# 博士の学位の授与に係る論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨の公表

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5289号 | 医学 | 山本　桂 | Brain activity in patients with unilateral sensorineural hearing loss during auditory perception in noisy environments<br>(一側性高度感音難聴患者の騒音環境下での語音聴取における脳活動) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5290号 | 医学 | 大庭　篤志 | ARID2 modulates DNA damage response in human hepatocellular carcinoma cells<br>(ヒト肝癌細胞においてARID2はDNA損傷応答を調整する) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5291号 | 医学 | 曽我　一將 | Gene dosage effect in spinocerebellar ataxia type 6 homozygotes: A clinical and neuropathological study<br>(脊髄小脳失調症6型ホモ接合体における遺伝子量効果の臨床的、神経病理学的研究) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5292号 | 医学 | 阿部　圭輔 | TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis patients<br>(筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者皮膚におけるTDP-43発現に関する研究) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5293号 | 医学 | 齋藤　龍佑 | Strenuous running exacerbates knee cartilage erosion induced by low amount of mono-iodoacetate in rats<br>(ラットMIAモデルに強制走行を付加することでOA進行は加速する) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5294号 | 医学 | 沼沢　祥行 | Depressive disorder may be associated with raphe nuclei lesions in patients with brainstem infarction<br>(うつは脳幹梗塞患者における縫線核病変と関連している可能性がある) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5295号 | 医学 | 日熊　麻耶 | Whole-Day Gait Monitoring in Patients with Alzheimer's Disease: A Relationship between Attention and Gait Cycle<br>(アルツハイマー病患者における1日歩行解析：注意力と歩行周期の関連について) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5296号 | 医学 | 野本　英嗣 | Mechanisms of Diuresis for Acute Decompensated Heart Failure by Tolvaptan: Assessment by Bioelectrical Impedance Analysis<br>(生体電気インピーダンスを用いて評価した急性非代償性心不全に対するトルバプタンの作用機序に関する臨床研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5297号 | 医学 | 近江　哲生 | Malondialdehyde-Modified Low Density Lipoprotein as Oxidative-Stress Marker in Vasospastic Angina Patients: Based on Guideline of Japanese Circulation Society<br>(日本循環器学会ガイドラインに基づいた冠攣縮性狭心症における酸化ストレスマーカーとしてのMDA-LDLの意義) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5298号 | 医学 | 結城　新 | Associated lateral/medial knee instability and its relevant factors in anterior cruciate ligament-injured knees<br>(前十字靭帯損傷膝における膝内外反不安定性およびそれに関連する因子の検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5299号 | 医学 | 前屋舗　千明 | HADHA, the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells<br>(ミトコンドリア三頭蛋白のアルファサブユニットであるHADHAは腸上皮細胞における長鎖脂肪酸誘導性オートファジーに関わっている) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5300号 | 医学 | 三上　さおり | Discrete roles of intracellular phospholipases A2 in human neutrophil cytotoxicity<br>(ヒト好中球の細胞毒性における細胞内ホスホリパーゼA2の個々の役割について) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5301号 | 医学 | 畑　伸秀 | Comparative analysis of knowledge on Schistosomiasis japonica in the local people in the former endemic area in Yamanashi Prefecture, Japan: comparisons among the background of age and occupation<br>(人獣共通感染症としての日本住血吸虫病に関する疾病認知度の世代および職業専門性に基づく集団間の比較研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5302号 | 医学 | 佐藤　弘典 | Electrocardiogram Characteristics that Distinguish Perimitral Reentry from Other Atrial Tachycardias after Atrial Fibrillation Ablation<br>(心房細動アブレーション後に出現した心房頻拍のうち、僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍を識別する体表12誘導心電図の特徴) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5303号 | 医学 | 木幡　一博 | Influences of osteoarthritis and osteoporosis on the electrical properties of human bones as in vivo electrets produced due to Wolff's law<br>(Wolffの法則により生ずる生体電池としての人骨電気学的特性に変形性関節症と骨粗鬆症がおよぼす影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5304号 | 医学 | 宗次　太吉 | Evaluation of the correlation between severity of acquired idiopathic generalized anhidrosis and quality of life scores<br>(特発性後天性全身性無汗症(AIGA)のQOLと重症度の相関に関する検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5305号 | 医学 | 日山　鐘浩 | Meniscal Regeneration After Resection of the Anterior Half of the Medial Meniscus in Mice<br>(マウス内側半月板1/2前方切除モデルにおける半月板再生過程の評価) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5306号 | 医学 | 前田　裕子 | Association of non-synonymous variants in WIPF3 and LIPA genes with abdominal aortic aneurysm: an autopsy study<br>(腹部大動脈瘤はWIPF3及びLIPA遺伝子の非同義置換変異と関連する：高齢者連続剖検例を用いた研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5307号 | 医学 | 坂東　倫行 | Differential usage of COX-1 and COX-2 in prostaglandin production by mast cells and basophils<br>(好塩基球は肥満細胞とは異なるCOXアイソフォームを使用してプロスタグランジン産生を制御する) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5308号 | 医学 | 村上　悠二 | A novel mother-to-child human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) transmission model for investigating the role of maternal anti-HTLV-1 antibodies using orally infected mother rats<br>(HTLV-経口感染母ラットを用いた新規母子感染モデルの作製と母子感染における移行抗体の役割に関する検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5309号 | 医学 | 宮地　康高 | Roles for Cell-Cell Adhesion and Contact in Obesity-Induced Hepatic Myeloid Cell Accumulation and Glucose Intolerance<br>(肥満に伴う肝臓への骨髄系細胞の集積と耐糖能異常における細胞間接着と細胞間接触の役割) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5310号 | 医学 | 上田　浩樹 | Refractory Long-Term Cholangitis After Pancreaticoduodenectomy: A Retrospective Study<br>(膵頭十二指腸切除術後の長期間にわたる難治性胆管炎についての検討：後方視的研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5311号 | 医学 | 遠藤　彰 | Development of Novel Criteria of the "Lethal Triad" as an Indicator of Decision Making in Current Trauma Care: A Retrospective Multicenter Observational Study in Japan<br>(治療方針決定の指針となりうる"外傷死の三徴"の新基準の開発；日本における多施設共同後方視的研究) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5312号 | 医学 | 簡　伯任 | Bio-sniffer (gas-phase biosensor) with secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH) for determination of isopropanol in exhaled air as a potential volatile biomarker<br>(潜在的な揮発性バイオマーカーである呼気中イソプロパノールのための二級アルコール脱水素酵素を利用したバイオスニファ(気相用バイオセンサ)) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5313号 | 医学 | 大野　真紀 | Feasibility, safety, and potential demand of emergent brain magnetic resonance imaging of patients with cardiac implantable electronic devices<br>(心臓植込みデバイス患者の緊急頭部MRI撮影の実現可能性、安全性、潜在需要に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5314号 | 医学 | 岡田　隆平 | The extended bundle of the tensor veli palatini: Anatomic consideration of the dilating mechanism of the Eustachian tube<br>(耳管周囲筋群の解剖:耳管開口機構における解剖学的考察) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5315号 | 医学 | 増戸　梨恵 | Evaluation of human nonmercaptalbumin as a marker for oxidative stress and its association with various parameters in blood<br>(酸化型アルブミンの酸化ストレスマーカーとしての評価および各種血中パラメーターとの関連性について) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5316号 | 医学 | 大畠　慶映 | Acquired Resistance with Epigenetic Alterations Under Long-Term Antiangiogenic Therapy for Hepatocellular Carcinoma<br>(肝細胞癌の長期抗血管新生療法による耐性獲得とエピジェネティック変化) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5317号 | 医学 | 髙山　啓 | Early Recurrence after Longstanding Persistent Atrial Fibrillation Ablation: Time Course, Optimization of the Blanking Period, and Clinical Outcome<br>(持続性心房細動アブレーション後の早期再発:経時的変化、ブランキングピリオドの最適化と臨床的予後に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5318号 | 医学 | 木脇　圭一 | Clinical and pathological significance of myeloid differentiation factor 88 expression in human hepatocellular carcinoma tissues<br>(ヒト肝細胞癌におけるMyD88発現の臨床病理学的意義に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5319号 | 医学 | 白井　剛 | Protein antigen of bird-related hypersensitivity pneumonitis in pigeon serum and dropping<br>(鳥関連過敏性肺炎の原因抗原に関する研究) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5320号 | 医学 | 榊原　ゆみ | Radiopathological Features and Identification of Mycobacterial Infections in Granulomatous Nodules Resected from the Lung<br>(切除肺肉芽腫病変の画像病理学的特徴および抗酸菌症診断) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5321号 | 医学 | VIBOONYASEK Suteera | Spatial rearrangement of Purkinje cell subsets forms the transverse and longitudinal compartmentalization in the mouse embryonic cerebellum<br>(マウス胎仔小脳においてプルキンエ細胞の小集団の空間的な再配置が横方向と縦方向の区画構造を形成させる) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5322号 | 医学 | 落合　香苗 | Increasing or fluctuating bispectral index values during post-resuscitation targeted temperature management can predict clinical seizures after rewarming<br>(心停止蘇生後体温管理療法中におけるバイスペクトラルインデックスの上昇や変動は復温後の痙攣後遺症を予測する) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5323号 | 医学 | 秀瀬　真輔 | Cerebrospinal fluid neural cell adhesion molecule levels and their correlation with clinical variables in patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder<br>(統合失調症、双極性障害、および大うつ病性障害患者における脳脊髄液中NCAM量とその臨床変数との相関に関する研究) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5324号 | 医学 | 鈴木　陽子 | Is prolongation of correctedQT interval associated with seizures induced by electroconvulsive therapy reduced by atropine sulfate?<br>(電気けいれん療法術中の補正QT時間に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5325号 | 医学 | 宮本　憲一 | Differential expression of ACINUS variants in bone marrow in myelodysplastic syndromes<br>(骨髄異形成症候群の骨髄におけるACINUS亜型の発現差異についての研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5326号 | 医学 | 韋　雪濤 | Augmentation of Fracture Healing by Hydroxyapatite/Collagen Paste and Bone Morphogenetic Protein-2 Evaluated Using a Rat Femur Osteotomy Model<br>(ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体およびBone morphogenetic protein-2による骨癒合促進効果・・・ラット大腿骨骨切りモデルによる検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5327号 | 医学 | 津山　直子 | BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation<br>(びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫におけるBCL2蛋白の発現に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5328号 | 医学 | 細川　敦美 | Molecular mechanisms of insulin resistance in 2 cases of primary insulin receptor defect-associated diseases<br>(インスリン受容体異常症の病態解明：自験例2例の分子内分泌学的検討) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5329号 | 医学 | 平井　作京 | Correlation between Clinical Presentations and Hemodynamic Parameters Measured by Dynamic Susceptibility Contrast Magnetic Resonance Imaging in Adult Patients with Moyamoya Disease<br>(成人もやもや病における発症形式とDSC-MRIを用いた脳循環動態測定の相関) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5330号 | 医学 | 松本　有加 | Distinct intestinal adaptation for vitamin B12 and bile acid absorption revealed in a new mouse model of massive ileocecal resection<br>(新規小腸切除マウスモデルの確立とビタミンB12と胆汁酸吸収に関わる腸管順応機構解析) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5331号 | 医学 | 佐野　元子 | Association of Palliative Care Consultation With Reducing Inpatient Chemotherapy Use in Elderly Patients With Cancer in Japan: Analysis Using a Nationwide Administrative Database<br>(日本における高齢がん患者に対する緩和ケア介入と入院化学療法低減の関係：全国診療報酬データを用いた分析) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5332号 | 医学 | 奥村　敬子 | Prospective analyses of female urinary incontinence symptoms following total hip arthroplasty<br>(人工股関節置換術が女性の尿失禁に与える影響についての前向き研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5333号 | 医学 | 粟野　暢康 | Histological analysis of vasculopathy associated with pulmonary hypertension in combined pulmonary fibrosis and emphysema: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis or emphysema alone<br>(気腫合併肺線維症における、肺高血圧症に関連する血管病変の病理学的検討　―特発性肺線維症、肺気腫との比較―) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5334号 | 医学 | 石塚　典子 | Psychological Distress and Resilience among Partners of Cancer Patients Receiving Outpatient Chemotherapy<br>(外来化学療法受療中のがん患者のパートナーにおける精神的苦痛とレジリエンス) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5335号 | 医学 | 荻島　隆浩 | ATRX status correlates with 11 C-methionine uptake in WHO grade II and III gliomas with *IDH1* mutations<br>(IDH1変異を持つWHO グレードⅡ,Ⅲ神経膠腫におけるATRX遺伝子の状態と、11Cメチオニンの取込みとの相関に関する研究) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5336号 | 医学 | 梅本　朋幸 | Optical coherence tomography assessment of new generation mesh-covered stents after carotid stenting<br>(次世代型頸動脈用メッシュカバードステント留置後の光断層撮影所見に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5337号 | 医学 | 梅澤　佳央 | Molecular mechanisms for enhancement of stromal cell-derived factor 1-induced chemotaxis by platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1)<br>(PECAM－1によるSDF－1誘導性遊走亢進の分子機構) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5338号 | 医学 | 冨井　知春 | TPX2 expression is associated with poor survival in gastric cancer<br>(胃癌切除検体におけるTPX2の発現と予後に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5339号 | 医学 | 島袋　林秀 | Handheld fetal Doppler device for assessing heart rate in neonatal Resuscitation<br>(新生児蘇生における携帯式胎児ドプラ装置の心拍数評価) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5340号 | 医学 | 大迫　美穂 | A20 restores phorbol ester-induced differentiation of THP-1 cells in the absence of nuclear factor-κB activation<br>(A20はNF-κB 活性の抑制下でフォルボールエステル誘導性のTHP-1細胞の分化を回復させる) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5341号 | 医学 | 萬代　新太郎 | Generation of Hypertension-Associated STK39 Polymorphism Knockin Cell Lines With the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 System<br>(CRISPR/Cas9システムを用いた高血圧関連STK39多型ノックイン細胞株の樹立と解析) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5342号 | 医学 | 石田　友香 | Potential role of sirtuin 1 in Müller glial cells in mice choroidal neovascularization<br>(脈絡膜新生血管におけるミュラーグリア細胞の役割に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5343号 | 医学 | 中村　政宏 | The evaluation of contralateral foot circulation after unilateral revascularization procedures using indocyanine green angiography<br>(片側血行再建術後のインドシアニングリーン血管撮影検査による対側肢の血流に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5344号 | 医学 | 中島　康雄 | Morphology of the region anterior to the anal canal in males: visualization of the anterior bundle of the longitudinal muscle by transanal ultrasonography<br>(男性における肛門管前方領域の形態：解剖学的および組織学的所見に基づいた経肛門的超音波検査による縦走筋層の前束の視覚化) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5345号 | 医学 | 小幡　佳輝 | Prognostic Impact and Post-operative Evaluation of Volumetric Measurement of the Cerebellopontine Cistern in Trigeminal Neuralgia Using 3 Tesla Magnetic Resonance Imaging<br>(三叉神経痛患者における3テスラMRIを用いた小脳橋角部脳槽容積測定による予後への影響と術後評価) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5346号 | 医学 | 馬渕　卓 | Beneficial Effects of Xanthohumol on Obesity and Insulin Resistance in Obese, Diabetic (*ob/ob*) Mice<br>(肥満糖尿病(ob/ob)マウスにおいてキサントフモールは肥満およびインスリン抵抗性を改善する効果を有する) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5347号 | 医学 | NASR BAONGOC | High expression of EphA3 (erythropoietin-producing hepatocellular A3) in gastric cancer is associated with metastasis and poor survival<br>(胃癌におけるEphA3の高発現は転移および生存不良に関連する) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5348号 | 医学 | 安田　庸輔 | Early response of C-reactive protein as a predictor of survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors<br>(転移性腎癌における分子標的薬治療開始後の早期C反応性蛋白(CRP)反応と予後に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5349号 | 医学 | 笠木　祐里 | Impaired degradation of medullary WNK4 in the kidneys of KLHL2 knockout mice<br>(KLHL2ノックアウトマウスにおいて腎臓髄質でのWNK4の分解が障害される) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5350号 | 医学 | 榊原　里江 | EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer<br>(EBUS-TBNA検体はPD-L1発現評価に有用) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5351号 | 医学 | 佐々木　絵美 | *KLHL3* Knockout Mice Reveal the Physiological Role of KLHL3 and the Pathophysiology of Pseudohypoaldosteronism Type II Caused by Mutant KLHL3<br>(KLHL3ノックアウトマウスが、KLHL3の生理的役割と変異型KLHL3に起因する偽性低アルドステロン症II型の病態生理を明らかにした) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5352号 | 医学 | 佐方　信夫 | Epidemiological study of adult-onset Still's disease using a Japanese administrative database<br>(日本の医療管理データベースを利用した成人スティル病の疫学的研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5353号 | 医学 | 近藤　崇史 | Evaluation of the relationship between the static measurement of transverse arch flexibility of the forefoot and gait parameters in healthy subjects<br>(健常者における静的な前足部横アーチの形態評価と歩行動作の関係) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5354号 | 医学 | 石井　洋介 | Chronologic Evaluation of Cerebral Hemodynamics by Dynamic Susceptibility Contrast Magnetic Resonance Imaging After Indirect Bypass Surgery for Moyamoya Disease<br>(もやもや病に対する間接バイパス術後のMRI潅流強調画像を用いた経時的脳血行動態評価) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5355号 | 医学 | 日浦　幹夫 | Response of Cerebral Blood Flow and Blood Pressure to Dynamic Exercise: a Study using PET<br>(持久的運動に対する脳血流および血圧応答:PET研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5356号 | 医学 | 中嶌　雄高 | Anatomical study of the left superior mediastinal lymphatics for tracheal branches of left recurrent laryngeal nerve-preserving mediastinoscope-assisted surgery in esophageal cancer<br>(縦隔鏡下食道癌手術における左反回神経気管枝温存による上縦隔郭清の妥当性の検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5357号 | 医学 | 奥田　将史 | Subcloning and characterization of highly metastatic cells derived from human esophageal squamous cell carcinoma KYSE150 cells by *in vivo* selection<br>(*in vivo* selectionによる食道扁平上皮癌細胞由来の高転移細胞株の樹立と探索に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5358号 | 医学 | MOHAMMAD　OMAR MASHAL | Hidden burden of non-medical spending associated with inpatient care among the poor in Afghanistan<br>(アフガニスタン貧困者層における入院医療に伴う間接経費の経済的負担) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5359号 | 医学 | 油谷　知毅 | High expression of P21-activated kinase 5 protein is associated with poor survival in gastric cancer<br>(P21-活性化キナーゼ5タンパク質は胃癌の予後不良と関連する) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5360号 | 医学 | TANIGUCHI Juliana Bosso | RpA1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair<br>(RpA1を用いた脊髄小脳失調症の遺伝子治療開発に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5361号 | 医学 | 花岡　まりえ | Expression of ATF6 as a marker of pre-cancerous atypical change in ulcerative colitis-associated colorectal cancer: a potential role in the management of dysplasia<br>(潰瘍性大腸炎における小胞体ストレス応答関連蛋白ATF6の発現：Dysplasia鑑別における有用性) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5362号 | 医学 | 新井　洋平 | Salt suppresses IFNγ inducible chemokines through the IFNγ-JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells<br>(塩分負荷が近位尿細管細胞のインターフェロンγ誘導性ケモカインの発現をIFNγ-JAK1-STAT1シグナルカスケードを介して抑制する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5363号 | 医学 | 秋山　慎太郎 | *CCN3* Expression Marks a Sulfomucin-nonproducing Unique Subset of Colonic Goblet Cells in Mice<br>(*CCN3*は、マウス大腸上皮の硫酸化ムチン非産生杯細胞を標識する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5364号 | 医学 | 許　暁茵 | BCL-XL binds and antagonizes RASSF6 tumor suppressor to suppress p53 expression<br>(BCL-XLは腫瘍抑制分子RASSF6によるp53の安定化に拮抗する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5365号 | 医学 | 内堀　健 | Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer<br>(ブリガチニブと抗EGFR抗体の併用がEGFR陽性非小細胞肺癌におけるオシメルチニブ耐性を克服する効果に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5366号 | 医学 | 齊藤　和毅 | Steroidogenic pathways involved in androgen biosynthesis in eumenorrheic women and patients with polycystic ovary syndrome<br>(正常月経女性および多嚢胞性卵巣症候群患者の多様なアンドロゲン合成経路に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5367号 | 医学 | 秋山　弘樹 | High-dose methotrexate following intravitreal methotrexate administration in preventing central nervous system involvement of primary intraocular lymphoma<br>(原発性眼内リンパ腫に対するメトトレキサート硝子体注入に続く大量メトトレキサート全身投与による中枢神経進展予防) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5368号 | 医学 | 古川　聡一 | Analysis of transcription factors expressed at the anterior mouse limb bud<br>(肢芽前方領域に発現する転写因子の解析) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5369号 | 医学 | 佐藤　哲也 | Intramuscular Tendon of the Adductor Pollicis and Underlying Capsule of the Metacarpophalangeal Joint: An Anatomical Study with Possible Implications for the Stener Lesion<br>(母指内転筋筋内腱と母指MP関節包に関する解剖学的研究—Stener病変発生に関連して) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5370号 | 医学 | 小柳津　卓哉 | Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation<br>(高気圧酸素環境は炎症を低減し、損傷筋を酸素化し、マクロファージと筋衛星細胞の活性化を介して筋再生を促進する) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5371号 | 医学 | 小日向　浩行 | Disrupted offset analgesia distinguishes patients with chronic pain from healthy controls<br>(慢性疼痛患者のオフセット鎮痛には長時間の痛み刺激が必要である) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5372号 | 医学 | 塩田　幹夫 | TNFα promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential<br>(TNFα は滑膜由来幹細胞の増殖を促進する) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5373号 | 医学 | 白井　怜子 | Effect of individualised dietary education at medical check-ups on maternal and fetal outcomes in pregnant Japanese women<br>(妊婦健診の機会を利用した個別食生活指導が妊娠転帰に与える影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5374号 | 医学 | 野田　隆政 | Working memory and prefrontal/temporal hemodynamic responses during post-task period in patients with schizophrenia: A multi-channel near-infrared spectroscopy study<br>(近赤外線光トポグラフィーを用いた、統合失調症における作動記憶と前頭・側頭部のヘモグロビン変化に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5375号 | 医学 | SAWADA　Leila | IL-10-mediated signals act as a switch for lymphoproliferation in Human T-cell leukemia virus type-1 infection by activating the STAT3 and IRF4 pathways<br>(IL-10シグナルはSTAT3・IRF4を介してHTLV-1感染細胞の増殖を促進する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5376号 | 医学 | 石橋　史明 | Contribution of ATOH1+ Cells to the Homeostasis, Repair, and Tumorigenesis of the Colonic Epithelium<br>(大腸上皮の恒常性維持、組織修復、発癌におけるATOH1陽性細胞の機能解析) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5377号 | 医学 | 足立　雄太 | Resistance mediated by alternative receptor tyrosine kinases in FGFR1-amplified lung cancer<br>(FGFR1遺伝子増幅肺癌における受容体型チロシンキナーゼによる治療耐性機構) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5378号 | 医学 | 松村　惠津子 | Pretreatment with IL-1β enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells<br>(IL-1βの前投与は滑膜由来間葉系幹細胞の増殖・軟骨分化能を亢進させる) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5379号 | 医学 | 田村　律人 | Differential requirement for ATG2A domains for localization to autophagic membranes and lipid droplets<br>(ATG2Aは異なる領域を介してオートファジー関連膜及び脂肪滴に局在する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5380号 | 医学 | 井上　雅人 | Specific Factors to Predict Large Vessel Occlusion in Acute Stroke Patients<br>(急性期脳卒中患者における脳主幹動脈閉塞の予測因子に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5381号 | 医学 | 瀬間　学 | Environmental levels of avian antigen are relevant to the progression of chronic hypersensitivity pneumonitis during antigen avoidance<br>(慢性鳥関連過敏性肺炎の抗原回避中における環境中鳥抗原量と疾患進行の関連に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5382号 | 医学 | 小髙　愛未 | A new cell-based assay to evaluate myogenesis in mouse myoblast C2C12 cells<br>(マウス筋芽C2C12細胞の筋分化を評価する新しいアセイ系) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5383号 | 医学 | 藤田　修平 | Dual inhibition of EZH1/2 breaks the quiescence of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia<br>(EZH1/2の二重阻害により急性骨髄性白血病の白血病幹細胞の休眠状態を打破できる) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5384号 | 医学 | 岡田　啓五 | FLT3-ITD induces expression of Pim kinases through STAT5 to confer resistance to the PI3K/Akt pathway inhibitors on leukemic cells by enhancing the mTORC1/Mcl-1 pathway<br>(FLT3-ITDはSTAT5を介してPimキナーゼを発現し、mTORC1/4EBP1経路を活性化することで白血病細胞にPI3K/Akt阻害薬に対する抵抗性を付与する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5385号 | 医学 | 羅　媛君 | Single axonal morphology and termination to cerebellar aldolase C stripes characterize distinct spinocerebellar projection systems originating from the thoracic spinal cord in the mouse<br>(単一軸索の形態と小脳アルドラーゼC縦縞への終止様式は、マウス胸髄からの異なるグループの脊髄小脳投射系を特徴付ける) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5386号 | 医学 | 太田　卓哉 | Skin CD4$^{+}$ Memory T Cells Play an Essential Role in Acquired Anti-Tick Immunity through Interleukin-3-Mediated Basophil Recruitment to Tick-Feeding Sites<br>(皮膚のCD4$^{+}$メモリーT細胞はIL-3産生を介してマダニ再感染局所への好塩基球浸潤を誘導し、マダニ耐性に寄与する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5387号 | 医学 | 室田　吉貴 | Requirement of ABC transporter inhibition and Hoechst 33342 dye deprivation for the assessment of side population-defined C6 glioma stem cell metabolism using fluorescent probes<br>(蛍光プローブを用いた癌幹細胞の代謝解析におけるABCトランスポーターの阻害とDNA染色性色素除去の必要性の発見) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5388号 | 医学 | 冨樫　由紀 | *MYB* and *MYBL1* in adenoid cystic carcinoma: diversity in the mode of genomic rearrangement and transcripts<br>(腺様嚢胞癌におけるMYB, MYBL1の遺伝子再構成様式と転写産物の多様性) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5389号 | 医学 | 岩澤　絵梨 | Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Activation Enhances Leptomeningeal Collateral Development and Improves Outcome after Stroke in Mice<br>(スフィンゴシン1リン酸受容体1の活性化はマウス脳梗塞モデルにおいて脳軟膜動脈の側副血行路を発達させ予後を改善する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5390号 | 医学 | 吉川　俊輔 | Predictive ability and interobserver reliability of computed tomography findings for angioembolization in patients with pelvic fracture<br>(骨盤骨折症例に対するTranscatheter Arterial Embolization(TAE)に関するCT所見の予測能と観察者間信頼性) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5391号 | 医学 | 水野　裕貴 | DEPDC5 deficiency contributes to resistance to leucine starvation via p62 accumulation in hepatocellular carcinoma<br>(肝細胞癌においてDEPDC5不活化はp62発現上昇を介してロイシン欠乏に対する抵抗性の獲得に寄与する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5392号 | 医学 | 木戸　浩司 | Cytotoxicity of propofol in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes<br>(ヒト人工多能性幹細胞由来心筋細胞におけるプロポフォールの細胞毒性評価に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5393号 | 医学 | NONTHASAEN　Pawaree | A morphological comparison of the extraforaminal ligament between the cervical and thoracic regions<br>(頸胸部におけるextraforaminal ligamentの形態の比較) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5394号 | 医学 | 海野　真一 | Effects of selective calcium-permeable AMPA receptor blockade by IEM 1460 on psychotomimetic-induced hyperactivity in the mouse<br>(IEM 1460による選択的なカルシウム透過型AMPA受容体遮断が精神異常発現薬誘発性の活動性亢進に及ぼす効果) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5395号 | 医学 | 綾部　智人 | Characterization of panel antibodies for classification of cancer type using novel antibody-based phosphoproteomics<br>(抗体を基盤とするホスホプロテオミクスによる癌分類の基礎的検討―抗体パネルに用いる候補抗体の特異性―) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5396号 | 医学 | 柴　久美子 | Canagliflozin, an SGLT2 inhibitor, attenuates the development of hepatocellular carcinoma in a mouse model of human NASH<br>(SGLT2阻害薬カナグリフロジンはNASHモデルマウスの肝臓癌の発生を抑制する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5397号 | 医学 | 清水　一秀 | Intraoperative Photodynamic Diagnosis Using Talaporfin Sodium Simultaneously Applied for Photodynamic Therapy against Malignant Glioma: A Prospective Clinical Study<br>(悪性神経膠腫に対するタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学治療に併用する術中光線力学診断に関する前向き臨床研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5398号 | 医学 | 渡邊　梨里 | Chest Pain Without Coronary Artery Obstruction and Calcification in Young Women May Indicate Left Ventricular Diastolic Dysfunction<br>(冠動脈狭窄と冠動脈石灰化のない若年女性の胸痛は左室拡張障害を示唆するかもしれない) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5399号 | 医学 | 長　齢 | Flexible spectral imaging color enhancement markedly reduces the iodine concentration required for the endoscopic diagnosis of superficial esophageal cancer<br>(早期食道癌スクリーニングにおけるFICE併用ヨード染色法についての検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5400号 | 医学 | 松沢　歩 | Preferable in vitro condition for maintaining faithful DNA methylation imprinting in mouse embryonic stem cells<br>(マウスES細胞におけるゲノムインプリンティング領域DNAメチル化を正常に維持するための培養条件の探索) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5401号 | 医学 | 久米　雄一郎 | The macroscopic and histological effects of argon plasma coagulation followed by subepithelial ablation on early esophageal squamous cell carcinoma using  magnifying endoscopy with blue laser imaging<br>(アルゴンプラズマ凝固-上皮下焼灼法における剥離上皮の組織所見からみた治療メカニズムの検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5402号 | 医学 | 鈴木　康平 | Single cell analysis of Crohn's disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties<br>(クローン病由来の小腸上皮オルガノイド構築による幹細胞形質の解析に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5403号 | 医学 | 渡部　太郎 | B cell activation in the cecal patches during the development of an experimental colitis model<br>(実験腸炎モデルにおける盲腸リンパ濾胞B細胞の解析) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5404号 | 医学 | 胡　亜軍 | Sequence configuration of spinocerebellar ataxia type 8 repeat expansions in a Japanese cohort of 797 ataxia subjects<br>(797失調症被験者の日本人コホートにおける脊髄小脳変性症タイプ8リピート伸長のシーケンス設定) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5405号 | 医学 | 小郷　泰一 | Comparative analysis of avascular areas in superficial esophageal squamous cell carcinomas using in vivo and ex vivo magnifying endoscopy<br>(食道表在癌内視鏡治療検体のホルマリン固定後拡大内視鏡観察によるavascular areaの検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5406号 | 医学 | 伊藤　陽子 | Biochemical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with valine-to-isoleucine substitution at codon 180 on the prion protein gene<br>(プリオン蛋白遺伝子V180I変異遺伝性クロイツフェルトヤコブ病の生化学的特性についての考察) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5407号 | 医学 | 辻本　和峰 | Epigenetic modulation of *Fgf21* in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood<br>(乳仔期のFGF21のDNAメチル化状態は成獣期まで維持され代謝表現型に寄与する) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5408号 | 医学 | 東　美和 | A diagnostic decision tree for adult cerebellar ataxia based on pontine magnetic resonance imaging<br>(橋MRIによる成人脊髄小脳変性症疾患群の鑑別手順の構築) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5409号 | 医学 | 林　志保里 | Increased Binding Potential of Brain Adenosine A1 Receptor in Chronic Stages of Patients with Diffuse Axonal Injury Measured with [1-methyl-$^{11}$C] 8-dicyclopropylmethyl-1-methyl-3-propylxanthine Positron Emission Tomography Imaging<br>([1-methyl-$^{11}$C] 8-dicyclopropylmethyl-1-methyl-3-propylxanthine PETを用いた慢性期びまん性軸索損傷患者の脳におけるアデノシンA1受容体結合能の増加に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5410号 | 医学 | 郭　慧佳 | Efficacy of microRNA silencing by lipid-conjugated double-stranded antisense oligonucleotides<br>(脂質リガンド型二本鎖アンタゴミアによるマイクロRNA抑制効果の検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5411号 | 医学 | 宇田川　智宏 | Amnionless-mediated glycosylation is crucial for cell surface targeting of cubilin in renal and intestinal cells<br>(腎や腸管細胞の受容体Cubilin膜発現におけるAmnionless介在性糖鎖修飾の重要性) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5412号 | 医学 | 李　富瑩 | Upregulation of lipoprotein receptors on brain endothelial cells and neurons in the early phase of ischemic stroke in mice<br>(マウス脳梗塞モデルを用いた虚血早期に見られる脳血管内皮細胞・神経細胞のリポプロテイン受容体の発現亢進に関する研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5413号 | 医学 | 松田　隼治 | Prevalence and Clinical Significance of Discordant Changes in Fractional and Coronary Flow Reserve After Elective Percutaneous Coronary Intervention<br>(待機的経皮的冠動脈形成術後におけるFFRとCFRの変化の関係と相違の臨床的重要性) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5414号 | 医学 | 李　哲民 | Impact of Coronary Plaque Morphology Assessed by Optical Coherence Tomography on Cardiac Troponin Elevation in Patients with Non-ST Segment Elevation Acute Coronary Syndrome<br>(非ST上昇型急性冠症候群患者における経皮的冠動脈インターベンション後の心筋トロポニン上昇と光干渉断層法でのプラーク性状との関連) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5415号 | 医学 | 石神　淳一 | Chronic Kidney Disease and Risk for Gastrointestinal Bleeding in the Community: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study<br>(慢性腎臓病における消化管出血リスク：ARIC 研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5416号 | 医学 | 小林　大介 | Detection of a novel putative phlebovirus and first isolation of Dugbe virus from ticks in Accra, Ghana<br>(ガーナ共和国アクラにおけるマダニからのフレボウイルス様新規ウイルスの検出ならびにダグビーウイルスの初分離) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5417号 | 医学 | 平澤　憲祐 | Effect of aortic regurgitant jet direction on mitral valve leafletremodeling: a real-time threedimensional transesophageal echocardiography study<br>(大動脈弁閉鎖不全症による僧帽弁尖に対するリモデリングに逆流ジェット方向が及ぼす影響についての3次元経食道心エコー図を用いた研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5418号 | 医学 | 稲村　幸洋 | Early repolarization and positive T-wave alternans as risk markers for life-threatening arrhythmias in patients with vasospastic angina<br>(冠攣縮性狭心症患者における致死的不整脈リスクマーカーとしての早期再分極とT-wave alternans(TWA)の検討) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5419号 | 医学 | KAMPAN Natnicha | The malaris muscle: its morphological significance for sustaining the intraorbital structures<br>(Malaris muscle：眼窩内の構造を保持する仕組みの形態学的重要性) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5420号 | 医学 | 岩塚　良太 | Arterial inflammation measured by $^{18}$F-FDG-PET-CT to predict coronary events in older subjects<br>(高齢者における大動脈$^{18}$F-FDG-PET-CTの冠動脈イベント予測の可能性) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5421号 | 医学 | 鍵山　暢之 | Insufficient Leaflet Remodeling in Patients With Atrial Fibrillation Association With the Severity of Mitral Regurgitation<br>(心房細動症例における不十分な弁葉リモデリングと僧帽弁逆流症との関連) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5422号 | 医学 | 河野　佑二 | Yields and chondrogenic potential of primary synovial mesenchymal stem cells are comparable between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients<br>(関節リウマチ膝と変形性関節症膝における初代滑膜由来間葉系幹細胞の収量および軟骨分化能は同等である) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5423号 | 医学 | 貫井　義久 | Identification of Apolipoprotein A-I in BALF as a biomarker of sarcoidosis<br>(サルコイドーシスのバイオマーカーとしてのBALF中のアポリポプロテインA-I) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5424号 | 医学 | 巖　康仁 | Liver atrophy after percutaneous transhepatic portal embolization occurs in two histological phases: Hepatocellular atrophy followed by apoptosis<br>(経皮経肝門脈塞栓術による肝萎縮は組織学的2段階を経る：肝細胞萎縮とそれに引き続くアポトーシス) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5425号 | 医学 | 游　理恵 | Basophils and mast cells are crucial for reactions due to epicutaneous sensitization to ovalbumin<br>(オブアルブミンによるマウス皮膚への経皮感作において好塩基球と肥満細胞が重要な反応を担う) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5426号 | 医学 | 瀧口　一夫 | Association of schizophrenia onset age and white matter integrity with treatment effect of D-cycloserine: a randomized placebocontrolled double-blind crossover study<br>(統合失調症の発症年齢および白質統合性とD-サイクロセリンによる治療効果の関連ープラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5427号 | 医学 | 葛井　総太郎 | Novel Assessment Tool Based on Laser Speckle Contrast Imaging to Diagnose Severe Ischemia in the Lower Limb for Patients With Peripheral Arterial Disease<br>(レーザースペックルコントラスト画像血流装置を用いた末梢動脈疾患患者における重症下肢虚血肢の新たな評価法) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5428号 | 医学 | 石川　喜也 | Surgical pitfalls of jejunal vein anatomy in pancreaticoduodenectomy<br>(膵頭十二指腸切除術における近位空腸静脈の解剖に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5429号 | 医学 | 掛川　智也 | Frequency of *Propionibacterium acnes* Infection in Prostate Glands with Negative Biopsy Results Is an Independent Risk Factor for Prostate Cancer in Patients with Increased Serum PSA Titers<br>(血清PSA値の上昇に伴う前立腺癌陰性生検における*Propionibacterium acnes*感染腺管率の算出は前立腺癌の独立したリスク因子となる) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5430号 | 医学 | 市川　裕菜 | Overexpression of exchange protein directly activated by cAMP-1 (EPAC1) attenuates bladder cancer cell migration<br>(EPAC1の強制発現は膀胱癌細胞の移動能を低下させる) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5431号 | 医学 | 小野　敏明 | Characterization of *in vitro* expanded virus-specific T cells toward adoptive immunotherapy against virus infection<br>(生体外で培養した、ウイルス感染に対する免疫療法であるウイルス特異的T細胞の特徴) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5432号 | 医学 | 前澤　勝美 | Real-time observation of pathophysiological processes during murine experimental *Schistosoma japonicum* infection using high-resolution ultrasound imaging<br>(高解像度超音波イメージングを用いた日本住血吸虫感染マウスにおける病態変化に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5433号 | 医学 | 王　元龍 | High potassium concentration regulates the WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade via kelch-like protein 2 in mouse vascular smooth muscle cells<br>(マウス血管平滑筋細胞において高カリウム濃度はkelch-like protein 2を介してWNK3-SPAK-NKCC1リン酸化カスケードを制御する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5434号 | 医学 | 金　光文 | Proanthocyanidin-rich grape seed extract prevent estrogen deficiency-induced metabolic disorders<br>(ブドウ種子抽出物投与はエストロゲン欠乏性糖代謝異常を是正する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5435号 | 医学 | 小林　桃子 | Association studies of WD repeat domain 3 and chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase genes with schizophrenia in a Japanese population<br>(日本人集団における統合失調症とWDR3およびALG1遺伝子との関連解析) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5436号 | 医学 | 木脇　祐子 | Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma<br>(グルタチオンペルオキシダーゼ4はDLBCLにおいてROS誘導性の細胞死を抑制する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5437号 | 医学 | 金　民大 | Coronal Instability after Total Knee Arthroplasty using Bi-Surface type 3: An Averaged 10 Year Follow-up Study<br>(Bi-Surface3型人工膝関節における冠状面での不安定性について平均10年の術後成績検討) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5438号 | 医学 | 魚水　麻里 | PDGF-induced proliferation and differentiation of synovial mesenchymal stem cells is mediated by the PI3K-PKB/Akt pathway<br>(PDGFにより活性化される細胞内PI3K-PDK1-Aktシグナル経路は、滑膜由来間葉系幹細胞の増殖と分化を共に促進する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5439号 | 医学 | 川井　清考 | Parental age and gene expression profiles in individual human blastocysts<br>(ヒト胚盤胞期胚の遺伝子発現と両親年齢に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5440号 | 医学 | 今井　紗智子 | High expression of P-cadherin is significantly associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer<br>(非小細胞肺癌においてP-cadherin高発現は予後不良因子である) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5441号 | 医学 | 橋本　恭子 | Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A<br>(がん細胞由来hsa-miR-940はARHGAP1およびFAM134Aの制御を介し造骨型骨転移を惹起する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5442号 | 歯学 | 金子　誠 | Toll-like receptor-2 has a critical role in periodontal pathogen-induced myocardial fibrosis in the pressure-overloaded murine hearts<br>(歯周病原細菌による圧負荷モデルでの心線維化の亢進にToll-like receptor-2が重要な役割をしている) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5443号 | 歯学 | 加地　博一 | Active Microbiota Show Specific Correlationships in Peri-implantitis and Periodontitis<br>(細菌活動性から顕在化するインプラント周囲炎および歯周炎の疾患特異的な細菌群集内の共起構造) | 平成28年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5444号 | 歯学 | 中村　敏成 | Influence of a Home Reliner on Denture Displacement and Patient-Reported Outcome<br>(ホームリライナーが義歯の変位と患者主観評価に与える影響) | 平成28年3月31日 |
| 甲第5445号 | 歯学 | 佐藤　博紀 | A Periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis deteriorates Isoproterenol-Induced myocardial remodeling in mice<br>(歯周病原細菌Porphyromonas gingivalisはマウスの Isoproterenol 誘導性心筋リモデリングを増悪させる) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5446号 | 歯学 | 山下　優 | Stability of Platelet-rich Fibrin in Vivo: Histological Study in Rats<br>(多血小板フィブリンの生体における安定性：ラットにおける組織学的研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5447号 | 歯学 | 中村　圭喜 | Effects of experimental pastes containing surface pre-reacted glass ionomer fillers on inhibition of enamel demineralization<br>(試作S-PRGフィラー含有ペーストのエナメル質の脱灰抑制に及ぼす効果) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5448号 | 歯学 | 田澤　建人 | Transient receptor potential melastatin (TRPM) 8 is expressed in freshly isolated native human odontoblasts<br>(TRPM8チャネルはヒト新鮮単離象牙芽細胞に発現している) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5449号 | 歯学 | PAWAPUTANON NA MAHASARAKHAM Chantida | BMP-2 Enhances Lgr4 Gene Expression in Osteoblastic Cells<br>(BMP 2は骨芽細胞におけるLgr 4の遺伝子発現を増強する) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5450号 | 歯学 | 小野里　祐佑 | Radiosensitivity of quiescent and proliferating cells grown as multicellular tumor spheroids<br>(多細胞腫瘍スフェロイドにおける静止期細胞と増殖期細胞の放射線感受性) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5451号 | 歯学 | 八尾　香奈子 | Effect of Laser Energy and Tip Insertion Depth on the Pressure Generated Outside the Apical Foramen During Er:YAG Laser-Activated Root Canal Irrigation<br>(Er:YAGレーザーを用いた根管洗浄時に生じる根尖孔外への圧力：レーザーエネルギーとチップ挿入深度の影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5452号 | 歯学 | 石川　陽子 | The effects of post and core material combination on the surface strain of the 4-unit zirconia fixed partial denture margins<br>(支台築造様式の組み合わせが4ユニットジルコニアブリッジの荷重時の表面ひずみに与える影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5453号 | 歯学 | 田上　温子 | The effect of curing conditions on the dentin bond strength of two dual-cure resin cements<br>(重合条件が2種類のデュアルキュア型レジンセメントの象牙質接着強さに及ぼす効果について) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5454号 | 歯学 | 野田　有佳里 | The effect of five kinds of surface treatment agents on the bond strength to various ceramics with thermocycle aging<br>(熱サイクル負荷後の各種セラミックスとレジンセメントの接着強さに及ぼす5種類の表面処理材の影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5455号 | 歯学 | 山形　優子 | CD163-Positive Macrophages Within the Tumor Stroma Are Associated With Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma<br>(口腔扁平上皮癌における腫瘍間質内のCD163陽性マクロファージとリンパ管新生およびリンパ節転移との関連) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5456号 | 歯学 | NGAMSOM Supak | The intravoxel incoherent motion MRI of lateral pterygoid muscle: a quantitative analysis in patients with temporomandibular joint disorders<br>(顎関節症患者における外側翼突筋の拡散強調MRI IVIM解析) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5457号 | 歯学 | 永田　瑞 | Conditioned Medium from Periodontal Ligament Stem Cells Enhances Periodontal Regeneration<br>(歯根膜幹細胞由来培養上清は歯周組織再生を促進する) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5458号 | 歯学 | 渡邉　知恵 | Chronological grey scale changes in supporting alveolar bone by removable partial denture placement on patients with periodontal disease: A 6-month follow-up study using digital subtraction analysis<br>(歯周病患者における部分床義歯装着による支持骨の経時的なグレースケール変化-Digital Subtractionを用いた6ヶ月追跡調査) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5459号 | 歯学 | 家持　剛 | Influence of water immersion on the transmitted load of home reliners<br>(水中浸漬がホームリライナーの伝達する荷重に与える影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5460号 | 歯学 | 篠﨑 裕道 | Relationship between jaw opening force and hyoid bone dynamics in healthy elderly subjects.<br>(健常高齢者における開口力と舌骨動態の関連性について) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5461号 | 歯学 | 時田　大輔 | Dynamic Torque and Vertical Force Analysis during Nickel-titanium Rotary Root Canal Preparation with Different Modes of Reciprocal Rotation<br>(ニッケルチタンロータリーファイルを用いた往復回転運動による根管形成:トルクおよび垂直荷重の動的解析) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5462号 | 歯学 | 阿部　泰典 | Unilateral nasal obstruction affects motor representation development within the face primary motor cortex in growing rats<br>(片側鼻閉塞は成長期ラット大脳皮質一次運動野顔面領域の発達に影響を与える) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5463号 | 歯学 | 須藤　毅顕 | Association of NOD2 mutations with aggressive periodontitis<br>(NOD2遺伝子変異と侵襲性歯周炎との関連) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5464号 | 歯学 | 笠原　由紀 | Low-intensity pulsed ultrasound reduces periodontal atrophy in occlusal hypofunctional teeth<br>(低出力パルス超音波は咬合刺激低下歯の歯周組織の萎縮を軽減する) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5465号 | 歯学 | 林　樹莉 | Real-Time Imaging of Gap Progress during and after Composite Polymerization<br>(コンポジットレジンの光照射中及び直後の界面ギャップ形成のリアルタイム観察) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5466号 | 歯学 | NGUYEN Thi Hoang Yen | Epidemiological Study on Early Childhood Caries in Vietnam<br>(ベトナムにおける早期小児う蝕に関する疫学研究) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5467号 | 歯学 | Md. Zahirul Haque Bhuyan | The intra-articular injection of RANKL-binding peptides inhibits cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis<br>(RANKL結合ペプチドの関節内注射は、マウスの変形性関節症モデルにおける軟骨変性を抑制する) | 平成29年9月21日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5468号 | 歯学 | Jorge Espigares Espigares | Applications of Optical Coherence Tomography in Minimally Invasive Dentistry: Enamel White-spot and Resealing Evaluation<br>(最小限侵襲の歯科治療における光干渉断層計の応用:エナメル質白斑病変部と再封鎖の評価) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5469号 | 歯学 | PAISANKOBRIT Vibul | Effect of thickness of zirconia framework on fracture strength and fracture mode of Ceria-stabilized tetragonal zirconia polycrystals /alumina ceramic restoration on resin tooth abutment<br>(レジン支台歯におけるCe-TZP/Aを用いたジルコニアセラミッククラウンのフレーム厚みが破壊強度に及ぼす影響) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5470号 | 歯学 | NGUYEN HO Quynh Anh | Altered Grey Matter Volume in Trigeminal Neuralgia<br>(三叉神経痛患者の灰白質容積変化について) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5471号 | 歯学 | HIRUNWIDCHAYARAT Worawalun | Site-specific regulation of oral mucosa-recruiting CD8+ T cells in a mouse contact allergy model<br>(マウス接触アレルギーモデルにおける口腔粘膜にリクルートする CD8+ T細胞による局所での免疫制御) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5472号 | 歯学 | SAWANGARUN Wanlada | Downregulation of Notch1 Expression in 4-Nitroquinoline-1-oxide-Induced Precancers of Mouse Tongue<br>(4-ニトロキノリン-1-オキシドによりマウス舌に誘発された前癌病変におけるNotch1の発現減弱) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5473号 | 歯学 | 丁　林 | Effect of doxycycline-treated hydroxyapatite surface on bone apposition: A histomophometric study in murine maxillae<br>(ドキシサイクリンが、ハイロドキシアパタイトをコーティングした表面周囲の骨形成に及ぼす影響:マウス上顎骨における組織形態計測学的研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5474号 | 歯学 | MOHAMMED YASSIN M BAKHIT | The stress distribution within dentin upon the use of different restoration materials<br>(種々のクラウンの材質による歯根象牙質内応力分布状態の検討) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5475号 | 歯学 | 稲用　友佳 | Adaptive change in chewing-related brain activity while wearing a palatal plate: an functional magnetic resonance imaging study<br>(口蓋床装着による口腔内環境の変化が健常者の咀嚼時の脳活動に及ぼす影響ーfMRIを用いた脳活動の経時的検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5476号 | 歯学 | 白子　高大 | Establishment of experimental models to evaluate the effectiveness of dental trauma splints<br>(外傷歯スプリント固定法の効果を評価するための実験モデルの確立) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5477号 | 歯学 | 行森　茜 | Genetic basis of calcifying cystic odontogenic tumors<br>(石灰化嚢胞性歯原性腫瘍の遺伝的基盤) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5478号 | 歯学 | KABOOSAYA Boosana | Ligation period required to induce periodontitis in mice: Analysis with micro-computed tomography.<br>(マウスにおいて歯周炎を起こすために必要な歯の結紮期間:マイクロCTを用いた解析) | 平成29年9月30日 |
| 甲第5479号 | 歯学 | 鈴木　啓之 | The effect of new complete denture fabrication and simplified dietary advice on nutrient intake and masticatory function of edentulous elderly: A randomized-controlled trial<br>(全部床義歯新製と簡便な食事指導が無歯顎高齢者の栄養素摂取と咀嚼能力に及ぼす影響:無作為化比較臨床試験) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5480号 | 歯学 | 久保　茉莉子 | The effect of glass fiber posts and ribbons on the fracture strength of teeth with flared root canals restored using composite resin post and cores<br>(漏斗状根管を持つ歯根に対しグラスファイバーポスト及びグラスファイバーリボンがレジン支台築造の破壊強度に及ぼす影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5481号 | 歯学 | 岩田　夏子 | Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation<br>(マイクロ・ナノ構造を有するチタン材料の骨芽細胞増殖能に与える影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5482号 | 歯学 | 山田　理沙 | Ag nanoparticle-coated zirconia for antibacterial prosthesis<br>(銀ナノ粒子コーティングを施したジルコニアの抗菌性に関する検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5483号 | 歯学 | 三好　智絵 | Effects of an interactive simulation material for clinical dentistry on knowledge acquisition<br>(臨床歯学に関する双方向型シミュレーション教材の知識獲得に対する効果) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5484号 | 歯学 | 庄司　あゆみ | Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via RANKL expression<br>(矯正学的歯の移動におけるRANKL発現を介した骨細胞による制御機構) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5485号 | 歯学 | 添田　ひとみ | A structural equation model to assess the influence of neuroticism on oral health-related quality of life in complete denture wearers<br>(共分散構造分析を用いた全部床義歯装着者の口腔関連QOLに患者の神経症傾向が与える影響の検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5486号 | 歯学 | 加納　亨紀 | Influence of enamel prism orientations on color shifting at the border of resin composite restorations<br>(エナメル小柱の走行がコンポジットレジン修復物の窩洞境界部の色調変化に及ぼす影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5487号 | 歯学 | 髙草木　謙介 | Effect of incorporation of surface pre-reacted glass ionomer filler in tissue conditioner on the inhibition of Candida albicans adhesion<br>(S-PRG filler添加によるTissue conditionerのCandida albicans付着抑制) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5488号 | 歯学 | 福島　由香乃 | Reduced mastication impairs memory function<br>(咀嚼刺激の低下は記憶機能を障害する) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5489号 | 歯学 | 塚越　香 | Association between Symptoms of Temporomandibular Disorders and Duration of Computer Use in a Working Population in Japan<br>(就労者における顎関節症症状とPersonal computer作業時間の関連) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5490号 | 歯学 | 矢野　孝星 | The Role of Tsukushi (TSK), A Small Leucine-rich Repeat Proteoglycan, in Bone Growth<br>(Small Leucine-rich Repeat ProteoglycanであるTsukushiの骨成長への役割) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5491号 | 歯学 | 河野　葉子 | Effects of oral stimulation with capsaicin on salivary secretion and neural activities in the autonomic system and the brain<br>(カプサイシンの口腔内刺激が唾液分泌および自律神経と脳活動に及ぼす影響) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5492号 | 歯学 | SHUJAA ADDIN Ammar Abduljalil Yahya | Biodegradable gelatin/beta-tricalcium phosphate sponges incorporating recombinant human fibroblast growth factor-2 for treatment of recession-type defects: A split-mouth study in dogs<br>(ゼラチン/β-TCP複合体スポンジとヒトリコンビナントFGF-2を用いた歯肉退縮欠損の治療:イヌスプリットマウス研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5493号 | 歯学 | 中山　玲奈 | Creating a quality of life index for patients with temporomandibular disorders<br>(顎関節症患者を対象としたQOL指標の作成) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5494号 | 歯学 | 丸山　起一 | Histological changes in alveolar bone after onlay augmentation using the Casing Method.<br>(ケーシング法を用いた顎堤増大術後における顎骨の組織学的変化) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5495号 | 歯学 | 小野　彌 | Implant insertion into an augmented bone region using the canine mandible augmented by the “Casing Method”<br>(“Casing Method”により骨造成した成犬下顎骨顎底部へのインプラント埋入に関する評価) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5496号 | 歯学 | 荒木　美祐 | Associations between malocclusion and oral health-related quality of life among Mongolian adolescents<br>(モンゴル国の思春期児童における不正咬合と口腔関連QoLとの関連) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5497号 | 歯学 | 浦羽　亜矢奈 | Biomechanical behavior of adhesive cement layer and periodontal tissues on the restored teeth with zirconia RBFDPs using three-kinds of framework design; 3D FEA study<br>(三次元有限要素法による3種類のジルコニア接着ブリッジのフレームデザインにおける接着セメント層と支台歯の歯周組織の挙動について) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5498号 | 歯学 | 田頭　いとゑ | A new evaluation of masticatory ability in patients with dysphagia : the Saku-Saku Test<br>(摂食嚥下障害患者の新たな咀嚼能力評価方法:サクサクテスト) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5499号 | 歯学 | 池田　恵莉 | Resveratrol Derivative-rich Melinjo Seed Extract Induces Healing in a Murine Model of Established Periodontitis<br>(歯周炎モデルマウスを用いたレスベラトロール誘導体メリンジョ種子抽出粉末の歯周炎への効果の検討) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5500号 | 歯学 | Thwe Zin Ei | Comparison of resin-based and glass ionomer sealants with regard to fluoride release and anti-demineralization efficacy on adjacent unsealed enamel<br>(フッ素含有のシーラントからのフッ素徐放性および被覆されていない隣接エナメル質における脱灰抑制効果について、レジン系およびグラスアイオノマー系シーラントの比較) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5501号 | 歯学 | 大畑　八重 | A distinctive subgroup of oral EBV+ B-cell neoplasm with polymorphous features is potentially identical to EBV+ mucocutaneous ulcer<br>(多形性の細胞形態を示す口腔EBV陽性B細胞性腫瘍は、EBV陽性皮膚粘膜潰瘍に合致する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5502号 | 歯学 | 松田　悠平 | Reliability and Validity of the MD Anderson Dysphagia Inventory Among Japanese Patients<br>(MDADI日本語版の信頼性および妥当性の検証) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5503号 | 歯学 | 坪川　正樹 | In vitro and clinical evaluation of optical coherence tomography for the detection of subgingival calculus and root cementum<br>(Optical Coherence Tomographyによる歯肉縁下歯石とセメント質の検出に関するin vitro及び臨床評価) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5504号 | 歯学 | 柿﨑　翔 | Observation and determination of periodontal tissue profile using optical coherence tomography<br>(光干渉断層撮影法を用いた歯周組織の観察及び分析) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5505号 | 歯学 | MOHAMED MOUSTAFA MOHAMED ALI SAID | Masticatory Function and Oral Health-related Quality of Life in Partial Maxillectomy Patients<br>(上顎骨切除患者の咀嚼機能および口腔関連の生活の質に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5506号 | 歯学 | 松浦　千尋 | 3D diagnosis of dentin caries beneath composite restorations using swept-source optical coherence tomography<br>(波長走査型光干渉断層計(SS-OCT)を用いたコンポジットレジン修復物下象牙質齲蝕の3D診断) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5507号 | 歯学 | 中村　州臣 | Healing after experimental luxation and intraalveolar root fracture in immature rat teeth<br>(ラット根未完成歯における実験的脱臼・歯槽内歯根破折後の治癒) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5508号 | 歯学 | 住谷　雄大 | Micro-CT Assessment of Comparative Radiopacity of Adhesive/Composite Materials in a Cylindrical Cavity<br>(円柱窩洞における接着材料とコンポジットレジンの相対的X線不透過性に関するマイクロCT評価) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5509号 | 歯学 | 畑山　貴志 | Stress distribution in tooth resin core build-ups with different post-end positions in alveolar bone level under two kinds of load directions<br>(ポスト先端部と歯槽骨の位置関係と荷重方向の違いがレジンコア築造歯の応力分布に与える影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5510号 | 歯学 | 藤田　和久 | Regulation of periodontal ligament-derived cells by type III collagen-coated hydroxyapatite<br>(3型コラーゲンコートハイドロキシアパタイトによる歯根膜幹細胞の制御) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5511号 | 歯学 | 吉田　結梨子 | Novel antibacterial mouthguard material manufactured using silver-nanoparticle-embedded ethylene-vinyl acetate copolymer masterbatch<br>(銀ナノ粒子含有エチレン酢酸ビニル共重合体マスターバッチを応用した新規抗菌マウスガード材料の開発に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5512号 | 歯学 | 柳　綾香 | Investigation of nutritional status using the Mini Nutritional Assessment-Short Form and analysis of the relevant factors in patients with head and neck tumour<br>(頭頸部腫瘍患者に対するMini Nutritional Assessment-Short Formを用いた栄養調査とその関連因子についての検討) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5513号 | 歯学 | 西条　美紀 | Evaluation of selected mechanical properties of NiTi rotary glide path files manufactured from controlled memory wires<br>(Controlled memory ワイヤー製グライドパス形成用ニッケルチタンロータリーファイルにおける機械的性質の評価) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5514号 | 歯学 | 田端　倫子 | Assessment of enamel cracks at adhesive cavosurface margin using three-dimensional swept-source optical coherence tomography<br>(3D波長走査型光干渉断層計による接着修復窩縁部に生じたエナメル質亀裂の評価) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5515号 | 歯学 | 南淵　眞愛 | Evaluating the optimal design of zirconia based resin-bonded fixed dental prostheses using finite element analysis<br>(有限要素法を用いたジルコニア接着ブリッジの最適デザインの検討) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5516号 | 歯学 | 静間　夕香 | Relationship between self-assessment and clinical evaluation of dental plaque and gingival condition in Japanese adolescents<br>(日本人高校生における歯垢と歯肉の状態の自己評価と臨床所見との関連) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5517号 | 歯学 | 駒崎　利奈 | Periodontal pathogenic bacteria, Aggregatibacter actinomycetemcomitans affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism<br>(歯周病原細菌Aggregatibacter actinomycetemcomitansは腸内細菌叢と糖代謝を変化させ非アルコール性脂肪性肝疾患に影響を及ぼす) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5518号 | 歯学 | KONG Sophannary | Biological effects of Er:YAG laser irradiation on the proliferation of primary human gingival fibroblasts<br>(初代培養ヒト歯肉線維芽細胞の増殖に対するEr:YAGレーザーの生物学的効果) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5519号 | 歯学 | 城戸　大輔 | Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress<br>(糖尿病が酸化ストレスを介して歯肉の創傷治癒に与える影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5520号 | 歯学 | 大津　杏理 | Porphyromonas gingivalis感染マウスにおける腸内細菌叢の変動 | 平成30年3月22日 |
| 甲第5521号 | 歯学 | 谷本　理沙子 | Low-level ultrahigh-frequency and ultrashort-pulse blue laser irradiation enhances osteoblast extracellular calcification by upregulating proliferation and differentiation via transient receptor potential vanilloid 1<br>(超高繰り返し超短パルス青色レーザーの低出力照射はTRPV1を介して骨芽細胞の増殖および分化を促進し、細胞外基質の石灰化を亢進させる) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5522号 | 歯学 | 天海　徳子 | The effect of prosthetic rehabilitation and simple dietary counseling on food intake and oral health related quality of life among the edentulous individuals: A randomized controlled trial.<br>(欠損補綴と簡便な食事指導が食品摂取と口腔関連QoLに与える影響：無作為化比較試験) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5523号 | 歯学 | 荒木田　俊夫 | Evaluating the influences of ambient light on scanning trueness,precision, and time of intra oral scanner<br>(口腔内スキャナの真度、再現性、スキャン時間に対する外乱光の影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5524号 | 歯学 | 髙木　徹 | Effective removal of calcified deposits on microstructured titanium fixture surfaces of dental implants with erbium lasers<br>(エルビウムレーザーを用いた歯科インプラントのチタンフィクスチャー表面微細構造上の石灰化付着物の効果的除去) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5525号 | 歯学 | 草薙　彩花 | Effect of nonthermal atmospheric discharge on tooth bleaching<br>(常温大気圧放電が歯の漂白に及ぼす影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5526号 | 歯学 | 池川　麻衣 | Interactive effect of rehydration with diluted sports drink and water gargling on change of salivary flow, pH, and buffering capacity during ergometer exercise in young adult volunteers.<br>(若年者におけるエルゴメータ運動中の唾液分泌量、pHおよび緩衝能の変化に<br>対する希釈スポーツドリンクによる水分補給と含嗽効果の交互作用) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5527号 | 歯学 | 金丸　智紀 | Modulation of Matrix Mineralization by von Willebrand Factor C Domain Containing 2 in Vivo and in Vitro<br>(VWC2によるin vivoとin vitroにおけるマトリックスミネラリゼーションの制御) | 平成29年3月31日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5528号 | 歯学 | 岡本　千絵 | Inverse response of osteoblasts and fibroblasts to growth on carbon-deposited titanium surfaces<br>(炭素付着したチタン表面における骨芽細胞と線維芽細胞の逆の挙動) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5529号 | 歯学 | 稲川　英明 | Potential for estimation of Young's modulus based on<br>computed tomography numbers in bone:<br>A validation study using a nano-indentation test on murine maxilla<br>(骨のCT値に基づくヤング率推定の可能性;<br>マウス上顎骨へのナノインデンテーション試験による検証研究) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5530号 | 歯学 | 武元　徹 | Combination of the RANKL-binding peptide W9 and bFGF induces bone regeneration in the rat calvarial defect model<br>(ラット頭蓋骨欠損モデルにおける、RANKL結合ペプチドW9とbFGFの組み合わせによる骨形成評価の検討) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5531号 | 歯学 | 成瀬　由己 | Effect of alumina-blasting pressure on adhesion of CAD/CAM resin block to dentin<br>(CAD/CAMレジンブロックと象牙質の接着に対するサンドブラスト圧の影響) | 平成29年3月31日 |
| 甲第5532号 | 歯学 | GANBOLD Khongorzul | Human pulpal blood flow in different root formation stages measured with transmitted-light plethysmography<br>(透過型光電脈波法を用いた幼若永久歯の発育段階に応じた歯髄血流変化の解析) | 平成29年9月30日 |
| 甲第5533号 | 歯学 | 金口　明美 | Low-intensity pulsed ultrasound stimulation for mandibular condyle osteoarthritis lesions in rats<br>(ラット下顎頭変形性関節症病変に対する低出力超音波パルス刺激) | 平成29年9月30日 |
| 甲第5534号 | 歯学 | 久保田　絢子 | Effectiveness of Individual Oral Health Education for Japanese University Students<br>(大学生への個別口腔健康教育の有効性) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5535号 | 歯学 | 宮安　杏奈 | Cost-effectiveness analysis of two impression methods for the fabrication of mandibular complete dentures<br>(下顎全部床義歯製作における印象採得法の費用効果分析に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5536号 | 歯学 | 中田　琢也 | Effect of a calcium phosphate and fluoride paste on prevention of enamel demineralization<br>(リン酸カルシウムとフッ素を含有したペーストによるエナメル質脱灰抑制効果) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5537号 | 歯学 | 髙橋　彬文 | The effect of different cleaning agents on saliva contamination for bonding performance of zirconia ceramics<br>(各種洗浄材が唾液汚染後のジルコニアセラミックスの接着性能に与える影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5538号 | 歯学 | 中村　慎太郎 | Efficacy of Bone Regeneration using Micro-graft Suspension of Palatal Mucosa in Rats<br>(ラットにおける口蓋粘膜のmicro-graft suspensionを用いた骨再生の有効性) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5539号 | 歯学 | 松原　麻梨子 | High-speed jaw-opening exercise in training suprahyoid fast-twitch muscle fibers<br>(嚥下時の舌骨挙上に関与する速筋訓練を目的とした反復開口訓練の効果) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5540号 | 歯学 | 小笠原　毅 | Shape Optimization of Bone-Bonding Subperiosteal Devices<br>with Finite Element Analysis<br>(有限要素解析を用いた骨膜下デバイスの形状最適化) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5541号 | 歯学 | 保母　宏基 | Effects of an interactive simulation material for clinical dentistry on knowledge acquisition and memory retention in dental residents<br>(臨床研修歯科医の知識獲得と記憶定着に対する双方向型コンピュータシミュレーション教材の効果) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5542号 | 歯学 | 荒岡　大輔 | The strategies used for curing universal adhesives affect the micro-bond strength of resin<br>cement used to lute indirect resin composites to human dentin<br>(間接修復におけるユニバーサルアドヒーシブの硬化様式がレジンセメントの<br>象牙質接着性能に及ぼす影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5543号 | 歯学 | 三浦　杏奈 | Psychiatric comorbidities in patients with Atypical Odontalgia<br>(非定型歯痛患者における精神疾患の併存について) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5544号 | 歯学 | 柴﨑　真樹 | Distribution of Single Nucleotide Polymorphisms in Protein-coding Regions of emm12 Group A Streptococcus from Two Scarlet Fever Outbreaks<br>(異なる地域に発生した猩紅熱の流行より採取されたemm12型A群連鎖球菌株における遺伝子変異の分布) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5545号 | 歯学 | 佐戸川　佑弥 | Short-term changes in chewing efficiency and subjective evaluation<br>in normal dentate subjects after insertion of oral appliances with an occlusal flat table<br>(健常歯列者におけるオクルーザルフラットテーブルを有する<br>オーラルアプライアンス装着後の咀嚼効率と主観的評価の短期的変化) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5546号 | 歯学 | 加治佐　枝里子 | The relationship between jaw-opening force and the cross-sectional area of the suprahyoid muscles in healthy elderly<br>(健常高齢者における開口力と舌骨上筋群の断面積との関連性) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5547号 | 歯学 | 安　珍圭 | The relationships between the arrangement of teeth, root resorption,<br>and dental maturity in bovine mandibular incisors<br>(ウシ下顎前歯部における歯の配列と歯根吸収、歯の成熟度との関連) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5548号 | 歯学 | LUONG DAO Minh Nguyet | New approaches in bond test and bleaching using biophotonic technologies<br>(バイオフォトニック技術による接着試験と歯の漂白法に関する新しいアプローチ) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5549号 | 歯学 | 後村　純史 | Influence of FCP-COMPLEX on bond strength and the adhesive-artificial caries-affected dentin interface<br>(FCP-COMPLEXが人工う蝕の影響を受けた象牙質に対する接着強さおよび接着界面に及ぼす影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5550号 | 歯学 | 木村　佳世 | Influence of habitual mouth breathing on taste sensation<br>(習慣的口呼吸が味覚感受性に与える影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5551号 | 歯学 | 平澤　正洋 | Superhydrophilic co-polymer coatings on denture surfaces reduce Candida albicans adhesion - An in vitro study.<br>(義歯表面にコーティングした超親水性コポリマーはCandida albicans付着を<br>減少させる- in vitro 研究) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5552号 | 歯学 | 井汲　玲雄 | Guided bone regeneration using a hydrophilic membrane made of unsintered hydroxyapatite and poly(l-lactic acid) in a rat bone-defect model<br>(親水性uHA/PLLAを用いたラット頭蓋骨欠損モデルにおける骨再生誘導) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5553号 | 歯学 | 宇田川　小百合 | Effect of Porphyromonas gingivalis infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight<br>(低出生体重児出産を伴う妊娠マウスの胎盤および臍帯におけるPorphyromonas gingivalis感染の影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5554号 | 歯学 | 中元　絢子 | Effect of fluoride mouthrinse on adhesion to bovine root dentin<br>(フッ化物洗口剤が牛歯根象牙質の接着に及ぼす効果) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5555号 | 歯学 | 馬場　優也 | Effectiveness of a combination denture-cleaning method versus a mechanical method: comparison of denture cleanliness, patient satisfaction, and oral health-related quality of life<br>(機械的な義歯洗浄方法と機械的・化学的手法を併用した義歯洗浄方法の効果：義歯清浄度、患者満足度、口腔関連QOLの比較) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5556号 | 歯学 | Mya　Nandar | Transcription factor Foxc1 is involved in anterior part of cranial base formation.<br>(フォークヘッド転写調節因子Foxc1は頭蓋底前部の形態形成に関与する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5557号 | 歯学 | MULATI　Aierken | Effects of osteotomy with drilling on osteocyte<br>(骨への外科的侵襲が骨細胞におよぼす影響) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5558号 | 歯学 | 星　礼子 | Preoperative imaging findings as predictors of postoperative inferior alveolar nerve injury following mandibular cyst surgery<br>(術前画像所見による下顎嚢胞術後下歯槽神経傷害の予測) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5559号 | 歯学 | 葉山　博工 | Trueness and precision of digital impressions obtained using an intraoral scanner with different head size in the partially edentulous mandible<br>(下顎部分歯列欠損に対する異なるヘッドサイズの口腔内スキャナを用いたデジタル印象の真度と精度) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5560号 | 歯学 | 池田　安紀津 | Chewing stimulation reduces attentional bias toward visual food stimuli in healthy-weight individuals<br>(咀嚼刺激は標準体重者において食物視覚刺激に対する指向性を低下する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5561号 | 歯学 | 西井　直人 | Systemic administration of a TLR7 agonist attenuates regulatory T cells by dendritic cell modification and overcomes resistance to PD-L1 blockade therapy<br>(TLR7アゴニストの全身投与は、樹状細胞の修飾により制御性T細胞を減少させ、PD-L1阻害療法に対する抵抗性を克服する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5562号 | 学術 | NADYA Niken Adiba | PI3K-Akt pathway enhances the differentiation of interleukin-27-induced type 1 regulatory T cells<br>(PI3K-Akt経路はインターロイキン27によって誘導される1型制御性T細胞の分化を促進する) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5563号 | 学術 | SHAGDARSUREN Tserendulam | Association between perceived neighborhood environment and health of middle-aged women living in rapidly changing urban Mongolia<br>(急速な都市化が進行するモンゴルの女性が認識する近隣環境の質と主観的健康観) | 平成28年9月30日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5564号 | 学術 | 古寺　敏子 | Differing contributions of the first and second pharyngeal arches to tympanic membrane formation in the mouse and chick<br>（マウスとニワトリの鼓膜形成では異なる鰓弓が中心的な役割を果たす） | 平成29年3月31日 |
| 甲第5565号 | 学術 | 野亦　久彌 | Enhanced biological fixation of ligaments to bone tissues utilizing chitin fabrics<br>（キチン繊維を利用した骨組織への靭帯の生物学的固定の強化） | 平成29年3月31日 |
| 甲第5566号 | 看護学 | 富岡　晶子 | Physical and social characteristics and support needs of adult female childhood cancer survivors who underwent hormone replacement therapy<br>（女性ホルモン補充療法を受けた成人女性小児がん経験者の身体・社会的特徴と支援ニーズ） | 平成29年3月31日 |
| 甲第5567号 | 看護学 | 小玉　淑巨 | Nurse managers’ attributes to promote change in their wards: a qualitative study<br>（病棟変革を促進する看護師長の特性：質的研究） | 平成29年9月21日 |
| 甲第5568号 | 看護学 | 岩﨑　孝子 | A purposeful yet non-imposing approach: How Japanese homecare nurses establish relationships with older clients and their families<br>（押しつけない意図的な歩みより：日本の訪問看護師は要介護高齢者・家族とどのように関係性を構築しているか） | 平成29年3月31日 |
| 甲第5569号 | 看護学 | 申　于定 | Intention Formation Process for the use of Tracheostomy and Invasive Ventilation in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis<br>（筋萎縮性側索硬化症患者の人工呼吸器装着に関する意向形成の過程） | 平成30年3月22日 |
| 甲第5570号 | 看護学 | 瀧口　千枝 | Development of the Nurses’ Care Coordination Competency Scale for mechanically ventilated patients in critical care settings in Japan:<br>Part 2　Validation of the scale<br>（クリティカルケア領域の人工呼吸器装着患者管理における看護師のケアコーディネーションコンピテンシー尺度の開発：　パート2　尺度の妥当性の検証） | 平成30年3月22日 |
| 甲第5571号 | 看護学 | 西村　礼子 | Effect of demonstrating situation awareness on nurses’ gaze and judgment in a computer-based task for environmental management: a randomized controlled trial<br>（環境整備に関するコンピュータを使用した課題での看護師の注視と判断に対する状況認識を示すことの効果） | 平成29年3月31日 |
| 甲第5572号 | 看護学 | 杉本　健太郎 | Factors associated with deaths in 'Elderly Housing with Care Services' in Japan: a cross-sectional study<br>（サービス付き高齢者向け住宅における入居者の施設内看取りに関連する要因） | 平成30年3月22日 |
| 甲第5573号 | 看護学 | 廣岡　佳代 | Quality of death, rumination, and posttraumatic growth among bereaved family members of cancer patients in home palliative care<br>（在宅緩和ケアを受けたがん患者遺族における看取りの質、反芻と心的外傷後成長） | 平成30年3月22日 |
| 甲第5574号 | 保健学 | 市村　直也 | High-Density Lipoprotein Binds to Mycobacterium avium and Affects the Infection of THP-1 Macrophages<br>（高比重リポタンパクはMycobacterium aviumに結合し、THP-1マクロファージへの感染に影響する） | 平成30年3月22日 |
| 甲第5575号 | 保健学 | 名倉　豊 | Regulation of the lysophosphatidylserine and sphingosine 1-phosphate levels in autologous whole blood by the pre-storage leukocyte reduction<br>（保存前白血球除去処理による自己全血液中のリゾフォスファチジルセリンおよびスフィンゴシン－１－リン酸濃度の変化） | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
|---|---|---|---|---|
| 甲第5576号 | 保健学 | 楾　清美 | Knowledge and attitude toward cervical cancer and its prevention among female workers in the Vientiane Capital, Lao PDR<br>(ラオス国首都ビエンチャンにおける女性労働者の子宮頸癌とその予防に関する知識レベルと態度に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5577号 | 保健学 | 緒方　勇亮 | Anterior cruciate ligament-derived mesenchymal stromal cells have a propensity to differentiate into the ligament lineage.<br>(前十字靭帯由来間葉系間質細胞は靭帯系統への分化指向性をもつ) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5578号 | 保健学 | 石井　佳菜 | Recapitulation of extracellular LAMININ environment maintains stemness of satellite cells in vitro<br>(生体内のラミニン環境を模倣することは筋サテライト細胞の幹細胞性を維持する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5579号 | 理学 | 虞　若星 | Evaluation of the Toxicity Effects of Drugs on Early Embryogenesis<br>(薬剤の初期杯に与える毒性評価) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5580号 | 理学 | Suvarna Kruthi Sharanjeet | Targeting carcinoma associated fibroblasts (CAFs) for treatment of breast cancer metastasis<br>(乳がん転移治療を目指した、がん関連線維芽細胞の標的化に関する研究) | 平成29年9月21日 |
| 甲第5581号 | 理学 | 大坪　香澄美 | Induction of Macropinocytic Cell Death by Oncogenic RAS in Human Epithelial Cells and Its Suppression by MYC Overexpression<br>(ヒト上皮細胞における活性化型RASに対するマクロピノサイトーシスを伴う細胞死の誘導とMYC過剰発現によるその抑制) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5582号 | 理学 | 五領田　小百合 | Dietary intakes and social capital in Great East Japan Earthquake and Tsunami<br>(東日本大震災被災者における食事摂取状況とソーシャル・キャピタルとの関連) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5583号 | 理学 | 杉山　香織 | Dysfunction of glial glutamate transporters contributes to spinal motor neuron death in vivo<br>(グリア型グルタミン酸輸送体の機能不全は脊髄運動神経細胞死にin vivoで寄与する) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5584号 | 理学 | 外山　桂 | Studies on New Peptide Inhibitors of Kinase Activity and Vehicles for Intracellular Drug Delivery Based on the EGF Receptor Dimerization Arm<br>(上皮成長因子受容体二量体化アームを基盤とした新規ペプチド性阻害剤／細胞内薬物送達分子に関する研究) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5585号 | 理学 | 細井　勇輔 | Analysis of lncRNA Fat60-deficient mice showing female-specific developmental abnormalities<br>(表現型に性差を示すLong non-cording RNA Fat60欠損マウスの解析) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5586号 | 理学 | 山本　由姫 | Pancreatic Tumor-targeting Oncolytic Adenovirus Showed High Infectivity and Strong Antitumor Effect for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Neuroendocrine Tumor<br>(膵腫瘍標的型溶解アデノウイルスは膵管がんおよび膵内分泌腫瘍において高い感染効率と腫瘍溶解効果を示す) | 平成30年3月22日 |
| 甲第5587号 | 工学 | 今泉　祐輝 | The development of cell membrane disorder assay by active pH sensing using Ion-Sensitive Field-Effect Transistor<br>(イオン応答性電界効果トランジスタを用いたアクティブ型pH計測による細胞膜障害性測定法の開発) | 平成30年3月22日 |

| 報告番号 | 学位 | 氏名 | 題目 | 授与日 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 甲第5588号 | 工学 | 金本　和也 | チオスルホナートを硫黄源とする多彩な含硫黄化合物の合成法の開発 | 平成30年3月22日 |
| 甲第5589号 | 工学 | HAI WENFENG | Study on electrochemical detection of human influenza virus using conducting organic material<br>(導電性有機材料を用いたヒトインフルエンザウイルスの電気化学的検出の研究) | 平成30年3月22日 |

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 山本　桂 |
| 論文審査担当者 | 主査　立石　宇貴秀<br>副査　杉原　泉、成相　直 |
| 論　文　題　目 | Brain activity in patients with unilateral sensorineural hearing loss during auditory perception in noisy environments |

（論文内容の要旨）

**＜緒言＞**

後天的に一側性難聴（UHL）になった患者は、騒音下で良聴耳に雑音が入る環境において、言葉の聴き取りづらさをしばしば訴える。言葉の聞き取り困難さは生活の質に密接につながると考えられる。

近年、UHL 患者の生活の質について、いくつかの研究がおこなわれている。厚生労働省研究班は、UHL 患者の生活の質を調査するため、UHL 患者に対して調査をおこなった。その結果、UHL 患者においては心理的な苦痛が多いという結果を示した。そしてその心理的苦痛の原因として、騒音下での会話の困難や騒音下での不快がおおいに影響を及ぼしていることを報告している。

また、心理的社会的障害やハンディーキャップについての過去の調査においても、UHL 患者の生活上での問題点は騒音下での言語の理解と、音源定位であるとされている。

Welsh らは、50ｄＢの大きさの単語音を使用して騒音環境下での一側性の聾患者の言葉の聞き取り能力について調べている。その結果、一側は聾、一側は健耳の患者の誤聴率は 4％～40％であり、一側は聾、一側は難聴の患者の誤聴率は 4％～72％で、一側が健耳、難聴にかかわらず、誤聴率の成績はばらついていた。この結果は、騒音環境下においては、聾患者の健耳が聾耳の機能を補っているとは言えないことを示している。したがって、UHL 患者においても同様に、騒音環境下においては、健耳が必ずしも難聴耳の機能を補っていない可能性があり、これが騒音環境下における UHL 患者の聴き取りづらさの原因であることを示唆している。しかし、アンケートや聴力検査は被験者の聴き取りづらさを示す指標ではあるが、主観的要素が多く含まれるため、現行の検査では客観的評価が困難であるので、聴き取りづらさを客観的に示すための指標が求められている。

近年発達した functional magnetic resonance imaging (fMRI)に代表される neuroimaging 手法を用いて、聴覚においても音処理に関与する脳領域についての研究が行われてきた。

Neuroimaging を使用した研究として、Propst らは UHL の子供たちの脳活動を調べるために、narrowband noise と speech in noise をもちいて、それぞれ音刺激の脳活動を調べ、narrowband noise の刺激では聴覚野の活動は見られるが、二次聴覚野の活動はなく、その一方で、speech in noise の刺激では、UHL の子供たちで二次聴覚野に活動あることを報告している。

単耳刺激での聴覚情報処理研究が以前はないことを受けて、Suzuki らは臨床にて語音弁別機能検査で使用される語音を用いて、語音を一側ずつ聴取しているときの UHL 患者の脳活動を調べた。

その結果、UHL 患者においても難聴耳からの語音の刺激で、一次聴覚野と二次聴覚野の活動が見られたと報告している。

これらの fMRI 研究結果は、UHL 患者の音刺激による聴覚野の活動領域が健常者の活動領域と類似していることを示している。

そこで、語音弁別能検査に使用されている語音と、純音聴力検査にて使用されている純音を使用して、両耳から２種類の音刺激を与え、UHL 患者と健常者との脳活動の違いをみることで聞き取りづらさを考察したいと考えた。

**研究方法**

**＜被験者＞**

8 人の健常者（男性 3 人と女性 5 人、年齢範囲 30～60 歳;平均年齢 41.8±12.8 歳）と、12 人の UHL 患者（男性 6 人と女性 6 人; 年齢範囲 26～72 歳;平均年齢 45.4± 15.7 歳）を対象にした。両群の年齢と性別に有意差はなかった。

**<聴力>**

すべての健常者は正常聴力（純音聴力検査の結果 125Hz から 8 kHz において両耳で 25dBHL 未満）であった。一方、すべての UHL 患者が 5 年以上の期間、125H から 8kHz にて 90dBHL 以上の感音難聴を呈した。これらの患者のうち、7 人は右 UHL 患者であり、5 人が左 UHL 患者であった。難聴の原因は、11 人の患者が突発性難聴で、ムンプス難聴患者が 1 人であった。

**<聴覚刺激>**

fMRI 実験を行う前に、語音弁別能検査（67-S 語試験）から 14 語音を選択した。選択した 14 語音は、「ア・キ・シ・ニ・ヨ・チ・ウ・ク・ス・ネ・オ・テ・モ・ト」であった。これらに加えて、比較対象として 1000Hz の純音を使用した。

**fMRI 実験**

**<実験デザイン>**

本 fMRI 研究では、イベントデザインを使用した。各音刺激は両耳より、75ｄB MRI スキャンノイズ下にて、ヘッドフォンで 8 秒毎（65～70ｄB で持続時間 1 秒）に提示した。14 語音と 1000Hz の純音をグループ化し、各刺激を（提示の順序は、無作為化された）10 回提示した。

したがって、被験者は、一回の測定セッションで刺激音を 150 回聴取することになった。被験者には、音刺激を聞いた場合、人差し指でボタンを押すように指示した。さらに、語音聴取時には、聴取した語音を強く想記することを指示した。被験者が視線を維持するために、固定点は画面の中央に表示した。

**<MRI データの取得>**

すべての MRI データは、1.5T MRI スキャナ（シーメンス社製、エルランゲン、ドイツ製）を使用して収集した。脳機能画像として grandient-echo echo-planer imaging (GE-EPI)法を用いて EPI 撮影を行った。EPI 画像は全脳スキャンであり、**T2** 強調画像の AC-PC line（EPI）で測定した。

機能画像を取得した後、脳形態画像として T1 強調画像を撮影した。

**<MRI データの分析>**

EPI 機能画像データは、Statistical Parametric Mapping 5（SPM5）を用いて前処理と分析をした。

**<領域の分析>**

本研究では、聴覚皮質の活動に焦点を当てた。脳機能画像より健常者にて語音聴取時に、脳活動は左右両方の聴覚皮質で認められた。その活動は一次聴覚野、前後の聴覚連合野である。

さらなる分析のために、健常者の結果を基にこれらに 6 つの領域（ROI）を設定した。そして、toolbox の MarsBaR を使用して、各 ROI の％signal change の変化を計算した。形状は、1 センチメートル半径の球であり、その中心座標は ROI を使用した。

**研究結果**

**行動データ**

反応データからは、すべての被験者が音(純音と 14 語音)を聴取したということを示している。

**脳機能画像解析結果**

健常者では、語音でも純音でも上側頭回と横側頭回に脳活動が認められた。前聴覚連合野の領域では、語音でも純音でも左右の上側頭回に活動が認められた。後聴覚連合野の領域では語音でも純音でも右中側頭回と左上側頭回に活動が認められた。このことは、1 次聴覚野と前後聴覚連合野は語音でも純音でも活動することを示した。

次に、設定した ROI における、% signal change を全ての被験者について算出し、健常者と UHL 患者のグループ内で、各 ROI において純音聴取時と語音聴取時で活動に違いがあるかどうかを解析した(paired t-test、$p < 0.008$)。

健常者においては、どの領域においても純音聴取時と語音聴取時で% signal change に差はなかった。

全ての UHL 患者の聴覚刺激による活動領域は 1 次聴覚野と 2 次聴覚野に存在していた。さらに左右で UHL 患者グループの傾向を解析した。

左 UHL 患者においては、ROI のすべての領域では語音聴取時と純音聴取時で活動の有意差はなかったことを示した。

右 UHL 患者においては、右後聴覚連合野(RPAA)の領域が語音聴取時より純音聴取時の方が活動の増大を示した（$p=0.002$）。

**考察**

本論文では、騒音環境下で UHL 患者が訴える会話の聞き取りづらさの原因が中枢での神経機構にある可能性を考え、fMRI を用いて健常者と UHL 患者の騒音環境下での聴覚関連領域の脳活動を比較した。

語音及び純音聴取時に、健常者および UHL 患者のどちらにも、両側の一次聴覚野と両側の二次聴覚野に脳活動が認められた。直接比較では両者に差が見られなかったため、健常者の結果に基づいて ROI を 6 つ定め、各領域について比較検討した。

その結果、UHL 患者内の比較において、右 UHL 患者では右側の二次聴覚野で語音刺激と純音刺激に対する脳活動に有意差を認めたが、左 UHL 患者ではこのような差を認めなかった。

まず本研究において、行動データから、すべての被検者は音刺激を 100%聴取できているが、脳活動の傾向には差があった。このことは、本研究の脳活動の差は音の識別を反映していると考えられる。

さらにその差が右半球に有意差を得たことを考察した。騒音がない環境下では優位半球は左半球であるが、過去の研究では、騒音環境下で語音の識別における右半球の優位性について報告されている。今回、右 UHL 患者の結果はそれらの研究結果とよく一致する。つまり、右 UHL 患者において、騒音下での語音識別に優位に働くとされる右半球での処理様式が純音処理の際の脳活動との違いになって表れたと考えられる。

そして、UHL により、聴覚伝導路の音処理のメカニズムが変化する可能性も過去の研究から示唆されており、我々の研究において左 UHL 患者では、右 UHL 患者で見られた語音処理と純音処理の脳活動の違いが見られなかったのは、左右 UHL 患者での聴覚伝導路での音処理のメカニズムの違いが影響している可能性が考えられる。

今回の研究では、UHL 患者が訴える騒音環境下での会話の聞き取りにくさに直接関係すると考えられる、健常者と比較した際の UHL 患者特有の脳活動を見出すことはできなかった。しかし、左右の UHL 患者では、語音に対する聴覚中枢の処理方法に違いがあることを示唆するデータが得られた。臨床では UHL 患者を左右の罹患耳を区別することなく同様のものとして診断、治療されているが、本研究結果は罹患耳の左右によって特有の症状が現れる可能性とそれに対する柔軟な治療法を選択する必要性を示唆している。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5289　号 | 山本　桂 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　立石　宇貴秀<br>副　査　杉原　泉、成相　直 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、functional magnetic resonance imaging (fMRI)を用い、騒音環境下で一側性難聴（unilateral sensorineural hearing loss:UHL）患者が訴える会話の聞き取りづらさの原因が中枢での神経機構にある可能性を考え健常者と UHL 患者の騒音環境下での聴覚関連領域の脳活動を比較した論文である。

語音弁別能検査に使用されている語音と、純音聴力検査にて使用されている純音を使用して、両耳から２種類の音刺激を与え、UHL 患者と健常者との脳活動の違いをみることで聞き取りづらさを評価し、UHL 患者内の比較において、右 UHL 患者では右側の二次聴覚野で語音刺激と純音刺激に対する脳活動に有意差を認めたが、左 UHL 患者ではこのような差を認めなかった。左右の UHL 患者では、語音に対する聴覚中枢の処理方法に違いがあることを示唆するデータが得られた。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

fMRI を使用した聴覚においても音処理に関与する脳領域に関しては以前より諸家の報告がなされてきている。speech in noise の刺激では、UHL の二次聴覚野に活動あることや UHL 患者においても難聴耳からの語音の刺激で、一次聴覚野と二次聴覚野の活動が見られることが知られている。しかしながら、語音弁別能検査に使用されている語音と、純音聴力検査にて使用されている純音にて両耳から２種類の音刺激を与え聴覚野の活動領域について焦点を絞った報告はなく、この点で本研究は独創性が認められる。

２）社会的意義

後天的な UHL 患者は、騒音下で良聴耳に雑音が入る環境において、言葉の聴き取りづらさをしばしば訴えるため、言葉の聞き取り困難さは生活の質に密接につながると考えられている。近年、UHL 患者の生活の質について、いくつかの研究がおこなわれている。厚生労働省研究班による報告では、UHL 患者の生活の質を調査した結果、UHL 患者においては心理的な苦痛が多いという結果を示した。また、その心理的苦痛の原因として、騒音下での会話の困難や騒音下での不快がおおいに影響を及ぼしていた。心理的社会的障害やハンディーキャップについての調査においても、UHL 患者の生活上での問題点は騒音下での言語の理解と、音源定位であるとされている。臨

床では UHL 患者を左右の罹患耳を区別することなく同様のものとして診断、治療されているが、本研究結果は罹患耳の左右によって特有の症状が現れる可能性とそれに対する柔軟な治療法を選択する必要性を示唆し、その社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

fMRI 実験を行う前に、語音弁別能検査（67-S 語試験）から 14 語音を選択しこれらに加えて、比較対象として 1000Hz の純音を使用した。各音刺激は両耳より、75ｄB MRI スキャンノイズ下にて、ヘッドフォンで 8 秒毎（65～70ｄB で持続時間 1 秒）に提示した。14 語音と 1000Hz の純音をグループ化し、各刺激を（提示の順序は、無作為化された）10 回提示した。被験者は、一回の測定セッションで刺激音を 150 回聴取することになり、臨床的に問題ないレベルであった。MRI データは、1.5T MRI 脳機能画像として grandient-echo echo-planer imaging (GE-EPI)法を用いて EPI 撮影を行った。EPI 画像は全脳スキャンであり、T2 強調画像の AC-PC line（EPI）で測定した。EPI 機能画像データは、Statistical Parametric Mapping 5（SPM5）を用いて前処理と分析をした。Marsbar ソフトウェアを使用して、ROI の％signal change の変化を計算した。1 回の刺激時間が短い event-related design の場合、1％以下の微小な差異を検出することができる統計処理
結果を導き出している。

４）考察・今後の発展性

騒音環境下で語音の識別における右半球の優位性について報告されている。右 UHL 患者において、騒音下での語音識別に優位に働くとされる右半球での処理様式が純音処理の際の脳活動との違いになって表れたと考えられる。UHL 患者が訴える騒音環境下での会話の聞き取りにくさに直接関係し、左右の UHL 患者では、語音に対する聴覚中枢の処理方法に違いがあることを示唆するデータが得られた。臨床では UHL 患者を左右の罹患耳を区別することなく同様のものとして診断、治療されているが、本研究結果は罹患耳の左右によって特有の症状が現れる可能性とそれに対する柔軟な治療法を選択する必要性を示唆している。

**３．その他**

Percent signal change の値の変化が小さいという指摘について、後日提出された報告書により、ボクセルの時間系列の平均活動値の基準を使用して、その時間平均値として計算されており、本研究でも使用した Marsbar ソフトウェアは小さな ROI に含まれているボクセルの平均信号から基準を計算するため 1％以下の微小な差異を検出することができると説明が補足された。また、研究の展望として、fMRI では脳の灰白質の機能を可視化することはできるが、脳の白質の評価をすることは不可能である。そこで、拡散強調画像をテンソル解析した、拡散テンソル画像を用いて脳の神経線維の走行状態を解析し、機能的結合性と併せて論じることにより新しい神経回路の構築を論じることができる。難聴症例は加齢因子も加味していくことが必須になってくるが、MR perfusion にて非侵襲的に聴覚領域の脳血流量を解析することで、加齢因子と難聴に伴う変化の解析も可能になると説明されている。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は本学博士の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 大庭　篤志 |
| 論文審査担当者 | 主査　石川　俊平<br>副査　稲澤　譲治、渡邉　守 |
| 論　文　題　目 | ARID2 modulates DNA damage response in human hepatocellular carcinoma cells |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年のゲノム研究は肝癌で SWI/SNF 複合体のサブユニットである ARID2 の変異頻度が高いことを示しているが、ARID2 の癌に関する分子メカニズムについては明らかにされていない。今回我々は Crisp/Cas9 システムを用いてヒト肝癌細胞株の ARID2 ノックアウト安定株（ARID2-KO 株）を作製し、ARID2 機能欠損によって高い造腫瘍性を獲得することを示した。さらに遺伝子発現解析で ARID2 機能欠損によって紫外線（UV）応答に関わる遺伝子が抑制的に調節されることを明らかにした。ARID2-KO 株では UV 照射や肝発癌物質のベンゾ[a]ピレン、FeCl3 暴露による DNA 損傷部位でのヌクレオチド除去修復機構（NER）の破綻を認めたが、これは NER の過程で重要な役割を担う XPG のリクルートが ARID2 機能欠損により抑制されたためであることが分かった。肝癌臨床検体のパブリックデータを用いた解析によって、肝癌を含む複数の癌で ARID2 変異症例は ARID2-KO 株と同様の分子生物学的変化を認め、また、ARID2 正常症例と比べて体細胞変異の数が有意に多くなっていることが明らかとなった。今回の発見により NER 破綻や体細胞高頻度突然変異をターゲットとした ARID2 変異癌の特異的な治療が確立されることが期待される。

＜緒言＞

肝癌は世界で 3 番目に死亡率の高い癌である。肝炎ウイルス、アルコール、メタボリックシンドロームなどに伴う肝炎や肝硬変が肝癌のリスクファクターであることは良く知られているが、肝癌の発癌分子メカニズムは複雑で未だ明らかではなかった。近年の次世代シークエンス研究によって TP53 や CTNNB1 の既知の変異の他に約 60%にクロマチンリモデリング因子の変異があり、その中でも SWI/SNF 複合体の変異が最も多いことが明らかになっている。SWI/SNF 複合体のサブユニットである ARID1A や BRG1 は synthetic lethality（合成致死性）を利用した癌治療の研究がすでに始まっている一方で、5-20%と肝癌で比較的特異的に不活化変異が多い ARID2 はどのように癌抑制的な役割を果たすのかは未だ明らかになっていない。そこで本研究では、我々は ARID2 の癌に関する分子メカニズムを明らかにするために Crisp/Cas9 システムを用いて肝癌細胞株のノックアウト安定株を作製し、遺伝子発現を比較した。その結果、ARID2 は DNA 損傷

応答に重要な役割を呈していることを発見した。

＜方法＞

肝癌細胞株である JHH4 と JHH5 を用いて Crisp/Cas9 システムで ARID2-KO 株を作製し、in vitro と in vivo で ARID2-KO 株の分子生物学的活性を評価した。JHH4 と JHH5 の野生株と ARID2-KO 株に対してマイクロアレイを用いた GSEA 解析を行った。ARID2 機能欠損によって UV 応答に関わる遺伝子が抑制的に調節されることが明らかとなったため、細胞株に UV 照射をし、γ-H2AX 発現、Annexin V、TUNEL アッセイを用いたアポトーシスの評価、UV の DNA 損傷応答に関わるとされる活性酸素種（ROS）や NER の評価を細胞免疫染色やフローサイトメトリーで行った。次に治療標的の可能性や分子メカニズムの解明のために EZH2 阻害剤や DNA 損傷応答に関わる抗癌剤、化合物、代謝産物を用いて細胞株の薬剤感受性を評価した。最後にパブリックデータを用いて in vivo での ARID2 変異症例の分子生物学的変化を解析した。

＜結果＞

① 肝癌細胞株 JHH4 と JHH5 の ARID2-KO 株を作製し、ウエスタンブロットで ARID2 タンパク発現

の消失を確認した。ARID2-KO 株は細胞遊走能が上昇し、ゼノグラフトモデルで高い造腫瘍性を獲得していることを示し、癌抑制遺伝子であることを明らかにした。次に GSEA 解析を行うと ARID2-KO 株では UV 応答に関わる遺伝子群が抑制的に調節されていることが分かり、ウエスタンブロットで UV 照射後のγ-H2AX タンパク発現レベルが ARID2-KO 株で有意に高くなっていることを確認した。Annexin V、TUNEL アッセイでも UV 照射後のアポトーシスが ARID2-KO 株で有意に多くなることが観察された。

② UV に対する DNA 損傷応答に関わるものとして、まず ROS の産生を評価すると UV 照射によって

ARID2-KO 株で有意に ROS の産生は増えるものの、N-acetyl-L-cysteine を用いて ROS を抑えることによってアポトーシスを抑えることはできなかったため、ROS が直接の UV アポトーシスの原因ではないと考えられた。次に DNA 損傷応答に関わる NER の過程で重要な役割を担う XPC と XPG の UV 損傷部位へのリクルートについて評価した。XPC は両者で差がなかったものの、XPG は ARID2-KO 株で有意に抑制されており、ARID2 が XPG リクルートを介して NER を調節していると考えられた。

③ EZH2 阻害剤 9 剤、PARP 阻害剤 olaparib を含む DNA 損傷応答に関わる 9 つの薬剤の薬剤感受性

試験では、NER に関与するベンゾ[a]ピレンと FeCl3 の 2 つで ARID2-KO 株への毒性が有意に高くなっており、さらにベンゾ[a]ピレン処理後でも同様に XPG のリクルートのみが ARID2-KO 株で有意に抑制されていることが確認された。

④ ARID2 変異の in vivo での評価のため ICGC のデータを用いて GSEA 解析を行った。JHH4 や JHH5 の ARID2-KO 株で発現低下している遺伝子群と肝癌、悪性黒色腫、卵巣癌の ARID2 変異症例で低下している遺伝子群に相関を認め、ARID2 変異症例でも in vitro と同様の分子メカ

ニズムが作用していることが示唆された。また肝癌、悪性黒色腫、卵巣癌において ARID2 変異症例は ARID2 正常症例と比べ、体細胞変異の数が有意に多くなっていることが明らかとなった。

＜考察＞

遺伝子発現解析の結果と同様、UV 照射によって ARID2-KO 癌細胞は特異的にアポトーシスを引き起こすことが示された。UV に対する DNA 損傷応答に関わるものとして、ROS と NER が挙げられるが、ROS を抑えることによってアポトーシスを抑えることはできなかったため、NER に関与し肝発癌物質として知られるベンゾ[a]ピレンや FeCl3 を用いて ARID2 機能欠損は NER のプロセスの破綻に関与すると結論付けた。NER は①XPC が DNA 損傷部位を認識して XPG をリクルートする、②XPD/XPB が DNA を開裂し XPC が 3’末端を XPF/ERCC1 が 5’末端を切断する、③PCNA や XRCC などが DNA 鎖を合成する、という過程をとる。過去には SWI/SNF 複合体が XPC と相互作用して UV 照射で惹起されたクロマチンリモデリングを行うという報告がある一方で、SWI/SNF 複合体の Brg1 が UV 照射による DNA 損傷部位へ XPG をリクルートするのに不可欠であるとする報告もある。今回の結果は、ARID2 機能欠損により XPC ではなく XPG のリクルートが抑制されており、後者の報告と合致する。SWI/SNF 複合体は、NER の①の過程の後半において重要な役割を果たしていると考えられる。ARID1A 機能欠損でも同様の NER 破綻をきたす結果であったため、過去の報告同様、SWI/SNF 複合体が DNA 修復機構に関わっていると考えられる。

DNA 修復異常と発癌との関わりは近年注目されている領域である。例えば HNPCC は MSH2 や MLH1 といったミスマッチ修復遺伝子群の loss-of-function 変異と関連しており、DNA 複製エラーの修復が不能になることで、発癌につながる microsatellite instability を引き起こすことが知られている。また家族性の乳癌、卵巣癌、膵癌は BRCA1, BRCA2 に代表される相同組換え修復遺伝子群の loss-of-function 変異に関連する。XPA や XPC など NER に関与する遺伝子に異常がある色素性乾皮症の患者では、DNA 修復異常が変異誘発や発癌につながることが報告されている。本研究では ARID2 機能欠損によって NER が破綻することが確認された。NER に関与し肝発癌物質として知られるベンゾ[a]ピレンや FeCl3 が ARID2-KO 株で特に毒性を示したことは興味深い。

近年、癌の分子標的治療が注目されているが、癌抑制遺伝子に異常がある場合には synthetic lethality という治療アプローチがとられている。実際、BRG1 異常を有する癌に対する BRM をターゲットとした“paralog dependency”というコンセプトの synthetic lethality が報告されている。また、ARID1A に対しては、エピジェネティック制御因子である EZH2 阻害剤を用いた synthetic lethality が報告されている。我々は、ARID2 が NER に関与していることから、“paralog dependency”でもエピジェネティクスでもない、第 3 の機序である DNA 修復を標的とした synthetic lethality が SWI/SNF 変異癌の新規治療方法の開発のヒントになるのではないかと考えている。良い例としては、BRCA1/2mutation と PARP 阻害剤の synthetic lethality が挙げられる。PARP 阻害剤が臨床レベルで BRCA1/2 変異の卵巣癌や乳癌に対して有効であることは、この DNA 修復を 2 経路ブロックすることで synthetic lethal を起こしているためであると考えられている。今回の研究結果からは EZH2 阻害剤や PARP 阻害剤 olaparib との synthetic lethality

は残念ながら示せなかったが、DNA 修復機構を制御するような新規治療薬が開発されれば、ARID2 変異肝癌の画期的な治療方法の確立に役立つと考えられる。

また近年、癌免疫逃避機構を阻害する薬剤の研究開発が盛んであるが、その適応として体細胞突然変異が多い腫瘍に対して免疫チェックポイント阻害薬の感受性が高いことが報告されている。ARID2 変異癌は体細胞突然変異が多いために免疫チェックポイント阻害薬の良い適応となるかもしれない。synthetic lethality か免疫チェックポイント阻害薬、あるいはそれらの組み合わせが ARID2 変異癌の有効な治療となる可能性があると考える。

＜結論＞

本研究では肝癌において ARID2 機能欠損が NER の破綻を引き起こすことを明らかにした。NER 破綻や体細胞高頻度突然変異をターゲットとした ARID2 変異癌の特異的な治療が確立されることが期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5290　号 | 大庭　篤志 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　石川　俊平<br>副　査　稲澤　譲治、渡邉　守 |
|---|---|

（論文審査の要旨）

**1.　論文内容**

本論文は肝癌における、SWI/SNF complex の構成タンパク ARID2 の変異の持つ悪性化への寄与やそのメカニズムを、主に細胞株のデータを用いて検証した論文である。

**2.　論文審査**

1）研究目的の先駆性・独創性

申請者はヒト肝癌において ARID2 の変異が一定の頻度で見られることに注目し、そのメカニズムが不明であったことから肝癌細胞株をもとにして ARID2-KO 株を作成し、その発現プロファイルから ARID2 はヌクレオチド除去修復機構（NER）に関わることを見いだしそのメカニズムを検証した。そのアプローチは独創的で評価に値する。

2）社会的意義

本研究で得られた結果は、肝癌における ARID2 の変異の意義の一反を解明するものであり、難治疾患である肝癌の診断・治療に資するものと考えられる。

3）研究方法・倫理観

申請者は Crisp/Cas9 システムを用いて肝がん細胞株（JHH4、JHH5）の ARID2-KO 株を作製しその発現プロファイルから ARID2 はヌクレオチド除去修復機構（NER）に関わることを見いだした。実験的検証を加え NER の過程で重要な役割を担う XPG のリクルートが ARID2 機能欠損により阻害されることを示した。またデータベースを用いた検索により、ARID2 変異肝癌は体細胞変異の数が相対的に多くなっていることも見いだした。申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されたと考えられる。

4）考察・今後の発展性

本研究結果は肝癌における ARID2 変異のメカニズムを明らかにし、今後の肝癌の治療に資する可能性がある。

**3.　審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 曽我　一將 |
| 論文審査担当者 | 主査　田邊　勉<br>副査　岡澤　均、渡瀬　啓 |
| 論　文　題　目 | Gene dosage effect in spinocerebellar ataxia type 6 homozygotes: A clinical and neuropathological study |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)は、常染色体優性遺伝性の小脳失調を主徴とする神経変性疾患の 1 つで、電位依存性カルシウムチャネルα1A サブユニット遺伝子(*CACNA1A*)における CAG リピートの 20 以上への伸長が原因である。SCA6 は伸長したポリグルタミン(polyQ)を有するα1A サブユニット蛋白($Ca_v2.1$)が凝集体を形成し、ポリグルタミン病の 1 つとされる。SCA6 ホモ接合体は、ヘテロ接合体より発症年齢が早くなるという遺伝子量効果の報告があるが、これを否定する報告もある。本研究の目的はホモ接合体 4 例を含む 120 例という単一施設では最大規模の SCA6 コホートにおいて遺伝子量効果があるかを明らかにすることである。ホモ接合体 4 例は両親の発症がはっきりせず、SCA6 の CAG リピート数は安定して世代間で伝達されることが知られており、ホモ接合体になることで発症していると考えた。しかし、多数例のヘテロ接合体における発症年齢と CAG リピート数の間の相関関係の分布の 95%信頼区間に含まれ、統計学的には遺伝子量効果は確認できなかった。ただ、同じ伸長 CAG リピート数の群において発症年齢に大きなばらつきがあり、例数の多い 21 および 22CAG リピート数のそれぞれの群の中では、ホモ接合体の発症年齢が早い傾向がみられた。また、22CAG リピート数のヘテロ接合体の群では、発症年齢と対側アレルの CAG リピート数との間に有意な弱い負の相関を認め、20/22CAG リピートを有するホモ接合体はその分布に従った。多様な修飾因子が発症年齢に影響し、遺伝子量効果は弱いと考えられた。神経症状の進行は、ホモ接合体 4 例中 2 例で車いす使用になるまでの年数が 9-10 年であり、これはヘテロ接合体の先行研究の報告より早く、ホモ接合体では進行が早い可能性が考えられた。SCA6 ホモ接合体の剖検例を $Ca_v2.1$ 凝集体形成含め神経病理学的解析を行った。ホモ接合体では、小脳以外に胸髄クラーク柱や淡蒼球内節において神経細胞脱落が見られた。また、ヘテロ接合体同様小脳プルキンエ細胞に凝集体を形成するが、小脳プルキンエ細胞以外でも弱い染色性の凝集体形成がみられた。今後より多数例で発症年齢に対する対側アレルの CAG リピート数の影響、症状の進行や病理学的変化に対する遺伝子量効果について検討する必要がある。

＜緒言＞

脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)は、常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈する神経変性疾患の 1 つで

ある。電位依存性カルシウムチャネルα1A サブユニット遺伝子(*CACNA1A*)のエクソン 47 における CAG リピートの伸長が原因で (正常では 4-19 リピートであるが、患者では 20-33 リピートである)、CAG リピート数は世代間で安定して伝達されることが知られている。CAG リピートはポリグルタミン(polyQ)に翻訳され、伸長した polyQ を有するα1A サブユニット蛋白($Ca_v2.1$)は凝集体を形成し、ポリグルタミン病の 1 つとされる。

SCA6 ホモ接合体は、ヘテロ接合体よりも発症年齢が早く、遺伝子量効果があるという報告もあるが、否定する報告もある。他のポリグルタミン病の脊髄小脳失調症 3 型(MJD/SCA3)や歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)のホモ接合体では、ヘテロ接合体と比較して発症年齢が早くなるが、ハンチントン病(HD)のホモ接合体とヘテロ接合体では発症年齢は変わらないと考えられている。また、ホモ接合体の神経病理学的解析については、他のポリグルタミン病(HD と MJD/SCA3)で、病理学的変化の広がりが報告されている。

今回 SCA6 ホモ接合体の遺伝子量効果を検証するため、単一施設で最大規模の SCA6 コホートを解析した。また、SCA6 ホモ接合体剖検例を病理学的に解析した。

＜目的＞

SCA6 ホモ接合体の遺伝子量効果を検証する。

＜方法＞

当研究室で 2004-2015 年の間に SCA6 と遺伝子診断し、詳しい臨床情報が得られたホモ接合体 4 例を含む 120 例を集めた。

ホモ接合体 4 例の発症年齢、症状の進行、小脳失調以外の症状、凝集体形成を含む病理学的変化をまとめた。ホモ接合体の発症年齢については、116 例のヘテロ接合体での解析と比較した。

＜結果＞

まず、発症年齢に対する遺伝子量効果を検証した。ホモ接合体 4 例は診断まで両親の発症が確認されず、孤発例のようにみえた。1 例のホモ接合体(20/22 リピート)の家系(父は 14/20 リピート、母は 12/22 リピート)のように SCA6 の CAG リピート数は安定して世代間で伝達されることが知られている。それぞれのホモ接合体の両親はヘテロ接合体と考えると、その子供はホモ接合体となることで発症しており、家系内でみると遺伝子量効果があると考えられた。しかし、多家系における 116 例のヘテロ接合体で解析した発症年齢と伸長 CAG リピート数との相関関係($R$=-0.7289, $p$<0.0001)において、ホモ接合体の発症年齢はヘテロ接合体の分布の 95%信頼区間に含まれる結果であり、発症年齢に対する遺伝子量効果は統計学的には確認できなかった。ただ、同じ伸長 CAG リピート数の群においても発症年齢に大きなばらつきがあり、例数の多い 21 および 22CAG リピート数のそれぞれの群の中では、ホモ接合体の発症年齢は早い傾向がみられた。最も例数の多い 22CAG リピート数のヘテロ接合体の群では、発症年齢と対側アレルの CAG リピート数との間に有意な弱い負の相関($R$=-0.2985、$p$=0.0299)を認め、20/22CAG リピートを有するホモ接合体はその分布に従った。

症状の進行として、車いす使用になるまでの期間は、4 例中 2 例で 9-10 年であった。

小脳失調以外の症状としては、4 例中 2 例で前頭葉徴候、認知機能障害、腱反射低下、振動覚低下がみられた。

病理学的には、小脳プルキンエ細胞の脱落と分子層や顆粒層の菲薄化がみられ、歯状核にはアストロサイトーシス、下オリーブ核背内側にはアストロサイトーシスを伴う神経細胞脱落がみられた。胸髄クラーク柱や淡蒼球内節にも神経細胞脱落やアストロサイトーシスがみられた。免疫組織化学では、ヘテロ接合体でみられるように、ホモ接合体においても小脳プルキンエ細胞に凝集体形成を認めた。また、小脳プルキンエ細胞以外にも弱い染色性の凝集体形成がみられた。

＜考察＞

家系内での発症年齢に対する遺伝子量効果はこれまでも同様に報告され、SCA6 knock-in mouse においても支持される結果であった。しかし、異なる家系間において、発症年齢に対する遺伝子量効果は統計学的には確認できなかった。SCA6 では同じ伸長 CAG リピート数の群においても発症年齢に大きなばらつきがあり、発症年齢に与える修飾因子が多様であると考えられる。例数の多い 21 および 22CAG リピート数のそれぞれの群の中では、ホモ接合体の発症年齢が早い傾向がみられ、22CAG リピート数のヘテロ接合体の群では、発症年齢と対側アレルの CAG リピート数との間に有意な弱い負の相関を認め、20/22CAG リピートを有するホモ接合体はその分布に従った。このことは対側アレルの CAG リピート数が長いことが発症年齢を早めることを別の角度から示唆していると考えられた。今回、発症年齢に対する遺伝子量効果が統計学的に確認できなかったのは、異なる家系間では多様な修飾因子の中で遺伝子量効果がそれらを凌ぐほど強くなかったためであり、SCA6 ホモ接合体の発症年齢に対する遺伝子量効果は弱いと考えられた。また、脊髄小脳失調症 1 型(SCA1)の原因遺伝子 *ATXN1* の両アレルの CAG リピート数の差や MJD/SCA3 の原因遺伝子 *ATXN3* の CAG リピート数が SCA6 の発症年齢へ影響することが報告されているが、今回ヘテロ接合体での解析では、*ATXN1* の両アレルの CAG リピート数の差($R$=-0.1156、$p$=0.2168)や MJD/SCA3 の *ATXN3* の CAG リピート数($R$=-0.1510、$p$=0.1057)の発症年齢への影響は認めなかった。発症年齢に対する対側 CAG リピート数の影響など今後より多数例での検証が必要と考えられた。

発症年齢に対する遺伝子量効果の結果は、ハンチントン病と同様に、機能獲得の病態による完全優性遺伝と考えられた。小脳検体を用いたホモ接合体における *CACNA1A* mRNA 発現はともに伸長した CAG リピートを有するものであることを確認した。このことから翻訳される $Ca_v2.1$ 蛋白は正常な polyQ を有するものはないと考えられるが、SCA6 knock-in mouse ではカルシウムチャネル機能が保たれるという報告があり、ヒトでも支持される結果と考えられた。

車いす使用になるまでの期間は、ヘテロ接合体で 12.8-35.2 年という報告があり、今回の 2 例のホモ接合体では症状の進行が早い可能性があると考えられた。

小脳失調以外の症状に関しては、既報以外の症状は認めなかった。

病理学的には、ヘテロ接合体で既報にない小脳外での神経細胞脱落や凝集体形成がみられ、HD や MJD/SCA3 のホモ接合体の報告と同様に幅広く影響を及ぼしている可能性があると考えられた。

症状の進行や小脳失調以外の症状、病理学的変化については少数例の検討であり、多数例での

検討が必要である。

＜結論＞

発症年齢に対する修飾因子は多様であり、ホモ接合体の遺伝子量効果は弱いと考えられた。発症年齢に対する対側アレルの CAG リピート数の影響、症状の進行や病理学的変化に対する遺伝子量効果について、今後より多数例での検討が必要である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5291　号 | 曽我　一將 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田邊　勉<br>副　査　岡澤　均、渡瀬　啓 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は脊髄小脳失調症 6 型（SCA6）ホモ接合体における遺伝子量効果を臨床的、神経病理学的に検討したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

SCA6 ホモ接合体は、ヘテロ接合体より発症年齢が早くなるという遺伝子量効果の報告がいくつかあるが、これを否定する報告もある。本研究の目的はホモ接合体 4 例を含む 120 例という単一施設では最大規模の SCA6 コホートを用いて SCA6 に遺伝子量効果を検証したものである。

２）社会的意義

本邦における SCA6 の遺伝子量効果の実態を明らかにすべく単一施設では最大規模の SCA6 コホートを用いて検討した。そして以下に示すような臨床的に極めて有用な研究成果を得た。

1. 発症年齢に対する遺伝子量効果は同一の家系内で認められるものが 1 例存在した。
2. 一方、家系が異なると、ヘテロ接合体でより若く発症している患者も見つかり、発症年齢に対する遺伝子量効果は統計学的に確認できなかった。
3. 116 例という多数のヘテロ接合体を扱うことで、今回初めて対側（正常側）のアレルにおける CAG リピート数が、患者の発症年齢に影響する可能性が示唆された。
4. ホモ接合体での小脳における凝集体形成量は、ヘテロ接合体とほぼ同程度であったが、小脳プルキンエ細胞以外でも弱い染色性の $Ca_v2.1$ 凝集体形成がみられ、胸髄クラーク柱や淡蒼球内節において神経細胞脱落が見られた。

３）研究方法・倫理観

本研究においては数理学的、免疫組織化学的、分子生物学的解析手法が用いられており、申請者の研究方法に対する技術力は高いと考える。

４）考察・今後の発展性

申請者らの本邦 SCA6 ホモ接合体 4 例を用いた実験結果からは統計学的に遺伝子量効果は認められなかった。しかし発症年齢に対する修飾因子は多様であり、今後さらに多数例での検討が必須である。

**３．その他**　　特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 阿部　圭輔 |
| 論文審査担当者 | 主査　岡澤　均<br>副査　横関 博雄、渡瀬　啓 |
| 論　文　題　目 | TDP-43 in the skin of amyotrophic lateral sclerosis patients |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は致死的な神経変性疾患である。ALS に共通で特徴的な病理は主に TDP-43 からなる細胞質封入体である。中枢神経内で TDP-43 産生は厳密に調節されていることが分かっているが、ALS 患者の皮膚でも同様な調節が行われているかは不明である。我々は上肢の症状で発症する ALS 患者において、病気の進行に伴って徐々に表皮に発現する TDP-43 の mRNA が有意に低下することを見出した。しかし、免疫ブロット法では上肢の症状で発症した ALS 患者の皮膚では他の部位で発症した ALS 患者の皮膚よりも TDP-43 蛋白が多く発現していることが明らかになった。TDP-43 の mRNA と蛋白質の発現レベルには相関がなく、ALS 患者の皮膚において TDP-43 発現の自己調節の機序が障害されていることを示唆していると考えられた。 ALS の臨床診断は臨床的徴候および電気生理学的所見に依存しており、早期診断を困難にしている。 ALS 患者皮膚の免疫ブロット法による TDP-43 の定量は、ALS 診断の新しいバイオマーカーとなる可能性がある。

＜緒言＞

ALS は運動神経を不可逆的に変性させ、運動麻痺、筋萎縮が進行し、最終的には呼吸筋麻痺により死亡する疾患である。TDP-43 はスプライシングを調節する RNA 結合蛋白質であり、ALS の多くのケースで認められる神経細胞質内の異常な封入体の主要構成成分として TDP-43 が同定されている。TDP-43 は身体中の様々な組織に発現する蛋白質であるが、ALS においてその特徴的な病理的変化が神経系のみに限局している理由は不明である。ALS 患者の皮膚では膠原線維の小径化や膠原線維束間の無定形物質の沈着、ヒアルロン酸の増加などの変化が報告されているが、ALS の神経細胞死と直接的な関係があるとされる TDP-43 については疾患対照群の生検皮膚に対して ALS 患者の生検皮膚では免疫組織学的に染色性が高いとする報告があるものの、生化学的に詳細な検討は報告されていない。TDP-43 は自身の pre mRNA の 3’UTR に結合することにより発現量を厳密に一定に保っているが、我々は ALS 患者の皮膚において TDP-43 の自己調節機能の異常が生じている可能性を考えた。本研究では ALS 患者の皮膚において TDP-43 の mRNA 及び蛋白質の定量を行い、疾患対照群に対して

全身的な発現量の変化があるかを検討し、さらに ALS の神経系で見られるような特徴的な病理学的変化が ALS 患者皮膚でも同様に起きているかを調べた。

＜方法＞

・対象

22 名の ALS 患者、26 名の疾患対照群（全て末梢神経障害の患者）から皮膚生検を行い、さらに死亡から 24 時間以内の ALS 患者の剖検例からも皮膚サンプルを採取した。

・皮膚生検とサンプルの処理方法

皮膚生検用の直径 3mm のデルマパンチを使用し、ALS 患者では上腕二頭筋、疾患対照群では下腿外側の腓腹神経の走行領域の皮膚を 10 個ずつ採取した。採取部位には明らかな皮膚異常はなく、8 個は生化学用に-80℃で、残りの 2 個は免疫組織用に 10%ホルマリン溶液にて固定した。

・Quantitative real-time PCR assay(qRT-PCR)

採取した皮膚サンプルを 3.8%チオシアン酸アンモニウムで処理することによって表皮のみを真皮から剥離した。Isogen(Nippon Gene)により 1μg の total RNA を抽出し、逆転写酵素 SuperScript III(Life Technologies)を反応させ cDNA を合成した。TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)によりデザインされた TDP-43(Hs00606522_m1)及びインターナルマーカーとして使用した keratin10(KRT10) (Hs00166289_m1)のプライマー&プローブを使用し、合成された cDNA を RT-PCR 法により定量した。

・免疫ブロット法

qRT-PCR と同様の手順で剥離した表皮を 200μL のホモジネートバッファーでホモジネートした後に 1% Triton 溶液に調整して氷上で 1 時間静置し、100,000 *g* で 20 分間超遠心し、上清と沈殿に分けた。得られた上清を電気泳動し、PVDF 膜に転写した。転写された蛋白質を抗 TDP-43 抗体(12892-1-AP, Proteintech Group, Inc.)と抗 α-tubulin 抗体(M175-3, MBL)でプローブし、対応する動物種の二次抗体と反応させた後に SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)により可視化し、ChemiDoc System (Bio-Rad)によって撮影した。

・免疫染色

10%ホルマリン溶液で固定された皮膚サンプルをパラフィンに包埋し、4μm の厚さで薄切した。脱パラフィン化と水和を行った後に内因性ペルオキシダーゼ阻害処理、5%ヤギ血清でブロッキングし、抗 TDP-43 抗体でプローブする(12892-1-AP, Proteintech Group, Inc.)。最後に ABC kit(Vector Laboratories, Burlingame)を用いて染色した。

＜結果＞

疾患対照群と ALS 群の間に TDP-43 mRNA 発現量の有意差は認めなかった（Figure 1A）。さらに ALS 群を発症部位に応じて 3 群(球麻痺発症、上肢発症、下肢発症)に分けたが、各群の間にも有意差を認めなかった。ALS は加齢と共に発症率が増加し、疾患の進行も速くなるという報告があるが、皮膚における TDP-43 mRNA 発現量と年齢の間に有意な相関はなかっ

た（Figure 1B）。上肢発症の群のみではあるが発症から生検までの期間（罹病期間）と TDP-43 mRNA 発現量の間には負の相関があり、罹病期間が長くなるにつれ TDP-43 mRNA は統計学的に有意に減少することが分かった（Figure 1C; $P < 0.01$）。球麻痺発症及び下肢発症の群では同様の相関はなかった（Figure 1D）。

免疫ブロット法による ALS 患者の皮膚生検サンプル中の TDP-43 蛋白質の定量では、罹病期間による有意な変化はなかったが（Figure 2C）、上肢発祥の群では他の部位で発症した群よりも統計学的有意差はないものの TDP-43 蛋白質は多い傾向があった（Figure 2B; $P = 0.07$）。上肢発祥の群で mRNA が増加すると TDP-43 蛋白質の発現量が増える傾向があったが、統計学的に有意ではなかった（Figure 2D; P=0.33）。

免疫染色では ALS 群と疾患対照群で核内の TDP-43 の染色性に有意差はないが、TDP-43 mRNA の発現量が多いほど核内の TDP-43 の染色性が高い傾向があった（Figure 3A; $P = 0.06$）。ALS の運動神経系でみられるような TDP-43 の異常局在は疾患対照群の全例と ALS のほとんどの例では認められなかったが（Figure 3C-3I, 3K-3P）、ALS の 1 例でのみ表皮基底膜内の TDP-43 が細胞質に異常局在していた（Figure 3J）。

＜考察＞

TDP-43 は細胞内での発現量が一定になるように厳密に制御されているが、実際に TDP-43 欠損マウスのホモ接合体は胎生致死でヘテロ接合体でも運動障害を生じる。一方で ALS と共通の病理を示す FTLD の患者脳では TDP-43 の発現量が 1.5 倍に増えているという報告があり、アデノ随伴ウイルスベクターによって脊髄前角で TDP-43 を過剰発現させたカニクイザルでは ALS 類似の進行性運動麻痺、筋萎縮を示し神経細胞内では細胞質への異常局在も引き起こす。これらのことから、TDP-43 の量的な変化は神経細胞に深刻な影響を及ぼすと考えられる。ALS では皮膚を始めとする神経系以外の組織で TDP-43 が変化しているとの報告はないが、我々の研究では ALS の上肢発症の群で皮膚の TDP-43 が罹病期間の増加に対して徐々に減少していくことを示している。さらに上肢発症の群では他の部位で発症した群に比べて皮膚の TDP-43 蛋白質の発現量は mRNA の発現量に関わらず増加しており、特に発症早期において TDP-43 の自己調節能に異常がある可能性があると考えられた。

我々は表皮の TDP-43 が増加するメカニズムについて２つの仮説を考えた。一つは異常な TDP-43 が神経系から表皮細胞に連続的に伝播しているとする考えである。ALS の多くの症例では運動症状は一箇所もしくは二箇所の領域に局在的に生じ、それが周囲の領域に連続的に伝播していくことが知られている。TDP-43 の C 末端にはプリオン様ドメインがあり、異常に折りたたまれた TDP-43 が近接する神経細胞間をまさにプリオンのように自身を鋳型として、その異常な性質を周囲に連続的に伝播している可能性がある。また、TDP-43 は神経の軸索終末から分泌され、また取り込まれることが報告されており、神経の軸索終末から細胞間スペースに異常な TDP-43 が分泌され、神経以外の組織に取り込まれることがあるのではないかと考えている。我々の研究では表皮の TDP-43 蛋白量の増加は上肢発症群でのみ認められている。生検皮膚は上腕二頭筋上から採取していることから、運動症状を生じてから時間経過の長い部位において神経系から隣接する皮膚にまで異常な TDP-43 が伝播しやすいの

ではと考えた。

もう一つの仮説は「multiple hits」である。孤発性 ALS の 30%で臨床症状が非連続的に拡がることが報告されている。この遠隔転移のメカニズムはよく分かっていない。我々の研究では上肢以外の部位で発症した 2 例（Figure 2A と Supplementary Table 1: B3 と L3）で有意な上肢の筋力低下がないのにも関わらず上腕から生検した皮膚の TDP-43 がわずかに増加していた。これらは血清や未知の機序を介して、運動症状の発症部位で形成された異常な TDP-43 が上腕の皮膚に遠隔的に転移した可能性を示唆している。

TDP-43 の 25kDa の C 末端断片が ALS の進行により増加しているという報告があり、TDP-43 病理が形成される時に高度に凝集しやすい TDP-43 断片が生成されていることを示唆している。我々の研究では ALS のいくつかの例で皮膚の TDP-43 の量的な増加はあるものの、ALS の神経組織でみられるような TDP-43 の異常局在を認めたのは 1 例のみ（Figure 3J）であり、免疫ブロット法でも 25kDa の C 末端断片は認めなかった。これは皮膚細胞の細胞周期のため、TDP-43 断片の凝集や細胞質封入体が形成されるよりも前に細胞表面から剥脱してしまうことが原因と考えられる。

ALS 患者の皮膚生検による TDP-43 の評価には二つの利点がある。一つには死後変化のない組織における TDP-43 病理の有無を調べられること、そしてもう一つは疾患の終末期だけでなく様々な進行段階での TDP-43 の評価が出来ることである。

＜結論＞

本研究は ALS 患者の皮膚において TDP-43 の生化学的解析を行った初めての研究であり、ALS の未知の病理学的メカニズムにより表皮細胞内の TDP-43 転写の自己調節能の低下が起きていることを示唆している。また、高度に進行した部位から採取した表皮の免疫ブロット法は新たな ALS の診断バイオマーカーになり得ると考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5292　号 | 阿部　圭輔 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　岡澤　均<br>副　査　横関 博雄、渡瀬　啓 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

筋萎縮性側索硬化症における皮膚生検材料の生化学的解析を行ったものであり、先行研究は有るものの、本研究は TDP43 の mRNA 発現量とタンパク発現量を比較した上で新規性を含む有意義な研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

筋萎縮性側索硬化症における皮膚病変の詳細は明らかではない。先行研究で TDP43 タンパク量の免疫組織学的な解析がなされており、染色性の増加が報告されている。これに対して、申請者は定量 PCR での TDP43-mRNA 量測定を行い、罹病期間と逆相関して mRNA が減少することを示した。一方、タンパク量については、一部の症例で増加する傾向にあった。

２）社会的意義

ALS の進行度、病型を客観的に把握する指標を開発することは重要であり、本研究はその端緒となる成果である。

３）研究方法・倫理観

広く汎用されている定量 PCR 法、Western Blot 法を用いている。倫理委員会承認のもとに行われた研究である。

４）考察・今後の発展性

サンプル数を増やすこと、皮膚生検部位を患者・コントロール間で統一すること、WB 法の定量性を高めること、などの改善により、より正確な結論が得られると期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえて、本論文は博士（医学）の学位申請に十分に価するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 齋藤　龍佑 |
| 論文審査担当者 | 主査　大川　淳<br>副査　上阪　等、淺原　弘嗣 |
| 論　文　題　目 | Strenuous running exacerbates knee cartilage erosion induced by low amount of mono-iodoacetate in rats |

（論文内容の要旨）

<要約>

変形性膝関節症(OA)動物モデルとして半月板逸脱、前十字靭帯切離など手術モデルが広く用いられているが、これらは外傷後の二次性 OA を模倣し一次性 OA とは異なる。ラット強制走行モデルはメカニカルストレスによる OA モデルだが，走行中の観察を要し脱落例も多く時間と労力を要する。Mono-iodoacetate (MIA)によるラット関節炎モデルは,関節炎重症度が用量依存性であり、軽微な炎症を生じさせることが可能である。OA の発症・進行にはメカニカルストレスと炎症の両方が関与することが示されているが、炎症期における強制走行はラット膝関節に対し有害か有益か統一した見解は得られていない。本研究はラット OA モデルとして手術操作を要さず、強制走行のみで安全に軟骨変性を生じる新しい OA モデルを作製する目的で行った。強制走行のみで OA を発症させる際の脱落率を明らかにし、MIA 少量関節内投与による炎症とメカニカルストレスを組み合わせることで相加的に軟骨変性が進行することを示した。

<緒言>

変形性膝関節症（OA）は様々な因子により関節軟骨・軟骨下骨の変性を生じる、疼痛と機能障害を主体とする疾患である。OA の発症には遺伝子的要因や環境要因、年齢、肥満、エストロゲンやサイトカインなどの液性因子と共にメカニカルストレスの関与が報告されている。疫学的にも日本を含む世界中で罹患されている疾患であり、今後も高齢化の進行に伴い罹患者数の増加が見込まれている。

これまでヒト OA を模倣した様々な OA 動物モデルが作成され、destabilization of the medial meniscus (DMM)や ACL transection(ACLT)などの surgical model が広く用いられているが，これらは外傷後の二次性 OA を模倣しており一次性 OA とは異なるモデルである。また手術操作の影響を無視できない。ラット強制走行モデルは手術侵襲を伴わない長期間の荷重肢に対するメカニカルストレスによる OA 動物モデルである。我々は過去に OA 発症には 6 週 30km の走行が必要であることを報告したが、走行中の怪我等により完走できず脱落するラットもおり、その脱落率については報告されていない。OA 進行には炎症が寄与することも知られており、滑膜炎は OA の特徴の一つである。Mono-iodoacetate (MIA)の関節内注射は関節炎を誘導する。関節炎 OA モデルや OA による疼痛モデルとして主に用いられてきた。MIA 投与による関節炎重症度は用量依存性

であり、低用量では軽微な炎症を生じさせることが可能である。1mg の MIA 投与が OA モデルとして広く用いられてきたが、この投与量では関節軟骨のみならず軟骨下骨の急速な破壊をきたし、OA の発症・進行を解析するモデルには適さない。OA の発症・進行にはメカニカルストレスと炎症の双方が関与するが、運動療法は慢性期の OA 症状を緩和する一方で、急性炎症期の運動は症状を増悪させる。炎症期における強制走行はラット膝関節に対し有害か有益か統一した見解は得られていない。低用量の MIA 投与に強制走行を加えることでより早期に OA の誘導が可能となれば一次性 OA を模倣した有用なモデルになる可能性がある。

本研究では(1)6 週 30km 強制走行での完走率、(2)強制走行と MIA 少量関節内投与による炎症が関節軟骨に及ぼす影響、(3)強制走行が滑膜に及ぼす影響について検討した。

<方法>

本学の動物実験委員会の承認を得て研究を開始した。10 週齢のオス野生型 Wistar ラットを使用した。(1)1 日 50 分間, 20m/分で週 5 日、6 週間の強制走行(合計 30km)を行い完走率を求めた(n=12)。(2)右膝関節内に MIA 0.1mg/50μl を 1 回注射し、左膝関節には対照として PBS50μl を注射し、関節内注射後 7 日より 1 日 50 分間、20m/分で週 5 日、3 週間の強制走行(合計 15km)を行った。注射後に強制走行させないラットを強制走行のコントロールとした。走行終了後、関節軟骨を肉眼的評価（変性範囲の面積計測）及び safranin-o 染色による組織学的評価を行った。(3)MIA 注射後 7 日時及び3週間の走行終了後に滑膜及び膝蓋下脂肪体の炎症を HE 組織標本で評価した。「PBS+0km」「PBS＋15km」「MIA＋0km」「MIA＋15km」の 4 群でそれぞれ比較を行った(n=4)。

<結果>

健常なラットでは 3 週 15km の強制走行を全頭が完走したが、20km 以降では後肢の怪我などにより走行を継続できなくなるラットが増加した。6 週 30km の強制走行において半数が脱落した。

「PBS+0km」「PBS＋15km」の 2 群において肉眼的に大腿骨・脛骨での関節軟骨変性は認めなかった。「MIA＋0km」「MIA＋15km」の 2 群で脛骨内側関節面の肉眼的変性を認めたが、墨汁染色陽性面積の有意な差は認めなかった。組織学的所見においても「PBS+0km」群及び「PBS＋15km」群では Safranin-O の染色性は保たれていた。「MIA＋0km」群では軟骨基質の広範な染色性低下が認められ,「MIA＋15km」群では脛骨関節軟骨でさらなる染色性の低下及び tide-mark に至る変性を認めた。OARSI スコアでは MIA 投与群で PBS 投与群に比べ優位な上昇を認めた。「PBS+0km」「PBS＋15km」の 2 群間には差を認めなかった。脛骨側において「MIA＋0km」群より「MIA＋15km」群のスコアの有意な上昇を認めた。

HE 染色で滑膜炎の評価を行った。PBS 注射群では注射後 1 週（走行前）・15km 走行後ともに滑膜の肥厚は認めなかった。一方、MIA 注射後 7 日群ではで明らかな滑膜肥厚を認めたが走行終了時点では著明に改善しており、MIA 注射非走行群と比較しても有意な差を認めなかった。3 週 15km の走行は滑膜の炎症に寄与しなかった。

<考察>

本研究では 6 週 30km の強制走行においてラットの半数が脱落する事が明らかになり、0.1mg

の MIA 関節内注射により誘導された脛骨関節軟骨の erosion は 3 週 15km の強制走行を加える事でより促進された。3 週 15km の強制走行のみでは軟骨の変化は生じず、滑膜炎も生じなかった。MIA により生じた滑膜炎は走行終了後に非走行群と同程度まで改善していた。

強制走行によるラット OA モデルには 6 週 30km の走行が必要であり、3 週 15km の走行では不十分であると報告されているが、実際に 30km を完走できるラットは半数であった。これまでに 6 週 30km の強制走行の脱落率についての報告はない。Beckett らは 3 週 30km・6 週 55km の走行でより OA の進行を認めたと報告しているが、脱落率についての言及はされてない。3 週 30km の走行ではより運動強度が少々するため脱落率の上昇が推測される。本研究の結果より走行距離の延長と共に脱落率が上昇する為、走行条件の変更・短縮が必要であると考えられた。

強制走行が OA に及ぼす影響は有害・有益の双方の報告がある。Wistar rat に対し強制走行を行なった過去の報告では、他に OA 誘導を行わないラットに対する 30km の走行は全て OA を促進する結果が得られている。過度の運動は OA を誘導する一方 15km の強制走行という軽度の運動負荷では chondrocyte の sGAG 産生が促進され軟骨への保護作用を示すと報告されている。15km の強制走行に他の OA 誘導を加えた報告は 4 例あり、2 例で有害、2 例で有益と結果が分かれている。有益と報告された 2 例のうち 1 例は surgical model (ACLT)であり、sGAG 産生増加により軟骨保護作用を示したと考えられる。Cifuentes らは MIA1.2mg 投与直後から 8 週 15km の走行を行い軟骨保護効果が得られたと報告している。MIA は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 活性を抑制し chondrocyte の解糖系阻害により細胞死を誘導する事で変性をきたす。我々は注射後 1 週より走行を開始しており、MIA が chondrocyte の細胞死を誘導した後に運動負荷を加えたために sGAG 産生増加の効果が得られず、メカニカルストレスによる軟骨変性が促進される結果が得られたと考えられた。MIA 投与後の強制走行により脛骨側のみで変性の進行が見られたが、変性進行部は半月板に被覆されていない関節面頂部に認められた。荷重関節である膝関節において大腿骨の荷重面への機械刺激は広範囲に分散されるのに対し、脛骨では露出部である関節面頂部に機械刺激が集中する為に変性の程度に違いが生じたと推測された。

Pomonis らは MIA 関節内投与が後肢荷重量で滑膜炎を評価し、関節内投与後減少した荷重量が 1 週で改善した後は時間経過で変化しなかったと報告している。本研究では MIA 投与により誘導された滑膜炎は注射後 7 日では残存していたが、3 週後には走行の有無によらず著明に改善し、3 週 15km の強制走行のみでは滑膜炎が誘導されなかった。本モデルにおいて 3 週 15km の強制走行は滑膜炎に影響を及ぼさない軽度の運動負荷であったことが示された。

低用量の MIA により誘導された炎症環境下での運動負荷は滑膜炎を増悪させることなく軟骨変性を促進した。本モデルはこれまで必要とされていた半分の走行距離及び期間で OA を誘導することができ、走行中の脱落例を出さない有用な OA を模倣した動物モデルであると考えられる。

<結語>

MIA による軟骨変性は 15km の強制走行で明確に促進されたが、滑膜の炎症には影響を及ぼさなかった。本モデルは、過去のモデルの半分の時間でより確実に脱落例が少なく軟骨変性を生じる OA の有用なモデルである。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5293　号 | 齋藤　龍佑 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　大川　淳<br>副　査　上阪　等、淺原　弘嗣 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

変形性膝関節症のラットモデル作成における至適条件を探索した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

超高齢社会を迎えて急増する変形性膝関節症（OA）のラットモデルを、比較的短期間に作成する方法を見出すことは、今後の病態解析、治療法開発の研究の促進するうえで意義深い。

２）社会的意義

本研究で得られた主な研究は以下のとおりである。

１．　従来の 6 週間 30 ㎞走行による OA モデルの成功率は 50%に過ぎなかった。

２．　少量のモノヨード酢酸を関節注射したのちに 3 週間 15 ㎞の走行を負荷することで、滑膜炎を遷延させることなく軟骨変性を誘発できた。

以上のように、申請者は手術侵襲を加えずに、化学的刺激と走行負荷により再現性の高いラット OA モデルの作成に成功しており、今後新規治療法開発研究に有用な研究成果といえる。

３）研究方法・倫理観

研究はラットに対して、膝関節への注射による化学的刺激と電気刺激による強制走行によるメカニカルストレスの 2 条件の組み合わせで行われた。所属分野の継続的研究であり、申請者の方法に対する習熟が十分高いことが示された。また、動物愛護の観点からは論文査読者の意見を参考にして方法が決定され、倫理的にも問題がないことが確認された。

４）考察・今後の発展性

本研究によりラットの変形性膝関節モデルが確立されたので、今後は薬物や細胞による変形性関節症抑止に向けた研究への発展が期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 沼沢　祥行 |
| 論文審査担当者 | 主査　西川　徹<br>副査　立石　宇貴秀、田中　光一 |
| 論　文　題　目 | Depressive disorder may be associated with raphe nuclei lesions in patients with brainstem infarction |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

うつは脳卒中後に良く見られる症候であるが、その神経基盤は明らかでない。一方、上行性セロトニン（5-HT）作動性神経系は、中脳の背側縫線核（DRN）と橋上部の正中縫線核（MRN）に由来する。我々は中脳もしくは橋にのみ病巣を持つ初発脳幹梗塞患者を 19 例集積し、うつを Montgomery Åsberg Depression Rating Scale (MADRS) で評価した。また、拡散テンソル画像（DTI）とプロトン密度強調画像（PDWI）を用いて DRN、MRN を同定し、梗塞巣により DRN、MRN の障害がある群（6 例）とない群（13 例）に分けた。DSM-5 に基づいたうつの頻度と MADRS スコアを 2 群で比較し、脳幹梗塞後のうつの頻度は縫線核の障害がある群で有意に高く(83% vs. 15%; $P = 0.01$)、MADRS スコアも有意に高かった(mean ± 1 SD, 17.5 ± 7.9 vs. 7.0 ± 4.4; $P = 0.002$)。本研究により、脳幹梗塞後のうつは縫線核の障害と関連することが示唆され、5-HT 作動性神経の機能障害が原因と考えられた。

＜緒言＞

うつは脳梗塞後に良く見られる重要な症候である。5 つのメタ・アナリシス(Ayerbe et al., 2013; Carson et al., 2000; Kutlubaev and Hackett, 2014; Wei et al., 2015; Yu et al., 2004)では脳卒中後のうつと病巣の間に明瞭な関係は見出されていない。一方で、5-HT の代謝物である 5-HIAA が脳梗塞後うつ患者の髄液で低下している報告が見られる(Bryer et al., 1992)。5-HT 含有神経は辺縁系や前頭前野などに広く投射していることが知られ、脳卒中後うつの患者ではこれらの線維が障害されていることが示唆される。

上行性 5-HT 作動性神経系の細胞体は主に、脳幹被蓋の正中付近に頭尾方向に広がって存在し、中脳の背側縫線核（DRN）、橋上部の正中縫線核（MRN）に存在する。これまでに、脳幹梗塞後のうつの頻度や病態生理を検討した報告はない。

脳幹の複雑な内部構造は通常のルーチン MRI では可視化が難しいが、拡散テンソル画像（DTI）とプロトン密度強調画像（PDWI）を用いて DRN や MRN を同定し、うつとこれらの縫線核の障害との関連を検討した。なお、うつはアパシーと混同されることがあり、同時に評価した。

＜方法＞

初発脳梗塞で脳幹に病巣が限局する患者を、武蔵野赤十字病院、JA とりで総合医療センター、土浦協同病院で集積した。本研究は、東京医科歯科大学とこれら 3 病院の倫理委員会で承認を受け、全ての患者より書面で同意を得た。（1）中脳もしくは橋梗塞、（2）74 歳以下、（3）右手利き、（4）意識清明、であることを組み入れ基準とした。（1）神経・精神疾患の既往、（2）失語もしくは重度の構音障害、（3）過去の脳卒中病巣、（4）重度の白質病巣、（5）著明な脳萎縮、（6）頭蓋内主幹動脈の高度狭窄か閉塞、を除外基準とした。

発症 2 週間後から、うつを Montgomery Åsberg Depression Rating Scale (MADRS) と Beck Depression Inventory-II (BDI-II)で評価した。MADRS は 10 項目（各項目は 0~6 点）からなり、12 点以上をうつとする。BDI-II は 21 項目（各項目は 0~3 点）からなり、14 点以上をうつとする。DSM-5 に従い、うつの診断を行った。また、アパシーをやる気スコア(AS)と Apathy Evaluation Scale-clinician version (AES-C)、全般的認知機能を MMSE を用いて評価した。

1.5T の MRI を用いて、急性期ルーチン撮像に加え、発症 2 週間以降に DTI と PDWI を撮像した。dTV-II SR と Volume-One の 2 つのソフトを用いて、拡散異方性（FA）の方向を色で示したカラーマップを生成した。核は細胞体が集積しているため、FA が低下しカラーマップで黒く表示される。また、ミエリンが少ないため、PDWI ではやや高信号として表示される。この条件に合致し、中脳から橋の被蓋に分布する構造を DRN と MRN として同定した。梗塞体積（$cm^3$）や、前頭葉皮質・基底核・視床に認められる FLAIR 高信号病変の数を計算した。拡散強調画像、FLAIR 画像を参照し、梗塞巣が縫線核を含む障害あり群と含まない障害なし群に患者を群分けして検討した。正規性と等分散が証明された連続変数（年齢、MADRS、BDI-II、AES-C、AS）は *t* 検定で比較した。非正規分布の連続変数（教育歴、梗塞体積、FLAIR 高信号病変の数、MMSE）と順序変数（NIHSS スコア）は Mann-Whitney の *U* 検定で比較した。カテゴリー変数（性別、リスク因子、2 群に分けた Fazekas grade と mRS）は Fisher の正確検定で比較した。全て両側検定で 5%を有意水準とし、統計解析には EZR を用いた。

＜結果＞

2013 年 10 月から 2015 年 12 月に、脳幹のみに梗塞巣のある 19 名（男：女=14：5、年齢 66.2 ± 5.3）の患者を集積した。障害あり群が 6 名、障害なし群が 13 名で、両群の背景因子には、梗塞体積($P$=0.02)を除いて差がなかった。あり群の患者は全て橋上部か中脳の傍正中領域梗塞であり、1 名は DRN、5 名は MRN の障害であった。うつは障害あり群の 83%(5/6)、障害なし群の 15%(2/13)に認められ、あり群で頻度が高かった($P$=0.01)。また、MADRS スコア（平均値±標準偏差）はあり群が 17.5±7.9、なし群が 7.0±4.4 で両群間に有意差を認めた($P$=0.002)。アパシーや全般的認知機能には差がなかった。MRN が障害された 1 名はうつがなかった。一方で、なし群でうつを示した 1 名は左の黒質に病巣があり、もう 1 名は右の外側橋底部から被蓋外側に連なる病巣で、いずれも回旋枝領域の梗塞であった。なお、２群間で差を認めた梗塞体積と MADRS スコアの相間解析では有意な相間を認めなかった(r = 0.2, $P$ = 0.4)。

＜考察＞

本研究により、脳幹梗塞におけるうつと DRN や MRN の障害との関連が示され、うつの頻度は縫線核が障害された群で高いことが明らかとなった。縫線核は脳幹の被蓋傍正中に存在するため、傍正中領域の梗塞巣が背側に及ぶと障害される可能性がある。

先行報告では、視床や基底核、前頭葉皮質の虚血病巣がうつと関係することが示されているため、本研究ではこれらの領域の FLAIR 高信号病変や深部白質病変を評価したが、２群間で差はみられなかった。うつは脳卒中後によく見られるが、脳幹梗塞後のうつは２報の報告のみで(Kulisevsky et al., 1995; Nishio et al., 2007)、DRN や MRN を含む脳幹梗塞によるうつは報告がない。

5-HT は DRN や MRN にある細胞体で作られ、軸索に沿って運ばれるが、うつ病患者の死後脳で DRN の領域が減少していることや(Matthews and Harrison, 2012)、Voxel-based morphometry (*in vivo*)で DRN を含む領域の信号強度が低下していることが報告されている(Lee et al., 2011)。またパーキンソン病(PD)の早期よりレビー小体が縫線核に出現し(Braak et al., 2003)、PD のうつに対する選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）の効果が報告され(Richard et al., 2012),、PD のうつと 5-HT の関連が示唆されている。

病巣研究により脳卒中後うつとの関連が示されている左前頭葉や左基底核(Robinson and Jorge, 2016)は、情動や行動を制御している前頭前野-皮質下回路の一部を成し(Cummings, 1993),、また前頭前野は 5-HT 作動性神経の投射先の 1 つである。また、脳卒中後うつ患者の髄液で 5-HIAA の低下が報告されている(Bryer et al., 1992)。これらは、脳卒中後うつにおける 5-HT の役割を示唆し、脳幹梗塞後のうつと縫線核の障害の関連を示した本研究の結果と合わせて、縫線核の障害による 5-HT 作動性神経の障害が、脳幹梗塞後のうつに重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究において障害あり群の 6 人中 3 人は、観察評価尺度である MADRS でうつを示したが、自己評価スケールの BDI-II ではうつを示さなかった。同様の解離は、MADRS とツングうつ病評価尺度との間でも報告されている(Matsuzaki et al., 2015)。脳幹梗塞後の脳卒中後うつの評価は、半構造化面接ガイド(SIGMA)を用いた MADRS による評価を用いた方がより適切で感度が高い可能性がある。また、BDI-II やアパシー、全般的認知機能には 2 群で差がなく、縫線核の障害による脳卒中後うつは他の症候とは独立して生じうることを示している。

障害あり群の中でうつを示さなかった 1 名の病巣は MRN の最も尾側にあったが、5-HT 作動性ニューロンは MRN の頭側に集積しているため、障害が軽度であったと考えられる。また、障害なし群で黒質に病巣がある 1 名はうつを示し、類似症例の先行報告が 2 例ある(Kulisevsky et al., 1995; Nishio et al., 2007)ことから、ドパミン系も脳卒中後うつにおいて重要な役割を果たしている可能性がある。

脳卒中後うつは、縫線核への障害、5-HT 投射経路や投射先の障害、その他の神経伝達物質の障害などいくつかの機序で生じると考えられる(Loubinoux et al., 2012)。脳卒中後うつに対する SSRI の二重盲検試験は、5 つのうち 2 つで効果が示されたが(Robinson and Jorge, 2016)、対象患者の脳卒中後うつの背景病態が均一でないことが、SSRI に対する反応が一定でない要因と考えられる。一方で、DTI や PDWI を用いれば、DRN や MRN の障害を可視化でき、SSRI に対する良好な反応性が期待される脳卒中後うつ患者の選択ができる可能性がある。今後の前向き介入研究が必要である。

本研究は、技術的な問題から核の障害と投射線維の障害を分離できておらず、投射線維を核から分離する今後の研究が必要である。また、本研究では直接的に 5-HT の低下を確認できておらず、髄液中 5-HT もしくは 5-HIAA を評価する研究が必要である。最後に、うつに関連しうる心理社会的背景（家族のサポートや内省など）の評価がなされておらず、これらをコントロールした今後の研究が必要である。

＜結論＞

DRN や MRN の障害が脳幹梗塞後のうつと関連する。上行性 5-HT 作動性神経の障害が脳卒中後うつの背景基盤であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5294　号 | 沼沢　祥行 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　西川　徹<br>副　査　立石　宇貴秀、田中　光一 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、中脳・橋に梗塞病巣をもつ脳卒中患者（19 名）について、MRI により、上行性セロトニン（5-HT）ニューロン起始核がある縫線核に病変が検出される群（6 名）の方が、検出されない群（13 名）に比べて抑うつ状態の発症率と重症度が高いことを初めて見出し、脳卒中後抑うつ（PSD）に上行性 5-HT ニューロンの障害の関与が示唆されることを報告したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

脳卒中患者の20～30％に抑うつ状態が出現することが広く知られているが、神経機序は不明である。本研究は、うつ病では大脳皮質等の5-HT神経伝達障害が推測される点に着目し、前脳部に投射する上行性5-HTニューロンの細胞体をもつ背側および正中縫線核における病変の有無と抑うつ状態の発症との関連を世界に先駆けて検討した、独創的なものと評価される。

２）社会的意義

本研究より次の結果が得られ、脳卒中後抑うつ（PSD）と5-HTニューロン起始核の病変の関連性が明らかにされた：1. 背側または正中縫線核に梗塞病巣が見られる患者群は、見られない患者群より抑うつ状態を発症する頻度が高い、2.前者は後者より、抑うつ症状評価尺度のスコアが高く症状が重度である、3.梗塞巣の大きさは抑うつ症状の重症度と関係しない。これは、PSDの治療・予防法開発の手がかりとなる臨床的にも極めて有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

適切な倫理的手続のもとに、複数の施設と多くの患者の協力を得て、2年の短期間で所期の目的を達成したことから、本研究の周到な計画が窺われる。また、脳MRI計測では、異なる施設間で統一的解析が可能な信頼性の高いデータを得る工夫をしており、深い理解が認められた。

４）考察・今後の発展性

申請者は、脳卒中患者において、5-HTニューロンの起始核だけでなく投射域と抑うつ状態の発症の関係や、5-HTニューロンの病態を直接検出する方法、縫線核群以外の脳部位の病変と抑うつ状態の関係等の検討を計画中であり、今後研究がさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記すべきことなし

**４．審査結果**

以上から、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 日熊　麻耶 |
| 論文審査担当者 | 主査　下門　顕太郎<br>副査　西川　徹、杉原　泉 |
| 論　文　題　目 | Whole-Day Gait Monitoring in Patients with Alzheimer’s Disease: A Relationship between Attention and Gait Cycle |

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

アルツハイマー病患者の歩行異常に関しては、特定の認知機能との関連に関する研究は多数行われているが、日常生活における歩行解析を解析した報告は少ない。今回我々は携帯歩行計を用いて、24 名のアルツハイマー病患者（AD 群）と 9 名のコントロール（HC 群）の 24 時間の歩行を記録し、1 日の平均歩行周期および歩行加速度（床反力）と認知機能検査結果との関連性を解析した。平均歩行周期、歩行加速度とも AD 群と HC 群の間で有意差を認めなかったが、AD 患者の認知機能と歩行の関連においては、注意集中力と歩行周期に相関を認めた。注意集中力の高低で AD 患者を 2 群に分けると、健常者程度に保たれている AD 患者群は健常者よりもゆっくりな歩行周期を示すが、注意集中力が低下した AD 患者群では健常者と同じ歩行周期であった。これは過去の検査室内での歩行解析から予測される結果とは異なっており、注意集中力が低下した患者は、日常環境では周囲の環境や自身の歩行の不安定性に注意が向けられていない可能性が考えられる。

〈背景〉

アルツハイマー病（AD）は進行性の認知機能低下を特徴とし、初期には歩行障害を認めないとされてきたが、近年、AD 患者における歩行異常について多くの報告がされている。通常の歩行において AD 患者は健常対象者よりも歩行速度が遅く、歩行周期（2 歩分に要する時間）が長く、歩幅が小さく、また歩行パラメーターのばらつきが大きく不安定であることが報告されている。さらに、同時課題を行いながらの歩行（dual task walking: DTW）では、上記の歩行異常がさらに顕著になることが報告されているが、これは注意力を歩行と認知課題の 2 つに分配する必要が生じるためであると考えられ、歩行の制御に高次機能が関わっていることを示唆している。実際、いくつかの歩行パラメーターは、高齢者や認知機能の低下した患者において全般的認知機能や記憶、注意遂行機能など様々な認知機能検査の結果と関連することが分かっている。

これまでに報告されている論文における歩行解析は、ほとんどが検査室内において短距離歩行や同時課題歩行などを行わせたものであり、人工的な環境・条件で行っているため、必ずしも日常生活での歩行を反映しているとは言えない可能性がある。しかしデバイスの開発がされなかっ

たため、これまでに日常生活における AD 患者の歩行について検討された報告は少ない。そこで、我々は、LSA メディエンスの携帯歩行計『見守りゲイト®』（Portable gait rhythmogram、以下 PGR）を用いて、AD 患者の 1 日の歩行を記録し、歩行パラメーターと認知機能との関連を解析した。

〈方法〉

2012 年 7 月から 2015 年 2 月までの間に、当院神経内科外来を受診され、NINCDS-ADRDA 診断基準により診断された AD 患者のうち、①65 歳以上、②MMSE 15 点以上、③日常生活で杖などを使用していない、④歩行に影響を与えうる関節疾患などや、認知症の他の原因がない、の 4 つの基準を満たす 24 名（平均 76.9 歳）について、歩行解析および神経心理検査を行った。年齢をマッチさせた 9 名の健常者についても検査を行った。

PGR は専用ベルトで腰に取り付け、1 日装着していただいた。PGR により記録された全運動による加速度データからは、パターンマッチングという方法を用いて歩行による加速度を反映するパターンのみが抽出され、歩行による加速度の強さ（床反力）と、歩行周期が計算される。これらの 1 日の平均値を解析に用いた。

神経心理検査には、Mini-Mental State Examination (MMSE)および改定ウェクスラー記憶検査（WMS-R）日本語版を用いた。今回の解析では WMS-R において標準化されていない 75 歳以上の被験者が 7 割近くを占めたため、言語性記憶、視覚性記憶、注意・集中力（以下注意力）、遅延再生の 4 つの指標について、下位検査の点数に重み付けをして算出した合計得点そのものを用いた。

歩行パラメーターの群間比較は、Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Wallis 検定により行い、各認知検査成績と歩行パラメーターの相関は Spearman 順位相関を用いて解析した。

〈結果〉

平均歩行周期は AD 群で 1.21 ± 0.08 秒、HC 群で 1.21 ± 0.06 秒（$p = 0.508$）、平均歩行加速度は AD 群で 1.90 ± 0.27 $m/s^2$、HC 群で 1.99 ± 0.31 $m/s^2$（$p = 0.417$）であり、いずれも両群間に有意差を認めなかった。

AD 患者について、歩行パラメーターと MMSE および WMS-R の各指標との間で相関解析を行った結果、歩行周期と注意力の得点の間に正の相関（$r = 0.057$, $p = 0.003$）を認めた。その他には有意な相関は認めなかった。

AD 群においては、注意力の得点は HC 群より有意に低かったが、6 名の患者は HC 群と同等（HC 群の 1.5 S.D.以内）であった。そこで AD 群を注意力の得点が保たれている 6 名と低下している 18 名に分けて、HC 群を含めて歩行周期を 3 群比較したところ、注意力の保たれている AD 患者群（1.34 ± 0.09 秒）は、注意力が低下している AD 患者群（1.21 ± 0.05 秒）および HC 群（1.2 ± 0.06 秒）と比較して歩行周期が長かった（それぞれ $p = 0.011$, $p = 0.048$）。注意力が低下している AD 患者群と HC 群の間には有意差を認めなかった。

〈考察〉

AD 患者の日常生活における歩行解析を行い、AD 患者においては歩行周期と注意力の間に関連があることが明らかとなった。つまり日常生活においては、注意力が保たれている AD 患者では、健常者より長い歩行周期で（ゆっくり）歩いているが、注意力の低下した AD 患者は、注意力の保たれている AD 患者よりも短く、健常者と同等な歩行周期で歩いていた。また AD 群と HC 群の間には、歩行周期や歩行加速度に明らかな群間差を認めなかった。

注意・遂行機能が歩行の制御に関わることは、近年明らかにされてきており、注意・遂行機能に関わる前頭前野を代表とする皮質領域は、方向定位に関係する海馬領域や、基底核などとともにネットワークを形成し、脳幹・脊髄レベルで形成される基本的歩行パターンを調節していると考えられている。また、検査室内で行われる DTW においては、注意を 2 つの課題（認知課題と歩行）に分配する必要があるため、通常歩行とくらべて歩行パターンは課題の難易度などにより影響を受けて変化するが、被験者の注意・遂行能力の程度によっても影響を受ける。報告により差異はあるものの、DTW による（通常歩行と比較した）歩行速度の低下、歩行周期の延長、歩幅の減少や不安定性の増大のいずれも、注意・遂行能力の程度と相関するという報告がある。このような過去の報告から類推すると、日常生活では、検査室内よりいろんな状況に適応したり情報を処理したりする必要があるため、注意力の低下している患者の方がゆっくり歩いているのではないかと予想されるが、面白いことに、今回の結果はむしろ逆であった。

検査室内と日常の歩行の違いが必ずしも認知機能のみで影響されるわけではないことは予想されるが、今回示された歩行周期と注意力との関連、過去の報告との乖離について、我々は以下の 2 つの可能性を考えた。1 つは、注意力が低下している AD 患者では、検査室内のように課題として与えられる場合とは異なって、日常生活ではあまり周囲の状況などに注意を向けられていない。一方で、注意力が保たれている AD 患者では、ある程度周囲の状況を知覚し、状況変化に適応しながら歩行しているために、（検査室内での結果から予想されるのと同じように、）歩行がゆっくりになる可能性である。過去の報告と比較すると、AD 患者で通常歩行における平均歩行周期は 1.0～1.2 秒、DTW では 1.2～1.7 秒であり、注意力の低下している患者は、ほぼ通常歩行のときに近い歩行周期を示している。

2 つ目に、注意力の保たれている患者は、いわゆる『cautious gait』をとっている可能性を考えた。Cautious gait は末梢の運動・感覚の異常や、小脳・基底核の異常から生じる歩行異常とは異なる“高次の歩行異常”に分類され、（意識的あるいは無意識的に）知覚されたバランスの異常や、転倒への不安に対する適応反応ととらえられている。Cautious gait はアルツハイマー病では約 20%、健常高齢者でも約 10%に見られ、特徴としては歩行速度や歩幅の減少、ステップ幅の増大があげられるが、近年の定量的歩行解析からは、歩行周期の延長も見られる。AD 患者では初期からバランス障害が見られる場合があることが報告されており、自身のバランス障害の認知やそれに対する適応にもまた、注意遂行機能を含めた高次機能が関与されると考えられるため、注意力が保たれている患者では、自身のバランス障害を認識して、それに対する適応として cautious gait をとるために、歩行周期が長くなっており、逆に注意力が低下している患者では自身のバランス障害を正しく認識できず、適応もできていないため、短い周期で歩いている可能性が考えられる。このことは、過去の報告で cautious gait がすべての病期にわたって観察されること、AD

患者において注意力と記憶力の障害が必ずしも相関していないことなどとも合致すると思われる。

2 つの可能性のどちらにしても、AD 患者で注意力が低下すると、日常生活においては周囲の環境への適応、自身の不安定性に対する適応がうまくなされず、不適切に速い歩行をしている可能性がある。

〈結論〉

今回日常における歩行を携帯歩行計で調べることによって、少数例での検討ではあるが、検査室内での歩行検査からは分からない、AD 患者の歩行の一面と、認知機能の関連を明らかにすることができた。従来の歩行検査は、患者がどれだけできるかという能力を評価するためには有用な手段であるが、患者が日常でその能力（歩行および認知）を実際にどう用いているかを評価するうえでは、今回のような長時間のモニタリングの方がより有用であると考える。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5295　号 | 日熊　麻耶 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　下門　顕太郎<br>副　査　西川　徹、杉原　泉 | |

（論文審査の要旨）

１．　論文内容

本論文はアルツハイマー型認知症患者の歩行特性を携帯歩行計を用いて評価したものである。認知症患者では歩行速度が遅くなり、歩幅が狭くなり、安定性が低下することが知られており、転倒につながると考えられている。しかしこれまでの研究は、検査室など検査を目的とした環境下で行われたものであり、日常生活における歩行状態をどの程度反映しているかは不明であった。申請者は、アルツハイマー型認知症高齢者 24 名につき、携帯歩行計を用い日常生活における歩行周期、歩行加速度、運動量を 24 時間記録し、認知機能が正常な対照群 9 名と比較した。

歩行周期、歩行加速度、運動量は両群間で差がなかった。患者群をウェクスラー認知機能検査の注意の障害の有無で分けて検討すると、注意力が正常な患者群では対照群に比べ歩行周期が延長したのに対して、注意力が低下した患者群の歩行周期では対照群と同等であった。これは、注意力が正常な認知症患者では、転倒を防ぐために歩行速度が遅くなるのに対して、注意力が低下するとこのような転倒防止に対する意識が低下することによる考えられた。

検査者の注視下で行われてきた従来の歩行検査は日常生活の中での歩行の状態を十分反映していない可能性ある。また認知機能低下者の中には、注意力が低下したために歩行速度の調節がきかず転倒のリスクが高まる一群が存在すると考えられた。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性、独創性

認知症患者では歩行のパラメター―に変化がみられることは知られていたが、特殊な環境で行われる検査で得られた結果は日常生活における歩行障害を反映していない可能性があるとの予想のもと研究を行い、このことを証明したことは先駆的かつ独創性に富む研究である評価できる。

２）社会的意義

超高齢社会においては認知症高齢患者は増加し、それに伴い高齢者の転倒、骨折も増加している。認知症患者の歩行特性の変化を明らかにすることは高齢者の転倒、骨折を予防するうえで極めて重要な研究であると言える。

３）研究方法・倫理観

本研究は新たに開発された携帯歩行計の利用により初めて可能になったものである。し

かし、今回の研究で明らかになった従来の結果とは異なる結果が用いた方法の違い起因する可能性は十分検討されているとは言えない。

本研究は患者を用いた観察研究であるが、用いた検査の侵襲性は低く、同意書の取得など研究倫理的な手続きに問題はない。

４）考察・今後の発展性

転倒のリスクの高い認知症高齢者の転倒予防に関する本研究は、極めて重要なものであり、今後の発展が期待できる。従来の研究との差異が用いた方法論によるものか否か、歩行速度と筋肉量や筋力との関係など、今後さらに検討すべき課題も多い。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は学位(医学博士)の申請をするのに値するものと判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 野本　英嗣 |
| 論文審査担当者 | 主査　古川　哲史<br>副査　荒井　裕国、蘇原　映誠 |
| 論　文　題　目 | Mechanisms of Diuresis for Acute Decompensated Heart Failure by Tolvaptan: Assessment by Bioelectrical Impedance Analysis |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

バソプレシン V2 受容体拮抗薬であるトルバプタンは、急性非代償性心不全(acute decompensated heart failure; ADHF)患者の治療において腎血流を低下させず、腎機能の増悪(worsening renal function; WRF)を引き起こさない。生体電気インピーダンス法(bioelectrical impedance analysis; BIA)は細胞外液(extracellular water; ECW)と細胞内液(intracellular water; ICW)の比を測定することにより血管内容量を評価できる。BIA によってトルバプタンの利尿作用機序を評価した報告はなく、今回我々は検討した。

2013 年 4 月から 2016 年 5 月の間に ADHF で当院に入院した患者のうち、治療前後に BIA を測定された 29 名を対象とした。15 名は既存の利尿薬による治療に加えてトルバプタンによる治療を行われ(トルバプタン群)、14 名は既存の利尿薬のみで治療された(対照群)。対照群では血清クレアチニン値(Cre)は有意に上昇し、ECW/ICW は有意に低下した。さらに、治療前後の Cre と ECW/ICW の差は負の相関を認めた。

今回の検討により、WRF は血管内容量の低下によって引き起こされ、トルバプタンは血管内容量を保ちつつ余剰な体液を減少させうることが示唆された。

＜緒言＞

ADHF 患者の治療において、利尿薬はうっ血と余剰な体液を減少させる目的で使用されるが、特にループ利尿薬は強い利尿作用があるため頻繁に使用される。日本の ATTEND registry によると ADHF で入院した患者の約 80%にループ利尿薬が使用されている。しかし、ループ利尿薬は電解質異常を引き起こし、腎機能を低下させ、神経体液性因子を活性させるため、その投与量と致死率が相関すると報告されている。そのため近年では心腎連関症候群の観点からループ利尿薬の使用が問題視されている。

トルバプタンは新規の利尿薬であり、集合管のバソプレシン V2 受容体に拮抗する。その作用機序は既存の利尿薬と異なり水利尿であるため、腎血流、電解質、血行動態に影響しない。EVEREST study でトルバプタンは尿量を増加させ体重や浮腫を減少させる効果が示されている。また既存の利尿薬と比較し、投与後 48 時間の尿量が有意に多く、WRF が少なかったと報告され

ている。

うっ血の解除はADHF治療の指標となり、退院時にうっ血が残存していると致死率と相関すると報告されている。従って退院時にうっ血を解除できているかがADHF治療の目標となる。近年BIAはADHFの治療の評価に有用とされている。BIAは体組織の異なるインピーダンスを測定することにより体組成を評価でき、総水分量(TBW)、ECW、ICWを測定できる。さらにECW/ICWは血管内容量を反映すると考えられている。今までトルバプタンによるADHF患者の治療をBIAで評価した報告はないため、我々は検討した。

＜方法＞

2013年4月から2016年5月までの間に独立行政法人国立病院機構災害医療センターにADHFで入院された患者のうち、治療の指標としてBIAを測定された29名の患者を後ろ向きに検討した。フラミンガム基準によりADHFと診断し、急性心筋梗塞、心原性ショック、気管内挿管患者、血液透析患者は除外した。全ての患者は退院時にはうっ血所見は改善していた。　入院中に少なくとも1回トルバプタンを投与した患者をトルバプタン群、トルバプタンを用いなかった患者を対照群として2つの群に振り分けた。

全てのデータは後ろ向きに収集された。患者背景としてNYHA機能分類、高血圧症、脂質異常症、糖尿病、慢性腎臓病が基礎疾患として存在するかを検討した。血液検査、心電図、心エコー、胸部X線写真は入院時に施行された。腎機能、尿浸透圧、電解質の値を治療前後で比較した。また、InBody S20という機器によりBIAを用いてTBW、ECW、ICWを測定してECW/ICWを計算し、治療前後で比較した。

解析ソフトにJMP 12を用いて、治療前後の血液検査所見、BIAデータは対応のあるペアでのt検定、Wilcoxon検定で解析し、血液検査所見とBIAデータの相関に関して単回帰解析を行った。

臨床研究はヘルシンキ宣言に沿って行われ、当院の倫理審査委員会に承認された。インフォームドコンセントは全ての患者と家族に得られた。

＜結果＞

患者背景は15名がトルバプタン群、14名が対照群であり、年齢、性別、既往症は有意差を認めなかった。対照群と比較してトルバプタン群では入院前から利尿薬を内服している人数と利尿薬の投与量がいずれも有意に高かった。NYHA機能分類、Nohria/Stevenson分類、クリニカルシナリオ、心エコー所見は有意差を認めなかった。

入院時の血液検査では対照群と比較し、トルバプタン群で血清尿素窒素(BUN)、Creが有意に高く、推定糸球体濾過値(estimated glomerular filtration rate; eGFR)は有意に低かった。血清ナトリウム値、血清カリウム値、尿浸透圧は有意差を認めなかった。またTBW、ECW、ICW、ECW/ICWは有意差を認めなかった。

治療後の血液検査では対照群で有意にBUN、Creが上昇し、eGFRが低下した。トルバプタン群では治療後の値に有意差を認めなかった。さらに2群間の値は治療後に有意差がなくなっていた。高ナトリウム血症は1人も起こさず、電解質は両群ともに有意な変化を認めなかった。尿浸透圧はトルバプタン群で有意に低下した。治療後の尿浸透圧はトルバプタン群で有意に低かった。

TBW、ECW、ICW は両群で治療後に有意に低下したが、ECW/ICW はトルバプタン群では変化しなかったが対照群で有意に低下した。治療後の TBW、ECW、ICW は両群間で有意差を認めなかったが、ECW/ICW は対照群で有意に低かった。治療前後の Cre、eGFR、ECW/ICW の差は対照群で有意に差が大きく、さらに ΔCre と ΔECW/ICW、ΔeGFR と ΔECW/ICW はそれぞれ負の相関、正の相関を認めた。

WRF はトルバプタンで 46.7%、対照群で 50%に認め、有意差はなかった。しかし、トルバプタン群では約半数が WRF を起こした後にトルバプタンを投与されていた。初回からトルバプタンを投与された患者と、初回からトルバプタンを投与されなかった患者の比較では、初回からトルバプタンを投与された群で有意に WRF が少なかった。

入院中に投与されたその他の薬剤は両群で有意差を認めなかった。経口利尿薬は退院時には両群間で有意差を認めなかった。

＜考察＞

ADHF 治療に関して、ループ利尿薬の使用はガイドラインで第一選択に推奨されている。しかし ESCAPE study ではループ利尿薬の投与量が致死率と相関することが報告されている。ループ利尿薬の投与量が 80mg/日を超えると生存率が有意に低下する。ループ利尿薬は血管内容量を低下させ、神経体液性因子に影響する。ADHF 治療においてはループ利尿薬による WRF、心腎連関症候群の発症を起こさないことが重要と考えられる。トルバプタンは血清浸透圧を上昇させるため、血管内容量を保つことにより腎血流を低下させないと報告されている。

実際に腎血流を測定することは困難である。BIA は非侵襲的で簡便に体組成を測定することができる。近年 BIA は ADHF 治療の指標に有用であると考えられており、ECW/ICW により血管内容量を評価できると報告されている。心不全患者においてはうっ血の解除が治療の目標であるが、急激な血管内容量の低下により腎血流の低下が起こると考えられている。我々はトルバプタンの作用により ECW/ICW を保ちつつ余剰な体液を減少できると仮定し、今回の検討を行った。今回の研究では ECW/ICW はトルバプタン群では変化せず、対照群でのみ有意に低下した。この結果によりトルバプタンは血管内容量を保ちつつ治療に有効であることが示された。また、ΔCre と ΔECW/ICW、ΔeGFR と ECW/ICW がそれぞれ相関した結果により、血管内容量の低下により WRF が起こると示唆された。さらに、トルバプタン群は入院時の腎機能が有意に低かったにも関わらず WRF を起こさずに治療できており、CKD 患者への効果も期待できると考えられた。また、一度 WRF を起こした患者でもトルバプタン投与後に改善を認めており、AKI に対する効果も期待された。

入院前の経口利尿薬の投与量はトルバプタン群で有意に多かったが、退院時の経口利尿薬の投与量は有意差を認めなかった。この結果によりトルバプタンを併用することによりループ利尿薬の投与量を抑えられる可能性が示唆された。

本研究は単施設の後ろ向き研究であり、症例数が少なかった。また入院時の腎機能や経口利尿薬の投与量で両群間に有意差を認めた。これはバイアスとなるが、現在の治療方針では腎機能が悪い患者やループ利尿薬の投与量が多い患者にトルバプタンを投与する傾向があるため、やむを得ないと考えられた。今後はさらなる症例数の蓄積と長期予後の検討が必要と考えられる。

＜結論＞

ADHF 患者の治療において、ループ利尿薬は血管内容量を減少させることにより腎血流の低下、WRF を引き起こす。一方トルバプタンは血管内容量を保ちつつ余剰な体液を減少させることが可能であり、WRF を起こしにくいと示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5296　号 | 野本　英嗣 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　古川　哲史<br>副　査　荒井　裕国、蘇原　映誠 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

ループ利尿薬（フロセミド）などの従来の利尿薬は Na 再吸収を阻害することにより間接的に水吸収を抑える Na 利尿を機序とするが、新たに開発されたトルバプタンは腎集合管での水再吸収を直接抑える水利尿を機序とする。フロセミドでは腎機能障害をもたらすことが臨床上問題となるが、トルバプタンは腎機能に悪影響を及ぼさないが、その機序は十分解明されていない。申請者は、フロセミドとトルバプタンの投与前後で生体電気インピーダンス法を用いて細胞内液量(ECW)、細胞外液量(ICW)を測定し、比較した。ECW/ICW を血管内循環液量の指標として、ECW/ICW と腎機能（血漿クレアチニン値、eGFR）が相関すること、フロセミドは ECW/ICW を減少させるが、トルバプタンは減少さないことを見出し、血管内循環液量の維持がトルバプタンに腎機能維持機構の一因であると結論した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

新たな利尿薬トルバプタンの腎機能保護作用のメカニズムは不明であった。このメカニズムに対して、実臨床で得られる臨床データからアプローチした点が独創的と考えられる。

２）社会的意義

心不全では、利尿薬投与による腎機能低下が治療管理上の問題となることが少なくない。この臨床上重要な問題に対して、新しいトルバプタンが腎機能保護的に働くこととそのメカニズムの一端を明らかにしたことは、心不全治療管理において高い意義を持つと考えられる。

３）研究方法・倫理観

申請者が所属する単一施設で、フロセミド単独あるいはトルバプタン併用患者で入院時と退院時で測定した生体電気インピーダンス法と腎機能データの相関を見た後ろ向き研究である。生体電気インピーダンス法は、透析患者などの体液量変化が大きいケースではその妥当性が示されているが、心不全の利尿薬治療による体液量変化を正確に反映するかが証明されていないことが、研究方法の問題点と考えられる。データが入院時と退院時の 2 点のものだけとなっており、治療経過の推移が分からないことも方法の限界と考えられる（この点に関しては、レポートでデータの解析を求めた）。また単一施設研究であること、ランダム化されていないこと、後ろ向き研究

であることなどが研究の限界と考えられる。

治療管理上必要な処置を行った患者のデータを用いたものであり、所属施設の倫理委員会の承認を得ており、すべての患者からインフォームドコンセントを得ており、倫理上は問題がない。

4）考察・今後の発展性

まずは、生体電気インピーダンス法が利尿薬治療の体液変化を正しく反映するか、動物実験も含めてその立証が必要と考える。そのうえで、ランダム化した研究を行うことが、今後の発展性の第一歩となると考える。

**3．その他**

特記事項なし。

**4．審査結果**

最終審査では、論文に関して多岐にわたる質問を行った。中でも、特に生体電気インピーダンス法原理、生体電気インピーダンス法が理の湯約投与による体液量変化を正確に反映するか、利尿薬の作用機序、データの解釈、特にトルバプタンで体液量の減少がみられない理由、データの推移の時間経過、などに関しての理解が不十分と考えられ、レポートの提出を求めた。レポート内容から十分な理解が得られたと考えられ、副査の荒井教授、蘇原准教授と合議の上、申請者は学位（医学博士）授与に値する学識を有すると判定する。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 近江　哲生 |
| 論文審査担当者 | 主査　木村　彰方<br>副査　荒井　裕国、下門　顕太郎 |
| 論　文　題　目 | Malondialdehyde-Modified Low Density Lipoprotein as Oxidative-Stress Marker in Vasospastic Angina Patients: Based on Guideline of Japanese Circulation Society |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

背景：冠攣縮性狭心症（VSA）は内皮細胞機能障害および血管平滑筋細胞の過収縮に起因する。酸化ストレスが内皮細胞機能障害を惹起しうるものの、冠攣縮性狭心症と酸化ストレスマーカーとしての Malondialdehyde-Modified Low Density Lipoprotein（MDA-LDL）との関連は未だ不明瞭である。目的：今回我々は血清 MDA-LDL を冠攣縮性狭心症が疑われた患者において評価した。安静時胸痛主訴に搬送された 84 名を解析の対象とした。各々を日本循環器学会ガイドラインに基づいて VSA 確定群、VSA 疑い群、VSA 否定群の 3 群に分けた。さらに VSA 確定群と VSA 疑い群を「臨床的 VSA」とした。

結果：VSA

確定群は 40 例、VSA 疑い群は 35 例、VSA 否定群は 9 例となり、臨床的 VSA は 75 例であった。臨床的 VSA 群では血清 MDA-LDL 値が VSA 否定群に比して有意に高値であった。また血清 MD-LDL 値は T-chol, LDL-C, TG そして FBS と正の相関が見られた。多変量解析では血清 MDA-LDL 値は臨床的 VSA の診断におけるもっとも優れた予測因子であった。冠攣縮性狭心症の確定診断で行われるアセチルコリン負荷試験では MDA-LDL 値が低い群と比して有意に高値であった群で ECG 変化の陽性率が高値であった。

結論：血清 MDA-LDL 値は VSA 診断における有力なバイオマーカーとなりうる。

＜緒言＞

VSA は安静時の胸痛を特徴とし、冠動脈の局所またはびまん性の攣縮に起因する病態である。胸痛の訴えに共に 12 誘導心電図での ST 上昇を伴った狭心症を Prinzmetal らが異型狭心症と命名した。かつては欧米人よりも日本人に多いとされてきたが、VSA が急性冠症候群発症と関連があると報じられ、欧米においても徐々に認知されるようになった。従来 VSA の系統だった診断方法がなかったため、日本循環器学会（JCS）では 2010 年に最初のガイドラインを発表し、2013 年に改訂した。診断としては安静時胸痛、12 誘導心電図や心電図モニターを元にフローチャートで手順が示され、アセチルコリンやエルゴノビンを用いた誘発検査を用いたカテーテル検査が確定診断に施行される。血管内皮細胞の機能障害と血管平滑筋細胞の過収縮反応が VSA の病態であると

判明しているが、喫煙・アルコール・脂質異常、糖代謝異常などの複数の環境因子がそのトリガーとなると考えられている。VSA はカルシウム拮抗薬やニトロ製剤による治療で発作の予防が図られ、その予後は一般的に良好とされているが、急性心筋梗塞や心室細動などを併発する予後不良な VSA もみうけられる。MDA-LDL は酸化 LDL の一種であり酸化ストレスマーカーであるとされ、喫煙や糖尿病で上昇するとも言われる。酸化ストレスは血管内皮細胞障害を惹起し、結果的に血管攣縮をきたしうるため、MDA-LDL は VSA の病態に何らかの形で関与していると考えられる。しかしながら MDA-LDL が VSA と臨床的にどう関連するかは不明であり、我々は侵襲的なカテーテル検査を施行せずに VSA を診断しうるかどうか MDA-LDL を用いて検討した。

＜方法＞

本研究では電子カルテシステム・カテーテル検査データベースから得られたデータを後ろ向きに解析し、2008 年 1 月から 2014 年 10 月まで当院に夜間明け方の安静時胸痛のため緊急搬送され、血液検査、12 誘導心電図、そして待機的もしくは緊急で冠動脈造影がなされた連続 84 症例を対象とした。VSA の診断は日本循環器学会（JCS）ガイドラインで行い、VSA 確定群（胸痛時の ECG 変化が陽性もしくはアセチルコリン負荷試験が陽性）、VSA 疑い群、そして VSA 否定群の 3 グループに分類した。75%以上の有意狭窄のためステント留置を必要とした症例、薬剤溶出ステント留置後、致死的不整脈、大動脈解離、脳血管障害が主病態であった場合は除外した。血清 MDA-LDL の測定には抗 MDA-LDL 抗体を用いた ELISA 法を用いた。正常範囲は 45 歳未満の男性もしくは 55 歳未満の女性で 46-82U/L、45 歳以上の男性もしくは 55 歳以上の女性で 61-105U/L である。本研究での全症例で冠動脈造影が施行され、アセチルコリン負荷試験は待機症例で施行された。待機症例ではカテーテル検査前に血管拡張薬内服は中断された。

＜結果＞

JCS ガイドラインに従って 40 名が VSA 確定群、35 名が VSA 疑い群、9 名が VSA 否定群となり、臨床的 VSA は 75 名であった。VSA 確定群では VSA 否定群と比して有意に MDA-LDL が高値であった。MDA-LDL は他のバイオマーカーすなわち T-chol、LDL-C、TG そして FBS と正の相関を有していたが、HDL-C とは相関がなかった。カテーテル検査は合計 60 名で施行されており、臨床的 VSA で 54 名、VSA 否定群で 6 名であった。アセチルコリン負荷陽性率は 60%で、臨床的 VSA でのアセチルコリン陽性率は 67%であった。臨床的 VSA の診断を下すにあたり最も有用な因子について多変量解析を行ったところ、MDA-LDL 値が独立して最有用な因子と判明した。ROC 解析では MDA-LDL は最高の AUC を呈し感度 93%, 特異度 45%そして最良の cutoff 値は 110.8U/L であった。ECG 変化が陽性か境界領域の人の MDA-LDL はそうでない人と比してより高値である傾向があることもわかった。

＜考察＞

本研究で判明した重要なことは、(1)血清 MDA-LDL 値が JCS ガイドラインに従って診断した臨床的 VSA 群で有意に上昇していたこと、(2)血清 MDA-LDL は動脈硬化プラーク形成に関与するといわれている血清 T-chol、LDL-C、血管内皮機能障害のマーカーとして知られている TG や FBS

と正の相関がみられたこと、(3)多変量解析の結果で VSA 診断において血清 MDA-LDL が最も有力なマーカーであったこと、そして(4)MDA-LDL 高値の症例でアセチルコリン負荷試験陽性が多い傾向にあったこと、である。VSA の臨床的予後は比較的良好とされるものの、急性心筋梗塞や突然死に至る症例もあるため正確な診断を下すことが肝要である。心臓カテーテル検査およびアセチルコリン負荷試験による確定診断は侵襲的であるため、検査前に非侵襲的な手段で補助的に評価することが期待されている。BMIPP 心筋シンチグラフィなど非侵襲的な補助診断方法も有用であると報告されているが高価である。MDA-LDL は、酸化ストレスマーカーとして知られている修飾 LDL-C であり、喫煙、糖尿病で上昇し血管内皮機能障害を反映する可能性がある。冠攣縮誘発にエルゴノビンを用いた研究も報告されているが、MDA-LDL 高値の症例で冠攣縮陽性率は高値であった。MDA-LDL は VSA 診断後の薬物治療においても重要な位置にある。VSA は喫煙・脂質異常症・腎機能障害そして高血糖など様々な因子によっても惹起されることが知られているため、これらの因子への介入も冠攣縮に対する治療につながる可能性が高い。冠動脈内の軽度プラーク部位の内皮機能障害に起因して冠攣縮が生じることが知られている。近年スタチン製剤が VSA に有効であるとの報告もなされているが、スタチンで MDA-LDL も低下することは知られる。MDA-LDL が冠攣縮機序に関与しているとすれば、スタチンによる VSA 治療の背景に MDA-LDL 低下が存在していたことが示唆される。今回我々の研究では、MDA-LDL 測定が VSA の初期診断の一助となることについて示すことができたが、MDA-LDL それ自体が VSA の治療ターゲットとなる可能性も考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5297　号 | 近江　哲生 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　木村　彰方<br>副　査　荒井　裕国、下門　顕太郎 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、冠攣縮性狭心症の指標としての血中 MDA-LDL の意義に関する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

冠攣縮性狭心症（VSA）は血管内皮細胞の機能障害と血管平滑筋細胞の過収縮に起因し、時に致死性となる疾患である。以前より酸化ストレスが血管内皮細胞機能障害を惹起することが知られているが、酸化ストレスマーカーとしての Malondialaldehyde-Modified Low Density Lipoprotein (MDA-LDL)との関連は不明である。このような背景のもと、申請者は、安静時胸痛を主訴として搬送された 84 例を対象として、日本循環器学会ガイドラインによる VSA 診断と血清 MDA-LDL との関連について解析しており、臨床現場に基づく着眼点は評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は、以下の通りである。

１．臨床的 VSA 群（VSA 確定群 40 例、VSA 疑い群 35 例）では、VSA 否定群（9 例）に比して血清 MDA-LDL 値は有意に高かった。

２．血清 MDA-LDL 値は総コレステロール値、LDL コレステロール値、中性脂肪値、空腹時血糖値との相関がみられたが、HDL コレステロール値との相関を認めなかった。

３．多変量解析から、血清 MDL-LDL は臨床的 VSA の独立した予測因子であった。

４．ROC 解析から、MDA-LDL は VSA 診断の感度 93%, 特異度 45%であった。

以上のように申請者は、臨床的 VSA と血清 MDA-LDL 値との間に有意な関連があることを見出した。これは臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、安静時胸痛を主訴として搬送され、血液検査、12 誘導心電図検査、冠動脈造影がなされた連続 84 例が対象とされた。これらの症例について、血清 MDA-LDL 値の測定が行われた。本手法は、十分な修練に基づく冠動脈疾患患者治療と血液検査所見に関する知識の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について、心臓カテーテル検査やアセチルコリン負荷試験等の侵襲的確定診断を下す前に、非侵襲的な補助診断として血清 MDA-LDL 値が使えるのではないかと考察している。これは、類似の先行研究がない中で、独創的な考察であるが、今後より多くの症例についての検討から、その妥当性が確認されるものと考えられる。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 結城　新 |
| 論文審査担当者 | 主査　大川　淳<br>副査　秋田　恵一、神野　哲也 |
| 論　文　題　目 | Associated lateral/medial knee instability and its relevant factors in anterior cruciate ligament-injured knees |

（論文内容の要旨）

<背景>

膝前十字靭帯（anterior cruciate ligament: ACL）再建術は整形外科手術の中で最も一般的に行われている手術の一つである。ACL再建術は良好な短期成績が報告されている一方、長期的な臨床成績は約11-30%で比較的良くないという結果が報告されており、いまだ改善の余地が多い。

ACL再建術の術後成績には様々な因子が関与しているといえる。近年ACL再建術の術後膝安定性に影響を与える因子として、secondary restraintの重要性が注目されている。ACL損傷に伴う膝内側部損傷に関しては多くの研究がある一方で、膝外側部損傷に関する報告はほとんどみうけられない。ACL再建術に加えて膝外側の関節外再建術を行うと回旋不安定性が改善するという先行研究や、前外側靭帯(anterior lateral ligament: ALL)の回旋不安定性に対する重要性が報告されているが、それらの研究でも内反不安定性に関する検討は行われていない。内反不安定性のfirst restraintは外側側副靭帯(lateral collateral ligament: LCL)であるが、LCLとALLは近接しており、膝外側部損傷は内反不安定性と回旋不安定性の両方に影響を与える可能性があると考えられる。

今研究の目的は、ACL損傷膝における前後/回旋不安定性と内外反不安定性との関連を検討すること、およびACL損傷膝における内外反不安定性に関連する因子を解明することである。

<方法>

この後ろ向き研究は東京医科歯科大学倫理委員会に承認され、2004 年から 2010 年の間に本施設にて ACL 再建術を施行された患者の医療記録をもとに調査された。対象患者基準は、骨格的に成熟しており、手術が必要な靭帯損傷を随伴しておらず、同側の膝の外傷歴・対側の膝靭帯の損傷歴がないこと、変形性関節症の所見が無いことであった。結果として 119 例(男性 65 例/女性 54 例)の ACL 損傷患者が対象となった。ACL 損傷の診断は臨床所見と MRI、関節鏡視にて確認された。

各症例において ACL 損傷膝と健側膝両方で、内反/外反ストレス X 線検査を評価した。内反/外反角度、内側/外側関節開大距離、内側/外側関節開大距離指数の 3 つの項目を評価した。これらの項目は患側と健側で比較した。患側膝の内外反不安定性は、この 3 つの項目の患健差を用いて評価した。内側/外側関節開大距離は、International Knee Documentation Committee (IKDC) form に

基づき、3mm 以上の群と 3 ㎜未満の群に分けて解析した。評価は 2 人の検者が行い、検者間の解析の信頼性の級内相関係数は、3 つの項目で各々0.947、0.808、0.846 であった。

LCL の MRI 所見は、冠状断で靭帯の非連続性・ゆるみや靭帯周囲の炎症などの損傷所見があるかどうかで評価し、LCL 損傷ありの群と損傷無しの群に分けた。評価は 2 人の検者が行い、検者間の解析の信頼性の級内相関係数は、0.648 であった。内反不安定性と MRI における LCL 損傷との相関を検討した。

ACL 損傷膝と健側膝両方で、手術の時点で麻酔下に ACL 損傷に関連する不安定性を徒手検査にて評価した。Lachman test と pivot shift test を施行し、患健差を用いた。pivot shift test の検者間の解析の信頼性の級内相関係数は、0.966 であった。KT-1000 arthrometer による膝の前方不安定性の計測を行い、患健差を用いた。内外反不安定性と ACL 損傷に関連する不安定性との相関を検討した。

患者背景に関しては、性別、関節弛緩性 8 項目、膝関節最大伸展角度、受傷からの期間、膝崩れの回数を調査し、同様に内外反不安定性との関連を検討した。

<結果>

内反ストレス X 線では、内反不安定性に関する 3 項目において ACL 損傷膝は健側膝と比較して有意に高値であった。つまり内反不安定性は ACL 損傷膝の方が健側膝より高いことを示した。

外反ストレス X 線では、外反角度において ACL 損傷膝は健側膝と比較して有意に高値であったが、その他の項目においては有意差は無かった。

MRI 検査では、119 例中 80 例に LCL に損傷所見を認めた。内反不安定性に関する 3 項目においては LCL 損傷ありの群と損傷無しの群とでは有意差を認めなかった。しかし、外側関節開大距離が 3mm 未満の群と 3mm 以上の群に分けて比較すると、LCL 損傷ありの群は有意に外側関節開大距離が大きく、その感度は 100%、特異度は 36%であった。

ACL 損傷に関連する不安定性については、KT 患健差は内反不安定性に関する 3 項目と相関をみとめなかったが、Lachman test、pivot shift test は弱い相関を示した。

同様に Lachman test、pivot shift test は外反不安定性に関する 3 項目においても弱い相関をみとめたが、内反不安定性に関する 3 項目との相関よりも弱いものであった。

患者背景では、内外反不安定性に関する 3 項目は性別間で有意差は無かった。また、患者背景におけるその他の項目は、膝崩れの回数と外反角度が弱い相関を示した以外は、内外反不安定性に関する 3 項目と相関をみとめなかった。

<考察>

今研究における最も重要な知見は、ACL 損傷膝は健側膝より内反不安定性が高かったということである。ストレス X 線における内反角度、外側関節開大距離、外側関節開大距離指数は、ACL 損傷膝では健側膝より有意に高値であった。

内外反不安定性は ACL 損傷に伴う前後/回旋不安定性に関連しているという仮説は部分的に妥当であった。内反不安定性と Lachman test、pivot shift test は相関があったが、KT 計測値とは相関をみとめなかった。外反不安定性も Lachman test、pivot shift test と相関があったが、内反不安定

性のそれより弱かった。よって、外反不安定性は内反不安定性よりも ACL に関連した不安定性との関連は少ないと考えられる。

内反不安定性の原因は多くの因子が関与しているという仮説もまた部分的に妥当であった。MRI における LCL 損傷所見は内反不安定性に影響を与えていたが、患者背景においては、膝崩れ回数と外反角度に弱い相関があること以外は、内外反不安定性に関与している項目はみつからなかった。

今研究では、全ての症例で grade 3 の内外反不安定性を有さない ACL 損傷であったにも関わらず、ACL 損傷膝は健側膝より内反不安定性が高かった。単独 ACL 損傷は内外反不安定性に影響を与えないという過去の報告や、ACL 損傷膝と健側膝の間において内外反ストレステストで明らかな有意差はみとめなかったというナビゲーションを用いた研究結果がある一方で、死体膝において ACL は膝関節屈曲 5 度/25 度での内外反安定性の 19.7%/10.3%を担っていたという報告や、同じく死体膝において、膝関節をより内反アライメントにすると、外側関節開距離と ACL の張力が増加したという報告もある。今研究の結果では、ACL は内反不安定性に対する secondary restraint としての役割を果たしていることが示唆される。

ACL 損傷における内反不安定性を報告した論文はほとんど見られないが、今研究において多くの症例(119 例中 80 例)で MRI にて LCL 損傷がみられたことは予想外の結果であった。MRI で LCL 損傷をみとめた群は外側関節開大距離が有意に高値であった。また、外側関節開大距離が 3mm 以上であることに対する MRI 所見の特異度が低いことより、内反ストレス X 線は内反不安定性を調べるのにより必要であることを示唆している。

今研究では内反不安定性と ACL に関連した不安定性に弱い相関をみとめた。最近の研究では、ACL 損傷に伴う ALL 不全がより著しい pivot shift 現象をきたす原因になりうると報告されている。ALL と LCL はお互い非常に近接しており、高度な内反不安定性を有する症例では、LCL 損傷に加え ALL 損傷の存在も関与しうるし、また前外側安定性そのものが LCL 損傷に起因するものかもしれない。

今研究にはいくつかの限界がある。1 つ目は、ストレス X 線が非麻酔下で行われた一方で、徒手検査は麻酔下で行われたことである。このことは内反不安定性が低く評価される原因になる。2 つ目は、ストレス X 線と MRI が異なる時点で行われたことである。MRI における LCL の損傷が、X 線を撮影したときの内反不安定性を反映していなかった可能性も考えられる。また、MRI における LCL 損傷の評価の検者間の解析の信頼性はあまり高くなかった(ICC: 0.648)。3 つ目は、今研究では grade3 の内反不安定性を有する症例は無かったが、11 例は grade 2 (IKDC grade B)の内反不安定性を有していたことである。このような症例では、LCL 損傷が内反不安定性の主な原因となり、内反不安定性における ACL の影響ははっきりしない可能性がある。最後に、今研究は ACL 損傷膝における術前要素のみを調べたものなので、さらに術後の臨床所見の内反不安定性に対する影響を調べていく必要がある。

<結語>

内反不安定性は ACL 損傷膝において健常膝よりも高かった。内反不安定性は MRI での LCL 損傷と同様、ACL に関連する不安定性にも関係していた。また、MRI は内反不安定性に関して特異

度が低かった。一方で、外反不安定性と ACL に関連する不安定性の関係は、内反不安定性のそれより低かった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5298　号 | 結城　新 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　大川　淳<br>副　査　秋田　恵一、神野　哲也 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

膝前十字靭帯の単独損傷においても、内反不安定性が比較的に高率に合併していることを、過去 7 年間 100 例を超える手術例を調査して明らかにした臨床研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

膝前十字靭帯（ACL）損傷では、膝不安定性によりスポーツ活動を含めた ADL に影響すれば靭帯再建術が行われる。近年長期的な手術後成績や再断裂に影響する因子として、前外側の靭帯構造に注目が集まっているが、その臨床的意義については十分な検討がなされてこなかった。本論文は追加手術を要さない程度の内反不安定性の合併頻度を MRI とストレス X 線計測を用いて、臨床的にはじめて明らかにした点で高い先駆性を有する。

２）社会的意義

本論文で明らかにされたのは次の点である。

１．ACL 単独損傷であっても一部の症例では内反不安定性（外側不安定性）が認められた。

２．MRI では軽度の外側側副靭帯損傷を 7 割以上に合併していた。

以上のように申請者は、膝前十字靭帯損傷には高率に subclinical な内反不安定性を合併しており、今後の手術の方法改良の根拠となる研究成果といえる。

３）研究方法・倫理観

研究は過去 8 年間に手術治療が行われた 119 例の診察所見と画像所見を対比することで行われており、申請者の臨床症例に対する深い洞察力を示唆している。膝靭帯損傷に関する十分な知識と経験に裏打ちされた臨床研究と評価できる。

４）考察・今後の発展性

本研究により内反不安定性が比較的高頻度に ACL 損傷に合併していることが示めされた。今後膝外側支持組織の状態と ACL 再建術の長期成績や再断裂との関連性がさらに明らかにされれば、ACL 再建術そのものの手術術式変更につながることが期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位を申請するにあたり、十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 前屋舗　千明 |
| 論文審査担当者 | 主査　清水　重臣<br>副査　稲澤　譲治、吉本　貴宣 |
| 論　文　題　目 | HADHA, the alpha subunit of the mitochondrial trifunctional protein, is involved in long-chain fatty acid-induced autophagy in intestinal epithelial cells |

（論文内容の要旨）

<要旨>

オートファジーはリソソームを分解の場とする細胞内の主要分解システムである。近年GWAS(ゲノムワイド関連解析)による研究で炎症性腸疾患（IBD）の疾患感受性遺伝子にオートファジー関連遺伝子が含まれていることが明らかになったが、オートファジーの制御因子が治療標的となり得るのかは未だ不明である。我々はオートファジーに関わる新規分子を同定するため、オートファジーモニターマウスとして広く使われている GFP-LC3 トランスジェニックマウス（以下 GFP-LC3 マウス）を用いた。GFP-LC3 マウスの小腸ではパネート細胞に LC3 が多く発現していることを確認し、GFP-LC3 マウスの腸上皮を用いた質量分析により HADHA（ミトコンドリア三頭蛋白(MTP)の α サブユニット）を LC3 結合タンパクとして同定した。HADHA は長鎖脂肪酸のミトコンドリア β 酸化を触媒することから、我々は長鎖脂肪酸が腸上皮においてオートファジーを誘導する可能性を検討した。その結果、代表的な長鎖脂肪酸であるパルミチン酸が腸上皮細胞株においてオートファジーを誘導することを見いだした。また、MTP をコードする HADHA がミトコンドリア分画だけでなく細胞質にも発現していることを見出した。細胞免疫染色で HADHA がミトコンドリア以外でパルミチン酸刺激誘導性に LC3 と結合している可能性が示唆され、HADHA がミトコンドリア以外で機能している可能性が見出された。さらに、パルミチン酸が腸上皮において細胞死を誘導し、オートファジー阻害剤により細胞死が増強することも明らかにした。このことから、パルミチン酸誘導性オートファジーが腸上皮のパルミチン酸誘導性細胞死を回避する方向で機能している可能性が示唆された。以上より、今回我々は、HADHA が腸上皮において長鎖脂肪酸誘導性オートファジーに関わっていることを見出し、炎症性腸疾患の病態解明や治療標的につながる新たな知見を見出した。

<緒言>

オートファジーはリソソームを分解の場とする細胞質成分の分解機構で、死細胞にはしばしばオートファゴソームの蓄積を認める。細胞の種類や刺激により異なってくるが、「オートファジーが誘導する細胞死」ではなく「オートファジーを伴う細胞死」を見ていることが多い。長鎖脂肪酸により誘導されるオートファジーと細胞死の関係はほとんど分かっていなかった。

これまでの研究でオートファジー関連遺伝子が炎症性腸疾患において重要な役割を担っている

可能性が示唆されてきたが、オートファジー制御因子が治療標的となり得るのかは不明である。また、食事や腸内細菌といった環境因子への曝露が炎症性腸疾患のリスク因子であることが言われており、過去の研究では脂肪酸と炎症性腸疾患の間に関連が報告されてきた。

ミトコンドリア三頭蛋白（MTP）は長鎖脂肪酸の β 酸化を触媒する多酵素複合体で、HADHA は MTP の α サブユニットをコードしている。ヒト MTP 欠損症ではライ様症候群や突然死などを引き起こす一方で、HADHA 欠損マウスでは長鎖脂肪酸代謝物の蓄積が報告され、HADHA ヘテロ欠損マウスでは脂肪肝やインスリン抵抗性を引き起こすことも報告されている。しかしながら、オートファジーにおいて HADHA が担う機能については詳細が分かっていない。

オートファジーが腸において重要な役割を担っていることを踏まえ、我々は腸上皮特異的な LC3 結合分子を見いだし、炎症性腸疾患の治療標的になり得るのかを検討した。

<方法>

GFP-LC3 マウスの小腸を蛍光顕微鏡にて観察した。そして、腸上皮における LC3 結合分子を同定するために、GFP-LC3 マウスの腸上皮細胞を単離し、GFP ビーズによる免疫沈降から液体クロマトグラフィー質量分析を行った。

また、パルミチン酸で大腸癌細胞株を刺激し、ウェスタンブロットおよび LC3 の細胞免疫染色でオートファジー誘導の有無を調べた。

続いて、質量分析にて同定された分子の局在を調べるために、大腸癌細胞株を細胞質分画とミトコンドリア分画に分けて、ウェスタンブロットを行なった。さらに、LC3 との共局在の有無を細胞免疫染色により調べ、パルミチン酸刺激の有無で変化があるのかを確認した。

最後に、長鎖脂肪酸で大腸癌細胞株を刺激し、細胞生存性試験を行った。また、長鎖脂肪酸にバフィロマイシンやクロロキンといったオートファジー阻害剤も加えた際の細胞生存率を調べた。

<結果>

GFP-LC3 マウスの腸管を蛍光顕微鏡で観察したところ、陰窩底部、特に Paneth 細胞で LC3 puncta が認められた。そこで、腸管上皮初代細胞を用いて GFP-LC3 に結合する分子を質量分析で解析し、HADHA を同定した。

HADHA が長鎖脂肪酸の β 酸化を触媒することから、我々は長鎖脂肪酸がオートファジーを誘導する可能性を検討した。食事中に最も多く含まれる飽和脂肪酸であるパルミチン酸で DLD-1 細胞、HT29 細胞、HCT116 細胞を刺激したところ、濃度依存性に LC3-Ⅱフォームが誘導され、パルミチン酸が複数の大腸癌細胞株においてオートファジーを誘導することが示唆された。また、DLD-1 細胞をパルミチン酸で 4 時間刺激した後に細胞免疫染色を行ったところ、LC3 puncta が劇的に増加し、パルミチン酸が大腸癌細胞株においてオートファジーを誘導することを明らかとした。

次に、我々は HADHA の局在を調べるため、細胞質分画とミトコンドリア分画の解析を行った。その結果、DLD-1 細胞および HT29 細胞において HADHA はミトコンドリア分画と細胞質分画の両方で発現が認められた。この局在はパルミチン酸刺激により変化を認めなかった。また、DLD-1

細胞において LC3 と HADHA の細胞免疫染色を行ったところ、HADHA の一部において LC3 が共局在し、パルミチン酸刺激により共局在が増えることが分かった。Tom20 も HADHA と共局在していたが、パルミチン酸刺激による変化を認めなかった。また、LC3 puncta と Tom20 の共局在が明らかでなかったことから、HADHA はミトコンドリア以外で LC3 と共局在していると考えられた。これらの結果から、HADHA が腸上皮細胞において LC3 と結合し、ミトコンドリア以外で何らかの機能を担っていることが示唆された。

続いて我々は、脂肪酸の蓄積が脂肪毒性により細胞死を誘導するため、細胞生存性を調べた。その結果、パルミチン酸が腸上皮細胞において濃度依存性に細胞死を誘導することを明らかとした。また、オートファジー阻害剤であるバフィロマイシンやクロロキンを加え検討した。パルミチン酸単剤では細胞死が誘導されなかった 8 時間後に、パルミチン酸に加えてオートファジー阻害剤も投与したところ、細胞死が強く誘導された。したがって、腸上皮においてオートファジーが細胞死を回避する方向で機能している可能性が示唆された。また、オレイン酸やリノレン酸といった他の長鎖脂肪酸でも腸上皮で細胞死が誘導されることが分かった。

<考察>

今回、腸上皮における LC3 結合分子として新たに HADHA を同定した。HADHA はミトコンドリアで機能すると考えられているが、元来ガストリン結合タンパクとも言われ、ガストリン結合タンパクの中には細胞膜に局在するものがある。実際、我々の解析により HADHA がミトコンドリアのみならず細胞質分画にも局在し、ミトコンドリア以外で何らかの重要な役割を担っている可能性が考えられた。さらに、Tom20 はパルミチン酸刺激誘導性に LC3 との共局在が増えなかったことから、パルミチン酸はミトファジーを誘導している訳ではないと考えられた。今後、HADHA が LC3 とどのような機能を担っているのか詳細な解析が必要である。

これまでの研究で、内皮細胞や膵島細胞においてパルミチン酸がオートファジーを誘導することが報告されてきたが、パルミチン酸がオートファジーに与える影響は細胞の種類により様々であった。今回我々は、腸上皮においてもパルミチン酸がオートファジーを誘導することを見出した。また、肝細胞において長鎖脂肪酸がアポトーシスを誘導することや、内皮細胞ではオートファジーを抑制するとパルミチン酸誘導性ネクロプトーシスを回避することが報告されている。我々の研究ではパルミチン酸によるオートファジー誘導が腸上皮細胞の生存を助けている可能性が示唆され、オートファジーと細胞死の関係を紐解く新たな分子機構の解明に展開できると期待された。

<結論>

今回我々は、腸上皮において長鎖脂肪酸がオートファジーおよび細胞死を誘導することを見出した。この知見は長鎖脂肪酸がオートファジーを介して腸の恒常性に関与している可能性を示唆している。また、我々は LC3 に結合する新規分子として HADHA を同定し、腸上皮において HADHA がパルミチン酸誘導性オートファジーに関わっていることを初めて見出した。さらなる分子機能解析により、炎症性腸疾患の病態解明や新たな治療標的に繋がる可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5299　号 | 前屋舗　千明 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　清水　重臣<br>副　査　稲澤　譲治、吉本　貴宣 |
|---|---|

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、長鎖脂肪酸が誘導するオートファジーが、同時に生じる細胞死を抑制する機能を有していること､このオートファジーに長鎖脂肪酸のβ酸化に関わる hydroxyacyl-CoA dehydrogenase αサブユニット(HADHA)が関与している可能性が有ることを見出した論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究では、LC3に結合する新規タンパク質としてHADHAを見出したほか、長鎖脂肪酸負荷が細胞に与える影響を解析したものであり、一定の評価ができる。

２）社会的意義

本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。

1.パネート細胞においてオートファジーが強く活性化されていることを、GFP-LC3トランスジェニックマウスを用いて見出した。

2. このマウスの腸管上皮細胞において、GFP−LC3と結合している分子として、HADHAを同定した。

3. HADHAは、通常ミトコンドリア内膜に存在するが、細胞質にも存在しており、LC3とは細胞質で結合している可能性を見出した。

4. 大腸がん由来の細胞に長鎖脂肪酸を投与すると、オートファジーと細胞死が同時に誘導され、このオートファジーは細胞死に対して抑制的に機能していることを見出した。

３）研究方法・倫理観

本研究は、細胞生物学や消化器内科学の知識を基盤として遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力に問題ないことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

研究の動機付けはクローン病の病態とオートファジーとの関連を明らかにしようとするものであったが、今回同定したHADHA分子が、オートファジーをいかに調節しているか、クローン病の病態に如何に関わっているかは不明である。今後、クローン病との関連を解析することにより、

本研究はさらに発展するものと思われる。

３．その他　なし

４．審査結果

　以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 三上　さおり |
| 論文審査担当者 | 主査　森尾　友宏<br>副査　横関　博雄、清水　重臣 |
| 論　文　題　目 | Discrete roles of intracellular phospholipases $A_2$ in human neutrophil cytotoxicity |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ホスホリパーゼ$A_2$は細胞膜リン脂質のsn-2を加水分解して脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素で、30種類以上が存在する。構造学的および触媒的な特徴から、cytosolic $PLA_2$ ($cPLA_2$)、secretory $PLA_2$ ($sPLA_2$)、$Ca^{2+}$-independent $PLA_2$ ($iPLA_2$)、platelet-activating factor acetylhydrolase、lysosomal $PLA_2$の５つの主要な酵素に分類される。カルシウム非依存性ホスホリパーゼ$A_2$（$iPLA_2$）は生体の様々な細胞に分布し、細胞膜のリモデリング、アラキドン酸やエイコサノイドの産生など多様な機能が考えられているが、急性炎症反応への役割は未だ明らかではない。$iPLA_2$は好中球の細胞毒性への関与が報告されているが、どのアイソザイムが関与しているかは十分に検討されていない。好中球の細胞毒性は、$cPLA_2$の活性化によって細胞膜リン脂質から遊離したアラキドン酸が主要な役割を果たしていると考えられているが、我々は、$iPLA_2$はヒト好中球の細胞毒性の発現に対する主要な酵素であると仮定した。本研究の目的は、$iPLA_2$の2種類のアイソザイムである$iPLA_2\beta$と$iPLA_2\gamma$の特異的阻害剤であるS-BEL、R-BELと、$cPLA_2$特異的阻害剤であるpyrrophenoneを用いて細胞内に局在する$iPLA_2$と$cPLA_2$の役割を明確にし、ヒト好中球の細胞毒性を誘導するアラキドン酸以外のシグナル伝達物質が存在する可能性を示すことである。

＜方法＞

分離したヒト好中球に、$iPLA_2$（β、γ）の特異的阻害剤であるS-BEL、R-BEL、あるいは$cPLA_2$の特異的阻害剤であるpyrrophenoneを添加して、37℃で10分間保温振盪した。その後、formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)で好中球を活性化して、細胞外で産生された活性酸素をcytochrome c 還元法で測定した。同様に、エラスターゼ遊離能はエラスターゼ特異的基質を使用して評価した。各阻害剤の濃度は、S-BEL 5uM、R-BEL 20uM、pyrrophenone 1.0uMを使用した。また、濃度依存性の実験では、S-BELは0.5-5uM、R-BELは1-10uM 、Pyrrophenoneは0.01-1.0uMの濃度を用いた。さらに、$PLA_2$酵素の好中球プライミング現象への関与を検討するために、好中球をplatelet activating factor (PAF)でプライミングし、fMLPあるいはPMAで活性化して活性酸素をcytochrome c 還元法で測定した。また、Boydenチャンバーによる遊走能の検討では、fMLPあるいはPAFに対する各阻害剤を添加した好中球の遊走反応を、下層チャンバーに移動した細胞数を計測することによって評価した。

＜結果＞

活性酸素産生について、R-BEL は fMLP 刺激に対して 90％抑制し、S-BEL は 45%の抑制を示した。PMA 刺激では R-BEL のみ部分的に抑制した。$cPLA_2$特異的阻害剤である pyrrophenone は fMLP や PMA による活性酸素の産生を抑制しなかった。各阻害剤の濃度依存実験では、fMLP 刺激に対して、R-BEL および S-BEL は濃度依存性を示した。PMA 刺激では、R-BEL は濃度依存的に抑制したが、pyrrophenone ではいずれの濃度でも抑制されなかった。

ヒト好中球プライミングへの関与を検討する実験では、PAF でプライミングした後、fMLP あるいは PMA で活性化して活性酸素産生を測定した。PAF/fMLP では、R-BEL は完全抑制したが、S-BEL や pyrrophenone では抑制されなかった。また、PAF/PMA に対して、いずれの阻害剤も抑制しなかった。

エラスターゼの遊離に関して、R-BEL は fMLP あるいは PMA によるエラスターゼの放出を完全に抑制した。一方、S-BEL は両刺激に対して約 50%の抑制を示した。各阻害剤の濃度依存性実験では、R-BEL、S-BEL 共に濃度依存的に抑制したが、pyrrophenone はいずれの濃度でも、fMLP、PMA 刺激に対する抑制効果を確認できなかった。

遊走能の検討では、R-BEL は fMLP あるいは PAF による遊走をほぼ完全に抑制したが、S-BEL や pyrrophenone は好中球の遊走を阻害することはできなかった。

＜考察＞

iPLA2 非選択的阻害剤である BEL を使用した過去の報告では、$iPLA_2$は好中球の活性酸素の産生に関与すること示唆されているが、どちらのアイソザイム（β、γ）が関与しているかは不明であった。したがって、本研究では、$iPLA_2\beta$ と γ の役割を明確にするために、$iPLA_2\beta$、$iPLA_2\gamma$ に対する特異的阻害剤である S-BEL、R-BEL を使用した。我々の検討では安静時好中球や PAF でプライミングされた好中球に対する fMLP 刺激によって産生される活性酸素は R-BEL で完全に阻害されたが、S-BEL は部分的に抑制した。したがって、$iPLA_2\gamma$ は、レセプター依存性の活性酸素の産生において極めて重要な酵素である可能性がある。一方、安静時好中球やプライミング好中球に対する PMA 刺激の場合、R-BEL は部分的抑制か、抑制効果の確認はできなかったことから、$iPLA_2\gamma$ はレセプター非依存的刺激による細胞外活性酸素産生に関与していないかもしれない。

$iPLA_2$と脱顆粒の関連性について、Balboa らは BEL や $iPLA_2$ antisense oligonucleotide は PAF や PMA 刺激による promocyte からのライソゾームの分泌を抑制することを報告しているが、$iPLA_2$ のどのアイソザイムが脱顆粒に関与しているかは明らかではなかった。本研究では、R-BEL が fMLP あるいは PMA 刺激によるエラスターゼ放出を完全に抑制し、S-BEL は部分的に阻害したことから、レセプター依存性および非依存性のエラスターゼ放出のシグナル伝達に、$iPLA_2\gamma$ がより強く関与している可能性がある。また、Balboa らは、$iPLA_2$欠損細胞において、$iPLA_2$の代謝産物である lysophosphatidylcholine (LPC)を投与することによって、ライソゾームの分泌能を回復させることを明らかにしている。以上より、その機序は未だ明確ではないが、$iPLA_2\gamma$ の活性化によって産生される LPC が好中球の脱顆粒に重要な役割を果たしている可能性がある。

Mishraらは、細胞内$PLA_2$である$iPLA_2$、$cPLA_2$はヒト単球のchemokine monocyte chemoattractant protein 1 (CMCP-1)に対する遊走能に対して必須であることを報告している。iPLA2βが関与するリゾリン脂質と$cPLA_2\alpha$が関与するアラキドン酸が、単球の遊走能におけるセカンドメッセンジャー

として作用することを示した。本研究では、fMLPやPAFに対するヒト好中球の遊走は、R-BELで完全に抑制されて、S-BEL、pyrrophenoneでは抑制されなかった。また、Melitonらは、pyrrophenoneはインターロイキン-8に対する好中球の遊走を部分的に阻害することを報告している。したがって、細胞内に局在する$PLA_2$の遊走能への関与は、細胞種や遊走刺激物質によって異なることが示唆される。

iPLA2γは極めて特徴的な基質特異性を有する。すなわち、リン脂質のsn-2にアラキドン酸やDHAなどの多価不飽和脂肪酸がエステル結合しているphosphatidylcholineの場合、$iPLA_2\gamma$は$PLA_2$に分類されているがPLA1作用を示し、リン脂質のsn-1を加水分解して主に飽和脂肪酸と2-arachidonoyl-LPC (2-AA-LPC)などのリゾリン脂質を遊離させる。2-AA-LPCはlysophospholipase Cを介して2-arachidonoylglycerol（2-AG）に代謝される。同様に、2-AA-LPCからlysophospholipase Dによって2-arachidonoyl lysophosphatidic acidが産生される。これらの脂質は生物活性を有しており、アラキドン酸と共に、好中球の細胞毒性のシグナル伝達に関与する可能性がある。

アラキドン酸は主に $cPLA_2\alpha$ の活性化によって細胞膜リン脂質から産生される。$CPLA_2\alpha$ は哺乳類の様々な細胞に存在し、遊離したアラキドン酸は leukotriene や prostaglandin、thromboxane などのエイコサノイドに代謝され、互いに協調して急性・慢性炎症において機能している。エイコサノイド産生とは別に、アラキドン酸は好中球に直接作用し、接着分子の細胞表面への発現を促進し、活性酸素産生や脱顆粒を誘導することが報告されている。しかしながら、炎症刺激に対する好中球の生物活性の発現は、同時に細胞内に産生されるアラキドン酸と無関係に誘導されることがいくつかの文献が報告している。Rubin らの報告によると、$cPLA_2\alpha$ 特異的阻害剤によって抑制された好中球、または遺伝子的に $cPLA_2\alpha$ を欠損させた好中球は、アラキドン酸を産生しないにもかかわらず、活性酸素産生や脱顆粒を全く抑制されないことから、アラキドン酸は生物活性の発現においてセカンドメッセンジャーとして機能していない可能性がある。これらのことから、$iPLA_2\gamma$ 酵素の活性によって産生された脂質メディエータが、好中球の細胞毒性を誘導しているかもしれない。

＜結論＞

$iPLA_2\gamma$ は、ヒト好中球の細胞外活性酸素産生、エラスターゼ遊離、遊走能において重要な酵素であることが示された。また、$cPLA_2$特異的阻害剤はヒト好中球の細胞毒性の発現を抑制できなかったことから、好中球の活性化には、アラキドン酸以外に $iPLA_2$酵素と関連したシグナル伝達物質が存在することが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5300　号 | 三上　さおり |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　森尾　友宏<br>副　査　横関　博雄、清水　重臣 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

ホスホリパーゼ $A_2$（以後 $PLA_2$）には、cytosolic $PLA_2$($cPLA_2$)、secretory $PLA_2$($sPLA_2$),カルシウム非依存性 $PLA_2$($iPLA_2$)などがあり、それぞれにはアイソフォームが存在する。今まで好中球の殺菌作用には、$cPLA_2$の活性化により細胞膜リン脂質から遊離したアラキドン酸が主たる役割を果たしていると考えられてきた。本論文では、$iPLA_2$のアイソフォームの中でも特に iPLA2γ が、好中球において、様々な刺激後の活性酸素産生、エラスターゼ放出、遊走に関与していることを初めて明らかにした。iPLA2γ はまた、アラキドン酸以外のメディエータを介して作用することも示唆した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

$iPLA_2$には9つのアイソフォームがあるが、今まではiPLA$_2$βに注目された検討が行われており、どのアイソフォームが好中球において重要な役割を果たすのかが明らかではなかった。このような背景の下、申請者はヒト好中球にプライミング刺激、活性化刺激を加え、iPLA$_2$β、iPLA$_2$γ、$cPLA_2$それぞれの特異的阻害薬を用いて、細胞内に局在するiPLA$_2$とcPLA$_2$の役割を解析した。また$PLA_2$によって誘導されるアラキドン酸以外のシグナル伝達物質の関与を明らかにすべく検討を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１.ヒト好中球にPAF/fMLP刺激を加えると、活性酸素産生が誘導されるが、iPLA$_2$γ阻害薬はこれらをほぼ完全に抑制した。一方、iPLA$_2$β阻害薬やcPLA$_2$阻害薬による抑制は認められなかった。iPLA$_2$γ阻害薬はfMLPやPMA刺激後の活性酸素産生を抑制し、その作用は濃度依存的であった。

２.エラスターゼ遊離や遊走能検査においても、iPLA$_2$γ阻害薬の抑制効果が明らかであった。

以上のように申請者は、iPLA$_2$γが好中球活性化において鍵になるPLA$_2$アイソフォームであることを明らかにしている。これは好中球の活性化を制御する手段を開発する際に重要な知見であり、臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究にはヒト好中球が用いられ、活性酸素産生、エラスターゼ遊離、遊走能の計測を多検体で行った。ヒト好中球には様々な刺激が加えられ、プライミングと活性化を分けた検討が行われた。これらの実験において、$iPLA_2$アイソフォーム、$cPLA_2$の特異的阻害薬が用いられ、それぞれの抑制効果を検証した。本手法は十分な生理学的および生化学的知識の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について、先行研究も鑑みて、$iPLA_2\gamma$の作用はアラキドン酸非依存的であり、リゾホスファチジルコリンが関与している可能性があると考察している。作用点を明確にすることにより、好中球の活性化と抑制を制御できるようになる可能性がある。これは極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 畑　伸秀 |
| 論文審査担当者 | 主査　中村　桂子<br>副査　藤原　武男、伏見　清秀 |
| 論　文　題　目 | Comparative analysis of knowledge on Schistosomiasis japonica in the local people in the former endemic area in Yamanashi Prefecture, Japan: comparisons among the background of age and occupation |

（論文内容の要旨）

**＜要旨＞**

山梨県は 1996 年度に日本住血吸虫症の流行終息宣言を行い、2001 年度をもって流行監視事業も終了した。しかし、山梨県は過去 100 年以上前から官民挙げての流行対策事業を進め、他の地域に例を見ないような住民の本症への認知度と予防対策の知識が住民の間に蓄積していた。本研究では流行終息宣言から 20 年を経て、日本住血吸虫症の旧流行地である山梨県の住民を対象に日本住血吸虫症の認知度をアンケート調査し、これを中学生および成人集団について過去の状況と比較解析し、流行地自治体主体で進められてきた日本住血吸虫症対策の知識と経験がどのように継承されているかを調査した。その結果、中学生集団では日本住血吸虫に関する認知度はほぼゼロに近くなっていたが、成人集団のうち、実際に本症流行を経験した高年齢層では過去と比べてほぼ同等の認知度が維持されていた。しかし、若年齢層では義務教育期間に予防対策の授業を受けていたにもかかわらず、認知度は著しく低下していた。一方、獣医師集団を対象とした調査では、本症に関する認知度について一般成人集団と比べて有意に高い認知度であったが、実体験をもつ高年齢層に比べて若年齢総獣医師では認知度に質的な差異が認められた。日本住血吸虫症対策で推進された感染予防の知識と行動は、今後起こりうる新たな感染症流行にも応用可能なことであり、そのための知識を獲得している獣医師集団には、感染症流行に一定の貢献が期待されることが確認できた。

**＜緒言＞**

日本住血吸虫症は血管内寄生の日本住血吸虫 (*Schistosoma japonicum*)による感染症である。その生活史に中間宿主である淡水産巻貝、ミヤイリガイ (*Oncomelania hupensis nosophora*)を必要とするため、流行地はミヤイリガイの流行地に限定され、流行形態としては風土病となるのが特徴である。日本国内にもかつては流行地が点在していた。特に山梨県甲府盆地、岡山県から広島県にわたる備後地方、および福岡県と佐賀県にまたがる筑後川流域の３地点は大きな流行地として知られていた。そのうち、備後地方と筑後川流域では、ミヤイリガイの生息密度が急速に低下して、1960 年代には流行が終息していったが、甲府盆地ではミヤイリガイの生息が今日も残っており、人体症例が 1977 年までみられていた。しかし、官民挙げての流行制圧事業の結果、1996 年

に山梨県知事が流行終息宣言を行い、さらに 5 年間の流行監視事業を継続した後、2001 年度ですべての疾病監視事業も終了して今日に至っている。

日本住血吸虫はミヤイリガイに寄生する有尾幼虫（セルカリア）が水中で游出してヒトを含む哺乳類宿主に経皮感染する。ヒト以外のウシ、ブタ、ヤギなど家畜動物にも感染する人獣共通感染症の病原体である。成虫は腸間膜静脈から肝門脈内に寄生し、産下した虫卵が肝臓や腸管粘膜の毛細血管に塞栓して、虫卵周囲に肉芽腫性炎症が起こることが病因とされ、肝線維症、門脈圧亢進症、腸粘膜の炎症などが発症する。さらに大腸がん、肝がん、てんかんなど多彩な症状を呈し、食道静脈瘤破裂などで死に至るケースがかつては見られていた。現在では特効薬のプラジカンテルで駆虫も容易になっているが、過去 40 年以上に亘る単剤使用は薬剤耐性住血吸虫の出現を誘導するとも考えられている。備後地方の流行地で記された片山記や、山梨県内の旧流行地の謡曲にある「水腫腸満」など、肝臓病変が特徴とされてきた。

わが国は 1977 年を最後に新規患者の報告はなく、今日国内で報告のある住血吸虫症患者はすべて輸入症例である。山梨県では中間宿主のミヤイリガイが未だ生息しているにもかかわらず、疾病流行は終息しており、これは世界に例を見ない快挙とされている。住血吸虫症の流行制圧については WHO がモデルアプローチを提唱しており、患者の捕捉と治療 (Case management)、中間宿主貝対策、生活用水およびし尿管理（環境整備）、衛生教育の徹底などをあげている。日本では特効薬 プラジカンテルの導入以前に流行制圧を完了しているため、Case management 以外のアプローチから流行を制圧したことになる。そのためには流行地住民一人一人が日本住血吸虫とその感染症について正しく認識し、科学的根拠に基づく感染予防行動を取り、住民主体となった中間宿主貝監視活動を実施したことが成功をもたらしたとされている。特に流行地住民の疾病認知度は極めて高かったことが成功の最大要因とされるが、それには小学校教師による学校保健活動、行政からの不断の衛生キャンペーン、地域の医療関係者による情報提供などがかかわっていた。

流行地住民の流行制圧のための適切な知識が一旦十分なレベルで確立した場合に、公衆衛生学的観点からはその状況の持続性 (Sustainability)の確保が極めて重要である。山梨県では中学生や一般成人の日本住血吸虫症に関する認知度を定期的にモニターしてきた。しかし、今日では行政的な流行制圧に関するキャンペーンが終了して 15 年を経過して、住民の認知度がどのような状況であるのか不明である。感染症の流行予防では、必要とされる知識の多くは共通している。そのために、山梨県で旧流行地住民に普及した病気の知識と感染予防のための知識を今後のさまざまな感染症流行に際しても応用活用することが十分に可能と考えられる。その意味で、かつての流行地住民の間で確立したさまざまな知識は今後も継続して保持されることが望ましい。

本研究では、過去に実施した山梨県流行地住民の日本住血吸虫症に関する認知度調査結果と今日の状況を比較して、この 15 年間の間に疾病認知度の持続性がどのようになっているのかを明らかにするとともに、本症の流行を実際に体験した年齢層とそうでない年齢層とでの認知度の比較、本症にかかわる専門性のある職業集団とそうでない一般住民との比較などを通じて、山梨県内の旧流行地で一旦確立された疾病予防に関する知識を今後の継続していることの可能性について検討することとした。特に日本住血吸虫症は人獣共通感染症であり、その流行監視や流行予防などに獣医学領域の専門家の貢献は期待されるところであり、今回は獣医学の専門家の認知度を指標として解析を加えた。

＜材料と方法＞

対象集団

山梨県の日本住血吸虫症旧流行地住民を対象とした。年齢層として 4 つの群を設定した。(1) 中学生 (N = 1,949)、(2) 20-39 歳の成人 (A 群　N = 62)：流行終息宣言の時は未成年で、学校保健で日本住血吸虫症の教育を受けているが実際の病気の流行を知らない年齢層、(3) 40～54 歳の成人 (B 群　N = 100)：流行終息宣言の時に成人であったが病気の流行は経験していない年齢層、(4) 55 歳以上の成人(C 群　N = 157)：病気の流行を経験した年齢層、である。日本住血吸虫症に関する専門知識を持っていることが期待される集団として獣医師およびその関係者 (N = 109)を検討した。獣医師集団も同様の年齢階層に分け、39 歳以下（A'群　N = 28）、40～54 歳（B'群 N = 36）、および 55 歳以上（C' 群　N = 45）であった。

アンケート調査

中学生対象のアンケートと成人対象のアンケートの 2 種類を用意した。ともにかつて山梨県が住民対象に実施した認知度モニター調査のアンケートと質問項目を極力一致させた。アンケートはすべて無記名で回答してもらった。中学生の場合は教育委員会の承認を得て学校長に説明し同意が得られた場合に限って調査を依頼し、学級担任を通じて生徒の回答を回収した。対象としたのは甲府市、甲斐市、中央市、韮崎市、南アルプス市、昭和町の公私立中学である。成人の場合は地域の医療機関や公的イベントに参加した人を対象として同意が得られた人について調査した。郵送または直接手渡しで回収した。獣医師集団については、山梨県獣医師会の会員を対象として一般成人と同じアンケートに回答をしてもらった。

アンケート調査実施については東海学院大学「人を対象とする研究」に関する倫理審査委員会（承認番号:2016-12）および比較統合医療学会の倫理審査委員会（承認番号:第 28-001 号）で承認を得てから実施した。

有意差検討

中学生については 1961 年に山梨県衛生研究所で実施した太田らの調査結果と比較した。成人集団については質問事項ごとの年齢層集団間の比較を行った。2 x 2 表を作成し、有意差検討は $\chi^2$ 検定により判断し、$p<0.05$ を有意差と判定した。相関の強さの判定のために Odds ratio も計算した。

＜結果＞

旧流行地中学生の認知度調査

1,949 名の中学生からの質問票を回収して解析した。これは 1961 年または 1975 年の調査資料との比較が主な目的である。自らの居住地が日本住血吸虫症の流行地であったことの認識も一般に低く、5%に満たない認知度である。一方、1961 年の調査結果では日本住血吸虫とその感染症の症状、感染経路、中間宿主であるミヤイリガイなどについて、当時の流行地の住民は 90%以上の認知度を持っていた。今日の中学生集団では病原体、感染経路、中間宿主などに関する知識は極めて低い。しかし、今回調査した地区の中では、昭和町の中学生集団で他の地区と比較して比較的高い認知度があることもわかった。例えば中間宿主の知識では、昭和町の中学生集団は今回調査した他の地区の中学生集団と比較して有意に高い頻度で知識を持っていた (P<0.01)。Odds ratio

で検討すると、最大で 9.79 倍の認知度であることがわかった。このように、中学生の日本住血吸虫症に関する認知度が半世紀前と比較して大きく低下している中で、有意な地域差があることがわかった。

旧流行地の一般成人集団の認知度

一般成人集団は、日本住血吸虫病の実体験の有無、本症に関する行政キャンペーンへのアクセス経験などの状況から A 群、B 群、C 群と 3 つの年齢階層を設定して調査した。調査対象者の性比については B 群の女性比率がやや高かったが ($p<0.05$)、特に補正はせずに以下の解析を進めた。年齢階層による比較から、一般集団における日本住血吸虫症の認知度が年齢依存的であることが明らかになった。質問事項のほぼすべてにおいて高年齢者群である C 群で有意に高い認知度を示していた。A 群と B 群はともに小学校で本症に関する保健授業を受けた年齢層であるが、県知事による流行終息宣言を含む行政機関からの公知活動に接する時期が成人であったか未成年であったかで分けたが、一部の質問については A 群と B 群間に有意差が認められており、行政活動に対する関心、接触などの経験による違いがある可能性も考えられた。しかし、日本住血吸虫病の認知度に年代間の差異があるものの、若い年代でも本症を知っている人では症状や感染経路などかなり正確な知識を持っていた。今日では特効薬であるプラジカンテルによって安全に駆虫ができることの知識は比較的認知度が低かった。

山梨県内の獣医師集団の認知度

獣医師集団における性比は一般集団のものと比較して有意に男性比率が高かった ($p<0.01$)。職業特性によるものと考えて、そのまま以下の解析を進めた。一般成人集団と同様に 3 つの年齢階層に分けて、獣医師集団内の年齢階層間の比較と、一般集団との比較をおこなった。獣医師集団内における年齢階層間では、日本住血吸虫病の認知度に有意差はなく、若年齢群（39 歳以下）でもほぼ 90％の認知度があった。しかし、症状や感染予防など、主にヒトの病気としての関連知識については、高年齢層（55 歳以上）の方が正確な知識の保有頻度が有意に高く ($p<0.05$)、実体験としての日本住血吸虫病の知識という点で、一般成人集団と同様の傾向を示した。一方、年齢階層を固定して一般成人集団と獣医師集団とを比較した結果、いずれの質問項目でも若年齢層では獣医師集団の認知度が有意に高かったが、C 群と C’群の比較では、質問項目によっては有意差がない場合もあり、流行を実際に経験した年齢層では日本住血吸虫症の認知度に関して他の年齢層よりは明確ではなかった。

＜考察＞

今回の研究は山梨県の日本住血吸虫症流行終息後 20 年、および山梨県の公的な疾病制圧活動終了 15 年の時点で、かつて流行地住民の間にほぼ 100％の認知度が確立した日本住血吸虫症の知識がどのように変化したかを確認する初めての研究である。感染症対策においては正しい知識に基づく行動変容が重要である。かつての山梨県ではそれがほぼ完ぺきに達成され、住血吸虫症の流行制圧に成功した世界でも例外的な事例となっている。過去 100 年以上の歳月をかけて獲得した流行地住民の誇るべき“知的財産”がどの程度の期間維持されるのかについては、今の山梨でなくては実証できないことであり、研究の意義が大きいと考えた。

かつて山梨県の流行地では健康診断や中間宿主対策と並行して、住民の日本住血吸虫症につい

ての保健教育が精力的に行われていた。県や市町村役場が主体となったキャンペーン活動、地域の医療者が率先した住民治療と予防啓もう活動、そして義務教育期間中の教師による学校での保健教育など、今日の世界で推進されている感染症制圧事業のパッケージがすでに 100 年前の山梨で実行されていたのである。その成果として、山梨県の日本住血吸虫症の流行終息が宣言され、21 世紀初頭には上記の監視活動や教育活動がすべて終了した。その後の 15 年間は、行政としての教育活動は一切行われていない。すなわち、山梨県における旧流行地住民に対しては 15 年前が流行防止対策に関する各種情報の最後のインプットであったことになる。

今回の調査では中学生の年代間比較と成人集団の世代間比較で興味ある結果が明らかになった。50 年前に実施された認知度調査では、流行地内中学生の日本住血吸虫症理解度はほぼ完ぺきであった。その理由は学校保健教育と家族を含む成人たちとの知識の共有という背景があったことと思われる。一方で今日の中学生は学校教育での知識取得の方法はなく、地域社会の人間関係の希薄化も進み、本症に関する情報接触の機会は個々の能動的な情報収集がない限りゼロに近い状況と推測され、実際に日本住血吸虫症に関する知識を有する中学生もほぼゼロに復している。すでに本症感染の危険はなく、ある意味当然の状況と理解できる。それに比較して、成人集団の調査で観察されたことは極めて示唆的であった。成人集団は 3 つの集団にわけて調査した。55 歳以上の集団（C 群）は実際に日本住血吸虫症流行を経験した世代である。40―54 歳（B 群）は実際に流行を経験してはいないが、県や市町村の各種対策事業には成人として接した世代であり、20-39 歳の若い群（A 群）は流行対策事業の実施時期にまだ未成年であった世代である。C 群の住血吸虫症に関する知識保有状況は 50 年前に実施された調査結果と比較してほとんど変化がない。住血吸虫病に関する病気、予防、治療等に関する知識はほぼ完全に保持されていたことになる。Ｂ群に比べて有意に高い認知度であった。B 群、C 群ともに義務教育における保健教育が実施されていたことを考えると、実際の病気の流行を経験したことで疾病認知度、予防・治療の知識が不可逆的に定着したことを強く示唆する。A 群とＢ群とでも認知度に有意差があり、行政による流行対策活動が実施されていたころの年齢による理解度の違いと解釈される。

質問事項の中で、「安全な治療薬があること」ということについては、C 群でさえも比較的認知度が低いことも興味ある結果であった。住血吸虫症の特効薬であるプラジカンテルが実用化されたのは 1977 年代半ばであるが、その頃までに山梨県の住血吸虫症流行はほぼ終息しており、プラジカンテルによる住民治療は実施されていない。流行継続時の本症の治療はスチブナールという 5 価のアンチモン製剤の静脈注射で行われていた。20 日間連続投与が必要であり、副作用もかなり強いものであったため、「住血吸虫症の治療はきつい」という認識が一般的であった。そのことからすると、C 群で認知度が比較的低いことの意味と A 群での低値とでは意味が異なると思われ、C 群では「副作用も強く、安全な治療薬はない」という当時の正しい情報が維持されていたと考えられる。一方で A 群の低値は知識不足を反映するものと思われる。

中学生対象の調査では認知度がほぼゼロに近い結果であったが、それは情報インプットがなかったためと解釈した。それでは、今日の中学生に山梨県の日本住血吸虫症流行に関する情報インプットの方法はないのであろうか？今日の中学生の生活環境で住血吸虫症流行に関する情報に接する機会として、山梨県立博物館の常設展示、市町村に設置されている流行記念館などの文化施設が考えられる。中学生が如何に積極的にそれらの施設で情報を得るかということ以外に方法は

乏しいと思われる。中学生のデータで興味があったのは、中学校の設置市町村間での認知の違いである。特にS町の中学生で他の市よりも認知度が高いことがわかった。このことに関しては、S町の小学校児童がS町内に設置してある住血吸虫症流行資料館見学をおこなうカリキュラムがあるとのことであり、そのことが反映されていると考えられた。

住血吸虫症の流行対策についての質問については、中学生を含む若年者層で認知度が低かったものの、「知っている」と回答した場合に記入してもらった内容がほぼ正答であったことは興味深い。実際の流行対策として実施された中間宿主貝駆除やモニタリング、田の畔のコンクリート溝渠化、土地利用の変更などを若年齢層でも回答していたことは、居住地の生活環境からも知識を得ることが可能であることを意味する。それぞれの対策事業がどのような意味があったのかまで掘り下げて質問しなかったが、一部の人たちでその意味を考えることまで進むならば大変良いことである。

獣医師集団についての質問調査も実施した。この集団では大学で寄生虫学教育を受けていることから、住血吸虫症に関する一般的な知識を得ている。比較的若年齢層であるA'群、B'群では、一般成人集団の同じ年齢層と比較して有意に高い認知度が確認された。このことは、社会の中で接触の機会が多いことが考えられる同じ年齢層で、獣医師集団が住血吸虫症についての情報ソースとして機能する可能性を示唆する。また、獣医師集団内であっても、高年齢層であるC`群はより高い認知度を持っていることが確認され、病気の流行を体験したことによる生きた知識として長く保持されることが考えられた。一般成人集団のC群と獣医師集団のC`群とで有意差はあるものの Odds ratio から見た認知度の違いは大きくなく、経験から得た知識の定着効率の強いことが再確認できた。一方で、獣医師集団内でも、大学教育の講義を通じて得た知識と実体験を通じて得た知識には質的な違いがあることもわかった。

これらの結果から確認できることは以下の通りである。山梨県による公的な流行対策事業が終了した結果、それ以降に生まれた中学生集団では、基本的に住血吸虫症に関する認知度はほぼゼロになってしまった。一方で、実体験として日本住血吸虫症流行を知っている世代では50年の時間経過を挟んで、認知度にはさほど大きな変化は起きていない。しかし、その認知度は時間経過に応じて低下してきており、日常生活上の脅威としての住血吸虫症の流行終息は、たとえ義務教育で授けられたとしても保健衛生知識の持続は極めて困難であることが明らかである。

山梨県にとって住血吸虫症流行の知識と経験は保持されるべきものであろうか？住血吸虫症は寄生虫病であり、ワクチンが実用化されていない感染症である。感染症の予防は一般論としてすでに確立されており、その知識をもとに感染を回避する行動をとるようにすることに努める。うがいと手洗いなどはほとんどすべての感染症の予防に有効であり、一つの感染症について習得した予防の知識と行動は他の多くの感染症にも有効である。その意味で、住血吸虫症の感染予防について獲得した旧流行地住民の知識と行動は今後の感染症対策にも応用可能であろう。山梨県の旧流行地住民が獲得した正しい知識と経験や行動は今後に引き継がれることに大きな意義がある。現在の若い世代では住血吸虫症流行を体験することは不可能であるが、県内各所にある博物館や資料館などの文化施設でも過去の経験を学ぶことが可能である。そして、今日の中学生にとっても、知識ソースとして機能しうることが今回の調査研究で確認でした。さらに、住血吸虫症を知る職能集団として獣医師集団を調査した結果、十分な知識と保有していることが明らかにな

った。実体験を持つ集団の高齢化を考えると、獣医師集団も流行予防に関する知識の発信ソースとして機能できることが考えられ、公衆衛生学的にも重要な役割を担うことが期待された。今後は山梨県に日本住血吸虫症流行が再興することはほとんど考えられないが、過去 1 世紀にわたって培った知識と経験を今後の感染症流行に活用することができるならば、国内でも他県にはないアドバンテージが山梨県にあると言えるのではないかと考えた。

＜結論＞

山梨県が日本住血吸症流行撲滅宣言を行った正しい知識と経験や行動が引き継がれることは、獣医師の知識が流行予防に関する知識の発信ソースとして機能できることが考えられ、公衆衛生学的にも重要な役割を担うことが期待された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5301　号 | 畑　伸秀 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　中村　桂子<br>副　査　藤原　武男、伏見　清秀 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、日本住血吸虫症の流行を終息させた地域の住民において、本症に関わる知識と予防対策についての知識が流行地でどのように継承されているかを分析した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

日本住血吸虫症の流行地であった山梨県では、住民教育と予防対策活動への住民の参加により、本症とその予防対策に関する知識が住民の間に深く浸透し、流行制圧の一因となったことが高く評価されている。申請者は、1996 年の本症流行終息宣言から 20 年を経た山梨県の旧流行地において本症に関する知識について調査し、本症の認知度に影響を及ぼす条件について考察した。本研究は、本症の再流行または新興感染症の予防対策について貴重な知見を示すものであり、申請者の着眼点は評価に値する。

２）社会的意義

申請者は、住民教育と予防対策活動への参加体験により本症に関する知識が長期にわたって保持される一方、病気流行の体験、教育の機会や予防活動参加体験がない住民の知識が著しく低く、知識と経験の継承は限られていたことを明らかにした。研究結果は、感染症対策における住民教育と体験による知識の蓄積の重要性を示しており、有意義な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

研究は、旧流行地の住民と地域の獣医師を対象に調査し、対象者の年代別および 55 年前の住民調査の結果と対比した分析を行っている。長期間にわたる時代の変遷と本症の流行と予防対策事業の経緯を整理し、本症に関わる住民の知識との関連について多面的な分析が行われた。

４）考察・今後の発展性

本研究の公衆衛生学的貢献の可能性、発展性について、質的情報の分析を加え、住民教育の重要性が示された。本研究成果をふまえ、開発途上国を含む他の地域での感染症対策、新興再興感染症対策に関わる研究への発展、予防対策への応用が期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上をふまえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 佐藤　弘典 |
| 論文審査担当者 | 主査　古川　哲史<br>副査　木村　彰方、吉田　雅幸 |
| 論　文　題　目 | Electrocardiogram Characteristics that Distinguish Perimitral Reentry from Other Atrial Tachycardias after Atrial Fibrillation Ablation |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

心房細動に対するカテーテルアブレーション後に新たに出現した心房頻拍のうち、僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍は出現頻度が高いメカニズムであるが、体表 12 誘導心電図を用いて鑑別・診断する方法はまだ確立していない。今回、心房細動アブレーション後に出現した計 30 個の心房頻拍（僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍は 15 個、その他のメカニズムによる心房頻拍は 15 個）の 12 誘導心電図の P 波の極性を調べ、僧帽弁輪旋回型心房頻拍とその他の心房頻拍とを比較したところ、胸部誘導において①V1 誘導の P 波が陽性、②V2-V6 誘導のどれかで平坦 P 波が出現する、③V2-V6 誘導では陰性や二相性の P 波が出現しない、の 3 点が僧帽弁輪旋回型心房頻拍に特徴的であった。この 3 つの特徴を持つことが僧帽弁輪旋回型心房頻拍であると診断するアルゴリズムを作成し、別の 31 個の心房頻拍を用いて作成したアルゴリズムの有用性を確認したところ、81%（25 個）の心房頻拍において僧帽弁輪旋回型心房頻拍であるか否かの鑑別を正しく行うことができた。この結果より、心房細動アブレーション後心房頻拍において 12 誘導心電図における胸部誘導の P 波の極性を用いて、僧帽弁輪旋回型心房頻拍を診断しうると考えられる。

＜緒言＞

カテーテルアブレーションは心房細動に対する効果的な治療法だが、治療後に新たな心房頻拍が発生することがある。特に、肺静脈隔離術（pulmonary vein isolation: PVI）に加えて左房でのさらなるアブレーションが追加される症例で発生しやすいとされている。心房細動アブレーション後心房頻拍は心臓電気生理学検査や三次元マッピングシステムを用いてその機序が診断され、僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー心房頻拍は最も一般的な機序と言われている。しかし、僧帽弁輪旋回型心房頻拍と他の機序の心房頻拍とを区別する 12 誘導心電図を使った診断方法は確立していない。この論文では、心房細動アブレーション後に出現した心房頻拍における 12 誘導心電図の P 波の極性において僧帽弁輪旋回型心房頻拍での特徴を調べ、僧帽弁輪旋回型心房頻拍と他の心房頻拍とを鑑別するアルゴリズムを作成し、そのアルゴリズムが鑑別に有用であることを確かめた。

＜方法＞

心房細動アブレーションをすでに一回以上施行され、上室性不整脈（心房細動もしくは心房頻拍）の再発に対するアブレーション治療中に発生した 61 の心房頻拍（48 人）を調査対象とした。この心房頻拍はすべて、アブレーションによって停止するか、心房頻拍の機序がマクロリエントリーであれば心房頻拍の頻拍周期がアブレーションによって延長した頻拍である。心臓手術歴のある患者は除外した。

最初の 30 の心房頻拍（24 人）における 12 誘導心電図の解析結果から僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性頻拍と他のメカニズムの心房頻拍とを区別するアルゴリズムを作成した。アルゴリズムを作成した医師とは別の循環器内科医が、残りの 31 の心房頻拍（24 人）についてアルゴリズムを用いて僧帽弁輪旋回型心房頻拍の診断を行い、その正確性を検証した。

心房頻拍の 12 誘導心電図で、12 の誘導すべてにおいて P 波の極性を 5 つに分類した。その 5 つとは、1）陽性、2）陰性、3）陽性/陰性、4）陰性/陽性、5）等電位（極性なし）である。心電図の解析は通常の心電図の波高と記録速度で行い、T 波と重なっていない P 波で解析を行った。

心房頻拍の機序は、心臓電気生理検査と三次元マッピングシステムを用いて診断し、大きく 4 つに分類した。マクロリエントリー、巣状興奮、伝導ギャップを介した肺静脈頻拍、左房-肺静脈間リエントリー、の４つである。アブレーションは、マクロリエントリーに対しては必須伝導部位を横切るように線状焼灼を行い、巣状興奮に対してはその興奮が開始する箇所に焼灼を行った。肺静脈興奮ならびに左房-肺静脈間リエントリーに対しては、以前の PVI 施行で作成したライン上における左房と肺静脈の伝導をつなぐ伝導ギャップを焼灼のターゲットとした。

＜結果＞

最初に解析を行った 24 人（30 の心房頻拍）の平均年齢は 64±10 歳。基礎心疾患は、3 人が軽度の僧帽弁狭窄症、1 人が非閉塞型肥大型心筋症だった。超音波検査による計測で左房径は 44±7 ㎜、左室駆出率は 67±9％だった。30 の心房頻拍はすべて PVI 施行後に発生したものであるが、22 の心房頻拍は右房峡部線状焼灼、8 の心房頻拍は左房天蓋部線状焼灼、7 の心房頻拍は僧帽弁峡部（左下肺静脈-僧帽弁輪間）線状焼灼、8 の心房頻拍は左房内を広範に焼灼された後に発生したものだった。

30 の心房頻拍のうち、21 がマクロリエントリー、1 つは僧帽弁輪旋回マクロリエントリーと左房天蓋部を必須回路に含むマクロリエントリーとを併せて旋回するいわゆる 8 の字型リエントリー、5 つは巣状興奮、1 つは肺静脈頻拍、2 つが左房-肺静脈間リエントリー性頻拍だった。21 のマクロリエントリーのうち、15 が僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍（8 が時計回転、7 が反時計回転）、天蓋部必須マクロリエントリーが 5、右房峡部必須型マクロリエントリーが 1 だった。一人の患者においてのみ、同一セッション中に時計回転と反時計回転の両方の僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍が出現した。

P 波の極性は、93％の僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍は、下壁誘導（II、III、aVF）で陽性の P 波を示した。同一セッション中に時計回転と反時計回転の両方向の興奮が出現した僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍においても、II、III、aVF の極性は時計回転と反時計回転ともに陽性だった。I 誘導と aVL 誘導は、ほとんどの僧帽弁輪旋回型心房頻拍で等電位と

陰性のP波だった。しかし四肢誘導のこれらの所見は、他の心房頻拍でも同様の所見だった。対して、胸部誘導は、87%の僧帽弁輪旋回型心房頻拍でV1誘導では陽性のP波を示した。V1誘導からV6誘導のなかで等電位P波が出現したのは、僧帽弁輪旋回型心房頻拍では93%であったのに対し、他の心房頻拍は50%で有意差を認めた（P=0.014）。また、僧帽弁輪旋回型心房頻拍では胸部誘導で陰性のP波がみられることはなく、二相性P波が出現したのも1例のみだった。

以上の結果より、①V1誘導のP波は陽性、②V2からV6誘導では、陰性もしくは二相性のP波がない、③V2からV6誘導のどれか一つ以上で等電位P波がある、の3つすべての特徴を有した心房頻拍が僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍とするアルゴリズムを作成した。このアルゴリズムは、アルゴリズム作成に用いた最初の30の心房頻拍では、感度87%、特異度93%、陽性的中率93%、陰性的中率88%であった。続いて、別の31の心房細動アブレーション後心房頻拍（僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍（時計方向回転が6、反時計方向回転が7）が13、天蓋部依存型心房頻拍が2、右房峡部依存型心房頻拍が3、僧帽弁輪と天蓋部依存型との8の字型リエントリーが1、肺静脈頻拍が1、左房-肺静脈間リエントリーが1、巣状興奮が10）を用いて、アルゴリズムの正確性について検証を行った。結果は感度85%、特異度78%、陽性的中率73%、陰性的中率88%だった。

＜考察＞

心房細動アブレーション後に出現する心房頻拍において、12誘導心電図の胸部誘導におけるP波の極性（①V1誘導のP波は陽性、②V2からV6誘導では、陰性もしくは二相性のP波がない、③V2からV6誘導のどれか一つ以上で等電位P波がある）が、僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍を鑑別しうることに有用と考えられた。僧帽弁輪旋回型心房頻拍はV1誘導のP波が陽性を示すことや、胸部誘導における陰性P波がマクロリエントリーが右房と左房のどちらで生じているのかを区別しうるという報告はあったが、胸部誘導における等電位P波の出現に言及した報告はない。僧帽弁輪旋回型心房頻拍の電気興奮は、胸部誘導に対して向かう興奮や離れる興奮が他の心房頻拍よりも少ないために、心電図上で電位がなくなり波が形成されないと考えられる。等電位P波が出現する胸部誘導の誘導が一定でないのは、患者ごとの左房の形態や位置が異なるためと考えられる。

今回作成したアルゴリズムにおいて、左房前壁起源の巣状興奮が偽陽性となりやすく、また、左房内を広範にアブレーションされた既往のある僧帽弁輪旋回型心房頻拍ではV1誘導で陽性P波を示さず偽陰性になることがあった。これらの欠点はあるが、今回作成したアルゴリズムは僧帽弁輪旋回型心房頻拍を診断するのに有用と考えられる。実際の臨床では、外来診療で僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍と考えられる12誘導心電図が記録されたとき、後日の心臓電気生理学検査ならびにアブレーション治療の際に心房頻拍が誘発されなかったとしても、治療（僧帽弁峡部などのアブレーション）を追加しうる根拠になる。

研究の限界としては、サンプル数が少ないために根拠が強固な明確な結論とすることができなかった。また今回は抗不整脈薬の使用や中止について統一した方法をとっていないため、薬剤の影響について考慮することができなかった。そして右房峡部の線状焼灼が施行されているケースが多く、右房峡部の線状焼灼が胸部誘導のP波の極性に影響があった可能性がある。しかし、実

際の臨床現場では、心房細動アブレーションとともに右房峡部の線状焼灼を追加することが多いのが現状であり、今回作成したアルゴリズムは現実の診療において有用な診断方法になりうると考えられる。

＜結論＞

心房細動アブレーション後に出現する心房頻拍のうち、V2 から V6 誘導のどれかで等電位 P 波が出現すると僧帽弁輪旋回型マクロリエントリー性心房頻拍であることが示唆され、今回作成したアルゴリズムによって 12 誘導心電図を用いて僧帽弁輪旋回型心房頻拍を診断しうる。

# 最終試験の結果の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5302　号 | 佐藤　弘典 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　古川　哲史<br>副　査　木村　彰方、吉田　雅幸<br>公開審査　：　平成２９年　２月　２３日 | |

（最終試験の結果の要旨）

副　査　　木村　彰方

本論文の主な研究成果は、カテーテルアブレーション治療後に出現することがある僧帽弁輪旋回型心房頻拍を、体表 12 誘導心電図における胸部誘導の P 波を用いて簡便に検出するアルゴリズムを開発したことであり、これは臨床的に有用な研究成果であると言える。また申請者は自身の言葉で研究の背景と目的、研究方法、研究結果とその解釈、本研究の意義や今後の課題などについての発表を行い、本研究が申請者自身の臨床経験に根差した着眼点の独創性、高い研究能力とその基礎となる豊かな学識に基づき実践されたものだということが確認された。

試問では、僧帽弁輪旋回型心房頻拍において胸部誘導の平坦 P 波が生じるメカニズム、開発したアルゴリズムが適用できない心電図波形が生じる理由、本アルゴリズムが臨床上有用となる局面と今後の発展形等の質問をし、概ね的確な回答を得た。

したがって申請者は、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判断した。

副　査　　吉田　雅幸

本論文の主な研究成果は、心房細動アブレーション後の患者に出現した心房頻拍のなかで、僧帽弁輪旋回型の機序を持つ心房頻拍を非侵襲的に識別できる心電図の特徴を見いだしたことである。本研究成果によって、カテーテル治療を実施する前に心房頻拍の原因を推定することが可能となり、不整脈診療に有用である可能性を示唆した。

カテーテルアブレーションは心房細動に対する有効な治療法であるが、治療後に新たな不整脈が発生することもある。このようなアブレーション治療後の不整脈に関する体表心電図を用いた診断はこれまで試みられて来なかった。そこで、本研究では、再発性の上室性不整脈に対してアブレーション治療が実施された 61 症例を対象として、最初の 24 症例（30 頻拍）のなかで僧帽弁輪旋回マクロリエントリー機序であった 21 例とそれ以外の機序であった 9 例の体表心電図における差異を検討し、P 波に関する３つの特徴を見いだした。これをもとに残りの症例における不整脈機序を心電図特徴から類推すると、感度 85%、特異度 78%で僧帽弁輪旋回マクロリエントリー機序を診断することができた。本研究の結果により、アブレーション後の心房頻拍についてカテーテル検査を実施する以前に心電図でその原因機序を推定することができることになり、臨床的意義が大きいと思われた。試問では、今回の研究の目的、特に僧帽弁輪旋回マクロリエントリー機序を持つ心房頻拍の臨床的重要性について様々な角度から質問を行った。申請者の回答は概ね

妥当であり、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判断した。

主　査　　古川　哲史

　最終試問では、本研究を行う意義、臨床応用の可能性、アルゴリズムが導かれる機序、など多岐にわたる質問を行った。すべての質問に対しておおむね満足のいく回答が得られた。副査の木村教授、吉田教授と協議の上、申請者は博士（医学）授与に値する学識を有すると判定する。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 木幡　一博 |
| 論文審査担当者 | 主査　大川　淳<br>副査　関矢　一郎、神野　哲也 |
| 論　文　題　目 | Influences of osteoarthritis and osteoporosis on the electrical properties of human bones as in vivo electrets produced due to Wolff's law |

（論文内容の要旨）

はじめに

力学的ストレスが骨に加わると電位が誘発される。圧迫力が加わる骨領域は陰極となり、牽引力の加わる領域は陽極となる。この現象はコラーゲンによって生じる圧電特性であり、骨を形成するコラーゲン線維が変位することにより電位が生じると考えられている。

これは人の骨内にも分極領域が存在することを示唆し、無機物の結晶がコラーゲンとともに骨の圧電特性に影響をおよぼすと考えられる。共著者の山下らは、疑似体液中に置かれた分極処理水酸アパタイトの陰極上で骨類似結晶体が加速度的に成長することを初めて報告した。また、水酸アパタイトセラミックの電気分極処理により、陽子が移動して表面電位を生じることを報告した。さらに、電気分極した水酸アパタイトの生体移植実験により、陰極表面で骨形成が促進されることを確認している。電気分極した連通孔を持つ水酸アパタイトセラミックの生体移植では、水酸アパタイトと蓄積電荷の協調的相互作用によりセラミックス中央部の骨孔内にまで骨が形成されていた。これらの実験結果から、人骨を分極処理できれば人骨の 3 次元構造と組成を持つ理想的な自家骨の代替物として同種骨の移植が期待できる。セラミックスの電気分極処理はこれまで高温で行われていたが、我々は生体骨を室温環境で分極する技術を開発し、有機物と無機物の構成物質が協調的に働き人骨の電気的特性を形成すること報告した 。

高齢化が進み、変形性関節症と骨粗鬆症が社会的問題となっている。変形性関節症では軟骨－軟骨下骨に変性を生じ、レントゲン上で関節裂隙の狭小化と骨硬化、骨棘と骨嚢胞の形成が見られ、長期間にわたる過荷重の結果である。したがって、骨密度は増加するが、骨のミネラル成分は減少して類骨を多く含み、軟骨下骨の微小構造が変化する。骨粗鬆症は全身の骨代謝が更新し、骨芽細胞による骨形成が追いつかず、ミネラル成分が減少し骨塩密度（bone mineral density: BMD）が低下して、骨の微小構造が変化する。進行期変形性股関節症で股関節痛が強く、日常生活の活動度が妨げられる場合には、人工股関節全置換術が行われる。一方、骨粗鬆症に伴う代表的脆弱性骨折の一つである大腿骨頸部骨折には人工骨頭置換術が施行される。いずれの手術でも大腿骨頭は術後廃棄される。今回の研究では、これらの術後骨試料を用いて、分極前後における人骨の電気的特性の変化を比較し、骨構成成分であるコラーゲン等の有機物と水酸アパタイトや炭酸アパタイト等の無機物が骨の電気特性に及ぼす役割を検討した。

方法

**骨試料の準備**

対象は 2012 年 9 月から 2015 年 8 月までに河北総合病院で進行期変形性股関節症に対し人工股関節全置換術を行った患者 33 人（OA 群、平均年齢 71.6±11.4 歳）と大腿骨頸部骨折に対し人工骨頭置換術を行った患者 37 人（FNF 群、平均年齢 81.9±9.9 歳）である。この研究はヘルシンキ宣言に基づき、所属施設の倫理委員会の承認を得ている。参加者には書面で説明し、同意を得て実施している。得られた骨試料は一時的に-20 度の冷凍庫で保存後、ダイヤモンドソーで厚さ 1 ㎜にスライスしたのち、蒸留水で洗浄後、40 度で乾燥して実験に用いた。

**マイクロ CT スキャン**

マイクロ CT を使用して海綿骨の構造を評価した。一次パラメータとして bone mineral content (BMC), bone volume (BV)、 tissue volume (TV)を測定し、二次パラメータとして BMD、BV/TV、BMC/TV を求めた。

**炭酸含有量の測定**

人骨の炭酸アパタイト含有量を見積もるために、attenuated total reflection (ATR)を使用して炭酸イオンの吸収量を測定した。400～4000$cm^{-1}$の波数領域で記録された炭酸アパタイトの強度パターンはタイプ B 炭酸アパタイトであった。また、リン酸含有量を見積もるために、リン酸イオンの吸収量を測定した 。それぞれの吸収領域は 871 $cm^{-1}$,559 $cm^{-1}$を採用した。さらに、炭酸イオンとリン酸イオンの強度比（$CO_3/PO_4$比）を求めた。

**人骨の分極処理**

骨試料を分極群と未分極群の２群に分けた。分極群は骨試料を 2 枚のプラチナ電極に挟みこみ、25 度室温下で 5kV・$cm^{-1}$電場となるように直流電圧をかけて分極処理を行った。

**熱刺激脱分極電流測定**

両群の骨試料をプラチナ電極にはさみ、その上をアルミナでカバーした状態で熱刺激脱分極電流（thermally stimulated depolarized current: TSDC)を測定した。サンプル温度を 1 分間に 5 度の昇温速度で 25℃から 600℃まで上昇させ、脱分極電流を測定した。骨試料の蓄積電荷は電流ピークとして記録され、これを積分することにより蓄積電荷量を計算した。

**統計解析**

両群の年齢、骨試料の二次パラメータ、骨内 $CO_3/PO_4$比、ポーリング前後の蓄積電荷量を Mann-Whitney 検定で比較した。また、Spearman の相関試験を用いてこれらの検討項目間の相関関係を評価した。さらに、有意な相関関係がある項目間では、単回帰分析を行った。p 値が 0.05 以下の場合に有意差があると判定した。

**結果**

OA 群は男性 3 名、女性 30 名、平均年齢 71.6±11.4 歳、FNF 群は男性 6 名、女性 31 名、平均年齢 81.9±9.9 歳だった。測定した試料の構造パラメータ（平均値±標準偏差）は OA 群で BMD 586.7±92.3(mg/$cm^3$) 、 BV/TV 23.9±9.1(%) 、 BMC/TV 144.3±65.0(mg/$cm^3$) 、 FNF 群 で BMD 559.0±132.1(mg/$cm^3$)、BV/TV 24.4±13.4(%)、BMC/TV 146.4±114.7(mg/$cm^3$)だった。$CO_3/PO_4$比は OA 群 0.58±0.18、FNF 群 0.62± 0.26 だった。TSDC カーブは、両群とも分極前後ともに 100℃、300℃、

500℃にピークを持っていた。骨試料中の蓄積電荷量は、分極前に OA 群で Q (100°C) 1.9±2.2(uC/cm$^2$)、Q (300°C) 3.6±2.2 (uC/cm$^2$)、Q (500°C) 16.3±9.4 (uC/cm$^2$)、Total Q 21.8±11.3(uC/cm$^2$)であり、分極前 FNF 群は Q (100°C) 0.9±1.7(uC/cm$^2$)、Q (300°C) 2.6±3.4(uC/cm$^2$)、Q (500°C) 11.3±8.4(uC/cm$^2$)、Total Q 16.2±10.6(uC/cm$^2$)だった。また、分極後は OA 群で Q (100°C) 45.1±67.6(uC/cm$^2$)、Q (300°C) 10.5±10.4(uC/cm$^2$)、Q (500°C) 48.1±60.9(uC/cm$^2$)、Total Q 103.8±116.4(uC/cm$^2$)、FNF 群で Q (100°C) 23.8±28.6(uC/cm$^2$)、Q (300°C) 9.5±11.8(uC/cm$^2$)、Q (500°C) 27.6±30.6(uC/cm$^2$)、Total Q 60.9±53.8(uC/cm$^2$)だった。平均年齢は有意に OA 群が FNF 群に比して若かった（$p < 0.01$）。分極前の試料において、100℃、300℃、500℃ピーク周囲の電荷量と全蓄積電荷量は OA 群で有意に高かった。分極処理後の 100℃, 500℃ピーク周囲の蓄積電荷量は OA 群が FNF 群に比し有意に高かったが、300℃ピーク周囲での蓄積電荷には有意差がなかった。一方、BMD と $CO_3/PO_4$ 比には負の相関があり、BMD と $CO_3/PO_4$ 比はそれぞれ分極前の 500℃及び全電荷量と正の相関関係が見られた。

**考察**

骨圧電現象の発見以来、力学的ストレスにより誘発される骨内電荷は Wolff の法則に従って骨のリモデリングに影響を与える可能性があり、関心がもたれている。ウサギやウシの骨を用いたこれまでの研究で、TSDC カーブは 100℃と 500℃に 2 つのピークを持ち、骨が電気を蓄積するエレクトレットとして機能していることを報告してきた。TSDC カーブの 100℃ピーク形成にはコラーゲン線維、500℃ピークには骨のミネラル成分の関与が示唆された。これに対し、今回の人骨の TSDC カーブでは 100℃、300℃、500℃の 3 か所にピークが観察された。人の骨はコラーゲンなどの有機成分とアパタイトなどの無機成分を含むことから、300℃と 500℃のピークは 2 種類の異なるアパタイト成分由来と考えられる。骨試料を焼灼すると有機物質や炭酸成分は失われ、水酸アパタイトへと変化する。したがって、500℃ピーク形成には水酸アパタイトが関与している可能性がある。一方、リン酸カルシウムと炭酸カルシウムが人骨の主要成分であることから、300℃ピーク形成には炭酸アパタイトが関与する可能性がある。さらに、炭酸アパタイトは 300℃と 500℃ピーク双方の形成に関与することも考えられる。

$CO_3/PO_4$ 比と BMD には負の相関関係があったが、$CO_3/PO_4$ 比と 300℃周囲の蓄積電荷量には相関関係がなかった。また、300℃周囲のピークは複数出現したり、幅をもったピークが見られたりするケースが、分極、未分極どちらの試料でもみられた。このような現象を生じる要因は、①炭酸含有量が個々のサンプルで異なること、② TSDC カーブの昇温過程でタンパク成分が焼灼され、アパタイト成分が炭酸化されることによって炭酸アパタイトが形成される可能性、③100℃から 400℃への昇温過程で炭酸アパタイト中の炭酸が失われた可能性が考えられる。TSDC カーブの 300℃ピーク周囲において、人骨では純粋な炭酸アパタイトとは異なる反応が生じている可能性がある。

未分極の骨試料では 100℃ピークがなかったり、とても小さいケースが認められた。この現象は、100℃以下ではコラーゲンを含む有機物質が存在し、これらが形成するピークは無機成分のピークと比較して非常に小さいということで説明できる。逆に分極後では、100℃ピークが未分極時に比べ 10-20 倍ほど大きくなるが、300℃と 500℃ピークは 3-4 倍程度の増加にとどまった。また、

分極前の蓄積電荷量と BMD は相関するが、分極後に相関関係がなくなった。以上の結果は、①室温条件での分極処理は有機成分のほうがミネラル成分より分極されやすい。しかしながら、②電気分極後、有機物質中の分極状態は緩和されやすくミネラル中の分極状態は長期間維持されることを示唆している。人骨を低温で分極した場合、骨成分の何が電荷キャリアーとして働き、どのような動きをするかを解明することが今後の課題である。

骨脆弱性骨折で人工骨頭置換術を受けた骨よりも進行期変形性関節症で人工股関節全置換術受けた症例の骨試料の方が蓄積電荷量と BMD が大きいことを考慮すると、生体骨の蓄積電荷量は骨の 3 次元構造や構造物質を含む骨質により強い影響をうける可能性がある。骨欠損部位への骨充填には自家骨移植が臨床的なゴールドスタンダートとなっているが、変形性関節症の手術で得られた同種骨を無菌的に凍結保存後、手術時に分極処理して骨欠損部位に移植できれば、骨形成や骨癒合が促進され、自家骨移植と同等の術後成績を得られることが期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5303　号 | 木幡　一博 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　大川　淳<br>副　査　関矢　一郎、神野　哲也 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、生体骨の電気的特性を熱刺激脱分極電流測定にて計測し、骨の性状による差異を明らかにすることを目的とした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

生体骨が力学的負荷に応じて帯電し、とくに屈曲凹側の陰性電位が骨形成促進と関連することが従来より知られていたが、加齢による骨量変化がこの特性に影響することは十分解明されていなかった。本研究では、２種類の傷病における高齢者の股関節手術において採取された大腿骨頚部の標本を用いて、骨の電気的特性を熱刺激脱分極電流測定により詳細に分析した点で独創性がある。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.骨粗鬆症（FNF群）と変形性関節症（OA群）の骨では、全蓄積電荷量に差があった。

2.骨試料を2枚のプラチナ電極に挟みこんで作成された分極骨に対する熱刺激脱分極電流測定では、100℃, 500℃ピーク周囲の蓄積電荷量はOA群がFNF群に比し有意に高かったが、300℃ピーク周囲での蓄積電荷には有意差がなかった。

3. 骨量と$CO_3/PO_4$比には負の相関があり、BMDと$CO_3/PO_4$比はそれぞれ分極前の500℃及び全電荷量と正の相関関係が見られた。

以上のように申請者は、骨組織に蓄積される電荷量には骨量や骨質に影響されることを明らかにしている。これは臨床的には難治性骨折に対する生体電気刺激治療の基盤をなす有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には手術中に採取された数十のヒト大腿骨標本が用いられたが、これは採取以前に申請者の研究方法に対する知識と技術力をすでに十分に有していたことを示し、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は力学的負荷に応答する骨の特性は、骨組織の有機成分の性質にも影響される可

能性を示唆しており、整形外科臨床医としての十分な知識、経験に裏打ちされた考察が行われた。今後、本研究で明らかにされた骨の電気的特性を活かした電気刺激治療法の開発につながる可能性がある。

**３．その他**

**４．審査結果**

プレゼンテーションの内容や試問での的確な回答を踏まえ、申請者は博士（医学）の学位授与の資格があると判断された。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 宗次　太吉 |
| 論文審査担当者 | 主査　西川　徹<br>副査　三宅　智、西村　栄美 |
| 論　文　題　目 | Evaluation of the correlation between severity of acquired idiopathic generalized anhidrosis and quality of life scores |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

特発性後天性全身性無汗症(AIGA)とは、温熱環境下や運動時の全身の発汗が後天的に障害されるために、うつ熱や熱中症を生じる疾患である。またコリン性蕁麻疹を生じるため、日常生活に与える影響が大きいが、その実態は十分把握されていない。そこで今回我々は登録された 3 施設において入院検査によって AIGA と診断した患者 44 名に対し、重症度評価と患者自己記入方式による DLQI 調査を実施した。AIGA の重症度と DLQI の相関関係、DLQI の下位尺度別の障害度を評価した。

調査の結果、重症度が高いほど DLQI は強く障害されており、DLQI の下位尺度では、特にレジャー（社会活動、スポーツ）の障害が強かった。他の皮膚疾患との比較では、AIGA 患者の QOL はアトピー性皮膚炎患者と同等かそれ以上に障害されている可能性が考えられた。AIGA の重症度が高いほど DLQI は強く障害され、従来考えられていたよりも広範に日常生活に支障をきたしていることが明らかとなった。

＜緒言＞

特発性後天性全身性無汗症(AIGA)とは、温熱環境下や運動時の全身の発汗が後天的に障害されるために容易にうつ熱や熱中症を生じる疾患である。また全身にチクチクした疼痛を主とするコリン性蕁麻疹を生じるため、日常生活や仕事に与える影響が大きいと考えられてきたが、実際にどの程度の影響を与えているかは、詳しく分かっていない。また AIGA はこれまでにアジア人、特に日本からの症例報告が多いものの、疾患そのものの認知度が低いため、治療開始がしばしば遅れてしまうことがある。したがって無汗症と診断されないために、不自由な生活を送っている患者は潜在的に多数存在すると考えられている。

そのような状況下で、AIGA 患者の日常生活における QOL 障害を調査することは重要と考えられ、今回我々は AIGA の重症度に注目し AIGA の重症度と QOL の相関関係、DLQI の下位尺度別の障害度について評価を行った。今回の報告は AIGA の重症度と QOL の相関関係について評価した最初の報告である。

＜方法＞

・研究デザイン

2014 年 8 月から 2015 年 8 月の期間に東京医科歯科大学皮膚科及び研究協力病院（埼玉医科大学神経内科と千葉大学神経内科）で入院検査を行い AIGA と診断した患者を研究の対象とした。2015 年 8 月に研究対象者の検査結果をベースにした重症度評価と、患者自己記入方式による DLQI 調査を実施した。調査は AIGA の診断基準を満たした 44 名を対象に行われた。男女比は、男性 30 名(68%)、女性 14 名(32%)で、平均年齢は 36.55 歳(15～75 歳)であった。

研究対象者には本研究の主旨を文章で説明し、調査に同意頂ける方は、回答を返送する方式とした。本研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会の承認を得て倫理的配慮のもとに行った。

・調査項目

調査項目は AIGA の重症度と DLQI の相関関係、DLQI の下位尺度別の障害度を評価した。まず AIGA ガイドラインの重症度判定基準に基づいて医師が入院検査時の重症度を評価した。重症度判定基準は 1)無汗低汗部の面積, 2)皮膚の痛み膨疹の面積 (コリン性蕁麻疹を含む), 3)熱中症の症状の 3 つの項目から構成されており、それぞれ症状なし=スコア 0 から重症=スコア 3 まで分けられている。3 項目の総合点を重症度判定基準の総スコアとし、総合点に応じて、重症度を定義している。

次に、皮膚疾患特異的 QOL 尺度である Dermatology Life Quality Index (DLQI)を用いて入院検査前 1 週間の状態について QOL の評価を行った。DLQI は 10 項目の質問からなり、患者は入院検査前の 1 週間で皮膚の状態が生活にどのくらい影響を与えたかを「非常に」=3 点から「全くない」=0 点、または「この質問は私には当てはまらない」=0 点の選択肢から選択する。総合点と symptoms and feeling, daily activities, leisure, work or school, personal relationships, treatment の 6 つの下位尺度からなり、得点が高いほど QOL が低いことを表す。

さらに、VAS による全般的な自覚症状の評価を行った。

・統計処理

統計解析には SPSS23 を用いた。各群間の比較は、two tailed t-test, ANOVA 検定を用いた。相関関係は、Spearman’s correlation test により評価した。有意水準は $P<0.05$ とした。

・本研究の限界

この研究は大学病院へ通院する患者を対象として実施されたため、重症患者が多く含まれる可能性がある。稀な疾患でありサンプルサイズが少ない。入院検査前 1 週間の状態について DLQI を調査したが、患者によっては季節的な変動により自覚症状に差があった可能性がある。コリン性蕁麻疹の重症度を蕁麻疹の強さではなく面積であらわさざるを得なかったことが挙げられる。

＜結果＞

・AIGA の重症度で分類した結果

AIGA ガイドラインの重症度判定基準に基づいて分類した結果、重症度が高くなると、DLQI が強

く障害されていた。DLQI の下位尺度について比較すると、特にレジャーの障害が強かった。AIGA 重症判定基準の総合スコアと DLQI 総合点の相関は、強い相関が認められた。(R=0.720, p=0.001）

・他疾患との比較検討
他の皮膚疾患と AIGA 患者の DLQI 総合点の平均を比較すると、AIGA 患者の DLQI はアトピー性皮膚炎患者や多汗症患者と同等かそれ以上に障害されていた。DLQI の下位尺度を比較すると、特にレジャー(社会活動、スポーツ)で著しく障害されていることが明らかとなった。

・VAS と重症度の相関性の検討
日常生活への影響を VAS を用いて AIGA の重症度別に比較したところ、重症であるほど VAS は高く、日常生活への影響が強いことが示唆された。VAS と DLQI 総合点は、強い相関を認めた。(R=0.783, P<0.001)

＜考察＞
一般的に AIGA の症状は、副腎皮質ステロイドパルス療法によって改善できることが多いが、ステロイドパルス療法が無効でその他の治療が試みられることもある。病態としては免疫学的な機序による汗腺のアセチルコリン受容体の障害が推定されているが、まだ明らかになっていない。患者は、夏季の外出が大変つらいことや、運動や寒暖差によってもコリン性蕁麻疹を生じるため、生活に支障があるということをしばしば訴えるが、実際に AIGA 患者の QOL を調査した報告は前述したように過去に 1 件のみであり、治療による症状の改善が QOL の改善につながっていたことが報告された。今回我々は、AIGA の重症度に注目し QOL との相関関係について調査を行った。

まず男女別に重症度を比較した場合に、男性だけに軽症の患者が認められたことに関しては、AIGA のサブタイプの中で特発性純粋発汗機能不全症(IPSF)と呼ばれていた群に由来する可能性があると考えた。IPSF に共通する特徴は 1)若年男性に多い、2)急性発症し疼痛やコリン性蕁麻疹を伴う、3)精神性発汗は保たれる、4)治療には副腎皮質ステロイドが有効であるという点である。IPSF 患者の QOL 障害の程度については今後再調査を行う必要があると考えられる。

AIGA 重症判定基準の総合スコアと DLQI 総合点には強い相関を認めた。重症者の中には、うつ熱やコリン性蕁麻疹を生じるため通勤通学でさえ中断せざるを得なくなり、在宅で勤務している患者もあった。これは日常生活が著しく障害されていることを示す一例である。VAS と DLQI 総合点は強い相関を認め、それぞれが QOL 評価ツールとして妥当であることを示す結果であった。

AIGA 患者の QOL 障害が他の皮膚疾患の患者よりも強かった点に関しては、無汗症自体が引き起こすうつ熱やコリン性蕁麻疹などの身体的症状に加えて、外出やスポーツなどの活動制限による QOL 低下が生じている点が挙げられる。また、AIGA 患者は、病的な皮疹を生じないため、他人に自身の病気を認識してもらえないことが多く、このことにより仕事や人間関係においてさらに困難な状況に陥っている可能性が考えられた。そのため、疾患への理解を社会全体に広げていく

必要があると考えられ、今回の調査はAIGA患者の実態を知るうえで有効であったと考える。

＜結論＞

AIGAの重症度とDLQIは相関しており、重症者ほどQOLの障害が強かった。他の皮膚疾患との比較では、AIGA患者のQOLはアトピー性皮膚炎患者以上に障害されている可能性が考えられた。またAIGA患者は、うつ熱/コリン性蕁麻疹に伴う身体的な苦痛の他に、スポーツ活動や通勤通学や外出が制限されたりする点で、従来考えられていたよりも広範に日常生活に支障をきたしていることが明らかとなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5304　号 | 宗次　太吉 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　西川　徹<br>副　査　三宅　智、西村　栄美 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

特発性後天性全身性無汗症（AIGA）患者 44 名において、症状の重症度と自己記入式の QOL 評価尺度の Dermatology Life Quality Index（DLQI）の相関を検討し、重症度が高いほど DLQI の障害が大きく、特にレジャーの下位尺度の程度度が高いことを示した初めての報告である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

AIGAは汗腺の発汗機能が特異的に障害され、アセチルコリン伝達系の異常が関与すると推測されているが病因・病態・治療効果・社会生活の障害の程度等は不明な部分が多い。本研究はAIGAが我が国に多く諸外国には少ない特徴を活かし、生活の質に与える影響に焦点を絞って検討した、先駆的な価値ある調査研究であると評価できる。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである：1. AIGAの診断喜寿の満たす44名のAIGA）患者（男性30名、女性14名）で、症状の重症度とDLQI得点が有意に相関し、DLQIのレジャーについての下位項目の得点との関連が最も強かった。2. DLQIの総合得点はアトピー性皮膚炎や多汗症の患者より高く日常生活の障害がより重度であることが示唆された。3. DLQI得点は自覚症状のVASスコアも強い相関を示した。これらは、AIGAの症状が日常生活を障害する程度が、他の皮膚疾患に比べても大きいことを、他に先駆けて統計学的に明らかにし、AIGA患者の治療、予後、社会復帰を検討する上で極めて有用なことから、臨床的意義が深いと考えられる。

３）研究方法・倫理観

本研究では、確立された標準的な評価方法が用いられ、倫理的にも適切な配慮と手続が取られており、十分な準備の上勧められたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、身体症状が重症化し治療に抵抗する例では、外出、仕事、対人交流等社会的活動が大幅に制限されることを見出し、従来の予想より重大な影響を受けると考察している。この点は申請者の病因・病態研究を促進することに結びついており、今後の発展が期待される。

**３．その他**　特記すべきことなし。

**４．審査結果**

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分に値すると認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 日山　鐘浩 |
| 論文審査担当者 | 主査　大川　淳<br>副査　淺原　弘嗣、秋田　恵一 |
| 論　文　題　目 | Meniscal Regeneration After Resection of the Anterior Half of the Medial Meniscus in Mice |

（論文内容の要旨）


要旨

膝半月板の変性や切除により、膝関節軟骨の変性が生じることは多数の動物実験で報告されている。膝関節ホメオスターシスの維持や、変形性関節症予防の観点からも、半月板の機能は非常に重要であるが、半月板損傷や切除後の再生過程に関する詳細な報告はこれまでにほとんど報告がない。我々はマウスの膝関節内側半月板切除後の再生過程を調査したのでこれを報告する。対象は C57Bl/6J マウスで、左膝内側半月版前方 1/2 切除を施行し、術後 3 日目、2 週後、4 週後、6 週後に再生半月板および膝関節軟骨の肉眼的、組織学的評価を行った。切除後 3 日にて、切除後周辺組織の滑膜にマクロファージの浸潤を認めた、切除後 2 週にて同領域に非常に旺盛な線維芽細胞の増殖、滑膜増生を認め、4 週にて線維芽細胞は軟骨基質産生能を有する細胞へと分化した。切除後 6 週にて正常半月板とほぼ同等の組織へと再生が見られた。切除した半月板に接する脛骨関節面軟骨は術後 2 週から 4 週にかけて著しい変性を認めたが、4 週から 6 週にかけては軽度の変性しか進まなかった。このことは、半月板再生と軟骨ホメオスターシスに関連性がある事を示唆している。


本文

背景

半月板の主な機能として膝関節のショック吸収、構造安定化、大腿骨脛骨間の関節運動潤滑化などが報告されている。半月板損傷や半月板部分切除、全切除は変形性膝関節症のリスクファクターであり、半月板損傷により膝関節の機能的安定性が損なわれ、荷重ストレスが増大し、種々のサイトカイン、ケモカイン、軟骨変性酵素が産生されることが報告されている。それゆえに、半月板損傷に対しての修復や再生治療はその機能、構造を温存し変形性膝関節症を予防するのに非常に重要である。

解剖学的知見からは、半月板はその血行分布により 3 領域に分類することができる。外縁 1/3 領域は Red/Red ゾーンと呼ばれ、その血行が非常に豊富である。一方内縁 1/3 は無血行野であり white/white ゾーンと呼ばれる。さらに内縁と外縁の中間領域は Red/white ゾーンと呼ばれている。半月板の損傷領域により、半月板縫合術の臨床成績は大きく異なる。Red/Red ゾーンでは半月板

損傷に対する縫合術において良好な臨床成績が報告されているが、White/White ゾーンにおいては血行野が存在ないため、半月板損傷後の治癒成績は不良である事が報告されている。このような半月板の領域による回復能の差の原因は明らかとなっていないのが現状であるが、血流量の差が重要な要素であると考えられている。Yuan らは血管内皮細胞がエンドセリン-1 のシグナルを介する事により、半月板線維芽細胞の遊走を誘導することを報告した。また、King らは半月板損傷においては、損傷領域が関節滑膜か関節包に接していない限り、治癒は見込めないと報告している。また、犬、家兎における実験では、無血行野領域での半月板損傷に対して滑膜片を用いることで半月板の治癒が促進したとの報告がある。これらの報告から、半月板再生においては、滑膜由来の線維芽細胞と半月板自体の軟骨芽細胞が重要な役割を担っていると考えることができる。我々は、ラットや家兎において、内側半月板前方 1/2 切除モデルを用いて、その自己修復能力を評価し、さらに同種滑膜由来間葉系幹細胞を膝関節内注射することにより、その再生が促進されることも報告した。過去の我々の研究からは、膝関節内に注射された滑膜由来間葉系幹細胞は損傷半月板部位に遊走し、その再生を促進することが明らかとなり、また軟骨においては、幹細胞非投与群では変性が進行するのに対し、幹細胞投与群では軟骨変性を抑制したことが分かった。

半月板のホメオスターシスや変形性関節症予防は非常に重要であるが、半月板再生自体の詳細な経過は、いまだ明らかとはなっていない。我々は、マウスは遺伝子操作が容易であることから、マウスにおいて半月板の研究を進めることに価値があると考え、その内側半月板前方 1/2 モデルを作成し、その再生過程を組織学的、肉眼的に評価したのでここに報告する。

材料と方法

８週齢の C57BL6/J マウス(雄)を用いた。マウスには自由に飲水、食事を許可した。

手術

イソフルランによる吸入麻酔の上、トリブロモエタノールを腹腔内注射し十分に麻酔を聞かせた上で、左膝関節に皮膚切開を施行、膝蓋腱の内側縁に沿って関節包を縦切開し、膝関節内に進入した。膝蓋骨を外側脱臼させて、内側半月板前角を切離、鑷子で内側半月板を牽引しながら内側側副靭帯前縁付近で内側半月板中節を切離、半月板前方 1/2 を摘出した。その後は、徒手的に膝蓋骨を整復し皮膚をナイロン糸で縫合した。

肉眼的評価

マウスは術直後、術後 3 日、2、4、6 週にて評価を施行した。マウスの下肢を切離し、軟部組織を除去、大腿骨を外した状況で膝関節を真上から撮影し評価を行った。

組織学的評価、免疫組織学的評価

マウスは術後 3 日、2、4、6 週で評価を行った。各々の時点でサフラニン-O（以下 SaO）染色、ヘマトキシリン-エオジン(以下 H.E)染色を施行した。軟骨評価のためには OARSI スコア、MANKIN スコアを用い、半月板評価として modified Pauli's スコア、滑膜炎評価として synovitis スコアを用いた。また、免疫組織学的染色として、F4/80 染色、2 型コラーゲン染色を用いた。

統計学的手法

EZR ソフトウェアを用いた。いずれのスコアリングに関しても Kruskal-Wallis test、Steel-Dwass test を用い有意検定を施行した。いずれの検定においても p 値は 0.05 以下を有意基準とした。

結果

肉眼的評価

術後 3 日にでは、切除した半月板の領域はほぼ空虚であった。切除後 2 週において、周辺組織からの滑膜移行によると思われる軟組織が形成され、4 週には軟組織は半月板様の組織が形成された。6 週においてはほぼ正常同様の半月板へと再生を認めた。また、脛骨内側関節面に対する再生半月板の面積の割合を meniscus covering ratio と定義し評価を行ったところ、術直後、術後 3 日、術後 2 週では大きな変化は認めなかったが、術後 4 週で有意にその割合は上昇した。4 週と 6 週ではほぼ変化を認めなかった。

組織学的評価

術後 2 週では切除領域に線維芽細胞の非常に旺盛な増殖を認めた、この細胞は術後 4 週に SaO 陽性の軟骨基質を産生する軟骨芽細胞へと分化した。6 週においてはさらに SaO 染色性、染色域が拡がり形態的にも正常と同様の半月板と類似したものへと再生を認めた。Modified Pauli's score も経時的に有意に上昇した。一方、脛骨内側関節面は半月板切除に伴い経時的に変性の進行を認めた。切除後、4 週までに SaO 陽性の軟骨マトリックス領域は徐々に減少した、その一方で正常半月板と接する後方関節面は正常のままであった。OARSI スコア、MANKIN スコアでは経時的に悪化を認めたが、OARSI スコアにおいては 4 週と 6 週においては有意差を認めなかった。滑膜評価に関しては H.E 染色にて行ったが、切除後 3 日では、滑膜表層に細胞が徐々に集積し、2 週後に細胞密度は劇的に増加を認めた。切除後 4 週で、滑膜炎はいったん収束し、6 週時点では徐々に通常の形態に戻りつつあった。Synovitis スコアは切除後 2 週で他のいずれの時点と比べても有意に高値であった。

免疫組織化学的染色

切除後 3 日では、切除領域の細胞密度は著しく低下しており、細胞間間質は空虚であった。2 週までには、細胞密度は増加したものの、Ⅱ型コラーゲンは陰性であった。4 週には再生領域にⅡ型コラーゲン陽性領域を認め、再生組織が軟骨分化し始めていることを確認できた。6 週ではさらにⅡ型コラーゲンの染色性が増大していた。一方、マウス特異的マクロファージ抗体である F4/80 の免疫染色においては、切除後 3 日標本において周辺滑膜に強い染色性を認めた。この染色性は 2 週までには消失した。

討論

一般的に、多くの組織の修復過程は、炎症期、組織形成期、リモデリング期の 3 期が重複しながら進行する。本検討から、半月板再生に関しても類似の経過が見られると考えられた。まず、切除領域周辺滑膜のマクロファージの浸潤が起こり（炎症期）、次いで、2 週後に滑膜組織に線維芽細胞の増殖を伴った滑膜炎が認められた、この時期には多くの線維芽細胞増殖が見られるとともに、その細胞が切除領域に移行しているのも観察できた（組織形成期）。この細胞は 4 週から 6 週にかけて軟骨分化をとげた。このように、半月板再生に関しても炎症期、組織形成期、分化期、と 3 つのフェーズを確認することができた。

我々は半月板再生におけるプライマリソースは滑膜由来の線維芽細胞だと考えている、その理由は、半月板切除後の空白領域に滑膜由来の旺盛な線維芽細胞増殖が見られたからである。それに加え、過去の我々の研究から、ブタ半月板損傷モデルにおいて、滑膜由来間葉系幹細胞を投与すると損傷部位に投与細胞が移行していることも根拠である。

本検討では 4 週において最も関節軟骨の変性が見られた、4 週から 6 週にかけてはほぼ軟骨変性は進行しなかったが、興味深いことに、この 4 週から 6 週の時期に半月板再生はほぼ完了していた。再生半月板の性質は精査していないが、再生半月板が膝関節の不安定性を改善し、軟骨変性抑止に貢献したと考えられた。この結果は、過去の我々の家兎やブタを用いた研究結果でも同様の結論であった。家兎の研究では、半月板切除モデルにおいて、膝関節内の半月板切除領域に変形性関節症の進行が見られており、初鹿らは未成熟な半月板であったとしても軟骨保護効果が認められたと考察している。

ヒトにおいては、半月板縫合術の成績は無血管野の場合は 0-46%とその成績は不良であるが、血行野である Red/Red ゾーンにおける縫合術には良好な成績が多数報告されている。本検討において、内側半月板前方 1/2 の切除断面は Red/Red から White/White ゾーンまでの全ての領域を包括しており、White/White ゾーンに生じた修復不可能な領域の損傷は、損傷が同時に Red/Red ゾーンや Red/White ゾーンにも生じることで、White/White ゾーンの修復も起こりえるのではないかと考えられた。

本検討の限界としては、半月板前方 1/2 欠損が臨床ではほぼ見られないこと、人間と 4 足歩行の動物とでは半月板の損傷形態が異なることである。

我々は、マウスの内側半月板前方 1/2 切除モデルを作成し、その再生過程を評価した。切除後 3

日でマクロファージの浸潤を伴う滑膜の炎症を認め、2 週には切除領域に線維芽細胞の増殖が見られた。4 週にて組織学的に軟骨分化を認め、6 週に半月板の再生を観察した。マウスは遺伝子学的に有利であるため、今後更なる半月板再生過程の詳細を研究したいと考えている。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5305　号 | 日山　鐘浩 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　大川　淳<br>副　査　淺原　弘嗣、秋田　恵一 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

マウスを用いた半月板前方切除モデルにおいて、半月板の自然治癒過程を組織学的に検証し、半月板再生と軟骨ホメオスタシスの関連性を示すことを意図した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

マウスにおける半月板切除モデルにおいて、半月板組織が再生されることは知られているが、再生過程の詳細についてはこれまで報告がなかった。申請者は組織学的観点からこの過程を検討し、将来的な治療介入モデルの基礎となる知見を得た点で重要な研究といえる。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．　マウス内側半月板 1/2 切除モデルでは、切除 2 週で滑膜移行による軟組織形成がみられ、4 週で半月板様組織となり、6 週でほぼ再生が完成した。

２．　切除後 3 日でマクロファージの浸潤を伴う滑膜炎症が起こり、2 週で線維芽細胞の増殖、4 週で軟骨分化を認めた。

以上のように、申請者はマウス半月板再生モデルにおける詳細な再生過程を明らかにしており、今後の治療介入モデルの基盤となる研究成果といえる。

３）研究方法・倫理観

マウスの半月板切除後に 3 日目から 6 週目までの間に、5 つの time point で肉眼、組織、免疫組織学的検討が行われた。本研究は所属教室におけるこれまでの膝半月板再生研究の一環として行われており、研究方法に関する知識や技術力は高い次元で保持されている。その点で、本研究が周到な準備に基づくものであることはいうまでもない。

４）考察・今後の発展性

今回の研究は主として現象論が取り扱われたが、線維化・軟骨化に関与するサイトカインやシグナルの研究についても今後必要である。一方で、ヒト臨床により近い治療モデルへの発展も期待される。

**３．その他**

本研究のマウスモデルにおいてステロイド投与の影響を検討した研究成果も披露された。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があると認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 前田　裕子 |
| 論文審査担当者 | 主査　北川　昌伸<br>副査　田中　敏博、吉田　雅幸 |
| 論　文　題　目 | Association of non-synonymous variants in *WIPF3* and *LIPA* genes with abdominal aortic aneurysm: an autopsy study |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

腹部大動脈瘤は、加齢、性別、高血圧や喫煙等の非遺伝的要因の他に遺伝的要因の強い関与が報告されている多因子疾患である。これまでにも一塩基変異（single nucleotide variant：SNV）を用いた遺伝子関連研究が実施され、腹部大動脈瘤と有意な関連を示す SNV が報告されている。その多くは細胞外マトリックスや心血管系に関連する候補遺伝子から同定されてきたものあるが、これらが腹部大動脈瘤の発生や進行にどのように寄与しているかについては未解明な点も多い。本研究では、高齢者連続剖検例を対象とし、エクソームの SNV を網羅的に解析にすることにより、腹部大動脈瘤に関連する遺伝子の同定を試みた。その結果、新たな関連候補遺伝子として *WIPF3* 及び *LIPA* を同定した。これらの遺伝子からコードされるタンパクでは、いずれも共通して泡沫化マクロファージと関係していることが報告されている。腹部大動脈瘤の発生には中膜変性硬化による病理学的変化の関与が考えられているが、本研究結果から、マクロファージの変化による腹部大動脈瘤への寄与の可能性が示唆された。今後、これらの SNV と泡沫化マクロファージの関連をさらに検討していくことで、腹部大動脈瘤の発生機序について新たな知見を得ることが期待される。

＜緒言＞

腹部大動脈瘤は、腹部大動脈の一部の壁が、全周性、または局限性に拡大または突出した状態と定義される。多くは無症状・無自覚なまま突然に破裂し、死に至る危険の高い重篤な疾患である。65～75 歳の欧米人の男性を対象とした調査において腹部大動脈瘤の有病率は約 5%である。本邦においては、60 歳以上の高血圧患者における有病率が約 4.1%との報告があるが、一般的な疫学調査は行われていない。地理学的集団別の調査を行った論文によると、米国 2.2%、欧州 2.5%、オーストラリア 6.7%に対して、アジアでは 0.5%とその発症が少ない傾向にある。そのため、今回包括的に日本人患者集団を対象として調査を行う意義は高いと考える。

腹部大動脈瘤の発症、進行には、様々な危険因子が報告されており、性別（男性）、加齢（65 歳以上）、動脈硬化、喫煙、高血圧、及び家族歴が知られている 。さらに、これまでに多くの遺伝子関連研究が実施されており、腹部大動脈瘤に関連する多くの遺伝子が報告されている。これらの多くは細胞外マトリックス、心血管系、免疫系、及びシグナル伝達系に関連する候補遺伝子

をターゲットとした研究である。また、ゲノムワイド関連解析（GWAS）により強い関連性を示す *CNTN-3*、*DAB2IP*、及び *LRP1* などの遺伝子も報告されている。しかしながら、これらの遺伝子と腹部大動脈瘤の発症や進行との関与については未解明な点も多い。このように腹部大動脈瘤には多くの因子の関与が示唆されているが、さらに新たな関連遺伝子を探索することにより、発生機序や症状進行に対する理解を深めることができると考えられる。そこで、本研究では、高齢者連続剖検例より得たデータを用いて、腹部大動脈の病理学的な変化と遺伝子の関係を検討することにより、新たな関連候補遺伝子の同定を試みた。

＜方法＞

東京都健康長寿医療センターにて 1995～2012 年に実施した高齢者連続剖検 2,343 例のうち、ジェノタイピングを行い、血縁関係にある患者、heterozygosity の患者等を除く 2,263 例を本研究の解析対象とした。腹部大動脈瘤の有無は病理学的診断に基づいて決定した。

ジェノタイピングは Illumina 社の HumanExome BeadChip を用いて、iScan により実施した。247,451 のエクソン領域 SNV から、再現率 0.99 未満、ハーディ・ワインベルグ平衡（Hardy-Weinberg Equilibrium : HWE）の p 値が $1.00\times10^{-5}$未満、マイナーアレル頻度（Minor allele frequency : MAF） 0.05 未満である SNV を除いた 24,423 の SNV について関連解析を行った。Bonferroni 補正有意水準 は $p<2.05\times10^{-6}$とした。腹部大動脈瘤との関連の示唆された SNV については、年齢、性、及び、年齢、性、喫煙の有無を調整因子としたロジスティック回帰分析を行った。

また、腹部大動脈瘤との関連が示唆される疾患（合併症）の有無、並び、動脈硬化に関連する大動脈等の血管の病理学的変化との関連性についても検討した。

＜結果＞

本研究の解析対象剖検例 2,263 例（腹部大動脈瘤を有する症例：118 例、腹部大動脈瘤を有しない症例：2,145 例）における関連解析の結果、事前に規定した Bonferroni 補正水準に達する p 値を満たす SNV は認められなかったが、*WAS/WASL interacting protein family 3*（*WIPF3*）遺伝子の rs3750092（$p=6.09\text{x}10^{-6}$、オッズ比 0.36）、*lysosomal acid lipase A*（*LIPA*）遺伝子の rs1051338（$p=2.79\text{x}10^{-6}$、オッズ比 2.50）及び rs2246942（$p=1.61\text{x}10^{-5}$、オッズ比 2.32）との強い関連が示された。rs3750092 の SNV により WIPF3 タンパクの 321 番アミノ酸はグルタミン酸（E）からグリシン（G）に置換し、腹部大動脈瘤に対し発症リスクを減らす因子となる可能性が示唆された。一方、rs1051338 の SNV により LIPA タンパクの 16 番アミノ酸がトレオニン（T）からプロリン（P）に置換するが、rs2246942 はイントロン領域にある SNV であった。これらの *LIPA* 遺伝子の SNV は腹部大動脈瘤の発症リスクを増大させる因子となる可能性が示唆された。

3 つの SNV について、年齢、性、及び、年齢、性、喫煙の有無を調整因子としたロジスティック回帰分析では、これらの調整因子による影響は無いことが示された。同様に、腹部大動脈瘤に関連する合併症、病理学的動脈硬化変化についても、これらの SNV は独立した因子であることが示唆された。

なお、腹部大動脈瘤と *WIPF3* 遺伝子との関連が示唆されたことから、探索的に腹部大動脈瘤患者のアテローム性プラーク及び大動脈中膜における WIPF3 タンパクの発現の有無を染色により検討した。この結果、アテローム性プラークに WIPF3 タンパクの発現を確認した。

＜考察＞

今回、腹部大動脈瘤とエクソン領域にある 24,423 SNV との関連性を解析した結果、Bonferroni 補正水準に達する SNV は認められなかったが、腹部大動脈瘤に関連する可能性を有する新たな候補遺伝子として *WIPF3* 及び *LIPA* を同定した。

解析した SNV のうち、本研究で強い関連性を示した SNV は、*WIPF3* 遺伝子の rs3750092、及び *LIPA* 遺伝子の rs1051338 及び rs2246942 であった。 *LIPA* 遺伝子の 2 つの SNV は、高い連鎖不平衡にある（$r^2$=0.907、D'=0.968、1000 genomes [phase_1 JPT data]より）。また、*LIPA* 遺伝子に関しては、今回同定された rs2246942 及び rs2246942 と高い連鎖不平衡の関係にある 2 つの SNV が心血管疾患（CAD）と関連するとの報告がある。さらに、LIPA mRNA 量の増加が CAD の危険因子であることも報告されている。*LIPA* 遺伝子はマクロファージのコレステロールエステル調節に重要な lysosomal acid lipase タンパクをコードしている。動脈硬化が CAD 及び腹部動脈瘤の両方の基礎疾患であることから、*LIPA* の SNV はこれらの疾患において、脂質代謝にも関連する共通の危険因子となる可能性がある。一方で、腹部大動脈瘤と本研究で同定した *LIPA* 遺伝子の SNV の関連性は、病理学的な動脈硬化性変化による影響を受けないことから、独立した機序で寄与する因子となり得ることも示唆される。

本研究では、*WIPF3* 遺伝子の SNV rs3750092 についても、腹部大動脈瘤との関連性が示された。WIPF3 タンパクは、neural Wiskott-Aldrich syndrome protein （N-WASP）と結合し、アクチン骨格と細胞移動の調整において重要な役割を担っている。WIPF3 タンパクが脳及び精巣に主に発現するとの報告はあるが、その他の細胞における発現や働きなどについてはよく分かっていない。また、これまでの研究で、N-WASP がマクロファージの podosome formation に必要であること、マクロファージが腹部大動脈瘤の形成において重要な役割を担うことは報告されているが、これらと WIPF3 を介した腹部大動脈瘤の発生・進行との関連については、これまで報告がない。

本研究で同定した候補遺伝子は、共にマクロファージに関連するものであったことから、これらの遺伝子がマクロファージに影響を及ぼすことで、腹部大動脈瘤の発症に寄与している可能性が考えられた。

＜結論＞

腹部大動脈瘤に関連する候補遺伝子として *WIPF3* 及び *LIPA* を同定した。これらの遺伝子はからコードされるタンパクはマクロファージに発現する。腹部大動脈瘤の発症機序におけるこれらの遺伝子との関連をさらに検討する研究が必要と考える。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5306　号 | 前田　裕子 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　北川　昌伸<br>副　査　田中　敏博、吉田　雅幸 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は腹部大動脈瘤と関連する遺伝子の一塩基置換の検討についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

腹部大動脈瘤は、加齢、性別、高血圧や喫煙等の非遺伝的要因の他に遺伝的要因の強い関与が報告されている多因子疾患である。これまでにも一塩基変異（single nucleotide variant：SNV）を用いた遺伝子関連研究が実施され、腹部大動脈瘤と有意な関連を示すSNVが報告されている。その多くは細胞外マトリックスや心血管系に関連する候補遺伝子から同定されてきたものあるが、これらが腹部大動脈瘤の発生や進行にどのように寄与しているかについては未解明な点も多い。本研究では、高齢者連続剖検例を対象とし、エクソームのSNVを網羅的に解析にすることにより、腹部大動脈瘤に関連する遺伝子の同定を試みた。これまで腹部大動脈瘤の発生機序に関わるSNVの解析は進んでおらず、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.　新たな関連候補遺伝子としてWIPF3及びLIPAを同定した。

2.　これらの遺伝子からコードされるタンパクでは、いずれも共通して泡沫化マクロファージと関係していることが報告されている。腹部大動脈瘤の発生には中膜変性硬化による病理学的変化の関与が考えられているが、本研究結果から、マクロファージの変化による腹部大動脈瘤への寄与の可能性が示唆された。

以上のように申請者は、新たな腹部大動脈瘤関連候補遺伝子としてWIPF3及びLIPAを同定し、腹部大動脈瘤発生の上で重要な知見である可能性を示している。これは意義のある研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では臨床検体に対して詳細な病理組織像の解析が行われ、遺伝子変化との対応の検討がなされた。本手法は十分な病理組織学的診断・解析能力と分子生物学的知識との裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と能力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果について、マクロファージの変化による腹部大動脈瘤への寄与の可能性があると考察している。これは腹部大動脈瘤に関する先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 坂東　倫行 |
| 論文審査担当者 | 主査　横関　博雄<br>副査　神奈木　真理、樗木　俊聡 |
| 論　文　題　目 | Differential usage of COX-1 and COX-2 in prostaglandin production by mast cells and basophils |

（論文内容の要旨）

【要旨】

好塩基球は肥満細胞と類似したいくつかの特徴を有しており，肥満細胞様の細胞と考えられてきた．しかし，近年，生体防御やアレルギー反応において好塩基球が独自の生理機能を有することが分かってきている．一方，脂質メディエーターを含め，好塩基球のエフェクター分子については不明な点が多い．我々は，LC-MS/MS を用いた分離定量系により，IgE 抗原架橋刺激をした際の好塩基球と肥満細胞が産生する複数の脂質メディエーターを即時相（刺激後 0.5 時間），遅延相（刺激後 6 時間）に分けて定量した．ロイコトリエン B4（LTB4）や 5-HETE 等の 5-lipoxygenase (5-LOX)代謝物については，好塩基球，肥満細胞共に即時相で多く遊離した．肥満細胞は好塩基球と比較して多量の LTB4, 5-HETE を産生したが，これは 5-LOX 遺伝子の発現量の差に起因するものと考えられた．一方，Cyclooxygenase（COX）代謝物については，肥満細胞では即時相，好塩基球では遅延相で産生量のピークが認められた．この産生タイミングの違いについて，遺伝子発現変動及び COX-1，COX-2 それぞれの選択的阻害剤を用いた検討により明らかにした．即ち，肥満細胞では，刺激前より COX-1 が優位に発現しており，刺激後即座に COX-1 を介して代謝物を産生している．一方，好塩基球では，刺激に応じて COX-2 の発現が誘導され，その後に COX-2 を介して代謝物を産生していた．

このことからプロスタグランジン等の COX 代謝物の産生は，好塩基球と肥満細胞において異なるメカニズムで制御されていることが明らかとなった．

【序論】

好塩基球は血中を循環する白血球のうち，1%未満に満たない最も少ない顆粒球である．
好塩基球は，細胞内に好塩基性顆粒を有し，細胞表面に高親和性 IgE 受容体の発現すること，また，抗原による IgE 架橋刺激などの刺激に応じてヒスタミンやプロテアーゼなどの起炎性メディエーターを産生する等，末梢組織に存在する肥満細胞と，共通した性質を持つ．これらの類似性

から，好塩基球は，血中循環型の肥満細胞の亜種あるいは，前駆細胞と見なされてきた．好塩基球はその数の少なさや，短寿命であることから研究が困難であったが，好塩基球欠損マウスの樹立等の技術的革新により，好塩基球の機能解析が可能となった．これにより，寄生虫に対する防御反応や，アレルギー反応等，様々な免疫反応において，好塩基球は肥満細胞と異なる生理的機能を示すことが分かってきている．一方，好塩基球が産生する脂質メディエーター等のエフェクター分子については，古くから研究されている肥満細胞に較べて，不明な点が多い．

アラキドン酸に由来する脂質メディエーター群であるエイコサノイドは，恒常性の維持や炎症反応において重要な役割を有している．ロイコトリエンやプロスタグランジン等のエイコサノイドの生合成経路は良く知られている．アラキドン酸は 5-LOX の作用により，LTA4，5-HETE に代謝され，LTA4 は LTA4 hydrolase の作用により LTB4 に，LTC4 synthase の作用により LTC4 に変換される．LTC4 はさらに，LTD4，LTE4 へと代謝される．一方，プロスタグランジン類は COX の作用によるアラキドン酸から PGH2 への変換と，以降の PGH2 から種々のプロスタグランジンアイソフォーム合成酵素の作用による PGD2，PGE2 等，各アイソフォームへの代謝により産生される．COX には 2 種のアイソザイム，COX-1，COX-2 が存在する．COX-1 は多様な細胞において構成的に発現しているのに対して，COX-2 は様々な刺激に応じてその発現が誘導される．

肥満細胞より産生されるエイコサノイドは，よく研究されており，IgE と特異的抗原による刺激（IgE 抗原架橋刺激）により，即座に LTB4，LTC4，5-HETE や PGD2 を産生することが分かっている．一方，好塩基球においては，長い間，LTC4 のみを産生すると考えられてきたが，近年，PGD2 や PGE2 も産生することが報告されている．しかしながら，これら好塩基球のエイコサノイドの産生量や産生メカニズムについては不明な点が多い．

本研究では，LC-MS/MS を用いた定量解析による，種々のエイコサノイド産生量や IgE 架橋刺激後の時間に応じた変動解析，及び各エイコサノイド産生の責任酵素の探索を行い，好塩基球と肥満細胞のエイコサノイド遊離の違いを明らかにした．

【方法】

マウス骨髄細胞を 100 pg/mL IL-3 存在下で 7 日間培養し，マウス骨髄由来好塩基球（BMBAs）を得た．また，マウス骨髄細胞を 10 ng/mL IL-3，2 ng/mL SCF 存在下で 6-8 週間培養し，マウス骨髄由来肥満細胞（BMMCs）を得た．BMBAs 及び BMMCs を抗 TNP-IgE 抗体にて感作させた後，TNP-OVA 抗原及び陰性対照として OVA にて刺激した．刺激後 0.5 時間，6 時間後の培養上清を回収した． LC-MS/MS にて培養上清中の各種エイコサノイドを分離，定量を行った．エイコサノイド産生に関与する責任酵素同定を目的とした実験においては， 5-LOX 阻害剤 BW-A4C, Cyclooxygenase 1 (COX-1)阻害剤 Sc560, Cyclooxygenase 2 (COX-2)阻害剤 Celecoxib を刺激 10 分前に添加した. 阻害剤添加の有無による刺激後培養上清中の各種エイコサノイド量の変化を比較し，責任酵素を同定した．

遺伝子発現実験では，TNP-OVA 抗原あるいは OVA にて刺激 0.5 時間後の BMBAs，BMMCs を回収し，total RNA を抽出した．各種酵素の定量的 RT-PCR を行い，*Gapdh* 遺伝子にて補正した．

【結果及び考察】

**好塩基球は刺激後早期に 5LOX 代謝物を遊離する．**

同細胞濃度に調製した，BMBAs, BMMCs を抗 TNP-IgE 及び TNP-OVA にて IgE 架橋刺激した．刺激後 0.5，6 時間後の培養上清中の各種エイコサノイドを分離定量した．その結果，BMBAs, BMMCs 共に，刺激後 0.5 時間をピークとするロイコトリエン B4（LTB4）及び 5-HETE の上昇が認められた．LTB4, 5-HETE の産生量は BMBAs に対して BMMCs で 10～20 倍多く産生されていた．LTB4, 5-HETE の酵素的な産生には 5-LOX が関与していることが知られている．そこで，BMBAs，BMMCs に 5-LOX 阻害剤 BW-A4C を作用させ，刺激 0.5 時間後の培養上清中の LTB4, 5-HETE を定量した．その結果，BMBAs，BMMCs いずれの培養上清中でも，5-LOX 阻害剤存在下では LTB4, 5-HETE の産生量が顕著に低下した．このことから観察された，好塩基球，肥満細胞からの LTB4，5-HETE 産生は 5-LOX を介して産生されることが分かった．加えて，好塩基球，肥満細胞における 5-LOX の発現量を定量的 RT-PCR 法にて比較した．その結果，肥満細胞では好塩基球よりも 5-LOX の発現量が多く，このことが肥満細胞においてより多くの LTB4，5-HETE 産生に寄与していることが考えられた．

**肥満細胞は刺激後早期に，好塩基球は刺激後期に COX 代謝物を遊離する．**

PGE2，PGD2 及び 11-HETE は COX により産生されるエイコサノイドである．これら 3 種のエイコサノイドは BMBAs，BMMCs ともに IgE 架橋刺激による産生上昇が観察されたが，BMMCs では刺激後即座に上昇が認められたのに対して，BMBAs では刺激 6 時間後に遅れて上昇した．この原因として，肥満細胞と好塩基球の間で COX の誘導に違いがある事が考えられた．そこで，COX-1，COX-2 の IgE 架橋刺激による遺伝子発現変動を調べた．COX-1 は刺激前より BMMCs で優位に発現しており，刺激による発現変動はなかった．一方，COX-2 は刺激により発現上昇したが，BMBAs でより高い発現を示した．このことから，肥満細胞では COX-1，好塩基球では COX-2 の作用により PGD2，PGE2，11-HETE が産生されていることが予想された．そこで，COX-1 阻害剤，COX-2 阻害剤添加による PGD2，PGE2，11-HETE 産生の変化を調べた．その結果，BMBAs では，COX-2 阻害剤添加により，IgE 架橋刺激による PGD2，PGE2，11-HETE 産生が全て完全に抑制された．一方，BMMCs では，PGD2, PGE2，11-HETE 産生に対して，COX-2 阻害剤は有意な阻害効果を示さず，COX-1 阻害剤はほぼ完全な抑制効果を示した．このことから，肥満細胞では，構成的に発現している COX-1 の効果により刺激後即座に PGD2, PGE2, 11-HETE の産生が上昇し，好塩基球では，刺激後に発現誘導される COX-2 の効果により遅れて PGD2, PGE2, 11-HETE 産生が上昇することが示唆された．

末梢組織に局在する肥満細胞に対して，好塩基球は血中を循環している．COX 代謝物であるプロスタグランジン類は，炎症・アレルギー反応に関与する脂質メディエーターである．寄生虫等の病原体の侵入に対して即座に反応する肥満細胞に対して，末梢組織に浸潤し，防御反応を発揮する好塩基球にとって，刺激後遅れて COX 代謝物を産生するのは好都合なのかもしれない．

【結論】

肥満細胞と好塩基球では異なる COX アイソザイムを使って，COX 代謝物を産生している．即ち，肥満細胞は定常時から発現している COX-1 の働きにより刺激後早期に，一方，好塩基球では，刺激に応じて COX-2 が誘導された後に COX 代謝物が産生・遊離される．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5307　号 | 坂東　倫行 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　横関　博雄<br>副　査　神奈木　真理、樗木 俊聡 | |

（論文審査の要旨）

１、論文内容

好塩基球は血中に循環する白血球のうち 1%に満たない少ない顆粒球で細胞内に好塩基性顆粒を有するなど肥満細胞と共通した特徴を有している。しかし、近年生体防御やアレルギー反応において好塩基球が肥満細胞と異なる機能を有することが明らかになっている。一方，両者における脂質メディエーターに関してはまだ明らかにされていない。そこで、申請者は，LC-MS/MS を用いた分離定量系により，IgE 抗原架橋刺激による好塩基球と肥満細胞が産生する脂質メディエーターを即時相（刺激後 0.5 時間）、遅延相（刺激後 6 時間）に分けて定量した．ロイコトリエン B4（LTB4）、5-HETE 等の 5-lipoxygenase (5-LOX)代謝物に関しては好塩基球、肥満細胞ともに即時相に多く遊離しており肥満細胞が好塩基球より多量の LTB4, 5-HETE の産生が認められた。この差は肥満細胞が 5-LOX 遺伝子を強く発現するためであることが明らかになった．一方，PGD2,PGD2 などの Cyclooxygenase（COX）代謝物に関しては、肥満細胞では即時相，好塩基球では遅延相で産生量のピークが認められた。遺伝子発現、COX-1，COX-2 の選択的阻害剤を用いて検討したところ肥満細胞では、IgE 抗原架橋刺激の有無にかかわらず COX-1 の常時発現が認められ主に COX-1 を介して産生している．一方，好塩基球では、IgE 抗原架橋刺激により COX-2 の発現が誘導され COX-2 を介して代謝物を産生していることが明らかになった. 以上の結果から肥満細胞と好塩基球では異なる COX アイソザイムを使って，COX 代謝物を産生していることが明らかになった。

２、論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者が LC-MS/MS を用いた独自の分離定量系により、IgE 抗原架橋刺激による好塩基球と肥満細胞が産生する脂質メディエーターを解析し、肥満細胞と好塩基球では異なる COX アイソザイムを使って COX 代謝物を産生していることを明らかにした点は独創的で評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は

１．肥満細胞と好塩基球では異なる COX アイソザイムを使って COX 代謝物を産生していることを明らかにしたことは意義があり COX-2 阻害剤を用いた治療法が期待できる。

２．5-lipoxygenase (5-LOX)代謝物に関しては好塩基球、肥満細法ともに即時相に多く遊

離しており特に肥満細胞が好塩基球より多量の 5-LOX 代謝物産生が認められたことより即時反応では肥満細胞の 5-LOX 代謝物をターゲットとした治療法が期待で来る点で優れている。

３．研究方法・倫理観

研究には好塩基球、肥満細胞を純化して培養しその培養上清を回収し、独自のLC-MS/MSを用いた分離定量系によりIgE抗原架橋刺激による好塩基球と肥満細胞が産生する脂質メディエーターを解析している。本手法は十分な生化学的および免疫的知識とLC-MS/MSを用いた特殊な技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

３、審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があると認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 村上　悠二 |
| 論文審査担当者 | 主査　宮坂　尚幸<br>副査　山岡　昇司、安達　貴弘 |
| 論　文　題　目 | A novel mother-to-child human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) transmission model for investigating the role of maternal anti-HTLV-1 antibodies using orally infected mother rats |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ヒトT細胞白血病ウイルス１型（HTLV-1）は、成人T細胞白血病/リンパ腫（ATL）を引き起こす。主な感染経路は母乳を介した母子感染であり、ATL発症危険因子の１つとして考えられている。母子感染率には、感染母体の持続感染量（PVL）や抗HTLV-1抗体価、授乳期間が関連していることが示唆されているが、母子感染のメカニズムに関して未だ不明な点が多い。本研究では、抗HTLV-1抗体応答が誘導されない経口感染ラットを用いて、母子感染率が高く、抗HTLV-1移行抗体のない母子感染モデルを確立した。さらに、抗HTLV-1 Env gp46中和モノクローナル抗体（LAT-27）を非感染ラット及び感染母ラットへ受動免疫した結果、LAT-27抗体は新規腹腔感染を抑制したが、新規経口感染や母子感染を抑制できないことがわかった。これらの知見は、この母子感染モデルが母子感染メカニズムだけではなく、抗HTLV-1抗体の母子感染における役割を解明できる有用なモデルになりうることを示唆している。また、ヒトでのHTLV-1母子感染を阻止する新たな予防法の確立をする上で、抗HTLV-1移行抗体の母子感染における役割に関する情報を提供できると考えられる。

＜緒言＞

ヒトT細胞白血病ウイルス１型（HTLV-1）は、感染者の約5%にCD4陽性T細胞の悪性腫瘍である成人T細胞性白血病/リンパ腫（ATL）を引き起こす。HTLV-1感染では、授乳を介した母子感染が主要な感染経路であり、このような乳児期におけるHTLV-1感染はATL発症危険因子の１つであると考えられている。これまでに長期授乳、母体の高い持続感染量（PVL）や抗HTLV-1抗体価が母子感染の危険因子として報告されているが、母子感染のメカニズムについては未だ不明な点が多い。また一般に、PVLと抗HTLV-1抗体価には正の相関関係があるため、母子感染における抗HTLV-1抗体の役割についても不明なままである。母乳を介した母子感染の機序等を解明するには動物モデルは有用であり、これまでにラットを用いた母子感染モデルも報告されているが、その感染率は約22%と高くないのが現状である。

本研究では、抗HTLV-1抗体応答がなく高PVLを特徴とする経口感染母ラットを用いて母子感染モデルを作製し、子供への感染率を検討した。また、このモデルを用いて感染母ラットへの

抗 HTLV-1 抗体の受動免疫が及ぼす母子感染への影響を検討した。

＜方法＞

免疫正常雌ラット（F344/N Jcl-*rnu/+*）への HTLV-1 感染には、HTLV-1 感染ヒト T 細胞株（ILT-M1）の経口または腹腔内接種を用いた。また母子感染系では、経口感染雌ラットに出産させ、生後 4 週（離乳後 1 週）まで自然哺育させた仔を使用した。各ラットの脾細胞もしくは末梢血単核球中の HTLV-1 プロウイルスの検出や PVL の測定には、HTLV-1 遺伝子の *pX* 領域を標的とした定量 PCR 法を用いた。また、血清中の抗 HTLV-1 抗体をゼラチン粒子凝集法及びウェスタンブロッティング法により検出した。

抗 HTLV-1 抗体の母子感染への役割を調べるため、ラット抗 HTLV-1 Env gp46 中和モノクローナル抗体（LAT-27）を用いた。LAT-27 抗体の HTLV-1 を中和するのに必要な濃度を決定するため、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に HTLV-1 LTR プロモーターを組み込んだレポータープラスミドを HTLV-1 非感染ヒト慢性骨髄性白血病細胞株（K562）に導入後、ILT-M1 との共培養で引き起こされる細胞融合や感染に対する LAT-27 抗体の抑制効果をレポーターアッセイにより確認した。

LAT-27 抗体の生体内動態を調べるため、抗体（10mg）を腹腔内投与した後、継時的に血清中の抗体濃度を ELISA 法により測定した。生体内での LAT-27 抗体による感染防御効果を検証するため、成体ラットへ LAT-27 抗体を腹腔あるいは経口感染前（-24h, -5h）、腹腔感染前後（-24h, +5h）に腹腔内投与した。各感染の 8 週後に脾細胞中の PVL を測定した。

LAT-27 抗体の母子感染への影響を調べるため、経口感染雌ラットへ LAT-27 抗体を腹腔内投与した後、その感染ラットに妊娠・出産させ、仔が離乳した後（生後 4 週）に HTLV-1 プロウイルスと移行した LAT-27 抗体の検出を行った。

＜結果＞

ILT-M1 により経口感染したラットでは、MT-2 細胞（HTLV-1 感染ヒト T 細胞株）を用いた以前の報告と同様に、腹腔感染ラットに比べ PVL が高く、抗 HTLV-1 抗体応答が検出できないことがわかった。この経口感染ラットを用いた母子感染系では、仔への感染率が平均 70%（50-100%）と高く、それは感染母ラットの PVL と相関する傾向が認められた。また感染母ラット 4 個体中 1 個体は 3 度出産を経験し、いずれの出産でも高い母子感染率を示していた。

抗 HTLV-1 抗体の母子感染における役割を検証するため、Env gp46 を認識し、HTLV-1 を中和することが報告されている LAT-27 抗体を使用することにした。試験管内での合胞体形成・感染抑制試験では、LAT-27 抗体は 10 μg/ml の濃度で HTLV-1 感染を抑制することがわかった。また、ラット生体内での LAT-27 抗体の半減期は約 2 週間であった。このような LAT-27 抗体をラットに前処置（感染-24h, -5h）した後、腹腔内感染させたところ感染が有意に抑制されたが、経口感染は抑制されなかった。また、腹腔感染前後（感染-24h, +5h）に LAT-27 抗体を処置したラットでも感染は有意に抑制されたが、その PVL は、2 度感染前に処置した個体群の PVL に比べやや高い傾向にあった。

LAT-27 抗体を接種した経口感染母ラットから生まれた第 1 仔群（抗体接種後 53 日）では、移

行した LAT-27 は約 0.5 μg/ml であり、母子感染率は 100%であった。しかし、同じ母ラットから生まれた第 2 仔群（抗体接種後 123 日）では、移行した LAT-27 抗体は検出できず、母子感染率も約 38%と低くなった。

＜考察＞

本研究では、高い PVL を示し、抗 HTLV-1 抗体応答の検出できない HTLV-1 経口感染ラットを用いることにより、母子感染率が以前の報告よりも高い母子感染モデルを作製した。このモデルでは、母親の PVL が高くなるにしたがって母子感染率が上昇する傾向を示した。この結果は、ヒトでの報告と一致していた。また、経口感染ラットでは抗 HTLV-1 抗体応答が誘導されないため、抗体を感染母ラットへ受動免疫することにより、母子感染における抗体の役割について検討できる有用なモデルになりうると考えられる。

LAT-27 抗体を成体ラットに感染前（感染-24h, -5h）に腹腔内投与した場合でも、感染前後（感染-24h, +5h）に投与した場合でも、腹腔感染は有意に抑制されたが、感染前後処置群の PVL は、感染前処置群の PVL に比べやや高い傾向にあった。これらの結果は、LAT-27 抗体は生体内でも HTLV-1 感染を抑制する能力を持っているが、効率良く感染を抑えるためには、感染暴露部位に高濃度に存在していることが必要であることを示している。一方、LAT-27 抗体を感染前（感染-24h, -5h）に処置したラットでは、経口感染が全く抑えられなかった。さらに、感染 24 時間前に LAT-27 を腹腔内接種後、ILT-M1 細胞と LAT-27 抗体を経口投与した場合でも、LAT-27 抗体は経口感染を抑えることができなかった。これらの結果は、HTLV-1 の粘膜感染には、中和抗体で抑えられない他の感染機序が存在する可能性を示唆している。

LAT-27 抗体を接種した感染母ラットが出産した第 1 仔群では、移行した血清中 LAT-27 抗体濃度は低く、母子感染率は 100%であったが、同じ感染母ラットから生まれた第 2 仔群では、移行した LAT-27 が検出できないにも関わらず、母子感染率（約 38%）が低くなった。さらに、第 2 仔群の PVL は第 1 仔群に比べ有意に低かった。これらの結果より、LAT-27 抗体を投与された感染母ラットの体内で、第 1 仔出産時に比べ第 2 仔出産時で PVL が減少した可能性や、サイトメガロウイルス感染で報告されているような低濃度に移行した抗ウイルス中和抗体による感染の促進が、HTLV-1 感染でも起こっている可能性が考えられた。

以上の結果から、LAT-27 抗体は感染経路によるが、生体内で感染防御効果を示すことがわかった。一方、LAT-27 抗体は HTLV-1 の主要感染経路である粘膜感染を抑制できなかったことから、母子感染（粘膜感染）における感染機序の詳細な解析が必要であると考えられた。

＜結論＞

本研究では、母親由来抗 HTLV-1 抗体が移行されない新規母子 HTLV-1 感染ラットモデルを確立した。このモデルは、これまで不明であった母子感染における母親由来抗 HTLV-1 抗体の役割を解明できる可能性のある有用なモデルであると考えられる。また本研究の結果は、新たな感染予防法を開発するうえで、重要な情報を提供するものと考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5308　号 | 村上　悠二 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宮坂　尚幸<br>副　査　山岡　昇司、安達　貴弘 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

ヒトＴ細胞白血病ウィルスＩ型（HTLV-I）は、成人Ｔ細胞白血病（ATL）の原因ウィルスであり、主たる感染経路は母乳を介した垂直感染であることが知られている。母子感染リスクを高める要因として、母体の proviral load、HLTV-I 抗体価、授乳期間の関与が知られているが、その詳細なメカニズムは依然として不明である。本研究では HTLV-I 経口感染ラットを用いて、抗体応答が誘導されない新規母子感染モデルを確立した。さらに抗 HTLV-I Env gip46 中和モノクローナル抗体（LAT-27）の感染予防効果を検討し、新規腹腔内感染を予防する効果があること、しかしながら新規経口感染や母子感染を予防する効果が無いことを明らかにした。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

ATL は HTLV-I キャリアに発症する難治性の白血病である。HTLV-I 感染は主として母乳を介した母児感染により成立することから予防が極めて重要であるが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。これまで用いられてきた動物実験モデルでは母児感染率が低く効率的な研究が困難であったが、本研究で HTLV-I 感染ヒトＴ細胞株（ILT-M1）をラットに経口感染させることにより高率に母児感染が成立するモデルを確立したことは、極めて先駆的、独創的な研究であると判断される。

２）社会的意義

日本で HTLV-I キャリアは 100 万人以上存在し、年間 1000 人のキャリアのうち 0.6-0.7 人が ATL を発症し極めて難治性である。また HTLV-I キャリアは ATL のみならず、HTLV-I 関連脊髄症（HTLV-I associated myelopathy）や HTLV-I 関連ブドウ膜炎などを引き起こし、いずれも難治性である。本研究で確立された動物実験モデルは、今後の垂直感染予防戦略の礎となるものであり、その社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

動物を用いた研究であり、東京医科歯科大学実験動物センターにて適切な審査を受けて行われた研究であり、倫理的な問題は認められない。また研究方法も適切であり、その解釈、考察も妥当である。

４）考察・今後の発展性

本研究で確立された動物実験モデルは、今後の母児感染予防戦略の確立、ワクチンの開発などに有用であり、今後の発展が大いに期待できる。

**３．その他**

スライド、口頭発表ともよく準備され、わかりやすい内容であった。質疑応答においても満足すべき解答が得られた。

**４．審査結果**

申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断される。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 宮地　康高 |
| 論文審査担当者 | 主査　仁科　博史<br>副査　渡邉　守、藍　真澄 |
| 論　文　題　目 | Roles for Cell-Cell Adhesion and Contact in Obesity-Induced Hepatic Myeloid Cell Accumulation and Glucose Intolerance |

（論文内容の要旨）

（要旨）

肥満に伴い肝臓には白血球が浸潤し糖代謝異常を引き起こす。白血球が肝実質へ浸潤する際には肝類洞内皮細胞（LSEC: liver sinusoidal endothelial cell）のバリアを通過する必要がある。今回、肥満マウス由来の LSEC において細胞接着因子 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)とそのリガンド VLA-4 (very late antigen-4)を介した単球細胞株との細胞接着が亢進していることを示した。食餌誘導性肥満マウスに抗 VLA-4 中和抗体を 6 週間反復投与すると、フローサイトメトリー解析により肝臓への好中球・単球浸潤が減少し、糖新生促進酵素 G6Pase (glucose 6-phosphatase)の遺伝子発現の低下および耐糖能異常の改善が認められた。抗 VLA-4 中和抗体を投与したマウス由来の肝細胞のマイクロアレイ解析により、細胞接触シグナルである Notch シグナルの活性化が示唆された。肝内白血球と初代培養肝細胞の接触共培養により、Notch シグナル依存的に G6Pase の遺伝子発現が上昇した。以上から、白血球と LSEC の細胞接着、浸潤白血球と肝細胞の細胞接触は肥満に伴う糖代謝異常を惹起することが示唆された。

（緒言）

肥満に伴い内臓脂肪組織には炎症性細胞が浸潤し、遊離脂肪酸や炎症性サイトカインの放出を増加させて全身のインスリン抵抗性が生じる。肝臓は体内で糖を産生する主要臓器であり、肝臓のインスリン抵抗性は糖放出の増加により耐糖能異常を惹起する。加えて、肥満では肝臓にも炎症性細胞が浸潤し、炎症性サイトカインおよびエラスターゼ等の生理活性物質の分泌を介して糖代謝異常を促進する。LSEC は類洞の最内層に位置し、肝細胞と類洞を隔てる類洞壁を構成する。LSEC は有窓構造で基底膜を欠くという形態学的特徴を有し、類洞血中のヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸や変性コラーゲンなどの巨大分子を処理している。肥満において、白血球が類洞から肝実質へ浸潤する過程で、LSEC のバリアを超える必要があるものの、その分子機構は不明であり、LSEC と白血球の相互作用が肝臓の糖代謝機能に及ぼす影響も明らかではない。加えて、肥満に伴い白血球は肝実質内に浸潤するが、浸潤白血球と肝細胞の物理的細胞間相互作用が肝細胞の糖代謝機能に及ぼす影響は明らかではない。

今回、肥満において、細胞接着因子 VCAM-1 のリガンドである VLA-4 を介した白血球と LSEC

との細胞接着、および Notch シグナルを介した浸潤白血球と肝細胞の細胞接触が糖代謝異常を引き起こすことを明らかにし、肝臓における細胞接触と細胞接着を介した新たな糖代謝調節機構を明らかにした。

（方法と結果）

1. 肥満マウスでは VCAM-1/VLA-4 系を介した LSEC と顆粒球の細胞接着が亢進している

生体イメージングにより、遺伝性肥満 *ob*/*ob* マウスを背景として顆粒球特異的に EGFP を発現する *ob*/*ob*; *Lysozyme M*-EGFP マウスにおいて、肝類洞内をローリングまたは肝類洞壁に接着する顆粒球が対照マウス（+/+; *Lysozyme M*-EGFP）より増加していた。また、透過型電子顕微鏡により、高脂肪食負荷（HFD: high-fat diet-fed）マウスの肝臓では肝実質に多数の単核球(単球/マクロファージ)が浸潤し、肝細胞と接触していることを確認した。HFD マウス由来 LSEC では、ケモカイン MCP-1（monocyte chemotactic protein-1）、サイトカイン IL-6（interleukin-6）および VCAM-1 の遺伝子発現が上昇し、還流条件下の細胞接着アッセイにより VCAM-1 と VLA-4 を介した単球細胞株との細胞接着が亢進していた。さらに、HFD マウス由来の LSEC を用いた経内皮遊走アッセイにおいて、単球細胞株は VLA-4 を介した内皮下への遊走が亢進していることが判明した。生体イメージングにおいて、抗 VLA-4 中和抗体の単回投与は肥満マウスの肝類洞壁に新たに接着する顆粒球を減少させた。さらに、HFD マウスに抗 VLA-4 中和抗体を 6 週間投与すると、糖新生関連酵素 G6Pase の遺伝子発現と耐糖能異常が改善し、フローサイトメトリー解析により肝臓への好中球・単球の浸潤が減少することが確認された。

2. 白血球と肝細胞の細胞接触により、Notch シグナルを介した糖代謝異常が惹起される

続いて、浸潤白血球と肝細胞との物理的細胞間相互作用について検討した。肝細胞において、細胞接触シグナルである Notch シグナルの活性化が糖新生を促進することが報告されているが、抗 VLA-4 中和抗体を投与した HFD マウス由来肝細胞のマイクロアレイでは、パスウェイ解析の上位に Notch シグナルが抽出された。実際に、抗 VLA-4 中和抗体を投与した HFD マウスの肝細胞では、Notch シグナルの活性化を示す Notch1 細胞内ドメイン(NICD: Notch1 intracellular domain)の発現および糖新生関連酵素 G6Pase の遺伝子発現が低下していた。加えて、初代培養肝細胞と肝内 CD45 陽性細胞の接触共培養により、Notch 標的遺伝子の発現が誘導され、G6Pase の遺伝子発現および培養上清中のグルコース濃度が増加した。また、同様の接触共培養において、Notch 阻害薬の前処置により G6Pase の発現上昇が抑制され、浸潤白血球と肝細胞の接触により Notch シグナルを介した糖新生が惹起されることが示唆された。

（考察）

今回の研究により、肥満に伴う糖代謝異常における肝臓内の非実質細胞同士の細胞接着、および実質細胞と非実質細胞の細胞接触の新たな病態生理学的意義が明らかとなった。

動脈硬化症において、肥満等の危険因子の存在下では単球のローリングおよび内皮細胞との接着が亢進し、内皮下への細胞浸潤の端緒となる。今回の検討において、肥満では白血球のローリングと LSEC への接着が亢進することを示し、肥満における肝臓への白血球の浸潤には動脈硬化症と同様の内皮細胞との相互作用が存在することが示された。生体イメージングにより、肥満マ

ウスでは肝類洞内をローリングする顆粒球、類洞壁に接着する顆粒球の数が顕著に増加し、抗 VLA-4 中和抗体によりローリングから接着に移行する細胞数が低下した。これまで、白血球と LSEC の細胞接着が非アルコール性脂肪肝やウイルス性肝炎など様々な肝臓の疾患モデル動物で亢進していることが報告されている。白血球と LSEC の細胞接着を亢進させる因子は病態毎で異なるが、いずれの場合でも細胞接着の亢進は肝実質への白血球浸潤を促進すると考えられている。また、肝臓でケモカイン MCP-1 を過剰発現させると、骨髄由来細胞の浸潤が増加し、全身のインスリン抵抗性と肝臓の炎症が引き起こされる。今回の検討で肥満マウスの LSEC では MCP-1 や炎症性サイトカインの発現が増加していることから、LSEC は細胞接着だけでなく、局所における白血球の誘導と活性化にも寄与している可能性がある。

細胞接着因子 VCAM-1 とそのリガンドである VLA-4 は、肝臓の虚血再灌流モデルにおいて白血球浸潤を促進する。また、全身に VLA-4 の点変異(Y911A)を有するマウスは高脂肪食負荷による耐糖能異常とインスリン抵抗性を軽減させることが報告されている。同報告では肝臓への炎症細胞浸潤は解析されていないが、我々の検討と合わせて考察すると、VLA-4 を介した肝臓内の細胞接着と炎症細胞浸潤の減少が耐糖能の改善に寄与している可能性がある。今回の検討において、HFD マウスへの抗 VLA-4 中和抗体投与は、好中球・単球の肝実質への浸潤を減少させ、耐糖能異常を改善させた。したがって、抗 VLA-4 中和抗体による LSEC への好中球・単球の接着の抑制により肝実質への浸潤が抑制され、好中球・単球由来の炎症性サイトカイン等の生理活性物質の作用が低下することにより、肥満マウスの耐糖能異常が改善したことが示唆される。

加えて、今回の検討では、肝内白血球と肝細胞の細胞接触が Notch シグナル依存的に糖新生を促進することが明らかとなった。抗 VLA-4 中和抗体により HFD マウスの肝細胞では、Notch シグナルの活性化を示す NICD の発現量が低下した。Notch シグナルは、Notch リガンドを発現するシグナル伝達細胞と Notch 受容体を発現するシグナル受容細胞の接触により活性化される。これまで、HFD マウスの肝細胞において Notch シグナルを阻害することにより、G6Pase の発現低下と肝糖放出の抑制を伴って耐糖能異常が改善することが報告されていたが、肝細胞の Notch シグナルを活性化するシグナル伝達細胞は同定されていなかった。今回の *in vitro* の検討から、肝実質に浸潤した白血球がシグナル伝達細胞になり得ることを示し、細胞接触を介した新たな白血球による肝細胞の糖代謝調節機構を明らかにした。この細胞接触を介した機序の個体レベルの意義を明らかにするためには、好中球や単球で Notch リガンドを欠損するマウスの解析が必須であり、今後の課題である。

（結論）

肝臓の糖代謝制御における LSEC と白血球との細胞接着、および浸潤白血球と肝実質細胞との細胞接触の意義が明らかとなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5309　号 | 宮地　康高 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　仁科　博史<br>副　査　渡邉　守、藍　真澄 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本研究で申請者らは､肥満マウスモデルを用いて､１)肥満マウス由来の肝類洞内皮細胞(LSEC)において細胞接着因子 VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)とそのリガンド VLA-4 (very late antigen-4)を介した骨髄系細胞との細胞接着が亢進していること、２）食餌誘導性肥満マウスに抗 VLA-4 中和抗体を投与すると、肝臓への好中球・単球浸潤が減少し、糖新生促進酵素 G6Pase (glucose 6-phosphatase)の遺伝子発現の低下および耐糖能異常の改善が認められること、さらに、３）浸潤した白血球が肝細胞との細胞―細胞接触を持った際に惹起される現象として、Notch シグナル依存的に G6Pase の遺伝子発現が上昇することを見いだした。これらの結果は、白血球と LSEC の細胞接着、浸潤白血球と肝細胞の細胞接触は肥満に伴う糖代謝異常を惹起することを示唆する。糖尿病・肥満における耐糖能異常の患者の治療にも応用可能な分子機構の存在を示した点で臨床的にも有用な研究成果である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

本論文は、「肥満時に観察される白血球の集積と血糖値の上昇」のメカニズムに関する論文である。

２）社会的意義

肥満は 2 型糖尿病、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病の原因となり、その予防法や治療法の確立は重要な課題となっている。肥満時の肝臓には好中球やリンパ球などの白血球が集積し、肝臓におけるインスリン抵抗性と糖代謝異常が誘導され、2 型糖尿病の原因の一つになると考えられている。しかしながら、肝臓に浸潤した白血球がどのような分子機構で肝類洞内皮細胞（LSEC: liver sinusoidal endothelial cell）と相互作用するのか、また、白血球はどのような分子機構で肝細胞の糖代謝に影響を及ぼすかについては不明であった。このような背景の下､申請者は､VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)とそのリガンド VLA-4 (very late antigen-4)が白血球と LSEC の細胞接着を亢進すること､Notch シグナルが肝細胞の糖代謝に影響を及ぼすことを見出した。肝臓内の細胞間の物理的相互作用が病態発症に関与することを示唆する研究成果である。新しい糖尿病治療法の開発へと繋がることが期待される先駆的な研究であると評価される。

３）研究方法・倫理観

高脂肪食を摂取させることで肥満マウスを作出し、分子生物学的手法や細胞生物学的手法を用いて、組織、細胞、分子レベルの解析を行った。また、二光子顕微鏡で肝臓内の白血球を生きたまま直接観察し、その動態を定量的に解析した。古典的な手法から最新の手法まで幅広く用いて、適切な解析が行われた。これら手法は、十分な知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と倫理観が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことを窺わせる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究成果から、肥満に伴う糖代謝異常における肝臓内の非実質細胞同士の細胞接着、および実質細胞と非実質細胞の細胞接触の新たな病態生理学的意義が明らかとなったと考察している。今後の研究の進展として、本細胞接着を治療標的にした糖尿病治療法の開発が期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 上田　浩樹 |
| 論文審査担当者 | 主査　植竹　宏之<br>副査　北川　昌伸、荒木　昭博 |
| 論　文　題　目 | Refractory Long-Term Cholangitis After Pancreaticoduodenectomy: A Retrospective Study |

（論文内容の要旨）

【要旨】

背景：術後胆管炎は膵頭十二指腸切除術(Pancreaticoduodenectomy; PD)後の重要な晩期合併症の一つであり、とりわけ反復する胆管炎は患者の QOL に大きく影響するが、これまで報告が少ない。本研究の目的は PD 後胆管炎の臨床的特徴を明らかにすることである。

方法：2007 年 1 月から 2013 年 12 月まで当科で PD を施行した連続する 155 例の患者の中、術後 1 年以上経過観察出来た 113 例を後方視的に検討した。再発による胆管炎は除外した。胆管炎の診断は改訂された東京ガイドライン 2013 の急性胆管炎の診断基準に従い、3 回以上繰り返す胆管炎を難治性胆管炎と定義した。

結果：難治性胆管炎は 21 人(18.6%)に発症した。うち 17 人が初回の胆管炎を術後 1 年以内に発症していた。10 人の患者が胆道狭窄を伴っていた。これらの患者は狭窄に対して平均 2 回のインターベンションまたは内視鏡的拡張術を要したが寛解した。一方胆道狭窄を伴わない患者は多くは抗生剤を中心とする保存的治療で軽快したが、寛解に至らず治療後も繰り返した。胆道狭窄を伴う群で胆管炎による緊急入院は多かった($p$=0.004)が、胆管炎の発症する間隔は狭窄を伴わない群で短かった(平均 5.3 カ月　vs 8.3 カ月)。難治性胆管炎の 2 年累積発症率は 18.9%であった。多変量解析の結果、難治性胆管炎のリスク因子は良性疾患(OR 比 18.52; $p$=0.001)、長時間手術(同 18.73; p=0.002)、術後 CRP 高値(同 6.55; p=0.014)、術後外来 ALP 高値(同 6.03; p=0.018)、術後胆道気腫(同 28.81; p=0.009)であった。

結語：PD 後胆管炎は通常 1 年以内に発症する。約半数の患者に胆道狭窄を認め、これらの患者には積極的な拡張術が有用である。

【背景】

PD は主に膵頭部癌または遠位胆管癌に適応となる侵襲の大きい術式である。外科的手技、周術期管理などの向上により、PD の術後死亡率は減少してきたが、合併症発生率に関しては専門施設であっても報告によっては約 50%と依然として高い。

ここ数年で膵癌の予後が改善してきており、加えて、PD の適応が IPMN などの低悪性度の腫瘤にまで拡大されてきており、PD 後の長期生存例も増加している。しかしながら PD 後の合併症に

関する研究の大部分は膵液漏など早期合併症に焦点を当てており、脂肪肝や胆管炎といった晩期合併症に関する報告はほとんどない。

術後胆管炎は PD 後の主要な晩期合併症の一つであるが、主に胆管空腸吻合部狭窄によって起こると考えられてきた。術後胆管炎は QOL に大きく影響するが、これまで長期的な臨床経過に関しての検討は十分にされていなかった。さらに胆管炎の定義自体もこれまで確立されておらず、PD 後胆管炎に関する議論は困難であった。本研究の目的はこの PD 後胆管炎についての頻度や発症の時期、治療法、リスク因子といった臨床的な特徴を明らかにすることである。

【方法】

2007 年 1 月から 2013 年 12 月まで当科で 155 例に PD を施行し、1 年以上経過観察出来た 113 例を対象とした。術後 1 年以内に死亡した 21 例、転院した 17 例など計 42 例を除外した。本研究は本学倫理委員会で承認された(許可番号 2132)。

急性胆管炎の標準的な定義は、急性胆嚢炎、急性胆管炎の国際コンセンサス会議である 2007 年版 Tokyo guideline(TG07)において初めて定義され、2013 年に改訂(TG13)され急性胆管炎の定義も新しくなった。本研究では術後胆管炎の診断はこの TG13 に準拠した。難治性胆管炎は PD 術後 3 回以上胆管炎を繰り返すものと定義した。胆管炎の原因が再発や転移によるものは除外した。胆道狭窄は胆管炎発症時に画像所見上胆管空腸吻合部の高さで狭窄を認め、閉塞性黄疸を伴うものと定義した。

PD は当科の標準術式である亜全胃温存 PD で行われ、膵腸吻合は Blumgart 変法で行った。胆管は 3 管合流部の直上で切離し、胆管空腸吻合は 4-0 または 5-0 吸収糸の結節縫合で行った。胆管ステントの留置は術者判断に委ねた。術後は 3-6 か月おきに血液検査や画像検査を施行し経過観察した。難治性胆管炎のリスク因子を術前因子、手術因子、術後因子の 3 つのカテゴリーに分類し解析を行った。

【結果】

対象 113 例の年齢中央値は 68 歳で 73.5%が男性であった。原疾患は膵癌が一番多かった(33.6%)。追跡期間中央値は 40 ヶ月であった。

難治性胆管炎は 21 例(18.6%)に発症した。延べ 143 回胆管炎が起こり、症例あたりの発症回数(中央値)は 5 回であった。うち 5 例(23.8%)が 10 回以上発症していた。手術から初回発症までの期間(中央値)は 7 ヶ月であり、17 例(81%)が 1 年以内に初回発症していた。胆管炎が原因の緊急入院回数(中央値)は 2 回であった。

難治性胆管炎 21 例中、胆道狭窄は 10 例に認められた。全 10 例で PTC または DBE による平均 2 回の吻合部の拡張治療が必要となり、うち 5 例に肝内結石を認めた。最終の拡張術以降は胆管炎を認めず寛解した。一方胆道狭窄を伴わない 11 例は多くは抗生剤による保存的治療が選択されていた。胆道狭窄を伴う群では伴わない群より胆管炎の緊急入院が多かったが、狭窄を伴わない群では狭窄を伴う群と比べ胆管炎がより繰り返されていた。難治性胆管炎の累積発生率を見ると 1 年累積発生率 15%、2 年累積発生率 18.9%であった。

難治性胆管炎のリスク因子について単変量解析を行った。若年、良性疾患、術前閉塞性黄疸な

し、術前減黄なし、長時間手術、POPF あり、周術期 CRP 高値、術後 γGTP 高値、同 ALP 高値、術後胆道気腫がリスク因子であった。これらを多変量解析したところ、難治性胆管炎のリスク因子は良性疾患(OR 比 18.52; p=0.001)、長時間手術(同 18.73; p=0.002)、術後 CRP 高値(同 6.55; p=0.014)、術後外来 ALP 高値(同 6.03; p=0.018)、術後胆道気腫(同 28.81; p=0.009)であることがわかった。

【考察】

18.6%に難治性胆管炎が起こり、複数回の発症と緊急入院を要していた。術後胆管炎はやはり PD 後の最も深刻な長期的合併症のうちの一つであった。過去の報告では PD 後の胆管炎の頻度は 5-6.7%とされるが、これらの報告では胆管炎の定義の記載なく比較検討は困難であった。我々の頻度が高い理由として、良性疾患や IPMC といった術前閉塞性黄疸を来たさない非拡張の胆管症例が我々の対象に多く(35.4%)、過去の報告では少なく(17.2-25.2%)、そういった症例で胆管炎が多かったのではないかと考えられた。実際に難治性胆管炎 21 例中 16 例が、良性疾患ないし IPMC であった。

過去の研究で PD 後の胆管狭窄の頻度は 2.6-7.4%であり、胆管炎の多くが胆管狭窄によるものと考えられていたが、本検討では難治性胆管炎発症の 50%以上に胆管狭窄を認めなかった。胆管炎は肝内胆管拡張がなくても起こることが知られている。PD 後や肝移植後の胆管狭窄を伴わない胆管炎に関する症例報告では、胆汁や小腸液の胆管への逆流が胆管炎の原因であるとし、他の報告では非閉塞型輸入脚症候群が胆汁鬱滞を起こし胆管炎となるとしている。

胆管狭窄は一般に PTC または DBE により管理出来ると考えられている。PTC による拡張術は一般的に複数回必要とされ、過去の報告では閉塞性胆管炎の治療に平均 7.5 回の拡張術が必要であったとされた。本検討では平均 2 回の拡張術で全 10 例の胆管狭窄群で寛解が得られた。Prawdzik らは胆管空腸吻合部の再手術は経験豊富な膵臓外科医であれば低合併症で安全に行え、積極的な再手術の長期成績が良いと報告しているが、再手術は通常困難であり、PTC や DBE といった低侵襲の治療から行うべきと考えた。

胆管狭窄を伴う患者にとって、狭窄部の拡張術は治癒を狙える治療である。一方、胆管狭窄を伴わない患者にとっては胆管炎は必ずしも重症にはならず薬物治療のみで軽快するが、再発する。これら胆管狭窄を伴わない胆管炎の原因が全て明らかになっていない以上、薬物療法だけでは根本的な治療としては不十分と思われた。

本研究では良性疾患、長時間手術、周術期 CRP 高値、術後 ALP 高値、胆道気腫が難治性胆管炎の 5 つのリスク因子であることを明らかにした。難治性胆管炎のうち 14 例が良性疾患であったが、9 例(64.3%)で胆管狭窄を認めた。一方悪性疾患症例では 1 例のみ胆管狭窄(14.3%)を認めた。良性疾患は多くが拡張胆管でなく胆管径が細いため、リスク因子となったと考えられた。長時間手術、CRP 高値、ALP 高値は多くの因子の影響を受けるため、リスク因子としての解釈は困難であった。PD 後の胆道気腫は 60-90%に起こるとされていた。本研究でも胆道狭窄の有無に寄らず 76 例(67.3%)に胆道気腫が認められた。難治性胆管炎 21 例中、実に 19 例に胆道気腫を認めた。対照的に胆道気腫を認めない 37 例中では難治性胆管炎は 2 例のみに認められた。PD 後胆道気腫を認めない症例ではほとんど胆管炎が起こらなかったことは特筆に価すると考えた。

今後は国際的、標準的な定義に基づいた、PD 後胆管炎に関する前向き研究が必要である。我々の知見が PD 後胆管炎の将来的なマネジメントに対し有用なものとなることを信じている。

【結論】

PD 後胆管炎は一般に術後 1 年以内に発症し、約半数に胆管狭窄を伴う。胆管狭窄あれば積極的な拡張術を行うことで寛解に導ける可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5310　号 | 上田　浩樹 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　植竹　宏之<br>副　査　北川　昌伸、荒木　昭博 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、膵頭十二指腸切除術（以下 PD）後の難治性胆管炎の臨床病理学的検討についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

PD 後、難治性胆管炎（3 回以上繰り返す胆管炎）は 20-30%に起こる。しばしば重症化し、再燃するが、臨床病理学的特徴、原因は明らかではなく、治療法も限られている。筆者らはこれらを明らかにし、有効な治療法の確立につなげる試みをしており、その着眼点は評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

① 難治性胆管炎のリスク因子は、単変量解析では若年、良性疾患、術前閉塞性黄疸なし、術前減黄なし、長時間手術、POPF あり、周術期 CRP 高値、術後 γGTP 高値、同 ALP 高値、術後胆道気腫であった。

② 多変量解析を行うと上記のうち、良性疾患(OR 比 18.52; p=0.001)、長時間手術(同 18.73; p=0.002)、術後 CRP 高値(同 6.55; p=0.014)、術後外来 ALP 高値(同 6.03; p=0.018)、術後胆道気腫(同 28.81; p=0.009)であることがわかった

従って、長時間手術、術後外来受診時に ALP 高値、CT で胆道気腫を認めた場合には難治性胆管炎のリスクを考慮する必要があると推察される。これは臨床的意義が大きく、今後は難治性胆管炎の予防法の開発につながる可能性もある。

３）研究方法・倫理観

本研究では、難治性胆管炎の発症と臨床病理学的因子の相関を検討し、難治性胆管炎に対する各種治療法の有効性、あるいは再燃率を適切な統計学的手法により解析している。本手法は十分な生理学的および解剖学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに筆者は難治性胆管炎の国際的診断基準の確立の重要性を指摘し、胆管狭窄あれば積極的な拡張術を行うことで寛解に導ける可能性があることを示唆している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 遠藤　彰 |
| 論文審査担当者 | 主査　田邉　稔<br>副査　伏見　清秀、重光　秀信 |
| 論　文　題　目 | Development of Novel Criteria of the “Lethal Triad” as an Indicator of Decision Making in Current Trauma Care: A Retrospective Multicenter Observational Study in Japan |

（論文内容の要旨）

【要旨】

アシドーシス・凝固障害・低体温で構成される「外傷死の三徴」は重症外傷においてダメージコントロールを行う根拠のひとつとして長らく使用されてきた。その従来の基準を検証し、治療方針決定に有用な新たな基準を構築した。15 施設の救命救急センターに 2012 年の 1 年間に搬送された ISS≧16 の患者を後方視的に検討した。計 796 例を解析した。従来基準を 1 項目以上満たしたときに死亡を予測する感度は 36%、特異度は 88%であり、3 項目では感度 4%、特異度 100%であった。すなわちこれらを満たした段階ではすでに死の転帰は避けられず、方針決定の根拠としては不適切と考えられた。三徴の枠組内で各種項目の転帰予測精度・閾値・影響力を検討し、FDP>90μg/ml を大項目、BE<−3mEq/L と体温<36℃を小項目とする新基準を構築した。新基準は大項目単独または小項目を同時に満たしたときに感度 83%、特異度 66%で転帰を予測した。新基準は方針決定の客観的根拠となり得る。

【緒言】

重症外傷患者の転帰には外傷そのものや治療に伴う侵襲に起因する生理学的恒常性の破綻が大きく影響する。これを回避するため、外傷急性期の初回手術は必要最小限にとどめる治療戦略が 1970 年代より提唱され、1990 年代には damage control surgery (DCS)として標準化された。更に近年、大量輸血プロトコルの導入、低血圧の容認、積極的な体温やアシドーシス補正などの集学的アプローチは Damage Control Resuscitation (DCR)として広まりつつある。DCS と DCR を組み合わせた”Damage Control Strategy”は、重症外傷患者の転帰を改善させることが期待されている。

Damage Control Strategy を最大限活用するには、本治療戦略の適応となる症例の適切な認識が重要となる。血液凝固異常にアシドーシスと低体温を加えた「外傷死の三徴」は大量出血を伴う重症外傷における死亡の予測因子として世界的に有名であり、DCS を行う根拠のひとつとして長らく使用されてきた。

今回我々は、従来の「外傷死の三徴」の有用性を検証するとともに、診療指針として活用できる新基準を構築した。

【方法】

15 施設の救命救急センターに 2012 年の 1 年間に搬送された Injury Severity Score（ISS）16 以上の外傷患者を対象とした。18 歳未満、妊婦、院外心肺停止、熱傷、肝硬変、脊髄損傷のみで ISS ≧16 となる症例は除外した。尚、本研究は各参加施設の倫理審査委員会で承認を得て行われた。

外傷死の三徴に厳密な定義は存在せず、本研究では諸家の報告に基づき、Prothrombin time-international normalized ratio (PT-INR) ＞ 1.5、pH ＜ 7.2、体温 ＜ 35℃とした。転帰は受傷後 28 日以内の死亡とした。

情報は診療録から収集し、欠測値は多重代入法で補完して 500 の data set を発生させた。統計解析は各 data set で行い、結果を Rubin's rule に基づいて統合した。転帰予測精度は Receiver operating characteristic curve（ROC 曲線）を用いて Area under the curve (AUC)を評価した。閾値は ROC 曲線から Top left 法で決定した。p 値 ＜ 0.05 を有意差有りとした。統計解析は SPSS Statistics 21 および R (Ver. 3.2.0)を用いた。

【結果】

まず、従来基準の転帰予測精度について検証を行った。従来基準の各項目に関する転帰予測精度をみると、PT-INR、pH、体温の感度はそれぞれ 16%, 18%, 16%であり、特異度は 96%, 97%, 94%であった。従来基準の 1 項目以上を満たしたときの感度は 36%、特異度は 88%であり、3 項目全てを満たすと感度 4%、特異度 100%であった。尚、AUC はそれぞれ PT-INR 0.747、pH 0.648、体温 0.622 であり、新たに導き出した閾値はそれぞれ 1.09、7.36、36.1℃であった。

次に、凝固専用異常並びにアシドーシスに関する項目の解析を行った。凝固線溶状態に関連した項目である fibrin/fibrinogen degradation product (FDP)、 D-dimer、Fibrinogen、血小板数について検討すると、AUC は 0.781、0.777、0.637、0.637 であった。 アシドーシスおよび組織低灌流の指標として、Base Excess (BE)と乳酸値の AUC は 0.711、0.696 であった。凝固線溶状態および組織灌流不全に関連した項目のうち最も予測精度が優れていた FDP と BE の閾値はそれぞれ 89μg/ml、−3mEq/L であった。三徴の各々の領域でもっとも AUC の大きかった FDP, BE, 体温を新たな変数として強制投入した Logistic 回帰分析の結果、それぞれの変数は独立して有意に転帰を予測する一方で、転帰への影響度（回帰係数）については FDP は体温の 3 倍、BE は体温の 2 倍であった。

以上の結果をもとに新たな基準の構築を行った。線溶異常:FDP > 90μg/ml を大基準、アシドーシス:BE＜−3mEq/L と低体温:体温 ＜36℃を小基準とする新たな基準を構築した。新基準では、大項目単独もしくは２つの小項目を同時に満たしたときに感度 81%、特異度 67%で死亡の転帰を予測した。

【考察】

今回の検討の結果、従来基準が転帰を予測する感度は著しく低く、また特異度は極めて高かった。すなわちこれらを満たした段階ではすでに死の転帰は避けられず、方針決定の根拠として用いるには不適切と考えられた。

Trauma-induced coagulopathy には、外傷そのものによって受傷直後から生じる凝固異常が含まれることが近年広く認識されつつある。丸藤らはこの病態は凝固の活性化、消耗性凝固異常、病的

線溶の亢進などが合わさった線溶亢進型の播種性血管内凝固であるとしており、本検討では凝固障害の指標とともに線溶系の指標も併せて検討した。

近年、予後予測指標としての Fibrinogen 値の有用性の報告も散見されるが、本検討では FDP や D-dimer といった線溶系の指標がより鋭敏に転帰を予測した。D-dimer は fibrin の分解を反映するのに対し、FDP は fibrin の分解に加えて fibrinogen の溶解も反映していることが影響している可能性がある。

本検討では循環不全の指標としては BE がもっとも鋭敏に転帰を予測した。pH 値は呼吸性に代償され、その異常はすなわち代償の破綻を意味し、早期指標としては不適切と考えられた。循環障害の指標として広く用いられている乳酸値も検討したが、本検討では BE がより鋭敏であった。呼吸循環障害から組織が酸素不足に陥ると嫌気性代謝が活性化され、乳酸が蓄積する。しかし乳酸値は必ずしも組織低灌流のみを反映しないとの報告や、乳酸値そのものでなく、乳酸アシドーシスこそが循環不全の指標であるとの報告もある。

低体温は酵素活性の低下などから恒常性の破綻を惹起する。本研究では独立したリスクではあったが、影響力は線溶異常やアシドーシスを下回った。しかし適切な閾値は 36℃であり、体温管理の重要性が改めて示唆された。

多変量解析の結果、“三徴”とはいえどもそれぞれの項目の影響度は同一ではなく、線溶異常の影響力は他と比べて大きく、アシドーシスと低体温の影響力の和と同等であった。従って線溶異常は三徴の枠組みの中で中心的位置づけとなり、他の二つは補完的位置づけと考えられた。これらの結果から、我々は線溶異常を大基準、アシドーシスと低体温を小基準とした新たな基準を提案した。新基準は感度を著しく改善しつつ、一定の特異度を維持したものとなった。

治療方針の判断は診療経過の中で繰り返し検討されるべきである。来院直後や、多様な介入がなされた後での判断は本研究で述べることはできない。しかし、新基準は来院時のデータのみで一定の精度で予後を予測し、治療方針の決定に有用な可能性があるという点で重要な意義を有すると考えられる。

【結論】

従来の「外傷死の三徴」は、治療方針の判断基準としては不適当であった。今回提案する新基準はより実用的であり、Damage Control Strategy 導入の客観的根拠となり得る。今後、本基準に基づく治療効果に関する更なる検討を期待したい。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5311　号 | 遠藤　彰 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田邉　稔<br>副　査　伏見　清秀、重光　秀信 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

重症外傷の転帰は、外傷そのものや治療に伴う侵襲に起因する生理学的恒常性の破綻が大きく影響する。生体への過大な侵襲を避けるため、重症外傷患者への初回手術は最小限にとどめる“damage control surgery（DCS）”が 1990 年代より標準化された。この治療戦略の適応となるのは文字通り重症外傷患者であり、アシドーシス、凝固障害、低体温で構成される「外傷死の三徴」は、DCS を行う根拠として長らく使用されてきた。申請者は、この基準の妥当性を検証するとともに、DCS の適応を決定するためのさらに有用な新基準を構築すべく、本研究を行った。

国内 15 施設の救命救急センターに　2012 年の 1 年間に搬送され、Injury Severity Score　（ISS）≧16 であった 796 例の患者を後方指摘に検討した。従来基準の場合、1 項目以上満たした場合の死亡予測感度は 36%、特異度は 88%であり、従来基準を満たした段階で既に死の転帰は避けられず、DCS を行う根拠としては不適切であることが明らかになった。そこで、三徴の枠内で各種項目の転帰予測精度、閾値、影響力を検討、FDP>90μg/mL を大項目、BE<-3mEq/L および体温<36℃を小項目とする新基準を構築した。新基準は大項目単独または小項目を同時に満たした場合、感度 83%、特異度 66%で転帰を予測することができ、より優れた DCS の適応判断のための根拠になり得ると考えられた。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

重症外傷を救急センターにおいて、搬送時の重症度の客観的な判定はその後の治療方針の決定において重要である。DCS の適応を決定するには、治療に反応しうる最重症患者を搬送時に迅速に見極めることが重要であり、その観点からすると従来基準は適応となる患者を的確に見極めるには不適切であることが本研究で明らかになった。また、本研究によって、DCS で救命しうる重症外傷患者を初療時に判別するより優れた新基準が提唱された。

２）社会的意義

迅速かつ簡便に使用できる重症度判定基準であり、多くの救命救急センターにおいて活用され、重症外傷患者の救命に繋がる可能性がある。

３）研究方法・倫理観

全国の主要救命救急センター１５施設におけるデータを活用した後方視的研究である。対象患者はISS≧16の重症外傷患者796症例。18歳未満、妊娠、院外心肺停止、熱傷、肝硬変、脊髄損傷のみでISS≧16となる症例は除外された。新基準作成の根拠となる転帰予測精度はROC曲線を用いてAUCを評価しており、統計学的手法は妥当である。本研究は、全参加施設の倫理委委員会の承認を得ている。本研究は申請者の救急医としての経験と知識の裏付けのもとに遂行され、研究方法に対する理解が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

治療方法の選択の根拠となる重症度の判定は、診療経過の中で繰り返し検討されるべきである。本研究で提唱された新基準は多様な治療介入がなされた後の重症度判定には不適切である。しかし、来院時のデータのみで迅速に一定の制度で予後を予測する新基準は、救急医療の現場で重要な意味を持つ。本研究はあくまで後方視的な解析に基づいたものであり、今後医療現場で前向きな検証を行い、その有用性が示されることが期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文はこれを以て博士（医学）の学位を申請するに値すると認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | CHIEN Po-jen |
| 論文審査担当者 | 主査　宮原　裕二<br>副査　稲瀬　直彦、永井　亜希子 |
| 論　文　題　目 | Bio-sniffer (gas-phase biosensor) with secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH) for determination of isopropanol in exhaled air as a potential volatile biomarker |

（論文内容の要旨）

1. Introduction

Researchers have identified more than two hundred volatile organic compounds (VOCs) in a composition of breath, and some of them have the potential to be biomarkers for indicating of the presence certain diseases. For example, nitric oxide is one of the well-known indicators for asthma, and a higher concentration of breath acetone, which is related to lipid metabolism, was observed in patients with diabetes mellitus. Recently, several researchers have found that the isopropanol (IPA) concentrations in the breath may relate to some illnesses such as liver disease, breast cancer, and lung cancer. However, most studies mentioned above analyzed dozens of substances in the breath at the same time. Not much research exists that concentrates specifically on isopropanol in the breath and its implications for clinical diagnosis. A comprehensive investigation of the relationship between a status of human health and the exhaled IPA is necessary and extremely valuable. Currently, direct breath IPA analysis relies on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) related methods. These techniques, usually with high sensitivity, can detect targets at a very low concentration, but there still exists some deficiencies, including difficulties in continuous breath monitoring and inconvenience of a large amount of detection due to the complicated operations and the high cost of instruments. A biochemical gas-sensor exploiting advantages of specific enzymatic reactions could be a good candidate for the determination of VOCs in exhaled breath. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent secondary alcohol dehydrogenase (S-ADH) is an enzyme that can catalyze secondary alcohols to ketones, and the main substrate is IPA. In a weak alkaline environment, S-ADH prefers to catalyze IPA to acetone and simultaneously produces proportional NADH. NADH has a unique fluorescence property that it releases visible fluorescence (491 nm) when it is exposed to 340 nm of ultraviolet (UV) excitation light. Thus, according to the fluorescence intensity of NADH, the concentration of the IPA could be calculated.

**2. Materials and methods**

The IPA bio-sniffer comprises a photon detection unit, an excitation light source, a bifurcated optical fiber, an optical fiber probe equipped with cylindrical flow cell and an enzyme immobilized membrane.

The NADH excitation equipment contains a high power UV-LED, which could emit UV-light with the center wavelength of 340 nm, and a controllable power supplier. A photomultiplier tube (PMT) was employed as the NADH fluorescence intensity detector. These two components were connected to the two ends of the bifurcated optical fiber and the common end was assembled with an optical fiber probe. The IPA sensing region was manufactured by equipping a flow-cell on the top end of fiber probe and attaching to a S-ADH immobilized membrane. In this design, the $NAD^+$ (1 mmol $L^{-1}$) contained tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride buffer (Tris-HCl, 0.1 mol $L^{-1}$) was first pumped into the entrance flow channel and streamed through the space between the cell and enzyme membrane, then withdraw from the other flow channel. The stream of buffer in the flow-cell kept the S-ADH membrane moist, supplied fresh $NAD^+$, and eliminated the reaction products. When S-ADH contacted with the IPA vapor, NADH was produced immediately, and the change in the fluorescence intensity were measured and recorded by the PMT measurement unit. At the same time, the circulated buffer removed the NADH and brought new $NAD^+$. Thus, the working principle of the bio-sniffer was established on the balance between the production and elimination rates of NADH.

Following steps were carried out to characterize the IPA bio-sniffer: Clean air was flowed into a Teflon tube first, and then, the valve was switched to let the IPA vapor be supplied to the bio-sniffer. Finally, the valve was switched again to stop the supply of the IPA vapor, and flowed the clean air. The standard IPA vapor (0.5 ppb to 54 ppm) was applied to determine the calibration range. The reproducibility of the IPA bio-sniffer was repeatedly evaluated with 108 ppb of standard IPA and clean air for five minutes, respectively. This cycle was repeated ten times, and the coefficient of variation (C.V.) was calculated. For optimizing the detection conditions, several factors including buffer pH and buffer flow rate were evaluated. 1 mmol $L^{-1}$ of $NAD^+$ was prepared in phosphate buffer (PB, 0.1 mol $L^{-1}$, pH 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 and 8.0), Tris-HCl buffer (0.1 mol $L^{-1}$, pH 8.0, 8.5, and 9.0), and carbonate-bicarbonate buffer (CB, 0.1 mol $L^{-1}$, pH 9.0, 9.5, 10.0, and 11.0). The relative response of the IPA bio-sniffer using these buffers was measured by detecting 108 ppb of standard IPA vapor. For the purpose of confirming the selectivity of the S-ADH, ten kinds of substances that have similar chemical structures to IPA were measured. They were: 2-butanol (racemic), (S)-(+)-2-butanol, (R)-(-)-2-butanol, 1-propanol, ethanol, 1-butanol, methanol, acetone, 2-buanone, and acetaldehyde. All of these gasses were measured at 600 ppb, and obtained change in fluorescence intensities were compared to the standard gaseous IPA at the same concentration.

After the measurement conditions were optimized, the bio-sniffer was applied to determine the IPA concentration in the breath of healthy people for verifying its bio-analytical ability.

**3 Results and discussion**

The bio-sniffer displayed a high sensitivity and a wide calibration range (1–9060 ppb, r=0.997). It is comparable to or more than other reported IPA detection methods. Furthermore, this bio-sniffer could be used for human exhaled air analysis because the calibration range includes the reported breath IPA concentration in health people and some diseases. Additionally, the bio-sniffer also showed high reproducibility (C.V.: 2.59 %, n=10) to the repetitive measurement of IPA (108 ppb) in the gas phase. For

an investigation of dependence of the sensor signal on the buffer pH, a plateau of the relative change in intensity of fluorescence was observed from pH 7.5 to pH 9.0, which implied that this pH range was appropriate for the bio-sniffer. After taking the stability of $NAD^+$ into consideration, pH 8.5 was selected as the optimum condition. Regarding the selectivity, the bio-sniffer slightly responded to primary alcohols such as ethanol, 1-propanol, and 1-butanol, and almost did not react to acetaldehyde and some ketones. Although S-ADH showed relatively high responses to racemic 2-butanol and (S)-(+)-2-butanol (58% and 88.9% respectively), it would not interfere with our human breath analysis due to much lower concentration of two substances with respect to IPA in the human exhaled breath or body tissues.

Finally, the IPA concentration in the breath of a healthy human was investigated using the developed bio-sniffer. In total, we measured 67 breath samples from 30 healthy volunteers. For all the volunteers, the measured breath ranged from 2.1 ppb–54.4 ppb, and the mean ± standard deviation concentration was 16.1 ± 11.9 ppb. This obtained result is similar to other studies. Accordingly, the results of this experiment suggested that the bio-sniffer enable to analyze the human exhaled IPA, and this bio-sniffer may be used for investigating breath biomarkers in lung-related diseases or monitoring of some illness.

**4. Conclusion**

In summary, a highly sensitive and selective gas-phase bio-sniffer using an enzymatic reaction of S-ADH for analysis of the IPA in exhaled breath was developed and optimized. The calibration range of the bio-sniffer was 1–9060 ppb, which was comparable to other reported IPA analyzed methods such as GC-MS associated instruments, and this calibration range also includes concentrations of breath IPA in healthy and disease people. The breath analysis we performed on a healthy population showed a mean breath IPA concentration was approximately 16.0 ppb. This novel bio-sniffer could be an effective tool to measure breath IPA, and it may also be of value in other related breath research.

