE、S'、RVFAC、free-RVLSを右室収縮能の従来の指標として計測した。計測はアメリカ心エコー図学会が推奨する方法に則り行った。

3. 3D心エコー図を用いたRVEFの計測

3D心エコー図は、心尖部四腔像を基準とし、右室全体が3Dエコーで描出されるように注意を払いながら画像の取得を行った。3Dデータを用いたRVEFの計測は、4D RV-FUNCTION 2.0 software (TomTec Imaging Systems GmbH, Unterschleißheim) を用いて行った。

4. 右室自由壁長軸ストレイン (free-RVLS) の計測

右室に焦点を当てた心尖部四腔像にて画像を記録し、オフライン下でQLAB (Philips Medical Imaging) を使用し、スペックルトラッキング法にてfree-RVSLの計測を行った。free-RVLSは右室自由壁長軸を基部、中間部、心尖部の3つの領域におけるストレインカーブの平均で算出した。

5. MTADの計測

右室に焦点を当てた心尖部四腔像にて画像を記録し、オフライン下でQLAB (Philips Medical Imaging) を使用し、スペックルトラッキング法にてMTADの測定を行った。ROIを側壁側三尖弁輪部、中隔基部ならびに心尖部に設定した。以上の操作により、解析ソフトにて自動的に側壁側三尖弁輪部と中隔基部の中間点が表示され、その点が収縮期に心尖部(右室長軸方向)へ移動した距離、ならびに拡張期における中間点から心尖部までの距離に対する比率(MTAD)が自動的に計算された。

6. 検者間・検者内計測誤差の解析

無作為に抽出した20例での検者間ならびに検者内級内相関係数の解析を行った。

7. 統計学的解析

解析は全てJMP pro version 13.0を用いて行った。連続変数は平均±標準偏差で表示した。カテゴリ変数は数値とパーセントで表示した。アメリカ心エコー図学会の推奨から、右室収縮不全をRVEF45%未満と定義し、それぞれのエコー指標における右室収縮障害検出の感度、特異度を、ROC曲線を用いて算出した。それぞれの指標のAUCの比較は、Holm法にてP値を調節し、多変量検定を行った。P<0.05を統計学的に有意差ありと判定した。

【結果】

MTADは56例(91.8%)、free-RVLSは50例(82.0%)、RVFACは60例(98.4%)で計測可能であった。TAPSEとS'は全例で計測可能であった。MTAD不成功例の原因は、右室自由壁基部の描出不良であった。MTAD計測可能例では、全例が10秒以内で解析された。MTAD、TAPSE、S'、RVFAC、free-RVLSの検者内級内相関係数はそれぞれ0.991、0.928、0.995、0.907、0.915であり、検者間級内相関係数はそれぞれ0.984、0.627、0.920、0.735、0.896であった。

61例中15例でRVEF<45%の右室収縮不全例であった。右室収縮不全を有する群は、右室収縮を有さない群と比較し、TAPSE(17.1±4.4mm vs. 22.0±4.2mm, p<0.001)、S'(10.4±4.1cm/s vs. 12.9±2.0cm/s, p=0.04)、RVFAC(26.4±13.0% vs. 42.6±11.6%, p<0.001)、free-RVLS(-15.9±3.9% vs. -21.0±3.5%, p<0.001)、MTAD(11.3±3.6% vs. 19.0±3.1%, p<0.001)と、いずれの指標においても絶対値が有意に低値であった。右室収縮不全の検出精度において、MTADはカットオフ値14.7%未満で、感度93%、特異度95%、AUC 0.97であり、従来の指標と比べて高い診断精度が示された。

【考察】

本研究では、MTADは高い右室収縮不全検出能を有することが示された。さらに、MTAD計測に関する検者間ならびに検者内級内相関係数は良好であった。

既存の報告では、従来の右室収縮指標は心臓MRIによるRVEFと比較し、相関を有することが報告されてきた。しかし、1) TAPSEやS'には角度依存性があり、右室自由壁のみの評価であること、2) RVFACには描出画像に大きく依存することや、検者間・検者内誤差が大きいこと、3) free-RVLSには描出画像に依存することや右室自由壁のみの評価であること、が検査上の問題点であった。本研究で検討したMTADは、心尖部、側壁側三尖弁輪部、中隔部にROIを設定し、三尖弁輪の中心の右室長軸方向への移動距離を、スペックルトラッキング法を用いて計測する方法である。そのため、角度非依存性であり、右室自由壁のみならず中隔側も加味した右室全体の収縮を反映している点が利点で