生体ガスには多様な揮発性有機成分が含まれ、高感度に計測することで、非侵襲での代謝評価・疾病スクリーニングが可能と考えられる。イソプロパノール（IPA）はケトン体であるアセトンの代謝物で、血液を介して呼気・尿として体外へ排泄され、呼気中の IPA 濃度は肝疾患、慢性閉塞性肺炎、肺癌等との関連が報告されている。本研究では、IPA 用の高感度な気相用バイオセンサを開発し、呼気計測に応用した。

本センサは、IPA を認識・酸化触媒する二級アルコール脱水素酵素（S-ADH） にて産生される還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ex. 340 nm, fl. 491 nm）を蛍光検出し測定する。計測系は、S-ADH 固定化膜を有するフローセル、紫外 LED、光電子増倍管にて構築した。実験ではセンサ特性を評価した後、健常者の呼気中 IPA 計測に行った。

本センサに標準 IPA ガスを負荷したところ、蛍光出力の増加及び濃度に応じた安定値が確認され、呼気中濃度を含む、1–9060 ppb の範囲で IPA の定量が可能であった。またガス選択性を調べたところ、IPA 以外では 2-butanol ガスにのみ出力（58%）を示したが、呼気中にはほとんど含まれないことから、呼気 IPA の選択的な計測が可能と判断した。最後に、本センサを健常者の呼気中 IPA 計測に供したところ、既報値と矛盾しない結果（16.0 ± 11.9 ppb: n=67）が得られ、本セン

サによる呼気中 IPA 計測の有用性が確認された。今後、本センサを利用することで、簡便かつ非侵襲的な代謝評価・スクリーニング法が期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5312　号 | CHIEN Po-jen |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宮原　裕二<br>副　査　稲瀬　直彦、永井　亜希子 | |

（論文審査の要旨）

**１．論文内容**

本論文は、呼気中イソプロパノール測定のための二級アルコール脱水素酵素を利用した気相用バイオセンサについての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

生体ガスには多様な揮発性有機成分が含まれ、高感度に計測することで、非侵襲での代謝評価・疾病スクリーニングが可能と考えられる。イソプロパノール（IPA）はケトン体であるアセトンの代謝物で、血液を介して呼気・尿として体外へ排泄され、呼気中の IPA 濃度は肝疾患、慢性閉塞性肺炎、肺癌等との関連が報告されている。しかし、高感度で高い選択性をもって簡便に呼気中 IPA を測定する技術は実現されておらず、申請者は上記 IPA 測定システムの開発に取り組んだ。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。 1. 標準 IPA ガスによりセンサ性能を評価し、呼気中濃度を含む、1–9060 ppb の範囲で IPA の定量が可能であった。2. 健常者及び糖尿病患者の呼気中 IPA 計測したところ、健常者では既報値と矛盾しない結果（16.0 ± 11.9 ppb: n=67）が得られ、2 型糖尿病患者では呼気中 IPA の増加が認められた。以上のように申請者は、高感度で高い選択性をもって簡便に呼気中 IPA を測定するシステムを開発した。これは先制医療への応用の可能性に繋がる成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本センサは、IPA を認識・酸化触媒する二級アルコール脱水素酵素（S-ADH） にて産生される還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ex. 340 nm, fl. 491 nm）を蛍光検出し測定する。計測系は、S-ADH 固定化膜を有するフローセル、紫外 LED、光電子増倍管にて構築した。本手法は十分な生理学的な知識と蛍光検出の高感度化技術が組み合わされて実現しており、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果について 2 型糖尿病患者で呼気 IPA が増加した理由を NADH/NAD+ の比の増加のためと考察している。今後、本センサを利用することで、簡便かつ非侵襲的な代謝評価・スクリーニング法の開発が期待される。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 大野　真紀 |
| 論文審査担当者 | 主査　横田　隆徳<br>副査　大友　康裕、立石　宇貴秀 |
| 論　文　題　目 | Feasibility, safety, and potential demand of emergent brain magnetic resonance imaging of patients with cardiac implantable electronic devices |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ペースメーカーや ICD などの心臓植込みデバイス患者で、緊急 MRI 撮影の実現可能性、安全性、及びその潜在需要については不明である。我々は 2012 年 10 月から 2016 年 9 月までの間のデバイス患者の MRI 撮影について後方視的に調査し、緊急撮影と予定撮影依頼を比較した。11 件が救急外来を介した緊急撮影で、38 件は予定撮影であった。患者背景は両群で有意差を認めなかったが、緊急撮影では頭部撮影が有意に多かった（p=0.002）。撮影理由と依頼した医師にも 2 群間で有意差を認めた（p<0.001、p=0.003）。救急外来経由の緊急撮影のうち、11 件中 10 件は頭部撮影で、10 件中 9 件は緊急頭部撮影が施行できた。救急受診から撮影までは 144±29 分で、循環器医師への撮影連絡から実際の撮影までは 60±10 分であった。9 件のうち 4 件が緊急 MRI により急性脳梗塞の確定診断がつき、2 件は緊急血栓溶解療法を受け神経学的に完全回復した。全ての緊急撮影は安全に施行され、合併症は認めなかった。心臓植込みデバイス患者の緊急 MRI 撮影では頭部の撮影に予定撮影と比較し潜在需要があり、また緊急撮影は急性期脳梗塞の診断治療のために実現可能で安全であることがわかった。

＜背景＞

心臓植込みデバイス患者は安全性への懸念から MRI 撮影が最近まで禁忌であった。2008 年に条件付き MRI 対応心臓植込みデバイスが世界に登場し、2012 年に日本に導入された。それ以降、条件付き MRI 対応心臓植込みデバイスの安全性に関し報告されている。

75%のデバイス患者で生涯 MRI が必要になると推定されている。MRI は多くの疾患に有用で、急性脳梗塞では MRI が梗塞病変と治療の有効性を示すペナンブラの同定に重要である。発症 4.5 時間以内の血栓溶解療法と 8 時間以内の血管内治療は急性脳梗塞の治療に効果的である。デバイス自体は MRI 非対応のものであったが、あるコホート研究でのデバイス患者の MRI は頭部撮影が 40%を占めた。急性脳梗塞では迅速な検査と治療が求められ、MRI が律速段階になるべきではない。

日本は世界で最も MRI を所有し（100 万人あたり、日本：46.8 台、OECD 平均：14.0 台）、広く救急医療で使用できる。条件付き MRI 対応デバイスは比較的新しい技術でありデバイス設

定変更が撮影前に必要で、条件付き MRI 対応デバイス患者の緊急 MRI 撮影の必要性と実現可能性に焦点をあてた研究は今までにない。デバイス患者に役立てるため、我々の病院は 2012 年以降条件付き MRI 対応デバイス患者の 24 時間 MRI 撮影体制を構築してきた。

＜方法＞

2012 年 10 月から 2016 年 9 月まで三次救急病院の亀田総合病院で条件付き MRI 対応心臓植込みデバイス患者に対し施行された MRI で、緊急撮影と予定撮影を比較した。

MRI は 1.5 テスラーを用い、循環器内科医か不整脈医とデバイスに精通したコメディカルが立ち会った。

循環器内科医か不整脈医が患者とデバイスの情報を確認し MRI 対応を判断した。Slew rate や Specific absorption rate などの撮影条件は放射線技師が確認した。ペーシング閾値やリード抵抗値の記録や MRI 適応モードへの設定変更は臨床工学技士が行った。撮影中は SpO2 や心電図が適切にモニタリングされ、ACLS 設備が常備された。撮影後は全てのデバイス設定をただちに撮影前の状態に戻した。

日中は当番の循環器内科か不整脈医と関連するコメディカルが緊急撮影に招集された。夜間は当直の循環器内科医と放射線技師が招集され、夜間担当の臨床工学技士が自宅から招集された。

＜結果＞

患者背景：

計 57 件の MRI 依頼のうち、11 件が救急外来経由の緊急撮影で、8 件は一般外来または入院患者の予定外の準緊急撮影で、38 件は予定撮影であった。11 件の緊急撮影と 38 件の予定撮影が本研究で比較された。

年齢、性別、植え込まれたデバイス、メーカー、植込み理由、植込み病院、植込みから撮影までの日数は 2 群間で差を認めなかった。現在日本で利用可能な全 5 メーカーがこの研究で使用された。

緊急と予定 MRI 撮影の比較：

緊急撮影群では頭部撮影が予定撮影群より有意に多かった（p=0.002）。これは予定撮影での多様性とは異なる。（予定検査の部位：頭部 14 件、脊椎 11 件、腹部 7 件、胸部または心臓 4 件、頸部 2 件）。この結果で、緊急でのデバイス患者の頭部 MRI には、潜在需要があることが明らかになった。

MRI を依頼した医師も 2 群間で有意差を認めた（p<0.001）。緊急撮影では救急医と神経内科医で占められ、予定撮影では循環器医や様々な科の医師（整形外科 9 件、消化器 4 件、脳外科 1 件、外科 1 件、泌尿器 1 件、産婦人科 1 件、耳鼻科 1 件、リウマチ 1 件、血液腫瘍内科 1 件、呼吸器 1 件）が依頼した。

緊急撮影では脳梗塞が主な理由で、予定撮影での撮影理由は異なり（p=0.03）整形疾患と癌が重要であった。予定撮影での 8 件の脳梗塞評価は、陳旧性梗塞のフォローが含まれ、新規脳梗塞の診断は 1 件だけであった。

予定撮影は主に日中（9 時～17 時）で、緊急撮影はそれ以外の時間で施行された（p=0.03）。撮影成功率に差はなく、いずれの群にも撮影に伴う合併症は認めなった。

緊急撮影の詳細：
救急外来経由の緊急撮影の 11 件中、10 件は頭部の撮影で 1 件は外傷で頸部撮影であった。
11 件中 10 件は緊急で MRI が施行できた。1 例は人員不足で緊急撮影ができず、同日中に準緊急で撮影した。10 件の救急受診から撮影までは 144±29 分で、循環器への撮影依頼から実際の撮影までは 60±10 分であった（6 名のみデータあり）。救急医が 7 件で MRI の依頼をし、神経内科医が 4 件で依頼をした。撮影時刻は日中から深夜まで多様であった。
頭部撮影では 9 件中 4 件で緊急 MRI により急性脳梗塞の確定診断がつき、2 件は血栓溶解療法を受け神経学的に完全回復した。緊急撮影により 9 件中 5 件で急性脳梗塞の除外診断がついた。
全ての緊急撮影は安全に施行され、合併症は認めなかった。ペーシング閾値、リード抵抗、電池状況は撮影後に変化を認めなかった。全ての緊急撮影はデバイスの適合が確認され安全に施行されたが、11 件中 3 件で条件付き MRI 対応を示すカードを携帯していなかった。

症例：
85 歳の女性が構音障害で当院へ搬送された。患者は徐脈頻脈症候群のためペースメーカーが植え込まれ、抗凝固療法を続けていた。構音障害は 18 時に出現し、家族が救急要請した。救急隊から当院へ連絡が入り、救急外来に 19 時 20 分に到着した。すぐに採血をして緊急頭部 CT が 19 時 30 分に施行された。循環器内科医とコメディカルは救急医より既に連絡を受けており、CT で脳出血が否定された後 19 時 40 分に緊急頭部 MRI が施行された。頭部 MRI で CT では診断できない右側の末梢動脈の梗塞が判明した。MRI により血管内治療ではなく tPA が安全性と効果から最適と判断された。本症例の律速段階である血液検査の結果を待って、tPA が投与された。患者は神経内科に入院し、脳梗塞の後遺症なく自宅退院できた。本症例では循環器内科医とコメディカルに早期に情報伝達があったことが、緊急撮影が成功した要因であった。また、MRI によって神経内科医は血栓溶解療法の安全性と効果を強く確信できた。

＜考察＞
心臓植込みデバイス患者の緊急 MRI 撮影は全 MRI 撮影中 19%（57 件中 11 件）を占めるため、我々の後ろ向き研究では 24 時間 MRI 撮影が可能であることは、特に頭部撮影において、非デバイス患者と同様にデバイス患者にとっても潜在需要があると示された。CT で除外できない急性脳梗塞の評価と血栓溶解療法の判断のために、救急外来では頭部撮影が最大の理由であり、緊急 MRI は今回の症例のように必要とされる。本研究は頭部 CT 単独と比較しての緊急頭部 MRI 撮影の有効性を示すには十分なデータがないが、救急外来でのデバイス挿入患者症例の蓄積や前向き観察が、急性脳梗塞の診断治療に対するデバイス患者での有効性を示していくだろう。
本研究では、MRI 適合性の評価とデバイス設定の変更が必要にもかかわらず、90.1%の成功率で緊急撮影が安全に施行可能であった。

緊急撮影は潜在需要がありまた可能であるが、我々が克服すべき点もある。第一にデバイス患者情報を救急医、循環器内科医、不整脈医、臨床工学技士、放射線技師で共有することは迅速な緊急 MRI のため必要不可欠である。脳梗塞評価での頭部 MRI はスピードが重要であり、事前情報を得ることは MRI 条件が複雑化しているために有用である。デバイス患者の撮影は可能だが、全体の数はまだ少ない。全ての医師へ条件付き MRI 対応デバイスの認識をしてもらう必要がある。病院に新システムを導入するのは難しいが、緊急 MRI 体制に粘り強く取り組むべきである。

第二に、患者は異なったメーカーのデバイスを植え込まれ、各社と各デバイスが異なった規制をする複雑な状況である。時間短縮と安全な撮影のため我々は事前に準備すべきである。患者が他院から搬送された際、デバイス情報がわからない可能性があり、MRI の適合性の判断により注意を払うべきである。

第三に、11 例中 3 例が MRI カードを携帯せず、MRI 撮影条件と MRI カードについて患者と家族に認知させることが必要である。

＜結論＞

心臓植込みデバイス患者の緊急 MRI 撮影は特に急性脳梗塞の診断と治療に潜在需要がある。安全な MRI 撮影に十分注意すべきであるが、24 時間の緊急 MRI 撮影をデバイス患者に施行することは実現可能である。デバイス患者の緊急 MRI 撮影の必要性は増えていくだろう。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5313　号 | 大野　真紀 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　横田　隆徳<br>副　査　立石　宇貴秀、大友　康裕 | |

（論文審査の要旨）

**１．論文内容**

本論文は、心臓植込みデバイス患者の緊急頭部 MRI 撮影の実現可能性、安全性、潜在需要に関する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究はペースメーカーや ICD などの心臓植込みデバイス患者の緊急 MRI 撮影の安全施行およびその需要を調査したユニークな研究である。臨床現場に基づく着眼点は評価できる。

２）社会的意義

特に頭部撮影において、非デバイス患者と同様にデバイス患者にとっても潜在需要があると示され、90.1%の成功率で緊急撮影が安全に施行可能であった。この結果はデバイス患者の緊急 MRI 撮影の必要性と安全を示すことができた。

３）研究方法・論理観

三次救急病院の亀田総合病院で条件付き MRI 対応心臓植込みデバイス患者に対し施行された MRI で、緊急撮影と予定撮影を比較した。循環器内科医か不整脈医が患者とデバイスの情報を確認し MRI 対応を判断した。Slew rate や Specific absorption rate などの撮影条件は放射線技師が確認した。ペーシング閾値やリード抵抗値の記録や MRI 適応モードへの設定変更は臨床工学技士が行った。撮影中は SpO2 や心電図が適切にモニタリングされ、ACLS 設備が常備された。撮影後は全てのデバイス設定をただちに撮影前の状態に戻した。

４）考察・今後の発展性

デバイス患者情報を救急医、循環器内科医、不整脈医、臨床工学技士、放射線技師で共有することは迅速な緊急 MRI のため必要不可欠で、全ての医師へ条件付き MRI 対応デバイスの認識をしてもらう必要がある。患者が他院から搬送された際、デバイス情報がわからない可能性があり、MRI の適合性の判断により注意を払うべきである。さらに、MRI 撮影条件と MRI カードについて患者と家族に認知させることが必要である。これらの考察は今後の心臓植込みデバイス患者への安全な緊急頭部 MRI 撮影の医療体制を構築することを示唆している。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士(医学)の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 岡田　隆平 |
| 論文審査担当者 | 主査　堤　剛<br>副査　星　治、沢辺　元司 |
| 論　文　題　目 | The extended bundle of the tensor veli palatini: Anatomic consideration of the dilating mechanism of the Eustachian tube |

（論文内容の要旨）

(要旨)

耳管周囲の筋肉の形態において未だに完全に統一された見解は得られていない。本研究はヒトにおける耳管周囲の筋肉の形態を調べるために行った。

12 体 24 側の成人献体頭部を使用し肉眼的解剖ならびに組織学的研究を行った。主たる結果として下記のものが認められた。①口蓋帆張筋の外側下方の筋束は翼突鉤で内側へ翻転することなく、外側へ走行し頬筋と連続していた。②口蓋帆張筋は耳管膜様部の外側部に付着していた。③上咽頭収縮筋と頬筋は外側では筋性に連続していた。④上咽頭収縮筋の一部の線維は口蓋腱膜の上に付着していた。⑤口蓋帆挙筋は耳管軟骨内側板のすぐ下方を走行していた。以上の結果より、口蓋帆張筋、頬筋、上咽頭収縮筋、口蓋帆挙筋が複雑に連携して力を及ぼすことで耳管が開口すると考えられた。

(諸言)

耳管開口のメカニズムを解明するためには耳管周囲の筋肉の形態を知ることが重要であるが、その解剖学的複雑さから未だ統一された見解が得られていないのが現状である。

一般的に耳管を開口する筋として考えられているのは口蓋帆張筋である。しかし、口蓋帆挙筋が耳管開口に関与しているのではないかとする報告も散見される。また、耳管咽頭筋も耳管軟骨から起始する筋として耳管の開口に寄与している可能性がある。

本研究の目的は、耳管周囲の筋の形態学的調査を行うことにより、耳管開口のメカニズムを解明することである。

(方法)

12 体 24 側の成人献体頭部を使用した（男性 4 人、女性 8 人、平均年齢 82.5 歳）。肉眼的解剖には 8 体 16 側を使用した。最初に耳管周囲の構造物を取り出した。その後 Plank-Rychlo 水溶液を用いて十分に脱灰した。内側からは粘膜を、外側からは咀嚼筋や翼突板等の骨を顕微鏡を用いながら除去し、耳管周囲の筋を剖出し観察した。そのうちの一側に関しては、口蓋帆張筋と頬筋との関係性を見るために組織学的な観察を追加した。口蓋帆張筋と頬筋を一塊にパラフィン包埋し、

5μm の組織切片を作成し、Elastica van Gieson 染色を施行し観察した。

4 体 8 側は組織学的観察に用いた。耳管周囲の構造物を一塊に取り出し、Plank-Rychlo 水溶液で十分に脱灰した後、パラフィン包埋した。様々な角度で 5μm の組織切片を作成し、Masson's trichrome 染色ならびに Elastica van Gieson 染色を施行し観察した。

(結果)

１．内側からの観察

１−１．肉眼的観察

耳管軟骨内側板の直下に口蓋帆挙筋が観察された。また耳管軟骨外側板のさらに外側に口蓋帆張筋が観察された。耳管咽頭筋は、耳管軟骨内側板最前部の下面から起始し、口蓋咽頭筋背側に合流していた。耳管咽頭筋は 16 例中 7 例に小さな筋として認められたが、残りの症例では明らかな筋線維は確認できなかった。

１−２．組織学的観察

耳管軟骨と、口蓋帆張筋ならびに口蓋帆挙筋の関係を調べるために耳管の長軸に垂直な方向で連続切片を作成して観察した。口蓋帆張筋は前方では蝶形骨の舟状窩から、また後方では耳管軟骨外側板から起始していた。また口蓋帆張筋の内側部は耳管膜様部への付着も認められた。口蓋帆挙筋は耳管軟骨内側部のすぐ下方を走行していたが、組織学的に明らかな付着は認めなかった。

２．外側からの観察

２−１．肉眼的観察

口蓋帆張筋の内側の筋束は、翼突鉤で内側へ翻転し、口蓋腱膜を形成していた。口蓋帆張筋の外側下方の筋束は翼突鉤の外側を通過し全例で頬筋と連続していた。頬筋は上顎結節、翼突鉤から起始する他に口蓋帆張筋ならびに上咽頭収縮筋と筋性に連続していた。また、上咽頭収縮筋の一部は翼突鉤や口蓋腱膜から起始していた。

２−２．組織学的観察

肉眼的観察で口蓋帆張筋と頬筋が筋性に連続している様子が観察されたので、同部位を一塊に切り出し、組織学的に観察した。その結果、口蓋帆張筋と頬筋は結合組織を介することなく連続していた。また翼突鉤周囲の筋の走行を組織学的に検索した。翼突鉤には後方から上咽頭収縮筋、前方外側から頬筋が付着しているのが認められた。口蓋帆張筋は翼突鉤で方向を変えていたが、翼突鉤への明らかな付着は見られなかった。さらに、口蓋帆張筋の内側部は翼突鉤で内側へ向きを変えて口蓋腱膜を形成し、外側部は翼突鉤で内側へ向きを変えること無く外側へ走行しているのが観察された。

（考察）

今回の研究では、口蓋帆張筋、頬筋、上咽頭収縮筋が互いに連続していることが明らかになった。また、口蓋帆張筋ならびに口蓋帆挙筋と耳管軟骨の位置関係も明らかにすることができた。これらの複雑な構造から、ヒトにおける耳管の開口機構には非常に多くの筋が複雑に関係していることが示唆された。

１．　耳管外側を下方に牽引する筋群

一般的に口蓋帆張筋は蝶形骨舟状窩と耳管軟骨外側板から起始するとされているが、今回の結果より耳管膜様部の外側にも付着していることがわかった。この部分の筋線維は耳管膜様部を直接外側下方へ牽引すると考えられ、耳管開口に重要な部分と考えられる。

また口蓋帆張筋は一般的には翼突鉤で内側へ翻転し、口蓋腱膜を形成するとされている。直接翼突鉤へ停止する線維を報告しているものもあるが、今回の研究ではそのような線維は認められなかった。一方で口蓋帆張筋は下方で２層に分かれることが明らかになった。内側の層は、翼突鉤を回って口蓋腱膜に付着し、外側下方の層は翼突鉤の外側を通り抜け頬筋と連続していた。ヒトにおいて口蓋帆張筋の一部が翼突鉤で翻転せず外側に走行する例が存在することは過去にも報告があるが、それらは上顎結節や口蓋弓周囲の粘膜下に停止するというものである。今回の結果のように頬筋と連続するとした報告は今までない。口蓋帆張筋と頬筋が連続しているため、頬筋の張力は口蓋帆張筋にも影響を及ぼすと考えられる。また、上咽頭収縮筋の一部が口蓋腱膜に付着していたことを考えると、上咽頭収縮筋の張力も口蓋腱膜を下方に押し下げることより間接的に口蓋帆張筋を牽引する作用があると考えられる。

２．　耳管を押し上げる筋

口蓋帆挙筋は耳管軟骨内側板の直下を走行していた。ヒトでは耳管と口蓋帆挙筋は極めて近い位置関係にあり、耳管の開口について何らかの作用があると示唆された。口蓋帆張筋が耳管軟骨外側板を安定させた際に、耳管軟骨内側板の下にある口蓋帆挙筋が収縮することにより耳管軟骨内側板は挙上することになる。また、耳管軟骨外側板が口蓋帆張筋、頬筋、上咽頭収縮筋の作用により下方に引き下げられた際には、口蓋帆挙筋は間接的に内側板を支える役割をしていると考えられる。これらの動きにより耳管軟骨に捻れが生じるものと考えられる。また、口蓋帆挙筋の支配神経は咽頭神経叢から上咽頭収縮筋の支配神経とともに分岐することが報告されており、上咽頭収縮筋と連動して収縮する可能性がある。

３．　耳管開口のメカニズム

教科書的には口蓋帆張筋、頬筋、上咽頭収縮筋は３つの独立した構造物として描かれて、それぞれ支配神経も異なるとされる。しかし、脳神経において、支配領域が明確に分けられず、互いにオーバーラップすることがあると報告されている。それ故この３つの筋が互いに明確に区別がつかず、連続することがあっても不思議ではない。

耳管軟骨から直接起始している筋は口蓋帆張筋であり、同筋が耳管開口筋の主たる筋であると考えられる。口蓋帆張筋は蝶形骨舟状窩ならびに耳管軟骨外側板から起始していた。蝶形骨舟状窩から起始する線維は耳管軟骨や口蓋帆張筋そのものを安定させる働きがあると考えられる。一方で、耳管軟骨外側板から起始する線維は耳管軟骨外側板を外側下方へ牽引する。さらに、耳管膜様部の外側へ付着している部分は耳管膜様部外側を直接外側下方へ牽引する働きがあると考えられる。このように口蓋帆張筋が作用するとき、翼突鉤で内側へ翻転する部分は単に下方へ牽引するのみであるが、頬筋と連続する部分は外側へも牽引する。

また、口蓋腱膜に付着している上咽頭収縮筋も耳管軟骨に対する間接的作用を持つと考えられ

る。さらに、口蓋帆挙筋と耳管軟骨内側板との位置関係から、間接的ではあるかもしれないが、口蓋帆挙筋の耳管軟骨に対する作用が十分に推測される。以上より、耳管開口は、単一の筋による働きによるというより、多くの筋が複合的に作用することにより起きると考えられた。

耳管咽頭筋は、耳管軟骨に直接付着することから、耳管開口に対して影響を与える可能性は十分考えられる。しかしながら、本筋には解剖学的に変異が多くみられ、小さかったり欠損したりしていることが知られている。本研究でも、9/16 では明らかな筋束は認めず、残りの献体でも筋束も非常に細いということから、耳管開口に及ぼす働きは限定的であると考えられる。

(結論)

本研究で口蓋帆張筋、頬筋、上咽頭収縮筋はそれぞれ支配神経が異なっているにも係らず、互いに連続していることが分かった。また、上咽頭収縮筋の一部は口蓋腱膜の上に付着しており、耳管開口に寄与している可能性があると考えられた。さらに、口蓋帆張筋、口蓋帆挙筋の解剖学的位置関係を明らかにすることによりこれら 2 つの筋が耳管軟骨を捻る働きがあることが示唆された。これらの要素が複雑に関係して耳管が開口すると考えた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5314　号 | 岡田　隆平 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　堤　剛<br>副　査　星　治、沢辺　元司 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文はヒトの耳管開閉にかかわる口蓋帆張筋、口蓋帆挙筋、上咽頭収縮筋、頬筋の解剖学的形態についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

耳管周囲の筋肉の形態に関してはいまだ統一された見解は得られておらず、滲出性中耳炎や真珠腫性中耳炎の形成過程における詳細なメカニズムを解明する上でのネックの一つとなっている。今回の研究でその一端を多数のヒト検体によって明らかにし、耳管の開放メカニズムについて新たなモデルが構築・提唱されている。耳科および鼻咽腔・口腔領域の今後の臨床に大きな発展をもたらす礎となりうるものである。

２）社会的意義

本研究において、口蓋帆張筋、口蓋帆挙筋、上咽頭収縮筋、頬筋が相互に連絡しながら耳管開放機能を形成していることが示唆された。これは今後の滲出性中耳炎や真珠腫性中耳炎、癒着性中耳炎などの新たな治療指針や発生予防のための知見につながっていくものと思われる。

３）研究方法・倫理観

本研究には 12 体 24 側の成人検体頭部が使用された。肉眼的解剖と各構造物の詳細な組織学的観察が行われており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は本研究における各筋群の走行・連絡の形態から、耳管開放のメカニズムにおける各筋の相互作用について新たなモデルを提案している。中耳腔換気能における耳管の生理学的な役割の詳細な理解に向けて大きな進展をもたらすとともに、治療や予防医学の領域においても飛躍的な進歩が期待できる。さらに、組織の透明化による神経構造の解明に向けた研究など、次のステップに向けた研究も開始されている。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 増戸　梨恵 |
| 論文審査担当者 | 主査　東田　修二<br>副査　戸塚　実、宮坂　尚幸 |
| 論　文　題　目 | Evaluation of human nonmercaptalbumin as a marker for oxidative stress and its association with various parameters in blood |

（論文内容の要旨）

【要旨】

酸化型アルブミンは酸化ストレスマーカーとして有用と考えられるが、測定に時間を要することが問題であった。我々はヒト非メルカプトアルブミン(酸化型アルブミン，HNA)の測定について、最近確立された従来法と比較して短時間に測定可能な陰イオン交換 HPLC 法により測定した HNA の評価を行った。60 名の検診受診者において、血清 HNA の平均値は 25.1 ± 3.0 %で男女差はなく、年齢と有意な正の相関が認められた。酸化ストレスとの関連性が報告されている C-反応性蛋白、γ-グルタミルトランスフェラーゼおよび鉄と HNA との間に相関はみられなかったが、収縮期血圧、脈圧、ボディマス指数との間に有意な正の相関が認められた。また、HNA と AST, LDH, BUN およびクレアチニンとの間に有意な正の相関が認められたことから酸化ストレスは肝障害や腎機能に関連することが示唆された。さらに、男女別にみると HNA は女性で尿酸との間に有意な正の相関がみられたことから、女性においてのみ高尿酸値が酸化ストレスの増大につながることが示唆された。その他に性差が認められた項目について、白血球数が女性おいて、一方、赤血球関連項目が男性において HNA との間に有意な相関がみられた。結論として、健常人の血清 HNA 値は既報の通りおよそ 25 %であり、酸化ストレスは高血圧、肥満、肝障害、腎機能、貧血と密接に関連する可能性が示された。

【緒言】

活性酸素やフリーラジカルにより引き起こされる酸化ストレスは糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化、歯周病、アルツハイマー病、パーキンソン病や癌など、種々の疾患に関与すること知られている。しかし、臨床現場では酸化ストレス疾病の病態や抗酸化剤の治療効果を評価するための高感度なバイオマーカーは開発されていない。

この目的のために、我々は血清中における主要な抗酸化物質の 1 つであるアルブミンに着目してきた。アルブミンは活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)によりアルブミン自身が酸化されると同時に他の生体内物質に対して抗酸化物質としての役割を果たしている。HSA 分子上の 34 番目のシステイン残基(Cys-34)が酸化還元作用を有していることが明らかにされており、HSA は血管内外に広く分布していることから、HSA の酸化は体全体の酸化状態を反映するとされてい

る。Cys-34 の SH 基がフリーの状態であるのが還元型アルブミン(human mercaptoalbumin; HMA)であり、Cys-34 に Cys やグルタチオンなどが結合しているのが酸化型アルブミン(human nonmercaptoalbumin; HNA)である。健常成人において血清アルブミンの約 70～80 %が HMA で残りの 20～30 %が HNA であるとされている。

HMA および HNA が酸化ストレスを評価するための血中マーカーとして有用であることが示唆されているにもかかわらず、HMA および HNA の測定法は操作が煩雑で時間がかかるという欠点があることから、我々は、最近確立された陰イオン交換 HPLC を用いて従来法と比較してより信頼性が高く短時間に HMA と HNA を分離する方法により、検診受診者の HNA の評価を行い、C-反応性蛋白(CRP)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、尿酸(UA)といった血中パラメーターが酸化ストレスのマーカーとして報告されていることから、これらのパラメーターが実際に酸化ストレスと関連するか、また、酸化ストレスを評価・推定可能であるかを検討した。

【方法】

対象は 2016 年 6 月から 7 月に東京大学医学部附属病院検診部における検診受診者 60 名(男性 30 名、女性 30 名)である。早朝空腹時に採血を行い、生化学および血算の測定を行った。本研究は 1975 年ヘルシンキ宣言に基づいて実施し、東京大学大学院医学系研究科医学部倫理委員会の承認(承認番号 2565-(2))を得て行った。書面にて検体使用に関するインフォームド・コンセントを得た。

HMA および HNA の測定は陰イオン交換 HPLC 法を用いて行った。

データは平均値±標準偏差(SD)で表し、2 群間比較には Mann-Whitney U-test を用いた。スピアマンの順位相関により HNA と各種血中パラメーターとの相関の検討を行った。$P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果および考察】

本研究の対象者の平均年齢は 63.1 ± 9.9 歳で比較的高齢であり、検査結果の平均値から判断すると健常人であると想定された。本研究の対象者の HNA の平均値は 25.1 ± 3.0 %で、男性の平均値が 25.1 ± 3.1 %であるのに対し、女性の平均値は 25.0 ± 3.2 %で性差はみられず、血清アルブミンの約 20 - 30 %が HNA であるとされており、既報の結果と一致した。また、既報の通り HNA と年齢との間に正の相関が認められた。

血清 HNA 値と各種血中パラメーターの関連性についてみたところ、HNA と有意な正の相関を示した項目は脈圧(PP)、AST、LDH、BUN、Cre、収縮期血圧(SBP)、UA、WBC、BMI、TG、HbA1c であった。AST、Cre、UA において HNA との相関に性差がみられた。

CRP、GGT、Fe は酸化ストレスと関連するとされているが、本研究においては HNA との間に有意な相関はみられなかった。GGT には性差があるため男女別で HNA との相関を検討したが、関連性はみられなかった。従って、CRP、GGT、Fe は酸化ストレスマーカーとして再評価の必要性があることが示唆された。

高血圧の成因の 1 つとして酸化ストレスマーカーの関与が報告されており、本研究においても血圧関連項目の中で PP および SBP と HNA の相関性が高いことが示されたが、拡張期血圧(DBP)

と HNA との間に有意な相関はみられなかったことから、収縮期血圧のみ酸化ストレスと関連する原因を明らかにする必要性があると思われた。また、女性において肥満により酸化ストレスが増大するとされているが、本研究においては明らかな性差はみられなかった。血圧および肥満と酸化ストレスとの関連性について因果関係を解明すべきであると思われた。

飲酒や喫煙といった生活習慣が HNA に影響を及ぼすかどうか検討したところ、飲酒歴によって HNA に差は認めらなかった。また、喫煙歴も HNA に影響を与えることはなかったが、喫煙中に HNA が増加するかどうかは喫煙中の対象者が少なかったため検討することはできなかった。HNA と BUN および Cre との間で有意な正の相関性が示されたことから、酸化ストレスは腎機能との関連性が高いことが示唆された。また、血液透析の前後でヒト血清アルブミンの酸化還元状態が急速に変化するとされていることから、腎機能は血清 HNA 値の主要な決定因子の 1 つであり、従って、腎機能が酸化ストレスを反映するかもしれない。

核酸が代謝される際，プリン塩基の 1 つであるキサンチンがキサンチンオキシダーゼ(XO)によって UA となるが，UA 高値は XO の活性が高いことを反映しており，過剰な XO はフリーラジカルの産生につながることから高度の酸化ストレスをもたらすとされている。しかしながら、UA は活性酸素のスカベンジャーで，抗酸化作用を有し、全抗酸化作用の 3 分の 2 を担うとされているため，低 UA 血症状態では活性酸素による障害を強く受けると考えられている。このように UA は酸化と抗酸化と相反する見解がもたらされており、本研究では HNA と UA は有意な正の相関を示したことから、UA により酸化ストレスが抑制されることはなく、UA の抗酸化作用はみられず、むしろ酸化ストレスのマーカーとしての意義が高いことが示唆され、これは特に男性よりも女性で顕著であった。興味深いことに、男性において UA が高値であると将来のパーキンソン病の罹患リスクが低くなるという報告があり、また、本研究において男性では UA と HNA は相関しなかったことから、男性においては UA と酸化ストレスとの関連性は低いようである。

好中球は細胞内活性酸素を殺菌などに有効活用しているが，反面，自己融解により活性酸素を内皮に放射し，内皮傷害を起こすことが知られており、また、単球は細胞内活性酸素が増加すると接着分子などを発し，内皮に接着することで動脈硬化病変をつくりはじめると考えられている。さらに、好中球の酸化ストレスは HbA1c によって影響を受けるという報告があり、WBC と HbA1c は酸化ストレスとの関連性が高いことから、本研究においても HNA との間にそれぞれ相関が認められたものと考えられた。WBC については男女別にすると女性で HNA と有意な正の相関が認められたが、RBC 関連項目では、男性で有意な負の相関が認められた。ROS により造血幹細胞が老化し造血障害が起こるとされていることから、貧血と酸化ストレスとの関連性について説明することができるかもしれない。また、男性において血小板数と HNA との間に有意な負の相関が認められたことから、造血においては女性よりも男性が ROS の影響を受けやすいのかもしれない。

肝障害関連項目である AST、ALT、LDH についてみると、男性よりも女性において HNA との関連性が高かった。従って、腎だけでなく肝も酸化ストレスの標的臓器の 1 つであることが示唆された。

結論として、新法により測定した健常人の血清中の HNA 値は既報と一致して約 25 %で、年齢と相関したが、性差はなかった。本研究における HNA と各種血中パラメーターとの回帰分析の

結果から、高血圧、肥満、肝障害、腎機能および貧血が酸化ストレスと密接に関連する可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5315　号 | 増戸　梨恵 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　東田　修二<br>副　査　戸塚　実、宮坂　尚幸 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、酸化ストレスマーカーである酸化型アルブミンの、全アルブミンに対する百分率を、新たに開発された HPLC 法を用いて、健常成人 60 名の血清検体に対して測定し、他の検査結果などとの関連性を調べ、酸化ストレスが高血圧や肝障害などと関連することを示したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

酸化ストレスマーカーとしての酸化型アルブミンの測定はすでに行われているが、現行の測定法は長時間を要し、正確性に欠ける欠点があった。申請者は新たに開発された HPLC を用いた測定法で多数の健常人検体を測定し、検査の迅速性と正確性を示すとともに、酸化型アルブミンと他の検査所見などとの関連性を見い出しており、評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1. HPLC による測定法で、血清中の酸化型アルブミンの比率を迅速かつ正確に測定できる。
2. 酸化型アルブミンは高血圧、肥満、肝障害などと関連性がある。

以上のように申請者は、酸化ストレスが高血圧、肥満、肝障害などと関連がある可能性を示している。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

酸化型アルブミンの測定方法として、陰イオン交換 HPLC 法を用いている。この測定は、生化学的知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術が十分に高いことが示されると同時に、臨床検体を用いることに対する倫理観を持って行われたことが示された。

４）考察・今後の発展性

申請者は、今後、種々の疾患の患者検体や、同一患者の経過を追った検体での測定を行う予定であることを述べており、研究がさらに発展することが期待される。

**３．その他**

なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 大畠　慶映 |
| 論文審査担当者 | 主査　稲澤　譲治<br>副査　植竹　宏之、渡邉　守 |
| 論　文　題　目 | Acquired Resistance with Epigenetic Alterations Under Long-Term Antiangiogenic Therapy for Hepatocellular Carcinoma |

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

抗血管新生療法は、肝細胞癌（HCC）を含む固形腫瘍に対して初期は有効であっても、最終的には腫瘍が再発・進行し、かえって予後不良となることさえある。この問題を解決するため、我々はヒト HCC 細胞株を免疫不全マウスに皮下移植して VEGFR 阻害剤を投与し、残存した腫瘍片を次のマウスに皮下移植して阻害剤投与を行う操作を 12 回繰り返し、in vivo で薬剤耐性株を確立することに成功した。そして、親株と薬剤耐性株で遺伝子発現を網羅的に比較し、薬剤耐性株で高発現している遺伝子として thymosin beta 4 (Tβ4)を同定した。両株間での Tβ4 のエピジェネティック変化を解析すると、薬剤耐性株ではプロモーター領域の DNA 脱メチル化およびヒストン H3 の活性型修飾が認められ、結果として Tβ4 発現が誘導されていることが示唆された。ヒト HCC 細胞株における Tβ4 の過剰発現によって、in vitro のスフェア形成能・遊走能・浸潤能が顕著に亢進した。また in vivo でも造腫瘍能を亢進し、VEGFR 阻害剤 sorafenib による腫瘍増殖抑制効果を減弱した。臨床的には、sorafenib 治療を受けた HCC 患者において、Tβ4 高発現群では無増悪生存率が有意に低いことを見出した。本研究において、エピジェネティック変化により誘導された Tβ4 の発現が、スフェア形成能や造腫瘍能などの癌幹細胞性の獲得と抗血管新生療法に対する耐性化に寄与していることが明らかになり、エピジェネティック制御が薬剤耐性化を阻止する重要な標的となる可能性が示唆された。

〈緒言〉

進行 HCC は、SHARP 試験と Asia-Pacific 試験に基づいて、sorafenib による全身化学療法が一般的となっている。現在は lenvatinib の第Ⅲ相試験が進行中であり、RESORCE 試験において regorafenib が sorafenib 治療後に進行した HCC 患者において全生存期間の改善を達成するなど、分子標的治療薬の臨床試験が盛んに行われている。この３剤は何れも VEGFR を介した血管新生を主な標的とするマルチキナーゼ阻害剤であり、腫瘍の退縮によって生存期間を延長させることが期待される。しかしながら一方で、抗血管新生療法に対する薬剤耐性や抗血管新生療法後の悪性化に関する報告が散見される。また、分子標的治療に対する薬剤耐性と、エピジェネティック変化の関連が報告されている。効果的な治療を行うためには耐性メカニズムを理解することが重

要であるが、未だに不明な点が多い。本研究では免疫不全マウスへのヒト HCC 細胞株の皮下移植と VEGFR 阻害剤処理を 12 ヶ月間繰り返し行い、in vivo で薬剤耐性株を作製した。そしてこの薬剤耐性株を用いて、エピジェネティック変化を含めた抗血管新生療法における耐性メカニズムの解明を試みた。

〈方法〉

長期抗血管新生療法に対する抵抗性のメカニズムを明らかにするために異種移植マウスモデルを確立した。NOD/SCID マウスにヒト HCC 細胞株 HuH7 を皮下移植し VEGFR/Aurora kinase 阻害剤 JNJ-28841072 を腹腔内投与した後、残存腫瘍を摘出して腫瘍片の一部を次の NOD/SCID マウスに直接移植した。この過程（約 1 ヵ月）を 6 回および 12 回繰り返すことにより、薬剤耐性株(HuH7-F6, -F12)を作製した。この親株と 2 種類の薬剤耐性株で網羅的遺伝子発現解析を行い薬剤耐性株で高発現している遺伝子を探索した。エピジェネティック解析は、DNA メチル化解析としてメチル化特異的 PCR（MSP）とバイサルファイトシーケンシング法、ヒストン修飾解析としてクロマチン免疫沈降法（ChIP）を施行した。また同定した遺伝子を過剰発現させた細胞株を作成して、薬剤耐性化における機能を解析した。さらに、HCC 臨床検体の免疫組織学的染色によって臨床応用の可能性を検証した。

〈結果〉

薬剤耐性株(HuH7-F6, -F12)からなる腫瘍では、JNJ-28841072 による腫瘍縮小効果は認められず、HuH7-F6、-F12 の抗血管新生療法に対する in vivo 耐性が確認された。親株と 2 種類の薬剤耐性株(HuH7-F6, -F12)でマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を施行した結果、Gene Set Enrichment Analysis によって薬剤耐性株では幹細胞性・未分化度が上昇していること、HCC における悪性形質を呈することが示された。耐性株で共通して過剰発現する遺伝子として thymosin β 4, X-linked (Tβ4)を同定した。Tβ4 は、G アクチンと結合し細胞骨格に関与する単量体結合タンパクである。また耐性株では幹細胞マーカーである CD133 が過剰発現していることも確認した。

エピジェネティック変化が薬剤耐性に関連しているという報告に基づいて、Tβ4 転写調節におけるエピジェネティック変化について解析した。HuH7 を脱メチル化剤 5-aza-dC および HDAC 阻害剤 trichostatin A で処理したところ いずれの場合にも Tβ4 発現レベルが上昇した。Tβ4 遺伝子で親株と薬剤耐性株のプロモーター領域でのメチル化状態を解析した結果、MSP によって HuH7-F0 でメチル化を認め、HuH7-F6、-F12 では脱メチル化を認めた。バイサルファイトシーケンシング法では、HuH7-F0、-F6、-F12 のメチル化率はそれぞれ 94.0%、55.8%、45.3%であった。これらの結果より、抗血管新生療法耐性の形成過程で Tβ4 遺伝子プロモーター領域における脱メチル化が生じ、徐々に進行することが示された。また Tβ4 遺伝子のプロモーター領域の定量的 ChIP 分析を施行した結果、HuH7-F6、-F12 において活性型ヒストン修飾である H3K4me3、H3K27ac レベルが有意に上昇することを明らかにした。HuH7-F6、-F12 における H3K4me3、H3K27ac タンパク量全体の上昇も確認した。

次に Tβ4 の HCC 悪性化における意義を検証するため、HuH7 に Tβ4 を恒常的に過剰発現させた HuH7-Tβ4 細胞株を用いて解析した。HuH7-Tβ4 は HuH7-F12 と同様に in vitro スフェア形成能・遊

走能・浸潤能、in vivo 腫瘍増殖能が亢進し、sorafenib による血管新生阻害効果が認められず、治療抵抗性を獲得することが明らかとなった。

さらに HCC 臨床症例における Tβ4 発現の意義を検証した。当科肝切除後の HCC 再発に対して sorafenib 治療を受けた 30 例を用いて、Tβ4 の免疫組織学染色的解析を施行した。Tβ4 高発現群:7 例、Tβ4 低発現群:23 例を比較した結果、背景となる臨床病理学因子には何れも相違を認めなかったが、sorafenib 治療後の無増悪生存率が Tβ4 高発現群では有意に低いことが明らかとなった(p=0.009)。

〈考察〉

本研究では、異種移植マウスモデルを用いて、抗血管新生療法に対する耐性獲得のメカニズムを解明した。in vivo における薬剤耐性の研究は in vitro における薬剤耐性の研究よりはるかに困難であるが、in vivo で解析を行うことは実臨床で薬物耐性の出現を克服するために重要である。さらに sorafenib および他のキナーゼ阻害剤は、VEGF 依存性血管新生阻害作用が主であり、癌細胞自体ではなく微小環境を標的とするため、in vivo モデルの方がより臨床で経験する薬剤耐性獲得の過程を反映している。in vivo モデルでの sorafenib 耐性の報告は 2 報あり、Rudalska らは Mapk14 を抑制するとマウス HCC の sorafenib 感受性が強くなることを同定した。また Tovar らは、sorafenib 感受性腫瘍と耐性腫瘍との生物学的および分子的特性を比較し、癌幹細胞様形質の獲得および IGF/FGF シグナルの活性化が薬物耐性を引き起こしていると主張した。これらの研究よりもさらに臨床の治療に近い状況を想定し、本研究では反復移植・反復投与という手法で抗血管新生療法耐性をモデル化した。

薬剤耐性獲得において、エピジェネティック変化の重要性を示す報告が増えている。しかしながら、これらは全て癌細胞自体に作用する抗癌剤を用いた in vitro 解析であり、血管新生のような腫瘍微小環境に作用する in vivo 解析の既報はない。本研究では血管新生阻害下で生存する HCC 細胞株を解析し、H3K4me3 および H3K27ac のタンパク量全体が増加し、癌細胞のエピジェネティックスが in vivo 腫瘍微小環境の変化に影響されるという証拠を初めて明らかにした。薬剤耐性株では Tβ4 プロモーター領域の脱メチル化、H3K4me3 および H3K27ac などの活性型ヒストン修飾が認められ、オープンクロマチン状態となっている可能性が示唆された。最近、クロマチン制御因子 BRD4 がアセチル化ヒストン領域に結合してエンハンサー活性化に関与することが示され、BRD4 阻害剤 JQ1 が耐性化に関連する遺伝子発現を低下させることにより、耐性化細胞特異的にアポトーシスを誘発することが報告された。Tβ4 に関しても同様に、活性型のクロマチン制御因子に対するエピジェネティック治療薬が、HCC における抗血管新生療法の耐性化を阻止する薬剤として期待される。

〈結論〉

HCC の抗血管新生療法耐性の異種移植モデルを確立した。この過程で癌幹細胞様形質および Tβ4 発現を誘導するエピジェネティック変化を獲得することを明らかにした。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5316　号 | 大畠　慶映 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　稲澤　譲治<br>副　査　植竹　宏之、渡邉　守 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

免疫不全マウス皮下に作製したヒト肝細胞癌（HCC）細胞株移植腫瘤を用いた in vivo 選択法により VEGFR 阻害剤耐性亜株を樹立し、その耐性亜株と親株における網羅的発現、エピジェネティック解析等の比較からか抗血管新生療法における耐性メカニズムの解明を試みた。その結果、エピジェネティック変化により誘導された Tβ4 の発現が、スフェア形成能や造腫瘍能などの癌幹細胞性の獲得と抗血管新生療法に対する耐性化に寄与していることを明らかにして、エピジェネティック制御が薬剤耐性に関与する可能性を示唆した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

進行性のHCCにおいてVEGF阻害剤のsorafenibによる全身化学療法が一般的な治療法となっている。しかし、他のキナーゼ阻害の分子標的薬と同様、VEGF阻害剤においても投与経過中に薬剤耐性を獲得することが知られている。これら背景から、当該研究の目的は先駆的かつ独創的と言える。

２）社会的意義

VEGF 阻害剤の薬剤耐性機構の解明や耐性克服はHCC の薬物療法においても喫緊の究明すべき課題である。したがって、今回の研究で得られた成果は、エピジェネティックス制御が薬剤耐性化を阻止する重要な標的となる可能性が示唆され、HCC 治療において科学的のみならず社会的意義をも認めるものである。

３）研究方法・倫理観

*In vitro, in vivo* 実験あるいは患者試料を用いて示された今回の研究は倫理的にも適正であり、また、得られた結果の解釈においても矛盾なく適切な解釈のもとで考察が展開されている。

４）考察・今後の発展性

親株と薬剤耐性株で遺伝子発現を網羅的に比較するとともに、DNA メチル化解析やヒストン修飾解析などのエピジェネティック解析を行い、その結果、プロモーター領域の DNA 脱メチル化

およびヒストン H3 の活性型修飾などのエピジェネティック制御を通して薬剤耐性亜株で高発現する thymosin β 4, X-linked (Tβ4)を同定した。Tβ4 は、Ｇアクチンと結合し細胞骨格に関与する単量体結合タンパクとして知られている。耐性亜株では幹細胞マーカーである CD133 が過剰発現していることも確認できた。親株 HuH7 に Tβ4 を過剰発現させることで、in vitro のスフェア形成能・遊走能・浸潤能の顕著な亢進が認められ、さらに、in vivo においても造腫瘍能の亢進ならびに sorafenib による腫瘍抑制効果の減弱が確認された。臨床的には、sorafenib 治療を受けた HCC 患者 30 例の免疫組織学染色的解析から、Tβ4 高発現群では無増悪生存率が有意に低いことが見出された(p=0.009）。

本研究において、エピジェネティック変化により誘導された Tβ4 の発現が、スフェア形成能や造腫瘍能などの癌幹細胞性の獲得と抗血管新生療法に対する耐性化に寄与していることが明らかになり、エピジェネティックス制御が薬剤耐性化を阻止する重要な標的となる可能性が示唆されている。今後の一層の発展が期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

申請者は、自身の言葉をもって研究の背景と目的、実験方法、結果の解釈、本研究の意義や今後の課題などについての発表を行い、本研究が申請者自身の高度な研究能力とその基礎となる豊かな学識に基づき実践されたものということが確認された。

研究の意義、当該解析において使用した実験手法の詳細、今後の研究の展開等の質問がなされた。申請者からはいずれにおいても的確な回答が得られた。副査の植竹宏之教授、渡邉　守教授と協議のうえ、申請者は、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 髙山　啓 |
| 論文審査担当者 | 主査　古川　哲史<br>副査　吉田　雅幸、笹野　哲郎 |
| 論　文　題　目 | Early Recurrence after Longstanding Persistent Atrial Fibrillation Ablation: Time Course, Optimization of the Blanking Period, and Clinical Outcome |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

持続性心房細動に対するアブレーション後は、多くの症例で早期再発を認める。持続性心房細動に対しアブレーション実施した 204 例の術後経過を検討したところ、115 例で初回治療後 60 日以内に早期再発を認めた。受信者動作操作曲線を用いた検討から、適正なブランキングピリオドは 15 日であった。非早期再発群と初回治療後 15 日以内の早期再発群では、初回治療後 16 日以降の早期再発群と比較して、有意に晩期再発は少なく臨床的予後は良好であった。また、長期の心房細動持続期間と左房径の拡大は、初回治療後 16 日以降の早期再発群の独立した予測因子であった。さらに、再治療を施行した 101 例の検討では、肺静脈左房再伝導群は非再伝導群と比較して、初回治療から早期再発までの期間が有意に延長していた。

＜緒言＞

アブレーションは、心房細動に対する安全で確実な治療法として確立してきた。発作性心房細動等と比較して、持続性心房細動ではアブレーション後の再発が多いことが知られているが、肺静脈隔離術に加えて心房細動基質に対するアブレーションを施行する治療法が普及することにより、術後の臨床的予後は改善している。

Oral らの発作性及び持続性心房細動を含む群での検討では、肺静脈隔離術後 3 ヶ月以内の早期再発は、臨床的予後に影響しないことが報告され、肺静脈隔離術後には、生じた心房細動を早期再発とはみなさない期間であるブランキングピリオド を設定している。

一方で、肺静脈隔離術に加えて心房細動基質に対するアブレーションを施行する持続性心房細動アブレーション後の再発例では、適正なブランキングピリオドに関する合意は得られていない。

本研究では、持続性心房細動に対して施行した肺静脈隔離術及び心房細動基質に対するアブレーション後の再発の経時的変化を解析することにより、適正なブランキングピリオドを設定し、早期再発と臨床的予後との関係を検討した。さらに、再治療中の肺静脈左房再伝導所見の有無と早期再発の時期の関係を検討することにより、持続性心房細動の再発例に対する再治療の条件を明らかとした。

＜方法＞

2006 年 8 月より 2010 年 2 月までの期間に、1 年以上持続する薬剤抵抗性の持続性心房細動に対して肺静脈隔離術及び心房細動基質修飾術を施行した 254 例のうち、条件を満たす 204 例について検討を行った。

初回治療後は全ての抗不整脈薬を中止し、最低 3 日間の心電図モニタリングを実施した。退院後は 1 か月毎に外来診察を実施し、問診、12 誘導心電図、ホルター心電図により再発の有無を確認した。観察期間中に、101 例は再発のため再治療を実施した。

初回治療後 60 日以内に認めた心房細動又は心房粗動を早期再発、61 日以降に生じたものを晩期再発とした。1 回目の早期再発の時期を独立変数、晩期再発の有無をアウトカムとした受信者動作特性曲線を用いて、感度及び特異度が最大となる時期を、適正なブランキングピリオドとした。非早期再発群、ブランキングピリオド内早期再発群、ブランキングピリオド後早期再発群に分類して、臨床的予後等に関して統計学的検討を実施した。

＜結果＞

平均年齢は 62±9 歳、平均心房細動持続期間は 74±84 か月、平均左房径は 47.2±5.5mm であった。初回治療後の観察期間は平均 426±224 日であった。

204 例中 115 例（56%）では、初回治療後 60 日以内に、少なくとも 1 回の早期再発を認めた。晩期再発を認めず洞調律を維持した症例は、早期再発群の 43 例（37%）に対して、非早期再発群（以下、noER 群という。89 例）では 65 例（73%）と臨床的予後は有意に良好であった（p<0.0001）。初回治療から早期再発までの期間は、平均 9±1 日であった。早期再発群では、72 例（63%）は初回治療後 5 日以内に早期再発を認め、うち 31 例は初回治療後 24 時間以内であった。早期再発の経時的変化を検討すると、初回治療後 6 日以降は早期再発が漸減し、術後 15～20 日には早期再発が比較的多く発生する期間を認めた。

受信者動作特性曲線を用いて解析を行うと、適正なブランキングピリオドのカットオフ値は 15 日であった（感度 88%、特異度 54%）。早期再発群を、初回治療後 15 日以内の早期再発群(以下、ER≦15 群という。 50 例)と 16 日以降の早期再発群(以下、ER16-60 群という。 65 例)に区分すると、ER16-60 群は noER 群と比較して、有意に心房細動持続期間が長期であり（p<0.05）、左房径が拡大していた（p=0.01）。

また、Kaplan-Meier analysis を用いて臨床的予後を検討すると、noER 群と ER≦15 群の間では有意差を認めないが（p=0.055）、noER 群及び ER≦15 群は ER36-60 群と比較して、晩期再発が有意に少なく臨床的予後は良好であった（p<0.0001）。

さらに、多変量解析を用いた検討では、ER16-60 群の独立した予測因子は、長期の心房細動持続期間と左房径の拡大であった。

観察期間中に 101 例（49%）が再治療を行った。再治療時の所見では、74 例（73%）で少なくとも 1 か所の肺静脈左房再伝導を認め、平均再伝導肺静脈数は 2.4±1.0 であった。肺静脈左房再伝導群は非再伝導群と比較して、初回治療から早期再発までの期間が有意に延長していた（p=0.002）。また非再伝導群では初回治療後 10 日以内に約 80%の症例で、さらに術後 11 日から 20 日の間に 15%の症例で早期再発を認めたが、再伝導群では初回治療後 11 日以降に約 5 割の症

例で早期再発を認め、20 日以降にも早期再発が認められた。再治療後の臨床的予後は、両群間で有意差を認めなかった。

＜考察＞

本研究で得られた主要な知見は以下の 3 つである。①持続性心房細動アブレーション後の早期再発に関する適正なブランキングピリオドは 15 日である。②noER 群及び ER≦15 群は ER16-60 群と比較して有意に晩期再発が少なく臨床的予後が良好である。③再治療時の肺静脈左房再伝導群では、非再伝導群と比較して早期再発の時期が遅い。

早期再発の経時的推移について：

先行研究では、術後 5 日以内の早期再発は、一時的な左房拡大や CRP の上昇を伴う炎症反応と関係しているが、晩期再発とは関係せず臨床的予後は良好との報告がある。本研究では、持続性心房細動アブレーション後の早期再発の 6 割以上が、初回治療後 5 日以内に生じ、治療 15 日以内の早期再発は晩期再発に影響しないとみなせることが示された。

また、心房細動アブレーション後の再発は、肺静脈左房再伝導が主たる原因の一つであることが知られているが、持続性心房細動アブレーション後の再発における肺静脈左房再伝導の役割は明らかではない。本研究では、持続性心房細動アブレーション後の再治療時に、肺静脈左房非再伝導群では、早期再発の 8 割は初回治療後 10 日以内に生じ、20 日以降はゼロであったが、再伝導群では早期再発の時期はより分散しており、初回治療後 20 日以降の早期再発も認めた。これらの結果は、初回治療直後には、肺静脈左房再伝導と関係しない早期再発が多く生じ、時間が経過するごとに、肺静脈左房再伝導と関係する早期再発が生じる可能性を示唆している。

持続性心房細動アブレーション後のブランキングピリオドの最適化について：

心房細動に対するアブレーションでは、ブランキングピリオドを術後 3 か月としている。しかし、発作性心房細動と比較して、再発が多く一旦再発すると持続する、持続性心房細動アブレーションでは、適正なブランキングピリオドに関する合意が存在していない。本研究では、受信者動作特性曲線を用いた検討から、1 年以上持続する持続性心房細動に対するアブレーション後の適正なブランキングピリオドが 15 日であり、初回治療後 15 日以内の早期再発は 16 日以降の早期再発と比較して、晩期再発の発生が有意に少ないことを報告した。我々が知る限りにおいて、本研究は持続性心房細動アブレーションにおける ブランキングピリオドの最適化についての初めての報告である。

持続性心房細動アブレーション後の再治療の条件について：

本研究は、長期の心房細動持続期間及び左房径の拡大が、晩期再発のリスクが高い初回治療後 16 日以降の早期再発の独立した予測因子であり、初回治療後、時間が経過するごとに、肺静脈左房再伝導との関係が示唆される早期再発が生じている可能性があることを報告した。持続性心房細動アブレーションの有効性を高め、再治療を適正化するためには、長期の心房細動持続時間及び左房径の拡大を認める持続性心房細動で、初回治療後 16 日以降に再発を認めた症例に対して、

肺静脈隔離術を含めた再治療を実施することが望ましい。

＜結論＞

持続性心房細動アブレーションでは、初回治療後 15 日以内の早期再発症例は、16 日以降の早期再発症例と比較して、有意に晩期再発は少なく臨床的予後は良好であった。持続性心房細動アブレーション後の適正なブランキングピリオドは初回治療後 15 日であり、長期の心房細動持続期間及び左房径の拡大は、初回治療後 16 日以降の早期再発を独立して予測する因子である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5317　号 | 高山　啓 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　古川　哲史<br>副　査　吉田　雅幸、笹野　哲郎 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

1 年以上持続する心房細動に対してカテーテルアブレーション治療を行い、長期予後と関係しない早期再発の blanking period が発作性心房細動で言われている 3 か月に比べて 15 日と短いこと、再発の予測因子となるものが心房細動の持続時間と左房径であり、15 日以降に早期再発を認め、心房細動の持続時間が長く左房径が大きいものに関しては、積極的に再アブレーション治療を施行することが望ましいことを示した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

発作性心房細動に関しては、早期再発と長期的再発の関係に関しては十分な知見が得られており、アブレーション施行後 3 カ月以内の再発は長期再発と関係ないことがガイドラインにも示されているが、1 年以上続く心房細動に関しては、早期再発と長期的再発の関係を検討したものがないことから、これを検討した点で先駆的・独創的と考えられる。

２）社会的意義

発作性心房細動に関しては、治療ガイドラインも確立しつつあるが、持続性心房細動に関してはまだデータを収集している段階にある。その点で、早期再発のタイムコース、早期再発と長期的再発および適切な blanking period、再アブレーション施行の必要に関係する因子に関する貴重なデータが得られた点で社会的意義は高いと考えられる。

３）研究方法・倫理観

研究方法・倫理観には特別に問題がない。

４）考察・今後の発展性

単施設で行われた後ろ向き研究であり、サンプル数も少ないことが limitation と考えられ、今後さらに多施設でサンプル数を増やして検討を行うことが望まれる。また、今回は再発をエンドポイントしているが、生命予後を改善するかの検討を行うことが望まれる。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

最終諮問では、パワーポイントを用いた発表の後、論文に関する様々な質問を行った。質問では、アブレーション手技、統計方法、結果の解釈、特に後ろ向き研究の限界、臨床的意義、など多岐にわたる質問を行った。おおむね満足のいく回答が得られた。副査の吉田教授、笹野准教授と協議の上、博士（医学）の授与に値する学識を十分に有すると判定する。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 木脇　圭一 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　真二<br>副査　田中　雄二郎、沢辺　元司 |
| 論　文　題　目 | Clinical and pathological significance of myeloid differentiation factor 88 expression in human hepatocellular carcinoma tissues |

（論文内容の要旨）

<要旨>

Toll 様受容体(TLR)を含む自然免疫系は炎症や発癌において重要な役割を果たす。MyD88 (myeloid differentiation factor 88)は TLR のアダプター分子であり、発癌に様々な影響を及ぼす事が知られているが、肝細胞癌(HCC)の発癌における MyD88 の働きは分かっていない。本研究ではヒト HCC における MyD88 の発現と臨床病理学的因子の関係について免疫組織化学染色、Western blot、定量的 RT-PCR (qRT-PCR)を用いて解析した。HBs 抗原陽性の症例や腫瘍径 3cm 以上の症例、脈管侵襲や肝内転移を示す症例で MyD88 の発現が有意に減弱した。Western blot では正常肝組織と HCC いずれでも性差が認められ、肝硬変症例において MyD88 タンパクの発現が有意に低下していた。qRT-PCR では脈管侵襲を伴う症例において MyD88 mRNA のレベルが低下していた。これらの結果は先行研究と異なり、MyD88 の発現低下が HCC の進展と関連する事を示唆した。

<緒言>

自然免疫系は多様な機能を有し、病原体や病的物質の認識において重要な役割を果たす。外部の病原体から生体を保護するとともに、内部の病的物質を認識し、生体の恒常性維持に関与している。自然免疫は TLR をはじめ様々なシグナル伝達系によって厳密に制御されている。最近の研究から TLR を含む自然免疫と発癌が密接に関係していることが明らかになってきた。HCC の発癌には炎症が関与していると考えられており、TLR は肝細胞癌の発癌に重要な役割を果たす事が報告されている。TLR は TLR3 を除き、MyD88 を介したシグナル伝達系に関与する。MyD88 は腫瘍形成との関連が示されているが、腫瘍形成と炎症における MyD88 の役割は多岐に及ぶ。MyD88 は皮膚癌、膵臓癌、大腸癌の発癌に関与する一方で、ウイルス発癌や大腸癌におけるアゾキシメタン(AOM)/デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導発癌を抑制する。肝細胞癌では、腫瘍発生と Kupffer 細胞の IL-6 産生が MyD88 を含むシグナル伝達系に依存していることがマウスの実験系で示され、MyD88 ノックアウトマウスはジエチルニトロサミン(DEN)誘導発癌に抵抗性であることが明らかにされている。また、Liang らにより、ヒト HCC 組織では UICC stage の高い症例や予後不良の症例で MyD88 の発現増強が認められ、MyD88 の発現が腫瘍の進展、転移と関係することが示唆されている。

本研究ではヒトHCCにおけるMyD88の発現と臨床病理学的因子の関係について免疫組織化学染色、Western blot、qRT-PCRを用いて解析した。先行論文とは異なり、MyD88の発現低下がHCCの進展と関連することが示唆された。

<方法>

1991年から2011年の間に帝京大学病院で切除された肝細胞癌105症例について、肝細胞癌組織と隣接する非腫瘍部肝組織の10%ホルマリン固定・パラフィン包埋組織を免疫組織化学的に検討した。さらに、105例中29例について、診断に支障のない部分の凍結組織検体を採取した。転移性肝癌9症例の背景肝の一部を採取し、正常肝組織検体とした。全例において術後1〜12ヶ月毎に胸部CT、腹部造影CTおよび血清AFP, PIVKA-IIの測定を行った。再発は腫瘍マーカーの上昇と腹部CTの結果によって判断した。

免疫染色は抗ヒトMyD88ウサギポリクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)を1次抗体として用い、検出系にEnVision FLEX (Dako)とDako Autostainer Link 48を使用した。HCCおよび非腫瘍部肝組織のMyD88の発現は発現強度に応じて半定量的に評価した(0, 陰性; 1, 弱陽性; 2, 中等度陽性; 3, 強陽性)。また陽性細胞の割合によって発現量を評価した(0, <10%; 1, 10-25%; 2, 26-50%; 3, 51-100%)。染色スコアは両者の積で計算し、0, 陰性; 1-3, low; 4-9, high とした。マクロファージやKupffer細胞においては高倍視野10視野あたり20個以上陽性細胞が見られる場合をhigh、20個未満の場合をlowとした。

Western blotでは抗ヒトMyD88抗体(R&D Systems)を用いた。コントロールとして抗βアクチン抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いた。

RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて凍結検体からRNAを抽出し、QuantiTect RT Kit (Qiagen)を用いてcDNAに逆転写した。Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いてqRT-PCRを行った。グリセルアルデヒド-3-リン酸塩デヒドロゲナーゼ (GAPDH) RNAをコントロールとして用いた。

<結果>

MyD88は肝細胞およびKupffer細胞、HCC細胞および腫瘍内マクロファージの細胞質に観察された。HCC症例の17例でHCC細胞にMyD88の高発現が認められた。腫瘍内マクロファージは10例で高発現を示した。背景肝組織では52例の肝細胞および32例のKupffer細胞において高発現を認めた。統計学的にMyD88発現は性別、年齢、血清AFP値、血清PIVKA-II値、背景肝の肝硬変の有無、UICC stage、HCCの分化度、線維性被膜の有無、被膜浸潤の有無と相関が見られなかった。腫瘍径3cm以上の症例、脈管侵襲や肝内転移を示す症例でMyD88の発現が有意に減弱した(p=0.012, p=0.041, p=0.029)。HBs抗原陽性例ではMyD88の発現が低下し(p=0.041)、HCV陽性例ではMyD88の発現が増強した(p=0.022)。MyD88の発現とOSの相関は見られなかった。

Western blotではMyD88タンパクの発現は肝硬変症例において有意に低下した(vs 正常肝組織, p=0.003; 非腫瘍性慢性肝炎組織, p=0.009; HCC, p=0.038)。正常肝組織ではMyD88タンパクの発現は男性例で有意に増強した(p=0.004)が、HCC 組織では女性例で有意に増加を示した(p=0.041)。MyD88タンパクの発現はHCCの腫瘍径と相関していなかったが、脈管侵襲が見られる症例で発

現が減弱する傾向が見られた(p=0.110)。

qRT-PCR においては MyD88 mRNA の発現は腫瘍径や性別との相関は見られなかったが、脈管侵襲を伴う症例で有意に発現が低下していた(p=0.001)。

<考察>

MyD88 は炎症依存性のシグナル伝達系と癌遺伝子の活性化を伴う内因性シグナル伝達系の 2 つの機序を介して発癌に関与していると考えられている。MyD88 は自然免疫系を介して抗腫瘍作用を持つことも知られている。Ochi らは RAS 変異を有するマウスモデルにおいて MyD88 を抑制することで膵炎が増悪し、膵癌が増加する事を報告し、MyD88 が膵癌に対して抑制的に作用する事を示唆した。Salcedo らは炎症関連の大腸癌発癌モデルにおいて MyD88 が抑制的に作用することを報告した。しかし皮膚癌や大腸癌、リンパ腫において MyD88 は発癌に促進的に働く事が知られている。肝臓では Naugler らによってマウスで発癌剤(DEN)が血清 IL-6 を増加させ、HCC を増加させることが報告された。メスのマウスよりもオスで有意に HCC が誘発され、ヒト HCC が男性に多く発生することと類似性を示すと報告した。DEN に暴露されることで Kupffer 細胞が MyD88 依存性に IL-6 産生を増し、それが発癌を促進し、MyD88 の発現をノックアウトすることでオスのマウスにおいて DEN 誘導の HCC が減少した。また、Liang らはヒト HCC において UICC stage の高い症例で MyD88 の発現が高く、再発率が高いことを報告した。これらの報告から、MyD88 の発現が増強することで HCC の発育、転移が促進されることが示唆された。

本研究では先行論文と異なり、腫瘍径が 3cm 以上の症例、脈管侵襲や肝内転移を伴う症例で有意に MyD88 の発現が低下していた。脈管侵襲を伴う HCC 症例において MyD88 タンパクの発現が減弱する傾向が見られた。また、MyD88 mRNA の発現は脈管侵襲を伴う症例で有意に低下していた。これらの結果から、MyD88 の発現が低下することが腫瘍の進展と関係していることが示唆されるが、MyD88 の発現と生存率（OS）の相関は見られなかった。

先行論文と異なる結果が得られた理由は明らかでないが、検討方法の違いが一因として挙げられる。免疫染色の手順が異なることに加えて、これまでの報告では Western blot や qRT-PCR による検討結果はなされていない。また、Liang らの報告症例は我々の研究対象よりも年齢が若く、腫瘍径が大きく、また HBs 抗原陽性症例が多かった。本研究では腫瘍径が大きい症例、また HBs 抗原陽性の症例で MyD88 の発現が低下していた。

Naugler らは DEN 誘導の肝細胞癌発癌モデルの性差は MyD88 依存性の IL-6 産生の性差に由来すると報告した。本研究では正常肝組織においては男性の方が女性よりも MyD88 の発現が増加していたが、HCC 組織においては逆に女性の法が男性よりも MyD88 の発現が増加していた。これらの結果は MyD88 発現における性差の存在を示唆していると考えられた。

<結論>

MyD88 の発現低下が HCC の進展と関連する事が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5318　号 | 木脇　圭一 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　田中　真二<br>副　査　田中　雄二郎、沢辺　元司 |
|---|---|

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は自然免疫系 Toll-like-receptor のアダプター分子 myeloid differentiation factor 88 (MyD88)について、肝細胞癌における発現と臨床病理学因子の関連について研究した成果である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

肝細胞癌における MyD88 の発現を免疫組織化学染色、Western blot、定量的 RT-PCR (qRT-PCR)を用いて解析し、臨床病理学的因子の関係について解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 肝細胞癌の免疫組織化学染色解析では、MyD88 の発現が HBs 抗原陽性の症例、腫瘍径 3cm 以上の症例、脈管侵襲や肝内転移を示す症例で有意に減弱した。
2. Western blot では正常肝組織と肝細胞癌いずれでも性差が認められ、肝硬変症例において MyD88 タンパクの発現が有意に低下していた。
3. qRT-PCR では脈管侵襲を伴う症例において、肝細胞癌における MyD88 mRNA のレベルが低下していた。

以上のように申請者は、先行研究と異なり MyD88 の発現低下が肝細胞癌の進展と関連することを明らかにしている。これは臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には帝京大学病院で切除された肝細胞癌 105 症例が用いられ、肝細胞癌組織と隣接する非腫瘍部肝組織の MyD88 免疫染色所見と臨床病理学的因子の相関を調べている。さらに Western blot、qRT-PCR を用いた解析により、臨床病理学的因子の相関を検証している。十分な病理組織学的知識、技術のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示された。帝京大学医学部倫理審査委員会の承認を得ており、本研究が十分な準備の上に行われてきたと考えられる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果によって MyD88 の発現低下が肝細胞癌の進展と関連することを明らかにしている。そのメカニズムや自然免疫への関与を解析することにより、今後の研究展開や臨床応用が期待される。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

論文審査の内容を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するに値する十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 白井　剛 |
| 論文審査担当者 | 主査　東田　修二<br>副査　横関　博雄、上阪　等 |
| 論　文　題　目 | Protein antigen of bird-related hypersensitivity pneumonitis in pigeon serum and dropping |

（論文内容の要旨）

〈緒言〉

過敏性肺炎は原因抗原の反復吸入により生じる。抗原は多岐にわたり、曝露様式も抗原毎に異なる。過敏性肺炎は臨床経過から、急性と慢性に分類されるが、慢性過敏性肺炎では多くの場合患者が無自覚に原因抗原に曝露されており、進行性の肺の線維化を生じ予後不良である。

鳥由来タンパクは過敏性肺炎の重要な吸入抗原の一つである。1965 年に Reed らが鳩飼育者に発症した過敏性肺炎を初めて報告して以来、今日まで、国際的には bird fancier’s lung や、pigeon breeder’s lung と呼称されているが、必ずしも鳥を飼育していなくとも発症することや、羽毛製品使用など鳥由来成分への間接的な曝露でも発症することが知られており、我々はそのような症例も含めて鳥関連過敏性肺炎（bird-related hypersensitivity pneumonitis; BRHP）と総称している。

鳥関連過敏性肺炎の抗原は、乾燥した鳥糞、羽毛に含まれ、環境中に飛散したこれらの成分の吸入により肺内に到達すると推測されているが、これらに含まれるどの成分が抗原であるのか、十分に解明されていない。

今回、我々はハト血清、ハト腸、PDE を材料に、鳥関連過敏性肺炎患者と対照疾患患者、健常者血清を用いた Western blotting の比較から、患者特異的に反応する責任抗原タンパクを同定した。さらに同定されたタンパクの抗原性を精製したリコンビナントタンパクを使用した免疫学的検査により検証した。

〈方法〉

・対象

2003 年～2013 年に当科を受診し、鳥関連過敏性肺炎と診断された患者 8 例を対象とした（急性鳥関連過敏性肺炎 2 例、慢性鳥関連過敏性肺炎 6 例）。慢性過敏性肺炎の診断は吉澤らの診断基準に準拠した。対照として夏型過敏性肺炎 2 例、加湿器肺 2 例、健常者 3 例の血清を使用した。

・Sample

ハト血清は HPLC を用いて血清アルブミンを除去したものを使用した。ハト腸は摘出後、超音波 homogenizer を用いて破砕した後、タンパクを濃縮し PBS に懸濁した。PDE はハト小屋から採

取したハト糞を、透析・撹拌後、フィルターろ過を行い、凍結乾燥させたものを使用した。

・SDS-PAGE、Western blotting

ハト血清、ハト腸 homogenate はタンパク量として 7.5μg/lane を、PDE は凍結乾燥重量 7.5μg/lane 分を polyacrylamide gel に添加し泳動した。泳動後、PVDF 膜に転写し、転写した PVDF 膜を患者血清、対照疾患患者血清及び健常者血清（各 1000 倍希釈）とともに室温で一晩振盪して反応させた。その後 2 次抗体（biotin 標識 anti-human IgG）と反応させ、Cy3 標識 streptavidin を用いて検出した。

・2 次元電気泳動、質量分析

等電点電気泳動には非線形、7cm、pI 3-10 の IPG strip を使用した。乾燥した IPG strip を膨潤 buffer に浸漬し膨潤させた。膨潤後、タンパク量として 100μg のハト血清、PDE を可溶化 buffer に溶解し、ろ紙に含ませて添加した。等電点電気泳動を行った後、先述した方法と同様に SDS-PAGE、Western blotting を行った。同定した spot は染色後、フルオロホレスター®3000 で撮影し、gel spot picker で切り出した。切り出した gel を trypsin で断片化した後、Liner ion trap / 電場型 FT-MS/MS を用いて質量分析を行った。得られた mass spectra と、MASCOT database 上で、鳥由来の既知のタンパク質と比較することでタンパクを同定した。

・リコンビナントタンパク精製

ハト腸由来の cDNA から目的遺伝子を PCR で増幅後、制限酵素を用いて pHUE vector に組み込んだ。大腸菌に形質転換し、histidine tag 付き ubiquitin 融合タンパクを発現させた。合成したタンパクはバッチ法により精製、濃縮した。リンパ球刺激試験で細胞刺激に使用する組み換えタンパクは別途大腸菌発現系で精製した後、HPLC で大腸菌由来の LPS 除去（＜1EU/μg）を行った。

・ELISA

精製したリコンビナントタンパクを固相化 buffer に溶解し 10μg/ml に調整した。96 well plate に 100μl ずつ加え固相化した。400 倍希釈した血清を 100μl ずつ添加し反応させたのち、2 次抗体として biotin 標識 goat anti-human IgG を 100μl 加えたのち、OPD を添加して発色させた。Plate reader を使って吸光度 490nm で測定した。

・リンパ球刺激試験

Ficoll 液を使って末梢血から末梢血単核球を分離し、RPMI1640 液体培地に懸濁し $1\times10^6$個/ml に調整後、細胞培養用 96wel plate に各 well あたり $2\times10^5$個ずつ添加した。リコンビナントタンパクを 2、5、10%になるように添加後、72 時間培養した。その後、$^3$H-thymidine を加えさらに 16 時間程度培養し、filter plate に harvest した後、 scintillation counter で β 線量を測定した。

・Multiplex cytokine assay

リコンビナントタンパクを抗原として添加した PBMC の培養上清中の各種サイトカインを

Luminex 200 system を用いて測定を行った。培養 5 日目の上清を採取し、BioPlex human cytokine Th1/Th2 9-plex pane を使用して human IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α を同時測定した。

〈結果〉

ハト血清、ハト腸 homogenate の Western blotting では鳥関連過敏性肺炎患者全例で多数の band を認めた。PDE はおおよそ 50kDa 以下の領域を中心にいくつかの band が認められた。これらの中から、患者 8 例中 7 例で、3 種の材料すべてに共通して認められた、分子量約 26kDa の band に着目した。

この band に含まれるタンパクは 2 次元電気泳動で、ハト血清では 4 つの spot に、PDE ではで 5 つの spot に展開された。この内 4 つの spot が患者血清を使った Western blotting で陽性の spot として認められた。

これらの陽性 spot をハト血清、PDE からそれぞれ切り出し、質量分析を行ったところ、ハト血清、PDE いずれの spot からも Columba livia（カワラバト）由来の Immunoglobulin lambda-like polypeptide-1; IGLL-1 が同定された。

同定された IGLL-1 の抗原性を検証するため、リコンビナントタンパク（recombinant IGLL-1; 以下 rIGLL-1）を精製し検証実験を行った。精製した rIGLL-1 を使用して、血清中の IGLL-1 に対する IgG 抗体価を ELISA で測定した。急性鳥関連過敏性肺炎患者群では健常者群と比べ有意に抗体価が高く、慢性鳥関連過敏性肺炎患者群においても有意差は認めなかったものの、同様の傾向がみとめられた。対照とした他の間質性肺疾患群（特発性間質性肺炎、他の過敏性肺炎、膠原病肺）と比較しても有意差は認めなかったものの高い傾向にあった。

急性、慢性をあわせた鳥関連過敏性肺炎患者群で rIGLL-1 に対する IgG 抗体価と、当教室で現在測定している PDE に対する血清中 IgG 抗体価との比較を行ったところ、高い相関を認めた。
さらに、細胞性免疫を評価する目的で、rIGLL-1 を抗原とした患者 PBMC を使ったリンパ球刺激試験を行った。rIGLL-1 を添加した際の細胞増殖の増加比を示す Stimulation Index; S.I 値 2 以上を陽性として評価したところ、急性鳥関連過敏性肺炎 5 例中 2 例（40%）、慢性鳥関連過敏性肺炎 17 例中 7 例（41.2%）が陽性と判定された。一方で、鳥以外の抗原が原因である過敏性肺炎（4 例）や間質性肺炎患者（8 例）、健常者（10 例）では全例が陰性であった。

また、rIGLL-1 を抗原として添加した患者、健常者 PBMC の培養上清中の各種サイトカインを測定したところ、健常者では抑制性の IL-10 産生が亢進するとともに、TNF-α の産生低下が認められた。一方で、患者群では、rIGLL-1 添加による IL-10 産生の亢進が認められず、TNF-α の高い状態が維持された（**図 6**）。他の Th1 サイトカインである IL-2、INF-γ、IL-12 に差は認めなかったが、患者群で IGLL-1 が Th1 優位な免疫応答を誘導することが示唆され、従来言われている過敏性肺炎の病態と合致した。

〈結論〉

今回の研究で、我々はハト血清、ハト腸、PDE と鳥関連過敏性肺炎患者血清を使った Western blotting から、ハト血清、PDE に共通して含まれるタンパク、ハト immunoglobulin lambda-like

polypeptide-1（IGLL-1）を同定した。リコンビナントハト IGLL-1 を使用した ELISA では急性鳥関連過敏性肺炎患者群で、対照疾患患者群、健常者に比べ高い血清 IgG 抗体価を示し、かつ PBMC に抗原としてハト IGLL-1 を添加したリンパ球幼若化試験では急性、慢性鳥関連過敏性肺炎患者ともに 40%程度が陽性となった。またリコンビナントハト IGLL-1 添加により患者 PBMC の培養上清中のサイトカインは Th1 優位に変化し、ハト IGLL-1 が、鳥関連過敏性肺炎の原因抗原であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5319　号 | 白井　剛 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　東田　修二<br>副　査　横関　博雄、上阪　等 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、鳥関連過敏性肺炎（bird-related hypersensitivity pneumonitis; BRHP）を引き起こす原因抗原が、ハトの Immunoglobulin lambda-like polypeptide-1（IGLL-1）であることを同定し、さらに、BRHP の新たな検査法として、遺伝子組換え型 IGLL-1 を作製して ELISA 法やリンパ球刺激試験を開発したことを報告する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

BRHP は、鳥糞や羽毛に含まれる成分を吸入し肺内に到達して発症することは知られていたが、具体的に何が抗原であるのかは不明であった。本研究は患者検体を用いて、細胞分子生物学的解析を行うことにより、原因抗原が IGLL-1 であることを同定し、さらに遺伝子組換え型 IGLL-1 を作製して新たな検査法を開発したことは、先駆的であり評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1. BRHP を引き起こす原因抗原として、ハト IGLL-1 タンパクを同定した。
2. 組換え IGLL-1 による ELISA 法で BRHP 患者血清は高い抗体価を示す傾向がみられた。
3. 組換え IGLL-1 によるリンパ球刺激試験で 約４割の BRHP 患者リンパ球が陽性となった。

以上のように申請者は、IGLL-1 タンパクが BRHP の原因抗原である可能性を示した。これは臨床的に極めて有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

原因抗原の同定は、ハト血清と糞および患者血清を用いて、タンパク 2 次元電気泳動と質量分析法によって行われた。この解析は分子生物学的知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術が十分に高いことが示されると同時に、臨床検体を用いることに対する倫理観を持って行われたことが示された。

４）考察・今後の発展性

申請者は、組換え IGLL-1 タンパク刺激による BRHP 患者リンパ球の種々のサイトカイン産生

能に対する作用も検討しており、これが発展すれば、IGLL-1 吸入がどのようなメカニズムで BRHP の発症につながるかが解明される可能性があり、本研究がさらに発展することが期待される。

**３．その他**

なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 榊原　ゆみ |
| 論文審査担当者 | 主査　大久保　憲一<br>副査　立石　宇貴秀、　沢辺　元司 |
| 論　文　題　目 | Radiopathological Features and Identification of Mycobacterial Infections in Granulomatous Nodules Resected from the Lung |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

肺肉芽腫病変は画像的特徴が肺癌と類似し鑑別が困難なことがあるため、しばしば外科的に切除される。切除された肺肉芽腫病変の多くは抗酸菌感染症が原因であるとされているが、確定診断に至らない症例も数多く経験する。今回我々は、肺癌が疑われ切除された孤発性肉芽腫病変において、画像的特徴と病理学的特徴および抗酸菌診断に関し検討した。

22 例中 19 例（86%）で培養、免疫染色、遺伝子解析のいずれかの方法で抗酸菌症所見が得られ、切除肉芽腫病変の主因は抗酸菌感染であることが明らかになった。免疫染色での陽性率は高いが菌種同定は出来ない点が問題であった。ゴールドスタンダードである抗酸菌培養は陽性率 45%であり、病変が大きい場合は培養が陽性になる傾向にあった。一方 18-fluorine fluorodeoxyglucose positron emission tomography（$^{18}$F-FDG-PET）にて高集積を認める病変では結核菌 DNA 検出が診断に有用なツールとなる可能性が示唆された。また培養で非結核性抗酸菌を検出した病変において結核菌 DNA 陽性例が含まれ、重複感染に留意が必要と思われる。

＜緒言＞

術前肺癌が疑われ手術した症例の中には、良性病変も含まれる。悪性と良性疾患の鑑別として、CT 所見における結節辺縁部の不整像や胸膜嵌入像、30 ㎜以上のサイズ、年齢、増大率、上葉病変、特徴的な石灰化の有無などが鑑別点となりうる因子とされている。また、悪性腫瘍における $^{18}$F-FDG-PET の有用性は確立されており頻用されている。しかし、慢性炎症や肉芽腫疾患等では $^{18}$F-FDG-PET にて偽陽性となる。そのため、臨床経過および画像的特徴から肺癌と鑑別が困難であることが多く、確定診断および治療を兼ねてしばしば肺結節は外科的切除される。

肉芽腫疾患の原因として、感染症、サルコイドーシスなどがある。感染症では、真菌症が多いアメリカ以外の地域では抗酸菌症が多いことが知られており、真菌症は組織学的に診断が容易であるのに対し抗酸菌症では主に培養結果により確定診断されている。しかし術中に十分な培養検体が採取できない場合がある点、抗酸菌培養や抗酸菌染色（Ziehl-Neelsen 染色）の陽性率が低い点、ホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed and paraffin-embedded）組織ではダメージが大きく遺伝子検索に限界がある点などが問題となり、確定診断に至らない症例をしばしば経験するが実態は分かっていない。抗酸菌症

の主な原因は結核であるが、本邦は結核の中蔓延国である。また近年では非結核性抗酸菌症症例も急速に増えており、世界的に問題となりつつあるが中でも本邦は罹患率が高い。これらの背景から、肉芽腫の原因の一つとして抗酸菌感染の可能性が高いことが推測され、中でも結核に関しては適切な診断および治療の必要性がある。

今回我々は、肺癌が疑われ切除された孤発性の肺肉芽腫病変において原因として抗酸菌症がどの位存在し、またどの様な画像的特徴および病理学的特徴があるのか、診断に何が有用か画像および病理組織検索を横断的に検討した。

＜方法＞

2010 年 1 月～2015 年 3 月に東京医科歯科大学医学部附属病院呼吸器外科にて肺癌が疑われ外科的切除された肺内孤発性結節 185 病変のうち、病理組織学的に肉芽腫と診断された 24 病変（13.0%）から明らかに真菌症と診断された 2 病変を除いた 22 病変（11.9%）を対象とした。一方肉芽腫以外の良性病変（13 病変）をコントロールとして使用した。臨床的・画像的特徴、細菌・抗酸菌培養結果を収集。またホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて、組織学的特徴、抗酸菌染色（Ziehl-Neelsen 染色）および Grocott 染色、免疫染色として抗酸菌菌体成分をターゲットとした抗リポアラビノマンナン（LAM）に対するモノクローナル抗体（本学人体病理学分野にて作成）および抗 BCG ポリクローナル抗体を使用し施行した。また同検体を用いて、結核菌 *IS6110* をターゲットとした real-time PCR および nested PCR 法（outer 220bp, inner 123bp）にて結核菌遺伝子の検出を施行した。更に $^{18}$F-FDG-PET の集積と各検査結果との関連性を検討した。

＜結果＞

患者背景では、肉芽腫群 2 名が陳旧性肺結核の既往があった。画像所見では、肉芽腫群とコントロール群において画像的には胸膜嵌入像および末梢に病変が位置する点で有意差が認められた。また 36%が手術直前に病変が縮小していた。$^{18}$F-FDG-PETでは肉芽腫群の 63%で SUVmax≧2.5 と高集積を認めた。

抗酸菌培養陽性は肉芽腫群 22 例中 10 例（45.5%）であり結核菌 2 例、*Mycobacterium avium* complex (MAC)菌 8 例で検出し、陰性例は 8 例であった。抗酸菌培養結果と病変の大きさとの間には相関があり、培養陽性群は病変が有意に大きいことが判明した（positive 30.5±13.1mm, negative15.13±6.3mm; $P<0.05$）。

組織学的特徴として、抗酸菌培養陽性例は全例で類上皮肉芽腫であり、77%で類上皮性肉芽腫を認めた。病理学的な滲出性所見は MAC 症例で高率に認められた。乾酪性肉芽腫の程度が顕著な病変程、$^{18}$F-FDG-PETの集積を認める傾向にあった。

ホルマリン固定パラフィン包埋組織における抗酸菌検索の結果、抗酸菌染色（Z-N 染色）は 5 例（33%）で陽性であり、免疫染色では抗 LAM 抗体 68%、抗 BCG 抗体 55%の陽性率であった。

一方、結核菌 DNA は、nested PCR 法 8 例（36%）、real-timePCR法 7 例（32%）で検出され、real-time PCR 陽性であった病変は全て nested PCR においても陽性を呈した。結核菌 PCR 結果と $^{18}$F-FDG-PET の集積の関係は、nested PCR 法および real-timePCR 法どちらにおいても PCR 陽性病変では全例 SUVmax≧2.5 であり $^{18}$F-FDG-PETの集積を認め、集積がない症例は全例 PCR 陰性であった。

22 例中 19 例（86%）で培養、免疫染色、遺伝子解析のいずれかの方法で抗酸菌症所見が得られた。また培養にてMAC菌を検出した症例において、3 例で結核菌DNAが含まれていた。1 例は結核の既往歴があり石灰化を伴う所見を認め、他の 1 例は気管支洗浄液でのMAC菌検出であったため保菌の可能性もあり得たが、他の 1 例は原因が判明しなかった。

＜考察＞

従来から指摘がある通り抗酸菌染色（Z-N 染色）の陽性率は低く、免疫染色が有用であった。抗酸菌細胞壁構成成分であるLAMに対する抗体は抗BCG抗体と同等の陽性率であり、かつモノクローナル抗体である点から比較的明瞭に染色された。しかし、菌種同定ができないため培養および遺伝子検索が必要となる。培養の手術時施行率は高かったが十分な検体が取れない場合が多く、また元来肉芽腫内に生菌が少ない可能性も考えられ陽性率は45%に留まっていた。今回の検討で、病変の大きさが培養における菌検出の有無に関与している点は臨床において留意する点として示唆された。

一方、遺伝子検索においてはホルマリン固定パラフィン包埋組織検体はホルマリンによるダメージを受けるため解析できる DNA の長さが短く、real-timePCR 法や nested PCR 法を用いた菌種同定法が使用される。 診断のためには十分な菌体ゲノム量を含有している点が重要になるが、菌量が多く、遺伝子解析で陽性率が高い因子として、抗酸菌染色陽性、乾酪性壊死を有する、石灰化を認めるなどが報告されている。一方、抗酸菌症の中でも空洞や浸潤影を認めない小結節をきたす肉芽腫型の病変では特に菌量が少ない。今回我々が解析した孤発性肺結節は菌量が少ない可能性が高く、困難を要した。しかし $^{18}$F-FDG-PET における集積の有無が結核菌遺伝子検索の有用性の一つの判断指標になる点は臨床的に意義があると考えられた。

非結核性抗酸菌に関しては小結節、 非乾酪性病変を呈する多いことから病変部での菌量が少なく、また環境中に存在する菌種であるためコロナイゼーションや解析過程でのコンタミネーションが問題となり得るため、菌の検出および同定は結核に比べて更に困難である。今回我々は菌種同定法として *hsp65* sequence も行ったが、結核菌、*M.avium* 以外に一部の検体から *M.gordonae* を検出し、コンタミネーションを否定できずデータとして表記できなかった。病理組織検体を用いた非結核性抗酸菌症の遺伝子解析の一つの問題点であり、術中の検体採取の重要性を再認識した。

＜結論＞

肺癌と鑑別が困難であった肉芽腫病変の主因は抗酸菌感染であり、診断および菌種同定には切除時の培養が重要である。結節の大きさが大きい場合は培養が、 $^{18}$F-FDG-PET にて高集積を認める場合は結核菌 DNA 検出が診断に有用なツールとなる可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5320　号 | 榊原　ゆみ |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　大久保　憲一<br>副　査　立石　宇貴秀、　沢辺　元司 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は肺肉芽腫病変の画像病理診断・抗酸菌症診断についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

肺肉芽種病変は肺癌と鑑別困難で外科切除が行なわれるが，確定診断に至らない症例を経験する。抗酸菌感染症が原因となることが多いとされるが不明である。申請者はその頻度を解明し、画像診断・病理診断・抗酸菌診断の特徴を検討した。以上評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 抗酸菌症所見が 86%症例に認められ、主因は抗酸菌感染であった。
2. 培養陽性は約半数で、病変の大きさとで抗酸菌培養結果に相関がみられた。
3. PET 検査での FDG 高集積が結核菌 DNA 検出と相関した。

鋭敏な検査法で結節病変の大部分が抗酸菌感染を証明し、画像所見との相関を示した有用な研究結果である。

３）研究方法・倫理観

研究には手術摘出検体が用いられ，培養検査・菌染色/免疫組織染色・菌遺伝子検査が用いられた。本方法は十分な抗酸菌知識と免疫染色手技・遺伝子検査技術の裏付けで遂行されており，申請者の知識と技術力が高いことが示される。と同時に、研究計画が周到な準備の上に行なわれたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は本研究結果について、モノクローナル抗体の感受性が優れるが菌種同定に至らないこと、非結核性抗酸菌のコロナイゼーションやコンタミネーションの問題点を考察した。今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ，本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | Suteera VIBOONYASEK |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　光一<br>副査　寺田　純雄、石川　欽也 |
| 論　文　題　目 | Spatial rearrangement of Purkinje cell subsets forms the transverse and longitudinal compartmentalization in the mouse embryonic cerebellum |

（論文内容の要旨）

**[Introduction]**

The adult cerebellar cortex is subdivided into transversely-folded lobules and lobule-related longitudinal compartmentalization of Purkinje cell (PC) subsets which have a unique expression profile of several molecular markers. These compartmentalization have specific projection patterns of efferent and afferent axons and are involved into the functional localization of the cerebellum; anterior (lobule I-V) and posterior (lobule VIII-X) cerebellar lobules are related to somatosensorimotor function, while the central lobule (VI-VII) are related to non-motor and visuomotor function. Concerning their development, Purkinje cell subsets are compartmentalized into clusters, which are the direct origin of longitudinal striped compartments of the adult cerebellar cortex, in the superficial part of the cerebellum by E17.5.　However, we have limited understanding of the early Purkinje cell subset organization before E17.5. In the present study, we focused on the mouse cerebellum from E14.5 to E17.5 to understand how the early developmental process is related to the formation of adult Purkinje cell compartments. Pcdh10 (protocadherin 10) is a marker for specific Purkinje cell subsets that are clearly delineated in the embryonic cerebellum. Therefore, we aimed at identifying the positional organization of Pcdh10-positive Purkinje cell subsets and then, tracking the changes in the position and shape of Pcdh10-positive Purkinje cell subsets from E14.5 to E17.5 mainly by using Pcdh10-reporter mice.

**[Materials and Methods]**

The experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (A2017-060A, 0170098A, 0160139C) and Recombinant Experiment Safety Committee (2012-064C4) of Tokyo Medical and Dental University. We used heterozygous and wild-type embryos of OL-KO knock-in mouse strain in which protocadherin 10 (Pcdh10) gene is replaced by ß-galactosidase gene. Brains were dissected from the perfuse-fixed E13.5-E17.5 embryos. We performed 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyramoside (X-gal) labeling of the whole-mount cerebellum and X-gal labeling of 40 µm-thick serial coronal, horizontal and sagittal sections in heterozygous

samples, and double or triple immunostaining of markers of embryonic PCs (FoxP2, RORα and Corl2) and PC subsets (Pcdh10 and EphA4) in 40 μm-thick serial coronal sections in wild-type samples.

Sections were imaged by CCD camera attached to the bright-field and fluorescent microscope. To reconstruct Pcdh10-positive area in the three-dimensional space, the images of serial sections were superimposed and the contours of the surface of the cerebellum and Purkinje cell subsets were extracted as drawings by using Adobe Illustrator. The three-dimensional models were produced by Rhinoceros software.

**[Results]**

**Spatial organization of Pcdh10-positive Purkinje cell subsets**

X-gal staining in the whole mount cerebellum showed four major domains of Pcdh10-positive Purkinje cell (PC) subsets from E13.5 to E17.5. These domains showed significant change in shape and position.

PC subsets were recognized in the E14.5 wild type cerebellum by immunohistochemistry of PCs markers (FoxP2, RORα, Corl2, Pcdh10, and EphA4). Labeling patterns of FoxP2 and Corl2 indicated that at E14.5, PC subsets can be divided into eight groups (medial, dorsal, central, mid-lateral, lateral, rostrodorsolateral, dorsolateral, and ventrolateral groups). Pcdh10-positive domains or subareas were located within the medial, dorsal, central and mid-lateral groups, which were designated as m-P, d-P, c-P and ml-P, respectively.

To understand the recognization process of PC subsets during development on E14.5-E17.5, this study focused on these 4 Pcdh10-PC positive subareas (as medial, dorsal, central, and mid-lateral). OL-KO mice were used to track the distribution of PCs at one-day interval by X-gal staining in whole-mount preparation and sections, and three-dimensional reconstruction technique.

**Pcdh10-positive subareas in the medial group (m-P)**

The m-P showed a rostrocaudally-oriented column-shaped structure in the paramedian plane. The ventral part of m-P (m-v-P) extended laterally at E13.5 and thereafter, while the dorsocaudolateral part (m-d-P) protruded and elongated at E15.5-16.5. The m-d-P eventually separated from the original cluster later at E17.5. Related to the formation of immature fissures and lobules, the m-P subarea were distributed in the whole rostrocaudal extent in the paramedian area in all lobules. In addition, the m-v-P and m-d-P moved in the lateral direction into more lateral parts of lobule X and lobules VI-VII in the cerebellar vermis.

**Pcdh10-positive subareas in the dorsal and central groups (d-P and c-P)**

The d-P and c-P were located within the dorsal and central groups of PC subsets, respectively, in the paravermal area. The d-P divided longitudinally into rostral (d-r-P) and caudal (d-c-P) parts, which eventually positioned rostral to primary fissure (lobules IV–V) and around the prebiventral fissure

(lobules VII–VIII) at E17.5, respectively. In the meanwhile, the c-P moved laterally toward the cerebellar surface. Eventually, the c-P became widely exposed to the cerebellar surface in the central area between the primary and secondary fissures (presumably centered in crus I) at 17.5.

We examined the shift of c-P to relate it with the distribution of Pcdh10-negative PCs populations. Because of its shift, the c-P approached the ml-P by separating the area between the c-P and ml-P that was filled with Pcdh10-negative PCs into rostral and caudal parts.

**Pcdh10-positive subareas in the mid-lateral group (ml-P)**

The ml-P contained of the dorsal (ml-d-P) and ventral (ml-v-P) parts and located in the lateral paravermal part of the cerebellum at E13.5-14.5. At E15.5 and thereafter, the ml-d-P protruded in the rostral (ml-r-P) and lateral (ml-l-P) directions, whereas the ml-v-P extended ventrolaterally and approached the superficial area. Consequently, the ml-P was extended longitudinally from lobules IV-V, through simple lobule, crus I, crus II, paramedian lobule, copula pyramidis and to paraflocculus, continuously. The ml-l-P was expanded laterally in crus I.

**Summary of the spatial reorganization processes of Purkinje cell subsets**

In this study, we mainly identified the four major subareas or domains of Pcdh10-positive PC subsets (m-P, d-P, c-P and ml-P) in the E14.5 mouse cerebellum and traced them between E14.5 and E17.5. By referring to our previous study (Fujita et al., 2012), how these subareas are transformed into particular Purkinje cell clusters at E17.5 and particular longitudinal stripes in adult were inferred. The predominant separation and rearrangement processes that were revealed in Pcdh10-positive Purkinje cell subareas can be classified into the longitudinal (radial and tangential) and transverse (lateral) types.

1. The longitudinal shift was generally observed in many subareas. This brought about longitudinal extension of Purkinje cell subsets, resulting distribution of Purkinje cell subsets in immature cerebellar lobules, which were simultaneously being formed during this period (E14.5-E17.5).

2. The transverse shift was observed in particular parts of subareas, in the m-P (m-d-P and m-v-P), c-P, and ml-P (ml-l-P and ml-v-P), which was eventually positioned in in the central lobules of the cerebellum (lobules VIb-VII and crus I).

**[Discussion]**

The compartment organization of cerebellum is formed by grouped or clustered distribution of Purkinje cell subsets which have a unique profile of expression of molecular markers. At E17.5, previous study showed that the molecular expression profiles can distinguish more than 50 in total of PCs (Fujita et al., 2012). However, the pattern in earlier stages have not been much clarified. The present study first clarified eight groups of PC subsets by Purkinje cell marker immunostaining at E14.5 and then traced Pcdh10-positive subareas during the period from E14.5 to E17.5. We demonstrated detailed rearrangement processes, through which these subareas became positioned

eventually in particular lobules. We conclude that the transverse shift of subareas of Pcdh10-positive Purkinje cell subsets, which were demonstrated first in the present study, is the developmental basis for the laterally-shifted arrangement of wide aldolase C-positive stripes in the central lobules (lobules VIb-VII and crus I). We speculate that the lateral shift can also explain why aldolase C-positive stripes are wide and laterally shifted in the central lobules and why the somatosensorimotor functions, which are located mainly in aldolase C-negative stripes, are usually represented in the anterior and posterior lobules in the adult cerebellum.

＜要約＞

成獣の小脳皮質は、横方向に襞をなす小葉と分子発現パタンの特徴が一致するプルキンエ細胞亜集団の縦縞状の配置による縦横の区画構造が存在する。区画ごとに機能の基盤となる軸索投射パタンが異なるが、小脳の大まかな機能区分としては、前の小葉と後ろの小葉が感覚運動機能に関係し、中央の小葉が非運動機能と視運動機能に関係するとされる。発達形成過程の点からは、胎生期 17.5 日齢のマウス小脳で、成獣の区画構造の元となる 50 余りの区画構造が、プルキンエ細胞亜集団としてすでに形成されていることが報告されている。本研究においては、胎生期 14.5 から 17.5 日齢（E14.5-E17.5）に焦点をあて、特にプロトカドヘリン 10 (Pcdh10)陽性のプルキンエ細胞集団の存在領域の変化を三次元的に解析し、小脳の区画構造の形成過程の理解を試みた。

Pcdh10 遺伝子の発現がベータガラクトシダーゼ発現で標識された OL-KO マウスの胎仔を用い、ヘテロ接合体胎仔の脳では全小脳標本および連続切片の X-gal 染色を行い、野生型胎仔の脳では連続切片においてプルキンエ細胞およびその亜集団のマーカー分子の免疫染色を行った。連続切片染色の顕微鏡画像から、三次元コンピューターソフトウエアにより領域の再構築を行った。

4 個の Pcdh10 陽性のプルキンエ細胞集団の存在領域(m-P, d-P, c-P, ml-)を E14.5 小脳で明らかにし、それらを E17.5 小脳まで追跡した。それら領域の多くは縦方向に伸展して各小葉に分布していく変化を主に示した。しかし、領域の一部は、横（外側）方向への伸展または移動を行って中央の小葉（第 VIb-VII 小葉と第 I 脚）に配置された。この再配置が、成獣の中央の小葉において縦縞構造が外側へシフトしさらに感覚運動領域が前と後ろの小葉に分離して存在することの原因であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5321　号 | Suteera VIBOONYASEK |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田中　光一<br>副　査　寺田　純雄、石川　欽也 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、プロトカドヘリン 10(Pcdh10)陽性のプルキンエ細胞集団の局在の変化を三次元的に解析し、胎生 14.5 日(E14.5)における 4 個の Pcdh10 陽性のプルキンエ細胞集団が縦方向および横方向へ伸展・移動し、成獣における小脳の区画構造になることを明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

成獣の小脳皮質は、縦方向と横方向からなる区画構造が存在し、区画ごとに軸索の投射パタンが異なることが知られているが、区画構造の形成機序は不明な点が多い。このような背景の下、申請者は Pcdh10 に対する抗体や Pcdh10 の遺伝子座にベータガラクトシダーゼをノックインしたマウスを用い、Pcd10 陽性のプルキンエ細胞亜集団の区画構造形成における寄与を解析しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. E14.5 の小脳では、4 個の Pcdh10 陽性のプルキンエ細胞亜集団が存在する。
2. 上記亜集団の多くは縦方向に伸展し各葉に分布し、一部の亜集団は横方向へ伸展・移動し中央の小葉に分布した。

以上のように申請者は、E14.5 における小脳プルキンエ細胞の亜集団の空間的な再配置が小脳の区画構造形成に寄与することを明らかにしている。小脳の発生異常は、自閉症などの発達障害に関与することを考慮すると、臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

プルキンエ細胞の局在変化の解析は、免疫組織化学・遺伝子改変マウスを駆使し行われ、連続切片の顕微鏡画像から、三次元コンピューターソフトウエアによる局在の再構築をもとに行われている。これは、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことを示していると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。全ての実験は、動物実験委員会や組換え DNA 実験委員会の承認のもとに行われている。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、同様の解析をトリを用いて行っており、胎児期のプルキンエ細胞の亜集団の伸展･移動が成獣小脳の区画構造に寄与することが種を超えた原理である可能性を考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 落合　香苗 |
| 論文審査担当者 | 主査　前原　健寿<br>副査　内田　篤治郎、重光　秀信 |
| 論　文　題　目 | Increasing or fluctuating bispectral index values during post-resuscitation targeted temperature management can predict clinical seizures after rewarming |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

心停止蘇生後体温管理療法（TTM）における Bispectral Index（BIS）の上昇と復温後の痙攣発作発生・神経学的転帰との関連につき検討するため、東京都の 3 次医療施設において心停止蘇生後体温管理療法を行った成人心停止蘇生後患者を対象に単施設後ろ向きの予後予測研究を行った。体温管理開始から復温完了までの BIS を測定して BIS 平均値・BIS 標準偏差・BIS 回帰係数を算出し、蘇生 30 日時点における復温後痙攣発作の発生と神経学的転帰不良を評価項目とした。心停止蘇生後、集中治療室に入室した 534 症例のうち、103 症例を対象とした。30.1%の症例が復温後痙攣発作を生じ、50.5%の症例で 30 日後神経学的転帰不良であった。復温後痙攣発作の予測精度は BIS 標準偏差（area under the ROC curve［AUC］=0.763）、BIS 回帰係数（AUC=0.763）が BIS 平均値（AUC=0.657）に比べ高く、神経学的転帰の予測精度は BIS 平均値（AUC=0.861）が最も高かった。以上より、蘇生度体温管理療法中の BIS の上昇や急激な変動は復温後の痙攣発作の予測因子となると示唆された。

＜背景＞

心停止蘇生後（PCAS）の患者では神経学的転帰改善のため神経集中治療が重要であることが認識されつつあり、International Liaison Committee on Resuscitation の国際ガイドラインでも蘇生後に昏睡のある患者には TTM を行うことを推奨している。鎮静下の昏睡患者の脳機能をモニタリングすることは困難だが、amplitude electroencephalography、continuous encephalography、cerebral/somatic oximeter（INVOS™ system）、cerebral venous oxygen saturation monitoring、BIS など、いくつかのモニタリングデバイスが存在しており、それぞれにつき検討されている。BIS は麻酔深度を測定する機器として作られ、集中治療領域でも鎮静深度のモニターとして普及している非侵襲的で連続的なモニターであり、前頭部に貼付したプローベにて得られた脳波を分析して 0（平坦脳波）から 100（覚醒）までの値に数値化するため、脳波に関する専門的な知識を要さず脳機能評価が可能である。これまでに、蘇生後体温管理中の患者の特定の時点における BIS と神経学的転帰の関連を検討した研究は散見されるが、BIS の経時的変化と転帰に関する検討はされていない。

また、2015 European Resuscitation Council(ERC) Guidelines では蘇生後の痙攣発作は脳代謝率を上昇させ、脳機能障害を悪化させる恐れがあるため迅速な治療が必要であるとしている。復温後の痙攣発作も主要な後遺症のひとつであり、継続的な抗痙攣薬の投与は患者の生活の質を低下させる。これまでの研究で、BIS 高値は神経学的転帰良好を予測するとされているが、痙攣発作で BIS 値が上昇することも報告されている。われわれは、TTM 中の BIS 値の漸増や突然の上昇が痙攣発作を反映しているという仮説のもと、BIS の経時的変化が復温後の抗痙攣薬投与を要する痙攣発作発生や神経学的転帰不良の予測因子となるかどうかを検討した。

＜方法＞

国立病院機構災害医療センターにおける単施設後ろ向きの予後予測研究であり、2008 年 4 月から 2015 年 4 月までに同院集中治療室（ICU）に入室した 18 歳以上の PCAS・TTM 施行症例を対象とした。BIS 測定がされていないか、測定が 12 時間未満であった症例、復温前に死亡した症例は除外した。体温管理療法中の BIS 平均値（*m*BIS)、BIS 標準偏差（*v*BIS)、BIS トレンドの回帰係数（Δ*t*BIS）の 3 つの予測因子を設定した。主要評価項目は蘇生後 30 日以内に 1 回以上抗痙攣薬治療を要した痙攣発作の発生、副次評価項目は蘇生 30 日後の神経学的転帰とした。抗痙攣薬投与開始は神経内科医へのコンサルテーションで決定され、神経学的転帰の評価は cerebral performance categories （CPC）scale にて CPC1・2 を転帰良好、CPC3～5 を転帰不良とした。

体温冷却は蘇生直後より 4℃の生理食塩水の輸液にて初療室で開始し、ICU 入室後は冷却ブランケットを用いて体温管理を行った。目標体温は 33 または 34℃とし、維持期間（24～48 時間)、復温時間（12～48 時間）は患者入院時期により異なる管理とした。体温は膀胱温にて測定した。すべての患者は筋弛緩薬（vecuronium bromide)、鎮静剤（midazolam、propofol、thiopental）の持続投与を行い、大半の症例で鎮痛薬（fentanyl、buprenorphine、ketamine）の持続投与を行った。TTM 中の抗痙攣薬や脳浮腫改善薬の使用は主治医の裁量権に任された。

復温後は筋弛緩薬・鎮静薬は可及的速やかに投与終了し、体温を 37.5℃以下に維持すべく必要に応じて ice pack による冷却、解熱剤投与、冷却ブランケットを使用した。TTM 後の神経学的評価として脳 CT・MRI・脳波検査などの高次機能評価を適宜行った。脳幹反射消失、CT における全脳虚血所見、平坦脳波、その他検査所見にて意識回復が見込めないと判断された場合には、担当医が治療方針や蘇生行為につき家族と検討した。

BIS の値は、目標体温達成から復温完了までの期間に少なくとも 2 時間おきに記録した。

主要評価項目・副次評価項目は診療録より後ろ向きに記録した。ROSC から 30 日以内の新規の痙攣発作（convulsion、myoclonus、脳波上のてんかん波）に対する抗痙攣薬投与の有無も同様に診療録より記録した。

予測因子（mBIS、vBIS、Δ tBIS）の予測精度を検討するために、receiver operating characteristics（ROC） analysis を行い、area under the curve（AUC）（95%信頼区間）を求めた。Index test と reference standard の関係を評価するために単変量ロジスティック回帰分析を行った。解析は SPSS ver. 23、統計ソフトウエア R を使用した。

＜結果＞

研究期間に 534 症例の PCAS 患者が ICU に入室し、134 症例が TTM を行った。31 症例を除外し、103 症例を研究対象とした。49.5%の患者が神経学的転帰良好（ROSC30 日後の CPC1-2）であり、18.4%が観察期間中に死亡した。30.1%の症例で観察期間に 1 回以上の痙攣発作を生じて抗痙攣薬の投与を受けた。すべての症例で痙攣発作発症直後に抗痙攣薬を開始され、予防的投与を行った症例はなかった。非痙攣群のうち 2 症例で心停止以前より抗痙攣薬を処方されていたが、痙攣群では処方されていた症例はなかった。

TTM 中の痙攣群の BIS 値の上昇（ΔtBIS）は+1.00/h（95%CI : 0.75～1.24）、非痙攣群の BIS の上昇は+0.14/h（95%CI : -0.06～0.33）であった。さらに、BIS のトレンドは神経学的転帰不良群に比して神経学的転帰良好群で一貫して高値を示した。

ROC 解析において、vBIS（AUC 0.763, 95%CI: 0.658～0.869）とΔtBIS（AUC 0.763, 95%CI: 0.661～0.865）は mBIS（AUC 0.657, 95%CI: 0.549～0.765）に比べて TTM 後の痙攣発作発生の予測精度が高かった。痙攣発作発生の感度・特異度・閾値はそれぞれ mBIS で 74.2%・63.9%・<64、vBIS で 61.3%・88.9%・>10、ΔtBIS で 74.2%・68.1%・>0.46/h であった。神経学的転帰不良の予測精度は mBIS（AUC 0.861, 95%CI: 0.788-0.934）が感度 73.1%、特異度 90.2%、閾値<68 で最も高かった。

＜考察＞

本研究は心停止蘇生後の痙攣後遺症と TTM 中の BIS の値の関係を検討した初めての研究である。われわれはこの後ろ向き単施設観察研究において、vBIS とΔtBIS、つまり BIS の漸増や突然の上昇が TTM 後の痙攣後遺症の有用な予測因子となることを明らかにした。

PCAS 患者は神経学的転帰の程度に関わらず痙攣後遺症を生じる。CPC1 から 4 となるにつれその頻度は高くなり、CPC5 では脳死患者を含むため頻度は低くなる。頻度は低いが、CPC1 の患者でも痙攣後遺症は見られており、長期にわたる抗痙攣薬内服は生活の質を低下させる。

ERC Guidelines では、心停止蘇生後の痙攣発作は脳細胞傷害を悪化させるため治療介入を要すると勧告している。Wang らは、マウスの脳虚血モデルにおいて lorazepam や fosphenytoin の予防的腹腔内投与が痙攣発作を軽減し、生命転帰を改善したと報告した。また、ミトコンドリア傷害や脳細胞死は脳虚血から 6 時間後に生じることが 2 つの虚血再灌流モデルを用いた動物実験により示されている。臨床研究では、心停止から 15～20 時間後よりてんかん波が好発すると報告されている。つまり蘇生後早期において、傷害された脳細胞は低活動となり、障害を受けていない脳細胞は正常に近い活動をすると考えられる。Alvarez らは、特に TTM 中に発生する痙攣発作は予後不良である一方、復温後に起こる痙攣発作は予後良好であると報告した論文の中で、蘇生後早期の痙攣発作は脳細胞壊死による重度の不可逆的傷害であるのに対し、復温後に生じる痙攣発作はアポトーシスに関連するもので、重症度が低く可逆的である可能性があると考察している。Rundgren らは脳波における継続的皮質活動パターンは復温後の意識回復と強く相関するが、Suppression-burst パターンはどの時期に出現しても復温後の昏睡持続と相関することを示した。平坦脳波または正常脳波の status epilepticus への変化の予後予測に関する意義は明らかにされておらず、TTM 中の抗痙攣薬投与による痙攣への治療介入が予後を改善するかどうかは議

論の余地がある。

BIS モニターによる痙攣波の検出に関してはいくつかの症例報告があり、BIS 値の漸増や突然の上昇は、筋弛緩下における潜在的な痙攣発作を反映すると示唆される。前述の通り蘇生後の痙攣発作が TTM 後期に生じやすいことを考慮すると、BIS 上昇が痙攣波の出現を捉えているとして矛盾しない。

蘇生後の痙攣発作の診断・治療には脳波検査が必要であることは明白だが、BIS モニターは非侵襲的連続的モニターであり、一部の脳波を画面上で確認できること、閾値を決めてアラーム設定できることなどを考慮すると、痙攣発作のスクリーニングツールとして有用である。

神経学的転帰不良の予測因子としては、mBIS が最も精度が良く、これは、TTM 中の BIS 低値が神経学的転帰不良を予測するという過去の数々の研究結果と一致する。

本研究の限界として、まず、単施設後ろ向き研究でサンプル数が少ないこと、痙攣後遺症という主要評価項目において抗痙攣薬治療をされなかった痙攣発作が見逃されている可能性があること、外的妥当性が評価されていないことが挙げられる。第 2 に BIS 値が盲検化されていないことが挙げられるが、BIS 値は治療方針決定の基準に含まれなかった。第 3 に BIS 値の算出過程は完全に明らかにされていないため BIS 高値が必ずしも痙攣発作を反映していない可能性があった。しかしながら本研究で、BIS はベッドサイドスクリーニングモニターとしては有用であると示された。

＜結論＞

蘇生後 TTM 中の筋弛緩下における BIS 値の変動は、痙攣後遺症を予測することが示唆された。TTM 中の痙攣コントロールに関するさらなる研究が神経学的転帰改善につながるものと期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5322　号 | 落合　香苗 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　前原　健寿<br>副　査　　内田　篤次郎、重光　秀信 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

心停止蘇生後体温管理療法(TTN)における bispectral index (BIS)の上昇と復温後の痙攣発作、神経学的転帰との関連を検討した。心停止蘇生後、集中治療室に入室した 103 例を対象とした。

体温管理開始から復温完了までの BIS を測定し、BIS 平均値、標準偏差、回帰係数を算出し,蘇生 30 日時点における復温後痙攣発作の発生と神経学的的転帰不良項目を評価した。復温後痙攣発作の発生には BIS 標準偏差、BIS 回帰係数が BIS 平均値より高く、神経学的的転帰の予測精度は BIS 平均値が最も高かった。蘇生後体温管理療法中の BIS の上昇や急激な変動は復温後の痙攣発作の予測因子になると示唆された。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

心停止蘇生後の痙攣後遺症を、集中治療のモニタリングとして常用する BIS モニターを用いて検討した初めての研究である。

２）社会的意義

BIS という比較的容易に使用可能なモニターを用いているため、心停止蘇生患者の治療において広く普及する可能性がある。

３）研究方法・倫理観

心停止蘇生後、集中治療室に入室した 103 例を対象とした研究で、倫理的な問題は無い。

４）考察・今後の発展性

今回は 30 日目での観察であったが、より長期の患者観察が望ましい。

**３．その他**

審査では、心停止が原因の症例とその他の症例での違い、鎮静薬の影響について、筋弛緩薬の影響についての質問がなされた。また BIS についての質問、低酸素脳症のけいれんとてんかんについて等の質問がなされたが、いずれも適切な回答であった。

**４．審査結果**

学位授与に値すると考えられた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 秀瀬　真輔 |
| 論文審査担当者 | 主査　岡澤　均<br>副査　西川　徹、横田　隆徳 |
| 論　文　題　目 | Cerebrospinal fluid neural cell adhesion molecule levels and their correlation with clinical variables in patients with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Neural cell adhesion molecule (NCAM)は神経可塑性において重要な働きをする分子である。NCAM と精神疾患との関連は示唆されていたが、脳脊髄液中 NCAM 量に関する先行研究では一致した結果が得られていない。そこで本研究は、統合失調症、双極性障害、および大うつ病性障害患者の脳脊髄液中 NCAM 量を調べ、健常者と比較するとともに NCAM と臨床症状の関連について検討することを目的とした。対象は年齢、性、および人種をマッチした統合失調症患者 85 名、双極性障害患者 57 名、大うつ病性障害患者 83 名、および健常対照者 111 名であった。腰椎穿刺で採取した脳脊髄液中 NCAM を enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法で定量した。年齢と性を統制した共分散分析において、全精神疾患患者、なかでも双極性障害患者の NCAM 量が健常対照者に比して有意に低下していた。NCAM 量は双極性障害群、大うつ病性障害群、および健常対照群で年齢と有意に正に相関していた。NCAM 量は双極性障害患者の抑うつスコアと有意な負の相関を示した。また、NCAM 量は統合失調症患者の陰性症状スコアと有意な負の相関を示し、カテゴリー流暢性および文字流暢性スコアと有意な正の相関を示した。以上から、脳脊髄液中 NCAM 量は、精神疾患、とりわけ双極性障害患者において健常対照者と比べて減少していること、NCAM 量は双極性障害および統合失調症患者の症状と相関することが明らかになり、中枢神経系 NCAM の低下が重篤な精神疾患の病態に関与することが示唆された。

＜緒言＞

代表的な精神疾患である統合失調症、双極性障害、および大うつ病性障害の脳内メカニズムは未だ十分に解明されていないが、神経可塑性の障害が病態生理の一つとして注目されている。NCAM は神経可塑性において重要な役割を担っており、中枢神経系で細胞接着やシグナル伝達を担う蛋白質である。これまでの動物実験で、NCAM は海馬シナプス可塑性や記憶・学習に重要であり、Alberecht と Stork、Jürgenson らの研究によって NCAM ノックアウトマウスが精神疾患に類似した表現型を示すこと、Sandi らおよび Bisaz らによって急性および慢性のストレス負荷後に中枢神経系における NCAM 発現量が減少することがそれぞれ報告されていた。しかし、ヒト脳脊髄液検体で NCAM 量を測定した Jorgensen ら、Poltrak ら、および Vawter らによる臨床

研究は、サンプル数が不十分であることなどから、一致した結果が得られていない。また、動物実験から予想される結果と合致するものではなかった。本研究は十分なサンプル数のヒト脳脊髄液で NCAM 量を測定し、精神疾患患者における変化や各種臨床変数との相関を調べることで、精神疾患病態への神経可塑性障害の関与について検討することを目的とした。

＜方法＞

年齢、性、および人種（日本人）をマッチした統合失調症患者 85 名(40.9±10.1 歳、51 名男性)、双極性障害患者 57 名(43.1±11.6 歳、30 名男性)、大うつ病性障害患者 83 名(42.4±10.1 歳、43 名男性)、および健常対照者 111 名(42.5±15.4 歳、64 名男性)を対象とした。診断は、精神障害の診断と統計マニュアル第 4 版（DSM-Ⅳ）の基準や精神疾患簡易構造化面接法（M.I.N.I.）の情報に基づいて行った。統合失調症の症状は陽性・陰性症状評価尺度（PANSS）、双極性障害および大うつ病性障害の抑うつ症状は 21 項目版ハミルトンうつ病評価尺度(HAMD-21)、双極性障害の躁症状はヤング躁病評価尺度(YMRS)で評価した。統合失調症の認知機能評価には統合失調症認知機能簡易評価尺度(BACS)を用いた。脳脊髄液は、局所麻酔下で無外傷性ペンシルポイント針を用いた腰椎穿刺で採取し、低タンパク吸着チューブに保存した。脳脊髄液中 NCAM 量は human NCAM に対するサンドイッチ ELISA キットで測定した。NCAM 量の診断群間の比較は年齢と性を統制した共分散分析で行い、多重比較の補正には Bonferroni 法を用いた。NCAM 量と連続変数との相関はピアソンの積率相関係数、カテゴリー変数との相関はスピアマンの順位相関係数で各々評価した。NCAM 量と症状・認知機能との相関は、年齢、性、および向精神薬使用の有無を統制した重回帰分析で解析した。

＜結果＞

脳脊髄液中 NCAM 量は精神疾患患者全体(228.0±74.2 ng/mL, $n$=225)で健常対照者(247.2±78.5 ng/mL)に比して有意に低下していた($p$=0.033)。各疾患の NCAM 量は統合失調症患者(228.4±63.8 ng/mL)、双極性障害患者(215.7±82.9 ng/mL)、大うつ病性障害患者(236.0±77.5 ng/mL)であり、多重比較の結果、双極性障害患者で健常対照者と比べて有意な低下が認められた(corrected $p$=0.039)。いずれの疾患でも向精神薬の未使用群と使用群との間で NCAM 量に有意差を認めなかった。双極性障害群($r$=0.41, $p$=0.002)、大うつ病性障害群($r$=0.30, $p$=0.006)、および健常対照群($r$=0.36, $p$=0.0001)で NCAM 量は年齢と有意に正に相関していた。重回帰分析では、双極性障害群で NCAM 量は抑うつ症状の重症度(HAMD-21 スコア)と有意な負の相関を示したが($\beta$=-0.27, $p$=0.040)、躁症状の重症度(YMRS スコア)との有意な相関は認められなかった。統合失調症群では、NCAM 量は統合失調症症状のうち PANSS の陰性症状スコアと有意な負の相関を示し($\beta$=-0.25, $p$=0.029)、認知機能のうち BACS のカテゴリー流暢性($\beta$=0.32, $p$=0.011)および文字流暢性($\beta$=0.27, $p$=0.023)スコアと有意な正の相関を示した。

＜考察＞

本研究は、精神疾患患者における脳脊髄液中 NCAM 量を、特異的抗原抗体反応を用いた ELISA 法で初めて測定したものである。その結果は従来のヒト脳脊髄液研究と必ずしも合致しなかった

が、サンプル数が多いこと、捕捉抗体と検出抗体によるサンドイッチ ELISA 法を用いていることが先行研究と比した利点と考えられる。双極性障害患者で NCAM 量が減少し抑うつ症状と負の相関を示したこと、統合失調症患者で NCAM 量が陰性症状と負の相関、言語流暢性と正の相関を示したことはいずれも基礎研究において精神疾患モデル動物で観察されていた結果と対応していた。脳脊髄液は中枢神経系の分子状態を反映していると考えられることから、精神疾患では中枢神経系 NCAM 量が減少しており、特に双極性障害の症状や統合失調症の症状および認知機能に影響を与えている可能性が示唆された。NCAM は膜蛋白であり、細胞外ドメインの切断(ectodomain shedding)によって、細胞膜から放出されることが Hinkle らや Hubschmann らによって報告されている。本研究では、ectodomain shedding により生じた可溶性 NCAM を脳脊髄液検体で測定している一方、同検体中に存在しない膜結合型 NCAM の測定は行われていないことから、精神疾患患者の死後脳で NCAM を定量することが今後の課題として挙げられる。

＜結論＞

精神疾患における神経可塑性障害を検証するため、多検体の年齢、性、および人種をマッチした脳脊髄液サンプルで NCAM 量を測定した。NCAM 量は、精神疾患、なかでも双極性障害患者で健常対照者と比べて低下していた。NCAM 量は、双極性障害の抑うつ症状と負の相関を示し、統合失調症の陰性症状と負の相関、言語流暢性と正の相関をそれぞれ示した。以上より、精神疾患における脳脊髄液中 NCAM 量の減少と重症度や認知機能低下との関連が示され、重篤な精神疾患の病態生理に NCAM が関与することが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5323　号 | 秀瀬　真輔 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　岡澤　均<br>副　査　西川　徹、横田　隆徳 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

統合失調症、双極性障害、および大うつ病性障害患者における脳脊髄液中 NCAM（Neural cell adhesion molecule）量の変化、および、その臨床症状等との相関を検討したものであり、新規性を含む有意義な研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

NCAM は神経系の細胞接着因子であり種々の神経機能と関連する。精神疾患との関連も示唆されてきたが、脳脊髄液中 NCAM 量に関する複数の先行研究では一致した結果が得られていない。本研究は、年齢、性、および人種をマッチさせた統合失調症患者 85 名、双極性障害患者 57 名、大うつ病性障害患者 83 名、および健常対照者 111 名を対象とするものであり、先行研究よりも大規模な解析である。

２）社会的意義

精神疾患の診断補助と治療法開発等に寄与する可能性がある。

３）研究方法・倫理観

研究手法は汎用されている市販のキットを用いたものであり、研究計画について倫理委員会の事前承認を得て行われた研究である。

４）考察・今後の発展性

R&D 社 ELISA によって検出される NCAM の種類、由来、生物学的意義等について、より詳細な検討が進むことで、疾患病態との具体的な関係性が明らかになることが期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえて、本論文は博士（医学）の学位申請に十分に価するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 鈴木　陽子 |
| 論文審査担当者 | 主査　古川　哲史<br>副査　平尾　見三、平井　伸英 |
| 論　文　題　目 | Is Prolongation of Corrected QT Interval Associated with Seizures Induced by Electroconvulsive Therapy reduced by Atropine Sulfate? |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

修正型電気けいれん療法の心電図上の異常が報告されている。心電図から得られる補正QT時間(corrected QT; QTc) の延長は心室の再分極延長の指標であり、torsade de pointes (TdP)のような心室性不整脈のトリガーになる可能性がある。本研究ではECT術中の全般性強直間代発作中のQTcの変化と硫酸アトロピン投与の有無との関係を評価した。32名のうつ病患者(25名女性、67.4±8.7歳)を対象とした。通電前30秒のQTcの平均値をbaseline値とした。QTcについて通電後20-30秒間の平均値、140-150秒間の平均値を比較した。QT c において通電後20-30秒間の有意な延長および140-150秒間の有意な短縮を示した。硫酸アトロピン使用により、QT c 延長が抑制された。これらのデータはECTによって通電直後にTdPのリスクが増加する可能性を示した。TdPを含めた心室性不整脈のリスクは、硫酸アトロピン投与によって緩和される可能性がある。

＜緒言＞

修正型電気けいれん療法(electroconvulsive therapy; ECT)は重症な精神疾患に対し、有効な治療法で麻酔と筋弛緩薬を用いて行われる。ECTは有効性と安全性が確立している一方、術中の補正QT時間(corrected QT interval; QTc)の延長が報告されている。QTcの延長は心室性不整脈のリスク増加に関連している。三環系抗うつ薬や選択的セロトニン再取り込み阻害剤などの抗うつ薬や抗精神薬は突然死に関連している。これらは薬剤延長性QTが原因である可能性があり、臨床投与量でも突然死は発生することがある。これらのことから、ECT通電刺激によるQTc延長は、服用薬との相乗効果でさらに増加する可能性がある。反対に、硫酸アトロピン投与は心拍数を増加させ、QT時間およびQTcを短縮させることが報告されている。しかしながら、硫酸アトロピンの術前投与の是非については、議論がある。硫酸アトロピンは、通電直後の徐脈化の予防と、気道分泌物の抑制のために投与される。一方で、硫酸アトロピンがECT通電後の頻脈反応を悪化させることを避けるため、術前投与しない病院施設もある。本研究ではECT術中のQTcの延長/短縮を高い時間分解能で調べることを目的とした。また、ECT誘発性のQTc延長リスク対して硫酸アトロピンが与える影響を調べた。

＜方法＞

うつ病の治療目的でECTを受けた32名の患者を対象とした(うち女性25名、67.4±8.7歳)。本研究は東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会、公社豊島病院倫理委員会および公社荏原病院倫理委員会の承認を得て行われた。全ての患者においてプロトコルを十分に説明したのち、文書にて同意を得た。ECTは1-3回/週のスケジュールで行われた。合計295回のECTセッションを評価し、患者一人当たりの平均ECT回数は9.2回だった。32名中公社荏原病院に入院していた10名は、術前30分前に硫酸アトロピンが投与された。公社豊島病院に入院していた22名は、硫酸アトロピンが投与されなかった。ECT手術施行のプロセスは両病院で同じだった。アトロピンが投与された群をA群(10名)、アトロピンが投与されなかった群をnon-A群(22名)とした。心電図はLRR-03(GMS JAPAN)を用いた。CM5誘導でECT術中の心電図を記録した。麻酔薬はチオペンタール、筋弛緩薬はロクロニウムあるいはスキサメトニウムが術中通電前に投与された。ECTはThymatron® System Ⅳを用いて31名が両側刺激、1名でせん妄のリスクがあったため、右側刺激で施行された。275件の術中心電図から心拍数、QT時間、QTcを求めた。QTcは心拍数の過補正を防ぐためにHodgesの補正式により算出した[QTcH]。Luoらの報告に基づき、QTcHの下限値を372ミリ秒とした。BednarらとMakkarらの先行研究において、QTc 500ミリ秒以上でTdPがハイリスクと報告されて根拠にに基づき、QTcH延長の異常値を500ミリ秒以上とした。通電前の30 秒間の平均値をbaselineとした。Baselineと通電後で下限値、異常値を示したECT回数をA群とnon-A群でそれぞれカウントした。ハミルトンうつ病評価尺度を用いて、ECT1クール前後にそれぞれうつ病の精神症状評価を行った。統計解析について、心拍数、QT時間、QTcHを通電前後それぞれ240秒で患者ごとに加算平均した。心拍数は群間因子(A群対non-A群)と時間(baseline、通電後30-40秒、140-150秒)で二元配置分散分析を行った。QT時間は群間因子と時間(baseline、通電後40-50秒、140-150秒)で二元配置分散分析を行った。QTcHは群間因子と時間(baseline、通電後20-30秒、140-150秒)で二元配置分散分析を行った。Post-hoc検定はBonferroniの補正を行った。カイ二乗検定を用いてQTcH短縮下限値があったECTセッション数を群間で比較した。フィッシャーの正確検定を用いてQTcH延長の異常値があったECTセッション数を群間で比較した。統計学的有意水準は0.05とした。

＜結果＞

心電図については、ECT中に不整脈は出現せず、QT波形の異常もみられなかった。Baseline心拍数は全体で81.0±13.3 (beats per minute; bpm)、A群で90.2 ± 12.5(bpm)、non-A群で 76.8 ± 11.6 (bpm)だった。心拍数については、二元配置分散分析の結果、有意な時間の主効果が示され、群と時間の交互作用が示された。A群とnon-A群の比較において、Bonferroni補正は、baselineと通電後140-150秒でA群の有意な心拍数の低下を示した。反対に心拍数は通電後30-40秒で群間差は無かった。統計の結果、心拍数が通電後30-40秒で有意に上昇し、140-150秒でbaselineまで回復することが示唆された。さらに硫酸アトロピン投与により、baselineと通電後140-150秒間の心拍数が増加することが示唆された。QT時間においては、群と時間でそれぞれ主効果を示し、群と時間で有意な交互作用を示した。A群とnon-A群の比較においてBonferroni補正はQT時間がA群でbaselineと通電後140-150秒で有意に短縮していることを示した。一方通電後40-50秒でQT時間は群間差がなかった。統計の結果、QT時間が通電後40-50秒で有意に低下し、140-150秒でbaselineまで回復することを示

した。硫酸アトロピン投与により、baselineと通電後140-150秒間でQTは短縮することが示唆された。QTcHにおいては、二元配置の分散分析の結果、有意な時間と群の主効果が示され、群と時間の相互作用が示された。A群とnon-A群の比較において、Bonferroni補正は硫酸アトロピン投与により、QTcHがbaseline、通電後20-30秒そして140-150秒においてそれぞれ短縮することを示した。統計の結果から、QTcHは通電後20-30秒で延長し、140-150秒で回復することを示唆した。そして硫酸アトロピンはQTcHを短縮させ、かつこれらの変化を緩和することを示した。A群とnon-A群でbaselineにおいてQTcHが500ミリ秒を超えた患者はいなかった。硫酸アトロピン使用群で通電後にQTcHが500ミリ秒を超えた患者はいなかった。BaselineでQTcHの下限値以下の短縮(QTcH< 372ミリ秒)を示した患者はいなかったが、通電後において、硫酸アトロピンを使用した群が有意に多く、QTcHの下限値以下の短縮を示した。臨床評価においては、ハミルトンうつ病評価尺度は治療終了後に有意な減少を示し、全ての患者においてECT治療終了後に精神症状が改善した。A群とnon-A群間の比較においては、差は認められなかった。

＜考察＞

本研究では、ECT通電後の急激なQTcHの変化を高い時間分解能で計測し、また心拍数の過補正が少ないHodgesの補正を用いてより正確に評価した。この結果、通電後のQTcが500ミリ秒以上まで延長することを初めて示した。より高い時間分解能でのQT時間とQTcの評価が求められている背景として、臨床評価において、臨床ガイドラインInternational Conference of Harmonisation (ICH) E14が制定され、' thorough QT' (TQT) 試験'が新薬の開発評価において必要とされるようになっていることがあげられる。さらに、抗精神薬とQT延長との因果関係が認められ、TdPの発生にQT時間延長が先行することから、抗精神薬服用患者において、抗精神薬血中濃度およびQT時間モニタリングが推奨されている。ECT術中やECT終了後に、QTcの延長や心血管イベントが報告されている。心疾患のある患者は、心疾患のない患者と比較して、ECT術中の心不整脈が多いことが報告されている。しかしながら重篤な心疾患をもつ患者においても、術中に綿密にモニタリングすることによって、安全にECTを行えることが報告されている。したがってECT術中のQTおよびQTcの綿密なモニタリングが重要であると考えられる。本研究においては、QTcの急激な延長は通電直後に生じ、心室性不整脈の危険性が通電後に上昇することが示された。通電後に心拍数が上昇したことより、通電後の交感神経活動のバランスが崩れることがQTcの急激な延長の原因と考えられる。先行研究において、ECT術中にTdPを生じた症例におけるQT延長の増悪因子として、緊張病における不動状態、高熱、自律神経活動の不安定な状態が挙げられている。自律神経活動の不安定な状態は不整脈リスクの増加につながり、心拍数の上昇と局所的に誘発される徐脈はリエントリー性不整脈の原因となる。一方、硫酸アトロピンは通電後のQTcの変化量を緩和することを示した。ただし、本研究ではハイリスクな不整脈は出現せず、硫酸アトロピンが不整脈リスクに与える影響は明らかにできなかった。硫酸アトロピンは心拍数を上昇させることで心室不応期を短縮させ、QTcを短縮する。先天性QTc延長もしくは薬物治療のために安静時心電図でQTcが延長している患者に対しては、術前の硫酸アトロピン投与が心室性不整脈予防に対し有効である可能性がある。

＜結論＞

ECT通電直後にQTcが急激に延長することより、TdPを含む心室性不整脈のリスクが上昇することが示された。一方で硫酸アトロピン投与によりQTcが減少することから、治療前にQTcが延長している患者における不整脈リスクが硫酸アトロピンの投与により軽減できる可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5324　号 | 鈴木　陽子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　古川　哲史<br>副　査　平尾　見三、平井　伸英 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

修正型電気けいれん療法は、うつ病などの精神疾患の治療に使われているが、心血管系副作用として QT 時間の延長を伴う心室性不整脈が報告されている。QT 時間は心拍数により変動するため、心拍数で補正した補正 QT(QTc)時間が評価に用いられる。修正型けいれん療法で電気刺激負荷後、心拍数が増加するが、通常用いられている Bassett の補正式は頻拍時の補正に問題があることから、今回頻拍時の補正に優れる Hodges 補正式を用いて修正型電気けいれん療法が QTc 時間に与える作用を検討した。また、電気刺激負荷後一過性に徐脈になるため、施設によっては硫酸アトロピンの前投与を行う。そこで、硫酸アトロピン前投与の QTc 時間に与える影響も検討した。その結果、電気刺激後 10～20 秒で QTc が最大に延長すること、硫酸アトロピンはこれを軽減することが明らかとなった。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

修正型電気けいれん療法の QTc に対する影響を、頻拍時の補正に優れる Hodges の補正式を用いて調べたこと、心電図を連続的にモニターしたことにより QTc の変化の時間経過を明らかにすることができたこと、の 2 点が先駆的と考えられる。

２）社会的意義

修正型電気けいれん療法は、一定の侵襲がある治療法であり、その知られている心血管系副作用に対する電気刺激の影響をモニターし、この心血管系副作用の予防につながる情報を得たことが、社会的に意義があると考えられる。

３）研究方法・倫理観

修正型電気けいれん療法を治療の一環として行った 32 名のうつ病患者で、治療中にモニターした心電図を使って解析した。硫酸アトロピンは、施行医の判断で投与した患者と投与しなかった患者があった。研究に関しては、各施設での倫理審査委員会での承認を得ており、また全員から同意書を得て行った。

治療の一環として行った情報であるため、硫酸アトロピン使用の有無における比較に関して主治医のバイアスが入る可能性が否定できない点が問題であるが、少なくとも調べた患者背景（治

療薬なども含めて）には両群間で差を認めなかった。

４）考察・今後の発展性

これだけの人数の修正型電気けいれん療法を行った患者のデータを集めるのは、かなり困難なことであり、その点が評価される。一方、今回の患者ではもともとの QTc が短く、また実際に QTc 延長に伴う心室性不整脈などは一例も起こっておらず、比較的リスクの低い患者におけるデータであったと考えられる。本当にリスクの高い患者で硫酸アトロピンが QTc 延長を予防するかは、さらなる研究が必要と考えられる。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

最終諮問では、パワーポイントを用いた発表の後、論文に関する様々な質問を行った。質問では、研究デザイン、結果の解釈、臨床的意義、硫酸アトロピンが予防的であったメカニズムに関する考察、など多岐にわたる質問を行った。おおむね満足のいく回答が得られた。副査の平尾教授、平井准教授と協議の上、博士（医学）の授与に値する学識を十分に有すると判定する。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 宮本　憲一 |
| 論文審査担当者 | 主査　三浦　修<br>副査　沢辺　元司、清水　重臣 |
| 論　文　題　目 | Differential expression of ACINUS variants in bone marrow in myelodysplastic syndromes |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

骨髄異形成症候群（MDS）の骨髄中の造血細胞では複雑な細胞動態、活発な細胞増殖、および頻繁なアポトーシスが認められる。MDS の骨髄での細胞動態制御に対する ACINUS 発現の影響を検討するため、対照患者、MDS、MDS から発症した白血病（OL）、*de novo* AML の患者の骨髄検体について免疫組織化学的分析および定量的 PCR を用いた分析を行った。MDS、OL、*de novo* AML 群では ACINUS の発現亢進を認めた。ACINUS-S' RNA は同様のパターンで発現亢進していたが、ACINUS-L にはそのようなパターンは認められなかった。*In vitro* の系では ACINUS-S'の発現亢進は細胞増殖を示した。以上から ACINUS 亜型は MDS, OL, AML といった骨髄腫瘍において異なる発現パターンと機能を果たしていることが示唆された。

＜諸言＞

骨髄腫瘍における造血細胞の動態は骨髄の多様で複雑な因子により制御されている。これらには造血幹細胞・新生物細胞の遺伝子変化やエピジェネティックの変化も含まれる。液性因子としては多種多様な細胞から分泌されるサイトカインおよびケモカイン、いわゆる微小環境を構築している間質細胞と造血細胞の相互作用、血管供給があげられる。骨髄性白血病・骨髄増殖性疾患とは異なり、MDS の造血細胞はアポトーシス傾向と同時に高い細胞増殖活性を示すという特徴がある。

我々はこれまでに MDS 骨髄細胞のアポトーシスを多種の生物学的シグナルが調整していることを示してきた。マウスのレトロウイルス誘導白血病のモデルでは Minichromosome maintenance 2 および ACINUS という２つの蛋白質が、Friend leukemia ウイルス感染マウスの造血細胞の宿主特異的な DNA 損傷性アポトーシスの誘導において鍵となる因子であったことを示した。

ACINUS は上述した実験系で一つのアポトーシスの鍵となる蛋白質であるが、アポトーシスのクロマチン凝集に必要な Caspase 3 により活性化される蛋白質として既治のものである。ACINUS には亜型として ACINUS-L, ACINUS-S, ACINUS-S'があり、上流分子である Akt が ACINUS をリン酸化し、その蛋白分解的切断を抑制して ACINUS 依存性のクロマチン凝集を抑制することは既に示されている。結果としてこの Akt 制御過程が細胞生存に導くことも示されている。

骨髄腫瘍における ACINUS の潜在的影響についてはよく分かっていない。本研究の目的は骨髄腫瘍患者および対照者の骨髄細胞の ACINUS 発現を分析・検討することである。さらに培養細胞株を用いて ACINUS の機能的側面についての分析も行った。

＜方法＞

免疫組織化学的分析にはホルマリン固定・パラフィン包埋された骨髄検体を用いた。対象としては MDS 患者 21 例（男性 15、女性 6、年齢中央値 64 歳）、MDS からの OL　13 例（男性 9 例、女性 4 例、年齢中央値 62 歳）、AML 患者 8 例（男性 6 例、女性 2 例、年齢中央値 62 歳）、造血器疾患ではない患者および骨髄に病的変化を認めなかった 8 例（男性 3 例、女性 5 例、年齢中央値 58.5 歳）について検討した。一次抗体として ACINUS、CD33、CD61 および CD71 を用いて免疫組織化学染色を行い、ACINUS 陽性細胞数のカウントおよび ACINUS と CD33, CD61, CD71 との二重染色により ACINUS 陽性細胞の局在について検討した。

定量的 PCR は新鮮凍結検体から mRNA を抽出し cDNA へ変換後、*ACINUS-L*、*ACINUS-S*、*ACINUS-S'*に対する特異的なプライマーを用いて real time PCR を行い、測定結果を $2^{-\Delta\Delta Ct}$法を用いて分析した。対象として治療前 MDS 患者 28 例（男性 23、女性 5、年齢中央値 75.5 歳）、MDS からの OL　11 例（男性 7 例、女性 4 例、年齢中央値 65 歳）、AML 患者 19 例（男性 9 例、女性 10 例、年齢中央値 73 歳）、造血器疾患ではない患者および骨髄に病的変化を認めなかった 18 例（男性 6 例、女性 12 例、年齢中央値 67 歳）を用いた。

*In vitro* の系として HEK293T 細胞を用い、*ACINUS-L, ACINUS-S, ACINUS-S'*を同細胞に導入して過剰発現による影響を検討した。また同様に ACINUS に対する short hairpin RNA( shRNA )を作成、導入して ACINUS をノックダウンしてその影響を検討した。

＜結果＞

免疫組織化学的分析：MDS, OL, AML の骨髄では対照に比して ACINUS は強く発現していた。統計学的には、ACINUS は MDS, OL, AML 群で対照群に比して有意な増加を認めた。MDS を次の 3 群に分けて解析した：低リスク群（RA, RARS）、中等度リスク群（RCMD, RAEB-1）、高リスク群（RAEB-2）。ACINUS の発現は高リスク群および中等度リスク群が低リスク群に比して有意な増加を示していた。このことは MDS の病態に芽球増殖制御において ACINUS が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

次に MDS における ACINUS を発現している造血細胞を同定するため各系統のマーカーと ACINUS の二重染色を行った。造血細胞マーカーとして CD33( myeloid cells )、CD71( erythroid cells )、CD61( megakaryocytes )を用いた。ほぼすべての CD33 陽性細胞は ACINUS 陽性であった。対照的に CD61 陽性細胞および CD71 陽性細胞はほとんど ACINUS 陽性ではなかった。

MDS 骨髄における ACINUS 亜型 mRNA 発現：*ACINUS* のスプライシングパターン亜型である *ACINUS-L*、*ACINUS-S*、*ACINUS-S'*それぞれについて定量的 PCR を用いて対照, MDS, OL, AML 群で分析した。*ACINUS-L* は AML 群に比して MDS, OL 群で強く発現していた。*ACINUS-S* は各群間で有意な差を認めなかったが、*ACINUS-S'*は対照群に比して OL および AML 群で発現が亢進していた。総じて OL および AML の骨髄には骨髄芽球を含んでおり細胞増殖活性が高い。したがって

*ACINUS-S'*は MDS, AML の芽球の細胞増殖に寄与し、*ACINUS-L* はこれらの骨髄新生物の細胞動態の制御において異なる役割を果たしていることを示唆している可能性がある。

HEK239T 細胞を用いた ACINUS 亜型過剰発現の検討：ACINUS 亜型 3 種の遺伝子産物を HEK293T 細胞に導入した。導入後のそれぞれの発現を Western blot で評価した。予想通り ACINUS-S'導入群は対照群に対して細胞増殖を示した。ACINUS-L、ACINUS-S'の導入においても細胞増殖は認めたが ACINUS-S'において細胞増殖は最も顕著であった。この結果は *vivo* のデータと一致しており MDS 骨髄の細胞増殖において ACINUS-S'が重要な役割を果たしていることが示唆された。

HEK239T 細胞を用いた ACINUS ノックダウンの効果についての検討：ACINUS に対する short hairpin RNA( shRNA )を用いてノックダウンする系を検討した。shRNA で HEK239T を処理し ACINUS をノックダウンすると HEK239T 細胞は shRNA 処理後 48 時間で細胞数減少を示した。以上から ACINUS は MDS における細胞増殖の重要な制御因子であることが示唆された。

＜考察＞

ACINUS にはスプライシングパターンにより ACINUS-L、ACINUS-S、ACINUS-S'という 3 種類の亜型あるが機能がどのように異なっているか分かっていない。本研究では ACINUS-S'は MDS および AML における骨髄の細胞増殖に対して促進的に働くことが示唆され、ACINUS-L は MDS における MDS/OL 特異的な細胞動態において何らかの役割を果たしており、それはアポトーシス誘導である可能性がある。*In vitro* の結果によれば ACINUS-S'は細胞株を強く増殖に導くこと示された。

ACINUS を含めたアポトーシス機構は赤芽球分化および単球のマクロファージへの分化に関与していることが既に示されている。また、ACINUS は前立腺癌細胞のアポトーシス誘導にも強く関与していることが示されている。しかしながら ACINUS がどのようにして発癌、癌進展の細胞動態を制御しているのかは分かっていない。本研究では MDS および AML では ACINUS 発現は亢進しており、ACINUS 亜型（ACINUS-L、ACINUS-S'）が骨髄造血新生物のアポトーシスのみならず造血細胞の増殖・アポトーシスを別々に制御している可能性が示唆された。その機序は複雑であり明らかにするためにはさらなる研究を要するが ACINUS の働きを制御することにより今後 MDS や AML の治療に結びつく可能性があると考える。

MDS においては多数の遺伝子異常が認められることはすでに知られているが MDS に特異的な遺伝子異常は同定されていない。近年 MDS においては RNA スプライシング機構を構成する複数の構成要素の頻回な遺伝子変異が特徴的であるとの報告がなされている。一方 RNA の結合・スプライシングへの ACINUS の役割についても報告されている。つまり本研究で示した ACINUS 亜型の発現プロファイルが MDS／AML に特徴的な RNA スプライシングと関連している可能性があり今後のさらなる研究が期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5325　号 | 宮本　憲一 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三浦　修<br>副　査　沢辺　元司、清水　重臣 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は骨髄異形成症候群(MDS)、MDS から急性骨髄性白血病(AML)への進行例、および新規に発症したＡＭＬ症例の骨髄検体を解析し、ACINUS の発現量とその発現様式とこれらの病態との関連を明らかにしたものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

これまでに ACINUS の腫瘍細胞における発現や、アポトーシス及び細胞増殖との関連を示した報告はあるが、ACINUS の各 isoform の発現を、MDS から AML への進展過程との関連に着目して分析し、その役割の検討を行った点に新規性が認められる。

２）社会的意義

本研究で得られ得た主な結果は以下の通りである。

1. ACINUS は骨髄球系細胞に主に発現しており、その発現量は骨髄の cellularity と相関する。
2. MDS 骨髄では ACINUS の発現は正常骨髄に比して増加しており、特に芽球の増加傾向等を伴う高リスク群でより上昇を認め、AML 症例でも上昇を認める。
3. ACINUS を発現させた HEK293T 細胞では細胞増殖の有意な亢進が認められた。

以上のように申請者は、ACINUS の発現と MDS の進展や細胞の増殖との間に関連があり得ることを明らかにしている。これは、臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

臨床検体を用いて主に免疫組織染色法と RT-PCR 法による分析を行い、適切な統計解析を行った研究で、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は ACINUS の高発現が、増殖能の亢進を介して MDS から AML への進展過程に関係するものと考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに詳細な機序が明らかにされる事が期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に充分な価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 韋　雪涛 |
| 論文審査担当者 | 主査　関矢　一郎<br>副査　山下　仁大、淺原　弘嗣 |
| 論　文　題　目 | Augmentation of Fracture Healing by Hydroxyapatite/Collagen Paste and Bone Morphogenetic Protein-2 Evaluated Using a Rat Femur Osteotomy Model |

（論文内容の要旨）

**【緒言】**

骨折治療の原則は、ずれた骨を「整復」し「固定」することで、あとは生物学的な修復機転により「骨癒合」が得られる。治療として医療が介入しているのは整復と固定の部分で、骨癒合に関しては自然な治癒過程に依存しているのが現状である。骨癒合には短くても 4～6 週は要し、QOL を著しく低下させる。

近年、分子生物学の進歩により、骨形成を促進する様々な手段が考案され、これを骨癒合促進に応用しようという試みがなされ始めている。機器を使用したものとしては低出力超音波パルス（LIPUS）や電気刺激（ESTIM）により骨芽細胞分化を促進する方法がある。また、高齢化社会の進行とともに、様々な骨粗鬆症治療薬が開発されているが、その中でも副甲状腺ホルモンのアナログである PTH(1-34)（テリパラチド）やスクレロスチンを抑制することで骨芽細胞分化を促進する抗スクレロスチン抗体などの骨折治癒促進効果も期待されている。この他、細胞の増殖を促進する fibroblast growth factor (FGF)や Platelet derived growth factor (PDGF)を多く含む多血小板血漿(PRP)を応用しようという試みもなされている。しかしながら、これらの効果は限定的で十分な結果が得られているとは言えないのが現状である。この他に最も大きな期待を集めた薬剤として Bone morphogenetic proteins (BMPs)がある。中でも BMP-2 は強力な骨誘導能を有し、腰椎の前方固定と脛骨の開放骨折への適応が承認され 2000 年代前半から主に米国で使用され始めた。しかしながら、担体の性能不足に起因すると考えられる合併症により、普及が進まないのが現状である。

ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体（HAp/Col）は、ナノスケールの HAp 結晶と豚皮由来のタイプ I コラーゲンからなる吸収性の生体材料で、多孔体は骨補填材として 2012 年より国内で発売されている。多孔質 HAp/Col は高い骨伝導能を有し、骨欠損に移植すると旺盛な骨形成反応が生じることが確認されている。また、BMP など様々な分子を吸着する HAp の比表面積が大きく、BMP の担体としても有望であることが分かっている。

本研究では HAp/Col は、骨折部においても周囲の細胞を刺激することで骨折治癒を促進するという仮説のもと、骨折部投与に適した HAp/Col ペーストを考案し骨折治癒促進効果をラットの骨切りモデルで検証を行った。また、HAp/Col ペーストを BMP-2 の担体としても使用することで、

さらに骨癒合促進効果を高めることができるか検証した。

【方法】

HAp/Col からの BMP-2 の徐放評価

HAp/Col 線維（20mg）と rhBMP-2 溶液（75μg/120μl）を混ぜ 1 時間静置した。これに 1ml の胎児ウシ血清（FBS）を加えよく混合し、遠心分離し上清を全て採取した。上清中に残存した BMP-2 濃度を ELISA 法にて測定することで、HAp/Col に吸着できた BMP-2 の定量を行った。BMP-2 を吸着した HAp/Col には、新たに用意した 2.5ml の FBS を加えよく混合し 4℃にて次のサンプル採取時まで静置した。サンプル採取では再び遠心分離し上清をサンプルとして採取し、新たな 2.5ml の FBS に置換した。以降同様の操作を繰り返した。なお、サンプル採取は実験開始後 0.5, 2, 24, 48, 72, 120 時間とした。各サンプル中の BMP-2 濃度を測定し、BMP-2 の徐放量を定量した。

HAp/Col ペーストの作成

乾燥させた 1g の HAp/Col 線維と生理食塩水 3ml を混合し HAp/Col ペーストを作成した。移植には実験としての再現性を考慮し､骨欠損とほぼ同形状の型に注入し（直径 4mm x 高さ 1.5mm）、乾燥させてディスク状になったものを使用した。

手術

ラット（Wistar、オス、300-320g）の大腿外側からアプローチし骨膜を温存し大腿骨を露出した。PEEK 製プレートを大腿骨前外側に置き、直径 1.4mm のステンレスワイヤー4 本を刺入し固定した。さらに巻きワイヤーを用いて締結固定を加えた。プレート固定を行った後、生理食塩水で冷却しつつ骨幹部でスチールバーを用いて 1mm 幅の骨切りを行った。骨切り部を生理食塩水で洗浄した後、ラットを以下の 4 群に分け各インプラントの移植を行った。骨切り部に何も移植しない **Control 群**、HAp/Col ペーストから作成したディスクを移植した **HAp/Col 群**、既存製品であるコラーゲンスポンジ（ACS）に BMP-2（1μg)を含浸させたものを移植した **ACS + BMP-2 群**、HAp/Col に BMP-2 を含浸させた **HAp/Col + BMP-2 群**。継時的にマイクロ CT 撮影を行い、術後 8 週間で組織を摘出しその他の評価を行った。

力学強度評価

移植後 8 週間で大腿骨を摘出し、プレートを除去後に徒手的に骨切り部の可動性を評価した。明らかな可動性を認めず骨癒合と判断された検体に関しては 3 点曲げ試験を行った。3 点曲げ試験は下部支点間の距離を 10mm とし、大腿骨前面から圧子（クロスヘッドスピード 0.5mm/min）で圧迫を行った。

組織学的評価

摘出組織は脱灰しパラフィン包埋した。厚さ 5μm で前額断の切片を作成しヘマトキシリン・エオシン染色を行った。

【結果】

BMP-2 の吸着・徐放

20mg の HAp/Col には 66.6μg の BMP-2 が吸着しており、1g の HAp/Col には 3.33mg の BMP-2 が吸着することが確認された。徐放の評価では初めの 2 時間に全吸着量の約 19%が放出されたが、その後の放出は非常に緩徐で 5 日経過後でも全体の 27%しか放出されていなかった。

マイクロ CT 評価

コントロール群では術後 2,3 週頃から骨切り部に仮骨形成が確認された。その後 6 週頃には、断端の骨萎縮も見られるようになった。HAp/Col 群でも、術後 2,3 週から骨切り部に仮骨を認め、コントロール群よりも多かった。しかしながら骨癒合は 8 例中 2 例でしか得られなかった。ACS + BMP-2 群では術後 2,3 週には全例で仮骨形成を認め、その量は前述 2 群よりも明らかに多く、最終的には 8 例中 5 例で骨切り部での骨性架橋が確認された。HAp/Col + BMP-2 群でも術後 2,3 週から仮骨形成を認め、全例で骨性架橋が確認された。

力学強度評価

プレートを除去する前の検体では、明らかな可動性を認める検体は無く、固定性が維持されていることが確認された。プレート除去後の徒手試験では、マイクロ CT で骨性架橋が認められた例では徒手的にも骨癒合と判定され、コントロール群では 0/8 例、HAp/Col 群では 2/8 例、ACS + BMP-2 群では 5/8 例、HAp/Col + BMP-2 群では全例の 8/8 例で骨癒合と判定された。また、徒手検査で骨癒合と判断された検体に関しては、力学試験器を用いた 3 点曲げ試験を行ったが、骨癒合をした検体に関しては、正常骨に匹敵する破壊強度が得られていた。なお、群間には有意差を認めなかった。

組織学的所見

コントロール群では、骨髄腔に多少の新生骨は認めたものの骨癒合しておらず、骨切り部付近の骨髄腔は線維組織で満たされていた。HAp/Col 群でも新生骨が少なかった例に関してはコントロール群とほぼ同様な所見であった。骨癒合が得られなかった例でも新生骨が多い例では、骨形成が多いだけでなく正常骨髄の回復が認められた。なお、HAp/Col の残存は認められなかった。ACS + BMP-2 群においても、骨癒合が得られなかった例では、骨切り部周囲の骨髄は線維性組織で満たされていた。骨癒合が得られた例では、骨切り部の皮質骨は疎な骨組織で架橋されており、正常骨髄への回復も進んでいた。HAp/Col + BMP-2 群では全例で疎な骨組織による皮質骨間の架橋を認め、正常骨髄への回復も進んでいた。

【考察】

本研究では高い骨伝導能を有する HAp/Col を骨折部に移植することで、周囲の幹細胞や前駆細胞を刺激し骨癒合が促進できるのではないかと仮説を立て、ラットの骨切りモデルを使用して効果を検証した。また、HAp/Col は BMP のキャリアとしても優れた特性を有していることから、BMP-2 を組み合わせての効果も検証した。

本研究では 1mm という、比較的小さな骨欠損を伴う骨切りモデルであり、一般的には自然治癒するとされている。しかしながら本研究でのコントロール群は一例も骨癒合が得られなかった。一般的には癒合不全は固定性が不良な場合に生じることが多いが、本研究では摘出時に明らかな可動性を認める検体は無かった。このことから、固定性不良が原因とは考えにくいが PEEK プレートの強度不足によるマイクロモーションが原因である可能性も否定できない。一方で、強固すぎる固定を長期間続けると骨癒合が遅延するというラットモデルを用いた報告もある。また、大腿骨のワイヤー挿入部を境に骨髄の様相が異なっており、挿入したワイヤーが太過ぎたために骨髄腔の交通を遮断し、骨癒合を阻害した可能性も考えられるが、本実験ではその原因を特定することはできなかった。HAp/Col 群では、新生骨の量はコントロール群よりも多かったものの、2 例しか骨癒合は得られておらず、本実験モデルでは骨癒合促進効果を確認するまでには至らなかった。HAp/Col + BMP-2 群では全例で骨癒合が得られ骨癒合促進効果が確認された。BMP は強力な骨誘導能を有していることから、本実験モデルのように骨髄腔の交通が阻害されているような場合でも、周囲の筋肉組織から細胞を導引することで骨癒合を得ることができたと考えられる。また、同じ BMP を用いた ACS + BMP-2 群よりも癒合率が高かったが、これは HAp/Col の BMP-2 の担体としての優位性に原因があると考えられる。BMP の吸着および徐放の結果が示す通り、BMP の吸着、徐放には不利と考えられる FBS 中でも HAp/Col は BMP-2 を長期にわたり保持することができていた。

骨折での臨床応用を想定すると、HAp/Col ペーストにはさらなるメリットがある。ACS を含む他のインプラントとは異なり、注入が可能であるため手術を要しないようなごく一般的な骨折にも応用が可能である。しかしながら、実際の臨床での実用性に関しては、効果とコストあるいは効果とリスクのバランスを評価できるような実験モデルでの更なる検討が必要であると考えられる。

また、本研究で用いた HAp/Col ペーストは、HAp/Col 線維と生理食塩水だけを混合したものである。したがって、移植後は体液の循環などにより容易に拡散してしまう可能性があり、その場合、HAp/Col による効果は早期に減弱してしまうと考えられる。今後は、HAp/Col の拡散を防止するようなバインダーの添加に関しても検討を行っていく。

**【結論】**

HAp/Col ペーストの骨癒合促進効果が示唆された。また、HAp/Col ペーストに BMP-2 を添加することで強力な骨癒合促進効果を発揮することが確認された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5326　号 | 韋　雪涛 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　関矢　一郎<br>副　査　山下　仁大、淺原　弘嗣 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体（HAp/Col）ペーストを新たに考案し、BMP-2 の担体として使用可能か、また骨癒合促進効果を高めることができるか新規のラット骨折モデルで検証した。1g の HAp/Col ペーストには 3.33mg の BMP-2 が吸着し、5 日経過後でも 27%しか放出されなかった。ラット骨折モデルに、BMP2 を含浸させた HAp/Col ペーストを移植することで、骨癒合が促進することをマイクロ CT、力学強度評価、組織学的評価で明らかにした。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

本グループは骨補填材としてスポンジ状のハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体を開発し、すでに販売に至っている。本研究では HAp/Col のペースト状のものを新たに開発し、その骨癒合促進効果を検証した。新規生体材料の検討であり、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

骨折治療の原則は、ずれた骨を「整復」し「固定」することで、あとは生物学的な修復機転により「骨癒合」が得られる。治療として医療が介入しているのは整復と固定の部分で、骨癒合に関しては自然な治癒過程に依存しているのが現状である。本研究成果は骨癒合の促進に結び付き、臨床的に有用な研究成果である

３）研究方法・倫理観

研究にはラットの新規骨折モデルが用いられ、マイクロ CT 評価、生体力学的評価と組織学的評価がおこなわれた。本手法は十分な解剖学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は本研究結果について、HAp/Col ペーストには注入が可能であるため手術を要しないようなごく一般的な骨折にも応用が可能であると考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 津山　直子 |
| 論文審査担当者 | 主査　東田 修二<br>副査　三浦　修、沢辺 元司 |
| 論　文　題　目 | BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation |

（論文内容の要旨）

**Summary**

Overexpression of the BCL2 is associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), as is concurrent MYC expression. The assessment of MYC immunohistochemistry (IHC) is becoming optimized, whereas the criteria for BCL2 positivity are highly variable, and the data on its frequency and prognostic value are conflicting. We aimed to evaluate BCL2 expression by IHC and assess the prognostic significance of the histopathologically-scored BCL2 expression in 456 patients with DLBCL uniformly treated with standard immunochemotherapy (rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; R-CHOP). We initially designed four-grade BCL2 scoring criteria, from 0 to 3+, and found that approximately 40% of DLBCL showed strong BCL2 expression (score 3+). The scores from the pathologist's visual estimation were confirmed to be reliable using a digital image analysis. A retrospective survival analysis revealed that BCL2 score 3+ was a significant prognostic factor independent of the international prognostic index, the IHC-determined cell of origin, and the MYC protein/rearrangement status in a training set (n = 218). The adverse prognostic impact of BCL2 score 3+ was confirmed in a validation set (n = 238). We also developed a prognostic model consisting of three groups with a combined BCL2 score and MYC protein/rearrangement status. Patients with BCL2 score 3+ showed a higher treatment failure rate, and alternative therapeutic strategies should be considered for these patients. A highly selective BCL2 inhibitor, venetoclax, was recently introduced as breakthrough therapy. Our BCL2 scoring system could be readily used by pathologists to evaluate patients with DLBCL who might benefit from BCL2-targeted therapies.

**Introduction**

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) represents the largest entity of non-Hodgkin lymphoma and is recognized as heterogeneous at both the clinical and molecular levels.

Two-thirds of the patients with DLBCL show a good response to standard R-CHOP therapy. Predictive biomarkers have been explored for the remaining 30% of the patients at higher risk of treatment failure.

The antiapoptotic protein BCL2 is overexpressed in many cancers, and BCL2 overexpression is associated with drug resistance. Recently, venetoclax, a highly selective BCL2 inhibitor, was developed and reported to be efficacious in several hematological cancers, and thus, BCL2 expression in tumor cells has attracted tremendous attention. In DLBCL, the frequency of BCL2 expression and its prognostic relevance is highly variable in previous studies using immunohistochemistry (IHC). The aim of this study is to evaluate BCL2 protein expression by IHC and assess the prognostic significance of the histopathologically-scored BCL2 expression in a total of 456 patients with newly diagnosed DLBCL treated with R-CHOP therapy.

**Materials and Methods**

We studied 456 patients who were newly diagnosed as having DLBCL between March 2003 and November 2015 and were followed up at the Cancer Institute Hospital. Diagnostic FFPE tissue specimens were obtained, and 2-μm-thick sections were used for the morphological, IHC, and FISH analyses. The IHC-stained slides were scanned with a ScanScope AT (Aperio Technologies) and were analyzed using Aperio ImageScope software.

We assessed BCL2 IHC with a microscope on the diagnostic biopsies. Based on the proportion of positively-stained tumor cells and the staining intensity, the results were classified into the four-grade scores. For the quantitative evaluation, the digital slide images were obtained from the same IHC-stained slides and were analyzed with the Aperio Positive Pixel Count Algorithm.

The Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were estimated by the Kaplan-Meier method, and differences were evaluated by the log-rank test. A multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazards regression model.

**Results**

Information on both FISH and IHC results for MYC and BCL2 was available for 218 of the 456 patients. These 218 patients were selected as a training set to assess the prognostic value of MYC and BCL2 status. The remaining 238 patients were used as a validation set to evaluate the prognostic significance of the BCL2 IHC scores.

We first assessed BCL2 IHC on 218 cases in the training set. According to our criteria, 89 (41%), 55 (25%), 37 (17%), and 37 (17%) cases scored 3+, 2+, 1+, and 0, respectively. The pathologist's IHC score significantly correlated with the quantitative values by the image analysis. In the 218 cases, 20 (9%) were positive for BCL2 rearrangement by FISH. Seventeen out of the 20 (85%) cases showed higher BCL2 IHC scores (score 3+, n = 15;

score 2+, n = 2), suggesting an upregulated BCL2 due to translocation. Interestingly, 2 cases scored 0 despite the presence of a BCL2 rearrangement; these cases were weakly positive when stained with another BCL2 antibody, which was produced by a different immunogen. This finding implies that these cases had a BCL2 mutation.

Patients with a score of 3+ presented with a significantly higher relapse rate after complete remission (CR) ($P$ = .004) and a poorer 3-year PFS ($P$ = .006) than patients with a score of 2+. In addition, the score of 3+ group showed a lower rate to achieve CR ($P$ < .001), an elevated LDH level ($P$ = .01), stage 3 or 4 ($P$ = .03), a high IPI (P = .04), and non-GC type ($P$ = .002) compared with the patients in the score of 0 to 2+ group.

In the training set, the BCL2 score of 3+ group showed significantly inferior outcomes compared with patients with a score of 2+ (PFS, $P$ = .001; OS, $P$ = .03). The adverse prognostic effects of a score of 3+ against the score of 2+ group were confirmed in the validation set (PFS, $P$ = .03; OS, $P$ = .007). Furthermore, the adverse impact of a BCL2 score of 3+ was observed within both GC and non-GC types. The univariate and multivariate analyses revealed that a BCL2 score of 3+ was a significant prognostic factor for both PFS and OS independent of the IPI and MYC status in the training set. MYC IHC >60% and MYC rearrangement-positive were both significantly associated with a poor PFS and OS.

**Discussion**

The present study showed the prognostic value of an IHC-based scoring system for BCL2 protein expression in patients with DLBCL uniformly treated with R-CHOP chemotherapy. We initially designed a four-grade scoring criteria, from 0 to 3+, and found that approximately 40% of the DLBCL cases showed a strong BCL2 expression (score 3+). The scores by the pathologist's visual estimation were confirmed as reliable by an image analysis. The retrospective survival analyses revealed that a BCL2 score of 3+ was a significant prognostic factor independent of the IPI, COO, and MYC IHC/FISH status.

In the clinical settings, an accurate and prompt decision of the BCL2 expression status is becoming more crucial for the treatment of patients with DLBCL. A highly selective BCL2 inhibitor, venetoclax, was recently designated as a breakthrough therapy.

By applying the combination of the staining intensity and the ratio, we achieved a good correlation in the BCL2 IHC evaluation between the pathologist's score and the quantified values obtained by the image analysis, which was a highly reproducible method. From a practical point of view, we adopted the pathologist's score for the survival analysis because the traditional use of a microscope is faster and more accessible than using image analysis. The scoring strategy presented herein can be generally accepted by pathologists and is another potential method that is better than setting a threshold percentage.

BCL2 mutations are frequently detected in GC-type DLBCL, are associated with a BCL2 translocation, and can cause pseudo-negative BCL2 protein expression by IHC. In our

analyses, the frequency of the pseudo-negative BCL2 protein expression was low, and the BCL2 rearrangement was not correlated with the prognosis or the BCL2 protein expression; however, we still recommend using BCL2 FISH for the BCL2-negative GC-type DLBCL, because FISH may be useful for selecting the patients who could benefit from the BCL2 inhibitors. Although BCL2 mutations were not examined in the present study, a comprehensive assessment of BCL2 abnormalities will be needed for patients who are potentially eligible to receive BCL2-targeted therapies.

In summary, we provided additional evidence for the prognostic value of BCL2 protein expression. The BCL2 scoring system we proposed is a simple, at-a-glance, and highly reliable system, which was confirmed by an image analysis. Therefore, it will be readily used by pathologists in the forthcoming era of BCL2 inhibitors.

【和文による要約】

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL）は我が国で最も頻度の高いリンパ腫病型である．抗アポトーシス蛋白 BCL2 の高発現は DLBCL において予後不良因子であることが報告されてきたが，バイオマーカーとしての発現測定法，判定基準は報告によって異なり確立していない．

初発 DLBCL 456 例を対象に，腫瘍細胞における BCL2 蛋白の発現を免疫組織化学法で検出し，標準的治療法である R-CHOP（rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone 併用療法）治療の予後との関連を評価した．免疫染色の結果は，病理医が顕微鏡下に陽性腫瘍細胞率と染色強度を判定，それらに基づく 4 段階のスコアリングシステム（0～3+）を考案した．各症例にスコアを付し，デジタル画像解析によって得られた数値と比較し，その再現性を確認した．

Training コホート 218 例において，BCL2 高発現（スコア 3+）は 89 例（41%）に見られた．スコア 3+群はスコア 0～2+群と比較し初回治療後の寛解率が有意に低く，寛解例においても再発率が有意に高かった．生存分析では progression-free survival，overall survival 両者においてスコア 3+群が有意に予後不良であった．同様の結果は validation コホート 238 例においても確認された．多変量解析では，BCL2 スコア 3+は国際的予後指標 International prognostic index とともに，独立した予後不良因子であることが示された．

現在，海外では BCL2 蛋白を発現するある種の血液がんに対して BCL2 蛋白阻害剤が治療薬として承認されている．本研究では，我々が提唱した BCL2 発現の判定基準が，（1）DLBCL の予後予測に有用であること，（2）病理医が簡便かつ再現性高く施行できること，を示した．したがって，将来的に BCL2 蛋白阻害剤が DLBCL にも適応となった場合，そのバイオマーカー診断法の候補として本判定基準を用いた免疫染色法は有用であろうと考えた．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5327　号 | 津山 直子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　東田 修二<br>副　査　三浦　修、沢辺 元司 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)の多数症例の病理組織標本での BCL2 の発現を半定量的に評価してスコア化する方法を開発し、その BCL2 発現スコアが、その症例の治療による寛解率や生存期間などの予後を反映する予後不良因子となることを報告した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

DLBCL の予後に BCL2 の発現が関与することは知られていたが、免疫組織学的な BCL2 蛋白の発現量の標準的な判定方法が確立していないため、予後との相関に関しても、さまざまな結果が報告されていた。本研究で、異なる病理医が簡便に再現性高く施行できる BCL2 蛋白発現の判定法を確立したことは、先駆的であり、評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1. DLBCL における BCL2 発現をスコア化によって簡便かつ再現性高く評価する方法を確立した。

2. BCL2 発現スコアが、その症例の予後不良因子となることを多数症例の検討により証明した。

以上のように申請者は BCL2 発現によって予後を予測する方法を開発した。これは臨床的に極めて有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

BCL2 発現のスコア化は、多数症例の病理組織標本の顕微鏡による観察によって行われ、同時に行ったデジタル画像解析によって得られた数値と比較し，その再現性を確認している。また、発現スコアと予後との関連性の検討は、適切な統計学的解析に基づいて行われた。こうした解析は病理学および医療統計学の高い知識と経験の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術が十分に高いことが示されると同時に、臨床検体と臨床情報を用いることに対する適切な倫理観を持って行われたことが示された。

４）考察・今後の発展性

申請者が開発した BCL2 発現の評価法が世界に普及すれば、BCL2 発現スコアに応じて治療内容を変えるようなことが行われる可能性がある。また、すでに開発されている BCL2 阻害薬が将来、DLBCL の治療にも用いられるようになった場合に，その薬の有効性を予測して適応症例を選別する検査法になる可能性がある。

**３．その他**

なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 細川　敦美 |
| 論文審査担当者 | 主査　木村　彰方<br>副査　宮坂　尚之、吉本　貴宣 |
| 論　文　題　目 | Molecular mechanisms of insulin resistance in 2 cases of primary insulin receptor defect-associated diseases |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

インスリン受容体(INSR)異常症は、インスリン抵抗性を引き起こし、幅広い表現型を呈する。一般的に片アリル変異では A 型インスリン抵抗症を呈し、両アリル変異では最重症型である妖精症を生じるとされる。*INSR* 遺伝子変異を同定した A 型インスリン抵抗症例(症例 1)と妖精症例(症例 2)について、機能解析結果を報告する。

両症例に対し、Sanger 法で *INSR* 遺伝子を解析した。検出された変異 INSR におけるタンパク質量・リガンド結合能・自己リン酸化能について強制発現系を用いて解析を行った。また症例 2 で患者リンパ球由来不死化細胞を用い *INSR* の mRNA 発現量を qRT-PCR にて定量した。

*INSR* 遺伝子において、症例 1 で父方由来の c.3436G＞A(p.Gly1146Arg)、症例 2 で母方由来の c.294C＞A(p.Ser98Arg:新規変異)のヘテロ接合性変異を同定した。Gly1146 はチロシンキナーゼドメインに存在し、p.Gly1146Arg ではリン酸化能が障害されていた。Ser98 はリガンド結合ドメインに位置し、p.Ser98Arg ではインスリン結合能が低下していた。症例 2 では片アリル変異に加え、患児および父由来のリンパ芽球細胞株で *INSR* mRNA 発現量の低下を認めた。

新規変異を含む 2 種の *INSR* ミスセンス変異を同定し、機能解析にて疾患原性を確認した。本解析により、いずれの症例においても遺伝リスクについて確定することができた。また症例 2 については、定量 PCR の結果から、変異がない *INSR* 遺伝子アリルにおいても何らかの発現調節機構の障害により発現量が低下したことで、重症型を呈したと考えられた。

INSR 異常症において、遺伝子解析および発現量解析が重要であることが示唆された。

＜緒言＞

インスリン受容体(INSR)はリガンド結合部位を含む α サブユニットとチロシンキナーゼ活性を持つ β サブユニットより構成されるホルモン受容体であり、*INSR* 遺伝子でコードされる。

インスリン受容体異常症は、*INSR* 遺伝子変異により発症し、インスリン抵抗性が引き起こされる先天性疾患である。表現型は幅広く、乳幼児期に致死的となる最重症型の妖精症(Donahue 症候群)から学童期以降に発症する A 型インスリン抵抗症まで存在する。

一般的に片アリル変異では A 型インスリン抵抗症を呈し、両アリル変異によって起こる最

重症型の妖精症は、発症頻度 1-4 万出生に 1 人と稀である。

我々は、A 型インスリン抵抗症例(症例 1)と妖精症例(症例 2)において、新規変異を含めた *INSR* 遺伝子変異を同定し、その機能解析を行った。さらに、患者由来リンパ芽球細胞株を用いた *INSR* mRNA 発現量解析の結果、*INSR* mRNA 発現がインスリン受容体異常症発症に関与することが示唆された。

本研究を通し、我々は *INSR* 遺伝子変異および *INSR* mRNA 発現制御障害が、インスリン抵抗性の成因として重要であることを示した。

＜症例＞

症例１：11 歳男児。黒色表皮腫を主訴に受診した。身長：135.7cm、体重：46.6kg、BMI：25.3kg/m2(+1.8SD)と軽度の肥満を認めた。空腹時血糖：82.3mg/dL、空腹時血清インスリン(IRI)：72 μU/mL、HOMA-IR：16.9 と著明なインスリン抵抗性を認めた。父は非肥満であったが、空腹時血糖：91.1 mg/dL、空腹時 IRI：35 μU/mL、HbA1c：5.0%、HOMA-IR：9.0 とインスリン抵抗性が認められた。以上より A 型インスリン抵抗症と診断した。

症例２：新生児、女児。両親は近親婚でなく、糖尿病の既往はなかった。子宮内発育遅延のため在胎 36 週に出生体重 1234g(-3.86SD)で出生した。妖精様顔貌、黒色表皮種、陰核肥大、皮下脂肪欠如を呈していた。日齢 8 に随時血糖：200mg/dL 以上、随時 IRI：1070-6681μU/mL を呈し、妖精症と診断した。高用量インスリン療法（15U/kg/day）で血糖コントロールが困難であり、IGF-1 治療(0.7mg/kg/day)を導入した。その後良好な血糖コントロール(HbA1c:5.0%)および体重増加が得られたが、1 歳 6 ヶ月時に胆汁鬱滞による肝硬変で死亡した。

＜方法＞

患者リンパ球からゲノム DNA を抽出し、Sanger 法による *INSR* 遺伝子全エクソンシークエンシングを行った。また、症例 2 に対して exon skipping を調べるため、患者リンパ球由来 RNA より cDNA を作成し、*INSR* transcript に対する primer で PCR 反応を施行した。その PCR 産物のバンドサイズを対照と比較した。さらに、症例 2 では *INSR* 遺伝子領域の欠失を調べるため、SNP array 解析を行った。

同定した遺伝子変異の機能解析を行うため、FLAG タグ付きヒト INSR 発現ベクターに対して変異導入を行った。変異 INSR の自己リン酸化能解析を行うため、COS-1 細胞に野生型および変異型 INSR を強制発現させ、得られたタンパク質で western blotting を行った。変異 INSR のリガンド結合能を解析するため、野生型・変異型 INSR を強制発現させた CHO 細胞に、ラジオアイソトープで標識したインスリンを作用させ、γ カウンターで測定した放射能からインスリン結合率を算出した。変異 INSR の細胞内局在を観察するため、野生型・変異型 INSR を発現させた COS-1 細胞に対して、免疫蛍光染色を行った。さらに病原性把握のため、変異部位を INSR の三次元構造解析で同定した。

症例 2 では *INSR* 遺伝子で同定された変異が片アリルのみであったため、発症原因の解明のため、*INSR* mRNA 発現量を解析することとした。患者、その両親、対照由来のリンパ芽球細胞株を樹立し、細胞株から抽出した RNA より cDNA を得て、定量 real time-PCR 解析(qRT-PCR)を行った。*INSR* mRNA 発現量低下の原因検索のため、*INSR* 遺伝子の遺伝子発現調

節領域のシークエンシング、および *INSR* 遺伝子を正に制御する *HMGA1* 遺伝子の全エクソンシークエンシングを行った。

＜結果＞

遺伝子シークエンシングにより、症例 1 で c.3436G>A(p.Gly1146Arg)の既報の変異を、症例 2 で c.294A>C(p.Ser98Arg)の新規変異を同定した。いずれも種間で保存されたアミノ酸であり、in silico 解析で damaging または probably damaging と予測された。3 次元解析で、Gly1146 はチロシンキナーゼドメインに、Ser98 はリガンド結合ドメインに存在した。

症例 2 に対する SNP array 解析では *INSR* 遺伝子領域を含めて病的意義のある欠失・重複は認められなかった。また cDNA を鋳型とした PCR 反応では、対照と異なるバンドサイズは得られず、exon skipping は否定的であった。

免疫蛍光染色では、変異 INSR の細胞内局在に異常を認めなかった。Western blotting の結果、p.Gly1146Arg 変異を持つ INSR では自己リン酸化能が障害されていた。リガンド結合能解析では p.Ser98Arg で結合率低下が認められた。

症例 2 の家系における *INSR* mRNA の qRT-PCT では、患者および父で発現量低下が認められた。患者において *INSR* 遺伝子内の遺伝子発現調節領域および *HMGA1* 遺伝子のシークエンシングを行ったが、変異は同定されなかった。

＜考察＞

本研究より、p.Gly1146Arg および p.Ser98Arg 変異は、インスリン受容体機能を障害し、インスリン抵抗性を引き起こす病的変異であることが示された。

症例 2 では、父子ともに *INSR* mRNA の発現量低下が示され、母由来のミスセンス変異および父に由来する *INSR* 遺伝子発現量低下が複合したことで最重症型をきたしたと考えられた。

過去にも *INSR* mRNA の発現障害とインスリン抵抗性の関連は報告されているが、その仕組みについては明らかにされていない。本症例でも父由来アリルにおいて、*INSR* 遺伝子発現上重要な何らかの cis-element の存在が想定された。我々は発現量低下の原因を調べるため、症例 2 で *INSR* 遺伝子内の既知のプロモーター・エンハンサー領域のシークエンシングを行ったが、変異は同定されなかった。さらに *INSR* 遺伝子を正に制御する *HMGA1* 遺伝子にも変異は認めなかった。

*INSR* 遺伝子発現障害はインスリン抵抗性の成因の一つと考えられ、遺伝子解析で病的変異が同定されない場合、qRT-PCR による発現量解析を考慮すべきである。特に妖精症のような重症疾患においては、遺伝的リスクを明らかにした上での遺伝相談が重要となる。本症例の場合、片親は *INSR* 遺伝子に変異を有し、もう片方の親は *INSR* 遺伝子発現に影響する何らかの変異を有することが示唆され、常染色体劣性遺伝形式を想定した遺伝相談を行った。過去の報告では線維芽細胞を用いて *INSR* 遺伝子発現量解析が行われているが、我々は患者リンパ球由来の不死化細胞株にて同様の解析を行い、採取が容易な方法で解析が可能であることを示した。本方法により、症例 2 のようなケースの遺伝学的解析を促進することができると

考えられる。

＜結語＞

インスリン抵抗性を示す症例における INSR 異常症を念頭に置いた遺伝子解析・機能解析の重要性が示された。また、*INSR* 遺伝子の mRNA 発現量低下がインスリン抵抗性の一因となることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5328　号 | 細川　敦美 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　木村　彰方<br>副　査　宮坂　尚之、吉本　貴宣 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文はインスリン受容体遺伝子（INSR）遺伝子変異に起因するインスリン異常症の病態解明についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

インスリン受容体異常症は、インスリン受容体遺伝子（INSR）遺伝子変異に起因するインスリン抵抗性によって、様々な表現型を呈する先天性疾患であり、乳児期に発症し致死的になる最重症型の妖精症（Donahue 症候群）や学童期以降に発症する A 型インスリン抵抗症がある。一般に、妖精症では両アリル変異、A 型インスリン抵抗症では片アリル変異であるが、変異ごとにもたらす機能変化が異なっており、個々の変異がいかなる機序でインスリン異常症の病態を呈するのかについては不明な点が残されている。このような背景の下、申請者は自験例である妖精症、A 型インスリン抵抗症各１例について、その病態を解明するために、遺伝子解析、家系解析、変異がもたらす機能解析を駆使して総合的に評価しており、その着眼点は評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．妖精症の症例では、母親由来の c.294C>A（p.Ser98Arg）変異があり、また、患児および父親では INSR の発現量が低下していた。

２．p.Ser98Arg はリガンド結合部位にあり、インスリン結合能を低下させた。

３．患児および父親の INSR 遺伝子には、発現制御領域を含めて構造異常がなかったことから、これまでに知られていない機序による INSR の発現低下が示唆された。

４．A 型インスリン抵抗症の症例では、父親由来の c.3436G>A(p.Gly1146Arg)変異があった。

５．p.Gly1146Arg はチロシンキナーゼドメインにあり、自己リン酸化能が障害されていた。

以上のように、申請者はインスリン異常症の２例について、INSR 変異を同定し、その機能異常を分子レベルで解明している。さらに、妖精症の解析から、これまでに知られていない INSR の発現制御機序の存在を示唆するデータを得ている。これは、臨床的にも、基礎医学的には有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、遺伝子解析、分子生物学的解析、生化学的解析、細胞生物学的解析が用いられ、患児および両親における INSR 遺伝子変異の同定、同定された変異の機能解析として in silico 機能予測、変異遺伝子導入細胞株を用いたインスリン結合性および自己リン酸化解析、患児および両親から樹立したリンパ芽球様細胞株を用いた INSR 発現解析が行われている。これらの手法はそれぞれの領域における十分な知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に関する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる、

４）考察・今後の発展性

さらに申請書は、本研究成果について、個々の症例の病態をもたらす機序が、変異に基づくインスリン結合性低下あるいは自己リン酸化低下、INSR の下流にある細胞内シグナル伝達が異常になることであると考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察である。一方で、申請者は、これまでの知見では説明できない INSR 発現低下機序があることを見出しており、今後の研究によって新たな INSR 制御機構の解明に発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 平井　作京 |
| 論文審査担当者 | 主査　立石　宇貴秀<br>副査　横田　隆徳、根本　繁 |
| 論　文　題　目 | Correlation between Clinical Presentations and Hemodynamic Parameters Measured by Dynamic Susceptibility Contrast Magnetic Resonance Imaging in Adult Patients with Moyamoya Disease |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

脳循環代謝の測定はもやもや病患者の臨床管理において非常に重要である。今回我々は、成人もやもや病患者の発症形式と Dynamic susceptibility contrast magnetic resonance imaging (DSC-MRI) を用いた脳循環動態の測定との相関について検討した。対象は、122 例の成人もやもや病患者（男性：30 例、女性：92 例、平均年齢：34.2 歳（15 – 60 歳））の 157 半球である。DSC-MRI を用いて大脳の各領域について、小脳を対象領域とした cerebral blood volume (CBV)比、mean transit time (MTT)差を測定した。対象患者を発症時の症候別に無症候(NS)群と 3 つの症候群（出血(H)群、脳梗塞(I)群、一過性脳虚血発作(T)群）の 4 型に分類した。CBV 比は T,I 群で NS 群に比較して有意に全大脳皮質領域で上昇していた (P<0.01)。H 群は NS 群に比較して前頭葉のみで有意に上昇していた。症候群間では有意差は認められなかった。MTT 差では、T,I 群で NS 群に比較して全大脳皮質領域で上昇していた。H 群は、T 群と比較して、前頭葉と rolandic area で有意に低値であった。DSC-MRI による脳循環動態の測定は、もやもや病患者の臨床症状を反映していた。CBV と MTT で重度の脳虚血を検出できるだけでなく、軽微な脳循環代謝異常が検出可能であった。DCS-MRI は成人もやもや病の病態把握において汎用性の高い有用な modality である。

＜緒言＞

もやもや病は、両側の内頸動脈終末部の狭窄とそれに伴う側副血行路の発達を特徴とする進行性の閉塞性脳血管障害である。もやもや病の患者は、一過性脳虚血発作（TIA）、脳梗塞、脳出血などの様々な発症形式をとる以外に、偶発的に診断される無症候も存在する。このような臨床症状の多様性は小児より成人で顕著である。過去の報告で、もやもや病患者の脳循環は一様ではなく、ある特定の患者グループが重度の血行力学的脳虚血状態にあることが、positron emission tomography (PET)の研究で示され、脳循環代謝の測定はもやもや病患者の管理において重要であることが報告されている。

近年、脳血行動態の評価において DSC-MRI の有用性が多数報告されている。DSC-MRI では脳血流の様々なパラメーターの測定が可能で、高い画像解像度と汎用性があり、PET よりも非侵襲的である。しかし、DSC-MRI による成人もやもや病の脳血流評価で、PET で示されたような脳血

流の多様性が示されるかは分かっていない。本研究の目的は、成人もやもや病の発症形式とDSC-MRI で測定した脳血行動態の相関を評価し、もやもや病の臨床管理における DSC-MRI の有用性と妥当性の評価を行うことである。

＜対象と方法＞

対象

2001 年 4 月から 2014 年 10 月までの連続 122 例の成人もやもや病患者（男性：30 例、女性：92 例、平均年齢：34.2 歳（15 – 60 歳））の 157 半球を対象とした。対象患者を発症時の症候別に無症候(NS)群と 3 つの症候群（出血(H)群、脳梗塞(I)群、TIA(T)群）の 4 型に分類し、DSC-MRI で CBV と MTT を測定した。

無症候群

31 例(男性：9 例、女性：22 例、平均年齢：37.2 歳（16 – 60 歳）)、62 半球を評価した。無症候群は、神経症状がなく、偶発的に MRI で診断されたもやもや病患者である。全例で MRI T2 画像で梗塞や出血の所見はなかった。

症候群

症候群の患者は、出血(H)群、脳梗塞(I)群、TIA(T)群の 3 群に分類した。症候群は病側の半球のみを対象とした。

出血群（男性：3 例、女性：13 例、平均年齢：34.1 歳 (18 – 56 歳)）は出血発症の 16 例で、出血側と同側の 16 半球を対象とした。全例、脳出血後の ADL は良く保たれていた。DSC-MRI は慢性期に行った。

梗塞群（男性：10 例、女性：13 例、平均年齢：37.9 歳（15 – 58 歳））は脳梗塞発症の 23 例で、DSC-MRI は、発症から 2 ヶ月以上経過した時点で行っている。1 例で、両側の大脳半球に由来する脳梗塞を呈した症例があり、23 例 24 半球を対象とした。

TIA 群（男性：8 例、女性：44 例、平均年齢：30.9 歳（15 – 57 歳））は、TIA 発症の 52 例である。これらの患者は、一過性の運動、感覚、視野、言語障害で発症し、DSC-MRI の検査時に神経学的症状はなく、MRI T2 画像で大きな脳梗塞の所見はなかった。3 例で、短期間に両側の大脳半球由来の TIA を呈した症例があり、55 半球を対象とした。

本研究のプロトコールは、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を得ている。

**DSC-MRI プロトコール**

DSC-MRI は円偏波ヘッドコイルを用いた 1.5 テスラ（T）MRI (Magnetom Vision, Siemens Medical System, Erlangen, Germany)、あるいは 8 チャンネルヘッドコイルを用いた 3.0T MRI (Signa HDxt, GE Healthcare, Waukesha, WI)を用いた。Perfusion MRI は multislice, single-shot, gradient-echo-planar のイメージングシークエンスで施行した。撮影条件は、repetition time は 1.5T＝1200 ms、3.0T＝1000 ms、echo time は 1.5T＝66 ms、3.0T＝40 ms、field of view は 230 × 230 $mm^2$、matrix size は 128 × 128 である。ガドリウム造影剤（0.2 mmol/kg body weight; OMNISCAN 32%, Daiichi-Sankyo Seiyaku,

Tokyo）を肘静脈から 3ml/sec での注入後に 15ml の生理食塩水の注入をインジェクター（Nemoto Kyorindo, Tokyo, Japan）を使用して行い、7.5mm 間隔で 5mm 厚の 7 スライスを画像として得た。7 スライスの下端はコントロールとして小脳を含め、両側の大脳半球が cover できるようにした。

**DSC-MRI のデータ解析**

MRI のデータ解析と region of interest (ROI)の評価は、我々の過去に報告した研究と同様に行った。データ解析は Dr.View soft (Infocom, Tokyo, Japan)を用いた。データは、pixel-based numerical integration analysis で評価し、測定したデータを用いて、time-$\Delta R_2$ curve から relative CBV と relative MTT を算出した。ROI は用手的に大脳皮質（前頭葉、側頭葉、頭頂葉、運動感覚野）、基底核（視床、被殻）、小脳皮質に、梗塞巣は避けて置いた。ROI は、直径 1cm の円形で構成されており、大脳皮質に沿って置き、視床や被殻は、2x3cm の楕円形と 2cm の円形の ROI をそれぞれ置いた。大脳皮質に置いた各 ROI から relative CBV と MTT の平均値を算出した。大脳皮質に置いた各 ROI の CBV と、コントロールとしての小脳との比を CBV 比、各 ROI の MTT と小脳との差を MTT 差と定義した。

統計解析

4 群間の患者背景（男女比や年齢）の差の検定にはカイ二乗検定を用いた。4 群間の CBV と MTT の差の検定については、ANOVA 検定を用い、有意差が見られた時には、事後比較の為に Turkey-Kramer test を用いた。P 値が 0.05 以下を統計学的有意差とした。全ての統計解析は JMP version 10.0.0(SAS Institute Inc., Cary, North Carolina)を用いた。

＜結果＞

患者背景

各 4 群間の患者背景では、I 群の男性比は他の 3 群より有意に高く、T 群は他の 3 群より有意に低かった。平均年齢は、NS 群と I 群で T 群より有意に高かった（P<0.05）。

**CBV 比**

CBV 比は、全ての領域で NS 群に比較して T 群で有意に高く（P<0.01）、I 群は視床以外の全ての領域で有意に高く（P＜0.05）、H 群は前頭葉でのみ NS 群より有意に高かった（P＜0.05）。3 つの症候群間内での有意差は見られなかった。

**MTT 差**

MTT 差は、全ての領域で NS 群に比較して T 群で有意に高く（P＜0.01）、I 群は視床以外の全ての領域で有意に高く（P＜0.05）、T 群は H 群と比較しても、前頭葉、運動感覚野、被殻で有意に高かった（P<0.05）。

＜考察＞

本研究で、第一に、DSC-MRI で得られた CBV と MTT で、各群間の血行動態を明確に分別可

能であったこと、第二に、これらの DSC-MRI の結果は、同様の PET を用いた研究と良い相関を示した事の 2 点が明らかとなった。

成人もやもや病患者は、その脳血流の状態に応じて、様々な臨床症状を呈する。臨床症状の多様性は、病期の進行に伴い悪化する血行力学的要素と、側副血行路の発達に見られる脳血流の保持機序の双方の要因と関連がある。脳循環代謝の検査は、もやもや病患者の管理において不可欠である。

脳循環代謝の評価で最も信頼性が高い modality は、その高い定量性と再現性を持つ PET である。しかし、PET は可能な施設が限定されおり、日常臨床で使用することは困難である。DSC-MRI は、より低侵襲に脳血行動態の評価が可能で、一回の検査で全脳の情報を、通常の MRI と組み合わせる事で詳細な解剖学的画像とともに得ることができ、日常臨床に際して有用な modality になりうる。

本研究で、CBV 比は虚血症状を呈した患者群は、無症候の患者より全皮質領域で有意に上昇し、出血発症の患者の CBV 比もまた、無症候の患者より、前頭葉、運動感覚野で高値であった。CBV は、脳血流を保持するための代償的な血管拡張の程度を反映するものある。本研究で、DSC-MRI で測定した CBV 比は、過去の PET で測定した CBV と同様の結果を示した。このことから、DSC-MRI で測定した CBV は、もやもや病患者の各発症形式による血行力学的ストレスを正確に評価できる可能性がある。

MTT 差の結果も CBV と同様の結果を示している。虚血症状を呈した患者群の MTT 差は、無症候の患者より全皮質領域で有意に上昇していた。症候群の患者間でも、前頭葉と運動感覚野で TIA 発症の患者は、出血発症の患者より有意に MTT 差が延長していた。過去の報告では、MTT 差で貧困灌流の存在と程度を検出できるとされている。我々の今回の結果でも、虚血症状を呈する患者が、最も重度の血行力学的虚血状態にあり、DSC-MRI でもやもや病患者の脳血行動態の評価が正確に可能であることが示された。

今回の研究ではいくつかの limitation がある。第一に、患者背景のグループ毎の相違である。グループ内の DSC のパラメーターの相違を十分に議論するにはさらなるデータの蓄積が必要である。次に、本研究は ROI に基づいた分析であり、ROI を置く場所による bias の影響があることである。しかし、梗塞のある患者では、梗塞の場所を避けて ROI を設置している。用手的に設置した ROI と自動で置いた ROI との比較研究が待たれる。

DSC-MRI で測定した成人もやもや病患者の発症形式別の CBV 比と MTT 差の多様性を示すことができた。もやもや病患者の DSC-MRI による評価は、PET を用いた同様の研究の結果と同様の結果を示し、日常臨床において有用で適切であることがわかった。

＜結論＞

成人もやもや病患者の発症形式と DSC-MRI を用いた脳循環動態の評価の相関について報告した。DSC-MRI で測定したパラメーターは、もやもや病患者の臨床症状の相違を正確に反映している。特に、CBV と MTT は有用な指標で、重度の脳虚血だけでなく、軽微から中等度の血行力学的虚血状態の検出が可能である。PET に比較して低侵襲で汎用性が高い DSC-MRI で、もやもや病の脳血流の評価に際して、信頼性の高い結果が得られる。DSC-MRI は、もやもや病患者の日常

臨床に際し、有用性と汎用性の高い modality になりうる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5329　号 | 平井　作京 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　立石　宇貴秀<br>副　査　横田　隆徳、根本　繁 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、成人もやもや病患者の発症形式と Dynamic susceptibility contrast magnetic resonance imaging (DSC-MRI)を用いた脳循環動態の測定との相関について検討し、DCS-MRI は成人もやもや病の病態把握において汎用性の高い有用な modality であることを *in vivo* で証明した。DSC-MRI で得られた CBV と MTT で、各群間の血行動態を明確に分別可能であったこと、第二に、これらの DSC-MRI の結果は、同様の PET を用いた研究と良い相関を示した事の 2 点が明らかとなった。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

成人もやもや病患者の脳循環代謝については、これまで諸家の報告がなされてきているが、O-15PET を用いた検討が主体で DSC-MRI についての有用性は確立されておらず、本研究は独創性が認められる。

２）社会的意義

成人もやもや病患者の脳循環代謝については、O-15PET を用いた検討が主体でこの領域の研究におけるスタンダードとなっているが、O-15PET を実施可能な施設は限られ、また被ばくする検査のため普及していない。DSC-MRI は有用性の確立されていない手法ではあるものの、被ばくはなく、低侵襲で汎用性の高い再現性のある評価方法であり、広く受け入れられる性質を備えた検査である点で社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

臨床的自験例をもとに研究背景、目的、研究計画をたて、有用性の確立されていない手法ではあるものの DSC-MRI で比較することで再現性のある評価方法を取り入れ、実例を元に結果を出されている。

４）考察・今後の発展性

成人もやもや病患者の病勢を正しく評価することについては治療の時期を逸しない点で重要である。今後は DSC-MRI 撮影方法の標準化、ROI 設定の明確化、検査データの解析手法について十分な初期データを取得後、前向き試験にて診断基準の明確化を行い、観察者間の再現性、偽陽性・

偽陰性の具体的要因を調査し検討を追加する必要がある。DSC-MRI を成熟した検査として使用することで治療を実際に行う際の患者層別化のための一手段として活用できる可能性がある。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は本学博士（医学）の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 松本　有加 |
| 論文審査担当者 | 主査　植竹　宏之<br>副査　江石　義信、金井　正美 |
| 論　文　題　目 | Distinct intestinal adaptation for vitamin B12 and bile acid absorption revealed in a new mouse model of massive ileocecal resection |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

回盲部切除は重篤な栄養不良を呈する短腸症候群の原因となる。小腸切除後の残存腸管では構造的順応反応が起こることが知られるが、腸上皮の部位特異的吸収機能の代償性変化に関する解析は進んでいない。本研究ではヒトの重篤な SBS を模倣する広範囲 ICR マウスモデルを開発し、残存腸管が失われた回腸の特異的機能を代償するかを調べた。回腸で吸収される胆汁酸に関連する遺伝子群は大腸で有意に増加した一方、回腸でのビタミン B12 吸収に不可欠な Cubilin は mRNA と蛋白のいずれにおいても増加しなかった。血清ビタミン B12 値は有意な低下を認め、術後の代償的 Cubilin 発現誘導の欠如がビタミン B12 欠乏を引き起こすことが示唆された。本結果より、小腸切除後に見られる部位特異的腸上皮機能の順応反応は、回腸特異的吸収機構に一律ではないことが明らかとなった。また本モデルはヒトの SBS 病態解析と治療法開発に有用となるものと考えた。

＜緒言＞

短腸症候群（Short bowel syndrome; 以下 SBS）は腸管の外科的切除により栄養不良を呈す病態であり、その臨床徴候と重症度は切除腸の範囲と部位で異なる。重症例には経静脈栄養や小腸移植が施行されるが、新規治療開発が強く望まれている。

小腸切除後の残存腸では順応反応が起こる。例えば残存小腸では、内腔に突起する絨毛と増殖細胞を含む陰窩がともに伸長し、この構造的順応反応により吸収面積が拡大する。ヒト SBS 例においては一般的に、回盲部切除（Ileocecal resection; 以下 ICR）が空腸切除よりも重篤な徴候を引き起こすとされる。これは術後に残存した場合、回腸よりも十二指腸や空腸の順応能が低いためと考えられてきた。しかしながら、ICR が重篤になりやすい理由として、回腸が限局して有する様々な部位特異的機能が残存腸管で代償されていない可能性についての詳細な解析はあまり進んでいない。

本研究ではまず、ヒトの重篤な SBS 病態を模倣し、経口食餌のみでは健康状態を維持しえない新規 SBS マウスモデルを開発した。さらに本モデルを利用し、回腸特異的に吸収される胆汁酸（Bile acid：以下 BA）とビタミン B12（VitminB12：以下 VB12）の吸収機構の代

償性変化が残存腸管で起こるかを詳細に解析した。

＜方法＞

研究デザイン

12 週齢野生型 C57BL マウスを 75%回盲部切除群（ICR 群）と Sham 手術群（Sham 群）、非手術コントロール群(Control 群)に割りあてた。回腸盲腸接合部の 25cm 近位側と盲腸直下部を切断後、介在する遠位小腸 75%と盲腸を切除し端端吻合を行うことで ICR 群とした。Sham 群は回腸盲腸接合部の 25cm 近位側で切断し再吻合した。

Kaplan-Meier 法での生存解析は ICR と Sham 群(n = 6)で調べた。また、術後 14 日目の ICR と Sham 群、および Control 群の 3 群より血清(n = 6)、腸管組織(n = 3 - 6)を採取し解析に用いた。腸組織の解析において、本研究では便宜的に全腸管を十二指腸、近位空腸、遠位空腸、近位回腸、遠位回腸、近位大腸、遠位大腸の 7 区画に規定した。これによると ICR 群の残存腸管には、十二指腸、近位空腸の近位部、近位大腸、遠位大腸の 4 区域が含まれる。これら区域ごとに RNA の抽出と組織標本作製を行った。Sham 群も、ICR 群と同じ 4 区域から同様に RNA と組織標本を得た。Control 群からは血清に加え、全腸 7 区域の RNA 抽出と組織標本作製を行った。

組織学的解析

HE 染色をおこなった各区域の腸組織を用いて、腸管径、絨毛長、および陰窩長を測定した。抗 Ki67 抗体、抗 SLC10A2 抗体、抗 CUBN 抗体を用いて免疫染色を行った。

遺伝子発現解析

各腸組織から抽出した total RNA の逆転写産物用い、qPCR をおこなった。定量解析は、villin 遺伝子を参照値とする delta Ct 法でおこなった。

統計学的解析

生存曲線は log-rank 法で比較検定した。その他は Mann-Whitney U 法で検定した。いずれの解析も P 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有意と判定した。

＜結果＞

Sham 群は術後 60 日を超えて生存したが、ICR 群に 35 日以上生存したものはなく、生存率は Sham 群に比べて有意に低かった。ICR 群は全個体が下痢を呈したほか、肛門出血や 30%の体重減少で死亡したものなど、重篤な臨床症状を呈した。また、全てのコホートの解析において、術後 14 日目の ICR 群の体重は、Control 群、Sham 群と比べて有意に少なかった。

腸管径は Sham 群に比べて ICR 群で拡張し、近位大腸以外の 3 区画では有意な差を認めた。絨毛長、陰窩長は全区画で ICR 群は他 2 群より有意に増大し、また陰窩当りの Ki67 陽性細胞数は ICR 群において他 2 群よりも全区画で有意に増加していた。以上より、この致死的 ICR モデルでも全残存腸管に上皮組織の構造的順応反応がみられること、およびこれには陰窩底の上皮細胞増殖亢進が関与することが示された。

次に主に回腸とその近傍に発現し、BA の吸収に関わる分子の発現が ICR 後の残存腸管で

いかなる変化を示すかを調べた。Control マウス腸における BA 吸収に関与する Fabp6、Slc10a2、Slc51b、Fgf15 の発現パターンを、Control 全 7 区域から抽出した total RNA を用いて qPCR で評価した結果、遠位回腸、あるいはは回腸・近位大腸で高い発現を示した。そこで ICR 後の残存腸管での遺伝子発現の変化を調べた。術後 14 日目の ICR 群の残存腸管 4 区画におけるこれら遺伝子発現を Sham 群と比較解析した結果、全遺伝子が近位大腸で Sham 群よりも ICR 群で有意に高い発現を示した。一方、どの遺伝子も小腸区域では Sham と ICR 群間に差を認めなかった。これにより ICR に対し、近位大腸は BA 吸収関連遺伝子発現を増大させることが判明した。このことを蛋白レベルでも確認するため、SLC10A2 の免疫染色をおこなった。その結果、Sham 群の近位大腸には SLC10A2 発現を認めないのに対し ICR 群では強い発現を認めた。以上より ICR 群の近位大腸における Slc10a2 mRNA の発現上昇はその蛋白発現増加を誘導することが示された。

次に遠位回腸における VB12 吸収に関わる Cubilin(以下 Cubn)の発現を調べた。Control 群の腸管では、Cubn 遺伝子発現は十二指腸から回腸に向かって発現が増加して最大となり、大腸では同定できないほど急減した。次に ICR 後の残存腸 4 区画での発現を qPCR で Sham 群と比較し評価すると、いずれの区画でも有意な差を認めなかった。免疫染色でも、ICR 群の残存腸で CUBN 蛋白発現が増強するとの結果はどの区域でも確認できなかった。実際の VB12 吸収を血清 VB12 値で評価した結果、Sham 群と Control 群は同程度の値であったが、ICR 群はこれらよりも有意に低値であった。これらの結果から、本マウスモデルでは ICR 後の構造的順応反応が誘導されるものの、残存腸管に Cubn 発現を代償する機能的変化はみられないことが明らかとなった。

＜考察＞

新しく作成した ICR マウスモデルを用いて、回腸優位に発現する BA 吸収関連遺伝子は残存腸で順応性発現増大を示すのに対し、Cubn 遺伝子と蛋白は残存腸のどの部位でも順応性発現がないことを示した。

一般に小腸切除後に見られる腸組織の順応性変化には、吻合部より遠位に流入する栄養素の増加など腸管内容物の変化が関わる直接的因子と、小腸切除よる液性・内分泌性因子が腸上皮に作用する間接的因子の両者が影響すると考えられる。

BA 関連遺伝子は、ICR 後の近位大腸で強く発現誘導される一方、残存小腸での変化は著明ではないことから、順応的発現増加には高濃度 BA の流入が直接的遺伝子発現亢進刺激になると考えられた。

一方、Cubn はどの区域でも代償性変化が見られなかった。このことは、腸管腔内環境による直接的遺伝子発現刺激機構が無いだけでなく、実際に血清値低下を呈する吸収不良状態が腸における代償性発現を誘導する間接的機構も存在しない、あるいは不十分であることを示唆するものである。今後の研究で腸上皮、特に遠位小腸上皮における Cubn 発現調節機構を明らかにすることは、ICR 後に Cubn の順応的発現増加が欠如する機構を明らかにする点で重要であろう。

また本研究は、ヒトの重篤な SBS に類似する臨床徴候を示し、かつ回腸特異的機能欠損を、

血清 VB12 値としてモニタリングできる新しいマウスモデルを提示するものであり、遠位小腸機能障害を示す SBS に対する治療効果を評価する有用なモデルになりうるものと考える。

＜結論＞

広範囲遠位小腸切除においては、遠位小腸喪失を代償する機能的順応が腸管における栄養吸収システムに共通機構ではないことを示した。また本研究で開発したマウスモデルが、広範囲 ICR による重篤な SBS の病態解析や、これに対する新規治療法開発に有用なツールとなる可能性も考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5330　号 | 松本　有加 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　植竹　宏之<br>副　査　江石　義信、金井　正美 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は「短腸症候群（以下 SBS）マウスモデルを用いてビタミン B12 と胆汁酸の吸収に対して腸管の順応反応が異なること」を示した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

SBSにおける各種栄養障害において、経腸あるいは経静脈的な栄養補給の有用性は広く知られている。SBSの栄養障害はしばしば重症化し、危険因子として腸管切除長や切除部位との関連が指摘されているがそのメカニズムはまだ解明されていない。このような背景の下、申請者は回盲部切除（Ileocecal resection; 以下ICR）マウスを用いた新規重症SBSモデルを用いて、胆汁酸とビタミンB12の吸収機構の代償性変化についての解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 腸管径はSham群に比べてICR群で拡張し、近位大腸以外の区画では有意な差を認めた。絨毛長、陰窩長は全区画でICR群は有意に増大し、また陰窩当りのKi67陽性細胞数はICR群において全区画で有意に増加していた。以上より、この致死的ICRモデルでも全残存腸管に上皮組織の構造的順応反応がみられること、およびこれには陰窩底の上皮細胞増殖亢進が関与することが示された。
2. 回腸で吸収される胆汁酸に関連する遺伝子群は大腸で有意に増加した一方、回腸でのビタミンB12吸収に不可欠なCubilinはmRNAと蛋白のいずれにおいても増加しなかった。血清ビタミンB12値は有意な低下を認め、術後の代償的Cubilin発現誘導の欠如がビタミンB12欠乏を引き起こすことが示唆された。

以上のように申請者は、小腸切除後に見られる部位特異的腸上皮機能の順応反応は、回腸特異的吸収機構において一律ではないことが明らかとなった。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究にはマウスが用いられ、絨毛長、陰窩長、および胆汁酸とビタミンB12吸収に関連する遺

伝子群の発現検索を行った。本手法は十分な生理学的および解剖学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「広範囲遠位小腸切除においては、遠位小腸喪失を代償する機能的順応が腸管における栄養吸収システムに共通機構ではないことを示した。また本研究で開発したマウスモデルが、広範囲ICRによる重篤なSBSの病態解析や、これに対する新規治療法開発に有用なツールとなる可能性も考えられた」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 佐野　元子 |
| 論文審査担当者 | 主査　三宅　智<br>副査　吉田　雅幸、松島　英介 |
| 論　文　題　目 | Association of Palliative Care Consultation With Reducing Inpatient Chemotherapy Use in Elderly Patients With Cancer in Japan: Analysis Using a Nationwide Administrative Database |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

終末期医療における患者ニーズが多様化する中、積極的な治療の是非が大きな議論となっている。焦点の一つは、死亡直前まで行われる化学療法である。本研究では、全国診療報酬データ（以下、DPC データ）を用いて国内高齢がん患者における「緩和ケアの介入」と「死亡前 2 週間以内の化学療法実施」との関係を明らかにすることを目的とした。

積極的な治療が患者のアウトカムに与える影響についての研究は、欧米やアジア各国でこの 10 年ほどの間に盛んに行われてきた。評価指標はいくつかあるが、終末期がん患者に対する死亡間近の化学療法施行は、一貫して積極的かつ延命的な治療と考えられている。日本の場合、がんを原因とした死亡患者の約 90%が病院で亡くなっており、約 20%を 75 歳以上の高齢者が占めているのが特徴的である。

本研究は、2010 年 4 月から 3 年間で国内の DPC 病院にて入院加療した患者のうち、65 歳以上、がん進行ステージ 3 以上、5 大がん（肺・胃・大腸・肝・乳）で死亡した 26,012 症例を対象とし、カイ二乗検定およびロジスティック回帰分析を行った。

対象症例中、死亡前 2 週間以内の化学療法施行率は 3.7%と、諸外国と比して低かった。また、男性、若年層、初発がんの患者は化学療法を実施される率が有意に高かった。緩和ケアを受けた患者は 3,134 人（12%）で、そのうち、死亡前 2 週間以内に化学療法を施行されたのは 46 人（1.5%）であった。一方、緩和ケアを受けなかった群で化学療法を受けたのは 909 人（4%）であった（オッズ比[OR] 0.35; 95%信頼区間[CI] 0.26-0.48）。日本では入院中の終末期がん患者に対する積極的な化学療法が少ない中、緩和ケアを受けた患者ではさらにその傾向が強まることが示された。

＜緒言＞

昨今、終末期医療における積極的な治療のあり方が大きな課題となっている。例えば、米国臨床腫瘍学会による指標のみならず、臨床系専門学会が 400 余りの「無駄な医療」を根拠文献と共にリストアップする Choosing Wisely Campaign など、医療資源配分の有効性を問う活動が国際的な広がりを見せている。がん治療分野、とくに固形がん終末期の患者に対して行われる化学療法は積極的かつ延命的な治療とされ、その他の積極的な治療の効果評価と併せて 2000 年過ぎから各

国で研究が進んできた。

我が国では 1981 年以来、死亡原因の 1 位はがんであり、全体の約 3 分の 1 を占めてきた。2002 年に診療報酬制度に「緩和ケアチーム加算」が追加され、がん対策法（2006 年）ならびに抗がん対策推進基本計画（2007 年）が順次制定された。しかし、その中で大きな位置を占める高齢患者に特化した施策はほとんど見られない。世界で最も急速に拡大する高齢化を経験している日本において全国データベースを用いた高齢がん患者に対する緩和ケア介入の実態を把握することは、がん診療の質を測る第一歩となると考え、本研究の目的とした。

高齢患者に焦点を当てるもう一つの理由は、この年齢層が病院という高度医療提供施設において死亡する際、積極的な化学療法を受ける機会、あるいは可能性が高まるリスクがあるためである。死亡したがん患者の約 9 割が病院に入院中に死亡し、約 2 割が 75 歳以上という事実からも、国内において緩和ケア資源が必要なレベルで利用されていない状況が推察される。日本における老年腫瘍学の実態を示す研究は少なく、全国的なデータの分析は全く行われていないのが現状である。

＜方法＞

解析対象は、2010 年 4 月から 2013 年 3 月の間に国内の DPC 病院で死亡した 65 歳以上の患者とした。症例抽出には最多医療資源投入傷病名が ICD-10 分類の肺（C34）、胃（C16）、大腸（C18-20）、肝臓（C22）、および乳房（C50）の 5 大がん患者を対象とした。

緩和ケア介入の有無は、診療報酬制度の「緩和ケア診療加算」または「緩和ケア病棟入院加算」の算定を根拠とした。また、死亡前 2 週間以内に化学療法を実施したかどうかは、厚生労働省研究班が公表している化学療法薬のデータセット（32 領域 924 品目）から主に経静脈で投与される薬剤を抽出した（31 領域 740 品目）。その他に年齢、性別、Charlson Comorbidity Index（CCI）、がんステージ（≧3）、初発がんまたは再発がんの区別、全身麻酔による手術の有無、および入院した病院の規模（≧200、≧500）が、死亡前 2 週間以内の化学療法の投与の有無に与える影響をカイ二乗検定およびロジスティック回帰分析を用いて検証した。

＜結果＞

解析対象症例は 26,012 人であった。そのうち、緩和ケアの介入を受けた群が 3,134 人（12%）であった。 緩和ケアを受けた患者のうち、死亡前 2 週間以内の化学療法が 46 人（1.5%）に施行された。 緩和ケアを受けなかった患者群では、化学療法は 909 人（4.0%）に実施された（オッズ比[OR] 0.35; 95%信頼区間[CI] 0.26-0.48）。全体では、死亡前 2 週間以内に化学療法を施行された患者数は 3.7%であった。

その他の変数では、性別、年齢、がんの部位、および初発/再発の区別において有意差が見られた。すなわち、男性患者、若年、乳がん、再発がん患者は、死亡前 2 週間以内に化学療法を受けるオッズ比がそれぞれの対照群よりも高かった。また、病床数が 500 床以上の病院に入院した患者は、化学療法を受ける可能性が高いことが分かった。CCI、がんステージ、または、全身麻酔を伴う手術の有無は化学療法の使用に有意差はなかった。

＜考察＞

国内 DPC 病院における高齢がん死亡症例では、死亡前 2 週間以内の化学療法施行率が 3.7%と国際的にも低い水準であることが分かった。海外では、米国の国立がん研究所が 5 大がんを対象に死亡前 2 週間以内の化学療法施行率 10%以下という基準を提唱している。また、同様の先行研究によるとオーストラリア 4.3%、ポルトガル 10.7%、カナダ 4.2%、スイス 7.6%という施行率の報告がある。本研究では、緩和ケアを受けた患者群と対照群のオッズ比は 0.35 と有意で、緩和ケアチームによる働きかけが死亡間近の入院がん患者に対する積極的な化学療法の使用の低減に寄与している可能性が示唆された。

ただし、本結果にはホスピスや自宅での最期を希望しながらも急性期病院で死亡した患者が含まれている可能性に留意すべきである。終末期医療施設や在宅サービスの量的不足が、入院患者における化学療法使用率を他国に比して低い水準に留めていることが考えられる。

また、高度医療を提供すべき DPC 病院群において、緩和ケア関連加算を算定できているのが本研究対象のうち 3134 人（12%）に過ぎないとも言え、腫瘍医あるいは緩和ケア専門医の全国的な不足が推察される。言い換えれば、患者の終末期に化学療法を使用するかどうかの方針決定に、必ずしも老年腫瘍学が専門ではない現場の各科医師が携わることが珍しくない状況が考えられる。

＜Limitation＞

本研究は DPC という大規模データを用いた、終末期の緩和ケア介入と化学療法施行の関係性を検証した本邦初の研究である。しかしながら、研究の限界として下記が考えられる。

まず、解析対象が DPC 病院に入院した患者、かつ 5 大がん、高齢者のみという制限がある。患者本人や家族が最後を過ごしたいと思う場所の希望についても明らかでない。

第二に、多施設横断型のコホート観察研究であり、因果の推論を行うことはできない。対象施設にはがん診療連携拠点病院が多く含まれており、通常の時系列であれば緩和ケア専門チームの介入は死亡前 2 週間、すなわち最終末期の化学療法を開始するタイミングより早いと考えられるが、データ上は不明である。

第三に、これまでの先行研究は平均年齢が 60 代のものが多いが、本研究はより高齢の患者を対象としており（75±6.4 歳）、化学療法の使用率を過小評価している可能性は否定できない。また、データの性質上、治療関連死、または緩和的な目的の化学療法が含まれている可能性がある。明らかに積極的な化学療法使用例を抽出するために 95 歳以上の患者を除外し、データの定義上、薬剤の投与方法を経静脈に限ったが、完全ではない。

最後に、この研究は入院患者に限られているが、これは終末期ケアのひとつの側面に過ぎない。昨今は外来通院による化学療法も増加しており、データ入手が可能であれば外来患者を含めた研究が待たれる。

＜結論＞

高齢がん入院患者に対する緩和ケアチームの介入は、死亡前 2 週間以内の化学療法の実施率の低さに寄与していることが分かった。日本の終末期化学療法の実施率は、他国と比しても低い水

準にあり、多くの患者に対して無駄の少ない入院加療が行われている可能性の一端が示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5331　号 | 佐野　元子 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　三宅　智<br>副　査　吉田　雅幸、松島　英介 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本研究は、全国診療報酬データ（以下、DPC データ）を用いて国内高齢がん患者における「緩和ケアの介入」と「死亡前 2 週間以内の化学療法実施」との関係を明らかにすることを目的としたものである。その結果、日本では入院中の終末期がん患者に対する積極的な化学療法が少ない中、緩和ケアを受けた患者ではさらにその傾向が強まることが示された。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

高齢がん患者は、病院という高度医療提供施設において死亡する際、積極的な化学療法を受ける機会、あるいは可能性が高まるリスクがあるが、日本における老年腫瘍学の実態を示す研究は少なく、全国的なデータの分析は全く行われていない。

２）社会的意義

日本においては超高齢者社会となり、今後も高齢者のがん患者の増加が確実であること、さらに近年のがん薬物療法の進歩（分子標的治療薬、免疫チェックポイント阻害薬、プレシジョンメディシンなど）からそれらの治療を希望する患者の増加も予測される。本研究は今後の医療資源の活用法なども射程に入れた社会的な意義を有すると考えられる。

３）研究方法・倫理観

26,012 名の高齢がん患者を対象に、DPC データをもとに調査を行った研究であり、統計学的解析法、倫理的配慮についても十分検討されている。

４）考察・今後の発展性

高齢がん入院患者に対する緩和ケアチームの介入は、死亡前 2 週間以内の化学療法の実施率の低さに寄与していることが分かった。日本の終末期化学療法の実施率は、他国と比しても低い水準にあり、多くの患者に対して無駄の少ない入院加療が行われている可能性の一端が示された。本研究の結果は、今後の超高齢者社会の到来および薬物療法の進歩を見据えて、高齢がん入院患者に対する適切な薬物療法の提供体制の構築に寄与する可能性がある。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 奥村　敬子 |
| 論文審査担当者 | 主査　藤井　靖久<br>副査　藤原　武男、神野　哲也 |
| 論　文　題　目 | Prospective analyses of female urinary incontinence symptoms following total hip arthroplasty |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

変形性股関節症の女性患者に対する人工股関節置換術（THA）が尿失禁を改善することは報告されているが、その尿失禁タイプや重症度は不明である。本研究ではそれぞれのタイプの尿失禁に対する THA 後の改善について評価し、解剖学的な考察を含め報告する。

前方アプローチによるTHAが行われた尿失禁のある50人の女性を評価した。主要下部尿路症状質問票（CLSS）、排尿困窮度調査（UDI-6）、国際前立腺症状スコア（IPSS）、過活動膀胱症状質問票（OABSS）の4つの質問票と尿流測定・残尿測定で評価した。股関節機能はWestern Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index（WOMAC）・関節可動域（ROM）で評価した。

50 人の患者のうち、21 人が腹圧性尿失禁（SUI）、16 人が混合性尿失禁（MUI）、8 人が切迫性尿失禁（UUI）であった。36 人（72%）が改善以上であり、改善もしくは治癒の率は、SUI では 76%、MUI は 100%、UUI は 50%であった。ROM は、尿失禁の治癒・改善群の方が不変・悪化群に比べ明らかに改善していた。

これらのデータから、股関節疾患の患者において、股関節の治療が尿失禁の治療としても有益であることが示された。

＜緒言＞

尿失禁や過活動膀胱は世界中の中高年女性にとって非常に多く見られる疾患である。その症状は生命予後に関わるものではないが、日常生活の中で非常に煩わしく、QOL を下げる。高齢化社会の日本では 40 代の女性の 12.4%が過活動膀胱を患い、年齢とともに疾患罹患率は上昇するため、日本には 810 万人の過活動膀胱患者が存在すると考えられる。

変形性股関節症も中高年女性に多く、様々な治療法があるが、人工股関節置換術（THA）は有用な治療法の一つである。当分野の先行研究で、整形外科医が国際失禁会議尿失禁質問票短縮版（ICIQ-SF）を用いて、THA 後術後 3 カ月で 64%の尿失禁が改善されると報告したが、尿失禁に関しては詳細な分析はなされていなかった（Tamaki et al., 2014）。本研究では THA 術前後における腹圧性尿失禁（SUI）と切迫性尿失禁（UUI）の改善について複数の質問票を用いて調査し、解剖学的に尿失禁と THA の関連について検討した。

＜方法＞

2012 年 9 月から 2014 年 3 月までに共同研究施設にて THA が行われた 83 人の患者のうち、56 人に術前尿失禁があり、そのうち術前・術後 3 日目・術後 3 カ月のすべての評価が行われている 50 人の女性患者を前向きに評価した。患者の平均年齢は 62.9±8.5 歳、平均 BMI22.7 で、尿失禁のリスクとなる肥満は少なく、多産や巨大児も認めなかった。

尿失禁の評価のために、主要下部尿路症状質問票（CLSS）、排尿困窮度調査（UDI-6）、国際前立腺症状スコア（IPSS）、過活動膀胱症状質問票（OABSS）を用いた。また尿流測定、残尿測定を行った。股関節機能の評価のために、The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)、股関節可動域（ROM）を用いた。

今回 CLSS の SUI スコア UUI スコアの両方が術後 0 点になった者を「治癒」とし、1 点以上改善した者を「改善」とし、点数に変化がない者を「不変」、どちらかのスコアが 1 点以上悪化した者を「悪化」と定義した。

THA は全例前方アプロ―チで行われた。前方アプローチは、筋への侵襲が最小の術式であり、術後 1 日目から離床が可能となる。

＜結果＞

CLSS の評価にて、術前の尿失禁の程度は比較的軽度なものが多かった。UUI に関して、24 人が「たまに」4 人が「時々」と回答していたが、「いつも」と答える人はいなかった。また SUI に関しても、31 人が「たまに」11 人が「時々」と回答したが、「いつも」と答える人はいなかった。

CLSS では、尿意切迫感、SUI、UUI、QOL スコアが術後 3 日目・術後 3 カ月ともに有意に改善した。UDI-6 では、頻尿、SUI、UUI が術後 3 カ月で有意に改善し、少しの漏れは術後 3 日目・術後 3 カ月ともに有意に改善した。IPSS では、残尿感、頻尿、尿意切迫感、合計点が術後 3 カ月で有意に改善した。OABSS では、尿意切迫感が術後 3 日目・術後 3 カ月ともに有意に改善し、UUI、合計点が術後 3 カ月で有意に改善した。

CLSS で尿失禁の改善を評価すると、術前は 50 人中 22 人が SUI、18 人が混合性尿失禁、10 人が UUI であった。全体では、37 人(74%)が「改善」もしくは「治癒」であり、13 人（26%）が「不変」であった。尿失禁のタイプ別にみると、術前 SUI がある 22 人において、術後 14 人が「治癒」、2 人が「改善」、5 人が「不変」、1 人に de novo UUI が見られた。術前混合性尿失禁のある 18 人では、12 人が「治癒」、5 人が「改善」、1 人が「不変」であった。術前 UUI のある 10 人では、4 人が「改善」、4 人が「不変」、1 人が「悪化」、1 人が de novo SUI を認めた。治癒もしくは改善を示した率は、SUI で 73%、混合性尿失禁で 94%、UUI で 40%であった。

尿流測定では、尿の勢いを示す Qmax や 1 回排尿量には術前後で有意差はなく、残尿量にも有意差を認めなかった。

WOMAC では、すべての項目で術後 3 カ月に有意な改善を認めた。ROM では屈曲・伸展・外転・内旋で術後 3 カ月に有意な改善を認めた。ROM において、尿失禁改善～治癒群では、屈曲・伸展・外転・内旋で有意な改善を術前後で有意な改善を認めた。しかし不変～悪化群では内旋の有意な改善を認めるのみであった。

＜考察＞

菊池らは、70 歳以上の集団において、身体活動が高い方が尿失禁の有病率が低いと報告している（Kikuchi et al., 2007）。この報告は THA により身体活動が上がり、尿失禁が改善された本研究を支持する報告であると考える。THA 術前の尿失禁の有病率は、田巻らの報告では 33%、馬場らの報告では 28.9%とされているが、本研究では 67%であった（Tamaki et al., 2014, Baba et al., 2014）。本研究は泌尿器科医が個別に問診を行う研究であり、軽度な尿失禁も聴取できたと考えられる。混合性尿失禁が SUI、UUI に比べて治癒率が高かったが、SUI/UUI に比べ失禁の程度が軽かったことが原因と考えられる。多くの整形外科医は、尿失禁の改善は単にトイレまでの歩行が早くなったことが原因と考えるが、本研究ではまだ歩行困難が伴う術後 3 日目に尿失禁が改善している事実から、それだけの理由ではないことを示している。

股関節周囲にある、内閉鎖筋、双子筋、大腿方形筋は股関節の回旋筋群である。そのひとつである内閉鎖筋の大部分は骨盤内に主に存在し、その表面にある挙筋腱弓から肛門挙筋が起始する。肛門挙筋を構成する腸骨尾骨筋、恥骨尾骨筋、恥骨直腸筋などが共同して排便、排尿を制御し、また、肛門挙筋の前方筋束は膀胱頚の位置を支えるという。

変形性股関節症の患者では股関節の可動域が減少し、内閉鎖筋を含む股関節周囲の筋緊張は低下していると考えられる。THA により股関節の可動域を改善させることで、これらの緊張は回復すると期待される。解剖学的な研究に基づくと、肛門挙筋と内閉鎖筋は密接な関係にあることに加え、股関節機能の改善が尿失禁の改善につながることが本研究で明らかとなった。すなわち、肛門挙筋の機能は内閉鎖筋の改善と相互に関係していた。故に我々は骨盤底の緩みが THA によって改善されたと考える。

骨盤底筋体操（PFMT）は尿失禁に対する唯一有効とされる運動である。PFMT を毎日続けることにより、Kim らは 3 ヵ月間で 44.1%の治癒、Bo らは 6 カ月間で 92%の改善を報告した（Kim et al., 2011, Bo et al., 1999）。本研究では 64%の尿失禁治癒率を得ており、数カ月間におよぶ PFMT と同等の治癒率であると考える。

股関節の可動域は THA 後、特に内旋が明らかに改善された。尿失禁が改善した群と尿失禁が改善しなかった群の可動域の改善を比較すると、前者では屈曲・伸展・外転が有意に改善していた。THA により内閉鎖筋の緊張が増加し、骨盤筋膜と肛門挙筋の起始は頭側に持ち上げられたと考えられる。これによって、筋力が増加する前である術後 3 日で尿失禁の改善が得られた理由が説明される。そしてさらにリハビリを経て術後 3 カ月で筋力が増加することによりさらに改善すると考えられる。

馬場らは THA の前方アプローチと後方アプローチにおける尿失禁の改善の違いを検討した（Baba et al., 2014）。後方アプローチでは、内閉鎖筋腱を含む股関節後方の筋を一部切断するが、前方アプローチでは筋の損傷は少ない。後方アプローチでは尿失禁が悪化し、前方アプローチでは尿失禁が改善した。このことからも股関節周囲の筋が尿失禁を防ぐことに重要な働きをしていることを示している。

＜結論＞

股関節機能の改善は SUI、UUI、MUI、これら３つのタイプの尿失禁を改善させた。これらか

ら、股関節の機能と骨盤底筋の機能には関連性があることが示唆され、股関節の機能不全により尿失禁が生じることが説明できる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5332　号 | 奥村　敬子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　藤井　靖久<br>副　査　藤原　武男、神野　哲也 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、人工股関節置換術が女性の尿失禁に与える影響についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

変形性股関節症の女性患者に対する人工股関節置換術が尿失禁を改善することは主に整形外科医師より少数報告されているが、その尿失禁タイプや重症度は不明である。本研究では、泌尿器科医医師の専門的な視点から、それぞれのタイプの尿失禁に対する人工股関節置換術後の改善について評価し、解剖学的な考察を含め報告したもので、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 人工股関節置換術（全例前方アプロ―チ）後、腹圧性尿失禁、混合性尿失禁、切迫性尿失禁の何れもで、尿失禁が改善した

2.　術後の股関節可動域は、尿失禁の治癒・改善群の方が不変・悪化群に比べ有意に改善していた

以上のように申請者は、人工股関節置換術が女性の腹圧性、混合性、切迫性尿失禁の全てを改善し、その改善が術後の股関節可動域と有意な関連があることを明らかにしている。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

人工股関節置換術が行われ、術前尿失禁があり、術前・術後 3 日目・術後 3 カ月のすべての評価が行われている女性患者を前向きに評価した。

尿失禁の評価のために、主要下部尿路症状質問票（CLSS）、排尿困窮度調査（UDI-6）、国際前立腺症状スコア（IPSS）、過活動膀胱症状質問票（OABSS）を用いた。また尿流測定、残尿測定を行った。股関節機能の評価のために、The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)、股関節可動域（ROM）を用いた。用いられた質問票は、国際的に確立したもので、女性の尿失禁を評価するのに適切なものであり、本手法は十分な泌尿器科学的および解剖学的知識の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識・倫理観

が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者は、人工股関節置換術による股関節機能の改善が尿失禁の改善につながる本研究結果について、尿失禁が改善した群と尿失禁が改善しなかった群の可動域の改善を比較すると、前者では屈曲・伸展・外転が有意に改善していたことから、人工股関節置換術により内閉鎖筋の緊張が増加し、骨盤筋膜と肛門挙筋の起始は頭側に持ち上げられたと考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 粟野　暢康 |
| 論文審査担当者 | 主査　大久保　憲一<br>副査　宮崎　泰成、　明石　巧 |
| 論　文　題　目 | Histological analysis of vasculopathy associated with pulmonary hypertension in combined pulmonary fibrosis and emphysema: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis or emphysema alone |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

気腫合併肺線維症(combined pulmonary fibrosis and emphysema: CPFE）の剖検症例における肺血管病変の病理学的特徴を評価し、特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)と肺気腫(emphysema)の剖検症例における所見と比較した。日本赤十字社医療センターにて施行された上記3疾患の剖検症例を後方視的に解析し、線維化部、気腫化部、比較的肺構造が維持された部分(保存部)の肺血管病変を評価した。CPFE 群では中等度から高度の肺動脈病変を認めたが、線維化部と気腫化部では3群間で有意差を認めなかった。一方、保存部の肺動脈病変は3群間で有意差を認め、CPFE 群が最も重症であった。静脈・細静脈病変、細動脈病変も同様に、線維化部と気腫化部では3群間で重症度に有意差を認めず、保存部では CPFE 群が最も重症であった。CPFE 群では肺血管病変が線維化部と気腫化部のみならず保存部にも認められ、肺野全体に病変が及んでいると示唆された。この病理学的変化は、CPFE に肺高血圧症が高率に発症する一因と考えられた。

＜緒言＞

CPFE は Cottin らによって報告された上葉の肺気腫と下葉の間質性肺炎が併存した病態であり、肺高血圧症を高率に合併することが報告されている。しかし、その肺血管病変の病理学的特徴に関する報告、特に剖検例を用いて全肺野を解析した報告はほとんどみられない。そこで今回我々は、CPFE の剖検症例における肺血管病変の病理学的特徴を評価し、IPF と emphysema の剖検症例における所見と比較、検討した。

＜方法＞

日本赤十字社医療センターにて、1992 年 12 月 1 日から 2015 年 7 月 31 日までに施行された剖検症例 1613 例を後方視的に解析した結果、CPFE 26 例、IPF 11 例、emphysema 23 例の合計 60 例が本研究の対象となった。肺高血圧症はニース分類を基に診断した。膠原病などの二次性間質性肺炎やニース分類のⅢ群以外の肺高血圧症は除外した。

呼吸器科医、放射線科医、病理医それぞれ3名により、臨床、画像、病理学的特徴を評価した。臨床所見は診療録を基に血液検査、呼吸機能検査、心臓超音波検査、右心カテーテル検査を解析

した。画像所見は high resolution CT を用い、IPF ガイドラインに準じた間質性肺炎の病型、Goddard 分類に準じた emphysema の程度、肺動脈の直径を解析した。病理学的所見はホルマリン固定、パラフィン包埋した検体を用い、ヘマトキシリンエオジン染色と elastica–van Gieson 染色を行った。IPF の診断は IPF ガイドラインに準じて行った。肺血管病変の評価は以下の手順で行った。(i) 全肺野のうち線維化部、気腫化部、保存部に該当する箇所を選択する、(ii) それぞれの部位の中から呼吸細気管支または終末細気管支に伴走する直径 200 から 300 μm の肺動脈をランダムに 3 つ選択する、(iii) Heath–Edwards 分類に準じて肺動脈の変化を評価、スコア化する、(iv) 3 つのスコアを平均化し、最終スコアを計算する、(v) 同部位における、小葉内静脈や細静脈の細胞性または線維性内膜肥厚と動脈化現象を評価する、(vi) 同部位における、肺胞管に伴走する直径 100 μm 未満の細動脈の中膜、内膜肥厚を評価する。

統計解析は IBM SPSS STATISTICS を用い、両側検定で $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。

本研究は日本赤十字社医療センターにおける臨床研究倫理委員会にて承認され(678 番)、インフォームドコンセントはすべての患者の家族より取得した。

＜結果＞

臨床所見: 大多数の症例は男性であり、3 群間で年齢、性別、喫煙歴に有意差を認めなかった。心臓超音波検査による推定肺動脈楔状圧(estimated systolic pulmonary artery pressure: eSPAP)は有意差を認めなかったものの、CPFE 群が IPF 群、emphysema 群よりも高い傾向にあった($P = 0.052$)。右心カテーテル検査が施行されたのは CPFE 1 例のみであった。呼吸機能検査による拡散能($DL_{CO}$%)は CPFE 群が IPF 群、emphysema 群よりも有意に低かった。

画像所見: CPFE 群では 26 例中 21 例が、IPF 群では 11 例中 9 例が画像上、definite usual interstitial pneumonia pattern と診断された。Goddard 分類による気腫の程度は、多くの肺葉において emphysema 群の方が CPFE 群よりも高度であった。肺動脈径は 3 群間で有意差を認めなかったが、CPFE 群と IPF 群は emphysema 群と比較し、肺動脈径が大動脈径よりも長い症例が有意に多かった($P = 0.027$)。

病理所見: Heath–Edwards 分類による肺動脈のスコア化に関して、CPFE 群と IPF 群の線維化部、CPFE 群と emphysema 群の気腫化部では有意差を認めなかった。しかし、保存部では 3 群間に有意差を認めた($P < 0.001$)。即ち、保存部の血管病変は CPFE 群と IPF 群では有意差を認めなかったものの、CPFE 群は emphysema 群より($P < 0.001$)、IPF 群も emphysema 群よりも($P = 0.001$)有意にスコアが高かった。Plexiform lesion は CPFE 群の 2 例と IPF 群の 1 例で、ともに線維化部にみられた。肺静脈や細動脈の内膜・中膜肥厚は大多数の線維化部、気腫化部において認められたが、その頻度は 3 群間で有意差はみられなかった。一方、保存部においては静脈・細静脈($P < 0.001$)と細動脈病変($P < 0.001$)の頻度は 3 群間で有意差を認め、特に CPFE 群において有意に emphysema 群よりも高率であった。CPFE 群における特徴的な肺血管病変は以下の通りであった。(i) Heath–Edwards 分類のスコアは線維化部が気腫化部($P < 0.03$)や保存部($P < 0.001$)よりも高かった、(ii) 同スコアは気腫化部が保存部よりも高かった($P = 0.010$)、(iii) 線維化部における静脈・細静脈病変は気腫化部($P = 0.017$)や保存部($P < 0.001$)よりも重症であった、(iv) 3 領域における細動脈病変の頻度は有意差がみられなかった。CPFE 群では肺血管病変と呼吸機能検査に関連性がみられた。

即ち、拡散能が低下した症例($DL_{CO}\% < 50$)を比較した結果、Heath–Edwards 分類のスコアは CPFE 群が emphysema 群よりも高値であった($P = 0.015$)。また、有意差は認められなかったが、CPFE 群は IPF 群よりも高い傾向にあった($P = 0.26$)。なお、IPF 群と emphysema 群では有意差はみられず、拡散能が維持された症例($DL_{CO}\% \geq 50$)においては 3 群間に有意差はみられなかった。

＜考察＞

本研究は CPFE の全肺組織における血管病変を解析した初の報告である。我々は肺動脈、肺静脈、細静脈、細動脈に特徴的な病変がみられ、かつそれらは線維化部や気腫化部のみならず、保存部にも及んでいることを示した。

本研究において、CPFE 群の臨床学的な特徴は以前の報告通りであり、拡散能の低下は肺高血圧症の発症を示唆していた。しかし、我々の症例の中で右心カテーテル検査がなされたのはわずか 1 名のみであったため、肺高血圧症の臨床学的な正診は不可能であった。肺高血圧症の画像的特徴を満たした CPFE 症例は少なかったため、本研究の CPFE 群で肺高血圧症を発症していた症例はわずかであったかもしれない。

一方、病理学的には多数の CPFE 症例に特徴的な血管病変が確認された。我々は肺動脈病変の評価のため、Heath–Edwards 分類を使用した。この分類はもともと先天性心疾患による肺動脈性肺高血圧症の評価に用いられたが、簡便かつ重症度の評価に有用であるため、その他の原因で発症する肺高血圧症にも用いられている。本研究では grade4 以上の肺動脈病変をきたした症例はほとんどみられなかったが、grade1–3 の病変は多数の症例にみられた。さらに、保存部における重症度スコアが 3 群間で最も重症であったため、CPFE 群では部分的ではなく、肺全体に肺動脈病変が及んでいると考えられた。

CPFE における拡散能低下と肺高血圧症との関連は今までにも報告がなされている。本研究では CPFE 群において全肺野に及ぶ広範な肺血管病変を認め、これが拡散能低下と関連していると推察した。これは気腫化による肺胞上皮の表面積の減少や線維化による拡散距離の増加が主因と考えられた。本研究結果より、拡散能の低下は保存部における肺血管病変の重症度と関連していると考えられた。

＜結論＞

本研究は CPFE における肺血管病変に関して、新たな知見を示した。CPFE では保存部における動脈・細動脈病変や静脈・細静脈病変が肺高血圧症の発症に重要な役割を果たしていると示唆された。右心カテーテル検査による肺高血圧症の臨床診断と病理学的特徴との関連や肺高血圧症の発症機序を解析するさらなる研究が必要と考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5333　号 | 粟野　暢康 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　大久保　憲一<br>副　査　　宮崎　泰成、　明石　巧 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は気腫合併肺線維症における肺血管病変の病理学所見についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

気腫肺合併肺線維症(CPFE)では肺高血圧症を高率に合併することが報告されているが、肺血管病変の病理学的特徴に関する報告はほとんどない。申請者は剖検例を用いて、全肺野を解析し、気腫肺のみ・肺線維症のみ症例の肺血管病変の病理学所見との相違を検討した。その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. CPFE 群で中等度から光度の肺動脈病変を認め、線維化部と気腫部では肺気腫群・肺線維症群と有意差を認めなかった。
2. CPFE 群では肺血管病変が線維化部と気腫部のみならず保存部にも有意に認められ、肺野全体に及んでいた。

申請者は、CPFE と肺血管病変の病理学的所見の関連を明らかにし、CPFE に肺高血圧症が高率に発生する一因になることを示した。これは臨床的に有用な研究成果と言える。

３）研究方法・倫理観

研究には CPFE、特発性肺線維症、肺気腫の剖検症例が用いられ，臨床・画像・病理学的特徴が評価された。肺動脈病変の評価には Heath-Edward 分類を使用した。本手法は十分な呼吸器学的・放射線学的知識、病理学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が高いことが示され、本研究が周到な準備の上に行われたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は本研究において、右心カテーテル検査による肺高血圧症の臨床診断と病理学的特徴との関連や肺高血圧症の発症機序を解析する更なる研究が必要としており、今後の研究の発展が期待される。

**３．その他**　なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士(医学)の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 石塚　典子 |
| 論文審査担当者 | 主査　三宅　智<br>副査　藤原　武男、豊福　明 |
| 論　文　題　目 | Psychological Distress and Resilience among Partners of Cancer Patients Receiving Outpatient Chemotherapy |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

がん患者のパートナー（配偶者または内縁関係にある者）は，精神的苦痛を経験するリスクが高いことが報告されている。精神的苦痛に対抗する保護的要因としてレジリエンスが知られているが，がん患者のパートナーにおける精神的苦痛とレジリエンスとの関連に関する量的研究は少ない。本研究では，外来化学療法受療中のがん患者のパートナーにおける精神的苦痛とレジリエンスとの関連，およびがん関連の心理的経験が精神的苦痛とレジリエンスとの関連に及ぼす影響について検討することを目的とした。本研究は自記式質問紙を用いた横断研究であり，分析対象者は 109 名であった。精神的苦痛を従属変数とし，レジリエンスおよびがん関連の心理的経験を独立変数とした階層的重回帰分析の結果，レジリエンスが高いほど精神的苦痛が低いことが示された。しかし，心理的経験を投入した最終ステップでは，トラウマティック・ストレスおよび主観的な介護負担度が高いほど精神的苦痛が高く，レジリエンスと精神的苦痛との有意な関連は示されなかった。したがって，外来化学療法受療中のがん患者のパートナーにおけるレジリエンスの保護的効果は，トラウマティック・ストレスと主観的な介護負担によって緩和されることが示唆された。

＜緒言＞

がん患者のパートナーは，抑うつや不安等の精神的苦痛を経験するリスクが高く，一般市民と比較すると，精神的苦痛の有訴率は約 3 倍であることが報告されている。パートナーの精神的苦痛は，本人や患者のみならず，患者の抑うつのリスクや家計収入の減少のリスクの増大等，家族全体に多大な影響を及ぼす。

パートナーの精神的苦痛の要因として，女性であることや若年であることが明らかになっているが，こうした人口統計学的要因に加えて，がん関連の心理的経験もまた精神的苦痛の増大に影響を及ぼすことが報告されている。たとえば，侵入的思考，介護負担に対するネガティブな知覚，患者の治療をストレスであると評価すること，および感情的またはスピリチュアルな対処されていないニーズの存在等である。

このようなリスク要因とは反対に，レジリエンスは精神的苦痛に対抗する保護的要因である。

がん患者に関する先行研究では，レジリエンスが高いほど，精神的苦痛が低いことが示されている。しかしながら，パートナーにおける量的研究は少なく，レジリエンスの直接的な精神的苦痛への影響のみならず，リスク要因への遭遇のような逆境にあってもレジリエンスが機能するか否かについては，知るところが少ない。患者の化学療法受療中は，副作用の扱いに困難を感じたり，社会活動への参加が減少したりすることから，パートナーは重大な精神的苦痛を経験している可能性がある。したがって，化学療法受療中のがん患者のパートナーにおける精神的苦痛については慎重に検討される必要がある。精神的苦痛とレジリエンスとの関連に関するメカニズムを理解することは，日常の臨床における実際的な介入を考案し，実施することや，また，精神的苦痛を経験しているパートナーに適時に注意を払うことにおいて有用であると考えられる。

本研究では，外来化学療法受療中のがん患者のパートナーにおける精神的苦痛とレジリエンスとの関連，およびがん関連の心理的経験がこれらの関連に及ぼす影響について検討することを目的とした。

＜方法＞

本研究は，単施設における自記式質問紙法による横断研究であり，2012 年 7 月から 2014 年 3 月の間に実施された。対象者は，外来化学療法を受療中のがん患者のパートナーであり，適格基準は，診断について告知されていること，20 歳以上，および日本語の質問紙に回答できることとした。質問紙は，レスポンス・バイアスを最小にするため無記名とし，同意書とともに返信用の封筒に同封した。

研究期間中の対象者は 171 名であった。返送された 122 名（回収率 70.8%）のうち，有効回答を得られた 109 名を分析対象者とした（有効回答率 63.7%）。サンプルサイズは，重回帰分析において，検定力 0.8，有意水準 0.05，中程度の効果量，7 独立変数とした場合，104 が推奨されており，本研究における 109 は妥当であるといえる。

収集したデータは，人口統計学的データ，患者の医療情報，精神的苦痛，レジリエンス，がん関連の心理的経験（トラウマティック・ストレス，主観的な介護負担度，患者の症状に対する知覚，心理的サポートの必要性）であった。精神的苦痛の測定には，Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)，レジリエンスには，The short Japanese version of the Resilience Scale, トラウマティック・ストレスには, The Japanese-language version of the Impact of Event Scale – Revised の各尺度を用いた。主観的な介護負担度は，現在の家事および介護の負担度について 0 点から 10 点での評価を求めた。患者の症状に対する知覚，および心理的サポートの必要性は，それぞれ,「患者の症状のうち自分がつらいと感じる症状の有無」,「心理的サポートが必要と思うか否か」を尋ね，選択肢は“はい”または“いいえ”の二択であった。

統計的分析は，最初に交絡因子を抽出するために，精神的苦痛を従属変数，人口統計学的変数および医療情報の各変数を独立変数とし，単回帰分析を実施した。次に，精神的苦痛を従属変数とした，強制投入法による階層的重回帰分析を実施した。Step 1 では，先行研究の知見を元に，年齢，性別，および単回帰分析で有意な関連が示された変数を独立変数として投入した。Step 2 では，レジリエンスの精神的苦痛に対する直接的な影響を調べるために，Step 1 で投入した変数に加えて，レジリエンスを投入した。最終ステップでは，心理的経験が，レジリエンスと精神的

苦痛との関係に及ぼす影響を調べるため，Step 2 で投入した変数に加え，心理的経験の 4 変数を投入した。

本研究は，東京医科歯科大学医学部倫理委員会および実施施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

＜結果＞

分析対象者の中央年齢は 62.5 歳，男性 73 名（67.0%）であり，33 名（30.3%）が精神的苦痛を有していた（HADS の得点が 15 以上）。単回帰分析の結果，質問紙を受け取った人がパートナーであることが，精神的苦痛の高さと有意に関連していた（$B = 3.13$, $p = 0.03$）。階層的重回帰分析の Step 1 では，質問紙の受取人がパートナーであることが，精神的苦痛の高さと有意に関連があった（$\beta = 0.31$, $p = 0.003$）。Step 2 では，レジリエンスが高いほど精神的苦痛が低いことが示された（$\beta = -0.39$, $p < 0.000$）。また，質問紙の受取人がパートナーであることが，精神的苦痛の高さと有意に関連していた（$\beta = 0.28$, $p = 0.004$）。最終ステップでは，トラウマティック・ストレスおよび主観的な介護負担度が高いほど，精神的苦痛が高いことが示され（順に，$\beta = 0.64$, $p < 0.000$；$\beta = 0.22$, $p < 0.000$），レジリエンスと精神的苦痛との間に有意な関連は見られなかった。モデルの調整済決定係数は 0.722 であった。

＜考察＞

階層的重回帰分析の Step 2 において，レジリエンスと精神的苦痛との間に有意な関連が見られたが，最終ステップでは，トラウマティック・ストレスと主観的な介護負担度が精神的苦痛と有意に関連し，レジリエンスと精神的苦痛の間には有意な関連は示されなかった。この結果は，レジリエンスはパートナーの精神的苦痛に対する保護的な役割を担うものの，ある種の逆境においてはレジリエンスが機能しないことを示唆しているといえる。

患者の症状に対する知覚については，先行研究と異なり，65.1%のパートナーがつらい症状があると回答したにも関わらず，精神的苦痛との有意な関連は示されなかった。これは，本研究の対象者は，患者の症状を治療の肯定的な効果であるととらえる傾向があったことによるものと推察される。同様に，心理的サポートの必要性もまた，先行研究の結果とは一致せず，精神的苦痛との有意な関連が見られなかった。同時に検討した介護負担に関して，先行研究では，“予定が乱される”等の介護の結果としての負担についての項目群を使用していたのに対し，本研究では，現在の家事や介護負担の強度を直接的に尋ねた。本研究の結果は，パートナーは自身のニーズよりも患者のニーズを優先する傾向があることを示唆している。換言すると，精神的苦痛を経験しているパートナーが必ずしも心理的サポートの必要性を表明するわけではないことが示されたといえる。

臨床的観点から見ると，サポートを必要としているパートナーに対して，適切なサービスを提供することが重要な課題である。精神的苦痛に関するスクリーニングの研究では，精密なスクリーニングに先立ち，簡便かつ非侵襲的な質問項目を用いる多段階のアプローチが推奨されており，本研究の結果は，トラウマティック・ストレスや主観的な介護負担度に関する簡易な質問項目を，スクリーニングの最初の段階に適用できることを示唆している。また，心理的サポートに関して

は，その形式に関わらず，レジリエンスの向上に主眼を置くことが適切である。レジリエンスがコーピング・スキルと精神的苦痛との関連を媒介することが報告されており，レジリエンスの向上を目指すためには，コーピング・スキルの改善に焦点を当てた介入が有効であると考えられる。

＜結論＞

本研究では，外来化学療法を受療中のがん患者のパートナーの精神的苦痛に対するレジリエンスの保護的効果は，トラウマティック・ストレスと主観的な介護負担度の高さによって減少することが明らかになった。また，パートナーは精神的苦痛を経験していても，必ずしも心理的サポートを要求しないことが示唆された。これらの知見は，がん患者のパートナーに対する適切な心理的サービスを提供するための系統的な方法の必要性を示唆している。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5334　号 | 石塚　典子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三宅　智<br>副　査　藤原　武男、豊福　明 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本研究は、外来化学療法受療中のがん患者のパートナーにおける精神的苦痛とレジリエンスとの関連，およびがん関連の心理的経験が精神的苦痛とレジリエンスとの関連に及ぼす影響について検討することを目的とした研究である。精神的苦痛を従属変数とし，レジリエンスおよびがん関連の心理的経験を独立変数とした階層的重回帰分析の結果，レジリエンスが高いほど精神的苦痛が低いことが示された。しかし，心理的経験を投入した最終ステップでは，トラウマティック・ストレスおよび主観的な介護負担度が高いほど精神的苦痛が高く，レジリエンスと精神的苦痛との有意な関連は示されなかった。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

がん患者のパートナー（配偶者または内縁関係にある者）は，精神的苦痛を経験するリスクが高いことが報告されている。精神的苦痛に対抗する保護的要因としてレジリエンスが知られているが，がん患者のパートナーにおける精神的苦痛とレジリエンスとの関連に関する量的研究は少ない。

２）社会的意義

外来化学療法受療中のがん患者のパートナーにおけるレジリエンスの保護的効果は，トラウマティック・ストレスと主観的な介護負担によって緩和されることが示唆された。

３）研究方法・倫理観

109 名の成人がん患者を対象に、患者背景および質問紙法による調査を行った研究であり、統計学的解析法、倫理的配慮についても十分検討されている。

４）考察・今後の発展性

本研究では，外来化学療法を受療中のがん患者のパートナーの精神的苦痛に対するレジリエンスの保護的効果は，トラウマティック・ストレスと主観的な介護負担度の高さによって減少することが明らかになった。また，パートナーは精神的苦痛を経験していても，必ずしも心理的サポートを要求しないことが示唆された。これらの知見は，がん患者のパートナーに対する適切な心理的サービスを提供するための系統的な方法の必要性を示唆している。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

以上を踏まえ、申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 荻島　隆浩 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　真二<br>副査　江石　義信、三木　義男 |
| 論　文　題　目 | ATRX status correlates with 11 C-methionine uptake in WHO grade II and III gliomas with *IDH1* mutations |

（論文内容の要旨）

<要旨>

遺伝子解析の進歩により、クロマチンリモデリングに関連した ATRX(α-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)遺伝子の変異がIDH変異をもつWHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマに高頻度に認められることがわかってきている。一方、グリオーマではメチオニン PET での 11C メチオニンの取り込みが腫瘍の生物学的性質を良く反映することがわかっている。本研究は、IDH 変異をもつ WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマにおいて、ATRX 変異と PET での 11C メチオニンの取り込みとを比較検討したものである。また、ATRX 変異と患者群の臨床的特徴、予後についても比較検討を行った。11C メチオニンの取り込みは、腫瘍と正常脳との SUV(standardized uptake value)の比である T/N 比を用いて評価した。IDH 及び ATRX については、摘出した腫瘍組織を用い、免疫染色で評価した。ATRX は変異により核の染色性が消失した場合に ATRX loss、核染色が認められる場合に ATRX retention とした。ATRX loss の症例は組織形態学的には星細胞腫であり、ATRX retention の症例と比較して予後が悪かった。ATRX loss 群の T/N 比は、 ATRX retention 群と比較して有意に低かった(p=0.0171, U-test)。IDH 変異をもつ WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマでは、ATRX 変異と 11C メチオニン PET での T/N 比に相関があることが示された。本研究によって、WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマにおける新たな生物学的、画像診断学的知見を得ることができた。

<緒言>

低グレード、及び中間グレードのグリオーマ(WHO グレードⅡ, Ⅲ)の臨床経過、及び予後は多様であり、必ずしもその組織学的なクラス分けによって予後を予測し得ない。近年の網羅的な遺伝子解析によりグリオーマの生物学的特徴が明らかになり、臨床的特徴も特定の遺伝子変異の組み合わせによって予測されるようになってきている。最新の WHO による中枢神経系腫瘍分類(WHO 2016 分類、第 4 版)では、旧来の組織学的分類に新たに分子学的分類を組みわせた”integrated diagnosis (統合的病理診断) ”が導入された。

WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマにおける遺伝子マーカーの中で、IDH 遺伝子変異は腫瘍化の早期に起こるものと考えられている。IDH 変異をもつグリオーマは、組織形態学的には乏突起膠細

胞系腫瘍と星細胞系腫瘍とに分類される。乏突起膠細胞系腫瘍は、IDH 遺伝子変異と、1p/19q 欠失、TERT プロモーター変異によって決定づけられる。一方で、星細胞系腫瘍は IDH 遺伝子変異に伴って、ATRX, TP53 遺伝子変異が高頻度で見られることがわかっている。これまで 1p/19q 欠失を持つグリオーマについてはその生物学的特徴についての報告がなされているが、ATRX 遺伝子変異を持つグリオーマについては詳細がよくわかっていない。

本研究の目的は、IDH 変異を持つ低悪性度グリオーマにおいて、ATRX 変異の有無による生物学的特徴の違いを明らかにすることである。我々はまず、IDH 変異を持つ低悪性度グリオーマを ATRX 免疫染色によって分類し、術前のメチオニン PET と ATRX 変異の有無との関連を解析した。また、ATRX 変異の状態と患者群の臨床的特徴、予後についても比較検討を行った。

<方法>

2000 年 4 月から 2015 年 4 月に東京医科歯科大学で初回手術を行い WHO grade Ⅱ,Ⅲと診断された 71 例のグリオーマを対象とし、このうち術前のメチオニン PET が得られた 62 例(年齢範囲 19-78 歳、男性 32 例、女性 30 例)を解析した。摘出した腫瘍組織を免疫染色にて評価した。ATRX 免疫染色は、腫瘍細胞の核染色のみを評価対象とし、腫瘍細胞の核染色が消失し且つ血管内皮細胞・ミクログリア・反応性アストロサイト・浸潤リンパ球細胞などの核染色が保たれている場合にのみ、ATRX loss と判断した。メチオニン PET における局所的な 11C メチオニンの取り込みは、以下の式で計算される SUV で表し、腫瘍と正常脳との SUV の比である T/N 比を用いて評価を行った。

・ SUV = ([tissue activity{Bq}/tissue volume{ml}])/([injected radioisotope activity{Bq/body weight{g}}])

・T/N 比 = SUV tumor peak / SUV normal brain

生存解析はカプランマイヤー法及びログランク検定を、ATRX 変異の有無と他の患者背景との評価にはフィッシャーの正確検定とロジスティック検定を、T/N 比、及び Ki-67 の評価はマン・ホイットニーU 検定を用いた。

<結果>

62 症例を解析したところ、WHO 2007 分類に基づく組織学的分類の内訳は、びまん性星細胞腫 13 例、退形成性星細胞腫 28 例、乏突起膠腫 7 例、退形成性乏突起膠腫 7 例、乏突起星状膠腫 1 例であった。IDH 変異は 27 例に認めた。IDH 変異のある 27 例中、ATRX loss 症例は 9 例（33.3%）で、組織学的な内訳はびまん性星細胞腫 5 例、退形成性星細胞腫 4 例で、全例が星細胞系腫瘍であった。一方、IDH 変異のある 27 例中、ATRX retention 症例は 18 例(66.6%)であったが、組織学的な内訳は、乏突起膠腫 12 例、退形成性乏突起膠腫 3 例、退形成性星細胞腫 3 例で、15 例(83.3%)が乏突起膠腫系の腫瘍であった。

生存解析では、ATRX loss 群は ATRX retention 群に比べて有意に予後が悪い結果であった(p=0.0227)。全生存期間で比較すると、ATRX loss 群で 5 年生存率が 55.6%(95%CI 20.4-80.5%)、10 年生存率が 37.0%(95%CI 6.80-69.3%)であったのに対し、ATRX retention 群では 5 年生存率が 92.3%(95%CI 56.6-98.9%)、10 年生存率が 70.3%(95%CI 32.2-89.6%)であった。メチオニン PET の

解析では、T/N 比の平均値は ATRX loss 群 は 2.20±0.53 で、ATRX retention 群 の 3.28±1.32 と比較して統計学的に有意に低かった(p=0.0171)。一方で、腫瘍の増殖能を Ki-67 染色で計測評価したところ、両群に有意な差は認めなかった(5.80±3.84 vs. 6.89±5.56, *p*=0.877)。

<考察>

本研究では、IDH 遺伝子変異をもつ WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマに焦点を当て、メチオニン PET の T/N 比が、ATRX retention 群と比較して ATRX loss 群で有意に低いことを示した。また、ATRX loss 群は、ATRX retention 群と比較して有意に予後が悪いことを示した。近年の研究においては、乏突起膠腫において 1p/19q 欠失がメチオニン PET の T/N 比と相関することが明らかとなっている。しかしながら、ATRX とメチオニン PET の TN 比との関連については我々の知る限り報告はなされていない。我々の研究は、IDH 変異をもつ WHO グレードⅡ,Ⅲのグリオーマにおいて、ATRX と 11C メチオニン取り込みとの関連を初めて示すことができた。この結果は、ATRX によって分類される 2 群が、生物学的特徴が異なることを示している。

メチオニンの取り込みは、タンパク合成とアミノ酸輸送に影響されると考えられているが、Ki-67 で示される増殖能には差がなかったにもかかわらず T/N 比には有意な差が見られたことから、ATRX loss 群と ATRX retention 群の T/N 比の差は、アミノ酸輸送の違いによるものに起因すると考えられた。メチオニンを含む大型で中性のアミノ酸の取り込みは、BBB の細胞膜上に存在する Na 非依存性の共通の輸送システムである Large neutral Amino acid Transporter 1(LAT1)を介して行われ、LAT1 は幾つかの腫瘍で発現が亢進していることが示されており、また腫瘍血管内皮で発現していることがわかっている。先行研究において、乏突起膠腫での 11C メチオニン取り込みの T/N 比が星細胞腫と比較して有意に高いことと、その背景として前者で微小血管領域が有意に多いこと、dynamic susceptible contrast (DSC)-MRI で測定した blood volume で示される腫瘍の血管床が有意に高いことが報告されている。これらの報告の結果は本研究の結果と一致するものである。ATRX loss 群は形態学的に星細胞系腫瘍であり、有意に 11C メチオニンの T/N 比が低くなるものと考えられる。

本研究では、汎用され実践的である免疫染色によって IDH と ATRX とで分子分類を行った。免疫染色での ATRX loss は特異的で ATRX 遺伝子変異とよく一致することが報告されている。ATRX loss は 1p/19q 欠失と相互排他的であることが知られており、煩雑な 1p/19q 欠失の解析の必要性を減じることが可能と思われる。本研究の結果は、IDH と ATRX の免疫染色による分子分類が予後予測や治療法選択において有用である可能性を示唆するものである。

<結論>

IDH 変異をもつ WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマにおいて、ATRX loss を有する群は星細胞系腫瘍から成り、有意に予後が悪く、また 11C メチオニン取り込みの T/N 比が有意に低いことを示した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5335　号 | 荻島　隆浩 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田中　真二<br>副　査　江石　義信、三木　義男 | |

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は癌抑制遺伝子 ATRX 発現と PET 検査における 11C メチオニン取り込みの相関について、IDH 変異をもつ WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマを用いて研究した成果である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

グリオーマにおける ATRX の発現を免疫組織化学染色を用いて解析し、11C メチオニンの取り込み等の臨床病理学的因子との比較検討を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. グリオーマの免疫組織化学染色解析の結果、ATRX loss の症例は組織形態学的には星細胞腫であり、ATRX retention の症例と比較して予後が悪かった。
2. ATRX loss 群の 11C メチオニン取り込み T/N 比は、 ATRX retention 群と比較して有意に低かった(p=0.0171, U-test)。
3. IDH 変異をもつ WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマでは、ATRX 変異と 11C メチオニン PET での T/N 比に相関があることが示された。

以上のように申請者は、WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマにおける新たな生物学的、画像診断学的所見を見出している。これは臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には東京医科歯科大学で初回手術を行い WHO gradeⅡ,Ⅲと診断された 71 例のグリオーマを対象とし、このうち術前のメチオニン PET が得られた 62 例(年齢範囲 19-78 歳、男性 32 例、女性 30 例)を解析している。十分な病理組織学的知識、技術のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示された。東京医科歯科医学部倫理審査委員会の承認を得ており（承認番号 1331）、本研究が十分な準備の上に行われてきたと考えられる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果によって IDH 変異をもつ WHO グレードⅡ,Ⅲグリオーマでは、ATRX 変異と 11C メチオニン PET での T/N 比に相関があることが示されている。そのメカニズムや腫瘍代謝等への関与を解析することにより、今後の研究展開や臨床応用が期待される。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

論文審査の内容を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に値する十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 梅本　朋幸 |
| 論文審査担当者 | 主査　根本　繁<br>副査　古川　哲史、荒井　裕国 |
| 論　文　題　目 | Optical coherence tomography assessment of new generation mesh-covered stents after carotid stenting |

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

次世代頸動脈用メッシュカバードステントは，従来型ステントに比べて，周術期の合併症を低減すると期待されている．ステント留置後に，メッシュ及びステントストラットがどのようにプラークを圧排しているのかを詳細に観察するため，2種類のメッシュカバードステント（CGUARDステント，ROADSAVERステント）を用いて，ステント留置後に光断層撮影（Optical Coherence Tomography: OCT）を施行し，ストラット圧着不良およびプラーク突出の頻度に関して検討した．ストラット圧着不良頻度に関しては，2つのステント間で，ほぼ同程度であった（CGUARD 20.5% vs ROADSABER 26.8%, p = 0.26）．プラーク突出頻度に関しては，CGUARDステントで少ない傾向が見られた(CGUARD 10.8% vs ROADSABER 20.7%, p = 0.05)．これらのデータを，同様のプロトコール下で，従来型ステントを用いて行った研究データと比較した．メッシュカバードステントのストラット圧着不良は，従来型ステントであるクローズドセル型ステント（29.8%）とオープンセル型ステント（13.2%）の中間であった．プラーク突出は，従来型ステントよりもメッシュカバードステントで低い傾向が見られた．研究期間を通じて，臨床イベントは認めなかったため，OCTで観察されたこれらの所見の臨床的意義は不明である．しかしながら，メッシュカバードステントでは，ストラットから突出したプラークがメッシュ構造により押さえられ血管内腔への突出に至っていない画像所見を数多く認めており，手技中の遠位塞栓予防に関しては従来型ステントよりも優れていると予想される．また，このメッシュ構造により手技後に生じる遅発性プラーク突出も低減できる可能性が示唆される．

〈緒言〉

頸動脈ステント留置術(Carotid Artery Stenting: CAS)は頸動脈内膜剥離術の代替治療になりつつある．遠位塞栓予防フィルターや近位保護法の開発などにより，周術期合併症は減してきた．術後に発生する塞栓性合併症の原因の一つとして，ステント留置後に生じるプラーク突出が注目されている．血管内超音波検査（IVUS）や光断層撮影（OCT）などの血管内画像検査法を用いることにより，ステント留置後のプラーク突出について詳細に評価することが可能である．OCTを頸動脈で施行すること安全性や有効性に関しては，いくつかの報告がなされてきている．最近になり，いくつかのタイプのメッシュカバードステントが開発されてきており，メッシュ構造により留置後のプラーク突出を減らせる

のではと期待されている．従来型ステントと比較してメッシュカバードステントは周術期合併症が少ないという報告はいくつかあるが，メッシュカバードステントの種類による違いを検討した報告はこれまでになく，OCTを用いて評価した報告もない．今回我々は，異なる２つのメッシュカバードステントに関して，留置後にOCTを施行しストラット圧着不良やプラーク突出について評価した．また，以前報告した従来型ステントのデータと比較し検討した．

〈方法〉

イタリア国内の２施設において，２０１４年１０月から２０１５年７月までの間に，メッシュカバードステントを用いて治療し，OCTを施行し得た内頚動脈狭窄症患者16名を対象とした．治療対象は，NASCET法で，狭窄度が80％以上の症候性患者および，狭窄度が50％以上の無症候性患者とし，臨床的特徴を術中及び術後に前方視的に収集した．術前に体表ドップラーエコーを用いて評価し，Gray-Weale分類に基づいて以下の4タイプに分類した（タイプ1：エコー輝度が低いもの，タイプ2：ややエコー輝度の低いもの，タイプ3：ややエコー輝度の高いもの，タイプ4：エコー輝度が高いもの）．

CASは，遠位保護法あるいは近位保護法を用いて施行した．近位保護法では，モマ・ウルトラ（Boston社）を使用した．遠位保護法では，スパイダーFXフィルター（Covidien社）あるいはフィルターワイヤーEZ(ボストン)を使用した．塞栓予防デバイスを留置した後，OCTで病変部を観察した．その後，すべての症例で次世代メッシュカバードステントを留置した．ステント径は，総頚動脈の径を参照として決定した（総頚動脈径+1mm）．ステント長は，病変を全てカバーするように決定した（病変の遠位端および近位端+0.5mm）．全ての症例で規定圧によるバルーン後拡張を行い，残存狭窄率30％以下を手技成功と定義した．

本研究においては，次世代メッシュカバードステントとして，CGUARDステント（InspireMD社）およびROADSAVERステント（Terumo社）の2種類を使用した．これらのステントはメッシュ構造が互いに異なっている．CGUARDステントは，ポリエチレンテレフタレート製のメッシュがナイチノールステントの外側に存在しており，網目の径は165μmである．これに対して，ROADSAVERステントは，ナイチノール製のメッシュがナイチノールステントの内側に存在しており，網目の径は375μmである．

OCT画像は全て，カテーテル治療の内容を知らされていない，2名の医師により解析された．解析方法は，ステント留置部の断面を1mmスライスずつ観察し，ストラット圧着不良やプラーク突出に関して評価した．ストラット圧着不良症例の定義は，同一断面で5個以上のストラットが血管壁と200μm以上の距離があるものとした．プラーク突出症例の定義は，ストラット間から何らかの組織が突出しているものとした．

さらに，このようにして得られたデータを，同様のプロコトール下で施行された従来型ステントを用いた過去の報告と比較検討も行った．従来型ステントの内訳は，クローズドセル型が17症例，オープンセル型が13症例，ハイブリッド型が10症例であった．

1次評価項目は，それぞれのステントにおける，ストラット圧着不良およびプラーク突出の頻度とした．2次評価項目は，入院中の合併症および30日以内の全死亡，脳卒中とした．

〈結果〉

全ての症例で，解析に適したOCT画像が得られまた，全ての症例で血行再建に成功した．．CGUARD

ステントは11症例（68.7%）に，ROADSAVERステントは5症例（31.3%）に用いられた．患者背景に関して両群間に差は認めなかった．いずれの症例においても周術期及び30日までに死亡及び脳卒中は認めなかった．

OCT画像解析では，症例につき平均16±4スライスが得られた．全248スライスを，ストラット圧着不良およびプラーク突出の頻度に関して評価した．ストラット圧着不良は，CGUARD群およびROADSAVER群に有意差は見られなかった（20.5% vs 26.8%; p = 0.26）．プラーク突出は，CGUARD群の方がROADSAVER群に比べやや少ない傾向が見られた（10.8% vs 20.7%, p = 0.05）．しかしながら，術前の体表ドップラーエコーによるプラーク診断では，CGUARD群にのみタイプ4の症例が見られていた．そこで，このタイプ4の症例を除外して比較検討したところ，両群に明らかな差は認められなかった（17.7% vs 20.7%, p=0.70）．

従来型ステントとの比較では，メッシュカバードステントのストラット圧着不良は，クローズドセル型（29.8%）とオープンセル型（13.2%）の中間であった．プラーク突出は，従来型ステントよりもメッシュカバードステントで低い傾向が見られた．

〈考察〉

本研究は，異なる種類の次世代メッシュカバードステント留置後の所見に関して，OCT を用いて比較検討した初の報告である．従来型ステントと比較して，柔軟性およびプラーク突出予防に関して，非常にバランスの取れたステントであると言える．しかしながら，メッシュカバードステントであっても，完全にプラーク突出を防ぐことは出来ないため，体表エコーや MRI によるプラーク評価が重要である．もし，不安定なプラークが疑われた場合には，近位保護法による手技が安全であると考えられる．また CAS 後の塞栓性合併症は，術中よりも術後に多く発生している．抗血小板薬の効果不十分やストラットの圧着不良により生じたステント内血栓が術後の塞栓性合併症の原因になっているかもしれない．一方で，CT 検査を用いて術後あらたに生じたプラーク突出を観察した報告がある．この『遅発性プラーク突出』現象も，術後の塞栓性合併症の原因として考えられる．今回の研究では術後に CT 検査を行っていないので，次世代メッシュカバードステントを用いた場合にも，遅発性プラーク突出が生じているかは不明である．しかしながら，ステントストラットとメッシュの間にプラーク突出が留まっている画像が観察されたことから考えると，次世代メッシュカバードステントが血管内腔へのプラーク突出を防ぐ効果は，術中だけでなく術後も持続するものと期待される．

一方で，メッシュ構造が追加されているため，術後の抗血小板薬 2 剤投与期間は少なくとも 3 ヶ月以上必要と報告されている．またステント再狭窄やステント血栓症の頻度についてはまだデータがないため，長期的なフォローアップも必要である．

〈結論〉

次世代メッシュカバードステントの留置後の所見を OCT で観察した．プラーク突出が従来型ステントと比較して少なかった．これにより術中および術後の塞栓性合併症を低減できる可能性がある．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5336　号 | 梅本　朋幸 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　根本　繁<br>副　査　古川　哲史、荒井　裕国 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、頚部内頚動脈狭窄症に対するステント留置術において新しいメッシュ被覆型ステント２機材を用いた治療を治験として実施している。ステント留置術の際に問題となるアテローマプラークがステントの strut から逸脱する plaque protrusion を従来の血管内超音波（IVUS)より高解像度の Optical Coherent Tomography（OCT)を用いて観測を行い、その結果を分析した。どちらのメッシュ被覆型ステントも臨床的には良好な結果を示した。plaque protrusion に関しては、かなり高い陽性所見が得られたが、合併症発現には至らなかった。OCT は高解像度のために従来の IVUS では検出できない微細な病変まで検出可能であった。Plaque protrusion が発生してもステント表面のメッシュ被覆により血栓形成、塞栓形成に対する予防効果があると推測された。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

ステント留置術の新しいデバイスによる治験と OCT という新しい診断技術の導入は独創性が認められる。

２）社会的意義

脳血管障害の血管内治療においてデバイスの改善は重要な課題であり、それと共に治療における診断技術の改良により、治療成績向上に貢献すると期待され、社会的意義は大きいと考えられる。

３）研究方法・倫理観

留学先での治験は承認されたプロトコールに則った手技で実施され、倫理性においても十分基準を満たしていると考えられる。

４）考察・今後の発展性

新規のデバイスが我が国でも承認されて臨床応用される見込みがあり、OCT については基礎的なものは既に導入されており、ステント留置術で今後さらに発展的に普及することが期待される。これらの点において、本研究は今後の臨床研究に大いに貢献できると考えられる。

３．その他

特記事項なし。

４．審査結果

以上をふまえ、本論文は本学博士（医学）の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 梅澤　佳央 |
| 論文審査担当者 | 主査　東田　修二<br>副査　田中　真二、倉田　盛人 |
| 論　文　題　目 | Molecular mechanisms for enhancement of stromal cell-derived factor 1-induced chemotaxis by platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) |

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

PECAM-1は接着分子の一つで、細胞接着や遊走の制御に関与している。今回私たちは、ケモカインであるSDF−1が様々な造血細胞株や白血病細胞株においてPECAM−1のITIMモチーフのチロシンをリン酸化することを見出した。キナーゼ阻害剤を用いた検討から、SDF−1刺激下にLynやBTK、Jak2によりPECAM−1がリン酸化を受けることが確認され、それらのキナーゼ阻害によりSDF−1誘導性の遊走抑制が観察された。また、32Dcl3細胞ではPECAM−1の過剰発現によってSDF−1に対する遊走能は亢進し、それと相関してSDF−1によるPI3K/Akt/mTORC1経路やsmall GTPaseであるRap1の活性化が亢進していた。さらに私たちは、PECAM−1とSDF−1の受容体であるCXCR4が結合していることを、293Tを用いた一過性発現系において確認した。PECAM−1の過剰発現により、CXCR4の発現自体は変化がみられないものの、SDF−1刺激後のCXCR4のエンドサイトーシスの抑制が観察された。CXCR4のエンドサイトーシス抑制変異体発現細胞ではPECAM−1過剰発現細胞と同様にSDF−1に対する遊走、PI3K/Akt/mTORC1シグナル、Rap1の活性化が亢進していた。これらの結果より、PECAM-1はCXCR4とのphysical associationを通じてCXCR4の細胞表面発現を維持し、それがPI3K/Akt/mTORC1シグナルやRap1の活性化に繋がり、細胞遊走を増強するものと考えられた。

〈緒言〉

SDF−1は骨髄間質細胞から産生されるケモカインの一つで、遊走や接着能を増強させることにより骨髄への造血細胞集積に関与する。SDF−1のGタンパク共役受容体であるCXCR4への結合により$G\alpha_i$サブユニットが解離し、PI3K/Akt経路やMEK/Erkシグナルや様々なsmall GTPaseが活性化する。この他にもJak2やLyn、BTKなどのチロシンキナーゼもSDF−1による活性化が報告されているが、SDF−1/CXCR4経路による細胞遊走亢進のメカニズムは依然として不明な点が多い。CXCR4はSDF−1の結合によりエンドサイトーシスが起こり速やかに細胞内に移動する。その際にC末端のセリンのリン酸化が重要と報告されており、この近辺に変異をもつ先天性疾患（WHIM症候群）や原発性マクログロブリン血症の一部ではエンドサイトーシスが阻害されることにより持続的なSDF−1/CXCR4シグナルの増強が起こり、骨髄への細胞集積が亢進することが知られて

いる。

PECAM−1は130kDaのイムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型の接着分子の一つである。細胞内にチロシンを含むITIMを二つもち、これらのチロシンリン酸化がSHP2に代表されるアダプター分子の結合を通じて細胞内シグナル伝達にも関与していると考えられている。ノックアウトマウスの研究などから、PECAM−1がSDF−1に対する遊走亢進に関与することが報告されているが、その機序は依然として不明な点が多い。

今回我々はPECAM−1がSDF−1によりITIMのチロシンリン酸化を受けることを見出した。そこで本研究ではPECAM−1がSDF−1/CXCR4シグナルを通じて細胞遊走亢進に寄与するメカニズムを検討し、PECAM−1がCXCR4との相互作用からCXCR4のエンドサイトーシス抑制効果を持ち、結果としてPI3K/mTORC1経路やRap1の活性化を増強させ、遊走能の亢進に繋がることを見出した。

〈方法〉

造血細胞株32Dcl3、白血病細胞株であるUT7等を用いてSDF−1による遊走やPECAM−1のリン酸化の検討を行った。また、32D細胞にレトロウイルスベクターを用いてPECAM-1やその変異体およびCXCR４やその変異体を発現させ検討を行った。また、293T細胞での一過性発現系を用いても検討を行った。PECAM-1のチロシンリン酸化は免疫沈降と免疫ブロット法にて検討し、Rap1の活性化はGST-RalGDS-RBD fusion proteinを用いたアフィニティ精製を用いて行った。細胞遊走能はポアサイズ5μMのポリカーボネート製メンブレンインサートを用いて行った。PECAM−1やCXCR4などの細胞表面発現や一部の細胞内タンパクの活性化に関してフローサイトメトリー法を用いた検討も行った。

〈結果〉

造血細胞株32Dcl3や白血病細胞株であるUT7においてSDF−1の刺激によるPECAM−1のITIM特異的なリン酸化が観察された。BTKやLynなどのキナーゼがPECAM−1のリン酸化を担っているとの報告があるが、我々の検討でも32Dcl3においてSDF−1刺激によりBTKやLynの活性化が観察され、BTK阻害薬のibrutinib、Lynを含むSrc family kinaseの阻害薬であるdasatinibによりSDF−1によるPECAM−1のチロシンリン酸化が著明に抑制された。さらに、293Tを用いた一過性発現系でJak2とPECAM−1を共発現させるとPECAM−1にリン酸化が得られ、一部の骨髄増増殖性疾患で見られるactive mutationであるJak2−V617Fとの共発現でPECAM−1のリン酸化は著明に増強した。また、SDF−1によるPECAM−1のリン酸化はJak2阻害薬であるruxolitinibにより一部抑制されていた。このことからBTK、Lynに加えJak2もSDF−1によるPECAM−1のチロシンリン酸化に関与していると考えられた。

PECAM−1を過剰発現させた32Dcl3ではSDF−1に対する遊走が亢進し、それと相関して、SDF−1刺激によるPI3K/Akt/mTORC1経路とsmall GTPaseであるRap1の活性化が亢進した。PI3Kの阻害薬やRap1のGAPであるSPA-1発現を用いた検討ではSDF−1刺激下にこれらの経路は独立して活性化し、遊走能亢進に寄与すると考えられた。

293Tを用いた一過性発現系おいて、免疫沈降法により、PECAM−1とSDF−1受容体である

CXCR4のphysical associationが観察された。32Dcl3細胞ではPECAM−1発現増強にともなうCXCR4の発現への影響は見られなかったが、SDF−1刺激後のCXCR4のエンドサイトーシス抑制が観察された。CXCR4のエンドサイトーシス抑制変異体を発現させた32D細胞では、CXCR4野生型発現と比較して有意にSDF−1に対する遊走、PI3K/Akt/mTORシグナル、Rap1の活性化が亢進していた。これらの結果から、PECAM−1はCXCR4との相互作用によりCXCR4の細胞表面発現を維持し、それを通じて細胞遊走に寄与すると考えられた。

〈考察〉

我々は今回SDF−1によるPECAM−1のITIM特異的なチロシンリン酸化を報告し、BTK、Lyn、Jak2によりそのリン酸化が制御されることを見出した。特に一部の骨髄増殖性疾患で見られるJak2のactive mutationであるJak2-V617Fが野生型と比較して非常に強くPECAM−1をリン酸化しており、骨髄増殖性疾患の発症や治療抵抗性にPECAM−1が関与している可能性も考えられる。

PECAM−1の発現により32Dcl3におけるSDF−1に対する遊走亢進が観察された。ITIMのチロシンをフェニルアラニンに変えたPECAM−1変異体を発現させた32Dcl3細胞でも遊走亢進は認められたが、PECAM−1の変異体はホモフィリックな結合により内在性のPECAM−1のリン酸化を亢進させうることが考えられ、この結果からITIMのリン酸化が遊走能に重要であるということは難しい。しかし、dasatinibやibrutinibなどを用いてPECAM−1のリン酸化を阻害するとSDF−１に対する遊走が抑制されることから、ITIMのリン酸化が遊走亢進に関与することは十分に考えられる。

我々の検討では、PECAM−1による遊走亢進にはmTORC1とRap1の活性化がそれぞれ独立して重要な役割を果たすことが示された。我々はこれまでも様々なサイトカインがRap1を通してインテグリンを活性化し、細胞接着能が亢進することを報告している。Rap1のGEFに対するアダプター因子であるCrkLの発現などはPECAM−1の発現により変化が見られず、mTORC1やRap1の活性化がどのような機序でSDF−1に対する遊走亢進を誘導するのかさらなる検討が望まれる。

293T を用いた検討では PECAM−1 と CXCR4 の間に physical association が認められ、その相互作用から SDF−1 による CXCR4 のエンドサイトーシスを抑制し、このことが mTORC1 や Rap1 の活性亢進につながると考えられた。CXCR4 の C 末端セリン近傍の mutation は原発性マクログロブリン血症において頻繁に認められ、SDF−1/CXCR4 シグナルの増強が治療抵抗性に繋がる可能性が示唆されている。PECAM−1 による CXCR4 下流のシグナル増強が SDF−1 に富む骨髄微小環境において造血器腫瘍に治療抵抗性を付加する可能性も考えられ、今後のさらなる検討が望まれる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5337　号 | 梅澤　佳央 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　東田　修二<br>副　査　田中　真二、倉田　盛人 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、血球系細胞に対する SDF-1 刺激により、その受容体である CXCR4 の下流にある Lyn や JAK2 を介して PECAM-1 がリン酸化され、一方、PECAM-1 は CXCR4 と結合して CXCR4 の細胞表面発現を維持し、これらの作用により細胞の遊走能が亢進するという分子機序をを新たに見出して報告した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

PECAM−1 が SDF−1 刺激による遊走亢進に関与することが報告されていたが、その分子機序は不明であった。本研究により、SDF−1、PECAM−1、CXCR4 とこれらの下流のシグナル伝達分子との関連が明確になったことは先駆的であり、評価に値する。

２）社会的意義

本研究で PECAM−1 や CXCR4 の細胞に対する作用が明らかになったことで、例えば、*CXCR4* 遺伝子に変異を有する原発性マクログロブリン血症などの血液腫瘍の病態解明につながり、臨床的にも極めて有用な研究成果であるといえる。

３）研究方法・倫理観

本研究では種々の培養細胞に対して、SDF−1 刺激やシグナル阻害剤を添加し、あるいは変異を有する PECAM−1 や CXCR4 を発現させて、種々のシグナル蛋白の活性化を緻密に解析している。これらは、申請者の細胞分子生物学に関する高度な知識と技能の裏付けのもとに遂行されており、極めて周到な準備と検討の上に行われたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究の結果からでは解決できていない事象や、マウス細胞とヒト細胞での違いによる結果への影響なども十分に認識しており、今後の研究において、これらを解明することにより、PECAM−1 と CXCR4 の細胞遊走における役割が一層明確となり、この領域の研究の発展に寄与すると期待される。

３．その他

なし

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 冨井　知春 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　真二<br>副査　石川　俊平、明石　巧 |
| 論　文　題　目 | TPX2 expression is associated with poor survival in gastric cancer |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

TPX2 は微小管関連タンパクで、紡錘体の形成に必要なたんぱく質である。TPX2 は複数の癌で過剰発現となり、腫瘍の増殖と転移に関連することが報告されている。しかし、胃癌における TPX2 の役割に関してはほとんど報告がない。今回我々は、胃癌患者における TPX2 の発現と臨床病理学的因子および予後との関係を調べた。当院で切除された胃癌 290 症例を対象とし、免疫組織染色法にて TPX2 の発現を評価した。また 19 症例を対象として qRT-PCR 法にて TPX2 の発現を評価した。まず、mRNA レベルにおいては、非癌部に比べ癌部での TPX2 が高発現であった（p=0.004）。免疫組織染色法においては、TPX2 の高発現を 123 例（42.4%）に認め、年齢、組織学的分化度、深達度、リンパ節転移、stage、遠隔転移や再発との関連を認めた。また TPX2 高発現群では DSS（p=0.004）、RFI（p=0.013）に関して予後の悪化を認めた。TPX2 の発現は、胃癌においても腫瘍の進行に関連し、予後の悪化と関連することが示された。

＜背景＞

胃癌の死亡率は減少傾向とはいえ、癌による死因の上位にある。限局した胃癌に対しては、手術による切除が一番の治療法だが、進行した症例では切除後の再発も多い。また化学療法を施行しても、切除不能胃癌や再発胃癌の全生存期間は 10-14 か月と短いのが現状である。それゆえ、胃癌の新しいバイオマーカーを発見することは、胃癌治療にとって大きな意味を持つことと考える。

TPX2 は、染色体の 20q11.1 に位置する微小管関連タンパクである。その出現は細胞周期によって統制されており、G1-S 期に出現し、S-G2 期に核内、分裂期に紡錘体に存在し、細胞分裂の終了とともに消失する。Aurora-A、Eg5 と伴って、微小管の組み立てを制御し、紡錘体の安定化をはかり、正常な紡錘体の二極化と染色体分裂に欠かせないタンパクである。

肺癌、肝臓癌、大腸癌、膵臓癌、甲状腺癌、子宮癌といった癌で、TPX2 の高発現が報告されている。さらに、肺癌、肝臓癌、大腸癌においては、TPX2 の高発現が予後の悪さと相関することが報告されている。しかしながら、TPX2 と胃癌との関連に関しての報告はほとんどなく、今回我々は手術の切除標本を使用し、TPX2 の発現と臨床病理学的因子および予後との関連につい

て検討した。

＜方法＞

患者

2003 年 1 月から 2008 年 12 月の間に、当院で施行された胃癌患者 290 人を対象とした。術後のフォローアップは 3-6 か月毎に、CT、腹部エコー、腫瘍マーカーを測定した。遠隔転移を有する患者や再発患者に対しては、S-1 を使用した化学療法を行った。予後追跡期間の中央値は 62 か月（範囲：2-111 か月）で、その間に 99 人（34%）が死亡し、84 人（29%）が再発による原病死、15 人（5%）が他病死している。

RNA 抽出と cDNA 合成

胃切除術施行後速やかに、癌部辺縁と正常粘膜よりそれぞれ検体を採取し、RNA later (Qiagen, Valencia, CA)に浸漬し、-80 度で保存した。Total RNA の抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen) を使用し、Total RNA の濃度測定は、UV spectrophotometer (Beckman Coulter) を使用した。cDNA は、10μg の total RNA を High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写し、作成した。

Real-time quantitative reverse transcription PCR

7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。TPX2 のプライマー (Hs00201616_m1)、TaqMan gene expression assays を用いて、Relative Quantification Study Software を使用し、相対定量法（ΔΔCt 法）で定量した。

免疫組織染色方法

脱パラフィン後、賦活液は 1×Tris-EDTA,Ph8.0 を使用し、マイクロウェーブ法（98℃, 25 分）にて賦活化処理を行った。過酸化水素水を使用したブロッキングの後、一次抗体として mouse monoclonal antibody, sc-376812 (Santa Cruz Biotechnology)を 50 倍希釈にて使用し、4℃で一晩（16 時間）反応させた。二次抗体には、Histofine Simple Stain Max PO [MULTI] (Nichirei)を使用し 30 分反応させ、発色は Histofine Simple Stain DAB Solution (Nichirei)を使用し 20 分反応させた。

免疫染色の評価方法

核が茶色に染色されているものを、濃さに関わらずプラスと評価した。1 つのスライドの中で、よく染色されている視野を 5 つ選び、著者と共著者（高木洋子氏）の 2 人が各々カウントし、結果が食い違った場合は再度評価し直した。5%以上染色されているものを高発現、5%未満のものを低発現とした。

統計解析

癌部と正常粘膜の mRNA の発現量に関しては t-検定を行った。臨床病理学的因子と免疫組織染色結果に関しては、χ2 検定と Mann-Whitney U 検定を行った。予後と免疫組織染色結果に関して

は、disease-specific survival (DSS)と relapse-free interval (RFI)で評価し、Kaplan-Meier curve を描出し、log-rank 検定を行った。P<0.05 を統計学的有意差ありとした。

＜結果＞

mRNA 発現に関しては、19 検体の癌部と正常粘膜の mRNA 発現を評価したが、正常粘膜に比較して癌部での TPX2 発現が有意に高かった（p=0.004）。免疫組織染色に関しては、290 症例を染色し、123 例（42.4%）が TPX2 高発現（5%以上）であった。TPX2 は主に癌組織の核に存在し、正常組織の核には存在しなかった。TPX2 発現と臨床病理学的因子の関係については、年齢（<65 vs. ≥65, p<0.001）、分化度（differentiated vs. undifferentiated, p=0.002）、深達度(T1 vs. T2 vs. T3 vs. T4, <0.001)、リンパ節転移度(N0 vs. N1 vs. N2 vs. N3, p<0.001)、stage(I vs. II vs. III vs. IV, p<0.001)、遠隔転移や再発の有無(presence vs. absence, p=0.02)が TPX2 の高発現と関連していた。予後に関しては、TPX2 高発現群では、DSS、RFI いずれにおいても予後が悪く、TPX2 高発現群で、5 年 DSS が 65.9%、5 年 RFI が 69.9%であったのに対し、低発現群では、5 年 DSS が 78.1%、5 年 RFI が 82.8%であった。5 年 DSS に影響を与える臨床病理学的因子を多変量解析すると、深達度（p<0.001）、リンパ節転移度（p<0.001）が独立した予後因子となったが、TPX2 は独立した予後因子とはならなかった。5 年 RFI に関しても、腫瘍の部位（p=0.02）、深達度（p=0.001）、リンパ節転移度（p<0.001）が独立した予後因子となったが、TPX2 は独立した予後因子とはならなかった。さらに、再発後の生存期間と TPX2 の発現との関係を検討したが、有意な結果は得られなかった。

＜考察＞

胃癌の外科的切除標本を使用し、TPX2 の発現を mRNA レベルとタンパクレベルで検討した。TPX2 高発現は、胃癌の進行と予後の悪化に影響することが示唆された。

多くの固形癌は aneuploidy（異数体）を示すと言われており、aneuploidy は細胞分裂の異常の結果生じる。TPX2 は微小管関連タンパクで、分裂期に Aurora-A、Eg5 と相互作用し、微小管の組み立てを制御し、紡錘体の安定化をはかる。正常な紡錘体の二極化や細胞分裂に必要不可欠なタンパクである。これを裏付ける報告として、*TPX2*-siRNA-treated マウス胚では、紡錘体の形成不全により、桑実胚で成長が止まった、という報告や、*TPX2*-siRNA によって、四倍体や異数体を生じた、という報告が存在する。

TPX2 は大腸癌、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、甲状腺癌、子宮頸癌など多くの癌で高発現しており、癌の進行度や予後の悪さとの関連が報告されている。また、TPX2 の発現を抑制することが、癌治療に効果的であることを裏付ける報告が多数存在する。例えば、肝臓癌など複数の癌の cell line において、*TPX2*-siRNA は細胞生存能や細胞増殖能を低下させることが報告され、また癌細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。さらに、腫瘍を移植されたマウスに *TPX2*-siRNA を注入すると腫瘍が縮小したという報告もある。また、パクリタキセルとの相互作用に関する報告もあり、膵臓癌の細胞株において *TPX2*-siRNA すると、パクリタキセルへの感受性が上がったという報告もある。これらの報告は、TPX2 が癌治療におけるバイオマーカーとして有効であることを示唆するものと考える。これまで胃癌における TPX2 の発現を報告するものはなかったが、最近我々の報告以外にも同様の報告がなされた。TPX2 の高発現が癌の進行度と予後の悪さと関

連するというもので、さらには胃癌の cell line において、*TPX2*-siRNA することで癌の浸潤、転移と関係する上皮間葉転換を抑制したというものである。今後さらなる検討を重ねることで、TPX2 が胃癌治療のバイオマーカーとなり、胃癌治療に貢献できる日が来るかもしれない。

＜結論＞

TPX2 発現は胃癌患者における癌の進行と予後の悪化に関係する。TPX2 は胃癌の進行に重要な役割を果たしている可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5338　号 | 冨井　　知春 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　田中　真二<br>副　査　石川　俊平、明石　巧 |
|---|---|

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は胃癌における TPX2 発現と臨床病理学因子、予後との関連についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

微小管関連タンパク TPX2 について、当院で切除された胃癌切除症例を用いて mRNA 発現を評価した上、免疫組織染色所見と臨床病理学因子、予後との関連について解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 胃癌 19 症例を対象として qRT-PCR 法にて TPX2 の発現を評価したところ、非癌部に比べ癌部において TPX2 mRNA が高発現であった（p=0.004）。
2. 胃癌 290 症例を対象として免疫組織染色法にて TPX2 の発現を評価したところ、TPX2 蛋白の高発現を 123 例（42.4%）に認めた。
3. TPX2 蛋白高発現群では、年齢、組織学的分化度、深達度、リンパ節転移、stage、遠隔転移や再発との関連を認めた。
4. TPX2 蛋白高発現群では、DSS（p=0.004）、RFI（p=0.013）に関して予後の悪化を認めた。

以上のように申請者は、TPX2 発現が胃癌の進行に関連し、予後の悪化と関連するバイオマーカーとして有効であることを明らかにしている。これは臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には本学医学部附属病院で根治切除がなされた胃癌症例 290 症例が用いられ、免疫組織染色所見と予後の相関を調べている。十分な病理組織学的知識、技術のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示された。また、本学医学部倫理審査委員会の承認を得ており、本研究が十分な準備の上に行われてきたと考えられる（831 消化器癌および乳癌の発生と進展、治療効果、予後に関わる因子の解析）。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果によって TPX2 の発現が胃癌において腫瘍の進行に関連し、予後の悪化と関連する有用なバイオマーカーのひとつとなる可能性を考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

論文審査の内容を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に値する十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 島袋　林秀 |
| 論文審査担当者 | 主査　内田　篤治郎<br>副査　森尾　友宏、宮坂　尚幸 |
| 論　文　題　目 | Handheld fetal Doppler device for assessing heart rate in neonatal Resuscitation |

（論文内容の要旨）


**＜要旨＞**

**背景**：新生児蘇生の心拍数(HR)評価に新生児用 3 誘導心電図（Neo-ECG）の活用が提案されているが、日本の一次分娩施設（産科診療所や助産院）の Neo-ECG の設備は十分とはいえない。本研究の目的は、分娩室蘇生での HR 評価に汎用されている携帯式胎児ドプラ装置(FDD)が Neo-ECG の代用として活用できるかどうか、Neo-ECG との同等性を比較することである。**方法**:低リスク正期産児に対して、出生後から 5 分まで 1 分毎に計 5 回にわたり FDD と Neo-ECG の HR 測定を行い、同等性を比較した。同等性マージンは HR の差を±5 beats/min(bpm)未満および±5%未満とした。また両測定法の HR が表示されるまでの時間を計測した。**結果**：33 症例 155 測定に対して、FDD と Neo-ECG の HR 値は強く相関していた（*r*=0.977）。両者の HR の差の平均値とその 95%信頼区間（95%CI）は−0.123（-0.594～0.345）bpm で、同等性マージン（±5 bpm）の範囲内であった。両者の HR の比の対数変換値とその 95%CI も -0.0003(-0.0020～0.0015)であり、同等性マージン（±5%）に相当する対数変換値である±0.021 の範囲内であった。FDD の HR 評価は 165 測定中 155 測定（93.9%）が 10 秒未満に測定可能であった。**結語**：FDD での HR 評価は Neo-ECG が十分装備されていない一次分娩施設で代用となりうる。


**＜背景＞**

新生児蘇生法の原則は遅延なき有効な人工呼吸であり、新生児の呼吸状態と心拍数(HR)を正確かつ迅速に評価しなければならない。国際蘇生連絡委員会の「心肺蘇生に関わる科学的根拠と治療勧告コンセンサス 2015」では、新生児用 3 誘導心電図（Neo-ECG）の活用が提案されている。分娩室蘇生での Neo-ECG の HR 評価は、聴診やパルスオキシメータより正確で迅速とされているが、日本の分娩場所は、諸外国と異なり一次分娩施設（産科診療所や助産院）が約半分を占める（出生の 53.7%が病院、45.5%が産科診療所、0.7%が助産所）。周産期センターと比較し一次分娩施設の蘇生物品の整備は不十分であり、一次分娩施設への Neo-ECG の普及には時間と費用を要する。

一方、携帯式胎児ドプラ装置（FDD）は、胎児心拍数の測定装置として日本の一次分娩施設でも汎用されている。本研究の目的は分娩室蘇生での HR 評価に汎用されている FDD が Neo-ECG の代用として活用できるかどうか、Neo-ECG との同等性を比較することである。

＜方法＞

**研究デザイン**

Prospective cross-sectional study

**研究対象**

研究対象者は、2016 年 1 月から 10 月までに選択的帝王切開により出生した在胎 37 週以降の正期産児とし、先天奇形のある新生児は除外した。

**プロトコール**

選択的帝王切開時に、蘇生スタッフとは別に研究者が FDD と Neo-ECG のすべての測定を行った。出生後、児の胸郭表面に Neo-ECG の電極を装着し、装着完了から HR が表示されるまでの時間(秒)を記録した。また、胸骨左縁第 2 肋間の胸骨寄りに FDD プローベを当て、生後 1 分から 5 分まで 1 分毎に合計 5 回の FDD と Neo-ECG の HR を測定した。また FDD プローベを胸壁に当ててから HR が表示されまでの時間（秒）を測定毎に記録した。HR 測定に 10 秒以上要するものは、臨床上蘇生の中断を意味するために測定不能とした。

**使用した機器**

使用した FDD は、Fetal Doppler Elite 200 (Atom Medical Corp. Tokyo, Japan)で、3MHz プローベをもつ重量約 265g の携帯式である。FDD の HR 表示範囲は 60-199 beats/min (bpm)で、1 bpm 毎に表示することが可能である。Neo-ECG モニタは、IntelliVue MP5 (Philips Electronics Japan, Tokyo, Japan)で、電極は 13953D (Philips Electronics Japan Ltd.)を使用した。事前に代諾者である親に研究内容を説明し、研究参加への同意を得た。なお、本研究の実施にあたり、聖路加国際病院研究倫理委員会の承認を得た(承認番号 15-R052)。

**分析方法**

FDDとNeo-ECGで得られるHRの差の平均値は、対応のあるt検定を用いて検討した。また両者の相関関係については、ピアソンの相関係数を求め、差分およびFDDのHRをNeo-ECGのHRで除した対数変換値をBland-Altman Plotで確認した。同等性マージンは、差分が±5bpmおよび±5%とした。t検定における95%CIを求め、それぞれの同等性を検討した。統計ソフトには、SPSS Ver22 (IBM, Armonk, New York, USA)を使用した。

＜結果＞

分析対象は 33 症例で、すべて低リスクの正期産児であった。中央値は、在胎週数 38.3 週（37.3-39.6）、出生体重 2,940g（2,364-3,650）、臍帯動脈血 pH7.31(7.16-7.41)、Apgar スコア 1 分 8.1 点（8−9）、5 分 9 点(9)であった。人工呼吸や経鼻的持続陽圧呼吸療法を必要とする症例はなかった。

**同等性の確認**

FDD と Neo-ECG の HR 測定値の相関係数 $r$＝0.977 で、両者の平均値およびその標準偏差は、それぞれ 172.5（±12.1）bpm、172.9（±11.8）bpm であった。両者の差の平均値とその 95%CI は、それぞれ-0.123（-0.595～0.350）bpm であった。出生後の 1 分から 5 分までの各測定時間においても、差の平均値の 95% CI はすべて±2.5bpm 以内であり、同等性マージン（±5bpm）の範囲内を満たした。155 測定中 143 測定が±5bpm 内に分布していた。また、FDD の HR 値を対応する Neo-ECG の HR 値で除した対数変換値と

その 95%CI は -0.00033(-0.0020～0.0015)で、同等性マージン（±5%）に相当する対数変換値である±0.021 の範囲内であった。155 測定中 154 測定が同等性マージン（±5%）の範囲内に分布していた。

**測定時間**

Neo-ECG での測定時間の中央値は 5.2 秒（4—8）で、全症例が 10 秒未満に表示可能であった。一方、FDD では 165 測定中 155 測定(93.9%)が 10 秒未満に HR が表示され、10 秒未満に測定できた HR の計測時間の中央値は 5.6 秒であった。

**＜考察＞**

本研究の結果から、低リスクの正期産児を対象とした新生児蘇生での HR 評価では、FDD と Neo-ECG には±5bpm、±5%の範囲内で同等性があることが明らかになった。Neo-ECG と FDD は HR の検出方法がそれぞれ異なる。Neo-ECG は心臓の電気的活動を捉えたもので、不整脈の鑑別だけでなく HR 評価を持続的に実施できるが、電極付着が困難な場合や電極配線が蘇生の妨げとなる可能性がある。一方、FDD は心臓や血流から反射波を受信し、ドプラ周波数を検出・増幅することで可聴音にし、可聴音の周期から心拍数として算出している。心電図における無脈性電気活動も除外でき、心臓あるいは大血管動脈の血流測定により脳血流を間接的に知ることができるが、持続的な HR 評価は困難で、測定毎に人員が必要となる面もある。

ドプラを活用した新生児の HR 評価の研究は少ないが、いずれもその有用性を示している。Goenka らは、生後 1 分から 8 分の健康な新生児に対して 3MHz ドプラと Neo-ECG の HR 評価を行い、HR の差の平均値とその標準偏差は 3.15（±6.2）bpm、$r$=0.95 で高い相関であったと報告している。Dyson らは生後数日経った新生児 51 例を対象とした研究で、10 秒以上カウントされた Audible Doppler と Neo-ECG の HR の差の平均値とその 95%CI は 0.69（-2.9 to +1.5）bpm、$r$=0.94 であったとしている。

本研究では、3MHz プローベの FDD を使用した 9 割以上の HR 測定が 10 秒未満に可能であった。本研究の FDD プローベ部位は、全例、新生児の胸骨左縁第 2 肋間の胸骨寄りとした。Dyson らは大動脈弓や肺動脈の主分岐に一致する胸骨第 2 肋間 (Louis 角)をプローベ部位とし、ドプラ音が聴取するまで左右にプローベを動かして HR 測定しており、その測定時間は中央値 3 秒(1-45)であったとしている。

本研究の限界は次の 2 点である。第一に、研究対象に人工呼吸や胸骨圧迫が必要な児は含まれていない。特に徐脈（HR100bpm 未満）の新生児仮死を対象とした検討が必要である。第二に、すべての FDD 測定は同一の測定者によって行われている。ドプラ測定は個人差が大きいため、一次分娩施設で活用するためには、新生児蘇生に立ち会うすべてのスタッフにおいて同様な結果が得られることが必要である。

本研究から、FDD は医療費の投資が難しい地域での新生児蘇生にも活用できる可能性が示唆された。また、FDD は電池で稼働することから、ライフラインが乏しい環境でも活用できる可能性もある。

**＜結語＞**

FDD での HR 評価はしばしば 10 秒以上要することがあるが、FDD と Neo-FDD の HR 評価の同等性が示された。日本の一次分娩施設に Neo-ECG が導入されるまでの間、FDD での HR 評価は Neo-ECG の代用となりうる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5339　号 | 島袋　林秀 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　内田　篤治郎<br>副　査　森尾　友宏、宮坂　尚幸 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、新生児蘇生における心拍数評価において、分娩室蘇生での心拍数評価に汎用されている携帯式胎児ドプラ装置（FDD）が、ガイドラインで推奨されている 3 誘導新生児用心電図（NEO-ECG）と同等に使用できることを、低リスク正期産児を対象として検討した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

新生児蘇生における心拍数評価は、自発呼吸の評価と並んで重要な項目であり、出生後ただちに測定し、蘇生の必要性が判断されなければならない。新生児蘇生のガイドラインの変遷を見ても、古くからの聴診法に加えて 2010 年にはパルスオキシメーターが推奨されたが、パルスオキシメーターは、特に末梢の血流が悪いと心拍数の表示までに 90 秒以上を要することがあり、2015 年の改訂では、3 誘導新生児用心電図（NEO-ECG）に置き換えられた。ところが、日本の一次分娩施設では、NEO-ECG の普及は十分でないため、分娩室蘇生での心拍数評価に汎用されている FDD が活用できるのではないかとの着想に至った。本研究は、出生直後の新生児を対象として、FDD と NEO-ECG の心拍数測定の同等性を明らかにした初めての研究である。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

１．　FDD を用いた測定では 90％以上の頻度で、10 秒以内に心拍数の測定値を得ることが可能であった。

２．　FDD と NEO-ECG の心拍数は強く相関し(r=0.977)、155 回の測定のうち、143 回の測定で、両者の差が±５bpm 以内であった。

以上のように、申請者は、FDD と NEO-ECG の間の同等性を明らかにしている。これは、臨床的な実用性という点で、きわめて有用な研究成果であるといえる。

３）研究方法・倫理観

研究には、広く普及している FDD 装置と NEO-ECG が用いられ、出生直後 5 分以内の新生児を対象として、蘇生アルゴリズムの流れの中で、1 分ごとに両装置における測定値が記録され、比較検討された。FDD による測定法は、準備の段階で簡潔かつ再現性の高い方法が検討され、また、

FDD と NEO-ECG の同等性は、Bland-Altman 分布による検討、や FDD と NEO-ECG の測定値の比の対数化により同等性マージンを検討することにより示され、本研究が極めて周到な準備と正確な方法論によって行われてきたことがうかがわれる。

４）考察・今後の発展性

本研究では、低リスク正期産時においては、FDD による測定により、きわめて高率に NEO-ECG と同等の心拍数評価が可能であることが示された。日本の分娩の約半数は一次分娩施設で行われており、一次分娩施設での心拍数評価が NEO-ECG に移行していくまでの橋渡し的な意味を持ち、今後の蘇生コンセンサスやガイドラインに反映されうる研究である。また、医療費投資が難しい地域での新生児蘇生の現場に活用できる可能性もあり、今後の発展が期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 大迫　美穂 |
| 論文審査担当者 | 主査　清水　重臣<br>副査　神奈木　真理、三浦　修 |
| 論　文　題　目 | A20 restores phorbol ester-induced differentiation of THP-1 cells in the absence of nuclear factor-κB activation |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

A20 は tumor necrosis factor alpha (TNFα)-induced protein 3 (TNFAIP3)　とも呼ばれる転写因子 NF-κB によって発現誘導されるユビキチン修飾酵素で、NF-κB 活性化を抑制する機能を有する。A20 の他の良く知られた役割として、TNFα 誘導性の細胞死の抑制がある。単球性白血病細胞 U937 での NF-κB 活性化の抑制は、分化途中におけるアポトーシスを引き起こすことが知られている。しかし、単球からマクロファージへの分化を支える NF-κB 依存性に発現する分子についてはまだよく知られていない。われわれは、単球性白血病細胞株で phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)誘導性分化モデルとして使用される THP-1 細胞と、末梢血中の単球を用いることで、単球からマクロファージへの分化過程で NF-κB の転写活性が亢進するとともに A20 の発現が持続的に上昇することを示した。変異型 IκBα (Super-repressor form of IκBα; SR-IκBα) の強制発現による NF-κB の活性化抑制は PMA 誘導性分化過程において細胞死を引き起こしたが、さらに A20 を強制発現させると THP-1 細胞の細胞死を防ぎ、細胞表面分化マーカーの発現や貪食能の回復をもたらした。変異体実験により、A20 の細胞死抑制と分化能回復の機能は、カルボキシ（C）末端の zinc-finger (ZF) ドメインの働きによるものであり、脱ユビキチン化酵素活性によるものではないことがわかった。A20 遺伝子をノックアウトすると、PMA 刺激によって細胞死が誘導されることも判明した。以上の結果は、A20 が THP-1 細胞における細胞分化と生存を支えることを示している。

＜緒言＞

A20 はもともと内皮細胞において TNFα 反応性に発現する ZF タンパク質として同定された。A20 はユビキチン化修飾タンパクであり、アミノ（N）末端の ovarian tumor (OTU)ドメインにより脱ユビキチン化反応を触媒し、C 末端の ZF ドメインは E3 ligase 活性を有する。A20 は TNFα 刺激下の NF-κB 活性化において receptor interacting protein1 (RIP1)からの K63 ユビキチン鎖の除去と K48 ユビキチン鎖の付加により RIP 1 を不安定化させることで、NF-κB 活性化を抑制する。さらに、A20 は NF-κB 活性化抑制以外の作用として、細胞死を制御することも知られている。一方、単球からマクロファージへの分化過程において NF-κB 活性化が必要であることが報告されている。本研究では、PMA 誘導性の THP-1 細胞の変化をマクロファージ様分化モデルとして用いた。

＜方法＞

単球系白血病細胞株 THP-1 に、NF-κB 反応性プロモーター作動性のホタルルシフェラーゼ遺伝子と、内因性コントロールとして elongation factor 1 プロモーター作動性のウミシイタケルシフェラーゼを発現するレンチウイルスベクターを感染させ、THP-1 レポーター細胞株(THP-1dR)を作製した。THP-1dR 細胞に SR-IκBα や A20、A20 の変異型を発現させて PMA で分化誘導し、caspase-3 の活性化、7-AAD 陽性率、プレートへの細胞接着能、CD-11b の発現率やビーズ貪食能を測定した。末梢血を用いた実験では、末梢血から濃度勾配法を用いて単球を分離し、単球細胞を培養して monocyte derived macrophage (MDM)を得た。A20 のノックアウト実験では lentiCRISPR-A20 を導入したレポーター細胞を限界希釈することで単一の A20 ノックアウト細胞クローンを得て実験に用いた。

＜結果＞

PMA 刺激下の THP-1 細胞では NF-κB の持続的活性化と A20 の発現誘導がみられた

PMA 刺激下での THP-1 細胞における NF-κB の活性化機構を調べるために、THP-1 dR 細胞に 20 nM の PMA を 24 時間投与し、その後、培地を交換し PMA を取り除くという刺激方法を執った。変異型の IκBα を発現することで NF-κB の活性化が抑制されている THP-1 dR SR 細胞と、コントロール細胞 THP-1dR EV を比較した。PMA 刺激では THP-1dR EV 細胞では A20 の急激な発現誘導が見られたのに対し、THP-1 dR SR 細胞では、A20 の発現誘導は見られなかった。また、THP-1 dR EV 細胞では PMA 刺激で 24 時間以内に細胞がプレートに接着したが、THP-1 dR SR 細胞ではこの変化はほとんど見られなかった。また、ヒト末梢血中の単球では A20 の発現がほとんど見られないのに対し、単球由来マクロファージでは A20 の発現が豊富であった。

A20 は THP-1 dR SR 細胞において、PMA 誘導性の分化を回復させた

A20 の役割を見るために、4 種類の細胞プール（EV1-EV2, EV1-A20, SR-EV2, SR-A20）を作製した。SR-IκBα の発現の有無にかかわらず、A20 を発現している THP-1dR 細胞は PMA 刺激後も細胞は生存し、細胞体の接着・伸展が見られた。コントロール細胞 THP-1 dR EV1-EV2 では PMA 刺激後 3 日目で CD11b の発現がみられた。PMA 刺激後 3 日目で生存している他の細胞プールでも同様に CD11b の発現がみられ、ビーズ貪食能に差はなかったが、注目すべき点は SR-EV2 細胞では接着細胞数自体が減少していたことである。これらの結果は A20 が SR-IκBα 発現 THP-1 細胞において細胞死を抑制し、分化を促進することを示している

A20 は THP-1 dR SR 細胞において、caspase-3 活性化と細胞死を阻止する

A20 がどのように細胞の生存と分化を回復させるのかを調べるために caspase-3 の状態を調べた。THP-1 dR SR-EV2 細胞に 20 nM PMA 投与後 18 時間で、活性型である 19KD と 17KD の caspase-3 の存在を western blotting で認めた。SR-A20 細胞では、SR-EV2 細胞に比べ caspase-3 の活性化が減弱していた。同様に、FACS での 7-AAD 陽性細胞の割合は SR-EV2 細胞では EV1-EV2、EV1-A20 細胞に比べて増加しており、この増加は SR-A20 細胞では抑制されていた。興味深いことに、レポーターアッセイでは A20 の発現により EV1-A20 細胞では EV1-EV2 細胞に比べ NF-κB の活性化

は軽度抑制されており、SR-EV2 細胞、SR-A20 細胞でともに著明に抑制されていた。これらの結果は、外因性の A20 発現が NF-κB 依存性転写活性の有無にかかわらず PMA 誘導性の THP-1 細胞の分化を回復させたことを意味する。

A20 の C 末端にある ZF ドメインが細胞生存に必要である

A20 の THP-1 細胞における細胞死抑制作用が A20 のユビキチン化修飾作用によるものかどうかを調べるために、脱ユビキチン化酵素活性を欠損させる OTU 変異、ユビキチン化酵素活性を欠損させる ZF4 変異、両者を欠損させる OUT/ZF4 変異 A20 を、SR-IκBα と共発現した細胞を作製した。SR-IκBα に加え、野生型 A20 やこれらの変異 A20 を発現させた THP-1 dR 細胞では全て caspase-3 の活性化が抑制されていた。この時 NF-κB 活性化はどの細胞でも抑制されており、7-AAD 陽性率も抑制されていた。したがって、ユビキチン化修飾酵素活性は、A20 の THP-1 における細胞死抑制作用に関与していないことが示唆された。

次に、どのドメインが細胞死の抑制に関わっているのかを調べるために、C 末の ZF ドメインを欠いた A20N と、N 末の OUT ドメインを欠いた A20C の欠失変異体を用いて実験した。Western blotting では野生型 A20 と A20C はともに SR-IκBα 強制発現下での PMA 刺激による caspase-3 の活性化を抑制した。一方、A20N の caspase-3 活性化の抑制効果は前者二つに比べて減弱していた。FACS 解析では、7-AAD 陽性細胞の出現率は野生型 A20 発現細胞と A20C 発現細胞ではほぼ同程度であったが、A20N の強制発現は SR-IκBα 発現のみで見られた高い 7-AAD 陽性率を下げなかった。これらの結果は、A20 の C 末端側 ZF ドメインが PMA 刺激による細胞死の抑制に関与していることを示している。

A20 を欠損する THP-1 dR 細胞は分化誘導刺激により細胞死を起こす

内因性の A20 が THP-1 細胞の分化の際に細胞生存のために必要であるかを知るために、Cas9 と *A20* 遺伝子のエクソン 2 を標的とする sgRNA を発現するレンチウイルスベクターを用いて *A20* 遺伝子をノックアウトした。*A20* ノックアウトクローン細胞 A5-1 では、PMA 刺激によりコントロール細胞に比して 7-AAD 陽性細胞の割合の上昇がみられ、接着細胞数も減少していた。次に A5-1 細胞に A20C を強制発現させたところ、PMA 刺激下で 7-AAD 陽性細胞の割合が減少した。これらの結果は *A20* 遺伝子のノックアウトが PMA 刺激下で細胞生存を損ない、A20 の C 末端の ZF ドメインが細胞死抑制に重要であることを示している。

＜考察＞

本研究は、末梢血単球のマクロファージへの分化に伴い A20 が発現誘導されること、THP-1 細胞では NF-κB 活性化が抑制された状態であっても A20 が PMA 刺激による細胞生存と分化を支えられることを示した。過去の同様な分化モデルを用いた論文では NF-κB 活性化が p21 の発現に必要であることや、p21 の発現が細胞周期の G1 期における停止に必要であるなどの報告があったが、NF-κB の標的遺伝子のどれが分化と生存に必要十分であるかは不明であった。A20 の細胞生存作用についてはすでに報告があるが、本研究は細胞分化モデルにおける A20 の細胞死抑制機能について初めての報告である。とりわけ本研究では NF-κB の活性化は抑制された状態で実験して

おり、この条件下では内因性の A20 の発現が抑制されているので、A20 のどのドメインが細胞生存に関わるのかという機能解析を行うことができた。

本研究は、C 末端の A20 の ZF ドメインが caspase-3 活性化の抑制に必要であることを明らかにした。最近の報告では、A20 の 7 番 ZF ドメインや 4 番 ZF ドメインが線維芽細胞実験系において TNFα やサイクロヘキサミドによる細胞死の抑制に重要であることが示されている。THP-1 細胞において SR-IκBα 存在下での PMA による細胞死の誘導メカニズムの全容は不明であるが、A20 が 7 番 ZF ドメインを介して death-inducing signaling complex(DISC)の直鎖ユビキチン鎖に結合し、DISC の活性化を抑えることで細胞死を抑制している可能性が考えられる。*A20* 遺伝子ノックアウト細胞で PMA 刺激後に viability が低下していることは、分化途中の THP-1 細胞において A20 が NF-κB 依存性細胞死抑制産物として重要であることを示している。さらに、PMA 刺激による分化途中の THP-1 細胞は外因性の A20 によって細胞死から守られ、その場合 NF-κB 活性化は必要としないことも明らかになった。

A20 が NF-κB inducing kinase (NIK)の安定化に関与していることという報告や、末梢血中の単球由来マクロファージでは NIK が安定化しているという報告がある。本研究で見出された A20 の発現上昇は、NIK の安定化に寄与している可能性がある。

＜結論＞

本研究は、初代培養マクロファージでの A20 の発現上昇、分化モデル細胞における A20 の細胞死抑制作用、A20 ZF ドメインの作用を示した。マクロファージの分化における A20 の役割について、さらなる研究が必要と考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5340　号 | 大迫　美穂 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　清水　重臣<br>副　査　神奈木　真理、三浦　修 | |

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は､単球からマクロファージへの分化に必要な NF-κB の標的分子として A20 分子に着目し、A20 がアポトーシスの抑制等を介してマクロファージへの分化に寄与することを見いだしたものである。申請者は、単球性白血病細胞株 THP-1 細胞に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を投与してマクロファージに分化させる系を用いて、この知見を明らかにした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

単球からマクロファージへの分化に転写因子NF-κBが重要であることはよく知られていた。しかし、その下流で機能する責任分子に関しては十分な知見がない。本研究は、A20がNF-κBの下流分子としてマクロファージへの分化に寄与していることを明らかにしたもので高く評価できる。

２）社会的意義

本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。

1. THP-1細胞にPMAを投与すると、NF-κB活性化に伴ってA20の発現が上昇し、マクロファージへの分化が誘導された。この時、人為的にNF-κB活性を抑制するとA20の発現が起こらず、THP-1細胞はアポトーシスに陥った。しかし、この際にA20を発現させるとアポトーシスは回避されマクロファージへの分化が観察された。
2. A20のアポトーシス抑制効果には、A20のカルボキシ末端のzinc-fingerドメインが重要であった。
3. ヒト末梢血単球ではA20がほとんど発現しておらず、単球由来マクロファージではA20が高発現していることを見出した。

３）研究方法・倫理観

本研究の遂行には、細胞生物学、分子生物学、血液学などの知識が必要であり、申請者の学識と技術力が伺える。

４）考察・今後の発展性

単球からマクロファージへの分化機構の一端を明らかにしたもので、基礎的、臨床的に有用な

研究である。

３．その他　なし

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 萬代　新太郎 |
| 論文審査担当者 | 主査　澁谷　浩司<br>副査　淺原　弘嗣、古川　哲史 |
| 論　文　題　目 | Generation of Hypertension-Associated *STK39* Polymorphism Knockin Cell Lines With the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 System |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

高血圧の病態には多様な遺伝要因、環境要因が関与しており未だ十分に解明されていない。2009年以降数多くのゲノムワイド関連解析（GWAS）により 50 を超える高血圧感受性遺伝子が明らかにされた。しかしながら、この結果を裏付ける各遺伝子の基礎実験検証は十分に進んでいない。本研究では GWAS で初めて指摘された Serine threonine kinase 39 (*STK39*)に着目した。*STK39* は腎臓における Na 再吸収並びに血管平滑筋収縮制御により血圧調節を担う WNK-SPAK-SLC12A 輸送体シグナル系の中心的役割を果たす SPAK キナーゼのコード遺伝子である。*STK39* イントロンの一塩基多型（SNP）rs3754777G>A は世界一般人集団で約 20%の高頻度アリルであり、メタ解析でも高血圧との関連が証明された。本研究ではこの SNP の生理機能の解明を目的とした。CRISPR/Cas9 システムを用い *STK39* イントロンにこの SNP を組み込んだヘテロ、ホモノックインヒト胎児腎細胞（HEK293T）を樹立し、WNK シグナル各分子について mRNA 量、タンパク量を評価した。ヘテロ、ホモノックイン細胞株において *STK39* mRNA 発現量の段階的増加を認めた。さらに SPAK、主要な SLC12A 輸送体の一つである Na-K-Cl 共輸送体 1（NKCC1）リン酸化蛋白発現量にも同様の段階的増加が認められ、WNK シグナルの活性化が示唆された。SPAK 転写産物の配列変化を認めず、actinomycin D を用いた分解速度の検討で差異を認めなかった事から、この SNP は SPAK の転写活性に影響するものと推察された。この多型は一般人で見られる高頻度 SNP であり、これによる SPAK-SLC12A シグナル活性化がヒト本態性高血圧の成因に深く関与することが示唆された。CRISPR/Cas9 はイントロンを含めた SNP の機能解析にも今後ますます重要なツールとなると思われる。

＜緒言＞

高血圧症は国内外で 3 人に 1 人が罹患する疾患であり、脳卒中、心疾患、腎不全の最大危険因子であることから生命予後、医療経済双方にとって大きな問題である。高血圧の病態には様々な遺伝要因、環境要因が関与しており、その全貌は未だ解明されていない。中でも遺伝要因は 30%から 50%を占めるとされており、実際近年のゲノムワイド関連解析（GWAS）により 50 を超える高血圧感受性遺伝子が明らかにされた。

STE20/SPS1 関連プロリン/アラニンリッチキナーゼ（SPAK）をコードする Serine threonine kinase

39（*STK39*）は GWAS で初めて指摘された本態性高血圧関連遺伝子である。*STK39* イントロン 5 の SNP rs3754777A>G は世界一般集団で 10-30%に見られる高頻度アリルであり、有意な血圧上昇との関連が報告された。近年複数人種におけるメタ解析でも、高血圧リスクとの関連性が加えて証明されている。

SPAK は一方で、稀な遺伝性高血圧性疾患である偽性低アルドステロン症 II 型の責任遺伝子 WNK1、WNK4 キナーゼの重要な基質として我々が報告したキナーゼである。SPAK が中心的役割を果たす WNK-SPAK-SLC12A 輸送体シグナル伝達系は、腎臓における Na 再吸収、並びに血管平滑筋収縮制御により生理的血圧調節を担うことが証明されている。そこで本研究では、CRISPR /Cas9 システムを用いて *STK39* rs3754777 ノックイン細胞株を樹立し、この SNP が SPAK 並びに下流分子の発現量を制御しているか検証した。

＜方法＞

double nicking 用の Cas9 変異体 D10A、guide RNA（gRNA）発現ベクターをそれぞれ構築した。gRNA 発現ベクターは、目的変異部位を挟む周辺配列に相同性のある 23 bp の基本配列（20 bp + PAM 配列 3 bp）をデザインし（The CRISPR Design Tool : http://crispr.mit.edu）、これを組み込んだ 2 種類を構築した。目的一塩基変異を持った一本鎖 DNA オリゴヌクレオチド（ドナーDNA）を準備し、6-well プレートに播種した HEK293T 細胞にこれらをトランスフェクションした。まずゲノム DNA を抽出し、ターゲット SNP 周辺配列の PCR 増幅後、MiSeq（illumina）による増幅配列の ultra-deep sequencing によってノックイン効率が約 1%であることを確認した。ノックイン細胞のセレクションはゲノム DNA の PCR 増幅、変異特異的制限酵素切断、アガロースゲル電気泳動により行い、低ノックイン効率であったことから二段階のセレクション、濃縮を経て、ノックイン細胞株のシングルコロニー化を実施した。樹立したノックイン細胞株を用い、SPAK を始めとした WNK シグナル各分子について mRNA 量を定量 RT-PCR により、タンパク発現量をウェスタンブロットにより検証した。RT-PCR およびサンガーシークエンスにより SPAK エクソン 5-6 の配列変化の有無を検証した。また、確認された SPAK mRNA の変化に関し、actinomycin D を用いた分解速度の検討も行った。

＜結果＞

*STK39* rs3754777 ヘテロ、ホモノックイン HEK293T 細胞株をそれぞれ樹立した。定量 RT-PCR の結果、ヘテロ、ホモノックイン細胞株で SPAK mRNA の段階的な発現増加を認めた。RT-PCR の結果 SPAK 転写産物に塩基の挿入や欠損といった配列変化は認めなかった。また SPAK mRNA の分解速度に細胞株間で差は認めなかった。ウェスタンブロットの結果、ヘテロ、ホモノックイン細胞株において SPAK、リン酸化 SPAK、リン酸化 NKCC1 の段階的発現量増加を認めた。これらの結果から、*STK39* rs3754777 による SPAK の転写活性増加、WNK シグナル活性化が示された。

＜考察＞

近年 GWAS によって、様々な疾患における疾患感受性遺伝子が明らかにされてきた。しかしながら GWAS が通常対象とするのはアリル頻度 5%以上の SNP であり、通常高頻度 SNP の疾患表現型への寄与は小さいことが多い。また GWAS 解析に使用されたタグ SNP が、真の責任変異で

ある保証はない。そのため、GWAS で候補となった遺伝子と疾患との関連性を証明するには、やはり実験的検証が不可欠である。本態性高血圧においても、感受性遺伝子の報告は相次ぐものの個別の実験検証は十分に進んでいるとは言えない。

本研究では CRISPR/Cas9 システムを用いて、*STK39* のイントロンに存在する SNP rs3754777 のノックイン細胞株の樹立に成功した。そして、ノックイン細胞株で SPAK の mRNA、蛋白発現量、リン酸化 NKCC1 の増加が明らかとなった。SNP により SPAK からその下流の SLC12A 輸送体群へとつながるリン酸化シグナルカスケードが活性化することが、SNP による血圧上昇機序と考えられた。この *STK39* rs3754777 は一般人に高頻度のアリルであり、WNK シグナルの活性化による塩分再吸収亢進並びに血管トーヌス調節障害がヒト本態性高血圧の発症に重要な一因子であることが示唆された。

CRISPR /Cas9 システムは Cas9 蛋白、gRNA ベクターによって行うより簡便な第 3 のゲノム編集技術であり、2013 年に開発されて以後、目まぐるしい発展を遂げている。gRNA はゲノム DNA の 20 塩基程度のターゲット特異的配列を捕捉し、それに導かれた Cas9 が DNA 二本鎖を切断する。この修復過程で変異の入ったドナーDNA がテンプレートとなり、一定の確率で目的変異がノックインされる。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行う際には GFP や抗生剤耐性配列などを使用しセレクション効率を高めるのが通例だが、我々の実施した段階希釈法によるクローン化では、野生型株と比してターゲット塩基のみに単一遺伝子変異が組み込まれており、より精度の高い検証を可能にしたものと考えられた。本技術は従来ノックイン検証が困難であるとされたイントロンを含めた SNP の機能解析にも今後有用なツールとなると思われる。

今回の検証により、GWAS で報告されたタグ SNP そのものが機能性変異である事が示された。一方で、*STK39* rs3754777 がスプライス異常等による転写配列変化に依らず SPAK の転写活性を増加させる機序は不明である。この SNP はプロモーターやエンハンサー領域ではなくイントロンに存在する。*in silico* の解析でも SNP 周辺配列を認識しうる既知の転写因子や micro RNA は見当たらなかった。未知の転写制御機構が存在する可能性も示唆され、今後の検証が課題である。

＜結論＞

CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集により、高血圧関連 SNP *STK39* rs3754777 ノックイン細胞株を樹立した。この SNP が SPAK ならびに SLC12A 輸送体群へのシグナル活性化を招くことが、SNP による血圧上昇メカニズムの一端と考えられた。

CRISPR/Cas9 はイントロンを含めた遺伝子多型の機能解析に有用なツールであることが示唆され、今後ますます多分野での発展、汎用が期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5341　号 | 萬代　新太郎 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　澁谷　浩司<br>副　査　淺原　弘嗣、古川　哲史 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、高血圧症に関連する遺伝子 *STK39* の多型ノックイン細胞株の樹立と解析に関する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

ゲノムワイド関連解析（GWAS）により明らかにされた高血圧感受性遺伝子 Serine threonine kinase 39 (*STK39*)は腎臓における Na 再吸収並びに血管平滑筋収縮制御により血圧調節を担う WNK-SPAK-SLC12A 輸送体シグナル系の中心的役割を果たす SPAK キナーゼのコード遺伝子である。*STK39* イントロンの一塩基多型（SNP）rs3754777G>A は世界一般人集団で約 20%の高頻度アリルであるが、この SNP の生理機能の検証は進んでいない。このような背景の下、申請者は CRISPR/Cas9 システムを用い *STK39* イントロンにこの SNP を組み込んだヘテロ、ホモノックインヒト胎児腎細胞（HEK293T）を樹立し、この SNP の生理機能解明を進めており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．ヘテロ、ホモノックイン細胞株において *STK39* mRNA 発現量の段階的増加を認めること。

２．SPAK、主要な SLC12A 輸送体の一つである Na-K-Cl 共輸送体 1（NKCC1）リン酸化蛋白発現量にも同様の段階的増加が認めること。

３．SPAK 転写産物の配列変化を認めず、actinomycin D を用いた分解速度の検討で差異を認めなかったこと。

以上のように申請者は、この多型は一般人で見られる高頻度 SNP であり、これによる SPAK-SLC12A シグナル活性化がヒト本態性高血圧の成因に深く関与することを明らかにしている。実験系を含むこれらの結果は今後の SNP の機能解析においても極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いた SNP を組み込んだヘテロ、ホモノックイン細胞を樹立し、生化学的および分子生物学的解析が適切に行われ、SNP の機能解析を遂行した。これら

手法は、十分な知識と技術の裏付けのもとに行われており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことを窺わせるものである。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究成果によって、CRISPR/Cas9 の技術はイントロンを含めた SNP の機能解析に有用である可能性を考察している。これは先行研究と照らし合せても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 石田　友香 |
| 論文審査担当者 | 主査　寺田　純雄<br>副査　岡澤　均、田中　光一 |
| 論　文　題　目 | Potential role of sirtuin 1 in Müller glial cells in mice choroidal neovascularization |

（論文内容の要旨）

＜目的＞

脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization: CNV)において、sirtuin-1 賦活剤である resveratrol (RSV) のミュラーグリア細胞 (Müller glial cells (MGCs)) への効果を検証した。

＜方法＞

C57BL/6 マウスにレーザー光凝固術によって CNV を作成し、RSV を硝子体注射で投与した。術後７日目に全眼球ホールマウントを作成し IsolectinB4 にて血管内皮細胞を染色し共焦点レーザー走査型顕微鏡で撮影し、CNV の体積を算出した。また、CNV 周囲の MGCs の動態を調べるために CNV 作成と RSV 硝子体注射の１、３、５、７日後に眼球凍結切片を作成し、活性型 MGCs に特異的な抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体による免疫染色を行った。さらに RSV の MGCs への効果を調べるために、生後３～８日のマウスの網膜から取り出した MGCs を初代培養し、抗血管新生因子である pigmented epithelium-derived factor (PEDF)と thrombospondin-1 の mRNA 産生と、MGCs のラテックスビーズに対する貪食能を、RSV 投与群とコントロール群で比較した。

＜結果＞

レーザー光凝固術後、RSV 投与により、CNV 周囲の MGCs は、早期から活性化が促進された。３日目にはコントロール群では活性型 MGCs がわずかに CNV 上に遊走しているだけであったが、RSV 投与群において、活性型 MGCs はコントロール群より多く、また CNV 上とその内部にまで遊走していた。５日目、７日目において、コントロール群では CNV は増大し、その周囲の MGCs は活性化していたが、RSV 投与群では CNV が縮小し、すでに MGCs の活性化は低下していた。一方、７日目までコントロール群では CNV 内部への MGCs の遊走は見られなかったが、RSV 投与群において活性型 MGCs は５日目、７日目に縮小した CNV 内部に観察され続けた。初代培養された MGCs において、RSV は MGCs の GFAP 陽性率を上昇させ、PEDF と thrombospondin-1 の mRNA 発現を亢進させた。また、RSV を投与された MGCs では、ラテックスビーズに対する貪食能が上昇していた。

＜結論＞

RSV は、MGCs を活性化し、また、CNV の発生を抑制した。MGCs は、CNV の治療における新たなターゲットとなる可能性があり、RSV の CNV 治療への応用が期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5342　号 | 石田　友香 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　寺田　純雄<br>副　査　岡澤　均、田中　光一 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文はマウスの脈絡膜新生血管に対するミュラーグリア細胞の反応に sirtuin1 賦活剤である Resveratrol が与える影響を検討したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

加齢性黄斑変性症を初めとする原疾患により発症する脈絡膜新生血管の治療は抗 VEGF 抗体の硝子体注射が主となっているが、効果の認められない症例があり、網膜色素細胞からの VEGF 分泌抑制以外の治療戦略が必要である。このような背景の下、申請者らは脈絡膜新生血管の滲出時に活性化する網膜特異的グリア細胞であるミュラーグリア細胞に注目し、その機能賦活化を介して新生血管の滲出を抑制する可能性を検討している。具体的には過去に脈絡膜新生血管に対して抑制効果の示唆されている sirtuin1 賦活剤である Resveratrol が、ミュラーグリア細胞の機能変調に寄与するか、検討を加えている。難治性眼疾患に対し、新たな治療戦略を探る意味で意義ある着眼点であると評価できる。

２）社会的意義

本研究による主な結果は以下の通りである。

１．　Resveratrol は、初代培養下のミュラーグリア細胞を活性化し、抗血管新生因子の発現を増殖させ、更にその貪食能を亢進させる。

２．　脈絡膜新生血管の動物モデルとしてマウスのレーザー誘発性脈絡膜新生血管に対し Resveratrol の硝子体内注射の影響を検討したところ、新生血管の縮小、新生血管周囲のミュラーグリア細胞の早期の一過性活性化、新生血管巣内部における活性化の持続が観察された。

以上から、Resveratrol はミュラーグリア細胞の活性化に寄与し、脈絡膜新生血管治療の新たなターゲットとなる可能性を有することが明らかとなり、臨床的にも一定の意義ある成果と評価できる。

３）研究方法・倫理観

研究には主としてマウスを使用した初代培養細胞とレーザー誘発性脈絡膜新生血管モデルが用

いられ、それぞれ in vitro と in vivo の観点から Resveratrol がミュラーグリア細胞活性化と脈絡膜新生血管進展経過に与える影響について、機能的、形態学的評価を加えている。動物実験施行における配慮を含めて一定の見識と倫理観にもとづいた研究であると考えられる。

４）考察・今後の発展性

本研究は、論文標題にある sirtuin1 の脈絡膜新生血管における役割というよりも、その賦活剤としてしられる Resveratrol による影響を検討したもので、脈絡膜新生血管滲出発症抑制に至る分子メカニズムにまで直接迫ったものではない。またミュラーグリア細胞の形態的な変化と機能変調の対応付けも限定的であり、結果の解釈については更なる検討と考察が必要である。このあたりの状況についても申請者は一定の理解を下に研究結果を適切に解釈している。実際の治療応用に向けて、更なる考察の深化と研究の発展が期待される。

**３．その他**

特記すべき事項はない。

**４．審査結果**

以上より、本論文による成果は博士（医学）の申請に値する水準にあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中村　政宏 |
| 論文審査担当者 | 主査　吉田　雅幸<br>副査　荒井　裕国、金子　英司 |
| 論　文　題　目 | The evaluation of contralateral foot circulation after unilateral revascularization procedures using indocyanine green angiography |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

片側の血行再建術が対側肢に与える影響に関してインドシアニングリーン血管撮影検査(indocyanine green angiography: ICGA)を用いて検討した。2016 年 1 月から 2016 年 4 月までに当院で待機的に片側の血行再建術を施行し、術前後で ICGA を施行し得た 21 症例を対象とした。ICGA ではパラメーターとしては最大輝度($I_{max}$)、蛍光開始から最大輝度に達するまでの時間($T_{max}$)、蛍光開始から最大輝度の半分に達するまでの時間($T_{1/2}$)を計測した。術前後で比較すると治療側の肢で $T_{max}$ ($P$= 0.016) 、 $T_{1/2}$ ($P$= 0.013)が有意した減少し、対側肢では $T_{max}$ ($P$= 0.013)、$T_{1/2}$ ($P$< 0.001)で有意な増加を認めた。この結果は周術期での治療側における血流改善と対側肢の血流低下を反映しており、片側の血行再建術は対側肢の血流を低下させ、術前の対側肢血流評価が重要であることが示唆された。

＜緒言＞

下肢の血行再建術は末梢動脈疾患(peripheral arterial disease: PAD)による虚血の治療を目的に行われる。血行再建後に対側肢の虚血症状は時に増悪するが、動脈硬化病変の進行や治療側の歩行可能距離延長に伴った対側肢症状の顕性化によるものと考えられている。しかし、重症下肢虚血に対する血行再建術後に対側肢の皮膚血流が減少することが報告されており、この現象について追加の検証は行われていない。周術期の下肢血行動態の評価として足関節上腕血圧比(ankle brachial pressure index: ABI)が広く用いられているが、対側肢で認められる皮膚血流変化については ABI では評価が困難である。一方で、ICGA は末梢動脈疾患を伴う下肢の皮膚血流の評価に用いられるようになっている。今回、我々は片側の血行再建術が対側肢の皮膚血流に与える影響につき ICGA を用いて評価したので報告する。

＜方法＞

本研究は東京医科歯科大学の倫理委員会で承認を受け、対象となった全ての患者から書面で同意を得た。2016 年 1 月から 2016 年 4 月までに当科で 48 症例に対して待機的に血行再建術を行った。このうち、術前後に ICGA を行う同意が得られ、片側のみの血行再建術を行った症例を対象

とした。また、対側穿刺を伴う血行再建や大腿動脈—大腿動脈バイパスの様な対側肢の血行動態に影響を与えうる手術を行った症例は除外したため、対象症例は 21 例となった。術前検査として全症例に対してコンピュータ断層撮影もしくは超音波検査を用いて両下肢の動脈病変を評価した。また下肢血行動態の評価として周術期の ABI、足趾上腕血圧比(toe-brachial pressure index: TBI)、足趾圧(toe pressure: TP)を VaSera VS-1500E™ device (FUKUDA DENSHI, 東京)により計測した。血行再建の臨床的改善は ABI で 0.1 以上の改善もしくは虚血症状の明らかな改善をもって判断した。

ICGA は仰臥位の状態でジアグノグリーン注射用 ™(インドシアニングリーン、第一三共製薬、東京)を右上肢の表在静脈より 0.1mg/kg を静脈注射した後、赤外線カメラシステム(Photo Dynamic Eye™、浜松ホトニクス、浜松)により両側足部を撮影し 5 分間記録した。なお、ICGA は手術前日ないしは前々日および術後 3 日目に施行した。関心領域は両側足部の足関節部から末節骨末梢までの足背全域として、パラメーターとしては最大輝度($I_{max}$)、蛍光開始から最大輝度に達するまでの時間($T_{max}$)、蛍光開始から最大輝度の半分に達するまでの時間($T_{1/2}$)を計測した。また足部血流の変化率を術後パラメーターの術前パラメーターに対する割合として算出した。統計学的解析はエクセル統計 2012™ (Social Survey Research Information Co., Ltd., 東京)を用いた。連続変数の記載は中央値および四分位範囲として、検定はウィルコクソンの符号順位検定、スピアマンの順位相関検定により行い、$P < 0.05$ を有意差ありとした。

＜結果＞

治療した病変部位としては、腸骨動脈：10 例、総大腿動脈：1 例、浅大腿動脈：8 例、大腿—膝窩動脈バイパスグラフト：2 例であった。閉塞病変が 4 例であり、その他は狭窄病変であった。対側肢の病変は明らかな病変のない症例：11 例、腸骨動脈：3 例、浅大腿動脈：5 例、下腿動脈病変：2 例であった。閉塞病変を 2 例で認め、その他は狭窄病変であった。血行再建の術式は血管内治療：17 例、血栓除去および血管内治療：2 例、大腿膝窩動脈バイパス術：1 例、血栓内膜摘除および血管内治療：1 例であった。血管内治療はすべて同側の大腿動脈穿刺で行った。全症例で臨床的改善が認められた。周術期で ABI、TBI、TP はいずれも患側で有意な改善を認めたが、対側肢では有意な変化が認められなかった。

足部の皮膚血流を術前後に行った ICGA の結果により評価したところ、術前の $T_{max}$ と $T_{1/2}$ は術前の ABI と有意な相関を示した ($T_{max}$: $\rho$= -0.459, $P$= 0.003; $T_{1/2}$: $\rho$= -0.401, $P$= 0.010 )。また、治療側では $T_{max}$ が 80.4 (44.6- 110.2)秒から 38.8 (27.2- 65.8)秒、$T_{1/2}$ が 20.7 (17- 30.4)秒から 14.4 (13- 22.7)秒と有意な改善（$T_{max}$: $P$= 0.016, $T_{1/2}$: $P$= 0.013）を認めたが、対側肢では Imax が 83.9 (48.9- 108.3)から 75.6 (49- 84.7)、Tmax が 46.6 (34- 95.8)秒から 82.4 (45- 103.8)秒、 T1/2 が 15.9 (12.6- 19.9)秒から 21.9 (15.9- 27.7)秒と有意な増悪（$I_{max}$: $P$= 0.006, $T_{max}$: $P$= 0.001, $T_{1/2}$: $P$< 0.001）を認めた。次に、対側肢における $T_{1/2}$ の変化率と治療側における $T_{1/2}$ の変化率、治療側の ABI 改善値、および対側肢の術前 ABI について相関関係を調べたがいずれの間にも有意な相関は見られなかった。

＜考察＞

血行再建術は PAD に伴う下肢の虚血症状改善を目的に行われるが、片側の血行再建術が対側に与える影響は不明瞭である。対側肢の症状増悪については動脈硬化病変が主な要因と考えられて

いる。しかし、これまでの報告で、対側肢の病変進行に要する時間は治療を行っていない症例に比べて片側血行再建術後の方が早いことが示唆されている。Nicoloff らは PAD の進行は 5 年間で 22%の症例で認められたと報告している。また、Sigvant らは 5 年間で無症候性の PAD 症例の 7%において下肢跛行症状の出現を、跛行症状の PAD 症例の 21%で虚血症状が増悪したと報告している。しかしながら、de Vries らは片側血行再建術後を施行した PAD 症例では 4 年間に 34.6%から 52.7%に何らかの虚血症状が増悪したと報告しており、血行再建術に伴い対側肢の症状進行が早まることが示唆されている。

本検討では、血行再建術後の対側肢において血行動態の変化は明らかでないものの、ICGA の結果で対側足部の血流が有意に低下することが認められた。これまでにも Saucy らが重症下肢虚血に対する片側血行再建術後の足部皮膚血流についてレーザードップラーを用いて同様の報告をしている。この検討では、術前と手術 10 日後に足底の前足部および踵部で皮膚血流を測定しており、治療側の前足部で 135±67 perfusion unit(PU) から 202±86PU（$P$= 0.001）、踵部で 148±58PU から 203±83PU（$P$= 0.001）と足部皮膚血流が上昇したのに対して、対側肢では前足部で 250±123PU から 2176±83PU（$P$= 0.001）、踵部で 208±116PU から 133±40PU（$P$= 0.001）と足部の皮膚血流は減少した。

今回の短期間の検討においては対側肢で症状が増悪した症例は認められなかった。しかし、ICGA は ABI と比較してより軽微な血流低下の検出に効果的であることが報告されており、術後の皮膚血流低下がその後の虚血症状増悪に関連している事が示唆される。術後の対側足部血流の低下率に影響する因子は本検討では有意なものを認めなかったが、血行再建術施行時に治療側が重症下肢虚血であった症例や対側肢の ABI が低値である症例は対側肢の重症虚血化のリスクが高いことが報告されている。そのため、血行再建術を行う際には術前に対側肢の血流に関しても評価を行うことが必要と考えられる。

片側血行再建後に対側肢の足部皮膚血流が低下する機序は明らかでないが、我々は 2 つの機序を想定している。一つは治療側の血流改善に伴った盗血現象による対側血流の低下である。本検討において、術後早期より対側に明らかな病変のない症例においても対側足部の血流低下が認められており、この事が盗血による影響を示唆しているものと考えられる。しかし、治療側の血流改善の程度や肢の状態と対側肢の血流変化率に関連がないことから、より複雑で全身的な機序の存在が考えられ、一酸化窒素のようなサイトカインの変化に伴う血流変化がもう一つの機序として考えられる。血中の一酸化窒素濃度上昇は血管拡張や虚血肢の血流増加を促すが、血行再建術後には一酸化窒素の血中濃度は低下することが報告されており、対側肢の皮膚血流低下に関与している可能性がある。

＜結語＞

片側の血行再建術後により対側肢の皮膚血流は低下する。術後早期に対側肢の虚血症状の増悪は認めなかったが、中長期的には対側肢の虚血進行と関連している可能性もある。
片側の血行再建術を行う際には、術前に対側の血流についても評価する必要があることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5343　号 | 中村　政宏 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　吉田　雅幸<br>副　査　荒井　裕国、金子　英司 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、片側のみの血行再建術を行った下肢末梢動脈疾患症例に対して術前後でインドシアニングリーン血管撮影検査(ICGA)を実施し、治療側ではいずれも下肢虚血の改善を認めたが、未治療の対側では逆にいずれも有意に血流低下する事象を認めた。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

下肢の血行再建術は末梢動脈疾患(peripheral arterial disease: PAD)による虚血の治療を目的に行われる。これまで、血行再建後に対側肢の虚血症状増悪は見られるが、動脈硬化病変の進行や治療側の歩行可能距離延長に伴った対側肢症状の顕性化によるものと考えられ、定量的に測定された研究は少なかった。本研究ではこれまでにない着眼点を有している。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は、（１）治療側では血流パラメータの有意な改善を認めたが、対側肢では ICGA により計測したパラメータ全てで有意な増悪を認めた。（２）対側肢と治療側とのパラメータ変化に関わる因子として、治療側の ABI 改善値、および対側肢の術前 ABI などを調べたがいずれの間にも有意な相関は見られなかった。これは片側の下肢末梢動脈疾患症例の周術期の管理に関して非常に重要な知見であり、臨床的にも有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

今回の研究では、腸骨動脈：10 例、総大腿動脈：1 例、浅大腿動脈：8 例、大腿―膝窩動脈バイパスグラフト：2 例が用いられた。本研究は医学部倫理審査委員会の承認の元に実施されており、倫理的な問題はない。

４）考察・今後の発展性

本研究でみられた治療側の対側における血流低下現象は大変興味深く、今後の機序解が多いに期待された。

**３．その他**

特記すべきことなし。

**４．審査結果**

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中島　康雄 |
| 論文審査担当者 | 主査　植竹　宏之<br>副査　江石　義信、立石　宇貴秀 |
| 論　文　題　目 | Morphology of the region anterior to the anal canal in males: visualization of the anterior bundle of the longitudinal muscle by transanal ultrasonography |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

男性の肛門管前方における縦走筋層の前束の構造は解剖学的に明らかになっていない。この研究は、縦走筋層の前束およびその周辺の構造の正確な形態を明らかにし、経肛門的超音波検査によって縦走筋層の前束を視覚化する目的で行った。本研究には 7 名の男性解剖体に対し、組織学的調査を行った。加えて、3 名の男性解剖体に対し矢状断面において経肛門的超音波検査を追加し、実際の解剖体で剖出した所見との比較検討を行った。東葛辻仲病院に受診した男性 50 名に対し、経肛門的超音波検査を行い調査した。肛門管前方において、平滑筋と横紋筋が相補的に配置されていた。縦走筋層の前束は平滑筋であり、この領域の相補的配置の中に組み込まれていた。縦走筋層の前束は解剖体に対する超音波検査と実際に剖出した構造物の比較検討により明らかになった。生体に対する超音波検査によって、縦走筋層の前束は長さが平均 8.7mm の hypoechoic layer であった。縦走筋層の前束は超音波検査によって容易に描出された。

＜緒言＞

男性の肛門管前方の構造を正確に理解することは、前立腺癌に対する前立腺摘出術の際の切除線を決めるにあたり非常に重要である。この部位は、肛門管と尿生殖器の間に位置している。女性に比べ男性の構造は特に複雑である。男性の肛門管前方構造において、縦走筋層の前束と呼ばれる構造は以前から研究されており、手術の際に非常に重要とされている。それらの研究では縦走筋層の前束が外肛門括約筋を前方から包み込むような構造になっており、その末梢部が会陰小体に終着していると記載されている。しかし、その縦走筋層の前束やその周辺の肛門構造の詳細はよくわかっていない。会陰領域の構造を調べる際に、経肛門的超音波検査は空間分解能が高く詳細な検討が可能なため注目されている。たとえば、肛門管の構造たとえば内肛門括約筋や外肛門括約筋のような構造はすでに経肛門的超音波検査を使い示されている。しかしながら、経肛門的超音波検査を用いた肛門前方構造の研究とくに縦走筋層の前束の研究はまだ行われていない。それゆえ今回の研究では、解剖により剖出した構造物と経肛門的超音波検査により描出した構造物（特に縦走筋層の前束）を比較検討した。また、生体においても経肛門的超音波検査を実施し、解剖体の所見と比較した。

＜対象と方法＞

*解剖実習体の組織学的観察*

解剖 7 体（77 歳―93 歳　平均年齢 87 歳）の解剖を行った。直腸、肛門その他の周辺組織を一塊に摘出し、矢状断面の切片にて Elastica van Gieson(EVG)染色、平滑筋および横紋筋の免疫組織化学的染色も行い検討した。

*解剖実習体における超音波画像所見と解剖所見との比較*

解剖 3 体（72 歳―80 歳　平均年齢 76.7 歳）に対し、リニアプローベ（7.5MHz)を用いた経肛門的超音波検査を行い、その後同部位を解剖し比較検討した。超音波装置は SSD-4000(Aloka Co,Tokyo)を用いた。

*生体における超音波画像による観察*

2013 年 7 月 31 日までに東葛辻仲病院を受診した前方以外の痔瘻症例 50 例（22 歳―76 歳 : 平均年齢 43.1 歳）に対し、経肛門的リニアプローベ（7.5MHz),　経肛門的ラジアルプローベ(10MHz)による肛門前方構造の調査を行った。超音波装置は SSD-4000(Aloka Co,Tokyo)を用いた。縦走筋層の前束については、その長さと幅の計測を行った。３例については、前方構造が痔瘻の影響により描出不良のため除外した。

*解剖実習体と倫理*

解剖実習体は、全て東京医科歯科大学解剖学教室に献体されたものを用いた。また、本研究については、本学医学部倫理審査委員会の許可を得ている（No. 1624)。

＜結果＞

*解剖実習体の組織学的所見*

男性解剖体の正中矢状断面において、肛門管、膀胱、前立腺、尿道、尿道海綿体が同時に剖出できる組織標本を作成し検討した。尿道海綿体の下面を球海綿体筋が覆っていた。肛門管内側よりみてみると内肛門括約筋、肛門管の縦走筋層、外肛門括約筋が同定でき、縦並びの構造であった。外肛門括約筋の最下端である皮下外肛門括約筋は前方に進展しており、尿道海綿体に付着していた。肛門直腸会陰筋は肛門管、前立腺および尿道海綿体に囲まれた部位に同定された。この肛門直腸会陰筋は縦走筋が突出した構造物であり、平滑筋で構成されていた。直腸縦走筋の前束は、直腸縦走筋が前下方に進展した構造物であり、外肛門括約筋と球海綿体筋の間を進展して、外肛門括約筋の前面を覆って疎性結合組織に付着していた。前束は免疫組織学的染色にて平滑筋であった。肛門管前方の構造は平滑筋および横紋筋により構成されていた。これらの筋は互いに密着し、相補的に配置されていた。

*解剖体を用いた肉眼解剖学的所見と超音波画像所見についての比較*

男性解剖体矢状断面の肛門管前方において内肛門括約筋、外肛門括約筋および球海綿体筋が茶色の筋肉質として確認された。縦走筋層は内肛門括約筋と外肛門括約筋との間を通る白色の層と

して確認された。

一方、縦走筋層の前束も外肛門括約筋と球海綿体筋の間を通る白色の層として確認された。同解剖体の経肛門的超音波画像所見では内肛門括約筋、縦走筋層および縦走筋層の前束は明瞭な hypoechoic layer として描出された。外肛門括約筋は厚い斑状の hypoechoic layer として描出された。

*生体における超音波画像所見*

尿道は肛門管前方のリニア超音波画像所見において曲線を描く hypoechoic layer として描出された。前立腺、尿道海綿体は尿道に接していた。尿道海綿体は、斑状の hypoechoic layer として球海綿体筋を下面より覆うように描出された。肛門管に近接して内肛門括約筋、肛門管の縦走筋層が hypoechoic layer として描出された。外肛門括約筋および外肛門括約筋の皮下部は内肛門括約筋、肛門管の縦走筋層の外側に斑状 hypoechoic layer として描出された。肛門直腸会陰筋は球海綿体筋と尿道海綿体の間で縦走筋層が突出した構造物として描出された。肛門直腸会陰筋は球海綿体筋および尿道海綿体筋と近接した構造物であり縦走筋層と同様の hypoechoic layer として描出された。肛門直腸会陰筋の幅を起始部において計測したところ、平均 6.6±1.5mm(2.8-8.9mm)であった。前束は球海綿体筋と外肛門括約筋の間を下降する縦走筋層の突出物であり hypoechoic layer として描出された。前束の長さを計測した。平均 8.7±2.9mm(3.8-8.9mm)であった。前束は radial の画像所見においても、外肛門括約筋の前方にむかって縦走筋層より突出した構造物として描出された。

＜考察＞

*肛門管の前方構造の解剖について*

この研究において、縦走筋層の前束の解剖学的構造の詳細が明らかになった。前束は３つの構造的特徴があった。①前束は肛門管の縦走筋層の一部であった。②前束は球海綿体筋と外肛門括約筋に挟まれて周囲と密着していた。③前束は疎性結合組織に付着するように終わっていた。

肉眼解剖における以前の研究で、肛門管前方に縦走筋層の前束が存在するとの報告はあった。今回の研究では、前束の構造と周囲筋との関係を明らかにした。加えて、免疫組織化学的染色により肛門前方の平滑筋と横紋筋の構造を詳細に示した。同部位は平滑筋と横紋筋で主に形成されていた。平滑筋と横紋筋は相補的に配置されていた。前束は平滑筋と横紋筋でできた構造物を支えるような構造物であった。

今回の研究で示した前束の構造は会陰小体の概念に置き換えることができるかもしれない。会陰小体は会陰筋群が収束する付着中心として記載されてきた。しかし、会陰小体の正確な位置はいまだに明らかになっていない。いくつかの研究では会陰小体は前束よりも上方であると記載されている。一方、他のいくつかの研究において、会陰小体は前束より下方に位置すると記載されている。会陰小体は同定できないとの研究もある。この研究では会陰筋の付着中心としてではなく、平滑筋と横紋筋を相補的に並べた肛門管前方構造物の一つとして、会陰筋群を支えるために縦走筋層の前束が変化しているとの概念を示すことができた。そのような平滑筋と横紋筋の相互関係は肛門管の構造や機能を論じるために重要である。我々は肛門管後方における平滑筋と横紋

筋の機能的交差について報告した。この研究では肛門管前方における平滑筋と横紋筋の相互関係を明らかにした。この所見は後方の機能的な領域と対照的に前方において肛門管を固定する役割を担っていることが示唆された。

*経肛門的超音波画像について*

この研究では、経肛門的超音波検査によって前束とその周辺の構造を描出した。超音波検査によって描出した画像と解剖体で剖出した構造物を比較検討した。その所見を基に、生体における超音波検査の画像を調べた。以前の研究では、前束は経肛門的超音波検査において描出されなかった。この研究では解剖体と生体の両方において経肛門的超音波検査により前束を描出できることを明らかにした。超音波画像として前束が縦走筋層の一部であることと、球海綿体筋と外肛門括約筋の間を下降する構造物として hypoechoic に描出されることを示した。また、起始からの長さの平均が 8.7mm 程度であることを示した。超音波検査によって描出された前束はその組織学的構造物を反映している。前束は組織学的に縦走筋層の一部であった。そして平滑筋により構成されていた。これらの構造物はおそらく超音波画像で描出される縦走筋層からつづく hypoechoic layer と同じものである。組織学的構造物と超音波画像を対応させることができたことで、超音波検査がこの領域における上述の構造を理解するために、非常に役に立つと考えられた。

＜結論＞

この研究において前束の解剖学的詳細を明らかにした。肛門管前方における平滑筋と横紋筋とが相補的配置の関係を示すことがわかった。加えて、解剖学的所見と対比することにより、前束が生体の経肛門的超音波検査において明確に描出されることを示した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5344　号 | 中島　康雄 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　植竹　宏之<br>副　査　江石　義信、立石　宇貴秀 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は「男性における肛門管前方領域の形態：解剖学的および組織学的所見に基づいた経肛門的超音波検査による縦走筋層の前束の視覚化」についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

男性の肛門管前方の構造を正確に理解することは、前立腺癌に対する前立腺摘出術の際の切除線を決めるにあたり非常に重要である。女性に比べ男性の構造は特に複雑である。男性の肛門管前方構造において、縦走筋層の前束と呼ばれる構造は以前から研究されており、手術の際に非常に重要とされている。それらの研究では縦走筋層の前束が外肛門括約筋を前方から包み込むような構造になっており、その末梢部が会陰小体に終着していると記載されている。しかし、その縦走筋層の前束やその周辺の肛門構造の詳細はよくわかっていない。このような背景の下、申請者は前記の解剖学的構造をまず解剖体において研究し、さらに経肛門超音波検査において臨床例で研究したことは注目に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は以下の通りである。1）尿道海綿体の下面を球海綿体筋が覆っていた。肛門管内側よりみてみると内肛門括約筋、肛門管の縦走筋層、外肛門括約筋が同定でき、縦並びの構造であった。外肛門括約筋の最下端である皮下外肛門括約筋は前方に進展しており、球海綿体筋に付着していた。直腸尿道筋は肛門管、前立腺および尿道海綿体に囲まれた部位に同定された。この直腸尿道筋は縦走筋が突出した構造物であり、平滑筋で構成されていた。直腸縦走筋の前束は、直腸縦走筋が前下方に進展した構造物であり、外肛門括約筋と球海綿体筋の間を進展して、外肛門括約筋の前面を覆って疎性結合組織に付着していた。前束は免疫組織学的染色にて平滑筋であった。肛門管前方の構造は平滑筋および横紋筋により構成されていた。これらの筋は互いに密着し、相補的に配置されていた。2）　リニア超音波画像所見において、尿道海綿体は、斑状の hypoechoic layer として球海綿体筋が下面より覆うように描出されたなど、1）の解剖体における所見と一致していた。これらのことは前立腺手術において、局所解剖を正確に理解しうる重要な成果である。

３）研究方法・倫理観

前記の手法は十分な生理学的および解剖学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について前立腺手術においてのみならず、痔ろうの手術の解剖学的理解においても有用であろうと考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**3. その他**

特記事項無し

**4. 審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小幡　佳輝 |
| 論文審査担当者 | 主査　横田　隆徳<br>副査　立石　宇貴秀　寺田　純雄 |
| 論　文　題　目 | Prognostic Impact and Post-operative Evaluation of Volumetric Measurement of the Cerebellopontine Cistern in Trigeminal Neuralgia Using 3 Tesla Magnetic Resonance Imaging |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

術前後の小脳橋角部脳槽容積測定の重要性を 3 テスラ MRI で評価することが、当研究の目的である。2012 年 4 月から 2015 年 12 月までに、三叉神経痛に対し微小血管減圧術を受けた患者は 87 人おり、そのうち 51 人は動脈圧迫が原因であった。術前後に施行した 3 テスラ MRI を用いて両側の小脳橋角部脳槽容積を計測し、評価には小脳橋角部槽のゆがみを示す指数として Cistern Deviation Index を用いた。術後の画像変化により三叉神経痛の再発と非再発の違いが見いだせるかを調べた。罹患側の小脳橋角部槽の平均容積は、非罹患側よりも有意に小さかった（P <0.001）。51 例中 5 例（10%）の三叉神経痛患者に再発があった。再発群は、非再発群よりも術前の Cistern Deviation Index が有意に低かった（P = 0.035）。非罹患側において、再発群における術後の容積減少が非再発群よりも有意に大きかった（P = 0.004）。術前の Cistern Deviation Index は三叉神経痛の再発を予測するのに有用なパラメーターだと考えられる。再発群では、手術後の炎症反応が手術側だけでなく健常側にも広がり、小脳橋角部槽容積を減少させる可能性がある。

＜緒言＞

最近の MRI の進歩により、術前の神経血管圧迫の視覚化が可能になった。最近のいくつかの研究では、神経血管圧迫の術前評価において、3 テスラ MRI が 1.5 テスラ MRI より優れていることが明らかにされている。

以前の研究では、高解像度 1.5 テスラ MRI を用いて小脳橋角部槽容積を計算し、三叉神経痛患者では、罹患側で非罹患側よりも有意に小さく、健常対照においては有意差がないことを示した。さらに、その研究では小脳橋角部槽のゆがみの程度を評価するために、Cistern Deviation Index を用いた。Cistern Deviation Index は、三叉神経痛の患者で健常者と比較して統計学的に有意に小さく、再発群よりも非再発群で有意に大きかった。Cistern Deviation Index は、微小血管減圧術における転帰の予測因子であることが判明している。

以前の研究では小脳橋角部槽の術前の容積測定の重要性を評価したが、術後の変化は調べていない。術後の画像評価により三叉神経痛再発の原因が分かるかもしれない。そのため、高分解能 3 テスラ MRI を用いて三叉神経痛患者の小脳橋角部脳槽容積および Cistern Deviation Index を計測

し、微小血管減圧術後の再発群と非再発群の間で比較・検討を行った。

＜材料および方法＞

・患者集団

2012 年 4 月から 2015 年 12 月までに三叉神経痛の治療のために微小血管減圧術を受けた連続 87 例を登録した。術後少なくとも 1 年経過した患者を対象とした。以前に微小血管減圧術を受けていた 14 例と、静脈または他の病因によって痛みが引き起こされた 22 例を対象から除外し、最終的に 51 例の解析を行った。

三叉神経痛の再発は、投薬（例えば、カルバマゼピン）を必要としたときと定義した。外来通院を継続していない患者では、術後の状態を確認するために電話での調査を行った。非再発患者における経過観察のエンドポイントは、最後の外来患者訪問または電話調査を行ったときとした。再発患者のエンドポイントは再発した時である。

・外科処置

単一術者が手術を行っている。顕微鏡で三叉神経を圧迫している血管を同定し、その血管を小さなテフロンフェルトを用いて転位した。

・ 画像処理

手術前、手術後 2〜5 ヶ月後に 3 テスラ MRI を用いて全患者を検査した。

小脳橋角部槽は、三叉神経根部の断面から 1.2mm の厚さで計測し、左右ともに測定した。

小脳橋角部槽のゆがみの程度を表すために、Cistern Deviation Index を定義している。すなわち、患側の容積を両側の総容積で除した数に 100 を掛けた数値である。

＜結果＞

・患者の特徴

本研究に登録された 51 例の平均年齢は 61.94±13.03 歳だった。51 例の経過観察期間は 18.09±8.20 ヶ月であった。罹患側の小脳橋角部脳槽の平均容積は、非罹患側よりも有意に小さかった（215.57±54.57mm$^3$および 233.71±59.07mm$^3$; P<0.001）。

・再発群と非再発群間の比較

51 例のうち、5 例（10%）に三叉神経痛の再発があった。2 度目の手術が必要となった患者はいなかった。非再発群のフォローアップ期間は 19.51±7.17 ヶ月であり、再発群の再発までの期間は 4.96±4.87 ヶ月であった。術後から MRI 検査までの期間に再発群と非再発群で有意差はなかった（2.92±0.81 ヶ月および 2.43±0.44 ヶ月; P=0.155）。

・術前および術後の Cistern Deviation Index について

再発群の術前Cistern Deviation Indexは非再発群より有意に低かった（43.17±5.09および48.49±3.32; P=0.035）。一方、再発群および非再発群の術後の Cistern Deviation Index に有意差はなかった

（41.54±7.21 および 44.58±5.53; P=0.295）。

・術前および術後の小脳橋角部脳槽容積の変化
全例における手術前の罹患側の小脳橋角部脳槽容積は 214.66±55.56 $mm^3$であり、手術後には 187.14±59.96 $mm^3$に有意に減少した（P=0.006）。非罹患側に変化はなかった。
罹患側では、再発群における小脳橋角部槽の術後容積は、術前容積と比較して小さい傾向があった（147.04±20.80$mm^3$対 171.12±25.45$mm^3$; P=0.189）。非再発群では、有意差をもって術後容積が小さくなった（189.78±59.89$mm^3$対 220.26±54.84$mm^3$; P<0.001）。術後の容積減少率に関しては、再発群と非再発群の間に有意差はなかった。
再発群の非罹患側の小脳橋角部槽は、術後容積がより小さい傾向であった（術前 227.52±47.64$mm^3$; 術後 209.52±40.59$mm^3$; P=0.188）。非罹患側においては、再発群は非再発群よりも有意に大きな術後容積減少が見られた（18.00±21.64$mm^3$対 2.64±51.36$mm^3$、P=0.004）。

＜討論＞
神経血管圧迫は、三叉神経痛の病因と考えられている。これは、3D-FIESTA および他の高解像度シーケンスを使用した MRI で同定できる。さらに、1.5 テスラ MRI よりも 3 テスラ MRI を用いたほうが、神経血管圧迫がより高い感度および特異度で同定できる。そのため、本研究では高分解能の 3 テスラ MRI を使用した。
小脳橋角部槽の面積または容積、三叉神経の長さなどが三叉神経痛の発症と関与しているといういくつかの報告がある。それらによると、小脳橋角部槽が小さいほど、三叉神経痛の発生率が高くなる。我々の研究でも同じ結果が得られた。
本研究では、小脳橋角部槽の容積測定が術後再発の予測因子となりうるかを検討した。手術前の Cistern Deviation Index は術後再発と有意に相関することを以前に報告しているが、今回の 3 テスラ MRI を用いた解析でも以前の結果と一致していた。
術前の Cistern Deviation Index は再発の有意な予測因子であることが分かったため、今回は術後の小脳橋角部槽の容積について解析を追加した。まず、罹患側の術後容積変化に焦点を当てた。罹患側の小脳橋角部槽では、再発群と非再発群の間に統計学的な差はなかった。手術側の術後の小脳橋角部槽容積が減少しているが、これは外科的介入により大脳組織やくも膜の接着が引き起こされるためと考えられる。
さらに、非罹患側の術後の容積変化を調べた。非再発群では容積変化は見られなかったが、再発群では術後に有意な容積減少が見られた。これは、術後の炎症反応が健常側に及んで容積を減少させた可能性が考えられる。炎症反応が非罹患側で容積減少を誘発するのに十分に強い場合、狭い小脳橋角部槽で罹患三叉神経への動脈圧迫や周囲の癒着により、三叉神経痛の再発をもたらす可能性がある。
三叉神経痛患者における術前の容積測定の重要性は以前のいくつかの研究で述べられている。しかし、我々の知る限りでは、3 テスラ MRI を用いた術後の画像変化を検討した研究はない。以前は、小脳橋角部槽を狭くしないことが再発率の低下に寄与する可能性があると報告したいたが、それは適切ではないと考えられる。再発を予防するためには、術後の炎症反応や癒着を予防し、

非手術側に影響が広がらないようにする必要がある。それを調べるには、より多くの症例やさらなるデータの蓄積が必要である。

＜結論＞

我々は、高分解能3テスラMRIを用いて小脳橋角部槽容積測定の有用性を調べ、Cistern Deviation Indexおよび術前後の容積形態の変化を評価した。術前のCistern Deviation Indexは三叉神経痛の再発を予測するのに有用な因子であった。罹患側では、術後の小脳橋角部脳槽容積は、再発群および非再発群の両方において減少した。 対照的に、非罹患側では小脳橋角部脳槽の手術前後の容積変化は、再発群と非再発群の間で有意に異なった。小脳橋角部脳槽内の術後の炎症反応は、小脳橋角部脳槽容積を減少させ、微小血管減圧術後の再発に重要な役割を果たす可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5345　号 | 小幡　佳輝 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　横田　隆徳<br>副　査　立石　宇貴秀　寺田　純雄 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

三叉神経痛患者における3テスラMRIを用いた小脳橋角部脳槽容積測定による予後への影響を術後評価に関する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

術後の画像評価により三叉神経痛再発の原因の推定、小脳橋角部脳槽容積および Cistern Deviation Index を術前術後で評価計測し、微小血管減圧術後の予後予測因子になる可能性を示した。

２）社会的意義

三叉神経痛の原因の推定、手術の適応、微小血管減圧術後の予後予測因子を評価に有用である。

３）研究方法・倫理観

2012年4月から2015年12月までに三叉神経痛の治療のために微小血管減圧術を受けた連続51例において3テスラ MRI を用いて小脳橋角部脳槽容積と Cistern Deviation Index を算出し、三叉神経痛の微小血管減圧術後再発を予測可能か検討した。外科的手術は顕微鏡で三叉神経を圧迫している血管を同定し、その血管を小さなテフロンフェルトを用いて転位した。

三叉神経痛の再発は、投薬（カルバマゼピン）を必要としたときと定義した。

４）考察・今後の発展性

術前の Cistern Deviation Index は三叉神経痛の再発を予測するのに有用な因子であった。罹患側では、術後の小脳橋角部脳槽容積は、再発群および非再発群の両方において減少した。 対照的に、非罹患側では小脳橋角部脳槽の手術前後の容積変化は、再発群と非再発群の間で有意に異なった。小脳橋角部脳槽内の術後の炎症反応は、小脳橋角部脳槽容積を減少させ、微小血管減圧術後の再発に重要な役割を果たす可能性があり、今後に症例数を重ねて解析すれば Cistern Deviation Index などの画像解析が手術の適応や予後予測に発展する可能性がある。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士(医学)の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 馬渕　卓 |
| 論文審査担当者 | 主査　藍　真澄<br>副査　吉田　雅幸、吉本　貴宣 |
| 論　文　題　目 | Beneficial Effects of Xanthohumol on Obesity and Insulin Resistance in Obese, Diabetic (*ob/ob*) Mice |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ホップ由来のフラボノイドであるキサントフモール（XN）は、げっ歯類において抗肥満および抗糖尿病効果を有する。しかし、XN が肥満およびインスリン抵抗性を改善する詳細なメカニズムは完全には解明されていない。レプチン欠損肥満糖尿病（*ob/ob*）マウスに、XN（10mg /kg BW）を 6 週間腹腔投与したところ、体重増加の抑制および血漿インスリン濃度が有意に低下し、耐糖能が改善した。さらに XN は脂質合成に重要な酵素である ACC の発現抑制を介して脂肪肝を改善した。XN 投与群では、肝臓において炎症反応が抑制され、インスリン感受性が改善していた。XN のエネルギー消費に対する効果について検討したところ、脂質消費を促すことが明らかとなった。これらの結果は、XN の有益な効果が、肝臓インスリンシグナル伝達および脂質合成・代謝と関連することを示している。

＜緒言＞

XN はホップ（*Humulus lupulus*）に由来するプレニルフラボノイドである。XN は肥満および糖尿病に対して予防的な効果を有することが報告されている。しかし、抗肥満、抗糖尿病作用の根底にある分子メカニズムは十分には解明されていない。これまでに、XN はファルネソイド X 受容体（FXR）に作用し、ミトコンドリア脱共役およびグルタチオンリサイクルを増加させ、脂質代謝および肥満に対する XN の有益な効果に寄与することが報告されている。また XN は脂肪酸および脂質合成の調節因子であるステロール調節エレメント結合タンパク質（SREBP）-1 の mRNA 発現を低下させ、SREBP-1 の不活性化因子として機能すると報告されている。

Akt の活性化は、インスリンの代謝作用において中心的な役割を果たすことが知られている。これまでに我々は、誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）が肥満に起因するインスリン抵抗性において重要な役割を示すこと、また iNOS を介した Akt の S-ニトロソ化によって、Akt を不活性化することを示した。さらに、肝細胞特異的に iNOS を強制的に発現させることによって、肝臓におけるインスリン抵抗性と脂肪肝を引き起こすことを示した。しかし、XN によるインスリンシグナル系への影響については未だ研究されていない。また、XN が脂質代謝に与える影響についても詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで今回、肝臓におけるインスリン感受性と

脂肪肝に関連した遺伝子発現への XN による影響を調べるとともに、FXR を介した白色脂肪細胞の褐色化について検討した。

＜方法＞

本研究では、8 週齢の *ob / ob* マウスを用いた。25℃、12：12 時間の明暗サイクルの環境下で、普通餌と、水を自由に摂取させた。実験群には XN（10mg /kg BW）を、コントロール群には DMSO を 5 日間/週、合計 6 週間、腹腔投与した。サンプルの回収前に 4 時間絶食をし、血中グルコースは血糖測定器を用いて計測した。麻酔下で心臓より全血採血を行い、肝臓と精巣上体脂肪組織を採取した。

ブドウ糖負荷試験では、13 週齢で一晩絶食した後、*ob/ob* マウスにブドウ糖（1.0g /kg BW）を腹腔内投与した。ブドウ糖注入の直前、および投与 15, 30, 60 および 120 分後に血糖値を測定した。また、インスリン感受性を評価するために、HOMA-IR を測定した。

全身エネルギー消費量の評価については、質量分析システムを用いて測定した。XN または生理食塩水を腹腔内投与した後、マウスを個別に代謝チャンバーに入れて、夜間にモニターした。１匹につき３分毎に、ガス試料の分析をおこなった。出力パラメータは、VO2（ml/分および ml/分・kg）および RQ（VO2/VCO2）を含み、暗時４時間データを平均した。

肝臓の Akt における S-ニトロソ化は、ビオチンスイッチアッセイによって評価した。S-ニトロソ基をビオチンに置換した後、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズによって沈降、溶出し、SDS-PAGE により分離して抗 Akt 抗体を用いた免疫ブロット法で検出、定量した。

*ob/ob* マウスの肝臓インスリン感受性を評価するために、一晩絶食させ、麻酔下でインスリン（0.5 単位/kg BW）または生理食塩水を経門脈的に注入し、その 5 分後に麻酔下で肝臓を取り出し、液体窒素で急速凍結した。

全 RNA を RNeasy Mini キットで単離し、1μg の全 RNA から相補的 DNS（cDNA）を合成した。*Srebp-1, Acc, FAS, iNos* および *Gapdh* について 10ng の cDNA を用いて、リアルタイム PCR 分析を行った。遺伝子発現は *Gapdh* で標準化した。

抗 UCP1 抗体による免疫染色は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片にて、標準的なプロトコールによって行った。ペルオキシダーゼ活性は DAB を用いて 3 分間検出した。最後に、核を Mayer のヘマトキシリン溶液で対比染色した。

肝臓組織における還元型グルタチオン（GSH）対、酸化型グルタチオン（GSSG）比は、GSH/GSSG アッセイキットを用いて測定した。

また、肝臓組織から抽出した脂質中のトリグリセリド含量は、Triglyceride キットを用いて測定した。さらに血漿トリグリセリド、総コレステロールおよび遊離脂肪酸濃度についても、アッセイキットを用いて測定した。

統計分析は、一元配置分散分析、続いて Scheffe の多重比較検定または student の t 検定を用いた。全ての値は平均±SEM で表し、0.05 未満の *p* 値を統計的に有意とした。

＜結果＞

6 週間の XN 投与は、食物摂取に影響を与えることなく *ob/ob* マウスの体重増加を有意に抑制し

た。コントロール群と XN を投与した *ob/ob* マウスの血糖値に差はなかったが、インスリンの血漿濃度と HOMA- IR は有意に低く、インスリン抵抗性の改善がみられた。また、ブドウ糖負荷試験では、XN 投与群において耐糖能改善が示された。

XN 投与群では、*ob/ob* マウス肝臓中のトリグリセリド含量、および血漿総コレステロール値が有意に減少した。肝臓における脂質合成に関与する遺伝子発現について調べたところ、*Srebp-1*、*Fas* の mRNA レベルに統計学的優位差はみられなかったが、*Acc* の mRNA レベルに有意な低下がみられた。

XN 投与群では、インスリン刺激による、Akt のスレオニン 308 およびセリン 473 のリン酸化がコントロール群と比較し有意に増加した。一方、Akt タンパク質の発現量に変化はみられなかった。また XN 投与群では、肝臓における Akt の S-ニトロソ化と iNOS 発現は有意に減少がみられた。これらの結果は、XN が Akt の S-ニトロソ化抑制を介して肝臓のインスリンシグナル伝達を改善したことを示している。

S-ニトロソ化は可逆的な反応であり、還元する物質が多いときには脱ニトロソ化反応が起こる。そのため、生体内の主な還元物質であるグルタチオンを調べたところ、XN 投与群では、肝臓における GSH 含量が増加した。一方、GSSG ならびに GSH 対 GSSG 比には有意な差はみられなかった。

XN 投与群では、白色脂肪組織における UCP1 発現は有意に増加した。そこで、全身のエネルギー消費量の評価を行ったところ、XN 投与群では、総酸素消費量（VO2）を減少させなかったが、呼吸指数（RQ）は有意に減少しており、脂質消費の増加が示唆された。

＜考察＞

本研究では、*ob/ob* マウスにおいて、XN 投与により（１）体重減少、（２）インスリン感受性と耐糖能の改善、（３）インスリン刺激に伴うリン酸化 Akt の増加、（４）肝臓中のトリグリセリド含量の減少、（５）白色脂肪組織における UCP1 発現の増加、（６）RQ 減少がみられた。これらのデータは XN の抗肥満および抗糖尿病効果を示す以前の研究とほぼ一致している。この研究による新たな発見は、XN 投与により、(a) インスリン刺激に伴うリン酸化 Akt の増加、(b) 肝臓における iNOS 発現および S-ニトロソ化 Akt の減少、(c) 白色脂肪細胞における UCP1 発現の増加、(d) 脂質消費の増加がみられたことである。

XN 投与が iNOS 発現および Akt の S-ニトロソ化の抑制によって、肝臓インスリン抵抗性が改善することが示された。このことから、iNOS により介在されたニトロソストレスの緩和が *ob/ob* マウスにおける XN の有益な効果に寄与すると考えられた。

また本研究では、XN によって UCP1 タンパク質が増加するデータを得た。白色脂肪組織における UCP1 発現の増加は、ミトコンドリア脱共役の増加に寄与し、脂肪消費の増加に役割を果たす可能性があり、*ob/ob* マウスにおける XN の抗肥満効果に寄与していると推測される。

本研究では、XN による Srebp-1 の発現レベルの変化はみられなかったが、*Srebp-1* の標的遺伝子である *Acc* の mRNA 発現を有意に減少させた。XN は肝臓における SREBP-1 の転写活性を減弱させ、*ob/ob* マウスの肝臓における脂肪蓄積を防ぐことが示唆される。

肝臓および脂肪組織におけるこれらの効果が、*ob/ob* マウスにおける XN の抗肥満、抗糖尿病効

果に協調して寄与し得ることが考えられる。

＜結論＞

本研究では、*ob/ob* マウスにおける XN のインスリン感作効果の様々な側面を研究した。XN 投与によって、インスリン抵抗性が有意に改善し、体重増加が抑制された。XN の抗肥満、抗糖尿病効果は、脂肪肝の改善、肝臓インスリン抵抗性の改善、および脂質消費と UCP1 発現の増加に関連していた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5346　号 | 馬渕　卓 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　　藍　真澄<br>副　査　　吉田　雅幸、吉本　貴宣 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

ホップ由来のフラボノイドであるキサントフモールは、げっ歯類において抗肥満および抗糖尿病効果を有するが、その詳細なメカニズムは完全には解明されていない。レプチン欠損肥満糖尿病（*ob/ob*）マウスに、キサントフモール（10 mg/kg BW）を 6 週間腹腔投与したところ、体重増加の抑制および血漿インスリン濃度が有意に低下し、耐糖能が改善した。キサントフモール投与群では、肝臓において炎症反応が抑制され、インスリン感受性が改善していた。さらにキサントフモールは脂質合成に重要な酵素である ACC の発現抑制を介して脂肪肝を改善した。キサントフモールのエネルギー消費に対する効果について検討したところ、脂質消費を促すことが明らかとなった。これらの結果は、XN の有益な効果が、肝臓インスリンシグナル伝達および脂質合成・代謝と関連することを示している。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

糖尿病を始めとする生活習慣病や癌など、慢性疾患に共通する基盤病態として慢性炎症が注目され、炎症プロセス進行における細胞間・分子間での相互作用の解明が進んでいる。

本研究では、肥満や糖尿病など、加齢に伴って進行する慢性炎症に関連した疾患の発症メカニズムに注目した上で、植物性化学物質であるキサントフモールの、インスリン感作効果に関する様々な側面を検討した点で先駆性があるものと考えられた、

２）社会的意義

日本国内をはじめとして世界的に糖尿病、肥満有病者数は増加傾向にあり、これらの疾患発症に対してキサントフモールが予防的に寄与しうることを示した点で社会的意義のある研究と考えられた。

３）研究方法・倫理観

研究計画及び研究方法は幅広い視野に基づき策定され、特に植物性化学物質であるキサントフモールに着目し、in vivo, in vitro からのアプローチにより、インスリンシグナル伝達改善作用が肝臓における Akt の S-ニトロソ化抑制を介していることを明らかにし、キサントフモールの抗肥満、抗糖尿病効果は、肝臓インスリン抵抗性の改善、脂肪肝の改善、および脂質消費と UCP1 発現の

増加に関連していたことを示した。研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針及び本学規定等を遵守して行われ、高い倫理観のもと十分な配慮がなされたことを確認した。

４）考察・今後の発展性

本研究によって、キサントフモールが有する多様な生理活性の中でも、特にタンパク質の S-ニトロソ化抑制に有効であること、また白色脂肪の褐色化に有効であることが明らかとなった。キサントフモールは、肥満や糖尿病予防効果をもつ機能性食品として応用されることが期待される。

また植物性化学物質の中には、糖尿病や肥満を始めとする生活習慣病などの慢性疾患に対し、有効性をもつものがある。これらの物質が有する抗炎症作用において、キサントフモール同様、一酸化窒素の修飾機構を介した生体内分子シグナル伝達経路への影響について、解析を進めることも期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた、

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | NASRI BAONGOC |
| 論文審査担当者 | 主査　江石　義信<br>副査　田中　真二、三宅　智 |
| 論　文　題　目 | High expression of EphA3 (erythropoietin-producing hepatocellular A3) in gastric cancer is associated with metastasis and poor survival |

（論文内容の要旨）

<要旨>

エリスロポエチン産生肝細胞（Eph）受容体は、種々のタイプの腫瘍における進行および予後に関係しているが、胃癌における EPHA3 の役割および機序は依然として十分に理解されていない。我々は、胃腺癌に対して胃切除術を受けた患者から採取した胃癌組織いて免疫染色法により EphA3 の蛋白発現を分析した。EphA3 高発現は分化型、深達度、リンパ節転移、病理学的ステージ、肝転移、遠隔転移と有意に相関していた。EphA3 の高発現群では、EphA3 低発現群よりも無再発生存期間（RFS）、全生存期間（OS）が有意に短縮していた。

.

<緒言>

胃癌は世界で 5 番目に多い悪性腫瘍であり、世界で 3 番目に多い死因である。外科的切除、化学療法、ホルモン療法、放射線療法を含む現在の集学的治療にもかかわらず、高度進行癌の 5 年生存率は依然として低い。多くの受容体チロシンキナーゼ（RTK）は胃癌の浸潤および転移に関連するが、ヒト上皮成長因子受容体（HER-2）阻害剤、血管内皮細胞成長因子受容体（VEGFR-2）阻害剤が分子標的療法として臨床的に用いられている。胃癌症例のわずか 10～20%が HER-2 陽性である。しかもトラスツズマブで化学療法を受けた HER-2 陽性患者では生存期間中央値は 16 ヶ月であった。したがって胃癌の予後や化学療法に関与する分子マーカーの探索が必要である。

エリスロポエチン産生肝細胞癌受容体（Eph）およびそれらのリガンドであるエフリンは、脈管新生および腫瘍の浸潤や転移と関連しており、治療の標的として研究されている。Eph は多数のサブクラスを有し、Eph の発現は様々な癌腫において腫瘍の進行を促進または抑制することが報告されている。胃癌では EphA1 および EphA4 が治療の標的分子として研究されている。EphA3 も固形癌の浸潤や転移に関連するといわれる。しかし胃癌における EphA3 の役割と機序は十分には解明されていない。我々は、胃癌における EphA3 の発現と臨床病理学的因子および予後との関連を検討した。

<方法>

東京医科歯科大学の腫瘍外科における 2003 年 1 月から 2007 年 3 月の間に、初発の胃腺癌のた

めに根治的な胃切除術を受けた 202 例（病理学的ステージ I から III まで）を対象とした。ホルマリン包埋標本を 3～4μm に薄切し、1 次抗体はサンタ・クルス社の EphA3 抗体(sc-920)を用いて、2 次抗体はニチレイ社のヒストン・シンプルステイン Max PO を用いての免疫染色法で蛋白発現を調べた。免疫染色の評価は染色強度のスコアを 0 点（なし）、1 点（弱陽性）、2 点（中等度または強陽性)の 3 つに分類した。染色陽性率のスコアは、0 点（0-9%）、1 点（10-49%）および 2 点（50-100%）の 3 つに分類した。染色強度のスコアと染色陽性率のスコアの和を用いて 3 点以上は高発現、3 点未満は低発現と規定した。統計解析は IBM SPSS Statistics 23 ソフトウェアを用いて行った。病理組織学的因子の解析には chi-square test、生存期間の単変量解析は log-rank test、多変量解析には Cox proportional-harzards regression models を用いた。

<結果>

EphA3 の高発現は男性($p = 0.031$)、分化型で($p < 0.001$)有意に多かった。腫瘍の深達度($p = 0.002$)、リンパ節転移($p = 0.001$)、遠隔転移($p = 0.021$)、肝転移($p = 0.024$)、病理学的ステージ($p < 0.001$)、HER2 高発現($p = 0.017$)とも有意に関連していた。EphA3 の高発現群（5 年 RFS が 67%）は EphA3 の低発現群（同 82%）に比較して有意に RFS が短縮していた（$p = 0.014$）。同様に OS も EphA3 高発現群で有意に短縮していた（5 年 OS が 68% vs 82%、p=0.026）。しかし RFS,OS の多変量解析では、深達度およびリンパ節転移が独立した予後因子であった。

<考察>

我々の研究は、EphA3 の高発現が胃癌における腫瘍の浸潤、転移および予後に重要な役割を果たすことを示唆している。EphA3 は固形および造血腫瘍細胞で過剰発現が報告されている。EphA3 の高発現は、結腸直腸癌のリンパ節転移およびステージに関連し、前立腺癌における悪性度と関連していた。肝細胞癌では、高い EphA3 発現は腫瘍サイズ、腫瘍グレード、転移、静脈浸潤と関連していた。しかし一方で、EphA3 の高発現は非小細胞肺癌の増殖を抑制することも報告されている。正常組織において EphA3 は発生中の軸索、気道、腎臓、および心臓の間葉組織に豊富に存在し、中胚葉、神経系の発達に関与している。EphA3 の発現は、細胞増殖、フィブロネクチンへの細胞接着の喪失、細胞遊走、上皮間葉転換、およびアポトーシスなどとの関連が報告されている。EphA3 の異常調節およびその遺伝子変異が、多くの固形癌の発生や進展と強く関連していることも示されている。EphA3 の下流のシグナル伝達においては Jak / Stat および Akt / PI3K シグナルを活性化することによって腫瘍の増大、浸潤を促進すると考えられている。

胃癌に対する他者の報告では Xi らの研究がある。彼らは正常組織よりも胃腺癌における Western Blot 法による EphA3 の蛋白発現が高く、また mRNA 発現も高いことを示した。彼らの報告でも EphA3 の高発現が胃癌の深達度、リンパ節転移、病理学的ステージ、遠隔転移および予後と関連していることを示しており、我々の結果と一致している。

<結論>

本研究では EphA3 の高発現が、胃癌の深達度、リンパ節転移、病理学的ステージ、遠隔再発、肝再発、生存期間の短縮に有意に関連していることを示した。EphA3 は胃癌の治療のターゲット

になるかもしれない。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5347　号 | NASRI BAONGOC |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　江石　義信<br>副　査　田中　真二、三宅　智 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は、胃癌における EphA3(erythropoietin-producing hepatocellular A3)発現の臨床病理学的特徴を明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

エリスロポエチン産生肝細胞癌受容体（Eph）およびそれらのリガンドであるエフリンは、脈管新生および腫瘍の浸潤や転移と関連しており、治療の標的として研究されている。Ephは多数のサブクラスを有し、Ephの発現は様々な癌腫において腫瘍の進行を促進または抑制することが報告されている。胃癌ではEphA1およびEphA4が治療の標的分子として研究されている。EphA3も固形癌の浸潤や転移に関連するといわれる。このような背景の下、申請者はいまだ胃癌における役割と機序が十分に解明されていないEphA3の胃癌における発現と臨床病理学的因子および予後との関連を検討しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

胃腺癌に対して胃切除術を受けた患者から採取した胃癌組織いて免疫染色法によりEphA3の蛋白発現を分析した。EphA3高発現は分化型、深達度、リンパ節転移、病理学的ステージ、肝転移、遠隔転移と有意に相関していた。EphA3の高発現群では、EphA3低発現群よりも無再発生存期間（RFS）、全生存期間（OS）が有意に短縮していた。

以上のように申請者は、EphA3 の高発現が胃癌における腫瘍の浸潤、転移および予後に重要な役割を果たすことを明らかにしている。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、初発の胃腺癌のために根治的な胃切除術を受けた202例（病理学的ステージIからIIIまで）を対象とした。ホルマリン包埋標本を薄切し免疫染色法で蛋白発現を調べた。免疫染色の評価は染色強度のスコアを0点（なし）、1点（弱陽性）、2点（中等度または強陽性)の3つに分類した。染色陽性率のスコアは、0点（0-9％）、1点（10-49％）および2点（50-100％）の3つに分類した。染色強度のスコアと染色陽性率のスコアの和を用いて3点以上は高発現、3点未満は低発現

と規定した。研究方法は十分な外科病理学的な知識と免疫組織学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「EphA3の異常調節およびその遺伝子変異が、多くの固形癌の発生や進展とも強く関連しており、EphA3が胃癌の治療のターゲットになるかもしれない」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 安田　庸輔 |
| 論文審査担当者 | 主査　三宅　智<br>副査　江石　義信、田邉　稔 |
| 論　文　題　目 | Early response of C-reactive protein as a predictor of survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors |

（論文内容の要旨）

【要旨】

本研究の目的は転移性腎細胞癌症例において、分子標的薬治療後の CRP 早期反応と予後との関連を解析することである。2008 年から 2013 年に東京医科歯科大学、がん研有明病院ならびに JA とりで総合医療センターにおいて分子標的薬を導入した転移性腎細胞癌症例 103 例を解析対象とし、後ろ向き解析を行った。無増悪生存率ならびに全生存率を主要評価項目として、予後因子の解析を行った。観察期間中央値は 21 か月であり、1 年全生存率は 69%であった。多変量解析では、CRP 早期反応は無増悪生存率ならびに全生存率に対する予後予測因子となった。分子標的薬投与前に CRP 値が 10mg/L(1.0mg/dL)以上の症例のうち、分子標的薬投与後 4 週間で 20%を超えて低下するものは、そうでない症例よりも有意に予後が良好な成績であった。転移性腎細胞癌に対する薬物治療として二次治療以降に免疫チェックポイント阻害剤などの新規薬剤が新たに登場している中で、分子標的薬投与後早期の CRP の反応により個々の治療方針を選択することが可能になると考えられる。

【緒言】

腎細胞癌は悪性腫瘍全体のおよそ 2%から 3%を占めるとされ、そのうち約 30%は診断時に転移を有するとされている。近年、転移性腎細胞癌に対する一次治療は免疫治療から分子標的薬治療へと変遷してきている。腎細胞癌、特に転移性腎細胞癌において、炎症反応マーカーが予後を規定し、病勢を反映するものとして注目されている。そのうちの一つとして、CRP が、腎細胞癌の予後を推測するという報告がある。転移性腎細胞癌に対する分子標的薬治療前の CRP の値が予後を予測することを我々は既に報告している(参考論文、Int J Clin Oncol. 2013)。また、転移性腎細胞癌に対する治療介入に伴う CRP の動き(CRP kinetics)が、病勢を反映することも、免疫治療ならびに分子標的治療薬において報告されている。これら CRP kinetics の概念を踏まえて、分子標的薬治療導入早期の CRP 値の推移と予後の関連について解析した。

【方法】

2008 年から 2013 年までに東京医科歯科大学、がん研有明病院ならびに JA とりで総合医療セ

ンターにおいて転移性腎細胞癌に対して分子標的薬を導入した 103 例（スニチニブ 60 例、ソラフェニブ 43 例）を対象とした。分子標的薬投与前の CRP 値が 10mg/L を超えないものを CRP 非上昇群(62 人)、投与前の CRP 値が 10mg/L 以上のものの、投与 4 週間で CRP 値が 20%を超えて減少するものを CRP 早期反応群(19 人)、20%を超えた減少を認めないものを非 CRP 早期反応群(22 人)として、3 群間における予後の解析を行った。年齢、性別、Performance status(PS)、貧血の有無、腎摘の有無、免疫治療の有無、分子標的薬の種類、高カルシウム血症の有無、lactate dehydrogenase (LDH )、臓器転移の個数ならびに CRP 早期反応と無増悪生存率ならびに全生存率の関連について解析した。

【結果】

観察期間中央値は 21 ヶ月（1-79 ヶ月）。観察期間中に 69 人（67%）が死亡した。

無増悪生存における単変量解析では、CRP 早期反応の他、腎摘の有無、LDH が有意な予後予測因子だった。多変量解析では、CRP 早期反応と腎摘の有無が無増悪生存に対する予後予測因子となった。全生存における単変量解析では、CRP 早期反応の他、PS、貧血の有無、腎摘の有無、LDH が有意な予後予測因子だった。多変量解析では、CRP 早期反応と PS と LDH が無増悪生存に対する予後予測因子となった。

CRP 早期反応は無増悪生存ならびに全生存率と相関した。3 群間における 1 年無増悪生存率は、CRP 非上昇群、CRP 早期反応群、非 CRP 早期反応群の順に各々50%、23%、10%(p<0.001)、また、無増悪生存期間の中央値は、各々12 か月、8 か月、3 か月(p<0.001)であった。3 群間における 1 年全生存率は、CRP 非上昇群、CRP 早期反応群、非 CRP 早期反応群の順に各々79%、62%、36%(p<0.001)、また、全生存期間の中央値は、各々33 か月、19 か月、10 か月(p<0.001)であった。

【考察】

本研究において、CRP 早期反応は、分子標的薬で治療された転移性腎細胞癌症例の無増悪生存ならびに全生存率において、予後予測因子であった。

転移性腎細胞癌の薬物治療には、従来から免疫療法が施行されてきたが、近年、分子標的薬が、薬物治療の第一選択となっている。転移性腎細胞癌の予後因子として Motzer らが提唱した MSKCC 分類(J Clin Oncol. 2004)がある。血液学的因子としては、貧血の有無、高カルシウム血症の有無や lactate dehydrogenase (LDH )などが挙げられるが、これらは免疫療法時代の検討である。分子標的薬時代の検討として、Heng ら(J Clin Oncol. 2009)が新たに好中球増多ならびに血小板増多といった炎症反応性マーカーを予後不良因子として提唱している。

CRP が腎細胞癌の予後因子となることは以前から提唱されている。転移性腎細胞癌症例に対する分子標的治療薬投与前の CRP 値が予後予測因子となることも我々が報告している。また、Teishima らは分子標的薬を投与した転移性腎細胞癌症例において、治療介入後に CRP 値が低下したものはそうでないものと比較して予後が良好であるという報告(BJU Int. 2016)をしている。彼らの報告では、治療介入後の効果判定のために CT スキャンを測定したタイミングでの CRP 値を治療前の CRP 値と比較している。これらは症例を後ろ向きに解析し、CRP 値が治療介入により低下したかどうかを観察しているものである。

転移性腎細胞癌症例の薬物治療として、今後、免疫チェックポイント阻害剤などが新たに 2 次治療以降に選択されることを踏まえると、分子標的薬投与の効果判定がより早いタイミングで施行されることが求められる。今回、我々の報告では分子標的薬投与 4 週間後という早いタイミングでの CRP 値の変化により予後を予測している。分子標的薬投与後早期における治療効果判定が可能となることにより、2 次治療以降へより適切なタイミングで移行することが可能となると考えられる。

【結論】

分子標的薬で治療された転移性腎細胞癌に対し CRP 早期反応は予後予測因子となり、治療早期での予後予測が可能となることが示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5348　号 | 安田　庸輔 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三宅　智<br>副　査　江石　義信、田邉　稔 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本研究は、転移性腎細胞癌症例における予後因子として、血清 CRP 値の有用性をレトロスペクティブに解析したものである。本学および複数の関連施設における 103 例を対象として、主要評価項目を無増悪生存率および全生存率として多変量解析を行った結果、CRP 値が無増悪生存率および全生存率いずれに対しても、予後決定因子として抽出された。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

日常臨床でも一般的に測定している血清 CRP 値と転移性腎細胞癌患者の予後が相関するという系統的な報告は今までになされておらず、臨床の現場での観察から導出された研究である。

２）社会的意義

実臨床における簡便な予後予測および治療方針の決定に寄与する研究成果であり、医療経済の面からも重要な知見と考えられる。

３）研究方法・倫理観

103 名のがん患者を対象に、レトロスペクティブに調査を行った研究であり、統計学的解析法、倫理的配慮についても十分検討されている。

４）考察・今後の発展性

今後は、腎細胞癌への免疫チェックポイント阻害薬の投与機会が増加することを考えると、分子標的治療薬投与時の CRP の変化を早期に検出することにより、適切な時期での治療法の変更が可能となる可能性がある。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、副査の江石教授、田邉教授と合議の上、申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 笠木　祐里 |
| 論文審査担当者 | 主査　金井　正美<br>副査　澁谷　浩司、吉本　貴宣 |
| 論　文　題　目 | Impaired degradation of medullary WNK4 in the kidneys of KLHL2 knockout mice |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

偽性低アルドステロン症Ⅱ型(PHAⅡ)は、高カリウム血症、代謝性アシドーシス、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患である。PHAⅡの原因遺伝子としては過去に、With-No-Lysine Kinase(WNK)1, WNK4, Kelch-like(KLHL)3, Cullin 3(CUL3)の四つが同定されている。当教室ではこれまでに、PHAⅡにおいて、KLHL3がCUL3とE3 ligaseを形成し、腎臓遠位尿細管でWNK1, WNK4を分解することを明らかにしてきた。

KLHL3はBTB, BACK, kelch repeatの3つのドメインを共通にもつKLHL familyに属する。KLHL family のなかで、WNK との結合部位において KLHL3 との相同性が最も高い分子が KLHL2 である。細胞実験では KLHL2 もまた CUL3 と結合し、WNK を分解に導くと考えられたが、生体の腎臓における生理的な役割は不明であった。

そこで、CRISPR/cas9 システムを用いて KLHL2 ノックアウトマウスを作製し、腎臓での表現型を解析した。KLHL2 ノックアウトマウスの腎臓において WNK4 蛋白の増加がみられた。WNK4 の転写亢進は伴わず、分解が障害されていると考えられた。しかし、下流の OSR1/SPAK-NCC カスケードの蛋白発現量に差はなく、過去に当教室で作成した KLHL3 変異マウスのような PHAⅡの徴候は呈さなかった。

KLHL2 ノックアウトマウスの腎臓において WNK4 の分解障害があるにも関わらず PHAⅡ様の徴候がみられない理由として、KLHL2 と KLHL3 の腎臓内での局在の違いに着目した。腎臓を皮質と外側・内側髄質に分けて評価したところ、KLHL2 は腎髄質における発現量がより豊富であり、KLHL2 ノックアウトマウスでは髄質における WNK4 蛋白が有意に増加していた。

KLHL3 は腎皮質の遠位尿細管において NCC のリン酸化を制御し、PHAⅡの原因となることがわかっており、今回の結果から、KLHL2 はその局在の違いのために、NCC の制御には強く関与していない可能性がある。本研究により、KLHL2 が特にマウス腎髄質における WNK4 の制御に関わっていることを明らかにした。

＜緒言＞

偽性低アルドステロン症Ⅱ型（PHAⅡ）は、NCC の機能亢進により高カリウム血症、代謝性ア

シドーシス、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患である。この病態の解明を通じて、尿細管における塩分出納の機序や、生活習慣病としての本態性高血圧の機序および治療アプローチに迫ることが期待できる。この PHA Ⅱの原因遺伝子として WNK1, WNK4, KLHL3, CUL3 が同定されており、KLHL3 は CUL3 と E3 ligase を形成し、WNK キナーゼを分解に導くこと、腎臓遠位尿細管においては主に WNK4 が OSR1/SPAK のリン酸化を介して NCC を活性化することが分かっている。

KLHL3 は BTB, BACK, kelch-repeat の 3 つのドメインを共通にもつ KLHL family の一員である。KLHL3 は kelch-repeat 部位で、基質である WNK と結合する。KLHL family には数十種の分子が存在するが、このなかで KLHL2 は KLHL3 と最も相同性が高く、特に kelch-repeat 部位において 86%の相同性をもつ。KLHL2 は 1999 年に脳に多く発現する分子として同定され、Mayven という別称でも呼ばれる。KLHL2 の生体での機能に関する報告は脳神経系に関するものが多く、腎臓での役割は未だ不明である。過去の研究で *in vitro* において、KLHL2 もまた CUL3 と結合し WNK を分解することがわかってきた。このように KLHL2 には KLHL3 と類似の役割が期待されるにも関わらず、PHA Ⅱの原因遺伝子として過去に報告がない。KLHL2 の生体腎臓での機能を明らかにするため、本研究を行った。

＜方法＞

CRISPR/Cas9 システムを用いて KLHL2 ノックアウトマウスを作製した。Exon 3 と Exon 4 上の PAM 配列を標的とする guide RNA をそれぞれ作成し C57BL/6 マウスにインジェクションを行った。その結果、Exon 3 の 7 塩基欠失と exon 4 の 38 塩基欠失という、変異部位の異なる 2 種類のマウスが得られた。後述する実験において二種類のマウスはいずれも同様の結果を示し、オフターゲット効果の影響が否定できた。このマウスを用いて腎臓のフェノタイプを解析した。血液検査および腎臓蛋白のウエスタンブロッティング、腎臓 mRNA の定量 PCR での解析を行った。また、腎臓内での各分子の発現について、目視で腎臓の切り分けを行い、各部位のウエスタンブロッティングで評価した。

＜結果＞

KLHL2 ノックアウトマウスの腎臓において KLHL2 蛋白の発現が消失していることを確認した。腎臓の WNK-OSR1/SPAK-NCC カスケードを評価したところ、腎臓の WNK4 蛋白発現は増加していた。しかし、OSR1、SPAK、NCC のリン酸化亢進および蛋白発現の増加はみられなかった。また、過去の PHA Ⅱモデルマウスや PHA Ⅱ患者では代謝性アシドーシス、高カリウム血症がみられるため、採血を施行したが、異常はみられなかった。

KLHL3 は腎臓では皮質に限局して存在することがわかっている。一方、KLHL2 については、mRNA レベルで腎臓の各部位に存在することが報告されている。これらより我々は KLHL2 と KLHL3 の局在の違いに着目した。腎臓を皮質、外側髄質、内側髄質の 3 部位のそれぞれに分け、まず野生型マウスにおける KLHL2 発現量を評価したところ、KLHL2 蛋白は皮質よりも髄質により豊富に存在していた。続いてこれらの各部位で、野生型および KLHL2 ノックアウトマウスにおける WNK4 の発現量を確認した。WNK4 は KLHL2 ノックアウトマウスの腎髄質で増加がみら

れ、皮質では有意な増加はなかった。以上より、KLHL2 は実際に生体腎臓において WNK4 を制御していることが明らかになった。特に、腎髄質の WNK4 制御において特に重要な役割を担うことが示唆された。

＜考察＞

KLHL family のうち、CUL3 と複合体を形成し E3 ligase として機能する分子は、KLHL3 以外にも Keap1 など複数が知られている。しかし、これまで WNK キナーゼに直接結合し制御することが分かっていたのは KLHL3 のみであり、他の KLHL 蛋白が生体内で WNK を分解しうるのかは不明であった。

今回、KLHL2 ノックアウトマウスにおいても腎臓の WNK4 分解の障害がみられ KLHL2 もまた実際に腎 WNK4 の制御因子であることを証明した。しかし、既知の下流カスケードである SPAK, OSR1, NCC の変化や血液検査の異常は見られなかった。

KLHL3 は腎皮質の遠位尿細管において NCC のリン酸化を制御し、KLHL3 変異においてこれが障害されると PHA Ⅱ を発症する。今回の結果から、KLHL2 は腎臓内で皮質に比べ髄質により豊富に存在しており、このために NCC の制御にはあまり関与していない可能性が示唆された。

KLHL2 および WNK4 が腎髄質でどのような役割を担っているかは未だ不明であるが、WNK キナーゼには腎皮質以外の役割も報告が散見されている。KLHL3 とは異なる生理的な意義が推測され、今後の検討課題であると考える。

＜結論＞

KLHL2 ノックアウトマウスの作製および解析により、KLHL2 が実際に生体腎臓において WNK4 の制御を担っていることが明らかになった。なかでも、KLHL2 は腎髄質により豊富に存在し、特に腎髄質での WNK4 分解に関わっていることが分かった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5349　号 | 笠木　祐里 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　金井　正美<br>副　査　澁谷　浩司、吉本　貴宣 | |

（論文審査の要旨）

1.　　論文内容

偽性低アルドステロン症Ⅱ型(PHAⅡ)は、高カリウム血症、代謝性アシドーシス、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患である。PHAⅡの原因遺伝子としては過去に、With-No-Lysine Kinase(WNK)1, WNK4, Kelch-like(KLHL)3, Cullin 3(CUL3)の４遺伝子がすでに同定されている。KLHL2 は KLHL3 と相同性が高く、*in vitro* では KLHL3 同様に CUL3 と結合し WNK を分解するが、生体の腎臓における生理的な役割は不明であった。本研究においては、CRISPR/cas9 システムを用いて KLHL2 ノックアウトマウスを作製し、その腎臓での表現型解析から、KLHL2 が腎髄質に置いて WNK4 の制御に関わっていることを明らかにした。

2.　論文審査

1）　研究目的の先駆性・独創性

PHAⅡは、NCC の機能亢進により高カリウム血症、代謝性アシドーシス、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患である。この病態の解明を通じて、尿細管における塩分出納の機序や、生活習慣病としての本態性高血圧の機序および治療アプローチに迫ることが期待できる。本研究では KLHL2 が実際に生体腎臓において、腎髄質により豊富に存在し、WNK4 分解に関わっていることを明らかとした重要な結論を得るに至っており、先駆性、独創性ともに高いものである。

2）　社会的意義

PHAⅡの新しい治療法の開発において、本研究の成果は重要な知見であり、これを基にした治療開発が期待される。

3）　研究方法・倫理観

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて KLHL2 ノックアウトマウスを作製し変異部位の異なる 2 種類のマウスが得られた点が評価される。このマウスを用いて個体レベルでの腎臓表現系の解析を行った。血液検査および腎臓蛋白のウエスタンブロッティング、腎臓 mRNA の定量 PCR での解析を行い、腎臓内での各分子の発現について各部位のウエスタンブロッティングで評価した。これらの研究は動物実験委員会で認められた適切な実験動物計画に基づいて行われている。

3.　考察・今後の発展性

申請者は、本研究の結果から、WNK4 は KLHL2 ノックアウトマウスの腎髄質で増加がみられ、KLHL2 が WNK4 を制御していることから、その新しい治療開発を議論しており、今後の発展が期待される。また、基礎医学的にも、新たな原因遺伝子を探索すべく重要な課題を提示するものであり、申請者の博士研究者としての更なる活躍に繋がるものである。

4.　その他

特になし

5.　審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 榊原　里江 |
| 論文審査担当者 | 主査　江石　義信<br>副査　大久保　憲一、宮崎　泰成 |
| 論　文　題　目 | EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer |

（論文内容の要旨）

‹要旨›

肺癌は進行期に発見されることが多く，微小検体を用いた分子診断が求められている．Endobronchial ultrasound-transbronchial needle aspiration （EBUS-TBNA）検体を用いた Programmed death-ligand 1（PD-L1）の免疫組織化学染色（Immunohistochemistry ; IHC）による評価の有用性を，Transbronchial Biopsy（TBB）検体と比較し検討した. EBUS-TBNA 検体は TBB 検体に比して有意に腫瘍細胞数が多く，挫滅による細胞形態の変化も少なかった（$P<0.001$）．また原発巣の腫瘍内不均一性により，微小検体では必ずしも PD-L1 発現が一致しないことも予測されたが，EBUS-TBNA 検体と原発巣の PD-L1 陽性率には相関が認められた($r=0.75$, $P=0.086$; $n=6$). 同様に EBUS 検体と転移リンパ節でも相関が認められた($r=0.93$, $P=0.023$; $n=5$). さらに切除した EBUS-TBNA 検体と TBB 検体 ($n=16$), TBB 検体と原発巣($n=41$), 転移リンパ節と原発巣($n=47$)にも相関が認められ(all $r>0.48$, all $P<0.001$), 原発巣と EBUS-TBNA 検体の相関を強調する結果となった．これらの結果から EBUS-TBNA は PD-L1 発現の評価に適する検査法であることが示唆された.

‹緒言›

近年，肺癌に対する分子標的薬の開発が進み，分子診断の重要性が再認識されているが，肺癌の多くは進行期に発見されるため，微小検体を用いた分子診断が求められている．これまで肺癌診断は TBB が主流であったが，最近では TBB より多くの組織を採取できる非侵襲的な方法として, EBUS-TBNA が使用されている.

現在，肺癌を含めた悪性腫瘍において，抗 PD-L1 抗体のような免疫チェックポイント阻害薬の有効性が示されている. PD-L1 は T 細胞上の PD-1 に結合し，免疫抑制を促進する調節機構である．腫瘍内の PD-L1 発現は，抗 PD-L1 抗体の臨床効果の予測因子と考えられている．PD-L1 発現は，IHC でのみ評価可能であることから，十分な腫瘍組織を得ることが正確な分子診断のために重要である．生検で採取された微小検体を用いた分子診断は，腫瘍細胞数がわずかなために難しいと考えられ，IHC による PD-L1 発現の評価には十分な腫瘍細胞を用いることが勧められていた．しかしこれまでに，生検で採取された微小検体中の腫瘍細胞の総数や，腫瘍細胞の形態について検討された報告はない.

我々は，主要評価項目として，EBUS-TBNA と TBB で採取された検体の腫瘍細胞の総数と挫滅率を比較し, EBUS-TBNA 検体の PD-L1 発現評価における有用性について検討した.

また，肺癌の腫瘍内不均一性を考慮すると, EBUS-TBNA 検体と対応する原発巣の PD-L1 発現を評価する必要がある．これまでにも，生検検体と原発巣の切除検体の PD-L1 発現の相関についての検討がなされていたが，結論が出ていない．そこで我々は，副次評価項目として，EBUS-TBNA 検体と原発巣の相関関係を確認するため，生検検体と原発巣の切除検体の PD-L1 陽性率を評価した.

‹対象と方法›

主要評価項目は, TBB 検体と比較した EBUS-TBNA 検体の IHC による PD-L1 発現評価の妥当性の検討である．2013 年 1 月から 2014 年 12 月までに，がん研究会有明病院で施行された EBUS-TBNA 213 例を対象とした．EBUS-TBNA は，診断もしくは肺門と縦隔リンパ節の転移の有無の評価目的に施行された．組織診断は，病理医 2 名により，HE 染色と PAS 染色で診断した．組織亜系の判定には，必要があれば IHC を追加し診断した．213 例中，原発性肺癌は 100 例で，主要評価項目では，そのうち腺癌（Adenocarcinoma ; AD）53 例，扁平上皮癌（Squamous cell Carcinoma ; SqCC）17 例，神経内分泌癌（Neuroendcrine carcinoma ; NEC）27 例を対象とし，同時に原発巣から採取された TBB 検体 20 例と比較した．副次評価項目の対象は，同期間に同院で採取された TBB 検体と原発巣の手術検体 41 例，転移リンパ節と原発巣の手術検体 47 例である．また，本研究の対象となった患者は，研究についての十分なインフォームドコンセントを受け，がん研究会の倫理委員会の承認を得た.

本研究において，EBUS-TBNA は肺門と縦郭リンパ節の組織採取にのみ使用した．EBUS-TBNA は，呼吸器科医 2 名以上によってオリンパス社製の EBUS-TBNA システム（BF-UC260F, オリンパス株式会社，東京，日本）を用いて施行された．出血リスクを最小限にするために血流ドップラーを用いてリンパ節周囲およびリンパ節内の血流を観察した. TBNA は 22G の穿刺針で 10-20 回穿刺した. 1 検査中のリンパ節の穿刺吸引回数は 3-5 回とした．凝血塊や組織片は検体採取後, 20％中性緩衝ホルマ ン固定し，パラフィン包埋した組織ブロックから 2μm に薄切した．複数個のリンパ節を穿刺した場合には，採取した腫瘍組織が最大の検体を対象とした．合併症は 213 例中 1 例にキシロカイン中毒を認めたが，死亡例はなかった．また，EBUS-TBNA 施行後，同時に肺野病変が認められる症例に対して TBB を追加施行した．TBB に使用した内視鏡は EBUS-TBNA と同様で，呼吸器科医 2 名以上で直視下もしくは透視下で腫瘍組織を鉗子で採取した．組織片は検体採取後，EBUS-TBNA と同様に 20％中性緩衝ホルマリン固定し，パラフィン包埋した組織ブロックから 2μm に薄切した.

EBUS-TBNA と TBB で採取された微小検体の IHC による診断の適用条件として，(1)検体内に 100 個以上の十分な腫瘍細胞が確認できること, (2)挫滅などの細胞の形態変化が少ないこと，の 2 項目を満すこととした.

EBUS-TBNA 検体は，目視法と画像解析法で測定した．目視法では，HE 染色標本を用いて病理医が腫瘍細胞数を測定した.画像解析法では, Scan Scope AT Turbo (Aperio Technologies, Vista, CA）によって取り込まれたスライドを，自動解析装置（Aperio Image Scope, Aperio Technologies, Vista,

CA）を用いて測定した． IHC には Leica Bond III automated system (Leica Biosystems Melbourne Pty Ltd., Australia)を使用し，抗体は TTF-1 抗体(mouse monoclonal, clone 8G7G3/1, diluted 1:1000, Dako, Carpinteria, CA, USA), p40 抗体 (mouse monoclonal, clone BC28, 1:200, Abcam, Cambridge, UK) , CK AE1/ AE3 抗体 (mouse monoclonal, clone AE1/ AE3, 1:100, Dako) を使用した. AD は TTF-1 陽性細胞 47 例（TTF-1 陰性 6 例を除外）と SqCC は P40 陽性細胞 15 例（p40 陰性 2 例を除外）を，自動解析装置の nuclear algorithm を用いて解析した. NEC は CK_AE1+3 陽性細胞 27 例を，自動解析装置の membrane algorithm を用いて解析した.

TBB 検体も, EBUS-TBNA と同様に目視法と画像解析法で測定した. TTF-1 陽性 AD 20 例（TTF-1 陰性 2 例を除外）, P40 陽性 SqCC 3 例, CK AE1/ AE3 陽性 NEC 4 例の計 20 例を測定した．さらに, EBUS-TBNA 検体と TBB 検体の細胞形態を比較するため，目視法にて全細胞数中の挫滅細胞の割合を挫滅率として測定した.

PD-L1 抗体(rabbit monoclonal, clone EPR1161(2), 1:200, Abcam)は, pH9, 20 分 100℃の条件で染色し，目視法にて腫瘍細胞の PD-L1 発現を測定した. PD-L1 発現は腫瘍細胞でのみ評価し，いずれの染色強度でも陽性と判断した．また次の 5 つの対象における PD-L1 陽性率の相関関係を評価した．対象は，(a)EBUS-TBNA 検体と原発巣 (n=6), (b)EBUS 検体と転移リンパ節 (n=5), (c)EBUS-TBNA 検体と TBB 検体 (n=16), (d)TBB 検体と原発巣(n=41), (e)原発巣と転移リンパ節 (n=47)とした．手術検体は，20％中性緩衝ホルマリン固定し，パラフィン包埋した組織ブロックから 4μm に薄切した.

‹結果›

主要評価項目と副次評価項目に使用した検体の臨床病理学的背景には有意差を認めなかった.

EBUS-TBNA 検体は TBB 検体に比して有意に腫瘍細胞数が多く，挫滅による細胞形態の変化も少なかった． 目視法での腫瘍細胞数中央値(IQR)は, EBUS-TBNA 検体では 1149(379-3334), TBB 検体では 435(218-1085)であった．画像解析法では EBUS-TBNA 検体では 1893(502-5670), TBB 検体では 312(140-1055)であった．腫瘍細胞数中央値(IQR)は, EBUS-TBNA 検体では 1149(379-3334), TBB 検体では 435(218-1085)であった．目視法と画像解析法によって測定された腫瘍細胞数は相関が認められた(EBUS-TBNA: r = 0.77, P < 0.001; TBB: r = 0.75, P < 0.001). EBUS-TBNA 検体は TBB 検体に比して有意に挫滅による細胞形態の変化も少なかった（$P$<0.001）.

肺癌には腫瘍内不均一性があるため，EBUS-TBNA 検体と切除した原発巣の比較が可能な症例が 6 例を用いて PD-L1 発現を評価した結果，EBUS と切除した原発巣の PD-L1 発現は相関を認めた(r = 0.75, P = 0.086; n=6). 同様に EBUS-TBNA 検体と転移リンパ節でも相関が認められ(r=0.93, P=0.023; n=5), 切除した EBUS-TBNA 検体と TBB 検体 (n=16), TBB 検体と原発巣(n=41), 転移リンパ節と原発巣(n=47)にも相関が認められ(all r>0.48, all P<0.087), 原発巣と EBUS-TBNA 検体の相関を強調する結果となった.

さらに TBB 検体の症例を増やし TBB 検体についても追加検討したところ，TBB 検体では腫瘍細胞数が 100-1000 個では原発巣との相関を認めない(r = 0.19, P = 0.49; n=15)が，腫瘍細胞数が 2000 個以上と多ければ，原発巣との PD-L1 発現の相関係数が高くなった(r = 0.68, P = 0.0019; n=18).

これらの結果から EBUS-TBNA は PD-L1 発現の評価に適する検査法であることが示唆された.

‹考察›

本研究によって, EBUS-TBNA は, TBB に比して採取できる腫瘍細胞数と細胞形態の変化も少ないことから, EBUS-TBNA が肺癌の PD-L1 発現評価に有用であることが示唆された.

これまでの検討では, 肺癌の腫瘍内不均一性から, 微小検体は PD-L1 発現評価に適さないと考えられていたが, 本研究で EBUS-TBNA, TBB, 原発巣, 転移リンパ節の PD-L1 陽性率は類似する傾向にあったため, EBUS-TBNA は PD-L1 発現評価に有用であると考えた.

近年, 分子標的治療薬が開発され, 肺癌において EGFR 遺伝子変異や ALK 転座は, 薬剤の治療効果を予測する治療効果予測バイオマーカーとなる. PD-1/PD-L1 抗体は, T 細胞の制御経路を標的とし, 抗腫瘍免疫の増強することによる効果的な肺癌治療法である. 多くの臨床試験において, 腫瘍細胞の PD-L1 IHC は, PD-1/PD-L1 抗体の治療効果を規定する要素と考えられた. 免疫チェックポイント阻害剤は期待の薬だが, いまだ特異的なバイオマーカーは確立していない.

また内視鏡は肺癌の分子診断に有用とされ, TBB 検体は EGFR 遺伝子変異や ALK 転座などの遺伝子解析にも用いられるが, 本研究では TBB と原発巣の PD-L1 陽性率は, TBB で採取された細胞数が多いほど相関を認めた.

EBUS-TBNA は, TBB に比して安全で非侵襲的な検査であり, 確定診断と縦郭/肺門リンパ節転移の有無から病期診断目的に施行される. さらに, 術後再発の再生検目的や, 繰り返しの検査も可能である. また EBUS-TBNA 検体を用いて EGFR 遺伝子変異や ALK 転座, FISH, PCR などの遺伝子解析も可能であるが, 本研究は, EBUS-TBNA が腫瘍細胞数と細胞形態の 2 点で PD-L 発現評価に有用か検討した初めての研究である.

本研究の限界は, 四点あげられ, 第一に対象症例数が少ない. 原因は, EBUS-TBNA 施行には熟練した技術が必要であることや, EBUS-TBNA で腫瘍細胞が採取された場合は手術不能の進行期であることが多いことが考えられる. 第二に, PD-L1 抗体による治療効果のデータがない. 第三に, PD-L1 発現を腫瘍細胞のみで評価している抗 PD-L1 抗体の治療効果予測バイオマーカーはまだ確定していない. 第四に, 単施設における日本人患者のみを対象としている. そのため, 研究結果をより確証するためには, さらなる症例数の蓄積が必要である.

‹結論›

本研究において, EBUS-TBNA は PD-L1 発現の評価に適する検査法であることが示唆された.

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5350　号 | 榊原 里江 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　江石　義信<br>副　査　大久保　憲一、宮﨑　泰成 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は、進行性肺癌患者に対して免疫チェックポイント阻害薬の適応を決める上で重要なPD-L1 発現解析法において、EBUS-TBNA 検体を用いた免疫染色法がその発現解析の評価に適する検査法であることを明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

現在, 肺癌を含めた悪性腫瘍において, 抗PD-L1抗体のような免疫チェックポイント阻害薬の有効性が示されている.腫瘍内のPD-L1発現は, 抗PD-L1抗体の臨床効果の予測因子と考えられている. PD-L1発現は,免疫染色でのみ評価可能であることから, 十分な腫瘍組織を得ることが正確な分子診断のために重要である. 生検で採取された微小検体を用いた分子診断は, 腫瘍細胞数がわずかなために難しいと考えられ, 免疫染色によるPD-L1発現の評価には十分な腫瘍細胞を用いることが勧められている。このような背景の下、申請者はEBUS-TBNAとTBBで採取された検体の腫瘍細胞の総数と挫滅率を比較し, EBUS-TBNA検体のPD-L1発現評価における有用性について検討するとともに、EBUS-TBNA検体と原発巣の相関関係を確認するために、生検検体と原発巣の切除検体のPD-L1陽性率を評価しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

EBUS-TBNA検体はTBB検体に比して有意に腫瘍細胞数が多く, 挫滅による細胞形態の変化も少なかった。原発巣の腫瘍内不均一性により微小検体では必ずしもPD-L1発現が一致しないことも予測されたが, EBUS-TBNA検体と原発巣のPD-L1陽性率には相関が認められた。同様にEBUS検体と転移リンパ節でも相関が認められた。さらに切除したEBUS-TBNA検体とTBB検体、TBB検体と原発巣、転移リンパ節と原発巣にも相関が認められ、原発巣とEBUS-TBNA検体の相関を強調する結果となった。

以上のように申請者は、EBUS-TBNA 検体を用いた免疫染色法が PD-L1 発現の評価に適する検査法であることを明らかにしている。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、がん研究会有明病院で施行されたEBUS-TBNA 213例を対象とした. EBUS-TBNAは診断もしくは肺門と縦隔リンパ節の転移の有無の評価目的に施行された. 組織診断は, 病理医2名によりHE染色とPAS染色で診断した. 組織亜系の判定には必要があれば免疫染色を追加し診断した.

EBUS-TBNA検体は目視法と画像解析法で測定した. 目視法ではHE染色標本を用いて病理医が腫瘍細胞数を測定した.画像解析法では自動解析装置を用いて測定した. EBUS-TBNA検体とTBB検体の細胞形態を比較するため, 目視法にて全細胞数中の挫滅細胞の割合を挫滅率として測定した. PD-L1 抗体による免疫染色を施行し目視法にて腫瘍細胞のPD-L1発現を測定した. PD-L1発現は腫瘍細胞でのみ評価し、いずれの染色強度でも陽性と判断した。研究方法は十分な外科病理学的な知識と免疫組織学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「肺癌の腫瘍内不均一性から微小検体はPD-L1発現評価に適さないと考えられていたが、本研究でEBUS-TBNA, TBB, 原発巣, 転移リンパ節のPD-L1陽性率は類似する傾向にあることから、EBUS-TBNAは PD-L1発現評価に有用である」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 佐々木　絵美 |
| 論文審査担当者 | 主査　金井　正美<br>副査　澁谷　浩司、吉本　貴宣 |
| 論　文　題　目 | *KLHL3* Knockout Mice Reveal the Physiological Role of KLHL3 and the Pathophysiology of Pseudohypoaldosteronism Type II Caused by Mutant KLHL3 |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

遺伝性高血圧疾患である、偽性低アルドステロン症Ⅱ型 (PHAⅡ)の原因遺伝子として、With-no-lysine kinase 4 (WNK4) や WNK1 以外に、kelch-like 3 (KLHL3) と cullin3 (CUL3) が同定され、最近これらがユビキチン・リガーゼ複合体として WNK キナーゼの分解を担うことが明らかとなった。当教室では、以前に KLHL3 $^{R528H/+}$ ノックインマウスを作製し、変異型 KLHL3 が WNK1 と WNK4 の分解を阻害し PHAⅡを来たすことを証明した。しかし、KLHL3 の全身における組織分布や機能、そして PHAII の常染色体優性遺伝変異型 KLHL3 R528H の機序は不明であった。

今回、KLHL3 の組織分布と生理的機能を明らかにし、変異型 KLHL3 R528H による PHAII の病態生理を明らかにするために、KLHL3 KO/LacZ KI（KLHL3 -/-）マウスを作製し解析した。

β-gal の Western blotting では、特に脳と腎臓に発現が強く確認され、KLHL3 が豊富な臓器であると考えられた。KLHL3 -/- マウスは腎臓において WNK 蛋白が増加することで PHAII 様の表現型を示したが、他の臓器での WNK キナーゼ発現量の変化は認めなかった。一方、KLHL3 +/- マウスでは、KLHL3 がヘテロになったにも関わらず、KLHL3$^{R528H/+}$とは異なり、phenotype を認めなかったことから、変異型 KLHL3 R528H には dominant negative 効果があることが示唆された。その機序解明のために、細胞実験を行い、変異型 KLHL3 R528H は 2 量体を形成することによって、dominant negative 効果を発揮すると考えられた。

＜緒言＞

遺伝性高血圧疾患である偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAⅡ)は、塩分感受性高血圧、高カリウム血症、代謝性アシドーシスを呈する単一遺伝子変異によるものであり、2001 年に With-no-lysine kinase 1 (WNK1)、WNK4 がその原因遺伝子として同定された。PHAⅡの病態解析を通じ、腎遠位尿細管において WNK-oxidative stress-responsive kinase 1 (OSR1)/STE20/SPS1-related proline/alkaline-rich kinase (SPAK)カスケードが Na-Cl 共輸送体 (NCC)を正に制御を行うことを見出した。2011 年に、kelch-like 3 (KLHL3)、cullin3 (CUL3) が新たに原因遺伝子として報告され、KLHL3$^{R528H/+}$ノックインマウスの解析を通じて KLHL3/CUL3 ユビキチン・リガーゼ複合体として、WNK1、WNK4 のユビキチン化とその分解に関与することが証明された。しかしながら、生理的

な KLHL3 の役割はまだ十分には解明されておらず、KLHL3 が発現量によって WNK 分解能が制御されるかどうか不明である。また、KLHL3 が全身でどのように発現しているかなど、他臓器での働きもわかっていない。さらに、KLHL3$^{R528H/+}$ノックインマウスの解析から変異型 KLHL3R528H の dominant negative 効果が示唆されたが、その機序は不明であった。

今回、我々は独自に作成した KLHL3 KO/LacZ KI (KLHL3 -/-)マウスを用いて、KLHL3 の局在や各臓器での WNK の発現量の検討を行った。その結果、KLHL3 は腎臓と脳に発現が多いことがわかったが、腎臓以外の臓器では WNK の増加を認めなかった。KLHL3 +/-が野生型マウスと同様に WNK カスケードの亢進を認めなかったことから、PHAII の常染色体優性遺伝変異 KLHL3 R528H の dominant negative 効果が示唆された。その機序についても細胞実験を用いて検討を行ったところ、変異型 KLHL3 R528H は, 野生型 KLHL3 とヘテロダイマーを形成することで、dominant negative 効果を有していることが明らかになった。

<方法>

KLHL3 の exon3 に LacZ を組み込み, 内因性の KLHL3 プロモーター下に β-gal を発現する KLHL3 KO/LacZ KI (KLHL3 -/-)マウスを作製した。

β-gal の western blotting により各臓器での KLHL3 の発現を評価し、発現を認めた臓器に関しては LacZ 染色を試み、WNK 発現量に関しても評価した。また、野生型、KLHL3 +/-、KLHL3 -/-マウスにおいて、血液検査ならびに腎臓における WNK シグナルへの KLHL3 の発現量による制御を検討した。

<結果>

KLHL3 KO/LacZ KI（KLHL3 -/-）マウスを用いた、β-gal 抗体の Western blotting では、腎臓、脳、眼、精巣、肺、心臓、肝臓、胃、大腸に染色を確認し、特に脳と腎臓で発現が強く認められた。LacZ 染色では、腎臓の遠位尿細管、脳の皮質と海馬に強く染色が認められた。KLHL3 -/- マウスは腎臓において WNK1 と WNK4、SPAK と NCC のリン酸化の増加を認め、PHAII 様の表現型（高 K 血症、代謝性アシドーシス、塩分感受性高血圧）を示した。しかし、WNK キナーゼは腎臓以外の臓器で増加を認めなかった。一方、KLHL3 +/-マウスにおいては、野生型と同様に WNK シグナルの増加を認めなかった。このことは、以前に当教室で作製解析を行った、PHA Ⅱ モデルマウスである、KLHL3 $^{R528H/+}$ヘテロノックインマウスにおいて、野生型 KLHL3 がヘテロであっても phenotype を示すことから、変異型 KLHL3 R528H が dominant negative 効果を有することが示唆された。その機序を探るために、HEK293T 細胞に、野生型 KLHL3 を強制発現させ共免疫沈降を行ったところ、KLHL3 は 2 量体を形成することがわかった。次に野生型 KLHL3 と変異型 KLHL3 R528H でも同様の実験を行い、ヘテロ 2 量体を形成することを確認した。さらに、WNK4 蛋白の分解は、変異型 KLHL3 R528H を加えると dominant negative 効果により減弱し、この効果は BTB-BACK ドメインを欠損させ、２量体形成をできなくした KLHL3 R528H では認めないことから、変異 KLHL3 R528H は, 野生型 KLHL3 とヘテロダイマーを形成することで、dominant negative 効果を有していることがわかった。

＜考察＞

以上の知見から、KLHL3 欠損による PHAⅡ様症状が出現することは、本来 WNK1 ならびに WNK4 と結合するはずの KLHL3 が欠損することで、これらのユビキチン化が減弱し、その結果 WNK の蛋白量が増加して、WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化シグナルが亢進するために発症すると考えられた。

腎臓以外にも KLHL3 は多臓器に発現していることがわかったが、WNK の発現量に関しては変化を認めなかった。これは、KLHL3 を発現している臓器の WNK 蛋白は KLHL3 のみに制御されているのではないことが考えられた。KLHL3 は多臓器にわたり存在していることがわかったため、本マウスを通じて、今後は腎外臓器での KLHL3 の働きを探る必要がある。

PHAⅡを起こす変異型 KLHL3R528H には dominant negative 効果があり、2 量体形成がその一因として示唆され、強いフェノタイプを示すには、KLHL3 は量だけではなく，KLHL3 の質的変化も重要であると考えられた。

今回、KLHL3 が腎臓におけるナトリウム調節について重要な生理的役割を果たしていることを証明したことになり、今後の高血圧の研究や新薬の開発に大きなインパクトをもたらすものと考えられる。

＜結論＞

KLHL3-/- マウスは腎臓において WNK 蛋白が増加することで PHAII 様の表現型を示したが、他の臓器での WNK キナーゼ発現量の変化は認めなかった。

変異型 KLHL3 R528H は 2 量体形成によって dominant negative 効果を発揮すると考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5351　号 | 佐々木　絵美 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　金井　正美<br>副　査　澁谷　浩司、吉本　貴宣 | |

（論文審査の要旨）

1.　　論文内容

偽性低アルドステロン症Ⅱ型(PHAⅡ)は、高カリウム血症、代謝性アシドーシス、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患である。PHAⅡの原因遺伝子は、With-No-Lysine Kinase(WNK)1, WNK4, Kelch-like(KLHL)3, Cullin 3(CUL3)の４遺伝子で、KLHL3 は CUL3 と結合し WNK を分解することがすでに明らかにされている。しかしながら KLHL3 の全身における組織分布やその機能、PHAII の常染色体優性遺伝変異型 KLHL3 R528H の病態発症の機序は不明であった。本研究においては、KLHL3 KO/LacZ KI（KLHL3 -/-）マウスを作製し、KLHL3$^{R528H/+}$との比較により、KLHL3 を介した PHAⅡ発症のメカニズムを解明した。

2.　論文審査

1）　研究目的の先駆性・独創性

PHAⅡは、NCC の機能亢進により高カリウム血症、代謝性アシドーシス、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患である。その病態解明を通じて、尿細管における塩分出納の機序や、生活習慣病としての本態性高血圧の機序および治療アプローチに迫ることができる。本研究では、KLHL３の全身における組織分布や機能、KLHL3 -/- マウスが腎臓において WNK 蛋白を増加させ、PHAII 様の表現型を示し、更に、変異型 KLHL3 R528H との比較から、その dominant negative 効果を示した重要な結論を得るに至っており、先駆性、独創性ともに高いものである。

2）　社会的意義

PHAⅡの新しい治療法の開発において、本研究の成果は重要な知見であり、これを基にした治療開発が期待される。

3）　研究方法・倫理観

本研究では、KLHL３KO/LacZ KI マウスを作製し、KLHL3 $^{R528H/+}$ヘテロノックインマウスと共に解析を進めた点が評価される。これらのマウスを用いて個体レベルで KLHL３表現解析を行った。血液検査および腎臓蛋白のウエスタンブロッティング、組織解析、生化学解析を実施した。以上の研究は動物実験委員会で認められた適切な実験動物計画に基づいて行われている。

3.　考察・今後の発展性

申請者は、本研究の結果から、変異型 KLHL3 R528H は 2 量体を形成することによって、dominant negative 効果を発揮することを示した。総合的に KLHL3 を介した PHAⅡ発症機序の一端の解明につながるものと考えられ、今後の発展が期待される。また、基礎医学的にも、新たな病態発症機序を探索すべく重要な課題を提示するものであり、申請者の博士研究者としての更なる活躍に繋がるものである。

4.　その他

特になし

5.　審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 佐方　信夫 |
| 論文審査担当者 | 主査　髙田　和生<br>副査　窪田　哲朗、河原　和夫 |
| 論　文　題　目 | Epidemiological study of adult‐onset Still's disease using a Japanese administrative database |

（論文内容の要旨）

**【要旨】**

成人スティル病は稀な自己免疫疾患であり、その希少性から十分な症例数を有した疫学的研究は少ない。成人スティル病の予後は良好と言われているが、一方で血球貪食症候群（MAS）や播種性血管内凝固症（DIC）など致死的な合併症を起こすことが知られている。しかし、この合併症の頻度や死亡率については、これまで十分に調べられていない。そこで、本研究では、日本の医療管理データベースを用いて、成人スティル病で入院した患者の特性および致死的合併症の発生率、院内死亡率について分析を行った。

分析結果では、513 人の成人スティル病患者が同定され、平均年齢は 53.1 歳、女性の割合は 64.1%であった。年齢分布では明らかなピークはなく、30 歳代と 60 歳代で比較的患者数が多かった。合併症については、本研究では MAS と DIC 合わせて 76 人が同定され、発症頻度は 14.8%（95%信頼区間:11.9-18.2）であった。年齢調整した後でも女性は男性よりも合併症の発症頻度が高く、オッズ比は 2.07（95%信頼区間 1.14-3.73）であった。

本研究の結果から成人スティル病は若年成人に限らず、全ての年齢層に発症していることが分った。また、高齢者の AOSD 患者は今後、人口の高齢化とともに増えていくものと考えられた。重篤な合併症については、女性の方が発症しやすいことが示された。

**＜緒言＞**

成人スティル病（Adult-onset Still’s disease, 以下 AOSD）は原因不明の全身性炎症疾患で 1971 年に最初に報告された。症状としては、高熱と全身性の発疹、関節痛、リンパ節腫張を特徴とする。診断には山口基準が最も用いられており、治療は主にステロイド、時に免疫抑制剤を用いるが最近では、生物学的製剤の有効性が報告されている。

AOSD は比較的予後良好な疾患で、大抵の場合は致死的ではないと報告されている。しかしながら、血球貪食症候群(MAS)や播種性血管内凝固症（DIC）を合併することがあり、これらは致死的である。この合併症については、AOSD が希少疾患であるため （0.16-0.4/100,000 人） どの程度の頻度で起きるのか、またどの程度の割合で死亡するのかについては、これまで十分なサンプル数で示された研究はない。そこで本研究では、AOSD の合併症の発症率と死亡率、合併症

患者の属性を明らかにすることを目的に、日本の大規模疾病管理データベース(DPC データ)を用いて研究を行った。

＜方法＞

本研究では、日本の急性期入院医療における診断群分類（DPC）のデータベースのうち、2010 年 7 月 1 日から 2012 年 3 月末までに入院した患者のデータを用いて分析した。

対象患者は、ICD10 コードで M06.1 成人スティル病が主傷病として記録されている患者で初回の入院例のみとした。合併症については、MAS は ICD10 コード（D76.3）、DIC については D65 が病名として記録されている患者を対象とした。対象患者が AOSD であることの確度を上げるため、画像検査（造影 CT、MRI、シンチのいずれか）を受けており、血液培養を入院中に実施した者、加えてプレドニゾロンを 20mg/日以上または 0.5mg/kg/日以上投与されている者で、4 日以上入院している者に限定した。「AOSD 疑い」と記録されている患者、他の自己免疫疾患（悪性関節リウマチ、血管炎、SLE など）や悪性腫瘍が併存症として記録されている患者は分析対象外とした。

＜結果＞

2 年 9 ヶ月の対象期間で上記の適格基準をみたした AOSD 患者は 513 人であった。患者の平均年齢は 53.1 歳で女性の割合は 64.1%であった。男女比は 75 歳以上の群を除く全ての年齢層でほぼ同じであった。年齢分布については、明らかな年齢のピークは認めないが、30 歳代と 60 歳代に患者数が多かった。本研究では、76 人（14.8%）に MAS と DIC が合併していた。これらの患者のうち、52 人は骨髄穿刺・生検をうけていた。死亡率に関しては、51 人の MAS 合併患者のうち、8 人が死亡し、25 人の DIC 合併患者のうち 4 人が死亡していた（それぞれ 15.7%、16%）。年齢調整した後でも女性は男性よりも合併症を発症しやすかった(オッズ比 2.07、95%CI：1.14-3.73, p = 0.014 ).

＜考察＞

本研究では、DPC データを用いて、AOSD について先行研究にはない規模のサンプル数で患者特性と致死的合併症の発症率、死亡率を示した。

本研究の結果から、第 1 に多くの高齢 AOSD 患者が存在することが示された。本研究の対象患者のうち、75 歳以上は 16%を占めており、平均年齢も高かった。これまで AOSD は若年成人に多いとされていたが、本研究の結果は異なっていた。これについては、同じ日本で行われた複数の AOSD に関する疫学研究において、調査年が進むにつれて患者の平均年齢が上がってきていることから、人口の高齢化による影響が考えられた。

第 2 に MAS と DIC の合併症発生率が、本研究では比較的大きなサンプル数を元に示された。特に、これらの合併症については、骨髄穿刺・生検が大半の症例で行われていることから、診断の確度は高く、先行研究の結果にも一致していることから、結果として強固であると言える。

第 3 に本研究では MAS と DIC 合併患者の死亡率が示されたが、これについては先行研究がほとんどなく、貴重な知見であると言える。先行研究 (Lenert 2016)では、MAS 合併患者の死亡率

を 0%と報告しているが、患者数が少ない上（7 人）、本邦では上市されていない生物学的製剤（Anakinra, IL－１受容体阻害薬）を全例で投与しており、本研究の結果とは異なったと考えられた。日本でもこのような生物学的製剤の使用が保険適用されれば、致死的合併症の死亡率も下がる可能性があると考えられた。

本研究では幾つかの限界がある。第一に DPC データベースでは主治医がコーディングを決定しており、カルテ情報などの臨床情報を有さないため、この診断が本当に正しいのかは確認できず、誤った対象患者を含んでいる可能性がある。第 2 に、本研究では対象とする AOSD 患者の確度を上げるため、血液培養や画像検査の実施、ステロイドの投与などの条件を満たした者のみ分析している。このため、これらを満たさないが本当は AOSD であった患者を対象外としている可能性があり、選択バイアスの恐れがある。第 3 に DPC データでは異なる病院への再入院については判別できない。このため、本研究では再入院症例は対象外であるが、初回入院症例の中に他病院からの再入院例が含まれている可能性がある。

＜結論＞

成人スティル病は本研究では若年成人に優位ではなく、全ての年齢層に発症していることが分った。高齢者の AOSD 患者は人口の高齢化とともに今後も増えていくのと考えられた。また重篤な合併症は女性の方が発症しやすいことが示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5352　号 | 佐方　信夫 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　髙田　和生<br>副　査　窪田　哲朗、河原　和夫 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

日本の急性期入院医療における診断群分類（Diagnosis and Procedure combination, DPC）のデータベースを用いて、成人スティル病で入院した患者の特性および致死的合併症（血球貪食症候群、播種性血管内凝固症候群）の発生率、院内死亡率について分析したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

稀少疾患である成人スティル病において、全国網羅的な業務データである DPC データベースを用いることにより、他に例のない 513 名もの症例集積を達成した点に独創性がある。また抽出症例の診断的正確性向上のために、主傷病コードだけでなく画像検査、血液培養、治療内容などよりなる適格基準を用いた点にも独創性がある。さらに、これまでほとんど報告がなかった血球貪食症候群および播種性血管内凝固症候群の合併率および死亡率を提示した点に先駆性がある。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 同定された 513 人の成人スティル病患者の平均年齢は 53.1 歳であり、年齢分布では明らかなピークはなく（75 歳以上が 16%を占める）、30 歳代と 60 歳代で比較的患者数が多かった。
2. 血球貪食症候群または播種性血管内凝固症候群の合併を 76 人に認め（14.8%）、年齢調整した後でも女性は男性よりも合併症の発症頻度が高かった（オッズ比 2.07）。

高齢者においても発症率が大きく下がらないことを示した点は、特に今後さらに高齢化が進む日本において意義がある。実際、本研究の結果が厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等政策研究事業自己免疫疾患に関する調査研究班編集による成人スチル病診療ガイドライン 2017 年版における根拠の一つとして引用されている。また血球貪食症候群および播種性血管内凝固症候群の合併率および死亡率、そしてそれらにおける患者属性（女性優位）が提示されたことは、現場で本疾患の診療にあたる医療者に対する注意喚起、そして有効な治療薬・治療法の積極的な開発の促進に繋がるという点で、社会的意義がある。

３）研究方法・倫理観

1058 病院より提出された、2010 年 7 月からの 1 年 9 ヶ月間の入院患者に関する DPC データ（連結不可能匿名化）より、成人スティル病を主傷病とする初回入院例を抽出し、診断的正確性向上のために、当該疾患入院例にほぼ普遍的に行われる検査および治療にて限定し、さらに類似疾患

合併者除外も行った上で、患者属性（年齢、性別）と重篤合併症および院内死亡との関係を解析した。これらは十分な臨床的および疫学的知識の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺える。

本研究は、本学医学部の倫理審査委員会から承認を得ている。

４）考察・今後の発展性

本研究では診療情報を使用しておらず、入院を要する患者のみに限定したものであり、さらに成人スティル病や播種性血管内凝固症の疾患特性（確定診断方法がない、分類基準の限界など）などもあり、本研究が示したデータが実際の合併率、死亡率を過大または過少評価している可能性が否めず、検証的研究（validation study）が必要であることを申請者は認識している。成人スティル病など特定疾患医療費助成制度対象疾患の場合には、診断的正確性向上目的に同助成の有無に関する情報などの利用も検討できる可能性もある。DPC データベースを用いたアプローチは他の稀少疾患においても、診断的正確性への配慮により適用可能であり、応用発展性がある。

**３．その他**

なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 近藤　崇史 |
| 論文審査担当者 | 主査　大川　淳<br>副査　秋田　恵一、神野　哲也 |
| 論　文　題　目 | Evaluation of the relationship between the static measurement of transverse arch flexibility of the forefoot and gait parameters in healthy subjects |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

本研究は，健常者 20 名を対象に，3 次元足部形状スキャナを用いた横アーチの形態評価と矢状面における歩行動作の生体力学因子(床反力，下肢関節角度，下肢関節モーメント)の関係を検討した．横アーチの形態評価は横アーチの幅と高さを(1)座位，(2)立位，(3)下腿前傾・前足部荷重位の 3 条件で計測を行い，それぞれの条件間の変化率を算出した．本研究の結果では，横アーチの形態評価における立位と下腿前傾・前足部荷重位の条件間の変化率と歩行動作の生体力学的因子(立脚期前半の床反力後方方向成分，立脚期後半の床反力前方方向成分，足関節底屈モーメント，股関節伸展角度)で関係を認めた．横アーチの形態評価では立位と下腿前傾・前足部荷重位の条件間の変化率において，横アーチ stiffness が高い足では足関節底屈モーメント，横アーチ stiffness が低い足では股関節角度変化を多く示す歩行動作を行うと考えられた．

＜緒言＞

足部の構造として代表的なものには，内側縦アーチ，外側縦アーチ，横アーチのアーチ構造が挙げられる．足部は複数の骨ならびに関節からなる複雑な構造のため，機能的に捉えづらく評価の方法が限られているのが現状である．

足部アーチ構造の臨床評価としては, 内側縦アーチ構造では Arch Height Index や Navicular Drop テストなどがすでに臨床評価として用いられている．

足部アーチ構造の 1 つである横アーチの形態評価では，計測手法として足底圧分布装置，超音波画像診断装置，レントゲン撮影を用いた先行研究が散見される．近年，3 次元形状スキャナなどの非侵襲画像診断装置により体表からの足部形態評価は容易になりつつあるが，横アーチの形態評価と動作との関係を検討したものは少なく，横アーチの臨床評価は限られる．

本研究は 3 次元足部形状スキャナにより横アーチの形態評価を行い，横アーチの形態評価と矢状面における歩行動作との関係を明らかにすることで，横アーチの臨床評価の一助とすることを目的に研究を行った．

＜方法＞

対象は健常成人 20 名(男性 10 名，女性 10 名；平均年齢 22.6 ± 2.8 歳)とした．横アーチの形態計測には，3 次元足部形状スキャナ(INFOOT)を用いた．計測肢位は(1)座位，(2)立位，(3)下腿前傾・前足部荷重位の 3 条件とした．得られたデータから，中足骨頭レベルの横アーチ幅，横アーチ高さを抽出した．抽出した代表値から，座位と立位，立位と下腿前傾・前足部荷重位の変化率(%)を横アーチ幅，横アーチ高さのそれぞれで算出した．歩行動作の計測には，3 次元動作解析装置(VICON)および床反力計を用いた．力学データの算出には，Plug-In-Gait full body model を使用した．動作課題は歩行(歩行率 110 歩/分)とした．歩行中の矢状面上における床反力，下肢関節角度，下肢関節モーメントの最大値および最小値を抽出した．統計学的分析には，横アーチ幅，横アーチ高さの座位と立位，立位と下腿前傾・前足部荷重位，それぞれの条件間の変化率と歩行動作の床反力，下肢関節角度，下肢関節モーメントの関係を検討するため，Shapiro-Wilk 検定によりデータの正規性を確認したのちに，Spearman の順位相関係数を用いて検討を進めた．

＜結果＞

座位と立位の変化率では，横アーチ幅および横アーチ高さともに，歩行動作のいずれの要因においても有意な相関は認めなかった．

立位と下腿前傾・前足部荷重位の変化率では，横アーチ幅の変化率と歩行動作の床反力前方成分と後方方向成分，股関節伸展角度と正の相関関係を認めた．さらに，横アーチ高さの変化率と歩行動作の足関節底屈モーメントと負の相関関係を認めた．

＜考察＞

横アーチの形態評価において座位と立位の条件間の変化率では歩行動作のいずれの要因とも有意な関係を認めず，立位と下腿前傾・前足部荷重位の条件間の変化率では，歩行中の床反力前方方向成分・後方方向成分，股関節伸展角度，足関節底屈モーメントと相関関係を認めたことから，横アーチの形態評価には立位と下腿前傾・前足部荷重位の条件間の横アーチの変化率を捉えることが有用となりうると考えられた．足部は荷重により形態が変化することは先行研究に報告されており，座位と立位の横アーチの形態評価では荷重の量と横アーチ(前足部)への荷重が不十分であったため歩行動作との関係を認めなかったと考えられた．よって，横アーチの形態評価には荷重の位置や量を考慮に入れる必要性が示唆された．

立位と下腿前傾・前足部荷重位の横アーチの変化率と歩行動作の関係では，床反力前方方向成分と後方方向成分に正の相関関係を認めた．床反力後方方向成分は歩行立脚期前半の荷重応答・衝撃吸収の役割を表し，また床反力前方方向成分は歩行立脚期後半の身体重心の前方推進を表すことから立位と下腿前傾・前足部荷重位の横アーチの形態評価において横アーチの広がりやすさが歩行立脚期前半の動作の安定性，歩行立脚期後半の前方推進性を示唆する 1 つの指標となり得ると考えられた．

さらに立位と下腿前傾・前足部荷重位の横アーチの変化率と歩行中の股関節伸展角度とは正の相関関係を，足関節底屈モーメントとは負の相関関係を認めた．本研究の横アーチ変化率を横アーチの剛性・硬さ(stiffness)として解釈すると，横アーチの変化率が大きいほど横アーチの stiffness

は低く，柔軟な横アーチであることを表わしており，横アーチの変化率が小さいほど横アーチの stiffness は高く，硬い横アーチであることを表している．よって，本研究の結果を横アーチの stiffness で解釈すると，立位と下腿前傾・前足部荷重位の条件間の横アーチの形態評価において，横アーチの stiffness が低い場合では足関節底屈モーメントは小さく，股関節角度変化を大きくした歩行動作を行っており，また横アーチの stiffness が高い場合では足関節底屈モーメントは大きく，股関節角度変化を小さくした歩行動作を行っていたと考えられる．

足部形態とジョギングやランディング動作を検討した先行研究では，high arch foot の対象者(stiffness が高い対象者)では足関節の役割が，low arch foot の対象者(stiffness が低い対象者)では股関節の役割が動作中に大きくなると報告されており，今回の研究の足部横アーチの形態評価と同様の知見が得られた．本研究は対象が健常者に限られた研究ではあるが，足部横アーチの形態評価と歩行動作に関係性を認めたことは，臨床評価として活用できる可能性が示唆された．

＜結論＞

横アーチの形態評価では座位と立位の条件間の変化率よりも，立位と下腿前傾・前足部荷重位の条件間の変化率の方が歩行動作と多くの関係を認めた．立位と下腿前傾・前足部荷重位の横アーチの形態評価において横アーチ stiffness が高い足では足関節底屈モーメント，横アーチ stiffness が低い足では股関節角度変化を多く示す歩行動作を行うと考えられた．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5353　号 | 近藤　崇史 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　大川　淳<br>副　査　秋田　恵一、神野　哲也 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は前足部横アーチの形態評価と歩行機能解析における生体力学的計測値との関連を健常人で検討した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

足部には，内側縦アーチ，外側縦アーチ，横アーチのアーチ構造が存在し、アーチ構造の異常により歩行時の慢性痛が惹起される。本研究は、従来研究が少ない横アーチの形態評価を、産総研で開発された独創的な 3 次元形状スキャナを用いて行い、歩行動作中の生体力学的計測値との関連を検討した点で先駆性の高い研究といえる。

２）社会的意義

足の痛みに対する治療法を確立するうえで、基礎的情報となりうる。

３）研究方法・倫理観

足の痛みのない健常人ボランティアのデータを解析し、足アーチと歩行の様式を解明する方法は倫理的には問題がない。さらに、新規性の高い 3 次元形状スキャナによる静的データと、歩行動作解析から求められた床反力（床をける力）や関節可動性などの動的計測値との関連性を検討した研究はこれまでも見られない。

４）考察・今後の発展性

横アーチの形態が荷重状態によって変化しにくい固い足では歩行時の足関節底屈モーメント，横アーチの形態が変化しやすい柔らかい足では股関節伸展との相関がみられた。この結果に基づき、横アーチ形態を理学療法により変化させたり、足痛を訴える患者の足形態からみた歩容改善指導に発展させたりすることが可能と考えられる。

**３．その他**

申請者は理学療法士であるが、医学的観点から研究を遂行し、臨床応用可能な結果を得ることができたことは高く評価できる。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 石井　洋介 |
| 論文審査担当者 | 主査　横田　隆徳<br>副査　立石　宇貴秀　根本　繁 |
| 論　文　題　目 | Chronologic Evaluation of Cerebral Hemodynamics by Dynamic Susceptibility Contrast Magnetic Resonance Imaging After Indirect Bypass Surgery for Moyamoya Disease |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

背景：間接バイパス術は虚血発症のもやもや病に対して効果のあることが示されているが、術後に脳血行動態の改善が始まる時期および改善が最大に達する時期の詳細は明らかでない。

目的：造影剤を用いた MRI 潅流強調画像(DSC-MRI)を間接バイパス術後に繰り返して施行することにより、術後の脳血行動態の経時的な変化を評価した。

方法：間接バイパス術を施行したもやもや病症例のうち、術後 6 ヶ月以内に複数回の DSC-MRI を施行した 25 例 37 手術側を対象とした。小脳を対照とした平均通過時間(MTT)の遅延時間を MTT delay とし、MTT delay の経時的な変化を後方視的に評価した。

結果：術前の MTT delay は 2.11 ± 0.98 秒であり、術後 1 週間以内 1.81 ± 1.16 秒、術後 1-2 週 1.57 ± 1.01 秒、術後 2-4 週 1.55 ± 0.68 秒、術後 4 週-2 ヶ月 1.32 ± 0.68 秒、術後 2-3 ヶ月 0.95 ± 0.32 秒、術後 3-6 ヶ月 0.77 ± 0.33 秒であり、術後 2-4 週以降の全群で術前と比較して有意に MTT delay が減少していた。

結語：間接バイパス術後の脳血行動態の改善は術後早期に始まり術後 3 ヶ月で最大に達した。DSC-MRI は間接バイパス術後の微小な血管新生による血行動態の変化を術直後から検出できることが示唆された。

＜緒言＞

もやもや病は慢性進行性の閉塞性脳血管障害であり、両側内頚動脈終末部の狭窄と「もやもや血管」と呼ばれる代償性に拡張した側副血管を特徴とする。脳梗塞、脳出血、一過性脳虚血発作など様々な臨床像を示し、臨床像によって脳血行動態が異なる傾向を示すことが過去に報告されている。間接バイパス術は虚血発症のもやもや病に対する特異的な手術法として発展してきた。信頼性の高い測定方法を用いて術前に脳血行動態を評価し、症例を選択することにより、間接バ

イス術は小児例、成人例のいずれに対しても低侵襲で脳血行動態の改善をもたらすことが可能である。一方、直接バイパス術と比較した場合に、効果の発現までに時間を要することが問題点の一つとして指摘されてきた。しかしながら、間接バイパス術に引き続いて起こる脳血行動態の経時的変化の詳細は未だ明らかでない。

造影剤を用いた MRI 灌流強調画像である Dynamic Susceptibility Contrast MRI (DSC-MRI)は低侵襲で簡便に脳血行動態の様々なパラメータを測定可能である。かつて DSC-MRI と Positron emission tomography(PET)のパラメータの比較試験がおこなわれ、これにより DSC-MRI における小脳を対照とした平均通過時間(MTT)の遅延時間と PET における酸素摂取率の上昇が相関しており、すなわち DSC-MRI における MTT が貧困灌流の検出に有用であることが明らかにされている。

本研究は DSC-MRI を術後に繰り返して行うことにより、間接バイパス術後の側副血行の発達による脳血行動態の経時的な変化を明らかにすることを目的として行った。

＜方法＞

2005 年 4 月から 2009 年 3 月までに間接バイパス術を施行したもやもや病 57 症例のうち、術後 6 ヶ月間に複数回の DSC-MRI を施行した 25 例 37 手術側(女性 16 例、平均年齢 14.7 ± 11.1 歳)を対象とした。全例術前に DSC-MRI を施行し、術後に計 118 手術側で施行した（術後 1 週間以内に 20 側、1-2 週に 23 側、2-4 週に 30 側、4 週-2 ヶ月に 20 側、2-3 ヶ月に 9 側、3-6 ヶ月に 16 側）。

MRI は 1.5 テスラの Magnetom Vision を用いて撮像し、ピクセル毎に時間変化率曲線から直接 MTT を算出した。関心領域を内頚動脈灌流域(前方循環領域)の皮質下白質および小脳上部においた。小脳を対照とした MTT の遅延時間を MTT delay とした。前方循環領域においた関心領域の MTT delay の平均値を anterior MTT delay として検討に用いた。

データは平均値±標準偏差で表し、一元配置分散分析を行った後に対照群との多重比較には Dunnett 検定、多群間比較には Tukey-Kramer 検定を行った。P<0.05 をもって統計学的有意差とした。

＜結果＞

anterior MTT delay は手術直後に減少が始まり、緩やかに３ヶ月後まで続き、それ以降は横ばいとなった。術前の anterior MTT delay は 2.11 ± 0.98 秒だった。術前と術後各期間を比較すると、術後 1 週間以内 1.81 ± 1.16 秒(p=0.68)、術後 1-2 週間 1.57 ± 1.01 秒(p=0.10)、術後 2-4 週 1.55 ± 0.68 秒(p=0.047)、術後 4 週-2 ヶ月 1.32 ± 0.68 秒(p=0.006)、術後 2-3 ヶ月 0.95 ± 0.32 秒(p=0.002)、術後 3-6 ヶ月 0.77 ± 0.33 秒(p<.001)であり、術後 2-4 週以降の各期間で術前と比較して有意に減少していた。

前方循環領域を frontal, parietal, rolandic, temporal の４つの領域に分割し、局所での MTT delay

の変化の比較を行った。rolandic 領域と parietal 領域では術後 1−2 ヶ月後以降、その他の領域では 2-3 ヶ月後以降の期間で術前と比較して有意な減少がみられた。減少量について比較すると rolandic 領域と parietal 領域で他の領域と比べて有意に MTT delay の減少が大きかった。

対象を subgroup に分けて比較を行った。まず手術前の MTT delay が２秒以上に延長していた群と２秒未満であった群とに分けて比較した。術後の MTT delay の減少量は術前 MTT delay が２秒以上であった群で有意に大きく、術後 2-3 ヶ月後以降は２群間に有意差がなかった。次に成人例と小児例で比較すると、成人例で術後の MTT delay の低下はやや緩やかであったが全期間で２群間に有意差はなかった。成人例では術後 2-3 ヶ月後以降、小児例では術後 1-2 ヶ月後以降で術前と比較して有意な MTT delay の減少がみられた。

＜考察＞

今回我々はもやもや病に対する間接バイパス術後の脳血行動態の経時的変化を DSC-MRI を用いて術後に繰り返し MTT を計測することで評価し、いくつかの新たな知見を得た。第 1 に間接バイパス術後の MTT delay の減少は手術直後に始まり 3 ヶ月まで緩やかに続いた。特定の期間に急速に進行することはなかった。第２に間接バイパス術を施行する開頭野である rolandic 領域と parietal 領域において、他の領域と比べて MTT delay の減少は進行が早く変化も大きかった。第３に術後の MTT delay の変化は術前の MTT delay による影響が大きく、年齢による影響は小さかった。

間接バイパス術による術後の血管新生に関する過去の報告において脳血管撮影検査や MRA を用いた検討では画像所見の変化が確認できるまでに 3-4 ヶ月を要するとされていた。一方でドップラーエコーを用いた最近の報告では間接バイパス術後 1 ヶ月で浅側頭動脈の血流速度の有意な上昇と血管抵抗の減弱がみられ､3 ヶ月後にはこれらの変化が plateau に達していたとされている。また豚の脳虚血モデルを用いた間接バイパス術後の組織学的な検討においては、術後 1 週間で側頭筋とくも膜の間に癒着という形で血管新生(angiogenesis)がみられ、4 週間後に虚血脳では外頸動脈と脳表の小動脈の間に新生血管による吻合(arteriogenesis)が生じていたが、健側では arteriogenesis が生じていなかったと報告されている。最近、間接バイパス術後約 20 年での剖検例において donor 組織と脳表血管の間に 3 層構造の血管壁を有する新生血管によるネットワークが形成され、保たれていたことが報告されている。これら過去の研究結果と今回の結果から、間接バイパス術後 1 週間以内の早期に創傷治癒のプロセスとして開頭野において angiogenesis が始まり、その後に外頚動脈系と内頚動脈系の圧較差による fluid shear stress が存在する領域において arteriogensis が起こり、3 ヶ月ほど続いていくことが示唆された。

対象を術前の MTT delay によって分けた 2 群間の比較において、術前に MTT delay が 2 秒以上に遅延していた群で遅延が 2 秒未満であった群に比べ、術後の MTT delay の改善が有意に大きか

った。これは術前に MTT delay が延長していた群で間接バイパス術後の血管新生がより広範囲にみられたという過去の報告と合致していた。また過去の PET と DSC-MRI の比較検討において MTT delay が 2 秒以上に延長した領域は貧困灌流となっていることが示されており、この結果は間接バイパス術後の arteriogenesis には fluid shear stress としての内・外頚動脈の圧較差が必要という仮説を支持するものであった。

＜結論＞

間接バイパス術後に側副血管が血管撮影で検出可能となるまでには 3-4 ヶ月を要するとされてきたが、脳血行動態の改善は術後 1-2 週間後の早期から始まり術後 3 ヶ月まで続いた。DSC-MRI は間接バイパス術後の微少な angiogenesis および arteriogenesis による血行動態の変化を術後早期から検出可能であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5354　号 | 石井　洋介 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　横田　隆徳<br>副　査　立石　宇貴秀　根本　繁 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

間接バイパス術は虚血発症のもやもや病に対して効果のあることが示されているが、術後に脳血行動態の改善が始まる時期および改善が最大に達する時期の詳細は明らかでない。造影剤を用いた MRI 潅流強調画像(DSC-MRI)を間接バイパス術後に繰り返して施行することにより、術後の脳血行動態の経時的な変化を評価した。間接バイパス術を施行したもやもや病症例のうち、術後 6 ヶ月以内に複数回の DSC-MRI を施行した 25 例 37 手術側を対象とした。小脳を対照とした平均通過時間(MTT)の遅延時間を MTT delay とし、MTT delay の経時的な変化を後方視的に評価した。結果 : 術前の MTT delay は 2.11 ± 0.98 秒であり、術後 1 週間以内 1.81 ± 1.16 秒、術後 1-2 週 1.57 ± 1.01 秒、術後 2-4 週 1.55 ± 0.68 秒、術後 4 週-2 ヶ月 1.32 ± 0.68 秒、術後 2-3 ヶ月 0.95 ± 0.32 秒、術後 3-6 ヶ月 0.77 ± 0.33 秒であり、術後 2-4 週以降の全群で術前と比較して有意に MTT delay が減少していた。以上の結果から間接バイパス術後の脳血行動態の改善は術後早期に始まり術後 3 ヶ月で最大に達した。DSC-MRI は間接バイパス術後の微小な血管新生による血行動態の変化を術直後から検出できることが示唆された。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

もやもや病の間接的血行再建術前後の MRI 潅流強調画像(DSC-MRI)の撮影を行い、脳血行動態の経時的な改善の機序を明らかにして点で先駆性・独創性を有する。

２）社会的意義

もやもや病においては間接的血行再建術が開発されその有効性が報告されているが、直接的血行再建術との優劣や適応の選択については明らかでない。本研究はもやもや病の間接的血行再建術の血行動態を解明する上で意義のある研究成果であると考えられる。

３）研究方法・倫理観

もやもや病患者に対し MRI 潅流強調画像(DSC-MRI)の撮影を行い、小脳を対照とした平均通過時間(MTT)の遅延時間を MTT delay として算出し、間接バイパス術後の脳血行動態の改善は術後

早期に始まり術後 3 ヶ月で最大に達すること を証明した。

４）考察・今後の発展性

本研究では MTT 遅延の低下が術後 2-4 週間で認められ、3 カ月以後ではほぼ plateau に達していた。このことは血行再建術後 1-2 週間で毛細血管レベルの angiogenesis が起こり、4 週間後に動脈吻合による arteriogenesis が起こるという動物実験結果を裏付けるデータであると推察した。また、また過去の PET と DSC-MRI の比較検討において MTT delay が 2 秒以上に延長した領域は貧困潅流となっていることが示されており、この結果は間接バイパス術後の arteriogenesis には fluid shear stress として の内・外頚動脈の圧較差が必要という仮説を支持するもの であった 。今後はより侵襲のない ASL との関係や発展性を議論した。

**３．その他**

**４．審査結果**

本論文は間接バイパス術後のもやもや病患者に対し DSC-MRI を施行して 術後の局所における微小血管新生による血行動態の変化をとらえたもの であり、先駆的ではあるがまだ発展途上の領域であると解釈される。しかし、申請者はそういった現時点での限界も良く理解した上で考察しており、また、研究方法について複数の機能画像検査方法の優劣や血行動態の因子である脳血流量、脳血液量との関連などの基本事項を質問して的確な回答が得られたため、申請者は、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 日浦　幹夫 |
| 論文審査担当者 | 主査　立石　宇貴秀<br>副査　横田　隆徳、杉原　泉 |
| 論　文　題　目 | Response of Cerebral Blood Flow and Blood Pressure to Dynamic Exercise: a Study using PET |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

持久的運動に伴い血圧と脳血流の変動が生じる。本研究は運動中及び運動後低血圧(post exercise hypotension: PEH)における血圧と脳血流の応答を陽電子放出断層撮像法（positron emission tomography ; PET）を用いて検討した。脳血流は$^{15}O$-$H_2O$ を用いたPET検査によって計測された。11名の被験者を対象とし、安静時（Rest）、運動開始時（Ex1）、運動継続後期（Ex 2）およびPEHにおける脳血流を$^{15}O$-$H_2O$ を用いたPET検査によって計測した。全脳血流量(global cerebral blood flow: gCBF)はEx1においてRestと比較し13%有意に増加したが、Ex2およびPEHにおいては変化しなかった。Restと比較しEx1では小脳、両側下肢領域の感覚運動野皮質（$M_{1Leg}$ and $S_{1Leg}$）、島皮質および脳幹で局所脳血流量（regional CBF: rCBF）の増加を認めたが（20～42%）、Ex2ではrCBF増加部位は小脳虫部と$M_{1Leg}$ and $S_{1Leg}$に限局していた（28～31%）。PEHではRestと比較し小脳、側頭葉、梨状葉皮質、視床および脳幹でrCBFの減少を認めた（8～13%）。運動中及びPEHにおいてrCBFと平均血圧の間に相関を認めた領域は、脳幹、小脳、および視床下部を含み自律神経系の調節に関与する脳内回路を表象する解剖学的経路に一致していた（$R^2$ = 0.25-0.64）。本研究は高次脳領域が運動時の心血管応答を制御するために脳幹の反射中枢と協調していることを提示している。

＜緒言＞

持久的運動に伴い脳血流量は増加することがこれまでに報告されている。PETによる機能画像を用いてサイクリング運動に代表される多数の筋群で有酸素代謝が持続するダイナミックな運動(持久的運動)中の局所脳血流量（regional CBF: rCBF）を報告した研究は数少ない。運動中は活動筋群への血流供給のために心拍出量は増加し、交感神経系および副交感神経系が同時に変化することで血圧は上昇する。運動中止後に血圧が運動開始前のレベルより低下する現象が知られており、運動後低血圧（post-exercise hypotension: PEH）と呼ばれている。疾病予防を目的とした日常的な運動習慣の内容として、中等度(moderate)運動強度での有酸素身体活動を最低30分間、1週間に5回、あるいは活発な(vigorous)運動強度での有酸素運動を最低20分間、1週間に3回実践することが推奨されている。したがって、習慣的にこのような有

酸素運動を実践する場合には血圧の上昇と低下に伴い脳血流も変動することが予想される。そのため運動中およびPEHにおける脳血流の変化を解明することは重要である。

持久的運動終了後の脳血流の報告は少なく、研究デザインや方法も異なるため得られた結果も一致していない。例えば、単一光子放射断層撮影（single photon emission computed tomography: SPECT)を用いて解析した研究ではrCBFの変化が提示されているが、定量値は計測されていない。一方でpseudo-continuous arterial spin labeling 法によるMRIを用いた研究報告もあるが、MRIあるいはPETによる計測方法に応じてrCBFの定量値は異なることが予想される。

このような背景を踏まえ、本研究の主な目的は$^{15}O\text{-}H_2O$ を用いたPET検査を活用しサイクリング運動中およびPEHにおけるrCBF変化を定量的に解析することである。さらに、運動中およびPEHにおける脳血流と血圧の関係を明らかにする目的で、運動がもたらすrCBFと動脈血圧の変化を同時に解析した。これまでの先行研究の結果とPEHにおける血圧低下の程度を考慮し、PEHに伴うrCBFの変化は運動開始時と比較すると大きくないと仮定した。また、自律神経系あるいは心血管系構築に関与する機能解剖と関係する脳領域、すなわち末梢受容体からの反射性入力を受ける脳幹や視床下部においてrCBFは血圧に相関すると仮定した。

＜方法＞

11名の健常男性を対象とし、PET計測時には低血圧が生じるように、初めの17分間を中等度強度、残りの3分間を高強度で行う20分間の仰臥位サイクリングエルゴメーター運動を実施した。各被験者の運動強度には30%、45% Heart Rate Reserve（予備心拍数）、すなわち、安静時心拍数と最大心拍数の差分の30%および45%心拍数が増加する強度をそれぞれ低等度および中等度運動強度として用いた。PET計測は運動前安静時（Rest）、運動開始3分後（Ex1）、運動開始13分後（Ex2）、運動中止10分後（Post-10）、20分後（Post-20）、30分後（Post-30）に実施し、心拍数（HR)、動脈血圧（BP）を同時に計測した。

PET計測は3Dモードで撮影され、$^{15}O\text{-}H_2O$ 投与後autoradiography 法にてrCBFを算出した。得られた画像データはSPM 8とMatlab 7.0を用いて統計画像処理を実施し、解剖学的部位を参照する目的で各被験者のPET画像とMRI画像は標準脳テンプレートを用いてco-registrationされた。全脳血流量(global cerebral blood flow: gCBF)は、Dr. Viewソフトウェアの機能であるsegmentation法（Bitmap処理）を活用し、標準化されたPET画像上の脳実質のみを対象部位として算定した血流量と定義した。Rest、Ex1、Ex2、Post 10、Post 20、Post 30についてrCBFの絶対値の変化を分散分析（repeated measures one-way ANOVA）を用いて検討し、安静時、運動中およびPEHの時間経過中のrCBFと平均血圧(mean blood pressure: MBP)について回帰分析を実施した。さらにDr.Viewを用いて関心領域におけるrCBFの定量的解析も行った。結果の数値は平均値±標準偏差として提示した。

＜結果＞

低等度（17分）および中等度運動強度（3分）運動中の負荷値はそれぞれ77 ± 6 W、114 ± 6 Wであった。HRはRest（61 ± 8 beats/min）と比較しEx1、Ex2(102 ± 5, 104 ± 6 beats/min)におい

て有意に増加し($p<0.001$)、MBPはRest（90 ± 8 mmHg）と比較しEx1、Ex2(104 ± 10, 97 ± 12 mmHg)において有意に増加した（$p<0.05$）。MBPはPost-10(86 ± 8 mmHg)においてRestと比較し有意に減少した（$p<0.05$）。Restと比較しEx1では小脳、$M_{1Leg}$ and $S_{1Leg}$、島皮質および脳幹にrCBFの増加を認めたが、Ex2ではrCBFの増加部位の範囲が減少した。Post-10ではRestと比較し小脳、上および下側頭葉、左視床、橋、左梨状葉皮質扁においてrCBFの減少を認めた。回帰分析にてrCBFとSBP間で有意な相関を認めた領域は小脳虫部、延髄、中心灰白質（PAG）、$M_{1Leg}$ and $S_{1Leg}$、後部帯状回、視床下部を含んでいた。gCBFはRest(41.8 ± 5.9 mL/100 g/min)と比較しPost 10では減少傾向を認めた（39.2 ± 3.9 mL/100 g/min)。rCBFはRestと比較しEx1において小脳虫部、視床下部、$M_{1Leg}$ and $S_{1Leg}$、右尾状核、島皮質などで著明に増加し、相対変化率は20.1-42.7%であった。Restと比較しPost-10ではrCBFは小脳半球、上側頭回、橋、左視床などで有意に減少し、相対変化率は8.2-12.8％であった。SPMによる回帰分析にて有意な変化を認めた部位のうち小脳虫部、延髄、視床下部では、rCBFの定量値とMBPとの相関係数$R^2$は0.25-0.64であった。

＜考察＞

**持久的運動中および運動後における局所脳血流量変化**

PEHにおけるrCBFをPETを用いて解析した報告はわれわれの知る限り本研究が最初である。本研究の主要な所見としてPEHにおいてrCBFは最大12.8％減少したが、減少の程度はこれまでにSPECTを用いた研究報告と比較して少ない。先行研究ではピーク酸素摂取量の60％運動強度でランニングを行った場合について検討され、PEHの生じた程度は本研究よりも著明であった。PEHにおける血圧低下の程度の違いがrCBFに影響を及ぼすと推測されるが、この関係性を明らかにするためには今後も検討を重ねる必要である。動脈血中酸素分圧と二酸化炭素分圧は有意に脳血流に影響を及ぼすが、本研究ではこれらの値はPEHにおいて安静時と比較し変化しなかったため脳血流への影響はほとんどないと考えられる。

さらに、われわれがこれまでに報告した研究とは異なり本研究では運動中に脳幹においてrCBFの変化を認めた。rCBFがEx1において安静時と比較し増加した領域は脳幹、島皮質、基底核であった。したがって、これらの領域は中枢指令あるいはフィードフォワード制御、もしくは動脈圧反射受容体、化学調節性受容体、exercise pressor reflexを調節する骨格筋のergoreceptorsなどの広範囲の末梢受容体で生じる反射入力を統合する役割を担っていると推測される。

**血圧と局所脳血流量の関係**

血圧が変化した場合、脳血管自動調節能（cerebral autoregulation）によって広範な変動範囲内で（MBP: 60～150 mmHg）脳血流は一定に保たれる。しかし、本研究では運動中とPEHにおけるrCBFとMBPの間に相関を認めた脳領域では、MBPが脳血管自動調節能の限界範囲内にとどまっているにもかかわらずrCBFの変化を認めた。中枢性指令あるいは末梢器官に由来するフィードフォワード制御によって運動はrCBFに影響を及ぼすと考えられ、そのため運動中はrCBFとMBPの関係は従来提唱されている脳血管自動調節能に従わないことが推測される。

運動中とPEHにおいてrCBFとMBPの間に相関を認めた脳領域は、脳幹や視床下部などの数多くの部位を含む「中枢性自律神経ネットワーク」と呼ばれる恒常性維持のための統合器官と重複していた。孤束核、延髄吻側腹外側部は中枢性自律神経ネットワークにおける基幹的構成要素であり、動脈圧反射などの末梢受容体からの入力を受ける中枢性反射部位としての役割を担っている。一方、動脈圧反射は前頭領域あるいは中脳から生じる中枢性指令によって強力に調節されている可能性がある。このように、高次脳領域と脳幹の双方でrCBFとMBPとの間の関連性は運動中の中枢性自律神経ネットワークを提示していると推測される。

視床下部においてrCBFとMBPの間に相関を認めたが、この領域は運動中の中枢性心血管調節に関与していると考えられる。中心灰白質におけるわれわれの結果を支持するように、この領域は心血管応答と関連して多彩な行動の応答を協調させる可能性があることが報告されている。さらに、小脳においてrCBFとMBPの間に相関を認めた所見は、小脳は大脳皮質と脳幹を連絡する機能を担い、認知や情動行動と関連する大脳皮質の活動によって脳幹の反射中心が小脳を介して調整されていることを提示したPETを用いた先行研究の結果と一致する。

本研究では低強度および中等度強度の運動中とPEHにおけるrCBFを定量的に提示した。rCBFとMBPとの間に相関を認めた脳領域は中枢性自律神経ネットワークに相当する。これらの所見は、高次脳領域は運動時の心血管応答の調節に関与し末梢受容体に由来する神経入力が統合される脳幹の反射中枢と協調するという概念を支持するものである。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5355　号 | 日浦　幹夫 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　立石　宇貴秀<br>副　査　横田　隆徳、杉原　泉 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、低強度および中等度強度の運動中と運動後の血圧低下（post-exercise hypotension: PEH）と脳血流量の変化を $^{15}O\text{-}H_2O$ positron emission tomography (PET)を用いて定量測定し、それらの相関関係から PEH に関係する脳領域が自律神経調節と関係があることを *in vivo* で証明した。運動開始 13 分後では脳血流量の増加部位の範囲が減少した。運動中止 10 分後では小脳、上および下側頭葉、左視床、橋、左梨状葉皮質扁において脳血流量の減少を認めた。運動中及び PEH において脳血流量と平均血圧の間に相関を認めた領域は、脳幹、小脳、および視床下部を含み自律神経系の調節に関与する脳内回路を表象する解剖学的経路に一致した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

脳循環代謝の評価で最も信頼性が高いmodalityは、その高い定量性と再現性を持つ $^{15}O\text{-}H_2O$ PET である。本研究結果では運動時の $^{15}O\text{-}H_2O$ PET を経時的に撮影し、その定量値をもとに解析しているため、他に類を見ない貴重なデータを提示し本研究は独創性が認められる。

２）社会的意義

運動前後の脳循環代謝変化については、$^{15}O\text{-}H_2O$ PET を用いた検討がなされたことはない。脳循環代謝を定量化でき、低被ばく、低侵襲で最も信頼性の高い評価方法である点で社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

実験データをもとに研究背景、目的、研究計画をたて、有用性の確立されていない手法ではあるものの定量性の高い評価方法を取り入れ、実例を元に結果を出されている。

４）考察・今後の発展性

臨床的に PEH が脳梗塞後のリハビリで検証すべき今後の課題となっている。今後はより汎用性の高い modality との相関を得た上で、Arterial spin labeling (ASL)撮影方法の標準化、ROI 設定の明確化、検査データの解析手法について十分な初期データを取得後、前向き試験にて診断基準の明確化を行い、観察者間の再現性、偽陽性・偽陰性の具体的要因を調査し検討を追加する必要がある。

３．その他

特記事項なし。

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は本学博士の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中嶌　雄高 |
| 論文審査担当者 | 主査　小嶋　一幸<br>副査　大久保　憲一、明石　巧 |
| 論　文　題　目 | Anatomical study of the left superior mediastinal lymphatics for tracheal branches of left recurrent laryngeal nerve-preserving mediastinoscope-assisted surgery in esophageal cancer |

（論文内容の要旨）

（背景）

食道癌では上縦隔へのリンパ節転移が比較的多く、食道切除に加え、徹底した上縦隔郭清が必要とされる。しかし郭清を徹底すると気道反射の低下が生じやすく、肺炎のリスクが高まるといった問題がある。一方、低肺機能症例に左反回神経気管枝温存が呼吸器合併症に有用であったという報告が存在する。

左反回神経周囲リンパ節は転移が比較的多く、郭清上極めて重要な領域である。気管枝温存にあたっては、リンパ管走行およびリンパ節の分布と左反回神経およびその気管枝の位置関係についての微細解剖が必要であるため、詳細な解剖学的検討を行うこととした。

（方法と対象）

10%ホルマリン固定した献体の胸部を用いて、左上縦郭を解剖、左反回神経周囲のリンパ管の走行について手術用顕微鏡を用いて詳細に観察、記録をした。さらに水平断の切片ブロックを 20μm 刻みで作成し顕微鏡にて観察を行った。HE 染色に加えリンパ管同定のために D2-40(Podoplanin) による免疫染色を施行し、これらも連続切片としリンパ管の走行と周囲組織、特に左反回神経との位置関係について検討した。

（結果）

左上縦隔の食道・気管周囲のリンパ管は、左反回神経に沿って頭尾側方向に走行しているのが観察された。また、左反回神経気管枝も明瞭に観察されたが気管枝の腹側背側へ交差するリンパ管はマクロ解剖および組織学的にも観察されなかった。

（結論）

左上縦隔において左反回神経気管枝が作る面を跨ぐような複雑なリンパ管ネットワーク構造は認められなかった。以上より左頸部からの気縦隔法による左反回神経周囲リンパ節郭清術は、郭清精度を保ちながら左反回神経気管枝が温存できる郭清手法となりえる可能性が示されたと思われた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5356　号 | 中嶌　雄高 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　小嶋　一幸<br>副　査　大久保　憲一、明石　巧 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は**縦隔鏡下食道癌手術における左反回神経気管枝温存による上縦隔郭清の妥当性の検討についての論文である。**

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

近年低侵襲治療として、食道癌に対する縦隔鏡下手術が行われるようになっており、拡大視効果により術中左反回神経の気管への分枝が明瞭に観察され、この分枝を温存することが可能になっていが、リンパ節郭清が不十分になる可能性が指摘されている。この様な背景の下、申請者は胸部献体を用いて、左反回神経周囲のリンパ管の走行について手術用顕微鏡を用いて詳細に観察し、さらに上縦隔において水平断の切片ブロックを作成し、リンパ管の走行と周囲組織、特に左反回神経との位置関係について検討を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1. 手術用顕微鏡下での観察において、左上縦隔の食道・気管周囲のリンパ管は、頭尾側方向に走行しているのが観察された。
2. 左反回神経気管枝も明瞭に観察されたが、明らかな気管枝の腹側・背側方向へ跨って走行するリンパ管は観察されなかった。

以上の様に申請者は、左反回神経気管支を温存しても、リンパ節郭清として不十分にならない可能性を示し、臨床的には術後呼吸器合併症の低減に繋がる可能性のある有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、10%ホルマリン固定した検体の胸部、計 5 体を用いて、左反回神経周囲のリンパ管の走行について OLYMPUS 社製手術用顕微鏡 OME-8000 を用いて詳細に観察、記録。さらに詳細な検証のため、上縦隔において水平断の切片ブロックを作成し、4μm にて薄切、20μm 刻みで連続切片を作成し顕微鏡にて観察を行っている。リンパ管同定のために D2-40(Podoplanin)による免疫染色を施行し、リンパ管の走行と周囲組織、特に左反回神経との位置関係について検討している。本手法は充分な解剖学的、免疫学的な知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示される同時に、本研究が極めて周

到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

更に申請者は、本研究について「健常解剖体５体のみの検討であり、食道癌担癌状態と比較しリンパ管の走行部位の変化の有無やリンパ流の動的評価については困難である。また反回神経気管枝の形体が温存されていても機能温存の評価についても課題が残る。今後さらなる症例の蓄積と検討が必要と考えられる。」と考察している。今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに充分な価値があると認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 奥田　将史 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　真二<br>副査　三宅　智、石川　俊平 |
| 論　文　題　目 | Subcloning and characterization of highly metastatic cells derived from human esophageal squamous cell carcinoma KYSE150 cells by *in vivo* selection |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

食道癌は，全世界において，すべての癌の中で８番目に多く，癌関連死亡数では６番目に多いことが知られている．今日まで癌研究は進歩しているが，いまだ転移のメカニズムは完全には解明されていない．今回，我々は，*in vivo* selection を用いることで，通常の食道扁平上皮癌細胞株（KYSE150）に比べ，転移能の高い高転移細胞株（KYSE150−LuM）を樹立することに成功した．さらに，転移のメカニズム解明の為に，KYSE150 細胞と，KYSE150-LuM 細胞の特徴の違いを検討した．IL-6,IL-1β,LCN2 といった炎症反応に関与するサイトカインが，Lum 細胞において上昇していた．これらのサイトカインは，すでに癌の増殖や転移との関連が示唆されており，さらに近年，癌微小環境との関連に注目が集まっている．従って，今回我々が *in vivo* selection により樹立した高転移細胞株は，サイトカインに関連した腫瘍の増殖・転移の解明，さらにはそれに関与する腫瘍微小環境の解明に役立つ可能性がある．

＜緒言＞

食道癌は，組織学的に腺癌と扁平上皮癌が大半を占め，特に日本を含むアジアにおいては，扁平上皮癌が大多数を占める．喫煙・飲酒はリスク因子として強く相関があり，*ADH1B* や *ALDH2* の遺伝子多型や，様々な癌関連遺伝子との関係も報告されている．しかし，今日までの様々な研究や，治療方法・戦略の進歩にも関わらず，食道癌の予後は依然として十分なものではなく，特に遠隔転移を伴った食道癌患者の 5 年生存率は，わずか 4.3%と非常に低く，転移メカニズムのさらなる解明が重要である．

転移プロセスには，多くの段階的なステップが存在し，腫瘍細胞と宿主因子との様々な相互作用が，転移を成立させる上で重要である．これまでに，当研究室では，*in vivo* selection を用いて，転移メカニズムの解明を行ってきた．「*in vivo* selection」は，腫瘍細胞の生存能力や，遠隔転移での生着能・増殖能を反映しており，転移メカニズム解明に有用であるとされている．

今回我々は，*in vivo* selection によって，より転移能の高い細胞株を樹立することに成功し，さらにこの細胞株を詳細に探索することで，転移のメカニズムの解明を目指した．

＜方法＞

食道扁平上皮癌細胞株（KYSE150）を NOD/SCID マウスに尾静注し，肺転移を形成させ，その転移巣を細胞株化した．この工程（*in vivo* selection）を３回繰り返し，より転移能の高い KYSE150-LuM（以下,LuM）を樹立した．さらに，LuM 細胞の *in vivo* での転移能を評価し，*in vitro* では，親株との違いを発現アレイ，サイトカインアレイなどを用いて検討した．

＜結果＞

NOD/SCID マウスにおいて，LuM 細胞は，親株である KYSE150 と比較し，より短期間に肺へ転移することがわかった．さらに，*in vitro* での実験において，LuM 細胞は親株に比べ，増殖速度は遅いにも関わらず，遊走・浸潤能が高いことがわかった．また，低酸素状態に対する耐性も高いことがわかった．

親株と LuM 細胞との違いを同定するために，発現アレイ解析を行い，IL-6,IL-1β などのサイトカインや炎症反応に関する経路が,LuM 細胞において発現上昇していた．また，サイトカインアレイにおいては，すでに癌との関連が報告されている Lipocalin-2(LCN2)の上昇を認めた．

＜考察＞

本研究では，*in vivo* selection によって，より転移能の高い細胞株を樹立することに成功し，このことは腫瘍の不均一性を示していると思われた．さらに，この細胞株は，約 30 日という短期間に肺転移を形成することから，今後は，*in vivo* での転移実験や治療実験を行う際に，非常に有用な資源になりえると考える．

LuM 細胞自体の特徴としては，様々な炎症に関わるサイトインの関与が示唆された．すでに，持続的な炎症応答は，食道癌の発生・発達に関与していることが報告されており，炎症反応は，腫瘍増殖に関与する種々の酵素活性や，癌関連遺伝子を活性化することが知られている．特に，IL-6/STAT3 経路や，IL-1β は，発癌に関与する炎症関連経路として重要であると言われている．また，IL-6,IL-1β は，食道癌患者において発現上昇していることが報告されている．IL-6/STAT3 経路は，通常であれば，外因性のストレス下において，正常細胞のアポトーシスを防ぎ，生体防御の役割を果たしている．しかし，腫瘍細胞のアポトーシスも防いでしまうことで，腫瘍の増殖や転移を促進してしまうのである．IL-1β や LCN２も，同様に炎症を介した腫瘍増殖や転移形成が報告されている．

今回，これらのサイトカインが，LuM 細胞において発現上昇していることを示した．従って，LuM 細胞は，今後サイトカインに関連した腫瘍増殖・転移のメカニズム解明に有用である可能性がある．

また，近年転移形成に関しても，腫瘍微小環境という概念が注目されており，宿主と腫瘍細胞との相互作用は非常に重要である．腫瘍微小環境には，さまざまな因子が関わっており，VEGF や PD−1,CTLA-4 なども含まれ，すでに治療標的の一つとして考えられている．しかし，腫瘍微小環境はまだ十分に解明されているわけではない．サイトカインの関与も微小環境の一つと考えられており，今回サイトカインとの関連が示された LuM 細胞のさらなる探索が，腫瘍微小環境の解明，そして新たな治療標的の開発につながるかもしれない．

＜結論＞

*in vivo* selection を用いることで，より高い転移能力を持った細胞株を樹立することに成功した．この細胞株は，腫瘍増殖・転移に関連するサイトカインの発現上昇を認めた．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5357　号 | 奥田　将史 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田中　真二<br>副　査　三宅　智、石川　俊平 | |

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は in vivo selection を用いたヒト食道扁平上皮癌細胞株の高転移細胞株の樹立と、その分子生物学的特徴について研究した成果である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

ヒト食道扁平上皮癌細胞株から高転移細胞株の樹立し、遺伝子発現アレイおよびサイトカインアレイなどを用いて解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. ヒト食道扁平上皮癌細胞株（KYSE150）を NOD/SCID マウスに尾静注し、肺転移巣を株化する操作を３回繰り返し(in vivo selection)、KYSE150-LuM（以下 LuM）細胞株を樹立した。
2. NOD/SCID マウスを用いた in vivo 実験の結果、LuM 細胞は親株 KYSE150 と比較して 短期間に肺へ転移することを確認した。
3. 培養による in vitro 実験の結果、LuM 細胞は親株と比較して増殖速度は遅いにも関わらず、遊走・浸潤能が高いこと、低酸素状態に対する耐性が高いことが見出した。
4. LuM 細胞と親株の違いを同定するため遺伝子発現アレイ解析を行った結果、LuM 細胞において IL-6,IL-1β, Lipocalin2(LCN2)などのサイトカインや炎症反応に関する経路の発現上昇を認めた。
5. サイトカインアレイを行った結果、LuM 細胞において LCN2 蛋白の高発現を認めた。

以上のように申請者は、in vivo selection によりヒト食道扁平上皮癌の高転移細胞株を樹立し、サイトカインや炎症反応に関する経路が転移に関与する可能性を示している。これは臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究にはヒト食道扁平上皮癌細胞株を用いて転移細胞株の樹立し、遺伝子発現アレイおよびサイトカインアレイなどを用いて詳細な解析を行っている。十分な病理組織学的知識、技術のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示された。

また、遺伝子組換え実験および動物実験の本学承認を得ており、本研究が十分な準備の上に行われてきたと考えられる（2016-011C, 0170 036 C-2）。

4）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果によってヒト食道扁平上皮癌の転移機序として、サイトカインに基づく腫瘍微小環境が関与する可能性を考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

3．その他

特記事項なし

4．審査結果

論文審査の内容を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に値する十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | MOHAMMAD OMAR MASHAL |
| 論文審査担当者 | 主査　藤原　武男<br>副査　川渕　孝一、古賀　英之 |
| 論　文　題　目 | Hidden burden of non-medical spending associated with inpatient care among the poor in Afghanistan |

（論文内容の要旨）

**Introduction**

Paying at the point of health-care services from a household source is a widespread mode of health-care financing in developing countries, for example in low-income countries more than 70% of total health-care spending coming from household.

In Afghanistan, the government's share in the total health-care expenditure is only 6 % and 18 % is funded by international donors. Health insurance systems are not available yet. Therefore, payment from a household source is the dominant mode of health-care financing. According to a national health account report 76 % of total health-care payments are paid from private sources, of which 99 % is household money.

Over and above the direct medical health-care payments (diagnosis fee, physician fee, medicine costs), there are direct non-medical health-care payments such as for accommodation and transportation, the hidden cost of health care which could be a substantial proportion of a household's spending on health care.

The patterns and the burden of health-care payments have not yet been studied in Afghanistan, the objectives of this study are to elucidate the household payments required for medical and non-medical spending for inpatient healthcare care and to examine the patterns of household payments according to the household economic status, remoteness of the area of residence, and living in urban or rural area in Afghanistan.

**Methods**

Our study used data from the Afghanistan Mortality Survey (AMS) conducted in 2010 by the Ministry of Public Health and Central Statistic Organization of Afghanistan, the survey included responses from 22,351 households from all 34 provinces selected using a stratified multistage sampling method. From a total of 180,676 subjects in the survey, 7542 subjects who reported at least one overnight stay in a hospital during the last 12 months were initially included in the current analysis.

Independent variables of this study were: age and sex of the study participants, place of residence

(urban/rural), wealth status, and remoteness of the area of residence of the household, type of healthcare facility used for inpatient care and number of nights in healthcare facility.

Wealth status is an index of socioeconomic status and was constructed through a principal component analysis using household asset data and dwelling characteristics, the subjects were then divided into quintiles (poorest, poorer, middle, richer and richest).

The remoteness of the area of residence is index developed using cluster-level information, this index describes the degree of the household distance from a service center, the subjects were then divided into quintiles (most remote, RQ2, RQ3, RQ4, and least remote).

Depended variables were household's spending related to the most recent inpatient stay by individual household members and included: total amounts spent and the amounts by components. The components of diagnosis and medicine were referred to as medical spending, and accommodation and transportation were referred to as non-medical spending. The amount of payment was reported in Afghani currency (50 Afghani = 1 USD, as of the survey time in April 2010).

In this study, the amounts of payment for the total and for each of the components were individually categorized into five classes: (1) 0–1000; (2) 1001–3000; (3) 3001–5000; (4) 5001–10,000; (5) 10,001 or more (in Afghani). These categories were used for the ranked order for further analyses.

A bivariate and multivariate ordinal logistic model was used to identify associations between the types of household payment related to inpatient care and the socioeconomic characteristics of the study participants. All the analyses were performed using SPSS version 18.0, $P<0.05$ indicates significant difference.

**Results**

Among study subjects, 67.6 % were living in rural areas, 28.5 % belonged to the richest wealth quintile, and 23.6 % were living in the most remote areas. Overall, 78.3 % of the patients used public health-care facilities, and 29.8 % of them stayed in the hospital for 6 days or longer.

Regarding healthcare spending, the total amount of payments ranged from 20 to 800,000 Afghani, and nearly half (47.6 %) of the patients had spent more than 5000 Afghani in total for inpatient care during their recent overnight stay in the hospital.

The results of a bivariate analysis indicating that patients in the poorest group paid more for total payment, accommodation, and transportation, compared with their richest counterparts (OR = 1.30, $P<0.001$; OR = 1.51, $P<0.001$; and OR = 2.79, $P<0.001$; respectively). However, the poorest group paid less for diagnosis (OR = 0.38, $P<0.001$). Similar results were observed for patients living in the most remote areas: they paid more for total payment, accommodation, and transportation (OR = 1.23, P = 0.011; OR = 1.32, P = 0.007; and OR = 1.81, $P<0.001$, respectively) but paid less for diagnosis (OR = 0.50, $P<0.001$), compared with patients living in the least remote area.

Compared with rural residents, urban residents paid more for total payment, diagnosis, and medicine (OR = 1.11, P = 0.037; OR = 1.87, $P<0.001$; OR = 1.39, $P<0.001$, respectively). However, urban patients paid less for transportation services associated with inpatient care (OR = 0.56, $P<0.001$).

The results of a multivariable analysis indicating that compared with the richest group, patients in the poorest group paid more for total payment associated with inpatient care and transportation services (AOR = 1.24, P = 0.031; AOR = 2.09, P<0.001; respectively). However, the poorest group paid less for diagnosis and medicine payments (AOR = 0.37, P<0.001; AOR = 0.78, P = 0.009, respectively). There was no significant difference in accommodation costs between the poorest and richest groups.

Urban residents spent less for accommodation and transportation services associated with inpatient care, compared with rural residents (AOR = 0.73, P<0.001; AOR = 0.58, P<0.001, respectively).

**Discussion**

Using nationally representative data, this study found that poor people spent more for total payments and transportation services than the rich. However, poor people spent less for diagnosis and medicine. Patients in urban areas spent less for accommodation and transportation than patients in rural areas. A crude analysis showed higher payments for total, accommodation, and transportation among patients living in remote areas compared with those living in non-remote areas. However, in multivariate analysis, the independent associations between remoteness and amount of payment disappeared.

The higher amounts of total and transportation spending associated with inpatient are among the poorest group might be explained by the higher impact of diseases and renting or paying for transportation while traveling to and from the hospital.

The consequences of higher spending on health care are very serious for the poor population: they might be driven to cut basic (food and non-food) consumption, their children might be withdrawn from school to compensate for health-care expenses for a household member, and they could be pushed into severe impoverishment which restricts them from seeking health care when needed and this develops into a vicious cycle.

Another finding of this study was the higher level of spending for non-medical services (accommodation and transportation) associated with inpatient care among patients living in rural areas which could be explained by low-quality housing and poor sanitation, that could have substantial effects on illness and consequently increase the amount of spending for health care.

A national health system should be financed in a way that protects the poor and those living in rural areas from the high spending associated with accommodation and transportation required for inpatient care. A health-care equity fund provided by the national government and compulsory, salary-based insurance from the formal sector are the primary and potential steps toward initiating a social security system in Afghanistan to protect the poor from high health-care costs.

**Conclusion**

Among the different socioeconomic groups, poor households pay less for diagnosis and medicine, but they pay more for transportation related to inpatient care. We also found an unadjusted higher spending for non-medical inpatient care among the population living in the most remote areas.

（要約）

アフガニスタンでは総医療費の 76%が家計負担である。国民が医療を受けるには、患者が直接医療機関や薬局に支払う費用の他、患者及び家族の宿泊、食事、移動に関わる費用を間接経費として負担し、家計の大きな負担となっている。本研究の目的は、入院医療の直接経費と間接経費を分析し、世帯の経済状況、医療施設への近接度、都市又は農村居住との関連を明らかにすることである。

2010 年にアフガニスタン公衆衛生省が実施した全国受療状況調査のデータを使用した。層別多段抽出法により選択された 22,351 世帯の合計 180,676 人の内、調査前 12 ヶ月間に 1 泊以上の入院を報告した 7,542 人を分析対象とした。対象者の年齢、居住地（都市/農村）、世帯の経済水準、医療施設への近接度、医療施設の種類、入院日数、入院に関する総費用、直接経費（診断費、医薬品費）、間接的経費（患者と家族の宿泊費と交通費）のデータを用いた。すべての費用を低から高の５つのカテゴリに分けた。回答世帯の経済状況、医療施設への近接度は、それぞれ指標を作成し 5 分位指標を分析に用いた。総費用、区分別費用のすべての項目のデータを得られた 5,490 人について、費用と社会経済指標、医療施設指標、居住地との関係を分析した。

入院患者の 78.3％が公的医療施設に入院し、29.8％が 6 日以上の入院であった。 47.6％の患者が 1 回の入院で 5000Afghani（アフガニスタンの通貨単位：50 Afghani = 1 米ドル）を超える費用を支出していた。順位ロジスティック回帰分析の結果、経済水準が最も貧しい世帯の患者は最も豊かな世帯の患者より、診断費（AOR = 0.37, P <0.001）と医薬品費（AOR = 0.78, P = 0.009）の支出が少なく、交通費（AOR = 2.09, P <0.001）の支出が多く、総費用（AOR = 1.24, P = 0.031）の支出も多かった。 都市部の患者は農村部の患者より宿泊費（AOR = 0.73, P <0.001）と交通費（AOR = 0.58, P <0.001）の支出が少なかった。

アフガニスタン国民の入院に関わる患者の経済負担は、貧しい世帯の患者は診断と治療の費用負担は少なく、交通費の負担は逆に大きく、総費用も大きい負担であった。すべての人が必要な 質の良い保健医療サービスを適切な経済負担で受けることを実現するには、特に貧しい世帯に対して直接医療費以外の経済負担を軽減する制度が必要と考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5358　号 | MOHAMMAD OMAR MASHAL |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　藤原　武男<br>副　査　川渕　孝一、古賀　英之 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、アフガニスタンにおける入院に関する総医療費が世帯の経済状況、医療施設への近接度、都市又は農村居住とどのように関連しているのかを明らかにした研究である。2010 年にアフガニスタン公衆衛生省が実施した全国受療状況調査のデータ（層別多段抽出法により選択された 22,351 世帯の合計 180,676 人の内、調査前 12 ヶ月間に 1 泊以上の入院を報告した 7,542 人）を用いて、順位ロジスティック回帰分析を行った結果、経済水準が最も貧しい世帯の患者は最も豊かな世帯の患者より、診断費と医薬品費の支出が少ないが、交通費の支出が多く、総費用の支出も多かった。 都市部の患者は農村部の患者より宿泊費と交通費の支出が少なかった。

この結果から、アフガニスタン国民の入院に関わる患者の経済負担は、貧しい世帯の患者は交通費の負担が大きく、それによる総費用も大きい負担であることを明らかにした。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

アフガニスタンという戦後の復興が期待される発展途上国、しかも山間部で医療アクセスについてこれまでとは異なる事情が推測される国において、社会的環境要因が医療費とどのように関連するのかを明らかにした研究は先駆的である。

２）社会的意義

アフガニスタンが今後、発展していくためにどこに限られた資源を投入するべきかを示唆したという点において、社会的意義がある研究と考えられる。

３）研究方法・倫理観

既存のデータを用いた 2 次解析である。具体的には、2010 年にアフガニスタン公衆衛生省が実施した全国受療状況調査のデータを使用した。層別多段抽出法により選択された 22,351 世帯の合計 180,676 人の内、調査前 12 ヶ月間に 1 泊以上の入院を報告した 7,542 人を分析対象とした。対象者の年齢、居住地（都市/農村）、世帯の経済水準、医療施設への近接度、医療施設の種類、入院日数、入院に関する総費用、直接経費（診断費、医薬品費）、間接的経費（患者と家族の宿泊費と交通費）のデータを用いた。すべての費用を低から高の 5 つのカテゴリに分けた。回答世帯の経済状況、医療施設への近接度は、それぞれ指標を作成し 5 分位指標を分析に用いた。総費用、

区分別費用のすべての項目のデータを得られた 5,490 人について、費用と社会経済指標、医療施設指標、居住地との関係を分析した。この調査自体はアフガニスタン公衆衛生省倫理委員会の承認を得ている。

４）考察・今後の発展性

アフガニスタンにおいてすべての人が必要な 質の良い保健医療サービスを適切な経済負担で受けることを実現するには、遠隔地の貧しい世帯に対して直接医療費以外の経済負担を軽減する制度が必要と考えられた。具体的にそれをどのようにするか、については今後の研究課題として取り組んでいきたい、とのことであった。

**３．その他**

**特になし**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請する価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 油谷　知毅 |
| 論文審査担当者 | 主査　石川　俊平<br>副査　三宅　智、田中　真二 |
| 論　文　題　目 | High expression of P21‐activated kinase 5 protein is associated with poor survival in gastric cancer |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

P21-活性化キナーゼ 5（PAK5）はセリン/スレオニンキナーゼ PAK ファミリーの構成因子であり、いくつかの癌のシグナル伝達経路の下流エフェクターである。PAK5 は神経の伸長を促進し、微小管安定性に寄与し、アポトーシスに対する抵抗性を誘導する。本研究では胃癌における PAK5 発現を評価し、臨床病理学的特徴および予後との関連を調べた。東京医科歯科大学病院で胃切除術を受けた 279 人の患者から切除した原発性胃癌検体の PAK5 発現を免疫染色で評価した。279 例中 44 例（15.8%）は PAK5 の発現が高く、分化型胃癌、深達度、リンパ節転移、遠隔転移または再発、進行したステージ、低い疾患特異的生存率（DSS）と有意に関連していた。ステージ I-III 疾患では、38/254（15.0%）の患者が高い PAK5 発現を示し、PAK5 の高発現は無再発生存期間（RFI）と有意に関連していた。PAK5 は腫瘍の進行において重要な役割を果たし、胃癌患者の転帰に影響を及ぼす可能性がある。

＜緒言＞

腫瘍の肉眼的完全切除の後でさえ、進行した胃癌は臨床転帰が不良である。全身化学療法の最近の進歩にもかかわらず、進行胃癌に対する国際的に認められた標準化学療法レジメンはない。確固とした予後/予測バイオマーカーを同定することが必要である。

P21 活性化キナーゼ（PAK）は、いくつかの癌シグナル伝達経路において下流エフェクターとして働くセリン/スレオニンキナーゼのファミリーである。 PAK は、それらのアミノ酸相同性に基づいて、グループ I（PAK1,2,3）およびグループ II（PAK4,5,6）に分類される。

東京医科歯科大学の小林らは、高い PAK4 発現が、腫瘍進行に関連する臨床病理学的因子（深達度、リンパ節転移、病理学的ステージ、遠隔転移、再発）と有意に相関していることを明らかにした。高い PAK4 発現は、より低い疾患特異的生存率（P <0.001）および無再発生存期間（P <0.001）と有意に関連していた。

様々な癌における PAK5 の役割はいくつかのグループによって調査されている。膵臓癌細胞株 MiaPaCa-2 において、PAK5 発現の阻害がアポトーシスの 7 倍の増加を誘導したことは、PAK5 が膵臓癌細胞をアポトーシスから保護し得るキナーゼであることを示唆している。大腸癌では免疫

組織化学により PAK5 の過剰発現が評価され、PAK5 は大腸癌の細胞の接着性を減少させ、I 型コラーゲン上で癌細胞の移動を促進し、大腸癌細胞の移動や浸潤に関連していることが示唆された。胃癌では免疫組織化学的分析で HEK293 細胞や近接した正常組織と比較して胃癌細胞株や胃癌組織で PAK5 は高発現していた。肝細胞癌では PAK5 の mRNA レベルは腫瘍外の組織と比較して高発現であった。胃癌、肝細胞癌、および神経膠腫細胞における PAK5 のノックダウンは G0 / G1 における細胞周期停止を誘導することによる細胞増殖を抑制した。Gu らは胃癌の 57 例の標本で免疫組織化学を用いて検討し、臨床病理学的パラメーターは PAK5 と関連していなかったものの、PAK5 の発現レベルは隣接する正常組織と比較して胃癌組織で有意に高く（P = 0.0001）、癌の進行とともに PAK5 の発現に変化があることを示唆していた。

本研究では 279 例の胃癌検体の PAK5 発現と臨床病理学的因子と予後の関連を調査した。

＜方法＞

東京医科歯科大学病院で 2003 年 1 月から 2008 年 12 月にかけて胃切除術を受けた原発性胃癌の平均年齢 65 歳（21-92 歳）の患者 279 例を対象とした。男性 213 人、女性 66 人であった。乳頭状および管状腺癌は分化癌に分類され、低分化腺癌、印環細胞癌および粘液腺癌は未分化癌として分類した。全ての患者を追跡し、経過観察期間の中央値は 61 ヶ月（2〜11 ヶ月）であった。

ホルマリン固定パラフィン包埋組織試料の脱パラフィン切片を、一般的な免疫酵素ポリマー法を用いて免疫組織化学的に染色した。一次抗体は Fang らの研究で適用された抗 PAK5 ポリクローナルウサギ抗体（カタログ番号 ab110069）を Abcam（Cambridge、UK）から購入し、150 倍希釈で使用した。陰性対照は一次抗体の代わりに正常ウサギ IgG を用いた。同じブロックから得られた強くかつ均一に染色された胃癌検体を、陽性対照として使用して染色条件による偏りを減少させた。二次抗体は Histofine Simple Stain Max Po multikit（ニチレイ）を用い、Histofine Simple Stain DAB 溶液（ニチレイ）を用いて発色して可視化した。切片をヘマトキシリンで対比染色した。

スライドは 2 人の研究者によって別々に評価し、患者の結果は盲検化された。代表的な断面切片全体の染色された癌細胞と染色されていない癌細胞を計数した。低分化腺癌のような離散的に分布した癌細胞を評価には、各腫瘍の最も進行した細胞層および孤立した腫瘍細胞群を含む 5 つ以上の視野をカウントした。染色強度は、0（なしおよび非常に弱い）、1（弱陽性）、2（強陽性）の 3 段階にスコア化した。染色細胞の割合を 1（≦25%）、 2（26-≦50%）、3（51~75%）および 4（≧76%）の 4 つの等級にスコア化した。上記強度スコアおよび割合スコアの加算し複合スコアとした。複合スコア 6 を高発現と定義し、スコア≦5 を低発現と定義した。2 人の研究者でスコアが異なる場合はひとつのモニターで同時に再検討し、コンセンサスを得てスコアを決定した。

統計分析は IBM の SPSS version 22.0 を用いて行った。

＜結果＞

PAK5 の発現は主に腫瘍細胞および非腫瘍細胞の細胞質において観察された。正常上皮ではほとんど検出されなかった（図 1）。がん病変の近くに位置する化生性腸上皮は弱く染色されても強くは染色されなかった。279 例中 44 例（15.8%）が高い PAK5 発現を示した。

PAK5 の高発現は、分化型（分化型対未分化型; P <0.001）、T2 以深（T1 対 T2-T4; P <0.001）、リ

ンパ節転移陽性（N0 対 N1-N3; P <0.001）、遠隔転移または再発の存在（あり vs.なし; P = 0.038）および進行したステージ（I 対 II-IV; P = 0.001）と有意に関連していた。

PAK5 の高発現は、低い DSS と有意に関連していた（P = 0.013; 図 2）。 5 年 DSS は、PAK5 高発現患者で 58.0%、低発現患者で 74.8%であった。単変量解析では胃上部病変、未分化型癌、深い深達度、リンパ節転移陽性、遠隔転移陽性、進行した病期および PAK5 の高発現は低い DSS と有意に関連していた（表 II）。しかし、腫瘍の局在、病理学的組織型、深達度、リンパ節転移、遠隔転移について調整された多変量コックスの比例ハザード回帰分析において、PAK5 の高発現は独立した予後因子ではなかった[ハザード比（HR）= 1.14; 95%信頼区間（CI）、0.65-2.00; P = 0.659]（表 II）。

ステージ I〜III の患者（n = 254）では、単変量解析で高い PAK5 発現が RFI と有意に関連していた（P = 0.044; 図 3）。しかし、PAK5 の発現は、RFI の独立した予後因子ではなかった（HR = 0.96; 95%CI、0.48 1.91; P = 0.909）（表 III）。

＜考察＞

本研究により、PAK5 の高発現が、胃癌患者の腫瘍の深達度、リンパ節転移、遠隔転移および再発、乏しい DSS および RFI と有意に関連することが明らかとなった。しかし PAK5 の高発現は、多変量解析では独立した予後因子ではなかった。 Gu らの研究は、臨床病理学的因子のいずれも PAK5 発現に関連しないことを報告したが、本研究とのこの不一致は、PAK5 の状態を測定するために使用された採点システムや方法論に寄与している可能性がある。本研究では正常な上皮組織において PAK5 染色は検出されず、癌病変の近くに存在する化生性の腸上皮は弱く染色されるが、強く染色されることはなかった。この点に関しては、PAK5 の免疫組織化学的発現レベルが隣接する正常組織サンプルと比較して癌組織において有意に高いことを報告した Gu らの知見と同様である。これらの知見により、胃癌の進行において PAK5 が重要な役割をもっていることが示唆される。

多数の癌の場合と同様に、異質性は胃癌組織において一般的であるが、erb-b2 受容体チロシンキナーゼ 2（HER2）を含む、胃癌細胞において不均一に発現する特定のタンパク質は、臨床的に有効な抗癌剤の標的である。胃癌を有する全患者のわずか 10〜20%のみが HER2 を過剰発現し、HER2 発現は腸型の組織型との間に高い相関性を有する。本研究では、HER2 と同様に、PAK5 の発現は組織型によって大きく異なっているが、いくつかの腫瘍は分化型と未分化型の癌細胞が混在し、背景には現時点では解明されていない複雑な分子的病因がある。

＜結論＞

PAK5 の高発現は、分化型胃癌、進行癌、リンパ節転移、遠隔転移または再発の存在と有意に関連し、ゆえに進行した病期、DSS および RFI の低下と有意に関連していた。本研究は、PAK5 が胃癌における治療標的となりうることを示唆している。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5359　号 | 油谷　知毅 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　石川　俊平<br>副　査　三宅　智、田中　真二 | |

（論文審査の要旨）

**1.　論文内容**

本論文は胃癌における PAK5 発現と予後や臨床病理学的因子との相関について解析した論文である。

**2.　論文審査**

1）研究目的の先駆性・独創性

申請者は癌関連分子である PAK5 に関して、胃癌における臨床病理学的意義がよくわかっていないことに着目し、胃癌手術検体を用いて免疫組織化学による発現情報と臨床病理学的因子との詳細な関連解析を行った。

2）社会的意義

本研究で得られた結果は、胃癌における PAK5 の臨床像に与える影響の一部を解明するものであり、胃癌の診断・治療につながる有意な結果と考えられる。

3）研究方法・倫理観

申請者は 279 人から得られた胃癌切除組織を免疫染色し、PAK5 の発現を評価した。PAK5 高発現は分化型、T2 以深、リンパ節転移陽性、遠隔転移または再発の存在および進行したステージと有意に関連していた。また PAK5 高発現群は低発現群に比較して disease-specific survival が有意に低く、ステージ I〜III の患者における recurrence-free interval と有意に関連していた。論文の内容からは申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されていると考えられた。

4）考察・今後の発展性

本研究結果によって PAK5 は胃癌患者における新たな予後因子であり、今後の胃癌の診断・治療につながる可能性が示された。

**3.　審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | TANIGUCHI Juliana Bosso |
| 論文審査担当者 | 主査　杉原　泉<br>副査　横田　隆徳、　中田　隆夫 |
| 論　文　題　目 | RpA1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair |

（論文内容の要旨）

**Abstract**

DNA damage and repair is a critical domain of many neurodegenerative diseases. In this study, we focused on RpA1, a candidate key molecule in polyQ disease pathologies, and tested the therapeutic effect of adeno-associated virus (AAV) vector expressing RpA1 on mutant Ataxin-1 knock-in (Atxn1-KI) mice. We found significant effects on motor functions, normalized DNA damage markers (□H2AX and 53BP1), and improved Purkinje cell morphology; effects that lasted for 50 weeks following AAV-RpA1 infection. In addition, we confirmed that AAV-RpA1 indirectly recovered multiple cellular functions such as RNA splicing, transcription and cell cycle as well as abnormal morphology of dendrite and dendritic spine of Purkinje cells in Atxn1-KI mice. All these results suggested a possibility of gene therapy with RpA1 for SCA1.

**Introduction**

Polyglutamine diseases refer to a group of heritable disorders caused by the expansion of CAG repeat that codes for a glutamine stretch (polyQ). Spinocerebellar ataxia 1 (SCA1) is one of the nine polyQ diseases that presents a polyQ expansion containing more than 40 CAG repeats in the ataxin-1 gene. In SCA1, the mutant ataxin-1 protein causes degeneration predominantly in Purkinje cells and neurons within the brain stem and spinal cord, producing a progressive ataxia and bulbar dysfunction. At the early stages of the disease, common symptoms are gait disturbance, slurred speech, nystagmus and mild dysphagia. Muscle atrophy and cognitive impairment appear in advanced stages.　No therapeutic treatment has succeeded to the recovery of symptoms in patients so far.

Previously, our research group performed a systematic in vivo screen of DNA repair genes in *Drosophila*, the outcome was the presence of core networks connecting genes that relieved and aggravated the SCA pathology. Among them, RpA1 shows the largest effect on lifespan elongation of the SCA1 fly model. RpA1 is a relevant molecule related to DNA replication, repair and recombination, and seems a candidate molecule in polyQ disease pathologies.

**Material and Methods**

AAV expressing RpA1 was injected in the surface of the cerebellum of mutant Atxn1-KI mouse. Heterozygous KI mice with repeat numbers from 125 to 140 repeats were used. Non-transgenic sibling mice were used as control. The recombinant AAV vectors were produced by transient transfection of HEK293 cells using the vector plasmid; an AAV2 rep and AAV1 vp expression plasmid; and an adenoviral helper plasmid, pHelper (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The recombinant viruses were purified by isolation from two sequential continuous CsCl gradients, and the viral titers were determined by qRT-PCR.

To evaluate the motor functions, rotarod and footprint tests were performed. For rotarod assessment, mice at age of 9, 13 and 40 weeks were placed on a rotating rod. The amount of time spent on the drum until the mouse falls off was measured four times per day during 3 days, and 10-min intervals were made between the measurements. Footprint patterns were evaluated with the following parameters of footprint patterns: stride, length, hind- base width, frontbase width, front footprint/hind foot print overlap.

Immunohistochemistry was performed using DNA damage markers (γH2AX and 53BP1), and cell cycle antibody (PCNA).

Confocal microscopy was used to acquire images in immunohistochemistry. A total of 30 stained cells was selected and the fluorescence signal intensity per cell was recorded. The mean values of nuclear signals were compared among the three groups of control (non-Tg sibling), Atxn1-KI and AAV-RpA1- injected Atxn1-KI mice.

Images of dendritic spine were acquired at objective UPLANSAPO 40X (zoom 1 and 5), Argon and HeNe(G) lasers, 1 channel (Alexa Fluor 488) and step size of 0.5lm. Obtained images were analyzed for dendrite length, area and branching point number, or spine density, length, maximum diameter and protrusion subtypes by IMARIS 7.2.2 (Bitplane, Zurich, Switzerland).

**Results**

We injected AAV-RpA1 to mutant Atxn1-KI mice at 5 weeks of age, and evaluated their motor function with rotarod test at 9, 13, 40 and 56 weeks. As the control we used the mice of the same genetic back- ground (non-transgenic sibling mice), Atxn1-KI mice without injection and AAV-EGFP-injected Atxn1-KI mice.

We found improvement of Atxn1-KI mice by AAV-RpA1 in stay time on rotarod at all the time points. The improvement was significant at 9 weeks, became less obvious from 13 to 40 weeks, but again became significant at 56 weeks

The recovery of motor dysfunction was also supported by the footprint test. The improvement of motor function in AAV-RpA1-injected KI mice still continued at 56 weeks in comparison non-injected KI mice, suggesting that a single injection of AAV-RpA1 provided a long lasting recovery of motor function to Atxn1-KI mice for more

than 50 weeks.

Normalized DNA damage markers (γH2AX and 53BP1), returned to the normal levels by AAV-RpA1 at 9 weeks, and the reduction of cH2AX and 53BP1 continued until 56 weeks.

Next, we investigated morphological changes of dendrites and dendritic spines that associate with functional damage of Purkinje cells. As we showed previously dendritic structures of Purkinje cells were substantially changed in mutant Atxn1-KI mice. The abnormal changes such as decreased dendrite area, total dendrite length and branching numbers of dendrites were substantially recovered in mutant Atxn1-KI mice at 13 weeks of age that had received injection of AAV-RpA1 at 5 weeks of age. We further extended the analyses of dendrites at 56 weeks and found the similar impairment in mutant Atxn1-KI mice and the similar recovery by AAV-RpA1 at 56weeks.

Regarding the dendritic spines, we had reported that Atxn1- KI mice show the increase of spine density and of abnormally long spines in the molecular layer of the cerebellar cortex.

**Discussion**

RpA1 is an essential molecule in DNA damage repair that conceals naked single strand DNA until the other repair proteins start the repair and also helps the other repair proteins to access DNA damage foci efficiently. We revealed in our previous study that mutant Atxn1 interacts with RpA1, disturbs the translocation of RpA1 to DNA damage foci and eventually shifts the balance between DNA damage and DNA repair in the nuclei of a mammalian cell line. In this regard, the most plausible explanation of the mechanism for the therapeutic effect of AAV-RpA1 in Atxn1-KI mice would be that RpA1 supplementation normalized the balance between DNA damage and DNA repair, and decreases DNA damage in affected neurons including Purkinje cells. The result in this study that AAV- RpA1 decreased the amount of DNA damage markers like cH2AX and 53BP1 supported the hypothesis.

**Conclusion**

The therapeutic effect of the RpA1 overexpression observed in the SCA1 fly model was observed also in the SCA1 mouse model. Our data showed that AAV-RpA1 recovers DNA damage, dendritic shrinkage, spine abnormalities and motor dysfunction of mutant Atxn1-KI mice through multiple but mainly DNA damage repair related mechanisms.

(要約)

DNA 損傷修復機構は、多くの神経変性疾患において重要である。これまで、私達の研究グループでは、ショウジョウバエをもちいた in vivo スクリーニングを行い、SCA1 病態を左右するコア遺伝子ネットワークの存在を報告している。その一つである RpA1 は、ショウジョウバエモデル動物において寿命延長効果がもっとも優れた遺伝子であった。RpA1 は、DNA 複製・修復・recombination に関わる主要な分子であり、ポリグルタミン病病態改善に貢献できる分子として期待できる。

そこで、本研究では、ポリグルタミン病病態における重要な分子 RpA1 に注目し、RpA1 発現アデノ随伴ウイルスベクターによる変異 ataxin-1 ノックインマウスに対する治療効果を検討した。その結果、行動異常の顕著な改善、DNA 損傷マーカー (gH2AX と 53BP1)の減少、プルキンエ細胞の形態学的異常の改善が見られ、その効果は投与後 50 週を越えて持続した。さらに、AAV-RpA1 は RNA スプライシング、転写機能、細胞周期などの複数の機能の改善とともに、プルキンエ細胞における樹状突起およびスパインの形態異常も改善した。これらは、脊髄小脳失調症 1 型(SCA1)に対する RpA1 の遺伝子治療の可能性を示唆している。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5360　号 | TANIGUCHI Juliana Bosso |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　杉原　泉<br>副　査　　横田　隆徳、　中田　隆夫 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、脊髄小脳変性症１型（SCA1）モデルマウスにおいて、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)による小脳での DNA 修復分子 RpA1 の発現誘導が、SCA1 による運動障害と小脳形態異常を改善することを明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

脊髄小脳変性症は、遺伝性のものに関しては遺伝子が同定されているが、病態メカニズムは完全には解明されておらず、治療法も確立していない。近年、SCA1 に関して、RpA1 による DNA ダメージ修復と関連するという説が現れたため、これを検証し更に治療にもつなげるために RpA1 の AAV を作成し、SCA モデルマウスにおいて効果を確認した。分子レベル、形態レベル、行動レベルの解析から、その治療効果を確認した。このように、この研究は、新しい視点から未解決の重要な問題の解明に成功している。

２）社会的意義

本研究で得られた主な成果は以下のとおりである。

１．　SCA1 の主要なメカニズムが DNA ダメージであることが示された。

２．　DNA ダメージ修復分子 RpA1 の発現誘導が SCA1 の病態改善をもたらすことを示した。

以上のように、申請者は、神経変性疾患として患者数が 3 番目に多い脊髄小脳変性症に関して、その病態メカニズムの主要部分を明らかにし、モデル動物での治療法を開発した。これは、臨床的にも極めて有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

本研究は、背景を十分に理解したうえで、分子レベル、形態レベル、行動レベルの解析を、その手法と意義をよく理解した上で行っている。様々の実験の結果を理論的に総合して結論に至るようによく準備された研究である。

４）考察・今後の発展性

本研究は、将来的にヒトでの臨床応用に発展することが大いに期待される研究である。また、

申請者は、本研究がモデルマウスによる結果であり、これをヒトでの臨床応用につなげるためには、今後 AAV の投与方法や副次的効果に関してどのような問題があり得るかをよく認識している。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分は価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 花岡　まりえ |
| 論文審査担当者 | 主査　稲澤　譲治<br>副査　渡邉　守、　江石　義信 |
| 論　文　題　目 | Expression of ATF6 as a marker of pre-cancerous atypical change in ulcerative colitis-associated colorectal cancer: a potential role in the management of dysplasia |

（論文内容の要旨）

【背景】

潰瘍性大腸炎（UC）の患者数は全世界的に増加傾向である。UC の炎症が長期化すると発癌することが知られており、更に通常の大腸癌よりも UC 関連大腸癌の方が予後が悪いことも報告されている。従って UC の治療において、前癌病変である Low grade dysplasia (LGD)を拾い上げることは重要である。しかし、炎症性変化を伴う背景粘膜からの LGD の鑑別はしばしば困難である。UC 関連大腸癌の発癌メカニズムについての研究は進んでいるが、解明には至っていない。初期段階で p53 遺伝子変異が生じるため、p53 を用いた免疫染色が UC の前癌病変の診断に用いられている。しかし、p53 免疫染色の有用性については、その偽陰性、偽陽性の問題があり議論の余地がある。近年、小胞体ストレス応答（UPR）の炎症性腸疾患や発癌との関与が報告されている。細胞に酸化ストレスや慢性炎症などの、いわゆる小胞体ストレスが加わると、3 種類の小胞体ストレスセンサーが応答し、細胞がストレス下の環境に適応できるように UPR を発動させる。我々は UPR が UC 関連大腸癌の発癌過程に関与する可能性に着目した。

【目的】

大腸癌において高発現する UPR 関連遺伝子を抽出し、その遺伝子の大腸癌および UC 関連大腸癌における発現を検討した。また、同遺伝子が UC 症例における LGD の鑑別に有用か否かを検討した。

【方法】

Stage1～3 の大腸癌手術検体 152 例を対象とした網羅的発現解析を用いて、癌部で非癌部より 1.5 倍以上高発現する遺伝子[Wilcoxon exact rank-sum test ($p<0.001$)] のうち、文献的に UPR に関連する遺伝子を抽出したところ、Activating Transcriptional Factor 6 (ATF6)のみが候補に残った。従って ATF6 を候補遺伝子として、以下の患者群において同遺伝子の蛋白発現を免疫染色（ATF6-IHC スコア 0～14）にて検討した。

(1) 2010～2011 年に手術を施行された大腸癌 137 例、(2) 同時期に内視鏡的摘除された 95 例（腺腫 48 例、pTis 癌 47 例）、(3) 2004～2015 年に手術を施行された UC51 例、136 病変（非活動性炎症粘膜 39 病変・活動性炎症粘膜 59 病変、LGD 24 病変、High grade dysplasia (HGD) 7 病変、UC-CRC 15 病変）。(3)では p53 免疫染色も併施し、LGD の鑑別における ATF6 と p53 の精度を比較した。

ATF6 免疫染色は、核と細胞質の両者で染色を認めたため、それぞれで判定を行った。過去の報告に基づき、intensity（強度）と extensity（広がり）の程度をスコア化して組み合わせることで、最終的スコアとした。Intensity は 0(negative)、1(weak)、2(strong)、extensity は 0 (0–5%)、 1 (6–30%)、 2 (31–70%) 、 3 (71–100%) と判定した。P53 免疫染色における陽性、陰性は、核の染色分布を 5 種類に分類することで判定した。

【結果】

(1)ATF6 の蛋白発現は正常大腸粘膜では認めず、大腸癌では全例で発現を認めた。ATF6-IHC スコアと臨床病理学的因子との関連を調べたが、壁深達度や Stage との相関はなく、唯一リンパ管脈管侵襲陽性と ATF6 高発現との関連を認めた（$p$=0.026）。（2）内視鏡的摘除症例では、低異型度腺腫＜高異型度腺腫＜pTis 癌の順に ATF6 発現が高かった[中央値（範囲）; 2.0（0-4）、5.0(0-8)、7.0（3-14）、$p$＜0.001]。（3）UC 症例では、Dysplasia・癌部で ATF6 の発現が高く（中央値 6.0）、炎症粘膜(中央値 3.0)と LGD(中央値 6.0)の間で有意差を認めた（$p$＜0.001）。炎症粘膜のうち、活動性炎症粘膜(中央値 3.0)と非活動性炎症粘膜(中央値 3.0)では有意差を認めなかった($p$=0.249)。全 UC 症例の ATF6-IHC スコアの中央値 4.0 を用いて、4 以下を陰性、5 以上を陽性として、各 UC 病変の ATF6・p53 陽性率を検討した。P53 陽性率は、炎症粘膜と LGD 間で差を認めず、LGD（16.7%）より活動性炎症粘膜（40.7%）で高値であったのに対し、ATF6 陽性率は、LGD（70.8%）が非活動性炎症粘膜（17.9%）および活動性炎症粘膜（24.1%）に比べ高かった。炎症粘膜から LGD を鑑別する感度・特異度は、ATF6 が p53 に比べどちらも高かった（感度:70.8% vs. 16.7%、 特異度:78.5% vs. 71.0%）。

【考察】

今回着目した ATF6 は、UPR 関連遺伝子で小胞体ストレスセンサーの 1 つである。ATF6 に関するこれまでの報告としては、休眠期の癌細胞の mTOR 経路を活性化させることで癌の生存に重要な役割を果たすという報告、UC 患者の大腸粘膜で発現が亢進しているという報告などがある。従って今回の研究では、ATF6 の大腸癌および UC 関連大腸癌の発癌/進展への関与と、臨床的に重要である UC の Dysplasia の拾い上げに有用であるかを検討した。

大腸癌/大腸腺腫と ATF6 の発現の検討では、癌の進展に関与する TNM 因子と発現の関連は認めず、前癌病変から早期癌にかけて段階的に発現が強くなったことから、ATF6 は大腸癌の進展よりも、むしろ発癌と関与することが示唆された。UC 症例においては、Dysplasia がない病変において発現は低く、Dysplasia 特に LGD では高発現であったことから、ATF6 は UC 症例においても発癌過程に関与する可能性が示唆された。

P53 免疫染色は UC 関連大腸癌の診断にしばしば用いられるが、P53 免疫染色陰性でも p53 遺伝子変異を 50%以上に認め、一致率が低いという報告が散見される。今回の結果では、p53 陽性率は HGD や UC 関連癌では高かったが、LGD では炎症粘膜と同じ程度であり陽性率は低かった。UC 症例における Dysplasia の拾い上げには、P53 より ATF6 の方が有用である可能性が示唆された。

UC 症例における LGD のマネジメントについては、日本および欧州のガイドライン上で一定の見解はなく、LGD が指摘された時点で大腸全摘を行う、もしくは内視鏡的完全摘除を行い密にフォローを続けることが推奨されている。しかし LGD が指摘された後に大腸全摘を行った症例の 30%に、より異型度の進

んだ Dysplasia および癌を認めるという報告も散見されるため、LGD の拾い上げは臨床的に非常に重要であると考える。今回の研究から、将来的には ATF6 が内視鏡的生検組織における LGD の補助的診断に役立つ可能性があると考える。

Limitation として、ATF6 は LGD と HGD の鑑別はできないという点と、ATF6 陽性の病変が将来的に癌化するかは分からないという点が挙げられる。ATF6 陽性病変が将来的に癌化することが分かれば、臨床的により重要な意味が出てくるだろう。今後は、より多くの、継続的なフォロー下における UC 症例における内視鏡的生検組織を用いた研究が必要だと考える。

【結論】

小胞体ストレス応答関連蛋白 ATF6 は、大腸癌および UC 関連大腸癌の前癌病変の段階で発現が上昇していた。ATF6 の免疫染色が UC 症例における LGD の診断の一助となる可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5361　号 | 花岡　まりえ |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　稲澤　譲治<br>副　査　渡邉　守、　江石　義信 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

大腸癌で高発現する小胞体ストレス応答（UPR）関連遺伝子 ATF6 に着目し、免疫組織学により ATF6 蛋白の発現定量が潰瘍性大腸炎（UC）症例の Low grade dysplasia (LGD)の鑑別に有用であるかの検討を行った。その結果、ATF6 蛋白発現を検出することが UC 症例における LGD 診断の一助となる可能性を示すことができた。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

UC 関連大腸癌の発癌ステップの比較的初期に p53 遺伝子変異が生じるとされ、p53 免疫染色が UC の前癌病変の診断に用いられている。しかし、この p53 免疫染色の有用性については議論の余地を残す。今回の研究では、ATF6 と p53 の免疫染色を比較することで、炎症粘膜における LGD の鑑別において、ATF6 が p53 より、感度・特異度ともに高いとの結果が得られた。これにより、ATF6 免疫染色が UC 症例の LGD 診断に有用である可能性が示され、臨床的にも価値の高い成果が得られた。

２）社会的意義

現在、UC 症例で LGD が指摘された場合、大腸全摘が行われるか、あるいは内視鏡的完全摘除が行われている。したがって、LGD の正確な診断は臨床的に極めて重要である。今回の研究において、ATF6 免疫染色が内視鏡的生検組織を用いた LGD 診断の補助バイオマーカーとして役立つ可能性が示され、臨床的にも意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

手術摘出された大腸癌や内視鏡的摘除された腺腫、さらに UC の非活動性炎症粘膜・活動性炎症粘膜などの保存生体試料を用いて ATF6 ならびに p53 の蛋白発現が免疫染色法にて検討された。生体試料は適正な倫理的配慮のもとで収集され有効に使用された。

４）考察・今後の発展性

将来的には ATF6 が内視鏡的生検組織における LGD の補助的診断に役立つ可能性がある。

３．その他

４．審査結果

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分に価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 新井　洋平 |
| 論文審査担当者 | 主査　樗木　俊聡<br>副査　森尾　友宏、澁谷　浩司 |
| 論　文　題　目 | Salt suppresses IFNγ inducible chemokines through the IFNγ-JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年塩分過剰摂取によって引き起こされる生体内の塩分濃度の上昇が、様々な組織の免疫応答を直接修飾することが明らかとなった。この免疫系への修飾作用を介して塩分過剰摂取が様々な疾患の病態に影響を及ぼすことが示され、塩そのものが強力な免疫調節因子の一つとして新たに注目されてきている。

一般的に腎疾患の多くは慢性的な塩分過剰摂取により病態が増悪することが知られているが、近位尿細管障害を主体とする急性腎障害の一部には塩分負荷により病態の軽減あるいは予防効果があることも示されている。これまで塩が炎症を活性化するメカニズムは明らかになりつつあったが、塩がもつ免疫抑制機構については不明であった。そこで我々は、近位尿細管細胞では塩分負荷により高い塩分濃度に曝されることで抑制される免疫機構があるのではないかと考えた。

まず塩分を過剰に摂取させたマウスの腎臓における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにて網羅的に解析し、塩分負荷でインターフェロン γ(IFNγ)誘導性ケモカインが近位尿細管において抑制されることを発見した。さらに、ヒト近位尿細管細胞株である HK2 細胞を用いた in vitro の実験系で、塩分濃度の上昇が IFNγ 誘導性ケモカインの発現を抑制すること、またこの発現抑制機構が細胞膜表面上の IFNγ 受容体の発現が減少することで下流の JAK1/STAT1 signaling pathway が抑制されることに起因することを示した。

本研究は、塩がもつ新しい免疫修飾機構の発見であると同時に、塩分負荷の新たな治療応用にもつながる発見と考えられる。

＜緒言＞

近年塩分過剰摂取によって引き起こされる生体内の塩分濃度の上昇が、様々な組織の免疫応答を直接修飾することが明らかとなった。この免疫系への修飾作用を介して塩分過剰摂取が様々な疾患の病態に影響を及ぼすことが示され、塩そのものが強力な免疫調節因子の一つとして新たに注目されてきている。これまで塩そのものが炎症を活性化するメカニズムは明らかになりつつあったが、塩そのものがもつ免疫抑制機構については不明であった。

一般的に腎疾患の多くは慢性的な塩分過剰摂取により病態が増悪することが知られているが、

シスプラチン腎症や造影剤腎症などの近位尿細管障害を主体とする急性腎障害の一部には塩分負荷によって病態の軽減あるいは予防効果があることも示されている。

これらの事実から、我々は、近位尿細管細胞では塩分負荷によって高い塩分濃度に曝されることで抑制される免疫機構があるのではないかと考え、本研究を行った。

＜方法＞

体内に過剰に塩分を貯留させたマウスと通常の状態のマウスにおいて、腎臓における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイで網羅的に解析して、塩分負荷により抑制されるサイトカインを同定した。マイクロアレイでの比較解析には、塩分貯留モデルとして当教室で以前に作成した偽性低アルドステロン症 II 型モデルマウスである *With-no-lysine kinase 4* (*WNK4*) $^{D561A/+}$ マウスに 8%高塩食を 7 日間摂取させたものを使用し、これを通常食を摂取させたリッターメイトの *WNK4* $^{+/+}$ マウスと比較した。なお、*WNK4* $^{D561A/+}$ マウスとは、遠位尿細管に存在する NaCl cotransporter (NCC) による NaCl 再吸収が亢進することで、塩分排泄が障害されたマウスである。定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) 法によりマイクロアレイの結果の再現性を確認するとともに、8%高塩食と通常食をそれぞれ 7 日間摂取させた C57BL/6 マウスの比較を行い、塩分負荷のみで同様の変化が生じるかを検討した。また塩分負荷によるサイトカインの発現抑制が近位尿細管で起こっているかどうかを検証するために、免疫染色およびウェスタンブロットを実施した。さらにヒト近位尿細管細胞株である HK2 細胞を用いて、サイトカインの発現抑制が培養液中の塩分濃度の上昇に起因するかを検証するとともに、サイトカインの発現抑制に関わる分子機構を検討した。

＜結果＞

マイクロアレイの結果から、8%高塩食を 7 日間摂取させた *WNK4* $^{D561A/+}$ マウスの腎臓では、インターフェロン γ(IFNγ) 誘導性のケモカインの一つである Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) とその特異的受容体である Chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (CXCR3) の mRNA が共に抑制されていた。qRT-PCR 法でもこれらのケモカインの発現抑制は再現され、さらにもう一つの IFNγ 誘導性ケモカインである CXCL10 も抑制されていることがわかった。またこれらの変化は、8%高塩食を 7 日間摂取させた C57BL/6 マウスにおいても確認され、塩分負荷によって腎臓における IFNγ 誘導性ケモカインの発現が抑制されることがわかった。CXCL9 および CXCL10 は IFNγ 刺激により近位尿細管において誘導され、CXCR3 を発現する免疫細胞を誘引することが知られている。そこで C57BL/6 マウスに IFNγ を腹腔内投与してケモカインを誘導して、近位尿細管における CXCL9 の発現を免疫染色で評価したところ、塩分負荷によって近位尿細管における CXCL9 の発現誘導は抑制されることがわかった。

高塩食を摂取したマウスの尿では塩分濃度が有意に上昇しており、塩分負荷により尿細管細胞が高い塩分濃度に曝されることで、IFNγ 誘導性ケモカインの発現抑制が引き起こされる可能性を考えた。そこで HK2 細胞を IFNγ 刺激してケモカインを誘導する際に、培養液中に 80mM の NaCl を添加して高塩濃度刺激を加えたところ、浸透圧コントロールとして 160mM の Sorbitol を培養液中に添加した場合と比較して、IFNγ 誘導性ケモカインの mRNA の発現は有意に抑制された。さ

らに HK2 細胞から培養液中に分泌されるケモカインを Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) で評価したところ、高塩濃度刺激によって CXCL9 と CXCL10 の分泌は有意に抑制されることがわかった。以上から、塩分負荷によって近位尿細管細胞が高塩濃度刺激に曝されることに起因して、IFNγ 誘導性ケモカインの発現誘導が抑制されることがわかった。

塩分負荷によるケモカインの発現抑制に関わる分子機構を解明するため、IFNγ 誘導性ケモカインの転写制御を担う Janus kinase (JAK) / Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT) signaling pathway に着目した。IFNγ 誘導性ケモカインの転写を正に制御する転写因子である STAT1 の核内のリン酸化は高塩濃度刺激によって減弱しており、STAT1 の活化低下を認めた。また STAT1 をリン酸化する JAK1 と JAK2 を評価したところ、高塩濃度刺激により JAK1 のみリン酸化が減弱しており、JAK1 の活性低下を認めた。JAK1 のリン酸化に関わる Interferon gamma receptor 1 (IFNGR1) の細胞膜表面上の発現を Biotinylation assay で評価したところ、高塩濃度刺激によって IFNGR1 の細胞膜表面上の発現が低下し、internalization することがわかった。以上から、高塩濃度刺激によって IFNGR1 が internalization を起こし、IFNγ 刺激で誘導される JAK/STAT signaling pathway が阻害されることで、ケモカインの発現抑制が起こる可能性が示唆された。実際に、JAK 阻害薬の投与を細胞に対して行うと、高塩濃度刺激によるケモカインの発現抑制効果は阻害された。また生体内でも塩分負荷により腎臓の JAK/STAT signal が減弱するかを評価したところ、8%高塩食を 7 日間摂取させた C57BL/6 マウスの腎臓で JAK1 のリン酸化の減弱が確認された。

＜考察＞

IFNγ は主に Th1 細胞から分泌されるサイトカインとして知られ、近位尿細管細胞に作用すると CXCL9 および CXCL10 を誘導する。これらのケモカインは、特異的受容体である CXCR3 を発現する免疫細胞を誘引して、組織における免疫応答を修飾している。CXCL9 および CXCL10 は近位尿細管障害の急性期に誘導され病態形成に関与するという報告もあり、塩分負荷が一部の近位尿細管障害の病態の軽減または予防に有効であるメカニズムに関与している可能性が示唆される。しかし一方で塩分負荷により活性化する免疫機構があることも確かであり、塩分負荷の治療応用についてはさらなる検討が必要である。

＜結論＞

塩分負荷によって、IFNγ-JAK1-STAT1 signaling pathway の抑制を介して、近位尿細管における IFNγ 誘導性ケモカインの発現が抑制されることがわかった。本研究は、塩そのものがもつ新しい免疫修飾機構の発見であるとともに、塩分負荷の新たな治療応用にもつながる発見と考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5362　号 | 新井　洋平 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　樗木　俊聡<br>副　査　　森尾　友宏、澁谷　浩司 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

近位尿細管細胞および同細胞株を用いて、塩分負荷により IFNγ 誘導性ケモカインの産生が抑制されること、その機序として IFNγ 受容体の発現が低下することを示した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

これまで塩分負荷が免疫・炎症反応を亢進させることは報告されていたが、免疫抑制現象については不明であった。申請者は、塩分負荷により近位尿細管細胞周辺で抑制される免疫経路を明らかにした。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．8%高塩食で飼育した *WNK4* $^{D561A/+}$ および C57BL/6 マウス腎臓では、IFNγ 誘導性 CXCL9/10 および CXCR3 の発現が mRNA レベルで抑制された。

２. 80mM NaCl 添加培地（高塩濃度刺激）で培養したヒト近位尿細管細胞 HK2 細胞株でも、IFNγ 誘導性 CXCL9/10 の産生が抑制された。

３．さらに分子基盤として、高塩濃度刺激で IFNγ 受容体の内在化が起こり、JAK1/STAT1 のリン酸化が減弱していることが判明した。

３）研究方法・倫理観

コントロールマウスと 8%高塩食で飼育した上記マウス腎臓における網羅的遺伝子発現解析を行い、塩分負荷により抑制される IFNγ 誘導性ケモカインを抽出、ヒト近位尿細管細胞株 HK2 でも高塩濃度培地で類似の現象を確認・検証した。

４）考察・今後の発展

近位尿細管細胞周辺で塩分負荷により免疫・炎症応答が抑制される分子機構の詳細を明らかにすることにより、標的分子の絞り込み・選択、さらには腎関連疾患の予防や治療応用への可能性が期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 秋山　慎太郎 |
| 論文審査担当者 | 主査　江石　義信<br>副査　樗木　俊聡、　金井　正美 |
| 論　文　題　目 | *CCN3* Expression Marks a Sulfomucin-nonproducing Unique Subset of Colonic Goblet Cells in Mice |

（論文内容の要旨）

<要旨>

腸上皮杯細胞に含まれる機能の異なる杯細胞亜集団を特定の分子発現と関連付けて解析した研究は少ない。本研究では、マウス大腸上皮オルガノイドで Notch シグナルを阻害すると発現が誘導される CCN ファミリー分子に属する *CCN3* が、マウス近位・中位大腸の陰窩下部に局在する alcian blue 染色陽性、high iron diamine 染色陰性のユニークな杯細胞で発現することを見いだした。さらに、マウス DSS（デキストラン硫酸ナトリウム）腸炎モデルを用いた解析で、正常遠位大腸には存在しない *CCN3* 陽性細胞が、上皮再生過程で一過性に遠位大腸に出現することを示した。以上より、CCN3 が硫酸化ムチン非産生杯細胞というユニークな大腸杯細胞を標識し、大腸部位特異的杯細胞機能や上皮再生機構に関与する可能性が示された。

<緒言>

腸上皮杯細胞は、形態的な特徴を有するとともに Muc2 を主とする粘液成分を分泌する細胞集団である。腸杯細胞は、内分泌細胞、パネート細胞とともに、上皮陰窩底部の *Lgr5* 陽性幹細胞より発生した共通の前駆細胞から分化する。この分泌系細胞への分化は、細胞間シグナル伝達系である Notch シグナルの抑制により誘導される。

腸杯細胞は、機能の異なる亜集団を含むことが知られる。例えば、酸性ムチンを染色する alcian blue (AB)染色で認識される杯細胞は、酸性ムチンの一種である硫酸化ムチンを産生する high iron diamine (HID)染色陽性杯細胞とは完全に一致しない。このことから AB 陽性杯細胞には、硫酸化ムチンを豊富に産生する HID 陽性杯細胞（AB+HID+）と、硫酸化ムチンの産生量が少ない、もしくは産生しない HID 陰性杯細胞（AB+HID-）が含まれることが示唆される。しかしながら、腸杯細胞における機能の異なる亜集団を、特定の分子発現と関連付けて解析した論文は少ない。

CCN3 は CCN ファミリー分子のメンバーで、細胞外マトリクスと会合し標的細胞に作用し、血管新生、幹細胞制御、組織修復など様々なプロセスに関与するが、腸組織における CCN3 の発現や機能を調べた報告はない。本研究では、*CCN3* が、マウス大腸上皮オルガノイドで Notch シグナル阻害により誘導される遺伝子であることを見いだした。また、*CCN3* 発現がマウス近位と

中位大腸上皮に局在し、かつ杯細胞の一部の亜集団に限局することを明らかにした。さらに、マウス実験的腸炎モデルの上皮修復過程における *CCN3* の発現解析もおこなった。

<方法>

マウス

野生型 C57BL6 マウス（8 週齢、雄）を用いた。

オルガノイド培養

マウス大腸から単離した陰窩を I 型コラーゲンに包埋し、Wnt3a、R-spondin1、Noggin、EGF、HGF を含む培地で既報にしたがい培養した。培養 3 日後、γ-secretase inhibitor(GSI) である LY411575(1 μM)、溶媒（DMSO）を添加した。

発現遺伝子解析

LY411575 添加前と添加 48 時間後の遠位大腸オルガノイドから RNA を回収しマイクロアレイ解析を行った。添加前後で 2.5 倍以上発現変動した遺伝子中の複数については半定量 RT-PCR で評価した。

DSS 腸炎モデル

マウスに、3%DSS 水溶液を自由飲水で 5 日投与し腸炎を誘導した。DSS 投与後 Day5、10、16 で組織を解析した。

組織学的解析

常法にしたがい 10 μm の腸組織凍結切片を作成し、HID/AB 染色を行った。*in situ* hybridization(ISH)は、*CCN3* のジゴキシゲニン（DIG）標識 RNA プローブ、*Muc2* のフルオレセイン（FITC）標識 RNA プローブを作成しおこなった。*CCN3* の単一染色では、アルカリホスファターゼ（AP）結合抗 DIG 抗体と AP 基質でプローブを検出した。*CCN3*、*Muc2* の 2 重染色では、ペルオキシダーゼ結合抗 FITC 抗体とチラミドシグナル増幅法により *Muc2* プローブを、AP 結合抗 DIG 抗体と AP 蛍光基質で *CCN3* プローブを検出した。

ウエスタンブロット

マウスの小腸、近、中、遠位大腸各々から抽出した蛋白質を SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロット法により CCN3、β actin を検出した。

<結果>

マウス遠位大腸オルガノイドに GSI を添加し発現上昇を示す遺伝子群として、マイクロアレイ解析で 143 遺伝子が抽出された。ここに含まれ、分泌系細胞で発現する既知遺伝子の GSI による変化は、半定量 RT-PCR でも再現された。本研究では、マイクロアレイ解析で抽出され、半定量 RT-PCR でも GSI による発現誘導が確認された *CCN3* に着目した。

腸組織での ISH の結果、*CCN3* が小腸、盲腸および遠位大腸には発現せず、近位・中位大腸上皮の陰窩中位から底部に限局して発現することを見いだした。大腸における *CCN3* mRNA と蛋白質の部位依存性発現は、腸の各部位の上皮サンプルを用いた半定量 RT-PCR およびウエスタンブロットでも確認できた。

近位・中位大腸で限局する *CCN3*+細胞の特徴的な形態から、これらが杯細胞に一致する可能

性が考えられた。そこで、杯細胞マーカー*Muc2*と *CCN3*の 2 重蛍光 ISH を実施したところ、近位・中位大腸陰窩下部の *CCN3*+細胞は全て *Muc2*+であった。一方、近位・中位大腸の陰窩上部および遠位大腸では、*Muc2*+細胞は存在するものの *CCN3*-であった。このことから *CCN3*は、近位・中位大腸の *Muc2*+杯細胞の中でも陰窩下部に局在する一部の亜集団に発現することが示された。

酸性ムチンを産生する AB+杯細胞は、硫酸化ムチンを検出する HID 染色により分類可能であることが知られる。マウス腸組織において AB/HID 染色を実施した結果、近位・中位大腸では陰窩上部に AB+HID+細胞を認めるのに対し、陰窩下部では AB+HID-細胞が優位に存在した。一方、遠位大腸および小腸では、AB+HID-細胞は認めなかった。以上より、AB+HID-細胞と *CCN3*+細胞の分布が一致する可能性が示唆された。実際、HID 染色と *CCN3* ISH を比較した結果、*CCN3*+細胞と HID+細胞の分布が相互排他的であることが示された。

大腸上皮障害時、あるいは再生時における杯細胞の詳細な挙動は不明な点も多い。そこで、マウスに DSS 腸炎を誘導した後の大腸組織における AB/HID 染色と *CCN3* 発現パターンを経時的に解析した。

腸炎急性期（Day5）の中位大腸では、陰窩の破壊とともに AB+杯細胞が減少した。このとき、陰窩内の AB+細胞は HID+となるとともに、*CCN3*+細胞は消失した。回復期（Day10、16）の中位大腸では、陰窩の伸長をともなう組織再生を認め、AB+HID+細胞は再び陰窩上部に限られる点で正常時と同様であった。また、*CCN3*+細胞も多数再出現し、伸長した陰窩下部の AB+HID-細胞の分布に一致した。

遠位大腸において、Day5 では著明な組織破壊により、杯細胞だけでなく陰窩構造も完全に消失した。Day10, 16 では、同じマウス個体内でも、観察部位により異なる程度の組織修復が確認された。例えば、正常程度にまで陰窩構造が回復した Day16 組織中の部位では、陰窩内全ての AB+細胞は、HID+*CCN3*-で正常時と同様であった。一方、Day10、16 の著明な陰窩伸長を示す再生上皮では、正常遠位大腸では観察されない *CCN3*+細胞が、伸長した陰窩底部側に明瞭に出現した。この *CCN3*+細胞も HID-であり、正常時あるいは腸炎時の近位・中位大腸で観察される *CCN3*+細胞と類似していた。

<考察>

本研究では、*CCN3*が、マウスの近位・中位大腸上皮の陰窩下部に存在する杯細胞に限局して発現する分子であることを示した。また *CCN3*+細胞は HID-の硫酸化ムチン非産生杯細胞を標識する可能性を提示した。ラット大腸においては、上行結腸の陰窩下部に局在する HID-杯細胞が指摘され、電子顕微鏡で見る微細形態が陰窩上部の杯細胞とは異なるとの報告がある。本研究は、ラット大腸で示されてきたこれら杯細胞の亜集団が、分子マーカー*CCN3*により標識される可能性を見出した。今後、HID-杯細胞および CCN3 の機能を明らかにすることは、大腸杯細胞の多彩な種類や、大腸頭尾軸に沿った杯細胞の部位特異的な制御機構を理解することに重要であると考える。

本研究では、DSS 腸炎誘導後の組織変化に伴う *CCN3*+細胞の挙動も解析した。その結果、遠位大腸において、炎症による上皮破壊に続く組織再生期には正常時に観察されない *CCN3*+杯細

胞が出現との興味深い現象を発見した。遠位大腸に異所性に出現した *CCN3*+細胞は *Muc2*+であり、再生陰窩底部に局在し、HID-であることから、正常時の近位・中位大腸に見られる *CCN3*+細胞と共通の特徴を有していた。このことは、遠位大腸上皮が傷害後に再生する際には、むしろ正常な近位・中位大腸の増殖分化機構に類似して、*CCN3*+HID-杯細胞の一過性出現を誘導する何らかの機構が作動する可能性が示された。今後、上皮再生における *CCN3*+杯細胞の機能やこれら細胞が遠位大腸に出現する機構を解析することは、大腸上皮再生機構を理解する上で有用であると考える。

<結論>

*CCN3* は、大腸上皮において Notch シグナル阻害により発現誘導される因子であり、硫酸化ムチン非産生杯細胞を標識する。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5363　号 | 秋山　慎太郎 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　江石　義信<br>副　査　樗木　俊聡、　金井　正美 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は、*CCN3* がマウス大腸上皮オルガノイドで Notch シグナル阻害により誘導される遺伝子であることや、*CCN3* 発現がマウス近位と中位大腸上皮に局在しかつ杯細胞の一部の亜集団に限局することを明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

腸杯細胞は機能の異なる亜集団を含むことが知られるが、腸杯細胞における機能の異なる亜集団を特定の分子発現と関連付けて解析した論文は少ない。他方、CCN3はCCNファミリー分子のメンバーで、細胞外マトリクスと会合し標的細胞に作用し血管新生、幹細胞制御、組織修復など様々なプロセスに関与するが、腸組織におけるCCN3の発現や機能を調べた報告はない。このような背景のもと申請者は、*CCN3*が大腸上皮においてNotchシグナル阻害により発現誘導される因子であることを独自に見いだしており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．*CCN3*はマウス大腸上皮オルガノイドでNotchシグナル阻害により誘導される遺伝子である。

２．*CCN3*発現はマウス近位と中位大腸上皮に局在しかつ杯細胞の一部の亜集団に限局する。

３．マウス実験的腸炎モデルの上皮修復過程において興味ある*CCN3*発現が認められた。

以上のように申請者は、CCN3が硫酸化ムチン非産生杯細胞というユニークな大腸杯細胞を標識し、大腸部位特異的杯細胞機能や上皮再生機構に関与しうることを明らかにしている。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、マウス大腸から単離した陰窩を用いたオルガノイド培養法、大腸オルガノイドから抽出したRNAを用いたマイクロアレイ解析、DSS腸炎モデル作成、ISH法などの組織学的解析、ウエスタンブロットなどが用いられている。これらの研究方法は十分な研究倫理的な知識と分子生物学的および組織学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「大腸杯細胞の多彩な種類や大腸頭尾軸に沿った杯細胞の部位特異的な制御機構を理解するうえで、上皮再生におけるCCN3+杯細胞の機能やこれら細胞が遠位大腸に出現する機構を解析することは、大腸上皮再生機構を理解する上で有用である」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 許　暁茵 |
| 論文審査担当者 | 主査　清水　重臣<br>副査　田中　真二、仁科　博史 |
| 論　文　題　目 | BCL-XL binds and antagonizes RASSF6 tumor suppressor to suppress p53 expression |

（論文内容の要旨）

**Summary**

BCL-XL is a pro-survival member of BCL-2 family proteins. BCL-XL directly inhibits pro-apoptotic BAX and BAK. BCL-XL also traps tBID, a pro-apoptotic activator BH3-only protein, and sequesters p53. In addition, BCL-XL regulates the mitochondrial membrane permeability *via* voltage-dependent anion channel. In these manners, BCL-XL plays an anti-apoptotic role. RASSF6, a member of the tumor suppressor Ras-association domain family proteins, induces apoptosis in the caspase-dependent and -independent manners. RASSF6 interacts with MDM2 and stabilizes p53. We have found the interaction of BCL-XL with RASSF6. BCL-XL inhibits the interaction between RASSF6 and MDM2, and suppresses p53 expression. Consequently, BCL-XL antagonizes RASSF6-mediated apoptosis. Thus, the inhibition of RASSF6-mediated apoptosis also underlies the pro-survival role of BCL-XL

**Introduction**

RASSF6 is a member of Ras-association family proteins (RASSF) that has a Ras-association (RA) domain. *RASSF6* is frequently suppressed by DNA hypermethylation in human cancers and its low expression correlates with tumor progression and short disease-free survival. Hence, RASSF6 is regarded as a tumor suppressor. Accordingly, RASSF6 binds to MDM2, blocks p53 degradation, and eventually induces cell cycle arrest and apoptosis *via* p53.

Human *BCL2L1*, a BCL2-related gene, encodes two proteins with 233 and 170 amino acid residues. The former product is BCL-XL, which has four BCL-2 homology (BH) domains (BH1 to BH4). The latter product, BCL-XS, lacks BH1 and BH2. BCL-XL is a transmembrane protein in the mitochondria and acts as an anti-apoptotic protein. BCL-XL was originally thought to bind to pro-apoptotic BAX or BAK and to inhibit cell death. However, certain BCL-XL mutants that fail to bind BAX or BAK still block cell death, which suggests that the anti-apoptotic property of BCL-XL does not solely depend on the direct inhibition of BAX or BAK. Indeed, BCL-XL interacts with and traps tBID, the pro-apoptotic activator BH3-only protein, that activates BAX or BAK to lead to mitochondrial outer membrane permeabilization. BCL-XL binds voltage-dependent anion channel (VDAC) to regulate the

permeability transition pore complex. BCL-XL interacts with and sequesters p53. These interactions explain how BCL-XL plays an anti-apoptotic role. On the other hand, in response to an apoptotic signal, the sensitizer BH3-only proteins, BAD and BIK, bind to BCL-XL and release tBID to activate BAX and BAK.

In this study, we report the interaction between RASSF6 and BCL-XL. This interaction prompts us to conceive two scenarios. BCL-XL may block RASSF6-mediated apoptosis to enhance cell viability. Alternatively, RASSF6 may block the interaction of BCL-XL with tBID, VDAC, or p53 to trigger apoptosis. We have found that BCL-XL attenuates the interaction between RASSF6 and MDM2, and antagonizes the RASSSF6-mediated stabilization of p53. Thus, BCL-XL competes with RASSF6 to balance cell survival and death.

**Materials and Methods**

- ***DNA constructions*** were conducted by conventional molecular biology techniques.
- ***Antibodies and reagents*** were obtained from commercial sources.
- ***HEK 293FT, SW480. and HCT116, cells*** were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10%(v/v) fetal bovine serum and 10 mM Hepes-NaOH pH7.4 under 5% $CO_2$ at 37°C. Exogenous protein expression was performed by transfection with Lipofectamine 2000 or infection with retrovirus vectors.
- ***Co-immunoprecipitation experiments*** were performed with anti-DYKDDDDK-tag beads or anti-GFP antibody pre-fixed on protein G sepharose 4 fast flow beads.

**Results**

**RASSF6 interacts with BCL-XL.**

RASSF6 interacts with Modulator of apoptosis-1 (MOAP1), which interacts with and activates BAX. We raised a question whether RASSF6 binds other BAX-interacting proteins. We exogenously expressed BCL-XL and RASSF6 in HEK293FT cells and observed the co-immunoprecipitation of both proteins. We next immunoprecipitated endogenous RASSF6 from human colon cancer SW480 cells. The immunoblotting with anti-BCL-XL antibody detected the signal with approximately 26 kilodalton, which corresponds to the estimated size of BCL-XL. Although we used the antibody that recognizes both BCL-XS and BCL-XL, we could not detect BCL-XS in the input and the immunoprecipitate from SW480 cells.

**The N-terminal and the SARAH domain of RASSF6 bind to the region covering BH1, BH2, BH3, and TM of BCL-XL.**

We subsequently determined which region of RASSF6 is involved in the interaction with BCL-XL. We expressed various GFP-fused RASSF6 constructs with Myc-BCL-XL in HEK293FT cells and performed the immunoprecipitation with anti-GFP antibody. Myc-BCL-XL was co-immunoprecipitated with the full length RASSF6 (GFP-RASSF6-FULL) and the N-terminal region of RASSF6 (RASSF6-N). BCL-XL

was also slightly co-immunoprecipitated with the SARAH domain of RASSF6 (RASSF6-C) but not with the RA domain (RASSF6-RA). To determine which region of BCL-XL binds RASSF6-N and RASSF6-C, we expressed mCherry-BCL-XL, mCherry-BCL-XL-N, and mCherry-BCL-XL-del N with either FLAG-RASSF6-N or GFP-RASSF6-C, and conducted the immunoprecipitation. RASSF6-N bound BCL-XL-del N, which covers BH1, BH2, and BH3, but did not interact with BCL-XL-N, which harbors BH4. Similarly, RASSF6-C interacted with BCL-XL-del N but not with BCL-XL-N. We furthermore confirmed that RASSF6 could interact with BCL-XL-C containing BH1 and BH2.

**The effect of BCL-XL on the interaction between RASSF6 and various proteins related to apoptosis.**

RASSF6 is a pro-apoptotic protein. RASSF6 co-operates with the tumor suppressor Hippo pathway through the interaction with mammalian Ste20-like kinase (MST) 1 and -2, the core kinases of the Hippo pathway, but induces apoptosis independently of the Hippo pathway. One of the proposed mechanisms is BAX activation through MOAP1. RASSF6 also interacts with MDM2 and blocks the MDM2-mediated degradation of p53 to cause apoptosis and cell cycle arrest *via* p53). Considering the anti-apoptotic role of BCL-XL, we examined whether and how BCL-XL affects the interaction of RASSF6 with the molecules relevant to apoptosis. First, we expressed GFP-MST1 and GFP-MST2 with FLAG-RASSF6 in HEK293FT cells and immunoprecipitated FLAG-RASSF6. Myc-BCL-XL slightly reduced the amount of GFP-MST1 and GFP-MST2 co-immunoprecipitated with FLAG-RASSF6. The co-expression of Myc-BCL-XL had no effect on the interaction between FLAG-RASSF6 and GFP-MOAP1. In contrast, Myc-BCL-XL clearly decreased the co-immunoprecipitated MDM2.

**The effect of RASSF6 on the interaction of BCL-XL with BAX, tBID, VDAC, or p53.**

BCL-XL suppresses apoptosis through the interaction with pro-apoptotic proteins including BAX, tBID, VDAC, and p53. The sensitizer BH3-only proteins, such as BAD and BIK, binds to BCL-XL and releases tBID from BCL-XL to trigger apoptosis. By analogy, we tested the idea that RASSF6 releases pro-apoptotic proteins from the inhibition by BCL-XL. However, we could not find that RASSF6 reduces the binding of BCL-XL to BAX, tBID, p53, or VDAC.

**BCL-XL suppresses RASSF6-mediated apoptosis by reducing p53.**

The above result suggests that BCL-XL may interfere with RASSF6-MDM2-p53 axis. Consistently, BCL-XL abrogates RASSF6-mediated enhancement of p53 expression. We previously reported that RASSF6 enhances the ubiquitination of MDM2. But BCL-XL suppressed the ubiquitination of MDM2 and the RASSF6-induced enhancement of the ubiquitination. Accordingly, BCL-XL attenuates apoptosis in cells expressing RASSF6. When HCT116 cells were transfected with pCIneoGFP-RASSF6, 24 h after transfection, almost 35% GFP-RASSF6-positive cells showed the nuclear condensation, but the co-expression of Myc-BCL-XL partially reduced the number of the cells with the nuclear condensation. BCL-XL also suppressed the cytochrome c release in HCT116 cells expressing GFP-RASSF6. These findings support that BCL-XL antagonizes RASSF6-mediated apoptosis and enhances cell viability.

**Discussion**

BCL-XL binds to RASSF6 and attenuates the interaction between RASSF6 and MDM2, and abrogates RASSF6-mediated enhancement of p53. In this way, BCL-XL blocks RASSF6-induced p53-dependent apoptosis. It will be intriguing to examine whether other RASSF proteins also interact with BCL-XL and whether RASSF6 interacts with other BCL-2 family proteins.

日本語訳

BCL-2 ファミリーは、直接細胞死を誘導する分子、細胞死を阻害する分子、細胞死を誘導する分子を活性化する分子、細胞死を阻害する分子にトラップされた細胞死誘導分子を解放して細胞死を誘導する分子などから構成され、細胞の生と死のバランスをとる上で重要な役割を果たす。BCL-XL はミトコンドリアの膜透過性を高める BAX、BAK や VDAC の阻害し、あるいは、細胞死を誘導する tBID や p53 をトラップして、生存維持の役割を担う。私たちは、腫瘍抑制分子 RASSF6 が BCL-XL と結合することを見出し、その意味を解析した。RASSF6 は MDM2 と結合して、MDM2 による p53 の分解を抑制して細胞死を誘導する。BCL-XL は RASSF6 と MDM2 の相互作用を阻害し、RASSF6 による細胞死を軽減することが明らかになった。すなわち、RASSF6-MDM2-p53 系の阻害も、BCL-XL の生存維持の分子機構の一翼を担っていると考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5364　号 | 許　暁茵 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　清水　重臣<br>副　査　田中　真二、仁科　博史 | |

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、抗アポトーシス分子である Bcl-$x_L$が、がん抑制遺伝子 Ras-association domain family member 6 (RASSF6)と結合してその pro-apoptotic な機能を阻害していることを明らかにしたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究は、がん抑制遺伝子RASSF6の分子機能の一端を明らかにしたもので評価できる。

２）社会的意義

本研究で申請者が提示した主な結果は以下の通りである。

1. RASSF6とBcl-$x_L$を過剰発現した細胞を用いた免疫沈降実験において、両者の結合を見いだした。また、これらの相互作用に必要なアミノ酸領域を決定した。
2. Bcl-$x_L$の抗アポトーシス活性は、Baxなどのpro-apoptotic分子との結合などを介して実行されるが、RASSF6はこの結合には影響を与えなかった。即ち、RASSF6がBcl-$x_L$の抗アポトーシス活性に影響を与えている可能性は低いものと考えられた。
3. 一方、RASSF6のpro-apoptotic活性は、mdm2のユビキチン化などを介して実行されるが、Bcl-$x_L$はこの機能には負の影響を与えた。即ち、Bcl-$x_L$がRASSF6のpro-apoptotic活性に影響を与えているものと考えられた。

３）研究方法・倫理観

本研究の遂行には、細胞生物学、分子生物学などの知識が必要であり、申請者の学識と技術力が伺える。

４）考察・今後の発展性

本論文は、がん抑制遺伝子であるRASSF6の分子機能の一端を明らかにしたもので、がん抑制機能を解析する上で有用な研究である。

３．その他　なし

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 内堀　健 |
| 論文審査担当者 | 主査　三宅　智<br>副査　稲澤　譲治、大久保　憲一 |
| 論　文　題　目 | Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

上皮成長因子受容体（EGFR）活性化変異陽性肺癌の治療において、第 1 世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）に対する耐性のうち最も頻度の高い T790M 変異（790 番目のスレオニンがメチオニンに置換）は、第 3 世代 EGFR-TKI のオシメルチニブで克服できることが示されてきた。しかし、オシメルチニブが共有結合する 797 番目のシステイン残基がセリンに置換する C797S 変異が出現すると、オシメルチニブへの耐性が生じる。現在のところ、この C797S/T790M/活性化変異（3 重変異）による EGFR-TKI 耐性を克服する有効な治療戦略は存在しない。本研究において、我々は ALK チロシンキナーゼ阻害剤であるブリガチニブが 3 重変異 EGFR を ATP 競合的に阻害し、その耐性を克服しうることを見出した。構造活性相関解析によりブリガチニブが 3 重変異 EGFR の阻害に重要な官能基を同定することができ、さらにコンピューターシミュレーションにより EGFR に対する結合様式と、ブリガチニブの変異 EGFR への結合に寄与する原子の推定に成功した。さらに、ブリガチニブと抗 EGFR 抗体との併用療法により、動物実験において顕著な腫瘍縮小効果が認められ、そのメカニズムとして、細胞表面ならびに細胞内の総 EGFR 発現量の減少によりブリガチニブの効果が増強されていた。本研究により発見したブリガチニブと抗 EGFR 抗体の併用療法は 3 重変異 EGFR を克服する有力な候補になると考えられる。

＜緒言＞

EGFR 活性化変異を有する肺癌症例に対して EGFR-TKI が非常に有効であるが、1 年前後で獲得耐性を生じて病勢は悪化に転じる。T790M 変異を克服できるオシメルチニブでさえ、C797S が追加された 3 重変異が出現すると耐性となる。今後オシメルチニブの投与症例の増加に伴い、3 重変異による獲得耐性症例も次第に増加することが予想されるため、克服治療の開発が非常に重要である。本論文では既存薬の併用療法によりその候補となりうる治療法を発見した。

＜方法＞

マウスの proB 細胞である Ba/F3 細胞に、各種の EGFR 変異体を導入し、EGFR の活性依存的に生存する細胞を作成した。ヒト肺腺癌由来の細胞株である PC9 細胞と Gefitinib 耐性 PC9-T790M

細胞、PC9-triple-mutant 細胞、Erlotinib 耐性肺癌患者の胸水より樹立された MGH121 細胞と第 3 世代 EGFR-TKI 耐性を誘導した MGH121-res2 細胞は Massachusetts General Hospital の Dr. Niederst と Dr. Engelman より提供されたものを倫理審査委員会にて承認された研究プロトコールに則り使用した。

細胞増殖阻害試験は、段階的に希釈した薬剤を細胞に添加処理した 72 時間後に CellTiter-Glo assay により細胞内 ATP 量を測定することで生存率とした。薬剤スクリーニング実験は、研究室独自で作製されたライブラリーを用いた。Western blotting は、薬剤処理された各種細胞を可溶化の後、SDS-PAGE し、PVDF 膜に転写した上で、定法に従い各抗体を用いて評価した。

In vitro kinase assay は Promega 社の ADP-Glo assay キットを用い、SignalChem 社より購入した精製キナーゼの基質リン酸化能に対するブリガチニブの阻害活性を測定した。Flow cytometry は細胞膜表面 EGFR を蛍光標識抗体を用い flow cytometer により測定した。マウス実験は、全て施設内のガイドラインに準じて行われた。PC9-triple-mutant 細胞と PC9-T790M 細胞それぞれ $6\times10^6$個を Balb-c nu/nu マウスに皮下移植し、腫瘤の体積が 200 ㎣に到達した時点より、オシメルチニブ 50mg/kg、ブリガチニブ 75mg/kg の経口投与と抗 EGFR 抗体の腹腔内投与を開始し、その後の腫瘍体積を週 2 回で測定することで効果を評価した。なお、腫瘍体積 700 ㎣を越えた時点まで薬剤投与と腫瘍サイズの測定を継続した。

＜結果＞

各種の変異 EGFR を導入した Ba/F3 細胞に対する既存の EGFR-TKI の効果を細胞増殖阻害試験により検証したところ、3 重変異 EGFR はすべての EGFR 阻害薬が無効であった。次に、3 重変異 EGFR を克服する薬剤を探索するため、チロシンキナーゼ、セリン/スレオニンキナーゼを中心とした 30 種の薬剤で構成されるライブラリーパネルを用いてスクリーニングしたところ、ブリガチニブが有望な増殖阻害効果を示した。3 重変異 EGFR を持つ Ba/F3 細胞のブリガチニブに対する $IC_{50}$は約 60 nM と低く、ブリガチニブが十分な阻害活性を有していることが確認され、併せて Western blotting（WB）から EGFR の自己リン酸化と下流のシグナル抑制が用量依存的に示された。これらの結果は、Ba/F3 細胞のみならず、肺癌細胞株などで同様に確認されたことから、ブリガチニブは 3 重変異 EGFR を直接阻害することで細胞増殖を抑制していることが示された。

精製 EGFR キナーゼを用いた in vitro kinase assay により、ブリガチニブの EGFR 抑制様式は ATP 競合阻害であることが明らかになり、3 重変異 EGFR に比較して野生型に対する阻害作用は 10 倍程度弱いことが示された。さらに、野生型 EGFR 遺伝子が増幅している A431 細胞株において、ブリガチニブの $IC_{50}$はアファチニブやオシメルチニブよりもはるかに高く、野生型 EGFR への阻害効果が引き起こす皮膚障害等の副作用がより軽いもので済むと期待される。

ブリガチニブは ALK 阻害剤として開発が進められ、米国 FDA に承認されている薬剤である。類似構造を持つ 5 種の ALK 阻害剤の阻害活性を比較した結果、各阻害剤に特有の構造と阻害活性の関係が明らかになり、3 重変異 EGFR の阻害に、ブリガチニブの持つ phosphine oxide 基などの官能基が重要であることが明らかになった。

京都大学・理化学研究所との共同研究でスーパーコンピュータ京を利用したシミュレーション解析からブリガチニブと 3 重変異 EGFR（C797S/T790M/L858R）との結合様式が解析され、ブリ

ガチニブが 3 重変異 EGFR の T790M や C797S の変異蛋白と立体障害をきたすことなく ATP 結合ポケットに結合しうることが明らかになった。特に、ブリガチニブの phosphine oxide 基が ATP 結合部位における 3 リン酸結合領域を占有し、周囲原子との電気的相互作用やファンデルワールス力を稼いでいることが、他の ALK 阻害剤よりも 3 重変異 EGFR の抑制効果が優る根拠であると考えられた。一方で結合に貢献しないと推定される原子も明らかになり、将来の構造展開の候補になると思われる。

3 重変異 EGFR をもつ細胞を移植したマウスゼノグラフトモデルにおいて、ブリガチニブ単剤ではコントロールやオシメルチニブに比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示したが顕著な腫瘍縮小は認められなかったため、第 1 世代 EGFR-TKI 耐性症例に対してアファチニブ＋セツキシマブ併用が一定の腫瘍縮小を達成した臨床試験を参考に、ブリガチニブと抗 EGFR 抗体との併用を検証した。ブリガチニブと抗 EGFR 抗体の併用は、培養細胞においてブリガチニブの $IC_{50}$値を 2~3 倍低下させ、*in vivo* では 3 重変異 EGFR 細胞の腫瘍増殖を長期にわたって良好に抑制することができ、その効果は MGH121-res2 細胞では明確な腫瘍縮小として再現された。この結果は抗 EGFR 抗体がセツキシマブ、パニツムマブいずれでも同等の結果であった。併用による効果増強のメカニズムを解析したところ、FACS や WB の結果から、併用によって細胞表面の EGFR 発現量減少と細胞内の総 EGFR 量の減少が確認され、ブリガチニブと抗 EGFR 抗体併用による効果増強のメカニズムと考えられた。

＜考察＞

この研究における重要な課題は 3 点想定される。第 1 に、ブリガチニブが EGFR 陽性症例に対して既に行われた臨床試験において、42 例中 2 例のみしか奏効例が認められなかったことである。しかしながらブリガチニブの推奨投与量における既報の血中濃度は、今回示された 3 重変異 EGFR に対する $IC_{50}$を明らかに上回るものであり、抗 EGFR 抗体との併用がマウスモデルにおいても十分な腫瘍のコントロールを得られたことから、臨床における検証に値すると考えられる。第 2 にブリガチニブが 3 重変異 EGFR を ATP 競合的に直接阻害することは示したものの、その結合様式は、コンピューターシミュレーションで示したものだけであり、間接的な証拠しかない。今後共結晶構造解析などによりその結合様式の詳細を解明する必要がある。第 3 に 3 重変異 EGFR の正確な出現頻度が明らかでない点があげられるが、これまでに報告されているデータを参考にすれば、オシメルチニブ耐性症例の 20%程度とされており、肺癌全症例の 2-4%に相当するため臨床的意義は高いと考えられる。

＜結論＞

EGFR-TKI 多剤耐性を示す 3 重変異 EGFR に対してブリガチニブが阻害活性を有することを発見し、抗 EGFR 抗体との併用によりその効果が *in vitro*、*in vivo* いずれにおいても増強されることを見出した。構造活性相関解析とコンピューターシミュレーション解析により有効性を決定づける官能基が明らかになったと同時に、ブリガチニブの分子内で結合安定性に寄与が薄いと思われる構造も明らかにできたため、今後単剤でより高活性な薬剤を開発するうえで重要な情報である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5365　号 | 内堀　健 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三宅　智<br>副　査　稲澤　譲治、大久保　憲一 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本研究は、ALK チロシンキナーゼ阻害剤であるブリガチニブが C797S/T790M/活性化変異（3重変異）EGFR を ATP 競合的に阻害し、その耐性を克服しうることを明らかにした。また、ブリガチニブと抗 EGFR 抗体（セツキシマブ, パニツムマブ）との併用療法により、動物実験において顕著な腫瘍縮小効果が認められ、そのメカニズムとして、細胞表面ならびに細胞内の総 EGFR 発現量の減少（internalization）によりブリガチニブの効果が増強されていることを明らかにした。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

肺癌臨床の現状から発想を得た研究であり、十分な基礎的なデータの裏付け、広範な実験手技や考察が行われ、論理的な展開で結果を導出した優れた研究である。

２）社会的意義

実臨床においても、肺癌の治療の新たな戦略として実行可能であり、今後の実臨床においても肺癌患者の生存期間延長、QOL の向上にも寄与すると考えられる

３）研究方法・倫理観

細胞およびマウスを用いた研究であるが、実験手法についても倫理的な配慮がなされており、問題はないものと考える。

４）考察・今後の発展性

今後は、臨床研究として発展する方向性と、立体構造の解析を進めることによって、新規薬剤の開発にも端緒を開くものである。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、副査の稲澤教授、大久保教授と合議の上、申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 齊藤　和毅 |
| 論文審査担当者 | 主査　藤井　靖久<br>副査　淺原　弘嗣、阿久津　英憲 |
| 論　文　題　目 | Steroidogenic pathways involved in androgen biosynthesis in eumenorrheic women and patients with polycystic ovary syndrome |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ヒト女性では、古典的な Δ5 および Δ4 ステロイド合成経路を介してアンドロゲンが合成される。近年、dihydrotestosterone（DHT）の産生に関わる複数の非古典的経路が報告されたが、これら経路の生体内における意義は未だ明らかにされていない。本研究では正常月経女性および多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）患者におけるアンドロゲンの由来を明らかとすることを目的とした。我々は液体クロマトグラフータンデム型質量分析および化学発光免疫測定法を用いて、正常月経女性 31 名および PCOS 患者 28 名を対象に、アンドロゲン合成に関わる 13 のステロイドの血清中濃度を測定した。PCOS 群では正常月経群と比較して、血中の 17-hydroxy（17-OH） progesterone（17-OHP）, androstenedione（Δ4A）, testosterone, androstanedione, androsterone および androstanediol が高値であった。正常月経群では、DHT の値は testosterone, androstanedion, androstanediol の値と相関した。また、量的な相関関係は 17-OH allopregnanolone, androsterone, ansrostanediol と DHT の間、および Δ4A, androstanedione, androsterone と androstanediol の間にも認められた。PCOS 群では、DHT の値は testosterone の値のみと相関し、androstanedione および androstanediol の値とは相関しなかった。また、Testosterone および Δ4A は 17-OHP と強く相関した。さらに、androstanedione, androsterone, androstanediol と 17-OH allopregnanolone の間にも量的相関関係を認めた。重回帰分析により、両群において androsterone の値は 17-OH allopregnanolone と androstanedione の両方の値に関連することが示された。以上の結果より、正常月経女性および PCOS 患者において多様なアンドロゲン合成経路が働いていることが明らかとなった。PCOS 患者の過剰なアンドロゲンは主に古典的経路を介して産生され、backdoor pathway や androstanedione を介する経路は活性の弱いアンドロゲンの産生や DHT 前駆体の供給に寄与すると推測される。

＜諸言＞

ヒト女性では主に卵巣と副腎において、Δ4 経路および Δ5 経路と呼ばれる古典的経路を介して主要なアンドロゲンである testosterone が産生される。testosterone は 5α-reductase により、最も生理活性の強いアンドロゲンである dihydrotestosterone（DHT）へと代謝される。近年、

progesterone もしくは 17-hydroxy（17-OH）progesterone（17-OHP）から 17-OH allopregnanolone を経由することにより、testosterone を介さずに DHT を産生する backdoor pathway が提唱されるようになった。しかし、その生体内における意義は明らかにされていない。

多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）は生殖年齢女性の 5-10％程度に認められる多因子疾患である。アンドロゲン過剰症は本症候群の主要徴候の一つであり、dehydroepiandrosterone（DHEA）、androstenedione（Δ4A）、testosterone などの古典経路上のアンドロゲンの過剰産生は主に卵巣と、一部の例では副腎で行われる。PCOS 患者では、古典経路に関わるステロイド合成酵素の活性異常が報告されているものの、過剰なアンドロゲンが古典経路のみに由来するか否かは明らかにされていない。また、日本は欧米と比較して PCOS 患者にアンドロゲン過剰症を認める割合が低いことが報告されている。しかし、臨床において評価されるのは主に古典経路上のアンドロゲンのみである。一方、PCOS と同様に 17-OHP の濃度が上昇する 21 水酸化酵素欠損症や P450 oxidoreductase 異常症の女性では、backdoor pathway が 17-OHP から DHT への代替経路として働くことが既に明らかにされている。

さらに他グループの報告では、PCOS 患者に DHEA を投与した後の血中 DHT と testosterone 濃度の解析結果より、Δ4A から androstanedione を介して DHT が産生される非古典的 DHT 産生経路（androstanedione-mediated pathway）の存在が主張されている。しかしこれに追従する報告は未だなく、androstanedione を経由する経路の存在は未だ推測の域を出ない。そのため本研究は、正常月経女性と PCOS 患者のアンドロゲン合成に関わるステロイド合成経路を明らかにすることを目的とした。

＜方法＞

本研究は成育医療研究センターの倫理審査委員会の承認を得て行われた。

本研究の対象は、研究参加の同意を得た正常月経群 31 名および PCOS 群　28 名。正常月経群は、アンドロゲン過剰症を認めない正常月経女性を対象とし、PCOS 群はロッテルダム診断基準を満たす患者を対象とした。正常月経群は卵胞期中期に、PCOS 患者は病態に特徴的な多嚢胞性卵巣を示す状態下に採血を行った。血清中の pregnenolone, progesterone, 17-OH pregnenolone, 17-OHP, allopregnanolone, 17-OH allopregnanolone, Δ4A, testosterone, DHT, androstanedione, androsterone および androstanediol の濃度を液体クロマトグラフ－タンデム型質量分析で測定し、DHEA-S 化学発光免疫測定法で測定した。高速液体クロマトグラフィーシステムは、SCL-10Avp システムコントローラー、LC-20AD ポンプ、CTO-20A オートサンプラー、SIL-HTc カラムオーブンからなり、タンデム型質量分析計にはエレクトロスプレー法を用いる API5000 を使用した。

以上により得られたステロイドの測定データに対して、統計学的解析を行った。正常月経女性と PCOS 患者における差の検定には Mann-Whitney *U* 検定を用い、ステロイド代謝産物間の量的相関は Spearman の順位相関係数を用いて検討した。正常月経群と PCOS 群の androsterone 合成に関わるステロイドを明らかとするため、重回帰分析を用いて非古典的経路における 2 つの前駆体と androsterone の濃度の関連を検討した。必要に応じて変数変換を行い、各変数の分散の均一性と正規性、外れ値の有無を評価したうえで解析を行った。解析に

は SPSS version 22.0 を用い、*p* 値 0.05 未満を統計学的有意差と判断した。

＜結果＞

血中の pregnenolone, progesterone, allopregnanolone, 17-OH pregnenolone, 17-OH allopregnanolone, DHEA-S および DHT の濃度は正常月経群と PCOS 群の間に有意な差を認めなかった。一方、17-OHP, Δ4A, testosterone, androstanedione, androsterone および androstanediol の血中濃度は正常月経群と比較して PCOS 群で有意に上昇していた。アンドロゲン過剰症を呈する患者と呈さない患者の間には、ステロイド濃度の有意な差を認めなかった。

正常月経群では、DHT の値は testosterone, androstanedione および androstanediol の値と相関した。また 17-OH allopregnanolone, androsterone, androstanediol と DHT、ならびに Δ4A, androstanedione, androsterone と androstanediol の間に強い量的相関を認めた。PCOS 群では、DHT の値は testosterone の値のみと相関したが androstanedione および androstanediol の値とは相関しなかった。17-OHP の値は Δ4A および testosterone の値と強く相関した。また、androstanedione, androsterone androstanediol と 17-OH allopregnanolone の血中濃度間にも相関関係を認めた。PCOS 群では正常月経群と比較して各ステロイド間の相関係数は概して低かった。

重回帰分析の結果、正常月経群では androsterone と androstanedione（標準誤差（SE）, 0.274; 標準偏回帰係数（β）, 0.382; p = 0.008）および androsterone と 17-OH allopregnanolone（SE, 1.194; β, 0.525; p =0.001）の間に関連を認めた。同様に PCOS 群も、androsterone と androstanedione（SE, 0.276; β, 0.374; p = 0.026）および androsterone と 17-OH allopregnanolone（SE, 1.960; β, 0.467; p =0.007）の間に関連を認めた。

＜考察＞

本研究により、女性のアンドロゲン合成経路につき新たな知見が得られた。正常月経女性では、DHT の血中濃度は古典的経路上の testosterone のみならず、非古典的経路上の androstanedione や androstanediol の濃度とも相関した。さらに backdoor pathway および androstanedione-mediated pathway 上の各ステロイド濃度は互いに相関した。重回帰分析により、androstanedione と 17-OH allopregnanolone の値の両方が androsterone の値と関連することが明らかとなった。これらの知見は、非古典的経路が正常月経女性で働いていることを初めて示すものである。

また PCOS 患者のアンドロゲン合成は、主に古典的経路を介することが示された。実際、PCOS 群で血中 17-OHP 濃度が上昇していること、ならびに 17-OHP の値が Δ4A と testosterone の値と相関することから、多量の Δ4A と testosterone が Δ4 経路を介して産生されることが示唆される。一方で、血中の androstanedione, androsterone および androstanediol の濃度が上昇しているため、非古典的経路もアンドロゲン過剰に寄与する可能性がある。Androsterone は弱いアンドロゲン活性を示すため、androsterone の過剰は PCOS の男性化徴候を強める可能性がある。さらに androstanedione と androstanediol は DHT へと代謝されうる。重要な点として、重回帰分析で androstanedione および 17-OH allopregnanolone の値の両方が androsterone の値に

相関することは、androsterone が androstanedione-mediated pathway と backdoor pathway の両方を介して産生されたことを示す。17-OHP が蓄積する別疾患の患者で backdoor pathway を介したステロイド代謝が亢進するのと同様に、PCOS でも 17-OHP の蓄積が backdoor pathway を介したステロイド代謝を促した可能性がある。また本研究における結果は、Fassnacht らが主張する PCOS 患者の androstanedione-mediated pathway によるアンドロゲン合成を支持する。しかし、backdoor pathway も androstanedione-mediated pathway も経路上に双方向の反応を含むため、前駆体と代謝産物の関係については更なる検証が必要である。PCOS 群では正常月経群よりも各ステロイド濃度間の相関が弱いため、アンドロゲン産生経路間の機能的バランスは個々の患者において異なることが示唆される。しかし、正常月経群と PCOS 群の DHT 濃度に差を認めず、DHT の値は androstanedione および androstanediol の値と相関しないため、非古典的経路が PCOS のアンドロゲン産生に果たす役割は補足的であると推測される。

本研究の結果は、既報論文における PCOS のステロイド代謝酵素の活性異常の報告に合致する。まずアンドロゲンの産生過剰は、3β 水酸化ステロイド脱水素酵素および 17,20 lyase の酵素活性の亢進、および 21 水酸化酵素の活性低下が原因となっている可能性がある。さらに PCOS 患者の莢膜細胞および顆粒膜細胞では、P450scc や steroidogenic acute regulatory protein を含む、古典経路上のステロイド合成酵素の発現亢進が確認されている。また androstanedione-mediated pathway や backdoor pathway を介したステロイド代謝は、PCOS 患者の莢膜細胞および顆粒膜細胞で 3β 水酸化ステロイド脱水素酵素や 5α 還元酵素が上方制御されることや、PCOS 患者の卵巣由来の培養細胞において 17β 水酸化ステロイド脱水素酵素サブタイプ 6 の mRNA レベルが増加すること、1 型 5α 還元酵素の活性が亢進することに合致する。

本研究の限界は以下の 4 点である。まず、解析の対象となった PCOS 患者の数が少なく、本研究ではアンドロゲン過剰症の有無と血中ステロイドの関連が十分に検討できていない。また本研究の参加者は日本人のみであり、PCOS の臨床像には人種差が存在することから、本研究の結果が他民族には当てはまらない可能性がある。さらに欧米の典型的 PCOS 患者は肥満を合併することが多いが、本研究では BMI が+2.5 SD を超える患者は 5 名のみであり、肥満の影響を解析していない。最後に、非古典的経路における前駆体と産物の関係および関連する酵素の活性に関しては、更なる検証が必要である。

＜結論＞

本研究により多様なアンドロゲン合成経路が女性で働いていることが示された。PCOS 患者では、古典的ステロイド合成経路を介してアンドロゲンの大部分が産生され、backdoor pathway および androstanedione-mediated pathway は、活性の弱いアンドロゲンと DHT の前駆体の産生に寄与することが明らかとなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5366　号 | 齊藤　和毅 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　藤井　靖久<br>副　査　淺原　弘嗣、阿久津　英憲 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、正常月経女性および多嚢胞性卵巣症候群患者の多様なアンドロゲン合成に関する研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

ヒト女性では､古典的なΔ5およびΔ4ステロイド合成経路を介してアンドロゲンが合成される。近年、dihydrotestosterone（DHT）の産生に関わる複数の非古典的経路が報告されたが、これら経路の生体内における意義は未だ明らかにされていない。本研究では正常月経女性および多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）患者におけるアンドロゲンの由来を明らかとすることを目的とした。

本研究では、液体クロマトグラフータンデム型質量分析および化学発光免疫測定法という従来法に比べてより正確なアッセイを用いて、正常月経女性およびPCOS患者を対象に、アンドロゲン合成に関わる13のステロイドの血清中濃度を測定した。ヒト女性において、多くのアンドロゲン合成に関わるステロイドの同時測定を行った独創的な研究であり、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．　PCOS群では正常月経群と比較して、血中の17-hydroxy（17-OH） progesterone（17-OHP）, androstenedione（Δ4A）, testosterone, androstanedione, androsteroneおよびandrostanediolが高値であった。

２．　正常月経群では、DHTの値はtestosterone, androstanedion, androstanediolの値と相関した。また、量的な相関関係は17-OH allopregnanolone, androsterone, ansrostanediolとDHTの間、およびΔ4A, androstanedione, androsteroneとandrostanediolの間にも認められた。

３．　PCOS群では、DHTの値はtestosteroneの値のみと相関し、androstanedioneおよびandrostanediolの値とは相関しなかった。また、TestosteroneおよびΔ4Aは17-OHPと強く相関した。さらに、androstanedione, androsterone, androstanediolと17-OH allopregnanoloneの間にも量的相関関係を認めた。

４．　重回帰分析により、両群においてandrosteroneの値は17-OH allopregnanoloneと

androstanedione の両方の値に関連することが示された。

以上のように申請者は、正常月経女性および PCOS 患者において多様なアンドロゲン合成経路が働いていることを明らかにし、PCOS 患者の過剰なアンドロゲンは主に古典的経路を介して産生され、backdoor pathway や androstanedione を介する経路は活性の弱いアンドロゲンの産生や DHT 前駆体の供給に寄与すると推測している。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本研究は成育医療研究センターの倫理審査委員会の承認を得て行われた。

本研究の対象は、研究参加の同意を得た正常月経群 31 名および PCOS 群　28 名。正常月経群は、アンドロゲン過剰症を認めない正常月経女性を対象とし、PCOS 群はロッテルダム診断基準を満たす患者を対象とした。正常月経群は卵胞期中期に、PCOS 患者は病態に特徴的な多嚢胞性卵巣を示す状態下に採血を行った。アンドロゲン合成に関わる 13 のステロイドの血清中濃度を液体クロマトグラフータンデム型質量分析で測定し、DHEA-S 化学発光免疫測定法で測定した。

申請者の研究方法に対する知識・倫理観　が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

本研究の結果は、既報論文における PCOS のステロイド代謝酵素の活性異常の報告に合致するものでその理論的根拠を補強するものである。まずアンドロゲンの産生過剰は、3Δ 水酸化ステロイド脱水素酵素および 17,20 lyase の酵素活性の亢進、および 21 水酸化酵素の活性低下が原因となっている可能性がある。さらに PCOS 患者の莢膜細胞および顆粒膜細胞では、P450scc や steroidogenic acute regulatory protein を含む、古典経路上のステロイド合成酵素の発現亢進が確認されている。また androstanedione-mediated pathway や backdoor pathway を介したステロイド代謝は、PCOS 患者の莢膜細胞および顆粒膜細胞で 3Δ 水酸化ステロイド脱水素酵素や 5Δ 還元酵素が上方制御されることや、PCOS 患者の卵巣由来の培養細胞において 17Δ 水酸化ステロイド脱水素酵素サブタイプ 6 の mRNA レベルが増加すること、1 型 5Δ 還元酵素の活性が亢進することに合致する。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 秋山　弘樹 |
| 論文審査担当者 | 主査　大野　京子<br>副査　前原　健寿、金兼　弘和 |
| 論　文　題　目 | High-dose methotrexate following intravitreal methotrexate administration in preventing central nervous system involvement of primary intraocular lymphoma |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

原発性眼内リンパ腫（Primary Intraocular Lymphoma, PIOL）の中枢神経進展を予防しその予後を改善させるため、我々は初発 PIOL に対してメトトレキサート硝子体注入に続く大量メトトレキサート全身投与を行いその効果を検討する前向き臨床試験を行った。初発の眼内限局 PIOL 患者 10 例に対して週 1 回のメトトレキサート硝子体注入を眼病変寛解まで施行、その後 2 週毎に大量メトトレキサート全身投与を 5 回施行した。全例で治療開始後硝子体液 IL-10 の速やかな低下とともに眼病変の寛解が得られ、全身治療を含め重篤な有害事象は認められなかった。追跡期間中央値 29.5 か月において、4 例（40 %）で中枢神経進展が認められ、無中枢神経病変生存（CNS lymphoma free survival, CLFS）期間は平均 51.1 か月、2 年 CLFS 率は 58.3 %であった。一方、我々の施設においてメトトレキサート硝子体注入のみで治療された 8 例の眼内限局 PIOL について後方視的に解析したところ、その 2 年 CLFS 率は 37.5 %であった。以上より、メトトレキサート硝子体注入に続く大量メトトレキサート全身投与は PIOL の中枢神経進展を予防する治療として適している可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

＜緒言＞

眼内リンパ腫は非ホジキンリンパ腫の 1 %未満という非常に稀な疾患であり、ほとんどは形態学的・遺伝学的にびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の形質を示す。眼内に限局して発症するものと中枢神経悪性リンパ腫の眼病変として発症するものがあり、前者が原発性眼内リンパ腫（Primary Intraocular Lymphoma, PIOL）と定義される。

PIOL の初発症状はぶどう膜炎に類似した非特異的なものであり、また病変が眼球という生検検体を得にくい部位であることから診断は困難であった。近年、感度の低い硝子体液細胞診に加えて、PCR 法やフローサイトメトリー法による腫瘍細胞の同定、硝子体液サイトカイン測定など感度の高い補助的検査が可能となってきた。

一方で PIOL に対する有効な治療法はいまだ確立されていない。局所放射線照射やメトトレキサート硝子体注入は重篤な合併症なく高い寛解率が得られるが、これら局所治療のみでは眼病変が寛解を得ても数年内に高頻度で中枢神経進展をきたし、その予後は極めて不良であった。大量

メトトレキサート全身投与は中枢神経進展を予防する治療法として有効である可能性があるが、一方で眼病変のコントロールが不良であると報告されている。

そのため、我々はメトトレキサートの硝子体注入と全身投与を併用することで PIOL の眼病変の寛解および中枢神経進展の予防効果を得られる可能性を考えた。これを検討するため、初発の眼内限局 PIOL に対してメトトレキサート硝子体注入に続き大量メトトレキサート全身投与を行う前向き臨床試験を施行した。

＜方法＞

PIOL は、典型的な眼所見を有し、かつ硝子体液細胞診で病理学的に悪性リンパ腫と証明されるか硝子体液の PCR 法やフローサイトメトリー法においてリンパ腫細胞が同定されるものと定義した。全例において髄液検査を含む全身検索により眼外病変を認めないことを確認した。

治療としてまず病変側硝子体に週 1 回 400 μg のメトトレキサート注入を眼病変寛解まで繰り返した。続いて 3.5 $g/m^2$の大量メトトレキサート全身投与を 2 週毎に 5 回施行した。一次評価項目は 2 年間の無中枢神経病変生存（CNS lymphoma free survival, CLFS）率とし、CLFS は PIOL の診断から中枢神経病変の出現までと定義した。二次評価項目は、治療の安全性と眼を含むリンパ腫の再発率とした。

PIOL に対する局所治療のみでの中枢神経進展に関する報告が無いため、本試験に参加せずメトトレキサート硝子体注入のみで治療された眼内限局 PIOL 患者について、その CLFS を含む臨床経過を後方視的に解析し本試験の結果と比較した。

本試験は本学倫理委員会の承認を受けた単一群前向き臨床試験であり、大学病院医療情報ネットワーク研究センター（UMIN）に登録されたものである（UMIN000003921）。患者に対してはヘルシンキ宣言に基づき十分な説明を行い文書による試験参加の同意を得た。

＜結果＞

2007 年 1 月から 2013 年 12 月の間に本学において PIOL と診断された 10 例が臨床試験に参加した。男性 40 %、年齢中央値 68.5 歳であり、70 %で両側性病変を認めた。自覚症状出現から診断までの期間は中央値 8 か月であった。

10 例全例が治療を完遂した。眼病変はメトトレキサート硝子体注入により速やかに寛解が得られ、投与回数中央値は 5 回であった。硝子体注入による重篤な有害事象は認められなかった。硝子体液 IL-10/IL-6 は 10 例中 9 例で診断時に 1.0 よりも高値であり、IL-10 の中央値は 1348 pg/ml であった。治療後は全例で速やかに IL-10 が検出感度以下へ低下した。その後の大量メトトレキサート全身投与による有害事象としては、CTCAE grade 3 の食思不振、貧血、悪性腫瘍が各 1 例ずつで認められた。悪性腫瘍は、リンパ腫治療終了 2 年後に大腸癌を発症したものであるが、本治療との因果関係は明らかではない。追跡期間中央値 29.5 か月において、2 例（20 %）で眼内局所再発、4 例（40 %）で中枢神経進展が認められ、平均の CLFS 期間は 51.1 か月、2 年 CLFS 率は 58.3 %であった。一方、2008 年 1 月から 2012 年 4 月の間にメトトレキサート硝子体注入のみで治療された眼内限局 PIOL 患者 8 例について後方視的に解析したところ、追跡期間中央値 40 か月において、2 例（25 %）で眼内局所再発、7 例（87.5 %）で中枢神経進展が認められ、平均 CLFS

期間は 25.8 か月、2 年 CLFS 率は 37.5 %であった。

＜考察＞

本研究は、眼内限局 PIOL に対するメトトレキサート硝子体注入と大量メトトレキサート全身投与の併用による治療効果を検討した初めての前向き臨床試験である。眼病変はメトトレキサート硝子体注入により速やかに寛解が得られ、大量メトトレキサート全身投与も含めて治療は安全に施行可能であった。比較対照試験ではないため直接比較はできないが、硝子体注入のみで治療された患者の 2 年 CLFS 率 37.5 %に対し、本試験での 2 年 CLFS 率は 58.3 %であり、硝子体注入に加えて大量メトトレキサート全身投与を併用することで予後が改善する可能性が示唆された。

PIOL は非常に稀な疾患であり、これまでに大規模前向きランダム化比較試験は報告されていない。Grimm らによる 83 例の、および Riemens らによる 78 例の PIOL についての後方視的解析では、局所治療と全身治療を受けた群に明らかな予後の差は認めなかった。しかし、これらの報告は PIOL の診断基準が一定でなく髄液細胞診陽性例を含め眼内限局でない患者が含まれること、症例により様々なレジメンで治療が行われていることから、一定の結論を出すには適していない。本研究は症例数が少ないものの単一の診断基準に基づき一定の治療プロトコルで施行された前向き試験であり、その意義は大きいと考えられる。

Hashida らの PIOL26 例についての後方視的解析によれば、中枢神経進展までの期間は局所治療群で 10.2 か月に対し大量メトトレキサート全身投与群で 48 か月と有意に延長していた。Stefanovic らは大量メトトレキサート全身投与と局所放射線照射を組み合わせたプロトコルで治療された PIOL について前向きに追跡、追跡期間中央値 40 か月で重篤な有害事象なく 6 例中 5 例で完全寛解が維持されていると報告しいてる。Taoka らも大量メトトレキサート全身投与・全脳放射線照射・局所放射線照射により治療された PIOL について前向きに追跡、追跡期間中央値 32 か月にて 5 例全例で寛解が維持されていると報告している。本研究結果は、これらに加えてさらに PIOL に対する大量メトトレキサート全身投与による中枢神経進展予防の可能性を支持するものである。

また本研究により、硝子体液 IL-10 濃度が眼内リンパ腫の病勢を反映し、メトトレキサート硝子体注入による眼病変の改善に伴い速やかに低下することが確かめられた。これまで眼内リンパ腫の病勢とサイトカイン濃度についてはいくつかの症例報告しかなく、今回の研究はその点においても意義深いものである。

一方で今後さらに検討すべき課題もある。第一に眼内局所再発が 20 %に認められたことである。Frankel らは週 2 回のメトトレキサート硝子体注入により局所再発は認めなかったと報告しており、本研究の週 1 回投与では治療効果が不十分である可能性もある。抗 CD20 モノクローナル抗体であるリツキシマブの硝子体注入が有効であったという報告もあり、これも含めた治療法の検討が必要である。第二に、40 %の患者で 2 年以内に中枢神経進展が認められており、中枢神経進展のリスク因子の同定やより予防効果のある治療法の模索も必要である。また、年齢や合併症のため大量メトトレキサート全身投与が行われなかった患者は高い確率で中枢神経進展を認めており、そのような患者に対する中枢神経進展予防法についても今後検討する必要がある。

以上より、メトトレキサート硝子体注入に続く大量メトトレキサート全身投与は眼内限局性の原発性眼内リンパ腫の中枢神経進展を予防する治療として適している可能性があり、治療効果改

善のため今後さらなる検討が必要と考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5367　号 | 秋山　弘樹 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　大野　京子<br>副　査　前原　健寿、金兼　弘和 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、原発性眼内リンパ腫に対するメトトレキサート硝子体注入に続く大量メトトレキサート全身投与により中枢神経への進展が予防できるかを検討したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

原発性眼内リンパ腫（Primary Intraocular Lymphoma, PIOL）は非ホジキンリンパ腫の 1 %未満という非常に稀な疾患である。PIOL の治療法として、局所放射線照射やメトトレキサート硝子体注入が施行され、高い局所病変の寛解率が得られるが、局所治療のみでは数年内に高頻度で中枢神経進展をきたし、予後不良であった。そこで本研究では、メトトレキサートの硝子体注入と全身投与を併用することで PIOL の眼病変の寛解および中枢神経進展の予防効果を得られると考え、併用による無中枢神経病変生存（CNS lymphoma free survival, CLFS）を調べた。生命予後が不良である PIOL に対し、新たな治療戦略を探る意味で有意義な着眼点である。

２）社会的意義

本研究による主な結果は以下の通りである。

1. 初発の PIOL 患者 10 例に対し、メトトレキサート硝子体注入による眼病変寛解後に大量メトトレキサート全身投与を施行した。追跡期間中央値 29.5 か月において、4 例（40 %）で中枢神経進展が認められ、CLFS 期間は平均 51.1 か月、2 年 CLFS 率は 58.3 %であった。
2. メトトレキサート硝子体注入のみで治療された PIOL8 例について後方視的に解析したところ、2 年 CLFS 率は 37.5 %であった。

以上より、メトトレキサート硝子体注入に続く大量メトトレキサート全身投与は PIOL の中枢神経進展を予防する治療として適している可能性が示され、臨床的にも意義のある成果と評価できる。

３）研究方法・倫理観

今回の研究は、初発の PIOL 患者 10 例に対する前向き臨床研究であり、また対照として過去に硝子体注射のみを受けた PIOL 患者８例を後ろ向きに解析している。本試験は本学倫理委員会の

承認を受けた単一群前向き臨床試験であり、大学病院医療情報ネットワーク研究センター（UMIN）に登録されたものである（UMIN000003921）。患者に対してはヘルシンキ宣言に基づき十分な説明を行い文書による試験参加の同意を得ており、倫理上の問題はない。

４）考察・今後の発展性

本研究では、初発の PIOL 患者 10 例に対し、MTX の硝子体注射と高濃度全身投与を併用することにより、CLFS を抑制できる可能性を示した重要な研究である。PIOL が稀な疾患であるため、症例数が 10 例と少ないこと、また対照となる硝子体注射のみの症例が少ないことが今後の更なる研究が必要なポイントであるが、この点についても申請者は理解し、研究成果を適切に解釈している。今後、より多数例での前向き比較研究による発展が期待される。

**３．その他**

特記すべき事項はない。

**４．審査結果**

以上より、本論文による成果は博士（医学）の申請に値する水準にあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 古川　聡一 |
| 論文審査担当者 | 主査　井関　祥子<br>副査　秋田　恵一、関矢　一郎 |
| 論　文　題　目 | Analysis of transcription factors expressed at the anterior mouse limb bud |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

肢芽のパターニング、伸長、分化は転写因子やシグナル分子、およびその下流遺伝子によって統合的に構築されたネットワークを通じて時空間的に正確に制御される。しかし、肢芽の形態形成に関しては未だ正確な機序は解明されていない。我々は、先行研究で構築した転写因子の whole-mount *in situ* hybridization データベース（EMBRYS）に基づいた転写因子の発現パターン解析を行ない、肢芽前方のパターニングに関与する転写因子を抽出すべく、胎生 9.5 から 11.5 日目のマウスの肢芽前方領域に特徴的な発現パターンを示す転写因子を抽出した。抽出した転写因子のうち、*Irx3* 遺伝子は *Shh-KO* 胚の肢芽において後方に拡大した発現パターンを呈し、*Gli3-KO* 胚の肢芽において前方に縮小した発現パターンを示した。上記の EMBRYS に基づいた段階的なスクリーニングシステムを評価するため、我々は *Prrx1* 制御エレメント下に *Irx3* を肢芽全体発現する *Irx3* 過剰発現マウスを樹立した。このマウスは自脚において手指・足趾の欠損、橈側偏移、中手骨・中足骨の癒合等、複雑な表現型を呈し、*Irx3* 遺伝子の自脚のパターニングへの関与が示唆された。以上の結果は、EMBRYS に基づいた発現パターン解析が肢芽のパターニングに関与する遺伝子の同定に貢献し得ることを示すものである。

＜緒言＞

発生段階における形態形成は、指定、増殖、分化といった発生学的プロセスを遺伝子間の協調的な相互作用を通じて制御することにより進行する。肢芽の形態形成は軸形成、パターニング、伸長そして分化において確立したメカニズムに従って進行すると考えられ、肢芽形成は個体形成を研究する上で良い発生モデルであると言える。しかし、この発生期の形態形成において高度に統合化されたプロセスを協調させる正確なメカニズムは未だ解明されていない。

四肢動物の四肢は、解剖学的に柱脚（上腕骨、大腿骨）、軛脚（橈骨／尺骨、脛骨／腓骨）、自脚（手、足）の三部から構成される。肢芽は体幹における特定の体節レベルの側板中胚葉より伸長を開始し、それぞれ遠近軸（四肢の先端から付け根）、前後軸（第Ⅰ指／趾から第Ⅴ指／趾）、そして背腹軸（手背から手掌）といった三方向の軸に沿って形態形成が進行する。過去のニワトリ胚の操作実験から、これらの軸形成は、未分化の間充織細胞にアイデンティティーを付与する

“オーガナイザー”と呼ばれる細胞集団によって決定されることが示された。オーガナイザーはモルフォゲンと呼ばれる分泌因子を介してそれぞれの方向の軸を決定する。すなわち、遠近軸は肢芽先端の外胚葉性頂堤（the apical ectodermal ridge；AER）由来の線維芽細胞増殖因子（Fibroblast growth factor；Fgf）シグナルを通じて決定され、前後軸方向では肢芽後方の間充織である極性化活性帯（the zone of polarizing activity；ZPA）がソニックヘッジホッグ（Sonic hedgehog；Shh）シグナルを介することでオーガナイザーとしての機能を果たすことが示されている。

また、マウスモデルを用いた遺伝子学的アプローチの集積により、肢芽のパターニングに関与するキーファクターあるいはメカニズムの存在を理解することが可能になった。例えば、前後軸方向のパターニングでは、ZPA 由来の *Shh* をそれぞれ正・負に制御する *Hand2* と *Gli3* が各々肢芽後方、前方に限局し、互いに制御し合うことによって、前後軸の決定、つまりプレパターニングが実現する。続いて、各指のパターニングは SHH の濃度勾配と暴露時間によって決定されることも知られている。

さらに、網羅的な生化学的実験により、位置および時期特異的に *Shh* や *Gli3* によって制御される無数の標的遺伝子の存在も明らかになり、これらを統合的に制御するネットワークが肢芽の形態形成に重要であることも示唆されている。しかし、これらの制御ネットワークを構成する因子群が機能する時期、位置、そして機能そのものも未だすべて解明には至っていない。

これらは、転写因子の研究から発生、分化のプロセスに関する重要な知見の獲得に繋がることを示唆すると考えられる。我々は先行研究で胎生（E）9.5、10.5、11.5 日のマウス胚における 1520 個の転写因子、転写共役因子（以下、転写関連因子）の時空間的発現パターンを示した、EMBRYS と称した whole-mount *in situ* hybridization (WISH)データベースを構築した。

本論文では、このデータベースに基づいた段階的なスクリーニングを行ない、肢芽前方領域のパターニングに関与する候補転写因子の遺伝子を抽出した。この候補遺伝子のうち、すでに前方化因子として示唆されている *Irx3* 遺伝子に着目し、その gain-of-function モデルマウスを作成した。その表現型の観察を通じて、本スクリーニングシステムが自脚における前後軸形成パターニングに関与する遺伝子の同定に貢献することを示し、このシステムが有用であることを証明した。

＜方法＞

EMBRYS データベースに基づき抽出した 691 個の候補遺伝子のうち、その時空間的な発現パターンに応じて、肢芽パターニングを制御する転写関連因子候補を分類、抽出した。このうち、前方制御因子候補に対する機能的解析として、*Shh-KO*$^{-}$マウス胚および *Gli3-KO*（*extra-toes* : *Gli3*$^{xt/xt}$）胚に対する WISH を施行した。本スクリーニングシステムにより抽出された候補遺伝子の一つである *Irx3* 遺伝子の gain-of-function マウスモデルを、*Tol2* トランスポゾンシステムを用いて作出した。すなわち、*Tol2* 転移酵素の mRNA をターゲティングベクターとともに前核期凍結胚に顕微注入することで、*CAG* プロモーター配列、*loxP* で挟まれた *CAT* 遺伝子、および *Irx3* 遺伝子のコーディング領域配列を有した DNA 断片を挿入したトランスジェニックマウス（*Irx3-Tg* マウス）を作出した。*Irx3-Tg* ♀マウスを *Prrx1-Cre* ♂マウスと交配することで、*Prrx1* プロモーター下に *Irx3* を過剰発現するマウス（*Prrx1-Irx3* マウス）を得た。*Irx3* 発現確認目的に、*Prrx1-Irx3* マウスの四肢組織より全 RNA を抽出し、qRT-PCR を施行した。自脚を中心に表現型を観察し、各表現型を

分類の上、それぞれの浸透率を算出した。

＜結果＞

前出のデータベースより抽出した、肢芽に発現する 691 個の候補遺伝子のうち、肢芽前方領域に発現する 5 遺伝子（*Irx3*、*Asb4*、*Lhx2*、*Nr4a2*、*Hhex*）を、中央領域に発現する 5 遺伝子（*Osr1*、*Osr2*、*Nr2f2*、*Gsc*、*Eomes*）を抽出した。

抽出した前方制御因子候補のパターニングにおける機能を解析するべく *Shh-KO*、*Gli3-KO* 胚に対してそれぞれ WISH を施行した。*Shh-KO* 胚において、5 遺伝子すべてが野生型胚に比べ後方に拡大した発現パターンを示した。一方、*Gli3*$^{xt/xt}$胚において、*Irx3* 遺伝子では野生型胚に比べ肢芽近位前方領域に縮小した発現パターンを呈したが、他の候補においては有意な発現パターンの変化を確認するに至らなかった。

そこで *Irx3* 遺伝子の gain-of-function マウスモデルを作成した。*Prrx1-Irx3* マウスの四肢組織においては、野生型に比べ、約 8 倍の *Irx3* の発現を確認した。*Prrx1-Irx3* マウスは自脚において、手指・足趾の欠損（63.6%）、橈側偏移（45.5%）、中手骨・中足骨の癒合（45.5%）等、複雑な表現型を呈した。

＜考察＞

転写因子階層での肢芽パターニング、指形成を制御する発生メカニズムを理解すべく、既出の 1520 個の転写関連因子の発現パターンのデータベースより、肢芽に発現を認める 691 個の候補遺伝子を抽出した。このうち、前後軸方向のパターニングへの関与が予想される候補因子を、その時空間的な発現パターンに基づいて選別、分類した。

前方制御因子候補として抽出した 5 個の候補遺伝子の多岐にわたる時空間的な発現パターンから、各々の機能が推察された。時間的発現パターンの観点から、*Gli3*、*Irx3*、*Asb4*、*Lhx2* は E9.5 期より既に肢芽の広範囲に発現し、肢芽発生初期に活性化され、前後軸方向のプレパターニングへの関与も示唆されるのに対し、*Nr4a2*、*Hhex* は前者より遅れて発現し、肢芽発生後期の増殖、分化、あるいは各指の指定の段階で機能することが予想された。一方、空間的発現パターンの観点から、E11.5 期の *Irx3* は柱脚、軛脚の橈側に発現しており、同部の伸長への関与が示唆された。*Asb4* は酸素依存性の血管分化に関与することで知られるが、比較的酸素へのアクセスのよい肢芽辺縁に沿った *Asb4* の発現は、同部における血管形成を通じて増殖、分化等に影響を及ぼす可能性を示唆すると考えた。*Lhx2* も *Asb4* と同様の発現パターンを示す一方、*Nr4a2* と *Hhex* は肢芽前方側においてスポット状の発現を示した。

機能解析の目的で、*Shh-KO* および *Gli3-KO* 胚に対して WISH を施行した。*Shh-KO* マウス胚において、抽出した 5 遺伝子すべてが後方に拡大した発現パターンを示し、これらの候補遺伝子の発現パターンが肢芽後方では *Shh* により抑制され、*Shh* の発現しない前方でのみ発現することで前後軸の極性を獲得する可能性が示唆された。一方、*Gli3*$^{xt/xt}$マウス胚において、すべての候補遺伝子が発現の縮小を呈したわけではなく、Gli3 以外のパスウェイを介した肢芽前方のパターニングへの関与が示唆された。

Li Danyi らの報告により、*Irx3* 遺伝子は肢芽前方領域における前駆細胞のコミットメントに関

与することが知られていたことから、上記のスクリーニングシステム系を評価すべく、我々は *Irx3* 遺伝子の gain-of-function マウスモデルを作出した。得られた *Prrx1-Irx3* マウスにおいて、自脚において複雑な表現型を呈し、*Irx3* 遺伝子の自脚のパターニングへの関与が示唆された。また、これらの表現型は部分的にではあるが、*HOXA/D13* に変異を持つ家系や *Hoxd13-KO* マウス、*Prrx1-Hand2*；*Gli3* conditional double KO マウス等、前後軸方向のパターニングを制御する遺伝子に異常を持つ個体に類似の表現型を認め、*Prrx1-Irx3* マウスの表現型も前後軸方向のパターニング異常を示唆するものと考えられた。

以上から、既存のデータベースに基づいた段階的なスクリーニングシステムが、前後軸の肢芽パターニングに関わる転写関連因子候補の同定に貢献し得ることが示された。

＜結論＞

既存のデータベースより肢芽の形態形成パターニングに関わる転写関連因子候補を抽出するスクリーニングシステムを構築した。*Irx3* 遺伝子の gain-of-function マウスモデルの表現型解析から、本システムの有効性を示した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5368　号 | 古川　聡一 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　井関　祥子<br>副　査　秋田　恵一、関矢　一郎 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

肢芽形成は、形態形成の分子メカニズムを研究する上で汎用される優れたモデルシステムであるが、未だ正確な形成機序は解明しきれていない。本論文では、申請者所属分野で開発された EMBRYS（**E**mbryonic gene expression **D**atabase as a **B**iomedical **Re**search **S**ource）を用いて、四肢の前方領域の形成制御への関与が考えられる遺伝子を抽出し、さらに当該遺伝子の改変マウスの作出により当該遺伝子の肢芽の前後軸形成への関与を示す表現型を得たことから、EMBRYS が形態形成メカニズムの研究において有用なデータベースであることを示した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

肢芽発生は、軸形成、パターニングなどが観察しやすく、形態形成のモデルシステムとして精力的に研究されてきたが、形態形成の過程は非常に複雑であり、未だ解明されていないプロセスが多数存在する。このような背景のもと、申請者は所属分野において開発された EMBRYS を用いてマウス肢芽発生における前方領域の形成を制御する分子の同定を試みた。本データベースより候補遺伝子を抽出し、肢芽の前後軸形成に関与する遺伝子が欠失した変異マウスでのこれら候補遺伝子の発現パターンを検討し、最終候補遺伝子を抽出した。さらに、この最終候補遺伝子の gain-of-function マウスを *Tol2* トランスポゾンシステムによって作出したところ、表現型は当該遺伝子の肢芽の前方領域の形成への強い関与を示した。これらの結果は、EMBRYOS が形態形成研究に有用であることを示した。よって、本研究は未だ解明しきれない形態形成の分子メカニズム研究に対する新たなアプローチを示したと考えられ、評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られたストラテジーは、多因子疾患が多くの原因を占めると考えられている先天異常症例の発症メカニズムの解明や、これらの疾患に対する予防や治療、および組織再生などへの基盤情報を与えると考えられる。

３）研究方法・倫理観

EMBRYS データベースに基づき抽出した 691 個の関連候補遺伝子から、時空間的な発現パターンに応じて肢芽の前方領域の形成を制御する転写関連因子候補を分類、最終候補遺伝子を抽出し

ている。さらに、遺伝子改変マウス作出にあたっては、近年開発された効率良い技術が使用されている。研究のストラテジーが適切であるとともに、手法についても、申請者の十分な解剖学的および分子生物学的知識に基づいて遂行されている。

4）考察・今後の発展性

今後、本データベースを用いて、さまざまな形態形成プロセスに関与する、未だ同定されていない分子メカニズムが明らかとなる可能性があり、先天異常を含めた形態形成研究の発展に寄与することが期待される。

**３．その他**

なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 佐藤　哲也 |
| 論文審査担当者 | 主査　関矢　一郎<br>副査　星　治、柳下　和慶 |
| 論　文　題　目 | Intramuscular Tendon of the Adductor Pollicis and Underlying Capsule of the Metacarpophalangeal Joint: An Anatomical Study with Possible Implications for the Stener Lesion |

（論文内容の要旨）

<要約>

目的：母指中手指節関節（以下 MP 関節）の靭帯損傷には，Stener 病変と呼ばれる自然修復不能な病態が存在する．Stener 病変を理解するため，MP 関節安定化機構である内転筋，尺側側副靭帯（以下 UCL），関節包の構造を解剖学的に解析した．

方法：屍体母指 37 指を用いて，内転筋の筋内腱，筋内腱の骨停止部，側副靭帯・関節包の付着部を同定した．3 母指は組織標本とし，別 3 母指にマイクロ CT を施行後，化学処理で軟部を除去し、骨形態の観察を行った．

結果：母指内転筋には遠位部，掌側部，背側部の連続する 3 部位により構成される筋内腱が存在していた．各筋内腱が骨停止部に向かって連結し，連結部の断面ではラムダ形を呈していた．筋内腱背側部は尺側種子骨背側の関節包に結合して停止していた．掌側部は尺側種子骨に、遠位部は基節骨外側結節に停止していた．関節包の中で厚みをもつ線維束状構造をなす部位は，基節骨外側結節の近位にあり、それとは区別される面に付着していた．

結論：Stener 病変には内転筋筋内腱の背側部が関与し，内転筋腱と関節包の解剖学的層関係に起因する可能性がある．背側部は全例で存在し，種子骨背側で関節包に直接結合している．母指 MP 関節に外傷性の外転作用が加わる際，内転筋腱は防御的に収縮し，筋内腱と結合する関節包を介し、UCL が近位方向へと引き出される機序が推定される．

<緒言>

母指 MP 関節の UCL 断裂は，手外科分野の靭帯損傷で頻度が高い疾患である．UCL 断裂の治癒不良例では，母指には疼痛，不安定性，筋力低下が生じる．1962 年の Stener による報告では，UCL 断裂は主に遠位付着部で生じ，断裂した靭帯とその基節骨停止部の間に内転筋腱膜が介在するため靭帯の自然修復が困難となる．この病態は Stener 病変と命名され，多くの外科医により Stener 病変は手術治療が必須と考えられている．

実験的研究では Stener 病変を再現するために，内転筋を牽引して、内転筋腱膜に緊張をかけておく必要があると指摘している．また，徒手ストレス操作による外転では Stener 病変が実験的に再現できないことが示されている。これらの研究は，Stener 病変の発症機序には，UCL と

内転筋の両構造の関連性が何かしら関与していることを示唆している．しかしながら、過去の解剖研究では，UCL 単独の位置や長さに関してや，内転筋停止部に偏っていた．内転筋の筋内腱構造や UCL との層関係，それらの最深層である関節包について解析した解剖学的研究は未だない．本研究の解剖学的知見が、Stener 病変の発生機序を解明する手掛かりになると考える．

本研究の目的は，内転筋の筋内腱，UCL，関節包の層関係を肉眼解剖，組織学的，骨形態学手法を用いて解析することである．

＜方法＞

本研究には 31 屍体 44 母指を使用した．標本は 8%ホルマリンで固定し，30%エタノールで保存した．1 母指は重度変形のために除外した．37 母指は肉眼解剖に使用，別 3 母指は組織学的解析に使用，さらに別 3 母指は骨形態の観察を行った．

標本は母指 CM 関節より遠位部分で本体から切り出した．内転筋の外観を観察後，長母指屈筋と腱鞘を切除した．内転筋は筋線維を除去し，筋内腱を明らかにした．筋内腱の配列を理解するため，筋内腱の骨停止部よりわずか近位側で筋内腱を切離した．筋内腱の骨停止部を明らかにするため，筋の下層にある関節包を温存しながら、筋内腱を近位から遠位方向へと剥離した．関節包の付着部を明らかにするため，関節包は長母指伸筋の尺側で切開し，背側から掌側方向にむかって骨から剥離した．29 母指では内転筋の基節骨停止部と関節包付着部の広がりを計測した．

3 母指を用いて組織標本を作製した．ダイアモンドソーを用い，尺側種子骨と基節骨外側結節を結ぶ面と内転筋腱膜と内転筋を結ぶ面の間で，MP 関節尺側部分のブロックを作成し、脱灰・薄切後にマッソントリクローム染色した．

別の 3 母指を用いて、未解剖の状態でマイクロ CT を用いた 3D 画像を作成した．メスを使用した軟部剥離操作による骨表面への影響を除外するため，0.8%水酸化ナトリウム溶液を用い，先に CT で用いた 3 母指の軟部組織を化学的に除去し，骨形態を解析した．

＜結果＞

<u>内転筋の筋内腱構造とその停止部</u>

内転筋は外観から横頭と斜頭に区別可能であった．内転筋の筋成分を除去すると，連続する 3 部位からなる筋内腱が存在し，それぞれ、遠位部，背側部，掌側部と命名した．筋内腱の断面は 3 部位が連続し，折り畳まれた構造で，ラムダ形を呈していた．筋内腱の背側部は内転筋腱膜と連続し，さらに尺側種子骨背側の関節包に結合する様に停止していた．筋内腱の掌側部は尺側種子骨に、遠位部は基節骨外側結節に停止していた．

<u>関節包付着部と内転筋停止部との関係性</u>

関節包の中手骨・基節骨への付着を示すため，関節包を背側より掌側にむかって骨から剥離した．中手骨背側結節の掌側から、中手骨頭掌側軟骨境界までの領域に，関節包は幅広く付着していた．幅がひろく付着している部分の関節包は厚い，線維束状の構造を呈していた．厚みのある関節包の遠位部は，基節骨外側結節の近位にある、それとは区別される面に付着していた．また，この二つの付着部以外の領域では関節包が骨膜と連続し，関節包のみの付着幅は不明瞭であった．関

節包肥厚部の骨付着幅は，基節骨側では背側 3.4 ㎜～掌側 3.5 ㎜であり，中手骨側では最大幅が 8.2 ㎜であった．

内転筋停止部の組織学的解析

内転筋筋内腱と関節包の層関係を理解するため，内転筋の基節骨停止部と尺側種子骨含む組織切片を作成した．基節骨外側結節と尺側種子骨を含む組織切片では，内転筋筋内腱と UCL を含む関節包とが隣接するものの、各々、境界をもち、基節骨外側結節に別々の停止部・付着部を呈していた．一方、尺側種子骨の背側における組織切片では、内転筋筋内腱が関節包に結合しているのを確認できた．

内転筋停止部と関節包付着部の骨形態

メスによる線維軟骨の剥離操作で生じる骨形態への影響を減じるため，解剖の前にマイクロ CT を撮像し，その後，化学処理にて軟部を骨から除去した．基節骨近位部尺側には外側結節とよばれる隆起があり，この隆起の近位側には別の面を同定することができた．中手骨頚部尺側では背側結節の掌側に明らかな陥凹を認めた．これらの所見はマイクロ CT，化学処理骨のどちらの手法でも観察可能であった．

＜考察＞

Gerber は母指内転筋の骨停止部に着目し，横頭は基節骨に，斜頭は尺側種子骨に停止する事を報告した．Mochizuki らの肩関節における解剖研究では，腱板の筋成分を除去し筋内腱を観察することにより，棘上筋腱は従来認識されてきたより狭い領域で大結節に停止し，棘下筋腱が大結節の大部分に停止することが明らかになった．本研究においても同様の手法を用いて，母指内転筋腱における 3 つの筋内腱を同定した．従来の内転筋横頭は遠位部と，斜頭は掌側部と一致すると考えられる．

さらに，本研究では筋内腱の背側部を第三の腱として新たに同定できた．1858 年，Henle は母指中手骨から起始し内転筋腱膜へと停止する筋体を母指掌側骨間筋として初めて発表した．その後の研究で，内転筋の背橈側部が母指掌側骨間筋であると認識されているが，この筋束の出現頻度は報告毎に異なる．母指掌側骨間筋は背側部に一致すると考えられ，筋内腱では常に存在する．また，背側部は内転筋腱膜に停止するのみでなく，関節包へ結合していた．

過去の研究は UCL 単体の解剖学的位置や大きさに焦点が絞られてきた．Bean や Carlson らは，UCL の基節骨付着部中心は関節面から約 3 ㎜離れていると報告している．彼らの研究では，関節の最も深層に存在するはずの関節包はただの薄い中間膜として無視されている．一方，UCL と関節包の層関係がいまだに明確になっていない．肩、肘関節ではあるが、過去の解剖学的研究では，関節包は薄い均一な膜状構造が線状に付着しているというよりは，骨に対して明瞭な幅のある付着部をもち，部位により実質の厚みや付着幅が変化する構造であり、そのことが、疾患固有の病態や関節支持性に関与している可能性が示されている．母指 UCL 構造を膝内側側副靭帯と同様に関節包靭帯と想定している報告もある．本研究では，内転筋より下層の構造を、靭帯という固有の構造ではなく、連続する関節包という膜状構造の一部として包括的に捉えて解剖学的に解析

した．膜状に連続する関節包の内で，一般に UCL 固有部に相当する部位は，中手骨尺側の陥凹部から基節骨外側結節の面までに局在し，厚みのある線維束として存在していた．

臨床関連項目として，母指 MP 関節 UCL 断裂の病態に関わるいくつかの問題解明に役立てる可能性がある．Stener 病変の病態を仮定してみると，MP 関節に過外転作用が生じたとき，UCL を含む関節包が基節骨付着で断裂すると同時に，内転筋には防御性の収縮が生じ，関節包と結合する内転筋の収縮作用で靭帯断端は近位方向へと引き出される機序が想定される．次に、基節骨近位尺側部の剥離骨折に関して，UCL 付着部で骨折が生じると認識されているが，中に 2 つの骨折片が含まれる症例が存在する．基節骨近傍の大きな骨片には UCL が付着しておらず，もう一つの小さな，転位骨片が UCL 付着部と一致し，これを Two fleck sign と命名、報告されている．Thirkannad らは前者の大きな骨片が内転筋停止部の剥離から生じたと報告している．我々はこの意見に賛同し、内転筋筋内腱の遠位部と UCL を含む関節包とは，基節骨外側結節で近接しているが個別の面に停止，または付着していることにより生じているのではないかと理解できる．

本研究の限界は，健常母指標本に対し純粋な解剖学的手法のみを用いているため，Stener 病変の病態に対する仮説はあくまで推論である．これらの仮説を証明するためには、さらなる生体工学的研究や，臨床例における画像解析研究が必要となる．しかし，我々はこの解剖学研究結果が実際の臨床例における治療や手術成績の向上につながることを期待している．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5369　号 | 佐藤　哲也 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　関矢　一郎<br>副　査　星　治、柳下　和慶 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

屍体母指 37 指を用いて，内転筋の筋内腱，筋内腱の骨停止部，側副靭帯・関節包の付着部を同定した。母指内転筋には遠位部，掌側部，背側部の連続する 3 部位により構成される筋内腱が存在していた。各筋内腱が骨停止部に向かって連結し，連結部の断面ではラムダ形を呈していた。筋内腱背側部は尺側種子骨背側の関節包に結合して停止していた．掌側部は尺側種子骨に、遠位部は基節骨外側結節に停止していた．関節包の中で厚みをもつ線維束状構造をなす部位は，基節骨外側結節の近位にあり、それとは区別される面に付着していた.

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

母指中手指節関節（MP関節）の靭帯損傷には，Stener病変と呼ばれる自然修復不能な病態が存在する。申請者はStener病変を理解するため, MP関節安定化機構である内転筋, 尺側側副靭帯（UCL），関節包の構造を解剖学的に解析した。その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

Stener 病変は、母指 MP 関節に外傷性の外転作用が加わる際，内転筋腱は防御的に収縮し，筋内腱と結合する関節包を介し、UCL が近位方向へと引き出されることで発症することが本研究から推定された。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には肉眼解剖、組織学、CT 解析が用いられた。本手法は十分な解剖学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果について、骨片を 2 つ有する難治性剥離骨折の機序を考察している。これは臨床所見と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

申請者は指にとどまらず、肩等の他の関節における筋内腱の知識が豊富にある。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小柳津　卓哉 |
| 論文審査担当者 | 主査　淺原　弘嗣<br>副査　畑　裕、神野　哲也 |
| 論　文　題　目 | Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

【目的】

当院ではスポーツによる軟部組織外傷に対して高気圧酸素治療(HBO)を行い復帰期間の短縮に一定の成果を上げている。しかしながら、基礎研究においてシミュレーションとなりうる圧挫損傷モデルを用いた研究は少ない。本研究ではラット骨格筋圧挫損傷モデルを用いて、骨格筋圧挫損傷に対する HBO の有効性を検討した。急性期反応として、①損傷筋における HBO の酸素化能を確認した。損傷後の変化として、②損傷肢体積・筋湿重量・細胞外間質面積・血管透過性・再生筋線維数を測定した。また、骨格筋機能の回復指標として、③筋張力を測定した。再生過程に与える影響として、④血中炎症細胞動態および損傷筋内マクロファージ・筋衛星細胞を組織学的に定量し、⑤損傷筋内の IL-6・STAT3 を定量した。

【方法】

骨格筋圧挫損傷モデルには Drop mass 法を用いた。ラット後肢腓腹部中央に直径 1 ㎝のインパクターを設置し 640g の重錘を高さ 25cm から落下させ下腿筋を損傷した。対照群と HBO 群（酸素加圧、加減圧時間 15 分(0.1 気圧/分)、2.5 絶対気圧･120 分間維持、損傷当日から 1 日 1 回施行最大 5 回まで）に分けた。

①筋内酸素濃度測定：損傷前・損傷 30 分・3 時間・6 時間・24 時間・30 時間後において針型酸素プローブを下腿筋に刺入し酸素濃度を測定した。(n=5)

②-1)損傷肢体積測定：損傷 6 時間・24 時間・3 日・5 日・7 日後において動物用 μCT システムを用いて損傷肢の CT 像を撮影し、3D 再構成ソフトを用いて体積を測定した。(n=13-20)

②-2)損傷筋湿重量測定：損傷 6 時間・24 時間・3 日・5 日・7 日後において下腿筋を採取し電子天秤にて測定した。(n=8)

②-3）細胞外間質評価：損傷 24 時間後に下腿筋 H.E.染色標本を作製し、損傷部の組織内間質腔面積を定量し割合を比較した。(n=5)

②-4）血管透過性評価：タンパク結合色素 Evans blue を損傷 22 時間後に静注し、損傷 24 時間後に下腿筋を採取、抽出液の吸光度を吸光光度計(620nm)にて測定した。(n=10)

②-5)再生筋線維評価：下腿筋 H.E.染色標本を作製し、損傷 5 日・7 日後において線維中央に核を持つ再生筋線維数を定量した。（n=5）
③筋張力測定：損傷 5 日・7 日後において、アキレス腱を切離し、断端とトランスデュ-サーを接続したのち、脛骨神経を刺激して下腿筋の最大筋張力を単収縮（twitch）、強収縮（tetanus）ともに測定し、同一個体の患健比を検討した。(n=6)
④-1）血中炎症性細胞測定：損傷前・損傷 3 時間・6 時間・24 時間・2 日・3 日後において動脈血を採取し、CD11b 陽性細胞と CD68 陽性細胞の割合を flow cytometry で測定した。(n=5)
④-2）損傷部マクロファージ評価：抗 CD68 抗体・抗 CD163 抗体・抗 CD206 抗体にて免疫染色を行い、損傷 24 時間・3 日・5 日・7 日後において定量した。(n=5)
④-3）筋衛星細胞評価：凍結切片を抗 Pax7 抗体・抗 MyoD 抗体・抗 Ki67 抗体を用いて免疫染色を行った。損傷 24 時間・3 日・5 日・7 日後における $Pax7^{+}/MyoD^{-}$、$Pax7^{+}/MyoD^{+}$、$Pax7^{-}/MyoD^{+}$、$Pax7^{+}/Ki67^{+}$細胞数を顕微鏡下に定量した。(n=5)
⑤ サイトカイン測定：損傷下腿筋を採取し、ELISA 法にて IL-6・STAT3 を損傷前、損傷 3 時間・6 時間・24 時間後において定量した。(n=6-8)

【結果】
①筋内酸素濃度測定：損傷に伴い筋内 $pO_2$は約 1/3 程度に低下した。対照群では 30 時間かけて緩徐に損傷前酸素濃度に回復したが、HBO 群では HBO1 回施行後から有意に改善し、経時的にも維持された。HBO は筋損傷後の低酸素環境を酸素化した。
②-1)損傷肢体積測定：下肢体積は、損傷前・損傷 6 時間後においても 2 群間に有意差は認められなかった。損傷 6 時間・24 時間・3 日後では対照群よりも HBO 群で有意に低下した。損傷 5 日・7 日後では 2 群間に有意差は認められなかった。HBO は圧挫損傷後の腫脹を軽減した。
②-2)損傷筋湿重量測定：筋湿重量は損傷前・損傷 6 時間後においては対照群、HBO 群で有意差はなかった。損傷 24 時間・3 日後では対照群よりも HBO 群で有意に低下していた。損傷後 5 日・7 日では 2 群間に有意差は認められなかった。HBO は損傷後の筋重量の増加を軽減した。
②-3）細胞外間質評価：筋損傷部における細胞外間質面積は、対照群と比して HBO 群で有意に減少していた。HBO は損傷骨格筋の浮腫を軽減した。
②-4）血管透過性評価：損傷 24 時間後における色素吸光度は対照群・HBO 群で非損傷群と比して有意に増加していた。HBO 群の吸光度は対照群より有意に低かった。HBO は血管透過性の亢進を改善した。
②-5)再生筋線維評価：再生筋線維数は HBO 群で損傷 5 日後において有意に増加していたが、損傷 7 日後において有意差は認められなかった。HBO は損傷 5 日後の再生筋線維数を増加させた。
③筋張力測定：最大筋張力の患健比は損傷 7 日後において HBO 群で Twitch、Tetanus とも有意に改善していた。HBO は損傷 7 日後の筋張力を改善した。
④-1）血中炎症性細胞測定：血中 CD11b 陽性細胞は損傷 6 時間・24 時間後で HBO 群が有意に低く、血中 CD68 陽性細胞は損傷 24 時間後では対照群が有意に低かった。HBO は血中炎症性細胞の増加を抑制し、CD68 陽性細胞の変動を早期化した。
④-2）損傷部マクロファージ評価：CD68 陽性細胞数は損傷 1 日、3 日後では HBO 群で、損傷 5

日、7日後では対照群で有意に多く、HBO群の陽性細胞数のピークは対照群より2日早かった。CD163陽性細胞数は損傷7日後にHBO群で有意に増加していた。CD206陽性細胞数は損傷3日・5日後にHBO群で有意に増加していた。HBOはマクロファージの浸潤を促進した。
④-3)筋衛星細胞評価：$Pax7^{+}/MyoD^{-}$細胞数は損傷3日・5日後にHBO群で有意に増加していた。$Pax7^{+}/MyoD^{+}$細胞数は損傷1日・3日後にHBO群で有意に増加していた。$Pax7^{-}/MyoD^{+}$細胞数は損傷3日・5日後にHBO群で有意に増加していた。また、HBOは筋衛星細胞数を増加させた。$Pax7^{+}/Ki67^{+}$細胞数は損傷1日・3日後にHBO群で有意に増加していた。
⑤サイトカイン：損傷筋内のIL-6は損傷3時間後でHBO群が有意に高く、損傷6時間後でNT群が有意に高かった。total STAT3は損傷3時間・6時間後でHBO群が有意に低く、phosphorylated/total STAT3比は損傷3時間後でHBO群が有意に高かった。HBOは損傷筋内IL-6を増加させ、STAT3を活性化した。

【考察】

骨格筋圧挫損傷後の急性期炎症においては、炎症細胞が誘導されるとともに血管透過性が亢進する。損傷組織は細胞外液が増加し、腫脹と組織圧上昇・末梢循環障害をきたし、低酸素状態となり、二次的な損傷をきたす。本実験においてHBOは損傷後低酸素状態となった骨格筋を酸素化し、血中炎症性細胞を減少させ、血管透過性を改善し、細胞外間質腔を減少させた。HBOは低酸素に伴う二次的な筋損傷を減少させる可能性が示唆された。

骨格筋損傷後の筋再生過程において、筋衛星細胞は炎症によって休止期から活性化し、自己増殖したのちに分化し、筋管構造を形成し癒合し、再生筋線維へと分化する。一部の細胞は再び休止期となり、損傷へ備えることとなる。筋衛星細胞は、休止期・増殖期・分化期において、それぞれ$Pax7^{+}/MyoD^{-}$・$Pax7^{+}/MyoD^{+}$・$Pax7^{-}/MyoD^{+}$となる。本実験において、HBOは損傷後早期には増殖期の筋衛星細胞を、その後は休止期・分化期の細胞を増加させた。HBOは損傷後における筋衛星細胞の反応を促進した。

一方、損傷骨格筋の再生においては、炎症性細胞の関与も指摘されている。骨格筋損傷に伴い単球は血中から損傷部へと浸潤し、組織内でマクロファージへと分化する。損傷骨格筋内マクロファージは、炎症初期は炎症性M1マクロファージであり、筋衛星細胞の自己増殖を刺激することで筋再生過程を促進する。経時的にM1から抗炎症M2マクロファージへと形質転換し、増殖した筋衛星細胞の分化を促進する。M2マクロファージのうちCD206陽性細胞は特に組織修復を促進することが知られている。本実験においてHBOは損傷筋内のCD68陽性M1マクロファージの浸潤ピークを早め、早期からCD206陽性、その後CD163陽性M2マクロファージを増加させた。HBOは損傷後の炎症反応をpeak outし、筋再生を促したと考えられた。

IL-6は骨格筋から分泌されるサイトカインであり、STAT3をリン酸化して核内へ移行させ、抗炎症サイトカインIL-10や筋再生遺伝子MyoD・Myogeninを誘導する。本実験ではHBOによりIL-6の上昇とともに細胞質内のSTAT3が減少し、STAT3のリン酸化比率が上昇しており、HBOはIL-6/STAT3系を介して作用すると考えられた。

HBOは骨格筋圧挫損傷に対して、急性期反応の軽減と骨格筋再生の促進作用を持つことが明らかとなった。HBOは治療としてすでに汎用され、その安全性も確立されており、本実験の結

果は骨格筋圧挫損傷に対する HBO の臨床的適応の根拠となると考えられた。

【結語】

ラット骨格筋圧挫損傷モデルにおいて、高気圧高酸素環境は急性期の腫脹を軽減し、IL-6/STAT3 系、マクロファージおよび筋衛星細胞を活性化することで筋再生を促進することが明らかとなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5370　号 | 小柳津　卓哉 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　淺原　弘嗣<br>副　査　畑　裕、神野　哲也 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、高気圧酸素治療(HBO)による軟部組織外傷の治癒促進を目指し、ラット骨格筋圧挫損傷モデルを用いて HBO の治療効果検証と機序解明を試みたものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

筋挫傷治療には高気圧酸素治療が有効である可能性が示唆されているが、その根拠となる実験データは乏しい。本研究では、科学的なアプローチを通して、この効果の検討とメカニズムの解明を試みるもので、先駆性、独創性ともに十分に高い。

２）社会的意義

本研究は、スポーツ外傷の治療にあたる申請者の診療活動に動機づけられた研究であり、有効な治療法の開発に根拠を獲得する目的で行われており、社会的意義は高い。

３）研究方法・倫理観

高気圧酸素治療(HBO)による軟部組織外傷の治癒促進効果を検討するうえで、スポーツなどに伴う筋挫傷の適切な動物モデルがなく、十分な研究がなされていなかったが、申請者は、ラットの筋肉に錘を落下させる実験モデルを作製し、高気圧酸素治療の効果の判定を行い、結果、高気圧酸素治療の有効性を支持する結果を得た他、そのメカニズムとして、IL6-STAT3 系を介した効果を示唆しており、研究方法として適切なものであり、動物実験を中心に倫理的にも配慮されたうえで行われている。

４）考察・今後の発展性

整形外科医として HBO に携わる中で課題を抽出し、科学的手法で一定の成果を得た。今後の HBO 適応拡大にもつながりうる基礎的研究であるともいえ、将来的な期待も大きい。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小日向　浩行 |
| 論文審査担当者 | 主査　田邊　勉<br>副査　横田　隆徳、杉原　泉 |
| 論　文　題　目 | Disrupted offset analgesia distinguishes patients with chronic pain from healthy controls |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ヒトに熱痛み刺激を与える際、目標温度(T1)から１℃だけ上昇(T2)させて 5 秒間維持し、元の T1 に戻すと痛み感覚の大幅な軽減を認める。これは内因性鎮痛機構の一つでありオフセット鎮痛（Offset analgesia : OA）と呼ばれる。また、OA は慢性疼痛患者において減弱すると言われている。今回、我々は T2 時間の長短が OA の大きさ（ΔOA）に与える影響を健康被験者と慢性疼痛患者において調査した。

健康被験者においてより長い T２時間がその後のより大きな OA をもたらすことが分かった。慢性疼痛患者においても同様の傾向は認められ、短い T２時間では慢性疼痛患者のΔOA が有意に小さかったが、長い T２時間では両群間で有意な差は認めなかった。また、一定の熱痛み刺激を与えた場合、慢性疼痛患者では最大の痛み感覚を知覚するまでの時間が健康被験者より長いことが分かったが、慢性疼痛患者ではその時間の長さとΔOA には負の相関があることを示した。それらの要素を加味した OA index により、慢性疼痛患者と健康被験者を判別できることを示した。

これらの結果より、慢性疼痛患者におけるオフセット鎮痛の減弱は熱痛み刺激の知覚の遅延によってもたらされ、さらには下行性疼痛抑制系の機能低下と関連している可能性が示唆される。

＜緒言＞

オフセット鎮痛（OA）は、熱痛刺激の短時間で一時的な増加後に疼痛感覚の大きな減少が起こる現象であり、2002 年に Grill and Coghill によって最初に報告された。 OA のメカニズムは判明していないが、疼痛感覚の時間的鋭敏化とそれに伴う下行性疼痛抑制系によって媒介されると考えられており内因性鎮痛機構の１つとされている。

OA は、健康被験者と比較して、神経因性疼痛を有する患者において消失または減少すると報告されているが、慢性的な疼痛状態により下行性疼痛抑制系が減弱することが原因である可能性がある。そのような病理学的特徴は、線維筋痛症および慢性腰痛症のような他の慢性疼痛疾患においても潜在的に共有される可能性がある。

一方、慢性疼痛患者における OA の減少は、疼痛感覚の時間的鋭敏化機構が病態生理学的に変化することによるものかもしれない。慢性疼痛患者は、有害刺激の変化を検出する際に鈍化が見

られる可能性がある。したがって、内因性鎮痛機構を起動するためには疼痛を知覚する時間がより長く必要となる。

本研究では、最初に OA に対する年齢、性別、および様々な長さの疼痛知覚時間の影響を確認するために、多くの健常ボランティアにおける OA 反応を調べた。次に、慢性疼痛患者および年齢・性別が一致した健康被験者における OA 反応を疼痛知覚の持続時間を変えて測定し、OA の程度が慢性疼痛患者の疼痛知覚の持続時間に依存するという仮説を検証した。我々はまた、OA の大きさを含むいくつかの項目が慢性疼痛の診断能力を有するかを調べた。

＜方法＞

21-65 歳の健康被験者 40 人（年齢、性別を慢性疼痛患者とマッチさせた 12 人を含む）と慢性疼痛患者 12 人に対し、左前腕腹側にペルチェ式熱刺激装置（PATHWAY）を用いて熱痛み刺激を与えた。開始温度 32℃、T1(10 秒):45℃、T2(5 秒):46℃とし、T3(20 秒):45°C 刺激した後、開始温度に戻すというパラダイム（OA paradigm）を行いながら、デジタル VAS 測定装置（CoVAS）を用いて痛み感覚を VAS(0-100mm)にて持続的に測定した。T2 時間を 5 秒から 10 または 15 秒に変化させたパラダイムをさらに用いた。また開始温度から 45℃の一定の痛み刺激を 35 秒間与え開始温度に戻すというパラダイム（CS paradigm）を行った。それらの刺激は各 2 回乱雑な順序で繰り返し行った。

OA paradigm において、T2 中の VAS 最高値と T3 の最初の 10 秒以内の VAS 最低値との差を OA の大きさ(ΔOA)と定義した。また CS paradigm において、VAS が最高点に達するまでの時間（maximumVAS latency）とその VAS 値(maximumVAS)を測定した。

OA index はΔOA/maximumVAS latency と定義し ROC 曲線を作成し、カットオフ値を決定し、慢性疼痛患者と健康被験者の判定能を検証した。統計分析には SPSS を用い、3 つの異なる T2 によるΔOA の統計学的有意差を調べるために、一元分散分析（ANOVA）を使用した。患者と健康被験者の比較には t 検定を用い、有意差の閾値は $p < 0.05$ とした。

温度が 32℃からゆっくりと上昇する間に、被験者が初めて痛みと感じた時（pain thresholds）と VAS60（pain-60）と感じた時にボタンを押すことによってその温度を各個人で測定した。すべての実験の前に、被験者は、痛みの感覚的および感情的な側面ならびに一般的な気分に関する複数のアンケートに答えた。疼痛に対する負の感情は Pain Catastrophizing Scale（PCS）によって評価した。日常生活での痛みの症状の評価には、Short-Form McGill Pain Questionnaire（SF-MPQ）日本語版を使用した。痛みの神経障害性成分は painDETECT、痛みに伴う抑うつ状態のレベルは Beck Depression Inventory-II（BDI-II）によって評価した。

＜結果＞

健康被験者において、年齢、性別によるΔOA の差は認めなかった。T 2 時間の影響に関しては、T2＝5 秒と比較して T2＝10、15 秒ではより大きなΔOA をもたらした（T2 = 5 s, 55.9 ± 26.1; 10 s, 66.1±26.8; 15 s, 65.8±26.3; P = 0.04）。

一方、慢性疼痛患者と健康被験者との比較では、患者は、T2 = 5 秒（35.3 ± 24.9 vs. 61.8 ± 21.7; P < 0.001）および 10 秒（52.8 ± 31.5 vs. 70.5 ± 22.6; P = 0.03）では健康被験者よりも ΔOA が有意

に小さかったが、15 秒では有意な差は認められなかった（62.5 ± 31.9 vs. 72.3 ± 19.8; P = 0.21）。T2 における最大 VAS は、異なる T2 間および患者と健康被験者との間で異ならなかった。 T3 における最小 VAS は、患者においては T2 = 15 秒で有意に小さく、OA の反応を強く反映するものであった。

一方、CS paradigm では、患者は健康被験者よりも maximumVAS latency が有意に長かった（16.4 ± 7.1 vs 11.5 ± 3.1; P = 0.004）。maximumVAS は、患者と健康被験者との間で違いはなかった（63.9 ± 22.5 vs. 59.3 ± 18.0; P = 0.43）。

患者のΔOA は T2 時間による変化が健康被験者よりも大きく、その変化を T2＝5 秒と 15 秒のΔOA の差（ΔOA15-ΔOA5）と定義し、他のパラメータとの相関を調べた。その結果、maximumVAS latency との正の相関を認めた（$R^2$ = 0.20, P = 0.028）。また、慢性疼痛罹患期間とΔOA との間に負の相関を認めたが（T2=5 s; $R^2$=0.26, T2=10 s; $R^2$=0.46, T2=15 s; $R^2$=0.32）、疼痛の強さとの相関はなかった。その他パラメータである pain threshold、pain-60、PCS、SF-MPQ、painDETECT および BDI-II スコアとのいかなる相関も認めなかった。

患者の OA index は健康被験者と比較して有意に高く、T2 = 5 秒での OA index は、患者と健康被験者との診断能力に優れていた。カットオフポイントを 3.83 に定めると、感度が 87.5%および特異度が 75%であった。ROC 曲線の AUC は 0.897±0.043（95%CI：0.812-0.981; P <0.001）であった。

＜考察＞

我々は、慢性疼痛患者と健常被験者の両方において、10 秒または 15 秒とより長い T2 時間が OA の大きさを増強することを初めて示した。特に慢性疼痛患者では、T2 が 15 秒では健常被験者と同程度の明らかな OA 反応を示した。

OA は痛み刺激の軽減という点では adaptation や habituation などと同様の結果であるが、全く異なる特徴的な現象であり、conditioning pain modulation (CPM)と同様に内因性鎮痛機能の一つと考えられている。ただし、CPM が空間的鎮痛機構であるのに対し、OA は時間的鎮痛機構とされている。

OA の詳細な神経生理学的機構は解明されていない。近年の脳イメージングの研究によると中脳水道周囲灰白質、吻側延髄腹側部や青斑核などの中枢神経系や脳幹における OA 関連の活性化が指摘されている。一方で末梢神経のメカニズムも指摘されている。健康被験者において OA が前腕では観察されるが手掌では観察されなかったため、末梢性の因子が指摘された。さらに中枢神経作動薬が OA の反応に影響を与えなかったことから OA が中枢でのメカニズムだけでは説明ができないとされている。

より長い T2 時間が OA の反応を増強するという結果は、maximumVAS latency が 11.5 秒であったことからも十分な OA の反応には T2 が 10 秒よりも長い時間必要である可能性が示唆される。

今回、健康被験者において年齢や性別による OA の反応への影響は認められなかったが、過去の研究では加齢により OA の反応が減少するや女性より男性の方が OA の反応が大きいという脳と矛盾するものであった。高齢者の数が比較的少なかったことが影響している可能性がある。

慢性疼痛患者においては T2 時間が 15 秒で健康被験者と同等の OA が見られたが、maximumVAS latency が 16.4 秒であることからもわかるように、健康被験者よりも熱痛み刺激の知覚に時間を要することから今回の結果を説明することができる。

慢性疼痛患者では、罹患期間がΔOA と負の相関があることを初めて示した。長期にわたる疼痛が内因性疼痛機構を時間依存的に抑制することを示唆している可能性がある。すなわち、疼痛の慢性化は、下行性疼痛抑制系の機能不全と何らかの因果関係を有する可能性がある。慢性腰痛患者では、罹患期間と別のタイプの内因性鎮痛機構である CPM との間に同様の関係が以前の報告で指摘されている。OA または CPM で測定した内因性鎮痛機構の程度は、潜在的に疼痛の慢性化に関連するバイオマーカーとなりえる。

OA index は慢性疼痛について診断能力が高いことを示した。それは、以前の報告で指摘されているΔeVAS よりも優れている。慢性疼痛患者における痛み刺激の知覚の遅延を示す maximumVAS latency が診断能力を高めることに役立った可能性がある。

今回の研究には２つの制限がある。第１に今回の研究ではサンプルサイズが比較的小さかったために、慢性疼痛の原因となる疾患による違いや薬物の影響を考慮しなかった。
第２に OA の反応と心理学的変数との多変量解析を行わなかったが、これを行えば、内因性鎮痛機構に対する心理学的影響を明らかにすることが出来た可能性がある。これは疼痛の慢性化に対する感情的、認知的影響を解明することに役立つと考えられる。今後はより多くの患者を対象とすることにより上記の項目を検証する研究を計画したい。

＜結論＞

より長い時間の熱痛み刺激によって OA が増強されることを示した。また、慢性疼痛患者の疼痛感覚の遅延は、疼痛の慢性化のメカニズムの根底にある内因性鎮痛機構の変化の一つの因子であることを示した。 OA index は慢性疼痛の有用な診断マーカーである可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5371　号 | 小日向　浩行 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田邊　勉<br>副　査　横田　隆徳、杉原　泉 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は慢性疼痛患者のオフセット鎮痛には長時間の痛み刺激が必要であることを示したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

ヒトに熱痛み刺激を与える際、目標温度(T1)から１℃だけ上昇(T2)させて 5 秒間維持し、元の T1 に戻すと痛み感覚の大幅な軽減を認める。これは内因性鎮痛機構の一つでありオフセット鎮痛（Offset analgesia : OA）と呼ばれる。また、OA は慢性疼痛患者において減弱すると言われてきた。しかしながら本研究において、慢性疼痛患者においては T2 時間の延長により、健康被験者と同等レベルの OA が得られることが明らかとなった。

２）社会的意義

OA は、健康被験者と比較して、神経因性疼痛を有する患者において消失または減少すると報告され、慢性的な疼痛状態により下行性疼痛抑制系が減弱することが原因である可能性などが示唆されてきた。しかしながら本研究によって、OA は慢性疼痛により減弱するのではなく、OA が誘導されにくくなるだけにすぎないことが明らかとなった。

３）研究方法・倫理観

ヒトを用いた痛み実験という事で、十分な倫理的配慮が取られていた。またそのことが研究成果の解釈を困難にしていることも事実である。

４）考察・今後の発展性

痛み関連研究という事で様々な制約の下、研究を行われなければならず、直接的な結果を得るのは非常に困難であるが、様々な工夫を重ね成果を積み上げているのは素晴らしい。

OA が誘導されにくくなる理由として、慢性疼痛そのものが関与するのか、慢性疼痛患者に投与されている鎮痛薬（COX2 阻害薬やフェンタニル、トラマドール、プレガバリンなど）が関与しているのかに関しては今後の課題である。

**３．その他**　　特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 塩田　幹夫 |
| 論文審査担当者 | 主査　田賀　哲也<br>副査　大川　淳、　淺原　弘嗣 |
| 論　文　題　目 | TNFα promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

滑膜幹細胞はその優れた軟骨分化能から、軟骨および半月板の再生医療において重要な位置づけとなっている。滑膜幹細胞を効率的に増殖させることができれば、適応を拡大し、広範囲の軟骨や半月板損傷に対しての自家移植が可能となる。TNFα は成長や分化をはじめ様々な機能を持つサイトカインである。本研究の目的は TNFα がヒト滑膜幹細胞の増殖能、軟骨分化能に与える影響について検討することである。2 ドナーより採取された滑膜幹細胞を複数の濃度 TNFα 添加条件に割り振り（$2.5 \times 10^{-12}$~$10^{-7}$ g/ml と control）、14 日間培養した。その結果 25 ng/ml の TNFα 添加が最も効率よく滑膜幹細胞増の増殖を亢進し、コロニー数には影響を与えないことが明らかとなった。25 ng/ml の TNFα 添加条件でさらに 6 ドナー分の検証を行い同様の結果を得た。

次に 25 ng/ml の TNFα 添加条件で 14 日間培養した細胞で軟骨分化培養（6 ドナー）と表面抗原発現（3 ドナー）の検討を行った。結果、軟骨分化培地で培養した軟骨ペレット大きさ、重量に有意差は認めず、軟骨分化へ与える影響は認めないと考えられた。一方表面抗原は本来発現している CD105 抗原、CD140b 抗原の減少をすべてのドナー細胞で認め、今後さらなる検証が必要と考えられた。本研究で TNFα は滑膜幹細胞の軟骨分化能を維持しつつ細胞増殖能を亢進する事が明らかとなった。

＜諸言＞

滑膜幹細胞はその優れた軟骨分化能から、軟骨および半月板の再生医療において重要な位置づけとなっている。臨床分野においては大腿骨部への滑膜幹細胞の自家移植が 10 症例で行われており、MRI 評価　所見　リスホルムスコアにおいてその効果が証明されている。現在、変性した損傷半月板に対する滑膜幹細胞自家移植の効果を評価する臨床研究が行われている。これらの臨床研究では、滑膜幹細胞は 5000 万細胞程度を 14 日間の培養で調達する必要があるが、より細胞を効率的に増殖させることができれば、適応を拡大し、広範囲の軟骨や半月板損傷に対しての自家移植が可能となる。

TNFα は動物における腫瘍の退行を促す因子として最初に報告された物質であり、成長や、分化、代謝など、体内の様々な有核細胞に対して作用を持つサイトカインである。又、全身性の炎

症に関与し、その発現は関節リウマチのような疾患の病態に関連している。

TNFα がリウマチ患者由来の滑膜繊維芽細胞の増殖能を亢進するという報告はあるが、滑膜幹細胞に与える影響に関する報告はまだない。

TNFα が軟骨分化に与える影響に関しては議論があるが、Wehling らは TNFα は骨髄由来間葉系細胞の軟骨分化を抑制したと報告している。一方で Michal らは TNFα は骨髄由来間葉系細胞の軟骨分化に影響を与えなかったと報告している。TNFα が滑膜幹細胞に対して、は軟骨分化に影響を与ええず、その増殖能を亢進させた場合、軟骨および半月板に対する再生医療に対して有用である。本研究の目的は TNFα がヒト滑膜幹細胞の増殖能、軟骨分化能に与える影響について検討することである。

＜方法＞

ヒト滑膜幹細胞

ヒト滑膜幹細胞は 14 名の人工膝関節置換手術施行患者から術中に採取された滑膜より確保された。滑膜は 3mg/ml のコラゲナーゼで 3 時間　37 度で処理された後、取り出された有核細胞を 10％の牛血清を含む αMEM 培地で 14 日間培養した。

TNFα が滑膜幹細胞の増殖能に与える影響に関して

2 名のドナーから採取した Passage1 のヒト滑膜幹細胞を $10^4$ 細胞/60cm$^2$ でディッシュに播種し、2 週間培養した。その際、コントロールと TNFα を 2.5 x $10^{-12}$~$10^{-7}$ g/ml の濃度で割り振り、各条件での細胞増殖、コロニー数、1 コロニー当たりの細胞数を比較した。ディッシュはクリスタルバイオレットで染色し、直径 2 ㎜以上のものをコロニーとしてカウントした。次に前述の実験で最適と思われた濃度の TNFα で Passage1 のヒト滑膜幹細胞を 6 ドナー分 14 日間培養し、細胞増殖、コロニー数、1 コロニー当たりの細胞数をコントロールと比較した。

TNFα が滑膜幹細胞の分化に与える影響に関して

6 ドナーより採取した Passage1 ヒト滑膜幹細胞を 25ng/ml の TNFα 添加群とコントロール群で 14 日間培養し（$10^4$ 細胞/60cm$^2$）、それぞれの細胞群から 250000 細胞のから成るペレットを作成、軟骨分化培地で 21 日間の軟骨分化培養を行い、その直径、重量を比較した。

TNFα が表面抗原の発現に与える影響に関して

3 ドナーより採取した Passage1 ヒト滑膜幹細胞を 25ng/ml の TNFα 添加群とコントロール群で 14 日間培養し（$10^4$ 細胞/60cm$^2$）、得られた細胞の表面抗原をフローサイトメーターで計測した。

＜結果＞

TNFα が滑膜幹細胞の増殖能に与える影響に関して

2.5ng/ml 以上の濃度の TNFα 添加で滑膜幹細胞の増殖は優位に亢進した。1 コロニー当たりの細胞数の増殖は認めるが、1 ディッシュ当たりの細胞数の増加は認めなかった。

最適濃度と思われた 25ng/ml TNFα 添加下に 6 ドナー分の滑膜幹細胞の増殖を検討したところ、

すべてのドナー細胞での有意な増殖能亢進を確認した。

TNFα が滑膜幹細胞の分化に与える影響に関して

軟骨分化培地で培養した軟骨ペレット大きさ、重量に有意差は認めず、軟骨分化へ与える影響は認めないと考えられた。

TNFα が表面抗原の発現に与える影響に関して

本来発現している CD105 抗原、CD140b 抗原の減少をすべてのドナー細胞で認めた。

＜考察＞

本研究の結果は①TNFα が滑膜幹細胞の増殖能を亢進すること　②TNFα はコロニー数を増やすことなくコロニー当たりの細胞数を増殖させること　③TNFα 前投与は滑膜幹細胞の軟骨分化に対しては影響を与えない　という事を示した初の研究となる。

我々の実験では 2.5ng/ml 以上の濃度の TNFα が有意に滑膜幹細胞の増殖を亢進していた。これまでの TNFα 添加と細胞増殖に関する報告によると、線維芽細胞では 25ng/ml、骨髄由来間葉系細胞では 10ng/ml、 神経幹細胞では 4～10ng/ml 、心筋線維芽細胞では 10ng/ml 平滑筋腫細胞では 25ng/ml と、いずれも今回の結果と近い濃度であった。本研究で TNFα はコロニー数に対しては影響を与えないことが明らかとなった。これは TNFα が滑膜幹細胞のディッシュへの生着する割合に影響を与えないという事を示唆している。

Wolfgang らは TNFα は VCAM-1（vascular cell adhesion molecule-1）のような接着、遊走因子の発現を増殖させると報告しているが、我々の使用するディッシュに対しての接着能に変化は認めなかった。

Wehling らは 10ng/ml TNFα 添加は NF-κB に影響し、軟骨ペレット形成を抑制したと報告する一方、Michel らは 10ng/ml TNFα 添加は３D 高密度培養下の軟骨分化において影響を与えなかったと報告している。これらの報告は骨髄由来間葉系細胞に関して報告したものであり、TNFα は軟骨分化培地に添加されている。そのため、これらの二つの報告と我々の研究では TNFα の投与法が大きく異なる（我々は前投与）。

TNFα は CD44、73、90 の発現に影響を与えなかったが、検査 CD105 と 140b の発現を 3 ドナー全てで低下させた。CD105 は細胞表面のタイプ 1 グリコプロテインであり、endoglin として知られている。

また、TGFβ レセプター複合体の一部である。Fan らは滑膜幹細胞の CD105 陽性群は陰性群と比較して aggrecan type2 や Sox9 の発現が高いと報告している。この結果は我々の結果とは異なるものとなった。CD140b は PDGF レセプターβ として知られている。PDGF ファミリーは 5 つの異なるアイソフォームから構成され、ホモ 4 量体（AA BB CC DD）と 1 つのヘテロダイマーで構成されている。又、PDGF レセプターはの 2 量体（α/α　β/β）と　α/β の 1 量体から形成されている。PDGF-AA は PDGF レセプターα/α のみを活性化し、PDGF-AB は PDGF レセプターα/α と α/β を活性化し、　PDGF-BB はすべての PDGF レセプターを活性化する。TFNα のシグナル伝達機構は、PDGF レセプターβ 発現減少の効果以上の作用があると考えられた。

臨床応用について　TNFα は増殖能を亢進し、軟骨分化能に影響しない点が臨床応用に適していると思われる。しかしながら、TNFα は CD105 と 140b の発現を低下させるため、滑膜幹細胞の何らかのプロパティを低下させている可能性がある。TNFα は炎症性サイトカインの一種として知られている。リウマチ患者の関節内での増加を認め、アポトーシスや組織の変性に寄与する。リウマチ患者関節内の TNFα の濃度は約 300pg/ml 程度と報告されている。我々の研究では 25ng/ml の TNFα が有効であったが、これはリウマチ患者関節内濃度の役 100 倍近くの濃度に当たる。TNFα の臨床応用の前に我々はさらなる検討が必要となる。

＜結論＞

TNFα は滑膜幹細胞の軟骨分化能を維持しつつ細胞増殖能を亢進する。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5372　号 | 塩田　幹夫 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田賀　哲也<br>副　査　大川　淳、　淺原　弘嗣 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、TNFα の滑膜由来間葉系幹細胞に対する作用を検討し、軟骨分化能を維持した増殖を促進させることを報告するとともに、その臨床的意義を論じたものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

TNFα は多様な機能を持つサイトカインである。これまで知られていなかった TNFα の滑膜由来幹細胞に対する効果を見出すとともに、間葉系幹細胞移植による膝軟骨や半月板の治療における可能性を考察した点で、研究目的の先駆性と独創性は高い。

２）社会的意義

申請者の所属分野では滑膜由来間葉系幹細胞の、膝軟骨や半月板の移植治療における臨床応用が進行中である。これまで未解決であった TNFα の滑膜由来間葉系幹細胞に対する作用を増殖および分化能の観点から示し今後の展開研究への示唆を与えた点で本論文の社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

仮説に基づいて必要な実験方法により研究を組み立てており、また承認を得た上で倫理的配慮の下で行われた研究である。

４）考察・今後の発展性

本論文はその考察において今後の開発的研究における可能性や問題点を示唆しており、今後の発展が期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 白井　怜子 |
| 論文審査担当者 | 主査　藤原　武男<br>副査　森尾　友宏、中村　桂子 |
| 論　文　題　目 | Effect of individualised dietary education at medical check-ups on maternal and fetal outcomes in pregnant Japanese women |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

背景：妊娠期の低栄養による胎児発育抑制は児の成人後の生活習慣病の発症リスクを高める可能性があることが指摘されている。やせ妊婦の増加や妊娠中の不十分な体重増加により、日本では低出生体重児が増加していると考えられる。そこで、妊婦健診の機会を利用して妊娠前の体格別に体重増加量をモニタリングしながら、個別に食生活介入を行い、妊娠転帰への影響を検討した。

方法：妊娠 20 週から 30 週まで妊婦健診を受ける者を対象に、厚生労働省の「妊産婦のための食生活指針」を用いて、助産師より保健指導、および 28 週前後で体重増加量が過少または過多の者に対しては栄養士より個別食生活指導を行った。本研究への参加に同意した対象者（介入群：406 名）の妊娠転帰を、2008-2010 年に同病院で分娩した者（非介入群：792 名）の分娩データと比較した。非妊娠時体格が BMI＜25 で在胎週数が 36-41 週の分娩を検討の対象とし、妊娠前より高血圧や糖尿病を合併した者は除外した。

結果：両群とも 24%以上がやせ（BMI＜18.5）であった。介入群において 28 週および分娩時に体重増加量が適正であった者の割合が高かった。児の平均出生体重や低出生体重児割合よび 10%タイル未満の児の割合には差を認めなかったが、出生体重が 3%タイル未満の児の割合が介入群に有意に低かった。

結語：妊婦健診での個別食生活指導は母体の適正な体重増加を促し、児の極端な発育不全を抑制できると考えられた。

＜緒言＞

妊婦の肥満は妊娠高血圧症候群（PIH）や妊娠糖尿病（GDM）の発症や帝王切開分娩、妊産婦死亡のリスクを高めるため、妊娠中の体重増加過多を抑制するための多くの介入研究が行われている。一方、日本では他の OECD 諸国とは異なり、若年女性の肥満割合は非常に低く、妊娠中の不十分な体重増加を伴うやせ妊婦の増加により低出生体重児が増加していることが問題となっている。先行研究より、低出生体重で産まれた児は成人後の生活習慣病の発症リスクが高いことが指摘されており、日本での単胎の低出生体重児割合が 1976 年の 4.6%から 2010 年には 8.4%まで増加したことは将来の健康問題のリスクであると考えられる。厚生労働省が 2006 年に発表し

た「妊産婦のための食生活指針」の中に、正常な胎児発育を促すため非妊時体格別に妊娠中の推奨体重増加量が示されているが、2010 年時点で平均出生体重も低出生体重児割合も改善傾向がみられていない。そこで、妊婦健診の機会を利用して妊娠前の体格別に体重増加量をモニタリングしながら、個別に食生活指導を行い、妊娠転帰への影響を検討する目的で介入研究を行った。

＜方法＞

介入群：2012 年 7 月から 2013 年 8 月に妊娠 15-20 週の者を対象に研究参加のリクルートを行った。妊娠 30 週まで継続して妊婦健診を当該施設で受ける予定の者、妊娠転帰に影響を与える可能性のある合併症のない者を対象とし、口頭および書面で説明し同意を得た（n=447）。このうち、途中から研究参加を拒否した者、子宮内胎児死亡、30 週未満で転院した者、36-41 週以外の分娩、児の多発奇形を除外した（n=417）。この中には当該施設で分娩した者の他に、30 週以降に転院し他施設で分娩した 38 名を含み、彼らのデータは分娩施設および本人から書面で得た。さらに妊娠前体格が肥満（BMI≧25）の者を除外し、406 名を最終的な検討の対象とした。

非介入群：単独施設での研究であったため、同時期に対照群を設定することが困難であったため、同施設での 2008 年から 2010 年の分娩データを非介入群として比較を行うこととした。妊娠転帰に影響を与える可能性のある合併症のない 36-41 週の分娩（n=994）のうち、妊娠前、28 週頃、分娩時の体重データのない者、児の多発奇形、介入に参加した者の分娩、2008-2010 年に 2 回分娩した者の 1 回目のデータ、妊娠前体格が肥満の者を除外し、792 名の分娩データを最終的な検討の対象とした。「妊産婦のための食生活指針」は 2008 年に母子健康手帳に収載されたため、同指針の情報を得ることができる 2008-2010 年の分娩を非介入群に選定した。

食生活指導内容：「妊産婦のための食生活指針」の中の推奨体重増加量、食事バランスガイドを用いて、食生活指導を行った。対象者に対して妊娠 15-20 週に、自己申告の身長と非妊時体重から算出した非妊時 BMI を基に、妊娠中の推奨体重増加量を説明した。以降妊婦健診の際に、非妊時体格別の体重増加チャートを用いながら、助産師より体重増加状況の評価と簡単な食生活指導をした。当該施設で分娩する者は分娩まで、30 週以降に転院した者は転院まで指導を行い、GDM と診断された者については指導を中止した。妊婦健診の頻度は日本産科婦人科学会のガイドラインに従った。妊娠 28 週頃に体重増加量が不十分あるいは過多の者については、栄養士より個別食生活指導を行った。3 日間の食事内容の記録を依頼し、栄養士はこの記録をもとに食生活改善のアドバイスをした。さらに、3 日のうち 1 日の食事内容を詳しく聴取し、後日、エネルギー、栄養素摂取量と食事バランスガイドでのサービング摂取数を解析した。解析結果にアドバイスを加えた用紙を指導の約 2 週後に指導を受けた者に返却した。

妊娠転帰の評価：母体の結果として合併症頻度、妊娠 28 週および分娩時の体重増加量および体重増加量が推奨範囲内であるか（体重増加状況）について介入群と非介入群で比較した。児の結果として、性別、在胎日数、出生体重、低出生体重児、巨大児、small for gestational age (SGA)(＜10%tile)、large for gestational age (LGA)(≧90%tile)の割合、さらに 3%tile 未満を extremely SGA、97%tile 以上を extremely LGA と設定してそれらの割合を両群間で比較した。さらに、栄養士による個別食生活指導の効果を評価するために、妊娠 28 週に体重増加量が不十分あるいは過多であった者の分娩時の体重増加量と児の出生体重について介入群と非介入群間で比較した。

統計学的解析にはIBM SPSS Statistics 20を用いて$p<0.05$を有意とした。なお、本研究は研究実施施設および国立健康・栄養研究所の研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

＜結果＞

分娩時年齢は介入群で有意に高かったが、妊娠前体格、初産割合、喫煙割合は両群間に差がなかった。両群でやせの割合は24%以上であった。

母体の妊娠転帰を比較したところ、帝王切開やPIH割合に差はなかった。介入群において、28週までの体重増加量が有意に小さく、28週での体重増加状況が過多の者の割合が有意に低かった。さらに、28週以降の体重増加量が有意に大きく、分娩時の体重増加状況では有意に適正な者の割合が高く、不十分、過多の者の割合が低かった。児の結果では、在胎日数やApgar Scoreが7点未満の割合に差はなかった。平均出生体重は両群ともに3.07kgであった。低出生体重児割合、SGA割合には有意な差はなかったが、介入群においてextremely SGAの割合が有意に低かった。巨大児割合、LGA割合、extremely LGAの割合には有意な差はなかった。

妊娠28週で体重増加量が不十分あるいは過多の者における妊娠転帰を介入群と非介入群で比較した結果、介入群では妊娠28週以降の体重増加量が有意に大きく、分娩時に体重増加が適正な者の割合が有意に高かったが、児の平均出生体重に差はなかった。一方、28週で体重増加が過多の者については、28週以降の体重増加量および分娩時の体重増加状況に有意な差はなかった。

＜考察＞

日本において、低出生体重児を減らすための食生活介入研究は初めてである。我々の食生活指導介入では、厚生労働省の「妊産婦のための食生活指針」に基づいて個別に食生活指導を行い、妊娠中の適切な体重増加を促すことができた。児の出生体重は介入群と非介入群で有意な差は認めなかったが、介入群においてextremely SGAの割合が低くなった。これは、低栄養による児の胎児発育不全を食生活指導により抑制できた可能性があることを示唆している。さらに、体重増加状況が過多の者の割合も介入群で低くなり、PIHや帝王切開、巨大児の割合は両群間で差を認めなかったことから、今回の介入に有害事象はないと考えられた。

栄養士による個別食生活指導については、特に体重増加が不十分な妊婦に対する大きな効果を認めたが、両群間で児の出生体重には差がなく、体重増加が過多の者に対しての効果は明らかではなかった。GDMのスクリーニング後である28週頃に食生活指導を設定したが、より早い週数で開始していれば、効果が大きくなった可能性がある。

本研究の限界として、介入群全員の食事調査はしていないため、介入群全員がバランスの良い食事をとることができていたかは不明である。

今回の結果により妊婦健診の機会に行った個別化した食生活指導が妊婦の食習慣に影響を与えた可能性が示唆された。今後は、胎児の低栄養を改善し、女性の生涯を通じた健康的な食生活を維持するための効果的な食生活指導方法の改良と長期間にわたる大規模な介入研究が望まれる。

＜結語＞

妊婦健診の機会を利用した個別食生活指導は母体の適正な体重増加を促し、児の極端な発育不

全を抑制できると考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5373　号 | 白井　怜子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　藤原　武男<br>副　査　森尾　友宏、中村　桂子 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、やせ妊婦の増加や妊娠中の不十分な体重増加により、日本では低出生体重児が増加していると考えられることから、妊婦健診の機会を利用して妊娠前の体格別に体重増加量をモニタリングしながら、個別に食生活介入を行い、妊娠転帰への影響を検討した論文である。妊娠 20 週から 30 週まで妊婦健診を受ける者を対象に、厚生労働省の「妊産婦のための食生活指針」を用いて、助産師より保健指導、および 28 週前後で体重増加量が過少または過多の者に対しては栄養士より個別食生活指導を行った。その結果、介入群において 28 週および分娩時に体重増加量が適正であった者の割合が高かった。児の平均出生体重や低出生体重児割合よび 10%タイル未満の児の割合には差を認めなかったが、出生体重が 3%タイル未満の児の割合が介入群に有意に低かった。妊婦健診での個別食生活指導は母体の適正な体重増加を促し、児の極端な発育不全を抑制できると考えられた。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

やせ妊婦は我が国における重要な健康問題であり、具体的な介入がいまだに確立されていない中で、既存の食事バランスガイドをもちいて行った介入研究は先駆的であるといえる。

２）社会的意義

我が国の出生体重の低さは OECD 諸国においても特に高く、その原因の一つとして妊娠中の体重増加の不十分さがあげられている。その対策は十分になされていないなかで、このような介入研究を実施しエビデンスを創出することは大きな価値がある。

３）研究方法・倫理観

研究方法は、介入群を 2012 年 7 月から 2013 年 8 月に妊娠 15-20 週の者を対象に口頭および書面で説明し同意を得て、途中から研究参加を拒否した者、子宮内胎児死亡、30 週未満で転院した者、36-41 週以外の分娩、児の多発奇形を除外した 417 名である。さらに妊娠前体格が肥満（BMI ≧25）の者を除外し、406 名を最終的な検討の対象とした。非介入群は過去の分娩歴から 2008-2010 年の分娩があった 792 名とした。介入は「妊産婦のための食生活指針」の中の推奨体重増加量、食事バランスガイドを用いて、食生活指導を行った。対象者に対して妊娠 15-20 週に、自己申告

の身長と非妊時体重から算出した非妊時 BMI を基に、妊娠中の推奨体重増加量を説明した。以降妊婦健診の際に、非妊時体格別の体重増加チャートを用いながら、助産師より体重増加状況の評価と簡単な食生活指導をした。当該施設で分娩する者は分娩まで、30 週以降に転院した者は転院まで指導を行い、GDM と診断された者については指導を中止した。妊婦健診の頻度は日本産科婦人科学会のガイドラインに従った。妊娠 28 週頃に体重増加量が不十分あるいは過多の者については、栄養士より個別食生活指導を行った。3 日間の食事内容の記録を依頼し、栄養士はこの記録をもとに食生活改善のアドバイスをした。さらに、3 日のうち 1 日の食事内容を詳しく聴取し、後日、エネルギー、栄養素摂取量と食事バランスガイドでのサービング摂取数を解析した。解析結果にアドバイスを加えた用紙を指導の約 2 週後に指導を受けた者に返却した。得られた妊娠転帰を介入群と非介入群で比較した。さらに、栄養士による個別食生活指導の効果を評価するために、妊娠 28 週に体重増加量が不十分あるいは過多であった者の分娩時の体重増加量と児の出生体重について介入群と非介入群間で比較した。インフォームドコンセントを得た参加者に実施しており、研究実施施設および国立健康・栄養研究所の研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

４）考察・今後の発展性

解析方法についてはサンプルサイズを含めてさらに精緻に行う可能性はあるものの、不十分とはいえず、一定のエビデンスとして評価できると考えられた。今後、さらに大規模な多施設介入研究が期待できた。

**３．その他**

**特になし**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請する価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 野田　隆政 |
| 論文審査担当者 | 主査　横田　隆徳<br>副査　前原　健寿　竹内　崇 |
| 論　文　題　目 | Working memory and prefrontal/temporal hemodynamic responses during post-task period in patients with schizophrenia: A multi-channel near-infrared spectroscopy study |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

統合失調症（Sz）における認知機能障害は特徴的な症状でありが社会機能に影響する。脳画像研究によってSzの前頭前野の機能異常が明らかになってきた。近赤外線光トポグラフィー（NIRS）によるSzを対象とした先行研究によると、oxy-hemoglobin（oxy-Hb）は言語流暢性課題（VFT）中に健常者（HC）に対して増加量が小さく、VFT終了後にアンバランスに再上昇することが指摘されている。そこで、再上昇が脳活動の不十分な抑制のために起こり、再上昇と認知機能障害が関係するという仮説を立てた。30名のSz患者と30名のHCが研究に参加し、52チャンネル（52ch）のNIRS機器を使用してVFT中の脳活動を計測した。SzではVFT終了後に前頭、側頭部において再上昇していた。また、Sz簡易認知機能評価尺度（BACS）得点とVFT中のoxy-Hbとは関係しないが、課題終了後のoxy-HbとBACSの作業記憶（WM）とが背外側前頭前野（DLPFC）や側頭部において有意な負の相関を示した。本結果はSzのWM障害と前頭側頭部におけるoxy-Hb再上昇が関係しており、NIRSが慢性SzにおけるWMのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

＜緒言＞

Szは妄想や幻覚だけでなく認知機能障害も特徴的な症状である。Szの認知機能障害は、WMや言語記憶、空間記憶、注意、処理速度、言語流暢性、遂行機能と多岐に渡る。脳画像研究では前頭前野の機能障害がSzの認知機能障害に影響していることが示唆されている。Hillら（2004）のメタ解析でも安静時や課題中の前頭葉機能低下が指摘されている。

NIRSは近赤外光により脳機能の時空間特性を検討でき、非侵襲的、高い時間分解能（0.1ms）を備えた光学的手法である。NIRSはoxy-HbとdeoxyHbの濃度変化を計測し、本邦で治療抵抗性うつ病の鑑別診断補助検査として保健収載されている。

SzのNIRSに関した先行研究では、HCと比較して認知課題中の前頭部低活性が報告され、2-back課題ではBACS総合得点と服外側前頭前野（VLPFC）やDLPFCの脳活動が正の相関を示した報告がある。また、慢性Szにおいて機能の全体的評定（GAF）とoxy-Hbが正の相関を示された。また、VFT中の前頭部低活性を示したNIRS研究は多数あり、VFT終了後の再上昇も指摘されて

いる。ところが再上昇に関する研究は十分な知見がない。そこで、VFT 終了後の再上昇が不適切な神経活動の抑制のために起こり、再上昇が認知機能障害に関係しているという仮説を立て、oxy-Hb と認知機能との関係を調査した。

＜方法＞

30 名の Sz 患者と 30 名の年齢、性別、教育歴、眠気、病前 IQ（JART を使用）を統制した HC を検査した。被験者の選択基準は 18 歳から 60 歳、日本語が母国語、右利きのである。神経疾患、頭部外傷、アルコール/物質乱用や嗜癖は除外され、Sz においては電気けいれん療法の治療歴がある患者も除外された。診断は構造化面接（SCID-I）を用い、HC は SCID-NP を用いた。29 名の患者に抗精神病薬、12 名に抗不安薬、12 名に睡眠導入薬が処方されていた。

臨床評価は陽性・陰性症状評価尺度（PANSS）、認知機能は BACS を用いた。BACS は言語記憶、WM、注意、処理速度、遂行機能の 6 つの下位項目が測定できる検査である。得点は標準化 z スコアが計算される。

NIRS 測定は 52ch の装置を用いた。測定部位は左右の前頭・側頭部であり、測定課題は 60 秒間の VFT、統制課題を含め 160 秒間で検査が終了する。NIRS は 0.1 秒毎にデータ計測でき、Takizawa ら（2008）の手法に則り得られたデータはアーチファクトを除くため 5 秒間の移動平均処理、線形一次補正した後に解析に用いた。

統計解析は、両群間の臨床データの比較にはカイ二乗または t 検定を用いた。NIRS データは oxy-Hb を用いた。まずは課題による賦活を VFT 前と VFT 中の oxy-Hb 平均値を t 検定した。次いで群間比較、BACS データと oxy-Hb 平均値とでピアソン相関分析を行った。しかし、服薬、年齢、性別、他の臨床的変数のような潜在的交絡因子は、oxy-Hb 変化および認知機能の両方に十分に影響し得る。有意な相関を示した ch における oxy-Hb 平均値に対する認知機能の独立した寄与を解明するために、Sz 群に対してステップワイズ重回帰分析を行った。oxy-Hb 平均値を従属変数、年齢、性別、教育年数、VFT の課題成績、GAF、PANSS 得点、BACS-WM 得点、抗精神病薬処方量を独立変数とした。NIRS データの統計解析では多重比較を行っているため、false discovery rate (FDR)補正を行った。統計解析は SPSS22.0 を用い、有意確率 0.05 未満を統計学的有意と設定した。

＜結果＞

両群の臨床指標、VFT の課題達成数において有意差はなかった。Sz 群では VFT 前の統制課題に比べて 46 個の ch で、HC 群では全ての ch で oxy-Hb 平均値が有意に増加した。Sz 群は HC 群よりも 37 個の ch で有意に VFT 中の oxy-Hb 平均値が小さいという結果であった。一方、VFT 終了後では、Sz 群は HC 群よりも 14 個の ch で有意に oxy-Hb 平均値が小さかった。Sz 群では、VFT 終了後にほとんどの ch で先行研究と同様に oxy-Hb の再上昇を認めた。Oxy-Hb は VFT が終了すると速やかに減少した後に再上昇していた。

PANSS 尺度や臨床指標（年齢、性別、教育年数、病前 IQ、課題達成数、GAF 得点、抗精神病薬処方量）と VFT 中および VFT 終了後の oxy-Hb 平均値とは有意な相関がなかった。BACS 得点と VFT 中 oxy-Hb 平均値との相関も認めなかった。一方、VFT 終了後の oxy-Hb 平均値と BACS-WM 得点は 8 個の ch（ch1, 11, 13, 19–20, 22, 29, 50）において有意な負の相関（相関係数–0.555～–0.485）

を示した。次いで行ったステップワイズ重回帰分析では、前記 8 個の ch において採択された因子は ch11 のみ BACS-WM、年齢、性別、それ以外の ch は BACS-WM のみであり、いずれの ch においても BACS-WM により有意に説明可能であった。

＜考察＞

本研究は Sz の認知機能障害と VFT 終了後の脳活動との関連を示した初めての報告である。VFT 終了後の oxy-Hb 平均値と BACS-WM 得点の有意な負の相関が示された 8 個の ch は、それぞれ両側 DLPFC（ブロードマン[BA]9,46）、左運動前野・左補足運動野（BA6）、ウェルニッケ野の右縁上回部（BA40）、下前頭回（BA40）に相当するが、これらと VLPFC は WM に関連していることが先行研究で示されている。

VFT では正しい単語の想起、課題への集中、発語した単語を記憶しておくための WM、間違った単語の抑制、実行機能といった広範囲の認知機能を必要とする。VFT 終了後の oxy-Hb 再上昇は、課題の実行とは無関係な神経活動の抑制が不十分であることを反映していると考えられる。WM の機能の一つはアクティブな活動を終了させて不要な情報を消去することであり、VFT 終了後に生じた脳活動が WM と負の相関を示したことは、WM が低下した Sz 患者は、oxy-Hb 再上昇が示すようにプロセスを適切に終了させることが困難であったと考えられる。

WM 障害は Sz における最も頻度の高い認知機能障害の一つである。WM は複雑であり、目標指向の行動を導くために、情報を短期間保持する多くのサブコンポーネントで構成される。Sz の WM 障害は、無関係な情報を抑制できないことや、想起の際の応答を選択できないことに影響している。Eich ら（2014）は fMRI を用いて Sz の WM 研究を行い、保持課題中は VLPFC 後部の活動が維持されていたが、HC で認める抑制課題に関連した VLPFC 後部の活動低下は見られず、WM 抑制の障害が Sz の中核的症状であると指摘している。また、被験者は VFT 中に意味のある日本語の単語を生成したが意味のある単語は記憶に残り消去が難しい。WM 障害によって意味のある単語が保続し、VFT 終了後の oxy-Hb 再上昇に繋がっている可能性がある。

限界：本研究にはサンプル数が限られていること、薬物療法の影響を完全には排除できない、被験者が慢性期の Sz であるため発症からの未治療期間（DUP）が不明であるという限界がある。将来は大きなサンプル数で初発エピソードからの未治療 Sz 患者の経時的な研究が望まれる。

＜結論＞

本研究では 30 名の Sz を対象として、NIRS を用いて VFT およびその後の脳活動を計測することで認知機能障害と oxy-Hb の関係を調査した。Sz では先行研究と同様に VFT 終了後に前頭部、側頭部において oxy-Hb の再上昇を認めた。さらに VFT 終了後の oxy-Hb 平均値は BACS-WM と有意な負の相関を示した。NIRS が慢性 Sz における WM のバイオマーカーとなる可能性を示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5374　号 | 野田　隆政 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　横田　隆徳<br>副　査　前原　健寿　竹内　崇 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

統合失調症（Sz）における認知機能障害は特徴的な症状でありが社会機能に影響する。脳画像研究によってSzの前頭前野の機能異常が明らかになってきた。近赤外線光トポグラフィー（NIRS）によるSzを対象とした先行研究によると、oxy-hemoglobin（oxy-Hb）は言語流暢性課題（VFT）中に健常者（HC）に対して増加量が小さく、VFT終了後にアンバランスに再上昇することが指摘されている。そこで、再上昇が脳活動の不十分な抑制のために起こり、再上昇と認知機能障害が関係するという仮説を立てた。30名のSz患者と30名のHCが研究に参加し、52チャンネル（52ch）のNIRS機器を使用してVFT中の脳活動を計測した。SzではVFT終了後に前頭、側頭部において再上昇していた。また、Sz簡易認知機能評価尺度（BACS）得点とVFT中のoxy-Hbとは関係しないが、課題終了後のoxy-HbとBACSの作業記憶（WM）とが背外側前頭前野（DLPFC）や側頭部において有意な負の相関を示した。本結果はSzのWM障害と前頭側頭部におけるoxy-Hb再上昇が関係しており、NIRSが慢性SzにおけるWMのバイオマーカーとなる可能性が示唆した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

統合失調症患者でのVFT中の前頭部低活性とVFT終了後の再上昇を示したNIRS研究はあるが、

再上昇の意義はわかっておらず、今回認知機能障害との関連を検索した。

２）社会的意義

統合失調症における認知機能障害の詳細を明らかにして、統合失調症のバイオマーカーを検索する。

３）研究方法・倫理観

30名のSz患者と30名の年齢、性別、教育歴、眠気、病前IQ（JARTを使用）を統制した正常対象例において、VFT試行中および終了後のNIRS（52ch）による脳血流測定を用った。統合失調症の臨床評価は陽性・陰性症状評価尺度（PANSS）を用い、認知機能はBACSを用いて行い、NIRSの結果と比較検討した。

４）考察・今後の発展性

統合失調症では VFT 終了後に前頭、側頭部において再上昇することを確認した。また、統合失調症簡易認知機能評価尺度（BACS）得点と VFT 中の oxy-Hb とは関係しないが、課題終了後の oxy-Hb と BACS の作業記憶（WM）とが背外側前頭前野（DLPFC）や側頭部において有意な負の相関を示した。

**３．その他**

**４．審査結果**

審査では、１）統合失調症の NIRS の結果は罹病期間によって異なるのか、本研究の結果は精神科臨床の中で具体的にどのように活かされるのか。２）NIRS の検査の原理としてのその時間軸と血流変化の程度からいかなる神経活動を反映しているか、３）ワーキングメモリーの生理学的基盤のいままでの知見と申請者の解釈、４）ワーキングメモリーのバイオマーカーとなる理論的根拠や臨床的な意義、５）投薬との関係、研究の限界、などの質問をして的確な回答を得た。

以上から、申請者は、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | SAWADA Leila |
| 論文審査担当者 | 主査　樗木　俊聡<br>副査　山岡　昇司、三浦　修 |
| 論　文　題　目 | IL-10-mediated signals act as a switch for lymphoproliferation in Human T-cell leukemia virus type-1 infection by activating the STAT3 and IRF4 pathways |

（論文内容の要旨）

**Summary:**

Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) causes two distinct diseases, adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Since there are no disease-specific differences among HTLV-1 strains, the etiological mechanisms separating these respective lymphoproliferative and inflammatory diseases are not well understood. In this study, by using IL-2-dependent HTLV-1-infected T-cell lines (ILTs) established from patients with ATL (ATL-ILTs) and HAM/TSP (HAM/TSP-ILTs), we demonstrate that the anti-inflammatory cytokine IL-10 and its downstream signals potentially act as a switch for proliferation in HTLV-1-infected cells. Among six ILTs used, all three ATL-ILTs grew much faster than those from three HAM/TSP-ILTs. IL-10 production was preferentially observed in the rapid-growing ILTs. Treatment with exogenous IL-10 markedly enhanced proliferation of the slow-growing HAM/TSP-ILTs. This proliferation was associated with STAT3 phosphorylation and induction of survivin and IRF4, all of which are characteristics of ATL cells. STAT3 knockdown reduced IL-10 expression, implying a positive-feedback regulation between STAT3 and IL-10. STAT3 knockdown also reduced survivin and IFN regulatory factor 4 (IRF4). Knockdown of IRF4 further suppressed survivin expression and the cell growth in ILTs. These findings indicate that the IL-10-mediated signals promote cell proliferation in HTLV-1-infected cells through the STAT3 and IRF4 pathways. Our results imply that, HTLV-1 infection alone may not be sufficient for cell proliferation, IL-10 and its signaling pathways within the infected cell itself and/or its surrounding microenvironment may play a critical role in pushing HTLV-1-infected cells towards proliferation at the early stages of HTLV-1 leukemogenesis.

**Introduction:**

HTLV-1 is a retrovirus that infects 5-10 million people worldwide. Although most infected individuals remain asymptomatic carriers (AC), approximately 4% develop ATL and less than 2% develop HAM/TSP. Previous reports have shown that there are no disease-specific HTLV-1 strains causing these diseases, indicating that these different clinical outcomes could be attributed to host factors. However, the essential

host factors and diseases etiological mechanisms remain unclear.

Our previous work described the potential involvement of the innate immune response in HTLV-1 pathogenesis. We showed that ATL cells constitutively express antisense RNA, including the HTLV-1 LTR region, resulting in constitutive activation of NF-κB through activation of the double-stranded RNA (dsRNA)-dependent protein kinase (PKR), partially explaining how HTLV-1 produces constitutive NF-κB activation without detectable HTLV-1 Tax protein.

In the present study, we describe that IL-10 and its mediated signals induced proliferation of ILTs. We demonstrate that exogenously added IL-10, especially in HAM/TSP-ILTs, induced cell proliferation, IRF4 and survivin, resembling ATL cells, indicating that IL-10-dominant microenvironment might play critical role in the early stages of leukemogenesis.

**Methods:**

ILTs were established by long-term culture of PBMCs from ATL and HAM/TSP patients, following stimulation with phytohemagglutinin or antibodies for CD3/CD28. Cell proliferation was evaluated by Cell counting kit-8 (Dojindo) or trypan blue exclusion method. Cytokine measurement was accessed by a multiplex bead-based immunoassay LEGENDplex (Miltenyi Biotec). Protein expression was assessed by FACS or Immunoblotting. qRT-PCR was used for mRNA quantification. Electroporation of siRNA was performed with Neon Transfection System (Invitrogen).

**Results:**

IL-10 promotes proliferation of ILTs

ILTs were $CD4^{+}CD8^{-}$, without preferable expression of a specific T-CD4 subtype marker. Even in the presence of recombinant human IL-2, HAM/TSP-ILTs proliferation was much slower than ATL-ILTs. HAM/TSP-ILTs produced negligible levels of IL-10 and ATL-ILTs produced varying levels of this cytokine. ILT-H2 was the highest IL-10 producer.

We next examined the significance of IL-10 on cell proliferation by adding recombinant human IL-10 (rhIL-10) to the cell culture medium. RhIL-10 treatment induced cell proliferation in five of the six ILTs (treatment effect was limited in ILT-H2) and the impact in HAM/TSP-ILTs proliferation was remarkably greater than in ATL-ILTs. RhIL-10 effect on Tax expression was limited. Thus, IL-10 production was associated with ILTs proliferation, especially in HAM/TSP-ILTs and this was not correlated with Tax.

IL-10 enhances Ki67 expression and survivin in HAM/TSP-ILTs

We investigated the effect of IL-10 on cell cycling and apoptosis. In the absence of rhIL-10, Ki67 expression in HAM/TSP-ILTs was lower than ATL-ILTs and rhIL-10 treatment increased the Ki67 expression in most of the ILTs.

HAM/TSP-ILTs showed more AnnexinV+ cells than ATL-ILTs. RhIL-10 decreased the amount of apoptotic cells in HAM/TSP-ILTs, while this treatment showed no impact or slight increase of AnnexinV+ cells in ATL-ILTs. Intriguingly, ILTs constitutively presented caspase-3 cleavage and the anti-apoptotic protein survivin expression. These proteins expression was further increased with rhIL-10 treatment. This

suggests that although ILTs have a constitutively active apoptotic machinery, IL-10 promoted cell cycle progression and inhibited apoptosis partly through induction of survivin.

IL-10 strongly activates STAT3, especially in HAM/TSP ILTs

Since IL-10 has been described to activate the STAT3 pathway through engagement of its cognate receptor, we investigated this pathway involvement in IL-10-induced cell growth. Immunoblotting analysis showed that STAT3 phosphorylation strongly enhanced in the presence of rhIL-10 in most of the ILTs. ILT-227 and ILT-H2, spontaneous high IL-10 producers, presented a constitutive strong STAT3 phosphorylation.

STAT3 contributes to the expression of IL-10, survivin and IRF4

We next investigated the role of STAT3 in ILTs. STAT3 knockdown reduced cleaved caspase-3, survivin and IRF4 expression, as well as IL-10 mRNA. The apparent IL-10-STAT3 loop led us to investigate its role in cell growth. Interestingly, IL-10 knockdown effect on ATL-ILTs proliferation was limited. Nevertheless, treatment with AS101 (immunomodulator that inhibits IL-10) and cucurbitacin I (STAT3 inhibitor) markedly reduced the cell growth in tested ILTs. Thus, STAT3 contributes to the IL-10-mediated cell growth, which was associated with the induction of survivin and IRF4.

IRF4 contribution to cell growth and survivin expression

IRF4 expression has been reported in ATL cells, however the relation between IL-10 and IRF4 remains to be elucidated. Here we show that IL-10 treatment induced IRF4 expression in ILTs, with the exception of ILT-H2. IRF4 knockdown reduced survivin expression and increased the 19 kDa form of cleaved caspase-3.

Cell proliferation was more efficiently decreased by IRF4 knockdown than STAT3 knockdown, as shown by trypan blue exclusion method and by a reduced Ki67 expression. Thus, IL-10 enhanced expression of IRF4 partly through STAT3, and IRF4 plays critical roles in the survival and proliferation of ILTs.

**Discussion:**

IL-10 and its downstream signaling play critical roles in the proliferation of HTLV-1-infected T lymphocytes. The proliferation speed seemed to be influenced by their IL-10 production. Further rhIL-10 treatment enhanced cell growth, indicating that HTLV-1 infection alone may not be sufficient for infected cells proliferation and IL-10-dominant polarization of the infected cell itself or its microenvironment potentially contributes to proliferation of HTLV-1-infected cells. Lymphoproliferation is a characteristic of ATL and is not associated with HAM/TSP. Therefore, IL-10-mediated signals may act as a switch toward leukemogenesis at the early stages of ATL development.

Our results contribute to the understanding of previous reports, which showed that ATL patients present high IL-10 serum levels, with IL-10 concentration increasing as ATL progresses. No differences in serum IL-10 levels were found between HAM/TSP patients and ACs.

The IL-10 downstream signaling involved STAT3 and IRF4. These pathways are important for cell growth; however, the impact of STAT3 knockdown on proliferation was not as effective as IRF4 knockdown, indicating IRF4 primary role in cell survival. Moreover, the different effect of si-STAT3 and

si-IRF4 in cleaved caspase-3 levels suggests the presence of simultaneous pro- and anti-apoptotic signals regulated by STAT3, in which IRF4 potentially regulates the anti-apoptotic machinery.

**Conclusion:**

The anti-inflammatory cytokine IL-10 and its downstream signaling act as a switch for the proliferation of HTLV-1-infected cells through activation of the STAT3 and IRF4 pathways. IL-10 dominant microenvironment may be a critical host factor, particularly in the early stages of leukemogenesis. This partly explains the mechanism of how HTLV-1 causes lymphoproliferative and inflammatory diseases without disease-specific virus strain. The present findings will contribute not only to the understanding of the disease mechanisms but also to the prediction of the diseases risks and prophylactic strategies against disease development in HTLV-1 infection.

（要約）

ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）は、感染後数十年の潜伏期を経て感染者の約5%に成人T細胞白血病（ATL）を、約1%にHTLV-1関連脊髄症 (HAM/TSP)をおこす。ATLは悪性腫瘍性疾患であり、HAM/TSP は難治性の慢性炎症性疾患である。何故同じウイルスが全く異なる疾患を起こすのか分かっていない。ATL患者とHAM/TSP患者由来のウイルス株間に本質的な違いが認められないことから、疾患機序には宿主側の要因が関与すると考えられる。本研究では、血清中のIL-10濃度がATL患者で比較的高いことが指摘されていることに着目し、HTLV-1持続感染による炎症と腫瘍の成立機序にIL-10が果たす役割を解明することを目的とした。ATL患者またはHAM/TSP患者末梢血から樹立されたIL-2依存性HTLV-1感染T細胞株（ILT）３株ずつを比較したところ、ATL由来ILT株は増殖速度が速くIL-10を産生するのに対し、HAM/TSP由来ILT株は増殖速度が遅くほとんどIL-10を産生していなかった。リコンビナントIL-10を添加するとHAM/TSP由来ILTの増殖速度は著明に増加し、これは、STAT3リン酸化、survivin、IRF4の発現誘導を伴っていた。これらの分子の発現はATL細胞の特徴と合致している。ATL由来ILTではこれらの分子発現ははじめから高く、IL-10添加による影響は乏しかった。これらの細胞において、RNA干渉によりSTAT3発現を抑制するとsurvivin、IRF4発現は抑制され、IRF4発現を抑制すると細胞増殖は著しく低下した。以上から、IL-10-STAT3 シグナルはsurvivin、IRF4発現を介して、HTLV−１感染細胞を増殖させると結論した。IL-10 は炎症抑制に働くサイトカインであることから、HTLV−１感染においては炎症と増殖の切り替えスイッチとして働くことが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5375　号 | SAWADA　Leila |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　樗木　俊聡<br>副　査　　山岡　昇司、三浦　修 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

成人 T 細胞白血病（ATL）患者で血清中 IL-10 濃度が比較的高いことに着目し、HTLV-1 持続感染による ATL 細胞の増殖における IL-10 の役割を示した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

HTLV-1 感染者の約 5%が ATL を、約 1%が HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP)を発症する。本研究では、HAM/TSP に比べ ATL 患者血中で IL-10 濃度が高いことに着目し、白血病細胞が IL-10 を産生し増殖に利用していることを明らかにした。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．ATL 患者または HAM/TSP 患者末梢血から樹立された T 細胞株（各々３株）を比較したところ、前者は増殖速度が早く IL-10 を産生していたが、後者は増殖速度が遅くほとんど IL-10 産生が観られなかった。

２．ATL 患者由来 T 細胞株増殖において RNA 干渉により IL-10 受容体シグナルに関与する STAT3 を抑制すると、survivin 及び IRF4 発現が低下し、さらに IRF4 発現を抑制すると細胞増殖が著名に抑制された。

３．これらの結果から、AML 細胞の産生する IL-10 は、STAT3 活性化→survivin/IRF4 発現を介して増殖を誘導・促進することが明らかになった。

３）研究方法・倫理観

ATL 患者または HAM/TSP 患者末梢血から樹立された T 細胞株を用いて、IL-10 産生や IL-10 依存性増殖関連シグナル伝達系に関するさまざまな解析を行った。

４）考察・今後の発展

HTLV-1 感染後の ATL 発症予測や早期診断、さらには治療への応用が期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 石橋　史明 |
| 論文審査担当者 | 主査　田賀　哲也<br>副査　江石　義信、樗木　俊聡 |
| 論　文　題　目 | Contribution of ATOH1$^{+}$ Cells to the Homeostasis, Repair, and Tumorigenesis of the Colonic Epithelium |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ATOH1 は分泌型腸管上皮細胞への分化に必須の転写因子である。近年、分泌型上皮細胞が腸管上皮幹細胞へ脱分化する可能性が報告されている。しかしながら、ATOH1 陽性分泌型上皮細胞が、組織の恒常性維持、組織修復、発癌の各局面においてどのような機能を有するかは明らかにされていない。今回、マウス ATOH1 陽性細胞の系譜解析モデルを用いて、恒常状態において一定数の ATOH1 陽性細胞が腸管上皮幹細胞に脱分化することを見出した。ATOH1 陽性細胞の脱分化能はデキストラン硫酸（DSS）誘発性腸炎の環境下で増幅された。さらに、炎症性発癌モデル（AOM-DSS モデル）においては、形成された腫瘍内で ATOH1 陽性細胞を由来とする腫瘍幹細胞様細胞が存在することを示した。

＜緒言＞

腸管上皮は陰窩底部に位置する腸管上皮幹細胞により恒常性が維持されている。腸管上皮幹細胞は Lgr5 を特異的マーカー遺伝子として発現し、分化することでその発現は消失する。分化の初期段階では、転写因子である ATOH1 を発現することで分泌型腸管上皮細胞へ、HES1 を発現することで吸収型腸管上皮細胞への運命決定が成される。この分化制御機構は腸管上皮幹細胞を頂点とする一方向的な階層構造として説明されてきたが、近年、特定の細胞集団は上皮傷害時に幹細胞に脱分化する可能性があることが報告された。NGN3 陽性内分泌細胞、DLL1 陽性分泌型前駆細胞、DCLK1 陽性タフト細胞においてこの現象が報告されたが、これらはいずれも分泌型細胞に含まれる。また、長期間休止期に在る特異な分泌型前駆細胞も、上皮傷害時には幹細胞への脱分化能を有することが報告されている。これらの機能的解析結果に加え、近年 LGR5 陽性細胞のシングルセル解析で、非常に稀に LGR5$^{+}$ ATOH1$^{+}$細胞が存在する可能性が示され、ATOH1 陽性分泌型細胞の中に潜在的な幹細胞が含まれることが示唆された。しかしながら、この LGR5$^{+}$ATOH1$^{+}$細胞の恒常状態あるいは上皮傷害時における機能的解析は成されておらず、また ATOH1 陽性細胞の幹細胞への脱分化を制御する因子についても明らかにされていない。

この論文では、恒常状態においてマウス腸管上皮細胞に LGR5$^{+}$ATOH1$^{+}$細胞が存在することを同定し、恒常的に幹細胞へ脱分化し得ることを示している。さらに、ATOH1 陽性細胞は DSS 腸

炎環境下で脱分化能が増幅され、炎症性発癌においてはATOH1陽性細胞を由来とする腫瘍幹細胞が腫瘍内に存在することを明らかにしている。

＜方法＞

ATOH1 陽性細胞の系譜解析のために、Atoh1-cre$^{PGR}$マウスと Rosa-LSL-tdTomato マウスを交配し、Atoh1$^{tdTomato}$マウスを樹立した。ATOH1 陽性細胞の標識効率及び標識特異性を、ATOH1 タンパク、分泌型腸管上皮細胞マーカーの免疫染色により検証した。Single copy RNA in situ hybridization により Atoh1 mRNA、Lgr5 mRNA の腸管上皮細胞内での局在を可視化した。Atoh1$^{tdTomato}$マウスの系譜解析を行い、ATOH1 陽性細胞の脱分化の頻度を定量化した。Atoh1$^{tdTomato}$マウスを Lgr5-EGFP-IRES-cre$^{ERT2}$マウスと交配し、tdTomato$^{+}$EGFP$^{+}$細胞および tdTomato$^{-}$EGFP$^{+}$細胞を分取し、microarray により幹細胞性維持に関わる遺伝子群の発現解析を行った。腸管上皮体外培養系（オルガノイド）を用いて、ATOH1 陽性細胞の系譜解析を in vitro で行った。Atoh1$^{tdTomato}$マウスを用いて、DSS 腸炎環境下における ATOH1 陽性細胞の系譜解析を行った。DSS 腸炎回復期の tdTomato 陽性細胞を分取し、抽出した RNA を用いた microarray 解析により NFκB シグナル及び幹細胞性維持に関わる遺伝子群の発現解析を行った。Atoh1$^{tdTomato}$マウス由来大腸上皮オルガノイドを Notch 阻害剤により分泌型上皮細胞へ誘導し、NFκB シグナルの誘導による ATOH1 陽性細胞の系譜の変化を解析した。Atoh1$^{tdTomato}$マウスを用いて、AOM-DSS モデルにおいて ATOH1 陽性細胞の系譜解析を行った。ATOH1 陽性細胞を起源とする腫瘍腺管に腫瘍幹細胞が含まれるかどうか、single copy RNA in situ hybridization、免疫染色、オルガノイド構成能により評価した。さらに、ATOH1 陽性細胞を起源とする腫瘍腺管由来のオルガノイドを免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍再構築能を評価した。

＜結果＞

Atoh1$^{tdTomato}$マウスにおける ATOH1 陽性細胞の標識効率は小腸で 70%、大腸で 43%であった。全ての tdTomato 陽性細胞は ATOH1 を発現しており、分泌型腸管上皮細胞マーカータンパク（MUC2、CHGA、DCLK1、Lysozyme）を共発現する細胞を含んでいた。野生型マウスの single copy RNA in situ hybridization の結果、小腸、大腸いずれにおいても一定数の Lgr5$^{+}$Atoh1$^{+}$細胞が存在することが分かった。陰窩底部の細胞集団に発現するマーカータンパクである CD24 を用いて、Atoh1$^{tdTomato}$マウスの上皮細胞より陰窩底部の tdTomato 陽性細胞を CD24$^{high/mid}$tdTomato$^{+}$細胞として分取し、定量 PCR により解析すると、この分画において幹細胞マーカー遺伝子である Lgr5、Olfm4、Ascl2 の発現も認めた。

Atoh1$^{tdTomato}$マウスで Cre の誘導を 5 日間行い、その後 1 週間毎に ATOH1 陽性細胞の系譜解析を行ったところ、誘導後 6 日目には陰窩から絨毛にかけて tdTomato 陽性細胞は散在していたが、13 日目には tdTomato 陽性細胞が連続して陰窩から絨毛までを占拠し、20 日目にもこの像は残存していた。この連続した tdTomato 陽性細胞中には、免疫染色の結果、MUC2、CHGA、DCLK1、Villin、CA2、Lysozyme 陽性細胞を含み、全ての系譜細胞が存在することが分かった。さらに、Lgr5-EGFP-cre$^{ERT2}$マウスを Atoh1$^{tdTomato}$マウスと交配し、同様に ATOH1 陽性細胞の系譜解析を行うと、tdTomato で連続的に標識される細胞の中に EGFP を共発現する細胞を認めた。

tdTomato$^{+}$EGFP$^{+}$細胞と tdTomato$^{-}$EGFP$^{+}$細胞を分取し、幹細胞性維持に関わる遺伝子群に関して GSEA を行うと、この両細胞群間で差がないことが分かった。また、誘導後 20 日目に小腸、大腸それぞれの陰窩を単離すると、tdTomato で全体が標識されるオルガノイドを樹立可能であった。これらの結果より、系譜解析で観察された像は、ATOH1 陽性細胞を起源とするクローン（クローナルリボン）であると考えた。

Atoh1$^{tdTomato}$マウスに 3%DSS を 5 日間投与後、5 日間 Cre の誘導を行い、その後 1 週間毎に ATOH1 陽性細胞の系譜解析を行った。誘導後 6 日目に DSS 腸炎マウスにおいて、tdTomato 陽性細胞がコントロールマウスに比べ増加していた。Single copy RNA in situ hybridization の結果、Atoh1 mRNA の発現量に差はなく、Lgr5 mRNA の発現量は DSS 腸炎マウスにおいて減少していることが分かった。誘導後 13 日目の解析で、直腸粘膜に tdTomato で広範囲が標識される領域を認め、この部分の組織切片の解析で、潰瘍形成後の再生部位に一致して tdTomato 陽性クローナルリボンが形成されていた。誘導後 20 日目までの解析で、tdTomato 陽性クローナルリボンの形成頻度を定量化すると、誘導 6 日目、13 日目、20 日目各時点でコントロールマウスに比べ DSS 腸炎マウスで形成頻度が増加していた。誘導 6 日目に DSS 腸炎マウス、コントロールマウスそれぞれの tdTomato 陽性細胞を分取し microarray 解析を行うと、DSS 腸炎マウスにおいて高発現する遺伝子の一つとして Dll1 を同定した。誘導 6 日目の組織で DLL1 の免疫染色を行うと、DSS 腸炎マウスにおいて有意に DLL1 陽性細胞数が増加していた。Microarray データを用いた GSEA の結果、DSS 腸炎マウスの tdTomato 陽性細胞では NFκB シグナル及び幹細胞性維持に関わる遺伝子群が有意に発現亢進していた。Atoh1$^{tdTomato}$マウスの大腸上皮よりオルガノイドを樹立し、Notch 阻害剤（DBZ）の添加により分泌型上皮細胞へ分化誘導を行い、その 48 時間後に Cre の誘導を行うと同時に菌体成分（LPS、Flagellin）及びサイトカイン（TNFα、IL1β）の添加で NFκB シグナルの誘導を行ったところ、48 時間後に tdTomato で連続的に標識されるオルガノイドが形成された。NFκB シグナルの誘導と同時に特異的阻害剤である Piceatannol あるいは IMD0354 を添加すると、濃度依存性に tdTomato 陽性オルガノイドは形成されなくなった。Atoh1$^{tdTomato}$マウスで DSS 腸炎惹起後、Cre を 2 日間誘導後に tdTomato 陽性細胞を分取し、シングルセルからオルガノイドの形成効率を検証したところ、コントロールマウスに比べ DSS 腸炎マウスでは約 2.5 倍形成効率が高かった。

Atoh1$^{tdTomato}$マウスに AOM 投与後、3 週間毎に 5 日間ずつ 3%DSS を投与し、最後の DSS 腸炎投与後に Cre 誘導を行い、誘導直後及び 2 週間後に大腸腫瘍の解析を行った。Cre 誘導直後の解析では、腫瘍内には tdTomato で標識される細胞はわずかに存在するのみであったが、誘導 2 週間後には tdTomato で全体が標識される腫瘍腺管が出現した。Single copy RNA in situ hybridization の結果、tdTomato 陽性腫瘍腺管には Lgr5 陽性細胞を含んでおり、さらに免疫染色の結果、腫瘍幹細胞マーカータンパクである CD44、CD133 陽性細胞を含んでいた。tdTomato 陽性腫瘍腺管を由来とするオルガノイドを樹立し、Wnt3a 及び R-spondin-1 を含まない培地においても培養可能であった。tdTomato 陽性腫瘍腺管由来オルガノイドを免疫不全マウス（nude mouse）の皮下に移植したところ、腫瘍の再構築が可能であり、この腫瘍内には tdTomato 陽性細胞が維持されていた。

＜考察＞

ATOH1 陽性細胞が恒常状態において脱分化することを示した。Atoh1$^{tdTomato}$マウスは従来用い

られた系譜解析モデルに比べ、より広範囲の分泌型細胞を包括的に解析することが可能であり、特に大腸においてマウスあたり 1500～1800 個の tdTomato 陽性クローナルリボンを同定できた。従来存在が示唆されていた Lgr5$^{+}$Atoh1$^{+}$細胞を可視化することに成功し、恒常状態において潜在的な幹細胞能を持つ分泌型細胞の候補であると考えられる。

DSS 腸炎による大腸上皮傷害時にはATOH1 陽性細胞の脱分化の頻度が増加することを示した。小腸における放射線障害モデルにおいて、DLL1 陽性分泌型前駆細胞が幹細胞に脱分化することを示した既報とも矛盾しない。興味深いことに、DSS 腸炎の回復期において、Atoh1 の発現量は維持される一方で Lgr5 の発現量は減少しており、恒常状態では Lgr5$^{+}$Atoh1$^{+}$細胞が脱分化能を有する分泌型細胞の候補であるのに対して、DSS 腸炎環境下ではこの細胞とは異なる集団が関与している可能性が考えられる。DLL1 陽性細胞が DSS 腸炎回復期に増加することが分かり、大腸上皮修復の局面では DLL1 陽性分泌型細胞が脱分化能を有する細胞の有力な候補であると考えられた。また、炎症性発癌モデルにおいては、ATOH1 陽性細胞が腫瘍内で腫瘍幹細胞様細胞として振る舞うことを示した。恒常状態、大腸炎、炎症性発癌の各局面で、従来考えられてきた以上に分泌型細胞は幹細胞への可塑性を保持していることが分かり、恒常性維持および病態形成に深く関与していることが示唆された。

＜結論＞

ATOH1 陽性細胞が恒常状態、大腸炎、炎症性発癌の各局面で幹細胞への可塑性を示すことが分かった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5376　号 | 石橋　史明 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田賀 哲也<br>副　査　江石 義信　樗木 俊聡 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、遺伝子改変マウスを用いたマーキング法等により、ATOH1 陽性分泌型上皮細胞が腸管上皮幹細胞に脱分化すること、および炎症性発癌モデで ATOH1 陽性細胞に由来する癌幹細胞が存在することを示すとともに、その臨床的意義を論じたものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

遺伝子変マウスを用いて ATOH1 陽性細胞を起源とする細胞をマーキングするなどにより ATOH1 陽性分泌型上皮細胞の挙動解析に取り組み、その脱分化を観察し、また発癌モデルで幹細胞性を有するに至ることを明らかにした点で、本研究の目的は先駆性・独創性のいずれにおいても高い。

２）社会的意義

モデルマウスを用いて腸管上皮の恒常性維持機構の一部に ATOH1 陽性分泌型上皮細胞の幹細胞への脱分化が関わることを示唆し、さらに炎症性発癌における癌幹細胞が ATOH1 陽性細胞由来であることを示唆した点で、社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

モデルマウスを適切に用い、また、倫理的は考察もなされている。

４）考察・今後の発展性

本論文は今後開発的研究へ展開できる可能性を示唆するものであり、今後の発展が期待される。

**３．審査結果**

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 足立　雄太 |
| 論文審査担当者 | 主査　稲澤　譲治<br>副査　大久保　憲一、三宅　智 |
| 論　文　題　目 | Resistance mediated by alternative receptor tyrosine kinases in FGFR1-amplified lung cancer |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

固形癌患者に対する汎 FGFR 阻害薬の早期臨床試験において *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌患者では良好なレスポンスが得られていない。本研究は *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌における FGFR 阻害薬の耐性メカニズムについて受容体型チロシンキナーゼ(Receptor Tyrosine Kinase：RTK)の役割を同定した。FGFR1 と異なる RTK は PI3K-AKT 経路を優位に活性化し、また MAPK 経路の再活性化にも寄与していた。この現象は FGFR 阻害薬に対して初期耐性を有する細胞株だけでなく、感受性細胞株または獲得耐性株についても認められ、FGFR 阻害薬に対する耐性をもたらしていた。*FGFR1* 遺伝子増幅肺癌における PI3K-AKT 経路の活性化は FGFR1 とは異なる RTK の存在を示唆し、FGFR 阻害薬に対する患者選択の指標になり得る。

＜緒言＞

線維芽細胞増殖因子受容体(Fibroblast Growth Factor Receptor :FGFR)経路は発生、血管新生などの過程における細胞の増殖、分化に重要である。その一方で *FGFR* 遺伝子異常は悪性腫瘍との関連も注目され、*FGFR1* 遺伝子増幅は肺扁平上皮癌患者の約 20%に確認されている。前臨床における報告では *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌細胞株は FGFR 経路に依存し、in vivo での検討でも優れた効果を示していた。しかしながら *FGFR1* 遺伝子増幅肺扁平上皮癌患者に対して汎 FGFR 阻害薬が投与された第 I 相試験では薬剤反応性は乏しい傾向にあった。過去に *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌細胞株において FGFR 阻害薬が奏功するためには遺伝子増幅に加え蛋白質発現が必要であることが報告されているが、*FGFR1* 遺伝子増幅が原発性肺癌において治療標的となりうるかどうかは依然として不明である。

＜方法＞

*FGFR1* 遺伝子増幅肺癌細胞株として NCI-H1581、DMS-114、NCI-H520、NCI-H1703、Calu-3、および HCC95 を使用した。これらの細胞株におけるシグナル活性化については Western Blot を、細胞増殖抑制効果は Cell Couting Kit を用いて解析した。また FGFR1 と相互作用する蛋白同定のために抗 FGFR1 抗体による免疫沈降を、及び PI3K-AKT 経路の活性化因子を検索するた

めに PI3K の制御性サブユニットである p85 に対する抗体による免疫沈降を行った。NCI-H1581 に汎 FGFR 阻害薬である PD173074 または BGJ398 1nM から 1μM まで段階的に曝露させることにより FGFR 阻害薬獲得耐性株を作成した。獲得耐性株の耐性化機序については Western Blot に加え RTK array、FISH、定量的 PCR、免疫蛍光染色を用いて解析した。

＜結果＞

*FGFR1* 遺伝子増幅肺癌細胞株における BGJ398 投与下の下流シグナルの抑制効果を検討した結果、FGFR 阻害薬感受性株である NCI-H1581 では AKT リン酸化の活性化に乏しく、ERK リン酸化は持続的に抑制されていた。一方でその他の細胞株では PI3K-AKT 経路の活性化は維持されていたが、ERK リン酸化は HCC95 を除き、一時的な抑制は認めたが、長期曝露では再活性化が認められた。またその再活性化の程度は FGFR 阻害薬に対する感受性と相関していた。

次に FGFR1 蛋白発現の低い HCC95 及び NCI-H1703 において MAPK 経路が再活性化するメカニズムを解析した。HCC95 では ERBB3 が、NCI-H1703 では PDGFRα が FGFR1 とは異なる RTK として下流シグナルの活性化に寄与していることが過去に報告されており、siRNA による ERBB3、PDGFR α の knockdown は、AKT リン酸化に加え、ERK リン酸化も抑制した。また各々のチロシンキナーゼ阻害薬である Lapatinib 及び Imatinib を FGFR 阻害薬と共に使用したところ PI3K-AKT 経路が抑制されることに加え、MAPK の再活性化も抑制された。NCI-H1703 における FGFR1 と PDGFRα の相互作用を検索するために抗 FGFR1 抗体による免疫沈降を行った結果、PDGFRα と FGFR1 の結合が確認された。以上から FGFR1 蛋白発現の低い細胞株では FGFR1 と異なる RTK からのシグナルにより MAPK が再活性化され耐性が誘導されていた。

FGFR1 蛋白発現が高い DMS-114 は FGFR 阻害薬感受性株であるが、FGFR 阻害薬曝露後も AKT リン酸化は維持されており、ERK リン酸化の再活性化も認められたことから、FGFR1 と異なる RTK が活性化している可能性が示唆された。PI3K-AKT 経路を活性化する蛋白を同定するために抗 p85 抗体による免疫沈降を行った結果、160kDa 付近に結合蛋白を認め、IGFR のアダプター蛋白である IRS４であることを同定した。IRS4 の knockdown を行うと、AKT リン酸化が抑制されるとともに ERK リン酸化の低下も認められ、FGFR 阻害薬との併用で MAPK の再活性化が抑制された。上記の現象は IGFR 阻害薬である Linsitinib においても確認され、また FGFR 阻害薬と IGFR 阻害薬を組み合わせることで増殖抑制及びアポトーシスが単剤と比較し強く誘導された。このように FGFR 阻害薬感受性である細胞株においても FGFR1 と異なる RTK の存在が確認され、下流シグナルの活性化に寄与していた。

次に NCI-H1581 を用い PD173074 に対する獲得耐性株(PD resistant cells :PDR)を作成し下流シグナルを検討した結果、親株と比較し FGFR 阻害薬曝露後に MAPK 経路が再活性化しており、PI3K-AKT 経路が活性化していた。抗 p85 抗体による免疫沈降では PDR において 110Kda 付近に結合蛋白が確認され、GAB1 の knockdown によりその結合が解除された。また PDR における GAB1 の knockdown により AKT リン酸化だけでなく ERK リン酸化の低下も認められ、FGFR 阻害薬を追加することで ERK リン酸化が完全に抑制された。以上から GAB1 をアダプターとして FGFR1 と異なる RTK がクロストークを行うことで下流シグナルを活性化していると考えられた。PI3K-AKT 経路を活性化している RTK を解析するために phosphoRTK array を行っ

た結果、親株と比較し獲得耐性株では cMET 経路が活性化していた。同様の現象は異なる FGFR 阻害薬である BGJ398 に対する耐性株(BGR)でも認められた。また FGFR 阻害薬及び MET 阻害薬(Crizotinib、JNJ-38877605)の使用により増殖抑制及びアポトーシスが単剤と比較し強く誘導された。最後に獲得耐性細胞における cMET 経路活性化のメカニズムを検討した。FISH、定量的 PCR による遺伝子コピー数の解析では *MET* 遺伝子増幅は認められなかった。一方で FGFR 阻害薬低濃度耐性株においても *MET* 遺伝子発現は上昇していたことから、親株について検討したところ遺伝子発現を定量的 PCR で確認した。NCI-H1581 親株に対して cMET 蛋白の蛍光組織染色を行った結果、cMET 蛋白を発現するサブクローンが非常に少ない頻度で認められ(0.33%)、このサブクローンが FGFR 阻害薬により選択されることで耐性を獲得すると考えられた。

＜考察＞

本研究により *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌細胞株では FGFR1 と異なる RTK が PI3K-AKT 経路及び MAPK 経路を活性化することで FGFR 阻害薬に対する耐性を誘導していることが明らかとなった。また *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌細胞株において遺伝子増幅に加え蛋白質発現が FGFR 阻害薬が奏功するために必要であることが報告されているが、本研究から FGFR1 蛋白質の発現レベルにかかわらず、PI3K-AKT 経路が活性化している *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌では FGFR1 と異なる RTK が下流シグナルの活性化に寄与し、耐性化を誘導する可能性が示唆された。FGFR 阻害薬感受性 NCI-H1581 細胞株では FGFR1 は唯一活性化された RTK であるため MAPK 経路は FGFR1 に依存しており、また PI3K-AKT 経路の活性化にも乏しかった。しかしながら、その獲得耐性株においても FGFR1 と異なる RTK である cMET が PI3K-AKT 経路を活性化し、MAPK 経路を再活性化させていた。以上から PI3K-AKT 経路の活性化状態の評価が FGFR 阻害薬に対する感受性に結び付く可能性が考えられた。また *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌において FGFR 阻害薬および RTK 阻害薬を組み合わせることは有効であり得るが、本研究から様々な RTK が関与している可能性があり、その臨床的応用は困難であると考えられた。

＜結論＞

*FGFR1* 遺伝子増幅肺癌では FGFR1 と異なる RTK が PI3K-AKT 経路を優位に活性化し、また MAPK 経路を再活性化することで FGFR 阻害薬に対する耐性を誘導していた。*FGFR1* 遺伝子増幅肺癌における PI3K-AKT 経路の活性化は FGFR 阻害薬感受性の指標になり得る。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5377　号 | 足立　雄太 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　稲澤　譲治<br>副　査　大久保　憲一、三宅　智 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、*FGFR1* 遺伝子増幅肺癌における FGFR 阻害薬の耐性メカニズムについて受容体型チロシンキナーゼ(Receptor Tyrosine Kinase : RTK)と下流シグナルの役割を明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

*FGFR1* 遺伝子増幅は肺扁平上皮癌患者の約 20%に確認されている。前臨床試験の結果では *FGFR1* 遺伝子増幅肺癌細胞株は FGFR 経路に依存し、in vivo での検討でも優れた効果を示した。しかし、*FGFR1* 遺伝子増幅肺扁平上皮癌患者に対する第 I 相試験では必ずしも良好な結果が得られていない。このような背景のもと本研究では、FGFR 阻害薬に対して初期耐性や感受性株、さらに耐性獲得亜株など種々の肺癌細胞株を用いて、FGFR を含む種々の受容体型チロシンキナーゼ(Receptor Tyrosine Kinase : RTK)とそれら下流シグナルを詳細に解析した。その結果、*FGFR1* 増幅肺癌細胞株では FGFR1 とは異なる RTK が、PI3K-AKT 経路及び MAPK 経路のクロストークによって活性化され FGFR 阻害薬耐性が誘導されることが明らかになった.

以上より本研究は、FGFR 阻害薬の肺癌細胞株における耐性メカニズムについて RTK の役割の解明を試みた先駆的な内容であり，FGFR 阻害薬の耐性を克服の戦略においても独創的かつ重要な知見が得られている。

２）社会的意義

FGFR 阻害薬は肺癌を含む難治性固形癌の分子標的薬として期待されており、当該研究で明らかになった FGFR 阻害薬の耐性メカニズムの詳細は、当該治療効果患者群の層別化などにも重要な情報を提供するものであり社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

申請者は呼吸器内科医として豊富な肺癌化学療法の臨床を経験しており、それを基盤に新規 FGFR 阻害薬の耐性機構の解明研究を実施した。高い倫理観のもと適正な研究方法が用いられた。

４）考察・今後の発展性

*FGFR1* 遺伝子増幅肺癌において FGFR 阻害薬および RTK 阻害薬を組み合わせることは理論的には有効であり得る。しかし、本研究から様々な RTK が関与している可能性が明らかになったことから、その臨床的応用は比較的困難であるとことが示唆された。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分に価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 松村　惠津子 |
| 論文審査担当者 | 主査　田賀　哲也<br>副査　秋田　恵一、江面　陽一 |
| 論　文　題　目 | Pretreatment with IL-1β enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells |

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

我々は、滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜MSCs）を軟骨・半月板の再生を目的に臨床試験で用いている。より良好な成績を得るためには、限られた培養期間で高い軟骨分化能を有するより多くの細胞を確保することが望ましい。IL-1βは線維芽細胞の増殖を支持することが知られており、IL-1βが滑膜MSCsの増殖促進因子として作用すると考え、IL-1βの前投与が滑膜MSCsの増殖・軟骨分化に与える影響を調べた。滑膜MSCs(P1)を播種し、IL-1β（$10^{-13}$、$10^{-12}$、$10^{-11}$、$10^{-10}$、$10^{-9}$、$10^{-8}$g/ml）存在下及び非存在下で14日間培養し細胞増殖及び軟骨分化能を比較した。また、IL-1β刺激による幹細胞の性質の変化を表面抗原の陽性率変化及びサイトカイン発現量を用いて解析した。細胞数はIL-1βの濃度依存性に増加し、軟骨塊の大きさはIL-1βを$10^{-11}$もしくは$10^{-10}$g/ml添加群において極大となり$10^{-8}$g/ml添加群は全例減少した。サフラニンO染色は$10^{-10}$g/ml添加群が最も染色性が強かった。細胞溶解液中のIL-6、IL-8濃度は増加したがPDGF等の既知のMSCs増殖因子の発現量に変化はなかった。IL-1βを前投与した滑膜MSCsは細胞増殖を亢進させるだけではなく、軟骨分化能も促進させ至適濃度があることが示唆された。今後メカニズムとin vivoの検討が必要であるが、滑膜MSCsを用いた再生医療への応用へ期待できる。

〈緒言〉

ヒトの関節疾患を対象として、骨髄、滑膜、脂肪、筋肉由来の間葉幹細胞を用いた関節軟骨の再生研究や軟骨再生を目指した臨床研究が行われている。中でも滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜MSCs）は、高い軟骨分化能を持つことから軟骨や半月板再生において魅力的な細胞源と考えられている。私たちは、軟骨・半月板の再生を目的として滑膜MSCsの臨床応用を試みており、関節軟骨疾患を対象とした研究で良好な成績をあげている。軟骨再生医療の効率をあげ、より良い成績を目指すには、限られた培養期間で軟骨分化能が高い多くの細胞を確保することが望ましい。

IL-1βは、炎症の場の形成、痛みの誘発、自己免疫反応の活性化を行うPro-inflammatory cytokineである。ヒト軟骨細胞において炎症性サイトカイン（IL-6, IL-8,MCP-1, RANTES等）の発現を上昇させること、軟骨細胞をアポトーシスに導くことが報告されている。IL-1βは、関節リウマチ（RA）や変形性膝関節症（OA）の増悪因子であることから、その作用の拮抗による症状改善効

果を期待した研究が行われてきた。また、RAやOA様変化を誘導する試薬として研究に使用されてきた。

本研究とは異なる研究において、滑膜MSCsに対するIL-1βの細胞障害性を検討する目的で、IL-1β存在下での滑膜MSCsの培養を行なったところ、細胞増殖の亢進されることを見出した。また、我々は過去に前十字靭帯靭帯損傷と半月板損傷後の関節液中に滑膜MSCsの増殖が亢進すること報告している。さらに関節炎を誘発することで、マウスの滑膜MSCsを効率よく回収できることを報告している。これらの結果から、関節炎症時に関節液中に誘導されるIL-1βが滑膜MSCsの細胞増殖を亢進させるとの仮説をたた。本研究では、IL-1βの前投与が滑膜MSCsの増殖・分化能に与える影響を検討した。

〈方法〉

本学倫理委員会の承認（承認番号2121）後、変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術を施行する患者の同意を得て、術後に廃棄される滑膜組織を使用した。採取した滑膜組織をコラゲナーゼ処理し滑膜MSCs(P0)を14日間培養後、継代した滑膜MSCs(P1)を60cm$^2$ディッシュに10$^4$細胞で再播種し、10％FBS添加αMEM培地にIL-1βを添加しないコントロール群とIL-1βを添加した群（10$^{-13}$、10$^{-12}$、10$^{-11}$、10$^{-10}$、10$^{-9}$、10$^{-8}$g/ml 添加）全7群に分けて培養した。14日間培養後、細胞数とクリスタルバイオレット染色で細胞増殖能を比較した。軟骨分化能は、滑膜MSCs(P1)をIL-1β添加しないコントロール群とIL-1βを添加した群で14日間培養後、細胞数を揃え軟骨分化誘導培地に変え21日間培養を行なった。その後軟骨塊の重量を計測し組織学的に検討した。さらに、増殖能と分化能を共に亢進させたIL-1βの濃度10$^{-10}$、10$^{-9}$g/mlの２条件を選択し、コントロール群と合わせ3群間で多分化能の比較とMSCs表面抗原発現分析（フローサイトメトリー）、ケモカインや成長因子を含む102種類のサイトカインを特定できるサイトカインアレイを用いてそれぞれ比較した。

〈結果〉

クリスタルバイオレット染色は、IL-1β濃度依存性にコロニーの染色性の亢進を認め、細胞数は10-$^{10}$g/mlより有意に増加し、濃度依存性に増加し10$^{-8}$g/mlで最大となった。軟骨塊の重量は、IL-1βを10$^{-13}$と10$^{-8}$ g/ml添加した群はコントロールと差を認めなかったが、10$^{-12}$、10$^{-11}$、10$^{-10}$、10$^{-9}$g/ml添加した群は重量が増大し、10$^{-11}$g/ml添加群が最大となった。IL-1βを10$^{-8}$g/mlの高濃度を添加したものは全ての例において軟骨塊の重量、大きさは減少した。コントロール群と比較し10$^{-8}$ g/ml添加した群はトルイジンブルー染色でメタクロマジーを示したことから軟骨基質の産生が確認されたが、サフラニンO染色では軟骨基質が赤く染色されず、中心部はほとんどプロテオグリカンの蓄積は観察されなかった。7群比較の結果、IL-1βを前投与した滑膜MSCsの細胞増殖・軟骨分化能には、至適濃度が存在するがその濃度にはドナー間差があることが示唆された。細胞増殖及び軟骨塊形成を共に有意に亢進したIL-1β濃度は、10-$^{10}$、10-$^{9}$g/mlの2群であった。次に、IL-1β添加によるMSC関連表面抗原の陽性率の変化を検討した結果、コントロール群に対してIL-1β添加群において発現量が有意に減少したマーカーはCD73、CD106、CD140b、SSEA3、CD271、CD34であった。一方で、有意に増加したマーカーはCD146であった。全細胞からMSCの性質を示す代表的なマーカーであるCD45陰性,CD44, 73, 90, 105陽性の条件を同時に満たす細胞の割合は、コントロー

ル群97.5％、IL-1βを$10^{-10}$ g/ml添加した群は93.5％、$10^{-9}$g/ml添加した群は85.3％であった。IL-1βを$10^{-10}$ g/ml添加した群よりも$10^{-9}$g/ml添加した群ではやや下がる傾向にあった。プロテインアレイを用いたサイトカイン発現量解析は、4人のドナー間でばらつきを認めたが、共通した結果としてENA-78、IL-6、IL-8がIL-1β前投与量に濃度依存性に増加傾向で、TNFα、IFNγは変化を認めなかった。IL-6と細胞数、軟骨重量に弱～中等度の相関を認め、IL-8と軟骨重量は弱い相関を認めた。

〈考察〉

IL-1βを$10^{-10}$～$10^{-8}$g/ml添加することにより滑膜MSCsの細胞増殖能は増大し、培養後回収される細胞数は4倍以上になった。またIL-1βを$10^{-13}$～$10^{-9}$g/ml添加するとドナー間差があるものの軟骨塊の形成が亢進されることを示した。これらは、IL-1βが至適濃度を持って滑膜MSCsの増殖性及び同化作用の両方を有することを示唆している。IL-1βに対するドナー間差を検討することは、今後、幹細胞の増殖、分化のメカニズムの解明、さらに臨床応用において幹細胞治療の質の安定化、均一化に貢献できると考える。

MSCs関連表面抗原発現解析の結果は、MSCsの必要最小限の細胞表面マーカー（CD45 - CD90 + CD44 + CD105 + CD73+）に適合する細胞集団が、コントロール群と比較しIL-1βを$10^{-10}$、$10^{-9}$g/ml添加群で減少することを示している。この理由は不明であるが、IL-1βによる急速な細胞増殖が細胞の接触阻害を引き起こしたことに起因する可能性を考えている。これまでの研究で、細胞に対するIL-1βの影響は、添加より8時間から72時間の間に最大であったことが報告されているが、本研究では、臨床応用を反映するためにIL-1βを投与し14日後の細胞溶解液を使用しサイトカインアレイ分析を行った。サイトカインアレイの結果は、ケモカインファミリーのみ含有量を増加させたが、軟骨細胞およびMSCsの増殖を誘導することが報告されているINFγ、TNFαおよびbFGFは不変であった。IL-6と細胞数、軟骨重量の間に正の相関の傾向が観察されたことは、IL-6は骨髄由来MSCsの増殖および未分化状態を維持するという過去の報告と合致する。

本研究の限界として、滑膜MSCsのみで観察される現象である可能性があるため、細胞増殖の分子メカニズムの解明が必要である。また、滑膜MSCsのin vivo適用におけるIL-1β前投与の有効性の解明も欠いているため動物実験を用いた検討も必要である。今後、滑膜MSCsを用いた再生医療の最適化にさらなる研究が必要である。

〈結論〉

IL-1βの前投与は滑膜MSCsの増殖・軟骨分化能を亢進させた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5378　号 | 松村　惠津子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田賀　哲也<br>副　査　秋田　恵一、江面　陽一 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、滑膜由来間葉系幹細胞に対する IL1-β の増殖作用および分化への影響を検討し、至適濃度を報告するとともに今後の展望について論じたものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者は IL1-β が線維芽細胞の増殖を支持する一方で滑膜由来間葉系幹細胞への増殖効果が未解明であった点に取り組み、至適濃度を見出すとともに分化能への影響の観点から間葉系幹細胞移植治療における応用への可能性を考察した点で、研究目的の先駆性と独創性は高い。

２）社会的意義

本研究は膝関節軟骨欠損や半月板損傷の治療に用いるための滑膜由来間葉系細胞の調製法に関わる課題に一定の示唆を与えた点で社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

本研究は、申請者が立てた仮説に基づいて設定した適切な実験方法により組み立てられており、また承認を得た上で倫理的配慮の下で行われている。

４）考察・今後の発展性

本論文はその今後の臨床応用に向けた研究における可能性や問題点の双方を考察しており、今後の開発的研究への発展が期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 田村　律人 |
| 論文審査担当者 | 主査　清水　重臣<br>副査　畑　裕　、荒川　博文 |
| 論　文　題　目 | Differential requirement for ATG2A domains for localization to autophagic membranes and lipid droplets |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ATG2 はオートファジーに必須であり、隔離膜に局在する。しかしながら、ATG2 のオートファゴソーム形成における機能は未だ明らかにされていない。本研究では ATG2A の局在および機能に関与する領域の同定を試みた。我々はこれまでに ATG2A が隔離膜だけでなく、脂肪滴にも局在することを報告し、隔離膜と脂肪滴の両方への局在に必須な領域を同定している。今回、この領域中に隔離膜及び脂肪滴局在に関与する両親媒性αヘリックスを同定した。この領域に加え、ATG2A の二次構造は、N 末端領域、C 末端領域が進化的に高度に保存されている。これらの保存領域欠損変異体を用いた解析から、N 末端領域は ATG2A の隔離膜局在に必要であり、C 末端領域は脂肪滴への局在に関与することを見出した。また C 末端領域はオートファジーには必要でないことも明らかにした。以上の結果から、２つのオルガネラへの局在には ATG2A の異なる領域が関与することが示唆された。

＜序論＞

オートファジーは酵母から哺乳類まで高度に保存された細胞内分解系の一つである。オートファジーが誘導されると細胞質内に隔離膜が形成され、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体に成熟する。オートファゴソーム形成は隔離膜上に集積する autophagy-related（ATG）タンパク質群により駆動される。ATG2 はホスファチジルイノシトール３リン酸への結合能をもつ WIPI と結合し、隔離膜に局在する。しかしながら、ATG2 はオートファジーに必須であるが、オートファゴソーム形成における詳細な分子機能は不明である。我々はこれまでに ATG2A は隔離膜だけでなく、脂肪滴上にも局在し、ATG2A の隔離膜及び脂肪滴局在に必須な領域（1723—1829 アミノ酸）を同定している。この領域に加え、ATG2A の N 末端領域（1—198 アミノ酸）および C 末端領域（1829—1938 アミノ酸）は進化的に高度に保存されており、VPS13 ファミリーと高い相同性を示す。VPS13 はオルガネラ間のコンタクトサイトに局在に、オルガネラ膜のリン脂質量の維持に関与することが知られている。しかしながら、これらの保存領域が ATG2A の局在および機能に関与するかどうかは不明であった。本研究では、哺乳類ホモログ *ATG2A* および *ATG2B* をノックアウトした細胞を樹立し、領域欠損変異体を用いた解析を行い、ATG2A の局在および機能

に必要な領域を同定した。

＜方法＞

CRISPR/Cas9 法により human *ATG2A/B* または mouse *Atg2a/b* をノックアウトした HeLa 細胞およびマウス胎児線維芽細胞をそれぞれ樹立した。これらの細胞に進化的に保存された領域を欠損した変異体を安定発現させ、オートファジー分解活性を検証した。また各変異体の細胞内局在も検証した。隔離膜及び脂肪滴局在に必須な領域（1723—1829 アミノ酸）中の両親媒性αヘリックスの予想には helical wheel プロット（Heliquest）および二次構造予測（psipred）を用いた。

＜結果＞

*ATG2A/B* DKO 細胞の樹立

哺乳類では *ATG2A* と *ATG2B* の 2 つのホモログが存在する。CRISPR/Cas9 法により *ATG2A/B* ダブルノックアウト細胞を樹立した。*ATG2A* または *ATG2B* 単独ノックアウト細胞ではオートファジー分解は抑制されないが、*ATG2A/B* ダブルノックアウト細胞はオートファジー分解が抑制された。以上から ATG2 はオートファジーに必須であり、ATG2A と ATG2B は重複した機能を有することが示された。この結果は我々がこれまでに報告していた *ATG2A/B* ノックダウン細胞の結果と一致した。

ATG2 は隔離膜の伸長に関与する

野生型細胞では ATG 分子はオートファゴソームマーカータンパク質である LC3 と共局在した。*ATG2A/B* ダブルノックアウト細胞では、ほぼすべての ATG タンパク質が野生型よりも大きな構造体を形成し、LC3 陽性の構造体周辺に蓄積した。蓄積した構造体を電子顕微鏡で観察した結果、*ATG2A/B* ダブルノックアウト細胞では野生型細胞では観察されたようなオートファゴソーム様構造体やオートリソソーム様構造体は観察されなかったが、小胞体膜で囲まれた領域内にオートファジー分解基質や LC3 陽性の小胞が高頻度に観察された。よって *ATG2A/B* ダブルノックアウト細胞では、ATG タンパク質の集積は観察されるが、オートファゴソーム様構造体が観察されないことから、ATG2 は隔離膜の伸長に関与すると考えられた。

ATG2A の N 末端領域は隔離膜への局在に必要であり、C 末端領域は脂肪滴への局在に必要である

ATG2A の機能領域を同定するため、進化的に保存され、かつ VPS13 ファミリーと高い相同性を示す N 末端領域 (1-198 アミノ酸) および C 末端領域 (1830-1938 アミノ酸) を欠損した変異体を作製した。これらの変異体を *ATG2A/B* ダブルノックアウト細胞に安定発現させた結果、N 末端領域欠損体はオートファジー活性を相補しなかったが、C 末端領域欠損体はオートファジー活性を相補した。予想外なことに進化的保存度が高く、VPS13 との相同性が高い C 末端領域はオートファジーには必要でないことが明らかとなった。また領域欠損変異体の細胞内局在を観察した結果、N 末端領域欠損体は脂肪滴にのみ局在し、C 末端欠損体は隔離膜にのみ局在した。以上の結果から、N 末端領域は隔離膜への局在に必要であり、C 末端領域は脂肪滴への局在に関与するが、オートファジーには必須でないことが示された。

両親媒性 α ヘリックスを介して、ATG2A は隔離膜及び脂肪滴に局在する。

われわれはこれまでに ATG2A の 1723—1829 アミノ酸領域が隔離膜及び脂肪滴への局在に必須

であることを報告している。本研究で、この領域中に両親媒性 α ヘリックスモチーフを予想した。両親媒性 α ヘリックス中の疎水性アミノ酸をグルタミン酸に置換した変異体は、細胞内で隔離膜にも脂肪滴にも局在しなかった。またこの変異体は *ATG2A/B* ダブルノックアウト細胞ではオートファジー分解活性を相補しなかった。従って、ATG2A は 1723—1829 アミノ酸領域中の両親媒性 α ヘリックスを介して、隔離膜及び脂肪滴に局在すると考えられる。

＜考察＞

本研究では *ATG2A/B* ダブルノックアウト細胞を新規に樹立し、表現型解析を行った。また ATG2A の領域欠損変異体を用いて進化的に保存された N 末端領域と C 末端領域はそれぞれ異なるオルガネラへの局在に必要であることを示した。しかし、2 つの領域がどのようにして局在を制御しているかは不明である。アミノ酸相同性が高い VPS13 の N 末端領域および C 末端領域は特定のリン脂質への親和性を持ち、膜結合を示すことが報告されている。そのため ATG2A も同様にそれぞれのオルガネラの脂質膜を認識している可能性が考えられる。

最近､他のグループより ATG2 と結合タンパク質である WIPI 4 との複合体の構造が報告された。この論文中では ATG2 と WIPI4 の結合モチーフも同定されている。今後、ATG2 と WIPI4 の関係性を明らかにする必要がある。また *in vitro* リポソーム実験から ATG2 が膜同士の係留タンパク質として機能することが示唆されている。しかしながら、オートファゴソーム形成において ATG2 の膜係留機能が機能するかは不明である。よって in vivo での検証が必須である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5379　号 | 田村　律人 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　清水　重臣<br>副　査　畑　裕、荒川　博文 | |

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は、オートファジー実行分子である ATG2A/2B に関して、そのオートファジーにおける分子機能ならびに脂肪滴合成における関与を明らかにしたものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

ATG2はオートファジーの必須分子であり隔離膜に局在することが知られている。しかしながら、その分子機能は明らかにされていなかった。本研究は、ATG2A/B両欠損細胞を作成して、ATG2分子がオートファジーの隔離膜形成に必要であること、また脂肪滴合成に関わっていることを明らかにしたもので高く評価できる。

２）社会的意義

本研究で申請者が提示した主な結果は以下の通りである。

1. Crispr/Cas9を用いて作製したATG2A/B両欠損細胞の解析から、両遺伝子を欠損すると飢餓誘導によるオートファジーが実行されなくなることを見出した。
2. ATG2A/B 両欠損細胞に飢餓誘導をかけると、FIP200, ATG9A, WIPI2 などの斑状集積が顕著になることを見いだした。即ち、オートファジー機構における ATG2A/B の作用点は、これらのオートファジー関連分子の下流であるものと思われた。また、電子顕微鏡解析から、ATG2A/B は隔離膜の正常な伸長に必要であることが判明した。
3. ATG2A分子はオートファジーの隔離膜に局在するほか、脂肪滴にも局在するが、前者の局在にはATG2A分子のN末端が、後者の局在にはATG2A分子のC末端が重要であることを見出した。

３）研究方法・倫理観

本研究の遂行には、分子生物学、細胞生物学、超微形態学などの知識が必要であり、申請者の学識と技術力が伺える。

４）考察・今後の発展性

本論文は、今まで不明であったATG2分子の機能を明らかにしたもので、オートファジー研究ならびに脂質研究の面で重要な研究である。

３．その他　なし

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 井上　雅人 |
| 論文審査担当者 | 主査　大友　康裕<br>副査　前原　健寿、立石　宇貴秀 |
| 論　文　題　目 | Specific Factors to Predict Large Vessel Occlusion in Acute Stroke Patients |

（論文内容の要旨）

【背景】

近年、脳梗塞急性期における血栓回収術の有用性が確立されたが、全ての救急施設で実施可能というわけではなく、脳主幹動脈閉塞（LVO：Large Vessel Occlusion）を早期に判断する必要がある。【目的】LVO 例に特有の因子を選別する。【方法】当院で 2014 年 7 月から 2016 年 6 月の期間に脳梗塞又は脳出血と診断され、NIHSS 8 点以上で発症 6 時間以内に来院した患者を対象とした。LVO 群と非 LVO 群に分け、背景因子、発症形式、NIHSS 各項目、来院時血圧を後方視的に検討した。選別された因子を過去に報告された LVO 予測スケールと比較した。　【結果】期間内の脳卒中患者は 722 症例で、NIHSS8 以上かつ 6 時間以内の来院症例 196 例（脳梗塞 79 例、脳出血 117 例）、そのうち LVO 例は 56 例であり、心房細動あり、収縮期血圧 170mmHg 以下の 2 項目が LVO 群に有意に多かった。 この 2 項目は既存の LVO 予測スケールと同等の予測ができた。【結論】救急隊から脳卒中疑いの搬送依頼を受けたときに、心房細動の既往、収縮期血圧を確認することで LVO 予測精度をさらに上げることができる。

【緒言】

近年、脳主幹動脈閉塞（LVO）による脳梗塞患者では経静脈的血栓溶解療法だけではなく、血栓回収術を行うことがより良い転帰につながることが明らかとなった。より早く治療を行うことがより良い転帰をもたらすことも明らかとなっている。このため、LVO の有無を早期に予測することが望まれる。救急隊は病院前脳卒中スケールを用いて初期診療にあたっているが、このスケールから脳出血か脳梗塞かを区別することは難しい。そこで来院時の患者情報を解析し LVO を予測する因子を検討した。

【対象と方法】

当院で 2014 年 7 月から 2016 年 6 月の期間に脳卒中（脳梗塞または脳出血のみとし、くも膜下出血は除外）と診断され、NIHSS8 以上で発症 6 時間以内に来院した患者を対象とした。脳主幹動脈閉塞の定義は頭部 CTA または MRA にて確認された内頚動脈閉塞、中大脳動脈 M1 または M2 閉塞、脳底動脈閉塞とし、M3 以遠の閉塞や後大脳動脈閉塞は含めなかった。発症時間不明の

症例は最終未発症時刻から 6 時間以内に病院に到着した症例を対象とした。対象を LVO 群と非 LVO 群に分け、年齢、性別、発症形式、既往歴、生活歴、脳卒中の家族歴、内服歴、NIHSS の各項目、来院時血圧を後方視的に比較検討した。連続変数に有意差がある場合、ROC 曲線から最適な閾値を定め比較検討を行った。対象患者について過去に報告された脳卒中予測スケールである CPSS と LVO 予測スケールである 3ISS、RACE、CPSSS、PASS、FAST-ED、NIHSS-8 の各スケールについて点数を算出し比較を行った。

【結果】

期間内に 722 例の脳卒中（脳梗塞または脳出血のみとし、くも膜下出血は除外）が入院した。722 例のうち脳出血が 261 例、脳梗塞が 461 例であった。そのうち発症から 6 時間以内に病院に到着した症例は 423 例で、脳出血 201 例、脳梗塞 222 例であった。6 時間以内に病院に到着した症例のうち NIHSS8 以上の症例は 196 例で、脳出血 117 例、脳梗塞 79 例であった。この 196 例のうち LVO 症例が 56 例、非 LVO 症例が 140 例であった。

LVO 群と非 LVO 群で年齢、性別、突然発症かどうかについては、有意差を認めなかった。既往歴について、脳梗塞、高血圧、糖尿病、腎疾患、維持透析は両群で有意差を認めなかった。心房細動は LVO 群で 32 例 57.1％に認めたのに対し、非 LVO 群では 15 例 10.7％に認め明らかな有意差を認めた（P＜0.0001）。心不全は LVO 群 9 例 16.1％に認めたのに対し非 LVO 群 5 例と両群とも症例は少ないが有意差を認めた（P=0.0021）。高脂血症については LVO 群 16 例 28.6％に認めたのに対し非 LVO 群 21 例 15％と有意差を認めた（P=0.03）。生活習慣である喫煙、飲酒については両群で有意差を認めなかった。脳卒中の家族歴についても両群とも 10％程度であり有意差を認めなかった。内服薬については抗凝固薬の内服が LVO 群で 10 例 17.9％に認めたのに対して非 LVO 群では 6 例 4.3％と有意差を認めた（P=0.002）。

NIHSS の各項目についてもそれぞれ解析を行った。顔面麻痺について有意差を認めた（P=0.03）がそのほかの項目は有意差を認めなかった。来院時の血圧については、収縮期血圧が LVO 群で平均 153.7mmHg に対して非 LVO 群で平均 179.8mmHg と非 LVO 群で有意に高い結果であった（P＜0.0001）。拡張期血圧については両群で有意差を認めなかった。収縮期血圧について ROC 曲線から最適な閾値を 170mmHg と定め、170mmHg 以下について検討を行うと、LVO 群 44 例 78.6％に認めたのに対して非 LVO 群 61 例 43.6％と明らかな有意差を認めた（P＜0.0001）。

単変量解析の結果、心房細動、収縮期血圧 170mmHg 以下、顔面麻痺、高脂血症、抗凝固薬内服、心不全の 6 項目が LVO 群に有意に関連したため、この 6 項目を用いて多変量ロジスティック解析を行った。心房細動はオッズ比 11.5（95％信頼区間 4.04－32.9、P＜0.0001）と最も強い相関を認めた。収縮期血圧 170mmHg 以下はオッズ比 2.99（95％信頼区間 1.33－6.71、P＝0.008）と強い相関を認めた。この結果から LVO 群に特異的な項目として心房細動の既往があること、収縮期血圧が 170mmHg 以下であることの 2 項目が考えられた。この 2 項目のどちらかを満たす場合、LVO を強く予測されることが示唆された。

心房細動の既往歴と収縮期血圧 170mmHg 以下の 2 項目による LVO 予測の有効性を確認するため、過去に報告されている脳卒中スケールを今回の対象患者である 196 症例において算出し、比較を行った。CPSS の項目を満たす症例は LVO 群で 56 例、非 LVO 群 140 例で両群とも全例であ

った。3ISS で LVO の可能性が高いと診断される 4 点以上の症例は LVO 群 56 例中 35 症例（感度 62.5%）、3ISS で LVO の可能性が低いと診断される 4 点未満の症例は非 LVO 群 140 例中 66 例（特異度 47.1%）であった。RACE で LVO の可能性が高いと診断される 5 点以上の症例は LVO 群 56 例中 49 例（感度 87.5%）、LVO の可能性が低いと診断される 5 点未満の症例は非 LVO 群 140 例中 31 例（特異度 22.1%）であった。CPSSS で LVO の可能性が高いと診断される 2 点以上の症例は LVO 群 56 例中 49 例（感度 87.5%）、LVO の可能性は低いと診断される 2 点未満の症例は非 LVO 群 140 例中 20 例（特異度 14.3%）であった。FAST-ED で LVO の可能性が高いと診断される 4 点以上の症例は LVO 群 56 例中 51 例（感度 91.1%）、LVO の可能性が低いと診断される 4 点未満の症例は非 LVO 群 140 例中 34 例（特異度 24.3%）であった。PASS で LVO の可能性が高いと診断される 2 点以上の症例は LVO 群 56 例中 50 例（感度 89.3%）、LVO の可能性が低いと診断される 2 点未満の症例は非 LVO 群 140 例中 22 例（特異度 15.7%）であった。NIHSS-8 で LVO の可能性が高いと診断される 8 点以上の症例は LVO 群 56 例中 50 例（感度 89.3%）、LVO の可能性が低いと診断される 8 点未満の症例は非 LVO 群 140 例中 36 例（特異度 25.7%）であった。

心房細動の既往または収縮期血圧 170mmHg 以下を満たす症例は LVO 群 56 例中 52 例に認め、感度 92.7%であった。一方、心房細動の既往がなく、収縮期血圧 170mmHg を超える症例は 76 例で特異度 54.3%であった。

【考察】

脳主幹動脈閉塞による脳梗塞に対する血栓回収術は、再開通までの時間が転帰を左右することが明らかになっている。血栓回収術はすべての脳卒中治療施設で施行可能とは言えないため、診断がついてから実施可能施設に転送することもあるが直接搬送のほうが再開通までの時間を短縮できる。また、血栓回収術実施可能施設でも常に脳血管内治療医が院内に待機しているわけではないことが多い。このため脳主幹動脈閉塞の有無は搬送先選定や人員の招集のためにできるだけ早く確認することが望まれる。

過去に報告されている LVO 予測スケールは主に NIHSS の項目をもとに作成されている。LVO 予測の感度は高いが脳出血を鑑別することが難しくいずれのスケールも特異度が低くなっている。脳出血症例を主幹動脈閉塞と誤って判断し包括的脳卒中センターに搬送しても治療上大きな問題はないとする報告もあるが、脳出血症例が多い日本では脳出血の鑑別は非常に重要である。我々が検討した心房細動ありまたは収縮期血圧 170mmHg 以下の 2 項目は NIHSS の項目ではなく臨床所見や既往歴という救急隊が容易に収集可能な情報からなっている。LVO の感度が高い。我々の症例は全例が CPSS の基準を満たしており、救急隊による脳卒中予測の感度は高いことがわかる。CPSS を満たす患者でさらにこの 2 項目に該当する場合は血栓回収術を施行可能施設に直接搬送することが望ましく、受け入れ施設も早期に血栓回収術の準備を進めることが可能となる。

【結語】

発症から 6 時間以内に救急搬送された脳卒中疑いの患者で、症状が中等度以上の場合は、心房細動の既往の有無、収縮期血圧が 170mmHg 以下であるかどうかを確認することで脳主幹動脈閉

塞による脳梗塞を予測することができる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5380　号 | 井上　雅人 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　大友　康裕<br>副　査　前原　健寿、立石　宇貴秀 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

近年、脳梗塞急性期における血栓回収術の有用性が多くの国際的権威の高い学術雑誌で示されている。本論文は脳梗塞急性期の血栓回収療法において最も重要な因子である脳主幹動脈閉塞(LAO)を病院搬入前に収集可能な限られた情報から的確に予測する方法を検討したものである。申請者の施設に 2 年間で搬送された脳梗塞又は脳出血と診断された患者のうち NIHSS 8 点 以上でかつ 6 時間以内に来院した 196 例のうち LVO は 56 例であった。LVO の予測因子は「心房細動あり」、「収縮期血圧 170mmHg 以下」の 2 因子であり、救急隊から脳卒中疑いの搬送依頼を受けた時に、この２因子を確認することで LVO 予測精度をあげることができることを示した。救急隊にこの因子を周知することで、血栓回収術が実施可能な医療機関へ迅速な搬送が可能になることが示された。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

LVO の予測因子は、これまで様々に提案されてきているが、本研究は病院前という制約の中で得られる情報のみを用いて、簡便に LVO を高精度に予測することを明らかにした点が評価に値するものである。

２）社会的意義

血栓回収術は、脳梗塞急性期で有効な治療法であるが、全ての救急医療施設で実施可能というわけではない。このため、救急隊が LVO を適切な搬送先を選定するためには、病院前において、LVO を適確に予測する事が重要となる。本研究は、そのための有用な判定基準を提示する有意義な研究である。

３）研究方法・倫理観

申請者の施設で 2014 年 7 月から 2016 年 6 月の期間に脳卒中（脳梗塞または脳出血）と診断され、NIHSS8 以上で発症 6 時間以内に来院した患者を対象とした。脳主幹動脈閉塞の定義は頭部 CTA または MRA にて確認された内頚動脈閉塞、中大脳動脈 M1 または M2 閉塞、脳底動脈閉塞とし、M3 以遠の閉塞や後大脳動脈閉塞は含めなかった。発症時間不明の症例は最終未発症時刻から 6 時間以内に病院に到着した症例を対象とした。対象を LVO 群と非 LVO 群に分け、年齢、性別、発症形式、既往歴、生活歴、脳卒中の家族歴、内服歴、NIHSS の各項目、来院時血圧を後方視的に比較検討した。連続変数に有意差がある場合、ROC 曲線から最適な閾値を定め比較検討

を行った。対象患者について過去に報告された脳卒中予測スケールである CPSS と LVO 予測スケールである 3ISS、RACE、CPSSS、PASS、FAST-ED、NIHSS-8 の各スケールについて点数を算出し比較を行った。

本研究は倫理上、指摘するべき事項はない。

４）考察・今後の発展性

本研究は後ろ向き単施設の検討である。本研究で提示された LVO 予測スケールを、他の大規模データセット（日本脳卒中データバンクなど）を用いてのバリデーションや多施設前向き試験などの発展が期待できる。

本研究の成果は、脳主幹動脈閉塞による脳梗塞症例を、血栓回収術が実施可能な医療施設に、迅速に搬送することを可能とし、多くの脳梗塞患者の転帰改善に寄与すると考える。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（博士）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 瀬間　学 |
| 論文審査担当者 | 主査　横関　博雄<br>副査　角　勇樹、明石　巧 |
| 論　文　題　目 | Environmental levels of avian antigen are relevant to the progression of chronic hypersensitivity pneumonitis during antigen avoidance |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

慢性過敏性肺炎の治療において抗原回避は必須である。しかし、無自覚な抗原曝露は抗原回避が困難である。最近、我々は慢性鳥関連過敏性肺炎において診断時における環境中鳥抗原量が予後を規定することを報告した。本研究では慢性鳥関連過敏性肺炎において、抗原回避中の鳥抗原量と疾患進行との関連を検討することを目的とした。まず 28 人の連続する患者（22 人の慢性鳥関連過敏性肺炎患者および 6 人の急性鳥関連過敏性肺炎患者）および 12 人の健常者における環境中鳥抗原量を測定した。次に 53 人の間質性肺炎および他疾患患者において鳥抗原量測定と同時に自宅環境における質問表を渡し回収した。さらに 14 人の慢性鳥関連過敏性肺炎患者を対象に前向きに鳥抗原量を定期的に測定し、臨床データとの関連を検討した。診断時の慢性鳥関連過敏性肺炎患者における環境中鳥抗原量は健常者と比較して有意に高く、また急性鳥関連過敏性肺炎患者群は最も高値であった。多変量解析にて住居への鳥の頻繁な飛来が環境中鳥抗原量高値の独立した規定因子であることが示された。また、1 年間の鳥抗原量の平均値と年間の%VC の低下が相関することが示された。抗原回避中においても鳥抗原が残存することがあり、屋外の野鳥の飛来が寄与することがありうると考えられた。

＜緒言＞

過敏性肺炎は原因抗原の吸入によって惹起される間質性肺疾患である。慢性過敏性肺炎の管理では抗原回避は必須であるが、鳥関連過敏性肺炎では鳥飼育による直接曝露以外に、羽毛布団、野鳥、隣人の鳥飼育などの無自覚の曝露が原因であることがあり、抗原回避が困難である。そのため、環境中鳥抗原量を測定することが重要と考えられる。最近、我々は鳥抗原量を測定する sandwich ELISA 系を開発し、慢性鳥関連過敏性肺炎において診断時における環境中鳥抗原量が予後を規定することを報告した。しかし、可視的な抗原回避施行後に残存する抗原の曝露によって慢性過敏性肺炎は進行することが考えられており、診断後の抗原回避中における鳥抗原量がどのように変化するか、鳥抗原量が疾患進行との関連があるかどうかは未知である。今回、一連の研究を計画した。まず、慢性鳥関連過敏性肺炎患者における環境中鳥抗原量の背景を知るために、急性鳥関連過敏性肺炎患者および健常者群と比較した（Retrospective Dust Study）。次に質問表を

用いて鳥抗原量が高い環境因子の特定を検討した（Questionnaire Dust Study）。さらに慢性鳥関連過敏性肺炎の診断後・抗原回避中における鳥抗原量を定期的に測定した（Prospective Dust Study）。

＜方法＞

【鳥抗原量の測定】

40μm の専用フィルターのついた Dustream Collector とよばれるキットを家庭用掃除機の先端に装着し、リビングや寝室などからダストを採取した。100 ㎎のダストを 4ml の PBST に溶解し 2 時間かけて室温で撹拌した後、500G で 5 分間遠心分離を行った。上清を 40μm 及び 0.45μm のフィルターで濾過し、抽出液を-20℃で保存した。鳩糞抽出物に対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を用いて、sandwich ELISA を行った。

【Retrospective Dust Study】

2011 年 4 月から 2016 年 10 月まで東京医科歯科大学医学部附属病院にて診断された急性鳥関連過敏性肺炎、慢性鳥関連過敏性肺炎患者を後ろ向きにカルテベースでデータを抽出した。急性鳥関連過敏性肺炎の診断基準は、急性症状、鳥や鳥製品との接触歴があること、胸部 CT にてすりガラス状陰影があること、鳥抗体価が高値であることとした。慢性鳥関連過敏性肺炎の診断基準は、慢性症状、慢性間質性肺炎の画像所見（網状影・蜂巣肺）を呈すること、鳥抗原吸入誘発試験が陽性であることとした。さらに当科医局員の中から健常者をリクルートメントした。急性鳥関連過敏性肺炎、慢性鳥関連過敏性肺炎の診断時における環境中鳥抗原量を測定した。

【Questionnaire Dust Study】

2016 年 4 月から 2017 年 5 月までに当科に来院した患者から無作為に多疾患患者（間質性肺炎、肺癌、気管支喘息を含む）をリクルートメントした。患者に自宅内のダスト採取を依頼すると同時に自宅内外の環境に関する質問表を送り、回収した。以前に報告した環境中鳥抗原量の cut off 値である 0.74μg/g of dust を基準にして、0.74μg/g of dust 以上を「高曝露群」、0.74μg/g of dust 未満を「低曝露群」とした。

【Prospective Dust Study】

2011 年 4 月から 2015 年 8 月までに当科において吸入誘発試験を施行し陽性基準を満たした慢性鳥関連過敏性肺炎患者を対象とした。呼吸機能検査が不可能な患者や、研究参加に同意がとれない患者、転院して 1 年間追跡できない患者を除外した。研究対象者は登録時およびその後 3 か月毎、計 1 年間呼吸機能検査および同時期にダストを採取し、環境中鳥抗原量を測定した。1 年間の環境中鳥抗原量の平均値をとり、0.74μg/g of dust 以上を「高曝露群」、0.74μg/g of dust 未満を「低曝露群」とした。

【統計解析】

PRIZM, SPSS にて統計解析を行った。2 群間の連続変数の比較には Mann-Whitney U test を、カテゴリー変数の比較には Fisher's exact probality test を行った。3 群間の連続変数の比較には

Kruskal-Walis test を、カテゴリー変数の比較には Fisher's exact probality test を行った。Questionnaire Dust Study における鳥抗原量高値に関する因子の評価にはロジスティック回帰分析を用いた。Prospective Dust Study における 1 年間の鳥抗原量の平均値と％VC 低下の相関の評価には Spearman rank correlation を用いた。いずれも p 値 0.05 未満で有意と判定した。

＜結果＞

【Retrospective Dust Study】

2011 年 4 月から 2016 年 10 月までに 6 人が急性鳥関連過敏性肺炎と診断され、環境中鳥抗原量を測定した。上記期間に慢性間質性肺炎に対して 36 人に鳥抗原吸入誘発試験が施行され、25 人が陽性基準を満たし、慢性鳥関連過敏性肺炎と診断された。そのうち、22 人の環境中鳥抗原量が測定された。コントロールとして 12 人の健常者の環境中鳥抗原量が測定された。急性鳥関連過敏性肺炎は 5 人が鳥飼育者であった。急性鳥関連過敏性肺炎患者群における環境中鳥抗原量は慢性鳥関連過敏性肺炎患者群に比べ有意に高値であった。また慢性鳥関連過敏性肺炎患者群は健常者群に比べ環境中鳥抗原量は有意に高値であった。

【Questionnaire Dust Study】

53 人の患者から自宅内のダストおよび環境に関する質問表を回収した。多変量解析にて庭・ベランダに鳥飛来が頻繁であることが自宅内のダスト中の鳥抗原量が高いことの独立した規定因子であることが示された。

【Prospective Dust Study】

2011 年 4 月から 2015 年 8 月までに 29 人が吸入誘発試験陽性にて慢性鳥関連過敏性肺炎と診断された。内 13 人が登録前に転院となり、1 人が登録前に死亡に至り除外された。結果、15 人の患者が登録され、そのうち、1 人が 1 年間フォローできなかったため、最終的には 14 人が解析された。14 人のうち、4 人が「高曝露群」、10 人が「低曝露群」に区分された。医師による抗原回避の指導がなされているため、「低曝露群」の 1 人を除いて皆が鳥関連製品を所有していなかった。「高曝露群」では「低曝露群」に比べ郊外に住んでいる人数が有意に多かった。1 年間の鳥抗原量の平均値と％VC の変化量には相関が認められた（r=-0.55; 95%CI, -0.84--0.01; p=0.043）。「高曝露群」では「低曝露群」に比べ有意に 1 年間の VC および FVC の低下を認めた。

【考察】

環境中鳥抗原量は、鳥関連過敏性肺炎患者では健常者より高値であり、慢性鳥関連過敏性肺炎において鳥抗原量が高い患者群では疾患進行を認めた。Retrospective Dust Study では、急性鳥関連過敏性肺炎群では他群に比べ有意に鳥抗原量が高値であった。これはほとんどの患者で鳥飼育がなされており、直接的に抗原曝露がされていたことが原因と考えられた。Questionnaire Dust Study では、住居周囲への鳥飛来が頻繁であることが、屋内の鳥抗原量高値と関係があることが示された。以前の報告でもなされているように、屋外の鳥抗原が屋内に流入していることが考えられた。Prospective Dust Study では、抗原回避施行後の慢性鳥関連過敏性肺炎患者において、鳥抗原量と

年間の VC 低下の相関があることが示された。目にみえる抗原回避（羽毛布団、ダウンジャケット、鶏糞肥料、鳥剥製の除去）を行ったにもかかわらず、鳥抗原量が高値である場合があることが示された。本研究では、抗原回避後にもかかわらず鳥抗原量が高い群では呼吸機能の低下が著明であることが示された。Questionnaire Dust Study の結果を合わせて考慮すると、鳥抗原量は、屋内の鳥関連製品ではなく、むしろ屋外の鳥抗原と関連がある可能性が考えられた。

【結論】

鳥関連製品の除去後も鳥抗原が残存することが示された。屋外の環境由来の鳥抗原が慢性鳥関連過敏性肺炎の疾患進行と関連がある可能性が示唆され、環境中鳥抗原量を測定することが重要と考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5381　号 | 瀬間　学 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　横関　博雄<br>副　査　角　勇樹、明石　巧 | |

（論文審査の要旨）

１、論文内容

慢性過敏性肺炎の治療において抗原を明らかにして抗原を回避するは重要なことは言うまでもない。申請者らは慢性鳥関連過敏性肺炎において診断時における環境中の鳥抗原量を測定して明らかにすることにより予後を予測できることを明らかにした。申請者は本研究で慢性鳥関連過敏性肺炎において、抗原回避中の鳥抗原量と過敏性肺炎の進行との関連を検討した。最初に 28 人の連続する患者（22 人の慢性鳥関連過敏性肺炎患者および 6 人の急性鳥関連過敏性肺炎患者）および 12 人の健常者における環境中鳥抗原量を測定した。次に 53 人の間質性肺炎および他疾患患者において鳥抗原量測定と同時に自宅環境に関する質問表を渡し回収した。さらに 14 人の慢性鳥関連過敏性肺炎患者を対象に前向きに鳥抗原量を定期的に測定し、臨床データとの関連を検討した。その結果、診断時の慢性鳥関連過敏性肺炎患者における環境中では鳥抗原量は健常者と比較して有意に高く、また急性鳥関連過敏性肺炎患者群では最も高値であることが明らかになった。多変量解析を行ったところ住居への鳥の頻繁な飛来してくる環境が鳥抗原量高値の独立した規定因子であることが示された。また、1 年間の鳥抗原量の平均値と年間の％VC の低下が相関することが示された。鳥抗原の平均値が過敏性肺炎のマーカーである%VC の低下と相関することを明らかにしたことは意義のある研究である。

２、論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

過敏性肺炎は原因抗原の吸入によって惹起される間質性肺疾患である。慢性過敏性肺炎の管理では抗原回避は必須であるが、鳥関連過敏性肺炎では鳥飼育による直接曝露以外に、羽毛布団、野鳥、隣人の鳥飼育などの無自覚の曝露が原因であることがあり、抗原回避が困難である。そのため、環境中鳥抗原量を測定することが重要であり正常人を含めて過敏性肺炎患者の抗原を測定したことは独創的であると考えられる。今回、鳥抗原の平均値が過敏性肺炎のマーカーである%VC の低下と相関することを明らかにしたことは独創的で意義のある研究である。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は

１）　環境中鳥抗原量は、鳥関連過敏性肺炎患者では健常者より高値であり、慢性鳥関連過敏性肺炎において鳥抗原量が高い患者群では疾患進行を認めた。

２）　Retrospective Dust Study では、急性鳥関連過敏性肺炎群では他群に比べ有意

に鳥抗原量が高値であった。これはほとんどの患者で鳥飼育がなされており、直接的に抗原曝露がされていたことが原因と考えられた。

３）　Questionnaire Dust Study では、住居周囲への鳥飛来が頻繁であることが、屋内の鳥抗原量高値と関係があることが示された。以前の報告でもなされているように、屋外の鳥抗原が屋内に流入していることが考えられた。

４）　Prospective Dust Study では、抗原回避施行後の慢性鳥関連過敏性肺炎患者において、鳥抗原量と年間の VC 低下の相関があることが示された。本研究では、抗原回避後にもかかわらず鳥抗原量が高い群では呼吸機能の低下が著明であることが示された。さらに、鳥抗原量が、屋内の鳥関連製品ではなく、むしろ屋外の鳥抗原と関連がある可能性が示唆されたことは今後、鳥抗原を回避する上で重要な学術的意義、社会的意義が非常にあると思われる。

３）　研究方法・倫理観

鳥抗原は鳩糞抽出物に対するポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を用いて、sandwich ELISA を行った。鳥関連過敏性肺炎に対して鳥抗原との関連性を Retrospective, Questionnaire, Prospective な解析を行った。倫理的には問題がない。

３、審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があると認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小髙　愛未 |
| 論文審査担当者 | 主査　澁谷　浩司<br>副査　淺原　弘嗣、中田　隆夫 |
| 論　文　題　目 | A new cell-based assay to evaluate myogenesis in mouse myoblast C2C12 cells |

（論文内容の要旨）

<要旨>

マウス筋芽 C2C12 細胞は筋分化研究に汎用される。筋萎縮治療薬の探索、開発においても候補薬剤の C2C12 細胞の筋分化に対する効果判定は有意義である。しかし、ミオシン重鎖など筋分化マーカーの発現レベルや多核化を指標とする評価法は、煩雑な作業が求められるため大量のサンプルに対しては使いにくい。本研究では分割緑色蛍光蛋白（GFP）法を応用し、新しいアセイ系を開発した。GFP を構成する 11 個の β ストランドを N 末側の 10 個 GFP1-10 と C 末端の 1 個 GFP11 に分割すると、それぞれは蛍光を生じないが、両者を共在させると自然に会合し蛍光が復活する。GFP1-10 と GFP11 をそれぞれ発現する C2C12 細胞を共培養し筋分化を誘導すると融合が起こり、GFP1-10 と GFP11 が同じ細胞に発現し GFP 蛍光が生じる。この GFP 蛍光を指標として筋分化を定量評価できることを確認した。本アセイ系は、各種薬剤の筋分化に対する効果のみならず、融合や萎縮に対する効果の判定にも応用可能と期待される。分割 GFP 法に基づくアセイ系は、筋萎縮治療薬の開発に有用な新しい手法である。

＜緒言＞

老化に伴う筋萎縮は高齢化社会が直面している重要な医療課題である。適切な栄養と運動による予防が重要だが、外傷、疾病などで筋萎縮が起きた後でもリハビリを可能にする筋量の回復を達成する薬剤も必要である。マウス C2C12 細胞は、一定の培養条件に置くと融合して多核の筋管を形成する筋芽細胞のモデルであり、筋分化を促進する薬剤の探索にもよく用いられる。実際、私たちは、C2C12 細胞の筋分化を促進する化合物を選抜し、その中からマウスの筋萎縮を軽減する化合物を見出している。C2C12 細胞の筋分化は、細胞染色によるミオシン重鎖（MHC）など筋分化マーカーの発現、多核化の定量によって行われるのが一般的だが、作業が煩雑で大量のサンプルを処理するのは難しい。本研究では、C2C12 細胞の筋分化を効率よく定量的に評価する新しいアセイ系の樹立を試みた。

GFP は 11 個の β ストランドをもつ。N 末側の 10 個の β ストランド GFP1-10 と C 末端の 1 個 GFP11 に分離すると蛍光が失われる。しかし、GFP1-10 と GFP11 が共在すると自然に会合して蛍光が復活する。GFP1-10 と GFP11 をそれぞれ発現する C2C12 細胞を作製し両者を共培養して分化誘導すると、細胞が融合して GFP1-10 と GFP11 が共在し、蛍光を発すると予測される。この方法

を使えば、蛍光の強度を測定することにより、C2C12 細胞の筋分化の度合いを定量的に評価できるのでないかと考えた。

＜方法＞

GFP1-10 と GFP11 を C2C12 細胞に発現させるためのレトロウイルスベクターをパッケージベクターと共に HEK293 細胞に遺伝子導入してレトロウイルスを作製し、それを C2C12 細胞に感染させることで細胞株を作成した。作成した C2C12 細胞を、馬血清を含む DMEM 培地に置換し分化誘導した。

分化誘導した C2C12 細胞を固定して MHC を免疫蛍光染色し、蛍光シグナルを ImageJ により定量した。全体の核のうち多核細胞に含まれる核の割合を myofusion index として筋分化を評価した。GFP 蛍光は ArrayScan VII（Thermo Scientific）を用いて定量した。遺伝子の発現量と蛋白量は定量的 RT-PCR 及びウエスタンブロット法で確認した。

＜結果＞

GFP11 は 16 アミノ酸しかなく単独では安定した発現を確認できないため 14-3-3 と融合させた。GFP1-10 を発現する C2C12 細胞(GFP1-10 細胞)と GFP11 を発現する C2C12 細胞(14-3-3-GFP11 細胞)を、それぞれ別に培養し分化させても蛍光を生じないが、共培養して分化させると蛍光が観察された。GFP 蛍光の発現と MHC の抗体染色による蛍光、myofusion index は、ほぼ同じ時間経過で増加した。

本アセイ系が筋分化・筋融合を促進する薬剤探索に有効であることを確認するため、筋分化・筋融合を促進することが知られている β-グアニジノプロパン酸（GPA）、IGF-1、IBS008738（私たちが見出した新しい薬剤）と、逆に阻害する z-VAD-FMK を添加し、GFP 蛍光に対する影響を解析した。期待通り GPF、IGF-1 は蛍光発現を促進し、z-VAD-FMK は抑制した。ところが IBS008738 では有意な上昇が見られなかった。14-3-3-GFP11 細胞はもともと筋分化が促進する傾向にあるので、代わりに筋分化を抑制する YAP1 に GFP11 を融合させた YAP1-GFP11 細胞を使用したところ、IBS008738 による用量依存的増強が観察された。

成体における筋量増加の一部は、筋組織幹細胞が分化し既存の筋管に融合することによって起こる。そこで本アセイ系で単核の筋芽細胞の多核の筋管への融合を評価できるか検証した。GFP1-10 細胞を 96 時間分化培養したのち、未分化の 14-3-3-GFP11 細胞を加えると、時間依存的に GFP 蛍光が生じた。次に、14-3-3-GFP11 細胞の方も分化させ多核にしたのち、多核化した GFP1-10 細胞に加えたところ、やはり GFP 蛍光が生じた。どちらのデザインでも GPA、IGF-1 は融合を促進した。筋分化の初期に特に有効であることが知られている IBS008738 は前者のデザインでは効果を示したが、後者では示さなかった。筋融合に重要であることが知られている低分子量 G 蛋白 Rac1 の阻害剤を加えると GFP 蛍光の発現は抑制された。

がん患者は食事量と運動量の低下、がん細胞に由来する炎症性サイトカインなどが原因で筋萎縮を示す。そこで本アセイ系が、がん悪疫質の病態の解明と治療薬の探索に有効か検証するため、マウスルイス肺癌（LLC）細胞をC2C12細胞の分化培地で培養した培養上清をC2C12細胞の培地に加え、分化に対する影響を評価した。その結果、LLC培養上清により筋分化マーカーの発現は著

しく低下し、筋融合も抑制された。このときGFP蛍光の発現も低下した。すなわち、本アセイ系はがん悪疫質にみられる筋分化抑制の評価にも使用できることが分かった。

がん悪疫質では、骨格筋の蛋白異化も亢進する。LLC培養上清を加えたC2C12細胞ではE3リガーゼMuRF1とMAFbxが誘導され、蛋白異化についても細胞レベルで再現できることが確認された。次にLLC培養上清が、分化し既に多核の筋管になったC2C12細胞で萎縮を起こすかを検討した。GFP1-10細胞と14-3-3-GFP11細胞を共培養し分化させGFP蛍光を確認したのち、LLC培養上清を加えた。すると筋管が細くなり、萎縮が起きていることが確認できた。さらに、IBS008738がLLC培養上清によるGFP蛍光の減弱を軽減することも確認された。以上から、本アセイ系はがん悪疫質による筋萎縮の病態の解明と治療薬探索にも適用できると期待される。

GFP11 は単独では安定した発現を確保できないため、何らかの蛋白と融合して発現させる必要がある。本研究では主に 14-3-3-GFP11 を使い、一部で YAP1-GFP11 を使った。YAP1-GFP11 を使うと IBS008738 の効果を確認できたが、14-3-3-GFP11 では確認できず、融合蛋白の選択が重要と思われる。そこで、筋分化に対する影響の少ない中立的な蛋白を模索するため、ブラストシジン耐性遺伝子産物（BSR）を GFP11 に融合させた。BSR-GFP11 細胞と GFP1-10 細胞の組み合わせでも筋融合により GFP 蛍光を生じ、IBS008738 による筋分化促進効果や、LLC 培養上清による筋分化の抑制、LLC 培養上清による筋萎縮と IBS0087378 による軽減が観察された。

＜考察＞

加齢による筋萎縮に伴う運動障害は、高齢者の QOL を損ない、要介護の状態を招き、家族社会の負担を増大させるため、高齢化が進む先進国が直面している大きな医療課題である。蛋白同化作用のあるアンドロゲンやグレリン、筋萎縮をおこすサイトカイン（ミオスタチン）シグナルに対する抗体薬などが筋萎縮治療薬候補とされているが、実用化されている薬剤はなく、引き続き筋萎縮予防、治療に有効な薬剤の探索が必要とされる。とりわけ、成体の骨格筋の恒常性維持に重要な骨格筋組織幹細胞を賦活化する薬剤は、画期的な治療薬として期待される。C2C12 細胞は骨格筋組織幹細胞の性質を部分的に保持し、筋分化の研究に汎用される。C2C12 細胞の筋分化に対する促進効果を評価するアセイ系は、筋萎縮治療薬探索のステップとして意義深い。本研究で開発したアセイ系では、C2C12 細胞の筋分化を GFP 蛍光に置き換えて定量評価する。初期の筋分化のみならず、分化し多核化した筋管への未分化細胞の融合や、筋管同士の融合の評価にも使用できる。がん悪疫質で見られる筋萎縮の評価にも適用できる。IGF-1 や GPA など筋分化・筋融合を促進する薬剤、z-VAD-FMK や Rac1 阻害剤など筋分化・筋融合を抑制する薬剤に対しては、それぞれ GFP 蛍光の上昇・低下が認められるので、筋分化・筋融合の促進、筋萎縮の抑制に効果を示す化合物探索にも使用できると期待される。ただし、GFP11 に融合する蛋白の選択が、アセイ系の改善に重要であることも示唆された。

＜結論＞

分割 GFP を利用して、C2C12 細胞の筋分化を効率的、定量的に評価する新しいアセイ系を開発した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5382　号 | 小髙　愛未 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　澁谷　浩司<br>副　査　淺原　弘嗣、中田　隆夫 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、筋分化を評価する新しいアッセイ法の開発に関する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

マウス筋芽 C2C12 細胞は筋分化研究に汎用され、筋萎縮治療薬の探索、開発においても候補薬剤の筋分化に対する効果判定は有意義であることが知られていた。一方、ミオシン重鎖など筋分化マーカーの発現レベルや多核化を指標とする評価法は煩雑な作業が求められるため、大量のサンプルに対して有効ではない。このような背景の下、申請者は分割緑色蛍光蛋白（GFP）法を応用し、新しいアッセイ系の開発を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

GFP を構成する 11 個の β ストランドを N 末側の 10 個（GFP1-10）と C 末端の 1 個（GFP11）に分割すると、それぞれは蛍光を生じないが、両者を共在させると自然に会合し蛍光が生じることを利用し、GFP1-10 と GFP11 をそれぞれ発現する C2C12 細胞を共培養し筋分化を誘導すると融合が起こり、GFP1-10 と GFP11 が同じ細胞に発現し GFP 蛍光が生じ、この GFP 蛍光を指標として筋分化を定量評価できることを明らかにした。

以上の結果から申請者は、本アッセイ系が各種薬剤の筋分化に対する効果のみならず、融合や萎縮に対する効果の判定にも有効であることを明らかにしている。これは筋萎縮治療薬の開発にも繋がる極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本研究では、レトロウイルスベクターを用いた細胞株の樹立をはじめ、生化学的および分子生物学的解析が適切に行われ、開発したアッセイ系の判定を遂行した。これら手法は、十分な知識と技術の裏付けのもとに行われており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことを窺わせるものである。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究成果によるアッセイ系は筋分化・筋融合の促進、筋萎縮の抑制に効果を示す化合物探索に繋がる可能性を考察している。これは先行研究と照らし合せても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 藤田　修平 |
| 論文審査担当者 | 主査　樗木　俊聡<br>副査　神奈木　真理、新井　文子 |
| 論　文　題　目 | Dual inhibition of EZH1/2 breaks the quiescence of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

急性骨髄性白血病は現在においても致死性の血液腫瘍であり、白血病細胞集団内のわずかな population である白血病幹細胞（LSCs: Leukemia Stem Cells）を起源とすることが知られている。白血病の再発は標準治療（化学療法）に抵抗性の白血病幹細胞が原因とされており、この細胞集団を標的とした治療法の開発が強く望まれている。Polycomb Repressive Complex2 (PRC2)はヒストン H3 の 27 番目のリシン（H3K27）をトリメチル化するヒストン修飾酵素であり、その標的遺伝子群の発現を抑制することで白血病幹細胞の幹細胞性の維持に寄与していることが知られている。我々は PRC2 の酵素活性部位である Enhancer of Zeste (EZH)1 と EZH2 が白血病細胞の階層の中で化学療法抵抗性の白血病幹細胞において最も強く発現していることを見出した。さらにマウス白血病モデルにおいて EZH1/2 を不活化することで化学療法抵抗性の白血病幹細胞を駆逐し、白血病再構築能を失わせ、白血病の完治へいたることを発見した。化学療法抵抗性の白血病幹細胞はその細胞周期が遅くなっていることにより化学療法抵抗性を呈すが、EZH1/2 の不活化はその下流の遺伝子である CyclinD の発現を上昇させ、それに伴い細胞分裂が促進され、休眠状態となっている白血病幹細胞を化学療法感受性の細胞集団へと変化させていた。我々は第一三共株式会社との共同研究により EZH1/2 二重阻害薬を開発し、この化合物の薬効評価を行った。この化合物はマウス白血病モデルあるいはヒト由来白血病異種移植モデルにおいても遺伝子の不活化とほぼ同様の効果を示し、白血病の進展を抑制し、白血病マウスの生存期間を延長させた。以上の結果から、EZH1/2 を抑制することは白血病治療において有望な治療戦略となりうると考えられた。

＜緒言＞

急性骨髄性白血病は未だ根治困難な致死性の血液腫瘍であり、近年の報告では白血病幹細胞と呼ばれる白血病再構築能を有す細胞集団から発症するとされており、特に細胞分裂静止期にある白血病幹細胞が白血病の化学療法抵抗性と再発の原因とされている。これまで静止期白血病幹細胞を標的とした治療戦略がいくつか報告されているが、いまだ臨床応用には至っていない。

Polycomb Repressive Complex2 (PRC2)はヒストン修飾酵素であり、ヒストン H3 の 27 番目のリ

シン（H3K27）をトリメチル化することでその標的遺伝子の発現を抑制する。PRC2 は ES 細胞、造血幹細胞を始めとした種々の幹細胞に必須の因子であり、また白血病幹細胞においてもその幹細胞性の維持に必須な因子として知られている。PRC2 の酵素活性部位は Enhancer of zeste (EZH)1 と EZH2 であり、特に EZH2 が酵素活性の大部分を担っており、その機能異常は悪性リンパ腫、白血病などの種々の悪性腫瘍において報告されている。実際、EZH2 の高活性は高リスクの骨髄異形成症候群や予後不良な急性骨髄性白血病との関連が報告されており、またマウス白血病モデルにおいては PRC2 の活性が白血病幹細胞の機能に必須であることが示されている。同時に白血病の根治には EZH2 の不活性化だけでは不十分であり、PRC2 の完全な機能失活が白血病の根治には重要であることも示されており、EZH2 のみならず EZH1 も白血病幹細胞性の維持に寄与していると考えられる。

この論文では、白血病幹細胞の幹細胞性維持の機構について EZH1 と EZH2 の両者に注目することで詳細に調べ、さらに白血病幹細胞の化学療法抵抗性との関連を明らかにしている。また第一三共株式会社との共同研究により開発した EZH1/2 二重阻害薬の前臨床薬効評価を施行することで、その臨床導入への妥当性を検証している。

＜結果＞

マウス白血病モデルにおいて白血病細胞の階層（末梢血白血病細胞から静止期 c-kit positive 白血病細胞（c-kit はマウス白血病モデルにおいて幹細胞性が高いとされている））ごとに Ezh1/2 の発現を確認したところ、興味深いことに Ezh1/2 は化学療法抵抗性である静止期白血病幹細胞分画において mRNA、タンパクレベル両者で最も高く発現していた。これは静止期白血病幹細胞が強く Ezh1/2 に依存している可能性を示唆していると考えられた。

次に我々は 2 種類の conditioanl knock out mouse を作成し、それを用いて白血病細胞における EZH1/2 の機能を解析した。genotype background として ERT2 Cre Ezh1+/+ Ezh2flox/flox と ERT2-Cre Ezh1-/- Ezh2flox/flox を有す 2 種類のマウスの造血前駆細胞から白血病融合遺伝子である MLL-AF10 と MOZ-TIF2 を導入し、tamoxiphen 投与によりそれぞれ Ezh1+/+ Ezh2Δ/Δ (Ezh2 sKO)、Ezh1-/- Ezh2Δ/Δ (Ezh1/2 dKO)となる白血病モデルマウス（MLL-AF10 マウス、MOZ-TIF2 マウス）を作成した。白血病マウスにおいて Ezh1/2 両者を欠失させたところ、白血病の完治を認める一方、Ezh2 sKO では生存期間が延長するのみで白血病の完治は認めなかった。このことから白血病の根治には Ezh1/2 両者の抑制が必要であると考えられた。さらに白血病幹細胞における Ezh1/2 欠失の効果を解析したところ、静止期白血病幹細胞は白血病階層における Ezh1/2 の発現解析の結果と一致するように他の白血病分画と比較して最も強い感受性を示し、また白血病幹細胞分画全体も細胞分化が誘導されその白血病再構築能を完全に失っていた。特に静止期白血病幹細胞は細胞分裂が促進されることにより静止期から追い出され、結果として静止期白血病幹細胞の枯渇に至っていた。

さらに我々は Ezh2 sKO と Ezh1/2 dKO 白血病幹細胞において RNA seq を施行し遺伝子発現解析

をしたところ、Ezh1/2 dKO 特異的に CyclinD1/2 の発現上昇を認めた。これが静止期白血病幹細胞の枯渇の原因と考え、CyclinD についてさらに解析を進めた。CyclinD1/2 は Ezh1/2 の不活性化により白血病幹細胞分画において特異的に発現上昇が誘導され、さらに ChIP 解析によりこれらが EZH1/2 の標的遺伝子であることが確認された。また CyclinD1/2 を過剰発現させた白血病モデルにおいては静止期白血病幹細胞が減少し、より化学療法感受性となっていた。以上から白血病幹細胞の静止期の維持には PRC2 による CyclinD の発現抑制が重要であり、また Ezh1/2 の抑制により化学療法耐性の白血病幹細胞を駆逐することが可能であることが明らかとなった。

次に第一三共株式会社との共同研究により開発した EZH1/2 二重阻害薬を用いて、前臨床試験として白血病モデルへの薬効評価を行った。二重阻害薬は白血病細胞に対して Ezh1/2 欠失と同様の効果を示し、ほぼ全てのサブタイプの白血病細胞に対して強力な細胞分化とアポトーシスを誘導した。また白血病モデルマウスへの投与では静止期白血病幹細胞の枯渇、白血病幹細胞の分化誘導が認められ、生存期間の延長が認められた。さらに同薬剤が化学療法抵抗性の分画を選択的に抑制していることから化学療法への上乗せ効果を期待してシタラビンとの併用を行ったところ、白血病マウスの生存期間を著明に延長させることに成功した。

さらにヒト由来の白血病サンプルから異種移植（PDX）モデルを樹立し、そのモデルに対して薬効評価を行った。PDX モデルでは白血病マウスモデルと同様に骨髄内白血病細胞で特に EZH1/2 の発現が高いことが確認でき、またシタラビンとの併用療法により単剤投与群と比較し長期間にわたり寛解を維持することが可能であった。

これらの結果から、EZH1/2 は白血病幹細胞の白血病再構築能と化学療法抵抗性の維持に必須の分子であることが明らかとなり、また EZH1/2 二重阻害薬は今後の白血病治療の成績向上に大いに期待できるものと考えられた。

＜考察＞

本論文において急性骨髄性白血病の白血病幹細胞性の維持、特にその化学療法抵抗性における Ezh1/2 の機能を明らかにし、また EZH1/2 二重阻害薬を用いて治療標的としての妥当性を検証した。白血病治療においてはすで急性前骨髄球性白血病に対する分化誘導療法として ATRA (All Trans Retinoic Acid) が標準治療法として確立しているが、EZH1/2 阻害薬が白血幹細胞の幹細胞性を消失させ、白血病細胞の分化を誘導することから、将来的に当該化合物は ATRA に類する治療戦略になりうると思われる。

これまで PRC2 の H3K27 のトリメチル化活性において EZH2 が活性の大部分を占めており、EZH1 は EZH2 の補助的な役割を担うとされていたが、本論文では EZH1 のみでも白血病幹細胞性の維持、白血病の成立に十分であることが明らかとなった。これは白血病においては EZH1 が腫瘍成立に重要な役割を担っており、その治療には両者の抑制が重要であることを示している。またこれまでの報告から EZH2 の不活性化後は最終的に PRC2 の機能維持のため EZH1 が補助的な機能を発揮することになることも明らかにされており、これらを考慮すれば PRC2 活性の完全な失活には EZH1/2 の二重阻害が必要であり、腫瘍治療においては EZH1/2 二重阻害は非常に理想

的な治療戦略と言える。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5383　号 | 藤田　修平 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　樗木　俊聡<br>副　査　　神奈木　真理、新井　文子 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

急性骨髄性白血病（AML）幹細胞の幹細胞性維持に寄与するヒストン修飾酵素 Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)分子に着目し、同分子の酵素活性部位 EZH1/2 を抑制することで AML 治療の改善効果を示した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

これまで EZH2 単独阻害では AML 抑制に十分な効果が得られないことが報告されていた。本論文では、EZH2 に加え EZH1 を阻害することが有望な AML 治療戦略になることを示した。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．PRC2 の酵素活性部位である EZH1/2 が AML 細胞の中で AML 幹細胞に最も強く発現していることを見出した。

２．EZH1/2 欠損 AML モデルを作製したところ、AML 幹細胞が著減すること、AML 再構築能が消失し完治に至ることが判明した。

３．その機序として、AML 幹細胞の細胞周期が回転すると同時に分化が促進されることが明らかになった。

４．EZH1/2 二重阻害化合物を開発し AML モデルに投与すると、AML 進展抑制と延命効果が認められた。ヒト AML 細胞移植モデル（PDX）でもシタラビンとの併用効果を確認した。

３）研究方法・倫理観

AML 融合遺伝子を導入した野生型あるいは EZH1/2 欠損骨髄細胞を放射線照射した別マウスに移植することによって AML モデルを作製し、ex vivo および in vivo において様々な解析を行った。

４）考察・今後の発展

現在、企業と共同で開発した EZH1/2 二重阻害薬を用いて前臨床薬効評価を行っており、AML 治療への応用と改善効果が期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 岡田　啓五 |
| 論文審査担当者 | 主査　清水　重臣<br>副査　神奈木　真理、新井　文子 |
| 論　文　題　目 | FLT3-ITD induces expression of Pim kinases through STAT5 to confer resistance to the PI3K/Akt pathway inhibitors on leukemic cells by enhancing the mTORC1/Mcl-1 pathway |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

FLT3-ITD と FLT3-TKD は急性骨髄性白血病(AML)で最も多くみられる変異であり、特に前者は予後不良である。我々は以前に FLT3-ITD 陽性細胞において STAT5 活性化が PI3K/Akt 阻害薬への抵抗性に寄与していることを報告しており、さらに今回 STAT5 により発現が上昇する Pim キナーゼの関与について検討した。Pim 阻害薬の AZD1208 と PIM447 は、PI3K/Akt 阻害薬と併用することで相乗的に mTORC1/4EBP1 経路を抑制し Mcl-1 発現を低下させ、内因性経路のアポトーシスを誘導した。これらの相乗効果は mTOR のノックダウンまたは恒常的活性化変異により、それぞれ亢進または減弱し、Mcl-1 の過剰発現によっても減弱した。Mcl-1 阻害薬の A-1210477 は PI3K 阻害薬と併用効果を発揮した。一方 Pim-1 の過剰発現は mTORC1/Mcl-1 経路を活性化し、PI3K/Akt 阻害薬や FLT3 阻害薬への抵抗性を付与した。FLT3-ITD 陽性の AML 患者検体においても、Pim 阻害薬と PI3K 阻害薬の併用効果が認められた。以上より、FLT3-ITD では Pim キナーゼが mTORC1/Mcl-1 経路を活性化し PI3K/Akt 阻害薬へ抵抗性を獲得すると考えられた。

＜緒言＞

FLT3 は造血の初期発生に関与する受容体型チロシンキナーゼである。AML において FLT3-ITD 変異および TKD 変異が約 20-30%に認められ、特に前者は治療抵抗性で予後不良であることが知られている。FLT3-ITD はリガンド非依存的に STAT5 や PI3K/Akt/mTOR 経路などのシグナルを活性化し、そのうち mTOR が構成する mTORC1 複合体は cap 依存性翻訳を制御し抗アポトーシス蛋白である Mcl-1 等の発現に関与している。これまで多くの FLT3 阻害薬や PI3K/Akt 阻害薬が開発されてきたが、十分な治療効果は得られていない。我々は以前に、FLT3-ITD が STAT5 活性化によって mTOR/Mcl-1 経路を保持することで、PI3K 阻害薬 GDC-0941(GDC)や Akt 阻害薬 MK-2206(MK)へ抵抗性を示すことを報告している。

Pim キナーゼは Pim-1、Pim-2、Pim-3 の 3 つの Isoform から成りほぼ同等の機能を持ち、Pim-1 と Pim-2 が血液細胞に強く発現することが知られている。Pim キナーゼは恒常的に活性化され半減期は短く、JAK/STAT 経路などにより主に転写レベルで発現が制御され、Myc や mTOR 経路を介して腫瘍細胞の増殖や生存に関与することが報告されている。全ての Isoform を抑える汎 Pim

キナーゼ阻害薬が有効と考えられ、AZD1208(AZD)や PIM447 等の試薬が開発され、現在血液がん・固形癌を対象とした臨床試験が進行中である。

今回我々は、FLT3-ITD 陽性細胞において STAT5 下流で発現する Pim キナーゼの機能を解析し、Pim 阻害薬を用いた FLT3-ITD 陽性 AML の新たな治療法の開発を目指した。

＜方法＞

マウス造血細胞株 32Dcl3 に FLT3-ITD または TKD を導入した 32D/ITD 及び 32D/TKD、FLT3-ITD 陽性のヒト白血病細胞株である MV4-11 を使用した。またこれらの細胞にレトロウイルスベクターを用いて STAT5 活性化変異や mTOR ノックダウン・活性化変異、Mcl-1 発現、Pim-1 発現プラスミドを導入して検討を行った。細胞増殖については Trypan blue 染色法と発色試薬法を、アポトーシス(Cell cycle analysis)や一部細胞内蛋白の抗体染色については Flow cytometry 法を、細胞内シグナル伝達については Western Blot 法・免疫沈降法を用いて検討した。AML 患者の骨髄または末梢血単核球を分離し RT-PCR により FLT3-ITD 変異の有無を確認した。

＜結果＞

32D/ITD では 32D/TKD より STAT5 が活性化し Pim-1 が強く発現しており、FLT3 阻害薬または STAT5 阻害薬により Pim-1 の発現が減少した。32D/ITD では AZD1208 により細胞増殖はわずかに抑制されたが、GDC・MK と併用することで増殖抑制効果が増強した。アポトーシスの誘導も AZD 単独ではほぼ認められなかったが、GDC・MK との併用で著しく効果が増強した。また Pro-apoptosis 蛋白である Bax や Bak の活性化、Caspase-3 の切断の増加が認められ、内因性経路のアポトーシスが誘導されていた。32D/TKD に STAT5 恒常的活性化変異を導入すると、Pim-1 の発現が増強し GDC によるアポトーシス誘導に抵抗性を示したが、AZD 併用によって効果は減弱した。MV4-11 では Pim-2 の発現が認められ、同様に AZD と GDC・MK の併用により細胞増殖の抑制、内因性アポトーシス誘導が認められた。以上より、STAT5 活性化による Pim キナーゼの発現が PI3K/Akt 阻害薬への抵抗性に関与していることが示唆された。

続いて mTOR 経路への影響について解析した。32D/ITD 及び MV4-11 では AZD により mTORC1 の基質である p70S6K と 4EBP1 のリン酸化の抑制が認められたが、GDC と併用するとより強く抑制され、PRAS40 のリン酸化と Mcl-1 発現も低下するようになった。また MV4-11 において両者の併用により eIF4E/eIF4G 複合体形成が阻害されていた。

MV4-11 に shRNA を用いて mTOR をノックダウンした細胞、また 32D/ITD に mTOR 活性化変異を導入した細胞では、AZD と GDC 併用による細胞増殖抑制・アポトーシス誘導・mTORC1/Mcl-1 経路がそれぞれ亢進または減弱した。以上より、Pim キナーゼが mTORC1 経路を活性化し Mcl-1 などの cap 依存性翻訳を増強していることが示唆された。

32D/ITD に Mcl-1 を導入した細胞では、AZD と GDC 併用による Mcl-1 発現の減少・アポトーシス誘導に抵抗性を獲得した。Mcl-1 特異的阻害薬である A-1210477 は、MV4-11 において Mcl-1 と Bim の結合を阻害し、GDC と併用することで内因性アポトーシスを著明に誘導し、Mcl-1 阻害の重要性が示唆された。

32D/TKD に Pim-1 を導入した細胞では、GDC・MK、STAT5 阻害薬による増殖抑制やアポトー

シス誘導に有意に抵抗性を獲得した。また p70S6K・4EBP1 のリン酸化が亢進し、GDC・MK、FLT3 阻害薬によるリン酸化抑制に抵抗性を示したが、AZD 併用によってその抵抗性は減弱した。mTOR 上流の PRAS40・TSC2 のリン酸化及び Mcl-1 発現は Pim-1 導入により明らかな増加は見られなかったが、上記の阻害薬による抑制に抵抗性を示した。以上より、FLT3-ITD では Pim キナーゼが PRAS40、TSC2、4EBP1 等の分子をリン酸化することで mTORC1/4EBP1/Mcl-1 経路を直接または間接的に活性化していると考えられた。

AML の患者検体 5 例では、FLT3-ITD 陽性の 2 例で AZD と GDC 併用による生細胞数減少が有意に認められ、FLT3-ITD 再発時陽性 1 例と陰性 2 例では有意ではなかった。4EBP1 のリン酸化と Mcl-1 発現は、FLT3-ITD 陽性 2 例・再発時陽性 1 例において顕著に抑制された。

＜考察＞

これまで FLT3-ITD 陽性細胞で Pim-1 または Pim-2 が発現し、腫瘍の増殖や生存に関与していることや、両者の機能的な差異についても報告がみられている。しかし我々の実験では 32D/ITD では Pim-1 が、MV4-11 では Pim-2 が主に発現していたが、いずれも STAT5 により発現が制御され、AZD1208 により全く同様にシグナルが抑制され、機能的な差異は認められなかった。Pim キナーゼは、AML や MM 等の血液腫瘍において TSC2 や PRAS40、4EBP1 のリン酸化を介して mTORC1 経路を活性化することが報告されている。我々の研究でも、Pim キナーゼの発現または抑制により 4EBP1 リン酸化が亢進または減弱し、PRAS40 リン酸化は GDC と併用した場合に顕著となり、TSC2 リン酸化は Pim-1 発現により薬剤による抑制に抵抗性となった。以上より、FLT3-ITD でも Pim キナーゼが TSC2・PRAS40・4EBP1 など複数の分子を介して mTORC1/Mcl-1 経路を活性化していると考えられた。初期の Pim 阻害薬である SGI-1776 等は特異性が低く、Pim キナーゼの正確な機能や治療目標としての重要性についての評価が難しかったが、後に特異的汎 Pim キナーゼ阻害薬である AZD1208 等が開発された。AZD が AML 細胞株の増殖を抑制し、mTORC1 活性を抑制することは既に報告されているが、FLT3-ITD の有無について詳細な解析はなされていなかった。我々は今回特に FLT3-ITD における Pim キナーゼの役割について検討を行い、Pim 阻害薬と PI3K/Akt 阻害薬の相乗的な併用効果が FLT3-ITD 陽性 AML の一部患者検体でも認められ、この難治性白血病への新しい治療選択肢となり得る可能性が示された。今後は既に報告のある Pim キナーゼと Bad や CXCR4 との関連についても研究が必要と考えられる。

＜結論＞

FLT3-ITD 陽性細胞は STAT5 の下流で発現する Pim キナーゼが、mTORC1/Mcl-1 経路活性化を促進することで PI3K/Akt 阻害薬へ抵抗性を示す。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5384　号 | 岡田　啓五 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　清水　重臣<br>副　査　神奈木　真理、新井　文子 | |

（論文審査の要旨）

１．論文内容

Flt3 遺伝子の Internal Tandem Duplication（ITD）型変異は、急性骨髄性白血病(AML)においてもっとも頻度が高い遺伝子変異である。Flt3-ITD 変異を有する白血病細胞は PI3K/Akt 阻害剤に対する抵抗性を示すことから、本研究ではその分子機序を探索した。その結果、従来より知られている Pim キナーゼの下流で、翻訳抑制因子 4EBP1 の制御や抗アポトーシス分子 Mcl-1 の発現上昇が関与していることを新たに見いだした。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

Flt3-ITD型遺伝子変異は、AMLの発症や重症度に関わる遺伝子変異である。この遺伝子変異による抗細胞死効果の分子機序は広く研究されており、PI3K/Akt経路の重要性が報告されてきた。一方で、PI3K/Akt阻害剤では、十分な殺細胞効果が得られないことも報告されてきた。本研究では、PI3K/Akt阻害剤に対する抵抗性の分子機序を解析した。その結果、Pimキナーゼの発現上昇、4EBP1の発現制御、Mcl-1の発現上昇を介したアポトーシス抵抗性の獲得が、白血病細胞の生存に寄与していることを見いだした。

２）社会的意義

本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。

１、マウス造血細胞株32Dcl3細胞にFlt3-ITD遺伝子を導入すると、Stat5を介してPimキナーゼが高発現した。

２、Pimキナーゼを32Dcl3細胞に過剰発現すると、4EBP1の発現制御、Mcl-1の発現上昇、アポトーシス抵抗性の獲得が観察された。

３、Flt3-ITD遺伝子導入32Dcl3細胞に、PI3K阻害剤とPimキナーゼ阻害剤を併用すると強い殺細胞効果が得られた。この時、4EBP1の発現上昇、Mcl-1の発現低下、アポトーシスの誘導が観察された。

４、ヒト臨床由来のFlt3-ITD型白血病細胞においても、PI3K阻害剤とPimキナーゼ阻害剤を併用すると、同様のメカニズムでアポトーシスが誘導された。

５、これらの結果より、Pimキナーゼの発現上昇、4EBP1の発現制御、Mcl-1の発現上昇を介したアポトーシス抵抗性の獲得が、PI3K/Akt阻害剤に対する抵抗性の原因であることが明らかとなっ

た。

３）研究方法・倫理観

本研究の遂行には、細胞生物学、分子生物学、血液学などの知識が必要であり、申請者の学識と技術力が伺える。

４）考察・今後の発展性

Flt3-ITD型白血病治療に応用できる有用な研究である。

３．その他　なし

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 羅　媛君 |
| 論文審査担当者 | 主査　寺田　純雄<br>副査　石川　欽也、中田　隆夫 |
| 論　文　題　目 | Single axonal morphology and termination to cerebellar aldolase C stripes characterize distinct spinocerebellar projection systems originating from the thoracic spinal cord in the mouse |

（論文内容の要旨）

Summary

The spinocerebellar projection has an essential role in sensorimotor coordination of limbs and the trunk. Damage to this projection causes sensorimotor disorders as seen in Friedreich's ataxia. Multiple groups of spinocerebellar projections have been identified in retrograde labeling studies. In this study, we aimed at characterizing the projection patterns of these groups using a combination of anterograde labeling of the thoracic spinal cord and aldolase C immunostaining of longitudinal stripes of the cerebellar cortex in the mouse.