ある。また、右室拡大を有する例では、右室心尖部の左心室側への回転（apical longitudinal rotation）という現象が認められるため、TAPSE や S' は過大評価されることが報告されている。一方、スペックルトラッキング法を用いる free-RVLS は、その影響が少ないことが報告されている。同じくスペックルトラッキング法を用いて解析される MTAD においても、apical longitudinal rotation の影響は少ないことが考えられる。このような点が、従来指標を含めた中で MTAD が高い右室収縮不全の検出精度を有した理由であると考えられる。

審査の要旨（審査の日、方法、結果）

平成31年2月13日、2月20日、2月21日、論文審査担当者は学位申請者に出席を求め学位論文について審査を行った。

各種心疾患において、右室駆出率(RVEF)は重要な予後規定因子であることが報告されているが、複雑な形態を有する右室の駆出率評価は容易ではない。これまでも簡易的な指標は提唱されてきたが、角度依存性を有する、画像の質に大きく左右されるなどの制限を有しており、これらの制限を克服する指標が渴望されていた。近年開発された、スペックルトラッキング法を用いると、描出角度に依存することなく、対象の移動距離や速度が計測可能となっている。スペックルトラッキング法を用い、三尖弁輪側壁ならびに中隔側、心尖部に開心領域を設定することで、三尖弁輪中点の長軸移動距離、ならびに拡張末期右室長軸長に対する比率(the percentage of mid-point between tricuspid annular plane displacement: MTAD)の測定が可能となっている。

本論文では、MTADがRVEF低下の検出に有用であるか否かを検定するために、従来の指標(tricuspid annular plane systolic excursion; TAPSE, doppler tissue imaging-derived tricuspid lateral annular systolic velocity; S', right ventricular fractional area change; RVFAC, right ventricular free-wall longitudinal strain; free-RVLS)と比較した。2016年から2017年に当院で3D心エコーが施行され、不整脈、心筋梗塞の既往、心臓手術の既往がない81例のうち、画像不良で3D心エコーによるRVEF計測が困難な20例を除外した61例を対象とした。

結果は、MTADにおいては56例(91.8%)で施行可能であり、高い実行可能性を有していた。MTAD不成功例の原因は、右室自由壁基部の描出不良であった。MTAD、TAPSE、S'、RVFAC、free-RVLSの検者内級内相関係数はそれぞれ0.991、0.928、0.995、0.907、0.915、検者間級内相関係数はそれぞれ0.984、0.627、0.920、0.735、0.896であり、MTADは他の指標と比較して高い再現性を有していた。

61例中15例でRVEFの低下(<45%)を認めた。右室駆出率低下を認める患者群(RVEF<45%)は、右室駆出率が維持されている患者群(RVEF≥45%)と比較し、TAPSE(17.1±4.4mm vs. 22.0±4.2mm, p<0.001)、S'(10.4±4.1cm/s vs. 12.9±2.0cm/s, p=0.04)、RVFAC(26.4±13.0% vs. 42.6±11.6%, p<0.001)、free-RVLS(-15.9±3.9% vs. -21.0±3.5%, p<0.001)、MTAD(11.3±3.6% vs. 19.0±3.1%, p<0.001)と、いずれの指標も絶対値が有意に低値であった。RVEF低下の検出精度において、MTADはカットオフ値14.7%未満で、感度93%、特異度95%、AUC 0.97であり、従来の指標と比べて診断精度が高かった。

本論文は、スペックルトラッキング法を用いて計測した MTAD が、簡便かつ迅速に右室駆出率低下を検出できる方法であることを明らかにしたものであり、学位論文として価値あるものと認めた。