We reconstructed 22 single spinocerebellar axons, wholly in the cerebellum and brain stem and partly, in the spinal cord. They were classified into three groups, (1) non-crossed axons of Clarke’s column neurons (NCC, 8 axons), (2) non-crossed axons of marginal Clarke’s column neurons (NMCC, 7 axons), and (3) crossed axons of neurons in the medial ventral horn (CMVH, 7 axons), based on previous retrograde labeling studies. While NCC axons projected mainly to multiple bilateral stripes in vermal lobules II–IV and VIII–IX, and the ipsilateral medial cerebellar nucleus, NMCC axons projected mainly to ipsilateral stripes in paravermal lobules II–V and copula pyramidis, and the anterior interposed nucleus. CMVH axons projected bilaterally to multiple stripes in lobules II–V with a small number of terminals but had abundant collaterals in the spinal cord and medullary reticular nuclei as well as in the vestibular and cerebellar nuclei. The results indicate that, while CMVH axons overlap with propriospinal and spinoreticular projections, NCC and NMCC axons are primarily spinocerebellar axons, which seem to be involved in relatively more proximal and distal sensorimotor controls, respectively. This study would provide the morphological basis to understand the pathophysiology of spinal and cerebellar disorders and to develop treatments for them.

Introduction

The spinocerebellar fiber projection is one of the major mossy fiber afferent projection systems of the cerebellum, and is involved in the sensorimotor coordination of the trunk and extremities. Conventionally, the spinocerebellar projection for the hind limb is classified into the dorsal and ventral spinocerebellar tract

systems which originate from the thoracic and lumbar segments, respectively. The dorsal spinocerebellar tract is one of the main damaged structures in Friedreich's ataxia.

Later retrograde labeling studies classified origins of the spinocerebellar projection into three groups in the thoracic segment of the spinal cord in the cat: (1) non-crossed Clarke's column (NCC) neurons which ascend the spinal cord ipsilaterally and project bilaterally to the cerebellum, (2) non-crossed marginal Clarke's column (NMCC) neurons which ascend the spinal cord ipsilaterally and project ipsilaterally to the cerebellum and (3) crossed medial ventral horn (CMVH) neurons which ascends the spinal cord contralaterally and project bilaterally to the cerebellum. Retrograde and marker labeling studies have indicated similar multiple groups of spinocerebellar projections in the mouse.

In this study, we labeled neurons anterogradely and reconstructed single spinocerebellar axons originating from the thoracic spinal cord, and mapped their termination on the immunostained striped pattern of aldolase C expression in the cerebellum. We then compared single axon morphology among reconstructed axons, and with that of other cerebellar afferent axons, to distinguish the different groups of thoracic spinocerebellar projections, and to speculate their functional and morphological significance.

## Materials and methods

Experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and Recombinant Experiment Safety Committee of Tokyo Medical and Dental University.

Biotinylated dextran amine (BDA) was injected into the gray matter in the right or left side of the thoracic spinal cord in anaesthetized adult mice. Ten-14 days after the injection, mice were perfusion-fixed, and the brain and spinal cord were dissected. The brain and medulla were cut into serial coronal sections, while the spinal cord was cut into sagittal sections. BDA was visualized in black by using ABC kit and diaminobenzidine. Then, aldolase C was then immunostained in brown in cerebellar sections.

Single labeled axons and BDA injection sites were traced and reconstructed from serial sections by using a bright-field microscope equipped with camera-lucida apparatus and a two-dimensional illustrating software. The location of mossy fiber terminals that belong to the labeled axons was identified with regard to the immunostained aldolase C stripes, and mapped on the scheme of the unfolded cerebellar cortex.

Retrograde labeling experiments were done in Aldoc-Venus:C57BL/6N mice, with the injection of latex beads suspension into lobule VIII. Fourteen days after injection, mice were perfusion-fixed, and the brain and spinal cord were dissected. Serial coronal sections were cut from the brain, and serial sagittal sections were cut from the spinal cord. Injection sites and retrogradely labeled neurons were imaged under the fluorescent microscope. The distribution of retrogradely labeled neurons was mapped and reconstructed.

## Results

Twenty-two single spinocerebellar axons were reconstructed. Axons that ascended at the same side as the BDA injection (designated as "ipsilateral side") and projected bilaterally in the cerebellum were classified into the NCC group (8 axons). Axons that ascended the ipsilateral side and projected ipsilaterally in the cerebellum were classified into the NMCC group (7 axons). Axons that ascended at the opposite side to the

BDA injection (contralateral side) were classified as the CMVH group (7 axons).

All NCC and NMCC axons ascended the dorsal part of the ipsilateral lateral funiculus, while CMVH axons mostly ascended the ventral part of the contralateral lateral funiculus. All of these axons enter the cerebellum through the inferior cerebellar peduncle in the medulla ("medullary path"), except for two NCC axons which enter the cerebellum through the lateral pons ("pontine path").

None of NCC or NMCC axons gave rise to collaterals in the spinal cord, while five of the six reconstructed CMVH axons gave rise to collaterals in the spinal cord.

NCC axons gave rise to collaterals in the medullary reticular nuclei only occasionally. NMCC axons did not give rise to collaterals in the medulla. CMVH axons almost always gave rise to multiple collaterals that terminated in various medullary and pontine reticular nuclei.

In the cerebellar and vestibular nuclei, NCC axons innervated the ipsilateral medial cerebellar nucleus and nucleus X. NMCC axons innervated the ipsilateral anterior interposed nucleus. CMVH axons had abundant collaterals in various vestibular and cerebellar nuclei.

In the cerebellar cortex, NCC axons projected mostly to the bilateral vermal area in lobules II–IV (mainly in aldolase C stripes 1+ and medial 1-, lateral 1-, 2+, and lateral 2- and b+) and VIII–IX (mainly in aldolase C stripes 2+ and 3+). NMCC axons projected mostly to the ipsilateral paravermal area in lobules II–V (mainly in aldolase C stripes 2-, 3+ and 3-) and copula pyramidis or lateral lobule VIII (mainly in aldolase C stripes f-, e1+, e1- and e2+). CMVH axons projected mostly to bilateral vermal area in lobules II–V (mainly in stripes 1+ and medial 1-, lateral 1-, 2+ and lateral 2- and b+) with a small number of terminals. The average number of mossy fiber terminals of NCC, NMCC and CMVH axons was 99.4, 91.0 and 27.7, respectively.

The above results clarified different morphological characteristics of the three groups of spinocerebellar axons. To confirm the differences between projections of NCC and NMCC axons, retrograde labeling experiments were performed. Retrograde tracer injection into the vermal area (aldolase C stripe 2+ in lobule VIII at the right side) labeled neurons in the bilateral Clarke's column nucleus in the thoracic spinal cord, whereas tracer injection into the paravermal area (aldolase C stripe 4- in copula pyramidis at the right side) labeled neurons in the bilateral Clarke's column nucleus with ipsilateral predominance and in the ipsilateral gray matter lateral to the Clarke's column nucleus only in the ipsilateral side, where NMCC neurons are located. Thus, the result of retrograde-labeling experiments was in conformity with the axonal morphology of NCC and NMCC groups.

## Discussion

Single axon morphology of cerebellar mossy fibers has been so far reported for the lateral reticular nucleus and the dorsal column nucleus. Their axons have as many as approximately one hundred mossy fiber terminals in the cerebellar cortex with (or without) collateral termination only in the cerebellar and vestibular nuclei. All NMCC axons and most of NCC axons, retained the same characteristics.

In contrast, the morphology of CMVH axons did not resemble the precerebellar-type projection. They had weak mossy fiber projection and abundant collateral projection in the spinal cord and medulla, serving as

the propriospinal and spinoreticular projections. We speculate that CMVH axons may reflect the extension of arbor preexisting axons into the developing cerebellum in phylogenetically old vertebrates before precerebellar-type axons were formed.

The target cortical areas of the three groups of axons generally fit with the hind limb area within the dual somatotopy of the spinocerebellum. Among the three groups of projections, NMCC axons projected more laterally (to the paravermal cerebellar cortex and anterior interposed nucleus) than NCC and CMVH axons, as clearly demonstrated in the present study by aldolase C labeling. This difference indicates that NMCC axons are involved more in the control of specific limb parts, whereas NCC and CMVH axons are involved more in the control of trunk movement, locomotion and posture.

In summary, we have presented nearly complete axonal trajectories of single spinocerebellar axons for the first time in the present study. The different branching and termination patterns of the three groups of axons, demonstrated here, may reflect different phylogenetic origins and different functions. In relation to clinical neurology, this study would provide a morphological basis to understand the pathophysiology of spinal and cerebellar disorders and to develop treatments for them.

（要約）

脊髄小脳投射は、四肢と躯幹の感覚運動の協調に重要な役割を持ち、この病変は Friedreich 失調症に見られるように感覚運動障害を引き起こす。これまでの逆行性標識法での研究により複数の脊髄小脳投射のグループが同定されている。私たちは、マウスにおいて、胸髄からの順行性の神経標識と小脳皮質縦縞構造のアルドラーゼ C 免疫染色とを組み合わせ、これらのグループの投射様式の特徴を明らかにすることを目標にした。

単一脊髄小脳路の軸索 22 本について、小脳と脳幹では軸索とその分岐の全体を、そして、脊髄では軸索を部分的に再構築した。それらの 22 本の軸索は、これまでの逆行性標識の研究に基づいて、（１）非交差性 Clarke 核軸索(NCC, 8 本), (2)非交差性辺縁 Clarke 核軸索(NMCC, 7 本)、および (3)交差性内側前角ニューロン軸索(CMVH, 7 本)に分類された。NCC 軸索は主に小脳の第 II—IV 小葉と VIII-IX 小葉の虫部の縦縞と内側小脳核に同側性に投射した。NMCC 軸索は主に第 II-V 小葉と錐体結合節の傍虫部縦縞、そして前中位核に同側性に投射した。CMVH 軸索は、第 II-V 小葉の虫部縦縞に少数の軸索終末で投射し、それ以外に脊髄、延髄網様、体前庭神経核、小脳核に多数の軸索終末で投射した。この結果は、CMVH 軸索は脊髄小脳投射に加えて脊髄固有投射と脊髄網様体投射の特徴を持つのに対して、NCC 軸索と NMCC 軸索は脊髄小脳投射の固有の軸索であることを示し、さらに、NCC はより近位、NMCC はより遠位の感覚運動制御に関わることを示す。脊髄・小脳疾患の病態理解と治療法開発のための基礎的な知見としても有用な結果である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5385　号 | 羅　媛君 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　寺田　純雄<br>副　査　石川　欽也、中田　隆夫 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文はマウスにおける脊髄小脳投射を単一軸索レベルで観察した結果をまとめたものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

哺乳類における脊髄小脳投射については、ネコ、マウス等で報告があるが、マウスにおける順行性標識による単一軸索レベルの観察所見はみられない。申請者らはグループ内で確立している順行性標識技術により、単一軸索の投射パターンと小脳皮質縦縞構造との対応を観察することにより、新規の機能的な所見を得ることを目標として解析を行った。観察そのものについても、解剖学的な記述として一定の意義を有するものと評価される。

２）社会的意義

本研究により、非交叉性クラーク核（小脳の第 II-IV 小葉と VIII-IX 小葉の虫部の縦縞と内側小脳核に同側性に投射）、非交叉性辺縁クラーク核（第 II-V 小葉と錐体結合節の傍虫部縦縞、前中位核に同側性に投射）、交叉性内側前核ニューロン（第 II-V 小葉の虫部縦縞に少数の軸索終末で投射し、それ以外に脊髄、延髄網様体、前庭神経核、小脳核に多数の軸索終末で投射）の三種の細胞由来と推定される単一軸索投射パターンが観察され、従来知られている所見を裏付けるより詳細な形態学的な記述が可能となった。小脳の関連する神経回路につき考察する際に一定の意義ある研究成果である。

３）研究方法・倫理観

研究にはマウスが使用され、既に確立された順行性、及び逆行性標識法と、連続切片の丹念な観察により、単一軸索の投射パターンの観察を行っている。手間がかかるために多数の例を検討することは困難であり、代替手法についての検討も望ましいと思われるが、得られた所見については確実性の高い結果が得られているものと評価できる。動物実験等につき倫理的な観点からは適正に研究が遂行されている。

４）考察・今後の発展性

申請者は非交叉性クラーク核由来の脊髄小脳投射は近位の、非交叉性辺縁クラーク核由来はよ

り遠位の感覚運動制御に関与し、交叉性内側前核ニューロン由来の脊髄小脳路は脊髄固有投射と網様体投射の特徴をあわせもつものと考察している。従来の所見を裏付ける内容である。申請者は今般以外の髄節由来の脊髄小脳投射についても解析を進めるとしており、新規所見が得られることを期待したい。

**３．その他**

特記すべき事項はない。

**４．審査結果**

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに水準にあるものと考えられる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 太田　卓哉 |
| 論文審査担当者 | 主査　樗木　俊聡<br>副査　神奈木　真理、安達　貴弘 |
| 論　文　題　目 | Skin CD4$^+$ Memory T Cells Play an Essential Role in Acquired Anti-Tick Immunity through Interleukin-3-Mediated Basophil Recruitment to Tick-Feeding Sites |

（論文内容の要旨）

<要旨>

外部寄生虫の一種であるマダニは、吸血時に様々な病原体を伝播するベクターとして知られる。マウスを含むいくつかの動物種は、一度マダニ吸血を経験すると二度目以降の感染時にマダニ吸血に対する抵抗性を示し、吸血量や病原体伝播の減少が見られる。最近我々は、マダニ吸血に対する獲得耐性を示すマウスではマダニ吸血局所に好塩基球が多数浸潤していることを発見し、この好塩基球を除去するとマダニ耐性が消失することを報告した。好塩基球がマダニ吸血局所に浸潤することは耐性獲得に重要であると考えられるが、この好塩基球浸潤メカニズムは全く分かっていないため、本研究で解明を試みた。T 細胞欠損マウスではマダニ吸血局所における好塩基球浸潤が見られないが、このマウスに CD4$^+$ T 細胞を移植すると浸潤が観察されるようになることから、好塩基球の浸潤には CD4$^+$ T 細胞が必須であることが分かった。さらに、好塩基球浸潤の見られるマダニ吸血局所ではインターロイキン 3(IL-3)が特徴的に上昇しており、*Il3* 欠損 CD4$^+$ T 細胞を T 細胞欠損マウスに移植しても好塩基球の浸潤を誘導できなかったことから、CD4$^+$ T 細胞由来の IL-3 が好塩基球浸潤に重要であることが分かった。興味深いことに、IL-3 産生能を持つ T 細胞は二度目のマダニ感染直前の段階ですでに全身の皮膚で検出され、これらは皮膚常在型 CD4$^+$メモリーT 細胞($T_{RM}$)の特徴を有していた。以上の結果より、一度目のマダニ吸血後、$T_{RM}$ が皮膚の広範囲に生着し、二度目のマダニ吸血時に $T_{RM}$ が即座に IL-3 を産生することで、マダニ吸血局所へ好塩基球浸潤を誘導していることが示唆された。

<緒言>

マダニはヒトや様々な動物から吸血を行う外部寄生虫の一種であり、吸血の際にライム病や重症熱性血小板減少症候群（SFTS）などに代表されるマダニ媒介性感染症の病原体を伝播することから、医学上大きな問題となっている。従来、こうした被害を防ぐために殺マダニ剤を用いた対策が講じられてきたが、近年では薬剤耐性マダニの存在が報告され、これに代わる新たな手段の開発が急がれている。古くから、マダニに一度でも吸血されたことのある動物では、二度目以降に感染するマダニの死亡率の上昇や、吸血量が減少するなど獲得免疫が発揮されることが知られている。さらに、このマダニ耐性を獲得した動物では、マダニによる病原体伝播も減弱するこ

とが報告されており、新たなマダニ対策として注目されている。最近当研究室では、マダニ吸血に対する耐性獲得に好塩基球が重要な役割を果たしていることを報告した。二度目のマダニ吸血局所では、初感染時には見ることのできない好塩基球の浸潤が観察されており、これを除去するとマダニ耐性が消失する。したがって、この好塩基球の浸潤がマダニに対する耐性発揮に重要であると考えられているが、その詳しい浸潤メカニズムについては不明である。そこで、本研究では二度目の感染時のマダニ吸血局所における好塩基球浸潤のメカニズムについて検討した。

<方法>

フタトゲチマダニ（幼ダニ）をまずマウス左脇腹に 40 匹感染させ、その 14 日後に右脇腹へ二度目の感染を行った。マダニ感染後 2 日目に吸血局所の皮膚を回収し、コラゲナーゼ処理によって細胞を単離後、フローサイトメトリーによってマダニ感染局所の細胞浸潤を解析した。T 細胞の IL-3 産生能は、抗 IL-3 抗体を用いて解析した。$CD4^+$ T 細胞の移入は、脾臓細胞から磁気ビーズと抗 CD4（GK1.5）抗体を用いて $CD4^+$ T 細胞を分離後、$1\times10^6$個を T、B 細胞欠損マウス（*Rag2* 欠損マウス）へ行った。その後、翌日から一度目のマダニ感染をおこない、細胞浸潤解析した。皮膚への IL-3 投与実験は、*Rag2* 欠損マウスの右脇腹にリコンビナント IL-3 (100ng/injection/day)を一度目のマダニ感染の 7 日前から浸潤解析を行う感染後 2 日目までの計 10 日間、毎日皮下に投与しておこなった。サイトカインなどの遺伝子発現は Q-PCR 法によって検出した。

<結果>

マダニ吸血局所への好塩基球浸潤の経時的変化を解析したところ、過去の報告通り一度目の感染では好塩基球浸潤が観察されないが、二度目の感染開始後 2～3 日をピークとして起こることが分かった。さらに、生体イメージング法により好塩基球の局在をより詳細に解析すると、マダニ吸血口を取り囲むように集積していることが明らかになった。

次に、好塩基球浸潤が一度目ではなく、二度目のマダニ吸血局所に起こることから、獲得免疫の関与を検討した。その結果、T 細胞を欠損している *Tcra* 欠損マウスや *Rag2* 欠損マウスでは好塩基球浸潤が見られなかったが、これらのマウスに野生型の $CD4^+$ T 細胞を移入するとことで好塩基球の浸潤が誘導できた。一方で、マダニ抗原を認識することのできない卵白アルブミン特異的 T 細胞受容体のみを持つ OT-II トランスジェニックマウスの $CD4^+$ T 細胞移入で好塩基球浸潤を誘導することができなかったことから、好塩基球の浸潤にはマダニ抗原特異的 $CD4^+$ T 細胞が必須であることが示唆された。興味深いことに、$CD4^+$ T 細胞もマダニ吸血局所において二度目の吸血で増加しており、好塩基球浸潤よりも前に増加していることが分かった。

好塩基球の浸潤に関与する分子を同定するため、マダニ吸血局所において様々なサイトカインの遺伝子発現を調べた。その結果、*Il4* および *Il3* の遺伝子が高発現していることが分かった。また *Il4* 欠損マウスでは好塩基球浸潤が野生型と同等に見られるものの、*Il3* 欠損マウスでは好塩基球浸潤が完全に消失していた。そこで、マダニ吸血局所での IL-3 の存在が好塩基球浸潤に重要かどうか調べるために、*Rag2* 欠損マウスのマダニ感染予定部位に予め IL-3 を投与したところ、一度目の感染でも吸血局所に好塩基球浸潤を誘導することができた。したがって、好塩基球浸潤は

マダニ吸血局所で産生された IL-3 によって誘導されるものと考えられた。

以上、$CD4^+$ T 細胞と吸血局所の IL-3 が好塩基球浸潤に重要であることから、$CD4^+$ T 細胞の産生する IL-3 が好塩基球の浸潤に関与する可能性が示唆された。そこで、*Rag2* 欠損マウスに *Il3* 欠損 $CD4^+$ T 細胞を移入したところ、$CD4^+$ T 細胞はマダニ吸血局所に浸潤できているにも関わらず、好塩基球浸潤を誘導できなかった。IL-3 の産生能を持つ $CD4^+$ T 細胞（$IL\text{-}3^+CD4^+$ T 細胞）はナイーブマウスの皮膚や 1 度目のマダニ感染初期にはほとんど見られないが、二度目の感染時にはマダニ吸血局所で増加していることが分かった。さらに、$IL\text{-}3^+CD4^+$ T 細胞を詳細解析したところ、これらの細胞の大部分は皮膚常在型メモリーT 細胞($T_{RM}$)のマーカーを発現していることが分かった。$IL\text{-}3^+$ $T_{RM}$は 1 度目のマダニ感染が終わった後から増加し、二度目の感染の直前にはすでに全身の皮膚に存在していることが分かった。

<考察>

一度目のマダニ感染後、マダニ抗原特異的な $IL\text{-}3^+$ $T_{RM}$が全身の皮膚に駐留し、二度目の感染時に $T_{RM}$がマダニ吸血部位で IL-3 を産生することで好塩基球浸潤を誘導していることが明らかとなった。$T_{RM}$は、これまでよく研究されてきた一般的なメモリーT 細胞であるセントラルメモリーT 細胞($T_{CM}$)や、エフェクターメモリーT 細胞($T_{EM}$)とは異なり、最初に高原暴露された組織に常在され続けるメモリー細胞であり、獲得免疫を現場において迅速に発揮するための重要な細胞として近年知られてきている。最近の報告では、$CD4^+$ $T_{RM}$がリーシュマニア感染において IFN-γを産生し、炎症性単球の浸潤を媒介することで感染防御に重要な役割を果たしていることが報告されている。このことから、マダニ吸血においても同様に、$T_{RM}$が一度目のマダニ感染後に皮膚組織へ生着することで、二度目以降のマダニ感染の際にいち早く IL-3 を産生し、スピーディーに好塩基球浸潤を誘導してマダニ耐性を発揮することに貢献しているものと考えられる。一方で、局所で産生される IL-3 がどのように好塩基球を浸潤に導くのか、そのメカニズムについては依然として不明である。IL-3 は血管内皮細胞および好塩基球に作用することが知られており、これにより接着因子の発現が誘導されて血管内皮細胞と好塩基球の接着が可能となり、組織への浸潤が促進するという報告もあるが、さらなる解析が必要である。

<結論>

IL-3 産生能を持つ皮膚常在性 $CD4^+$メモリーT 細胞がマダニ感染局所において IL-3 を産生することで、好塩基球の浸潤が誘導され、マダニ耐性が発揮されることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5386　号 | 太田　卓哉 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　樗木　俊聡<br>副　査　　神奈木　真理、安達　貴弘 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

マダニ吸血抵抗性に関わる獲得免疫細胞とその役割の詳細を明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

一度マダニ吸血を経験した動物は二度目以降のマダニ吸血抵抗性を示すこと、同抵抗性獲得に好塩基球が重要なこと知られている。本論文では、好塩基球の再感染局所への動員機構を新たに明らかにした。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．マダニ再感染時の皮膚局所への好塩基球の浸潤に必要な獲得免疫細胞を検討し、$CD4^+$T 細胞が必須であることを明らかにした。

２．当該 $CD4^+$T 細胞の産生するサイトカイン IL-3 が好塩基球の浸潤に重要なことを示した。

３．IL-3 産生 $CD4^+$T 細胞は初感染後に全身の皮膚に分布するようになり、皮膚常在型メモリー T 細胞（$T_{RM}$）の形質を示した。

３）研究方法・倫理観

フタトゲチマダニ（幼ダニ）をマウス左脇腹に 40 匹感染させ、14 日後に右脇腹に二度目の感染を行った。その後、皮膚浸潤細胞を単離してフローサイトメトリーや qPCR 等の解析を行った。

４）考察・今後の発展

今後、IL-3 の作用機序を明らかにすることによりマダニ吸血抵抗性獲得機構の理解が深化し、マダニ媒介性感染症（ライム病、SFTS）の予防や治療への応用が期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 室田　吉貴 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　真二<br>副査　三木　義男、三宅　智 |
| 論　文　題　目 | Requirement of ABC transporter inhibition and Hoechst 33342 dye deprivation for the assessment of side population-defined C6 glioma stem cell metabolism using fluorescent probes |

（論文内容の要旨）

【要旨】

癌幹細胞は治療抵抗性を呈し加えて再発に深く関わることから、その諸特性を解明することは重要な意義を持つ。そのため、癌の根治療法確立に向けてこれまでに癌幹細胞の分離法、培養法をはじめとして、シグナル伝達経路、血管構成細胞への分化、腫瘍随伴マクロファージの誘引、活性酸素の除去、異物の排出など様々な生物学的特性が明らかにされているが未だ全容解明には至っていない。とりわけ、癌化した細胞が正常細胞と異なる代謝を示すことが知られてはいるものの癌幹細胞の代謝特性に関しては未知の点が多い。そこで本研究は、迅速かつ簡便な定性・定量化が可能な蛍光プローブとフローサイトメトリーを用いて、癌幹細胞の代謝特性の解明を試みた。ラット C6 グリオーマ細胞のうち癌幹細胞画分である side population (SP)細胞と非癌幹細胞画分である main population (MP)細胞を、ミトコンドリアを検出する MitoTracker Green (MTG)、細胞内の活性酸素を検出する CellROX、ミトコンドリア膜電位依存的に単量体が凝集体を形成し、蛍光が長波長側にシフトする性質を有する JC-1 を用いて解析した。本研究により、蛍光プローブは癌幹細胞に発現している ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの基質となり細胞外に排出されるため、癌幹細胞の代謝解析にはトランスポーターの阻害が必要であることが示された。また、癌幹細胞の分離に用いる DNA 染色性色素 Hoechst 33342 は JC-1 色素の凝集を反映する蛍光強度を上昇させるため、Hoechst 色素の除去が必要であることが示された。これら ABC トランスポーターの阻害と DNA 染色性色素の影響を考慮し厳密に癌幹細胞の代謝解析を行ったところ、ラット C6 グリオーマ細胞において癌幹細胞と非癌幹細胞は、本研究で用いたプローブで調べた限りの観点では代謝特性に有意な差異はないことが示唆された。

【背景と目的】

腫瘍組織の不均一性を説明するモデルとして、腫瘍組織は「癌幹細胞」を頂点とし、そこから派生して分化した細胞によって構成されるという階層性モデルが主流となっている。癌幹細胞は既存の放射線化学療法に対して抵抗性を示し転移に寄与する特性も有することから、再発の根源であると考えられる。そのため癌の根治にあたって、腫瘍細胞のバルクを対象としたこれまでの研究に加えて癌幹細胞を標的とした癌研究が重要な意義を持つ。一方、解糖系やグルタミン代謝

の亢進、ミトコンドリアの機能低下など癌の代謝はその悪性化に関与すると考えられるためこれまで癌特異的な治療標的として注目されてきた。しかしながら、癌幹細胞の代謝特性については未だに結論を得られていない状況にある。例えば、Zhou らはグリオーマ癌幹細胞がエネルギー産生において解糖系への依存性が高いことを報告しているが(J Biol Chem, 2011)、一方で Vlashi らは癌幹細胞の解糖系への依存性の低さを報告している(Proc Natl Acad Sci USA, 2011)。所属研究室では以前に、ABC トランスポーターによる DNA 染色性色素 Hoechst 33342 の排出能力に基づく side population (SP)法を用いて、ラット C6 グリオーマ細胞株内で色素低染色性の SP 細胞が癌幹細胞、高染色性の MP 細胞が非癌幹細胞の特性を有することを見出している。本研究はこれら SP 細胞を癌幹細胞モデルとし、癌幹細胞と非癌幹細胞の代謝特性を比較することで癌幹細胞の理解および治療法開発への示唆を得ることを目的として実施した。

【方法】

ラット C6 グリオーマ細胞は 10%FBS 含有 DMEM で培養した。SP 細胞と MP 細胞を fluorescence-activated cell sorter (FACS)により回収後、ミトコンドリア量を検出する MTG、活性酸素を検出する CellROX、およびミトコンドリア膜電位を検出する JC-1 で染色した。ABC トランスポーター阻害剤である verapamil は細胞回収後、蛍光プローブによる染色の前に添加した。Hoechst 色素の除去は、SP 細胞と MP 細胞を分離回収後、6 日間再培養することにより行った。再培養後の細胞を Hoechst 33342 で染色し、SP 細胞と MP 細胞の性質が保たれているかを確認した。

【結果】

癌幹細胞と非癌幹細胞の代謝特性を比較するため SP 細胞と MP 細胞を MTG、CellROX、および JC-1 で染色したところ、SP 細胞で MP 細胞より有意に低い MTG、CellROX、および JC-1 単量体の蛍光強度が検出された。SP 細胞は細胞膜上の ABC トランスポーター依存的な異物排出能が高いことから、ABC トランスポーター阻害剤である verapamil 存在下で染色を行ったところ、SP 細胞における MTG、JC-1 単量体、および CellROX の蛍光強度は MP 細胞と同程度にまで上昇した。これらの結果は、蛍光プローブは SP 細胞に発現している ABC トランスポーターにより細胞外に排出されること、および SP 細胞と MP 細胞のミトコンドリアの量、活性酸素量は同等であることを示唆している。またこれらの結果は、蛍光プローブを用いた癌幹細胞の代謝特性解析には ABC トランスポーターを介したプローブの排出を阻害する必要があることを示している。ミトコンドリア膜電位の指標となる JC-1 凝集体の蛍光強度を比較すると、SP 細胞の蛍光強度は、verapamil 存在下においても MP 細胞より有意に低かったことから、癌幹細胞のミトコンドリア膜電位に関しては非癌幹細胞よりも低い可能性が示唆された。しかしながら、SP 細胞と MP 細胞を分離するために Hoechst 33342 の前染色を行っていることから、Hoechst 33342 の前処理が JC-1 凝集体の蛍光強度に与える影響を検討したところ、Hoechst 33342 の存在下では JC-1 凝集体の蛍光強度が上昇することが明らかとなった。この原因を探るため、まず初めに JC-1 を励起するための Ar レーザーが Hoechst 33342 を励起し、その蛍光が JC-1 検出用フィルターにより検出されている可能性を検証した。Hoechst 33342 で細胞を染色し JC-1 検出用フィルターで解析したところ、蛍

光は検出されなかったため、その可能性は否定された。次に、UV レーザーにより励起された Hoechst 33342 が JC-1 を励起した可能性を検証した。Hoechst 33342 と JC-1 で細胞を染色し、UV レーザーを切った状態で JC-1 凝集体の蛍光を解析したところ、UV レーザーの影響は見られなかったため、この可能性も否定された。最後に Hoechst 33342 が細胞のサイズや粒状性に与える影響を前方散乱光（FSC）および側方散乱光（SSC）から比較したが、その影響も確認されなかった。これらのことから Hoechst 33342 の前染色によりなぜ JC-1 凝集体の蛍光強度が上昇するかは解決できなかったが、少なくとも癌幹細胞のミトコンドリア膜電位を JC-1 により解析する場合には、細胞内 Hoechst 33342 の除去が必要であることが示された。そこで、SP 細胞と MP 細胞を分離回収後、6 日間の再培養を行い、Hoechst 33342 除去後の細胞を JC-1 染色したところ、JC-1 凝集体の蛍光強度に有意な差は確認されなかった。再培養後の細胞は Hoechst 33342 染色により SP 細胞と MP 細胞それぞれの性質を十分に維持していたことから、癌幹細胞と非癌幹細胞のミトコンドリア膜電位もまた、同程度であることが示唆された。

【考察】

癌幹細胞の抗がん剤耐性のメカニズムには ABCG2 や ABCB1（MDR1）をはじめとする ABC トランスポーターファミリー遺伝子の高い発現が寄与していることが知られている。本研究に適用した SP 法は、この ABC トランスポーターによる異物排出能に基づく機能的な癌幹細胞分離法のひとつであり、幅広い癌に適用されている。細胞の代謝解析にはしばしば蛍光プローブが用いられるが、異物排出能力の高い癌幹細胞に対しこのような解析用プローブが適用可能であるかどうかの検討は行われてこなかった。実際にトランスポーターの阻害なく蛍光プローブを用いて解析した研究がいくつか見受けられ、本研究はそれらに一石を投じる結果となった。本研究で Hoechst 33342 が JC-1 色素の凝集を反映する蛍光強度を上昇させる原因を特定するには至らなかったが、Hoechst 33342 は核 DNA のみならずミトコンドリア DNA も染色することが知られているため、ミトコンドリアマトリックスにおける Hoechst 33342 と JC-1 色素の共局在が凝集体形成に影響した可能性が考えられる。本研究において、少なくともラット C6 グリオーマにおける癌幹細胞と非癌幹細胞の代謝特性は類似していることが示唆された。解析に用いた細胞は 10%FBS 含有培地で培養したものであり、低酸素、低栄養、低 pH をはじめとした腫瘍環境の変化は考慮されていないため、それらを考慮した代謝解析を行うことで、in vivo における癌幹細胞の特性が顕在化する可能性もあると考える。

【結論】

代謝解析用蛍光プローブは癌幹細胞から排出されるため、ABC トランスポーターの阻害が必要であること、および癌幹細胞の分離に SP 法を適用した場合、Hoechst 33342 色素の前染色が JC-1 色素の凝集を反映する蛍光強度を上昇させるため Hoechst 色素の除去が必要であることが示された。ABC トランスポーターと Hoechst 33342 の影響を考慮し解析した結果、C6 グリオーマ細胞においてミトコンドリアの量、活性酸素、ミトコンドリア膜電位の観点では癌幹細胞と非癌幹細胞の代謝特性は類似していることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5387　号 | 室田　吉貴 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田中　真二<br>副　査　三木　義男、三宅　智 | |

（論文審査の要旨）

１．論文内容

本論文は蛍光プローブを用いた癌幹細胞の代謝解析において、ABC トランスポーター阻害と DNA 染色性色素除去の必要性を研究した成果である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

ABC トランスポーターによる DNA 染色性色素 Hoechst 33342 の排出能力に基づく side population (SP)法を用いて、ラット C6 グリオーマ細胞の癌幹細胞分画である SP 細胞と、非癌幹細胞分画である main population (MP)細胞をそれぞれ抽出して解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. ミトコンドリアを検出する MitoTracker Green(MTG)、細胞内活性酸素を検出する CellROX、ミトコンドリア膜電位を検出する JC-1 を用いて解析した結果、SP 細胞で MP 細胞より有意に低い MTG、CellROX、および JC-1 単量体の蛍光強度が検出された。
2. SP 細胞は細胞膜上の ABC トランスポーター依存的な異物排出能が高いことから、ABC トランスポーター阻害剤 verapamil 存在下で染色を行ったところ、SP 細胞における MTG、CellROX、および JC-1 単量体の蛍光強度は MP 細胞と同程度にまで上昇した。
3. ミトコンドリア膜電位の指標となる JC-1 凝集体の蛍光強度を比較すると、SP 細胞の蛍光強度は verapamil 存在下においても MP 細胞より有意に低かったが、Hoechst 33342 除去後の細胞を JC-1 染色したところ、JC-1 凝集体の蛍光強度に有意差は確認されなかった。

以上のように申請者は、ABC トランスポーターと Hoechst 33342 の影響を考慮し解析した結果、C6 グリオーマ細胞においてミトコンドリア量、活性酸素、ミトコンドリア膜電位の観点では癌幹細胞と非癌幹細胞の代謝特性が類似する可能性を示唆している。蛍光プローブを用いた癌幹細胞の代謝解析において、ABC トランスポーター阻害と DNA 染色性色素除去の必要性を示した研究成果である。

３）研究方法・倫理観

研究にはラット C6 グリオーマ細胞の癌幹細胞分画である SP 細胞と非癌幹細胞分画である MP 細胞を用いて詳細な解析を行っている。十分な細胞生物学的知識、技術のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示された。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果によりラット C6 グリオーマにおける癌幹細胞と非癌幹細胞の代謝特性が通常培養条件では類似することが示唆されたが、生体内条件では低酸素、低栄養、低 pH など腫瘍環境の変化が関与する可能性を考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究でさらに発展することが期待される。

３．その他

特記事項なし

４．審査結果

論文審査の内容を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位申請に値する十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 冨樫　由紀 |
| 論文審査担当者 | 主査　朝蔭　孝宏<br>副査　石川　俊平、江石　義信 |
| 論　文　題　目 | *MYB* and *MYBL1* in adenoid cystic carcinoma: diversity in the mode of genomic rearrangement and transcripts |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

腺様嚢胞癌（adenoid cystic carcinoma, ACC）は唾液腺型腫瘍に属する稀な癌である．これまでの報告から, ACC のおよそ 60%に *MYB-NFIB* 融合遺伝子あるいは *MYBL1-NFIB* 融合遺伝子が検出されている．しかしながら，融合遺伝子陰性例も数多く存在し，その病因は明らかとなっていない．本研究では，ACC100 症例について，独自設計したプローブを用いて FISH を施行し，*MYB*, *MYBL1* 遺伝子座の再構成の有無を解析した．解析対象 100 症例のうち，凍結保存検体が利用可能であった 27 症例について capture RNA sequencing を施行したところ，*MYB* (18 例，67%）あるいは *MYBL1*（9 例，33%）の相互排他的な高発現が見られ，それらの転写産物は融合型，切断型，全長型と多様であった．また，27 例全例において，*MYB* あるいは *MYBL1* 遺伝子座の再構成が FISH により観察され，それらの結果は *MYB* あるいは *MYBL1* の高発現と対応していた. フォルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE）検体のみ利用可能であった 73 症例の結果を合わせると, 100 症例のうち 97 症例に *MYB* 遺伝子座（73 例）あるいは *MYBL1* 遺伝子座（24 例）の再構成が認められた. 予後解析により, 組織学的グレード, 初発時腫瘍サイズ，初発時リンパ節転移は独立した予後因子であることが示された.

＜緒言＞

唾液腺型腫瘍は，全臓器腫瘍のおよそ 1%にみられる．ACC は唾液腺型腫瘍の一種であり，頭頸部領域の唾液腺に多く発生するが，涙腺，乳腺，気管支腺などの外分泌腺にも発生する．女性に比較的多く，40-60 歳代に好発することが知られている．ACC の進行は緩徐であり，短期予後は良好であるものの，術後の局所再発やリンパ節転移，遠隔臓器転移が頻発し，長期予後は不良である．ACC の組織病理学的特徴として，真の腺腔と偽腺腔からなる二相性を呈することが挙げられる．管状，篩状，充実性など種々の構造を呈し，とくに充実部の割合が多い症例は予後不良とされている．唾液腺型腫瘍の組織型は多彩であることから，相互の鑑別や治療選択に難渋する例が目立つ．ACC と類似する組織型を示す疾患として，基底細胞腺腫，基底細胞癌，多形腺腫，多形低悪性度腺癌，上皮筋上皮癌などが挙げられる．

近年，唾液腺型腫瘍において，組織型特異的な融合遺伝子が同定されている．多形腺腫におけ

る *PLAG1* や *HMGA2* の融合遺伝子，粘表皮癌における *CRTC1-MAML2*，分泌癌における *ETV6-NTRK3*，硝子化明細胞癌における *EWSR1-ATF1*，そして ACC における *MYB-NFIB* および *MYBL1-NFIB* である．これまでの報告から，ACC のおよそ 60%が *MYB-NFIB* あるいは *MYBL1-NFIB* を有すると推計される．しかしながら，残りの 40%は融合遺伝子陰性であり，病因は不明である．そこで，本研究では，ACC の病因不明群にフォーカスを当て，多数の ACC 検体を用いて，組織病理学的，分子生物学的手法を組み合わせた独自のアプローチによる ACC の統合的解析を行った．

＜方法＞

2005 年 1 月から 2016 年 10 月までにがん研有明病院で診断・治療を受けた ACC 症例 123 例について，3 名の病理医が組織学的レビューを行い，ACC と確定した 100 症例を解析対象とした．原発部位は，大唾液腺が 40 例，小唾液腺が 33 例，その他が 27 例であった．組織学的に充実性成分が 30%に満たない症例を grade 1，30%以上 50%未満を grade 2，50%以上を grade 3 と規定し，high-grade transformation が見られる場合は t を付記した．Grade 1,2 を low-grade 群，grade 3 と high-grade transformation 陽性例を high-grade 群と区分した．

まず，全例について，独自に設計したプローブを用いて *MYB*，*MYBL1* の split FISH，*MYB-NFIB*，*MYBL1-NFIB* fusion FISH を施行した．*MYB* split FISH に関しては，*MYB* (6q23.3)のほか，これまでの報告で使用されたものよりもはるかに広い領域をカバーする FISH プローブ，すなわち *MYB* 上流の 11.5Mb，*MYB* 下流の 8.4Mb，計 20Mb 弱をカバーするプローブを設計し，使用した．最近，*MYB* から離れた領域に位置する *NKAIN2* (6q22.31) や *AIG1* (6q24.2)と *NFIB* との融合転写産物が報告されたのを考慮したことによる．

続いて，凍結保存検体が利用可能であった 27 症例について，以下の解析を行った．1) *MYB-NFIB* および *MYBL1-NFIB* が取りうる，あらゆる融合点に対応可能な multiplex RT-PCR の系を確立し，得られた産物のダイレクトシークエンスあるいはサブクローニングにて融合点を決定した．2) capture RNA sequencing により，*MYB*，*MYBL1* の発現量やそれらの転写産物を解析した．必要に応じて，3′-RACE も行った．FFPE 検体のみ利用可能であった症例のうち，9 例については capture RNA sequencing を施行した．

さらに，原発部位が頭頸部領域，眼科領域であった 81 症例のうち，*MYB* あるいは *MYBL1* 遺伝子座の再構成が実証された 78 例について，予後解析を行った．

＜結果＞

解析対象 100 例の組織学グレードは，grade 1 が 65 例，grade 2 が 13 例，grade3 が 15 例，grade 1t が 5 例，grade 2t が 1 例，grade 3t が 1 例であった．すなわち，low-grade 群が 78 例，high-grade 群が 22 例であった．FISH により *MYB*，*MYBL1* 遺伝子座の再構成が確認されたのはそれぞれ，73 例，24 例であった．

凍結保存検体が利用可能であった 27 例に対する解析の結果，以下のことが明らかとなった．1) multiplex RT-PCR より，*MYB-NFIB* は 9 例（33%），*MYBL1-NFIB* は 6 例（22%）が陽性であった．2) capture RNA sequencing より，27 例全例において，*MYB*（18 例，67%）あるい

は *MYBL1*（9 例，33%）が相互排他的に高発現していた．3) capture RNA sequencing, 3′-RACE より，PCR 陰性であった 12 例のうち，3 例から *MYB* exon 14 と *NFIB* 3′ 下流の遺伝子外領域の融合配列が得られ，1 例からは *MYBL1* exon 10-*RAD51B* intron 9 の融合配列が得られた．残り 8 例のうち，6 例からは全長型 *MYB*, 2 例からは切断型 *MYBL1* の転写産物が得られた．また，*MYB* split FISH は陰性だが *MYB-NFIB* fusion FISH 陽性だった症例のうち 2 例において，*MYB* への *NFIB* 遺伝子座の small insertion が示唆される転写産物が得られた．

原発組織が頭頸部・眼科領域であった 81 例のうち，*MYB* あるいは *MYBL1* 遺伝子座の再構成が実証された 78 例を対象に，全生存期間（overall survival, OS）について単変量解析を行ったところ，初発時腫瘍サイズ（30 mm <, $P$= 0.0028），初発時リンパ節転移（positive, $P$<0.0001），組織学的グレード（high, $P$= 0.0022）は予後不良因子であった．多変量解析により，これらは独立した因子であることが明らかとなった（$P$= 0.003, $P$= 0.002, $P$<0.001）．また，*MYB*, *MYBL1* 遺伝子座の再構成による予後の差は認められなかったものの，*MYB* 遺伝子座に再構成がある群（61 例）は *MYBL1* 遺伝子座に再構成がある群（17 例）と比較して，組織学的グレードが高い傾向が見られた．

＜考察＞

本研究では，解析対象 100 例のうち 97 例において，*MYB* 遺伝子座（73 例）あるいは *MYBL1* 遺伝子座（24 例）の再構成が生じていることが示された．さらに，27 例の凍結保存検体の解析より，全例において *MYB* あるいは *MYBL1* の相互排他的な高発現が見られ，それらは *MYB*, *MYBL1* 遺伝子座の再構成の有無と強い相関があることが示された．*MYB*, *MYBL1* の転写産物は融合型，切断型，全長型と様々であり，融合型については，in-frame だけでなく out of frame である転写産物も検出され，検出されたすべての転写産物は，DNA 結合ドメイン，転写活性化ドメインを保持していた．したがって，ACC の発生においては，MYB family gene の融合タンパクが必須というわけではなく，これらのドメインの高発現がより本質的な事象であると考えられた．

＜結論＞

ACC の病因として，1）本質的なのは融合型，切断型，全長型であるかを問わない *MYB* あるいは *MYBL1* の高発現であり，2）*MYB-NFIB* や *MYBL1-NFIB* は頻度の高い *MYB* あるいは *MYBL1* 高発現様式のひとつにすぎず，3）*MYB* あるいは *MYBL1* 高発現は，それらの遺伝子座のゲノム構造異常によって惹起される，と考えられた．また，*MYB*, *MYBL1* の遺伝子再構成は ACC に高頻度にみられることから感度の高い診断マーカーとして有用だが，その様式が多彩であるため検出方法は熟慮されるべきである．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5388　号 | 冨樫　由紀 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　朝蔭　孝宏<br>副　査　石川　俊平、江石　義信 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は腺様嚢胞癌(ACC)における MYB, MYBL1 の遺伝子再構成様式と転写産物の多様性に関する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

腺様嚢胞癌の約 60%に MYB-NFIB 融合遺伝子あるいは MYBL1-NFIB 融合遺伝子が検出されることが知られているが、残りの 40%は原因不明である。このような背景のもと、申請者は原因不明の 40%の症例に対して、次世代シークエンサーによる capture RNA sequencing を行い、その原因を明らかにしており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１、腺様嚢胞癌は MYB, MYBL1 いずれかの異常発現によって発症する。

２、異常発現は、MYB あるいは MYBL1 遺伝子座の構造変異に由来する。

３、MYB-NFIB, MYBL1-NFIB 融合型について検出されたすべての転写産物は、DNA 結合ドメイン、転写活性化ドメインを保持していた。

以上のように申請者は、腺様嚢胞癌の MYB, MYBL1 の異常発現および構造変化を明らかにしている。これは腺様嚢胞癌の診断の補助に極めて有用な研究成果であるといえる。

３）研究方法・倫理観

研究には免疫染色、FISH, 次世代シークエンサーによる capture RNA sequencing などが用いられ、腺様嚢胞癌における MYB, MYBL1 の異常発現、遺伝子の構造変化、転写産物の検討を行った。本手法は十分な免疫組織学的、遺伝子学的知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について MYB, MYBL1 の遺伝子再構成は腺様嚢胞癌に高頻度に

みられる、感度の高い診断マーカーとして有用であると考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてされに発展することが期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 岩澤　絵梨 |
| 論文審査担当者 | 主査　根本　繁<br>副査　田邊　勉、　成相　直 |
| 論　文　題　目 | Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Activation Enhances Leptomeningeal Collateral Development and Improves Outcome after Stroke in Mice |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

脳梗塞発症後の側副血行路の発達は既存の細動脈の間に発生するずり応力、シアストレスにより引き起こされる。近年、内皮細胞に発現するスフィンゴシン１リン酸受容体１（S1P1）がシアストレスを感知し、その下流のシグナリングを誘導することが報告された。本研究では我々はS1P1 選択的作動薬である SEW2871 を中大脳動脈永久閉塞モデル(permanent middle cerebral artery occlusion;pMCAO)のマウスに投与し、脳軟膜動脈への効果を検証した。SEW2871 を投与するとpMCAO7 日後のマウスの脳軟膜動脈は有意に発達し、脳血流の改善、脳梗塞体積の減少、神経所見の改善が認められた。さらに S1P1 選択的作動薬の投与によって Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)リン酸化の亢進し、血管新生の促進、脳血液関門（blood-brain barrier; BBB）の強化も認められ、こうした効果も相乗して脳梗塞の予後が改善することが示唆された。

＜緒言＞

脳梗塞による身体的・社会的損失は甚大であり、効果的な治療の開発が急務である。特に重篤な後遺症を残す中大脳動脈近位部閉塞時には、脳軟膜動脈の既存の吻合を介した前および後大脳動脈からの側副結構路の発達が知られている。側副血行路の良好な発達は梗塞体積の減少や予後改善につながることがヒトにおいて報告されているが、発達させるための有効な治療介入はまだ開発されていない。動脈の閉塞や高度狭窄が起こると、既存の細動脈が血流を再分布させようとし、血流豊富な部位と血流が低下した部位をつなぐ細動脈にシアストレスが生じる。脳梗塞急性期においてはこのシアストレスがトリガーとなって側副血行路の発達につながる。

スフィンゴ脂質の一種である S1P は S1P1～S1P5 までの 5 つの受容体に結合することで様々な生理作用を発揮する。S1P1 は細胞の増加や遊走、血管の拡張につながることが知られている。S1P1 は神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞に存在するがその発現レベルは病態により変化する。脳梗塞においては S1P1 制御薬である FTY720 が神経細胞に対し保護的であることが報告されたが、血管内皮細胞に対する効果については知られていない。一方近年、血管内皮細胞に存在する S1P1 がシアストレスを感知しその下流のシグナリングを誘導することが報告された。我々は、脳梗塞急性期における S1P1 の発現の変化、および S1P1 選択的作動薬 SEW2871 投与による脳軟膜動脈

への作用について検証した。

＜方法＞

8～10 週齢の BALB/c マウス雄(20-24g)を使用した。脳梗塞モデルはイソフルランにて麻酔導入後､左側頭骨に 2mm 大の穴を作成しその直下にある中大脳動脈の第一分岐部より近位を焼灼する中大脳動脈永久閉塞モデル(pMCAO)とした。Sham 手術は頭蓋骨の穴作成後に動脈を焼灼せずに閉創した。

薬剤として①SEW2871 5mg/kg/day、②SEW2871 1.5mg/kg/day、③SEW2871 5mg/kg/day＋S1P1 拮抗薬 VPC23019 0.5mg/kg/day、あるいは溶媒である④dimethyl sulfoxide(DMSO)のみ、のいずれかを pMCAO 処置後に連日腹腔内投与した。

細胞はマウス脳神経細胞(Neuro-2a)およびマウス脳血管内皮細胞(b End.3)を用いて、in vitro における虚血モデルである oxygen-and-glucose-deprived (OGD)負荷を行った。

細胞または脳虚血組織から IsogenⅡにより RNA を抽出し taqman 法により RT-PCR を行った。採血は下大静脈から行い、脳虚血組織から抽出した蛋白は 10％または 5-20%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、PVDF 膜へ転写して Western blot を行った。

脳軟膜動脈は PILOT 社の市販品であるインクを用いて pMCAO 後、薬剤投与後のマウスを左室より灌流し、インクによりラベルされた脳軟膜動脈を評価した。組織学的検討では pMCAO 後、または pMCAO および薬剤投与後のマウスを 4% paraformaldehyde で灌流、脳を浸透固定し、包埋後に 20μm ごとに切片を作成した。神経学的所見は neurological deficit score および Adhesive removal test を実施して評価した。統計には多群間比較では one-way analysis of variance (ANOVA)、post-hoc Tukey-Kramer または Dunnet 検定を、2 群間では Students' *t* 検定を行った。

＜結果＞

１． pMCAO 後の S1P1 の発現推移

組織学的検討において、pMCAO では sham と比較し、S1P1 は脳軟膜動脈の血管内皮細胞での発現が有意に増加し、６時間後をピークに２４時間後まで有意な上昇が認められた。一方、神経細胞において有意な増加が認められたのは２４時間後以降であった。グリア細胞では発症４８時間後まで有意な発現増加は認められなかった。

２． *In vitro* 虚血モデルにおける S1P1 発現

OGD 負荷後、b End.3 では S1P1 mRNA の有意な発現増加は虚血早期である 4、6 時間後に見られた一方、Neuro-2A では 12 時間後でのみ見られた。

３． S1P1 選択的アゴニスト SEW2871 投与による pMCAO マウスの予後改善効果

pMCAO 後、SEW2871 5mg/kg/day を連日投与したマウスでは vehicle 群と比較し前および中大脳動脈灌流境界域における脳血流は有意に増加し、神経学的所見の改善、7 日後の梗塞体積の縮小が認められた。

４．　SEW2871 投与の脳軟膜動脈を介した側副血行路への影響

pMCAO マウスを 7 日後インク灌流し、脳軟膜動脈を評価すると、SEW2871 5mg/kg/day 投与群では前および中大脳動脈吻合の数、径、前大脳動脈から虚血領域までの長さが有意に上昇していた。SEW 1.5mg/kg/day では有意な増加は認められず、VPC 投与群では SEW5mg/kg の効果は完全に相殺されていた。以後の検討は SEW 5mg/kg/day で行った。

５．　SEW2871 の eNOS リン酸化への作用

pMCAO および薬剤投与 6 時間後の虚血脳から抽出した蛋白で western blot を行うと、phospho-eNOS / eNOS 比は SEW2871 投与により有意に増加した。

６．　SEW2871 の血管新生への作用

pMCAO7 日後、梗塞周辺領域の毛細血管密度を蛍光ラベルした毛細血管の定量により評価したところ、SEW2871 投与群で有意に血管密度が増加していた。さらに虚血脳表面の動脈周囲へ遊走するマクロファージ(Mac-2 陽性細胞)の数を定量化したところ、SEW2871 群で有意に増加していた。

７．　SEW2871 の BBB への作用

BBB の破綻が最も顕著となる pMCAO 3 日後の虚血脳から抽出した蛋白で western blot を行うと、BBB の tight junction を構成する蛋白（ZO-1 および Occludin）の発現は SEW2871 投与群で有意に高かった。

８．　SEW2871 の脳梗塞後の炎症反応への作用

pMCAO3 および 7 日後の末梢血ではリンパ球数は DMSO 群と SEW2871 群で有意差はなかった。組織学的検討では pMCAO7 日後、梗塞周辺へ集簇するミクログリア(Iba-1 陽性細胞)の数は両群で有意差はなかったものの、T 細胞(CD3 陽性細胞)の脳実質への侵入は SEW2871 群で有意に低下していた。

＜考察＞

脳梗塞発症後、S1P1 の発現は早期 6 時間をピークとして脳軟膜動脈を含む脳血管内皮細胞で増加し、神経細胞での増加は 24 時間後からであった。S1P1 制御による脳梗塞改善効果については直接的な神経保護効果が唱えられてきたが、今回の我々の検討では S1P1 作動薬 SEW2871 の投与により eNOS のリン酸化といった S1P1 の下流シグナルの亢進を介して血管の拡張が得られ、脳軟膜動脈を介した側副血行血流が保たれ、梗塞縮小、神経所見改善につながった可能性を示唆した。動脈の発達(arteriogenesis)に必要とされる、梗塞脳表面の動脈周囲へのマクロファージの遊走は SEW2871 群で増加すると同時に、梗塞周囲の毛細血管密度も増加(angiogenesis)し、この 2 つの血管新生メカニズムにより S1P1 の効果はさらに発揮されたと考えられる。S1P1 は BBB を制御する tight junction 蛋白を維持していることが知られており、今回 SEW2871 投与により tight junction 蛋白が保たれたことも予後改善につながった可能性がある。

また、S1P1 はリンパ球、特に T 細胞の遊走抑制等の免疫抑制効果が知られるが、今回の検討では重篤な末梢血リンパ球減少を引き起こすことなく、T 細胞の脳実質内への侵入を抑制しており、脳梗塞後の免疫反応抑制を介した予後改善効果も想定された。

側副血行路の発達した脳梗塞患者ではその後に閉塞血管の再開通が得られるか否かに関わらず予後良好であることがヒトで報告されており、側副血行路は主動脈の血流再開までの血流維持のみでなく神経保護因子や内因性の血栓溶解物質の送達にも寄与していると考えられており、S1P1 による側副血行路への介入は有効な治療戦略となり得る。

＜結論＞

我々は脳梗塞マウスへの S1P1 作動薬投与により、脳軟膜動脈を介した側副血行路が発達し、脳梗塞の予後が改善することを報告した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5389　号 | 岩澤　絵梨 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　根本　繁<br>副　査　田邊　勉、　成相　直 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

頭蓋内中大脳動脈閉塞による脳梗塞における脳軟膜動脈の吻合による側副血行が予後に大きな影響を及ぼすことが報告され、内皮細胞に発現するスフィンゴシン 1 リン酸受容体 1（S1P1）が細動脈間の側副血行発生に関与していることが示唆されている。そこで本論文は、マウスの中大脳動脈閉塞モデルに S1P1 選択的作動薬である SEW2871 を投与し、脳軟膜動脈への効果を検証した。その結果、SEW2871 を投与すると閉塞 7 日後に脳軟膜動脈は有意に発達し、脳梗塞体積の減少、神経所見の改善が認められた。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

脳梗塞の急性期治療では血行再建術により、予後の改善が期待できるが、治療効果には限界があり、更なる治療法が望まれている。本研究は、血行再建として側副血行を発達させるという斬新な治療を発展させる可能性を強く示唆するものであり、先駆性および独創性共に優れている。

２）社会的意義

脳梗塞急性期に新たな治療法が導入されれば、要介護、要支援患者を減らすことが期待できるという点で、社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

科学的に裏づけされた手法を組み合わせて論理的な実験を遂行し、統計学的にも十分な検討を加え、倫理的にも十分基準を満たしていると考えられる。

４）考察・今後の発展性

本研究のデータを基に、更に研究内容を発展させ、実臨床に応用できる治療法を開発できると大いに期待できる。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

以上をふまえ、本論文は本学博士（医学）の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 吉川　俊輔 |
| 論文審査担当者 | 主査　立石　宇貴秀<br>副査　重光　秀信、　吉井　俊貴 |
| 論　文　題　目 | Predictive ability and interobserver reliability of computed tomography findings for angioembolization in patients with pelvic fracture |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

本研究は、2006 年 4 月 1 日から 2015 年 10 月 31 日まで 2 つの三次救急施設で診療した骨盤骨折症例を対象とした後ろ向き観察研究であり、経動脈的塞栓術(Transcatheter Arterial Embolization, TAE)の必要性を推定した診断精度研究である。従来はこの推定に用いる画像所見として、CT での造影剤血管外漏出像の有無に大きく依存していたが、本研究では加えて骨盤骨折に伴い腫脹した骨盤周囲筋肉径と後腹膜血腫径の予測能と検者間一致率を検討した。

Receiver Operating Characteristic (ROC)解析による骨盤周囲筋肉径最大左右差、後腹膜血腫径の Area Under the Curve (AUC)は 0.75、0.73 であり比較的良好であった。血管外漏出像の有無は折点がひとつのみになるため AUC は求めなかった。造影剤血管外漏出像と、ROC 解析で求めた最適な閾値での骨盤周囲筋肉径最大左右差、後腹膜血腫径の感度はそれぞれ 0.57、0.79、0.65 で、特異度はそれぞれ 0.86、0.55、0.74 であった。造影剤血管外漏出像・筋肉径最大左右差・後腹膜血腫径の Diagnostic odds ratio (DOR)は、それぞれ 8.05、4.60、5.39 と造影剤血管外漏出像が最も良好な予測精度を示し、観察者間信頼性はそれぞれ 0.43、0.56、0.70 と後腹膜血腫径が最も良好な値を示した。骨盤周囲筋肉最大短径は予測確度・観察者間信頼性共に低かった。

本研究では骨盤骨折に対する TAE 必要性を推定するために、十分な予測確度と観察者間信頼性の双方を満たす単独の CT 所見を見出せなかった。骨盤骨折に対する TAE 適応は複数の画像所見を併せて判断すべきであり、加えて生理学的所見やその他の血液検査所見なども含めて決定されるべきであると考えられた。

＜緒言＞

Eastern Association for the Surgery of Trauma (EAST)のガイドラインには骨盤骨折症例に対する TAE の必要性を予測する画像所見についての記載があり、造影剤血管外漏出像は最も重要な TAE 予測因子としている一方で、感度が低く、循環動態安定症例では予測因子として不十分と指摘している。更に、後腹膜血腫の容量や厚さの予測能は過去の研究で十分に検証されておらず、TAE の予測因子として不適切としている。本研究ではまだ十分なコンセンサスを得ていない骨盤骨折に対する TAE を予測する画像所見の同定を目的とした。

一般的に骨折による出血は骨折部位周辺組織腫脹と関与するとされ、本研究では骨盤骨折に伴い腫脹した骨盤周囲筋肉径が骨盤骨折に対する TAE 必要性推定に有用であると仮説をたてた。仮説検証のため、腫脹した骨盤周囲筋肉径と TAE 予測因子として過去に報告された血管外造影剤漏出像と後腹膜血腫径を比較した。また画像所見読影評価の相違が診断や治療に影響するとされ、これらの所見の TAE 予測確度に加えて観察者間信頼性についても評価した。

＜方法＞

本研究は 2006 年 4 月 1 日から 2015 年 10 月 31 日までに、都市部の 2 つの三次救急施設で診療した骨盤骨折症例を対象とし、TAE の必要性を推定する CT 所見として骨盤周囲筋肉径・造影剤血管外漏出像・後腹膜血腫径の予測能と観察者間信頼性を評価した診断精度研究である。

研究施設到着後に撮影された CT で、研究施設の初療医が骨盤骨折を確認した外傷症例を対象とした。研究施設へ到着前に他施設で骨盤に対する放射線検査を施行された症例、来院時血圧が 0mmHg の症例、CT 撮影前に TAE・創外固定・骨盤パッキングのいずれかの骨盤骨折に対する止血処置がなされた症例、大動脈クランプあるいは大動脈閉塞バルーンを挿入した症例は除外した。

来院後の初回 CT のうち、来院から 3 時間以内に撮影された単純・造影 CT のいずれか一方あるいは両方の中で 2D 画像水平断のみを読影対象とした。使用した造影剤の名前・種類・投与から撮影までの時間は考慮しなかった。

研究施設で日常的に外傷診療に携わる外科専門医 2 名と研究施設に所属する放射線科専門医 2 名の合計 4 名の医師が、研究計画者より同じ文書による読影と測定の方法の説明を別々に受け、診療情報を知らされずに独立して CT 画像を読影した。

本研究の読影内容は腫脹した骨盤周囲筋肉径・後腹膜血腫径・造影剤血管外漏出像とした。骨盤周囲の筋肉は、腸骨筋・大腰筋・大臀筋・中臀筋・小臀筋・梨状筋・尾骨筋・内閉鎖筋・内転筋・恥骨筋・大腿方形筋を測定対象とした。このうち内転筋径は短内転筋・長内転筋・大内転筋を一括した径と定義した。筋肉径は、筋肉短径の最大値を測定し、更に同一スライスでの左右差を算出した。骨盤骨折によって生じた後腹膜血腫径は、観察された後腹膜血腫の最大短径とした。読影者が後腹膜血腫を認識できなかった場合は 0mm とした。造影剤血管外漏出像は撮影相にかかわらず評価し、単純 CT のみ撮影した症例では欠測とした。骨盤骨折以外の損傷に伴う造影剤漏出像と読影者が判断した場合は、撮影範囲内に漏出像があっても陰性と定義した。

本研究の転帰は来院から 24 時間以内に施行した骨盤骨折に対する TAE の施行とした。搬送症例を担当した研究施設の初療医・放射線科医が TAE の適応を決定した。

Receiver Operating Characteristic (ROC)解析を用いて TAE の施行をアウトカムとした診断精度を評価した。ROC 解析で得たカットオフ値を指標とし、感度・特異度とその区間推定を算出した。観察者間信頼性は、名義変数では Fleiss の Kappa 係数を、連続変数は Kendall の順位相関係数を求めた。

＜結果＞

研究期間内に合計 305 例の骨盤骨折症例が研究施設に来院した。除外基準の適用後に 244 例を解析対象とし、このうち 52 名が TAE を施行された。

ROC 解析では、筋肉径最大左右差、後腹膜血腫径、筋肉最大短径の Area Under the Curve (AUC)はそれぞれ 0.75、0.73、0.68 であった。血管外漏出像の有無は折点がひとつのみになるため AUC は求めなかった。造影剤血管外漏出像と、ROC 解析で求めた最適な閾値での筋肉最大短径、筋肉径最大左右差、後腹膜血腫径の感度はそれぞれ 0.57、0.76、0.79、0.65 であった一方で、特異度はそれぞれ 0.86、0.48、0.55、0.74 であった。造影剤血管外漏出像・筋肉最大短径・筋肉径最大左右差・後腹膜血腫径の Diagnostic odds ratio (DOR)は、それぞれ 8.05、2.99、4.60、5.39 と血管外漏出像が最も良好な診断精度を示し、観察者間信頼性はそれぞれ 0.43、0.43、0.56、0.70 と後腹膜血腫径が最も良好な値を示した。

＜考察＞

アメリカとヨーロッパのガイドラインは、来院時血圧などの生理学的所見に加え、一部の血液検査などの検査所見も骨盤骨折症例に対する TAE 必要性の推定に用いることを推奨した。しかし、これらの所見は多発外傷例では骨盤骨折以外の外傷にも影響されるため、特異的な骨盤画像診断も重要であるとされる。

本研究では骨盤骨折症例に対する TAE の必要性を推定する画像所見として、最も有用とされる造影剤血管外漏出像に加え、明確に定義した骨盤周囲筋肉径及び後腹膜血腫径の予測確度と観察者間信頼性を評価した。

画像読影における観察者間信頼性は診断や治療方針に影響を与えると報告されているが、診断精度研究で検証されることは少なかった。本研究では対象とした画像所見について、4 名の読影者の観察者間信頼性を検証した。

本研究は、造影剤血管外漏出像・筋肉径最大左右差・後腹膜血腫径は骨盤骨折に対する TAE の必要性を予測する可能性を示した。腫脹した骨盤周囲の筋肉最大短径は診断確度と観察者間信頼性ともに低く、骨盤骨折に対する TAE 予測因子として有用ではない。一方、本研究では単独で診断確度と観察者間信頼性の両者に優れた所見は見出せなかった。このため複数の画像所見を利用して TAE 適応決定の一助とすべきであると考えた。

本研究の制限事項を記載する。本研究は 2 つの研究施設で行われたサンプルサイズの小さな後ろ向き観察研究であり、外部検証に欠け、研究結果の一般化可能性に乏しい。また研究期間が 9 年以上であり、CT や血管内治療の技術やデバイスの進歩が、研究結果に影響を与えた可能性がある。そして、本研究における CT や TAE の適応及び CT 撮影条件や使用造影剤については、現場医師の判断に委ねられており、本研究独自のプロトコールがある訳ではない。さらに本研究で検証した CT 所見が、現場医師の治療方針決定に寄与した、診断精度研究における自己実現性予言（self-fulfilling prophecy）の可能性がある。

＜結論＞

造影剤血管外漏出像・筋肉径最大左右差・後腹膜血腫径は骨盤骨折に対する TAE の予測因子となる可能性を示した。大きいサンプルサイズの研究で、骨盤骨折に対する TAE とこれらの CT 所見との関係の外部検証を行うことが望ましい。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5390　号 | 吉川　俊輔 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　立石　宇貴秀<br>副　査　重光　秀信、　吉井　俊貴 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、骨盤骨折に対する経動脈的塞栓術(Transcatheter Arterial Embolization, TAE)の適応判断はCTで予測可能かどうか検査精度を比較した研究である。2つの三次救急施設で診療した骨盤骨折症例（52例TAE施行、192例未施行、合計244例）を対象とし、TAEの必要性を推定するCT所見として骨盤周囲筋肉径・造影剤血管外漏出像・後腹膜血腫径の予測能と観察者間信頼性を後ろ向きに評価した。ROC解析では、筋肉径最大左右差、後腹膜血腫径、筋肉最大短径のArea Under the Curve (AUC)はそれぞれ0.75、0.73、0.68であった。造影剤血管外漏出像、筋肉最大短径、筋肉径最大左右差、後腹膜血腫径の感度はそれぞれ0.57、0.76、0.79、0.65であり、特異度はそれぞれ0.86、0.48、0.55、0.74であった。腫脹した骨盤周囲の筋肉最大短径は診断確度と観察者間信頼性ともに低く、骨盤骨折に対するTAE予測因子として有用とは考えられなかった。単独で診断確度と観察者間信頼性の両者に優れた所見は見出せなかったものの造影剤血管外漏出像・筋肉径最大左右差・後腹膜血腫径は骨盤骨折に対するTAEの予測因子となる可能性を示した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

骨盤骨折の評価で最も信頼性が高いmodalityはマルチスライスCTである。本研究結果では2つの三次救急施設で同じCT機種を用いて撮影し、多症例の画像所見をもとに解析しているため、他に類を見ない貴重なデータを提示し本研究は独創性が認められる。

２）社会的意義

骨盤骨折のTAE治療適応を判定するためにCTを用いることは、迅速かつ低侵襲で最も信頼性の高い評価方法である点で社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

既存データをもとに研究背景、目的、研究計画をたて、十分な有用性の確立されていない因子を含んだ検討ではあるものの実例を元に結果を出されている。

４）考察・今後の発展性

骨盤骨折に対するTAE必要性を推定するために、十分な予測確度と観察者間信頼性の双方を満

たす単独のCT所見を見出せなかったが、骨盤骨折に対するTAE適応は複数の画像所見や生理学的所見やその他の血液検査所見なども含めて総合的に決定されるべきであると考えられた。検査データの解析手法について十分な初期データを取得後、前向き試験にて診断基準の明確化を行い、観察者間の再現性、偽陽性・偽陰性の具体的要因を調査し検討を追加する必要がある。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は本学博士の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 水野　裕貴 |
| 論文審査担当者 | 主査　稲澤　譲治<br>副査　三宅　智、沢辺　元司 |
| 論　文　題　目 | DEPDC5 deficiency contributes to resistance to leucine starvation via p62 accumulation in hepatocellular carcinoma |

（論文内容の要旨）

【要旨】

慢性肝疾患における血中 BCAA 濃度の低下、特にロイシンの低下は肝発癌を促すことが知られているが、その機序は未だ分かっていない。近年、ロイシンセンサーの一つである DEP domain-containing protein 5 (DEPDC5) と肝発癌の関連性の報告がなされているが、肝癌における機能は不明である。今回、CRISPR/Cas9 による DEPDC5-欠損肝癌細胞株、および TET-ON システムによる DEPDC5 発現誘導肝癌細胞株を作成して、ロイシン欠乏状態に対する細胞状態と、肝発癌に関与するオートファジーによる選択的分解基質 p62 の発現変化、および ROS 抵抗性について解析した。また、臨床検体 126 検体を用いて DEPDC5 発現と臨床的病理学的因子を解析した。その結果、慢性肝疾患によるロイシン欠乏状態下では DEPDC5 の不活化は肝細胞癌の ROS 抵抗性を増強させ、独立予後規定因子となっていることを見出した。慢性肝疾患という特殊な環境下において　DEPDC5 が癌抑制遺伝子として機能することを明らかにした。

【背景】

肝細胞癌の患者のほとんどは慢性肝炎、肝硬変などの慢性肝障害を合併し、血中アミノ酸濃度の低下、特に分岐鎖アミノ酸（BCAA）の低下を認める。アミノ酸欠乏は肝臓におけるオートファジーを誘導するが、オートファジーの欠損はオートファジー選択的分解基質である p62 の集積をもたらし、p62 が酸化ストレス抵抗性を亢進させ、癌細胞を増殖させることが知られている。従って、慢性肝疾患による血中アミノ酸濃度の低下は、オートファジーの誘導があれば肝細胞癌にとって抑制的に働くはずである。しかし、実際は血中 BCAA 濃度の低下がむしろ肝発癌リスクを高めており、中でもロイシン血中濃度のみが肝細胞癌発症と負に相関していることが報告されている。発癌や癌細胞の増殖に抑制的に働くはずのロイシン欠乏状態が肝発癌のリスクを高めているということは、肝細胞癌にロイシン欠乏状態に対する何らかの防御機構が存在することを示唆している。

アミノ酸欠乏下でのオートファジーには mTORC 活性の抑制が関与することが報告され、その中でもロイシン欠乏は GATOR1 複合体の活性化を介して mTORC 活性を抑制することが明らかにされている。家族性焦点性てんかんの原因遺伝子として同定された DEP domain containing 5

(DEPDC5)は、GATOR1 複合体の要素であり肝発癌に関与する可能性が示唆されているが、その意義については不明である。102 症例の膵神経内分泌腫瘍の全ゲノムシークエンス解析により、DEPDC5 の不活性化型突然変異が全体の半数以上で認められることが報告され、DEPDC5 が癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆されたが、その機能は不明であり、肝癌細胞における働きも全く分かっていない。

【方法】

DEPDC5 の肝細胞癌における機能、特にロイシン欠乏状態での機能を探求するため、CRISPR/Cas9 システムによる DEPDC5-欠損肝癌細胞株、および TET-ON システムによる DEPDC5 発現誘導肝癌細胞株を作成して、ロイシン欠乏状態に対する反応性と、p62 の変化、ROS 抵抗性について解析した。また、肝細胞癌臨床検体を用いた免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的因子について分析した。

【結果】

肝癌細胞株 3 種の細胞免疫染色で、JHH5 細胞と HLE 細胞では主に細胞質にドット状の DEPDC5 の発現を認めたが、HuH-7 では発現が弱かった。JHH5、HLE について、CHRIPR/Cas9 システムによりノックアウト（KO）細胞株を作成し、細胞免疫染色で KO 株での DEPDC5 の発現消失を確認した。

DEPDC5-KO 株と野生株(WT)で増殖能を比較したところ、通常培地では増殖に差は認めなかったが、血清含有ロイシン非含有培地でやや KO 株が高い増殖能を示し、血清およびロイシン非含有培地では WT 株よりも細胞の減少する程度が顕著に緩やかだった。細胞周期を FACS で解析すると、通常培地では差がないが、血清およびロイシン非含有培地では WT 株は顕著に SubG1 の比率が高くなるのに対し、KO 株ではほとんど変化がなかった。また、G0/G1 期、S 期、G2M 期の比率には WT 株と KO 株で差はなく、DEPDC5-KO 株はロイシン欠乏状態で細胞周期非依存的に、細胞死を免れていると考えられた。

Western Blotting で通常培地でも KO 株は WT 株よりも高い p62 発現を認め、ロイシン非存在下では WT 株よりも長く p62 が残存した。さらに LC3-Ⅱの発現量が WT 株よりも弱く、Leucine 非存在下でのオートファジーが KO 株で抑制されていることが分かった。また LC3 と p62 の細胞免染でも同様の結果だった。ロイシン欠乏による DEPDC5 を介したオートファジーの抑制と、それに続く p62 の発現増強により KO 株はロイシン欠乏耐性を獲得していると考えられた。

KO 株で p62 の集積増強が認められたことから、ROS の解析を行った。ロイシン欠乏状態で DEPDC5-KO 株では WT 株よりも有意に ROS が低下し、H2O2 付加による ROS 産生も KO 株で有意な低下を認め、細胞生存率も KO 株が顕著に高かった。KO 株はロイシン欠乏状態における ROS 抵抗性が亢進していると考えられた。

細胞免染で DEPDC5 発現の弱かった HuH7 細胞に対して、TET-ON システムを用いた DEPDC5 発現誘導細胞株を作成した。細胞免染で、ドキシサイクリン（DOX）付加による DEPDC5 の発現増加を確認した。この TET-ON DEPDC5 発現誘導細胞株について、DOX 付加をした細胞では顕著にコロニー形成が抑制された。Western Blotting で DOX 付加により時間経過とともに p62 の減

少が認められ、ROS の増加を認めた。NOD-SCID マウスの皮下にこの DEPDC5 発現誘導細胞株を移植したところ、DOX 投与群では非投与群よりも有意に腫瘍増殖が抑制された。DEPDC5 の発現誘導により p62 発現低下とともに ROS 抵抗性の低下をきたし、腫瘍増殖が抑制されたと考えられた。

ヒト肝細胞癌の臨床検体 126 例についての DEPDC5 の免疫組織化学染色では、ほとんどの症例で非腫瘍部の細胞質で DEPDC5 の発現を認めた。腫瘍部では 69 検体（54.8%）で DEPDC5 の発現低下を認め、DEPDC5 陽性例と比較し DEPDC5 陰性例は有意に PFS、OS ともに不良であった。p62 は DEPDC5 とは対照的に非腫瘍部よりも腫瘍部で発現が強く、p62 陽性の症例が予後不良であった。DEPDC5 陰性かつ p62 陽性の症例は特に予後が悪かった。

DEPDC5 陰性例と陽性例について、臨床病理学的因子を比較したところ、DEPDC5 陰性例では有意に AFP、PIVKA-II の値が高く、腫瘍径が大きく、門脈浸潤症例が多く、癌部の p62 発現が強かった。予後に相関する因子の多変量解析では、全生存期間、無増悪生存期間ともに癌部での DEPDC5 発現陰性が最も予後に相関する因子として残り、独立予後規定因子であることが示された。

【考察】

本研究では肝細胞癌症例の 45%にロイシンセンサーDEPDC5 の発現低下を認め、DEPDC5 が不活化すると、ロイシン欠乏下でもオートファジーが誘導されず、p62 が集積することになり、酸化ストレスへの抵抗性が亢進するというメカニズムを明らかにした。肝細胞癌のロイシン欠乏抵抗性に DEPDC5 低下が関与することが示唆された。

DEPDC5 の発現低下には様々なメカニズムが考えられる。星状細胞腫における DEPDC5 を含む領域のホモ結合型欠損の報告や、P-NET におけるコピーナンバー数異常による不活化の報告がある。肝細胞癌のパブリックデータでは、DEPDC5 の変異を 373 症例中 8 例（2.1%）に認め、OS は著明に不良であった。また、背景肝での DEPDC5 の SNP が肝発癌や肝線維化に関与するとする報告があるが、SNP と発現レベルとの相関については一定の見解が得られていない。mRNA の発現量については、肝細胞癌のパブリックデータでは、DEPDC の mRNA 発現量に差を認め、低下症例は有意に予後が不良であった。また、DEPDC5 蛋白にはユビキチン化モチーフが存在しており（Lys 1543）、タンパクレベルで調節される可能性も考えられる。肝細胞癌における DEPDC5 の発現調節のメカニズム解明は今後の課題である。

今回、DEPDC5-KO 株ではオートファジーの抑制を介して p62 が集積することを明らかにし、臨床検体でも DEPDC5 と p62 の発現は負の相関を示した。p62 は様々な癌腫で高発現し腫瘍促進的に機能することが知られており、その主な機序が腫瘍の ROS 抵抗性の亢進と考えられている。DEPDC5-KO 株はロイシン欠乏状態下でも p62 集積とともに ROS 低下が認められ、ロイシン欠乏に対する耐性の要因となっていると考えられた。逆に DEPDC5 の発現を誘導すると、p62 減少・ROS 亢進を伴った細胞増殖抑制効果を認めており、DEPDC5 が肝細胞癌において癌抑制的に機能していることを明らかにした。

ヒト肝細胞癌検体を用いた免疫組織化学染色で DEPDC5 の発現低下が独立した予後因子・再発因子であることを明らかにした。ロイシンセンサーDEPDC5 の低下は ROS 抵抗性を亢進させて腫

瘍増殖に働き、腫瘍の再発につながっている可能性がある。本研究では、慢性肝疾患で低下するBCAA の一つであるロイシンと肝細胞癌との関連について新たな知見を見出した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5391　号 | 水野　裕貴 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　稲澤　譲治<br>副　査　三宅　智、沢辺　元司 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

肝細胞癌における DEPDC5 不活化は p62 発現上昇を介してロイシン欠乏に対する抵抗性の獲得に寄与することを明らかにした。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

肝細胞癌の患者のほとんどは慢性肝炎、肝硬変などの慢性肝障害を合併し、血中アミノ酸濃度の低下、特に分岐鎖アミノ酸（BCAA）の低下を認める。なかでもロイシンの低下は肝発癌を促すことが知られているが、その機序は未だ分かっていない。申請者は、ロイシンセンサーの一つである DEP domain-containing protein 5 (DEPDC5) に着目し肝発癌の関連性を詳細に調べた。その結果、慢性肝疾患によるロイシン欠乏状態下では DEPDC5 の不活化は p62 の発現上昇を招き、肝細胞癌における ROS 抵抗性を増強させるとともに、独立予後規定因子となり得ることを見出した。本研究により得られた成果は、慢性肝疾患という特殊な環境下において　DEPDC5 が癌抑制遺伝子として機能することを明らかにした点において先駆性、独創性を有する。

２）社会的意義

本研究では、慢性肝疾患で低下する BCAA の一つであるロイシンと肝細胞癌との関連について新たな知見を見出しており、今後の肝細胞癌の診断、治療、予防法開発に資する成果であり、社会的意義も少なくない。

３）研究方法・倫理観

研究方法は適正な取り組みで実施され、また得られた結果も科学的妥当性をもって分析・解釈がなされている。また、ヒト肝細胞癌の臨床検体も適正な倫理的配慮のもとで収集・利活用されており、申請者の倫理観も問題はない。

４）考察・今後の発展性

肝細胞癌臨床検体を用いた検討から DEPDC5 の発現低下が独立した予後因子・再発因子であることも明らかにされており、本研究で得られた成果は、慢性肝疾患で低下する分岐鎖アミノ酸（BCAA）の一つであるロイシンと肝細胞癌との因果を知るうえで貴重な成果であり、今後、

DEPDC5 の癌抑制遺伝子としての詳細な機能解明へと発展することが期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分に価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 木戸　浩司 |
| 論文審査担当者 | 主査　古川　哲史<br>副査　重光　秀信、畑　裕 |
| 論　文　題　目 | Cytotoxicity of propofol in human induced pluripotent stem cell‐derived cardiomyocytes |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

プロポフォール注入症候群(Propofol infusion syndrome: PRIS)はプロポフォールの高用量長時間投与により誘発される致死的合併症であるが、高濃度のプロポフォールがヒト細胞に及ぼす影響は十分に解明されていない。そこで我々は、ヒト人工多能性幹細胞(iPS 細胞)由来心筋細胞を用いて、プロポフォールがヒト心筋細胞に与える影響を検討した。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に対し、プロポフォール (0-50 μg/ml)及び Coenzyme Q10 (CoQ10) (0, 5 μM)を 48 時間曝露した後、細胞生存率、ミトコンドリア機能、エネルギー代謝関連遺伝子の発現などを評価した。10 μg/ml 以上のプロポフォールによって、濃度依存性に細胞内 ATP と $NAD^+$/NADH 比は減少し、50 μg/ml のプロポフォールによって、細胞生存率は低下した。10 μg/ml 以上の群において、エネルギー代謝関連遺伝子の転写調節因子である *PGC-1alpha* とその下流で調節されるミトコンドリア呼吸鎖構成タンパク遺伝子や脂肪酸 β 酸化に関連した遺伝子などの有意な発現低下を認めた。一方、5 μM の CoQ10 を同時投与した際には、プロポフォールによる細胞毒性に対して、遺伝子発現の回復を伴った保護効果を認めた。

＜緒言＞

PRIS はプロポフォールの高用量長時間投与により誘発される致死的合併症であり、代謝性アシドーシス、難治性不整脈、心不全、高脂血症、肝腫大、腎不全、横紋筋融解症などの症候を示す。PRIS の従来の知見は、そのほとんどがヒトにおける限られた発症例の検討や一部の動物実験・in vitro 実験によるものであり、特にその機序に関しては、主にミトコンドリア機能を中心とした細胞内エネルギー代謝障害が仮説として提唱されているものの、正常ヒト組織・細胞に対する評価は十分とは言えず、未だ十分に解明されているとは言えない。我々は今回、PRIS の主要標的臓器として心筋が挙げられることから、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた実験を行うことで、プロポフォールによるヒト細胞への直接的な影響の有無、その分子学的な機序の解明を目指した。また、近年示された、プロポフォール毒性に対する CoQ10 の保護効果に関しても合わせて検証した。

＜方法＞

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に対し、プロポフォール(0, 2, 10, 50 μg/ml)を 48 時間曝露した後、生細胞プロテアーゼ活性(細胞生存率)、細胞内 ATP、$NAD^+$/NADH 比、ミトコンドリア膜電位、培地中の乳酸値を測定した(各群 n = 4)。また、プロポフォール (0, 50 μg/ml)と CoQ10 (0, 5 μM)を同時投与することで、CoQ10 の効果に関して評価した。ミトコンドリアの形態観察には、共焦点顕微鏡を使用した。さらに、RT-PCR を用いてエネルギー代謝関連遺伝子の発現変化を検索した(各群 n = 4-5)。統計学的検討には Mann-Whitney U 検定及び Steel の多重比較検定を用い、$P < 0.05$ を有意とした。

＜結果＞

プロポフォールの 48 時間曝露によって、10 μg/ml 以上の群において濃度依存性に細胞内 ATP と $NAD^+$/NADH 比は減少した(それぞれ $P < 0.05$)。50 μg/ml 群では、培地中の乳酸濃度の上昇および、細胞生存率とミトコンドリア膜電位の低下を認めた(それぞれ $P < 0.05$)。同濃度における共焦点顕微鏡の所見では、ミトコンドリアの断片化が観察された。RT-PCR による遺伝子発現の検索では、10 μg/ml 以上の群において、エネルギー代謝関連遺伝子の転写調節因子である *PGC-1alpha* の有意な発現低下が認められ($P < 0.05$)、その下流で調節される *NRF1* を介した *NDUFS8* (呼吸鎖 Complex Ⅰの構成タンパク遺伝子) と *SDHB* (呼吸鎖 Complex Ⅱの構成タンパク遺伝子)、および *PPARalpha* を介した *CPT1B* (脂肪酸β酸化の律速酵素遺伝子)などの発現低下も併せて認められた。CoQ10 の効果を確かめる実験においては、50 μg/ml のプロポフォール単独曝露では、細胞生存率の低下、培地中の乳酸濃度の上昇および細胞内 ATP の減少を有意に認めたのに対し($P < 0.05$)、5 μM の CoQ10 を同時投与した際には、これらのプロポフォールによる細胞毒性に対して、遺伝子発現の回復を伴った保護効果を認めた。

＜考察＞

今回の研究では、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞に高濃度のプロポフォールを長時間作用させた際の反応を確認し、PRIS の主要な症状に関連する反応をとらえ、プロポフォールが誘発する細胞毒性を評価するためのヒト培養細胞実験モデルを確立することに成功した。通常、臨床で使用される濃度をはるかに上回る、10 μg/ml 以上のプロポフォールを 48 時間作用させた場合、電子伝達系活性の指標である $NAD^+$/NADH 比と細胞内 ATP の減少を認め、さらに 50 μg/ml では、嫌気性代謝の亢進を反映した培地中の乳酸濃度の上昇およびミトコンドリア膜電位の低下を認め、心筋細胞の生存率は減少した。これらは、プロポフォール高用量長時間曝露に伴うミトコンドリア機能障害を示しており、これまでに考えられてきた PRIS における症候やプロポフォール毒性の機序に矛盾しない。

過去の報告では、抽出ミトコンドリアを使用した実験を中心に、プロポフォールによるミトコンドリア機能障害の機序として、電子伝達系への直接的な阻害効果が示されてきた。一方、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞にプロポフォールを曝露した今回の実験では、高濃度のプロポフォール曝露(≧ 10 μg/ml)によって、エネルギー代謝調節因子である *PGC-1alpha* とその下流で調節される呼吸鎖構成タンパク遺伝子や脂肪酸β酸化に関連した遺伝子などの発現低下が示され、プロポフォ

ールによるミトコンドリア機能障害の原因の一つとして遺伝子発現の変化も影響している可能性が示唆された。

近年、Vanlander や Bergamini は、ミトコンドリア呼吸鎖における CoQ10 の働きをプロポフォールが直接的に阻害しており、CoQ10 を補完することでプロポフォールによる細胞傷害・ミトコンドリア機能障害を抑制できる可能性を報告した。今回の研究においても、CoQ10 の投与によりプロポフォールの細胞毒性に対する保護効果が示されたが、同時に、*PGC-1alpha* の調節するエネルギー代謝関連系遺伝子群の発現低下が、CoQ10 の投与により回復することが示された。このような複数の系を介した、高濃度プロポフォールによるミトコンドリア機能障害に対しての CoQ10 の保護的作用は、CoQ10 の投与が、プロポフォールによる細胞毒性を回避するための予防的治療法になりうる可能性を示していると考えられる。

＜結論＞

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞において、プロポフォールの高用量・長時間曝露により、心筋細胞に対する毒性が認められ、原因の一つとして呼吸鎖タンパク遺伝子の発現低下を伴うミトコンドリア機能の低下が示唆された。これらのプロポフォールによる細胞毒性に対して、CoQ10 は遺伝子発現の回復を伴った保護効果を示した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5392　号 | 木戸　浩司 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　古川　哲史<br>副　査　重光　秀信、畑　裕 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

プロポフォールは手術時の鎮静薬などとして広く使われているが、致死的な副作用プロポフォール注入症候群を起こすことが問題となっている。プロポフォール注入症候群のメカニズムが十分解明されていないことから、プロポフォール注入症候群の主症状の 1 つの標的細胞である心筋細胞に対する作用を、ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を使って in vitro で検討した。プロポフォールがミトコンドリア機能の障害を起こすこと、Coenzyme Q10 の同時投与によりこの細胞毒性が軽減できることを示した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

ヒト細胞である、ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を使った点が先駆的である。

２）社会的意義

プロポフォール注入症候群は致死的な副作用であり、その正確な発症頻度に関する統計はないが、最近でも小児手術における複数死亡例が報告されマスメディアでも広く取り上げられるなど、社会的な関心度は高い。今回、in vitro 実験ではあるがヒト細胞を使ってそのメカニズムの一端を示したこと、Coenzyme Q10 がその細胞毒性を軽減できることを示したことは、プロポフォール注入症候群の予防、治療法に結びつく社会的意義の高い研究といえる。

３）研究方法・倫理観

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を使った in vitro 実験を行っている。プロポフォールの濃度は、臨床濃度を参考に、低濃度から臨床濃度を若干超える高濃度まで検討している。アッセイのタイミングは、臨床でプロポフォールの推奨される最長投与時間 48 時間で検討している。Coenzyme Q10 も臨床相当量を使って検討している。プロポフォール注入症候群の予防やプライマリーの標的を探すうえでは、より短時間、あるいは時間経過を検討することが望ましかったと思われる。

ヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞は市販の確立された細胞を購入して使用しており、臨床検体を用いていないこと、動物実験を用いないことから倫理上の問題点はない。また、ヒト iPS 細胞試用研究計画の承認を得たうえで行われている。

４）考察・今後の発展性

時間経過を追うなど実験によって、プロポフォールのプライマリーな標的を見つける研究を行うことが望まれる。また、プロポフォール注入症候群は心臓以外でも広く起こるので、心筋細胞以外でも検討することが望まれる。

**３．その他**

大学院生でありながら、correspondence として論文を執筆している点も評価される。

**４．審査結果**

最終試問では、パワーポイントを用いた発表の後、論文に関する質疑―応答が行われた。特に、プロポフォール注入症候群の臨床像からみて心筋細胞で実験することの妥当性、プロポフォール投与後 48 時間の 1 点で検討することの妥当性、ミトコンドリア機能抑制作用がプロポフォールの直接的な作用か間接的な作用か、などについて踏み込んだ質問が行われたが、おおむね満足のいく回答が得られた。副査の重光教授、畑教授と協議の上、博士（医学）の学位授与に値する学識を十分に有すると判定する。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | NONTHASAEN Pawaree |
| 論文審査担当者 | 主査　江石　義信<br>副査　中田　隆夫、星　治 |
| 論　文　題　目 | A morphological comparison of the extraforaminal ligament between the cervical and thoracic regions |

（論文内容の要旨）


**Abstract**

**Purpose**: The current study was conducted to clarify the morphology of the extraforaminal ligament (EFL) and their surrounding structures, additionally to clarify the details within the connecting bundles (CBs) at the cervicothoracic junction.

**Materials and methods**: The EFLs from the C4-T4 vertebrae were dissected in 56 sides of 28 Japanese cadavers (11 males, 17 females). In addition, CBs were analyzed by histological examination.

**Results**: Ventral to the spinal nerve, the capsulotransverse ligament (CTL), the transforaminal ligament (TFL) and the ligament between the C7 vertebra and the 1st rib were observed. The EFL ventral to the 1st thoracic nerve was not observed in all sides. Dorsal to the spinal nerve, the anterior part of the superior costotransverse ligament (ASCL) and the ligament homologous to the ASCL were observed. They were attached to the transverse process (TP) and rib. The superior radiating ligament (SRL) and the ligament homologous to the SRL were identified. The CBs identified between the C7 and the T1 nerves were histologically confirmed to consist of nerves and vessels.

**Conclusions**: The EFLs at the cervicothoracic junction were found to be homologous. The CBs were observed between the C7 and the T1 nerves. Interestingly, the T1 level alone might be a unique level at the cervicothoracic junction.


**Introduction**

The EFL was defined as a ligament related to the external aspect of the intervertebral foramen. Some previous study reported that the EFLs in the cervical, thoracic, and lumbar segment levels were similar each other. However, the homology of the EFL at the cervicothoracic junction has been still unclear. Hence, the purpose of the current study was to examine the EFL and the surrounding structures and to compare the EFL at the cervicothoracic junction. In addition, the CBs were also observed in detail.

**Materials and Methods**

We used 56 sides of 28 Japanese cadavers (11 males, 17 females). The range of age was 62.0 to 99.0

years. Both sides of the spines were dissected from the C4-T4 vertebrae. In the thoracic region, the attachment areas of the ASCL and a ligament which was located on the ventral side of the thoracic nerves were examined. In the cervical region, the attachment areas of the TFL and the SRL were observed in detail.

Secondly, we observed a structure which connected between the spinal nerves in 20 sides of the 10 specimens. We nominated the structure as a connecting bundle (CB). It was histologically observed in 4 specimens by using the Hematoxylin and Eosin stain (H&E). To clarify the origin of the contents included in the CBs, 2 specimens were investigated macroscopically.

**Results**

**EFL in the thoracic region**

In the thoracic region, we examined the ASCL dorsal to the thoracic nerve. It was attached to the inferior margin of the cranial TP and the superior margin of the caudal rib but not at the caudal TP. It was observed to run between the T1 and T4 levels in all specimens.

In addition, we observed a ligament ventral to the thoracic nerve. On the cranial side, it was attached to the inferior surface of the cranial TP. On the caudal side, it was mainly attached to the costovertebral joint capsule and it was fused with the ASCL. Some of the fibers of this ligament were connected to the caudal rib. Based on the attachment area, we nominated the ligament as capsulotransverse ligament (CTL). The CTL was observed in the thoracic region but not between the T1 vertebra and the 2nd rib.

**EFL in the cervical region**

In the cervical region, the TFL was attached to the posteroinferior margin of the posterior tubercle of the cranial TP and to the superior margin of the anterior tubercle of the caudal TP. The TFL crossed the cervical nerve on its ventral side.

Lateral to the cranial attachment of the TFL, the SRL was attached to the lateral part of the inferior margin of the cranial TP and directly connected to the cervical nerve.

**EFL in the cervicothoracic junction**

In the cervicothoracic junction, we observed the following three types of extraforaminal ligaments:

First, a ligament, which was attached to the inferior margin of the posterior tubercle of the TP of the C7 vertebra and the superior margin of the 1st rib, was observed at the C8 nerve level. It crossed the C8 nerve on its ventral side.

Second, a ligament, which was attached to the inferior surface of the posterior tubercle of the TP of the C7 vertebra and the superior margin of the dorsal side of the 1st rib, was also observed at the C8 nerve level. It crossed the C8 nerve on its dorsal side.

Third, a ligament was attached to the inferior margin of the TP of the T1 vertebra and directly connected to the T1 nerve. None of the ligament was observed at the T2 nerve level.

**Connecting bundles (CBs) in the cervicothoracic junction**

We found bundles connecting exclusively between the C7 and T1 nerves. The CBs passed through the foramen transversarium (C7 and C8 nerve) and the foramen costotransversarium (C8 and T1 nerve). We histologically examined the CBs. The inside of the connecting bundles was filled in fat tissues which was continuous to the epineurium. In the fat tissues, nerves branches, arteries, and also veins were identified.

After histological examination, we macroscopically observed the nerve branches from the stellate ganglion. In addition, the arteries from the thyrocervical trunk and the branches to the vertebral vein were found to longitudinally pass over the CBs.

## Discussion

### The extraforaminal ligaments (EFL)

We observed the ASCL in the thoracic region and the ligament between the TP of the C7 vertebra and 1st rib. They were attached to the TP and caudal rib, crossed the spinal nerve on its dorsal side. According to the attachment area and the positional relation with the nerves, these two ligaments are considered to be homologous with each other. In addition, we observed the CTL in the thoracic region, the TFL in the cervical region and the ligament between the C7 vertebra and the 1st rib. They were attached to the TP and caudal rib, and crossed the spinal nerve on their ventral side. Previous studied described that the posterior and anterior tubercles of the TP of the cervical vertebra are homologous to the TP of the thoracic vertebra and the rib, respectively. According to previous studied, these three ligaments are considered to be homologous with each other and they may support the ventral side of the spinal nerves

In the cervical region, we observed the SRL and the ligament between the TP of the T1 vertebra and the T1 nerve. They were attached to the lateral part of the inferior margin of the cranial TP, then it directly connected to the cervical nerve. It has been reported that the function of the SRL at the cervical region is to protect the cervical nerve from traction. Since the 1st thoracic nerve is also one of the components of the brachial plexus, this ligament might also be important to protect the 1st thoracic nerve from traction.

### The connecting bundles (CBs)

We found the CBs between the C7 and T1 nerves. The CBs passed through the foramen transversarium and the foramen costotransversarium. These foramina are considered to be homologous with each other. In addition, we observed that the arteries, the veins and the nerve branches occupy the CBs. However, we could not observe the CBs at the level lower than the T1 nerve. The CBs between the C7 and T1 nerves are considered to be characteristic structures at the cervicothoracic junction.

## Conclusions

The EFLs at the cervicothoracic junction were found to be homologous. The CBs were observed between the C7 and T1 nerves. Interestingly, in the T1 level, the EFL ventral to the T1 nerve was not observed in all specimens. Hence, the T1 level might be a special area morphologically.

（日本語要約）

【背景】

本研究の目的は、頚胸部における extraforaminal ligament（EFL）を明らかにし、両部位の EFL の付着部および EFL と脊髄神経前枝との位置関係を比較することであった。また、解剖中に観察された脊髄神経前枝間をつなぐ構造物（connecting bundle: CB）についても、その形態を明らかにすることとした。

【材料および方法】

解剖実習体 28 体 56 側（男性 11 名、女性 17 名、平均年齢 83.7 歳）を使用した。第 4 頚椎から第 4 胸椎において、EFL を剖出し、その付着部および EFL と脊髄神経前枝との位置関係を調査した。

10 体 20 側において、頚椎横突起前結節と近位肋骨を除去し、CB を観察した。さらに 4 側において組織学的に、別の 2 側において肉眼解剖学的に CB の解析を行なった。

【結果】

脊髄神経前枝の腹側には、胸部で the capsulotransverse ligament（CTL）が、頚部で transforaminal ligament （TFL）が、第 7 頚椎と第 1 胸椎の間で両者と相同な靭帯が観察された。しかしながら、第 1 胸椎と第 2 胸椎との間には第 1 胸神経腹側に位置する靭帯は全ての例で認められなかった。脊髄神経前枝の背側には、胸部で anterior part of the superior costotransverse ligament（ASCL）が、頚部で ASCL に相同な靭帯が観察された。さらに、頚神経前枝と連続する superior radiating ligament（SRL）と相同と思われる第 1 胸神経前枝と連続する靭帯も観察された。

CB は、第 7 頚神経と第 1 胸神経との間に認められ、その中には、星状神経節の枝、甲状頚動脈の枝、椎骨静脈の枝が走行していた。

【考察】

頚胸部における EFL の付着部および EFL と脊髄神経前枝との位置関係を調査した結果、頚胸移行部の EFL の相同性が明らかとなった。CB は、第 7 頚神経と第 1 胸神経の間にのみ認められ、頚胸移行部の特徴の一つであると考えられた。第 1 胸神経の腹側には全ての例において靭帯は観察されず、頚胸移行部のなかでも第 1 胸椎レベルは特殊な部分であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5393　号 | NONTHASAEN Pawaree |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　江石　義信<br>副　査　中田　隆夫、星　治 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は、頚胸部における extraforaminal ligament（以下 EFL）の付着部と周囲の構造および脊髄神経前枝間をつなぐ構造物（CB; connecting bundle）について明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

頚胸部におけるEFLの付着部と脊髄神経前枝との関係は、解剖学的に十分解明されていない。申請者らは、両部位のEFLの付着部およびEFLと脊髄神経前枝との位置関係を比較するとともに、脊髄神経前枝間をつなぐ構造物 CB についてもその形態を明らかにすることを目的として解剖を行った。脳脊髄液減少症では第1胸神経根に沿って髄液が漏漏れる頻度が最も高いとの報告もあることから、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

脊髄神経前枝の腹側には、胸部で capsulotransverse ligament (CTL) が、頚部でtransforaminal ligament (TFL) が、第7頚椎と第１胸椎の間で両者と相同な靭帯が存在していた。しかし、観察した全例において、第１胸椎と第2胸椎との間には第１胸神経腹側に位置する靭帯は認められなかった。また、脊髄神経前枝の背側には、胸部でanterior part of the superior costotransverse ligament (ASCL) が、頚部でASCLに相同な靭帯が認められた。CBは、第7頚神経と第1胸神経との間に存在し、星状神経節の枝、甲状頚動脈の枝、椎骨動脈の枝がその中を走行していた。以上より、頚胸移行部のなかで第１胸椎レベルは特殊な部分であることが示唆された。脳脊髄液減少症では第1胸神経根に沿って髄液が漏漏れる頻度が最も高いとの報告もあることから、これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、解剖実習体28体56側を使用し、第4頚椎から第4胸椎においてEFLを剖出し、その付着部およびEFLと脊髄神経前枝との位置関係を調査した。10体20側において、頚椎横突起前結節と近位肋骨を除去し、CBを観察した。さらに4側において組織学的に、別の2側において肉眼解剖学的にCBの解析を行った。研究方法は十分な肉眼解剖学な知識と組織形態学的技術の裏付けのも

とに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「第１胸神経の腹側にはすべての例において靭帯は観察されず、頸胸移行部のなかでも第１胸椎レベルは特殊な部分である」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 海野　真一 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　光一<br>副査　田邊　勉、横田　隆徳 |
| 論　文　題　目 | Effects of selective calcium-permeable AMPA receptor blockade by IEM 1460 on psychotomimetic-induced hyperactivity in the mouse |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

NMDA 型グルタミン酸（Glu）受容体（NMDA 受容体）の遮断薬や自己抗体が、統合失調症と区別し難い陽性症状、陰性症状および認知機能障害を引き起こすことから、本症では脳内 NMDA 受容体の機能不全が推測されている。陰性症状と認知機能障害に対しては、D2 型ドーパミン受容体遮断を主作用とする既存の治療薬が奏功せず、NMDA 受容体機能の促進が新しい治療法として期待されている。NMDA 受容体機能の低下状態では代償的に Glu 放出が増加し、同受容体以外の Glu 受容体が過剰に刺激される。前頭葉皮質では、このうちカルシウム透過性（CP）AMPA 型 Glu 受容体（CP-AMPA 受容体）の活性化により、細胞外において、NMDA 受容体コアゴニストの D-セリンが減少するため、NMDA 受容体機能がさらに減弱すると考えられる。そこで本研究では、CP-AMPA 受容体遮断が、統合失調症における NMDA 受容体機能不全の増悪を防ぎ、代償機構による回復・増強をもたらす可能性を初めて検証し、この仮説を支持する結果を得た。すなわち、マウスに CP-AMPA 受容体の選択的遮断薬である IEM1460 を皮下投与すると、統合失調症の動物モデルとして広く用いられる、NMDA 受容体遮断薬の phencyclidine または dizocilpine（MK801）を急性投与（皮下）した後に生ずる活動性亢進が、有意に抑制された。さらに、別のモデルの、統合失調症様の陽性症状を誘発する、ドーパミン作動薬 methamphetamine を投与したマウスの活動亢進も、IEM1460 が有意に抑制した。以上の結果は、統合失調症における Glu 伝達および Glu-ドーパミン相互作用の障害に CP-AMPA 受容体の過剰な活性化が関与しており、CP-AMPA 受容体の遮断薬が本症の新規治療薬として有用な可能性を示唆している。

＜緒言＞

NMDA 型グルタミン酸 (Glu) 受容体 (NMDA 受容体)の遮断薬および自己抗体が、統合失調症と酷似した陽性症状、陰性症状および認知機能障害を引き起こす事実にもとづいて、統合失調症の病態に NMDA 受容体の機能低下が関与することを推測されている。既存の統合失調症治療薬（抗精神病薬）は、D2 型ドーパミン受容体遮断作用を介して陽性症状を改善するが、陰性症状および認知機能障害には奏功せず、統合失調症患者の社会復帰を妨げている。したがって、NMDA 受容体機能の回復がこれらの難治性症状にも効果を示す新しい治療法として期待されている。一

方、動物実験により、NMDA 受容体の機能低下状態では代償的に Glu のシナプス間隙への放出が上昇し、同受容体以外の Glu 受容体が過剰に刺激されることが明らかにされている。申請者らは、ラット前頭葉皮質で、この中のカルシウム透過性（CP）AMPA 型 Glu 受容体（CP-AMPA 受容体）が、細胞外液中 D-セリン濃度の抑制性に制御することを見出した（参考論文：Ishiwata et al., 2013）。D-セリンは NMDA 受容体のコアゴニストであり、その細胞外濃度の減少が NMDA 受容体機能を減弱させることを考え合わせると、統合失調症における NMDA 受容体機能不全は CP-AMPA 受容体刺激増強による D-セリンの減少を介して増悪すると考えられる。

本研究では、CP-AMPA 受容体遮断により、このような増悪を防ぎ、代償機構によって NMDA 受容体機能を回復・増強させる、統合失調症の新たな治療戦略を立案し、マウスを使った行動薬理学的実験により妥当性を検証した。このため、選択的な CP-AMPA 受容体遮断薬として IEM1460 (*N*,*N*,*N*-trimethyl-5- [(tricycle-[3.3.1.1$^{3,7}$]dec-1-ylmethyl)amino]-1-pentanaminium bromide hydrobromide) を用い、統合失調症の動物モデルとして広く用いられる、NMDA 受容体遮断薬の phencyclidine（PCP）または dizocilpine（MK-801）の急性投与後（皮下）に生ずる活動性亢進に対する効果を検討した。また、別の本症のモデルである、統合失調症様の陽性症状を誘導するドーパミン作動薬 methamphetamine（MAP）を投与したマウスの活動亢進への影響を比較した。

＜方法＞

動物実験は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。動物は生後７～８s 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。

CP-AMPA 受容体遮断には、末梢投与可能で同受容体に対する選択性が高いことが報告されている IEM1460 を使用した。用量は、抗痙攣作用の研究に基づいて 5、10 および 20mg/kg とし皮下投与した。薬理学的統合失調症モデルの指標として、従来から確立されている、PCP 7.5mg/kg、MK-801 0.5mg/kg または MAP 4.8mg/kg を急性投与（皮下）したマウスの活動性亢進（主に移所運動増加や常同行動が出現）を定量的に計測した。IEM1460 の統合失調症モデルに対する効果を検討する実験では、IEM1460 または溶媒の生理的食塩水 (Saline: SAL; 対照群)を投与した 30 分後に、PCP、MK-801、MAP または溶媒の SAL を別の部位に皮下投与し、その後 60 分間活動性を解析した。

各マウスの活動性は、Supermex 行動測定装置（室町機械社製）を使い、防音箱内の計測用ケージで、上方に設置された赤外線カメラによって水平・垂直方向の運動量を自動的に計数した。

データの統計学的解析には、各 2 実験群間の平均値を両側性 Aspin–Welch's t test で比較し Bonferroni 補正を行うことによる多重比較を用いた。

＜結果＞

PCP を投与したマウスにおいては、その後 60 分間に、SAL 投与対照群に比べ著明な活動性増加（＋1517%）が認められた。CP-AMPA 受容体遮断薬 IEM 1460 は、この増加を用量依存的に抑制し、20 mg/kg の効果は統計学的に有意であった：mg/kg (抑制率), 5 (-5 %), 10 (-15 %), 20 (-50 %)。SAL は PCP による活動性上昇には影響しなかった。

MK801 および MAP を投与したマウスも、著しい活動性亢進を示した (SAL 投与に対する増加

率：MK801, ＋1335%; MAP, ＋834%)。これに対して、20 mg/kg の IEM 1460 を前処置したマウスでは、MK801 または MAP によって増加した運動量が、それぞれの 70%または 30%まで、有意に減少した。

＜考察＞

本研究は、統合失調症様発現薬が誘発する行動変化に対する、CP-AMPA 受容体遮断の影響を検討した最初の報告であり、選択的な同受容体遮断薬の IEM1460 が、NMDA 受容体遮断薬の PCP 投与後の活動性亢進を用量依存的に抑制することを明らかにした。また、別の NMDA 受容体遮断薬 MK-801 だけでなく、ドーパミン作動薬の MAP が引き起こす活動性亢進も減弱させた。IEM1460 単独投与群の活動量は、SAL 注射対照群に比し有意差が見られず、IEM1460 の行動異常に対する拮抗作用は、鎮静作用等の非特異的現象によるものではないことが分かった。これらの結果は、CP-AMPAR の過剰な刺激が、統合失調症様症状発現薬投与動物の行動異常に関与することを示唆している。

今回の観察結果は、カルシウム透過性・非透過性双方の AMPA 受容体を阻害する、GYKI 52466、NBQX、CNQX 等が、MK-801 または MAP 投与後の運動亢進を低下させることを示した、従来の報告と矛盾しない。CP-AMPA 受容体遮断薬が、統合失調症様症状発現薬の行動作用に拮抗する現象には複数のメカニズムが関係すると考えられる。全種類の AMPA 受容体を刺激した時に生ずる細胞外 D-セリン濃度の低下を、CP-AMPA 受容体選択的遮断薬が完全に阻害する点からは、本研究で仮定した通り、次の機序が推測される。すなわち、PCP および MK801 による NMDA 受容体遮断後に代償的に増加した Glu 放出が、CP-AMPA 受容体の過剰刺激を介して、NMDA 受容体活性化に必須の細胞外 D-セリン濃度の減少と、それに伴う同受容体機能低下を引き起こし、これを CP-AMPA 受容体遮断薬が回復させた可能性がある。一方、(1)PCP、MK801、および MAP は、急性投与時の行動変化に関与する前頭葉皮質や側坐核で、ドーパミン伝達を亢進させ、Glu 伝達にも影響することや、(2)AMPA 受容体作動薬が細胞外ドーパミン放出を促進する等の所見より、CP-AMPA 受容体遮断が、Glu 伝達系によるドーパミン放出増強を抑制した可能性もある。

本研究のデータは、CP-AMPA 受容体が統合失調症の新たな治療薬開発の標的として有用なことを示唆している。また、CP-AMPA 受容体遮断薬は、ドーパミン伝達亢進だけでなく NMDA 受容体機能不全による行動変化を抑制する点より、抗精神病薬抵抗性の症状も改善する効果が期待される。したがって、今後、難治性の陰性症状や認知機能障害を主に反映する動物モデルに対する CP-AMPA 受容体遮断薬の影響を検討する必要がある。

＜結論＞

選択的 CP-AMPA 受容体遮断薬が、統合失調症様症状を引き起こす NMDA 受容体遮断薬およびドーパミン作動薬によるマウスの行動変化を抑制することが明らかになり、統合失調症の新規治療薬として有用な可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5394　号 | 海野　真一 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　田中　光一<br>副　査　田邊　勉、横田　隆徳 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、カルシウム透過型 AMPA 受容体の阻害薬 IEM1460 が、統合失調症の 2 種類のモデル動物（NMDA 受容体阻害剤 PCP 及び MK801 投与モデルとドーパミン作動薬 methamphetamine(MAP)投与モデル）の活動亢進を優位に抑制することを明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

統合失調症の陽性症状は既存薬で治療可能であるが、陰性症状および認知機能障害は既存薬では治療が困難である。統合失調症の陰性症状・認知機能障害に、グルタミン酸受容体の NMDA 型受容体の機能不全が関与することが示唆されており、NMDA 受容体の機能促進が新しい治療法として期待されている。NMDA 受容体の機能不全により、グルタミン酸の放出が増加し、それが NMDA 受容体以外のグルタミン酸受容体を過剰に活性化し、NMDA 受容体の機能不全を増悪させている可能性が示唆されている。このような背景の下、申請者はカルシウム透過型 AMPA 受容体の阻害薬が、統合失調症の陰性症状および認知機能障害を改善するのではと考え、本研究を行った。その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. カルシウム透過型 AMPA 受容体の阻害薬 IEM1460 は、NMDA 受容体阻害剤投与モデルの活動亢進を抑制した。
2. カルシウム透過型 AMPA 受容体の阻害薬 IEM1460 は、ドーパミン作動薬投与モデルの活動亢進を抑制した。

以上のように申請者は、カルシウム透過型 AMPA 受容体の阻害薬 IEM1460 が異なる統合失調症モデルの行動異常を改善することを明らかにした。カルシウム透過型 AMPA 受容体の阻害薬 IEM1460 は、統合失調症の新規治療薬としての可能性を持っており、臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

PCP 7.5mg/kg、MK801 0.5 mg/kg、MAP 4.8 mg/kg を C57BL/6J マウスの皮下に投与し、統合失調症モデルを作成した。IEM1460 は、5, 10 および 20 mg/kg を上記薬物の投与 30 分前に、皮下投与した。マウスの活動量は、赤外線カメラを用い測定した。これは、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことを示していると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。全ての実験は、動物実験委員会の承認のもとに行われている。

４）考察・今後の発展性

IEM1460 の単独投与ではマウスの行動量に変化は観察されないので、IEM1460 の上記効果は非特異的な鎮静作用ではない。今後、他の統合失調症モデルを用い、陰性症状・認知機能障害への効果が観察されるなら、IEM1460 は統合失調症の新規治療薬として有用な可能性を持っている。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 綾部　智人 |
| 論文審査担当者 | 主査　三宅　智<br>副査　中村　卓郎、沢辺　元司 |
| 論　文　題　目 | Characterization of panel antibodies for classification of cancer type using novel antibody-based phosphoproteomics |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

我々は、ランダム免疫法により 154 種の特異性未同定の抗リン酸化蛋白質モノクローナル抗体（PPmAb）を産生するハイブリドーマを樹立し、これら PPmAb 群から構成した抗体パネルと腫瘍細胞との反応性を多変量解析の一種である正準判別分析を用いて解析することにより、腫瘍細胞を腫瘍種毎に分類出来るシステムを報告した。今後、このシステムの臨床診断上の信頼性を向上するためには、抗原特異性を明らかにした PPmAb 群を用いた新たな抗体パネルを用意する必要がある。本研究では、154 種の PPmAb 群を用いて、5 種の腫瘍組織を対象とした免疫染色を行い、その反応性から特に特徴のあった AKPS288 PPmAb に焦点を当て、免疫沈降法と質量分析法を組合せて AKPS288 PPmAb が認識する抗原の同定を試みた。その結果、AKPS288 PPmAb が認識する抗原分子が腫瘍関連抗原（TAA）のひとつである TATA-element modulatory factor 1（TMF/ARA160）であることが明らかとなった。これらのことから、抗 TAA 抗体群を組み合わせた新たな抗体パネルを作成することにより、より有用性の高いがん診断システムを構築できる可能性がある。

＜緒言＞

生体内の蛋白質は DNA 情報に基づいて翻訳された後、様々な生化学的修飾を受けることで、その特性を変化させる。蛋白質がリン酸化あるいは脱リン酸化されると、蛋白質を構成するアミノ酸残基の局部的な極性が変化し、その結果として蛋白質の高次構造や機能に変化が生じる。このリン酸化と脱リン酸化反応は、細胞内シグナル伝達や細胞周期の中心的な役割担うため、これら反応の破綻が多くの慢性疾患や発癌に関与していると考えられている。そのため、リン酸化蛋白質の発現プロファイルは腫瘍の種類に依存しており、その解析は癌の診断に役立つ可能性があると考えられる。

我々は、ヒト T 細胞腫瘍系である Molt-4 細胞より抽出されたリン酸化蛋白質ミックスを免疫抗原としたランダム免疫法により PPmAb 群を作出している。これら 154 種の PPmAb 群と腫瘍細胞株の反応性を正準判別分析で解析することにより、腫瘍細胞株を腫瘍種毎に明確に分類することのできるリン酸化蛋白質発現プロファイルを作成した。この方法を担癌患者由

来の腫瘍組織に適応した結果、腫瘍組織の分類が可能となり、PPmAb 群を基盤とする新たながん診断システムの構築を報告している。抗体を用いた腫瘍プロテオミクスの多くは腫瘍関連抗原（TAA）を標的とし、その多くがバイオマーカーとしての応用を検討している。一方、我々のがん診断システムは特異性不明の PPmAb 群と正準判別分析を組み合わせているため、標的とする蛋白質の性状は明らかではない。このシステムを臨床診断に応用するためには、抗原特異性を明らかにした PPmAb 群を用いた抗体パネルを用意することが重要であるが、全ての PPmAb についてその特異性を明らかにすることは困難である。そこで本研究では、新たな抗体パネルを用いたがん診断システムの構築のために、特異性未同定のの 154 種の PPmAb 群の反応性を腫瘍組織との免疫染色により評価し、特徴的な反応を示す PPmAb について、質量分析による抗原分子の同定を行った。

＜方法＞

（1）PPmAb 群の性状スクリーニング

Motofuji らによって樹立された PPmAb 群の性状を明らかにするために、コロジオンバッグ法により包埋したホルマリン固定 Molt-4 細胞および担癌患者由来のホルマリン固定組織（大腸、胃、肝臓、腎臓および前立腺）についてアビジン-ビオチン標識酵素複合体（ABC）法により免疫染色を施行した。

（2）抗原の精製および質量分析法による抗原分子の同定

PPmAb 群の性状スクリーニングの結果、大腸および胃の腫瘍部に特異的な反応性を示した AKPS288 PPmAb について、質量分析法による抗原分子の同定を検討した。質量分析に用いる試料の精製方法として Protein L-結合アガロースビーズを用いた免疫沈降法を採用し、Molt-4 細胞の可溶画分から抗原蛋白質を精製した。同標品を SDS-PAGE にて分画し、Western blot 法により反応性を確認後、目的の領域についてゲル内消化を行い質量分析法に供した。質量分析計には LC-MS/MS システムとして Nanospace SI-2（Shiseido）および LTQ-Orbitrap Discovery（Thermo Fisher Scientific）を用いた。検出されたペプチドは、Mascot により検索し、SwissProt により蛋白質の同定を行った。

＜結果＞

**1. 組織細胞学的検討**

**PPmAb 群と Molt-4 細胞および腫瘍組織との反応性**

PPmAb 群の反応性および抗原分子の細胞内局在を検討するため、ホルマリン固定 Molt-4 細胞および腫瘍組織を含むホルマリン固定組織（大腸、胃、肝臓、腎臓および前立腺）について免疫染色を行った。ホルマリン固定 Molt-4 細胞を用いた免疫染色では 154 種の PPmAb 群のうち 89 種が強い反応性を示した。次いで、これら 89 種の抗体について腫瘍組織を用いた免疫染色を行ったところ、54 種の PPmAb で反応性が確認され、その内訳は大腸で 4 種、胃で 36 種、肝臓で 19 種、腎臓で 31 種、そして前立腺で 23 種であった。これら 54 種の PPmAb が認識する抗原分子の細胞内局在パターンは細胞質型が 27 種、核型が 19 種、そして細胞質

および核型が 8 種であった。さらに、腫瘍部と非腫瘍部間で異なる反応性を示した PPmAb は 23 種認められた。このうち、AKPS288 PPmAb は大腸および胃腫瘍部の細胞質、前立腺非腫瘍部の細胞質の 3 種の組織に渡って特異的な反応性を示したことから、これ以降は AKPS288 PPmAb に焦点を当てて検討を行った。

**間接蛍光抗体法による腫瘍細胞株における AKPS288 PPmAb 反応性の検討**

PPmAb 作出時の免疫抗原としたT細胞腫瘍系のMolt-4細胞に加えて20種の腫瘍細胞株（大腸癌系 4 株、胃癌系 4 株、肝癌系 3 株、膵癌系 4 株、肺癌系 3 株および前立腺癌系 2 株）について AKPS288 PPmAb 関連抗原の細胞内局在を間接蛍光抗体法により検討した。T 細胞腫瘍系、大腸癌系、肝癌系および前立腺癌系で強い蛍光が細胞質に荒い顆粒状に観察された。一方、胃癌系では蛍光が細胞全体に広がる微細な顆粒状に観察された。また、300 個の細胞における蛍光陽性率を算出したところ、T 細胞腫瘍系、大腸癌系および肝癌系で陽性率が 70%以上を示した。前立腺癌系は 75%の陽性率を示したが、ホルマリン固定前立腺組織を用いた免疫染色では腫瘍部が陰性、非癌部が陽性を示し、結果に解離が認められた。

**2. 蛋白化学的検討**

**免疫沈降法および質量分析法による AKPS288 PPmAb 関連抗原の同定**

AKPS288 PPmAb が認識する抗原分子を精製するために免疫沈降法を採用した。通常、マウス IgG 抗体を用いた免疫沈降では Protein A あるいは Protein G を結合させたビーズが用いられる。しかし、AKPS288 PPmAb のアイソタイプがマウス IgM-κ 型と確認されたこと、さらに同抗体がウシ胎児血清を含む培養上清中に存在することから、Protein L-結合アガロースビーズを使用して抗原蛋白質を精製した。精製試料を SDS-PAGE で分画後、POD 標識抗マウス IgM 抗体を用いた Western blot 法により約 160 kDa に強いシグナルのバンドを認めたことから、これを AKPS288 PPmAb 関連抗原とした。同様に精製試料を分画し、蛋白染色したゲルから標的蛋白質に相当する約 160 kDa およびその周辺の 2 つのセクションからゲル断片を切り出し、ゲル内消化後のペプチド試料について LC-MS/MS による分析を行った。2 つのセクションから検出されたもののうち、coverage が 5%以上のものを候補蛋白質と定義したところ、4 種の候補蛋白質、すなわち TATA-element modulatory factor 1（TMF/ARA160）、amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase（AGL）、dermcidin（DCD）および transcription elongation factor SPT5（hSPT5）が同定された。さらにこれら 4 種の候補蛋白質のリコンビナントプロテインを入手し、AKPS288 PPmAb との反応性を Western blot 法により検討したところ、TMF/ARA160 にのみ反応性が認められた。

＜考察＞

本研究ではランダム免疫法により作出された PPmAb 群のうち、新規抗体パネルに応用するための候補抗体として大腸および胃の腫瘍部に特異的な反応を示す AKPS288 PPmAb に着目し、その特異性を質量分析法により検討した。

AKPS288 PPmAb が認識する抗原分子を同定するために、Protein L-アガロースビーズを用

いた免疫沈降法による抗原精製の検討および質量分析法による解析を行った。その結果、4種の候補蛋白質が同定され、それら候補蛋白質の強制発現を用いた Western blot 法により TMF/ARA160 にのみ反応性を認めた。質量分析法における信頼性の高い coverage は 30%程度と言われており、本検討での TMF/ARA160 の coverage は 41.99%と 45.75%であったことから、極めて信頼性の高い結果が得られたと言える。また、AKPS288 PPmAb の反応性をホルマリン固定 Molt-4 細胞の免疫染色および 21 種のメタノール固定腫瘍細胞株の間接蛍光抗体法にて確認したところ、AKPS288 PPmAb 関連抗原は細胞質に局在し、顆粒状に染色されていた。TMF/ARA160 はゴルジ体に局在することが明らかとされており、免疫染色および間接蛍光抗体法の結果は AKPS288 PPmAb 関連抗原が TMF/ARA160 であることを裏付けていた。以上のことから、AKPS288 PPmAb が認識する抗原分子は TMF/ARA160 であると決定した。

＜結論＞

本研究では、これまでに報告しているがん診断システムの臨床診断上の信頼性を向上させるために、免疫染色および質量分析を用いて PPmAb 群の特異性を評価した。特に、大腸および胃の腫瘍部に特異的な反応を示す AKPS288 PPmAb の抗原特異性を検討した結果、同抗体は TAA のひとつである TMF/ARA160 を認識していた。このことは、抗 TAA 抗体を中心とした新たな抗体パネルと正準判別分析を組み合わせることにより、さらに有用性の高いがん診断システムを構築できる可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5395　号 | 綾部　智人 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三宅　智<br>副　査　中村　卓郎、沢辺　元司 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本研究は、抗リン酸化タンパクを抗原として 154 種類のモノクローナル抗体を作成し、これらの抗体パネルを用いて腫瘍細胞を原発巣ごとに分類できる腫瘍を開発したことである。さらに、これらの抗体が認識するタンパクの一つが、腫瘍関連抗原の一つである TATA-element modulatory factor 1（TMF/ARA160）であることを明らかにした。今後は、これらの抗体パネルを用いた腫瘍細胞の詳細な診断についての発展が期待できる。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

臨床病理の実践から発想を得た研究であり、十分な基礎的なデータの裏付け、広範な実験手技や考察が行われ、論理的な展開で結果を導出した研究である。

２）社会的意義

実臨床においても、原発不明癌の診断など、がん細胞の性質をタンパクレベルで分類する一助となる発展性のあるものである。

３）研究方法・倫理観

細胞および臨床検体を用いた研究であるが、実験手法についても倫理的な配慮がなされており、問題はないものと考える。

４）考察・今後の発展性

今後は、抗体パネルの活用、抗原の同定などによって臨床的に有用性の高いがん診断システムの構築が期待できる。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、副査の中村連携教授、沢辺教授と合議の上、申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 柴　久美子 |
| 論文審査担当者 | 主査　仁科　博史<br>副査　田中　真二、明石　巧 |
| 論　文　題　目 | Canagliflozin, an SGLT2 inhibitor, attenuates the development of hepatocellular carcinoma in a mouse model of human NASH |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

非アルコール性脂肪肝炎（NASH: nonalcoholic steatohepatitis）は進行性の慢性肝疾患であり、高い頻度で肝硬変から肝臓癌を発症するために治療介入が必要であるが、食事・運動療法による減量以外に有効な治療法が確立されていない。今回、肥満、インスリン抵抗性を呈する NASH モデルマウスのメラノコルチン 4 型受容体（MC4R）欠損マウスを用いて、SGLT2 阻害薬カナグリフロジン(CANA)の肝線維化及び肝臓癌の予防効果を検討した。8 週齢雄性 MC4R 欠損マウスに高脂肪高蔗糖食を 8、20 または 52 週間給餌し、同時に CANA（0.03%w/w）を混餌投与した。CANA 8 週間投与により摂餌量と体重が増加したが、血糖値は低下した。精巣周囲脂肪組織重量及び脂肪細胞サイズは CANA により増加したが、肝中性脂肪含有量及び血清 ALT 値は低下した。CANA により肝臓の新規脂肪合成酵素 *Acc*、*Scd* 及び線維化関連遺伝子 *Col1a1*、*Timp1* の発現が減少した。20 週間投与では肝臓の組織学的評価で炎症と線維化が抑制された。52 週間投与では CANA により血清 ALT 値が低下し、肝腫瘍数が減少した。CANA は NASH マウスの脂肪肝、炎症、線維化及び癌の発生を抑制し、CANA により脂肪細胞のエネルギー蓄積能が増加して肝臓への異所性脂肪蓄積が減少したことにより、肝病変の進展が抑制されたことが機序の一つと考えられた。2 型糖尿病において SGLT2 阻害薬が NASH および肝癌の進展抑制効果を発揮する可能性が示された。

＜緒言＞

非アルコール性脂肪肝炎（NASH: nonalcoholic steatohepatitis）は進行性の慢性肝疾患であり、脂肪肝を背景として炎症や線維化を伴い、進行すると肝硬変や肝臓癌に至る。しかし、NASH の発症・進展予防には、減量以外に確立された治療法がないのが現状である。当研究室ではメラノコルチン 4 型受容体（MC4R）欠損マウスを用いてヒトの NASH の病態に酷似した新しい NASH マウスの開発に成功し、NASH の分子機構の解明や治療法の効果判定としての有用性を報告している。Sodium-glucose cotransporter2 (SGLT2)阻害薬は尿糖排出を促進し、インスリン作用とは独立した血糖降下作用を有する 2 型糖尿病治療薬である。当研究室は高脂肪食負荷マウスにおいて SGLT2 阻害薬イプラグリフロジンが精巣周囲脂肪組織重量の増加を伴って脂肪肝を抑制する

ことを見出し、脂肪細胞のエネルギー蓄積能の増加が肝臓への異所性脂肪蓄積を抑制する可能性を明らかにした。本研究では NASH マウスを用いて、SGLT2 阻害薬 CANA の肝線維化および肝臓癌の抑制効果を検証するとともに、肝臓及び脂肪組織におけるエネルギー蓄積機構の変化と機序について検討した。

＜方法＞

8 週齢雄性 MC4R 欠損マウスに高脂肪高蔗糖食を 8、20 または 52 週間給餌し、同時に CANA（0.03%w/w）を混餌投与した。体重、摂餌量、血中代謝パラメータ、肝臓および精巣周囲脂肪組織の臓器重量、遺伝子発現、組織像（HE 染色、シリウスレッド染色、F4/80 染色）、精巣周囲脂肪組織のメタボローム解析を行った。また、52 週間給餌したマウスは肝臓の腫瘍数と最大腫瘍径を評価した。さらに 3T3-L1 細胞を分化誘導後、還元型グルタチオン（GSH）で前処置して過酸化水素を添加し、NADPH オキシダーゼ関連遺伝子の発現を検討した。また、RAW264.7 細胞についても同様の実験を行い、炎症関連遺伝子の発現を検討した。

＜結果＞

MC4R 欠損マウスは高脂肪高蔗糖食の負荷により、肥満、高血糖、高インスリン血症、脂肪肝をきたした。CANA 投与により MC4R 欠損マウスの高血糖は改善したが、摂餌量が増加し、体重は投与 8 週間後より対照と比較して増加した。CANA 投与 8 週間では HOMA-IR が改善し、肝臓において新規中性脂肪合成酵素 *Acc*、*Scd* の遺伝子発現の低下を伴って中性脂肪含有量が減少した。また、CANA により精巣周囲脂肪組織重量及び脂肪細胞サイズが増加したが、*Tnfa* の遺伝子発現は低下し、組織学的には F4/80 染色で肥満の過程で炎症の起点となる Crown-like structure（CLS）数も減少していた。

CANA 投与 20 週間では肝中性脂肪含有量は対照と同等であったが、肝臓の炎症関連遺伝子 *Tnfa*、*Cd11c* や線維化関連遺伝子 *Col1a1*、*Tgfb* などの発現が低下した。また、組織学的にも NAFLD activity score の減少とシリウスレッド染色陽性面積が減少し、炎症と肝線維化が抑制されていた。精巣周囲脂肪組織は 8 週間投与と同様に、CANA により組織重量及び脂肪細胞サイズが増加したが、脂肪組織炎症は増悪せず、CLS 数も増加を認めなかった。

CANA 投与 52 週間では肝腫瘍数が減少し、血清 ALT 値の低下、*Myc* 及び非癌部の *Afp*（α-fetoprotein）の遺伝子発現が低下した。また、20 週間投与と同様に肝シリウスレッド染色で陽性面積が減少し線維化の改善を認めた。

脂肪細胞の増大にもかかわらず CANA 投与で炎症が改善しており、そのメカニズムを探索するため、精巣周囲脂肪組織のメタボローム解析を行った。メタボローム解析では還元型グルタチオン（GSH）の増加と酸化型グルタチオン（GSSG）の減少を認め、酸化ストレスの指標となる GSSG/GSH 比は著明に減少していた。GSH 増加に伴う脂肪組織への影響について検討し、GSH は 3T3-L1 細胞において過酸化水素による NADPH オキシダーゼ関連遺伝子 *gp91phox*、*p67phox* の発現誘導を抑制し、RAW 264.7 細胞においても炎症および線維化関連遺伝子の *Il6*、*Tgfb* の発現を抑制した。

＜考察＞

肥満、インスリン抵抗性を呈する NASH モデルマウスにおいて、CANA は肝線維化と肝臓癌の発生を抑制した。CANA による脂肪肝の進展抑制が、その後の炎症、線維化、肝臓癌の発生の抑制に寄与したと考えられた。CANA 投与により MC4R 欠損マウスの体重は増加するが、脂肪肝の進展抑制の機序として、①CANA が高血糖及び高インスリン血症を改善し、肝臓において新規中性脂肪合成を抑制したこと、②CANA が脂肪細胞のエネルギー蓄積能を増加させ、肝臓への異所性脂肪蓄積を抑制したこと、が考えられた。

CANA を 8 週間投与したマウスの代謝表現型は、我々が最近報告した高脂肪食誘導肥満マウスに SGLT2 阻害薬イプラグリフロジンを投与した検討と類似していた。両者とも高インスリン血症が改善し、肝臓における新規脂肪酸合成を低下させ、精巣周囲脂肪組織は増大するものの炎症と線維化は改善した。中性脂肪を蓄積する白色脂肪組織の線維化は脂肪細胞の肥大化を抑制し、肝臓への異所性脂肪蓄積を促進すると報告されている。これらから我々の研究では SGLT2 阻害薬投与により精巣周囲脂肪組織に正常に脂肪が蓄積され、肝臓への異所性脂肪蓄積が抑制されたと考えられた。

脂肪組織の変化に注目すると、脂肪細胞でインスリンシグナルを増加させた脂肪細胞特異的 phosphatase and tensin homologue （PTEN）欠損マウスでは、野生型マウスと比べ高脂肪食負荷による脂肪重量の増加が大きくなるものの、脂肪組織炎症は軽減し、脂肪肝が改善することが報告されている。今回の検討では CANA 投与により高インスリン血症が改善し、インスリン感受性も改善した結果、脂肪細胞の中性脂肪蓄積能が増大したと考えられた。

また、脂肪蓄積と酸化ストレスは相関し、肥満マウスでは脂肪組織の NADPH オキシダーゼ発現の上昇とともに活性酸素種(ROS)産生が増加することがこれまでに報告されている。さらに、酸化ストレスは脂肪組織の増大を妨げ、炎症反応を促進することも知られている。3T3-L1 細胞を用いた検討では、GSH 阻害剤が脂肪新生を阻害して脂肪細胞サイズを減じること、過酸化水素が細胞の炎症を惹起することも報告されている。本研究では、CANA が脂肪組織においてグルタチオン代謝を GSH 優位に変化させることにより、脂肪細胞サイズの増加にも関わらず酸化ストレス、炎症及び線維化反応を抑制したと考えられた。さらに高血糖は酸化ストレスと独立して脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性を引き起こすことが報告されており、今回 CANA により血糖を低下させたことも脂肪組織の炎症の抑制に寄与したと考えられた。

今回の検討では CANA 投与で肝腫瘍は減少したが、腫瘍の最大径は低下傾向であるものの有意差は認めなかった。CANA は腫瘍の成長よりも発癌の抑制に寄与していると考えられた。肥満 2 型糖尿病患者では高インスリン血症や高 IGF-1 血症に伴い発癌が増加すると報告されており、Akt/PI3K/mTOR 経路を促進させ細胞増殖を誘導することがそのメカニズムとして考えられている。しかし、本研究で CANA　20 週間、52 週間投与の時点では高インスリン血症の改善は認めず、脂肪肝・炎症・線維化の抑制が発癌を抑制した可能性が高いと考えた。CANA による発癌抑制の詳細なメカニズムの解析と、ヒトにおいても SGLT2 阻害薬が NASH 関連肝癌を抑制するか臨床的な検討を行う必要があり、今後の検討課題である。

＜結語＞

本研究により、肥満、インスリン抵抗性を有する 2 型糖尿病において、SGLT2 阻害薬が NASH および肝癌の進展抑制効果を発揮する可能性が示された。また、脂肪組織におけるエネルギー蓄積機構の解明と制御が、異所性脂肪蓄積に対する新たな治療法の創出につながることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5396　号 | 柴　久美子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　仁科　博史<br>副　査　田中　真二、明石　巧 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は「2型糖尿病治療薬カナグリフロジンのNASH予防効果」についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は高頻度で肝硬変から肝癌を発症するため、治療介入が必要であるが、食事や運動療法以外には有効な治療法が確立されていない。このような背景の下、申請者は、ヒト NASH モデルマウスであるメラノコルチン４型受容体（MC4R）欠損マウスと２型糖尿病治療薬である Sodium-glucose cotransporter2 (SGLT2)を用いて、NASH 発症に対する影響の検討を行った。尿糖排出を促進することで、NASH 発症を軽減させるという着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。MC4R欠損NASHモデルマウスを用いて、2型糖尿病治療薬SGLT2阻害薬カナグリフロジン(CANA)の肝線維化及び肝癌の予防効果を見出した。以上のように申請者は、SGLT2阻害薬がNASHおよび肝癌の抑制効果を持つ可能性を示した。これは新しい知見であり、基礎・臨床両面において有意義な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究にはヒトNASHモデルマウスが用いられ、血糖値やインスリンなどの血液成分の計測、メタボローム解析、遺伝子発現解析などが行なわれた。本手法は十分な生理学的および薬理学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について予防効果のみならず抑制効果についても興味深く考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．その他

４．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士(医学)の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 清水　一秀 |
| 論文審査担当者 | 主査　江石　義信<br>副査　横田　隆徳、田賀　哲也 |
| 論　文　題　目 | Intraoperative Photodynamic Diagnosis Using Talaporfin Sodium Simultaneously Applied for Photodynamic Therapy against Malignant Glioma: A Prospective Clinical Study |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

本研究の目的は、悪性神経膠腫に対する光線力学治療に用いられるタラポルフィンナトリウム（TS）を用いて同時に術中光線力学「診断」を行い、その有用性を明らかにすることである。悪性神経膠腫が疑われ腫瘍摘出および TS を用いた光線力学治療を行う患者を対象とした。組織標本は術中 MRI で造影される部位（造影病変）とその周辺の腫瘍境界にあたる部位（非造影病変）から採取された。400nm の半導体レーザーによる励起光、特製の光ファイバプローブ、小型分光光度計による計測系を構築し術中に標本からの蛍光を分光計測した。標本は病理学的に細胞密度を 0-3 の 4 段階に分類した。17 症例からの 86 標本を解析した。TS からの蛍光は 664nm に単一のピークを持ち、400nm の励起光と容易に分離可能であった。造影病変からの蛍光は非造影病変に比べ有意に強度が高かった（P<0.001）。DAPI 核染色と蛍光顕微鏡での観察により造影病変では細胞質に蛍光がみられ、血管内皮に沿って蛍光の集積が見られた。造影病変は初発と再発で蛍光強度に優位な差を認めなかった。全ての標本を病理分類で比較すると最も細胞密度が高いクラス 3 で顕著に高い蛍光強度を認め、クラス 0 と 3（P<0.001）1 と 3（P<0.001）、2 と 3（P<0.018）で有意な群間差を認めた。本手法により TS を用いた術中の光線力学診断と光線力学治療は同時に行えることが示唆された。病理学的に悪性の部位からの強い蛍光には微小血管の関与が示唆された。また既存の 5−アミノレブリン酸を用いた光線力学診断に臨床で用いられている青色光源が使用可能であった。

＜緒言＞

悪性神経膠腫、とりわけ膠芽腫は浸潤性の脳腫瘍で集学的治療によっても予後は不良である。特に局所再発が 50−80％と多いため治療は手術によって安全な範囲で最大限の摘出を行うことに続き、局所治療を行う事が最適である。悪性脳腫瘍に対する術中の光線力学診断（PDD）や光線力学治療（PDT）に代表される光線力学技術の臨床研究が注目されている。特に 5 アミノレブリン酸（5ALA）を用いた術中脳腫瘍 PDD（蛍光誘導手術）は確立しており、患者予後を改善すると報告されている。一方、悪性脳腫瘍に対する PDT では腫瘍特異的に集積する光感受性物質を術前に投与し適切な波長とパワーの光を励起光として腫瘍や摘出腔に照射することで一重項酸素を発生し殺細胞効果を発揮する。タラポルフィンナトリウム（Talaporfin sodium; TS）は悪性脳腫瘍

に用いられる第２世代の光感受性物質であり、これによる PDT が臨床的安全性と有効性を示したことにより日本国内での承認および保険収載を取得している。5ALA と TS は一部構造が同一であるため 400nm に共通の吸収ピークを持ち、TS も蛍光を発することが知られている。しかし 5ALA と TS は副作用の増強の危険性があるため同時投与は不可能である。よって、我々は TS のみを用いて PDD（腫瘍同定による最大限の腫瘍摘出）と PDT（摘出後の局所両方）の両方が同時に実現可能であると推定し研究を行った。

＜方法＞

2016 年 5 月から 2017 年 3 月まで、東京女子医科大学脳神経外科において悪性神経膠腫が疑われ TS による PDT を行なう成人手術症例を初発と再発の別は問わず前向きに検討した。東京女子医科大学、東京医科歯科大学の学内倫理審査を通過し、患者にインフォームドコンセントを行った。患者は術前 24 時間前に 40mg/kg の TS（レザフィリン、明治製菓ファルマ）を静脈内投与され、術中 MRI と画像ナビゲーションを用いて手術が行われた。腫瘍摘出完了後には治療用レーザーにより PDT が行われた。腫瘍標本は診断のために摘出され、造影病変（contrast-enhanced: CE）とその周辺の非造影病変（Non-CE:NCE）を記録した 3−5mm のサイズで計測を行った。標本は体内ではなく、摘出後に手術室内で迅速に蛍光計測を行った。蛍光計測に際しては 400nm の半導体レーザー（15mW）を励起光源とし、特注の同軸型光ファイババンドルで励起光の照射と、発生した蛍光の収集を行った。蛍光取得用の光ファイバは小型の分光光度計に接続し蛍光スペクトルを取得した。腫瘍標本と光ファイババンドルとの位置関係を固定し暗室条件を作るための計測治具を 3D プリンタで自作した。腫瘍標本に対して蛍光の結果を知らされない神経病理学専門医により H&E 染色を用いた病理学的解析を行った。全ての標本を細胞の密度と形態学的変化にもとづき 0 から 3 の 4 段階に分類（0 はほぼ正常、３は密な腫瘍細胞）した。WHO 脳腫瘍分類 2016 にもとづき最終病理診断が行われた。

＜結果＞

19 症例のうち、最終病理診断が壊死と Pilocytic astrocytoma（WHO grade I）であった 2 例を除き、17 症例 86 標本が解析可能であった。うち 3 患者は、2 回の PDT 治療を行ったため患者数では 14 で Median 年齢は 47 であった。82％で診断は膠芽腫（WHO grade IV）、残りは退形成性上衣腫(WHO grade III)であった。41%が初発であった。CE からの標本は 41、NCE からの標本は 45 であった。全症例で 95％以上の腫瘍摘出が完遂され、生検のみの症例は含まれなかった。蛍光は 664nm に単峰性のピークをもち、励起光の 400nm と容易に区別が可能であった。まず、TS を用いた PDD（TS-PDD）が可能であるか検討するために CE と NCE からの標本を比較したところ、CE で有意に高い蛍光強度が得られた（P<0.001）。次に、TS が腫瘍細胞に取り込まれていることを確認するため、標本の凍結切片を 10μm で作成し DAPI による核染色を行った。蛍光顕微鏡により、TS 蛍光が細胞質から見られることを確認した。蛍光は血管内皮で特に顕著であった。造影病変からの標本について初発と再発で比較したが有意差は認めなかった（P=0.26）。次に、蛍光による断端診断が可能かどうかを検討するため全ての標本について病理学的クラス分けによる検討を行った。蛍光強度は病理クラス 3（最も細胞密度が高い）で顕著に強かった。クラス 0 と３(P<0.001)、１と３(P<0.001)、２と３(P=0.018)で有意な群間差を認め、単純増加の傾向

（Jonckheere-Terpstra test；P<0.001）も確認された。代表症例では術前の GdT1・FLAIR 画像で左側頭葉の造影病変を、病理クラス３の標本の HE 像と強い傾向ピークを持つスペクトル、病理クラス０の標本の HE 像と弱い傾向ピークを持つスペクトルを示した。

＜考察＞

これまで動物や細胞実験で TS からの蛍光を示した報告はあったが、実際の臨床で患者標本を用いて蛍光強度を比較検討した報告は本研究が初めてである。造影病変や細胞密度の高い標本から強い蛍光が得られ、これまで報告された TS の腫瘍選択性と矛盾しない結果が得られた。本研究の結果により、本手法は残存する造影病変の術中同定による最大限の腫瘍摘出を助ける「TS-PDD」が可能であることを示唆した。特に、既存の５ALA に使われるものと同様の波長で本手法が実現可能であることからも利便性が高いものと考えられた。一般的に光感受性物質は励起波長の光を吸収した後に基底状態に戻る際に辿る経路の一つが一重項酸素の発生であり、一つが蛍光の発光である。脳腫瘍の PDD に用いられている５ALA と、やはり光感受性物質である TS は副作用を増強させる危険性があるため同時投与が許容されない。また、本邦で承認されている TS を用いた PDT では光の深達度を高めヘモグロビンによる吸収を避けるため長波長（赤色）のレーザーを用いることが定められているが､その際には 664nm の励起光により 672nm の蛍光が発生するため区別が非常に困難である。そのため我々は 400nm の励起光を選択した。また PDT は光照射された表面のみに有効であるため、照射に先立つ腫瘍の最大摘出が重要である。本手法の開発により、TS 単剤を用いて術中の腫瘍同定（PDD）補助による腫瘍の最大摘出と、引き続く局所治療（PDT）が同時に可能になると期待され、臨床的意義は大きい。また本手法は術中 MRI などの設備がない施設でも５ALA 用の器具で実行可能である利点もある。ただし TS は５ALA と違い静脈投与され代謝を経ずにタンパク質に結合することで腫瘍集積性を発揮するため、血管および血液中に TS が存在することに注意が必要である。実際、TS は早期肺癌の治療で先行して日本で承認を受けているが、微小血管の損傷による腫瘍への効果が報告されている。本研究は症例および腫瘍標本の数が少ないことや腫瘍サイズによる蛍光強度の変動の可能性について制限がある。また標本における腫瘍細胞の密度や悪性度について客観的な指標に欠ける点も記載する必要があるが、この手法は既に一般に論文報告されている５ALA の評価にも用いられている。これらの制約はあるが、本研究で開発した TS-PDD は、悪性神経膠腫の術中診断法として使用できることを初めて実際の患者組織を用いて示したものである。腫瘍切除率の向上と PDT の最適化、ひいては患者予後の改善につながるものと期待される。

＜結論＞

本研究は悪性神経膠腫の患者から得られた検体で TS から発生する蛍光による PDD が PDT と同時に実現可能であると示した初めての報告である。造影病変は非造影病変よりも、また病理学的に悪性度の高い標本ほど強い蛍光強度が得られた。微小血管の関与がその原因として疑われた。5ALA に用いられている青色励起光源が使用可能であった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5397　号 | 清水　一秀 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　江石　義信<br>副　査　横田　隆徳、田賀　哲也 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は、悪性神経膠腫に対する光線力学治療に用いられるタラポルフィンナトリウム（TS）を用いて同時に術中光線力学「診断」を行い、その有用性を明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

タラポルフィンナトリウム（Talaporfin sodium; TS）は悪性脳腫瘍に用いられる第２世代の光感受性物質であり、これによる光線力学治療が臨床的安全性と有効性を示したことにより日本国内での承認および保険収載を取得している。光線力学診断（蛍光誘導手術）に用いられている５アミノレブリン酸（5ALA）と TS は副作用の増強の危険性があるため同時投与は不可能である。このような背景のもと申請者は、TS のみを用いて光線力学診断（腫瘍同定による最大限の腫瘍摘出）と光線力学治療（摘出後の局所両方）の両方が同時に実現可能であると推定し研究を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．MRI造影病変からのTS蛍光は非造影病変に比べ有意に強度が高かった。

２．TS蛍光は腫瘍細胞の細胞質に認められ、血管内皮にも蛍光の集積が見られた。

３．MRI造影病変は初発と再発で蛍光強度に優位な差を認めなかった。

４．TS蛍光強度は病変部の腫瘍細胞密度と有意な層間を認めた。

以上のように申請者は、本手法によりTSを用いた術中の光線力学診断と光線力学治療が同時に行える可能性を示唆しており、これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本研究は、悪性神経膠腫が疑われ腫瘍摘出およびTSを用いた光線力学治療を行う患者を対象に行われた。組織標本は術中MRIで造影される部位（造影病変）とその周辺の腫瘍境界にあたる部位（非造影病変）から採取された。400nmの半導体レーザーによる励起光、特製の光ファイバプローブ、小型分光光度計による計測系を構築し術中に標本からの蛍光を分光計測した。標本は病理組織学的に形態を元に細胞密度を0-3の4段階に分類した。17症例からの86標本を解析した。こ

れらの研究方法は十分な研究倫理的な知識と光線力学的な知識および組織病理学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「本研究は症例および腫瘍標本の数が少ないことや腫瘍サイズによる蛍光強度の変動の可能性について制限がある。また標本における腫瘍細胞の密度や悪性度について客観的な指標に欠ける点も記載する必要があるが、この手法は既に一般に論文報告されている５ALA の評価にも用いられている。これらの制約はあるが、本研究で開発した TS を用いた光線力学診断法は、悪性神経膠腫の術中診断法として使用できることを初めて実際の患者組織を用いて示したものである。腫瘍切除率の向上と PDT の最適化、ひいては患者予後の改善につながるものと期待される」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 渡邊　梨里 |
| 論文審査担当者 | 主査　荒井　裕国<br>副査　古川　哲史、木村　彰方 |
| 論　文　題　目 | Chest Pain Without Coronary Artery Obstruction and Calcification in Young Women May Indicate Left Ventricular Diastolic Dysfunction |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

左室拡張障害（left ventricular diastolic dysfunction；LVDD）と冠動脈石灰化（coronary artery calcification；CAC）は年齢とともに進行する。しかしながら、冠動脈狭窄のない胸痛患者において、LVDD と CAC の関係性が性差によってどのように異なっているのかについては不明である。我々の研究の目的は、冠動脈狭窄のない胸痛患者の左室拡張障害と冠動脈石灰化の関連性を調べさらに性差、年齢についての相違を検討することである。方法は胸痛にて病院に来院し冠動脈 CT を施行した患者のうち冠動脈狭窄が否定され、冠動脈石灰化スコア（coronary artery calcification score；CACS）を同時に測定し、経胸壁心臓超音波検査で収縮不全がない 705 人（平均年齢 65 歳±13 歳、男性 342 人、49%）を対象とした。正常 CACS を 0、異常 CACS を CACS＞0 と定義した。また拡張能の評価法は心臓超音波検査を施行し組織ドプラ法にて僧房弁輪部の動きを記録し、中隔 e’（パルス組織ドプラ拡張早期波）＜8 を LVDD と定義した。結果、正常 CACS と異常 CACS の患者間に LVDD 割合の有意差を認めた(76.1% vs 88.9%; p<0.001)が、多変量解析では異常 CACS と LVDD 間に有意差は認めなかった。さらに、健常日本人の中隔 e’正常値以下を LVDD と再定義したのち、CACS と LVDD を各々性差と年齢（20-29、30-39、40-49、50-59、60-69、70-79 歳）により検討した。異常 CACS の患者数は男女ともに年齢とともに上昇した。一方 LVDD は正常 CACS の若年女性（20-39 歳）で高い LVDD の割合を認めた。しかし高齢女性(60-69 歳)、若年男性(20-39 歳)では LVDD の割合は低かった。このように冠動脈狭窄や石灰化のない若年女性の胸痛は LVDD と関連していた。正常冠動脈 CT でも胸痛のある若年女性は心臓超音波検査による LVDD の評価をしたほうがよいことが示唆された。

＜緒言＞

心不全患者のなかで拡張不全患者の頻度は 30-50%程度あるが未だ有効な治療法はない。LVDD は拡張不全と関連があり LVDD の早期発見が拡張不全予防に重要である。拡張不全のハイリスク群として、加齢、女性、高血圧、糖尿病、腎不全、冠動脈疾患等があり、最近の過去 2 つの報告では、冠動脈疾患のない患者において冠動脈石灰化と左室拡張障害の有意な関連性が報告されている。一般的に CACS と LVDD は年齢とともに罹患率が上昇し、CACS は特に男性に高く、LVDD

は女性に多い傾向があり性差を認めている。それゆえ、我々は CACS と LVDD の関係には性差が強く関係していると推測した。冠動脈狭窄のない胸痛患者での CACS と LVDD の関連性における性差については知られておらず、今回の研究の目的は冠動脈狭窄のない冠動脈疾患の胸痛患者での、CACS と LVDD の関連性を性差と年齢において評価することである。

＜方法＞

対象患者は 2010 年 8 月から 2015 年 10 月に国立国際医療研究センター病院に胸痛で来院した 20 歳以上の成人を後ろ向きに検討した。すべての患者は 320 列冠動脈 CT を施行され冠動脈石灰化スコアが同時に測定された（異常 CACS は CACS＞0 と定義）。また、冠動脈 CT 施行の 1 か月以内に経胸壁心臓超音波検査を施行し組織ドプラ法にてパルス組織ドプラ拡張早期波（e’）を測定した（左室拡張障害は中隔 e’＜8 と定義）。冠動脈 CT で明らかな冠動脈有意狭窄（＞70%）を認めた症例は対象から除外した。他の除外基準として虚血性心疾患や急性心筋梗塞の既往例、冠動脈経皮血管形成術、冠動脈バイパス術、左室収縮率が 50%未満の収縮不全、心房細動、中等度から高度の大動脈弁疾患や僧房弁疾患例、心膜疾患、僧房弁形成術や僧房弁置換術大動脈弁置換術の既往例や透析症例を対象から除外した。収縮不全のない、現在あるいは既往として虚血性心疾患のない、重篤な弁疾患のない 705 例の患者を対象とした。

＜結果＞

対象は 705 人で男性 342 人、女性 363 人、平均年齢 65 歳±13 歳であった。まずこれらの患者を CACS の有無により 2 つの群に分け関与する因子を検討した。正常 CACS 群は 418 人（59.3%）、異常 CACS 群は 287 人であった。脂質異常症や E 波、左室駆出率(ejection fraction ; EF)以外はすべて有意差を認め LVDD の割合は正常 CACS 群で 76.1%（318 人）異常 CACS 群で 88.9%（255 人）と有意差を認めた(P <0.001)。次に改めて LVDD の有無により 2 つの群に分け関与する因子を検討した。LVDD(-)群は 132 人(18.7%)、LVDD(+)群は 573 人であった。LVDD(+)群は LVDD(-)群と比較して高齢で高血圧や糖尿病の合併率が有意に高かった。異常 CACS の割合は LVDD(-)群で 24.2%(32 人)、LVDD(+)群で 44.5%(255 人)と有意差を認めた(P <0.001)。異常 CACS に対して多変量解析をおこない、年齢、性差、喫煙歴、左室心筋重量係数(left ventricle mass index ; LVMI)は関連性を認めたが、LVDD(P=0.73)や E/e’(P=0.90)は有意差を認めなかった。次に CACS の程度を調べたところ、CACS=0 が 418 人(59%)、異常 CACS(278 人）のうち CACS=1-99 が 178 人と異常 CACS の 62%を占めていた。CACS=100-199 は 45 人、CACS=200-299 は 28 人、CACS=300-399 は 13 人、CACS≧400 は 23 人であった。さらに、改めて日本人の基準値により LVDD を再評価し 20-79 歳の男女を対象として性差と年齢（20-29、30-39、40-49、50-59、60-69、70-79 歳）により LVDD と CACS の割合を検討した。CACS は男女ともに年齢とともに高くなり、特に男性で割合が高かった。20-29 歳の女性が 100%、30-39 歳の女性が 67%と LVDD の割合が高かった。しかし、60-69 歳の女性では 10%、20-29 歳の男性が 25%,30-39 歳の男性が 36%と低く、LVDD の割合に年齢と性差の違いを認めた。年齢と性差別に LVDD に関与する因子を各々解析検討した。20-39 歳女性の LVDD(+)群は弱いながら脂質異常症と関連を認め、20-39 歳男性の LVDD(+)群は胸痛以外に有意な因子は認めなかった。50-59 歳、70-79 歳女性と 60-79 歳男性の LVDD(+)群は LVMI と関連を

認めた。

＜考察＞

我々は、まず初めに冠動脈狭窄のない胸痛患者で冠動脈石灰化と左室拡張障害の関連性について検討し、その結果 CACS と LVDD の関連性を認めなかった。さらに日本人の正常値を使用し LVDD を改めて定義し、CACS と LVDD を年齢と性別により解析検討した結果、女性と男性では冠動脈の石灰化は年齢とともに徐々に上昇し動脈硬化が進行するが、左室拡張障害は 20-39 歳の若年女性に特に多いことが分かった。本研究の主な知見は性差による冠動脈の石灰化と拡張障害の進行の相違である。また若年女性では、男性と異なり冠動脈狭窄のない胸痛が、冠動脈石灰化の有無に関わらず LVDD と関係があることが今回の我々の研究で判明した。最近の研究で、LVDD が CACS と関連があると報告されている。一方、CACS と LVDD に正の相関はあるが有意差はなかったとする報告もある。日本人を対象とした研究が一例あり、CACS≧400 が LVDD と関連性があると報告している。我々の研究では多変量解析で LVDD と CACS の関係に有意差をみとめなかったが、その要因として CACS=0-99 の軽度冠動脈石灰化患者が 85%と多数で、CACS≧400 が 3%しか含まれていないことが 1 つの要因かもしれないと考えた。一般的に石灰化は年齢とともに増加し女性より男性に多くみられ、このことは我々の研究結果と一致していた。しかし、LVDD は本来高齢女性に多いが、年齢と性差により割合に相違を認めた。LVDD の一般的なハイリスク因子である高血圧や肥大傾向が 50-59、60-69、70-79 歳男女でみられた。虚血性心疾患は伝統的に冠動脈に狭窄のあることが原因と考えられてきたが、虚血症状を訴える患者のうち何人かは冠動脈造影をしても正常冠動脈であることが報告されている。またいくつかの研究では、約半数で有意な冠動脈狭窄がなかったと報告があり、これらの患者のうち 22-64%に冠動脈微小循環障害(coronary microvascular dysfunction;CMD)があると報告している。我々はこの CMD が若年女性の胸痛の原因のひとつであり、拡張障害の原因の一つであった可能性を考えた。実際、シンドローム X 患者では冠動脈疾患患者より CACS が低いことが報告され、我々の研究でも先に述べたように軽度の石灰化患者が多いことからも胸痛患者では CMD は念頭に置く必要があると考えた。また、最近の報告では CMD が拡張不全の要であるとの報告もあり、CMD と LVDD の関連性についての報告も見られてきている。また CMD の予後不良も報告されており、冠動脈狭窄や石灰化のない若年女性の胸痛は、注意深い経過観察が必要であると考える。

＜結論＞

性差により、冠動脈石灰化と左室拡張障害の割合と進展様式は異なっている。若年女性の胸痛は狭窄や石灰化がなくても心臓超音波検査で拡張障害の評価をしておくべきだろう。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5398　号 | 渡邊　梨里 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　荒井　裕国<br>副　査　古川　哲史、木村　彰方 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、冠動脈狭窄のない胸痛患者の左室拡張障害と冠動脈石灰化との関連性についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

左室拡張障害（left ventricular diastolic dysfunction ; LVDD）と冠動脈石灰化（coronary artery calcification ; CAC）は年齢とともに進行する。しかしながら、冠動脈狭窄のない胸痛患者において、LVDD と CAC の関係性が性差によってどのように異なっているのかについては不明である。申請者らは、冠動脈狭窄のない胸痛患者の左室拡張障害と冠動脈石灰化の関連性を調べさらに性差、年齢についての相違を検討しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は、以下の通りである。

１. 正常 CACS と異常 CACS の患者間に LVDD 割合の有意差を認めた(76.1% vs 88.9%; $p<0.001$)が、多変量解析では異常 CACS と LVDD 間に有意差は認めなかった。

２．異常 CACS の患者数は男女ともに年齢とともに上昇した。

３．　LVDD は正常 CACS の若年女性（20-39 歳）で高い LVDD の割合を認めた。しかし高齢女性(60-69 歳)、若年男性(20-39 歳)では LVDD の割合は低かった。

以上のように申請者らは、冠動脈狭窄や石灰化のない若年女性の胸痛は LVDD と関連していることを示した。従って、正常冠動脈 CT でも胸痛のある若年女性は心臓超音波検査による LVDD の評価をしたほうがよいことが示唆された。これは、臨床的に有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本研究は、2010 年 8 月から 2015 年 10 月に本学関連病院において胸痛で来院した 20 歳以上の成人で 320 列冠動脈 CT と経胸壁心臓超音波検査を施行した症例のうち、冠動脈有意狭窄、虚血性心疾患既往例、冠動脈経皮血管形成術後、冠動脈バイパス術・弁膜症術後、左室収縮率 50%未満、心房細動、弁膜疾患、心膜疾患、透析症例を除外した 705 例の患者を対象とした。冠動脈 CT

では冠動脈石灰化スコアを、心臓超音波では左室拡張障害の指標となるパルス組織ドプラ拡張早期波（e’）を測定し、その関連性を検討した。本手法は、充分な臨床的手法の裏付けのもとに遂行されており、申請者の知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が周到な準備の上に行われてきたことが窺える。

４）考察・今後の発展性

本研究の主な知見は性差による冠動脈の石灰化と拡張障害の進行の相違であり、軽度の冠動脈石灰化群ではCACSは拡張障害の指標とはならないことが明らかになった。従って胸痛があり冠動脈疾患が疑われた患者は、狭窄がないことだけを確認するだけでなく、CACS の有無にかかわらず特に高血圧、左室心筋重量係数高値の合併症がある患者では拡張障害を心エコーで確認することにより早期の拡張不全診断に役立つ可能性があることが示唆された。一方で、拡張障害の指標をE’単独で検討したことは今回の研究の限界であり、今後の研究では、E’単独ではなく他の指標も加え、特に若年者の適正な人数を確保したうえで総合判断することが必要であり、更なる研究成果に期待したい。

**３．その他**

特記すべきことなし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 長　齢 |
| 論文審査担当者 | 主査　三宅　智<br>副査　沢辺　元司、大塚　和朗 |
| 論　文　題　目 | Flexible spectral imaging color enhancement markedly reduces the iodine concentration required for the endoscopic diagnosis of superficial esophageal cancer |

（論文内容の要旨）

Background: In recent years, the usefulness of image-enhanced endoscopy. , such as narrow-band imaging (NBI) and flexible spectrum imaging color enhancement (FICE), has been reported for esophageal cancer screening.  Although iodine staining is currently the standard modality for the early diagnosis of esophageal cancer, conventionally used concentrations (1%-3%) often induce mucosal irritation, leading to heartburn, pain, and discomfort. The aim of the present study was to clarify the best setting of FICE system in emphasizing iodine staining effects to esophageal mucosa in endoscopic diagnosis.

Materials and Methods: Four specimens obtained from esophagectomy for esophageal squamous cell carcinoma between January 2012 and January 2013 were used. Each resected specimen was fixed on a plate, and 6 concentrations of iodine solution were evaluated: 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%, 0.2%, and 0.1%. A rectangular metal plate with almost 60 holes was installed on the esophageal specimen. The iodine solution and the rectangular metal plate were removed after 30 seconds of dripping each concentration into the holes, and iodine staining was observed using a gastrointestinal endoscope after 60 seconds. The color difference between iodine staining and the background mucosa was evaluated using FICE0-9 with the preset mode wavelength and calculated using the method described by Kuehni RG.

Additionally, the optimum wavelength from the increasing rate of each color difference was calculated with and without FICE, and the color difference was compared between each concentration of iodine (0.8%, 0.6%, 0.4%, 0.2%, and 0.1%) with FICE and the 1% iodine concentration.

Results: The concentration 1.0% of iodine solution used for 27 sites, 0.8% for 29, 0.6% for 34, 0.4% for 35, 0.2% for 34, 0.1% for 24 were evaluable respectively. The average values of increasing rate in the color difference with FICE enhancement were 1.52 in FICE 0, 1.61 in 1, 1.24 in 2, 1.36 in 3, 1.19 in 4, 1.89 in 5, 1.31 in 6, 1.97 in 7, 1.56 in 8, and 1.28 in 9 respectively, and the highest enhancement was obtained in FICE 7 . The average value of the color difference with 1.0% iodine solution in ordinary observation was 46.74, and with FICE 7 enhancement 87.71 with 0.8% solution, 77.24 with 0.6%, 76.21 with 0.4%, 74.44 with 0.2%, and 39.54 with 0.1% respectively. The concentration of iodine solution of 0.2% or more showed significantly higher enhancement comparing with 1.0% in ordinary observation.

Discussion: Patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) are good candidate for endoscopic mucosal resection (EMR) or endoscopic submucosal dissection (ESD) because almost all are cured only by

complete local resection with EMR or ESD procedures. Therefore, early detection of ESCC is quite important in treatments of esophageal cancer. The FICE system is a smart spectral colorimetric endoscopic system for gastrointestinal diagnosis and treatment. The system is used for detecting flat lesion(s), observing the micro-structure of mucosal surface, e.g. gastrointestinal mucosal pits, type of gland, and sub-epithelial micro-vascular texture, and determining the type of lesion and depth of tumor invasion. The optimal settings and wavelength combinations for FICE is still to be determined in clinical practice. Pohl et al observed mucosa pits and vascular texture with FICE using B-band wavelength combinations, and concluded that a combination of red (R, 500nm), green (G, 480nm) and blue (B, 420nm) was an optimal combination. We calculated the rising rate of contrast when using FICE to examine esophageal cancer, and concluded that the 7th combination of wavelengths (R=540nm, G=490nm, and B=420nm) best suits this application. In addition, We tested 5 concentrations of iodine (0.8, 0.6, 0.4, 0.2, and 0.1%) in combination with FICE using the 7th combination of wavelengths (R=540nm, G=490nm, and B=420nm), and compared their performance with 1% iodine staining under conventional endoscopy, and the effect of 0.2% iodine under FICE was the closest to that of conventional 1% iodine staining.

Conclusion: Although IE such as NBI and FICE have some difficulties in observing the strict boundary of an esophageal cancerous lesion and can’t completely replace conventional iodine staining, the combination of two methods, i.e. low concentration iodine staining and IE, has been proved to be of greater diagnostic value. The concentration of iodine solution of 0.2% or more with FICE showed significantly higher enhancement comparing with 1.0% in ordinary observation, and the best matching number of preset FICE was 7.

（要約）

目的：

FICE の最適波長の設定および FICE 併用により 通常濃度のヨード液と同等のコントラストを もたらすヨード液の最低濃度を，基礎的な検討により明らかにする．

対象と方法：

食道癌による切除食道標本 4 例を標本板に固定する．原則，短軸 5 個＊長軸 10 個の孔が開いた金属板を標本の正常粘膜上に設置する．6 種類の濃度（1，0.8，0.6，0.4，0.2，0.1%）のヨード液を作成し．金属板の孔に各濃度のヨード液を滴下し，30s 後にヨード液を除去．ヨードを除去後 60s 後に汎用スコープを用いて標本から垂直に 1cm 距離を取って撮影．プリセットモードでの FICE 撮影画像で色差の評価を行う．

結　果：

FICE を併用することで，すべてのヨード染色の色差が上昇し，その中で FICE7 が最も高値であった．通常ヨード染色に用いる 1%と同等以上の最低濃度ヨード液は 0.2%であった．

結論：

画像強調内視鏡を併用することで，ヨードの低濃度化が可能で，患者への侵襲低減に寄与する可能性が示唆された．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5399　号 | 長　齢 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三宅　智<br>副　査　沢辺　元司、大塚　和朗 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本研究の背景として、食道表在がんの診断に用いられるヨード染色において、従来から用いられている 1%溶液では、患者の負担（胸骨後部痛、不快感の出現など）が大きいことが挙げられる。申請者は Flexible spectrum imaging color enhancement (FICE)法による画像協調内視鏡を併用し、ヨード溶液の濃度を 0.2%に下げても 1%と同様の診断能が得られる条件を見出した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

食道表在がんの診断について実臨床の立場から立案された研究であり、臨床検体を用いて最新の内視鏡技術を併用し、論理的な展開で結果を導出した研究である。

２）社会的意義

実臨床においても、最適な FICE の条件を設定することにより、ヨード溶液の濃度を 0.2%まで下げることで、1%溶液と同等の診断能を保ち、患者負担の少ない検査法が可能となる可能性がある。

３）研究方法・倫理観

臨床検体を用いた研究であるが、実験手法についても倫理的な配慮がなされており、問題はないものと考える。

４）考察・今後の発展性

今後は、臨床応用によって、実際の食道表在がんの診断能について検証し、さらなる内視鏡技術の進歩と連動した研究が期待できる。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、副査の沢辺教授、大塚准教授と合議の上、申請者は博士（医学）の学位授与に値すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 松沢　歩 |
| 論文審査担当者 | 主査　田賀　哲也<br>副査　淺原　弘嗣、宮坂　尚幸 |
| 論　文　題　目 | Preferable in vitro condition for maintaining faithful DNA methylation imprinting in mouse embryonic stem cells |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

エピゲノム制御の代表的な DNA メチル化は遺伝子発現調節に重要なエピジェネティック機構であり、胚性幹（ES）細胞におけるインプリンティング領域の DNA メチル化は、発生に影響を与える面でも重要である。ここで我々は、Knockout serum replacement（KSR）培地と foetal bovine serum（FBS）培地を用いて、Mek1/2, Gsk3β 阻害剤（2i）を添加した条件、添加しない条件の 4 条件で継時的な ES 細胞のインプリント領域の Differentially methylated region（DMR）のメチル化状態を確認した（K+2i、K、F+2i、F）。その結果、現在広く使用されている K+2i の条件では早期継代（P7）から激しい低メチル状態が確認された。しかし、K+2i 以外の培養条件に変更し P25 まで継代することにより、メチル化は上昇した。また、K+2i 条件も、P50 まで継代することにより、メチル化は上昇を見せた。P25 までの K+2i における激しい DNA 低メチル化状態は *Tet1* や *Parp1* などの脱メチル化関連遺伝子に依存していることを確認し、さらに 2i は継代を重ねることで DNA メチルトランスフェラーゼの発現を抑制することを確認した。一方で、F+2i 条件で樹立、培養した ES 細胞におけるインプリント領域の DMR のメチル化状態は、体細胞様の正常なメチル化状態を保っていた。我々の研究はゲノムインプリントの観点からすると、ES 細胞の培養には F+2i 条件が適していることを証明した。

＜背景＞

ES 細胞は再生医療や基礎研究において重要なツールであり、増殖能、自己複製能、多能性を持つ。これらの能力は PI3K や LIF、STAT3 などの伝達物質を含む様々な因子によって支えられており、2i は ES 細胞の多能性を維持するために有効であるとされてきた(Ying *et al.* 2008)。しかし近年、2i はグローバルな脱メチル化状態を引き起こし（Ficz *et al.* 2013; Habibi *et al.* 2013; Leitch *et al.* 2013; von Meyenn *et al.* 2016）、LIF と組み合わせた条件下でインプリント DMR にもエピジェネティックな変化を引き起こすことが報告された（Choi *et al.* 2017; Yagi *et al.* 2017）。また、KSR に含まれていると言われるビタミン C がグローバルな脱メチル化を引き起こしているという報告もある(Blaschke *et al.* 2013)。

以上の報告から、より ES 細胞に適した培養条件を探索するため、我々は培地もしくは継代数

に依存的な ES 細胞の DMR への影響を調査し、B6 マウスと JF1 マウスの F1 胚を使用してアレルを区別することで、メチル化変動を詳細に解析した。

＜方法＞

C57BL/6NCr（B6）の卵子と JF1 の精子を用いて体外受精を行い、胚盤胞から ES 細胞の作製と inner cell mass（ICM）の回収を行った。ES 細胞の樹立は K+2i または F+2i 条件を用いた。K+2i で樹立した ES 細胞は P8 から FBS 培地及び KSR 培地に 2i 添加あり、またはなしの計 4 種類（K+2i、K、F+2i、F）に振り分け、P10、25、50 の 3 つのタイムポイントで回収した。回収した試料は、Bisulfite genomic sequencing 法により 3 つの母性インプリンティング DMR（Igf2r、Peg5、Snrpn）と 2 つの父性インプリンティング DMR（H19、IG-DMR）のメチル化状態を確認した。その際、B6 と JF1 の多型を見ることで両アレルの区別を行った。また、使用した ES 細胞の性質を確認するため、多能性マーカーである Oct3/4、Nanog、SSEA1 による免疫染色とアルカリホスファターゼ染色を行い、コルセミドにより M 期で停止させた ES 細胞の染色体の本数を調べた。さらに、トータル RNA から作製した cDNA を用いて real-time PCR を行い、メチル化関連遺伝子の発現解析を行った（*Dnmt1/3a/3b*、*Uhrf1*、*Prdm14*、*Tet1/2*、*Parp1/2*）。F+2i で樹立した細胞は、同条件のまま P25 まで継代し、P7、10、25 の 3 つのタイムポイントでメチル化状態を確認した。

＜結果＞

ES 細胞は内部細胞塊（ICM）由来であり、マウス ICM では DMR における片親アレルのメチル化状態は維持されていると信じられてきた。しかし、実際に ICM における DMR の DNA メチル化状態を調べたところ、ICM の一部は脱メチル化傾向にあることが確認された。次に、樹立直後の ES 細胞が ICM のメチル化状態を反映しているのか調べるため、K+2i で樹立した ES 細胞を早期継代（P3-5）で確認したところ、Peg5 や H19、そして Snrpn の一部で脱メチル化が進行していた。

K+2i で樹立された ES 細胞の P7 における細胞性質を確認したところ、全てのラインが ES 細胞として正常な性質を持っていた。しかし、これらの ES 細胞のメチル化状態を確認したところ、ES 細胞として正常な性質を持っているにも関わらず、ライン差はあるものの全てのラインで低メチル化状態が確認された。これらの細胞を P8 から培地条件を振り分け、P10、25、50 でメチル化状態を確認したところ、母性インプリント DMR の P10 では、培地条件に関わらず P7 を反映したメチル化状態が確認された。しかし P25 まで培養すると、K+2i 条件を除いた一部の細胞で Igf2r と Snrpn のメチル化の回復が見られた。P50 まで培養すると、Igf2r と Snrpn の DMR は K+2i 条件でも大幅にメチル化状態を回復させた。父性インプリント DMR では、本来メチル化されていないはずの母性アレルに *de novo* なメチル化が検出された。P10 における H19 は培地条件に関わらず P7 のメチル化状態を反映した不安定なメチル化パターンを見せた。一方 IG-DMR は継代を重ねるごとに 2i 条件下であっても逆アレルに *de novo* なメチル化が見られた。特に F 培地では母性、父性アレル共に完全にメチル化されていた。

このように複雑なメチル化状態を引き起こす原因の遺伝子を突き止めるため、我々は real-time PCR を行いメチル化関連遺伝子の発現を解析した。その結果、長期継代 (P50) することで *Dnmt3a*

の発現は上昇するが、2i の添加でこの発現は抑制され、逆に *Prdm14* は 2i 添加で発現が上昇することがわかった。また早期継代（P10）では、2i を添加することによる *Parp1/2* と *Tet1/2* の発現上昇が確認された。

次に、K+2i で樹立された ES 細胞の DNA メチル化状態が、P1 から F+2i で培養することによって改善するかどうかを調査した。その結果、F+2i に変更したラインは K+2i のまま培養したラインに比較して体細胞様のメチル化状態を示した。さらに、樹立直後から安定したインプリント状態の ES 細胞を作製するため、ES 細胞を F+2i で樹立し P3 における DNA メチル化状態を調査したところ、これらのラインの DMR はほぼ体細胞様のメチル化状態を示した。これらの細胞をさらに培養し、P7、10、25 においてメチル化を確認したところ、P3 と同様に体細胞様のメチル化状態を示した。これらの結果は、長期培養において F+2i 条件がインプリントの正常なメチル化状態を保つことに適しているということを示した。

＜考察＞

我々の研究は ES 細胞の樹立と維持の双方において、インプリントの観点からは K+2i よりも F+2i が適していることを証明した。K+2i と K 条件では脱メチル化傾向が見られ、特に Peg5 と H19 ではメチル化状態が著しく乱れるが、この低メチル化状態は、F+2i を用いることで回復することも示した。また、DMR における 2i の影響は、母性、父性インプリントで異なることが確認された。

さらに、ICM のインプリントは安定であると信じられていたが、実際は ICM のメチル化状態は不安定であることを示した。この結果から、ICM はインプリントのメチル化の破綻から逃れるための短期間のステージであり、ICM の ES 細胞のメチル化状態は非常に不安定で、培養条件に大きく影響されると考えられる。

また、2i による低メチル化状態は、早期継代では、*Tet1/2* と *Parp1/2* の発現上昇に影響を受け、長期では *Prdm14* を通して *Dnmt3a* を減少させることで引き起こされる可能性を示した。さらに、F 条件の長期培養における *de novo* のメチル化は *Dnmt3a* により、Peg5 の 2i による脱メチル化傾向は *Parp1* に影響を受けていると考えられる。

＜結論＞

我々の研究は、不安定なインプリント状態である ICM 由来の ES 細胞は非常に培地の条件を受けやすく、特に KSR 倍地や 2i で脱メチル化状態を引き起こしやすいこと。また、F+2i はインプリントの観点から ES 細胞の培養にも樹立にも適していることを証明した。これらは、再生医療分野において重要な役割を持つES細胞やiPS細胞にエピジェネティックな安定性をもたらす重要な発見である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5400　号 | 松沢 歩 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田賀　哲也<br>副　査　淺原　弘嗣、宮坂　尚幸 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、マウス embryonic stem cell (ES 細胞)の培養条件によってインプリンティング領域の DNA メチル化の状況がどのように変化するかを検討し、ES 細胞における正常なメチル化状態を保つ条件について論じたものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者はこれまで未解明であったマウス inner cell mass から ES 細胞を樹立し継代する培養条件によるインプリンティング領域の DNA メチル化の状況を明らかにするとともにメチル化に変化を与える要因について考察した点で、研究目的の先駆性と独創性は高い。

２）社会的意義

本研究は ES 細胞の樹立と培養における至適な条件を DNA メチル化の観点から論じており、発生学及び再生医学における多能性幹細胞に関して重要な示唆を与えた点で社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

本研究は、申請者の仮説に基づいて構築した適切な実験方法により実施されており、また関係する諸規則・ガイドラインの下で行われている。

４）考察・今後の発展性

申請者は本研究で実施した実験方法の限界および考察において補足するべき問題点を理解しており、今後の展開が期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 久米　雄一郎 |
| 論文審査担当者 | 主査　北川　昌伸<br>副査　三宅　智、荒木　昭博 |
| 論　文　題　目 | The macroscopic and histological effects of argon plasma coagulation followed by subepithelial ablation on early esophageal squamous cell carcinoma using magnifying endoscopy with blue laser imaging |

（論文内容の要旨）

【要旨】

内視鏡的粘膜切除術(EMR)，および粘膜下層剥離術(ESD)が困難な食道早期癌に対して，我々はアルゴンプラズマ凝固－上皮下焼灼法(APC-SEA)を開発・施行し，良好な成績を得てきた．第一焼灼後に上皮を剥離し，剥離面を第二焼灼することで，従来法より均質な粘膜下層の凝固変性が期待できる方法だが，その治療メカニズムの臨床例における病理組織学的な検討はなされていない．そこで，第一焼灼後の剥離上皮の病理組織学的検討と，剥離面の内視鏡観察所見から，食道粘膜の剥離に関する特性および APC-SEA の治療メカニズムと，その有用性を明らかにすることを，本研究の目的とした．

APC-SEA を施行した食道早期癌において，第一焼灼後の剥離上皮を摘出，ヘマトキシリン・エオジン染色を行い，組織剥離の深さ，焼灼による熱変性を受けた割合，検体内の癌の有無を評価した．基底膜の評価に関しては，IV 型コラーゲンの免疫染色を，血管内皮細胞の評価には，CD31 の免疫染色を併用した．また，第一焼灼後の上皮剥離面を拡大内視鏡で観察し，病理組織学的所見との対比を行った．第一焼灼後剥離上皮の病理組織学的検討から，上皮剥離の深度は基底層およびそのやや浅層(内腔側)であった．剥離上皮の乳頭部では IPCL および基底膜を含め切断された乳頭と，IPCL 及び基底膜を残して基底層およびそのやや浅層で剥離された乳頭が混在していた．検体の深部剥離断端には，基底膜を認めなかった．剥離面の内視鏡観察からは，白色調で粘膜下層の樹枝状血管も透見できない部分，樹枝状血管の上に上皮下毛細血管網(SECN)が広がっている部分，および乳頭内毛細血管ループ(IPCL)様のループ血管が観察された部分が混在していた．剥離上皮の病理組織学的検討結果と，剥離面の内視鏡観察結果の対比から，剥離面には，ほぼ均一に上皮の基底層近傍が露出していると考えられた．APC-SEA では，上皮の炭化に邪魔されることなくより短時間の放電で，内視鏡で焼灼の確実度を評価しながら，ほぼ常に癌が遺残する基底層と粘膜固有層および食道腺導管内進展の可能性を有する粘膜下層をまでをより直接的に焼灼・破壊できることが，示唆された．以上より，APC-SEA は，通常の APC よりも均質かつ確実な粘膜基底層から粘膜下層までの焼灼が可能で，筋層への熱損傷も防ぐことができると考えられ，根治性および安全性に優れた治療法と言える．

【背景】

深達度 EP，LPM までの食道早期癌に対する内視鏡治療は，食道癌診断治療ガイドラインにおいて,標準的な治療とされる．しかし，瘢痕形成著明な内視鏡的治療(ER)後の遺残・再発例，出血素因のある肝硬変の患者，高齢で予備能の低い患者など，内視鏡治療が選択困難な症例もある．このような症例に対して，アルゴンプラズマ凝固療法(APC)が応用されているが，従来より根治が難しいとされてきた．APC は非接触型の高周波凝固装置であり，本邦では近年上部消化管の表在癌に対しての応用が報告されており, マーキング内の黒色調変化を焼灼完了の目安としていた．しかし，黒色炭化を目指した焼灼は，単位面積当たりの焼灼時間の延長を招き，固有筋層を超えた深部焼灼の原因になる一方，炭化した組織が高周波の伝導を阻害し，焼灼が不十分となる領域が生じる可能性があった．特に，食道早期癌の治療においては食道腺導管内進展の可能性を有する粘膜下層の焼灼・破壊が重要であるが，実際，我々の以前のブタ食道での検討では，黒色炭化させた 11 例中，4 例の焼灼深度が SM1 以浅，5 例の焼灼深度が MP 以深と，適切な焼灼深度が得られた症例は 2 例に留まった．

そこで，我々は，病変を焼灼し,これを剥離し,剥離面を拡大観察して焼灼深度を推測しながら,均質にキツネ色に焼灼する APC-上皮下焼灼法(APC-SEA)による治療を開発した. そのブタ食道を用いた検討では， 12 例中 6 例で適切な焼灼深度が得られ，筋層損傷は 1 例のみであった．安全性および根治性の向上を目的とし，われわれはこの APC-SEA の臨床応用を 2002 年より行ってきた．その結果，2cm 以下で臨床的に T1a-EP,LPM の食道扁平上皮癌であれば APC-SEA で十分局所制御可能であったと報告している．しかし，その臨床例における治療メカニズムの病理組織学的な検討はなされていない．

【目的】

実臨床で適応を選び行ってきた APC-SEA 症例の臨床的な内視鏡所見と，剥離除去した組織片の病理学組織学的所見の対比を retrospective に行うことにより，食道粘膜の剥離に関する特性および APC-SEA の治療メカニズムを明らかにし,APC-SEA の治療成績が通常の APC に比し良好である理由を考察する．

【対象と方法】

2013 年 3 月から 2015 年 7 月まで，食道表在癌またはまだら不染に対し APC-SEA を行い、一年以上経過観察されたのは，31 例 42 病変．そのうち，拡大内視鏡にて B1 血管のみを認め，深達度 cT1a(EP)と診断し，かつ，事前に生検で扁平上皮癌が検出された症例は，16 例 17 病変であった．そこから，深達度 MM 以深の食道癌の既往・放射線治療歴・病変の長径が 21mm を超えるもの全てを除いた，全 12 例 13 病変を対象とした．

治療に際しては，先端にフードを装着した経口拡大内視鏡を用い，先端照射型のプローベを用いた．アルゴンガスの流量は 2.0L/min，Forced APC モード，出力は 60W とし，内視鏡のチャネルを通して挿入し、標的から 2-3mm 離して焼灼した．

治療直前に Blue laser Imaging（BLI）併用拡大内視鏡観察を行い，B1 以外の血管がないことを確認した. 0.5％ヨードにより病変の範囲を同定し,病変から 1mm ほど離した部位に病変を取り囲む

ように円を描くようにマーキングを行った。次いで病変全体が白く膨化するように焼灼し，フードでマーキング部分から剥離し，上皮を剥離摘出した．内視鏡治療検体と同様に標本板にピンで貼り付けてホルマリン固定し，2mm スライス切片を作成し，病理組織学的評価を行った．評価項目は，組織剥離の深さ，焼灼による熱変性を受けた組織の割合，検体内の癌の有無とした．また，免疫染色にて基底膜および血管内皮細胞の評価も行った．粘膜剥離後，剥離面を再度 BLI 拡大内視鏡で観察し，その焼灼深度の推測を行いながら均質にキツネ色に焼灼した．周術期の安全性，および短期成績についても,およそ半年ごとの内視鏡検査で経過観察して評価した．全ての症例に informed consent を得て行った．また，本研究は，東京医科歯科大学付属病院の倫理審査委員会による承認(M2016-050)を得て行い、ヘルシンキ宣言に準拠している。

【結果】

剥離除去された上皮の H.E.染色標本を観察すると，高度熱変性のため細胞及び核が融解して互いに癒合している部分が，それぞれの剥離上皮の 54%(30%～85%)を占めていた．熱変性の影響の少ない部分では病理組織学的な評価が可能であり，上皮は概ね基底層およびそのやや浅層(内腔側)で剥離されており，基底膜は標本の剥離面には観察されず，基底膜直下の毛細血管網も標本内に認めなかった．また，上皮内には切断された乳頭も複数確認されるが，内部に毛細血管を認めるものと認めないものが混在していた．CD31 の免疫染色にて，毛細血管が確認できる乳頭では、IV 型コラーゲンの免疫染色にて，2 本の血管の外側を取り囲む基底膜が確認できる．一方、毛細血管の含まれない乳頭に関しては，基底膜も確認できなかった．また，剥離面には基底膜は観察されなかった．基底膜は概ね患者側の剥離面に温存され,基底層およびそのやや浅い層で上皮が剥離除去されることが示された. 悪性度の評価に関しては, 13 例中 9 例で癌の診断が可能であった. 癌部と非癌部の比較を行うと，含まれる乳頭の数自体はほぼ変わらず，剥離深度もほぼ非癌部と同じであったが，毛細血管を含まない乳頭が非癌部よりも多く，乳頭の径もやや大きい印象であった.

内視鏡所見に関しては，第一焼灼で白色膨化した上皮を剥離し，第二焼灼前に剥離面を観察した．通常観察では剥離面全体にわたって点状出血はほぼ認めなかった．赤色調で表面平滑，血管透見の良好な部分では，変性上皮を認めず，粘膜筋板上の樹枝状血管と，それを覆うように広がる SECN，および IPCL 様構造を示すドット状血管が確認できた．同部位の生検では，熱変性の弱い間質組織を認めた．第二焼灼後の内視鏡所見では，一様に均質なキツネ色に焼灼されていたことが確認でき，拡大観察でも血管は確認できなくなっていた．また，筋層の露出は認めなかった.

平均治療時間は 4.2 分と短く，12 例中 11 例は外来で施行可能であった．出血・穿孔・狭窄などの重篤な合併症はなく，観察期間中央値 17 ヶ月で局所再発例は 1 例のみであった．その 1 例も再度の APC にて制御可能であり,短期成績は良好であった.

【考察・結論】

第一焼灼・上皮剥離後の内視鏡観察結果および生検結果から，赤色調の部位では剥離は比較的均一に起こっており，熱変性にも乏しいことが示唆された．剥離上皮の病理組織学的所見は，熱変性の比較的弱いところでのみ可能であったことと合わせて考えると，病理組織学的に観察でき

た上皮の剥離深度は，内視鏡的には概ね赤色の剥離面に対応していると考えられた．第一焼灼後の剥離面にはほぼ均一に癌の発生母地である基底層近傍が露出していることが示唆された．従来の上皮の表層からの焼灼と比較し，露出させた癌を直接焼灼可能であること，および，炭化した上皮に邪魔されることなく，粘膜下層のより安全・確実な焼灼の目安と考えられるキツネ色への変化を確認しながら，食道腺導管内進展の可能性を有する粘膜下層までをより直接的に焼灼・破壊できることから，安全で確実な早期癌の局所制御の点から，APC-SEA は優位性を有する治療法と考えられる．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5401　号 | 久米　雄一郎 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　北川　昌伸<br>副　査　三宅　智、荒木　昭博 | |

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、早期食道扁平上皮癌に対するアルゴンプラズマ凝固‐上皮下焼却法における治療メカニズムの組織所見による検討についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者らが開発したアルゴンプラズマ凝固‐上皮下焼却法は、第一焼却後に上皮を剥離し、剥離面を第二焼却することによって従来法より均質な粘膜下層の凝固変性が期待できる治療法だが、そのメカニズムの組織学的な検討はなされていない。そこで第一焼却後の剥離上皮の病理組織学的検討と剥離面の内視鏡観察所見からメカニズムを明らかにすることを目的として検討した。新たに開発した治療法のメカニズムを解析する研究で、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.　第一焼却後の上皮剥離の深度は基底層およびそのやや浅層（内腔側）であった。

2.　剥離面の内視鏡観察では、粘膜下層の樹枝状血管も透見できない部分、樹枝状血管の上に上皮下毛細血管網が広がっている部分、および乳頭内毛細血管ループ様のループ血管が観察された部分が混在していた。

以上のように申請者は、この治療法では第一焼却後に第二焼却を行うことで癌が遺残する可能性の高い基底層と粘膜固有層および粘膜下層を直接的に焼却できることを示し、根治性および安全性に優れていることを明らかにしている。これは臨床的に極めて意義のある研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では臨床検体に対して詳細な病理組織像・内視鏡所見の解析が行われ、両者の対応の検討がなされた。本手法は十分な病理組織学的診断・解析能力と臨床的知識との裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と能力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は本研究結果について、アルゴンプラズマ凝固‐上皮下焼却法での第二焼却が治療効果を担保する上で非常に重要であると考察している。これはこれまでの治療成績と照らし合わせて

も極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 鈴木　康平 |
| 論文審査担当者 | 主査　植竹　宏之<br>副査　田賀　哲也、石川　俊平 |
| 論　文　題　目 | Single cell analysis of Crohn’s disease patient-derived small intestinal organoids reveals disease activity-dependent modification of stem cell properties |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

腸管上皮クリプト底部に存在する上皮幹細胞は、個体の恒常性維持において不可欠な働きをしている。これら幹細胞の恒常性・機能異常がクローン病等の様々な消化管疾患の原因となり得る事が報告されてきた。クローン病は小腸・大腸に慢性炎症と粘膜組織の損傷を来す消化管難病で同疾患の治療において粘膜上皮内の幹細胞による適切な組織再生が重要であることが知られている。しかし患者の活動粘膜あるいは寛解粘膜の小腸粘膜に正常組織と同様の形質を保持した幹細胞が内在しているかは不明である。本研究ではクローン病の寛解期粘膜及び活動期粘膜より得られた内視鏡生検組織を用いて小腸上皮オルガノイドを樹立し、シングル・セル・レベルの遺伝子発現やオルガノイド再構成能を解析することにより、本疾患患者の小腸に内在する幹細胞の形質に関する解析を行った。

クローン病患者の病変部、非病変部より採取した生検組織を用いたところ、正常腸上皮と同等の条件で小腸上皮オルガノイドの樹立が可能であった。樹立した小腸オルガノイドを用い、幹細胞特異的な 12 遺伝子についてシングル・セル解析を行ったところ、活動粘膜・寛解粘膜いずれに由来するオルガノイドも正常腸上皮オルガノイドと同様に OLFM4, SLC12a2 発現プロフィールが亢進していた。また詳細な解析を行なった結果、活動粘膜由来のオルガノイドでは他の 2 群と比較し SMOC2-LGR5 発現の相関係数が低下していることが判明した。さらに単一細胞に分散した際のオルガノイド再構成能を解析した結果、活動粘膜に由来するオルガノイドが寛解粘膜および正常腸上皮由来オルガノイドと比較し、有意に再構成率が高かった。

本研究により、病変部由来のオルガノイドでは幹細胞遺伝子の発現が寛解粘膜および正常粘膜と比較して異なる発現パターンを示し、オルガノイド再構築能が高いことが示された。同結果から、クローン病に伴う炎症環境が小腸幹細胞形質に変化をもたらす可能性が考えられた。

＜緒言＞

腸管上皮は生体の恒常性維持に不可欠な存在であり、短い周期で組織の更新を繰り返しているが、これを支える重要な細胞として腸上皮幹細胞が存在している。炎症性腸疾患等の消化管疾患において、腸上皮幹細胞における機能異常が疾患発症・進展に繋がる事が示されている。

小腸上皮幹細胞は腸上皮の陰窩（クリプト）に存在し、LGR5、OLFM4、SMOC2、PROM1 等の特異的遺伝子によって同定される。同細胞は自己複製能・多分化能を有し、腸上皮を構成する 5 種の細胞へと分化することが可能である。一方、近年の研究において体性幹細胞集団内の階層性・不均一性が注目されている。実際、マウス小腸幹細胞における単一細胞レベルの解析により、同細胞集団の階層性・不均一性が示されている。また、ヒト大腸上皮においても幹細胞集団における亜集団の存在が示されている。しかしながらヒト小腸における幹細胞の不均一性・階層性については全く明らかとされていない。

腸管上幹細胞の機能解析において、近年は腸上皮オルガノイドの培養が標準的な手法として用いられている。腸上皮オルガノイドは由来組織に応じた生理的機能・病的変化を反映し得る系である事から、様々な疾患の病態解析に利用されている。例えば最近、潰瘍性大腸炎の患者由来腸上皮オルガノイドを用いた研究により、疾患特有の腸上皮内遺伝子発現パターンが存在することが示されている。そこで本研究では、ヒト小腸幹細胞より樹立した腸上皮オルガノイドを主な対象とし、単一細胞レベルの遺伝子発現解析を行う事により、ヒト小腸幹細胞の不均一性・階層性の描出とクローン病における意義の解明を試みた。

＜方法＞

炎症性腸疾患や小腸出血等の診断・治療目的により小腸内視鏡を実施した患者を対象とし、同意を取得の上、生検組織を採取した。対象患者は内視鏡所見を基に炎症性腸疾患以外の疾患と診断された正常粘膜群、寛解期クローン病群及び活動期クローン病群の 3 群に分類した。採取された生検組織よりクリプトを単離し、腸上皮オルガノイドを樹立した。全ての症例において十分な細胞量が得られる３継代目のオルガノイドを用いて免疫染色を施行し、構成する細胞について各症例あたり約 100 細胞・46 遺伝子の遺伝子発現プロファイルを取得した。取得した遺伝子発現プロファイルについて、対象患者集団間における各遺伝子の発現比較、細胞間の遺伝子発現類似性を分類するクラスター解析、及びヒエラルキー解析さらには t-SNE 解析を行うことにより、幹細胞集団における不均一性の有無について検討した。また同継代のオルガノイドを単一細胞に分離しオルガノイド再構成数を比較した。

＜結果＞

ヒト小腸幹細胞集団における不均一性の有無を明らかとするため、先ず内視鏡生検組織から単離したクリプトからオルガノイドの樹立を試みた。その結果活動期、寛解期、正常小腸粘膜由来全ての検体においてオルガノイドの樹立が可能であった。次に単一細胞レベルで解析する方法を確立した。正常粘膜群に加え、寛解期クローン病群及び活動性クローン病群の患者より樹立したオルガノイドを単一細胞に分離した上、マイクロ流路内で単一細胞毎の捕捉を実施した。その結果いずれの場合も同等の効率で単一細胞を捕捉し、その後 Taq-man 法によるマルチプレックス PCR が実施可能であることが確認され、遺伝子発現解析が可能であった。今回の発現解析においては幹細胞、前駆細胞および各分化系譜の指標となる既知の 46 遺伝子を対象とした。その結果、幹細胞遺伝子においては正常粘膜・寛解期・活動期クローン病群において OLFM4、SLC12a2 等の相対的高発現を一律に認めた。さらに小腸幹細胞集団内の不均一さを明らかとするため、解析対

象としていた既知の 12 種の幹細胞特異的遺伝子の発現を基にヒエラルキー解析を行った。その結果、すべての症例において LGR5、SMOC2 の発現パターンが近いことが判明した。続いてそれぞれの発現を元に個別の集団を解析するために PCA 解析を施行したが症例背景・疾患背景による特異亜集団は認めなかった。そこで細胞内の亜集団の有無を検索する目的で t-SNE 解析を施行した。すると Cluster#1-#3 の細胞群が同定され、なかでも Cluster#1 は既知幹細胞を高発現していることが判明した。以前の解析で発現パターンの近かった LGR5, SMOC2 に関し Cluster#1 における相関係数を求めたところ、正常粘膜および寛解粘膜では高い相関係数を示したのに対し(r=0.84)、活動期粘膜由来のオルガノイドでは比較して低値の相関係数を示し(r=0.72)活動性粘膜由来の幹細胞集団では異なった幹細胞形質を有していることが示唆された。そこで機能性評価を行う目的でそれぞれのオルガノイドを単一細胞に分離しそのオルガノイド再構成数を 3D scanner で測定した。その結果活動期粘膜のオルガノイドでは寛解期および正常上皮から樹立したオルガノイドと比較して単一細胞からオルガノイドを再構築する効率が高いことが明らかとなった。

従って活動期クローン病小腸粘膜から樹立したオルガノイドはより多くの幹細胞機能を有する細胞が内在している可能性が示唆された。

＜考察＞

本研究において内視鏡生検組織より単離したクリプトから樹立したヒト腸上皮オルガノイドを用いて単一細胞の遺伝子発現を解析する手法を確立した。オルガノイドを対象とした解析においては幹細胞特異的遺伝子を発現する細胞がより大きな細胞集団として解析が可能であり、これを利用することにより、正常粘膜群・寛解期クローン病群・活動期クローン病群における幹細胞集団内の不均一性を示すことが可能であった。今回の解析で認めた Cluster#1 と称される細胞集団は既知の幹細胞マーカーを高いレベルで発現しておりオルガノイド内でも真の幹細胞集団である可能性が示唆された。またオルガノイド再構成解析では活動性粘膜由来の単一細胞から高い効率でオルガノイドの再構成が認められた。この結果は活動粘膜由来のオルガノイドではより高い幹細胞性を持った細胞集団が存在している可能性や前駆細胞が炎症下において幹細胞性を再獲得する可能性などが考えられる。今後これら幹細胞の不均一性・亜集団の患者粘膜における存在や調節機構を明らかとする事により、クローン病における新たな病態の解明につながる可能性が考えられた。

＜結論＞

ヒト小腸上皮オルガノイドにおいて幹細胞集団の不均一性・亜集団が存在し、クローン病において同集団の構成が疾患特異的かつ活動性依存的に規定されているものと考えられた。(3606 字)

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5402　号 | 鈴木　康平 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　植竹　宏之<br>副　査　田賀　哲也、石川　俊平 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文はクローン病由来の小腸上皮オルガノイド構築による幹細胞形質の解析に関する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

小腸上皮幹細胞は腸上皮の陰窩（クリプト）に存在し、LGR5、OLFM4、SMOC2、PROM1 等の特異的遺伝子によって同定されが、ヒト小腸における幹細胞の不均一性・階層性については全く明らかとされていない。腸上皮オルガノイドは由来組織に応じた生理的機能・病的変化を反映し得る系である事から、様々な疾患の病態解析に利用されている。本研究では、ヒト小腸幹細胞より樹立した腸上皮オルガノイドを主な対象とし、単一細胞レベルの遺伝子発現解析を行う事により、ヒト小腸幹細胞の不均一性・階層性の描出とクローン病における意義の解明を試みた。本研究によりクローン病における小腸上皮幹細胞の特異性が示されればクローン病に対する個別化治療につながる可能性があり、臨床的に重要である。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は下記の通りである。

① 小腸内視鏡生検組織から単離したクリプトからオルガノイドの樹立に成功した。

② 次に単一細胞レベルで解析する方法を確立した。正常粘膜群に加え、寛解期クローン病群及び活動性クローン病群の患者より樹立したオルガノイドを単一細胞に分離した上、マイクロ流路内で単一細胞毎の捕捉を実施した。これに Taq-man 法によるマルチプレックス PCR が実施し、遺伝子発現解析が可能であった。今回の発現解析においては幹細胞、前駆細胞および各分化系譜の指標となる既知の 46 遺伝子を対象とした。

③ 幹細胞遺伝子においては正常粘膜・寛解期・活動期クローン病群において OLFM4、SLC12a2 等の相対的高発現を一律に認めた。

④ 小腸幹細胞集団内の不均一さを明らかとするため、解析対象としていた既知の 12 種の幹細胞特異的遺伝子の発現を基にヒエラルキー解析を行った。その結果、すべての症例において LGR5、SMOC2 の発現パターンが近いことが判明した。

⑤ 細胞内の亜集団の有無を検索する目的で t-SNE 解析を施行した。すると Cluster#1 - #3 の細胞

群が同定され、なかでも Cluster#1 は既知幹細胞を高発現していることが判明した。以前の解析で発現パターンの近かった LGR5, SMOC2 に関し Cluster#1 における相関係数を求めたところ、正常粘膜および寛解粘膜では高い相関係数を示したのに対し(r=0.84)、活動期粘膜由来のオルガノイドでは比較して低値の相関係数を示し (r=0.72) 活動性粘膜由来の幹細胞集団では異なった幹細胞形質を有していることが示唆された。

⑥ 機能性評価を行う目的でそれぞれのオルガノイドを単一細胞に分離しそのオルガノイド再構成数を 3D scanner で測定した。活動期粘膜のオルガノイドでは寛解期および正常上皮から樹立したオルガノイドと比較して単一細胞からオルガノイドを再構築する効率が高いことが明らかとなった。

これらの結果により、活動期クローン病小腸粘膜から樹立したオルガノイドはより多くの幹細胞機能を有する細胞が内在している可能性が示唆された。これは臨床的にも極めて重要な結果である

３）研究方法・倫理観

研究には小腸内視鏡生検組織からオルガノイドの樹立、Taq-man法によるマルチプレックス PCR、などが用いられ、遺伝子発現解析、3D scannerによるオルガノイド再構成数の測定の計測が行われた。本手法は十分な生理学的および解剖学的知識、分子生物学的知識裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、「今後これら幹細胞の不均一性・亜集団の患者粘膜における存在や調節機構を明らかとする事により、クローン病における新たな病態の解明につながる可能性が考えられる」と考察しており、今後の発展が期待される。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 渡部　太郎 |
| 論文審査担当者 | 主査　江石　義信<br>副査　樗木　俊聡、鍔田　武志 |
| 論　文　題　目 | B cell activation in the cecal patches during the development of an experimental colitis model |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

過去の研究により虫垂が腸炎の病態に関与していることは示唆されてきたが、その詳細な機役割は未だ明らかでない。本研究において我々は、実験腸炎モデルを用い、cecal patch（CP）と呼ばれるマウス虫垂リンパ濾胞の重要性について検討を行った。マウスへのオキサゾロン投与により腸炎が誘導されるとともに CP において潰瘍形成が認められた。また、この腸炎は虫垂切除や成熟 B 細胞の欠損により減弱することが分かった。そこで我々は、蛍光分子間励起エネルギー移動（FRET）を応用した生体イメージング法を用い、CP における B 細胞免疫応答を解析した。この方法により、CP B 細胞では腸炎発症早期から頻繁な $Ca^{2+}$ シグナルが認められることが明らかとなった。これらの知見は炎症性腸疾患（IBD）を含む腸炎の発症に CP B 細胞が関与していることを示唆するものであると考えられた。

＜緒言＞

これまで、T 細胞受容体 α 鎖変異マウス（TCR$\alpha^{-/-}$）の自然発症腸炎やデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導腸炎といった実験腸炎モデルでは、虫垂切除により腸炎が減弱することが報告されている。これらの結果から、虫垂リンパ組織が免疫学的に重要な機能を持つことが示唆されてきた。近年、cecal patch（CP）と呼ばれるマウスの虫垂リンパ濾胞が、大腸へ移行する IgA 分泌細胞の主たる産生源であることが報告されたが、腸炎の病態における機能は依然として不明であった。

腸炎の病態を解明するための動物モデルは多数確立されており、オキサゾロン腸炎もその一つである。このモデルでは、直腸内投与によりオキサゾロンを感作させることで、Th2 型サイトカインの上昇を伴う腸管傷害が誘導される。また、オキサゾロン腸炎の病理学的特徴は、ヒトにおける IBD、特に潰瘍性大腸炎（UC）に類似している。重症免疫不全（SCID）マウスにオキサゾロンを感作しても腸炎を発症しないことから、この腸炎の初期段階に T 細胞が不可欠であり、また、NKT 細胞がヒトの UC やマウスのオキサゾロン腸炎に関与していることも報告されている。このように、オキサゾロン腸炎はヒトにおける UC との類似性を持つモデルであり、このモデルを用いて腸炎における CP の重要性を検討することとした。

＜方法＞

8-12 週齢の野生型 C57BL/6 マウス（WT）の腹部を剃毛し、同部の皮膚に 3%オキサゾロン溶液を塗布して前感作を行った。1 週間後に 1%オキサゾロン溶液（対照群には 50%エタノール）を経肛門的に投与して感作し、腸炎を誘導した。誘導後 5 日間体重変化を観察した後、マウスを屠殺して大腸を摘出し、腸管長の計測および HE 染色による病理学的評価を行った。さらに大腸粘膜固有層からリンパ球を単離し、抗 CD3／CD28 抗体刺激下で 48 時間培養した上清を用いて ELISA による炎症性サイトカイン産生の解析を行った。

また、8 週齢の WT に対し、イソフルラン吸入麻酔下で腹部正中に小切開を置き、虫垂を体外に引き出して切除する手術を施行した。偽手術群に対しては虫垂を体外に引き出した後にそのまま腹腔内に戻して閉腹する手術を施行した。2 週間の回復期間を置いた後、オキサゾロン腸炎を誘導して同様の解析を行った。

さらに、成熟 B 細胞欠損マウス（μMT）にオキサゾロン腸炎を誘導し、同様の解析を行った。

最後に、$Ca^{2+}$ バイオセンサーである YC3.60 を B 細胞特異的に発現したマウス（CD19-Cre/YC3.60）を用いて cecal patch B 細胞の生体イメージングを行った。CD19-Cre/YC3.60 にオキサゾロン腸炎を誘導した後、イソフルラン吸入麻酔下で腹部正中に小切開を置き、虫垂を体外に引き出して共焦点顕微鏡のステージ上に固定した。共焦点顕微鏡を用いて YFP と CFP の蛍光強度の比（YFP/CFP ratio）を測定することにより、B 細胞における $Ca^{2+}$ シグナルを観察した。

＜結果＞

WT にオキサゾロン腸炎を誘導したところ、オキサゾロン投与翌日には対照群と比して顕著な体重減少を認めた。肉眼的に有意な腸管長の短縮を認め、病理学的には大腸粘膜固有層に著明な炎症細胞浸潤を認めた。さらに興味深いことに、CP を覆う濾胞関連上皮層（FAE）には顕著な潰瘍形成が観察された。また、大腸粘膜固有層リンパ球（LPL）では IFN-□、IL-4、IL-17 といった炎症性サイトカインの産生が増加していた。

FAE に潰瘍形成が見られたことから、CP における免疫応答が腸炎の病態に関与していると推測した。そこで、虫垂切除術または偽手術を施行したマウスにオキサゾロン腸炎を誘導し、両群を比較した。体重変化は両群に有意な差を認めなかった。腸管長は、偽手術群でオキサゾロン投与により短縮が見られたのに対し、虫垂切除群ではそうした変化が軽減された。また、病理学的にも虫垂切除/オキサゾロン投与群で炎症細胞浸潤が有意に減弱していた。さらに、虫垂切除/オキサゾロン投与群の大腸 LPL では IFN-□、IL-4、IL-17 の産生が有意に減少していた。

次に CP の特定の細胞群が腸炎の発症に関与していると推測した。一般に腸管関連リンパ組織（GALT）を含む二次リンパ組織は主に T 細胞と B 細胞で構成される。前述のとおりオキサゾロン腸炎における T 細胞の重要性はすでに示されている。今回我々は B 細胞の機能に着目し、μMT にオキサゾロン腸炎を誘導した。μMT ではオキサゾロン投与翌日に WT と同様の著明な体重減少を認めたが、投与 2 日目から 5 日目の回復期においては WT よりも低体重を示した。一方、腸管長の短縮は軽減され、病理学的にも腸炎の有意な減弱が確認された。また、μMT の大腸 LPL では IL-4 および IL-17 の産生が抑制されていた。

最後に CP B 細胞の免疫応答をよりダイナミックに観察すべく、CD19-Cre/YC3.60 を用いて生体

イメージングを試みた。YC3.60 は FRET を応用した $Ca^{2+}$センサーである。$Ca^{2+}$濃度が低い状態では励起光により CFP が発光するが、$Ca^{2+}$濃度が上昇すると CFP だけでなく YFP も発光する。この YFP/CFP ratio を測定することで細胞内の $Ca^{2+}$濃度を可視化した。

CD19-Cre/YC3.60 にオキサゾロンを投与した翌日に観察すると、CP B 細胞では頻繁な $Ca^{2+}$シグナルが認められた。投与 3 日後、5 日後にも観察を行ったが、活性化された B 細胞は時間経過とともに減少した。

＜考察＞

一部の実験腸炎モデルで虫垂切除により腸炎が減弱することが報告されている。ヒトでも大規模疫学調査により、20 歳以前に虫垂切除を施行された患者で UC の発症率が低いことが報告されている。これらの知見は、虫垂で生じた異常な免疫応答が腸管の慢性炎症を誘導する可能性を示唆するものだが、その詳細な機序は不明であった。ヒトの虫垂には多数のリンパ濾胞が存在するが、マウスでそれに相当するのが CP と呼ばれるリンパ濾胞である。近年、CP が大腸 IgA 分泌細胞の主要な産生源であり、腸内細菌の制御に関与することが報告されたが、腸炎の病態における機能は解明されていない。$TCR\alpha^{-/-}$の自然発症腸炎では CP B 細胞が増加・活性化していることが示唆されており、今回我々は CP B 細胞の機能に着目した。その解析にあたり、Th2 型の腸炎と考えられ、ヒトの UC との類似性を持つオキサゾロン腸炎を用いた。

我々の系でオキサゾロン腸炎を起こしたマウスの大腸 LPL では既報の通り IL-4 の産生が増加していた他、IFN-γ や IL-17 の産生も増加しており、オキサゾロン腸炎に Th1・Th2・Th17 型応答のいずれもが関与していることが示された。もう一つ興味深い所見として、CP 周囲に潰瘍形成が認められ、腸炎発症に CP 周囲の獲免疫応答が関与している可能性が示唆された。

虫垂切除によりオキサゾロン腸炎は減弱し、同時に大腸 LPL における IFN-γ・IL-4・IL-17 の産生も低下した。成熟 B 細胞の欠損も腸炎を減弱させたが、こちらでは IL-4・IL-17 の産生が低下したのに対し、IFN-γ の減少は有意でなかった。これらの結果は CP B 細胞が、オキサゾロン腸炎の Th2・Th17 型応答に関与していることを示唆しており、虫垂切除では CP に存在する樹状細胞やマクロファージも除去され Th1 型応答が抑制されたものと考えられる。また、μMT でオキサゾロン投与 3 日後から 5 日後に WT より低体重となったが、これは Th2・Th17 型応答に付随した全身性の浮腫が軽減されるためと考えられた。

$Ca^{2+}$シグナルの生体イメージングにより、CP B 細胞ではオキサゾロン投与翌日から頻繁な $Ca^{2+}$シグナルが観察された。一般に、二次リンパ濾胞の B 細胞の一部は濾胞 Th 細胞によって活性化され、形質細胞へと分化するとされており、今回の所見はそうした反応を捉えたものである可能性がある。一方で、腸炎発症早期の段階ですでに活性化された B 細胞が存在し、時間経過とともにこうした B 細胞が減少した。虫垂切除や成熟 B 細胞欠損で腸炎が減弱したことと併せ、CP B 細胞自体が腸炎発症に関与している可能性も考えられる。

UC やクローン病といった IBD の罹患患者数は増加の一途である。多くの努力により IBD の発症には環境、遺伝、免疫、腸内細菌など様々な要因が関与していることが明らかになってきたが、依然として不明な部分も多く、虫垂の関与はその一つである。今回の結果はヒトの虫垂リンパ濾胞 B 細胞が IBD の発症に関与する可能性を示唆するものである。B 細胞における $Ca^{2+}$シグナルの

さらなる解析が CP の新たな機能の解明につながるものと考える。

＜結論＞

虫垂切除や成熟 B 細胞の欠損により腸炎が減弱することから、オキサゾロン腸炎の病態において CP および同部位の B 細胞が重要な役割を担っていることが示された。さらに、CP B 細胞では腸炎発症早期から活発な $Ca^{2+}$シグナルが認められ、形質細胞への分化だけでなく、より早期の段階から獲得免疫誘導に関与している可能性が示唆された。

B 細胞の $Ca^{2+}$シグナルをより詳細に解析することで、腸管免疫応答における CP の新たな機能の解明につながる可能性が示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5403　号 | 渡部　太郎 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　江石　義信<br>副　査　樗木　俊聡、鍔田　武志 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は、オキサゾロン誘導性腸炎モデルにおける虫垂 B 細胞の役割を明らかにするため、虫垂切除マウスおよび B 細胞欠損マウスでオキサゾロン誘導性腸炎をおこし、これらのマウスで腸炎の程度が軽減していたことから、虫垂および B 細胞が腸炎の発症で何らかの役割を果たすことを明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

炎症性腸疾患の発症には、環境因子や遺伝的因子に加え、近年では腸内細菌の関与が示唆されている。ヒト疫学的調査やマウスIBDモデルを用いた研究により、虫垂切除により炎症性腸疾患の発症が低下・軽減することが報告されているが、その免疫学的機序は不明である。このような背景の下、申請者はオキサゾロン誘導性腸炎モデルに虫垂切除術を施行し、炎症性腸疾患発症における虫垂の役割を検討しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。
コントロール群との比較において、虫垂切除群では、腸管長、大腸粘膜固有層への炎症性細胞浸潤、同浸潤細胞の炎症性サイトカイン（IFN-γ, IL-4, IL-17）産生低下が観察され、腸炎が軽減していた。さらに成熟B細胞が著減しているμMtマウスでも腸炎の軽減が観察されたことから、虫垂のリンパ濾胞（cecal patch）の一定程度の関与が推察された。以上のように申請者は、オキサゾロン誘導性腸炎モデルにおけるcecal patchの役割の詳細は今後の解析が待たれるものの、当該モデルにおいても虫垂切除群で炎症性腸疾患が軽減することを示した。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、8-12週齢の野生型C57BL/6マウス（WT）を用い、腹部皮膚に3%オキサゾロン溶液を塗布して前感作を行い、1週間後に1%オキサゾロン溶液を経肛門的に投与して腸炎を誘導した。誘導後5日間で大腸を摘出し腸管長の計測およびHE染色による病理学的評価を行った。さらに大腸粘膜固有層からリンパ球を単離し、抗CD3／CD28抗体刺激下で48時間培養した上清を用いて

ELISAによる炎症性サイトカイン産生の解析を行った。また、イソフルラン吸入麻酔下で虫垂を体外に引き出して切除する手術を施行した。2週間の回復期間を置いた後、オキサゾロン腸炎を誘導して同様の解析を行った。さらに、成熟B細胞欠損マウス（μMT）にオキサゾロン腸炎を誘導し同様の解析を行った。最後に、$Ca^{2+}$バイオセンサーをB細胞特異的に発現したマウスを用いてcecal patch B細胞の生体イメージングを行った。研究方法は十分な実験動物学的な知識と免疫組織学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「cecal patch B細胞では腸炎発症早期から活発な$Ca^{2+}$シグナルが認められ、形質細胞への分化だけでなく、より早期の段階から獲得免疫誘導に関与している可能性がある」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 胡　亜軍 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　光一<br>副査　岡澤　均、田中　敏博 |
| 論　文　題　目 | Sequence configuration of spinocerebellar ataxia type 8 repeat expansions in a Japanese cohort of 797 ataxia subjects |

（論文内容の要旨）

**Abstract**

Spinocerebellar ataxia type 8 (SCA8), an autosomal dominant neurodegenerative disorder showing slowly progressive cerebellar ataxia, is caused by a tri-nucleotide CTG repeat expansion (CTGexp) in the SCA8 gene. As the CTGexp is not fully penetrant, the significance of screening CTGexp in ataxia subjects remains obscure. We tested SCA8 CTGexp in a cohort of 815 ataxia subjects, and if present, its sequence configuration was analyzed. CTGexp was found in 16 alleles from 14 individuals, 2 of which was homozygous for CTGexp. Nucleotide sequencing disclosed 3 types of sequence configurations: uninterrupted CTGexp, tri-nucleotide CTA interruption and CCG interruption. The 2 individuals with homozygous expansions were both sporadic cases with a clinical feature compatible with SCA8, supporting gene dosage effect. Seven out of 14 CTGexp-positive subjects were complicated by other SCAs [Machado-Joseph disease (n=1), SCA6 (n=3) and SCA31 (n=3)], whereas 7 others were not complicated with such major SCAs. A tendency for an inverse correlation observed between the ages-of-onset and the length of CTGexp in the 7 subjects not complicated by major SCAs, suggests that both interrupted and uninterrupted CTGexps could have similar effect on age-of-onset. The present study underscores importance of disclosing sequence configuration particularly in unexplained ataxia subjects.

**Introduction**

Spinocerebellar ataxia type 8 (SCA8) is an autosomal dominant cerebellar ataxia showing progressive, relatively pure cerebellar ataxia .This disease is caused by a tri-nucleotide CTG repeat expansion (CTGexp) lying in the 3´-untranslated region of the gene called, the ataxin-8 opposite strand (ATXN8OS) in the human chromosome 13q21-21.33.found that the CAG repeat in the ataxin-8 gene (ATXN8), complementary to the CTG repeat in ATXN8OS, is also transcribed [6]. Therefore, the CTGexp results in the transcription of the CUG repeat expansion RNAs (CUGexp) from ATXN8OS gene, and the CAG repeat expansion yields an expanded polyglutamine protein encoded by ATXN8 CAGexp transcripts expressed in the opposite direction, suggesting a toxic gain of function at both the protein and RNA levels. A number of evidence suggests that RNA gain of function mechanism triggered by the CUG expansion

RNAs plays a significant role in SCA8 [7]. For instance, CUGexp transcripts accumulate as ribonuclear inclusions (also called “RNA foci”) that sequester CUGexp-binding protein, muscleblind-like protein 1 (MBNL1) in selected neurons in the brain. As MBNL1 functions as a regulator of RNA metabolism, sequestration of MBNL1 in neurons could lead to a critical error in the RNA metabolism. In addition, it has been shown that SCA8 CUGexp transcripts trigger splicing changes and increase expression of the MBNL1 regulated target, such as GABA-A transporter 4 (GAT4/ Gabt4)[7]. Furthermore, the CUGexp and CAGexp transcripts leads to a translation of poly-peptide protein by a mechanism called repeat associated with non-ATG (RAN) translation [8]. Poly-alanine peptides, potentially translated from both ATXN8OS and ATXN8 transcripts, were indeed shown to be expressed in SCA8 human brain tissues .

**Methods**

The screening for SCA8 CTGexp in a cohort of ataxia subjects Sequence analysis of repeat expansions.The SCA8 CTGexp alleles were subjected for sequencing analysis. First, the PCR yields corresponding to the expanded alleles were separated by agarose gel electrophoresis, purified and subjected to direct nucleotide sequencing. Most samples were also sub-cloned into a cloning vector (pCRR-2.1-TOPOR, Invitrogen, USA), and multiple clones from each allele were tested to exclude mutation artifacts during the cloning process. The nucleotide sequences of expansions were determined using a genetic analyzer (ABI3130; Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) and Hi-Di formamide (Applied BioSystems) and GeneScan 500 LIZ (Applied BioSystems). As the repeat number can change during the cloning process due to a repeat instability, presence of interruptions was determined by direct nucleotide sequence. A correlation between the age of onset and the length of CTGexp (combined CTA-CTG repeat length), regardless of the presence of interruptions, was assessed in “undetermined” subjects. This is because the other subjects complicated with other SCA mutations have a significant confounding factor effecting the age of onset.then Statistical analysis.

**Results**

The distribution of CTA-CTG repeats in 815 ataxic subjects.Among the 815 ataxic subjects, a vast majority of alleles were normal ranging from 18 to 40 repeats. In contrast, 14 individuals (1.71%) harbored SCA8 CTGexp ranging from 89 to 180 combined CTA-CTG repeats (Figure 1). Thus, the frequency of SCA8 repeat expansion was 16/1,630 chromosomes (0.98%) in our ataxia cohort.

And we also find repeat configuration in the 16 CTGexp alleles

The result of exact sequences of the 16 CTGexp alleles are summarized in Table 2.No interruptions were found in 8 alleles (alleles 4, 5, 7-10, 14 & 15) having a short CTA repeat followed by pure CTG expansions. Six alleles (alleles 1-3, 6, 11 & 12) had 1, 2 or 4 CTA repeats interrupting the CTG repeat expansion. Interestingly, the CTA interruptions were always localized in the 5´ region of the CTGexp. As a result, the long CTGexp was not largely disrupted. The remaining 2 alleles (alleles 13 &16) contained CCG repeats. Particularly, the allele 13 had multiple CCG interruptions disrupting the CTGexp. No other tri-nucleotide sequence interrupted CTGexp.

Concerning the relationship between penetrance and the interruption, two important aspects were found. Subjects #8 and #9 are siblings both harboring pure CTGexp of 135 or 148 repeats. These individual also had another sibling who had the same phenotype with SCA8 CTGexp, though their parents were unaffected. Therefore, the family of Subjects #8 and #9 are compatible with a recessive inheritance due to pure CTGexp. We performed whole exome sequencing on these two individuals, but did not find any previously known mutations that account for cerebellar ataxia (data shown upon request). Given that these two siblings are true SCA8 cases, it seems that the pure CTG stretch is fully penetrant.

Another important finding is that two out of three seemingly-sporadic cases (Subjects #10 and #12) harbored CTGexp homozygously. This may suggest that gene dosage effect is present in SCA8 CTGexp: their parents who are obligate heterozygous carriers of CTGexp did not manifest SCA8 phenotype.

When the age of onset and the length of CTGexp (i.e., combined CTA-CTG repeat) was tested in "undetermined" ataxia subjects, we observed a tendency for an inverse correlation . This suggests that the effect of CTGexp on age of onset does not change significantly depending on the presence or absence of interruption. However, the number of alleles did not reach a significant level to draw a conclusion

**Discussion**

We demonstrated that the prevalence of SCA8 CTG repeat expansions were 1.71% among the present ataxia subject cohort. On the chromosomal basis, the SCA8 CTG repeat expansions were seen in 0.98% of all chromosomes we analyzed. Seven out of 14 subjects with the SCA8 CTG repeat expansion had other SCAs as well. Three out of ## SCA6 subjects (%) and 1 out of ## MJD/SCA3 subjects (%) had SCA8 CTG repeat expansion. These numbers of prevalence did not differ from the previous study in different Japanese ataxia cohort [19]. A combination of SCA8 and SCA31 was seen in three subjects (% among our SCA31 cohort). These findings indicates that SCA6 and SCA31 could be complicated by SCA8.Overall, the repeat configurations were basically three patterns in the present cohort of SCA8 expansion carriers: pure CTG repeat expansions, CTGexp with either CTA or CCG interruptions. The role of SCA8 genetic testing in the diagnosis of ataxia needs to be further evaluated by checking the internal sequence of repeat.

（要約）

脊髄小脳失調タイプ 8（SCA8）〈小脳運動失調を示す常染色体優性遺伝性神経変性障害〉は、SCA8 遺伝子での tri-ヌクレオチド CTG リピートの異常伸長（CTGexp）により起こされる。CTGexp と臨床症状が完全に一致するわけではないので、CTGexp の病的意義が不明瞭である。私達は 797 名の小脳失調患者において SCA8 CTGexp の頻度とその内部配列を解析した。CTGexp は、14 人の患者からの 16 のアリルに認められた。14 人の内、7 名は他疾患のリピート伸長を有した症例であった。リピートの内部配列を解析すると、CTA リピートに続く CTG リピートが数回の CTA や CGG によって途切れる（interruption）配列が 8 配列あり、CTA リピートのあとの CTG リピートが途切れない配列(pure repeat expansion)が 8 配列あった。以上より、SCA8 の CTG リピート伸長の頻度は、個体ベースでは 1.76%と高くなく、半数は他疾患に合併すると結論した。CTG リピートの病的意義を解析するためには、2000 症例程度の収集・解析が必要であり、現在、症例の収集

を進めている。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5404　号 | 胡　亜軍 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田中　光一<br>副　査　岡澤　均、田中　敏博 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、脊髄小脳変性症 8 型 (SCA8)の原因と考えられている ATXN80S および ATXN8 が共有するゲノム領域に存在する CTG/CAG リピートの異常伸長の病的意義を明らかにするため、797 名の小脳失調患者における SCA8 のリピート伸長を解析し、小脳失調を示す患者の 1.76%にリピートの伸長があることを明らかにした。また、リピート伸長を持つ患者の半数は、他の脊髄小脳変性症に見られる遺伝子異常も持つことを明らかにした。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

SCA8 は、脊髄小脳変性症の一つで、ATXN80S および ATXN8 が共有するゲノム領域に存在する CTG/CAG リピートの異常伸長が原因と考えられている。しかし、SCA8 のリピートの異常伸長を示す人の中で小脳失調を呈さない人が存在すること、さらに、この異常伸長が SCA8 以外の精神神経疾患に見られることなどから、その病的意義は不明な点が多い。このような背景の下、申請者は東京医科歯科大学で集積した 797 名の小脳失調患者における SCA8 のリピート伸長頻度とリピートの内部配列を解析し、臨床症状との関連を解析することによりリピートの異常伸長の病的意義を解明できるのではと考え、本研究を行った。その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. SCA8 のリピートの異常伸長を示す疾患頻度は 1.76%、アリル頻度は 1.0%であった。また、異常伸長を示す患者の半数は、SCA3・SCA6・SCA31 のリピートの異常伸長を有していた。
2. SCA8 のリピートの内部配列を解析したところ、CTA リピートに続く CTG リピートが途切れないタイプ (pure repeat expansion)と CTG リピートが他の配列で途切れるタイプ (interruption)の 2 種類あり、頻度は 50%ずつであった。

以上のように申請者は、SCA8 のリピートの異常伸長は、小脳失調患者の 1.76%に見られ、その半数は他の脊髄小脳変性症を合併していることを明らかにした。SCA8 のリピートをこれだけ多くの患者で解析した例はなく、臨床的にも有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

ATXN80S における CTG リピート（ATXN8 方向では CAG リピート）の伸長を既報の通り PCR 法で増幅し解析を行った。さらに、異常伸長のある症例では、伸長アリルを TA クローニングでクローニングし、サンガーシークエンス法でその内部配列を解析した。これは、申請者の研究方法に対する知識と技術力が高いことを示していると同時に、本研究が周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。全ての実験は、倫理審査委員会の承認のもとに行われている。

４）考察・今後の発展性

今回の研究結果からは、異常伸長を示す症例数が少なく、その病的意義を解析することができなかった。今後、異常伸長の SCA8 発症における意義や臨床症状との対応を解明するためには、症例数を増やす必要があり、現在、2000 症例を目標にサンプルの収集を行っている。それと同時に健常者のリピートの解析も行う必要がある。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請する価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小郷　泰一 |
| 論文審査担当者 | 主査　北川　昌伸<br>副査　植竹　宏之、大塚　和朗 |
| 論　文　題　目 | Comparative analysis of avascular areas in superficial esophageal squamous cell carcinomas using in vivo and ex vivo magnifying endoscopy |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

背景）avascular area (AVA)は，食道表在癌が膨張・圧排性に発育した際に，腫瘍表面に現れる微細血管構造の変化である．本研究では，食道表在癌の内視鏡治療検体をホルマリン固定後に拡大内視鏡観察し，AVA の内視鏡所見と病理組織学的所見の正確な対比を行うことを目的とした．

対象と方法）食道表在癌治療前精査の拡大内視鏡にて AVA を同定し，内視鏡的粘膜下層剥離術を施行した 16 症例を対象とした．内視鏡治療検体をホルマリン固定し，拡大内視鏡を用いて AVA の幅を実測し，HE 染色後に光学顕微鏡を用いて AVA の厚み測定および腫瘍深達度の診断を行った．

結果）AVA の平均幅は M1, M2, M3/SM-でそれぞれ 0.434, 0.578, 0.835 mm であった（M1 vs. M2, $P$=0.16; M2 vs. M3/SM-, $P$=0.07）. 平均の厚みは M1, M2, M3/SM-でそれぞれ 0.176, 0.518, 0.800 mm であり（M1 vs. M2, $P$<0.01; M2 vs. M3/SM-, $P$<0.05），有意差を認めた．AVA の幅と厚みに有意な相関を認めた．

結論）ホルマリン固定後の内視鏡治療検体を拡大内視鏡観察することで，AVA サイズの実測および，病理所見との正確な対比が可能であった．AVA の厚みは幅と同様に，食道表在癌の深達度診断に有用である．

＜諸言＞

食道は正常上皮から浸潤癌まで，表面の微細血管形態の変化を拡大内視鏡観察することのできる唯一の臓器である．井上らが正常食道上皮において，表面の微細なループ状血管を intra-papillary capillary loop (IPCL)として報告して以降，食道表在癌における微細血管網の変化について数多くの報告がなされてきた．熊谷らは手術切除検体に Microfil を注入して微細表在血管径を測定し、血管径と腫瘍深達度が相関することを報告した．井上ら，有馬らはそれぞれ腫瘍進展に伴う IPCL の形態変化を分類して報告し，それらの分類は食道表在癌深達度診断に広く用いられている．

avascular area は，日本食道表在癌拡大内視鏡分類において，無血管領域もしくは血管の疎な領域と定義される．有馬らは，AVA は腫瘍が膨張・圧排性に発育した際に出現する微細血管構造

の変化，と報告しており，AVA のサイズが腫瘍深達度と相関していることを報告している．

しかし，生体内で AVA のサイズを正確に測定することは困難であり，推定にとどまる．さらに生体内にて拡大内視鏡で観察した関心領域を，正確に病理組織学的診断領域と一致させるのは困難を伴う．本研究は，内視鏡治療検体をホルマリン固定後に拡大内視鏡観察することで，正確に腫瘍表面の微細血管構造を評価し，病理組織学的所見と確実に対比することを目的とした．

＜対象と方法＞

2013 年 10 月より 2015 年 9 月に，治療前精査の拡大内視鏡検査にて AVA を有すると診断した食道表在癌に対し，内視鏡的粘膜下層剥離術（Endoscopic submucosal dissection: ESD)を施行した 16 例を対象とした．化学療法・放射線療法施行例は除外した．肉眼型は type0-IIc が 12 例，type0-IIc+”0-IIa”が 3 例，type0-IIc+”0-Is”が 1 例であった．男女比は 13 対 3，平均年齢は 65.4 歳であった．全例外来掲示板にてインフォームドコンセントを取得し，倫理委員会の承認を受けて研究を行った．

治療前の内視鏡観察では blue laser imaging (BLI)を用いて，先端フード装着の上で拡大観察を行った．ESD は光学診療部もしくは手術室にて行った．ヨード染色を行った上で病変範囲をマーキングし，インジゴカルミン 0.6ml＋0.1%アドレナリン 0.6ml＋10%グリセリン 300ml の局注液を粘膜下層に注入し，フラッシュナイフ（Fujifilm, Tokyo, Japan)およびムコゼクトーム (Pentax, Tokyo, Japan)を用いて ESD を施行した．切除検体は伸展してゴム板に貼り付け，ホルマリンで固定した．

ホルマリン固定後に検体を 2mm 幅で切り出し，拡大内視鏡を用いて表面の微細血管網を観察した．低倍率で全体を観察した後，AVA を有する関心領域を高倍率で観察した．AVA 部分が切り出されていることを確認し，断面を BLI 併用拡大内視鏡にて観察した．断面の中で最も血管間距離の長い箇所を AVA の幅とし，電子ノギスを用いて距離を測定した．

切除検体を HE 染色した後，最も広い血管間距離をもつ AVA の厚みを 100 倍の光学顕微鏡下に測定した．同部位の腫瘍深達度を病理診断医が診断した．深達度は，上皮にとどまる腫瘍を M1，粘膜固有層に浸潤する腫瘍を M2，粘膜筋板に浸潤する腫瘍を M3，粘膜下層浸潤距離 200 μm 未満の腫瘍を SM1，粘膜下層浸潤距離 200 μm 以上の腫瘍を SM2，とした．

統計学的検討は Mann-Whitney U test および Spearman’s rank correlation coefficient で行った．$P<0.05$ を統計学的有意差ありと判断した．データ解析はエクセル統計 2012 (Social Survey Research Information Co., Ltd.）を用いて行った．

＜結果＞

16 症例 18 領域で検討を行った．18 領域ともホルマリン固定後に表面微細血管網を明瞭に観察し得た．深達度毎の症例数は，M1：4 例，M2：10 例，M3：3 例，SM1：1 例，であった．M1 症例は小さな AVA を形成し，取り囲む血管は不均一なドット状の血管であった．腫瘍の厚みは非常に薄く，平均幅 0.434mm，厚み 0.176mm であった．M2 症例は膨張性発育形態をとり，平均幅 0.578mm，厚み 0.518mm と M1 症例よりやや大きい AVA を形成していた．M3 および SM1 症例では腫瘍表面に，ループを形成せず不規則に分枝した血管を認め，厚みを増していた．平均

幅 0.835mm，厚み 0.800mm であった．

AVA の幅においては M1・M2 間，M2・M3/SM1 間でそれぞれ有意を認めなかったが，厚みにおいてはいずれも有意差を認めた．AVA の幅と厚みは有意な相関を認めた．

＜考察＞

近年，消化器内視鏡の進歩により，より多くの食道表在癌が診断されるようになった．特に narrow-band imaging や BLI，flexible spectral imaging color enhancement などの画像強調観察と拡大観察の併用により，より明瞭な腫瘍表面の微細血管構造が認識可能となった．これらの進歩により，微細血管構造の変化が腫瘍の深達度を反映していることが明らかとなった．

AVA はそのサイズが大きくなる程，腫瘍の深達度が深くなると報告されており，日本の食道表在癌拡大内視鏡分類では，AVA-small（＜0.5mm）は M1・M2，AVA-middle（0.5-3.0mm）は M3・SM1，AVA-large（＞3.0mm）は SM2 以深に相当すると分類されている．本研究では M1 の 4 領域はすべて AVA-small を形成, M2 の 10 領域中 5 領域は AVA-small, 他 5 領域は AVA-middle を形成，M3・SM1 の 4 領域は AVA-middle を形成していた．

本研究は，検体ホルマリン固定後に拡大内視鏡を用いて AVA 幅を実測することで，より正確な検討を可能とし，AVA サイズと深達度が相関するというこれまでの報告を支持する結果となった．さらに，AVA の厚みにおいても腫瘍深達度を反映していることを明らかにした．深達度毎の AVA の幅が有意差を検出するには至らなかったのは，症例数が少ないためと考えられた．また，AVA の幅と厚みに有意な相関を認めたことは，AVA の膨張性に発育する，という様式を客観的に示す結果となった．

AVA は腫瘍が膨張性に発育した際に IPCL を水平方向に押し出すことで形成される．腫瘍が基底膜を越えて浸潤し，一定のサイズを超えると，その中心に虚血性変化が生じ，新生血管を必要とする．以前の報告では腫瘍塊が 2-3 ㎣を超えると新生血管が必要となることが示されている．つまり，血管間の距離の増大には限界があるということであり，限界に達すると血管間距離は深達度診断に有用でなくなる可能性がある．その段階においては腫瘍の厚みが，血管間距離よりも腫瘍深達度を反映すると考えられる．よって，日本食道学会拡大内視鏡分類において，AVA を無血管領域だけでなく，血管の疎な領域も含めて定義するのは reasonable と考える．しかし，血管の疎な領域のサイズを判断するのは困難な場合も多く，その際には腫瘍の厚みが深達度診断を行う上で有用となる．

拡大内視鏡が一般的になる以前は，食道表在癌の病変の厚みが深達度を反映することが報告されてきた．大橋らは腫瘍の厚みと浸潤範囲が粘膜下層への浸潤と相関していたと報告している．我々は今回 AVA の厚みと深達度が相関することを示し, 腫瘍表面の微細血管網の観点からこれまでの報告を支持する結果となった．

＜結論＞

内視鏡切除検体のホルマリン固定後拡大内視鏡観察は，病理組織所見と微細血管網との正確な対比を可能とした．AVA の厚みは幅と同様に，食道表在癌深達度診断に有用である．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5405　号 | 小郷　泰一 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　北川　昌伸<br>副　査　植竹　宏之、大塚　和朗 | |

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は、食道表在癌における avascular area（AVA）について内視鏡所見と病理組織学的所見の正確な対比に関する検討についての論文である。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

食道表在癌における AVA は食道表在癌が膨張・圧排性に発育した際に、腫瘍表面に現れる微細血管構造の変化で、拡大内視鏡分類において無血管領域もしくは血管の疎な領域と定義される。しかし、拡大内視鏡で観察した領域を正確に病理組織学的診断領域と一致させることは難しい。そこで申請者らは内視鏡治療検体をホルマリン固定した後に拡大内視鏡観察することで病理学的所見との正確な対比を行い、内視鏡観察の正確性を判断することを目的として検討した。新たな観点から観察結果を解析する研究で、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. AVAの平均幅、平均の厚みは深達度ごとに有意差を認めた。
2. AVAの幅と厚みには有意な相関を認めた。

以上のように申請者は、ホルマリン固定後の内視鏡的治療検体を拡大内視鏡観察することでAVAサイズの実測および病理組織学的所見との対比を行うことを可能とした。この結果から、AVAの厚みは幅と同様に食道表在癌の深達度診断に有用であることを明らかにした。これは臨床的に意義のある研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では臨床検体に対して詳細な内視鏡所見・病理組織像の解析が行われ、両者の対応の検討がなされた。本手法は十分な病理組織学的診断・解析能力と臨床的知識との裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と能力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は本研究結果について、拡大内視鏡によるAVA観察が癌の深達度を判定する上で非常に重要であると考察している。これはこれまでの研究成果と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

３．審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 伊藤　陽子 |
| 論文審査担当者 | 主査　岡澤　均<br>副査　西川　徹、田中　光一 |
| 論　文　題　目 | Biochemical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with valine-to-isoleucine substitution at codon 180 on the prion protein gene |

（論文内容の要旨）

<要旨>

プリオン蛋白遺伝子（*PRNP*）コドン 180 がバリンからイソロイシンに置換した V180I 変異は、本邦の遺伝性プリオン病の約半数を占める病原性変異である。今回我々は、V180I 遺伝性クロイツフェルトヤコブ病（V180I-gCJD）患者 7 例の剖検脳を用いてその生化学的特性を調査した。ウェスタンブロット解析におけるプロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白（$PrP^{Sc}$）コアの特徴は、二糖鎖型を欠如し、少なくとも 3 つ以上の構成から成る。そして特に小さなカルボキシル基断端の比率が他の病型に比して非常に高いことが判明した。さらに、病理組織学的に海綿状変性の程度が強い領域により多くの $PrP^{Sc}$が認められ、$PrP^{Sc}$のもつ毒性によって海綿状変性が引き起こされることが示唆された。V180I-gCJD は $PrP^{Sc}$の生化学的特性からも孤発性 CJD（sCJD）とは大きく異なり、同変異が正常多型の一つではなく病原性を有する一疾患単位であると考えられた。

＜諸言＞

プリオン病は海綿状脳症を呈する致死性疾患であり、正常プリオン蛋白から立体構造を変化させ伝播性を獲得した異常プリオン蛋白（$PrP^{Sc}$）が中枢神経系に蓄積し神経細胞の変性を引き起こす。遺伝性プリオン病（gCJD）は *PRNP* 遺伝子変異に起因し、現在 50 以上の遺伝子異常が同定されている。本邦の gCJD の約半数を占める V180I 変異は、発生地域の偏りや家族歴の乏しさといった疫学的な特徴の他に、進行が比較的緩やかで、sCJD に特徴的な徴候や検査所見を欠くといった臨床像を呈し、プリオン病とは気づかれずその他の認知症性疾患に間違われやすい。病理学的には、1) 大脳皮質の強い海綿状変化、2) 罹病期間に比して軽い神経細胞脱落とグリオーシス、3) 大脳皮質においてシナプス型の PrP 沈着を示すが免疫原性は極めて弱い、といった特徴が報告されている。生化学的には、$PrP^{Sc}$分子量が sCJD type2 よりわずかに大きく、二糖鎖型を欠き、小断片が存在することが報告されているが、未だその正確な特性は明らかにされていない。今回我々は、V180I-gCJD 患者の剖検脳を用いて $PrP^{Sc}$の生化学的特性を解析した。

<方法>

脳病理組織学的に診断された V180I-gCJD 患者 7 例の臨床データ、凍結脳標本、不活化ホルマ

リン固定脳切片を各手順に従って解析した。

Western blotting

V180I-gCJD 患者 7 例から採取した未固定凍結脳標本からホモジネートを作成し、プロテアーゼ K（PK）処理および脱糖鎖処理（PNGaseF）を行い、SDS-PAGE にて泳動、PDVF 膜へ転写した。認識部位の異なる抗 PrP 抗体（3F4、#71、Tohoku2）を用いてプロテアーゼ抵抗性 $PrP^{Sc}$($PrP^{res}$)を検出した。sCJD-MM1、-MM2C、P102L-GSS、D178N-FFI、E200K-gCJD、M232R-gCJD におけるサンプルを同様の方法で作成し、V180I-gCJD とのバンドパターンの相違を評価した。

神経病理学的評価

V180I-gCJD 患者 11 例においてそれぞれ前頭葉、側頭葉、後頭葉、海馬、基底核、視床、小脳、脳幹から組織片を採取し、ギ酸処理にて不活化後、ホルマリン固定・パラフィン包埋にて切片を作成した。切片は HE 染色の他に抗 PrP 抗体を（3F4）を用いた免疫染色を行った。

<結果>

平均発症年齢は 81.3 歳、平均罹病期間は 29.3 ヵ月であった。

Western blotting 解析

V180I-gCJD（以下 V180I）のバンドシグナルは極めて弱く、sCJD の約 10 倍の泳動量を要した。V180I における $PrP^{res}$は既報と同様に二糖鎖型を欠き、無糖鎖型の分子量は type2 $PrP^{res}$（以下 type2）より若干大きかった。しかし、type2 と同等の分子量を呈し、type2 と同じ N 末断端を有する例が 7 例中 3 例に認められた。さらに C 末側認識抗体(#71)によって約 11kDa の小断片が検出され、V180I の全 $PrP^{res}$に占める小断片の割合はどの病型よりも最も高かった。また、脳内における $PrP^{res}$の分布は、海綿状変性の強い大脳皮質に多く、変性の弱い海馬では少なかった。

神経病理学的所見

V180I 全例に大脳皮質の強い海綿状変性、ニューロピル菲薄化、神経細胞脱落、グリオーシスを認めたが、葉間差は明らかではなかった。皮質におけるシナプス型 PrP 沈着の免疫染色性は極めて弱かった。さらに、皮質には多量の Aβ42 の沈着を認めた。

<考察>

$PrP^{Sc}$は蛋白分解酵素に対して部分抵抗性を示し、PK 処理によって N 末端長の異なる 19-21kDa のコア（$PrP^{res}$, 全長型）を生じる。一部にはさらなる内部切断を受けて各病型に固有の小断片が生じることもある。今回の解析により、V180I には PK 処理によって少なくとも 3 つのコアが生じることが判明した。第 1 は type2 より若干 N 末端の長い全長型、第 2 は 7kDa の N 末断片、第 3 は CTF12/13 と呼ばれる 11kDa の C 末断片であり、第 2 と第 3 は全長型が内部切断された N 末側と C 末側であると推察された。さらに、全長型には type2 同様 N 末端がコドン 97 で切断される $PrP^{Sc}$も存在し、その割合は症例毎に異なると考えられた。また V180I の $PrP^{res}$は他のプリオン病に比して PK 処理による内部切断が起こりやすいことも特徴の一つと考えられた。また、$PrP^{Sc}$の沈着量は大脳皮質に多く、その分布は海綿状変性の程度とも合致した。海綿状変性の程度は同罹病期間の sCJD と比べても非常に強く、V180I における $PrP^{Sc}$は海綿状変性の進行に関与するだけでなくその毒性も強いことが示唆された。しかしながら、臨床的には発症年齢が高くその後の

進行も比較的遅い、さらには髄液中の $PrP^{Sc}$を検出する RT-QuIC 法において陽性率が低いといった特徴が報告されており、病理学的変化と臨床像との間に乖離を認めた。その理由として、V180I では何らかの理由によりコドン 181 に糖鎖がついたものが $PrP^{Sc}$に転化しないことが報告されており $PrP^{Sc}$自体の量が少ない、または、生体内でも内部切断を受けやすい性質を持つため $PrP^{Sc}$が増幅しにくい、さらには、神経変性の過程において Aβ42 などの神経毒性を持つ蛋白が関与している可能性を考えた。

V180I はその家族歴の乏しさから、一部の研究者においては正常多型の一つと捉えられている。しかし今回の我々の調査により、V180I は臨床像だけでなく $PrP^{Sc}$の生化学的特性や病理学的変化においても sCJD とは全く異なる像を呈することが示され、sCJD の亜型というよりも一疾患単位として認識されるべき病的変異であると考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5406　号 | 伊藤　陽子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　岡澤　均<br>副　査　西川　徹、田中　光一 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

プリオン病の比較的稀な変異として V180I が報告されているが、V180I 変異プリオンタンパク質の生化学的特徴や発症メカニズムの詳細は明らかではない。本研究は、V180I 変異プリオンタンパク質が 12kD 付近のプロテアーゼ抵抗性のペプチド断片を生じやすく、これは修飾糖鎖が除去された後にプロテアーゼによる分解を受けて生じる２次的分解産物である可能性を示した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

V180I 変異は極めて進行の緩やかなクロイツフェルトヤコブ病に見られ、その病原性についても疑いがあるほどである。申請者は、V180I 変異患者脳サンプルでは他の変異の脳サンプルに比較してプロテアーゼ抵抗性のプリオンタンパク質分解産物の量が少ないことに加えて、これらの２次的分解産物とも言える 12kD 付近のプロテアーゼ抵抗性のペプチド断片が増加していることを示し、さらに糖鎖修飾の除去が２次的プロテアーゼ分解を促進することを示した。

２）社会的意義

プリオン病の病態理解を発展させた。将来的に疾患治療へと繋がりうる可能性がある。

３）研究方法・倫理観

研究手法は汎用されているものであり、研究計画について倫理委員会の事前承認を得て行われた研究である。

４）考察・今後の発展性

２次的タンパク質断片が本変異に特異的なものかを確かめることで、疾患進行とタンパク質分解の相互関係を明らかにしうる。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえて、本論文は博士（医学）の学位申請に十分に価するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 辻本　和峰 |
| 論文審査担当者 | 主査　石野　史敏<br>副査　宮坂　尚幸、森尾　友宏 |
| 論　文　題　目 | Epigenetic modulation of *Fgf21* in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

疫学調査より、幼少期の栄養環境が成長後の肥満や 2 型糖尿病の発症に関与することが示唆されており、その分子基盤として代謝遺伝子の「エピゲノム記憶」が想定されているが、詳細なメカニズムは不明である。今回我々は、乳仔期のマウス肝臓において糖脂質代謝ホルモン Fibroblast growth factor 21(FGF21)遺伝子が核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor α(PPARα)依存的な DNA 脱メチル化により発現制御されることを見出した。また母獣に PPARα の人工リガンド Wy14643(Wy)を投与し、乳汁を介して仔の肝臓の PPARα を活性化させると FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化はさらに促進され、一旦確立されたメチル化状態は成獣期まで長期に維持された。離乳後のマウスに Wy を投与した場合この結果は得られず、DNA 脱メチル化変化は乳仔期特異的に生じることが示された。成獣期まで維持された FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化状態は、Wy 単回投与や絶食といった PPARα 活性化状況においてその発現応答性を規定した。また乳仔期に促進された FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化状態は、離乳後の高脂肪食摂餌下においても維持され、成獣期における発現亢進を介して食餌性肥満改善に寄与し得ることが分かった。以上より我々は、乳仔期に確立した FGF21 遺伝子のエピゲノム記憶が、環境変化に対する発現応答性を規定することで成長後の代謝表現型に寄与することを初めて明らかにした。

＜緒言＞

多くの疫学調査より、臓器可塑性の高い胎児期から乳児期の栄養環境が成人期の肥満や 2 型糖尿病の発症に関与することが示唆されており、その分子機構として DNA やヒストンの後天的修飾による遺伝子発現のエピゲノム制御が注目されている。DNA メチル化は遺伝子発現抑制に働くことが知られており、メチル化状態は細胞分裂を経ても維持されることから長期に渡って個体の表現型に寄与することが推測される。しかしながらこの「エピゲノム記憶」の詳細なメカニズムは不明である。

核内受容体 PPARα は肝臓の脂質代謝において重要な転写因子である。我々は既に、乳仔期のマウス肝臓において PPARα 依存的な DNA 脱メチル化により脂肪酸 β 酸化遺伝子発現が制御されることを証明した（Diabetes 64: 775-784, 2015）。

FGF21 は肝臓から分泌される糖脂質代謝ホルモンであり、代表的な PPARα の標的遺伝子である。

本研究では、胎仔期から乳仔期のマウス肝臓において FGF21 の遺伝子発現が PPARα 依存的な DNA メチル化により制御されるか否かを検討した。この DNA メチル化状態が成獣期まで維持されるのかどうか、またそれが代謝表現型に影響するかどうかを検討した。

＜方法と結果＞

1. DNA メチル化状態が記憶される PPARα 標的遺伝子の同定

我々はまず、DNA メチル化状態が成獣期において維持される遺伝子の同定を試みた。4 週齢および 14 週齢のマウス肝臓の DNA メチル化を MIAMI 法(Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers)を用いて網羅的に解析した結果、DNA メチル化状態が変化しなかった遺伝子は 8906 遺伝子が該当した。次に、これらの遺伝子の中で、PPARα 依存的に促進した DNA 脱メチル化状態が成獣期において維持される遺伝子の同定を試みた。既報に従い、妊娠後期および授乳期の母マウス(産仔は胎生 14 日から生後 16 日に該当)に PPARα の人工リガンド Wy を投与し、4 週齢および 14 週齢の産仔(Wy-offspring 群)の肝臓の DNA メチル化を対照群(Veh-offspring 群)と共に網羅的に比較解析した。その結果、4 週齢および 14 週齢において DNA 脱メチル化状態が維持されていた遺伝子は 10 遺伝子が該当し、その中で PPARα 標的遺伝子は FGF21 遺伝子を含めて 6 遺伝子が該当した。

2. 乳仔期のマウス肝臓において FGF21 遺伝子は PPARα 依存的に DNA 脱メチル化され、その状態は成獣期まで維持される

次に我々は、胎生 14 日、生後 2 日、16 日、4 週齢、10 週齢、14 週齢の Veh-offspring 群、Wy-offspring 群、PPARα 欠損マウスの肝臓において FGF21 遺伝子の DNA メチル化をバイサルファイトシークエンス法により解析した。Veh-offspring 群(野生型マウス)は乳仔期(生後 2 日～16 日)に最も大きく DNA 脱メチル化が認められ、そのメチル化状態は離乳後(4 週齢～14 週齢)はほとんど変化しなかった。一方、PPARα 欠損マウスでは乳仔期における DNA 脱メチル化は認められずそのメチル化状態も成獣期まで変化しなかった。Wy-offspring 群は Veh-offspring 群と比較して、乳仔期(生後 2 日～16 日)において FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化促進が認められ、両群の DNA メチル化状態の差は成獣期まで維持された。

以上より、乳仔期に PPARα を介するリガンド依存的な FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化が生じること、乳仔期に一旦確立した DNA メチル化状態が成獣期まで維持されることが示唆された。

3. PPARα 依存的な FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化は時期特異的である

次に我々は、PPARα 依存的な FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化がどの時期に生じるのか調べた。FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化促進は、妊娠後期のみ(産仔は胎生 14 日から 18 日に該当)に Wy を投与した母マウスの産仔では認められず、授乳期のみ(産仔は生後 2 日から 16 日に該当)に Wy を投与した母マウスにのみ認められた。離乳後(4 週齢)の野生型マウスに Wy を 2 週間投与したところ、FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化促進は 6 週齢、14 週齢において認められなかった。

以上より、PPARα 依存的な FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化は乳仔期のみに生じることが示された。

4. 乳仔期における FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態は成獣期の PPARα 活性化に対する発現応答性を規定する

DNA メチル化状態が FGF21 遺伝子発現に影響するのか否かを明らかにするために、肝臓における FGF21 遺伝子発現および血清濃度を解析した。成獣期(4 週齢および 14 週齢)の Wy-offspring 群と Veh-offspring 群間の FGF21 遺伝子発現と血清濃度に有意差は認められなかった。しかしながら、これらのマウスに対して Wy を単回投与し一時的に PPARα を活性化させると、DNA メチル化の程度と逆相関して FGF21 遺伝子発現と血清濃度の有意な増加が認められた。

絶食時には脂肪分解により放出される遊離脂肪酸が肝臓における PPARα を活性化することが知られている。24 時間絶食後、成獣期(14 週齢)の Wy-offspring 群は Veh-offspring 群と比較して、DNA メチル化の程度と逆相関して血清 FGF21 濃度の有意な上昇が認められた。

以上より、維持された FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態は PPARα 活性化に対する発現応答性を規定することが示唆された。

5. FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化状態は高脂肪食摂餌下において維持され、成獣期における発現増加を介して食餌性肥満改善に寄与し得る

FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化の成獣期の代謝表現型への影響を調べるため、離乳後(4 週齢)の Wy-offspring 群と Veh-offspring 群に通常食(NCD)あるいは高脂肪食(HFD)を 10 週間摂餌させた。通常食を摂餌した群(Wy-NCD、Veh-NCD 群)の比較では、群間の体重、摂餌量、組織重量に有意差は認められなかった。しかしながら、高脂肪食を摂餌した群(Wy-HFD、Veh-HFD 群)の比較では、Wy-HFD 群において摂餌量変化に依存しない体重の低下、傍精巣上体白色脂肪組織(eWAT)の重量低下および脂肪径の減少が認められた。

Wy-HFD 群および Veh-HFD 群の FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態、また両群の差は高脂肪食摂餌前後(4 週齢および 14 週齢)で維持されていた。さらに 14 週齢において Wy-HFD 群は Veh-HFD 群と比較して、肝臓における FGF21 遺伝子発現が有意に増加しており、血清 FGF21 濃度は 24 時間を通して常に 2 倍程度に増加していた。Wy-HFD 群は Veh-HFD 群と比較して、eWAT における *Egr1*、*c-fos*(FGF21 シグナルの下流遺伝子)の発現亢進、また脂肪分解酵素遺伝子 *Hsl*、*Atgl* の発現亢進を認めた。

以上より、乳仔期に促進された FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化状態は高脂肪食摂餌下においても維持され、成獣期における発現増加を介して食餌性肥満改善に寄与し得ることが示された。

【考察】

今回我々は、FGF21 遺伝子が幼少期に一旦確立され、それが成長後まで長期に維持される遺伝子であることを見出した。この結果から、FGF21 遺伝子のような特定の遺伝子の DNA メチル化がエピゲノム記憶の根幹を担っていると考えられる。FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化が胎仔期および離乳後に PPARα を活性化しても生じなかったこと、また PPARα が乳汁由来の脂肪酸を感

知することから、乳仔期が PPARα 依存的な DNA 脱メチル化に非常に重要な時期(エピジェネティックウインドウ)であることが示唆される。

FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化が促進された群(Wy-offspring 群)は、Wy 単回投与や絶食、高脂肪食摂餌下でその発現が増幅されたことから、DNA 脱メチル化は環境因子に対する発現応答性を規定することが示唆される。肝臓における FGF21 遺伝子の絶食や高脂肪食摂餌下での発現は、ほぼ PPARα 依存的に誘導されることが知られているが、DNA メチル化が PPARα 非依存的な環境因子に対する発現応答性を規定しているのかどうかは不明である。

エピゲノム記憶を担う別の機序としてヒストン修飾が想定されるが、Wy-offspring 群に生じた FGF21 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾の変化は、乳仔期(生後 16 日)から成獣期(14W)にかけて維持されなかった(データ記載なし)ことから、FGF21 のエピゲノム記憶による発現制御にヒストン修飾は介在していないことが示唆される。

FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化状態は、高脂肪食摂餌下においても維持され、比較的安定した機構と考えられる。Wy-HFD 群は Veh-HFD 群と比較して体重の低下および eWAT の重量低下が認められ、血清 FGF21 濃度が Wy-HFD 群と同程度になるようにヒト FGF21 を投与したマウスにおいても同様の代謝表現型が確認された(データ記載なし)。このことから、FGF21 の脱メチル化促進が発現増加を介して Wy-HFD 群の代謝表現型に寄与していると考えられる。

通常食を摂餌した群(Wy-NCD、Veh-NCD 群)の比較では、DNA メチル化に差があるにも関わらず、その定常状態での血清 FGF21 濃度および代謝表現型に差は認められなかった。FGF21 遺伝子発現量が成獣期において少ないため、DNA メチル化による発現誘導は薬理学的な PPARα 活性化や飢餓、高脂肪食摂餌下のみでしか認められなかったものと考えられる。幼少期に確立する FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化は、成長後の新たな環境刺激に対する適応機構なのかも知れない。

FGF21 遺伝子以外の 5 つの PPARα 標的遺伝子が、4 週齢から 14 週齢にかけて DNA 脱メチル化状態が維持されていた、すなわちエピゲノム記憶された遺伝子として抽出された。このため、FGF21 遺伝子だけでなくこれらの遺伝子群も Wy-HFD 群の代謝表現型に寄与している可能性がある。また過去の報告において乳仔期に PPARα 活性化を介して DNA 脱メチル化を生じた β 酸化関連遺伝子 *Ehhadh*、*Acox1* についてはこれらに含まれず、その脱メチル化状態は成獣期まで維持されなかった。このことは全ての PPARα 標的遺伝子がエピゲノム記憶されるわけではないことを示している。

PPARα 依存的な DNA 脱メチル化の詳細なメカニズムは解明されていない。PPARγ 複合体が脂肪細胞分化の過程で DNA 脱メチル化酵素 TET1(Ten-eleven translocation 1)を誘因することにより、その標的遺伝子の DNA 脱メチル化を引き起こすという報告があり、PPARα が DNA 脱メチル化酵素と関連している可能性が推測される。さらなる検討が必要である。

【結論】

乳仔期までに PPARα 依存的に確立した DNA メチル化状態がエピゲノム記憶されることにより、成長後の飢餓や高脂肪食摂餌などの環境因子に対する FGF21 遺伝子発現の応答性が決定され、個体の代謝表現型に影響することが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5407　号 | 辻本　和峰 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　石野　史敏<br>副　査　宮坂　尚幸、森尾　友宏 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、乳児期の FGF21 の DNA メチル化状態が成獣期まで維持され、成獣の代謝表現型に寄与することについての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

疫学調査より、胎児期、幼少期の栄養状態が成長後の肥満や２型糖尿病、高血圧、冠動脈疾患の発症に影響することが DOHaD 仮説として提唱されている。本研究は、胎児期、幼少期の栄養状態が DNA メチル化などのエピジェネティックな変化に影響し、それが成体期まで維持されることで起こることを証明したものであり、その先駆性・独創性は高く評価される。実験では、乳仔期のマウス肝臓において、糖脂質代謝ホルモン Fgf21 が核内受容体 PPARα 依存的な脱メチル化を受けることを利用した。母親に PPARα の人工リガンドを投与することで、母乳摂取を介して乳仔期の脱メチル化を亢進できること、その低メチル化状態が成獣期まで維持されること、さらに高脂肪食摂餌下で Fgf21 の高発現を誘導でき、その結果肥満を改善できることを示した。また、PPARα の人工リガンドの投与の効果は乳仔期に限られることも明らかにした。

２）社会的意義

本実験は、ヒトにおいても乳児期の母乳摂取が成人期の肥満に影響することを示唆している。超高齢社会を迎えた本邦にいて生活習慣病対策は喫緊の課題であり、本研究成果の社会的、成人医学的意義は非常に高いと考えられる。

３）研究方法・倫理観

妊娠期の母親の栄養状態を変化させる実験は、実験結果が振れることが多く、種々の要因を考慮する必要があったため、実験自体の妥当性および得られた結果の解釈も難しいことが多かった。この実験では、新生児期の PPARα の人工リガンド摂取の影響に絞った実験デザインを採用することで、再現性のある、非常に明確な結論を得ることに成功していることは見事である。

４）考察・今後の発展性

乳汁に含まれる有効成分の同定、Fgf21のエピジェネティック発現制御の詳細な分子機構など、

発展性の高い研究テーマにつながる研究であるが、すでにいくつか有益な実験結果は得られている。臨床応用への発展が十分期待できるとともに、 新しい遺伝子発現制御機構の解明につながる可能性があると考えられる。

**３．その他**

非常に多くの実験に基づいた、整合性の高く、論理的にも完成度の高い論文であると評価した。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士(医学)の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 東　美和 |
| 論文審査担当者 | 主査　立石　宇貴秀<br>副査　岡澤　均、　成相　直 |
| 論　文　題　目 | A diagnostic decision tree for adult cerebellar ataxia based on pontine magnetic resonance imaging |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

脊髄小脳変性症（CA）は様々な疾患から成り、しばしば鑑別が必要となる。本研究では、橋 MRI 所見に基づいた CA の鑑別手順を構築することを目的とした。202 人の連続した CA 患者を、多系統障害型脊髄小脳失調症（SCA-BSI）、純粋小脳失調型 SCA、小脳型多系統萎縮症（MSA-c）、未分類 CA の 4 群に分け、橋 MRI 所見を後方的に調査した。T2 強調画像における橋信号所見は、所見なし、線状橋信号（PMH）、十字サイン（HCBS）に分類した。T1 強調画像で橋底部および橋被蓋部の前後厚の比率（BT-ratio）を評価した。HCBS は特異度 97.7%で MSA-c、または SCA2 を示唆した。PMH が観察された場合、BT-ratio が 3.54 以上であれば SCA-BSI、中でも Machado-Joseph 病（MJD）、SCA1、歯状核赤核淡蒼球ルイ萎縮症（DRPLA）を強く示唆し、3.54 未満であれば MSA-c または SCA2 を示唆した。所見なしの場合、BT-ratio が 3.52 以上であれば SCA-BSI を、3.52 未満であれば純粋小脳型 SCA または純粋小脳型の未分類 CA を示唆した。この鑑別手順は、30 人の CA 患者による異なるコホートにおいても有用であった。橋 MRI 信号変化と BT-ratio を組み合わせることで、遺伝子診断前の CA 疾患群鑑別に有用であることを示した。

＜緒言＞

CA は、進行性運動失調を特徴とする神経変性疾患群であり、SCA、劣性遺伝性 CA、多種の孤発性 CA、MSA が含まれる。日本ではそのうち約 60%が MSA、約 30%が SCA1、SCA2、MJD、SCA6、SCA31、DRPLA であり、それ以外の CA はごく少数である。これらの臨床像は重複しており、正確な鑑別診断はしばしば困難である。適切な分子遺伝学的検査により確定診断が可能だが、必ずしも常にできる検査ではなく、検査候補を絞ることは重要である。VBM、MRS、拡散テンソル、fMRI などの画像診断技術は鑑別に有用な可能性があるが、利用できる施設が限られる。従って、MRI による診断バイオマーカーが必要である。

CA では疾患間で橋変性に差があるため、我々は橋 MRI 所見に着目した。PMH や HCBS は MSA の特徴とされてきたが、近年 SCA でも観察されることが知られてきた。また、MSA-c と SCA2 では橋底部が、SCA1、MJD、DRPLA では橋被蓋部が優位に萎縮していることが知られている。そこで、CA 患者の大規模コホートにおける橋信号所見と BT-ratio を調べ、その所見を用いた鑑別手順の構築を試みた。

＜方法＞

2006 年 1 月から 2015 年 12 月までに東京医科歯科大学医学部附属病院で診断された CA 患者を後方的に分析した。MRI と遺伝子診断を当院と当研究室で実施した、成人発症の進行性運動失調患者を対象とし、後天性小脳変性症は除外した。SCA は遺伝子診断で、MSA-c は Gillman の診断基準により診断した。対象患者を、SCA-BSI（SCA1、2、MJD、DRPLA）、純粋小脳型 SCA（SCA6、31）、MSA-c、未分類 CA（成人発症で原因不明な孤発性運動失調症〔SAOA〕、原因遺伝子未同定の SCA）の四群に分けた。

当院で最初に撮影された頭部 MRI 画像を使用した。T2 強調画像で橋信号変化を先行研究に従って Stage0 から V と判定し、Stage0 を所見なし、Stage I と II を PMH、Stage III から V を HCBS と分類し、それぞれの患者群を他から鑑別するための感度、特異度、陽性的中率（PPV）、陰性的中率（NPV）を算出した。続いて鑑別困難であった PMH 群、所見なし群について、T1 強調画像で BT-ratio を評価し、鑑別のためのカットオフ値を求めた。

これらの結果を用いて CA 患者を鑑別するための鑑別手順を構築し、最初のコホートにおける誤分類率を求めた。更に、この鑑別手順を評価するため、2016 年 1 月から 2017 年 3 月に同院で診断された別の 30 名のコホートにおいて、本診断手順を用いた診断と遺伝子診断を含んだ臨床診断を前方的に比較した。

＜結果＞

対象基準に基づき、SCA-BSI 46 名、純粋小脳型 SCA 63 名、MSA-c 74 名、未分類 CA 19 名で成る計 202 名の CA 患者が対象となった。

全体では 202 人中 64 人（31.6%）で PMH、53 人(26.2%)で HCBS が観察された。各所見群で頻度が高かったのは、HCBS では MSA-c、PMH では SCA-BSI、所見なしでは純粋小脳型 SCA であった。HCBS は MSA-c で感度は 67.6%と高くないが、97.7%と高い特異度を示した。PMH の SCA-BSI を鑑別する感度と特異度はそれぞれ 71.7%、80.5%であった。所見なしは純粋小脳型 SCA において感度が高く、NPV も 96.6%と高かったが、特異度は 81.3%と中程度であった。

PMH 群と所見なし群は鑑別困難であったため、続いて BT-ratio の分析を行った。PMH 群において、BT-ratio は SCA-BSI 患者群が MSA-c 患者群より高値であった(P <0.001 )。ROC 分析の結果、BT-ratio はカットオフ値 3.54 で SCA-BSI 患者を MSA-c 患者から、100%の特異度および 93.9%の感度で鑑別した。所見なし群において、BT-ratio は SCA-BSI 患者群が純粋小脳型 SCA 患者群より高値であった(P <0.001 )。ROC 分析により、BT-ratio はカットオフ値 3.52 で SCA-BSI 患者を純粋小脳型 SCA 患者から、98.3%の特異度および 100%の感度で鑑別した。

これら結果から、橋 MRI 所見を用いた鑑別手順を次のように構築した。まず、CA 患者の橋信号所見を評価する。HCBS が観察された場合は、ほぼ MSA-c と考えてよいが、SCA2 の可能性も念頭に置く。PMH が観察された場合は、BT-ratio を測定する。BT-ratio が 3.54 以上であった場合、SCA-BSI、中でも SCA1、MJD、DRPLA の可能性を考慮する。BT-ratio が 3.54 未満であった場合、MSA-c もしくは SCA2 を考える。信号変化が観察されなかった場合も、BT-ratio を測定する。BT-ratio が 3.52 以上であった場合、SCA-BSI、中でも SCA1、MJD、DRPLA の可能性を考える。BT-ratio が 3.52 未満であった場合、一番に純粋小脳型 SCA を考慮するが、SAOA などの純粋小脳

型未分類 CA の可能性も念頭に置く。一方で橋信号変化が観察された場合、純粋小脳型 SCA は除外できる。

この鑑別手順を 202 例に適応すると、12 例（5.9%）が誤分類であったが、190 例（94.1%）は適切に診断された。また、別の 30 例のコホートでは、1 例を除く全例でこの鑑別手順を用いて適切に診断されることが確認できた。

＜考察＞

我々はこの研究で CA 疾患群の鑑別における橋異常信号および BT-ratio の感度・特異度を算出し、これらを用いた鑑別手順を構築した。本研究は、三次病院で遺伝子検査をされ診断を受けた、多数の連続した CA 大規模コホートを対象に、橋異常所見について分析された初めての研究である。

HCBS は MSA-c に特異性が高かったが、SCA2 でも 60%で認めた。PMH 症例のうち SCA-BSI の方が MSA-c よりやや高頻度であり、両者は BT-ratio により鑑別可能であった。SCA-BSI のうち SCA2 では BT-ratio は低値を取っており、HCBS も併せると、MSA-c と同様の MRI 所見をとることが示された。一方で、橋正常信号は純粋小脳型 SCA が多かったが、SCA-BSI 患者 10 人、未分類 CA 患者 16 人でも見られたため、特異度が比較的低くなった。ここでも BT-ratio により SCA-BSI は鑑別可能であった。ただし、誤分類例は 12 例中 7 例が正常所見群であり、注意を要する。

PMH や HCBS は橋横走神経変性を反映しており、変性が進むにつれ PMH から HCBS へ移行することが、MSA-c では知られている。MSA-c の主要な変性部位が橋核や下オリーブ核といった小脳入力系であるのに対し、SCA1 や MJD、DRPLA は歯状核や赤核といった小脳出力系が主な変性部位である。従って、これらの SCA では MSA-c と比較して橋核神経細胞変性が比較的緩やかなため、罹病期間が長くなっても PMH のままで留まると考えられる。SCA-BSI の中でも SCA2 だけは他と比較して MSA-c と同様の病理学的背景を持っているため、MRI 所見が似ていると推測される。

BT-ratio は、被蓋部が底部より強く萎縮していた場合は高値になり、底部が被蓋部より萎縮が強い場合は低値となる。MSA-c では底部萎縮が目立つため、低値を取る傾向が予想されるが、PMH が観察される MSA-c 例では健常例と同等の値を取っていた。これは、PMH が観察される程度の MSA-c 患者では、底部萎縮も進行していないからだと推測される。一方で、SCA2 以外の SCA-BSI では、被蓋部萎縮が進むため高値を取ると考えられる。純粋小脳型 SCA では BT-ratio は健常人と同等となり、これは橋萎縮がないことと矛盾しない。

本研究では、稀少 SCA や MSA-p が含まれていないこと、MRI 機器による誤差が想定されることといった限界がある。今回提唱した鑑別手順をより適切なものにするため、今後より大規模な他施設による解析を要する。

＜結論＞

橋 MRI 所見を用いた鑑別手順を構築し、CA 疾患群の初期鑑別に有用であることを示した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5408　号 | 東　美和 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　立石　宇貴秀<br>副　査　岡澤　均、　成相　直 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は脊髄小脳変性症（CA）を橋 MRI 所見から鑑別するための診断構築を目的とした後ろ向き研究の結果である。202 人の連続した CA 患者を、多系統障害型脊髄小脳失調症（SCA-BSI）、純粋小脳失調型 SCA、小脳型多系統萎縮症（MSA-c）、未分類 CA の 4 群に分け、T2 強調画像における橋信号所見を所見なし、線状橋信号（PMH）、十字サイン（HCBS）に分類した。T1 強調画像で橋底部および橋被蓋部の前後厚の比率（BT-ratio）を評価した。CA 患者の橋信号所見を評価する際、CBS が観察された場合は、ほぼ MSA-c と考えてよいが、SCA2 の可能性も念頭に置く。PMH が観察された場合は、BT-ratio を測定する。BT-ratio が 3.54 以上であった場合、SCA-BSI、中でも SCA1、MJD、DRPLA の可能性を考慮する。BT-ratio が 3.54 未満であった場合、MSA-c もしくは SCA2 を考える。信号変化が観察されなかった場合も、BT-ratio を測定する。BT-ratio が 3.52 以上であった場合、SCA-BSI、中でも SCA1、MJD、DRPLA の可能性を考える。BT-ratio が 3.52 未満であった場合、一番に純粋小脳型 SCA を考慮するが、SAOA などの純粋小脳型未分類 CA の可能性も念頭に置くことで鑑別診断がより明確になる。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

脊髄小脳変性症（CA）を橋 MRI 所見から鑑別するための診断構築を目的で施行した後ろ向き研究の結果であるため、他に類を見ない貴重なデータを提示し本研究は独創性が認められる。

２）社会的意義

CA の鑑別診断は遺伝子診断が基本であるが、phenotype を MRI で大まかに把握できればより的確で迅速な確定診断に迫ることができ、臨床的および社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

既存データをもとに研究背景、目的、研究計画をたて、結果として non-validated ではあるものの、実例を元に結果を出されている。

４）考察・今後の発展性

年齢調整後の BT-ratio を用いて解析し、また人工知能を診断手段に用いることでより正確な診

断を実施できるとよいと考えた。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は本学博士の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 林　志保里 |
| 論文審査担当者 | 主査　立石　宇貴秀<br>副査　寺田　純雄、　大友　康裕 |
| 論　文　題　目 | Increased Binding Potential of Brain Adenosine A1 Receptor in Chronic Stages of Patients with Diffuse Axonal Injury Measured with [1-methyl-$^{11}$C] 8-dicyclopropylmethyl-1-methyl-3-propylxanthine Positron Emission Tomography Imaging |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

アデノシン $A_1$受容体（A1R）は中枢神経系の疾患において神経保護作用あるいは神経調節作用を有することが知られている。近年開発された A1R に対する放射性リガンドである、[1-methyl-$^{11}$C] 8-dicyclopropylmethyl-1-methyl-3-propylxanthine (MPDX)を用いて、positron emission tomography (PET)により、慢性期のびまん性軸索損傷（DAI）患者脳における A1R の変化を *in vivo* で評価した。$^{11}$C-MPDX（A1R 結合能）、 $^{18}$F-FDG（ブドウ糖代謝）、$^{11}$C-FMZ（中枢性ベンゾジアゼピン受容体分布）の三種の PET を施行した DAI 患者群について、ROI 解析と SPM 解析により健常者群と比較した結果、$^{11}$C-MPDX PET では $^{18}$F-FDG と $^{11}$C-FMZ PET の取り込み低下により示された脳損傷部位ではなくその周辺で A1R が上昇した。このことから、A1R が慢性期 DAI 患者における神経保護作用、神経調節作用に寄与することが *in vivo* で示唆された。

＜緒言＞

アデノシンは 4 種（$A_1$、$A_2A$、$A_2B$、$A_3$）の特異的な G 蛋白結合受容体の作用により脳の神経伝達物質として働く、中枢神経系のシナプス機能における内因性神経調節因子であり、脳に多く存在し、睡眠や覚醒、神経保護、てんかん発作の感受性調節等に重要な役割を果たす。虚血や低酸素状態、外傷性損傷等による中枢神経障害での A1R の神経保護作用は基礎研究と臨床研究で示されている。アデノシン受容体の PET の放射性リガンドは近年複数開発されているが、$^{11}$C-MPDX は中枢神経系の A1R に選択的で高い親和性があることが報告された。$^{11}$C-MPDX PET による動物の研究では虚血性疾患脳の病理学的損傷を予測できることが示され、ヒトの臨床研究では、一次視覚野での $^{11}$C-MPDX の取り込み上昇は軸索投射の損傷による神経症状が後に回復する徴候であることが示された。従って $^{11}$C-MPDX はヒトの脳における軸索損傷の良いマーカーになる可能性があり、びまん性軸索損傷（DAI）のように形態学的な脳損傷が画像検査で認めにくい外傷性脳損傷患者の解析に有用なリガンドであると考えられる。

DAI は若年者における重症の外傷性脳損傷（TBI）の主要な病理学的特徴のひとつである。DAI 患者の多くは CT や MRI で異常が検出されなくとも高次脳機能障害を有し、医療的、社会的問題となるが、有効な治療法はまだ確立されていない。過去には TBI 後にドーパミン、セロトニン、

グルタミン酸のような神経伝達物質が変化することが報告されている。これらの神経伝達物質の変化は新たな診断法あるいは治療標的となる可能性があるが、PET ではいくつかの放射性リガンドを用いて in vivo で神経伝達物質の変化を検出できると考えられる。

本研究では、$^{11}$C-MPDX PET を用いて DAI 患者の脳画像における A1R の変化を調べ、これまでに DAI 患者においてその変化が既に報告されている $^{18}$F-fluorodeoxyglucose (FDG) PET、$^{11}$C-flumazenil (FMZ) PET と比較した。本研究の目的は、慢性期の DAI 患者における A1R の変化を明らかにし、新たな治療や診断の手段となる可能性を評価することである。

＜方法＞

$^{11}$C-MPDX PET 、$^{18}$F-FDG PET、$^{11}$C-FMZ PET を施行した 10 人の DAI 患者群（平均年齢 32.5 歳：24‐47 歳）について、健常者群と各 PET の結果を統計学的に比較した。$^{11}$C-MPDX PET により A1R 結合能を、$^{18}$F-FDG PET によりブドウ糖代謝を、$^{11}$C-FMZ PET により中枢性ベンゾジアゼピン受容体（cBZD-R）分布を、それぞれ評価した。

画像の統計学的解析は、ROI 解析と voxel-based SPM8 解析を用いた。ROI 解析には Dr. View medical image-processing software (Infocom, Tokyo, Japan)を使用し、10 ㎜径の円形 ROI を前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、小脳、rolandic area、帯状回の各皮質、視床に置き、10x20mm 径の楕円形 ROI を被殻に置いて対照群と領域ごとに Bonferroni 法で多重比較した。$^{11}$C-MPDX は小脳を参照領域とする結合能を、$^{11}$C-FMZ は小脳に対する standardized uptake value (SUV)比を用い、$^{18}$F-FDG は全脳平均に対する SUV 比について評価した。voxel-based SPM8 解析は、MATLAB (Mathworks, Sherborn, MA)と SPM8 (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging an UCL, London, UK) software を使用し、脳を解剖学的に標準化、平滑化後に、DAI 群と対照群の比較をボクセル毎に *t* 検定を行い、有意差のある部位を可視化した。

＜結果＞

$^{11}$C-MPDX PET では、ROI 解析において対照群と比較して DAI 群で有意に結合能が低下した部位は無かったが、低位前頭葉皮質と後方の帯状回皮質、rolandic area で結合能の上昇が見られた（$P$＜0.05）。SPM 解析でも脳実質に有意な結合能低下は認めず、中心前回、前頭葉内側と中前頭回で結合能上昇が見られた（$P$＜0.05）。$^{18}$F-FDG PET では、ROI 解析では前方・後方の帯状回皮質（$P$＜0.01）で取り込みが低下し、SPM 解析では前方帯状回皮質、右側頭極（$P$＜0.05）で取り込みが低下した。$^{11}$C-FMZ PET では、ROI 解析では前方の帯状回皮質（$P$＜0.01）で結合能が低下し、SPM 解析では脳実質の有意な低下は認めなかった。よって、$^{11}$C-MPDX PET での結合能上昇部位は、$^{18}$F-FDG PET や $^{11}$C-FMZ PET における糖代謝や cBZD-R 結合の低下部位と一致しなかった。

＜考察＞

本研究では、慢性期の DAI 患者における A1R の変化を *in vivo* で初めて報告した。A1R は DAI 患者の脳において有意に低下する部位は無く、低位前頭葉、後方の帯状回、rolandic area で上昇していた。このことから、本研究は神経保護や神経調節作用の重要な因子としての A1R の作用が報告されてきた過去の基礎的、臨床的報告を支持する最初の PET 研究となると考えられる。

アデノシンは A1R を介してシナプスで抑制性に働くことが広く知られており、脳損傷によりア

デノシンや ATP の放出が誘発される。A1R は持続的な活性により感受性が低下するが、条件によっては、A1R は傷害の広がりを抑制する可能性が報告されている。このことから、本研究では A1R 結合能は外傷の急性期、亜急性期に上昇し、二次的な神経障害を抑制するという仮説を立てた。

A1R の神経保護作用は中枢神経系疾患の研究において、多く報告されている。$^{11}$C-MPDX PET については、過去に動物の虚血モデルでは $^{11}$C-MPDX が脳の病理学的損傷を予測できる可能性が示された。ヒトの臨床研究では一次視覚野での $^{11}$C-MPDX の取り込み上昇は軸索投射の損傷による神経症状が後に回復する徴候であることが示された。また、神経損傷後の炎症反応の制御において A1R が主要な役割を果たすことも報告されている。今回の $^{11}$C-MPDX PET の結果から、A1R 結合能の上昇が慢性期の DAI 患者でさえも、神経保護的な役割を果たす可能性が示唆された。

もう一つの A1R 上昇の意義として、神経伝達系統の調整作用が考えられる。慢性期の TBI 患者における、ドーパミン、セロトニン等の神経伝達物質の変化が PET の研究により報告されていることと、A1R の作用によって複数の神経伝達物質の放出が抑制されるという報告があることから、慢性期の A1R の上昇は神経伝達物質の調整作用を示している可能性が示唆される。

本研究の結果で興味深い点は、$^{11}$C-MPDX の結合上昇部位が、$^{18}$F-FDG の取り込みや $^{11}$C-FMZ の結合低下部位と一致しなかったことである。DAI は白質の損傷であり、DAI における神経障害はネットワーク障害、神経活性の低下、神経細胞の脱落を引き起こし、広範囲の糖代謝低下に至る。従って、$^{18}$F-FDG PET は DAI 患者において確立された診断的画像の一つである。今回の $^{18}$F-FDG PET では、帯状回で糖代謝が低下したがこれは過去の報告と一致した。$^{11}$C-MPDX PET の変化部位と相違したことからは、$^{11}$C-MPDX PET が神経細胞の傷害部位を検出することはできないことが示された。

$^{11}$C-FMZ PET は TBI のもう一つの診断的画像である。$^{11}$C-FMZ の結合は cBZD-R の分布と親和性に起因し、神経細胞の viability のマーカーとなる。$^{11}$C-FMZ の結合低下により、$^{18}$F-FDG の取り込み低下よりもより厳密に細胞障害や神経細胞脱落が判明する。$^{11}$C-FMZ PET で DAI の前方帯状回で取り込みが低下したことから、同部位での深刻な神経損傷が示された。

本研究の結果から $^{11}$C-MPDX PET は神経損傷の診断マーカーにはならないが、神経保護的機構を示す可能性が示された。A1R 結合能は障害された脳組織では上昇しないが、その周囲で上昇し、神経保護、神経調節作用が脳障害部位の周囲で増強することを意味すると考えられる。

＜結論＞

慢性期の DAI 患者について $^{11}$C-MPDX PET を施行して A1R を評価した。脳の傷害部位の周囲で A1R 結合能は上昇し、慢性期 DAI において、A1R の神経保護あるいは神経調節作用が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5409　号 | 林　志保里 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　立石　宇貴秀<br>副　査　寺田　純雄、　大友　康裕 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、アデノシン A1 受容体（A1R）に対する新規開発された放射性リガンドである、[1-methyl-$^{11}$C] 8-dicyclopropylmethyl-1-methyl-3-propylxanthine (MPDX)を用いて、positron emission tomography (PET)により、慢性期のびまん性軸索損傷（DAI）患者脳における A1R の変化を *in vivo* で評価したことにある。$^{11}$C-MPDX（A1R 結合能）、 $^{18}$F-FDG（ブドウ糖代謝）、$^{11}$C-FMZ（中枢性ベンゾジアゼピン受容体分布）の三種の PET を施行した DAI 患者群について、ROI 解析と SPM 解析により健常者群と比較した結果、$^{11}$C-MPDX PET では $^{18}$F-FDG と $^{11}$C-FMZ PET の取り込み低下により示された脳損傷部位ではなくその周辺で A1R が上昇した。このことから、A1R が慢性期 DAI 患者における神経保護作用、神経調節作用に寄与することが *in vivo* で示唆された。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

アデノシン受容体の標識の有用性に関しては以前より諸家の報告がなされてきているが、検査成績に一定性がなく有用性は確立されていない。これまで DAI に特化して $^{11}$C-MPDX PET を用いて非侵襲的に病変の活動性を評価したまとまった報告はなく、本研究は独創性が認められる。

２）社会的意義

DAI の治療は浮腫の軽減などが基本であり、それのみでは十分な寛解は望めない。近年では神経保護作用のある物質の開発により、良好な成績が期待されている。しかし依然として予後予測や効果判定が診療上重要である。このためには治療前にいかにより正確に病期診断を非侵襲的に評価するかが重要であり、$^{11}$C-MPDX PET は治療の患者選択の一助になる可能性がある。

３）研究方法・倫理観

臨床的自験例をもとに研究背景、目的、研究計画をたて、有用性の確立されていない手法ではあるものの複数の PET 製剤で比較することで再現性のある評価方法を取り入れ、実例を元に結果を出されている。

４）考察・今後の発展性

急性期および慢性期の DAI による病変の広がり診断を実施し、病変の活動性の強さについては

F-18 FDG PET など他のモダリティを有効に活用し総合的に評価することが重要である。今後は $^{11}$C-MPDX PET の標準化、ROI 設定の明確化、検査データの解析手法について十分な初期データを取得後、前向き試験にて診断基準の明確化を行い、観察者間の再現性、偽陽性・偽陰性の具体的要因を調査し検討を追加する必要がある。$^{11}$C-MPDX PET を成熟した検査として使用することで治療を実際に行う際の患者層別化のための一手段として活用できる可能性がある。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は本学博士（医学）の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 郭　慧佳 |
| 論文審査担当者 | 主査　稲澤　譲治<br>副査　淺原　弘嗣、吉田　雅幸 |
| 論　文　題　目 | Efficacy of microRNA silencing by lipid-conjugated double-stranded antisense oligonucleotides |

（論文内容の要旨）

**Abstract**

MicroRNAs (miRNAs) are important therapeutic targets for intractable diseases. Although conjugation of ligands to antagomirs is a promising means of delivering them to target tissues and cells, the efficacy of these constructs is yet to be optimized. We designed a novel antagomir construct that comprise an antagomir strand and its complementary RNA strand. We were able to conjugate ligands to this double-stranded antagomir via the complementary RNA strand. We used single- or double- stranded antagomirs to examine effects of ligand type, conjugation site, or chemical modifications of the antagomir strand on miRNA silencing *in vitro*. We found that conjugation of cholesterol ligand to a double-stranded antagomir produced a construct with comparable miRNA-silencing efficacy as that of a single-stranded antagomir directly conjugated with the ligand. Our findings support application of this technology for the therapeutic regulation of miRNA.

**Introduction**

MicroRNAs (miRNAs) are 21–23 nucleotides non-coding RNAs which regulate mRNA post-transcriptionally. MiRNAs response to pathogens and various human diseases are caused by altered expression and profiling of miRNAs.

Antagomir is a chemically modified ASO with improved biostability. The chemistries used most often are phosphorothioate bond (PS) in internucleotide linkage and modification at ribose moiety, such as 2′-*O*-methylated ribose moieties (OM) or locked nucleic acid (LNA).

We reported a new class of DNA–RNA heteroduplex oligonucleotide (HDO), which comprise an ASO-strand and its complementary RNA (cRNA) strand. When HDO was conjugated with a lipid-ligand such as alpha-tocopherol (Toc), it improved the silencing effect by 10- to 20-fold in liver. RNase H recognizes DNA–RNA heteroduplex which composes ASO and the target mRNA and then cleaves the mRNA, resulting in degradation of the mRNA.

In this study, we designed a variety of double-stranded antagomirs which include various types of antagomirs or ligands. We investigated efficacy of antagomirs when we transfected those into cells to elucidate which types of double-stranded antagomir is promising for application to *in vivo* evaluation.

## Materials and Methods

### Design and synthesis of antisense oligonucleotides

Two types of antagomirs targeting miR-122 were synthesized by Gene Design (Osaka, Japan); OM-modified antagomir, and DNA/LNA mixmer type of antagomir. In addition, two cRNAs were synthesized by Hokkaido System Science (Sapporo, Japan) with following sequences; cRNA for OM-modified antagomir and cRNA for DNA/LNA mixmer type of antagomi. To generate double-stranded antagomir, equimolar amounts of antagomir and cRNA strands were heated in PBS (Sigma-Aldrich) at 95°C for 5 minutes and cooled to room temperature over 1 hour.

### Cell transfection

Huh-7 cells (human hepatocellular carcinoma cell line) in 24-well plates were transfected with increasing concentrations of antagomirs in Opti-MEM containing 10 μL/mL Lipofectamine RNAiMAX reagent (Life Technology). After 6 hours, the transfection medium was replaced with complete medium consisting of DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Invitrogen) and the cells were incubated for a further 18 hours and then used in the subsequent experiments. All protocols met ethics and safety guidelines for experimentation and were approved by Tokyo Medical and Dental University (2016-030C2).

### Quantitative RT-PCR.

Total RNA was isolated from the cells by the MagNA Pure 96 system (Roche Diagnostics). cDNAs were synthesized by TaqMan miRNA assays (Applied Biosystems) for miRNA experiments. qRT-PCR analysis normalized to small RNA U6 for miRNA experiments was performed with a TaqMan primer (Applied Biosystems) in a LightCycler 480 System with a LightCycler 480 Probes Master kit (Roche).

### Statistical analysis

Comparisons between single- and double stranded antagomir groups were performed using paired t test. $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance; Prism version 6.05 (GraphPad Software) was used to perform all statistical analyses.

## Results

### Design of a double-stranded, fully OM-modified, ligand-conjugated antagomir

To elucidate whether the double-stranded antagomir technology could be used to silence miRNA, we designed a double-stranded antagomir comprising an antagomir-strand and its cRNA-strand conjugated with a lipid ligand. The antagomir which silenced miR-122 is the most advanced antagomir in development of antagomir therapy. The antagomir-strand is a 23-mer fully OM-modified antisense oligonucleotide with a complementary sequence to that of mature miR-122 and carries five PS-backbones. We conjugated two types of lipid ligands, Chol or alpha-tocopherol (Toc). The Chol ligand could be attached to the end of either 3′- or 5′-end of oligonucleotides, whereas Toc could only be attached to the end of 5′-end due to methodological issues in the synthesis.

### MiRNA-silencing by Chol-conjugated single- or double-stranded OM-modified antagomir

We attached the Chol to the 3′ end of the parent single-stranded OM-modified antagomir and the cRNA strand of double-stranded antagomir targeting miR-122 and evaluated its silencing effect in Huh-7 cells.

Treatment with the double-stranded antagomir silenced the target miRNA in a dose-dependent manner as measured by miR-122-specific RT-PCR and no significant differences were found between miRNA silencing effect of the two antagomirs.

**Effect of Chol -ligand position (3′- or 5′) on miRNA silencing by a double-st**
**randed antagomir**

To examine whether the position of the ligand affected the efficacy of miRNA inhibition by double-stranded antagomir, we compared the potency of double-stranded antagomirs where Chol conjugation was made in either the 3′- or 5′-end in the cRNA strands. The double-stranded antagomir with Chol at the 3′-end showed greater miR-122 silencing significantly with 1 nM transfection than that by the double-stranded antagomir at the 5′-end did.

**Effect of Toc-conjugation to OM-modified antagomirs on miRNA-silencing**

To investigate the effect of a different type of lipid ligand on the miRNA silencing with the antagomirs, we attached Toc to either 5′-end of the parent single-stranded OM-modified antagomir or the cRNA strand of double-stranded antagomir. The miR-122 silencing in Huh-7 cells treated with the double-stranded antagomir with Toc was comparable with the single-stranded antagomir with Toc.

**Effect of Chol- or Toc- conjugation to single- or double-stranded DNA/LNA-modified antagomirs on miRNA-silencing**

To evaluate potency of a double-stranded antagomir with an antagomir strand that was not fully OM-modified, we designed double-stranded antagomir conjugated with lipid ligands, which comprise DNA/LNA mixmer type of antagomir which includes no more than three consecutive DNAs targeting miR-122. The double-stranded DNA/LNA mixmer antagomir conjugated with Chol was less potent significantly by 10 nM transfection than the parent single-stranded DNA/LNA mixmer with Chol. However, there were no significant differences between the single- or double-stranded Toc-conjugated DNA/LNA antagomirs.

**Discussion**

We describe a new type of antagomir, a double-stranded antagomir, in which molecular design are composed of the antagomirs and complementary RNAs strand conjugated with lipid ligands. The double-stranded antagomir with which cholesterol was conjugated at 3′-end of the cRNA inhibited miRNA more efficiently than that at 5′-end, indicating that the conjugation site of Chol affected efficacy.

The double-stranded antagomir did silence miRNA although its silencing effect was no better than the parent single-stranded antagomir. This finding indicated that there may be other as-yet-unidentified RNases that are responsible for cleavage of the cRNA strand or there is unwinding mechanism of double-stranded antagomir which is independent from cleavage.

The position of cholesterol conjugation (3′- vs 5′-end) was found to affect potency of double-stranded antagomir. The 3′-conjugation of cholesterol to the cRNA strand of double-stranded antagomir may enhance uptake to hepatocyte, resulting in higher potency than 5′-conjugation.

The types and affinities of carrier molecules in blood determinates the cellular uptake and intracellular trafficking of ASOs. The improved delivery might be caused by increased retention in blood because of

two speculated mechanisms as follow. One is that the double-stranded structure could be more resistant to nuclease in blood than the single-stranded structure. The other is that double-stranded structure which has a greater molecular size than the single-stranded structure could escape from renal excretion. These led us to expect combining double-stranded antagomir with a delivery ligand for target tissue or cells to enable higher efficiency *in vivo*.

In conclusion, we developed a novel oligonucleotide construct, double-stranded antagomir, and demonstrated that the type of lipid ligands and its conjugation-site are the important determinants of potency.

（要約）

近年、マイクロ RNA は様々な疾患の重要な治療標的として注目されており、マイクロ RNA を抑制するアンチセンス核酸であるアンタゴミアの臨床開発が進んでいる。アンチセンス核酸の標的の臓器や細胞指向性を向上する方法として送達分子となるリガンドの開発が有望であるが、その有効性の向上が急務である。本研究で我々は、リガンドを間接的に結合する新規技術として、アンタゴミアに対して相補的な RNA 鎖を結合させ、その相補 RNA 鎖にリガンドを結合する二本鎖アンタゴミアを開発した。マイクロ RNA-122 を標的とした 2 種のアンタゴミアにおいて、脂質リガンドの種類(コレステロール及び α トコフェロール)やその結合部位を変化させた二本鎖アンタゴミアを合成し、ヒト肝細胞癌株（Huh-7）へトランスフェクションした際のマイクロ RNA-122 抑制効果を定量的 RT-PCR を用いて比較検討した。その結果、リガンドを直接結合した 1 本鎖アンタゴミアと同等の miRNA 抑制効果を有する 2 本鎖アンタゴミアを同定した。本研究により、リガンド分子を間接的に結合することが可能な二本鎖アンタゴミアの開発が期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5410　号 | 郭　慧佳 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　稲澤　譲治<br>副　査　淺原　弘嗣、吉田　雅幸 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

マイクロ RNA を抑制するアンチセンス核酸であるアンタゴミアによる核酸創薬が期待されている。本研究では、miR-122 を標的にする脂質リガンド結合性 2 本鎖アンタゴミアを開発し、その有効性を評価した。その結果、リガンド結合性 1 本鎖アンタゴミアと同等の抑制効果を有する 2 本鎖アンタゴミアを同定した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

マイクロ RNA を標的にした核酸医薬が期待されている。アンチセンス核酸の標的の臓器や細胞指向性を向上する方法として送達分子となるリガンドの開発が求められている。今回の研究では、新規の技術として、アンタゴミアの相補 RNA 鎖にリガンドを結合させた二本鎖アンタゴミアを開発した点において独創性・先駆性を有すると言える。

２）社会的意義

1 本鎖アンタゴミアと同等の miRNA 抑制効果を有するリガンド結合性 2 本鎖アンタゴミアを同定したことは、核酸医薬開発への寄与が期待できる。

３）研究方法・倫理観

研究方法や結果の解釈は概ね妥当であり、生体試料・臨床情報等の扱いにおいても倫理的に適正と判断された。

４）考察・今後の発展性

今回の in vitro 研究成果に加えて、in vivo 研究での効果検証が行われ、さらに、核酸医薬開発に向けての proof of concept (POC)の取得へ発展することに期待がかかる。

**３．その他**

特になし

**４．審査結果**

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請に値すると認めた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 宇田川　智宏 |
| 論文審査担当者 | 主査　内田　信一<br>副査　淺原　弘嗣、田中　敏博 |
| 論　文　題　目 | Amnionless-mediated glycosylation is crucial for cell surface targeting of cubilin in renal and intestinal cells |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

Cubilin 遺伝子（*CUBN*）か Amnionless 遺伝子（*AMN*）のいずれかの変異は低分子蛋白尿と巨赤芽球性貧血を呈する常染色体劣性遺伝性疾患 Imerslund–Gräsbeck syndrome (IGS) の原因となる。細胞膜貫通部位のない Cubilin は Amnioless と複合体（Cubam）を形成し、腸管または腎尿細管上皮細胞において様々なリガンドの受容体として機能する。我々は腸管または腎培養細胞で Cubam 複合体の細胞膜発現量を Flow cytometry を用いて定量評価する系を確立し、IGS で発見された Cubilin と Amnionless 変異の病的メカニズムを解析した。*CUBN* の新規変異と既報のうち二種のミスセンス変異と、既報の *AMN* ミスセンス変異全てで、Cubam 複合体の小胞体貯留を引き起こし Amnionless 介在性 Cubilin 細胞膜発現を阻害した。このような Cubilin と Amnionless の小胞体貯留と局在異常は新規 *CUBN* 変異を持つ IGS 患者の腎組織でも確認された。興味深い事に Amnionless 依存的 Cubilin 膜発現には Cubilin-Amnionless の結合だけでなく、Amnionless 介在性 Cubilin 糖鎖修飾が必要であった。さらに質量分析と Cubilin の糖化阻害変異解析により、Cubilin 糖鎖修飾部位のうち少なくとも 4 か所の複合的な糖化が Cubam 膜発現に必須であることが解かった。以上の結果から腸管や腎細胞における Cubilin 細胞膜輸送のメカニズムの詳細を明らかにした。

＜緒言＞

腸管でのコバラミン（内因子-ビタミン B12 複合体）の吸収や、腎での糸球体濾過された低分子蛋白の再吸収には、Cubilin と Amnionless から形成されるリガンド受容体が必須である。Cubilin は N 末端と 8 個の EGF リピートと 27 の CUB ドメインからなる 460Kda の巨大分子であり、EGF リピート部位で 1 回膜貫通型蛋白 Amnionless と結合して Cubam 複合体を形成、細胞膜頭頂側に局在する。

Cubilin 遺伝子（*CUBN*）か Amnionless 遺伝子（*AMN*）のいずれかの変異は、Imerslund–Gräsbeck syndrome (IGS : OMIM # 261100)とよばれる、低分子蛋白尿と巨赤芽球性貧血を呈する常染色体劣性遺伝の疾患で原因となる。短縮型 *CUBN* 変異では、両者の腎尿細管上皮頭頂側発現が障害されることや、逆に欠失型 *AMN* 変異を持つイヌ IGS モデルで Cubam 膜発現が障害されるため、この両者は相互依存的に機能することが示唆されている。培養細胞で Cubilin と Amnionless は相互依

存的に細胞膜発現を可能にする。過去の検討では IGS 患者の原因となるミスセンス変異が膜発現、糖鎖修飾や受容体機能にどう影響するかは不明であり、Cubam の細胞膜発現量を定量評価する系を確立し、変異の影響を検討した。

＜方法＞

N 末 mycGFP タグの付きヒト Amnionless 全長と、C 末端に Flag タグの付いた、ラット Cubilin（N 末端～EGF～4 番目の CUB ドメインまで）をサブクローニングし、発現ベクターとして組み込んだ。細胞内局在の解析には、両者の内在性発現がない Human embryo kidney(HEK293T)、イヌ尿細管細胞 Madin-Darby canine kidney (MDCK)と、両者の内在発現があるヒト Primary renal proximal epitherial cell(RPTEC)を使用した。細胞膜発現は細胞膜の透過処理をせず、蛋白の細胞外領域を認識する抗体を用いて蛍光免疫染色を用いて解析した。蛋白の結合は Flag 抗体付きセファロースビーズを用いて免疫沈降法により解析した。質量分析には SILAC（(stable isotope labeling by amino acid in cell culture）システムを利用した。Cubilin 単独は普通培地、Amnionless と Cubilin の共発現はアルギニンとリジンを安定同位体で標識した培地で細胞を育て、質量変化を分析機で定量評価した。糖鎖解析には、N 型糖鎖修飾の一部を切断する Endoglycosydase H と N 型糖鎖修飾をすべて切断する PNGaseF を用いた。糖鎖の変異解析はアスパラギン(ASN)をアスパラギン酸(ASD)に置換した変異体を作成し行った。患者の全エクソン解析は血液 DNA から次世代シークエンサーを用いた。腎切片は針生検検体を脱パラフィン後、Cubilin と Amnionless 特異的抗体を使用して蛍光免疫染色を行い解析した。

<結果＞

1　HEK293T、MDCK 細胞と初代培養の RPTEC で既報通り Cubilin と Amnionless の相互依存的な膜発現を確認した。IGS 患者で発見された *CUBN* 新規ミスセンス変異（G653R）は Cubilin と Amnionless の膜発現を阻害した。又この変異は Amnionless 依存的 Cubilin 内在化を阻害した。この変異は野生型と共発現すると容量依存的に膜発現を障害するため、機能喪失型変異であると示唆された。

2　透過 HEK293T 細胞の Flow cytometry (FCM) 解析で Amnionless 発現中 95％で Cubilin を発現した。Amnionless が発現する非透過細胞中 Cubilin が膜発現する割合は、野生株で 85％だが、G653R 変異では 5％以下と著しく低下した。6 個の既報 *CUBN* ミスセンス変異（G142E、C222S、P334L、R651G、S829L、S865N）中 2 個（C222S, S829L）で同様の現象が認めた。既報の *AMN* ミスセンス変異 5 個（T41I、L59P、M69K、C234F、P254E）全てで膜発現の障害が起きた。

3　細胞内では、Cubilin は Amnionless 依存的に ER からゴルジ体へと輸送されるが、G653R 変異は小胞体貯留を引き起こした。

4　G653R *CUBN* ヘテロ変異を持つ IGS 患者腎組織の蛍光免疫染色により、近位尿細管上皮細胞で Cubilin と Amnionless が管腔側に発現せず、ER に貯留していた。

5　変異 Amnionless は Cubilin との結合を阻害したが、変異 Cubilin は Amnionless 結合に影響していなかった。さらに G653R、C222S、S829L Cubilin は Amnionless 介在性の Cubilin の N 型糖鎖修飾を阻害した。Cubilin 糖鎖修飾障害の重要性が示唆された。

6　Amnionless 介在性 Cubilin 膜発現はは N 型糖鎖修飾阻害剤 Tunicamycin で障害されたため、SILAC-質量分析を用いて、Cubilin ベクターに含まれる、N 型糖鎖修飾部位の重要部位を解析した。N 型糖鎖修飾が起こる ASN を ASD に置換した変異体では、7 か所の糖化部位の中、N 末から４、５、６、７番目の複合変異 Cubilin で Amnionless 介在性 Cubilin 膜発現が阻害された。またこの複合変異体は Amnionless との結合を阻害せず、小胞体貯留を引き起こした。

＜考察＞

この研究で Cubilin と Amnionless の細胞内輸送機序を明らかにし、*CUBN* や *AMN* 変異が小胞体貯留と Amnionless 介在性 Cubilin 糖鎖修飾と細胞膜発現を引き起こすことを示した。

N 型糖鎖修飾は蛋白質の主要な翻訳後修飾の一つで、蛋白の折り畳み、安定性、細胞内輸送そして複合体形成を制御する。我々は質量分析と変異解析により CUB ドメインの少なくとも 4 個所の複合的な N 型糖鎖が Cubilin 及び Amnionless の輸送に必要であった。*CUBN* 変異のうち、C222S と G653R、S829L は Amnionless との結合を阻害せずに Cubilin 糖鎖修飾を阻害していた。C222S は EGF リピート、G653R と S829L は CUB ドメインに位置し両者は離れている。この結果から Amnionless との結合以上に Cubilin の高次構造が、糖鎖修飾と膜発現に影響する可能性が考えられた。

*AMN* の変異部位は散在しているが全て Cubilin との結合を阻害するため Amnionless の機能の主体は Cubilin と結合し輸送する担体であると推察された。我々が診断した IGS 患者は *CUBN* ヘテロミスセンス変異と、母由来の *AMN* のミスセンス変異(c.883C>T (p.P295S))を持っていた。この変異の病原性は予測サイトにより「良性」と「不明」に分かれ、我々の解析では Cubilin 膜発現への影響は軽度で、病原性の結論に至らなかった。

腎近位尿細管では、Cubam の他に Megalin 受容体が存在する。調べた IGS 患者腎組織や既報において、Megalin の局在は Cubilin の局在異常の影響を受けない。MDCK は Megalin の内在発現がないため Cubilin と Megalin の細胞膜発現は独立することが示唆された。既報では、コバラミンの吸収には Cubilin と Megalin 複合体が内在化を促進すると報告されている。Cubilin-Amnionless-Megalin の三者の関係は重要だが不明な点が多く今後の研究課題である。

*CUBN* 遺伝子のミスセンス変異 I2984V はゲノムワイド関連研究によりアルブミン尿のリスクとして近年同定された。この変異の Cubam の膜発現や内在化への影響は未知なため、我々の確立した系と全長 Cubilin により病原性評価が可能と考えられた。

＜結論＞

我々は翻訳後糖鎖修飾に焦点をあて IGS 患者の *CUBN* や *AMN* の変異が、小胞体貯留と、糖鎖の成熟障害を起こし、Cubam の形質膜発現を障害する機序を明らかにした。以上から、IGS の腎や腸管での吸収障害メカニズムに Amnionless 介在性糖鎖修飾障害を介した Cubilin 細胞内輸送障害があることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5411　号 | 宇田川　智宏 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　内田　信一<br>副　査　淺原　弘嗣、田中　敏博 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、Imerslund-Gräsbeck syndrome (IGS)の患者において、責任遺伝子とされている Cubilin (CUBN) 遺伝子と Amnionless(AMN)遺伝子において発見された変異がもたらす分子病態を明らかにするために行われた。Cubulin と Amnionless は正常では腎臓近位尿細管の尿側の形質膜上に発現し、尿からの低分子蛋白の再吸収に関わっているため、培養細胞系における各種変異体の発現実験により、変異が細胞内局在に及ぼす影響をまず検討した。その結果、これら 2 つの分子はお互いに膜表面への発現に他を必要としていた。次に、膜表面への発現を定量的に調べるためにフローサイトメトリーによる評価法を開発し、いくつかの変異 Cubulin は膜表面への発現が障害されていた。しかしながら、Cubulin と Amnionless の両者の結合不全が膜表面への発現を傷害しているわけでは無いことも判明した。そこで、申請者は両者を発現させて時に Cubulin にメインのバンドの上に見かけの分子量の大きなバンドが出現することに注目し、これが glycosylation を受けた Cubulin ではないかと推定し、N 型糖鎖修飾阻害薬実験で証明した。そして、SILAC 法を用いた質量分析でいくつかの Amnionless 依存性の Cubulin の糖鎖修飾部位を同定し、変異導入により実際にこれらの部位での糖鎖修飾が Cubulin の膜表面への発現に関わる事を明らかにし、変異 Cubulin のもらたす病態の本質であると結論した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

昨今ゲノム解析が急速に進む一方、見つかった変異が病態と関連するか、またどのような機序で病態が引き起こされているか、を明らかにする研究は追いついていない。本研究は、IGS 症候群における分子病態解析を目的としており、今後の診断法・治療法開発の基礎となる重要なデータを提供するもので、その観点は臨床的に非常に重要である。

２）社会的意義

IGS 自体は希少疾患であるが、近位尿細管における低分子蛋白の輸送が関わる病態への理解を進める研究であり、類似の疾患の診断治療法の開発への波及効果も期待される。

３）研究方法・倫理観

本研究では、培養細胞系、ヒト腎生検検体、フローサイトメトリー、質量分析等多方面の技術を駆使して行なわれており、申請者の研究方法に対する知識と技術が十分高い事を示している。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究の結果について limitation をふくめて十分考察していた。そして今回明らかにした病態に基づいて新規診断法・治療法の開発を行う予定であり、発展が期待される。

**３．その他**

特記すべきこと無し。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | LI FUYING |
| 論文審査担当者 | 主査　前原　健寿<br>副査　赤澤　智宏、稲澤　譲治 |
| 論　文　題　目 | Upregulation of lipoprotein receptors on brain endothelial cells and neurons in the early phase of ischemic stroke in mice |

（論文内容の要旨）

**Abstract**

Current understanding on the mechanisms of acute stroke highlights the importance of targeting brain endothelial cells (ECs), which regulate blood–brain barrier (BBB) disruption, neuronal cell death, and immune cell infiltration. Because the transcellular pathway through ECs is activated immediately after stroke onset, understanding transporter expression should facilitate development of an efficient drug delivery system to ischemic ECs. Here, we examined BBB leakage profiles and expression of three lipoprotein receptors, low-density lipoprotein receptor (LDLR), scavenger receptor class B member 1 (SRB1), and LDLR-related protein 1 (LRP1), in a mouse model of permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO). Evans blue staining showed a biphasic BBB disruption with one peak at 6 h and the other at 3 days after MCAO. The tight junction protein occludin in the ischemic cortex significantly decreased at 3 days, but not 6 h, after MCAO. *LDLR*, *SRB1*, and *LRP1* mRNA levels were significantly up-regulated early after MCAO. LDLR and SRB1 proteins were colocalized predominantly in brain ECs, whereas LRP1 was localized in neurons in the ischemic cortex. The early overexpression of lipoprotein receptors after stroke suggests that lipoprotein-associated lipids could be suitable ligands for drug delivery into ECs and neurons in the acute ischemic brain.

**Introduction**

Stroke remains a major cause of mortality and long-term disability worldwide. Brain endothelial cells (ECs) form the interface between brain tissue and circulating blood, and maintain the homeostasis of the brain microenvironment by closely interrelating with the neurovascular unit (NVU), which comprises neurons and glial cells. Brain ECs form a transcellular and paracellular barrier to many blood-borne solutes via scarce endocytic vesicles and disrupted tight junctions (TJs). In ischemic stroke, the BBB primarily formed by ECs disrupts from as early as 3 h, allowing substances that do not pass during the steady state to pass from blood into the brain parenchyma; therefore, acute stroke therapy should be better to focus on the transcellular pathway of brain ECs to improve the chances of recovery. More broadly, enhancement of endothelial endocytosis and transcytosis across the BBB after stroke has been proposed as a drug delivery

tool to the ECs or brain parenchymal cells. Among these transport proteins, LDL receptor (LDLR) family members such as LDLR and LDLR-related protein 1 (LRP1) and a major HDL receptor called scavenger receptor class B member 1 (SRB1) are highly expressed within the CNS on brain ECs; these receptors are involved in receptor-mediated endocytosis and transcytosis of macromolecules including lipoproteins. In this sense, brain lipoprotein receptors should be a promising target for drug delivery to NVU cells including brain ECs, neurons, and glial cells in the ischemic brain. However, in the setting of acute ischemic stroke, the role and temporal profile of these lipoprotein receptors remain largely unknown. We hypothesized that lipoprotein receptors, such as LDLR, SRB1, and LRP1, would be up-regulated in the ischemic brain in parallel with enhanced transcellular transport in the early phase of stroke. Here, we investigated the BBB disruption and distribution of lipoprotein receptor expression from the very acute stage of ischemic stroke (3 h after onset) to 7 days after onset in a mouse stroke model.

**Methods and Results**

Immediately after pMCAO, CBF was significantly reduced, even 3 days after the operation. To elucidate the time course of BBB permeability after pMCAO, extravasation of EB was evaluated, and the area of EB extravasation in the ipsilateral hemisphere expressed as a percentage of the area of the contralateral hemisphere was significantly increased at 6 h, 3 days, and 7 days compared with 3 h, but not at 1 day after pMCAO. To evaluate the TJ protein at each of the biphasic peaks of BBB disruption after pMCAO, we examined the TJ protein occludin at 6 h and 3 days after pMCAO. The occludin levels were not significantly different to the level in sham-operated control level at 6 h after pMCAO, but were significantly decreased at 3 days after pMCAO by immunofluorescence staining, occludin signals were detected on CD31-positive ECs in the ischemic lesion at 6 h after pMCAO, but the signals were remarkably decreased at 3 days after the operation.

To evaluate *SRB1*, *LDLR*, and *LRP1* mRNA levels after permanent ischemia *in vitro*, mouse brain ECs (bEnd.3 cells) were subjected to OGD for 2, 4, or 6 h without reperfusion. The qRT-PCR assays showed that both *LDLR* and *SRB1* mRNA levels significantly increased after 2 h of OGD, and then significantly decreased by 6 h of OGD. In contrast, *LRP1* mRNA levels in mouse brain ECs did not change significantly at 2, 4, or 6 h after OGD compared with those in the controls.

To quantified *LDLR*, *SRB1*, and *LRP1* mRNA levels in the ischemic brain after pMCAO, the qRT-PCR analyses showed that the *LDLR* mRNA levels increased significantly at 6 h and 9 h after PMCAO compared with the sham control, respectively. And both *SRB1* and LRP1 mRNA levels increased significantly at 6 h, 9 h, and 15 h after pMCAO compared with the sham control, respectively.

By immunofluorescence staining, LDLR signals were not detected in the cortex of sham-operated mice, but were strongly detected on both the CD31-positive microvessels and/or neuron-like cells (blue arrowheads) in the ipsilateral ischemic cortex. The SRB1 signals primarily colocalized with CD31-positive microvessels in the ipsilateral ischemic cortex, but were not apparent in the cortex of sham-operated mice. To confirm the increased LDLR and SRB1 expression in brain ECs, we purified the EC fraction of the brains of sham-operated mice and of the ipsilateral ischemic cortex at 6 h and 3 days after pMCAO, and

then measured LDLR and SRB1 protein levels by Western blots analysis. The LDLR protein level in purified brain ECs significantly increased by 6 h after pMCAO, but significantly decreased by 3 days after pMCAO compared with sham-controls. The SRB1 protein level was significantly increased at 6 h after pMCAO, but was similar to the control level at 3 days after pMCAO. However, LRP1 signals were detected both in the cortex of sham-operated mice and pMCAO mice, and colocalized with neuronal cell marker NeuN.

To elucidate the different BBB permeability between C57BL/6 wild type (WT) and LDLR knockout (KO) mice in early phase of ischemic stroke, extravasation of EB was evaluated 6 h after pMCAO, respectively. The percentage area of EB extravasation was obviously decreased in LDLR KO mice compared with WT mice at 6 h after pMCAO operation, which indicates that LDLR may play a causative role as a transporter in early phase of ischemic stroke.

**Discussion**

In the current study, our EB extravasation results showed a biphasic pattern of BBB disruption in the pMCAO mouse model. Extravasated EB, an indicator of transported albumin, was detected as early as 3 h after pMCAO, and the EB area was extended in ischemic cortex at 6 h, and reduced at 1 day, and subsequently extended again at 3 days. The protein level of TJ protein occludin, which limits paracellular diffusion, was preserved at 6 h but significantly decreased at 3 days after pMCAO, indicating that transcellular diffusion was the major route for albumin transport within 6 h of ischemic stroke onset. In this initial phase of ischemic stroke, we found that lipoprotein receptors of LDLR and SRB1 were significantly upregulated in ECs and LRP1 was significantly upregulated in neurons in the ipsilateral ischemic cortex, whereas expression of lipoprotein receptors decreased from 24 h after pMCAO.

In our study, EB extravasation reduction in LDLR KO mice compared with WT mice at 6 h after pMCAO indicates that LDLR contribute to, if possibility, transcellular pathway after ischemia; which also speculates that upregulated LDLR may partially play a causative role as a transporter via LDLR-mediated transcellular pathway in early phase of ischemic stroke. Although a drug delivery system utilizing the paracellular pathway could be used to treat ischemic stroke in the late phase, but may not be effective for reducing damage in the early phase. Early effective intervention is needed to salvage the “penumbra area”, which remains viable for several hours after the onset of ischemic stroke but which may become part of the necrotic core within 24 h. Here, we found that the major three lipoprotein receptors of the brain, which are involved in LDL and HDL endocytosis and transcytosis across the BBB, LDLR and SRB1 were colocalized predominantly in brain ECs, whereas LRP1 was localized in neurons in the ischemic cortex at this early phase of ischemic stroke. Utilization of lipoprotein receptor–mediated endocytosis and transcytosis, which are significantly driven by ischemic stress, may enable early effective intervention in the early phase of ischemic stroke.

（要約）

近年、脳梗塞の分子病態が明らかとなってきており、neurovascular unit (NVU) 制御の中心的役割を担う脳血管内皮細胞や隣接した神経細胞を標的とした治療法開発が重要と考えられている。また、虚血に陥った脳組織は 12-24 時間後に非可逆的な梗塞病変に陥るため、標的細胞への数時間以内の薬物送達の必要が治療効果を上げるために重要である。脳梗塞急性期では、脳血管内皮細胞の受容体やトランスポーターを介した transcellular pathway（経細胞質輸送）が活性化すると言われており、マウス脳梗塞モデルを用いて血管内皮細胞の脂質受容体の発現解析を行った。

マウス脳梗塞モデルに Evans blue（EB）を静注すると、虚血 6 時間をピークに脳虚血病変に漏出し、24 時間後には漏出範囲は減少、3 日後には再び漏出範囲が増加する二相性の脳血管関門の破綻が見られた。遅発性 EB 漏出が見られる虚血 3 日目には tight junction 蛋白が見られ、paracellular（細胞間隙）からの漏出と考えられたが、虚血 6 時間後では tight junction 蛋白の減少は目立たなかった。LDLR、SRB1、LRP1 などの脂質受容体の mRNA を qRT-PCR で定量したところ、脳梗塞後 6-9 時間で優位な増加が見られた。虚血脳の脳血管内皮細胞を単離しウェスタンブロッティングで定量したところ、LDLR と SRB1 は虚血 6 時間で増加し、虚血 3 日後には低下していた。虚血病変の免疫組織学検討では、SRB1 は血管内皮細胞、LDLR は血管内皮細胞と神経細胞、LRP1 は神経細胞で発現が増加していた。

脳梗塞発症早期に脂質関連受容体は速やかに血管内皮細胞及び神経細胞で増加することから、そのリガンドである LDL や HDL 及びそれらに結合することが知られているビタミン E などの脂溶性ビタミンを用いることで、脳梗塞発症早期であっても、血管内皮細胞や神経細胞へ薬物送達が可能と考えた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5412　号 | LI FUYING |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　前原　健寿<br>副　査　赤澤　智宏、稲澤　譲治 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

マウス脳梗塞モデルを用いて、虚血早期に見られる脳血管内皮細胞・神経細胞のリポプロテイン受容体の発現亢進を検討した研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

虚血に陥った脳組織は 12-24 時間後に非可逆的な梗塞病変に陥るため、標的細胞への数時間以内の薬物送達の必要が治療効果を上げるために重要である。近年、脳梗塞の分子病態が明らかとなってきており、neurovascular unit (NVU) 制御の中心的役割を担う脳血管内皮細胞や隣接した神経細胞を標的とした治療法開発が重要と考えられている。脳梗塞急性期では、脳血管内皮細胞の受容体やトランスポーターを介した transcellular pathway（経細胞質輸送）が活性化すると言われており、本研究ではマウス脳梗塞モデルを用いて血管内皮細胞の脂質受容体の発現解析を行った。

２）社会的意義

脳虚血に落ちいった脳組織が、不可逆的な脳梗塞に陥る前に治療を行い救済することができれば、脳梗塞による症状発現の予防に繋げることができる。

３）研究方法・倫理観

マウス脳梗塞モデルに Evans blue（EB）を静注すると、虚血 6 時間をピークに脳虚血病変に漏出し、24 時間後には漏出範囲は減少、3 日後には再び漏出範囲が増加する二相性の脳血管関門の破綻が見られた。遅発性 EB 漏出が見られる虚血 3 日目には tight junction 蛋白が見られ、paracellular（細胞間隙）からの漏出と考えられたが、虚血 6 時間後では tight junction 蛋白の減少は目立たなかった。LDLR、SRB1、LRP1 などの脂質受容体の mRNA を qRT-PCR で定量したところ、脳梗塞後 6-9 時間で優位な増加が見られた。虚血脳の脳血管内皮細胞を単離しウェスタンブロッティングで定量したところ、LDLR と SRB1 は虚血 6 時間で増加し、虚血 3 日後には低下していた。虚血病変の免疫組織学検討では、SRB1 は血管内皮細胞、LDLR は血管内皮細胞と神経細胞、LRP1 は神経細胞で発現が増加していた。

４）考察・今後の発展性

脳梗塞発症早期に脂質関連受容体は速やかに血管内皮細胞及び神経細胞で増加することから、そのリガンドである LDL や HDL 及びそれらに結合することが知られているビタミン E などの脂溶性ビタミンを用いることで、脳梗塞発症早期であっても、血管内皮細胞や神経細胞へ薬物送達

が可能と考えられた。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、申請者は博士の学位授与に値する充分な学識を有するものと判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 松田　隼治 |
| 論文審査担当者 | 主査　古川　哲史<br>副査　荒井　裕国、吉田　雅幸 |
| 論　文　題　目 | Prevalence and Clinical Significance of Discordant Changes in Fractional and Coronary Flow Reserve After Elective Percutaneous Coronary Intervention |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

FFR(Fractional flow reserve)と CFR(Coronary flow reserve)は冠動脈の生理学的な指標として多く用いられている。しかし経皮的冠動脈形成術前後でそれらがどのように変化するかは十分に議論されていない。この研究の目的はそれらの変化とその後の臨床的なイベントを予測しうるかを検討することである。本研究では待機的冠動脈形成術が予定された 220 患者の 220 病変に対して冠動脈形成術前後で FFR と CFR を記録した。その結果 FFR が全例で改善したのに対して CFR は 71.8%しか冠動脈形成術後に改善が見られなかった。CFR が冠動脈形成術後に増加した因子を検討すると、術前の低い FFR と CFR、高い末梢循環抵抗が関連した。また中央値 24.3 か月の観察期間で予後を観察した結果、CFR が術前に低い症例はその後の悪い臨床イベントが多く(log-rank test $\chi 2$=7.26; P=0.007)、悪い臨床イベントを予測する独立した因子であった(hazard ratio 0.73; 95% CI 0.55–0.97; P=0.028)。このような結果から冠動脈形成術後に CFR が低下する症例も珍しいわけではなく、術前から CFR が高い症例、末梢循環抵抗が低い症例は術後に逆に CFR が低下することがわかった。本研究ではすべての症例で FFR の改善が得られ、成功した経皮的冠動脈形成を行ったにもかかわらず CFR の値によってその後の臨床イベントに違いがあった。心外血管の生理学的狭窄を表す FFR だけでなく、末梢循環の状態まで含めた CFR も併せて考えることによって経皮的冠動脈形成術が患者に真に効果的な治療かどうか考える事ができる。

＜緒言＞

FFR は心外血管の冠動脈の生理学的な狭窄を判断する指標として血行再建に多く用いられており生理学的な指標の一つとして確立している。また CFR は同様に心外冠動脈の狭窄、びまん性冠動脈病変、末梢循環不全において冠動脈の血流を評価する指標として臨床研究が行われている。経皮的冠動脈形成術において過去の研究によると FFR は増加するが、CFR がどのように変化するかについてはまだわかっていない。本研究では FFR と CFR の経皮的冠動脈形成術前後の変化の関係と、それを予測する因子、さらに臨床的な予後がそれらの生理学的な指標によって変わるかどうかを検討した。

＜方法＞

土浦協同病院単施設で 2012 年から 2015 年に de novo 病変の 1 枝病変で待機経皮的冠動脈形成術（PCI）を行った症例を対象とした。すべての症例が何らかの検査で虚血が証明されている労作性狭心症の症例であった。過去の CABG 歴がある症例、LMT 病変がある症例、透析や高度腎機能障害の症例、急性冠症候群の症例、極端な低心機能の症例は除外した。Successful PCI は残存狭窄が 20%未満であり grade3 の flow が得られたものと定義した。PCI 前後で FFR, CFFR, mean transit time (Tmn), index of microcirculatory resistance (IMR) の測定を Certus coronary pressure wire (St. Jude Medical)を用いて行った。234 症例の 234 病変に対して検査を施行し全体の 26.9%の 63 症例に術後のトロポニン I(TnI)の上昇がみられた。今回の研究では術後の TnI の上昇を 1.0 ng/mml 以上と定義した。そのような症例の中で４症例が末梢塞栓によって一時的な flow の低下をきたし、１０症例が 1.5mm 以上の側枝の閉塞を認めた。この１４例は PCI 関連の心筋障害と診断できるためこれらの症例は除外し、それ以外の症例はそのまま解析に加えて 220 症例 220 病変について検討した。データの解析は FFR と CFR の PCI 前後での変化とその関係について検討した。また CFR が術後に増加した群とそうでない群の 2 群に症例をわけて患者の characteristics や angiographical、physiological なデータに違いがあるか検討した。さらに長期間の follow-up のデータも集め、悪い臨床イベントが起きたかどうか検討した。悪い臨床イベントは心臓死、急性冠症候群の発症、いずれかの血管への再血行再建、心不全入院、臨床的に重要な不整脈の発症、脳血管障害と定義した。

＜結果＞

FFR と CFR の PCI 前後での変化について検討した結果､FFR が全例で改善したのに対して CFR は全体の 71.8%しか冠動脈形成術後に改善が見られなかった。CFR が術後に増加した群とそうでない群を比較すると、patient characteristics や angiographical なデータに両群に大きな変化は見られなかった。 Physiological なデータでは術後の CFR 増加群で術前の FFR (P=0.019)、術前 CFR が有意に低く(P<0.001)、術前の IMR は有意に高かった(P=0.001)。また Tmn であらわされる冠動脈血流量に関しては､術後に CFR が低下した群では hyperemic(最大充血時)において術前後の冠動脈血流の増加が確認されずに、CFR が増加した群で hyperemic において術前後の冠動脈血流の有意な増加を認めた(P<0.001)。CFR 増加群では有意に IMR が術前後で低下し、CFR 低下群では IMR の増加を認めた(P<0.001)。さらに多変量解析を用いて術後の CFR の増加の要因を検討した結果、術前の CFR 値(odds ratio 0.67; 95% CI 0.55–0.81, P<0.001)が独立した予測因子であった。今回の研究では TnI の術後の上昇の有無は 2 群で大きな差を認めなかった(P=0.72)。観察期間の中央値が 24.3 か月の中で全体の 17.4%に定義した悪い臨床イベントが発症した。イベントの有無で２群にわけて patient characteristics, medication, angiographical なデータ、TnI の上昇の有無を比較したが２群で有意な差は認めなかった。術前の低い CFR(P=0.008), FFR(P=0.033)がイベント群に多かった。多変量 Cox 回帰分析を行うと術前の CFR(hazard ratio 0.73; 95% CI 0.55–0.97; P=0.028)が独立したイベントの発生を予測する因子であった。ROC 曲線からイベントの有無を予測する CFR 値を求め、CFR=2.4 で２群に分けて Kaplan–Meier 曲線を描くと、CFR の低い群で有意にイベントの発生が多かった(logrank test $\chi 2$=7.26; P=0.007)。

＜考察＞

本研究で明らかになった主な要旨は以下の３つである。１つ目は、FFR と CFR が PCI 後に必ずしも同様に増加するわけではない点。２つ目は、術後に CFR が増加する症例では、術前に CFR、FFR が低く、IMR が高く術後に冠動脈血流の増加がみられる点。３つ目は、長期間の経過観察を行ったところ successful PCI を行ったにもかかわらず術前の CFR が低かった症例では有意にその後の悪い臨床イベントが多かった点である。すくなくとも PCI 後に FFR と CFR の変化に無視できない程度の乖離があるという報告は、少なくとも我々が知る限り初めての報告である。また術後に CFR が低下した群では hyperemic(最大充血時)において術前後の冠動脈血流の増加が確認されずに、CFR が増加した群で hyperemic において術前後の冠動脈血流の有意な増加を認めた。この現象は術後の冠動脈血流の増加がみられなかった(術後に CFR が低下した)症例では、FFR で生理学的に有意狭窄と判断されたにも関わらず実は non-flow limiting な狭窄であった可能性を示唆する。また CFR 増加群では有意に術後に IMR が低下しており、狭窄が解除されたことで末梢の血圧が上昇し末梢血管床が拡張したと説明でき、術前に IMR の高い症例が末梢の血管が拡張する可能性があり冠動脈血流が増加する症例であると考えられる。一方で術前から IMR が低い症例は心外血管の狭窄があるにもかかわらず冠血流が保たれている症例ですでに十分に末梢血管抵抗は低くなっており末梢血管はすでに拡張していると考えられる。本研究から PCI によって末梢血管抵抗が変化し、それが術後の CFR の変化、hyperemia での冠血流に反映されていることがわかる。本研究では successful PCI が行われた症例の中で悪い臨床イベントを予測したのは、patient characteristics や手技の問題ではなく術前の CFR であった。現在行われている臨床研究(DEFINE-FLOW; NCT02328820)とも概念が共通する。この関係をさらに検証するためにはこの分野でのより大きな臨床研究が必要と考える。

＜結論＞

FFR と CFR が PCI 後に必ずしも同様に増加するわけではない。術後に CFR が増加する症例では、術前に CFR、FFR が低く、IMR が高く術後に冠動脈血流の増加がみられた。successful PCI を行ったにもかかわらず術前の CFR が低かった症例では有意にその後の悪い臨床イベントが多かった。末梢循環の状態まで含めて考えることによって PCI が患者に真に効果的な治療かどうかを考える助けになる。

# 最終試験の結果の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5413　号 | 松田　隼治 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　古川　哲史<br>副　査　荒井　裕国、吉田　雅幸<br>公開審査　：　平成２９年１２月１８日 | |

（最終試験の結果の要旨）

副　査　　荒井　裕国

申請者らは、本学関連病院において 2012 年から 2015 年に待機的冠動脈形成術(PCI)が施行された 1 枝冠動脈狭窄症例 220 例において、PCI 前後の FFR(Fractional flow reserve)と CFR(Coronary flow reserve)を検討した。

その結果、FFR は全例で改善を認めたが、CFR は 72%の症例でのみ改善を認めた。PCI 後の CFR の増加には術前の低い FFR と CFR、高い末梢血管抵抗が関連しており、術前から CFR の低い症例で遠隔期のイベントが多かった。

一般的には冠動脈の器質的狭窄を示す FFR の改善が PCI の有効性の指標と考えられがちであるが、本研究は、遠隔期のイベント決定因子が FFR の改善ではなくてむしろ術前の CFR 値であることを示した点で新規性がある。PCI の適応決定や PCI 施行後の治療介入の決定に、術前 CFR 値が重要であることを示した点で臨床的な価値があると考えられた。しかしながら、本研究は、単なるカテーテル計測上の数値変化に基づく推論の域を出ておらず、今後は更なる検査指標（心筋シンチなど）との組み合わせで、病理学的・組織学的な観点からのメカニズムの解明の研究へと発展させてもらいたい。

申請者はパワーポイントを用い、研究の背景、目的、方法、結果およびその解釈について発表を行った。質疑では、方法論の限界や今後の発展性など多岐にわたる質問をしたが、申請者は本研究の問題点を認識したうえで、臨床経験と学識に基づいてほぼ的確に回答した。以上より　申請者は本学博士(医学)の学位授与にふさわしい学識を有していると判断した。

副　査　　吉田　雅幸

本論文の主な研究成果として、待機的経皮的冠動脈インターベンション（percutaneous coronary intervention: PCI）前後の FFR（Fractional Flow Reserve）と CFR（Coronary Flow Reserve）の変化について検討した結果、FFR が全例で改善したのに対し、CFR は 71.8%の症例でのみ改善しなかったことが分かった。また、長期予後を観察すると術前の CFR が低い症例のイベント発生が多く、独立した危険因子であることが分かった。

FFRは冠動脈の生理的狭窄を判断する指標のひとつとしてPCIに多く用いられている。また、CFRは末梢循環不全による冠動脈血流の指標として考えられている。これまで多くのPCI研究はFFRを指標として実施されており、CFRのPCIにおける意義は検討されていなかったため、今回

の研究の着想に至った。

申請者は、2012 年から 2015 年 6 月に土浦協同病院で新規一枝病変で待機的 PCI を実施した 234 人を対象とした。全 234 病変に対して PCI を実施し、全体の 26.9%で術後のトロポニン I 上昇を認めた。PCI 前後で FFR,CFR, mean transit time, index of microcirculatory resistance (IMR)の測定を行った。結果として FFR は全例で改善したのに対し、CFR は 71.8%の症例でのみ改善しなかった。CFR の改善群と非改善群で比較をしたが、患者背景や血管造影所見での差異はなかった。CFR 改善群では術前の FFR および CFR のいずれもが低く、一方術前の IMR は上昇していた。術後観察期間（中央値 24.3 ヶ月）における心血管イベントの有無と関連する因子を検討すると、術前の FFR および CFR の低値がイベントと相関していた。今回の研究で PCI によって CFR は必ずしも改善しない症例があり、PCI 自体による血流再開は良好であっても術前 CFR の低値症例では予後が良好でないことが示唆された。試問では、今回の研究の限界と今後の研究の方向性や、FFR および CFR をどのように臨床的に活用していくのかなどについて幅広く質問を行った。申請者の回答は概ね妥当であり、本学博士（医学）の学位授与に値する充分な学識を有すると判断した。

主　査　　古川　哲史

最終試問では、論文の説明に続き質疑応答を行った。主に結果の解釈に関する質問、特にステントによる狭窄解除によりかえって血流が低下した病態生理学的な意義、血流が改善したことが患者の予後につながらなかったことをどう考えるのか、などに関して踏み込んだ質問が行われた。おおむね満足に行く回答が得られ、副査の荒井教授、吉田教授と合議の上、博士（医学）の授与に値する学識を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 李　哲民 |
| 論文審査担当者 | 主査　古川　哲史<br>副査　荒井　裕国、吉田　雅幸 |
| 論　文　題　目 | Impact of Coronary Plaque Morphology Assessed by Optical Coherence Tomography on Cardiac Troponin Elevation in Patients with Non-ST Segment Elevation Acute Coronary Syndrome |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

非ST上昇型急性冠症候群患者における経皮的冠動脈インターベンション（percutaneous coronary intervention: PCI）後の心筋傷害（periprocedural myocardial injury: PMI）と、光干渉断層法（optical coherence tomography: OCT）での冠動脈プラーク性状との関連を調べた。解析可能な非ST上昇型心筋梗塞症例167名を48名（29%）の心筋傷害群と119名（71%）の非心筋傷害群の2群に分け、患者背景やOCT所見を比較検討したところ、腎機能障害、OCTで定義される不安定プラークのひとつであるTCFA（thin-cap fibroatheroma）と脂質性プラーク長さが独立した規定因子であった。また長期予後を検討したところ、心筋傷害群群では心血管イベント（死亡、心筋梗塞、致死性不整脈、不安定狭心症による入院）が有意に多く見られた。結語として、非ST上昇型急性冠症候群患者において、長期予後と関連し得るPCI後心筋傷害と不安定プラークのひとつであるTCFAとの関連が、OCTを用いることで可能であった。

＜緒言＞

経皮的冠動脈インターベンション（percutaneous coronary intervention: PCI）後の心筋傷害（periprocedural myocardial injury: PMI）には様々な因子が関与していると報告されている。近年の論文で、非ST上昇型急性冠症候群（Non-ST-segment ST elevation acute coronary acute coronary syndrome: NSTE-ACS）患者におけるPCI後心筋トロポニン上昇と予後との関連が報告されているが、NSTE-ACS患者における責任病変のプラーク性状とPMIとの関連については未だ十分に解明されていない。光干渉断層法（optical coherence tomography: OCT）は高解像度の血管内イメージング器具であり、冠動脈プラーク性状を詳細に検討することができる。そのため本研究では、NSTE-ACS患者におけるPCI治療前のOCTを用いた冠動脈プラーク性状とPMIとの関連を検討し、更にはPMI患者における心血管イベントの有無についても追跡調査した。

＜方法＞

2008年10月から2014年6月まで土浦協同病院でPCI治療前にOCTを施行し得た227人のNSTE-ACS患者を対象とした。NSTE-ACSの診断は、臨床症状、心筋トロポニン上昇、及び心電図

診断から成された。血中クレアチニン値が2.0mg/dLより高値の高度腎機能障害症例、OCTカテーテルが通過困難であった症例、OCT画像が不鮮明な症例を除外した。また心筋トロポニン値がPCI施行前まで上昇傾向のため、PMIと急性冠症候群自体による心筋障害か判定が困難な症例を除外した。最終的に、PCI前にOCTを施行し、心筋トロポニンが安定もしくは下降傾向にありPMIを判定しうる167例を対象とした。

心筋トロポニンはPCI施行前、PCI施行から1時間後、6時間後、20時間後およびピーク値が判定されるまで6時間ごとに測定した。PMIの有無は、近年の論文（Moussa ID, et al. Catheter Cardiovasc Interv 2014;83:27–36）での基準に従い、心筋トロポニンの最大標準限度値（upper limit of normal: ULN）の70倍以上と定義した。最終的にPMI患者48人（29%）のと非PMI患者119人（71%）とを、臨床背景、冠動脈画像所見、およびOCT所見とを比較検討した。

OCT画像解析は、Light Lab imaging社のM2/M3システムおよびSt. Jude Medical社のC7-XRシステムを用いた。OCT画像診断は最小内腔断面積前後15mm、計30mmの範囲で行い、プラーク性状診断は以前の報告に従った。脂質性プラーク角が90度以上かつプラークの線維性被膜70μm未満のものをTCFA（Thin-cap fibroatheroma）と定義した。長期予後はカルテ閲覧などを通して行い、心血管イベントの有無をチェックした。心血管イベントは心血管死、心筋梗塞、致死性不整脈、不安定狭心症による入院と定義した。

＜結果＞

臨床背景、冠動脈画像所見において、高齢、PCIの既往、腎機能障害、冠動脈造影検査上の病変長が非PMI群と比べて有意にPMI群で多く認められた。OCT所見ではTCFA、プラーク破裂が有意に多く、脂質性プラーク長も優位に長かった。PMIを従属因子とした多変量解析では、OCTで定義されるTCFA、脂質性プラーク長、腎機能障害が独立した予測因子であった。

中間値38か月の観察において、2例の心血管死を含む17例で心血管イベントを認めた。Kaplan-Meir法を用いた解析ではPMI群で複合心血管イベントの頻度が有意に多かった。

イベント発生群17例と非イベント発生群150例で比較検討したところ、心血管イベント発生群が非イベント発生群と比べて、PMI及び心筋梗塞の既往がより多かった以外に両群間に有意な差は無かった。Cox比例ハザードモデルを用いた解析では、PMIが心血管イベントを予測する因子であった。

＜考察＞

本研究ににおいて認められたことは以下のとおりである。1）NSTE-ACS症例におけるPMIの頻度は28.7%で、責任病変におけるOCTで定義される不安定プラークのひとつであるTCFAと有意な関連を認めた、２）TCFA、腎機能低下、脂質性プラーク長が多変量解析において独立した規定因子であった、３）長期予後観察において、PMI群は非PMI群と比較して有意に心血管イベントを多く認めた。

OCTで観察される不安定プラークとPMIとの関連については、田中らによる2009年のEuropean Heart Journal誌への報告などがある。しかしながら、NSTE-ACS患者におけるOCTを用いたプラーク性状とPMIとの関連についてはほとんど報告されていない。というのも、NSTE-ACS患者におい

て、急性冠症候群それ自体による心筋トロポニンなどの心筋バイオマーカー上昇と、PCI手技に関連したものとの判別が困難なためである。そのため本研究では、PCI前のトロポニン値が安定もしくは下降傾向にあるNSTE-ACS症例のみを抽出し検討した。PMIの要因について、PCIによりプラークが末梢に飛散することや、冠動脈内血栓化を惹起する因子が遊離することなどが知られている。以前の研究でも、PCI施行前のプラーク性状とPCI後の心筋バイオマーカー上昇との関連が報告されており、本研究におけるOCTでのTCFAと脂質性プラーク長がPMIと関連するとの結果も、今までの報告を裏付けるものである。以上からOCTを用いたプラーク観察は、NSTE-ACS患者におけるPMIリスクの層別化に有用であると思われた。また腎機能低下とPMIとの関連についても、今まで同様の報告がなされており矛盾しない結果と思われた。

本研究ではさらに、NSTE-ACS患者におけるPMI症例では心血管イベントがより多かったことが認められた。PCI後の軽微な心筋バイオマーカー上昇は珍しくなく、安定狭心症におけるPCI後の心筋トロポニン上昇と予後との関連について、今までの報告で明確な関連を示せずにいる。しかしながら、心筋トロポニンなど心筋バイオマーカー上昇が既知の急性冠症候群症例においては、PCI後の心筋トロポニン上昇が予後と関連することについて複数の研究で報告されており、NSTE-ACS症例を対象とした本研究はこれらの報告と矛盾しないと思われた。PCI後の軽度の心筋傷害が直接将来の心血管イベントと関連しているかは未だ不明だが、Niccoliによる2015年のEuropean Heart Journal誌での報告や、米津らによる2016年のInternational Journal of Cardiology誌での報告のように、OCTを用いて責任病変での不安定プラークの存在を明瞭化することにより、将来の心血管イベントのリスクや追加治療の必要性について層別化が可能であると考えられた。例を挙げると、PCI前にTCFAなどの不安定プラークを認めた場合、PMIを予防することが示唆されている抗血小板剤やスタチンなどの薬物治療も検討する必要があると思われた。末梢保護デバイスも選択肢として有用な可能性もあり、場合よってはPCIを回避し至適薬物治療を優先することも一考の余地があると考えられた。

本研究における限界について以下に述べたい。まず症例数が比較的少ない上に、元々の母集団から約20%の症例が除外された後の解析となったことである。次に心血管イベント数が少ないこと、および前述のNiccoliらや米津らによる報告のように、OCT所見と心血管イベントと直接の関連を示せなかったことである。しかしながら上記二つの報告はST上昇型急性心筋梗塞症例を含んでおり、本研究とは母集団が異なることを強調したい。最後にカテーテル挿入など、OCTイメージング手技それ自体による冠動脈プラークへの影響が避けられないことである。

＜結論＞

非ST上昇型急性冠症候群患者において、長期予後と関連し得るPCI後心筋傷害と不安定プラークのひとつであるTCFAとの関連が、OCTを用いることで可能であった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5414　号 | 李　哲民 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　古川　哲史<br>副　査　荒井　裕国、吉田　雅幸 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

安定狭心症に対しては、経皮的冠動脈再建術(PCI)後の血清トロポニン上昇で判断される心筋障害は予後不良の指標となることが知られているが､非ST上昇型急性冠症候群(NSTE-ACS)でのPCI後心筋障害の意義はよくわかっていない。申請者は、光干渉断層像(OCT)を用いてプラーク病変と PCI 後心筋障害の関係、PCI 後心筋障害と予後の関係を検討した。OCT における thin-cap fibroatheroma(TCFA)、破裂したプラーク、脂質プラークの長さが PCI 後心筋障害と関連しており、PCI 後心筋障害は心血管イベントの発症と関連していた。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

NSTE-ACS における PCI 後心筋障害と予後の関係を検討したこと、血管内エコーIVUS と PCI 後心筋障害の関係は知られているが OCT と心筋障害の関係を調べたことが、先駆的である。

２）社会的意義

PCI と冠動脈バイパス手術を比較した検討では、冠動脈バイパス術の方が生命予後が良いことが多くの研究で示されているが、我が国では PCI 術が極めて多く行われている。今回は少なくとも NSTE-ACS では、特定のプラーク性状を示すケースでは、PCI 後心筋障害を起こし、エベント再発生率が高いことから、末梢にバスケットを留置した状態で PCI を施行、冠動脈バイパス術、内科的治療後待機的な PCI を行うなど、他の治療法の検討が必要なことを示すことから、社会的意義は高いと考えられる。

３）研究方法・倫理観

NSTE-ACS ケースで、高度腎機能障害、PCI 前トロポニン上昇、以前の PCI などのケースを除外し、全例に研究デザインを説明し、書面による同意の得られたものに限り研究対象としており、研究方法・倫理観に問題はない。

４）考察・今後の発展性

OCT で TCFA を有する患者では、PCI 後心筋障害やイベント再発を予防するために何をすべきか、例えば冠動脈バイパス手術の優劣、などを検討し、OCT 所見を PCI 適応の指標とすることが

望ましい。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

最終試問では、パワーポイントを用いた発表の後、論文に関する様々な質問を行った。特に、OCT 所見と生命予後の関係、OCT と IVUS との比較、TCFA を有するケースに対する対応、などについて踏み込んだ質問が行われたが、おおむね満足のいく回答が得られた。副査の荒井教授、吉田教授と協議の上、博士（医学）の学位授与に値する学識を十分に有すると判定する。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 石神　淳一 |
| 論文審査担当者 | 主査　平尾　見三<br>副査　三浦　修、伏見　清秀 |
| 論　文　題　目 | Chronic Kidney Disease and Risk for Gastrointestinal Bleeding in the Community: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

目的：透析患者は高い消化管出血のリスクを有することは知られているが、保存期の慢性腎臓病においての消化管出血リスクについてはこれまで研究されていない。

方法：我々は Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study に参加している 11,088 人において、推定糸球体濾過量（estimated glomerular filtration rate (eGFR)）と尿中アルブミンクレアチニン比（urinary albumin-to-creatinine ratio (ACR)）が消化管出血を伴う入院のリスクと関連しているかどうかについて、1996 年から 2011 年にわたって観察研究を行った。

結果：中央値 14 年の観察期間において、686 例の消化管出血を伴う入院が観察された。多因子で補正したコックス比例ハザードモデルでは、eGFR の低い群と ACR の高い群がそれぞれ独立して消化管出血を伴う入院の高リスク因子であった。eGFR ≥90 ml/min/1.73m$^2$と比較し、消化管出血のリスクは eGFR 30-59 ml/min/1.73m$^2$で有意に高く（補正ハザード比、1.51; 95%信頼区間、1.13-2.02）、eGFR<30 ml/min/1.73m$^2$ で最も高かった（補正ハザード比、7.06; 95%信頼区間、3.91-12.76）。ACR<10mg/g と比較し、消化管出血のリスクは ACR10-29mg/g で有意に高く（補正ハザード比、1.36 、95%信頼区間、1.08-1.69）、ACR 30-299mg/g および ≥300mg/g でほぼ 2 倍であった（補正ハザード比、2.13; 95%信頼区間、1.66-2.71; 及び 2.07; 95%信頼区間、1.33-3.22）。これらの関連は年齢、性別、人種にかかわらず同様であり、観察期間中に発生した冠動脈疾患や末期腎不全のイベントで補正しても同様の結果が得られた。

結語:慢性腎臓病はたとえ軽症から中等症であっても消化管出血の独立した高リスク因子であり、診療において留意する必要がある。

＜緒言＞

消化管出血は透析を要する末期腎不全の重要な合併症の一つである。体外循環に使用する抗凝固薬が、消化管出血のリスク要因となっている可能性もあるが、これらの薬剤を使用しない腹膜透析患者や腎移植後患者においても消化管出血のリスクは高いことが知られている。一方、抗血小板薬は末期腎不全患者において頻繁に使用されており、消化管出血のリスクを上昇させている可能性もある。また、腎不全患者において、血小板の機能が低下している可能性があることが報

告されている。

これまでいくつかの研究で透析を要さない保存期の腎不全患者の消化管出血リスクが評価されている。しかし、以前の研究では慢性腎臓病の分類が不明確である場合や、心臓血管手術後の出血リスクのみを解析しており、結果の解釈は限定的であった。また、慢性腎臓病の診断と分類に重要な因子であるアルブミン尿の有無について加味されている研究はこれまで行われていない。本研究では、推定糸球体濾過量（estimated glomerular filtration rate (eGFR)）と尿中アルブミンクレアチニン比（urinary albumin-to-creatinine ratio (ACR)）が消化管出血を伴う入院のリスクと関連しているかどうかについて、一般人口集団で構成された Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) 研究のデータを用いて解析した。

＜方法＞

ARIC 研究は 1987-1989 年の間に米国の 4 つの地域において登録された 45 歳から 64 歳で構成された一般人口集団である。eGFR と ACR の評価は 1996 年から 1998 年にかけて行われ、本研究における観察開始時の基準として使用された。収集された 11,656 人のデータのうち、白人及び黒人以外の人種（n=31）、以前に消化管出血を伴う入院を経験している患者（n=160）、末期腎不全の患者（n=15）、血清クレアチニンもしくはシスタチン C のデータが欠損している場合（n=320）を除外し、残った 11,088 人が本研究の解析対象となった。

主要暴露因子は eGFR および ACR である。eGFR は CKD Epidemiology Collaboration equation を用いて計算された。ACR は尿中アルブミン量を尿中クレアチニン量で割ることにより計算された。主要アウトカムである消化管出血を伴う入院は、退院記録の診断コードの中から消化管出血（食道出血、胃十二指腸出血、小腸出血、大腸出血、出血源不明の消化管出血）に関連するものを抽出した。

観察開始時のデータは t 検定とカイ 2 乗検定を用いて比較された。ハザード比はコックス比例ハザードモデルを用いて評価された。モデルは交絡因子（年齢、性別、人種、喫煙歴、アルコール摂取量、体格指数、教育年数、糖尿病の既往、高血圧の既往、冠動脈疾患の既往、がんの既往、胃潰瘍の既往、肝硬変の既往、抗血小板薬の使用、抗凝固薬の使用）で調整された。観察された関連が、年齢、性別、人種によって相互作用をうけるかどうかは尤度比検定を用いて評価された。感度分析として、観察された関連が上部消化管と下部消化管で異なるかどうか評価するため、それぞれ個別に解析を行った。また、観察期間中に発生した冠動脈疾患や末期腎不全のイベントが関連に影響を及ぼしているかどうかを評価するため、観察期間中に発生したイベントを時間依存因子としてモデルに追加し調整を行った。最後に、eGFR と ACR の情報が将来の出血イベントを予測する有用な因子であるかを評価するため、既存の出血予測スコアモデルに eGFR と ACR の情報を加えることによってモデルの予測能が改善するかどうか、C 統計量を使用して評価した。

＜結果＞

中央値 14 年の観察期間中、686 例の消化管出血を伴う入院が観察された。消化管出血を経験した群は経験しなかった群と比較し、年齢が高く、黒人で多く、高血圧・糖尿病・肝機能異常及び冠動脈疾患の罹患率が高かった。また、eGFR が低い群と ACR が多い群では、eGFR が高い群も

しくはACRの低い群と比較し、年齢が高く、高血圧・糖尿病・冠動脈疾患の罹患率が高かった。

観察期間中の補正されていない発生率は人口1000人/年あたり4.9例であった（95%信頼区間、4.5-5.3）。交絡因子で調整したコックス比例ハザードモデルでは、関連はeGFR、ACRともに有意であった。eGFR≥90 ml/min/1.73m²と比較し、eGFR30-59 ml/min/1.73m²の群では消化管出血のリスクが50%高く（補正ハザード比、1.51; 95%信頼区間、1.13-2.02）、eGFR<30 ml/min/1.73m²では7倍リスクが高かった（補正ハザード比、7.06; 95%信頼区間、3.91-12.76）。ACR<10mg/gと比較し、ACR 30-299mg/g および≥300mg/gでは約2倍のリスクで消化管出血の発生が認められた（補正ハザード比、2.13; 95%信頼区間、1.66-2.71及び2.07; 95%信頼区間、1.33-3.22）。また、軽度のACR上昇（10-29 mg/g）でも有意に消化管出血のリスクが上昇していた（補正ハザード比、1.36；95%信頼区間、1.08-1.69）。

慢性腎臓病のガイドラインに準拠した診断分類に基づいて関連を評価した場合、eGFRとACRはそれぞれ独立して消化管出血のリスクに寄与しており、eGFRとACRの消化管出血リスクに対する相互作用は統計学的に有意でなかった。eGFRと消化管出血のリスクの関連は年齢、性別、人種に関わらず一定であった。ACRと消化管出血の関連は、白人と比較して黒人においてやや強かったが、年齢、性別には関わらず一定であった。

感度分析では、観察されたeGFRおよびACRと消化管出血リスクの関連は上部消化管出血、下部消化管出血、および出血箇所不明の消化管出血のそれぞれの解析で一貫して認められた。また、主要解析で調整した交絡因子に加え、さらに観察期間中に発生した冠動脈疾患および末期腎不全を時間依存性交絡因子として補正したモデルにおいても同様の関連が認められた。

最後に、既存の出血リスクの予測モデルにeGFRおよびACRの情報を加えることにより予測能が改善するかどうかを評価した。中等度の腎機能低下（eGFR30-59 ml/min/1.73m²）およびアルブミン尿の存在（ACR ≥30mg/g）をモデルに加えた場合、中等度の腎機能低下の関連の強さは高血圧やアスピリンの使用と同程度であり、アルブミン尿の存在の関連の強さは高齢、脳卒中の既往よりも強かった。既存のモデルに中等度の腎機能低下およびアルブミン尿の存在を加えた場合、出血予測モデルの予測能を有意に改善させた（C統計量の差、0.02; 95%信頼区間 0.01-0.03）。

＜考察＞

本研究では1万人を超える一般人口集団の14年にわたる観察により、eGFRとACRがそれぞれ独立して消化管出血を伴う入院リスクであることを示した。これらの関連は、様々な感度分析やサブグループ解析でも一貫して認められた。また、eGFRとACRの情報を追加することにより、既存の出血リスク予測モデルの予測能を改善させることを示した。

上部消化管と下部消化管の病態生理は異なることが知られているが、本研究では慢性腎臓病と出血リスクの関連は出血の部位に関係なく一貫して認められた。末期腎不全では、蓄積した尿毒素が血小板の作用や消化管粘膜に悪影響を及ぼし出血リスクを高めると考えられている。これまで報告されている研究では、主に進行した腎不全のみが解析の対象となっていたが、本研究ではたとえ末期腎不全を呈していない軽度から中等度のeGFRの低下でも消化管出血のリスクは有意に高まることが示された。

本研究はアルブミン尿と消化管出血のリスクの関連を示した初めての研究である。アルブミン

尿が出血リスクを上昇させる背景はよく解明されていないが、アルブミン尿の存在は出血性脳梗塞や虚血性脳梗塞後の脳出血のリスク因子であることが知られている。動物実験ではアルブミン尿の存在が内皮細胞の障害を反映することが示されており、内皮細胞が障害されることにより凝固機能に異常をきたしている可能性は考えられる。アルブミン尿と出血リスクを関連付ける病態生理は今後の研究を要する。

本研究は、いくつかの臨床的意義を示す。まず、たとえ軽度から中等度の慢性腎臓病であっても出血リスクを念頭に置く必要がある。これまでの出血リスクの予測モデルのほとんどは進行した腎不全のみをリスク因子としていた。また、本研究でアルブミン尿が腎機能とは独立した重要なリスク因子であることを示したが、アルブミン尿の存在は既存の出血予測モデルで加味されていない。アルブミン尿は高血圧や糖尿病のガイドラインで定期的な評価が推奨されており、情報が入手可能な場合は、出血リスクの評価に際し、有用に使用されるべきと考えられる。

＜結論＞

中高年の白人及び黒人で構成された一般人口集団において、低 eGFR と高 ACR はそれぞれ独立した消化管出血を伴う入院のリスク因子である。慢性腎臓病がたとえ軽症から中等症であったとしても、消化管出血のリスクに留意が必要である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5415　号 | 石神　淳一 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　平尾　見三<br>副　査　三浦　修、伏見　清秀 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は推定糸球体濾過量または尿中アルブミンクレアチニン比と消化管出血による入院頻度との関連の統計解析結果より、慢性腎臓病はたとえ軽症から中等症であっても消化管出血の独立した高リスク因子であることを示した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

透析患者の高い消化管出血リスクは知られているが、保存期慢性腎不全においては不明である。このような状況において、申請者は米国の ARIC（Atherosclerosis Risk in Communities）研究登録者薬 1 万人の 15 年間の臨床データを用いて、慢性腎臓病と消化管出血との関連を調べており、その着眼点は評価に値する。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．11088 例中、15 年間で 688 例の消化管出血が観察された。

２．多変量コックス比例ハザードモデルの解析では、低 eGFR と高 ACR がそれぞれ独立リスク因子であった。

３．出血リスクの補正ハザード比は eGFR<30ml/min/1.73m$^2$で 7.06、ACR>300mg/g で 2.07 と高かった。

これは日常診療においても留意すべき臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

申請者は米国の ARIC 研究の 11088 人の 1996 年～2011 年のデータを用いて,推定糸球体濾過量(eGFR)および尿中アルブミンクレアチニン比(ACR)と消化管出血入院リスクとの関連を調べた。研究遂行にあたっては、海外の研究所において、多数患者の 15 年間にわたる膨大なデータを統計解析していく手法を取った。申請者の研究方法に対する知識・技術・意欲が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な企画・準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに研究者は、本研究結果について保存期慢性腎不全でも消化管出血リスクが高いため診療上注意が必要であるものと考察し、その病態生理の詳細は不明ではあるが高血圧、血小板機能異常、内皮障害等の関与の可能性があることを提唱している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。今後の研究課題とした。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小林　大介 |
| 論文審査担当者 | 主査　山岡　昇司<br>副査　中村　桂子、鈴木　敏彦 |
| 論　文　題　目 | Detection of a novel putative phlebovirus and first isolation of Dugbe virus from ticks in Accra, Ghana |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

マダニはヒトや動物に多様な病原体を媒介する外部寄生虫である。とりわけ、マダニ媒介性ウイルスによって引き起こされる新興・再興感染症が、世界各地の公衆衛生上の大きな問題となっている。しかしながら、サブサハラアフリカ地域の多くの国々においては、マダニ媒介性ウイルス感染症の疫学情報が乏しく、それら感染症の流行実態は不明である。本研究では、2015 年にガーナ首都アクラとその近郊を含めた 3 調査地点において、医学的に重要なマダニ媒介性ブニヤウイルスの検出を行うため、マダニのサーベイランスを行った。採集調査の結果、調査地のイヌやウシからオウシマダニ属 *Rhipicephalus* やキララマダニ属 *Amblyomma*、チマダニ属 *Haemaphysalis* に属する多様なマダニが採集された。それら採集マダニのうち、オウシマダニ属のマダニからフレボウイルス様新規ウイルスが検出され、さらに、*Am. variegatum* からダグビーウイルスの分離に成功した。これらの知見は、クリミア‐コンゴ出血熱ウイルスを除けば、ガーナにおけるマダニ媒介性ウイルスに関する初めての報告である。

＜緒言＞

マダニはウイルス、細菌や原虫などの病原体をヒトや動物に媒介する重要な媒介動物である。近年、Bourbon virus、Heartland virus や重症熱性血小板減少症候群ウイルスなどのマダニ媒介性の新興ウイルスが世界各地で発見されている。一方で、半世紀以上前に報告されているクリミアーコンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)やダニ媒介性脳炎ウイルスについても、感染者数の増加やウイルスの分布域の拡大が報告されており、再興ウイルス感染症として世界的な問題となっている。しかしながら、サブサハラアフリカ地域においては、回帰熱や African tick-bite fever などマダニ媒介性の細菌感染症の知見は多いものの、マダニ媒介性ウイルス感染症に関する情報は乏しく、それらの流行実態は不明である。

西アフリカに位置するガーナ共和国は、その国内にウイルスのベクターとなりうる多くのマダニが分布しており、マダニからの CCHFV 検出例が報告されているものの、ヒトにおけるマダニ媒介性ウイルスの感染例はこれまで報告されていない。実際に近隣国では、Bhanja virus やダグビーウイルス(Dugbe virus; DUGV)などのマダニ媒介性ウイルスのヒトや動物における感染例が確認

されている。

本研究では、ガーナ共和国グレーター・アクラ州内に設定した首都アクラおよびその郊外の 3 調査地点において、マダニ媒介性ウイルスの分布やその感染リスクの調査を目的としたマダニのサーベイランスを行った。

＜方法＞

2015 年 9 月にガーナ共和国グレーター・アクラ州の Mobore、Pokuasi、Korle Gonno の 3 地点において、各調査地のイヌやウシからマダニの採集を行った。採集されたマダニは、属あるいは種、発育ステージ、雌雄ごとに最大 17 頭を 1 プールとして集約し、ウイルスの検出ならびに分離を行った。マダニプールを培地中で破砕した後に、フィルターろ過液から total RNA を抽出し、マダニ媒介性の重要なウイルスであるナイロウイルスおよびフレボウイルスそれぞれのユニバーサルプライマーを用いて RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出を行った。また、RT-PCR 陽性プールからダイレクトシークエンスを行い、分子系統解析に用いる塩基配列を決定した。マダニからのウイルス分離においては、前述のフィルターろ過液を BHK-21 細胞（シリアンハムスター腎臓由来）に接種し、盲継代後に細胞変性効果(CPE)を指標に、ウイルスの分離を試みた。分離されたウイルスを同定するため、培養上清から total RNA の抽出を行い、同様の方法でウイルス遺伝子の検出ならびにシークエンスを行った。さらに、ナイロウイルスおよびフレボウイルス以外のウイルスも網羅的に同定するため、次世代シークエンサーIon PGM system により、培養上清に含まれるウイルスゲノムの存在を確認した。また、シークエンスによって得られたウイルスゲノム配列を用いて、Clustal W による近縁ウイルスとのアラインメントを行い、MEGA ver.7 を用いた近隣結合法により系統樹を作成し、分子系統学的解析を行った。

＜結果＞

マダニ採集の結果、合計 153 頭のマダニが調査地のイヌやウシから採集された。これらのマダニを 29 プールに集約し、ウイルス遺伝子の検出を行った。その結果、Mobore で採集された *Am. variegatum* の 2 プールがナイロウイルス陽性であり、また Pokuasi ならびに Korle Gonno で採集されたオウシマダニの計 4 プールがフレボウイルス陽性であった。ダイレクトシークエンスにより、これらフレボウイルス陽性プールのうち 2 プールで 487 塩基のウイルスゲノム配列が確認され、暫定的に Odaw virus (ODWV)と命名した。分子系統解析の結果、ODWV はダニ媒介性フレボウイルスの中で、未分類のウイルスグループ(unclassified group)と同一クラスターを形成し、そのうちギリシャの *Rhipicephalus sanguineus* から検出された Antigone virus (ANTV)と最も近縁であることが判明した。

また、ウイルス分離においては、ナイロウイルス陽性であった Mobore で採集された *Am. variegatum* の 1 プールで激しい CPE が観察され、培養上清からのウイルス遺伝子検出ならびに分子系統解析の結果、分離されたウイルスは DUGV と同定された。また、次世代シークエンサーによるウイルス分離培養上清を用いた網羅的解析の結果、その他のウイルス配列は確認されなかった。

＜考察＞

本研究においてマダニから検出された ODWV は、イヌから採集した飽血ダニが含まれるプールから検出されたため、本ウイルスがイヌの血液由来のウイルスであるのか、あるいはマダニ由来のウイルスであるのかは不明であり、また、イヌに感染性のあるウイルスか、またはマダニ特異的なウイルスであるのかといったマダニ媒介性ウイルス以外の可能性も排除できない。ODWV と近縁であるフレボウイルスの unclassified group は、近年、世界各地のマダニから相次いで発見されている。しかしながら、これまでの報告において、それら unclassified group に属するウイルスは、ウイルスゲノムの M セグメントが確認されておらず、またウイルス分離株も得られていない。その一方で、それらウイルスは宿主マダニのゲノム由来の配列ではないということが確認されており、ODWV に最も近縁な ANTV においても DNA フォームの存在は否定されている。本研究では ODWV は分離されておらず、さらに ODWV の DNA フォームの確認も行っていないため、今後は ODWV を含めたフレボウイルス unclassified group の感染動態の理解や公衆衛生上の重要性を評価するためにも、さらなる研究が必要であると考えられた。

本研究において分離された DUGV は、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属のナイロビ羊病の血清群に属するウイルスであり、これまでにヒトへの感染例も数例報告されている。本ウイルスは 1964 年にナイジェリアで *Am. variegatum* から初めて分離され、その後、ナイジェリア以外に少なくともアフリカ域内の 9 か国(セネガル、カメルーン、中央アフリカ共和国、エチオピア、スーダン、ウガンダ、チャド、ケニア、エジプト)において分布が確認されている。しかし、ガーナにおける報告はなく、本研究はガーナでの DUGV 分布の初報告となった。先行研究において DUGV は、*Am. variegatum* やウシから分離されており、さらにウシの血清から本ウイルスの抗体が確認されている。また、DUGV は *Am. variegatum* において、効率的に増殖することも確認されていることから、自然界においては、*Am. variegatum* が DUGV のベクターであり、ウシが自然宿主であると考えられる。そのため、本研究で DUGV を保有しているマダニが採集されたグレーター・アクラ州の農村地域では、家畜と *Am. variegatum* の間で DUGV の感染環が成立していることが示唆された。

現在から約 20 年前の研究報告においては、*Am. variegatum* はガーナ国内中広くウシやヒツジ、ヤギに寄生している普通種のマダニであるとされている。我々が今回行った調査においては、本マダニ種は Mobore (農村地域)では普通種であったが、Pokuasi (都市の辺縁地域)や Korle Gonno (都市部)では採集されていない。そのため、農村や都市などといった環境の差異は、そこに生息するマダニ相だけではなく、それらによって媒介されるウイルス感染症の流行動態に影響を与える可能性があると考えられた。

＜結論＞

ガーナ共和国首都アクラにおいて採集されたマダニから、フレボウイルス様新規ウイルスである Odaw virus の遺伝子を検出した。さらにダグビーウイルスを分離し、同国におけるクリミア - コンゴ出血熱ウイルス以外のマダニ媒介性ウイルスの分布を初めて確認した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5416　号 | 小林　大介 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　山岡　昇司<br>副　査　中村　桂子、鈴木　敏彦 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、西アフリカ・ガーナにて採取したマダニからのフレボウイルス様新規ウイルス検出およびダグビーウイルスの初分離についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

サハラ砂漠南方地域ではマダニ媒介性ウイルス感染症の疫学情報が乏しく、しかも都市部、農村部、その境界部に分けてのマダニの採取、ウイルス検出は過去にほとんど例がなく、独創的で意義深い研究である。

２）社会的意義

マダニ媒介性ウイルスによる新興・再興感染症は世界各地で公衆衛生上の大きな問題となっているにもかかわらず、サブサハラ地域ではこれまでその流行実態が不明であった。

本研究は、

１　都市部、境界部のイヌから採取されたオウシマダニより、フレボウイルス様新規ウイルスを RT-PCR で検出した。

２　農村部のウシよりダグビーウイルスの分離に成功した。

以上の研究成果は、マダニが媒介するウイルスの多様性を示すとともに、熱帯性気候であっても人と動物の分布および地政学的条件によってマダニの分布、したがってウイルスの違いがあることを示唆するという点で、非常に意義深い研究である。

３）研究方法・倫理観

ガーナの首都アクラ周辺の都市部、境界部、農村部で動物からダニを採取し、その抽出液から RT-PCR および細胞変性効果を指標とするウイルス分離を行った。得られた核酸配列は、近縁ウイルスを含む系統樹解析に用いた。本人自身がガーナでのマダニ採取に参加しウイルス分離まで行っており、申請者が研究方法についてじゅうぶんな知識と技術力を有することがうかがえる。

４）考察・今後の発展性

動物に寄生するマダニからのウイルス検出・分離ということで、その自然宿主を含めたウイルスの生活環、ヒトへのリスク評価は今後の課題である。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認めた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 平澤　憲祐 |
| 論文審査担当者 | 主査　荒井　裕国<br>副査　古川　哲史、吉田　雅幸 |
| 論　文　題　目 | Effect of aortic regurgitant jet direction on mitral valve leafletremodeling: a real-time threedimensional transesophageal echocardiography study |

（論文内容の要旨）

<要旨>

慢性大動脈弁閉鎖不全症 (Chronic AR) は僧帽弁弁尖の拡大を引き起こすが、その詳細な機序については未だ不明である。本研究は大動脈弁閉鎖不全症による逆流 jet (AR jet) の方向が僧帽弁構造にもたらす影響について明らかにすることを目的とした。三次元 (3D) 経食道心エコーを施行した連続 69 例の Chronic AR 患者と 17 例のコントロール患者 (control group)に関して解析を行った。僧帽弁前尖 (AML), 僧帽弁後尖 (PML), 僧帽弁輪 (MV annulus) の面積について拡張中期に計測を行った。Chronic AR 患者については AR jet の方向によって後方群 (Group A, n=38)、それ以外の群 (Group B, n=31)に分類した。両群において、control group と比較し総弁尖面積 (Total leaflet area)は有意に大きかった。左室容量, PML 面積, MV annulus 面積については両群で有意差を認めなかったが AML 面積、AML/PML 面積比は Group B と比較し Group A で有意に大きかった ($P < 0.01$)。多変量解析では後方 AR jet は AML/PML 面積比について独立した関連因子であった ($P < 0.01$)。本研究において 3D 経食道エコーにより Chronic AR の jet 方向による僧帽弁構造の差異を明らかにすることが可能であった。これらの結果は Chronic AR における僧帽弁尖リモデリングの機序の理解に有用であると考えられた。

<緒言>

大動脈における弁膜症は高齢化社会において一般的な疾患となりつつある。大動脈弁閉鎖不全症 (AR) は大動脈から左室内への血液の逆流により特徴付けられる。これまでの報告では全人口における AR の有病率は Framingham Heart study で 4.9%, Strong Heart Study では 10%と報告されている。これらの研究では年齢が AR 有病率の独立した因子であり、先進国における有病率の上昇の原因となっている。AR における僧帽弁の拡大がこれまでに報告されている。Beaudoin らは僧帽弁尖の拡大が機能性僧帽弁逆流を抑制することを示し、その機序として左室の拡大に伴う弁尖の拡大が主たる要因であることを推察している。しかし、僧帽弁構造の変化の詳細な機序に関しては不明である。Chronic AR における非対称な僧帽弁尖の変化をしばしば経験することから、我々は大動脈弁逆流ジェット (AR jet)の方向により僧帽弁リモデリングの様式が異なる可能性を考えた。近年 3D 経食道エコーは僧帽弁輪面積や僧帽弁前尖 (AML) 面積, 僧帽弁後尖 (PML) 面積,

僧帽弁口面積など詳細な僧帽弁構造の解析が可能となっている。我々は AR jet 方向が僧帽弁に影響を及ぼし AML の拡大を引き起こすと仮定し、3D 経食道エコーを用いて AR jet が僧帽弁構造に及ぼす影響を解明することを目的とし検討を行った。

<方法>

2012 年 2 月から 2016 年 11 月までに 3D 経食道心エコー図検査を施行した連続 103 例の重症 AR 患者と 17 例のコントロール患者を対象とした。除外基準は解析に耐えない低画質、器質的僧帽弁疾患、感染性心内膜炎、大動脈解離、経皮的バルーン大動脈弁形成術後、人工弁患者とした。明らかな結合組織疾患を有する患者は含まれていなかった。重症 AR 患者群については AR jet 方向により後方 jet 群 (Group A), それ以外の群 (Group B)にさらに分類した。全患者で 2D 及び 3D 経食道エコーが施行されており、僧帽弁の 3D データに関して専用のソフトを用いて解析を行い、拡張末期の僧帽弁輪面積、AML 面積、PML 面積、僧帽弁口面積などを算出した。それぞれのデータに関して Group A, Group B, コントロール群での比較を行った。

<結果>

34 例が除外され、残りの 69 例の重症 AR 患者について AR jet 方向により Group A (n = 38)と Group B (n = 31)に分類した。僧帽弁の解析の結果、AML 面積は Group B と比較し Group A で有意に大きかった。($P < 0.01$) 一方で PML 面積に関しては両群で有意差を認めなかった。($P = 0.08$) AML/PML 面積比、AML/僧帽弁輪面積比は Group B と比較し Group A で有意に大きかった。(それぞれ $P < 0.01$, $P = 0.02$) 多変量解析では後方 AR jet が AML/PML 面積比、AML/僧帽弁輪面積比について独立して相関していた。

僧帽弁口面積に関しては後方 jet 群で小さいという結果となったが、僧帽弁通過血流に有意な差を認めなかった。

<考察>

以前より慢性 AR において僧帽弁尖面積の増大による機能性僧帽弁逆流の抑制が示されている。しかし僧帽弁尖面積の拡大の詳細な機序に関しては不明な点が多く、これまでは左室の拡大とそれに伴う僧帽弁輪の歪みがその原因と推察されていた。近年 3D エコーと僧帽弁解析ソフトの改良に伴い僧帽弁輪面積、総僧帽弁尖面積に加えて AML 面積、PML 面積をそれぞれ測定できるようになっている。本研究の結果、後方 AR jet を有する慢性 AR において PML 面積の拡大を認めない一方で AML 面積の拡大を認めており、非対称な弁尖の拡大が認められ、AR jet の方向によって僧帽弁尖のリモデリング様式が異なることが示唆された。この非対称な僧帽弁尖リモデリングの機序は左室拡大や僧帽弁輪拡大による牽引のみでは説明できず、AR jet による長期の周期的な機械的牽引が僧帽弁前尖のみにリモデリングを引き起こしていると考えられた。AML のサイズは弁輪形成リングのサイズの決定や、僧帽弁形成の成功率に関与することがこれまで指摘されており後方 jet を有する AR 患者では僧帽弁形成の際の詳細な検討を要する。また、僧帽弁前尖の拡大は弁尖の収縮期前方運動 (SAM)の誘因となる可能性があり、左室肥大を認める症例や運動、強心剤による治療を行っている症例については左室流出路狭窄を引き起こす可能性について

考慮する必要がある。

<結論>

3D 経食道エコーにより AR jet の方向の違いによる僧帽弁形態について示すことが可能であった。本研究では偏心性の後方 AR jet では拡張期中期の解析において AML の極端な拡大と僧帽弁開放制限が認められた。この結果は慢性 AR における僧帽弁のリモデリングの機序を理解するために有用であった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5417　号 | 平澤　憲祐 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　荒井　裕国<br>副　査　古川　哲史、吉田　雅幸 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、大動脈弁閉鎖不全症による僧帽弁尖に対するリモデリングに逆流ジェット方向が及ぼす影響に関する 3 次元経食道心エコー図を用いた研究についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

慢性大動脈弁閉鎖不全症 (Chronic AR) は僧帽弁弁尖の拡大を引き起こすが、その詳細な機序については未だ不明である。一方で、近年 3D 経食道エコーは僧帽弁輪面積や僧帽弁前尖面積, 僧帽弁後尖面積, 僧帽弁口面積など詳細な僧帽弁構造の解析が可能となっている。

申請者らは、AR jet の方向が僧帽弁のリモデリングに影響を及ぼし僧帽弁前尖の拡大様式の違いを引き起こすと仮定し、AR jet が僧帽弁構造に及ぼす影響を 3D 経食道エコーを用いて解明した。その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は、以下の通りである。

1. AR jet の方向に関わらず、control group と比較し総弁尖面積 (Total leaflet area)は有意に大きかった。
2. 左室容量, 後尖面積, 僧帽弁輪面積については AR jet の方向による有意差を認めなかったが、前尖面積、前尖/後尖面積比は、後方 AR jet 群で有意に大きかった ($P < 0.01$)。
3. 多変量解析では、後方 AR jet は前尖/後尖面積比と前尖/僧帽弁輪面積比について独立した関連因子であった ($P < 0.01$)。

以上のように申請者らは、3D 経食道エコーを用いて AR jet の方向の違いによる僧帽弁形態の違いを示した。偏心性の後方 AR jet において、前尖の極端な拡大と僧帽弁開放制限が認められ、この結果は慢性 AR における僧帽弁のリモデリングの機序を理解するために臨床的に有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究は、本学関連病院において 2012 年 2 月から 2016 年 11 月までに 3D 経食道心エコー図検査を施行した 69 例の重症 AR 患者と 17 例のコントロール患者を対象として、近年発達した 3D 経

食道エコーの僧帽弁解析ソフトを用いて僧帽弁輪面積や僧帽弁前尖面積，僧帽弁後尖面積，僧帽弁口面積など詳細な僧帽弁構造の解析を行った。本手法は、充分な臨床的手法の裏付けのもとに遂行されており、申請者の知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が周到な準備の上に行われてきたことが窺える。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果より、後方 AR jet を有する慢性 AR において、非対称な弁尖の拡大が認められ、AR jet の方向によって僧帽弁尖のリモデリング様式が異なることを示した。僧帽弁前尖のサイズは弁輪形成リングのサイズの決定や、僧帽弁形成の成功率に関与することがこれまで指摘されており、後方 jet を有する AR 患者では僧帽弁形成の際の詳細な検討を要することが示唆された。また、僧帽弁前尖の拡大は弁尖の収縮期前方運動の誘因となる可能性があり、左室肥大を認める症例や運動、強心剤による治療を行っている症例については左室流出路狭窄を引き起こす可能性について考慮する必要性を示している。以上の観点から、今後、後方 AR jet を有する慢性 AR 症例の外科治療成績の向上において、本研究結果の有用性が期待される。

**３．その他**

特記すべきことなし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 稲村　幸洋 |
| 論文審査担当者 | 主査　内田　篤治郎<br>副査　荒井　裕国、根本　繁 |
| 論　文　題　目 | Early repolarization and positive T-wave alternans as risk markers for life-threatening arrhythmias in patients with vasospastic angina |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

冠攣縮性狭心症患者は致死的不整脈の出現リスクが高いことが知られており、いくつかの致死的不整脈リスク因子との関連が報告されているが、詳細を検討した報告は少ない。今回冠攣縮性狭心症における致死的不整脈の出現と非胸痛出現時における 12 誘導心電図の早期再分極・Holter 心電図における T-wave alternans(TWA)の関連について検討した。横浜南共済病院において胸痛を主訴に受診し、器質的冠動脈狭窄が否定された胸痛症候群に対し冠攣縮症疑いでアセチルコリン負荷試験を行った連続 116 症例を対象とした。それぞれをアセチルコリン陽性群(n=66)と陰性群(n=50)にわけ、非胸痛出現時における早期再分極と TWA 値について検討した。結果冠攣縮性狭心症患者は有意に早期再分極と TWA 陽性(TWA>65μV)を認め、多変量解析において早期再分極と TWA 陽性は冠攣縮性狭心症の独立した危険因子であった。また、早期再分極と TWA 陽性を両者ともに認める症例は有意に致死的不整脈の出現リスクが多かった。上記より冠攣縮性狭心症に伴う致死的不整脈のリスクマーカーとして早期再分極と TWA は有用である可能性が示唆された。

＜諸言＞

冠攣縮性狭心症(VSA)は冠動脈の攣縮を原因として ST 上昇を伴う胸痛をきたす疾患であり、特に前駆症状なく安静時に突然胸痛をきたすのが特徴である。しばしば急性冠閉塞に伴い致死的不整脈や完全房室ブロックを併発する。横浜南共済病院は VSA 患者においては心臓電気生理検査で心室性不整脈が誘発しやすく、また安静時 12 誘導心電図での QT 間隔のばらつきが多いこと、また安静時 Holter 心電図での TWA が VSA 患者において高値であることを今までに報告してきた。QT 間隔のばらつきや TWA は心室筋における再分極過程の異常を示すよいマーカーであることが証明されていることから、VSA は非発作時においても心室筋の再分極過程に何らかの異常を認め、それにより安静時における致死的不整脈を起こす素因があることを提示してきた。

12 誘導心電図における早期再分極(Early repolarization:ER)所見は健康な若年の人に散見される所見であることから、いままでは良性所見と考えられてきた。しかし Aizawa らは下側壁誘導の ER は特発性心室細動患者において認められることが多いことを報告した。特に心電図波形上下側壁誘導における ST 部の形態が水平型/下方向型に上昇しているものは心臓突然死と深く関連があ

る可能性が示されている。この ER の所見は Brugada 症候群、急性心筋梗塞、たこつぼ型心筋症でも認められ、それゆえ下側壁誘導の ER は致死的不整脈と深い関連があるのではないかと考えられている。ER の原因として心室筋の脱分極過程の異常、再分極過程の異常のいずれの報告もあり、現時点で明確な答えは出ていない。

Oh らは 2013 年に VSA において ER は心臓突然死や致死的不整脈のリスク因子になりうることをはじめて報告した。今回の研究は VSA 患者における安静時における ER や TWA を評価し、致死的不整脈との関連を検討した。

＜方向＞

横浜南共済病院において 2010 年から 2014 年 4 月までに胸痛を主訴として VSA を疑いアセチルコリン負荷を疑った連続 116 症例を対象とした。アセチルコリン負荷試験が陽性であったものを VSA 群(n=66)として、陰性であったものをコントロール群(n=50)として 2 群に分けて検討した。患者背景として元々脚ブロックがある症例、WPW 症候群の症例は除外した。アセチルコリン負荷検査の少なくとも 3 日前にはすべての冠血管拡張薬やカルシウム拮抗薬は中止とした。冠動脈造影検査は午前 9 時前後に開始とし、冠動脈に有意狭窄のないことを確認後、はじめに左冠動脈に 20μ からアセチルコリンを冠動脈内投与、攣縮が誘発されなければ 50μg、100μg と順々に投与量を増加し順次投与した。冠攣縮が誘発されれば自然に攣縮が解除されるのを待ち、その後右冠動脈に 20、50、70μg と冠攣縮が誘発されるまで順に投与し 3 枝の冠動脈すべてにおける冠攣縮を評価した。冠攣縮の陽性基準は完全閉塞もしくは ST 変化を伴う 99%狭窄とした。ER の定義は J 点(QRS 末端から 2mm)における 1mm 以上の slur もしくは notch 型の ST 上昇が ⅡⅢaVF、V5-6 誘導の少なくとも 2 誘導以上で認めるものとした。アセチルコリン負荷後の ER の変化は冠攣縮誘発が確認されたタイミングもしくは誘発が陰性ならアセチルコリン投与 60 秒後の心電図で評価した。検査前の安静時心電図の ER と、検査中の J 点の ST 変化を検討した。TWA はアセチルコリン負荷検査前の Holter 心電図における modified moving average analysis of T-wave alternans(MMA-TWA)を解析した。VSA 群で 41 例、control 群で 27 例が Holter 心電図を行っており、TWA の値が 65μV を超えるものを陽性と定義した。VSA と診断された患者には何らかの冠血管拡張薬もしくはカルシウム拮抗薬を投与し外来でフォローとし、致死的不整脈の有無は心電図やモニターなどで心室頻拍や心室細動が診断前もしくは follow up 期間に捕えられているものを対象とした。明らかに胸痛後に失神した症例であっても、心電図が捕えられていないものは虚血に伴う血圧低下や房室ブロックなどの可能性もあるため致死的不整脈の群には入れないものとした。各項目について VSA 群と control 群で比較検討を行った。

＜結果＞

安静時心電図において VSA 群は control 群と比較し有意に ER の出現率が多く(36% vs 12% P=0.031)、特に VSA 群は有意に水平型/下方向型の ER が多かった(P=0.001)。また、VSA 群は有意に TWA 陽性が多く(44% vs 11%P=0.006)、ER と TWA 陽性をともに満たす 9 症例はすべてアセチルコリン陽性であった。アセチルコリン負荷中は、VSA 群で 7 例が新規 ER 出現を認め、control 群は 1 例も認めなかった(P=0.018)。また J 点の ST amplitude は負荷前心電図において VSA 群で有

意に高く(0.60±0.80mV vs 0.18±0.54 P=0.024)、負荷中心電図は control 群は J 点の ST 上昇を認めなかったが(0.18→0.20mV、P=0.841)、VSA 群では有意な ST 上昇を認めた(0.60→1.01mV、P=0.024)。単変量解析では男性、安静時心電図の ER、水平型/下方向型の ER、TWA 陽性が VSA 群で有意に多く、多変量解析では安静時心電図の ER と TWA 陽性が独立した VSA の危険因子であった(P=0.037 P=0.025)。

また、アセチルコリン誘発検査において 2 枝以上冠攣縮が誘発された群は、1 枝のみ冠攣縮が誘発された群と比較し有意に安静時心電図の ER が多かった(P=0.024)が、TWA 陽性は有意差を認めなかった(P=0.923)。

全 116 症例中、3 例で致死的不整脈(多型性心室頻拍もしくは心室細動)がモニター心電図や AED の記録などで確認されている。3 例はすべての症例で安静時心電図の ER と TWA 陽性を認め、致死的不整脈を認めない VSA 陽性群と比較すると、ER と TWA 陽性を両者ともに有する症例は有意に致死的不整脈を有する VSA 症例において有意に多いことがわかった(100% vs 15.8% P<0.001)。

＜考察＞

今回の結果をまとめると、①VSA の患者はアセチルコリン陰性の胸痛症候群の患者と比較し有意に安静時心電図の ER 出現率と TWA 陽性が多い、②安静時心電図の ER と TWA 陽性は VSA の独立した危険因子である、③2 枝以上冠攣縮が誘発された群は 1 枝のみ冠攣縮が誘発された群と比較し有意に安静時心電図の ER が多い、④安静時心電図の ER と TWA 陽性の両者の共存は VSA における致死的不整脈の強力なリスク因子となりうる、が主な論点である。

Oh らは VSA 患者において下側壁誘導における ER が VSA 患者に多いことを報告した。この研究は患者群が VSA 患者のみであり、我々の研究とは患者対象が異なるが我々の結果も VSA 患者において ER が有意に多いことで一致している。また、我々の研究では安静時心電図の ER と TWA 陽性は VSA の独立した危険因子であり、今回の研究では両者の共存は VSA の陽性的中率が 100%となった。このことからこれらのパラメーターは非侵襲的検査でありながら胸痛患者の VSA 診断の手助けになる可能性が考えられた。

VSA 群においてはアセチルコリン負荷中の J 点の ST 上昇は誘発された冠攣縮の虚血領域に一致して変化していた。対してコントロール群においてはアセチルコリン負荷での有意な J 点の ST 上昇は認めなかった。このことから J 点の ST 変化の原因としてアセチルコリンそのものの効果ではなく虚血に伴う変化と考えられた。また 2 枝以上冠攣縮が誘発された群では有意に安静時心電図の ER が多かったことから ER は虚血に伴う心筋障害が関連している可能性が考えられた。一部の報告によれば ER(以前 J wave と呼ばれていたもの)は心室筋の心内膜と心外膜の再分極過程の電位差から生じるといわれており、心筋虚血に伴う障害がこれらの電位差を生じている可能性が考えられる。

TWA はいくつかの報告から心筋の再分極過程の異常を示すマーカーであることが証明されており、致死的不整脈のリスクマーカーとなりうることが知られている。以前我々の施設では VT を有する VSA 患者は TWA が高値であり、カルシウム拮抗薬の内服で TWA が低下することを報告した。今回の症例においても、VSA 診断後に内服管理中の患者が心室細動をきたした症例では

TWA は高値のままであった。

今回は患者数が少ないため統計学的に意義のある報告はできないが、それでも安静時心電図の ER と TWA 陽性が共存する患者 9 例はすべて VSA 群であり、そのうちの 3 例は致死的不整脈が捕えられている。このことから安静時心電図の ER と TWA 陽性の共存は VSA 患者における致死的不整脈のリスク因子となりうると考えられる。ただし致死的不整脈を有した 3 症例中 2 症例は ER 波形が上方向型であり、従来の報告で言われているような水平型/下方向型の ER と致死的不整脈の関連は指摘できなかった。

＜結論＞

VSA 患者は安静時心電図の ER と TWA 陽性が独立した危険因子であり、特に多枝 VSA において安静時心電図の ER 出現頻度が高かった。また安静時心電図の ER と TWA 陽性の共存は VSA 患者における致死的不整脈のリスクとなりうることが示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5418　号 | 稲村 幸洋 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　内田　篤治郎<br>副　査　荒井　裕国、根本　繁 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、冠攣縮性狭心症患者（VSA）において早期再分極と T-wave alternans（TWA）陽性を認める割合が高いことを、器質的冠動脈狭窄が否定された胸痛症候群患者を対象として検討した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

VSA は、冠動脈の攣縮により ST 上昇を伴う胸痛をきたす疾患であり、しばしば致死的不整脈や完全房室ブロックを併発する。申請者が所属する横浜南共済病院のグループでは、VSA 患者の安静時ホルター心電図での TWA が高値であることを今までに報告し、VSA は非発作時においても心室筋の再分極過程に異常を認め、それにより致死的不整脈を起こす素因があることを示してきた。

一方、12 誘導心電図における早期再分極（ER）は、最近の報告で特発性心室細動患者において認められる頻度が高いことや、Brugada 症候群、たこつぼ心筋症などでも認められることが報告されている。そこで、申請者らは、VSA においても、度重なる冠動脈スパズムなどにより、心筋内で再分極過程に変化が生じるような状態が形成されており、そういった変化が致死的不整脈の発生と関連しているのではないか、という仮説を立てた。本研究では VSA 患者と、非 VSA 胸痛症候群患者における安静時の ER 所見陽性の頻度や TWA の有無を比較し、致死的不整脈発症との関連を検討した。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

（１）　VSA の患者では下側壁誘導における ER 出現率と TWA 陽性率が高い。

（２）　2 枝以上冠攣縮が誘発された症例では、1 枝のみの患者と比較して安静時心電図における ER 出現が高頻度にみられる。

（３）　安静時心電図において ER と TWA が両方みとめられる場合、致死的不整脈の強力なリスク因子となりうる。

以上のように、本研究では、VSA 患者における ER 出現、TWA 所見陽性所見について、致死性不整脈出現リスクの評価上有用であるという結論に至っている。ER の検出や TWA の解析は非侵

襲的で、臨床的実用性のある検査法である可能性が示唆され、有用な研究成果であるといえる。

３）研究方法・倫理観

研究では、横浜南共済病院において、器質的冠動脈狭窄を否定された胸痛症候群に対して冠動脈攣縮疑いでアセチルコリン負荷試験を行った連続 116 症例を対象とし、同試験陽性の VSA 群(n＝66)と陰性群(n＝50)の 2 群に分け、安静時心電図上の ER 要請所見と TWA 要請所見の有無について比較検討を行った。ER の判定は、心電図における J 点（QR 末端から 2mm）における 1 ㎜以上の slur もしくは notch 型の ST 上昇が、II・III・aVF, V5-6 誘導の少なくとも 2 誘導以上で認めるものとし、TWA は、アセチルコリン負荷試験前の modified moving average analysis of T-wave alternans (MMA-TWA)を解析し、65μV を超えるものを陽性と定義した。2 群間の比較には、Welch t test が用いられ、カテゴリー変数の比較においては、$\chi^2$ 検定が用いられた。冠攣縮の独立因子を検討する目的で、多変量ロジスティック回帰分析が用いられた。VSA と診断された患者では何らかの冠血管拡張薬もしくはカルシウム拮抗薬を投与し、外来フォローとし、本研究が極めて周到な準備と正確な方法論によって行われてきたことがうかがわれる。

４）考察・今後の発展性

今回の申請者らの研究においては、安静時心電図の ER 陽性、TWA 陽性は VSA の独立した危険因子であり、両者の共存は VSA の陽性的中率が 100%となった。このことから、これらのパラメーターは、非侵襲的検査でありながら、胸痛患者の VSA 診断の手助けになる可能性が示唆された。

研究のデザイン上、単施設研究であること、被検者の数が少ないことが研究の限界となっているが、現段階では、TWA の評価ができる施設はまだ少ないという状況である。今後より多くの施設でこれらの方法が普及し、今回の結果が検証されれば、VSA の診断に役立てられるものと期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | KAMPAN NATNICHA |
| 論文審査担当者 | 主査　柴田　俊一<br>副査　井関　祥子、森　弘樹 |
| 論　文　題　目 | The malaris muscle: its morphological significance for sustaining the intraorbital structures |

（論文内容の要旨）

**Introduction**

Orbicularis oculi muscle is composed of the orbital, palpebral and lacrimal parts, and has been investigated to ascertain the anatomical relation to facial aging, especially its orbital part (Oo). The Oo is generally described surrounding the palpebral part which spreads its fibers across the eyelids. The Oo arises from the nasal process of the frontal bone, the frontal process of the maxilla and the medial palpebral ligament. The Oo has also been generally accepted that its outermost muscle fibers usually extend to adjoin with the muscles of the periorbital regions particularly in the region inferior to the Oo. Previous studies on the distinct muscle bundles frequently found inferior to the Oo have described various definitions including the malaris muscle. Therefore, this study aims to examine in detail these muscle bundles in the region inferior to the Oo. The nerves innervating the midfacial muscles were also analyzed in detail to classify the midfacial muscles. In addition, in order to clarify the function of the muscle bundles inferior to the Oo related to facial aging, the sagittal histological sections were also examined.

**Materials and Methods**

We studied twelve head regions of Japanese cadavers (age range from 56 to 97 years, average age 82.5 years old). The 22 halves of the heads were used for the macroscopic investigation. The muscles, especially those in the region between the forehead and the upper lip, were carefully dissected to examine the muscle bundles around the Oo with special reference to additional muscles bundles and their variations. After the dissections of the facial muscles, six halves of the heads were further dissected from the inner surfaces to examine the patterns of facial nerve branches under the operating microscope.

Histological examinations were performed in two halves of the heads to investigate the relationship between the muscle bundles inferior to the Oo and the intra-orbital structures. We sagittally sliced these heads at the region of the mid medial third of the inferior orbital region. These specimens were embedded in paraffin, sliced into 5μm thick sections and then stained with Elastica van Gieson stain.

## Results

### *Macroscopic observations of the Oo and the neighboring muscles*

The muscle bundles consisting of lateral, medial and U-shaped suspending bundles were observed in the region inferior to the Oo. The lateral bundles were observed in all specimens. These lateral bundles arose obviously from the superficial temporal fascia, then ran inferiorward and adjoined with ZMi in all specimens, and with ZMj in 14 of 22 specimens. Some bundles were observed to run inferiorly towards the platysma muscles in eight of 22 specimens.

The medial bundles were noticed in nine of 22 specimens. These medial bundles ran inferiorly and adjoined with the LLSAN and/or the LLS. The medial bundles from the frontal process of the maxilla and from the medial palpebral ligament were observed in four of nine specimens and in four of nine specimens, respectively. Furthermore, some bundles were found to run across the medial palpebral ligament and to connect with the frontal belly of the occipitofrontalis (FB) in seven of nine specimens. Moreover, it was interestingly observed that the medial bundles were adjoined only to the FB in two of nine specimens.

In all specimens, the U-shaped muscle bundle adjacent to the inferior border of the Oo was constantly recognized; we termed this the suspending bundle in order to simplify notation. The lateral attachment of the suspending bundle was derived from the superficial temporal fascia in all specimens, whereas the medial attachments were derived from the frontal process of the maxilla in all specimens and the medial palpebral ligament in 15 of 22 specimens. Regarding the medial bundles, as previously described, the suspending bundles also adjoined with the FB in 15 of 22 specimens.

### *Innervation patterns of the Oo and the neighboring muscles*

Temporal branches of the facial nerve ran superomedially to innervate the lateral part of the orbicularis oculi muscle, and the zygomatic branches of the facial nerve ran medially to innervate the medial part of the muscle. Some of the temporal branches ran superiorly to innervate the lateral bundles and the lateral parts of the suspending bundle and the Oo. It was noted that a few branches innervating the lateral bundles passed through the bundles to innervate the suspending bundle and the Oo.

Most of the zygomatic branches ran medially to innervate the midfacial proper muscles including LLSAN, LLS, ZMi and ZMj from their inner surfaces. Some of these branches penetrated their muscles to innervate the medial bundles and the suspending bundle, and then a few of these branches penetrated the suspending bundle again to innervate the medial part of the Oo.

### *Histological observations of the sagittal sections of the mid medial third of the inferior orbital region*

In these sections, the intra-orbital fat tissue was protruding anteriorly, and the suspending bundle was observed inferior to the orbital septum. Although the Oo was thin and weak, the suspending bundle was relatively thick. In one specimen, the cheek fatty tissue was protruding superiorly, and the superior end of the fatty tissue was situated between the suspending bundle and the inferior margin of the orbit of the maxilla.

**Discussion**

This study revealed extra muscle bundles located in the region between the inferior margin of the Oo and the proper midfacial muscles including ZMi, ZMj, LLSAN and LLS. Henle (1858) and Lightoller (1925) reported that the medial and lateral bundles of the malaris muscle are observed within this region. Subsequently however, both muscle bundles of the malaris muscle were not described altogether within the same research. Interestingly, the suspending bundle adjacent to the inferior part of the Oo in this study was observed in all specimens. Since the suspending bundle in this study ran between the attachments of the medial and lateral bundles, thus the suspending bundle could be regarded as the identical muscle complex composed of the malaris muscle.

According to the morphology and the stepwise innervation patterns, the malaris muscle comprising three muscle bundles should be an independent muscle from the orbicularis oculi muscle, and it is considered as the transitional muscle group between the Oo and the proper midfacial muscles.

The protrusion of the intraorbital fat has been reported to be caused by various factors including orbital fat prolapse, loss of skin elasticity as well as laxity of the orbicularis oculi muscle. Histological sections in this study suggested the Oo becoming thinner than the other muscle structures, whereas the suspending bundle seemed relatively thicker than the Oo. According to the positional relationships between the suspending bundle and the intra-orbital structures, the role of the suspending bundle could sustain the intraorbital structures and it could make the obvious groove between the suspending bundle and the Oo by herniation of the intra-orbital fat tissues with aging.

In conclusion, the malaris muscle is the muscle group situated inferior to the Oo and composed of three muscle bundles. According to the morphology and the innervation patterns, this muscle group should be an independent muscle from the orbicularis oculi muscle, and it is considered as the transitional muscle group between the Oo and the midfacial proper muscle group, including ZMj, Zmi, LLS and LLSAN. The malaris, especially the suspending bundle adjacent to the inferior part of the Oo, is considered to have a role to sustain the intra-orbital structures, and it could make the obvious groove between the suspending bundle and the Oo by herniation of the intra-orbital fat tissues with aging.

（要約）

【背景・目的】

眼輪筋は眼窩部、眼瞼部、涙嚢部より構成され、眼窩部(Oo)は顔の加齢性変化との関係が着目されている。Oo 内側端は前頭骨鼻部、上顎骨前頭突起、内側眼瞼靭帯に付着し、その多くは楕円状に走行するが、下方の近接領域へは細かな筋束が放散する。時折、Oo から大・小頬骨筋など固有の表情筋へ放散する明瞭な筋束群が観察され、malaris muscle と呼ばれている。malaris muscle は内側部(MB)・外側部(LB)により構成されるとの報告がある一方で、LB のみを malaris muscle とする報告、MB を malaris muscle ではない別の筋束とする報告や Oo の一部とする報告などがあり、一貫した定義がなされていない。本研究の目的は、malaris muscle の解剖学的本態とその形態学的意義を明らかにすることである。

【材料と方法】

解剖学実習体 12 体、左右 24 側を用い、肉眼解剖学的(22 側)・組織学的(2 側)に精査した。肉眼解剖学的に解析した 22 側中 6 側は支配神経の解析も行った。

【結果】

LB は全例にみられ、側頭筋膜に付着し、Oo 外縁に沿った後、下方へ放散していた。側頭筋膜から下方へ放散せず Oo 外縁に沿いながら U 字型に走行し、Oo 内側端と共通の付着をもつ筋束(suspending bundle)も全例にみられた。MB は、22 側中 9 側にみられ、Oo 内側端と共通の付着をもち、Oo 外縁に沿いながら下方へ放散していた。MB が存在する例では、suspending bundle が MB と LB を結んでいた。また、顔面神経がこれら筋束群に対し、深層から浅層に向かい、時折筋束を貫きながら、固有の表情筋(e.g.大・小頬骨筋)、MB・LB、suspending bundle、Oo の順に支配枝を分岐していた。組織学的解析では、suspending bundle より上方の眼窩内構造が前方へ突出する様子が観察された。

【結論】

Malaris muscle とは、MB・LB および suspending bundle を含む、固有の表情筋と Oo の間を埋める移行的筋束群であると考えられた。また、眼窩内構造との位置関係より malaris muscle の形態学的構造は顔の加齢性変化に関与する可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5419　号 | KAMPAN NATNICHA |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　柴田　俊一<br>副　査　井関　祥子　森　弘樹 | |

【論文審査の要旨】

１．論文内容

本論文は､眼窩部に存在する表情筋の１つである malaris muscle に関して肉眼解剖的見地から構造上の特徴を検索し、眼輪筋との比較対象を通じてこの筋の新たな定義および形態学的意義を提唱するものである。

２．論文審査

１）研究目的の先駆性・独創性

眼輪筋は眼窩部、眼瞼部、涙嚢部に分類され、特に眼窩部 (Oo) は顔の加齢性変化との関連が指摘され､臨床医学のみならず美容領域からも注目されている。眼窩部から大･小頬骨筋に放散する明瞭な筋束が頻繁に観察され、malaris muscle と呼ばれている。しかしながら malaris muscle の区分を含めた解剖学的本態に関しては眼輪筋の一部とする報告等も見られ、見解が統一されていないのが現状である。本研究では、解剖実習体を用いて malaris muscle の筋束の走行、神経支配様式および組織学的観察を併用し、この筋の解剖学的本態と形態学的意義を明らかにしようとしたものであり、その着眼点は大いに評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. Maralis muscle は外側部 (LB: 全例に存在)、内側部（MB: 22 側中 9 側に存在）に加え、側頭筋膜から Oo 外縁に沿い Oo 内側端と共通の付着を持つ suspending bundle が全例に存在した。

2.　顔面神経の頬骨枝、側頭枝が深層から浅層に向かって大･小頬骨筋、MB･LB、suspending bundle、Oo の順に各筋を貫通して支配していた。この所見は各筋が段階的 (stepwise) に配列している事を意味し、malaris muscle とは MB, LB 及び suspending bundle によって構成され、固有の表情筋と Oo の間の移行的筋束群であり､この筋が Oo とは独立して存在するものである事を示唆するものである。

3.　組織学的観察により、Oo の筋束が退縮･菲薄化を示すのに対し suspending bundle は比較的厚みが維持されていることから眼窩脂肪体が前方に突出し、それが Oo と suspending bundle との間に深い溝が生じさせ、顔面の加齢性変化に関与している可能性を示した。

以上のように申請者は、malaris muscle の解剖学的本態と顔面の加齢変化への関与を示唆する結果を示し、これは解剖学領域のみならず臨床領域においても非常に有用な研究成果であると評価

できる。

３）研究方法・倫理観

申請者は解剖実習体において、皮下の脂肪組織を完璧に除去する事により malaris muscle, 眼輪筋を含む顔面の表情筋の筋束を明瞭に剖出するとともにその神経支配に関しても非常に細いものまでの剖出に成功している。これは十分な解剖学的知識と技術がなければなし得ないものである。また筋束の走行や神経支配の様式によって各筋の位置を体系的に分類し、それぞれの筋の解剖学的本態を明らかにするように研究を進めている。また組織学的手法も導入し眼窩脂肪体、眼窩隔膜等の構造とこれらの筋束との関連を検索し、加齢変化等臨床的見地からの解析も試みている。

以上のように本研究は十分な肉眼解剖学的および組織学的知識･技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識・倫理観が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、malaris muscle の解剖学的本態について解剖学的および組織学的手法により、この筋は MB, LB 及び suspending bundle によって構成され､Oo とは独立して存在するものである事を示唆した。この考察は長年に渡って議論されてきた、malaris muscle の形態的意義について新たな一石を投じるものである。また組織学的検索から Oo ならびに suspending bundle の筋束の変化によって眼窩脂肪体が前方に突出し、Oo と suspending bundle との間に深い溝が生じさせ、顔面の加齢性変化に関与している可能性があると考察した。これらの考察は先行研究と照らし合わせても極めて妥当なものであり、本研究は口腔領域の筋の解析への応用等、今後の発展性も大いに期待できるものである。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 岩塚　良太 |
| 論文審査担当者 | 主査　吉田　雅幸<br>副査　立石　宇貴秀、笹野　哲郎 |
| 論　文　題　目 | Arterial inflammation measured by $^{18}$F-FDG-PET-CT to predict coronary events in older subjects |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

$^{18}$F-FDG-PET-CT における $^{18}$F-フルオロデオキシグルコース（FDG）の血管内への取り込みは、アテローム性動脈硬化症による炎症を検出する感度が高く信頼性のあるマーカーとして知られており、これまでに若年者における動脈硬化性イベントの発症を予測する可能性が示唆されている。しかしながら高齢者における大血管の炎症が冠動脈イベントの予測因子となりうるかは不明であった。本研究では冠動脈疾患の既往のない非癌患者で、65 歳以上の被験者 309 人を対象とした。上行大動脈で Target-to-background ratio (TBR)を計測する事で炎症を定量化し、エンドポイントを冠動脈イベントの発生として後ろ向きに調査した。その結果、TBR は既知の予測因子から独立して冠動脈イベントを予測した。

＜緒言＞

アテローム性動脈硬化性疾患は依然として世界的な主要な死因の 1 つであり、高齢化社会となるに連れその罹患率は増加の一途を辿っている。年齢はアテローム性動脈硬化症の介入不能なリスク因子であるため、特に高齢者における血管イベントのリスク予測はより重要となる。これまでにいくつかのアテローム性動脈硬化性疾患の予後予測モデルが提唱されてきたが、それらの殆どのモデルは非高齢者層を対象としており、高齢者に適応した場合その精度が低下する事が報告されている。

近年、アテローム性動脈硬化症は全身性疾患であり、動脈内膜内の炎症細胞が内皮細胞の損傷を引き起こすことで生じる事が明らかになってきた。

$^{18}$F-FDG-PET は悪性疾患の診断に有用であり、全身性の炎症疾患の定量的評価にも利用できる信頼性の高いスクリーニング方法の 1 つである。更に computed tomography (CT)画像と組み合わせることにより、血管の炎症部位をより正確に示すことができる。いくつかの報告によれば、大血管への FDG の取り込みは、全身性のアテローム性動脈硬化による血管の炎症を意味し、心血管イベント発生の予測因子になり得る可能性を示している。したがって、我々は高齢者においても $^{18}$F-FDG-PET-CT によって評価された血管の炎症が、心血管イベントの予測因子となり得るという仮説を生成し、検討を行った。

＜方法＞

2007 年 4 月から 2014 年 3 月までの間に亀田メディカルセンターで $^{18}$F-FDG-PET-CT を施行した 8963 人を後ろ向きに調査した。本研究は高齢者を対象としており 65 歳未満の患者は除外した。また、癌患者や癌の既往のある患者、心血管疾患の既往のある患者、脳血管疾患や炎症性血管疾患を有する患者、医療記録や採血データの不十分の患者、画像データが不十分である患者を除外した。最終的に絞られた 309 人に対し、医療記録を元に予後調査をおこなった。予後に関連する情報が医療記録から得られない場合は電話で連絡をとりデータを取得した。

本研究のリスクスコアで使用した gender-specific Framingham risk score（FRS）は、元となる FRS を改良したもので、もともとの FRS は対象年齢が 30 歳から 74 歳の人口であるのに対し、gender-specific FRS は高齢者における心血管イベント予測能の外敵妥当性が確認されている FRS である。

$^{18}$F-FDG-PET-CT の撮像は 6 時間以上の絶食を行い、血糖値が 180mg/mL 以下であることを確認し撮影した。得られた画像から上行大動脈の $^{18}$F-FDG standardized uptake values (SUVs)を計測した。同時に上行大静脈の SUV を計測し、上行大動脈の SUVs を上行大静脈の SUV で除した値を target-to-background ratio (TBR)とした。7 スライスの平均値を算出し炎症の度合とした。得られた全患者の TBR 値を三分位とし、それぞれの Coronary heart disease (CHD)の累積発生曲線を求め、非 CHD による死亡を競合リスクとし、Competing risk regression model（Gray モデル）を用いて比較した。

＜結果＞

登録された 309 人の殆どが癌の疑いで PET-CT を施行され（n=294）、残り 15 人は癌ドック検診にて施行された。全体の平均 TBR は 1.97±0.35、平均 FRS は 7.8±2.5 であった。より高い年齢が高い TBR と関連していたことを除いて、三分位群間のバックグランドに有意差はなかった。より高い Cr 値と CRP 値がより高い TBR に観察されたが、統計学的に有意差はなかった。年齢と TBR（r=0.18, p=0.004）との間に有意ではあるが弱い正の相関をみとめた。TBR と FRS との間に有意な相関はなかった（r=-0.027, p=0.673）。追跡期間の中央値は 3.9 年であり、28 例の CHD イベント（STEMI, n=3; NSTEMI, n=8; UAP, n=1; 心血管死, n=4; 狭心症による入院, n=4, 血行再建による入院, n=8）と、12 例の非 CHD による死亡が確認された。ベースラインの TBR 値は CHD イベントを起こした群とおこさなかった群で有意に異なったが（p value =0.001）、非 CHD による死亡群と CHD イベントを起こさなかった群との比較では TBR に差を認めなかった。各 TBR 三分位群の累積発生率は、より高い TBR 値でより高い CHD イベントの発生を認めた。単変量および多変量競合リスクハザード回帰モデルでは、tertile1(lowest TBR)と比較し、tertile2、tertile3 で CHD イベント発生において有意に高い HR を示した。TBR を連続スケールとして同様の解析を行っても、TBR は有意に CHD イベントを予測する結果であった。ROC 分析を FRS 単独モデルと、FRS に TBR を加えたモデルで比較したところ、FRS 単独で AUC は 0.57（信頼区間 0.44-0.69）であり、TBR を加えた場合 0.73（信頼区間 0.63-0.82）となり、有意な上昇を認めた（p=0.028）。

＜考察＞

今回の研究では、癌や心血管イベントの既往のない高齢者について、大動脈の炎症が将来の心血管イベント発生の予測因子となり得るかを調べたものである。TBR 値は高値を示すほど予後が悪くなり、FRS による調整を加えた後もその結果は保持された。これは高齢者において $^{18}$F-FDG-PET-CT の冠動脈イベントのリスク予測能の可能性を示した最初の研究である。

昨今、アテローム性動脈硬化症の炎症を定量化し心血管イベントを予測することができることが明らかになってきた。今までに 2 本の retrospective study が TBR と心血管イベントの関連を評価している。Rominger らは PET-CT を用い心血管イベントと脳血管イベントの既往のない 932 人の癌患者を、複数の動脈の平均 TBR を用い予後予測能を評価した。彼らは TBR が心血管イベントと関連していると報告したが、注目すべきことにその母集団はほぼ全て癌と診断された患者であり、282 人が腫瘍性疾患で死亡している。また、著者らは競合するリスクを考慮せずに分析を行っており、腫瘍性疾患が生存期間、および血管イベントの発生率に大きく影響を与えることを考慮に入れると、この交絡が研究結果に大きな影響を与えた可能性がある。結論としては同様な結果であるが、我々の研究では競合リスクとして心血管イベント以外の死亡を評価しており、TBR と将来の心血管イベントとの関係をより正確に評価している。更に、我々のコホートにおいて非 CHD による死亡の主な原因は肺炎であり、高い TBR 群では評価できない非 CHD による死亡を考慮に入れると、その関連性はより強いものになる可能性がある。Figueroa らの研究では、513 人の心血管疾患の既往を持たない患者を癌の評価のため PET-CT を行った。追跡期間の中央値は 4.2 年であり、44 例の心血管イベントが発生した。上行大動脈の TBR 値はその後の心血管イベントの独立した予後予測因子とされ、本研究の結果と一致する。しかし、Figueroa らの研究においても癌の病歴を有する被験者が多く含まれており（513 人中 429 人）、癌の生存者は冠動脈疾患を含む心血管疾患を起こすリスクが比較的高い事がよく知られている事を考えると、この研究結果の非癌患者への外敵妥当性は不明である。本研究では癌の疑いや癌のスクリーニングを目的に PET-CT 検査を施行した結果、癌が存在しないことが証明された患者を対象としている。このことは、高齢者ではより癌のスクリーニングを行う事が多く、その情報を 2 次利用できることを考えると、医療費や検査リスクの面でも臨床的に有用である事を示唆する。本研究では TBR 値で予後予測能が示されたが FRS では示されなかった。これは本研究のコホートにおける FRS の正確性が欠ける事が原因と思われる。多くのリスクスコアにおいても、若年層に比して高齢者では心血管イベントの予測能が悪化することが知られている。これは現存するパラメータを改善するのみでは心血管イベントの予測をすることが困難な可能性があることを示唆する。また、TBR 値の三分位間に FRS で差を認めなかった理由としては、FRS が高齢者のアテローム性動脈硬化性血管炎との関連性が少ない可能性と、非アテローム性動脈硬化性血管炎（例えば全身性炎症性疾患）の影響を受けている可能性があげられる。

＜結語＞

高齢者において $^{18}$F-FDG-PET-CT を用いた大動脈の TBR 値は心血管イベントの予後予測因子となりえる可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5420　号 | 岩塚　良太 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　吉田　雅幸<br>副　査　立石　宇貴秀、笹野　哲郎 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

$^{18}$F- FDG- PET- CTにおける$^{18}$F-フルオロデオキシグルコース（FDG）の血管内への取り込みは、アテローム性動脈硬化症における炎症検出マーカーとして知られている。今回の研究では、癌や心血管イベントの既往のない高齢者について、大動脈の炎症をTarget-to-backgraound（TBR）を指標として計測し、将来の心血管イベント発生の予測因子となり得るかを調べたものである。TBR値は高値を示すほど予後が悪くなり、フラミンガムリスクスコア（FRS）による調整を加えた後もその結果は保持された。これは高齢者において$^{18}$F- FDG- PET- CT の冠動脈イベントのリスク予測能の可能性を示した最初の研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

高齢者における動脈硬化性病変の増加を食い止めるため、動脈硬化症血管におけるリスク因子と最近いわれている炎症反応の定量化として FDGPET の取り込みに着目し、全身性の炎症性疾患としての動脈硬化症のスクリーニング法としての有用性を検証した。これまで同種の研究は高齢者を対象としては実施されておらず、本研究ではこれまでにない着眼点を有している。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は、本研究コホートにおいては TBR 値が予後予測因子として有用であったのに対し、FRS は有効な予後予測ができなかった。従来より若年者に比べ高齢者では種々の心血管予後予測因子がうまく作用しないことが示されていることを支持するものである。これは高齢者の動脈硬化症を考えるうえで非常に重要な知見であり、臨床的にも有用な研究成果である。

３）研究方法・倫理観

今回の研究では、PET-CT を実施された８９６３名のうち、若年者、がん患者、心血管疾患の既往歴などに該当するものを除いた３０９名とした。本研究は医学部倫理審査委員会の承認の元に実施されており、倫理的な問題はない。

４）考察・今後の発展性

本研究で明らかになった高齢者における$^{18}$F- FDG- PET- CTを用いた大動脈のTBR値は心血管イベントの予後予測因子となり得る可能性が示唆された。

**３．その他**

特記すべきことなし。

**４．審査結果**

以上より、本論文は博士（医学）の学位を申請するに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 鍵山　暢之 |
| 論文審査担当者 | 主査　荒井　裕国<br>副査　内田　篤治郎、東田　修二 |
| 論　文　題　目 | Insufficient Leaflet Remodeling in Patients With Atrial Fibrillation Association With the Severity of Mitral Regurgitation |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

心房細動によって僧帽弁輪が拡大することはよく知られているが、弁輪の拡大が単独で僧帽弁逆流を引き起こすかは議論が残るところである。

本研究では経食道 3 次元心エコー図を用いて、中等度以上の僧帽弁逆流を有する心房細動症例 28 例(MR 群)、僧帽弁逆流を有さない心房細動症例 56 例(非 MR 群)、健常例 16 例(対照群)の僧帽弁 3 次元構造を解析した。僧帽弁輪面積は MR 群でも非 MR 群でも対照群に比べて有意に拡大していたが、一方で弁輪サイズに対する弁葉の拡大(リモデリング)を示す弁葉面積弁輪面積比は MR 群でのみ有意に低下しており、非 MR 群では対照群と有意差を認めなかった。弁葉弁輪面積比は有効逆流面積と逆相関しており、僧帽弁逆流を予測するための弁葉弁輪面積比の ROC 曲線の曲線下面積は有意に弁輪面積のそれを上回った。多変量解析の結果、弁葉弁輪面積比は独立した MR の予測因子であり、弁輪面積は有意な予測因子とはならなかった。以上の結果から、心房細動症例において、単純な弁輪拡大よりもむしろ弁葉リモデリングの程度が僧帽弁逆流の重症度に寄与している可能性が示唆された。

＜諸言＞

心房細動は最も頻度の高い不整脈である。今までの研究から心房拡大に伴い、僧帽弁輪が拡大することは知られているが、心房細動による弁輪拡大が僧帽弁逆流を引き起こすかどうかに関しては議論が残っている。

古典的には、孤立性心房細動の患者をは健常例に比べて有意な弁輪拡大を有しているにもかかわらず僧帽弁逆流を呈さないことから、通常心房細動に伴う弁輪拡大から有意な僧帽弁逆流は生じないと考えられていた。一方で近年、心房細動症例の中で有意な僧帽弁逆流を有する症例に焦点を当てた報告が相次ぎ、そのような症例では弁輪が拡大していることが指摘されている。一見相反するこの 2 つの主張であるが、我々はここから、心房細動症例が有意な僧帽弁逆流を合併するには単純な弁輪拡大に加えてさらに何かの要素が必要ではないかと考えた。

近年、左室機能不全による機能性僧帽弁逆流において、弁葉リモデリング、つまり弁尖テ

ザリングに対して対症的に僧帽弁弁葉が拡大することが、僧帽弁逆流を抑える方向に働くと報告されている。

本研究の目的は心房細動症例における、弁輪拡大への対照機構としての弁葉リモデリングが、僧帽弁逆流の重症度に寄与するかどうかを検討することである。

＜方法＞

2014 年 4 月から 2015 年 9 月までの間に経食道心エコー図を行った症例の中から、心房細動の既往があり、左室機能が正常で、先天性心疾患や僧帽弁の明らかな器質的変化がなく、僧帽弁以外の弁に重度の弁膜症を有しない症例 268 例を検討した。このうち、中等度以上の僧帽弁逆流を有していた 40 例のなかから、肥大型心筋症に伴うもの、および 3 次元画像の記録がないものを除いた 28 例を MR 群とした。残り 228 例から、非 MR 群として年齢と性別を合致させた 56 例を抽出し解析した。対照群は健常例 16 例とした。

本研究は心臓病センター榊原病院の倫理委員会の承認を得て行われた。

全症例において僧帽弁全体が入るように 3 次元心エコー図画像を取得した。ボリュームレートを最大にするために撮像は基本的に 2-6 心拍による多心拍合成で行われたが、息止め不良の症例、撮像時に心房細動であった症例では 1 心拍で撮像した。取得された画像はオフラインで専用の解析用コンピュータにて、2 名の熟練した解析者により行われた。解析には市販の僧帽弁解析専用ソフトウエア(MVN プログラム : Philips 社製)が用いられた。本ソフトウエアの妥当性は以前我々が報告しており、高い検者間、検者内一致率を示した(参考論文)。過去の報告に従って、僧帽弁葉面積は拡張期に、弁輪面積は収縮期に計測し、その比を弁葉弁輪面積比とした。弁葉弁輪面積比が小さいことは、僧帽弁輪の拡大に比して僧帽弁葉が十分に拡大していないこと、つまり弁葉リモデリングが不十分であることを示す。

僧帽弁逆流の重症度は proximal isovelocity surface area 法を用いた有効逆流面積および vena contracta を用いた包括的な方法で決定された。有効逆流面積 0.2 ㎝ $^2$以上、もしくは vena contracta 3 ㎜以上を有意な僧帽弁逆流と定義した。

弁輪、弁葉などの計測値は体表面積で補正して比較した。弁葉弁輪面積比と有効逆流面積の関連性をピアソンの相関係数および線形回帰分析にて検定した。弁葉弁輪面積比が弁葉面積よりも僧帽弁逆流と強い関連があるかを検定するため、それぞれの ROC 曲線の曲線下面積を計算した。さらに弁葉弁輪面積比の独立性を示すため、過去の論文に示された心房細動症例における僧帽弁逆流と関係のある因子(年齢、弁輪面積、左房容積、心房細動が持続性か発作性かどうか)を用いて多変量ロジスティク回帰分析を行った。

＜結果＞

3 群間にて年齢、性別、体表面積に有意な差は認めなかった。左房容積は有意に MR 群、非 MR 群、対象群の順に大きかった。

経食道心エコー図の解析結果として、弁輪面積は有意に MR 群(645±126 $cm^2/m^2$)、非 MR 群(568±121 $cm^2/m^2$)ともに対象群(444±108 $cm^2/m^2$)よりも大きかったが、MR 群と非 MR 群の差はあまり開いておらず、弁輪面積のみでこれら 2 群を分類することは困難であった。一方で

弁葉面積は MR 群(828±161 $cm^2/m^2$)で有意ではないがわずかに、非 MR 群(929±202 $cm^2/m^2$)で有意に対照群(741±169 $cm^2/m^2$)より大きかった。これらの結果、弁葉弁輪面積比は MR 群(1.29±0.05)のみで有意に対照群より小さく、非 MR 群(1.65±0.24)ではほぼ対照群と同程度(1.70±0.29)となり、MR 群と非 MR 群との差が明らかであった。

線形回帰分析およびピアソンの相関係数によると、弁葉弁輪面積比は僧帽弁逆流の重症度指標である有効逆流面積と有意な負の相関を示した($r = -0.73$, $P<0.001$)。

有意な僧帽弁逆流に対する ROC 曲線の曲線下面積は弁葉弁輪面積比で 0.95 であり、これは弁輪面積(0.72)や弁葉面積(0.62)のそれを有意に上回った。ROC 曲線から求めた弁葉弁輪面積比の最良のカットオフ値は 1.38 で、そのときの感度は 93.5%、特異度は 83.5%であった。

多変量解析の結果、弁葉弁輪面積および左房容積のみが独立した因子として残り、弁輪面積は残らなかった。これらの結果から、弁葉弁輪面積比が小さいこと、つまり弁葉リモデリングが不十分であることは弁輪面積よりも強く僧帽弁逆流の発生に関連していることが示された。

＜考察＞

本研究で我々は経食道 3 次元心エコー図を用いて、(1)心房細動症例において僧帽弁葉が対照群に比して拡大している、すなわち弁葉リモデリングが起こっていること、(2)弁葉リモデリングの指標である弁葉弁輪面積比が僧帽弁逆流の重症度と逆相関すること、(3)僧帽弁逆流の発生には、単純な弁輪面積ではなく、それに対する弁葉の面積つまり弁葉弁輪面積比が小さいこと、が強い関係性を持っていることを示した。

心房細動は最も頻度の高い不整脈であり、それ自体が心房細動の更なる悪化、心房の拡大、僧帽弁輪の拡大を来す。心房細動症例は脳卒中以外にも心不全や心臓死のリスクが一般人口より高いことが知られており、高齢化に伴い今後ますます増加する心房細動症例において、心臓合併症の機序を理解し、治療に結び付けることは非常に重要である。

心房細動に伴う僧帽弁輪拡大がそれ自体で有意な僧帽弁逆流を呈するかは前述のように議論の残るところであった。今回我々は弁葉リモデリングに注目したが、この弁葉リモデリングは左室機能不全による僧帽弁逆流において、人体における心エコー図、動物実験による直接観察、などで立証されており、弁輪拡大、弁尖テザリングに対する対症機構として注目されている。

本研究では、弁輪面積自体も MR 群、非 MR 群で差はあったものの、そこには大きな重複があり、これだけで有意な僧帽弁逆流の発生要因となるとは考え難い所見であった。一方で弁葉弁輪面積比は明瞭に 2 群を分けており、また僧帽弁逆流の重症度と逆相関を認め、僧帽弁逆流の機序の一翼をなしていることが強く示唆された。実際に多変量解析の結果、僧帽弁輪面積は有意な因子として残らず、弁葉弁輪面積比が残ったこともこれを裏付けている。

本研究で認められた僧帽弁逆流は大部分が中等度であり、重症度がそれほど高くはないが、今後心房細動症例の絶対数は爆発的に増加すること、心房細動症例に多い心不全合併症例では中等度機能性僧帽弁逆流でも予後に悪影響を及ぼしうることから、この研究の対象となった心房細動に伴う僧帽弁逆流は決して軽視されるべきではなく、今後更なる研究および治療

方針の確立が望まれる。

＜結論＞

心房細動症例において、弁葉弁輪面積比が小さいこと、すなわち弁葉リモデリングが不十分であることは有意な僧帽弁逆流の発生に独立した関連性をもっていた。弁葉リモデリングは心房細動症例の僧帽弁逆流の発生に非常に重要な役割を担っている可能性があり、今後治療戦略への応用が期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5421　号 | 鍵山　暢之 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　荒井　裕国<br>副　査　内田　篤治郎、東田　修二 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、心房細動症例における不十分な弁葉リモデリングと僧帽弁逆流症との関連についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

心房細動によって僧帽弁輪が拡大することはよく知られているが、弁輪の拡大が単独で僧帽弁逆流(MR)を引き起こすかは議論が残るところである。

申請者らは、心房細動症例が有意な僧帽弁逆流を合併するには単純な弁輪拡大に加えてさらに何かの要素が必要ではないかと考え、弁輪拡大への対照機構としての弁葉リモデリングが、僧帽弁逆流の重症度に寄与するかどうかを検討した。その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた結果は、以下の通りである。

１．僧帽弁輪面積は MR 群でも非 MR 群でも対照群に比べて有意に拡大していた。

２．弁輪サイズに対する弁葉の拡大(リモデリング)を示す弁葉面積弁輪面積比は MR 群でのみ有意に低下しており、非 MR 群では対照群と有意差を認めなかった。

３．弁葉弁輪面積比は有効逆流面積と逆相関しており、僧帽弁逆流を予測するための弁葉弁輪面積比の ROC 曲線の曲線下面積は有意に弁輪面積のそれを上回った。

４．多変量解析の結果、弁葉弁輪面積比は独立した MR の予測因子であり、弁輪面積は有意な予測因子とはならなかった。

以上のように申請者らは、心房細動症例において、単純な弁輪拡大よりもむしろ弁葉リモデリングの程度が僧帽弁逆流の重症度に寄与している可能性を示唆しており、臨床的に有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究は、2014 年 4 月から 2015 年 9 月までの間に経食道心エコー図を行った症例の中から、中等度以上の僧帽弁逆流を有する心房細動症例 28 例(MR 群)、僧帽弁逆流を有さない心房細動症例 56 例(非 MR 群)、健常例 16 例(対照群)を抽出し、市販の僧帽弁解析専用ソフトウエア(MVN プロ

グラム：Philips 社製)を用いて、僧帽弁 3 次元構造を解析した。本手法は、充分な臨床的手法の裏付けのもとに遂行されており、申請者の知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が周到な準備の上に行われてきたことが窺える。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果より、(1)心房細動症例において僧帽弁葉が対照群に比して拡大している、すなわち弁葉リモデリングが起こっていること、(2)弁葉リモデリングの指標である弁葉弁輪面積比が僧帽弁逆流の重症度と逆相関すること、(3)僧帽弁逆流の発生には、単純な弁輪面積ではなく、それに対する弁葉の面積つまり弁葉弁輪面積比が小さいこと、が強い関係性を持っていることを示した。

今後、心房細動症例の絶対数は爆発的に増加すること、心房細動症例に多い心不全合併症例では中等度機能性僧帽弁逆流でも予後に悪影響を及ぼしうることから、この研究の対象となった心房細動に伴う僧帽弁逆流は決して軽視されるべきではなく、今後更なる研究および治療方針の確立に発展すると考えられ、本研究結果の有用性が期待される。

**３．その他**

特記すべきことなし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 河野　佑二 |
| 論文審査担当者 | 主査　淺原　弘嗣<br>副査　田賀　哲也、渡部　徹郎 |
| 論　文　題　目 | Yields and chondrogenic potential of primary synovial mesenchymal stem cells are comparable between rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜幹細胞）は増殖・軟骨分化能に優れており、変形性膝関節症(OA)の再生医療への応用が期待される。我々は人工膝関節置換術で得られる滑膜を使用して、滑膜幹細胞の解析を行ってきたが、関節リウマチ(RA)における軟骨再生は依然未知のことが多い。本研究の目的は、RA膝から得られる滑膜幹細胞に関して、初代滑膜幹細胞の収量および軟骨分化能を、OA膝由来のものと比較することである。

RA(n=8)およびOA(n=8)の人工膝関節術後に得られる滑膜を酵素処理後、$10^4$個の滑膜有核細胞を60-$cm^2$ dishに6枚ずつ播種し、14日間培養した。細胞数を評価後、表面抗原および多分化能を比較検討した。

滑膜1mgあたりの有核細胞数、14日間培養後の平均収量および得られた細胞の表面抗原の発現率に有意差を認めなかった。軟骨分化能に関して、軟骨ペレットの湿重量およびsulfated glycosaminoglycan (sGAG)含有量は同等であった。脂肪分化能および石灰化能も同等であった。

RAおよびOA膝から得られる初代滑膜幹細胞の収量、軟骨分化能を比較した研究はこれまでなく、いずれも同等であるという本結果はOA同様にRAでも軟骨再生が実現可能であることを示唆する。

＜緒言＞

我々は膝関節軟骨および半月板再生を目指し、人工膝関節置換術(TKA)で得られる滑膜を使用して変形性膝関節症(OA)の滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜幹細胞）を解析してきた。滑膜幹細胞は増殖能および軟骨分化能に優れており、2008年からは軟骨欠損部や半月板縫合部に初代滑膜幹細胞を移植するという臨床応用も行っている。

しかしながら関節リウマチ(RA)における軟骨および半月板再生に関しては、生物製剤の導入により関節炎コントロールが劇的に可能になったとはいえ、依然未知のことが多い。

RAおよびOA膝から得られる初代滑膜幹細胞の収量、軟骨分化能を比較した研究はこれまでない。本研究の目的は、RA膝およびOA膝由来の初代滑膜幹細胞の性状を比較することである。

＜方法＞

本学および協力施設の倫理委員会の承認を得て本研究を行った。RA(n=8、平均年齢60歳)およびOA(n=8、平均年齢74歳)のTKA後に得られる滑膜300-500mgを酵素処理後、$10^4$個の滑膜有核細胞を60-$cm^2$ dishに6枚ずつ播種し、14日間培養した。コロニー形成および得られた細胞数を評価後、表面抗原および多分化能を比較検討した。

表面抗原マーカーに関して、RAとOAそれぞれ培養前の滑膜有核細胞および14日間培養後に得られた細胞に対してフローサイトメトリー解析を行った。

軟骨分化能の評価は、滑膜有核細胞を14日間培養して得られた細胞（Passage 0）を軟骨分化培地にて1ペレットあたり$2.5\times10^5$個ずつ21日間培養行い、軟骨ペレットを作成して行った。軟骨ペレットの湿重量、sGAG含有量、safranin-o染色およびtype Ⅱ collagen免疫染色性、定量PCRによるaggrecanおよびtype Ⅱ collagen発現を評価項目として比較した。

脂肪分化能について、14日間培養で得られた細胞を100個ずつ60-$cm^2$ dishに播種し（Passage 1）、14日間後コロニー形成を確認できたら脂肪分化培地でさらに14日間培養行った。脂肪細胞コロニーをoil red-o染色した後、同じdishをcrystal violet染色行い、oil red-o染色陽性コロニー率を評価した。また定量PCRによるlipoprotein lipaseおよびperoxisome proliferator activated receptor γ (PPARγ)発現も測定した。

石灰化能に関しても、脂肪分化同様に石灰化誘導を行い、alizarin red染色陽性コロニー率を評価し、また単位タンパク量あたりのalkaline phosphatase(ALP)活性も測定した。

＜結果＞

採取した滑膜の酵素処理後の有核細胞数は、滑膜1mgあたり、RA 4.4-14.3個、平均8.4 ± 3.9($\times10^3$)個、OA 7.1-9.0個、平均8.0 ± 0.9 ($\times10^3$)個で、両群に有意差はなかった。

14日間培養後、crystal violet染色にて両群ともに良好なコロニー形成が確認でき、コロニー形成した細胞形態も紡錘形で両群同様であった。

14日間培養後の滑膜1mgあたりの収量は、RA 0.3-1.3個、平均0.7 ± 0.4 ($\times10^6$)個、OA 0.1-0.8個、平均0.5 ± 0.3 ($\times10^6$)個であった。RA群で検体間差が大きかったが（F検定、p=0.02）、平均収量は両群で有意差を認めなかった。

表面抗原マーカーについて、培養前の滑膜有核細胞はRA、OA両群ともに、HLA-DR, CD11b, CD11c, CD31 & CD45など造血系マーカーは低～中レベル、CD44, CD73, CD90, CD105など間葉系幹細胞マーカーは中レベルに発現していた。一方、14日間培養後に得られた細胞は、両群ともに造血系マーカーの発現はほぼ陰性、間葉系幹細胞マーカーの発現はほぼ陽性であった。

軟骨分化能に関して、両群とも軟骨分化誘導した細胞ペレットは球状で透過性をもつようになり、組織切片はsafranin-o染色陽性、type Ⅱ collagen免疫染色陽性で、軟骨に分化していることが確認できた。Bernスコアにてsafranin-o染色性を定量評価したが、両群同等であった。軟骨ペレットは両群とも検体により大小さまざまであったが、平均湿重量はRA 1.3 ± 1.5 mg、OA 1.1 ± 1.4 mgで有意差なく、1ペレットあたりのsGAG含有量もRA 4.7 ± 4.8 μg、OA 4.8 ± 4.8μgで有意差はなかった。また軟骨ペレットの定量PCR解析ではaggrecanおよびtype Ⅱ collagen発現は両群同等であった。

脂肪分化能について、培養して得られた細胞を脂肪分化誘導すると細胞に脂肪滴がみられるようになり、約半数のコロニーにoil red-o染色陽性となり、陽性コロニー率は両群で同等であった。また定量PCR解析でもlipoprotein lipaseおよびPPARγ発現に有意差を認めなかった。

石灰化能も脂肪分化同様に石灰化誘導すると、ほとんどのコロニーがalizarin red染色陽性となり、陽性コロニー率はRAとOAで同等であった。また単位タンパク量あたりのALP活性を測定したが、両群で有意差を認めなかった。

＜考察＞

滑膜1mgあたりの有核細胞数は両群に有意差を認めなかったが、RA群では検体間のばらつきが大きい傾向にあった。このことはRA滑膜の多様性が示唆され、培養前の滑膜組織所見と酵素処理後の有核細胞数の関係を調査すると興味深い結果が得られるかもしれない。

14日間培養後の収量は両群同等であったが、一方で我々はラットのカラギナン誘発関節炎モデルにて滑膜炎スコアと滑膜MSCsの収量は比例すると報告した(Matsukura et al. J Orthop Res. 2015)。今回の研究ではRA #1-5検体およびOA #9-13検体の収量を比較したが、いずれも滑膜採取時のCRPは正常範囲内で滑膜炎が十分コントロールされていた。RA #1と#2検体で収量が多かったのは過去の滑膜炎を反映しているかもしれない。

RA #3-5検体では酵素処理後の滑膜有核細胞および培養後の収量が比較的少なかった。我々は滑膜採取1週間前にグルココルチコイドを膝関節注射したOA患者で滑膜MSCsの収量が少なくなった例を経験したが、今回少なかったRA 3検体のうち2検体はプレドニゾロン内服しており、グルココルチコイドの影響も考えられるかもしれない。

表面抗原マーカーについて、培養前の滑膜有核細胞はHLA-DR, CD11b, CD11c, CD14, CD206などマクロファージや単球マーカーの発現率が我々の予想外に比較的低かった。しかし、RA #7検体ではHLA-DR, CD11b, CD11cの発現率が比較的高く、採取時のCRPも5.9と高値であった。滑膜有核細胞におけるマクロファージや単球マーカーの発現率は滑膜炎を反映していると考えられた。一方、14日間培養後に得られた細胞は両群ともに、CD44, CD73, CD90, CD105陽性、CD45陰性で、間葉系幹細胞の特性を有していると考えられた。

軟骨分化能に関して、軟骨ペレットの湿重量は両群に有意差なかったが、ペレット湿重量の増加は細胞外基質産生を表しin vitroでは間葉系幹細胞の軟骨分化能の定量指標となるので、本結果は軟骨分化能が同等であることを示唆する。またsGAG含有量も定量したが、1ペレットあたりのsGAG含有量は軟骨ペレットの湿重量と比例した。

RA滑膜幹細胞の軟骨分化能がOAと同等であるかどうかについては賛否あり、SkalskaらやKoizumiらは両群で同等と報告している一方で、Jonesらは滑膜炎の程度と負の相関があると報告している。IL-1β、TNFα、IL-17などの炎症性サイトカインは骨髄MSCの軟骨分化能を阻害するという報告もあり、今回両群で差がなかったのはTKA術前に滑膜炎がコントロールされていたことが一つの要因と考えられる。

本研究で我々は初代滑膜幹細胞を解析したが、他の比較研究ではPassage 2-4滑膜幹細胞を使用している。間葉系幹細胞の継代により染色体異常が起こるという報告は多々あり、染色体異常が有害事象かどうかは賛否あるが、我々は初代滑膜幹細胞を使用することが染色体異常に関連するリスクを避けられると観点で有用と考える。

初代滑膜幹細胞の自家移植による再生医療の適応は現況 OA 患者に限られているが、今後は滑膜炎がコントロールされた RA 患者への適応拡大も期待される。本研究は滑膜幹細胞の収量、軟骨分化能が同等という観点から、OA 同様に RA でも軟骨再生の実現が可能であることを支持する。

＜結論＞

RA膝から得られる初代滑膜幹細胞の収量、表面抗原マーカーの発現率および軟骨分化能はOA膝と同等であった。本結果はOA同様にRAでも軟骨再生が実現可能であることを示唆する。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5422　号 | 河野　佑二 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　淺原　弘嗣<br>副　査　田賀　哲也、渡部　徹郎 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文において、申請者は、変形性関節症および関節リウマチそれぞれの滑膜由来の間葉系幹細胞を採取、培養し、その終了や分化能を解析、将来的な滑膜由来間葉系幹細胞治療のソースとしての可能性について検討した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

所属した研究室が中心になって、滑膜由来間葉系幹細胞は増殖・軟骨分化能に優れていること、また、それを用いた膝関節軟骨および半月板の再生医療が行われているが、滑膜由来間葉系幹細胞を十分得るためのソースとして、リウマチ滑膜はあまり検討されておらず、本研究目的の意義、先駆性は高い。

２）社会的意義

再生医療の実践において、整形外科医としてのバックグラウンドを生かしたリサーチクエスチョンにのっとり、重要なデータを得たことは、社会的にも意義が高い。

３）研究方法・倫理観

ヒトサンプルを適切な倫理的プロセスを経て取得、研究に利用していることが確認された。細胞分化、培養、および分子生物学的な基本技術を十分に取得し、研究を遂行することができた。

４）考察・今後の発展性

滑膜由来間葉系幹細胞を用いた再生医療研究において、今回の研究は価値のあるものであり、十分量の間葉系幹細胞を、短期間に得るための基盤情報の一つとなると思われる。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 貫井　義久 |
| 論文審査担当者 | 主査　江石　義信<br>副査　大久保　憲一、　戸塚　実 |
| 論　文　題　目 | Identification of Apolipoprotein A-I in BALF as a biomarker of sarcoidosis |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

肺サルコイドーシスは約 2/3 の症例で自然寛解が得られる一方、約 20%の症例は肺の線維化を来すと報告されている。肺サルコイドーシスにおける肺線維化および病型による病態の違いはいまだ十分に解明されていない。肺サルコイドーシスの気管支肺胞洗浄液（BALF）を用いて、stage I と stage IV について比較検討することで、肺サルコイドーシスの線維化および病型に関わる蛋白を明らかにすることを目的とした。肺サルコイドーシス stage I 8 例と stage IV 5 例の BALF に発現している蛋白を、2 次元電気泳動および質量分析を用いて解析した。Stage I で有意に発現が高いスポットは apolipoprotein A-I(Apo A-I) fragment、fibrinogen γ chain、calcyphosine、complement C3、surfactant protein A であった。一方、stage IV で有意に発現が高いスポットは認めなかった。BALF 中 Apo A-I の結果を確認するために症例数を増やし、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay（ELISA）にて BALF の Apo A-I 濃度を測定した。BALF の Apo A-I 濃度は stage I が stage IV よりも有意に高値であった。また Stage I において BALF の Apo A-I 濃度は BALF のリンパ球分画と有意に正の相関を認めた。臨床経過と BALF の Apo A-I 濃度との関連をしらべるために、診断時から観察期間内にサルコイドーシスのなんらかの臓器病変に対し全身性ステロイドが使用されたか否かを調べた。Stage I において経過中に全身性ステロイドが使用された群では使用されなかった群と比べ有意に BALF の Apo A-I 濃度が高値であった。BALF の Apo A-I はサルコイドーシスの病態に関わっているのかもしれない。また Stage I において疾患活動性の指標となりえる可能性が示唆された。

＜緒言＞

サルコイドーシスは原因不明に全身性肉芽腫性疾患である。主には肺、リンパ節、眼病変を認めることが多いがその他多彩な臓器病変を来す。肺病変はサルコイドーシスの 90%以上の症例で認められる。肺サルコイドーシスは約 2/3 の症例で自然寛解が得られる一方、約 20%の症例は肺の線維化を来すと報告されている。サルコイドーシスの胸部病変は胸部単純 X 線の所見にもとづき stage I（両側肺門リンパ節腫脹）、stage II（両側肺門リンパ節腫脹+肺野病変）、stage III（肺野病変［両側肺門リンパ節腫脹なし］）、stage IV（肺の線維化）に分けられる。線維化をともなったサルコイドーシスは予後が悪いものの、線維化のメカニズムや病型による病態の違いはいまだ十

分に解明されていない。

Apolipoprotein A-I (Apo A-I)は HDL の主な構成タンパクである。脂質の逆転送系において重要な働きをするとととともに、抗炎症、抗酸化作用が知られている。肺疾患においては特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis: IPF）や気管支喘息患者の BALF の Apo A-I に関する報告があり、肺における抗炎症作用が示唆されている。

今回我々はサルコイドーシス stage I と stage IV の BALF のプロテオミクス解析を行うことで、肺の線維化に関わる蛋白、病型に関わる蛋白を同定することを目的とした。また stage I と stage IV の間で相違があった Apo A-I に関してサルコイドーシスとの関連を検討した。

＜方法＞

2007 年から 2014 年の間に診断された未治療の肺サルコイドーシスを対象とした。まず stage I 8 例、stage IV 5 例を２次元電気泳動の対象とした。BALF 中の蛋白を 2 次元電気泳動に展開し、ゲルを Sypro Ruby で蛍光染色した。FluoroPhoreStar 3000 を用いてゲルを撮影し、その画像を解析ソフト（Progenesis PG220）で解析し、各スポットを定量化した。stage I と stage IV において、発現量に差を認めたスポットについて蛋白の同定を行った。同定は質量分析（LC-nESI-MS/MS）および SWISS-PROT などのデータベース検索により行った。

さらに stage I と stage IV にて発現に差があった Apo A-I に注目した。対象症例数を stage I 19 例、stage IV 12 例と増やし BALF と血清中の濃度を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay（ELISA）にて測定した。疾患コントロールとして関節リウマチ関連間質性肺疾患（rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease: RA-ILD）13 例、IPF 8 例、健常成人 5 例の BALF の Apo A-I 濃度を測定した。

またサルコイドーシスの疾患活動性の指標を探索するために、診断時から観察期間内にサルコイドーシスのなんらかの臓器病変に対し全身性ステロイドが使用された群と使用されなかった群に分け、BALF の Apo A-I 濃度や他の血液検査、BALF 組成等に関し比較検討した。

＜結果＞

2 次元電気泳動および質量分析を用いて解析した結果、Stage I で有意に発現が高いスポットは Apo A-I fragment、fibrinogen γ chain、calcyphosine、complement C3、surfactant protein A であった。一方 stage IV で有意に発現が高いスポットは認めなかった。Apo A-I fragment および Apo A-I は 5 個のスポットとして同定された。この 5 個のスポットのうち、Stage I にて有意差をもって発現高いスポットは 1 個であったが他の 4 個のスポットはいずれも Stage I で高い傾向にあった。

続いて BALF の Apo A-I 濃度を ELISA にて測定した。BALF の Apo A-I 濃度は Stage I が stage IV、RA-ILD、IPF、健常成人いずれよりも有意に高値であった。血清の Apo A-I 濃度は stage I と stage IV に有意な差は認めなかった。Stage I において BALF の Apo A-I 濃度と BALF のリンパ球比率の間に有意な正の相関を認めた。Stage IV においては BALF の Apo A-I 濃度と血清 angiotensin converting enzyme (ACE)の間に有意な正の相関を認めた。Stage I と Stage IV いずれにおいても BALF と血清の Apo A-I 濃度の間に有意な相関は認めなかった。

臨床経過と BALF の Apo A-I 濃度に関する検討では、stage I において観察期間内に全身性ステロ

イドが使用された群では、全身性ステロイドが使用されなかった群と比べ診断時の BALF の Apo A-I 濃度が有意に高値であった。

＜考察＞

２次元電気泳動を用いたプロテオミクス解析によって stage Ⅰと stage Ⅳの間で異なる蛋白質が確認された。その中で Apo A-I に注目した。 Stage I は Stage IV と比べ BALF 中 Apo A-I 濃度が有意に高値であり、Apo A-I がサルコイドーシスの臨床病型と関連した蛋白である可能性が示唆された。また BALF の Apo A-I 濃度と BALF のリンパ球比率に有意な正の相関があり、疾患活動性を予測する指標となる可能性が示唆された。

Apo A-I は活性酸素の除去や、TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 などの分泌を阻害することによる抗炎症効果が報告されている。サルコイドーシスでは活性化し増殖した CD4 陽性 T 細胞とマクロファージからの IL-2、IFN-γ、TNF-α といった炎症メディエーターが肉芽腫形成に重要と考えられている。BALF の Apo A-I がサルコイドーシス stage I において抗炎症作用を目的として発現しているのかもしれない。Stage I において BALF 中 Apo A-I 濃度が高値であったもう一つの理由としてサルコイドーシスの肺胞毛細血管バリア障害による血漿蛋白の漏出の関与が推察された。サルコイドーシスの BALF には血漿由来の蛋白を多く含むことが報告されている。Apo A-I は血漿蛋白であり、BALF の Apo A-I 濃度上昇は肺胞毛細血管バリア障害を反映しているのかもしれない。

今回 Stage IV の BALF 中 Apo A-I 濃度は Stage I と比べ低値であった。サルコイドーシスの肺線維化は肉芽腫性炎症が消失し、しばしば「burnt out」と表現される。Stage IV の BALF の Apo A-I 濃度が低値であった理由として肉芽腫性炎症の低下が関与しているかもしれない。あるいは IPF において BALF の Apo A-I 濃度が健常人よりも低値であったという報告があり、BALF 中 Apo A-I 濃度が低値であることが肺の線維化と関連している可能性が推察される。

Stage Ⅰにおいて経過中に全身性ステロイドが使用された群では、使用されなかった群と比べ診断時の BALF の Apo A-I 濃度が有意に高値であり、stage I において BALF の Apo A-I 濃度は疾患活動性の指標となりえる可能性が示唆された。

＜結論＞

サルコイドーシス stage I と stage IV の間で発現の異なる 5 個の蛋白を同定した。BALF の Apo A-I 濃度は病型による病態の違いに関与している可能性があり、また stage I において疾患活動性の指標となりえる可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5423　号 | 貫井　義久 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　江石　義信<br>副　査　大久保　憲一、戸塚　実 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は、Apolipoprotein A-I(Apo A-I)がサルコイドーシスの臨床病型と関連した蛋白であり、肺胞洗浄液中の Apo A-I 濃度が疾患活動性を予測する指標となる可能性を示した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

Apo A-IはHDLの主な構成タンパクである。脂質の逆転送系において重要な働きをするとともに、抗炎症、抗酸化作用が知られている。肺疾患においては特発性肺線維症や気管支喘息患者の気管支肺洗浄液(BALF)のApo A-Iに関する報告があり、肺における抗炎症作用が示唆されている。このような背景の下、申請者はサルコイドーシスstage Iとstage IVの肺胞洗浄液(BALF)のプロテオミクス解析を行うことで、肺の線維化に関わる蛋白、病型に関わる蛋白を同定するとともに、stage Iとstage IVの間で相違があったApo A-Iに注目してサルコイドーシスの病型や活動性との関連を検討しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。肺サルコイドーシスstage I とstage IV のBALFに発現している蛋白を、2次元電気泳動および質量分析を用いて解析したところ、Stage Iで有意に発現が高いスポットはApo A-I fragment、fibrinogen γ chain、calcyphosine、complement C3、surfactant protein Aであり、stage IVで有意に発現が高いスポットは認めなかった。BALF中のApo A-I濃度はstage Iがstage IVよりも有意に高値であった。Stage IにおいてBALFのApo A-I濃度はBALFのリンパ球分画と有意に正の相関を認めた。Stage Iにおいて経過中に全身性ステロイドが使用された群では使用されなかった群と比べ有意にBALFのApo A-I濃度が高値であった。以上のように申請者は、BALFのApo A-Iがサルコイドーシスの病態に関わっており、Stage Iにおいて疾患活動性の指標となりうる可能性を示した。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究では、未治療の肺サルコイドーシスstage I 8例、stage IV 5例から得られたBALF中の蛋白を2次元電気泳動に展開し、Sypro Rubyで蛍光染色したゲルをFluoroPhoreStar 3000で撮影し、その画像を解析ソフト（Progenesis PG220）で解析することで各スポットを定量化した。stage Iとstage IV

において発現量に差を認めたスポットについて、質量分析（LC-nESI-MS/MS）およびSWISS-PROTなどのデータベース検索により蛋白の同定を行った。さらにstage Iとstage IVにて発現に差があったApo A-Iに注目し、stage I 19例、stage IV 12例を対象に、BALFと血清中のApo A-1濃度をEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay（ELISA）にて測定した。研究方法は十分な生化学的な知識と技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「BALFのApo A-Iがサルコイドーシスstage Iにおいて抗炎症作用を目的として発現しているのかもしれない。Stage IにおいてBALF中Apo A-I濃度が高値であったもう一つの理由としては、サルコイドーシスの肺胞毛細血管バリア障害による血漿蛋白の漏出の可能性がある」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 巌　康仁 |
| 論文審査担当者 | 主査　仁科　博史<br>副査　北川　昌伸、清水　重臣 |
| 論　文　題　目 | Liver atrophy after percutaneous transhepatic portal embolization occurs in two histological phases: Hepatocellular atrophy followed by apoptosis |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

門脈塞栓術によって生じる肝萎縮の組織学的変化を詳細に明らかとする為に、経皮経肝門脈塞栓術（PTPE）を施行したブタモデル 5 頭の肝標本を用いて、経時的な組織学的変化の観察を行った。塞栓域と非塞栓域を取り出し、門脈域と中心静脈間の距離（PV-CV）・肝小葉内の肝細胞数を計測し、TUNEL 法を用いて apoptosis を評価、免疫組織化学的に LC3 や LAMP2 を用いて autophagy の評価を行った。さらに PTPE を施行されたヒト肝切除標本 10 症例で同様の評価を行った。PV-CV は PTPE 後 2 週目以降の塞栓域で有意差（$P<0.001$）を持って縮小していたが、肝小葉内の肝細胞数は PTPE 後 4 週目以降の塞栓域で有意差（$P<0.05$）を持って減少した。TUNEL 活性は、PTPE 直後と 4 週目の塞栓域で有意に上昇し、LC3 や LAMP2 は PTPE 後 2 週目の塞栓域で上昇した。ヒト標本の結果もブタ標本の結果と一致した。以上の結果から、PTPE による肝萎縮は 2 段階に分けられた。すなわち、autophagy との関連が示唆される肝細胞萎縮の 2 週間とその後に引き続く apoptosis である。

＜諸言＞

門脈塞栓術や腫瘍栓などによる門脈血流の途絶により、その還流領域の肝組織が臨床的に著明な萎縮を来すことがわかっているが、その詳細なメカニズムは不明のままである。我々は既に無水エタノールを用いたブタ PTPE モデルを用いた検討により、注入直後の肝逸脱酵素の一過性かつ急激な上昇と、PTPE 後 2 週目には既に肝萎縮、future liver remnant (FLR) / total estimated liver volume ratio の増加が認められることを報告している。

肝臓の微小環境を観察する上で、その最小ユニットである肝小葉に注目することは、重要である。組織学的変化が、肝臓内の血流変化で生じ、それぞれのゾーンで異なる肝小葉内の代謝にも依ると考えられる。

また、近年、apoptosis と autophagy の相互の関連性が報告されている。autophagy の評価に微小管関連の LC3 やリソソームの LAMP2 を用いていることが出来る。肝臓においては、飢餓による autophagy の惹起と著明な肝細胞の萎縮との関連性が報告されている。

本研究は、既に我々が確立したブタ PTPE モデル切除標本を用いて、経時的な病理組織学的変

化を詳細に検討し、autophagy および apoptosis と肝萎縮の関連性について明らかにすることである。さらに、ヒト切除標本を用いて、ブタにおける実験結果や既に報告された検討結果との整合性を検証する。

＜方法＞

動物

ブタ 7 頭の肝標本を実験に用いた。全てのブタは X 線透視下に segmental に PTPE が施行され、塞栓基質として 10ml の無水エタノールを注入された。詳細な方法は過去の我々の文献を参照。2 頭の肝標本が病理学的評価に適さず、PTPE の後 0 日目に 1 頭、2 週間目に 2 頭、4 週間目に 1 頭、6 週間目に 1 頭をそれぞれ犠牲にした。

患者

2004 年から 2010 年の間に国立がん研究センター中央病院肝胆膵外科で、術前 PTPE を施行したのち肝切除された症例のフォルマリン固定パラフィン標本を用いた。該当期間に行われた 111 名の患者の中から、大腸がん肝転移症例で黄疸もなく肝炎ウイルス感染もない症例のうち、さらに脂肪肝がなく、組織学検討で塞栓部と非塞栓部（尾状葉など）の肝実質を比較可能な患者 10 名を抽出した。それぞれの患者は、20 から 36 日目までの間（中央値 : 22 日）に切除された（男 : 女＝4:6、年齢の中央値 : 59 歳、範囲は 43-76）。全ての患者に PTPE を行った。研究プロトコールは、当院の倫理委員会に承認され、すべての患者から本研究を含めたインフォームドコンセントを得た(ID: 2007-022)。

以下、全ての組織学的検討は NDP でスキャンされた画像で行われた。

小葉の形態学的検討

H&E 染色を用いて、肝小葉における塞栓部と非塞栓部の組織形態的変化を観察した。同一小葉内の門脈内皮と中心静脈の内皮との距離(PV-CV)、肝小葉の断面積、を 50 ヶ所ランダムに計測を行った。さらに、肝小葉の大きさの中央値を決定した後、中央値±0.100mm2 までの肝小葉をランダムに 20 ヶ所抽出し、肝小葉内の肝細胞数を計測した。

apoptosis の評価

TUNEL 法を用いて、ランダムに抽出した 10 ヶ所の陽性率を 5 回計測した。

免疫組織化学染色

脱パラフィン後、10 分間 121℃1.5 気圧のオートクレーブによる賦活化後に、ポリマーシステム法を用いて施行された。LC3、LAMP2 各抗体を室温下 2 時間反応させた。

小葉内での LC3 発現強度は、IHC 染色切片を NDP のデジタル画像を、ImageJ®, version 1.48 を用いて解析した。

動物愛護

既に報告している文献の通り、当施設の倫理委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに沿って行われた（ID: K03-004）。

＜結果＞

肝小葉の PV-CV 間の距離、面積、肝細胞数の経時的変化

0 日目での PV-CV は、 塞栓部と非塞栓部でそれぞれ 0.571 mm, 0.485 mm を示し、有意差を認めなかったが、PTPE 後 2 週間以降の塞栓部ではそれぞれ 2 週目: 0.364 mm, 4 週目: 0.335 mm, 6 週目: 0.372 mm を示し、それぞれの非塞栓部と比して有意に短縮した (それぞれ $P < 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.001$)。さらに 0 日目の塞栓部と比しても有意に短縮していた（それぞれ $P < 0.001$, $P = 0.001$, $P = 0.001$）。PTPE 後 2 週間以降の塞栓部の肝小葉の断面積もそれぞれ 2 週目: 0.368 $mm^2$, 4 週目: 0.532 $mm^2$, 6 週目: 0.462 $mm^2$ を示し、PV-CV と同じようにそれぞれの非塞栓部(それぞれ、2 週目: 0.717 $mm^2$, 4 週目: 0.836 $mm^2$, 6 週目: 1.376 $mm^2$)や 0 日目の塞栓部: 1.096 $mm^2$ と比べると有意に縮小した( 全て $P < 0.001$)。 また、PV-CV 間の距離も肝小葉の断面積も 2 週目以降の塞栓部の値には、それぞれ統計学的な有意差はなかった。

肝小葉内の肝細胞数は、PTPE 後 2 週間目までの塞栓部と非塞栓部に有意な差異は認めなかったが、 4 週間に塞栓部: 1459, 非塞栓部: 2055、6 週目に塞栓部: 1494, 非塞栓部: 2642 を示し、それぞれ有意に減少した(それぞれ $P = 0.025$, $P < 0.001$) 。4 週目と 6 週目の塞栓部は、0 日目および 2 週目の塞栓部や非塞栓部と比較して有意な細胞数の減少を示した（全て $P < 0.001$）。

apoptosis の経時的変化

TUNEL 陽性肝細胞率は 0 日目と 4 週目でそれぞれ非塞栓部よりも塞栓部が有意に上昇した（0 日目で 11.1 % v.s. 2.37% , 4 週目で 5.51 % v.s. 0.493 %)(それぞれ $P = 0.018$, $P = 0.009$)。

小葉内における LC3, LAMP2 の発現強度の経時的変化

ImageJ®を用いた LC3 の IHC 発色強度は､2 週目の塞栓部で（それぞれ LC3: 0.994, LAMP2: 45.4）と非塞栓部で（LC3: 0.486, LAMP2: 27.0）を示し、塞栓部が非塞栓部に比べ有意に増強を示し ($P = 0.046$, 0.014)、他のグループとの比較中で最も強い有意差を示した($P < 0.025$, 0.014)。

ヒト検体における塞栓部と非塞栓部の評価

ブタ標本を用いた結果を、PTPE 後のヒト肝切除後標本でその妥当性の検証を行った。ヒトの肝臓はブタとは違い、明瞭な肝小葉構造を取らないので、PV-CV 間の距離の評価を形態学的に行った。PV-CV は塞栓部と非塞栓部で、それぞれ 0.455 mm, 0.563 mm を示し、塞栓部での距離が有意に短かった。 ($P < 0.001$) ブタ 4 週目の検討結果と同様の傾向となった。 塞栓部と非塞栓部での TUNEL 陽性肝細胞率は 2.804 %、0.559 %で、塞栓部は非塞栓部に比べ有意に高かった。($P < 0.001$) すべての症例で塞栓部と非塞栓部での LC3 の発色強度に有意な差は認められなかった。ブタ 4 週目の検討結果と同様の傾向となった。

＜考察＞

門脈血流遮断により塞栓部は萎縮を来し、非塞栓部は門脈血流の増加により代償性に肥大する。門脈血流の遮断により肝細胞の大きさの変化や apoptosis の増加との関連が報告されている。本研究の経時的な肝小葉に着目した形態学的な検討から、我々は門脈血流の途絶による肝萎縮について大きく 2 つの期間が存在すると考えた。門脈血流の途絶後 2 週目までに細胞数の変化を伴わない肝萎縮と LC3 や LAMP2 の高発現がみられた第一期と、2 週目から 4 週目までの間に、肝小葉の大きさに変化を伴わない肝細胞数減少と LC3 や LAMP2 発現低下および TUNEL 陽性率上昇を認めた第二期である。

肝細胞数の減少を伴わずに肝小葉の面積と PV-CV の著明な減少が認められた最初の 2 週目までの期間を肝細胞萎縮期ととらえることが出来ると考える。門脈塞栓術によって富栄養血流である門脈血流の途絶は、肝細胞の飢餓を引き起こすと考えられ、2 週目の塞栓部では LC3 や LAMP2 の高発現が観察された。従って、2 週目までの第一期は門脈血流途絶によって生じた autophagy の活性化が主に関連した肝細胞萎縮ととらえることができると考える。

4 週目では、塞栓部の肝小葉の大きさは 2 週目と変化がほとんどないが、著明な肝細胞数の減少が生じた。4 週目では 2 週目に比べ、LC3 発現は有意差をもって著明な減少を来し、TUNEL 陽性率の有意な上昇を認めていることから、この間に autophagy 活性の著明な減少と apoptosis の上昇が生じたと考える。従って、我々の検討結果から、autophagy の後に apoptosis が引き起こされ、細胞数の減少が生じたと考えられ、2 週以降の第二期は apoptosis 期と考えることが出来る。さらに、4 週目と 6 週目においては、小葉の形態学的・免疫組織化学的変化は認められず、TUNEL 陽性率も塞栓部と非塞栓部で有意差を示さない。以上の事実から、4 週間目から 6 週間目までの間に肝萎縮は組織学的に完成しているものと考えられる。これらの事実から、臨床的に FLR の肥大を待って PTPE 後 4 週程度で手術が行われることは、我々の検討でもたとえ 2 週目で巨視的な萎縮が完了していても微視的な萎縮の完了する 4 週を待つという意味で妥当であることが示唆された。

本研究ではブタ標本の数が十分とは言えず、肝細胞萎縮と autophagy の関連性の証明も十分ではない。Western-blotting で LC3-II を分離もしくは電子顕微鏡でオートファゴソームの観察の必要であるが、フォルマリン固定後の標本ではうまく行かなかった。さらなる研究によって、肝萎縮のメカニズムを解明することに十分寄与することと信じている。そしてこのメカニズムの解明は、門脈血流の減少に起因する慢性肝疾患の治療の確立に貢献出来る可能性がある。

＜結論＞

我々の検討から、門脈血流の途絶後の肝萎縮には、2 週間目までに細胞数の変化を伴わない肝小葉の萎縮と LC3 の高発現がみられる autophagy を主体とした変化の肝細胞萎縮期と、2 週間目から 4 週間目までの間に、肝小葉の変化を伴わずに肝細胞数減少、LC3 発現低下、TUNEL 陽性率上昇を認める apoptosis を主体とした変化の apoptosis 期の存在が示唆された。PTPE 後のヒト切除検体での検討でも 4 週目のブタ検討結果と同様の傾向が得られ、ヒトの PTPE 後の肝萎縮も同様のメカニズムで生じている可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5424　号 | 巖　康仁 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　仁科　博史<br>副　査　北川　昌伸、清水　重臣 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は「経皮経肝門脈塞栓術による肝萎縮」についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

無水エタノールを用いた経皮経肝門脈塞栓術は、肝切除術前準備としてしばしば行われる。門脈塞栓術による代償性肝肥大に関する研究成果は多数報告されているが、肝萎縮に関する報告はほとんど存在しない。このような背景の下、申請者は、ブタを用いた実験ならびに臨床サンプルを用いて、経皮経肝門脈塞栓術後の肝組織像の変化を検討した。これまで注目されていなかった肝萎縮を対象にした着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

ブタを用いた実験結果から、肝小葉の萎縮、小葉内肝細胞数の減少が、各々術後2週目、4週目より生じることを見出し、臨床検体でもこれを支持する結果を得た。以上のように申請者は、臨床検体で生じている事象をモデル動物で検証し、外科領域に科学的視点を導入した。基礎・臨床両面において有意義な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究にはブタが用いられ、詳細な組織化学的解析が行なわれた。本手法は十分な生理学的知識と外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究結果について深く考察し、自身の外科医としての行為を科学的に理解しようとしている。科学的根拠を基づいた新たな術法の開発へと発展することが期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士(医学)の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 游　理恵 |
| 論文審査担当者 | 主査　森尾　友宏<br>副査　宮﨑　泰成、樗木　俊聡 |
| 論　文　題　目 | Basophils and mast cells are crucial for reactions due to epicutaneous sensitization to ovalbumin |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年、食物アレルギー罹患率は世界中で増加しており、感作経路として、皮膚を介した反応が注目されている。これらの機序を解明する目的で、マウスにおけるオブアルブミン（OVA）の経皮感作マウスモデルを作成した。テープストリップを施したマウス皮膚に、OVA を 1 週間密封貼付し感作を、それぞれ 2 週間の間隔をおいて合計 3 回の感作を行い、OVA を経口投与した。直腸温の経時的測定を行い、反応を観察後、皮膚組織及び血液を採取し、組織学的、血清学的な解析を行った。また、遺伝子組み換えマウスを用い、好塩基球、肥満細胞を除去した状態で、経口投与後の反応を観察し、比較検討を行った。

OVA による経皮感作を行ったマウスにおいては、直腸温の低下に代表される全身性アナフィラキシー反応を認めた。OVA 特異的 IgE および IgG の上昇を確認し、アジュバント等の物質を用いることなく、経皮感作によるアナフィラキシー反応が成立することを示した。これらの皮膚組織において、肥満細胞と好塩基球数の増加を認め、mouse Mast cell protease-1 (mMCPT-1)の優位な上昇を認めた。この反応は、野生型マウスに Ba103 抗体を投与し、好塩基球が惹起時に除去された状態でほぼ抑制され、Mcpt8-DTR マウスにおいて好塩基球が deplete された状態では、部分的に抑制された。肥満細胞のない $Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$マウスではほぼ完全に全身性アナフィラキシーの症状が抑制された。この結果から、我々のマウスモデルのアナフィラキシー反応において、肥満細胞が必須であること、惹起時に好塩基球がある一定の役割を担う可能性があることを示した初めての研究である。また、OVA により経皮感作された皮膚組織においては、TSLP(thymic stromal lymphopoietin)の上昇を認め、特殊な操作を用いずに感作皮膚において TSLP が上昇することを示した。今回我々は OVA による経皮感作が成立し、食物アレルギーによるアナフィラキシー反応が起こることを示し、この反応に TSLP-好塩基球-肥満細胞が関与することを推測し、これらが食物アレルギーの新しい治療戦略となり得ることが示唆された。

＜緒言＞

近年、食物アレルギーの有病率は、小児において 10%、成人において 2-3%とも言われている。これまで、食物アレルギーは腸管における免疫寛容の拒否(failure)に起因して起こると言われてい

たが、最近では、腸管を介さず、経皮的に感作が成立し食物アレルギーが発症するというエビデンスが示されている。代表的な例としては、ピーナッツオイルを皮膚に塗布したことによるピーナッツアレルギーの成立が示されており、経皮的感作が注目されている。また本邦においては、加水分解小麦を含む石鹸の使用により小麦アレルギーが発症した症例が社会問題となった。これらの症例はいずれも、腸管を介さずに食物アレルギーが成立していることを示しており、より一層、感作の経路として、皮膚を介した反応が注目されるようになった。

これまで、IgE が肥満細胞に結合することで、食物アレルギー反応が起こることが様々な実験で示されてきた。しかしながら、感作相や食物アレルギーの反応相においての開始機序については、まだ明らかではない。今回我々は、OVA を用いた経皮感作マウスモデルを作成し、機序の解明を目的として実験を行った。

＜方法＞

剃毛を行いテープストリッピングをした BALB/c マウス背部皮膚に、OVA を 1 週間密閉貼付、このサイクルを 2 週間の間隔を開けて計 3 回の感作を行った。このマウスに OVA を経口投与し、直腸温や皮膚反応を観察し、血清タンパクの変化等につき検討した。また、感作部位の皮膚を採取し、好塩基球数、肥満細胞数について、病理学的検討を行った。これらのマウスに対して、予め好塩基球除去抗体(Ba103)を経口投与 24 時間前に静脈注射し、OVA 経口投与を行い、比較検討した。Mtpt8-DTR マウスに関して、前述のスケジュールで経皮感作を行い、48 時間前に DT を静脈注射し、好塩基球を選択的に除去した状態で、経口投与による惹起を行った。肥満細胞欠損マウス($Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$)マウスに関しても、同様のスケジュールで経皮感作し、経口投与を行った。

＜結果＞

OVA 抗原の経皮感作をした BALB/c マウス（OVA-epicutaneous-sensitized mice; OESM）群では、OVA 特異的 IgG および IgE の上昇を認め、経口抗原投与後に直腸温の急激な低下を認めた。これは、OVA を経腹腔内投与し感作した陽性コントロール群 (systemic anaphylaxis-induced mice; SAIM)と同程度であり、陰性コントロール群（saline pretreated）と有意差を認めた。
OESM 群および SAIM 群では、感作を行った皮膚において、組織中の肥満細胞数の増加を認め、血清中の mMCPT1 の有意な上昇を認めた。腸管における肥満細胞数は増加の傾向がみられたものの、統計学的有意差は認めなかった。

また、好塩基球数に関しては、OESM 群および SAIM 群において、皮膚だけでなく腸管組織での増加を認めた。

OVA 抗原感作部位では、全てのマウス群において皮膚の炎症反応変化を認め、組織像は表皮肥厚と炎症細胞浸潤を示した。OVA 経皮感作群において、皮膚での TSLP の発現が、NS 貼付群と比較して上昇を認めた。

Ba103 を惹起前に投与した群では、全身性アナフィラキシー反応の抑制が観察されたが、コントロール IgG を前投与した群においても、部分的に反応の抑制を認めた。このため、Mcpt8-DTR トランスジェニックマウスを用い、比較検討を行った。惹起より 48 時間前にジフテリア毒素(DT)を静注することで好塩基球を末梢血中より選択的に除去した Mcpt8-DTR トランスジェニックマ

ウス群においては、部分的にアナフィラキシー反応が抑制するされた。また、小さいながらも有意差をもって皮膚組織において脱顆粒した肥満細胞数の低下を認めた。血中 mMCPT-1 濃度は、DT 静注群で著明な低下を認めた。

また、肥満細胞の関与を検討するため、$Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$マウスとその野生型マウスを用いた実験を行った。$Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$マウス群では、全身性アナフィラキシー反応のほぼ完全な抑制を認めた。好塩基球数の変化は認められなかった。

＜考察＞

近年の食物アレルギーの概念において、経皮的に抗原に感作されて成立することが注目されている。本研究では、アジュバンドなどの特殊な手技を用いずに経皮感作を行い、特異的 IgE 抗体、特異的 IgG 抗体が上昇していることを確認した。そしてこのマウスは、全身性アナフィラキシーモデルマウスとして確立されている経腹腔内感作されたマウスと同等の体温の低下を認め、経皮感作によるアナフィラキシーモデルマウスが成立することを示した。本研究の特筆すべき点と言える。我々は、このマウスモデルを用い、アレルギー反応における主たるエフェクター細胞である好塩基球と肥満細胞の関与について研究を進めた。

まず、OESM 群、SAIM 群において、皮膚組織への好塩基球数の増加を認め、血中 mMCPT-1 がともに増加していた。経皮膚経路と経腹腔経路において、好塩基球と肥満細胞が抗原感作相で関与していることを示した。

次に、アナフィラキシー反応相での好塩基球と肥満細胞の関与を検討するために実験を行った。まず野生型マウスに Ba103 抗体を経口投与 48 時間前に静脈注射し、WT マウスにおいて好塩基球が除去された状態で経口投与を行ったところ、陽性コントロール群に比べてほぼ完全に体温の低下を抑制した。これに加え、同様の経皮感作を行った Mcpt8-DTR マウスに対して経口投与 48 時間前に DT（ジフテリア毒素）を静脈注射し、経口投与チャレンジの時点で好塩基球が選択的に deplete された状態のマウスでは、部分的な体温低下の反応が抑制された。そして、肥満細胞のない $Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$マウスでは、ほぼ完全に全身性アナフィラキシー反応が抑制された。これらの結果から、肥満細胞がない状態ではアナフィラキシー反応が起こらないが、好塩基球がない状態では、肥満細胞があるにも関わらずアナフィラキシー反応が減弱することが示された。以上より、我々のマウスモデルにおいては、アナフィラキシー反応には肥満細胞が必須であること、また好塩基球が全身性アナフィラキシー反応に対してある一定の部分を担うことが示唆された。

近年、バリア機能の破壊された皮膚の表皮細胞から TSLP が産生されていることが示されている。この TSLP の産生が好塩基球を活性化し、Th2 型反応を誘導し、皮膚や腸管における肥満細胞の活性化を促すことで、IgE 依存性の食物アレルギーを引き起こすとされる。アトピー性皮膚炎に代表される皮膚バリア障害が、食物アレルギーの成立にとって一つのリスクファクターである仮説を支持する内容である。

本研究においては、テープストリッピング操作のみを用い経皮感作を行ったが、感作抗原を貼付した皮膚で TSLP の発現の上昇を認めた。また感作部位の皮膚において好塩基球の著明な増加を認めたことから、好塩基球が感作相において重要な役割を果たしている可能性は高いと言える。このような好塩基球の惹起が、肥満細胞の活性化や Th2 型反応へのシフトを引き起こした結果、

経皮感作が成立する機序が推測された。また全身性アナフィラキシー反応において、肥満細胞だけでなく、好塩基球も部分的に指令的な役割を担っている可能性が示された初めての研究である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5425　号 | 游　理恵 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　森尾　友宏<br>副　査　宮﨑　泰成、樗木　俊聡 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、マウスにおけるオブアルブミン（OVA）の経皮感作マウスモデルを作成し、OVA の経口投与で OVA 特異的 IgE および IgG の上昇を伴うアナフィラキシー反応を誘導し、その過程に感作皮膚からの TSLP→好塩基球→肥満細胞が関与することを示したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

食物アレルギー罹患率は世界中で増加しており、感作経路として、皮膚を介した反応が注目されているが、その機序は明らかになっていない。このような背景の下、申請者は経皮感作マウスモデルを確立し、経口投与でアナフィラキシー反応を誘導し、その反応への好塩基球や肥満細胞の関与について解析を行っている。その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた成果は以下のとおりである。

1. OVA 抗原の経皮感作をした BALB/c マウスでは、OVA 特異的 IgG および IgE の上昇を認め、経口抗原投与後にアナフィラキシーが認められた。
2. 感作を行った皮膚において、組織中の肥満細胞数の増加を認め、TSLP の発現が上昇し、血清中の mouse Mast cell protease-1（mMCPT1）の有意な上昇を認めた。好塩基球は皮膚及び腸管にて増加を認めた。
3. 好塩基球を除去すると、アナフィラキシーの抑制が認められた。また後者では皮膚組織において脱顆粒した肥満細胞数の低下を認めた。
4. 肥満細胞がない状態では、アナフィラキシー反応がほぼ完全に抑制された。

以上のように申請者は、皮膚における TSLP の発現上昇から、好塩基球の増加、肥満細胞の活性化に至る過程の一部を明らかにしており、これは臨床的にも極めて有用な研究結果と言える。

３）研究方法・倫理観

研究ではOVAの経皮感作モデルが作成され、既存の腹腔内感作モデルとの比較が行われた。好塩基球除去には抗好塩基球抗体（Ba103）やMcpt8-DTRトランスジェニックマウスが用いられ、肥満細胞欠損モデルとして$Kit^{W\text{-}sh/W\text{-}sh}$マウスが使用された。経口感作前後の、直腸温変化、病理組織、

局所のTSLP発現や、血清中のmMCPT1などの検討が行われており、申請者の研究方法に対する知識と技術が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は本研究において、好塩基球が感作相において重要な役割を果たしている可能性を指摘している。また全身性アナフィラキシー反応においては、肥満細胞だけでなく、好塩基球も部分的に指令的な役割を担っている可能性があると考察している。これらは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な結論であり、今後の研究の更なる発展が期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 瀧口　一夫 |
| 論文審査担当者 | 主査　立石　宇貴秀<br>副査　前原　健寿、功刀　浩 |
| 論　文　題　目 | Association of schizophrenia onset age and white matter integrity with treatment effect of D-cycloserine: a randomized placebocontrolled double-blind crossover study |

（論文内容の要旨）

<要旨>

統合失調症の抗精神病薬抵抗性の難治性症状に対する、NMDA 型グルタミン酸受容体機能を促進する本受容体グリシン調節部位の刺激薬の効果と、これに影響する因子を明らかにする目的で、D-cycloserine（DCS）のプラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験を行い、臨床症状評価尺度、発症年齢、MRI 脳画像所見、等との関係を調べた。本試験では、統合失調症患者 41 名に DCS およびプラセボを、それぞれ 3 週間の無投与期間前後の 6 週間に無作為に割り付け、服用中の抗精神病薬に add-on 投与したが、陽性症状、陰性症状、および認知機能障害の評価尺度のスコアには、DCS による有意な改善は見られなかった。これに対し、発症年齢を考慮した検討では、DCS は 18 歳未満に発症した患者の陰性症状スコアを増悪させた。MRI 拡散テンソル画像解析では、(1) 矢状層、帯状束、脳弓・分界条、脳梁膝、外包の白質統合性と、DCS による統合失調症認知機能簡易評価尺度（BACS）の改善効果、および(2) 脳梁膨大の白質統合性と、陽性・陰性症状評価尺度の総合精神病理スコア（PANSS-G）の減少効果、の間に正の相関が見られ、(3)左側後視床放線の白質統合性と、PANSS-G および陰性症状評価尺度の快感消失・非社交性スコアの改善効果には負の相関が認められた。以上の結果から、DCS の抗精神病薬抵抗性症状に対する効果は、発症年齢や特定脳部位の白質統合性に影響される可能性が示唆された。

<緒言>

フェンサイクリジンやケタミンをはじめとする NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）遮断薬や、NMDA 受容体に対する自己抗体が、統合失調症様の陽性・陰性症状と認知機能障害を引き起こすことから、本症において NMDA 受容体を介したグルタミン酸神経伝達の低下が推察されている。従って、NMDA 受容体機能の回復によって、既存の抗精神病薬に抵抗する陰性症状および認知機能障害が改善することが期待され、NMDA 受容体グリシン調節部位を刺激し本受容体機能を促進する薬物を、抗精神病薬服用中の統合失調症患者に add-on 投与する臨床試験が進められている。

このうち、D-サイクロセリン（D-cycloserine: DCS）は、抗結核薬として臨床的に使用されてきたが、1989 年に新たに NMDA 受容体グリシン調節部位に対する部分アゴニスト作用が報告さ

れ、NMDA 受容体賦活による統合失調症の症状改善を目的とした臨床試験に応用されるようになった。これまでの臨床試験では、50mg/日が NMDA 受容体機能促進効果を最も期待でき、陰性症状や認知機能障害を改善したことが報告されているものの、否定するデータもあり結果は一致していない。この不一致は、統合失調症の異質性に起因している可能性がある。そこで本研究では、(1)臨床症状は類似していても、原因が異なると、発症開始年齢に差異が見られる疾患があることや、(2)統合失調症では白質やその主要成分であるオリゴデンドログリアの異常が指摘されていること等に着目し、DCS の精神症状に対する効果を検証するとともに、発症年齢や白質の状態を反映すると言われる MRI 拡散テンソル画像所見との関連を検討した。

<方法>

本試験は、東京医科歯科大学、徳島大学、国立精神・神経医療研究センター、針生ヶ丘病院および大宮厚生病院において、治験審査委員会の承認を得て実施した。DSM-Ⅳの統合失調症の診断基準を満たし、書面で研究参加への同意を得た患者 41 名を対象に、DCS およびプラセボを、3 週間の無投与観察期間の前後に設定した、各 6 週間の第一治療期と第二治療期に無作為に割り付け，服用中の薬剤に add-on 投与する、プラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験を行った。被験者はすべての期間中、試験開始前に服用していた薬剤を変更しなかった。

精神症状の評価は、陽性・陰性症状評価尺度（PANSS）、陰性症状評価尺度（SANS）、統合失調症認知機能簡易評価尺度（BACS）、情動知能尺度（EQS）、カルガリー統合失調症用抑うつ症状評価尺度（JCDSS）、および全般的評価尺度（GAF）により行った。さらに薬原性錐体外路症状評価尺度（DIEPSS）、異常不随意運動評価尺度（AIMS）を用いて錐体外路症状を評価した。

全体の DCS 効果の評価には反復測定分散分析を用いた。さらに、発症年齢の DCS に対する反応性への影響を検討するため、対象サンプルを発症年齢が 18 歳未満の患者を早期発症群（EOS）、18 歳以上の患者を非早期発症群（non-EOS）と定義し、評価尺度のそれぞれの下位項目の DCS-effect（DCS 投与期の症状評価得点から PCB 投与期の得点を引いたもの）を従属変数、発症年齢（EOS vs non-EOS)を独立変数とした多変量分散分析を用いて EOS と non-EOS を比較した。

MRI 画像については、第一治療期開始前に 3 テスラ MRI にて拡散テンソル画像を撮像し、Tract based spatial statistics（TBSS）により、白質統合性の指標である Fractional anisotropy（FA）値を算出した。FA 値と DCS-effect との関連性を検討する目的で、48 脳領域の FA 値と DCS-effect のピアソン相関分析を行った。

<結果>

41 名の患者を第一治療期で DCS を服用する群（DCS-first 群）と第一治療期でプラセボを服用する群（PCB-first 群）に無作為に割り付けたところ、それぞれ 19 名と 22 名となった。臨床試験を完遂したのは DCS-first 群が 17 名、PCB-first 群が 19 名の合計 36 名であった。

PANSS、SANS 、BACS、EQS のそれぞれの下位項目では DCS 投与時と PCB 投与時で有意な差は認めなかった。また GAF、JCDSS、DIEPSS、AIMS のいずれにも有意な差は認めなかった。

EOS と non-EOS の比較において、PANSS の陰性尺度に有意な差を認めた。陰性尺度は、non-EOS では、DCS とプラセボのどちらの治療期も時間経過とともに得点が減少し、両者の差はほとんどなかったのに対し（DCS-effect -0.07）、EOS ではプラセボ治療期では得点が減少する一方で、DCS 治療期にはむしろ増加した（DCS-effect +2.2）。SANS、BACS、EQS の得点には有意な差はなかった。

拡散テンソル画像の解析による各脳領域の FA 値と DCS-effect の相関の検討では、次の通り、各臨床評価項目において有意な相関係数（$P < 0.01$）が認められた：(1) PANSS の総合精神病理スコア（PANSS-G）と、脳梁膨大の FA との負の相関（FA が高いほど DCS による改善度が大きい）、および左側後視床放線の FA との正の相関（FA が低いほど DCS による改善度が大きい）、(2) SANS-IV と、左側後視床放線の FA との正の相関、(3)BACS トークン運動課題（BACS-TM）と、左側矢状層、右側及び左側帯状束、右側脳弓・分界条の 4 領域の FA との正の相関、(4) BACS ロンドン塔検査（BACS-TOL）と、脳梁膝、左側外包、右側及び左側帯状束、左側脳弓・分界条の 5 領域の FA との正の相関。

<考察>

本研究において、DCS は統合失調症の陽性症状、陰性症状、認知機能障害を改善しなかった。DCS が効果を示さなかったことは、部分アゴニストであるために治療域用量の範囲が狭く、海外の研究で使用された DCS 50mg/日が日本人にとって至適用量ではなかった可能性がある。また、試験参加以前から患者が服用していた抗精神病薬の種類の影響も否定できない。すなわち、先行研究では、定型抗精神病薬よりも非定型抗精神病薬を併用している患者の方が、DCS を add-on した時の陰性症状に対する改善効果が弱いことが指摘されており、本研究ではほとんどの被験者が後者を服用していたことが、DCS の陰性症状への効果を見かけ上減弱させた可能性がある。

発症年齢が DCS の効果に与える影響を検討した結果、概ね EOS では non-EOS と比べて諸症状のスコアが増悪する傾向が認められた。特に PANSS の陰性症状では、EOS のスコアの悪化は non-EOS と統計学的に有意差があった。一般に EOS の患者は non-EOS と比較して、症状や治療薬への反応に違いがあり、より難治性で予後が悪いと言われている。さらに、我々は統合失調症患者死後脳を分析した研究において、グルタミン酸神経伝達に関連する *DLG1* 遺伝子の発現が、EOS と non-EOS の間で著明な差異があることを報告している。以上の所見は、統合失調症の異質性を支持していると考えられ、グルタミン酸神経伝達系の病態に差異がある統合失調症群が存在し、これらは発症開始年齢が異なることを示唆している。

拡散テンソル画像では、DCS による特定の症状評価スコアに対する効果と特定の脳部位の FA 値の間に相関を認めた。FA 値が高いほど DCS によるスコアの改善度が大きい脳領域と、FA 値が低いほど DCS による改善度が大きい脳領域が見られることは、DCS の効果を予測する指標や統合失調症の異質性解析の手がかりになると考えられる。

<結論>

DCSは統合失調症患者全体としては陽性症状、陰性症状、認知機能障害に改善効果を認めなかった。しかしDCSへの反応性は発症年齢や白質統合性の違いにより異なることがわかり、DCSの

ようにNMDA受容体機能を促進する薬物による治療においては、これらの患者の異質性を反映する指標を考慮する戦略の必要性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5426　号 | 瀧口　一夫 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　立石　宇貴秀<br>副　査　前原　健寿、功刀　浩 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は､統合失調症の薬物治療における NMDA 型グルタミン酸受容体機能を促進する刺激薬の効果とこれに影響する因子を明らかにする目的で施行した D-cycloserine（DCS）のプラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験の結果である。統合失調症患者 41 名に DCS およびプラセボを、それぞれ 3 週間の無投与期間前後の 6 週間に無作為に割り付け、服用中の抗精神病薬に add-on 投与した。PANSS、SANS 、BACS、EQS のそれぞれの下位項目では DCS 投与時と PCB 投与時で有意な差は認めなかった。また GAF、JCDSS、DIEPSS、AIMS のいずれにも有意な差は認めなかった。発症年齢が 18 歳未満の患者を早期発症群（EOS）､18 歳以上の患者を非早期発症群（non-EOS）と定義し、これらの比較において、PANSS の陰性尺度に有意な差を認めた。発症年齢や白質の状態を反映すると言われる MRI 拡散テンソル画像所見との関連を検討し、脳梁膝、左側外包、右側及び左側帯状束、左側脳弓・分界条の 5 領域の FA との正の相関が得られた。DCS は統合失調症の陽性症状、陰性症状、認知機能障害を改善しなかったが、EOS では non-EOS と比べて諸症状のスコアが増悪する傾向が認められた。統合失調症の異質性を支持していると考えられ、グルタミン酸神経伝達系の病態に差異がある統合失調症群が存在し、これらは発症開始年齢が異なることを示唆している。

**２．論文審査**

<u>１）研究目的の先駆性・独創性</u>

統合失調症の薬物治療における NMDA 型グルタミン酸受容体機能を促進する刺激薬の効果とこれに影響する因子を明らかにする目的で施行した D-cycloserine（DCS）のプラセボ対照二重盲検クロスオーバー試験の結果であるため、他に類を見ない貴重なデータを提示し本研究は独創性が認められる。

<u>２）社会的意義</u>

DCS は統合失調症の陽性症状､陰性症状､認知機能障害を改善しなかったが､EOS では non-EOS と比べて諸症状のスコアが増悪する傾向が認められた点で社会的意義は大きい。

<u>３）研究方法・倫理観</u>

既存データをもとに研究背景、目的、研究計画をたて、結果として negative data ではあるもの

の、実例を元に結果を出されている。

４）考察・今後の発展性

DCS は統合失調症の陽性症状、陰性症状、認知機能障害を改善しなかったが、EOS では non-EOS と比べて諸症状のスコアが増悪する傾向が認められた。データを補正し対照群を絞った試験を実施できるとよいと考えた。

**３．その他**

特記事項なし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は本学博士の学位授与に値する十分な価値を有すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 葛井　総太郎 |
| 論文審査担当者 | 主査　平尾　見三<br>副査　吉田　雅幸、水野　友裕 |
| 論　文　題　目 | Novel Assessment Tool Based on Laser Speckle Contrast Imaging to Diagnose Severe Ischemia in the Lower Limb for Patients With Peripheral Arterial Disease |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

末梢動脈疾患（Peripheral Arterial Disease; PAD）患者において、経皮酸素分圧（transcutaneous oxygen tension: $tcPO_2$）プローブによる足背部の局所加温後の血流量変化をレーザースペックルコントラスト画像（Laser Speckle Contrast Imaging: LSCI）装置で経時的に評価した。2015 年 1 月から 6 月に東京医科歯科大学血管外科を受診した PAD 患者 36 例、63 肢を対象とした。結果は明らかに異なる 2 つの群に分類できた。すなわち、一過性の血流量上昇後に急激に低下する群（decrease group; D 群）と、変化に乏しくプラトーな変化血流量低下を示す群（plateau group; P 群）に分類された。P 群が重症虚血肢の基準の一つである $tcPO_2$値 30mmHg 未満を検出する感度は 78.7%、特異度は 96.2%であった。本法が重症下肢虚血肢の新たな評価法として有用である可能性が示唆された。

＜緒言＞

PAD は客観的な検査による診断が推奨される。足関節上腕血圧比（Ankle Brachial Index: ABI）や $tcPO_2$は血圧や組織酸素化による非侵襲的な下肢虚血評価法である。特に、$tcPO_2$は重症虚血肢評価の最も一般的な方法の 1 つである。一方、非侵襲的な血流イメージング技術である LSCI 装置は、組織にレーザーを照射し、散乱光の空間的および時間的変化を観察することにより組織血流量と同等の値を検出する。LSCI を含むレーザー血流計を用いた熱負荷が引き起こす皮膚血流量の変化は古くから研究されおり、局所冷却に対する皮膚血流量の変化は“Cold-induced vasodilation”と呼ばれる再現可能な一過性の血流量上昇を示すことが知られている。これは三相性応答、つまり最初の急速な血管収縮、その後の一過性血管拡張、および最後の長期的な血管収縮からなる。しかし、このような熱負荷による血流量の経時的変化を重症虚血肢の評価に応用する方法は確立されていない。我々は、LSCI で検出される熱負荷後の血流量の経時的変化は重度の虚血肢では特異的な変化を示すと仮定した。一過性の血流値上昇後の長期的な血流量減少を“slope”という指標で数値化し、従来の虚血評価の指標である ABI および $tcPO_2$と比較検討し、LSCI を用いた温度負荷に基づく虚血重症度評価法の確立を試みた。

＜方法＞

2015 年 1 月から 6 月に、PAD の臨床的徴候を有し当科で診察を行った 36 例 63 肢を対象とした。すべての患者から、ABI、$tcPO_2$、および新たな検査法である LSCI 温度負荷（LSCI thermal load: LTL）検査の 3 つの方法を用いて評価した。LTL 検査の評価方法は、まず室温が 23-25℃に設定された部屋に患者を 15 分間仰臥位で安静とした。次に $tcPO_2$装置（TCM400™, Radiometer 社，コペンハーゲン）を用いて酸素分圧の測定を行った。これは同時に $tcPO_2$測定時のプローブによる局所加温を目的として使用した。約 1cm 大の $tcPO_2$プローブを 44℃に設定し、足背の近位と遠位（第 1 と第 2 中足骨との間）の 2 カ所に 20 分以上装着し安定した $tcPO_2$値を測定した。血流値計測は $tcPO_2$プローブを皮膚から取り除いた、すなわち外気に曝され自然冷却された瞬間から、足背部より 40cm の距離に設置された LSCI 装置（Omegazone™, Omegawave 社，東京）の CCD カメラで足背部を 15 分間にわたり録画した。この画像から $tcPO_2$プローブで加温された 1cm 径の 2 か所を関心領域に設定し血流量（Perfusion value; PV）を解析した。観察される一過性の血流量上昇の頂点から 5 分間における分時血流量の低下を“slope”として新たな指標とした。単位は PV/min であった。この slope を ABI、$tcPO_2$と比較検討した。統計学的解析としてマン・ホイットニーU 検定および受信者動作特性（Receiver Operating Characteristic; ROC）曲線を用いた。p 値は 0.05 未満で統計学的有意差ありとした。

＜結果＞

36 例の平均年齢は 74 歳で 25 例が男性であった。63 肢のうち Rutherford 分類における Grade I は 33 肢、Grade II および III は 30 肢であった。LTL を検査した 126 カ所において、血流量の変化は明らかに異なる 2 つのパターンを示した。それらを一過性の血流量上昇後に急峻に低下を示す“D 群”と、変化に乏しくプラトーな変化を示す“P 群”に、slope を 0.20 PV/min を閾値として分類した。その結果、P 群は 40 カ所、D 群は 86 カ所であった。P 群における ABI の中央値は 0.35 [25－75％範囲：0.11－0.61]、$tcPO_2$の中央値は 8.0mmHg [3－18mmHg]であり、D 群における ABI の中央値 0.66 [0.52－0.84]、$tcPO_2$の中央値 45mmHg [36－53mmHg]に比較し有意に低値であった。40 カ所の P 群の内、ABI が 0.40 未満は 21 ヵ所（52.5％）、$tcPO_2$ が 30mmHg 未満は 37 ヵ所（92.5％）であった。ROC 曲線による P 群が ABI 0.40 未満を検出する感度は 61.8％、特異度は 75.0％、ROC 曲線下面積は 0.723 を示した。また、P 群が $tcPO_2$ 30mmHg 未満を検出する感度は 78.7％、特異度は 96.2％、ROC 曲線下面積は 0.908 を示した。同様に $tcPO_2$ 20mmHg 未満を検出する感度は 88.2％、特異度は 88.2％、ROC 曲線下面積 0.919 であった。

＜考察＞

本研究の目的は、レーザー血流計を用いた新たな下肢虚血重症度の評価法を確立することである。我々が知る限りこれは LSCI 装置を用いた温度負荷による下肢虚血評価における最初の報告である。患者の分布では ABI、$tcPO_2$では大きな偏りは見られなかったが、slope では、0.15－0.20 PU /min の範囲には 2 カ所のみ分布し、その範囲を境に 2 峰性に分布していた。slope が 2 極化されることは重要な結果の 1 つであり、slope の値 0.20 PU /min を閾値として採用し、一過性の血流上昇後にプラトーな変化を示す P 群と急速な減少を示す D 群とに分類した。P 群は、ABI、$tcPO_2$

ともにD群より有意差をもって低値を示し、大部分は重症下肢虚血として適当な値であった。米国血管外科学会が提唱したWIfI分類では重症下肢虚血評価基準としてABI 0.40未満を挙げている。今回のROC曲線分析ではP群はABI 0.40未満を検出する感度と特異度は高くなかった。ABIはPADのスクリーニングおよび重症度評価法として広く用いられるが、ABIの信頼性は動脈中膜石灰化の著しい患者では限定的とされる。本研究の全患者のうち66%が糖尿病を有し、22%が維持透析を受けており、高度の動脈中膜石灰化を有すると考えられる患者を多く含むことがP群におけるABI 0.40未満の検出率を低下させた理由として考えられた。従って、LTL検査は動脈中膜石灰化によりABIの信頼性が低下する場合に有用となる可能性がある。一方、$tcPO_2$の測定は、動脈中膜石灰化の影響を受けないので重症虚血肢の診断に最も有用な検査法の一つとされる。WIfI分類やTASC IIといったPADのガイドラインでは重症下肢虚血評価基準として$tcPO_2$ 30 mmHg未満を挙げている。一方で$tcPO_2$ 20 mmHg未満が重症下肢虚血評価の閾値として妥当との報告もあり、$tcPO_2$における重症下肢虚血診断の閾値には議論の余地がある。本研究では、P群は$tcPO_2$ 20 mmHg未満および$tcPO_2$ 30 mmHg未満の検出のいずれにも高い精度を示した。従って、LTL試験は、$tcPO_2$値が20－30mmHgの境界域にある患者においても重症虚血肢として明確に診断できる可能性がある。

本研究では、局所加温の方法として足背部に44℃の$tcPO_2$プローブを20分以上装着することとした。記録したものは、加温終了後に室温（23-25℃）に曝され、相対的な冷却で生じる一過性の血流量上昇の過程と推測した。局所的な冷却に対する皮膚血流量の変化には血管収縮因子としてアドレナリン作動性神経成分と、血管拡張因子として一酸化窒素シンターゼ（NOS）による影響が報告されている。我々は、$tcPO_2$が低値を示す低酸素状態、つまり重症虚血状態では、神経性NOSの活性化とノルアドレナリンに対する感受性の低下が生じ、それらが引き起す細動脈拡張が局所皮膚冷却に対する一過性血流量上昇反応における長期の血管収縮反応を減弱させると考えている。しかし、この機序を明らかにするためにさらなる研究が必要である。本研究は制約があるが、LTL検査は非侵襲的で高精度な重症下肢虚血肢の診断法として、またABIにおける高度な動脈中膜石灰化病変や$tcPO_2$値が20－30mmHgの議論の余地がある範囲の患者においても有用な検査であると考える。

＜結論＞

LTL試験は、高い特異度で$tcPO_2$ 30mmHg未満を検出することができる。下肢の重症虚血を診断する上で信頼度の高い$tcPO_2$測定と同様にLTL検査は重症下肢虚を診断するための新たな非侵襲的手法として期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5427　号 | 葛井　総太郎 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　平尾　見三<br>副　査　吉田　雅幸、水野　友裕 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、レーザースペックコントラスト画像(Laser Speckle Contrast Imaging:LSCI)による重症下肢虚血肢の動脈血流量に関する新しい評価法の有用性についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

末梢動脈疾患（Peripheral arterial disease:PAD）の外科治療（下肢切断）方針においては、信頼できる客観的診断方法が不可欠である。従来、足関節上腕血圧比(Ankle brachial index:ABI)やtcPO2（経皮酸素分圧）が用いられてきたが、診断感度、診断精度に限界がある。

このような背景の下、新しい診断法を考案し、その有用性について検討したことは、臨床的重要性から鑑みて、評価に値する。

２）社会的意義

本研究で 36 例、63 肢を対象として得られた主な結果は以下の通りである。

1. 従来の tcPO2 法で用いる足背部への局所加温装置を用いて、局所加温後の血流量変化を LSCI で経時的に評価したところ、２分類できた
2. 一過性の血流上昇後に急激に血流低下する decreased(D)群と、変化に乏しくプラトーな血流量低下を示す plateau(P)群である
3. P 群が重症虚血肢の診断に有用であった（感度 78.7%、特異度 96.2%）

以上のように申請者は、LSCI を用いた新しい検査方法が重症下肢虚血肢の診断・評価法として臨床的に有用である可能性を示し、これは虚血肢切断などの診断時には臨床的にも極めて有用な研究成果といえる。

３）研究方法・倫理観

研究には非侵襲的な血流イメージング技術である LSCI 含む血流計と従来の局所加温装置とを組み合わせたものが用いられ、加温終了後に出現する経時的血流変化をグラフ化した。重度の虚血肢ではこの血流量グラフ上の一過性血流値上昇後の血流低下に注目し、それを slope という指標で数値化し、従来法（ABI 法、tcPO2 法）と比較検討することにより新しい方法の有用性を検証した。本法は十分な生理学的および解剖学的知識と外科的技術のもとに遂行されており、申請

者の研究方法に関する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者はP群が重症虚血肢を示したことについて、加温終了後に室温に曝され、相対的な冷却により生ずる一過性血流量増加と推測した。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、より詳細なき機序については今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 石川　喜也 |
| 論文審査担当者 | 主査　秋田　恵一<br>副査　渡邉　守、絹笠　祐介 |
| 論　文　題　目 | Surgical pitfalls of jejunal vein anatomy in pancreaticoduodenectomy |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

膵頭十二指腸切除において膵鉤部を切離する際に上腸間膜動脈(SMA)および上腸間膜静脈(SMV)からの脈管を処理する必要がある。しかし、同部位の脈管形態、特に静脈の解剖学的分岐形態は未だ不明な点が多い。第 1 空腸動脈(J1A)や下膵十二指腸動脈(IPDA)の走行に関する報告はしばしばあるが、第 1 空腸静脈(J1V)や第 2 空腸静脈(J2V)の走行に関する報告はほとんどない。近年の画像機器の進歩により、膵実質と周囲の動静脈を合わせた 3D-CT 画像の作成が可能となり、立体的な位置関係の把握も容易となった．当科で造影 CT を撮像した、肝胆膵疾患を有する 155 例を対象に、3D-CT 画像を用いて J1V と J2V の走行について検討した。

結果、155 例中 130 例(84%)で J1V と J2V が共通幹(FJT)を形成していた。25 例(16%)は J1V と J2V がそれぞれ別個に本幹へ流入していた。静脈系と SMA の位置関係から以下の 6 型に分類した。1 型：FJT が SMA 背側を走行。2 型：FJT が SMA 腹側を走行。3-1 型：J1V，J2V ともに SMA 背側を走行。3-2 型：J1V が SMA 背側、J2V が SMA 腹側を走行。3-3 型：J1V が SMA 腹側、J2V が SMA 背側を走行。3-4 型：J1V，J2V ともに SMA 腹側を走行。1 型、2 型、3-1 型、3-2 型、3-3 型、3-4 型はそれぞれ 98 例(63%)、32 例(21%)、7 例(5%)、9 例(6%)、5 例(3%)、4 例(2%)であった。

J1V と J2V の流入形態は、多様のバリエーションを認めたが、共通幹が SMA 背側を走行することが最も多かった。術前にこれらの解剖を把握することで、膵頭十二指腸切除をより安全に行うことが可能となる。

＜緒言＞

膵癌は予後不良の難治性癌であり、根治の可能性がある治療は、外科的切除のみである。膵頭部癌に対する標準的な手術は膵頭十二指腸切除術(PD)であるが、動脈や静脈、胆管が複雑に絡んでいる解剖学的特徴もあって、難度の高い術式として考えられている。術中に下膵十二指腸動静脈脈(IPDA、IPDV)や近位空腸動静脈を切離するが、その解剖については不明な点が多い。

近年は“artery-first approach”という概念が提唱され、IPDA を先行処理することで、術中出血量が有意に減少したとする報告がなされている。この観点から、IPDA や第 1 空腸動脈(J1A)、第 2

空腸動脈(J2A)の解剖に関する報告は増えているが、静脈系の解剖については未だほとんどない。とりわけ第 1 空腸静脈(J1V)と第 2 空腸静脈(J2V)の関係に着目した報告は皆無である。静脈は動脈と比して脆弱であり、容易に出血しうる。この論文では、安全に PD を遂行するにあたって必要となる、膵頭部周囲の静脈系解剖を明らかにした。

＜方法＞

2014 年 1 月から 2015 年 12 月の間に、当科で造影 CT を施行した 155 例を対象とした。造影 CT は動脈相、門脈相、平衡相の 3 相で撮像し、SYNAPSE 3D(富士フィルム®)を用いて 3D 画像を作成した。

近位空腸動静脈の名称に関しては、正式な定義がないため、しばしば混乱を招く。本研究では SMA から空腸へと分岐する 1 本目の枝を J1A、2 本目の枝を J2A と定義し、それらに伴走する静脈をそれぞれ J1V、J2V と定義した。J1V と J2V が合流する場合は共通幹部分を first jejunal vein(FJT)と命名した。また、膵後部から流入するもっとも太い静脈を下膵十二指腸静脈(IPDV)と定義した。

3D 画像を用いて、IPDA の起始部、J1V と J2V の走行、FJT のドレナージ領域、IPDV の流入部について解析した。

＜結果＞

IPDA は 150 例で同定された。IPDA の起始部は 3 パターンに大別され、J1A と共通幹を形成することがもっとも多かった(100 例、66%)。次いで SMA から直接分岐するが多く(49 例、33%)、置換右肝動脈(r-RHA)から分岐する症例も 1 例(1%)認めた。

J1V と J2V は 155 例全例で同定された。130 例(84%)で J1V と J2V が FJT を形成していた。25 例(16%)は J1V と J2V がそれぞれ別個に本幹へ流入していた. 静脈系と SMA の位置関係から以下の 6 型に分類した。1 型：FJT が SMA 背側を走行。2 型：FJT が SMA 腹側を走行。3-1 型：J1V，J2V ともに SMA 背側を走行。3-2 型：J1V が SMA 背側、J2V が SMA 腹側を走行。3-3 型：J1V が SMA 腹側、J2V が SMA 背側を走行。3-4 型：J1V，J2V ともに SMA 腹側を走行。1 型、2 型、3-1 型、3-2 型、3-3 型、3-4 型はそれぞれ 98 例(63％)、32 例(21％)、7 例(5％)、9 例(6％)、5 例(3％)、4 例(2％)であった。

FJT を形成していた 130 例(1 型 98 例、2 型 32 例)を対象に、FJT のドレナージ領域を調べた。4 本以上の空腸動脈支配領域をドレナージしている FJT は、1 型で 6 例(6%)であったのに対し、2 型では 7 例(22%)と、2 型で多い傾向にあった。

IPDV は 155 例で同定され、その流入部は 2 パターンに大別され。123 例(79%)で IPDV は FJT に流入し、残り 32 例(21%)では SMV に直接流入していた。多くの症例で IPDV 以外にも SMV や FJT に流入する小静脈を複数認めた。

＜考察＞

J1V と J2V の解剖に関する詳細な報告は、過去になかった。今回 3D 画像を用いて J1V と J2V が 84%の症例で共通幹 FJT を形成することを初めて明らかにした。

実臨床では、通常、J1A および J1V をその根部、ないしは末梢で切離することになる。J2V は

挙上空腸の重要なドレナージ静脈であるため温存すべき血管である。J1V と J2V の解剖学的関係をあらかじめ把握しておくことで、切離すべき静脈と、温存すべき静脈の同定が容易となる。FJT はときに J1V と誤認され、切離されるが、結果として挙上空腸のドレナージが不良となり、うっ血を来たすことになる。挙上空腸のうっ血は、PD における致死的合併症のひとつである膵液瘻のリスクとなり得る。J1V と J2V の走行を術前に把握することは、不要な静脈性出血を防ぐだけでなく、術後合併症の減少にも有用だと考える。

J1V と J2V の走行を 6 型に分類したが、中でも 2 型(FJT が SMA 腹側を走行)は注意を要する。FJT は膵鉤部付近に位置するため、癌浸潤によって合併切除されることも少なくない。2 型では、FJT が広範なドレナージ領域(4 本以上の空腸動脈)を担っていることもあるため、このような症例では FJT の再建も考慮すべきである。また、FJT が SMA 腹側にあることで、IPDA の起始部が FJT に覆われていることが多い。IPDA を確保するためには FJT を SMA から剥離する必要があるが、この際に過度の牽引をかけると FJT に流入する IPDV を損傷してしまうことがある。IPDV の流入部を把握し、術中の早い段階で、この静脈を処理するよう心がけている。

＜結論＞

3D 画像を用いて膵頭部周囲の静脈系解剖を明らかにした。J1V と J2V は 84%で共通幹を形成しており、SMA 背側を走行することが多かった。J1V と J2V が別個に SMV へ流入する症例は少数であった。術前にこれらの解剖を把握することは、手術の安全性に寄与するものと思われる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5428　号 | 石川　喜也 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　秋田　恵一<br>副　査　渡邉　守、絹笠　祐介 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、膵頭十二指腸切除術の為に必要な、近位空腸静脈の灌流様式についての論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

膵頭十二指腸切除において膵鉤部を切離する際に、上腸間膜動静脈の枝や流入枝などを処理することが必要となる。この領域の動脈の分布についての研究は散見されるが、静脈の流入様式についてはいまだ不明な点が多い。本研究は、特に静脈に着目して研究を行ったところが、着眼点として評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究では、第１空腸静脈(J1V)と第２空腸静脈(J2V)が共通幹(FJT)を形成することが非常に多いということを明らかにした。また、静脈系と上腸間膜動脈（SMA）の位置関係から流入形態を6型に分類し、FJT が SMA の背側を走行するものが 63%と最も多いこと、FJT が SMA の腹側を走行するものが 21%であることなどが明らかにした。この様な、これまであまり注目されてこなかった空腸静脈のヴァリエーションを報告するというのは極めて有用なことである。また、画像診断のデータからの再構築によって、このようなヴァリエーションを知る事が出来るということは、術前診断などへの応用の可能性が広がることから、臨床的にも非常に有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、本学肝胆膵外科で造影 CT を施行した 155 例を対象としており、それをもとに SYNAPSE 3D (富士フィルム®)というビューワーソフトウェアを用いて画像を作成し、ヴァリエーションについて調べられた。本手法は、十分な解剖学的知識と画像診断学的知識ならびに外科手技の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されるとともに、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたかということが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに、申請者は、挙上空腸のドレナージが不十分なためにうっ血が起こることが膵頭十二指腸切除術における重大なリスクとなる可能性について注目をしている。このことから、空腸静脈の十分な確認が重要であり、膵頭部からの静脈の形態を把握し、それを適切に処理することを確立することで、手術リスクを減らすことができるということを述べている。今後の外科臨床における発展が期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 掛川　智也 |
| 論文審査担当者 | 主査　藤井　靖久<br>副査　池田　通、鈴木　敏彦 |
| 論　文　題　目 | Frequency of *Propionibacterium acnes* Infection in Prostate Glands with Negative Biopsy Results Is an Independent Risk Factor for Prostate Cancer in Patients with Increased Serum PSA Titers |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)は近年、慢性前立腺炎や前立腺癌の発症に関わることが示唆されている。以前の前立腺全摘出検体を対象とした検討の抗 *P. acnes* 抗体を用いた免疫染色において、前立腺癌症例では非癌症例に比較して上皮内に *P. acnes* が認められた腺管の割合が高値であった。この *P. acnes* 陽性腺管率の算出が血清 PSA 値が高値であり前立腺針生検が施行されたものの前立腺癌陰性となった症例に対して前立腺癌のリスク評価として有用的であるか検討した。結果、*P. acnes* 陽性腺管率は癌群の方が非癌群に比較して高値であり、一方血清 PSA 値は両群間に有意な差は認められなかった。また、これらの結果より ROC 曲線を描くと *P. acnes* 陽性腺管率は血清 PSA 値に比較して AUC が高く、特異性に優れるものであった。ロジスティック回帰分析を行うと多変量解析にて *P. acnes* 陽性腺管率は前立腺癌に対して独立したリスク因子であり、そのオッズ比は血清 PSA 値のものよりも高値であった。*P. acnes* 陽性腺管率の算出は前立腺癌診断において有用的な手法であると考えられる。

＜背景＞

前立腺癌を始め種々の癌では炎症が発癌に影響を与えるものである。*Propionibacterium acnes* は前立腺炎および前立腺癌組織より高頻度に検出され、本菌の感染が前立腺癌の発症に関与することが示唆されている。当研究室にて作製された抗 *P. acnes* モノクローナル抗体は前立腺腺管上皮内の *P. acnes* を免疫組織化学染色にて検出可能である。以前の研究において前立腺全摘出手術検体を対象として抗 *P. acnes* 抗体を用いた検討を行い、非癌群に対して癌群にて上皮細胞内に *P. acnes* が感染している腺管率が多いことを報告している。本研究では血清 PSA 値の上昇に伴い前立腺針生検が施行されたものの前立腺癌陰性であった症例に対して *P. acnes* が感染している腺管率を算出することが前立腺癌診断においてリスク評価として有用的であるか検討することを目的とした。

＜方法＞

東京医科歯科大学医学部付属病院にて複数回針生検が施行された症例を対象とし、初回生検時

に前立腺癌陰性であり、4 年以内に前立腺癌が認められた症例を PCa 群、3 年以上前立腺癌陰性であり続けた症例を Control 群とした。初回生検と最終生検の両方を用いて PCa 群 44 例、Control 群 36 例のパラフィン包埋組織を薄切した後に HE 染色および抗 *P. acnes* 抗体による免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡下にて慢性炎症および *P. acnes* の局在について観察した。慢性炎症は 4 段階にて評価し、また非癌部における腺管上皮内に *P. acnes* が検出された腺管数を正常な全腺管で除することで *P. acnes* 陽性腺管率を算出するとともに、間質における *P. acnes* 陽性マクロファージ数をカウントし、コアあたりの平均値を算出した。これらに針生検施行直前の血清 PSA 値を含め PCa 群と Control 群の間における比較および初回生検と最終生検の間における比較を行うとともに、*P. acnes* 陽性腺管率の診断有用性について統計学的解析をおこなった。

＜結果＞

*P. acnes* 陽性腺管率(%)の中央値は PCa 群では初回生検 12.1 と最終生検 19.1 であり Control 群ではそれぞれ 4.8 と 4.7 で両群ともに初回生検から最終生検にかけて有意差は認められなかった。一方 PCa 群では初回生検、最終生検ともに Control 群に比較して有意に高値であり、初回生検と最終生検を混合した場合でも同様であった。さらに経会陰と経直腸を複合して生検を行った症例と、どちらかの手法のみで行った症例に分けた場合や採取コア数を 15 本未満と 15 本以上に分けた場合においても PCa 群が有意に高値であった。

コアあたりの *P. acnes* 陽性マクロファージ数は PCa 群にて初回生検から最終生検にかけて増加が認められた。一方 Control 群では有意な変化は認められず、また PCa 群と Control 群の間にも有意な差は認められなかった。

血清 PSA 値(ng/ml)の中央値は PCa 群では初回生検 8.8 と最終生検 12.0 であり、Control 群ではそれぞれ 6.9 と 10.1 であり両群ともに初回生検から最終生検にかけて有意な上昇が認められた。一方で PCa 群と Control 群の間に有意な差は認められなかった。また慢性炎症の程度についても同様に両群ともに初回生検から最終生検にかけて増加が認められるが、両群間の差は認められなかった。

初回生検ならびに初回生検と最終生検の混合サンプルにて *P. acnes* 陽性腺管率および血清 PSA 値を用いて ROC 曲線を描くと、AUC は初回生検では *P. acnes* 陽性腺管率 0.722 と血清 PSA 値 0.605 であり、混合サンプルではそれぞれ 0.764 と 0.599 であった。特異度は初回生検にて *P. acnes* 陽性腺管率 94%と血清 PSA 値 69%であり、混合サンプルではそれぞれ 93%と 63%となり、どちらも *P. acnes* 陽性腺管率の方が高値であった。一方感度については初回生検にてそれぞれ 32%と 57%であり、混合サンプルでは 46%と 56%となり血清 PSA 値の方が高値であった。また Threshold は *P. acnes* 陽性腺管率では初回生検 18.5%、混合サンプル 17.7%、血清 PSA 値はそれぞれ 8.29ng/ml と 9.71ng/ml となった。

ROC 曲線より得られた Threshold を用いてロジスティック回帰分析を行い、多変量解析にてオッズ比を算出した。*P. acnes* 陽性腺管率は初回生検 14.8、最終生検 13.9 であり、血清 PSA 値ではそれぞれ 4.6 と 2.3 であった。

また、より簡便な手法としてコア毎に *P. acnes* 感染の有無を観察し、陽性コアの割合を求める検討を行った。その結果 *P. acnes* 陽性腺管率の場合と類似した傾向がみとめられた。

＜考察＞

PCa 群にて Control 群に比較して陽性腺管率が高値であったことは手術摘出検体を用いた先行研究の結果と同様である。今回の生検サンプルを用いた検討では *P. acnes* 陽性腺管率の高さは PCa 群の初回生検において高いオッズ比を示し、血清 PSA 値よりもリスク評価の有用性は優れていた。*P. acnes* の感染が前立腺癌の発症に寄与することを示唆するだけでなく発癌のリスク評価にも有用であると考えられる。

手術摘出サンプルを用いた先行研究においては PCa 群と Control 群の間に有意な差が認められていたが、今回の検討ではその差は認められなかった。その理由としては用いた組織量の違いが考えられる。*P. acnes* 陽性マクロファージは散在的で前立腺組織中にわずかにしか存在しないことに影響を受けたと考えられる。また、先行研究により *P. acnes* 陽性マクロファージは前立腺において慢性炎症には関わりがあるが発癌には直接的に関与しないと報告しており、今回の検討では PCa 群と Control 群の間に慢性炎症の程度に差がないためであるとも考えられる。

また、PCa 群にて *P. acnes* 陽性マクロファージ数が最終生検の方が増加しているのは同群にて慢性炎症の程度が最終生検にて増強しているためであると考えられる。慢性炎症の程度と血清 PSA 値がともに初回生検に比較して最終生検にて増加している傾向は PCa 群と Control 群ともに認められるものであり、加齢もしくは炎症や過形成などに影響を受けていると考えられる。

前立腺針生検は経会陰か経直腸もしくは組み合わせによる手法がとられている。手法の違いやコア数の違いによる *P. acnes* 陽性腺管率の結果に大きな差はみられなかったが、コア毎に陽性腺管率は異なるため、手法の統一化によるより正確な解析が望ましい。

*P. acnes* 陽性腺管率は血清 PSA 値に比較して ROC 曲線では AUC と特異性が高く、ロジスティック回帰分析にて独立したリスク因子であると示された。PSA 値も独立したリスク因子であるがオッズ比では *P. acnes* 陽性腺管率の方が高値であり、血清 PSA 値の上昇に伴う針生検において *P. acnes* 陽性腺管率はより有用なリスク評価になると考えられる。

さらにスコアリング手法を用いることでより簡便に *P. acnes* 感染の程度について測ることができる。この手法はコア内の *P. acnes* 感染の有無についてのみ観察し、組織中全ての腺管を観察する必要がないものである。この手法による解析結果は全腺管を対象とした陽性腺管率の算出による AUC やオッズ比と類似した結果を得ることができた。スコアリング手法は陽性腺管率の算出に比較して感度に優れ、特異性に劣るものであり、このようなリスク評価には感度が求められることからも有用的である。

針生検は前立腺癌における最終診断となるが偽陰性率が高いことが問題である。針生検の手法は常に進歩しており、MRI 等を組み合わせることでより診断の正確性は高められてきた。この評価手法を加えることで診断に更なる情報を提供できると考える。

抗 *P. acnes* 抗体による免疫染色は過剰な針生検を減らし前立腺癌リスクの低い患者への負担を軽減できる可能性がある。血清 PSA 値高値による針生検の施行で癌が検出できなかった場合にスコアリング手法を用い、その結果リスクが高いと判断された場合のみ再生検を含めた注意深い経過観察を必要とする。このように *P. acnes* 感染の程度は治療選択に有用な情報を提供し得るものだと考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5429　号 | 掛川　智也 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　藤井　靖久<br>副　査　池田　通、鈴木　敏彦 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、血清 PSA 値の上昇に伴う前立腺癌陰性生検における Propionibacterium acnes 感染腺管率と、前立腺癌リスクとの関連を検討した研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

Propionibacterium acnes (P. acnes)は、近年、慢性前立腺炎や前立腺癌の発症に関わることが示唆されている。

本研究では、この研究室にて作製された抗 P. acnes モノクローナル抗体を使用しているが、この抗体は前立腺腺管上皮内の P. acnes を免疫組織化学染色にて検出可能である。この研究室の以前の研究において前立腺全摘出手術検体を対象として抗 P. acnes 抗体を用いた検討を行い、非癌群に対して癌群にて上皮細胞内に P. acnes が感染している腺管率が多いことを報告していた。本研究では血清 PSA 値の上昇に伴い前立腺針生検が施行されたものの前立腺癌陰性であった症例に対して P. acnes が感染している腺管率を算出することが前立腺癌診断においてリスク評価として有用的であるか検討することを目的とした独創的な研究であり、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1) P. acnes 陽性腺管率(%)の中央値は PCa 群では初回生検 12.1 と最終生検 19.1 であり Control 群ではそれぞれ 4.8 と 4.7 で両群ともに初回生検から最終生検にかけて有意差は認められなかった。一方 PCa 群では初回生検、最終生検ともに Control 群に比較して有意に高値であり、初回生検と最終生検を混合した場合でも同様であった。
2) 初回生検ならびに初回生検と最終生検の混合サンプルにて P. acnes 陽性腺管率および血清 PSA 値を用いて ROC 曲線を描くと、AUC は初回生検では P. acnes 陽性腺管率 0.722 と血清 PSA 値 0.605 であり、混合サンプルではそれぞれ 0.764 と 0.599 であった。
3) ROC 曲線より得られた Threshold を用いてロジスティック回帰分析を行い、多変量解析にてオッズ比を算出した。P. acnes 陽性腺管率は初回生検 14.8、最終生検 13.9 であり、血清 PSA 値ではそれぞれ 4.6 と 2.3 であった。
4) より簡便な手法としてコア毎に P. acnes 感染の有無を観察し、陽性コアの割合を求める検討を行った。その結果 P. acnes 陽性腺管率の場合と類似した傾向がみとめられた。

３）研究方法・倫理観

本研究は東京医科歯科大学の倫理審査委員会の承認を得て行われた。

当院にて複数回針生検が施行された症例を対象とし、初回生検時に前立腺癌陰性であり、4 年以内に前立腺癌が認められた症例を PCa 群、3 年以上前立腺癌陰性であり続けた症例を Control 群とした。初回生検と最終生検の両方を用いて PCa 群 44 例、Control 群 36 例のパラフィン包埋組織を薄切した後に HE 染色および抗 P. acnes 抗体による免疫組織化学染色を行った。非癌部における腺管上皮内に P. acnes が検出された腺管数を正常な全腺管で除することで P. acnes 陽性腺管率を算出した。これらに針生検施行直前の血清 PSA 値を含め PCa 群と Control 群の間における比較および初回生検と最終生検の間における比較を行うとともに、P. acnes 陽性腺管率の診断有用性について統計学的解析をおこなった。

申請者の研究方法に対する知識・倫理観　が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

本研究の結果は、既報論文における P. acnes 感染と前立腺癌発症の関連を見た報告に合致するものでその理論的根拠を補強するものである。すなわち、PCa 群にて Control 群に比較して陽性腺管率が高値であったことは手術摘出検体を用いた先行研究の結果と同様である。今回の生検サンプルを用いた検討では P. acnes 陽性腺管率の高さは PCa 群の初回生検において高いオッズ比を示し、血清 PSA 値よりもリスク評価の有用性は優れていた。P. acnes の感染が前立腺癌の発症に寄与することを示唆するだけでなく発癌のリスク評価にも有用であることを示唆したものである。

P. acnes 陽性腺管率は血清 PSA 値に比較して ROC 曲線では AUC と特異性が高く、ロジスティック回帰分析にて独立したリスク因子であると示された。PSA 値も独立したリスク因子であるがオッズ比では P. acnes 陽性腺管率の方が高値であり、血清 PSA 値の上昇に伴う針生検において P. acnes 陽性腺管率はより有用なリスク評価になると考えられる。さらにスコアリング手法を用いることでより簡便に P. acnes 感染の程度について測ることができることも示した。

抗 P. acnes 抗体による免疫染色は過剰な針生検を減らし前立腺癌リスクの低い患者への負担を軽減できる可能性がある。血清 PSA 値高値による針生検の施行で癌が検出できなかった場合にスコアリング手法を用い、その結果リスクが高いと判断された場合のみ再生検を含めた注意深い経過観察を必要とする。このように P. acnes 感染の程度は治療選択に有用な情報を提供し得るものだと考えられる。

これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 市川　裕菜 |
| 論文審査担当者 | 主査　畑　裕<br>副査　藤井　靖久、稲澤　譲治 |
| 論　文　題　目 | Overexpression of exchange protein directly activated by cAMP-1 (EPAC1) attenuates bladder cancer cell migration |

（論文内容の要旨）

【要旨】

Exchange protein directly activated by cAMP（EPAC）は近年同定されたアデノシン 3',5'-リン酸（cAMP）関連タンパク質である。EPAC は cAMP により直接活性化されることで低分子量 G タンパク質 Rap1 または Rap2 を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）である。EPAC1 の機能については、癌細胞の増殖促進、細胞死誘導、移動能や転移能の促進または抑制という相反する報告がある。

本研究で我々は、臨床検体の膀胱腫瘍組織における EPAC1 および EPAC2 の発現が正常膀胱上皮組織と比較し有意に低下していることを見出した。また、膀胱癌細胞株においても初代培養正常膀胱移行上皮細胞と比較して EPAC1 の発現が総じて低い傾向にあることを明らかにした。そこで膀胱癌細胞株に EPAC1 を導入し強制発現させたところ、細胞は著明な細胞間接着性の高い形態変化と細胞移動能の低下を示したが、細胞生存に影響はなかった。EPAC1 を強制発現させた膀胱癌細胞株での EPAC1 細胞内局在を解析したところ、細胞間の接着面に高い集積を示した。以上をまとめると、膀胱腫瘍組織での EPAC1 発現の低下と膀胱癌細胞株での EPAC1 強制発現による移動能の低下は、膀胱癌において EPAC1 発現が癌細胞の浸潤あるいは播種の抑制に関与している可能性を示唆している。

【緒言】

膀胱癌の多くは膀胱移行上皮に由来する癌であり、その再発率は非常に高いことが知られている。これは、膀胱癌が膀胱内腔に多発することにも起因している。これまでに、膀胱移行上皮の癌化に関連する遺伝子の報告はあるが、膀胱内腔播種に関連する遺伝子の報告はほとんどない。

cAMP は細胞膜に存在するアデニルシクラーゼにより生成され、セカンドメッセンジャーとして機能している。これまで cAMP は Protein kinase A (PKA)依存的にシグナル伝達を行うことで様々な生理現象を調節しているとされていた。しかしながら近年、PKA を介さない別のシグナル伝達分子 EPAC の存在が明らかになった。EPAC1 と EPAC2 の 2 つのアイソフォームが存在し、各々*RAPGEF3*、*RAPGEF4* にコードされている。共同研究者らは最近、EPAC1 および EPAC2 が膀胱排尿平滑筋において発現し、平滑筋の収縮に関与していることを見出した。癌における

EPAC の機能についてのこれまでの報告は EPAC1 に関連するものが多く、癌の種類によりその機能は多様で、増殖促進、アポトーシス誘導、移動、転移などを正または負に制御することが報告されている。実際に EPAC1 発現は、膵臓癌では癌細胞の増殖・移動・転移の促進、卵巣癌では増殖促進と報告されているに対し、神経膠芽腫では細胞周期停止による細胞死誘導に関与するという報告がある。前立腺癌においては、増殖促進を示す報告と、増殖・移動の抑制を示す報告がある。

本論文では、未だに明らかにされていない膀胱癌における EAPC 発現とその役割について解析を行った。

【方法】

臨床検体の正常膀胱組織（男性：n = 6、女性：n = 2）および膀胱腫瘍組織（男性：n = 12、女性：n = 7）から total RNA を抽出し、EPAC1/2 の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。同一患者組織(n = 3)から癌部、非癌部を単離し、RNA 抽出とタンパク質抽出行い、定量的 RT-PCR 法またはウエスタンブロッティング法により各々の内在性 EPAC1/2 の発現を比較した。膀胱癌細胞株 RT4、KK-47、5637、T-24、TCCSUP、UMUC3 および初代培養正常膀胱移行上皮細胞における EPAC1/2 の発現を定量的 RT-PCR 法により解析した。EPAC1 を発現するレンチウイルスベクターおよびそのコントロールベクターを膀胱癌細胞株 UMUC3 および KK-47 細胞に感染させ、ブラストサイジン S による薬剤選択を行い、EPAC1 強制発現細胞株とそのコントロール細胞株を樹立した。それらの細胞の形態変化は、顕微鏡下で観察した。樹立した細胞株の生存率はアラマブルー法を用いて解析した。創傷治癒実験として、細胞間に一定の溝を作製するインサートを装着したプレートに細胞を播種後、インサートを除去し、細胞移動により埋められた面積を経時的に ImageJ 画像解析ソフトを用いて解析しグラフ化した。EPAC1 標的タンパク質 Rap1 の活性化状態（Rap1-GTP 型）は、Rap1 activation Assay Kit を用いたプルダウン法により Rap1-GTP 型を抽出し、ウエスタンブロッティング法により検出した。発現させた EPAC1 の細胞内局在は蛍光免疫染色法により共焦点顕微鏡を用いて観察した。

【結果】

定量的 RT-PCR の結果より、臨床検体における EPAC1 および EPAC2 の発現量は正常膀胱組織と比較して膀胱腫瘍組織において有意に低下していた。同一患者における EPAC1 の mRNA およびタンパク質は、非癌部と比較し癌部において低下傾向が見られた。EPAC2 の mRNA は、患者検体 1 を除き非癌部と比較し癌部において低下していた。膀胱癌細胞株における EPAC1 の発現量は初代培養正常膀胱上皮細胞と比較して、T24 細胞を除き総じて低下していた。EPAC2 発現量もまた EPAC1 と比べわすかであるが、癌細胞株で低下傾向を示した。

次に、膀胱癌における EPAC1 の役割を解析するために、膀胱癌細胞株 UMUC3 および KK-47 細胞に EPAC1 を強制発現させた EPAC1 強制発現膀胱癌細胞株(UMUC3-EPAC1, KK47-EPAC1 細胞)を樹立した。UMUC3-EPAC1 および KK47-EPAC1 細胞の生存率は EPAC1 強制発現による影響は受けず、コントロール細胞と同様であった。一方、UMUC3-EPAC1 細胞は高い細胞間接着性を示し、敷石状に細胞が増殖しているのが観察された。そこで EPAC1 の過剰発現がもた

らす下流の Rap1 への影響を調べたところ、UMUC3-EPAC1 細胞では Rap1-GTP 型の顕著な増加を認めた。同様に、KK47-EPAC1 細胞もまた Rap1-GTP 型の増加を示したが、形態変化は伴わなかった。

UMUC3-EPAC1 細胞において細胞間接着の増強が見られたことから、EPAC1 発現が細胞の移動能に影響する可能性が示唆された。そこで、UMUC3-EPAC1 および KK47-EPAC1 細胞用いて創傷治癒実験を行った。非常に興味深いことに、UMUC3-EPAC1 細胞、KK47-EPAC1 細胞ともに、コントロール細胞と比べ移動能が有意に抑制されていた。

活性化された EPAC1 は細胞膜に局在することが報告されていることから、UMUC3-EPAC1 および KK47-EPAC1 細胞における EPAC1 の細胞内局在に注目した。細胞が単独で存在する場合、EPAC1 発現は細胞内全体に認められたが、細胞同士が接着している場合は、その接着面で EPAC1 の集積を示した。これらの結果から、著明な形態変化を示さなかった KK-47-EPAC1 細胞においても、細胞間接着が亢進していることが示唆された。そこで、細胞間の接着に重要なマーカーとして知られる ZO-1 および E-cadherin 発現についても解析したが、それらに有意な変化は見られなかった。これらのことから、EPAC1 は ZO-1 および E-cadherin とは別の経路を介して膀胱癌細胞の接着性を調節している可能性が示唆された。

【考察】

本研究は、正常膀胱組織で発現していた EPAC1 および EPAC2 の発現が膀胱腫瘍組織において有意に低下していることを初めて明らかにした。さらに本研究では、EPAC1 の過剰発現が膀胱癌細胞株の形態変化や細胞移動能の低下を引き起こすことを示した。これは、膀胱癌での EPAC1 発現の低下が癌細胞の浸潤または播種と関連する可能性を示唆する。

これまでに癌に関する報告で EPAC2 について述べているのは肺癌細胞株 H1299 細胞を用いた研究のみであったのに対し、EPAC1 の関与する報告は多数ある。しかし、その多くは癌での EPAC1 発現の上昇に伴って生じる結果を示しているものが多く、膀胱癌で見られるような EPAC1 発現の低下についての報告はほとんどない。本研究では、膀胱癌で EPAC1 および EPAC2 発現が低下する詳細なメカニズムの解明には未だ至っておらず更なる研究が必要であるが、EPAC1 が膀胱癌の悪性度評価あるいは特異的な治療法の開発に貢献する可能性がある。

以前の報告で、EPAC1 は Rap1 の活性化を介して E-cadherin を介した細胞間接着を制御していることが知られており、本研究で用いた EPAC1 強制発現細胞では Rap1 が恒常的に活性化していたことから、細胞の形態変化および細胞移動能の低下は Rap1 を介して行われている可能性が示唆される。しかしながら、本研究では E-cadherin の発現に変化は見られなかった。これらのことから、EPAC1 による膀胱癌細胞の細胞移動抑制は、E-cadherin を介さない別の経路により引き起こされている可能性が考えられ、EPAC1 の細胞移動抑制の詳細な機序の解析が必要と考えられる。

【結論】

膀胱癌では EPAC の発現が低下しており、EPAC1 が膀胱癌の細胞間接着性と移動能を制御す

ることを明らかにした。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5430　号 | 市川　裕菜 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　畑　裕<br>副　査　藤井　靖久、稲澤　譲治 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

低分子量 G 蛋白質制御分子 EPAC1 と膀胱がんの病態の関係を解析した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

Cyclic AMP の標的分子として知られる、EPAC1・2 については、がんに抑制的に働くという報告と、促進的に働くという報告がある。申請者は、ヒト膀胱がんで EPAC1 の発現が低下していることに着目し、膀胱がん細胞に EPAC1 を発現させたときにおこる変化を解析することにより、膀胱がんにおいては EPAC1 が腫瘍抑制的に働く可能性を明らかにした。この点に、学術的な意義が認められる。

２）社会的意義

本研究は直ちに応用的価値を持つわけではないが、腫瘍を抑制するか、促進するか議論が分かれる EPAC1 という分子について、膀胱がんにおいては、腫瘍抑制的に働く可能性を明らかにし、EPAC1 を活性化することが治療に有用である可能性を示した点で意義がある。

３）研究方法・倫理観

ヒト膀胱がん臨床検体における EPAC1 の発現を解析したのち、EPAC1 の発現が高い膀胱がん細胞株と、低い膀胱がん細胞株を用いて研究を行った。発現が低下している膀胱がん細胞に EPAC1 を導入すると、低分子量 G 蛋白 Rap1 が活性化し、細胞の形態が変化し、EPAC1 は細胞接着面に集積し、移動能が低下した。以上から、EPAC1 は膀胱がん細胞では、細胞の形態、移動能を制御し、腫瘍抑制的に働く可能性があると結論した。

４）考察・今後の発展性

本申請研究は、膀胱がんでは EPAC1 は腫瘍用抑制的に働く可能性を支持する。EPAC1 による細胞形態や移動能が Rap1 を介しているのか、Rap1 は Ras に拮抗的に作用しているのか、など、興味ある問題が提起される。今後の解析が楽しみである。

**３．その他**

特記事項はない。

**４．審査結果**

審査会では種々の質問が行われたが、申請者は概ね適切に回答した。よって、本学博士（医学）の学位に値すると判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小野　敏明 |
| 論文審査担当者 | 主査　神奈木　真理<br>副査　樗木　俊聡、清水　則夫 |
| 論　文　題　目 | Characterization of *in vitro* expanded virus-specific T cells toward adoptive immunotherapy against virus infection |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

ウイルス特異的 T 細胞の投与は、免疫不全状態の宿主におけるウイルス感染の治療のための有望な治療アプローチとして注目されている。生体外で培養したウイルス特異的 T 細胞は、1〜2 個の HLA 適合対立遺伝子対であっても感染を制御することができる。ウイルス特異的 T 細胞の特徴付けは、治療の治癒メカニズムに不可欠な情報を提供する。今回の研究では、我々は、3 つのウイルス（サイトメガロウイルス(CMV)：pp65，IE1、 エプスタイン-バールウイルス(EBV)：LMP2A，EBNA1，BZLF1、 アデノウイルス(AdV)：Penton）由来の 6 つのウイルスタンパク質にまたがる 718 本のオーバーラッピングペプチド(OLP)のための T 細胞エピトープマッピングシステムを開発した。 33 人の健康な日本人ドナーにおいて、IL4 および IL7 の存在下で CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞が生体外で培養され、中央値 13（2~246）のペプチドが認識された。我々は日本人に多いヒト白血球抗原（HLA）において、T 細胞によってよく認識されるウイルス領域を同定した。また、自由に入手可能なオンラインツールを用いて CD8 陽性 T 細胞応答のエピトープ予測を行い、いくつかの応答は予測通りであると考えられた。

＜緒言＞

ウイルス感染は、いまだに造血幹細胞移植または AIDS 患者のような、免疫不全宿主における主要な死亡要因である。いくつかのウイルス感染に対する免疫療法としてのウイルス特異的 T 細胞の投与は、同種異系造血幹細胞移植後の有効な予防的および治療的処置となっている。ウイルス特異的 T 細胞は、目的のウイルスタンパク質の OLP をドナー末梢血由来単核球に刺激することにより生体外で培養することができる。ウイルス特異的 T 細胞は重度のウイルス感染を伴うレシピエントに対して有用で安全に投与することができる。最近の報告において、ドナーとレシピエントの間で単一の HLA のみ同じでも有効であることが示されている。T 細胞は HLA 依存的に抗原を認識するため、HLA によって提示されるペプチドを認識するウイルス特異的 T 細胞のみがドナーとレシピエントの間で共有され、ウイルス感染細胞を認識して排除する。 実際、ウイルス特異的 T 細胞は、ドナーとレシピエントとの間の共有 HLA によってエピトープが提示される場合にのみ、感染細胞を認識していると考えられる。このことから、各種 T 細胞応答およびそれらの

HLA 拘束性のペプチドを同定することは、ウイルス特異的 T 細胞の有効性を検討するために重要である。

今回のウイルス特異的 T 細胞は日本における臨床応用のために考慮されている。CMV および EBV に対する HLA 拘束性エピトープの情報が集められているが、この情報は、白人集団においての一般的な HLA に偏っている。本研究では、CMV（pp65 および IE1）、EBV（EBNA1、LMP2、BZLF1）および AdV（Penton）の日本人集団でよく認められる T 細胞標的領域を同定するために ELISpot 法に基づくエピトープマッピングを行った。我々はまた、CD8 陽性 T 細胞において日本人集団に多い HLA に対する応答を特徴付けるエピトープの予測を行った。

＜方法＞

33 名の日本人健康志願者から採取した末梢血単核球を用いて培養と HLA タイピングを行った。末梢血単核球にペプチドを刺激し、IL-4/7 添加培地(RPMI1640+10%FCS)で 2 週間前後培養を行ってウイルス特異的 T 細胞を得た。ペプチドは市販されている 4 つずつずれた 15mer のペプチドを用いた（CMV; pp65, IE1、EBV; EBNA1, LMP2A, BZLF1、ADV; Penton）。

エピトープの候補ペプチドの選定には ELISpot 法を用いた。過去の報告を参考にして各ウェルに 12～17 のペプチドを混ぜたペプチドマトリックスを作成し、陽性判定したものを候補ペプチドとした。得られた候補ペプチドを用いてフローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン染色を行った。今回の検討では IFNγ の検出をもってウイルス特異的 T 細胞とした。

エピトープの予測には、インターネット上で利用可能な T 細胞エピトープ予測ツール HLArestrictor(Ver1.2)を利用した。

＜結果＞

作成したペプチドマトリックスを用いて ELISpot 法を行い、候補ペプチドを選定することができた。候補ペプチドをやはり ELISpot 法を用いて単一のペプチドで刺激し、反応するペプチドを決定した。6 つのウイルスタンパク質からなる 718 の OLP のうち、少なくとも 33 人のドナーから 283 のペプチドが認識された。すべてのウイルスタンパク質に対する 1 人あたりの T 細胞応答の中央値は 13（2～246）であった。最も広範な応答は CMV pp65（中央値 5 (0～33)）で見られた。

最も頻繁に標的となるペプチドは、CMV pp65 のアミノ酸 489～503 位に位置する OLP123：AGILARNLVPMVATV であった。細胞内サイトカイン染色による解析を行うことができた 12 人のドナーのうち、3 人が CD4 陽性の、6 人が CD8 陽性の T 細胞応答を示し、他の 3 人のドナーは CD4 陽性および CD8 陽性のどちらの T 細胞にも応答を示した。このことは、このペプチドが HLA クラス I-および II-の拘束性エピトープが両方含まれることを示唆している。HLA-A 02：01/06 によって拘束される既知のエピトープ NLVPMVATV は OLP123 に組み込まれ、CD8 陽性 T 細胞応答を有する 9 人のドナーのうち 8 人が HLA-A 02：01 または A 02 ：06 を有しており、CD8 陽性 T 細胞応答の一部がエピトープに特異的であることを示唆している。このペプチドには、一部の HLA-DRB1（DRB1 03：02、DRB5、DRB15）拘束性エピトープの存在も報告されているが、これらの HLA は日本人集団ではまれである。よって、このことはまだ同定されていない HLA クラス II 分子に拘束されるエピトープの存在を示唆する。

pp65 で 101-135 に位置する（OLP26～31）SICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIPSINVHHYPSAA という領域は、12 人のドナーが CD8 陽性 T 細胞において応答した。そこでわれわれはHLArestrictor によって OLP26-31 領域内のペプチドのエピトープ予測を行った。HLA-B 51：01 を発現する 3 人のドナーは、HLA-B 51 拘束性エピトープ LPLKMLNI が報告されている OLP28 に対して CD8 陽性 T 細胞での応答を示した。同様に、HLA-B 35 : 01 を発現する別の 3 人のドナーは、HLA-B 35：01 拘束性エピトープ IPSINVHHY が報告されている OLP28 に対して CD8 陽性 T 細胞での応答が認められた。これらのデータは予測ソフトで予想されたエピトープへの応答を示唆しているが、応答が別の未知のペプチドを標的とする可能性を排除することはできない。

HLA-B 54：01 および HLA-C 01：02 を共有する 3 人のドナーにおいて、OLP26 / 27 に対する CD8 陽性 T 細胞での応答が検出されたが、OLP26 と OLP27 には HLA-B 54：01 拘束性の MSIYVYALPL と SIYVYALPL、HLA-C 01：02 拘束性の EPMSIYVYA と EPMSIYVYAL が予測されている。別の 2 人のドナーの OLP29 に対する CD8 陽性 T 細胞の応答もまた、HLA-A 24：02 拘束性の VYALPLKMLNI および HLA- B 54：01 拘束性の LPLKMLNI、LPLKMLNIPS および LPLKMLNIPSI が予測されている。HLA 拘束性および各 CD8 陽性 T 細胞応答の最適なペプチドを確認するために、単一 HLA 適合細胞系および短縮型ペプチドパネルを用いるさらなる実験が必要であるが、エピトープ予測は T 細胞標的の決定に関する有用な情報を与えることができる。

＜考察＞

ウイルス特異的 T 細胞投与による免疫療法は、同種異系造血幹細胞移植後のウイルス感染の予防および治療として提案されている。本研究では、CMV、EBV、および AdV 由来のウイルスペプチドの T 細胞標的をマッピングする方法を開発し、日本人に多い HLA の標的領域を決定した。ウイルス特異的 T 細胞を刺激するために複数のウイルスタンパク質にわたるペプチド混合物を使用することは、より広範なウイルス特異的 T 細胞応答の利点を有する。

単一の HLA 発現細胞株は各 T 細胞応答における HLA 拘束性の決定に有用であろうが、HLA 多様性をカバーするために複数の単一 HLA 発現細胞株を調製するのは時間がかかる。そこで我々は、エピトープ予測ツール HLArestrictor を用いて CD8 陽性 T 細胞応答の HLA 拘束性の情報を得た。HLA-B 54：01 および-C 01：02 を発現する 3 人のドナー由来の T 細胞において、OLP26 / 27 に対する CD8 陽性 T 細胞の応答もまた HLArestrictor によって予測されていた。

エピトープデータベースおよび予測ツールは有用な情報を提供するが、HLA の遺伝子はヒトゲノム中で最も可変しうる遺伝子座であり、アレル分布は人種間で多様である。エピトープ情報の蓄積は、エピトープ予測ツールの精度をより高くし、ウイルス感染の治療としてだけでなく、将来の癌のための T 細胞免疫療法にとって極めて有用である。

＜結論＞

健常者の末梢血由来単核球にペプチド刺激をし、IL-4/7 添加培地にてウイルス特異的 T 細胞を作成した。HLA 拘束性の候補ペプチドを選定し、CD8 陽性 T 細胞に関しては予測ソフトを用いてエピトープの候補を見出した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5431　号 | 小野　敏明 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　神奈木　真理<br>副　査　樗木　俊聡、清水　則夫 | |

（論文審査の要旨）

**１．論文内容**

体外で誘導培養したウイルス特異的Ｔ細胞の投与は、同種造血幹細胞移植後のウイルス感染の予防および治療として期待されているが、必要となる既知のＴ細胞エピトープは限られている。このため申請者は、３種類のウイルス（CMV、EBV, AdV）の６種類の蛋白に対する、日本人集団で頻度の高いＴ細胞エピトープを同定するためのシステムを確立し、これを用いて 33 人の日本人健常者 PBMC から 283 個のエピトープ候補を得た。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

ウイルス特異的Ｔ細胞の投与による抗ウイルス治療の治験を行うにあたり、より多くの患者に適応できるよう、日本人集団で頻度の高いＴ細胞エピトープを得ることが目的である。

２）学術および社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 既知のT細胞エピトープペプチド刺激を加え、IL-4, IL-7添加培地で２週間培養した結果、ウイルス特異的T細胞が増殖することを確認した。
2. 考案したスクリーニング法を用いて、33人の日本人健常者サンプルから６種類のウイルス抗原に関して283個のペプチドがエピトープ候補として選出された。
3. 最も高頻度に認められたCMV pp65（489～503）ペプチドは、HLA-A0201/0206拘束性の既知のエピトープの他、MHC-IIの拘束エピトープも含むと考えられた。
4. HLA-B 54：01およびHLA-C 01：02を共有する3人のドナーで認められたエピトープは、既存のエピトープ予測ツールでそれぞれのHLAに提示され得ることが確認された。

３）研究方法・倫理観

PBMCをウイルス蛋白由来の718個の連続ペプチド全てで刺激培養後、方眼に並べた縦横約16個ずつを混合したペプチド群(matrix peptide pool)で再刺激し、96 well IFNγ-ELISPOT法で反応を評価した。縦と横両方のペプチド群に反応した際の共通ペプチドをエピトープ候補として選出した。

４）考察・今後の発展性

考案した方法でT細胞エピトープをスクリーニングできることが分かった。今後、この方法で未知のエピトープが同定されることが期待される。

**３．その他**　特記すべき事項無し

**４．審査結果**

　以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 前澤　勝美 |
| 論文審査担当者 | 主査　鈴木　敏彦<br>副査　山岡　昇司、宮坂　尚幸 |
| 論　文　題　目 | Real-time observation of pathophysiological processes during murine experimental *Schistosoma japonicum* infection using high-resolution ultrasound imaging |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

住血吸虫症は二億人以上が感染の危険にさらされており、その一種である日本住血吸虫症は、現在ではアジア諸国が流行地域である。腸管系静脈叢に寄生する日本住血吸虫による本感染症は経皮感染後、主に肝臓や脾臓、腸管に病変が認められる。有名な病態変化としては主に肝において虫卵周囲肉芽腫を形成し、門脈圧亢進症や肝線維化を引き起こすことである。この病態は日本住血吸虫症に特徴的な画像変化として描出され、臨床においても超音波や CT、MRI を用いた際の確定診断の一助として役立っている。しかし、これまで画像上の変化を、日本住血吸虫感染マウスにおいて同一個体を用い経時的に追った報告は少ない。本実験では高解像度超音波装置を用いて肝中心の腹腔内検索を行った。その結果、感染早期より肝実質変化や門脈径の変化、脾腫大の経過、腹水の描出などの病態進行のみならず、生体内において門脈内に寄生する虫体の様子も捉えることに成功した。これは日本住血吸虫感染患者の経過と酷似している部分も多く、病態解明の一助、さらには治療薬やワクチン開発時にも非常に有用な所見であると考える。

＜緒言＞

日本住血吸虫症は現在、中国、フィリピン、インドネシアを含むアジア諸国が流行地域である。感染幼虫であるセルカリアが宿主の皮膚から侵入し、腸間膜静脈や門脈に移動して成熟、産卵した後、特異的Ｔ細胞応答の制御下で虫卵周囲肉芽腫を形成し、門脈圧亢進症や肝線維化などの肝病変を発症させる。感染後の連続的な病態生理学的変化は小動物用非侵襲的検査装置の開発がなされて間もないため、未だ充分に研究がなされていない。また、病理学的考察は、観察時に実験動物を屠殺した動物から得たもので、主に時間的断面観察に基づいている。我々は同一個体における日本住血吸虫感染後の病態経過を連続的に観察可能とするため、非侵襲的アプローチとして高解像度超音波装置を用いて、肝病変を主体とした腹腔内臓器変化をリアルタイムに観察した。

＜方法＞

5 週齢 BALB/c マウス雌を用い、ソムノペンチル®50mg/kg 腹腔内麻酔下に S.japonicum Yamanashi 株のセルカリアを経皮感染させた。感染後短期から中期にわたる観察のため、グルー

プ１としてセルカリアを 25 匹感染(n=12)させ、並行して１年間の長期観察のためにグループ２としてセルカリアを 10 匹感染(n=10)させた。感染させていないマウスをネガティブコントロールとして使用した。グループ１のマウスでは、1 週間に 1 回超音波検査を行った。マウスをソムノペンチル®またはイソフルラン®で麻酔後、温水で暖めたエコー用ゼリーを剃毛後に塗布、プラットフォーム上に固定し循環動態が安定してから超音波検査を行った。グループ 2 のマウスでは、1 年間生存させたのち同様の手順で超音波検査を施行した。小動物用超音波装置 Prospect 3.0（50MHz、分解能 30μm、Nepagene）と ALOKA Noblus（ヒト用リニアプローブ、18-4MHz、Hitachi Corporation）の二種類の超音波装置を使用した。ALOKA Noblus は、肝臓、脾臓、門脈、腸および腹水を含む腹腔内全般にわたる観察に使用した。Prospect 3.0 は、肝臓の辺縁角度および門脈の血流を測定するために使用した。同時にマウスの全身状態の指標とするため体重測定を、また、住血吸虫の感染成立と産卵の進行を確認するため、糞便１ｇ中の虫卵数をカウントした。さらに血清中 ALT、A/G、および Mac-2 結合蛋白糖鎖修飾異性体（M2BPGi）を肝機能と肝線維化の指標として測定した。

＜結果＞

１．体重と糞便虫卵数

感染マウスとコントロールマウスでは感染７週間後で体重の差が明らかとなった。虫卵数は経時的に増加した。

２．血液生化学検査

ALT の最高値は感染７週後であった。 A/G 比は６週後まで徐々に低下し、その後安定していた。M2BPGi は８週後に急激に増加していた。

３．超音波検査

①肝

グループ１のマウスでは感染３週後までは特に変化は検出されなかったが、４週後に肝実質に高エコースポットが検出された。８週後にはスポット間を結ぶように細い線状高エコーが現れた。その後、高エコースポットは大きさを増しつつ、数も増えながら互いに融合していった。それと並行し線状高エコーは太さを増していった。この所見は肝全体に描出された。同様の傾向が 2 群マウスの肝臓でも描出されたがグループ１の所見より線状高エコーの所見が顕著であった。感染の進行に伴い、肝臓周辺の角が徐々に鈍くなり、肝肥大や萎縮などの変形を示唆した。

②門脈および脾静脈

コントロールマウスの門脈径は 0.7～0.8mm であった。グループ１のマウスで感染８週後まで門脈径は拡張傾向にあったが、その後は徐々に縮小し、グループ２の感染１年後にはコントロールとほぼ等しい門脈径となった。門脈の血流は６週後で一時的に減速したが、８週後にはコントロールレベルに戻った。

脾静脈径は、門脈からの分岐近傍でコントロールマウスにおいて約 0.3mm であり、感染 10 週後では２倍となった。12 週後にも同様に約２倍の直径で観察されたが感染１年後では腸管ガスにより明確に検出することは困難であった。また、感染４週後の門脈内において、心拍と同期せず、ゆっくりとした動きの高エコーに描出される虫体と思われる像をとらえた。

③他、腹腔内所見

脾臓は感染４週後から徐々に肥大した。腹水は感染９週後でごく少量が描出され始め、１年後には顕著に認めるようになった。腸管壁は徐々に厚みを増し、その柔軟性の喪失が示唆された。

＜考察＞

高解像度超音波装置は、リアルタイムバイオイメージングのツールの１つであり、病態評価のために様々な臨床医学分野に応用されている。獣医学分野で広く適用されており、ツールの改良により小動物研究への応用が容易になっている。寄生虫疾患は、複雑な宿主寄生虫間相互作用の結果であり、病態生理学のより深い理解を得るために連続的な観察が必要である。肝脾腫大、肝線維化、門脈圧亢進症、腹水の出現などが日本住血吸虫症の典型的な所見であることは解明されているが、根本的な病態は免疫、病理学など異なるアプローチを用いて情報が得られている。本研究では高分解能超音波装置を用いて、日本住血吸虫感染マウスの肝病変などの腹腔内所見を経時的に観察し、超音波画像上、出現順序を明確に描出した。WHO のガイドラインでは、住血吸虫症における肝実質変化を超音波画像所見の変化により score 化しており、score の低い順から「Starry sky」、「rings and pipe stems」、「"ruff" around portal bifurcation」、「patches」および「bird's claw」のパターンを図示している。本実験において感染４週以降で肝実質に観察された高エコースポットの所見は、WHO によるヒト肝の「Starry - sky」様パターンと類似していた。これは虫体が門脈で産卵後、Glisson 鞘の微小毛細血管での卵塞栓のタイミングと一致しており、卵周囲肉芽腫形成および Glisson 鞘の線維化を示唆している可能性がある。のちに現れた高エコー線状パターンは、ヒト住血吸虫症の際に特徴的に観察される「ネットワークパターン」と酷似しているようである。感染１年後では、この線維化のパターンが著明に増悪していた。感染早期から肝機能障害は認められ、これは虫卵塞栓による微小循環障害のためと考えられる。さらに肝線維化の連続的な進行にもかかわらず肝機能は正常値に近い値に回復していく。門脈血流量の減少を補うために肝動脈血流量が増加することが報告されているが、これは今回の観察では明らかにはならなかった。肝線維化マーカーは感染８週後に急激に上昇し、門脈径も感染初期より変化し感染８週後にはピークに達するが、その後徐々に減少し、感染１年後での肝線維化所見の増悪にもかかわらずほぼ正常レベルとなった。虫卵周囲肉芽腫の最大形成時点で門脈圧が最大に達したか、または門脈圧亢進を軽減するために側副血行路が形成され、血流量が回復した可能性がある。脾静脈の拡張が感染 10 週後に明確に描出されたので、日本住血吸虫感染マウスにおいてもヒトの門脈圧亢進症と同様の血行動態の変化が起こりえた可能性は高い。門脈圧亢進および肝線維化の進行程度は、必ずしも平行しているわけではないと推測する。

＜結論＞

日本住血吸虫感染マウスにおける肝病変を主体とした病態変化を、感染早期より経時的に観察することに成功した。超音波画像での宿主の病態変化の経過把握は、ワクチンや治療薬開発時の効果判定などに有用性が期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5432　号 | 前澤　勝美 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　鈴木　敏彦<br>副　査　山岡　昇司、宮坂　尚幸 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

日本住血吸虫を感染させたマウスに対し、高解像度超音波イメージングを用いて病態変化を詳細に解析した研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

マウス感染モデルを用いての日本住血吸虫感染の病態解析は有用な研究ツールである。しかし、同一個体内における病態変化を経時的に解析しうる非侵襲的検査装置が開発されて日が浅く十分に研究がなされていない。本研究では 2 種類の高解像度超音波装置を用いて感染マウスを経時的に解析しており、先駆性があり意義深い研究である。

２）社会的意義

日本住血吸虫による本感染症は経皮感染後、主に肝臓や脾臓、腸管に病変が認められる。これらの変化は日本住血吸虫症に特徴的な画像変化として描出され、臨床においても超音波や CT、MRI を用いた際の確定診断の一助として役立っている。しかし、これまで画像上の変化を、日本住血吸虫感染マウスにおいて同一個体を用い経時的に追った報告は少ない。本研究では高解像度超音波装置を用いて感染マウスの経時的解析を実施した。その結果、感染早期より肝実質変化や門脈径の変化、脾腫大の経過、腹水の描出などの病態進行のみならず、生体内において門脈内に寄生する虫体の様子も捉えることに成功した。

以上の研究成果は、本感染症の病態解明の一助になり、さらには治療薬やワクチン開発における動物モデルの解析にも有用な知見をもたらしており、社会的意義が高い研究である。

３）研究方法・倫理観

本研究は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て実施された。

BALB/c マウスに対し腹腔内麻酔下に日本住血吸虫 *S.japonicum*　Yamanashi 株のセルカリアを経皮感染させた。感染後定期的に麻酔下で小動物用およびヒト用超音波装置を用いた解析を実施した。肝臓、脾臓、門脈、腸および腹水を含む腹腔内全般、および肝臓の辺縁角度および門脈の血流を精査した。また、住血吸虫の感染成立と産卵の進行を確認するため、糞便 1 g 中の虫卵数を、さらに血清中 ALT、A/G、および Mac-2 結合蛋白糖鎖修飾異性体（M2BPGi）を肝機能と肝線維化の指標として測定した。

これらの研究は周到な準備の上に実施され、申請者が研究方法について十分な知識と技術力を有することを裏付けている。

４）考察・今後の発展性

高解像度超音波装置は、リアルタイムバイオイメージングのツールの１つであり、病態評価のために様々な臨床医学分野に応用されている。獣医学分野で広く適用されており、ツールの改良により小動物研究への応用が容易になっているが、マウス感染モデルに対する応用は少ない。本研究では、日本住血吸虫感染マウスにおける肝病変を主体とした病態変化を、感染早期より経時的に観察することに成功した先駆的な研究である。今後、ワクチンや治療薬開発時の効果判定などに有用性が期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認めた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 王　元龍 |
| 論文審査担当者 | 主査　澁谷　浩司<br>副査　古川　哲史、平尾　見三 |
| 論　文　題　目 | High potassium concentration regulates the WNK3–SPAK–NKCC1 phosphorylation cascade via kelch-like protein 2 in mouse vascular smooth muscle cells |

（論文内容の要旨）

＜Abstract＞

High intake of potassium, including that by dietary supplementation, has been shown to attenuate hypertension. However, the molecular mechanisms by which potassium ameliorates hypertension remain unelucidated. We hypothesized that the WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade, which is regulated by kelch-like protein 2 (KLHL2) in vascular smooth muscle cells, could be directly linked to the anti-hypertensive effects of potassium. Therefore, we used mouse vascular smooth muscles cells in vitro to check whether high potassium concentration could influence the WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade. We found that high potassium levels lead to KLHL2-mediated WNK3 ubiquitin degradation, thereby inhibiting the WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade and the molecular mechanisms we identified in present study could be responsible for the antihypertensive effects of high dietary potassium intake.

<Introduction>

Mutations in the WNK1 and WNK4 genes lead to pseudohypoaldosteronism type II (PHAII), which is characterized by hereditary hypertension, hyperkalemia, metabolic acidosis, and thiazide sensitivity. We have previously demonstrated that WNKs increase the phosphorylation of oxidative stress-responsive kinase 1 (OSR1) and STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase (SPAK), which are known as substrates of WNKs that in turn increase the phosphorylation of NCC and NKCC. The over activation of the WNK–OSR1/SPAK–NCC phosphorylation cascade by mutated WNK4 is a major cause underlying PHAII.

Recently, we have reported that KLHL3 forms a complex with Cullin3 (CUL3) that mimics E3 ubiquitin ligase, which can be serves as a substrate adaptor for ubiquitination. KLHL3-CUL3 E3 ligase complex and that mutations in WNK4, KLHL3, or CUL3 impair the KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4, which is responsible for PHAII development. Because KLHL3 binds to a highly conserved acidic domain belonging to WNKs, all WNKs can be substrates of the KLHL3-CUL3 E3 ligase complex. KLHL2, the closest homolog of KLHL3, possesses a kelch domain (WNK-binding domain) that is highly similar to that

of KLHL3; therefore, KLHL2 can also form a KLHL2-CUL3 E3 ubiquitin ligase and bind to all WNKs for degradation.

NKCC1 regulates vascular smooth muscle cell contractions via intracellular chloride accumulation and membrane depolarization, leading to the activation of voltage-gated calcium channels and, consequently, the elevation of peripheral resistance. We have previously reported that WNK1 and WNK3–SPAK–NKCC1 signaling in arteries are critical in maintaining vascular tone in vivo. Moreover, we have recently found that KLHL2 is expressed, but not KLHL3, in the mouse aorta and mouse vascular smooth muscle (MOVAS) cells, therefore, we focused on KLHL2 in WNK signaling cascade and excluded the influence of KLHL3.

Based on clinical studies, increased dietary potassium intake is recommended for preventing and treating hypertension, regardless of the paradoxical tendency of raising blood pressure caused by the increase in aldosterone level induced by hyperkalemia. Furthermore, high dietary potassium intake is inversely related to the occurrence of cardiovascular diseases and mortality. Because of the health benefits of high dietary potassium, it is particularly important to elucidate the biochemical mechanism underlying the attenuation of hypertension by potassium. In addition, we have reported that the extracellular potassium negatively regulates the WNK1–OSR1/SPAK–NCC phosphorylation cascade in COS7 cells, it is possible that high potassium concentrations suppress WNK1 and WNK3 activities, thereby inhibiting the SPAK–NKCC1 phosphorylation cascade in vascular smooth muscle cells.

In this study, we clarified the WNK3–SPAK–NKCC1 phosphorylation cascade was suppressed by high potassium concentrations in vascular smooth muscle cells and this mechanism is KLHL2-dependent. This molecular mechanism could be responsible for antihypertensive effects of high dietary potassium intake.

<Methods>

In this study, we performed MOVAS cells as the in vitro model. MOVAS cells were incubated in both normal (5 mM $K^+$) -and high (8.4 mM $K^+$) -potassium media for 60 min before performing analysis using Western blotting and RT-PCR.

We evaluated the protein expression of WNK-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade to clarify whether the WNK–SPAK–NKCC1 phosphorylation cascade is suppressed by high potassium concentrations. Then we evaluated the mRNA level of WNK3 and protein expression level of KLHL2 to clarify whether KLHL2 is involved in this mechanism. Finally, we performed KLHL2 knockdown experiments in MOVAS cells and evaluated the protein expression of KLHL2, WNK3 and P-SPAK to confirm this mechanism is KLHL2-dependent.

<Results>

After we examined WNK–SPAK–NKCC1 phosphorylation cascade in MOVAS cells after incubating with normal- or high-potassium medium. We observed the WNK3–SPAK–NKCC1 phosphorylation cascade in MOVAS cells decreased in the presence of high potassium concentration, but WNK1 levels remained unchanged. This suggested that WNK3 plays a critical role in high potassium

concentration-induced decreased phosphorylation of SPAK–NKCC1 signaling, which leads to decreased vascular tonus.

We further investigated how potassium regulates WNK3 levels. We found that WNK3 mRNA levels in MOVAS cells did not change in the presence of high potassium concentrations and KLHL2 protein levels increased in the presence of high potassium concentrations. These results indicated that high potassium concentrations increased KLHL2 levels in MOVAS cells, leading to a proportionate increase in WNK3 degradation without influencing WNK3 transcription.

To confirm whether reduced WNK3 levels in the presence of high potassium concentration are regulated by KLHL2, we performed KLHL2-knockdown experiments using MOVAS cells. We observed that in the control knockdown group, KLHL2 levels were increased and the WNK3-SPAK phosphorylation cascade was decreased due to high potassium concentrations, as expected, but these phenomena did not occur in case of KLHL2 knockdown. KLHL2-knockdown increased WNK3 and P-SPAK levels in the presence of normal potassium concentrations. The decrease in WNK3-SPAK phosphorylation cascade due to the high-potassium media was canceled in KLHL2-knockdown MOVAS cells. These results indicated that the KLHL2-mediated WNK3 ubiquitin degradation was necessary for the inhibition of the WNK3–SPAK–NKCC1 phosphorylation cascade in MOVAS cells caused by high potassium concentrations.

< Consideration>

From the above findings, high potassium concentrations were found to increase KLHL2 levels in vascular smooth muscle, leading to a proportionate increase in WNK3 degradation. Suppression of WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation signal was thought to attenuate vascular tonus in vascular smooth muscle.

<Conclusion>

High potassium levels lead to KLHL2-mediated WNK3 ubiquitin degradation, thereby inhibiting the WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade. The molecular mechanisms we identified in present study could be responsible for the antihypertensive effects of high dietary potassium intake.

（日本語要約）

遺伝性高血圧疾患である、偽性低アルドステロン症Ⅱ型 (PHAⅡ)の原因遺伝子として、With-no-lysine kinase 4 (WNK4) や WNK1 以外に、kelch-like 3 (KLHL3) と cullin3 (CUL3) が同定され、最近これらがユビキチン・リガーゼ複合体として WNK キナーゼの分解を担うことが明らかとなった。我々は以前に E3 ユビキチンリガーゼの構成因子である KLHL2 と CUL3 複合体が WNK キナーゼに結合し、分解することによって発現量を調節していることを解明した。血管平滑筋細胞において、KLHL2 は WNK３を適宜分解することで、WNK3-SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードの調整を行い、血管トーヌスを制御する。カリウムを多く含んだ食事摂取により、血圧が上がりにくいという事実を説明する機序の一つとして末梢血管の抵抗減少が挙げられているが、細胞外高カリウムと WNK シグナルによる血管トーヌス調整機構の関連はまだ解明されていない。本研究では、マウス血管平滑筋(MOVAS)細胞にカリウム負荷を与え、WNK-SPAK-NKCC1 リン酸化カスケードを解析した。結果、高カリウムによる顕著な WNK3-SPAK-NKCC リン酸化カスケードの減弱が確認された。さらに、カリウム負荷によって MOVAS 細胞の KLHL2 増加が認められ、KLHL2 ノックダウン実験により、カリウム負荷による WNK3-SPAK-NKCC リン酸化カスケードの減弱は KLHL2 による WNK3 の分解亢進によるものと考えられた。本研究で同定した分子メカニズムは高カリウム食摂取の抗高血圧作用の原因解明に繋がる可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5433　号 | 王　元龍 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　澁谷　浩司<br>副　査　古川　哲史、平尾　見三 |
|---|---|

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、高カリウム濃度下の血管平滑筋細胞における KLHL2 による WNK3–SPAK–NKCC1 リン酸化カスケード制御に関する論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

WNK1、WNK4、KLHL3、Cullin3 の変異は偽性低アルドステロン症Ⅱ型(PHAⅡ)の原因遺伝子であり、E3 ユビキチンリガーゼの構成因子である KLHL2 と CUL3 複合体が WNK キナーゼに結合し、分解することによって発現量を調節していることが知られていた。一方、高濃度カリウムと WNK シグナルによる血管トーヌス制御機構の関連はわかっていない。このような背景の下、申請者はマウス血管平滑筋(MOVAS)細胞にカリウム負荷を与え、WNK-SPAK-NKCC1 リン酸化カスケード制御機構について解析を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．高カリウムによる顕著な WNK3-SPAK-NKCC リン酸化カスケードが減弱すること。

２．カリウム負荷によって MOVAS 細胞の KLHL2 が増加すること。

３．KLHL2 ノックダウン実験により、カリウム負荷による WNK3-SPAK-NKCC リン酸化カスケードが減弱すること。

以上の結果から申請者は、カリウム負荷による WNK3-SPAK-NKCC リン酸化カスケードの減弱は KLHL2 による WNK3 の分解亢進によることを明らかにしている。これは高カリウム食摂取の抗高血圧作用の原因解明においても極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

本研究では、マウス血管平滑筋(MOVAS)細胞を用い、生化学的および分子生物学的解析が適切に行われ、KLHL2 の機能解析を遂行した。これら手法は、十分な知識と技術の裏付けのもとに行われており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことを窺わせるものである。

４）考察・今後の発展性

申請者は、本研究成果による分子メカニズムは高カリウム食摂取の抗高血圧作用の原因解明に繋がる可能性を考察している。これは先行研究と照らし合せても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特になし。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 金　光文 |
| 論文審査担当者 | 主査　畑　裕<br>副査　淺原　弘嗣、吉本　貴宣 |
| 論　文　題　目 | Proanthocyanidin-rich grape seed extract prevent estrogen deficiency-induced metabolic disorders |

（論文内容の要旨）

**Abstract**

The postmenopausal state is associated with an increased risk of metabolic syndrome. Grape seed extract (GSE), a rich source of proanthocyanidins, has beneficial effects on low-grade inflammatory diseases in a high-fat diet-induced obesity model and therefore is a candidate to improve postmenopausal metabolic abnormalities. In the present study, the effects of dietary GSE on body weight and glucose tolerance were examined in ovariectomized (OVX) mice. Female C57BL6/J mice underwent ovariectomy or a sham operation, and OVX mice were orally administered GSE (100 mg/kg B.W.) or the vehicle solution (OVX+V). Mice in the OVX+V group weighed significantly more than mice in the Sham group. Body weight was significantly lower in the OVX+GSE group than in the OVX+V group. The weights of subcutaneous white adipose tissue (WAT) and visceral WAT were significantly lower in the OVX+GSE group than in the OVX+V group. In glucose tolerance tests, OVX+GSE mice showed significantly lower blood glucose levels at 30 min and 60 min than those in OVX+V mice. In conclusion, we demonstrated that GSE prevents metabolic disorders, such as obesity and glucose intolerance, in OVX mice. These results support the potential therapeutic applications of GSE in postmenopausal women.

（日本語要約）

閉経はメタボリックシンドロームの危険因子である。近年、プロアントシアニジンを多く含むブドウ種子抽出物（GSE）が、高脂肪食負荷による肥満モデルにおいて、脂肪組織の慢性的な弱い炎症を予防する効果が示されている。以上に基づき、本研究では、マウス卵巣摘出（OVX）モデルを用いて、エストロゲン欠乏に伴う肥満、耐糖能低下に対する GSE 投与の効果を明らかにすることを目的とした。生後 8 ヵ月の雌 C57BL6/J マウスを sham 手術群（sham 群）、OVX 群、OVX 後に GSE を投与する群（OVX+GSE 群）に分けた。GSE（100mg/kg 体重）は手術直後からゾンデにて毎日経口投与し、sham 群と OVX 群には溶媒を経口投与した。OVX 群は sham 群よりも有意に体重が増加したが、GSE 投与によって体重は減少した。耐糖能を解析するためにブドウ糖負荷試験を行ったが、OVX によって悪化した耐糖能は、GSE 投与により改善された。術後 13 週にて屠殺し、脂肪重量、内臓重量を計測したが、OVX 群では sham 群よりも皮下脂肪、内臓脂肪が増

加したのに対し、OVX＋GSE 群ではいずれの重量も OVX 群より有意に減少した。以上の結果は、定期的な GSE 服用が、ヒト閉経後の肥満、耐糖能低下に対して、予防効果を有する可能性を示唆する。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5434　号 | 金　光文 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　畑　裕<br>副　査　淺原　弘嗣、吉本　貴宣 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

閉経に伴うメタボリックシンドロームにブドウ種子抽出物が有効であるかを、マウスモデルで検討した。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

本研究は、閉経に伴うメタボリックシンドロームという理解しやすい問題に取り組む目的で立案、遂行された。ブドウ種子抽出物を用いている点で、実用化への障壁も比較的少ないと期待される。

２）社会的意義

社会の高齢化に伴い、今後、大きな課題となる可能性がある閉経に伴うメタボリックシンドロームの予防、治療の可能性を提示した点で社会的意義がある。

３）研究方法・倫理観

卵巣摘出マウスが体重増加、脂肪組織増加、耐糖能低下を示すことを確認したのち、ブドウ種子抽出物を投与し、その効果を判定した。その結果、ブドウ種子抽出物により、体重が減少し、耐糖能が回復する傾向が確認された。したがって、ブドウ種子抽出物は閉経に伴うメタボリックシンドロームの予防に有効かもしれないと考察した。

４）考察・今後の発展性

本申請研究の成果をもとに、ブドウ種子抽出物による閉経に伴うメタボリックシンドロームの予防、治療が実現する可能性が期待される。

**３．その他**

特記事項はない。

**４．審査結果**

審査会では種々の質問が行われたが、申請者は概ね適切な回答を行った。よって、本学博士（医学）の学位に値すると判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小林　桃子 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　敏博<br>副査　石川　欽也、功刀　浩 |
| 論　文　題　目 | Association studies of WD repeat domain 3 and chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase genes with schizophrenia in a Japanese population |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

統合失調症および薬物による統合失調症様症状は，思春期以降に発症する。また，これらの統合失調症様症状発現薬を投与した齧歯類に出現する，統合失調症モデルとして確立されている異常行動のパターンも生後 3 週頃の臨界期以降に見られる。したがって，統合失調症で障害される神経回路および脳内分子は，動物でも相同のものが存在し，思春期 (ヒト) や臨界期 (動物) の前後で上記の薬物投与後の変化が異なると考えられる。本研究では，統合失調症の分子機構の手がかりを得る目的で，統合失調症様の状態を引き起こすドパミン作動薬およびNMDA型グルタミン酸受容体遮断薬に共通して，発達依存的応答変化を示す WD repeat domain 3 (*WDR3*) および chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase (*ALG1*) 遺伝子に着目した。これらの遺伝子を，新規の統合失調症関連候補遺伝子として統合失調症との相関解析を行った。ヒト *WDR3* 遺伝子において 16 部位 [W1 (rs1812607) - W16 (rs6656360)], *ALG1* 遺伝子において 10 部位 [A1 (rs8053916) - A10 (rs9673733)] の一塩基多型 (SNPs) をそれぞれ選択し，日本人の統合失調症患者および健常対照者の末梢血由来ゲノム DNA サンプルを用いて検討した結果, *WDR3* SNP W4 (rs319471) および W4 (rs319471) – W5 (rs379058) からなるハプロタイプブロックにおいて女性の統合失調症と有意な関連が認められ，多重比較後にも有意差を示した。以上の結果から，*WDR3* 遺伝子が，女性の統合失調症における感受性因子である可能性が示唆された。

＜緒言＞

統合失調症は約 0.8%の高頻度で発症する重篤な精神疾患であり，一般に思春期以降に発症する。また，ドパミン作動薬や, NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) の遮断薬によって引き起こされる統合失調症様症状も，思春期以降に出現する。これらの薬物を投与したラットおよびマウスに見られる，統合失調症モデルと考えられる異常行動のパターンも，生後 3 週の臨界期以降に観察される。以上のことから，統合失調症に関連する神経回路および脳内分子は，臨界期の前後で上記の薬物投与後の変化が異なると考えられる。本研究では，統合失調症の分子機構の手がかりを得る目的で，このような，発達依存的応答を示す遺伝子を新しい候補として，日本人の統合失調症患者および健常対照者の血液ゲノムサンプルを用いた一塩基多型 (SNPs) の解析を進

め，統合失調症との関連を検討した。まず，ラットを用いた動物実験において，投与群毎に 5 匹の動物から得た大脳新皮質組織を 1 つに合わせ，DNA マイクロアレイを用いた発現比較実験 (N=1) を行った。ドパミン作動薬の methamphetamine (MAP) および NMDA 受容体遮断薬の phencyclidine (PCP) の投与後に，生理食塩水投与対照群に比べて発現上昇が，生後 8 日令では 110%未満であり，生後 50 日令では 120%以上となる遺伝子を検索した。本条件に該当した WD repeat domain 3 (*WDR3*) は，18S rRNA のプロセシングに関与し，chitobiosyldiphosphodolichol beta-mannosyltransferase (*ALG1*) は, oligosaccharides の *N*-glycosylation に関わる細胞質酵素であることが知られている。双方の遺伝子ともに, (1) 脳を含む幅広い組織で発現しており，生体反応に重要な遺伝子であること，(2) 統合失調症関連領域として報告されているゲノム領域にマップされていること (WDR3, 1p12; ALG1, 16p13) を考え合わせ，解析対象とした。

＜方法＞

ケース・コントロール解析は，日本人の統合失調症患者 1808 人および健常対照者 2170 人から採取した末梢血由来ゲノム DNA を解析対象とした。解析を行う SNPs は，各対象遺伝子の上下流 10 kbp を含む領域にあるタグ SNPs をマイナーアレル頻度 (MAF) > 0.10, 相関係数 ($r^2$) > 0.85 を条件に NCBI データベースを用いて検討した。また，遺伝子の外側の影響を及ぼす領域として，隣接する遺伝子との間に存在するインスレーター領域を CTCFBSDB 2.0 データベースを用いて検索し，インスレーターとされた領域上にあり，日本人で頻度が認められた SNPs を検討した。以上の条件により選択した SNPs の遺伝子型の判定を行った。統計解析では，Fisher の正確確率検定，多重検定補正，ハーディー・ワインベルグ平衡 (HWE) からの逸脱を評価するカイ二乗検定を行った。加えて, Linkage disequilibrium (LD) ブロックの解析をし，ハプロタイプ相関解析を行った。さらに遺伝子間相互作用を調べるために, multifactor dimensionality reduction (MDR) 解析を行った。

また，統合失調症においては，(1) 発症年齢，症状，経過等に性差が指摘され，(2) 症状の特徴や治療反応性から異質性の存在が示唆されることや，パーキンソン病の例のように，原因遺伝子が異なる場合 (異質性) にそれぞれの発症年齢に違いが見られる可能性があること，等の点に基づいて，関連解析は，全体だけでなく性別および発症年齢階層別についても行い，各比較群の検出力を算出した。

＜結果＞

*WDR3*, *ALG1* の双方とも，ケース・コントロール全体の解析では，有意な関連を示す SNPs は認められなかった。

性別の解析では，女性の統合失調症において *WDR3* SNP W4 (rs319471)に有意な関連が認められ [Risk Factor “C”; allelic $P$ = 0.003; OR, 95 % CI = 1.38, 1.12-1.70]，ハプロタイプ解析でも，*WDR3* の W4 (rs319471) – W5 (rs379058)からなるハプロタイプブロックに有意な関連が認められた (global haplotypic $P$ = 0.016)。これらは多重比較後も有意差が確認された。このような関連は男性には観察されず, *ALG1* SNPs についても検出されなかった。

発症年齢階層別に解析したところ，多重比較後は有意ではなかったが，$P$＜0.05 の水準で関連の傾向を示す SNPs が，次のように多く見出された: [男女全体; 17 歳以下 (*WDR3*, 1 SNP), 18 歳以上

(*WDR3*, 1 SNP; *ALG1*, 1 SNP), 16-25 歳 (*WDR3*, 1 SNP; *ALG1*, 1 SNP), 26-35 歳 (*WDR3*, 1 SNP; *ALG1*, 1 SNP), 36 歳以上 (*ALG1*, 2 SNPs), 男性; 26-35 歳 (*WDR3*, 2 SNPs), 女性; 15 歳以下 (*WDR3*, 1 SNP), 26-35 歳 (*WDR3*, 3 SNPs; *ALG1*, 1 SNP), 36 歳以上 (*WDR3*, 1 SNP; *ALG1*, 2 SNPs)]。

MDR 解析では, *WDR3* と *ALG1* 遺伝子の相互作用を示す SNP は認められなかった。

＜考察＞

本研究は, *WDR3* および *ALGI* 遺伝子と統合失調症との初めての遺伝子関連解析であり, タイピングエラー等の理由で *WDR3* 遺伝子の一部タグ SNPs を解析より除外したため, 遺伝子全体を網羅的に解析したものではないが, *WDR3* 遺伝子が女性の統合失調症に関連していることが明らかになった。この関連は, 男性群には見られず, *ALGI* 遺伝子に関しては検出できなかったことから, 非特異的な現象ではないと考えられる。

女性の統合失調症と特異的関連を示す SNPs およびハプロタイプの意義については今後の検討を要するが, 本症において広く指摘されている性差と関係すると推察される。すなわち臨床所見では, 男性の統合失調症は女性より早期発症で重症の経過を取り, 陰性症状や認知機能障害が目立つ傾向があるのに対し, 女性では情動性症状が出現し易い傾向がある。分子遺伝学的アプローチにおいても, disrupted in Schizophrenia 1 (*DISC1*), reelin (*RELN*), D-amino acid oxidase (*DAO*), *Dlg1* (discs, large homolog 1 of *Drosophila*)/*SAP97* (synapse-associated protein 97 (*DLG1*)) 等の複数の遺伝子について, 性別特異的な統合失調症との関連が報告されている。女性の統合失調症との関連が認められた W4 (rs319471) は, 遺伝子の上流にある CTCF 結合部位上に存在する SNP である。今回の研究では, クロマチン構造の制御にかかわるインスレーター機能に着目をして CTCF 結合部位上に存在する SNPs を選択しているが, W4 (rs319471) を含む上下流 50 塩基について, CTCF コンセンサス配列を調べたところ, W4 [C/T] が “C” のときにのみ, コンセンサス配列を形成することが判明した (ATCACTGCC)。マイナーアレル (T) の頻度が健常対照者に比べ低くなっていることから, 女性の統合失調症において CTCF 結合活性が高くなる可能性が示唆された。脳の発達においては, (1) CTCF を欠損させたニューロンの樹状突起の分枝およびスパインが減少することや, (2) インスレーターの構築に異常があるとシナプス発達障害が引き起こされること, 等が報告され, 統合失調症の脳では神経発達やシナプス機能の異常が推測されていることより, W4 (rs319471)の多型はインスレーター機能やクロマチンの立体構造への影響を介して, 統合失調症のシナプス病態の形成に関与することも考えられる。

一方, *WDR3* および *ALG1* 遺伝子において, 多重比較後は有意ではなかったが, 特定の発症年齢階層と $P<0.05$ の水準で関連の傾向を示す SNPs が認められた。SNPs またはそのゲノム領域が統合失調症の発症年齢に影響を与えることを反映している可能性があり, 今後さらに症例数を増やすことや, 別の大規模なコホートで解析することによって, 検証する意義があると考えられる。

＜結論＞

*WDR3* 遺伝子と統合失調症との関連解析の結果, *WDR3* 遺伝子は女性の統合失調症の感受性因子であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5435　号 | 小林　桃子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田中　敏博<br>副　査　石川　欽也、功刀　浩 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は候補遺伝子アプローチにより、統合失調症の遺伝的背景を探った研究成果を著したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

さまざまな研究がなされているが、統合失調症の遺伝的要因は現時点で明らかになったとはいえない状況である。それを打破するために申請者のとった手法は、モデルラットの発現実験で手がかりを得た上で遺伝子解析に進む候補遺伝子アプローチであり、先駆性がある。

２）社会的意義

本研究により女性の統合失調症と WDR3 遺伝子の遺伝学的関連が明らかになった。本疾患は臨床的に男性と女性とで症状が異なる傾向があることが知られている。本遺伝子により臨床症状の性差の一部を説明できる可能性があり、社会的な意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

研究には遺伝学的関連解析の手法が用いられ、臨床情報と SNP 情報との関連が検索された。この手法は疾患遺伝学研究領域においては確立されており、妥当な研究方法である。また、ヒト試料を用いることから高い倫理観が必要であるが、当該指針に基づき、該当するすべての施設において倫理審査委員会での研究計画の承認を得る等、本研究は周到な準備の上に行われてきたと考えられる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は本研究結果から引き続いて、細胞から個体レベルでの WDR3 遺伝子の機能解析と本疾患の病態形成機序の解明の可能性を考察している。この考察に基づいた研究により仮説の検証ができれば、疾患の深い理解に道を拓くものであり、大きな発展につながることが期待される。

**３．その他**

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 木脇　祐子 |
| 論文審査担当者 | 主査　東田　修二<br>副査　清水　重臣、沢辺　元司 |
| 論　文　題　目 | Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma |

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

酸化ストレスやレドックス制御系は腫瘍発生や腫瘍の悪性化において重要な役割を担っており、腫瘍の新しい治療標的として非常に注目されている。抗酸化酵素の一つであるグルタチオンペルオキシダーゼ４（GPX4）は生体膜の構成成分であるリン酸化脂質のペルオキシド化を抑制することで細胞死を抑制する事が知られている。しかし、DLBCL を初めとする悪性リンパ腫における GPX4 の発現や臨床的意義は解明されていない。本研究では DLBCL における GPX4 の発現や意義について検討した。免疫組織化学染色では GPX4 は DLBCL 症例の 35.5% (33/93 例)に発現していた。GPX4 陽性群は、GPX4 陰性群と比較して全生存期間、無増悪生存期間ともに有意に短く、Cox 比例ハザード解析では GPX4 過剰発現は DLBCL における独立予後不良因子であることが示された。GPX4 と酸化ストレスマーカーである８-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の発現を免疫組織化学的に検討すると、GPX4 と 8-OHdG の間には負の相関関係があり、GPX4 陽性かつ 8-OHdG 陰性を示す群は、他の群と比較して全生存期間、無増悪生存期間ともに有意に短い事が明らかになった。また、リンパ芽球様細胞株ある LCL-K を用いた細胞実験では、GPX4 を過剰発現させた LCL-K 細胞は活性酸素で誘導される細胞死に対して抵抗性を示し、逆に GPX4 をノックダウンした細胞株では活性酸素誘導性の細胞死に対して感受性が高まることが示された。これらより GPX4 は DLBCL において活性酸素誘導性の細胞死を抑制し、予後不良因子である事が示唆された。この結果は GPX4 が DLBCL における予後予測因子となり得るだけでなく、近年注目されているフェロトーシスのメカニズムを用いた新しい治療戦略の可能性を示唆する。

〈諸言〉

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(DLBCL)は非 Hodgkin リンパ腫のうち大型の B 細胞が腫様な構成成分を占めるものと定義され、新規に診断される悪性リンパ腫の約 1/3 を占める。Aggressive lymphoma の 80%以上を占め、未治療では生存期間中央値が 1 年未満の予後不良のリンパ腫である。DLBCL はその定義から多彩な疾患群が含まれており、表現型、遺伝子発現、臨床予後などの観点から様々な分類が提唱されている。個々の症例にあわせた治療選択のためにも新しい予後予測マーカーを探索することの重要性は益々増している。

一般に腫瘍細胞は非腫瘍性細胞に比べて増殖活性が高く、そのために酸素需要量が多いため非腫瘍性細胞よりも酸化ストレスに晒されやすい。そのため腫瘍細胞は thioredoxin-thioredoxin reductase system や cystine/glutamic acid transporter (xc−) system といった様々な抗酸化システムを発達させることで酸化ストレスを低減さている。これらの抗酸化システムおよび関連分子は、発がんのみならず腫瘍の進展にとっても重要な働きを担い、様々な腫瘍における抗がん剤のターゲットやバイオマーカーとして用いられている。

グルタチオンペルオキシダーゼ(GPX)は代表的な細胞内の抗酸化酵素であり、GPX ファミリーの一つ、GPX4（別名 phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)）は GPX ファミリーの中で唯一脂質ペルオキシドを還元し、生体膜の抗酸化において重要な役割を担う。近年 GPX4 の過剰発現や枯渇が腫瘍の発生や悪性化に影響を及ぼす事が報告されているが、DLBCL を含め悪性リンパ腫における GPX4 の発現頻度や組織学的評価、予後との関係については渉猟する限り先行研究が見られない。

そこで我々は DLBCL における GPX4 の発現様式および GPX4 の発現の多寡による臨床病理学的な予後の相違、さらに腫瘍細胞の生存にどのように作用するのかについて検討した。

〈方法〉

東京医科歯科大学附属病院で化学療法(CHOP 療法あるいは R-CHOP 療法)を受け、切除された 93 例の DLBCL 症例を対象に免疫組織化学的な検討を行った。診断は WHO 分類に準じ、免疫染色結果に準じて半定量化し、統計学的処理を行った。48 例の DLBCL 凍結標本に対して qRT-PCR を用いて GPX4 mRNA の定量を行った。また、GPX4 と 8-OHdG の二重染色を行い、組織切片上での両者の発現様式について検討した。

LCL-K にレンチウイルス形質導入ないし shRNA サイレンシングによって GPX4 過剰発現細胞株ないし GPX4 ノックダウン細胞株を樹立した。これら細胞株を酸化剤である tert-butyl hydroperoxide (TBHP)ないし核小体ストレス剤である etoposide で処理し、フローサイトメトリーを用いて細胞内活性酸素の蓄積の度合いおよび細胞の生存率を解析した。

〈結果〉

DLBCL 症例における免疫組織化学染色では GPX4 は細胞質に局在し、35.5% (33/93 例)が陽性と判定された。統計解析では GPX4 陽性症例は 65 歳以上が有意に多く、かつ骨髄浸潤ありが有意に多かった。GPX4 陽性群は全生存期間、無増悪生存期間共に GPX4 陰性群と比較して有意に短かった。Cox 比例ハザード解析では GPX4 陽性および Performance Status 2 以上の 2 項目が独立予後不良因子となった。GPX4 と 8-OHdG を組み合わせた検討では GPX4 と 8-OHdG は互いがほぼ排他的に染色される事が二重染色で明らかとなった。GPX4 陽性かつ 8-OHdG 陰性を示す群が、他の群よりも全生存期間、無増悪生存期間共に短かった。

GPX4 過剰発現細胞では、コントロールと比較して、TBHP 投与下での活性酸素の蓄積が有意に抑制されることが分かった。Etoposide ないし TBHP を投与して細胞の生存率を計測すると、TBHP 投与下、つまり活性酸素ストレス下においてのみ GPX4 過剰発現細胞とコントロールの間に有意差が見られ、GPX4 過剰発現細胞の方が活性酸素投与下の細胞死が有意に減少した。逆に GPX4

をノックダウンさせた LCL-K 株で同様の実験を行うと、TBHP 投与下においてのみ細胞死が有意に増加した。

〈考察〉

正常組織において GPX4 は精巣、脂肪組織および網膜に多く分布することが知られているが、腫瘍においては一定の見解が得られていない。結腸癌、肝細胞癌では GPX4 発現が増加し、膵臓癌、乳癌、淡明細胞型腎細胞癌では GPX4 発現が減少するとの報告があるが、DLBCL を含め悪性リンパ腫で GPX4 の発現や予後との関係を検討した報告は見られない。

DLBCL 切除検体において免疫組織化学的に 35.5%の症例で GPX4 過剰発現が認められた。非腫瘍性 B 細胞では GPX4 蛋白はほとんど検出されないことが知られており、GPX4 の過剰発現が腫瘍の発生や進展に作用している可能性が考えられた。一方で GPX4 陽性群と GPX4 陰性群で GPX4 の mRNA レベルに有意差が見られなかった事から、ユビキチン-プロテアソーム系のような転写後調節機構が GPX4 の発現に関与する可能性が示唆された。

GPX4 には細胞質型（cGPX4）、ミトコンドリア型（mGPX4）、核小体型（nGPX4）の 3 つの亜型が知られているが、今回の検討では細胞質への GPX4 の局在のみが確認された。これは、GPX4 の中でも細胞質型 GPX4 の過剰発現が予後不良に作用する可能性を示唆するが、正常体細胞では細胞質型 GPX4 と比較するとミトコンドリア型および核小体型は発現量が非常少ない事が知られており、今回の検討で単にミトコンドリア型 GPX4 や核小体型 GPX4 が検出出来なかっただけである可能性も否定出来ない。

本研究では GPX4 陽性群は全生存期間、無増悪生存期間が有意に短く、GPX4 陽性が独立予後不良因子となった。また 8-OHdG と GPX4 を組み合わせた免疫組織化学的検討や培養細胞を用いた検討から、GPX4 は DLBCL 細胞内の活性酸素の蓄積を抑制し、腫瘍細胞の生存を有利にすることで、結果として患者の予後不良につながっていると推測された。

LCL-K を用いた細胞実験においても GPX4 が LCL-K 細胞内の活性酸素蓄積を抑制することで腫瘍細胞の生存率を向上させるという結果が得られた。先行研究でも、DLBCL においてチオレドキシンやグルタメート-システインリガーゼなどの酸化還元調節酵素の過剰発現が、活性酸素生成性の抗癌剤に対し抵抗性を獲得するために予後不良をもたらすと報告されている。現在ヒト腫瘍における GPX4 の発現様式と患者の予後との間に明確なコンセンサスは存在しないが、これらの結果から腫瘍細胞におけるレドックス酵素の高発現が予後不良につながる事が推察される。しかし酸化的ストレスやレドックス系は腫瘍をはじめ生体内で多種多様な作用を有するため、腫瘍の発生・進展と GPX4 を含む抗酸化酵素との関係についても議論の余地がある。

近年 Yang により、GPX4 の不活性化または細胞内グルタチオンの枯渇が引き金となる、鉄依存性の非アポトーシス性新規細胞死、フェロトーシス（ferroptosis）が提唱された。その報告の中で、DLBCL は未知の理由によりフェロトーシスに非常に敏感な腫瘍の 1 つであるとされている。本研究で GPX4 高発現が DLBCL 患者の予後不良と有意に相関する結果となった事も、GPX4 の存在により DLBCL がフェロトーシスから免れた結果、患者の予後不良につながったとも推測できる。本研究での細胞死がフェロトーシスであるか否かに関しては、フェロスタチン-1、ビタミン E、GPX4 阻害ペプチドといった、GPX4 阻害剤として知られる薬剤を用いた細胞死実験での検証が必

要である。フェロトーシスについてはそのカスケードを含め未解明な点が多いものの、GPX4 が他の抗酸化物質とは異なるユニークな抗酸化酵素である可能性を示唆している。

フェロトーシスのメカニズムや GPX4 の作用機序が解明されることで GPX4 は今後の新たな治療標的となる事が期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5436　号 | 木脇 祐子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　東田　修二<br>副　査　清水　重臣、沢辺　元司 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（以下、DLBCL)症例の病理標本の免疫組織染色において、抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ４(以下、GPX4)陽性となる症例は有意に予後が不良であることを明らかにし、さらに、*in vitro* 実験において、GPX4 を過剰発現させたリンパ系細胞は活性酸素で誘導される細胞死に対して抵抗性を示すことを証明した論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

腫瘍細胞は非腫瘍性細胞に比べて酸素需要量が多いため酸化ストレスに晒されやすい。代表的な細胞内の抗酸化酵素である GPX4 の過剰発現が腫瘍の悪性化に影響を及ぼす事は報告されているが、リンパ腫細胞での GPX4 の発現や予後との関係については先行研究がない。このような背景の下、DLBCL と GPX４との関連について、臨床的解析および実験的検討を行っており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.GPX4 陽性の DLBCL 症例は予後不良である。

2.GPX4 発現は活性酸素誘導性の細胞死に対する抵抗性をもたらす。

以上のように申請者は､GPX4 発現と DLBCL 症例の予後に有意な関連があることを明らかにした。これは臨床的に極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には DLBCL の生検標本とリンパ系細胞株が用いられ､GPX4 発現などの解析を行った。本手法は十分な病理学的な知識と細胞分子生物学的技術との裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

4）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果の PGX4 発現の意義について、近年、細胞死の新たな機序としてのフェロトーシスとの関連について考察している。これは極めて重要かつ妥当な考察であり、今後の研究によりさらに発展することが期待される。

**３．その他**　　なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）　の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 金　民大 |
| 論文審査担当者 | 主査　大川　淳<br>副査　秋田　恵一、神野　哲也 |
| 論　文　題　目 | Coronal Instability after Total Knee Arthroplasty using Bi-Surface type 3: An Averaged 10 Year Follow-up Study |

（論文内容の要旨）

<要旨>

Bi-Surface type 3（BS3）を用いて手術を行った膝の中に、立位前後（AP）X 線写真上で脛骨大腿骨関節の側方変位が進行するものがあり、側方不安定性を疑った。本研究の目的は冠状面での関節不安定性とそれに関連する因子を明らかにすることである。

26 膝の BS3 と 38 膝の NexGen LPS（LPS）についてレントゲン画像と臨床成績を比較した。すべての手術は当院において同様の手術手技で行われた。放射線学的評価では冠状面の不安定性を示すコンポーネントシフト比も調査した。最新のフォローアップ時のレントゲン計測および臨床成績と、コンポーネントシフト比との相関も評価した。

BS3 群ではより大きなコンポーネントシフト比を認めたが、臨床成績は両群において有意差を認めなかった。最終フォローアップ時の脛骨後方傾斜、大腿骨脛骨角、インプラント伸展角度、膝伸展角度の増加に伴ってコンポーネントシフト比は増大した。

BS3 膝は放射線写真で冠状面での不安定性を示したものの、臨床成績は LPS 膝と同様の結果であった。 BS のデザイン特性を理解し、過剰な後脛骨傾斜を避け、軟部組織のバランスに注意することが、術後の不安定性を防止するために重要であると思われる。

<緒言>

人工膝関節置換手術(以下、TKA)後の関節不安定性は再手術の主要な原因の一つであり、20%ほどにのぼると報告されている。TKA 後に関節不安定性を起こす要因はいくつか考えられるが、インプラントデザインや手術手技などが非常に大きな影響を与えていると考えられる。PS 型人工膝関節ではポストカム構造が膝関節運動における安定性に重要な役割を果たしている。Bi-Surface 型人工膝関節はポストカム構造の代わりにボール＆ソケット構造を採用した特徴的な人工膝関節であり、優れた膝関節可動域と軸方向へのスムーズな下腿の回旋を達成し、手術後の満足度を向上してきた。我々も 1999 年から数年間、Bi-Surface3 型人工膝関節(以下、BS3)を採用し、手術を行った。しかし、手術後に単純レントゲン画像において側方の膝関節不安定性を呈する例を認め、再手術を要する症例があった。今回、BS3 の膝関節不安定性を調査するため、BS3 を用いて手術した症例と、同時期に用いられていたポストカム構造をもつ PS 型人工膝関節である NexGen LPS

型人工膝関節(以下､LPS)を用いて手術を行った症例のレントゲン画像所見､臨床成績を比較した。

<方法>

1999 年から 2002 年までに当院で行った 225 例の初回人工膝関節手術のうち、変形性膝関節症に対して BS3 および LPS を用いて手術を行い、2 年以上フォローアップを行った BS3 26 膝、LPS 38 膝を対象とした。

BS3 と LPS は後十字靭帯を必要としない PS 型の人工膝関節である。BS3 は特徴的なボール＆ソケット構造を採用し、膝深屈曲時に大腿骨コンポーネントと脛骨コンポーネントが後方インピンジメントを起こすことなくスムーズにロールバックが可能となっている。ボール＆ソケット構造は機能するのは 60°屈曲からである。LPS は従来型のポストカム構造をもち、cam の突起が post の溝にはまり接することにより大腿骨のロールバックを可能にしている。そしてこれは側方安定性の制御も行っている。ポストカム構造が働き始めるのは 75°からである。BS3 は 150°の深屈曲を目標とし、LPS は 125°の屈曲を目標として設計をされている。

すべての手術は当院において、同様の手術手技で行われた。すべては midvastus approach でアプローチを行い、Mesured bone resection 法で行った。軟部組織の剥離は症例ごとにケースバイケースでコンポーネントギャップの計測をしながら行った。全てのコンポーネントはセメントで固定を行った。膝蓋骨は全例で置換を行った。術後のリハビリテーションは同様に行われた。

臨床成績は術後 1 年の時点と、最終フォローアップ時の可動域、満足度、Knee Society の Knee Score と Function Score を評価した。放射線学的評価では術後 1 年の時点と、最終フォローアップ時のコンポーネント設置角、大腿骨脛骨角(FTA)、ラジオルーセントラインに加えてインプラント伸展角、冠状面の不安定性を示すコンポーネントシフト比も調査した。FTA については short film で評価を行った。

また最新のフォローアップ時のレントゲン計測および臨床成績と、コンポーネントシフト比との相関も評価した。

すべての計測は筆頭著者がレントゲン画像を用いて行った。検者内または検者間誤差については級内相関係数(ICC)を求めた。検者間誤差はランダムに選ばれた 20 膝について筆頭著者と他の整形外科医が独立して計測を行った。検者間の ICCs は BS3 群で 0.92、LPS 群で 0.82 であった。検者内誤差は筆頭著者がランダムに選ばれた 20 膝について 2 回計測を行った。検者内の ICCs は BS3 群で 0.93、LPS 群で 0.85 であった。

統計学的評価は t 検定、Mann-Whitney の U 検定、Fisher の正確確率検定を用いた。また、各パラメーターについて Spearman の順位相関係数について調べた。p 値は 0.05 以下を有意とした。統計ソフトは SPSS を用いた。

<結果>

放射線学的計測では BS3 群で LPS 群に比べてより大きなコンポーネントシフト比を術後 1 年時($p<0.001$)と最終フォローアップ時($p<0.001$)に認めた。術後 1 年の時点で 3%を超えるコンポーネントシフト比は計測されなかったが、最終フォローアップ時の計測では BS3 群では 6 膝で 5%のコンポーネントシフト比を計測した一方で､LPS 群では 5%をこえるものは 1 例も計測されなかった

(p<0.001)。コンポーネントシフト比の分布を比較してみると LPS 群では正規分布に近い分布を認めるのに対し、KU3 群ではシフト比が大きい領域に分布の偏りを認め、分布の違いが明らかであった。FTA とインプラント伸展角については両群とも有意差を認めなかった。1mm 以上のラジオルーセントラインは BS3 群(5 膝)で LPS 群(0 膝)より多く認めた(p<0.009)。しかし、BS3 群でコンポーネントシフト比の大きかった膝にはラジオルーセントラインは認められなかった。大腿骨コンポーネントおよび脛骨コンポーネントの設置角は両群とも有意差を認めなかった(α 角, 95±2, 96±3, p=0.548; β 角, 90±3, 89±2, p=0.151; γ 角, 3±2, 4±2, p=0.183; δ 角, 85±2, 85±1, p=0.365)。

臨床評価ではいずれの項目についても術後 1 年時、最終フォローアップ時で両群において有意差を認めなかった。

放射線学的計測では最終フォローアップ時のコンポーネントシフト比はいずれも BS3 群において δ 角(r= -0.454, p= 0.020)、FTA(r= 0.428, p= 0.029)、インプラント伸展角(r= 0.456, p=0.019)とに相関を認めた。両群とも術前の FTA、α 角、β 角、γ 角についてはコンポーネントシフト比と相関を認めなかった。

臨床評価では最終フォローアップ時の BS3 群での膝伸展角度のみが(r= 0.508, p= 0.008)コンポーネントシフト比と相関していた。

<考察>

この研究で最も重要な結果は BS3 群で LPS 群よりも立位単純 X 線画像において術後 1 年時、最終フォローアップ時ともに脛骨コンポーネントの側方移動を認めた点である。これは BS3 において膝関節伸展時に不安定性があることを示唆する所見である。全ての手術は同様な手技で行われており、術後の FTA やコンポーネント設置角、インプラント伸展角についても BS3 群、LPS 群ともに同様な結果であった。しかしながらコンポーネントシフト比については BS3 群で LPS 群よりも大きな値を示しており、この違いはインプラントデザインによる影響があったのではないかと考えられる。術後 1 年時では両群とも 3%を超えるコンポーネントシフト比を示していなかったが、最終フォローアップ時では BS3 群で 5%を超えるコンポーネントシフト比を示すものが多数見られたことからは、BS3 群において側方の不安定性が進行しているものと考えられる。

今回、コンポーネントシフト比と相関を認めたのは最終フォローアップ時の δ 角、FTA、インプラント伸展角であった。術後の FTA は内側よりも外側の軟部組織の動揺性を反映しており、この角度が大きくなるほどコンポーネントシフト比が大きくなるものと考えられた。過去には術前に高度の膝関節変形があると軟部組織のバランスも変化しており術後の膝関節不安定につながる可能性があるため、手術中の軟部組織バランスに注意が必要であると報告されているが、本研究では術前の FTA とコンポーネントシフト比とに相関を認めなかった。設置角では冠状面の α 角、β 角には相関がなく、矢状面の δ 角に負の相関があったこと、インプラント伸展角と膝関節伸展可動域に相関があったことを考慮すると膝関節の伸展時に不安定性や動揺性が生じている可能性がある。一般的な TKA 手術時の脛骨骨切り時は強い後方傾斜を避け、軟部組織の剥離に気をつける必要があるが、大きなコンポーネントシフト比が生じる原因は BS 型膝のデザインに原因があるのではないかと思われる。BS3 のボール＆ソケット構造は膝関節伸展から 80°屈曲までの間の関節安定性を内外側副靭帯とギャップバランスに大きく依存している。

1mm 以上のラジオルーセントラインが BS3 側に多く出現しており、またそのいずれもがコンポーネントシフト比の増大を認めていない。長期成績が良好な BS3 でも 20%ほどにラジオルーセントラインを認めるとの報告もあるため、側方の不安定性によりかかる負荷がインプラントと骨の間で吸収されているのかもしれない。

また術後可動域や臨床成績について過去にされた様々な報告に反して、本研究では臨床成績、膝関節可動期とも BS3 と LPS との間に有意差を認めなかった。

本研究の限界は軟部組織バランスに影響があると考えられるリウマチ性疾患を除外していること、手術法が一通りであること、インプラントの選択がランダム化されていないこと、症例数が少ないことであｒ.

<結論>

BS3 膝は放射線写真で冠状面での不安定性を示したものの、臨床成績は LPS 膝と同様の結果であった。 コンポーネントシフト比は最終フォローアップ時の脛骨後方傾斜、大腿骨脛骨角、インプラント伸展角度、膝伸展角度の増加に伴って増大した。BS のデザイン特性を理解し、過剰な後脛骨傾斜を避け、軟部組織のバランスに注意することが、術後の不安定性を防止するために重要であると思われる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5437　号 | 金　民大 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　大川　淳<br>副　査　秋田　恵一、神野　哲也 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文はデザイン特性の異なる２種類の人工膝関節インプラントを、術後長期間（９～１０年）にわたって経過を観察し、その臨床成績と画像上の変化を解析した研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

同一施設内の、同時期に行われた２種類の機種の臨床成績の比較研究は、エントリーが２０年近く前であることを考えると、極めて独創性が高く、先駆的な研究と評価できる。

２）社会的意義

安定した長期成績を得ることを目的として、人工関節のデザインはさまざまな力学的特性、形状特性を持ってデザインされるが、その有効性の検証は長期にわたる経過を臨床的に観察していくしかない。その意味で、本研究は、２機種とはいえ、長期的な臨床成績および画像上の変化を明らかにした点で意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

表面形状で安定性を確保するタイプと関節内支柱をもって安定性を確保するタイプの２種類の人工関節使ったほぼ同時期に行われた手術成績を、９～１０年間ののちに比較することでデザインコンセプトの妥当性を検証した。使用した機種は認可された市販タイプのものであり、医療倫理上の問題はない。

４）考察・今後の発展性

臨床成績に差は認めなかったが、画像上は表面形状で安定性を得るタイプで横方向のずれが大きくなり、今後さらに長期に経過を見ると何らかの影響が出る可能性あると考えられた。また、このタイプの人工関節の挿入時には骨切除に一定の配慮が必要なことが明らかにされた。結論的には手術技術への依存より支柱による安定性確保のほうが有効であることが明らかにされ、今後の人工関節デザインに大きく影響する結果といえる。

**３．その他**

とくに特記すべき事項はない。

**４．審査結果**

臨床的な論文であるが、明確な研究計画のもとで１０年近い経過を追った力作であり、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 魚水　麻里 |
| 論文審査担当者 | 主査　田賀　哲也<br>副査　大川　淳、冨田　誠 |
| 論　文　題　目 | PDGF-induced proliferation and differentiation of synovial mesenchymal stem cells is mediated by the PI3K-PKB/Akt pathway |

（論文内容の要旨）

**＜要旨＞**

血小板由来成長因子(PDGFs)による、滑膜由来間葉系幹細胞(滑膜 MSCs)の増殖の分子メカニズムについて解析を行った。

PDGF による増殖促進効果は phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)阻害剤である LY290042 により有意に抑制された。軟骨凝集塊の形成は PDGF 存在下で増大したが、PI3K 阻害剤存在下では、軟骨基質の産生が有意に抑制された。また、PI3K 阻害剤は細胞外基質の石灰化も有意に抑制した。

本研究で、PDGFs による PI3K 情報伝達経路の活性化が、滑膜 MSCs の増殖及び骨軟骨分化に対して必須であることが示された。この結果が、滑膜 MSCs の臨床応用においてより効率的かつ安全な培養方法の構築に寄与することが期待される。

**＜諸言＞**

滑膜由来間葉系幹細胞(滑膜 MSCs）は、in vitro において高い増殖能と骨、軟骨、脂肪細胞へ分化できる多能性を有するため、関節軟骨や半月板の再生医療への応用が期待されている。本学における臨床試験では、自己滑膜 MSCs を細胞治療センターで 2 週間培養した後、軟骨欠損部に移植を行なっている。効果的かつ再現性の高い臨床プロトコールを確立するためには、移植細胞の質、量の双方が厳密にコントロールされる必要があり、培養条件の最適化が非常に重要となる。

PDGF は、in vitro で滑膜 MSCs の増殖を促進することが報告されている。また滑膜 MSCs は、PDGF 受容体を発現し、血清中の PDGF 量に応じて増殖することが報告されている。骨髄由来 MSC においては、PDGF 情報伝達の阻害は、幹細胞関連転写因子(Oct4 および Nanog）の発現を増強し、多能性の制御を行うことが示されている。以上より、PDGF シグナル伝達が滑膜 MSCs においても増殖および分化の両方に関与していることが示唆されるが、PDGF シグナルの滑膜 MSCs 細胞内での作用分子機構については報告されていない。

本研究の目的の一つは、PDGF により制御される滑膜 MSCs の増殖の細胞内分子メカニズムを解明することである。また、そのシグナル経路が滑膜 MSCs の分化のプロセスに対してどのような影響を与えるかを検討することが第二の目的である。本研究では、PDGF シグナルによる PI3K 経路の活性化が増殖と分化の双方に必須であることを示した。

＜方法＞

**PDGF により活性化される細胞内シグナル伝達経路の解析**

組換えヒト PDGF-AA および PDGF-BB は R&D Systems より購入した。LY290042 (PI3K 阻害剤)及び GF10923X (Protein Kinase C 阻害剤)は、和光純薬より購入した。PD98059 (Erk1/2 阻害剤)は CST 社より、SB203580(p38/MAPK 阻害剤)は Upstate Biotech 社より購入した。

**滑膜 MSCs の分離培養**

本研究は、本学倫理委員会(承認番号 2121 号）の承認及び、人工膝関節全置換術を受けた患者の同意の下、術中に廃棄された滑膜組織から分離、培養した細胞(6 継代以内)を用いて行なった。

**細胞増殖アッセイ**

滑膜 MSCs は、$5.7\times10^2$ cells / $cm^2$で播種した。翌日、0.1％FBS を含む培地に交換し、$ED_{50}$の 3 倍量の PDGF-AA および-BB を添加した。0 日目、2 日目、5 日目および 8 日目に細胞を採取し、細胞カウンター(BioRad 社製 TC20）により細胞数を測定した。

**PDGF シグナル伝達経路の阻害による滑膜 MSCs 増殖の阻害**

滑膜 MSCs を、96 well plate に $5.0\times10^6$cells / well で播種した。翌日、培地を 0.1％FBS、PDGFs および/または各シグナル経路阻害剤($IC_{50}$の 3 倍量）を添加した培地に交換した。 MTT アッセイにより細胞増殖率を測定した。

**タンパク発現解析**

滑膜 MSCs の表面抗原は、フローサイトメーター(FACS Verse, BD)を用いて行なった。PDGFRβ/CD140b の細胞質アミノ酸残基のリン酸化は、特異的ホスホチロシン(PY）抗体染色により測定した。PDGF による細胞内 Erk1/Erk2 及び Akt/PKB のリン酸化は western blotting 法を用いて検討した。

**分化アッセイ**

分化アッセイは、Colter による方法に従い行った(D.C. Colter, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001) 。各軟骨ペレットに含まれる GAG(グリコサミノグリカン)の量は、Blyscan アッセイキット(Biocolor Ltd, Newtonabbay, Ireland)を用いて測定した。

**統計**

Kruskal-Wallis 検定(Steel Dwass 法)、または Mann-Whitney U 検定を統計分析に用いた。 統計的有意差は P 値が 0.05 未満でありとした。

＜結果＞

**滑膜から分離培養した MSC は PDGFR を発現する**

滑膜組織より分離した細胞は、培養とともに PDGFR の陽性率が上昇するとともに線維芽細胞

様の形態を示した。培養 14 日目の細胞は MSC の表面抗原を発現していたことから、滑膜 MSCs の増殖に PDGF シグナルの関与が示唆された (Fig1)。

**PI3K および Erk1/2 の活性化は、PDGF による滑膜 MSCs の増殖に重要である**

細胞内情報伝達分子に対するリン酸化の解析から、PDGF は滑膜 MSCs において、PI3K、Erk1/2、及び PLC の経路を活性化することが確認された (Fig2)。特異的阻害剤を用いた実験では、PI3K 及び Erk1/2 のリン酸化を抑制した場合、細胞増殖は有意に阻害されたことから、この 2 つの情報伝達経路の活性化が、滑膜 MSCs の増殖に重要であることが示唆された (Fig3)。

**PDGF による滑膜 MSCs の軟骨分化の促進作用は、PI3K の阻害によりキャンセルされる**

PDGF-AA、-BB ともに、滑膜 MSCs の軟骨ペレットの湿重量及び GAG 量を有意に増加させた。組織学的解析では Type II コラーゲンの発現は、PDGF-AA 添加群で亢進していた。これらの効果は、PI3K 阻害により完全にキャンセルされた (Fig4)。

**PI3K 経路の阻害は、滑膜 MSCs の骨分化を有意に抑制した**

骨分化、脂肪分化の過程で PI3K 経路を阻害したところ、石灰化骨基質の産生は有意に抑制された。一方、脂肪細胞の形成に PI3K 阻害剤は影響を及ぼさなかった (Fig4)。

＜考察＞

これまでに我々は血清 PDGF が滑膜 MSCs の多分化能に影響することなく増殖を促進すると報告してきた。本研究では、PDGFR を発現した線維芽細胞が滑膜 MSCs の培養中に増殖したことを示した。これは、PDGF シグナル伝達が滑膜 MSCs の増殖において中心的な役割を果たすことを示唆している。また本研究では、PDGF-AA、-BB の両方が滑膜 MSCs の増殖を促進し、PKB/Akt と Erk1 / 2 リン酸化の阻害が増殖を抑制することが示されたが、リン酸化のパターンは異なっていた。MSC 増殖に及ぼす PDGF-AA と-BB の生理機能の差に関しては、さらなる解析が必要である。

PI3K 経路の役割は、他の組織由来の MSC においても報告されている。Gharibi らは、PI3K の阻害が、ヒト骨髄由来 MSC の PDGF-BB による DNA 合成を有意に抑制すること、PDGF-BB がサイクリン D1 の発現を促進し、またこの作用は LY290042 によって抑制されることを報告した。Qiu らは、ヒト臍帯血由来 MSC を用いて同様の知見を報告している。本研究では、滑膜 MSCs でのサイクリン D1 の発現については分析を行っていないが、同様の分子機構が存在すると仮定することは可能である。本研究は、滑膜 MSCs における細胞周期の進行を担う細胞内シグナル伝達経路を報告した最初の研究である。

本研究で明らかとなったもう一つの新たな知見は、PI3K 活性が滑膜 MSCs の骨分化、軟骨分化能に重要な機能を果たすことがあげられる。PDGF-AA は軟骨ペレット形成を有意に促進したが、PI3K 阻害剤 LY290042 はそれを有意に抑制した。また PDGF の作用により、Type II コラーゲンといった細胞外マトリックスタンパク質の発現を促進することも示した。PDGF 存在下でペレットあたりの GAG 量も有意に増加したが、これはペレットあたりの細胞数増加によると考えられた。

また、LY290042 の存在下では、CFU-OB はほぼ完全に消失した。コロニー数の変化はなかったが、各コロニーのサイズは減少しており、PI3K 活性は滑膜 MSCs の骨分化にも必要であることが示された。一方この結果とは対照的に、Gharibi らは、PDGF-BB が骨髄由来 MSC の骨分化を阻害し、I 型コラーゲンやアルカリホスファターゼなどの骨芽細胞関連マーカーの発現の阻害が原因になっていると示した。この不一致の理由は現在不明であり、異なる組織由来の MSC の特徴についてさらなる分析が必要である。

＜結論＞

本研究により、PDGF が滑膜 MSCs の増殖および分化を促進させる際に PI3K シグナル伝達こそが最も重要であることが解明された。滑膜 MSCs の in vitro 培養条件の最適化に寄与することが期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5438　号 | 魚水　麻里 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田賀　哲也<br>副　査　大川　淳、冨田　誠 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、滑膜由来間葉系幹細胞に対する PDGF-AA と PDGF-BB の増殖作用および分化への影響を検討し、また細胞内シグナル伝達についての考察と臨床的展望を論じたものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

申請者は滑膜由来間葉系幹細胞の細胞治療への応用にあたり未解明であった PDGF-AA と PDGF-BB の作用に取り組み、増殖効果を見出すとともに軟骨分化への効果の観点から応用への可能性を考察した点で、研究目的の先駆性と独創性は高い。

２）社会的意義

本研究は膝関節軟骨欠損や半月板損傷の治療に滑膜由来間葉系細胞を用いる際の調製法に関わる課題に示唆を与えた点で社会的意義は大きい。

３）研究方法・倫理観

本研究は、申請者の仮説に基づき実施した適切な実験方法により得た結果により構成されており、また承認を得た上で倫理的配慮の下で行われている。

４）考察・今後の発展性

申請者は臨床応用に向けて生じ得る問題点やそれらの問題解決後の可能性を適切に考察しており、今後の開発的研究への発展が期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上のことから、本論文は博士（医学）の学位に十分値するものであると結論した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 川井　清考 |
| 論文審査担当者 | 主査　金井　正美<br>副査　森尾　友宏、角田　達彦 |
| 論　文　題　目 | Parental age and gene expression profiles in individual human blastocysts |

（論文内容の要旨）

<要旨>

ゲノムのエピジェネティックな状態は、受精から着床にかけて動的に変化する。更に、両親の年齢を始めとして、配偶子形成過程の生理学的環境は、受精後の胚のエピゲノムに影響を及ぼす可能性がある。生殖医療補助技術を改善させるためには、胚の遺伝子発現に及ぼす両親の年齢の影響を明確化することが重要である。

本研究において両親の年齢が胚遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響を解明するために、高齢の母親由来の胚も含めたヒト胚盤胞の単一胚 RNA-seq を行った。その結果、母親の年齢の上昇に伴い発現レベルの低下する遺伝子を多数同定した。更に、メジャーサテライト反復配列に由来する転写物も母親の年齢の上昇に伴い減少していた。これらの結果は、両親の年齢に伴って卵母細胞ゲノムのエピジェネティックな修飾が変化し、次世代に伝達されることを示唆する。

<緒言>

配偶子形成から胚着床までの期間における遺伝子発現の調節は、劇的に変化するのみならず、個体発生の最初の段階において生じることから、生物学的、生殖補助医療共に重要である。しかし包括的な遺伝子発現解析はごく最近始まったばかりである。両親および環境からの様々な因子が胚のトランスクリプトームとエピゲノムとに影響を及ぼし、その結果、胚の発達と妊娠率が影響を受ける可能性がある。不妊治療において重要な問題の一つは、母親の高齢化による妊娠率の低下である。この妊娠率低下の主な原因は、卵母細胞減数分裂中の染色体不分離に起因する異数性であると考えられている。胚の染色体異数性と母親の年齢との関係は長年にわたって研究されてきており、多数報告されている。1993 年に初めて着床前遺伝子スクリーニング(PGS)が導入されて以来、海外では栄養外胚葉の生検による臨床的 PGS は広く適用されている。母親の年齢と卵母細胞減数分裂時の染色体異常とは強く相関し、深刻な問題と考えられている。また、正倍数性の胚盤胞が置床された場合であっても、着床率は 50～80%に留まっている。従って、染色体異常の他にも、着床前の胚の発達、子宮内膜、胚と子宮内膜との相互作用に関連する因子など、胚の着床に影響を及ぼす重要な因子が存在するはずである。これらのことから減数分裂、着床前の発達や着床などの重要な機能を有する遺伝子の発現調節を解明することが重要となる。よって、ヒ

トの着床前胚の標準的な遺伝子発現プロファイルを取得することが必要である。個々の胚盤胞から個別の RNAseq ライブラリーを構築するために、T7-RNA ポリメラーゼを用いた線形 cRNA amplification を行なうことで単一胚ごとに RNAseq を行い、遺伝子発現プロファイルを取得し、両親の年齢と遺伝子発現との相関を解析した。

<結果>

総遺伝子発現プロファイル

ヒト胚盤胞の遺伝子発現プロファイルに及ぼす両親の年齢の影響を評価するため主成分分析(PCA)を行なった。次に、各主成分と母親または父親の年齢との相関を計算したところ母親の年齢は第１主成分と有意に相関していたが、父親の年齢は相関していなかった。一方、第２主成分は、母親の年齢と弱く相関し、父親の年齢とは強く相関していた。しかし、本研究への胚を提供した 9 組カップルにおいては、父親の年齢と母親の年齢とは弱いながらも相関を示したことから、父親の年齢が遺伝子発現プロファイルに直接的に影響したと結論することは困難である (ρ= 0.554, P = 0.00749)。

両親の年齢と関連して発現に変化を示した遺伝子

若齢母親群(３５歳未満)と高齢母親群(３５歳以上)との間で発現が異なる遺伝子の探索を行った。その結果、発現が低下また上昇した遺伝子として、それぞれ 818 個と 576 個が同定された。

母親の年齢依存的な下方制御を示した遺伝子セットは、次いで生物学的機能のアノテーションに関する Gene Ontology (GO) term との関連を同定するために、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery を用いて解析した。母親の年齢に従って発現低下を示した遺伝子群に対して関連を示した GO term は、“nucleosome assembly”、“chromatin assembly”、“protein-DNA complex assembly”、“nucleosome organization”、“chromosome organization” 、“homologous chromosome segregation”などが認められた。“chromosome organization”に関連する遺伝子が有意に濃縮されていることを示す Benjamini 補正 P 値は 0.00145 であった。

これらの用語と関連を示した遺伝子には、*PTTGs*、*MEIKIN*、*CENPW* が含まれていた。これらの遺伝子に由来するタンパク質は、細胞周期の中期の間の染色体の分離のために重要である。特に、*PTTG1/Securin* ( = -0.811, P = 0.00000460)と *PTTG2* ( = -0.780, P = 0.0000188)の遺伝子発現は、母親の年齢と強い負の相関を示した。更に、これらの遺伝子は父親の年齢とも弱い負の相関を示した。*AUKRC* は、母親の年齢との間に、*PTTG1* より弱い負の相関を示した( = -0.614, P = 0.00235)。

母親の年齢の上昇と関連して発現が低下した遺伝子の多くは、有意に濃縮された GO term との関連は認められなかった。しかしこれらの中には、着床前の胚の発達と着床に重要と考えられる遺伝子が含まれていた。例えば、着床に関与する LIF は母親の年齢と逆相関し(ρ= -0.492, P = 0.0201) 、父親の年齢に対しても弱く逆相関する(ρ= -0.0977, P = 0.665) ことを同定した。

対照的に、オートファジーにおいて重要な 2 種類の遺伝子、*GABARAPL1* (ρ= -0.608, P = 0.00267) と *GABARAPL3* (ρ= -0.543, P = 0.00901)は、父親の年齢の上昇と負の相関を示した。しかし、母親の年齢との交絡の可能性も除外できない。

多くの遺伝子発現は、発生過程で大幅に発現が変動する。母親の年齢の上昇に従って胚の発達

が遅延または加速されるならば、これらの遺伝子発現変化は、発達プロセスの遅延または加速によって説明できる可能性がある。しかし既報の RNAseq データと本研究における母親の年齢に対して解析を行なったが、桑実胚と胚盤胞期胚の間での遺伝子発現の増減と母親年齢に対する胚盤胞期胚における遺伝子発現の相関係数の間に相関は認められなかった。従って母親年齢の上昇に伴って発生の速度が変化する可能性は無いことが示された。

発現が母親の年齢と関連する反復配列由来の転写物

胚のゲノムにおいて母親の加齢によるエピジェネティックな変化が生じるか調べるために、Repbase 上に RNAseq データをマッピングした。その結果、 AluY、AluS とメジャーサテライト反復配列が上位を占めた。生殖細胞系列においては、メジャーサテライト配列が脱メチル化されて転写されることが報告されている。観察されたメジャーサテライト配列の発現レベルの変化は、母親の年齢に伴ってセントロメア領域のエピジェネティックな状態が変化することを示唆している。

<考察>

本研究によって、母親の年齢は胚盤胞期の遺伝子発現プロファイルに強い影響を及ぼすことが明らかとなった。母親の年齢により発現が低下する 800 個を超える遺伝子を同定した。従って、母親の年齢は、ヒトの胚盤胞における遺伝子発現の調節に最も強い影響を及ぼす因子であると考えられる。その様な遺伝子の中には “cell cycle control” や“metaphase checkpoint regulation”などの GO タームと関連した遺伝子が有意に濃縮されており、減数分裂時の染色体分離において重要な役割を果たす遺伝子が複数認められた。

染色体分配に関係する遺伝子以外にも、両親の加齢により発現が低下し、潜在的に胚の成長や着床と関係する遺伝子も同定した。高齢の母親の胚盤胞において LIF 発現が低下していることを観察したが、種々の報告から着床率低下の直接的な原因であるとは考えにくい。しかし、母親の高齢化に伴って発現が低下した 800 を超える遺伝子の中に認める増殖因子やサイトカインの発現レベルの低下は、母親の高齢化に関連した胚の着床率の低下をもたらしいている可能性がある。

また胚盤胞におけるメジャーサテライト由来転写物の発現レベルが、母親の年齢に従って低下することを見出した。セントロメアのメジャーサテライト反復配列のシトシン修飾と減数分裂中の動原体形成や染色体分配の関係は明らかにされていないが、この現象は、母親の年齢に伴って減数分裂時の染色体不分離が増加するという事実との関連においても興味深い。

当解析は高齢女性を含めたヒト ICSI 胚盤胞に対して単一胚 RNAseq を施行した初めてのトランスクリプトーム解析である。この論文では両親の年齢が胚のトランスクリプトームに強く影響することを明らかにし、また母親の高齢化に伴って発現レベルが低下した複数の遺伝子を同定した。それらの中には、減数分裂時の染色体分離に重要なものがあり、あるいは胚の着床や成長に必須のものもある。減数分裂エラーのプロセス、胚の着床、そして年齢を含む両親の生理的状態によって誘導されるエピジェネティックな変化に関する理解を深め、女性の妊娠率を改善させるための新規戦略に資する重要な基礎的知見となる可能性を持つ。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5439　号 | 川井　清考 |
|---|---|---|

| 論文審査担当者 | 主　査　金井　正美<br>副　査　森尾　友宏、角田　達彦 |
|---|---|

（論文審査の要旨）

1.　論文内容

両親の年齢が胚遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響を解明するために、高齢の母親由来の胚も含めたヒト胚盤胞の単一胚 RNA-seq を行った。その結果、母親の年齢の上昇に伴い発現レベルの低下する遺伝子を多数同定した。更に、メジャーサテライト反復配列に由来する転写物も母親の年齢の上昇に伴い減少していた。本研究においては、両親の年齢に伴って卵母細胞ゲノムのエピジェネティックな修飾が変化し、次世代に伝達されることを示唆し、両親の年齢と遺伝子発現との相関を解明した。

2.　論文審査

1）　研究目的の先駆性・独創性

母親の年齢は胚盤胞期の遺伝子発現プロファイルに強い影響を及ぼすことが明らかとなった。母親の年齢により発現が低下する 800 個を超える遺伝子を同定し、母親の年齢は、ヒトの胚盤胞における遺伝子発現の調節に最も強い影響を及ぼす因子であると言う結果を直接的に導く重要な結論を得るに至っており、先駆性、独創性ともに高いものである。

2）　社会的意義

生殖医療補助技術を改善させるために、胚の遺伝子発現に及ぼす両親の年齢の影響を明確化した本研究の成果は重要な知見であり、今後これらを基にした治療方法の発展が期待される。

3）　研究方法・倫理観

本研究では、ヒトの着床前胚の標準的な遺伝子発現プロファイルを取得する為に、不妊治療の際に得られた余剰胚を用い、個々の胚盤胞から個別の RNAseq ライブラリーを構築するために、T7-RNA ポリメラーゼを用いた線形 cRNA amplification を行なうことで単一胚ごとに RNAseq を行い、遺伝子発現プロファイルを取得した。以上の研究は本学の医学部倫理審査委員会で承認を受けた計画書に基づいて実施されている。

3.　考察・今後の発展性

申請者は本研究の結果から、高齢女性を含めたヒト ICSI 胚盤胞に対して単一胚 RNAseq を施行した初めてのトランスクリプトーム解析を実施した。申請論文では両親の年齢が胚のトランスクリプトームに強く影響することを明らかにし、また母親の高齢化に伴って発現レベルが低下した複数の遺伝子を同定した。以上の結果は、臨床医学的にも新たな生殖補助医療の改善に関して、重要な課題を提示するものであり、申請者の博士研究者としての更なる活躍に繋がるものである。

4.　その他

特になし

5.　審査結果

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 今井　紗智子 |
| 論文審査担当者 | 主査　江石　義信<br>副査　荒井　裕国、宮﨑　泰成 |
| 論　文　題　目 | High expression of P-cadherin is significantly associated with poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer |

（論文内容の要旨）

【緒言】

肺癌の治療は分子標的薬や免疫療法の登場によりめまぐるしく進化を遂げているが、依然として肺癌は部位別癌死亡数の 1 位である。肺癌細胞が増殖能、浸潤能、転移能を獲得する tumor progression について解明することが必要とされる。

カドヘリン(cadherin)は細胞外領域でカルシウム依存性に細胞接着を担う分子の総称で、ヒトでは 100 種類を超えるスーパーファミリーを形成している。そのうち、クラシック・カドヘリン・サブファミリーには上皮細胞に発現する E (epithelial)-cadherin、胎盤で発現が初めて確認された P (placenta)-cadherin、神経細胞に発現する N(neural)-cadherin などが含まれ、細胞膜近傍にて α-catenin、β-catenin、p120 catenin などと結合し、cadherin-catenin 複合体を形成している。

クラシックカドヘリンは tumor progression において重要な役割を果たしている。そのひとつに上皮間葉転換 epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)があり、癌細胞の E-cadherin 喪失が重要な特徴とされ、catenin の膜近傍から細胞質や核への移動が関与すると報告されている。

P-cadherin 高発現は乳癌、卵巣癌、膵癌などでは malignant phenotype に関連し、予後不良因子と報告されている。P-cadherin の高発現は E-cadherin 喪失からの cadherin switch として知られてきたが、近年の乳癌での報告では E-cadherin と P-cadherin の共発現した腫瘍細胞では転移や浸潤、アポトーシスへの抵抗性が増加し、共発現した腫瘍組織は病理病期の進行と予後不良に関連していた。このように tumor progression において P-cadherin の発現さらに E-cadherin 発現との関連を知ることが非常に重要となる。

原発性肺癌における P-cadherin 発現と役割を調べた報告は少ない。今回、我々は、非小細胞肺癌の臨床検体を用いて P-cadherin、E-cadherin、p120 catenin の免疫染色による腫瘍内発現を調べ、P-cadherin 発現と E-cadherin 発現の臨床病理学的所見、p120 catenin 局在変化との関連について検討した。

【対象】

2010 年 4 月から 2013 年 3 月までに、東京医科歯科大学附属病院呼吸器外科において肺切除手術を施行された原発性肺癌 172 症例を対象とした。

【方法】

179 例の切除標本における腫瘍部分パラフィンブロックから、4μm 厚の薄切標本を作製し、抗体は P-cadherin（抗体：56/P-cadherin, BD Transduction Laboratories）E-cadherin（抗体：HECD-1, Takara）p120 catenin（抗体 : 98/pp120, BD Transduction Laboratories）Ki67（抗体 : MIB-1, Dako Denmark A/S）を用いて免疫染色を行ない、腫瘍細胞での染色を評価した。P-cadherin と E-cadherin 発現率の評価には、染色率(0-100%)と染色程度(0-3)を乗じて求める H-score を用いた。p120 catenin は細胞膜、細胞質の染色率を評価し、細胞膜は 70%以上、細胞質は 10%以上を発現ありとした。Ki67 は核の染色率を腫瘍増殖指標となる Ki67 指数として評価し、25%以上を高値とした。

P-cadherin と E-cadherin の発現率と臨床病理学的因子及び Ki67 指数、p120 catenin 局在との関連を統計学的に検討した。臨床病理学的因子としては、年齢、性別、喫煙指数、HR-CT における GGO の有無、PET における腫瘍 SUV max 値、腫瘍組織型、分化度、腫瘍径、脈管浸潤、リンパ節転移の有無、病理病期、を評価項目とした。

ROC 曲線から求めた Youden index (P-cadherin 45 と E-cadherin 24)を cut off 値として、high expression 群と low expression 群の２群に分け、さらにそれぞれの組み合わせから P-cadherin high expression/ E-cadherin high expression (EhPh)、P-cadherin low expression/ E-cadherin high expression (EhPl)、P-cadherin high expression/ E-cadherin low expression (ElPh)、P-cadherin low expression/ E-cadherin low expression (ElPl)の４群に分け臨床病理学的因子と Ki67 指数、p120 catenin の局在との関連を評価した。

P-cadherin と E-cadherin の high expression 群、low expression 群、さらに EhPh 群、ElPh 群、EhPl 群、ElPl 群における Overall survival (OS)と Disease recurrence-free survival (DFS)はカプランマイヤー法ロングランク検定を行い解析した。

【結果】

腫瘍細胞における P-cadherin は膜に発現が見られ、腫瘍細胞内での発現の局在は見られなかった。P-cadherin 高発現は、リンパ節転移陽性(P < 0.001)、病理病期Ⅱ期以上(P < 0.001)、Ki67 指数高値(P = 0.042)と関連していた。

腫瘍細胞における E-cadherin も膜に発現が見られた。E-cadherin 低発現は PET-CT における SUV max 高値(P = 0.018)、リンパ節転移陽性 (P=0.015)、病理病期Ⅱ期以上(P=0.046)と関連していた。E-cadherin と P-cadherin の発現に相関は見られなかった。

４群別の比較では ElPh 群は他の群と比較して、リンパ節転移陽性 (P < 0.001)、病理病期Ⅱ期以上(P < 0.001)が多かった。

p120 catenin の細胞質局在は EhPh 群、ElPh 群よりも ElPh 群に多く見られた(P<0.001, P=0.036)

生存解析においては P-cadherin high expression 群では全生存期間が短く(P=0.044)、無再発生存期間も短かった(P=0.044)。さらに ElPh 群は他群と比較して優位に無再発生存期間が短かった(P=0.024)

【考察】

今回我々は肺癌切除検体 172 例に対して免疫染色にて P-cadherin の発現率を評価し、E-cadherin

発現、catenin の局在、臨床病理学的因子との関連について統計学的に解析した。非小細胞肺癌における P-cadherin はリンパ節転移、病理病期の進行、Ki67 高値といった tumor progression に関連し、予後不良因子であった。

種々の癌で、E-cadherin から P-cadherin への cadherin switch が tumor progression に関連すると報告されている。我々の結果では、E-cadherin 低発現/P-cadherin 高発現群にはリンパ節転移と病理病期の進行が多く、予後不良であったことから、肺癌の tumor progression において E-cadherin から P-cadherin への cadherin switch が起きていると考えられた。

膵癌では p120 catenin 細胞質局在変化が P-cadherin 高発現に関連し、tumor progression の一経路として報告されている。肺癌では E-cadherin 喪失と p120catenin 細胞質局在の関連が報告されている。我々の結果では、p120 catenin の細胞質局在は E-cadherin 低発現/P-cadherin 高発現群に多くみられ、肺癌において E-cadherin から P-cadherin への cadherin switch が、p120 catenin 局在の変化に関与している可能性が示唆された。

P-cadherin に関連する細胞内シグナル経路は様々報告されている。さらに乳がんや食道がんでは P-cadherin 高発現例に対する抗 P-cadherin IgG1 モノクローナル抗体による臨床試験も行われており、今後肺癌への応用も期待される。

【結語】

非小細胞肺癌における P-cadherin 高発現は tumor progression と関連し、予後不良因子であった。P-cadherin 高発現群のうち、E-cadherin からの cadherin switch を示す群では p120 catenin の細胞質局在に関与した tumor progression が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5440　号 | 今井　紗智子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　江石　義信<br>副　査　荒井　裕国、宮﨑　泰成 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本文は、非小細胞肺癌におけるP-cadherin高発現がtumor progressionと関連し、予後不良因子であることを明らかにした論文である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

癌は上皮型の形質から悪性の形質へ転換する事で増殖、浸潤、転移能を獲得する。この形質転換においてCadherinが重要な働きを担う分子として知られている。Cadherinはカルシウム依存性の細胞接着分子で、細胞接着、選別、極性に関わり、また細胞膜近傍でcateninと複合体を形成しcateninによる細胞内シグナル伝達を調整している。E(epithelial)-cadherinの消失は上皮間葉転換epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)の特徴の一つとされ、腫瘍の進行との関連が報告されている。このような背景の下、申請者は肺癌の進行におけるP(placental)-cadherinの発現に注目しており、その着眼点は評価に値するものである。

２）社会的意義

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。非小細胞肺癌172例においてP-cadherin高発現はリンパ節転移、病理病期の進行、腫瘍増殖指数となるKi-67の高値に関連し、予後不良因子であった。さらに、E-cadherin低発現・P-cadherin高発現群はリンパ節転移と病理病期の進行が多く、またp120cateninの細胞質局在も多く、予後不良であった。以上のように申請者は、肺癌においてE-cadherinからP-cadherinへのcadherin switchが悪性の形質転換、さらにはp120 cateninの局在変化をもたらし腫瘍進行に関連していることを示した。これは臨床的にも極めて有用な研究成果であると言える。

３）研究方法・倫理観

研究には、東京医科歯科大学附属病院呼吸器外科において肺切除手術を施行された原発性肺癌172症例の切除検体を用い、免疫染色法により肺癌におけるP-cadherinの発現を調べ、腫瘍の進行との関連、E-cadherinとの発現パターン、cadherin発現と細胞内シグナルとしてp120 cateninの局在との関連について、臨床病理学的所見も含めて包括的に検討した。研究方法は十分な臨床病理学的な知識と免疫組織学的技術の裏付けのもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識

と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

４）考察・今後の発展性

さらに申請者は、本研究結果について「p120 cateninの細胞質局在はE-cadherin低発現/P-cadherin高発現群に多くみられ、肺癌においてE-cadherinからP-cadherinへのcadherin switchが、p120 catenin局在の変化に関与している可能性がある」と考察している。これは先行研究と照らし合わせても極めて妥当な考察であり、今後の研究にてさらに発展することが期待される。

**３．その他**

特記事項無し

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 橋本　恭子 |
| 論文審査担当者 | 主査　淺原　弘嗣<br>副査　関矢　一郎、中村　卓郎 |
| 論　文　題　目 | Cancer-secreted hsa-miR-940 induces an osteoblastic phenotype in the bone metastatic microenvironment via targeting ARHGAP1 and FAM134A |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

骨は、進行がんの好発転移臓器である。骨転移巣は造骨型、溶骨型といったがん腫特有の骨病変を呈することが知られているが、骨転移の発症、進展機序の解明は未だ十分ではない。マイクロ RNA(miRNA)は、標的遺伝子の発現を制御する小分子 RNA であり、エクソソームに含有されて細胞外へ分泌され、周囲の細胞の機能を制御することが知られている。そこで我々は、骨転移微小環境において、miRNA を分泌するがん細胞とその miRNA を取り込む骨芽細胞・破骨細胞との相互作用が、造骨型・溶骨型といったがん腫特有の骨病変を惹起する可能性を考えた。まず、造骨型もしくは溶骨型の骨病変を形成するヒトがん細胞株から分泌された miRNA の網羅的発現解析を行い、造骨型骨病変を誘導する前立腺がん細胞株が積極的に分泌している miRNA を同定した。次に、同定された miRNA をヒト間葉系幹細胞株に過剰発現させたところ、hsa-miR-940 が著明な骨分化促進作用を有することを見出した。さらに、通常は溶骨型骨病変を形成するヒト乳がん細胞株に hsa-miR-940 を過剰発現させ、免疫不全マウスへ移植したところ造骨型骨病変が誘導された。また、この骨病変は移植部に遊走してきたマウス由来細胞の骨分化が誘導された結果、形成されることが示された。以上の結果から、骨転移における造骨型骨病変の形成は、がん細胞が分泌する miRNA によって誘導される可能性が示された。

＜緒言＞

前立腺がんは男性が発症するがんの中でも最も一般的なものの一つであるが、骨転移巣はその 70%が造骨型骨病変を形成することが知られている。骨転移は疼痛、病的骨折、脊髄圧迫などを惹起するため、骨転移の発症、進展機序の解明は新規治療法の開発および生存率の改善のために重要である。

骨転移微小環境では、がん細胞は骨芽細胞、破骨細胞、間葉系幹細胞などと相互に作用し合い、造骨型や溶骨型といった骨病変を引き起こすことが知られている。Kingsly らは、前立腺がんの骨転移において、がん細胞から分泌される BMP、VEGF、PDGF、endothelin-1、Wnt ligands、urokinase plasminogen activator などが骨芽細胞やその前駆細胞に作用し、造骨型骨病変を惹起することを報告している。一方で、乳がん、肺がん、腎がん、骨髄腫は溶骨型骨病変を惹起することが知られ

ており、過去の報告によると、がん細胞から RANKL、IL-6、IL-8、IL-11 などが分泌され、破骨細胞を活性化していることが報告されている。

miRNA は、それ自身はタンパク質をコードしない小分子 RNA であり、標的遺伝子の 3'UTR に結合し、翻訳の阻害または mRNA の分解を介して遺伝子の発現を制御している。miRNA は様々な細胞において発生、増殖、分化にかかわることが知られており、我々の研究室では、mmu-miR-206 および mmu-miR-145 が骨芽細胞分化に重要であることをこれまでに報告している。さらに、近年の研究から miRNA は、エクソソームを介して別の細胞へと伝播し、細胞間コミュニケーションツールとして重要であることも明らかになった。すでに、がん細胞が分泌する miRNA が腫瘍周囲の微小環境に影響を与え、腫瘍の発症、進展、転移を制御しているという数多くの報告がある。これらの報告は、骨転移巣においてもがん細胞が分泌する miRNA が骨代謝に影響を与える可能性を示唆しているが、そのメカニズムは十分解明されていない。

そこで我々は、骨転移微小環境において miRNA を分泌するがん細胞とその miRNA を取り込む骨の細胞との相互作用ががん腫特有の骨病変を惹起している可能性を考え、その検証を目的として本研究を行った。

＜方法＞

まず、造骨型骨病変を形成する 3 種類のヒトがん細胞株(前立腺がん細胞株；C4、C4-2、C4-2B)および溶骨型骨病変を形成する 3 種類のヒトがん細胞株(乳がん細胞株；MDA-MB-231-Luc、骨髄腫細胞株；KMS11、U266)の培養上清からエクソソームを抽出し、エクソソーム中に含まれる miRNA の網羅的発現解析を行った。次に、網羅的発現解析から同定された miRNA をヒト間葉系幹細胞株(hMSCs)もしくはヒト破骨前駆細胞に過剰発現させ、これらの細胞の分化に与える影響を検討した。さらに、同定された miRNA を過剰発現するがん細胞株を免疫不全マウスへ移植し、miRNA が *in vivo* における骨病変の形成に与える影響を検討した。

＜結果＞

ヒトがん細胞由来分泌型 miRNA の網羅的発現解析により、造骨型骨病変を形成する前立腺がん細胞株が積極的に分泌している計 8 種類の miRNA、および溶骨型骨病変を形成する細胞株が積極的に分泌している計 4 種類の miRNA を同定した。これらの miRNA をヒト間葉系幹細胞株(hMSCs)に過剰発現させ、アルカリフォスファターゼアッセイおよび von Kossa 染色により骨分化に与える影響を検討したところ、前立腺がん細胞株からの分泌が亢進していた hsa-miR-940 が著明な骨分化促進作用を有することを見出した。また、ウエスタンブロットおよびルシフェラーゼアッセイにより、ARHGAP1 および FAM134A が hsa-miR-940 の標的遺伝子であることを同定し、また、これらの遺伝子に骨分化抑制作用があることも見出した。一方、hsa-miR-940 が破骨細胞分化に与える影響も検討したが、有意な差は認められなかった。

次に、がん細胞から分泌された hsa-miR-940 が、エクソソームを介して造骨型骨病変の形成を誘導するかの検討を行った。まず、hsa-miR-940 を過剰発現する乳がん細胞株(miR-940-MDA-MB-231)を作成し、培養上清から抽出したエクソソームを hMSCs に添加したところ、hsa-miR-940 を含むエクソソームの hMSCs への取り込みが確認できた。また、エクソソーム

の添加により hsa-miR-940 の標的遺伝子の発現が低下し、骨分化の指標となるアルカリフォスファターゼ遺伝子の発現が上昇した。続いて hsa-miR-940 の *in vivo* における作用を検討するために、miR-940-MDA-MB-231 を免疫不全マウスへ移植したところ、通常の MDA-MB-231 は溶骨型骨病変を形成するにもかかわらず、造骨型骨病変が誘導された。さらに、がん細胞と宿主由来細胞を識別するために、エクソソームマーカーを赤色蛍光で標識した miR-940-MDA-MB-231 を作成し、全身で緑色蛍光を発現する免疫不全マウスに移植したところ、がん細胞から分泌されたエクソソームの宿主細胞への取り込みが *in vivo* でも確認された。またエクソソームを取り込んだ宿主細胞において、hsa-miR-940 の標的遺伝子(Arhgap1 および Fam134a)の発現が低下し、アルカリフォスファターゼの発現が上昇していることも、ウエスタンブロットおよび免疫染色にて明らかにした。以上の結果より、がん細胞から宿主由来間葉系細胞へ hsa-miR-940 を含むエクソソームが伝播することによって、宿主由来間葉系細胞の骨分化が誘導され、造骨型骨病変が形成されることが示された。

＜考察＞

骨髄内微小環境は、骨芽細胞、破骨細胞、間葉系幹細胞などの多くの細胞によって形成されている。そのため、骨転移巣ではこのような細胞とがん細胞が相互に作用しあうことにより、造骨性や溶骨性といったがん腫特有の骨病変が形成されると考えられている。しかしながら、そのメカニズムは十分明らかになっておらず、骨病変形成の分子メカニズムのさらなる解明が、骨転移の新たな治療標的の同定につながることが期待される。

本研究において、我々は造骨型骨病変を形成する前立腺がん細胞株で分泌が亢進している計 8 種類の miRNA を同定した。さらに、同定された miRNA のうち hsa-miR-940 は間葉系幹細胞の骨分化を著明に促進することを見出した。hsa-miR-940 に関しては、細胞の増殖や遊走、またはアポトーシスに関連するなどさまざまな報告があり、Rashed らはがん細胞が自らの増殖能、浸潤能を維持するためにエクソソームによって hsa-miR-940 を分泌していると報告している。骨代謝に関する報告はこれまでになく、本研究は、hsa-miR-940 が骨形成に促進的に働くことを示した初めての報告である。

我々は、hsa-miR-940 の標的遺伝子として、ARHGAP1 および FAM134A を同定し、この 2 つの遺伝子が骨芽細胞分化を制御することを示した。ARHGAP1 は GTPase 活性化タンパクの構成因子の一つであり、G タンパクを不活性化し、特に RhoA/ROCK 経路を阻害することが知られている。MacBeath らは、RhoA/ROCK 経路が間葉系幹細胞の骨分化を促進する作用を持つことを報告している。我々は本研究において、ARHGAP1 の過剰発現が間葉系幹細胞の骨分化を抑制することを見出しており、hsa-miR-940 による骨分化の促進は、ARHGAP1 の抑制による RhoA/ROCK 経路の活性化が寄与している可能性が示唆される。FAM134A は生体のあらゆる組織で発現していることが示されているが、その機能に関する報告は非常に少ない。Lu らは、FAM134A ががん細胞の遊走を促進することを報告しているが、骨分化に関する役割は未だ不明である。

乳がん細胞株 MDA-MB-231 は、溶骨型骨病変を強力に誘導するがん細胞株として知られている。我々は、C4 linage 細胞株と同等の hsa-miR-940 の発現レベルを示す miR-940-MDA-MB-231 を作成し、免疫不全マウスの頭蓋冠上に移植した。miR-940-MDA-MB-231 を移植したマウスでは、

多数の新生骨を含む腫瘍が形成され、hsa-miR-940 の *in vivo* における骨形成促進作用が示された。しかし、miR-940-MDA-MB-231 を免疫不全マウスの皮下に移植したところ、造骨型病変は形成されなかった。このことから、hsa-miR-940 による造骨型病変の誘導は腫瘍微小環境に依存しており、骨髄内もしくは骨に近接した微小環境でないと造骨型病変は形成されないと考えられる。

最後に我々は、hsa-miR-940 ががん細胞の化学療法耐性に関与していることも示した。近年、miRNA ががん細胞の化学療法耐性に影響を与えることが数多く報告されている。我々の検討により、hsa-miR-940 の過剰発現が、前立腺がん細胞株および乳がん細胞株の抗がん剤(5-FU、メトトレキサート、ビンブラスチンなど)に対する抵抗性を増強させることが示された。このことから、hsa-miR-940 は造骨型骨病変の形成だけでなく、一部の化学療法への耐性を増強させる作用もあることが明らかとなり、造骨型骨転移に化学療法が効きにくい一要因になっている可能性が示唆された。

＜結論＞

本研究より、がん骨転移における造骨型骨病変の形成は、がん細胞が分泌する miRNA によって誘導される可能性が示された。この研究は、がん細胞から分泌された miRNA が造骨型骨病変を形成することを世界に先駆けて明らかにした研究であり、骨転移微小環境における新たな骨形成因子を同定したという点で、大変意義深い研究といえる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5441　号 | 橋本　恭子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　淺原　弘嗣<br>副　査　関矢　一郎、中村　卓郎 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、前立腺がんなどの骨転移における造骨型骨病変の形成は、がん細胞が分泌するエクソソーム由来の miRNA-940 によって誘導される可能性を示したものである。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

前立腺がんを中心として骨転移における造骨型病変の形成機構を、適切な科学的なアプローチを通して、エクソソーム由来のマイクロ RNA の同定とその機能解析まで試みたもので、この効果の検討とメカニズムの解明を試みるもので、先駆性、独創性ともに十分に高い。

２）社会的意義

本研究では、がんの骨転移という医学的に大きな課題にたいして挑戦し、新しい分子メカニズムを提唱しており、また、その研究結果を裏付けるデータとしてヒト前立腺がん骨転移病巣の一部において miR-940 の高い発現を見出しており、社会的意義は高い。

３）研究方法・倫理観

前立腺がんの骨転移の新しいメカニズムとして、エクソソームを介したマイクロ RNA、miR-940 の関与を動物モデルや分子生物学を適切に用いることで解明しており、動物実験、ヒトのサンプルを用いた研究においても学内審査を受けたうえで行われている。

４）考察・今後の発展性

骨転移の分子メカニズムは不明の点が多く、本研究がきっかけとなって、診断・治療に繋がる新たな展望が期待される。

**３．その他**

特記事項なし

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 金子　誠 |
| 論文審査担当者 | 主査　荒川　真一<br>副査　鈴木　敏彦　　原田　浩之 |
| 論　文　題　目 | Toll-like receptor-2 has a critical role in periodontal pathogen-induced myocardial fibrosis in the pressure-overloaded murine hearts |

（論文内容の要旨）

<要旨>

近年、歯周病原細菌が心筋の線維化を亢進することが報告されている。*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) は歯周病原細菌の中で主要な細菌と考えられており、Toll-like receptor-2 (TLR-2) によっても主に認識されると考えられている。一方、歯周病原細菌による心筋線維化の亢進における TLR-2 の役割についての詳細は不明である。本研究では、歯周病原細菌による心筋の線維化亢進における TLR-2 の関与について検討した。

野生型と TLR-2 欠損型の雄 C57BL/6 マウスに対して、大動脈縮窄術 (TAC)を行い圧負荷による心肥大モデルを作製した。週に一度 *P.g.*またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を、予め背部皮下に設置したチャンバーに注射した。Sham 群としては、麻酔下で開胸手術のみを行った。TAC 手術 1 週後心エコー検査により左室内径短縮率(FS)を測定し、心収縮力の評価をした。術後 4 週で血清および心筋細胞を採取した。心体重量比の計測、病理組織学的分析としてマロリー染色による組織線維化の観察を行った。左心室の心筋細胞から mRMA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて各種サイトカインの mRNA 量を定量した。

心エコーの所見に関しては、野生型マウス対照群（WT, TAC）は Sham 群と比較して FS の低下はなかったが、感染 sham 群（Sham, *P. g*）と比較して FS の有意な低下が認められた。一方、TLR-2 欠損マウスにおいては、感染群（TLR2KO, TAC, *P. g.*）、対照群（WT, TAC, *P. g.*）ともに FS の低下は認められなかった。心臓病理切片のマロリー染色を用いて線維化を検討した結果、TAC 施術マウスから採取した心室切片で、心筋間質や血管周囲に線維化が認められた。野生型マウス対照群（WT, TAC）と比較して、感染群（WT, TAC, *P. g.*）では線維化の亢進が認められたが、TLR-2 欠損マウス（TLR2 KO, TAC, *P. g*）では感染による線維化の亢進は認められなかった。MMP-2 の発現レベルは、野生型マウス感染群（WT, TAC, *P.g*）と比較して、TLR2 欠損マウス感染群（TLR2 KO, TAC, *P.g*）で有意に低下していた。

以上の研究結果から、*P.g.*が TLR-2 を介して認識され MMP-2 などのサイトカインの発現量が亢進され、結果として心筋の線維化が増悪したと考えられる。

＜緒言＞

心筋の線維化は圧負荷に対する心臓の主要な代償機構であると考えられている。この線維化の過程には Extracellular matrix (ECM)ネットワークの異常がかかわっている。一方、Matrix metalloproteinase (MMP)は、心筋細胞の線維化に深くかかわっていることが明らかになっており、圧負荷を受けた心臓での MMP-2 のをコードする mRNA レベルが増加していたことが報告されている。

歯周炎は *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)等の歯周病原細菌による感染症である。歯周病原細菌の感染により炎症反応が起きるが、MMP は歯周炎における歯肉 ECM の崩壊にも関与している。さらに、近年、歯周炎と循環器疾患との関連性が報告されている。

Toll-like receptors (TLRs)は、自然免疫を担うパターン認識受容体で微生物などを認識して炎症反応へと誘導する。TLRs は細菌の感染により選択的に発現が上昇するが、*P.g.*は主に TLR-2 を刺激すると報告されている。TLR-2 は、心筋細胞においても発現されており、TLR-2 経由の炎症反応が圧負荷による心肥大にも関与しているとの報告がある。一方、歯周病原細菌は TLR-2 を介した炎症性サイトカインなどの産生亢進に関与しており、歯周炎と循環器疾患リスクの増大との関連性が示唆されている。

本研究では、TLR-2 を介した歯周病原細菌感染による圧負荷心筋の線維化の亢進メカニズムを検討した。

＜方法＞

TLR-2 欠損型と野生型の雄性 8 週令 C57BL/6 マウスを用いて、背部皮下に歯科矯正用ステンレス製ワイヤで作製したチャンバーを埋入し、細菌感染スペースとした。埋入 2 週後、TLR-2 欠損マウス・野生型マウスそれぞれに、抱水クロラールによる腹腔内麻酔下で開胸し上行大動脈を 6-0 絹糸にて結紮し大動脈を狭窄させ(大動脈縮窄術: TAC)、圧負荷による心肥大モデルを作製した。感染群では、$10^8$ Colony Forming Unit/ml の *P.g.* (Strain A7A1-28) を TAC 手術後毎週 1 回、4 週間にわたって 0.1mL ずつ注入した。対照群ではリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を 0.1mL ずつ注入した。Sham 群として、麻酔下で開胸手術のみを行ったものを用いた。TAC 手術後 1 週で心エコー検査(M モード)を実施し、左室内径短縮率(FS)を算出し心臓の収縮力を評価した。TAC 手術後 4 週間後、心臓と血清を採取した。解析項目として、心体重量比の計測、病理組織学的分析としてマロリー染色による組織の線維化を観察した。組織切片は光学顕微鏡にて 20 倍、400 倍で観察し、ImageJ64 により切片全面積に対する線維化面積の割合をトレースし計測した。また定量リアルタイム PCR 法を用いて、心筋組織における MMP-2、MMP-9、TNF、TGF-β1、ANP をコードする mRNA の発現量を計測し比較、検討を行った。

＜結果＞

*P.g.*感染群において当該細菌に対する血清抗体価が対照群と比較して有意に上昇していることを確認した。

野生型対照群（WT, TAC）では Sham 群と比較して FS の低下は認められなかったが、感染群（WT、TAC、*P.g*）では Sham 群（Sham、*P.g*）と比較して FS の有意な低下が認められた。一方、TLR-2 欠損マウスにおいては、感染群、対照群ともに FS の低下は認められなかった。

心体重量比については、野生型感染群（WT、TAC、*P.g*）では Sham 群（Sham、*P.g*）と比較して増加傾向にあったが、有意差は認められなかった。

心室切片のマロリー染色による心筋の線維化の観察では、TAC 手術をしたマウスの心室切片で心筋間質や血管周囲に線維化が認められた。その心室切片全面積に占める線維化面積の割合を比較したところ、野生型感染群（WT、TAC、*P.g*）は対照群（WT, TAC）と比較して有意に線維化面積割合が高かった。一方、TLR-2 欠損マウスにおいては感染群（TLR2 KO, TAC、*P.g*）と対照群（TLR2 KO、TAC）では同等であった。また、野生型感染群（WT, TAC、*P.g*）と比較して TLR-2 欠損マウス感染群（TLR2 KO、TAC、*P.g*）では、線維化の割合が有意に低く、線維化が抑制されていることが明らかになった。

心筋組織における mRNA 発現レベルの比較では、MMP-2 の発現レベルは、感染群 TLR-2 欠損マウス（TLR2 KO、TAC、*P.g*）は野生型マウス（WT、TAC、*P.g*）と比較して有意に低かった。MMP-9 に関しては、全群において有意な差は認められなかった。TNF の発現レベルは、感染群の TLR-2 欠損マウスにおいて野生型マウスと比較して有意に低かった。TGF-β1 の発現レベルは感染群・対照群とも TLR-2 欠損マウスにおいて野生型マウスと比較して有意に低かった。ANP の発現レベルについては、TLR-2 欠損マウス（TLR2 KO、TAC、*P.g*）で、野生型マウス（WT、TAC、*P.g*）と比較して有意に低値を示した。

＜考察＞

歯周炎は様々な全身疾患と関わりが明らかになっており、その一つとしてマウスにおいて圧負荷を受けた心臓の心肥大と心筋の線維化が *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 感染により悪化したとの報告がある。本研究の結果においても、圧負荷を受けた心臓での線維化が *P.g.*感染により亢進していた。また、歯周病原細菌感染により全身炎症が惹起されるが、炎症状態は左室肥大と正の相関があると報告されている。しかし、歯周炎と心筋線維化との関係についてメカニズムの詳細は明らかになっていない。

本研究において、圧負荷による心筋の線維化が TLR-2 欠損マウス感染群（TLR2 KO, TAC、*P.g*）では、野生型マウス感染群（WT, TAC、*P.g*）と比較して減少していた。TLR は細菌関連分子パターンの認識をする重要なパターン認識受容体である。TLR による認識は、炎症性サイトカイン産生やその下流の宿主防衛の因子産生のトリガーとなっている。Monaco らにより、ヒト培養アテローマ細胞において TLR-2 阻害により MMP の産生が有意に減少したことが報告されている。Matsusaka らは MMP-2 欠損マウスにおいては、野生型マウスと比較して、TAC による心筋間質における線維化が減少したとの結果を受け、MMP-2 が圧負荷による心臓の心肥大や線維化、機能障害に重要な役割を果たしていると結論付けている。本研究では、TLR-2 欠損マウス（TLR2 KO, TAC、*P.g*）、（TLR2 KO, TAC）では、野生型（WT, TAC、*P.g*）、（WT, TAC）と比較して MMP-2 の mRNA レベルが低下していた。したがって、心筋線維化に TLR2 が関与していることが示唆された。

Andrian らにより *P.g.*が口腔由来細胞における MMP 産生にかかわっていることが報告されている。したがって、歯周病原細菌による MMP-2 産生が TAC 手術を施された心臓において、心筋の線維化を増悪させた可能性が示唆される。さらなる詳細なメカニズムについては、今後の研究が

必要である。

＜結論＞

*P. g.*は TLR-2 により認識された結果、全身炎症が惹起され、圧負による心筋の線維化が増悪されたことが明らかになった。したがって、TLR-2 は心筋の線維化において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5442　号 | 金子　誠 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　荒川真一<br>副　査　鈴木敏彦　原田浩之 | |
| 論　文　題　目 | Toll-like receptor-2 has a critical role in periodontal pathogen-induced myocardial fibrosis in the pressure-overloaded murine hearts | |

（論文審査の要旨）

現在、疫学研究から歯周病と循環器疾患との関係が指摘されている。Toll-like receptor-2（以下 TLR-2）が圧負荷心肥大モデルにおいて炎症を惹起しているとの報告がある。歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*（以下 *P. g.*）は TLR-2 によっても認識される。しかし心肥大モデルにおける心筋の線維化への *P.g.*感染による影響や、TLR-2 の関与についての詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで金子は心肥大モデルでの心筋の線維化における歯周病原細菌感染の影響と TLR-2 の役割を検討するため、本研究を行った。

本研究では、野生型と TLR-2 欠損マウスに対し、絹糸を用いて大動脈を縮窄させる方法を用いて心肥大モデルを作製した。また、マウスの背中に埋入したチャンバーを用いて、代表的な歯周病原細菌である *P.g.*を感染させ、その影響を解析した。このことから金子が、歯周病原細菌感染が心筋の線維化に与える影響とそのメカニズムを解明する周到な研究計画を構築していることが窺われ、高く評価できる。なお、本研究は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で行われた（0150166A、2009-015C2）。

本研究の成果は以下の通りである。

1. *P. g.*感染・野生型マウス（WT, TAC, *P. g.*）は Sham 群（Sham, *P.g*）と比較して心収縮力が低下していた。TLR-2 欠損マウスにおいては、感染の有無により有意差は認められなかった。
2. 心体重量比については、*P. g.*感染・野生型マウス（WT, TAC, *P. g.*）は Sham 群（Sham, *P.g*）と比較して増加傾向にあったが、群間において有意差は認められなかった。
3. マロリー染色による心筋の線維化の評価により、*P. g.*感染・野生型マウス（WT, TAC, *P. g.*）で線維化の亢進が認められた。TLR-2 欠損マウス（TLR2 KO, TAC, *P. g*）においては線維化の亢進は認められなかった。*P. g.*感染・野生型マウス（WT, TAC, *P. g.*）は、TLR-2 欠損マウス（TLR2 KO, TAC, *P. g*）と比較して線維化が抑制された。
4. *P. g.*感染・TLR-2 欠損マウス（TLR2 KO, TAC, *P. g*）は、*P. g.*感染・野生型マウス（WT, TAC, *P. g.*）と比較して、MMP-2、TNF、TGF-β1、ANP の発現の抑制が認められた。

これらの結果から、以下のことが考察された。

*P. g.*が TLR-2 により認識され、圧負荷により惹起された心筋の線維化が増悪した。この現象のメカニズムとして、TLR-2 により *P. g.*が認識され、その結果 TNF などの炎症性サイトカイン産生が亢進され、さらに MMP-2 の発現が誘導され、心筋の線維化病変が進行したと考えられる。これらの考察は理論的であり、論文中に明確に記載されている。

本研究結果は、歯周病原細菌感染により循環器疾患に影響を及ぼす可能性を示した点で高く評価できる。また TLR-2 による歯周病原細菌の認識が心筋の線維化の亢進に関わるというメカニズムの一端が解明されたことは、歯周病と循環器疾患との関連性を知る上で極めて重要なものであり、今後の歯周病学および循環器内科学の発展に寄与するものと考えられる。

したがって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 加地　博一 |
| 論文審査担当者 | 主査　鈴木　敏彦<br>副査　荒川　真一、出雲　俊之 |
| 論　文　題　目 | Active Microbiota Show Specific Correlationships in Peri-implantitis and Periodontitis |

（論文内容の要旨）

【要旨】

歯科用インプラント周囲炎は口腔内複合感染症の代表的疾患である。その症状は歯周炎の症状と類似しているが、進行速度や治療効果に相違があると報告されている。本研究は、疾患特異的な口腔内細菌の同定およびそれらの生態の解明から、両疾患の病態の違いを明らかにすることを目的とした。両疾患を同一口腔内に有する患者 11 名から試料を採取して 16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）および 16S rRNA の配列情報を取得・解析した。その結果、細菌種の組成比は疾患間だけでなく、同一疾患内の患者間でも大きく異なるにも関わらず、予測された細菌叢全体が保有する機能遺伝子組成は類似していることが示された。さらに、16S rRNA／16S rDNA 比を細菌種の活動性を示す指標として評価することにより、罹患部位で高い活動性を保有する細菌種は、従来報告されていたインプラント周囲炎および歯周炎の細菌種と異なることが示された。さらに細菌の存在量が必ずしも細菌の活動性と相関していないことを明らかにした。また、細菌活動性および 16S rRNA プロファイルから同定した高い活動性を保有する細菌種同士が構成する共起ネットワークは、インプラント周囲炎と歯周炎とで大きく異なることが示唆され、両疾患の病態の違いに寄与している可能性が示された。

【緒言】

歯科インプラント周囲炎は、バイオフィルムが関与する口腔内複合感染症の代表的疾患の一つである。インプラント周囲炎に罹患すると、インプラント周囲の組織が破壊されてインプラントの脱落を招く。歯の喪失を補う治療法として歯科インプラント埋入例が増えるに伴いインプラント周囲炎も増加してきており、その病態解明と治療法の確立が求められている。インプラント周囲炎と歯周炎は類似した臨床症状を呈するが、疾患の進行速度や治療効果には相違があることが報告されている。疾患コントロールのためには、疾患の原因となる口腔内細菌を同定し、その生態を解明することも必要である。従来、16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）領域を対象として上記疾患の原因微生物を同定する研究が行われ、両疾患のコア・マイクロバイオームが報告されてきた。しかし、DNA を対象とした解析では死菌の DNA も検出してしまい、インプラント周囲炎、歯周炎の病態に直接影響を与える生菌を解析することができない。さらに、16S rDNA 領域には機能遺

伝子に関する情報が存在しないため、細菌叢が保有する機能を評価できない。そこで、我々は 16S rDNA および 16S rRNA の両データを用いて細菌の活動性を評価し、両疾患の罹患部位における生菌の同定を試みた。さらにメタゲノムを予測することで細菌叢が保有する機能を比較解析するとともに、活動性の高い細菌同士の共起関係を比較解析して、両疾患の差異の原因となる要因の解明を試みた。

【方法】

本研究は、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を受け行われた（第 661 号）。

本学歯周病科に受診している患者で、インプラント周囲炎と歯周炎との両疾患に罹患している 11 名を被験者とした。罹患部位の歯肉縁上プラークを除去後、ポケット最深部にペーパーポイントを挿入して縁下プラークを採取した。サンプルから DNA および RNA を抽出し、抽出した RNA からは cDNA を合成した。ユニバーサルプライマーを用い、PCR 方で 16S rDNA および 16S rRNA の V3 – 4 領域を増幅した。増幅産物は電気泳動法で視覚化し、抽出・精製した。ライブラリーを調製後、MiSeq を用いて塩基配列取得した。

獲得した塩基配列は解析ソフトウェア USEAECH を用いてキメラ配列除去およびクオリティの低いリード数を除去した後、97%の配列の相同性で Operational taxonomic units（OTU）を作製した。その後、BLASTN および GREENGENES database を用いて塩基配列類似性検索を行い、種レベルでのアサインメントと系統解析を実施した。各サンプルの種多様性は、OTU 数、Shannon 指数を指標に調べた。また、サンプル間でコミュニティ構造を比較するために主座標分析を行った。さらに、16S rDNA および 16S rRNA の存在比（16S rRNA/16S rDNA 比）を計算して細菌の活動性指標とし、各細菌種の活動性を評価して生菌を選定した。本研究では、上記活動性指標の値が平均で 1 以上の細菌を高い活動性を保有する細菌種と定義した。

次に、メタゲノム予測ソフトウェア PICRUSt および機能遺伝子解析パイプライン HUMAnN を用い、各疾患の細菌群が保有する機能遺伝子を比較・解析した。さらに、活動性の高い細菌同士の共起関係を解析するために、スピアマンの順位相関係数を算出しヒートマップを作成した。また、上記スピアマンの順位相関係数を用いて、有意に共起関係を保有する活動性の高い細菌同士の共起ネットワークを Cytoscape により解析した。

【結果・考察】

前処理後の 7,493,910 本（27,277 ～ 628,962 本 : 平均 170,316 本）のリードを用いて以下の解析に使用した。

16S rDNA、16S rRNA 配列から細菌種数を種レベルでみたところ、合計で 524 菌種（インプラント周囲炎では 16S rDNA 配列で平均 243.5 菌種、16S rRNA 配列で平均 267.7 菌種、歯周炎では 16S rDNA 配列で平均 240.2 菌種、16S rRNA 配列で平均 260.9 菌種）が同定された。両疾患で種多様性に有意な差は認められなかった。一方で、細菌種の組成比は、疾患間だけでなく、同一の疾患内の被験者間でも大きく異なることが明らかになった。このことから、両疾患の細菌叢は、同一の疾患であっても抗菌薬等による口腔内の環境変化に応じて細菌叢の組成比が変化している可能性があると考える。

次に細菌の活動性に着目し、慢性期におけるインプラント周囲炎および歯周炎の罹患部位で直接的に疾患に関与している細菌種を特定した。その結果、インプラント周囲炎では 58 菌種、歯周炎では 51 菌種が活動性の高いコア・マイクロバイオームとして選定された。従来、Red complex に属し歯周炎の発症、進行に関与すると報告されている *Porphyromonas gingivalis* は、両疾患において存在比は 5%以上であったが、その活動性はいずれの疾患でも低かった（16S rRNA／16S rDNA 比：約 0.6）。細菌の存在量および活動性に関しスピアマンの順位相関係数を計算したが、細菌の存在量と活動性の間には有意な正の相関は認められなかった。上記活動性の高いコア・マイクロバイオームのうち、20 菌種および 13 菌種はインプラント周囲炎および歯周炎でのみ選定されており、疾患の進行速度または治療効果の差異に生み出す要因になっている可能性が示唆された。

次に、解析ソフトフェア PICRUSt および HUMAnN を使用して予測されたメタゲノムから両疾患の細菌叢の機能組成を解析した。その結果、インプラント周囲炎および歯周炎の細菌叢から KEGG orthology で 145 のオーソログが検出され、両疾患で機能組成は類似していることが明らかとなり、ANOSIM の値（R=0.1029、$p$=0.069）からも類似性が示された。同一疾患のサンプル間で細菌種の組成比が異なるにも関わらず機能組成が類似していることから、口腔環境の変化等によって細菌種組成が変化しても、細菌叢全体の機能は維持できる頑強性を両疾患の細菌叢が保有する可能性があると考えられた。一方で、活動性の高い群と低い群とで機能を比較すると、両群で保有する機能が異なることが PCoA から示された。そこで、各疾患で活動性の高いコア・マイクロバイオーム群に着目し、保有する機能を比較した。その結果、Bacterial chemotaxis と Flagellar assembly に関与する機能遺伝子が歯周炎において有意に発現されていることが示された。上記機能は細菌の可動性または定着に関与する機能であり、歯科インプラントおよび歯根の形態的複雑さの違いから発現量の差が生じている可能性があると考える。

さらに、活動性の高い細菌種同士の共起関係を解析した。その結果、両疾患で共起パターンに明らかな違いはなく、両疾患とも同一の門に属する細菌種は正の相関を有する傾向があった。この傾向は、特に *Firmicutes* 門および *Synergistetes* 門で顕著であった。インプラント周囲炎では *TG5* sp. 同士が最も強い相関を示し、歯周炎では *Streptococcus salivarius* と *Streptococcus* sp.が最も強い相関を示した。また、歯周炎群では Red complex に属し、当該疾患の進行に大きく関与すると報告されている *Tannerella forsythia* と *Treponema denticola* とは有意な正の相関が認められなかった。

さらに、有意に強い正の相関を示す細菌種同士が構築する共起ネットワークの解析を行った。その結果、インプラント周囲炎からは 4 つ、歯周炎からは 5 つの共起サブネットワークが抽出された。インプラント周囲炎では、主要なサブネットワークは 8 個のノードから構成され、クラスタリング係数は 0.358 であった。一方で、歯周炎の主要なサブネットワークは 16 個のノードで構成され、クラスタリング係数は 0.573 であり、インプラント周囲炎の主要なサブネットワークに比べてより複雑な構造を有することが明らかになった。インプラント周囲炎の主要なサブネットワークでは、*Capnocytophaga gingivalis* がネットワークのハブとなっており、*C. gingivalis* を除去するとサブネットワークは構造が維持できないことが示唆された。歯周炎では、*T. forsythia* および *T. denticola* が、有意な共起関係を有していないにも関わらず同一の主要なサブネットワークに存在していることが明らかになった。*T. forsythia* と *T. denticola* とが同一の共起ネットワークに存

在するためには、*Treponema* sp.oral taxon260、 *Campylobacter showae*、 *TG5* sp. または *Desulfobulbus* sp.が媒介として存在する必要がある可能性が示唆された。このような共起ネットワークの構造の違いが、両疾患の病態の差を生み出している可能性が示された。

【結論】

本研究では、細菌叢が異なる細菌種組成を有するにも関わらず、類似した機能を維持する頑強性の可能性が示唆された。また、細菌の活動性に着目することで、高い活動性を持つ細菌群の違い、それらが形成する共起ネットワークの構造の差異が明らかとなった。このような差異がインプラント周囲炎および歯周炎の進行速度や治療効果の違いに寄与していると考えられた。本解析の手法および結果と、メタゲノム、メタトランスクリプトーム解析から得られるビッグデータを併せて解析していくことにより、インプラント周囲炎をはじめとした複合感染症の病態解明に役立つことが期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5443　号 | 加地　博一 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　鈴木　敏彦<br>副　査　荒川　真一、出雲　俊之 | |
| 論 文 題 目 | Active Microbiota Show Specific Correlationships in Peri-implantitis and Periodontitis | |

（論文審査の要旨）

歯科インプラント周囲炎は、バイオフィルムが関与する口腔内複合感染症の代表的疾患の一つである。インプラント周囲炎と歯周炎は類似した臨床症状を呈するが、疾患の進行速度や治療効果には相違があることが報告されている。疾患コントロールのためには、疾患の原因となる口腔内細菌を同定しその生態を解明することも必要である。従来、16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）領域を対象とした解析から、両疾患のコア・マイクロバイオームが報告されてきた。しかし、DNA を対象とした解析では死菌の DNA も検出してしまい、インプラント周囲炎、歯周炎の病態に直接影響を与える生菌を解析することができない。さらに、16S rDNA 領域には機能遺伝子に関する情報が存在しないため、細菌叢が保有する機能を評価できない。そこで、加地らは 16S rDNA および 16S rRNA の両データを用いて細菌の活動性を評価し、両疾患の罹患部位における生菌の同定を試みた。さらにメタゲノムを予測することで細菌叢が保有する機能を比較解析するとともに、活動性の高い細菌同士の共起関係を比較解析して、両疾患の差異の原因となる要因の解明を試みた。

本研究で得られた成果は以下の通りである。

1. インプラント周囲炎と歯周炎とで細菌叢の種多様性に有意な差を認めなかった。一方で、細菌叢の組成比は疾患間だけでなく、同一疾患内の被験者間でも大きく異なることが明らかとなった。
2. 細菌の活動性に着目し、慢性期におけるインプラント周囲炎および歯周炎の罹患部位で直接的に疾患に関与している細菌種を特定した。その結果、インプラント周囲炎では 58 菌種、歯周炎では 51 菌種が活動性の高いコア・マイクロバイオームとして選定された。これらの細菌種のうち、20 菌種および 13 菌種はインプラント周囲炎および歯周炎でのみ選定された。細菌の存在量および活動性に関しスピアマンの順位相関係数を計算したが、細菌の存在量と活動性の間には有意な正の相関を認めなかった。
3. インプラント周囲炎および歯周炎の細菌叢から KEGG orthology で 145 のオーソログが検出され、両疾患で機能組成は類似していることが示された。また、歯周炎において活動性の高い活動性を有する細菌群は、インプラント周囲炎におけるそれらと比較し、Bacterial chemotaxis と Flagellar assembly に関与する機能遺伝子が歯周炎において有意に発現されていることが示された。

4. 活動性の高い細菌種同士の共起関係を解析した結果、両疾患で共起パターンに明らかな違いはなく、両疾患とも同一の門に属する細菌種は正の相関を有する傾向があった。この傾向は、特に *Firmicutes* 門および *Synergistetes* 門で顕著であった。
5. インプラント周囲炎において活動性の高い細菌種が構築する共起ネットワークは、歯周炎におけるそれとは異なっていた。また、歯周炎の主要なサブネットワークはインプラント周囲炎に比べてより複雑な構造を有することが明らかになった。

以上の結果から、インプラント周囲炎および歯周炎の細菌叢は、口腔内の環境変化に応じてその組成比が異なっている可能性がある。しかし、細菌叢が保有する機能は、細菌叢の組成比の変化の影響を受けず維持される頑強性を保有する可能性があると考えた。本研究では細菌の活動性に着目することで、従来報告されていたコア・マイクロバイオームとは異なる細菌種が同定された。さらに、細菌の存在量および活動性に正の相関を認めなかった。従来、Red complex に属し歯周炎の発症、進行に関与すると報告されている *Porphyromonas gingivalis* は、両疾患において存在比は 5%以上であったが、その活動性はいずれの疾患でも低かった。一方で、慢性期の歯周炎においては *Tannerella forsythia* が *P. gingivalis* の活動を抑制しているという先行研究の報告もあることから、両疾患の発症期と慢性期で病態に関与している細菌種が異なる可能性があると考察した。また、インプラント周囲炎または歯周炎で高い活動性を保有する細菌種同士が構築する共起ネットワークは大きく異なっており、活動性の高い細菌種の相違およびそれらの細菌種が構築するネットワーク構造の相違が、両疾患の病態や治療効果の差に関与している可能性があると考察した。これらの考察は理論的に実施されており、論文中に明確に記載されている。

本研究結果は、次世代シークエンサーを用いて網羅的に細菌叢を解析した点と、社会学や人類学などで発展したネットワーク分析を細菌種間の共起・排除関係の解析に応用し、その特徴を理解しやすい形で示した点は、本研究独自のものといえる。また本研究で構築した解析手法は、インプラント周囲炎の特異的な治療法の開発だけでなく、他の難治性複合感染症にも応用可能なモデルケースになりうると考えられ、高く評価できる。

したがって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 中村　敏成 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　若林　則幸<br>副　査　鈴木　哲也　　木下　淳博 |
| 論　文　題　目 | Influence of a Home Reliner on Denture Displacement and Patient-Reported Outcome |

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

従来の全部床義歯治療で下顎義歯に不満を持つ者は 22%という報告もされている．近年，義歯安定剤により患者の満足度が向上するため，使用する患者は少なくないことが報告されている．義歯安定剤にはさまざまな種類のものがあり，ホームリライナーも義歯安定剤の一つである．ホームリライナーは，緩衝効果によって痛みを軽減するために使用される弾力性のある酢酸ビニルを主成分とした義歯安定剤である．ホームリライナーは唾液中に溶出せず，使用後に口腔粘膜へ残留しないため好む患者もいる．ホームリライナーは使用により患者評価を向上させることが報告されている．また，適切な量を使用することで粘膜に加わる応力を軽減することがシミュレーション実験で報告されている．一方，ホームリライナーによって，顎堤の吸収を惹起したとする報告がある．しかし，この報告は長期にわたり不適切に使用したものである．日本補綴歯科学会のガイドラインでは，ホームリライナーは顎堤に対する義歯の位置を変化させ，短期間のうちに顎堤に大きなダメージを与えることが懸念されると記載されている．しかし，この記載には十分なエビデンスは存在しない．適切に義歯を製作したにも関わらず，ホームリライナーを自己判断で使用する患者がいた場合，歯科医師は正確な知識を持ち，適切に管理することが求められる．そこで，本研究では，適切に製作した義歯に対し，患者が短期間ホームリライナーを使用した場合の，ホームリライナーの厚み，義歯の変位量，咬合接触状態の評価を行うこととした．ホームリライナーの適切な使用方法を明らかにするため，ホームリライナーを貼付していない状態，患者が歯科医師の指導なしでホームリライナーを貼付した状態，歯科医師指導のもと患者がホームリライナーを貼付した状態の 3 条件を比較した．帰無仮説は，ホームリライナーの使用が義歯の変位，咬合接触，患者主観評価に影響を与えないとした．

＜方法＞

被験者は東京医科歯科大学歯学部付属病院にて 2 年以内に上下全部床義歯を製作し，メンテナンス中の 20 名とした．ホームリライナーを貼付していない状態，患者がホームリライナーを貼付した状態，歯科医師の指導のもと患者がホームリライナーを貼付した状態で，義歯データの記録，咬合接触状態の記録，患者主観評価の記録を行った．患者自身による貼付は，添付文書を手渡し，毎日ホームリライナーを交換するように指示し，４日目に記録を行った．その後１週間のウォッシュアウト期間を設け，歯科医師指導のもと患者が貼付し食事をした後，記録を行った．(東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会承認第 1230 号)

義歯データの記録はマイクロフォーカス X 線 CT 装置（inspeXioSMX-100CT，Shimadzu) を

用いた．得られた義歯の CT 画像は 3 次元モデルである STL データへ変換した．ホームリライナーを貼付していない状態，患者がホームリライナーを貼付した状態，歯科医師指導のもと患者がホームリライナーを貼付した状態の 3 つの STL データを CAD ソフトを用いて重ね合せ，偏差を計測した．ホームリライナーの厚みは，咬合面を基準として重ね合わせを行った偏差から計測した．計測エリアは右側臼歯部粘膜面，左側臼歯部粘膜面，前歯部粘膜面とした．義歯の変位は，粘膜面を基準として重ね合わせた偏差から計測した．計測ポイントは右側第一大臼歯近心頬側咬頭頂，左側第一大臼歯近心頬側咬頭頂，切歯点とした．また，この 3 点を結ぶ平面に対し，両側の第一大臼歯近心頬側咬頭頂を結ぶ線を左右の軸とし，この座標を元に，前後，左右，上下の変位量を記録した．

咬合接触状態の記録にはブルーシリコーン（Blue Silicon，GC）を用い，0～50 μm の咬合接触面積，0～200 μm の咬合接触面積を測定した．50 μm までの咬合接触面積を用いて右側の咬合接触面積が全体の咬合接触面積に占める割合を，200 μm までの厚みの咬合接触面積を用いて前歯の咬合接触面積が全体の咬合接触面積に占める割合を算出した．前歯の咬合接触面積の割合については，前歯部に接触が見られた 10 名を対象とした．

主観評価の記録は VAS スケールを用い，下顎義歯の安定，維持，適合性，快適性，咀嚼能力，会話能力，満足度について記録した．

＜結果＞

ホームリライナー全体の厚みは，指導なしでは 0.259 (0.0965) mm，歯科医師が指導した場合では 0.166 (0.0564) mm であり，指導することで有意に薄くなった．指導の有無に関わらず，前歯部の厚みが臼歯部と比較し有意に厚かった．右側臼歯部と左側臼歯部の厚みは，指導の有無に関わらず有意差を認めなかった．

義歯の変位量について，臼歯部では，指導なしでは 0.360 (0.387) mm，指導した場合は 0.200 (0.133) mm であった. 前歯部では, 指導なしで 0.432 (0.603) mm, 指導した場合は 0.250 (0.218) mm であった．測定した 3 部位の総変位量は，指導なしの状態，指導ありの状態ともに有意差はなかった．そのため，咬合接触面積，咬合接触の割合共に，ホームリライナーを貼付していない状態，指導なしの状態，指導ありの状態で有意差は認められなかった．

変位の方向について，測定した 3 部位すべてで，指導なしでは指導ありと比較して上下方向の成分のみ有意に大きい値であった．左右，前後方向の変位量は指導の有無に関わらず，有意差は認められなかった．また，指導なしの状態，指導ありの状態ともに，測定した 3 部位すべてにおいて，前後，左右方向の変位量と比較し上下方向の変位量が有意に大きかった．

患者主観評価は，安定，維持，適合性，快適性，咀嚼能力，会話能力，満足度について，ホームリライナーを貼付していない状態と比較し，患者がホームリライナーを貼付した状態のほうが，有意に VAS の値が大きかった．また，安定，維持，適合性，快適性，会話能力については，患者がホームリライナーを貼付した状態と比較し，歯科医師の指導のもとホームリライナーを貼付した状態のほうが有意に VAS の値が大きかった．

＜考察＞

適切に製作された義歯に対して短期的にホームリライナーを使用したとき，材料の厚みによ

る義歯の変位を生じるが，歯科医師の指導がある場合は義歯の変位量が減少した．また，指導の有無に関わらず，咬合平面に対して垂直方向に義歯が変位したため，咬合接触状態は変化しないことが明らかとなった．ホームリライナーの使用により患者主観評価が向上することが明らかとなった．ホームリライナーの使用方法は，義歯の垂直的な変位，患者主観評価の向上に影響を与えた．このことから，義歯の変位，患者主観評価に関する帰無仮説は棄却された．

本研究では，義歯を 3 次元データ化するためマイクロフォーカス CT を用いた．得られた CT 画像のピクセルサイズは 0.158mm であった．最終的に作成された STL データの点と点の距離精度はピクセルサイズの 6 分の 1 の精度であった．咬合面の重ね合わせは，人工歯全体を用い，重ね合わせ偏差は 0.00483±0.0404 mm であった．粘膜面の重ね合わせは，義歯調整の影響を考慮し，非可動粘膜の 60%以上のエリアを用いた．重ね合わせに用いた非可動粘膜の面積は 74.2%±7.42%で，重ね合わせ偏差は 0.00939±0.0697 mm であった．本研究で測定されたホームリライナーの厚みと義歯の変位量と比較し，モデルの精度と重ね合わせの偏差は小さく誤差の許容範囲内であった．

義歯のリラインでは，義歯の変位が生じるため咬合調整が必要であること，前方方向への変位が起こる可能性があることが報告されている．ホームリライナーによる義歯の変位量はリラインによるものと比較して小さな数値で咬合接触状態の変化もなかった．これは，ホームリライナーがすぐに硬化せず，塑性流動を続ける材料であるため，咬合することで咬合面に誘導されながらホームリライナーが薄くなるためと考えられる．

また，適切に製作した義歯に対しホームリライナーを使用することで患者の主観評価は向上することが明らかとなった．下顎義歯に関して，安定が咀嚼能力，満足度に有意に関連するとの報告がある．本研究の結果においてホームリライナーを使用することで安定が向上したことにより，咀嚼能力，満足度が向上したと考えられる．

主観評価が向上することから，患者がホームリライナーを使用する可能性は否定できない．しかし，ホームリライナーにはさまざまな問題がある．剥離が困難であることや，軟質の床用材料を用いることで粘膜に対する影響もあるとされる．このことから長期にわたり使用することで床粘膜面の形態を変化させる可能性があり，顎堤にダメージを与える可能性が考えられる．そのため，長期にわたり使用することは問題があると考えられる．

ホームリライナー使用中の継時的な変化は本研究では考慮されていない．ホームリライナーは塑性流動を続ける材料であるため，咬合のたび義歯の変位を繰り返している可能性がある．このことは，短期的な使用であっても粘膜に対し何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる．今後この影響について検討していくことが必要である．しかし，本研究の結果から，しっかり咬合することでホームリライナーの厚みが薄くなり，義歯の変化量を小さくできると考えられる．そのため，やむを得ずホームリライナーを使用する患者に対して，歯科医師は短期的な使用にとどめるよう指導すること，義歯の変位を少なくするためよく咬合し使用するよう指導すること，そして，常に適切な義歯を使用するよう患者の管理を行うことが求められる．

＜結論＞

本研究により以下の結論を得た．

１．使用方法を歯科医師が指導することによりホームリライナーの厚みは有意に減少し，義歯

の変位量は有意に少なくなった.

2．ホームリライナーの使用により咬合接触状態に有意な変化はなかった．これはホームリライナーの使用による義歯の変位の方向がほぼ垂直方向であったためと考えられた,

3．ホームリライナーを使用することで患者の主観評価は有意に向上した.

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲第　5444　号 | 中村　敏成 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　若林　則幸<br>副　査　鈴木　哲也　　木下　淳博 | |
| 論文題目 | Influence of a Home Reliner on Denture Displacement and Patient-Reported Outcome | |

（論文審査の要旨）

近年，義歯使用時の満足度の向上を期待し，義歯安定剤を使用する患者が少なくないことが報告されている．ホームリライナーは，緩衝効果によって痛みを軽減するために使用される弾力性のある酢酸ビニルを主成分とした義歯安定剤である．ホームリライナーは唾液中に溶出せず，使用後に口腔粘膜へ残留しないため好む患者も多い．またホームリライナーの使用により患者評価が向上すること，適切な量を使用することで粘膜に加わる応力が軽減することが報告されている．しかし，長期にわたる不適切な使用により，顎堤の吸収が生じた症例報告がある．日本補綴歯科学会ガイドラインには，ホームリライナーは顎堤に対する義歯の位置を変化させ，短期間のうちに顎堤に大きなダメージを与えることが懸念されると記載されているが，明確なエビデンスは存在しない．ホームリライナーは患者の自己判断で使用されるため，適切に義歯を製作したとしても患者主導で使用されている．そのためホームリライナーがどのように使用され，義歯の変位がどの程度起きているか明らかになっていない．こうした状況を背景に，中村敏成は適切に製作した義歯に対し患者が短期間ホームリライナーを使用した時の，ホームリライナーの厚み，義歯の変位量についてマイクロフォーカス X 線 CT を用い検証した．ホームリライナーの使用方法による影響を明らかにするため，ホームリライナーを貼付していない状態，患者が歯科医師の指導なしでホームリライナーを貼付した状態，歯科医師指導のもと患者がホームリライナーを貼付した状態について，ホームリライナーの厚み，義歯の変位量，咬合接触状態，患者主観評価を比較した．本研究はホームリライナーによる義歯の変位について，患者への指導による影響を基に検証した新しい試みである．本研究は綿密な研究計画をもとに実施され，適切な統計学的解析により妥当性の高い結果を導いており，研究計画から考察に至るまで高く評価できる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

４．ホームリライナーの厚みは患者自身の使用で 0.259 mm, 使用法を指導すると 0.166 mm で．指導により有意に薄くなった．

５．義歯の変位量は患者自身の使用で 0.386 mm，使用法を指導すると 0.217mm で，使用方法を指導することで，有意に変位は少なくなる．しかし，変位の方向は、主に上下方向であるため，咬合接触状態に有意な変化はない．

６．ホームリライナーを使用することで患者の主観評価は有意に向上する．

以上の結果より，ホームリライナーの厚み，義歯の変位量が明らかとなった．さらに，指導

を行うことで変位量を小さくできることが明らかとなった．このことから，やむを得ずホームリライナーを使用する患者に対して，歯科医師は，義歯の変位を少なくするため使用方法について指導を行い，常に適切な義歯を使用するよう患者の管理を行うことの必要性が確認された．

本研究は，ホームリライナーによる義歯の変位をマイクロフォーカス CT により評価した唯一の研究であり，全部床義歯を使用する患者管理，患者指導の一助となり、今後の歯科補綴学、高齢者歯科医療に寄与するところ大であると考えられる．よって本論文は，博士(歯学)の学位を請求するのに十分価値のあるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 佐藤　博紀 |
| 論文審査担当者 | 主査　荒川　真一<br>副査　川口　陽子　　木下　淳博 |
| 論　文　題　目 | A Periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis deteriorates Isoproterenol-Induced myocardial remodeling in mice |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

歯周炎は、アテローム動脈硬化や不整脈、心筋梗塞など心血管疾患との関連性が報告されている。本研究は、心疾患発症前に発生する心筋肥大において、歯周病原細菌がどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的として実施した。7 週齢の雄の C57BL/6J マウスを用い、イソプロテレノール (ISO) によって誘発させた心筋細胞肥大に、*Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) を感染させ、その影響を検討した。心筋細胞の大きさを評価したところ、ISO と *P. g.*の両方で刺激したマウスでは、ISO 単独刺激マウスと比較して有意に大きな値であった。次に、心筋細胞の肥大のメカニズムを明らかにするために、左心室細胞における各種タンパク質をコードする mRNA の発現をリアルタイム PCR 法 (RT-PCR 法) を用いて検討した結果、Toll-like receptor 2 (TLR2)と NADPH oxidase 4 (Nox4) の発現が *P. g.*の刺激によって亢進していることが明らかになった。以上の結果から、歯周病原細菌は、TLR2 または Nox4 を介して ISO 誘導心筋細胞肥大を亢進している可能性が示唆された。

＜緒言＞

心不全は肥大型心筋症を含む様々な病態によって引き起こされる重篤な疾患である。病理組織学的に心機能障害は細胞死や組織間質の線維化といった組織変性によって引き起こされる。これは心筋リモデリングと呼ばれる。マウスにおいて交感神経 β 受容体への慢性的刺激がこの心筋リモデリングを引き起こすと報告されている。

心筋肥大は心筋細胞の肥大・質量の増加を特徴としているが、これはしばしば機械的なストレスによって引き起こされる。この心筋肥大は致死性の肥大型心筋症や心不全へつながる可能性がある。持続的な交感神経刺激の研究モデルとして、ISO 誘導性の心筋肥大が用いられている。

歯周炎は歯の支持組織の破壊を特徴とする慢性炎症性疾患であり、歯周炎と心疾患の関連性について多くの報告がなされている。その中には歯周病原細菌の一つである *P. g.*が心血管疾患の増悪に関与するとの報告がある。一方、我々はこれまでに、歯周病原細菌が大動脈縮窄術 (TAC) 誘導性の心筋肥大を増悪させたことを報告した。これらの結果は、TAC と ISO はともに心筋肥大を誘発するが、その病理学的メカニズムは異なることを示唆する。TAC は圧負荷による機械的なス

トレスであるのに対し、ISO は交感神経 β1,β2 受容体を刺激する薬理学的なストレスである。これら二つの病態においては、心肥大に対する歯周病原細菌の作用メカニズムが異なる可能性がある。そこで本研究は、歯周病原細菌感染が ISO 誘導性の心筋細胞肥大にいかに作用しているかを解明することを目的として実施した。

＜方法＞

本実験では、7 週齢の雄の C57BL/6J マウスの背部に皮下チャンバーを埋入した。埋入したコイル型のチャンバーは 0.5mm 径のステンレスワイヤーで作成した。コイル型チャンバー埋入 14 日から *P. g.*懸濁液 0.1ml を週に 1 回の頻度で 4 週間にわたり注入した。対照群のマウスには *P. g.* 懸濁液の代わりにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を注入した。 *P. g.* 懸濁液は臨床分離株である A7A1-28 株を $10^8$ CFU/ml の濃度で調整して用いた。*P. g.*感染は抗 *P. g.*血清抗体価を Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA 法)を用いて評価した。

ISO の投与は、浸透圧ポンプをチャンバーとして用いた。ISO の濃度は 1 日に 30 mg/kg body weight で徐放するよう PBS にて濃度を調整した。浸透圧ポンプの埋入は、コイル型チャンバーの埋入から 2 週後に行った。ISO 投与後 28 日後にマウスを屠殺して組織を採取した。屠殺前に血圧と脈拍、心エコー検査による左室内径短縮率 (FS) を算出した。心室組織に対しては鍍銀染色を行い、左心室の心筋細胞の大きさを測定した。その際、左心室から無作為に心筋細胞を 100 個選択し、面積の和をその個体の心筋細胞の大きさとした。さらに、心室細胞における、心肥大のマーカーである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP)と肥大型心筋症の病因遺伝子として知られている心筋ミオシン重鎖 (MyHC7)、細菌毒素などのレセプターである TLR2 と TLR4 および酸化ストレス応答タンパク質である Nox2, Nox4 をコードする mRNA の発現を RT-PCR 法で定量した。なお、本実験は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た（承認番号 0170323A）。

＜結果＞

心機能評価に関しては、ISO を投与群（ISO(+)/*P. g.*(-) 群、ISO(+)/*P. g.*(+) 群）では非投与群（ISO(-)/*P. g.*(-) 群）と比較して、脈拍数と血圧が上昇する傾向にあったが、ISO(+)/*P. g.*(-) 群と ISO(+)/*P. g.*(+) 群間では有意差が認められなかった。エコーによる FS も ISO 投与 2 群で減少傾向が見られたが、*P. g.*感染による影響はなかった。心体重量比については、ISO(-)/*P. g.*(-) 群, ISO(+)/*P. g.*(-) 群, ISO(+)/*P. g.*(+) 群の順で増大傾向を示したが、有意差は認められなかった。

心肥大に対する *P. g.*の影響を検討した結果、ISO(+)/*P. g.*(-)群と比較して ISO(+)/*P. g.*(+) 群において有意な心筋細胞面積の増大が認められた。

ISO(+)/*P. g.*(+) 群の心筋細胞肥大のメカニズムを検討した結果、ANP と MyHC7 をコードする mRNA の発現量において、ISO(-)/*P. g.*(-) 群, ISO(+)/*P. g.*(-) 群, ISO(+)/*P. g.*(+) 群の順で増大傾向を示した。TLR2 と TLR4 をコードする mRNA においては、ISO(+)/*P. g.*(+) 群の TLR2 mRNA レベルは ISO(+)/*P. g.*(-) 群と比較して有意に亢進していた。TLR4 をコードする mRNA については、ISO(+)/*P. g.*(+)群では ISO(+)/*P. g.*(-) 群と比較して増加傾向を示したが、有意な差は認められなかった。酸化ストレス応答を評価するため Nox2, Nox4 をコードする mRNA レベルを測定した。ISO(+)/*P. g.*(+) 群の Nox4 mRNA レベルは ISO(+)/*P. g.*(-) 群のそれと比較して有意に亢進してい

た。一方、Nox2 mRNA レベルについては、群間で有意差は認められなかった。IL-1β、IL-6 をコードする mRNA 量は各群間で有意差が認められなかった。

＜考察＞

ISO(+)/*P. g.*(-)群と比較して、ISO(+)/*P. g.*(+)群では左心室の心筋細胞の大きさについて有意に高値を示した。さらに、TLR2 と Nox4 をコードする mRNA レベルでの発現も有意に増加していた。近年、心血管疾患は慢性炎症によって促進されるという知見が得られている。また、自然免疫が心筋虚血や心不全の進行に重要な役割を果たすことが報告されており、TLRs が血管のリモデリングに重要な働きをしていることが明らかになっている。 TLRs が心筋細胞肥大やアポトーシスに対し影響を与えていることも報告されている。細菌感染が直接的または間接的に Na-Ca チャネルを介して心肥大を誘導するという報告もある。慢性炎症は活性酸素種産生を介した心肥大に大きく関与するとされ、最近になって Nox4 と心肥大との関連性が報告されている。

*P. g.*はヒト上皮細胞や単球、歯根膜線維芽細胞といった細胞において TLR2 の発現を亢進したとの報告がある。これらの結果は *P. g.*が心筋組織においても TLR2 の発現を亢進させる可能性を示唆している。TAC 2 週後、TLR2 KO マウス（マウス心肥大モデル）では、野生型マウスと比較して心肥大が抑制されたとの報告がある。本実験では ISO 刺激 4 週後に、心筋細胞の肥大と TLR2 の発現の亢進が同時に認められた。これらの結果から、TLR2 が歯周病原細菌誘導性の心筋細胞肥大において、重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

*P. g.*を歯根膜線維芽細胞に対して作用させると、Nox4 の発現が亢進されたことが報告されている。本研究では *P. g.*注入マウスの心筋細胞に Nox4 の発現亢進が認められた。したがって、Nox 4 は心筋細胞肥大において重要な作用もしていることが示唆される。現在のところ、メカニズムの詳細は明らかではいないが、TLR2 と Nox4 は *P. g.*感染により誘導されることが示唆された。本研究では *P. g.*感染により ISO 誘導性の心筋細胞増大が亢進されたが、細胞死や線維化などの組織変化は認められなかった。我々のグループによる研究において、歯周病原細菌は虚血誘導性の心筋リモデリングを増悪させたが、*P. g.*感染それ自体では病理的な組織変性は誘導されなかった。それゆえ、したがって、歯周病原細菌感染の病的心筋細胞への影響は限定的であると考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5445　号 | 佐藤　博紀 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　荒川　真一<br>副　査　川口　陽子　　木下　淳博 | |
| 論 文 題 目 | A Periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis deteriorates Isoproterenol-Induced myocardial remodeling in mice | |

（論文審査の要旨）

現在、疫学研究から歯周病と循環器疾患との関係が指摘されている。実際に本態性高血圧の患者では、歯周病の重症度(CPITN)と左心室重量に相関関係が認められたとの報告があり、心筋症など重篤な心臓疾患の前段階で認められる心肥大と歯周炎との関連性が示唆される。しかし現在のところ、歯周病原細菌の感染が心肥大の病態に及ぼす影響については明らかになっていない。そこで佐藤博紀は心肥大の所見のうち、心筋細胞の大きさの変化に着目し、心筋細胞肥大における歯周病原細菌感染の影響を検討するため、本研究を行った。

本研究では、マウスに対し、イソプロテレノール（ISO）を徐放するポンプを皮下に埋入して高血圧誘導性の心筋細胞肥大のモデルを作製した。また、マウスの背中に埋入したコイルをチャンバーとして用いて、そこに代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*（*P. g.*）を感染させた。上記の 2 種の刺激を同時に開始し、28 日後にその影響を解析した。なお、本研究は本学において動物実験計画書の申請を行い、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で行った（承認番号 0170323A）。

本研究の成果は以下の通りである。

ISO 刺激と *P. g.*感染の有無で ISO(-)/*P. g.*(-)、ISO(+)/*P. g.*(-)、ISO(+)/*P. g.*(+) の 3 群を設定した。

1. *P. g.*の感染により、*P. g.*に対する血清抗体価の上昇が認められた。
2. 心体重量比、心重量、血圧、脈拍数は各群間で有意差は認められなかった。
3. ISO 投与及び *P. g.*感染から 28 日後、心室中央部での横断切片を鍍銀染色法で染色し、顕微鏡下で心筋細胞サイズ（面積）を比較したところ、ISO(+)/*P. g.*(+) は他の 2 群と比較して心筋細胞の有意な増大が認められた。
4. 病的心肥大で発現亢進が認められる心房性利尿ペプチド、及びミオシン重鎖 7 をコードする mRNA の発現が ISO(+)/*P. g.*(+)群で上昇する傾向が認められたが、群間に有意差は認められなかった。
5. ISO(+)/*P. g.*(+)群は他の 2 群に比較して Toll like receptor (TLR) 2 をコードする mRNA の発現が有意に亢進することが認められた。TLR4 をコードする mRNA の発現は ISO(+)/*P. g.*(+)群で上昇する傾向が認められたが、群間に有意差は認められなかった。
6. ISO(+)/*P. g.*(+)群は他の 2 群に比較して NADPH oxidase (Nox) 4 をコードする mRNA 発現

が有意に亢進されることが認められた。Nox2 については ISO(+)/*P. g.*(+)群で上昇する傾向が認められたが、群間に有意差は認められなかった。

7. 炎症性サイトカイン IL-1β、IL-6 をコードする mRNA の発現については群間で有意な差は認められなかった。

これらの結果から、以下のことが考察された。

ISO 刺激による心筋細胞肥大において、*P. g.*感染による亢進が認められ、左心室組織での TLR2 と Nox4 の発現が上昇した。複数回の細菌投与により、TLR2 発現の亢進が認められたが、これは細菌に対する感受性が増加した結果である可能性が考えられる。TLR2、Nox4 は心筋細胞肥大に関与しているとの報告があり、*P. g.*感染により酸化ストレスが誘導され、心筋細胞の病的な変性が増悪された可能性が示唆される。

本研究結果は、*P. g.*感染が循環器疾患に影響を及ぼす可能性を示した点で高く評価できる。歯周病原細菌による心筋細胞肥大を *in vivo* で明らかにした最初の報告である。また TLR2、Nox4 産生量の増加が ISO 刺激性の心筋細胞肥大の増悪に関わるというメカニズムの一端が解明されたことは、歯周病と循環器疾患との関連性を知る上で極めて重要なものであり、今後の歯周病学・循環器内科学の発展に寄与するものと考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 山下　優 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　柴田　俊一<br>副査　原田　浩之　　池田　正明 |
| 論　文　題　目 | Stability of Platelet-rich Fibrin *in Vivo*: Histological Study in Rats |

（論文の内容の要旨）

**Background:** The use of autogenous materials is preferred, being considered as the gold standard mainly due to the positive response of the body by avoiding negative immunological effects and infectious risks. Platelets store growth factors, such as PDGF and TGF-beta, which stimulate cellular proliferation and differentiation. Platelets release these growth factors when activated. Thus, blood-derived materials containing platelets potentially stimulate tissue regeneration. There are several blood-derived materials prepared with different techniques.

Platelet-Rich Fibrin (PRF) is one of the blood-derived material containing platelets defined as an autologous leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) biomaterial. Among blood-derived materials containing platelets, PRF has the following advantages: Simple preparation (one centrifugation), no additives, prolonged release of growth factors, fibrin-rich material and easy conversion to a membrane. Indeed, beneficial effects of PRF in clinical dentistry have been reported and PRF is extensively used clinically in bone augmentation including maxillary sinus augmentation. However, it is not clear how long PRF can exist *in vivo*. The purpose of the present study is to examine the stability of PRF *in vivo*.

**Material and Methods**:

**PRF preparation**

The PRF membrane was prepared in accordance to the Choukroun method. Under anesthesia with intraperitoneal injection of Ketamine and Xylazine, blood, approximately 1 ml, was collected from the superficial femoral vein with a small syringe and a needle, transferred to a small 1 ml glass tube and immediately centrifuged at 400 x g at room temperature for 12 min. After centrifugation, 3 layers are formed: supernatant on the top, PRF gel in the middle, and red blood cell layer at the bottom. PRF gel was collected after cutting between the junction of the middle layer and the RBC layer, including the small top portion of the RBC layer. The clot was placed inside gauze and pressed. Finally, the PRF membrane was obtained.

**Surgical protocol**

Shaving and disinfecting the surgical area, a linear incision on the mid-posterior part of the body of the rat was performed and the muscle was exposed. On the left side, a small incision was made on the surface of the muscle. The PRF membrane was placed partially into the incised muscle and stitched. On the right side, sterile saline was applied as the control. They were then covered with a Teflon dome, which would

serve as a guide when harvesting a specimen. The rats were then sacrificed at 7, 14, 21 and 28 days by injection of Nembutal in excess.

**Preparation of the Specimens**

Using the Teflon dome as a guide, a 10 x 10 mm portion of tissue from the surrounding area was excised and fixed in 10% formalin. The tissue specimen was dehydrated and then embedded in paraffin. Sections of 1 μm thickness were prepared and stained with hematoxylin-eosin (HE). The specimen was then observed under an optical microscope. The area of PRF was measured with an image analyzer (Image J., National Institute of Health, USA).

**Immunohistochemical Imaging**

The sections were incubated with an antibody against rat PDGF-AA and incubated with secondary antibody, fluorescein-labeled rabbit anti-goat IgG in a humidified box. After washing with phosphate buffered saline (PBS), the sections were observed with a fluorescent microscopy.

**Results:** The PRF could be prepared from the superficial femoral vein of the rat. Although the size of PRF was small, its stiffness was almost similar to the human PRF. We could stitch the PRF to the muscle of the rat easily. In the histological images, the transplanted PRF, which showed bluish color with a characteristic structure, was distinguishable from the surrounding tissue. Notably, with time, the transplanted PRF became small and sparse. The change of the PRF area with time was presented at 28 days, although PRF was still detectable, the area of PRF extremely decreased.

Positive fluorescence was observed at 7, 14, 21 and 28 days; however, it was evident that intensity and area of the fluorescence decreased with time and the fluorescence became very week at 28 days.

**Discussion** The use of autogenous materials has become the ideal standard since we are able to avoid many negative immunological responses and infection. Furthermore, the cost of preparing autogenous materials is negligible compared with using commercially available biomaterials. Recently, patient's blood derived autologous products have been drawing attention. Especially, blood products containing platelets can potentially stimulate tissue regeneration because platelets store growth factors such as PDGF, TGF-beta and VEGF. Indeed, several different blood-derived autologous products containing platelets have been developed and clinically used. Among these blood-derived products, PRF is advantageous because of its simple preparation without any additive.

The results of the present study demonstrated that PRF also degraded in vivo. The degradation speed in vivo is slower than in vitro. In our previous in vitro study, we examined human PRF whereas we used rat PRF in the present study. The difference of the degradation speed might be due to the difference of the species.

PRF in this study and in our previous study was prepared according to the Choukroun's protocol. PRF is characteristic in releasing growth factors for a prolonged period compared to other blood products containing platelets such as platelet-rich plasma (PRP). We have reported that large amount of PDGF could be extracted with Guanidine solution from PRF after the PRF membrane was intensively incubated with phosphate-buffer, which indicates that PDGF strongly binds to fibrin in PRF. Thus, it was reasonable that we could detect PDGF in PRF at 21 days and 28 days in the present study.

The time-dependent decrease in intensity and area of fluorescence in the present study demonstrates PDGF disappearance from the PRF. The mechanism of the disappearance would be simply due to the diffusion. In addition, degradation of fibrin and PDGF would also contribute to PDGF disappearance from PRF.

One of the advantages of PRF is that it is possible to make a membrane-like form easily. PRF membrane has been clinically used to cover the grafted material in bone augmentation. Such a PRF application would stimulate wound healing preventing the exposure of the grafted material, which sometimes occurs. However, the role of the barrier membrane cannot be expected to the PRF membrane because the PRF almost disappeared at 28 days in the present study. Thus, the grafted material for bone augmentation should be covered with a more stable barrier membrane for GBR to prevent soft tissue invasion to the grafted material.

PRF has been also applied to maxillary sinus floor augmentation for dental implant treatment. After lifting the sinus membrane, placing PRF alone under the sinus membrane induces bone. However, since the degradation of PRF is fast as shown in the present study, we cannot expect enough volume of augmentation if PRF is used without any bone substitute.

PRF has been also applied to the socket after tooth extraction to preserve the alveolar ridge. PRF would stimulate socket healing: bone formation and mucosa healing, which has been proved by the recent animal study. When PRF is applied to the socket after tooth extraction, socket healing will be fast. However, it is not clear whether PRF application to the socket after tooth extraction is beneficial in the alveolar ridge preservation or not. Since the decrease of width and height of the alveolar ridge after tooth extraction is due to the lack of mechanical stress to the alveolar bone, especially buccal side, where osteoclastic bone resorption occurs.

When PRF alone is applied to the tooth socket after tooth extraction, it would be also quickly degraded although it would stimulate socket healing. It is likely that PRF alone would not keep the shape of the alveolar ridge because inhibition of osteoclastic bone resorption by PRF cannot be expected. Therefore, similar to maxillary sinus augmentation, combination of PRF with non-resorbable bone substitute would be effective for socket preservation.

**Conclusions:** Although PRF can potentially stimulate tissue regeneration, its degradation with time should be considered in its clinical applications. It is also obvious that PRF alone cannot work as a scaffold or a barrier membrane for maintaining the space of regeneration.

（日本語　要約）

背景：血小板は、PDGF および TGF-β などの成長因子を放出し組織再生を促進する。多血小板フィブリン（Platelet-rich Fibrin, PRF）は、患者自身の血液から調整する血小板および白血球を多く含むフィブリンから成る生体材料である。PRF は現在臨床において広く用いられているが、生体内で PRF は分解されるので、どの程度の期間効果が期待できるかは不明である。本研究の目的は、生体内での PRF の安定性を調べることである。

材料および方法：15 週令の雄性 Wistar 系ラットの浅大腿静脈より採取した約 1 ml の血液をガラス管に移し遠心分離した。下層の赤血球層の最上部を含めるように、上層のゲルを切り出して、ガーゼで圧接して PRF 膜を作製した。ラットの背部筋肉を露出し、筋肉表面を切開して左側の筋肉内 PRF 膜を縫合した。対照群として、右側の筋肉内に生理食塩水を適用した。処置部位をテフロンのドームで覆い、そのドームを筋肉に縫合した。手術をおこなってから 7、14、21 および 28 日後にラットを安楽死させ、移植部位を採取した。通法に従ってパラフィン包埋後切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色およびラット PDGF-AA に対する抗体を用いた免疫抗体蛍光法を用いて観察した。

結果：ラットの浅大腿静脈から採取した血液から PRF 膜を作製し、同一ラットの背部筋肉に縫合固定することが可能であった。HE 染色像において、移植した PRF 膜と周囲組織を識別することができ、移植 7 日目においては免疫抗体蛍光法で強い蛍光が確認された。時間経過とともに移植した PRF は小さくなるとともに、その構造は粗になった。移植後 28 日後において、PRF は極めて小さくなり、免疫抗体蛍光法で極めて弱い蛍光が確認されるのみであった。

結論：PRF は組織の再生を促進するが、臨床で使用する際には PRF の分解速度について考慮する必要がある。また組織再生のスペースを確保する遮断膜として、PRF 膜を使用することは非常に難しい事も示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5446　号 | 山下　優 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　柴田　俊一<br>副　査　原田　浩之　　池田　正明 | |
| 論 文 題 目 | Stability of Platelet-rich Fibrin *in Vivo*: Histological Study in Rats | |

（論文審査の要旨）

患者から採血した血液を一回の遠心分離操作をおこなって調整することが可能な多血小板フィブリン（Platelet-rich Fibrin, PRF）は、血小板と白血球を多く含むフィブリンからなる生体材料である。PRF は血小板由来の PDGF および TGF-β などの成長因子を放出し、組織再生を促進する作用があるため、現在臨床に広く用いられている。しかし、PRF は生体内で分解されるので、どの程度の期間組織再生促進効果が期待できるかは不明であった。山下はこのような背景をもとに、PRF の生体内安定性についての動物実験を立案し、厳密に実行した。このような着想および実験の遂行能力は高く評価できる。

ラットの浅大腿静脈より採取した約 1 ml の血液をガラス管に移し、遠心分離を行って PRF を分離し、下層の赤血球層の最上部を含めるように上層のゲルを切り出し、ガーゼで圧接して PRF 膜を作製した。ラットの背部筋肉を露出し、筋肉表面を切開し、左側の筋肉内で PRF 膜を縫合した。対照群として、右側の筋肉内に生理食塩水を適用した。処置部位をテフロンのドームで覆い、そのドームを筋肉に縫合した。手術を行なってから 7、14、21 および 28 日後にラットを安楽死させ、移植部位を採取した。通法に従って固定後パラフィン包埋を行い、切片作製後に HE 染色およびラット PDGF-AA に対する抗体を用いた免疫抗体蛍光法を用いて観察した。これらの実験方法が適切に選択されていること、また実験手法に細かい工夫がなされていることを確認した。

本研究において以下の結果を得た。

① ラットの浅大腿静脈から採取した血液から PRF 膜を作製し、同一ラットの背部筋肉に縫合固定することができた。

② HE 染色した組織像において、移植した PRF 膜と周囲組織を識別することが可能であったが、時間経過とともに移植した PRF 膜は小さくなるとともにその構造は粗になっていき、移植後 28 日後には極めて小さくなっていた。

③ PDGF に対する免疫抗体蛍光反応は 7 日後から 28 日後まで PRF 膜上に認められたが、時間経過とともに反応は減弱していった。

これらの実験結果が、論文中に明確に記載されていることを確認した。

Discussion においては、現在患者自身からの血液から調整した PRF の生体材料としての利点、PRF の歯科領域での臨床応用、本研究における実験動物の選択、in vitro における PRF の安定性に

関する研究、PRF を抜歯窩に適用した場合の治癒促進効果に関する研究について、研究結果に基づいて論理的に考察がおこなわれていることを確認した。

本研究において、PRF は組織の再生を促進するが、臨床応用する場合には PRF の分解速度について考慮する必要があること、組織再生のスペースを確保する遮断膜として PRF 膜を使用することは非常に難しいことが示唆された。

患者自身の末梢血から調整することが可能であり、組織再生促進効果が期待できる生体材料として PRF が注目され、現在盛んに臨床で用いられている。PRF の生体内での安定性について明らかにした本研究は、PRF を臨床応用についての重要な情報を提供しており、歯科臨床医学の発展に大きく貢献すると考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中村 圭喜 |
| 論文審査担当者 | 主査　興地 隆史<br>副査　川口 陽子　　高橋 英和 |
| 論　文　題　目 | Effects of experimental pastes containing surface pre-reacted glass ionomer fillers on inhibition of enamel demineralization |

（論文内容の要旨）

フッ化物含有ペーストによるブラッシングがう蝕の発生を低下させることが知られている。フッ化物を配合したバーニッシュやジェルの脱灰エナメル質への局所塗布も治療法として確立しており、脱灰エナメル質の再修復や酸暴露に抵抗する効果をもたらす。これまでにフッ化物が酸によるエナメル質のミネラル喪失を減少させることがin-vitro及びin-situの研究によって示されている。

近年、surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG)フィラーが開発されている。これは、フルオロボロアルミノシリケートガラスとポリアクリル酸の酸塩基反応によって生成されたものであり、ボンディング材、シーラント材、コンポジットレジンなどの歯科材料に応用されている。これらの材料はaluminium (Al)、boron (B)、fluoride (F)、sodium (Na)、silicon (Si)、strontium (Sr)などのイオンを中性あるいは酸性環境下で放出する。

マイクロ CT は、試料を非破壊で三次元的に画像構築ができ、歯科においてはエナメル質や象牙質の脱灰、再石灰化の評価に有用であることが示され、脱灰エナメル質の定量的評価にも使用されてきた。また PIXE (Particle induced X-ray emission) は、励起された陽子によって発生する特性 X 線を用いて元素分析を行う装置である。マイクロ PIXE は、試料表面にミクロンサイズに絞ったビームを照射しスキャンすることにより、高空間解像度および高感度に元素分布の画像を得ることができる。PIXE は種々の硬・軟組織に含まれている重元素の分布を解析することに用いられている。

本研究の目的は、S-PRG フィラー含有試作ペーストによるエナメル質の脱灰抑制効果についてマイクロ CT、SEM、マイクロ PIXE を用いて評価することである。

＜材料と方法＞

抜歯後凍結保存された牛歯歯冠部から精密低速切断機(Isomet、Buehler)を用いて 3 ×3 ×2 mm の象牙質を含むエナメル質ブロックを切り出した。エナメル質表面は#600-2000 耐水研磨紙(Fuji Star、Sankyo Rikagaku)を用いて研削した後、ネイルバーニッシュ(680、Revlon)を塗布して 2 ×2 mm の処理面を規定した。次にマイクロ CT 撮影の基準孔(直径 1mm、深さ 0.5mm)をダイヤモンドバー(440SS ISO # 010、Shofu)を用いて作製し、試料総数は 70 個として以下の 7 群に分けた。すなわ

ち、コントロールとして脱イオン水 (Direct-Q、Millipore) (DW)と、950ppm NaF 含有ペースト(メルサージュプラス、Shofu) (MP)とを用い、試作ペーストは、S-PRG フィラーを各々0、1、5、10、30 wt%を含む 5 種(S00、S01、S05、S10、S30)を調製して用いた。各ペーストは、脱イオン水と重量比で 3 倍希釈してスラリーとして使用した。

試料は、スラリー中に 1 日 2 回、1 回 5 分間浸漬した後、脱イオン水で 10 秒間洗浄し、37℃の恒温槽に保存した。この処理を 4 日間行った後、マイクロ CT (InspeXio SMX-100CT、Shimadzu)にて撮影した。さらに試料を 10ml の脱灰液(pH 4.5)に浸漬して 3 日間脱灰させ、再びマイクロ CT 撮影を行い、脱灰した試料のミネラル密度を求めた。

マイクロ CT 撮影には、ビームハードニング効果補正のため、0.2mm の真鍮フィルターを使用した。得られたデータは、3D ソフトウェア(TRI/3D-BON、Ratoc)を用いて 8.1μm ピクセル、解像度 512×512 ピクセルで 3D データを構築した。各試料のミネラル喪失量(ML)は、脱灰前後のミネラル密度(MD)から算出した。

エナメル質表面の脱灰前後の表面を SEM 観察するため、試料を上記と同様の条件で処理し、SEM (JSM-5310LV、JEOL)にて 3500 倍で観察した。

マイクロ PIXE 観察には、S10 群及び DW 群の脱灰前後の試料を用いた。試料を注水下で精密低速切断機(Isomet)にて処理面の中央部を垂直に切断して 0.5 × 3 × 2 mm の切片を作製した。次に切断面をアルミナ耐水研磨紙(Lapping paper、3M ESPE)にて研磨した。マイクロ PIXE 測定では、加速させた陽子線(3.0 MeV、直径 2 μm)を試料表面及び割断面に照射してスキャンした。発生した特性 X 線を Si (Li) 検出器と CdTe 検出器を使用して検出し、元素分布と特性 X 線スペクトルを解析した。

得られたデータは、one-way ANOVA 及び Tukey 検定にて有意水準 5%で統計学的に解析を行った。

＜結果＞

マイクロ CT による MD プロファイルの解析結果から、DW 群では約 100μm の最も顕著な脱灰が認められ、S00 群と S01 群も DW 群と同様の脱灰パターンを示した。一方、S05 群と S30 群は DW 群と比べて脱灰量は少なく、S10 群において最も低い脱灰量を示した。MP 群は DW 群と S30 群の中間的な脱灰パターンを示した。

ML において、S00、S01、DW 群は高い値を示した。一方、S05、S10、S30 群は、S00、S01、DW 群と比較して有意に低い脱灰量を示した($p<0.05$)。しかし、S10 群と S05、S30 群との間に統計学的な有意差は認められなかった。MP 群は S10 群と比較して有意に大きな値を示した($p<0.05$)が、S10 を除く他の群との間に有意な差は認められなかった。

エナメル質表面の SEM 観察の結果、脱灰前の全ての群においてエナメル質表面にスメア層が観察されたが、S00、MP、DW 群の脱灰後の試料においてはエナメル小柱が観察された。S10 群においては脱灰後においてもエナメル小柱の露出は観察されず、研削傷が観察された。

マイクロ PIXE の結果、DW 群と S10 群でエナメル質表面における Ca の分布は同一であり差は認められなかった。一方、Sr の分布では S10 群は DW 群より多く存在する傾向が認められた。さらに S10 群の割断面の解析結果から、脱灰前後において Ca の分布に差は認められなかったが、

Sr は脱灰前のエナメル質表層において Sr の集積を認め、脱灰後に消失した。

＜考察＞

本研究においては、口腔内で使用することを想定し、0-30 wt% S-PRG フィラー含有ペーストを３倍に希釈したスラリーを使用し、エナメル質脱灰抑制効果を調べた。

マイクロ CT より得られた MD プロファイルからエナメル質の脱灰は各群によって異なり、DW 群で最も高い脱灰量を示し、5 wt% 以上の S-PRG フィラーを含む場合により大きな脱灰抑制効果を示すことがわかった。S10 群は MP 群よりも高い脱灰抑制効果を示した一方で、S30 群が S10 群に比べて高い脱灰抑制効果を示さなかったのは、S30 群のペーストの粘度が高く、歯面上でのイオン交換が緩徐であったためと考えられる。

エナメル質の脱灰後の SEM 像は各群で異なっており、特に S10 群においては他群と異なり、脱灰によるエナメル小柱の構造が認められなかったことから S10 群の脱灰抑制効果が明らかであり、これはマイクロ CT の結果とも一致するものである。

S-PRG フィラーは、フルオロボロアルミノシリケートガラスとポリアクリル酸との酸塩基反応によって生成され、6 種類のイオン(Al、B、Na、Si、Sr、F)を徐放することが知られている。脱イオン水に溶け出した S-PRG フィラーからの F は、約 90 ppm であるとの報告がある。この濃度は、F 徐放量としては予想に反して少ない。したがって、本研究における S-PRG フィラー含有ペーストの脱灰抑制効果は F のみによる効果ではなく、S-PRG フィラーから徐放される多種のイオンの効果によるものであることが示唆された。

マイクロ PIXE によるエナメル質処理面の元素分析の結果から、S10 の試料においては Sr が脱灰前のエナメル質表面に集積しており、脱灰後には消失していることが観察された。Sr は Ca の同族元素であり、F と結合し石灰化を促進すると考えられ、Sr の存在するアパタイト表面で Ca-Sr 複合体を生成し、この複合体が酸による溶解を阻止する重要な働きを有するとの報告もある。本研究結果よりエナメル質表面に蓄積した Sr がエナメル質の脱灰抑制効果に役割を果たした可能性も考えられる。

本研究結果は、S-PRG フィラー含有ペーストが酸暴露からエナメル質表面を保護する可能性を示すものである。今後、S-PRG フィラーから放出される多種類のイオンがエナメル質と象牙質の脱灰・再石灰化に及ぼす効果を検討する必要がある。

＜結論＞

マイクロ CT と SEM を用いた解析によって、S-PRG フィラー含有ペーストがエナメル質の脱灰抑制に効果的であることが明らかとなった。さらにマイクロ PIXE 解析から 10 wt% S-PRG フィラーを含むペーストにて処理したエナメル質表面に Sr の集積が認められ、Sr がエナメル質脱灰抑制に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5447　号 | 中村 圭喜 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　興地 隆史<br>副　査　川口 陽子　　高橋 英和 | |
| 論 文 題 目 | Effects of experimental pastes containing surface pre-reacted glass ionomer fillers on inhibition of enamel demineralization | |

（論文審査の要旨）

フッ化物配合の歯面研磨用ペースト、バーニッシュ、ジェルなどの臨床応用が進められており、脱灰エナメル質の再石灰化や耐酸性の向上が報告されている。近年開発された surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG)フィラーは、フルオロボロアルミノシリケートとポリアクリル酸との酸塩基反応により生成され、コンポジットレジン、ボンディング材、フィッシャーシーラントなどの様々な歯科材料に応用されている。S-PRG フィラーからは 6 種類のイオンが放出され、これらのイオン徐放によるう蝕抑制効果が期待されている。

本研究は、濃度の異なる S-PRG フィラー配合ペーストを試作し、そのエナメル質表面に対する脱灰抑制効果について検討したものである。治療用材料でなく、ホームケアによる歯質耐酸性向上を図る試みとして、新規性のある研究である。

実験に用いたペーストは、S-PRG フィラーを 0、1、5、10、30 wt%含む 5 種類の試作ペースト(それぞれ S00、S01、S05、S10、S30)、脱イオン水(DW)、NaF として 950ppmF 含有ペーストであるメルサージュプラス(松風、MP)であり、臨床的な視点だけでなく材料学的にも考慮された材料選択である。ペーストの使用は口腔内の唾液の存在下で使用することを想定し、重量比で各ペーストを 3 倍希釈して使用しており、臨床応用を考慮した条件設定がなされている。各種処理後のエナメル質試料に対しては、う蝕を想定した人工脱灰液を用いて脱灰しており、これも妥当な方法である。

脱灰前後の各試料は、マイクロ CT を用いて非破壊的に 3 次元観察し、ミネラル密度プロファイルからミネラル喪失量を算出しており、従来の評価法を踏襲しながらも、脱灰前後のエナメル質表層の形態変化の SEM 観察に加えて、マイクロ PIXE による微量元素分析を行っている。S-PRG フィラーから放出される微量元素の影響を評価するための適切な分析法であり、高く評価できる。得られた結果の統計処理も適切になされている。

本実験から得られた主な結果は以下のとおりである。

1．マイクロ CT 解析の結果、S05、S10 および S30 群は、S00、S01 および DW 群と比較し有意に低い脱灰量を示し、S10 群が最も低い脱灰量を示した($p<0.05$)。

2．MP 群は S10 群と比較して有意に脱灰量が多かった($p<0.05$)。MP 群と他の群とでは有意

差は認められなかった。

３．SEM 観察では、脱灰後にエナメル小柱が S00、MP および DW 群で観察された。S10 群では、脱灰後に研削傷が観察され、エナメル小柱は観察されなかった。

４．マイクロ PIXE 観察では、スラリー処理後のカルシウム(Ca)の分布は DW および S10 群で同程度であり差はなかった。一方、ストロンチウム(Sr)の分布は S10 群でエナメル質表層に DW 群より多く分布している傾向を示した。また、縦断面観察において S10 群の脱灰前後における Ca の分布に差はなかった。Sr はスラリー処理後の表層においてその集積を認めたが、脱灰後に消失した。

S-PRG フィラー含有ペーストの中で S10 群が最も高い脱灰抑制能を示す一方で、より高濃度の S-PRG フィラーを含む S30 群では S10 群に比べて脱灰されやすいことについては、S30 群ではペーストの粘度が高く、エナメル質表層でのイオン交換率が低くなり、脱灰抑制に不利となったとしている。SEM 観察の結果も S10 群の高い脱灰抑制効果を裏付けており、説得力のある考察となっている。さらにマイクロ PIXE を用いてコントロール群と S10 群との脱灰前後のエナメル質表層の元素分布を比較しており、S10 群処理エナメル質表面に S-PRG フィラー由来と考えられる Sr イオンの集積を確認していることは新規性のある知見である。さらに脱灰によって Sr が消失していることから、Sr と Ca とから複合体が生成され、耐酸性向上に寄与したと考察している。

以上のように本研究は、S-PRG フィラー含有ペーストの塗布が、エナメル質の耐酸性を向上させて脱灰抑制効果を有することを明らかにした。さらにその効果についてミネラル密度やイオン分布を解析し、フッ素以外の微量元素による耐酸性向上効果の可能性を示したことで、脱灰抑制効果についての新たなメカニズムにつながる新知見を提示した。本研究の成果は臨床的にもきわめて有益であり、さらに新規材料の開発にも大いに貢献するものと考えられる。以上より本論文は博士　(歯学)　の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 田澤　建人 |
| 論文審査担当者 | 主査　和泉　雄一<br>副査　深山　治久　　大槻　昌幸 |
| 論　文　題　目 | Transient receptor potential melastatin (TRPM) 8 is expressed in freshly isolated native human odontoblasts |


【要旨】

冷刺激感受性陽イオンチャネルである transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) 及び transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)が 象牙芽細胞の知覚機能に重要な役割を担っている可能性がある。そこで本研究では、ヒト新鮮単離象牙芽細胞を用いて象牙芽細胞に TRPM8 および TRPA1 が発現しているかを調査した。歯髄における TRPM8 および TRPA1 の mRNA レベルでの発現を検証するために象牙芽細胞および内側歯髄組織に分け定量 PCR 解析を行ったところ、*TRPM8* mRNA は内側歯髄組織に比べ象牙芽細胞で有意に多く発現していた。*TRPA1* mRNA は象牙芽細胞、内側歯髄組織とも検出限界以下であった。新鮮単離象牙芽細胞および抜去歯の歯髄に対する免疫染色から、象牙芽細胞における TRPM8 の発現を確認できたが、TRPA1 の発現は確認できなかった。以上の結果から、象牙芽細胞が TRPM8 をタンパク、mRNA レベルで発現することが確認されるとともに、TRPM8 を介して外来冷刺激を検知している可能性が示唆された。


【緒言】

象牙質の感覚受容機構は一般に動水力学説で説明されるが、本説では説明できない事象も報告されている。そこで、別の受容機構として象牙芽細胞受容器説が提唱されている。これは、象牙芽細胞が歯髄の最外層に位置し、長い突起を象牙細管内に伸ばしていること、および、その突起に近接して一次求心神経線維終末も存在していることから、象牙芽細胞が象牙質外層からの刺激を検知し、それによって生じるシグナルを周囲の神経線維に伝播しているとする説である。近年、この象牙芽細胞受容器説を支持する知見として、歯髄幹細胞を分化誘導して得られた象牙芽細胞様細胞における複数の温度感受性 transient receptor potential (TRP)チャネルの発現が報告されている。TRP チャネルを発現する細胞は刺激受容器として機能する可能性があるため、象牙芽細胞様細胞が複数の温度刺激に対する受容器として機能し得ることが示唆される。冷刺激受容に関連する TRP チャネルとして TRP melastatin 8 (TRPM8)および TRP ankyrin 1 (TRPA1)が知られているが、ヒト象牙芽細胞様細胞を用いた従来の解析では、これらの発現様式について見解の相違がみられるため、より生体に近い状態の象牙芽細胞で解析を行うことが必要である。そこで本研究では、齲蝕や炎症の無い新鮮抜去歯から直ちに得られた新鮮単離象牙芽細胞を用いて、ヒト象牙芽細胞における TRPM8 および TRPA1 発現の有無を検証した。

【材料および方法】

矯正歯科学的理由で抜去した齲蝕のない抜去健全永久歯 8 歯を実験に使用した。免疫組織染色のため、抜去歯のうち 4 歯を歯頚部で水平に切断し、歯冠側をパラホルムアルデヒド固定、17% EDTA 脱灰後凍結切片を作成し、抗-TRPM8 抗体、抗-TRPA1 抗体および抗-nestin 抗体を用いて免疫組織染色を行った。また、象牙芽細胞の単離のため、残りの抜去歯 4 歯をセメント-エナメル境で水平に切断し、まず内側歯髄組織を一塊で摘出した。その後、適切な水圧が放出できるように作成したピペットをシリンジに接合し、リン酸緩衝生理食塩水で歯冠内側を洗い流すことにより歯冠内側象牙質に残存している象牙芽細胞を単離した。得られた新鮮単離象牙芽細胞の一部は TRPM8 および nestin に対する免疫染色に使用し、残りの新鮮単離象牙芽細胞および内側歯髄組織は RNA 抽出後 PCR 解析に使用した。PCR 解析では、象牙芽細胞関連遺伝子である *DMPI*、*DSPP*、*nestin* の発現の有無を確認し、さらに、単離象牙芽細胞と内側歯髄組織で TRPM8、TRPA1 および DMP1 の mRNA 発現量を定量 PCR にて解析した。

【結果】

新鮮単離象牙芽細胞は象牙芽細胞関連遺伝子である DMPI、DSPP、nestin の mRNA 発現を示した。また、単離象牙芽細胞は内側歯髄組織と比較して有意に高レベルに *TRPM8* および *DMP1* mRNA を発現していることが明らかになった (Mann-Whitney U test, $P<0.05$)。*TRPA1* mRNA は単離象牙芽細胞と内側歯髄組織とも検出限界以下であった。一方、単離した細胞は 100-150 μm の長い単極性の突起を有しており、TRPM8 および nestin の陽性反応像を示した。抗体吸収試験を行ったところ、単離象牙芽細胞における TRPM8 の陽性反応像の消失を認めた。また、象牙質-歯髄複合体の免疫組織染色より象牙芽細胞の体部および突起における TRPM8、nestin の発現を認めたが、TRPA1 については発現を認めなかった。

【考察】

本研究では、酵素を使用せずに機械的に象牙芽細胞を象牙質壁から単離した。単離された細胞は長い単極性の突起を有し、さらに DMP1、DSPP、nestin といった象牙芽細胞関連遺伝子の mRNA 発現を示した。以上のことから、これらの単離された細胞は形態的にも遺伝子の表現型的にも象牙芽細胞であることが確認できた。単離した象牙芽細胞を免疫染色および PCR で解析したところ、TRPM8 タンパクおよび mRNA 発現を認めた。TRPM8 タンパク発現は歯髄組織切片の免疫染色においても象牙芽細胞層に認めたため、生体に存在する象牙芽細胞も TRPM8 を発現していることが示唆された。一方、酵素を使用して単離したラット象牙芽細胞における先行論文では、*TRPM8* mRNA 発現は検出できなかったと報告されているが、これは、象牙芽細胞の単離過程で酵素処理により *TRPM8* 発現が消失する可能性、もしくはラット象牙芽細胞での *TRPM8* 発現が検出限界以下であった可能性が考えられる。本研究では内側歯髄組織においても発現量は非常に少ないものの *TRPM8* mRNA の発現を検出できたが、これには歯髄の線維芽細胞が *TRPM8* mRNA を発現していることが反映されているのかもしれない。

これまでのヒト象牙芽細胞における TRPM8 発現の有無を調べた研究は、歯髄細胞の分化誘導により作成された象牙芽細胞様細胞を使用したものしか存在せず、さらに象牙芽細胞様細胞におけ

る TRPM8 発現にも統一見解がない。具体的にはβ-glycerophosphate で分化誘導した象牙芽細胞様細胞では *TRPM8* mRNA およびタンパク発現が確認されているが、β- glycerophosphate とアスコルビン酸を用いて分化誘導された象牙芽細胞様細胞では *TRPM8* mRNA 発現は認められていない。このような相違の理由として、分化誘導を行う元となる細胞の種類が異なっている可能性、および象牙芽細胞様細胞への分化誘導方法が異なっていることによる可能性が考えられる。

TRPA1 は 17℃以下の侵害性冷刺激に対してセンサーとして働くチャネルとして知られており、マウス炎症結腸でその発現が上昇するとの報告がある。さらには、TRPA1 がヒト齲蝕歯の象牙芽細胞で強く発現していたとの報告もある。このように、組織の状態によっては TRPA1 の発現量は変化するようである。本研究では、TRPA1 発現はヒト新鮮単離象牙芽細胞、および歯髄組織には認めないという結果であったが、齲蝕や炎症がない歯を用いたため、TRPA1 が検出できるほど発現していなかったことが推測される。しかし、感染および炎症が象牙芽細胞の性質を変化させる可能性はあり、齲蝕歯の象牙芽細胞では TRPA1 発現が増加することが予想される。

一方、TRPM8 は非侵害性冷刺激（28 ºC 以下）に対するセンサーと考えられており、象牙芽細胞が TRPM8 を発現していることは象牙芽細胞が非侵害性冷刺激に対する受容器として機能することを示唆する。しかし、象牙芽細胞の受容器としての役割を証明するためには、象牙芽細胞と歯髄一次求心神経間の電気信号の伝達経路、および冷刺激後の TRPM8 チャネルの機能的活性を明らかにする必要がある。伝達経路に関しては、近年、刺激によって象牙芽細胞が神経伝達物質の 1 つである ATP を放出することが報告されており、ATP を介したシグナル伝達の可能性が示唆されている。冷刺激後における TRPM8 チャネル機能の発現を調査した研究として、カルシウムイメージングやパッチクランプ法を用いて機能解析を行ったものがあるが、それらの論文で使用された細胞は歯髄幹細胞由来の象牙芽細胞様細胞、もしくは酵素を用いて単離した象牙芽細胞である。これら細胞では細胞膜の完全性が失われていたり、生体本来の象牙芽細胞と膜の性質が異なっていたりする可能性があり、イオンチャネル機能解析には理想的ではない。本研究のように、酵素を使用せずに単離した新鮮単離象牙芽細胞はパッチクランプ法を用いたイオンチャネル解析により適している。さらには、TRP チャネルの遺伝子発現様式は生体における細胞と短期間培養した細胞でさえも異なっていることが報告されており、正確な TRP チャネル発現解析は新鮮単離象牙芽細胞のような非培養細胞で行う必要がある。以上のことから、我々のヒト象牙芽細胞の単離方法は、象牙芽細胞の非侵害性冷刺激に対する受容器としての新しい知見を明らかにすることに非常に有用であるといえる。

【結論】

ヒト健全歯から採取した新鮮単離象牙芽細胞において TRPM8 タンパク、mRNA の発現が確認されたが TRPA1 発現は認めなかった。健全な状態の象牙芽細胞は TRPM8 を介して外来冷刺激を検知するのに重要な役割を担っていることが示唆される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲第　5448　号 | 田澤　建人 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　和泉 雄一<br>副　査　深山 治久　　大槻　昌幸 | |
| 論文題目 | Transient receptor potential melastatin (TRPM) 8 is expressed in freshly isolated native human odontoblasts | |

（論文審査の要旨）

近年、歯髄幹細胞を分化誘導して得られた象牙芽細胞様細胞に複数の温度感受性 transient receptor potential (TRP)チャネルが発現していることが報告され、象牙芽細胞様細胞が複数の温度刺激に対する受容器として機能し、周囲の神経線維にシグナル伝達を行っている可能性（象牙芽細胞受容器説）が示唆されている。これまで、象牙質の感覚受容機構は一般に動水力学説で説明されてきたが、象牙芽細胞受容器説により動水力学説だけでは説明ができなかった事象も説明ができる可能性がある。象牙質感覚を誘発する刺激としては冷刺激が最も一般的であり、冷刺激受容に関連する TRP チャネルとして TRP melastatin 8 (TRPM8)および TRP ankyrin 1 (TRPA1)が知られている。これまでにもヒト歯髄幹細胞を分化誘導して得られたヒト象牙芽細胞様細胞を用いた解析により冷刺激感受性 TRP チャネル発現の有無が検証されてきたが、これらの発現様式については見解の相違がみられる。また、解析に使用された象牙芽細胞様細胞が生体内に存在している象牙芽細胞と性質を異にしている可能性が否定できないことも問題視されている。

田澤建人は、このような背景に基づき、新鮮抜去歯から酵素を使用せず単離した新鮮単離象牙芽細胞を用いることで生体により近い状態での解析が可能であるとの着想のもと、新鮮単離象牙芽細胞における冷刺激感受性 TRP チャネルの発現解析を行った。その着眼は、先行研究の問題点を明確にした上で、新たな解析方法を導入し検証しようとするものであり、象牙芽細胞の冷刺激に対する受容器としての機能を解明するうえで新規性が高いものと評価できる。

田澤建人は、矯正歯科学的理由で抜去した齲蝕のない健全永久歯を用いて冷刺激感受性 TRP チャネルの発現解析を行った。すなわち、新鮮抜去歯から新鮮単離象牙芽細胞を得たのち、免疫染色および PCR 解析により象牙芽細胞としての妥当性を評価し、さらには新鮮単離象牙芽細胞と歯髄内側組織との遺伝子発現の定量比較を行うことで、冷刺激感受性 TRP チャネル発現の組織内局在を定量評価した。加えて、歯髄組織切片の免疫組織染色による冷刺激感受性 TRP チャネル発現の評価も行った。以上の解析は、高い生物学的知識と実験技術の裏付けのもと周到かつ適切に遂行されており、高く評価できる。

本研究から、田澤建人は以下の結果を得た。

1. 新鮮単離象牙芽細胞は象牙芽細胞関連遺伝子である DMPI、DSPP、nestin の mRNA 発現を示した。また、100-150 μm の長い単極性の突起を有しており、TRPM8 および nestin の陽性反応像を示した。
2. 新鮮単離象牙芽細胞は内側歯髄組織と比較して有意に高レベルに TRPM8 および DMP1 mRNA を発現していた。一方、TRPA1 mRNA は単離象牙芽細胞と内側歯髄組織とも検出限界以下であった。
3. 象牙質-歯髄複合体の免疫組織染色より象牙芽細胞の体部および突起における TRPM8、nestin の発現を認めたが、TRPA1 については発現を認めなかった。

これらの結果から田澤建人は、以下のことを考察した。

新鮮単離象牙芽細胞における冷刺激感受性 TRP チャネルの発現様式が初めて解析されており、ヒト健全歯髄においては TRPM8 が象牙芽細胞で有意に高レベルに発現していることが高い説得力のもと示されている。象牙芽細胞における TRPA1 の発現が先行研究で認められたものの本研究では認められなかった理由としては、解析に用いられた細胞種の違いや炎症による

発現誘導の可能性などを挙げて、適切に考察している。また、本研究で採用された象牙芽細胞単離方法が、非侵害性冷刺激受容に関する機能的知見を得るうえでも有用と思われることを、本研究の今後の発展性を示すものとして明瞭に考察している。

以上のように、本論文において、田澤建人は、ヒト新鮮単離象牙芽細胞における冷刺激感受性 TRP チャネルの発現様式を明確にし、象牙質の感覚受容機構を理解する上で新規かつ有益な情報を提示した。

これらの知見は、歯科医学・医療の今後の発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | PAWAPUTANON NA MAHASARAKHAM Chantida |
| 論文審査担当者 | 主査　中島 友紀<br>副査　木下 淳博、新田 浩 |
| 論　文　題　目 | BMP-2 Enhances Lgr4 Gene Expression in Osteoblastic Cells |

（論文内容の要旨）

**Introduction**

Osteoporosis affects approximately 10% of general population and therefore, one of the most prevalent age-associated diseases in the world. Osteoporosis is a major issue in the society as major fractures in highly aged patients result in a significant mortality rate. Although prolonged negative balance between bone formation and bone resorption leads to osteoporosis and results in osteoporotic fractures, the mechanisms underlying the regulation of bone formation are still incompletely understood. Bone morphogenetic protein (BMP) plays a critical role in bone formation and many other biological events including control of the stemness of certain cells. However, BMP actions in bone still remain unknown. Leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 4 (LGR4) gene encodes an orphan receptor and its genetic features has been shown to be related to low bone mineral density (BMD) and osteoporotic fractures in genome-based studies. Therefore, we examined the effects of BMP on the expression of *Lgr4* in osteoblastic cells.

**Materials and Methods**

**Cell culture**; Osteoblastic MC3T3-E1 cells and primary calvarial osteoblasts were plated at $1x10^4$ cells/$cm^2$ and cultured in α-MEM supplemented with 10% FBS. To investigate the effects of recombinant human BMP2 (BMP) to the osteoblasts, the medium was replaced with fresh α-MEM supplemented with 0.5% FBS in the presence or absence of BMP. For combination treatment, cells were treated with vitamin D, dexamethasone, FGF2 or TGF-β1 in the presence or the absence of BMP for 24 h. To examine if the BMP induced *Lgr4* expression depends on transcriptional or post-transcritptional events, MC3T3-E1 were pretreated with β-D-6-dichloro-1-b d-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) or cycloheximide (CHX) for 1 hour, followed by BMP treatment for 24 hours.

**siRNA experiment;** MC3T3-E1 cells were cultured overnight. Then, these cells were transfected with siRNA designed to knockdown the *Lgr4 (*si*Lgr4)* or the negative control (siControl), using Lipofectamine RNAi-MAX and cultured for indicated days.

**Gene expression analysis;** Total RNAs were extracted from the cultured osteoblasts using TRIzol. Total RNA was used to synthesize complementary DNA (cDNA) using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. cDNAs of each samples and standard control were amplified using FAST SYBR Green master mix. Then, the levels of *Lgr4, Alp, Runx2, Osx, Bsp* and *β-actin* were analyzed by qRT-PCR using Step-one™ systems. The mRNA expression values were normalized against the mRNA levels of *β-actin*

**Alkaline phosphatase (ALP) activity assay;** ALP activity assay was performed on the cell lysate collected at 72 hours after BMP treatment. PNPP (p-nitophenyl phosphate) was used as a substrate. The kinetic absorption at wave length 405 nm was measured by spectrophotometer to estimate the ALP activity.

**Statistical analysis;** The statistical significance of differences between two groups was determined by Student's t-test. *P* values were less than 0.05 were considered statistically significant.

**Results**

Our *in vitro* experiments demonstrated that *Lgr4* was expressed in MC3T3-E1 cells. *Lgr4* mRNA expression was detectable on day-0, peaked on day-3, and then gradually declined until day-14. Since *Lgr4* expression was regulated time-dependently along with the differentiation status of these cells, we examined the effects of BMP on the expression of *Lgr4*. We found that BMP enhanced *Lgr4* expression on day-1 at highest level, and on day-2 and day-3 with fewer effects. BMP enhancement of *Lgr4* expression was also dose-dependent from 10 to 200 ng/ml. Similar enhancement of the *Lgr4* expression was observed in primary cultures of osteoblasts by BMP. To investigate whether BMP may regulate *Lgr4* through transcriptional or post-transcriptional events, MC3T3-E1 cells were subjected to BMP in the presence or absence of transcription inhibitor, DRB or protein synthesis inhibitor, CHX. Without the inhibitors, the *Lgr4* expression was enhanced by BMP, but this expression was totally inhibited in the presence of DRB and CHX, indicating that BMP action was part via transcriptional event and required new protein synthesis.

To understand the functional aspects of BMP enhancement of *Lgr4* expression in MC3T3-E1, we examined if siRNA transfection against *Lgr4* may affect the enhanced ALP activity by BMP. Indeed, we found that *Lgr4* knockdown resulted in the suppression of BMP-induced ALP activity, in addition to the suppression in its mRNA expression. The expression of BMP-induced *Runx2, Osx,* and *Bsp* were also suppressed by *Lgr4* knockdown. Based on ALP activity assay and gene expression analysis on a specific set of osteogenic-related genes, our results indicate that *Lgr4* was required for BMP-induced osteoblastic differentiation.

Although the *Lgr4* expression could also be regulated by other bone regulators, our data demonstrated that FGF, TGF-β, vitamin D or dexamethasone alone did not affect the baseline levels of *Lgr4* expression. However, BMP-induced *Lgr4* expression was inhibited by FGF, TGF-β and vitamin D. More importantly, dexamethasone not only suppressed the BMP-induced *Lgr4* expression, but also reversed the direction below the baseline level. Thus, BMP-induced *Lgr4* expression was the conversion points for the control by

both local and systemic regulators of osteoblasts.

**Discussion**

BMP is a critical molecule for osteoblastic activation and bone formation. However, the downstream molecules activated by BMP are still incompletely understood. We now discovered that *Lgr4* is a novel downstream molecule of BMP signaling, because its expression was enhanced by BMP. In addition, Lgr4 was required for the full anabolic action of BMP, because *Lgr4* knockdown suppressed BMP action on osteoblastic differentiation.

Since low BMD is a fundamental diagnostic criterion of osteoporosis, genetic bases for low BMD have been searched extensively. As indicated by Styrkarsdottir et al. in 2013, a strong association of a nonsense mutation of *LGR4* with pathologically low BMD and osteoporotic fractures was evidenced by whole-genome sequencing on Icelandic individuals. However, the regulation of *Lgr4* by the modulators of osteoblastic function has been unknown. Our discovery on the link between BMP and *Lgr4* pointed to the importance of this gene in bone formation especially with respect to the function of BMP.

*Lgr4* may be regulated by other regulators such as local cytokines (FGF and TGF-β) and systemic hormones (dexamethasone and vitamin D) that may be involved in bone metabolism and homeostasis of bone mass. Regarding this point, our data indicated that BMP-induced *Lgr4* expression was negatively regulated by FGF and TGF-β and vitamin D. Importantly, BMP-induced *Lgr4* expression was suppressed (even reversed) by dexamethasone. This reverse effect is interesting, since the osteoporosis is known to be a highly frequent side effect of glucocorticoid treatment. Our observations suggest that the *Lgr4* regulation by BMP is an important conversion point for the regulation by major local and systemic modulators of bone metabolism.

A previous report by Luo et al. in 2009 indicated that osteoblast differentiation during bone formation was delayed in *Lgr4*$^{-/-}$ mice. However, due to the facts that most of *Lgr4*$^{-/-}$ mice died immediately after birth, and the limited number of the survivors still exhibited multiple organ failures, the *in vivo* data was so far controversial. However, since our data indicated the BMP-induced *Lgr4* expression has important role in osteoblasts to enhance differentiation, the *in vivo* observation in *Lgr4*$^{-/-}$ mice could be reconciled by cell autonomous function of Lgr4 in osteoblasts. The possible roles of *Lgr4* in bone metabolism still need further investigation.

In summary, the *Lgr4* expressed in osteoblasts is one of the BMP targets, and is required for BMP actions to induce osteoblast differentiation. The regulation is influenced by multiple trophic factors including FGF, TGF-β, vitamin D and dexamethasone. Our findings may shed light on the unknown cellular bases of the *Lgr4* functions in osteoblasts leading to the pathogenesis of osteoporosis.

和文要旨

骨形成に重要な役割を担う BMP は、様々な下流標的分子の発現を制御する。大規模な遺伝疫学的研究から同定された *Lgr4* 遺伝子変異は、高齢者の著しい骨量低下を来すことが明らかにされ、骨代謝制御における重要性が示唆されている。そこで我々は、骨芽細胞における *Lgr4* 発現に対する BMP の影響を検討した。骨芽細胞様細胞 MC3T3E1 における *Lgr4* 遺伝子の mRNA 発現は時間依存的に変動し、BMP はその発現について、転写制御を介して増加させた。マウス頭蓋冠由来の初代培養骨芽細胞においても BMP は *Lgr4* 発現を増加させた。MC3T3-E1 の *Lgr4* を siRNA でノックダウンすると、BMP によって誘導される *Alp* の mRNA 発現は抑制され、酵素活性の評価によってその効果は確認された。FGF および TGF-β は、単独で *Lgr4* 発現に影響を及ぼさなかったが、BMP による *Lgr4* 発現上昇を減弱させた。また単独で *Lgr4* 発現に影響を及ぼさないデキサメタゾンは、BMP と共に加えることで *Lgr4* 発現上昇を低下させたが、*Alp* 発現上昇を増強した。以上の結果から、*Lgr4* 遺伝子は BMP によって制御されるとともに、BMP の骨芽細胞分化誘導に対して重要な分子であることが示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5449　号 | PAWAPUTANON NA MAHASARAKHAM Chantida |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　中島 友紀<br>副査　木下 淳博、新田 浩 | |
| 論 文 題 目 | BMP-2 Enhances Lgr4 Gene Expression in Osteoblastic Cells | |

（論文審査の要旨）

高齢化社会の進展に伴い骨粗鬆症の増加が社会的な問題となる現在、骨リモデリングに関する研究が盛んに行われている。しかし、骨形成において重要な役割をもつ分子 BMP がどのように骨芽細胞を制御し骨形成に関与しているのか、未だ不明な点は多いのが現状である。一方、近年の大規模な遺伝疫学的研究では、*LGR4* の遺伝子変異が骨密度の低下や骨粗鬆症に伴う骨折に関連する興味深い報告がなされている。

PAWAPUTANON NA MAHASARAKHAM Chantida は、骨芽細胞における *Lgr4* の役割と BMP との関係性を明らかにするため、骨芽細胞様株 MC3T3-E1 細胞およびマウス頭蓋骨由来骨芽細胞を用いた骨形成系の実験を実施した。そして、BMP が骨芽細胞の *Lgr4* 発現を介して細胞分化を促進していることを明らかにした。

本研究から、PAWAPUTANON NA MAHASARAKHAM Chantida は以下の結果を得た。

・*Lgr4* は MC3T3-E1 に発現し、BMP は濃度依存的に *Lgr4 および Alp* 発現を増強した。
・siRNA を用いた *Lgr4* ノックダウンでは、BMP による *Alp* 発現が抑制された。
・*Lgr4* ノックダウンでは、BMP によって発現増強される骨芽細胞マスター転写因子 *Runx2* や *Osx* も抑制された。
・骨形成に関与する TGF-β や VitD は BMP による *Lgr4* 発現を促進するが、デキサメタゾンは *Lgr4* 発現を抑制した。
・マウス頭蓋骨由来骨芽細胞においても BMP は濃度依存的に *Lgr4* 発現を増強した。

以上のように、本研究において PAWAPUTANON NA MAHASARAKHAM Chantida は、BMP が MC3T3-E1 細胞およびマウス頭蓋骨由来骨芽細胞において、*Lgr4* 発現を増強させ、骨芽細胞分化にポジティブに作用している可能性を見出した。

この研究成果は、BMP による骨形成を制御するメカニズムを解明するための一助となり、今後の医科および歯科分野での骨疾患制圧を目指した最先端医療の発展に貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小野里　祐佑 |
| 論文審査担当者 | 主査　渡部　徹郎<br>副査　池田　通　　渡邊　裕 |
| 論　文　題　目 | Radiosensitivity of quiescent and proliferating cells grown as multicellular tumor spheroids |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

スフェロイドモデルは部分的に腫瘍微小環境を模しており、その放射線感受性についてこれまでに多くの報告がある。しかし、技術的制約のためスフェロイド内部の静止期細胞と増殖期細胞を生きた状態で分離することは困難で、包括的な特徴付けはなされてこなかった。本研究では、細胞周期を可視化する Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator ( Fucci )システムを使用し、スフェロイド内部の静止期細胞と増殖期細胞を分離し、放射線感受性について検証することに成功した。予想に反し、照射直後にスフェロイドを分散して放射線感受性を調べると、接触効果により増殖期細胞は静止期細胞よりも放射線抵抗性を示した。静止期細胞の放射線感受性は、軽度低酸素状態(HIF-1α陽性)の影響は受けなかったが、照射後 24 時間でスフェロイドを分散すると、その放射線抵抗性は、PLD 修復により増殖期細胞の生存率と同程度まで上昇した。スフェロイド照射後の長期観察では、外層から細胞の脱落が次第に生じることでスフェロイドは徐々に縮小し、内部の静止期細胞は外側から内側に向かって増殖期への移行と脱落が進んだ。興味深いことに、照射後約 40 日でスフェロイド中心部に存在した細胞は赤色を維持して休眠状態になり、照射後 2 ヶ月以上生存し、しかも再増殖能を保持していた。Fucci システムによって、スフェロイドの放射線感受性について包括的な特徴付けを行うことに初めて成功した。これにより、腫瘍微小環境下における放射線感受性を判断する上で、照射後の細胞周期動態の重要性が示された。

＜緒言＞

細胞周期は放射線感受性に影響を与える因子であることが証明されている。また、細胞周期を停止している細胞には PLD 修復が生じることが広く認識されている。PLD 修復は増殖抑制下にある静止期細胞に対し、照射数時間後に観察される生存率上昇現象である。スフェロイドモデルには血管が存在しないが、3 次元構造、増殖期細胞と静止期細胞、低酸素領域を有するため、部分的に固形腫瘍モデルを模しているとされる。また、これまでにスフェロイドを用いて、3 次元的な細胞間の接触によって生じる接触効果と低酸素細胞分画により放射線抵抗性を示すことが報告されている。しかし、後者について、単純なスフェロイドモデルでは明確な放射線抵抗性を示

す低酸素分画は極めて小さいことも報告されている。成熟したスフェロイド外層には増殖期細胞が、内部には静止期細胞が存在していることが知られているが、技術的問題でこれらの細胞を生きたままの状態で分離することは困難であった。この技術的問題を解決するために、申請者らはFucci システムを利用した。このシステムは生きた状態のまま細胞周期を可視化することが可能であり、G1 期細胞は赤色、S/G2/M 期細胞は緑色蛍光を発する。本研究では、Fucci システムを導入したヒト舌癌細胞(SAS-Fucci 細胞)を新たに樹立し、スフェロイドを作製した。まずスフェロイドにおける放射線照射後の細胞周期動態の特徴を調べ、その特性を利用して静止期細胞と増殖期細胞それぞれを分離し、さらにそれぞれの細胞の放射線感受性をコロニー形成法で求めた。照射後、スフェロイド構造を保ったまま細胞動態の長期観察も行い、コロニー法による放射線感受性との比較も行った。

＜方法＞

レンチウイルスを用いて Fucci プラスミドを口腔癌細胞株 SAS に導入した。 Hydrocell™ 96 ウェルプレートの各ウェルに 1000 個の細胞を播種し、1 週間培養して作製したスフェロイドを解析した。10Gy 照射直後あるいは 24 時間後に Fucci の蛍光に基づいたソーティングを行い、コロニー形成法で放射線感受性を比較した。またアネロパックケンキを用いてスフェロイドを低酸素状態（酸素濃度 0.1%未満）で培養した。またアネロパックケンキを用いてスフェロイドを低酸素状態（酸素濃度 0.1%未満）で培養した。解析には、蛍光顕微鏡　BZ9000、共焦点顕微鏡 FV10i-LIV、フローサイトメーター　FACSCantⅡを用い、ソーティングには　MoFlo XDP を用いた。低酸素マーカーには HIF-1α、Pimonidazole (Pimo)を用い、S 期の細胞の指標として EdU を用いて免疫染色を行った。

＜結果＞

SAS-Fucci 細胞は、G1 期では赤色を、S/G2/M 期では緑色蛍光を示した。また、10Gy 照射後 16 時間で大半の細胞は緑色に変化し、そのピークを示した。照射後 24 時間から赤色細胞の出現が始まり、72 時間でほぼ照射前と同じ細胞動態を示した。DNA 量解析から、これは G2 アレストを反映しているものと考えられた。以上の結果より、SAS-Fucci 細胞において Fucci システムは正常に機能していることがわかった。

直径 700μm 大のスフェロイドの切片像では、外層の約 70 μm の部分には緑色細胞が多く、内部は大半が赤色細胞であった。EdU 存在下で培養し、免疫染色を行うと、外層の緑色細胞と EdU 陽性部位が一致していたが、内部の赤色細胞は EdU 陰性であった。また、内部は HIF-1α陽性、Pimo 陰性(陽性：酸素分圧 <10 mmHg=1.3%)であった。以上の結果より、スフェロイド外層は増殖期細胞が多く、内部は軽度低酸素状態であり、その大半が G0 期細胞であることが示された。さらに、照射後のスフェロイドの細胞周期動態をタイムラプスイメージングで確認した。非照射スフェロイドでは蛍光量の変化は認めなかった。増殖期細胞群に対応する底面から 25μm の位置では、照射前は赤と緑色細胞は混在していたが、照射後、緑色細胞の割合は次第に増加し、24 時間で緑色細胞の割合はピークを迎え、その後、赤色細胞が出現し 72 時間後にはほぼ照射前の状態に戻った。これは G2 アレストを反映したものと考えられた。静止期細胞が大半を占める 100μm

の位置を観察すると、照射後も内部の細胞は赤色を維持したままであった。

次に、スフェロイド外層の増殖期細胞と内部の静止期細胞の分離を試みた。照射直後の FACS では、赤色蛍光強度は低レベルから高レベルまでの分画が認められたが、24 時間後には高レベル分画のみ残存した。これは、照射後 24 時間の間に、G1 期細胞が示す低レベル分画が G2 期にシフトし、高レベル分画である G0 期細胞のみ残ったものと考えられた。そこで、静止期細胞として赤色強度の高い分画を、増殖期細胞として緑色分画をソーティングして、細胞の放射線感受性をコロニー形成法で調べた。驚くべきことに、照射直後に分離した赤色細胞の放射線感受性は単層培養系のそれとほぼ同等であった。しかし、緑色細胞は接触効果により顕著な放射線抵抗性を示した。また、照射後 24 時間で分離した赤色細胞の生存率は PLD 修復により増殖期細胞と同程度まで上昇した。酸素分圧 0.1%未満の低酸素状態で照射をすると、外層・内部の細胞はどちらも顕著な放射線抵抗性を示した。この結果から、スフェロイド内部の細胞は放射線感受性に影響を与える程の低酸素状態にはないことがわかった。　さらに、照射後のスフェロイド外層と内部の DNA 二重鎖切断(DSB)数を 53BP1 の斑点数で比較した。照射後 30 分で、多くの斑点が外層に観察されたが、内部の斑点は有意に少なかった。その後斑点数は漸減したが、内部の斑点は常に外層よりも少ない状態であった。以上の結果から、単純な DSB の初期生成量や再結合では、放射線感受性の相違を説明できないことが示された。

次に、照射後のスフェロイドの長期観察を行った。スフェロイドのサイズから、最初に G2 アレストから解除された増殖期細胞は脱落したことが分かった。静止期の細胞は外層から内部へと順次緑色へ変化して脱落し、スフェロイドは縮小した。照射後 45 日でスフェロイドの中心部は休眠状態に変化し、照射後 76 日までその構造を維持した。その後スフェロイドを単層培養系に移すと再増殖を開始し、コロニー形成能を保持していた。

＜考察＞

本研究では、接触効果は増殖期細胞にのみ生じることが示されたが、細胞周期を停止させると接触効果が減弱することが報告されており、より明確な結果が直接的に示された。また、軽度の低酸素状態は静止期細胞の放射線抵抗性に与える影響は少ないが、PLD 修復により、生存率は増殖期細胞と同程度まで上昇することがわかり、照射後の DSB の初期生成量や再結合とは単純に相関していなかった。Liu らは G0 期細胞に PLD 修復が生じるのは非相同末端結合によるもので、修復の量的効率ではなく正確度によることを報告している。スフェロイドの増殖期細胞においてのみ DSB 修復の正確さが亢進する何らかの機構が存在し、それが接触効果として発現する可能性が考えられた。また、スフェロイドの長期観察では、外層の細胞の脱落が次第に進みつつ、内部の静止期細胞が外側から順次増殖期へ移行していくことが観察された。これは外層の細胞が脱落すると、内部の細胞に再酸素化が生じ、静止期から増殖期へとシフトすることで細胞死が誘導されたと考えられた。しかし、40 日を過ぎると内部の細胞が休眠状態となり、そうした細胞は 2 ヶ月以上も生存し、再発能を保持していた。照射後、スフェロイドの構造を崩してしまうコロニー法では、こうした細胞動態は反映されないことになる。休眠状態の出現は臨床的にも認められ、癌幹細胞が関与しているとの報告もあり、治療後の腫瘍再発に大きく寄与していると考えられている。スフェロイド中心部にも癌幹細胞が存在していると考えられるが、今後さらなる研究が必

要である。

＜結論＞

本研究では Fucci システムを用いることで、スフェロイド内の静止期細胞と増殖期細胞の放射線感受性を求め、包括的なスフェロイドの放射線感受性の特徴付けに成功した。その結果、放射線感受性は、腫瘍微小環境中の細胞動態に大きな影響を及ぼすことがわかった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5450　号 | 小野里　祐佑 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　渡部　徹郎<br>副　査　池田　通　　渡邊　裕 | |
| 論 文 題 目 | Radiosensitivity of quiescent and proliferating cells grown as multicellular tumor spheroids | |

（論文審査の要旨）

近年、高精度放射線治療など様々な放射線治療の技術が発達しているが、腫瘍内部の微小環境下において、放射線照射後にどのような細胞動態の変化が起こっているのかは正確にはわかっておらず、照射後の腫瘍内の細胞動態を検証することは、更なる治療効果の向上を図るために必要であると考えられる。小野里は、Fucci のシステムを口腔扁平上皮癌細胞株 SAS に導入し、スフェロイドモデルに応用した。これまで、Fucci のシステムを口腔癌細胞に応用した報告はなく、その着眼点は高く評価できる。

EdU の取り込み程度により、スフェロイド外層は増殖期細胞が、内部は静止期細胞が多いことが示された。また、HIF-1α陽性、Pimonidazole 陰性であることからスフェロイド内部は軽度低酸素状態であることがわかった。そこでスフェロイドに 10Gy 照射をすると、増殖期細胞には G2 アレストが生じるが、内部の細胞は G0 期のまま細胞周期を停止させていることが示された。このような内部の G0 期細胞は DNA 損傷量が少なく、放射線抵抗性であると当然予想されたが、意外なことに照射直後にソーティングを行うと、増殖期細胞の方が放射線抵抗性を示していた。照射後 24 時間でソーティングを行うと、今度は静止期の細胞に生存率の上昇現象が起こり、増殖期細胞と同程度の放射線抵抗性を獲得していることが示された。これまで、スフェロイドモデルでは３次元的な接触効果により、単層培養系よりも放射線抵抗性を示すことは広く認識されていたが、小野里は、増殖期細胞にのみ接触効果が生じることを新たに示した。これは過去の、「静止期細胞では接触効果が減弱する」という報告と一致しており、本研究にでは、それをより明確に証明したことになる。また、照射後 24 時間で、静止期の細胞に PLDR が生じ、生存率が上昇することを示した。増殖期細胞は接触効果により、静止期細胞は PLDR により、内部の低酸素状態の影響をほとんど受けることなく、放射線抵抗性を獲得することを示したことは、Fucci を利用したが故に得られたユニークな知見である。増殖期細胞と静止期細胞の DSB 量を比較すると、初期の DSB 量は外層の増殖期細胞の方が多いことが示された。つまり、初期 DSB 量と生存率との結果に乖離が認められた。確かに、53BP1 斑点数で検証した初期 DSB 量には差があるが、コロニー法には最終的には正確な修復能が反映されるため、増殖期細胞においてのみ DSB 修復の正確さが亢進する何らかの機構が存在し、それが接触効果として発現するという推察は、妥当であると考えられた。照射後のスフェロイドの長期観察により、45 日を経過するとスフェロイドが休眠状態になり、さらに、その休眠状態のス

フェロイドを接着性のプレートに播種すると、再増殖能を有していたことが示された。スフェロイドの構造を崩してしまうコロニー法では、こうした細胞動態は反映されず、長期のスフェロイドの観察によって初めて判明したことであり、腫瘍微小環境がいかに放射線感受性に影響を与えるものかを如実に示す結果といえる。

口腔癌細胞株 SAS に Fucci を応用することで、スフェロイド内の静止期細胞と増殖期細胞の放射線感受性を求め、包括的なスフェロイドの放射線感受性の特徴付けに成功した本論文は、歯科医学のみならず放射線腫瘍学の発展に大きく貢献するものであり、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 八尾　香奈子 |
| 論文審査担当者 | 主査　櫻田　宏一<br>副査　木下　淳博　　大槻　昌幸 |
| 論　文　題　目 | Effect of Laser Energy and Tip Insertion Depth on the Pressure Generated Outside the Apical Foramen During Er:YAG Laser-Activated Root Canal Irrigation |

【緒言】

歯内療法の目的は、軟組織の残渣や壊死組織、根管内の微生物といった病原性物質を根管から除去し、根尖性歯周炎の予防または治療を行うことにある。根管の機械的清掃は根管内の病原性物質の除去において不可欠であるが、根管が三次元的に複雑な構造をしていることから、適切に機械的操作を行ったとしても、根管壁の大部分（20-60%）は清掃されていないことが過去の研究で示されている。そのため、根管形成後の根管洗浄は根管内に残存する病原体を根絶するために必要不可欠である。

シリンジと洗浄針を用いた従来の洗浄法（SI）は、基本的な術式として現在も臨床で広く用いられているが、その一方で、根管洗浄の有効性の向上を目的として、様々な洗浄法が開発されている。例えば受動的超音波洗浄（PUI）では、キャビテーションにより急激な蒸気泡の発生、移動と崩壊に伴う急速な圧力変化が生じるため、洗浄効果が向上すると報告されている。

近年では Er,Cr:YSGG レーザーや Er:YAG レーザー等を用いたレーザー洗浄（LAI）が開発されており、PUI 同様に LAI もキャビテーションが生じるため、高い洗浄効果が期待できると考えられている。過去の研究において、LAI は PUI や SI と比較して、根管内の根尖部削片の除去効率が同程度以上であったと報告されている。

次亜塩素酸ナトリウム溶液は、有機物溶解作用と殺菌効果を有するため、洗浄液として世界中で使用さている。しかし、次亜塩素酸ナトリウム溶液が根尖孔外へ溢出すると、根尖歯周組織に化学的損傷を与え、激痛と腫脹を引き起こすことが数多く報告されている。そのため、洗浄液の溢出に関して多くの研究がなされてきた。

LAI においても根尖孔外に洗浄液の溢出が生じたという報告がある。LAI を安全に臨床応用するためにも洗浄液の溢出に関する更なる研究が必要とされているが、Er:YAG レーザーを用いた LAI で、根尖孔外に生じる圧力を詳細に調査した研究はない。そこで本研究では、レーザーエネルギーとチップ挿入深度が LAI 時に根尖孔外に生じる圧力に及ぼす影響を検討することを目的とした。

【材料および方法】

プラスチックピペットチップ（チップ先端内径 0.4 mm、テーパー 6 %、長さ 20 mm）を模擬

根管模型として用い、根管内は蒸留水で満たした。LAI 群では、Er:YAG レーザー装置（Erwin AdvErl、モリタ）およびレーザーチップ（R200T、モリタ）を使用した。PUI 群では、超音波装置として Piezon Master 400 （EMS, Switzerland)と U ファイル（#20、松風）を使用した。SI 群では、27 ゲージ洗浄針およびシリンジを使用した。

実験 1 では、レーザーエネルギーの影響を評価するために、根管模型（n=50）を LAI 群（30, 50，70 mJ、10 pps）PUI 群、SI 群（各群=10）の 5 群に分けた。チップの先端を根尖孔から-2 mm の位置に設置し、各根管模型につき 10 回ずつ、20 秒間洗浄を行った。

実験 2 では、チップ挿入深度の影響を評価するために、LAI 群（70 mJ、10 pps）、PUI 群、SI 群に分け、さらに各群のチップの先端を根尖孔から-2，-5，-10 mm に設置し、9 群として、各根管模型につき 10 回ずつ、20 秒間洗浄を行った。

根尖孔外に生じた圧力は、模擬根管根尖部に蒸留水を満たしたチューブを介して圧力計測装置を接続し、これをアンプおよび記録装置に接続して各根管模型につきそれぞれ 10 回ずつ計測し、最大圧力（kPa）を測定した。

実験結果の統計学的解析には、一元配置分散分析および Tukey-Kramer 法を用いた。有意水準はいずれも 5%とした。

【結果】

実験 1： LAI 群は、レーザーエネルギーが大きくなると、根尖孔外に生じる圧力も大きくなることが示された。LAI (30 mJ)群は LAI (70 mJ)群に比べ、根尖孔外に生じる圧力は有意に小さかった($p$<0.05)。全ての LAI 群において、根尖孔外に生じる圧力は SI 群と比べて有意に小さかった($p$<0.05)。LAI 群と PUI 群に生じる根尖孔外の圧力を比較すると、LAI (30 mJ 、50 mJ)群では PUI 群との間に有意差はなかったが、LAI (70 mJ) 群は有意に大きかった ($p$<0.05)。

実験 2： LAI、SI、PUI 群における根尖孔外に生じる圧力は、チップ挿入深度が根尖近いほど大きくなることが示された。しかし、LAI 群間に有意差は認められなかった。チップ挿入深度が-2 mm の位置において、根尖孔外に生じる圧力は SI > LAI > PUI であった($p$<0.05)。-5 mm、-10 mm の位置において、根尖孔外に生じる圧力は、SI = LAI > PUI であった。

【考察】

LAI は、根管内に高速の水流、衝撃波を発生させ、キャビテーションを生じさせることから高い洗浄効果が期待できるが、根尖孔外への洗浄液の溢出が懸念される。そこで、本実験は LAI のチップ挿入深度、および照射出力を変化させ、根尖孔外の圧力を測定し、SI、PUI と比較検討を行った。実験 1 において、SI 群の根尖孔外に生じる圧力は LAI、PUI 群に比べ有意に大きかった。SI は洗浄針から洗浄液が押し出されることで根管内に陽圧が生じるため、他の群に比べ高い圧力が計測されたと思われる。LAI 群における根尖孔外に生じる圧力では、LAI（30 mJ）群は LAI（70 mJ）群より有意に低かった。LAI で出力 10 mJ の条件では 20 mJ の条件より溢出量がわずかに少ないという報告もあり、レーザーエネルギーは洗浄液の溢出に関係があることが示唆された。

キャビテーションは LAI と PUI で生じる共通の現象である。LAI ではチップ周囲の水の微小爆発によってキャビテーションが生じるのに対し、PUI では主に超音波振動によってキャビテーシ

ョンが生じる。そのため、LAI と PUI は、チップ周囲においてキャビテーションの減圧によって陰圧が生じると考えられる。LAI は、微小爆発およびレーザー照射によって、チップ前方へ向かう水流が生じ、PUI と比較し大きな圧力が生じた可能性がある。レーザーエネルギーの上昇が、大きな水流を引き起こしたという報告もある。そのため、本実験結果において LAI（70 mJ）群は、PUI 群と比較して有意差が生じたと考えられる。

実験 2 では、全ての群において、チップ先端が根尖孔から離れると、根尖孔外に生じる圧力は小さくなった。これは、根尖孔から離れた位置で照射したとき根尖部の水流が減少するとの報告と同様であった。一方で、チップ挿入深度が-5 mm の位置における LAI が、-1 mm の位置における PUI の洗浄効果と同程度という報告もある。LAI では PUI より浅い挿入深度で十分効果が得られること、あるいは安全性の面から浅い挿入深度で LAI を行うべきことが示唆される。

本研究結果は、LAI においてレーザーエネルギーとチップ挿入深度により根尖孔外への圧力が変化することを示している。この結果は、適切な照射条件とチップ挿入深度により、安全かつ効果的に洗浄を行える可能性を示すものである。臨床的にどの程度の溢出量で問題が生じるかは不明であるが、洗浄液の根尖孔外への圧力は可及的に低くなることが望ましい。本研究結果から、LAI は低い照射出力かつ根尖孔から離れた位置でのチップ挿入深度が推奨される。さらに、LAI は SI に比べて根尖孔外の圧力が同程度以下であり、根尖孔外への洗浄液の溢出の観点からは、LAI の安全性は SI と同等以上と考えられる。

【結論】

本実験条件下において、Er:YAG レーザーを用いた根管洗浄法（LAI）における根尖孔外に生じる圧力は、レーザーエネルギーとチップの挿入深度にかかわらず、従来の根管洗浄法（SI）と比較して小さいまたは同程度であった。しかしながら、LAI の根尖孔外に生じる圧力は、受動的超音波洗浄法（PUI）と比較して大きかった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5451　号 | 八尾　香奈子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　櫻田　宏一<br>副　査　木下　淳博　　大槻　昌幸 | |
| 論 文 題 目 | Effect of Laser Energy and Tip Insertion Depth on the Pressure Generated Outside the Apical Foramen During Er:YAG Laser-Activated Root Canal Irrigation | |

（論文審査の要旨）

根管洗浄は歯内療法における重要なステップであり、軟組織の残渣、壊死組織、根管内細菌などの病原因子を除去するために必要不可欠である。根管洗浄の術式として通常のシリンジによる洗浄（syringe irrigation；以下 SI）が現在なお頻用されているが、近年では洗浄効果の向上を目的として、受動的超音波洗浄法（passive ultrasonic irrigation；以下 PUI）、レーザー洗浄法（laser activated irrigation；LAI）などの様々な洗浄法が開発されている。LAI は、PUI と同様にキャビテーションによる蒸気泡の急激な発生、移動と崩壊に伴う急速な圧力変化が生じるため、高い洗浄効果が期待できると考えられている。

一方、根管洗浄時に留意すべき重篤な偶発症として、次亜塩素酸ナトリウム溶液の根尖孔外溢出による根尖歯周組織の化学的損傷が挙げられる。LAI においてもこの種の偶発症の発生が報告されており、その安全な臨床応用を図るためには、LAI 実施時における洗浄液の挙動や溢出動態の解析が不可欠である。

本研究では以上のような背景のもと、Er:YAG レーザーを用いた LAI において、洗浄液の根尖孔外溢出の指標として根尖孔外で生じる圧力が解析されており、その着眼は充分な意義を有すると評価される。特に、Er:YAG レーザーの照射条件を変化させつつ、また SI, PUI との差異も含めて解析した点において、充分な新規性を備えた内容となっている。

実験は模擬根管模型を使用して可及的に規格化を図った条件で行われている。また、圧力の測定は模擬根管の根尖孔外に圧力センサーを接続する独自性のある方法で行われており、微弱な圧力の相違を検出することに成功している。本論文では２つの実験が行われており、実験１ではレーザーの照射出力を、また実験 2 ではチップ挿入深度をそれぞれ三段階変化させ、さらに SI および PUI とも比較することで、LAI における照射条件の相違が根尖孔外への圧力に及ぼす影響について調べている。いずれも妥当な実験群の設定がなされるとともに、得られた結果を適切に統計処理している。

得られた主な結果は次のとおりである。

実験１

1. LAI ではレーザー出力の増加とともに根尖孔外の圧力が上昇する傾向を示し、最低出力と最高出力との間に有意差がみられた。
2. LAI で根尖孔外に生じる圧力はレーザー出力によらず SI と比べて有意に小さかった。

3. LAI を最高出力で行った場合、根尖孔外に生じる圧力は PUI より有意に大きかった。

実験２

1. LAI ではチップ挿入深度が深くなるとともに根尖孔外の圧力が上昇する傾向を示したが、挿入深度の相違による有意差は認められなかった。
2. LAI で根尖孔外に生じる圧力は、チップ挿入深度によらず PUI より有意に大きかった。
3. チップ挿入深度が最も深い条件では、LAI で根尖孔外に生じる圧力は SI より有意に小さかった。

以上のように、本研究の結果は、LAI ではレーザー出力やチップ挿入深度の相違に応じて根尖孔外への圧力が変化することを明確に示している。これに基づき、LAI は照射条件とチップ挿入深度によっては、根尖孔外への洗浄液の溢出を引き起こすことなく、効果的に根管清掃ができる可能性があると考察している。また、LAI と PUI で生じるキャビテーションについては、LAI ではチップ周囲の水の微小爆発によってキャビテーションが生じるのに対し、PUI では主に超音波振動によってキャビテーションが生じるという相違があると論述している。さらに、本研究において LAI の出力が高い場合に PUI より有意に高い圧力が計測されたことに関して、チップ周囲では LAI、PUI ともキャビテーションの減圧による陰圧が生じるが、LAI ではこれに加えて、レーザー照射時のパルス圧によりチップ前方へ向かう水流が生じているためと考察している。以上に基づき、LAI では低出力かつチップ挿入深度が浅い照射条件を推奨すべきとしている。

本研究は、 LAI の安全性について根尖孔外の圧力を測定することで検討しており、レーザーの歯内療法への適応範囲の拡大を図る上での意義は大きく、医療安全管理の面でも非常に有益な情報を提示するものであり、歯科医学・医療の今後の発展に寄与するところが大きいと考えられる。

従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 石川　陽子 |
| 論文審査担当者 | 主査　若林　則幸<br>副査　高橋　英和　　塩田　真 |
| 論　文　題　目 | The effects of post and core material combination on the surface strain of the 4-unit zirconia fixed partial denture margins |

（論文内容の要旨）

Ⅰ．緒言

歯冠が大きく崩壊した根管処置歯に対して、多くの場合支台築造が行われる。近年では歯科材料の進歩によって、鋳造支台築造に加えグラスファイバーポストを併用したコンポジットレジン支台築造も広く行われている。金属に比べコンポジットレジンは弾性係数が象牙質と近く、歯根破折のリスクが軽減されるようになった。また、ジルコニアを用いたオールセラミック修復がその審美性、生体適合性から広く使われるようになった。イットリア安定化正方晶ジルコニアは臼歯部のブリッジフレームにも適用可能であり、臨床報告においても金属フレームと同等の生存率であると言われている。ジルコニアフレームの高い弾性係数は焼き付け陶材の破折を防ぐとの報告もある。

支台築造材料、フレーム材料のそれぞれについて研究した過去の報告は多くある。支台築造材料は弾性係数が象牙質に近づけられている傾向にある一方で、ジルコニアフレームは従来から使用されているメタルフレームと比較し弾性係数が大きい。支台築造材料とフレーム材料の弾性係数の違いが応力集中に与える影響について、稲垣らは、臼歯部４ユニットジルコニアブリッジフレームにおいて小臼歯支台歯に高い表面ひずみが認められ、また鋳造支台築造はレジン支台築造に比べ表面ひずみを抑えると報告している。しかしこの報告では両支台歯に同じ支台築造様式を使用しており、支台歯それぞれの歯種に適した支台築造様式に関しては明らかになっていない。そこで本実験では、４ユニットジルコニアブリッジフレームにおいて、それぞれの支台歯に異なる支台築造様式を行った場合、応力集中を抑えるための最善な支台築造様式の組み合わせをひずみゲージ法を用いて調査することを目的とした。

Ⅱ．方法

下顎右側４ユニットブリッジを想定し、築造窩洞形成のなされた下顎右側第一小臼歯、ならびに下顎右側第二大臼歯の人工歯(B12-50-#44, B12-51-#47, Nissin)を、コンポジットレジン(Clearfil DC Core Automix ONE, Kuraray Noritake Dental Inc.)を用いて各 20 個ずつ複製した。複製した歯根は、歯間距離 18.0 mm で、小臼歯は近心に 6 °、頬側に 9 °、大臼歯近心根は近心に 14 °、舌側に 20 ° 傾斜するように仮固定した。

続いて築造体を製作するための作業用模型(New Fujirock, GC Corp.)を準備し、間接法によるグラスファイバーポスト(Clearfil fiber post #4, Kuraray Noritake Dental Inc.)併用コンポジットレジン(Clearfil DC Core Automix ONE, Kuraray Noritake Dental Inc.)支台築造体と、白金加金合金(PGA-3, 石福金属興業)を用いた鋳造支台築造体を、各支台歯でそれぞれ 10 個ずつ同一形態になるよう製作した。各築造体はコンポジットレジン製の支台歯に接着性レジンセメント(Panavia F 2.0, Kuraray Noritake Dental Inc.)にてメーカー指示に従い合着した。実験群は小臼歯にグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造、大臼歯に鋳造支台築造を行った RM 群、小臼歯に鋳造支台築造、大臼歯にグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を行った MR 群の二群(n=10)を設定した。

その後、ジルコニアフレームを製作するための作業用模型(New Fujirock, GC Corp.)を準備し、歯科用 CAD/CAM システム(Cercon smart ceramics, DeguDent)を用いて４ユニットブリッジのジルコニアフレームを製作した。ジルコニアブロックにはイットリア部分安定化正方晶ジルコニア多結晶体(Cercon base, DeguDent)を用いた。フレームはメーカー指示に従い各支台歯に接着性レジンセメント(Panavia F 2.0, Kuraray Noritake Dental Inc.)にて合着した。

ジルコニアフレームおよび歯根表面の第一小臼歯頬舌側遠心隅角、第二大臼歯頬舌側近心隅角にゲージ用セメント(CC-33A, 共和電業)を用いてロゼットゲージ(KFG-1-120-D17-11 N30C2, KFRS-02-120-D35-13 N30C2, 共和電業)を貼付した。各試料は、疑似歯根膜としてシリコン印象材(Correct Plus, Pentron Clinical)を 0.25 mm 幅で介してアクリルレジン(Palapress vario, Heraeus Kulzer)に包埋した。万能試験機(Autograph AGS-H, 島津製作所)を用い小臼歯中央、ポンティック中央、大臼歯中央に 200 N の荷重を加え、その際のひずみ量を計測した。計測された値を元に、各部位での最大主ひずみ、最小主ひずみの大きさを計算した。

得られた値をボンフェローニの方法により全体の危険率が 5%となるように調整したマンホイットニーの U 検定にて検定した。

## Ⅲ．結果

1. すべての荷重点において、大臼歯では MR 群のほうが有意に高いひずみが認められ、また小臼歯では RM 群のほうが有意に高いひずみが認められた。すなわち鋳造支台築造を行った支台歯のほうがひずみは有意に小さい値を示した。
2. すべての荷重点において、どちらの実験群においてもフレーム、歯根ともに小臼歯のほうが大臼歯に比べ有意に高いひずみが認められた。小臼歯と大臼歯間のひずみの有意差は RM 群のほうが MR 群に比べ多く見られた。

## Ⅳ．考察

支台築造様式の違いによるひずみ量を検討した結果、鋳造支台築造を行った支台歯の方が、グラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を行った支台歯に比べ、有意に低い値を示した。過去の報告では弾性係数が異なる物質の界面に応力集中は起こると言われている。白金加金合金の弾性係数はコンポジットレジンおよびグラスファイバーポストと比較すると高く、ジルコニアの弾性係数との差が小さくなっている。本実験では各支台歯に異なる支台築造を行ったが、

白金加金合金の方がジルコニアフレームとの弾性係数の差が小さいため、過去の報告にもあるようにジルコニアフレームと歯根が部分的に剛体として働くことにより、ひずみが小さくなったと考えられる。また、過去の報告と同様に、ポンティック荷重時に高いひずみが見られ、その際、支台築造様式間の有意差も最も多く見られた。これはブリッジフレームが支台歯で固定されているため、ポンティック荷重時は連結部に応力集中が起こりやすい条件下となり、弾性係数の違いから起こる物質の挙動の違いが大きくなるためであると考えられる。本実験ではひずみを抑えるために支台築造材料の弾性係数はジルコニアフレームに近いほうが望ましいという結果となったが、歯根破折を防ぐためには支台築造材料の弾性係数は象牙質に近いほうが望ましいとされている。しかし、ジルコニアと象牙質の弾性係数は大きく異なるため、支台築造材料を双方の弾性係数に近くすることは難しいと言える。支台築造様式を決定する際、残存歯質の状態、残存歯槽骨の状態等、さまざまな要因が関係し、明確な基準がないためさらなる検討が必要である。

支台歯間でひずみ量を比較すると、小臼歯のほうが大臼歯より高いひずみを示した。過去の報告では生体外でのひずみの測定では、生体内と異なり荷重下にある支台歯にひずみが限局されていた。しかし、本実験では非荷重下にある支台歯でもひずみが検出され、生体内でのひずみの測定に近いデータが得られたのは、歯槽骨、歯根膜を模倣し生体内の条件に近づけられたためであると考えられる。また、他の報告では歯槽骨の変形とともに歯根の体積もひずみに影響を与えうると言われている。大臼歯のほうが小臼歯より体積が大きく、また大臼歯は複根であるのに対し、小臼歯は単根である。歯根の形態の違いも応力分布に影響を与えると考えられる。

２つの実験群の間で、フレームと歯根を合わせた試料全体の応力分布を比較すると、RM 群のほうが MR 群に比べ小臼歯と大臼歯間の有意差は多く見られた。MR 群では、ひずみが大きくなる傾向にある小臼歯に鋳造支台築造を用い、大臼歯にグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を用いたことにより、小臼歯と大臼歯のひずみ量が近づき、試料全体で変形していると考えられる。そのため試料全体で最も高いひずみの値は MR 群の方が小さくなった。したがって、支台築造様式の組み合わせは応力分布に影響を与え、MR 群の支台築造様式の組み合わせは応力集中を減らすと考えられる。

本実験では稲垣らの論文と同様、鋳造支台築造のほうがグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造よりひずみを抑制する、という結果が得られた。本実験では両支台歯に異なる支台築造を用いた場合のみ検討しているため、小臼歯では MR 群、大臼歯では RM 群のほうがひずみは小さくなったが、稲垣らの論文では小臼歯、大臼歯ともに鋳造支台築造を行っている群のほうがひずみは小さくなった。そのため稲垣らの論文をふまえると、両支台歯に鋳造支台築造を行う組み合わせが最もひずみが小さくなると考えられる。

本実験ではジルコニアブリッジフレームを想定したが、陶材焼付冠ブリッジのメタルフレームの場合、金合金の弾性係数は Y-TZP の弾性係数より低い値を示すため、本実験よりひずみは大きくなると考えられる。しかし、鋳造支台築造体、コンポジットレジン支台築造体、フレーム材料それぞれの弾性係数の関係性や、小臼歯、大臼歯の関係性は変わらないため、本実験と同様の結果が得られると考えられる。しかし、本研究結果を踏まえた推測になるため、今後の課題としていきたい。

Ⅴ．結論

本研究結果より、臼歯部二歯欠損に対してジルコニアブリッジフレームにて補綴し、各支台歯に異なる支台築造様式を用いる場合、小臼歯支台歯に鋳造支台築造、大臼歯支台歯にグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を用いると、応力集中を抑制できることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5452　号 | 石川　陽子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　若林　則幸<br>副　査　高橋　英和　　塩田　真 | |
| 論 文 題 目 | The effects of post and core material combination on the surface strain of the 4-unit zirconia fixed partial denture margins | |

（論文審査の要旨）

近年の歯科材料の進歩により支台築造の様式は鋳造支台築造に加えグラスファイバーポストを併用したレジン支台築造が使用されるようになった。また、ブリッジに用いられる材料も金属フレームに加えジルコニア等金属不使用の材料が強度的にも使用可能になってきた。しかし、残存歯、歯周組織に対し、支台築造様式とブリッジフレーム相互の材料特性を考慮した術式は確立されていないのが現状である。

歯は機能時に変位するが、ジルコニアフレームはひずみにくいため、支台歯に応力が集中する部位が生じると支台歯の破折を引き起こす可能性がある。本研究は、４ユニットジルコニアブリッジを用いる際、それぞれの支台歯に異なる支台築造様式を行った場合、支台歯への応力集中を抑えるためにはどの様な支台築造様式の組み合わせが望ましいかを検討したものであり、この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって有意義なものと高く評価できる。

本研究は、模型実験であるが、可及的に実際の状況を再現するために、下顎右側４ユニットブリッジを想定し、築造窩洞形成のなされた下顎右側第一小臼歯、ならびに下顎右側第二大臼歯のコンポジット製人工歯を複製し、歯間距離 18.0 mm で、小臼歯は近心に６°、頬側に９°、大臼歯近心根は近心に 14°、舌側に 20° 傾斜するように、パテ状のシリコン印象材（Exafine putty type, GC Corp., Tokyo, Japan）に埋め込む形で仮固定し、間接法によりグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン支台築造体と、白金加金合金を用いた鋳造支台築造体を、各支台歯で同一形態になるよう製作している。各築造体はコンポジットレジン製の支台歯に接着性レジンセメントにて合着している。

実験群は小臼歯にグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造、大臼歯に鋳造支台築造を行った RM 群、小臼歯に鋳造支台築造、大臼歯にグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を行った MR 群の二群(n=10)を設定している。

その後、CAD/CAM にて４ユニットブリッジのジルコニアフレームを製作し、メーカー指示に従い各支台歯に接着性レジンセメントにて合着している。

ジルコニアフレームおよび歯根表面の第一小臼歯頬舌側遠心隅角、第二大臼歯頬舌側近心隅角にゲージ用セメントを用いてロゼットゲージを貼付している。各試料は、疑似歯根膜としてシリコン印象材を 0.25 mm 幅で介してアクリルレジンに包埋し、万能試験機を用い小臼歯中央、ポンティック中央、大臼歯中央に 200 N の荷重を加え、その際のひずみ量を計測している。

計測された値を元に、各部位での最大主ひずみ、最小主ひずみの大きさを計算し、得られた値をボンフェローニの方法により全体の危険率が 5%となるように調整したマンホイットニーのU 検定にて検定している。

このように、本研究方法は周到な実験計画に基づいて遂行されており、必要かつ十分で正確な結果の得られる妥当な方法といえる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. すべての荷重点において、大臼歯では MR 群のほうが有意に高いひずみが認められ、また小臼歯では RM 群のほうが有意に高いひずみが認められた。すなわち鋳造支台築造を行った支台歯のほうがひずみは有意に小さい値を示した。
2. すべての荷重点において、どちらの実験群においてもフレーム、歯根ともに小臼歯のほうが大臼歯に比べ有意に高いひずみが認められた。小臼歯と大臼歯間のひずみの有意差は RM 群のほうが MR 群に比べ多く見られた。

以上の結果から、本実験により、臼歯部二歯欠損に対してジルコニアブリッジフレームにて補綴し、各支台歯に異なる支台築造様式を用いる場合、小臼歯支台歯に鋳造支台築造、大臼歯支台歯にグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を用いると、応力集中を抑制できることが示唆されたことは高く評価できる。

このように、本論文は歯冠修復を行う際に有用な示唆を与えるものであり、歯科補綴学ひいては歯学全般の進歩、発展に寄与するところが大である。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 田上　温子 |
| 論文審査担当者 | 主査　興地　隆史<br>副査　宇尾　基弘　　三浦　宏之 |
| 論　文　題　目 | The effect of curing conditions on the dentin bond strength of two dual-cure resin cements |

（論文内容の要旨）

<緒言>

接着性レジンセメントを用いた間接法審美修復は広く普及している。レジンセメントはその高い接着性、耐摩耗性、難溶解性などの性質により、間接法審美修復において最も有効な接着材料である。一般にレジンセメントを確実に重合させることを目的として、光重合触媒と化学重合触媒の両方を含むデュアルキュア型レジンセメントが広く用いられている。しかし、光照射条件によってはデュアルキュア型レジンセメントの重合が不十分になるとの報告がある。臨床においては、光源からレジンセメントまでの距離及び修復物の光透過性の違いにより、光強度の減弱が生じる可能性がある。

従来のレジンセメントでは、化学重合触媒として過酸化ベンゾイル/第三級アミンが用いられてきたが、最近アミンを使用しない新規化学重合触媒を含有したデュアルキュア型レジンセメントが開発された。

本研究の目的は、従来の過酸化ベンゾイル/第三級アミン含有レジンセメントであるパナビア F2.0 と、アミンフリーのレジンセメントであるパナビア V5 を用いて、その重合方法の違いと修復材料の厚みが象牙質接着強さに及ぼす影響について評価することである。

<材料と方法>

使用した 2 種類のデュアルキュア型レジンセメントは、従来型デュアルキュア型レジンセメントであるパナビア F2.0 とアミンフリーのレジンセメントであるパナビア V5（いずれもクラレノリタケデンタル）である。接着前処理としてパナビア F2.0 では ED プライマーII、パナビア V5 ではトゥースプライマー（いずれもクラレノリタケデンタル）を業者指示に従って使用した。

ハイブリッド型硬質レジン（エステニア C&B、シェード DA2、クラレノリタケデンタル）を用いて、レジンディスク（直径 10 mm、厚さ 1 mm、2 mm、3 mm）を作製した。レジンディスク表面に対して 10 mm の距離から 0.15MPa で 50μm のアルミナサンドブラスト処理を 10 秒間行い、3 分間蒸留水で超音波洗浄した。ハロゲン光照射器（オプチラックス 501、デメトロン・カー）の光照射強度は、レジンディスクなし、または各レジンディスク（厚さ 1 mm、2 mm、3 mm）を介した各条件で、ラジオメーター（オプチラックスラジオメーター、デメトロン・カー）を用いて

測定した。

本研究では学内倫理審査委員会承認のもと、50 本のヒト健全抜去臼歯を使用した。まず歯冠部咬合面象牙質をモデルトリマーにて露出後、耐水研磨紙（＃600）にて研削した。重合方法とレジンディスクの厚みの違いにより、光重合条件下でレジンディスクの厚みを 0 mm（レジンディスクなし）（DC-0 群）、1 mm（DC-1 群）、2 mm（DC-2 群）、3 mm（DC-3 群）とし、さらに光照射なしの化学重合の条件でレジンディスクの厚み 3 mm（SC-3 群）の 5 群とした。また、使用するレジンセメントにより 2 群に分けて計 10 群とした。

象牙質表面は業者指示通りに接着前処理した。次に DC-0 群では、レジンセメントを塗布後、透明ストリップスを介して 10 秒間 500g 荷重後、照射器（オプチラックス 501）にて 20 秒間光照射を行った。その他の群においては、レジンディスクを 37%リン酸にて処理後、さらに表面をシラン処理した。各レジンセメントを象牙質表面に塗布後、レジンディスクを塗布して 500g 荷重後、余剰セメントを除去し、ディスクを介して 20 秒間光照射（DC-1、DC-2、DC-3 群）、または 30 分間暗所にて保管した（SC-3 群）。

各試料は 37°C 水中に 24 時間保管後、クロスヘッドスピード 1 mm/min で微小引張接着試験を行った。得られた値は two-way ANOVA 及び Tukey test を用いて有意水準 5%にて統計処理を行った。接着試験後、試料の破断面の観察を走査電子顕微鏡(SEM)で行った。破壊形態の分類は以下の通りである。A：レジンディスクとレジンセメント間の界面破壊、B：混合破壊（レジンディスクとレジンセメントの界面破壊及びレジンセメント内の凝集破壊）、C：レジンセメントの凝集破壊、D：混合破壊（レジンセメントと象牙質の界面破壊とレジンセメントの凝集破壊）、E：レジンセメントと象牙質の界面破壊、F：象牙質内の凝集破壊。

<結果>

光照射器の光照射強度は、600 mW/cm$^2$であった。一方、厚み 1 mm、2 mm のレジンディスクを介した光照射強度はそれぞれ 90、20 mW/cm$^2$と減衰し、厚さ 3 mm の場合、光照射強度は測定不能となった。象牙質に対する接着強さは、two-way ANOVA の結果より「重合条件」と「レジンセメントの種類」によって影響を受けることがわかった。また、「重合条件」と「レジンセメントの種類」の間には交互作用が認められた。レジンセメントの比較では、いずれの重合条件下においても、パナビア V5 はパナビア F2.0 に比べて有意に高い象牙質接着強さを示した。またパナビア F2.0 においては、DC-1 群と DC-2 群、DC-2 群と DC-3 群、DC-3 群と SC-3 群の間で有意差が認められた。一方、パナビア V5 においては、DC-1 群は DC-2 群、DC-3 群、SC-群 3 に比べて有意に高い接着強さを示したが、DC-2 群、DC-3 群、SC-3 群間では、有意差が認められなかった。DC-0 群においては、パナビア F2.0、パナビア V5 ともに最も高い接着強さを示した。

接着試験後の破壊形態は、DC-0 群では両レジンセメントにおいて主にタイプ C とタイプ F が観察された。一方、他の重合条件下においてはレジンセメントの種類によって破壊形態が異なる傾向を示し、パナビア F2.0 の DC-1 群では、主にタイプ E、DC-2 群と DC-3 群ではタイプ C、SC-3 群ではタイプ C が観察され、パナビア V5 では、どの群においても主にタイプ C が観察された。

<考察>

本研究の結果、重合条件とレジンセメントの種類は、象牙質接着性に影響を及ぼす重要な因子であることがわかった。これまでの研究より、コンポジットレジンやセラミックスのような半透明の修復材料の場合、材料の厚みの増加はレジンセメントへの光照射強度の減衰の原因であることが報告されている。また、光照射強度が低いほどレジンセメントの重合率が低下すると指摘されている。本研究では、ラジオメーターによる光強度の測定の結果、レジンディスクの厚みが 1 mm の場合、光照射強度は 85%減少し、厚さ 3 mm では測定不能となった。使用するラジオメーターによる光照射強度の測定値のばらつきが報告されており、正確な照射強度の測定にはパワーメーターの使用が推奨されているが、本実験で用いたラジオメーターもスクリーニングには充分に効果がある。

パナビア F2.0 を含む従来のデュアルキュア型レジンセメントは、化学重合触媒として過酸化ベンゾイル/第三級アミンの酸化還元システムを使用しているが、このシステムには 2 つの大きな欠点がある。一つは歯質に残存する酸性モノマーと過酸化物/アミン系重合開始剤による酸-塩基反応がもたらす不適合性である。パナビア F2.0 の歯面処理材である ED プライマーII は、マイルドなワンステップセルフエッチングシステムであり、歯質を酸性モノマーにより脱灰する。そのためレジンセメントが前処理した象牙質に触れると重合阻害が生じて硬化が緩徐になり、象牙質側からの水分がプライマーを介してレジンセメント側に移動する。その結果、接着面で水滴が形成されることが報告されている。これらの現象は化学重合条件における接着強さの低下の原因となる。このような知見によりパナビア F2.0 の化学重合条件における接着強さの低いことが説明できる。もう一つの欠点は、化学重合で用いられるアミンの酸化反応において生じるデュアルキュア型セメントの変色の増加である。これは、コンポジットレジンの重合反応開始に必要なアミンの酸化によるものである。一方パナビア V5 の場合、アミンフリーの化学重合触媒を用いているため、従来型のレジンセメントの欠点を改善して、化学重合条件下での接着性が向上しており、さらにレジンセメントの変色も改善されると考えられる。

パナビア F2.0 及びパナビア V5 の接着については、各々付属プライマーと組み合わせて使用することが推奨されており、重合促進材を含有するプライマーと重合開始剤を含有するレジンセメントの両者が接触することで重合開始する「touch and cure」システムが採用されている。SC-3 群におけるパナビア V5 の象牙質に対する接着強さは、パナビア F2.0 の 2 倍以上であり、破壊形態は主にレジンセメント内の凝集破壊であった。このことから、パナビア V5 ではパナビア F2.0 と比べて象牙質－レジンセメント接着界面の弱点が改善されたと考えられる。

<結論>

光照射条件は、デュアルキュア型レジンセメントの象牙質接着性に大きな影響を与えることがわかった。新規に開発されたパナビア V5 はパナビア F2.0 に比べて、光照射の有無に関わらず、高い象牙質接着強さを示すことがわかった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5453　号 | 田上　温子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　興地　隆史<br>副　査　宇尾　基弘　　三浦　宏之 | |
| 論 文 題 目 | The effect of curing conditions on the dentin bond strength of two dual-cure resin cements | |

（論文審査の要旨）

臨床における患者の審美的な要求の高まりとともに間接歯冠色修復法が広く普及している。このような歯冠色修復法の接着には一般にデュアルキュア型レジンセメントが使用されるが、その象牙質接着には光照射が必須であり、光照射が不足する条件下では十分な接着が得られないのが現状である。実際の臨床においては光源からレジンセメントまでの距離が離れていたり、修復物を介して照射した光が減弱するなどの可能性がある。従来のレジンセメントには一般に化学重合触媒として過酸化ベンゾイル/第三級アミン系が用いられてきたが、最近、アミンフリーの新たな化学重合触媒系を導入した新規レジンセメントが開発された。

このような背景のもと、学位申請者である田上は、新規デュアルキュア型レジンセメントであるパナビア V5 と従来型レジンセメントであるパナビア F2.0 を用いて、その重合方法の違いが象牙質接着強さに及ぼす影響について検討したものであり、新規性の高い研究といえる。

本実験で用いた間接法コンポジットレジンであるエステニア C&B は広く臨床で使用されており、作製したコンポジットレジンディスクの厚み（1，2，3 mm）は十分な予備実験にもとづいて規定されている。

評価項目は、微小引張接着試験と接着試験後の破断面形態の走査電子顕微鏡(SEM)観察と分類、ラジオメータを用いた光照射強度の測定であり、過去の文献や ISO 規格に基づいた適切な手法である。得られた結果に対する統計学的解析も適切であり、十分な情報と知識を背景に周到な準備の下に本研究が計画、遂行されたことが窺われる。

得られた結果は以下の通りである。

1. 光照射器の光照射強度は 600 mW/cm$^2$であったが、コンポジットレジンディスクを介した光照射強度は減衰し、厚み 1 mm では 90 mW/cm$^2$、2 mm では 20 mW/cm$^2$、3 mm では測定不可能であった。
2. 象牙質に対する微小引張接着強さは、使用するレジンセメント及び重合条件の違いにより影響を受けた。間接法コンポジットレジンディスクなしの場合、他の重合条件に比べて有意に高い接着強さを示した。さらに同一の重合条件の場合、すべての群においてパナビア V5 はパナビア F2.0 に比べて有意に高い接着強さを示した。
3. 接着試験後の破壊形態は、0 mm の群では両レジンセメントにおいて主にレジンセメントの

凝集破壊と象牙質内の凝集破壊が観察された。一方、他の重合条件においてはレジンセメントの種類によって破壊形態は異なる傾向を示した。

以上のように修復物の有無や厚みによって光照射に伴うデュアルキュア型レジンセメントの重合条件は大きく異なり、その違いはレジンセメントの象牙質接着強さに大きな影響を与えることが判明した。しかし、新規に開発されたパナビア V5 は、従来型レジンセメントであるパナビア F2.0 に比べて光照射のどの条件下においても高い接着強さを示すことがわかった。本研究で得られた知見は臨床的に非常に有益な情報であり、今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 野田 有佳里 |
| 論文審査担当者 | 主査　三浦　宏之<br>副査　興地　隆史　　宇尾　基弘 |
| 論　文　題　目 | The effect of five kinds of surface treatment agents on the bond strength to various ceramics with thermocycle aging |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

近年審美的欲求の高まりにより、審美性に優れたオールセラミック修復が、金属製修復物に代わって用いられるようになってきている。セラミック修復物を口腔内で長期間機能させるためには、レジンセメントとセラミック修復物の接着が重要であり、これまで様々な表面処理方法が開発されている。最近では、歯質だけでなくセラミック修復物も処理できる、1 液性のセルフエッチングアドヒーシブが開発され、臨床応用されているが、これらのシングルボトルの表面処理材、並びに従来のマルチボトルの表面処理材が、様々なセラミックスに対するレジンセメントの初期及び長期接着能にどのような影響を及ぼすかという報告は少ない。そこで本研究では、熱サイクル負荷後の各種セラミックスとレジンセメントの接着強さに及ぼすシングルボトルまたはマルチボトルの表面処理材の影響を、微小せん断接着試験を用いることにより比較検討した。

＜材料と方法＞

本研究では、長石系として AAA（クラレノリタケ社製）、二ケイ酸リチウム系として IPS e.max Press（Ivoclar Vivadent 社製、以下 e.max）、ジルコニア系として Lava（3M ESPE 社製）の 3 種類のセラミックスを用いた。表面処理材としては、クリアフィルフォトボンド＋ポーセレンボンドアクチベーター（クラレノリタケ社製、以下 PB）、クリアフィル SE One＋ポーセレンボンドアクチベーター（クラレノリタケ社製、以下 SO）、セラミックプライマー（クラレノリタケ社製、以下 CP）、ユニバーサルプライマー（トクヤマデンタル社製、以下 UP）、スコッチボンドユニバーサルアドヒーシブ（3M ESPE 社製、以下 SU）の 5 種を使用した。これらのうち、PB、SO、UP はマルチボトル型、CP と SU はシングルボトル型である。AAA は板状（縦 10 mm、横 10 mm、厚さ 2 mm）に築盛焼成し、セラミックス試験片を作製した。e.max はブロック状に射出成型後、板状に切り出しセラミックス試験片を作製した。Lava はブロック状に築盛焼成後、板状に切り出しセラミックス試験片を作製した。各セラミックス試験片をそれぞれ 45 枚準備し、＃1000 の耐水研磨紙にて研磨後、3 分間超音波洗浄を行った。15 秒間リン酸エッチング後水洗し、それぞれのセラミックス試験片を各表面処理材にて業者指示通りに処理した。その後、各セラミックス試験片表面に 4 つのプラスチックチューブ（直径 0.8 mm、高さ 0.5 mm）を置き、その中にレジン

セメント（クラパール DC、クラレノリタケ社製）を填入後、40 秒間光照射を行った。チューブを除去後、24 時間 37℃にて水中保管し、その後 5℃30 秒、55℃30 秒を 1 サイクルとする熱サイクルを、0、5000、10000 回行った。熱サイクル負荷後、クロスヘッドスピード 1 mm/min の条件で、微小せん断接着試験を行った。接着試料数は各実験群ともそれぞれ 12 とし、得られたデータはウィルコクソンの順位和検定とボンフェローニの補正を用い、有意水準 5%にて統計処理を行った。

＜結果＞

AAA では、PB を用いたときには、SO、CP、UP を用いたときよりも、有意に接着強さが高くなり、SU を用いたときには、SO、CP、UP を用いたときよりも、有意に接着強さが低かった。また 5000 回の熱サイクル負荷後、すべての表面処理材で有意に接着強さが低くなり、10000 回の熱サイクル負荷後では、CP と UP を用いたときには、さらに接着強さが低くなった。

e.max では、SU を用いたときには、PB、SO、CP、UP を用いたときよりも、有意に低い接着強さを示した。また 5000 回の熱サイクル負荷後、SU を用いた群では、すべてのセメントがセラミックス試験片から脱落し、PB、SO、CP、UP を用いたときには、有意に接着強さが低くなった。10000 回の熱サイクル負荷後、UP と SU を用いた群で、すべての試料でセメントがセラミックス試験片から脱落し、また CP を用いたときには、さらに接着強さが低くなった。

Lava では、UP を用いたときには、PB、SO、CP、SU を用いたときよりも接着強さは低かった。5000 回の熱サイクル負荷後、PB を除く表面処理材を用いたときには、有意に接着強さが低くなり、10000 回熱サイクル負荷後では、UP を用いたときに、さらに接着強さは低くなった。

＜考察＞

シリカ系セラミックスにおいて、γ-MPTS が加水分解、活性化することによりシロキサン結合が形成され、レジンセメントの接着強さは向上する。この反応は、酸性環境下で促進する。本実験では、PB、SO、UP は、シリカ系セラミックスに対し高い接着強さを示した。PB は、γ-MPTS を含む溶液と、酸性モノマーである MDP を含んだデュアルキュアアドヒーシブからなる。SO と UP は 2 つの溶液からなり、一方は酸性モノマー、もう一方は γ-MPTS を含む。γ-MPTS と酸性モノマーを塗布直前に混ぜることで、γ-MPTS は活性化し、セラミックス表面で有効に働いていると考えられる。一方で γ-MPTS と酸性モノマーが 1 つのボトルの中に含有されているものの、水が含まれていない CP は、AAA と e.max に対し、SO、UP と同様の接着強さを示した。この結果より、CP に含まれる γ-MPTS がセラミックス表面で有効に機能している可能性が示唆された。

SU は MDP、HEMA、γ-MPTS、水を含む、1 液性のセルフエッチングアドヒーシブである。γ-MPTS と酸性モノマー、水を 1 液に混ぜたことにより、保管期間中にボトルの中で γ-MPTS が加水分解してしまう可能性がある。本研究では、シリカ系セラミックスにおいて、SU を用いたとき、他の表面処理材に比べ低い接着強さを示し、すべての試料で界面での破壊が認められた。さらに 5000 回と 10000 回の熱サイクル負荷後、すべての試料でセメントがセラミックス試験片から脱落していた。このことから SU に含まれる γ-MPTS は、セルフエッチングアドヒーシブ中に含まれる水の存在により加水分解されて劣化が生じ、有効に働いていない可能性が示唆された。

ジルコニアセラミックスにおいて、酸性モノマーのヒドロキシ基と、ジルコニア表面のヒドロキシ基との間に、ファンデルワールス力または水素結合が形成され、高い接着強さを示すと報告されている。本研究では、リン酸モノマーの MDP を含む PB、SO、CP、SU を用いたとき、カルボン酸モノマーの Mac-10 を含む UP を用いたときよりも高い接着強さを示した。このことから MDP の方が Mac-10 よりも、ジルコニアの接着の向上に寄与している可能性が示唆された。

レジンセメントとセラミックスの接着における耐久性は、長期水中保管、または熱サイクル負荷により評価されてきた。本研究では 5000 回の熱サイクル負荷後、Lava で PB を用いたときを除き、すべての材料で接着強さは低下した。e.max では、PB、SO、CP、UP を用いた群で熱サイクル負荷の回数が増えるにつれて、接着界面での破壊が増えた。接着操作により、レジンセメントとセラミックス間に化学結合を形成するが、その後この結合は熱サイクル負荷により劣化し、接着強さが低下すると考えられる。SO と SU は HEMA と水を含む 1 液性のセルフエッチングアドヒーシブである。SO と SU では、HEMA に吸着した水を完全に除去することは出来ず、水を含んだ poly-HEMA 分子の劣化が、熱サイクル負荷中に、レジンセメントとセラミックスの接着強さの低下を引き起こすと考えられる。

本研究では、すべてのセラミックスで PB と SO を用いたときと、Lava で SU を用いたとき、熱サイクル 5000 回と 10000 回の間に有意な接着強さの差を認めなかった。一方 Lava で CP を用いたときを除き、すべてのセラミックスで CP と UP を用いたとき、熱サイクル 5000 回に比べ 10000 回の方でより接着強さが低下した。それに加え、e.max で UP を用いた群では 10000 回の熱サイクル負荷後、すべてのセメントがセラミックス試験片から脱落した。PB はシランカップリング剤とデュアルキュアアドヒーシブを混和したもので、SO と SU は光重合型アドヒーシブを利用したもので、光重合触媒を含んでいる。したがって PB、SO、SU は、レジンセメントと共に表面処理材自身も光重合したと考えられる。一方で CP と UP は重合触媒を含まないため、その重合はセメントの重合様式に依存する。この重合様式の違いが、熱サイクル負荷後の耐久性に影響を与えている可能性が考えられる。これまでの研究で、酸性環境下においては、レジンの化学重合が阻害されるという報告がある。γ-MPTS と酸性モノマーを含む表面処理材は、セラミックス／セメント界面で化学重合レジンセメントとの重合阻害を誘発し、接着安定性を低下させる可能性がある。光重合及び化学重合によるレジンセメントのセラミックスへの接着性能や、重合の挙動について、さらなる研究が必要である。

＜結論＞

本研究より、シリカ系セラミックスの AAA と e.max において、水を含んだ 1 液性セルフエッチングアドヒーシブである SU を用いたとき、マルチボトルの表面処理材である PB、SO、UP や、水を含まない 1 液性の CP を用いたときに比べて、有意に低い接着強さを示した。ジルコニア系セラミックスの Lava において、MDP を含んでいる PB、SO、CP、SU を用いたとき、Mac-10 を含む UP を用いたときに比べて、有意に高い接着強さを示した。5000 回の熱サイクル負荷後、すべてのセラミックスにおいて、どの表面処理材を用いたときも、接着強さは低くなり、10000 回の熱サイクル負荷後、重合触媒を含まない CP と UP を用いたとき、さらに接着強さは低くなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第5454　号 | 野田 有佳里 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三浦　宏之<br>副　査　興地　隆史　　宇尾　基弘 | |
| 論 文 題 目 | The effect of five kinds of surface treatment agents on the bond strength to various ceramics with thermocycle aging | |

（論文審査の要旨）

近年、金属製修復に代わって、審美性に優れたオールセラミック修復が多く用いられるようになってきている。セラミック修復物を口腔内で長期間機能させるためには、セラミックスと歯質を堅固に接着させることが重要である。そのためには歯質側だけでなく、セラミック修復物とレジンセメントとの接着も重要であり、修復物内面に対するアルミナ粒子によるサンドブラスト処理や、フッ化水素酸などの酸によるエッチング処理、シランカップリング材やリン酸モノマーなどによる化学的表面処理など、様々な処理方法が開発されている。

これまでの研究で、シリカ系セラミックスに対しては、シランカップリング材の塗布により、γ-MPTS が加水分解、活性化することでシロキサン結合が形成され、レジンセメントの接着強さが向上することが報告されている。またジルコニア系セラミックスに対しては、MDP など酸性モノマーを含む表面処理材の塗布により、酸性モノマーのヒドロキシ基とジルコニア表面のヒドロキシ基との間にファンデルワールス力または水素結合が形成されることで、レジンセメントの接着強さが向上することも報告されている。これまでの表面処理材は、使用直前に 2 液または 3 液を混和させるマルチボトルのプライマーや、アドヒーシブが開発されてきた。最近では、シングルボトルのセラミックプライマー、さらには歯質だけでなくセラミック修復物も処理できる、酸性モノマー、HEMA、γ-MPTS、水を 1 液に混ぜたシングルボトルのセルフエッチングアドヒーシブが開発され、臨床応用されている。

このような背景のもと、野田は熱サイクル負荷後の各種セラミックスとレジンセメントの接着強さに及ぼす各種シングルボトルまたはマルチボトルの表面処理材の効果について、微小せん断接着試験を用いることにより比較検討を行った。これまで、各種表面処理材が様々なセラミックスに対するレジンセメントの初期及び長期接着能にどのような影響を及ぼすかという報告は少なく、その着眼点は極めて高く評価できる。また得られた結果に対する検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことがうかがわれる。

本研究により得られた主な結果は以下の通りである。

1. シリカ系セラミックスの AAA と e.max において、水を含んだ 1 液性セルフエッチングアドヒーシブである SU を用いたとき、マルチボトルの表面処理材である PB、SO、UP や、水を含まない 1 液性の CP を用いたときに比べて、有意に低い接着強さを示した。

2. ジルコニア系セラミックスの Lava において、MDP を含んでいる PB、SO、CP、SU を用いたとき、Mac-10 を含む UP を用いたときに比べて、高い接着強さを示した。
3. 5000 回の熱サイクル負荷後、すべてのセラミックスにおいて、どの表面処理材を用いたときも、接着強さは低くなり、10000 回の熱サイクル負荷後、重合触媒を含まない CP と UP を用いたとき、さらに接着強さは低くなった。

以上の結果より、シリカ系セラミックスの AAA と e.max において、γ-MPTS と酸性モノマーを別々の容器で保管し、塗布直前に混和して活性化した γ-MPTS をセラミックス表面に塗布するマルチボトルタイプの表面処理材は、レジンセメントの接着強さの向上に寄与していることを明らかにしている。一方、水を含んだ 1 液性セルフエッチングアドヒーシブである SU の場合、保管状態においてすでに酸性環境であることから、γ-MPTS は加水分解されて劣化し、セラミックス表面で有効に働いていない可能性を示している。一方で、1 液性であるものの、水を含まない CP の場合、γ-MPTS は劣化せず、セラミックス表面上で有効に働いていると結論づけている。さらにジルコニア系セラミックスにおいて、MDP の方が Mac-10 よりも、ジルコニア表面に対する接着の向上に寄与していることも明らかにしている。また熱サイクル負荷後の耐久性にも言及しており、5000 回の熱サイクル負荷後、レジンセメントとセラミックス間に形成された化学結合が熱サイクル負荷により劣化し、接着強さが低下することを考察している。一方で、10000 回の熱サイクル負荷後、重合触媒を含まない表面処理材を用いたときに接着強さがさらに低下したことから、表面処理材とレジンセメントの重合様式が、熱サイクル負荷後の接着耐久性に及ぼす影響についての興味深い考察を加えている。

こうした結論に至るまでの考察は、得られた実験結果を適切に解釈し、材料学的な特性を十分に理解したうえで理論的な展開がなされており、申請者の本領域における十分な知識と情報を裏付けるものである。

以上のように、本研究は微小せん断接着試験を用い熱サイクル負荷後の各種セラミックスとレジンセメントの接着強さに及ぼす 5 種類の表面処理材の影響を明らかにしたものである。得られた知見は臨床的にも非常に有益な情報であり、今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 山形　優子 |
| 論文審査担当者 | 主査　三浦　雅彦<br>副査　渡部　徹郎　　山口　聰 |
| 論　文　題　目 | CD163-Positive Macrophages Within the Tumor Stroma Are Associated With Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma |

（論文内容の要旨）

１．要旨

腫瘍間質内に浸潤するマクロファージ(tumor-associated macrophage：TAM)が様々な悪性腫瘍の進展に関わっていることが報告されているが、口腔扁平上皮癌(OSCC)におけるその役割は十分には解明されていない。

舌扁平上皮癌 70 症例を用いて免疫組織化学的に検討した結果、腫瘍浸潤部での CD68/CD163/CD204 陽性 TAM の密度とリンパ節転移との間には有意な関連があることが示された。また、腫瘍浸潤部におけるリンパ管密度は頸部リンパ節転移陽性症例で有意に高値を示すこと、さらには CD163 陽性 TAM の密度が高い群で有意に上昇していることが示された。蛍光二重染色にて、70 症例中 52 症例(74.2%)で VEGF-C を産生する CD163 陽性 TAM が確認された。*in vitro* では、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株の conditioned medium の添加により、マウス単球性白血病細胞株 RAW264.7 における IL-10、 CCL22、 VEGF-A および VEGF-C の mRNA の発現が有意に上昇したが、IL-12 の mRNA の発現に変動はなかった。

口腔扁平上皮癌では CD163 陽性 TAM が VEGF-C を産生することによりリンパ管新生を促し、その結果頸部リンパ節転移が亢進していることが示唆された。

２．緒言

口腔癌は頭頸部の中でも頻度が高い悪性腫瘍であり、その大半を扁平上皮癌が占めている。その診断や治療法が進歩し治療成績は向上しているが、改善の余地もあり、新たな治療法の開発が期待される。

近年、腫瘍周囲で形成される微小環境が、腫瘍の進展や治療抵抗性の獲得などに重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている。マクロファージは腫瘍微小環境の主要な構成要素であり、とくに腫瘍浸潤部におけるマクロファージは、「腫瘍随伴性マクロファージ tumor-associated macrophage：TAM」と呼ばれている。TAM はその周囲環境からの様々なシグナルを受け M1 型、M2 型の２つのタイプに分化する。近年、種々の悪性腫瘍で認められる TAM が M2 型の性格を有していること、それらが腫瘍の浸潤・転移や患者の予後に関連していることが報告されているが、口腔扁平上皮癌における TAM の役割は十分に解明されていない。リンパ

管新生は、癌が原発巣を離れて所属リンパ節へ転移し、最終的に全身に進展していくのに重要な役割を果たしている。TAM は血管新生だけでなくリンパ管新生にも関与していることが明らかにされてきているが、OSCC における TAM とリンパ節転移との関連や、TAM によるリンパ管新生の分子メカニズムに関しては十分に解明されていない。本研究では、口腔扁平上皮癌における TAM の役割を解析し、新たな治療標的となり得るかを検討することを目的としている。

３．方法

１）東京医科歯科大学歯学部附属病院顎口腔外科において、舌扁平上皮癌と診断され手術を施行された 70 例の組織標本を用いて、腫瘍浸潤部における TAM の分布を CD68(pan-macrophage マーカー)、CD163 および CD204(ともに M2 型 macrophage マーカー)抗体にて免疫組織化学的に検討した。また、各抗体に陽性を示す TAM の密度を計測して、各密度の違いについても検討した。

２）上記１）で計測した TAM の密度を中央値で CD68/163/204-High 群、CD68/163/204-Low 群の 2 群に分類し、TAM の密度と各種臨床病理学的因子との関連について解析した。

３）各症例の腫瘍浸潤部におけるリンパ管密度を計測して、頸部リンパ節転移との関連を検討した。さらに、リンパ管密度と TAM の密度との関連についても検討した。

４）CD163 陽性 TAM についてリンパ管新生促進因子である VEGF-C の発現を、蛍光二重染色を用いて解析した。

５）ヒト口腔扁平上皮癌細胞株（HO1-N-1, HSC4）由来の conditioned medium (CM)をマウス単球性白血病由来細胞株である RAW264.7 に添加した。M2 型 TAM で高発現している IL-10、CCL22、 VEGF-A の mRNA レベルを、また M1 型 TAM で高発現している IL-12 の mRNA レベルを、それぞれ定量リアルタイム PCR 法を用いて解析した。さらに VEGF-C の mRNA レベルに関しても同様に検討した。

４．結果

１）免疫組織化学的検討から、腫瘍間質内において CD68 (中央値：73 個/mm2) , CD163(中央値 : 73 個/mm2), および CD204(中央値 : 76 個/mm2) 陽性を示す TAM が存在していることが確認された。各抗体に陽性を示す TAM の密度の中央値はほぼ同等であることから、OSCC において CD68 陽性を示す TAM のほとんどが M2 型であることが示唆された。また、TAM の大部分は腫瘍間質内に局在しており、腫瘍胞巣内に分布する TAM はごくわずかであった。

２）臨床病理学的因子との統計学的検討から、CD68-High 群では分化度において中・低分化型の割合が有意に高く、また頸部リンパ節転移率も有意に高いという結果であった。CD163-High 群では頸部リンパ節転移率が有意に高く、静脈侵襲の割合も有意に高いという結果であった。CD204-High 群では男性が有意に多く、また頸部リンパ節転移率も有意に高いという結果であった。

３）リンパ管密度は、リンパ節転移陰性症例よりも陽性症例で有意に高値であった。CD163-High 群は CD163-Low 群と比較して、リンパ管密度が有意に高値を示した。一方で、CD68 および CD204 陽性を示す TAM の密度とリンパ管密度との間に関連は認められなかった。

4）蛍光二重染色の結果、CD163 陽性 TAM において VEGF-C が高発現している割合は、70 症例中 52 症例（74.2%）であった。

5）HSC4 由来の CM によって RAW264.7 における IL-10 の発現は有意に上昇した。また、いずれの癌細胞株由来の CM でも、CCL22、VEGF-A、VEGF-C の発現は有意に上昇した。一方で、IL-12 の発現に関しては、いずれの癌細胞株由来の CM でも発現レベルに有意な変化は認められなかった。

５．考察

TAM は腫瘍間質内に存在する細胞の中でも主要な構成要素のひとつとされている。Mori らは、口腔扁平上皮癌の腫瘍浸潤部では CD80 陽性 M1 型 TAM はほとんど認められず、CD163 陽性 M2 型 TAM が大半を占めていると報告している。本研究でも、腫瘍浸潤部の CD68 陽性 TAM のほとんどは CD163/CD204 陽性であり、先の報告を支持する結果であった。

口腔扁平上皮癌において CD163 陽性 TAM の密度と腫瘍細胞の分化度やリンパ節転移との間には関連性があることが報告されている。本研究でも、CD163 陽性 TAM の密度はリンパ節転移と有意な相関を示した。また、本研究では M2 型 TAM のマーカーとして CD204 抗体も用いて検討した。Shigeoka らは食道 SCC では、CD163 よりも CD204 陽性 TAM の方が腫瘍深達度やリンパ節転移と強い相関を示すと報告している。Komohara らは、神経膠腫において CD204 陽性 TAM の密度とその組織学的悪性度との関連を報告している。肺腺癌においては、CD204 陽性 TAM は腫瘍の大きさ、腫瘍細胞の分化度、リンパ節転移に関連があると報告されている。本研究では、CD163 と同様に CD204 もまたリンパ節転移を予測するマーカーとして有用であることを口腔扁平上皮癌で初めて報告した。

リンパ節転移は患者の予後を決定する重要な因子であり、そのメカニズムを解明し制御することは患者の生存率を改善することにつながる。本研究では、リンパ節転移陽性例は陰性例と比較して、腫瘍浸潤部でのリンパ管密度が有意に上昇していることが示された。Kurahara らは同様の所見を膵癌で報告しており、さらに CD163/CD204 陽性 TAM の密度が高い群ではリンパ管密度がより高値であることも報告している。本研究でもこれらの報告と同様の結果を示した。近年、TAM が VEGF-C を産生することによりリンパ管新生に関与していると報告されている。Wu らは胃癌患者における術前 VEGF-C 血清濃度が、切除標本の TAM の密度と相関があると報告している。Moussai らは皮膚 SCC において、CD163 陽性 TAM が VEGF-C を産生している事を報告している。本研究の結果も、TAM は VEGF-C を産生しリンパ管新生に重要な役割を担っていることを示している。

TAM における VEGF-C 産生の機構は解明されていないが、本研究は口腔扁平上皮癌由来細胞株の CM が RAW264.7 細胞における VEGF-C 産生を促進させることを見出した。Zhang らは RAW264.7 細胞とマウス Lewis 細胞を共培養することで、RAW 細胞の VEGF-C 産生が促進されることを報告している。Wu らはヒト単球性白血病細胞株 THP-1 と胃癌細胞株を共培養することで、THP-1 の VEGF-C 産生が促進され、その機構に NF-κB シグナルが関与していることを報告している。Ji らは腫瘍が産生する TNF-α が TAM の VEGF-C 産生に関与していると報告している。腫瘍細胞が TAM の VEGF-C 発現を誘導する様々な因子を産生していることが示唆されるが、

その詳細の解明には今後も更なる検討が必要と考えられる。

６．結論

口腔扁平上皮癌における腫瘍微小環境内のM2型TAMは、腫瘍細胞からの刺激によりVEGF-Cを産生することでリンパ管新生を促しており、これにより頸部リンパ節転移が促進されていることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5455　号 | 山形　優子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三浦　雅彦<br>副　査　渡部　徹郎　　山口　聰 | |
| 論 文 題 目 | CD163-Positive Macrophages Within the Tumor Stroma Are Associated With Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma | |

（論文審査の要旨）

腫瘍間質内に浸潤するマクロファージ(tumor-associated macrophage：TAM)が様々な悪性腫瘍の進展に関わっていると報告されているが、口腔扁平上皮癌(OSCC)におけるその役割は十分には解明されていない。

山形は舌扁平上皮癌の手術標本について免疫組織化学的に解析し、腫瘍浸潤部における TAM の分布と臨床病理学的因子との関連を詳細に検討した。さらに、OSCC 細胞株（HO1N1, HSC-4）から精製した conditioned medium (CM)と，マウス単球性白血病細胞株 RAW264.7 を用いた in vitro の実験系を用い、口腔癌細胞が TAM に及ぼす影響を分子生物学的に解析した。この着眼点と本研究の周到な研究計画は高く評価できる。

本研究によって得られた主な結果は以下のとおりであった。

１）舌扁平上皮癌 70 症例を用いた免疫組織化学的検討から、腫瘍間質内には CD68（中央値：73 個/mm$^2$）、 CD163(中央値：73 個/mm$^2$)、 および CD204(中央値：76 個/mm$^2$) 陽性を示す TAM が存在していることが確認された。

２）TAM の密度を中央値で High 群と Low 群に分類し、各種臨床病理学的因子との関連を統計学的に解析した。CD68-High 群では分化度において中・低分化型の割合が有意に高く、また頸部リンパ節転移率も有意に高いという結果であった。CD163-High 群では頸部リンパ節転移率が有意に高く、静脈侵襲の割合も有意に高いという結果であった。CD204-High 群では男性が有意に多く、また頸部リンパ節転移率も有意に高いという結果であった。

３）腫瘍浸潤部でのリンパ管密度は、リンパ節転移陰性症例よりも陽性症例で有意に高値であった。また、CD163-Low 群に比して CD163-High 群の方が、リンパ管密度が有意に高値であった。

４）蛍光二重染色の結果、CD163 陽性 TAM において VEGF-C が高発現している割合は、70 症例中 52 症例（74.2%）であった。

５）HSC4 由来の CM によって RAW264.7 における IL-10 の発現は有意に上昇した。また、いずれの癌細胞株由来の CM でも、CCL22、VEGF-A、VEGF-C の発現は有意に上昇した。一方で、IL-12 の発現に関しては、いずれの癌細胞株由来の CM でも発現レベルに有意な変化は認められなかった。

以上の結果から山形は、OSCC における腫瘍微小環境内の M2 型 TAM は、腫瘍細胞からの刺激により VEGF-C を産生することでリンパ管新生を促しており、これにより頸部リンパ節転移が促進されていることを示した。本研究から得られた知見は、口腔癌におけるリンパ節転移の病態メカニズムを解明する上で極めて重要なものであり、今後の口腔癌の治療の発展にも大きく寄与するものと考えられ、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | NGAMSOM Supak |
| 論文審査担当者 | 主査　　樺沢 勇司<br>副査　　柴田 俊一　　山田 一郎 |
| 論文題目 | The intravoxel incoherent motion MRI of lateral pterygoid muscle: a quantitative analysis in patients with temporomandibular joint disorders |

（論文内容の要旨）

**Introduction**

The lateral pterygoid muscle (LPM), one of the masticatory muscles, consisted of the superior belly of the lateral pterygoid (SLP) and the inferior belly of the lateral pterygoid (ILP). It was known that the temporomandibular joint disorder (TMD) had a close association with LPM dysfunctions such as hyperactivity, hypoactivity or lack of muscle coordination. Several studies reported pathological changes of the LPM in patients with TMD by MRI. However, these studies were all conducted using conventional MRI.

Recently, the intravoxel incoherent motion (IVIM) MRI, one of the diffusion-weighted imaging (DWI) techniques, is widely used to investigate several diseases throughout the body by separately estimate both water diffusion and blood perfusion of the biologic tissue. Concerning the masticatory muscles, It was reported that IVIM could demonstrate increasing of blood perfusion of the masseter and the medial pterygoid muscles during clenching. However, there have been no studies to evaluate the pathological conditions of the LPM related to TMDs by IVIM.

The aims of this study were to quantitatively evaluate the LPM changes in patients with TMDs by IVIM and to correlate these values with conventional MRI findings on temporomandibular joint (TMJ).

**Materials and Methods**

*Subjects:* The protocol of this prospective MRI study received approval from the institutional review board of our university (No.1206) and written informed consent was obtained from all patients before MRI examination. Forty-five consecutive patients were registered in this study. Among them, three patients were excluded because of severe image distortions due to motion or susceptibility artifacts on the DW images.

*MRI techniques:* All MRI examinations were performed using a 3T MRI scanner with a 4-channel special purpose coil for conventional MRI, and a 16-channel head and neck coil for DWI. The conventional MRI protocol for TMJ was performed on the closed-mouth position and on the open-mouth position. After conventional MRI, 3D T1-weighted (3D T1W) images

were obtained using sampling perfection with application optimized contrasts by different flip angle evolutions (SPACE) sequence (TR/TE, 650/20 ms; number of slice, 88; FOV, 182 x 182 mm; matrix, 192 x 192 interpolated to 384 x 384; slice thickness, 0.5 mm; voxel size, 0.5 x 0.5 x 0.5 mm; iPAT, 2 (GRAPPA)). The 3DT1W images were used to select the planes showing the maximal area of the SLP and the ILP. After that, DWI data were obtained by spin-echo based single-shot echo planar imaging (EPI) (TR/TE/TI, 6800/72/250 ms; FOV, 230 x 220 mm; matrix, 92 x 88 interpolated to 184 x 176; voxel size, 1.25 x 1.25 x 3 mm; slice thickness, 3 mm without gap; Number of average, 3; iPAT, 3 (GRAPPA)). Motion-probing gradients for DWI were applied in 3-scan trace diffusion mode with 8 b values (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 s/mm$^2$).

*Evaluation of conventional MR images:* All conventional MR images were evaluated by two oral radiologists, for the articular disk displacement, the presence or absence of joint effusion, and the presence or absence of osteoarthritis. The articular disk displacement was classified into 3 categories: normal disk position; ND, anterior disk displacement with reduction; ADWR, anterior disk displacement without reduction; ADWOR.

*IVIM data analysis:* Using conventional MR images as the references to identify the contour of the SLP and ILP, the ROI was drawn by freehand to include the whole area of the SLP or ILP. After that, the ROI was superimposed on all the DW images at the same level with b values of 0 - 500 s/mm$^2$ to measure signal intensities. For both SLP and ILP, IVIM parameters were quantitatively estimated according to the IVIM model:

$S_b / S_0 = (1 - f) \exp(-bD) + f \exp[-b(D + D^*)]$

Where $S_0$ is the signal intensity at b = 0 s/mm$^2$, $S_b$ is the signal intensity at given b values (50-500 s/mm$^2$), $f$ is the perfusion fraction, $D$ is pure molecular diffusion, and $D^*$ is the diffusion coefficient for microcirculation.

The correlation of two IVIM parameters ($D$ and $f$) with conventional MRI findings on TMJs was investigated. Statistical analysis was carried out using the Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test with Bonferroni correction. A $p$ value of < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

Forty-two patients (84 TMJs) were included in this study. There were 11 males [mean age, 47.1 years; range, 25-77 years] and 31 females [mean age, 46.7 years; range, 22-78 years]. Regarding the articular disk position, MRI revealed ND, 32 TMJs, ADWR, 26 TMJs, and ADWOR, 26 TMJs. Joint effusion was found in 30 TMJs, and osseous change of condyle was found in 22 TMJs.

For SLP, the $D$ parameter was significantly higher in TMJs with osteoarthritis compared to those without (median: 0.63 x 10$^{-3}$mm$^2$/s vs 0.57 x 10$^{-3}$mm$^2$/s, p = 0.015). Whereas, the $f$ parameter in TMJs with ADWOR was significantly higher than in ND (0.40 x 10$^{-3}$mm$^2$/s vs 0.33 x 10$^{-3}$mm$^2$/s, p = 0.015). It was also significantly higher in TMJs with joint effusion than those without (0.42 vs 0.34, p = 0.016). On the other hand, for ILP, the $D$ parameter in TMJs with osteoarthritis was significantly higher than those without (0.67 x 10$^{-3}$mm$^2$/s vs 0.60 x 10$^{-3}$mm$^2$/s, p = 0.022), which was similar to the result for SLP. However, the presence of ADWR/ ADWOR or joint effusion did not increase both $f$ and $D$ parameters.

## Discussion

To our knowledge, this is the first study that quantitatively evaluated the pathological conditions of LPM in TMD patients by IVIM. In our study, the pathological changes of SLP and ILP in TMDs could be detected as alterations in the IVIM parameters. In SLP, the *f* parameter significantly increased in TMJs with ADWOR compared to ND. The increase may reflect high blood volume in the capillaries, implying inflammation of the SLP. In fact, the increase in the *f* parameter was relatively small in TMJs with ADWR. These results may also indicate that changes in the *f* parameter in SLP were related to the severity of anterior disk displacement. Regarding ILP, significant changes in the *f* parameter were not found regardless of disk position. The difference between the SLP and ILP was possibly due to the fact that only the SLP inserted into the articular disk . Finden et al. performed a quantitative analysis of LPM on conventional MRI and reported that pathological changes of SLP in patients with TMDs were shown as alterations of MR signal intensity. Further, they showed that the signal intensity of SLP increased approximately linearly with the severity of disk derangement: ND, ADWR and ADWOR. The results of those studies were consistent with ours.

Similarly to TMJs with ADWOR, an increase of the *f* parameter in SLP was found in those with joint effusion. The level of proinflammatory cytokines and cytokine receptors in synovial fluid has been reported as increased in patients with joint effusion. Further, some studies reported that the presence of joint effusion reflected synovitis and was clinically related to TMJ pain. Thus, the increase in the *f* parameter related to joint effusion was also considered as reflecting the SLP inflammation.

TMJ osteoarthritis is considered to occur in the late stage of TMDs, and clinically causes limitation of mandibular movement. Osteoarthritis induces reduction of muscle function, leading to weakening and atrophy of the muscles. Our study showed that only the *D* parameter in both SLP and ILP was significantly increased in TMJs with osteoarthritis. These results may reflect the expansion of extracellular space in LPM due to atrophic changes. An experimental study using rabbits showed that atrophic muscles were likely to have an increased apparent diffusion coefficient (ADC) value.

We consider that pathological changes of ILP may occur secondary to those of SLP. Lafreniere et al. demonstrated by electromyography that ILP function became abnormal after the loss of SLP function. Thus, pathological changes of the LPM seem to occur in both bellies, first in SLP and followed by ILP. In our study, the changes of the IVIM parameter in the early stage of TMD (without osteoarthritis) were found in SLP, but not in ILP. The parameter in ILP only changed in the later stage of TMD with bone destruction of TMJs.

Our study had some limitations. First, the severity of the clinical symptoms, including joint pain and the mouth opening limitation, were not evaluated. Further studies will be needed. Second, we obtained DW images with b values of 0 - 500 s/mm$^2$. To minimize the geometric distortion caused by susceptibility, chemical shift and N/2 artifacts, the higher b values such as 800, 1000 and 1500 s/mm$^2$ were not performed. However, it is not certain whether the DWI methods in our study were optimal to obtain the IVIM parameters of LPM.

**Conclusions**

The pathological conditions of LPM in patients with TMD may be quantitatively evaluated by IVIM. The pathological changes were more frequently found in SLP than in ILP.

[和文要旨]

IVIM (intravoxel incoherent motion)解析とは、人体内部における水分子の微小灌流および拡散現象を拡散強調 MR 像に含まれる灌流情報から分離解析する手法である。本学倫理審査委員会の承認を得て実施された本研究では顎関節症患者の外側翼突筋部の水分子の拡散および灌流を IVIM 解析によって評価し、顎関節部 MRI 所見との関連を明らかにすることを目的とした。顎関節部の MRI 検査が実施された 42 患者を対象とし、IVIM 解析を用いて外側翼突筋上頭および下頭の拡散値(D)および灌流値(f)を算出した。これらと顎関節 MR 像での診断所見との対比を行った。非復位性関節円板前方転位群では円板位置異常のない群と比較して上頭では f 値が有意に高値であった。これは炎症による筋内毛細血管の血流増加に起因するものと考えられた。一方で下頭では f 値に有意差を認めなかったが、これは上頭のみが顎関節円板に付着しているためと考えられた。joint effusion 群では上頭の f 値は有意に高値を示したが、同様の理由からと考えられる。下顎頭変形を認めた群では上頭、下頭ともに D 値は有意に高値を示した。下顎頭変形は筋の機能を低下させ、萎縮へと導くため、これによって外側翼突筋内の細胞外間隙が拡大し、結果として細胞外水拡散が増加したためと考えられた。

以上のように、本研究は顎関節症患者の外側翼突筋の病的変化を IVIM 解析によって定量的に評価できることを示すとともに、同病的変化は上頭においてより多く認められることを明らかにした。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5456　号 | NGAMSOM Supak |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　樺沢 勇司<br>副査　　柴田 俊一　　山田 一郎 | |
| 論 文 題 目 | The intravoxel incoherent motion MRI of lateral pterygoid muscle: a quantitative analysis in patients with temporomandibular joint disorders | |

（論文審査の要旨）

顎関節症の画像診断には MRI が広く利用されており、関節円板の異常や関節腔における滲出液の貯留、下顎頭や関節窩の骨変化などが明瞭に描出される。一方顎関節症は咀嚼筋、特に外側翼突筋の障害と密接に関連することが知られているが、通常の MRI 画像によって筋内部の病的変化を詳細に評価することは難しい。

IVIM (Intravoxel Incoherent Motion)イメージングは、ボクセル内の水分子の拡散と毛細血管の灌流を画像化する拡散強調 MRI の手法であり、前者は D 値、後者は f 値と呼ばれるパラメーターを用いて定量的に評価することが可能である。近年 IVIM は、脳や腹部、筋骨格系などの疾患の診断に利用され、その有用性が報告されている。NGAMSOM はこの点に着目し、顎関節症患者の外側翼突筋の評価のために IVIM イメージングを応用し、得られた結果と顎関節 MRI 所見との関連について検討を行った。本研究は顎関節症に伴う外側翼突筋の損傷を評価するための新しい画像診断法の開発を目的としたものであり、その着眼点と独創性は高く評価される。

本研究において NGAMSOM は、本学歯学部倫理審査委員会の承認のもと、臨床的に顎関節症が疑われた 42 患者を対象として、通常の顎関節 MRI 撮像に加えて、外側翼突筋の IVIM イメージングを行った。撮像後に外側翼突筋の上頭 (SLP)および下頭 (ILP)の D 値および f 値を計測すると共に、同計測値と顎関節 MRI 所見との対比を行った。以上の研究方法は明快であり、統計学的分析に関しても適切な手法が用いられている。また IVIM 解析においても、データの再現性を高めるための種々の工夫がなされており、本研究が十分な検討のもとに実施されたことが伺える。

本研究によって得られた主な結果は、以下のとおりであった。

1) 全ての対象患者の SLP, ILP について、D 値および f 値を計測することができた。

2) 非復位性関節円板障害群では、同正常群と比較して、SLP の f 値に有意な上昇が認められた。一方 ILP では、f 値の上昇は認められなかった。

3) joint effusion が見られる群では、見られない群と比較して、SLP の f 値に有意な上昇が認められた。一方 ILP では、f 値の上昇は認められなかった。

4) 顎関節の骨変化が見られる群では、見られない群と比較して、SLP と ILP の D 値に有意な上昇が認められた。

以上の結果について NGAMSOM は、非復位性関節円板障害や joint effusion が見られた症例における外側翼突筋の f 値の上昇は、炎症に伴う毛細血管の血流増加を反映するものであり、これが

SLP のみに見られた理由として、解剖学的に SLP のみが関節円板に付着しているためと考察している。更に変形性顎関節症において、外側翼突筋の D 値の上昇が見られた理由として、筋の萎縮によって細胞外間質における水分子の拡散制限が小さくなったことが考えられるとしているが、これらの考察は本研究で得られた結果を良く説明するものであり、妥当な考察であると評価される。

以上のように、本研究は顎関節症患者における外側翼突筋の障害を IVIM イメージングによって定量的に評価したはじめての研究であり、今後の歯科医学の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 永田　瑞 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　青木　和広<br>副 査　　田賀　哲也　　新田　浩 |
| 論　文　題　目 | Conditioned Medium from Periodontal Ligament Stem Cells Enhances Periodontal Regeneration |

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

歯根膜幹細胞(PDLSC)は歯根膜から単離、培養される間葉系幹細胞(MSC)様集団であり、現在 PDLSC 移植によって歯周組織が再生される報告が数多くなされている。一方、MSC 移植による組織再生のメカニズムの一つとして、移植された MSC が創傷部において放出するパラクライン因子が組織の創傷治癒を促進することが明らかとなり、MSC 培養上清の投与による組織再生も報告されている。そこで我々は、PDLSC 由来パラクライン因子を含む培養上清(PDLSC-CM)の投与によって歯周組織の組織修復が促進されるか否かをラット歯周組織欠損モデルを用いて検討した。その結果、濃縮した PDLSC-CM は歯周組織局所における TNF-αの発現抑制を介した抗炎症作用により、歯周組織再生を促進することが示唆された。本研究により、PDLSC-CM 投与は、新たな歯周組織再生療法となりうることが示唆された。

＜緒言＞

MSC は *in vitro* の分化誘導系において骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞様に分化し、間葉系組織の仮想の幹細胞とされてきた。近年、脂肪、胎盤、臍帯、歯髄、歯根膜など全身の様々な組織から骨髄由来 MSC と類似する性質を持った細胞が単離、培養可能であることが明らかとなり、各組織における組織幹細胞として創傷治癒や恒常性維持に役割を果たしていると考えられている。現在、培養した MSC を用いた組織再生治療が提唱され、多くの疾患に対して培養 MSC 移植の臨床試験が開始されているが、MSC による組織再生のメカニズムについては未だ不明な点が多く残されている。移植された MSC は局所へ定着、増殖、分化し組織を形成することが期待されるが、近年、MSC 移植による治療効果において、移植した MSC は Recipient 側へは長期間生着せず、MSC から放出されるパラクライン因子が組織再生あるいは創傷治癒促進に関与していることが明らかとなってきた。MSC のパラクライン因子による作用としては、抗炎症、抗アポトーシス、血管新生、細胞増殖促進などが知られており、パラクライン因子を含む MSC の培養液を投与することによって創傷治癒が促進することも報告されている。

歯周病は細菌感染によって引き起こされる慢性炎症疾患であり、病状の進行に伴い歯根膜、セメント質、歯槽骨などの歯の支持組織が破壊される。近年、歯周組織の恒常性や組織再生にとって重要な組織とされている歯根膜から単離される MSC である PDLSC を用いた細胞移植による歯周組織再生が注目され、これまで多くの動物実験によって PDLSC 移植が歯周組織の再生を促進することが報告されている。

我々はこれらの背景をもとに PDLSC から産生される液性因子を投与することによって歯周組織の再生が促進するのではないかと仮説を立て、PDLSC-CM 投与の歯周組織再生に与える影響を検討した。

＜方法＞

PDLSC は、健全抜去歯より回収した歯根膜組織から酵素処理法にて採取し、15%FBS 添加α-MEM 培地にて培養した。PDLSC-CM は、無血清 DMEM 中で PDLSC を 48 時間培養した後、培養上清を遠心、フィルトレーションを行い回収することにより調製した。また、培養上清の濃縮には限外濾過を行い(10 kDa 以下を分離)、濃縮倍率の異なる三種類の PDLSC-CM を作製し、それぞれ PDLSC-low(濃縮なし)、PDLSC-moderate(約 27 倍濃縮)、および PDLSC-high(約 450 倍濃縮)を作製した。対照群として、ヒト皮膚線維芽細胞培養上清(Fibroblast-CM)、無血清 DMEM のみをインキュベートした Control-CM を作製した。高さ 2 mm 幅 3 mm の実験的歯周組織欠損をラット下顎第一臼歯頬側に外科的に作製し、PDLSC-CM、Fibroblast-CM、Control-CM をそれぞれコラーゲンスポンジに含浸し欠損部に投与した。投与後 5 日における歯周組織欠損内の軟組織から total RNA を抽出し、RT-PCR を用いて遺伝子発現解析を行った。また、投与後 4 週にてラット下顎骨を回収し、マイクロ CT により歯槽骨再生の測定、ヘマトキシリン・エオシン染色、アザン染色による組織学的観察を行った。また、PDLSC-CM 中の網羅的な成分解析を目的として、Antibody array を用いて血管新生関連因子、細胞増殖因子、サイトカインに関するタンパク解析を行った。また、PDLSC-CM の抗炎症作用を検討するため、マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 細胞へ 24 時間各 CM を作用させた後、6 時間 IFN-γ刺激を行い TNF-α遺伝子発現を RT-PCR にて測定した。

＜結果＞

投与後 4 週におけるマイクロ CT 像において、PDLSC-moderate 群、PDLSC-high 群は Control-CM 群と比較し有意に露出歯根表面積が減少し、歯槽骨再生が促進された。また、PDLSC-CM(約 30 倍濃縮)は同じ間葉系細胞由来の Fibroblast-CM と比較して有意な歯槽骨再生を示した。組織学的な評価では、全ての群においてアンキローシスの所見は認められず、また歯根膜線維の走行も顕著な違いは認められなかったが、PDLSC-moderate 群と PDLSC-high 群では他の群と比較し、より高い位置まで歯槽骨再生が観察された。新生歯槽骨頂部付近の骨では、PDLSC-low 群、Fibroblast-CM 群、Control-CM 群では島状の骨片や血管の豊富な骨組織、そして骨表面に整列する骨芽細胞が多く観察されたのに対し、PDLSC-moderate 群と PDLSC-high 群では、骨細胞の取り込みが観察され骨の成熟が進んでいた。

Antibody array の結果より、PDLSC-CM 中には多種の血管新生因子、細胞増殖因子、またいくつかのサイトカインを含むことが明らかとなった。投与後 5 日での歯周組織局所における遺伝子発現を検討した結果、PDLSC-CM 投与群では Control-CM 投与群と比較し、有意に炎症性マーカーである TNF-αの遺伝子発現が抑制された。また、*in vitro* において、PDLSC-CM 添加群は Control-CM 添加群と比較し、RAW264.7 細胞の IFN-γによって誘導される TNF-αの発現を抑制した。

＜考察＞

本研究より、ラット歯周組織欠損モデルにおいて PDLSC-CM は歯周組織再生を促進することが初めて明らかとなった。これまで、MSC 培養上清を用いた歯周組織再生は、骨髄間葉系幹細胞(BMMSC)を用いた培

養上清投与が報告されている。PDLSC は BMMSC と同様に、分化能、免疫調節能などを有しているが、さらに *in vivo* においてセメント質-歯根膜複合体を形成する能力を有することが報告されている。また、イヌ歯周組織欠損モデルへの PDLSC 移植は、BMMSC 移植と比較しセメント質-歯根膜構造の形成をより促進することも報告されているが、今後 PDLSC-CM と BMMSC-CM の再生能をより詳細に検討していく必要があると思われる。

また、PDLSC-CM の投与は濃度依存的に歯周組織を再生することが明らかとなった。どのタンパク質が再生に寄与しているかは本研究より明らかにできなかったが、PDLSC-CM 中には網羅的な解析により様々なタンパク質が含まれていることが明らかとなった。今後、PDLSC-CM 中の歯周組織再生へ寄与する因子を特定するため、さらなる研究が必要である。

また組織切片より、再生量の少なかった Control-CM 群、Fibroblast-CM 群、PDLSC-low 群では、新生歯槽骨頂部において未成熟な骨が観察され、一方、再生量の多かった PDLSC-moderate 群、PDLSC-high 群では前述の 3 群より成熟した骨が認められたことから、後者ではより骨の形成が早期に進行した可能性が考えられた。これらより、PDLSC-CM は創傷治癒や組織再生の速度を速め、歯周組織再生を促進するというメカニズムが示唆された。

PDLSC-CM は、歯周組織欠損部局所また *in vitro* においてマクロファージ細胞の TNF-αの遺伝子発現を抑制した。過去に、急性肝障害モデルにおいて、MSC-CM 投与が TNF-αの遺伝子発現抑制を介し創傷治癒を促進したことが報告されている。また、ブタ歯周組織欠損へ IGFBP-5 遺伝子を強制発現させた MSC を移植した際、TNF-αの発現を抑制し、セメント質再生を促進したことも報告されている。これらの結果は、TNF-αの抑制と歯周組織再生の関連を示し、PDLSC-CM による TNF-α抑制を介した歯周組織再生の促進、という我々の知見を支持するデータとも考えられる。

PDLSC-CM 投与は、現在広く応用されている MSC 移植と比較し、幾つかの利点を持つと考えられる。特に、PDLSC-CM 投与は細胞移植を避けることができるため、腫瘍化のリスクを下げることができると考えられる。また、培養上清は保存が容易であり、臨床操作においても簡便である。さらに培養 PDLSC の移植と比較し、他家や異種の細胞を用いた臨床応用へのハードルも低いと考えられるが、今後さらなる培養上清の安全性の検証が必要となってくるであろう。

＜結論＞

本研究の結論として、濃縮した歯根膜幹細胞培養上清の投与は歯周組織再生を促進し、新たな歯周組織再生法となりうることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5457　号 | 永田　瑞 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　青木　和広<br>副 査　　田賀　哲也　　新田　浩 | |
| 論 文 題 目 | Conditioned Medium from Periodontal Ligament Stem Cells Enhances Periodontal Regeneration | |

（論文審査の要旨）

歯根膜幹細胞(PDLSC)は歯根膜から得られる間葉系幹細胞様集団であり、現在培養 PDLSC を用いた歯周組織再生治療が提唱され、PDLSC 移植によって歯周組織が再生される報告が数多くなされているが、その組織再生メカニズムについては未だ十分な解明に至ってない。永田は、間葉系幹細胞が創傷部において放出するパラクライン因子を投与すると組織の創傷治癒が促進することに着目した。間葉系幹細胞培養上清投与による組織再生も報告されていることから、永田は、PDLSC の培養上清(PDLSC-CM)にも歯周組織の組織修復能があると仮定した。

永田は、PDLSC 由来のパラクライン因子が PDLSC による組織再生のメカニズムの一つとなりうることを証明するために、ラット歯周組織欠損モデルを用いてX線学的、および組織学的な検討を加えている。その結果、ラットの歯周組織欠損を濃縮した PDLSC-CM により修復可能であることを示した。さらに、その組織修復作用が抗炎症作用によるものと仮定し、炎症性サイトカインである TNF-αの遺伝子発現が PDLSC-CM により低下することをラットの再生部位の組織とマクロファージ細胞株を用いた実験より明らかにしている。また、PDLSC-CM に含まれるパラクライン因子の解明のために、抗体アレイを用いた網羅的解析も行っている。

本実験により、永田が得た結果は主に以下の５点である。

１．PDLSC-CM の濃縮倍率に依存して、ラット歯周組織再生が促進されること、また、PDSLC-CM は線維芽細胞培養上清(Fibroblast-CM)と比較しても有意に歯周組織再生を促進することを見出した。

２．全ての投与群において歯根と骨が歯根膜を介さずに癒着するアンキローシス等の異常所見を認めず、濃縮した PDLSC-CM を投与した群では、濃縮倍率の低い群に比べてより高い位置まで歯槽骨再生が促進する。

３．網羅的なタンパク質解析により、PDLSC-CM 中には、血管内皮増殖因子、インスリン様増殖因子結合蛋白質 6 などの血管関連因子、細胞増殖因子、また単球走化性蛋白質-1 などいくつかのサイトカインが含まれることを明らかにした。

４．PDLSC-CM を投与したラットでは、歯周組織局所の TNF-α発現が有意に抑制され、また、その他の炎症性マーカーも抑制される傾向であったことを見出した。

５．PDLSC-CM は、Control-CM 群、Fibroblast-CM 群と比較し、マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 細胞の IFN-γ刺激による TNF-α発現を抑制することを見出した。

このように、永田は濃縮した PDLSC-CM が歯周組織局所における TNF-αの発現抑制を介した抗炎症作用により、歯周組織再生を促進することを明らかとし、PDLSC-CM 投与による新たな歯周組織再生療法の可能性を見出したことは評価できる。

これらの結果から永田瑞は、以下のことを考察している。

・ラット歯周組織欠損モデルにおいて、PDLSC-CM が歯周組織再生を促進することを明らかとした。これまで、間葉系幹細胞培養上清を用いた歯周組織再生は、骨髄間葉系幹細胞培養上清を用いた投与も報告されており、今後 PDLSC-CM と骨髄間葉系幹細胞培養上清の再生能をより詳細に検討していく必要がある。

・PDLSC-CM は濃度依存的に歯周組織を再生したが、PDLSC-CM 中には含まれる様々なタンパク質が再生に寄与している可能性が考えられるが、今後、PDLSC-CM 中の歯周組織再生へ寄与する因子を特定するため、さらなる研究が必要である。

・濃縮した PDLSC-CM では、より成熟した骨の状態が認められたことから、PDLSC-CM は創傷治癒や組織再生の速度を速め、歯周組織再生を促進するというメカニズムが示唆された。

・PDLSC-CM は、歯周組織欠損部局所また *in vitro* においてマクロファージ細胞の TNF-αの遺伝子発現を抑制したことから、組織中の TNF-α抑制による抗炎症作用を発揮し、組織再生を促進したと考えられる。

本論文は、濃縮した PDLSC-CM 投与が歯周組織再生を促進することを初めて示すことにより、PDLSC-CM 投与が新たな歯周組織再生法として有用であることを示唆する重要な結果を与えている。

歯周組織再生に必須な PDLSC から放出されるパラクライン因子の解明は待たれるが、PDLSC-CM 投与は、現在広く応用されている間葉系幹細胞移植と比較し、細胞移植を避けることができるため、腫瘍化のリスクの軽減や他家移植へのハードルの低さなど、様々な利点を持っており、再生医療研究の観点から極めて重要なものであるといえる。

このように、永田が行った一連の研究は、今後の幹細胞を用いた医科および歯科分野における再生医療の進展に貢献する可能性を示している。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 渡邉　知恵 |
| 論文審査担当者 | 主査　倉林　亨<br>副査　和泉　雄一　　水口　俊介 |
| 論　文　題　目 | Chronological grey scale changes in supporting alveolar bone by removable partial denture placement on patients with periodontal disease: A 6-month follow-up study using digital subtraction analysis |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

歯周炎に罹患し，すでに一部の歯を喪失した患者では，更なる歯の喪失を防ぐために，安定期治療（SPT)と適切な咬合回復が必要である．咬合回復の方法として，残存歯・欠損部顎堤・内科的疾患の状況による制限や，装着時の組織への侵襲が少なく，装着後にさらに歯を喪失してもその変化に対する追従性に富むという点で部分床義歯（RPD）を適用する場合は少なくない．特別な配慮や条件によって，残存歯の歯周組織の状態が改善するという報告があるものの，一般的には RPD 装着は残存歯に対して為害性があるという報告が多い．しかしながら，これらの多くは歯周組織の状態や RPD 装着が結果にどの程度の影響を与えているかの議論に乏しい．これらの研究における残存歯周囲骨の評価には，エックス線写真の読影が用いられてきたが，長期的な支台歯周囲骨の高さや歯冠歯根比の変化を見ているに過ぎなかった．そこで我々は，ある期間をおいて定点撮影した 2 枚の口内法エックス線写真を利用して，歯槽骨の量的変化だけでなく，質的変化を骨密度の変化として評価する手法であるデジタルサブトラクション法に着目した．この手法を用いれば，残存歯周囲骨の RPD 装着前後および装着後の骨密度の変化を評価することが可能である．本研究は前向き介入試験により，中等度から重度歯周炎患者における，RPD 装着による支台歯の歯槽骨への影響について義歯装着直後を含めて評価することを目的とした．

＜方法＞

東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来で初診時に中等度もしくは重度の歯周炎と診断された患者の中で，臼歯部欠損を有し SPT 期間に移行した者を被験者の候補とした．対象となる欠損は，過去 1 年以上補綴治療が施されていない片側または両側の遊離端欠損とし，初診時に，4mm 以上のプロービング深さを 4 か所以上，エックス線診査で 30%以上の骨欠損を有していることを条件とした．安定期治療に移行した段階で研究参加の同意を得られた場合に被験者として登録した．以上の結果，13 名の被験者（女性 8 名；男性 5 名，平均年齢 67.2 歳；幅 37 歳～80 歳）が条件を満たし，この研究に参加した．本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認のもと（承認登録 1105 番），2014 年 12 月から 2016 年 9 月までの期間中に行われた．

全ての RPD の設計は 1 名の補綴専門医が行い，15 床の RPD（上顎 5 床；下顎 10 床，両側遊

離端義歯 4 床；片側遊離端義歯 11 床）を装着した．直接支台装置を設定した残存歯のうち，遊離端欠損に隣接した合計 19 歯（前歯 1 歯；犬歯 1 歯；小臼歯 17 歯）を評価対象とした．データ採取では，1.歯周組織検査としてプロービングポケット深さ（PPD），臨床アタッチメントレベル（CAL），歯の動揺度，2．咬合力（歯列全体および小臼歯支台歯）測定，および 3．エックス線写真撮影を行った．ベースラインと各撮影日のエックス線写真のサブトラクション画像は，画像処理ソフト（Emago，Oral Diagnostic System，オランダ）を用いて作成した．関心領域（ROI）は，被験歯歯根周囲の骨頂部，中央部，根尖部のそれぞれ近遠心の計 6 ヶ所とした．サブトラクション像は 0 から 255 までのグレーレベル（GL）で濃淡が示され，中央値 127 を境にそれよりも高いと骨密度の増加，反対にそれよりも低いと骨密度の低下と考えられる．各 ROI の GL の平均を代表値とし，撮影日間での比較を行った．また，咬合力測定と GL においては，オクルーザルユニットによるサブグループ間での各測定日ごとの比較を行った．

＜結果＞

歯周組織検査の結果では，観察期間 6 か月を通じて PPD・CAL・動揺度のいずれの数値にも有意な変化は認められなかった．全体の咬合力は観察期間を通して有意な差を認めなかった一方で，支台歯の咬合力は装着時にのみ有意に減少を認めた．サブトラクション像の GL では遠心骨頂部においてのみ装着 1 週間後に有意な上昇が認められたが，その後 1 ヶ月以降ではベースラインに近い値に戻ることが確認された．遠心骨頂部以外では 6 か月を通して有意な変化は認められなかった．オクルーザルユニット数で分けたグループ間比較では，全体の咬合力にのみ装着 1 週間後にサブグループ間での有意な差が認められたが，支台歯の咬合力および GL では有意な変化は認められなかった．

＜考察＞

過去の研究ではサブトラクション像において GL の変化は骨密度の増減と捉えられてきた．本研究では，支台歯の遠心骨頂部において RPD 装着 1 週間後に GL 平均値の一時的な上昇，つまり骨密度の増加傾向を認めた．過去の研究では遊離端義歯に咬合力が加わると支台歯には遠心方向への荷重が加わり，支台歯遠心歯槽骨の骨頂に圧縮が生じることが報告されている．また，骨に加わるメカニカルストレスが一定以下であると骨形成作用が働くことが，vivo 実験および vitro 実験において示されている．さらに，骨に圧縮力を与えた際の骨形成に関する生体反応は， 3～7 日後から出現するという報告がある．本研究での，GL の上昇は RPD 装着後比較的早期に支台歯に対して遠心への荷重がかかること，さらにその荷重は骨形成を誘導する程度に軽微なものであることが示唆された．また過去には，骨に対する軽微な圧縮力が骨密度を維持するような生体反応を誘導することで，歯周組織の恒常性が保たれると報告されている．本研究では，すべての ROI において 6 ヶ月後にベースラインの値まで骨密度が戻った．これは，RPD 装着による支台歯への負荷が，歯周組織の恒常性を保てる程度に弱いものであることが示唆された．

これまでのサブトラクションを利用した研究では歯周治療やインプラントの即時埋入で治癒過程における骨密度の増加が報告されているが，これらの反応は介入して 1 ヶ月後にはじめて確認されているため，本研究の一過性の反応とは異なるものと考えられる．本研究では，RPD 装着後

短期間の歯周組織の影響を評価したが, RPD の効果を包括的に捉えるためには今後とも長期経過を追う必要がある.

＜結論＞

デジタルサブトラクションによる骨密度の分析から，中等度から重度歯周炎に罹患した患者の遊離端欠損に RPD を装着すると，装着後 1 週間後に支台歯には遠心方向への負荷がかかり一時的に骨密度の増加を認めるものの, その後骨密度は義歯装着前の状態まで戻ることが示唆された. ただし， その現象は歯周炎に関する測定値に影響することはなく，定期的なプロフェッショナルケア，口腔衛生指導のもとでは，残存歯の歯周組織は 6 か月間での経過では安定的に維持されることが示唆された.

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5458　号 | 渡邉　知恵 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　倉林　亨<br>副　査　和泉　雄一　　水口　俊介 | |
| 論 文 題 目 | Chronological grey scale changes in supporting alveolar bone by removable partial denture placement on patients with periodontal disease: A 6-month follow-up study using digital subtraction analysis | |

（論文審査の要旨）

歯周炎で歯を喪失した際，残存歯の歯周組織の状態，欠損部顎堤吸収の程度などから，部分床義歯を適用する場合が少なくない．しかし，部分床義歯装着が残存歯の予後を左右するという認識が強く，とくに中等度から重度の歯周炎患者では残存歯への為害性が多く報告されている．実際に部分床義歯装着により残存歯の歯周組織が左右されるかどうかは，口腔内細菌，口腔内清掃状態，歯周組織へのメカニカルストレスなど多くの因子に関連している．その中でも支台歯はそれらの影響を強く受ける部位であり，部分床義歯装着が支台歯の歯周組織にどのような影響を与えるのか客観的に評価することは臨床上極めて重要である．

今回，渡邉は中等度から重度歯周炎患者に部分床義歯を装着後，デジタルサブトラクション法を用いて支台歯周囲骨の変化を調べ，義歯装着が支台歯および周囲の歯周組織に与える影響について多角的に検討した．デジタルサブトラクション法は，これまで歯周治療やインプラント領域で利用されてきた手法であるが，部分床義歯による残存歯への影響の評価に本手法を用いたことは新規性が認められる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

歯周治療開始時に中等度から重度歯周炎と診断された患者の中で，安定期治療期間にある患者の遊離端欠損に部分床義歯を装着すると，装着 1 週間後に支台歯の遠心骨頂部に一時的にグレーレベルの増加を認めるものの，その後，義歯装着前の状態まで戻った．グレーレベルの上昇は骨密度の増加を示すとされ，本研究では，義歯装着後比較的早期に支台歯に対して遠心への荷重がかかること，さらにその荷重は骨形成を誘導する程度に軽微なものであることが示唆された．一方で，歯周ポケット，アタッチメントレベル，動揺度といった歯周病に関する測定値には観察期間 6 ヶ月を通じて変化は認められず，定期的なプロフェッショナルケア，口腔衛生指導のもとでは，支台歯の歯周組織が安定的に維持された．また，歯列全体の咬合力は観察期間を通して有意な変化を認めなかったものの，支台歯に生じる咬合力は装着時にのみ有意に減少した．

本研究の結果は，中等度から重度歯周炎患者の部分床義歯装着による支台歯の挙動について多角的に評価したという点で，臨床的意義が大きい．さらに本研究は，歯周炎罹患患者にとって部分床義歯による咬合回復がさらなる歯の喪失を防ぐための有効な手段であるという指標になり得る．本研究は綿密な研究計画をもとに実施され，適切な解析により妥当性の高い結果

を導いており，研究計画から考察に至るまで高く評価できる．

以上の成果は今後の歯科医学の発展に寄与するところが大きく，よって，本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 家持　剛 |
| 論文審査担当者 | 主査　若林　則幸<br>副査　宇尾　基弘　　古屋　純一 |
| 論　文　題　目 | Influence of water immersion on the transmitted load of home reliners |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

ホームリライナーは酢酸ビニル樹脂とエタノールを主な成分とし、義歯と義歯床下粘膜の隙間を埋めるパテ状の義歯安定剤である。ホームリライナーを適切に使用することにより、床下粘膜に伝達される荷重が軽減すること、咀嚼能力や患者満足度が向上することが報告されている。したがって、要介護者や入院患者など、すぐに歯科医院を受診できない患者が一時的にホームリライナーを使用することは、食形態を維持するうえで有用と考えられる。しかし、患者自身の判断で使用されるため、義歯が変位することで、顎堤吸収を惹起することが懸念されており、使用に否定的な見解も多い。さらに、使用時間が長くなるほどホームリライナーは柔軟性を失い、義歯床から剥離することが困難になるため、口腔衛生上の問題が指摘されている。したがって、柔軟性が失われる前に、速やかに材料を交換する必要がある。

村田らは、水中浸漬 12 時間、1、2、4、7 日後の動的粘弾性および吸水・溶解量を測定し、水中浸漬 24 時間後において動的粘弾性に大きな変化が認められたことを報告し、その原因はエタノールの溶出および吸水が原因であると考察している。一方、高橋らは、水中浸漬による表面性状および重量の変化を評価し、表面性状の変化は水中浸漬直後から認められたとしている。このことから、ホームリライナーの適切な交換時期を患者に指導するためには、より短時間での物性変化を評価することが重要である。

そこで、本研究では、水中浸漬時間を 0、1、3、6、12、24 時間とし、ホームリライナーを介して擬似粘膜下の圧力センサーに伝達される荷重を測定した。さらに、ゲル浸透クロマトグラフィー（以下 GPC）およびガスクロマトグラフィー（以下 GC）を行い、分子量およびエタノール含有量がホームリライナーの物性に及ぼす影響を考察した。

＜材料・方法＞

1.材料

ホームリライナーは、タフグリップピンク(小林製薬、以下 TG)、ライオデントピンク(ライオン、以下 LD)、クッションコレクト(塩野義製薬、以下 CC)の 3 種類とした。

2. 伝達荷重の測定

加熱重合型義歯床用アクリルレジン（Acron live pink、ジーシー）をメーカー指示に従い重合し、直径 20mm、厚さ 1.5mm の円板状試験片を作製した。作製した試験片にホームリライナーを厚さ 1.0mm になるよう貼付し、37℃の蒸留水に 0、1、3、6、12、24 時間浸漬したものを試料とした(N=5)。

直径 20mm、厚さ 1.5mm の疑似粘膜(フィットチェッカーⅡ、ジーシー)を成形し、下面中央に直径 8mm、厚さ 0.35mm の圧力センサー(Single Tact miniature force sensor、シスコム)を設置した。ホームリライナーを貼付した面が接するように疑似粘膜上に試料を設置し、試料の上面から金属製円柱棒にて 4.9N の荷重を加えた。圧力センサーのデータは 20ms 毎にパーソナルコンピュータへ取りこみ、荷重開始 5 秒後のデータ 10 個の平均値を伝達する荷重とした。

得られた結果について、二元配置分散分析（ANOVA）を行い、次いで多重比較試験（Tukey HSD）にて統計解析を行った。有意水準 0.05 とした。

3. GPC

ホームリライナー 20mg をテトラヒドロフラン溶液（以下 THF）10ml で溶解後、GPC 装置(HLC-8220GPC、東ソー)にて測定した。測定条件は、カラム(Shodex Kf-G+KF-805L×2+K-800D)、カラム温度:40℃、流速:1.0ml/min、注入量：100μl、前処理：濾過(0.2μl フィルター)、検出器：示差屈折計とした。分子量マーカーとしてポリスチレンを使用し、数平均分子量 Mn、重量平均分子量 Mw、及び多分散度 Mw/Mn を算出した。なお、LD は一部不溶成分を認めた。

4. GC

ホームリライナー 200mg を 20ml のメスフラスコに採取し、THF で溶解後、GC 装置(GC2010 型、島津製作所)にて測定した。測定条件は、カラム：DB-17(0.25mml.Dφ×30m、df=0.25μm、温度：50℃-3min-15℃/min→300℃、注入量：1μl、He 流速：1.0ml/min、スプリット比：50 対 1、インジェクション温度：260℃とした。測定は 2 回行い平均を求めた。

＜結果＞

伝達荷重の測定において、TG は水中浸漬 3、6、12 時間後に有意な上昇を認めた。LD は、3、6、12、24 時間後有意に上昇した。CC は、3 時間後および 12 時間後に大きく上昇し、有意差を認めた。

GPC において、TG は単一で連続的なピークが検出された。LD は連続的な 2 つのピークと小さな 2 つのピークが検出された。CC は幅広い形状のピークが 2 つと連続的なピークが 1 つ検出された。多分散度が表す分布の広がりは、TG が分子の分布が比較的広く、LD が比較的狭いことがわかった。重量平均分子量 Mw は、CC が 860,000、LD が 150,000、TG が 130,000 であり、CC が TG、LD に比べ 5 倍以上大きかった。

GC の結果から、CC、TG、LD のエタノール含有量はそれぞれ 26、19、16wt%であり、CC が最も大きかった。

＜考察＞

貼付直後（水中浸漬前）における伝達荷重は、ホームリライナーを貼付していない場合と比較し、すべての試料において、約 30%荷重の減弱が認められた。TG と LD は、分子量分布が異なるが、平均分子量とエタノール含有量が近似している。CC は、平均分子量の大きい酢酸ビニルを含有しているが、TG、LD と比較してエタノール含有量が多い。以上のことから、平均分子量とエタノール含有量によって、製材の粘弾性を調整していると考える。

すべての材料において、水中浸漬 3 時間後に伝達荷重の有意な上昇を認めた。CC は、6 時間後、さらに 12 時間後に荷重が大きく上昇した。CC は平均分子量が大きく異なる 2 種類の酢酸ビニルを含有するため、吸水やエタノール溶出に影響したと考える。TG は浸漬 6 時間後に大きな上昇が認められたが、LD は経時的に緩やかな上昇が認められた。TG と LD は平均分子量とエタノール含有量が近似しているが、LD には低分子領域にピークが検出された。このピークは油性の可塑剤であるサラシミツロウと推察され、緩やかな物性変化に有効に働いていると考える。

酢酸ビニルは、側鎖がカルボキシル基である場合とアルデヒド基の場合で吸水に違いが出る可能性がある。これには赤外分光法や核磁共鳴法により詳細な分析が必要である。また、物性変化がエタノールの溶出によるのか、吸水によるのか明らかでないため、浸漬時間ごとの GC 分析を行いエタノールの溶出挙動を明らかにする必要がある。

今回の実験では実使用とは異なる点が幾つかある。第一に吸水膨張の制限である。実際には、ホームリライナーは粘膜と義歯の間に介在し、圧がかかっているので吸水による変形は in vitro より少ない可能性がある。第二に咬合力である。過去の文献では総義歯患者の臼歯部での咬合圧は数十 kPa～300kPa ほどとされている。本実験では最大荷重 10N までのセンサーであるため、約 16kPa を荷重としているが、実際にはより強い力が加わることや、顎堤粘膜の被圧変位性の違いにより顎堤には不均一な力が加わることが予想される。また、静的荷重は咀嚼運動と異なるため、繰り返し荷重に対してどのような挙動になるか知る必要がある。第三に試料の厚みである。実際に使用する厚みについては中村の報告から 1 mm 以下であることが予想され、厚みの違いは硬化の違いとして現れる可能性がある。

＜結論＞

ホームリライナーの適切な効果が認められるのは 3 時間以内であることが明らかになった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5459　号 | 家持　剛 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　若林　則幸<br>副　査　宇尾　基弘　　古屋　純一 | |
| 論 文 題 目 | Influence of water immersion on the transmitted load of home reliners | |

（論文審査の要旨）

義歯安定材の一種であるホームリライナーは、義歯床と床下粘膜の適合を改善し患者満足度や咀嚼効率を向上させる一方、誤った使用により顎堤吸収や口腔衛生状態の悪化が問題となる。ホームリライナーは患者自身の判断で使用されるため、適切な使用方法についての情報提供が必要である。

村田らは、水中浸漬 12 時間、1、2、4、7 日後の動的粘弾性および吸水・溶解量を測定し、水中浸漬 24 時間後において動的粘弾性に大きな変化が認められたことを報告し、その原因はエタノールの溶出および吸水が原因であると考察している。一方、高橋らは、水中浸漬による表面性状および重量の変化を評価し、表面性状の変化は水中浸漬直後から認められたとしている。このことから、ホームリライナーの適切な交換時期を患者に指導するためには、より短時間での物性変化を評価することが重要である。

こうした状況を背景に、家持は圧力センサーを用いてホームリライナーを介して顎堤粘膜へ伝達される荷重を測定することを試み、実使用に準じた水中浸漬が伝達される荷重に及ぼす影響を評価した。さらに、ゲル浸透クロマトグラフィーを用いて分子量分布、ガスクロマトグラフィーを用いてエタノール含有量を測定し、ホームリライナーの組成が物性変化に及ぼす影響について考察を加えた。

伝達荷重の測定には、義歯床用アクリルレジン製の試験片（直径 20mm、厚さ 1.5mm）にホームリライナーを厚さ 1.0mm になるよう貼付し、37℃の蒸留水に 0、1、3、6、12、24 時間浸漬したものを試料とした。直径 20mm、厚さ 1.5mm の疑似粘膜(フィットチェッカーⅡ、ジーシー)を成形し、下面中央に直径 8mm、厚さ 0.35mm の圧力センサー(Single Tact miniature force sensor、シスコム)を設置した。ホームリライナーを貼付した面が接するように疑似粘膜上に試料を設置し、試料の上面から金属製円柱棒にて 4.9N の荷重を加えた。圧力センサーのデータは 20ms 毎にパーソナルコンピュータへ取りこみ、荷重開始 5 秒後のデータ 10 個の平均値を伝達する荷重とした。試験に供したホームリライナーは、タフグリップピンク(小林製薬、以下 TG)、ライオデントピンク(ライオン、以下 LD)、クッションコレクト(塩野義製薬、以下 CC)の 3 種類とした。

本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な統計学的解析により妥当性の高い結果を

導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 貼付直後（水中浸漬前）における伝達荷重は、ホームリライナーを貼付していない場合と比較し、すべての試料において、約 30%荷重の減弱が認められた。
2. 水中浸漬後の伝達荷重において、TG は水中浸漬 3、6、12 時間後に有意な上昇を認めた。LD は、3、6、12、24 時間後有意に上昇した。CC は、3 時間後および 12 時間後に大きく上昇し、有意差を認めた。
3. GPC において、TG は単一で連続的なピークが検出された。LD は連続的な 2 つのピークと小さな 2 つのピークが検出された。CC は幅広い形状のピークが 2 つと連続的なピークが 1 つ検出された。多分散度が表す分布の広がりは、TG が分子の分布が比較的広く、LD が比較的狭いことがわかった。
4. 重量平均分子量は、CC が 860,000、LD が 150,000、TG が 130,000 であり、CC が TG、LD に比べ 5 倍以上大きかった。
5. GC の結果から、CC、TG、LD のエタノール含有量はそれぞれ 26、19、16wt%であり、CC が最も大きかった。

ホームリライナーは、不適合な義歯床と顎堤粘膜の隙間を埋めることにより、義歯に加わる機能圧が義歯床下粘膜の一部へ集中することを防ぐ役目を担う。本研究の疑似粘膜モデルは、センサーの厚さだけ中央部分がわずかに凸となっており、ホームリライナーを貼付しない場合はセンサーを中心とした疑似粘膜部分の荷重負担が大きくなる。貼付直後のホームリライナーは柔軟性があるため、疑似粘膜全体に荷重を分散させ、伝達することになる。そのため、センサー部分の荷重負担が相対的に減少する。一方、水中浸漬によってエタノールが溶出し柔軟性を失ったホームリライナーは、荷重を分散させることができず、疑似粘膜全体で荷重を負担できないため、センサー部分の荷重負担が相対的に増加したと解釈できる。

材料が劣化し義歯床下粘膜との適合が十分に改善されず、不均一な機能圧負担となることは、疼痛や顎堤吸収のリスクとなりうる。本研究の評価方法は、動的粘弾性の変化を測定する方法と比較し、材料の交換時期をより直接的に判断する情報を提供した点に有意性が認められる。本研究で得られた結果は、ホームリライナーを患者が適切に使用するうえで正しい情報を提供する一助となる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 篠﨑 裕道 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　泰羅　雅登<br>副　査　下山　和弘　　深山　治久 |
| 論　文　題　目 | Relationship between jaw opening force and hyoid bone dynamics in healthy elderly subjects. |

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

高齢者に多くみられる誤嚥の原因の一つとして舌骨挙上量の減少が挙げられる。食塊が誤嚥されずに円滑に食道へ運ばれるためには、嚥下時における喉頭および舌骨の移動が重要な因子である。Perlman らの報告では舌骨挙上量の低下がみられる患者は、低下がみられない患者の 3.5 倍の誤嚥リスクがあることが示されている。古川は加齢によって下降した喉頭の位置を嚥下時に挙上量増加で代償できなければ嚥下障害が出現する可能性が増すと報告している。このように、嚥下中の舌骨の位置、変位の解析は嚥下動態を観察する上で重要な意義がある。これまでに様々な研究で嚥下造影検査（以下、VF）を用いた嚥下時の舌骨の上方方向、および前方方向の変位について検証、定量化されている。また、VF での側方画像の解析の結果、舌骨の前方移動は食道入口部の開大、上方移動は喉頭閉鎖に関与しているとの報告がある。舌骨の前方移動ではオトガイ舌骨筋が主に働き、補助的に顎二腹筋前腹が関わるとされ、上方移動では顎舌骨筋が主として働き、補助的に顎二腹筋後腹が働くとされている。そのため、舌骨上筋群の筋力が嚥下時の舌骨動態とその位置に影響を与えることは明らかであるが、舌骨上筋群の筋力を直接的に測定することは難しい。そこで、舌骨挙上筋である舌骨上筋群が、同時に開口筋であることを利用して、開口することで舌骨上筋群の筋力を測定し、嚥下機能の簡易な評価を目的とした開口力測定器が開発された。開口力に関する研究では、舌骨上筋群の筋力として測定された開口力は全身の筋力の指標である握力と相関があり、健常成人と比較すると健常高齢者が有意に低く、女性より男性が有意に高いことが報告されている。さらに、嚥下障害者において開口力の低下は誤嚥および咽頭残留を招く可能性が示唆されているが、開口力と嚥下時の舌骨動態の関連はわかっていない。本研究では高齢者の開口力と、舌骨安静時位置、嚥下時の舌骨最大挙上位置、および舌骨動態の関連性について検討した。

＜対象と方法＞

対象：平成 27 年 9 月～11 月に健康診断を目的に外来受診した 65 歳以上の健常高齢者 36 名（男性 16 名、女性 20 名、平均年齢 75.5±6.4 歳）。意思疎通が可能で、過去に嚥下障害を呈していない者を対象として、その中でも脳血管疾患および神経筋疾患、顎関節症をもつ者は除外した。

方法：30 フレーム/秒の速度で VF（デジタル X 線 TV システム FLEXAVISION（株）島津メディカルシステムズ）側面像の撮影を行い、動画としてデジタルビデオレコーダー(SHARP DV-AC82)に録画した。その後、動画を MP4 に変換してパーソナルコンピューターに取り込んだ。90° 座位、頸部中間位の姿勢をとった被検者に、解析時にマーカーとして使用する直径 14.3mm の鉛球を頸椎上に添付した。

そして、40%W/V バリウム液 10ml を検査者がシリンジを用いて舌下部に注入した。被検者のタイミングで自由に嚥下をするよう指示し、得られた画像情報を用いて、嚥下運動における舌骨の動態を評価した。

開口力は開口力トレーナー（リブト社）を用いて嚥下障害患者の診療経験のある 1 名の歯科医師が計測した。開口力トレーナーは頭部を囲う頭部キャップ、調整可能なベルト 2 本付属した顎カップ、計測器で構成されている。頭部キャップを頭に被せ、顎カップを顎にあて調整ベルトをきつく締めた後、被検者に最大開口を指示し開口力を計測した。測定は３回行い、平均値を計測値として用いた。

舌骨位置・運動量の測定方法

第 2 頸椎と第 4 頸椎の下端を結んだ直線を Y 軸とし、第 4 頸椎下端から Y 軸に垂直に引いた直線を X 軸として座標系を設定した。原点は第 4 頸椎下端とし、舌骨位置は舌骨体部上端を指標として、原点からの X-Y 座標点(mm)で計測を行った。

口腔内になにも含まず舌骨が静止した状態を安静時舌骨位とした。安静時舌骨位は舌骨上端から Y 軸に対する垂直的距離、最大挙上位は安静時舌骨位から嚥下時の最大挙上位における舌骨の上端までの垂直的距離として求めた。X 軸方向への移動距離を前方移動量、Y 軸方向への移動距離を上方移動量、それらの値を二乗して足した値の平方根を斜辺移動量としてそれぞれ求めた。

データ処理および解析

画像解析は画像ソフト（ImageJ ver1.49 National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA）を使用した。統計解析は SPSS Statistics 20.0 J(IBM Japan, Ltd, Tokyo, Japan)を使用した。男女差は Mann-Whitney の U 検定、開口力、安静時舌骨位、嚥下時の舌骨最大挙上位、舌骨の前方移動量、上方移動量、斜辺移動量の関連について Spearman の順位相関係数を用いて検討した。なお、有意水準は 5%とした。

＜結　果＞

男性のみ開口力と安静時舌骨位に強い正の相関、前方移動量、上方移動量、斜辺移動量に負の相関を認めた。女性の開口力といずれの測定項目で相関は認めなかった。また、男女ともに最大挙上舌骨位と開口力に相関は認めなかった。

＜考　察＞

本研究では 65 歳以上の健常高齢者のみを対象とし、男性のみにおいて開口力と安静時舌骨位と正の相関がみられた。安静時舌骨位についての研究で、喉頭および舌骨の下降は、加齢に伴う舌骨上筋群の筋線維の萎縮、緊張の低下、靭帯のゆるみにより起こるとされている。他方、70 歳未満と 70 歳以上の健常者の開口力を比較した結果、70 歳以上で開口力は減少すると報告されている。舌骨は抗重力筋である舌骨上筋群に支持されているため、筋肉と顎関節が固定された位置で計測される開口力の測定が、速筋（Ⅱ型筋線維）よりも静止位置を維持する遅筋（Ⅰ型筋線維）の筋力が反映されているため、開口力が大きいと安静時舌骨位が高いことが考えられる。男性のみにおいて相関がみられた理由としてはインスリン様成長因子 IGF-1 やテストステロンといった内分泌系の加齢変化が関与している可能性がある。IGF-1 やテストステロンといった骨格筋の同化作用を有するホルモ

ンは、特に男性で加齢変化を受け易いことが報告されており、これらホルモンの血中レベルの低下により男性では骨格筋量が低下しやすいという。また、本研究では骨格的な差異を検討項目に入れていないが、女性に比して骨格の大きい男性が重力の影響を大きく受けるため、結果として男性が筋力低下により舌骨下垂が生じやすかったためと考えられる。男性で開口力と嚥下時の舌骨の上方移動、前方移動、斜辺移動量全てと負の相関がみられた理由として、開口力が大きいと安静時の舌骨の位置は上がるため、その分舌骨を牽引する距離が減るためと考えられる。男女ともに開口力と最大挙上舌骨位の相関はみられないことから、嚥下時における舌骨の最大挙上位置の明らかな年齢変化はないとする過去の報告と一致する結果が得られた。加齢により安静時の舌骨位置が下がると正常な嚥下を達成するための必要挙上距離が増す。舌骨の位置が高いということは、少ない運動で誤嚥しないだけの有効な挙上が得られるため嚥下には有利となる。そのため、舌骨の位置が低下した高齢男性では嚥下時に舌骨の挙上量を大きくする必要があるが、過去の報告によると高齢男性では若年男性と比較すると舌骨挙上量は少ないという。今回の研究では健常者を対象としたため、安静時舌骨位が低くとも舌骨の移動量が増すことで代償され、誤嚥や顕著な残留を認めた被検者はいなかった。しかし、脳血管障害、神経筋疾患、廃用症候群等による嚥下障害を対象とした過去の報告では開口力の小さい被検者群において誤嚥および咽頭残留を認めたことから、開口力減少によって下垂した舌骨を代償的に挙上機能障害によって増加できなかったことが異常所見を呈する原因のひとつと考えられる。

＜結　論＞

本研究では開口力を測定することで舌骨挙上筋である舌骨上筋群の筋力を計測し、安静時舌骨位および嚥下時の舌骨動態との関連について検討した。その結果、高齢者男性のみにおいて、開口力の減少は安静時舌骨位の低位に関連があると考えられた。また健常者であれば性別に関わらず舌骨の位置が低いことで、嚥下時に舌骨の総移動量が代償的に大きくなり、舌骨の最大挙上位は開口力の影響を受けないことが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5460　号 | 篠﨑 裕道 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　泰羅　雅登<br>副　査　下山　和弘　　深山　治久 | |

（論文審査の要旨）

高齢者に多くみられる誤嚥の原因の一つとして舌骨挙上量の低下が挙げられる。食塊が誤嚥されずに円滑に食道へ運ばれるためには嚥下時における喉頭及び舌骨の移動が重要な因子である。そのため、これまでに様々な研究で嚥下造影検査（以下、VF）を用いた嚥下時の舌骨の上方方向および前方方向の変位について検証、定量化されている。舌骨の前方移動ではオトガイ舌骨筋が主に働き補助的に顎二腹筋前腹が関わるとされ、上方移動では顎舌骨筋が主として働き補助的に顎二腹筋後腹が働くとされている。 このことから、舌骨上筋群の筋力が嚥下時の舌骨動態とその位置に影響を与えることは明らかであるが、舌骨上筋群の筋力を直接的に測定することは難しい。そこで、舌骨挙上筋である舌骨上筋群が、同時に開口筋であることを利用して、開口することで舌骨上筋群の筋力を測定し、嚥下時の舌骨の動態および安静時位置との関連性について検討した。

研究方法として、平成 27 年 9～11 月に健康診断を目的に外来受診した 65 歳以上の健常高齢者 36 名（男性 16 名、女性 20 名、平均年齢 75.5±6.4 歳）の VF 画像を基に嚥下時の舌骨動態について評価を行った。評価項目は第 3 頸椎前方下端を原点として、安静時舌骨位、嚥下時の舌骨最大挙上位、舌骨の前方移動量、上方移動量、斜辺移動量とした。検査食は、40%W/V バリウム液 10ml を使用した。検査者がシリンジを用いて被検者の舌下部に注入し、被検者のタイミングで自由に嚥下を指示した。開口力は開口力トレーナーを用いて 3 回計測し、平均値を計測値として用いた。

画像解析は画像ソフト（ImageJ ver1.49 National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA）を使用した。統計解析は SPSS Statistics 20.0 J(IBM Japan, Ltd, Tokyo, Japan)を使用した。男女差は Mann-Whitney の U 検定、開口力、安静時舌骨位、最大挙上舌骨位、舌骨の前方移動量、上方移動量、斜辺移動量の関連について Spearman の順位相関係数を用いて検討した。なお、有意水準は 5%とした。

研究結果として以下の所見が得られた。

男性のみ開口力と安静時舌骨位に強い正の相関、前方移動量、上方移動量、斜辺移動量に負の相関を認めた。女性の開口力といずれの測定項目で相関は認めなかった。また、男女ともに最大挙上舌骨位と開口力に相関は認めなかった。

以上の結果を基に、舌骨は抗重力筋である舌骨上筋群に支持されているため、筋肉および顎関

節が固定された位置で計測される開口力の測定が、速筋（Ⅱ型筋線維）よりも静止位置を維持する遅筋（Ⅰ型筋線維）の筋力が反映されているため、開口力が大きいと安静時舌骨位が高いと考察した。また、男性のみにおいて相関がみられた理由としては、年齢に伴う舌骨上筋群の筋線維の萎縮、緊張の低下、靭帯のゆるみの他に内分泌系の加齢変化の男女の相違が関与している可能性を述べた。男性で開口力と嚥下時の舌骨の上方移動、前方移動、斜辺移動量全てと負の相関がみられた理由としては、開口力が大きいと安静時の舌骨の位置は上がるため、その分舌骨を牽引する距離が減るためと考察している。男女ともに開口力と舌骨最大挙上値の相関はみられなかったことに関しては、嚥下時における舌骨最大挙上位の明らかな年齢変化はないとする過去の報告と一致する結果が得られている。

今回の研究は、舌骨上筋群の筋力として測定された開口力と液体嚥下時の舌骨動態および安静時舌骨位との関連性について初めて検討を行ったものである。VF は嚥下時の舌骨動態を把握する上で欠かせないが、被曝を伴い、また寝たきりで離床できない患者などでは実施が難しい。一方、開口力計は持ち運びが可能であり、ベッドサイドで簡易に検査が実施できる。開口力と舌骨動態との関係が明らかになることで、嚥下障害者に対する適正なリハビリテーションメニューの選択とリハビリテーション効果のフィードバックが可能になるだけでなく、他のスクリーニングテストと組み合わせることでより精度の高い診査が可能となり臨床的意義は非常に大きい。本研究は高齢者歯科学のみならず、今後の歯科医学の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられた。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 時田　大輔 |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　荒木　孝二　　二階堂　徹 |
| 論　文　題　目 | Dynamic Torque and Vertical Force Analysis during Nickel-titanium Rotary Root Canal Preparation with Different Modes of Reciprocal Rotation |

[緒言]

NiTi ロータリーファイルを往復回転運動で駆動すると、単一のファイルで根管形成が可能となること、あるいは連続回転に比べて回転疲労破折に対する抵抗性が向上することが報告されている。この種の往復回転運動は、トルクに関係なく正逆方向への回転を繰り返す機構であり、時間依存型往復回転運動と定義されるものである。また、近年ではトルクリバース機構を改良し、往復回転運動を取り入れたモーターも開発されている。これらは通常は連続正回転で作動するが、既定のトルク値に達すると逆回転したのちトルク検出を行わずに正回転する機構、すなわちトルク依存型往復回転運動と定義される機構で設計されている。

一方、いわゆるねじ込み効果（screw-in effect）は、らせん状のファイル刃部が根管壁に食い込んだ結果、ファイルが根尖方向に引き込まれる現象であり、ねじれ疲労破折の一因と考えられている。往復回転運動では非切削方向への回転でねじれ応力が解放され、ファイルの食い込みの軽減も期待されるが、往復回転運動時に生じるねじ込み力（screw-in force）に対する動的解析はほとんど行われていない。そこで本研究では、自作型の自動根管形成・応力解析装置を用いて、NiTi ロータリーファイルをトルク依存型あるいは時間依存型往復回転で駆動して根管形成を行った際に生じるトルクと垂直荷重を解析し、連続回転で用いた場合と比較検討した。作業仮説は「NiTi ロータリーファイルを用いた根管形成で、トルク依存型あるいは時間依存型往復回転で生じるトルクや垂直荷重は連続回転と比較して小さい」とした。

[材料と方法]

1）自動根管形成・応力解析装置：本研究では、試作型根管形成モーター、電動スタンドおよび垂直荷重・トルク測定部で構成される自動根管形成・応力解析装置を製作し、解析に用いた。試作型根管形成モーターは、トルク依存型往復回転（トルクを検知すると連続正回転から 90 度逆回転したのち正回転方向に 180 度回転）、時間依存型往復回転（トルクに関係なく 90 度逆回転、180 度正回転を繰り返す)、および連続回転が可能であり、電動スタンドに装着されたハンドピースが上下動を行う設計とした。また、電動スタンドは 10 mm/min で作動し、トルク依存型上下動、時間依存型上下動の二種の動作が可能なようプログラムした。すなわち、トルク依存型上下動では、既定トルク値以下ではペッキングモーションを模した上下動（2 秒下降し 1 秒上昇）、

また既定トルク値を検知した場合は引き抜き動作を模した運動（0.25 秒下降し 3 秒上昇）を行う設計とした。また、時間依存型上下動ではトルク値に関係なく 2 秒下降し 1 秒上昇する動作とした。

垂直荷重・トルク測定部では、根管模型固定用金属ステージに金属棒で連結されたトルクセンサーを、垂直荷重測定のために用いた。また、この金属棒にストレインゲージを設置してトルク測定に用いた。ストレインゲージで計測されるひずみ値のトルクへの変換係数は、既知の長さの糸と重りを用いて金属棒に既知のトルクを加えたときに測定されるひずみ値より求めた。なお、根管上部から根尖方向に加わる力と逆方向の力を，それぞれ正、負の荷重と定義した。また、正回転方向、逆回転方向のトルクを、それぞれ正，負のトルクとした。

2) 根管形成：21 本の直線型透明根管模型を用い、実験群（各群 n=7）は(1)トルク依存型往復回転とトルク依存型上下動を組み合わせた群（TqR 群）、(2)時間依存型往復回転と時間依存型上下動を組み合わせた群（TmR 群）、および(3)連続回転と時間依存型上下動を組み合わせた群（CR 群）とした。NiTi ロータリーファイルとして TF Adaptive ファイルを用い、 SM1（#20/0.04 テーパー）および SM2（#25/0.06 テーパー）にて作業長まで根管形成を行い、SM2 での根管形成時に垂直荷重およびトルクを測定した。また、使用後の SM2 をデジタルマイクロスコープで観察し、変形の有無を確認した。各群の垂直荷重およびトルクの平均値と最大値を求め、一元配置分散分析および Tukey's test にて有意水準 5%で統計学的解析を行った。

[結果]

TqR 群では、根尖付近に向かうに従い負の垂直荷重(歯根側から歯冠側への力)と正のトルク（正回転方向）が増加した。TmR 群では垂直荷重、トルクは共に正・負両者の方向で増加した。CR 群では負の垂直荷重と正のトルクが増加した。

垂直荷重およびトルクの平均値については、正，負方向ともすべての群間で有意差は認められなかった。しかしながら、垂直荷重の最大値については、負領域で TmR 群が CR 群より有意に小さい値を示しており($P<0.05$)、また、トルクの最大値は正・負領域とも TqR 群と TmR 群が CR 群に比べて有意に小さい値であった($P<0.05$)。

なお、TmR 群で 2 本、CR 群では 4 本のファイルの変形を認めた。

[考察]

トルク依存型および時間依存型往復回転によって根管形成を行った際の垂直荷重およびトルクを測定した報告は、著者らの知る限り行われていない。さらに本実験に用いた自動根管形成・応力解析装置はトルク依存型上下動を初めて可能としたものであり、類似した実験装置はいくつかあるが、臨床で用いられる操作をより良好にシミュレートできたと考えられる。

本研究の結果、垂直荷重の最大値については、負領域で TmR 群が CR 群より有意に小さい値であり、また、トルクの最大値は正・負領域とも TqR 群と TmR 群が CR 群に比べて有意に小さい値であった。したがって、「NiTi ロータリーファイルを用いた根管形成で、トルク依存型あるいは時間依存型往復回転で生じるトルクや垂直荷重は連続回転と比較して小さい」との仮説は支

持された。

TqR 群では断続的に垂直荷重が負領域に増加すると同時にトルクが正領域へと増加した。このようなパターンは、ねじ込み効果の発現を示唆するとともに、トルク依存型運動によりトルク検知後直ちに応力が解除されたことをも反映したものと考えられる。

TmR 群では垂直荷重とトルクは TqR 群よりも連続的に正・負領域で増加した。負方向の垂直荷重と正方向のトルクの増加はねじ込み効果の発現を、また正方向の垂直荷重と負方向のトルクの増加は逆回転での下降運動を反映しており、これらの現象が交互に生じたものと考えられる。しかしながら、逆回転での上昇運動の際にトルクの解放が生じたと思われる。

CR 群は TqR 群と同様に、ねじ込み効果の発現と解放を示唆する応力変化パターンを示した。本群では垂直荷重とトルクは上昇運動時にのみ解放されるため、他群より大きいトルク最大値を示したものと思われる。

TmR 群における垂直荷重の負領域での最大値は CR 群に比べて有意に小さかった。時間依存型往復回転では非切削方向への回転により力が解除されるため、ねじ込み力が抑制されたものと考えられる。

また TqR 群および TmR 群では、最大トルク値は正・負領域とも CR 群に比べて有意に小さい値であった。正領域のトルクについては、CR 群ではファイル下降中の食い込みにより顕著なねじ込み力が生じたと思われるが、TqR 群および TmR 群では非切削方向への回転によりねじ込み力が解放されたと考えられる。また CR 群における負領域のトルクについては、食い込んだファイルが上昇運動で引き抜かれ、ねじれ応力が解放された際に、反発的に生じたと推定される。

本研究結果から、二種の往復回転運動は連続回転運動と比較して、ねじ込み効果で生じる応力の軽減に有効であることが示唆される。ねじ込み力の減少はファイル破折の原因となるねじれ疲労の軽減に結びつくと思われる。

[結論]

本実験条件下では、TF Adaptive ファイルを用いた根管形成において、トルク依存型および時間依存型往復回転では、連続回転と比較して最大トルクが有意に低値となること、およびねじ込み効果によって生じた応力が減少することが示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5461　号 | 時田　大輔 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宇尾　基弘<br>副　査　荒木　孝二 二階堂　徹 | |
| 論 文 題 目 | Dynamic Torque and Vertical Force Analysis during Nickel-titanium Rotary Root Canal Preparation with Different Modes of Reciprocal Rotation | |

（論文審査の要旨）

NiTi ロータリーファイルは彎曲根管を効率的かつ確実に形成可能な器具として開発され、臨床への普及が進んでいるが、根管形成中に突然破折してしまう問題は十分には解決されていない。しかしながら近年では、NiTi ロータリーファイルを往復回転運動させて根管形成を行うことにより、ファイルの破折抵抗性が向上することが注目されている。そのためトルクに関係なく正逆方向への回転を繰り返す機構である時間依存型往復回転運動、あるいは、トルクを検出しつつ正回転で作動し、既定のトルク値に達すると逆回転したのちトルク検出を行わずに正回転する機構、すなわちトルク依存型往復回転運動で作動する根管形成用モーターが開発されている。

一方、いわゆるねじ込み効果（screw-in effect）は、らせん状のファイル刃部が根管壁に食い込んだ結果、ファイルが根尖方向に引き込まれる現象であり、ねじれ疲労破折の一因と考えられている。往復回転運動では非切削方向への回転でねじれ応力が解放され、ファイルの食い込みの軽減も期待されるが、往復回転運動時に生じるねじ込み効果に対する動的解析はほとんど行われていない。

本研究は以上のような背景のもと、自作型の自動根管形成・応力解析装置を用いて、NiTi ロータリーファイル（TF Adaptive）をトルク依存型あるいは時間依存型往復回転で駆動して根管形成を行った際に生じるトルクと垂直荷重を計測し、連続回転で用いた場合との比較が行なわれており、充分な新規性を備えた内容となっている。さらに、本研究のために開発された自動根管形成・応力解析装置は、トルクに応じてハンドピースの上下動を制御することが可能となっている。これは既報で用いられた類似装置の機能を上回る設計であり、ファイルの動きを臨床的な動作に近似した条件でシミュレートしながら解析が行なわれている点は高く評価できる。

本研究では、上述の自動根管形成・応力解析装置にて、TF Adaptive を用いたシングルレングス法により規格化直線根管模型の形成が行なわれており、トルク依存型往復回転運動、時間依存型往復回転運動、あるいは連続回転運動で根管形成を行った際に生じる垂直荷重およびトルクの特徴を捉えることに成功している。さらに、垂直荷重およびトルクの各群における平均値と最大値を算出して比較解析が行なわれている。ファイルの駆動様式による差異を規格化された条件で客観的に検出するうえで、妥当な実験条件ならびに実験群の設定がなされており、

得られた結果に対する統計処理も適切である。

得られた結果の概要は以下の通りである。

1. トルク依存型往復回転運動では、根尖付近に向かうに従い負の垂直荷重(歯根側から歯冠側への力)と正のトルク（正回転方向）が増加した。
2. 時間依存型往復回転運動では垂直荷重、トルクは共に正・負両者の方向で増加した。
3. 連続回転運動では負の垂直荷重と正のトルクが増加した。
4. 垂直荷重およびトルクの平均値については、正，負方向ともすべての群間で有意差は認められなかった。
5. 垂直荷重の最大値は、負領域で時間依存型往復回転運動が連続回転運動より有意に小さい値を示した。
6. トルクの最大値で、正・負領域ともトルク依存型および時間依存型往復回転運動が連続回転運動に比べて有意に小さい値であった。

以上のように、本研究では、トルク依存型および時間依存型往復回転運動、あるいは連続回転運動で根管形成を行った際に生じる垂直荷重およびトルクの特徴を明確にしている。これに基づき、トルク依存型往復回転運動ではねじ込み効果が生じた際に規定トルク値に達し、反時計方向の回転が作動してトルクが解除されること、時間依存型往復回転運動では規則的な往復回転によりトルクが解除されること、および、連続回転ではねじ込み効果で生じる応力がハンドピースの上昇でのみ解除されることを考察している。また、往復回転運動において、負領域の垂直荷重の最大値、あるいは正・負領域のトルクが連続回転運動より有意に低値となったことについては、往復回転運動における反時計方向の回転によりねじ込み効果で生じる応力が早期に解除されるためとしている。

本研究は、NiTi ロータリーファイルの根管内破折を防止するうえでの往復回転運動の有用性を、独自の自動根管形成・応力解析装置を用いて解析したものであり、NiTi ロータリーファイルによる根管形成の安全性向上や適応範囲の拡大を図る上で極めて有益な情報を提供しており、歯科医学・医療の今後の発展に寄与するところが大きいと考えられた。従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 阿部　泰典 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　泰羅　雅登<br>副 査　　谷口　尚　　森山　啓司 |
| 論　文　題　目 | Unilateral nasal obstruction affects motor representation development within the face primary motor cortex in growing rats |

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

呼吸機能が顎顔面の成長発達に与える影響については広く議論されている。正常な鼻呼吸は顎顔面の調和した成長発達を促し、咀嚼・嚥下機能の発達をもたらす。一方、鼻呼吸障害は、アレルギー性鼻炎、副鼻腔炎および扁桃肥大などの鼻閉塞により引き起こされ、ヒトにおいて慢性的な鼻呼吸障害は、口唇の弛緩、低位舌および下顎骨の後方回転を招くことが報告されている。特に成長期の鼻呼吸障害は口唇、舌および頬筋の機能低下を引き起こし、さらに成長期ラットにおける鼻呼吸障害の実験においても咬筋と顎二腹筋前腹の成長量を低下させ、舌突出筋の耐疲労性の増加や開口反射の潜時延長を生じることが明らかになっている。

顎顔面の運動機能は、大脳皮質一次運動野顔面領域（face-M1）により制御されている。face-M1 は、咀嚼・嚥下などの半随意運動や開閉口運動のような随意運動に重要な役割を果たし、精密な運動を可能とする。face-M1 の機能的な変化を解明するために皮質内微小電気刺激（ICMS）が広く用いられており、先行研究により、face-M1 は新たな運動の獲得や新しい環境への適応においては神経可塑性を示し、歯の移動や喪失、舌神経損傷および咬合挙上などにより末梢感覚が変化すると、face-M1 では機能的な変化が認められると報告されている。

成長期における鼻呼吸障害は、顎顔面領域の形態や機能の発達に影響を与えることが数多く報告されているが、咀嚼や嚥下などの機能を司る中枢神経系に与える影響については未だ明らかでない。そこで本研究は、成長期における鼻呼吸障害が顎顔面領域の運動制御に重要な役割を担う face-M1 の発達に与える影響について、ICMS を用いて解明することを目的とした。本研究の仮説は、成長期ラットにおける片側鼻閉塞は face-M1 の発達に影響を与えるとした。

＜材料および方法＞

6 日齢 Wistar 系雄性ラット 72 匹を実験群と対照群（各 n=36）に分けた。両群とも 8 日齢で低温麻酔を施し、実験群ラットは電気焼灼器で左側外鼻孔を焼灼し閉塞させ、対照群ラットは左側外鼻孔の 1～2mm 上方を焼灼する偽手術を行った。経皮的動脈血酸素飽和度（SpO2）は覚醒下で計測し、連続した 40～50 秒間の平均値とした。

ICMS による記録は、両群とも 5、7、9 および 11 週齢で行った（各 n=9）。ケタミン麻酔下で脳定位固定装置にラット頭部を固定し、刺激電極として直径 100μm のタングステン微小電極を使用し、刺激電流として 60μA、333Hz、12 pulses の矩形波を用いて行った。電極の刺入部位は、bregma を基準に前方に 0.0～4.5mm、側方に 0.0～5.0mm の範囲とし、0.5mm 間隔で刺入、深さを 0.5mm ずつ変化させた。ICMS により誘発される舌運動および顎運動はオトガイ舌筋（GG）、左側顎二腹筋前腹（LAD）および右側 RAD から筋電図活動（EMG）を用いて記録した。ICMS で連続した 5 回の電気刺激を加え、EMG で 3 回以上の筋活動が誘発された部位を ICMS 陽性部位とした。ICMS で電気刺激後 40 ミリ秒以内に EMG で基線より 2 S.D.を超えて大きな電圧が認められた場合を筋活動が誘発されたと判定した。さらに重心は、GG、LAD および RAD の陽性部位の 3 次元的座標の平均から算出した。分析項目は体重、SpO2、ICMS 陽性部位数、重心および潜時とした。統計学的解析は、多重比較に Sidak 法による単純主効果分析を用い、有意水準は 5%とした。

＜結果＞

体重は、すべての週齢において両群間に有意差を認めなかった。SpO2 は、すべての週齢において対照群に対し実験群が有意に小さい値となった。実験群の群内比較では、GG、LAD、RAD、GG+LAD、GG+RAD、LAD+RAD および GG+LAD+RAD の筋活動が誘発された刺激部位数の総和が 5 週齢から 9 週齢まで有意に増加し、9 週齢と 11 週齢で有意差を認めなかった。同様に対照群の群内比較では、筋活動が誘発された刺激部位数の総和が 5 週齢から 9 週齢まで有意に増加し、9 週齢と 11 週齢で有意差を認めなかった。実験群の筋活動が誘発された刺激部位数の総和はすべての週齢で対照群に対して有意に小さな値となった。

実験群の GG の重心は、対照群に対して 7、9 および 11 週齢で有意に内側に位置した。実験群の LAD の重心は、対照群に対して 5 週齢で有意に吻側に位置し、7、9 および 11 週齢で有意に内側に位置した。実験群の RAD の重心は、対照群に対して 5 週齢で有意に吻側に位置し 9 および 11 週齢で有意に内側に位置した。

実験群の GG、LAD および RAD の潜時は、すべての週齢において対照群に対して有意な差は認めなかった。

＜考察＞

本研究において、face-M1 領域は両群とも 5 週齢から 9 週齢まで有意に増加し、9 週齢と 11 週齢で有意差を認めなかった。正常な成長期ラットの face-M1 領域は 9 週齢までにプラトーに達すると考えられる。成長期ラットの M1 前脚領域（forelimb-M1）は同様に 60 日齢までにプラトーに達し、機能的に成熟することが報告されている。M1 領域は運動技能の向上により拡大する一方で、筋力や筋持久力の向上では変化しないことが明らかになっている。これらより成長期ラットは、咀嚼・嚥下や開閉口運動などの複雑な顎運動の発達に関係して face-M1 領域は拡大し、9 週齢までに機能的に成熟することが示唆された。

SpO2 に関して、すべての週齢で実験群は対照群に対し有意に小さな値となり、成長期における片側鼻閉塞は呼吸動態を変化させることが本研究により明らかとなった。成長期の呼吸動態の変化は、顎顔面の

筋の発達に影響を与え、顎二腹筋前腹や咬筋の成長量が有意に減少することが報告されている。また、顎二腹筋前腹ではミオシン重鎖（MHC）の組成割合が変化し、MHC II-X が増加する一方で MHC II-A が減少することも報告されている。MHC の組成は筋機能の変化に応じて変化することが知られており、成長期における鼻閉塞は、顎顔面の筋機能を変化することが示唆される。

一方、実験群の筋活動が誘発された刺激部位数の総和は、すべての週齢で対照群に対して有意に小さな値となり、成長期における片側鼻閉塞は face-M1 の領域は縮小を招くことが明らかとなった。成長期ラットにおいて前肢を取り除くと forelimb-M1 は縮小することが報告されている。口腔領域においても、顔面神経損傷や下顎前歯切除により face-M1 が萎縮し、face-M1 は環境の変化に応じて変化することが報告されている。これらの先行研究より、片側鼻閉塞は顎顔面の筋機能の発達に影響を与え、face-M1 の発達に影響を与えたと考えられる。成長期における片側鼻閉塞による face-M1 領域の縮小は、顎口腔機能の低下を示唆する。重心の変化を伴わない M1 の変化は、M1 を修飾する前運動野、大脳基底核および体性感覚野などの M1 以外の領域の変化を反映している可能性が考えられるが、本研究では実験群の GG、LAD および RAD の重心は対照群に対して有意な変化を認めたため、M1 自体に変化が起きていると考えられる。

潜時に関しては、すべての週齢において実験群と対照群で有意な変化は認めなかった。ICMS の潜時の変化は、皮質脊髄路の伝導性の変化により起こることが知られている。このことから、成長期における片側鼻閉塞は皮質脊髄路の発達に影響を与えないことが本研究より示唆された。この結果に関し、口腔環境の変化が潜時に影響を与えないことが先行研究でも同様に報告されている。

以上のことから、本研究は成長期ラットにおける片側鼻閉塞が開口筋および舌突出筋の運動制御を司る face-M1 の発達に与える影響を初めて明らかにした。ヒトにおいて、顎顔面領域の末梢神経の損傷や局所麻酔に伴い、ラットと同様に face-M1 が変化することが経頭蓋磁気刺激法や機能核磁気共鳴断層装置により報告されている。これらの先行研究から、ヒトにおいても、成長期のおける鼻閉塞は face-M1 の発達に影響を与えることが示唆される。成長期における鼻閉塞が中枢に与える影響やその機序を解明することは、顎顔面領域の形態および機能の効果的な治療法の確立に寄与すると考えられる。

＜結論＞

成長期ラットにおける片側鼻閉塞は、呼吸機能のみならず顎顔面領域の運動制御に重要な役割を担う face-M1 の発達に影響を与えることが明らかになった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5462　号 | 阿部　泰典 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　泰羅　雅登<br>副 査　　谷口　尚　　森山　啓司 | |
| 論 文 題 目 | Unilateral nasal obstruction affects motor representation development within the face primary motor cortex in growing rats | |

（論文審査の要旨）

歯科矯正臨床において顎顔面領域の正常な発達を促す上で、鼻呼吸は重要な役割を果たすと認識されている。近年、アレルギー性鼻炎等により鼻呼吸障害を有する小児が増加傾向にあり、成長期における鼻呼吸障害が顎顔面領域の形態および機能の発達に与える影響は数多く報告されている。一方で、鼻呼吸障害が中枢に与える神経生理学的影響は未だ明らかになっていない。

そこで、阿部は顎顔面領域の運動制御に関与する face-M1 に着目し、成長期の大脳皮質一次運動野は鼻呼吸障害という末梢環境の変化に応じて発達するという仮説を立て、電気生理学的手法を用いてその仮説を検討し、興味深い結果を報告した。

研究方法としては、6 日齢 Wistar 系雄性ラット 72 匹を実験群と対照群（各 n=36）に分け、両群とも 8 日齢で低温麻酔を施し、実験群ラットは左側外鼻孔を焼灼し閉塞させ、対照群ラットは偽手術を行った。両群とも 5、7、9 および 11 週齢時に大脳皮質一次運動野をタングステン微小針電極を用いて ICMS を行い、誘発されたオトガイ舌筋および左右顎二腹筋前腹の筋活動を記録した。また、同時期に SpO2 を測定した。分析項目として、SpO2、単独の筋の筋活動が誘発された刺激部位数、同時に 2 つまたは 3 つの筋の筋活動が誘発された刺激部位数、それぞれの筋に筋活動が誘発された刺激部位の重心、刺激を行ってから筋活動が誘発されるまでの潜時を算出し分析した。本手法は、電気生理学的知識のみならず高い解剖学的知識、外科的技術の裏付けのもとに遂行されており、同人の研究方法に対する知識と技術力が十分に高いことが示されると同時に、本研究が極めて周到な準備の上に行われてきたことが窺われる。

得られた結果の概要は以下のようなものである。

1. 各週齢において実験群と対照群の体重に有意な差は認められなかった。
2. 各週齢において対照群の SpO2 は実験群に対して有意に小さな値となった。
3. 実験群と対照群ともにオトガイ舌筋および左右顎二腹筋前腹に筋活動が誘発された刺激部位数の総和は 5 週齢から 9 週齢まで有意に増加したが、9 週齢と 11 週齢で有意な差は認められなかった。
4. 実験群のオトガイ舌筋および左右顎二腹筋前腹に筋活動が誘発された刺激部位数の総和は対照群に対してすべての週齢において有意に小さな値となった。

5. 実験群の左側顎二腹筋の筋活動を誘発する刺激部位数は対照群に対してすべての週齢で有意に大きな値となった。

6. 実験群と対照群ともに各筋の筋活動が誘発された刺激部位の重心は成長と共に吻側および外側に移動した。

7. 実験群の各筋の筋活動が誘発された刺激部位の重心は対照群に対して内側に位置した。

8. 各週齢において実験群と対照群の各筋の潜時に有意な差は認めなかった。

face-M1 は末梢環境の変化に応じた顎運動および舌運動の制御に重要な役割を果たすことが知られている。上記の結果から、成長期ラット face-M1 は成長とともに拡大し、９週齢までに成獣と同じ大きさに達し機能的に成熟するが、鼻呼吸障害により face-M1 は単独で対側の顎二腹筋前腹の筋活動を誘発する領域を除いて縮小することが示唆された。

以上より、本論文は、大脳皮質一次運動野の体部位局在に着目し、成長期における鼻呼吸障害が末梢における変化のみならず中枢神経系、特に face-M1 に与える影響について初めて明らかにしたものであり、今後の歯科臨床のみならず、歯科医学や神経生理学の発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 須藤　毅顕 |
|---|---|
| | 主 査　　木下 淳博<br>副 査　　櫻田 宏一　角田 達彦 |
| 論　文　題　目 | Association of *NOD2* mutations with aggressive periodontitis |

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

侵襲性歯周炎（AgP）は急速な歯槽骨破壊と早期の歯の喪失を特徴とする疾患であるが、その病因は未だ不明である。AgP の遺伝的要因を明らかにする為、著者らはまず identity-by-descent（IBD）mapping を行い、責任遺伝子が含むことが予想される 32 遺伝子座位を同定した。続いて罹患者 5 名、非罹患者 1 名を含む 2 家系を用いた全エクソーム解析を実施した。変異の絞り込みとサンガーシークエンス解析による確認を行った結果、16q12 に位置する *NOD2* において 2 つのミスセンス変異（p.Ala110Thr と p.Arg311Trp）を同定した。さらに、94 名の遺伝的に独立した AgP 患者に対し *NOD2* のターゲットシークエンス解析を行い、2 名の患者においても p.Arg311Trp 変異を認め、3 つのさらなるミスセンス変異（p.His370Tyr、p.Arg459、p.Ala868Thr）を同定した。これらはいずれも、アジア人集団において、報告無し、もしくは極めて頻度が低い（0.1%未満）変異であった。NOD2 タンパクは、細胞内受容体として nuclear factor- kappa B (NF-κB) 及び mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル経路を活性化させ、自然免疫における重要な役割を担っている。これらの結果は、*NOD2* が AgP の新規責任遺伝子であることを示している。

＜緒言＞

侵襲性歯周炎（AgP: MIM170650）は希少かつ重篤なタイプの歯周炎であり、特徴として急速な歯槽骨破壊、全身的に医科的既往歴が無いこと、及び家族集積性等が挙げられる。遺伝要因が主な発症要因の一つと考えられているが、これまでの免疫関連遺伝子に焦点を当てた候補遺伝子アプローチによる研究では、未だ原因遺伝子の同定には至っていない。地域によって多少のばらつきを認めるものの、その低い罹患率が世界中で報告されており、低い罹患率と家族集積性の特徴から稀な遺伝子変異が疾患リスク要因であることが示唆される為、より包括的なアプローチによる原因遺伝子の探索が必要と考えられた。

これらのことから、著者らは日本人祖先由来の AgP 患者を含む 2 家族を対象に全エクソーム解析を行い、NOD2 遺伝子の変異の同定に成功した。また 94 人の遺伝的に独立した AgP 患者を対象にターゲットシークエンス解析を行い、さらに 3 つの変異を同定した。

＜方法＞

東京医科歯科大学歯学部附属病院の歯周病外来を通じて AgP 患者を 99 人選出し、その内 2 家系（AgP 患者 5 人および非罹患者 1 人）について、末梢血由来のゲノム DNA を用いて IBD (identity-by-descent) mapping および Ion Proton による全エクソーム解析を行った。全ゲノム SNP ジェノタイピングは、HumanCoreExomeBeadChip、塩基の決定とクラスタリングは GenomeStudio v1.0 Genotyping Module を用いた。ノンパラメトリック IBD 解析は Okada らによって新しく開発された手法を用いた。

エクソーム解析によって得られた遺伝子変異に対して、下記の filtering を実施した。すなわち（1）低 depth 変異の除去、（2）Insertion/deletion の除去、（3）罹患者に共通した変異以外の除去、（4）同義置換の除去、（5）公共データベース（Human Genetic Variation Browser、1000-genome database、NHLBI Exome Sequence Project）に登録され Minor Allele Frequency（MAF）1%以上のコモンバリアントの除去を行った。絞り込まれた変異の確認はサンガーシークエンス法にて行った。最後に 94 人の独立した AgP 患者に対し、Ion Proton を用いて *NOD2* のターゲットシークエンス解析を行った。

＜結果＞

まず 99 人のうち 2 家系（Family1: AgP 患者 3 人と非罹患者 1 人、Family2: AgP 患者 2 人）を対象に、原因変異が含まれることを期待した IBD 領域を同定する為に、Okada らによって新たに開発されたノンパラメトリック連鎖解析を行った結果、54.2Mbp に及ぶ 32 の IBD 領域を AgP 罹患者が共有していることが分かった。続いて同じ 2 家系を対象に全エクソーム解析を行い、平均 35,154,417 リードが hg19 ヒト参照配列にマッピングされ、on target 比率とカバレッジはそれぞれ 93.36%と x93.01 であった。Torrent suite software v4.0 を用いて平均 48,733 変異が検出され、独自のフィルタリングに従って解析を行った結果、Family 1 では 96 変異、Family 2 では 321 変異まで絞られた。絞られた変異を 2 家系間で比較した結果、*NOD2*（MIM: 605956）と *OBSCN*（MIM: 608616）の 2 遺伝子に各家系の罹患者に共通のミスセンス変異を認めた。

これらの候補遺伝子変異の妥当性を確かめるため、4 つの変異は全てサンガーシークエンス法により評価した。*OBSCN* の 2 つのミスセンス変異のうち、c.7589T>G は変異が確認されず、*NOD2* における 2 つの変異、c.328G>A（p.Ala110Thr）と c.931C>T（p.Arg311Trp）は共にヘテロ接合性の変異が確認された。さらに、*NOD2* の変異は IBD mapping によって同定された IBD 領域に含まれていたが、*OBSCN* の変異は含まれていなかった。2 つの変異 c.328G>A と c.931C>T は既に rs571102620、rs104895427 として dbSNP データベースに登録されており、公共データベースにおける各 MAF は 1%未満であった。NOD2 は細胞内タンパク質であり、NF-κB や MAPK シグナルを促進するパターン認識受容体として、自然免疫において必須の役割を担っている。*NOD2* の変異によるアミノ酸配列の変化（Ala110Thr、Arg311Trp）は、いずれも進化的に高い保存性を持ち、in silico の予測ツールにおいて、大きくタンパク質の機能に影響を与えると予想された。

著者らはさらに 94 人の遺伝的に独立した AgP 患者に対しターゲットシークエンス解析を行った。解析の結果、94 人のうち 5 人（5.3%）にミスセンス変異を認め、さらに公共データベースにおけるアジア人集団の MAF が 0.1%以下または登録無しの稀な 3 つの変異（His370Tyr、Arg459Cys、Ala868Thr）を同定した。Arg311Thr 変異も更に 2 人の患者に見られ、サンガーシークエンス法により確認された。

＜考察＞

この研究では、AgP 罹患者を含む日本人家系例を対象に、全エクソーム解析と新規考案されたノンパラメトリック連鎖解析を統合して *NOD2* における 5 つの変異を同定した。さらに、日本人 AgP 患者のうち 5.3%の患者が NOD2 変異を保有していることを明らかにした。NOD2 タンパクは病原菌と特異的に反応するセンサーとして、自然免疫において重要な役割を担っている。NOD2 タンパクは、caspase activation and recruitment domains（CARDs）、nucleotide-binding domain（NBD）、leucine-rich repeats（LRRs）の 3 つのドメインからなり、順にタンパク-タンパク相互作用、自己重合化作用、リガンド認識作用を担っている。

LRRs は、グラム陰性菌の細胞膜を構成するペプチドグリカンの最小単位構造であるムラミルジペプチド（MDP）を認識し、NBD の自己重合化作用による立体構造変化を促す。自己重合化の後に起こる CARDs 相互作用は、NF-κB と MAPK シグナルの活性化を引き起こす。*NOD2* はクローン病、Blau 症候群、早期発症型サルコイドーシスなどの原因遺伝子の一つとして知られており、クローン病ではその多くが LRR に存在する機能喪失型変異、Blau 症候群と早期発症型サルコイドーシスでは NBD に存在する機能獲得型変異が報告されている。今回同定した変異は、Ala110Thr が CARD1、Arg311Thr と Arg459Cys が NBD、Ala868Thr は LRR に位置している。CARD の変異は、どのように下流のシグナルを変化させるか未だ不明であり、下流の RICK の持つ CARD との結合を活性化し、NF-κB シグナルを促進する可能性が考えられるが、CARD 内の他部位の変異により NF-κB 活性、および MDP との反応性も低下したという報告もある。AgP の発症機序の更なる理解の為に本研究で同定した変異の詳細な機能解析が必要と考えられる。

炎症性腸疾患と歯周炎は多因子の炎症疾患であり、細菌感染とそれに続く宿主の免疫反応が主な発症要因である点が共通している。未だ AgP の遺伝要因は明らかになっていないが、炎症性腸疾患における遺伝要因の関与については数多く報告がある。著者らは初めて AgP 患者における *NOD2* の変異を報告し、炎症性腸疾患と AgP の新たな共通因子を見出した。今後、どの様に *NOD2* 内の異なる変異が 2 つの疾患を引き起こすか検討する必要がある。

＜結論＞

本研究により、日本人の侵襲性歯周炎患者における *NOD2* 遺伝子の変異が同定され、侵襲性歯周炎の遺伝的背景の一端が解明された。*NOD2* が自然免疫システムに重要な細胞質内受容体であることから、急速な歯槽骨破壊を招く過程において、*NOD2* の遺伝子変異が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5463　号 | 須藤　毅顕 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　木下 淳博<br>副 査　　櫻田 宏一　角田 達彦 | |
| 論 文 題 目 | Association of *NOD2* mutations with aggressive periodontitis | |

（論文審査の要旨）

侵襲性歯周炎は比較的早期に急速な歯槽骨破壊を認める劇症型の歯周炎で、家族集積性という特徴があることから遺伝要因の関与が示唆されている。これまで一塩基多型（SNP)を利用した遺伝子解析が主に行われてきたが、再現性のある遺伝子の報告は無く、罹患率も非常に低いことから、よりアレル頻度が低い変異が疾患に寄与している可能性が考えられる。本研究では、世界に先駆けて侵襲性歯周炎の家系例を用いたエクソーム解析を行い、家系内の罹患者に共通して認められる *NOD2* 遺伝子の変異を同定した。

本研究では、東京医科歯科大学附属病院歯周病外来にて本研究への協力を表明した侵襲性歯周炎患者 99 人のゲノム DNA を収集した。侵襲性歯周炎患者を複数含む 2 家系(罹患者 5 名、非罹患者 1 名)について、まず identity-by-descent（IBD）mapping を実施し、続いて同じ 2 家系に対しエクソーム解析を実施した。得られた各サンプルの遺伝子変異に対して、低 depth 変異の除去、Insertion/deletion の除去、罹患者に共通した変異以外の除去、同義置換の除去、公共データベースに登録され頻度 1%以上のコモンバリアントの除去、の順に絞り込みを実施し、サンガー法にて確認を行った。他の罹患者における同じ遺伝子内に稀なミスセンス変異の有無を検討するため、残りの遺伝的に独立した侵襲性歯周炎患者 94 人に対し、同定した遺伝子のターゲットシークエンス解析を行った。

本研究から、須藤毅顕は以下の結果を得た。

・日本人の侵襲性歯周炎患者のエクソーム解析により、*NOD2* 遺伝子の変異（p.Ala110Thr と p.Arg311Trp）を同定した。
・エクソーム解析により同定した *NOD2* 遺伝子変異は、identity-by-descent（IBD）mapping により絞り込まれた 32 の DNA 領域内に含まれており、サンガー法により確認された。
・94 例を対象にターゲットシークエンスを行い、*NOD2* 遺伝子に稀なミスセンス変異が検出された割合は 5.3%であった。
・本研究により *NOD2* 遺伝子のエクソン領域内に 5 箇所の稀なミスセンス変異を同定し、*NOD2* を構成する 3 つのドメイン（LRR、NBD、CARD)のいずれの領域でも認められた。またそのうち 1 箇所はこれまで変異の報告のない新規遺伝子変異であった。

またこれらの結果から、須藤毅顕は以下の点について考察している。

・*NOD2* タンパクは自然免疫のシグナル伝達経路において重要な細胞内受容体であり、口腔内の細菌侵入における炎症反応において大きな役割を果たすことが知られている。侵襲性歯周炎の病態の本質は細菌感染による歯槽骨破壊であることから、*NOD2* 遺伝子の変異が侵襲性歯周炎の発症に影響を与えている可能性は高いと考えられる。

・*NOD2* はクローン病、Blau 症候群、早期発症型サルコイドーシスなどの炎症性腸疾患の原因遺伝子として知られている。炎症性腸疾患と歯周炎は共通点が多く、特に多因子の炎症疾患であること、細菌感染とそれに続く宿主の免疫反応が主な発症要因であることなどが挙げられる。しかし、どのようなメカニズムで *NOD2* 内の異なる変異が 2 つの疾患を引き起こすかについては、未だ解明されていない。炎症性腸疾患の *NOD2* 変異は欧米人の集団で報告が多く、アジア人では少ないため、集団による違いが影響している可能性が考えられる。

・*NOD2* は LRR、NBD、CARD の 3 つのドメインから構成されており、順にリガンド認識、多量体形成、シグナル伝達の機能を有することが知られている。クローン病における *NOD2* 変異ではその多くが LRR に存在する機能喪失型変異、Blau 症候群と早期発症型サルコイドーシスでは NBD に存在する機能獲得型変異が報告されており、今回同定した 5 箇所の変異は、Ala110Thr が CARD1、Arg311Thr と Arg459Cys が NBD、Ala868Thr は LRR に位置していた。CARD の変異については、下流の RICK の持つ CARD との結合を活性化し、NF-κB シグナルを促進する機能獲得型が予想されるが、機能喪失型の報告もあり、これら変異が疾患に及ぼす影響を解明するための詳細な機能解析が必要と考えられる。

本研究で須藤毅顕は、侵襲性歯周炎患者における *NOD2* 遺伝子変異の存在を初めて明らかにした。侵襲性歯周炎を対象にしたエクソーム解析を行った報告は少なく、仮説を置かない本網羅的解析で自然免疫において重要な役割を担う *NOD2* 遺伝子の変異が同定されたことは、*NOD2* 遺伝子が侵襲性歯周炎の発症メカニズムに影響を与えていることを強く示唆している。また *NOD2* はクローン病などの炎症性腸疾患の原因遺伝子として報告されており、細菌感染全般の原因解明にも貢献する可能性があり、その意義は非常に大きいものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 笠原　由紀 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　井関　祥子<br>副 査　　森山　啓司　　中濵　健一 |
| 論　文　題　目 | Low-intensity pulsed ultrasound reduces periodontal atrophy in occlusal hypofunctional teeth |

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

犬歯低位唇側転位や開咬による咬合刺激の低下が、歯根膜や歯槽骨の廃用性萎縮をもたらすことはよく知られている。近年、整形外科領域において骨折治癒を促す手段として低出力パルス超音波（LIPUS）が臨床応用されている。そこで、咬合刺激低下歯に対する LIPUS 照射が歯周組織の萎縮を軽減すると仮定し、本研究を行った。Micro-CT 解析の結果から、LIPUS 照射によって歯根膜の萎縮および歯槽骨の骨密度の低下が減少することが明らかとなった。さらに、コラーゲン線維の産生および改造に関与する Twist1、Ctgf ならびに Postn の歯根膜における mRNA の発現量をリアルタイム PCR で検討したところ、咬合刺激低下歯では減少したが、LIPUS 照射により増加した。以上のことから、LIPUS 照射が咬合刺激低下歯における歯周治療および骨再生を促進するアプローチとなる可能性が示唆された。

＜緒言＞

矯正歯科治療においては、犬歯低位唇側転位、開咬あるいは埋伏歯のような不正咬合に頻繁に遭遇する。このような不正咬合に伴う咬合刺激の低下は、歯根膜の菲薄化、骨密度の低下といった萎縮性変化を歯周組織に引き起こすことがよく知られている。すなわち、歯根膜の恒常性の維持および歯槽骨のリモデリングにはメカニカルストレスが重要な役割を果たすと考えられている。

歯根膜は、骨芽細胞、線維芽細胞ならびにそれらの前駆細胞などの様々な細胞種を含む細胞集団と細胞外マトリックスで構成されている。細胞外マトリックスの主な構成成分は、コラーゲンから成る歯根膜線維であり、その大半はⅠ型コラーゲンである。Ⅰ型コラーゲンは結合組織増殖因子（Ctgf）と periostin（Postn）によって合成が促進されることが報告されており、Postn は Ctgf と共に TGF-β/Twist1 を介して歯根膜組織の恒常性の維持に関与していると考えられている。また、Ctgf は、Ⅰ型、Ⅲ型コラーゲンおよび Postn の発現を促進し、コラーゲン線維束に高密度の Postn が局在する成熟歯根膜組織の再生を促進することが知られている。加えて、咬合刺激は歯根膜における Twist1 と Postn の発現を増加させ、咬合刺激の喪失が Ctgf と Postn の遺伝子およびタンパク質の発現を減少させるとの報告もある。

低出力パルス超音波（LIPUS）照射は、メカニカルストレスを付与することで骨折治癒を促進することから整形外科領域において臨床応用されている。LIPUS 照射は骨密度と骨ミネラル含有量の増加および骨癒合を促進する。この骨折治癒促進メカニズムに関して、LIPUS 照射が MEK-ERK 経路を介して間葉系幹細胞と骨芽細胞の成熟骨芽細胞への分化を促進するとの報告や、Vegf、Bmp2 および Runx2 を含む様々な遺伝子発現を介して骨芽細胞増殖・分化に関与するとの報告がある。一方、細胞外マトリックス産生に関して、コラゲナーゼで処理した腱線維芽細胞を用いた実験では、LIPUS 照射は細胞増殖およびコラーゲンの合成を促進することが報告されている。また、培養歯肉細胞を用いた実験においては LIPUS 照射によって Ctgf 遺伝子およびタンパク質発現が増加することが示されている。

以上のことから、本実験においては、咬合刺激低下に伴う歯周組織の萎縮に対する LIPUS 照射の効果を明らかにすることを目的とした。また、LIPUS 照射が線維形成に関連する因子の発現を誘導することにより歯根膜および歯槽骨の形態的回復を促すと仮定し、*Twist1*、*Ctgf* ならびに *Postn* の発現レベルを評価した。

＜材料および方法＞

本研究は、東京医科歯科大学動物実験規則に従って計画し、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認（承認番号：0170209A）を得て遂行した。［動物実験モデル］臼歯歯根完成期にあたる生後 12 週の Sprague-Dawley 系雄性ラット 15 匹を用いた。ラットは正常咬合（C）群、咬合刺激低下（H）群、咬合刺激低下かつ LIPUS 照射（HL）群の 3 群（各 n=5）に分類した。H および HL 群において Suhr ら（2002）の方法に準じて、上顎切歯に金属製バイトプレート、下顎切歯に金属製キャップをコンポジットレジンにてそれぞれ装着し、上顎第一臼歯（M1）の咬合接触を排除して咬合刺激低下状態を誘導した。2 週間経過後、HL 群にのみ 1 日 20 分間の LIPUS 照射を 5 日間連続して行った。LIPUS 照射のパラメータは周波数 1.5 MHz、繰り返し周波数 1.0 kHz、パルス持続時間 200 μs、強度 300 mW/cm$^2$とした。C 群および H 群には偽照射を行った。最終照射の 8 時間後に $CO_2$を用いて全てのラットを安楽死させた後、上顎骨を採取し、4%ホルムアルデヒドにて固定した。［Micro-CT 解析］Micro-CT を用いて全てのサンプルを 20 μm 幅で撮影した。M1 の根間中隔部歯槽骨の歯槽骨体積/骨組織体積（BV/TV）および M1 の遠心頬側根の歯根膜腔体積を Shimizu ら（2013, 2014）の方法に基づき測定した。これらの測定には 3D 画像解析ソフトを用いた。［リアルタイム PCR］M1 の遠心頬側根の歯根膜を採取し、*Vegf*、*Runx2*、*Twist1*、*Ctgf* および *Postn* の mRNA 発現量を TaqMan プローブ法により測定した。インターナルコントロールとして *Gapdh* を用いた。［統計学的解析］Tukey 法による多重比較検定を用い、有意水準 5%レベルで有意差検定を行った。

＜結果＞

M1 の根間中隔部歯槽骨の BV/TV は C 群に比較して H 群で有意に（C 群の 0.94 倍）減少したが、HL 群では C 群との間で有意差が認められなかった。歯根膜腔体積は C 群に対して H 群で有意に（C 群の 0.68 倍）小さく、歯根膜の萎縮が観察された。HL 群では歯根膜腔体積が H 群に対して有意に（H 群の 1.24 倍）大きく、歯根膜の萎縮が軽減されていた。

リアルタイム PCR による mRNA 発現量の解析において、C 群と比較して咬合刺激が低下している H 群では *Vegf* と *Runx2* は低下傾向を示し、*Twist1*、*Ctgf*、*Postn* は有意に低下していた。LIPUS 照射した HL 群では、これらすべての遺伝子の mRNA 量が H 群と比較して有意（*Vegf*: H 群の 4.48 倍、*Runx2*: H 群の 5.45 倍、*Twist1*: H 群の 7.43 倍、*Ctgf*: H 群の 12.91 倍、*Postn*: H 群の 13.63 倍）に増加していた。

＜考察＞

咬合刺激低下歯の歯周組織においては、歯根膜の菲薄化、歯根膜線維の減少ならびに血管形成の低下などの萎縮性変化が起こる。一方、LIPUS は、骨折治癒における非侵襲的治療として用いられているとともに、in vivo の動物実験において歯の移動速度が上昇することが報告されている。本研究においては、LIPUS 照射に伴い歯根膜の萎縮が減少し、コラーゲン線維の産生および改造に関与する Ctgf および Postn の mRNA 発現量が上昇した。また、*Runx2* の発現は HL 群において有意に高かったが、BV/TV は H 群と HL 群の間で有意差が認められなかった。Runx2 は早期骨芽細胞の分化初期のマーカーであり、Bmp2/Smad/Runx2 経路の転写因子である。Xue らは、ヒト歯根膜細胞への LIPUS 照射は、Runx2 を介して Bmp2 の転写量増加によってタンパク質量が増加すると報告している。継時的な *Bmp2* の発現観察により、培養 5 日目から徐々にその発現量が増加し、7 日目にピークを示した後、14 日目まで発現レベルが維持されていたことが報告されている。よって、本実験における 5 日間の LIPUS 照射期間は萎縮した歯槽骨組織の回復を誘導するには不十分であった可能性がある。

咬合刺激低下によって歯根膜での *Postn*、*Twist1* および *Ctgf* の発現量が低下することは先行研究により報告されている。本研究でも同様に咬合刺激を低下した H 群において *Postn* ならびに *Twist1*、*Ctgf* の発現量が減少したが、LIPUS 照射はこの減少を抑制した。Postn は歯根膜の恒常性を維持するマトリックスタンパク質と考えられており、前骨芽細胞である MC3T3-E1 の骨芽細胞への分化誘導後に著しく発現が低下することから Postn は前骨芽細胞で発現していると考えられる。一方、*Postn* の発現は、メカニカルストレス下において Twist1 によって転写制御されると報告されている。Twist1 は、Twist1 に存在する Twist box が Runx2 の DNA 結合領域に作用することで Runx2 の転写活性を低下させ、骨芽細胞分化を阻害することが示されている。以上のことから、本研究においても LIPUS 照射が Twist1 の発現増加を介して歯根膜の恒常性を維持していると考えられた。

先行研究を併せ鑑みると、本研究結果は咬合刺激と同様に、LIPUS 照射が Twist1 および Ctgf を介して Postn の発現を誘導することで、歯根膜の萎縮を防ぐことを示唆している。歯根膜における Twist1 による Postn 発現を介した LIPUS 照射の効果を明らかにするために、Twist1 拮抗薬などを用いたさらなる解析が必要である。

＜結論＞

LIPUS 照射は咬合刺激低下に伴う歯根膜の萎縮と歯槽骨の骨密度低下を軽減した。咬合刺激低下歯に対する LIPUS 照射は歯根膜における Vegf と Runx2、Twist1、Ctgf および Postn の mRNA 発現レベルを増加させた。以上のことから、LIPUS 照射が咬合刺激低下歯における歯周治療および骨再生を促進するアプローチとなる可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5464　号 | 笠原　由紀 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　井関　祥子<br>副 査　　森山　啓司　中濵　健一 | |
| 論 文 題 目 | Low-intensity pulsed ultrasound reduces periodontal atrophy in occlusal hypofunctional teeth | |

（論文審査の要旨）

矯正歯科治療においては、犬歯低位唇側転位、開咬あるいは埋伏歯のような不正咬合に頻繁に遭遇する。このような不正咬合に伴う咬合刺激の低下は、歯根膜の菲薄化、骨形成や骨密度の低下といった萎縮性変化を歯周組織に惹起することがよく知られており、治療による歯牙の移動への影響が示唆されるところである。一方、歯根膜の恒常性および歯槽骨のリモデリングには、メカニカルストレスが重要な役割を果たすと考えられている。笠原は、骨折治癒を促すとして整形外科領域において臨床応用されている低出力パルス超音波（LIPUS）を咬合刺激低下歯に照射することで、歯周組織の萎縮を抑制できると仮定して実験を行った。

実験方法としては、臼歯歯根完成期にあたる生後 12 週の Sprague-Dawley 系雄性ラット 15 匹を用い、正常咬合（C）群、咬合刺激低下（H）群、咬合刺激低下および LIPUS 照射（HL）群の 3 群（各 n=5）に分類し実験を行った。H および HL 群において、上顎切歯に金属製バイトプレート、下顎切歯に金属製キャップをそれぞれ装着し、上顎第一臼歯（M1）の咬合接触を排除して咬合刺激低下状態を誘導した。2 週間経過後、HL 群にのみ 1 日 20 分間の LIPUS 照射を 5 日間連続で行い、最終照射 8 時間後にすべての個体から標本を回収して解析を行った。M1 の根管中隔部歯槽骨の歯槽骨体積/骨組織体積（BV/TV）、および遠心頬側根歯根膜腔体積を Micro-CT 画像によって、遠心頬側根歯根膜組織の Vegf、Runx2、Twist1、Ctgf および Postn の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR を用いて測定した。統計学的手法として Tukey 検定を用い、有意水準は 5%とした。本実験計画は、結果を解析するのに必要な要件が整えられていた、

笠原は研究結果として以下の知見を得た。

１、M1 の根間中隔部歯槽骨の BV/TV は C 群に比較して H 群で有意に（C 群の 0.94 倍）減少したが、HL 群では C 群との間で有意差が認められなかった。

２、歯根膜腔体積は、C 群に対して H 群で有意に（C 群の 0.68 倍）小さく、歯根膜の萎縮が観察された。LIPUS を照射した HL 群では歯根膜腔体積が H 群に対して有意に（H 群の 1.24 倍）大きく、歯根膜の萎縮が抑制された。

３、mRNA 発現量の解析において、C 群と比較して、咬合刺激が低下している H 群では Vegf と Runx2 の mRNA 量は低下傾向を示し、Twist1、Ctgf、Postn の mRNA 量は有意に低下した。LIPUS 照射した HL 群ではこれらすべての mRNA 量が有意（Vegf：H 群の 4.48 倍、Runx2：H 群の 5.45 倍、Twist1：H 群の 7.43 倍、Ctgf：H 群の 12.91 倍、Postn：H 群の 13.63 倍、）に増加した。

本研究の結果より、笠原は、歯根膜組織の恒常性維持に関与すると報告されている Twist1、Ctgf、Postn の発現レベルが LIPUS 照射によって増加したことで、咬合刺激低下に伴う歯周組織の萎縮を抑制したと考察している。Twist1 は、未分化骨芽細胞において *Postn* のプロモーター領域に結合して Postn の発現を誘導すると報告されており、これは LIPUS 照射によって得られた結果と一致する。また、Twist1 は Runx2 タンパク質の DNA 結合領域と作用して骨芽細胞分化を阻害し、歯根膜の石灰化を抑制していると考えられているることから、笠原は LIPUS 照射が Twist1 の発現上昇を介して歯根膜組織の維持に重要な役割を果たしたと推測している。矯正力による歯の移動を行った先行の動物実験において、野生型マウスと比較して Postn ノックアウトマウスでは TRAP 陽性破骨細胞の出現数減少および歯の移動量の著しい減少が観察されたこと、ならびにマウスを用いた in vivo 実験において咬合刺激低下により歯根膜細胞での Postn および Twist1 の発現が低下したことが報告されている。これらの報告と同様に咬合刺激低下により発現減少を示した *Twist1*、*Ctgf* および *Postn* が、本研究では LIPUS 照射により上昇したことから、笠原は歯科矯正治療における咬合刺激低下歯への LIPUS 照射の適用の可能性を示唆した。本研究では BV/TV については H 群と HL 群の間で有意差が認められなかった。これに関しては、ヒト歯根膜細胞を用いた LIPUS 照射の先行研究において、Runx2 を介した Bmp2 の発現レベルが 5 日目から徐々に増加し、7 日目に発現のピークを示し、その後 14 日目まで発現レベルが維持されることが報告されており、萎縮した歯槽骨組織の回復を誘導するには 5 日間の LIPUS 照射では不十分であった可能性を笠原は考察している。

以上のことから、本研究は、咬合刺激低下に伴う歯周組織の萎縮に対して LIPUS 照射が軽減作用を示すことを明らかにしたものであり、今後の歯科領域における LIPUS の臨床応用に寄与するところが大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 林　樹莉 |
| 論文審査担当者 | 主査　高橋　英和<br>副査　興地　隆史　　渡邊　裕 |
| 論　文　題　目 | Real-Time Imaging of Gap Progress during and after Composite Polymerization |

（論文内容の要旨）

**＜緒言＞**

光重合型コンポジットレジンは、歯質接着材料の開発ならびに改良と共に、近年の最小限の侵襲（Minimal Invasion）や審美修復の要求の高まりの観点からも広く選択されている。しかし、コンポジットレジン重合時のポリマー鎖形成に起因する容積収縮及び応力の発生は免れ得ない。材料中で発生した収縮応力は接着界面に伝搬され、修復物辺縁封鎖の喪失またはギャップ形成を引き起こし、二次齲蝕や術後知覚過敏症などの臨床的問題を引き起こすことから、光重合型コンポジットレジンの主要な課題は、歯質―修復物界面を完全に封鎖することであるといえる。

一般的に、臨床試験におけるコンポジットレジン修復の耐用期間は、数ヶ月から数年間の観察期間において、辺縁漏洩、二次齲蝕、脱離、再修復または歯牙・修復物破折などを考慮し評価される。通常、これらの臨床的に不良と判断される病態は、たとえ初期に発生していたとしても、診療直後には視認されない。一方非臨床試験では、修復材料の臨床的性能を予測するため、種々の顕微鏡観察や引っ張り試験における接着強さの評価を通じ、材料間等の比較を行うことを目的としている。しかしながら、これら従来の試料破壊を伴う試験からは、臨床的構成を損なうことなく界面ギャップ形成のタイミングやメカニズムに関する情報を得ることはできなかった。

光干渉断層計（Optical Coherence Tomography: OCT）は、近赤外光を用いて非破壊的に生体及び材料の内部構造を可視化する装置であり、コンポジットレジン修復界面ギャップの同定と定量化における有用性もすでに実証されている。 OCT の特徴的な機能は、切片作成や放射線暴露を必要とせず、組織の微細断面画像をリアルタイムで再構成できることであり、これによりコンポジットレジンの光重合中にリアルタイムで界面ギャップの発生ならびに進行の観察が可能であると考えられる。現在、OCT を用いたギャップ形成のリアルタイム定量分析や 3 次元的(3D)定量に関する報告はない。これらを踏まえ、本研究では窩洞内での光照射中ならびに直後のコンポジットレジンの挙動を記録し、エナメル質および象牙質界面でのギャップ形成量を 3D 定量し、接着材間の比較を行った。

**＜材料と方法＞**

１）<u>試料作製</u>

40 本の牛歯健全上顎切歯の唇側面表層を#800 耐水研磨紙で研削し平坦エナメル質面を調製後、ダイヤモンドバー（SF207CR）を用いて、注水下で窩洞外側縁は平坦エナメル質、窩底は象牙質に位置する、テーパー付き円筒形窩洞（直径 4 mm、深さ 2 mm、C-factor= 2.0）を形成した。実験群は評価する接着材毎に、以下のとおり 4 群を設けた（n=10)。

1 ステップセルフエッチングシステム（1-SEAs）

Bond Force 群（BF 群; Tokuyama Dental）

Scotchbond Universal Adhesive 群（SBU 群; 3M ESPE）

2 ステップセルフエッチングシステム（2-SEAs）

Optibond XTR 群（XTR 群; Kerr）

Clearfil SE Bond 2 群（SE2 群; Kuraray Noritake Dental）

２）OCT リアルタイム動画撮影および 3D データ収集

接着材塗布ならびに光照射後、フロアブルコンポジットレジン Estelite Flow Quick A2 シェード(Tokuyama Dental) を一括充填した試料を OCT プローブ下に設置し、光照射開始から照射終了後 10 分間にかけて、窩洞中央のリアルタイム断層画像を観察、動画にて記録した。同時に、照射終了直後、1，3，5，10 分後における窩洞全体の OCT 3D データを収集した。

３）OCT 3D 画像の再構築及びギャップ形成量測定

3D 可視化解析システム Amira にて、光照射終了直後及び 10 分後の OCT3D データを再構築し、エナメル質窩壁または象牙質窩底部の関心領域（Volume of interest: VOI）の XY スライスを重ね合わせ、最大強度投影（Maximum intensity projection: MIP）法を用いて単一の 2 次元的（2D）窩壁エナメル質画像または窩底象牙質画像を合成した。ノイズ除去後二値化された画像において、高輝度を示す画素（ギャップ）を識別し、VOI 中の窩壁エナメル質または窩洞象牙質総面積に占める、ギャップを示さない（封鎖された）面積の割合を、Sealed enamel walls area percentage (E%)、Sealed dentin floor area percentage (D%)として算出した。

４）CLSM 観察

OCT 断層画像の高輝度部位とギャップ形成部位の比較の為、OCT2D 断層撮影部位と一致するように切断面を鏡面研磨した試料について、1250 倍にて CLSM 観察を行った。

５）統計処理

E%および D%値は、二元配置反復測定分散分析を行ったのち、ボンフェローニ補正を用いてペアワイズ比較を行った。 全ての分析において有意水準は $\alpha = 0.05$ に設定し、検定は IBM SPSS Statistics 23（SPSS, Chicago, IL, USA）を用いて行った。

＜結果＞

OCT2D 画像上の修復物界面における信号強度の増加は、CLSM 観察におけるギャップと対応していることが確認された。

リアルタイム断層観察において、界面ギャップの開始は主に光照射中に観察され、照射終了後も不可逆的にその進行は続いた。窩底象牙質では、1-SEAs の BF 群、SBU 群において光照射中および照射終了後に広範囲でギャップ進行を認めた一方で、2-SEAs の XTR 群、SE2 群において

は観察期間を通じてほぼギャップの発生や進行を認めなかった。窩壁エナメル質では、窩底象牙質と比較してギャップ形成のタイミングの明確な確認は困難であったが、一旦発生すると、エナメル質のギャップもまた経時的に成長し続けた。

ギャップの発生部位および進行方向について、窩底象牙質では、窩洞隅角付近に発生したギャップは、経時的に窩底中央に向かって進行する様子がリアルタイムに観察されたが、これは、OCT3D 画像において得られた特徴的なトーラス状窩底象牙質ギャップの所見と一致する。また、OCT3D 画像より、窩壁エナメル質では、垂直方向よりも水平方向（窩底と平行）に進行する傾向が認められた。

E%について、BF、SBU および XTR において光照射終了後 10 分間で有意に低下し、すべての群間で有意差を認めた。D%について、BF および SBU において光照射終了後 10 分間で有意に低下し、BF および SBU (1-SEAs) と SE および XTR (2-SEAs) の間に有意差を認めた。窩壁エナメル質において、SBU が最も高いギャップ進行を示したのに対し、窩底象牙質では BF が最大のギャップ進行を示した。

＜考察＞

コンポジットレジンの窩壁適合性評価について、従来の顕微鏡下形態学的観察に加え、近年 OCT を用いた、異なる光学特性を持つ物質内を通過する近赤外光の散乱に起因する、修復物界面の高輝度部位をギャップとして非破壊的に定量解析する手法がすでに確立されている。しかしながらこれまでの研究が、ある一時点における OCT2D 断層画像上のギャップ定量解析であったのに対し、本研究の新規性として、タイムラプス 3D 視覚化、エナメル質・象牙質界面を区別した 3D ギャップ定量解析および、OCT2D 断層画像におけるコンポジットレジンの光硬化中及び直後の経時的挙動変化をリアルタイムで記録したことの 3 点が挙げられる。これらは、高速レーザ走査、高速データ取得及びリアルタイムでのビデオ画像への変換を実現したデジタル/アナログ基板、および MIP 法など高度な機能を有する医療用 3D 画像解析ソフトによって可能となった。

収縮応力に影響を及ぼす因子は、窩洞の大きさ、形状、および剛性に依存してより複雑であるが、コンポジットレジンのプレゲル相からポストゲル相への重合反応の進行に伴い、ポリマー鎖の架橋は弾性率を増加させ、粘弾性流動による応力緩和を防止する。本研究のコンポジットレジン光照射中及び直後のリアルタイム観察において、光照射開始後 7 から 14 秒後に主に象牙質窩底部における界面ギャップ形成が開始したが、これは、標準的光硬化プロトコル下でのカンファーキノン重合開始剤添加コンポジットレジンでは、照射開始後約 2 秒でゲル開始点に到達するという過去の報告と比較して、窩底部におけるギャップ形成がやや遅延していることを示す。この現象は、到達光強度に関連した窩洞深部方向における重合反応相移行と収縮にタイムラグが発生するという過去の報告に矛盾しない観察であるといえる。また、本研究によって観察された、光照射終了後においても継続した界面ギャップ成長は、いくつかの過去の報告において示唆されている、ポストゲル相の残留応力の存在を支持している。

本研究の 3D 可視化によって、窩底象牙質における特徴的なトーラス状ギャップパターンが新たに発見されたが、これは、2 次元断層観察における窩底中央部の適合と隅角部のギャップ形成および応力集中、また重合収縮に伴うフィラー移動量の追跡試験において、一括充填された円筒

形窩洞内における最大収縮応力ベクトルが窩底部隅角近傍で観察される、という複数の異なる過去の報告を共に実証している。

エナメル質と象牙質の両方において、1-SEAs は 2-SEAs よりも大きなギャップ形成および進行を示した結果については、接着材または象牙質に由来する残留溶媒及び水の存在が共重合を阻害し、接着界面にギャップを形成するという過去の報告に支持される。さらに、エナメル質界面と象牙質界面では材料毎のギャップ形成及び進行量が異なる傾向を示した結果について、ほぼ無機質の組成を有するエナメル質接着においては、適切なエッチング効果が重要な因子として考慮されるべきである。セルフエッチング接着材(SEA)においては、自身の酸性度によりエッチング効果を発現するが、以前の研究において、比較的酸性度の低い SEA では、リン酸によるエナメル質の選択的エッチングがエナメル表面の親水性および酸性官能性モノマーとヒドロキシアパタイトとの化学結合反応を改善したという結果が得られていることは、本研究における結果と矛盾しない。

興味深い所見として、接着界面の緊密な適合に伴う、界面近傍のエナメル質亀裂の発生をリアルタイムに確認した。これにより、接着材料に応じた界面適合性のみならず、コンポジットレジンの重合収縮管理が、修復の成功に重要な役割を果たすことが明らかとなった。 OCT リアルタイムイメージング法は、修復材料および充填技法の開発および評価における新たな可能性を提供した。

＜結論＞

テーパーが付与された円筒形窩洞に充填された光重合型フロアブルコンポジットレジンの界面ギャップ形成量は接着材料によって異なり、2-SEAs は 1-SEAs よりも少ないギャップ形成量を示した。形成されたギャップは、光照射終了後も伝搬を続けた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5465　号 | 林　樹莉 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　高橋　英和<br>副　査　興地　隆史　　渡邊　裕 | |
| 論 文 題 目 | Real-Time Imaging of Gap Progress during and after Composite Polymerization | |

（論文審査の要旨）

近年コンポジットレジン修復の適応範囲は拡大し、特にⅠ級窩洞における修復処置は第一選択とされている。しかしながらⅠ級窩洞のような高い C-factor の条件では、重合収縮に起因する界面ギャップ形成のリスクが高まり、確実な辺縁封鎖を実現する歯質接着材料の使用が臨床的成功を導く上で必須の条件となる。一方、光干渉断層計（OCT）は近赤外光を用い非破壊で内部構造を可視化する装置であり、修復物の適合性を評価する新しい方法として注目されている。本研究は光学画像機器の発展を背景に、審美修復として使用頻度が増加したコンポジットレジン修復における臨床的課題を捉えて計画し、遂行されたものである。

実験は牛歯抜去歯牙を用いて各種接着材のギャップ形成量を比較しているが、規格窩洞を形成し均一な実験条件を得る上で適切な選択といえる。コンポジットレジン修復の界面ギャップの同定と定量化では、窩洞全体を包括的に評価するために医療用 3D 解析ソフトを用い、OCT3D データの画像再構成および定量解析を行っているが、画像解析における専門的知識と高い技術が要求される方法であり、申請者の優れた研究遂行能力を窺わせるものである。

接着界面の観察では、OCT の長所と特性を利用し、光照射時における接着界面の様相をリアルタイム動画記録しているが、界面ギャップ形成の発生及び進行を経時的に捉えた新しい報告であり、高く評価することができる。また光照射開始時からの観察では、初期窩洞適合性の喪失や気泡の混入等を排除しており、純粋にコンポジットレジン重合に起因する界面ギャップ形成を抽出するための慎重な配慮がなされている。

データの解析では、窩洞外縁をエナメル質、窩底部を象牙質に設定し、エナメル質窩壁と象牙質窩底を区別して 3D データを 2 次元投影し評価をおこなっており、界面ギャップの好発部位や進行方向など、接着修復において新規性が高く有益な情報を得ることに成功している。

本研究から得られた主な結果は以下のとおりである。

１．リアルタイム観察において、界面ギャップの開始は主に光照射中に観察され、照射終了後も不可逆的にその進行は続いた。

２．窩底象牙質では窩洞隅角付近に発生したギャップが、経時的に窩底中央に向かって進行しトーラス形状を成すのに対し、窩壁エナメル質では、垂直方向よりも水平方向（窩底と平行）にギャップが進行する傾向が認められた。

３．窩壁エナメル質・窩底象牙質ともに 1-SEAs は 2-SEAs よりも大きなギャップ形成および

進行を示した。
４．ギャップ形成を示さなかった試料において、エナメル質亀裂の発生と進行を認めることがあった。

本論文の考察は、OCT による新しいリアルタイム観察および 3D 評価の有用性、コンポジットレジンのプレゲル相―ポストゲル相移行と応力発生と伝搬のメカニズム、ポストゲル残留応力の存在と界面ギャップ進行への影響、接着材料の溶媒、pH 等化学的組成や 1-SEAs の多孔質構造と歯質接着性能との関係などから構築され、いずれも過去の文献の結果と対比しながら理論的に実験結果を分析しており、興味深い内容となっている。

以上より、申請者 林樹莉が本研究領域において最先端の技術を駆使し、コンポジットレジン修復の窩洞適合性に関して新たな評価を行い、臨床評価の開発に資する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | NGUYEN Thi Hoang Yen |
| 論文審査担当者 | 主 査　品田　佳世子<br>副 査　森尾　郁子　大木　明子 |
| 論　文　題　目 | Epidemiological study on early childhood caries in Vietnam |

（論文の内容の要旨）

**Introduction**

Early childhood caries (ECC) is a significant oral health problem among young children worldwide, especially in developing countries such as Vietnam, due to a large number of untreated decayed teeth. Caries is a multifactorial disease which is arguably the most common disease to affect children. The last national oral health survey in Vietnam was conducted in 1999 and the data were collected from children aged six years and older. Therefore, no national data on caries in preschool children are available. Lack of data on caries in children leads to a failure to comprehend fully the current situation and to implement measures for promoting child oral health. Moreover, without information the general public cannot learn about ECC and its prevention.

Dental treatment is necessary for children who have severe caries. Generally, it is costly to receive dental treatment by dental professionals because the procedure usually requires various equipment and materials. Therefore, children from low-income families cannot afford it. Further, treatment is not easily available because of lack of dental resources such as manpower or facilities. Therefore, inexpensive and effective clinical alternatives for treating and preventing dental caries are necessary to improve oral health of such underserved children.

Silver diamine fluoride (SDF), 38% $Ag(NH_3)_2F$, has been used to arrest caries of children and its effectiveness has been reported in many countries. Despite studies conclude that SDF is a safe, inexpensive and effective medicament, a recommended frequency of SDF application has not been established. For resource-limited countries with high caries prevalence, such as Vietnam, establishing evidence-based consensus for the frequency of SDF application is financially and materially critical in planning a program to tackle children's caries.

Therefore, the aims of this thesis were to investigate caries prevalence in Vietnamese preschool children, examine its relationship with socioeconomic status and oral health behaviors, and compare the effectiveness of annual and biannual SDF applications in arresting dental caries.

## Methods

This study used a convenience sample from six public kindergartens in Thua Thien Hue province, Vietnam. A total of 1,028 children, aged 2 to 5 years were included in this study. A self-administered questionnaire survey was conducted to collect information about socioeconomics and oral health behaviors. A tooth surface level clinical examination and oral hygiene assessment were conducted by two calibrated dentists at preschools.

Among all children, 295 children aged 2 to 3 years were selected for a 1-year longitudinal SDF application study. A questionnaire was administered and completed by caregivers after 1 year. Baseline and follow-up clinical examinations and oral hygiene evaluation at 6 months and 1 year were performed by the same dentists. A decayed surface was classified as active caries if the cavity's floor and walls were soft when touched with the probe and as arrested if hard when touched with the probe.

Saforide®, 38% aqueous solution of SDF (44,800 ppmF), and Fluoride gel, 2% sodium fluoride (9,000 ppmF) (Toyo Seiyaku Kasei Co. Ltd., Osaka, Japan) were used in this study. Children in 3 kindergartens were assigned to Group 1 (G1) who received annual SDF and biannual NaF application, and those in other 3 kindergartens to Group 2 (G2) who received biannual SDF and biannual NaF application. Children whose caregivers did not agree to participate in SDF application in 6 kindergartens were assigned to Group 3 (G3) who only received a biannual NaF application.

Chi-square test, ANOVA, repeated measures ANOVA, and a logistic regression was performed using SPSS software (19.0, IBM Corp, Armonk, NY, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$ for all tests.

This study was approved by the Research Ethics Committees of Hue University of Medicine and Pharmacy, Vietnam and Tokyo Medical and Dental University, Japan (Number: 1173).

## Results

Caries prevalence and dmft of all children were 89.1% and 9.32, respectively. Those by age were: 72.4% and 5.57 in 2-year-olds; 90.7% and 9.68 in 3-year-olds; 93.0% and 10.42 in 4-year-olds; and 94.5% and 10.36 in 5-year-olds, respectively. At any age, maxillary central incisors were most affected, followed by first or second molars, and canines had the lowest caries prevalence of all teeth.

There were several related risk factors for caries, such as low educational level of mother, long time breast feeding, frequent sweet food or drink consumption, food retention in the mouth for a long period of time, and high debris index score.

Mean dmfs were 14.92 in G1, 15.99 in G2, and 18.30 in G3. Mean ds was the main component of dmfs in all 3 groups at baseline: 14.92 in G1, 15.91 in G2, and 18.17 in G3. From baseline to 6 months or to 1 year, mean ds increased significantly in all children : 1.88 and 3.75 in G1, 2.22 and 3.47 in G2,

and 5.20 and 8.91 in G3. There were no significant differences in mean ds or dmfs between the 3 groups at baseline. However, at 6 months, mean ds and dmfs were significantly higher in G3 than G1 ($p < 0.01$) or G2 ($p < 0.05$). At 1 year, there were significantly higher mean ds and dmfs values in G3 than G1 ($p < 0.001$) or G2 ($p < 0.01$).

About 60% of active carious surfaces were treated with SDF in both G1 and G2 at baseline. In G1, mean number of active carious surfaces with SDF application at baseline was 9.41. Mean number and proportion of arrested carious surfaces decreased significantly from 6 months (5.82 and 61.8%) to 1 year (4.48 and 47.6%). For G2, mean number of active carious surfaces that had received an SDF application was 9.68 at baseline. There were significant increases of mean number and proportion of arrested carious surfaces from 6 months (5.59 and 57.7%) to 1 year (6.19 and 64.0%). There were no significant mean or distributional differences in active carious surfaces and arrested carious surfaces between the 2 groups at baseline or 6 months. However, at 1 year, G2 had a significantly higher mean number and proportion of arrested carious surfaces or a lower mean number and proportion of active carious surfaces than G1 ($p < 0.001$).

**Discussion**

This study revealed a serious oral health problem among kindergarten children in Thua Thien Hue province, Vietnam. The results showed an early onset of caries as more than 70% of 2-year-olds had caries. Caries progressed very quickly and 3-year-olds had about 10 decayed teeth. Most caries was untreated and just 5% of children had received treatment. The findings imply children's oral health receives little attention.

The results suggest that caregivers, the majority of them are mothers, need to be well educated about oral health and hygiene, and the health education should include the importance of deciduous teeth, causes of dental caries, diet, tooth brushing, fluoride toothpaste, and regular dental check-ups. Besides mothers, teachers play an important role in taking care of children's oral health in kindergartens and should be educated, too.

Among 2-3-year-old-children, from baseline to 1 year, caries had developed and there were significant differences in caries status by tooth surface level between the 3 groups. Fewer active surfaces were observed in children who had received annual or biannual SDF application than those without SDF application at 6 months and 1 year. The proportion of arrested carious surfaces was around 60% in both biannual and annual SDF application groups at 6 months. However, at 1 year, more than 60% of carious surfaces were arrested in the biannual SDF application group, while fewer than half of them in the annual SDF application group. These findings showed biannual application had a greater caries arresting effect than annual application.

This study employed SDF and NaF, both of which had a caries preventive effect, but without a good oral health environment, the effect of SDF and NaF could not be maximized. It is therefore necessary to increase caregivers' awareness about the importance of oral health care and the promotion of good

oral health behavior. Children also should be educated about good oral hygiene by tooth brushing at least twice a day and snack control.

**Conclusion**

Dental caries in children is a serious problem and creates a huge financial burden in developing countries like Vietnam. Proposing an effective and realizable method for managing caries in children is a concern for health care professionals and other parties. The 1-year study period of this study may not be sufficient to observe the long-term effect of SDF application on dental caries. Nonetheless, the findings in this study indicated the effectiveness of SDF, especially biannual application, in arresting dental caries among preschool children. SDF application appears to be a promising intervention candidate for improving children's oral health status.

（和文による要約）

開発途上国においてう蝕の有病率および進行したう蝕を有する者の割合は依然高い状況にある。ベトナムにおいても早期小児う蝕（ECC）を有する者の割合は高く、緊急に対処すべき課題とされている。しかし、ベトナムでは国レベルでの歯科疾患の実態調査やう蝕治療・予防プログラムは実施されていない。そこで、本研究ではベトナムにおいて 2～5 歳の小児 1,028 名を対象にう蝕の有病状況を疫学調査し、う蝕と社会経済状況および歯科保健行動等との関連を分析した。また、2～3 歳の小児 295 名に対し、う蝕の進行抑制・予防を目的としてフッ化ジアンミン銀（SDF）およびフッ化ナトリウム（NaF）の塗布を行い、その効果について検討を行った。

その結果、2～5 歳児でのう蝕有病率は 89.1%であり、dmft は 9.32 であった。2 歳児ですでに 72.4%の者にう蝕が認められ、う蝕有病率および dmft ともに年齢が上がるにしたがい高くなった。う蝕のリスク要因として、母親の教育レベルの低さ、長期の母乳による授乳、甘味飲食物の頻繁な摂取、長時間の食物の口腔内への保持、多量の歯垢の付着が挙げられた。う蝕の進行抑制・予防を目的に SDF と NaF の塗布を行ったところ、6 か月後には塗布を行った歯の約 60%にう蝕の進行抑制が認められた。1 年後のう蝕の進行抑制は、SDF を 1 回のみ塗布した群では 47.6%と 6 か月後に比べ有意に減少したが、2 回塗布した群では 64.0%と有意に増加した。

本研究によりベトナムの小児では低年齢よりう蝕が蔓延しており、う蝕の重症度も高いことが明らかになった。本研究結果は、今後ベトナムにおいて健康教育、SDF や NaF 等の応用によるう蝕治療・予防プログラムを構築する際に、重要な参考資料になると考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5466　号 | NGUYEN Thi Hoang Yen |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　品田　佳世子<br>副　査　森尾　郁子　　大木　明子 | |
| 論 文 題 目 | Epidemiological study on early childhood caries in Vietnam | |

（論文審査の要旨）

ベトナムでは乳幼児のう蝕（ECC）が蔓延しているにもかかわらず、ECC に対する適切な予防対策が実施されていない。その理由の一つに、ECC に関する疫学データの不足が挙げられる。特に、低年齢児における ECC の実態調査が行われていないため、政府や歯科専門家は乳歯う蝕の正確な有病状況を把握できず、効果的な対策を実施できない状況にある。また、人々の乳歯のう蝕に対する関心は低く、歯科医師数の不足と相まって、ほとんどが未処置のまま放置されている。

このようなベトナムの歯科事情を鑑み、ECC の有病状況とそのリスク要因を明らかにするために、NGUYEN Thi Hoang Yen は幼児を対象に疫学調査を実施した。また、う蝕進行抑制・予防を目的としてフッ化ジアンミン銀（SDF）およびフッ化ナトリウム（NaF）塗布を行う介入研究を実施し、その効果を検討した。現在、ベトナムが抱えている喫緊の口腔保健課題に取り組んだ着想は高く評価できる。

具体的には、ベトナム中部のフエ地域の 6 つの幼稚園において 2～5 歳児 1,028 名を対象に、口腔内診査および質問票調査を実施した。また、口腔保健状況と社会人口統計的特性（性別、年齢、母親の学歴）と口腔保健行動（母乳・哺乳瓶による授乳状況、食習慣、口腔習癖、口腔清掃習慣等）との関連を分析し、う蝕のリスク要因を明らかにした。さらに、2～3 歳児 295 名を 3 群に分けて、SDF と NaF による予防処置を行い（NaF 年 2 回塗布群：106 名、SDF 年 1 回および NaF 年 2 回塗布群：90 名、SDF 年 2 回および NaF 年 2 回塗布群：99 名）、6 か月後と 1 年後にフォローアップ調査を行い、その効果について検討を行った。人を対象とする研究倫理指針に則って計画を立案し、国際的に妥当性が確認されている歯科検診基準や指標を使用した研究を実施し、科学的な統計解析手法を用いて分析し、結果に対する考察も適切に行われている。

本研究によって、以下のことが明らかになった。

1. 疫学調査の結果、全対象者のう蝕有病率は 89.1%であり、年齢別にみると 2 歳児は 72.4%、3～5 歳児では 90%以上であった。一人平均 dmft は 9.3 で未処置歯（dt）がほとんどで、2 歳児は 5.6、3～5 歳児は約 10 であった。
2. 2 歳児を対象とした分析では、母親の教育歴が低い（中卒以下）者は、高い（高卒以上）者と比較して 2.43 倍、口の中に食物を長時間保持する者は、そうでない者と比較して 2.50

倍、う蝕を有するリスクが高かった。

3. 3～5 歳児を対象とした分析では、母乳による授乳期間が 13～18 か月の者、18 か月以上の者は 12 か月以下の者と比べ、それぞれ 3.11 倍、3.25 倍、甘味食品の摂取頻度が 1 日 2 回以上の者は 2 回未満の者に比べ 2.22 倍、指しゃぶりをしない者はする者に比べ 2.12 倍、DI スコアが 1 より高い者は 1 以下の者に比べ 8.85 倍、う蝕を有するリスクが高かった。
4. NaF と SDF による介入研究では、ベースラインと比較して 6 か月後、1 年後にすべての群で dmfs は増加していた。NaF のみの塗布群と比較して、SDF 塗布群では dmfs の増加は低かった。SDF 塗布歯面の 6 か月後と 1 年後のう蝕進行抑制状況を比較したところ、6 か月後のう蝕進行抑制歯面率は、SDF 年 1 回塗布群では 61.9%、年 2 回塗布群では 58.3%と同程度であった。しかし、1 年後のう蝕進行抑制歯面率は、SDF 年 1 回塗布群は 47.3%と減少したが、年 2 回塗布群は 65.1%と増加した。

以上の結果から、ベトナムでは 2 歳児の 7 割以上、3～5 歳の 9 割以上にう蝕が認められ、そのほとんどが未処置歯であり、乳歯う蝕が早期から広範に蔓延している実態が明らかになった。また、う蝕のリスク要因として 2 歳児では母親の教育歴や食物の口腔内への保持、3～5 歳児では授乳期間、甘味食品の摂取頻度、指しゃぶり、口腔清掃状況等が示唆された。さらに、う蝕予防処置による介入研究では、SDF 塗布歯面の約 6 割にう蝕進行抑制効果が認められ、年 1 回の塗布では効果は減弱するが、年 2 回塗布することで効果が増大することが明らかになった。

本研究の中で、ベトナムの乳歯う蝕の実態、う蝕関連要因の分析、SDF の効果的な使用法などが提示されたが、これらは、今後、ベトナムにおいて適切な口腔保健対策を国レベルで検討していく上で貴重な資料となり、有益な指針を示唆するものである。乳幼児期のう蝕は、小児の身体や心の成長発育や、永久歯のう蝕の多寡にも多大な影響を与えるので、本研究が寄与する意義は大きい。本研究の成果は、ベトナムだけでなく状況が類似している他の国々においても、地域レベルや国家レベルで予防を中心としたオーラルヘルスプロモーションを推進していく上で、有効に活用できると考えられる。

以上のことから、本研究は今後の歯科医学・歯科医療の発展に寄与するところが大きいと考えられ、博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | BHUYAN Md Zahirul Haque |
| 論文審査担当者 | 主査　中島 友紀<br>副査　関矢 一郎　　篠村 多摩之 |
| 論　文　題　目 | The intra-articular injection of RANKL-binding peptides inhibits cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis. |

（論文内容の要旨）

**[Introduction]**

Several lines of evidence have recently shown that the mesenchymal stem cells (MSCs) in the synovial fluid have a protective role in cartilage repair and the maintenance of cartilage. The intra-articular injection of synovium-derived MSCs has already been used in the treatment of osteoarthritis (OA). However, cell therapy may not become a standard treatment for OA due to various aspects related to clinical safety related of (e.g., the risk of complications after surgery, donor stem cell compatibility).

Middle-molecular-weight drugs, such as peptide drugs (molecular weight: between 1,000 - 2,000) are now drawing attention because they are thought to be associated with the advantages of both high-molecular-weight drugs (i.e., antibody drugs) and low-molecular-weight drugs (i.e., orally-administered drugs). In this stream of research, we have been developing peptide drugs to prevent inflammatory bone loss. In particular, the systemic administration of the receptor activator of the NF-κB ligand (RANKL)-binding peptide has been shown to be effective for inhibiting cartilage degeneration as well as bone loss in a murine model of rheumatoid arthritis (RA). It is simple to understand the mechanism by which the RANKL-binding peptide inhibits bone loss in the RA model since RANKL is an important molecule for inducing bone resorption and the peptide inhibits osteoclastogenesis. Recently, we found that the RANKL-binding peptide OP3-4 stimulates the differentiation of both chondrocytes and osteoblasts. Thus, we could not understand whether the RANKL-binding peptide directly affected the cartilage without enhancing bone formation or whether it indirectly led to the protection of cartilage degeneration through the inhibition of bone loss because cartilage repair sometimes takes place as a consequence of

preventing subchondral bone loss under the cartilage of the knee joints.

In the present study, we used a murine model of OA rather than an RA model to clarify the direct effects of the RANKL-binding peptide on cartilage tissue. Since the OA model used in this study did not show bone loss, we could exclude the possibility that the prevention of bone loss by the RANKL-binding peptide induced the protection of cartilage degeneration.

**[Materials and Methods]**

For the proliferation assay, C3H10T1/2 cells were seeded at a density of $5\times10^3$ cells/well in 96-well plates using Basal Medium Eagle containing 10% fetal bovine serum in presence or absence of OP3-4 and W9 in the concentration of 200 μM for 24h and 48h. After 24 and 48 hours incubation, a cellular proliferation assay was performed using microplate reader.

Nine week-old C57BL/6J male mice were randomly divided into 5 groups (n=5 per group): 1) Control + Vehicle, 2) Monosodium iodoacetate (MIA) + Vehicle, 3) MIA + 28 mg/kg W9, 4) MIA + 33 mg/kg OP3-4, and 5) MIA + 34 mg/kg control (Ctr) Peptide. In this experiment, a granular type of gelatin hydrogel (GH) carrier was incorporated with the injected materials. All of the peptides were administered at a dose that delivered the same molar amount. The RANKL-binding peptides, Ctr Peptide, which cannot stimulate osteoblast differentiation or vehicle (physiological saline with the GH carrier), were injected directly to the intra-articular space of the right knee joint on days 7, 14 and 21 after the injection of MIA or physiological saline. To measure the bone formation parameters, the mice were subcutaneously injected with calcein (20 mg/kg) and alizarin complexon (20 mg/kg) on days 13 and 19, respectively. The mice were sacrificed under dormitor anesthesia by cervical dislocation on day 28 after the injection of MIA or physiological saline. The right knee joints of the mice were then dissected and fixed in phosphate buffered saline (PBS)-based formaldehyde (3.7%) fixative (pH 7.4) for 2 days at 4°C, washed with PBS for 1 day, and then used for the radiological and histological analyses. The bone area of the sagittal plane in the reconstructed μCT images was measured using the ImageJ software program. The toluidine-blue-stained positive area was measured using the Image J software program. Fluorescence-labelled images were used to analyze the calcein- and the alizarin-labelled area in the patellofemoral joints. The ROI for measuring the calcein and the alizarin-labelled area were set 200 μm in width from the surface of the cartilage to the subchondral bone of both

patellae and femurs at the patellofemoral joints. The degree of cartilage degeneration was quantitatively determined using four scoring systems.

The statistical significance of differences among groups were assessed using a one-way analysis of variance (ANOVA). When significant F-values were detected, Fisher's PLSD *post-hoc* test was performed to compare each of the groups. The Kruskal–Wallis test was performed to analyze the modified Mankin score and the cartilage score. The Mann–Whitney U test with Bonferroni correction was applied for the comparison of each group.

**[Results]**

Both RANKL-binding peptides OP3-4 and W9 significantly promoted the proliferation of C3H10T1/2 cells in comparison to the vehicle control after 24- and 48-hour stimulation, respectively. Ctr peptide did not enhance the proliferation.

In the *in vivo* experiments, unlike the RA model, the bone area of the sagittal plane in both tibiofemoral and patellofemoral joints of the MIA + Vehicle group was significantly increased in comparison to the Control + Vehicle group. Furthermore, the calcein-labelled area, which showed bone formation activity on day 13, was significantly promoted in the patellofemoral joints in comparison to the Control + Vehicle group. The intra-articular injection of RANKL-binding peptides did not alter the bone area at the sagittal plane in either the tibiofemoral joints or the patellofemoral joints to a statistically significant extent compared to MIA+ Vehicle group. Furthermore, the local injection of the peptide into the knee joints did not increase the calcein-labelled area. The alizarin-labelled area was similar among the groups. The bone formation activity, which was shown as the alizarin-labelled areas, in the MIA + Ctr Peptide group was not altered in comparison to the MIA + Vehicle group. After the evaluation of the fluorescence images, we assessed of histological sections under a light microscope. The toluidine blue-stained area of the patellofemoral joints in the MIA + Vehicle group appeared to be reduced in comparison to the Control + Vehicle group. On the other hand, both RANKL-binding peptides, W9 and OP3-4, appeared to inhibit the cartilage degeneration induced by MIA. The Ctr Peptide did not seem to inhibit the degeneration. The four types of cartilage assessments such as cartilage score confirmed the above-mentioned observations.

**[Discussion]**

In the present study, we aimed to clarify whether the RANKL-binding peptide could inhibit cartilage degeneration even in the case of the OA model, in which cartilage degeneration was not accompanied by bone loss. Actually, the peptides could prevent cartilage degeneration and did not stimulate bone formation in the OA model where bone loss did not take place. Thus, it became clear that the inhibition of cartilage degeneration by the RANKL-binding peptides took place without the enhancement of bone formation and that it did not take place as a consequence of preventing the loss of bone under the cartilage of the knee joints.

At the beginning of this study, we had been wondering why the peptide promoted the differentiation of both osteoblasts and cartilage cells, since stimulators of cartilage differentiation usually inhibit the differentiation of osteoblasts. We showed that the proliferation of MSCs, which are the common origin of both chondrocytes and osteoblasts, was stimulated by the peptides. Also, several lines of evidences show that MSCs can be isolated from the synovium at patellofemoral joints of mice, indicating that there are MSCs in the synovium tissues at mouse knee joints. On the other hand, the RANKL-binding peptide OP3-4 stimulates proliferation as well as differentiation of chondroprogenitor cell line, ATDC5 cells where the *Rankl* is shown to be expressed. Furthermore, the Ctr peptide, which does not bind to RANKL compared to OP3-4, did not stimulate proliferation of MSCs and did not inhibit cartilage degeneration. Thus, our results suggest that the RANKL-binding peptides might stimulate the proliferation of the MSCs derived from synovial tissues and/or chondroprogenitors in the RANKL-affinity dependent manner, thereby contributing to the inhibition of disease progression that appeared in the OA model.

In conclusion, our data suggest that the RANKL-binding peptides might inhibit degeneration of cartilage and that it is likely that this occurs due to the stimulatory effects on the proliferation of the MSCs in the intra-articular space where we injected the peptides.

（和文要旨）

Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) 結合ペプチドである OP3-4 が、軟骨細胞と骨芽細胞双方の分化を刺激することを見出した。また、コラーゲン誘導関節リウマチ(CIA)モデルを用いて OP3-4 を全身投与すると、軟骨の消失を抑制することも示されている。しかし CIA モデルを用いた実験では、骨形成促進作用を持つペプチドが軟骨下骨の骨量減少を抑制するために、軟骨が守られたのではないかとも考えられる。このため本研究では、関節部の骨量が減少しない変形性関節症(OA)モデルを用いて、ペプチドが軟骨変性を抑制するか否かを試みた。まず、軟骨および骨組織の共通起源となる間葉系幹細胞の細胞株 C3H10T1/2 を用いてペプチドの増殖への影響を調べた。RANKL 結合ペプチドである OP3-4 および W9 は、それぞれ 24 時間および 48 時間で細胞増殖を有意に促進したが、骨芽細胞分化を刺激することができないコントロールペプチドは細胞増殖を促進しなかった。次に、monosodium-iodoacetate (MIA) 誘導 OA モデルを用いて、軟骨変性に対する RANKL 結合ペプチドの効果を検証した。実験には 9 週齢の C57BL/6J 雄性マウス 25 匹を用いた。MIA 注射後 7, 14 および 21 日目に粒子状のゼラチンハイドロゲルを担体としてペプチドの溶媒、あるいは同じモル量の W9、OP3-4 とコントロールペプチドをマウスの膝関節の関節腔内に直接それぞれ注射した。MIA 投与後 28 日目にマウスを安楽死させ、膝関節部の組織形態計測を行ったところ、MIA 投与により関節部の骨量は減少せず、溶媒注射群に比べて RANKL 結合ペプチド注射群は骨形成活性を増強することなく軟骨変性を抑制することが明らかとなった。これらの結果は、RANKL 結合ペプチドによる間葉系幹細胞の増殖亢進が、OA の軟骨変性抑制をもたらし得ることを示唆している。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5467　号 | BHUYAN Md Zahirul Haque |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　中島　友紀<br>副　査　関矢　一郎　　篠村　多摩之 | |
| 論 文 題 目 | The intra-articular injection of RANKL-binding peptides inhibits cartilage degeneration in a murine model of osteoarthritis. | |

（論文審査の要旨）

変形性関節症（OA）は軟骨の変性・磨耗を生じる疾病であり、骨棘形成も OA の一つの病態と考えられている。OA による痛みを抑えるためには、いくつかの治療を組み合わせる必要が提唱されているが、BHUYAN は OA 治療法の一つとして、ペプチド薬を用いた新たな治療法の可能性を提案している。

ペプチド薬は経口投与薬に代表される低分子薬と抗体医薬に代表される高分子薬の長所を併せ持つ薬として注目されている。ペプチド薬の中でも破骨細胞分化促進に重要な receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) に結合するペプチド（以下、RANKL 結合ペプチド）は、低カルシウム食飼育モデル、卵巣摘出モデル、歯周病モデル、関節リウマチモデルなど様々な骨量減少モデルにおいて、それらのモデルで引き起こされる骨量減少を皮下投与により抑制することが明らかにされている。BHUYAN は骨吸収抑制作用だけでなく、骨形成促進作用や軟骨細胞分化促進作用を発揮することが示されている 2 種類の RANKL 結合ペプチド W9 および OP3-4 に着目した。

通常、骨芽細胞分化促進作用を促進する薬剤は、軟骨分化を抑制するが、BHUYAN は骨芽細胞と軟骨細胞の共通起源である間葉系幹細胞の増殖に対する RANKL 結合ペプチドの作用を検討することにより、W9 と OP3-4 が骨芽細胞と軟骨細胞の双方の分化促進を説明しようと考えた。また、すでに関節リウマチモデルにおける軟骨消失に対して W9 や OP3-4 の皮下投与による抑制作用が明らかとなっているが、軟骨下骨の破壊がペプチドの骨吸収抑制作用や骨形成促進作用により抑制されれば、ペプチドが直接軟骨組織に働きかけなくても、間接的に軟骨消失が抑制された可能性が考えられる。このため BHUYAN は、RANKL 結合ペプチドの軟骨組織に対する直接作用を明らかにするために、本研究を計画した。

まず、間葉系幹細胞株を用いて RANKL 結合ペプチドの増殖活性作用を検討した。次に、軟骨下骨の減少がおこらない薬剤誘導 OA モデルを用いて、RANKL 結合ペプチドの軟骨変性への直接抑制作用を検討している。BHUYAN は、monosodium-iodoacetate（MIA）の関節腔内投与 7 日後から 1 週間ごとに計 3 回、RANKL 結合ペプチドあるいは RANKL 親和性の低いコントロー

ルペプチド（以下 Ctr ペプチド）を同モル量直接膝関節腔内に投与した。その際、徐放作用を期待して粒子状のゼラチンハイドロゲルをペプチドの足場として用いている。ペプチドの溶媒も同様の足場に含ませて OA を誘導しないコントロール群と MIA を投与した OA 誘導群に投与し、RANKL 結合ペプチドである W9 と OP3-4 および Ctr ペプチドを OA 誘導マウスに投与した計 5 群に分けて実験を行っている。なお、25 匹の 9 週齢雄性 C57BL6/J マウスを用いた本研究は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で実施されている（承認番号 0170259A）。

本研究により BHUYAN が得た結果は主に以下の 4 点である。

1. RANKL 結合ペプチドにより間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞の増殖が亢進した。
2. 本研究で用いた薬剤誘導マウス OA モデルでは、関節周囲の骨破壊は引き起こされず、逆にコントロール群に比べて骨形成が促進し関節周囲骨が増加した。
3. RANKL 結合ペプチドである W9 と OP3-4 はともに薬剤誘導 OA モデルにおける軟骨変性を抑制した。
4. RANKL に親和性の低い Ctr ペプチドは C3H10T1/2 細胞の増殖を亢進せず、薬剤誘導 OA モデルにおける軟骨変性を抑制できなかった。

本研究は、RANKL 結合ペプチドの関節腔内への直接投与が、OA モデルにおける軟骨変性に対して抑制効果を持つことを示すことにより、今後の軟骨変性疾患に対する治療法開発に向けて新たな選択肢を与えている。一方で、本研究で用いた間葉系幹細胞株に RANKL の発現が確認されていないことから、RANKL に対する親和性が強いペプチドが間葉系幹細胞の増殖を亢進する作用メカニズムに関しては、今後の研究が待たれる。また、軟骨細胞や軟骨前駆細胞には RANKL 発現が確認されてはいるため、細胞膜上の RANKL に作用することにより OA モデルの軟骨変性を抑制した可能性も否定できないが、ペプチドが RANKL 以外の分子に結合して作用した可能性も否定できないことから、滑膜由来の間葉系幹細胞の増殖を亢進するという直接のエビデンスとその作用メカニズム解明に向けて今後の研究展開に期待がかかる。

本研究の成果は、骨芽細胞分化促進作用と軟骨細胞分化促進作用を併せ持つペプチド薬の局所投与による軟骨変性疾患治療の新たな可能性を示しただけでなく、経口投与薬と抗体医薬の長所を合わせ持つ中分子ペプチドの有用性を示した新たな知見であるとも考えられる。

このように、BHUYAN が行った一連の研究は、今後の中分子ペプチドを用いた医科および歯科分野における骨・軟骨疾患治療薬開発に大きく貢献する可能性を示している。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | ESPIGARES ESPIGARES Jorge |
| 論文審査担当者 | 主査　倉林　亨<br>副査　高橋　英和　　荒木　孝二 |
| 論　文　題　目 | Applications of Optical Coherence Tomography in Minimally Invasive Dentistry: Enamel White-spot and Resealing Evaluation |

（論文内容の要旨）

**[Background]**

Dental caries is a highly prevalent disease, and although, in most developed countries, its prevalence has declined, the disease remains a major public health problem. Signs of the caries process cover a continuum from the first molecular changes in the apatite crystals of the tooth, to a visible white-spot lesion, through to dentin involvement and eventual cavitation.

Over time, modern dentistry and the management of dental caries has evolved from G.V. Black's "extension for prevention" to "minimally invasive". This approach is the adoption of detection, diagnosis, limited surgical intervention for excavation of decay, and restoration, with a view toward maximum preservation of tooth structure.

Early detection of caries offers the possibility of monitoring the lesions over time and also treats them with other non-invasive methods. White spot enamel lesions are a stage of the caries process, prior to cavitation, where mineral has been lost from the enamel subsurface, with an intact surface layer overlying the mineral-poor region. This subsurface mineral loss has produced changes in the optical properties of enamel detectable as a loss of translucency, resulting in a white appearance of the enamel surface.

On the other hand, it is estimated that the replacement of existing restorations corresponds to around two-thirds of all operative procedures carried out regularly and has exceeded the procedures involved in the restoration of new lesions. This practice is usually accompanied by the associated loss of healthy dental structure leading to a repeated restoration cycle and eventual tooth loss.

Thus, the detection and diagnosis of caries at early stages, and repairing rather than replacing existing restorations in order to perform a non- or minimally invasive treatment approach are essential.

The conventional tools for early detection include visual and tactile examination, and dental radiographs. However, they do not have the sensitivity for detection of early carious lesions

and are not considered to be suitable for monitoring purposes.
Although other technologies have become available for enamel evaluation purposes, the ideal tool for detection, assessment and monitoring of these lesions has not been identified yet. Optical Coherence tomography (OCT) is a non-invasive and non-destructive diagnostic method that provides high-resolution cross-sectional images. In OCT, a coherent light is projected over the sample, and the image is reconstructed in real time from depth-resolved backscattering. Swept source optical coherence tomography (SS- OCT) is a variant of OCT, wherein the light source is a tunable laser that sweeps the near-IR wavelength at a high rate.

**[Objectives]**

The aim of this research is to assess the feasibility of OCT for its application in the minimally invasive dentistry concept.
In the first study, natural enamel lesions in vitro were assessed with OCT in comparison with microfocus x-ray computed tomography (µCT).
In the second study, composite restoration resealing with low-viscosity resins were evaluated with OCT.

**[Materials and Methods]**

Both human and bovine teeth were used in this research. In the first study, human teeth with visible white spot-like changes on enamel meeting the criteria of International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) code 2 were used. Specimens were subjected to imaging by µCT and swept source optical coherence tomography (SS-OCT) for the white spot lesions assessment followed by image analysis where the lesions depth and surface layer thicknesses were compared between OCT and µCT.
In the second study, bovine teeth were used for evaluating gap resealing by low-viscosity resins. Tapered round cavities were prepared on sound bovine teeth, and restored with adhesive and flowable resin composite in a single increment. Cross-sectional images with OCT were obtained before and after the application of the low-viscosity resin to the enamel margins, and also after thermal cycling procedure. Specimens were then observed under confocal laser scanning microscope (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM). The gap extent at the enamel margins was then calculated by image analysis. The relationship of µCT versus OCT was investigated using Pearson parametric correlation (study 1) and ANOVA was used for comparing the gap data (study 2).

**[Results]**

In µCT, the lesions appeared as radiolucent dark areas, while in SS-OCT, they appeared as areas of increased signal intensity beneath the surface. These high scattering zones on SS-OCT images matched the demineralized areas on µCT. The appearance of an enamel

lesion on SS-OCT occurs because the backscatter signal intensity increases with demineralization due to scattering at the numerous microinterfaces created in the hard tissue by the dissolution process of mineral. Subsurface lesions could be confirmed with both systems and their shape and depth could be determined on the resulting images from µCT and SS-OCT. A statistically significant correlation was found regarding lesion depth and also surface layer thickness between both devices. In the second study, gaps at the enamel margins appeared as a peak in the signal intensity. Lack of seal between composite resin and enamel causes such increased signal intensity at the interface. This is due to the increased scattering of light at an interface between two media with different refractive indices. SS-OCT images showed remarkable reduction of backscatter signal at enamel margins after application of the low-viscosity resin, confirmed through CLSM and SEM images.

**[Conclusion]**

OCT is a valid technology for non-invasive clinical assessment of surface layer and depth of natural subsurface enamel lesions in comparison with µCT without the use of X-ray. In addition, it is an effective tool for evaluation of composite restoration resealing where the low-viscosity resins improved sealing of enamel marginal gaps.

**[Clinical Significance]**

Although both experiments were performed in the laboratory, the potential for OCT-based diagnostics is excellent. As a non-invasive diagnostic device, OCT is a valid technology for clinical assessment and monitoring of early enamel lesions. Besides, it is an effective tool for evaluation of composite restoration resealing. This work will have an important role in clinical evaluations diagnosing early stages of carious lesions and promoting conservation of natural tooth structure following the minimally invasive dentistry approach.

**Study 1: Assessment of natural enamel lesions with optical coherence tomography in comparison with microfocus x-ray computed tomography**

**Introduction:** A technology to characterize early enamel lesions is needed in dentistry. Optical coherence tomography (OCT) is a noninvasive method that provides high-resolution cross-sectional images. The aim of this study is to compare OCT with microfocus x-ray computed tomography (µCT) for assessment of natural enamel lesions in vitro.

**Materials and Methods:** Ten human teeth with visible white spot-like changes on the enamel smooth surface and no cavitation (ICDAS code 2) were subjected to imaging by µCT (SMX-100CT, Shimadzu) and 1300-nm swept-source OCT (Dental SS-OCT, Panasonic Health Care). In µCT, the lesions appeared as radiolucent dark areas, while in SS-OCT, they

appeared as areas of increased signal intensity beneath the surface. An SS-OCT attenuation coefficient based on Beer–Lambert law could discriminate lesions from sound enamel.

**Results:** Lesion depth ranged from 175 to 606 µm in SS-OCT. A correlation between µCT and SS-OCT was found regarding lesion depth (R 1⁄4 0.81, $p<0.001$) and also surface layer thickness (R 1⁄4 0.76, $p<0.005$).

**Conclusion:** The images obtained clinically in real time using the dental SS-OCT system are suitable for the assessment of natural subsurface lesions and their surface layer, providing comparable images to a laboratory high-resolution µCT without the use of x-ray.

**Study 2: Enamel margins resealing by low-viscosity resin infiltration**

**Introduction:** Marginal gaps and microleakage remain as one of the reasons of failure of composite restorations and requires re-restoration. Therefore, a limited treatment such as resealing is desirable to preserve tooth structure. Low-viscosity light curing resins have been used as a micro-invasive treatment for caries infiltration; however, their properties as sealant for marginal gaps in restorations have not been extensively investigated. The aim of this study was to evaluate the efficacy of low-viscosity resin as enamel marginal gap sealant for existing composite restoration.

**Materials and Methods:** Standard restorations with marginal gaps were created in bovine teeth; gaps were resealed using G-Bond Plus (GB, GC, Japan) or Icon (ICN, DMG, Germany) with or without HCl pretreatment (n=8). Optical coherence tomography (OCT) images were taken before and after resealing of the margin and thermal cycling to calculate enamel gap extent. Cross-sectional microscopy was performed to confirm OCT findings.

**Results:** OCT showed remarkable reduction of backscatter signal at enamel margins after application of the low-viscosity resin. Enamel margin resealing significantly decreased gap and there was a significant difference between ICN (regardless of HCl pretreatment) and GB, while thermal cycling increased gaps ($p<0.05$).

**Conclusion:** The low-viscosity resin could effectively infiltrate micro-gaps at enamel margins and improve sealing of an existing composite restoration. Resin infiltration is a viable option for resealing intact restorations with open margins.

**和訳：最小限侵襲の歯科治療における光干渉断層計の応用：エナメル質白斑病変部と再封鎖の評価**

**研究１：光干渉断層計によるエナメル質病変部の観察とマイクロ CT との比較**

**緒言**

歯科臨床においてエナメル質初期脱灰病変の正確な診断は重要な課題である。光干渉断層計(OCT)は組織の断層画像を非侵襲的に高解像度で得ることができる。本研究は天然エナメル質脱灰病変の SS-OCT による計測精度を、マイクロ CT と比較することを目的として行われた。

**材料と方法**

エナメル質白斑状の脱灰病変を有するヒト抜去歯 10 本（ICDAS コード 2）を用意し、SS-OCT とマイクロ CT による観察に使用した。マイクロ CT では X 線透過性を示す部位を、SS-OCT ではシグナル輝度の上昇を示す部位を病変とした。SS-OCT による Beer-Lambert 則によるシグナルの減衰係数により、健全部と病変部を区別した。

**研究結果**

SS-OCT 計測による病変の深さは 175-606μm であった。また、マイクロ CT と SS-OCT による脱灰病変の深さと表層部の厚さの計測値に有意な相関がみられた。

**結論**

臨床における SS-OCT のリアルタイム画像は、エナメル質表層の脱灰病変と表層部の観察に適しており、マイクロ CT と同様の画像情報を提供することができた。

**研究２：低粘性レジン浸透材によるエナメル質窩縁部の再封鎖性**

**緒言**

コンポジットレジン修復における辺縁のギャップとマイクロリーケージは修復物脱落の原因となり、再治療が必要となることがある。したがって、歯の保存的治療として局所的な再封鎖が必要と思われる。低粘性光重合コンポジットレジンによるう蝕病変の浸透材は、侵襲の極めて少ない治療法として使用されている。しかしながら、修復物辺縁のギャップの封鎖材としての有効性についての検討はあまりおこなわれていない。本研究は、コンポジットレジン修復におけるエナメル質マージン部のギャップにおいて、低粘性レジンの封鎖材としての有用性を評価することを目的として行った。

**材料と方法**

牛抜去歯に形成した規定窩洞に、辺縁部ギャップを有するコンポジットレジン修復を行った。辺縁のギャップに G-Bond Plus または HCl 前処理の Icon を作用させ(n=8)、光干渉断層計（OCT)を用いて再封鎖前後の状態を撮影した。また窩洞にサーマルストレスを負荷し、同様に辺縁封鎖の状態を OCT 観察した。その後に試料を半切し、顕微鏡観察により OCT の結果を評価した。

**結果**

低粘性レジンを作用させることにより、エナメル質マージン部における OCT 画像の後方散乱光のシグナルは明らかに減少した。エナメル質マージン部の再封鎖によってギャップは有意に減少し、Icon による封鎖性は HCl による前処理を行わなくても G-Bond よりも優れた結果が得られ

た($p<0.05$)。

**結論**

低粘性レジンはエナメル質マージン部のギャップに効果的に浸透し、コンポジットレジン修復の辺縁封鎖性を改善することができた。レジン浸透材はう蝕のみられないコンポジットレジン修復のギャップへの対応として、有効な治療法と考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5468　号 | ESPIGARES ESPIGARES Jorge |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　倉林　亨<br>副　査　高橋　英和　　荒木　孝二 | |
| 論　文　題　目 | Applications of Optical Coherence Tomography in Minimally Invasive Dentistry: Enamel White-spot and Resealing Evaluation | |

（論文審査の要旨）

う蝕は世界に蔓延した疾患であり、抑制傾向にある先進国でも、健康上の大きな課題となっている。初期の脱灰は適切な処置を行えば再石灰化が可能であり、近年の治療は従来の切削介入を主とした外科的処置から、発症の予防と再石灰化、またはレジン含浸材の応用など、歯質の切削を極力抑制した内科的な処置へと移行しつつある。しかしながら、このような内科的治療を実践する上で、初期う蝕の脱灰を的確に検知する診断技術の開発は必須の条件となる。光干渉断層計（OCT）は、光の干渉作用を利用して組織の断層画像を得る技術であり、本実験で使用した波長走査型 OCT (SS-OCT)は画像深度に優れ、う蝕の診断と再石灰化の評価に利用できることが報告されている。本研究は、このような初期う蝕の治療における概念の変化と画像診断技術の発展を背景に実施されたものであり、その着眼は評価することができる。本研究は、SS-OCT を用いてエナメル質脱灰病変を評価し、Ｘ線マイクロＣＴと比較した論文１と、コンポジットレジン修復の周囲をレジン系浸透材によって再封鎖し、その効果を SS-OCT 画像で評価した論文 2 から成り立っている。

論文１では、White spot 状のエナメル質脱灰病変を有するヒト抜去歯を用意し、まず観察部位の上部 2mm と下部 2mm に Er:YAG レーザーにてマーキングしているが、観察を適切に行うための工夫として評価することができる。次に、マイクロ CT にて３D 画像を撮影し、過去の文献を参考に 87vol%以上のミネラル密度を健全部として、観察部位の脱灰病変の深さ（$LD_{\mu CT}$）と拡がり（$SL_{\mu CT}$）を計測している。近年、マイクロＣＴによるミネラル密度の計測は信頼性の高い方法として評価されており、本実験における比較対象として適切な選択ということができる。その後、観察部位における SS-OCT 画像を撮影し、画像処理を駆使してシグナルの減衰係数を計測し、画像上における病変の深さ($BD_{OCT}$)と拡がり（$SL_{OCT}$）を測定している。エナメル質脱灰病変の光学的評価を行った新しい試みであり、高く評価することができる。得られた結果は次のとおりである。

１．SS-OCT 画像において、エナメル質病変部の輝度の上昇部は、マイクロ CT における脱灰病変部とほぼ一致していた。

２．マイクロ CT において、$LD_{\mu CT}$は 402±163μm、$SL_{\mu CT}$は 83.5±14.5μm であり、また SS-OCT において $BD_{OCT}$は 366±134μm、$SL_{OCT}$は 65±10.3μm であった。

３．SS-OCT では脱灰病変における光の散乱によってシグナルの減衰率が高くなり、病変の深

部の画像情報を得ることは困難であった。

いずれも SS-OCT によるエナメル質脱灰病変の診断を行う上で貴重な情報であり、新規性の高い結果ということができる。

論文２では牛歯に形成した窩洞に、ギャップができるようにコンポジットレジン充填を行い、窩壁面をレジン浸透材 Icon により封鎖し１ステップ接着材のＧボンドプラスと比較している。Icon は TEGDMA を主成分とするレジン系材料であり、脱灰エナメル質に浸透させ、う蝕の進行の抑制を目的としているが、本論文ではその高い浸透性に着目し、ギャップの再封鎖に応用している。新しい試みとして、評価することができる。得られた主な結果は次のとおりである。

１．レジン浸透材を作用させると、SS-OCT 画像の窩縁部のギャップにおいて後方散乱光のシグナルは減少した。

２．窩縁部の再封鎖によってギャップは減少し、Icon による封鎖性は HCl による前処理を行わなくても G-Bond よりも優れていた($p<0.05$)。

本論文の考察は SS-OCT 画像とギャップにおける屈折率の変化、レジンの浸透性における表面張力と接触角ならびに粘度の影響、レジン浸透材と G-Bond の材料学的特性などから構成され、興味深い内容となっている。

以上より、申請者 ESPIGARES ESPIGARES Jorge が本研究領域において最先端の計測技術を駆使し、エナメル質脱灰病変の観察とコンポジットレジン修復の再封鎖に関する新たな臨床技法の開発に資する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | PAISANKOBRIT Vibul |
| 論文審査担当者 | 主 査　　宇尾　基弘<br>副 査　　山下　仁大　　笛木 賢治 |
| 論　文　題　目 | Effect of thickness of zirconia framework on fracture strength and fracture mode of Ceria-stabilized tetragonal zirconia polycrystals /alumina ceramic restoration on resin tooth abutment |

（論文の内容の要旨）

1. 緒言

近年、審美歯科治療に対する需要は高まってきている。オールセラミック修復はメタルセラミック修復に代わって広く使用されるようになっている。ジルコニアはその優れた機械的性質のためにオールセラミック修復の中でも重要な役割を示し、金属の代替としてクラウンやブリッジ、義歯などへの応用が進んでいる。中でもジルコニアセラミック修復は、陶材の優れた審美性とジルコニアフレームワークの高強度という両者の優れた特性を保持している。イットリア安定型正方晶ジルコニア多結晶体(Y-TZP)は、高い曲げ強さ（1000MPa）と破壊靭性（7MPa）を有し、臨床に広く応用されているが、水分存在下で低温で機械的特性が低下する低温劣化が危惧されている。他方、セリア安定型正方晶ジルコニア多結晶体・アルミナナノ複合体（Ce-TZP/A）は Y-TZP 同様の曲げ強さ（1000MPa）とより優れた破壊靭性（18MPa）を有し、低温劣化に高い耐性を持つため臨床に適している可能性が示唆されている。

一般にオールセラミック修復の支台歯形成は、メタルセラミック修復の支台歯形成よりも多くの削除量を必要とする。しかし Ce-TZP/A は優れた機械的性質を持つため、これを用いることでフレームワークの厚みを薄くし、支台歯形成の削除量が低減できる可能性が考えられる。

そこで本研究では、コンポジットレジン支台歯上で Ce-TZP/A と Y-TZP にて作製したジルコニアセラミッククラウンの破壊強度と破折様相を比較、検討することにより、厚さの薄い Ce-TZP/A フレームワークを用いた、支台歯形成削除量の少ない Ce-ZTP/A セラミッククラウンの有用性を評価することを目的とした。

2. 方法

支台歯として上顎第 2 小臼歯メラミン歯を使用した。形成はメタルセラミッククラウン支台歯形成（咬合面削除量：機能咬頭 1.8 mm，非機能咬頭 1.3 mm，頬側 1.0 mm，幅ラウンデッドショルダー，口蓋側ライトシャンファー、隅角は丸めた)と、オールセラミッククラウン支台歯形成（咬合面削除量:機能咬頭 2.0 mm，非機能咬頭 1.5 mm，全周 1.0 mm，幅ラウンデッドショルダー，他条件は同一)の 2 種とした。

前述の支台歯の印象を採得し、これをモールドとして使用し、コンポジットレジン支台歯を複製した。また前述の支台歯から同様の手法で超硬質石膏にてメタルセラミック形成模型およびオールセラミック形成模型を作製した。

ジルコニアフレームワークは Y-TZP（Cercon Base）と Ce-TZP/A（NANOZR）の 2 種類とした。フレーム形状は以下の 2 種類とした。(1) 標準型フレームワークとして、0.5 mm 均一厚みのフレームワークをオールセラミッククラウン形成模型に対して作製，(2) 改良型フレームワークとして、マージンより高さ 2.0 mm、最大厚み 1.0 mm のサポート形態を隣接面から口蓋側に付与した、厚さ 0.3 mm のフレームワークをメタルセラミッククラウン形成模型に対して作製。

材料と形状の組み合わせで、以下の 4 群について評価を行った。試料数は各群で n=10 とした。

1. 標準型 Y-TZP フレームワーク（Y-TZPs）
2. 標準型 Ce-TZP/A フレームワーク（Ce-TZP/As）
3. 改良型 Y-TZP フレームワーク（Y-TZPm）
4. 改良型 Ce-TZP/A フレームワーク（Ce-TZP/Am）

各群に歯科用 CAD/CAM（Y-TZP には Cercon Smart Ceramics、Ce-TZP/A には C-Pro System）を用いてジルコニアフレームワークを作製した。全てのフレームワークは内面適合診査、調整を行った後、

サンドブラスト処理（70μm アルミナを 0.2 MPa で距離 10 mm から 10 秒間噴射）し、洗浄・乾燥後にシェードベースステインを塗布・焼成した。その上に上顎第 2 小臼歯の解剖学的形態を模したシリコーン治具を用いて、咬合面機能咬頭で 1.5 mm、非機能咬頭で 1.0 mm となるようワックスアップした。ワックスパターンは埋没・焼却後、加圧成形用陶材（セラビアン ZR プレス）をプレスした後、調整と研磨を行い、ジルコニアセラミッククラウン試験片を得た。

クラウン内面はサンドブラスト後に洗浄・乾燥し、シランカップリング処理・乾燥した。レジン支台歯表面は 40%リン酸で洗浄・水洗・乾燥し、同様にシランカップリング処理して、各クラウンを支台歯に接着性レジンセメントで接着した。全ての試料は接着 1 時間後から 37℃脱イオン水中に 24 時間保管した。接着した試料を材料試験のためアルミニウムリングに、位置決め用ゲージを用いて、常温重合レジンで固定した。その際、生物学的複径を再現するため常温重合レジン固定はマージン下部約 2 mm の位置までとした。常温重合レジンが硬化後硬化後、万能試験機を用いた破壊試験に供した。

破壊試験では 4 mm ステンレススチールロッド、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min にて中心窩に歯軸方向に荷重し、破壊時最大荷重を破壊強度とした。破壊試験後、全試料の破折様相を観察し、タイプ A；陶材のみの破折、タイプ B；ジルコニアフレームワークまたはレジン支台歯におよぶ破折　に分類した。統計処理は有意水準 5%とし、破壊強度に対して一元配置分散分析後、Tukey HSD 多重比較検定を行った。破折様相に対してフィッシャー正確確率検定を行った。

3. 結果

Y-TZPs, Ce-TZP/As, Y-TZPm, Ce-TZP/Am の破壊強度は各々 3338.80±359.38 N, 3056.40±337.13 N, 2399.70±118.86 N, 2824.10±320.83 N であった。破壊強度は Ce-TZP/Am は Y−TZPm よりも有意に高かった。Ce-TZP/As と Ce-TZP/Am 間、Ce-TZP/As と Y-TZPs 間には有意差は認められなかった。破折様相に関して、いずれの試験群間にも有意差は認められなかった。

4. 考察

臼歯部の陶材焼付冠（PFM）の金属フレームワークの最小厚みは 0.3 mm とされているが、同部位の Y-TZP フレームワークでは 0.5 mm 以上の厚みが推奨されている。Ce-TZP/A は Y-TZP と比較して優れた機械的性質を有するため、Ce-TZP/A を用いるとフレームワークは Y-TZP より薄くできる可能性があるため、本研究では Ce-TZP/A に PFM の設計基準を応用し、支台歯削除量の少ないジルコニアセラミックス修復の可能性が期待される。

ジルコニアの破壊靭性は応力に対して正方晶から単斜晶に相変化し、体積膨張する応力誘起相変態に起因するが、この相変化は湿潤環境下では無応力でも生じ、破壊靭性を低下させる。この現象は低温劣化として知られ、Y-TZP では危惧されている。しかし Ce-TZP/A は低温劣化に耐性を有していることから、湿潤な口腔内環境下で使用するジルコニアフレームワークとして、Y-TZP より好適な素材と期待される。

以上から本研究では Ce-TZP/A による薄いフレームワークを用い、歯質削除量が少なく口腔内環境でより安定なオールセラミック修復物の可能性について検討した。

破壊試験において、Ce-TZP/Am の破壊強度は、Y-TZPm よりも有意に高い値を示した。このことは、Ce-TZP/A を用いたサポート形状付きのジルコニアセラミック修復を用いることで、従来よりも薄いジルコニアフレームワークの設計が可能となり、支台歯形成量の削減が可能となることが示唆された。Y-TZPs は Ce-TZP/Am よりも高い破壊強度を示したが、これは Y-TZPs のフレームワークが Ce-ZTP/Am のそれより厚いためと考えられた。Ce-TZP/Am と Ce-TZP/As は破壊強度に有意な違いは認めず、Ce-TZP/A は 0.3 mm のフレームワーク厚みでも強度を維持できることを示している。

支台歯形成量を PFM と比較すると、Y-TZP ではより多くの形成量が必要であるが、Ce-TZP/A ではそのフレームワークの薄さから PFM と同程度であり、支台歯形成時の歯質の保存が可能になり、歯髄損傷のリスク低減につながると推測された。

既往の研究で、歯科用陶材の破折は口蓋側サポート形状付与の解剖学的形態の適応で回避することが

可能と報告されている。また本研究で用いた陶材プレス法は陶材築盛法よりも高い生存率とより良好な臨床結果を示すことが知られている。

短期臨床予後経過では、ジルコニアセラミック修復はメタルセラミック修復と陶材の破折に差は無いと報告されており、これよりジルコニアセラミックセラミック修復はメタルセラミック修復の代替選択肢となりうる。本研究で得られた知見では Ce-TZP/A の優位性ならびに陶材プレス法による被覆を用いることで、強度を維持しつつ薄いフレームワークを製作可能であり、支台歯形成量を削減し、歯質を可能な限り保存することが可能であり、さらには低温劣化に抵抗性を有していることから、Ce-TZP/A はジルコニアセラミック修復において最も推奨される材料の一つと考えられた。

5. 結論

本研究において以下のことが結論付けられた。ジルコニアセラミック修復の際に Ce-TZP/A は、口蓋側サポート形状付きの 0.3 mm 厚みのフレーム形態で十分使用可能である。Ce-TZP/A は 0.3 mm という薄さで臨床応用可能なため、支台歯形成量が削減できる。Ce-TZP/A は生活歯やレジンコアで築造された失活歯において、0.3 mm 厚みで十分な強度を有している。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5469　号 | PAISANKOBRIT Vibul |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　宇尾　基弘<br>副 査　　山下　仁大　　笛木 賢治 | |
| 論 文 題 目 | Effect of thickness of zirconia framework on fracture strength and fracture mode of Ceria-stabilized tetragonal zirconia polycrystals /alumina ceramic restoration on resin tooth abutment | |

（論文審査の要旨）

近年、審美に対する要求の高まり、金属アレルギーへの不安からメタルフリー修復がひろくおこなわれるようになってきた。特に、歯科に CAD/CAM 技術が応用され、ジルコニアセラミックスが臨床に応用可能になってから、イットリア安定型ジルコニア（Y-TZP）を用いた補綴装置が臨床でも広く利用されるようになっている。しかしながら、従来のメタルセラミッククラウンやブリッジに比べ、歯質の削除量が多いなどの問題点も指摘されている。

一方、セリア安定型ジルコニア（Ce-TZP）は Y-TZP と比べて約 3 倍の高い破壊靭性値を有するが、曲げ強さや硬さが低く、歯科応用に至らなかった。しかし、近年 Ce-TZP の曲げ強さと硬さの欠点を補う Ce-TZP とアルミナとのナノ複合材料であるナノジルコニア（Ce-TZP/A）が開発された。Ce-TZP/A は、Ce-TZP とアルミナの双方向ナノ複合化により、Ce-TZP の高い破壊靭性値を維持したまま、欠点であった曲げ強さ、硬さを Y-TZP 同等に引き上げ、さらに Y-TZP に見られる低温劣化に抵抗性を示すという機械的に優れた性質を有する。

Ce-TZP/A を用いれば従来の Y-TZP フレームより薄く出来る可能性が出てきた。フレームを薄くすることは支台歯形成量減少につながり、有髄歯の歯髄保護をもたらし、欧米人に比べて歯質の薄い日本人においてもジルコニアセラミック修復が臨床で取り入れやすくなる。しかしながら、これまで Ce-TZP/A フレームの厚さが破壊強度、破折様相に及ぼす影響に関する研究はなされていない。

本研究はこの点に着目し、Ce-TZP/A と Y-TZP により作製されたジルコニアセラミッククラウンの破壊強度について比較・検討し、Ce-TZP/A の有用性について検討したものであり、この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって極めて有意義なものと高く評価できる。

上顎第 2 小臼歯を被験歯とし、コンポジットレジンを用いてオールセラミッククラウン形成模型およびメタルセラミッククラウン形成模型を作製している。ジルコニアフレームワークはオールセラミック形成模型に対し、標準型（厚み 0.5 mm）（Y-TZPs, Ce-TZP/As）、メタルセラミック形成模型に対し、改良型（厚み 0.3 mm、舌側サポート形状）（Y-TZPm、Ce-TZP/Am）を作製後、加圧成形用陶材をプレスし、試料としている（n = 10）。各試料をレジン支台歯にレジンセメントで合着後、万能試験機にて試料中央に歯軸方向に荷重し破壊強度を測定している。

破壊試験後、全試料の破折様相を観察し、タイプ A；陶材のみの破折、タイプ B；ジルコニアフレームワークまたはレジン支台歯におよぶ破折に分類し、統計処理は有意水準 5%とし、破壊強度に対して一元配置分散分析後、Tukey HSD 多重比較検定を行っている。破折様相に対してはフィッシャー正確確率検定を行っている。

このように、本研究方法は周到な実験計画に基づいて遂行されており、必要かつ十分で正確な結果の得られる妥当な方法といえる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

破壊強度は Y-TZPs、Ce-TZP/As、Y-TZPm、Ce-TZP/Am の順に 3338.8 N、3056.4 N、2399.7 N、2824.1 N で、Ce-TZP/Am と Y-TZPm 間に有意差を認めた。Ce-TZP/Am と Ce-TZP/Am 間、Y-TZPs と Ce-TZP/As 間には有意差を認めなかった。

以上の結果から、有髄歯やレジン支台築造の無髄歯において、Ce-TZP/Am は Y-TZP と比較して、フレームをより薄くすることが可能で、臨床的に極めて有用な材料であることが示唆されたことは高く評価できる。

以上より、本論文はオールセラミックス歯冠修復を行う際に有用な示唆を与えるものであり、歯科補綴学ひいては歯学全般の進歩、発展に寄与するところが大である。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | NGUYEN HO Quynh Anh |
| 論文審査担当者 | 主 査　原田　浩之<br>副 査　青木　和広　　渡邊　裕 |
| 論　文　題　目 | Altered Grey Matter Volume in Trigeminal Neuralgia |

（論文の内容の要旨）

INTRODUCTION

Trigeminal neuralgia (TN) poses many challenges to clinicians worldwide due to the chronic, severe, and intractable pain experienced by patients with the condition. According to the International Classification of Headache Disorder (ICHD) third edition, beta version, TN is divided into two categories: classical trigeminal neuralgia (CTN) and painful trigeminal neuropathy (PTN). CTN has been described as typically presenting with severe electric shock-like shooting pain that lasts from a few seconds to 2 minutes, triggered by innocuous stimuli. Besides, the etiology of PTN is either post-herpetic or post-traumatic, or it may be attributed to systemic disease such as acute herpes zoster, multiple sclerosis plaques, or space-occupying lesions. Among these types of PTN, painful post-traumatic trigeminal neuropathy (PPTN) seems to be more prevalent. The traumatic events may be mechanical trauma caused by accidents or postoperative injury. Dental treatments such as implantation, root canal treatment or extraction may also lead to PPTN. These TN disorders do not only have an impact on each individual patient's quality of life, but also have wider societal implications and are very costly to treat.

Unfortunately, the origin and mechanisms of both disorders remain elusive. Recent reviews mention several theories regarding mechanisms underlying general neuropathic pain. Central plasticity has also been posited as a key factor of chronic neuropathic pain. Brain imaging studies using voxel-based morphometry (VBM) have provided evidence of cortical and sub-cortical changes linked to chronic pain. Specifically, there have been reports of grey matter volume (GMV) decreases and/or increases in various types of chronic pain. However, there is little data regarding brain plasticity in patients with TN, especially PPTN.

In this study, we evaluated GMV differences in patients with CTN and PPTN compared to healthy controls, as well as comparing CTN and PPTN directly. We also investigated a potential relationship between pain characteristics and GMV alterations.

## MATERIAL AND METHOD

### 1. Participants

A final sample of 55 patients was divided into two groups: patients with CTN (n = 30) and patients with PPTN (n = 25). Patients were screened by experienced doctors at the Pain Clinic, TMDU, and categorized according to the criteria of the ICDH-3, beta version.

All patients were right-handed and had active attack pain at the time of study inclusion. The healthy control (HC) group comprised 30 healthy volunteers who fell within our inclusion criteria, and did not have CTN or PPTN. The HC group was matched to the patient groups in age, sex, and handedness.

### 2. Clinical measures

Pain characteristics were assessed using visual analog scale (VAS) and Mcgill Pain Questionnaires (SF-MPQ-2). Duration of pain was calculated in months. We also evaluated the psychological condition of participants using the Self-Rating Depression Scale (SDS), and the State-Trait Anxiety Inventory Form X (STAI-X1 and STAI-X2)

### 3. Neuroimaging acquisitions and preprocessing

Whole-brain three-dimensional (3D) T1-weighted images were acquired using a 3T MRI scanner equipped with a 16-channel phased-array head-coil using a magnetization prepared rapid acquisition gradient echo sequence (MP-RAGE sequence). All images were evaluated by an experienced radiologist for artifacts and brain anatomical abnormalities. We applied the optimized VBM method. All brain images were preprocessed using Statistical Parametric Mapping 12 (SPM12) software run in MATLAB 2015b.

### 4. Statistical analysis

Whole-brain VBM analysis was conducted using an uncorrected threshold of $p_{uncorrected} < 0.001$ and at corrected threshold with $p_{FWE} < 0.05$; FWE = family wised error. To cross-validate the whole-brain analysis and correct for multiple comparisons, ROI analyses were conducted. Pain intensity and duration, and psychological scores were investigated using bivariate correlation tests to investigate associations between these variables and GMV.

## RESULTS

### 1. Demographics and clinical characteristics

Demographics and clinical characteristics were summarized in Table 1. Stai-X1 scores were significantly higher in both CTN and PPTN compared to HC. Neuropathic scores revealed a significant difference between CTN and PPTN .

### 2. VBM analysis

#### 2.1 Patients compared to healthy controls

GMV in the right inferior temporal gyrus in CTN and GMV in the middle temporal gyrus and

bilateral inferior temporal gyrus in PPTN groups were significantly smaller compared with HC .

CTN group had smaller GMV compared to HC in the right inferior temporal gyrus, left cerebellum VIII, the right cerebellum crus 2 and the right superior frontal gyrus. Similarly, PPTN group had smaller GMV compared to HC in the bilateral middle and inferior temporal gyrus, and lobules VIII and crus 2 in the right cerebellum.

2.2 CTN compared to PPTN

Patients with PPTN had smaller GMV compared to CTN patients in the left superior temporal gyrus and left cuneus

3. Correlation analyses

Duration of pain in PPTN patients was negatively correlated with GMV. In contrast, in CTN group there was no correlation between GMV and duration of pain.

There were no significant correlations between neither pain intensity nor psychological scores and GMV.

4. ROI analyses

The results from both the VBM-ROI and ordinary-ROI analyses produced no additional significant results to those from the whole-brain VBM analysis.

DISCUSSION

In this study, we investigated GMV differences in patients with CTN and PPTN compared to healthy controls to improve the current lack of understanding about TN. Our most critical finding was that of significantly smaller GMV in the right inferior temporal gyrus (ITG) in both types of TN compared with HC, and the significantly smaller GMV in the middle temporal gyrus (MTG) in PPTN compared with HC. Our results suggest temporal cortices, especially the ITG contribute to the pathology of TN. Moreover, our results suggest that patients with PPTN might have smaller GMV in some brain regions compared with CTN. Similarities and differences in GMV between CTN and PPTN suggest corresponding diversity in brain morphological changes between the two TN types. It is possible that brain plasticity reflects central sensitization to differing levels of peripheral disorder.

The result of smaller GMV in TN patients compared with HC is consistent with previous studies. However, the structures with GMV alteration reported here and in previous studies are still discrepant. On the other hand, there was no greater GMV in the patient group compared to HC group in present study. Our results show some similarities and some differences to previous GMV studies of TN.

Changes in GMV have been found not only in trigeminal neuralgia but also in other orofacial pain. Also, GMV distortion has been reported in various types of pain in different parts of the

body, such as in chronic low back pain, fibromyalgia, migrain, and chronic tension type headache. The most common finding is the decrease and/or the increase of GMV overlapped in brain areas which are thought to be involved in "pain matrix", a network of brain regions activated in response to pain underlying central pain processing and various dimensions of pain perception. From our results, we assume that the GMV alteration does not have to be limited within the "pain matrix" and it is still too early to conclude whether there are brain structures specific to an individual pain due to lack of consistency in literature. Trigeminal nerve is a special complex nerve and trigeminal nervous system has original pain pathway different from other nervous system. Therefore, the neuropathic pain of the trigeminal nervous system possibly affects the brain areas where there was no change in the neuropathic pain of the other part of body. Our study provides potential candidates for the brain regions in central nervous system that concern with trigeminal neuropathic pain. Still, our study has some limitation. Future MRI studies should seek to improve these issues.

## CONCLUSION

The temporal cortex, especially inferior temporal gyrus probably plays a crucial role in TN.

（和文による要約）

題　：　三叉神経痛患者の灰白質容積変化について

緒言：三叉神経痛は最も激烈な顎顔面領域の神経障害性疼痛の一つであるが、その病態には不明な点が多く残されている。本研究では，典型的三叉神経痛（CTN）群および外傷後有痛性三叉神経ニューロパチー(PPTN)群と健康成人（HC)群を比較し，灰白質容積にどのような相違が認められるかを検討した。

方法：対象は全て女性であり，CTN 患者 30 名，PPTN 患者 25 名および健康成人 30 名であった。CTN 群および PPTN 群の灰白質容積を HC 群と比較するため，３テスラの磁気共鳴画像法にて撮影された画像を基に，Matlab R2015b を用いた SPM12 にてボクセル単位形態計測（VBM）を行った。疼痛強度や病悩期間，心理検査などの臨床的所見と灰白質容積の関連の有無を調べるため，回帰分析を行った。また，関心領域の解析には，多重比較を使用した。

結果：CTN 群および PPTN 群双方の右側下側頭回に，HC 群と比較して有意な灰白質容積の減少を認めた。また，PPTN 群の右側中側頭回に，HC 群と比較して有意な灰白質容積の減少を認めた。さらに，PPTN 群の側頭皮質および頭頂皮質に CTN 群と比較して有意な灰白質容積の減少を認めた。また、病悩期間と PPTN 群の全灰白質容積との間には負の相関を認めたが，CTN 群とは相関は認められなかった。

結論：三叉神経痛は側頭皮質の容積変化と関係があり，これらの部位が症状と関連する可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5470　号 | NGUYEN HO Quynh Anh |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　原田　浩之<br>副 査　　青木　和広　　渡邊　裕 | |
| 論 文 題 目 | Altered Grey Matter Volume in Trigeminal Neuralgia | |

（論文審査の要旨）

三叉神経痛（TN）には典型的三叉神経痛（CTN）および外傷後有痛性三叉神経ニューロパチー(PPTN)がある。近年，慢性疼痛患者の MRI 画像のボクセル単位形態計測（VBM）により，中枢の可塑性変化が痛みの発生に関わる可能性が示唆されている。とくに灰白質容積（GMV）の変化については，様々なタイプの慢性疼痛患者を対象にした研究報告があるが、TN の中でも PPTN についての報告は非常に少ない。

そこで NGUYEN HO Quynh Anh らは，典型的三叉神経痛（CTN）群および外傷後有痛性三叉神経ニューロパチー(PPTN)群と健康成人（HC)群に VBM を用いた GMV 測定を行い，灰白質容積にどのような相違が認められるかを検討した。

対象は東京医科歯科大学歯学部附属病院ペインクリニックに受診した CTN 患者（n = 30）および PPTN 患者（n = 25）と健康成人（n = 30）である。

CTN および PPTN 群では，Pain Intensity Evaluate Questionaires（痛みの質問表１）および Short-Form McGill Pain Questionaires-2 (SF MPQ-2)（痛みの質問表２）の調査を行った。また３群全てに心理検査、すなわち、Self-Rating Depression Scale (SDS), と State-Trait Anxiety Inventory Form X (STAI-X1 および STAI-X2) の調査を行った。

３Ｄ超高速スキャンシーケンス（MP-RAGE sequence）を用いた３テスラの磁気共鳴画像法にて全脳３ＤＴ１強調画像を撮影した。撮影された画像を基に，Matlab R2015b を用いた SPM12 にて VBM を行い，GMV を算出した。

疼痛強度や病悩期間，心理検査などの臨床的所見と GMV の関連の有無を調べるため，回帰分析を行った。また，関心領域の解析には，多重比較を使用した。

結果は以下のとおりである。

1. HC と比較し，STAI-X1 スコアが CTN, PPTN 群において有意に上昇していた。
2. SF-MPQ-2 スコアで，Neuropathic スコアが CTN 群に比べ，PPTN 群で有意に上昇していた。
3. $p_{FWE}$ を指標とすると，CTN 群の右側下側頭回および PPTN 群の右側中側頭回および両側下側頭回にて，HC 群と比較して有意な GMV の低下を認めた。
4. $p_{uncorrected}$ を指標とすると，CTN 群の右側下側頭回，左側小脳（Ⅷ領域），右側小脳（crus2 領域），

上前頭回にて，HC 群と比較して有意な GMV の低下を認めた。また PPTN 群では，両側の中側頭回および下側頭回，右側小脳のⅧ領域および crus2 領域にて，HC 群と比較して有意な GMV の低下を認めた。

5. $p_{uncorrected}$ を指標とすると，PPTN 群の左側上側頭回と左側楔部に CTN 群と比較して有意な GMV の低下を認めた

6. 病悩期間と PPTN 群の GMV 変化に負の相関を認めた。

7. 関心領域の解析では，統計学的有意差を認めた部位はなかった。

本研究では，HC 群と比較して CTN 群および PPTN 群両群での右側下側頭回の GMV 低下と，PPTN 群での右側中側頭回の GMV 低下が認められた。これらの結果から，NGUYEN HO Quynh Anh らは，側頭回，とくに下側頭回が三叉神経痛の病態と関係するのではないかと考察している。

GMV 変化については慢性痛を対象に様々な報告がなされているが、本研究において，三叉神経系の神経障害性疼痛では側頭皮質の容積変化と関係があり、これらの部位が症状と関連する可能性が考えられた。

以上より，NGUYEN HO Quynh Anh は、三叉神経系の神経障害性疼痛の症例に VBM を用いた GMV 測定を行い，灰白質容積にどのような変化が認められるかを検討し、三叉神経系の慢性痛では脊髄神経系の慢性痛と異なる脳部位で変化がある可能性を示唆した。本研究結果は、今後の疼痛研究の発展に大きく貢献すると考えられ、広く歯科医学・医療の進歩発展に寄与するものと判断される。よって本論文は、博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | HIRUNWIDCHAYARAT Worawalun |
| 論文審査担当者 | 主査　　池田　通<br>副査　　鈴木 敏彦、横山　三紀 |
| 論　文　題　目 | Site-specific regulation of oral mucosa-recruiting CD8$^{+}$ T cells in a mouse contact allergy model |

（論文内容の要旨）

Contact allergy is a T cell-mediated, delayed-type hypersensitivity generated by contact exposure of an allergen to the skin and mucosal surface. The clinical manifestations of allergic responses between the skin and oral mucosa vary and the differences in immunopathology have not been clarified. We generated hapten-induced contact hypersensitivity (CH) of the buccal mucosa (BM) in parallel studies with ear skin (ES) CH, and observed several characteristic findings of BM CH. The BM challenge induced more rapid and more severe inflammation than the ES challenge, with abundant granulocyte and CD8$^{+}$ T cell infiltration. However, these inflammatory responses diminished quickly. Recruiting CD8$^{+}$ T cells in the BM had higher ratios of CD62L$^{-}$CD44$^{low-hi}$ memory-type cells, and showed impaired IFN-γ, greater PD-1, and comparable Ki-67 expression, suggesting that the recruiting-proliferating CD8$^{+}$ T cells were unable to differentiate into effector T cells and converted into exhausted T cells at the local site. Preferentially greater expression of PD-1 ligand (B7-H1), was observed in the BM epithelium under the peak inflammation, and the absence of B7-H1 further accelerated CH responses, suggesting the occurrence of PD-1:B7-H1-mediated immune regulation at the local site. Our results may facilitate the understanding of the unique features of contact allergies in the oral mucosa, and guide the development of new strategies for control of contact allergy.

<Introduction>

The oral mucosa (OM) and skin are covered by stratified squamous epithelium and provide a first line of defense in protecting underlining tissues from harmful environmental stimuli. Allergic contact stomatitis is a T cell-mediated, delayed-type hypersensitivity generated by contact exposure of an allergen to the OM. However, the mechanisms by which allergens induce allergic contact stomatitis and the immunopathological differences between OM and skin contact allergies remain unknown. The use of 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) to

induce contact hypersensitivity (CH), with the ear skin (ES) serving as a challenge site, provides a classic and convenient murine model of allergic contact dermatitis. To date, no suitable experimental model of T-cell mediated OM CH has been established. By modifying an ES CH model, we generated a new model of OM CH induced by abdominal skin sensitization and buccal mucosa (BM) challenge. Then we compared the responses in the elicitation phase after ES and BM challenge, and found several unique features of OM CH.

<Materials and Methods>

Hapten-induced contact hypersensitivity of the skin and buccal mucosa; BALB/c mice were sensitized using 0.5% DNFB at abdominal area at days 0 and 1. At day 5, mice were challenged with 0.2% DNFB by painting onto BM or ES. Twenty-four hours after challenge, RLNs and local BM or ES tissues were collected.

Immunohistochemistry; ES and BM tissues were dissected, embedded in Tissue-Tek, frozen, and stored at -80°c until use. Serial cryostat sections were fixed in absolute cold acetone and subjected to enzymatic immunohistochemical analysis.

Isolation of tissue-recruiting lymphocytes; BM and ES tissues were cut into small pieces. BM was digested with collagenase I and DNase I; ES was digested with collagenases I alone. Alive cells were collected after nylon-mesh filtration and centrifugation by 1500 rpm for 5 minutes. Tissue samples from two to three mice were pooled.

Flow cytometry; Cells were treated with supernatants for anti-CD16/32 mAb to block FcγR, and stained with fluorochrome-conjugated or biotinylated mAbs. For intracellular cytokine staining, cells were stimulated with PMA and ionomycin in the presence of Breferdin A for 6 h, and then subjected to multicolor staining of intracellular cytokines and cell surface antigens. Stained cells were analyzed with a FACSVerse using FACSuite software. The results were analyzed using the FlowJo software.

Sensitized T cell transfer experiments; RLN T cells collected from the sensitized mice on day 5 were enriched by negative selection. Isolated RLN T cells ($2 \times 10^7$ cells) were transferred systemically into wild type and B7-H1/PD-1WKO mice. One day after, the BM challenge was performed with DNFB. Then, histological examination was performed.

<Results>

The DNFB challenge of the ES induced marked edema swelling at 24–72 h, with mild damage of epithelium layers. While, BM CH caused rapid inflammation at 12 h and severe epithelium damage at 24 h, which diminished quickly at 36 h. The ES challenge induced scattered, mild granulocyte infiltration from 24 to 72 h, whereas abundant granulocytes infiltration was observed in BM at 12 and 24 h. Most granulocytes were located at the lamina propria. These results indicate that BM CH elicited much faster and severe responses with abundant cell infiltration, but these effects diminished quickly. Thus, ES and BM CH

markedly differ.

Both challenges markedly increased the percentages of $CD45^+$ leukocytes at the time of peak inflammation (ES, 24–48 h; BM, 12–24 h. The BM showed much lower T cell ratios before and after the challenge, possibly due to the dominant infiltration of granulocytes. Both challenges significantly increased the percentages of $CD8^+$ T cells, which are critical effector cells in this model. Immunohistochemistry showed dominant recruitment of $CD8^+$ T cells in BM at 24 h and were located at the superficial submucosa. Our results demonstrate that a much larger number of $CD8^+$ T cells were recruited in the inflamed BM.

Based on the expression levels of CD62L and CD44, we divided the cells roughly into three fractions; $CD62L^+CD44^{low}$ (Fr-1), $CD62L^+CD44^{hi}$ (Fr-2), and $CD62L^-CD44^{low\text{-}hi}$ (Fr-3). Before challenge, the dominant fraction in both tissues was Fr-3 in $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells. Both challenges markedly decreased the ratios of Fr-1 and increased the ratios of Fr-2 plus Fr-3 in $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells. These results indicate that BM tissues consistently contained more Fr-3 $CD8^+$ T cells under non-inflammatory and inflammatory conditions. Moreover, BM-recruiting $CD8^+$ T cells showed a unique Fr-2-impaired status at the peak inflammatory condition.

To understand the activation and regulatory status of BM-recruiting $CD8^+$ T cells, we examined expression of IFN-γ, Ki-67, and PD-1. IFN-γ expression by ES-recruiting $CD8^+$ T cells was markedly increased after challenge, whereas that of BM-recruiting $CD8^+$ T cells was not affected, suggesting the occurrence of site-specific regulation in BM. ES- and BM-recruiting $CD8^+$ T cells exhibited similar percentages of Ki-$67^+$ cells during peak inflammation. However, the percentages of PD-$1^+$ cells were significantly higher in BM $CD8^+$ T cells. These results suggest that BM-recruiting $CD8^+$ T cells were unable to differentiate into effector T cells and converted into exhausted T cells.

The above results suggest the occurrence of site-specific regulation in BM, with involvement of the PD-1 pathway. We examined the expression of B7-H1, a PD-1 ligand, in local tissues. Preferentially greater induction of B7-H1 was seen in the prickle cells of BM and PD-1-expressing cells were observed in the superficial submucosal of BM at the peak inflammation. To confirm the direct involvement of B7-H1 in the inactivation of $CD8^+$ T cells, we performed an adaptive transfer experiment using DNFB-sensitized T cells. Sensitized T cell transfer in the B7-H1/PD-1WKO mice resulted in much faster and more severe inflammation with greater infiltrating cells and severe damage of epithelium at 10 h compared to wild type mice. These results suggest the involvement of BM epithelium-associated B7-H1 and PD-1-expressing $CD8^+$ T cells in site-specific regulation in the BM.

<Discussion>

We demonstrated the occurrence of characteristic CH responses in BM. The BM challenge

induced rapid and severe inflammation, but also rapid recovery. The rapid and severe inflammation may correlate closely with the degree of granulocyte infiltration at the local site, which in BM, much faster and abundant infiltration of granulocytes were seen. BM-recruiting T cells contained around two-fold greater percentages of $CD8^+$ T cells.

A striking finding of this study is a unique activation state of BM-infiltrating $CD8^+$ T cells, which may greatly contribute to rapid recovery from severe tissue inflammation. Most BM-recruiting $CD8^+$ T cells possessed proliferating Ki-67 markers, but showed clear impairment of IFN-γ expression. These results suggest that the BM-recruiting $CD8^+$ T cells were recently activated and had proliferating capacity, but were unable to differentiate into functional effector cells that secrete IFN-γ. The main reason for this impaired differentiation may be preferentially high expression of PD-1 in BM $CD8^+$ T cells. Proliferating Ki-$67^+$PD-$1^+$ $CD8^+$ T cells that receive PD-1 co-inhibitory signals may quickly shift to exhausted, non-functional Ki-$67^-$PD-$1^-$ $CD8^+$ T cells. The rapid inactivation of $CD8^+$ T cells in the BM was also indicated by the markedly lower percentages of $CD62L^+CD44^{hi}$ (Fr-2) $CD8^+$ T cells. Generally, primary Ag stimulation transforms naive $CD62L^+CD44^-$ T cells into $CD62L^-CD44^{hi}$ memory T cells through the state of double positive ($CD62L^+CD44^+$) cells. These characteristics are specific to $CD8^+$ T cells in the BM.

In addition, we observed greater B7-H1 expression in the BM epithelium and co-localization of PD-1-expressing infiltrating $CD8^+$ T cells and KCs. A previous report by Kang et al. in 2016 demonstrated powerful KC-mediated regulation in the oral epithelium. Our results also indicated that BM-associated B7-H1 inhibited $CD8^+$ T cell activation at the local site in a contact allergy model. Although IFN-γ is generally accepted to be a critical cytokine for the induction of B7-H1 in KCs, our results indicated that IFN-γ expression by BM-recruiting $CD8^+$ T cells was limited. These findings raise the question of which factors contribute to preferential B7-H1 and PD-1 induction in BM tissues. It has been shown that TGF-β is a potential candidate for induction of these molecules, as it has been shown to promote expression of PD-1 in tissue-infiltrating $CD8^+$ T cells. Further studies are required to identify the factors involved in site-specific regulation.

In conclusion, OM CH contained these characteristics: rapid and severe inflammation was mediated by granulocytes and $CD8^+$ T cells, infiltrating $CD8^+$ T cells had a unique activation status, the PD-1:B7-H1-mediated pathway was involved in local regulation, and the OM recovered rapidly from severe epithelium damage and inflammation. Our findings may facilitate the understanding of the differences in CH pathology between the OM and skin, and guide the development of strategies for control of allergic contact stomatitis.

＜和文要約＞

接触アレルギーは、皮膚あるいは粘膜へのアレルゲンの接触により引き起こされる T 細胞介在性の遅延型過敏症である。口腔粘膜と皮膚は共に重層扁平上皮に被覆されており、多様な接触アレルギーを呈するが、その免疫病理の違いについてはよくわかっていない。本研究では、頬粘膜でハプテン誘導性接触過敏症マウスモデルを樹立し、耳介皮膚を用いた接触過敏症と比較することで、いくつかの口腔粘膜特有の特性を見いだした。頬粘膜では、皮膚と比較して急速で激しい好中球と $CD8^+$ T 細胞の浸潤を伴う炎症が惹起された。しかしながら、この炎症はすばやく消退した。頬粘膜にリクルートする $CD8^+$ T 細胞の多くは、 $CD62L^-CD44^{low-hi}$のメモリータイプであったが、皮膚と比べて IFN-γ発現の低下、免疫チェックポイント分子 PD-1 発現の増強、増殖マーカー Ki-67 の同等の発現を示した。このことから、頬粘膜にリクルートしてきた増殖性の活性化 $CD8^+$ T 細胞は、エフェクターT 細胞に分化できずに局所で疲弊してしまった可能性が示唆され、これが頬粘膜における激しい炎症からの急速な回復の原因であると考えられた。また、炎症時には頬粘膜上皮に PD-1 のリガンドである B7-H1 の強い発現誘導が認められ、上皮細胞上の B7-H1 経路阻害により過敏応答の増強が認められたことから、頬粘膜における PD-1:B7-H1 経路を介した免疫制御機構の存在が確認できた。本研究結果は、口腔粘膜特有の接触アレルギーの免疫病態の理解を促し、新しい疾患コントロール開発に役立つと考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5471　号 | HIRUNWIDCHAYARAT Worawalun |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　池田　通<br>副査　　鈴木 敏彦、横山　三紀 | |
| 論 文 題 目 | Site-specific regulation of oral mucosa-recruiting CD8+ T cells in a mouse contact allergy model | |

（論文審査の要旨）

接触アレルギーは、皮膚あるいは粘膜へのアレルゲンの直接暴露により誘導される T 細胞介在性の遅延型過敏応答である。皮膚と口腔粘膜は共に重層扁平上皮からなり、抗原捕捉および抗原提示に関与する上皮ランゲルハンス細胞と上皮下間質樹状細胞が存在し、抗原特異的な T 細胞応答の惹起に関わっている点で類似している。口腔粘膜と皮膚の相違では、口腔粘膜の創傷治癒は速く、瘢痕が残らないということが知られており、これに関しては、細胞外マトリックスタンパクやサイトカイン・ケモカイン・増殖因子などの分泌、唾液の存在、炎症性細胞の違いなどが報告されてきている。しかしながら、 T 細胞介在性の接触アレルギーにおける皮膚と口腔粘膜の違いに関する報告は未だない。口腔粘膜では、歯科用金属等の歯科修復材料により、口腔扁平苔癬様反応（oral lichenoid reaction)が口腔粘膜に観察されるが、その臨床徴候は明確ではなく、口腔粘膜よりも皮膚に顕著な症状が現れることが少なくない。 口腔接触アレルギーの免疫病理学的理解には、適切な動物実験モデルが有用と考えられるが、口腔粘膜の接触アレルギー実験モデルは確立されていなかった。本研究で、W. Hirunwidchayarat は、口腔接触アレルギーの免疫病理学的メカニズムを明らかにするために、皮膚接触アレルギーモデルであるハプテン DNFB 誘導接触過敏症（contact hypersensitivity, CH)を一部改変し、口腔粘膜における CH 応答を皮膚と比較しながら評価可能なマウスモデルを確立した。さらに、この実験モデルを用いて、皮膚と口腔粘膜（頬粘膜）の局所応答を比較し、その違いを明確に示した。また、その応答の違いを生じた理由について、 T 細胞応答の免疫抑制経路である PD-1:B7-H1 経路に焦点をおいて、解析を加えた。

本研究で得られた結果は以下である。

1．耳介皮膚を用いた DNFB 誘導 CH モデルを改変し、頬粘膜にチャレンジすることで、口腔 CH モデルを確立することが可能となった。
2．頬粘膜へのハプテンチャレンジは、皮膚と比べて、早期で激しい組織炎症を誘導したが、その回復も非常に早かった。
3．頬粘膜の早期で激しい炎症は、顆粒球と CD8+ T 細胞の局所リクルートによるものであった。
4．頬粘膜 CH での CD8+ T 細胞は上皮直下および上皮内に浸潤していた。
5．頬粘膜浸潤 CD8+ T 細胞の多くが CD62L-CD44$^{low\text{-}high}$のメモリータイプ表現型をもって

いた。

6．頬粘膜浸潤 CD8+ T 細胞は、 Ki-67 を保持している　増殖性の細胞ではあるが、 PD-1 の発現率が高く、エフェクターサイトカインである IFN-γの発現率が低いという特徴的な表現型をもつ細胞であった。このことから、頬粘膜浸潤 CD8+ T 細胞は、最終エフェクター細胞に分化できずに、 PD-1 経路を介して不活化され疲弊細胞となる可能性が示唆された。

7．CH ピーク時における頬粘膜上皮では、 PD-1 のリガンドである B7-H1 の優位の発現誘導と PD-1 を発現している浸潤細胞が認められた。

8．　B7-H1 を欠損している宿主マウスにハプテン感作 T 細胞を移入したところ、頬粘膜 CH 応答はさらに早期で激しい応答となったことから、 B7-H1:PD-1 抑制経路の局所関与が示唆された。

以上の結果から、W. Hirunwidchayarat は、頬粘膜 CH モデルでは、顆粒球と CD8+ T 細胞浸潤の優位な早期の局所炎症が誘導されるが、局所上皮に発現誘導される B7-H1 と浸潤 CD8+T 細胞上に発現している PD-1 抑制性受容体との相互作用により、局所において CD8+ T 細胞は早急に不活化され、エフェクター細胞に分化することなく、炎症応答が鎮静化するという可能性を実験的に明らかにした。

W. Hirunwidchayarat は口腔粘膜における接触アレルギー実験モデルを確立することで、皮膚とのいくつかの相違点を明確に示した。また、激しい炎症が早期に消退する理由として、PD-1:B7-H1 抑制経路の関与の可能性を示したことは、口腔接触アレルギーの制御メカニズムの解明に繋がる価値ある研究と評価できる。

本研究は、金属アレルギーをはじめとする接触アレルギーのみならず、皮膚と口腔粘膜の両者に関連する種々の皮膚・粘膜疾患の病態解明と病態制御・治療法開発に有益な示唆を与えるもので、医歯学の発展に寄与するものと考えられ、博士（歯学）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | SAWANGARUN Wanlada |
| 論文審査担当者 | 主 査　　渡部　徹郎<br>副 査　　三浦　雅彦、丸川　恵理子 |
| 論　文　題　目 | Downregulation of Notch1 Expression in 4-Nitroquinoline-1-oxide-Induced Precancers of Mouse Tongue |

**Introduction**

Recent progress in gene mutation analysis of oral cancer provided relevant information for more precise diagnosis and better treatment. The list of frequently mutated genes in oral SCC includes NOTCH1 as a putative tumor suppressor. Inactivating mutations of NOTCH1 are common in SCC of different tissues, whereas NOTCH1 mutations are rare in the other cancers. This highlights the importance of Notch signaling in the pathogenesis of oral cancer.

The typical function of Notch signaling is cell fate determination at the stage of asymmetric division. However, Notch exhibits diverse functions, including regulation of stem cell self-renewal, cell proliferation, and differentiation.

Conflicting results have been reported regarding the expression of Notch1 in oral SCC. Despite its putative role as a tumor suppressor, there are publications showing that Notch1 is upregulated in oral cancer. Conversely, other articles have demonstrated that Notch1 expression is reduced in oral cancer and precancer. To further clarify these findings, we analyzed Notch1 expression in chemically-induced tongue tumors in mice, with a special interest in the relationship between Notch1 expression and the development of precancerous lesions.

**Materials and Methods**

*Induction of tongue tumors in mice*

Six-year-old CD-1 female mice were used in the study. 4-Nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) was added at a concentration of 100 μg/mL to the drinking water and provided for 8 weeks. After 8 weeks of administration period, normal drinking water was given. In the first set of experiments, nine 4-NQO-treated mice and nine untreated littermates were euthanized at 24 weeks after initiation of 4-NQO treatment. In the second set, nine 4-NQO-treated mice were euthanized at 16, 20, and 24 weeks after initiation of 4-NQO treatment; three mice were euthanized at each time point. The animal studies were reviewed and approved by the institutional animal care and use committee.

*Human specimens*

This study was approved by the institutional research ethics committee. Surgical specimens of 10 tongue SCC and 10 leukoplakia were collected from the archives of the Dental Hospital of Tokyo Medical and Dental University. The specimens that contained an epithelium with minimum histological alteration at the periphery of the lesion were selected.

*Histology and immunohistochemistry*

Four μm-thick tissue sections were cut and stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry of Notch1, Krt13, Krt15 and Ki67 were studied. Notch1 expression levels were evaluated by staining intensity in comparison with the levels in basal cells of adjacent normal epithelium in the same specimen and classified as normal (++), visible but downregulated (+), or downregulated to an undetectable level (-).

*Statistical analyses*

Statistical analyses were done using SPSS. Quantitative data were assessed by the Mann-Whitney *U* test or the Tukey-Kramer method. $P < 0.05$ was judged to be statistically significant.

## Results

*Histology of normal mouse tongue epithelium*

To confirm normal pattern of stratification and differentiation in mouse tongue tissue, we examined the expression of Notch1, as well as proliferation and differentiation markers. Ki67 was used as a marker of proliferation, Krt13 as a marker of terminal differentiation of squamous epithelium, and Krt15 as a marker of basal stem cells. In normal squamous epithelium of the tongue mucosa, Notch1 was expressed in the basal layer. Suprabasal cells, that constitute spinous and keratinized layers, were negative for Notch1 expression. Krt15 was also expressed in basal cells. Krt13 was expressed in most basal cells and all suprabasal cells. A small number of Krt13-negative cells were also present in the basal layer. This expression pattern was the same as that of a human tongue, except that most basal cells were positive for Krt13 in mice while basal cells were negative for Krt13 in humans.

*4-NQO treatment induced tongue tumors in mice*

To induce tongue tumors, 4-NQO was administered to mice through the drinking water. At 24 weeks after initiation of 4-NQO treatment, tongue surfaces of treated mice were rougher compared to the tongues of untreated mice. Histological examination revealed that the 4-NQO-treated group developed 1 - 4 lesions per midline tongue, whereas untreated mice developed no lesions. These were either SCCs or premalignant lesions that would be diagnosed as carcinoma in situ or severe epithelial dysplasia in humans. In addition, multiple flat-surfaced lesions that showed slight morphological alterations were observed. The epithelial lesions with histological alterations, suggestive of premalignancy, are subsequently referred to as precancers. Precancer was classified into high- and low-grade according to the histological abnormalities.

*Notch1 expression was downregulated in chemically-induced precancers*

In a total of six midline tongue specimens, two SCCs, three high-grade precancers, and 20 low-grade precancers were identified. In precancers, either low- or high-grade, remarkable downregulation of Notch1 was observed in 91% of the cases. In cancers, Notch1 expression was either downregulated or relatively unchanged. Notably, there were multiple epithelial areas that lacked Notch1 expression, apart from precancers and cancers. These areas looked histologically normal. Thirty-eight of these Notch1-negative areas were identified and are hereafter referred to as Notch1(-) patches. Additionally, at the periphery of precancers, epithelium showing normal histology and reduced Notch1 expression was often observed. The mean size of the lesion was the smallest in the Notch1(-) patches, the medium in the precancers, and the largest in SCC. The statistical analysis indicated a significant difference in the size of the Notch1(-) patches and precancers.

Tongues of 4-NQO-treated mice were collected at 16, 20, 24 after initiation of 4-NQO administration, and the occurrences of Notch1(-) patches and precancer were compared. The number of precancers tended to increase with time, whereas the number of Notch1(-) patches did not change significantly from 16 to 24 weeks, and showed a decrease from 20 to 24 weeks. The size of the lesions showed a tendency to increase with time, but the size of Notch1(-) patches did not change.

Next, we examined the expression of Krt13, Krt15, and Ki67 in Notch1(-) patches and precancers to investigate the effect of changes in Notch1 expression on differentiation and stratification. In precancers, Krt15 expression in basal cells, and Krt13 expression in suprabasal cells, was decreased substantially. Distribution of Ki67-positive cells was largely unchanged in low-grade lesions. In high-grade lesions, Ki67-positive cells increased in the suprabasal layer, although the number of Ki67-positive cells in the basal layer did not show a significant change. In contrast, in Notch1(-) patches, no abnormality was found in the expression patterns of Krt13, Krt15, and Ki67, suggesting that differentiation and stratification were not affected by insufficient Notch1 signaling.

*Notch1 expression was downregulated in human precancers.*

The above animal results suggest that the status of Notch1 expression may be useful for evaluating

human precancerous lesions. Abnormal epithelium with minute histological alterations is often present around the periphery of tongue cancer or precancer, and often makes it difficult to determine the extent of the lesion. We collected 20 human specimens with weak histological atypia that would be judged as normal or mild dysplasia, and assessed Notch1 expression immunohistochemically. Notch1 expression was found to be distinctly downregulated in many (80%) of these lesions: in 5 cases, Notch1 expression was downregulated to undetectable levels, and in 11 cases, Notch1 expression was visible but downregulated compared to that in the normal epithelium.

**Discussion**

Despite some differences between 4-NQO induced tongue tumors in mouse and those in human patients, the expression of Notch1 and the expression of differentiation markers are similar. This makes this tumorigenesis model a good experimental system that imitates the development of human tongue tumors.

We found that multiple Notch1-deficient epithelia, which was histologically indistinguishable from normal epithelia. These Notch1-negative epithelial units occurred in the form of patches. The number and mean size of the Notch1(-) patches did not increase significantly with time, whereas the number and mean size of precancers did increase gradually. Furthermore, precancers were often associated with Notch1(-) patch-like epithelium. Based on these findings, we hypothesize that each Notch1(-) patch may appear at the initial stage of tumorigenesis. These initial lesions may not grow significantly, until additional genetic or epigenetic changes occur, which would promote tumor growth and progression of Notch1(-) patches to precancers.

The present study provided evidence supporting the tumor suppressor function of Notch1. However, the Notch1(-) patches exhibited no abnormality in epithelial differentiation and stratification. Tthese results indicate that downregulation of Notch1 expression is an important step preceding the development of precancer, but may not directly cause major phenotypic alterations in the affected epithelium.

Although there is no direct evidence that Notch is involved in the maintenance of such stemness in squamous epithelium, the expression of Krt15, which is regarded as a stem cell marker, was reduced in concordance with Notch1 downregulation. The loss of stemness may occur indirectly in early stages of dysplasia, due to dysfunction of Notch1.

In human oral cancer, pathogenic NOTCH1 mutations are found in about 10%. On the other hand, downregulation of NOTCH1 expression is a common change found in more than 90% of human oral precancers and cancers. Therefore, the major cause of NOTCH1 downregulation is not the NOTCH1 gene mutation itself. Further analysis is necessary to elucidate the regulatory mechanism of NOTCH1 expression. The results of this study can be applied to the diagnosis of human precancer. Changes in Notch1 clearly appear from the very early stage of dysplasia.

This study established that Notch1 is downregulated in most precancers of the tongue, and also provided evidence showing that impaired Notch1 expression occurs at the initial stage of oral precancer development before dysplastic phenotype appears. These findings suggest a tumor suppressor function for Notch1. Alterations in NOTCH1 expression can, therefore, be used as a sensitive marker for precancerous lesions, providing a good diagnostic tool for pathologists.

（日本語要旨）

遺伝子解析の進歩は、口腔癌の診断と治療法の開発に重要な情報を提供しつつある。Notch1 の不活性化変異は、口腔癌を含む扁平上皮癌に特徴的に見られる。Notch1 は細胞の増殖や分化の制御に働き、腫瘍抑制遺伝子として重要であると考えられているが、口腔腫瘍における Notch1 の役割については、充分な研究がなされておらず不明である。本研究の目的は、Notch1 の発現と口腔の前癌病変の発生との関連を明らかにすることである。6 週齢のマウスに 4-ニトロキノリン-1-オキシド（4-NQO）を 8 週間飲水投与し、舌癌を誘発した。観察期間の後に投与後 16-24 週で舌を採取し、組織学的解析を行った。 4-NQO 投与群では前癌病変と癌が多発した。免疫組織学的解析により、前癌病変の多くで Notch1 の発現減弱を認めた。また、正常組織像を呈する Notch1 陰性領域の多発が観察された。4-NQO 治療の開始後 16, 20 および 24 週に採取した舌において、これらの病変の数と大きさを時系列的に比較したところ、腫瘍形成の初期段階で Notch1 陰性領域が生じ、その一部が前癌病変に進行することが示唆された。さらに、Notch1 陰性領域

における分化と増殖マーカーの発現は正常であり、Notch1 の機能は扁平上皮の分化に必須ではないことが示唆された。また、組織学的変化の弱い 20 症例のヒト舌上皮異形成の解析では、80%の症例に Notch1 発現の減少が認められ、前癌病変のマーカーとして使用できることが示唆された。以上より、Notch1 発現は舌前癌病変において減弱し、その変化は組織学的な変化が現れる前の、前癌病変のごく初期の段階で起こることが示唆された。 この知見は、Notch1 の腫瘍抑制機能と合致している。 本研究結果から、Notch1 発現の変化は、前癌病変の鋭敏なマーカーとして使用できる可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5472　号 | SAWANGARUN Wanlada |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　渡部　徹郎<br>副 査　　三浦　雅彦、丸川　恵理子 | |
| 論 文 題 目 | Downregulation of Notch1 Expression in 4-Nitroquinoline-1-oxide-Induced Precancers of Mouse Tongue | |

（論文審査の要旨）

遺伝子解析技術の急速な進歩により、癌に特有の遺伝子変異が見いだされ、癌の診断と治療薬の選択に有用な情報を提供しつつある。口腔癌のほとんどは扁平上皮癌であるが、Notch1 は扁平上皮癌で特徴的に変異がみられる遺伝子として注目されている。本研究で解析した Notch1 遺伝子は、口腔癌の発生機序の解明に重要な遺伝子であるが、その機能については不明な点が多い。また、本研究は癌の発育段階の初期である前癌病変に主眼を置いているが、扁平上皮の前癌病変の発生機序の解明は遅れている。以上より、口腔癌の病因研究として、本研究の意義は高く評価できる。

本研究では、前癌病変をマウス舌に誘発し、統計学的解析に必要十分な数の病変を、正常上皮から癌に至る病期の異なる病変にわたり解析している。解析に用いられた免疫組織学的手法によるタンパク発現の検出は明瞭かつ特異的で、発現動態の解析を行う基盤として適当である。本研究ではマウスとヒトの組織像や病変の様相の異同を注意深く検討するとともに、動物実験で得られた結果がヒト病変でも同様であることを確認している。以上のように本研究で採用された解析手法は科学的に妥当である。

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1) 4-ニトロキノリン-1-オキシドの飲水投与により、マウスの舌にヒトと類似する前癌病変, 舌癌を誘発した。
2) Notch1はマウスの舌の扁平上皮基底細胞に発現し、前癌病変の大部分で発現が減少した。
3) 1)の病変に加え、組織学的には正常像だが、Notch1の発現の減少を呈する小領域（以下Notch1陰性パッチ）が多発した。前癌病変と関連して存在するものもみられた。
4) 前癌病変の数と大きさは時間とともに増加した。これに対して、Notch1陰性パッチは時間とともに数と大きさが増加しなかった。
5) 前癌病変では分化や増殖のマーカーの発現の変化を認めた。しかしNotch1陰性パッチにこれらの変化は認めなかった。
6) ヒトの前癌病変の多くでNotch1の発現の減少を認めた。

以上の結果から、申請者はNotch1が扁平上皮の形成に必須ではない可能性を考察し、さらにNotch1発現の減弱が、前癌病変のごく初期の段階で起こることを考察している。このことは前癌病変の発生機序の解明に重要な知見と考えられる。また、申請者はNotch1発現の減弱が、前癌病変のマーカーとして応用できることを示唆しており、臨床的価値が高いものと認められる。

以上のように舌の前癌病変の発生における Notch1 の発現動態を明らかにし、その診断への応用も示唆した本論文は、歯科医学の発展に大きく貢献するものであり、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 丁　林 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　柴田　俊一<br>副　査　山下　仁大、井関　祥子 |
| 論　文　題　目 | Effect of doxycycline-treated hydroxyapatite surface on bone apposition: A histomophometric study in murine maxillae |

（論文の内容の要旨）

**Introduction**

Implant treatment is widely used for oral rehabilitation and it has become more clinically predictable and reliable. In recent years, numerous efforts have been exerted to make implant treatment more appealing for potential patients with compromised alveolar condition or severe systemic diseases. One of these efforts has been to modify the titanium implant surface to shorten and improve the osseointegration process.

Doxycycline is a broad-spectrum antibiotic of the tetracycline group, which is widely used for treating infectious disease including periodontitis. Moreover, there are several non-antibiotic properties of doxycycline. When doxycycline was first used in periodontal treatment, the efficacy was attributed to their antimicrobial properties. However, in recent years, several researches revealed that the efficacy should be attributed to the anti-inflammatory properties. Thereupon, a new concept of sub-antimicrobial dose doxycycline (SDD) or low-dose doxycycline (LDD) as adjuvant therapy for periodontal disease has been approved by U.S. Food and Drug Administration and other national regulatory agencies in Europe and Canada.

On the other hand, hydroxyapatite (HA) is widely used as bone substitute and surface coating of orthopedic and dental implants due to its high osseoconductivity. Indeed, HA coating can accelerate~~s~~ fixation of the implant by the adjacent newly formed bone tissues. A room temperature sputtering technology has been recently developed to deposit thin HA coating, which evoked much interest in the strong adhesion to Ti substrate, compact microstructure, well-controlled elemental composition, and preserved surface roughness of the underlying substrate. Due to its excellent characteristics, sputtered HA-coated surface would be a promising surface to improve the success rate in treating patients in the compromised alveolar bone condition. Indeed, HA can be also used as a carrier of delivery system for therapeutic drugs such as antibiotics or anticancer drugs.

Tetracyclines have been applied to hydroxyapatite for prolonged release of antibiotics. The releasing mechanism seems to be diffusion even though the formation of a chelate may also be involved. Interestingly, it has been reported that combination of doxycycline and HA promotes adhesion, proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in vitro.

The purpose of the present study was to examine the effect of doxycycline-treated HA surface on bone apposition. We compared bone appositions around doxycycline-treated HA coating implant and HA-coated implant in the murine maxillae.

**Material and methods**

Titanium implants were coated with thin HA with radio frequency magnetron sputtering. Half of the HA-coated implants were soaked in doxycycline solution, then washed and dried (DOX group) whereas the other HA-coated implants were untreated (HA group). Eight weeks after extracting the maxillary first molars of 4-week-old male mice, the implants of both groups were placed at the extracted sites. The animals were sacrificed at 4 and 8 weeks and the bone around the implants were evaluated radiologically and histomorphometrically. The bone-implant contact (BIC) was analyzed extending from the implant shoulder to the apical end. For the analysis of the bone area around each implant, the sum bone areas between all the threads in both medial and distal side of the implants were defined as new bone areas. BIC was defined as the length of bone surface in direct contact with the implant surface and calculated as percentage of bone surface in direct contact to all the threads part of implant surface. The mean value of new bone area (NBA) were defined as areas between the threads around the implants. BIC and NBA in HA-coated and DOX-treated groups were compared.

**Results**

The new bone formation around the implant was obvious whereas implant penetration to the sinus was not found by micro CT detection. The contact of the bone to the implant and the bone between the threads of the implant were observed in both groups.

At 4-week time point in HA-coating group, the newly formed trabecular woven bone was evident around the implant. Direct contact of the bone to the implant surface was obtained. The newly formed bone, which was clearly distinguishable from the native bone with relatively light stains, gained direct contact with the implant surface. At 4-week time point in Dox group, new bone had fulfilled the space between the threads and the contact of implant to the bone was very tight and there were less light stained areas of the newly formed bone in the threads than that in 4-week HA group. Well-established contact to the implant surface and less light stain indicated a more stable and mature condition of the newly formed bone comparing to HA group of same time point. At 8-week time point in HA group, the woven bones became more mature. Newly formed bone areas were also able to be observed; however, less than at 4 weeks of same group. At 8-week time point in Dox group, the woven bone was well located between the threads, and its contact to the implant was still firm. Bone status was more mature and stable comparing to the 4-week Dox group.

The mean values (± standard deviation) for bone-implant contact (BIC) were: HA-4w 66.06% (± 4.21%), DOX-4w 74.68% (± 2.25%), HA-8w 55.27% (± 2.52%) and DOX-8w 78.76% (± 3.32%). At 4 and 8 weeks BIC of Dox group was significantly higher than the one of HA group. In HA group BIC at 8-week was lower than the one at 4 weeks whereas in Dox group, the difference between 4 and 8 weeks was not detected.

Mean NBA measurements (± standard deviation) were: HA-4w 6435.65$\mu m^2$ (± 378.7), DOX-4w 7166.63$\mu m^2$ (± 847.65), HA-8w 4900.35$\mu m^2$ (± 73.52) and DOX-8w 7966.38$\mu m^2$ (± 397.1). At 8 weeks NBA of Dox group was significantly higher than the one of HA group.

**Discussion:**

In the present study histological observation clearly demonstrated new bone formation around the

HA-coated surface, reconfirming high osseoconductivity and tight osseointegration of HA-coated surface. Notably, decrease of BIC in HA group from 4 weeks to 8 weeks indicates bone remodeling around the implant.

The biocompatibility of HA has been well documented both in vitro and in vivo studies. In different experimental systems, it has been shown that a mineralized bone matrix can be newly formed in close contact with the HA coating; however, the proof of osseoinductivity of HA has still been controversial. It has been demonstrated that HA might act as a solid-state matrix for adsorption, storage and controlled release of bone morphogenetic proteins (BMPs), which locally initiate bone formation.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are considered as key initiators of collagen degradation, thus contributing to bone resorption in bone remodeling. During the process of bone remodeling, osteoblasts can initiate bone resorption by synthesizing the neutral proteinases including MMPs which can degrade osteoid. MMPs such as MMP-1, MMP-13 and MMP-14, which can degrade Type I collagen of demineralized bone, are also produced by osteoclasts. The inhibition of (MMPs) is the most widely documented and well-characterized non-antibiotic property of doxycycline.

It was shown that doxycycline also brought about the beneficial effect by inhibiting local and systemic oxidative stress. Furthermore, recent studies have shown that doxycycline inhibits osteoclastogenesis makes it favorable to bone regeneration. Chang and Yamada's study showed that collagen membrane combined with doxycycline utilized for guided tissue regeneration and local delivery system could enhance the new bone formation intensively. It was also reported that doxycycline treated TiZr implant surface increased bone formation markers in vitro and in vivo.

The morphometric data clearly showed that the doxycycline-treated implant surface was surrounded by more new bone within the threads than untreated group and had a higher BIC in both 4weeks and 8 weeks. Furthermore, the SEM and EDS analyses revealed that, athough osseointegration of the implant was succescully achieved in the both groups, new bone formation of DOX group was superior than the one of HA group.

The different bone responses at 4 weeks were at least due to the diffrence of bone formation and mineralization on the HA-coated surfaces treated with or without doxycycline.

It has been reported that doxycycline prevents periodontal tissue breakdown by inhibiting local and systemic oxidative stress, which in turn helps promote bone regeneration by activating osteoblastogenesis.

Overall, it is very likely that the stimulation of bone apposition in Dox group in the present study was due to the various effects of doxycycline, including inhibitions of MMPs, osteoclasitc differentiation and survival, and stimulation~~s~~ of proliferation, differentiation and function of osteoblasts. Furtehrmore, the positive effect of doxycycline on bone apposition might be partially due to its anti-oxidative effect.

Conclusively, the results of the present study indicate that HA-coating implant surface treated with doxycycline promotes bone apposition around the implant. Therefore, doxycycine treated HA coating implant surface may have prominent potential on orthopedic and dental applications

（和文抄録）

本研究の目的は、ハイドロキシアパタイト (HA) をコートしたインプラント表面をドキシサイクリンで処理し、その表面処理が骨形成におよぼす作用について、マウスの上顎骨の実験系におい

て評価することである。

スパッタリング法を用いて、チタン製の小型インプラント表面を HA でコーティングした。さらに、HA でコーティングしたインプラントをドキシサイクリン溶液に浸漬して、インプラント表面を改変した。ドキシサイクリンで表面処理したインプラント(DOX)と未処理のインプラント(HA)を、マウスの上顎骨に埋入し、4 週および 8 週後に屠殺し、組織形態計測の手法を用いて骨とインプラントとの結合率（Bone Implant Contact Ratio, BIC）と、インプラント周囲の新生骨量(New Bone Area, NBA)を計測した。

BIC の平均値±SD は、4 週後において HA 群で 66.06 ± 4.21%、DOX 群で 74.68 ± 2.25%であり、8 週後において HA 群で 55.27 ± 2.52%、DOX 群で 78.76 ± 3.32%であり、4 週後および 8 週後において DOX 群の BIC は HA 群に比較して高値であった。NBA ($\mu m^2$)の平均値±SD は、 4 週後において HA 群で 6435.65 ± 378.70 $\mu m^2$、 DOX 群で 7166.63 ± 847.65 $\mu m^2$、8 週後において, HA 群で 4900.35 ± 73.52 $\mu m^2$、DOX 群で 7966.38 ± 397.1 $\mu m^2$であった。8 週後において、DOX 群の NBA は HA 群に比較して高値であった。

以上の結果から、抗菌スペクトルが広範囲の抗生物質であるドキシサイクリンを用いてハイドロキシアパタイト表面を処理することで、骨形成が促進されることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5473　号 | 丁　林 |
|---|---|---|

| | |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　柴田　俊一<br>副　査　山下　仁大、井関　祥子 |
| 論 文 題 目 | Effect of doxycycline-treated hydroxyapatite surface on bone apposition: A histomophometric study in murine maxillae |

（論文審査の要旨）

骨結合型の歯科インプラントを用いる補綴治療（以下インプラント治療）は、現在広くおこなわれている。しかし、インプラント埋入部位の骨が脆弱な場合や、骨粗鬆症等の骨代謝異常がある場合には、インプラントと骨の十分な結合が得られないことがある。近年、インプラントと骨の結合を向上させる目的で、表面を改変した様々なインプラントが用いられている。ハイドロキシアパタイトは骨伝導性が高い生体材料であり、HA を表面にコーティングしたインプラントは骨と強固に結合することが知られている。一方、抗菌スペクトルが広いテトラサイクリン系の抗生物質の一つであるドキシサイクリンは、ハイドロキシアパタイトに対して高い親和性を示し、また、骨形成を促進することが報告されている。

これらの背景をもとに、丁　林が「ハイドロキシアパタイトコーティングしたインプラント表面にドキシサイクリン処理を加えることで、インプラントと骨の結合をさらに促進できるのではないか」という独創的な発想に基づいて本研究をおこなったことは高く評価できる。

丁　林は、実験を以下のように行った。チタン製の小型インプラントをスパッタリング法を用いてハイドロキシアパタイトで薄膜コーティングし、コーティングの前後において、SEM を用いてインプラント表面を解析した。さらに、ハイドロキシアパタイトで薄膜コーティングしたインプラント（HA）をドキシサイクリン溶液に浸漬し、インプラント表面を改変した。表面に結合したドキシサイクリンの量は紫外可視光分光光度計にて定量した。次にドキシサイクリンで表面を改変したインプラント (DOX) と HA を、マウスの上顎骨に埋入し、4 週および 8 週後に屠殺した。そして、マイクロ CT を用いて放射線学的に、さらに組織切片を作製して組織学的に解析し、骨とインプラントとの結合率（Bone Implant Contact Ratio, BIC）と、インプラント周囲の新生骨量 (New Bone Area, NBA)を求めた。これらの本研究で用いられた材料と実験方法は適切に選択されていた。

本研究において、以下の結果が得られた。

SEM 観察の結果からスパッタリングによって、インプラントはハイドロキシアパタイトによって均一にコーティングされていることが明らかとなった。紫外可視光分光光度計による解析結果では、インプラント当たりのドキシサイクリンの吸着量は 138±2.83ng であった。マウス上顎への埋入実験の結果では、4 週後および 8 週後において、DOX 群の BIC はそれぞれ 74.68±2.25%,

78.76±3.32%, HA 群の BIC はそれぞれ 66.06±4.21%, 55.27±2.52%であり、いずれの週齢も DOX 群が HA 群に比較して有意の差を持って高値を示した。また 4 週後および 8 週後の DOX 群の NBA はそれぞれ 7166.63±847.65μ㎡, 7966.38±397.1μ㎡, HA 群の NBA はそれぞれ 6435.65±378.7μ㎡, 4900.35±73.52μ㎡であり、4 週では DOX 群が HA 群と比較して高値の傾向を示し、8 週では有意の差を持って高値を示した。これらの定量的データとマイクロ CT 画像および組織像については、論文中に明確に提示されていることを確認した。

これら実験結果に対して丁　林は、まずハイドロキシアパタイトが骨伝導能を有し、骨親和性が高い材料であることの科学的背景について考察し、ハイドロキシアパタイトを用いたインプラントコーティングにおけるスパッタリングの優位性について考察をおこなった。それら内容は合理的であり、信頼できるものであった。

次に、本研究で用いられた「マウスの上顎骨を用いたインプラント研究のための実験モデル」は、本人が所属する研究室で最近確立された実験モデルであり、従来の他の動物種を用いた実験モデルと比較すると、遺伝子改変マウスへの応用が可能であることなど、このモデルの優位性についても考察をおこなった。

現在のところ、ドキシサイクリンによる骨量増加作用についての詳細な機序は不明である。しかしながら、Matrix Metalloproteinase はコラーゲン等の基質タンパクを分解する酵素であり、その作用がドキシサイクリンによって阻害されることが報告されている。また、酸化ストレスが炎症や組織破壊と密接に関連していることが知られており、ドキシサイクリンが酸化ストレスを減弱させる “anti-oxidant”としての作用を示すことも報告されている。さらに細胞培養系においては、ドキシサイクリンが破骨細胞形成を抑制するという報告もある。丁　林は先行研究におけるこれらの報告を引用し、本研究で明らかになった「ドキシサイクリン処理したハイドロキシアパタイトでコーティングされたインプラント周囲の骨の増加」は、これまでに報告されてきたドキシサイクリンの様々な複合作用による可能性が高いことを考察した。この考察過程はよくオーガナイズされており、たいへん理にかなったものであると評価した。

本研究の結果から、表面をハイドロキシアパタイトでコーティングし、さらにドキシサイクリングで表面改変をおこなったインプラントを骨内に埋入すると、インプラント周囲に骨形成が促進され、インプラントと骨との結合をさらに促進できることが示唆された。ドキシサイクリンは抗菌スペクトルが広い抗生物質で、重篤な副作用の心配が少ない。従って、ドキシサイクリンを用いた表面の改変は、骨造成に使用する骨補填材に対しても有効であると考えられる。さらに、ドキシサイクリンを用いて処理したインプラントあるいは骨補填材は、感染に対しても抵抗性を示すと考えられる。以上のことからこの材料は臨床での応用が大いに期待できるものであると評価した。

ドキシサイクリンの骨形成への特性を明らかにした本論文は、歯科インプラント治療を含め歯科臨床医学の発展に大きく貢献するものと考えられ、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | BAKHIT Mohammed Yassin M |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　水口　俊介、池田　正臣 |
| 論　文　題　目 | The stress distribution within dentin upon the use of different restoration materials |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

クラウン修復には、これまで歯科用貴金属合金、歯科用陶材、硬質レジン、ジルコニアなど様々な材質が用いられてきたが、近年では Polyetheretherketone（PEEK）が応用されるようになってきた。PEEK は化学的にも熱的にも安定であることから、優れた生体適合性を有しており、機械的特性も優れているため、歯科を含む医療領域に広く応用が始まっている材料である。歯科領域においてはその優れた材料学的特性から、部分床義歯のクラスプ、インプラントの仮封冠などに応用が試みられている。また、PEEK 材は耐熱性やクリープ挙動、弾力性にも優れていることから、クラウン修復で問題となるマージン部の応力集中を緩和し、二次カリエスを防ぐ可能性が考えられる。さらには、金属イオンを放出しないため、金属アレルギーを有する患者に対して有効な材料であると考えられる。本研究では、PEEK 材を含む 5 種類の歯冠修復材料を用いた場合の歯根内の応力分布状態を評価し、歯根は切の防止に有効な材料の組み合わせを探索することを目的として、有限要素解析による評価を行った。

＜研究方法＞

申請者の所属する教室で行われてきた過去の方法に準じて、下顎小臼歯を想定した歯周組織を含む有限要素モデルを作製した。歯根の長さは 12　mm とし、歯頚部では半径 6 mm とした。歯槽骨及び歯槽硬板の厚みをそれぞれ 0.2 mm と 0.3 mm とし、歯冠部の高さは 6 mm とした。支台築造はグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を想定し、ポスト部の長さは 6 mm とし、フェルールの高さは 2 mm とした。このモデルにおけるクラウン部分の材質は金銀パラジウム合金（PD）、ハイブリット型硬質レジン（HR）、ジルコニア（ZR）、セラミック（AC）および PEEK（PK）の 5 種類を想定した。これらのモデルに対し歯槽骨下面を完全拘束し、咬合面中央部 1 点に歯軸方向から 45°の角度から 100 N の荷重を付与した際の歯根内応力分布状態を有限要素解析によりシミュレートした。なお、解析点は歯頚部、ポスト基部およびポスト先端部の歯根象牙質とし、歯質および各種修復材料の力学的パラメーターは既往の研究に基づいて行った。

＜研究結果＞

歯頚部象牙質における PD, HR, ZR, AC および PK の応力値はそれぞれ 22.7, 21.0, 22.2, 22.2, お

よび 18.4 MPa であり、PD で最大値、PK で最小値となった。一方、ポスト基部の歯根象牙質の応力値はそれぞれ、6.5, 8.8, 5.9, 6.4, および 14.6 MPa、すなわち PK で最も大きな値、ZR で最も小さい値となった。一方、ポスト先端部の応力値はいずれの場合も 6.8MPa で同じ値となり、クラウンの材質の変化のみではポスト先端部にかかる応力に影響を及ぼさないと推測された。

＜考察＞

本研究では歯根内部における応力値を解析するために有限要素法を用いた。有限要素法は任意の断面で応力分布状態が検討可能であること、任意の解析点での応力の算出が可能であることなど様々な利点を有する。そこで、本研究では根管充填済みの小臼歯にファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を施した支台歯に対して 5 種類の歯冠修復材料を用いたクラウンの装着を想定した有限要素モデルを作製した。これらのモデルに対して荷重時の歯頚部、ポスト基部およびポスト先端部の歯根内象牙質の応力を解析した。

二次カリエスの原因としてはクラウンのマージン部の不適合、合着用セメントの溶出などが考えられるが、歯頚部における楔状欠損の主因が歯頚部象牙質における応力集中であることを考慮すると、同部位における応力集中もまた二次カリエスの一因となると考えられる。

支台築造にグラスファイバー併用コンポジットレジンを用いた場合、鋳造支台築造と比較して歯根縦破折のリスクが減るが、その反面、歯頚部象牙質に応力が集中するとの報告がある。一方で、クラウンの材質が歯頚部象牙質の応力値に影響を及ぼす可能性が考えられるが、その場合、歯頚部以外の部位にも応力集中が認められる可能性がある。そこで本研究では、歯頚部象牙質に加えて、ポスト基部およびポスト先端部の象牙質についても解析を行った。

本研究では、クラウンの材質のヤング率が大きいほどクラウンマージン部の歯頚部象牙質に応力が集中する結果となった。すなわち、ヤング率の最も小さい PK で最もクラウンマージン部付近の歯頚部象牙質の応力集中が緩和されていた。

現在歯科で応用されているクラウンの材質は象牙質と同等かそれ以上のヤング率を有するが、PK のヤング率は象牙質と比較してかなり小さい。従って、咬合面荷重時に他のクラウン修復材料と比較して大きく変形することでクラウンマージン部の応力集中を緩和させる反面、荷重点直下の支台築造部に応力が集中していた。その結果、歯頚部象牙質における結果とは逆にポスト基部において歯根象牙質の応力集中が認められた。一方、ヤング率が象牙質と比較して大きい PD,ZR,AC においては築造体のコア部あるいはポスト基部の象牙質において応力の集中が認められなかった。

PK をクラウン修復材料として選択する場合、クラウンと合着用セメントの接着が強固になされている必要があり、また支台築造部であるコンポジットレジン、グラスファイバーポストにも十分な強度が必要となってくると考えられる。一方で、ポスト先端部においては、いずれのクラウン材質も同じ応力値を示したことから、クラウンの材質の違いはポスト先端部付近の応力集中には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

また、PD では歯頚部象牙質において最も応力が集中するのに対し、PK では歯頚部象牙質において最も応力集中が緩和されており、換言すれば最も二次カリエスを防ぐ可能性があると考えられる。しかし、PK ではグラスファイバーポスト併用コンポジットレジンのコア部、ポスト基

部に応力が集中していることから更なる研究が必要であると考えられる。

＜結論＞

・本研究で解析した５種類のクラウン材料の中で PEEK 材を用いたクラウンは歯頚部象牙質の応力集中を緩和させた。

・PEEK 材を用いたクラウンでは、本研究で解析した５種類のクラウン材料のうち最もポスト基部の歯根象牙質における応力集中が生じた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5474 | BAKHIT Mohammed Yassin M |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宇尾　基弘<br>副　査　水口　俊介、池田　正臣 | |
| 論 文 題 目 | The stress distribution within dentin upon the use of different restoration materials | |

（論文審査の要旨）

従来、クラウン修復に用いられる材料は、歯科用貴金属合金、歯科用陶材、硬質レジンが主なものであったが、近年これらに加えてジルコニアが用いられるようになり、さらには熱可塑性樹脂である Polyetheretherketone（PEEK）の臨床応用が試みられるようになっている。これらのうち、PEEK は耐熱性・耐疲労性・耐衝撃性に優れた高機能性樹脂で化学的にも安定しており生体適合性に優れるため、歯科を含む医療領域への応用が試みられている。また、この材料は他のクラウン修復材料と比較して低い弾性率、高いポアソン比を有していることから咬合面に負荷される様々な力を吸収するため、歯根破折や二次カリエスに関係の深い歯根象牙質の応力分布状態が他の修復材料と異なる可能性がある。歯根内応力分布状態は、支台築造法やクラウン修復材料のヤング率などの物理的性質に深く関係していると考えられるため、長期にわたって機能する歯冠修復を設計するにあたって極めて重要な情報となる。支台歯の歯根内応力分布状態の検討には、これまで抜去歯を用いた荷重試験、光弾性実験、有限要素解析などが行われてきたが、これらの多くは歯根破折に関連する支台築造法とポスト先端部などの歯根内応力分布状態を比較検討しており、クラウンの材質と歯根内応力分布状態に関して比較検討した報告は少ない。現状では歯根内部の任意の点における応力分布状態を検討する研究方法として汎用構造解析ソフトを用いた有限要素解析法を用いる手法が最も詳細に検討できる方法と考えられる。

有限要素法を用いた多くの研究では、形態データをスキャンし構造解析プログラムへデータを代入する手法が用いられているが、歯根および支台築造の形態が歯根内応力分布状態に影響を及ぼすと考えられるため、第一歩としてはこれらの形態的因子による影響を除いて、クラウンの材質の変化が歯根内象牙質の応力分布状態に及ぼす影響を検討することが必要と考えられる。

このような背景をもとに、Bakhit Mohammed Yassin M は有限要素解析による構造解析プログラムを用いて、下顎小臼歯モデルを作製し 5 種類のクラウン修復材料を用いた場合の歯根内応力分布状態を解析、検討し評価を行っている。

本研究では歯槽骨、歯周組織などを含む単純な下顎小臼歯歯根モデルを作製し、支台築造法として歯根破折の生じるリスクが最も低いと考えられているグラスファイバーポスト併用コンポジットレジン築造を想定し、クラウンの維持に関連性の深いフェルールを付与している。

このモデルに対して、クラウン部分の材質を金銀パラジウム合金（PD)、ハイブリット型硬質レジン（HR)、ジルコニア（ZR)、セラミック（AC）および PEEK（PK）を想定し、歯槽骨下面を完全拘束し、咬合面中央部に歯軸に対して 45 度の方向から 100 N の応力を負荷し、歯根内応力分布状態を解析している。また、本研究における応力の解析点は、クラウンの材質によってクラウン内部の応力の伝播様相が異なると考えられることから、二次カリエスと関連の深いクラウンマージン部付近の歯頚部象牙質および歯根破折に関連の深いポスト基部とポスト先端部の歯根部象牙質の計 3 点としている。

応力解析の結果、クラウンマージン部の応力値は概ねクラウン修復材料のヤング率の大きさと関連があることが明らかとなり、すなわちヤング率の最も小さい PK で最も小さい値となったが、有限要素モデルの前頭面断における支台築造のコア部では、クラウン修復材料の弾性率が小さいほど応力集中が認められ、この応力はポスト部に沿った歯根象牙質に伝播されていることが明らかとなっている。よって、ポスト基部付近の象牙質の応力集中についても検討する必要性があると考え、さらに検討を加えている。一方で、クラウンの材質の差異はポスト先端部の応力値に影響を及ぼさないことも明らかとなった。

これまで、このように支台歯歯根象牙質の応力分布状態について詳細に検討した報告は少なく、その着眼点は高く評価できる。また、得られた結果に対する検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことがうかがわれる。

本研究から得られた結果は以下の通りである。

・本研究で解析した 5 種類のクラウンの材質の中で PEEK 材を用いたクラウンは歯頚部象牙質の応力集中を緩和させる。

・PEEK 材を用いたクラウンでは最もポスト基部の歯根象牙質における応力集中が起こる。

・ポスト先端部の歯根象牙質の応力値がほぼ一定の値を示すことから、クラウン修復材料の違いはポスト先端部の応力集中に影響を及ぼさない。

こうした結論に至るまで、クラウン修復装置の材料学的な特性を十分に理解したうえで理論的な展開がなされており、申請者の本領域における十分な知識と情報を裏付けるものである。また、本研究は有限要素解析を用いてクラウンの材質が支台歯歯根象牙質の応力分布について評価と検討を行ったものであり、研究の成果は、今後の歯科補綴学、歯科材料学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 稲用　友佳 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　水口　俊介<br>副 査　　柴田　俊一　　吉野　教夫 |
| 論　文　題　目 | Adaptive change in chewing-related brain activity while wearing a palatal plate: an functional magnetic resonance imaging study |

＜要旨＞

患者が新義歯装着後の口腔内環境の変化に適応することは、義歯による口腔機能の回復に必須である。本研究では口腔内環境の変化が咀嚼時の脳活動に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。28 名の健常有歯顎者（平均年齢 28.6 歳）に口蓋床を 1 週間装着させた時の客観的咀嚼能力、咀嚼の 1 ストロークあたりの時間（サイクルタイム）、機能的磁気共鳴画像法(functional magnetic resonance imaging: fMRI）を用いたガム咀嚼時の脳活動を経時的に計測した。その結果、口蓋床装着直後に客観的咀嚼能力の低下およびサイクルタイムの延長が認められ($P < 0.001$)、7 日後に装着前のレベルまで回復した。右側一次感覚運動野と右側被殻において、装着直後に有意に活動が低下し($P < 0.001$)、7 日後に装着前のレベルまで回復した。左側一次感覚運動野、左側被殻、前帯状回、右側内側前頭回後部では、装着直後に活動が有意に低下し($P < 0.001$)、7 日後でも有意な増加は認められなかった($P>0.05$)。以上の結果は、口蓋床による口蓋の被覆が咀嚼運動に影響を及ぼし、運動学習に関連する一次感覚運動野と被殻の活動に経時的な変化を引き起こしたと考えられた。また前帯状回と内側前頭回後部での活動が装着 7 日後でも回復しなかったことから、口蓋床を装着した咀嚼時の運動学習の自動化までは至っていないと考えられた。以上より義歯装着による口腔内環境の変化への適応には被殻における運動学習が関与する可能性が示唆された。

＜緒言＞

患者が新義歯装着後の口腔内環境の変化に適応することは義歯による口腔機能の回復に必須である。特に臨床では口蓋を被覆された義歯は患者にとって不快であり、適応に困難な場合もある。口蓋被覆に対する適応は義歯への適応に関する重要なプロセスの一つであると考えられており、先行研究では口蓋を被覆することにより食塊形成能力や咀嚼能力が低下し、装着後 1 週間で回復することが明らかになっているが、適応のメカニズムは未だ解明されていない。

一方で、中枢神経系において、口腔内環境の変化に対して適応変化が生じることが明らかになっている。例えば、ラットにおいて抜歯後に一次運動野の可塑的な変化が起こること、ヒトにおいて様々な補綴装置により咀嚼またはクレンチング時の脳活動の変化が異なる領域で生じること、義歯の臼歯部歯列の短縮が中前頭回での活動に影響を及ぼすこと、新義歯新製後に中心前回と中心後回において活動が経時的に変化することが報告されている。以上のことから、義歯装着による口腔内環境の変化に適応する過程で、咀嚼時の脳活動に経時的な変化が生じることが推測される。

咀嚼は中枢パターン発生器によって生成されるリズミカルな運動であり、末梢神経からの感覚情報が中枢神経系へフィードバックされ咀嚼運動の調節が行われる。中枢神経系における咀嚼運動の調節システムには、一次感覚運動野、補足運動野、前前頭野、島、視床、基底核、前帯状回、小脳が関与することが明らかになっている。そこで、本研究では、口蓋床装着による口蓋粘膜からの感覚入力の減少と舌運動の阻

害が咀嚼運動を変調させ、その結果、咀嚼に関わる脳領域の活動が減少し、適応過程で増加するとの仮説を立てた。本研究の目的は、口蓋床装着による口腔内環境の変化が咀嚼時の脳活動に及ぼす影響を明らかにすることとした。

＜方法＞

義歯の適応には義歯装着経験が影響することが知られている。そこで、本研究では、義歯装着の経験のない健常有歯顎者を対象とした。28 名の右利きの健常有歯顎者（男性 15 名、女性 13 名、平均年齢 28.6±2.5 歳）に厚さ 3 ㎜の口蓋床を 1 週間、日中常時装着させた。客観的咀嚼能力、1 ストロークあたりの咀嚼時間（サイクルタイム）、fMRI を用いたガム咀嚼時の脳活動を、口蓋床装着前（Day0）、装着直後（Day1）、装着 3 日後（Day3）、7 日後（Day7）に計測した。客観的咀嚼能力とサイクルタイムは咀嚼判定用色変わりガム（LOTTE）を 60 回自由咀嚼したときの色差⊿E と咀嚼時間を計測し算出した。

脳活動の計測は機能的磁気共鳴画像法 functional magnetic resonance imaging （fMRI）を用いて行った。安静状態と無味無臭ガム（LOTTE）を自身のペースで自由咀嚼する課題を各 18 秒間 6 回交互に行うブロックデザインで行った。撮像は Siemens 社製 3T MRI 装置を用いて gradient-echo echo-planner imaging 法で行い、水平断で 34 スライスの画像を 2 秒おきに撮像した（FOV 192mm、Matrix64×64、slice thickness 3mm、TR 2000ms、TE 30ms、Flip angle 77°）。

画像解析には脳機能画像解析ソフトウェア SPM12（Wellcom Department of Cognitive Neurology、London、 UK）を用いて前処理を行った後、一般線形モデルを用い、課題と同期して BOLD 信号が増加した voxel を統計的に検出した。さらに集団解析で、各測定日間の差分解析を voxel level $p<0.001$、cluster level $p<0.05$ の条件で行った。統計解析は線形混合分析とボンフェローニの多重比較補正を用い、有意水準は $\alpha=0.05$ とした。

＜結果＞

Day1 では Day0 に比べて有意に客観的咀嚼能力は低下し、サイクルタイムは延長した($P < 0.001$)。Day7 では Day1 に比べて有意に客観的咀嚼能力は増加し($P < 0.001$)、サイクルタイムは短縮した（$p<0.05$）。

MRI 撮像中に体動が 3 ㎜を超え、これによるアーチファクトを認めた 1 名を脳活動の解析から除外した。両側一次感覚運動野、両側被殻、前帯状回、右側上前頭回、左側後帯状回の 7 領域において、Day0 で Day1 よりも有意に活動が高かった（$p< 0.001$、多重比較補正なし）。上記の領域のうち咀嚼時の脳活動と関連しないとされる後帯状回は解析から除外した。他の 6 領域のピーク座標を ROI として設定し、Mars Bar software を用いて偏回帰係数 β 値を算出して経時的変化を解析した。その結果、右側一次感覚運動野、右側被殻において Day7 で Day1 よりも有意に活動が増加した（$p<0.05$）。左側一次感覚運動野、左側被殻、前帯状回、右側内側前頭回後部においても活動の増加が認められたが、有意には至らなかった（$p>0.05$）。

＜考察＞

本研究では、義歯の適応に関わる中枢メカニズムを明らかにすることを目的として、健常有歯顎者に口蓋床を装着させた時の咀嚼時の脳活動と顎運動を経時的に計測した。その結果、口蓋床による口腔内環境の変化が咀嚼時の脳活動と運動様相に影響を及ぼし、7 日間で適応変化が起こったことが示唆された。

本研究でガム咀嚼時に賦活が認められた一次感覚運動野の領域は、先行研究の報告と一致した。口蓋床装着直後に客観的咀嚼能力の低下とサイクルタイムの延長を認め 7 日後に回復したことに同調して、一次感覚運動野の活動が変化した。装着直後では口蓋床装着により口蓋粘膜からの感覚入力の減少と舌運動の阻害により、咀嚼運動に変調を生じた結果、一次感覚運動野の活動が減少したと考えられる。本研究では

舌運動の様相を直接確認できていないが、口蓋床装着後にサイクルタイムが客観的咀嚼能力に同調して変化していることから、咀嚼時に舌が新しい運動パターンを学習した結果、客観的咀嚼能力とサイクルタイムが回復し、一次感覚運動野の活動が増加したと考えられる。

これまでの研究から、新たなスキル獲得や長期の運動学習には大脳皮質、小脳、大脳基底核が連関して寄与することが示唆されている。本研究では、被殻の活動に変化が認められたが、これは大脳皮質－大脳基底核システムによる学習を反映していると考えられる。咀嚼のような複雑な運動には，大脳皮質－小脳システムも関与すると予想されたが、本研究では小脳の活動に有意な経時変化を認めなかった。先行研究において、小脳から歯状核への活動の移行は学習初期である初回の課題遂行時内に起こるが、被殻内の連合領域から感覚運動領域への活動の移行は学習後期に生じ数日間継続することが示されている。本研究において、装着直後よりも装着前で有意な活動を示した被殻は、感覚運動領域に位置しており、7 日後での β 値の有意な増加は学習後期の脳活動を反映していると考えられた。

前帯状回と内側前頭回後部は装着直後に活動が低下し 7 日後でも有意な増加を認めなかった。これらの領域は、複雑な運動のモニタリングと制御を行う領域と報告されている。運動学習に寄与する大脳皮質－小脳あるいは大脳皮質－大脳基底核システムで活動する領域は、連合領域と運動関連領域に分類される。背外側前頭連合野、吻側前運動野、下頭頂葉、小脳、歯状核を含む連合領域は運動学習の初期に活動し、前帯状回と内側前頭回後部はこの領域と関連することが知られている。本研究では、装着直後での最初の咀嚼課題遂行時に連合領域における学習初期が完了し、その後に学習後期へと移行している可能性がある。一方、学習が完了したあるいは自動化された運動を行う際に、前運動野と前帯状回の活動が増加することが分かっている。したがって、装着期間を延長して前運動野と前帯状回の活動を計測し、口蓋床装着時の咀嚼運動が自動化されるかどうか確認する必要がある。

本研究では義歯装着モデルとして、健常有歯顎者を対象にして口蓋床への適応変化を調べたが、今後は実際の患者を対象として義歯に対する適応過程を調べる必要がある。また咀嚼だけでなく口腔感覚や発音、嚥下、食塊形成などの因子が義歯の適応に関連していると考えられ、これらについても更なる研究が求められる。さらに臨床的な観点から、義歯への適応の個人差を生むメカニズムについても検討する必要がある。

＜結論＞

本研究では、健常有歯顎者において口蓋床装着後に客観的咀嚼能力の低下とその後の回復が認められた。また大脳皮質一次感覚運動野、被殻の活動においても同様の変化が認められた。これらのことから、口蓋床による口腔内環境の変化が咀嚼の運動様相と脳活動に影響を与え、7 日間で適応変化が起こったと考えられた。義歯装着による口腔内環境への適応には、中枢神経系の被殻における運動学習が関与する可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5475　号 | 稲用　友佳 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　水口　俊介<br>副 査　　柴田　俊一　　吉野　教夫 | |
| 論 文 題 目 | Adaptive change in chewing-related brain activity while wearing a palatal plate: an functional magnetic resonance imaging study | |

患者が新義歯装着後の口腔内環境の変化に適応することは、義歯による口腔機能の回復に必須である。特に臨床では口蓋を被覆された義歯は患者にとって不快であり、適応が困難な場合もある。口蓋被覆に対する適応は義歯への適応に関する重要なプロセスの一つであると考えられており、先行研究では口蓋を被覆することにより食塊形成能力や咀嚼能力が低下し、装着後 1 週間で回復することが明らかになっているが、適応に関連する中枢神経基盤は明らかになっていない。また抜歯や補綴治療後の咀嚼時およびクレンチング時の脳活動の変化から、口腔内環境の変化が中枢神経系の適応変化を引き起こすことも示されている。これらのことから稲用は、義歯装着後の咀嚼運動における適応過程には、大脳皮質における運動制御に基づく、咀嚼運動技能の再獲得が関連していると考えた。運動の学習にはいくつか段階があり、各ステージで異なる脳領域が活動し、学習が固定化・自動化・保持されることがこれまでの研究で分かっている。したがって義歯の適応過程が、中枢神経系における運動学習の結果であるかを検証することは、義歯の適応のメカニズムに迫る今までにない知見を得られる可能性がある。以上から、研究の目的は口蓋床装着による口腔内環境の変化が咀嚼時の脳活動に及ぼす影響を明らかにすることとした。具体的には口蓋床装着による口蓋粘膜からの感覚入力の減少と舌運動の阻害が咀嚼運動を変調させ、その結果、咀嚼に関わる脳領域の活動が減少し、適応過程で増加するとの仮説を立て、それを検証することとした。

仮説の検証に際し被験者の歯列の条件や年齢、義歯装着経験などが影響すると考えられたため、今回は義歯装着の経験のない右利きの健常有歯顎者 28 名に、咬合関係を変えない厚さ 3 ㎜の口蓋床を 1 週間、日中常時装着させた。咀嚼判定用色変わりガムを用いた客観的咀嚼能力、1 ストロークあたりの咀嚼時間（サイクルタイム）、機能的磁気共鳴画像法 functional magnetic resonance imaging (fMRI)を用いたガムの自由咀嚼時の脳活動を、口蓋床装着前、装着直後、装着 3 日後、7 日後に計測した。画像解析には脳機能画像解析ソフトウェア SPM12 を用いて前処理を行った後、一般線形モデルを用い、課題と同期して BOLD 信号が増加した voxel を統計的に検出した。さらに集団解析で、各測定日間の差分解析を行った。統計解析は線形混合分析とボンフェローニの多重比較補正を用い、有意水準は $\alpha=0.05$ とした。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 口蓋床装着直後に、客観的咀嚼能力の低下およびサイクルタイムの延長が認められ、装着 7 日後に有意に回復した。
2. 両側一次感覚運動野、両側被殻、前帯状回、右側上前頭回における咀嚼時の活動が、口蓋床装着直後に有意に低下した。
3. 一次感覚運動野と被殻において、装着 7 日後に装着直後に比べて有意な活動の増加が認められた。
4. 口蓋床による口腔内環境の変化が咀嚼時の脳活動に変調をきたし、7 日間で適応変化が起こったと考えられた。被殻における運動学習システムが、義歯の適応過程に関与する可能性が示唆された。

上記の 1. の結果と一次感覚運動野の活動変化から、装着 7 日後には口蓋床装着時の新しい舌運動パターンを学習し、舌の運動様相が変化した結果一次感覚運動野の活動も増加したと考えられた。また被殻の活動変化から、口蓋床装着により大脳皮質－基底核ループによる通常の適切な咀嚼運動が遂行できなくなるものの、7 日後までに運動学習が行われ、ループが回復しつつあることが示唆された。さらに複雑な運動のモニタリングと制御を行う領域である前帯状回と内側前頭回後部が装着 7 日後でも活動が回復しないことから、最終的な運動学習の保持、ループの回復には至っていないことが考えられた。したがって、口蓋床装着時の咀嚼運動の自動化を確認するには、さらに測定期間を延長する必要がある。

義歯に限らず、環境の変化に対する適応は重要かつ普遍的なテーマであり、本研究で示唆された中枢における適応メカニズムは、義歯以外の環境変化への適応過程においても作動している可能性がある。さらには、本研究の知見は、口腔内環境の変化に適応することが困難な患者に対する臨床的アプローチの一助にもなる可能性もある。今後、高齢者を対象とした研究に発展させ、加齢による認知・口腔機能の低下が義歯の適応に及ぼす影響を中枢神経レベルで明らかにできる可能性もあり、今後の歯科臨床への貢献も期待される。

以上の成果は今後の歯科医学の発展や歯科補綴臨床に寄与するところが大きく、よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 白子　高大 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　谷口　尚<br>副　査　　高橋　英和、宮新　美智世 |
| 論　文　題　目 | Establishment of experimental models to evaluate the effectiveness of dental trauma splints |

＜要旨＞

本研究の目的は、外傷歯スプリント固定法を開発研究するための新しい外傷歯実験モデルを提示した上で、実際に本実験モデルとペリオテスト装置を用いて様々なスプリントを試験することであった。既製歯列模型にOリングゴムとスプリングワッシャーを組み込んで外傷歯の動揺度を再現し制御した。今回はコンポジットスプリント固定と 2 種ワイヤーコンポジットスプリント固定（1：矯正角型ワイヤー、2：コバルト・クロム合金ワイヤー）の効果を評価した。ペリオテスト値は各固定処置の前後で 3 回ずつ計測された。固定効果は動揺度の変化として定義した。”ワイヤーコンポジットスプリント固定 1”＜”ワイヤーコンポジットスプリント固定 2”＜”コンポジットスプリント固定”の順で、固定効果は有意に増加した（$p<0.05$）。本実験モデルは固定方法の違いを含めて様々なスプリント固定の効果を分析評価でき、臨床的な重症度に即した外傷歯の状況を合理的に再現することができるシステムであると考えられた。

＜緒言＞

外傷歯スプリント固定法は外傷歯に対する主要な治療術式のひとつである。固定は整復された歯を保持し再受傷から守り治癒を助けること、ならびに治癒期間の患者の快適な機能をもたらすことを目的とする。固定法の剛性は治癒に影響するとされ、外傷歯治療のガイドラインによれば、生理的動揺を許容する flexible（non-rigid）な固定法が受傷歯の治癒を助け理想的であるとされる。そのため固定を施す際には固定効果について十分考慮しなければならない。

これまでにも様々な実験モデルを用いて固定効果の評価が行われている。例えば既製歯列模型やカスタムメイド模型、また動物（羊）やヒト健全歯、ヒト外傷歯（献体）などである。模型を用いたモデルについては、これまで入手が容易な既製模型を用いて、生体に近づけるための工夫を加えたり、あるいはカスタムメイドで実験モデルを製作した報告があるが、その工程が複雑であったり外傷を想定した歯の測定値が安定しないという問題があった。また動物やヒトを用いた実験モデルはより生体に近い条件で評価が行えるが、入手の難しさや個体差などの問題がある。したがって現時点において、外傷歯整復固定材の固定効果を評価する上で、十分な再現性があるモデルの報告はあまりない。

また外傷歯の形態は様々であり、受傷歯の動揺度も様々であると考えられるが、外傷の重症度を考慮した実験モデルの作製報告もほとんどない。それ故どの程度の動揺を持つ外傷歯にどの程度の固定を施すべきか明確な根拠指針は示されていないのが現状である。そこで今回、既製模型に単純な工夫を加えた方法による、2 段階の重症度をシミュレートした外傷歯固定効果の評価のためのモデルを構築した。そして現在外傷歯固定として標準的に行われているワイヤーコンポジットスプリ

ント固定とコンポジットスプリント固定の 2 種固定効果の評価を行った。

＜方法＞

既製上顎歯列模型 （D18-500-QF、ニッシン）を用い、外傷想定歯を右側中切歯（歯番 11）、固定源となる健全想定歯は両隣在歯（歯番 12、 21）と規定した。既製模型の中切歯部ソケットには同側側切歯の人工歯（ニッシン）を挿入した。健全想定歯は人工歯最下面とソケット底面間に O リングゴム（1A S-2、桜シール）を介在させ、模型とネジ頭間にスプリングワッシャー（SLW2、ミスミ）を介在させた。ソケット内をユーティリティーワックスで満たし根尖ネジを締めた。根尖ネジの締付けトルクは 11.0 cN・m とした。外傷想定歯として、人工歯をネジ止めせず、ソケットの底面・側面に接触せず浮いた状態とした重度外傷モデル（Level S）と、O リングゴムとスプリングワッシャーを介在させ、トルク 11.0 cN・m でネジ止めした中程度外傷モデル（Level M）の 2 段階を設定した。

ワイヤーコンポジットスプリント固定（WCS）ならびにコンポジットスプリント固定（CS）を試験した。具体的には、WCS1：矯正用ワイヤー（ブルーエルジロイワイヤー0.533×0.635mm、ロッキーマウンテンモリタ）－コンポジットレジン（MI フローⅡ、ジーシー）固定、WCS2：歯科用コバルト・クロム合金ワイヤー（サンコバルトクラスプワイヤー・直径 0.9mm、デンツプライ三金）－コンポジットレジン（MI フローⅡ）固定、CS：コンポジットレジン（MI フローⅡ）ダイレクトボンディング固定（幅 1.5mm：CS1／2.5mm：CS2）を行った（n=6）。

固定前後の動揺度をペリオテスト（メデジンテクニックグルデン、ドイツ）で評価した。固定前各歯に対して 3 回計測を行い、その平均値を測定値（PTVpre）とした。固定後も同様に各歯に対して 3 回計測を行い、その平均値を測定値（PTVpost）とした。固定効果は Δ PTV = PTVpre - PTVpost と定義した。Level S 外傷想定歯 PTVpre は測定不能であったため、ペリオテストの最大値 50 を代用した。固定前後での測定値比較に Wilcoxon 検定、健全想定歯 PTVpre と外傷想定歯 PTVpost の比較に Mann-Whitney U 検定、Δ PTV の固定法間比較および各測定値の模型間比較に Steel-Dwass 検定を用いた（$p<0.05$）。Kendall の一致係数にて模型のモデル一致性について分析した（$p<0.05$）。

＜結果＞

Level M における外傷想定歯の平均 PTVpre±SD は 31.5±0.9 であった。また Level M における外傷想定歯の PTVpre は模型間で統計学的有意差は認められず、その固定効果 Δ PTV に関しては WCS1＜WCS2＜CS1 の順に増加し、各処置間で統計学的有意差を認めた（$p<0.05$）。Level S における外傷想定歯の固定効果 Δ PTV に関して、WCS1＜WCS2＜CS1＜CS2 の順に大きくなり、各処置間で統計学的有意差を認めた（$p<0.05$）。各模型間の固定効果 Δ PTV において、Kendall の一致係数は 1 であった。

＜考察＞

外傷歯スプリント固定の効果を評価するため、シンプルで再現性のある実験モデルの構築が本研究の目的であった。また研究者や歯科医師が操作しやすく、測定値やモデルのばらつきを最小限に抑えることを目指した。そのため規格化された工業製品である市販の既製顎模型を用いた。これま

で顎模型を用いて行われた研究報告は幾つかあるが、ソケットを拡大したり、人工歯を削合したりして外傷状態を作り出している。模型に形状変更を加えることはテクニカルエラーが生じる可能性や術者の手技や技術力によって変動する恐れがあるので、再現性の高い方法とは言い難い。その点我々が考案したモデルは、ソケット底部に JIS 規格の O リングゴムとスプリングワッシャーを介在させて人工歯をネジ止めする方式で、そのねじ止めトルクを制御管理することで、外傷歯の動揺を容易に再現することができるものとなっている。実際、健全想定歯あるいは外傷想定歯の固定前の動揺度、すなわちペリオテスト値は安定していたので、再現性は比較的高いと考えられた。また健全想定歯のペリオテスト値はヒト健全歯のペリオテスト値と近似した値を示したことから、健全歯の想定も臨床に近い形で再現できるモデルと考えられた。

外傷歯固定材料や固定効果の評価に用いる計測機器に関して、過去の研究報告では動揺度計測器であるペリオテストや万能試験機が使用されており、本研究でもペリオテストを使用した。固定法の剛性の分類法に動揺度による評価が用いられていること、ならびに実際に臨床でよく用いられ、臨床的な動揺度との相関関係が示されており、測定自体も容易であることが選択理由である。

Level M において、全ての固定法による外傷想定歯 PTVpost は生理的動揺度の範囲内であった。CS1 の外傷想定歯 PTVpost と健全想定歯 PTVpre との間に有意差は認めなかったので、semi-rigid 固定と分類され、中程度外傷歯には向かない可能性がある。WCS1 と WCS2 の外傷想定歯 PTVpost は健全想定歯 PTVpre に比べ有意に高値を示し、flexible 固定と分類される。一方 Level S において、CS1 および CS2 の外傷想定歯 PTVpost は臨床的動揺度 I の範囲内、また WCS1 および WCS2 の外傷想定歯 PTVpost はそれぞれ臨床的動揺度Ⅲおよび Ⅱの範囲内を示した。いずれのスプリント固定法でも外傷想定歯 PTVpost は健全想定歯 PTVpre に比べ有意に高値を示したため、すべて flexible 固定と分類される。ただ固定後も高度な動揺が残存した WCS1 固定法は重症外傷歯に対し十分ではない可能性がある。

以上のように、本研究は新たに考案した実験モデルを用いて、外傷歯スプリント固定法の効果を動揺度の観点から評価したものであり、今後さらに多面的なアプローチによる検討が必要である。本研究で確立した実験モデルは臨床でしばしば遭遇する外傷性不完全脱臼や完全脱臼の状態を合理的に再現できるシステムであり、また各種スプリント固定法のペリオテスト評価に基づく固定効果の違いも分析評価することができることが示されたことから、極めて有用なものと考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5476　号 | 白子　高大 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　谷口　尚<br>副　査　　高橋　英和、宮新　美智世 | |
| 論 文 題 目 | Establishment of experimental models to evaluate the effectiveness of dental trauma splints | |

（論文審査の要旨）

外傷歯治療における主要術式の一つが整復固定処置である。外傷歯の固定法や使用器材に関する従前研究では動物やヒト外傷歯や天然歯、顎模型やカスタムメイド模型など、多種多様な試料やモデルで解析されているが、それぞれ一長一短があり、なかでも実験モデルの再現性や信頼性、安定性といった点で問題のあることが指摘されてきた。そうしたことから、外傷歯の特徴や特性を踏まえ、その挙動を的確に再現できる外傷歯実験モデルの作製は積年の課題であった。

以上のような背景にもとづき、申請者である白子高大は、歯学教育実習で頻用される人工歯付き顎模型をベースに、外傷歯実験モデルの作製に取り組んだ。人工歯ソケット底部に JIS 規格 O リングゴムとスプリングワッシャーを介在させて人工歯をネジ止めする新機構を考案し、ネジ止めトルク値を制御管理することで人工歯の動揺度を自在にコントロールできるモデルとすることに成功した。こうした独創的な発想力と精緻な技術力には高い評価を与えることができ、新規性も極めて高い。

今回考案したモデルに対する評価実験も行っており、不完全脱臼を想定した中等度外傷モデル（Level M）と完全脱臼を想定した重症モデル（Level S）の 2 条件を設定し、ワイヤーコンポジットスプリント固定とコンポジットスプリント固定の 2 種固定効果を検討している。動揺度計測装置ペリオテストを用いて、外傷想定歯と固定源である両隣在歯の計 3 歯の動揺度を固定前（PTVpre；コントロール）および固定後（PTVpost）の各 3 回計 6 回計測した。コントロールの固定前データから固定後データを減じた値（ΔPTV＝PTVpre－PTVpost）で固定効果を分析評価した。統計では Kolmogorov-Smirnov 検定、Wilcoxon 検定、Mann-Whitney U－検定および Steel-Dwass 法を駆使し解析している。また Kendall の一致係数にて模型のモデル一致性についても分析している。このように実験立案からデータ解析に至るまで十分な知識と情報に基づいて行われており、本実験が周到な準備のもと計画的に遂行されたことが窺われる。

本実験で得られた結果は以下の通りであった。

1）既製顎模型に O リングゴムとスプリングワッシャーを組み合わせて、人工歯のねじ止めトルク値を管理制御することで、外傷歯の動揺を再現できる実験モデルを新たに考案した。

２）Level M 外傷想定歯および健全想定隣在歯のコントロール値（平均 PTVpre）はそれぞれ 31.5 および 1.7 であった。

３）模型のモデル一致性について、Kendall の一致係数は 1 であった。

４）Level M において、WCS1、WCS2 および CS1 処置時の Δ PTV はそれぞれ 22.9、27.8 および 30.3 となり、CS1 が最も高値を示し、各処置間で有意差を認めた。

５）Level S において、WCS1、WCS2 、CS1 および CS2 処置時の Δ PTV はそれぞれ 1.9、20.5、30.2 および 37.3 となり、CS2 が最も高値を示し、各処置間で有意差を認めた。

本研究で確立したモデルは O リングゴムとスプリングワッシャーを応用して人工歯の動揺を可変制御する新機構を備えたことで、外傷性脱臼歯の挙動を精度よく、かつ安定的に再現できることが確認された。また本研究結果より、各種の整復固定装置の治療効果も的確に分析評価できる優れたシステムであることも検証されたことから、外傷歯の臨床術式や器材開発に関わる実験用標準モデルとして、今後の活用が期待される。さらには外傷歯学の教育実習用模型への製品展開も期待でき、その成果は高く評価できる。

以上のように、外傷歯の診断治療ならびに教育研修に資する実験モデルを新たに開発した本研究の学術的価値は高く、今後のスポーツ歯学ならびに外傷歯学の進歩発展に寄与するところが大きいと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 行森　茜 |
| 論文審査担当者 | 主査　　樺沢　勇司<br>副査　　渡部　徹郎　　青木　和広 |
| 論文題目 | Genetic basis of calcifying cystic odontogenic tumors |

（論文内容の要旨）

〈緒言〉

歯原性腫瘍は歯牙形成に関わる組織に由来して発生する腫瘍である。歯原性腫瘍は多彩な組織像を示し、発生母地や組織学的特徴に基づいて分類される。たとえばエナメル上皮腫は、エナメル器に類似した腫瘍胞巣を作り周囲組織に持続的に増大を示す真の腫瘍であるが、歯牙腫など過誤腫的な病変と考えられている病変もある。

石灰化嚢胞性歯原性腫瘍（calcifying cystic odontogenic tumor、以下 CCOT）は歯原性腫瘍の 1～2%を占める病変で、歯原性上皮の嚢胞性増殖を特徴とする。特徴的な組織学的所見として幻影細胞と呼ばれる、核が消失した好酸性細胞の出現が挙げられる。幻影細胞は腫瘍細胞が毛の形質に類似する異常角化を示したものと考えられている。CCOT では病理組織学的特徴によるサブタイプ分類も提唱されており、充実性増殖が主体のものや、歯牙腫に伴うものも認められる。CCOT は 2005 年版 WHO 分類では腫瘍に分類されていたが、2017 年版では石灰化歯原性嚢胞と名称が変わり、嚢胞に分類されるようになった。

近年、次世代シークエンサーを用いた解析によって、エナメル上皮腫における RAS-RAF 経路の遺伝子の変異が明らかになった。特に BRAF 変異は 46-63%のエナメル上皮腫に検出され、エナメル上皮腫の発生に重要であると考えられている。

しかし CCOT の網羅的な遺伝的変異解析は進んでいない。2003 年に CCOT における CTNNB1（βカテニン）変異が報告され、CCOT が遺伝子変異によって惹起される腫瘍性病変である可能性が示された。しかし、他の遺伝子の関与の有無は検討されておらず、CTNNB1 変異が CCOT の発生に関与する単一の原因遺伝子なのか、あるいは多数の遺伝子変異の中のひとつなのかは不明である。また、サブタイプが遺伝子変異の違いを反映したものかどうかも不明である。

そのため本研究では詳細に CCOT の遺伝子変異を検討した。

〈方法〉

1996 年～2016 年に採取され、本学歯学部附属病院に保管されている CCOT11 例とエナメル上皮腫 14 例のホルマリン固定パラフィン包埋検体を対象とした。

1)　CCOT11 例とエナメル上皮腫 7 例から DNA を抽出した。50 の癌関連遺伝子を検索する ION AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 と ION PGM を用いて次世代シークエンス解析を行った。検出

された変異は、リード数や頻度、検体中の腫瘍細胞量を指標として有意なものを選別した。さらにタンパクの機能予想ソフトであるSIFT、PolyPhen、Mutation Tasterのうち2種以上で有害であると判定された変異を抽出した。

2) 1)の症例にエナメル上皮腫7例を加え、DNAを抽出し、BRAF コドン600、MAP2K1 エキソン 2/3、CTNNB1 コドン 32/33/34/37を含む領域をPCRで増幅し、Sanger sequencingで変異の有無を調べた。また、BRAF(Val600Glu)変異タンパク、β カテニン、毛皮質ケラチンに対する免疫染色を施行した。

3) HEK293細胞にCTNNB1またはS33/S37.T41/S45変異CTNNB1を遺伝子導入した。培養細胞における毛皮質ケラチンの発現をウェスタンブロット法によって検討した。また、免疫染色で変異CTNNB1導入細胞におけるβ カテニンと毛皮質ケラチンの発現を検討した。

〈結果〉

1) 次世代シークエンサーを用いた遺伝子解析

CCOT11例中10例にCTNNB1変異を認めた。CTNNB1変異はSer33(6例)、Ser37(2例)、Asp32(2例)に位置し、すべて一塩基置換であった。Ser33、Ser37、Asp32はいずれもWNT/β カテニン経路の不活化に関連するリン酸化部位である。CTNNB1変異以外の遺伝子変異に関しては、1症例にAPC変異を認めた以外には認めず、サブタイプの差による遺伝子変異の差も見られなかった。

一方、エナメル上皮腫ではBRAF(Val600Glu)変異を7例中5例、NRAS(Gln61Arg)変異を2例に認め、BRAF変異とNRAS変異は相互排他的であった。

2) Sanger sequencingと免疫染色によるCTNNB1とBRAF変異の検出

2-1) Sanger sequencing

次世代シークエンスの結果の確認と、より単純な方法による変異検出が可能かどうかを検討するため、CTNNB1、BRAF、およびMAP2K1のホットスポットをPCRで増幅し、Sanger sequencingによって遺伝子変異解析を行った。CCOTでは次世代シークエンスで変異が検出された10例中6例でCTNNB1変異を検出した。エナメル上皮腫では14例中11例にBRAF(Val600Glu)を認め、次世代シークエンスの結果を合わせるとエナメル上皮腫全例にBRAF変異またはNRAS変異を認めた。そのうち、2例のエナメル上皮腫ではBRAF(Val600Glu)に加えて、CTNNB1(Ser37Cys)またはCTNNB1(Gly34Glu)をそれぞれ認めた。CCOT、エナメル上皮腫ともにMAP2K1に変異を認めなかった。

2-2) 免疫染色

CCOT全例とCTNNB1変異を有するエナメル上皮腫で、腫瘍細胞の核にβカテニンの集積を認め、幻影細胞に一致して毛皮質ケラチンの陽性像を認めた。

BRAF変異を有するエナメル上皮腫では、腫瘍細胞にBRAF(Val600Glu)変異タンパクの陽性像が見られた。

3) CTNNB1変異と幻影細胞形成

CTNNB1またはS33/S37.T41/S45変異CTNNB1を培養細胞に遺伝子導入したところ、どちらの細胞でも毛皮質ケラチンタンパクの発現が上昇し、変異CTNNB1を導入した細胞でより多量の毛皮質ケラチンの発現を認めた。蛍光染色にて、変異CTNNB1を導入した少数の細胞で毛皮質ケラチンの

発現の誘導を認めた。

〈考察〉

我々は次世代シークエンサーによる解析で 11 例中 10 例の CCOT に CTNNB1 変異を認めた。同様の CTNNB1 変異は大腸癌や肺腺癌などの多彩な癌で報告されているが、検出頻度は 5%以下と比較的低いため、これらの癌においては偶発的な変異であると思われる。それに対して CCOT では CTNNB1 変異が高率に見られ、他の遺伝子変異が認められないことから、CCOT と CTNNB1 変異の間には因果関係が強く示唆される。また CTNNB1 変異は WNT/β カテニン経路の活性化を通じて異所性の毛皮質ケラチンの発現を引き起こし、幻影細胞形成との関連があると考えられる。

我々が検出した CTNNB1 変異はコドン 32/33/37 部の一塩基置換であるが、これらの変異は過去の報告でも CCOT で検出されている。この領域の CTNNB1 変異は毛母腫やエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫でも報告されており、どちらの腫瘍でも β カテニンの核への集積を呈し、幻影細胞が出現する。このことから、CCOT、毛母腫、エナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫は、組織学的特徴が類似し発生母地が異なるが、変異した CTNNB1 が核に集積し毛への分化を誘導するという共通の機構が働いていることが示唆される。

CTNNB1 のコドン 33/37/41/45 部は GSK-3β によるリン酸化を通じて β カテニンの分解に関与する部位である。WNT/β カテニン経路が活性化すると GSK-3β が阻害され、β カテニンの分解抑制と核への集積が起こり、下流の遺伝子の発現増強を通じ細胞増殖の促進などが起こると考えられている。

一方、エナメル上皮腫の多くに BRAF(Val600Glu)を認めた。BRAF(Val600Glu)は MAPK 経路を活性化し、腫瘍の増殖を促進するが、この変異は大腸癌や悪性黒色腫などの多くの腫瘍に存在する。興味深いことに、頭蓋咽頭腫のもう一つのサブタイプである乳頭状頭蓋咽頭腫では CTNNB1 変異ではなく BRAF(Val600Glu)変異が見られると報告されている。

今回の解析で、エナメル上皮腫と CCOT の発生には、歯の発生に特異的な遺伝子ではなく、他組織の腫瘍と共通する遺伝子変異が関与することがわかった。大部分の悪性上皮性腫瘍では多様な複数の遺伝子変異が検出されるが、CCOT とエナメル上皮腫では基本的には相互排他的な単一遺伝子の変異が検出された。一方で、エナメル上皮腫では BRAF 変異と CTNNB1 変異の両方を有する症例も見出された。これらのエナメル上皮腫では、幻影細胞の出現も認められた。これらの症例では幻影細胞が少数であったためエナメル上皮腫と診断したが、遺伝子変異と組織型を考慮した分類基準も今後検討する必要があると思われた。

この研究を通じて、我々は CCOT の大部分は CTNNB1 変異によって引き起こされる病変であることを示した。CTNNB1 遺伝子変異は CCOT の診断の補助になるが、むしろ CTNNB1 変異は幻影細胞の最も信頼できる指標であり、確定診断にあたっては注意深く組織学的評価も行う必要がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5477　号 | 行森　茜 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　樺沢 勇司<br>副査　　渡部　徹郎　　青木　和広 | |
| 論 文 題 目 | Genetic basis of calcifying cystic odontogenic tumors | |

（論文審査の要旨）

本研究は特殊な歯原性腫瘍である石灰化嚢胞性歯原性腫瘍（CCOT）の遺伝子変異解析を行い、CCOT の病因と、腫瘍分類上の位置付けを考察したものである。近年、腫瘍の分類は、組織形態学に基づく伝統的な体系から、遺伝子変異に立脚した体系に急速に遷移しつつある。本研究では詳細に CCOT の原因遺伝子の探索を試みており、現代的な歯原性腫瘍の病因研究としての本論文の意義は高く評価できる。

本研究は、本学歯学部附属病院における CCOT11 例、エナメル上皮腫 14 例の切除材料を用いた観察研究が主体である。次世代シークエンスを用いて癌に関連する 50 種類の遺伝子を網羅的に解析している。その結果から絞り込んだ遺伝子を他の手法により注意深い追加検討を行っている。本研究で採用された解析手法は科学的に妥当であり、研究目的に沿ったものと考えられる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1)　次世代シークエンサーを用いた 50 種の癌関連遺伝子解析の結果、CCOT11 例中 10 例に CTNNB1（βカテニン）遺伝子変異を認めた。CTNNB1 変異は WNT/βカテニン経路の不活化に関与するリン酸化部位に位置していた。CTNNB1 以外の有意な遺伝子変異は認めなかった（1 症例のみは APC 変異を合わせ持っていた）。対照としたエナメル上皮腫では BRAF(Val600Glu)変異を 7 例中 5 例、NRAS(Gln61Arg)変異を 2 例に認め、BRAF 変異と NRAS 変異は相互排他的であった。

2)　免疫染色では CCOT でβカテニンの核への蓄積を認めた。また、幻影細胞特異的に毛皮質ケラチンの発現がみられた。エナメル上皮腫のうち 2 例は BRAF 変異と CTNNB1 変異の両方を有していたが、その 2 例では毛皮質ケラチン陽性を示す幻影細胞を認めた。

3)　変異 CTNNB1 を培養細胞に遺伝子導入したところ、毛皮質ケラチンの発現誘導を認めた。

以上の結果を基に、申請者は CTNNB1 変異は WNT/βカテニン経路の活性化を通じて、CCOT の発生と幻影細胞の形成に関与すると結論づけている。さらに、起源は異なるが同様の CTNNB1 変異を持つ皮膚や下垂体腫瘍と CCOT とは遺伝子的に相同の腫瘍であると考察している。

本研究の結果は CCOT の発生の分子的機序を明確に示した。これは遺伝子に立脚した腫瘍の分類体系を構築し、腫瘍の治療法を開発するための重要な知見となり、今後の歯科医学の発展に寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | KABOOSAYA Boosana |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　和泉　雄一<br>副　査　倉林　亨、田畑　純 |
| 論　文　題　目 | Ligation period required to induce periodontitis in mice: Analysis with micro-computed tomography. |

**緒言**

歯周病は歯の周囲組織に生じる慢性炎症性の疾患であり、歯肉、歯周靭帯、歯槽骨などの歯周組織が進行性に破壊される。歯周病は多種の細菌群が相乗的に作用することで起きる細菌感染症である。

歯周病の病態の解析そして治療法を研究する目的で、動物モデルが使用されている。マウスモデルは、感染性の炎症性疾患の病理学的解析を含む分子機序の解析において有用性が高い。実験用マウスは低コストである上に扱いが容易で、細菌叢のコントロールが可能である点に加え、週齢や遺伝子的背景が明確である。また、多種のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスが存在するため、生体内での様々なシグナリングや反応を解析することにおいてマウスは非常に優れた実験動物である。

マウスの臼歯の結紮により惹起した歯周炎において、炎症性細胞浸潤や上皮の侵入と骨吸収などの歯周炎に特有の病理変化が観察され、この実験モデルはヒトの歯周炎を模倣していると考えられている。これまでの研究において、歯周炎が１週間の結紮により惹起されたとする報告もあるが、結紮後２週間で骨を解析した報告もあり、さらに３週間あるいはそれ以上の結紮期間を用いた報告もあった。このように、この実験モデルにおける適切な結紮期間に関して、統一見解が得られていなかった。本研究の目的は、マウスにおいて歯周炎を惹起するために必要な歯の結紮期間を明らかにすることである。

**方法と材料**

東京医科歯科大学実験動物センターの承認を得た後、NIH ガイドラインに従って本動物実験を行った。

１．実験動物

8 週齢雄マウス(C57BL/6)18 匹を実験に供した。実験期間を通してすべてのマウスには通常の給餌を行い、餌と水の消費量は毎日確認した。

２．結紮による歯周炎の惹起

ケタミン(80mg/kg)とザイラジン(10mg/kg)の腹腔内注射による全身麻酔を行い、滅菌された 5-0 絹糸(Matsuda, Japan)を左側上顎第二臼歯周囲溝に挿入し、3 重にしっかりと結び、結び目が口蓋側歯頚部に位置する形で留置した。反対側同名歯には結紮を行わず対照群とした。定められた実験期間、結紮糸を留置して、プラークが蓄積しやすい状態を保った。想定外の症状の有無を確認するため、マウスの体重を測定した。

３．実験群

マウスは 6 匹ずつの 3 群に分け、以下のように結紮期間と観察期間を変えて実験を行った。第 1 群は 1 週間結紮した後に屠殺、第 2 群は 3 週間結紮した後に屠殺、第 3 群は 1 週間結紮をした後に結紮糸を除去し、結紮糸を除去してから 2 週間後に屠殺した。全てのマウスは結紮直後より実験期間を通して、滅菌水を自由に摂ることができる環境で飼育した。一定期間飼育後、麻酔下に頸椎脱臼を行って安楽死させ、上顎骨を採取した。

４．マイクロ CT 解析

採取した全ての上顎骨はマイクロ CT (InspeXio SMX-100CT;Shimadzu,Tokyo,Japan)を用いて解析した。ピクセルサイズ：1024×1024、ボクセルサイズ：12×12×12 $\mu m^3$、電圧：70kV、電流：30 μA の設定で、撮影をおこなった。3D 再構成ソフトウェア(TRI/3D-BON;RATOC System Engineering, Tokyo, Japan)を用いて、3 次元デジタルイメージを作成した。Image J (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて計測をおこなった。

５．歯槽骨吸収量測定

セメントエナメル境(cement-enamel junction: CEJ)から歯槽頂(alveolar bone crest: ABC)までの距離と面積の測定を以下のようにおこなって、歯槽骨吸収量(alveolar bone loss: ABL)を求めた。

深度計測：上顎第二臼歯頬側の 3 点（頬側近心・頬側中央・頬側遠心）における垂直的な骨吸収深度の測定

面積計測：上顎第二臼歯頬側根の露出面積の測定

６．統計学的解析

体重の測定値は Student's t-test を用いて解析を行った。深度計測と面積計測を含む骨吸収量の測定値は、Tukey's pos hoc test に基づき、一元配置分散分析(ANOVA)を用いて解析を行った。本実験では SPSS21.0 package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) を用い、P 値<0.05 で有意差有りと判定した。

## 結果

１．体重

全ての群における、マウス体重の初期値に差は認められなかった。実験中、すべてのマウスの体重が増加したが、特に第 1 群で顕著であり、それに続いて第 3 群の体重増加が認められた。

２．口腔内所見

結紮糸を除去すると、第 1 群では歯肉の発赤と易出血性を含む歯周炎の兆候が認められた。第 3 群ではわずかな歯肉の発赤が認められたが、ほぼ正常な歯肉の状態に回復していた。

３．マイクロ CT 所見

結紮によって、顕著な歯槽骨吸収を伴う歯周炎が惹起された。面積測定および深度測定において、第 1 群と第 2 群の頬側 CEJ から ABC における、骨吸収量に差は認められなかった。それに対して、同じ観察期間であったが、1 週間の結紮期間の後に結紮糸を

除去した群では3週間結紮糸を留置したものに比較して骨吸収量が少なかった。

**考察**

ヒトにおける歯周炎の研究では、種々の要因と歯周組織破壊との関連性を適正に設定することが困難である。歯周炎の動物実験モデルにおいては、疾患の再現性は完全ではないが、臨床研究に比較して制限が少なく、様々な要因をコントロールすることが可能である。

本研究で、上顎左側第二臼歯周囲に結紮を行うことにより、歯肉の炎症と歯槽骨吸収が生じた。下顎骨においては、骨吸収の速度が緩徐であることが報告されており、上顎臼歯部とその周囲歯槽骨が研究に用いられることが多い。

これまでの歯周病研究の中で、歯槽骨吸収が評価されてきた。歯槽骨吸収の評価には直線的深度計測と面積計測の二つの評価方法がある。どちらの計測方法をもちいても骨吸収を解析できるが、簡便性から深度計測が推奨される。

結紮後7日目で統計学的に有意な骨欠損が認められるとした以前の報告通り、結紮を行ってから最初の1週間で、対照測に比較して明らかな歯槽骨吸収が起きることを確認した。本研究では組織学的解析は行っていないが、1 週間の結紮によって破骨細胞が活性化されて歯槽骨の吸収が起きたことが推定される。

1週間結紮した第1群と、3週間結紮した第2群の間に、骨吸収量の差は認められなかった。一方、3週間結紮した第2群の骨吸収量に比較して、1週間結紮した後に結紮糸を除去し、結紮糸を除去して2週間後に観察した第3群の骨吸収量は少なかった。第3群においては、結紮糸の除去によって炎症が消退し、破壊された歯周組織の治癒が起きた可能性が考えられる。

本研究において、マウスの臼歯に結紮糸を1週間留置することで、歯槽骨吸収を観察できることが明らかになった。結紮糸の留置期間を1週間に短縮できることにより、歯周病研究の更なる推進が期待できる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5478　号 | KABOOSAYA Boosana |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　和泉　雄一<br>副　査　倉林　亨、田畑　純 | |
| 論 文 題 目 | Ligation period required to induce periodontitis in mice: Analysis with micro-computed tomography. | |

（論文審査の要旨）

歯周病は歯の周囲組織に生じる慢性炎症性の疾患であり、歯肉、歯周靭帯、歯槽骨などの歯周組織が進行性に破壊される。歯周病の病態の解析そして治療法を研究する目的で、種々の動物モデルが使用されているが、マウスを用いた実験モデルは、歯周病の発症と進行における分子レベルの解明において有用性が高い。実験用マウスは遺伝子的背景が明確であり、また多種のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスが存在するため、非常に優れた実験動物である。マウスの上顎臼歯の結紮により歯周炎を惹起する動物実験モデルは既に報告さているが、結索期間が 1 週間あるいは 2 週間あるいは 3 週間と、様々であり一定していない。このような背景を元に、マウスにおいて歯周炎を惹起するために必要な歯の結紮期間を明らかにするために、本研究を立案して実験をおこなったことは高く評価できる。

本研究において、8 週齢雄マウス(C57BL/6)18 匹が実験に用いられた。ケタミン(80mg/kg)とザイラジン(10mg/kg)の腹腔内注射による全身麻酔を行い、滅菌した 5-0 絹糸を左側上顎第二臼歯周囲溝に挿入して結び、結び目が口蓋側歯頚部に位置する形で留置した。反対側同名歯には結紮を行わず対照群とした。マウスは 6 匹ずつの 3 群に分け、以下のように結紮期間と観察期間を変えて実験を行った。第 1 群は 1 週間結紮した後に屠殺、第 2 群は 3 週間結紮した後に屠殺、第 3 群は 1 週間結紮をした後に結紮糸を除去し、その 2 週間後に屠殺した。屠殺後、マイクロ CT を用いて結紮した歯の周囲骨の解析をおこなった。セメントエナメル境から歯槽頂までの距離と面積の測定を以下のようにおこなって、歯槽骨吸収量を求めた。深度計測：上顎第二臼歯頰側の 3 点（頰側近心・頰側中央・頰側遠心）における垂直的な骨吸収深度の測定。面積計測：上顎第二臼歯頰側根の露出面積の測定点（頰側近心・頰側中央・頰側遠心）における垂直的な骨吸収深度の測定。

これらの本研究における実験方法、実験群の設定、結索した歯の周囲骨の吸収量の測定方法は適切であったと考えられる。

本研究において以下の結果が得られた。

1 週間の結紮によって、歯槽骨吸収を伴う歯周炎が惹起された。第 1 群と第 2 群の骨吸収量に差は認められなかった。それに対して、同じ観察期間であったが、1 週間の糸を結紮した後に結紮糸を除去してさらに 2 週間観察した第 3 群では、3 週間連続して結紮糸を留置した第 2 群に比較して、骨吸収量が少なかった。

これらの実験結果が論文中に明確に提示されていることを確認した。

考察においては、最初に歯周炎の動物実験モデルとしてマウスを用いることの利点、そして、下顎ではなく上顎第二臼歯に結索をおこなった理由について述べられている。次に、歯槽骨吸収の評価方法として本研究で用いた直線的深度計測と面積計測の二つの評価方法について比較考察し、簡便性から直線的深度計測を推奨している。

本研究において、結紮を行ってから最初の 1 週間で、対照測に比較して明らかな歯槽骨吸収が起きることが確認された。本研究において組織学的解析は行われていないが、1 週間の結紮期間中に破骨細胞が活性化されて、歯槽骨吸収が起きたことが推測される。

1 週間結紮した第 1 群と、3 週間結紮した第 2 群の歯槽骨吸収量を比較し、両群において歯槽骨吸収のレベルに差は認められなかった。一方、3 週間結紮した第 2 群における歯槽骨吸収量に比較して、1 週間結紮した後に結紮を除去して 2 週間治癒させた第 3 群の歯槽骨吸収量は軽度であった。この理由として、結紮糸の除去によって炎症が消退し、破壊された歯周組織の治癒が起きた可能性を推測している。

これらの考察が実験結果に基づいて、論理的におこなわれていることを確認した。

本研究において、マウスの上顎第二臼歯を 1 週間結紮することで、歯槽骨吸収を観察できることが確認された。本動物実験モデルを用いることで、歯周病に関する研究の更なる進展が期待できる。

このように本論文によって示されたマウスにおける歯周病の実験モデルは、歯周病の病態の解明、歯周病の予防さらに治療に関する研究に有用であり、歯科医学の発展に大きく貢献するものと考えられ、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 鈴木　啓之 |
| 論文審査担当者 | 主査　古屋　純一<br>副査　品田　佳世子　　下山　和弘 |
| 論　文　題　目 | The effect of new complete denture fabrication and simplified dietary advice on nutrient intake and masticatory function of edentulous elderly: A randomized-controlled trial |

（論文内容の要旨）

〈緒言〉

歯の喪失数は年齢を重ねるごとに増加していくことが知られているが，それに伴い，咀嚼能力が著しく低下することも明らかになっている．咀嚼は消化吸収の第一段階であり，その能力低下は，摂取した食物の消化・吸収効率低下をもたらし，栄養状態の悪化につながると考えられる．また，高齢者はこの咀嚼能力の低下に加えて味覚・嗅覚の低下や消化器機能低下などさまざまな要因により食欲低下を生じ，食品摂取量が低下すると考えられており，この食品摂取量低下に伴い，さまざまな栄養素摂取量が不足する傾向にあると言われている．さらに無歯顎高齢者となると，咀嚼能力が著しく低下することにより，摂取可能な食品が減少し，特に糖質，タンパク質，カルシウム，鉄，ナイアシン，ビタミンCの摂取量が低下することで，栄養状態の悪化が助長すると考えられている．この栄養状態の悪化は様々な疾患の原因となると考えられており，特にタンパク質摂取量の不足は筋肉量の減少の一因となり，サルコペニアやフレイルティを誘発する可能性も危惧されている．

無歯顎高齢者の咀嚼能力を改善するために，全部床義歯による欠損補綴治療が一般的に行われるが，全部床義歯そのものによる無歯顎高齢者の栄養素摂取状態への影響については明らかではない． Bradbury らは，無作為化比較臨床試験を行い無歯顎高齢者に対して全部床義歯新製に加えて栄養士によるテーラーメイドの食事指導を行うことにより，栄養素摂取状態の改善を認めたと報告している．この報告から，無歯顎高齢者の栄養素摂取状態を改善するためには全部床義歯装着に加えて食事指導が必要である可能性が高いと考えられる．しかし，Bradbury らの報告した手法である栄養士によるテーラーメイドの食事指導を行うことは，日常歯科臨床において難しい．一方で，Bartlett らは，前向き臨床研究において，義歯安定剤の使用に加えてパンフレットを用いた簡便な食事指導により，栄養素摂取状態の改善を認めたと報告している．この画一的なパンフレットを用いた簡便な食事指導は，テーラーメイドの食事指導とは異なり，歯科医師にも応用可能であると考えられる．そこで，本研究では，全部床義歯新製に加えて歯科医師でも日常臨床の中で実践可能な食事指導として，パンフレットを用いた簡便な食事指導が無歯顎高齢者の栄養素摂取状態に及ぼす影響を明らかにするために，無作為化比較臨床試験を実施した．

本研究の帰無仮説は全部床義歯新製に加えて簡便な食事指導を行った群と全部床義歯新製のみ

を行った群との間には，介入後の栄養素摂取量と咀嚼能力に有意な差は認められないとした．

〈方法〉

本研究のデザインは二重盲検無作為化比較臨床試験とし，対象者は上下全部床義歯の新製が必要な上下無歯顎患者とした．適格基準は，無歯顎期間が 1 年以上，自力通院可能な上下無歯顎患者とし，残根の有無に関しては問わなかった．除外基準は，感染症を有する者，顎口腔機能に異常を有する者，精神疾患を有する者，認知症の者，食事制限のある者，自身で食事を選択することが不可能な者とした．本研究開始前にすべての参加者には，口頭および文書を用いて研究内容を説明し，インフォームドコンセントを得た．なお，本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行っており（第 1144 号），本研究は大学病院医療情報ネットワーク研究センターが運営する臨床試験登録システムにも登録済みである(UMIN000017879).

本研究のサンプルサイズは主要アウトカムであるタンパク質摂取量から算出し，ドロップアウトを考慮したうえで 70 名の参加者を集め臨床研究を開始した. 本研究参加に同意を得られた参加者の，基本情報聴取およびベースラインアウトカム評価を行ったのち，参加者を，無作為に食事指導を受ける群（義歯新製＋食事指導群）と，義歯のケアに関する指導を受ける群（義歯新製群）の 2 群に分け，すべての参加者に対して全部床義歯新製を行った．なお，術者は臨床経験 11－14 年の歯科医師とした．全部床義歯作製過程のうち，蝋義歯試適時および義歯装着時の 2 回，義歯新製＋食事指導群に対しては『シニア向け食事バランスガイド』を基にした食事指導を行い，義歯新製群には義歯のケアに関する指導を行った．指導の形式は 20 分間の対面式指導とし，術者ではない歯科医師がそれぞれのパンフレットの内容を説明する形式で行った. 義歯装着後は，患者・術者ともに義歯に問題がないと判断されるまで調整を行い，調整終了 3 か月後に，すべての参加者に対し介入後アウトカムの評価を行った.

主要アウトカムは、簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)から得られたタンパク質摂取量とした．また，参加者の栄養素摂取状態を詳細に評価するため，エネルギー摂取量，脂質摂取量，炭水化物摂取量，ミネラル群，ビタミン群などについても評価を行った．副次アウトカムは客観的咀嚼能力とし，色変わりガム（キシリトール咀嚼チェックガム，ロッテ）による混合能力および検査用グミゼリー（咀嚼能力判定用グミゼリー，ユーハ味覚糖）による咬断能力を評価した．混合能力については，色変わりガムを参加者に毎秒 1 回の速度で 100 回自由咀嚼させた後，ガムを回収し 1.5mm 厚に圧接，色彩色差計（CR-13，コニカミノルタ）を用いて測定することで混合能力評価値（MPIG）を算出した．咬断能力については，グミゼリーを参加者に 30 回自由咀嚼させた後，その咬断片を全て回収し，0-9 段階のスコア法を用いて視覚的に評価した.

〈結果〉

本研究への参加を希望し東京医科歯科大学歯学部附属病院を受診した 79 名の適格性を評価し，そのうち 70 名の無作為割付を行った. 研究終了までに 8 名が病気などの理由で通院継続困難となったため，すべての研究課程を終了した 62 名（男性 31 名，女性 31 名，平均年齢 77.0 歳）の結果による解析を行った．ベースラインにおける 2 群間の患者特性に有意差は認められなかった．栄養素摂取量に関しては，義歯新製群と比較して義歯新製＋食事指導群の方が介入後においてタ

ンパク質を有意に多く摂取していた(p = 0.001)．さらに脂質(p=0.041)，ナトリウム(p=0.013)，カリウム(p=0.007)，マグネシウム(p<0.001)，リン(p=0.001)，鉄(p=0.011)，亜鉛(p=0.001)などのミネラル類，ビタミン B1(p=0.004)，ビタミン B2(p=0.027)，ビタミン B6 (p=0.002)，ナイアシン(p=0.002)，葉酸(p=0.031)，パントテン酸(p<0.001)などのビタミン類の摂取量も同様に義歯新製＋食事指導群が有意に多かった．一方で咀嚼能力は，介入後の群間に有意な差は認められなかったものの，術前後で比較した場合，義歯新製＋食事指導群では混和能力（p ≤ 0.001）・咬断能力（p = 0.016）ともに有意な改善を認め，義歯新製群では混和能力（p = 0.009）に有意な改善を認めた．

〈考察〉

タンパク質摂取量は骨格筋量の維持に重要な因子であり，また，高齢者が骨格筋量を維持するためには，質の良いタンパク質を一日 1.0~1.2g/kg，均等に分けて摂取する必要があると報告されている．さらに，カルシウム，マグネシウムや亜鉛の摂取量は骨密度と関連していると考えられており，ナイアシンの摂取量は心血管系疾患と関連していると考えられている．これらの栄養素は無歯顎高齢者で不足しやすいと考えられており，タンパク質摂取量不足に伴う骨格筋量減少から誘発されるサルコペニアや，微量栄養素の摂取量不足に伴う骨粗鬆症，心血管系疾患などの予防は，高齢者において非常に重要である．本研究では，介入後において，義歯新製＋食事指導群の方が義歯新製群に比べて，タンパク質摂取量，マグネシウム，亜鉛およびナイアシン摂取量が有意に多かった．このことから考えると，本研究の介入方法は，高齢者の栄養素摂取状態を改善するとともに，サルコペニア，骨粗鬆症，心血管系疾患などの全身疾患の予防にも寄与できる可能性が示唆された．

また，歯科臨床の場面は，患者の食事評価や食事指導を行う，最適な場であると考えられており，歯科治療時に付随して，1 対 1 の食事指導を行うことにより，患者の食習慣を変容させる可能性があることが明らかになっている．本研究においては，両群とも術後に咀嚼能力の有意な改善が認められたにもかかわらず，多くの栄養素は，義歯新製群と比較して義歯新製＋食事指導群の摂取量が有意に多かった．これらのことから，無歯顎高齢者の栄養素摂取状態を改善するためには，全部床義歯新製により咀嚼能力を改善するのみでなく，食事指導を行うことによる食習慣の変容が重要であり，栄養士による食事指導だけでなく，歯科医師による簡便な食事指導も食習慣の変容に有効な手法であると明らかとなった．

本研究において行った食事指導はパンフレットを用いた，非常に簡便な方法であり，このような食事指導を歯科臨床の場で合わせて行うことの負担は大きくないと考えられるため，歯科治療に加えて簡便な食事指導を加えることも検討していくことは，無歯顎高齢者の健康増進に重要であると考えられる．

〈結論〉

自力通院可能な無歯顎高齢者に対して，全部床義歯新製を行うことにより咀嚼能力を改善することが可能であり，栄養素摂取量を改善するためには，全部床義歯新製による咀嚼能力の改善に加えて，歯科医師による簡便な食事指導を行う必要性が明らかとなった．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5479　号 | 鈴木　啓之 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　古屋　純一<br>副査　品田　佳世子　　下山　和弘 | |
| 論 文 題 目 | The effect of new complete denture fabrication and simplified dietary advice on nutrient intake and masticatory function of edentulous elderly: A randomized-controlled trial | |

（論文審査の要旨）

無歯顎高齢者の咀嚼能力を改善するためには，全部床義歯による欠損補綴治療が一般的に行われる．高齢者の欠損補綴治療の最終的目標は，生活の質(QoL)を向上させ，さらには健康寿命を延伸させる観点からも，多様な食品摂取によるバランスの良い栄養摂取と考えられるが，全部床義歯補綴治療が無歯顎高齢者の栄養素摂取状態に与える影響については明らかではない．Bradbury らは無作為化比較臨床試験を行い，無歯顎高齢者に対して，全部床義歯新製に加えて栄養士によるテーラーメイドの食事指導を行うことにより，栄養素摂取状態の改善を認めたと報告しているが，歯科臨床の中で栄養士による食事指導を行うことは，現時点では実用的ではない．そのため，日常の補綴歯科臨床の中でも実践可能な食事指導・介入方法について検討する必要性があると考えられる．

こうした状況を背景に，鈴木は，歯科医師でも日常臨床の中で実践可能な食事指導である，パンフレットを用いた簡便な食事指導に着目し，全部床義歯新製時の食事指導の有無による 2 群を設定した二重盲検無作為化比較臨床試験を行い，歯科医師による簡便な食事指導が無歯顎高齢者の新義歯装着後の栄養素摂取状態に及ぼす影響を検証した．

研究参加者は選択基準を満たす上下全部床義歯の新製が必要な上下無歯顎患者とした．本研究開始前にすべての参加者には，口頭および文書を用いて研究内容を説明し，インフォームドコンセントを得た．なお，本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行い（第 1144 号），大学病院医療情報ネットワーク研究センターが運営する臨床試験登録システムにも登録済みである(UMIN000017879).

本研究参加に同意を得られた参加者の基本情報聴取および介入前アウトカム評価を行ったのち，参加者を無作為に義歯新製＋食事指導群，義歯新製群の 2 群に分け，すべての参加者に対して全部床義歯の新製を行った．なお，術者は臨床経験 11-14 年の歯科医師 3 名とした．全部床義歯作製過程のうち，ろう義歯試適時および義歯装着時の 2 回，義歯新製＋食事指導群に対しては農林水産省が提唱している『食事バランスガイド』を基にした食事指導を行い，義歯新製群にはダミー指導として，義歯のケアに関する指導を行った．指導の形式は 20 分間の対面式指導とし，術者ではない歯科医師がそれぞれのパンフレットの内容を説明する形式で行った．義歯装着後は，患者・術者ともに義歯に問題がないと判断されるまで調整を行い，調整終了 3 か月後に，介入後アウトカム評価を行った．

主要アウトカムは、簡易型自記式食事歴法質問票(BDHQ)から得られたタンパク質摂取量とした．また，参加者の栄養素摂取状態を詳細に評価するため，その他の栄養素摂取量の評価も行った．副次アウトカムは客観的咀嚼能力とし，色変わりガム（キシリトール咀嚼チェックガム，ロッテ）による混合能力および検査用グミゼリー（咀嚼能力判定用グミゼリー，ユーハ味覚糖）による咬断能力を評価した．サンプルサイズは先行研究よりタンパク質摂取量を基に算出し，介入後の栄養素摂取量は介入前の摂取量を共変量とした共分散分析(ANCOVA)を用いて比較した．なお，すべての栄養素摂取量は統計解析前に残差法によるエネルギー調整を行った．介入後の混合能力，咬断能力はそれぞれ Student t-test, Mann-Whitney's U test を用いて比較した．さらに，群内における，術前後の混合能力・咬断能力はそれぞれ Paired t-test, Wilcoxon signed-rank test を用いて比較した．

本研究は綿密な研究計画をもとに実施され，適切な統計学的解析により妥当性の高い結果を導いており，研究計画から考察に至るまで高く評価できる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 介入後において，義歯新製群と比較して義歯新製＋食事指導群の方が，タンパク質，マグネシウム，亜鉛などのミネラル類，ビタミン B1，B2，ナイアシンなどのビタミン類を有意に多く摂取していた．
2. 介入後において，義歯新製群と義歯新製＋食事指導群との間で，咀嚼能力に有意な差は認められなかった．
3. 全部床義歯を新製することにより，咀嚼能力は有意に改善した．

以上の結果より，自力通院可能な無歯顎高齢者に対しては，全部床義歯新製を行うことにより咀嚼能力を改善することが可能であるが，栄養素摂取量を改善するためには，全部床義歯新製による咀嚼能力の改善に加えて，歯科医師による簡便な食事指導を行う必要性が明らかとなった．本研究の成果は，全部床義歯新製に加えて歯科医師による簡便な食事指導により，無歯顎高齢者の栄養素摂取量を改善可能であることを示唆した唯一のランダム化比較試験であるため，明確なエビデンスを伴っている．本研究の成果をもとに多くの歯科医師が咀嚼機能改善に加えて食事指導の重要性を理解することにより，無歯顎高齢者の健康増進・健康寿命の一助になると考えられる．

よって，本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 久保　茉莉子 |
| 論文審査担当者 | 主査　水口　俊介<br>副査　高橋　英和　　笛木 賢治 |
| 論　文　題　目 | The effect of glass fiber posts and ribbons on the fracture strength of teeth with flared root canals restored using composite resin post and cores |

（論文内容の要旨）

Ⅰ．緒言

根管処置歯に対して歯冠修復を行う際、多くの場合支台築造が行われる。近年では、歯科材料の進歩により、従来行われてきた鋳造支台築造に加え、グラスファイバーポスト等を併用したコンポジットレジン支台築造も行われている。コンポジットレジンは象牙質に近い弾性係数と歯質に対する接着力を有するため、歯質を強化し歯根縦破折を起こしにくいとの報告もある。その一方で、コンポジットレジン支台築造は、側方応力のかかる歯頸部にて水平破折を起こしやすいとの報告がある。単冠での歯冠修復に比べ、ブリッジの支台装置や義歯の支台歯であれば更に支台歯に加わる側方応力は増加する。グラスファイバーポストは、コンポジットレジン支台築造体を強化する目的でしばしば併用され、高い破壊応力を示すとの報告がある。歯根縦破折のリスクは残存歯質の厚みとフェルールの有無に大きく影響されるが、臨床では、残存歯質が少なくフェルールを十分確保できない歯に歯冠修復を行う場合も少なくない。歯質の薄い漏斗状根管を持つような歯において、鋳造支台築造を用いると弾性率の違いから薄い歯質に応力が集中し、くさび効果も加わり歯根縦破折が生じやすい。従って、そのような歯に対しては薄い歯質の強化を期待してレジン支台築造を行うことが妥当と思われる。Lui らは、歯質の薄い歯根がレジンによって強化され高い破壊強度を示すことを報告している。

近年では、金属アレルギーの問題、審美修復の観点からメタルフリー修復が広まりつつある。そこで、本研究では漏斗状根管を持つ歯根の強度向上を図るメタルフリー支台築造法について検討した。

漏斗状根管に対して支台築造を行う場合、グラスファイバーポストの併用によるコンポジットレジン支台築造の強化が有用なのかは定かではない。コンポジットレジン支台築造の場合、歯頸部に応力が集中するとの報告もあることから、ポスト孔の中心を強化するよりもその外側を強化する方が効果的なのではないかと考えた。そこで、本研究では、漏斗状根管に対するコンポジットレジン支台築造の強化を目的として、円柱状のグラスファイバーリボンを用いてポスト孔の外側を強化する手法について検討した。漏斗状根管を持つ歯に対してポスト孔の外側を強化したものが高い破壊強度を示すという仮説のもと、４種類のレジン支台築造を行った場合の破壊応力と破壊様相について比較検討を行った。

Ⅱ．方法

自動精密切断機(Isomet, Buehler)にて歯冠を除去した牛歯下顎前歯 60 本の歯根部分に対し K ファイル(Files K, GC Co.)を使用し 120 号まで根管拡大、根管充填を行った。24 時間経過後、歯根外側をヒト下顎小臼歯に模して旋盤等を用いて整形した。各歯根にダイヤモンドバー（H250 033,Horico）を用いてポスト孔形成を行い、ポスト孔の深さ 8 mm、歯頸部の歯質の厚みを 0.8 mm の漏斗状根管を持つ歯根形態とした。得られた歯根を 15 本ずつ、コントロール群として支台築造用コンポジットレジン(Clearfil DC Core Automix, Kuraray Noritake Dental)のみを用いた群（RC 群）、中心にグラスファイバーポスト(Clearfil Fiber Post No.6, φ1.6 mm, Kuraray Noritake Dental)を用いた群（FP 群）、円柱状のグラスファイバーリボン(Construct Ribbon, Kerr Dental Corp.)を用いた群（FR 群）、グラスファイバーポストとグラスファイバーリボンを用いた群（FPR 群）に分け、それぞれ透明シリコンモールドを用いてレジン支台築造を行った。作製した試料は、疑似歯根膜としてシリコン印象材(Correct Quick, Pentron , 厚み 0.25mm)を介してアクリルレジン(Palapress vario, Heraeus Kulzer,)を用いてアルミリングに包埋した。万能試験機(Autograph AGS-H, Shimadzu)を用いて歯軸方向に対し 45 度の角度にてクロスヘッドスピード毎分 1.0 mm の条件で静荷重を加え、破壊時最大荷重を測定した。測定後の試料に対しては、コア部及び歯根部の破壊様相の観察を行った。破壊時最大荷重について，１元分散分析および Tukey HSD を用いて有意水準 5 %にて検定を行った。また、破壊様相については、フィッシャーの直接確率検定を行った。有意水準は Bonferroni 法による調整を行った.

Ⅲ．結果

１．FPR 群（1035.7N）と FR 群（881.77N）が、RC 群（567.97N）と比較し、有意に高い破壊時最大荷重を示した（$p < .05$）。また、FPR 群は、FP 群（769.40N）に対しても有意に高い破壊時最大荷重を示した（$p < .05$）。

２．ほとんどの試料において骨縁下に及ぶ再修復不可能な歯根破折が認められ、各群の歯根破折の有無の割合に有意差は認められなかった（$p > .008$）。また FR 群ではコア部の破折は認められず、RC 群は、コア部分における破折において FP 群、FPR 群と比較し有意に高い割合を示した（$p < .017$）。

Ⅳ．考察

FR 群が RC 群と比較して有意に高い破壊強度を示したことから、漏斗状根管を持つ歯根に対して、グラスファイバーリボンによるポスト孔外側の補強は、コンポジットレジン築造体の強度の増加に有効である可能性が示唆された。また、FPR 群は RC 群に加えて FP 群に対しても有意に高い破壊応力を示ことより、FPR 群の高い破壊応力は、グラスファイバーポストよりもグラスファイバーリボンに起因するものであると考えられる。以上の破壊応力の比較から、漏斗状根管に対するレジン支台築造において、円柱状のグラスファイバーリボンによるポスト孔外側部の強化は、グラスファイバーポストをポスト孔中心に心棒として用いるよりも効果的であることが示唆された。

破壊様相においては、大部分の試料に再修復不可能な歯根破折が認められた。漏斗状根管を持

つ歯根は、残存歯質の厚みが薄く強度が低い。そのため破折が起こる場合は再修復不可能な破壊様相であるとの報告がある。従って、最終的な歯根破折の有無ではなく、いかに高い応力まで破折が起きなかったかということに着目したい。RC、FP 群は比較的低い応力でも歯根に破折が生じているが、FR、FPR 群は比較的高い応力が加わるまで歯根破折が生じなかったと言える。後者は前者と比較し、応力を伝達、分散させ歯根に応力が集中することを防ぐ構造であるためと考えられる。以上のことから、漏斗状根管を持つ歯根の破折の生じやすさは、築造体の構造が大きな影響を持つと言える。

またコア部分における破折は、FR 群には認められず、FP、FPR 群でもほぼ認められなかったのに対し、RC 群は有意に破折が認められた割合が高かった。この結果から、レジンのみでは、歯頸部に集中する応力に対してコアの強度が不十分であることが示唆された。コア部とポスト部のコンポジットレジンを繋ぐ構造物を介在させることによりコア部にかかる応力を歯根方向へ伝達させ、コア部に応力が集中することを防ぐ必要があると考えられる。

漏斗状根管は、適切な形態の付与と十分な歯質の厚みの確保が困難であるため、歯冠修復を行うことが臨床的に困難な条件である。歯根縦破折を生じるリスクが高いため、長期的予後を望むことが難しい。そのような歯根に対しては抜歯も臨床的な選択肢の一つではあるが、最後の保存処置としての歯冠修復を行い、その歯の機能する期間を延長することも意味のある選択肢の一つであると考えられる。漏斗状根管に対して歯冠修復を行う場合、ポスト孔の外側を円柱状のグラスファイバーリボンを用いて補強することがレジン築造体の強化に効果的である可能性が、本実験から示唆された。

## V．結論

漏斗状根管を持つ歯根にコンポジットレジン支台築造を行う場合、その破壊強度は円柱状のグラスファイバーリボンによって有意に強化されることが明らかとなった。

漏斗状根管を持つ歯根については、コンポジットレジンのみ使用した支台築造では十分な強度を得られないため、コア部とポスト部のコンポジットレジンを繋ぐ構造物を介在させることによりコア部にかかる応力を歯根方向へ伝達させ、コア部に応力が集中することを防ぐ必要がある。本研究の結果から、コンポジットレジンを用いた支台築造において，ファイバーリボンとファイバーポストを組み合わせて使用することで破壊強度が向上することが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5480　号 | 久保　茉莉子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　水口　俊介<br>副　査　高橋　英和　　笛木 賢治 | |
| 論 文 題 目 | The effect of glass fiber posts and ribbons on the fracture strength of teeth with flared root canals restored using composite resin post and cores | |

（論文審査の要旨）

近年の歯科材料の進歩により支台築造の様式は鋳造支台築造に加えグラスファイバーポストを併用したレジン支台築造が使用されるようになってきた。歯根縦破折のリスクは残存歯質の厚みとフェルールの有無に大きく影響されるが、臨床では、残存歯質が少なくフェルールを十分確保できない歯に対する歯冠修復を行う場合も少なくない。歯質の薄い漏斗状根管を持つような歯において、鋳造支台築造を用いると弾性率の違いから薄い歯質に応力が集中し、くさび効果も加わり歯根縦破折が生じやすいことは知られているが、漏斗状根管に対して支台築造を行う場合、グラスファイバーポストの併用によるコンポジットレジン支台築造の強化が有効かどうかについてはいまだ明らかになっていない。本研究は、コンポジットレジン支台築造の場合、歯頸部に応力が集中するとの報告もあることから、ポスト孔の中心を強化するよりもその外側を強化する方が効果的なのではないかと考え、漏斗状根管に対するコンポジットレジン支台築造の強化を目的として、円柱状のグラスファイバーリボンを用いてポスト孔の外側を強化する手法について検討したものであり、この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって有意義なものと高く評価できる。

本研究は、４種類のレジン支台築造を行い、その破壊強度を比較、検討したもので、牛歯下顎前歯 60 本の歯根を、漏斗状根管を持つヒト下顎小臼歯に模して整形し、15 本ずつ４群に分け、コンポジットレジン支台築造を行っている。コントロール群として支台築造用レジンのみを用いた群（RC 群）、中心にグラスファイバーポストを用いた群（FP 群）、円柱状のグラスファイバーリボンを用いた群（FR 群）、グラスファイバーポストとグラスファイバーリボン両方を用いた群（FPR 群）の４群について、万能試験機を用いて歯軸方向に対し 45 度の角度にて静荷重を加え、破壊時最大荷重を測定し、破壊様相を観察している。破壊時最大荷重について，１元分散分析および Tukey HSD を用いて危険率 5 %にて検定を行い、破壊様相については、フィッシャーの直接確率検定を行っている。

このように、本研究方法は周到な実験計画に基づいて遂行されており、必要かつ十分で正確な結果の得られる妥当な方法といえる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.　FPR 群（1035.7N）と FR 群（881.77N）が、RC 群（567.97N）と比較し、有意に高い破壊時最大荷重を示した（$p < .05$）。また、FPR 群は、FP 群（769.40N）に対しても有意に高

い破壊時最大荷重を示した（$p < .05$）。

２．ほとんどの試料において骨縁下に及ぶ再修復不可能な歯根破折が認められ、各群の歯根破折の有無の割合に有意差は認められなかった（$p > .008$）。また FR 群ではコア部の破折は認められず、RC 群は、コア部分における破折において FP 群、FPR 群と比較し有意に高い割合を示した（$p < .017$）。

以上の結果から、本実験により、漏斗状根管を持つ歯根にコンポジットレジン支台築造を行う場合、その破壊強度は円柱状のグラスファイバーリボンによって有意に強化されることが明らかとなった。漏斗状根管を持つ歯根については、コンポジットレジンのみ使用した支台築造では十分な強度を得られないため、コア部とポスト部のコンポジットレジンを繋ぐ構造物を介在させることによりコア部にかかる応力を歯根方向へ伝達させ、コア部に応力が集中することを防ぐ必要がある。特に、ファイバーリボンとファイバーポストを組み合わせての使用が望ましいことが示唆されたことは高く評価できる。

このように、本論文は歯冠修復を行う際に有用な示唆を与えるものであり、歯科補綴学ひいては歯学全般の進歩、発展に寄与するところが大である。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 佐々木　夏子 |
| 論文審査担当者 | 主 査　宇尾　基弘<br>副 査　若林　則幸　　黒田　真司 |
| 論　文　題　目 | Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation |

（論文の内容の要旨）

Ⅰ．緒言

チタンインプラントの表面構造は生体内に埋入後の創傷治癒過程において骨芽細胞挙動の制御に重要な役割を担っている。チタン材料と骨とのオッセオインテグレーションの早期獲得のため、様々な表面改質法が検討されている。表面粗さに代表される表面構造のスケールは重要な要素であり、マイクロスケールとナノスケールの構造は各々骨芽細胞挙動に影響を与えることが報告されている。

表面改質したインプラント材料は臨床応用されており骨形成促進に寄与している。近年、生体内の細胞外環境の構造を模したバイオミメティック材料が注目されており、細胞－細胞外基質相互作用における構造因子の影響を明らかにし、さらには臨床において効果的な生体材料を創製することが期待されている。生体骨はハバース系、オステオンなどのマイクロ構造と、コラーゲン線維や無機・有機分子などのナノ構造を併せ持つ階層的な構造を有している。さらに骨リモデリングの過程において、骨芽細胞は破骨細胞の形成した約30-100 μmの吸収窩に接着し、骨形成を開始する。吸収窩は破骨細胞が残したコラーゲン線維によりマイクロ、ナノスケールの複雑な構造を有していることからも、マイクロ・ナノ構造を有するチタンインプラントの改質が重要であると考えられる。

陽極酸化により形成されるチタンナノチューブ酸化膜（TNT）は、チューブの直径を15-100 nm程度の範囲で制御可能であり、スケールの違いで細胞挙動を制御することが報告されている。マイクロ構造はサンドブラスト処理や酸処理により基盤の粗さを制御する方法が多く研究されており、細胞の機能発現に高い効果を示す一方で、細胞増殖能が抑制されるなどの課題がみられる。また構造を評価するパラメーターとして、算術平均粗さや最大高さなどの深さ方向の指標は頻用されるが、水平方向や空間的構造の評価方法の検討は不足しており、最適なスケールのマイクロ構造の決定に至っていない。

そこで本研究では、階層構造におけるマイクロ構造が細胞機能に与える影響を明らかにするため，マイクロ構造の形態を種々の大きさのジルコニアビーズを用いてサンドブラスト処理により付与し、化学的性質およびぬれ性を統一するために，ナノ構造を陽極酸化処理により付与した。作製した材料を用いて，階層構造チタンの骨芽細胞増殖能に与える影響を評価した。

Ⅱ．方法

直径 10 mm、厚さ 1.5 mm の純チタンを研磨荷重 800 g/5 個にて、耐水研磨紙#600 及び#1000 で研磨し、その後 9 μm ダイヤモンドサスペンション、0.04 μm コロイダルシリカをそれぞれ噴霧しながら鏡面研磨した（MP）。大きさを制御したマイクロ構造を形成するため、粒径 30, 90, 180 μm の球状ジルコニアビーズ（TZ-B30, 90, 180, 東ソー)をサンドブラスト粒子として用いて、投射圧力 0.6 MPa にてそれぞれ試料一面に均一に噴射した。ナノチューブ酸化膜形成のため、電解溶液 0.5wt%フッ化ナトリウム、1M 硫酸ナトリウム水溶液を用いて電圧 20V、室温下にて 3 時間陽極酸化を行った。得られたマイクロ・ナノ構造試料（粒径 30, 90, 180 μm のジルコニアビーズにてサンドブラスト処理の後、陽極酸化処理した試料：SB30TNT, SB90TNT, SB180TNT）および陽極酸化処理試料（TNT）をその後、500℃、 2 時間、 大気下にてアニール処理した。

作製した試料の表面微細構造を走査型電子顕微（SEM）にて解析した。算術平均表面粗さ(*R*a)および粗さ曲線要素の平均長さ(*R*Sm)をレーザー顕微鏡にて解析した。結晶構造を X 線回析（XRD）にて、ぬれ性を静的接触角測定にて解析した。

ヒト骨芽細胞様細胞（MG63）を用いて，細胞伸展面積および細胞増殖能を解析した。試料（n=6）に細胞濃度 $3 \times 10^4$ cells/cm$^2$にて播種、3, 6, 24 時間後に固定した後、細胞骨格を rhodamine phalloidin にて、核を DAPI にて染色し蛍光顕微鏡写真より細胞伸展面積を測定した。細胞増殖数は、試料（n=6）に細胞濃度 $1 \times 10^4$ cells/cm$^2$ にて播種し、1, 3 日培養後に固定、核を DAPI にて染色し解析した。細胞周期解析をフローサイトメトリー法により行った。MG63 を飢餓培地にて 3 日間培養した後、細胞濃度 $3 \times 10^4$ cells/cm$^2$ にて試料に播種し 24 時間培養した。その後細胞を固定、染色した後に細胞周期分布を解析した（n=3）。

Ⅲ．結果

SEM 画像により、弱拡大画像で TNT 表面に起伏はみられず、SBTNT 群の表面にはブラスト処理によるマイクロスケールの円形の凹みが観察された。強拡大画像より、TNT および SBTNT 群には直径約 110 nm のチューブ構造の形成が認められた。試料の *R*a および *R*Sm は、ブラストしたビーズの粒径の増加に伴い増加した。表面結晶構造は MP ではチタンのピークのみが検出され、TNT と SBTNT 群においてはアナターゼ型 $TiO_2$および基盤のチタンに一致するピークが検出された。静的接触角測定より、TNT および SBTNT 群ではぬれ性の増加が認められ、マイクロ構造の有無、大きさによるぬれ性の差はみられなかった。

骨芽細胞は試料の構造に従い異なる伸展を認めた。24 時間培養後、MP 上では細胞は面積を広く多方向に伸展していたのに対し、TNT、SBTNT 上では 2, 3 方向に葉状仮足を伸展させている様子が認められた。細胞面積解析により、MP 上で最も伸展面積が大きく、TNT は SBTNT 群より大きい傾向がみられた。培養 24 時間後、SBTNT 群ではマイクロ構造の径の減少に伴い細胞面積が減少し、SB30TNT 上で最も低い値を示した。細胞増殖能解析より、培養 3 日目に SB30TNT で MP と比較して細胞数の増加がみられた。細胞周期解析により、S 期にある細胞の割合は TNT と SBTNT 群が MP と比較して低く、一方 $G_2$/M 期にある割合は TNT と SBTNT 群が MP よりも高く、SB30TNT が TNT よりも有位に高かった。小さいマイクロ構造をもつマイクロ・ナノ構造において、細胞増殖能の促進が認められた。

Ⅳ．考察

本研究で作製したマイクロ・ナノ構造試料で骨芽細胞の伸展面積はマイクロ構造の大きさに従い異なる挙動を示した。培養時間24時間後にSB30TNT上で他群と比較して最も細胞伸展面積が抑制された。TNTとSBTNT群は同一の結晶構造およびぬれ性を有しているため、表面粗さの要素である*R*a、*R*Smの変化が細胞の伸展面積に影響を及ぼした可能性が考えられる。様々な粗さを与えた基盤上で骨芽細胞伸展を評価した過去の研究では、*R*aの値が2 μm以下では、細胞伸展に差がないことが報告されている。作製試料の*R*aは最大でSB180TNTの*R*a=1.51 μmであり、伸展面積に影響を与える要素ではないと考えられる。一方*R*Smは約70 μm以下の値で細胞伸展に影響を与えることが報告されている。本実験試料では、*R*Smの値は11.1から68.3 μmの範囲であることから、*R*Smの要素が細胞伸展に影響したと考えられる。またTNT形成面では平坦な面と比較して骨芽細胞伸展面積は小さく、また直径100 nmのTNT構造では増殖能が促進されると報告されている。本研究のTNTは直径約110 nmであり、細胞伸展形態も過去の報告と同様であった。しかしながらMP試料以外はすべて同一のTNT表面を形成されていたにもかかわらず、マイクロ構造の大きさの違いによって細胞伸展面積に差が認められた。

骨芽細胞増殖能は他群と比較して小さいマイクロ構造をもつ、SB30TNT において促進された。免疫染色法より培養 3 日目に SB30TNT では MP と比較して高い細胞増殖数を示した。また細胞周期解析より 24 時間後に分裂周期の後期である $G_2$/M 期にある細胞の割合が、TNT と SBTNT 群で MP よりも高く、また SB30TNT は TNT よりも高かった。このことより、TNT 表面およびそれと組み合わせた小さいマイクロ構造によって細胞増殖能が促進されることが確認された。

基盤の表面構造は細胞伸展や細胞骨格および様々な機能発現に影響を及ぼすことが報告されている。本結果では構造による細胞伸展の変化は培養6時間後から現れ、細胞増殖能に関する変化はその後現れた。このことから、細胞が先ず試料の表面構造を認識し細胞骨格の構成や伸展を誘導し、細胞増殖能に影響を与えた可能性が示唆された。作製した種々のマイクロ・ナノ構造が細胞外基質の構成や構造、力学的要素に影響を及ぼし、細胞接着機構やアクチン骨格の再構成を介して細胞内基質および核にシグナル伝達した可能性が考えられる。マイクロ・ナノ構造を持つSB30TNT上で、低い*R*Sm値の影響により骨芽細胞は伸展面積を抑制し、細胞内伝達を介して増殖能を促進したと考えられる。

Ⅴ．結論

本研究結果より、サンドブラスト処理と陽極酸化処理により形成されたマイクロ・ナノ構造が、骨芽細胞の伸展と増殖能に影響を及ぼすことが示された。試料表面は同一の結晶構造、ぬれ性を有していることが確認されており、マイクロ構造のスケールの違いによって細胞挙動に変化を与えたと考えられる。SB30TNT（$R$a=0.6 μm, $R$Sm=11.1 μm）の構造が最も増殖能を促進させ、インプラント材料の基盤設計における詳細な形態制御の重要性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5481　号 | 佐々木　夏子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　宇尾　基弘<br>副 査　若林　則幸　　黒田　真司 | |
| 論 文 題 目 | Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation | |

（論文審査の要旨）

生体骨の構造を模した階層的なマイクロ・ナノ構造表面を有するチタンインプラントは骨芽細胞の骨形成を促進させる効果が期待される。本研究では、階層構造におけるマイクロ構造が細胞機能に与える影響を明らかにするため、種々の大きさのジルコニアビーズを用いたサンドブラスト処理により、マイクロ構造の形態を付与し、化学的性質およびぬれ性を統一するために、ナノ構造を陽極酸化処理により付与した材料を用いて、階層構造チタンの骨芽細胞増殖能に与える影響についての検討したものであり、この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって有意義なものと高く評価できる。

本研究では、鏡面研磨した直径 10 mm、厚さ 1.5 mm の純チタンに、大きさを制御したマイクロ構造を形成するため、粒径 30, 90, 180 μm の球状ジルコニアビーズにて投射圧力 0.6 MPa でサンドブラストを行っている。ナノチューブ酸化膜形成のため、電解溶液 0.5 wt%フッ化ナトリウム、1M 硫酸ナトリウム水溶液を用いて電圧 20V、室温下にて 3 時間陽極酸化を行っている。得られたマイクロ・ナノ構造試料および陽極酸化処理試料をその後、500℃、 2 時間、 大気下にてアニール処理している。

作製した試料の表面微細構造を走査型電子顕微にて解析し、算術平均表面粗さ(*R*a)および粗さ曲線要素の平均長さ(*R*Sm)をレーザー顕微鏡にて解析し、結晶構造を X 線回析（XRD）にて、ぬれ性を静的接触角測定にて解析している。ヒト骨芽細胞様細胞（MG63）を用いて、細胞伸展面積および細胞増殖能を解析し、試料に細胞濃度 $3\times10^4$ cells/cm$^2$にて播種、3, 6, 24 時間後に固定した後、細胞骨格を rhodamine phalloidin にて、核を DAPI にて染色し蛍光顕微鏡写真より細胞伸展面積を測定している。細胞増殖数は、試料に細胞濃度 $1\times10^4$ cells/cm$^2$ にて播種し、1, 3 日培養後に固定、核を DAPI にて染色し解析し、細胞周期解析をフローサイトメトリー法により行っている。MG63 を飢餓培地にて 3 日間培養した後、細胞濃度 $3\times10^4$ cells/cm$^2$ にて試料に播種し 24 時間培養し、その後細胞を固定、染色した後に細胞周期分布を解析している。

このように、本研究方法は周到な実験計画に基づいて遂行されており、必要かつ十分で正確な結果の得られる妥当な方法といえる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1．　SEM 画像により、弱拡大画像で TNT 表面に起伏はみられず、SBTNT 群の表面にはブラスト処理によるマイクロスケールの円形の凹みが観察された。強拡大画像より、TNT および SBTNT 群には直径約 110 nm のチューブ構造の形成が認められた。試料の *R*a および *R*Sm は、ブラストしたビーズの粒径の増加に伴い増加した。表面結晶構造は MP ではチタンのピークのみが検出され、TNT と SBTNT 群においてはアナターゼ型 $TiO_2$および基盤のチタンに一致するピークが検出された。静的接触角測定より、TNT および SBTNT 群ではぬれ性の増加が認められ、マイクロ構造の有無、大きさによるぬれ性の差はみられなかった。

2．　骨芽細胞は試料の構造に従い異なる伸展を認めた。24 時間培養後、MP 上では細胞は面積を広く多方向に伸展していたのに対し、TNT、SBTNT 上では 2, 3 方向に葉状仮足を伸展させている様子が認められた。細胞面積解析により、MP 上で最も伸展面積が大きく、TNT は SBTNT 群より大きい傾向がみられた。培養 24 時間後、SBTNT 群ではマイクロ構造の径の減少に伴い細胞面積が減少し、SB30TNT 上で最も低い値を示した。細胞増殖能解析より、培養 3 日目に SB30TNT で MP と比較して細胞数の増加がみられた。細胞周期解析により、S 期にある細胞の割合は TNT と SBTNT 群が MP と比較して低く、一方 G2/M 期にある割合は TNT と SBTNT 群が MP よりも高く、SB30TNT が TNT よりも優位に高かった。小さいマイクロ構造をもつマイクロ・ナノ構造において、細胞増殖能の促進が認められた。

以上の結果から、サンドブラスト処理と陽極酸化処理により形成されたマイクロ・ナノ構造が、骨芽細胞の伸展と増殖能に影響を及ぼすことが示唆された。SB30TNT（Ra=0.6 μm, RSm=11.1 μm）の構造が最も増殖能を促進させ、インプラント材料の基盤設計における詳細な形態制御の重要性を示したことは高く評価できる。

このように、本論文は歯冠修復を行う際に有用な示唆を与えるものであり、歯科補綴学ひいては歯学全般の進歩、発展に寄与するところが大である。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 山田　理沙 |
| 論文審査担当者 | 主査　若林　則幸<br>副査　鈴木　敏彦　　宇尾　基弘 |
| 論　文　題　目 | Ag nanoparticle-coated zirconia for antibacterial prosthesis |

（論文内容の要旨）

Ⅰ．緒言

歯科において、機械的強度や生体安全性などの観点からイットリア部分安定型ジルコニア（YSZ）が利用されるようになってきている。オールセラミックス修復の失敗原因の一つに、二次う蝕や歯周疾患、インプラント周囲炎を引き起こす細菌の関与があげられる。そのため、装着した補綴装置の長期的予後の確立のためには、術後の感染防止が可能な抗菌性歯冠補綴装置の材料開発が強く望まれる。

近年、銀や銅などの金属ナノ粒子を用いて生体材料表面に抗菌効果を付与する事が注目され、中でも銀は他の金属ナノ粒子と比較して、広範な抗菌スペクトルを持ち、安全性も高く、医療分野を始めとする様々な分野での応用が報告されている。歯科材料では、コンポジットレジンやボンディング材、義歯床用材料、根管治療用材料などに銀ナノ粒子を配合したり、歯科用インプラント材料や矯正用ブラケットなどに銀ナノ粒子をコーティングしたりする方法も報告されている。YSZ への銀を用いた抗菌活性の付与では、ジルコニア粉末と銀を混和して焼結体を得る方法や、還元反応を用いて銀ナノ粒子をコーティングする方法などが報告されているが、通常の補綴装置作製の過程を阻害することなくチェアサイドでも簡便に、また症例に応じてその効果を付与する方法はいまだ報告されていない。そこで本研究では、YSZ に銀ナノ粒子を用いてコーティングを施し、種々の口腔内細菌に対する抗菌活性について評価をおこなった。さらに生体安全性や各種細菌に対する適正な銀ナノ粒子のコーティング量についての検討を行った。

Ⅱ．方法

試料は YSZ 粉末（TZ-3YSB-E, 東ソー)を使用し、一軸加圧成形により成形体(直径 8mm, 厚さ 1.3mm）を作製後、1450℃で 2 時間焼成し,焼結体を得た。得られた焼結体をアセトン、エタノール、純水にて 10 分間超音波洗浄を 2 回ずつ行い試料とした。試料表面に 0.2、0.5、1.0、2.5、5.0mM のナノ銀分散液（ナノ銀分散液 10mM, 和光純薬）を 30 μL ずつ滴下し、乾燥後 600℃で 30 分間アニール処理を行った。なお、コントロール試料は、ナノ銀分散溶液をコーティングしていないものとした。

FE-SEM (FE-SEM, S-4500, 日立）にて表面微細構造の観察を行い、得られた画像を基に画像

解析ソフト(ImageJ, National Institutes of Health)にて銀ナノ粒子の解析を行った。アニール処理後における銀ナノ粒子の酸化への影響を確認するために薄膜 X 線回析(GIXRD; D8 Advance, Bruker)にて銀の結晶構造解析、X 線光電子分光(XPS; JPS-9010MC, JEOL) にて試料表面に付着している銀の定量評価及び電子状態の評価を行った。

抗菌活性評価は ISO22196:2007 に基づいて行った。銀ナノ粒子の効果を検討するために、グラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* (NBRC 102135)、*Streptococcus mutans* (MT8148)、グラム陰性菌の *Escherichia coli* (NBRC3972)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC33384)を用いた。各細菌の培養には *S. aureus*、*S. mutans*、*E. coli* はトリプトソーヤブイヨン (Trypto-Soya Broth, ニッスイ)、brain-heart infusion (Bacto Brain heart Infusion, Becton, Dickson and Company, MD)、Luria-Bertani (LB) 培地(LB-Medium, MP Biomedicals, CA)を用いて液体培地、寒天培地を作製し培養は 37 ℃、24 時間で行った。*A.actinomycetemcomitans* は GC 液体・寒天培地を用いて 37℃、48 時間 5%$CO_2$下で培養を行った。各細菌の吸光度を測定し、0.4～3.0 × $10^8$ CFU/mL とした。各細菌を前培養し、濃度調整を行った菌液を用いて試料上に播種、プラスチックフィルムで被覆し培養した($n$ = 6)。試料上の菌液を希釈し、寒天培地に播種し、37℃、24 時間培養後、形成されたコロニー数から生菌数の評価を行った。抗菌活性値は次式を用いた。

$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0)$

$R$ : 抗菌活性値, $U_0$ : 無加工試験片の接種直後の生菌数の対数値の平均値

$U_t$ : 無加工試験片の 24 時間後の生菌数の対数値の平均値

$A_t$ : 抗菌加工試験片の 24 時間後の生菌数の対数値

人工唾液中への銀の溶出量を検討するために、加速溶出試験を行った。使用した人工唾液は 0.4 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.795 g/L $CaCl_2(H_2O)$, 0.69 g/L $NaH_2PO_4(H_2O)$, 0.005 g/L $Na_2S$, 1 g/L urea を用いて作成し、乳酸にて pH2 に調整した。試料は 1mL・37℃の人工唾液中に 1、7 日間静置し($n$ = 3)各期間後に人工唾液は全量交換し計測を行った。イオンの溶出量は ICP 発光分光分析 (ICP-AES,ICPS-7000 ver.2, 島津製作所) にて解析を行った。

細胞毒性の評価は ISO10993-5 に基づいて行った。マウス線維芽細胞 L929 (ATCC CCL1)を用いて細胞懸濁液を調整した。イーグル培地(E-MEM, 和光)、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリンストレプトマイシンを添加し、37℃、5%$CO_2$下で培養を行った。各試料($n$ = 6)に、5×$10^4$ cells/ml 加え 24 時間培養した。3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT, Dojindo) を各試料に添加して 3 時間培養後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、ジメチルスルフォキシド(DMSO, 和光) を加え溶解させた後、マイクロプレートリーダーにて 570 nm の波長で吸光度を測定し、細胞生存率を算出した。

## Ⅲ. 結果

コーティングした銀ナノ粒子は球状を呈し、YSZ 試料表面に均一に分散していた。またコーティング量の上昇に伴い、分散している銀ナノ粒子の直径と標準偏差は 19.7 ± 14.3 nm (0.2 mM), 23.4 ± 13.5 (0.5 mM), 30.6 ± 11.2 nm (1.0 mM), 41.3 ± 18.7 nm (2.5 mM), and 46.1 ± 20.4 nm (5.0 mM)と増加していた。XRD による表面の結晶構造では、いずれの試料も正方晶ジルコニア

のピークを認めた。XPS による表面解析では、ワイドスキャンの結果より、いずれの試料にも YSZ 表面に Zr、Y、O、C、Ag に一致するピークを認め、相対元素比を求めたところ、コーティング濃度の増加に比例して試料表面の銀の元素比の増加を認めた。ナロースキャンにて銀のピークを詳細に検討したところコーティングした銀ナノ粒子は Ag と AgO と $Ag_2O$ で構成されていた。

コーティングした試料上で培養した各細菌の生菌数は、グラム陽性・陰性菌共に銀の元素比の上昇に伴い減少した。

口腔内における長期的な抗菌効果を検討するために、低い pH に調整した人工唾液を用いて YSZ 表面からの銀ナノ粒子の溶出量を計測した。1 日後には少量の銀ナノ粒子が溶出しており、7 日後わずかではあるが溶出量は増加した。

L929 の細胞生存率を MTT アッセイにて検討した結果、銀の原子数濃度の上昇に伴って細胞生存率は減少し、5 mM が 64.7%と最も低い細胞生存率を示し、ISO 規格の基準である細胞毒性の基準を下回った。

Ⅳ．考察

本実験でコーティングに使用したナノ銀分散液には有機物が含まれているが、600℃のアニール処理で取り除かれ、また付着メカニズムはアニール処理での固相反応によって YSZ と銀ナノ粒子が固定されていると考えられる。銀は酸化しやすく、表面解析を行ったナロースキャンの結果でも銀ナノ粒子には Ag、$Ag_2O$、AgO も含むことが示された。

銀ナノ粒子を均一に分散させた YSZ は、歯科や整形外科領域での感染に関与した細菌に対して、抗菌活性を十分に発揮することが示された。銀ナノ粒子の抗菌メカニズムには DNA の複製阻害や、酵素の不活化、活性酸素(ROS)の発生で細胞膜の破壊を引き起こす経路などが報告されている。本材料では特に *E.coli* に高い抗菌活性を発揮していたことから、グラム陽性・陰性菌の細胞壁の構造の違いも関係していることが考えられる。グラム陰性菌の細胞壁は薄いペプチドグリカン層やリポポリサッカライドにより構成されており、グラム陽性菌ではペプチドグリカン層は厚く銀ナノ粒子の付着を抑制することが報告されている。一方、同じグラム陰性菌である *A.actinomycetemcomitans* では、他の細菌と培養方法が異なり 5%$CO_2$下と酸素濃度の低い条件下で培養を行った。ROS によって起こる銀ナノ粒子の膜障害は、培地中の酸素濃度の低下で弱まることもあるため、嫌気性菌は銀ナノ粒子の抵抗性が高まっていることが考えられる。

人工唾液中への溶出試験では液中に銀ナノ粒子又は銀イオンが確認されたが、その濃度は銀ナノ粒子全体の約 1%と微量であり、各細菌に対する MIC の条件を満たしておらず、その効果はほとんどないと考えられる。すなわち、浮遊している銀ナノ粒子同様、基板上に固定された銀ナノ粒子においても、細胞膜の破壊を起点とする抗菌効果を発揮可能であると考えられる。

L929 を用いた細胞毒性試験は、YSZ を生体内で使用する整形外科領域や歯科領域では直接細胞と接触することが考えられるため、生体安全性の評価に適している。銀の原子数濃度の上昇に伴い細胞生存率は減少しており、ISO の規格では細胞生存率が 70%を下回ると細胞毒性が有ると判定されることから、0.2 mM～2.5 mM の範囲では生体材料として利用可能なコーティング量であると判断できた。

Ⅴ．結論

本研究結果より、抗菌性 YSZ はグラム陽性・陰性菌に対して銀ナノ粒子の量に依存して抗菌活性を発揮していることがわかった。特に *E.coli* に対して最も優れた抗菌活性を示しており、L929 に対して 2.5 mM 以下であれば細胞毒性を示さなかった。抗菌性生体材料には抗菌活性と生体安全性のバランスが求められる事から、2.5 mM 以下のコーティング量が適正と考えられる。銀ナノ粒子をコーティングした YSZ は生体安全性に優れ、長期的に口腔内細菌のコントロールが可能であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5482　号 | 山田　理沙 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　若林　則幸<br>副　査　鈴木　敏彦　　宇尾　基弘 | |
| 論 文 題 目 | Ag nanoparticle-coated zirconia for antibacterial prosthesis | |

（論文審査の要旨）

近年の歯科材料の進歩、CAD/CAM 技術の応用により、ジルコニアを用いたオールセラミック修復が盛んに行われるようになってきた。術後の二次う蝕や歯周疾患を引き起こす細菌感染の防止は、装着した補綴装置の長期的予後の確立のために不可欠で有り、抗菌性を有する歯冠補綴装置の材料開発が強く望まれる。しかしながら、通常の補綴装置の製作過程を阻害することなくチェアサイドでも簡便に、また症例に応じてその効果を付与する方法はいまだ確立されていないのが現状である。

本研究は、YSZ に銀ナノ粒子を用いてコーティングを施し、種々の口腔内細菌に対する抗菌活性について評価を行い、さらに生体安全性や各種細菌に対する適正な銀ナノ粒子のコーティング量についての検討したものであり、この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって有意義なものと高く評価できる。

本研究では、YSZ 粉末から、一軸加圧成形により成形体を作製後、1450℃で 2 時間焼成し，焼結体を得た後、アセトン、エタノール、純水にて 10 分間超音波洗浄を 2 回ずつ行い試料としている。試料表面に 0.2、0.5、1.0、2.5、5.0 mM のナノ銀分散液を 30 μL ずつ滴下し、乾燥後 600℃で 30 分間アニール処理を行っている。FE-SEM にて表面微細構造観察を行い、得られた画像を基に画像解析ソフトにて銀ナノ粒子の解析を行っている。アニール処理後の銀ナノ粒子の酸化への影響を確認するために薄膜 X 線回析にて銀の結晶構造解析を行うとともに、X 線光電子分光にて試料表面に付着している銀の定量評価及び電子状態の評価も行っている。

抗菌活性の評価は ISO22196:2007 に基づいて行い、銀ナノ粒子の効果を検討するために、グラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* (NBRC 102135)、*Streptococcus mutans* (MT8148)、グラム陰性菌の *Escherichia coli* (NBRC3972)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC33384)を用いた液体培地、寒天培地を作製し、培養は 37℃24 時間で行っている。*A.actinomycetemcomitans* は GC 液体・寒天培地を用いて 37℃48 時間 5%$CO_2$ 下で培養を行っている。各細菌を前培養し、濃度調整を行った菌液を用いて試料上に播種、プラスチックフィルムで被覆し培養した($n$ = 6)。試料上の菌液を希釈し、寒天培地に播種し、37℃24 時間培養後、形成されたコロニー数から生菌数の評価を行っている。

人工唾液中への銀の溶出量を検討するために、加速溶出試験を行っている。試料は 1mL・37℃の人工唾液中に 1、7 日間静置し($n$ = 3)各期間後に人工唾液は全量交換し計測を行ってい

る。イオンの溶出量はICP発光分光分析にて解析を行っている。

細胞毒性の評価はISO10993-5に基づいて行っている。

このように、本研究方法は周到な実験計画に基づいて遂行されており、必要かつ十分で正確な結果の得られる妥当な方法といえる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1.　コーティングした銀ナノ粒子は球状を呈し、YSZ 試料表面に均一に分散していた。またコーティング量の上昇に伴い、分散している銀ナノ粒子の直径と標準偏差は 19.7 ± 14.3 nm (0.2 mM), 23.4 ± 13.5 (0.5 mM), 30.6 ± 11.2 nm (1.0 mM), 41.3 ± 18.7 nm (2.5 mM), and 46.1 ± 20.4 nm (5.0 mM)と増加していた。XRDによる表面の結晶構造では、いずれの試料も正方晶ジルコニアのピークを認めた。XPSによる表面解析では、ワイドスキャンの結果より、いずれの試料にも YSZ 表面に Zr、Y、O、C、Ag に一致するピークを認め、相対元素比を求めたところ、コーティング濃度の増加に比例して試料表面の銀の元素比の増加を認めた。ナロースキャンにて銀のピークを詳細に検討したところコーティングした銀ナノ粒子は Ag と AgO と $Ag_2O$ で構成されていた。

２．　コーティングした試料上で培養した各細菌の生菌数は、グラム陽性・陰性菌共に銀の原子数濃度の上昇に伴い減少した。口腔内における長期的な抗菌効果を検討するために、低いpHに調整した人工唾液を用いてYSZ表面からの銀ナノ粒子の溶出量を計測した結果、1日後には少量の銀ナノ粒子が溶出しており、7日後わずかではあるが溶出量は増加した。L929の細胞生存率をMTTアッセイにて検討した結果、銀の原子数濃度の上昇に伴って細胞生存率は減少し、5 mMが64.7%と最も低い細胞生存率を示し、ISO規格の基準である細胞毒性の基準を下回った。

以上の結果から、抗菌性 YSZ はグラム陽性・陰性菌に対して銀ナノ粒子の量に依存して抗菌活性を発揮していることがわかった。特に*E.coli*に対して最も優れた抗菌活性を示しており、L929に対して2.5 mM以下であれば細胞毒性を示さなかった。抗菌性生体材料には抗菌活性と生体安全性のバランスが求められる事から、2.5 mM以下のコーティング量が適正と考えられる。銀ナノ粒子をコーティングした YSZ は生体安全性に優れ、長期的に口腔内細菌のコントロールが可能であることが示唆されたことは高く評価できる。

このように、本論文は歯冠修復を行う際に有用な示唆を与えるものであり、歯科補綴学ひいては歯学全般の進歩、発展に寄与するところが大である。よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 三好　智絵 |
| 論文審査担当者 | 主査　荒木　孝二<br>副査　俣木　志朗　　鶴田　潤 |
| 論　文　題　目 | Effects of an interactive simulation material for clinical dentistry on knowledge acquisition |

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

本研究は意思決定を伴うコンピュータシミュレーション教材の知識獲得と不安軽減に対する効果を明らかにすることを目的として行われた。対象は東京医科歯科大学歯学部歯学科 4 年生とし、あらかじめ対象者を無作為に I 群と D 群に分けた。対象者には、状況シナリオの黙読、麻酔抜髄に関する双方向型教材（I 群）もしくは表示型教材（D 群）での学習、新版 STAI 状態 - 特性不安検査、知識獲得を評価するための学習効果測定テスト、教材に関するアンケートを実施させた。双方向型教材での学習に意思決定が伴うことを除いて、両教材の学習内容・素材は全て同一のものとした。特性不安と学習効果測定テストは対応のない *t* 検定で、アンケートは Fisher の正確確率検定で、状態不安は二元配置反復測定分散分析後 Bonferroni の多重比較法で、結果を分析した。学習効果測定テストでは I 群の点数が D 群の点数より有意に高かった（I: 75.4±1.4、D: 60.6±2.7、$p<0.001$）。教材の操作性に関する一つの質問（$p<0.05$）を除く全てのアンケート項目で、群と回答に有意な関連は認められなかった。状態不安に対する主効果が測定時点間に認められた（$p<0.001$）。状態不安は状況シナリオ黙読後に有意に上昇し（$p<0.001$）、教材学習後に有意に減少した（$p<0.001$）。以上のことから、意思決定を伴うコンピュータシミュレーション教材は、学習直後の知識獲得に効果があることが示唆された。

〈緒言〉

東京医科歯科大学ではコンピュータ支援教育を行っており、その際使用するシミュレーション教材に対しては学生からの評価が高く、e ラーニング教材として販売もされている。歯学教育において理論型コンピュータシミュレーション教材が学習改善に寄与しているとの報告もあるが、教材のどの要素が教育効果に寄与しているのかは明らかにされていない。

一般的に教育効果は、ストレスや不安など心理的要因にも影響されるといわれている。歯科医は他の職業に比べ強いストレスを伴う職業で、学生も強いストレスを抱えているとの報告もある。不安は成績や成果に影響を与えるため、歯学教育において不安を取り除くことは重要だといえる。

我々はシミュレーション教材における意思決定を促す双方向性が知識獲得に効果的であるという仮説を検証するため、同内容で教材資料や教材説明文・解説文が同一の、学習者による意思決

定の有無だけが異なる 2 つの教材を作成し、歯学科学生に応用して学習効果を評価した。加えて、不安軽減に対する効果を新版 STAI 状態 - 特性不安検査（以下 STAI）を用いて評価した。STAI は不安測定心理検査であり、今現在の不安を評価する状態不安と、個人の不安になりやすい傾向を評価する特性不安を測定できる。

〈方法〉

本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得ており（No.1146）、全ての被験者からインフォームドコンセントを得て実施した。研究実施前に、本研究の結果は成績には影響しないことを説明した。

対象者は 2014 年度東京医科歯科大学歯学科 4 年生 41 名と 2015 年度東京医科歯科大学歯学科 4 年生 53 名、あわせて 94 名とし、研究はコンピュータシミュレーション実習ユニットの授業中に行った。我々は麻酔抜髄に関する 2 種類の展開形式の教材（双方向型および表示型）を作成した。双方向型教材で学ぶ学習者は、教材が示す状況下において次に何をすべきか、選択肢の中から正しいものを選び意思決定するよう求められ、次の画面で選択の正誤に関わらずフィードバックを提供される形で学習を進める。一方表示型教材で学ぶ学習者は、双方向型教材と同一の教材資料と説明文、フィードバックを再構成した解説文を意思決定の機会なく提供される形で学習を進める。双方向型教材で意思決定をする機会があること以外、両者の教材内容、資料は同一とした。

我々は対象者を無作為に 2 群に分けた（I 群：2014 年度 21 名、2015 年度 26 名、D 群：2014 年度 20 名、2015 年度 27 名）。対象者には e ラーニングシステム WebClass 上で以下の検査や学習を実施させた。最初に STAI で開始時点の状態不安と特性不安を測定した。次に、口腔内写真などを掲載した状況説明シナリオを提示し、黙読させた。内容は、「今あなたは歯学科 6 年生で、右上第 2 小臼歯の急性歯髄炎と診断される患者に対応しており、一人で麻酔抜髄を実施するよう指導された。」と設定した。シナリオ黙読後、状態不安のみ測定した。測定後、I 群の学生には双方向型教材で、D 群の学生には表示型教材で学習させた。教材による学習後、状態不安の測定、学習効果測定テスト、教材評価に関するアンケートを実施した。学習効果測定テストは知識獲得を評価するため、双方向型教材で意思決定を求められた設問とは異なる問題を回答させた。両教材は最後に全員が学習できるよう提供した。

SPSS Ver.24 を用いて、特性不安と学習効果測定テストの結果は対応のない $t$ 検定で、アンケート結果は Fisher の正確確率検定で、状態不安の結果は二元配置反復測定分散分析後 Bonferroni の多重比較法で分析し、状態不安、特性不安及び学習効果測定テスト成績間の関係の強さは Pearson の積率相関係数を算出した。有意水準は 5%とした。

〈結果〉

I 群 47 名、D 群 47 名のうち、当日欠席した者、結果に不備のある者を除いた I 群 42 名、D 群 37 名より結果を得た。

学習効果測定テストでは I 群の点数が D 群の点数より有意に高かった（I: 75.4±1.4、D: 60.6±2.7、 $p<0.001$）。教材の操作性に関する「本教材の操作性は、良かったですか？」という

質問（$p<0.05$）を除く全てのアンケート項目で、各群と回答に有意な関連は認められなかった。両群間の特性不安に有意差が認められた（$p<0.01$）。状態不安に対する測定時点と群間の交互作用は認められなかった　（$F(2,154)=2.603$, $p=0.077$）。測定時点による主効果は認められたが（$p<0.001$）、群による主効果は認められなかった（$p=0.065$）。Bonferroni の多重比較法によると、状態不安は状況シナリオ黙読後に有意に上昇し（$p<0.001$）、教材学習後に有意に低下した（$p<0.001$）。D 群において特性不安と学習効果測定テストの成績に弱い正の相関が認められ、I 群 D 群ともに、状態不安と特性不安に有意な正の相関が認められた。

〈考察〉

学習効果測定テストの群間比較結果より、双方向型教材で学習した学生は問題解決の方法を意思決定後、フィードバックを得ることで学習内容を知識として獲得できたため、テストで好成績になったのだと考えられる。一方表示型教材で学習した学生は、意思決定の機会がなく、教材が講義や模型実習のおさらいとなり、学習内容を新たな知識として獲得することが困難だったと考えられる。また相関関係より、特性不安が高い学生ほど真剣に表示型教材に取り組み、双方向型教材の学習では特性不安に依存しない学習効果が得られたと推測された。本研究を実施した授業では、150 本の様々な歯学分野を網羅したシミュレーション教材が提供されている。今回は歯内治療学分野の教材で学習効果と不安軽減の効果を調べたが、今後は他分野の教材についても同様の結果が得られるか検討したい。さらに正確な学習効果を測るため、学業成績の事前測定も検討したい。

I 群 D 群ともに教材に対する評価は高かった。教材内の教材資料を治療過程とあわせてみることで、理解が深まったためと考えられる。「本教材の操作性は、良かったですか？」という操作性に対する質問に対して意見が分かれたのは、表示型教材では画面の都合上、説明文を全て読むためのスクロール回数が多くなるためだと推測された。

これまで教育技法が学習効果や学習者満足度に違いを生むことがいくつかの論文で発表されている。PBL における教科書学習とビデオ学習の比較報告、内視鏡学習における教科書学習と映像学習の比較報告、講義、website、配布資料、チュートリアルの比較報告、ビデオポッドキャストと講義の比較報告、双方向性ビデオと非双方向性ビデオなどの比較報告などがその例である。上記の報告における双方向性とはビデオコンテンツの操作性を意味しており、我々の研究における、学習者が教材内で意思決定することを意味する双方向性とは異なる。今回は、教材学習直後における知識獲得の成果を評価した。記憶の定着を評価するためには、教材学習した数週間後に同テストを実行するなど、さらなる研究が必要である。

不安変動に関し、両教材とも状態不安は教材学習後に低下することが示唆された。しかし、不安変動のベースラインと考えられる特性不安に有意な群間差が生じてしまったため、今回の研究では　I 群 D 群間で状態不安の結果を議論することは困難である。今後の研究では、特性不安を事前測定し、平均値等が同等になるように対象者を無作為割付することが望ましいと思われる。

〈結論〉

臨床歯学教育において、臨床的意思決定を組み込んだ双方向型教材が知識獲得に効果的である

ことが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5483　号 | 三好　智絵 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　荒木　孝二<br>副　査　俣木　志朗　　鶴田　潤 | |
| 論 文 題 目 | Effects of an interactive simulation material for clinical dentistry on knowledge acquisition | |

（論文審査の要旨）

東京医科歯科大学ではコンピュータ支援教育を行っており、その際使用するシミュレーション教材に対しては学生からの評価が高く、e ラーニング教材として販売もされている実績がある。歯学教育において理論型コンピュータシミュレーション教材が学習改善に寄与しているとの報告もあるが、教材のどの要素が教育効果に寄与しているのかは明らかにされていない。

本研究は意思決定を伴うコンピュータシミュレーション教材の知識獲得に対する効果を明らかにすることを目的として行われた。シミュレーション教材を通常講義授業や、アクティブラーニングに活用する際、より学習効果の高いシミュレーション教材を開発、提供することに貢献すると考えられ、高く評価できる。また同時に、新版 STAI 状態 - 特性不安検査を用い、教育効果に影響を与えるといわれる不安の軽減についても評価した。

対象者は 2014 年度東京医科歯科大学歯学科 4 年生 41 名と 2015 年度東京医科歯科大学歯学科 4 年生 53 名、あわせて 94 名とし、無作為に 2 群に分けた（I 群：2014 年度 21 名、2015 年度 26 名、D 群：2014 年度 20 名、2015 年度 27 名）。対象者には、状況シナリオの黙読、麻酔抜髄に関する双方向型教材（I 群）もしくは表示型教材（D 群）での学習、新版 STAI 状態 - 特性不安検査、知識獲得を評価するために作成された教材内容を踏まえた学習効果測定テスト、教材に関するアンケートを実施させた。特性不安と学習効果測定テストは対応のない $t$ 検定で、アンケートは Fisher の正確確率検定で、状態不安は二元配置反復測定分散分析後 Bonferroni の多重比較法で、結果を分析した。

本研究で得られた結果は以下のとおりである。

1.学習効果測定テストにおいて、双方向型教材で学習した I 群の点数の方が、表示型教材で学習した D 群の点数より有意に高かった。

2.群と状態不安測定時点に交互作用は認められなかったが、測定時点による主効果は認められた。群による主効果は認められなかった。状態不安はシナリオ黙読後に有意に上昇し、教材学習後に有意に減少した。シナリオ黙読前の特性不安において両群間に有意差が生じたため、本研究において不安変動について議論することは困難であった。

3.アンケートにおいて、教材の操作性に関する質問を除く項目で、各群と回答に有意な関連は認められなかった。

4. D 群において特性不安と学習効果測定テストの成績に弱い正の相関が認め、I 群 D 群とも

に、状態不安と特性不安に有意な正の相関が認めた。

以上の結果より，臨床歯学教育において、臨床的意思決定を組み込んだ双方向型教材が知識獲得に効果的であることが示唆された。

本研究は、意思決定を組み込んだ双方向型シミュレーション教材の学習効果を客観的指標で評価した研究である。本研究の結果から、シミュレーション教材の要素として、意思決定の存在が知識獲得に効果的であることが明らかとなった。シミュレーション教材は今後 e ラーニングやアクティブラーニングなどの教育手法を歯科医学教育の中で推進していくにあたり、重要な教材となっていくことが予想される。本報告は、今後開発するシミュレーション教材が効果的な学習効果を持つために必要な要素を示しており、教材開発の指針として活用されることが期待される。双方向型シミュレーション教材の学習効果を解明していくことは歯科医学教育にとって有用であり、本研究は今後の歯科医学教育の進歩に寄与すると考えられる。よって、本論文は博士(歯学)の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 庄司　あゆみ |
| 論文審査担当者 | 主査　　小野　卓史<br>副査　　青木　和広　　中濵　健一 |
| 論　文　題　目 | Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement *via* RANKL expression |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

矯正力の負荷に伴い、歯槽骨では骨の再構築、すなわち骨リモデリングを介して歯が移動する。圧迫側での歯槽骨吸収には破骨細胞が必須である。しかし、この骨リモデリングの鍵となる破骨細胞の分化誘導機構については、いまだ不明な点が多い。

生体の長管骨におけるモデリングやリモデリング時には、骨芽細胞や骨細胞など様々な細胞が破骨細胞分化因子 RANKL（遺伝子名: *Tnfsf11*）を発現し、破骨細胞分化を支持することが明らかになっている。一方、矯正学的歯の移動において歯周組織のどの細胞が RANKL を発現し破骨細胞の分化誘導の鍵となっているのかは不明である。

本研究では、矯正学的歯の移動に伴う歯槽骨リモデリングにおいて、骨細胞が RANKL の主要な発現細胞であることを個体レベルで明らかにした。歯周組織構成細胞を単離する新規分画法を確立し RANKL 発現を解析した結果、歯根膜細胞や骨芽細胞と比較し、骨細胞で RANKL の高い発現が見出された。骨細胞が発現する RANKL の重要性を個体レベルで明らかにするため、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウスを作出し、矯正力による歯の移動を解析した。このマウスにおいては圧迫側における破骨細胞数が減少し、歯の移動量が低下した。以上のことから、矯正力に伴う歯槽骨リモデリングにおいては、骨細胞が骨吸収を制御する RANKL の主要な発現細胞であることが明らかになった。

＜緒言＞

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成によって動的な恒常性を保ちながら常に作り替えられている。この再構築現象は「骨リモデリング」と呼ばれ、骨組織の強度とミネラル代謝などの機能の維持に重要である。内分泌系、免疫系、神経系など様々な生体システムが刺激に応じて骨リモデリングを調節することが知られている。

歯を支持する歯槽骨も同様に、生涯を通じて再構築を繰り返している。歯槽骨リモデリングは歯を含む顎顔面組織によって形成される力学的環境により制御されている。矯正学的な歯の移動過程において、歯根周囲の歯槽骨では緻密に制御された骨リモデリングが起こる。矯正力負荷時の力学的刺激は歯周組織構成細胞を刺激し、歯槽骨の圧迫側では骨吸収を、牽引側では骨形成を誘導する。しかしながら、矯正力による歯槽骨リモデリング誘導機構には不明な点が多いのが現状である。

圧迫側での骨吸収を担う破骨細胞は、単球/マクロファージ系前駆細胞の融合によって形成される多核巨細胞である。破骨細胞の分化には RANKL 発現細胞による支持が必須であり、RANKL や RANK を欠損するマウスは破骨細胞の欠如により重度の大理石骨病および歯の萌出不全を呈する。骨芽細胞や骨髄間葉系細胞は RANKL を発現するため破骨細胞分化の支持細胞であると考えられてきたが、近年、骨細胞由来の RANKL が骨リモデリングに大きく貢献していることが明らかになった。

骨細胞は骨基質中に埋入した細胞であり、骨組織中に最も豊富に存在する。骨細胞は骨細管中に細胞突起を伸展し、これらがギャップ結合によって連結することで細胞間ネットワークを形成している。このネットワーク構造は力学刺激の受容と細胞間の情報伝達に適しているとされており、骨細胞のメカノセンサーとしての役割が注目されている。骨細胞の矯正学的歯の移動への関与が示唆されているものの、その制御メカニズムはいまだ十分には解明されていない。

本研究により、骨細胞が歯周組織構成細胞の中で RANKL を高く発現すること、骨細胞由来の RANKL が歯の矯正学的移動において破骨細胞分化を誘導することが示された。

＜方法＞

<u>実験動物</u>

実験に使用した動物は 12 週齢雄性マウス(C57BL6/J)とした。骨細胞由来の RANKL の作用の検討のため、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウス(*Tnfsf11*$^{flox/\Delta}$ *Dmp1*-Cre マウス)を作出した。また、同腹仔の *Tnfsf11*$^{flox/+}$ *Dmp1*-Cre マウスをコントロールマウスとした。

<u>矯正力負荷モデル</u>

マウスの上顎切歯と左側第一臼歯間に NiTi クローズドコイルスプリングを 0.9 mm ステンレススチールワイヤーにて装着し、矯正力を負荷するモデルを用いた。矯正力負荷後、安楽死させたマウスより上顎骨を摘出、70%エタノールにて固定しマイクロ CT 撮像を行った。第一臼歯と第二臼歯間の距離を歯の移動量として画像解析ソフトウェアにて計測した。また上顎骨のパラフィン切片を作製し、TRAP 染色およびヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行った。上顎第一臼歯遠心頬側根の圧迫側における破骨細胞数（N.Oc/BS）および同根の牽引側における骨芽細胞面

(Ob.S/BS) を計測した。

抗 RANKL 中和抗体投与

矯正力負荷と同時に、10 μg の抗 RANKL 中和抗体(OYC1)またはコントロール抗体を連日投与した。投与部位は上顎第一臼歯の頬側および口蓋側周囲とし、矯正力負荷後に歯の移動量を解析した。

歯周組織の遺伝子発現解析

歯根周囲の RANKL の発現は、まず野生型マウス顎骨から顕微鏡下で 25G 針を用いて臼歯を抜歯し、抜歯後の歯槽骨周囲軟組織を除去し PBS により洗浄した。0.1% collagenase と 0.2% dispase の混合溶液にて酵素処理を３度行い、１度目及び３度目の画分は破棄、２度目の画分を骨芽細胞画分として PBS で再懸濁した。酵素処理後の歯槽骨を骨細胞画分として用いた。抜去歯周囲の軟組織を歯根膜画分として RNA を抽出した。

各画分の RNA より cDNA を合成し、遺伝子発現を qRT-PCR 法にて解析した。分画法の精度の評価は歯根膜細胞マーカーの scleraxis (*Scx*)、骨芽細胞マーカーの keratocan (*Kera*)および骨細胞マーカーの dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (*Dmp1*)発現を指標に行い、各々の画分の RANKL (*Tnfsf11*)発現を評価した。

＜結果＞

実際の矯正歯科治療を再現するため、矯正力負荷モデルを用いて歯の移動実験を施行した。まず本研究における適切な矯正力負荷のタイムコースについて検討したところ、矯正力負荷後 4 日目と 8 日目及び 12 日目では歯の移動量に有意差が認められたが、8 日目と 12 日目では差がなかった。また圧迫側での破骨細胞数も 4 日目と 8 日目及び 12 日目では有意差が認められたが、8 日目と 12 日目では差がなかったことから、本研究における矯正力負荷は 8 日間とした。

次に、矯正学的歯の移動に対する RANKL の作用を明らかにするため、OYC1 を用いた。OYC1 投与群においては対照群と比較して歯の移動が有意に減少したことから、矯正学的歯の移動に RANKL は必須であることが示された。

さらに、歯周組織構成細胞のうち RANKL を高発現する細胞を検討するため、野生型マウス歯周組織の構成細胞の分画法を確立した。その結果、歯根膜細胞画分では歯根膜特異的マーカーである *Scx* が高発現を示した。また、歯槽骨の酵素処理により得られた骨細胞画分において *Dmp1* などの骨細胞特異的マーカーが高い発現を示した一方、骨芽細胞特異的マーカーである *Kera* の発現は低い値を示した。以上のことから、正確なフラクショネーションが確認できたため、各画分における RANKL の発現を比較したところ、骨芽細胞や歯根膜細胞と比較して骨細胞で有意に高いことが見出された。

骨細胞由来の RANKL の作用を生体レベルで明らかにするため、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウスでの歯の移動実験を行ったところ、コントロールマウスと比較して歯の移動量が有意に低下し、圧迫側における TRAP 陽性破骨細胞数が減少していた。さらに、興味深いことに牽引側での骨芽細胞の出現も同様に減少していた。

＜考察＞

本研究から、矯正学的歯の移動における破骨細胞分化は、骨細胞が発現する RANKL により誘導されることが明らかになった。

まず、矯正学的歯の移動には RANKL が大きく貢献することを、中和抗体を用いた実験により実証した。これらの結果は、RANKL の局所遺伝子導入による歯の移動の促進、RANKL のデコイ受容体である osteoprotegerin（OPG）投与による歯の移動の抑制などの既報と同様に、RANKL-RANK シグナル伝達が矯正力により誘発される破骨細胞分化および歯の移動の重要な調節因子であることが示された。

矯正学的歯の移動における破骨細胞の分化支持細胞を明らかにすることは歯科医学において大きな課題であった。これまで、組織学的解析により、歯根膜細胞、骨芽細胞および上皮細胞を含む様々な細胞における RANKL 発現が報告されているが、細胞および生体レベルでの検討が乏しく、これらの細胞が実際に歯の移動に関与するかは不明であった。本研究では、歯周組織から各細胞種を得るための新規単離法を確立し、骨細胞は歯根膜細胞および骨芽細胞と比較して、極めて高い RANKL 発現量を示すことを細胞レベルで明らかにした。さらに、骨細胞特異的な RANKL 欠損マウスでは、矯正学的な歯の移動が有意に抑制されることを見出した。

本研究成果は、骨細胞に標的を絞った薬物の局所適用が RANKL の発現を調節することにより、矯正歯科治療において効果的な歯の移動の調節に寄与する可能性を示唆する。

＜結論＞

本研究は、矯正力に伴う骨吸収において、骨細胞が歯槽骨リモデリングを制御する RANKL の主要な発現細胞であることを細胞および生体レベルで明らかにした。この成果は、矯正力に伴う破骨細胞分化誘導の詳細な制御機構を解明するための一助となり、今後の矯正歯科治療における新規治療法開発の分子基盤の確立につながることが期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5484　号 | 庄司　あゆみ |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　小野　卓史<br>副　査　　青木　和広　　中濵　健一 | |
| 論　文　題　目 | Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement *via* RANKL expression | |

（論文審査の要旨）

矯正力の負荷に伴い、歯槽骨では骨の再構築、すなわち骨リモデリングを介して歯が移動する。圧迫側での歯槽骨吸収には破骨細胞が必須である。しかし、この骨リモデリングの鍵となる破骨細胞の分化誘導機構については、いまだ不明な点が多い。

生体の長管骨におけるモデリングやリモデリング時には、骨芽細胞や骨細胞など様々な細胞が破骨細胞分化因子 RANKL（遺伝子名: *Tnfsf11*）を発現し、破骨細胞分化を支持することが明らかになっている。一方、矯正学的歯の移動において歯周組織のどの細胞が RANKL を発現し破骨細胞の分化誘導の鍵となっているのかは不明である。

以上の背景から、申請者は、矯正力負荷に応答して RANKL を産生し、破骨細胞による骨吸収とそれに伴う歯の移動を制御する主要な細胞について検討した。

実験動物として、12 週齢雄性マウス(C57BL6/J)を用いた。また、骨細胞由来の RANKL の作用の検討のため、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウス(*Tnfsf11*$^{flox/\Delta}$ *Dmp1*-Cre マウス)を作出した。また、同腹仔の *Tnfsf11*$^{flox/+}$ *Dmp1*-Cre マウスをコントロールとした。マウスの上顎切歯と左側第一臼歯間に NiTi コイルスプリングを装着し、矯正力を負荷するモデルを用いた。矯正力負荷後、マウスの上顎骨を 70%エタノールにて固定しマイクロ CT 撮像を行い、第一臼歯と第二臼歯間の距離を歯の移動量として画像解析ソフトウェアにて計測した。また上顎骨のパラフィン切片を作製し、TRAP 染色およびヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行った。上顎第一臼歯遠心頬側根の圧迫側における破骨細胞数および同根の牽引側における骨芽細胞面を計測した。また 10μg の抗 RANKL 中和抗体(OYC1)を用いて歯の移動実験を行った。投与部位は上顎第一臼歯の頬側および口蓋側周囲とし、矯正力負荷開始から連日投与後、歯の移動量を解析した。歯根周囲の RANKL の発現は、野生型マウス顎骨から、歯周組織の構成細胞を分画し、qRT-PCR 法にて解析した。分画法の精度の評価は歯根膜細胞マーカーの scleraxis (*Scx*)、骨芽細胞マーカーの keratocan (*Kera*)および骨細胞マーカーの dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (*Dmp1*)発現を指標に行い、各々の画分の RANKL (*Tnfsf11*)発現を評価した。以上より、申請者の研究は適切な研究デザインのもと遂行されており、矯正力負荷時の RANKL 発現を十分に検討しうる実験系を構築し、分子生物学的手法を用い詳細に分析・考察している点で学術的価値は高く評価できる。

また、研究結果として、以下の知見を得ている。

実際の矯正歯科治療を再現するため、まず本研究における適切な矯正力負荷のタイムコースについて検討したところ、矯正力負荷後 4 日目と 8 日目及び 12 日目では歯の移動量に有意差が認められたが、8 日目と 12 日目では差がなかった。また圧迫側での破骨細胞数も 4 日目と 8 日目及び 12 日目では有意差が認められたが、8 日目と 12 日目では差がなかったことから、本研究における矯正力負荷は 8 日間とした。

次に、矯正学的歯の移動に対する RANKL の作用を明らかにするため、OYC1 を用いた。OYC1 投与群においては対照群と比較して歯の移動が有意に減少したことから、矯正学的歯の移動に RANKL は必須であることが示された。

さらに、歯周組織構成細胞のうち RANKL を高発現する細胞を検討するため、野生型マウス歯周組織の構成細胞の分画法を確立した。その結果、歯根膜細胞画分では歯根膜特異的マーカーである *Scx* が高発現を示した。また、歯槽骨の酵素処理により得られた骨細胞画分において *Dmp1* などの骨細胞特異的マーカーが高い発現を示した一方、骨芽細胞特異的マーカーである *Kera* の発現は低い値を示した。以上のことから、正確なフラクショネーションが確認できたため、各画分における RANKL の発現を比較したところ、骨芽細胞や歯根膜細胞と比較して骨細胞で有意に高いことが見出された。

骨細胞由来の RANKL の作用を生体レベルで明らかにするため、骨細胞特異的 RANKL 欠損マウスでの歯の移動実験を行ったところ、コントロールマウスと比較して歯の移動量が有意に低下し、圧迫側における TRAP 陽性破骨細胞数が減少していた。

以上のように、申請者は矯正学的歯の移動には RANKL が大きく貢献することを、中和抗体を用いた実験により実証した。これらの結果は、RANKL の局所遺伝子導入による歯の移動の促進、RANKL のデコイ受容体である osteoprotegerin 投与による歯の移動の抑制などの既報と合致するものであり、RANKL-RANK シグナル伝達が矯正力により誘発される破骨細胞分化および歯の移動の重要な調節因子であることが示された。

これまで、組織学的解析により、歯根膜細胞、骨芽細胞および上皮細胞を含む様々な細胞における RANKL 発現が報告されているが、細胞および生体レベルでの検討が乏しく、これらの細胞が実際に歯の移動に関与するかは不明であった。本研究では、歯周組織から各細胞種を得るための新規単離法を確立し、骨細胞は歯根膜細胞および骨芽細胞と比較して、極めて高い RANKL 発現量を示すことを細胞レベルで明らかにし、骨細胞特異的な RANKL 欠損マウスでは、矯正学的な歯の移動が有意に抑制されることから矯正力負荷時の骨細胞の RANKL の重要性を示した初めての報告である。

本研究の結果は、骨細胞に標的を絞った薬物の局所適用により RANKL 発現を調節することができれば、矯正歯科治療における効果的な歯の移動調節が可能となることを示唆している。

以上より、本研究の着眼点とその成果は高く評価され、基礎および臨床歯学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 添田　ひとみ |
| 論文審査担当者 | 主査　鈴木　哲也<br>副査　古屋　純一　　豊福　明 |
| 論　文　題　目 | A structural equation model to assess the influence of neuroticism on oral health-related quality of life in complete denture wearers |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

全部床義歯装着者における神経症傾向と口腔関連QOLの関連性とOral Health Impact Profile (OHIP)における下位尺度（機能制限，痛み，心理的不快感，障害，ハンディキャップ）の関係性を共分散構造分析を用いて解析した．被験者は本学歯学部附属病院にて上下顎全部床義歯を新製する方針となった無歯顎者248名とした．本研究の結果，全部床義歯装着者の神経症傾向が口腔関連QOLに影響を及ぼしている可能性が示された．

＜緒言＞

先進国において無歯顎者率は減少しているが，高齢化により無歯顎補綴の需要は減少していないと考えられる．McGillコンセンサスによると，2本のインプラントを用いたオーバーデンチャーが下顎無歯顎治療のスタンダードとされているものの，経済状況や，全身状態，骨の状態，等の理由によりすべての無歯顎者が受けられるとは限らず，従来の全部床義歯治療の満足度の予測因子を理解することは依然として重要である．義歯満足度は口腔関連 QOL と因果関係が確認されており，これまで全部床義歯満足度に関する研究において，下顎顎堤形態，下顎義歯の維持・安定などの要因があげられてきた．しかし，患者の性格，とりわけ神経症傾向が全部床義歯満足度および口腔関連 QOL へ与える影響については可能性が取り沙汰されているのみである．そこで，本研究の目的は，全部床義歯装着者において神経症傾向が口腔関連 QOL に与える影響と構造を明らかにすることである．Locker（1988）は疾患を源流とし，欠損が機能の制限や心理的不快感へつながり，さらに，障害を通してハンディキャップへつながるという概念を歯科に取り入れた．この概念を実証したのがBakerモデル(2007)で，口腔関連QOLの指標とされるOHIPにおける下位尺度間の関係を示している．本研究ではこのBakerモデルをもとに，神経症傾向の高低でモデル構造に差が出るか共分散構造分析を用いて検討した．

＜方法＞

被験者は2009年度から2012年度に，本学歯学部附属病院にて上下顎全部床義歯を新製する方針となった無歯顎者248名（男性105名，女性143名：平均年齢75.1±9.2歳）とした．欠損値

を伴う被験者のデータは削除し，199 名（男性 83 名，女性 116 名：平均年齢 75.3±9.2 歳）のデータを統計解析に採用した．

口腔関連 QOL を OHIP-EDENT-J で，神経症傾向をアイゼンク質問票により評価した．被験者をアイゼンク質問票のスコアが中央値であった 14 以下の 104 名を神経症傾向低群に，15 以上の 95 名を神経諸傾向高群に分けた．

全部床義歯の予後予測因子として先行研究で示されている下顎義歯の維持・安定および下顎顎堤形態について Baseline data として調べた．維持安定は Kapur 分類を，顎堤形態は Cawood & Howell 分類を用いた．

下位尺度スコアと神経症傾向スコアの Pearson の相関係数を調べ, 交絡因子の有無を確認した．0.85 以上で交絡ありとした．

両群の OHIP 回答傾向の差を調べるため，従来の下位尺度（機能制限，痛み，心理的不快感，身体的障害，心理的障害，社会的障害，ハンディキャップ）7 つについて Mann-Whitney 検定を行い，$p<0.05$ で有意差ありとした．

今回の研究では，Baker の先行研究をもとに全部床義歯装着者において神経症傾向低群および高群ともに，機能制限が痛みに，機能制限および痛みが心理的不快感に，機能制限および痛みおよび心理的不快感が障害に，障害がハンディキャップに影響すると仮定した．

統計解析には共分散構造分析を用いた．共分散構造分析は重回帰分析では表現できない多変量間の複雑な関係をパス図により視覚的に表現でき，直接効果と間接効果を分けて表現することが可能である．仮説に基づくシナリオを視覚的に表現し，客観的に検証できる．パスとパス係数により要因間の関係の強弱を数値化し, 潜在変数を用いることで複数の要因をまとめて分析できる．母数推定には最尤法およびランダムサンプルを 1000 とするブートストラップ法を用いた．統計ソフトは AMOS17.0（SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan）を用い，標準化直接効果値，間接効果値，総合効果値を推定した．効果値は，0.1 以下で small effect，0.3 前後で medium effect，0.5 以上で large effect とされる．有意水準は 5%とした．

また，２群が同一の集団かを検討するために多母集団分析を行った．多母集団分析は，標本を抽出した複数の集団が異なる母集団であるかを検討することが可能であり，複数の母集団から抽出された標本を同時に分析することで，モデル全体における母集団間での差異の有無の検討が可能となる．複数の集団で共通して適用されるパス図を構成し，集団ごとに適合度が良いことが確認された後，集団間でパス図は一緒で，推定値はそれぞれ異なってもよいという配置不変性を仮定し，検討を行う．配置不変性が確認された場合，すべての推定値がそれぞれ等しいという等値制約の仮定を検討し，すべての母数で等値制約が成り立つ場合には等質な集団とみなす．

サンプルサイズは自由母数一つ当たり 10 が必要とされている．Baker モデルは自由母数が 7 つであるためサンプルは 70 以上必要である．今回の研究では神経症傾向低群および高群においてサンプル数はそれぞれ 104，95 であり，ともに必要数を満たしていた．

モデル適合度指標は SRMR，RMSEA，GFI，$p$ 値を用いた．モデル適合度は一般的に，SRMR は 0.08 以下が好ましく，RMSEA は 0.05 以下で close fit，0.05 と 0.08 の間で reasonable fit，0.1 以上で poor fit とされている．GFI は 0.95 以上で good fit，$p$ 値は 0.05 以下で poor fit とされている．

＜結果＞

Baseline data として調査した下顎義歯の維持・安定，下顎顎堤形態についてはいずれも両群間に差はなかった．

下位尺度スコアと神経症傾向スコアの Pearson の相関係数は機能制限で 0.03，痛みで 0.14，心理的不快感で 0.09，障害で 0.25，ハンディキャップで 0.21 であり，交絡因子は存在しなかった．

OHIP 回答傾向は，社会的障害，ハンディキャップにおいて両群間で有意差が認められた．

共分散構造モデルにおいて，片矢印（→）は仮定された関連を示す．神経症傾向低群および高群での標準化総合効果値はそれぞれ，機能制限→痛みで 0.69 および 0.62，機能制限→心理的不快感で 0.71 および 0.52，機能制限→障害で 0.56 および 0.51，機能制限→ハンディキャップで 0.42→0.40，痛み→心理的不快感で 0.39 および 0.46，痛み→障害で 0.41 および 0.64，痛み→ハンディキャップで 0.31 および 0.51，心理的不快感→障害で 0.64 および 0.46，心理的不快感→ハンディキャップで 0.48 および 0.37，障害→ハンディキャップで 0.75 および 0.80 であり，いずれも $p<0.01$ であった．今回のモデル適合度は神経症傾向の低い群では $p=0.402$，GFI＝0.985，RMSEA＝0.008，SRMR＝0.0257 で基準を満たし，機能制限が痛みおよび心理的不快感へ，痛みが障害および心理的不快感へ，心理的不快感が障害へ，障害がハンディキャップへ直接影響するパス図が採用された．一方，神経症傾向の高い群においては $p=0.179$，GFI＝0.976，RMSEA＝0.078，SRMR＝0.0293 で基準を満たし，神経症傾向低群と同じパス図が採用された．

多母集団分析の結果，配置不変モデルにおいてのモデル適合度は $p=0.243$，GFI＝0.980，RMSEA＝0.038，SRMR＝0.0257 で基準を満たした．一方，等値制約を仮定したモデルでは，$p=0.006$，GFI＝0.953，RMSEA＝0.087，SRMR＝0.0277 であり，等値制約モデルの方が適合度指標値が悪化していた．異質なパスは痛み→障害であった．神経症傾向低群および高群における標準化直接効果値はそれぞれ，機能制限→痛みで 0.69 および 0.62，機能制限→心理的不快感で 0.44 および 0.24，痛み→心理的不快感で 0.39 および 0.46，心理的不快感→障害で 0.64 および 0.46，障害→ハンディキャップで 0.75 および 0.80 であり，神経症傾向低群の痛み→障害のパス以外 $p<0.01$ 以下で有意であった．決定係数は神経症傾向低群および高群においてそれぞれ痛みで 0.47 および 0.39，心理的不快感で 0.58 および 0.40，障害で 0.58 および 0.64，ハンディキャップで 0.56 および 0.63 であり，いずれも $p<0.01$ 以下で有意であった．

＜考察＞

今回の研究では，全部床義歯装着者の神経症傾向低群および高群において共通のモデルが採用された．機能制限が痛みと心理的不快感に，痛みが障害と心理的不快感に，心理的不快感が障害に，障害がハンディキャップに有意な影響を及ぼしていることが確認された．このモデルは先行研究である Baker (2007)，および Locker (1988)による研究を支持していた．社会的障害およびハンディキャップにおいて 2 群間の回答傾向に差がみられたことは，Baker モデルの下流に行くにしたがって差がみられたことを意味しており，モデルの構造の裏付けとなっていると考えられる．

今回の研究では配置不変モデルが採用され，痛み→障害のパスが異質であった．さらに，神経

症傾向高群では痛みから障害への効果値が高く出ており，神経症傾向の高い群においては痛みによる障害への影響が出やすいことが示された．これは２群間の性格による痛みの感じ方の違いによると考えられる．神経症傾向の強い人は，Eysenck (1967)によれば様々の刺激に対し非常に強い情緒的反応を示し，Martin(1985)によればネガティブライフイベントが抑うつにつながりやすい．これらの性質が痛みから障害への影響を強くしていると考えられる．

今回の研究により，神経症傾向が全部床義歯装着者の口腔関連 QOL に負の影響を及ぼしていることが示唆された．今後，神経症傾向およびその他の新しい変数を含めて義歯の成功予測因子に関する分析を行うことが，より正確な診断に必要である．

＜結論＞

全部床義歯装着者において，患者の性格，とりわけ神経症傾向が，口腔関連 QOL に有意な影響を及ぼしている可能性を明らかにした．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲第　5485　号 | 添田　ひとみ |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　鈴木　哲也<br>副　査　豊福　明　　古屋　純一 | |
| 論文題目 | A structural equation model to assess the influence of neuroticism on oral health-related quality of life in complete denture wearers | |

（論文審査の要旨）

全部床義歯の成功因子として顎堤条件，義歯製作法，義歯の質などが取り上げられており，患者の性格，とりわけ，神経症傾向については義歯満足度や口腔関連 QOL との関係が考えられてきた．しかし，口腔関連 QOL に関する研究はいずれも全部床義歯患者に限った調査ではなく，全部床義歯の成功要因がどのように義歯満足度や口腔関連 QOL に影響を及ぼしているのかは明らかになっていない．近年，社会・心理学分野で発展してきた SEM analysis (structural equation modelling analysis, 構造方程式モデリング，共分散構造分析)が歯科分野でも応用されてきている．これは相関・因果関係について多変量を解析可能で，関係性が複雑な事象をモデルにより視覚的に表現することができるのが特徴である．また，SEM を用いた多母集団分析を行うことで同一のパス図が成り立つ複数の集団間の異質性を評価することが可能である．Baker ら(2007)は SEM analysis を用いた口腔関連 QOL 下位尺度間の関係を報告している．

こうした状況を背景に，添田は，全部床義歯の成功因子のうち，患者の性格，とりわけ神経症傾向に着目し，神経症傾向高低での口腔関連 QOL 下位尺度間の関係を全部床義歯患者において検証した．仮説モデルを構築する際には Baker らによる先行研究を参考とし，Functional limitation（機能制限），Pain（痛み），Discomfort（心理的不快感），Disability（社会的・身体的・心理的障害），および Handicap（ハンディキャップ）間の影響度と有意性を SEM analysis により解析した．また，２群間の異質性について多母集団分析を用いて検討した．

被験者は本学歯学部附属病院にて上下顎全部床義歯を新製する方針となった無歯顎患者 199 名とし，口腔関連 QOL を OHIP-EDENT-J，神経症傾向を Modified short-form of the Eysenck Personality Questionnaire (MS-EPQ) の神経症傾向スコアにより評価した．

神経症傾向は中央値 14 で群分けし，スコア 14 以下であった 104 名を神経症傾向低群，15 以上であった 95 名を神経症傾向高群とした．OHIP 下位尺度間の関係については SEM analysis を用いてモデル構築を行い，多母集団分析を用いて異質性の検討を行った．

今回の研究では，Baker による先行研究をもとに全部床義歯装着者において，機能制限が痛み，心理的不快感および障害に，痛みが心理的不快感および障害に，心理的不快感が障害およびハンディキャップに，障害がハンディキャップに直接影響を与えていると仮定した．さらに，仮定したパス図は神経症傾向低群および高群で妥当であり，神経症傾向低群および高群のモデルは異なると仮定した．本研究は綿密な研究計画をもとに実施され，適切な統計学的解析によ

り妥当性の高い結果を導いており，研究計画から考察に至るまで高く評価できる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 神経症傾向低群と高群では共に，機能制限が痛みおよび心理的不快感に，痛みが心理的不快感および障害に，心理的不快感が障害に，障害がハンディキャップに有意に影響を与えていた．
2. 神経症傾向低群および高群では共に Baker モデルが妥当であった．
3. 神経症傾向低群と高群においては OHIP 下位尺度間の関係に異質性が認められ，痛みから障害への影響度に有意差が認められた．
4. 痛みから障害への影響度は神経症傾向高群で高かった．

以上の結果より，全部床義歯装着者において，神経症傾向が，痛みの感じ方に起因して，口腔関連 QOL 下位尺度間の関係に影響を与えている可能性が示唆された．

本研究では，統計手法として SEM analysis を用い，全部床義歯補綴における神経症傾向と口腔関連 QOL の関連性を示すことに成功している．本研究の成果は，患者の性格，とりわけ神経症傾向が口腔関連 QOL に影響を与えている可能性を示唆したもので，神経症傾向の高い全部床義歯患者に対する患者教育の必要性や, 症例難易度を判断する基準の一助となるものである．

よって本論文は，博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値のあるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 加納　亨紀 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　荒木　孝二<br>副 査　　三浦　宏之　　宇尾　基弘 |
| 論　文　題　目 | Influence of enamel prism orientations on color shifting at the border of resin composite restorations |

＜諸言＞

近年、光重合型コンポジットレジンは、審美修復材料として、前歯部から臼歯部まで幅広く用いられている。しかし、歯の色調は部位や年齢によって様々であること、コンポジットレジンのシェードが限られていることなどから、周囲歯質と正確に色調を適合させることは困難である。一方で、臨床においてコンポジットレジンと周囲歯質との色調差は、実際に窩洞にコンポジットレジンを充填した時の方が小さく見えることが知られている。この現象はカメレオン効果と呼ばれ、コンポジットレジンと周囲歯質がお互いに色を反映しあうことにより起こる。このようなコンポジットレジン修復物の色調変化は、コンポジットレジンと周囲歯質の光学的特性の相互作用により起こると考えられる。

光が対象物に当たった時に生じる吸収、透過、反射、散乱などの光学的特性は、対象物の組成および組織学的構造によって影響を受ける。エナメル質は、ハイドロキシアパタイト（HA）の集合体であるエナメル小柱を基本構造とするため、HA の様態は、歯質の色調に影響を及ぼすと考えられている。エナメル小柱の多くはエナメル象牙境からほぼ直角に立ち上がっているが、その走行は歯頸側ではエナメル質表層に向かって直角で、歯頂側になるにつれて次第に傾いていくことが知られている。このエナメル小柱の走行の違いは、コンポジットレジン修復における窩洞境界部の光学的特性に影響を及ぼし、同部の色調変化に影響を与えることが考えられるが、未だその影響についてはあまり報告がされていない。

近年、会田らはコンポジットレジン修復における窩洞境界部のマージン形態がコンポジットレジン色調適合性に及ぼす影響について、二次元色差計（RC500、PaPaLaB Co.）を用いて検討している。その結果、マージン形態の違いが窩洞内部のコンポジットレジンの色調変化に影響を及ぼし、さらに窩洞境界部にベベルを付与することにより、窩洞境界部における色調調和性を向上させることを報告した。この RC500 は XYZ デジタルデータから必要な範囲の色調変化を二次元的に評価することが可能であり、高い再現性で測色することができる。本実験では、RC500 を用い、唇側エナメル質板に充填されたコンポジットレジン修復物の歯頂側と歯頸側における窩洞境界部の色調変化を、L*、C* 及び h*値について計測することにより、エナメル小柱の走行がコンポジットレジン修復物の窩洞境界部の色調変化に及ぼす影響について評価・検討を行った。

＜方法＞

本研究では、光重合型コンポジットレジンとして以下 4 種(シェードは A2 を採択した場合に業者指示さ

れたエナメル色)を使用した；Estelite Asteria A2B (EA; Tokuyama Dental Corp.)、Estelite Pro A2E (EP; Tokuyama Dental Corp.)、Kalore WE (KA; GC America Inc.)、Clearfil Majesty ES-2 Premium A2E (MJ; Kuraray Noritake Dental Inc.)。40 本の冷凍保存されたウシ抜去歯を用い、厚さ 1.0 mm のエナメル質板を切り出した後、中央部に円柱状ダイヤモンドバーにて打ち抜き窩洞（直径 1.0 mm，3.0 mm）を形成し、その後 Clearfil SE-One（Kuraray Noritake Dental Inc.）を用いて業者指示に従って接着処理後、4 種のコンポジットレジンをそれぞれ窩洞に充填し、エナメル質板の表側および裏側から 60 秒ずつ光硬化させた。24 時間 37℃ にて湿潤保管後、エナメル質板両側を 2000 番の耐水研磨紙で研磨し、測色用試料とした。D65 光源下、黒色板背景、湿潤下にて、RC500 で試料を撮影し、その CIE XYZ データから、窩洞中央部を通る歯頂側から歯頸側エナメル質までの CIE L*C*h*を連続的に算出し、グラフ化した。得られたグラフから、コンポジットレジン修復エナメル質板のコンポジットレジン中央部、さらに、コンポジットレジンの窩洞境界部における色調変化の傾き（色調変化率）と距離（色調変化域）を、L*、C*及び h*値それぞれについて評価した。併せて、コンポジットレジンの板状試片（厚さ 1.0 mm）を作製し、24 時間 37° C 湿潤保管、2000 番の耐水研磨紙で研磨後、RC500 にて測色、さらに変角光度計にて 2 次元透過光強度のグラフを求め、正透過光特性（G0）、拡散透過光特性（DF）と透過光総量（Area）を計測した。それぞれの値は、One-way ANOVA、Three-way ANOVA、Dunnett's 検定と t 検定を用いて有意水準 5%で統計学的分析を行った。

＜結果と考察＞

全ての材料の L*値は、1 mm 及び 3 mm 窩洞群どちらにおいてもコンポジットレジン修復物中央部から窩洞境界部をこえて上昇し、周囲エナメル質で一定となった。一方で、コンポジットレジン修復物中央部から窩洞境界部までの C *及び h*値の変化は材料によって異なっていた。

窩洞内のコンポジットレジン修復物中央部の色調は、1 mm、 3 mm 窩洞群ともにおいて、全ての材料でコンポジットレジン板状試片と比較して L *値が上昇したが、3 mm 窩洞群において有意差は認められなかった。一方で、C*、h*値では中央部において 1 mm、3 mm 窩洞群ともにコンポジット板状試片との間に有意差は認められなかった。この結果より、L*値においてコンポジットレジン修復物の中央部は周囲エナメル質に影響を受けるが、その程度は窩洞の大きさに影響されることが明らかになった。

L*値において、歯頸側での色調変化率は歯頂側よりも有意に高かった。この違いはエナメル小柱の走行が歯頂側と歯頸側で異なっていることによるものと考えられる。本実験で形成した窩壁において、大部分のエナメル小柱は歯頂側では斜めに切断されており、歯頸側では縦方向に切断されている。エナメル小柱はエナメル質の光学的特性に影響することが知られており、エナメル質内部における光の散乱特性を左右する最も重要な構造である。さらに、エナメル小柱は光ファイバーのような役割をし、光を小柱走行に沿って透過させると報告されている。歯頂側と歯頸側における L*値の色調変化率の違いは、エナメル小柱の歯頂側、歯頸側においての走行の違いがエナメル境界部の光学的特性に影響したことによるものと考えられる。さらに、L*値の色調変化率においては、1 mm 窩洞群は 3 mm 窩洞群よりも有意に大きかった。これらの結果より、窩洞境界部における L*値の色調変化は、窩洞の大きさとそこに充填されたコンポジット

レジンの量にも影響を受ける可能性が示唆された。窩洞境界部における L*値の色調変化域は、コンポジットレジン側よりも歯質側が有意に大きかったが、以前の研究により、コンポジットレジン修復物窩洞境界部での色調変化は、コンポジットレジン側よりも歯質側の方が大きいことが報告されており、本実験はこれと一致するものであった。さらに、エナメル質側における L*値の色調変化域は、歯頂側と歯頸側の間で有意差はないが、コンポジットレジン側では歯頂側の方が歯頸側よりも有意に大きかった。この結果は、エナメル小柱の影響は歯質側よりもコンポジットレジン側で大きいことを示唆していると考えられる。3 mm 窩洞群では、歯頂側の L*値の色調変化域は歯頸側よりも有意に大きかったが、1 mm 窩洞群では有意差が認められなかった。色調変化率が低く色調変化域が大きい、すなわち緩やかで長い距離の色調変化が見られる歯頂側窩洞境界部では、色調調和性において歯頸側窩洞境界部よりも有利に働くと考えられる。

本研究では KA の C* 値と KA と MJ の h*値では歯質とコンポジットレジンとの色調の違いがあまりなかったため、これらについては色調変化率、色調変化域は評価することができなかった。KA を除く C*値において、1 mm、3 mm 窩洞群ともに色調変化率は歯頸側の方が歯頂側より有意に高かったが、色調変化域は両者の間に有意差は認められなかった。KA、 MJ を除く h*値においては窩洞の大きさにかかわらず歯頂側と歯頸側の間に色調変化における有意差は認められなかった。これらの結果より、エナメル小柱の走行は窩洞境界部の色調変化において、L*値に比べ C*値にはわずかに影響するものの、h*値にはほとんど影響しないことが示唆された。

本研究で用いられたコンポジットレジンの透過光特性（正透過光特性（G0）、拡散透過光特性（DF）、透過光総量（Area））は、材料により様々であった。L*、C*値の色調変化率は、材料によって有意に影響を受けたが、本研究においてはレジンコンポジットの光学的特性がいかに色調変化率に影響を与えるかについては明らかにできなかった。一方で、色調変化域において、L*値では 1 mm 、3 mm 窩洞群で材料によって有意に影響を受けなかったが、C*値では 3 mm 窩洞群で影響を受け、1 mm 窩洞群では影響を受けなかった。おそらくコンポジットレジンの窩洞境界部における色調変化は、コンポジットレジン自身の透過光特性それぞれの要素と窩洞の大きさ、さらに充填されたコンポジットレジンの量が複雑に絡み合って影響を及ぼしていると考えられる。コンポジットレジンの光学的特性が、コンポジットレジン修復物の窩洞境界部に及ぼす影響についてはさらなる研究が必要である。

今回の研究では 1 液性のボンディング剤が使用されたが、その pH の高さにより、エナメル質へのエッチング能力はリン酸エッチングよりも弱い。リン酸エッチングによるエナメル小柱の明瞭な露出によりエナメル質への接着性が高まるため、一部の臨床家の間ではボンディング塗布前のリン酸によるセレクティブエッチングの併用が推奨されている。このリン酸エッチングによるエナメル小柱の明瞭な露出は、コンポジットレジン修復物の窩洞境界部の色調変化に影響を及ぼす可能性がある。

本研究では、周囲歯質がコンポジットレジン修復物の色調変化に影響を及ぼすこと、さらにエナメル小柱の走行が、特に明度においてレジンコンポジット窩洞境界部の色調変化に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、コンポジットレジン修復物の窩洞境界部においては、歯頂側が歯頸側よりも色調調和性に優れていることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5486　号 | 加納　亨紀 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　荒木　孝二<br>副 査　　三浦　宏之　　宇尾　基弘 | |
| 論 文 題 目 | Influence of enamel prism orientations on color shifting at the border of resin composite restorations | |

（論文審査の要旨）

審美修復材料として近年幅広く用いられている光重合型コンポジットレジンは、周囲歯質と正確に色調を完全適合させることが未だ困難である。一方、コンポジットレジン修復物は、コンポジットレジンと周囲歯質の光学的特性の相互作用によって色調変化を起こし、色調差が小さく見えることが知られている。エナメル質において、ハイドロキシアパタイト（HA）の様態が、色調に影響を及ぼすと考えられており、また HA の集合体であるエナメル小柱は、光ファイバーのような働きにより、エナメル質内の光の集約や散乱に影響を及ぼし、その走行が光学的異方性を引き起こすことが報告されている。歯頂側、歯頸側におけるエナメル小柱の走行の違いはコンポジットレジン修復における窩洞境界部の色調変化に影響を与えることが考えられるが、未だその影響についてはあまり報告がされていない。

このような背景のもと、本研究では、ウシ抜去歯から切り出したエナメル質板に、打ち抜き円柱窩洞（直径 1mm，3mm）を形成後、4 種のコンポジットレジンを充填し、歯頂側、歯頸側それぞれのコンポジットレジン修復物窩洞境界部の色調変化について評価し、あわせてレジンの透過光特性を調べ、その関連性を検討したもので、その着眼は極めて高く評価できる。使用された 4 種類のレジン材料（Estelite Asteria:A2B（以下、EA）、 Estelite Pro:A2E (EP)、Kalore:WE (KA)、 Clearfil Majesty ES-2 Premium:A2E (MJ)）は、臨床的に広く用いられ、フィラー成分も様々である。本研究では EP、KA、MJ は Enamel 色、EA では Body 色を採用している。これは色調再現における業者指示の積層充填法が異なっていること、すなわち EP、KA、MJ では Body 色を充填した後、最表層に Enamel 色を充填することが推奨され、EA では最表層に Body 色を充填することが許容されていることによるものである。これらの材料の特性を理解したうえで選択されたものであり、適切な選択といえる。さらに、本研究では自動変角光度計を用いて透過光特性も評価しており、その結果も 4 種のコンポジットレジンで様々であることが確認されている。色調評価は、D65 光源下、黒色板背景、湿潤下にて、RC500 で試料を撮影し、その CIE XYZ データから、窩洞中央部を通る歯頂側から歯頸側エナメル質までの CIE L*C*h*を連続的に算出し、グラフ化した。得られたグラフから、コンポジットレジン修復エナメル質板のコンポジットレジン中央部、さらに、コンポジットレジンの窩洞境界部における色調変化の傾き（色調変化率）と距離（色調変化域）を、L*、C*及び h*値それぞれについて評価している。カラーパラメータ（L*C*h*）は、RC500 で撮影し得られた CIE XYZ ３刺激値より算出し

ている。本研究で使用した二次元色差計（RC500）はRGB等色関数にある負の感度を生じさせないように座標転換したCIE XYZ等色関数に適応したフィルターを実装することで、３バンドでありながら十分な計測精度を得ることができ、全色域カメラとして様々な分野で使用され、その有用性は高いことが認められている。しかしながら、歯科分野での研究応用はなされておらず、本研究の測色でRC500 を使用したことは、新たな試みとして高く評価できる。コンポジットレジン充填エナメル質板の色調変化について歯頂側から歯頸側まで連続的に観察し、その結果からコンポジットレジン修復エナメル質板のコンポジットレジン中央部、さらに歯頂側、歯頸側の窩洞境界部における色調変化率、色調変化域をL*、C*及びh*値それぞれについて比較・検討、さらに窩洞の大きさ（1mm窩洞群、3mm窩洞群）による差異についても十分な分析がなされている。得られた結果に対する統計学的な検討も適切に行われ、専門的な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1. 全ての材料のL*値は、1 mm及び3 mm窩洞群どちらにおいてもコンポジットレジン修復物中央部から窩洞境界部をこえて上昇し、周囲エナメル質で一定となった。一方で、コンポジットレジン修復物中央部から窩洞境界部までのC *及びh*値の変化は、材料によって異なっていることが観察された。
2. 窩洞内のコンポジットレジン修復物中央部の色調は、1 mm、 3 mm 窩洞群ともにおいて、全ての材料でコンポジットレジン板状試片と比較してL 値が上昇したが、3 mm窩洞群において有意差は認められなかった。一方で、C*、h*値では中央部において1 mm、3 mm窩洞群ともにコンポジット板状試片との間に有意差は認められなかった。
3. L*値において、歯頸側での色調変化率は歯頂側よりも有意に高かった。さらに、L*値の色調変化率においては、1 mm窩洞群は3 mm窩洞群よりも有意に大きかった。
4. L*値の色調変化域はコンポジットレジン側よりも歯質側が有意に大きく、歯質側におけるL*値の色調変化域は、歯頂側と歯頸側の間で有意差はないが、コンポジットレジン側では歯頂側の方が歯頸側よりも有意に大きかった。さらに、3 mm窩洞群では、歯頂側のL*値の色調変化域は歯頸側よりも有意に大きかった。
5. C*については、1 mm、3 mm 窩洞群ともに色調変化率は歯頸側の方が歯頂側より有意に高かったが、色調変化域は両者の間に有意差は認められなかった。さらに、h*については、窩洞の大きさにかかわらず歯頂側と歯頸側の間に色調変化における有意差は認められなかった。

本研究により、周囲歯質がコンポジットレジン修復物の色調変化に影響を及ぼし、特に明度において、エナメル小柱の走行が、レジンコンポジット窩洞境界部の色調変化に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、コンポジットレジン修復物の窩洞境界部においては、歯頂側が歯頸側よりも色調調和性に優れていることが示唆された。

以上のように、コンポジットレジンと歯質との色調適合性に関して臨床的に極めて有益な知見を得たことは、本論文の成果として高く評価できる。本研究は今後の歯科保存学の発展に大いに寄与するものと考えられる。従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分に価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 髙草木　謙介 |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　鈴木　敏彦　　鈴木　哲也 |
| 論　文　題　目 | Effect of incorporation of surface pre-reacted glass ionomer filler in tissue conditioner on the inhibition of *Candida albicans* adhesion |

（論文内容の要旨）

<要旨>

Tissue conditioner (以下 TC)の汚れは義歯性口内炎の一因となっている。本研究では、Surface reaction-type pre-reacted glass ionomer (S-PRG) filler の TC への含有が TC 表面への *Candida albicans* 付着及び、機械的性質、表面性状に与える影響を検討することを目的とした。S-PRG filler を 0wt%, 5wt%, 10wt%, 20wt%含有した TC(松風 tissue conditoner II)を使用し、試料表面に付着した *C.albicans* 量を CFU assay にて測定した。付着の様子は SEM にて観察した。さらに機械的性質を検討するため、ちょう度試験と針入深さ試験、表面粗さ測定(Ra)を行った。CFU assay の結果から S-PRG filler の含有により *C.albicans* の付着は有意に減少し($P<0.001$)、10wt%, 20wt%の試料ではコントロールと比較して有意な減少を認めた($P<0.05$)。SEM 画像より filler 含有群では *C.albicans* の菌糸型の発現が少ない傾向であった。filler 含有はちょう度、針入深さ、表面粗さにも影響を与えた($P<0.05$)。これらの結果から、10wt%以上の S-PRG filler の含有は *C.albicans* の付着を抑制すること、一方で filler の含有量は機械的性質や表面性状への影響により制限される可能性があることが示唆された。

<緒言>

義歯表面に付着するデンチャープラーク中には *C.albicans* が多く存在し義歯性口内炎の主要な原因となっている。そのため、デンチャープラークの除去は義歯性口内炎の治療及び予防に有効である。義歯治療に TC は広く使用されており、粘膜調整や機能印象を目的として用いられる。しかし、その表面は多孔性で粘弾性を有することから義歯用 PMMA と比較して *C.albicans* が付着しやすいことが報告されている。また、ブラシによる清掃は TC 表面を傷つけるため機械的清掃は推奨されていない。次亜塩素酸溶液や義歯洗浄剤による化学的清掃も *C.albicans* を除去するのに有効だが、数種の義歯洗浄剤は TC の表面性状に影響を及ぼす。従って、TC は機械的、化学的清掃が困難な材料である。細菌付着を減少させる他の方法としてナイスタチンや銀系抗菌剤を含有させる方法がある。これらの方法は耐性菌を発現させる可能性があり、口腔乾燥や動作障害のある患者などハイリスクな患者に使用が限定される。

S-PRG filler は *Streptococcus mutans* などのう蝕病原細菌およびプラーク付着を抑制する材

料として検討されてきた。S-PRG filler は主に $Na^{+}$, $Sr^{2+}$, $SiO_3^{2-}$, $Al^{3+}$, $BO_3^{3-}$, $F^{-}$ の 6 種類のイオンを放出する。S-PRG filler から放出されるイオンは殺菌的な作用よりも静菌的な作用であると考えられ、適応の制限を受けにくいと考えられる。我々は S-PRG filler 含有義歯用 PMMA が *C.albicans* の付着を抑制することを報告した。これらの事から S-PRG filler は TC の表面を清潔に保つのに効果的であると推測される。そこで、本研究で S-PRG filler 含有 TC の *C.albicans* の付着抑制効果を検討することとした。しかし抗菌剤の添加は表面性状や機械的性質に影響を及ぼすことが報告されている。試料の表面性状は細菌付着に影響を与え、ちょう度や針入深さなどの機械的性質は使用する際の操作性に影響する。従って、S-PRG filler 含有 TC の表面性状及び機械的性質についても検討が必要である。そこで、本研究の目的は S-PRG filler の含有が *C.albicans* の付着及び表面性状、機械的性質への影響を検討することとした。

<方法>

真菌付着関連

・試料製作

S-PRG filler を 0, 5, 10, 20wt%含有した TC をメーカ指定の紛液比(4.8 g/4 ml)で混和し厚さ 2 mm となるようガラス板にて圧接し直径 10 mm に繰り抜いた。それらを#2000 の耐水研磨紙まで研磨した同サイズの PMMA レジンディスク上に貼付け実験に供した。

・colony forming unit assay (n=15)

全ての試料を 24well マルチプレートに入れ、1 ml の人工唾液を加え、37℃、60 分培養した。1 ml の PBS で 2 回洗浄した。*C.albicans*(JCM2085)を YPD 培地で 30℃、5h 培養し、酵母型菌体が $10^4$ cell/ml となるように調整した懸濁液を 1 ml ずつ接種し、37℃、24 時間培養した。各試料に 1 ml のトリプシンを加え試料表面に付着したバイオフィルムを剥がし取り菌液とした。連続希釈した菌液 100 □ をサブロー寒天培地上に接種し 37℃、24h 培養しコロニー数を計測した。

・SEM による観察（n=5）

培養した試料を 2.5%グルタールアルデヒド固定液にて固定を行い、0.1 M リン酸緩衝液にて洗浄した後、1%オスミウム溶液で固定し、通法に従って SEM にて試料表面の様子を観察した。

・ちょう度（n=4)、針入深さ試験（n=5）

機械的性質を調査するために、ISO 10139-1:1991 に基づいて作成された JIS T6519:2000 に準拠してちょう度試験と針入深さ試験を行った。ちょう度試験では混和した TC をガラス板で挟み、1000 g のおもりを乗せ 8 分間インキュベーター内に静置した。広がった試料の平行接線間の距離の最大値と最小値を計測し、平均値からちょう度を評価した。

針入深さ試験では TC を直径 30 mm 高さ 3 mm の金属リング中に注ぎ、37℃の水中に浸漬した。2 時間後に、針入深さを測定した(PD2h)。試料を再び水中に浸漬し、7 日後に同じ試験を繰り返した(PD7d)。針入深さ比(PD ratio)は PD2h/PD7d と定義した。

・表面粗さ

YPD 培地中に 37℃、24 時間浸漬した試料を 3D レーザー走査顕微鏡にて撮影し、画像上の任意の 10 点において表面粗さ(Ra)を測定した。

・イオンリリース量測定

TC 試料を超純水中に 37℃24 時間浸漬し、$Na^{+}$, $Sr^{2+}$, $SiO^{3+}$, $Al^{3+}$, $BO_3^{3-}$の各イオン濃度については ICP 発光分光分析装置にて、$F^{-}$についてはフッ素イオン電極にて測定した。

・統計解析

統計解析は SPSS 21.0(IBM Japan)を用い、一元配置分散分析の後 Dunnett's の多重比較を行った。有意水準は 0.05 とした。

<結果>

CFU の結果より *C.albicans* の付着は一元配置分散分析で有意な減少を示した(P=0.005)。多重比較の結果より 10, 20wt%の試料はコントロール群と比較して有意な減少を示した(P<0.05)。一方で 5wt%の試料では有意差は認められなかった(P=0.071)。SEM 像では、コントロール群では *C.albicans* の菌糸型が多く認められ、filler 含有群では酵母型の発現が多く見られた。ちょう度と針入深さ(PD2h,PD7d)、表面粗さ(Ra)は filler の含有と共に増加した。PDratio は filler の増加と共に減少した。これらは一元配置分散分析の結果、有意な差を認め(P<0.001)、多重比較において 10, 20 wt%で有意な差を認めた(P<0.05)が、5wt%の試料では有意差は認めなかった(P>0.05)。イオンリリース量は各イオン共に、filler の含有量と共に増加する傾向を認めた。一元配置分散分析にて、各イオン共に有意差を認め(P<0.001)、多重比較の結果コントロール群と filler 含有群には有意差を認めた(P<0.05)が、5wt%含有群の $Na^{+}$のみ有意差を認めなかった(P=0.25)。

<考察>

本研究の結果は 10wt%以上の S-PRG filler の添加が TC 表面への *C.albicans* 付着を抑制することを示唆している。S-PRG filler 含有 TC は主に 6 種類($Na^{+}$, $Sr^{2+}$, $SiO_3^{2-}$, $Al^{3+}$, $BO_3^{3-}$, $F^{-}$)のイオンを放出するが、ホウ酸は *C.albicans* の菌糸型の発現を抑制し、フッ素は細胞の代謝障害などによる抗菌性を示すことが報告されている。しかし、本研究で TC から放出されたホウ酸イオンやフッ素イオンの濃度は報告されている濃度よりも低濃度であった。過去の報告では、酸化ストレスや浸透圧ストレスなどの複合的な効果は *C.albicans* への殺菌性、成長抑制を示すとされており、本研究においてはイオンの複合的な効果が *C.albicans* の付着抑制に影響したと考えられる。

我々は S-PRG filler 含有義歯用 PMMA が *C.albicans* の酵母から菌糸への形態変換を抑制している可能性を報告した。本研究の TC における SEM 像からも同様の所見が認められる。*C.albicans* は炎症環境では菌糸形態をとることが多く、通常の環境では酵母形態をとることが多いとされている。菌糸形態は上皮細胞を貫いて侵入していくことから 病原性が高いと報告されている。また、*C.albicans* は菌糸を伸ばすことでバイオフィルムを成長させるとの報告もされている。TC 表面の菌糸型の発現抑制は *C.albicans* の病原性の抑制及びバイオフィルム形成抑制に関係している可能性がある。

S-PRG filler 含有 TC から放出されるイオンの量は、S-PRG filler 含有 PMMA レジンからの放出量よりも高濃度であった。しかし、細菌付着に有効な filler 含有量は PMMA(5wt%)よりも TC(10wt%)の方が高かった。これは、TC 表面は多孔性で粘弾性を有しているため、PMMA レジンと比較してデンチャープラークが付着しやすいためであると推測される。TC 表面の細菌付着は 10wt%までは減少していくが、10wt%と 20wt%に差はなかった。一方で、レーザー顕微鏡像

から filler の TC 表面への露出が認められ、表面粗さは増加している。表面粗さは微生物の付着を増加させる因子であり、20wt%含有群では S-PRG filler から放出されるイオンの効果を相殺している可能性がある。

臨床で使用する際、TC は約 1 週間で交換することが推奨される。本研究では初期の細菌付着についての検討だが、S-PRG filler 含有 PMMA レジンでは試料を水中に浸漬し続けたときのイオン放出量は 2 日目には大幅に減少し、7 日後には約 10 分の 1 になると報告されている。また、TC の表面粗さは時間経過と共に増加すると報告されている。これらの報告は S-PRG filler の細菌付着抑制効果が時間経過により減少することを示唆している。一方で、フッ素はイオン溶液に浸漬することでリチャージされるとされており、長期の細菌付着に関するリチャージ効果、条件の検討が必要である。

filler 含有量の増加と共にちょう度と針入深さは増加し、針入深さ比は減少した。これは filler 含有により TC が軟らかくなることを示すが 20wt%含有でも JIS 規格(ちょう度 25-75 mm, PD2h <= 1.8 mm, PD7d >=0.18 mm, PD ratio <= 5.0)を満たしていた。しかし、filler 20wt%含有群はメーカー指標(ちょう度: 40.0 -54.0 mm, PD ratio: 1.2-2.2)を逸脱しており、機械的性質を検討すると 10wt%までの含有量が臨床応用に実用可能である可能性がある。本研究では、filler の含有量にかかわらず、TC の紛液比は一定とした。それゆえ、filler 含有により TC の液成分に対する粉成分(ポリエチルメタクリレート)の比率は減少している。これが機械的性質に影響を及ぼしたと考えられる。

本研究にはいくつかのリミテーションが存在する。まず、デンチャープラークがペリクル上に形成されていないという点で口腔内の環境と異なる。次に、本研究では *C.albicans* を単独で使用しているが、デンチャープラークは球菌や桿菌、糸状菌といった多種類の細菌で構成されるため複数の微生物を用いた試験が必要である。最後に S-PRG filler の TC への含有が義歯性口内炎の予防および粘膜の炎症に有効か、臨床的な視点から見て不明であることである。

以上より、10wt%以上の S-PRG filler の含有は TC 表面の *C.albicans* 付着抑制効果を持つことが示唆された。機械的性質及び表面性状への影響により filler の含有量は制限されるため、これらの影響を考慮すると、10wt%の含有が臨床に適用である可能性があると考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5487　号 | 髙草木　謙介 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宇尾　基弘<br>副　査　鈴木　敏彦　　鈴木　哲也 | |
| 論　文　題　目 | Effect of incorporation of surface pre-reacted glass ionomer filler in tissue conditioner on the inhibition of *Candida albicans* adhesion | |

（論文審査の要旨）

義歯治療に tissue conditioner(以下 TC)は広く使用されているが、その表面は義歯用 PMMA と比較して汚れが付着しやすく、また、表面荒れを起こしやすいため清掃が困難な材料である。従って TC は微生物のリザーバーとなり義歯性口内炎の一因となりうることが問題となっている。真菌である *Candida albicans* の異常増殖は義歯性口内炎の主要な原因となっており、TC 上の *C.albicans* を除去することは義歯性口内炎の発症の抑制に有効であると考えられる。真菌の付着を減少させる方法として TC への抗菌剤含有の応用が検討されてきたが耐性菌の発現などの問題から使用が難しく、義歯性口内炎に対する治療および予防の手段を確立することは臨床上極めて重要である。

今回、高草木は TC への S-PRG filler の含有が *C.albicans* の付着及び表面性状、機械的性質への影響を検討した。当分野では S-PRG filler 含有義歯用 PMMA への *C.albicans* 付着抑制について報告した。しかし、同 PMMA から放出されるイオンの量は微量であった。これは、PMMA の重合度が高く、試料表面に存在する filler のみからイオンを放出し、内部の filler の寄与が少ないためと推測した。一方で TC は水分の拡散性が高く表面だけで無く内部の filler からもイオンを放出するため多量のイオンを放出することが期待される。これは、S-PRG filler 含有 TC は高い *C.albicans* 付着抑制効果を示す可能性を示唆しており、義歯性口内炎に対する新しい治療および予防法として今後期待される。

試験に使用される試料は S-PRG filler を 0, 5, 10, 20 wt%含有した TC をメーカー指定の紛液比(4.8 g/4 ml)で混和し PMMA ディスク上に貼付して実験に供した。*C.albicans* 付着抑制効果の検討は、各試料上で *C.albicans*(JCM2085)を培養し、CFU assay、SEM による試料表面の観察を行った。機械的性質についてはちょう度試験、針入深さ試験を行い、さらに表面粗さ測定および超純水中に 24h 浸漬後のイオンリリース量($Na^{+}$, $Sr^{2+}$, $SiO_3^{2-}$, $Al^{3+}$, $BO_3^{3-}$, $F^{-}$)測定を行った。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

CFU assay の結果より *C.albicans* の付着は 10, 20wt%含有の試料はコントロール群と比較して有意な減少を示した($P<0.05$)。一方で 5wt%の試料では有意差は認められなかった($P=0.071$)。SEM 像ではコントロール群では *C.albicans* の菌糸型が多い傾向が認められ、filler 含有群では酵母型の発現が多く見られた。ちょう度と針入深さは filler 含有 10, 20 wt%で増加

した。針入深さ比は filler 含有量が 10, 20 wt%で減少した。5 wt%の試料では有意差は認めなかった(P>0.05)。表面粗さは filler 含有量 10, 20 wt%で有意に増加した。イオンリリース量は各イオン共に filler の含有量と共に増加する傾向を認めた。

上記の結果より 10wt%以上の S-PRG filler の添加が TC 表面への *C.albicans* 付着を抑制することが示唆された。また、SEM 像の所見より TC 表面の菌糸型の発現抑制によりバイオフィルムの病原性抑制につながる可能性があると考えられる。さらに、機械的性質の変化は試料の粉液比が影響していた可能性が考えられ、TC の使用目的別に粉液比を調整することで幅広い臨床応用が可能である可能性を示している。

本研究において S-PRG filler を添加した TC が *C.albicans* 付着抑制効果を持つことを示したことは、義歯性口内炎の新たな予防法として今後応用できる可能性が高いという点で、臨床的意義が大きい。本研究は綿密な研究計画のもとに実施され、適切な解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

以上の成果は義歯材料への抗菌性付与に重要な知見を与えるものであり、今後の歯科医学の発展に寄与するところが大きい。従って本論文は博士(歯学)の学位を申請するのに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 福島　由香乃 |
| 論文審査担当者 | 主査　櫻田　宏一<br>副査　水口　俊介、森山　啓司 |
| 論　文　題　目 | Reduced mastication impairs memory function |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

咀嚼は食物の消化・吸収だけでなく、全身の健康維持にも重要である。高齢者では、歯の喪失や咀嚼筋の機能低下により咀嚼障害を生じ、その結果、認知症の発症リスクの上昇や記憶・学習機能の低下が起こることが知られている。咀嚼は高齢者だけでなく成長期の小児の顎顔面組織の成長と中枢神経系の発達にも影響することが報告されている。このように、咀嚼による記憶・学習機能の制御が古くから認識されているものの、その詳細なメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。

本研究では、成長期における咀嚼障害が海馬の神経細胞に影響を与え、長期記憶と空間記憶を障害することを明らかにした。離乳期から成長期にかけて粉末食飼育し咀嚼刺激を低下させたマウスでは、記憶・学習機能の顕著な障害が認められた。さらに、このマウスの海馬では神経細胞数と新生神経細胞数の減少に加え神経活動やシナプス形成の低下および神経栄養因子の減少が見出された。

＜緒言＞

摂食時に食物をよく咀嚼することは消化を助けるだけではなく、全身の健康維持に大きな役割を担っている。注目すべきことに、認知症の発症率と歯の喪失には相関関係があるなど、咀嚼機能が認知機能にも影響することが明らかになっている。また、咀嚼刺激の低下したマウスでは記憶・学習障害が認められる。咀嚼刺激の低下が記憶・学習機能に及ぼす影響は高齢者だけではなく、若年者にも及ぶことが報告されており、その影響は成長期の小児において顕著であることが見出されている。記憶・学習の中枢は海馬であり、その成長・発達には neurotrophin family 分子の一つである brain-derived neurotrophic factor (BDNF: 脳由来神経栄養因子) が重要な役割を果たしている。咀嚼刺激低下と海馬の関係については、BDNF の発現低下や錐体細胞数の減少などが報告されているものの、神経基盤や分子メカニズムは十分には解明されてはいない。

本研究では、離乳期から成長期に粉末食で飼育した咀嚼刺激低下モデルマウスを用いて、その咀嚼刺激低下が記憶・学習機能に及ぼす影響を、形態学的、行動学的および分子生物学的手法を用いて検討した。

＜方法＞

実験動物

3週齢C57BL/6J雄性マウスを固形飼料（normal diet: ND）または粉末飼料（soft diet: SD）で飼育した。飼育期間は11週間とし、毎週体重を測定した。細胞増殖の評価に際しては、14週齢でbromodeoxyuridine（BrdU）を1日2回、3日間腹腔内投与した。実験終了後、全身麻酔下にて4%EDTA-PBS（遺伝子発現解析用サンプル）または4%パラホルムアルデヒド（組織学的解析用サンプル）にて灌流し、脳、大腿骨、下顎骨、開閉口筋およびヒラメ筋を摘出した。

行動実験

記憶・学習機能の評価には受動的回避試験（passive avoidance test）と物体位置認識試験（object location test）を行った。受動的回避試験では穴で連結された明箱と暗箱とで構成される明暗箱装置を使用した。マウスは暗い環境を好むため、明箱に放つと暗箱に侵入する。侵入までの時間（潜時）を計測し、暗箱中で電気刺激により恐怖条件付けを行った。24時間後潜時を計測し、条件付け前後の比較を行った。

物体位置認識試験では初日にオープンフィールドにマウスを入れ、自由に探索させ馴化を行った。2日目に異なる4つの物体をフィールド内に設置し、各物体に対する探索時間を測定した。3日目に、4物体のうち2物体の位置を変え、位置を変更した2物体に対する探索時間の増加を評価した。

活動性と不安様行動の評価にはオープンフィールドテストを行った。オープンフィールド内にマウスを放ち、自由に探索させ、その行動軌跡を記録、中央滞在時間と総行動距離を計測した。

運動能力の評価にはローターロッドテストを用いた。初日にマウスを低速回転させたロッド（4.0 rpm）上に乗せ訓化した。2日目より加速回転するロッド（4.0 – 40 rpm）上にマウスを乗せ、落下するまでの時間を計測した。

組織学的解析

灌流固定後の脳を30%スクロースに浸漬し、凍結切片の作成のためO.C.Tコンパウンドで包埋した。クライオスタットにより厚さ20 μmの切片を作成した。海馬（歯状回 dentate gyrus: DG, CA1, CA2, CA3）と大脳皮質（第一運動野 primary motor cortex: M1, 第一感覚野 primary somatosensory cortex: S1BF, 第一視覚野 primary visual cortex: V1）の神経細胞（$NeuN^+$）と海馬の新生神経細胞（$BrdU^+$）、活動神経細胞（$c\text{-}Fos^+$）およびシナプス後膜肥厚部（$PSD\text{-}95^+$）を評価した。

遺伝子発現解析

脳を摘出後、顕微鏡下で海馬を分離した。Acid guanidine thiocyanate-phenol- chloroform（AGPC）法により全RNAを抽出し、逆転写反応により一本鎖cDNAを合成した。qRT-PCR法により、遺伝子発現を解析した。目的の遺伝子発現量はΔΔCt法により相対値として算出した。内部標準として*Gapdh*を用いた。解析にはBDNF（*Bdnf*）とその受容体であるTrkB（*Ntrk2*）のプライマーを用いた。

＜結果＞

咀嚼刺激の低下を再現するために、粉末飼料を用いて飼育したマウス（SD 群マウス）を用い

た。これらのマウスの体重は、通常飼料で飼育したマウス（ND 群マウス）と比較し差は認められなかった。同様に、大腿骨の骨量やヒラメ筋の重量にも変化は見られなかった。一方、閉口筋である咬筋と側頭筋の重量や下顎骨の骨量やサイズは低下しており、本モデルが咀嚼刺激の低下により頭頸部領域に限局する表現型を呈することが見出された。

受動的回避試験にて両群とも潜時が延長していたが、ND 群と比較して SD 群では潜時が短く、咀嚼障害による長期記憶低下が見出された。また、物体位置認識試験において ND 群と比較し、SD 群では位置を変えた物体への探索時間は延長せず、空間記憶の障害が認められた。以上より、咀嚼刺激の低下により記憶・学習障害が誘発されることが明らかになった。不安状態でも学習機能が低下するため、オープンフィールドテストによる評価を行ったが、2 群間に差は認められず、記憶・学習機能の低下は不安によるものではないことが示された。

咀嚼障害による記憶・学習障害のメカニズムを解析するため、記憶を司る海馬の神経細胞数を評価した。ND 群と比較し、SD 群では CA1、CA3 領域において神経細胞の減少が認められた。また、DG 領域における神経細胞増殖が低下していた。DG 領域の増殖神経細胞数と CA1 領域の神経細胞数との間には正の相関が認められ、DG 領域の神経細胞新生が海馬の神経細胞の維持に寄与することが示唆された。

c-Fos の発現を指標に神経活動を解析したところ、CA3、M1 領域で活動性の低下が認められた。M1 領域の活動低下が咀嚼刺激低下によるものかを検証するため、ローターロッド試験を試行した。その結果、両群において運動機能に差を認めず、M1 領域の活動低下が咀嚼刺激低下を反映していることが示された。また、シナプス形成に関しては、SD 群マウスの CA1、CA2 および CA3 領域にて減少していた。BDNF は、神経細胞の新生や維持、神経活動やシナプスに関わると言われているが、その mRNA 発現量は SD 群の海馬で低下していた。

＜考察＞

咀嚼刺激低下モデルは多く存在するが、咀嚼刺激低下が全身に与える影響は知られていなかった。本研究により、咀嚼刺激低下が頭頸部領域の成長を抑制する一方、全身の成長には影響しないことが示された。したがって、本研究で用いた咀嚼刺激低下モデルは咀嚼と脳機能の関連の解析に適したモデルであると考えられる。

咀嚼刺激と顎骨成長の関連は古くから指摘されており、実際、咀嚼刺激低下により下顎骨の成長抑制を認めた。顎骨の劣成長は歯槽骨と歯のサイズの不調和の原因となり、不正咬合を呈しうる。不正咬合は更なる咀嚼刺激の低下をもたらし、不正咬合と顎骨成長障害の負のサイクルに陥ることが懸念される。矯正学的アプローチはこの負のサイクルからの脱却に有効であると考えられる。

海馬は記憶形成の中枢である。DG 領域では神経細胞新生が起こり、これが CA1、CA3 領域の神経細胞に分化する。本研究でも SD 群の DG 領域における神経細胞増殖の低下と CA1、CA3 領域の神経細胞数の減少が認められ、咀嚼障害は神経細胞の減少を介して記憶・学習障害を惹起することが示唆された。

咀嚼刺激低下により、神経細胞活動の減少が CA3 領域で認められた。これは、CA3 領域は DG 領域に入力された記憶情報が最初に伝達される部位であり、外部刺激の影響を最も受けやすいた

めと考えられる。また、興味深いことにM1領域においても神経活動の低下が見られた。咀嚼刺激低下マウスにおいて全身の運動機能は低下しなかったことから、これは咀嚼刺激の低下に関連した変化であると考えられる。

BDNFは受容体TrkBと結合し、神経新生や神経活動、シナプス可塑性を制御することが知られている。本研究においては、咀嚼機能障害が海馬の*Bdnf*を減少させることが示された。近年、運動により骨格筋でカテプシンB（CtsB）が誘導され、BDNFの発現を増強させることが報告された。しかし、咀嚼機能障害においては咀嚼筋での*Ctsb*発現の低下は認められなかった。咀嚼刺激によるBDNF誘導の詳細なメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

＜結論＞

成長期の咀嚼刺激の低下は、海馬にて神経細胞増殖、神経活動およびシナプス可塑性に影響を及ぼし、記憶・学習機能を障害することが明らかとなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5488　号 | 福島　由香乃 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　櫻田　宏一<br>副　査　水口　俊介、森山　啓司 | |
| 論 文 題 目 | Reduced mastication impairs memory function | |

（論文審査の要旨）

食生活の変化に伴い現代人の咀嚼回数は劇的に減少している。成長期における咀嚼刺激の低下は顎顔面組織の成長発育、さらには記憶・学習機能に影響を与えることが知られている。また、加齢に伴う歯の喪失によって生じる咀嚼機能の低下が、認知症の危険因子の 1 つであることも分かってきた。現在、高齢化は全世界で進行しており、高齢化に伴う咀嚼機能の低下とそれによる脳機能の低下が大きな問題となっている。しかし、咀嚼機能と高次脳機能の関係に関しては不明な点が多く残されている。記憶・学習機能をはじめとした脳機能の障害を予防するために、咀嚼機能と脳機能の連関メカニズムを解明することが重要な課題となっている。以上の背景から、申請者は咀嚼刺激低下が脳機能の発達に影響を及ぼすメカニズムを客観的手法に基づいて検討した。

3 週齢の C57BL6/J 雄性マウスを用いた。固形食飼育の normal diet 群（ND 群)と同成分の粉末食飼育の soft diet 群（SD 群)にランダムに分け、11 週間飼育した。記憶・学習機能を評価する行動実験として受動的回避試験（passive avoidance test）と物体位置認識試験（object location test）を行った。咀嚼筋（咬筋・側頭筋・顎二腹筋)とヒラメ筋の筋重量測定を行い、大腿骨と下顎骨の海綿骨骨量測定には 3DμCT を用いた。また下顎骨の形態測定を行った。海馬と大脳皮質の神経細胞（NeuN 陽性）と海馬の新生神経細胞（BrdU 陽性)、活動神経細胞(c-Fos 陽性)およびシナプス後膜肥厚部（PSD-95 陽性）を評価した。海馬から抽出した mRNA から qRT-PCR 法により BDNF（*Bdnf*)とその受容体である TrkB（*Ntrk2*)の遺伝子発現を解析した。以上より申請者の研究は適切な研究デザインのもと遂行されており、脳における咀嚼刺激の影響を十分に検討可能な実験系を構築し、詳細に分析・考察している点で学術的価値を評価できる。

また、研究結果として、以下の知見を得ている。

SD 群のヒラメ筋重量、大腿骨の海綿骨骨量は ND 群と比較して有意差がないことがわかった。一方で頭頚部の咀嚼筋重量では SD 群にて閉口筋重量が有意に減少しており、下顎骨の海綿骨骨量も減少し、下顎骨形態も有意に縮小していることが認められた。これは本モデルが咀嚼刺激の低下により頭頚部領域に限局する表現型を呈することを示唆している。

申請者はさらに、咀嚼障害による記憶・学習障害のメカニズムを解析するため、海馬の神経細胞数を評価した。ND 群と比較し、SD 群では CA1、CA3 領域において神経細胞の減少が認められた。また、SD 群において DG 領域における神経細胞増殖が低下していた。c-Fos の発現を指標に神経活動を解析したところ、CA3、M1 領域で活動性の低下が認められた。M1 領域の活動低下が咀嚼刺激低下によるものかを検証するため、全身運動を評価するローターロッド試験を試行した。その結果、両群において運動機能に差を認めず、M1 領域の活動低下が咀嚼刺激低下を反映していることが示された。また、シナプス形成に関しては、SD 群マウスの CA1、CA2 および CA3 領域にて減少していた。BDNF は、神経細胞の新生や維持、神経活動やシナプスに関わると言われているが、その mRNA 発現量は SD 群の海馬で低下していた。

申請者は成長期における咀嚼刺激の低下は、海馬にて神経細胞増殖、神経活動およびシナプス可塑性に影響を及ぼし、記憶・学習機能を障害することを見いだした。

咀嚼刺激低下が全身に与える影響は不明な点が多かったが、本研究により頭頸部領域の成長を抑制する一方で、全身の成長には影響しないことが示された。海馬は記憶形成の中枢であり DG 領域から神経細胞が新生し、CA1、CA3 領域に分化する。本研究でも SD 群にて DG 領域の神経細胞増殖の低下と CA1、CA3 領域の神経細胞数の減少が認められた。このことより咀嚼刺激の低下は神経細胞の減少を介して、記憶・学習障害を惹起することが明らかとなった。また SD 群にて神経細胞活動の減少が CA3 領域と M1 領域で認められた。　また BDNF は受容体 TrkB と結合し、神経新生や神経活動シナプス可塑性を制御することが知られており、本研究でも SD 群において海馬の Bdnf が減少することが明らかとなった。

以上より、本論文は咀嚼刺激と脳機能に着目した重要な研究であり、その研究成果は高く評価され、今後の基礎および臨床歯学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 塚越　香 |
| 論文審査担当者 | 主査　原田　浩之<br>副査　川口　陽子　　吉田　惠一 |
| 論　文　題　目 | Association between Symptoms of Temporomandibular Disorders and Duration of Computer Use in a Working Population in Japan |

（論文内容の要旨）

<緒言>

顎関節症（temporomandibular disorders: TMD）は，顎関節または咀嚼筋に症状を生じる疾患であり，複数の寄与因子の積み重ねにより発症する多因子疾患といわれている．寄与因子の種類や総量の違いが，顎関節症の発症や悪化，慢性化，再発に影響するとされている．寄与因子としては外傷，解剖学的要因，ホルモンや遺伝的要因，パラファンクションを含めた行動要因，心理社会的要因など多くの研究報告がある．

一方，近年 Visual Display Terminal (VDT) 症候群が注目されている. VDT とはパーソナルコンピュータ（PC）のモニター画面やタブレット画面の総称であり，VDT を前にした作業（VDT 作業）の長時間化が身体的および精神的な問題を生じるとされている．身体的な症状はドライアイや眼精疲労などの眼症状と頭痛，頸部痛，肩痛，背部痛，腰痛など筋骨格系の症状で，精神的な症状は不安感や抑うつ状態の亢進などメンタルヘルスに関するものが報告されている. VDT 作業時間の長時間化が VDT 症候群に影響するといわれており，作業時間が 5 時間を超えると症状発症のリスクが高まると報告されている．

顎関節症も咀嚼筋や顎関節など筋骨格系に症状を呈する疾患であり，不安感や抑うつの亢進など, 心理社会的要因がその発症や慢性化に影響するといわれている．このことから VDT 作業が顎関節症に何らかの影響を及ぼすものと推測される．本研究では企業就労者を対象とし，VDT 作業の 1 つである PC の使用時間と顎関節症関連症状（TMD related symptoms: TRS）の関連性を明らかにすることを目的とした．

<方法>

調査対象は，都内および近県の一部上場企業 4 社に勤務する就労者 5,619 名である．調査には自己記入式の質問票を用い，これを各企業の健康診断に合わせて配布し，記入後に回収した．質問票の内容は 1）性別および年齢，2）TRS，3）寄与因子頻度 ，4）上下歯間隙維持不快感，5）PC 使用時間などの全 21 項目とした．

TRS の評価には，杉崎らが開発した質問票（screening questionnaire for TMD: SQ-TMD）を用いた．SQ-TMD は 4 項目で構成され，各項目に対して 5 段階で回答し，各項目の評価値の合計スコアをもとにして顎関節症をスクリーニングするものである．寄与因子については，それぞれ

5 段階で評価，PC 使用時間については 1 日の平均使用時間を記入してもらい評価した．

分析に先立ち，得られたデータについて以下に示す処理を行った．SQ-TMD については杉崎らの報告をもとに，4 項目の評価値合計スコアに対して 8 点以下を non-TRS 群，9 点以上を TRS 群とした．寄与因子の頻度については評価値が 0～2 を低頻度（0），3～4 を高頻度（1）と 2 値データに変換した．PC 使用時間は 1 時間毎に TRS 群の割合を算出し，値に大きな変化がみられた時間を基準に 2 値化した．non-TRS 群と TRS 群との間で各因子の高頻度率を単変量解析で比較した．多変量解析は TRS を従属変数，単変量解析で有意差が認められた項目を独立変数とし，ロジスティック回帰分析（変数減少法尤度比）を行ってオッズ比（OR）を算出した．分析には SPSS version 24.0 を用い，有意水準は 0.05 とした．

なお，本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行った(No.325).

<結果>

最終的な分析対象者は，欠損値のあった 843 名(15%)および 1 日当たりの PC 使用時間が 1 時間未満であった 70 名(1.2%)を除外した 4,706 名（男性 3,317 名，女性 1,389 名)であった．解析対象者の平均年齢は 38.6±9.4 歳であった．また TRS 群は 360 名(7.6%)で，対象者全体の一日あたり PC 使用時間は平均 6.4 時間だった．

PC 使用時間を 1 時間毎に分けた際の TRS 群の割合は，4 時間を境として大きな変化が認められた．その結果，PC 使用時間のカットオフ値を 4 時間と仮定し，4 時間未満と 4 時間以上で 2 値化した．単変量解析の結果，ガム咀嚼と爪噛みでは両群間で有意差が認められなかったため，それ以外の項目をロジスティック回帰分析の独立変数とした．

ロジスティック回帰分析の結果，年齢(OR=0.99)，性別（OR=1.84)，姿勢の悪さ(OR=1.41)，片咀嚼(OR= 2.01)，緊張(OR=1.43)，起床時症状(OR=2.64)，上下歯間隙維持不快感(OR=1.75)，4 時間以上の PC の使用(OR=1.49)が TRS と有意な関連がある因子として抽出された．

<考察>

PC 使用を含む VDT 作業と筋骨格系の症状との関連性については様々な報告があり，頭痛，頸部痛，肩痛，背部痛，腰痛が主なものである．頭頸部に症状が出現することから，顎関節や咀嚼筋など顎関節症症状に関与している可能性は十分に考えられる．本研究では， PC 使用時間について 4 時間をカットオフ値として解析したところ，これが有意な因子として抽出された．過去の研究では, VDT 作業が 5 時間を超えると頭痛､肩痛など筋骨格系症状増加すると報告されている．このことから，顎関節症は他の筋骨格系よりも短い VDT 作業時間で影響を受ける可能性が考えられた．

また，TRS と関連のある因子として，片咀嚼，姿勢の悪さ，緊張，起床時症状，および上下歯間隙維持不快感が抽出された．姿勢の悪さについては，PC の使用とも関連している可能性がある．緊張については，心理社会的要因がブラキシズムを増加させ，これが顎関節症に影響を及ぼす可能性があると報告されている．また，上下歯間に存在する安静空隙を維持することが不快であるという状態が有意な因子として抽出されたが，これは覚醒時に上下の歯を咬み続けている可能性を示唆するものである．

本研究は質問票を用いた調査であり，顎関節症患者を直接診査していないため，TRS という表現を用いた．したがって，顎関節症そのものを表しているわけではない．しかし，SQ-TMD の感

度と特異度が高いことと，5,000 名近いサンプル数であることから，実際の顎関節症の評価に近い結果が得られたと考えられる．

今回の研究では PC 使用時間が TRS に与える影響を検討したが，VDT 作業全般との関連性を検討するのであれば，タブレットやスマートフォンなど，他の VDT 機器も含めた調査が必要になると考えられる．また，将来的には VDT 作業の時間だけではなく，休憩の有無や業種，VDT 作業の詳細も含めた検討が必要と考えられる．

<結論>

企業就労者に対し，顎関節症関連症状と PC 使用時間との関係について質問票による調査を行った結果，4 時間以上の PC 使用が顎関節症関連症状のリスクを高める有意な因子であった．PC の使用は他の筋骨格系症状も惹起するが、顎関節関連症状の方が早期に影響を受ける可能性が示唆された．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5489　号 | 塚越　香 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　原田　浩之<br>副　査　川口　陽子　　吉田　惠一 | |
| 論 文 題 目 | Association between Symptoms of Temporomandibular Disorders and Duration of Computer Use in a Working Population in Japan | |

（論文審査の要旨）

顎関節症（Temporomandibular disorders:TMD）は，顎関節および咀嚼筋といった筋骨格系に症状を呈する疾患であり，心理社会的要因が発症や慢性化に影響するといわれている．一方で, Visual Display Terminal(VDT)作業に伴う症状として眼症状，筋骨格系症状，およびメンタルヘルスの悪化が報告されている．VDT 作業が筋骨格系疾患である顎関節症に対しても影響する可能性があるが，両者の関連についての報告は少ない．そこで申請者塚越は企業就労者を対象としたアンケート調査により, VDT 作業の 1 つである PC の使用時間と顎関節症関連症状(TMD related symptoms: TRS)の関連性を検証した．

分析対象者は，4 企業の就労者 4,706 名である．調査には自己記入式の質問票を用いた．質問票の内容は，年齢，性別，TRS，習癖行動，メンタルヘルス項目，上下歯間隙維持不快感および PC 使用時間からなる 21 項目である．得られたデータをもとに対象者を non-TRS 群と TRS 群に分けた．寄与因子の頻度については低頻度と高頻度の 2 値データに変換し，PC 使用時間は TRS 率が大きく変化する 4 時間をカットオフ値として 2 値化した.単変量解析でそれぞれの因子について 2 群間で比較し，有意差があった因子を多変量解析に使用した．多変量解析は TRS の有無を従属変数，各寄与因子を独立変数としたロジスティック回帰分析（変数減少法尤度比）を行い，オッズ比(OR)を算出した．

ロジスティック回帰分析の結果，年齢(OR=0.99)，性別 (OR=1.84)，姿勢の悪さ(OR=1.41)，片咀嚼(OR=2.01)，緊張(OR=1.43)，起床時症状(OR=2.64)，上下歯間隙維持不快感(OR=1.75)，4 時間以上の PC 使用(OR=1.49)が TRS と有意に関連がある因子として抽出された．

VDT 作業と顎関節症との関連性を示唆した報告はいくつかあるものの、その使用時間について具体的に言及した研究はない．塚越はこの点に注目しアンケート調査を行い，4 時間以上の PC 使用が TRS 発現の危険因子となることを報告した点は独創的といえる.他の筋骨格系症状については VDT 作業が 5 時間を超えると増加するという報告があるが，顎関節症についてはそれよりも短い作業時間で影響を受ける可能性が示唆された．また，TRS と関連する他の因子として，片咀嚼，姿勢の悪さ，緊張，起床時症状，上下歯間隙維持不快感が抽出された．顎関節症は多因子疾患であり，そのコントロールが治療のポイントになるため，これらの危険因子を明らかにした臨床的意義は非常に大きい．本研究の成果は広く歯科医学・医療の進歩発展に寄与するものと判断される．よって本論文は博士（歯学）の学位を授与するに十分価値があるものと認められた．

学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 矢野　孝星 |
| 論文審査担当者 | 主査　中島　友紀<br>副査　柴田　俊一　　新田　浩 |
| 論　文　題　目 | The Role of Tsukushi (TSK), A Small Leucine-rich Repeat Proteoglycan, in Bone Growth |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

内軟骨性骨化は石灰化骨を形成する上で重要な過程である。Small Leucine-rich Repeat Proteoglycan（SLRP）は骨格領域に局在しており、骨の発達形成過程で重要な役割を果たしている。Tsukushi (TSK) は SLRP family に属する分子の一つである。これまでの研究結果から、TSK が骨形成に関連する可能性が示唆されるが、その詳細なメカニズムは、未だ不明な点が多いのが現状である。本研究では、TSK 欠損マウスを用いて、生体レベルでの骨形成における TSK の役割についての研究を行った。TSK 欠損マウスは、体長の減少、体重の減少、骨量の低下、大腿骨成長板の厚みの減少を伴う骨長の低下が見出された。また *in vitro* にて間葉系細胞株に siRNA を用いた実験系において、TSK をノックダウンさせると、軟骨細胞分化の促進が確認され、軟骨の分化を司る遺伝子群の変化が見出された。

＜緒言＞

石灰化骨を形成する上で重要な過程である内軟骨性骨化の過程には複数のシグナル経路が関わっている。SLRP はコラーゲン等の細胞外マトリクスや、BMP、TGF−β、FGF 等の成長因子と結合し、その働きを調節し、細胞機能を調節する。SLRP はほとんどの骨組織に局在しており、SLRP の欠如は、低身長を含む多様な表現型や、骨粗鬆症や異所性骨形成等の変性疾患を引き起こす事が知られている。TSK は SLRP ファミリー分子として同定された。TSK は構造的には SLRP classⅣに分類されているが、機能的にはビグリカンやデコリン、アスポリンを含む SLRP class Ⅰの特徴を有している。ビグリカン欠損マウスは、骨長の短縮と、骨量の低下を示す。過去の報告では、TSK は BMP、FGF、 Wnt、 TGF−βのようなシグナル因子を阻害することで、細胞外シグナル経路を多様に調整することが明らかになった。また、TSK 欠損マウスは、脳の前交連の欠如や、TGF−βシグナルに関連する毛髪サイクルの遅延、等の表現型を示した。BMP、FGF、Wnt、TGF−βのような因子は、成長板の細胞機能や骨形成において重要な役割を果たしており、TSK が骨形成に関与する可能性が示唆されるが、骨形成におけるその役割については、未だ不明な点が多いのが現状である。本研究では、TSK 欠損マウスを用いて、骨の形態解析から、骨組織の表現型を解明し、細胞株を用いた実験から、TSK の骨形成における役割の解明を試みた。

＜方法＞

まず、TSK 欠損マウスの骨における表現型を探るため、体重計測、体長計測、大腿骨骨長の計

測、アルシアンブルーとアリザリンレッドを用いた二重骨格染色を行い、野生型（WT）マウスとの比較検討を行った。また、μCT を用いて大腿骨の骨形態計測を行い、海綿骨骨密度と、皮質骨の厚みを計測し、両群間の比較検討を行った、さらに、大腿骨において LacZ 染色、H-E 染色、トルイジンブルー染色を施し、成長板軟骨の組織学的評価、成長板軟骨各層の厚みの計測を行い、両群間の比較検討を行った。レーザーマイクロダイセクション法を用いて、成長板軟骨層の組織回収を行い、各軟骨分化マーカー遺伝子の発現レベルを調べ、両群間で比較検討した。

また、間葉系細胞株である、ATDC5 を用いて、TSK siRNA を導入し、TSK の発現をノックダウンさせた時の、細胞分化能、経時的な各軟骨分化マーカー遺伝子の発現を観察した。

＜結果＞

TSK 欠損マウスは、寿命と繁殖力に異常がなく、異常行動も認められなかったが、TSK 欠損マウスは WT マウスと比較し、有意な体長の減少を認めた。また、生後 3 週齢から、10 週齢にいたるまで、各週齢において有意な体重の減少も認めた。さらに、3 週齢（幼若期）と 20 週齢（成体期）において、大腿骨の骨長計測をしたところ、いずれの週齢おいても、TSK 欠損マウスの骨長は有意に減少していた。新生仔マウスの二重骨格染色では、TSK 欠損マウスでは骨格と軟骨領域のサイズが減少していた。栄養摂取状況が骨格系の成長に影響を及ぼすことが知られているが、食事摂取量に両群間で有意な差を認めなかった。

次に、μCT を用いた骨形態計測を行い、骨の微細構造について解析したところ、幼若期、成体期いずれにおいても、TSK 欠損マウスでは骨量の減少を示した。また、骨梁数や厚み等の骨の微細構造を示すパラメーターも有意に減少した。一方、皮質骨の厚みは、幼若期においては、TSK 欠損マウスの皮質骨の厚みに変化は無かったが、成体期においては、TSK 欠損マウスの皮質骨の厚みは有意に減少した。TSK 欠損マウスの骨量減少という現象が、骨芽細胞あるいは破骨細胞の機能異常によるものかどうかを示すために WT マウスと TSK 欠損マウス（20 週齢）の大腿骨から骨髄細胞を採取し、骨芽細胞と破骨細胞の分化誘導試験を行った。

その結果、TSK 欠損細胞では、骨形成能に有意な差は見られなかったが、破骨細胞分化誘導は促進された。この結果から、成体期においては、TSK は破骨細胞の分化を制御することで、骨量を調節している可能性が示唆された。

続いて、TSK 遺伝子欠損アリルを検出するため、大腿骨の LacZ 染色を行い、大腿骨における TSK の発現相当部位を調べたところ、TSK は成長板軟骨の軟骨細胞や、骨髄腔内の骨梁および皮質骨周囲の細胞骨内にいたるまで広範囲で発現していた。次に、TSK 欠損マウスの軟骨における異常を観察するため、組織学的評価を行ったところ、TSK 欠損マウスの成長板増殖軟骨層の軟骨細胞配列は乱れ、増殖軟骨層と肥大軟骨層の厚みは有意に減少した。さらに、成長板軟骨の遺伝子発現を観察したところ、TSK 欠損は、*Sox9* や *Runx2* の有意な発現減少をもたらし、*Col10a1* や *Mmp13* などの中期・後期マーカーの発現を有意に上昇させた。

*in vitro* 実験においては、siRNA 導入群では、コントロール群と比較し、軟骨分化誘導条件下で、分化能が有意に上昇した。また、遺伝子発現を観察したところ、分化誘導条件下で、導入群においては *Sox9*、*Runx2* の発現が有意に減少し、 *Col2a1*、*Col10a1*、および *Mmp13* の発現は有意に上昇した。

＜考察＞

TSK 欠損マウスは、低身長、低体重、骨量の減少を伴う骨長の短縮等の表現型を示し、また、成長板軟骨層の厚みの減少や軟骨細胞配列の乱れを示した。このことは、骨格形成異常が成長板軟骨の機能異常によるものであることを示唆した。さらに、TSK 欠損は、成長板軟骨細胞における主要軟骨分化マーカーの発現低下と、中・後期マーカーの発現減少をもたらした。siRNA を間葉系細胞株に導入した *in vitro* 実験では、TSK 発現の低下が軟骨形成促進をもたらすことを明らかにした。これらの結果は、TSK が軟骨形成を促進する何らかのシグナル伝達分子を阻害している事を示している。さらに、TSK の発現低下により、主要軟骨形成マーカーの mRNA 発現レベルは上昇し、中・後期軟骨形成マーカーの発現は上昇した。このことから、TSK は、成長板軟骨細胞機能を調節することで、内軟骨性骨化とそれによる骨形成を調節し、骨の成長に影響を及ぼしていることが明らかになった。

TSK 欠損マウスの成長板軟骨細胞における *Sox9* および *Runx2* の発現レベルは有意に減少し、それと同様に、細胞株においても、TSK がノックダウンされると、*Sox9* および *Runx2* の発現レベルは有意に減少した。*Sox9* は、軟骨形成に必須の役割を果たし、軟骨内骨化の後期を阻害する。また、*Runx2* は増殖性軟骨細胞の肥大性軟骨細胞への分化を促進させる。対照的に、TSK 欠損マウスの成長板軟骨細胞における *Col10a1* および *MMP13* の発現レベルは有意に上昇し、それと同様に、細胞株においても TSK がノックダウンされると、*Col2a1*、*Col10a1* および *MMP13* の発現が経時的に上昇した。中・後期の軟骨分化マーカーは肥大軟骨細胞および軟骨内骨化と関連しており、肥大軟骨細胞の分化の促進は、軟骨細胞の総数を減少させ、早期骨化を誘発し骨格発達を損なう。つまり、TSK が欠損することにより、増殖性軟骨細胞数の減少および肥大性軟骨細胞の分化の加速を引き起こし、組織が未成熟な状態での軟骨内骨化の促進が引き起こされる事が考察された。成長板軟骨の活性は、パラクリン因子のみならず、GH および IGF-1 などの複数のホルモンによっても制御されており、栄養摂取状況は、IGF-1、レプチン、甲状腺ホルモンなどの内分泌調節物質に強く影響を受ける。しかし、WT マウスと TSK 欠損マウスとの間で食物摂取量に有意な差は無かった。

TSK は、class I の機能的特徴を有しており、SLRP class I の欠如が、骨粗鬆症や異所性骨形成および低身長症を含む変性疾患を引き起こすことが知られている。この表現型の一部は、本研究で示された TSK 欠損マウスの表現型と類似していると考えられる。また、SLRP class I は TGF-β と相互作用することによって骨格成長、骨形成および軟骨機能を制御するが、以前の研究では、TSK が TGF-β1 に直接結合し、シグナル伝達を調節する事が明らかになっている。軟骨細胞は TGF-βシグナルの影響を強く受けるが、本研究の研究結果を考慮すると、TSK は、TGF-β を抑制することによって軟骨内骨化を調節している可能性が示唆された。過度の TGF-βシグナル伝達は、先天的な結合組織疾患と関連しており、そのうちのいくつかは、短い身長および短い骨によって特徴付けられる。TSK の機能を今後解明していくことによって、骨格系疾患の新しい治療法が発見される可能性がある。

＜結論＞

本研究は、TSK が軟骨細胞を調節することによって骨格形成に重要な役割を担うことを、生体レベルで明らかにした。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5490　号 | 矢野　孝星 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　中島　友紀<br>副査　柴田　俊一　　新田　浩 | |
| 論　文　題　目 | The Role of Tsukushi (TSK), A Small Leucine-rich Repeat Proteoglycan, in Bone Growth | |

（論文審査の要旨）

内軟骨性骨化は石灰化骨を形成する上で重要な過程である。Small Leucine-rich Repeat Proteoglycan (SLRP)は骨格領域に局在しており、骨の発達形成過程で重要な役割を果たしている。Tsukushi (TSK) は SLRP ファミリー分子の一つであり、これまでの研究結果から、TSK が骨形成に関連する可能性が示唆されるが、その詳細なメカニズムは、未だ不明な点が多いのが現状である。

矢野孝星は、TSK が骨形成においてどのような役割を果たしているかを明らかにするために、TSK 欠損マウスを用いて骨における表現型の解析を行った。TSK 欠損マウスは体長の減少、体重の減少、骨量の低下、大腿骨成長板の厚みの減少を伴う骨長の低下を示した。また *in vitro* での間葉系細胞株に siRNA を用いた実験系において、TSK をノックダウンさせると、軟骨細胞分化が促進された。また主要軟骨分化マーカー遺伝子の発現低下と、中・後期軟骨分化マーカー遺伝子の発現上昇を伴った。

本研究は骨格形成における TSK の機能的な役割を明らかにした報告であり、TSK が軟骨細胞を調節することによって骨格形成に関与していることが明らかになった。

本研究から、矢野孝星は以下の結果を得た。

- TSK 欠損マウスは、低身長、低体重を示すことを確認した。
- TSK 欠損マウスは骨量の減少を伴う骨長の短縮を示すことを確認した。
- TSK 欠損マウスの骨髄細胞では、破骨細胞分化が促進することを確認した。
- TSK 欠損マウスの大腿骨成長板の厚みが減少することを確認した。
- TSK が欠損した成長板軟骨では、*Sox9* や *Runx2* の発現が有意に減少し、*Col10a1* や *Mmp13* などの中期・後期マーカーの発現が有意に上昇することを確認した。
- *In vitro* 実験においては、siRNA 導入群でコントロール群と比較し、非誘導条件下では有意に軟骨細胞の増殖能が上昇し、また誘導条件下では、分化能が有意に上昇した。また遺伝子発現を観察したところ、分化誘導条件下で、導入群においては *Sox9*、*Runx2* の発現が有意に減少し、 *Col2a1*、*Col10a1* および *Mmp13* の発現は有意に上昇した。
- 間葉系細胞株を用いた *in vitro* 実験において、TSK をノックダウンさせると、コントロール群と比較し、軟骨分化誘導条件下で、分化能が有意に上昇することを確認した。
- 間葉系細胞株を用いた *in vitro* 実験において、TSK をノックダウンさせると、軟骨分化誘

導条件下で、*Sox9*、*Runx2* の発現が有意に減少し、 *Col2a1*、*Col10a1* および *Mmp13* の発現が有意に上昇することを確認した。

これらの結果から矢野孝星は、以下のことを考察した。

- TSK 欠損マウスは、低身長、低体重、骨量の減少を伴う骨長の短縮等の表現型を示し、また、成長板軟骨層の厚みの減少や軟骨細胞配列の乱れを示した。
- TSK は成長板軟骨細胞機能を調節することで、内軟骨性骨化とそれによる骨形成を調節し、骨の成長に影響を及ぼすことを見出した。

以上のように、本研究において、矢野孝星は、TSK 欠損マウスの表現型の解析と、間葉系細胞株を用いた *in vitro* の実験を行うことで、TSK の骨形成における役割の重要性を明らかにした。

この知見は、新規の SLRP である Tsukushi が骨形成を制御するメカニズムを解明するための一助となり、今後の医学および歯学分野における骨疾患の制圧を目指した治療戦略の分子基盤になると考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 河野　葉子 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　深山　治久<br>副　査　　俣木　志朗、森尾　郁子 |
| 論　文　題　目 | Effects of oral stimulation with capsaicin on salivary secretion and neural activities in the autonomic system and the brain |

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

トウガラシの辛味成分であるカプサイシン摂取の効果については胃粘膜保護やエネルギー消費促進などが報告されているが、カプサイシンの口腔内への刺激が口腔内状態や神経活動に及ぼす影響についてはほとんど調べられていない。そこで本研究では、カプサイシンの口腔内刺激が、唾液分泌量と唾液成分、自律神経活動および脳活動に及ぼす影響について検討した。健康な成人を対象とし、カプサイシンおよび５基本味（甘味、塩味、酸味、うま味、苦味）で刺激した。各溶液の濃度は、各被験者の閾値に基づいて決定した。そして、カプサイシンと５基本味溶液の口腔内刺激による唾液分泌量変化を測定し、唾液中の成分として、粘膜免疫において主要な役割を果たす分泌型免疫グロブリンＡ（SIgA）の濃度変化を調べた。また、刺激による自律神経活動の変動を検討するため、唾液中のαアミラーゼ活性と心拍変動を指標として計測した。さらに、カプサイシン刺激時の精神状態を反映した脳活動変化を検討するため、脳波記録を行い、θ波、α波、β波のパワーレベルを分析した。

唾液分泌量については、脱イオン水と比較してカプサイシン、酸味、塩味で有意な増加がみられ、カプサイシンは味覚刺激よりも高い増加効果を示した。刺激直後の唾液分泌量もカプサイシンは他の刺激より多く、刺激後６分まで分泌量増加は持続した。また、カプサイシン刺激直後には１分あたりの SIgA 分泌量が有意に増加した。自律神経活動においては、カプサイシン刺激により唾液αアミラーゼ活性が有意に上昇し、心拍変動からも交感神経活動の有意な上昇が観察された。一方、脳波では、カプサイシン刺激によるβ波パワーの有意な上昇がみられたが、α波、θ波には変化がなかった。

以上の結果より、カプサイシンによる口腔内刺激は、唾液分泌を顕著にかつ持続的に増加させ、SIgA 分泌量を増加させたことから、口腔内状態向上に効果的であることが示唆された。また、カプサイシン刺激により交感神経活動が亢進し、脳波のβ波成分が増加したことから身体的・精神的な活性化を促すことが示唆された。

＜緒言＞

食物に添加されるトウガラシなどの香辛料は、食物をより美味しく感じさせ、食欲を刺激する効果をもつ。トウガラシに含まれる辛味成分カプサイシンについては受容から知覚までのメカニズムの解明が進んでおり、味覚とは異なる神経経路を介する。カプサイシンのバニリル基が、痛覚神経終末に発現するバニロイド受容体 Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 （TRPV1）に結合活性化して、陽イオンが流入し、細胞膜の脱分極から活動電位が発生す

る。この信号が大脳皮質に到達して灼熱感が辛味として知覚される。カプサイシンの作用については、嚥下反射促進効果、胃粘膜保護効果、エネルギー代謝促進効果など、摂取による効果はいくつか調べられているものの、摂取を伴わない口腔内への刺激が、口腔機能や神経活動に及ぼす影響についてはほとんど調べられていない。また、酸味やうま味などの味覚刺激が、味覚－唾液反射を介して唾液分泌を著しく増加させることは報告されているが、カプサイシンの唾液分泌への影響は調べられてはいない。唾液は、粘膜保護作用、緩衝作用、抗菌作用、組織修復作用などの重要な機能をもつため、唾液量の増加は口腔および全身の健康に重要である。そこで、本研究では、カプサイシンの口腔内刺激がヒトの唾液分泌量に及ぼす影響について、5 基本味の効果と比較検討した。加えて、唾液成分として粘膜免疫で主要な役割を果たし口腔および上気道への細菌およびウイルス感染を防ぐ SIgA の濃度を測定した。また、カプサイシンを含む食品の摂取後に交感神経活動の亢進が認められていることから、本研究でも自律神経活動への影響を検討するために、交感神経活動に伴って上昇する唾液αアミラーゼ活性および交感神経活動と副交感神経活動の変化を反映する心拍変動を指標として測定した。一方、カプサイシンには刺激性があり、精神活動を変化させる可能性があることから、それに伴う脳活動の変化を脳波から分析した。

＜方法＞

被験者は口腔内に異常のない健康な成人 18 名で、平均年齢は 26.6±4.5（S.D.）歳であった。カプサイシンおよび 5 基本味への感受性の差を考慮し同等の刺激強さを得るために、各被験者において、まずカプサイシンの検知閾値と 5 基本味の認知閾値の測定を行った。測定した閾値の 4 倍濃度の 5 基本味溶液とカプサイシン溶液および脱イオン水 5ml を被験者の口腔内に注入し、被験者は口腔内に各溶液を 1 分間保持した後分泌された唾液と共に吐き出し、その重量から刺激中の唾液分泌量を求めた。さらに各刺激終了直後の 1 分間の唾液分泌量を測定し、カプサイシンでは刺激後 8 分まで 1 分間隔で唾液分泌量を測定した。加えて、カプサイシン刺激の前後で、唾液中 SIgA 濃度およびαアミラーゼ活性を測定し、刺激による変化を調べた。また、カプサイシン刺激前と刺激中に被験者の胸部に装着した電極から心電図を記録し、心拍変動の周波数解析により刺激による交感神経活動および副交感神経活動の変動を分析した。同様に、カプサイシン刺激前、刺激中に前頭部頭皮上に装着した電極から脳波を記録し、周波数解析を行ってθ波、α波およびβ波の各パワーを計測した。

＜結果＞

カプサイシン、酸味、および塩味による口腔内刺激中、唾液分泌量は脱イオン水と比較して有意に増加した。とりわけ、カプサイシンの唾液分泌促進効果はすべての味覚刺激よりも有意に高く、刺激後においても同様に高かった。加えて、カプサイシンによる有意な唾液分泌促進は刺激後 6 分まで持続した。また、1 分間に分泌される唾液中 SIgA 量はカプサイシン刺激によって有意に増加した。

自律神経活動については、カプサイシン刺激によるαアミラーゼ活性の上昇と心拍変動解析から交感神経活動の有意な上昇が示され、副交感神経活動には有意な変化は認められなかった。また、脳波解析の結果では、カプサイシンによる刺激中、β波パワーの有意な上昇が観察されたが、α波、θ波のパワーには変化がみられなかった。

＜考察＞

カプサイシンは、刺激中および刺激直後において、5 基本味よりも高い唾液分泌促進効果を示し、刺激後の促進効果は 6 分間持続した。唾液分泌促進については、酸味とうま味の有効性が報告されているが、今回検討したカプサイシンには味覚刺激よりも高い効果が認められた。このことから、味覚刺激とカプサイシンの辛味刺激を組み合わせることにより、唾液分泌を大幅に促進できる可能性が示唆された。

さらに、唾液中の SIgA 分泌量はカプサイシン刺激によって有意に増加した。SIgA 分泌量は味覚刺激と嗅覚刺激を組み合わせることによって一層増加したとの報告があることから、味覚刺激とカプサイシン刺激を組み合わせることにより、さらなる SIgA 分泌量増加が得られる可能性が示唆された。唾液中の SIgA 量は加齢により低下することが知られているため、カプサイシンの口腔内刺激は免疫機能向上の面から高齢者の口腔の健康に寄与すると考えられる。

自律神経活動においては、カプサイシン刺激により交感神経活動が上昇したが、心拍変動からみたこの上昇はカプサイシン刺激中に限られていた。動物実験で、カプサイシン摂取が、交感神経活性化を介してエネルギー消費を促進し、脂肪蓄積を抑制することが報告されているが、これらの効果はカプサイシン摂取後数十分で出現しており、本研究での交感神経活動の上昇とは時間経過が大きく異なる。したがって、代謝変化を引き起こすには、短時間のカプサイシンによる口腔内刺激では不十分であり、カプサイシン摂取後の消化管における作用が重要であると考えられる。

一方、カプサイシン刺激時に脳波のβ波パワーが増加したが、β波は緊張や注意を集中した際に増加することが知られていることから、カプサイシンの口腔内刺激が覚醒効果をもつ可能性が示唆された。

＜結論＞

カプサイシンの口腔内刺激により、唾液と SIgA の分泌量が増加した。また、カプサイシン刺激中、交感神経活動が亢進し、脳波のβ波成分のパワーが増加した。これらの結果から、カプサイシン刺激は口腔内状態を向上させ、心身の活性化に役立つ可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5491　号 | 河野　葉子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　深山　治久<br>副　査　　俣木　志朗、森尾　郁子 | |
| 論 文 題 目 | Effects of oral stimulation with capsaicin on salivary secretion and neural activities in the autonomic system and the brain | |

（論文審査の要旨）

トウガラシなどの辛味香辛料は、食物をより美味しく感じさせ、食欲を刺激する。とりわけ、トウガラシの辛味成分であるカプサイシンについては、全身や嚥下機能への作用が注目され、胃粘膜保護効果、エネルギー代謝促進効果など、摂取による全身への効果が報告されている。また、口腔機能への影響に関しては、摂食嚥下障害患者へのカプサイシンの口腔内投与により、嚥下反射が促進されたことが報告されている。しかし、カプサイシンの口腔内刺激が、口腔内状態や神経活動に及ぼす影響については検討されておらず、特に、唾液分泌に及ぼす影響については全く知見がないため、河野葉子はカプサイシン口腔内刺激が唾液分泌、自律神経活動および脳活動に及ぼす影響を検討することを計画した。

実験では、カプサイシンの検知閾値と 5 基本味の認知閾値を測定した後、閾値の 4 倍濃度の 5 基本味溶液とカプサイシン溶液で口腔内刺激を行い、個人の感受性の差に応じて同等の刺激強度が得られるよう配慮している。安静時唾液量を測定後、各刺激溶液を被験者の口腔内に注入し、１分間保持し、吐き出した際の重量増加から刺激中の唾液分泌量を求めた。加えて、味覚刺激後ならびにカプサイシン刺激後の唾液分泌量を継続的に測定し、各刺激と比較したカプサイシンの唾液分泌への効果を検討している。唾液分泌量の検討に加えて、カプサイシン刺激前後の唾液中 SIgA 濃度を測定し、口腔内への影響を多角的に検討した。また、自律神経活動に関しては、唾液αアミラーゼ活性と心拍変動の周波数解析の 2 つの分析方法により検討している。加えて、精神状態の指標として、脳波の周波数解析からθ波、α波およびβ波の各パワーの計測を行っている。これら一連の実験手技ならびにデータ分析の手法は、いずれも適切かつ妥当であり、周到な準備の下に本研究が遂行されたものと評価された。

本研究の結果から、河野は以下の知見を得ている。

１．唾液分泌量は、刺激中、脱イオン水と比較して、カプサイシン、酸味、塩味で有意に増加し、カプサイシンは 5 基本味すべてより高い増加効果を示した。また、刺激後の唾液分泌量は、カプサイシンで脱イオン水および 5 基本味に比較して有意な増加がみられた。安静時と比較したカプサイシン刺激による有意な唾液分泌量の増加は刺激後 6 分まで持続した。

２．唾液 SIgA 分泌量は、刺激前のベースラインと比較してカプサイシン刺激直後に有意に上昇した。

３．唾液α-アミラーゼ活性の上昇および心拍変動分析から、カプサイシン刺激による交感神経活動の亢進が認められた。
４．カプサイシン刺激中、脳波中のβ波が増加し、α波とθ波では有意な変化は認められなかった。

本研究で得られた知見と過去の文献に基づき、カプサイシンは味覚刺激よりも強く持続的な唾液分泌促進効果を有し、味覚刺激の併用により高い唾液分泌の促進効果が得られる可能性、SIgA 分泌量増加により口腔免機能を向上させ高齢者の口腔状態の改善に寄与する可能性、ならびにカプサイシン刺激の覚醒効果について論理的かつ合理的に考察している。辛味と 5 基本味の唾液分泌量の違いについて明らかにしている報告はこれまでに例がなく、辛味刺激の口腔と全身への効果の知見は有益な情報を提供するものであり、口腔保健の維持増進に多大な示唆を与えるものと考える。従って本論文は、博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | SHUJAA ADDIN Ammar Abduljalil Yahya |
| 論文審査担当者 | 主査　木下 淳博<br>副査　宇尾 基弘　　塩田 真 |
| 論　文　題　目 | Biodegradable Gelatin/Beta-Tricalcium Phosphate Sponges Incorporating Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-2 for Treatment of Recession-Type Defects: A Split-Mouth Study in Dogs |

（論文内容の要旨）

**Introduction**

Gingival recession is a consequence of gingival margin displacement below the cemento-enamel junction (CEJ). To resolve such defects, combined hard and soft tissue regeneration is needed. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), a heparin-binding cytokine with strong angiogenic activity, have been shown exhibits promise with regard to periodontal regeneration. Different scaffolds have been utilized as growth factor carriers in an attempt to optimize bioavailability at therapeutic sites. Among these, a biodegradable sponge comprising gelatin with incorporated β-TCP (gelatin/β-TCP) has been developed. These gelatin scaffolds provide controlled release of rh bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and rhFGF-2, and are thus effective in inducing new bone formation in various experimental bone defects.

However, to date, treatment of gingival recessions by using rhFGF-2 and gelatin/β-TCP sponges has not been reported. In the present study, we evaluated regenerative effects of rhFGF-2 combined with a gelatin/β-TCP sponge on artificially created buccal recession-type defects in dogs

**Materials and Methods**

Gelatin sponges (isoelectric point, 5) containing 50% β-TCP (average diameter, 2.89 μm) were subjected to chemical crosslinking with glutaraldehyde as previously described. Freeze-dried rhFGF-2 was dissolved to a concentration of 0.3 mg/ml in phosphate-buffered saline solution (PBS; pH 7.4). rhFGF-2 incorporation was achieved by soaking gelatin/β-TCP sponges with 100 μl of rhFGF-2 solution before application to surgical sites.

Five 15-month-old male beagle dogs (body weight: 13–15 kg) were utilized; the sample size was determined using previous studies as reference. All experimental procedures were conducted according to a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan (No. 0160319 A). After

complete and partial thickness flap elevation, standardized critically-sized buccal dehiscence defects (extending 6 mm from the CEJ apically to the alveolar bone crest and 5 mm mesiodistally) were created using steel burs and chisels. The root surface was then scaled and planed using hand curettes. Reference notches were made at the level of the CEJ and the bottom of the defects. Bilateral defects were assigned randomly as gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 and gelatin/ß-TCP sites (split mouth design) by flipping a coin. Gelatin/ß-TCP sponges were trimmed (10 mm x 10 mm x 2 mm) to allow an extension of 2–3 mm on all sides of the defect. Gelatin/ß-TCP sponges soaked with 0.3% rhFGF-2 (100 μl) or PBS (100 μl) were placed in gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 or gelatin/ß-TCP sites, respectively. Finally, the flaps were positioned coronally and secured with interrupted sutures.

Tissue blocks were fixed on a cylindrical holder and subjected to cone-beam volumetric CT. The scanned data were reconstructed to three- and two-dimensional images using TRI/3D-BON software. New bone volume within the defects was calculated using this software.

Tissue blocks were subjected to histological processing, and histological sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin or Masson's trichrome. Histological analyses were performed to measure periodontal regeneration parameters including epithelial length, connective tissue attachment, new cementum, new bone height, new bone area, and defect height.

The paired t test (n = 5) was used to analyze differences between the two groups. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

**Results**

All treated sites exhibited favorable clinical healing with no suppuration or abscess formation. Complete root coverage was achieved in both groups.

Regarding micro-CT results, bone regeneration was detected in both groups; however, the gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites exhibited significantly larger volumes of new bone when compared to the gelatin/ß-TCP sites (4.61 ± 1.19 $mm^3$ and 1.77 ± 0.86 $mm^3$ respectively; p = 0.014).

Regarding histological results, scaffold remnants could not be identified in any of the 10 defects, and root resorption and ankylosis were not observed. New bone formation was observed in both groups, although the gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites exhibited larger amounts of new bone relative to the gelatin/ß-TCP sites. The new bone extended to the coronal third of the defect in two gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites, but was limited to the middle third in the other gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites. In contrast, new bone was detected in the middle third of the defect in two gelatin/ß-TCP sites. In the other gelatin/ß-TCP sites, new bone was detected in the apical third. Higher extension of the new cementum to the coronal third of the defects was observed in the gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites. In the gelatin/ß-TCP sites, the coronal third

healed with a long JE and connective tissue attachment. In three animals, the new cementum appeared to be thicker in the gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites than in the gelatin/ß-TCP sites. PDL-like tissue was observed in both treatment groups. However, PDL collagen fibers that had inserted perpendicularly into the new cementum were observed in three of the five gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 group specimens. The height and area of the new bone and amount of new cementum were significantly greater in the gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites than in the gelatin/ß-TCP sites. In contrast, the long JE and connective tissue attachment were significantly greater in the gelatin/ß-TCP sites relative to the gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites. No statistical significant difference was detected between the groups in terms of defects and coverage heights.

## Discussion

In the present study, gelatin/ß-TCP/rhFGF-2 sites exhibited more tissue regeneration, characterized by larger amounts of new bone and new cementum when compared to gelatin/ß-TCP sites. Moreover, healing was uneventful, with no adverse events such as root resorption and ankylosis. Previous animal histological studies utilizing similar defect models demonstrated very limited amount of new cementum and new bone at the most apical parts of the defects after a coronally advanced flap with or without connective tissue graft. Thus, our observations suggest that a gelatin/ß-TCP sponge may be used safely with rhFGF-2 as an adjunct to the coronally advanced flap in support of periodontal regeneration in gingival recession defects.

In this experiment, gelatin with 50 wt% incorporated ß-TCP was selected according to a previous in vitro study in which the alkaline phosphatase activity and osteocalcin content of mesenchymal stem cells were highest in the context of 50 wt% ß-TCP incorporation. The pore structure of this scaffold was adjusted to 150–200 μm, making it suitable for cell infiltration and vascularization.

In the present experiment, the gelatin/ß-TCP sponge was utilized as a carrier for rhFGF-2. Acidic gelatin complexes ionically with rhFGF-2, and rhFGF-2 is released as a result of the gelatin biodegradation. The time course of rhFGF-2 release depends on the water content of the gelatin; specifically, a decrease in the water content of the gelatin/ß-TCP sponge leads to a decrease in scaffold biodegradation with a resulting increase in the rhFGF-2 release period. The water content can be adjusted by altering the concentration of the gelatin and glutaraldehyde used for crosslinking reaction. Remnants of the gelatin/ß-TCP sponges were not identified in any of the histological sections, suggesting complete biodegradation or resorption of the scaffold by 8 weeks.

rhFGF-2 has been shown to stimulate the proliferation and migration of mesenchymal cells

within the PDL while maintaining the multipotency of these cells, which later differentiate into cementoblasts, osteoblasts, and collagen-forming cells.

In conclusion, these findings suggested that rhFGF-2 in a gelatin/β-TCP sponge exhibits an increased potential to enhance periodontal regeneration in canine buccal recession-type defects.

和文要旨

最近、歯周組織再生治療において成長因子として recombinant human fibroblast growth factor-2（rhFGF-2）が用いられるようになったが、歯肉退縮の治療について報告はない。我々は、増殖因子の徐放化を目的として開発されたゼラチン/β-リン酸三カルシウムスポンジ（β-TCP ゼラチンスポンジ）が rhFGF-2 と併用できることを報告した。本研究の目的はイヌに外科的に作成した歯肉退縮を伴う骨欠損に対し、rhFGF-2 と β-TCP ゼラチンスポンジの併用（実験群）と、生理食塩水と β-TCP ゼラチンスポンジ（対照群）の治療を比較し、rhFGF-2 の有効性を評価することである。

５頭の成犬の左右上顎犬歯に規格化した大きさの歯肉退縮を伴う頬側骨欠損を外科的に作製した。それぞれの欠損部位には実験群、対照群をランダム化して割り当てた。術後８週の組織標本を採取し、マイクロ CT による３次元での評価と光学顕微鏡を用いた組織学的評価を行った。

マイクロ CT では実験群で新生骨体積の統計学的に有意な増加が認められた。組織学的評価では両群において歯周組織の再生が得られたが、実験群では対照群と比較し、新生セメント質や新生骨の有意な増加が認められた。一方、対照群では、上皮性の付着と結合組織性の付着に特徴づけられる治癒を認めた。以上の結果より、rhFGF-2 は歯肉退縮を伴う骨欠損に対して、歯周組織の創傷治癒と再生を促進させることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5492　号 | SHUJAA ADDIN Ammar Abduljalil Yahya |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　木下　淳博<br>副　査　宇尾　基弘　　塩田　真 | |
| 論 文 題 目 | Biodegradable gelatin/beta-tricalcium phosphate sponges incorporating recombinant human fibroblast growth factor-2 for treatment of recession-type defects: A split-mouth study in dogs | |

（論文審査の要旨）

歯肉退縮の治療は、口蓋歯肉から採取した結合組織を移植して露出根面を被覆する術式がゴールドスタンダードとされている。しかしながら、採取部への二次的な侵襲が必須であることや、主に長い上皮性付着による治癒となる欠点がある。recombinant human fibroblast growth factor-2（rhFGF-2）には強力な血管新生作用と未分化幹細胞の増殖を促進する作用があり、骨再生に有効であることが報告されている。本論文に先行した論文で、細胞増殖因子の徐放化を目的として開発されたゼラチン/β-リン酸三カルシウムスポンジ（β-TCP ゼラチンスポンジ）と rhFGF-2 と併用することで骨再生が得られることを報告している。根面被覆術においては rhFGF-2 の有効性は明らかになっていないが、現状では治癒困難な歯肉退縮歯の頬側部で、骨形成を伴う治癒が得られるのであれば、臨床歯学的に意義がある。

SHUJAA ADDIN は、根面被覆術における rhFGF-2 の有効性を明らかにするため、イヌに外科的に作製した歯肉退縮を伴う頬側骨欠損に対し、rhFGF-2 と β-TCP ゼラチンスポンジの併用（実験群）と、生理食塩水と β-TCP ゼラチンスポンジ（対照群）の治療を比較する研究を行った。そして rhFGF-2 は歯肉退縮を伴う頬側骨欠損に対して、歯周組織の創傷治癒と再生を促進させる可能性を見出した。

本研究から、SHUJAA ADDIN は以下の結果を得た。

・実験群、対照群ともに術後 8 週において臨床的に炎症所見は認められず、良好な治癒過程を辿り、完全な根面被覆が達成された。

・マイクロ CT による解析から、実験群では対照群と比較して統計学的に有意な新生骨体積の増加が見出された。

・組織学的評価から、実験群では新生骨が頬舌的に厚く歯冠側に伸展する傾向が見られた。

・実験群では骨縁上で根面に付着する結合組織の面積が広く緊密である傾向が見られた。

・実験群では歯根膜線維が根面に垂直に、対照群では斜方または平行に走行している所見が多く得られた。

・組織形態学的な分析から、実験群では対照群と比較して新生セメント質や新生骨の統計学的に有意な増加が見出された。

・対照群では、上皮性の付着と結合組織性の付着に特徴づけられる治癒を認めた。

これらの結果から SHUJAA ADDIN は、以下のことを考察した。

・既存のエナメルマトリックスタンパクや、遮蔽膜を使用した組織再生誘導法を使用して根面被覆を行った研究結果と比較すると、本実験群ではより歯冠側近くまで骨再生が得られた。すなわち歯肉退縮を伴う頬側骨欠損において、rhFGF-2 と β-TCP ゼラチンスポンジの併用は、骨再生を支える大きなポテンシャルを有していると考えられる。

・β-TCP ゼラチンスポンジが再生のスペースを維持すると同時に、rhFGF-2 により刺激された歯根膜細胞や骨芽細胞の３次元的な足場となることで骨及びセメント質の形成が促進されると考えられる。

・β-TCP ゼラチンスポンジが吸収・分解され、rhFGF-2 が徐放的に溶け出すことで、持続的に作用したと考えられる。

以上のように、本研究において、SHUJAA ADDIN は、イヌ歯肉退縮モデルに対し rhFGF-2 と β-TCP ゼラチンスポンジを使用することで、根面への上皮の進展を抑制し、セメント質、骨の新生を伴う治癒が得られることを明らかにした。

本研究では、上皮性付着による治癒形態が主であった根面被覆術において、骨とセメント質の再生を伴う治癒が得られた。これは歯の長期経過に良好な影響を与えることが期待でき、健康長寿の延伸を目指す歯科医学の発展に貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中山　玲奈 |
| 論文審査担当者 | 主査　古屋　純一<br>副査　青木　和広、簡野　瑞誠 |
| 論　文　題　目 | Creating a quality of life index for patients with temporomandibular disorders |

（論文内容の要旨）

<緒言>

顎関節症(Temporomandibular disorders :TMD) は顎関節、咀嚼筋、口腔顔面領域の顎口腔系組織の機能障害が生じる筋骨格系の疾患である。TMD の治療目標は完全治癒ではなく、寛解という表現をするため、その症状によってどの程度日常生活に影響が現れているのかを評価する必要がある。

近年、患者の生活の質(Quality of Life: QOL)を評価することは医療を行う上で重要になっており、TMD においても症状の改善の有無について患者自身の評価が占める比重は大きい。TMD 患者に特有の問題を適切に評価することにより、患者の状態（重症度や QOL の低下の程度など）を医療者が評価することが可能となる。TMD 患者の QOL を評価するためには、複数の質問票を併用しなければならない現状があるが、質問票の項目数が多くなればなるほど、患者の負担も大きくなる。そこで、本研究では単体で評価できる TMD 患者に特化した QOL 質問票の開発を目的とした。

<方法>

2016 年 4 月から 2017 年 3 月にかけて、自記式質問票を用いた質問票調査を行った。研究対象は 20 歳以上の患者群 103 名と対照群 173 名である。患者群は、東京医科歯科大学歯学部附属病院顎関節治療部を初診来院、または治療中の患者のうち、Diagnostic criteria for TMD（DC/TMD）に基づき TMD と診断が確定しており、痛みが 3 か月以上継続している者とした。対照群は、同大学職員、学生、および卒業生のうち、TMD と診断を受けたことがない、または TMD の自覚症状がない者とした。両群とも、以下の条件に該当する者は除外した；1）リウマチなどの全身疾患を有する、2）急性症状を有する、3）抗うつ薬・抗不安薬・向精神薬を定期的に摂取している。

OHIP、LDF-TMDQ、DC/TMD、および他の TMD 患者に特化した質問票から、TMD 患者の QOL に関連性が高いと予測される質問項目を選択し、仮の質問票を作成した(temp-Q)。temp-Q の各項目については、OHIP などの既存の質問票の形式に従い、5 段階評価とした(0:全くない、1:ほとんどない、2:時々ある、3:よくある、4:いつもある)。また痛み強度、および痛みによる日常活動の制限についても NRS で評価した。痛み強度は過去 1 か月間における最大の痛みと平均

的な痛みとし、“痛み無し”を 0、“想像できる最大の痛み”を 10 とした。痛みによる日常活動の制限は、日常生活全般の制限、仕事の制限、および食事の障害とし、“全く問題ない”を 0、“何もできない”を 10 とした。さらに、抑うつと不安感に関して Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)を用いて評価した。対照群については、TMD リスクの高い者を除外するために、杉崎らによる顎関節症スクリーニング質問票も併せて使用した。

患者群と対照群の間で、temp-Q の各項目のスコアを Mann-Whitney U 検定を用いて比較し、統計的有意差がなかった項目を削除した。次に、各質問項目の回答のスコアの平均値を算出し、患者群と対照群の平均値の差を求め、差の大きさでランキングを作成した。ランキング表をもとに、平均値の差が 1.0 未満の項目を削除し、残った項目から最終的な質問票（fin-Q）を作成した。

fin-Q について因子分析(主因子法、プロマックス回転)を行い、構成概念の検討を行った。内的整合性を調べるため、質問票全体と構成概念ごとの Cronbach の $\alpha$ を求めた。また、fin-Q 総スコアを算出し、スコアの分布と NRS 値および HADS スコアとの相関係数を求めた。さらに、fin-Q 総スコアにおいて性差ならびに fin-Q 総スコアと年齢の間の相関係数を求めた。統計解析には SPSS version 21.0 (IBM Japan)を使用し、$P < 0.05$ を統計的有意差ありとした。なお本研究は、東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認(第 1285 番)を得て実施した。

<結果>

最終的な分析対象者は患者群が 101 名（平均年齢 50.7±14.9 歳、女性 83 名、男性 18 名）、対照群が 131 名（平均年齢 40.1±13.2 歳、女性 59 名、男性 72 名）となった。HADS スコアは両群間で統計的有意差が認められなかった。患者群と対照群の各質問項目のランキングをスコアの平均値の差（患者群－対照群）を基に作成した。その結果、「薄い食品をすりつぶせない」など 16 項目が残り、これを fin-Q とした。fin-Q の総合スコアの平均値および標準偏差は患者群で 26.5±11.1(最小値 2、最大値 60)、対照群で 3.5±5.2(最小値 0、最大値 25)であった。因子分析の結果、2 つの構成概念に分けられ、第 1 因子を心理社会的障害、第 2 因子を機能的障害とした。なお、16 項目全体での Cronbach の $\alpha$ は 0.950 であった。

患者群と対照群の fin-Q 総スコアと、NRS 値および HADS スコアとの相関係数を求めたところ、いずれにおいても中等度以上の相関関係がみとめられた。fin-Q 総スコアと性差については、有意差がみとめられた。また fin-Q 総スコアと年齢の間に有意な相関関係は認められなかった。

<考察>

以前より QOL を評価するための質問票は多く作成されてきた。OHIP の質問項目を TMD 患者と関連性の高い順番に並び替えたランキングが報告されている。しかし、その結果を用いて新規質問票を作成した研究は見当たらない。一方、日本人の痛みのある TMD 患者に特化した質問票も存在するが、心理的項目は含まれないため HADS など他の質問票も併用した多元的な調査票を用いなければ評価することが難しい。以上の理由から、既存の QOL 評価指標ではいくつかの点で不十分であると考えられる。

今回の研究では、TMD 患者の QOL に関連性が高く、内的整合性のある項目を選別できた。質問票の評価には、スコアの分布の広がりと NRS との相関係数を用いて行った。fin-Q のスコアは最大で 64 であるが、今回の対象者の回答では 2-60 点の間に分布し、広い範囲に分布する結果となった。OHIP そのものや、TMD 患者に特化した他の QOL 指標よりも点数の分布が幅広いこと

から障害レベルが小さい患者から大きい患者までが広範囲に分布しており、その差を反映しやすいと考えられる。したがってfin-QはTMD患者のQOLレベルを適切に表現できる可能性がある。一方、fin-Qのスコアと NRS の相関関係数をみると、0.6-0.8 であり、中等度以上の相関関係を示していた。fin-Q は従来の質問票よりも痛み強度や痛みによる障害の程度をより的確に評価できているといえる。

今回の研究において、患者群と対照群の間で年齢と女性率に有意な差があった。性差については、患者群における fin-Q 総スコアで有意な差がみとめられた。しかし、対照群においては性差がみとめられなかった。口腔関連 QOL について、女性の方が一般的には障害レベルが男性よりも高い傾向があると報告されている。また痛みのメカニズムが多くの要因の影響を受けるため性差が出た可能性が考えられる。以上のことから、今回作成した質問票を利用する際は、男女それぞれの基準値を作成して評価する必要があると考えられる。

<結論>

顎関節症患者を対象とした QOL 質問票の項目の検討を行った結果、食べ物が噛みにくいなど機能に関する 16 項目からなる新たな QOL 質問票が作成できた。この質問票は患者の痛み強度や主観的障害レベルとの相関も高いことから、TMD 患者の QOL レベルや、治療効果の指標として利用できる可能性があると考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5493　号 | 中山　玲奈 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　古屋　純一<br>副　査　青木　和広、簡野　瑞誠 | |
| 論 文 題 目 | Creating a quality of life index for patients with temporomandibular disorders | |

（論文審査の要旨）

顎関節症(Temporomandibular disorders :TMD) は顎関節、咀嚼筋、口腔顔面領域の顎口腔系組織の機能障害が生じる筋骨格系の疾患である。TMD の治療によってこれらの症状をすべて消失させることが困難な場合もあることから、治療目標は症状の寛解になることも多い。したがって、患者自身が TMD 症状によってどの程度日常生活が障害されているのか、すなわち Quality of life (QOL)を評価する必要がある。これまでも多くの研究で TMD 患者に特化した QOL 指標が作成されてきたが、質問項目が多く、しかも複数の質問票を併用しなければならない現状がある。そこで本研究で中山は、少ない項目数で個々の患者の症状に合った QOL を細かく評価できる質問票の開発を目的に研究を行った。

対象者は 20 歳以上の患者群 103 名と対照群 173 名である。患者群は、東京医科歯科大学歯学部附属病院顎関節治療部を初診来院、または治療中の者のうち、Diagnostic criteria for TMD(DC/TMD)をもとに TMD と診断が確定しており、痛みが 3 か月以上継続している者とした。対照群は、同大学職員、学生、および卒業生のうち、TMD と診断を受けたことがなく、TMD の自覚症状もない者とした。これらに対して過去の研究報告をもとに新たに作成した仮の質問票（temp-Q）と主観的疼痛強度、痛みによる日常生活障害レベルに対する主観的評価から構成される質問票調査を行った。temp-Q の各項目のスコアの平均値の差を両群で比較し、差の大きさでランキングを作成した。これを基に計 16 項目から成る最終的な質問票（fin-Q）を作成した。fin-Q の内的整合性を検討した結果、Cronbach の $\alpha$ は 0.950 であった。患者群において fin-Q の総スコアと痛み強度等を比較すると中等度以上の相関関係が認められた。性差についても有意差が認められたが、年齢との間には認められなかった。以上より、TMD 患者を対象とした QOL 質問票の項目の検討を行った結果、食べ物が噛みにくいなど機能に関す内的整合性の高い 16 項目からなる新たな QOL 質問票が作成できた。この質問票は患者の痛み強度や主観的障害レベルとの相関も高いことから、TMD 患者の QOL レベルや、治療効果の指標として利用できる可能性があると考えられる。

本研究で中山は国際的な TMD の診断基準である DC/TMD を基に診断した TMD 患者に特化した QOL 指標を作成した。これにより TMD 患者の治療効果の指標として使用できると同時に将来的には口腔顔面痛の患者に対する応用への可能性も示唆された。この成果は歯科医学の進歩発展に寄与するものと判断される。よって本論文は、博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 丸山　起一 |
| 論文審査担当者 | 主　査　春日井　昇平<br>副　査　山下　仁大　　小田　茂 |
| 論　文　題　目 | Histological changes in alveolar bone after onlay augmentation using the Casing Method. |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

様々な顎堤増大術の研究が行われているが、オンレーグラフトで良好な新生骨形成を得るのは困難である。オンレーグラフトで良好な新生骨形成を得るためには、骨形成能力の高い移植材を使用し、確実なスペースメイキングが必要である。我々は、メンブレンの代わりにポリエチレンテレフタレート（PET）のケースを使用し、イヌ顎骨の頬側面より側方に伸びるオンレーグラフトによる骨造成（Casing Method）を行った。PET ケース内には超微細骨粉（SFBP）と血漿の懸濁液を含浸させた多孔質ハイドロキシアパタイト（HA）・β リン酸三カルシウム（β-TCP）混合顆粒を充填した。本研究の目的は、Casing Method によるオンレーグラフトを行い、その有効性を組織学的に評価することである。

実験にはビーグル犬を使用した。抜歯後 12 週の顎骨頬側面に PET 製のケースを設置し、ケース内に SFBP と血漿の懸濁液を含浸させた HA、β-TCP 混合顆粒（体積比 1:1）を充填した。骨移植後 4 週、8 週、16 週で非脱灰研磨切片を作製し、組織学的に評価した。

術後 4 週で骨移植域の既存骨側で顆粒表面に沿った骨形成が認められた。16 週に至ると PET ケースのほぼ全域で骨形成が認められた。新生骨形成域は 16 週で 4 週、8 週と比較して統計学的有意に拡大していた。以上の結果から、Casing Method を用いたオンレーグラフトは、組織学的に良好な新生骨形成を得られることが示唆された。

＜緒言＞

歯科インプラント治療は咀嚼機能の回復に有効な治療法であるが、著しい顎骨吸収を伴う場合、インプラント埋入の前処置として骨造成が必要である。これまで骨移植材や顎堤増大術の研究が行われてきたが、オンレーグラフトは予後が不良であり、術後の合併症が多いと報告されている。オンレーグラフトはインプラント埋入するための骨の垂直的な高さが不足している症例に有効な術式である。オンレーグラフトの成功率を向上させるために、骨欠損を作製せずに骨面上にオンレーグラフトを行う動物実験が行われているが、良好な骨形成を得ることは極めて困難である。

オンレーグラフトによる良好な新生骨形成を得るためには、1)骨形成能力の高い移植材を使用し、2)確実なスペースメイキングによる創の安定が重要である。自家骨は骨形成能、骨誘導能、骨伝導能を有する理想的な骨移植材であるが、骨採取には新たな手術が必要であり採取量も限ら

れている。多孔質のハイドロキシアパタイト（HA）やβリン酸三カルシウム（β-TCP）は代表的な人工骨である。多孔質 HA は吸収傾向が低いため骨形成の足場になり、新生骨の維持が可能である。多孔質 β-TCP は HA と比較して吸収されやすく、リン、カルシウムの供給源として用いられている。両者の利点を活かした HA、β-TCP 併用の有効性が報告されている。我々は、自家骨を 1μm 以下まで粉砕した超微細骨粉（SFBP）と血漿を体積比 1:9 の割合で混合した懸濁液を HA、β-TCP（1:1）混合顆粒に含浸させ移植材とした。また、確実なスペースメイキングを得るために移植材を栄養孔付きポリエチレンテレフタラート(PET)のケースで被覆した（Casing Method）。

本研究の目的は、Casing Method によるオンレーグラフトを行い、その有効性を組織学的に評価することである。

＜方法＞

オスのビーグル成犬 7 頭を使用した。両側下顎臼歯を 2 本抜歯し、その 8 週後相当部の顎堤粘膜を剥離し、オンレーグラフトを行う部位の顎骨面をシリコン印象材にて印象し、石膏模型を作製した。石膏模型上で期待される造成骨の形態を模してワックスアップを行った（6 mm × 20 mm × 10 mm）。熱軟化性の PET 板を副模型に加熱圧接し、PET ケース上に栄養孔を直径 0.5mm のスチールバーを使用して 2mm 間隔で付与した。

抜歯 12 週後に Casing Method を用いた骨移植手術を行った。静脈より採取した血液を遠心分離し、血漿を得た。また、トレフィンバーを用いて脛骨から採骨した自家骨片を破骨鉗子、乳鉢を用いて 1μm 以下に粉砕して SFBP とした。その生理食塩水撹拌物を遠心分離で沈殿させ、沈殿物を血漿にて 10 倍希釈した。HA（APACERAM-G®）、β-TCP（OSferion60®）混合顆粒（体積比 1:1）に SFBP 血漿懸濁液を含浸させ移植材とした。顎骨面露出後、頬側皮質骨に直径 1mm ラウンドバーを用い 2mm 間隔でデコルチケーション行い、骨面に PET ケースをチタンスクリューにて固定した。ケース内に上記の移植材を充填した後、骨膜に減張切開を加え創部を完全閉鎖した。骨移植手術から 4 週、8 週、16 週で標本採取を行った。

非脱灰研磨切片を作製し、組織所見の観察、組織形態学的計測を行った。骨造成域を新生骨及び新生骨に囲まれた顆粒域と定義し、骨造成域内の軟組織形成域は除外した。ケース内域における骨造成域率（AA）を次の式で算出した： AA＝（骨造成域）/（ケース内域）。また、骨造成域に対する残存 HA 顆粒率（RHA）、残存 β-TCP 顆粒率（RTCP）、ケース内域に対する新生骨率（NB）を以下の式で算出した。RHA =（残存 HA 顆粒域）/（骨造成域）; RTCP =（残存 β-TCP 顆粒域）/（骨造成域）; NB =（骨造成域—{残存 HA 顆粒域＋残存 β-TCP 顆粒域}）/（ケース内域）。AA の 3 群比較（4、8、16 週）、RHA、RTCP、NB の 2 群比較（8、16 週）について統計分析を行った。

＜結果＞

術後 4 週群の 4 片顎のうちの 1 片顎は術後感染を伴う創部裂開を認めたため本研究から除外した。また術後 8 週群の 5 片顎のうちの 1 片顎は、粘膜に小さな瘻孔が認められたが、局所抗菌療法を行い治癒が認められたため、本研究に含めた。

術後 4 週で骨移植部の既存骨側で顆粒表面に沿った骨形成が認められた。骨形成域の既存骨側では β-TCP 顆粒や HA 顆粒の表面に沿って形成された新生骨が相互連絡していた。骨形成域中央部では顆粒間に毛細血管を含む髄腔が形成され始めていた。骨形成域最外側部では β-TCP 顆粒表面に多くの多核細胞が出現していた。また β-TCP 顆粒表面に立方型の骨芽細胞が出現し骨前質が

形成されていた。骨前質が肥厚した部位では顆粒表面側から石灰化が生じていた。

術後 8 週では骨形成状態に個体差が見られるものの、骨形成域は 4 週から拡大していた。典型的な標本では、ケース寄りの領域を残しほぼ全域が骨形成域になっていた。

術後 16 週に至ると骨形成域は全標本でケース内のほぼ最外側にまで及んでいた。骨形成域の既存骨側では顆粒を含む緻密な骨が形成されていた。髄腔は緻密骨内を貫通し、骨形成域中央部に形成された広い髄腔と連絡していた。広い髄腔内には HA、β-TCP 顆粒は消失しており、既存骨海綿骨域の骨髄と類似して血管系の他、脂肪細胞が多く出現していた。また骨形成域のケース寄りは広い髄腔周囲に顆粒を含む緻密な骨が形成されていた。また既存頬側皮質骨のリモデリングが進行し、顎骨上半側の既存皮質骨が不明瞭になっており、一部の髄腔や顆粒を封入した新生骨は既存海綿骨骨髄と接していた。

16 週群（n=5）の AA は 4 週群（n=3）、8 週群（n=5）と比較して統計学的有意に上昇しており、8 週群と 4 週群にも有意差が認められた。NB は 16 週で 8 週と比較して有意に上昇していた。RHA は 8 週と 16 週で有意差が認められなかったが、RTCP は 16 週で 8 週よりも有意に減少していた。

＜考察＞

顆粒表面での骨形成は既存骨側からの血管新生領域に多核細胞が出現し、その多核細胞の消失に伴い骨芽細胞が出現することで始まる。本研究においてこのプロセスは HA 顆粒よりも β-TCP 顆粒で先行していた。今回の HA 顆粒は 1μm 前後の 1 次粒子が比較的密に焼結してできた 2 次粒子が粗造に焼結しているのに対し、β-TCP は 1、2μm サイズの 1 次粒子が顆粒全体にわたり粗造に焼結している。この構造の差によって HA 顆粒よりも β-TCP 顆粒で血管新生が起こりやすく多核細胞付着と骨芽細胞の出現が先行したと考える。一方 HA は骨形成の足場としての役割を果たしており、新生骨の維持に寄与したといえる。これらの所見から、HA、β-TCP 顆粒混合使用は良好な新生骨形成と新生骨量の維持に有効であると考えられる。また著者らは現在 SFBP を含浸した多孔質 HA、β-TCP 顆粒を PET ケースに充填し、異所性骨形成の詳細を調べる実験を行っており、SFBP を含浸させることによって顆粒移植域内の組織分化が早く、優れた骨形成が得られることを観察している（未発表）。SFBP は顆粒表面での多核細胞の出現を促進し、周囲間葉系組織へ成長因子を放出しているのではないかと推測している。これらから SFBP を含浸させた多孔質 HA、β-TCP 混合顆粒は高い骨形成能力を有すると考えられる。

今回の実験において、16 週後にはケース内のほぼ全域に骨形成域が広がったのは、顆粒移植域を PET ケースで覆うことで歯肉上皮ならびに結合組織を遮断し、骨形成能力のある細胞を誘導することができたことによる可能性がある。加えて、PET ケースは他のメンブレンよりも形状が安定していることから、確実なスペースメイキング、創傷治癒の安定を提供できたと考える。

本研究では Casing Method を用いたオンレーグラフトで良好な骨形成と、造成量の維持が 16 週で達成された。過去に本研究と同様のオンレーグラフトを行っている研究はあるが、本研究における結果は良好な骨形成と造成量の維持という点でこれらの報告と比較しても優れていた。

＜結論＞

Casing Method を用いたオンレーグラフトは組織学的に良好な新生骨形成を得られることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5494　号 | 丸山　起一 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　春日井　昇平<br>副　査　山下　仁大　　小田　茂 | |
| 論　文　題　目 | Histological changes in alveolar bone after onlay augmentation using the Casing Method. | |

（論文審査の要旨）

吸収した顎骨にインプラント治療を行うためには、顎堤増大術が必要である。これまで多くの顎堤増大術の研究が行われてきたが、オンレーグラフトは予後が不良であり、術後の合併症が多いと報告されている。丸山起一らは、自家骨を 1μm 以下まで粉砕した超微細骨粉（SFBP）と血漿を混合した懸濁液を多孔質ハイドロキシアパタイト（HA）・β リン酸三カルシウム（β-TCP）（1:1）に含浸させ移植材として用い、確実なスペースメイキングと創の安定のために移植材を栄養孔付きポリエチレンテレフタラート(PET)のケースで被覆する術式を検討した（Casing Method)。同術式を用いたオンレーグラフトで良好な新生骨形成が得られれば、臨床歯学的に意義がある。臨床における骨造成の問題を解決するために本研究を計画したことは高く評価できる。

丸山起一は、オンレーグラフトにおける Casing Method の有効性を明らかにするため、イヌの顎骨に対し、同術式を用いた骨移植手術を行い、4 週、8 週、16 週での経時的な新生骨形成の変化を組織学的に観察する研究を構築した。そして同術式を用いたオンレーグラフトは有効である可能性を見出した。

本研究から、丸山起一は以下の結果を得た。

・1 標本を除いて臨床的に炎症所見は認められず、良好な治癒過程を辿った。
・術後 4 週で骨移植部の既存骨側で顆粒表面に沿った骨形成が認められた。
・術後 16 週で骨移植域のほぼ最外側まで新生骨形成が得られた。
・骨造成域は 16 週群では 4 週群、8 週群と比較して統計学的有意な増加が認められた。
・新生骨域は 16 週で 8 週と比較して統計学的有意な増加が認められた。
・残存 HA 顆粒域は 8 週から 16 週にかけて統計学的有意な減少は認められなかった。
・残存 β-TCP 顆粒域は 8 週から 16 週にかけて統計学的有意な減少を認めた。

これらの結果が、論文中に明確に記載されていることを確認した。

これらの結果から丸山起一は、以下のことを考察した。

・β-TCP 顆粒は血管新生が起こりやすい焼結構造であり、そのため多核細胞付着と骨芽細胞の出現が先行したと考えられる。一方 HA は骨形成の足場としての役割を果たしており、新生骨の維持に寄与したといえる。これらの所見から、HA、β-TCP 顆粒混合使用は良好な

新生骨形成と新生骨量の維持に有効であると考えられる。
・SFBP は顆粒表面での多核細胞の出現を促進し、周囲間葉系組織へ成長因子を放出している可能性があり、SFBP を含浸させた多孔質 HA、β-TCP 混合顆粒は高い骨形成能力を有すると考えられる。
・顆粒移植域を PET ケースで覆うことで歯肉上皮ならびに結合組織を遮断し、骨形成能力のある細胞を誘導することができた可能性があり、他のメンブレンよりも形状が安定していることから、確実なスペースメイキング、創傷治癒の安定を提供できたと考える。
・過去に本研究と同様のオンレーグラフトを行っている研究はあるが、Casing Method を用いたオンレーグラフトにおける結果はこれらの報告と比較しても優れていた。
　実験結果に対するこれらの考察が、論理的に適切におこなわれていることを確認した。

　以上のように、本研究において、丸山起一は、イヌ顎骨におけるオンレーグラフトモデルに対し、SFBP を含浸させた HA、β-TCP 混合顆粒を移植材として用い、Casing Method を応用することで良好な新生骨形成が得られることを明らかにした。
　この知見は、インプラント治療が困難とされてきた症例に対してもインプラント治療を適用できる可能性を有しており、咀嚼機能の回復による健康寿命の延伸を目指す歯科医学の発展に貢献するものと考えられる。
　よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小野　彌 |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　木下　淳博　　黒田　真司 |
| 論　文　題　目 | Implant insertion into an augmented bone region using the canine mandible augmented by the “Casing Method” |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

本研究は、大幅な骨造成を可能にする Casing Method を用いた骨造成術を行い、そこに埋入されたインプラントと周囲骨間の骨形成・骨結合状態を評価することを目的として行われた。ビーグル犬 3 頭を使用し、下顎臼歯の抜歯から 12 週後、骨面側が開放のポリエチレンテレフタラート(PET)のケースを下顎骨頬側面に設置した。ケース内にハイドロキシアパタイト(HA)とβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)の等量混合体に超微細骨粉の血漿懸濁液を含浸させたものを充填した。その 16 週後、インプラントを造成骨域と既存骨域の境界域を中心に埋入した。安楽殺後、非脱灰研磨切片を作成し、インプラントと周囲骨の関係を組織学的に観察した。骨造成術を行った領域には良好な骨形成が認められた。埋入時の骨切削面とインプラントの埋入間隙は既存骨域、造成骨域いずれも新生骨で満たされた。また造成骨域におけるインプラントと骨の接触率(BIC%)は、既存骨域に比べて有意に高い値を示した。Casing Method を用いた骨造成術はインプラントの適用の拡大に有効な術式であることが示唆された。

＜緒言＞

顎骨の骨吸収が高度に進行している症例では必要なサイズまた本数のインプラントの適用は困難となる。そのため、骨吸収が進行した顎骨にインプラントを用いるためには骨造成術による骨形態の回復が必要であると考えられる。既存の基礎実験の多くは実験的な骨欠損部での骨造成に関するもので、また臨床応用例では限局的な骨陥凹部の骨造成を目的としたものが多い。臨床に即した広範囲の骨欠損部の造成を可能にするには、顎堤を挙上・回復する新規術式の確立が必要と考えられる。

これを可能にする一手法として小木曽らは特定の構造を有する多孔質リン酸カルシウムブロックには骨誘導能があること、また同ブロックに自家超微細骨粉を含浸させるとその骨誘導能がより発揮されること、その骨粉含浸多孔体を栄養孔付き PET で被覆し周囲組織との連通性を制限することで多孔体内での骨形成を向上させることを見出した。さらに、この PET ケースに微細骨粉含浸多孔質リン酸カルシウム顆粒を充填した場合にもケース内に骨形成が生ずることを認め、その術式を“Casing Method”と名付けた。この Casing Method はその形態付与の容易性から、種々な

顎堤形態の回復に有用であると考えられる。今回、著者らは、Casing Method を用いて大幅な骨造成を行い、骨造成を行った領域へインプラントを適用し、インプラント周囲の骨形成状態を造成骨域と既存骨域で比較検討した。

＜材料と方法＞

ビーグル犬 3 頭を使用し、両側の下顎臼歯の抜歯より 8 週後、相当域顎骨の骨面印象を採得した。印象に基づいた石膏模型上で、目的とする骨造成形態（顎骨の頬側面に頬舌径 5 mm、近遠心径 20 mm、高さ 10 mm の領域）を被覆する PET 製のケースを加熱吸引法で作製した。抜歯より 12 週後、以下の手法で骨造成手術を行った。相当部顎堤粘膜を剥離し顎骨面を露出させ、顎骨に PET 製ケースをチタンスクリューで設置固定した。その後、ケース内に微細骨粉血漿懸濁液を含浸させたリン酸カルシウム顆粒を圧入した。顆粒は 150～500 μm サイズの HA(ApaceramG®)および β-TCP(OSferion60®)の等量混合顆粒とした。微細骨粉の血漿懸濁液は、小木曽らの報告をもとに、自家脛骨からの採骨片を超微細骨粉とし自己血漿で 10 倍希釈し撹拌したものを用いた。充填後、減張切開を加えた頬・舌側粘膜でケースを被覆閉鎖した。骨造成手術より 16 週以降に 1 片顎に対し 2 本ずつインプラントを埋入した。摘出標本は固定後、リゴラック樹脂包埋を行い、カッティングマシンにてインプラント軸に対し横断の非脱灰切片(厚み約 300 μm)を作製した。トルイジンブルー染色後、インプラント周囲の骨形成に関する組織学的評価を行った。

＜結果＞

3 頭全てにおいて、骨造成手術およびインプラント埋入後に臨床的な感染所見は認めず、インプラントの脱落もなかった。造成骨域全体としてケース形状に概ね一致して既存頬側緻密骨から連続する骨が形成され、それら造骨域が全てのインプラント頬側面を被覆していた。顆粒相互間の間隙に、毛細血管を通す細い血管通路を残して顆粒に沿った厚い骨が形成されており、その結果、顆粒と骨からなる緻密な構造となっている部が多かった。骨造成手術より 24 週後及び 32 週後のケース内部における骨組織形成域の割合について、両期間に有意な差は認めなかった。本実験の全てのインプラントで、インプラントと造成骨切削面は上方域で最も密接し、下方域に向かうにつれ両者の埋入間隙が広がっていた。インプラント埋入後 2 週において、造成骨や緻密骨、また厚い骨梁等の既存骨とインプラントとの間隙が 100 μm 以下の狭い間隙では間隙内の骨形成が未だ始まっていない部位が多かった。しかし造成骨や厚い既存骨との間隙が 100~200 μm 程度の部では、切削骨面またインプラント面に添加的骨形成が広範囲に生じ、両者の新生骨は短い梁状の骨で連続していた。約 200 μm 以上の広い埋入間隙が生じている部では、埋入間隙内に薄い新生骨梁が網目状に形成され、それら骨梁は骨切削面やインプラント面の添加骨と各所で連絡していた。埋入後 4 週に至ると、造成骨域や厚い既存骨の埋入間隙が 100 μm 以下の間隙内の骨形成が進行しており、50 μm 程度のかなり狭い埋入間隙部においても各所で隣接の髄腔が骨吸収によってインプラント面に達するとともに、その周囲間隙内で骨形成が始まっていた。100 μm 以上の広い間隙部では、切削骨面またインプラント面に沿って形成された添加骨また両者間の骨梁が肥厚することで新生骨間の髄腔が狭窄し、間隙内の骨の緻密質化が進行し、8 週に至ると 200 μm 程度までの間隙はその一部でかなり緻密な骨で満たされた状態となった。インプラント埋入後 16

週では、インプラントは周囲の造成骨また既存の緻密骨や骨梁と間隙内に形成された緻密な骨を介して結合した状態となっていた。16 週における造成骨域の BIC%は、既存骨域と比較し有意に高かった。

＜考察＞

ケース内の骨形成は粘膜側の一部で不良の部分があったものの、本実験で用いた全てのインプラントの頬側域は造成骨内に入っており、骨造成手術は、本実験の目的を達していた。Casing Method は従来の骨欠損を作成しない onlay graft 法や他の骨造成法と比較しても大規模に骨造成を図れる可能性があり、PET プレートの使用により、形態付与・形態記憶が可能になると期待される。それと同時に、その機械的強度により骨造成に必要とされる条件、すなわち骨面・栄養孔からの血管新生や、骨形成に適切な空間の維持、創傷の安定化に有利に働くと考えられる。

本実験での造成骨域のインプラント周囲の骨形成は、その埋入間隙が 100 μm 程度以上の領域では比較的早い時点で開始されているものの、それより狭い部分では骨形成は遅れ、特に密接部で両者の骨結合が遅れていた。インプラントと切削骨面が近接しすぎている、即ち極めて狭い埋入間隙では、一度骨吸収が起こった後に骨形成が起こるため、骨結合を達成するのに時間を要すると考えられた。また更に、今回の造成骨は緻密な構造になっている部分が多く、狭い間隙への血管系の構築が遅れまたそれに伴う骨吸収・骨形成も遅延している可能性が示唆された。インプラント埋入後 16 週では、造成骨域で埋入間隙が広くなりすぎた部を除き、いずれの領域もインプラントと周囲骨を連絡する緻密な骨が観察され、造成骨域と既存骨域でインプラントの骨結合に基本的な差は認められなかった。しかしながら、インプラント周囲埋入間隙での早期の骨結合、また切削骨との密接部の早期消失のためには、造成骨のリモデリングがさらに進行した時点でインプラントを埋入することや、造成骨域の骨密度がそれほど高くならないような顆粒の運用方法等の検討を要するものと考えられた。埋入後 16 週では造成骨域の BIC%が既存骨域に比べ有意に高かった。これは、8 週では造骨域での埋入間隙が狭く密接している部での骨形成が未だ十分でなく、また早期の骨形成が見られた埋入間隙でも周囲造成骨を含めたリモデリングが各所で生じており、その結果インプラント表面に形成された骨が消失しているのに対し、16 週に至ると狭い埋入間隙であった部の骨形成が進行してきているとともにリモデリングの生じている部が減少しインプラント表面に沿った骨形成域が増加したことによると推定された。本計測結果は、従来の報告と異なったモデルでの結果ではあるが、様々な材料を用いた既存の報告と比較して同程度以上の BIC%を 16 週での骨造成域で示した。

＜結論＞

Casing Method を用いた骨造成術はインプラントを埋入するために十分な骨造成を可能とした。また、造成された骨とインプラントの骨結合に関しては、既存骨における骨結合と比較して同等以上の結合を示すことを認めた。以上より、Casing Method を用いた骨造成術はインプラントの埋入及び骨結合に関して有効な術式であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5495　号 | 小野　彌 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宇尾　基弘<br>副　査　木下　淳博　　黒田　真司 | |
| 論 文 題 目 | Implant insertion into an augmented bone region using the canine mandible augmented by the “Casing Method” | |

（論文審査の要旨）

顎骨の骨吸収が高度に進行している症例においては、必要なサイズや本数の歯科用インプラントの適用が困難となる。そのため、骨吸収が進行した顎骨にインプラントを用いるためには骨造成術による骨形態の回復が必要とされる。既存の基礎研究の多くは人為的な骨欠損部での骨造成に関するもので、臨床に即した広範囲に渡り顎堤を挙上・回復する新規術式の確立は臨床歯学的に意義がある。

小野 彌はインプラント埋入にも応用可能な、広範囲に顎堤挙上・回復する新規術式を確立するために、超微細自家骨粉を含浸させたリン酸カルシウム顆粒で内部を満たした栄養孔付きポリエチレンテレフタラート(PET)製ケースを用いて骨造成（Casing Method）を行った。さらに同部に対して既存骨と造成骨の境界部にインプラントを埋入し、周囲骨組織の反応を比較する研究を構築した。そして Casing Method を用いた骨造成術はインプラントを埋入するための十分な骨造成・骨結合の可能性を見出し、顎骨形態の回復やインプラントの適応拡大に有効な術式であることが示唆された。

本研究から、小野は以下の結果を得た。

・全ての個体において、臨床的に炎症所見は認めず良好な治癒経過を辿り、インプラントの埋入を十分可能にする程度の骨造成を得られた。

・骨形態の回復では、適用した PET 製ケースの概形に準じた造成骨を確認した。

・骨造成手術 24 週後および 32 週後の両期間で、骨造成域における骨形成領域の割合は有意な差を認めなかった。

・インプラント埋入 2 週後では、インプラントと造成骨ならびに既存骨の間隙が 100~200 μm 程度の場合、間隙内を短い梁状の新生骨が網目状で形成され始めていた。

・埋入 2 週後において、インプラントと周囲骨の間隙が 300 μm 以上の領域では線維組織が形成され、骨梁形成をほとんど認めなかった。

・埋入 4 週後では、埋入 2 週後の時点で骨形成が認められなかった 50 μm 以下の狭い埋入間隙においても新生骨の形成が各所で認められた。

・埋入 16 週後では、インプラントと造成骨また既存骨が埋入間隙内に形成された緻密な骨を介して結合していた。

・埋入 16 週後では、500 μm 以上の広い間隙内はごく少量の骨梁と大多数の骨髄様組織で満た

されていた。
・骨-インプラント接触率(BIC)は埋入後 16 週において造成骨域が既存骨域よりも有意に高い割合を示した。

これらの結果から小野は、以下のことを考察した。
・Casing Method は従来の骨欠損を作成しない onlay graft 法や他の骨造成法と比較して、大規模に骨造成を図る可能性を有する。
・PET 製ケースの使用は、骨形成に適切な空間の維持、創傷の安定化、骨面・栄養孔からの血管新生に有利に働くと考える。
・インプラント埋入後、生物学的骨結合を早期に獲得するためには、切削骨面との間に 100 μm 程度の間隙が必要で、インプラント埋入に際してほぼ無圧下で埋入することが好ましいと考えられる。
・顆粒相互間に新生骨が充実している造成骨に対して、既存骨の海綿骨骨梁の相互間には広い骨髄が存在し、相当域のインプラント表面に骨形成のない部を認め、この差が造成骨域と比べて既存骨域で有意に低い BIC を示したと考えられる。

以上のように、本研究において、小野は、実験的骨欠損を作製しない状況下で、イヌ顎骨に対し、超微細自家骨粉を含浸させたリン酸カルシウム顆粒で内部を満たした栄養孔付きポリエチレンテレフタラート(PET)製ケースを用いた骨造成術(Casing Method)を適応し、インプラントの埋入を行い評価することで、Casing Method はインプラントの埋入及び骨結合に関して有効な術式であることを明らかにした。
以上の知見は、臨床に即した新規骨造成術の確立に大きく寄与し、今後の歯科医学における骨再生医療やインプラント治療の症例適応拡大の発展に貢献するものと考えられた。
よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 荒木　美祐 |
| 論文審査担当者 | 主査　　小野　卓史<br>副査　　川口　陽子　　宮新　美智世 |
| 論　文　題　目 | Associations between malocclusion and oral health-related quality of life among Mongolian adolescents |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

不正咬合は口腔関連 quality of life (QoL) に影響を与えると考えられるが、様々な因子が介在するため、両者の関連性は未だ十分に明らかとなっていない。本研究の目的は、昨今経済発展が著しく、社会環境が急激に変化しているモンゴル国において、一般集団における思春期児童を対象に、不正咬合が口腔関連 QoL に与える影響について検討することである。モンゴル国ウランバートル市における、市内中心部および郊外にある公立学校各 1 校、計 2 校に在籍する児童 420 名［平均年齢: 12.6 歳（10−16 歳)］を対象に口腔内診査を行い、矯正歯科治療必要度指標（index of orthodontic treatment need: IOTN）に準じて不正咬合の診査を行った。また、口腔関連 QoL については、4 つの質問領域（口腔内症状、機能障害、精神面への影響、ならびに社会面への影響）から構成されている child perceptions questionnaire (CPQ) を用いて評価を行った。解析は、多変量解析を用い、年齢、性別、齲蝕歯数、ブラッシング回数、ならびに親の収入を交絡因子として調整した。不正咬合と口腔関連 QoL の関連性について、CPQ の各 4 項目いずれも有意差は認められなかった。しかしながら、不正咬合の種類別に検討したところ、上顎前突では口腔内症状 (coefficient: 0.66, 95% CI: 0.14–1.19）、機能障害（coefficient: 0.62, 95% CI: 0.17–1.08）、ならびに社会面への影響（coefficient: 0.50, 95% CI: 0.06–0.93）との間に有意な関連性が認められた。また過蓋咬合では口腔内症状（coefficient: 0.54, 95% CI: 0.23–0.84）および機能障害 (coefficient: 0.45, 95% CI: 0.19–0.72）との間に有意な関連性が認められた。モンゴル人思春期児童を対象とした実態調査により、不正咬合のなかで上顎前突と過蓋咬合において口腔関連 QoL の低下との関連性が認められた。

＜緒言＞

子どもの口腔の健康状態は、単に口腔疾患の有無に止まらず、機能的、精神的、ならびに社会的要因とも密接に関連するため、学校生活を含めた日常生活にも大きな影響を与えるとの報告が

ある。したがって、口腔の健康状態は quality of life (QoL) に深く関わる重要な一因子と考えられる。口腔関連 QoL は、機能的要素、心理的要素、社会的要素、ならびに疼痛や不快症状の 4 つの構成要素からなる一連のパラメータによって評価され、その質問紙の代表例の一つに child perceptions questionnaire (CPQ) が挙げられる。

口腔関連 QoL に影響を及ぼす歯科疾患として、齲蝕、歯肉炎、不正咬合等が考えられる。中でも不正咬合は発音や咀嚼に影響するだけでなく、重度の不正咬合による審美的な問題により学校でいじめにあったりする可能性があり、社会的側面からも無視できない要素を含んでいる。

不正咬合と口腔関連 QoL との関連性に関する研究は、ブラジル、カナダ、サウジアラビア、ニュージーランド、ならびに韓国で過去に行われているが、対象とする国や地域、年齢、ならびに研究デザイン（病院ベースであるか集団ベースであるか）によって結果は異なり、一定の見解は得られていない。また、アジア諸国における報告は少数で、モンゴロイドを対象としたものはさらに少ない。

モンゴル国は、1992 年に社会主義国家から民主主義国家へと大きな変革がなされ、国名もモンゴル人民共和国から現在の名称へと改称されたが、それに伴う社会・経済的な変化は同時に食生活を含めた人々の日常生活を急激に変化させた。以前は羊、牛、馬やラクダのミルクあるいは肉が多く摂取されていたのに対し、近年では糖分を多く含んだ菓子やジュース類の摂取が増え、モンゴル国における齲蝕の罹患率の増加へと繋がった。当分野では、以前モンゴル国における不正咬合発症要因に関する研究を行ってきたが、不正咬合が口腔関連 QoL に与える影響に関する知見はいまだ得られていない。

よって、本研究ではモンゴル国の思春期児童における不正咬合と口腔関連 QoL との関連について調査し、不正咬合の種類が口腔関連 QoL に及ぼす影響について検討を行った。

＜方法＞

１．対象

モンゴル国の首都ウランバートル市の 9 地区のうち市内中心部及び郊外に位置する 2 つの地区、（Bayanzurkh 地区および Songino Khairkhan 地区）の公立学校各 1 校、計 2 校に在籍する 6-9 年生のうち、ランダムに抽出された 2 クラスの生徒、420 名 ［平均年齢: 12.6 歳（10−16 歳)］を対象とした。なお、本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会 （承認番号：961）およびモンゴル国立医科大学倫理審査委員会 （承認番号：13-12/1A） による承認を得て行われた。

２．不正咬合の診査

参加者は、東京医科歯科大学大学院顎顔面矯正学分野に在籍する矯正歯科医により座位にて診査された。診査項目は前歯部および臼歯部の交叉咬合、鋏状咬合、上下顎の叢生、上顎左側中切歯幅径等とした。

３．不正咬合の診断

不正咬合の診断基準は IOTN の dental health component (DHC) を用い、grade 4, 5 を「不正咬合あり」、grade 1−3 を「不正咬合なし」と判断した。さらにオーバージェットが 6mm を超

える場合を「上顎前突」、オーバージェットが-1mm より小さい場合を「反対咬合」、オーバーバイトが 3.5mm を超え、さらに口蓋部に圧痕が認められる場合を「過蓋咬合」、オーバーバイトが-4mm 以下の場合を「開咬」、アーチレングスディスクレパンシーが 5mm 以上の場合を「叢生」と診断した。交叉咬合および鋏状咬合の有無についても診断した。

４．口腔関連 QoL の評価

CPQ のうち、11 歳から 14 歳を対象にした質問紙（$CPQ_{11\text{-}14}$）を使用した。CPQ は英語で記載されているため、モンゴル語に一度翻訳し、さらにそれを英語へ再翻訳した。この質問紙は 35 個の項目からなり、「口臭が気になることがあった」といった口腔内症状、「発音しにくい言葉があった」といった機能障害、「いらいらしたり不安になることがあった」といった精神面への影響、「からかわれたことがあった」といった社会面への影響という 4 つに分類されている。それぞれの質問に対する回答は、「全くない：0 点」、「1 または 2 回：1 点」、「時々ある：2 点」、「しばしばある：3 点」、「毎日ある：4 点」の 5 段階で点数化し、合計点数が高いほど口腔関連 QoL が低いと判断した。

５．統計学的解析

不正咬合と性別、年齢、齲蝕歯数、ブラッシング回数、親の収入、ならびに学校の位置との関連についてはカイ二乗検定を用い、不正咬合と CPQ の合計点との関連については t 検定を用いた。さらに、不正咬合の種類別と CPQ の 4 項目に関しては、年齢、性別、齲蝕歯数、ならびにブラッシング回数を調整した多変量解析を用いて行った。全ての解析の有意水準は $p<0.05$ とした。

＜結果＞

矯正歯科治療を必要とする不正咬合の発症率は、31.2% (95% confidence interval [CI], 26.7–35.6%) であった。

それぞれの解析結果に関して、交絡因子と不正咬合の有無との間には有意な関連性は認められなかった。不正咬合の種類別の割合を見ると、叢生が 11.9%、過蓋咬合が 5.5%、前歯部交叉咬合が 4.0%、臼歯部交叉咬合が 3.8%、上顎前突が 2.4%という結果であった（重複あり）。

また、不正咬合の有無と CPQ の全点数および 4 項目それぞれの点数との間に統計学的に有意な関連性は認められなかった。

不正咬合の種類別と CPQ の 4 項目の関連性については、上顎前突と口腔内症状 (coefficient: 0.66, 95% CI: 0.14–1.19)、機能障害 (coefficient: 0.62, 95% CI: 0.17–1.08)、ならびに社会面への影響 (coefficient: 0.50, 95% CI: 0.06–0.93) との間に統計学的に有意な関連性が認められた。また、過蓋咬合と口腔内症状 (coefficient: 0.54, 95% CI: 0.23–0.84) および機能障害 (coefficient: 0.45, 95% CI: 0.19–0.72) との間に統計学的に有意な関連性が認められた。

＜考察＞

本研究では、モンゴル国の思春期児童において不正咬合の有無と口腔関連 QoL との間に有意な

関連性は認められなかった。しかしながら、上顎前突と口腔内症状、機能障害、ならびに社会面への影響との間に有意な関連性が認められ、過蓋咬合と口腔内症状、機能障害との間においても有意な関連性が認められた。本研究は集団ベースで思春期児童を対象に不正咬合の種類別と口腔関連 QoL との関連を明らかにした最初の報告である。

過去の研究においては、不正咬合と口腔関連 QoL との間に有意な関連性が認められたとする報告もあるが、これらの研究デザインは病院ベースであるため、対象集団は一般集団に比べて不正咬合に対する関心が高いというバイアスが存在する。また、不正咬合の種類は様々であるため、患者によって影響は異なると考えられ、ブラジルで行われた 8–10 歳の一般集団を対象とした研究では、前歯部の空隙と前歯部交叉咬合において口腔関連 QoL との関連性が認められたとの報告がある。本研究と結果が異なった原因として、対象年齢や、社会文化的背景の違いが考えられる。

上顎前突に関しては、「口臭が気になることがあった」、「歯肉から出血したことがあった」といった口腔内症状の質問項目において高い点数が認められた。また、上顎前突及び過蓋咬合においては、「硬い食べ物が食べづらいことがあった」、「口で呼吸することが多かった」といった機能障害の項目の点数が高く、さらに、過蓋咬合に関しては、「口の中に痛みを感じることがあった」という口腔内症状の項目で点数が高い傾向にあった。これらのことより、上顎前突や過蓋咬合では、口呼吸やそれに起因する歯周病、前歯部の咬合接触の困難性が口腔関連 QoL の低下と深く関わり、また過蓋咬合では口蓋粘膜を噛むことによって生じる疼痛等がこの結果に寄与する可能性が示唆された。また、上顎前突においては、その特異的な顔貌形態が対人関係に影響を与えるという社会面の影響も示唆された。以上より、本研究では、社会的・経済的変化が著しいモンゴル国の思春期児童において、不正咬合の種類と口腔関連 QoL との関連性について明らかにすることができた。

＜結論＞

本研究より、不正咬合と口腔関連 QoL に関連性は認められなかったが、上顎前突は口腔内症状、機能障害、ならびに社会面への影響との間に、過蓋咬合は口腔内症状および機能障害との間に有意な関連性が認められた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5496　号 | 荒木　美祐 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　小野　卓史<br>副　査　　川口　陽子　　宮新　美智世 | |
| 論 文 題 目 | Associations between malocclusion and oral health-related quality of life among Mongolian adolescents | |

（論文審査の要旨）

小児の口腔の健康状態は、単に口腔疾患の有無に止まらず、機能的、精神的、ならびに社会的要因とも密接に関連するため、学校生活を含めた日常生活にも大きな影響を与えるとの報告がある。したがって、口腔の健康状態は quality of life (QoL) に深く関わる重要な一因子と考えられる。口腔関連 QoL は、機能的要素、心理的要素、社会的要素、ならびに疼痛や不快症状の 4 つの構成要素からなる一連のパラメータによって評価される。

口腔関連 QoL に影響を及ぼす歯科疾患として、齲蝕、歯肉炎、不正咬合等が考えられる。なかでも不正咬合は発音や咀嚼に影響するだけでなく、重度の不正咬合による審美的な問題により学校でいじめにあったりする可能性があり、社会的側面からも無視できない要素を含んでいる。

不正咬合と口腔関連 QoL との関連性に関する研究は、様々な国で過去に行われているが、対象とする国や地域、年齢、研究デザインによって結果は異なり、一定の見解は得られていない。また、アジア諸国における報告は少数で、モンゴロイドを対象としたものはさらに少ない。

モンゴル国は、1992 年に社会主義国家から民主主義国家へと大きな変革がなされ、それに伴う社会・経済的な変化は同時に食生活を含めた人々の日常生活を急激に変化させた。

よって、本研究では昨今経済発展が著しく、社会環境が急激に変化しているモンゴル国の思春期児童における不正咬合と口腔関連 QoL との関連について調査し、不正咬合の種類が口腔関連 QoL に及ぼす影響の違いについて検討を行った。

モンゴル国の首都ウランバートル市の 9 地区のうち市内中心部および郊外に位置する 2 つの地区、（Bayanzurkh 地区および Songino Khairkhan 地区）の公立学校各 1 校、計 2 校に在籍する 6-9 年生のうち、ランダムに抽出された 2 クラスの生徒、420 名 ［平均年齢: 12.6 歳（10−16 歳)］ を対象とした。参加者は、東京医科歯科大学大学院顎顔面矯正学分野に在籍する矯正歯科医により座位にて診査された。診査項目は、オーバージェット、オーバーバイト、前歯部及び臼歯部の交叉咬合、鋏状咬合、上下顎の叢生、ならびに上顎左側中切歯幅径等とした。不正咬合の診断基準は IOTN

の dental health component (DHC)を用いた。また、口腔関連 QoL については、4 つの質問領域（口腔内症状、機能障害、精神面への影響、ならびに社会面への影響）から構成されている child perceptions questionnaire (CPQ) を用いて評価を行った。解析は、不正咬合と性別、年齢、齲蝕歯数、ブラッシング回数、親の収入、ならびに学校の位置との関連についてはカイ二乗検定を用い、不正咬合と CPQ の合計点との関連については t 検定を用いた。さらに、不正咬合の種類別と CPQ の 4 項目に関しては、年齢、性別、齲蝕歯数、ならびにブラッシング回数を調整した多変量解析を用いて行った。全ての解析の有意水準は $p<0.05$ とした。

研究結果として、以下の知見を得ている。

矯正歯科治療を必要とする不正咬合の発症率は、31.2% (95% confidence interval [CI], 26.7−35.6%)であった。

それぞれの解析結果に関して、交絡因子と不正咬合の有無との間には有意な関連性は認められなかった。不正咬合の種類別の割合を見ると、叢生が 11.9%、過蓋咬合が 5.5%、前歯部交叉咬合が 4.0%、臼歯部交叉咬合が 3.8%、上顎前突が 2.4%という結果であった（重複あり）。

また、不正咬合の有無と CPQ の全点数及び 4 項目それぞれの点数との間に統計学的に有意な関連性は認められなかった。

不正咬合の種類別と CPQ の 4 項目の関連性については、上顎前突と口腔内症状 (coefficient: 0.66, 95% CI: 0.14−1.19)、機能障害 (coefficient: 0.62, 95% CI: 0.17–1.08)、ならびに社会面への影響 (coefficient: 0.50, 95% CI: 0.06–0.93) との間に統計学的に有意な関連性が認められた。また、過蓋咬合と口腔内症状 (coefficient: 0.54, 95% CI: 0.23–0.84)および機能障害 (coefficient: 0.45, 95% CI: 0.19–0.72) との間に統計学的に有意な関連性が認められた。

本研究では、モンゴル国の思春期児童において不正咬合の有無と口腔関連 QoL との間に有意な関連性は認められなかった。しかしながら、上顎前突と口腔内症状、機能障害、ならびに社会面への影響との間に有意な関連性が認められ、過蓋咬合と口腔内症状および機能障害との間においても有意な関連性が認められた。したがって、不正咬合の種類によって口腔関連 QoL に及ぼす影響が異なる可能性が示唆された。本研究は集団ベースで思春期児童を対象に不正咬合の種類別と口腔関連 QoL との関連を明らかにした最初の報告である。

以上より、本研究の着眼点とその成果は高く評価され、基礎および臨床歯学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 浦羽　亜矢奈 |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　髙橋　英和　　二階堂　徹 |
| 論　文　題　目 | Biomechanical behavior of adhesive cement layer and periodontal tissues on the restored teeth with zirconia RBFDPs using three-kinds of framework design; 3D FEA study |

【要旨】

近年広く臨床で用いられている接着ブリッジ（以下：RBFDPs）は，歯質切削量が少なく低侵襲であるが，従来型ブリッジと比較して脱離しやすいという欠点を持つ．この問題点を克服すべく様々な設計について検討がなされており，片持ち設計は両持ち設計に比べ予後が良いとの臨床報告が多く認められる．本研究では上顎側切歯１歯欠損症例に，デザインの異なる３種類の RBFDPs を設計し，CT データと有限要素法を用いて脱離のリスクと歯周組織への影響について検討を行った．その結果，脱離への抵抗性は両持ち設計の RBFDPs が優れており，片持ち設計では中切歯支台の場合は脱離への抵抗性は高く，犬歯支台の場合は歯周組織の保護に有利であることが示唆された．

【緒言】

上顎前歯の欠損補綴には固定性ブリッジ，可撤性義歯，インプラントなどの治療法がある．固定性ブリッジの中でも RBFDPs は，低侵襲で審美的なことから広く臨床で用いられている．その一方で，従来型ブリッジと比較して脱離が多いという欠点もある．

近年，イットリア部分安定型ジルコニア（以下：Y-TZP）が機械的強度，審美性，生体親和性に優れているため，金属の代替材料として普及してきている．Y-TZP は RBFDPs のフレーム材料としても用いられるが，最小厚さ 0.5 mm で製作可能であり，金属フレームと比較して薄くできるため RBFDPs の適応症例の範囲が広がった．

RBFDPs の臨床成績を向上させるためには，歯周組織への影響が少なく，脱離しにくいフレーム設計を検討する必要がある．RBFDPs として従来用いられている両持ち設計に比べ，片持ち設計は脱離が少ないとの臨床報告を多く認めるが，設計に関して客観的評価を行った研究は少なく，さらに異なるブリッジフレームの設計が歯周組織に及ぼす影響について評価した論文はほとんど見受けられない．また，セメント層における過度な応力集中によりセメントの破壊が生じ，フレームの脱離が引き起こされると考えられているため，各設計におけるセメント層の応力分布についても評価する必要がある．

そこで本研究では，３種類の RBFDPs の設計の違いによるセメント層の応力，フレーム，歯根膜および歯槽骨のひずみを有限要素法にて観察し，フレームの脱離のリスクと歯周組織へのダメ

ージを軽減する最適なフレーム設計について検討を行った.

【材料および方法】

三次元画像構築

本研究は東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を得て（承認番号　第 1173 号）行った. マイクロフォーカス X 線 CT システム（inspeXioSMX-100CT, 島津製作所, 以下：マイクロ CT）にて東京医科歯科大学医歯学総合研究科顎顔面解剖学分野保管のヒト乾燥頭蓋骨の撮像を行い, 得られたデータ上で上顎左側側切歯（#22）を削除し, 1 歯欠損モデルを作製し, 3D プリンタ（Objet500 Connex, ストラタシス）を用いてレジン製模型を作製した.

支台歯形成

上顎左側中切歯（#21）および上顎左側犬歯（#23）に対し, RBFDPs のための支台歯形成を行った. 口蓋側は厚さ 0.5 mm のベニア形成を行い, 近遠心隣接面に幅 0.5 mm, 長さ 4.0 mm（#21）, 幅 0.5 mm, 長さ 3.0 mm（#23）のグルーブを平行に形成した. 基底結節部に直径 1.0 mm, 深さ 0.5 mm のホールを形成し, CEJ から 1.0 mm の位置に幅 0.5 mm のシャンファー形成を行った.

フレームの製作

アクリルレジン（パターンレジン, ジーシー）を用い, 両持ち設計（支台歯：#21, #23）, 片持ち設計（支台歯：#21）, 片持ち設計（支台歯：#23）の各フレームを作製した. フレームの厚さは 0.5 mm とし, ポンティック基底面はリッジラップ型とした. 作製したフレームを模型上に装着し, マイクロ CT にて撮像を行った.

三次元モデルの作製

模型, フレームのスキャンデータとヒト乾燥頭蓋骨のスキャンデータの重ね合わせから, エナメル質, 象牙質, 歯根膜, 皮質骨, 海綿骨, 接着性レジンセメント（Panavia F 2.0, クラレノリタケデンタル）および Y-TZP の各構造における境界設計を行った. ボクセルサイズは一辺 120 □m の立方体とし, 歯の接着界面からセメント層, 形成面のエナメル質層を厚み 120 μm に設定した. 各物性値は, 均質で等方性を持ち線形弾性（歯根膜のみ 2 相性）とし, 拘束点は上顎骨の上面とした. 前歯部における最大咬合力を模し, 200 N をポンティック基底結節部に長軸から 45°の方向より負荷した.

有限要素解析

ソフトウェア（TRI/3D-BON-FCS, ラトックシステムエンジニアリング）にて各フレーム, 歯根膜および歯槽骨の最大主ひずみと, セメントの剪断応力, 11 MPa 以上の値を示すセメントのボクセル数の割合を算出した.

【結果】

フレームの最大主ひずみ

両持ち設計では最大主ひずみはコネクター下部に集中しており，コネクター（#21，ポンティック間）のひずみが特に大きかった．片持ち設計ではコネクター口蓋側から切縁側にかけて最大主ひずみが集中していた．片持ち設計の#21 支台の最大主ひずみは#23 支台より小さく，さらに両持ち設計では一番小さかった．

セメントの剪断応力

剪断応力の最大値は，両持ち設計の#21 支台が 25 MPa，#23 支台が 17 MPa，片持ち設計の#21 支台が 105 MPa，#23 支台が 121 MPa であった．剪断応力値が 11 MPa 以上を示すセメントのボクセル数の割合は，両持ち設計の#21 支台が 4.16 %，#23 支台が 2.25 %，片持ち設計の#21 支台は 19.25 %，#23 支台は 23.4 %であった．全モデルでコネクター部のセメントに応力集中した．さらに，片持ち設計ではコネクター切縁側のセメントに応力集中する傾向があり，歯肉側のマージン部や基底結節部にも応力集中がわずかに観察できた．

歯根膜，歯槽骨の最大主ひずみ

両持ち設計では歯根膜の最大主ひずみは#23 支台より#21 支台の方が大きく，片持ち設計では#23 支台は#21 支台より小さかった．両持ち設計の歯根膜と歯槽骨の最大主ひずみは全モデルで一番小さかった．全モデルで歯頚部口蓋側に最大主ひずみの集中がみられた．

【考察】

荷重時のひずみを解析する方法として，有限要素法，光弾性法，ひずみゲージ法があり，有限要素法は複雑な構造の場合でも任意の部位におけるひずみ，応力の分布を観察できる．本研究では口腔内環境を再現するため，CT データにて有限要素モデルを構築した．

フレームの最大主ひずみの分布

本研究では両持ち設計は片持ち設計より最大主ひずみは小さく，両持ちと片持ち設計の破壊強度の比較における過去の論文報告の結果と一致したが，口腔内で想定されうる過酷な条件下での解析を行ったため，回転モーメントが生じやすく，片持ち設計のひずみが大きくなったと考えられた．片持ち設計では最大主ひずみはコネクター口蓋側に集中したことから，臨床応用の際はコネクター断面積を増加させる必要があることが示唆された．両持ち設計では最大主ひずみはコネクターの切縁側よりも歯頚側に集中し，片持ち設計ではコネクター切縁側に集中したことから，片持ち設計ではコネクター切縁側の厚みを増加させる必要があると考えられた．また，両持ち設計では#23 支台と比べ#21 支台に最大主ひずみは集中した．一方，片持ち設計では固定源が 1 つのみのため，支台歯の変位がフレームのひずみを軽減したと思われ，変位量の少ない#23 を支台歯に選択した設計のひずみがより大きくなったと想定された．

セメントの剪断応力

各ボクセルのフレーム側とエナメル質側の剪断応力値を算出した．過去の論文では PanaviaF 2.0 の許容剪断応力は Y-TZP に対して 11 MPa，エナメル質に対して 31 MPa との報告がある．弾性係

数の差が大きいフレーム側の値がより大きくなるため，合計値はフレームとセメント間の剪断応力として扱い，11 MPa 以上の値を示すボクセル数の割合を比較することでフレーム脱離のリスクを検討した．片持ち設計は両持ち設計よりも脱離のリスクが高いという結果になったが，本研究における過酷な条件下においては，両持ち設計はセメントの破壊が少なく脱離のリスクは低いと評価された．しかし臨床では支台歯形状，平行性の確保，エナメル質の厚みの制限などから両持ち設計には制限が生じやすく，その場合は片持ち設計が有効と考えられた．

片持ち設計ではセメントのコネクター側に応力集中が見られた．よって，片持ち設計の RBFPDs 脱離のリスクを軽減するためにはグルーブを可及的に長く形成することが望ましいが，歯頚部マージンにも応力集中がみられたため，シャンファー幅を広く確保し，咬合力への抵抗性を高める必要があると考えられた．

片持ち設計のセメントの剪断応力値は，#23 支台よりも#21 支台の設計の方が小さかった．本モデルの支台歯の接着面積は#21 が 103 $mm^2$，#23 が 75 $mm^2$であり，脱離のリスク軽減には接着面積の確保が重要であるため，本モデルでは#21 を支台歯に選択した方が脱離のリスクが低いと考えられた．つまり，グルーブの長さ，幅を十分とれる支台歯は接着面積も確保できるため，脱離への抵抗性があることが示唆された．

歯根膜，歯槽骨の最大主ひずみの分布

歯根膜と歯槽骨の最大主ひずみは両持ち設計が一番小さく，両支台歯を比較すると顕著な差はなく各々均等にひずみが分散した．片持ち設計の支台歯を選択する場合，咬合性外傷のリスクを軽減するという観点から#23 支台が有利であると考えられる．本モデルでは#23 の方が歯根は長く，歯根膜の体積は#21 の約 1.4 倍であった．しかし，犬歯はガイド面の保護のため形成面が限られ，支台歯形成が困難になる場合がある．

片持ち設計において脱離のリスクを軽減する中切歯を支台歯にする際は歯周組織への負担を軽減するために，咬合に注意を払う必要があり，特に前方・側方滑走時の調整が重要であると考えられる．また，歯周組織への負担を軽減する犬歯を選択する際は，脱離のリスクを軽減するために，接着面を広く確保する必要があると考えられた．

【結論】

本研究では，脱離への抵抗性は両持ち設計が優れていた．片持ち設計では中切歯支台の場合は脱離への抵抗性は高く，犬歯支台の場合は歯周組織の保護に有利であることが示唆された．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5497　号 | 浦羽　亜矢奈 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宇尾　基弘<br>副　査　髙橋　英和　　二階堂　徹 | |
| 論 文 題 目 | Biomechanical behavior of adhesive cement layer and periodontal tissues on the restored teeth with zirconia RBFDPs using three-kinds of framework design; 3D FEA study | |

（論文審査の要旨）

上顎前歯の欠損補綴には固定性ブリッジ，可撤性義歯，インプラントなどの治療法がある．固定性ブリッジの中でも RBFDPs は，低侵襲で審美的なことから広く臨床で用いられている．その一方で，従来型ブリッジと比較して脱離が多いという欠点もある．近年，イットリア部分安定型ジルコニア（以下：Y-TZP）が機械的強度，審美性，生体親和性に優れており，金属の代替材料として普及してきている．Y-TZP を RBFDPs のフレーム材料としても用いる場合，最小厚さ 0.5 mm に設定可能であり， 0.7-0.8mm の厚みを要する金属フレームと比較して薄くできるため，RBFDPs の適応症例の範囲が広がった．

RBFDPs の予後を改善するためには，歯周組織への影響が少なく，脱離しにくいフレーム設計を検討する必要がある．RBFDPs として従来用いられている両持ち設計に比べ，片持ち設計は脱離が少ないとの臨床報告を多く認めるが，設計に関して客観的評価を行った研究は少なく，異なる設計における歯周組織への影響を評価した論文はほとんど見受けられない．また，セメント層における過度な応力集中によりセメントの破壊が生じ，フレームの脱離が引き起こされると考えられるため，各設計におけるセメント層の応力分布についても評価する必要がある．

本研究は，上記のような状況を背景として，３種類の RBFDPs の設計の違いにおけるセメント層の応力，フレーム，歯根膜および歯槽骨のひずみを有限要素法にて解析し，フレームの脱離のリスクと歯周組織へのダメージを軽減する最適な RBFDPs フレーム設計について検討を行ったものであり，この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって有意義なものと高く評価できる．

本研究は東京医科歯科大学医歯学総合研究科顎顔面解剖学分野保管のヒト乾燥頭蓋骨をマイクロフォーカス X 線 CT システム（以下：マイクロ CT）にて撮像し，データ上で上顎左側側切歯を削除し１歯欠損モデルとした後，３Ｄプリンタを用いてレジン製模型を作製している．

上顎左側中切歯（#21）および上顎左側犬歯（#23）に対し，RBFDPs のための支台歯形成を行い，アクリルレジンを用いて以下の３種のフレームを作製し（①両持ち設計（支台歯：#21, #23）②片持ち設計（支台歯：#21）③片持ち設計（支台歯：#23)），作製したフレームを模型上に装着し，再度マイクロ CT にて撮像を行った．

模型およびフレームのスキャンデータと，ヒト乾燥頭蓋骨のスキャンデータの重ね合わせか

ら，エナメル質，象牙質，歯根膜，皮質骨，海綿骨，接着性レジンセメントおよび Y-TZP の各構造における境界設計を行った．ボクセルサイズは一辺 120 μm の立方体とし，歯の接着界面からセメント層，形成面のエナメル質層を厚み 120 μm に設定した．各物性値は，均質で等方性を持ち線形弾性（歯根膜のみ 2 相性）とし，拘束点は上顎骨の上面とした．前歯部における最大咬合力を模し，200 N をポンティック基底結節部に長軸から 45°の方向より負荷した．

専用のソフトウェア上にてフレーム，歯根膜および歯槽骨の最大主ひずみと，セメントの剪断応力が 11 MPa 以上の値を示すセメントのボクセル数の割合を算出した．以上のように，本研究は，周到な実験計画に基づいて行われており，その方法は妥当なものといえる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 両持ち設計では最大主ひずみはコネクター下部に集中しており，コネクター（#21，ポンティック間）のひずみが特に大きかった．片持ち設計ではコネクター口蓋側から切縁側にかけて最大主ひずみが集中していた．片持ち設計の#21 支台の最大主ひずみは#23 支台より小さく，さらに両持ち設計は一番小さかった．
2. 剪断応力の最大値は，両持ち設計の#21 支台が 25 MPa，#23 支台が 17 MPa，片持ち設計の#21 支台が 105 MPa，#23 支台が 121 MPa であった．剪断応力値が 11 MPa 以上を示すセメントのボクセル数の割合は，両持ち設計の#21 支台が 4.16 %，#23 支台が 2.25 %，片持ち設計の#21 支台は 19.25 %，#23 支台は 23.4 %であった．全モデルでコネクター部のセメントに応力集中した．さらに，片持ち設計ではコネクター切縁側のセメントに応力集中する傾向があり，歯肉側のマージン部や基底結節部にも応力集中がわずかに観察できた．
3. 両持ち設計では歯根膜の最大主ひずみは#23 支台より#21 支台の方が大きく，片持ち設計では#23 支台は#21 支台より小さかった．両持ち設計の歯根膜と歯槽骨の最大主ひずみは全モデルで一番小さかった．全モデルで歯頚部口蓋側に最大主ひずみの集中がみられた．

以上の研究結果は，RBFDPs 脱離への抵抗性は両持ち設計が優れていることを指摘するとともに，両持ち設計の RBFDPs を適応することができない場合において，支台歯の異なる片持ち設計の特徴をそれぞれ示すことで，設計を決定する際の一定の指針になり得ることを考察している．

以上のように，本研究では異なる設計の RBFDPs におけるセメント層の応力，フレーム，歯根膜および歯槽骨のひずみを有限要素法にて観察し，フレームの脱離のリスクと歯周組織へのダメージを軽減する最適なフレーム設計について検討を行ったものである．また本研究で用いた手法は，異なる欠損様式への対応が可能であることからも，得られた知見は臨床的に非常に有益な情報であり，前歯部ブリッジの設計を考える上で極めて重要な意義をもち，歯科補綴学のみならず歯学全般の進歩，発展に寄与するところは大である．よって本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 田頭いとゑ |
| 論文審査担当者 | 主査　　品田　佳世子<br>副査　　深山　治久　　古屋　純一 |
| 論　文　題　目 | A new evaluation of masticatory ability in patients with dysphagia: the Saku-Saku Test |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

咀嚼機能は嚥下機能と密接な関わりがあり、口腔期の問題は高齢者の誤嚥や窒息を引き起こす。従って、咀嚼機能を含めて摂食嚥下障害患者の咀嚼機能を含めた口腔機能を評価することは重要である。

しかしながら、摂食嚥下障害患者の誤嚥や不顕性誤嚥に対する簡単な検査はあるが、咀嚼機能を評価する方法は少なく、従来の咀嚼機能評価方法であるピーナッツやガムを用いる方法は健常者を対象としている。また、食塊を吐き出す方法が主流であることから、咀嚼から嚥下までの一連の自然な流れで評価することができず、指示を理解できない認知症患者などには適さない。自然な動作の中で嚥下前の食塊を評価する方法としては嚥下内視鏡(VE)を用いる方法があるが、高度な設備と熟練した術者を要するため、検査の機会は限定される。

一方、下顎は咀嚼時に舌と強調して動き、健常者では涙状や楕円形のパターンをとることが分かっている。そこで、我々は下顎回転運動を外部から観察することにより、摂食嚥下障害患者の咀嚼機能を評価することができるのではないかと考えた。

この研究では、さくさくとした食感の米菓を用いて下顎回転運動を外部評価する評価方法をサクサクテスト（SST）と名付け、SST の結果を VE で得られた咀嚼機能や嚥下機能と比較した。

＜対象と方法＞

<u>デザイン</u>

この研究は、東京医科歯科大学歯学部附属病院または新八千代病院にて 2015 年 11 月から 2017 年 3 月の間に行った。対象患者は、とろみ水を座位で摂取でき、窒息や頭頸部領域の手術の既往がなく、意識レベルが JCS 0 または 1 桁である者とした。臼歯に咬合支持がない者は除外した。

患者は座位にて嚥下内視鏡を鼻から挿入された状態で、ハッピーターン（亀田製菓（株）製）半量を摂取した。摂取している様子を動画撮影し、歯科医師 2 名が下顎回転運動評価を行った。正中またはわずかに咀嚼側に向かいながら開口し、開口路の側方で閉口するパターンを下顎回転運動良好とし、直線的なパターンは下顎回転運動不良とした。また、嚥下内視鏡検査で得られた動画から、嚥下直前の食塊について粉砕度と集合度をそれぞれ 3 段階に評価した。咽頭機能については penetration-aspiration scale を用いて評価し、スコア 6 以上を誤嚥として分類した。

解析

以上から下顎回転運動評価者の評価の一致率を算出した。次に、SST の粉砕度、集合度、誤嚥に対する感度・特異度を求めた。

＜結果＞

患者は、最終的に 105 人（男性 64 人、女性 42 人、中央値 78 歳）となり、疾患の内訳は、脳血管疾患が 56.2%、神経筋疾患が 13.3%、認知症が 12.4%、その他が 18.1%だった。

下顎回転運動評価の評価者 2 人の一致率はカッパ係数 0.8 であった。SST の感度は粉砕度 73.3%集合度 45.0%誤嚥 25.0%であり、特異度は粉砕度 93.3%、集合度 90.6%、誤嚥 84.5%であった。

＜考察＞

SST の信頼性

カッパ係数が 0.8 と高かったことから、SST は評価者が異なっていてもあまり差がない信頼性が高い検査といえる。105 人中 6 人では評価が一致しなかったが、下顎回転運動が小さい場合やスムーズでない場合に評価が分かれたと考えられる。

SST による咀嚼機能と嚥下機能の評価

粉砕度と集合度に対する特異度が高かったことから、SST は摂食嚥下障害患者のうち咀嚼能力がある患者を同定するのに役立つと考えられる。粉砕度に対しては 73.3%と感度も高かったことから、下顎回転不良な患者には咀嚼を要する食べ物が適さないことを示唆している。一方、誤嚥に対する感度は 25%と低かった。過去に下顎回転運動と喉頭侵入や誤嚥との関連はなかったという報告があることから、この結果も妥当であると考えられる。従って、咽頭機能については、SST 以外の別の方法で評価することが望ましいと考えられた。

検査食

我々は、食塊形成しやすく付着しにくいという特性から、検査食としてこの煎餅を選んだ。今回用いた煎餅は咀嚼を要する程度の硬さがある一方で、さくさくとした軽い食感で密度や最大荷重が小さいという特徴がある。煎餅の生地にでんぷんを加えていることから焼成時に多くの気泡が発生し、この気泡が水分を吸収しやすいという性質をもたらす。よって、咀嚼すると容易に唾液と混じって食塊を形成することができる。さらに、焼成後に煎餅にかける油が水とでんぷんとの反応を抑制するため、咀嚼しても付着性が低く維持される。92.4%の患者が誤嚥なく検査食を摂取できたことから、SST の検査食として適切であったと考えられる。

＜結語＞

・SST は評価者ごとの差が少ない信頼性の高い評価方法である。

・SST は粉砕度と集合度ともに特異度が高く、咀嚼能力がある摂食嚥下障害患者を同定するのに役立つ可能性がある。

・とろみ水を誤嚥なく摂取できる摂食嚥下障害患者の多くにおいて、この研究で用いた煎餅を誤嚥なく摂取可能であった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5498　号 | 田頭　いとゑ |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　品田　佳世子<br>副査　　深山　治久　　古屋　純一 | |

（論文審査の要旨）

咀嚼機能は嚥下機能と密接な関わりがあり、口腔期の問題は高齢者の誤嚥や窒息を引き起こす。従って、咀嚼機能を含めて摂食嚥下障害患者の咀嚼機能を含めた口腔機能を評価することは重要である。

しかしながら、摂食嚥下障害患者の誤嚥や不顕性誤嚥に対する簡単な検査はあるが、咀嚼機能を評価する方法は少なく、従来の咀嚼機能評価方法であるピーナッツやガムを用いる方法は健常者を対象としている。また、食塊を吐き出す方法が主流であることから、咀嚼から嚥下までの一連の自然な流れで評価することができず、指示を理解できない認知症患者などには適さない。自然な動作の中で嚥下前の食塊を評価する方法としては嚥下内視鏡(VE)を用いる方法があるが、高度な設備と熟練した術者を要するため、検査の機会は限定される。

このような背景のもと、田頭は本学倫理審査委員会の承認（第 1157 号）を得て、下顎回転運動を外部観察することにより、摂食嚥下障害患者の咀嚼機能を評価する方法について検討した。方法として、日常でよく用いられる食品（米菓：亀田製菓製、ハッピーターン）を用いて下顎回転運動を外部から評価（サクサクテスト、SST）し、SST の信頼性について検討するとともに、SST の結果を VE で得られた咀嚼機能や嚥下機能と比較した。

研究結果として以下の所見が得られた。

1. SST 検査者２名の一致率として算出したカッパ係数は 0.8 であった。
2. SST の感度は粉砕度 73.3%、集合度 45.0%、誤嚥 25.0%であり、特異度は粉砕度 93.3%、集合度 90.6%、誤嚥 84.5%であった。
3. とろみ水を誤嚥なく摂取できる摂食嚥下障害患者の多くが誤嚥なく、この煎餅を摂取可能だった。

以上の結果を基に田頭は、SST は評価者ごとの差が少ない信頼性の高い評価方法であると考察している。また、SST は粉砕度と集合度ともに特異度が高く、咀嚼能力がある摂食嚥下障害患者を同定するのに役立つ可能性があり、粉砕度については感度も高いため SST 不良であれば粉砕度が不良である可能性が高いとした。一方で、誤嚥に対する感度は低いため SST とは別に咽頭機能の評価が必要であると指摘した。

これらの知見は、摂食嚥下障害患者の訓練方法や食形態を判断する大きな一助になるものと考えられる。誤嚥に対する感度は低いため SST とは別に咽頭機能の評価が必要であるという指摘についても咽頭機能に問題をかかえる患者の咀嚼機能を評価する際に重要と考えられる。以上のように本研究は、摂食嚥下障害患者の咀嚼機能評価方法を検討した稀有な研究であり、高齢者歯科

学のみならず、今後の歯科医学の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられた。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 池田　恵莉 |
| 論文審査担当者 | 主査　木下　淳博<br>副査　池田　通、小田　茂 |
| 論　文　題　目 | Resveratrol Derivative-rich Melinjo Seed Extract Induces Healing in a Murine Model of Established Periodontitis |

（論文内容の要旨）

炎症性サイトカイン、活性酸素、白血球などの物質は歯周病原細菌を攻撃するために生体防御システムにより産生されるが、同時にこれらが歯周組織破壊の原因となっている。筆者らは抗酸化作用を持つレスベラトロール誘導体であるメリンジョ種子抽出粉末（melinjo seed extract: MSE）が歯周炎によって引き起こされる骨吸収の治癒を促進し、炎症反応を正常化すると仮説をたてた。本研究では、マウス上顎大臼歯に絹糸を結紮留置して歯周炎を誘発する歯周炎モデルマウスを用いて、15 日間歯周炎を誘発し、MSE を腹腔内から投与した。その後 17 日目、20 日目、22 日目にマウスを安楽死させ解析を行った。MSE を投与したマウスは患歯周囲上顎歯槽骨吸収の治癒が促進され、酸化ストレス量が減少していた。本研究により、歯周炎に対する MSE の投与は、骨の治癒を促進し、局所の酸化ストレスレベルを制御すると示唆された。

＜諸言＞

歯周病は世界中で極めて罹患性の高い慢性炎症疾患であり、歯を支える歯槽骨や結合組織などの歯周組織の破壊を引き起こし、やがて歯の喪失に至る。歯周病は多因子疾患であるが、その中でも歯周病原細菌と呼ばれる細菌群が歯周病の主原因であるとこれまでは考えられてきた。しかし、細菌が歯周病の進行に不可欠ではあるものの、細菌因子のみでは歯周病の病態を完全に説明するには不十分であった。歯周病原細菌が歯周組織中に侵入すると、生体の持つ免疫システムが働き、白血球などが歯周組織中に誘導され、炎症性サイトカイン、活性酸素(reactive oxygen species: ROS)が歯周組織中に産生される。これらの防御システムが過剰に起こると、局所的な過剰な免疫応答を引き起こし、歯周組織破壊の原因となる。つまり、口腔内細菌によって引き起こされる過剰な宿主免疫応答が歯周組織破壊を引き起こしていると近年考えられるようになってきた。

レスベラトロールはぶどうなどの植物から採取されるポリフェノールの一種である。糖尿病改善、抗がん作用、組織保護作用、抗酸化作用といった多くの健康作用が報告されている。特筆すべきはレスベラトロールが抗炎症作用、抗酸化作用、さらには骨のリモデリングに関与していると考えられている点である。数あるレスベラトロール類の中で著者らはメリンジョ種子抽出粉末（melinjo seed extract: MSE）に着目した。メリンジョ中のレスベラトロールは一般的な単量体

trans resveratrol のみならず、二量体やその配糖体を含んでいる。一般的な単量体のレスベラトロールは24時間以内に体外に排出されるが、メリンジョ中のレスベラトロール、特に二量体は96時間以上血中に留まり、効果の持続時間が長いと報告されている。著者らはレスベラトロールの免疫炎症応答、骨のリモデリングへの関与から、歯周炎モデルマウスにMSEを投与し、骨吸収、炎症性サイトカイン発現量、破骨細胞分化への影響、酸化ストレス量の検討を行った。

＜方法＞

マウスの上顎臼歯に9-0絹糸を結紮し歯周炎を誘発し、14日目にMSE溶液もしくはプラセボ溶液を40 mg/kg腹腔内に投与した。15日目に各群半数のマウスの結紮糸を除去し、残りの半数の糸はそのまま留置した。糸の除去は歯周炎治療における歯石、プラークの除去を想定している。治癒過程を観察し17、20、22日目にマウスを安楽死させた。マウスは以下の4群に分類した。

１． 歯周炎群（P群：結紮糸留置）
２． 歯周炎治療群（T群：結紮糸除去）
３． 歯周炎＋MSE群（P+MSE群）
４． 歯周炎治療＋MSE群群（T+MSE群）

＜結果＞

患歯周囲上顎歯槽骨吸収量を実体顕微鏡下で測定したところ、P+MSE群、T+MSE群はP群と比較して有意に骨吸収量が減少した。さらに患歯辺縁歯肉の炎症性サイトカイン(IL-1β、IL-4、IL-17、TNF-α)をqPCR法で測定したところ、P群と比較してP+MSE群のIL-1βの発現量が有意に低かった。それ以外のサイトカインの発現量に有意差は見られなかった。

さらに、マウス骨髄から単球を単離培養し、破骨細胞分化をTRAP染色によって観察した。P+MSE群、T+MSE群はP群と比較して有意に凝集核数が少なかった。

また患歯と歯周組織の組織染色を行った。上顎歯槽骨中のTRAP陽性エリアはT+MSE群ではP群と比較して有意に小さく、P+MSE群も低下傾向が見られた。ROSダメージを表す8-OHdG抗体と酸化ストレス応答系の主要因子であるnuclear factor E2-related factor(Nrf2)抗体での免疫組織化学的染色では、8-OHdG陽性細胞数がP+RSV群においてP群と比較して少なく、Nrf2陽性エリアはP+MSE群においてP群よりも大きかった。

＜考察＞

著者らは初めてマウスモデルにおいて、予防ではなく歯周病治療モデルを用いて歯周炎の治癒過程へのMSEの使用を調べた。今回の結果から、MSEは歯周炎モデルマウスにおいて炎症性サイトカイン発現量の抑制し、破骨細胞形成と骨吸収を抑制し、ROSの局所産生を抑制することで歯周炎による骨吸収の治癒を促進させたと考えられる。MSEは結紮糸を外さない状態（歯周炎治療なし）においても効果を示した。

結紮糸を留置して15日後以降、P群の骨吸収量は一定であった。MSEは歯周炎の治癒を促進し、さらにその効果は細菌因子が除去されていなくても（結紮糸を外さなくても）同等に効果的であった。これはとても重要なことである。なぜなら、細菌因子は歯周炎の進行に必要因子ではある

が、それだけでは病態を説明するには不十分である。近年では、宿主の免疫反応に注目が集まっており、結紮糸が残存（細菌因子が残存）していても歯周炎症を抑制できたということを示した本研究は、今後の歯周炎治療において非常に興味深いと思われる。

歯槽骨吸収は歯周炎の重要な臨床症状であり、破骨細胞は主要な骨吸収細胞である。破骨細胞の活性化には多くの因子、IL-1、IL-6、IL-11、IL-17、TNF-αなどが関わっており、歯槽骨吸収が起きるためには局所刺激が必要である。その中でも特に、IL-1/TNF-αは炎症性骨吸収を促進していると報告されている。本研究においては歯周組織中の炎症性サイトカイン産生について調べたところ、MSEの投与により歯肉中のIL-1βの産生が減少していた。IL-6, IL-17, TNF-αは有意差が見られなかった。骨髄と歯槽骨における破骨細胞について調べたところ、MSE投与によりTRAP陽性エリアの減少が認められた。レスベラトロールはRANKL誘発性破骨細胞を抑制すると言われている。その一方で、TNF-αはRANK/RANKLの相互作用と独立して破骨細胞分化に作用を及ぼすといわれている。MSE投与によりTNF-α発現に有意差が認められなかったことは、本研究の結果を考える上で重要と思われる。

＜結論＞

MSE 投与によって炎症性サイトカイン IL-1β発現の抑制、破骨細胞分化の抑制、Nrf2 抗酸化経路の活性化による ROS の局所産生の抑制、また歯周炎による骨吸収の治癒促進が見られた。レスベラトロール類を豊富に含む MSE は結紮糸除去による細菌因子の除去後の歯周組織の治癒を促進させた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5499　号 | 池田　恵莉 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　木下　淳博<br>副　査　池田　通、小田　茂 | |
| 論 文 題 目 | Resveratrol Derivative-rich Melinjo Seed Extract Induces Healing in a Murine Model of Established Periodontitis | |

（論文審査の要旨）

酸化ストレスとは、体内における活性酸素(reactive oxygen species: ROS)と抗酸化物質の産生のバランスが崩れた状態のことである。酸化ストレスが高い状態となると数多くの疾患が引き起こされるリスクが高まると考えられており、歯周炎もその一つである、歯周炎は多因子疾患であるが、これまでは歯周病原細菌と呼ばれる細菌群が歯周炎の主原因であると考えられてきた。しかし細菌が歯周炎の進行に不可欠ではあるものの、細菌因子のみでは歯周炎の病態を完全に解明し理解するには不十分であった。近年では体内における活性酸素の役割に注目が集まり、歯周病原細菌が歯周組織中に侵入すると、白血球が過剰な ROS を産生し、酸化ストレスが高い状態となることで歯周組織破壊が引き起こされると考えられるようになってきた。

レスベラトロールはぶどうやピーナッツの皮などから採取されるポリフェノールの一種である。レスベラトロールはポリフェノールの中でも特に強い抗酸化作用があり、これまでにアンチエイジング、抗がん作用、心血管疾患の予防といった多くの健康作用が報告されている。さらに、レスベラトロールが抗炎症作用、抗酸化作用、骨のリモデリングに関与するという報告がなされている。数あるレスベラトロール類の中で著者らはメリンジョ種子抽出粉末（melinjo seed extract: MSE）に着目した。メリンジョ中のレスベラトロールは一般的な単量体 trans resveratrol のみならず、二量体やその配糖体を含んでいる。一般的な単量体のレスベラトロールは 24 時間以内に体外に排出されるのに対し、二量体のレスベラトロールは 96 時間以上血中に留まり、長時間の持続効果を発揮すると報告されている。

今回著者らは、レスベラトロールの歯周炎への効果を期待し、歯周炎モデルマウスにレスベラトロール類を豊富に含んだ MSE を投与することで、骨吸収量の変化、炎症性サイトカインの発現量の変化、破骨細胞への影響、酸化ストレス量の変化の検討を行った。

本研究ではまず、マウスの上顎臼歯に 9-0 絹糸を結紮し歯周炎を誘発し、14 日目に MSE 溶液もしくはプラセボ溶液を 40 mg/kg 腹腔内に投与した。15 日目に各群半数のマウスの結紮糸を除去し、残りの半数の糸はそのまま留置した。糸の除去は歯周炎治療における歯石、プラークの除去を想定している。治癒過程を観察し 17, 20, 22 日目にマウスを安楽死させた。マウスは以下の 4 群に分類した。

１．歯周炎群（P 群。結紮糸留置）

２．歯周炎治療群（T 群。結紮糸除去）

３． 歯周炎＋MSE 群（P+MSE 群）
４． 歯周炎治療＋MSE 群（T+MSE 群）

本研究の主たる結果は、以下の通りである。

まず、患歯周囲上顎歯槽骨吸収量を実体顕微鏡下、またμCT を用いて測定したところ、P+MSE 群、T+MSE 群は P 群と比較して有意に骨吸収量が減少した。さらに患歯辺縁歯肉の炎症性サイトカイン(IL-1β、IL-4、IL-17、TNF-α)発現量を qPCR 法を用いて測定したところ、P 群と比較して P+MSE 群での IL-1β の発現量が有意に減少していた。それ以外のサイトカインの発現量に有意差は見られなかった。

さらに、マウス骨髄から単球を単離培養し、破骨細胞分化を TRAP 染色によって観察した。P+MSE 群、T+MSE 群は P 群と比較して有意に凝集核数が減少していた。

さらに患歯と周囲歯周組織の組織染色を行った。上顎歯槽骨中の TRAP 陽性エリアは T+MSE 群において P 群と比較して有意に小さく、P+MSE 群も低下傾向が見られた。ROS ダメージを評価するため 8-OHdG 抗体、酸化ストレス応答を観察するためその主要因子である nuclear factor E2-related factor(Nrf2)抗体を用いて免疫組織化学的染色を行ったところ、8-OHdG 陽性細胞数は P+RSV 群において P 群と比較して少なく、Nrf2 陽性エリアは P+MSE 群が P 群と比較して大きくなっていた。

本研究において、池田 恵莉は、MSE によって炎症性サイトカイン IL-1β の抑制、破骨細胞活性化の抑制、Nrf2 抗酸化経路の活性化による ROS の局所産生の抑制が起こり、それらの働きにより動物モデルで歯周炎の骨治癒が促進されることを報告した。

本研究結果は、歯周炎治療の新たな可能性を示唆するものであり、歯科医学のみならず、幅広い分野における発展に大きく貢献するものと考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | Thwe Zin Ei |
| 論文審査担当者 | 主 査　　宇尾　基弘<br>副 査　　興地　隆史　　渡邊　裕 |
| 論　文　題　目 | Comparison of resin-based and glass ionomer sealants with regard to fluoride release and anti-demineralization efficacy on adjacent unsealed enamel |

**Introduction**

Application of sealants is one of the most effective methods of preventing dental caries. Resin based sealants has been recommended as the gold standard for sealing pits and fissures because of their superior retentive properties compared with glass ionomer sealants. Although retention is a critical factor for sealants, in clinical practice, incomplete sealing often goes unnoticed despite good retention in the tooth. This favors biofilm accumulation that might lead to subsequent caries formation, particularly in high-risk patients. Therefore, incorporation of fluoride in sealants has been suggested as a viable option for caries prevention through the potential of fluoride released from materials (FR) that help to inhibit demineralization in the adjacent enamel. However, it is still unclear whether the fluorides released from resin-based sealants provide any additional clinical benefits.

Glass-ionomer sealants have been well known as rechargeable reservoirs rather than resin sealants, delivering fluoride from exogenous source. But it was reported that their recharging ability declines over time and still there is no information on efficacy of long term fluoride concentration released from glass ionomer excluding the influence of other F sources.

Optical coherence tomography (OCT) has been widely used for the non-destructive assessment of enamel and dentine demineralization. Quantitative measurement of light propagation in tissues, measured as the attenuation coefficient ($\mu_t$) parameter in OCT, has shown promising ability to discriminate between sound and demineralized tooth structures. We believe that OCT may also be useful for clinically assessing the inhibitory effects of sealants on the demineralization of adjacent unsealed enamel surfaces.

Therefore, this study aimed to compare the behavior of fluoride release over time and anti-demineralization effects of two resin-based sealants and a glass-ionomer sealant on adjacent unsealed enamel when fluoride releasing level of all the sealants become constant.

**Materials and Methods**

Simplified sealant cavities ($2\times2\times0.5$ mm$^3$) were prepared in bovine enamel blocks (n=10) and were filled with either: control group - non-fluoride containing adhesive and flowable composite resin; test groups - fluoride containing sealants Teethmate F-1(TF) and Clinpro™(CP), glass ionomer cement Fuji VII(FVII). Specimens were then incubated in artificial saliva (AS; 1 mM $CaCl_2$, 3 mM $KH_2PO_4$, 100 mM NaCl,100 mM Na acetate, 0.02% $NaN_3$, 100 µg/ml casein, pH 6.3) at 37$^o$C. AS were refreshed every 2 days during 14 days and FR were measured using a fluoride electrode. After the incubation of the enamel blocks in AS, the specimens were subsequently demineralized for 5 and 10 days at pH 4.8. Demineralization was assessed by comparing the mean optical attenuation coefficient difference ($\Delta\mu_t$) from SS-OCT obtained before and after demineralization. Nanohardness measurement was performed in randomly selected five specimens at the same area of OCT imaging. Integrated nanohardness (INH) was calculated for the whole lesion up to a depth of 200 µm. Statistical analysis were performed by using ANOVA and Tukey`s test ($\alpha$=0.05). The relationship between $\mu_t$ and INH for each specimen was also examined using Pearson's correlation.

**Results**

For all the sealants, the greatest amount of fluoride was released at the first measurement. FVII showed a significant difference in fluoride released among the groups on all incubation days ($p<0.05$). There was a significant difference in the cumulative amount of fluoride released after 14 days in all sealant groups, with the highest amount observed in FVII group followed by TF and CP groups. No fluoride was released in control group.

In 70% of TF specimens, protected zone from demineralization was observed in the area adjacent to the sealant. Conversely, all other sealant materials exhibited demineralization. The two-way ANOVA revealed a significant interaction between sealant and demineralization days, and both factors significantly influenced the $\Delta\mu_t$ ($p<0.05$). TF group showed the lowest $\Delta\mu_t$ amongst all the groups on both demineralization days, meaning the least demineralization. No significant differences in $\Delta\mu_t$ were observed between FVII, CP, and Control groups after 10-days demineralization. INH was significantly different between control and sealant groups, with TF group exhibiting the highest hardness value. No significant difference was observed between FVII and CP groups. A strong inverse Pearson`s correlation was exhibited between $\mu_t$ and INH with a good linearity ($R^2=0.77$).

**Discussion**

In the present study, specimens were incubated in AS that contained casein. It was recently reported that casein can mimic the mineral regulatory functions of salivary phosphoproteins, such as stabilization of supersaturation of AS and inhibition of unwanted apatite crystals growth as well as superficial fluoridated apatite precipitation on sound enamel which may provide the result of fluoride release and anti-demineralization efficacy similar to those achieved by in vivo situation.

Although the amount of fluoride released among the fluoride containing materials was different, the pattern was similar, where an initial release was rapid followed by a slow and long lasting release. The highest fluoride release from FVII may be due to the higher porosity of ionomer and superficial rinsing effect, resulting in an initial burst of fluoride released from the glass particles during the setting reaction. Conversely, TF contains an organic fluoride compound chemically bound to resin (MF-MMA), wherein the covalently bound fluoride is hydrolyzed over time. CP is assumed to release ionized fluoride ($F^-$) ions as a result of slower hydrolysis of tetrafluoroborate.

The anti-demineralization potential of each material on the adjacent unsealed enamel was evaluated by OCT and nanoindentation measurements. In the OCT images, the demineralized areas appeared as intense scattering zones with high reflectivity. Based on the findings obtained in previous studies, reflectivity was demonstrated to correlate with $u_t$, and the greater value of which indicated severer demineralization.

In this study, fluoride-release was monitored in the presence of an enamel substrate that underwent pre-treatment with acid etching prior to sealant application. Fluoride uptake in acid etched enamel had been reported approximately five times greater than in sound enamel. Although measurable fluoride from TF during incubation periods is low, it can be speculated that most of the released fluoride have been incorporated into adjacent demineralized enamel and enhanced acid resistance. Only ionized $F^-$ released from TF would also facilitate easily uptake of the $F^-$ by unsealed enamel during incubation period. Moreover, TF contains 10-methacryloyloxydecyl dihydrogenphosphate monomer which forms acid-resistant calcium-MDP complexes on the enamel surface. In addition, low viscosity resin sealant, TF may be infiltrated to acid etched enamel and could synergistically increase the demineralization resistance of adjacent enamel with fluoride. In CP group, very low concentration of fluoride was released, resulting in less amount of the fluoride incorporation into the adjacent acid treated enamel. In other word, the anti-demineralization efficacy by the incorporated fluoride may be less effective than increased solubility by acid pre-treatment.

Despite having the highest amount of fluoride, FVII did not exhibit a higher anti-demineralization effect than TF and CP. Fluoride release in FVII is reported to be accompanied by other ions namely aluminum, calcium and strontium. Among them, aluminum is known to have strong affinity to F- with forming Al-F complex and reduces the levels of free fluoride ions ($F^-$). Although total high fluoride concentration of FVII was measureable with de-complexing agent TISAB, it can be speculated that the incorporation of $F^-$ might be low during incubation due to the released aluminum ions, resulting in less anti-demineralization efficacy.

Currently, there are no standardized protocols for monitoring fluoride-release by dental sealants. Unlike others studies, the demineralization resistance potential was tested when fluoride releasing level of all the sealants became constant without external fluoride recharging in this study. As demonstrated, the amount of fluoride released from a

material should not be the only factor considered when determining the potential of different sealant materials. In case of glass ionomer cement, the role of fluoride recharging properties may play an important role in caries prevention rather than released fluoride itself present in the material. Long term slow release of fluoride from resin sealants may additionally protect the adjacent enamel in combined with high retentive potential. Further clinical studies still need to evaluate the clinical longevity and anti-cariogenic potential of fluoride sealants.

Conclusion

Resin based sealant (TF) exhibited the effective protection in adjacent unseal enamel from acid demineralization over the glass ionomer sealant. Low concentrations of fluoride released from resin sealants may provide comparable anti-demineralization effect with the glass ionomer sealant.


要約

本研究の目的は、フッ素含有のレジン系と glass ionomer 系のシーラントからのフッ素徐放性の違い、およびシールされていない隣接する健全エナメル質歯面での脱灰抑制効果の違いを検討することである。本研究ではシーラントとして、レジン系の Teethmate F-1 (TF)および Clinpro™ (CP)と、glass ionomer 系の Fuji VII (FVII)を比較検討した。コントロールとしてフッ素非含有のワンステップボンディング材（G bond Plus）を用いた。

まず牛エナメル質にう窩状の窪みを形成し、この人工う窩にシーラントを充填した。これらを 14 日間人工唾液に浸漬し、2 日に 1 回新しい人工唾液と取替えつつ、フッ素徐放量をモニターした。14 日後、これらの充填試料を脱灰液に 10 日間浸漬し、次いで光干渉断層計（OCT）とナノ硬さ計を用いて脱灰程度を評価した。

その結果、FVII 群が有意に最も多いフッ素徐放量（全フッ素量）を示した。しかし脱灰抵抗性に関しては、OCT 法では TF が有意に最も高く、他の 3 つの群間で有意差はなかった。ナノ硬さ計でも TF が有意に最も高く、CP 群と FVII 群では有意差はなかったが、コントロール群とでは有意差を認めた。この結果は、FVII から徐放されたアルミニウムがフッ素と強く結合し、脱灰抑制作用を最も強く発揮するフッ素種（イオン化したフッ素：F-）の濃度が減少したことによると推察された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5500　号 | Thwe Zin Ei |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　宇尾　基弘<br>副 査　　興地　隆史　　渡邊　裕 | |
| 論 文 題 目 | Comparison of resin-based and glass ionomer sealants with regard to fluoride release and anti-demineralization efficacy on adjacent unsealed enamel | |

（論文審査の要旨）

臼歯の裂溝う蝕の予防充填に用いるシーラントには歯質接着性を有するレジン系材料と、フッ素による齲蝕抑制効果を期待したグラスアイオノマー系材料があり、近年フッ素含有のレジン系シーラントが開発され臨床で用いられている。しかしながら、フッ素含有レジン系材料のエナメル質における脱灰抑制効果の詳細な情報は得られていない。光干渉断層計(OCT)は非侵襲的に生体の断層画像を撮影することができ、う蝕の診断のみならずエナメル質や象牙質の初期脱灰の評価に用いた研究が報告されている。本研究は OCT による画像評価法に着眼し、シーラントのう蝕抑制効果の検討を目的として実施したものである。

実験に用いた OCT は波長掃引型 OCT であり、光源として用いる 1310 nm の波長はエナメル質に高い透過性を有し、画像深度に優れていることが知られている。また試験片として牛抜去歯を用いているが、均一な試料条件からシーラント材料の特性を比較するためであり、いずれも本実験における適切な選択といえる。シーラントとしてはフッ素を含有する 2 種のレジン系材料と 1 種のグラスアイオノマー系材料を採用しているが、いずれも臨床で用いられている材料である。これらの材料にフッ素を含まない実験群を設定して比較を行っている。

本論文の実験はフッ素徐放量の計測、OCT による脱灰の光学的評価、ナノ硬さ試験の 3 系列より成立している。フッ素徐放量の計測では唾液に含まれるリンタンパクの影響に注目し、保管溶液にリンタンパクと同様の効果が得られるカゼインを加え、14 日間にわたり計測を行っている。リンタンパクは生体において過剰なアパタイト沈着を制御する役割があることから、脱灰試験における新しい試みといえる。OCT による光学的評価では過去の文献を参考にして、5 日間または 10 日間の脱灰の後、画像シグナルの深さ方向への減衰率の変化から、それぞれの材料の抗脱灰作用の比較を試みている。OCT シグナルの解析による新しい方法であり、評価することができる。ナノ硬さ試験ではシーラント材料に近接したエナメル質における脱灰後の硬さを幅 200 μm、深さ 200 μm の範囲で計測しており、実験データとして十分な測定域といえる。

得られた主な結果は次のとおりである。

１．レジン系の Teethmate F-1 は被覆していないエナメル質近接部において高い脱灰抑制効果を示した

２．グラスアイオノマー系の Fuji VII ではフッ素の徐放量が多くみられ再表層部の硬さは最も高い値を示したが、深部の硬さの上昇はレジン系シーラントよりも低かった

これらの結果についての考察は、牛抜去歯使用の妥当性、唾液に含まれるリンタンパクの影響とカゼインの比較、本実験で使用したグラスオノマー系シーラントとレジン系シーラントのフッ素徐放のメカニズム、OCT 画像評価とナノ硬さ試験の相関性、Teethmate F-1 に含まれるフッ素含有レジン MMA-F によるフッ素徐放性と接着性モノマーMDP による耐酸性効果、Clinpro における実験結果と OCT 評価の限界、Fuji VII のフッ素徐放性とアルミニウムイオンの影響などから理論的に構成され、興味深い内容となっている。また本実験系における限界についても言及され、今後の研究への示唆に富む内容となっている。

以上より、申請者 Thwe Zin Ei が本研究領域において最先端の技術を駆使し、シーラントの脱灰抑制効果に関して新たな評価を行い、臨床評価の開発に資する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 大畑　八重 |
| 論文審査担当者 | 主査　鈴木　敏彦<br><br>副査　三浦　雅彦　　丸川　恵理子 |
| 論文題目 | A distinctive subgroup of oral EBV+ B-cell neoplasm with polymorphous features is potentially identical to EBV+ mucocutaneous ulcer |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）は、臨床病理学的また生物学的に多様な性質を持つ疾患群である。DLBCL は節外性に発症することもまれではなく、口腔に発症する悪性リンパ腫の中で最も頻度の高い組織型である。Epstein-Barr virus (EBV) は、種々の悪性リンパ腫やリンパ増殖疾患の発症や進展に関与することが知られている。EBV 陽性 DLBCL は、“高齢者 EBV 陽性 DLBCL”として 2008 年版 WHO 分類で暫定サブタイプとして提唱され、急激な臨床経過をたどることが多い予後不良な悪性リンパ腫と報告された。しかし、2016 年の WHO 分類の改訂で、高齢者 EBV 陽性 DLBCL は、“DLBCL、非特異型（NOS）”に 名称が置き換えられ、さらに新たに EBV 陽性粘膜皮膚潰瘍（EBVMCU）が独立、提唱された。EBVMCU は、医原性ないし高齢による免疫不全に関連して粘膜や皮膚に限局して発症し、化学療法が奏功するだけでなく、保存的治療のみで自然治癒する可能性もある予後良好な疾患とされる。EBVMCU は口腔に好発し、EBV 陽性 DLBCL と共通の組織学的特徴を有する。ゆえに口腔において両者の鑑別は、治療法の選択や予後予測の観点から極めて重要である。しかし、DLBCL や EBVMCU に関して、口腔に特化した報告は乏しく、両者の正確な鑑別や病態については未だ不明な点が多い。

＜方法＞

口腔の DLBCL および細胞形態的に高悪性度を示すリンパ増殖疾患（LPD）49 例を対象とし、EBV 感染の有無に着目して臨床病理学検討および遺伝子変異検索を行った。臨床病理学的検討では、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体を用いた組織学的評価および免疫組織学的評価を行った。遺伝子変異検索では、同様の FFPE 検体から DNA を抽出し、DLBCL で比較的高頻度に変異が見られると報告されている、NFκB 経路関連因（*MYD88, CD79A, CD79B, CARD11*）およびエピゲノム関連因子（*EZH2*）を標的とした PCR 反応、サンガー法によるダイレクトシークエンスを行った。

＜結果＞

49 例中 14 例が EBV 陽性、35 例が EBV 陰性であった。臨床病理学的検討から、EBV 陽性例

はすべて EBVMCU の基準を満たし、EBV 陰性群と比較し病期ステージは有意に早期であった。さらに EBV 陽性群では全例が組織学的に多形性像を示すのに対し、EBV 陰性群は 91.4% (32/35) がびまん性単調増殖を示した。また、EBV 陰性群では、死亡ないし再発例が見られるのに対し (5/27)、EBV 陽性群では死亡や再発がなく (0/11)、予後良好を示した。遺伝子変異検索（*MYD88, CD79A, CD79B, CARD11, EZH2*）では、EBV 陰性群の 33.3% (9/27)が少なくとも一つの遺伝子変異を有するのに対し、EBV 陽性群では遺伝子変異は見られなかった（0/11)。

＜考察＞

EBV 陽性 DLBCL および LPD については、その病態生理や適切な分類法に関してこれまでに数多くの議論がなされている。EBVMCU は 2010 年に Dojcinovet らにより初めて提唱された。彼らは EBV 陽性の境界明瞭な潰瘍性病変 26 例を、医原性ないし高齢による免疫不全に関連し粘膜や皮膚に限局性に発症する疾患群として報告した。また、組織学的には、Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) 様細胞を伴うことを特徴とし、臨床的には保存的治療のみで自然治癒しうる、予後良好な疾患であると報告した。

口腔病変に着目した本研究では、興味深いことに、EBV 陽性群はすべて EBVMCU の基準を満たす、口腔に限局する境界明瞭な潰瘍性病変であった。さらにいずれも良好な経過をたどった。本研究の組織学的検討では、EBV 陽性群のうち典型的な HRS 様細胞を含む症例は約半数のみであったが、EBV 陽性例はいずれも組織学的多形性を示すことが明らかとなった。一方で EBV 陰性群はほとんどがびまん性単調増殖を示した。よって、組織学的多形性が口腔 EBVMCU のより特徴的な所見と考えられた。但し、EBV 陰性群のうち 3 例は多形性像を示したため、組織形態学的評価のみならず、EBV 感染の有無を EBV in situ hybridization や LMP-1 免疫染色等により確定することも、EBVMCU の診断には必要不可欠である。

遺伝子変異については、DLBCL の約 38%が、NFκB 経路関連因（*MYD88, CD79A, CD79B, CARD11*）やエピゲノム関連因子（*EZH2*）に遺伝子変異を持つと報告されている。NFκB 経路関連因子の遺伝子変異は non-germinal center B-cell (non-GCB) タイプに高頻度に見られるとされ、エピゲノム関連因子の変異は GCB タイプに多いとされる。本研究は、口腔 DLBCL および LPD に着目して遺伝子変異検索を行った最初の報告である。我々の結果からは、口腔の DLBCL における遺伝子変異頻度は、DLBCL 全体と同等であることが明らかとなった。しかし、*EZH2* の変異は non-GCB タイプの 1 例に認められたのみで、その他は全て NFκB 経路関連因子に関連する遺伝子変異であった。これは口腔の部位特異的な特徴の可能性がある。さらに、我々は EBV 陽性群では遺伝子変異が見られないことを明らかにした。EBV 陽性 DLBCL における遺伝子変異頻度は、EBV 陰性 DLBCL に比して低いことが過去に報告されている。しかし、Gebaueret らは、EBV 陽性 DLBCL26 例中 3 例に遺伝子変異（*CARD11* 2 例, *EZH2* 1 例）を報告している。彼らの検討症例の中には、EBVMCU の可能性がある症例 4 例（口腔粘膜 3 例, 扁桃 1 例）が含まれるが、遺伝子変異があったのはいずれも EBV 陽性 DLBCL, NOS と考えられる症例である（リンパ節 2 例, 大動脈 1 例)。これらの報告と我々の結果を併せると、既報の遺伝子変異は、EBVMCU を除く、EBV 陽性ないし陰性の DLBCL, NOS に共通する遺伝子変異である可能性が示唆される。

本研究の EBV 陽性群 14 例のうち 9 例は関節リウマチに対するメソトレキセート（MTX）の内

服を行っていた。そのためこれらはいわゆる MTX 関連 LPD (MTXLPD) と呼ぶこともできる。しかし、MTXLPD は、時に急激な経過をたどり予後不良を示すこともあることから、今回のような MTXLPD に該当する口腔 EBV 陽性症例を、EBVMCU と分類することは、臨床病理学的性質を反映する上でより有効と考えられる。もちろん、EBVMCU に合致するいずれの症例も、慎重な経過観察と、個々の患者に合わせた適切な治療法の選択が必要不可欠である。また、本研究では結果的に 14 例の口腔 EBVMCU 症例および 35 例の EBV 陰性口腔 DLBCL の詳細な臨床病理学的および遺伝子変異解析結果を報告したが、同様の口腔病変の正確な病態把握のためには、さらなる症例数の蓄積と前向き研究が望まれる。

＜結論＞

多形性の細胞形態を示す口腔 EBV 陽性 B 細胞性 LPD は、高い確率で EBVMCU に合致し、臨床病理学的および遺伝子変異の観点から特有の性質を示すことが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5501　号 | 大畑　八重 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　鈴木　敏彦<br>副査　　三浦　雅彦　　丸川　恵理子 | |
| 論 文 題 目 | A distinctive subgroup of oral EBV+ B-cell neoplasm with polymorphous features is potentially identical to EBV+ mucocutaneous ulcer | |

（論文審査の要旨）

本研究では、口腔のびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）および形態的に高悪性度を示すリンパ増殖疾患（LPD）について、Epstein-Barr ウイルス（EBV）感染、特に近年新たに WHO 分類に提唱された疾患群である、EBV 陽性粘膜皮膚潰瘍（EBVMCU)との関連に着目して、臨床病理学的検討および遺伝子変異解析を行った。EBVMCU は EBV 陽性 DLBCL と共通の組織学的特徴を有する。その一方で両者の臨床像は対照的で、EBVMCU は自然治癒する可能性を持つ予後良好な疾患であるのに対し、EBV 陽性 DLBCL は、一般的に急激な経過をたどり予後不良と言われる。EBVMCU は口腔に好発するため、特に口腔において両者の鑑別は極めて重要である。本研究は、口腔の DLBCL や LPD について詳細な検討を行った最初の報告であり、その研究成果は、病態把握のみならず患者の治療法決定や予後予測において、重要な指針となり得るものである。よって本論文の意義は高く評価できる。

本研究は、医学部包括病理学分野、口腔病理学分野を主体に、口腔外科や血液内科などを含む、医歯病連携によってなされた全学的研究である。本学歯学部附属病院、医学部附属病院、武蔵野赤十字病院において DLBCL ないし高悪性度リンパ増殖疾患と診断された口腔症例 49 例について検討している。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体を用いた組織学的評価および免疫組織学的評価ならびに、同様の FFPE 検体から抽出した DNA を用い、DLBCL で比較的高頻度に変異がみられると報告されている遺伝子変異に着目して、サンガー法によるダイレクトシークエンスによる遺伝子変異検索を行った。本研究で採用された解析手法は科学的に妥当であり、研究目的に沿ったものと考えられる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1) EBV 陽性群は、陰性群と比較し有意に病期ステージが早期であり、さらにいずれも口腔に限局する境界明瞭な潰瘍性病変であった。一方 EBV 陰性群では、様々な肉眼像を示した。

2) EBV 陽性例はいずれも腫瘍細胞に多形性を有していた。一方 EBV 陰性群のほとんどがびまん性単調増殖を示した。

3) EBV 陽性例では化学療法の施行あるいは関連薬剤の中止により全例長期寛解が得られた。一方 EBV 陰性群では、死亡や再発といった予後不良例が認められた。

4) EBV 陽性例は検討した全例が、 2016 年 WHO 分類で新たに提唱された疾患群である、EBVMCU に合致した。

5) EBV 陽性群では、一般的に DLBCL で高頻度に報告されている遺伝子変異が認められなかっ

た。EBV 陰性群では、33%に少なくとも 1 つの遺伝子変異を認めた。

以上の結果を基に、申請者は多形性の細胞形態を示す口腔 EBV 陽性 B 細胞性 LPD は、高い確率で EBVMCU に合致し、臨床病理学的および遺伝子変異の観点から特有の性質を示すと結論付けた。本研究で検討された EBV 陽性群の中には、いわゆるメソトレキセート関連 LPD (MTXLPD) も含まれる。申請者は、MTXLPD は時に急激な経過をたどり予後不良を示すこともあることを考慮し、今回のような MTXLPD に該当する口腔 EBV 陽性症例を、EBVMCU と分類することは、臨床病理学的性質を反映する上でより有効であると考察している。加えて更なる症例の蓄積と前向き研究の必要性に言及している。

本研究は通常の病理診断において EBVMCU を正しく診断するための基盤的検討を含んでおり、さらに臨床所見との照らし合わせによって EBVMCU との相同性を証明した。これにより、今後 EBVMCU に該当する可能性のある患者の治療法の決定や予後予測において重要な指針となる、医学的に極めて大きな研究成果である。よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 松田　悠平 |
| 論文審査担当者 | 主査　古屋　純一<br>副査　俣木　志朗　　原田　浩之 |
| 論　文　題　目 | Reliability and Validity of the MD Anderson Dysphagia Inventory among Japanese Patients |

（論文の内容の要旨）

＜緒言＞

日本国内の頭頸部癌患者数は年間 16,000 人（2009 年度）と報告されており、近年増加傾向にある。頭頸部癌患者の一般的な治療後の障害として嚥下障害があり、嚥下障害は低栄養のみならず肺炎も惹き起こすとされ、その結果、QOL の悪化につながるとされている。

近年、患者報告型アウトカムの中でも QOL 調査票の使用が治療結果の改善に重要な役割を果たしている。頭頸部癌患者の健康関連 QOL 調査票としては European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire-Core 30（EORTC QLQ-C30）、European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire-Head and Neck 35（EORTC QLQ-H&N35）、Swallowing Quality-of-Life Questionnaire（SWAL-QOL）、MD Anderson Dysphagia Inventory（MDADI）がある。EORTC QLQ-C30 はがん患者の包括的な QOL 調査票、EORTC QLQ-H&N35 は頭頸部癌患者用の疾患特異的な QOL 調査票となっており、併用することが推奨されている。また、SWAL-QOL は嚥下障害に関連した QOL 調査票、MDADI は頭頸部癌患者用の嚥下障害関連 QOL 調査票である。中でも MDADI は頭頸部癌患者の嚥下障害関連 QOL の評価に優れており、特徴として、構成する質問数が 20 問と少ないこと、頭頸部癌患者の嚥下障害に関連した QOL を計測する上で SWAL-QOL よりも内容的妥当性が優れていることが挙げられる。しかし、MDADI については日本語版が存在しない現状にある。

一方で、嚥下障害の客観的評価指標としては嚥下内視鏡検査や嚥下造影検査が Gold Standard であるが、経済的コストや患者の身体的負担の問題が報告されている。より簡便で非侵襲的な客観的評価指標としては Functional Oral Intake Scale（FOIS）がある。FOIS は 7 段階のリッカートスケールで構成され、嚥下造影検査との関連など信頼性および妥当性が検証されている。さらに、Heijnen らは FOIS と MDADI との関連について報告しているが、FOIS のスコアと MDADI のスコアが段階的に一致する傾向にあるかは不明である。

そこで、本研究は嚥下障害に関わる QOL 評価尺度である MDADI 日本語版（MDADI-J）の信頼性と妥当性を検証し、MDADI-J と FOIS の傾向についても検討した。

＜方法＞

MDADI は 4 つのサブスケール Global、Emotional、Functional、Physical からなる全 20 問で構成されており、MDADI-J は英語版のオリジナル尺度を国際基準に則って 1.尺度の選定、2.尺度原作者とのコンタクト、3.順翻訳、4.フォーカスグループでの検討、5.逆翻訳、6.尺度原作者とのコンタクト、7.パイロットテスト、8.暫定版完成、9.計量心理学的評価のための調査の過程を経て作成した。

2015 年 10 月から 2016 年 8 月の間に、NTT 東日本関東病院歯科口腔外科および九州歯科大学附属病院口腔保健科を受診した頭頸部癌患者 75 名が登録され、そのうち 72 名が MDADI-J に回答した。登録された 72 名のうち、19 名に対しては再試験を実施した。対象者の選定基準は頭頸部癌患者である、20 歳以上の成人であるとした。除外基準は認知症等の精神疾患の既往歴があり、自分の意思で質問用紙に回答ができないものとした。採取したデータについて、カルテからは性別、年齢、癌の原発部位、癌の臨床病期、癌の治療方法、FOIS を採取した。FOIS については、カルテより食事形態を把握し、Level の判定を行った。

また、自記式質問用紙により採取したデータは EORTC QLQ-C30、EORTC QLQ-H&N35、MDADI-J とした。統計学的検討については、内的整合性の検討として Cronbach’s α係数を各サブスケールで算出した。また、平均項目間相関係数についても各サブスケールで算出した。再現性の検討として再試験を 2 週間後に実施し、級内相関係数（ICC）を各サブスケールで算出した。並存的妥当性は EORTC QLQ-C30 と EORTC QLQ-H&N35 との Pearson の相関係数を算出し検証した。弁別的妥当性については臨床病期の Early stage（Stage I・II）と Advanced stage（Stage III・IV）に分けて、MDADI-J のスコアを t 検定により比較した。さらに、MDADI-J と FOIS の傾向を検討するためにトレンド検定（Jonckheere-Terpstra Test）を実施した。本研究は東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認（承認番号 1256）を得て実施した。

＜結果＞

解析対象者は男性 39 名、女性 33 名、平均年齢は 64.1 ± 11.4 歳であった。癌の原発部位は口腔が 64 名、中咽頭が 7 名、喉頭が 1 名であった。癌の臨床病期は Stage I が 24 名、Stage II が 15 名、Stage III が 14 名、Stage IV が 19 名であった。治療方法では外科治療単独が 50 名、外科治療と放射線療法が 8 名、外科治療と化学放射線療法が 12 名、化学放射線療法が 2 名であった。FOIS は Level 1 が 1 名、Level 2 が 3 名、Level 3 が 1 名、Level 4 が 10 名、Level 5 が 20 名、Level 6 が 14 名、Level 7 が 23 名であった。また、再試験の対象者は 19 名であった。MDADI-J 合計スコアの Cronbach’s α係数は合計スコアで 0.92、Emotional で 0.67、Functional で 0.81、Physical で 0.83 であった。平均項目間相関係数は合計スコアで 0.42、Emotional で 0.49、Functional で 0.47、Physical で 0.39 であった。ICC は合計スコアで 0.84、Global で 0.58、Emotional で 0.78、Functional で 0.79、Physical で 0.81 であった。MDADI-J は EORTC QLQ-C30、EORTC QLQ-H&N35 の各サブスケール（痛み、食欲不振、嚥下、知覚障害、会話障害、社会的摂食、歯牙の問題、開口障害、口腔乾燥、唾液粘稠、咳嗽）と有意な相関関係を示した。Stage I・II と Stage III・IV の比較では、合計スコアおよび全てのサブスケールにおいて有意な差が認められた。また、FOIS のスコアが増加すると、MDADI-J の合計スコアも増加する

有意なトレンドが認められた。

＜考察＞

信頼性について、他言語版（ドイツ語、韓国語、ポルトガル語、スウェーデン語）の Cronbach's α係数は Emotional で 0.79 から 0.86（日本語版 0.67）、Functional で 0.68 から 0.82（日本語版 0.81）、Physical で 0.74 から 0.89（日本語版 0.83）、合計スコアで 0.81 から 0.94（日本語版 0.92）であり、他言語版と比較して同様の水準であった。平均項目間相関係数についても Komagamine らの報告と同様の水準であった。他言語版（ドイツ語、韓国語、ポルトガル語、スウェーデン語）の再現性を示す ICC は Global で 0.82 から 0.83、Emotional で 0.88 から 0.93、Functional で 0.84 から 0.97、Physical で 0.84 から 0.94、合計スコアで 0.80 から 0.96 であった。日本語版の ICC は Global を除けば 0.78 から 0.84 で他言語版と同水準であった。日本語版の Global は 0.58 と低い値を示したが、他言語版においても Global のサブスケールは他のサブスケールと比較して最も低い値となっている。これらは、Global のサブスケールが 1 項目のみで構成されていることが原因として考えられる。結果として、日本語版の ICC は合計スコアで 0.84 と高い値を示したため、再現性についても問題ないものと考えられた。

MDADI-J と EORTC QLQ-C30 および EORTC QLQ-H&N35 との相関関係を検証したところ、各サブスケールにおいて過去の報告と同程度の相関関係が認められた。よって、MDADI-J は並存的妥当性についても問題ないものと考えられた。

Stage I・II と Stage III・IV の比較では、MDADI-J の合計スコアおよび全てのサブスケールにおいて有意な差が認められた。過去に MDADI の弁別的妥当性を証明した報告はスウェーデン語のみであり、今回の試験もそれを支持する結果となった。以上より、MDADI-J は信頼性および妥当性を有する QOL 調査票であることが証明された。

さらに、MDADI-J の合計スコアが増加すると、FOIS のスコアも単調増加することが明らかとなった。この結果は Yang らが報告した、嚥下造影検査と MDADI のスコアが相関を示した結果を支持するものと考えられる。つまり、嚥下の咽頭期における主観的評価と客観的評価が一致する可能性を示唆している。従って、臨床において嚥下の咽頭期に関する患者の訴えは客観的評価と同様に重要視する必要があると考えられる。

研究の限界について、本研究の患者集団の基本情報は本邦における頭頸部癌患者の集団と乖離していた。そのため、一般化可能性については慎重に検討する必要があり、研究の限界と判断した。また、FOIS について、Level 1 は 1 名、Level 2 は 3 名、Level 3 は 1 名であった。分布に偏りがあるため、トレンド検定の解析結果に影響を与える可能性を考慮する必要があると考えられた。

＜結論＞

以上の結果より、MDADI-J の信頼性および妥当性が示された。また、FOIS のスコアが悪化すると、MDADI-J のスコアも段階的に悪化することが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5502　号 | 松田　悠平 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　古屋　純一<br>副　査　俣木　志朗　　原田　浩之 | |
| 論 文 題 目 | Reliability and Validity of the MD Anderson Dysphagia Inventory among Japanese Patients | |

（論文審査の要旨）

日本国内の頭頸部癌患者数は年間 16,000 人（2009 年度）と報告されており、近年増加傾向にある。頭頸部癌患者の一般的な治療後の障害として嚥下障害があり、嚥下障害は低栄養のみならず肺炎も引き起こすとされ、その結果、QOL の悪化につながるとされている。近年、患者報告型アウトカムの中でも QOL 調査票の使用が治療結果の改善に重要な役割を果たしている。頭頸部癌患者の健康関連 QOL 調査票としては EORTC QLQ-C30、EORTC QLQ-H&N35、Swallowing Quality-of-Life Questionnaire（SWAL-QOL）、MDADI がある。中でも MDADI は頭頸部癌患者の嚥下障害関連 QOL の評価に優れており、特徴として、構成する質問数が 20 問と少ないこと、頭頸部癌患者の嚥下障害に関連した QOL を計測する上で SWAL-QOL よりも内容的妥当性が優れていることが挙げられる。しかし、MDADI については日本語版が存在しない現状にある。一方で、嚥下障害の客観的評価指標としては嚥下内視鏡検査や嚥下造影検査が Gold Standard であるが、経済的コストや患者の身体的負担の問題が報告されている。より簡便で非侵襲的な客観的評価指標としては Functional Oral Intake Scale（FOIS）がある。FOIS は 7 段階のリッカートスケールで構成され、嚥下造影検査との関連など信頼性および妥当性が検証されている。しかし、FOIS のスコアと MDADI のスコアが段階的に一致する傾向にあるかは不明である。

そこで松田は、嚥下障害に関わる QOL 評価尺度である MDADI-J の信頼性と妥当性を検証し、さらに MDADI-J と FOIS の傾向についても検討した。

解析対象者は男性 39 名、女性 33 名、平均年齢は 64.1 ± 11.4 歳であった。また、再試験の対象者は 19 名であった。MDADI-J 合計スコアの Cronbach's α 係数は 0.92、平均項目間相関係数は 0.39 から 0.49 であった。再現性の指標である ICC は合計スコアで 0.84 であった。MDADI-J は EORTC QLQ-C30、EORTC QLQ-H&N35 の各サブスケールと有意な相関関係を示した。臨床病期の Stage I・II と Stage III・IV の比較では、合計スコアおよび全てのサブスケールにおいて有意な差が認められた。また、FOIS のスコアが増加すると、MDADI-J の合計スコアも増加する有意なトレンドが認められた。以上より、MDADI-J の信頼性および妥当性が示された。また、FOIS のスコアが悪化すると、MDADI-J のスコアも段階的に悪化することが示唆された。

本研究により、国際的に使用されている頭頸部癌患者の嚥下障害関連 QOL 尺度である

MDADI の日本語版が作成され、MDADI 日本語版が頭頸部癌患者の嚥下障害のアウトカムの１つの指標として使用できるとともに、将来的には頭頸部癌のみならず他の疾患に起因する嚥下障害患者への応用の可能性も示唆された。また、嚥下障害に関わる客観的評価と主観的評価が一致する可能性についても指摘した。この成果は歯科医学の進歩発展に寄与するものと判断される。よって本論文は、博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 坪川　正樹 |
| 論文審査担当者 | 主査　倉林　亨<br>副査　三浦宏之　　新田　浩 |
| 論　文　題　目 | *In vitro* and clinical evaluation of optical coherence tomography for the detection of subgingival calculus and root cementum |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

光干渉断層画像診断法(OCT)は、光エネルギーを用いた非侵襲性の断層画像診断システムである。本研究の目的は、歯肉縁下歯石およびセメント質の検出装置としての、OCTの有効性を検証することである。まず、*in vitro*において抜去歯を用いて、歯肉縁下歯石の機械的除去前後でOCT撮影を行い、非脱灰切片とOCT画像の比較を行った。また、厚さの異なる豚歯肉の被覆による歯石の画像の変化を観察した。次に、臨床において歯肉縁下のデブライドメント前後にOCT撮影を行い、画像を比較分析した。抜去歯でのOCT画像においては、歯肉縁下歯石が無構造の灰白色を示す構造物として描出され、除石後に消失した。セメント質は薄い暗色の層として描出された。豚の歯肉で被覆した場合、歯肉の厚さが増すにつれ、歯石は不明瞭となった。口腔内の前歯、小臼歯頬側歯頸部において、歯肉縁上の歯石とセメント質は明瞭に描出された。歯肉縁下歯石は不鮮明ながらも灰白色像として検出することが可能であり、デブライドメント後にその消失が確認された。さらに、画像のデジタル加工により、歯石の検出が容易になった。SS-OCTは歯周組織の断層診断装置としてだけではなく、歯周病罹患根面のデブライドメントにおいて、チェアーサイドでのセメント質や歯肉縁下歯石の補助的な検出装置としても有望である。しかしながら、臨床応用には装置のさらなる改良が求められる。

＜緒言＞

歯周病の治療において、根面の歯石除去は最も重要な治療手順の一つである。歯肉縁下歯石の検出は歯周プローブによる手指の感覚を頼りに行われてきたが、手指の感覚は術者の経験や能力に左右されてしまう。従って、新しい、信頼性の高い、客観的な縁下歯石検出法が望まれている。歯石検出の方法として、近年いくつか新しい方法が報告されているが、簡便性や信頼性などの問題で、未だ一般には広まる方法はない。

一方で、根面のデブライドメント後にセメント質が残存する場合、歯周組織の治癒に良い影響があることが報告されており、セメント質の保存は近年推奨されるようになっている。しかしながら、現在、口腔内においてセメント質の有無を正確に判断する方法は存在しない。

光干渉断層画像診断法(Optical Coherence Tomography: OCT)は、光エネルギーを用いた非

侵襲性の断層画像診断システムであり、近赤外光を使用しているため他の画像診断法と比較して、高解像度の画像を得ることができ、放射線被曝などの生体に対する為害作用が無く安全である。1991 年に初めて生体への応用が報告されたのち 1998 年には歯周組織への応用も報告されている。歯肉縁下歯石やセメント質の検出も報告されているが、解像度の低い画像の報告しかみられない。OCT の原理自体は進化しているわけではないが、近年の解析の能力の進化によるモーションアーティファクトへの耐性や S/N 比の改善により、以前の装置と比べ鮮明な画像を得ることが可能になっている。

本研究の目的は、OCT の口腔内における歯肉縁下歯石およびセメント質検出の臨床応用の可能性を探ることである。

＜方法＞

本研究では、二種類の波長掃引型光干渉断層画像診断装置（IV-2000, サンテック社, 愛知県；Prototype 2, パナソニックヘルスケア, 愛媛県）を使用した。中心波長はIV-2000が1,310 nm、Prototype 2が1,330 nmである。どちらのシステムもレーザー発振器、カプラー、干渉計、ハンドプローブ、解析用PC、モニターから構成されている。出力はどちらもレーザーの安全基準クラスＩを満たす5 mW以下となっている。実験１、２ではIV-2000を、実験３では臨床機としてPrototype 2を使用した。画像解析ソフトはImageJ (ImageJ version 1.47V, NIH, Tethesda, MD, USA)を使用した。

実験1として、それぞれ３本の抜去歯を超音波スケーラー群および手用スケーラー群として用いた。術前に抜去歯を卓上の万力に固定し、縁下歯石の認められる歯根面に直上から歯冠歯根方向のOCT断層撮影を行った。その後一人の術者が、それぞれの除石機器を用いて歯石の除去を行った。同部位での術後のOCT撮影を行ない、ホルマリン固定、トルイジンブルー染色を行い、非脱灰切片を作製した。

実験2として、豚の下顎より歯肉片を採取し、厚さの異なる４つの豚歯肉シートを作成した。乾燥による変化を防ぐため、歯肉は湿潤状態を保持した。歯肉の厚さの計測ではデジタルキャリパーを使用した。卓上の万力に固定された歯石沈着の有る同一の抜去歯の根面を、厚さの異なる歯肉片で被覆した状態でそれぞれOCT撮影を行い、歯石を含む画像の変化を観察した。

実験3として、東京医科歯科大学歯学部付属病院歯周病科に通院中の患者のうち、プロービングにより歯周ポケット内の根面に粗造感が触知された5名の患者の同意を得て、歯肉縁下のデブライドメント前後にOCT撮影を行い、画像を比較分析した。歯石と思われる構造物の歯冠歯根方向の中央部で、歯肉側の歯石上面および根面側の歯石下面において歯肉表面からの深さを計測した。

次に、歯石の検出を容易にするために、OCT画像の加工処理を行った。画像解析ソフトを使用し、OCTのシグナル強度により画像の2階調化を行い、閾値は歯肉の構造が判別できる最低の値を画像ごとに決定した。さらに、歯石と思われる構造物の中央で、隣接するピクセルのみの範囲選択を行い、構造物のアウトラインを描出した。

なお、上記の研究は東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認（No.527, No777）を得て行

われた。

＜結果＞

抜去歯において根面上の歯肉縁下歯石は、無構造の灰白色を示す構造物として検出され、除石後に消失した。セメント質は、象牙質より暗色の薄層として検出された。デブライドメント後はどちらの群もセメントエナメル境付近を除きほとんどのセメント質が残存していたが、超音波スケーラーと比較し、手用スケーラーでデブライドメントをした根面の方がセメント質は薄くなり、象牙質が露出している部分が多くなる傾向にあった。

豚の歯肉で被覆した場合、歯肉の厚みが増すにつれ、歯石は不明瞭となった。0.50 ㎜の歯肉で被覆すると歯石はわずかに識別されたが、0.81 ㎜と1.40 ㎜の歯肉で被覆した際には歯石は検出不可能であった。

口腔内の露出した根面において、縁上歯石とセメント質はOCT画像において明瞭に描写された。５名の被検者においてプロービングで粗造感が触知された８箇所の前歯、小臼歯の頬側中央の歯周ポケット内の露出根面において、７箇所でOCTにより歯肉縁下歯石の検出が可能であった。歯肉縁下のセメント質は歯肉辺縁付近において検出できる場合があった。歯石は辺縁が不明瞭な灰白色の構造物として検出され、根面のデブライドメント後に構造物の消失が確認された。検出深さは、歯石上面までが0.80±0.20 ㎜、歯石の下面までが0.93±0.20 ㎜であった。OCT画像の2階調化によって歯石、セメント質はより容易に判別することが可能となった。

＜考察＞

OCT画像上では歯石、象牙質、エナメル質、セメント質の順で白く描写された。セメント質は白い２本のラインに囲まれた暗色の層として描写された。これは表面とセメント象牙境との２箇所で光の強い反射が起きているためと考えらえる。歯石は不透過性が高く、光の吸収が高いため、白色の無構造物として描写される。その不透過性から、歯石より深い部分の像は信号がなく、下部組織の判別ができないことも多かった。これまでにも歯石やセメント質の報告はあったが、本研究では、以前の報告より解像度の高い明瞭な画像を報告することができた。

*In vitro*の研究では0.81 ㎜以上の厚さの豚歯肉で被覆することにより歯石は判別できなくなったが、ヒトロ腔内における本研究では、平均して0.80㎜の厚さの歯肉内部に存在する歯石が判別できた。これは血液の循環していない豚歯肉と生体のヒト歯肉の光の透過性の違いと考えられる。

臨床において歯肉縁上歯石は明瞭に検出され、歯肉縁下歯石も辺縁は不明瞭ながら灰色の構造物として検出することができた。歯肉縁下のセメント質の検出は限られていたが、肉眼では識別困難な歯肉縁上のセメント質が、OCTで容易に検出可能であることがわかった。

歯石の検出に関しては様々な試みがなされてきたが、歯周プローブと比較し優位なものは未だ開発されていない。これまでに，歯科用内視鏡、Spectro-Optical法、レーザー自己蛍光法、超音波法などがあるが、以上の方法はOCTと違い、いずれも歯肉内部へのプローブの挿入

が必要であり、また、セメント質を判別することが可能なシステムは存在しない。

OCTシステムは非接触であり、非侵襲、高解像度、リアルタイムでの画像構築という利点を持っている。しかしながら、光を使用するシステムであるが故の限界もあり、現在のシステムにおいてハンドプローブの形状から、撮影は頬側の歯面に限られている。また歯肉における光の透過性に限界が存在するため、OCT画像の深さ方向の限界が存在する。一方で透過性の問題を解決する内視鏡型のOCTシステムも開発されている。

今回採用したSS-OCTシステムは画像構築時間がほぼリアルタイムで可能である。その特性を利用した、非外科処置時や外科処置時の露出根面などにおける縁下歯石やセメント質のリアルタイム観察も今後の研究課題である。

＜結論＞

歯肉縁下歯石およびセメント質は周囲組織と識別可能な画像を示し，口腔内においても、限られた条件下ではあるが歯石、セメント質の探知も可能であった。従って OCT は歯周組織の断層診断装置としてだけではなく、歯周病罹患根面のデブライドメントにおいて、チェアーサイドでの歯肉縁下歯石およびセメント質の補助的な検出装置としても有用である可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5503　号 | 坪川　正樹 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　倉林　亨<br>副査　三浦宏之　　新田　浩 | |
| 論 文 題 目 | *In vitro* and clinical evaluation of optical coherence tomography for the detection of subgingival calculus and root cementum | |

（論文審査の要旨）

光干渉断層画像診断法(OCT)は、医科で広く使用されている超音波断層診断装置と類似した装置であり、近赤外光を用いて、非侵襲的に断層画像を得ることのできるシステムである。超音波断層診断装置と比較し、高い解像度と、非接触であるという２点が大きく異なる。また、生体に対する為害作用が無く、リアルタイムに画像が構築されるため短時間での診断が可能である。現在医科においてもOCTの応用が研究されており、眼科領域ではすでにOCT検査機器が広く使用されている。歯科でも1998年から応用が開始されているが、主に歯冠部の脱灰やう蝕、破折の検出を対象として研究が進められてきた。歯周治療においても、OCTは歯周組織の新しい画像診断法として病態の把握や治療後の治癒の評価への応用などに期待が持たれているが、詳細な研究はほとんど行われていない。

歯周病の治療において、歯肉縁下歯石の検出は歯周プローブによる手指の感覚を頼りに行われてきたが、術者の経験や能力に左右されやすい。そこで、新しい、信頼性の高い、客観的な縁下歯石の検出法が望まれている。また、デブライドメント後の根面においては、セメント質の有無が歯周組織の治癒に良い影響があることが報告されているが、セメント質の有無を判断する方法は存在しない。

そこで申請者の坪川は、OCTを歯石およびセメント質の探知に応用することに着目し、*in vitro*、*in vivo*双方において光学的手法による歯石およびセメント質の評価分析法を確立することを目的とし、本研究を行った。すなわちまず*in vitro*における基礎的解析を行い、それを踏まえた上で臨床での評価を行なっており、OCTの特性を良く理解し、周到な計画の下に研究を行っていることは高く評価できる。

本研究では、二種類の波長掃引型OCT装置(IV-2000:サンテック社、Prototype 2:パナソニックヘルスケア)を使用している。実験では、まず*in vitro*において帯状に歯肉縁下歯石の付着した抜去歯を用いた。術前にOCT断層撮影を行った後、手用キュレットもしくは超音波スケーラーにて歯石の除去を行った後、再度OCT撮影を行い、比較分析した。次に、厚さの異なる豚の歯肉片にて被覆した歯石の付着した根面を撮影し、歯石の画像の変化を観測した。更に臨床症例において、患者の同意を得た上で、プロービングにより根面に粗造性の認められた歯周ポケットを対象として、スケーリング・ルートプレーニング前後にOCT撮影を行い、歯石および歯根面の画像を比較分析した。また歯石の検出を容易にするため、OCT画像の加工処理を行った。なお、本研究は本学歯学部倫理審査委員会の承認を得て実施された（承認番号

No.527, No.777))。

本研究の主たる結果は、以下の通りであった。

・抜去歯を用いたOCT画像において、エナメル質、象牙質などの基本的な解剖学的形態が高解像度で明瞭に描写された。*in vitro*において，根面上の歯肉縁下歯石は、一様に強い灰白色を示す構造物として検出され、歯石除去後に消失し、また、デブライドメント面の残存セメント質の有無も、組織標本と対照した結果、OCTにより検出可能であることを示した。

・*in vitro*において豚の歯肉で被覆した場合、歯肉の厚さが増加するに従い、歯石の像は不明瞭となった。厚さ0.50mmの歯肉で被覆したときには、歯石は識別可能であったが、0.81mm以上の場合の歯肉で被覆した際には歯石は検出不可能であり、検出深さに限界があることを示した。

・口腔内において、露出した根面上の歯石とセメント質の明瞭なOCT画像を初めて報告した。

・根面に粗造感が触知された５名の被検者の８箇所の前歯、小臼歯の頬側歯頸部中央において、７箇所でOCTにより歯石の検出が可能であった。歯肉縁下歯石は辺縁が不明瞭な灰白色の構造物として検出され、スケーリング・ルートプレーニングにより消失した。

・検出深さは、歯石表面までが平均で0.80mmであり、生体内においては、より深くまで描写されることを示した。

・歯肉縁下のセメント質の検出は限られていたが、肉眼では識別困難な縁上のセメント質は、OCTで容易に検出可能であることがわかった。

・OCT画像の2階調化によって歯石、セメント質はより容易に判別することが可能となった。

本研究において、坪川は、OCTにより、歯肉縁下歯石が周囲組織と識別可能な画像として描出されることを明らかにすると共に，生体内における歯周組織の高精細な光学的断層像を初めて示した。更に限られた条件下ではあるが、歯周病罹患根面のデブライドメントに際して、OCTがチェアーサイドでの歯肉縁下歯石およびセメント質の検出のために利用できることを初めて明らかにした。

本論文は歯周治療におけるOCTの臨床的有用性を詳細に検討した初めての論文であり、歯周治療学だけでなく歯科医学全体の発展に大いに貢献するものと考えられる。

よって本論文は、博士(歯学)の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 柿﨑　翔 |
| 論文審査担当者 | 主査　倉林　亨<br>副査　荒川　真一　　樺沢　勇司 |
| 論　文　題　目 | Observation and determination of periodontal tissue profile using optical coherence tomography |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

歯周治療において診断は治療を開始する上で重要である。本研究の目的は、光干渉断層撮影法（OCT）のヒト歯周組織における断層像観察及び組織計測における有用性を評価することである。

実験 1 では波長 1,330 nm におけるヒト歯肉の屈折率を OCT 画像から算出した。実験 2 では健康な歯周組織を有する 30 名のボランティアの下顎前歯唇側中央部に対して OCT 撮影を行った。また、歯肉溝深さを測定するために、歯周プローブを歯肉溝に挿入した状態で口腔内写真を撮影し、その深さを画像上で計測した。OCT 画像上で歯肉、さらには、上皮、結合組織の厚さを測定し、また、OCT 画像上で歯槽骨頂の位置を決定することによって生物学的幅径の値を算出した。

結果として、ヒト歯肉の屈折率は 1.397 であった。歯肉、上皮の最大厚さの平均は、それぞれ 1.06±0.21 mm、0.49±0.15 mm であり、生物学的幅径の平均値は 2.09±0.60 mm であった。OCT は非侵襲的に歯周組織の断層像を詳細に観察することができ、その歯周組織内部の各構造物の厚さや生物学的幅径の計測にも利用できることが示唆された。

＜緒言＞

光干渉断層撮影法（OCT）は生体組織の断層像を描出することが可能で、診断において有用である。眼科領域では、眼底の観察に対して一般的に用いられており、歯科領域においても様々な領域で診断に利用できる可能性が示唆されている。

本研究の目的は、OCT を用いて非侵襲的に歯周組織の断層像を詳細に観察し、形態学的に歯肉の内部構造（上皮、結合組織、歯槽骨）の厚さなどを計測すると共に生物学的幅径を計測することである。

＜方法＞

本研究では、歯科用波長掃引型光干渉断層撮影装置(Prototype 2, Panasonic Health Care, Ehime, Japan)を用いた。この装置は中心波長が 1,330 nm のレーザー光源を用いており、走査速度は 30 kHz で掃引幅は 100 nm である。垂直方向分解能は大気中で 12 μm、組織中では 8 μm であり、水平方向分解能は 20 μm である。

実験１．屈折率の測定

OCT 画像において深さ方向の距離を計測するためには対象とする組織の屈折率による補正が必要となる。光が組織中を通過する長さは「光学的距離（OPL）」とよばれ、組織の厚さは光学的距離を屈折率で割った値となる。そこで、まず、Hariri らの報告にある Optical path length （OPL）マッチング法を用いて、蒸留水、ブタ歯肉および、ヒト歯肉の屈折率を算定した。ヒト歯肉における実験では、東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来に来院しており、歯周外科を予定している患者 5 名を対象としてインフォームドコンセントを得た後に、歯肉切除手術後に不要となった辺縁歯肉を入手しトリミングして用いた。それぞれの試料は自由に移動可能な台の上に設置した金属プレートの上に設置し、2D-OCT 画像を撮影後、台を一定方向に一定間隔で移動し各試料について 6 回撮影を行った。すべての OCT 画像は画像解析ソフト上で解析を行い、OPL と実測値を測定した。屈折率は光学的距離を実測値で割ることによって算出した。上記の実験は、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行われた(No.1194)。

実験２．健全歯周組織の OCT 撮影

東京医科歯科大学大学院歯周病学分野に在籍する歯科医師 30 名を対象とし、実験参加前に説明を行い、同意を得た。被験者は全てアジア人で、男性 18 名、女性 12 名、平均年齢は 27.3±2.2 歳で年齢の範囲は 24 歳から 33 歳であった。 全ての被験者は全身的に健康であり、対象歯に歯周疾患がなく、歯冠部の治療は認められなかった。まず、頬側中央部の 2D-OCT、3D-OCT 撮影を行い、その後、頬側中央部の歯肉溝に歯周プローブを挿入し、その状態の口腔内写真を撮影し、画像上で測定を行った。撮影した OCT 画像から歯肉、上皮、結合組織、歯槽骨頂の位置を同定し最終的に生物学的幅径を算出した。上記の実験は、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行われた(No.578)。

統計学的解析には 1-way または 2-way ANOVA を用いて、Bonferroni post hoc test にて検定を行った。

＜結果＞

蒸留水の 1,330 nm における屈折率は 1.335（1.335±0.005, n = 6)で、ブタ歯肉における屈折率は、1.393（1.393±0.010, n = 18)と算出され、過去に報告されたデータと近似していることから、今回行った測定の精度の高さが証明された。ヒト歯肉における屈折率は 5 名の被験者から 1.397（1.397±0.008, n = 30)と算出された。

30 名の被験者から合計 177 歯について検査を行った。5 名の被験者は過去に矯正治療を受けた既往があった。全ての被験者の歯周組織は健康であり、177 歯全てにおいて歯肉溝深さは 2 mm 以下であった。プロービング時出血（BOP）は 6 歯において観察された。

OCT 画像上では典型的な歯および歯周組織の構造（エナメル質、象牙質、歯根面、上皮、結合組織、歯槽骨）を観察することができた。いくつかの症例では、歯肉溝上皮、接合上皮を観察することができた。血管は結合組織内にシグナル強度の低い楕円形の構造物として明瞭に描出された。歯肉表面の構造としてスティップリング、また歯根吸収も明瞭に描出された。典型的な歯周組織の構造物（上皮、結合組織、歯槽骨）は 3D-OCT においても同様に観察された。

歯肉の厚さは、歯肉の表層から歯根面までの距離とし、歯肉縁から 0.5 mm、1.0 mm の部位と厚さが最大となる部位の 3 ヶ所で計測した。それぞれの測定値は、実験１で求めたヒト歯肉におけ

る屈折率1.397を用いて補正を行った。歯肉縁から0.5㎜、1.0㎜の部位における歯肉の厚さの平均はそれぞれ0.70±0.14 ㎜（n = 177)、0.89±0.18 ㎜（n = 176)であり、最大歯肉を示す部位では1.06±0.21 ㎜（n = 176)であった。歯種による厚さの差は認められなかったが、3つの計測部位それぞれにおいて厚さに有意な差を認めた。(P ＜ 0.001)

辺縁歯肉において上皮の構造は明瞭に描出された。歯肉縁から結合組織の最も高い位置までの距離を測定し、上皮の厚さとした。177歯中83歯(全体の49%)について測定を行った結果、その平均は0.55±0.25 ㎜（n = 83)であった。上皮の厚さは、歯槽骨頂よりも上部で結合組織性の付着を有する範囲で最大を示し、水平的な上皮の厚さの最大値の平均は 0.49±0.15 ㎜（n = 177)であった。男性は女性と比較して有意に上皮の最大厚さが厚い傾向にあった（P ＜ 0.001)。歯肉の厚さが最大を示す部位における結合組織の厚さは0.39 ± 0.10㎜（n = 176)であった。

歯槽骨は全177 歯中 161 歯(91%)において観察することができた。歯槽粘膜の厚さは161 歯中159歯において歯槽骨頂から約1㎜下方の部位において、0.30±0.10 ㎜（n = 159)であった。歯槽粘膜における上皮の厚さは 0.13±0.05 ㎜（n = 159)であり、辺縁歯肉における上皮の厚さと比較して顕著に低い値となった。歯槽粘膜における結合組織の厚さは 0.17±0.06 ㎜（n = 159)であった。

歯周プローブを歯肉溝に挿入した状態で撮影した画像は、画像解析ソフト上で歯肉溝深さを計測した。歯肉溝深さの平均は1.13 ± 0.29 ㎜（n = 177) であった。男性の歯肉溝深さの平均は1.18±0.28 ㎜（n = 106)で、女性の平均は 1.05±0.28 ㎜（n = 71)であり、男性は女性と比較して有意に深い歯肉溝深さを示した(P ＜ 0.05)。

歯肉縁から歯槽骨頂部までの距離の全体の平均は全177歯中161歯(91%)において、3.20±0.63㎜（n = 161)であった。男女、歯種による平均値の差は認められなかった。さらに、この長さからそれぞれの歯肉溝深さを差し引くことにより、最終的に生物学的幅径の値は2.09±0.60 ㎜（n = 161)と算出された。男女、歯種、矯正治療の既往による差は認められなかった。

＜考察＞

OCT 機器は近年使用されている画像診断技術と比較して、より精密な断層画像を描出することができる。本研究で用いたOCT機器は空気中での分解能が12 μmであり、CBCT、超音波装置と比較して高い値を示している。この高い分解能のおかげで、歯肉内の上皮と結合組織の違いを明確に区分することができ、歯槽骨の観察も可能となっている。

本研究ではOPLマッチング法を用いて1,330㎚におけるヒト歯肉の屈折率を算定し、形態計測分析においてOCT画像における光学的距離をこの値で割ることによって実際の組織の厚さを算出した。

歯周治療を行う上で、歯周組織の各構造物を正確に観察することは重要である。SS-OCTを用いることによって歯肉内部の構造を非侵襲的に直接確認することができ、口腔上皮、結合組織、歯槽骨の形態を観察できるだけでなく、場合によって接合上皮、血管その他の構造物も観察することができた。

本研究では、唇側の歯肉、上皮の厚さを計測した。歯肉の厚さは歯周組織の維持に影響を与えることが知られており、薄い歯肉では歯肉退縮を起しやすいことが報告されている。過去に、歯

肉の厚さを測定した報告はいくつかあり、Müller らは 1997 年に、下顎前歯頬側中央部の歯肉溝底部での歯肉の厚さを超音波装置を用いて測定しているが、本研究では、歯肉溝底部に近い歯肉縁から 1.0 mm の部位(本研究における平均歯肉溝深さは 1.13±0.29 mm)での歯肉の厚さがこれらの研究結果と近似した値を示した。

生物学的幅径の概念は Gargiulo らによって 1961 年に提唱され、Ingber らによって 1977 年にはじめて「生物学的幅径」という言葉が使用された。生物学的幅径は歯肉溝底部から歯槽骨頂までの距離を示しており、歯槽骨より上方で結合組織性の付着と上皮性の付着から構成されている。生物学的幅径を測定した報告として、Gargiulo ら、Vacek ら、Xie らは組織切片を作製し計測を行い、その値は 2.04 mm、1.91 mm、2.17 mm であった。本研究では、初めて臨床検査結果と光学的手法を合わせることによって生物学的幅径を算出し、過去の報告と近似した 2.09±0.60 mm の値が得られた。

OCT は歯周組織の観察だけでなく、形態計測分析にも利用でき、臨床的に歯肉溝深さを計測することによって生物学的幅径の算出にも利用可能であることが示唆された。また、ほとんどの症例において下顎前歯唇側の歯周組織内部の構造を観察することができた。口腔内に対して一般診療で用いるためには、さらに深部の画像を観察できるように機器を改良する必要性がある。

＜結論＞

OCT を用いることによって非侵襲的に歯周組織内部構造を詳細に観察および分析することが可能であった。OCT 機器は、歯周組織診断に対して有効であるだけでなく、歯周組織の形態計測分析、生物学的幅径の計測に利用することが可能であった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5504　号 | 柿﨑　翔 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　倉林　亨<br>副　査　荒川　真一　　樺沢　勇司 | |
| 論 文 題 目 | Observation and determination of periodontal tissue profile using optical coherence tomography | |

（論文審査の要旨）

光干渉断層撮影法（Optical Coherence Tomography：OCT）は近赤外光を用いた診断技術であり、非侵襲的に生体組織内部を観察することができる画像診断法である。現在、眼科領域では一般的に用いられており、歯科領域に関してもその応用の可能性が示唆されている。歯周治療において、歯周組織の詳細な情報を得ることは重要であり、非侵襲的に観察および分析する方法の開発が望まれている。しかし OCT を用いて歯周組織の内部構造を詳細に観察、分析した報告はみられない。そこで柿﨑は、歯科用 SS-OCT 機器を用いて歯周組織の観察及び計測を行った。

本研究では、まずヒト歯肉における屈折率を算出するために、予備的に蒸留水、豚辺縁歯肉を Optical path length matching method を用いて算出した。その後に歯周外科時に採取したヒト歯肉を用いて同様に屈折率を算出した（歯学部倫理審査委員会承認番号 No.1194）。また、健常歯肉の観察及び分析を行うため、歯周病学分野医局員のアジア人 30 名を対象として、下顎前歯唇側中央部の 2D-OCT、3D-OCT 撮影を行い、口腔内写真撮影を行った後、歯肉溝深さを画像上で計測するために歯周プローブを歯肉溝内に挿入した状態で再度写真撮影を行った（歯学部倫理審査委員会承認番号 No.578）。

本研究において、柿﨑は OCT 機器の特徴、歯周組織の解剖学的形態を十分理解したうえで、適切な実験計画の下で周到に本実験を遂行した。さらに、OCT システムを深く理解し、その撮像に熟練し、とくに、生物学的幅径の測定への応用に着目して詳細な観察および計測を行ったことは高く評価できる。

本研究の主たる結果は以下の通りであった。

1．　1,330 nm における蒸留水および豚歯肉の屈折率は、1.335、1.393 と算出された。過去に報告されたデータと非常に近似していることから今回の測定法の高い精度が確認された。その結果、ヒト歯肉の屈折率は 1.397 と測定算出された。

2．　撮影した 2D-OCT、3D-OCT 画像の観察から、OCT 画像上で歯牙（エナメル質、象牙質）、歯肉（上皮、結合組織）、歯槽骨を観察することができた。また、その他の特徴的な構造物として、血管、スティップリング、歯根吸収を観察することができた。

3．　OCT 画像上で組織形態計測を行うことができ、歯肉、上皮、結合組織、歯槽粘膜の厚さを詳細に測定することができた。また、歯槽骨が観察できる画像については、歯肉縁から歯槽

骨頂部までの距離を測定することができた。

４．　OCT 画像上で測定した歯肉縁から歯槽骨頂までの距離から画像上で測定した歯肉溝深さを減ずることによって、生物学的幅径を計測することが可能となり、その値は 2.09 ± 0.60 ㎜であった。

以上の結果より、OCT を用いて非侵襲的に歯周組織内部構造を詳細に観察および計測することが可能であることが明らかとなった。更にプロービング値と合わせることによって OCT を生物学的幅径の算出にも利用できることが初めて示された。

本研究において、柿﨑は、近年医学および歯学の分野において応用が進んでいる OCT を歯周組織に対しても応用し、各構造物の詳細な計測値を報告した。OCT 画像上で分析を行った計測値は、過去の他の診断機器や、分析方法で得られた数値と近似していたことから、本研究が適切な実験手法によって行われたことが確認できた。また、光学的な手法と臨床検査結果を合わせて生物学的幅径を測定した報告は過去になく、臨床的に、生体組織に対して非侵襲的に生物学的幅径を測定できることを報告した点は非常に興味深い。

本研究は、今後歯科用 OCT を歯周治療の臨床に応用する上で有用なエビデンスを提供するものであり、歯周治療学のみならず歯科医学全体の発展に大いに寄与するものと考えられた。

よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行うにあたり、十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | SAID Mohamed Moustafa Mohamed Ali |
| 論文審査担当者 | 主 査　原田 浩之<br>副 査　樺沢 勇司、笛木 賢治 |
| 論　文　題　目 | Masticatory Function and Oral Health-related Quality of Life in Partial Maxillectomy Patients |

**Masticatory function and oral health-related quality of life in patients after partial maxillectomies with closed or open defects**

**Introduction**

Maxillofacial prosthetics is subspecialty of prosthodontics that involves prosthetic treatment of patients with defects in oral and/or maxillofacial regions. Patients with acquired maxillary defects can be restored to normal function and appearances by use of intraoral prostheses. The prosthetic rehabilitation of the maxillectomy defect is important to restore oral functions and facial contours as well as to improve patients' oral health-related quality of life (OHRQoL). Since the surgical defect size and configuration can vary widely and greatly affect the masticatory function and OHRQoL, the present research focused only on patients who had undergone partial maxillectomy. The aim of this project was to evaluate masticatory function and OHRQoL in partial maxillectomy patients after prosthetic rehabilitation with intraoral obturator.

The healing pattern after the surgical resection of tumors of the oral cavity involving the maxilla may vary from one patient to another. The result may be open communication between the oral and nasal cavities (open defect) or complete oronasal separation after healing of the defect area (closed defect). Open communication between the oral and nasal cavities may occur, accompanied by hypernasal speech, low speech intelligibility, nasal regurgitation of food and liquids, inability to masticate, and facial disfigurement. Consequently, social behavior and quality of life will be adversely affected. Different methods have been used to assess patients' masticatory function.

Objective assessments include using gummy jelly or color-changeable chewing gum, while subjective assessment involves patient- perceived chewing ability using a food intake questionnaire. OHRQoL has been assessed using patient-based outcome measures such as the Oral Health Impact Profile (OHIP) and the Geriatric Oral Health Assessment Index (GOHAI). A strong correlation is reported between GOHAI and OHIP, although GOHAI is considered more convenient for detecting oral function impairment and evaluating dental care needs in elderly individuals. A significant association was seen between the chewing ability index and OHRQoL in the general population. Perceived chewing ability was closely associated with OHRQoL in partially dentate patients, and was also reported to be a critical factor in the assessment of OHRQoL in patients with removable partial dentures. A similar correlation between OHRQoL and maxillectomy patients remains undetermined.

The current project was designed to answer two research questions. The first research question aimed to compare masticatory function and OHRQoL between patients with closed and open defects who had

undergone a partial maxillectomy and were wearing dentomaxillary prostheses.

**Materials and Methods**

Thirty-eight participants who had undergone a partial maxillectomy and who were wearing dentomaxillary prostheses were enrolled between September 2014 and April 2016. The participants were allocated to 2 groups according to the type of defect after healing: 19 consecutive participants had a closed defect and 19 consecutive participants had an open defect. Masticatory function was evaluated objectively and subjectively. The objective measure was food-mixing ability, which was assessed using color-changeable chewing gum. The subjective measure was perceived mastication ability, rated as a masticatory score based on the patient's responses to a 35-item food intake questionnaire. OHRQoL was assessed using the GOHAI questionnaire. The GOHAI questionnaire comprised 12 items reflecting 3 hypothesized domains of the impact of oral disease: physical function, psychosocial function, and pain or discomfort. Differences in the scores obtained by the 3 measures were compared between the 2 groups using the Wilcoxon rank-sum test ($\alpha$=.05).

**Results**

No significant differences were seen between the 2 groups in objective mixing ability, subjective masticatory score, or GOHAI ($p>.05$). Regarding the GOHAI physical function domain, only the swallowing item was significantly lower ($p=.025$) in participants with an open defect than in participants with a closed defect. Regarding the GOHAI psychological function domain, the item on patients' psychological worries or concerns about their teeth, gingival tissue, or dentures was significantly lower ($p=.045$) in patients with an open defect than in those with a closed defect. Other items related to physical function, psychological function, and pain or discomfort were not significantly different ($p>.05$) between the 2 groups.

**Conclusions**

The type of defect, closed or open, in patients who had undergone a partial maxillectomy might not influence their masticatory function and overall OHRQoL if they have adequate prosthetic rehabilitation. However, special consideration should be given to patients with an open defect with regard to swallowing function and psychological concerns in order to improve their OHRQoL. Prosthetic rehabilitation of patients with partial maxillectomies and an open defect could enhance the restoration of their masticatory function and general OHRQoL to a level comparable with that of patients with a closed defect. Further analysis of the swallowing function and psychological assurance of patients with an open defect about their oral condition may help improve OHRQoL.

**Association between masticatory function and oral health-related quality of life in partial maxillectomy patients**

The second research question investigated associations between objectively and subjectively measured masticatory function and OHRQoL in partial maxillectomy patients wearing dentomaxillary prostheses.

**Materials and Methods**

A convenience group of 32 consecutively treated patients who had undergone a partial maxillectomy were enrolled. Masticatory function was assessed using two objective and one subjective measures. The objective measures were masticatory performance(MP), which was estimated by measuring the glucose extracted from gummy jelly; and food mixing ability (a*), which was assessed using color-changeable chewing gum. The subjective measure was perceived chewing ability, rated as masticatory score (MS) based on the patient's responses to a food intake questionnaire. OHRQoL was assessed using GOHAI questionnaire. Relationships between the masticatory function measures and OHRQoL were analyzed using Spearman's rank correlation coefficient.

**Results**

The correlation coefficients (r) obtained were 0.57 (p = .001) for MS and GOHAI, 0.247 (p = .173) for MP and GOHAI, -0.173 (p= .343) for a* and GOHAI, 0.517 (p = .002) for MP and a*, 0.199 (p= .257) for MP and MS, and 0.019 (p = .919) for a* and MS.

**Conclusions**

Of the three masticatory function measures used in this study, only the subjective measure of MS showed a significant positive correlation with GOHAI score. Therefore, perceived chewing ability may be an important factor for assessing OHRQoL in partial maxillectomy patients wearing dentomaxillary prostheses.

和文要約

【題名】上顎骨切除後口腔鼻腔瘻の有無別による咀嚼機能と口腔関連の生活の質について

【緒言】顎顔面補綴学とは、顎顔面領域に生じた欠損に対し、補綴的手法を用いて患者の生活の質（Quality of Life、QOL）を回復し、口腔機能回復を図る学問である。本研究計画の目的は、上顎骨切除後に顎義歯を装着し、咀嚼機能回復や口腔関連QOLについて評価することである。本研究では、上顎骨切除後に顎義歯を装着している患者のうち、鼻腔に交通のある患者群と交通のない患者群において、咀嚼機能および口腔関連QOLをそれぞれ比較検討した。

【方法】2014年9月から2016年4月までに顎義歯外来を受診し、選定基準を満たした顎義歯を装着している38人の上顎骨切除患者を被験者とし、鼻腔との交通を認める19名と鼻腔との交通を認めない19名の2群に分けた。咀嚼機能評価として、色変わりガムを用いた客観的な咀嚼混合能力テスト、35食品摂取アンケートを用いた主観的評価を行った。口腔関連QOL評価として、口腔に関連した包括的な健康関連QOLを測定する尺度（Geriatric Oral Health Assessment Index、GOHAI）を用いた。主観的咀嚼機能評価、客観的咀嚼機能評価、口腔関連QOLについて、Wilcoxonの順位和検定を行い、2群間比較を行った。

【結果】主観的咀嚼機能評価、客観的咀嚼機能評価、口腔関連QOLのいずれにも統計学的有意差を認めなかったものの、GOHAIの嚥下および心配に関する項目ついて有意差を認めた。

【結論】適切な顎顔面補綴治療が行われていれば、顎欠損部における鼻腔への交通の有無は、咀嚼機能や口腔関連QOLに影響しないことが示唆された。今後、嚥下機能や心理的な評価についてさら

に分析を行うことで、鼻腔への交通を認める患者の口腔関連QOLの改善につながると考えられた。

【題名】上顎骨切除患者における咀嚼機能と口腔関連の生活の質の関係について
【緒言】上顎骨切除後に顎義歯を装着している患者で、主観的咀嚼機能評価、客観的咀嚼機能評価、口腔関連QOLの関連性について検討を行った。
【方法】選定基準を満たした顎義歯を装着している32名の上顎骨切除後の患者を被験者とした。客観的咀嚼機能評価として、グミ咀嚼を用いた咀嚼能力検査（Masticatory Performance、MP）と色変かりガムを用いた咀嚼混合能力検査（a*）を用いた。主観的咀嚼機能評価として摂取食品アンケート（Masticatory Score、MS）を用いた。口腔関連QOL評価として、GOHAIを用いた。各評価項目についてSpearmanの相関係数を用いた。
【結果】MSとGOHAIの相関係数は0.57 (p = .001)、MPとGOHAIの相関係数は0.247 (p = .173)、a*とGOHAIの相関係数は-0.173 (p= .343)、MPとa*の相関係数は0.517 (p = .002)、MPとMSの相関係数は0.199 (p = .257)、a*とMSの相関係数は0.019 (p = .919) であった。
【結論】主観的咀嚼機能評価と口腔関連QOLについて相関関係を認めたことから、主観的咀嚼機能評価は、上顎骨切除後の顎義歯装着患者の口腔関連QOLに影響する重要な因子であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5505　号 | SAID Mohamed Moustafa Mohamed Ali |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　原田 浩之<br>副 査　樺沢 勇司、笛木 賢治 | |
| 論 文 題 目 | Masticatory Function and Oral Health-related Quality of Life in Partial Maxillectomy Patients | |

（論文審査の要旨）

SAID Mohamed Moustafa Mohamed Ali 論文は顎顔面補綴治療、特に上顎骨切除後に生じる顎欠損を有する患者を対象に、顎義歯による補綴治療後の咀嚼機能や口腔関連の生活の質（Quality of Life、QOL）について検討したものである。これまでに行われてきた顎顔面補綴治療後の機能評価や口腔関連 QOL に関する研究を総括し、今後発展すべき事項に着目している点は高く評価できる。本研究で用いられた評価手法、アンケートを用いた主観的咀嚼機能評価、グミやガムを用いた客観的機能評価、アンケートを用いた口腔関連の生活の質（口腔関連 QOL）に関する評価、上顎骨切除後の患者の顎顔面補綴治療に影響する因子についての概要は以下の通りである。

第一の研究では、‘Masticatory function and oral health-related quality of life in patients after partial maxillectomies with closed or open defects’と題し、上顎骨切除後の患者 38 名を対象とし、切除部分が鼻腔と交通している患者群（19 名）と交通していない患者群（19 名）に分け、咀嚼機能評価および口腔関連 QOL について、Wilcoxon の順位和検定を用いて統計学的に検討を行った。その結果，主観的咀嚼機能、客観的咀嚼機能、口腔関連 QOL のいずれにも 2 群間に統計学的有意差を認めなかった。このことから、適切な顎補綴治療が行われれば、切除部分の鼻腔への交通の有無は、咀嚼機能および口腔関連 QOL に影響がないことが明らかになり、上顎骨切除後の適切な顎補綴治療の重要性が示唆された。さらに，口腔関連 QOL の各質問項目を検討したところ、’嚥下’と’心配’に関する項目ついて 2 群間に統計的有意差が認められた。このことから，上顎骨切除後に鼻腔と交通した患者における、補綴治療による嚥下機能の回復の難易度の高さと心理的ケアの必要性が示唆された。

第二の研究では、‘Association between masticatory function and oral health-related quality of life in partial maxillectomy patients’と題し、上顎骨切除後に顎義歯を装着している患者 32 名を被験者とし、主観的咀嚼機能、客観的咀嚼機能、口腔関連 QOL との関連性について検討を行った。その結果、主観的咀嚼機能と口腔関連 QOL について統計的に有意な相関関係を認めた。この結果から上顎骨切除後に顎義歯を装着している患者の場合、摂取可能な食品を増やすことで口腔関連 QOL が向上する可能性が示唆された。

以上の 2 つの研究において、SAID Mohamed Moustafa Mohamed Ali は、上顎骨切除後の顎顔面補綴治療における主観的咀嚼機能評価、客観的咀嚼機能評価、口腔関連 QOL に関する評価を用い、総合的かつ体系的に考察した点が高く評価される。今後は、症例数を増やし、より大

きな欠損を伴う上顎腫瘍切除後の顎義歯による口腔機能の回復について評価を行ない、さらに口腔関連 QOL に影響する因子を検討することが期待される。本研究で示された知見は、今後の口腔外科学、頭頸部外科学ならびに顎顔面補綴学、ひいては歯科医学の進歩・発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行なうにあたって十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 松浦　千尋 |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　興地　隆史　　倉林　亨 |
| 論　文　題　目 | 3D diagnosis of dentin caries beneath composite restorations using swept-source optical coherence tomography |

＜緒言＞

光重合型コンポジットレジンは優れた審美性と歯質接着性を備え、歯質切削量の少ない最小限の侵襲の治療を実現する材料として臨床に広く使用されている。しかしながらコンポジットレジンは重合収縮により修復物辺縁部にギャップを形成することがあり、接着界面の崩壊に伴い細菌の侵入と齲蝕の発症を起こすことがある。臨床現場で修復物の再治療の必要性を判断するためには、修復物下の齲蝕の診断が極めて重要である。X 線写真は齲蝕を検出する最も一般的な方法であるが、早期病変を検出する感度が低く、病変の大きさを過小評価する傾向にある。再発性齲蝕の X 線写真での検出精度は研究によって大きく異なり、X 線写真のみを用いた場合、病変のほぼ半分を検出できなかったとの報告がある。特に修復物下の齲蝕の検出は困難であり、齲蝕を確実に検出できる画像技術の開発が望まれている。

光干渉断層計（Optical Coherence Tomography：OCT）は生体ならびに材料の内部構造の断層撮影が可能な新しい診断方法である。近年 OCT はフーリエ変換（FD）技術の応用により従来の OCT から感度を著しく向上させ、特に波長走査型（Swept-source）OCT は時間符号化された近赤外波長の超高速走査により三次元の画像情報を記録することができる。また小型 OCT プローブを用いることにより、臨床にて口腔内の画像を撮影することもできる。SS-OCT 技術は画像撮影速度と分解能の改善により、齲蝕の診断において高い感度と特異度を得られることが報告されている。

本研究はコンポジットレジン修復物下の象牙質齲蝕の検出を SS-OCT を用いて試みるとともに、その診断精度を X 線写真の結果と比較することを目的として行った。

＜材料および方法＞

40 本のヒト抜去大臼歯を用意し、うち 20 本は健全歯、他の 20 本は ICDAS II（International Caries Detection and Assessment System II）コード 5 の深さの象牙質齲蝕を有する歯とした。抜去歯の使用に関しては、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を受けている（承認番号 725）。まず歯冠部を#600 耐水研磨紙で研削し、平坦な健全象牙質面または齲蝕象牙質面を調製し、それぞれ 10 本ずつの 2 グループに振り分けた。平坦に調製した象牙質面に 2 ステップセルフエッチングシステム（Clearfil SE Bond、Kuraray Noritake Dental）を業者指示通りに塗布し、厚さ 1 mm または 2 mm のコンポジットレジン（Estelite Σ Quick、Tokuyama Dental）を築盛、出力 600 mW/cm$^2$のハロゲン光照射器（Optilux 501、Kerr）にて 40 秒間光照射して重合した。

<u>デンタル X 線診査</u>

象牙質に厚さ 1 mm または 2 mm のコンポジットレジンを築盛した後、齲蝕象牙質と健全象牙質の接着界面の頬側からデジタルデンタル X 線撮影装置（Dentnavi Hands、Yoshida Dental）の画像を撮影した。撮影条件は焦点フィルム距離 10 cm、試料フィルム距離約 0 cm、管電圧 70 kV、管電流 4 mA、露光時間 0.10 秒とした。

SS-OCT 診査

本実験にて使用した SS-OCT（Yoshida Dental）の光源中心波長は 1310 nm、波長走査幅は 1240 nm から 1380 nm、掃引速度は 50 kHz であり、空気中分解能は深さ方向 11 μm 以下、横方向ならびに軸方向 40 μm 以下である。口腔内用プローブを用いてコンポジットレジン修復物の表面から SS-OCT 画像のスキャンを行い、コンポジットレジンと象牙質の接着界面の 3D 画像を構築した。

評価

齲蝕の評価に参加しない研究者（CM）が 3D SS-OCT 構築画像から 2D 断面画像を抽出し、評価は信頼度 95%とするために 17 名（齲蝕学の臨床経験 5～10 年 7 名、11～20 年 4 名、21 年以上 6 名）の歯科医師が行った。コンポジットレジン修復物から得られたデンタル X 線写真、SS-OCT 画像から齲蝕の有無を評価した。

評価の一年後、同じデンタル X 線写真、SS-OCT 画像を用いて齲蝕の再評価を行った。再評価は評価者の中の 9 名が行った。

統計処理

SPSS for Windows version 23 software（IBM）を用いて統計処理を行った。デンタル X 線写真ならびに SS-OCT 画像におけるコンポジットレジン修復物下の齲蝕検出の感度、特異度、偽陽性、陰性的中率を評価者毎に計測し、感度、特異度から受信者動作特性曲線（ROC）分析を行い、ROC 曲線下面積（Az 値）を算出した。それぞれの計測結果について Mann-Whitney U 検定と Kruskal-Wallis 検定（$\alpha$=0.05）を行った。また評価者間の一致率、評価者内の一致率について unweighted kappa 係数を算出し、Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Wallis 検定（$\alpha$=0.05）を行った。

＜結果＞

SS-OCT 画像ではコンポジットレジンは入射光を散乱するため OCT 画像上では白く表示され、象牙質は暗くみえることから、厚さ 2 mm のコンポジットレジンでも象牙質との界面を識別することができた。修復物下の象牙質齲蝕は輝度が上昇し、健全象牙質とは異なっていた。

SS-OCT はデンタル X 線写真よりも有意に高い感度、特異度、Az 値、陰性的中率を示した。SS-OCT の偽陽性はデンタル X 線写真と比べ有意に低かった。しかしながらコンポジットレジンの厚さが 2 mm の結果は 1 mm よりも値が低くなった。評価者間ならびに評価者内の一致率についても SS-OCT はデンタル X 線写真よりも有意に高い結果となった。

＜考察＞

3D SS-OCT から得られた画像では、コンポジットレジンと象牙質は光学的特性の違いによりコンポジットレジンは白く、健全象牙質は暗く表示されていた。また、コンポジットレジン修復物下に存在する象牙質齲蝕は非侵襲的に明るい領域として表示され、健全部と区別することができた。屈折率の異なる媒体の界面では光が反射することが知られている。象牙質の屈折率は象牙細管の方向によりわずかに異なることから、本実験では接着面に対して象牙細管がほぼ垂直に走行

する象牙質面を使用した。SS-OCT の画像深度は一般に 2〜3 mm であるが、コンポジットレジンの高い光透過性によってコンポジットレジン下層の象牙質を鮮明に表示することができた。また象牙質齲蝕では脱灰による微小な空隙とミネラル結晶との界面において光が散乱し、OCT 画像上では明るさが増加する。

厚さ 1 mm のコンポジットレジン修復物における SS-OCT の感度は 0.91 であったが、厚さ 2 mm では 0.82 に低下した。コンポジットレジンの光透過率はコンポジットレジンマトリックスの組成やフィラー組成と含量、顔料やその他の添加物を含む多くの因子によって異なり、またコンポジットレジンの厚さが増加すると指数関数的に減少する。したがって厚さ 2 mm における感度の低下は修復物によるシグナルの減衰による影響ということができる。コンポジットレジン修復物下の齲蝕を診査する場合、SS-OCT では光透過性が高い修復材料において良好な結果が得られることから、コンポジットレジンの影響について更なる研究が必要と思われる。

デンタル X 線写真ではミネラルの損失部位や欠損部における X 線の吸収が少ないことから、検出器ならびにイメージレセプタに高い線量の X 線が到達し、暗い領域として表示された。現代の歯科医学におけるデンタル X 線写真の有用性は疑う余地のないものであるが、齲蝕病変の検出について歯科医師間に違いがあり、病変の大きさや撮影方向などの影響を受ける。さらに実際の臨床ではエナメル質や周囲組織が X 線画像に重なることから、齲蝕を検出する感度はさらに低下する可能性がある。また偽陽性はコンポジットレジンの厚さが 1 mm、2 mm において、それぞれ 0.29、0.23 であり、SS-OCT よりも有意に高い値であった。偽陽性率が高くなると、不要な切削治療を行うリスクも高まる。デンタル X 線写真における偽陽性の原因として、境界領域が暗くみえる視覚錯覚のマッハバンド効果なども考えられ、修復物下の齲蝕を検出する際には注意が必要である。またデンタル X 線写真では厚い接着材層が存在する場合、修復物直下の X 線の透過性が高くなり、齲蝕の診断が困難になる。SS-OCT では接着材の屈折率はコンポジットレジンの屈折率とほぼ同じであるため、界面の画像は後方散乱シグナルを強調することなくほぼ均一であり、接着材による影響をほとんど受けない。本研究ではデンタル X 線写真の評価者内一致率ならびに評価者間一致率についても SS-OCT よりも低く、これらの影響が考えられる。

SS-OCT の 3D 画像は正確な診断ならびにアーチファクトの低減に有効であり、また 3D 画像情報から適切な断面を選択できるだけではなく、マルチスライス、マルチプレーナービューなどの高度な画像構成を行うこともできる。コントラストや明るさの調整を行うと、さらに詳細な情報が得られる可能性が高くなる。これらの方法は医学分野において CT や MRI 等で採用されており、確立した画像診断技術であるが、歯科分野ではあまり普及していない。より高速なレーザー光源ならびにボリュームセット処理とともに、微小電気機械システム MEMS ベースのイメージングプローブにより 3D OCT の歯科医療における普及につながると考える。OCT 撮影の主な利点の一つとして歯科における被曝量の抑制が挙げられ、この観点から SS-OCT は妊婦や幼児に対する安全性の高い診断ということができる。本研究の結果から、SS-OCT はコンポジットレジン修復物下の象牙質齲蝕を検出することができ、デンタル X 線診査に代わる安全な診断法となる可能性が示唆された。しかしながら画像深度は限られており、より深い修復物下の齲蝕の診査において正確な結果を得るための開発が必要と思われる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5506　号 | 松浦　千尋 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宇尾　基弘<br>副　査　興地　隆史　　倉林　亨 | |
| 論 文 題 目 | 3D diagnosis of dentin caries beneath composite restorations using swept-source optical coherence tomography | |

（論文審査の要旨）

コンポジットレジンは優れた審美性と歯質接着性を有することから、歯冠修復材料として広く使用されている。しかしながら重合収縮による接着界面の崩壊ならびに齲蝕発症のリスクが指摘されており、特に修復物下の齲蝕に関しては早期診断が望まれる。光干渉断層計（OCT）は近赤外光を用い非破壊で内部構造を可視化する装置であり、中でも SS-OCT は画像処理速度が速く、三次元画像構築が可能である。本研究は光学画像機器の発展を背景に、審美的接着修復の重要な課題に取り組んだものである。実験に使用した SS-OCT は吉田製作所の試作モデルであり、高速で 3D OCT 画像が構築可能な最新の機器として注目されている。また比較対象のデジタルデンタル X 線撮影システムは同じく吉田製作所の製品であり、広く臨床で用いられている装置である。試料としてヒト抜去大臼歯を用い健全歯と象牙質齲蝕を選んでいるが、臨床における修復物下の象牙質齲蝕を再現する上で適切な方法といえる。象牙質齲蝕の深さの指標として ICDAS コードを適用しており、近年のカリオロジーの傾向を適切に捉えるとともに、均一な実験条件を得るための工夫ということができる。使用したコンポジットレジン修復材料は Clearfil SE Bond と Estelite ΣQuick であり、いずれも臨床で広く用いられている材料である。また築盛したコンポジットレジンの厚さは 1 mm と 2 mm であり、光透過性の影響を強く受ける OCT の性能を評価する上で、極めて適切な判断ということができる。齲蝕の評価は 17 名が行っており、実験の信頼性を高め再現性の高い結果を得ることに成功している。感度、特異度、Az 値、偽陽性、陰性的中率に加え、評価者内一致率、評価者間一致率についても慎重な分析が行なわれていることは高く評価できる。得られた主な結果は以下の通りである。

1．SS-OCT の 3D 画像構築から齲蝕を診断するための適切な断層画像を得ることができた
2．SS-OCT はデンタル X 線写真よりも感度、特異度、Az 値、陰性的中率は高く、偽陽性は低かった
3．SS-OCT の感度はコンポジットレジンの厚さが 2 mm になると 1 mm よりも低くなった

本研究の考察は SS-OCT の画像の深度とコンポジットレジンの光透過性の影響、デンタル X 線撮影における偽陽性の原因、3D 画像化の利点などから構築され、適切かつ興味深い内容となっている。

以上より、申請者 松浦千尋が本研究領域において最先端の技術を駆使し、コンポジットレジン修復物下の齲蝕の検出に関して新たな評価を行い、臨床評価の開発に資する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博

士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中村　州臣 |
| 論文審査担当者 | 主査　倉林　亨<br>副査　櫻田　宏一　　田畑　純 |
| 論　文　題　目 | Healing after experimental luxation and intraalveolar root fracture in immature rat teeth |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

小児が前歯を失う原因の一つは外傷である。特に根未完成歯の歯根破折歯は保存が難しく、かつ治療法が確立していない。このような歯根破折の治癒には時間がかかり、不明な点が多いため、本学小児歯科学分野ではラット臼歯に歯根破折（歯根亀裂）を作製し、損傷 2 週後までの破折部の治癒過程を病理組織学的に観察し報告した（Oishi et al., 2013）。そこで本研究の目的は、歯根破折を伴う歯根未完成のラット臼歯の治癒過程を 2 週以降にわたって観察することで、脱臼や歯根破折が発育過程にある受傷歯に与える影響を明らかにし、本研究の実験モデルの、歯の外傷学研究における意義を評価検討することである。

なお、本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号 0170222A）。

＜材料と方法＞

生後 4 週齢の雄性 Crlj:WI ラット 15 匹（実験群 8 匹、対照群 7 匹）を用い、抱水クロラールで全身麻酔を行い、脱臼・歯根破折作製装置を適用して両側上顎第一臼歯を頬側から把持し、口蓋側方向へ 900g の負荷をかけ、右側第一臼歯を支えとして、左側第一臼歯を口蓋側方向へ一定角度傾斜させ実験群とした。対照群は負荷を与えなかった。

ラットは損傷後 3 週飼育群と 4 週飼育群に分け、飼育期間後に炭酸ガスで安楽死させ、上顎骨を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンで固定したのち、工業用 X 線 μCT で上顎左側臼歯部を撮影してから脱灰し、通法に従いパラフィン切片（厚さ 5μm）としてヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡下で観察と写真撮影を行った。

また、損傷後の経時変化・成長発育を比較するために、頭部は、損傷後 30 分、2 週、3 週、4 週（4 週飼育群のみ）実験動物用 X 線 μCT で撮影して、歯の位置や、歯列弓幅径（上顎第一臼歯・第二臼歯接触面口蓋側点間距離）の測定、歯列や骨、歯髄腔の形態計測を行った。

さらに、固定試料を用いた工業用 X 線 μCT 撮影像は、左側第一臼歯と周囲組織を 3 次元構築し、組織切片所見との比較に用いた。加えて、近心根歯根長や近心根中央部における前頭断面内の歯根膜腔幅径等を測定し、3 週後と 4 週後における対照群と実験群との形態を比較した。各群の測

定値については平均値を Student の t 検定を用い比較した（有意水準 $p<0.05$）。

＜結果＞

１）所見の概観

肉眼所見では、ラットの上顎第一臼歯は、左側第一臼歯が明瞭な口蓋側傾斜を示した後、荷重除去後は自動的に元の位置に戻るのが観察された（対照群の 1 匹が死亡、2 匹は操作を誤り情報が得られなかった）。実験動物用 X 線 μCT 画像の所見からは、全観察期間を通じて明瞭な硬組織の崩壊、歯の位置異常等がなかった。組織切片所見と工業用 X 線 μCT 画像において、感染や著しい組織喪失はなく、実験群中 4 歯（4 箇所）の近心根に象牙質の欠損と不規則な硬組織形成と硬組織の不連続性が見られたため歯根破折部と解釈した。

２）損傷後 3 週の所見

歯根破折があった 2 歯には、破折部に細管構造を持つ修復象牙質と変性した細胞を含む部分やエオジンに染まるヒアリン様小領域があった。修復象牙質の歯髄側には象牙芽細胞様細胞があり、歯根膜側は、一部象牙質の露出とセメント質の添加があった。近心根周囲の歯根膜主線維は正常な走行が見られたが、破折部の歯根膜線維の走行は不規則で、歯根膜腔幅径は、実験群では対照群よりも広い傾向があった。

その他、実験群は歯根吸収が明瞭で、遠心口蓋根と中央口蓋根の口蓋側歯頸部で特に顕著だった。歯根吸収窩には少数の破歯細胞が観察され、吸収窩内の歯根膜線維は吸収窩に平行に走行していた。なお、歯根吸収に面した歯根膜腔幅径が極めて狭い部分が 1 歯にあった。なお実験動物用 X 線 μCT 画像情報を立体構築して測定した上顎歯列弓幅径は、実験群と対照群とで差がなかった。

３）損傷後 4 週の所見

歯根破折が 2 歯に見られ、修復象牙質は歯髄内に突出して見え、象牙前質も形成されていた。歯根膜寄りには変性した細胞が含まれた部分やエオジンに染まるヒアリン様小領域があった。修復象牙質の歯髄側には象牙芽細胞様細胞が見られ、歯根膜側は、根尖側では細胞性セメント質が歯根膜側に突出した部位もあった。歯根分岐部においてはセメント質が被っており、細胞性セメント質は少なかった。

歯根破折や歯根吸収のない部位では、歯根膜線維の走行は対照群同様であったが、歯根破折部では不規則な走行が見られた。その上、4 週においても 3 週同様に、実験群近心根の歯根膜腔幅径は、対照群よりも広く見えた。従って、工業用 X 線 μCT 撮影情報を用いて、近心根中央位置における歯根膜の頬側幅径、口蓋側幅径、根尖側幅径を測定し、その平均値を群間で比較したところ，実験群は対照群よりも大きい傾向が認められた。

固有歯槽骨が対象群では実験群に比べ連続した形態をとり、石灰化した骨の割合が高く見えた。

その他、遠心口蓋根と中央口蓋根の口蓋側歯頸部では歯根吸収が明瞭だった。歯根吸収窩には少数の破歯細胞が観察され、吸収窩内の歯根膜線維は吸収窩に平行に走行していた。

口蓋側歯頸部の歯根吸収は 3 週から 4 週にかけて深さが増大し、最深部は歯根幅径の 3 分の 2 に至り、歯頸部から全方向へと範囲が拡大していた。従って、エナメル質の内側、すなわち歯冠部にも広がりが見られた。他方で、歯根吸収窩をセメント質が被う部分も一部に観察された。

工業用 X 線 μCT 撮影情報による歯の 3 次元構築像を観察すると、根尖の硬組織添加は次第に増加して根尖周囲に膨隆を形成し、特に歯根破折のある近心根は、対照群や歯根破折のない歯に比べセメント質の表面が粗造で、根尖外形が角張って見えた。なお、歯根長の平均値は、統計解析において、実験群が対照群に比べ有意に短かった（$p<0.05$）。歯根吸収については、3 週に比べ、全方向的に歯根吸収が拡大し深化したことが確認された。実験動物用 X 線 μCT 画像情報を立体構築して測定した上顎歯列弓幅径は、実験群において狭い傾向を示した。

＜考察＞

本研究において脱臼・歯根破折作製装置を用いラット第一臼歯に外傷性損傷を生じさせた結果は、被験歯の脱臼と近心根に 50%の確率で歯根亀裂を作製できた点で、同装置を用いた過去の報告と同様の損傷が得られた。

歯根破折部の歯髄側に修復象牙質形成が開始した後に、その歯根膜側にセメント質の添加が継続したことは、臨床で観察される硬組織による治癒過程を想起させた。なお、脱臼・歯根破折作製装置での損傷 2 週後においては､修復象牙質内歯根膜側にヒアリン様小領域が報告されており、本研究の全観察期間中にも見られたことから硬組織を欠く脆弱部位であると思われた。

また、歯根破折部や歯冠側における修復象牙質形成や、歯根周囲のセメント質が実験群で 4 週後も継続していたことは、ヒトが歯の脱臼や歯根破折後に併発する歯髄腔狭窄の所見に関連する可能性があり、実験群の近心根歯根長が対照群より有意に短かったことは、臨床で見られる脱臼既往歯の短根化に類似していた。

脱臼・歯根破折作製装置に軽い荷重を作用させた過去の報告においては、歯根膜や歯槽骨の所見は損傷 4 週後までに正常化していた。しかし、本研究において、近心根の歯根膜腔幅径は、組織所見と工業用 X 線 μCT 画像所見共に、実験群が対照群に比べ広い傾向があったほか、実験群において、固有歯槽骨は 4 週後では対照群同様の形態を示さず、近心根歯根長が有意に短かったことと、実験動物用 X 線 μCT 画像情報から得た上顎歯列弓幅径は狭い傾向が継続したことは、臼歯を口蓋に傾斜させ、脱臼または歯根破折を生じさせるほどの外力は、歯根や歯槽骨、歯根膜の形態異常を招くか、成長を阻害する危険性があることを示した。

他方、本研究における口蓋側歯頸部歯根吸収は、より軽い荷重による脱臼実験に比べて、より広く深い吸収窩を示し、吸収窩の深さと広がりがより短期で生じたことから、損傷外力の大きさが歯根吸収の進行の様相に関与した可能性が示された。このような外傷を誘因とする歯根吸収の病理的分類には未だ定説がない。その上、再現性のある歯の外傷損傷モデルが少なかったため、受傷歯に生じる歯根吸収過程の報告も抜歯再植後の所見などに限られていた。本研究で観察された歯根吸収は損傷 3 週後から 4 週後にかけて進行したが、両時点共に吸収窩内の破歯細胞が少なかったことなどから、歯根吸収の進行過程については詳細の解明はできなかった。しかしながら、歯の脱臼・歯根破折モデルとして本研究の損傷方法を用いることによって、外傷由来の歯根吸収の研究を展開できる可能性が示された。

＜結論＞

根未完成のラット上顎第一臼歯に脱臼・歯根破折作製装置を用いて、不完全破折を 50%の確率

で作製できた。組織学的観察に加え、実験動物用ならびに工業用 X 線 μCT 撮影から得た情報を分析した結果、損傷 4 週後まで、ヒトに換算すれば成人期までの、歯根破折部の修復過程、歯周組織や歯槽、歯根成長への外力の影響、歯根吸収等を観察することができた。また、ヒトの幼若永久歯における脱臼後ならびに歯槽骨縁下歯根破折における治癒過程や合併症と類似した所見が認められた。さらに、外力による歯根や歯槽の成長発育への負の影響の可能性、ならびに損傷に起因する歯根吸収などが追跡可能であったことから、外傷歯研究のための実験的損傷モデルとして、本研究の手法は有用であることが示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5507　号 | 中村　州臣 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　倉林　亨<br>副　査　櫻田　宏一　　田畑　純 | |
| 論 文 題 目 | Healing after experimental luxation and intraalveolar root fracture in immature rat teeth | |

（論文審査の要旨）

小児が前歯を失う原因の一つは外傷である。特に根未完成歯の歯根破折歯の病理は解明されておらず治療法も確立していない。外力を受けた歯は必ず軽度またはそれ以上の脱臼状態に陥ることが予想され、歯冠破折が観察される一方で歯肉縁下では、歯根の破折や亀裂を生じることがあるが、肉眼ではもちろん、通常のエックス線診査によっても必ずしも把握できないことすらある。本学小児歯科学分野ではラットの根未完成臼歯に規格化された脱臼や歯根破折（歯根亀裂）を実験的に作製し、実験病理学的研究を行ってきた。本研究では、この脱臼・歯根破折モデルが、外力より損傷された根未完成歯の治癒過程と成長発育に対する、脱臼や歯根破折特有の影響を検討するなど歯の外傷学研究のために有用であるか検討することを目的とした。

材料としては、生後 4 週齢の雄性 Crlj:WI ラット 15 匹（実験群 8 匹、対照群 7 匹）を用いた。方法としては、全身麻酔下で脱臼・歯根破折作製装置を両側上顎第一臼歯に装着し、口蓋側方向へ負荷をかけた実験群、負荷をかけない対照群の 2 群を作り、左側第一臼歯を被験歯とした。ラットは損傷後、損傷の 30 分、2 週、3 週、4 週後に実験動物用 X 線 μCT 撮影を行い、形態の経時的変化・成長発育観察した。飼育 3 週および 4 週後に安楽死させて、上顎を摘出して固定液に浸漬後、工業用 X 線 μCT 撮影を行ってから脱灰切片とヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。また、2 種類の X 線 μCT 撮影情報の 3 次元構築を行い、形態の観察と組織所見との比較を行った。各群における測定値の平均の差の検定は Student の t 検定（有意水準 $p<0.05$）を用いた。研究結果として、以下の知見が得られた。

ラットの上顎左側第一臼歯は、脱臼・歯根破折作製装置による外力を受けて、口蓋側に傾斜したが、荷重除去後は自然に元の位置に戻ったように観察された。実験動物用 X 線 μCT 所見では、全観察期間において、上顎歯列弓幅径は、実験群では対照群より小さい傾向が見られた。また、組織切片所見と工業用 X 線 μCT 画像において、実験群近心根の 50%（4 歯、4 箇所）に歯根破折が確認され、損傷後 3 週から 4 週にかけて破折部歯髄側に修復象牙質が形成され、歯根膜側にはセメント質や細胞性セメント質が形成された。損傷 3 週以後の被験歯の歯根膜線維はほぼ正常な走行を示したが、歯根破折部においてのみ線維の走行が不規則で、実験群の歯根膜腔幅径は対照群よりも広い傾向があった。

一方、歯根吸収が実験群において明瞭であり、口蓋側歯頸部において顕著だった。歯根吸収窩には少数の破歯細胞が観察され、吸収窩は 3 週に比べ 4 週では歯頸部から深化と拡大を示し、

エナメル質の内側、歯冠部にも広がった。

さらに、歯根形成への影響を観察するために、工業用 X 線 μCT 撮影情報を用いて歯の 3 次元構築を行い、近心根歯根長を測定したところ、実験群における平均値は対照群の平均値より有意に短かった。

以上の結果から、本研究に用いた脱臼・歯根破折作製装置はラット第一臼歯に対して 50%の確率で歯根破折を生じさせ、これは同装置を用いた先行研究同様の結果であった。同装置を用いると歯根破折部歯髄側に損傷後 2 週までに修復象牙質が形成されることは、すでに報告されていたが、本研究における損傷 3 週ないし 4 週後にかけて修復象牙質ならびに歯根膜側にはセメント質がさらに添加され続けた所見は、臨床でヒト歯根破折部が硬組織によって結合される治癒過程や歯髄腔狭窄に関わると推察された。また、歯冠側における修復象牙質形成は、ヒトの脱臼歯における歯髄腔狭窄所見に関連する可能性があった。さらに、実験群の近心根歯根長は対照群よりも有意に短かったことは、ヒトの脱臼既往歯に見られる短根化を想起させた。その上、近心根の歯根膜腔幅径は実験群において対照群よりも広い傾向があり、実験群において上顎歯列弓幅径は狭い傾向が続いたことも合わせ考えると、臼歯を口蓋側傾斜させるほどの脱臼または歯根破折を生じさせるほどの外力は、歯根や歯槽骨、歯根膜の形態や成長を阻害するリスクであったことが示された。

このように外傷を受けた歯における脱臼や歯根破折などに起因すると推察される独特な損傷の長期的研究を可能にする「歯の脱臼・歯根破折モデル」を初めて示した本研究は、歯の外傷学、外傷歯治療学研究のために有用な成果を示しただけでなく、外傷を誘因とする歯根吸収を研究するための損傷モデルとしての新たな意義も明らかにした点で、歯科における基礎ならびに臨床医学の発展に貢献することが期待できる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 住谷　雄大 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　倉林　亨　　宮新　美智世 |
| 論　文　題　目 | Micro-CT Assessment of Comparative Radiopacity of Adhesive/Composite Materials in a Cylindrical Cavity |

＜緒言＞

近年、マイクロ CT は歯科分野への応用として、コンポジットレジンの重合収縮率、コンポジットレジン修復物内部の気泡、修復物界面の適合性の評価などに用いられている。ISO 規格によると、歯科修復材料の X 線不透過性が同じ厚みのアルミニウムと同等以上の X 線不透過性を有する場合に X 線不透過性を有するとされる。マイクロ CT 解析において、修復物の X 線不透過性のコントラストは識別性を改善する要因であり、修復物の不十分な X 線不透過性は、マイクロ CT による解析を困難にする。従来のデンタル X 線フィルムでは、ボンディング材層は薄いために検出が困難であるが、その X 線不透過性に関する規格はない。また、マイクロ CT を用いて３次元的に窩洞周囲の歯質と窩洞内の修復材料との X 線不透過性を評価した報告もない。

本研究の目的は、円柱窩洞における各種コンポジットレジン修復物のエックス線不透過性についてマイクロ CT を用いて評価することである。

＜材料と方法＞

接着システムとして２ステップセルフエッチング接着システムである Clearfil SE Bond（以下 SE; Kuraray Noritake Dental, Tokyo, Japan）と FL-Bond II（以下 FL; Shofu, Kyoto, Japan）、コンポジットレジンとしてフロアブルレジンである Beautifil Flow F10（以下 BF; shade A2, Shofu）と Clearfil Majesty ES Flow High（以下 MJ; shade A2, Kuraray Noritake Dental）を使用した。予備実験において数種類の材料の X 線不透過性について検討した中で、SE の X 線不透過性は象牙質より低く、FL は象牙質よりも高く、また、MJ の X 線不透過性は BF よりも顕著に高いという結果を得た。さらに X 線不透過性の基準値を得るため、2 mm 径のアルミニウムワイヤーを用いた。

まず、ボンディング材、コンポジットレジン、牛歯エナメル質、牛歯象牙質の X 線不透過性についてマイクロ CT を用いて評価した。牛歯歯冠部から精密低速切断機を用い、注水下にて 4×4×3 mm のエナメル-象牙質ブロックを切り出した。また、各ボンディング材とコンポジットレジンをピペットチップ（10 μL）に注入し、光照射器（OPTILUX 501, Kerr, Orange, CA, USA）にて 10 秒間光照射後、マイクロ CT 撮影を行った。マイクロ CT により得られた３次元画像から２次元画像を 15 枚ずつ抽出し、解析ソフト（ImageJ version 1.45S, U.S. NIH, Bethesda, MD, USA）を用いて平均グレースケール値を求めた（n=15）。予

備実験において窩洞内と窩洞外の空気のX線不透過性を評価し、両者間に有意差がないことを確認したため、試料外側の空気のX線不透過性を空気のグレースケール値とした。統計はone-way ANOVA及びTukey's testにて行った。

次にコンポジットレジン修復窩洞のマイクロＣＴによる評価を行った。12本の牛歯歯冠部に円柱窩洞（直径2.0 mm、深さ2.2 mm）をダイヤモンドバー（#202; Shofu）で形成した。その後、窩洞表面を#800の耐水研磨紙にて研削し、平坦な規格窩洞（直径2.0 mm、深さ2.0 mm）とした。その後、精密低速切断機を用い、窩洞を含む4×4×3 mmのエナメル-象牙質ブロックを切り出した。試料側面にダイヤモンドバーを用いて直径1 mm、深さ0.5 mmのマイクロCT測定用の基準孔を付与した。修復材料の組み合わせは、SE-BF、SE-MJ、FL-BF、FL-MJの４種類とした（n=3）。接着操作は業者指示通りに行い、コンポジットレジンを窩洞内に充填後、光照射器先端を5mm離して10秒間光照射した。

試料は即時重合レジンを用いて試料台に固定し、窩洞形成後、ボンディング材の光重合後、コンポジットレジンの光重合後にマイクロCT撮影を行った。得られた３次元画像から２次元画像を抽出し、ImageJを用いて画像内のグレースケール値と頻度値を示すヒストグラムを作製した。さらに２次元画像における各材料を組み合わせた修復物の相対的Ｘ線不透過性を比較するため、１．空気-ボンディング材、２．象牙質-ボンディング材、３．ボンディング材-コンポジットレジン、４．ボンディング材-エナメル質について、Otsuの二値化処理を用いて画像の二値化を行った（n=3）。

＜結果＞

空気、象牙質、エナメル質、ボンディング材、コンポジットレジンから得られた平均グレースケール値は、すべての群間に有意差が認められた。空気のグレースケール値は最も低い値を示し、続いてSEの値が低かった。FLの値は象牙質とエナメル質の中間であった。BF、MJの値は、SE、FLよりも有意に高く、MJは最も高かった。また、アルミニウムワイヤーのグレースケール値は象牙質とFLの中間であった。

マイクロCT画像において全ての群の修復物にはギャップ形成を示す透過像は認められなかった。ボンディング材の厚みは、窩壁部で約70 µm、窩底部で約100～350 µmであった。SE-BF画像では、歯質とボンディング材、コンポジットレジンの識別は明瞭であったが、SEのボンディング層の不透過性は低く、窩洞外の空気の不透過性に近かった。SE-MJ画像では、MJはSE-BF画像内のBFと比べてより明瞭に識別された。FL-BF画像では、FL、BF、エナメル質間のグレースケール値のコントラストが近似し、識別困難であった。FL-MJ画像では、ボンディング材、コンポジットレジン、象牙質、エナメル質が最も明瞭に識別された。

各修復物の２次元画像のグレースケール値をヒストグラムで示した結果、SE-BFにおいては、SEのグレースケール値は象牙質と空気との間に位置し、SEの厚みが他の材料に比べて薄いため、頻度値が最も低かった。BFとエナメル質のグレースケール値は近似し、その頻度値は重なっていた。SE-MJ画像のヒストグラムでは、全ての素材のグレースケール値は分散していた。FL-BFでは、FL、象牙質、エナメル質

のグレースケール値は近接していた。FL-MJ では、FL-エナメル質を除き、グレースケール値は分散していた。

二値化処理の結果、FL-BF、FL-エナメル質を除き、全ての隣接する素材の閾値は、各素材のグレースケール値の平均値の間に位置していた。一方、FL-BF 間の閾値は FL のグレースケール値と重なり、FL-エナメル質間の閾値も FL とエナメル質のグレースケール値と重なっていた。

＜考察＞

マイクロ CT 撮影を行う際、ビームハードニング効果によるアーチファクトが問題となる。本研究では、その対策として 0.2 mm の真鍮フィルターをビームハードニング効果の軽減のため使用した。

象牙質は、エナメル質と比較してハイドロキシアパタイトの含有量が少なく、エナメル質よりも X 線不透過性は低かった。一方、コンポジットレジンの X 線不透過性は、フィラー含有量とフィラー粒子の種類に依存している。フィラー成分がシリカやアルミナなどの原子番号の低い元素で構成される場合、エックス線不透過性は低く、亜鉛、ストロンチウム、酸化ジルコニウム、バリウムガラス、硫酸バリウム、ランタン、イッテルビウムなどの原子番号の高い元素で構成される場合、X 線不透過性が高くなる。本研究においては、MJ は BF と比較して X 線不透過性が顕著に高かったが、これはその組成とフィラー充填率の違いによるものと考えられる。MJ のバリウムガラスフィラーの充填率は 71 wt%であり、その X 線不透過性はエナメル質よりも有意に高かった。一方、BF では S-PRG フィラーの充填率は 40-50 wt%であり、エナメル質の X 線不透過性に近かった。S-PRG フィラーは、ホウ素、ナトリウム、ケイ素、アルミニウム、フッ素、ストロンチウムを含む。

ボンディング材である SE、FL もフィラーを含むがその含有率はコンポジットレジンより低い。SE はシリカフィラーを 10.1 wt%、FL は S-PRG フィラーを 43.5 wt%含有しており、FL のグレースケール値は、SE よりも高かった。さらに FL のグレースケール値は、象牙質よりも高く、エナメル質と BF の値に近かった。一方、SE のグレースケール値は空気と象牙質の間に位置していた。このため２次元画像内において SE は他の素材との識別性は高かったが、空気のそれと近似しているため、修復物周囲のギャップ形成をマイクロ CT で評価した際に、SE を空位すなわちギャップの形成として認識する危険性がある。さらに窩壁側に位置するボンディング層の厚みは 70 μm であり SE の検出は困難であった。FL は MJ と明瞭に識別されたが、BF、エナメル質との識別性は低かった。これはヒストグラム内において、グレースケール値の頻度値が重なっていたためと考えられる。

本研究では２つの素材間の識別を可視化するために、二値化を行った。FL-BF 間と FL-エナメル質間を除き、閾値は２つの素材間のグレースケール値の間に位置していた。このことは、マイクロ CT 画像上において修復材料間での識別が可能であることを示している。一方、FL-BF 間の閾値は FL のグレースケール値と重なっており、このことは FL と BF が画像上で分離困難であることを示している。FL-エナメル質間の閾値も FL とエナメル質のグレースケール値と重なっており、同様に分離困難であることを示す。

歯質と修復物とのギャップを評価する際、ボンディング材の低い X 線不透過性は障害になる。すなわ

ち、SE-BF や SE-MJ の場合にギャップの検出は困難となる可能性がある。一方、FL-BF や FL-MJ の場合、FL は X 線不透過性が高く、修復物のギャップ形成の検出は容易であることがわかった。過去の研究においては、ボンディング材を使用せずに窩洞におけるコンポジットレジンの重合収縮を評価したものもあるが臨床的ではない。また、修復物のギャップ形成について硝酸銀を用いてマイクロ CT で評価した研究もあるが、エナメル質のギャップ形成や、硝酸銀の到達しない窩底部のギャップ形成の検出は困難である。

臨床においても修復物を評価する際、コンポジットレジンとボンディング材の X 線不透過性は重要な要素の１つである。

＜結論＞

修復材料と歯質の相対的な X 線不透過性は、マイクロ CT によるコンポジットレジン修復物の画像識別性に影響を与えた。修復材料の種類や組み合わせは、修復物のギャップや二次う蝕の形成などの臨床診断に影響を及ぼす可能性があることがわかった。

# 論文審査の要旨および担当者

| | | |
|---|---|---|
| 報 告 番 号 | 甲 第　5508　号 | 住谷　雄大 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　倉林　亨　　宮新　美智世 | |
| 論 文 題 目 | Micro-CT Assessment of Comparative Radiopacity of Adhesive/Composite Materials in a Cylindrical Cavity | |

（論文審査の要旨）

近年、マイクロ CT の歯科材料研究への応用が進み、これまでにコンポジットレジンの重合収縮率の評価、コンポジットレジン修復物の内部気泡の観察、修復物界面の適合性評価などが報告されている。ISO によると、歯科修復材料は同じ厚みのアルミニウムと同等以上の X 線不透過性を有する場合に X 線不透過性を標榜できるとされているが、ボンディング材に関しては推奨や規格化はされておらず、また、マイクロ CT を用いて修復窩洞の X 線不透過性を評価した報告はない。申請者は修復材料の X 線不透過性に着目し、異なるボンディングシステムとフロアブルレジンの組み合わせによるコンポジットレジン修復物の識別性についてマイクロ CT を用いて検討しており、優れた着眼といえる。

本研究で使用した材料は、２ステップセルフエッチング型ボンディングシステムである Clearfil SE Bond（以下 SE）と FL-Bond II（以下 FL）、及び２種類のフロアブルレジン Beautifil Flow F10（以下 BF）と Clearfil Majesty ES Flow High（以下 MJ）であるが、これらは予備実験により数種類の材料の X 線不透過性を計測して材料を選択しており、材料選択は慎重かつ適切になされている。牛歯に対する規格窩洞の形成、それに続く修復操作も適切に行われている。マイクロＣＴによる撮影は、修復前後で３回行い、３次元画像から２次元画像を採取し、実験モデルに対する慎重な配慮がなされている。２次元画像の評価方法として、グレースケール値のヒストグラムの作成を行い、さらに画像内の各素材間の二値化処理を行い、画像上の視覚的な識別性を定量的に解析しており、これは専門的な高い知識と技術を要するもので、申請者の優れた研究遂行能力を窺わせる。

本研究から得られた主な結果は以下のとおりである。

1. マイクロ CT 解析において、各素材の X 線不透過性は、MJ、BF、エナメル質、FL、象牙質、空気の順に高かった。
2. ２次元画像上での視覚的な識別では、SE は空気と似たグレースケール値を示したが、BF、MJ との識別は良好であった。一方、FL は象牙質より高いグレースケール値を示したが、BF との識別は困難であった。BF は FL、エナメル質との識別が困難であった。MJ は、どの素材とも識別良好であった。
3. ２次元画像のグレースケール値のヒストグラムから、FL-BF の組み合わせにおいては FL、エナメル質、

BF の頻度値が重なっていたが、他の組み合わせにおいては頻度値の重なりは少なかった。

4. 2 値化の結果、FL-エナメル質、FL-BF 間以外は良好な識別性が得られた。FL-エナメル質間の閾値は、それぞれの平均グレースケール値と重なっており、FL-BF 間の閾値は FL 以下の値を示した。

本論文では、これらの結果に関して、修復材料の X 線不透過性を、その構成元素及びフィラー充填量と関連付けた考察がなされている。また、マイクロ CT 解析において、不透過性の高いボンディング材を用いることの有益性についても言及されており、興味深い内容となっている。

修復物を構成する各素材のX線不透過性の違いについては、歯質の場合には無機成分であるハイドロキシアパタイトの含有量、コンポジットレジンとボンディング材においては、そのフィラー含有量とフィラー粒子の種類が影響していることを指摘している。各素材のX線不透過性の違いは修復物のギャップ形成を観察する場合、障害となるばかりでなく、実際の臨床におけるギャップや二次う蝕の診断にも影響を及ぼす可能性がある。

これまでのマイクロＣＴによるコンポジットレジン修復物の重合収縮によるギャップ形成についての評価では、ボンディング材とコンポジットレジン材料の X 線不透過性やその組み合わせについての議論はなかった。本研究により、材料選択の際には X 線不透過性についての配慮の重要性が明らかとなり、臨床においても修復物を評価する際、コンポジットレジンとボンディング材の X 線不透過性は重要な要素の１つであることが示唆された。

以上より、マイクロ CT を用いた修復窩洞における歯質と修復物の X 線不透過性の評価に関する本研究は、歯科材料学ならびに保存修復学に極めて有益な情報を提供したものであり、高く評価できる。従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分に価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 畑山　貴志 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　由井　伸彦　　岡田　大蔵 |
| 論　文　題　目 | Stress distribution in tooth resin core build-ups with different post-end positions in alveolar bone level under two kinds of load directions |

＜緒言＞

近年、根管処置歯に対するファイバーポスト・コンポジットレジン支台築造法は、新しい接着材料の発展と相まって広く使用されている。この支台築造法では、ファイバーポスト及びコンポジットレジンの弾性率が象牙質に近く、ポスト先端部の応力集中を回避できるので、再修復不可の壊滅的な歯根破折を減少させることができると報告されている。しかし、その修復歯の予後に対する、ファイバーポスト埋入の効果や、ポストの長さの影響に関しては未だ多くの議論がなされている。また、歯槽骨（皮質骨、海綿骨）とポスト先端部の位置関係も支台築造歯の予後に対する重要な因子であり、レジンコア築造歯内部の応力分布に影響を与えると考えられる。コア築造歯の内部応力分布を調べるためには有限要素法解析を用いることが有効であり、多くの研究者により検討がなされているが、荷重は咬頭に対して一方向から与えているものがほとんどで、荷重方向の変化によるレジンコア築造歯内部の応力分布への影響の報告は少ない。

本研究の目的は、有限要素法解析を用いてポスト先端部と歯槽骨（皮質骨、海綿骨）の位置関係がレジンコア築造歯の内部応力に与える影響を調べ、また荷重方向の変化やファイバーポストの有無がそれらに対してどう影響するかを検討することである。

＜材料および方法＞

根管治療後の下顎第一小臼歯をモデルに、歯根、歯根膜、歯槽骨、根管充填材、レジンコアおよびセラミッククラウンからなる三次元モデルを製作した。クラウンの高さは 6 mm とし、フェルールは設置せず、ポスト窩洞深さは 0 mm、1 mm（ポスト先端の位置は皮質骨縁上）、2 mm（ポスト先端の位置は皮質骨と海綿骨の間）、3 mm（ポスト先端の位置は海綿骨縁上）、4 mm（ポスト先端の位置は海綿骨縁より 1 mm 下）、6 mm（ポスト先端部の位置は海綿骨縁より 3 mm 下）と 6 群に設定し、3、4 および 6 mm のモデルには直径 1.7 mm のファイバーポストを入れたモデルと入れないモデルを用意した。各部は接着していると仮定し、弾性係数とポアソン比は報告されている実験値を引用した。各部は線形弾性等方性物質としたが、ファイバーポストのみ異方性物質とし、横方向 9,500、縦方向 37,000 MPa に設定した。各モデルは近遠心で対称設定とし、約 125,000 の六面体要素に分割した後、頬側咬頭頂に頬側方向から（A 方向）あるいは舌側方向から（B 方向）斜め 45°の角度で 400 N の荷重をかけ、有限要素解析を行った。内部の相当応力とレジンコアと歯根の接着界面におけるせん断応力分布を分析した。さらにレジンコア内部の引張応力と圧縮応力の方向も分析した。

＜結果＞

荷重方向がA方向からB方向に変わると、歯根内部、レジンコアともに最大相当応力の位置は舌側から頬側に変わり、その値は増加し、ファイバーポストの有無とポスト長さは影響しなかった。またポスト先端では大きな応力集中は認めなかったものの、ポスト長さ3 mmのとき1、2、4および6 mmのときよりも大きな相当応力を認めた。また、レジンコア内部の引張応力と圧縮応力の走行は、3、4および6 mmポストの内部において、皮質骨で覆われた歯根内のレジンポストのほぼ中央部を中心に弧を描いていることがわかった。1および2 mmポストにおいては、応力の走行は弧を描かなかった。

コア底面の接着界面では、近遠心歯頚部において最大せん断応力を認めた。その値はファイバーポストの有無とポスト長さに影響されなかったが、荷重方向が変わると最大せん断応力の大きさや位置は変わらないが、せん断応力の向きが真逆に変わった。ポスト側面では、どちらの荷重でもポスト上部の近遠心側面に最大せん断応力を認め、その値はファイバーポストの有無とポスト長さに影響されなかった。

＜考察＞

荷重方向がA方向からB方向に変わると、歯根内部、レジンコアともに最大相当応力は舌側から頬側に変わり、その値は増加したが、その理由はおそらく荷重のかかった位置（頬側咬頭）と応力集中した位置（歯根の歯槽骨縁上の歯根側面、もしくはレジンコアの歯頚部付近）との距離がB方向荷重の時の方が近かったからだと考えられる。それらの値はポスト長やファイバーポストの有無に影響されなかった。また、歯槽骨の位置と応力分布の関係性についての論文では、歯根側面にかかった大きな内部応力はポストの種類に関わらず、歯槽骨の位置が下がると大きく増加したと報告されている。歯槽骨縁上の歯根側面が斜めに荷重がかかった時の支点になるので、その位置が荷重をかけた位置から遠くなることが原因だと考えられる。歯根の内部応力にとっては、ファイバーポストの有無やポスト長の変化より、骨レベルが重要な因子となると考えられる。

また、レジンコアのポスト基部と先端においても、コア部に観測された最大相当応力よりは小さいが、応力集中が見られた。ポスト基部では相当応力の値はファイバーポストの有無やポスト長に影響されなかったが、先端部ではポスト長さが 3 mm（先端の位置は海綿骨縁上）の場合、ファイバーポストの有無に関係なく相当応力は最も大きくなり、結果としてポスト基部の大きさと同等になった。レジンコア内部の引張応力と圧縮応力の方向を調べてみると、ポスト長3、4および6 mmモデルでは、皮質骨で囲まれた象牙質内のポストのほぼ中央部を中心にその応力方向は弧を描いていることがわかり、斜めに荷重がかかるとそこを中心としてレジンコアが回転運動をすると考えられる。3 mm モデルのポスト先端部は、その回転中心と距離が近いので、相当応力が4および6 mmモデルより大きくなったものと思われる。2 mmおよび1 mmポスト内部の引張と圧縮応力の方向は円弧を描かなかったことから、レジンコア内部にはその他のモデルと異なる応力挙動が生み出されると考えられる。これらはおそらく1 mmおよび2 mmのモデルはポスト先端部の位置は硬い皮質骨の支えのない位置にあるからと推測される。これらの結果を考えると、ポスト先端部の応力集中にとって、ポスト先端の位置と皮質骨、海綿骨との位置関係が重要であると考えられる。

多くの研究者がレジンコアの成否は、象牙質接着性能に左右されると報告しており、またレジンコアと歯根象牙質の間に生じた高いせん断応力によって接着剥離が起きるリスクは高まると報告されている。本研究において最大せん断応力集中はコア底部の近遠心歯頚部に起こり、およそ 25 MPa であったが、一方ポスト部においても基部の近遠心側面においてせん断応力集中が起こり、その大きさはおよそ 20 MPa であった。コア底部の最大応力はファイバーポストの有無やポスト長に影響されなかったが、ファイバーポストの使用によりポスト基部においてのみ、せん断応力をわずかに軽減することが出来た。今まで様々な研究者が象牙質へのせん断接着強さ（SBS）の値を様々な異なった接着材料や試験設定で報告しているが、De Munck らによる過去 5 年間の 134 つの論文を再評価したシステマティックレビューによれば、SBS の平均値はおよそ 30 MPa であると報告されている。今回の結果であるせん断応力のコア底部 25 MPa、ポスト基部 20 MPa という値は、30 MPa を下回っているため今回用いた 1 回の荷重のみで接着界面が破壊されることはないと思われる。一方で、臨床的には、接着界面の疲労による剥離の可能性も考慮する必要がある。一方向からの繰り返し荷重によるせん断疲労強度（SFS）を計算した論文によれば、その値はおよそ 20 MPa 程度であったと報告している。本研究の最大せん断応力値は 20 MPa を超えているので、この結果は繰り返しの荷重負荷の疲労による接着界面破壊がコア底面の近遠心歯頚部から起こる可能性があることを示している。さらに本研究における荷重方向が変化するとせん断応力方向が正反対方向に変わるという結果から、接着界面の疲労破壊リスクはさらに高まると考えられる。

＜結論＞

本研究では、ポスト先端部の歯槽骨に対する位置は、レジンコアのポスト先端の相当応力集中にとって重要な因子と考えられる。頬側咬頭への荷重方向の違いは、レジンコア内部や歯根内部の最大相当応力を示す位置や、その大きさを変えることが明らかとなった。また、荷重方向の変化はコア底面の近遠心歯頚部に観測された最大せん断応力の方向を真逆に変えるので疲労破壊のリスクを増加させる可能性があることが示された。ファイバーポストを埋入することにより、最大せん断応力を観測した近遠心歯頚部界面や、最大相当応力を観測した歯根側面や頬舌側歯頚部のレジンコア内部の応力集中は軽減されなかった。

# 論文審査の要旨および担当者

| | | |
|---|---|---|
| 報 告 番 号 | 甲 第　5509　号 | 畑山　貴志 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　由井　伸彦　　岡田　大蔵 | |
| 論 文 題 目 | Stress distribution in tooth resin core build-ups with different post-end positions in alveolar bone level under two kinds of load directions | |

（論文審査の要旨）

近年、支台築造法としてレジンコアおよびファイバーポストが広く用いられるようになってきている。コンポジットレジンやファーバーポストのように弾性率が象牙質と同等である築造用材料が、ポスト先端部における応力集中を軽減することができ、これまで広く用いられてきた弾性率が象牙質より著しく高い鋳造メタルコアよりも壊滅的な歯根破折などのトラブルを回避することができると報告されている。一方で支台築造歯の破折挙動に大きな影響を及ぼすと考えられるポスト長に関しては、従来の支台築造法より短くできるとされているが、その詳細は不明である。支台築造歯破壊試験において、骨吸収したモデルで骨縁下にポスト先端部を位置させると、レジン・ファイバーポスト支台築造法でも重篤な歯根破折を引き起こすとも報告されている。歯槽骨（皮質骨、海綿骨）とポスト先端部の位置関係は内部応力へ影響すると考えられるが、そこに着目した論文は少ない。また、ファイバーポスト埋入による優位性についても未だに議論が続いている段階である。これまで行われている実際の歯牙を用いた支台築造歯の破折強度試験では、破折を引き起こす最大応力を評価しているが、臨床において破折が起こるのは継続的な繰返し負荷がもたらす疲労による可能性の方が高いと考えられる。しかしながら、そのような疲労試験を多様な因子を包含している支台築造歯で行っても、その結果は抜去歯牙の個体差に大きな影響を受けてしまうため、どの因子が問題なのか特定することは困難と考えられる。有限要素法を用いた研究は、そういった抜去歯牙の個体差の影響を排除し、支台築造歯の内部応力分布を検討することで、破壊がどこから起こるのか予測するには適した手法だと思われる。

このような背景のもと、本研究では有限要素法解析を用いて、コンポジットレジンで支台築造した小臼歯モデルにおいて、ポスト先端部と骨との位置関係、荷重方向、およびファイバーポスト埋入の有無を変化させ、レジンコアおよび歯根内部における相当応力、さらにレジンコアと歯根の接着界面に生じるせん断応力を算出し、ポスト先端部と骨との位置関係による内部応力への影響や、荷重方向の違いによる内部、界面への影響、およびファイバーポスト埋入の有用性について検討を行った。これまでレジンコアと歯質との接着は支台築造歯の耐久安定性の維持に非常に重要な役割を果たすことが報告されているものの、荷重方向の違いによる接着界面への応力挙動を検討した報告は少なく、疲労による接着破壊にまで考察を展開させている点は高く評価できる。またポスト長についても、その先端の位置と、皮質骨-海綿骨縁との関連性について着

目した点も評価できる。得られた結果に対する検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことがうかがわれる。

本研究により得られた主な結果は以下の通りである。

1. 頬側咬頭への荷重方向の違いは、レジンコア内部や歯根内部の最大相当応力を示す位置や、その大きさを変化させた。
2. ポストの長さが 3 mm、すなわちポスト先端部が皮質骨-海綿骨縁に位置する場合、ポスト先端部の相当応力はその他の短いポストや長いポストと比較して最も大きな値となった。
3. 荷重方向の変化はコア底面の近遠心歯頚部に観測された最大せん断応力の方向を真逆に変化させ、それにより同部位での接着疲労破壊リスクを増加させる可能性があることが示された。
4. ファイバーポストの埋入によるコア底面の最大せん断応力やレジンコア、歯根内部の最大相当応力に対する応力軽減効果は認められなかった。

本研究により、荷重方向が変化すると、レジンコア底面における近遠心の端において、疲労による剥離が起きるリスクが大きくなることが示唆された。また、ポスト長を長くすることや、ファイバーポストを埋入することでは、剥離を招く応力を軽減は出来ないことが明らかとなった。また大きな応力ではないものの、レジンコアにおいてもポスト長と歯槽骨（皮質骨、海綿骨）との位置が、ポスト先端部の応力集中に影響を及ぼすことが示唆された。

以上のように、本研究は有限要素解析を用いて支台築造歯の応力分布について評価と検討を行い、ファイバーポスト・コンポジットレジン支台築造歯のポスト先端部における歯槽骨（皮質骨、海綿骨）との位置関係の影響や荷重方向の違いに伴うレジンコア底面における接着破壊の可能性を明らかにしたものである。本研究の成果は、今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 藤田　和久 |
| 論文審査担当者 | 主査　和泉 雄一<br>副査　春日井 昇平　　宇尾 基弘 |
| 論　文　題　目 | Regulation of periodontal ligament-derived cells by type III collagen-coated hydroxyapatite |

【要旨】

歯根膜は二つの硬組織に挟まれ一定の幅を保つ線維性結合組織で，歯周組織の恒常性の維持を担っている．歯根膜には多分化能を有する歯根膜幹細胞が存在し，その接着や分化は足場材料により制御されるため，歯周組織再生を目的とする歯根膜幹細胞に適した生体材料の開発が必要とされている．そこで本研究では歯根膜幹細胞の最適な継代数を検討し，ハイドロキシアパタイト（HAp），type I 及び type III collagen 上での歯根膜細胞の増殖・分化挙動を評価した．歯根膜幹細胞は HAp と type I collagen 上で骨芽細胞への分化を促進したが，type III collagen ではその接着能と増殖能を亢進し，骨形成能を抑制することが明らかとなった．

【緒言】

歯根膜はセメント質と歯槽骨に挟まれた線維性結合組織で，歯牙と硬組織を連結するとともに，歯周組織の恒常性の維持を担っている．歯根膜幹細胞は硬組織形成能によって歯槽骨やセメント質を形成する一方で，硬組織を作らずに一定の幅を維持する性質をもっている．近年，抜去歯の歯根膜組織の酵素処理による歯根膜幹細胞の採取法とその多分化能が研究されており，歯周組織再生への応用が期待されている．歯周組織を模倣した階層性生体材料の開発も進んでいるが，歯根膜を含む歯周組織の再生は非常に困難である．細胞の増殖，分化は，細胞の接着する足場に影響されるため，歯根膜幹細胞の活動を維持しながら必要な分化を誘導する最適な足場材料の開発が必要である．

歯根膜には，細胞外基質として主に 2 種類の collagen が存在している．Type I collagen が約 80%，type III collagen が約 20%含まれている．Type I collagen は骨の有機成分の 90%を占めており，これに異常をきたすと osteogenesis imperfecta が発症することから type I collagen は骨形成において重要な役割を担っていることが分かる．Type I collagen は骨芽細胞と間葉系幹細胞の分化，増殖を誘導するためインプラントのコーティングに適していると言われている．一方，歯根膜に含まれる type III collagen の量（～20%）は，歯槽骨（～1%）やセメント質（～5%）に比べ非常に多い．Type III collagen は生体内では type I collagen と共存しており，幼若な組織や損傷治癒過程の組織に多く見られるが，やがて type I collagen に置換される．また，セメント質や骨に埋め込まれたシャーピー線維では type III collagen が検出される．Type III

collagen が欠損する vascular Ehlers-Danlos syndrome では，結合組織に異常をきたすことが報告されており歯周組織にも異常が見られる．さらに type III collagen は，骨芽細胞様細胞の増殖や分化を促進する．しかしながら，歯根膜中で多く見られる type III collagen が，歯根膜幹細胞に及ぼす影響は分かっていない．そこで研究では，足場材料の種類による歯根膜幹細胞の影響に着目し，異なる足場材料として Hap，type I 及び type III collagen が歯根膜幹細胞の細胞増殖能と骨形成能に与える影響について評価を行った．

【材料および方法】

水酸化カルシウム懸濁液にリン酸水溶液を滴下し，Ca/P 比が 1.67 になるよう混合，攪拌，静置をそれぞれ 24 時間行った．濾過残渣を数日乾燥させ，仮焼，分級後，120 MPa にて一軸加圧成形を行い，水蒸気雰囲気下 1250℃にて焼結させて HAp を作製し，XRD と FT-IR を用いて試料の評価を行った．HAp をコントロールとし，type I 及び type III collagen を HAp にコートした試料を作製した．Type I 及び type III collagen は、ニッタゼラチン社製の Cellmatrix Type I-C および Cellmatrix Type III を用いた．それぞれのコラーゲン溶液に HAp をティップコートした後に乾燥させ、コラーゲンコート試料とした．以下、各試料を Hap，Type I，Type III と記載した．コーティングの評価として SEM による表面構造解析と，FT-IR による成分分析を行った．各試料を洗浄し細胞実験用試料とした．

Wistar rat の上顎臼歯を抜歯後，酵素処理を行い，歯根膜幹細胞の単離・培養・継代を行った．1～4 継代目での歯根膜幹細胞の Runt-related transcription factor 2（RUNX2），osteopontin（OPN），F-spondin，S100A4，periostin の遺伝子発現量を real-time PCR にて評価した．

２継代目にて試料上に細胞を播種し，1，3 日後に MTT assay を用いて細胞増殖能の評価を行った．また，細胞播種後，コンフルエントになった後に分化培地に交換し 7，10，14 日後に alizarin red S にて染色を行い，染色された石灰化化合物を蟻酸，塩酸を用いて溶解した．415nm にて吸光度を測定し，歯根膜細胞の石灰化能の評価を行った．さらにそのメカニズムを調べるために 4，7 日後に real-time PCR を用いて alkaline phosphatase（ALP）と collagen type I alpha I（Col1a1）の遺伝子発現量を解析した．

【結果】

XRD による HAp の結晶構造分析では，ICDD に記載されている HAp と一致するパターンを認め，HAp 単相の結晶構造を示した．FTIR では，リン酸イオンおよび水酸化物イオンに一致するピークが観察され，作製した試料は HAp 単相であることが確認された．SEM によるコーティングの評価において，HAp は緻密な多結晶体であり，Type I，Type III では線維状の構造が観察でき，FT-IR による成分分析では，collagen の特徴である Amide I，II，III バンドに帰属するピークが観察され，$CH_2$，$CH_3$に帰属するピークも観察されたことからコーティングが適切に施されていることが確認された．

歯根膜幹細胞の最適な継代数を検討するため，real-time PCR を用いて骨芽細胞（RUNX2，OPN），セメント芽細胞（F-spondin），歯根膜細胞のマーカー（S100A4、periostin）の遺伝子発現量を測定したところ，それぞれ三継代目以降で大きな変化が見られた．

歯根膜幹細胞の細胞増殖能の評価では，HAp と Type I に比べ Type III では有意に高い値が得られた．さらに骨伝導能試験では，HAp と Type I で骨芽細胞への分化と骨形成能が促進され，Type III でそれぞれ抑制された．

【考察】

本研究では，HAp 基盤に collagen をコートした階層性モデルを用いた．多くの研究で HAp/collagen 複合体の骨再生への有用性が報告されているが，これらは HAp の持つ優れた骨伝導能の影響も考えられる．歯周組織では，歯根膜幹細胞が Hap，type I 及び type III collagen という足場材料に接着し，歯槽骨とセメント質の固定や恒常性の維持に貢献していることから，本研究では階層性生体材料を用い歯根膜幹細胞の機能評価を行った．

本実験で用いた歯根膜幹細胞は間葉系幹細胞と同様の多分化能を持つと考えられている．ラットより単離された歯根膜幹細胞を 1～4 継代まで継代し最適な継代数を検討したところ，RUNX2，OPN，F-spondin の遺伝子発現量は 3 継代目にて明らかな減少を認め，periostin，S100A4 では 3 継代目で大幅な増加が見られた．このことから初代細胞からの変化を最小限に抑えるための歯根膜幹細胞の最適な継代数は 2 継代目であることがわかったため，本研究では 2 継代目を使用した．

細胞増殖能試験では，type III collagen において初期接着と増殖能が有意に高い値を示した．損傷組織や幼若組織形成においては，type III collagen は細胞の足場として高い初期接着能と細胞増殖能を有し，組織再生に貢献していると考えられる．歯根膜のコラーゲンの代謝回転は歯肉の 5 倍，皮膚の 15 倍早いため，この非常に早い代謝回転が type I collagen への置換と type III collagen の減少を防ぎ，歯根膜幹細胞の細胞増殖能の高さを保っていると考えられる．以上より，type III collagen は歯根膜再生において重要な役割を持っていると考えられた．

石灰化能試験では，骨・セメント質の主成分である HAp と type I collagen 上での歯根膜幹細胞の石灰化能が促進された．遺伝子発現量の評価では，骨芽細胞分化マーカーである ALP と Col1a1 の発現量が有意に増加していた．この結果は HAp と type I collagen コーティングが骨芽細胞と未分化間葉系細胞の骨伝導能を促進するという報告と一致することから，これらは歯根膜幹細胞を用いた場合でも硬組織形成細胞分化および石灰化を促進させるため，硬組織再生のために有用なコーティング材料であると言える．これは歯根膜幹細胞が歯槽骨やセメント質表面で硬組織形成細胞に分化し石灰化を促進することを示唆している．

一方，type III collagen は有意に少ない石灰化量を示し，ALP と Col1a1 の発現量も有意に抑制された．歯根膜では type I collagen は type III collagen に覆われシャーピー線維として歯槽骨やセメント質に埋入されている．シャーピー線維は石灰化せずに埋入され硬組織を結びつけているため，type III collagen は歯根膜の石灰化を抑制していると考えられている．

本研究では，type III collagen が歯根膜幹細胞の分化と石灰化能を抑制しているため，type III collagen は歯根膜とシャーピー線維の石灰化を抑制し恒常性の維持に貢献していることを示唆していると考えられた．

細胞外基質と細胞の相互作用はインテグリンを介したシグナル伝達により制御されている．Collagen のインテグリン接着部位には RGD 配列と非 RGD 配列が存在するが，RGD 配列は通常 3 重らせん構造内に隠れており，熱処理などにより変性させなければ接着部位は露出しない．すなわ

ち，本実験において歯根膜幹細胞は非RGD配列であるGER配列に接着したと考えられる．Type I collagenとtype III collagenはそれぞれ異なるGER配列を含んでおり，それらはそのアミノ酸配列により異なるインテグリン親和性を持つことが報告されている．例えば，type I collagenにはGFOGER, GLOGER, GROGER, GMOGERなどが存在するが，type III collagenではGFOGER, GLOGERが存在しない．骨芽細胞や前駆細胞表面に存在するα2β1インテグリンはGFOGERと接着し分化を促進することやインプラント表面にGFOGERコーティングを施すとtype I collagenと比べ高い骨結合を示すことから，非RGD配列は細胞の接着，増殖，分化を制御していることがわかる．しかしながらtype III collagenに存在するインテグリン接着部位についてはいまだ多くは分かっておらず，おそらく接着部位の数や部位が細胞とtype III collagenの相互作用に影響を持つのではないかと考えられる．

以上より，type I collagen に接着した歯根膜幹細胞は硬組織形成細胞に分化し硬組織を形成するが，type III collagen は接着能を促進し石灰化抑制のために未分化の状態を維持することが分かった．繰り返されるコラーゲンの代謝回転は豊富な type III collagen と歯根膜幹細胞の相互作用のバランスを保ち，type III collagen は骨形成を抑制し歯周組織の恒常性の維持に貢献していることを示唆している．

【結論】

歯根膜幹細胞はtype I collagenに接着することにより骨芽細胞に分化し石灰化を促進し，type III collagenは歯根膜幹細胞の初期接着を促進し石灰化を抑制することが明らかとなった．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲第　5510　号 | 藤田　和久 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　和泉 雄一<br>副査　春日井 昇平　　宇尾 基弘 | |
| 論　文　題　目 | Regulation of periodontal ligament-derived cells by type III collagen-coated hydroxyapatite | |

（論文審査の要旨）

歯根膜は二つの硬組織に挟まれ一定の幅を保つ線維性結合組織で歯周組織の恒常性の維持を担っている．歯根膜には多分化能を有する歯根膜幹細胞が存在し，その接着や分化は足場材料により制御されるため，歯周組織再生を目的とする歯根膜幹細胞に適した生体材料の開発が必要とされている．近年，ハイドロキシアパタイトやリン酸カルシウムなどの，リン酸カルシウム系セラミックスが骨補填材として広く臨床応用されている．細胞は，細胞外基質にインテグリンを介して接着し，埋入型生体材料の損傷治癒過程を制御することが報告されている．細胞外基質の一つであり、歯根膜の主組織であるコラーゲン線維は，α1鎖とα2鎖のヘテロ三量体である TypeI コラーゲンと，α1鎖のホモ三量体である TypeIII コラーゲンにより構成されている．これらを生体材料として用いた際の歯根膜細胞の応答は不明であり，歯根膜再生を目的とした生体材料の設計のための基礎的知識が必要と考えられる．

歯根膜に含まれる type III collagen の量は，歯槽骨やセメント質に比べ非常に多い．Type III collagen は生体内では type I collagen と共存しており，幼若な組織や損傷治癒過程の組織に多く見られるが，やがて type I collagen に置換される．また，セメント質や骨に埋め込まれたシャーピー線維では type III collagen が検出される．Type III collagen が欠損する vascular Ehlers-Danlos syndrome では，結合組織に異常をきたすことが報告されており歯周組織にも異常が見られる．さらに type III collagen は，骨芽細胞様細胞の増殖や分化を促進するが，歯根膜中で多く見られる type III collagen が，歯根膜幹細胞に及ぼす影響は分かっていない．本研究は，上記のような状況を背景として，足場材料の種類による歯根膜幹細胞の影響に着目し，異なる足場材料として HAp，type I 及び type III collagen が歯根膜幹細胞の細胞増殖能と骨形成能に与える影響について検討を行ったものであり，この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって有意義なものと高く評価できる．

本研究は水酸化カルシウム懸濁液にリン酸水溶液を滴下し，Ca/P 比が 1.67 になるよう混合，攪拌，静置をそれぞれ 24 時間行い，生成物を仮焼，分級後，120MPa にて一軸加圧成形を行って水蒸気雰囲気下 1250℃にて焼結させ HAp を作製している．HAp をコントロールとし，type I 及び type III collagen を HAp にコートした試料を作製し，各試料を Hap，Type I，Type III とし，コーティングの評価として SEM による表面構造解析と，FT-IR による成分分析を行っている．

Wistar rat の上顎臼歯を抜歯後，酵素処理を行い，歯根膜幹細胞の単離・培養・継代を行い，1～4 継代目での歯根膜幹細胞の RUNX2，OPN，F-spondin，S100A4，periostin の遺伝子発現量を real-time PCR にて評価している．

２継代目にて試料上に細胞を播種し，1，3 日後に MTT assay を用いて細胞増殖能の評価を行うとともに，細胞播種後，コンフルエントになった後に分化培地に交換し 7，10，14 日後に alizarin red S にて染色を行い，染色された石灰化化合物を蟻酸，塩酸を用いて溶解し，415 度にて吸光度を測定し，歯根膜細胞の石灰化能の評価を行っている．さらにそのメカニズムを調

べるために 4，7 日後に real-time PCR を用いて ALP と collgen type I alpha I の遺伝子発現量を解析している．

以上のように，本研究は，周到な実験計画に基づいて行われており，妥当な方法によるものといえる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. XRD による HAp の結晶構造分析では, ICDD に記載されている HAp と一致するパターンを認め，HAp 単相の結晶構造を示した．
2. FT-IR では，リン酸イオンおよび水酸化物イオンに一致するピークが観察され，作製した試料は HAp 単相であることが確認された．
3. SEM によるコーティングの評価において, HAp は緻密な多結晶体であり, Type I, Type III では線維状の構造が観察でき, FT-IR による成分分析では, collagen の特徴である Amide I, II，III バンドに帰属するピークが観察され，$CH_2$，$CH_3$に帰属するピークも観察されたことからコーティングは適切に施されていることが確認された．
4. SEM によるコーティングの評価において, HAp は緻密な多結晶体であり, Type I, Type III では線維状の構造が観察でき, FT-IR による成分分析では, collagen の特徴である Amide I, II，III バンドに帰属するピークが観察され，$CH_2$，$CH_3$に帰属するピークも観察されたことからコーティングは適切に施されていた．
5. 歯根膜幹細胞の細胞増殖能の評価では，HAp と Type I に比べ Type III では有意に高い値が得られた．さらに骨伝導能試験では，HAp と Type I で骨芽細胞への分化と骨形成能が促進され，Type III でそれぞれ抑制された．

以上の研究結果から，歯根膜幹細胞は type I collagen に接着することにより骨芽細胞に分化し石灰化を促進し，type III collagen は歯根膜幹細胞の初期接着を促進し石灰化を抑制することが明らかとなった．コラーゲンコートを施した HAp 上での歯根膜細胞の挙動が明らかになったことは臨床的に非常に有益な情報であり，歯科補綴延いては歯学全般の進歩，発展に寄与するところは大である．よって本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 吉田　結梨子 |
| --- | --- |
| 論文審査担当者 | 主　査　　高橋　英和<br>副　査　　鈴木　敏彦、大木　明子 |
| 論　文　題　目 | Novel antibacterial mouthguard material manufactured using silver-nanoparticle-embedded ethylene-vinyl acetate copolymer masterbatch |

＜緒言＞

スポーツ用マウスガード(MG)はスポーツ時における口腔外傷から口腔内を保護する重要な役割を担っている。しかし使用後の MG は適切に洗浄されていないケースが散見され、細菌の増殖による口腔粘膜や歯への悪影響が懸念されている。そこで我々は長期的な抗菌効果の持続と使用後のメンテナンスの簡便化を目指し、MG 材料の母材に抗菌効果を付与する方法を検討した。母材には MG 材料として一般に広く使用されているエチレン-酢酸ビニル共重合体(EVA)を使用し、抗菌材料には細菌に対する広い抗菌スペクトル、耐熱性、高い抗菌持続性や生体安全性などの特徴を有する銀ナノ粒子を用いた。試作した試験片に銀ナノ粒子が適切に付与されていることを確認するため電界放出形走査電子顕微鏡(FE-SEM)およびエネルギー分散型 X 線 (EDS) 分析を行い、その後抗菌効果試験により試験片における抗菌効果の有無を評価した。また衝撃試験を行いプロテクターとして十分な耐衝撃性能を持つことを確認した後、銀ナノ粒子の溶出による人体への影響を考慮して銀粒子の溶出試験を行った。

＜材料および方法＞

抗菌材料として銀ナノ粒子 5000ppm 含有の EVA マスターバッチを加熱プレス機にて 22 MPa、120℃の条件下で 0. 3mm 厚の薄いシート状にした(Ag-EVA シート)。この Ag-EVA シートを市販 2mm 厚 EVA シート(ERK)と重ね合わせて再び加熱プレス機にて加熱成型し、片面が Ag-EVA シートからなる試作抗菌 EVA シートを作製した(NAE)。この NAE については溶融温度や表面張力の影響により加熱成形時にシート表面に EVA が流出し EVA 膜が形成されることが予測された。そこで NAE 表層部に形成された EVA 膜を取り除くため、有機質溶解作用を持つ市販 MG 表面処理剤(Finishing Liquid、Dreve)にて表面処理を施した試験片を用意した(TAE)。

(表面性状試験)

表面に銀ナノ粒子が露出していることを確認するため、NAE と TAE について FE-SEM および EDS 分析を行った。

(抗菌試験)

抗菌加工製品に対する抗菌性試験方法 ISO 22196 の手順に従い、ERK、NAE、TAE の 3 種類の試験片について抗菌効果を比較した。試験細菌には *Streptococcus sobrinus*、*Porphyromonas gingivalis*、*Escherichia coli* を用意し、試験片に 24 時間菌液を接種した後、*S. sobrinus*、*P. gingivalis*

を BHI 液体培地 *E. coli* を LB 液体培地でそれぞれ洗い流し、回収菌液を *S. sobrinus*、*P. gingivalis* は TS 血液寒天培地で、*E. coli* は LB 寒天培地で培養した。培養後に形成されたコロニー数をカウントし、24 時間培養を行った前後での生菌数の差から抗菌活性値を算出した。

(衝撃試験)

衝撃吸収能を調べるため、TAE、ERK および control(試験片を置かない状態)の 3 条件下で鉄球落下試験を行った。市販 MG 材料に関する過去の鉄球落下試験結果と比較するため、先行研究にならって試験片は直径 50 mm、2 mm 厚とした。鉄球は直径 20 mm、重さ 32.6 g からなるものを使用し、デュポン衝撃試験機にて 600 mm の高さから自由落下させた。衝撃強さは 3 つのロードセルセンサを用いて計測し、最初のピーク値を MIF、鉄球が接触してから MIF に達するまでの時間を MIF-t として計測を行った。

(溶出試験)

TAE からの銀ナノ粒子の溶出量を確認するため、*in vitro* で溶出量を確認した。試験片の寸法は 20 mm×30 mm、表面積は 600 $mm^2$となるようにした。ポリエチレン製容器中に 30 ml の純水を入れ、その中に試験片を浸漬した。浸漬から 1 日、7 日および 20 日後に、CCD マルチ ICP 発光分光分析装置を用いて溶液中の銀ナノ粒子濃度を計測した。

＜結果＞

(表面性状分析)

FE-SEM 分析の結果、表面処理を行わなかった NAE は表面滑沢で、境界不明瞭な白色点状の粒子が散在する像が観察されたが、EDS 分析では銀ナノ粒子の存在は示されなかった。一方、表面処理を行った TAE は表面が粗造となっており、銀ナノ粒子と推察される境界明瞭白色点状の像が観察され、EDS 分析から銀ナノ粒子の存在を確認できた。

(抗菌試験)

TAE では 24 時間培養後の細菌数は培養前に比べ *S. sobrinus*、*P. gingivalis*、*E. coli* すべての菌種において有意に減少しており、抗菌活性値はそれぞれ>3.4、>7.0、>6.3 であった。NAE では 3 菌種とも培養前より細菌数が増加しており抗菌作用は確認できなかった。

(衝撃試験)

ERK および TAE の MIF 値(mean±SD)はそれぞれ 366.6±12.2 N および 405.7±1.20 N であり、control 値(648.9±8.7 N)と比較して TAE では 37.5%の衝撃吸収能を有していた。また ERK および TAE の MIF-t 値はそれぞれ 0.45±0.02 ms および 0.39±0.01 ms で、control 値は 0.23±0.01 ms であった。TAE では MIF、MIF-t とも ERK と比較して衝撃吸収能の低下を認めた。

(溶出試験)

TAE からの銀ナノ粒子溶出濃度は浸漬 1 日、7 日および 20 日の時点でそれぞれ 0.0137 ± 0.0007 mg/L、0.02 ± 0.0007 mg/L および 0.0237 ± 0.0003 mg/L であった。

＜考察＞

(表面性状分析)

銀ナノ粒子の表層は常に強力なゼータ電位(+)を帯びており、これがマイナス電位を帯びた細菌の細胞膜に吸着することで細胞膜を破壊し、細胞を死滅させると報告されている。それゆえ効率的に抗菌効果を発揮させるためには銀ナノ粒子を MG 材料表層に露出させる必要がある。しかし MG を作製する上で必須工程である加熱成形によってシート表面に EVA 膜が形成されるので、この EVA 膜を除去する必要がある。我々は表層を覆う EVA 膜の除去に市販 MG 表面処理剤を利用した。今回使用した MG 表面処理剤のほかにも、他社 MG 表面処理剤や MG 研磨用ホイールも検討したが、いずれも FE-SEM および EDS 分析で銀ナノ粒子の露出を認めることはできなかった。MG 研磨用ホイールについては切削熱が原因で EVA 膜を適切除去できなかったものと考えられた。他社 MG 表面処理剤は配合成分の違いが影響したものと思われる。今回の実験では Finishing Liquid による表面処理で銀ナノ粒子を露出させることができることが確認されたが、より効率的に表面処理を行う方法についてさらに検討する必要がある。

(抗菌試験)

MG は数か月以上繰り返し使用され、清掃等のメンテナンスは使用者によって行われる。清潔に保管されないと細菌の温床となる場合があり、歯や口腔粘膜への為害作用が指摘されている。また MG 材料にプラークが堆積することで材料劣化が促進されることも懸念される。そこで今回、*S. sobrinus* (齲蝕病原細菌,グラム陽性)、*P. gingivalis* (歯周病原細菌,グラム陰性)、*E. coli* (一般細菌,グラム陰性)を用いて抗菌効果試験を行った。TAE での抗菌活性値は *S. sobrinus*、*P. gingivalis*、*E. coli* がそれぞれ >3.4、>7.0、>6.3 と、いずれも抗菌活性基準値 2.0 を上回り、十分な抗菌効果を有することが示された。*S. sobrinus* の抗菌活性値は低い傾向にあったが、これはグラム陽性菌細胞壁に存在する厚いペプチドグリカン層のために銀ナノ粒子による抗菌作用が発揮されにくいとする過去報告と一致した結果といえる。

(衝撃試験)

MG の使用目的は外傷から歯や口腔粘膜を守ることであり、高い衝撃吸収能は MG に求められる重要な機能である。今回の鉄球自由落下試験は過去データと比較できるよう、先行研究の測定条件に則って行った。その結果 MIF は control と比較して TAE では 37.5%の衝撃吸収能を認めた。また MIF-t も control 値の 1.75 倍であった。深沢らの報告によれば 12 種類の市販 MG 材料の MIF は 26-37%、MIF-t は 1.08～1.59 倍であった。したがって今回試作した TAE は市販 MG シートより衝撃吸収能はやや低下しているものの十分性能は保持していると考えられた。今後 TAE に占める Ag-EVA シートの厚みを抑えることや銀ナノ粒子含有量を低下させることで、衝撃吸収能を向上させることが可能であると考えている。

(溶出試験)

銀ナノ粒子は現在様々な分野で活用されているが、安全性については未だ明らかにされていない部分が多い。銀ナノ粒子の毒性は銀化合物に比べ毒性は低いとされているが、臨床応用を見据えて

安全性を確認することは必要不可欠である。WHO ガイドラインで人体に影響を及ぼす銀摂取量は生涯で 10 g 以上とされている。今回 20 日間で表面積 6 ㎠から溶出した銀量は 0.0237 ± 0.0003 mg/L であり、実際の MG 表面積は多く見積もって 200 ㎠であることを考えると極微量である。ただ今回の実験は *in vitro* での結果であり、 *in vivo* では唾液性状により違った結果が得られることも予想されるので、さらなる検討を加える必要がある。

＜結論＞

本 *in vitro* 研究の結果から、今回作製した銀ナノ粒子配合 EVA 材料は *S. sobrinus*、*P. gingivalis*、*E. coli* に対して有効な抗菌活性を示した。また衝撃吸収性能も市販 MG 用材料と同等であったことから、抗菌 MG 用材料として臨床応用可能と示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5511　号 | 吉田　結梨子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　高橋　英和<br>副　査　　鈴木　敏彦、大木　明子 | |
| 論 文 題 目 | Novel antibacterial mouthguard material manufactured using silver-nanoparticle-embedded ethylene-vinyl acetate copolymer masterbatch | |

（論文審査の要旨）

スポーツ外傷の予防装具であるマウスガード（MG）は国際歯科連盟 FDI の政策声明にも採択され、いまや世界各国で普及しつつある。本邦でもボクシングや格闘技、身体接触を伴うコンタクトスポーツを中心に義務化され、使用が推奨許可される競技も増加している。しかしその一方で、不適切な清掃保管に関わる衛生問題や汚染物付着による口腔への影響が問題視されている。そのため最近、専用の洗浄・除菌剤なども開発されているが、メンテナンス法として普及していないのが実情である。このような背景にもとづき、申請者である吉田は優れた抗菌性を有し、すでに生活用品への応用実績もある銀ナノ粒子に着目し、MG 材自体に抗菌性を付与することを着想し、本研究を行った。

試料作製にあたり、技術的にも難易度が高く、コスト面でも不利な混和法でなく、薄層マスターバッチ積層法を駆使した点が極めて独創的で、新規性が高いと判断された。また作製過程で母材の EVA 膜によって銀ナノ粒子が被覆され、機能性の発現阻害が生じる可能性を予見し、その解決法として表面処理剤を用いた化学的処理が適することを提示した点も高く評価できる。

抗菌試験も口腔内への装用とスポーツ現場を想定して、*S. sobrinus*、*P. gingivalis*、*E. coli* の３菌種を選択しており、実験の方法や解析手法も適切であった。また MG の最重要機能である衝撃吸収能についても評価し、生体安全性も溶出試験を通じて分析するなど、本研究が十分な学識と周到な準備計画のもとで行われたことが確認された。

得られた結果は以下の通りであった。

１）銀ナノ粒子 5,000 ppm 配合マスターバッチを応用した新規 MG 材料を作製した。

２）本材料の *S. sobrinus*、*P. gingivalis* および *E. coli* に対する抗菌活性値はそれぞれ＞3.4、＞7.0 および＞6.3 であった。

３）本材料の 2 ㎜厚衝撃吸収能は 37.5％を示し、母材性能を低下させることはなかった。

４）純水浸漬 20 日後の銀溶出濃度は 0.0237 mg/L とごく微量で、安全性が確認された。

本研究結果より、銀ナノ粒子配合マスターバッチを応用して市販 MG 材料そのものを抗菌化する手法の有効性と安全性が確認されたことから、今後の臨床応用が期待されるとともに、他

の口腔内装置への応用展開も可能と考えられた。

以上のように、抗菌性を有するマウスガード用熱可塑性弾性樹脂材料の新規開発を試みた本研究成果はマウスガードの高機能化、高付加価値化に資するもので、今後のスポーツ歯学の進歩発展に寄与するところが大きいと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求を行うにあたり十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 柳　綾香 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　川口　陽子<br>副 査　　原田　浩之　　水口　俊介 |
| 論　文　題　目 | Investigation of nutritional status using the Mini Nutritional Assessment-Short Form and analysis of the relevant factors in patients with head and neck tumour |

＜要旨＞

頭頸部腫瘍の治療に伴い，歯や顎骨を失った高齢患者は，低栄養となるリスクが高い．しかし，このような患者の栄養状態に関する報告はほとんどされていない．本研究の目的は，頭頸部腫瘍患者の栄養状態を Mini Nutritional Assessment-Short Form（MNA-SF）を用いて明らかにし，頭頸部腫瘍患者の栄養状態に影響を及ぼす因子を検討することとした．被験者は東京医科歯科大学歯学部附属病院顎義歯外来を訪れた患者のうち，46 名（平均年齢 74.7 歳）を対象とした．栄養状態は，MNA-SF を用いて評価し，ステップワイズ法による重回帰分析を用いて，MNA-SF スコアに影響を及ぼす予測因子を同定した．独立変数として，年齢，性別，顎義歯の使用経験，残存歯数，上下顎別切除部位，頸部郭清術の有無，治療方法を用いた．その結果，対象となった患者の約半数に低栄養の危険性があることが判明した．また，MNA-SF スコアの回帰式は，顎義歯の使用経験と頸部郭清術の有無の 2 つの独立変数を用いることで説明された．以上のことから，顎義歯の長期使用は栄養状態の改善に関与することが示唆された．　一方で，頸部郭清術の既往は栄養状態を低下させる可能性があることが示唆された．

＜緒言＞

高齢者において，低栄養状態は自立低下による要介護の上昇などをもたらす危険因子であり，口腔内状態によって影響を受ける可能性がある．　Doherty らは骨格筋量の減少や高齢者の歯の喪失が低栄養の危険因子になる可能性があると報告し，また，Cousson らは無歯顎患者が有歯顎患者よりも低栄養のリスクが高いと報告している．一方，菊谷らは歯数と栄養状態との間には関係がないと報告している．このように様々な報告があり，患者の口腔状態が栄養状態に及ぼす影響は未だ明らかにされていない．頭頸部腫瘍の発生率は年齢とともに増加するため，高齢者の増加に伴い頭頸部腫瘍の患者数は今後増加すると考えられる．一般的な高齢者と比較して，頭頸部腫瘍に罹患経験のある高齢者は，治療によって咀嚼，嚥下，発音機能に重度の機能障害を引き起こす可能性があるため，低栄養に陥る可能性が予測される．上顎または下顎に欠損のある患者の多くは，咀嚼，嚥下，発音の機能障害を補い，また，顔面の変形を改善するために顎義歯を使用しており，その有効性はこれまで多く報告されている．しかしながら，顎義歯の有無が患者の栄養状態を改善するかどうかは明らかにされていない．また，頭頸部腫瘍患者は，多くの場合，外科手術のみならず化学療法および放射線療法が併用されており，頭頸部腫瘍における治療方法と栄養との関連も未だ明らかにされていない．

高齢者の栄養スクリーニング検査には多くの方法があるが，その中でもアンケートは患者主導であり，簡単で非侵襲的な方法である．　低栄養の危険性がある患者を特定するためのアンケートであ

る Mini Nutritional Assessment-Short Form（MNA-SF）は，ヨーロッパ臨床栄養代謝学会（ESPEN; The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism）において推奨されている高齢者の栄養状態をスクリーニングする調査方法である．

本研究の目的は，MNA-SF を使用し患者の栄養状態を明らかにすること，また，頭頸部腫瘍患者の栄養状態に影響を及ぼす因子を検討することである．

＜方法＞

東京医科歯科大学歯学部附属病院顎義歯外来を受診した患者を調査した． 選択基準は，（i）65 歳以上であること；（ii）頭頸部腫瘍の診断を受けていること；（iii）顎顔面補綴治療の経験があることの３項目である． 除外基準は，日本語を話したり，読んだり，理解したりすることができないこととした．これらの基準に従い，2014 年 9 月から 2015 年 10 月までに 46 名の被験者（男性 19 名，女性 27 名，平均年齢 74.7 歳）を得た．各患者には本研究について口頭で説明をし，書面による同意を得た．本研究は，東京医科歯科大学歯学部倫理委員会（承認番号 D2014-076，旧 1079）によって承認を受けている．

MNA-SF は，低栄養のリスクがある患者をスクリーニングすることを目的として開発され，国際老年医学会から普及し，6 つの簡単な質問で構成され，5 分以内に実行できる． 最高得点は 14 点，最低得点は 0 点で，12～14 点のスコアは正常な栄養状態，8～11 点は低栄養の危険性，0～7 点は低栄養とされる．また，MNA-SF は，栄養状態を評価するのに有用である Body Mass Index（BMI）を考慮している． BMI では，18.5 未満の場合は低体重，18.5～25（普通体重），25 を超える場合は肥満とみなされる．本研究では，被験者の体重および身長を外来においてデジタル身長体重計（A&D Medical AD-6351; Tokyo, Japan）を用いて測定した．

統計分析には，ステップワイズ法による重回帰分析を用い，MNA-SF スコアに影響を及ぼす予測因子を同定した．説明変数として，年齢，性別，顎義歯の使用経験，残存歯数，上下顎別切除部位，頸部郭清術の有無，治療方法を抽出した．これらの変数を，独立した予測変数を特定するために重回帰モデルに投入した．性別（男性= 1，女性= 2），顎義歯の使用経験（使用していない= 0，1 年未満の使用= 1，1 年以上の使用= 2），上下顎別切除部位（上顎= 1，下顎= 2），頸部郭清術の有無（ある= 0，ない= 1），治療方法（外科的手術，化学療法および/または放射線療法= 0，外科的手術のみ= 1，根治的放射線治療法= 2）をカテゴリ変数とした．年齢および残存歯数は数値変数とした．また，MNA-SF スコアを従属変数とし，p 値が 0.05 未満において統計的有意性を示すものとした．統計分析には SPSS Statistics ソフトウェア（バージョン 21.0，IBM;東京，日本）を使用した．

＜結果＞

7 名の被験者が BMI25 以上，32 名が BMI18.5～25 であり，7 名が BMI18.5 未満であった． MNA-SF の結果は，25 名は正常な栄養状態，19 名は低栄養の危険性があり，2 名は低栄養であった．最も低いスコアは 7 点，最も高いスコアは 14 点であり，平均は 11.5 点であった．ステップワイズ法による重回帰分析により，MNA-SF スコアの予測因子として，顎義歯の使用経験および頸部郭清術の有無の２つを同定し，以下の回帰式を得た．

MNA-SF スコア= 9.682 + 1.546 ＊″顎義歯の使用経験″+ 1.813 ＊″頸部郭清術の有無″ $R^2$係数は 0.467 であり，自由度調整済み $R^2$係数は 0.442（$p < 0.01$）であった．

＜考察＞

MNA-SF スコアの結果より，被験者のほぼ半数（46 名中 21 名，45.7%）が低栄養であるか，低栄養の危険性があることが明らかとなった．この結果は，頭頸部癌患者の 35～60%が低栄養であることを示す以前の研究の結果とも一致した．一方で，BMI の結果より，被験者の 15.2%（46 名中 7 名）が低栄養となった．MNA-SF は，過去 3 ヶ月間の被験者の状態に加えて BMI 自体を考慮するため，BMI 単独で栄養状態を評価するよりも，より正確で有用な手段となる可能性が示唆された．

さらに，得られた回帰式（MNA-SF スコア= 9.682 + 1.546 ＊″顎義歯の使用経験″ +1.813 ＊″頸部郭清術の有無″）より，以下のことが示唆された．

1.顎義歯をより長く使用することは，MNA-SF スコアにとって正の要因である．

2.頸部郭清術の既往は，MNA-SF スコアの負の要因である．

項目 1 は，他の義歯に関する以前の報告と同様，顎義歯も使用に慣れるために患者が時間を必要とすることを示唆している．このことは，術後即時顎補綴装置などの積極的な介入が，高齢者の栄養状態を維持するのに役立つことを示し，そのためには頭頸部腫瘍患者の治療に携わる口腔外科や放射線治療などの他の医療スタッフとの連携が必要である．術前および術後の期間を通じて，切除範囲，再建範囲および創面の状態の情報の共有は，顎義歯の設計および作製のタイミングを予測する上で重要であると思われる．

項目 2 は，頸部郭清術が上下顎別の切除部位または治療方法よりも，栄養状態に強い影響を与えることを示唆している．頸部郭清術は，発音障害，咀嚼障害などの重篤な後遺症を引き起こす可能性があるため，医療従事者は術前に患者への十分な情報提供と，頸部郭清術を受けた患者が術後の皮膚や筋の拘縮を防止するためのリハビリテーションをできるだけ早期から介入し，嚥下機能を評価すべきである．一方，今回の重回帰分析では，残存歯数は予測因子ではないことが明らかとなった．これは，顎義歯を使用することで欠損側での咀嚼が可能となったり，患者自身で食形態を工夫し，咀嚼能力の低下を補償したためと考えられる．近年の嚥下食は摂食・嚥下障害の程度による分類に基づいて安全な食形態となっているだけではなく，見た目や味付けの改善が図られ，そのシェアを伸ばしており，薬局やスーパー，コンビニエンスストアでも容易に入手できるようになった．頭頸部腫瘍患者にこそ低栄養に陥ることなく健康を維持し，再発のリスクに備えるために十分な情報提供と食形態に関する指針が提供されなければならないと考えられる．

一方，患者が自分自身の低栄養の危険性を自覚することは困難であり，歯科治療に訪れる全ての患者の栄養状態を栄養士が把握することもまた困難である．したがって，患者の咀嚼機能ならびに摂食・嚥下機能向上のために定期的に診察する機会のある歯科医師は，患者の外見や会話からの栄養状態の変化に注意すべきである．

本研究では，得られた回帰式より MN-SF スコアを予測できるようになったが，これらの患者の栄養状態は様々な要因によって複雑になる可能性があるため，他の予測因子や異なる基準の検討を含むさらなる研究が必要である．

＜結論＞

顎義歯治療のために診察を受けた頭頸部腫瘍患者の約半数（45.6%）は，低栄養（4.3%）または低栄養の危険性（41.3%）があり，顎義歯をより長く使用することは栄養状態の改善に関与し，頸部

郭清術の既往は栄養状態を低下させる可能性があることが示唆された.

# 論文審査の要旨および担当者

| | | |
|---|---|---|
| 報告番号 | 甲第　5512　号 | 柳　綾香 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　川口　陽子<br>副 査　　原田　浩之　　水口　俊介 | |
| 論 文 題 目 | Investigation of nutritional status using the Mini Nutritional Assessment-Short Form and analysis of the relevant factors in patients with head and neck tumour | |

（論文審査の要旨）

頭頸部腫瘍の発生率は年齢とともに増加しており，高齢者の増加に伴い頭頸部腫瘍の患者数は今後増加すると考えられる．一般的な高齢者と比較して，頭頸部腫瘍に罹患経験のある高齢者は，外科治療や放射線治療などによって咀嚼，嚥下，発音機能に重度の機能障害を後遺する可能性があるため，低栄養に陥る可能性がある．上顎または下顎に欠損のある患者の多くは，咀嚼，嚥下，発音の機能障害を補い，また，顔面の変形を改善するために顎義歯を使用しており，その有効性はこれまで報告されている．

高齢者において，低栄養状態は自立低下による要介護の上昇などをもたらす危険因子であり，骨格筋量や歯の残存歯数などの口腔内状態が栄養状態に影響を及ぼす可能性が十分にあると考えられるが，高齢者の口腔内状態が栄養状態に及ぼす影響は未だ明らかにされていない．

本研究では，頭頸部腫瘍患者の栄養状態と顎義歯装着との関連に着目し，その栄養評価と栄養状態に影響を与える因子の検討を行っている．栄養学的観点から頭頸部腫瘍患者の治療による影響を包括的に調査し、影響を与える因子を探るという試みは独創性，新規性があると考えられ，高く評価される．

被験者は，本学歯学部附属病院顎義歯外来を訪れた患者のうち，①65 歳以上，②頭頸部腫瘍の診断を受けていること，③顎顔面補綴処置の経験があること，の３条件を満たす計 46 名を対象とした．これら被験者に対し，外来にて身長体重を測定し，質問表に MNA-SF を用い，統計処理にはステップワイズ法による重回帰分析を用い，MNA-SF スコアに影響を及ぼす予測因子を同定した．

本研究で得られた結果は以下の通りである．

１．対象となった患者の約半数に低栄養または低栄養の危険性があった．

２．MNA-SF スコアの回帰式は，顎義歯の使用経験と頸部郭清術の有無の２つの独立変数を用いることで説明された．

以上の結果より，顎義歯外来受診の頭頸部腫瘍患者の約半数に低栄養の危険性があり，顎義歯をより長く使用することは栄養状態の改善に関与し，頸部郭清術の既往は栄養状態を低下させる可能性あることが示唆された．

本研究は頭頸部腫瘍患者において，栄養状態の評価およびこれに影響を与える因子の検討を行

った独創性，新規性が高い研究であり，外来に通院する頭頸部腫瘍患者の約半数に低栄養の危険があること，また顎義歯を使用することが栄養状態に改善に役立つことを明らかにした．

口腔内状態が全身の機能に与える影響を解明していくことは歯科医学にとって有用であり，本研究は今後の歯科医学，医療，補綴歯科臨床の進歩に寄与すると考えられる．よって，本論文は博士(歯学)の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 西条　美紀 |
| 論文審査担当者 | 主査　高橋　英和<br>副査　宇尾　基弘　大槻　昌幸 |
| 論　文　題　目 | Evaluation of selected mechanical properties of NiTi rotary glide path files manufactured from controlled memory wires |

**緒言**：

グライドパス形成は、ニッケルチタンロータリーファイル（NiTi ファイル）の破折の危険性を軽減し、エラーを防止するため重要な手順である。また現在、NiTi 合金に対する熱処理がその機械的性質を向上させることから、各種の熱処理を施された NiTi ファイルが開発されている。これらの中で、Controlled Memory（CM）ワイヤー製の HyFlex CM や同ワイヤーの放電加工により製作された HyFlex EDM では、回転疲労抵抗性の向上や特有の構造特性が報告されている。これらに対応するグライドパス形成用の製品として、HyFlex GPF および HyFlex EDM Glide Path File が開発されている。

NiTi ファイルの破折は、ねじり負荷や回転疲労により生じ、根管内にファイルが引き込まれた際に生じる根尖方向の力（ねじ込み力）は、ねじり破折の一因とされている。グライドパス形成用ファイルは、湾曲狭小根管では破折の危険性が高いと思われることから、ねじり/回転疲労抵抗性が大きくねじ込み力の発生が少ないことが望ましい。往復回転は破折抵抗性を高め、ねじ込み力を減少させると報告されているが、グライドパス形成における往復回転の影響は評価されていない。

本研究は、(1) CM ワイヤー製グライドパス形成用ファイルの柔軟性や破折抵抗性に関連した機械的性質を評価すること、および(2) これらのファイルの回転疲労抵抗性とねじ込み力の発生に及ぼす往復回転の影響を調べることを目的とした。帰無仮説は、（i）被験ファイル間の機械的特性に差異はない。（ii）回転疲労抵抗およびねじ込み力の発生は、往復回転と連続回転とで差異はない、とした。

**材料および方法**：

HyFlex EDM Glide Path File（先端径 0.10 mm、5％テーパー; EDM）、HyFlex GPF（先端径 0.15 mm、2％テーパー; GPF）、Scout RaCe（従来型 NiTi 合金製、先端径 0.15 mm、2％テーパー; RaCe）を解析対象とした。

<u>曲げ試験</u>：自作型抗曲試験機を 37°C で使用し、ファイル（各 n = 10）を先端から 7 mm で固定し、たわみが 3.0 mm に達するまでファイル先端から 2 mm の点に荷重を加えた（速度 1.0 mm /min）。0.5 mm および 2.0 mm のたわみ（弾性領域および超弾性領域に対応）が生じた際の曲げ荷重を測

定した。
ねじり試験：ISO3630-1 に従い、ファイル先端から 3 mm を 2 rpm で時計回りに回転させ、破断時の最大トルクおよび回転角度を記録した（各 n = 10）。
回転疲労試験：自作型回転疲労試験機を 37°C で使用し、ファイル（各 n = 20）を湾曲率 60°、曲率半径 5 mm に設置し、往復回転（300 rpm、180 度反時計回りおよび 90 度反時計回り）または連続回転で回転させ、破断までの時間を記録した。
ねじ込み力測定：自作型根管形成・応力解析装置を使用した。ハンドピースを上下動（2 秒下降 1 秒上昇、10 mm/min）させながら往復または連続回転で根管模型を形成した（各 n = 20）。その際に生じる歯冠方向の力をねじ込み力と定義し、最大値を算出した。
統計解析：曲げ試験およびねじり試験では一元配置分散分析および Games-Howell 試験にて、回転疲労試験およびねじ込み力測定では二元配置分散分析および単純主効果検定（Bonferroni 補正）にて有意水準 5%で解析した。

**結果：**
曲げ試験：0.5 mm で GPF が EDM、RaCe より有意に低い曲げ荷重を示した。2 mm では EDM> RaCe> GPF であった。
ねじり試験：EDM の最大トルクが GPF、RaCe より有意に大きく、GPF の回転角度が EDM、RaCe より有意に大きかった。
回転疲労試験：破断時間は往復回転では EDM> GPF> RaCe であり、連続回転では EDM, GPF が RaCe より有意に長かった。EDM、GPF において往復回転は連続回転より長い破断時間を示した。
ねじ込み力の評価：ファイル間で有意差を認めたが、回転運動間では有意差が認められなかった。交互作用は認められなかった。EDM は GPF、RaCe と比較し有意に大きかった。

**考察**：
本研究の結果は、合金処理や製造過程の差だけでなく、ファイルの形状の相違などの影響も受けていると考えられるが、グライドパス形成における各ファイルの挙動を理解する上で有益な情報を提供していると思われる。
本研究の結果から、（i）EDM は GPF、RaCe より有意に大きな破断トルクを示し、往復回転時の破断時間が長く、ねじ込み力が大きいこと、（ii）GPF は、EDM、RaCe より有意に低い曲げ荷重および大きな回転角度を示し、RaCe より破断時間が有意に長いことが明らかになった。従って第一の帰無仮説は棄却された。さらに、EDM、GPF では往復回転での破断時間は連続回転と比較して有意に延長したが、ねじ込み力の最大値は回転運動に影響されなかったことから、第二の帰無仮説は一部棄却された。
曲げ荷重には、NiTi 合金の結晶構造やファイルの設計など、様々な要因が影響する。CM ワイヤーは体温でマルテンサイト相を含み、オーステナイト相に比べ低い荷重で変形する。さらに、マルテンサイト変態応力は、オーステナイト変態終了温度（A*f*）の上昇に伴い減少する。HyFlex EDM、HyFlex CM が高い A*f* を示すことが知られるため、GPF の低い荷重量は高い A*f* によると考える。また、EDM は 2.0 mm のたわみが生じる曲げ荷重が最も大きかったが、これは EDM の大

きなテーパーによると考えられる。

ねじり試験では、先端 3 mm での直径が最も大きい EDM が、最大トルクを示した。これは、最大トルクがファイルの直径の増加に比例するとの報告で説明される。GPF は最も大きな回転角度を示したが、これは CM ワイヤーの優れた柔軟性によると考えられる。GPF と RaCe は同様の最大トルクを示したが、これは 2 種の Typhoon ファイル（CM ワイヤーと従来の NiTi ワイヤー製）でトルク値が類似しているとの報告と同様の所見である。

回転疲労試験では EDM と GPF が優れた破折抵抗性を示したが、これは CM ワイヤーの A*f* が高く体温でマルテンサイト相が含まれるためと考えられる。また、過去の研究と同様、往復回転の場合、EDM は GPF より高い回転疲労抵抗性を示した。しかし、連続回転下では EDM と GPF との間に有意差が認められなかった。これには、テーパーの増加に伴い回転疲労抵抗性が低下するとの報告から、EDM の大きいテーパーが関連したと考えられる。EDM、GPF において往復回転では連続回転より破断時間が長かったが、これは往復回転が亀裂の伝播を遅延させるとの報告と一致する所見である。

EDM は GPF、RaCe と比較し大きなねじ込み力を示したが、これは EDM の大きなテーパーに起因すると考えられる。そして、同様の断面形状、先端サイズ、テーパーを有する GPF と RaCe にはねじ込み力に有意差は認められなかった。また、往復回転と連続回転でねじ込み力に有意差はみられなかったが、これはファイルと根管模型のサイズ（＃15、0.02 テーパー）が近似しており、ねじ込み力がファイルの上昇時に容易に解放されたためと思われる。

本研究の結果は、CM ワイヤー製ファイルは従来の NiTi ファイルと比較して破折抵抗性が向上しており、湾曲根管の形成に臨床的利点を有することを示唆するものである。また EDM の大きなテーパー（5%）は、ねじれ破壊抵抗性の増加に加え、テーパーの大きなグライドパス形成が可能という臨床的利点を有している。またグライドパスファイルの柔軟性がトランスポーテーション量に影響を与えないことから、EDM の低い柔軟性は、根管成形能にほとんど影響しないと思われる。しかし、大きなねじ込み力はねじり疲労や根尖孔を越えた器具操作に関連する可能性があるため、EDM の臨床使用中に際して大きなねじ込み力の発生を考慮すべきである。

本実験条件下では、以下の結論が得られた。

(i) EDM および GPF は、RaCe と比較して曲げ荷重が小さく、また回転疲労破折およびねじり破折に対する抵抗性は大きかった。しかしながら、EDM は GPF および RaCe よりも大きいねじ込み力を発生させた。

(ii) 往復回転では、連続回転と比較して、EDM および GPF における回転疲労抵抗性が向上した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲第　5513　号 | 西条　美紀 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　高橋　英和<br>副査　宇尾　基弘　大槻　昌幸 | |
| 論文題目 | Evaluation of selected mechanical properties of NiTi rotary glide path files manufactured from controlled memory wires | |

（論文審査の要旨）

グライドパス形成は、ニッケルチタンロータリーファイル（NiTi ファイル）の破折の危険性を軽減し、エラーを防止する重要な手順として近年重要視されている。また NiTi ファイルの改良に関する最近の動向として、NiTi 合金に対する熱処理が柔軟性や破折抵抗性を向上させることが注目を集めており、各種の熱処理が施されたさまざまな NiTi ファイルが開発されている。本研究は、NiTi ファイルを用いた根管形成に関するこれらの潮流を踏まえ、近年開発された Controlled Memory（CM）ワイヤー製の二種のグライドパス形成用ファイル、すなわち HyFlex GPF（GPF）および HyFlex EDM Glide Path File(EDM)に着目して、これらの機械的特性の多面的な解析に取り組んだものであり、タイムリーかつ充分な新規性を備えた内容となっている。

とりわけ、NiTi ファイルの根管内破折の問題は未だに十分解決されていない。本研究はこの点に特に着目し、ねじり疲労と回転疲労の両面からグライドパス形成用ファイルの破折抵抗性を評価している。特にねじり疲労については、ねじり試験に加えてねじ込み力（根管内にファイルが引き込まれた際に生じる根尖方向の力）の発生についても測定するとともに、破折抵抗性向上への寄与が近年注目されている往復回転運動の効果についても解析しており、グライドパス形成用ファイルの安全な臨床応用に資する基礎的検討が多角的に実施されている点で高く評価できる。

本研究では EDM、GPF、および対照群として Scout RaCe（従来型 NiTi 合金製、以下 RaCe）を解析対象としており、素材、形状などの異同に配慮した適切な実験群が設定されている。また、試験法として曲げ試験、ねじり試験、回転疲労試験、ねじ込み力測定が採用されており、柔軟性や破折抵抗性に関わる機械的性質が多面的に評価されている。さらにねじ込み力測定では、ペッキングモーションをシミュレートした動作が可能な独自の根管形成・応力解析装置が用いられており、臨床的な動作を客観的かつ規格化された条件で再現し解析した点は高い評価に値する。得られた結果に対する統計処理も適切に行われている。

得られた結果の概要は以下の通りである。

1.　曲げ試験：0.5 mm で GPF が EDM、RaCe より有意に低い曲げ荷重を示した。2 mm では EDM> RaCe> GPF であった。

2.　ねじり試験：EDM の最大トルクが GPF、RaCe より有意に大きく、GPF の回転角度が EDM、RaCe より有意に大きかった。

3.　回転疲労試験：破断時間は往復回転では EDM> GPF> RaCe であり、連続回転では EDM, GPF が RaCe より有意に長かった。EDM、GPF において往復回転は連続回転より長い破断時間

を示した。

4.　ねじ込み力の評価：ファイル間で有意差を認めたが、回転運動間では有意差が認められなかった。交互作用は認められなかった。EDM は GPF、RaCe と比較し有意に大きかった。

以上の結果は、EDM および GPF は従来型の RaCe と比較して破折抵抗性が向上しており、湾曲根管の形成に臨床的利点を有することを示唆するものである。加えて、往復回転がファイル破折防止に有用であることを明らかにしている。これらの結果に対する考察は、加熱処理に伴う相変態温度の変化が曲げ荷重や回転疲労抵抗性の相違に及ぼす影響、各被験ファイルのねじ込み力の相違に関わる因子、往復回転で高い回転疲労抵抗性が得られる理由などから構築され、いずれも先行研究の知見と対比しながら実験結果を理論的に分析したもので、適切かつ興味深い内容となっている。

以上のように、本研究は CM ワイヤー製グライドパス形成用ファイルの臨床的有用性や安全性に関して極めて有益な情報を提供しており、歯科医学・医療の今後の発展に寄与するところが大きいと考えられる。従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求するに十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 田端　倫子 |
| 論文審査担当者 | 主 査　倉林　亨<br>副 査　宇尾　基弘　　砂川　光宏 |
| 論　文　題　目 | Assessment of enamel cracks at adhesive cavosurface margin using three-dimensional swept-source optical coherence tomography |

（論文内容の要旨）

**＜緒言＞**

接着技術の進歩により、歯冠色の審美的修復材料を用いた侵襲性の少ない歯科治療が可能になり、直接法コンポジットレジン修復の適応症は、隣接面接触点や歯頸部を含む大きな歯質の喪失を伴う症例に拡大している。しかしながらコンポジットレジンは重合収縮するため、接着界面にギャップまたは接着修復窩縁部にエナメル質亀裂が生じることがある。臨床にてコンポジットレジン修復の窩縁にエナメル質亀裂が生じると、修復物辺縁部はやや白く見え、窩洞表面エナメル質の微小亀裂は術後疼痛ならびに二次齲蝕を生じる可能性がある。重合収縮応力の大きさは窩洞形態、コンポジットレジンの組成、硬化特性、ならびに光照射法など、多くの因子に依存しているが、光照射の方法や強度よりもむしろコンポジットレジンの性質が収縮や白線の形成に有意に影響を及ぼすことが報告されている。

エナメル質は主に微細構造異方性を有する高濃度に無機質を含む小柱から成り、歯頸部エナメル質はランダムに配向したハイドロキシアパタイト結晶と非定形エナメル小柱を含んでいる。エナメル質の位置における構造的な違いは、エナメル質亀裂の発生に潜在的に影響を及ぼす可能性があるが、これまでの文献では限られた情報しかない。

波長走査型光干渉断層計（SS-OCT）は、生体に無害な近赤外光と光学干渉計の応用により、被写体内部から得られた後方散乱光を解析することで、非破壊、非侵襲的に組織の精密断層像を得ることができる。本研究は SS-OCT を用い、コンポジットレジン修復の窩縁におけるエナメル質亀裂を観察し、窩洞の位置と選択的リン酸エッチングの影響を評価した。

**＜材料と方法＞**

1）<u>SS-OCT 観察</u>

本研究で用いた SS-OCT は、中心波長 1310 nm、波長走査幅 1240 nm～1380 nm、掃引速度 50 kHz であり、分解能は空気中で深さ方向 11 μm、水平方向はいずれも約 40 μm である。SS-OCT を用いて試料の 3D OCT 画像構築を行い、そこから断層画像を抽出した。

2）<u>窩洞形成と SS-OCT を用いたエナメル質亀裂の評価</u>

本研究では牛切歯を使用し、エナメル質の歯冠中央部ならびに歯頸部に、注水下でダイヤモン

ドバー（＃SF440）ならびにカーボランダムポイント（＃SF22）を用いて直径 3 mm、深さ 2 mm の皿状窩洞を形成した。窩洞形成後の全ての窩洞を SS-OCT にて観察し、形成によって窩縁エナメル質に亀裂が生じていないものを選択し、60 個の窩洞を用意した。歯冠中央部と歯頚部でそれぞれ無作為に 15 個の窩洞を選択し、窩縁エナメル質を 40%リン酸（K-etchant Gel、Kuraray Noritake Dental）にて 10 秒間処理を行った。メーカー指示通りに 60 個全ての窩洞を 2 ステップのセルフエッチングプライマー接着材（Clearfil SE Bond、Kuraray Noritake Dental）で処理し、フロアブルコンポジットレジン（Estelite Flow Quick A2 シェード、Tokuyama Dental）を一括充填し、光照射器（Optilux 501、550~600 mW/cm$^2$、Kerr Corporation）を用い、20 秒間照射した。コンポジットレジン修復を行った窩洞の表面は注水下でシリコーンポイントを用いて研磨し、余剰な接着材およびコンポジットレジンを除去した。修復を行った窩洞について、窩洞の位置（歯冠中央部または歯頚部）ならびにエナメル質の選択的リン酸エッチング（有り または無し）による 4 つの群（n=15）を設けた。37℃水中にて 7 日間保存した後、SS-OCT を用いて試料の 3D 画像構築を行い、得られた画像から窩洞の断層画像を抽出して観察を行い、窩縁の円周に沿ったエナメル質亀裂の有無と拡がりについて 5 段階（0：亀裂なし、1：窩縁の 1/4 までの亀裂、2：窩縁の 1/4～1/2 の亀裂、3：窩縁の 1/2-3/4 の亀裂、4：窩縁の 3/4 以上の亀裂）に分類し評価した。

3）<u>レーザー顕微鏡観察</u>

SS-OCT 画像のエナメル質亀裂と比較するため、SS-OCT により観察されたエナメル質亀裂を有する 5 つの窩洞を各実験群から選択し、抽出した断層画像と一致するように切断面を鏡面研磨し、240 倍にて共焦点走査型レーザー顕微鏡（CLSM）で観察した。

4）<u>統計分析</u>

Bonferroni 補正を用いた Wilcoxon 順位和検定を行った。分析において有意水準は $\alpha = 0.05$ に設定し、統計的ソフトウェアパッケージ（SPSS）を用いて行った。

＜結果＞

SS-OCT によりコンポジットレジン修復窩縁のエナメル質亀裂の検出が可能であった。エナメル質亀裂は SS-OCT 画像にて信号強度の増加した明るい線として明確に識別された。歯頚部の窩洞では歯冠中央部よりも有意にエナメル質亀裂が生じていた（$p<0.05$）。また選択的リン酸エッチングをエナメル質に行うと、エナメル質亀裂は有意に増加していた（$p<0.05$）。

SS-OCT 画像において白線として観察したエナメル質亀裂の部位を半切し、CLSM により観察すると、SS-OCT 画像と一致して亀裂の存在が確認された。エナメル質亀裂は、主に窩縁に隣接して始まり、エナメル象牙境に向かって延び、時には接着界面にまで達する様子が確認された。

＜考察＞

コンポジットレジン修復窩縁部でのエナメル質の微小亀裂ならびに辺縁漏洩は、二次齲蝕や歯髄刺激を引き起こすことがある。辺縁漏洩は修復材料のエナメル質に対する接着性に依存するが、優れた接着性能を有する現在の接着材を用いてもエナメル質に亀裂が生じることがあり、窩縁エナメル質亀裂の防止は接着歯学における課題となっている。本研究では 3D SS-OCT を用いてエ

ナメル質窩縁の亀裂を観察し、窩洞の位置ならびに選択的リン酸エッチングによる影響を評価した。その結果、SS-OCT 画像ではエナメル質亀裂面からの反射シグナルが強く白線となり、健全なエナメル質や界面のギャップと区別して検出できることが明らかとなった。白線の形成に関与する因子として、試料作製中にダイヤモンドバーによって生成される微小な亀裂が挙げられるが、本研究では窩洞形成後にエナメル質窩縁を SS-OCT にて観察し、亀裂のみられる窩洞は実験から除外している。

本研究では粘弾性緩和メカニズムは考慮していないが、光重合型フロアブルコンポジットレジンの使用は、従来の光重合型コンポジットレジンの一括充填に比べて、重合収縮による応力の緩和を可能にするとされている。コンポジットレジンの重合収縮はゲル化後に起こり、その硬化が応力の蓄積をもたらし、辺縁封鎖の完全性を損なう。エナメル質への接着や接着材とコンポジットレジンの共重合が強く、重合収縮応力に抵抗すると、エナメル質および接着界面に沿って応力が発生する。したがって光重合型コンポジットレジンのエナメル質に対する化学結合がエナメル小柱の破壊靭性よりも大きい場合には、コンポジットレジン表層の重合収縮により、辺縁のエナメル小柱と隣接する小柱が分離する可能性がある。また光重合型コンポジットレジンは化学重合型よりも高い重合収縮応力を生じることが指摘されている。

本研究の結果から、窩縁におけるエナメル質亀裂の発生は、窩洞の位置や窩洞壁におけるエナメル小柱の方向性に依存しており、また選択的エナメル質リン酸エッチングの併用は、セルフエッチング接着材を用いた接着修復物において隣接するエナメル質の状態を脆弱化させた可能性がある。セルフエッチング接着材のみの使用においても、発生は少ないもののエナメル質亀裂は歯冠中央部と歯頚部の両窩洞に生じていた。一方、非切削エナメル質におけるセルフエッチング接着材の使用は、コンポジットレジン修復辺縁部に着色を生じることがあり、特にコンポジットレジン充填が窩洞から溢れて非切削エナメル質上に及んだ部位に多くみられる。またセルフエッチング接着材の使用はメーカー指定通りに厳密に従っても、エナメル質での辺縁漏洩を防ぐことができないという報告がある。エナメル質辺縁の封鎖性の観点から、非切削エナメル質の選択的リン酸エッチングの臨床的効果は、セルフエッチング接着材よりも優れているといわれている。したがって、形成された窩洞辺縁のエナメル質の選択的リン酸エッチングは、主にコンポジットレジンが延在する非切削エナメル質において特に効果的であり、窩洞面エナメル質を保護しながら、エナメル質に良好な接着を提供することができると考えられる。コンポジットレジン修復辺縁における白線の形成を防止するためには、さらなる研究が必要である。

本研究では、歯頚部領域は歯冠中央部よりもエナメル質の亀裂を生じやすい傾向がみられた。マイクロラジオグラフィーによる研究では、歯頚部エナメル質のミネラル含有量は歯冠部領域よりも低く、それは歯頚部エナメル質における炭酸イオンやマグネシウムの高い含有量と相関していることが報告されている。アパタイト格子構造に組み込まれた炭酸イオンは、リン酸エッチングに対してより高い感受性を示すものと思われ、歯頚部エナメル質の化学的安定性に影響を及ぼす可能性がある。歯頚部領域においてエナメル質亀裂の頻度が高いのは、リン酸エッチング後のエナメル質の脆弱化によるものと推察される。

本研究の結果、コンポジットレジン修復のエナメル質窩縁に生じる亀裂は SS-OCT によって白線として明確に観察することができ、また亀裂の発生状況は窩洞形成の位置と窩壁面の接着処理

によって異なっていた。したがってコンポジットレジン修復においてエナメル質窩縁を保護するためには接着処理方法の改良が望まれ、さらなる研究が必要と思われた。

＜結論＞

3D SS-OCT はコンポジットレジン修復窩縁のエナメル質亀裂を非侵襲的に検出する上で有効であった。エナメル質亀裂の発生程度は、窩洞の位置と接着手順に依存していた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5514　号 | 田端　倫子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　倉林　亨<br>副　査　宇尾　基弘　　砂川　光宏 | |
| 論 文 題 目 | Assessment of enamel cracks at adhesive cavosurface margin using three-dimensional swept-source optical coherence tomography | |

（論文審査の要旨）

直接法コンポジットレジン修復は審美的修復として多くの症例に使用されるが、重合収縮応力により接着界面のギャップや窩縁部エナメル質の亀裂を生じることがある。エナメル質の亀裂は修復物周囲に白線となって現れ、その発生にはエナメル質の歯冠部における部位や小柱の走行が潜在的に影響を及ぼす可能性がある。一方、波長走査型光干渉断層計（SS-OCT）は被写体内部から得られた後方散乱光を解析することで、非破壊、非侵襲的に組織の精密断層像を得ることができる新しい技術として注目されている。本研究は光学画像機器の発展を背景に、審美修復として使用頻度が増加したコンポジットレジン修復における臨床的課題を捉えて計画し、遂行されたものである。

実験は牛抜去歯を用いており、規格窩洞を形成し均一な実験条件を得る上で適切な選択といえる。歯冠中央部と歯頚部に窩洞を形成しエナメル質の位置による影響を、またセルフエッチング接着材にエナメル質にリン酸エッチングを行った場合の違いを比較しており、申請者が接着修復における深い知識を有し、また知見を得るために慎重に実験を計画したことが推察される。エナメル質亀裂の観察には SS-OCT による 3D 画像構築を行い、そこから窩縁部の水平断層画像を抽出して行っており、新しい試みとして評価できる。また得られた SS-OCT 画像から窩縁部エナメル質の亀裂の拡がりを 5 段階に分類し、統計処理を行っていることも適切な方法である。

本研究から得られた主な結果は以下のとおりである。

1．SS-OCT によってコンポジットレジン修復窩縁のエナメル質亀裂を検出することができた。

2．歯頚部エナメル質では歯冠中央部よりも有意に多くエナメル質亀裂が生じた。

3．エナメル質の選択的リン酸エッチングを行うと、エナメル質亀裂が増加した。

本論文の考察は、3D SS-OCT を用いたエナメル質亀裂の観察の有用性、光重合型コンポジットレジンの重合収縮力がエナメル質に及ぼす影響とメカニズム、選択的リン酸エッチングの効果とセルフエッチング接着材のエナメル質への接着、歯頚部と歯冠中央部のエナメル質の相違などから構築され、いずれも過去の文献の結果と対比しながら理論的に実験結果を分析しており、興味深い内容となっている。いまだ明確な臨床指針が示されていない選択的リン酸エッチングの有用性についても、示唆に富む考察がなされており、極めて臨床的な価値の高い研究

であると評価される。

以上のように、本論文は、コンポジットレジン修復における臨床技法の開発に資する多くの新しい知見を提供するものであり、得られた研究成果は、歯科保存学のみならず歯科医学全般の発展に大きく寄与するものと評価された。よって本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 南淵　眞愛 |
| 論文審査担当者 | 主査　水口　俊介<br>副査　山下　仁大　　若林　則幸 |
| 論　文　題　目 | Evaluating the optimal design of zirconia based resin-bonded fixed dental prostheses using finite element analysis |


【要旨】

近年広く臨床で用いられている接着ブリッジ（以下：RBFPDs）は，歯質切削量が少なく低侵襲であるが，従来型のブリッジに比べて脱離しやすいという欠点がある．そこで，本研究は有限要素法を用いて，ジルコニア接着ブリッジの最適デザインを検討することを目的として行った．

フレームは補助的維持装置有り，無しの 0.5 ㎜厚イットリア安定型正方晶ジルコニア多結晶体（以下：Y-TZP）フレーム（0.5Y，　0.5Y(-)），　補助的維持装置有りの 0.5 ㎜厚セリア安定型正方晶ジルコニア多結晶体アルミナナノ複合体（以下：Ce-TZP/Al）フレーム（0.5C），補助的維持装置有り，無しの 0.3 ㎜厚 Ce-TZP/Al フレーム（0.3C，0.3C(-)）　の 5 種類とし，荷重を加えた際に 11MPa 以上の剪断応力が加わった接着レジンセメントの体積の割合を算出した．セメント層に生じた剪断応力の割合は，0.5Y，0.5C，0.3C，0.5Y(-)，0.3C(-)でそれぞれ 2.93 ％，1.43 ％，1.79％，3.03 ％，1.81 ％であったことから，　0.3 ㎜厚の Ce-TZP/Al 接着ブリッジフレームが有用であることが示唆された．


【緒言】

上顎前歯の欠損補綴には固定性ブリッジ，可撤性義歯，インプラントなどの治療法がある．固定性ブリッジの中でも RBFPDs は，低侵襲で審美的なことから広く臨床で用いられている．その一方で，従来型ブリッジと比較して脱離が多いという欠点もある．

近年，　Y-TZP が機械的強度，審美性，生体親和性に優れているため，金属の代替材料として普及してきている．Y-TZP は RBFPDs のフレーム材料としても用いられるが，厚さを 0.5 ㎜に設定することが可能であり，金属フレームと比較して薄くできるため RBFPDs の適応範囲が広がってきた．

RBFPDs の予後を改善するためには，歯周組織への影響が少なく，脱離しにくいフレーム設計を検討する必要がある．RBFPDs として従来用いられている両持ち設計に比べ，片持ち設計は脱離が少ないとの臨床報告を多く認めるが，片持ち設計では，支台歯に回転力が作用し，支台歯の動揺度が増加する危険性があるため，より脱離の危険性が少ない両持ち設計のフレームデザインを確定する必要がある．

ブリッジ脱離の原因となる過度な応力集中によるセメント層の破壊に着目して，両持ち設計の

ブリッジフレームデザインについて客観的評価を行った研究は少ない.

そこで，本研究は，材料あるいはデザインの異なる５種類の RBFPDs のフレームにおけるフレームのひずみ，セメント層の応力を有限要素法にて観察し，フレームの脱離のリスクを軽減する最適なフレーム設計について検討を行った.

【材料および方法】

１．三次元画像構築

本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て（承認番号　第１１７３号），東京医科歯科大学医歯学総合研究科顎顔面解剖学分野保管のヒト乾燥頭蓋骨をマイクロフォーカス X 線 CT システム（inspeXioSMX-100CT，島津製作所，以下：μCT）にて撮像した．データ上で上顎左側側切歯（#22）を削除し１歯欠損モデルとし，３D プリンタ（Objet500 Connex，ストラタシス）を用いてレジン製模型を作製した.

２．支台歯形成

上顎左側中切歯（#21）および上顎左側犬歯（#23）に対し，RBFDPs のための支台歯形成を行った．口蓋側は厚さ 0.5 mm のベニア形成を行い，近遠心隣接面に幅 0.5 mm、長さ 4.0 mm（#21），幅 0.5 mm，長さ 3.0 mm（#23）のグルーブを平行に形成した．基底結節部に直径 1.0 mm，深さ 0.5 mm のホールを形成し，CEJ から 1.0 mm の位置に幅 0.5 mm のシャンファー形成を行った.

アクリルレジン（パターンレジン，ジーシー）を用い，補助的維持装置有り，無しの 0.5 mm厚 Y-TZP フレーム(0.5Y,　0.5Y(-))，補助的維持装置有りの 0.5 mm厚 Ce-TZP/Al フレーム(0.5C)，補助的維持装置有り，無しの 0.3 mm厚 Ce-TZP/Al フレーム（0.3C, 0.3C(-)）の５種類のフレームを作製した.作製した各フレームを模型上に装着し，μCT にて撮像を行った(tube current: 60 μA, tube voltage: 60 kV, scaling coefficient: 100, voxel size: 0.029 mm/voxel, FOV: 30.0×30.0×27.7 mm, geometric magnification: 1.93, slice thickness: 0.032 mm).

３．三次元モデルの作製

模型，フレームのスキャンデータとヒト乾燥頭蓋骨のスキャンデータを重ね合わせ，エナメル質，象牙質，歯根膜，皮質骨，海綿骨，接着性レジンセメント（Panavia F 2.0，クラレノリタケデンタル），Y-TZP および Ce-TZP/Al の各構造における境界設計を行った.

４．有限要素解析

ボクセルサイズは一辺 120 μm の立方体とし，歯の接着界面からセメント層，形成面のエナメル質層を厚み 120 μm に設定した．各物性値は，均質で等方性を持ち線形弾性（歯根膜のみ 2 相性）とし，拘束点は上顎骨の上面とした．前歯部における最大咬合力を模し，200 N をポンティック基底結節部に長軸から 45° の方向より荷重した.

ソフトウェア（TRI/3D-BON-FCS，ラトックシステムエンジニアリング）にて各フレームの最大主ひずみと，セメントの剪断応力，11 MPa 以上の値を示すセメントのボクセル数の割合を計測した.

【結果】

荷重を加えた際に 11MPa 以上の剪断応力が加わった接着レジンセメントの体積の割合を算出し

た結果，セメント層に生じた剪断応力の割合は，0.5Y で 2.93%，0.5C で 1.43%，0.3C で 1.79%であった．

セメント層に発生するせん断応力は，欠損側の中切歯と犬歯で高い応力集中を示した． 補助的維持装置の有無で比較すると，セメント層に生じた剪断応力の割合は，0.5Y(-)では 3.03%，0.5Y では 2.93%，0.3C(-)では 1.81%，0.3C では 1.79%であった．

補助的維持装置無しの 0.3mm 厚の Ce-TZP/Al フレーム（0.3C(-)）では，セメント層に発生するせん断応力が 11MPa を超える割合は，補助的維持装置有りの 0.5mm 厚の Y-TZP フレームよりも小さかった．

【考察】

荷重時のひずみを解析する方法として，有限要素法，光弾性法，ひずみゲージ法があり，有限要素法は複雑な構造の場合でも任意の部位におけるひずみ，応力の分布を観察できる．本研究では口腔内環境を再現するため，CT データにて有限要素モデルを構築した．

Motta らはポンティック部に荷重が加わった時に，支台歯とポンティックの連結部に最大のひずみが現れると報告している．また，ポンティック部に単独に荷重した時にフレームのひずみが最大になると述べている．そこで，本実験では最も過酷な条件をシミュレートするためにポンティックの舌側基底結節部に前歯の最大咬合力と考えられている 200N の荷重を加えた．

11MPa 以上の剪断応力が加わった接着レジンセメントの体積の割合は,0.5Y で 2.93%，0.5C で 1.43%，0.3C で 1.79%であった．本研究では，0.5C および 0.3C のせん断応力は 0.5Y のせん断応力よりも小さかった．フレームの変形を抑制すると，セメント層に発生するせん断応力を低減することができる．Ce-TZP/Al の弾性率は Y-TZP より大きいため，Ce-TZP/Al を用いた場合に，剥離に影響を及ぼすせん断応力を低減できたと考えられる．

Nair らは補助維持装置を付与すると維持力が約 2.5 倍に改善されたと報告している．11MPa 以上の剪断応力が加わった接着レジンセメントの体積の割合は，0.5Y および 0.5Y(-)で，それぞれ 2.93%および 3.03%であった．0.3C および 0.3C(-)では，それぞれ 1.79%および 1.81%であった．特に，ポンティックに隣接する領域のセメント層には応力集中が見られ，フレームの厚みや接着面積を確保するために，支台歯の欠損側側にグルーブを形成することが必要であると考えられる．

また，0.3mm 厚さの Ce-TZP/Al フレーム（0.3C(-)）では，せん断応力が 11MPa を超える接着セメントの体積の割合は、0.5mm 厚の Y-TZP フレーム（0.5Y）よりも小さかった．したがって，エナメルが薄い症例や，補助的維持装置の平行性を得ることが困難な症例では Ce-TZP/Al フレームがより有用であると考えられる．

【結論】

本研究結果から，厚さ 0.3mm の Ce-TZP/Al フレームを用いた RBFDPs は，Y-TZP を使用する場合と比較して，歯の削除量が少ないため，前歯一歯欠損の RBFDPs に有効な方法であることが明らかとなった．補助的維持形態を付与することによってセメント層の応力を低減できることが示唆された． ただし，フレーム材として Ce-TZP/ Al を使用する場合は，エナメルが薄い症例や，補助

的維持装置の平行性を得ることが困難な症例では，必ずしも補助的維持装置を付与しなくても良いことが示唆された.

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲第　5515　号 | 南淵　眞愛 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　水口　俊介<br>副　査　山下　仁大　　若林　則幸 | |
| 論文題目 | Evaluating the optimal design of zirconia based resin-bonded fixed dental prostheses using finite element analysis | |

（論文審査の要旨）

上顎前歯の欠損補綴には固定性ブリッジ，可撤性義歯，インプラントなどの治療法がある．固定性ブリッジの中でも RBFDPs は，低侵襲で審美的なことから広く臨床で用いられている．その一方で，従来型ブリッジと比較して脱離が多いという欠点もある．近年，イットリア部分安定型ジルコニア（以下：Y-TZP）が機械的強度，審美性，生体親和性に優れており，金属の代替材料として普及してきている．Y-TZP を RBFDPs のフレーム材料としても用いる場合，厚さ 0.5 mm に設定可能であり，厚みとして 0.7-0.8mm を要する金属フレームと比較して薄くできるため，RBFDPs の適応症例の範囲が広がった．

RBFDPs の予後を改善するために，歯周組織への影響が少なく，脱離しにくいフレーム設計を検討する必要がある．RBFDPs として従来用いられている両持ち設計に比べ，片持ち設計は脱離が少ないとの臨床報告を多く認めるが，片持ち設計では，支台歯に回転力が作用し，支台歯の動揺度が増加する危険性があるため，より脱離の危険性が少ない両持ち設計のフレームデザインを確定する必要がある．しかしながら，ブリッジ脱離の原因となる過度な応力集中によるセメント層の破壊に着目して，両持ち設計のブリッジフレームデザインについて客観的評価を行った研究は少ない．

本研究は，上記のような状況を背景として，材料あるいはデザインの異なる５種類の RBFPDs のフレームにおけるフレームのひずみ，セメント層の応力を有限要素法にて解析し，フレームの脱離のリスクを軽減する最適な RBFPDs フレームの設計について検討を行ったものであり，この研究への着眼点は歯科補綴学の臨床にとって有意義なものと高く評価できる．

本研究は東京医科歯科大学倫審査委員会の承認を得て（承認番号　第１１７３号），東京医科歯科大学医歯学総合研究科顎顔面解剖学分野保管のヒト乾燥頭蓋骨をマイクロフォーカス X 線 CT システム（inspeXioSMX-100CT, 島津製作所）にて撮像し，データ上で上顎左側側切歯を削除し１歯欠損モデルとした後，３D プリンタを用いレジン製模型を作製している．

上顎左側中切歯（#21）および上顎左側犬歯（#23）に対し，RBFDPs のための支台歯形成を行い，アクリルレジンを用いて以下の５種のフレーム（補助的維持装置有りの 0.5Y, 0.5C, 0.3C と補助的維持装置無しの 0.5Y, 0.3C）を作製し，作製したフレームを模型上に装着し，再度 μCT にて撮像を行っている．

模型およびフレームのスキャンデータと，ヒト乾燥頭蓋骨のスキャンデータを重ね合わせ，エナメル質，象牙質，歯根膜，皮質骨，海綿骨，接着性レジンセメント，Y-TZP および Ce-TZP/Al の各構造における境界設計を行っている．ボクセルサイズは一辺 120 μm の立方体とし，歯の接着界面からセメント層，形成面のエナメル質層を厚み 120 μm に設定した．各物性値は，均質で等方性を持ち線形弾性（歯根膜のみ 2 相性）とし，拘束点は上顎骨の上面としている．前歯部における最大咬合力を模し，200 N をポンティック基底結節部に長軸から 45° の方向より荷重している．

専用のソフトウェア上にて各フレームの最大主ひずみと，セメントの剪断応力，11 MPa 以上の値を示すセメントのボクセル数の割合を計測している．以上のように，本研究は，周到な実験計画に基づいて行われており，妥当な方法によるものといえる．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 荷重を加えた際に 11MPa 以上の剪断応力が加わった接着レジンセメントの体積の割合を算出した結果，セメント層に生じた剪断応力の割合は，0.5Y で 2.93%，0.5C で 1.43%，0.3C で 1.79%であった．
2. セメント層に発生するせん断応力は，欠損側の中切歯と犬歯で高い応力集中を示した．補助的維持装置の有無で比較すると，セメント層に生じた剪断応力の割合は，0.5Y(-)では 3.03%，0.5Y では 2.93%，0.3C(-)では 1.81%，0.3C では 1.79%であった．
3. 補助的維持装置無しの 0.3mm 厚の Ce-TZP/Al フレーム（0.3C(-)）では，セメント層に発生するせん断応力が 11MPa を超える割合は，補助的維持装置有りの 0.5mm 厚の Y-TZP フレームよりも小さかった．

以上の研究結果より，厚さ 0.3mm の Ce-TZP/Al フレームを用いた RBFDPs は，Y-TZP を使用する場合と比較して，歯の削除量が少ないため，前歯一歯欠損の RBFDPs に有効な方法であることが明らかとなった． また，補助的維持形態を付与することによってセメント層の応力を低減できることが示唆された． ただし，フレーム材として Ce-TZP/ Al を使用する場合は，エナメルが薄い症例や，補助的維持装置の平行性を得ることが困難な症例では，必ずしも補助的維持装置を付与しなくても良いことも示唆された．

以上のように，本研究では異なる設計の RBFDPs におけるセメント層の応力，フレームのひずみを有限要素法にて観察し，フレームの脱離のリスクを軽減する最適なフレーム設計について検討を行ったものであり，得られた知見は臨床的に非常に有益な情報であり，前歯部ブリッジの設計を考える上で極めて重要な意義をもち，歯科補綴学ひいては歯学全般の進歩，発展に寄与するところは大である．よって本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 静間　夕香 |
| 論文審査担当者 | 主　査　荒川　真一<br>副　査　森尾　郁子　　宮新　美智世 |
| 論　文　題　目 | Relationship between self-assessment and clinical evaluation of dental plaque and gingival condition in Japanese adolescents |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

歯周病は世界的に蔓延している歯科疾患であり、世界保健機関（WHO）により青少年においてもその多くが初期の歯肉炎所見を有すると報告されている。歯肉炎は歯周炎に進行することが多く、歯周組織の破壊や歯の動揺、最終的に歯の喪失を招き、個人の QOL に影響を与える。そのため、歯周病の初期症状である歯肉炎の段階での予防対策が重要である。歯肉炎予防にはプロフェッショナルケアや、セルフケア実施による口腔衛生状態の向上が不可欠であるが、まず本人が自分の歯肉炎に気づくことが重要であると考えられる。

これまで未処置歯や補綴状況等の歯の状態に関しては、歯科医師による評価と本人によるセルフアセスメントとを比較し、その正確性が確認されている。しかし、歯周病に関するセルフアセスメントに関しては不正確であるという報告が多く、その有用性は十分に証明されていない。

そこで本研究では、鏡で観察しやすい前歯部の歯垢付着と初期に炎症所見が認められる歯間乳頭部の歯肉を観察することを目的として開発したセルフアセスメント票を開発し、歯肉炎の発症率が高まる高校生に適用した。生徒によるセルフアセスメントと歯科医師による評価結果とを比較して、生徒のセルフアセスメント能力を評価・検討することが本研究の目的である。

＜対象と方法＞

1.　対象

東京都内にある某高等学校に在籍する 1 年生（15-16 歳）163 名を対象とした。そのうち、前歯部に欠損のある者と調査項目に記入漏れのあった 12 名を除外し、151 名（男子 77 名、女子 74 名）を対象として分析を行った。なお、本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号 No.859）。

2.　歯垢と歯肉に関するセルフアセスメント

生徒に手鏡を見ながら、自分の前歯唇側の歯垢付着状況と前歯歯間乳頭部の歯肉炎症の有無をセルフアセスメント票に記入させた。歯垢に関しては、1 歯を 3 区画に分けた模式図を用い、歯垢の付着がない場合には「－」、歯垢の付着がある場合には「+」を区画ごとに記入させた。また、歯肉に関しては、模式図の部位ごとに健康だと判断したら「－」、炎症があり健康ではないと判断したら「+」を記入させた。

3. 歯科医師による歯垢と歯肉の臨床的評価

あらかじめキャリブレーションを行った歯科医師 4 名が歯垢と歯肉の臨床的評価を実施した。歯垢の付着状況は Greene & Vermillion の Oral Hygiene Index（OHI）の Debris Index の変法（modified DI）を用い、前歯 12 歯の唇側を評価した。各歯面を 0-3 で評価し（0：歯垢および着色付着物が認められない、1：歯垢が歯面の 1/3 以内に付着している、2：歯垢が歯面 1/3-2/3 に付着している、3：歯垢が歯面 2/3 以上に付着している）、その総計を個人の歯垢付着値（0-36）とした。

また歯肉に関しては、Schour & Massler の PMA Index の変法（P-Index）を用い、歯間乳頭部の炎症度を評価した。対象部位は上下顎前歯の歯間部の 10 部位である。歯肉に炎症がなければ 0 点、炎症があれば 1 点とし、その総計を個人の歯肉炎症値（0-10）とした。

4. 認識スコア

生徒と歯科医師による評価との整合性を評価するため、生徒の歯垢と歯肉に関する認識スコアをそれぞれ算出した。歯垢は各歯種のセルフアセスメントによる「＋」の数と歯科医師による評価が一致している場合は 1 点、一致していない場合は 0 点として合計点を算出した。また歯肉は、各部位の生徒と歯科医師による評価が一致している場合は 1 点、一致していない場合は 0 点として合計点を算出した。したがって、歯垢の認識スコアは 0-12 点、歯肉の認識スコアは 0-10 点となる。

5. 統計分析

性別による歯垢付着値と歯肉炎症値、歯肉・歯垢の認識スコアは独立したサンプルの t 検定、生徒と歯科医師の歯垢と歯肉の評価の一致率は $\chi^2$検定、さらに、歯垢付着値、歯肉炎症値と歯肉・歯垢の認識スコアとの関連については One-way ANOVA と Bonferroni を用いた多重比較によって分析した。なお、全ての統計学的分析には SPSS statistics 20.0J（日本 IBM、東京）を用い、有意水準は $p<0.05$ とした。

＜結果＞

1) 歯垢の付着状況

①歯科医師による臨床的評価

歯科医師による前歯 12 歯の歯垢付着値は、男子 12.4±7.5、女子 9.5±7.4、計 11.0±7.6 であり、男子は女子に比べ有意に高かった（$p<0.05$）。全ての前歯 1812 歯を対象とした歯垢付着値の内訳は、付着値 0 が 33.5%（607 歯）、付着値 1 が 45.6%（825 歯）、付着値 2 が 16.9%（307 歯）、付着値 3 が 4.0%（73 歯）であった。

②生徒と歯科医師の評価との一致状況

歯垢に関する生徒と歯科医師の評価が一致していたのは、男子 34.1%（315/924 歯）、女子 40.9%（363/888 歯）、全体では 37.4%（678/1812 歯）であり、男子は女子と比較して歯垢の判定の一致率が有意に低かった（$p<0.05$）。付着値 0 の歯の一致率は 51.6%、1 は 34.2%、2 は 22.5%、3 は 19.2%であり、付着値 1-3 の歯の一致率は、付着値 0 と比較して有意に低かった（$p<0.01$）。

③歯垢の認識スコア

歯垢の認識スコアは男子 4.09±2.64 点、女子 4.91±2.99 点、計 4.49±2.84 点であり、性別による差はみられなかった。歯科医師の評価を基準として、歯垢の付着状況を良好群（0-6）、中等度群（7-14）、不良群（15≦）に 3 分位し、歯垢の認識スコアとの関連をみたところ、良好群と比較して、中等度群および不良群は認識スコアが有意に低かった（$p<0.01$）。口腔清掃状態が不良な者ほど、自分の歯垢の付着状態を正しく認識していなかった。

2) 歯肉の炎症状態

①歯科医師による臨床的評価

歯科医師による歯肉炎症の評価は、男子 6.9±3.2、女子 5.9±3.5、計 6.4±3.4 であり、性別による差は認められなかった。 全対象部位である 1510 部位における所見は、「歯肉炎症なし」が 36.2%（547 部位）、「歯肉炎症あり」が 63.8%（963 部位）であった。

②生徒と歯科医師の評価との一致状況

歯肉炎症の有無に関して、生徒と歯科医師の評価が一致していた部位は、男子 45.8%（353/770 部位）、女子 48.8%（361/740 部位）、全体では 47.3%（714/1510 部位）であり、性別による差はみられなかった。歯科医師と生徒が一致していたのは「歯肉炎症なし」は 82.4%、「歯肉炎症あり」は 27.3%であった。「歯肉炎症なし」と判定した部位に比べ、「歯肉炎症あり」と判定した部位の一致率は有意に低く（$p<0.01$）、生徒は歯肉炎症がある部位を正しく判定できていなかった。

③歯肉の認識スコア

歯肉の認識スコアは男子 4.58±2.85 点、女子 4.88±2.95 点、計 4.73±2.89 点であり、性別による差は認められなかった。歯肉炎症値を良好群（0-5）、中等度群（6-8）、不良群（9-10）の 3 群に分け、歯肉の認識スコアとの関連を検討したところ、歯肉炎症の良好群と比較して、中等度およ

び不良群は認識スコアが有意に低かった（$p<0.01$）。歯肉炎症値が高い生徒ほど、自分の歯肉の炎症状態を正しく認識できていなかった。

＜考察＞

本研究では、歯垢と歯肉の評価に関する生徒と歯科医師の評価との一致率はいずれも低く、多くの高校生は自分の口腔内状態を正確に認識していないことが判明した。歯垢の付着状況に関する一致率は約 37%であり、歯垢の付着が多い歯ほど認識できていなかった。また、歯垢がないことを理解できたのは 50%以上であったが、歯垢があることを正しく認識できていたのは 30%以下であり、生徒が歯垢の存在を正しく認識することは困難であると推察された。

また、歯肉炎症がない部位を正しく判定できたのは 80%以上であったが、歯肉炎症がある部位を正しく認識していたのは約 27%であり、歯肉炎症に関しても、歯垢と同様、認識することが困難であることが明らかになった。先行研究において、一般の人と専門家では歯周病に対する評価に乖離があると報告されている。本研究においても、歯垢付着や歯肉の炎症部位を高校生が正しく評価することは困難であったとの結果が得られた。この要因として、高校生では歯垢や歯肉への関心が低く、セルフチェックそのものを行っていないか、もしくは行っていてもその状態を正しく認識することができていなかったことが考えられた。

また、歯科医師の評価と認識スコアとの関連から、中等度・不良の口腔衛生状態と歯肉炎症のある者は、良好な口腔保健状況の者と比較して、歯垢・歯肉の認識スコアが有意に低いことが判明した。この結果から、セルフアセスメント能力が低いために不良な口腔保健状況になった可能性が考えられた。一般的に、痛みの少ない歯肉炎の初期症状を早期に認識することは困難であり、歯周炎に進行し、痛みを感じ、歯の動揺等の症状が出現することではじめて、その疾患の存在に気づき、治療の必要性を認識することが多い。したがって、本人が歯肉の「健康」と「病的」な状態との違いを見分けるためのセルフアセスメント能力を向上させることが重要と考えられる。このセルフアセスメント能力を高めることで、適切な口腔保健行動や受診行動に結びつくことが期待される。

本研究におけるセルフアセスメントでは、歯と歯肉の模式図を用い、歯垢付着と歯肉の炎症状態について、鏡で詳細に観察する方式をとった。この観察方法は、歯科医師が口腔内を診る際の方法を模したものであり、対象者の観察眼を養うことを目的とした。一般の人が歯科医療従事者と全く同じように口腔内を診ることはできないため、鏡で観察しやすい前歯部のみを観察部位とし、歯頸部付近の歯垢に注目させるために歯を 3 分割し、初期段階で炎症所見がみられる歯間乳頭部のみを観察するようにした。本票を用いて口腔内を観察することで、生徒は歯や歯肉のどの部位を観察することが大切かを自然に学べるようにした。

青少年や成人を対象としてセルフアセスメントを実施した先行研究においては、’How was your

overall oral health ?’のように、口腔内の全体的な健康状態や歯周病に関する一般的な認識を質問する方法が多く、本研究のように対象者のセルフアセスメント能力を数値化して検討した研究はなかった。当該研究で用いたセルフアセスメント票を用いることにより、対象者と歯科医師の評価内容を部位ごとに 1 カ所ずつ照合することで、生徒の歯垢と歯肉に関するセルフアセスメント能力を数値として評価することが可能になっている。

本研究で用いた認識スコアは、対象者が自分の口腔内を観察した内容と歯科医師の評価との一致度から得られた数値である。本人の口腔内のみを判定しただけでは、歯垢や歯肉のアセスメント能力を客観的に評価できたとはいえない可能性があるため、本票に加え、歯垢付着や歯肉炎の症例を示した口腔内写真を複数枚用意し、それぞれ判定させるなど、対象者のアセスメント能力を客観的に測定していく手法について検討する必要があると考えられた。今後、青少年期の歯周病を予防・管理するためには、当該セルフアセスメント票を用いた口腔内のセルフアセスメント能力を向上させる、歯科健康教育プログラムの開発が必要であると考えられた。

＜結論＞

本研究により、自分の歯垢付着、歯肉の炎症状態を正しく認識することができない高校生が多いことが明らかになった。また、歯垢と歯肉のセルフアセスメント能力と口腔保健状況との間に関連が認められた。さらに口腔清掃状態と歯肉の炎症状態が不良な者ほど、良好な者と比較して歯垢・歯肉の認識スコアが低いことが判明した。今後、青少年期の歯肉炎を早期に予防するには、自分の口腔内に関するセルフアセスメント能力を向上させることが重要であると示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5516　号 | 静間　夕香 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　荒川　真一<br>副　査　森尾　郁子　　宮新　美智世 | |
| 論 文 題 目 | Relationship between self-assessment and clinical evaluation of dental plaque and gingival condition in Japanese adolescents | |

（論文審査の要旨）

歯周病は有病率の高い歯科疾患であり、進行すると歯の動揺や喪失を招き、生活の質(QOL）を低下させる要因となる。そのため、歯周病の初期症状である歯肉炎の段階での予防が重要である。歯肉炎予防には歯科医院を受診してプロフェッショナルケアを受けること、および、毎日のセルフケアによる口腔衛生状態の改善が必要であるが、それらの保健行動への動機付けとして、歯肉の状態を本人が把握することが重要と考えられる。これまで、歯周病に関するセルフアセスメントについて調査した研究はあるが、その多くは歯肉の健康状態のセルフアセスメントは歯科医師による評価と異なることが報告されている。また、先行研究では成人を対象としたものが多く、高校生を対象としたセルフアセスメント能力を数値化して評価した研究は皆無である。

そこで、静間は、対象者が鏡を用いて歯垢と歯肉炎症を自ら評価し、セルフアセスメント能力を数値化できるセルフアセスメント票を開発した。鏡で観察しやすい前歯部のみを観察対象とし、歯頸部付近の歯垢に注目させるために歯を 3 区分した模式図を使用した。歯肉炎の初期段階で炎症所見が認められる歯間乳頭部を部位別に評価する分かりやすい図を考案するなど、様々な工夫を行ったことが高く評価できる。

具体的には、都内の高等学校に在籍する 1 年生 151 名を対象として、当該セルフアセスメント票を用いて自己評価し、同時に歯科医師も同部位の歯垢付着状況および歯肉炎症の有無に関して評価した。生徒と歯科医師の評価との一致状況を分析し、さらに、対象者の口腔保健状況との関連について検討した。本研究では、人を対象とする研究倫理指針に則って計画が立案され、適切に研究が実施され、科学的な統計解析手法を用いた分析が行われ、結果に対する考察も適切に行われたと考えられる。

本研究の結果、以下のことが明らかになった。

1. 歯垢に関して生徒と歯科医師の評価とが一致していたのは 37.4%であり、男子（34.1%）は女子（40.9%）に比べ、一致率が有意に低かった。付着値 0 の歯の一致率は 51.6%、1 は 34.2%、2 は 22.5%、3 は 19.2%であり、付着値 0 と比較して付着値 1～3 の一致率は

有意に低かった。また、口腔清掃状態の不良群および中等度群は良好群と比較して、歯垢の認識スコアが有意に低かった。

2. 歯肉炎症の有無に関して、生徒と歯科医師の評価が一致していたのは 47.3%であり、男子（45.8%）と女子（48.8%）に差は認められなかった。生徒と歯科医師の評価が一致していたのは、「歯肉炎症なし」は 82.4%、「歯肉炎症あり」は 27.3%であり、2 群間に有意な差が認められた。また、歯肉の炎症状態の不良群および中等度群では、良好群と比較して歯肉の認識スコアは有意に低かった。

本研究により、自分の歯垢付着、歯肉の炎症状態を正しく認識していない高校生が多いことが明らかになった。また、歯垢と歯肉についてのセルフアセスメント能力は口腔保健状況と関連があり、口腔保健状況が不良な者は良好な者と比較して、歯垢や歯肉の認識スコアが低いことが判明した。したがって、高校生において、保健指導や健康教育の中で歯垢や歯肉に対するセルフアセスメント能力を高めることの必要性が示唆された。

我が国の学校歯科保健活動では、小学生を対象としたう蝕予防プログラムが数多く実施されているが、中学生・高校生を対象とした歯周病予防のプログラムは非常に少ない。本研究の成果は、青少年期の歯周病の予防・管理のうえで有効に活用でき、歯科診療所における保健指導や、学校歯科保健活動における健康教育等にも応用することが可能であり、歯周病予防に対する貢献度は大と考えられる。

以上のことから、本研究は今後の歯科医学・歯科医療の発展に寄与するところが大きいと考えられ、博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 駒崎　利奈 |
| 論文審査担当者 | 主査　鈴木　敏彦<br>副査　荒川　真一　　新田　浩 |
| 論　文　題　目 | Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年、歯周病が非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の増悪因子となる可能性が示唆されている。本研究では、まず 52 人の NAFLD 患者における歯周病原細菌の感染と NAFLD の臨床/生化学的パラメーターとの関係を調べた。血清中の抗 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（以下 *Aa*）IgG 抗体価は、内臓脂肪面積、空腹時血清インスリン、AST、および HOMA-IR と正の相関が、L/S 比とは負の相関が認められた。これらの結果を基に、C57BL / 6J マウス（8 週齢、雄）に *Aa* または生理食塩水(co)を 6 週間与え、普通食（NCAa、NCco）または高脂肪食（HFAa、HFco）のいずれかを与えた。NCAa および HFAa は、対照群と比較して耐糖能異常およびインスリン抵抗性を示し、また HFAa は、HFco よりも高い肝臓の脂肪化を示した。肝臓の DNA マイクロアレイ解析により同定された DEGs を用いた KEGG パスウェイ解析では glucagon signaling pathway、adipocytokine signaling pathway、insulin resistance の上昇が認められた。血漿グルカゴン濃度は NCco と比較して NCAa で有意に高く、さらに、リン酸化 Akt の割合は NCco / HFco マウスよりも NCAa / HFAa で有意に低かった。16S rRNA 遺伝子に基づく腸内細菌叢解析、機能予測解析から、*Aa* 投与により腸内細菌叢の組成が変化し、腸内に脂肪酸が蓄積する可能性が示された。したがって、*Aa* の感染は腸内細菌叢および糖代謝を変化させることにより、NAFLD の増悪因子として働く可能性が示唆された。

＜緒言＞

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は慢性肝疾患である。NAFLD の発症に関連するリスク要因としては肥満、糖尿病、インスリン抵抗性などが挙げられている。

歯周病は、グラム陰性嫌気性細菌によって、歯槽骨を含む歯周組織破壊を引き起こす疾患である。歯周病原細菌は、リポ多糖類（LPS）のような、歯周組織の炎症を誘発する因子を有している。また、口腔内から飲み込まれた歯周病原細菌は腸内細菌叢に影響を及ぼす可能性がある。

歯周病患者は血清中の歯周病原細菌に対する IgG 抗体価が上昇し、抗体価は歯周病の重症度と相関することが明らかになっている。歯周病の感染は、糖尿病などの様々な疾患のリスクとなることが報告されているが、近年歯周病が NAFLD のリスク因子となる可能性が示唆されている。さらに、腸内細菌叢の変化は NAFLD の進行に関与することも報告されている。

本研究では、NAFLD 患者の歯周病原細菌に対する血清中の IgG 抗体価を測定することにより、歯周病と NAFLD との関係を検討した。その結果をもとに、マウスの肝臓の脂肪化および腸内細菌叢、糖代謝、脂質代謝に対する *A. actinomycetemcomitans* の感染の影響を調べた。

＜方法＞

NAFLD患者52名より末梢血を採取し、ELISA法により歯周病原細菌3菌種（*A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718、*Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586、 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277）に対する血清中のIgG抗体価を測定した。また、8週齢雄C57BL/6Jマウスに高脂肪食（HF）または普通食（NC）を与えるとともに、それぞれの群を更に2群に分け、$10^8$ cellsの*Aa*（HFAa、NCAa）、または生理食塩水（HFco、NCco）を週6日経口投与した。6週後、12週後に経口糖負荷試験、インスリン負荷試験、マイクロCTを用いた脂肪量の評価、さらに糞便を用いて16S rRNA遺伝子配列に基づく腸内細菌叢解析を行った。また肝臓を用いたHE染色による組織学的解析、ウェスタンブロット解析を行うとともに、DNAマイクロアレイ解析を行った。また別の群においては、*Aa*の腸内細菌叢への影響を遮断するため、抗生物質（ノルフロキサシン）を*Aa*と同時に投与した（3g/日）。なお、本研究は、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認（第1147号）、および東京医科歯科大学動物実験委員会の承認(0170225A)のもとに実施された。

＜結果＞

NAFLD 患者では血清中の *Aa* に対する IgG 抗体価と内臓脂肪面積、空腹時血清インスリン、AST および HOMA-IR と正の相関が、L/S 比とは負の相関が認められた。マウス実験においては NCAa、HFAa ともに 6 週後の時点で耐糖能異常、インスリン抵抗性が認められ、また 12 週後の時点では、HFAa は HFco と比較して体重、皮下脂肪体積、内臓脂肪体積の増加、肝臓の脂肪化が認められた。NCAa は NCco と比較して肝臓において *Acc1*、*Glck* の発現が有意に上昇していたが、*Tnfa*、*Il6*、*Il1b* では実験群と対照群で有意差は認められなかった。NCco と NCAa の間で、DNA マイクロアレイ解析により同定された DEG を用いた KEGG パスウェイ解析では glucagon signaling pathway、adipocytokine signaling pathway、insulin resistance の上昇が認められた。また血漿グルカゴン濃度は NCAa が NCco と比較して有意に高く、*Prkaca* の発現も有意に上昇していた。ウェスタンブロットによるタンパク解析においてはリン酸化 Akt の割合は NCco / HFco マウスよりも NCAa / HFAa で有意に低下していたが、リン酸化 Erk の割合に有意差は認められなかった。腸内細菌叢解析において、NCAa は NCco と比較して *Turicibacter* 属が有意に減少していた。HF と NC の腸内細菌叢は大きく異なっていたが、HFAa においても HFco と比較して *Turicibacter* 属の減少傾向が認められた。また機能解析において、NCAa は NCco と比較して、脂肪酸合成の亢進と脂肪酸分解の減少を認めた。

ノルフロキサシンを同時に投与したマウスでは、投与していないマウスと比較して耐糖能異常、インスリン抵抗性の改善傾向、肝臓の脂肪化の減少傾向が認められた。

＜考察＞

近年提唱されている NAFLD における multiple hit theory では、インスリン抵抗性、LPS、遺伝的因子、後天的因子などの複数の因子が共に作用して NAFLD を誘発すると仮定している。*Aa* は侵

襲性歯周炎において多く検出され、内毒素だけでなく外毒素であるロイコトキシンを有している。本研究ではNAFLD患者では血清中の*Aa*に対するIgG抗体価と肝臓の脂肪化の臨床パラメーターとの間に有意な相関が認められた。したがって、NAFLDの危険因子として本研究では*Aa*に焦点を当てた。

DNA マイクロアレイ解析により同定された DEGs を用いた KEGG パスウェイ解析では glucagon signaling pathway、adipocytokine signaling pathway、insulin resistance の上昇が認められた。また血漿グルカゴン濃度は NCAa が NCco と比較して有意に高く、NCco/HFco と比較して NCAa/HFAa は、肝臓においてより低い pAkt / Akt を示したが、pErk / Erk に有意差は認められなかった。これは、King らによる「selective insulin resistance」の概念に沿ったものである。King らは糖尿病およびインスリン抵抗性によって引き起こされるグルコース、炎症性サイトカインの上昇レベルは、IRS / PI3K / Akt 経路を介してインスリンの作用を選択的に阻害するが Grb / Shc / MAPK 経路は阻害しないことを報告している。

腸内細菌叢の変化は NAFLD の悪化に関与していることが報告されている。*Aa* 投与マウスでは *Turicibacter* 属が減少していたが、これは酪酸の生産と関連していると報告されており、酪酸の増加はインスリン感受性の改善と関連しているとの報告がある。このことから *Aa* の投与は、腸内細菌叢を変化させ酪酸の産生を低下させることによりインスリン抵抗性を引き起こす可能性が示唆された。

抗生物質投与は、耐糖能異常および肝臓脂肪化を改善し、腸内細菌叢の変化を引き起こすとの報告がある。本研究ではノルフロキサシン投与により、*Aa*投与による耐糖能異常の改善傾向と、肝臓における脂肪化の部分的抑制を認めた。これは*Aa*の有する内毒素、外毒素が原因となり、*Aa*の作用を完全に阻止することができなかったためと考えられる。

腸内細菌叢の機能予測解析では、*Aa*投与により脂肪酸生合成の増加および脂肪酸分解の減少を示した。腸内に脂肪酸が蓄積すると、門脈を介して肝臓に輸送され、肝臓の脂肪化を悪化させる可能性がある。

本研究において、肝臓における *Tnfa*、*Il6*、および *Il1b* など炎症性サイトカイン関連の遺伝子発現は、普通食または高脂肪食を与えたマウスにおいて *Aa* 投与による有意差が認められなかったことから、歯周病が腸内細菌叢を変化させることにより、NAFLD に影響を与えることが示唆された。

＜結論＞

*A. actinomycetemcomitans* は、糖代謝および腸内細菌叢を変化させ、NAFLD を悪化させる可能性が示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5517　号 | 駒崎　利奈 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　鈴木　敏彦<br>副　査　荒川　真一　　新田　浩 | |
| 論 文 題 目 | Periodontal pathogenic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism | |

（論文審査の要旨）

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は慢性肝疾患である。歯周病は、主にグラム陰性嫌気性細菌によって引き起こされる疾患で、歯槽骨を含む歯周組織の破壊を招く。歯周病原細菌は、リポ多糖類（LPS）のような、歯周組織の炎症を誘発する因子を有しており、口腔内の細菌叢が腸内細菌叢とは異なることを考慮すると、飲み込まれた口腔内細菌は腸内細菌叢に影響を及ぼす可能性がある。近年歯周炎が NAFLD のリスクとなる可能性が示唆されている。しかしながらその機序については未だ不明な点は多い。そこで駒崎は、NAFLD 患者の血清と、マウスモデルを用いて歯周病原細菌の肝臓への影響を調べた。

本研究では、NAFLD 患者の歯周病原細菌に対する血清中の IgG 抗体価を測定することにより、歯周病原細菌の中でも *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（以下 *Aa*）と NAFLD との関係を見出した。その結果をもとに、8 週齢雄 C57BL/6J マウスに高脂肪食（HF）または普通食（NC）を与えるとともに、それぞれの群を更に 2 群に分け、$10^8$ cells の *Aa*（HFAa、NCAa）、または生理食塩水（HFco、NCco）を週 6 日経口投与した。6 週後、12 週後に経口糖負荷試験、インスリン負荷試験、マイクロ CT を用いた脂肪量の評価、さらに糞便を用いて 16S rRNA 遺伝子に基づく腸内細菌叢解析を行った。また肝臓を用いた HE 染色による組織学的解析、ウェスタンブロット解析を行うとともに、DNA マイクロアレイ解析を行った。また別の群においては、*Aa* の腸内細菌叢への影響を遮断するため、抗生物質（ノルフロキサシン）を *Aa* と同時に投与し（3g/日）、解析を行った。

本研究において、駒崎は適切な実験計画の下で本実験を遂行している。さらに、*Aa* の肝臓、腸内細菌叢への影響を DNA マイクロアレイ解析や 16S rRNA 遺伝子配列に基づく細菌叢解析により検討を行ったことは高く評価できる。なお、本研究は、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認（第 1147 号）、および東京医科歯科大学動物実験委員会の承認(0170225A)のもとに実施された。

本研究の主たる結果は以下の通りである。

1．NAFLD 患者では血清中の *Aa* に対する IgG 抗体価と内臓脂肪面積、空腹時血清インスリン、AST および HOMA-IR と正の相関が、L/S 比とは負の相関が認められた。

2．マウス実験においては NCAa、HFAa ともに 6 週後の時点で耐糖能異常、インスリン抵抗性が認められ、また 12 週後の時点では、HFAa は HFco と比較して体重、皮下脂肪体積、内臓脂肪体

積の増加、肝臓の脂肪化が認められた。

３．NCAa は NCco と比較して肝臓において *Acc1*、*Glck* の発現が有意に上昇していたが、*Tnfa*、*Il6*、*Il1b* では実験群と対照群で有意差は認められなかった。

４．NCco と NCAa の間で、DNA マイクロアレイ解析により同定された DEGs を用いた KEGG パスウェイ解析では glucagon signaling pathway、adipocytokine signaling pathway、insulin resistance の上昇が認められた。また血漿グルカゴン濃度は NCAa が NCco と比較して有意に高く、ウェスタンブロット解析においてはリン酸化 Akt の割合は NCco / HFco マウスよりも NCAa / HFAa で有意に低下していたが、リン酸化 Erk の割合に有意差は認められなかった。

５．腸内細菌叢解析において、NCAa は NCco と比較して *Turicibacter* 属が有意に減少していた。また機能予測解析において、NCAa は NCco と比較して、脂肪酸合成の亢進と脂肪酸分解の減少が認められた。

６．*Aa* とノルフロキサシンを同時に投与したマウスでは、投与していないマウスと比較して耐糖能異常、インスリン抵抗性の改善傾向、肝臓の脂肪化の減少傾向が認められた。

以上の結果より、*A. actinomycetemcomitans* は腸内細菌叢を変化させ、糖代謝を変化させることにより NAFLD のリスク因子となることが明らかにされた。

本研究において、駒崎 利奈は、*Aa* と NAFLD の関連を初めて報告した。また、DNA マイクロアレイ解析、16S rRNA 遺伝子配列に基づく細菌叢解析により肝臓、腸内細菌叢への *Aa* の影響を詳細に調査した点は非常に興味深い。本研究結果は、今後歯周病が NAFLD に与える影響を検討する上で非常に有用な結果である考えられる。

よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行うにあたり、十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | KONG Sophannary |
| 論文審査担当者 | 主査　木下　淳博<br>副査　渡部　徹郎　　小田　茂 |
| 論　文　題　目 | Biological effects of Er:YAG laser irradiation on the proliferation of primary human gingival fibroblasts |

（論文内容の要旨）

**Introduction**

Erbium-doped yttrium-aluminum-garnet (Er:YAG) laser has been effectively used for ablation of both soft and hard tissues with minimal heat-related side effects (Aoki et al. 2015) because its 2,940 nm-wavelength is well absorbed by water molecules and hydroxyapatite. Previously, photobiomodulative effects of low-level Er:YAG laser irradiation (up to 4.3 J/cm$^2$) without cell damage were demonstrated by our research group (Pourzarandian et al. 2005; Aleksic et al. 2010; Ogita et al. 2015). However, to the best of our knowledge, how gingival fibroblasts respond to Er:YAG laser irradiation at moderate to high energy levels has remained elusive. Therefore, the aim of this study was to comprehensively investigate the biological effects of Er:YAG laser irradiation at fluency ranged from moderate to high levels on primary human gingival fibroblasts (HGFs).

**Materials and methods**

An Er:YAG laser apparatus (2,940 nm; DELight®, HOYA ConBio, USA) was employed in a defocused mode perpendicularly to primary human gingival fibroblasts (HGFs) culture dish at fluences of 3.6, 4.2, 4.9, 6.3, 8.1, or 9.7 J/cm$^2$ at 20 or 30 Hz for 20 or 30 s at the distance of 15 or 20 cm.

HGFs isolated from five clinical samples and HGF-1 (ATCC® CRL-2014™) were cultured at 3.0 × 10$^4$ cells per dish for 24 hours in complete growth medium which consisted of 10% fetal bovine serum (FBS) supplemented in 1% antibiotic-Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Then, the cells were serum-starved in 0.5% FBS-contained DMEM for an additional 24 hours to induce cell cycle synchronization. On the day of laser treatment, supernatants of HGF cultures were temporarily removed to expose the cell monolayers to laser irradiation, and then the supernatants were returned to the cell culture dishes immediately afterwards.

Cell proliferation was determined on day 1 and 3 following irradiation by Trypan blue exclusion and WST-8 assay. Cell damage was examined by lactate dehydrogenase (LDH) measurements. To visualize

overall cell density and laser-affected area, HGFs were stained with a 0.2% crystal violet solution. Cell cycle progression was evaluated by Ki67 immunostaining and mRNA expression of the gene encoding mitotic G2 phase-related cyclin (cyclin-A2) by real-time PCR on day 1 and 3. Functional integrity of cells was evaluated by ATP enzyme assay after 5 and 30 minutes. The ultrastructure of irradiated HGFs was examined by transmission electron microscopy (TEM) at 3 and 24 hours. Gene expression profiles were determined in HGFs at 8 hours following irradiation at 6.3 J/cm$^2$ by microarray analysis. Real-time PCR was performed to validate the upregulated differential expressed genes. Surface temperature was measured before, during, and after laser treatment on monolayer HGFs using a non-contact infrared thermometer at room temperature (25–26 °C). To re-evaluate the photothermal effect of Er:YAG irradiation at 6.3 J/cm$^2$ on HGF proliferation activity, the cells were treated with medium pre-warmed at 40 °C for 30 s. In some experiments, HGFs were pretreated 10 minutes prior to irradiation with 5 μM capsazepine (CPZ), a specific inhibitor of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), or 5 μM SKF96365 (SKF), a non-selective inhibitor of transient receptor potential (TRP) channels, and the proliferation activity was measured on day 3 using Trypan blue exclusion and WST-8 assay.

One-way analysis of variance was performed for all-group comparison, followed by Dunnett's and Tukey's tests to compare the differences between groups. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

**Results**

HGF proliferation after Er:YAG laser irradiation at 6.3 J/cm$^2$ was maximal and higher than that in the control. Irradiation at higher energy levels of 8.1 and 9.7 J/cm$^2$, resulted in the appearance of cell-free areas and reduced WST-8 absorbance. LDH concentrations were directly proportional to the energy levels used. At 6.3 J/cm$^2$, when the WST-8 absorbance was maximal, a significant LDH elevation was also observed.

Irradiation at weaker fluency range of 3.6, 4.2, and 6.3 J/cm$^2$ also induced significant cell proliferation compared with that in the control group. Similarly, potent induction of cell proliferation was observed in all primary HGFs obtained from the five different donors, and also in HGF-1. ATP production was significantly elevated at 30 minutes following irradiation at all tested energy levels from 3.6 to 6.3 J/cm$^2$. The number of Ki67-positive cells after irradiation at 6.3 J/cm$^2$ on day 1, and at 3.6 and 6.3 J/cm$^2$ on day 3, was significantly higher than that in control. mRNA expression cyclin-A2 in HGFs was significantly up-regulated on days 1 and 3 after irradiation at 3.6 and 6.3 J/cm$^2$.

At 3 hours post-irradiation at 6.3 J/cm$^2$, the accumulation of electron-dense granules inside the mitochondrial matrix and less frequent occurrence of ribosomal studding on the rough endoplasmic reticulum (ER) were observed. These ultrastructural changes were subsided after 24 hours.

Microarray analysis revealed that a total of 22 differentially expressed genes (DEGs) were identified in

HGFs (|fold change| > 2; FDR < 0.05). Among them, 21 genes were up-regulated. Gene Ontology analysis showed that genes involved in heat-related biological responses were overrepresented. KEGG pathway analysis further revealed that "ER-associated degradation" pathway, an adaptive response to misfolded protein assembly to prevent apoptosis, and "MAPK signaling pathway", were enriched. Significantly up-regulated mRNA expression of *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA6*, *DUSP5 and DUSP6* was confirmed by real-time PCR.

Irradiation at 6.3 J/cm$^2$ increased the surface temperature of cell monolayers from 26.7 ± 0.1 °C at the beginning of the experiment to 40.9 ± 1.4 °C after irradiation, with an average increase of 14.2 °C. Treatment with the medium pre-warmed to 40 °C for 30 s also induced a significant increase in cell proliferation. Pre-treatment with the temperature-sensitive TRP channel inhibitor CPZ and the non-selective TRP channel inhibitor SKF before irradiation reduced the ability of Er:YAG laser irradiation to promote cell proliferation on day 3.

**Discussion**

Er:YAG laser irradiation at high fluence levels of 8.1 and 9.7 J/cm$^2$ caused extensive cell death. In contrast, irradiation at a moderate level of 6.3 J/cm$^2$ only caused transient cell injury but induced maximal cell proliferation. Induction of the cell cycle-related molecules Ki67 and cyclin-A2 strongly indicated that cell proliferation was enhanced by irradiation at 6.3 J/cm$^2$. These findings suggest that the optimal conditions for cell proliferation and the threshold level for cell damage overlapped for this energy level. This character may correspond to moderate-level light therapy (MLLT) according to Ohshiro's new classification of laser treatments (Ohshiro 2011).

The accumulation of electron-dense granules inside the mitochondrial matrix appeared to be structurally similar to the calcium-associated electron-opaque mass described in mitochondria following $Ca^{2+}$ overload both *in vitro* (Greenawalt, Rossi, and Lehninger 1964) and *in vivo* (Reynold 1965) studies. The reduced association of ribosomal chains with the ER surface would likely lead to suppression of protein synthesis (Ueno et al. 2010). The absence of these changes by 24 hours post-irradiation, suggested that the ultrastructural alterations induced by irradiation at 6.3 J/cm$^2$ were reversible.

Microarray analysis revealed that irradiation at 6.3 J/cm$^2$ up-regulated genes that were related to adaptation to heat. The up-regulated mRNA expressions of the genes encoding heat shock protein (HSP) family proteins were confirmed by real-time PCR. The HSP70 family proteins are conserved molecular chaperones essential for proper folding, assembly of proteins and cell protection from damage caused by a variety of stressors (Gabai et al. 1997 and Beere et al. 2000), including hyperthermia (Khan, Tang, and Arany 2015). In particular, *HSPA6* is induced only at high temperature and shows little or no basal expression (Leung et al. 1990). Er:YAG laser irradiation at 6.3 J/cm$^2$ increased the temperature of the HGF cell layer surface to 40.9 ± 1.4 °C from an ambient temperature of 26.7 ± 0.1 °C within 30 s, indicative of

acute hyperthermia. In addition, the treatment with the medium pre-warmed to 40 °C for 30 s induced significant cell proliferation. Therefore, the striking up-regulation of *HSPA6* following Er:YAG laser irradiation could be a consequence of the photo-thermal effect.

Heat sensing is typically mediated through TRP channels. In particular, the TRPV1 channel exhibits potential thermosensory function with a threshold of 42–43 °C (Benham, Gunthorpe, and Davis 2003). The suppression of laser-induced cell proliferation by CPZ and SKF suggested that TRP channels may be involved in the enhancement of HGF proliferation activity, and that the thermal effect may be an important factor following Er:YAG laser irradiation at 6.3 J/cm$^2$.

**Conclusion**

Er:YAG laser irradiation at 6.3 J/cm$^2$ promoted maximal HGF proliferation that was accompanied by transient cell damage. The irradiation consequences likely represented photo-thermal effects of heat stress that elicited various biological responses, including activation of TRP channels.

（和文要旨）

Er:YAG レーザーの生物学的効果を検討するために、初代培養ヒト歯肉線維芽細胞に対し、3.6, 4.2, 4.9, 6.3, 8.1 あるいは 9.7 J/cm$^2$ のエネルギー密度（フルーエンス）において、パルス数 20 あるいは 30 Hz で 30 秒間 Er:YAG レーザーを照射した。その結果、6.3 J/cm$^2$の照射において線維芽細胞の細胞増殖が最も促進されたが、同時に細胞傷害性を示す乳酸脱水素酵素の上昇も観察された。また、Ki67 陽性細胞数および cyclin-A2 の mRNA 発現がレーザー照射により増加した。透過型電子顕微鏡解析では、6.3 J/cm$^2$での照射の 3 時間後にミトコンドリアとリボソーム小胞体が変化したが、その変化は 24 時間後には消失した。マイクロアレイ解析により遺伝子発現の変化を網羅的に検討したところ、Heat shock protein 70 ファミリータンパク質などの熱作用に関連した遺伝子や小胞体機能に関連する遺伝子発現の変化が見られた。温度測定を行ったところ、6.3 J/cm$^2$での照射により 40.9°C までの細胞表面温度の上昇が観察された。また、40°C に加温した培養液を線維芽細胞に添加したところ、細胞増殖の促進がみられた。さらに、この 6.3 J/cm$^2$でのレーザー照射による細胞増殖の促進は、Transient receptor potential (TRP) channels の阻害剤の添加によって抑制された。以上より、6.3 J/cm$^2$での Er:YAG レーザー照射は、一過性の細胞傷害を引き起こすが、光熱ストレスによりヒト線維芽細胞の増殖を増強しており、創傷治癒において有利な効果を発揮する可能性が示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5518　号 | KONG Sophannary |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　木下淳博<br>副査　渡部 徹郎　　小田　茂 | |
| 論 文 題 目 | Biological effects of Er:YAG laser irradiation on the proliferation of primary human gingival fibroblasts | |

（論文審査の要旨）

Er:YAGレーザーは、発振波長の水への吸収性が非常に高いという特徴から、安全に歯周硬・軟組織の両方へ応用できるため、歯周治療に広く利用可能である。また、Er:YAGレーザーは高出力における組織の蒸散だけではなく、照射周囲組織では低出力による生物学的効果も確認されており、これまでに4.3 J/cm$^2$までの低出力エネルギー密度において細胞障害を生じることなく、細胞の増殖を促進することが報告されている。

しかし、中等度から高度出力のEr:YGAレーザーの細胞への影響は明らかにされていなかった。そこで申請者は、中等度から高度の出力でのEr:YAGレーザー照射の、ヒト線維芽細胞に対する生物学的効果を、包括的に検討した。

本研究では、Er:YAGレーザーの生物学的効果を検証するために、初代培養ヒト線維芽細胞に対し、3.6 - 9.7 J/cm$^2$のエネルギー密度でEr:YAGレーザーを照射し、細胞増殖および傷害の程度を、WST-8、細胞数計測およびLDHにより評価した。さらにエネルギー活性・細胞周期への影響については、ATPレベルの測定、 Ki67 染色およびcyclin-A2 のmRNA発現の測定を用いて検討した。透過型電子顕微鏡解析にて形態的変化を観察し、マイクロアレイ解析により遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。また、細胞の表面温度測定を行い、熱応答性のTransient receptor potential (TRP) channelsの関与をその阻害剤を用いて検討した。なお、本研究は本学歯学部倫理審査委員会の承認を得て実施された。

本研究において、申請者が、Er:YAGレーザーの特性を良く理解し、その生物学的効果をより詳細に解明するために、従来評価が行われてこなかった細胞傷害の生じる中等度の出力から、明かな細胞死が生じる高度の出力に着目し、準備周到な計画の下に、各種の実験手法を用いて包括的な研究を遂行し、詳細な研究分析を行っていることは高く評価できる。

本研究の主たる結果は、以下の通りである。

1. ヒト線維芽細胞は、 6.3 J/cm$^2$でのEr:YAGレーザー照射により、細胞増殖が最大に促進されたが、同時に細胞傷害を示す乳酸脱水素酵素の上昇を伴っていた。
2. Er:YAGレーザー照射は、ATP産生、 Ki67 染色細胞数およびcyclin-A2 のmRNA発現を増加させ、細胞周期に影響を及ぼし、増殖中の細胞数を増加させた。

3. 透過型電子顕微鏡解析により、6.3 J/cm²での照射の3時間後に、ミトコンドリアとリボソーム小胞体が変化し、24時間後にはその変化が消失しており、6.3 J/cm²でのレーザー照射は一過性の細胞傷害を生じさせていた。
4. マイクロアレイ解析により、熱作用に関連した生物学的反応や小胞体関連の変化が判明した。Heat shock protein 70ファミリーのmRNA発現は増加し、その遺伝子発現の変化はRT-qPCRによって確認された。
5. 6.3 J/cm²での照射は発熱を生じ、照射後の細胞表面温度は40.9 °Cに達していた。レーザーにより誘導された細胞増殖は熱応答性のTRP channelsの阻害により抑制された。また、40°Cに加温した培養液の添加は細胞増殖を促進した。

結論として、6.3 J/cm²でのEr:YAGレーザー照射は、一過性の細胞傷害を引き起こすが、同時に光熱ストレスによりヒト線維芽細胞の増殖を強力に増強しており、創傷治癒において有利な効果を発揮する可能性が示唆された。

本研究において、申請者は、細胞障害が生じる6.3 J/cm²の出力おいて、Er:YAGレーザー照射が最も細胞増殖促進作用が高いことを初めて立証した．これは本レーザーの臨床応用において参考となる興味深い所見である。

特に6.3 J/cm²でのEr:YAGレーザー照射による温熱効果の関与を明らかにし、熱作用に関連した生物学的反応および熱反応性のTRP channelsの関与、さらに一過性の細胞構造の変化を明らかにしたことは、本レーザーの生物学的効果のメカニズムを考える上で重要なエビデンスを多く提供している。

本論文は今後の歯周治療における、Er:YAGレーザーの臨床応用において多くの点で参考となる内容であることから、レーザー歯学および歯周治療学のみならず歯科医学全体の発展に大きく貢献するものと考えられる。

よって本論文は、博士(歯学)の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 城戸　大輔 |
| 論文審査担当者 | 主査　荒川　真一<br>副査　池田　通、小田　茂 |
| 論　文　題　目 | Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

本研究は、糖尿病の歯肉の創傷治癒へ影響を与えるメカニズムを評価することを目的とした。健常ラットおよびストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット（DM 群）の左右側上顎口蓋歯肉に創傷を作製した。術直後、3、7、21 日後に創傷閉鎖の評価を行ない、組織学的評価として創部の標本を作製した。創部の歯肉から mRNA を抽出し、創傷治癒や酸化ストレスに関する遺伝子発現を real time PCR 法を用いて測定した。さらに、創傷作製時に除去した歯肉から歯肉線維芽細胞を分離・培養し、高血糖による遊走能や増殖能への影響について、酸化ストレスやインスリン抵抗性の点から検討を行なった。*In vivo* 実験から、DM 群のラットでは創傷治癒の有意な遅延が認められた。*In vitro* 実験から、高血糖条件で培養された歯肉線維芽細胞では遊走能、増殖能が有意に低下し、酸化ストレスの有意な亢進とインスリン抵抗性が発現した。さらに、抗酸化剤の添加によってインスリン抵抗性の改善が認められた。以上の結果から、糖尿病ラットの歯肉においては、高血糖による酸化ストレスを介して誘発されたインスリン抵抗性によって歯肉線維芽細胞が機能不全を起こし、その結果、創傷治癒が遅延することが示された。

＜緒言＞

歯周病と糖尿病との間に密接な関係にあることは多くの疫学研究や臨床研究によって明らかになっている。臨床においても、DM 罹患患者では非外科の歯周治療や歯周外科治療後の治療成績が不良であり、組織の治癒および再生が遅延することが知られている。高血糖状態において歯肉の創傷治癒が遅延することは知られているものの、そのメカニズムについては不明である。本実験の目的は、糖尿病誘発ラットを用いて高血糖が歯肉の創傷治癒に与える影響について検討することである。

＜方法＞

本研究では、糖尿病モデルラットを用いた *in vivo* 実験と、そのラットから分離・培養した歯肉線維芽細胞を用いた *in vitro* 実験を行なった。糖尿病の誘発は、12 時間絶食後にストレプトゾトシン(STZ)を 60mg/kg 腹腔内投与して行った。6 週齢の Wistar 系雄性ラット 36 頭を無作為に２群に分け、一方の群に STZ を、もう一方の群は同量の生理食塩水を腹腔内投与した。STZ を投与したラットのうち 1 週間後の血糖値が 350mg/dl 以上を示したものを糖尿病群（DM 群）とした。糖尿病発症 2 か月後にインスリン分泌量および酸化ストレスの変化を検討するため、血中のイン

スリン濃度および尿中の 8-ヒドロキシ-2’-デオキシグアノシン(8-OHdG)濃度を ELISA 法にて測定した。

口蓋歯肉の創傷は、イソフルレンの吸入麻酔下に仰臥位にラットを固定し、上顎臼歯部両側口蓋粘膜に長さ 5mm、幅 1.5mm の切開を行い、歯肉を骨膜ごと除去することで創傷を外科的に作製した。

創傷治癒の過程における創部の閉鎖状況を定量的に評価するため、規格化した口腔内写真を撮影し、創部面積の計測を行なった。口腔内写真の撮影は、ラットを仰臥位に固定し開口させた状態で上顎咬合平面に対して 70° 上方から 1.5 倍の拡大率で術後、3、7、21 日後に撮影し、創部面積の計測を行なった。イメージングソフト（Image J）を用いて撮影された画像の創部面積を測定し、その閉鎖状況を経時的に評価した。ラットは術後 3、7、21 日に安楽殺した。安楽殺後、創部を含む上顎組織を 10%ホルマリンで固定し、10%EDTA 溶液にて 8 週間緩徐脱灰を行い、次いで通法に従いパラフィン包埋した。包埋後、厚さ 4μm の薄切連続脱灰切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。染色後の組織切片は光学顕微鏡にて観察し、創部における歯肉の治癒、再上皮化、炎症性細胞の浸潤について観察した。

歯肉局所における創傷治癒や酸化ストレスに関わる遺伝子発現を検討するために、創傷作成時に除去した歯肉、および 3、7, 21 日後に採取した創部の肉芽組織から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて Nox1、Nox2、Nox4、p-47、eNOS、VEGF、TNF-α、FGF2、コラーゲン I の mRNA の発現を解析した。

*In vivo* 実験で得た結果を検証するために、使用したラットの口蓋歯肉線維芽細胞を用いて *in vitro* 実験を行なった。創傷作製時に切除した口蓋歯肉を抗菌薬含有 PBS で洗浄し、ディスパーゼ I にてインキュベートを行ない、上皮と結合組織に分離した。上皮の分離によって得られた結合組織を 2 ㎟に細断後組織培養し線維芽細胞を得た。高血糖の影響を検討するため、得られた線維芽細胞における至適グルコース濃度を検討した。浸透圧を調整した 5.5、15、20、25、50、75、100mM のグルコース培養液にて線維芽細胞を 72 時間培養し、各グルコース濃度における細胞遊走能、細胞毒性をそれぞれ *in vitro* wound healing assay、LDH release assay にて検討した。その結果から、高グルコース濃度群および対照群のグルコース濃度を決定した。

コントロール群および DM 群ラット由来の線維芽細胞における遊走能、増殖能をそれぞれ *in vitro* wound healing assay、EdU および WST-8 assay を用いて検討した。また細胞レベルでの高血糖による酸化ストレスの影響を検討するために酸化ストレスマーカーである Nox1、Nox2、Nox4、p-47 の発現を定量し、ROS 産生について CM-H2DCFDA にて解析した。さらに、細胞遊走や増殖を制御する PI3K、MAPK 経路を介したインスリン抵抗性の発現を検討するためにインスリン刺激後の Akt および Erk のリン酸化をウエスタンブロット法にて評価した。

*In vivo*、*in vitro* 実験の結果から、インスリン抵抗性の発現に高血糖に伴う酸化ストレスの影響が考えられたため、抗酸化剤である N-Acetyl-L-cysteine (NAC) 5mM を培養液に添加し、再度インスリン抵抗性の発現を検討した。

なお、本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会で審査・承認(承認番号: A2017-182A)され、東京医科歯科大学動物実験規則に基づき実施された。

＜結果＞

STZ 投与により、DM 群では血糖値が平均 465.1±63.7mg/dl まで増加し、体重はコントロール群と比較して有意に減少した。また血中インスリンレベルは有意に低下し、尿中 8-OHdG の測定により全身的に酸化ストレスが有意に上昇したことが明らかになった。

コントロール群では創傷作製後 21 日で創の完全な閉鎖が認められたのに対して、DM 群では15.4%で完全閉鎖は認められなかった。また組織学的には、創傷作成後 21 日でコントロール群では創部の完全な治癒と炎症性細胞の消失が認められたのに対し、完全閉鎖が認められなかった DM 群では上皮による創傷の完全な閉鎖が認められず、また創部において炎症性細胞が浸潤していた。

歯肉における mRNA の発現の検討では、DM 群において Nox1、Nox2、Nox4、p47 などの酸化ストレスマーカー、炎症性マーカーである TNF-α は術前から有意に増加を認めた。また DM 群において創傷治癒マーカーである eNOS と VEGF は発現の上昇が遅延し、FGF2 およびコラーゲン I は、有意に発現量が低下した。

線維芽細胞を用いて至適グルコース濃度を検証した実験の結果、グルコース濃度 15mM において最も毒性が低下し、20mM 以上では細胞毒性が増加したが 75mM までは有意な増加はみられず、100mM で有意に増加したことが明らかになった。また、細胞遊走能は、15mM において最も遊走能が増加し、20mM 以上では遊走能は低下し、75mM において有意に減少した。なお、100mM においてはスクラッチ後 18 時間以内に細胞が完全に浮遊し、遊走能の評価が不能であった。これらの結果から、細胞遊走能がもっとも増加する 15mM および、もっとも低下する 75mM の条件で比較実験を行うこととした。コントロール群と DM 群から分離・培養した線維芽細胞における細胞遊走能の経時的な検討では、18、24、30、36 時間において DM 群で有意に低下した。また、細胞遊走能、増殖能の検討においては、コントロール群では、15mM 培養群と 75mM 培養群で有意差を認めなかったが、DM 群において 75mM 培養群は 15mM 培養群と比較して両者が有意に低下した。また、15mM、75mM のそれぞれのグルコース濃度で比較した場合、DM 群が遊走能、増殖能ともに有意に低下していた。*In vitro* における酸化ストレスの評価では、Nox1、Nox2、Nox4、p47 の発現量、ROS 産生量ともに DM 群で有意に増加し、Nox1、Nox2、p47、ROS 産生量についてはコントロール群、DM 群ともに、75mM 培養群は 15mM 培養群と比較して有意な増加が認められた。また、Nox4、p47、ROS 産生量については 15mM 培養群、75mM 培養群ともに DM 群で有意な増加を認めた。インスリン抵抗性の検討では、DM 群においてインスリン刺激後の Akt のリン酸化が有意に減少しておりインスリン抵抗性の発現が認められた。また、インスリン刺激前に NAC で前培養を行った場合には、DM 群においても Akt のリン酸化が有意に増加した。

＜考察＞

本研究は、高血糖によって引き起こされる酸化ストレスを介して線維芽細胞にインスリン抵抗性が発現し、機能が低下することで糖尿病ラットの歯肉で創傷治癒が遅延することを明らかにした初めての論文である。創傷治癒の形態学的、および組織学的な評価では、コントロール群においては術後 7 日までに上皮の伸展や創部の閉鎖が認められた一方で、DM 群では術後 21 日でも創部の閉鎖が認められないものがあり、創傷治癒の遅延が示唆された。

高血糖状態により全身的に酸化ストレスが増加することや、増加した酸化ストレスが糖尿病合併症の発現に関与することが報告されているが、本研究においても Nox1、Nox2、Nox4、p47 の発現の増加から DM 群では歯肉局所において、さらに ROS 測定によって培養細胞においても酸化ストレスが有意に増加していることが示唆された。これらの DM 群が示した特徴は、膵臓 β 細胞を選択的に破壊する STZ によって糖尿病が誘発された高血糖になった結果と考えられる。

DM 群において、血管新生に関わる eNOS の発現の有意な減少、eNOS の下流の VEGF の有意な減少が認められ、組織再構築に関わる FGF2 やコラーゲン I の発現についても DM 群において有意に低

下することから、DM 群における創傷治癒の低下は血管新生や組織再構築が低下や遅延が原因であることが示唆された。また、コントロール群、DM 群ともに、高グルコース濃度状態での培養によって、細胞増殖能および細胞遊走能の低下、さらに酸化ストレスの増加が認められたことから、細胞レベルにおいても高血糖が細胞機能を阻害することが示唆された。

さらにメカニズムについては、75mM で培養した DM 群由来の線維芽細胞では 15mM で培養したコントロール群由来の線維芽細胞と比較して、細胞増殖能や遊走能が有意に低下し、かつインスリン刺激後 Akt 活性化が低下しインスリン抵抗性の発現が認められた。抗酸化剤である NAC を用い、糖尿病群において低下した Akt のリン酸化が改善したことから、糖尿群において PI3K/Akt 経路を介してインスリン抵抗性が発現する過程に高血糖に由来する酸化ストレスが関与していることが示唆された。

以上より、細胞増殖や遊走に関わるインスリンシグナルが酸化ストレスを介して減弱することで糖尿病ラットにおいて歯肉の創傷治癒が遅延することが示唆された。

＜結論＞

持続する高血糖状態によって、歯肉線維芽細胞において酸化ストレスを介したインスリンシグナルの減弱が生じることにより、インスリン抵抗性を獲得し、歯肉における血管新生や組織再構築が阻害され、創傷治癒が遅延することが明らかになった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5519　号 | 城戸　大輔 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　荒川　真一<br>副　査　池田　通、小田　茂 | |
| 論 文 題 目 | Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress | |

（論文審査の要旨）

歯周治療において、糖尿病患者では治療効果が低く、さらに治癒が遷延することが報告されている。これまで、高血糖と創傷治癒の関連に関する研究としては、ラットの口蓋粘膜における創傷治癒の遅延に関する研究があるが、そのメカニズムとしてインスリン抵抗性について検討した報告はなかった。

そこで申請者は、糖尿病誘発ラットと健常ラットにおける創傷治癒過程の分析、およびラットから培養した線維芽細胞における高血糖の影響について検討した。本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会で審査・承認(承認番号: A2017-182A)され、東京医科歯科大学動物実験規則に基づき実施された。

糖尿病誘発に伴う高血糖による酸化ストレスの全身的評価として尿中 8-OHdG の測定を行った。歯肉における創傷治癒の検討では、口蓋歯肉に創傷を作製し、その治癒過程において形態学的、組織学的な解析を行ない、さらに創部歯肉における酸化ストレス、炎症、創傷治癒関連タンパクをコードする遺伝子発現を検討した。

さらに、高血糖状態の線維芽細胞への影響を検討するため、細胞増殖能や遊走能、酸化ストレスについて分析を行なった。また、歯肉の線維芽細胞における高血糖に由来するインスリン抵抗性発現のメカニズムを検討するため、PI3K/Akt 経路についてウエスタンブロット法にてインスリンシグナリングの解析を行なった。

本研究において申請者が、高血糖状態が歯肉に与える影響について充分理解し、かつ創傷治癒に対する生物学的効果を詳細に解析するために、歯肉、および線維芽細胞の分析方法について事前に充分な検討を重ね、適切な研究計画の下で本実験を遂行したことは高く評価できる。

本研究の主たる結果は以下のとおりである。

1.　ラット口蓋に作製した創傷は、DM 群において術後 21 日で創の完全な閉鎖が認められず、術後 21 日で完全な閉鎖を認めたコントロール群と比較して有意な遅延が認められた。

2.　組織標本における形態学的分析により、コントロール群では術後 21 日で創傷の完全な治癒と炎症性細胞の消失を認めたが、DM 群では創傷の完全な閉鎖が認められず、また創部周辺における炎症性細胞の浸潤が認められた。

3.　酸化ストレスや炎症など創傷治癒に関する各種タンパクをコードする mRNA 発現の分析を行った結果、DM 群において Nox1、Nox2、Nox4、p47、TNF-αがベースライン時の歯肉において有意に増加していた。一方、創傷治癒マーカーである eNOS、VEGF、FGF2、Collagen I については DM 群において有意に発現が低下した。

4.　両群ラットから単離・培養した歯肉線維芽細胞の遊走能と増殖能を解析した結果、DM群で有意に遅延が認められ、酸化ストレスについては、DM群で有意にNox1、Nox2、Nox4、p47の発現量、およびROS産生量が増加した。また、DM群・コントロール群ともに、高グルコース濃度状態で遊走能や増殖能が低下し、酸化ストレスは増加した。
5.　DM群ではインスリン刺激後のAktのリン酸化が有意に減少し、インスリン抵抗性が認められた。さらに、インスリン刺激前に抗酸化剤であるNACで前培養を行なった結果、DM群においてもインスリン刺激後のAktのリン酸化が有意に増加した。

以上の結果より、歯肉線維芽細胞において、高血糖による酸化ストレスを介して細胞増殖や細胞遊走に関わるインスリンシグナルに抵抗性が発現した結果、歯肉の創傷治癒が遅延する可能性が示唆された。

本研究は、糖尿病モデルラットの歯肉創傷治癒の遅延は、高血糖による酸化ストレスを介した線維芽細胞の機能不全によることを初めて詳細に報告したものである。これらの知見は、糖尿病と創傷治癒に関する研究において非常に重要なものであり、歯周治療のみならず、今後の抗酸化剤の治療への応用など、広く医療分野に大きく貢献すると考えられる。

よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行なうにあたり、十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 大津　杏理 |
| 論文審査担当者 | 主査　鈴木　敏彦<br>副査　木下　淳博，荒川　真一 |
| 論　文　題　目 | *Porphyromonas gingivalis* 感染マウスにおける腸内細菌叢の変動 |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

近年，心臓血管疾患，糖尿病，誤嚥性肺炎，早産・低体重児出産など，様々な全身疾患におけるリスク因子として，歯周病が注目されている。そのメカニズムとして，口腔細菌の構成成分や菌体そのもの，また病変部で産生された炎症メディエーターが全身循環へ流入し，遠隔の標的臓器へ到達し影響を及ぼす可能性や，歯周病原細菌の菌体成分と分子相同性の高い自己成分の存在が持続的な免疫応答を引き起こす可能性などが考えられる。また最近では，口腔細菌が唾液や食物とともに大量に消化管へ流入することで，歯周病に関わる細菌が腸内細菌叢に変化を与え，全身に影響を及ぼす新たなメカニズムが注目されている。腸内細菌は食物に由来する栄養素を代謝することで宿主に恩恵を与えているだけでなく，有害細菌の増殖阻止や腸管免疫系を制御することで全身の免疫応答にも関与している。これら腸内細菌種の構成異常(いわゆる dysbiosis)は，消化管疾患に限らず，肥満や糖尿病，非アルコール性脂肪肝炎，アレルギー疾患，関節リウマチなど，様々な疾患の発症・進行へ関与することが指摘されている。

本研究では，代表的な歯周病原菌である *P. gingivalis* をマウスに経口投与し，腸内細菌叢に与える影響を調べた。

＜方法＞

本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会で審査・承認(0170331A)され，東京医科歯科大学動物実験規則に基づき実施された。4 週齢のオスの野生型 C57BL/6J マウスを 12 時間の明暗サイクルで飼育した。*P. gingivalis* ATCC 33277 を嫌気条件下で培養し，最終濃度が $1\times10^9$ 個/mL となるよう希釈調製した。また菌液の一部は超音波ホモジナイザーにかけ，菌体を破砕したものを作製した。マウス 8 週齢より，100 µL の *P. gingivalis* 生菌（Pg-L），*P. gingivalis* 死菌（超音波破砕物，Pg-D），または生理食塩水（co）のいずれかを週 2 回，5 週間にわたり経口投与し（n = 7），13 週齢時に血液，糞便，臓器のサンプル採取を行った。血漿中の抗 *P. gingivalis* IgG 抗体価を ELISA 法にて測定した。腸内細菌叢解析のため糞便より細菌 DNA を抽出し，16S rRNA 遺伝子解析を行った。小腸および肝臓組織から RNA を抽出し，これら組織における炎症性サイトカインおよび腸管上皮のタイトジャンクションタンパク質の mRNA 発現を定量的 PCR 法により調べた。

＜結果＞

抗 *P. gingivalis* IgG 抗体価は，Pg-L 群および Pg-D 群では co 群と比較して有意に高い値を示した。

16S rRNA 遺伝子解析に基づく主座標分析において，Pg-D 群と co 群の細菌叢は有意に異なるピークパターンを示した。さらに，Pg-L 群と Pg-D 群との間でも差違が認められた。

各群における腸内細菌の構成は，4 つの門において有意な存在比率の相違が認められた。Pg-D 群では，Actinobacteria 門が Pg-L 群と比較して，また TM7 門が co 群と比較して高い存在比率を示した。また Pg-D 群では Proteobacteria 門の存在比率が他の 2 群よりも低く， Pg-L 群では Deferribacteres 門が他の 2 群より高い存在比率を示した。さらに，いずれの群においても 0.1%以上の割合を占める属に注目し解析すると，Pg-L 群では他の 2 群と比較して *Lactobacillus* 属が低い存在比率を，*Mucispirillum* 属が高い存在比率を示していた。一方， Pg-D 群では *Bifidobacterium* 属が高い存在比率を示した。種レベルで各群において相対比率 0.1%以上の細菌に注目した場合においても，Pg-L 群で *Lactobacillus johnsonnii* が Pg-D 群と比較して低い存在比率を示し，*Mucispirillum schaedleri* が Pg-D 群と比較して高い存在比率を示していた。また *Bifidobacterium pseudolongum* は Pg-D 群では他の 2 群と比較して高い存在比率を示していた。

小腸のタイトジャンクションタンパク質である ZO-1，claudin-1，occludin の mRNA 発現を調べたところ，3 群間で有意な差は認められなかった。また小腸および肝臓での TNF-α および IL-6 の mRNA 発現を調べたところ，Pg-D 群では co 群と比較して *Il6* の発現が小腸および肝臓で有意に高く，小腸における *Tnfα* 発現も上昇の傾向（P =0.053）が認められた。Pg-L 群では co 群と比較して，肝臓における *Il6* の発現が有意に高かった。

＜考察＞

歯周病原細菌である *P. gingivalis* の経口投与は，菌の生死にかかわらず腸内細菌叢に変化を生じさせたが，それらの細菌構成には違いが認められた。属レベルで検索すると，co 群と比較して Pg-L 群では *Lactobacillus* 属の存在比率低下と *Mucispirillium* 属の上昇が認められ，Pg-D 群では *Bifidobacterium* 属の割合上昇が認められた。*Lactobacillus* 属は消化管内において上皮に強く付着し，酸性環境を作り出すことで他の病原微生物と拮抗するだけでなく，腸粘膜における細菌の通過を制御することで免疫寛容に関与し，その恒常性の維持に働いていることが知られている。また *L. johnsonii* は胆汁酸に対し高い加水分解活性を示すことが知られている。胆汁酸は体内コレステロールの最終代謝産物であり，生体におけるコレステロールの増加抑制に働くと考えられる。本菌の減少は Pg-L 群にのみ認められた。さらに Pg-L 群では *Mucispirillum* 属および *M. schaedleri* の増加が認められているが，*M. schaedleri* は齧歯動物やその他家畜動物などで急性大腸炎に関わる病原菌として知られている。一方で Pg-D 群では *Bifidobacterium* 属の増加が認められた。*Bifidobacterium* は *Lactobacillus* と同様，乳酸菌に分類され腸内環境の維持に有益な役割を果たしていると考えられる。ヒトにおいて *Bifidobacterium* は加齢とともに減少し，逆に *Clostridium perfringens* など疾患の原因とな

る細菌が増えることが知られている。これらのことから，生菌が投与された場合に腸内細菌叢はより病的な状態に傾くことが推測された。

*P. gingivalis* の経口投与により，小腸や肝臓において炎症性サイトカインである IL-6 の mRNA 発現が上昇していることから，歯周病原細菌の経口的な流入が局所の臓器において炎症を惹起することで全身の健康に負の影響を及ぼす可能性があると考えられた。腸管透過性の亢進は，細菌自体またはその成分が血流に侵入することで炎症を引き起こす可能性が考えられるが，本研究では生菌および死菌のいずれを投与した場合においても細胞間接着に関わる膜タンパク質の mRNA 発現に変化は認められなかった。本研究により歯周病原細菌の経口投与が局所の臓器に炎症を起こす可能性が示され，腸内細菌叢の変化も確認された。一方，歯周病が全身に与えるメカニズムとして，リーキーガット症候群において病因因子と考えられている腸管透過性の亢進と腸内細菌の dysbiosis を想定していたが，本研究のモデルではそれを裏づける結果は得られなかった。

＜結論＞

マウスにおける歯周病原細菌の経口投与は，腸内細菌叢を変化させていた。この変化は生菌に限らず，細菌の菌体成分のみでも変化を起こしうることが示された。また歯周病原細菌の投与が局所臓器で炎症を惹起する可能性が示唆された。一方，腸管透過性の亢進を裏づける研究結果は本研究では確認できず，経口投与が全身に与えるメカニズムについては腸内細菌叢の変化を介さない経路などについても考える必要性があることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5520　号 | 大津　杏理 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　鈴木　敏彦<br>副　査　木下　淳博，荒川　真一 | |
| 論 文 題 目 | *Porphyromonas gingivalis* 感染マウスにおける腸内細菌叢の変動 | |

（論文審査の要旨）

腸内細菌叢の構成異常(dysbiosis)は消化管疾患に限らず，肥満や糖尿病，非アルコール性脂肪肝炎，アレルギー疾患，関節リウマチなど，様々な疾患で認められ，その発症や進行に関与することが疑われている。そして一方、歯周病はこれら疾患のリスク因子となることが報告されている。近年，歯周病原細菌が消化管を通じて腸内細菌叢にも変化を生じさせることで，全身の健康に影響を及ぼす新たなメカニズムが注目されているが，喫煙など共通するリスク因子も多く，歯周病と腸内細菌叢の因果関係については推測の域を出ていない。本研究ではこの機序を検討するために，代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* をマウスに経口投与し，腸内細菌叢に与える影響を調べることを目的とした。歯周病と全身疾患との関連を考える際に腸内細菌叢の関与について着目した研究は少なく，この点に焦点を当てたことは高く評価できる。

本研究では，*P. gingivalis* 生菌（Pg-L），*P. gingivalis* の超音波破砕物（Pg-D），生理食塩水（co）のいずれかをマウスに経口投与し，各群において糞便をサンプルとした腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子解析を行った。また各臓器に与える影響を調べるために，小腸および肝臓組織における炎症性サイトカインおよび腸管上皮のタイトジャンクションタンパク質の mRNA 発現を定量的 PCR 法にて解析した。(東京医科歯科大学動物実験委員会承認番号：0170331A)

本研究の主たる結果は以下の通りである。

1．*P. gingivalis* 投与により血漿中の抗 *P. gingivalis* IgG 抗体価は上昇しており，特に Pg-L 群でより高い抗体価が確認された。
2．16S rRNA 遺伝子解析に基づく主座標分析において，Pg-D 群と co 群の細菌叢は有意に異なるピークパターンを示した。さらに，Pg-L 群と Pg-D 群との間でも差違が認められた。
3．3 群間における腸内細菌の構成は，主要な細菌門では違いが認められなかったものの，4 つの門において有意な存在比率の相違が認められた。Pg-D 群では，Actinobacteria 門が Pg-L 群と比較して，また TM7 門が co 群と比較して高い存在比率を示した。また Pg-D 群では Proteobacteria 門の存在比率が他の 2 群よりも低く， Pg-L 群では Deferribacteres 門が他の 2 群より高い存在比率を示した。
4．いずれの群においても 0.1%以上の割合を占める属に注目し解析すると，Pg-L 群では他の 2

群と比較して *Lactobacillus* 属が低い存在比率を，*Mucispirillum* 属が高い存在比率を示していた。一方， Pg-D 群では *Bifidobacterium* 属が高い存在比率を示した。

５．さらに種レベルで各群において相対比率 0.1%以上の細菌に注目した場合においても，Pg-L 群で *Lactobacillus johnsonii* が Pg-D 群と比較して低い存在比率を示し，*Mucispirillum schaedleri* が Pg-D 群と比較して高い存在比率を示していた。また *Bifidobacterium pseudolongum* は Pg-D 群では他の 2 群と比較して高い存在比率を示していた。

６．小腸のタイトジャンクションタンパク質である ZO-1，claudin1，occludin の mRNA 発現を調べたところ，3 群間で有意差は認められなかった。

７．小腸および肝臓での TNF-α および IL-6 の mRNA 発現を調べたところ，Pg-D 群では co 群と比較して *Il6* の発現が小腸および肝臓で有意に高く，Pg-L 群では co 群と比較して肝臓における *Il6* の発現が有意に高かった。

これらの結果から以下のことが考察された。

歯周病原細菌である *P. gingivalis* の経口投与は，菌の生死にかかわらず腸内細菌叢に変化を生じさせたが，それらの細菌構成には違いが認められた。歯周病が全身の健康に影響するメカニズムとして，リーキーガット症候群において病因因子とされる腸管透過性の亢進を考えていたが，これを裏づける現象は本研究では確認できなかった。しかし小腸や肝臓において炎症性サイトカインである IL-6 の mRNA 発現が上昇していることから，歯周病原細菌の経口投与が各臓器に炎症を起こす可能性が示唆された。

本研究において大津 杏理は，歯周病と全身疾患の新たなメカニズムのひとつとして歯周病原細菌が腸内細菌叢に与える影響について検討し，報告した。マウスにおける歯周病原細菌の経口投与は，腸内の細菌構成を変化させていた。この変化は生菌に限らず，細菌の超音波破砕物の投与でも認められ，細菌の菌体成分であっても腸内細菌叢に変化を起こしうることが示された点は興味深い。また，経口感染によって他の臓器に炎症を惹起させる可能性が示された。

歯周病と全身疾患との関連が報告されているが，その機序については依然不明な点が多い。本研究は，歯周病が全身へ影響を与える新たなメカニズムを解明する上で重要なものであると考えられる。

よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行うにあたり，十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 谷本　理沙子 |
| 論文審査担当者 | 主査　柴田　俊一<br>副査　荒川　真一、中浜　健一 |
| 論　文　題　目 | Low-level ultrahigh-frequency and ultrashort-pulse blue laser irradiation enhances osteoblast extracellular calcification by upregulating proliferation and differentiation via transient receptor potential vanilloid 1 |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞


低出力レーザー照射 (Low level laser irradiation: LLLI) は創傷治癒や骨折治癒の促進をすることが知られているが、その詳細な機序については不明な点が多い。本研究ではマウス由来骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1) に対して超高繰り返し (ultrahigh-frequency: UHF) 超短パルス (ultrashort-pulse: USP) の青色レーザー (405 nm, 80 MHz) による LLLI を行い、その作用を検討した。その結果、細胞増殖試験や ALP 活性試験により、UHF-USP 青色レーザーによる LLLI は、同一波長の連続波と比較して有意に骨芽細胞の増殖と分化を促進することが明らかとなった。UHF-USP 青色レーザーによる LLLI は、9.4 J/cm$^2$までは出力依存的に細胞増殖を促進したのに対し、骨芽細胞分化の促進については 5.6 J/cm$^2$で最大であった。その際、*runt-related transcription factor 2 (Runx2)*、*osterix (Osx)*、*alkaline phosphatase (Alp)*、 *osteopontin (Opn*) などの骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現が促進されていた。またアリザリン染色により、UHF-USP を用いた LLLI による細胞外基質の石灰化の促進が確認された。さらに、LLLI による生体刺激効果と細胞膜上のイオンチャネルのひとつである transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の関連を明らかにするべく、TRPV1 の選択的阻害薬である capsazepine (CPZ) を用いた阻害実験行ったところ、CPZ は LLLI により促進された細胞増殖及び ALP 活性を抑制することが明らかとなった。

以上より、超高繰り返し超短パルス青色レーザーを用いた低出力照射は骨芽細胞の増殖と分化を促進することで細胞外基質の石灰化を促進し､それらの効果はいずれも TRPV1 を介している可能性が示唆された。


＜緒言＞

低出力レーザー照射　(Low level laser irradiation: LLLI) は創傷治癒や骨折治癒の促進をすることが知られている。これまで赤外および近赤外領域の光源を用いた LLLI について多くの検討がなされ、骨芽細胞を用いた *in vitro* の研究においては、LLLI は様々な増殖因子および骨形成関連遺伝子の発現や石灰化を促進することが報告されている。また *in vivo* においても LLLI は骨折治癒を促進することが示されている。しかし、青色波長レーザーを用いた LLLI の骨芽細胞への影響に関する報告はほとんどなく、さらに超高繰り返しパルスによる LLLI の骨芽細胞への効果も

十分に検証されていない。本論文では超高繰り返し超短パルスの青色レーザーを用いた LLLI が骨芽細胞の増殖および分化へ及ぼす作用とそのメカニズムについて検討を行った。また近年、青色ならびに緑色光源による LLLI は細胞膜上の transient receptor potential (TRP) チャネルを介して作用している可能性が報告されている。我々は本研究で用いる超高繰り返し (UHF) 超短パルス (USP) のレーザーが、細胞に対して機械的な刺激を与える可能性があることから、本レーザーによる LLLI が機械刺激や熱刺激など様々な物理的・化学的刺激の受容体である TRP vanilloid 1 (TRPV1) を介しているかの検討を併せて行った。

＜方法＞

マウス由来骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 を骨芽細胞分化誘導培地 (50 μg/ml アスコルビン酸、10 mM β-グリセロフォスフェート、10 nM デキサメタゾンを添加した 10% FBS 含有 α-MEM) にて培養し、波長 405 nm の青色半導体レーザー (Insight DeepSee、Spectra-Physics 製) を 80 MHz、100 fs にて UHF-USP として発振し、1 分間照射を行った。連続波との比較を行う際は波長 405 nm、連続波の青色ダイオードレーザー (NDV7116、日亜製) を使用した。レーザー照射による発熱の細胞への影響を調べるため、デジタル温度計を用いてレーザー照射時の培地の温度上昇を計測した。レーザー照射後、3 日目に細胞増殖試験 (WST-8 assay, cell counting assay) 、1、2、3 日目に *in vitro* wound healing assay、7 日目にアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性試験、3 週後に ALP 染色を行った。また、レーザー照射後 0、9 時間後、1、3、7 日目に骨芽細胞分化マーカーである *runt-related transcription factor 2 (Runx2)*、 *osterix (Osx)*、*alkaline phosphatase (Alp)*、*osteopontin (Opn)* について mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて測定し、細胞外基質の石灰化についてアリザリン染色の面積測定により評価した。さらに、LLLI による生体刺激効果と transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の関連を明らかにするべく、TRPV1 の発現をウェスタンブロット法にて確認し、TRPV1 の選択的阻害薬である capsazepine (CPZ) を用いた阻害実験を行った。5 μM の CPZ を培地に添加してから 10 分後にレーザー照射を行い、3 日目に細胞増殖試験を、7 日目に ALP 活性試験を行った。

＜結果＞

UHF-USP 青色レーザーによる LLLI は、連続波による LLLI と比較して 1.9 J/cm$^2$と 5.6 J/cm$^2$においてレーザー照射 3 日後の MC3T3-E1 細胞の増殖を有意に促進した。また、レーザー照射後 7 日目の ALP 活性についても、UHF-USP 青色レーザーは連続波と比較して有意に促進することが分かった。

UHF-USP 青色レーザー照射による培地の温度上昇は 0.4 ℃以下であり、熱による細胞への影響は非常に低いことが分かった。

UHF-USP 青色レーザーによる細胞増殖促進効果はレーザー照射後 3 日目において、5.6 -9.4 J/cm$^2$までは出力依存的に増加し、13.1 J/cm$^2$以上の出力では逆に細胞増殖を有意に抑制することが分かった。さらに *in vitro* wound healing assay により、1.9 J/cm$^2$と 5.6 J/cm$^2$の出力で LLLI を行った群ではレーザー照射後 1 日後と 2 日後において創の閉鎖を有意に促進することが示された。

レーザー照射後 7 日目の ALP 活性は 1.9、5.6、9.4 J/cm$^2$の LLLI により有意に促進され。その効果は 5.6 J/cm$^2$の出力において最大であった。また ALP 染色において、1.9 J/cm$^2$と 5.6 J/cm$^2$で照射

した群は、非照射群と比較してより広い面積が染色された。また骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて測定したところ、骨芽細胞分化に関わる転写因子である *Runx2* および *Osx* と骨芽細胞分化の初期マーカーである *Alp* の mRNA 発現はレーザー照射後 3 日目または 7 日目で有意に亢進していた。さらに培養開始から 2、4、6、9、11 日目の計 5 回、5.6 J/cm$^2$ の出力で照射を行った群では、照射後 3 週目において非照射群と比較して細胞外基質の石灰化が有意に促進されていることがアリザリン染色により示された。

一方で、ウェスタンブロット法により照射後 3 日目と 7 日目における TRPV1 タンパク発現は対照群と照射群で有意な差がないことを確認した。次に、TRPV1 阻害薬である capsazepine (CPZ) を用いて阻害実験を行ったところ、非照射群では CPZ 非添加群と添加群の間で細胞増殖に有意な差は認めなかったが、LLLI 群おいては CPZ を添加すると LLLI により促進された細胞増殖のうち 82%が抑制されていた。同様に ALP 活性についても、非照射群では CPZ 添加の有無により有意な差は認めなかったが、LLLI 群においては CPZ を添加すると促進された ALP 活性のうち、64%が抑制された。

＜考察＞

これまで LLLI の生体刺激効果について *in vitro* や *in vivo* において多くの報告がなされてきたが、その多くは近赤外から赤外領域の光源を用いたものであった。本研究では骨芽細胞において青色レーザーを用いた LLLI が細胞増殖および分化の両者を促進することを初めて示した。

これまで連続波 (CW) と比較して高パルスのレーザーは高い生体刺激効果を持つことがいくつかの論文により示されてきたが、本論文では既存の LLLI に関する論文で使用されているものよりはるかに高い繰り返し数 (UHF: 80 MHz) および超短パルス (USP: 100 fs) という特性をもつレーザーの効果を検討し、細胞増殖と骨芽細胞分化の両者において、UHF-USP は CW と比較して有意に細胞賦活効果が高いことを明らかにした。また興味深いことに、両者における最適出力は細胞増殖では 5.6 J/cm$^2$であったのに対し、骨芽細胞分化 では 9.4 J/cm$^2$と明らかな相違が認められ、それぞれ異なった経路を介して作用している可能性が示唆された。

UHF-USP 青色レーザーによる LLLI が作用するメカニズムを考える際、青色の光自体が持つ作用と UHF-USP による機械的な刺激による作用の両者を考える必要がある。前者についてはシトクロム C オキシダーゼやフラビンタンパクなどが光受容体として働く可能性が示されている。

一方、後者の機械的な刺激に関わるメカニズムのひとつとして、本研究では TRPV1 の関与の検討を行った。TRPV1 は温度刺激、機械刺激、pH や浸透圧などさまざまな刺激により活性化される細胞膜上のカルシウムチャネルである TRP スーパーファミリーの一つである。本研究において、TRPV1 の阻害剤である CPZ を用いたところ、LLLI により誘導された細胞増殖および骨芽細胞分化は抑制されることが示された。また TRPV1 のタンパク発現は非照射群と照射群の差を認めなかったことから、UHF-USP 青色レーザーによる LLLI は TRPV1 の発現に影響を及ぼすことはなく、光受容体として、骨芽細胞に対して生体刺激効果をもたらすことが示唆された。

UHF-USP 青色レーザーによる LLLI の臨床応用は、歯周外科治療時に骨面に照射することにより骨芽細胞を賦活化させて骨再生を促進する使用法や、細胞療法において移植細胞への術前照射による活性化への応用などが期待される。そのために、今後は LLLI のメカニズムの解析や、幹

細胞など別種の細胞での検討および *in vivo* での検討を行っていく必要がある。

＜結果＞

超高繰り返し超短パルス青色レーザーの低出力照射は骨芽細胞の増殖と分化を促進し、細胞外基質の石灰化を促進した。また、それらの効果はいずれも TRPV1 を介している可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5521　号 | 谷本　理沙子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　柴田　俊一<br>副　査　荒川　真一、中浜　健一 | |
| 論 文 題 目 | Low-level ultrahigh-frequency and ultrashort-pulse blue laser irradiation enhances osteoblast extracellular calcification by upregulating proliferation and differentiation via transient receptor potential vanilloid 1 | |

（論文審査の要旨）

低出力レーザー照射 (Low level laser irradiation: LLLI) は細胞の機能を調節することが知られているが、その詳細な機序については不明な点が多い。これまで近赤外および赤外光源を用いた LLLI による硬組織形成の促進ついては多くの検討がなされている一方で、青色レーザーを用いた LLLI についての検討は未だ不十分であり、特に骨芽細胞への効果は検証されていない。加えて高繰り返しパルスレーザーを用いた LLLI では組織に機械的な刺激が加わることが近年報告されているが、その詳細については不明な点が多い。

そこで申請者は、80 MHz の超高繰り返し (ultrahigh-frequency: UHF) および 100 fs の超短パルス (ultrashort-pulse: USP) で発振される 405 nm の青色レーザーによる LLLI を骨芽細胞へ新規に応用し、その作用を検討した。

本研究では、マウス由来骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 を骨芽細胞分化誘導培地にて培養した後、超高繰り返し超短パルス波 (UHF-USP) 青色半導体レーザーを用いて細胞へ 1 分間照射を行った。連続波との比較を行うため、コントロールとして波長 405 nm、連続波の青色ダイオードレーザーを使用した。レーザー照射後、細胞増殖試験 (WST-8 assay、cell counting assay) 、*in vitro* wound healing assay、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性試験、ALP 染色を実施した。

また、レーザー照射後の骨芽細胞分化マーカーについて mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて測定し、細胞外基質の石灰化についてアリザリン染色面積測定により評価した。さらに、化学物質、温度変化、機械刺激等の刺激により $Ca^{2+}$等の流入を制御するタンパク質である transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の関連を明らかにするべく、TRPV1 の発現をウェスタンブロット法にて確認し、TRPV1 の選択的阻害薬である capsazepine (CPZ) を用いて、阻害実験を細胞増殖試験と ALP 活性試験において行った。

本研究において、申請者が UHF-USP 青色レーザーの特性を十分に理解し、骨芽細胞に対する生物学的効果を詳細に解析するために、骨芽細胞増殖および分化の解析方法について事前に十分な検討を重ね、適切な研究計画の下で本実験を遂行したことは高く評価できる。

本研究の主たる結果は以下のとおりである。

1. 連続波と比較して UHF-USP 青色レーザーを用いた LLLI は照射後 3 日目の骨芽細胞の増殖および照射後 7 日目の ALP 活性を有意に促進した。

2. UHF-USP 青色レーザーによる LLLI は照射後 3 日目において骨芽細胞の増殖を有意に促進し、その効果は 9.4 J/cm$^2$ が最大であった。*in vitro* wound healing assay において、1.9、5.6 J/cm$^2$ での LLLI は照射後 1 日目、2 日目の創の閉鎖を有意に促進した。
   UHF-USP 青色レーザーによる LLLI は照射後 7 日目の ALP 活性を有意に促進し、その効果は 5.6 J/cm$^2$ で最大であった。骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現について real time PCR 法を用いて検討したところ、照射後 3 日目から 7 日目において LLLI 群の *Runx2*、*Osx*、*Alp* mRNA 発現量は非照射群と比較して有意に増加していた。

3. 照射終了後 3 週の細胞外基質の石灰化をアリザリン染色により評価した結果、LLLI 群では染色面積が非照射群と比較して有意に増加していた。
   TRPV1 の発現についてリアルタイム PCR 法にて mRNA の発現を、ウェスタンブロット法にてタンパクレベルでの発現を検討したところ、両者とも LLLI 群と非照射群で有意な差を認めなかった。一方で、TRPV1 選択的阻害薬である CPZ を添加したところ、CPZ 単体では細胞増殖および ALP 活性に影響を与えなかったが、LLLI 群に対して照射前に CPZ を添加した場合、LLLI により誘導された細胞増殖および ALP 活性が阻害されることが判明した。

以上の結果より、超高繰り返し超短パルス青色レーザーを用いた低出力照射は骨芽細胞の増殖と分化を促進し、細胞外基質の石灰化促進を認めた。また、それらの効果はいずれも TRPV1 を介している可能性も示した。

本研究において、申請者は、近年医学および歯学の分野において組織の治癒促進や骨形成の促進を目的とする応用が進んでいる LLLI について、*in vitro* でその生物学的効果を詳細に検討し、超高繰り返し超短パルス青色レーザーの低出力照射が骨芽細胞の増殖と分化を促進し、細胞外基質の石灰化を促進することを初めて示した。

歯科臨床において歯周治療やインプラント治療など多くの術式で、骨形成の促進がその治療成績の向上に貢献することはいうまでもないが、より低侵襲でなおかつ安全性の高い処置によりその目的を達成することが求められている。本研究では、低侵襲で安全性の高い術式である LLLI の骨芽細胞への効果を、波長 405 nm の青色レーザーを用いて検討した。これまで細胞傷害性があると考えられてきた青色光源を用いた点に加え、これまで LLLI 研究で用いられたことのない超高繰り返し超短パルスのレーザーを用いて新規に検討した点は評価できる。

研究内容については、細胞外基質の石灰化につながる細胞増殖と分化について解析を行い、その結果を詳細に考察している。さらに、そのメカニズムについて化学物質や温度変化、機械刺激などに反応するイオンチャネルである TRPV1 に着目し、検討した点も非常に興味深く、いまだに詳細が明らかとなっていない LLLI のメカニズムの解明の一助となることが期待できる。

本研究は、超高繰り返し超短パルス青色レーザーが骨芽細胞の増殖と分化を、TRPV1 を介して促進し、細胞外基質の石灰化を亢進させることを詳細に報告した初めてのものであり、本手法の臨床応用へ向けた基礎研究へのエビデンスを提供するとともに、今後のレーザー治療および歯周組織などを含めた再生医療分野に大きく貢献する可能性を示すものである。

よって本論文は博士 (歯学) の学位申請を行なうにあたり、十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 天海　徳子 |
| 論文審査担当者 | 主査　品田　佳世子<br>副査　笛木　賢治　　古屋　純一 |
| 論　文　題　目 | The effect of prosthetic rehabilitation and simple dietary counseling on food intake and oral health related quality of life among edentulous individuals: A randomized controlled trial. |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

近年の研究から，歯の喪失が食物選択へ影響を与えることが多く報告されている．無歯顎者では，野菜や乳製品の摂取量が減り，炭水化物や菓子類の摂取量が多いことが報告されており，野菜・果物の摂取量の減少により栄養状態が悪化することで，心疾患，糖尿病などの罹患率が増加することも明らかになっている．以上より，無歯顎者は食品摂取状態の偏りにより，種々の疾患罹患のリスクが高い状態であると示唆される．さらに，高齢者においてはたんぱく質の摂取量減少により，筋力低下などを特徴としたフレイルの状態に陥るリスクが上昇することも明らかになっている．フレイルは，将来の身体機能障害との関連が強く，人口の高齢化が進む日本においては，重要な健康問題である．

歯を喪失した者の咀嚼能力を改善するために，一般的に義歯による欠損補綴が行われるが，補綴のみでは食品摂取状態の改善を認めないとする報告が多くされており，近年では義歯製作に加えて食事指導を行なうことが必要であると示唆されている．その理由として，歯の喪失による咬合機能の低下よりもむしろ個人の習慣が食物選択に影響を与えるという報告や，歯を喪失した人々が食事指導なしでは自分たちの栄養状態の低下を認識せず，食事を変化させる必要性に気づかないといった報告がある．

これまでに補綴と関連して食事指導を行なった研究にはBradburyらの報告があり，無歯顎者に対して全部床義歯新製と共に栄養士によるテーラーメイドの食事指導を行った結果，野菜・果物の摂取量が有意に増加したと報告している．この研究は，歯科治療において食事指導を行なうことの有効性を示している．しかし，実際の臨床の場において，このような栄養士によるテーラーメイドの指導を患者個別に行うことは困難であり，パンフレットを使用するなどの簡便な食事指導が現実的であると考えられる．

さらに，このような欠損補綴と食事指導の組み合わせが，口腔関連QoLに関しても影響を与える可能性が考えられる．しかし，これまでに補綴に加えて食事指導を行なうことによる口腔関連QoLへの影響を報告した研究はない．

そこで本研究では，上下顎全部床義歯製作に加えて簡便な食事指導を行うことが，日本人無歯顎高齢者の食品摂取状態と口腔関連QoLに及ぼす影響について検証することを目的とし無作為化

比較臨床試験を行なうこととした.

＜方法＞

被験者は，全部床義歯新製を希望する上下無歯顎患者であり，以下の基準を満たす者とした.

採用基準 -以下の基準を全て満たす者

- 上下無歯顎患者
- 全部床義歯新製を希望する者
- 自力通院が可能な者
- 日本語が理解でき，質問票への回答が可能な者

除外基準 -以下の基準をいずれかひとつでも満たす者

- 感染症患者
- 専門家より栄養指導を受けている者
- 施設居住者
- 口腔乾燥症，顎関節症，オーラルディスキネジア等があり通常の義歯作製が困難な者
- 認知症，精神疾患の者

被験者を無作為に 2 群に割付け，両群の被験者に対して通法通り，上下全部床義歯新製を行った．さらに介入群には食事指導を，control 群には義歯の取扱いに関する指導をそれぞれ 20 分間行った．それぞれの指導は簡便で画一的なものとなるよう，パンフレットを用いて行なった．介入群の指導には，農林水産省発行の「高齢者向け食事バランスガイド」を使用し，control 群の指導には， ACP ガイドラインに基づき作成したパンフレットを用いた．各指導は，義歯の試適時，set 時の 2 回ずつ行なった.

アウトカムは食品摂取量と口腔関連 QoL とし，評価は介入前と介入後の 2 回行なった.

食品摂取量の測定は，簡易型自記式食事歴質問票（BDHQ）を用いて行った．BDHQ は，過去 1 ヶ月間の食品と飲料についての摂取頻度を，択一式で回答させる質問票であり，専用の栄養価計算プログラムによって 58 種類の食品，飲料の摂取量推定値を算出できる.

また，口腔関連 QOL（OHRQoL)は OHIP-EDENT-J を用いて測定した．OHIP-EDENT-J は日本人無歯顎者の口腔関連の機能障害や不快感などを評価するための質問票であり，Functional limitation, Physical pain, Psychological discomfort, Physical disability, Psychological disability, Social disability and Handicap の 7 つのサブスケールから構成されている.

2 群間のベースライン特性の比較には t-検定，カイ 2 乗検定を用いた．介入前後における食品群の摂取量, OHIP -EDENT-J の総スコア, サブスケールスコアの群間比較には Mann-Whitney U test を用いた．OHIP-EDENT-J の総スコア，サブスケールスコアの介入前後の比較には Wilcoxson signed-rank test を用いた． 統計解析には SPSS 22.0 (SPSS Statistics 22.0, SPSS Inc, an IBM Company, Chicago, IL, USA)を用いた．有意水準は 0.05 とした.

＜結果＞

参加者 70 名のうち，介入後の評価までに，8 名がドロップアウトし，最終的にアウトカムの解析に用いられた人数は 62 名となった.

各群のベースライン特性に群間で有意差は認めなかった.

食品摂取量に関しても，ベースライン診査時において，群間で有意差は認められなかった. 介入後において食品摂取量の群間比較を行うと，栄養指導群では，control 群と比較し鶏肉，骨ごと魚，にんじん・かぼちゃの摂取量が統計的に有意に多かった.

OHIP-EDENT-J の総スコアと各サブスケールに関しては，ベースライン介入前と介入前後のいずれにおいても統計的に有意な群間差は認められなかった. また，両群共に，介入前後での比較で総スコアの有意な改善が認められた. さらに，各サブスケールについては，栄養指導群では 7 項目中 6 項目（Functional limitation, Physical pain, Psychological discomfort, Physical disability, Psychological disability, Handicap）で介入後に統計的に有意な改善が認められたのに対し，control 群では 3 項目（Functional limitation, Physical pain, Psychological discomfort）のみ，統計的に有意な改善が認められた.

＜考察＞

本研究の結果より,臨床の場において補綴と共にパンフレットを使用した簡便な食事指導を実施することで，いくつかの食品摂取量を改善させられることが示唆された. 本研究で使用したパンフレットは，様々な食品をバランスよく食べることを推奨する内容となっている. 指導により参加者の食事に対する意識に変化が生じ，その結果として食品摂取状況へ影響を与えたと考えられる.

介入群において摂取量が多かった食品のうち， 鶏肉,骨ごと魚はたんぱく質源となるものであり，たんぱく質摂取はフレイルの予防に重要であることが報告されている. また，かぼちゃ・にんじんは緑黄色野菜であり，野菜・果物の摂取が，糖尿病や心血管疾患などの疾患のリスクを減少させることが報告されている. 以上より，本研究の介入方法により，無歯顎高齢者の食品摂取状態を改善することで，全身疾患の予防にも寄与できる可能性が示唆された.

過去の栄養状態を調査した報告では，食事記録法や，24 時間思い出し法，食物摂取頻度法など様々な食事調査法が用いられている.本研究で用いた BDHQ は食品の摂取頻度とその摂取量から情報を得る食物摂取頻度法と，食品の調理方法や各食事の主食を尋ねる食事歴法からなる質問票である. BDHQ は，被験者の記憶に依存する方法であることや，質問票であるため限定された食品のみしか摂取量が得られないといった短所はあるが，十分な妥当性と再現性をもつことが確認されている. また，患者の負担の大きい食事記録法や，訓練されたインタビュワーを必要とする 24 時間思い出し法と比較し，BDHQ はより簡単に摂取量を推定することが可能である. さらに，BDHQ は日本の食文化や食習慣,料理法を考慮して開発されている.以上の理由で,本研究における BDHQ の選択は適当であったといえる.

また,介入前後で比較し,両群共に口腔関連 QoL を表す OHIP 総スコアの有意な改善が認められた. 本研究では，両群において義歯新製を同様の手順で行ったため，両介入後の義歯の質が同じレベルとなったことが原因であったと考えられる.一方,栄養指導群のみ「Physical disability」,「Psychological disability」,「Handicap」の 3 サブスケールの有意な改善が認められた.「Physical disability」は食事に関する機能面を主に評価する質問項目である. 食事指導により知識を得たことにより，自分の食事の現状を知り，食品選択の変化の必要性を認識することで,

食事に対する態度の変化（行動変容）が起き，介入群における「Physical disability」の改善につながったと考えられる．そして，「Physical disability」の改善が，さらに日常生活での快適さや満足感などを評価する質問項目である「Psychological disability」，「Handicap」の改善へつながったことが考えられる．

＜結論＞

全部床義歯新製に加え簡便な食事指導を行った群は，全部床義歯製作と義歯の取り扱いの指導のみを行った群と比較して，介入後に鶏肉，骨ごと魚，かぼちゃ・にんじんの摂取量が有意に多く，さらにより多くの OHIP-EDENT-J のサブスケール項目で介入前と比べて改善を認めた．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5522　号 | 天海　徳子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　品田　佳世子<br>副　査　笛木　賢治，古屋　純一 | |
| 論 文 題 目 | The effect of prosthetic rehabilitation and simple dietary counseling on food intake and oral health related quality of life among edentulous individuals: A randomized controlled trial. | |

（論文審査の要旨）

歯の喪失により無歯顎高齢者は偏った食品摂取状況に陥りやすく，様々な全身疾患やフレイルなどのリスクが高まることが報告されている．一般的に，無歯顎者の咀嚼能力を改善するために全部床義歯の作製が行われるが，これまでに，欠損補綴のみでは患者の食品摂取状況の改善につながらないとする報告が多くされている．バートレットらは，無歯顎高齢者に対し，欠損補綴と併せてテーラーメイドの食事指導を行うことで，患者の野菜と果物の摂取量を改善させる可能性があることを報告した．しかし，実際の臨床の場においてこのようなテーラーメイドの食事指導を行うことは専門的な知識を持たない歯科医師にとって難しく，現実的ではない．

そこで天海は，全部床義歯新製に加えて，栄養の専門知識を持たない者でも実施可能であるパンフレットを用いた簡便な食事指導を行なうことで，患者の食品摂取状況に与える影響を明らかにすることを目的とし，無作為化臨床試験を行った．

参加者を，義歯新製と併せて簡便な食事指導を行う「介入群」と，義歯新製のみを行う「control 群」の 2 群に無作為に割付け，両群の被験者に対して通法通り上下全部床義歯新製を行った．さらに介入群には簡便な食事指導を，control 群にはダミー指導として義歯の取扱いに関する指導をそれぞれ 20 分間行った．それぞれの指導は簡便で画一的なものとなるよう，パンフレットを用いて行なった．　アウトカムは食品摂取量と口腔関連 QoL とし，評価は介入前と介入後の 2 回行った．

本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な統計学的解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 介入後において食品摂取量の群間比較を行うと，栄養指導群では，control 群と比較し鶏肉，骨ごと魚，にんじん・かぼちゃの摂取量は統計的に有意に多かった．
2. OHIP-EDENT-J の総スコアは，両群共に，介入前後での比較で有意な改善が認められた．
3. OHIP-EDENT-J の各サブスケールについては，栄養指導群では 7 項目中 6 項目（Functional limitation，Physical pain，Psychological discomfort，Physical disability，Psychological disability,

Handicap）で介入前後での比較で有意な改善が認められたのに対し，control 群では 3 項目（Functional limitation，Physical pain，Psychological discomfort）のみ，有意な改善が認められた．

本研究の結果より，臨床の場において補綴治療と共にパンフレットを使用した簡便な指導を実施することで，いくつかの食品摂取量を改善させられることが示唆された．今回改善が認められた食品のうち，かぼちゃとにんじんは緑黄色野菜，骨ごと魚，鶏肉はタンパク質源となるものであり，これまでにこれらの摂取により，高齢者の様々な疾患のリスクを減少させる可能性が報告されている．以上より，本研究の介入方法により，無歯顎高齢者の食品摂取状態を改善することで，全身疾患の予防にも寄与できる可能性が示唆された．

また，口腔関連 QoL の指標である OHIP-EDENT-J のサブスケール項目に関しては，栄養指導群のみ「Physical disability」，「Psychological disability」，「Handicap」の 3 サブスケールで有意な改善が認められた．「Physical disability」は食事に関する機能面を主に評価する質問項目である．食事指導により知識を得たことにより，自分の食事の現状を知り，食品選択の変化の必要性を認識することで，食事に対する態度や行動の変化が起き，介入群における「Physical disability」の有意な改善につながったと考えられる．そして，「Physical disability」の改善が，さらに日常生活での快適さや満足感などを評価する質問項目である「Psychological disability」，「Handicap」の改善へつながったことが示唆される．

本研究の結果は，実際の歯科臨床において実施可能なパンフレットを用いた簡便な食事指導を欠損補綴と共に行うことで，無歯顎高齢者の食品摂取状態を改善させる可能性があること，また，患者の口腔関連 QoL の改善につながる可能性を示唆している．本研究は専門知識を持たない者でも実施可能な簡便な栄養指導の有効性を示唆した点から，高齢者の健康増進に大きな意義を有するものである．

よって，本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 荒木田　俊夫 |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　若林　則幸、三浦　宏之 |
| 論　文　題　目 | Evaluating the influences of ambient light on scanning trueness,precision, and time of intra oral scanner |

（論文内容の要旨）

〈緒言〉

光学印象は患者の印象手技への不快感の改善、印象材の変形などのエラーの低減、三次元画像を介した視覚的な印象確認、費用対効果の将来的な改善などの利点がある。光学印象は従来の印象材による印象採得での問題点である窒息、嘔吐、不快の改善や、印象採得に要する時間の短縮や再印象の手間の少なさなどの点から患者の治療に対する満足度が高いという研究結果も報告されており、患者の治療に対する要求が多様化している現在では、治療の満足度向上の点でも注目されている。

スキャナの性能の改良が進み、それを用いた光学印象の精度も飛躍的に向上している。スキャナの精度は真度（trueness）と再現性（precision）のふたつの値によって評価される。真度は測定対象物と測定データの偏差であり、再現性は各群内の測定データの偏差として定義される。光学印象の精度に対して最近は多く報告があり、それらによると、光学印象精度は最終補綴物の段階では従来の方法と相違ないとする報告が多いが、全顎や口腔内全域となると光学印象そのものの精度はまだ従来法に劣っているとする報告が多い。

光学印象精度に影響を与える因子の一つとして、工学分野の研究報告では、外部の光が光学印象に対して影響を与える可能性があると報告されている。非接触式三次元スキャナのセンサーは外乱光の影響を受けるため、外乱光のなるべく少ない環境での作業が推奨されている。しかし、歯科分野においては照明環境に関して検証した報告はまだない。

本研究の目的は、有歯顎に対する光学印象において、外乱光の照度と色温度が印象の真度、再現性、および時間に与える影響を模型実験にて評価し、光学印象の実臨床環境での精度を評価することである。

〈方法〉

**マスターデータの作製**

マスターモデルにはシリコーンガム模型（500H-1, ニッシン）を用いた。マスターモデルは高精度全焦点三次元形状測定器（Infinit Focus G5，Alicona　imaging）を用いて咬合面、頬側面、舌側

面の３回に分けてスキャンを行いデジタルデータ化し、STL データ形式で保存した。その後、これら３つのデータをベストフィットアルゴリズムで合成することでマスターモデルを作成した。

**光学印象**

光学印象は口腔内スキャナ（True Definition Scanner，3M ESPE）を用いて行った。実験は他の外乱光の侵入を防ぐため照度 0 lux の暗室で行った。外乱光の条件を設定するにあたり、照度（Lux）と色温度（Kelvin）の 2 つの要素を用いた。色温度の設定には、7500 K（白色）の LED 照明（SpotAce，林時計工業）とそれに付属した色温度 3900 K（黄色）、4100 K（橙色）、19000 K（青色）の色温度変換レンズ（色温度変換フィルター，林時計工業）を用いた。各色温度にて、照度を 0 lux、500 lux、2500 lux に調整した。照度の測定には照度計（510 LUX METER，横河メーター）を用いた。印象範囲は下顎右側第一小臼歯から第二大臼歯とし、光学印象操作は咬合面のスキャン、頬側のスキャン、および舌側のスキャンの 3 段階に分けて行った。

光学印象は各条件につき 5 回行った。光学印象操作はスキャナーワンドを固定し、模型を動かして行った。時間は光学印象開始から全てのスキャン操作が終了するまでに要した時間を記録した。

**真度・精度の解析**

得られたスキャンデータは STL データに変換後，CAD ソフトウェア（Geomagic，Freeform）にインポートし、歯肉部のトリミングを行った。続いて、真度はマスターデータとスキャンデータとの重ね合わせを CAD ソフトウェア（CATIA V5，Dassault systems）にて行った後、両データの偏差解析を行い、対応する点の法線距離を算出した。算出結果の 90 パーセンタイルと 10 パーセンタイルの平均を求め、データ間の法線距離の平均偏差を算出した（n=5）。再現性に関しては各条件で得られた 5 個のスキャンデータの中から 2 個ずつ組み合わせてデータを重ね合わせて偏差解析を行い、真度と同様の手順で 10 個の組み合わせに関して平均偏差を算出した（n=10）。

**統計解析**

得られた真度と精度は色温度と照度を要因とする二元配置分散分析を行ったのち、多重比較検定を行った有意水準は 5%とした。統計処理は統計ソフト（SPSSver16.0，IBM）を用いた。

〈結果〉

真度に関して、照度 2500 lux，色温度 3900 K の群において平均偏差が 63.8μm となり最も大きい値を示した。また、照度 500 lux、色温度 3900 K の群において平均偏差が 59.8μm となり、最も小さい値を示した。統計解析の結果、色温度と照度の間に交互作用が有意に認められた。多重比較の結果、照度 500 lux の条件において、色温度 3900 K の群はその他の色温度と比較して有意に小さい平均偏差を示した。また、色温度 3900 K の条件において、照度 500 lux 群がその他の色温度と比較して、有意に小さい平均偏差を示した。

再現性に関して、照度 2500 lux、色温度 3900 K の群と照度 2500 lux，色温度 4100 K の群において平均偏差が 18.0 μm で最も大きな値を示した。また、照度 500 lux、色温度 3900 K 群において、平均偏差が 15.2μm で最も小さい値を示した。統計解析の結果、交互作用は認められなかった。多重比較の結果、すべての群間に有意差は認められなかった。

時間に関して、照度 2500 lux、色温度 19000 K の群で 82.2 秒となり、最も長くなった。照度 500

lux、色温度 3900 K 群で、55.8 秒となりスキャンに最も短くなった。統計解析の結果、照度と色温度の間に交互作用が有意に認められた。すべての色温度において照度 2500 lux 群において有意に時間が長くなった。また、照度 500 lux、2500 lux の条件において色温度 3900 K 群において有意にスキャン時間が短くなった。

〈考察〉

本研究モデルにおいて、光学印象時には照度 500 lux、色温度 3900 K の照明環境において最も高い真度を示した。また、時間は照度 2500 lux において有意に延長した。以上の結果から光学印象における周囲の照明環境は再現性に対する影響は認められなかったが、真度と時間に対して影響を与える可能性が示唆された。本研究で用いた照度 500 lux は診療室内の明るさ、2500 lux はユニットライトで照らされた術野の明るさを想定しており、色温度は 3900 K が黄色、4100 K が橙色、7500 K が白、19000 K が青色となる。そのため、本研究の結果、光学印象にとっては黄色の室内照明環境が適していることが示唆された。

上記の外乱光による光学印象への影響は、光学スキャナの 3D データの取得方法に関連すると考えられた。光学スキャナは光を対象物に照射し、その反射を受光センサーで感知し、対象物までの距離を認識することにより、3D データを得ている。しかし、外乱光などが混入して受光センサーへの光量が過剰になるとセンサーが飽和して測定が困難となり、スキャンデータの部分的欠損や、形状認識の遅延が発生する。これらが外乱光により光学印象の真度と計測時間が影響を受ける一因と考えられた。

本研究モデルでは光学印象にパウダーを併用することにより、スキャン対象物の表面性状による反射率の変化を防止している。また、スキャナーワンドを固定し模型を動かしてスキャンをおこなっているため、光学印象操作による影響を最小限に抑制されており他の阻害因子に対する対策を施して外乱光の影響による変化を感度よく検証できるような実験系となっている。

本研究では模型実験であるため、実際の口腔内での光学印象精度に対する外乱光の影響については、さらに今後の検討が必要と考えられる。また口腔内ではパウダーを均一塗布したとしても唾液やスキャナの種類による影響パウダーレスでスキャンする場合の対象物の表面性状による反射率への影響など、今後の検討が必要な要因と考えられた。

〈結論〉

本研究モデルに限り以下結論が導き出された。

・照度 500 lux、色温度 3900 K において光学印象の真度は最も高くなった。

・照度 2500 lux においてすべての色温度で、時間が長くなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5523　号 | 荒木田　俊夫 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　若林　則幸、三浦　宏之 | |
| 論 文 題 目 | Evaluating the influences of ambient light on scanning trueness,precision, and time of intra oral scanner | |

（論文審査の要旨）

光学印象は患者の印象手技への不快感が改善される、印象材の変形などのエラーが存在しない、三次元画像を介して視覚的に形成が確認できる、費用対効果の改善が将来期待できるという利点がある。光学印象は従来の印象材による印象採得での問題点である窒息、嘔吐、不快な味覚刺激の改善や、印象採得に要する時間の短縮や再印象の手間の少なさなどの点から患者の治療に対する満足度が高いという研究結果も報告されており、患者の治療に対する要求が多様化している現在では、治療の満足度向上の点でも注目されている。しかし、光学印象の全顎や口腔内全域に対する精度は、まだ従来法に劣っているとする報告が多く、それには光学印象の精度を低下させる様々な因子が関連している。

こうした状況を背景に, 荒木田は, 光学印象の精度に影響を与える外部から侵入する光（外乱光）に注目し、外乱光の強さ（照度)、色（色温度）が光学印象の真度（Trueness)、再現性（Precision)、時間（time）に与える影響を検証することとした。

マスターモデルのシリコーンガム模型（500H-1，ニッシン）を高精度全焦点三次元形状測定器（Infinit Focus G5，Alicona　imaging）を用いて咬合面、頬側面、舌側面の３回に分けてスキャンを行い、デジタルデータ化することでマスターモデルを作成した。光学印象は口腔内スキャナ（True Definition scanner ，3M ESPE）を用いて採得した。実験は他の外乱光の侵入を防ぐため照度 0 lux の暗室で行った。色温度の設定には、7500 K（白色）の LED 照明（SpotAce，林時計工業）とそれに付属した色温度 3900 K（黄色)、4100 K（橙色)、19000 K（青色）の色温度変換レンズ（色温度変換フィルター，林時計工業）を用い、各色温度にて、照度を 0 lux、500 lux、2500 lux に調整して照射した。照度の測定には照度計（510 LUX METER，横河メーター）を用いた。印象範囲は下顎右側第一小臼歯から第二大臼歯とし、光学印象操作は咬合面のスキャン、頬側のスキャン、および舌側のスキャンの 3 段階に分けて行った。光学印象採得は各条件につき 5 回行った。光学印象操作はスキャナーワンドを固定し、模型を動かして行った。時間は光学印象開始から全てのスキャン操作が終了するまでに要した時間を記録した。得られたスキャンデータは STL データに変換後，CAD ソフトウェア（Geomagic，Freeform）にインポートし、歯肉部のトリミングを行った。続いて、真度はマスターデータとスキャンデータとの重ね合わせを CAD ソフトウェア（CATIA V5，Dassault systems）にて行った後、両データの偏差解析を行い、対応する点の法線距離を算出した。算出結果の 90 パーセ

ンタイルと 10 パーセンタイルの平均を求め、データ間の法線距離の平均偏差を算出した（n=5）。再現性に関しては各条件で得られた 5 個のスキャンデータの中から 2 個ずつ組み合わせてデータを重ね合わせて偏差解析を行い、真度と同様の手順で 10 個の組み合わせに関して平均偏差を算出した（n=10）。得られた真度と精度は色温度と照度を要因とする二元配置分散分析を行ったのち、多重比較検定を行った有意水準は 5%とした。統計解析は統計ソフト（SPSSver16.0，IBM）を用いた。

本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な統計学的解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1. 真度に関して、照度 2500 lux，色温度 3900 K の群において平均偏差が 63.8μm となり最も大きい値を示した。また、照度 500 lux、色温度 3900 K の群において平均偏差が 59.8μm となり、最も小さい値を示した。統計解析の結果、色温度と照度の間に交互作用が有意に認められた。多重比較の結果、照度 500 lux の条件において、色温度 3900 K の群はその他の色温度と比較して有意に小さい平均偏差を示した。また、色温度 3900 K の条件において、照度 500 lux 群がその他の色温度と比較して、有意に小さい平均偏差を示した。
2. 再現性に関して、照度 2500 lux、色温度 3900 K の群と照度 2500 lux，色温度 4100 K の群において平均偏差が 18.0 μm で最も大きな値を示した。また、照度 500 lux、色温度 3900 K 群において、平均偏差が 15.2μm で最も小さい値を示した。統計解析の結果、交互作用は認められなかった。多重比較の結果、すべての群間に有意差は認められなかった。
3. 時間に関して、照度 2500 lux、色温度 19000 K の群で 82.2 秒となり、最も長くなった。照度 500 lux、色温度 3900 K 群で、55.8 秒となりスキャンに最も短くなった。統計解析の結果、照度と色温度の間に交互作用が有意に認められた。すべての色温度において照度 2500 lux 群において有意に時間が長くなった。また、照度 500 lux、2500 lux の条件において色温度 3900 K 群において有意にスキャン時間が短くなった。

以上の結果より、照度 500 lux，色温度 3900 K において光学印象の真度は最も高くなり、照度 2500 lux においては色温度に関わらず, スキャン時間が長くなることが明らかになった。本研究の成果は、近年発展している口腔内スキャナによる光学印象の問題点の一つである、外乱光の影響についてのエビデンスを伴った唯一の研究である。本研究の成果は口腔内スキャナの測定時間、測定精度の改善につながると期待され、歯科補綴学にのみに関わらず、今後の歯科臨床医学全般に広く貢献するものと考えられた。よって，本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 髙木　徹 |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　春日井　昇平　　小田　茂 |
| 論　文　題　目 | Effective removal of calcified deposits on microstructured titanium fixture surfaces of dental implants with erbium lasers |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年インプラント周囲炎の罹患数が増加しているが、インプラントの汚染された表面を除染する適切な方法は確立されていない。本研究の目的は、表面付着物除去を目的としたエルビウムレーザー照射後のインプラント体の表面微細構造の形態的変化を調査し、綿球、チタンスケーラーおよびエルビウムレーザーそれぞれによるインプラント体表面上の石灰化付着物の除去効果を明らかにすることとした。結果として、最適な照射パラメーターを用いたエルビウムレーザーの照射はインプラント体の表面微細構造に影響を与えないことが明らかとなった。また、綿球およびチタンスケーラーと比較し、エルビウムレーザーは非接触、注水下、20 Hz、40 mJ/pulse (ED 14.2 J/cm$^2$/pulse) の出力において、表面微細構造の破壊を伴うことなく石灰化付着物を効果的に除去することが可能であった。このことから、エルビウムレーザーは綿球およびチタンキュレットを用いた機械的デブライドメント方法と比較して、表面微細構造の破壊を伴わずに石灰化付着物を除去する上でより有利であった。

＜緒言＞

インプラント周囲炎はバイオフィルムによって引き起こされ、支持骨の喪失を招く。インプラント周囲炎の罹患率は増加しており、インプラント周囲炎は歯科インプラントの長期的成功における主要な危険因子である。近年、様々な機械的除染方法がインプラント周囲炎治療に応用されている。しかし、機械的なデブライドメント方法はインプラント体表面の物理的損傷や、金属およびプラスチックの残留元素の存在などの問題が明らかになっている。現在、石灰化付着物で汚染されたインプラント体表面を、表面微細構造の破壊を伴わずに除染できる適切な処置方法は確立されていない。

エルビウムレーザーは、軟組織および硬組織の蒸散や殺菌、照射面の濡れ性の向上などのインプラント周囲炎治療に期待される様々な特性を有している。Er:YAG および Er,Cr:YSGG レーザーは機械的損傷を引き起こすことなくインプラント表面微細構造をデブライドメントする能力を有することが明らかになっている。しかし、表面微細構造の石灰化付着物の除去に関する詳細な研究はほとんど行われていない。

本研究の目的は、2 種類のエルビウムレーザー照射後の表面微細構造を持つインプラント体表

面の形態的変化を調査し、綿球、チタンスケーラーおよびエルビウムレーザーによるインプラント体表面上の石灰化付着物のそれぞれの除去効果を明らかにすることであった。

＜材料と方法＞

サンドブラストエッチング処理された中等度粗面および機械研磨面を持つ 10 本の未使用のインプラント体 (SLA®, Straumann, Waldenburg, Switzerland) と、重度のインプラント周囲炎のために抜去された 4 本の抜去インプラント体を用いた。レーザーは Er:YAG レーザー (ErL: DELight™, HOYA Conbio Inc., Fremont, CA, USA; 波長 2.94 μm) および Er,Cr:YSGG レーザー (ErCrl: Waterlase®, Biolase Technology, Inc., San Clemente, CA, USA; 波長 2.78 μm)を使用し、それぞれのレーザーにおいて未使用の直径 600 μm の 80°湾曲型石英コンタクトチップあるいはストレートサファイアコンタクトチップを用いた。パワーメーター (Field Master™, Coherent Inc., Santa Clara, CA) によりチップ先端出力を計測し、コントロールパネルにおける出力設定を決定した。

実験 1 ：エルビウムレーザー照射後の表面微細構造の形態的変化

1-1) 定点照射

3 本の未使用インプラントを用いた。ErL と ErCrL の各レーザーの出力は先端出力で 30, 40, 50, 60 mJ/pulse [エネルギー密度 (ED) 10.7, 14.2, 17.8 , 21.4 J/cm$^2$] および 20 Hz に設定し、注水量および空気量は ErL でそれぞれ 8 ml/min, 3.4 l/min とし、ErCrL でそれぞれ 12 ml/min, 3.5 l/min に設定した。レーザーハンドピースをクランプにより固定し、インプラント体表面に対し 1 mm の距離を保持して非接触、注水下にて 5 秒間垂直的に定点照射を行った。

1-2) スウィーピング照射

1 本の未使用インプラントを用いた。ErL と ErCrL の各レーザーの出力は先端出力で 30, 40, 50, 60 mJ/pulse [エネルギー密度 (ED) 10.7, 14.2, 17.8 , 21.4 J/cm$^2$] および 20 Hz に設定し、注水量および空気量は 1-1)と同様に設定した。インプラント体表面に対し約 1 mm の距離を保持して非接触、注水下、垂直照射にて、5 秒間で 5 mm の距離を左右に 5 回反復するスウィーピング照射を行った。

実験 2： 未使用インプラント表面微細構造上の人工石灰化物の除去

6 本の未使用インプラントを使用した。「水中熱基盤法」(Kuroda ら, 2001 年) を改変応用し、5 本のインプラント体を硬水溶液 (Contrex®, Nestlé, Vevey, Switzerland) に浸漬し、80～100℃の条件下で 3 V の電圧を 9 時間印加し、インプラント体の表面に石灰化物を付着させた。残りの未使用のインプラントをコントロール (virgin surface: VS) とした。人工石灰化物を付着させた 5 本のインプラントに対し、ErL、ErCrL、チタンキュレット (TC) (Wingrove™ B5-6 Ti R661: Paradise Dental Technologies, USA) および生理食塩水浸漬綿球 (CP) を用いて被治療部位を 90 秒間処置した。レーザーは 20 Hz、40 mJ/pulse (ED 14.2 J/cm$^2$/pulse)、注水下で、スウィーピングモーションにて照射を行った。

実験 3：抜去インプラント表面微細構造上の石灰化付着物の除去

広範囲におよそ均一に歯石が付着した 4 本の抜去インプラントを使用した。ErL、ErCrL、TC お

よび CP を用いて被治療部位を 40 秒間処置した。レーザーは 20 Hz、40 mJ/pulse (ED 14.2 J/cm$^2$/pulse)、注水下で、スウィーピングモーションにて照射を行った。

実験後、実験 1〜3 において処置した部位を実体顕微鏡 (SM) (VH-7000®, キーエンス) および走査型電子顕微鏡 (SEM) (S-4500, 日立ハイテク) によって形態変化を分析した。実験 2 および 3 では、処置表面の元素分析をエネルギー分散型 X 線分析 (EDS) を用いて行い、炭素 (C)、酸素 (O)、カルシウム (Ca) およびチタン (Ti)含量を半定量分析した。

＜結果＞

実験 1 ：エルビウムレーザー照射後の表面微細構造の形態的変化

20 Hz での非接触定点照射では、ErL および ErCrL 照射後の表面微細構造は、先端出力 40 mJ/pulse 以下の条件では形態変化を認めなかった。スウィーピング照射では、先端出力 50 mJ/pulse 以下において ErL および ErCrL 照射後に表面微細構造の形態変化を認めなかった。

実験 2： 未使用インプラント表面微細構造上の人工石灰化物の除去

平滑面：20 Hz、40 mJ/pulse (ED 14.2 J/cm$^2$/pulse)、注水下での ErL および ErCrL 照射では、TC と比較し、表面微細構造の損傷はなく人工石灰化物を除去することが可能であった。除染後の EDS 分析では、インプラント体表面の C, O, Ca 検出量は未処置面と比較して処置群で少なく、C および Ca はエルビウムレーザー照射群において、その他と比較して少ない傾向を示した。Ti 検出量はレーザー群において、その他の群と比較して多い傾向が認められた。

粗面：20 Hz、40 mJ/pulse (ED 14.2 J/cm$^2$/pulse)、注水下での ErL および ErCrL 照射では、TC と比較し、表面微細構造の損傷はなく人工石灰化物を除去することが可能であった。除染後の EDS 分析では、未処置面および CP と比較して、インプラント体表面の C 検出量はエルビウムレーザー群で有意に少なく、Ca 検出量もレーザー群においてその他の群と比較して少ない傾向を示した。Ti 検出量はエルビウムレーザーにおいて多い傾向が認められ、ErL では未処置面、CP および TC と比較して有意に高い値を示した。

実験 3：抜去インプラントの微細表面構造上の石灰化付着物の除去

ErL および ErCrL では表面微細構造の損傷なく石灰化付着物を除去することが可能であった。除染後の EDS 分析においては、未処置面および CP と比較してインプラント体表面の C 検出量はエルビウムレーザー群で有意に少なく、Ca 検出量もレーザー群において、その他の群と比較しより少ない傾向を示した。Ti 検出量はレーザー群において多い傾向が認められ、未処置面および CP と比較し有意に高い値を示した。

＜考察＞

石灰化付着物やバイオフィルムをインプラント体表面から除去し、インプラント体を除染することはインプラント周囲炎の治療において重要である。超音波スケーラー、キュレットおよび綿球を使用する従来の機械的除染方法、ならびにエアアブレーション、チタンブラシおよびレーザー等の方法が、インプラント周囲炎の治療において研究されている。しかし、機械的除染方法はインプラント体の微細構造を破壊し、損傷した表面微細構造では細胞活性能が低下する可能性が

あると報告されている。

Er,Cr:YSGG レーザーは歯石を除去する能力を有し、インプラント周囲炎治療において Er:YAG レーザーと同等の効果を持つことが期待されている。しかしながら、Er:YAG レーザーおよび Er,Cr:YSGG レーザーのインプラント体表面の石灰化付着物の除去能力に関しては詳細な研究が行われていなかった。本研究の結果、エルビウムレーザーは 20 Hz、40 mJ/pulse (14.2 J/cm$^2$/pulse)、注水下、5 秒間の定点およびスウィーピング照射条件下において、チタン表面微細構造を損傷しないことが実体顕微鏡および SEM 観察により明らかとなり、これらの照射パラメーターは表面微細構造のデブライドメントに最適であると考えられた。

さらに本研究では新規の人工石灰化物付着モデルおよび、石灰化物の付着した抜去インプラントを用い、各種除染方法による石灰化物除去の効果を実体顕微鏡および SEM により観察し，表面に存在する元素比を EDS により半定量分析した。適切な条件下でのエルビウムレーザー照射により、熱損傷を引き起こさずに微細構造を維持しながら石灰化付着物の効果的な除去が達成された。人工石灰化物付着モデルを用いた実験 2 と抜去インプラントを用いた実験 3 の結果は類似しており、人工石灰化物付着モデルの有用性が示唆された。本研究では臨床的条件を完全に模倣することはできないが、エルビウムレーザーが石灰化付着物を有するチタン微細表面構造の除染に有用な方法であることを示唆している。

＜結論＞

Er:YAG および Er,Cr:YSGG レーザーは、綿球またはチタンキュレットと比較して、チタンインプラントの表面微細構造から石灰化沈着物を除去する上でより有利であった。エルビウムレーザーは 20 Hz、40 mJ/pulse (14.2 J/cm$^2$/pulse)、注水下、非接触において表面微細構造の破壊を伴わずに効果的に石灰化付着物を除去することができた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5524 号 | 髙木 徹 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宇尾　基弘<br>副　査　春日井　昇平　　小田　茂 | |
| 論 文 題 目 | Effective removal of calcified deposits on microstructured titanium fixture surfaces of dental implants with erbium lasers | |

（論文審査の要旨）

歯科インプラントでは早期のオッセオインテグレーションの獲得を目指し、表面構造の改変に関する研究開発が行われてきた。その結果、中等度粗面を持つ表面微細構造のインプラントが主流となった一方で、インプラント周囲炎の罹患数も増加してきている。一度感染した表面微細構造は、その複雑な微小構造により除染を困難にし、様々な除染方法が試されているものの、現在でも除洗方法は確立されていない。エルビウム系レーザーは軟組織および硬組織の蒸散や殺菌、照射面の濡れ性の向上などインプラント周囲炎治療に期待される特性を有している。Er:YAG レーザーや Er,Cr:YSGG レーザーは、インプラント表面に機械的損傷を引き起こすことなく、その表面を除染する能力を有することが明らかになっているが、石灰化付着物の除去に関する詳細な研究はほとんどない。

そこで申請者の髙木 徹は、2 種のエルビウムレーザーによる石灰化物の除去効果を詳細に分析することに着目し、同一の照射条件下において従来の機械的手段と比較し評価を行った。実験ではエルビウムレーザー照射後の表面微細構造を持つインプラント体表面の形態的変化を調査し、インプラント体表面上の石灰化付着物の除去効果を検討した。申請者が実験遂行の準備にあたり、エルビウムレーザーの特性を良く理解し、とくに独自にインプラント体への人工石灰化物の付着作製法を調査考案し、さらには石灰化物が付着した抜去インプラントを入手し、用意周到な計画の下に緻密な研究分析を行ったことは高く評価できる。

実験では定点照射およびスウィーピング照射条件において、数種類の出力を用いて 2 種のエルビウムレーザーをインプラント体表面に照射し、実体顕微鏡と SEM を用いて被照射面の形態学的評価を行い、その適正出力を検討した。次に、エルビウムレーザーを適正出力下にて用い、従来用いられている綿球およびチタンスケーラーと比較し、人工石灰化物および抜去インプラント上の歯石の除去効果をエネルギー分散型 X 線分析 (EDS) を用いて半定量的に検討した。

本研究の主たる結果は, 以下の通りである.

先端出力 40 mJ/pulse、20 Hz、注水下の条件において、エルビウムレーザーはチタンの表面微細構造を損傷せずに表面の除洗に応用できることが明らかとなった。また同出力において、形態観察により、Er:YAG レーザーおよび Er, Cr:YSGG レーザーはともに、綿球およびチタンスケー

ラーに比べて、インプラント体に付着した石灰化付着物を効果的に除去することが可能であった。照射後の表面の EDS 分析においては、インプラント体表面に残存する C および Ca 検出量はエルビウムレーザー群で最も少ない傾向を示した。逆に Ti 検出量は、レーザー群において他群と比較しもっとも多い傾向が認められた。

以上の結果より、適切な照射条件下において、エルビウムレーザーがインプラント表面微細構造から石灰化付着物を効果的に除去できることが示唆された。

本研究において、髙木 徹は Er:YAG および Er,Cr:YSGG レーザーによるインプラント体の石灰化物の除去効果について、従来の機械的除染方法と比較してエルビウムレーザーが表面微細構造の破壊を伴わず、より効果的にデブライドメントを行えることを示した。

従来より歯周治療に用いられてきたエルビウムレーザーであるが、Er:YAG および Er,Cr:YSGG レーザーをチタンインプラント体に照射する際の適切な照射閾値を同条件にて検討し、さらに石灰化物の除去効果を詳細に分析し明らかにした研究はこれまでになく、エルビウムレーザーのインプラント周囲炎治療における有用性を基礎的に示したことは重要である。

また、新規に人工石灰化物付着モデルを考案し、*in vitro* の系において撤去インプラントの歯石付着の代用として用い、規格化された実験を実施したことは評価できる。

本研究結果は、エルビウムレーザーのインプラント周囲炎治療への臨床応用をする上で、重要な基礎的エビデンスを提供するのみならず、今後のインプラントの臨床応用にも有益な知見を与えることから、レーザー歯科医学のみならず、インプラント歯科学および歯科学全体における発展に大きく貢献するものと考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うにあたって十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 草薙 彩花 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　宇尾　基弘<br>副 査　　興地　隆史　　荒川　真一 |
| 論　文　題　目 | Effect of nonthermal atmospheric discharge on tooth bleaching |

＜要旨＞

本研究の目的は、常温大気圧放電（Nonthermal atmospheric discharge: NADC）が歯の漂白に及ぼす影響を歯科用色彩計と汎用色彩計を用いて明らかにすることにある。NADC からの気流を 5、10、20、30 および 60 分間、ヘマトポルフィリン（HP）染色紙に暴露した。併せて、NADC のない気流の暴露（陰性対照）、市販の歯科用漂白材による漂白（陽性対照）も行った。暴露前後の色彩測定は歯科用色彩計と汎用色彩計を用い L*a*b*値を求め、暴露前後の色差を算出した。また、牛歯変色歯モデルを作製し、5、10、20、30 および 60 分間、NADC を暴露し、同様に測定を行った。NADC は、HP 染色紙および牛歯変色歯モデルに対して漂白効果を示した。また、歯科用色彩計と汎用色彩計の測定値は、一致率は低かったものの、有意に高い相関を示した。以上より、NADC は漂白効果を示し、また測定に用いた 2 つの色彩計はいずれも有用であることが明らかになった。

＜緒言＞

歯の漂白治療は、人々に笑顔をもたらす、最も歯質保存的で費用対効果の高い審美歯科治療のひとつである。生活歯の漂白法には、ホームブリーチとオフィスブリーチの 2 つがある。歯の漂白材の有効成分は過酸化物であり、オフィスブリーチでは過酸化水素、ホームブリーチでは過酸化尿素が主に使用されている。オフィスブリーチの効果を促進するために、高濃度の過酸化水素の使用や各種光源を用いた光照射などが行われている一方、光照射による漂白促進効果はなく、むしろ知覚過敏を増悪させるとの報告もある。

放電によって生じる常温大気圧プラズマ（Nonthermal atmospheric pressure plasma: NAPP）は、過酸化水素による漂白効果を促進するとの報告がある。また、NAPP の過酸化尿素や水の存在下での漂白効果も報告されている。しかしながら、プラズマ単体での漂白効果についての研究は見当たらない。

一方、歯の漂白の効果を評価するために、正確な歯の色彩測定は重要である。歯の色彩測定には、シェードガイドを用いた主観的な視感比色法と測定機器を用いる客観的な方法がある。歯の漂白に関する研究においては、歯科用色彩計のみならず、汎用の色彩計も用いられることがある。そのため両色彩計による計測値を比較したい場合があるが、その一致性については明らかではない。

本研究の目的は、NADC によって生じたプラズマが歯の漂白に及ぼす影響を、*in vitro* で評価するとともに、測定に歯科用色彩計と汎用色彩計を用いて両色彩計の計測特性を明らかにすることにある。

＜方法＞

常温大気圧放電の装置は、マルチファンクションシンセサイザー、増幅器、オシロスコープ、エアーポンプ、試作放電管等から構成されている。漂白特性の評価に用いる HP 染色紙は、写真用光沢紙を 0.1% HP エタノール溶液に浸漬して調製し、汎用色彩計（NR-11、日本電色、以下 NR）で測定した L*値が 48～53 のものを実験に供した。各種条件による実験群は以下の 3 群とした。

・DC(+)群：ピーク電圧 5 V、電流 10 A、周波数 1.3 kHz の条件で放電した電極からプラズマを発生させ、プラズマ発生装置を通過する空気流量を 5 L/分の条件下で HP 染色紙に吹き付けた。吹き付け開始から 5、10、20、30 および 60 分後の HP 染色紙の L*a*b*値を歯科用色彩計（Shade Eye NCC、松風、以下 SE）と汎用色彩計 NR を用いて測定した。

・DC(-)群（陰性対照群）：DC(+) 群と同じ装置を用いて、放電はせずに、空気の吹付けのみを行い、DC(+) 群と同様に測定を行った。

・BL 群（陽性対照群）：歯科用漂白材（ピレーネ、三菱ガス化学）を用いて漂白を行った。すなわち、ピレーネの 2 液を混合して紙面に塗布し、ピーク波長 405 nm、光強度 55 mW/cm$^2$の LED 照射器（コスモブルー、ジーシー）で照射し、他の実験群と同様に、5、10、20、30 および 60 分後に測定を行った。

実験例数は各群 10 とした。なお、実験試料の表面は処理ごとにデジタルカメラで写真撮影を行った。また、各測定値と実験開始前の測定値との色差（ΔE）を算出した。

牛歯を用いた漂白試験では、ウシ下顎切歯の唇側エナメル質を削去して平坦なエナメル質面を調製し、5 x 5 mm の試片を切り出した。試片は、歯科用アクリルレジンで包埋し、表面を耐水研磨紙 #1,200 で研削した。試料は、7 日間紅茶に浸漬した後、NR で測定し、L*値が 43～58 のものを実験に供した。着色したエナメル質表面は、DC(+)群と同条件で NADC からの空気を吹付け、5、10、20、30 および 60 分後に SE と NR で測定を行った。

得られた測定値と色差は、5%有意水準で、HP 紙では二元配置分散分析、一元配置分散分析、および、Tukey の HSD で、牛歯では一元配置分散分析、および、Tukey の HSD で統計学的検討を行った（p=0.05）。また、両色彩計の測定値について、Kendall's W と Spearman's rho で一致率と相関を 5%有意水準で検討した（p=0.05）。

＜結果＞

HP 染色紙を用いて行った 3 実験群において、DC(+)群と BL 群では、肉眼で経時的に漂白効果が認められた。DC(-)群では肉眼的には変化が見られず、L*a*b*値にほとんど変化がみられなかった。二元配置分散分析で、SE、NR のいずれを用いて測定した場合においても、L*a*b*値は、実験群と暴

露時間のいずれの因子についても有意差が認められた。DC(+)群と BL 群の L*値は、DC(-)群に比べて有意に高く、特に、最初の 30 分で大きく上昇した。色差は、BL 群、DC(+)群、DC(-)群の順に高く、BL 群が最も高い漂白効果を示した。L*a*b*値の Kendall's W は、それぞれ、0.000, 0.886, 0.506 であり、また、Spearman's rho は、いずれも統計学的に有意であり、それぞれ 0.980, 0.968, 0.967 であった。

牛歯においても、NADC による漂白効果が認められたが、その程度は軽微であった。L*a*b*値の Kendall's W は、それぞれ、0.735, 0.308, 0.934 であった。Spearman's rho は、それぞれ 0.949, 0.790, 0.821 であり、いずれも統計学的に有意であった。

＜考察＞

本研究では、HP 染色紙と牛歯変色歯モデルを用いて漂白効果を評価したが、いずれも過去の研究に一般的に用いられている手法である。HP 染色紙は、感度が高くスクリーニングテストに適しているが、この結果のみで臨床での効果を予測することは困難である。一方、牛歯変色歯モデルでの評価は、より臨床に近いものと考えられる。

過酸化水素は、オフィスブリーチ材の有効成分として広く用いられている。過酸化水素は、水と酸素に分解され、その際、各種フリーラジカルを発生する。このフリーラジカルが変着色歯の原因となっている有機着色分子を分解することによって漂白効果が生じると考えられている。この反応は、熱、触媒、光照射などによって加速される。

本研究では、NADC によってプラズマを発生させ、そこを通過するエアーを被験面に吹き付けたところ漂白効果を示した。プラズマは気体が部分的に電離した状態であり、その技術は産業に広く応用されているのみならず、インプラント体、セラミック、象牙質の表面処理、レジンの重合、歯の漂白など、歯科医療への応用も試みられている。過去の NAPP を用いた歯の漂白に関する研究では、過酸化水素、過酸化尿素、水などを歯面に塗布し、プラズマを直接暴露させていた。過酸化水素や尿素はプラズマによって、反応速度が加速され、漂白効果が発現されるとされている。また、水とプラズマが反応して、過酸化水素、オゾン、各種フリーラジカルが発生するとの報告がある。本研究での漂白の機序は明らかではないが、空気中の酸素や水分から NADC で発生したプラズマによって、過酸化水素や各種フリーラジカルが発生して、これが漂白に寄与したものと考えられる。

測定には、色彩計と分光測色計が使われている。色彩計は、分光測色計に比べて精度が劣るとされているが、比較的安価で広く使用されている。色彩計は分光測色計と同様に、定量的な測定値が得られ、統計解析に有用である。本研究で用いた歯科用色彩計 SE は、天然歯や陶材修復物の測定に適しているとされている。一方、汎用色彩計を臨床で歯の色彩測定に使用することは困難なこともある。また、歯科用色彩計を歯以外の色彩測定に用いることの可否は必ずしも明らかではなかった。したがって、歯科用色彩計と汎用色彩計の互換性を明らかにしたことは有用なことと思われる。HP 染色紙

と牛歯変色歯モデルを用いたいずれの実験においても、Kendall's W の低いものが認められたが、Spearman's rho はいずれも有意で高いものであった。したがって、SE と NE の測定値を直接比較することは困難であると考えられる。しかしながら、有意で高い相関があることから、漂白による色の変化を評価するためには NR、SE ともに有効であり、どちらを用いても同一の傾向が得られるものと思われる。

NAPP と過酸化物や水による歯の漂白での、歯質の形態学的変化、温度変化について安全であるとの報告がある。過酸化物や水を用いない NADC による漂白についても、臨床応用に際しては今後、安全性についての評価が必要であると考えられる。

＜結論＞

NADC による HP 染色紙と牛歯変色歯モデルに対する漂白効果が認められ、また、測定に用いた 2 つの色彩計はいずれも HP 染色紙と牛歯変色歯モデルを用いた漂白の評価に有効であった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5525　号 | 草薙　彩花 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　宇尾　基弘<br>副 査　　興地　隆史　　荒川　真一 | |
| 論 文 題 目 | Effect of nonthermal atmospheric discharge on tooth bleaching | |

（論文審査の要旨）

生活歯の漂白法のひとつであるオフィスブリーチでは過酸化水素が主に有効成分として使用されている。漂白効果を促進するために、高濃度の過酸化水素の使用や光照射などが行われているが、これらは知覚過敏などの為害作用を生じることもある。放電によって生じる常温大気圧プラズマ（Nonthermal atmospheric pressure plasma: NAPP）は、過酸化水素による漂白効果を促進するとの報告があるが、プラズマ単体での漂白効果についての研究は見当たらない。歯の漂白効果を評価するために歯科用色彩計のみならず、汎用の色彩計も用いられている。そのため両色彩計による測定値を比較したい場合があるが、その一致性については明らかではない。そこで草薙は、常温大気圧放電（Nonthermal atmospheric discharge: NADC）によって生じたプラズマ単体が歯の漂白に及ぼす影響を、測定に歯科用色彩計と汎用色彩計を用いて明らかにすることを試みた。

マルチファンクションシンセサイザー、増幅器、オシロスコープ、エアーポンプ、試作放電管等から構成された NADC の装置を試作した。被検体としては、ヘマトポルフィリン（HP）染色紙と牛歯変色歯モデルを調製した。いずれも、術前の被検体の測定を行って選別を行い個体差によるばらつきの減少を試みている。HP 染色紙を用いた実験では、実験群（DC(+)群）の他に、陰性対照として放電しないもの（DC(-)群）、陽性対照として市販の歯科用漂白材による漂白（BL 群）を設定した。漂白時間は 5、10、20、30 および 60 分とし、経時的な変化を評価している。測定には歯科用色彩計（Shade Eye NCC、松風、以下 SE）と汎用色彩計（NR-11、日本電色、以下 NR）を用いて、その測定値を比較していることも興味深い。これらの実験方法は、周到な準備のもと、綿密に計画されたことが伺われる。また、用いた統計手法も妥当である。

得られた結果であるが、HP 染色紙については、実験群である DC(+)群と陽性対照の BL 群では、肉眼でも顕著な漂白効果が認められ、陰性対照の DC(-)群では漂白効果が認められなかった。また、牛歯変色歯モデルでも NADC による漂白効果は認められたが、HP 染色紙と比較してやや軽微なものであった。HP 染色紙および牛歯変色歯モデルにおける SE と NR の測定値を比較すると、Kendall's W は低いものもあり、一致率は必ずしも高いとは言えなかったが、Spearman's rho はいずれも有意で、両色彩計の測定値には高い相関が認められた。

これらの結果を過去の報告と合わせて草薙は考察を展開し、本研究での漂白機序について、空気中の酸素や水分から NADC で発生したプラズマによって、過酸化水素や各種フリーラジカルが発生して、これが漂白に寄与したものとしている。

さらに、歯科用色彩計と汎用色彩計を用いた歯の測色値の相関はこれまで明らかではなかったが、その相関性が明らかとなり、また SE と NE の測定値を直接比較することは困難であるものの、どちらを用いても同一の傾向が得られることが確認されたことは、本研究の評価すべき成果である。

以上のように本研究によって、NADC による歯の漂白効果の可能性が明らかとなり、測色に用いた 2 つの色彩計はいずれも漂白の評価に有効であることが示されたことは、新たな歯の漂白方法の開発につながるものであり、高く評価できる。よって本研究結果は今後の保存修復学、歯科審美学の発展に寄与するものと考えられ、博士（歯学）の学位を請求するのに十分値するものと認められる。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 池川　麻衣 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　川口　陽子<br>副　査　　下山　和弘、大槻　昌幸 |
| 論　文　題　目 | Interactive effect of rehydration with diluted sports drink and water gargling on change of salivary flow, pH, and buffering capacity during ergometer exercise in young adult volunteers. |

＜緒言＞

アスリートの平均う蝕経験歯数は一般人に比べて高いことが報告されている。運動に伴う口渇、スポーツドリンクの過剰摂取、間食や補食の常態化、肉体疲労によるブラッシングの怠慢などがう蝕のリスクを引き起こすと考えられているが、その詳細は不明である。これまでの研究から、運動中のスポーツドリンク摂取は脱水を抑制するものの、唾液 pH や唾液緩衝能を低下させてしまうことが問題となっている。

そこで本研究では、健常者を対象に、運動中のスポーツドリンク摂取後の含嗽が唾液分泌量、pH および緩衝能に及ぼす影響について検討した。また、口腔環境の維持に対する希釈スポーツドリンクの摂取と含嗽の交互作用について分析した。

＜方法＞

被験者

健康若年成人 19 名（男性 8 名：平均年齢 25.3±3.2 歳、平均身長 170.1±6.6cm、平均体重 62.9±7.3kg、女性 11 名：23.1±3.1 歳、160.5±4.0cm、53.5kg±4.3kg）を対象に、運動負荷試験を実施した。本研究実施については東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得た（第 899 号）。

デザイン

実験 1 は被験者 19 名全員を対象に、スポーツドリンクを補給しながら最大心拍数 80%レベルの自転車エルゴメータ運動を 30 分間行わせた。これを条件 1[運動後含嗽なし]、条件 2[含嗽あり]の 2 条件で実施した。

次いで被験者を 2 群に分けて、以下の追加実験を行った。実験 2-A（n=9）では条件 3[1.5 倍希釈スポーツドリンク摂取・運動後含嗽なし]、条件 4[1.5 倍希釈ドリンク摂取・含嗽あり]とした。実験 2-B（n=10）では条件 5[2 倍希釈ドリンク摂取・含嗽なし]、条件 6[2 倍希釈ドリンク摂取・含嗽あり]とした。

使用飲料は市販スポーツドリンク（pH3.6: アクエリアス ™、日本コカ・コーラ）であり、飲料希釈および含嗽にはミネラルウォーター（pH7.5: エビアン ™、ダノンウォーターズオブジャパン）を用いた。1.5 倍および 2 倍希釈時 pH はそれぞれ 3.7 および 4.1 であった。

実験手順

食後 2 時間以上、ブラッシングから 1 時間以上経過した状態で実験を行った。運動前唾液を採取

した後、自転車エルゴメータ運動負荷試験（Aerobike Ai、コンビウェルネス）を水分補給しながら行わせた。運動負荷試験はウォームアップ 5－10 分、本運動 30 分（最大心拍数 80%レベル強度）およびクールダウン 1 分から構成した。最大心拍数は性別と年齢から使用機器が自動算出し、運動中はイヤーセンサからリアルタイム監視された。

水分補給としては運動前、開始 10 分後、20 分後、直後の 4 回、1 回 150ml 計 600ml のスポーツドリンクを摂取させた。含嗽は運動直後水分補給の後、ミネラルウォーター約 30ml を口に含ませて「ぶくぶくうがい 10 秒間」を 3 回行わせた。実験室温は約 23℃に、飲料は 10-11℃に保った。

唾液検査

パラフィンワックス咀嚼刺激全唾液を採取した。無味無臭パラフィンワックス片を 3 分 30 秒間咀嚼させた。開始 30 秒間の唾液は棄却し、3 分間の刺激唾液全てを計量器に吐出させ、計量した（唾液分泌量）。採取は運動前（コントロール）、直後、30 分後、60 分後の計 4 回行った。含嗽実施条件では含嗽後採取した唾液を運動直後のものとした。

唾液 pH および緩衝能は携帯型 pH メーター（LAQUAtwin、堀場製作所）で測定した。センサー部に採取唾液 0.25ml を滴下し、表示された pH 値を読み取る（唾液 pH）。続いて酸負荷液（乳酸 0.25ml・pH3）を試料に滴下し 20 秒間混和後に表示される pH 値を読み取った（唾液緩衝能）。

統計学的検定

含嗽の有無と時間経過を要因とした二元配置分散分析（実験 1）およびさらに希釈の有無も要因とした三元配置分散分析（実験 2）で統計学的検定を行い、有意差があった場合、Tukey-Kramer 法にて分析した。

＜結果＞

唾液分泌量

実験 1、2-A および 2-B に関して、二元および三元配置分散分析を行った結果、いずれも有意差はみられなかった。

唾液 pH

(1)実験 1

二元配置分散分析の結果、含嗽の有無($p$<0.01)と時間経過($p$<0.01)の 2 要因で有意差がみられた。条件 1 および 2 において、運動直後それぞれ 0.38 および 0.23 減少したが、30 分後回復した。

(2)実験 2-A および 2-B

三元配置分散分析の結果、実験 2-A で希釈の有無($p$<0.001)、含嗽の有無($p$<0.01)、時間経過($p$<0.001)の 3 要因で有意差がみられた。条件 3 では運動直後 0.17 減少したが、30 分後回復した。条件 4 では運動中ほぼ一定の値をとり、有意差はなかった。

実験 2-B では希釈の有無と含嗽の有無の 2 要因間に交互作用が認められた($p$<0.01)。条件 5 および 6 ともに運動中ほぼ一定の値をとり、有意差はなかった。

唾液緩衝能

(1)実験 1

二元配置分散分析の結果、時間経過で有意差がみられた($p$<0.001)。条件 1 と 2 において、運動直後それぞれ 0.57 および 0.68 減少したが、30 分後回復した。

(2)実験 2-A および 2-B

三元配置分散分析の結果、実験 2-A と 2-B において、時間経過で有意差がみられた($p$<0.05)。条件 3 と 6 で、運動直後それぞれ 0.13 および 0.43 減少したが、60 分後には回復した。

＜考察＞

唾液採取

唾液には安静時唾液と刺激時唾液がある。唾液緩衝能を測定する場合、重炭酸イオンがより多く含まれる刺激時唾液が適しており、安静時唾液の採取は時間もかかる。以上の理由から、本研究では刺激時唾液を採取した。

唾液分泌量の変化

本実験では全ての条件で水分補給を行い、その補給量も 10－15 分毎 100－200ml の推奨量を参考に統一した。その結果、実験前後で唾液分泌量に大きな変化はみられなかった。飲料希釈の有無との間にも交互作用がみられなかったことから、飲料希釈そのものが唾液分泌量に直接的な影響を与えるものではないことが示唆された。

唾液 pH と緩衝能に対する希釈スポーツドリンクの影響

本研究では 2 種類の希釈スポーツドリンク（1.5 倍および 2 倍）で実験を行った。この希釈濃度は被験者への事前調査ならびにアスリートの飲料嗜好に関する研究成果を参考に決定した。

唾液 pH に関して、条件 1 で運動直後と 30 分後、直後と 60 分後に有意差がみられたことは先行結果を追認するものであった。条件 3 で運動直後の唾液 pH の低下が条件 1 に比べて緩やかであった。条件 5 の実験前後で唾液 pH に大きな変動はなかった。条件 3 と 5 の結果比較から、唾液 pH は希釈率によって影響を受けることが示唆された。一方条件 3 と 5 の運動直後の唾液緩衝能の低下は条件 1 に比べて緩やかであった。以上の結果から、ミネラルウォーターで希釈したスポーツドリンクを摂取すると、運動後の唾液 pH や緩衝能の低下を緩やかにすることができると考えられる。しかしドリンク希釈による栄養学的側面について今後検討する必要がある。

運動後の含嗽

条件 2 で運動直後、30 分後、60 分後の唾液 pH は有意に低下したが、含嗽を行わなかった条件 1 と比較すると、その低下は緩やかなものであった。飲料希釈条件 4 および 6 では唾液 pH の有意な変化はみられなかった。したがって唾液 pH は含嗽によって影響を受け、含嗽効果はドリンクの希釈率に影響されることが示唆された。

条件 2、条件 4、条件 6 において運動直後の唾液緩衝能が運動前に比べ有意に低下した。これは唾液緩衝能が唾液中の重炭酸塩イオンに由来し、唾液分泌量に影響されるため、飲料摂取後に含嗽を行っても唾液緩衝能の変化に直接的な影響を及ぼさなかったものと考えられる。今後、含嗽の所

要時間や回数に関する検討が必要である。

アスリートの効果的な口腔ケア

運動中にスポーツドリンクを摂取することによって、唾液分泌量は影響されないが、唾液 pH や緩衝能は低下し、その回復に 60 分要することが明らかとなった。よってう蝕や酸蝕症のリスクコントロールは困難であるが、本研究結果からドリンク希釈や運動後の含嗽が唾液 pH や緩衝能の減少を抑える一助となりうる。歯科医師および歯科衛生士はアスリートやコーチに対して、食後のブラッシングケアの実践とともに、スポーツドリンクのメリット、デメリット、希釈や含嗽効果を伝えるべきである。

＜結論＞

1. スポーツドリンクを摂取しながら、最大心拍数 80%レベル自転車エルゴメータ運動を 30 分間行った時の唾液分泌量に有意な変化は見られなかった。
2. 水で含嗽することで、スポーツドリンク摂取による唾液 pH の低下を有意に抑制できた。この効果は 1.5 倍希釈時にも保持された。
3. スポーツドリンクを２倍希釈して摂取しても、運動直後の唾液緩衝能は有意に低下した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5526　号 | 池川　麻衣 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　川口　陽子<br>副　査　　下山　和弘　　大槻　昌幸 | |
| 論 文 題 目 | Interactive effect of rehydration with diluted sports drink and water gargling on change of salivary flow, pH, and buffering capacity during ergometer exercise in young adult volunteers. | |

（論文審査の要旨）

アスリートは高強度の運動を繰り返すため脱水し、カロリーも大量消費するため、運動強度や環境温などに応じた給水や補食が欠かせない。運動時の水分補給源としてスポーツドリンクの有効性はすでに示されており、世界中で愛飲されている。しかしその反面、含糖量の多さと低 pH の視点からう蝕や酸蝕症といった歯科疾患の誘発リスクなど口腔内環境への悪影響が指摘されている。そのため現場では、スポーツドリンク摂取後の含嗽・ブラッシングの励行や、ドリンクの希釈など様々な提言が行われているが、十分な検証が行われていないため、有効かつ具体的な予防対策を確立するに至っていない。

このような現状を鑑み、申請者である池川はアスリートの口腔保健に資することを目的として、本研究を行った。

健康な成人 19 名を対象に規格化されたエルゴメータ運動負荷試験を課し、市販スポーツドリンクを摂取させた時の口腔内状況を含嗽およびドリンク希釈という 2 要因で調査し、その交互作用を詳細に検討した。その際、負荷強度の設定、実験環境のコントロール、飲料選定、摂取量や希釈率など、いずれも実際のスポーツシーンに即したプロトコールが組まれていることは高く評価された。唾液検査も運動前から終了後 60 分にわたって実施され、評価項目も分泌量、pH および緩衝能と複数行われ、本研究が周到な準備計画のもとで行われたことが窺われる。

得られた結果は以下の通りである。

1) 含嗽およびスポーツドリンクの希釈にかかわらず、唾液分泌量は運動負荷試験の前後で有意な変化を示さなかった。
2) 唾液 pH は運動直後有意に低下し、30 分後に回復した。唾液緩衝能も運動直後有意に低下し、60 分後に回復した。
3) スポーツドリンク摂取による唾液 pH の低下は含嗽を行うことで抑制された。
4) 含嗽とドリンク希釈の 2 要因間に交互作用が認められ、含嗽による唾液 pH 低下抑制効果は原液および 1.5 倍希釈では保持されたが、２倍希釈すると失われた。

本研究結果より、運動時にスポーツドリンクで水分補給した場合、脱水に伴う口渇は効果的

に抑制される一方、唾液 pH および緩衝能は 30 分から 60 分間有意に低下することが明確に示された。加えて、運動後に含嗽を行うと唾液 pH の低下を抑制できること、またスポーツドリンクを 2 倍希釈して薄めた場合この含嗽効果が弱まることなどが示唆された。論文では、先行研究の成果を踏まえ、アスリートの口腔ケアの在り方についても適切に考察されている。

以上のように、運動後の含嗽効果とドリンク希釈の交互作用を解明した本研究の成果はアスリートの口腔保健指導の計画立案や指針の策定に資する重要な情報であり、今後のスポーツ歯学、歯科医療の進歩発展に寄与するところが大きいと考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求を行うにあたり十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 金丸　智紀 |
| 論文審査担当者 | 主査　春日井　昇平<br>副査　中島　友紀、坂本　啓 |
| 論　文　題　目 | Modulation of Matrix Mineralization by von Willebrand Factor C Domain Containing 2 in Vivo and in Vitro |

（論文内容の要旨）

〈要旨〉

システインリッチドメインを有するシステインノットプロテイン(CKP)は、主に骨形成タンパク質（Bone morphogenetic protein: BMP）によって誘導される骨形成を阻害することが知られている。 最近、新規の CKP である von Willebrand factor C domain containing 2 (VWC2)が同定されたが、この新規分子の骨形成に対する効果はいまだ不明である。 申請者らは、骨芽細胞様細胞株に VWC2 を添加すると、骨基質の石灰化やアルカリホスファターゼ(ALP)活性が有意に増加することを見出した。また、VWC2 は、マウス頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞において、マスター転写因子である Osterix や Runt-related transcription factor 2（Runx2）の発現を増加させた。 さらに、in vivo 骨再生実験において、マウスの頭蓋骨欠損部に VWC2 を処理すると、新生骨の促進と石灰化の上昇が認められた。これらの結果から、VWC2 は骨芽細胞の分化を促進させることで、骨形成を正に制御する新規分子であることが示唆された。

〈緒言〉

Transforming growth factor-β（TGF-β）スーパーファミリーは、BMP、TGF-β、GDF およびアクチビンを含むサイトカインの総称で、哺乳類において約 40 種類が報告されている。TGF-β スーパーファミリーの分子は、細胞表面上の特異的な受容体に結合し、Smad などのシグナル分子のリン酸化を介して細胞内に情報を伝達する。そして、これらのサイトカインは、細胞増殖、細胞死、細胞分化、胎児期の体軸の形成など、様々な組織の形成を制御していることが知られている。

BMP-2 は骨形成を誘導する分子であり、現在、米国ではヒト組換えタンパク質が、頭蓋顔面再建や骨修復、骨再生手術に使用されている。 BMP-2 は、侵襲を伴う自家骨移植を不要とした骨形成誘導分子として臨床応用が注目されているが、医療経済的に大きな負担、適切な保持・徐放の困難さや、BMP 誘導性の炎症反応をはじめとした副作用など、多くの問題を抱えているも現実である。

TGF-β スーパーファミリー分子は、Noggin、Chordin、および Follistatin などのアンタゴニストによって細胞外で制御されていることが知られている。これらのアンタゴニストの一つである CKP は、TGF-β スーパーファミリーに結合するシステインリッチドメインを有する。最近の研究

で、2 つの新規 CKP、VWC2 と VWC2-like が、バイオインフォマティクス解析から同定されている。VWC2 と VWC2-like の構造は類似しており、その同一性は、ヒトで 60%、マウスで 55%であり、VWC2 は 325 アミノ酸、VWC2-like は 222 アミノ酸から成り、どちらも 2 つのシステインリッチドメインを有している。これまでの報告で、VWC2-like が骨芽細胞の Osterix 発現を調節することによって、石灰化形成を促進することが見出されているが、VWC2 の骨形成における機能はいまだ不明である。本研究では、in vivo 骨再生実験を用いた骨新生の形態解析から、骨組織における VWC2 による骨形成への促進効果を見出し、骨芽細胞を用いた in vitro 実験から、その作用メカニズムの解明を試みた。

〈方法〉

VWC2 による骨形成への影響を解析するため、骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いて、アリザリンレッド S による石灰化基質の染色、ALP 活性を計測した。また、マウス新生児頭蓋骨を酵素処理して、頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞を単離・培養した。得られた骨芽細胞に VWC2 を作用させ、real-time PCR にて、骨芽細胞分化および骨基質分子の発現を測定、対照群と比較した。さらに、生体レベルでの VWC2 による骨形成への作用を解析するために、5 週齢の ICR マウスの頭頂骨に直径 3.5mm の円形の欠損する in vivo 骨再生モデルを使用した。VWC2 や BMP-2 をコラーゲンスポンジに含ませ骨欠損部位に移植し、欠損部における骨再生の評価は、マイクロ CT を用いて観察した。また、新生骨が形成され始めてから 6 日間ごとに骨沈着性の蛍光物質カルセインを注射し、その蛍光ラベル間の距離を測定することで、新生骨の石灰化速度を測定した。

〈結果〉

MC3T3-E1 細胞を用いた石灰化試験では、VWC2 処理後 3 週間で、対照群と比較して、VWC2 処理群で有意な石灰化の形成の増加が見られた。この効果は石灰化促進能力が高い BMP-2 と同程度の有意な結果であった。また、ALP 活性能では、VWC2 処理後 3 日での ALP 活性が対照群と比較して有意に上昇していることが見出された。

マウス頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞に、VWC2 を処理すると、骨芽細胞のマスター転写因子である Osterix や Runx2 の有意な増加が見出された。さらに、骨芽細胞分化後期に発現する骨基質である骨シアロタンパク質(BSP)の発現が、対照群と比較して有意に上昇していた。一方、I 型コラーゲンやオステオカルシンなどの骨基質分子は、VWC2 の影響を受けなかった。

In vivo 骨再生実験の結果、骨欠損部への VWC2 移植により、顕著な新生骨がマイクロ CT 解析によって確認された。さらに、蛍光ラベリングによる骨石灰化速度の測定では、VWC2 処理によって骨石灰化速度が有意に上昇していることが見出された。

〈考察〉

本研究では、CKP の新規メンバーである VWC2 が、骨芽細胞のマスター転写因子 Osterix および Runx2 の発現の制御し、骨形成を促進することを見出した。以前、VWC2 は中枢神経系において発現し、ニューロン分化を促進することが見出されている。さらに、BMP-2 や 6 によって誘導される ALP 活性ならびに BMP 特異的 Smad1/5/8 のリン酸化を阻害することも報告されている。

しかしながら、本研究では、ALP 活性および骨形成に関連する分子の発現が、VWC2 処理で促進されることが見出された。これら相反する結果は、VWC2 が豊富な増殖因子を含む高濃度の FBS の存在下で、BMP による骨分化誘導に対しては抑制的に作用するが、正常条件下では骨形成に促進的に作用する可能性が考えられる。

さらに、VWC2 が骨形成に促進的に機能するメカニズムとして、VWC2 が BMP の阻害剤を抑制することで、骨形成に促進的に作用することも考えられる。Crossvinless 2 は VWC2 同様システインリッチドメインを有する Chordin ファミリーの分子であり 、BMP の阻害剤の一つである Chordin に結合し、Chordin の BMP2 阻害作用を抑制することが見出されている。VWC2 が Crossvinless 2 と同様な機序で、骨形成を促進する可能性もまた示唆される。また、インヒビンは、システインリッチドメイン様の構造を有しており、アクチビンの機能を抑制し、骨芽細胞分化を調節することが報告されており、VWC2 も同様に、抗骨形成作用を有する TGF-β やアクチビンのようなタンパク質の活性を阻害する可能性も考えられる。VWC2 の骨形成における促進機能を、今後、さらに解明していくことで骨疾患の新たな治療戦略の確立に期待がかかる。

〈結論〉

本研究は、CKP の新規分子 VWC2 が、骨芽細胞の分化を促進させることで、骨形成を正に制御する分子であることを生体レベルで明らかにした。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5527　号 | 金丸　智紀 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　春日井　昇平<br>副　査　中島　友紀、坂本　啓 | |
| 論 文 題 目 | Modulation of Matrix Mineralization by von Willebrand Factor C Domain Containing 2 in Vivo and in Vitro | |

（論文審査の要旨）

本論文では、新規のシステインノットプロテイン（CKP）である von Willebrand factor C domain containing 2 (VWC2)の骨形成機能に関して報告している。先行研究で 2 つの新たな CKP である VWC2 と VWC2-like がバイオインフォマティクス解析から同定されている。VWC2 と VWC2-like は構造が類似しており、どちらも 2 つのシステインリッチドメインを有し、VWC2-like が骨芽細胞での Osterix 発現を制御することで石灰化を促進することも報告されている。申請者らは、2 つの分子間の構造に類似性に着目し、本研究で VWC2 の骨形成における影響を解析した。

VWC2 による骨形成への影響を解析するため、骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞とマウス頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞が用いられた。骨芽細胞に VWC2 を作用させ、石灰化基質の染色やアルカリホスファターゼ(ALP)活性の計測、real-time PCR による骨芽細胞関連分子の発現を測定した。さらに、生体レベルでの VWC2 による骨形成への作用を解析するために、in vivo 骨再生モデルを使用し、欠損部における骨再生能をマイクロ CT で三次元の骨解析をした。また、カルセインラベルの測定から、新生骨の石灰化速度を測定した。

得られた結果は以下の通りである。

1) 石灰化試験では、VWC2 処理後 3 週間で、対照群と比較して VWC2 処理群で有意な石灰化結節形成の増加が見られた。
2) ALP 活性能の解析では、VWC2 処理後 3 日での ALP 活性が対照群と比較して有意に上昇し、それはほぼ濃度依存的であることが判明した。
3) マウス頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞を用いた、real-time PCR による骨芽細胞の関連分子の発現解析では、VWC2 作用後 24 時間で、骨芽細胞マスター転写因子 Osterix と Runx2 の有意な発現上昇が見出された。また、VWC2 作用後 14 日で、骨芽細胞の骨基質分子である骨シアロタンパク質(BSP)の発現が有意に上昇した。
4) マウス頭蓋における骨欠損モデルを用いた in vivo 骨再生実験では、VWC2 の移植グループで骨新生の有意な増加が観察された。
5) 蛍光ラベリングによる骨石灰化速度の測定では、VWC2 処理によって有意な骨石灰化速度の亢進が認められた。

以上のように、本研究において、申請者、金丸智紀は、CKP の新規分子 VWC2 が、骨芽細胞の分化を促進させることで、骨形成を正に制御する分子であることを生体レベルで明らかにした。

この知見は、VWC2 による骨形成の制御メカニズムを解明するための一助となり、今後の医学および歯学分野における骨疾患の制圧を目指した治療戦略の分子基盤になると考えられる。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 岡本　千絵 |
| 論文審査担当者 | 主査　青木　和広<br>副査　岸田　晶夫　　塩田　真 |
| 論　文　題　目 | Inverse response of osteoblasts and fibroblasts to growth on carbon-deposited titanium surfaces |

（論文内容の要旨）

<緒言>

インプラント治療の成功は、骨とインプラントが十分に結合することで成立する。インプラント体表面改質についての研究は進んでいるが、インプラント周囲に骨組織は完全には形成されないと言われている。骨とチタンの接触率は、45%±16%、 50-65%と報告されており未だ 100%には達していない。これはインプラント体表面が骨組織だけではなく、線維性結合組織によっても囲まれている可能性を示している。チタン製インプラント表面では、どのような種類の細胞も、接着、増殖、分化する可能性がある。 骨芽細胞だけでなく線維芽細胞も容易にチタン上へ接着するとの報告がある。線維芽細胞がより滑沢な表面を好むのに対し、骨芽細胞は粗造な表面を好む傾向があるという報告はあるものの、チタン表面における細胞接着のレベルは、骨芽細胞も線維芽細胞もほぼ等しいことも報告されている。これは、チタン表面の粗さを変化させたとしても、骨芽細胞の早期における接着をコントロールすることが難しいことを示している。表面性状、濡れ性、化学組成等のチタン表面の性質は、骨とインプラントの結合に重要な要素である。炭素はチタン表面に生じる汚染物質を構成しており、34 種の異なるインプラント表面の化学組成を分析すると 17.9-76.5%の表面に炭素が付着しているとの報告もある。さらに喪失したインプラント表面の分析では、かなりの量の炭素がインプラント表面から検出されたとの報告もある。これらの研究は、チタン表面の炭素の付着は回避不可能であること、表面性状に関係なく炭素の付着がチタン系材料に生じる可能性を示している。従って、チタンインプラントに対する骨芽細胞と線維芽細胞の細胞反応の違いが炭素の付着量に依存しているのなら、インプラントの製品としての品質の不均一性により、重大な問題が生じる可能性がある。また、炭素付着量に影響される骨芽細胞と線維芽細胞の挙動が解明されれば、インプラント周囲における骨組織と線維組織の形成メカニズムを明らかにすることに貢献するだろう。現在まで、炭素の付着が骨芽細胞と線維芽細胞の生体親和性に与える影響は研究されていない。本研究では化学的組成、特に炭素付着が細胞に与える影響に焦点を当てた。特に、炭素を付着させたチタン表面では、骨芽細胞と線維芽細胞の反応の挙動と機能に差が出るのではないかと仮説を立て検証した。

<材料・方法>

直径 8 ㎜、厚さ 1.5 ㎜の純チタンを鏡面研磨、プラズマ照射後、カーボンコータを用いてチタンディスク上に炭素を付着させた。Ti/C の割合は X 線光電子分光法（XPS）で分析、最終的に 6.5、0.02、0.005、0 とした。サンプル表面の親水性の評価は、0.7μℓ の液量で自動接触角計にて測定した。炭素自体の細胞毒性を調べる為、骨芽細胞（MC3T3-E1）と線維芽細胞（NIH/3T3）を炭素付着させたガラスプレート上で、それぞれ 24、72 時間培養、その後、生細胞のレベルをテトラゾリウム塩（WST-8）を用いた比色分析で確認した。培養 4、24 時間後に、サンプル表面に接着した骨芽細胞、線維芽細胞それぞれの細胞数を、WST-8 にて評価を行い、同時に 24 時間培養後にカルセイン染色した細胞を、蛍光顕微鏡にて観察した。チタン表面の骨芽細胞と線維芽細胞の形態学的および細胞骨格評価として、蛍光顕微鏡を用い、24 時間培養後、10%ホルマリン液で固定し、ローダミンファロイジン融合タンパクを用いてアクチンフィラメントを染色し、イメージアナライザーにて定量評価した。また、それぞれの細胞をサンプル上で 24 時間培養後、細胞接着タンパクである vinculin の発現を免疫染色により可視化し、イメージアナライザーを使用しピクセルベースの密度で定量化した。また培養 7、14 日後、生成されたコラーゲン量をシリウスレッド染色で評価した。統計処理は、一元配置分散分析の後、Tukey の多重比較を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

<結果>

XPS でサンプルごとの Ti2p、O1s、 C1s について測定をした。C1s ピークは炭素付着に従い増加、Ti2p と O1s ピークは減少した。Ti/C(0)の Ti2p ピークは検出されず、チタン表面が炭素で完全に被覆されたことを示した。接触角は炭素の量が増えるに従って増加、表面の濡れ性が親水性から疎水性に変化し、Ti/C(0)は Ti/C (6.5)よりも疎水性で、50° 以上の接触角度を示した。骨芽細胞と線維芽細胞の生存率は、通常のポリスチレンプレート上で培養したものと比較し、炭素を付着させたガラスプレート上でも減少しなかった。これにより本研究で使用した炭素は、細胞死を誘発することがないことが示された。

WST-8 比色分析による細胞初期接着は、培養 4 時間後の骨芽細胞は、Ti/C (0.005)が Ti/C (6.5)よりも 20%減少し、24 時間後では 40%の減少を示した。反対に、線維芽細胞では炭素の量に依存して増加した。培養 4 時間後の Ti/C (0.005)での付着は Ti/C (6.5)に比べ 2 倍に増加、24 時間後でも増加をしていた。この結果は、カルセイン染色による蛍光顕微鏡画像でも確認をすることが出来、骨芽細胞と線維芽細胞は逆の挙動を示した。

アクチンフィラメント染色による 24 時間後の骨芽細胞の蛍光顕微鏡画像では、Ti/C (6.5)の細胞がより大きく、細胞骨格の伸展及びアクチン線維構造が見られたが、Ti/C (0.005)または(0)の大部分の細胞で細胞の伸展は認められなかった。炭素の付着は、細胞形態の指標である面積、フェレ径も抑制していた。反対に、線維芽細胞の骨格伸展、アクチン線維構造は、炭素濃度の増加に伴って徐々に増加し、面積、フェレ径も増加を示した。細胞接着タンパクである vinculin の発現は、炭素の増加に伴って骨芽細胞では減少し、Ti/C (6.5)と比べ Ti/C (0.005)は 50%の減少であった。反対に、線維芽細胞の vinculin 発現は炭素の量に依存して増加を示した。

骨芽細胞の総コラーゲン量は炭素の付着に伴って減少した。培養 7 日後では、Ti/C (6.5)は Ti/C

(0.005)と比較し 30%以上の減少、14 日後でも減少した。相対的なコラーゲン量（総コラーゲン量/WST-8 比色分析で測定された細胞の量）は、炭素の量に依存して減少し、骨芽細胞の細胞分化活性が炭素の付着により抑制されたことを示した。線維芽細胞は 7 日も 14 日もコラーゲン合成が著しく増加した。

<考察>

我々の知る限り本研究は、炭素付着により、チタン表面において骨芽細胞と線維芽細胞の間で逆の生物学的挙動を生じることを示した最初の報告である。培養 7 日後のコラーゲン合成能は、骨芽細胞においては Ti/C (0.005)で 25%の減少が見られたが、線維芽細胞においては Ti/C (0.005)で 100%の増加が見られた。 この結果により、カーボンが付着したチタン表面においては骨形成が減少し、インプラント表面の骨結合部への軟組織侵入が増加する可能性が示された。

細胞分化の抑制や促進は、細胞の接着、伸展など初期の細胞活性と密接に関連している。炭素が付着した表面における骨芽細胞の細胞接着、伸展の減少は、骨芽細胞の分化も減少させるという、林らによる先行研究の結果と一致していた。一方で、炭素付着の増加に伴って線維芽細胞の接着や面積は増大した。また、vinculin による上方制御に影響され、炭素付着が生じたチタン表面に対する線維芽細胞の接着はより増加する可能性があり、これは、細胞接着分子やインテグリン、アクチンフィラメントの連携に関与し、細胞接着や細胞形態形成を開始する役割を担うことになる。さらに、チタンディスク上において、Ti/C(6.5)は 24 時間培養後の線維芽細胞の接着レベルが、4 時間培養で計測した Ti/C (0.005)および(0)の細胞接着レベルに達していなかった。 これは、初期の親和性の違いがその後の生物活性に影響を与えていることを示唆している。

インプラント表面は空気、水、洗浄液などからの不純物を絶えず吸着しているという報告がある。とりわけ、炭化水素の吸着が増加するに伴い、チタン表面の濡れ性は減少するという報告があるが、これは親水性に寄与するチタン表面上の酸素種が、炭化水素に被覆されてしまうことによるものと考えられる。この炭素吸着の増加とチタンの濡れ性の関係性 は XPS で確認することが出来る。Ti2p と O1s ピークの縮小に伴い、C1s ピークの増加がみられた。一般に、チタンだけでなく、高分子の足場材料表面の疎水性が増加すると、骨欠損の治癒を低下させるという報告があるが、線維芽細胞の活性に影響を与える生体材料の表面親水性については未だ議論の余地がある。ポリハイドロキシアルカン酸を用いて親水性を改善したチタン表面上では、線維芽細胞の増殖が低下するという報告があり、本研究結果と一致している一方で、チタン表面の親水性を改善すると、NIH/3T3 線維芽細胞の接着と増殖が促進するとした報告もあることから、ぬれ性と線維芽細胞の生体適合性の影響に関して最終的な結論を出すことは難しい。また、これらの報告では、材料表面の微細構造や化学的組成が異なっており、その結果の解釈は複雑である。本研究では、同一の表面形状に異なる炭素濃度を設定し、同一表面構造における線維芽細胞の反応を調べることができた。炭素濃度は、親水性の程度よりも線維芽細胞の活動性にとって重要な影響を与えるということを本研究で証明することができるだろう。

今回の結果は、チタン表面の炭素付着量が、インプラント表面に対する骨芽細胞と線維芽細胞の初期の親和性を決定するために重要であるということを示している。また、炭素の除去が軟組織の侵入を防ぎ、インプラント周囲の骨形成を促進する重要なステップになることが示唆された。

だが、軟/線維組織の親和性は、インプラントにおける創傷治癒においては重要で、特に歯肉と接するインプラントネック部では必要とされている。インプラント治療の合併症として、インプラント周囲炎が最も悩ましい問題の一つとして考えられている。感染を防ぐためには、軟組織による強固な接着が必要であり、本研究の結果から、炭素を付着させたインプラント表面を軟組織により封鎖すると同時に、インプラントネックの骨側表面を骨組織で封鎖することで、インプラント周囲炎を回避できることを示唆した。また、インプラント周囲炎の治療においては、炭素が付着したインプラント表面でも、デブライドメントを徹底し、軟組織で封鎖させることで、より良い周囲炎の治癒が期待できる。

炭素は人の体を構成する主要元素であり、生体適合性が高いと言われることから、今日ではカーボンナノチューブの様な生体材料に応用されている。線維芽細胞の効果的な接着を達成する為にはチタン表面上の炭素の付着が有効であることを示した今回の研究結果は、インプラントネック部周囲の軟組織の密閉を促進する新しい戦略を提示し、さらにはインプラントの安定性をさらに向上させることを示唆するものである。炭素の付着がチタンインプラントにポジティブな影響を与えるのか、ネガティブな影響を与えるのかを特定する目的で、そして、インプラントの安定性を得るためにインプラント表面の最適化を図る目的でも、動物の口腔内における研究が今後は必要である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5528　号 | 岡本　千絵 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　青木　和広<br>副　査　岸田　晶夫　　塩田　真 | |
| 論 文 題 目 | Inverse response of osteoblasts and fibroblasts to growth on carbon-deposited titanium surfaces | |

（論文審査の要旨）

インプラント治療後の脱落あるいはインプラント周囲炎を引き起こす要因の一つとして、インプラント表面と周囲骨との接触率が低い事が考えられている。岡本は、インプラント体表面が骨組織だけではなく、線維性結合組織にも囲まれていることにより、インプラント治療の問題が生じると考え、チタン製インプラント表面における骨芽細胞や線維芽細胞の接着、増殖、分化に着目した。骨とインプラントの結合において重要な要因である生体親和性は、表面性状、濡れ性、 化学組成などの物理化学的性質に依存していることから、岡本はチタン表面の回避不可能と考えられている炭素の付着が、チタン製インプラントに対する骨芽細胞と線維芽細胞の細胞反応の違いに関与しているのではないかと発想したことは評価できる。チタンの表面性状により、細胞接着の違いは報告されてはいるものの、チタン表面における細胞接着のレベルは、骨芽細胞も線維芽細胞もほぼ等しいことが報告されていることから、岡本は炭素の付着量が、インプラント表面の骨接触率の低下を招く原因となっており、インプラント臨床において重大な問題となる可能性があるのではないかと想定した。現在まで、炭素の付着が骨芽細胞と線維芽細胞の生体親和性に与える影響について十分な評価はされていないことから、本論文では炭素付着が細胞に与える影響に焦点を当て、特に、炭素を付着させたチタン表面では、骨芽細胞と線維芽細胞の反応の挙動と機能に差が出るのではないかという仮説を立て、これを検証している。

岡本は仮説を明らかにするために、1）親水性の評価、2）細胞初期接着の評価、3）細胞の形態学的及び細胞骨格評価、4）細胞接着タンパクである vinculin の発現と生成されたコラーゲン量の評価を骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞、線維芽細胞 NIH/3T3 を用いて行った。評価項目は骨芽細胞及び線維芽細胞の挙動、機能を評価する適切な方法であった。得られた結果に対する統計学的な検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われた。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 炭素濃度の増加に伴い、チタン表面の濡れ性が親水性から疎水性に変化し、50°以上の接触角度を示した。

2. 細胞初期接着は炭素濃度の増加に伴い、骨芽細胞では減少するのに対し、線維芽細胞では増加が認められた。
3. 骨芽細胞は、炭素濃度の増加に伴い、細胞骨格の伸展及び actin 線維構造が認められなかったが、逆に線維芽細胞はより大きく、細胞骨格の伸展及び actin 線維構造が認められた。
4. Vinculin の発現は、炭素濃度の増加に伴い骨芽細胞では減少し、反対に線維芽細胞の vinculin 発現は、炭素の量に依存して増加した。
5. コラーゲン合成は、炭素濃度の増加に伴い、骨芽細胞では減少し分化が抑制され、反対に線維芽細胞は増加した。

本研究は同一の表面形状に異なる炭素濃度を設定し、同一表面構造における骨芽細胞と線維芽細胞の反応を調べ、チタン表面の炭素の付着量が、インプラント表面における骨芽細胞と線維芽細胞の初期の親和性を決定するために重要であるということを示している。

論文中において、浮遊細胞と接着した細胞での WST-8 による生細胞数測定(Fig.1-C)は、細胞に対する、使用した炭素の毒性評価として実施し、この結果により Fig.2 では、チタン上に接着した細胞数が少ない現象は今回使用した炭素自体の毒性に起因するものではないことを示している。骨芽細胞、線維芽細胞は接着依存性細胞であるため、非接着状態で 72 時間生存することは困難であると考えられるが、炭素付着したチタン表面上においては生存する可能性も否定はできない。炭素付着量が多いほど骨芽細胞はチタンに接着するまでに時間がかかり、線維芽細胞では比較的早くチタン表面に接着する傾向が認められ、これらの原因として、両者の細胞接着スピードの違い、あるいは細胞の形態変化で示唆される細胞の接着力が両者で異なるため、観察時の洗浄工程による剥離が起因した結果と考えられた。

今回の研究結果は、炭素付着の除去が強固な骨結合に繋がる可能性を示唆し、また、反対に、炭素の付着が骨形成には不利になる可能性が高く、インプラントネック部周囲においては軟組織の密閉を促進する新しい戦略になり得ること、さらにはインプラントの安定性をさらに向上させる可能性を示している。

本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な測定手技により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できると考えられる。よって本論文は、博士（歯学）の学位を請求するのに十分に価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 稲川　英明 |
| 論文審査担当者 | 主査　小野 卓史<br>副査　塙 隆夫　　田畑 純 |
| 論　文　題　目 | Potential for estimation of Young's modulus based on computed tomography numbers in bone: A validation study using a nano-indentation test on murine maxilla |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

顎骨内部に発生する応力の解析を目的とした数値モデルでは，計算に必要な骨のヤング率をコンピューター断層撮影（CT）に含まれる各部の CT 値から換算することが多いが，その精度と妥当性は確立していない．本研究では，マウス上顎骨のヤング率をナノインデンテーション（NI）法により計測し，同一個体同一部位の CT 値から換算した骨密度（BMD）と比較することにより，ヤング率換算の妥当性を検討した．17 週齢雄 C57BL/6J マウスの上顎骨（n=9）を屠殺後に micro-CT（μCT）で撮影し，切歯に近い前頭面と平行な断面上にある硬口蓋の皮質骨に 2 つの関心領域，すなわち正中に近い口蓋上部で比較的不均質な骨質を示す部位（ROI-1）と，その約 500μm 外側の比較的骨質が均質な部位（ROI-2）を設定した．湿潤状態で NI 測定（n=5）を行い，Oliver-Pharr 法でヤング率（E）に変換した．同部に一致するボクセルの CT 値を抽出し，これをハイドロキシアパタイトのファントムを基準として BMD に換算した．その結果、ROI-1 の NI によるヤング率の平均値は ROI-2 よりも有意に低く（$p < 0.05$），BMD の平均値は ROI-1 と ROI-2 で有意差はなかった．ヤング率と BMD の関係は，ROI-2 の累乗回帰モデルにおける決定係数（$R^2$）が比較的高く，予測式は信頼性が高かったが，ROI-1 ではこの係数が低かった．これは，μCT の分解能が不均質な微細構造を再現するのに十分ではないことに起因すると推察された．結果より，骨のヤング率を CT 値のみから推定することの困難さが示唆された．

＜緒言＞

インプラントの埋入部位や本数などを診断して補綴治療の計画を立案するためには，骨内部の応力や歪みを力学的に分析して術後の骨吸収やオッセオインテグレーションの損傷リスクを考慮することが有効である．この目的のために顎骨の CT 画像をもとに力学モデルを構築し，モデル内の応力・歪み分布を計算することが広く行われている．この力学解析においては，骨のモデルに部位ごとに異なるヤング率をモデル情報として入力する必要がある．このため，非侵襲的にヤング率を得る方法として, CT データに含まれる CT 値から骨各部のヤング率を推定する方法が広く用いられている．しかしながら，この方法により得られたヤング率の精度と妥当性は，現在まで明らかになっていない．CT 値は放射線濃度を表す量的尺度であるが，この値をハイドロキシ

アパタイトのファントムを参照して局所的な骨密度（BMD）に変換する方法は，医科用 CT を用いた臨床診断法として一般的となっている．このため，これまで十分に検証されていない骨密度とヤング率との関係性を検証することにより，CT 値からヤング率を推定する妥当性の評価が行える可能性がある．

CT 値を基にした BMD と実際に計測したヤング率との関係性は，これまで動物とヒトの各部の骨を対象として検討されてきた．しかし，それぞれの研究で提唱された変換式は研究ごとで異なり，一貫性を欠いている．両者の関係性が明確でなければ，CT 値から推定したヤング率に妥当性があるとは言えず，このため診断のための応力解析の正確性は担保されないと考えられる．本研究の目的は，マウス顎骨のヤング率をナノインデンテーション（NI）法で測定し，同一個体同一部位の CT 値から得られた BMD と比較することにより，両者の関係を明らかにすることである．本研究では，CT 値から換算する BMD と NI 法で計測したヤング率との間に正の相関関係にあると仮定した．これをもとに CT 値からヤング率を推定するための変換式の妥当性を検討した．

＜方法＞

17 週齢雄 C57BL/6J マウス（n=9）上顎骨を鼻から 2-3mm で約 1-2mm 厚さに前頭面と平行に切断し，光重合レジン（PMMA/テクノビット 7210）を用いてアクリル板に接着して、包埋した．試料をμCT で撮影後，表面を研磨し，研磨面の右側硬口蓋の歯間部皮質骨に 2 つの関心領域（ROI）を設定した．すなわち，ROI-1 は口蓋正中の皮質骨，ROI-2 は ROI-1 から約 500μm 外側の皮質骨とした．各マウスを屠殺から 4 時間後，各 ROI 内部の 5 か所を NI 法で測定し，荷重-変位曲線除荷曲線をもとにヤング率を得た．NI 後の ROI 領域をレーザー顕微鏡で，骨表面の圧痕を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した．次に，μCT のデータを基に 3D 画像を構築し，さらに NI 測定と同一平面における各ボクセルの CT 値を抽出した．NI の圧痕と同一個体同一部位の CT 値を，ハイドロキシアパタイトのファントムにおける CT 値と BMD との線形関係をもとに BMD に変換した．得られたヤング率（E）と BMD（$\rho$）との関係は，累乗関数 $E=\alpha\rho^{\beta}$で回帰分析した．また，ROI-1 の骨構造はハバース管周囲のハバース層板部分を Hav，介在層板を特徴とする表面を Int，ハバース層板と介在層板が混在する部分を Mix として 3 つのサブグループに分類した．

＜結果＞

ROI-1（1.27±0.13 g / cm$^3$）と ROI-2（1.38±0.13 g / cm$^3$）の平均 BMD は有意差がなく，ROI-1 の平均ヤング率（19.38 ± 3.49 GPa）は ROI-2（28.91±5.06GPa）より有意に低かった（$p<0.05$）．Hav，Int および Mix の平均 BMD に有意差はなく（$p<0.05$），平均ヤング率は Int よりも Hav で有意に高かった（$p<0.05$）．累乗回帰モデルは ROI-2（$E = 17.486\rho^{1.596}$, $R^2 = 0.661$, $p = 0.013$）で比較的 $R^2$は高かったが，ROI-1（$E = 16.748\rho^{0.662}$, $R^2 = 0.256$, $p = 0.163$）では $R^2$は低かった．ROI-1 の圧痕部位にハバース管を中心としたいくつかの層状構造が観察されたが，ROI-2 の圧痕部位には比較的均質な表面が見られた．圧痕の平均直径は ROI-1（約 4.57±0.85μm）の方が ROI-2（約 3.98±0.35μm）よりも大きかった．

＜考察＞

本研究における BMD の平均値は過去の文献における結果と比較して大きかった．過去の研究では BMD が上顎骨よりも低い傾向のある大腿骨などを用いたことが主な理由と考えられる．NI 法で計測した骨のヤング率は過去の報告よりわずかに高く，湿潤状態では乾燥状態より低いとされる報告とは一致しなかった．これも上顎骨の性質が影響したことが理由と考えられるが，この理由に加えて測定までの時間が従来よりも短かったことが関係したと思われる．従来の研究では試料を 24 時間以上溶液に漬けて乾燥し，その後再水和させた状態での湿潤環境であるが，本研究では骨組織の変性を最小限にするため，屠殺後可及的に早い４時間後に測定した．再水和状態とは異なる，生体により近い湿潤状態であったことでヤング率が比較的高くなったと考えられる．

２つの ROI を比較すると，NI 圧子と骨の間では小孔が表面構造を軟化させヤング率を減少させるため，ハバース系や小孔がある不均一な表面が見られた ROI-1 のヤング率は ROI-2 より低く，圧痕直径は ROI-1 の方が大きくなったと考えられた．

ROI-1 の累乗回帰モデルにおける決定係数（$R^2$）が比較的低かった理由の一つとして，骨質が不均一でヤング率の SD が大きかったことが考えられた．この部位の骨質の不均一性は CT におけるボクセルの部分容積効果により平均化されて CT 値には反映されず，その結果 ROI-1 のサブグループ間の BMD 値にも差が生じなかったと考えられる．一方，ROI-2 は骨質が比較的均一だったため決定係数 $R^2$が高く，BMD からヤング率を正確に推定できると考えられた．ROI-1 のサブグループではヤング率はハバース層板の方が介在層板よりも高く，この結果は過去の結果と一致しなかった．これは、過去の研究では層板ごとに明確に分類した試料を計測したのに対し，本研究では圧痕が複数の層板にまたがっていたケースが混在したためと考えられる．

過去の研究でも BMD と実際のヤング率との関係を数式で近似する試みが行われた．これらの結果と本研究から得られた変換式を比較すると，本研究のヤング率は過去の研究よりも大きかったため単位 BMD あたりのヤング率を表す $\alpha$ は大きく，BMD の大小によるヤング率の差は小さかったため関数の曲率に影響を及ぼす $\beta$ は小さかったと考えられる．この特徴は，比較的小さい BMD では過去の式より高いヤング率を算出し，高い BMD では過去の式と同等のヤング率を算出することを意味する．また，過去の研究の中には BMD 値を CT 値以外の試料の重量を体積で割る方法で得たものもあり，それらの実験でのヤング率は小さかったため本実験よりも $\alpha$ は小さく，過去の方法では BMD の大小によるヤング率の差が大きかったため $\beta$ が本実験よりも大きかったと考えられる．

マウス上顎骨の局所での CT 値を基にした BMD と NI で計測したヤング率の比較的低い相関（ROI-1）または緩やかな正の相関（ROI-2）を示した．この結果は，現状のμCT の分解能では不均一な骨微小構造を再現していないことや，骨石灰化度，骨結晶特性ならびにコラーゲン線維なども骨ヤング率に強く影響したことを反映したものと考えられる．本研究の結果から，CT 値のみに基づくヤング率の推定には限界があることが示唆された．

＜結論＞

CT 値を基にしたヤング率の予測は，比較的均一な皮質骨構造においては有効だが，不均一な骨構造のハバース系を有する骨構造では正確性の担保が難しい．これは，μCT 撮影が不均一な骨

微細構造を反映するほどの解像度ではないことと関係する．ヤング率をより正確に推定するためには，エックス線画像だけでなく，生物学的情報を同時に分析してモデル構築に役立てる必要性が示唆された．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5529　号 | 稲川　英明 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　小野　卓史<br>副　査　塙　隆夫　　田畑　純 | |
| 論 文 題 目 | Potential for estimation of Young's modulus based on computed tomography numbers in bone: A validation study using a nano-indentation test on murine maxilla | |

（論文審査の要旨）

インプラントの埋入部位や本数などを診断して補綴治療の計画を立案するためには，骨内部の応力や歪みを力学的に分析して術後の骨吸収やオッセオインテグレーションの損傷リスクを考慮することが有効である．この目的のためにCT画像をもと構築された顎骨の力学モデルでは部位ごとに異なるヤング率をモデル情報として入力する必要があるが，このヤング率をCT 値から推定する方法が広く用いられてきた．CT 値と実際に計測したヤング率との関係性は，これまで動物とヒトの各部の骨を対象として検討されてきたが，両者の関係式は研究ごとで異なり一貫性を欠いていた．本研究の目的は，マウス顎骨のヤング率をNI法で測定し，同一個体同一部位のCT値から得られたBMDと比較することにより，両者の関係を明らかにし，CT値からヤング率を推定するための変換式の妥当性を検討することである．

17週齢雄C57BL/6Jマウス（n=9）上顎骨を鼻から2-3mmで1-2mm厚さに前頭面と平行に切断し，アクリル板に固定・包埋した．試料をμCTで撮影後，表面を研磨し，研磨面の右側硬口蓋の歯間部皮質骨に2つの関心領域（ROI）を設定した．すなわち，ROI-1は口蓋正中の皮質骨，ROI-2はROI-1から約500μm外側の皮質骨とした．各マウスを屠殺から4時間後，各ROI内部の5か所をNI法で測定し，荷重-変位曲線除荷曲線をもとにヤング率を得た．NI後のROI領域をレーザー顕微鏡で，骨表面の圧痕を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した．次に，μCTのデータを基に3D画像を構築し，さらにNI測定と同一平面における各ボクセルのCT値を抽出した．NIの圧痕と同一個体同一部位のCT値を，ハイドロキシアパタイトのファントムにおけるCT値とBMDとの線形関係をもとにBMDに変換した．得られたヤング率（E）とBMD（$\rho$）との関係は，累乗関数 $E=\alpha\rho^{\beta}$ 回帰分析した．また，ROI-1の中をより詳細に比較するために，骨構造はハバース管周囲のハバース層板部分，介在層板を特徴とする表面，ならびにハバース層板と介在層板の混合的な表面として3つのサブグループに分類した．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

１．　CT値から得られたBMDは過去の研究の値よりも大きく，均一な骨面と不均一な骨面の間で有意差がなく，不均一な骨面の中でハバース管を囲む骨構造が異なる３つのサブグループ間でも有意差は認められなかった．

２．　NIから得られたヤング率は過去の研究の値よりわずかに大きく，平均のヤング率は不均一な骨面の方が均一な骨面よりも有意に小さく，不均一な骨面の中ではハバース層板の方が介

在層板よりも大きかった.

３． BMD とヤング率の間の関係は累乗回帰モデルを用いたところ，不均一な骨面は $E=16.748\rho^{0.662}$ ($R^2=0.256$, $p=0.163$)と μ CT が低分解能なため $R^2$は小さく，曲線のあてはまりは良くなく，均一な骨面は $E=17.486\rho^{1.596}$($R^2=0.661$, $p=0.013$)と $R^2$は比較的大きく，回帰モデル式は結果と比較的良くあてはまった.

以上の結果から SEM 像で示される骨の小孔は，CT 値にしたとき一つのボクセルとして平均化され， CT 値に反映されなかったと考えられた．また，骨小孔や骨層板は，不均一な骨面と比較的均一な骨面とのヤング率の差や，ヤング率計測精度に影響を及ぼしたと考えられる．これらに累乗回帰モデルにおける当てはまりは影響を受け，CT 値を基にしたヤング率の予測は，比較的均一な骨構造においては有効だが，不均一な骨構造では妥当性を確認できなかった．従って，CT 値からヤング率を正確に推定するためには，より解像度の高いμCT を用いることや，エックス線画像だけでなく生物学的情報を組み合わせてモデル構築の方法を再考することの必要性が示唆された.

CT 画像から得られる力学モデルにおいて，応力解析プログラムに入力する患者特有の骨ヤング率が予測できれば，これを用いた応力解析により，補綴治療後の骨の微小領域における予知性を評価する一助となる．以上の成果は今後の歯科医学の発展や歯科補綴臨床に寄与するところが大きく，よって，本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた.

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 武元　徹 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　春日井　昇平<br>副査　和泉　雄一　　山口　聡 |
| 論　文　題　目 | Combination of the RANKL-binding peptide W9 and bFGF induces bone regeneration in the rat calvarial defect model |

（論文の内容の要旨）

〈緒言〉

局所に骨再生をもたらすサイトカインには、bFGF（basic fibroblast growth factor）・BMP-2 (bone morphogenetic protein-2)・TGF (transforming growth factor) - β 等が過去に報告されている。1 種類のサイトカインを使用するよりも多種類を組み合わせて用いると骨形成が増強されるとの報告がある。近年、コスト削減、構造改変の容易さや副作用の低減を目的に開発されたペプチド製剤が、骨代謝改善薬候補として有用であることが報告されている。ペプチド製剤の 1 つである W9 ペプチド (W9)は破骨細胞分化促進因子である RANKL（receptor activator of NF- κ B ligand）に結合し骨吸収抑制作用を発揮するが知られているが、2013 年以降に骨芽細胞分化促進作用も発揮することが判明している。しかし、W9 単剤ではその効果は限定されており、*in vivo* では単剤による骨形成促進作用は認められない。また、間葉系幹細胞に対し増殖活性を持つサイトカインの 1 つである bFGF も近年骨形成促進薬として歯科領域で臨床応用されている。bFGF 単剤でも投与濃度や投与期間、さらには溶媒の種類、あるいは調整が必要であり、徐放させる担体の工夫など、骨形成を導くためには様々な条件設定が必要であることが知られている。

本研究では、増殖活性を持つ bFGF と骨芽細胞分化促進作用を持つ W9 とを併用することにより、骨形成促進作用が単剤よりも亢進するか否かを明らかにすることを目的として研究を行った。まず、2 薬剤の投与方法や投与時期を検討するため細胞培養実験を計画した。bFGF に W9 を併用することで、増殖能の亢進が認められるかを検討した。次に細胞分化能についても検討した。細胞分化の培養実験においては、予め bFGF と W9 の異時投与の効果についても検証を行ったが、同時投与する方が有効であったため同時投与で実験を行うこととした。最後に、ラット頭蓋骨欠損モデルを用いて bFGF と W9 の併用による、*in vivo* での骨形成作用を検討した。

〈材料と方法〉

実験は以下の 3 項目を検証すべく計画し、実行した。

1)bFGF 単独と比較した際の骨芽細胞分化促進作用における bFGF と W9 の併用効果。

2) bFGF 単独と比較した際の細胞増殖促進作用における bFGF と W9 の併用効果。

3) bFGF 単独と比較した際の in vivo での骨形成促進作用における bFGF と W9 の併用効果。

1)については、新生児マウス頭蓋骨由来骨芽細胞を使用し、6 日後に alkaline phosphatase (ALP) 染色、21 日後に von Kossa 染色し、各染色面積占有率の計測を行った。

2)については、マウス間葉系幹細胞（C3H10T1/2 cell）を使用し、48 時間後の増殖活性を評価するために、吸光度の測定を行った。

3)については、9 週齢オスの Wistar 系ラットの頭蓋骨に直径 5mm 大の臨界骨欠損モデルを作製した。予め欠損部の大きさに調整した bFGF 含有のシート状 gelatin hydrogel (GH)担体を置き、W9 とその control peptide（W9 のアミノ酸 1 つを変えることにより RANKL 結合能を下げたペプチド）含有の粒子状 GH を追加投与した。GH に浸透させた薬剤により、① GH 担体のみ、② bFGF（25μg）、③ W9 (0.56 mg)、④ bFGF（25μg）と W9 (0.56 mg)併用(bFGF/W9 群)、⑤ bFGF と control peptide (0.56 mg)併用(bFGF/Ctrp 群）の 5 群に分けた（n=4)。骨形成の経時的変化を確認するため、術後 15 日目にカルセイン、術後 20 日目にアリザリンによる蛍光色素投与を行った。欠損作製から術後 4 週間後に頭蓋骨を摘出し、骨欠損部の新生骨をＸ線学的解析、骨形態計測学的解析により評価を行った。

Ｘ線学的解析は、microfocal computed tomography (μCT) により頭蓋骨欠損部の不透過性を比較検討した。骨形態計測学的解析は、非脱灰凍結切片（5 μm）を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。また、骨形態計測法を用いて、あらかじめ投与しておいた蛍光色素であるカルセインとアリザリンの骨への取り込み部位から動的骨形成指標である mineralizing surface (MS)、mineral apposition rate (MAR)、 local bone formation activity (MS x MAR と定義)を算出し、骨形成活性の評価を行った。統計解析は、1-way analysis of variance (ANOVA)による分散分析を行った後、Fisher‘s PLSD post hoc テストにより各群間（3～7 群）の有意差を検討した。なお、本実験は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。（承認番号 0170324A）

〈結果〉

骨芽細胞分化の培養実験において、bFGF と W9 の投与時期を同時にする実験系を施行した。実験 6 日後の ALP 染色陽性部を計測したところ、bFGF 単独群と比較して W9 併用群が有意に染色面積の増加を認めた。しかし、実験 21 日後の von Kossa 染色陽性部を計測したところ、併用しても有意に染色面積の増加が認められなかった。間葉系幹細胞を使用した細胞増殖実験においては bFGF 単独群と比較して W9 併用群にて有意に細胞増殖を亢進する結果となった。

続いて、ラット頭蓋骨欠損モデルにて実験を行った。

μCT を用いた X 線学的分析の結果、①担体のみ投与した群と③W9 のみを投与した群において、頭蓋骨欠損部に X 線不透過像は認められなかった。②bFGF 群では、欠損部の辺縁から X 線不透過性の領域が認められた。④bFGF/W9 群において 5 群中で最大の X 線不透過像が認められた。全群と比較して有意に骨形成がされている結果が得られた。⑤bFGF/Ctrp 群は、② bFGF 単独よりも有意に骨形成面積の減少が認められた。さらに、欠損部に対する新生骨面積の割合について評価した所、μCT 像と同様の結果を得ることができた。

組織学的分析では、まず HE 染色により、④bFGF/W9 群において骨形成がなされているこ

とを確認した。さらに、蛍光ラベリングによる動的骨形成指標を計測した所、形成指標であるMS、MAR、local bone formation activity のいずれにおいても②bFGF 群に対して、④bFGF/W9 群で有意な増加が認められ、⑤bFGF/Ctrp 群で有意に骨形成面積の減少が認められた。以上より、骨形成の増強効果が bFGF と W9 併用により示された。

〈考察〉

今回、bFGF に骨芽細胞分化促進作用を有する W9 を併用した場合の骨形成への効果を検討するために、細胞培養実験並びにラット頭蓋骨臨界骨欠損モデルへの局所応用することにより評価を行った。

bFGF と W9 の投与時期については細胞培養実験において同時投与が最も効果的であることが示された。次に bFGF の骨芽細胞分化能が W9 を併用することによって亢進するか否かを同時投与により初期分化（6 日目）と後期分化(21 日目)において染色により評価を行った。石灰化面積を評価したところ、初期分化においては併用することで有意に石灰化面積が増加したが、後期分化においては石灰化面積増加は認められなかった。

また、W9 は新生児マウスの頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞に対して増殖を亢進させないことが知られている。一般的に細胞分化が促進する時期には細胞増殖は抑制されているため、W9 の増殖能の研究では分化促進作用が明らかである頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞を使わず、未分化な間葉系細胞を用いて実験を行った。本実験より W9 を併用することで bFGF の有する細胞増殖能を亢進させる結果が得られたことから、*in vivo* 実験でのペプチドと bFGF との組み合わせで骨形成が増した理由の一つは、間葉系幹細胞の増殖における 2 つの薬材の相乗効果が考えられた。しかし、用いた間葉系幹細胞株での RANKL の発現は検討しておらず、RANKL 結合ペプチドである W9 が増殖活性を増すメカニズム解明に向けて、さらなる検討が必要である。ラット頭蓋骨欠損モデルにおける骨形成実験においては担体として gelatin hydrogel(GH)を用いた。この GH は化学的な作用によって物質を保持させ、生分解によって保持されている物質の徐放が可能となる。bFGF 単独使用の過去の報告によると、ウサギの実験（GH 併用）においては欠損修復までに 12 週間を要し、4 週間のラット頭蓋骨欠損モデル実験（GH 以外の担体）においては、我々の結果以上に骨欠損修復を認めていない。この結果より、担体の選択も重要となってくる。今回、W9 を併用したところ他群と比較して有意に骨形成促進が認められた。過去の報告ではイヌ 3 壁性歯周組織欠損モデルにおいて、bFGF により BMP-2 シグナルの上昇を認め、bFGF と BMP-2 の作用を発現することで骨形成が促進されたという報告がある。また、W9 と BMP-2 を使用した実験においても W9 が骨形成促進を誘導することが報告されている。そのため、併用によって骨形成が増強された要因として、両者を併用することによる BMP-2 様のシグナルが活性化され、bFGF と W9 と BMP-2 の作用が発揮された可能性が考えられた。また、*in vitro* 実験と *in vivo* 実験より W9 の control peptide を bFGF 併用した場合、明らかに骨形成が少なくないことから、RANKL に依存した様式で骨芽細胞分化を促進していることも推察された。

本研究により、bFGF と W9 の薬剤を徐放させて用いることは骨形成に有効であることが示された。一方で、GH 担体の有用性も過去の論文から実証されており、投与割合や投与量の微

妙な変化で骨形成の抑制が生じる可能性もある。bFGF は MAPK pathway にて増殖を刺激し、W9 は mTORC1 活性が増殖に関わっていることが知られているが、bFGF の作用増強に W9 が如何に関わって作用していたかについての機序の解明には今後さらなる検討が必要であると思われた。

〈結論〉

本研究により、W9 と bFGF を併用することにより、細胞増殖ならびに初期骨芽細胞分化を促進するという結果が得られた。さらに、ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた *in vivo* 実験においても併用することで骨形成が促進されるという結果が得られた。以上より、両剤の併用は、顎顔面領域の骨再生に有効である可能性が示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5530　号 | 武元　徹 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　春日井　昇平<br>副　査　和泉　雄一　　山口　聡 | |
| 論 文 題 目 | Combination of the RANKL-binding peptide W9 and bFGF induces bone regeneration in the rat calvarial defect model | |

（論文審査の要旨）

局所の骨再生を行う場合、サイトカイン単剤を使用した実験が数多く報告されているが、骨欠損が大きい場合には多種類の薬剤を組み合わせにより骨再生が増強されるとの報告もある。成長因子の 1 つである bFGF ( basic fibroblast growth factor )は細胞増殖を亢進させるサイトカインとして知られ、歯科領域においては歯周病治療薬としても使用されており、骨形成促進作用が期待できる薬剤として上市された。一方、分子量 1,000～2,000 程度の中分子医薬であるペプチド製剤が標的への特異性の高さや、完全合成が可能なことによる作製コストの低減など低分子医療と抗体医薬の利点を併せ持つ薬剤として注目されている。TNF α の阻害作用を示す W9 は関節リウマチをターゲットして開発された薬剤であるが、RANKL にも結合することから骨吸収阻害薬としての働きも注目されている。近年、*in vitro* 実験による骨芽細胞分化促進作用や全身投与による *in vivo* 実験において W9 の骨形成作用が明らかとなっている。武元は骨芽細胞分化作用を有する W9 が単剤では局所の骨形成作用を安定的に発揮できないことから、増殖作用と分化促進作用を期待して bFGF と W9 の両者を併用することにより骨形成を促進させる発想に至った。

培養実験においては、新生児マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞を使用した分化実験、マウス間葉系幹細胞を使用した増殖実験にて解析した。この結果を基に 9 週齢の雄性 Wistar ラット頭蓋骨に欠損を作製し、担体としてゼラチンハイドロゲルに薬剤を含浸させて実験を行った。担体のみ、bFGF 単剤、W9 単剤、bFGF と W9 併用、そして bFGF と control peptide 併用の 5 群を設定した。実験 28 日後の骨形成につき、エックス線学的および組織形態計測学的に解析した。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

まず、 *in vitro* 実験の解析結果を示す。

1) bFGF にて細胞増殖させた状態で、骨芽細胞促進作用を有する W9 併用実験を添加しても、骨芽細胞分化作用は促進させなかった。

2) 同時併用した場合、bFGF 単独と比較して初期分化（6 日目の ALP 染色）を亢進させ、一方で後期分化（21 日目の von Kossa 染色）は促進させなかった。

3) 間葉系幹細胞を使用した細胞増殖実験では、W9 自体に増殖促進作用が発揮され、bFGF と併用することで bFGF 単独と比較しても、細胞増殖能を促進させた。

次に、*in vivo* 実験の解析結果を示す。
1) bFGF と W9 を同時併用することにより bFGF 単独と比較して、骨形成を促進させた。
2) 骨形態計測指標においても、bFGF と W9 の同時併用群は bFGF 単独群と比較して有意に骨石灰化面と骨石灰化速度を促進させた。
両実験に共通する結果として、
1) control peptide に bFGF 作用増強効果は見られなかった。

本研究結果は、bFGF と W9 との併用が、細胞増殖の亢進ならびに初期骨芽細胞分化の促進につがなるという新たな知見が得られたことは非常に興味深い。骨芽細胞の後期分化が促進されなかった理由は明らかにはできていないが、足場材料の工夫によりさらなる発展も期待できる。

さらに、ラット頭蓋骨欠損モデルを使用した実験においても、武元が設定した bFGF 単剤では局所の骨形成促進作用は認めらなかったが、W9 との併用により骨形成が促進するという新たな知見が見出されたことは薬理学的にも価値ある結果といえる。また、両者を併用することにより顎顔面領域の骨欠損や整形外科領域における骨再生への応用にも期待できると思われる。

よって本論文は、歯科医学の発展だけではなく、医学領域への発展にも寄与するところが大きく、博士（歯学）の学位申請を行うに当たり十分に価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 成瀬　由己 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　三浦　宏之<br>副 査　　高橋　英和　　鈴木　哲也 |
| 論　文　題　目 | Effect of alumina-blasting pressure on adhesion of CAD/CAM resin block to dentin |

＜緒言＞

近年、患者の審美的な歯科治療への欲求が高まり、メタルフリー修復の需要は増加傾向にある。CAD/CAM 技術の発展によって、コンピューター制御された機械加工を用いた歯科技工物の製造が可能となり、均一な材料品質、再現性の向上、および製造コストの削減が実現された。歯科における CAD/CAM 技術の応用は、歯科治療の効率化と質的向上を図るとともに、医療コストの低減にもつながると考えられる。これらの技術は導入初期においては、様々なセラミック材料のブロックが用いられたが、近年レジン系の材料が導入され、臨床応用されている。

CAD/CAM 用レジンブロックは革新的な新しい CAD/CAM 用ブロックであり、優れた審美的結果を簡単なステップで達成することを可能としている。また、製造するのに安価であり、最終技工物の作製も容易であることから、今後セラミック材料の代替品として期待されている。臨床においては、CAD/CAM 用レジンブロックにより作製されたインレーは、CAD/CAM 用セラミックブロックで作製されたインレーと３年予後で同等の性能を示すことが示唆されているが、弾性係数などの機械的性質においてはセラミック材料よりも劣ることが報告されている。

セラミックやレジンなどは、歯科用金属材料と比較してその機械的強度材料は劣るため、従来からの機械的維持力に依存した合着ではなく、接着性レジンセメントを用いて歯質に接着させることが推奨されている。強固に接着させることで、歯質と一体化させることが口腔内での長期に安定した予後のためには不可欠である。しかしながら、CAD/CAM 用レジンブロックは、工業的に高温、高圧下にて重合を行い、重合度を高めることで機械的性質を向上させているため、未重合の残留モノマーが少なく、レジンセメントとの接着が困難であるいう報告もある。また、近年の臨床調査においては、CAD/CAM 用レジンブロックを用いた修復物は他の修復材料と比較して高い割合での脱離が報告されているものの、その原因は未だ解明されていない。

CAD/CAM 用レジンブロックの接着前の表面処理については、アルミナ粒子を用いたサンドブラスト処理によって接着強さが有意に向上するとの報告が数多くあるが、ほとんどの研究は CAD/CAM 用レジンブロック同士を接着させて接着強さを測定している。CAD/CAM 用レジンブロックに対する接着前処理の評価ではあるものの、臨床に近似した象牙質に対する接着性能を評価した報告は少ない。そこで本研究の目的は、２種類の異なるレジンセメントシステムならびに異なる圧力での修復物サンドブラスト処理を用い、

CAD/CAM 用レジンブロックと象牙質の接着に対するサンドブラスト圧の影響を評価することとした。

【材料および方法】

CAD/CAM 用レジンブロック（Lava Ultimate、3M ESPE）を厚さ 2 mm になるように切り出した。被着面を耐水研磨紙（#600）にて研削した後、サンドブラスト処理を行わない群、0.1 MPa でサンドブラスト処理を行った群、0.2 MPa でサンドブラスト処理を行った群の 3 群に分けた。サンドブラストは平均粒径 50 μm のアルミナ粉末を用いて、10 mm の距離から 10 秒間実施した。エタノール中にて超音波洗浄を 3 分間実施したのち、被着面に 40%リン酸ゲル（K エッチャント GEL、クラレノリタケデンタル）を塗布、水洗した。各気圧でのサンドブラスト処理後のレジンブロック表面について、走査電子顕微鏡（JSM-5310LV、日本電子）を用いて形態学的観察を行った。またレーザ顕微鏡（VK-X150, キーエンス）を用いて各群のレジンブロックの表面粗さ解析を行った。

牛歯頬側歯冠部をモデルトリマーにて象牙質を露出させた後、耐水研磨紙（#600）にて研削を行い被着体とした。各群の表面処理を施した CAD/CAM 用レジンブロックと牛歯被着体とをレジンセメントにて接着させた。その際 CAD/CAM 用レジンブロック表面をスコッチボンドユニバーサル（3M ESPE）にてシラン処理を行い、レジンセメントとして Rely X Ultimate（3M ESPE） を用いる群（RXB 群）とスコッチボンドユニバーサルにてシラン処理を行い、Rely X Unicem2（3M ESPE）を用いる群（U2B 群）、セラミックプライマー（3M ESPE）にてシラン処理を行いレジンセメントとして Rely X Unicem2 を用いる群（U2C 群）の３群に分けた。光照射はハロゲン光照射器（Optilux501、600 mW/cm$^2$、Kerr）にて CAD/CAM ブロック側より 60 秒間実施した。試料は 24 時間 37 ℃水中保管を行った後、低速切断機（Isomet、Buehler）にて 1 mm×1 mm のビーム状試片を切り出し、小型卓上試験機（EZ Test、島津製作所）にてクロスヘッドスピード 1 mm/min にて微小引張り接着試験を行った。また、得られた結果については、bonferroni の調整を行った？t-test を用いて危険率 5 %にて検定を行った。引張接着試験後の破断面形態については走査電子顕微鏡（JSM-5310LV、日本電子）を用いて観察を行った。

【結果】

サンドブラスト前後の CAD/CAM 用レジンブロックの表面性状の観察においては、未処理群では、耐水研磨紙の研削痕が多数観察された。0.1 MPa 群と 0.2 MPa 群においては、形成された凹凸は観察されるものの、両群間に形態学的な差は認められなかった。レーザー顕微鏡を用いた表面粗さについては、サンドブラストの圧力が増加するにつれて表面粗さも増加する傾向が認められた。

微小引張り接着強さについては、サンドブラストの圧力にかかわらず RXB 群が最も高い引張り接着強さを示し、続いて U2C 群および U2B 群となった。未処理群では RXB 群と U2C 群との間に有意差は認めないが、それ以外の各群間に有意差がみられた。RXB 群では未処理群が 0.1 MPa と 0.2 MPa と比較して有意に低い引張り接着強さを示した。使用したレジンセメントに関わらず、サンドブラストの圧力が増加するにしたがって引張り接着強さが高くなる傾向が認められた。

破壊形態の観察では U2B 群および U2C 群では、サンドブラストの圧力に関係なく、主としてセメントと象牙質との間での界面破壊が観察された。サンドブラストの圧力が増加するにつれて、レジンブロック

とセメント間の界面破壊が減少した。RXB 群では、レジンブロックとセメント間の界面破壊が未処理群において高い割合で観察されたものの、サンドブラスト圧が増加するにつれて界面破壊は減少し、象牙質の凝集破壊は増加する傾向が認められた。

【考察】

CAD/CAM 用レジンブロック表面には未重合モノマーが少なく、レジンセメントとの安定した接着を達成させるのに不十分であることが報告されている。接着強さを向上させるにはサンドブラストなどの機械的処理、シラン処理などの化学的な処理が有効であることが報告されている。しかしながらサンドブラストによってレジンブロック表面に微小な亀裂が発生し、長期接着性能を低下させるとの報告も見られる。本研究の微小引張り接着試験の結果では、レジンブロックへのサンドブラスト圧が増加するに従って、引張り接着強さが向上する傾向が認められた。また破断面形態の観察の結果においても、サンドブラスト圧が増加するにしたがってレジンブロックとセメント間の界面破壊の割合は減少し、0.2 MPa において消失した。これらの結果から 0.2 MPa でのサンドブラストで CAD/CAM 用レジンブロックとレジンセメントとの機械的嵌合が得るのに十分な条件であることが示唆された。

シラン処理剤として本研究ではスコッチボンドユニバーサルもしくはセラミックプライマーを用いた。微小引張り接着試験と破断面形態の観察の結果、untreated において全てのレジンセメントにおいて安定した接着性能が得られないことからも、シラン処理のみではレジンブロックーセメント間において安定した接着が獲得できないことが示唆された。また、U2C 群と比較して U2B 群は有意に低い引張り接着強さを示しており、スコッチボンドユニバーサルによる表面処理では、ブロック表面のシラン処理が不十分である可能性が示唆された。シランカップリング剤は水分の存在下で加水分解反応が起こり、その後の縮合反応によってシリカ表面と化学反応することが知られている。スコッチボンドユニバーサル中の水分によってすでに塗布前に加水分解が起こり、塗布時には反応性のシラン処理剤が減少している可能性が示唆された。

Rely X Unicem2 を用いた群ではサンドブラストの有無に関わらず引張り接着強さが RXB 群と比較して有意に低く、セメントと象牙質間の界面破壊ならびにセメントの凝集破壊が主に観察された。セルフアドヒーシブセメントである Rely X Unicem は、象牙質への接着性能が不十分である可能性が示唆された。

臨床においては、サンドブラストを行わずに修復物を接着させた場合、レジンブロックーセメント界面に十分な接着が得られず、脱離や破折などの可能性が高まることが示唆された。また、サンドブラストを十分に実施したとしても、セルフアドヒーシブセメントを用いた場合は、セメントー象牙質界面に十分な接着が得られない可能性が示唆された。CAD/CAM 用レジンブロックを象牙質に接着させるためには、0.2 MPa のアルミナサンドブラスト処理を実施し、プライマー併用タイプのレジンセメントを用いることが推奨される。

【結論】

口腔内で機能するのに十分な接着を獲得するためには、CAD/CAM 用レジンブロック被着面に対して適切な圧力でのサンドブラスト処理を行うことが必要である。歯質側においても安定した接着性能を発揮させるために、歯面処理用のプライマーを用いるレジンセメントシステムの使用が推奨される。

# 論文審査の要旨および担当者

| | | |
|---|---|---|
| 報 告 番 号 | 甲 第　5531　号 | 成瀬　由己 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　三浦　宏之<br>副 査　　高橋　英和　　鈴木　哲也 | |
| 論 文 題 目 | Effect of alumina-blasting pressure on adhesion of CAD/CAM resin block to dentin | |

（論文審査の要旨）

近年セラミックやレジンなどによる臼歯修復の機会が増えている。セラミックやレジンなど比較的機械的強度の高くない材料は、支台歯と接着性レジンセメントにより強固に接着させ、一体化させることが口腔内での長期に安定した予後のためには欠かすことができない。

CAD/CAM 用レジンブロックは、工業的に高温、高圧下にて重合を行い、重合度を高めることで機械的性質を向上させているが、その一方で未重合の残留モノマーが少なく、レジンセメントと接着は困難である。臨床調査においては、CAD/CAM 用レジンブロックを用いた修復物は他の修復材料と比較して高い割合での脱離が報告されているものの、その詳細な機序は未だ解明されていない。

このような背景のもと申請者は、２種類の異なるシステムのレジンセメントを用い、サンドブラスト処理の圧力が CAD/CAM 用レジンブロックと象牙質との接着に及ぼす影響を評価した。本研究で使用したレジンセメントと CAD/CAM 用レジンブロックには、臨床において修復物の脱離症例が多く報告されているものも含まれており、臨床的な問題解決を志向した適切な選択といえる。

補綴物はセメントと修復物との界面、およびセメントと象牙質との界面で脱離を起こす可能性があり、CAD/CAM 用レジンブロックと象牙質とを接着させた複合的な試片により引張り接着試験を行ったことは、臨床に即した CAD/CAM レジンクラウンの装着法の検討として評価できる。さらに、サンドブラスト処理後の CAM/CAM 用レジンブロック表面の形態観察および表面粗さの解析も行っており、専門的な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。

本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1.　SEM を用いたレジンブロックの表面性状の観察では未処理群とサンドブラスト処理を行ったものの形態学的な差が認められたが、0.1 MPa, 0.2 MPa の各群間に明瞭な差は認められなかった。

2.　レーザー顕微鏡観察では、無処理群、0.1 MPa、0.2 MPa すべての群間で表面性状の差が認められた。表面粗さの計測では、サンドブラストの圧力が上昇するにつれて表面粗さも上昇する傾向が認められ、すべての群間に有意差を認めた。

3.　微小引張り接着試験では、サンドブラストの圧力にかかわらず接着性レジンを併用するセメントを用いた群が最も高い値を示した。接着操作をしないセルフアドヒーシブレジンでは接着強さは総じて低く、象

牙質とセメントの界面での破壊が生じていた。接着操作を含むセメントでは無処理群ではレジンブロックとセメントの界面での破壊が多くみられ、サンドブラスト処理によりこの界面破壊は減少し、圧力が 0.2 MPa の群ではこの界面破壊は観察されなかった。

以上の結果から、臨床的に十分な接着を獲得するには、CAD/CAM 用レジンブロック表面の前処理として適切な圧力でのサンドブラスト処理を行うこと、および象牙質に対しても歯面処理用のプライマーを用いるレジンセメントシステムの使用の必要性があると結論している。

以上のように本研究は、サンドブラスト処理の圧力が CAD/CAM 用レジンブロックの象牙質接着性能に与える影響の評価について、レジンブロック、象牙質という被着体を複合的に用いた臨床的な接着試験モデルとして新たな評価法を行い、現在の臨床において未解決である、CAD/CAM レジン冠の高い確率での脱離という現象について、その機序の一端を明らかにしたものである。これらの成果は、CAD/CAM レジン冠の装着における臨床手技の向上に極めて有益であり、今後の歯科保存学、歯科材料学ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分に価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | GANBOLD Khongorzul |
| 論文審査担当者 | 主　査　　興地　隆史<br>副　査　　三浦　宏之、大槻　昌幸 |
| 論　文　題　目 | Human pulpal blood flow in different root formation stages measured with transmitted-light plethysmography |

＜要旨＞

**Introduction:**

Transmitted-light plethysmography (TLP) is a non-invasive and objective optical method that utilizes a single light-emitting diode (LED) to detect blood volume changes in the dental pulp. It has been reported that the TLP signal is less likely to be contaminated by the blood circulation of surrounding tissues than laser Doppler flowmetry (LDF). The TLP amplitude has a significant negative correlation with age in children. Our previous studies using an extracted tooth model have clarified that dentin thickness, pulp chamber size, LED wavelength, and blood concentration are substantial factors affecting the transmission of light through the teeth, and that changes in both the TLP amplitude and optical density (OD) are indicators of pulpal circulation. The clinical application of TLP to traumatized teeth has shown that the TLP amplitude changes during the follow-up period, depending on the prognosis of the trauma. There have been several studies on age-dependent changes in the pulpal blood supply using various non-invasive methods. However, throughout the root formation period, the pulpal chamber size varies in children of the same age. To our knowledge, there are no clinical studies regarding pulpal blood supply changes in different root formation stages. Furthermore, the effects of growth and development process on TLP have not been clarified yet.

Thus, the aims of the present study were (1) to investigate pulpal blood flow with TLP and the optical characteristics in different root formation stages in healthy permanent maxillary central incisors and (2) to assess the influences of body growth of children and cervical tooth color on the TLP amplitude.

**Materials and Methods:**

This cross-sectional study was approved by the Ethics Committee of the Graduate School of Tokyo Medical and Dental University (No. 914). The subjects were 31 children aged 6-17 years who visited the pediatric dental clinic and 10 adult volunteers aged 25-36 years. Intraoral radiographs of the subjects' teeth were taken to evaluate the root formation stages. The teeth were divided into four groups (G1-G4) according to their developmental stages.

Group 1. Half to three-quarters developed roots with a wide-open apex.

Group 2. Root completed in length with open apex.

Group 3. Completed root development, with half-closed apex.

Group 4. Adult mature teeth with fully closed apex.

A TLP system with a 525-nm green LED (prototype system, J. Morita Corp., Kyoto, Japan) was used to measure the pulpal blood flow of the maxillary central incisors. Prior to measurement, an individual acrylic

resin cap was made for each tooth to hold an LED on the palatal side and a photo detector on the labial side. Each measurement lasted 90 seconds, while the subjects were in the supine position, and finger plethysmogram was recorded simultaneously to obtain the heartbeat signals. The average amplitude of 30 waves was measured using a signal processing software program (LabChart, AD Instruments Pty., Ltd., Australia).

For the OD measurement, a mini-spectrometer (model C10082CA, Spec Evaluation software; Hamamatsu Photonics K.K, Hamamatsu, Japan) was used to detect the incident ($I_0$) and transmitted light ($I_t$) intensities to derive OD value (OD=ln ($I_0/I_t$)).

A Crystaleye Spectrophotometer® (Olympus Corp., Tokyo, Japan) was used to record the color of the cervical area on the labial surface. The CIELAB color scale was applied to obtain L*a*b* parameter values.

A Sybron Endo vitality scanner ™ (model 2006; Sybron Endo Dental Specialties, Glendora, CA, USA) was used for electric pulp vitality testing. EPT values from 0 to 80 were recorded when each subject could perceive any sensation.

The body weight and height of the children were measured on the same day with optical measurements.

The comparisons of the TLP amplitude, OD values, EPT values, and tooth color indicators (L*, a*, and b*) between Groups 1 to 4 were analyzed using a one-way ANOVA and the Bonferroni method. The Pearson correlation coefficient was calculated between tooth color, weight, height, and TLP amplitudes. P values less than 0.005 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the SPSS software program, version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

**Results:**

During the TLP measurements, the tooth and finger plethysmogram showed synchronized rhythmic activities. The TLP amplitude increased as the root development stage progressed from Group 1 to 3, and Group 3 had the highest amplitude at 0.102% ± 0.056%. Once the root matured, the TLP amplitude showed a statistically significant decrease, with Group 4 showing the lowest value at 0.043% ± 0.027%.

OD values showed a similar pattern to TLP amplitude. During the root formation periods, the OD increased significantly, with the lowest value (5.7 ± 0.7) in Group 1, and the highest value (7.1 ± 0.7) in Group 3 ($p<0.005$). The OD of Group 4 tended to be lower than that of Group 3, albeit not to a significant degree.

EPT tests showed that the scores decreased as the root development periods progressed. Group 1 had the highest value (50.3 ± 15.9) and Group 4 the lowest value (21.3 ± 5.9). There was a statistically significant difference between the groups ($p<0.005$).

The results of tooth color measurement showed an increase in the values of L* and b* with tooth maturation. The L* and b* values in Group 4 were significantly higher than those in Group 1 ($p<0.005$). In contrast, the value of a* decreased significantly with the progress of tooth development. Although the L*, A*, and B* values varied during the root formation stages, there was no significant different correlation with the TLP amplitudes.

There was a statistically significant correlation between the TLP amplitude and body weights and heights of children (n=59), with Pearson's correlation coefficient of 0.37 (p=0.004) and 0.45 (p=0.0004),

respectively.

**Discussion:**

In this study, we first investigated the pulpal blood volume change and factors possibly affecting tooth plethysmography in different stages of root development in young permanent teeth.

*TLP amplitude*

Each root formation stage had a distinct TLP amplitude which increased as tooth development progressed, and decreased after complete maturation. Since the TLP amplitude is influenced by multiple factors, we assume that the changes among the stages in children could be induced by two aspects: local pulpal factors and general body factors.

Regarding local pulpal factors, the neuronal regulation is one of the ways of maintaining homeostasis in the pulpal circulation. Sympathetic nerve terminals were found to be in close association with smooth muscles in the walls of arterioles, but not all vessels have these nerve terminals. In addition, newly erupted teeth have fewer nerve endings than older teeth. Therefore, we speculate that immature neuronal regulation of arteriolar vasoconstriction might be insufficient, and so the pulpal blood volume change was not significant enough to induce higher TLP amplitudes. Group 4 with adult teeth had the lowest TLP amplitude. The decreasing number of pulpal blood vessels and age-related cardiovascular transitions might explain this finding.

Regarding general body factors, the TLP pulsation may be associated with cardiovascular systemic changes in children. Studies using photoplethysmography have shown an increase in the brachioradial pulse wave velocity and peripheral pulse transition timing with age and body growth in healthy children. As for the dental pulp, although the surrounding hard tissue makes it difficult to perform measurements, the present study showed that the pulsatile blood volume changes could be measured, and TLP amplitudes increased with growth in children. We speculate that changes occurring in the pulpal circulation may be related to body growth spurts, especially in children/adolescents in Group 3.

*OD*

According to the present results, the OD of the teeth increased with root formation. On radiographs, the hard tissue became thicker and pulp chamber size narrower with tooth maturation. Group 1 teeth with thinner dentin and a larger pulp chamber had the lowest OD, while Group 3 teeth with thicker dentin and a narrower pulp chamber had the highest OD. Based on these findings, varying pulpal blood volume changes are represented by the TLP amplitude, whereas the OD of the whole tooth indicates the absolute optical property, reflecting tooth maturation, aging, and pathological conditions such as pulp canal obliteration and calcification.

*Tooth color*

The results showed no significant correlation between the TLP amplitude and tooth color parameters, implying that tooth color is not a dominant factor affecting the TLP amplitude. However, the tooth color L*a*b* parameter values changed throughout the root formation process. As the part of the findings were not

consist with other reports, which investigated subjects older than those of present study, the color shift associated with healthy tooth maturation remains to be evaluated.

*EPT*

EPT measurement demonstrated that sensitivity to electrical stimulation increased with age and root development. Most Group 1 teeth demonstrated no or low sensitivity to EPT, but we were able to record TLP pulse waves. In this regard, since both EPT and TLP complement each other, a comprehensive diagnosis with more than one pulp vitality test may offer better outcomes.

This was the first attempt to record pulp blood flow changes in different root formation stages utilizing tooth plethsymography. In the clinical practice of pediatric dentistry, we often encounter cases requiring a credible diagnosis of the pulp vitality of traumatized young permanent teeth. Although these teeth often do not respond to pulp sensitivity tests, the use of TLP allowed us to diagnose teeth with a relatively high nerve stimulation threshold. We suspect that changes in the TLP amplitude may be caused by not only the healing process of the pulp but also other factors, such as root development, body growth, and tooth color. Ther present study clearly demonstrated dynamic changes in the pulp blood flow during different root formation stages and may be used as reference data for a diagnosis in young permanent teeth under pathological conditions.

**Conclusion:**

The TLP amplitude and OD may indicate the changes in vascular dynamics in the pulp and hard tissue maturation during the root formation stages. Growth and development of the body positively correlate with the TLP amplitude in children. TLP can be a useful diagnostic tool for detecting the pulp vitality of immature permanent teeth, even in traumatized conditions.

<和文要旨＞

外傷歯の歯髄診断を行う際、電気歯髄診や温度診など歯髄神経の感覚を利用した診断法が用いられる。しかし、歯髄神経の未熟な幼若永久歯や外傷歯では、電気刺激に対して応答しない場合もある。透過型光電脈波法（Transmitted-light plethysmography : TLP）は非侵襲的で客観的な歯髄診断法であり、525 nm の LED（Light emitting diode）透過光による歯髄脈波(TLP)測定により、歯髄血流の有無を診査することができる。過去の研究では、外傷歯の TLP 振幅が予後によって次第に変化することが明らかになった。本研究では、外傷後の TLP から歯の健全度についてのより正確な情報を得るため、健全な根未完成歯の歯根発育過程が TLP へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。被験歯は 31 名の小児患者と 10 名の成人被験者の健全な上顎中切歯（n=78）で、被験歯を歯根形成度により 4 群に分類し、各 Group 間の TLP 振幅、透過光減衰度（Optical Density : OD）、電気歯髄診（EPT）の比較を行った。さらに歯の色や全身の発達と TLP 振幅の関係を調べた。その結果、TLP 振幅と OD は歯根形成と共に増加し Group 3（14.2±2.3 歳）で最大となり、Group 4（30.4±3.6 歳）で減少した。TLP 振幅は身長、体重と有意な相関があったが、歯の色との相関は

なかった。本研究より、TLP と OD は小児の成長発育と共に変化し、歯髄や硬組織の成熟度を反映することが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5532　号 | GANBOLD Khongorzul |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　興地　隆史<br>副　査　　三浦　宏之、大槻　昌幸 | |
| 論 文 題 目 | Human pulpal blood flow in different root formation stages measured with transmitted-light plethysmography | |

（論文審査の要旨）

成長発育途中にある幼若永久歯の歯髄診断を正しく行い歯髄保存に努めることは、歯の予後を良好に保つ上で非常に有益である。従来から用いられている歯髄診断法として、歯髄神経の応答を見る電気歯髄診や温度診があるが、小児患者では診査の際に客観性を欠くことも多い。また、幼若永久歯では歯髄神経が応答しない場合もあることが報告されている。

透過型光電脈波法 (transmitted-light plethysmography; TLP)は、心拍に同期して起こる歯髄血流量変化を光強度の変化である歯髄脈波として検出し、血流の有無より歯の生活反応を非侵襲的、客観的に診断する手法である。Laser Doppler 法と比較して歯周組織からの脈波混入が少ないことが報告されている。申請者の研究グループでは、TLP の臨床応用を進める中で、抜去歯による光学測定より、歯髄脈波振幅や透過光減衰度 (Optical Density; OD)が被験歯の象牙質の厚み、歯髄腔の大きさ、LED 光源波長、歯髄血液濃度に影響を受ける可能性があることを報告した。また、ヒト外傷歯の歯髄脈波を経時的に測定し、歯髄脈波振幅が外傷歯の予後によって次第に変化することを報告した。しかし、小児患者の歯根の発育に伴う歯の解剖学的変化、歯髄の循環系の変化が歯髄脈波へどのように関与しているかは明らかになっていなかった。

以上の背景にもとづき、GANBOLD Khongorzul は、外傷後の歯髄脈波から歯の健全度についてのより正確な情報を得るため、根未完成歯の歯根発育過程が歯髄脈波へ及ぼす影響を明らかにすることを研究の目的とし、小児と成人の健全歯を対象に歯根形成段階に伴う歯髄脈波振幅と OD の変化について調べた。また、外傷を受けた歯では歯の変色が見られるため、歯の色と歯髄脈波の関係についても分析を行った。さらに、被験者の全身の成長発育と歯髄脈波との関係についても分析を行った。これまで、歯根や全身の発育段階と歯髄脈波との関連を報告は少なく、幼若永久歯の歯髄診断の精度の向上を図る上で、その着眼点は極めて高く評価できる。

被験者は、健全な上顎中切歯を有する 6～17 歳の若年被験者 31 名、および 25～36 歳の成人被験者 10 名とし、被験歯(n=78)を歯根形成度に応じて 4 つの Group に分類した。

Group 1. 歯根長は 1/2~1/3 完成　根尖は開大（n=16、平均年齢：7.7±1.0）

Group 2. 歯根長は完成　根尖は開大している（n=25、平均年齢：10.6±1.9）

Group 3. 歯根長は完成　根尖は閉鎖しつつある（n=18、平均年齢：14.2±2.3）

Group 4. 成人の歯根完成歯（n=19、平均年齢：30.4±3.6）

TLP の歯髄脈波測定には試作機（J. Morita Corp., Kyoto, Japan） を使用した。光源である 525 nm の LED を口蓋側から照射し、透過光は唇側の受光素子により受光した。歯と LED、受光素子を固定するため、個々の歯に適合したレジンキャップを即時重合レジンにより作製した。心拍の参照信号として、歯髄脈波測定と同時に指尖脈波測定を行った。TLP の測定は仰臥位で約 90 秒間行い、歯髄脈波の平均加算(n=30)を行い、波形解析ソフト LabChart により振幅を求めた。また、OD を算出するため、分光器を使用して入射光強度($I_0$)及び透過光強度($I_t$)を測定し、OD = ln ($I_0/I_t$)により求めた。

歯の測色には歯科用測色装置（Crystaleye）を使用し、被験歯唇側面の透過光を測定する位置において CIELAB 表色系の L*値、a*値、b*値の測定を行った。また、電気歯髄診断器（Sybron Endo Vitality Scanner）を用いて歯髄電気診（EPT）を行い、0~80 の相対値を記録した。全身の成長発育の指標として、歯の光学測定と同日に被験者の身長と体重を測定した。

各歯根形成段階における TLP の歯髄脈波振幅、OD 値、EPT 値、歯の色（L*値、a*値、b*値）について Group 間の比較を行い、一元配置分散分析および Bonferroni 法によって統計解析を行った。歯の色、身長、体重と歯髄脈波振幅の相関関係についても解析を行った。

以上の解析では、研究目的の遂行に必要な手法が適切に遂行されるとともに、得られた結果に対する統計解析も適切に行われており、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことがうかがわれる。

本研究で得られた結果は以下の通りであった。

1） 歯髄脈波振幅は Group 1～3 において増加傾向にあり、Group 3 で最大（0.102 ± 0.056%）となったが、歯根が成熟する Group 4 では有意に減少した。
2） OD は Group 1 で最小(5.7 ± 0.7)となり、歯根の形成とともに有意に増加し Group 3 で最大(7.1 ± 0.7)となったが、Group 4 ではやや減少した。
3） EPT 値は、歯根形成段階が進むにつれて有意に小さくなった。
4） 歯の色は、L*および b*においては歯根の成長とともに増加したが、a*においては有意に減少した。L*値、a*値、b*値と歯髄脈波振幅の間には有意な相関は認められなかった。
5） 若年被験者（Group 1-3）において、歯髄脈波振幅と身長、体重の間には有意な相関が認められた。

本研究結果より、GANBOLD Khongorzul は歯髄脈波振幅と OD が歯髄の血流動態や歯質の成熟を反映すると考察している。また、小児の全身の成長発育が、歯髄の血流動態へ間接的に関与している可能性も考察している。これらは得られた実験結果を適切に解釈し、理論的に展開したものであり、申請者の本領域における十分な知識を裏付けるものである。

これまでの研究においては、TLP や LDF を使用して被験者の年齢変化と血流動態の関係について調べた報告はあるものの、健全な幼若永久歯の歯根形成と歯の光学特性（TLP 歯髄脈波振幅、OD）の関係を調べた報告はない。本研究は、健全歯を対象に歯根形成度と歯髄の血流動態との関係を調べたという点で新規性があり、幼若永久歯の歯髄の循環系の成長メカニズム解明の手掛かりとなり得る。また、今後 TLP 法により歯髄の血流動態という観点から外傷歯の病態を診査し、歯の健全度を予測する上で参照できる結果が得られており、その成果は高く評価できる。本研究結果は今後の小児歯科学、外傷歯学の発展に大いに寄与するものと考えられ、博士（歯学）の学位を請求するのに十分値するものと認められる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 金口　明美 |
| 論文審査担当者 | 主査　柴田　俊一<br>副査　森山　啓司　　西山　暁 |
| 論　文　題　目 | Low-intensity pulsed ultrasound stimulation for mandibular condyle osteoarthritis lesions in rats |

**<Introduction>**

Temporomandibular joint osteoarthritis (TMJ-OA) is an important subtype of temporomandibular disorders (TMD), and the most common signs and symptoms of TMJ-OA are masticatory myalgia, headache, crepitation, and limited mandibular movement. TMJ-OA is also characterized by the death of chondrocytes, synovitis, changes in the structure and composition of the extracellular matrix, cartilage degradation, and subchondral bone resorption.

The treatments currently available for OA are limited, and the most conservative treatments for early OA include physical therapy, regular exercise, weight loss, and pharmacologic treatment, such as with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and intra-articular injection of hyaluronic acid. Treatments for advanced OA usually require surgical intervention, such as osteotomy or joint prosthesis, to relieve pain and improve joint function. Presently, there are no pharmacological agents that can prevent OA, and current therapeutic strategies are aimed at reducing pain and improving joint function to improve quality of life.

Recently, low-intensity pulsed ultrasound stimulation (LIPUS) has been used as a physical therapy tool. Some studies have shown that LIPUS applied to the healthy TMJ can cause histological changes, including chondrogenic and osteogenic processes, which enhance the condyle and mandible in growing animals. However, the effect of LIPUS on adult condyle with OA lesions remodeling has not yet to be investigated. Thus, in the present study, we aimed to determine if LIPUS could stimulate bone formation in the mandibular condyle in an adult rat OA model.

In this study, we used a lower dose of MIA (0.01 mg) in the TMJ to produce TMJ-OA in adult rats. In association with a reduction in the dose of MIA, the organism load of the rats was decreased to control the weight of all groups. To demonstrate the restorative effect of LIPUS on the condylar bone, the bone microstructure was evaluated with three-dimensional imaging.

**<Materials and methods>**

Animal model: To induce OA symptoms and signs similar to those in humans, a low dose (0.01 mg) of MIA (Sigma, Saint Louis, USA) was used to make the TMJ-OA animal model. The MIA was dissolved in 50 μL of contrast media and injected with the lateral puncture technique into the upper

compartment of the TMJs, using a 27-gauge 0.5-inch needle while the rats were under anesthesia by isoflurane inhalation without surgical assistance. Another technical elaboration in this study was to use contrast media instead of saline to confirm that the joint cavity was filled into the upper compartment of the TMJ, using *in vivo* micro-computed tomography (micro-CT) after injection.

LIPUS application: LIPUS was applied with an average spatial intensity of 30 mW/cm2, frequency of 3.0 MHz, and a duty cycle of 20% with gel as a conductive medium on the shaven skin for 15 min/day for 4 weeks without anesthesia.

Time schedule: Twenty-four 12-week-old male Wistar rats (Sankyo Lab Service Corporation, Inc., Tokyo, Japan), age at which rats are considered adults were divided into the control (n=6), LIPUS (n=6), MIA (n=6), and MIA+LIPUS (n=6) groups. Rats in the control group were injected with 50 μL of contrast media in the upper compartment of both TMJs when they were 12 weeks old and observed until they were 20 weeks old. Rats in the LIPUS group were injected with contrast media at 12 weeks of age, using the same procedure as for the control group, and then LIPUS treatment was applied from 16 to 20 weeks of age; the ultrasound exposure was as described above. Rats in the MIA group were developed into a TMJ-OA model at 12 weeks of age as described above and observed until they were 20 weeks old. Rats in the MIA+LIPUS group underwent the same procedures for inducing TMJ-OA as the MIA group did at 12 weeks of age and LIPUS was applied from 16 to 20 weeks of age. After injection of contrast media or MIA with contrast media at 12 weeks of age, three-dimensional images of the TMJs in all groups were obtained with *in vivo* micro-CT. Condylar BMD, bone mineral content (BMC), and bone volume (BV) were evaluated weekly with *in vivo* micro-CT.

For the injection procedure, all rats were anesthetised with isoflurane combined with oxygen. For LIPUS application, we avoided the daily application of anaesthesia so that the animals would not experience secondary effects of anaesthesia. At 20 weeks of age, the animals were euthanized through inhalation of $CO_2$ followed by decapitation. To understand the effects of MIA and LIPUS treatment on the TMJ, the sagittal sections of the cartilage of the condyles were stained with haematoxylin and eosin (HE) to detect the condylar cartilage thickness and chondrocyte number. The thickness was measured at three regions the anterior, middle and posterior condylar cartilage and then averaged. The number of chondrocytes was counted in a 300×200mm area of the posterior of the cartilage of the condyles, as the posterior area of condyle had the most changes on the micro-CT 3D images.

Histological and immunohistochemical statistical analyses were compared using a nonparametric one-way ANOVA with post hoc tests, and the data from micro-CT analysis were first analysed with a repeated-measures multivariate two-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc tests. $p<0.05$ was considered to be statistically significant. Results were expressed as the mean ± standard deviation.

**<Results>**

Histological changes in TMJ: In the control and LIPUS group condyle, HE staining showed that the chondrocytes were evenly arrayed, well organized and the shape of chondrocytes were changed. MIA group showed a severe loss of staining and decreased chondrocytes in comparison to control group. In

MIA+LIPUS group showed staining was slightly lost; chondrocytes were disarranged; and the number of the chondrocytes was reduced compared to the control group, however, in comparison to MIA group, it showed the chondrocytes were increased with more continuity. In quantitative analysis of MMP- 13, immunopositive cells were found in the proliferative and mature cell layers in the four groups. There were no significant differences (9.72 ±1.2 vs 9.22±1.22) (p=0.62) in the ratio of immunopositive cells between the control and LIPUS groups. However, the number of immunopositive cells in the MIA group was higher than that in any of the studied groups. The MIA+LIPUS group showed significantly (p=0.036) fewer immunopositive cells compared to that in the MIA group (26.96±3.3 vs 36.92± 2.75) but higher (26.96 ±3.3 vs 9.72±1.2 vs 9.22±1.22) (p=0.002) than that in the control and LIPUS groups.

Micro-CT analysis of 12, 16, and 20-week-old animals: At age 20 weeks, the mono-iodoacetate + low-intensity pulsed ultrasound group showed significantly ($p<0.05$) higher values of bone mineral density (465.6±1.9 vs 444.3±2.5), bone mineral content (1.23±0.01 vs 1.07±0.01), and bone volume ($0.002\pm3\times10^{-4}$ vs $0.0007\pm1\times10^{-4}$), than the mono-iodoacetate group alone.

**<Discussion>**

All groups TMJ were examined at 20 weeks of age by HE staining study. OA lesion induced by 0.01 mg MIA including loss of chondrocytes. After LIPUS treatment, were few apoptotic chondrocytes in comparison of MIA group.

The results showed that the MIA+LIPUS group increased the number of chondrocytes than the MIA group alone; however, chondrocytes number were lower than the control and LIPUS group, respectively. Other in vitro studies on the effects of LIPUS have shown a stimulatory effect on chondrocyte activity, as well as on bone cell activity. LIPUS transfers mechanical energy into biological tissues and triggers biochemical events at the cellular level with acoustic pressure waves, which directly affect chondrocytes, endothelial cells, and osteoblasts. This stimulation induces the cellular processes of chondrogenesis, angiogenesis, and osteogenesis and produces endochondral bone formation more aggressively than natural processes do. Our results coincided with previous studies showing that chondrocytes influence bone formation.

In the micro-CT image analysis, the BMD, BMC, and BV for all groups were compared at 12, 16, and 20 weeks of age. At 16 weeks, BMD, BMC, and BV were significantly lower in the MIA and MIA+LIPUS groups than in the control and LIPUS groups ($p<0.05$), suggesting that the TMJ-OA model was successfully induced. Comparing the amount of decrease in BMD, BMC, and BV, it was observed that BV decreased the most, followed by BMD, and BMC did not decrease as drastically as did BV. Thus, it appears that MIA not only affects the volume and the shape of the bone in condyle but also decreases the quantity and quality of bone minerals. At 20 weeks, BMD, BMC, and BV were not significantly different between the control and LIPUS groups. Thus, LIPUS treatment appears to have no effect on the healthy mandibular condyle. However, BMD, BMC, and BV in the MIA group were significantly lower than those in the control, LIPUS, and MIA+LIPUS groups. These lower MIA group values compared to those in the MIA+LIPUS group indicate an increase in BMD, BMC, and

BV with LIPUS treatment in the MIA+LIPUS groups, because the values for the MIA+LIPUS group were significantly higher than those in the MIA group. The values that increased most drastically were those for BV, while BMC did not increase drastically, suggesting that bone regeneration occurred after MIA induced the lesions. Positive effects were especially observed with respect to the total condyle volume. Although the BMD and BMC values did not increase to the same extent as the BV values did, the increase was significant, confirming that LIPUS improves bone quality. In contrast, when comparing the control and LIPUS groups with the MIA+LIPUS group, BMD, BMC, and BV were significantly lower in the MIA+LIPUS group. These differences suggest that the rats in the MIA+LIPUS group did not fully recover from the OA lesions. In HE staining and quantitative analysis of MMP-13, the MIA+LIPUS group had an increased number of chondrocytes and a lower ratio of MMP-13 immunopositive cells compared to the MIA group. However, the number of chondrocytes was still lower and the ratio of MMP-13 immunopositive cells was still greater than that in the control and LIPUS groups.

Findings from this study demonstrated the effectiveness of LIPUS for treating TMJ-OA bone lesions. BMD, BMC, and BV in the MIA+LIPUS groups for 18-week-old rats were compared with those for 19- and 20-week-old rats, but there was no significant increase, suggesting that the second week after TMJ-OA induction was the most effective time point for accelerating new bone formation with LIPUS treatment.

**<Conclusions>**

LIPUS application in a TMJ-OA model demonstrated that the chondrocytes were increased with more continuity and also had significant increase in BMD, BMC and BV at 20 weeks. On the other hand, we observed there are no significant differences in BMD, BMC and BV values from 18 weeks to 20 weeks in the MIA + LIPUS group. These results suggest that LIPUS is more effective after 2 weeks.

＜和文による要約＞

非侵襲的な再生治療法開発のため、まず Monosodium iodoacetate（MIA）のラット関節腔への注入によって変形性顎関節症（顎関節 OA）病変モデルを確立した。次いで OA 病変を誘発したラット下顎頭に対して、これまで膝関節等で骨修復効果が報告されている低出力超短波パルス（Low intensity pulsed ultrasound stimulation: LIPUS）を照射することによる下顎頭の骨・軟骨の修復過程を検索することを目的として本実験を行った。

12 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、対照群、MIA 群、LIPUS 群、MIA＋LIPUS 群の 4 群に分け、20 週齢まで飼育した。実験期間中、4 群間の体重に有意差は認められなかった。下顎頭の 3 次元的骨微細構造変化の解析のため、顎関節マイクロ CT を毎週撮影し、骨密度(BMD)、骨量(BMC)、ならびに骨体積 (BV) を比較した。さらに組織標本を作製し HE 染色を行い、下顎頭軟骨層の厚みおよび軟骨細胞数の変化と抗 MMP-13 抗体を用いた免疫組織化学染色により、MIA および LIPUS 照射が顎関節に与える影響を観察した。統計学的解析には、多重比較検定（$p<0.05$）を用いた。その結果、MIA による OA 様の骨･軟骨破壊が認められ、この実験系が OA モデルと

して適切である事を明らかにした。また LIPUS 照射による骨･軟骨修復過程を確認することができた。さらに、MIA+LIPUS 群では LIPUS を照射し始めた 16 週齢から 18 週齢に BMD が増加しており、18 週齢と 20 週齢の間に有意差は認められなかったことから、最も効果の高い LIPUS 照射期間は 2 週間であるという結果も得られた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5533　号 | 金口　明美 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　柴田　俊一<br>副査　森山　啓司　　西山　暁 | |
| 論 文 題 目 | Low-intensity pulsed ultrasound stimulation for mandibular condyle osteoarthritis lesions in rats | |

（論文審査の要旨）

顎関節症は多因子疾患であり、矯正歯科治療において注意すべき病態の一つである。顎関節症の分類の中に、関節の変性疾患として変形性関節症（OA）がある。現在、OA の治療法には保存療法と手術療法があるが最善の治療法はいまだに確立されておらず、非侵襲的な再生治療法を開発することは臨床上極めて重要である。

そこで金口は、近年、超音波エネルギーを用いて損傷を受けた組織を効果的に修復することが知られている低出力パルス超音波パルス（Low intensity pulsed ultrasound stimulation: LIPUS）を、mono-iodoacetate（MIA）注入により OA 病変を誘発したラット下顎頭に対して照射し、その効果を検討した。

実験には 12 週齢の Wistar 系雄性ラット 24 匹を用い、対照群、LIPUS 群、MIA 群、ならびに MIA＋LIPUS 群の 4 群に分けた。組織学的評価には HE 染色を行い、20 週齢の下顎頭軟骨の厚みおよび軟骨細胞数の変化を観察、計測し定量的に解析した。軟骨の厚みは前方部、中央部および後方部の３つの領域で測定した。軟骨細胞数はマイクロ CT 画像より下顎頭の後方部が最も変化があったため、先行研究に基づき、軟骨の後部領域の軟骨細胞数を計測した。免疫組織化学的検索には抗 MMP-13 抗体を用い、下顎頭軟骨後方部を対象として免疫反応陽性率を評価した。骨形態計測的解析として、マイクロ CT で下顎頭を撮影し、骨密度（BMD）、骨量（BMC）、ならびに骨体積（BV）を評価した。統計学的解析として、組織学的および免疫組織化学的評価には nonparametric one-way ANOVA 法および post hoc 検定を用いた。骨形態計測的評価においては、全 4 群の 12、16 および 20 週齢と各週齢の BMD、BMC および BV を two-way analysis ANOVA 法および多重比較検定後 Tukey’s post hoc 検定を用い比較した。$p<0.05$ を有意水準として設定した。

本研究において、申請者がまず実験モデルを確立させ、LIPUS の創傷修復能を理解した上で、さらに骨･軟骨の形態解析方法について事前に十分な検討を重ね、適切な研究計画の下で本実験を遂行したことは高く評価できる

金口は、研究結果として以下の知見を得た。

1. HE 染色では、対照群と LIPUS 群において、軟骨細胞は均一に配列しており、軟骨層の厚さと細胞数に有意差は認められなかった。MIA 群および MIA+LIPUS 群は対照群と比較して有意に軟骨層の厚さと細胞数が減少したが、MIA＋LIPUS 群は MIA 群と比

較して軟骨層の厚さと細胞数が有意に増加し、軟骨組織の回復を示す所見が得られた。

2. 免疫組織化学的検索では、対照群と LIPUS 群において、陽性細胞率に有意差は認められなかった。MIA 群は他のすべての群と比較して陽性細胞率が有意に増加していた。MIA+LIPUS 群は、MIA 群と比較すると有意に減少していたが、対照群および LIPUS 群と比較すると陽性細胞率はまだ有意に高い状態であった。

3. マイクロ CT 画像より、16 週齢では、MIA 群および MIA+LIPUS 群では有意に BMD が減少したが、20 週齢においては、MIA＋LIPUS 群は MIA 群と比べて有意に BMD が増加していた。BMC および BV も BMD と同様の結果であった。

4. ３次元イメージングにおいて、16 週齢の MIA 群と MIA+LIPUS 群では対照群と比較して BMD が低下していることが明瞭に示唆された。一方、20 週齢では、MIA 群はさらに骨吸収の進行が認められたが、MIA+LIPUS 群では 16 週齢における BMD 低下領域での同要素の回復が認められた。

本研究の結果より、金口は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ活性の阻害剤である MIA の関節腔注入が軟骨細胞の喪失と軟骨層の厚さの減少を引き起こすことを示した。また OA 破壊分子である MMP-13 免疫陽性細胞率が高いことを示したことから、本実験モデルは顎関節 OA 病変を惹起できることが明らかとなった。さらに、OA と骨密度 (BMD) の関係は、骨損失に関連していること、機械的負荷による顎関節 OA モデルにおける BV/TV の減少や、ヒトの手指 OA における BMD および BMC の減少が報告されている。以上の報告と本研究における MIA 注入に伴う BMD、BMC および BV の減少を考慮すると、本研究で用いた実験モデルは顎関節 OA モデルとして妥当なものであると考えられた。

LIPUS の効果は、*in vitro* 研究において LIPUS 刺激による軟骨細胞活性が報告されている。本研究においても、MIA 群と MIA+LIPUS 群を比較すると MIA+LIPUS 群の軟骨細胞数が有意に増加していることから、LIPUS は軟骨細胞の増殖に影響を与えることが示された。しかしながら、対照群と比較すると MIA+LIPUS 群の方が、軟骨細胞数が有意に少なかったことから、完全な修復には至っていない事が明らかとなった。免疫組織化学染色では、MIA +LIPUS 群は、MIA 群と比較して MMP-13 陽性細胞率が有意に減少したことから、LIPUS は MMP-13 発現を減少し、顎関節 OA の進行を減弱することが示された。

先行研究では 4 週間で LIPUS の効果が見られるとされており、本研究でも同様な結果を予想したが、実際には MIA+LIPUS 群では LIPUS を照射し始めた 16 週齢から 18 週齢において BMD が有意に増加しており、18 週齢と 20 週齢の間に有意差は認められなかった。この所見から、金口は本モデルにおける LIPUS 治療の有効期間は 2 週間であると結論づけた。

以上の結果から、本研究は、MIA のラット関節腔注入による顎関節 OA モデルを確立さ

せた上で、LIPUS 照射による下顎頭の OA 病変修復効果を明らかにしたものであり、今後の歯科領域における LIPUS の臨床応用に寄与するところが大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 久保田　絢子 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　荒木　孝二<br>副 査　　品田　佳世子、吉田　直美 |
| 論文題目 | Effectiveness of Individual Oral Health Education for Japanese University Students |

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

日本の口腔健康問題の一つとして、20 代前半におけるう蝕および歯周疾患の急激な増加が挙げられる。本研究は、この年代にある大学生の口腔保健状況を把握し、口腔保健向上のための個別教育プログラムを実施して、その有効性を検討することを目的とした。

自主的協力を得られた 20-22 歳の学生 52 名を対象とし、介入群に 29 名、対照群に 23 名を割り当てた。研究開始時および終了時（6 ヵ月後）に、う蝕指数、Plaque Index（PI）、地域歯周疾患指数改定版および安静時唾液量を測定した。加えて、口腔保健行動について、両時点で自記式質問票による評価を行った。介入群には、開始時評価から 3 ヶ月後に、歯科衛生士による口腔保健状態の説明、セルフケアの方法と口腔保健行動に関する指導を含む単回の健康教育を実施した。対照群には 6 カ月間、何ら介入を行わなかった。

最終的に、介入群 27 名、対照群 16 名が研究を完了した。介入群では、処置歯数の増加と PI スコアの減少がみられたが、対照群ではこれらの所見は観察されなかった。歯肉出血は対照群で悪化したが、介入群では悪化がみられなかった。一方、未処置歯数、歯周ポケットスコア、および安静時唾液量では、両群とも変化が認められなかった。口腔保健行動においては、介入群でフロッシング頻度の増加と意識的なブラッシングへの改善がみられたが、対照群ではこのような変化は認められなかった。

本結果から、歯科専門家による個別口腔健康教育が、20 代前半の大学生の口腔保健状況や口腔保健行動の改善に有効であることが示唆された。

＜緒言＞

歯の保持は咀嚼や摂食機能にとって重要であり、これらの機能は生涯を通して心身の健康と QOL を維持するうえで不可欠である。しかし、多くの人が様々な理由で歯を失っており、その主な理由にう蝕と歯周病が挙げられる。未処置のう歯保有率は 25 歳でピークに達し、歯周病の罹患率は 20 歳頃から増加し始めるなど、20 代前半での口腔保健状況の悪化は、日本における健康課題の一つである。この年代で良好な口腔保健行動を獲得し、口腔保健状況を改善することは、生涯にわたる口腔保健に

非常に重要であるにもかかわらず、いくつかの要因によって口腔保健状況および口腔保健行動の悪化がひき起こされていると推測される。

まず、日本では学校保健安全法によって、高等学校までは毎年の定期健康診断における歯科検診が義務づけられているが、大学や専門学校では検査項目から除外可能とされているため、ほとんどの教育機関では歯科検診が実施されていない。高等学校卒業後は半数以上が進学するため、そのほとんどが歯科検診を受けない状況となる。また、日本の 20 代で過去 1 年以内に歯科検診を受けた者の割合は他の世代に比べて特に低い状況にある。これらに加えて、一人暮らしの開始などに伴う不規則な食生活も要因として挙げられる。

以上より、20 代前半では口腔保健への関心が低いと考えられ、歯科専門職による介入が特に必要とされる。口腔健康教育については、個別もしくは集団への指導、いずれでも同等の効果が報告されているため、各自の口腔保健状況に基づいた個別指導が効果的であると考え、本研究では、大学生の口腔保健状況改善のための適切な介入方法を検討するために、個別口腔健康教育を実施し、その有効性を検討した。

＜方法＞

2016 年 4 月から 10 月に、歯科の専門的知識を持たない 20 歳以上の都内医療系大学生 160 名から研究協力者を募集した。自主的協力を得られた 52 名を対象とし、予定された介入に参加可能な学生 29 名を介入群、残りの 23 名を対照群に割り当てた。

研究開始時（Baseline 以下 BL）および 6 か月後の終了時（End of Study 以下 ES）に、口腔保健状況の評価として、う蝕指数（DMFT）、Plaque Index（PI）、地域歯周疾患指数改定版、および安静時唾液量の測定を行った。同時期に、口腔内の問題、口腔保健行動、食習慣に関する自記式質問紙調査を実施した。

介入群は、BL から 3 ヶ月後に、15～20 分程度の単回の個別口腔健康教育を実施した。指導内容は、各自の BL の口腔内状況および当日の口腔衛生状況に基づき、十分に訓練された歯科衛生士が決定した。主な内容は、う蝕と歯周病に関する口腔内状況の説明、歯みがき方法と毎日のフロッシング指導、フッ化物配合歯磨剤の使用等の口腔衛生指導、食習慣改善のための助言とした。特に問題がある部位および染色した歯垢については手鏡で示しながら説明し、歯みがき方法およびフロッシング方法について実演と練習を行った。さらに、未処置歯を有する者へは歯科受診を強く勧奨し、全員に個別指導にそったセルフケアの継続を奨励した。

一方、対照群へは研究期間中に一切の介入を行わなかった。非介入による不利益を避けるため、ES 評価の後、口腔保健状況の説明および保健指導を実施した。

統計分析は、BL の 2 群間比較には、Mann-Whitney の $U$ 検定、カイ二乗検定または Fisher の正

確確率検定を用い、同一群内の BL と ES の比較には Wilcoxon の符号付順位和検定、符号検定または McNemar 検定を用いた。さらに、ES の歯肉出血悪化の有無を目的変数として、BL の関連変数による調整を行い、多重ロジスティック回帰分析にて関連度を検討した。

＜結果＞

介入群で 2 名、対照群で 7 名が ES 評価に参加できなかったため、最終的に介入群 27 名（男性 15 名、女性 12 名；平均年齢 20.6±0.7 歳）および対照群 16 名（男性 6 名、女性 10 名；平均年齢 20.8±0.7 歳）を分析対象とした。介入群 1 名（3.7%）、対照群 2 名（12.5%）が喫煙者で、性別と喫煙者の割合に 2 群間で有意差はみられなかった。

未処置歯数、処置歯数ならびに DMFT は、BL で 2 群間に有意差が認められなかった。未処置数は、ES に両群で有意な変化はみられなかったものの対照群で増加傾向がみられ、処置歯数は、介入群で有意に増加し（$P < 0.05$）、対照群では変化しなかった。DMFT は介入群（$P < 0.01$）、対照群（$P < 0.05$）ともに有意に増加した。

PI スコアは、BL で 2 群間に有意差がなく、ES で介入群のみ有意に減少した（$P < 0.01$）。歯肉出血は、BL では 2 群間に有意差はなく、ES では対照群で有意に増加し（$P < 0.01$）、介入群で変化がみられなかった。歯周ポケットスコアおよび安静時唾液量は、BL で 2 群間に有意差はなく、ES で両群とも有意な変化を示さなかった。

質問紙調査では、歯間清掃の頻度および歯肉辺縁を意識的に磨くかの質問に対する回答において、介入群でのみ ES に有意な改善が認められた。その他の質問項目では、両群ともに有意な変化はみられなかった。

ES の歯肉出血の悪化要因についての多重ロジスティック回帰分析では、介入群は対照群に対しオッズ比 ＝0.193、95%信頼区間 ＝0.041-0.92 となり、介入が低下要因であることが示されたが、他の PI、歯磨き回数等の要因は関連を示さなかった。

＜考察＞

本研究は、20 代前半にある大学生への口腔健康教育を実施し、口腔保健状況と口腔保健行動の改善への有効性を評価することを目的とした。介入群では、処置歯数が有意に増加したが、未処置歯数の変化はみられなかった。一方、対照群では、処置歯数に有意な変化はなく、未処置歯数が増加傾向にあった。また、PI スコアは介入群でのみ有意に減少した。質問紙調査においても、介入群でのみフロスの使用頻度が増え、歯肉辺縁の意識的な歯みがきへの変化がみられた。これらの結果から、今回の歯科衛生士による口腔健康教育が口腔清掃技術および習慣の改善に効果的であったことが示唆された。しかし、介入群で処置歯が増加したにもかかわらず未処置歯が減少しなかったことは、新たに未

処置歯が増加したことを示し、本介入内容はう蝕予防効果としては不十分であることが示唆された。その要因として、介入によって糖質摂取頻度などの食習慣が改善されなかったことが挙げられる。十分なう蝕予防効果を得るためには、より継続的な教育を行い口腔保健行動の改善を図ることが必要と考える。

一方、介入群で口腔清掃習慣の改善がみられたにもかかわらず、ポケットスコアに有意な変化が認められなかった。このことは、比較的深いポケットを改善するうえでは、今回の口腔清掃の技術および習慣の獲得は不十分であり、専門的処置も必要とされることを示唆している。歯肉出血については、対照群では有意に悪化したのに対し、介入群では有意な変化が認められなかった。多重ロジスティック回帰分析から、介入により歯肉出血の悪化の確率が 0.19 倍に減少することが示されたことからも、今回の口腔衛生指導が、歯肉の状態の改善にまでは至らないものの、悪化防止には有効であったと考えられる。

大学生の口腔健康増進を目的とした介入研究がほとんど無いことから、本研究では医療系大学生を対象として個別口腔健康教育を行い、対象者が少ないながら一定の効果を得られることが示された。この結果は、一般大学生の口腔保健改善に向けて有用な情報になると考える。しかし、より広範に大学生の口腔保健状況を把握するためには、多様な学科で多数を対象とした調査が必要であり、より効果的な口腔健康教育プログラムの確立には、より継続的かつ大学生の特徴に応じた介入方法の検討が必要である。

＜結論＞

本研究では、医療系大学生を対象として単回の個別口腔健康教育を実施し、その効果を検討した。介入群では処置歯数が有意に増加し、PI スコアが有意に減少した。歯肉出血は対照群で有意に悪化したが、介入群では変化しなかった。また、質問紙調査では、口腔清掃習慣の改善がみられた。以上より、本口腔健康教育には一定の効果があることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5534　号 | 久保田　絢子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　荒木　孝二<br>副 査　　品田　佳世子、吉田　直美 | |
| 論 文 題 目 | Effectiveness of Individual Oral Health Education for Japanese University Students | |

（論文審査の要旨）

歯の保持は咀嚼や摂食機能にとって重要であり、これらの機能は生涯を通して心身の健康と QOL を維持するうえで不可欠である。しかし、多くの人が年齢とともに歯を喪失しており、その主な理由にう蝕と歯周病が挙げられる。20 代前半におけるう歯保有率および歯周疾患の罹患率の増加は、日本における口腔健康課題の一つである。壮年期以降の歯の喪失を防ぐには、この年代からの口腔保健が重要である。久保田は大学生の口腔保健状況を把握し、口腔保健向上のための個別教育プログラムを実施して、その有効性を検討することを目的として本研究を行った。20 代である大学生の口腔健康増進を目的とした歯科衛生士による介入研究はほとんど無いことから、久保田が考案実施した個別教育プログラムは非常に価値あるものといえる。

対象者は、歯科の専門的知識のない医療系大学生で自主的協力を得られた 20-22 歳の学生 52 名とし、介入群に 29 名、対照群に 23 名を割り当てた。研究開始時および 6 か月後の終了時に、う蝕指数、Plaque Index（PI）、地域歯周疾患指数改定版および安静時唾液量を測定した。加えて、両時点で、口腔保健行動について自記式質問票による評価を行った。介入群には、開始時評価から 3 ヶ月後に、歯科衛生士による各学生の口腔保健状態の説明、セルフケア方法と口腔保健行動に関する指導を含む単回の健康教育を実施した。対照群には 6 カ月間、何ら介入を行わなかった。最終的に研究を完了した介入群 27 名、対照群 16 名を分析対象とした。

本研究の結果から、久保田は以下の知見を得ている。

１．介入群では、処置歯数の増加と PI スコアの減少がみられたが、対照群ではこれらの所見は観察されなかった。

２．歯肉出血は対照群で悪化したが、介入群では悪化がみられなかった。

３．未処置歯数、歯周ポケットスコア、および安静時唾液量では、両群ともに変化が認められなかった。

４．質問紙調査の口腔保健行動においては、介入群でフロッシング頻度の増加と意識的なブラッシングへの改善が示されたが、対照群ではこのような変化はみられなかった。

久保田は本研究で得られた知見と過去の文献に基づき、個別口腔健康教育が歯科的知識をもたない一

般学生の口腔保健状況や口腔保健行動の改善に有効であること、単回介入の限界をふまえた今後の展開に向けての課題などについて、論理的かつ合理的に考察している。大学生を対象とした歯科衛生士による口腔健康教育介入を実施し、その有効性を実証した報告はこれまでになく、大学生ひいてはその将来にわたる口腔保健に寄与する重要な示唆をあたえるものである。従って本論文は、博士（歯学）の学位を請求する論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 宮安　杏奈 |
| 論文審査担当者 | 主査　　若林　則幸<br>副査　　鈴木　哲也　　川渕　孝一 |
| 論　文　題　目 | Cost-effectiveness analysis of two impression methods for the fabrication of mandibular complete dentures |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

無歯顎患者にとって，全部床義歯は一般的な治療であるが，不快感や咀嚼困難さゆえに患者が不満を訴えることも多く，特に，下顎の義歯は解剖的形態が複雑であるために大きな問題となり，経験豊富な補綴歯科医が義歯を製作したとしても，良好な結果を得るのは難しい．全部床義歯製作に関しては，これまでにいくつか研究が発表されており，大きく分けて従来法と簡便法の 2 つの製作方法が報告されている．従来法とはアルジネート印象材と既成トレーで行った予備印象から個人トレーを製作し，これをベースに筋形成を行ったのちにシリコーン印象材を用いて精密印象を行う印象方法, さらには咬合器装着のためにフェイスボウなどを併用する方法のことである．これに対して，簡便法とは既成トレーを用いてアルジネート単独で印象採得を行い，フェイスボウなどを併用せず，義歯を簡便に製作する方法のことである．歯科教育の現場では，従来法を用いた全部床義歯製作が推奨されているが，このような推奨方法があるにもかかわらず，技術不足および費用と時間の問題により，多くの開業歯科医が簡便法を用いて全部床義歯を製作していると報告されている．治療方法の選択は個人の歯科医師の判断に任せられているが，それぞれの患者に対し，医学的・社会的・倫理的・経済的に考慮し，どのような治療方法がより適切かを選択することが必要とされる．

このように全部床義歯製作は，治療技術の選択肢が多岐にわたることが多く，診療従事者は常に一つの症例に対して，どの治療技術を用いるか，その判断をしなければならない．しかしながら，医療情報が膨大であるため，その意思決定が困難となることが少なくない．医療技術が進歩し，同じ状態の患者に対して複数の治療技術が利用できるようになったことが，個人レベルにおいても政策レベルにおいても意思決定を複雑なものにしている．朗報は最近，メタ分析や決断分析などの研究手法が開発され，医療技術の意思決定に利用されていることである．いずれにせよ，新しい治療方法を導入する際には，費用の比較や費用効果分析を含めた経済的な側面からも評価する必要がある．

過去には，全部床義歯製作における従来法と簡便法の経済学的評価について，いくつかの結果が報告されている．これらの研究結果から，従来法は簡便法と比較してより多くの時間と費用がかかることが明らかとなっている．しかしながら，これらの先行研究では，いずれも費用のみの

比較になっており，その費用対効果は明らかになっていない．さらに，いずれの報告においても，上下の全部床義歯に関して，印象採得から咬合採得の過程で従来法を用いており，特に臨床的に難しいとされる下顎の印象採得のみに関する報告は未だない． そこで宮安らは，下顎全部床義歯の印象採得のみに対して，介入を行ったクロスオーバー比較臨床試験を行い，2 つの異なる印象採得方法（1）従来法（2）簡便法を比較検討した．本研究の目的は，この比較試験において，従来法と簡便法の全部床義歯製作費用を比較し，その費用対効果を評価することとした．

＜方法＞

採択基準に適格した上下顎無歯顎患者 27 名をグループ C-S とグループ S-C にランダム割付けし，単盲検無作為化クロスオーバー比較試験を行った．介入は下顎の全部床義歯製作の印象採得に対してのみ行い，（1）従来法と（2）簡便法を用いた．グループ C-S では，まず従来法を用いて義歯を製作し，それを 1 ヶ月間使用させ，その後に簡便法を用いて義歯を新たに製作し，同様に 1 ヶ月間使用させた．グループ S-C では，その反対を行った．

（1） 従来法：既成トレーとアルジネートを用いて，予備印象を行い，研究用模型を製作した．その模型上で個人トレーを用意し，コンパウンドによって筋形成を行い，シリコーン印象材にて精密印象を行った．この印象を最終印象として作業模型を製作した．

（2） 簡便法:既成トレーとアルジネートを用いて印象採得を行い, この印象を最終印象として, 作業模型を製作した．

印象採得後の治療過程はどちらの方法においても同様で，咬合床を用いて咬合採得し，平均値咬合器に模型を装着した．その後，排列試適を行ったのちに，義歯完成とした．因みにいずれの方法においても上顎の全部床義歯はすべて従来法の印象採得を用いて製作した．各介入における義歯の調整は 1 週間に 1 回，計 4 回と規定した．

100mm Visual Analog Scale による患者満足度の評価は 4 回目の義歯調整終了後に行った．また，従来法，及び簡便法それぞれの印象採得から義歯調整終了までの各行程に歯科医師，及び歯科技工士が費やした時間と材料の使用量を記録した．費用分析では，人件費と材料費を含む直接費用のみを合計費用として算出した．人件費は記録した時間と歯科医師あるいは歯科技工士の平均時給（平成 26 年度賃金構造基本統計調査，厚生労働省）を用いて算出し，材料費は使用した材料の量と購入価格を用いて算出した．これらの費用を Mann-Whitney U 検定を用いて，2 群間比較した（有意水準 5%）．また費用効果分析では，効果値に患者満足度を用いて，1 効果当たりの増分費用を示す増分費用効果比を算出した．増分費用効果比は従来法を用いた場合の増分費用を増分効果で割ることによって求められる．

本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認（第 946 号），及び臨床試験登録システム UMIN の登録（UMIN000009875）を行っている．

＜結果＞

データは Jo Ayami らが 2013 年 8 月～14 年 10 月に回収したものの二次利用で被験者 27 名のうち 3 名が脱落し，分析は 24 名に対して行った．

歯科医師及び歯科技工士の時給はそれぞれ 3,558 円，1,883 円と算出され，これらを用いた結果，

従来法及び簡便法の人件費はそれぞれ 35,534 円，32,850 円となった．また材料費はそれぞれ 8,641 円，6,772 円と算出された．従来法の費用は人件費においても材料費においても有意に高く，人件費が合計費用の 8 割以上を占めていた．費用合計は従来法で 43,904 円，簡便法で 39,792 円と算出され，2 群間に有意な差が認められた．

また，我々の先行研究により従来法を用いた下顎全部床義歯の患者満足度は 91.0，簡便法では 84.5 であることがすでにわかっているため，従来法の増分効果は 6.5，また増分費用は 4,112 円となり，増分費用効果比は 633 円と算出された．

＜考察＞

本研究の結果から，全部床義歯製作費用は下顎の印象採得に従来法を用いた場合に，有意に高額となり，これは，簡便法を用いた場合に省略されている個人トレー製作や精密印象に要した時間及び材料が多く費消したことに起因していた．しかしながら，これらの治療過程を省略することによって，その後の義歯製作過程（咬合採得，試適及び義歯調整）の時間や使用材料の量に影響を与えることはなかった．つまり，従来法の個人トレー製作や精密印象に費やす時間や材料費を節約することによって，従来法を用いた下顎全部床義歯をより費用対効果の高いものにすることが可能であることが示唆された．さらに，従来法を用いた場合の増分費用効果比 633 円は患者満足度 1 効果あたり 633 円分の医療資源が必要であったことを意味し，これは経済的に妥当な金額であると考えられる．したがって，下顎の全部床義歯の印象採得に従来法を用いることは臨床的・経済的に有意義であると考察できる．

なお本研究において，人件費に関しては客観値を使用することができたものの，材料費に関してはすべての材料について厚生労働大臣告示の「材料価格基準」を用いることはできなかった．より正確に費用効果分析を行うには，すべてに客観値を用いて行うべきであるが，本研究結果において材料費が費用全体に及ぼす影響は少ないと考えられるため，この値は妥当であると考察できる．しかしながら，本研究では人件費と材料費のみを算出して費用分析を行っているため，より詳細な分析を行うためには，設備費や歯科医師，歯科技工士以外の診療従事者の人件費や患者費用などの間接費用を含めた費用の算出が必要である．さらに，今後はマルコフモデルなどを利用し，全部床義歯の長期予後経過を含めた口腔関連 QoL の指標を効果値に用いた費用効果分析を行うことによって，医療経済学的に患者の QoL をより効果的に向上させることができる全部床義歯製作方法が明らかになると考えられる．

＜結論＞

本研究において，下顎全部床義歯製作の印象採得において従来法を用いた場合，簡便法と比べて費用は有意に高くなり，患者満足度 1 効果あたりの増分費用は 633 円であると明らかになった．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5535　号 | 宮安　杏奈 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　若林　則幸<br>副　査　　鈴木　哲也，川渕　孝一 | |
| 論 文 題 目 | Cost-effectiveness analysis of two impression methods for the fabrication of mandibular complete dentures | |

（論文審査の要旨）

無歯顎患者にとって，全部床義歯は一般的な治療であるが，不快感や咀嚼困難さゆえに患者が不満を訴えることも多い。特に，下顎の義歯は解剖的形態が複雑であるために大きな問題となり，経験豊富な補綴歯科医が義歯を製作したとしても，良好な結果を得るのは難しい．全部床義歯製作に関しては，大きく分けて従来法と簡便法の 2 つの製作方法が報告されている．従来法とはアルジネート印象材と既成トレーで行った予備印象から個人トレーを製作し，これをベースに筋形成を行ったのちにシリコーン印象材を用いて精密印象を行う印象方法，さらには咬合器装着のためにフェイスボウなどを併用する方法のことである．これに対して，簡便法とは既成トレーを用いてアルジネート単独で印象採得を行い，フェイスボウなどを併用せず，義歯を簡便に製作する方法のことである．歯科教育の現場では，従来法を用いた全部床義歯製作が推奨されているが，このような推奨方法があるにもかかわらず，技術不足および費用と時間の問題により，多くの開業歯科医が簡便法を用いて全部床義歯を製作していると報告されている．過去には，全部床義歯製作における従来法と簡便法の経済学的評価を行った研究があり，従来法は簡便法と比較してより多くの時間と費用がかかることが明らかとなっている．

しかしながら，これらの先行研究では，いずれも費用のみの比較になっており，その費用対効果は明らかになっていない．さらに，いずれの報告においても，上下の全部床義歯に関して，印象採得から咬合採得の過程で従来法を用いており，特に臨床的に難しいとされる下顎の印象採得のみに関する報告は未だない．このような背景のもと，宮安は，下顎全部床義歯の 2 つの異なる印象採得方法によって作製された全部床義歯の費用を比較し，その費用対効果を評価することとした．

上下顎無歯顎患者 27 名に対して単盲検無作為化クロスオーバー比較試験を行い，下顎の全部床義歯製作の印象採得に介入を行い，（1）従来法と（2）簡便法を用いた．

（1）　従来法 : 既製トレーとアルジネートを用いて，予備印象を行い，研究用模型を製作した．その模型上で個人トレーを用意し，コンパウンドによって筋形成を行い，シリコーン印象材にて精密印象を行った．この印象を最終印象として作業模型を製作した．

（2）　簡便法 : 既成トレーとアルジネートを用いて印象採得を行い，この印象を最終印象として，作業模型を製作した．

印象採得後の治療過程はどちらの方法も同様で，咬合床を用いて咬合採得し，平均値咬合器に模型を装着した．その後，排列試適を行ったのちに，義歯完成とした．義歯調整は 1 週間に 1 回，計 4 回と規定した．因みにいずれの方法においても上顎の全部床義歯はすべて従来法の印象採得を用いて製作した．従来法，及び簡便法それぞれの印象採得から義歯調整終了までの各行程に歯科医師，及び歯科技工士が費やした時間と材料の使用量を記録した．費用分析では，人件費と材料費を含む直接費用のみを合計費用とし，人件費は記録した時間と歯科医師あるいは歯科技工士の平均時給（平成 26 年度賃金構造基本統計調査，厚生労働省）を用いて算出し，材料費は使用した材料の量と購入価格を用いて算出した．これらの費用を Mann-Whitney U 検定を用いて，2 群間比較した（有意水準 5%）．また費用効果分析では，効果値に患者満足度を用いて，1 効果当たりの増分費用を示す増分費用効果比を算出した．

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1. 歯科医師及び歯科技工士の時給はそれぞれ 3,558 円，1,883 円と算出され，これらを用いた結果，従来法及び簡便法の人件費はそれぞれ 35,534 円，32,850 円となった．また材料費はそれぞれ 8,641 円，6,772 円と算出された．従来法の費用は人件費においても材料費においても有意に高く，人件費が合計費用の 8 割以上を占めていた．費用合計は従来法で 43,904 円，簡便法で 39,792 円と算出され，2 群間に有意な差が認められた．
2. Jo Ayami らの先行研究の結果より，従来法を用いた場合の増分効果は 6.5，また増分費用は 4,112 円となり，増分費用効果比は 633 円と算出された．

本研究の結果から，下顎全部床義歯の印象採得において従来法を用いた場合の全部床義歯の費用は 43,904 円，簡便法を用いた場合は 39,792 円となり，従来法は有意に高い結果となったが，患者満足度 1 効果あたりの増分費用は 633 円と妥当な額であると明らかとなった．本研究の成果は，下顎全部床義歯作製における印象採得の経済的評価のエビデンスを伴った唯一の研究である．また本研究の成果は，歯科医師が，臨床的難易度が高いとされる下顎全部床義歯の印象採得の方法を選択する際の一助となることが示唆され，高齢化が進む日本において，大いに貢献するものと考えられる．よって，本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中田　琢也 |
| 論文審査担当者 | 主査　高橋　英和<br>副査　三浦　宏之　　渡邊　裕 |
| 論　文　題　目 | Effect of a calcium phosphate and fluoride paste on prevention of enamel demineralization |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

う蝕はエナメル質の脱灰と再石灰化とのバランスが崩壊することによって生じる。その過程が初期段階で中断されなければ、エナメル質からミネラルの実質的な損失が起こり、表面の脱灰にいたる。このため、エナメル質表面の耐酸性を向上させることは、歯の脱灰を抑制するために重要である。

現在、研究および臨床において、エナメル質脱灰を抑制するために、フッ化物および CPP-ACP 等の物質が使用されている。フッ化物の局所応用効果は、無作為化比較試験による高いエビデンスに基づいており、歯の表層にフッ素化アパタイトを形成して結晶の溶解性を低下させ、その結果耐酸性を向上させる。Chow は、リン酸四カルシウム（TTCP）と無水リン酸水素カルシウム（DCPA）が溶解すると、ハイドロキシアパタイト（HA）が過飽和となり、HA の沈着をもたらすことを報告している。近年の *in vitro* 研究では、TTCP および DCPA を含有した知覚過敏抑制剤を歯の表面へ塗布すると、HA 結晶様構造が形成されることが観察されている。また、この形成物が象牙細管を物理的に閉塞することで象牙質知覚過敏症を軽減し、さらに象牙質の脱灰を抑制することが示唆されている。これらのことから、TTCP および DCPA の合成物はう蝕予防剤となりうる。しかしながら、TTCP および DCPA のエナメル質脱灰抑制効果に関しては未だ検討されていない。

一方、光干渉断層計（OCT）は、組織の断層画像構築を行う画像機器であり非侵襲的ならびにリアルタイムに内部構造変化を観察することを可能にした。

本研究では、OCT を用い、人工脱灰モデルにおける、（a）TTCP・DCPA・950 ppmNaF 含有ペースト、（b）CPP-ACP 含有ペースト、（c）950 ppm NaF 水溶液のエナメル質脱灰抑制効果について比較検討した。

＜方法＞

本実験ではエナメル質の脱灰抑制を比較検討するために、（a）TTCP・DCPA・950 ppm NaF 含有 Teethmate AP Paste（AP Paste 群; Kuraray Noritake Dental）、（b）CPP-ACP 含有 MI Paste（MI Paste 群; GC Dental）、および（c）950 ppm NaF 水溶液（NaF 群; Wako Chemicals）の 3 種類の材料を使

用した。また、ネガティブコントロールとして（d）超純水を使用した。

40 本のウシ下顎切歯を、精密低速切断機（Isomet、Buehler）にて 6 mm×3 mm×3 mm のエナメルブロックを切り出し、エポキシレジンにて包埋した。エナメル質表面に平坦な領域が得られるまで耐水研磨紙#800 を用いて研削後、エナメル質表面積の半分（3 mm×3 mm）を、ボンディング材である G-BOND PLUS で被覆し、残りの半分の領域は、上記の 3 種類の材料の 1 つまたは超純水を用いて処理した（各群 n = 10）。全てのサンプルを 37℃の環境下で pH 4.5 の脱灰ゲルに 1 時間浸漬した後、pH 6.3 の再石灰化液に 23 時間浸漬した。この実験サイクル（実験材料または超純水の塗布、脱灰ゲルへの浸漬および再石灰化液への浸漬）を 28 日間繰り返した。実験サイクル開始前および開始後 7、14、21、28 日後における脱灰層同一部位の OCT 画像を撮影し、Image J（Wayne Rasband）を用いてエナメル表層からの脱灰深さを計側した。試料の表面を Icon（DMG）およびエポキシレジンにて包埋、精密低速切断機にて試料を割断し、鏡面研磨を行った後、CLSM（1LM21H / W、Lasertec）を用いて観察した。

Repeated Measures ANOVA を用いて、実験材料間の各脱灰時間における脱灰進行度およびそれらの交互作用を比較した後、ボンフェローニ法で多重比較を行った。さらに one-way ANOVA を用いて、各脱灰時間における各材料間の脱灰深さを比較した。全統計解析は SPSS を用いて有意水準 5%で行った。

＜結果＞

Repeated Measures ANOVA 解析により、脱灰時間および使用材料が脱灰深さに有意に影響することが判明した。また、それらの交互作用に有意差が認められた。AP Paste 群と NaF 群の脱灰進行度は、MI Paste 群と対照群と比べて有意に小さかったが、AP Paste 群と NaF 群との間に有意差は認められなかった。

さらに、one-way ANOVA を用いて各脱灰時間における実験材料間の比較を行うと、7 日目で各材料間に有意差は認められなかったが、14 日目および 21 日目では、AP Paste 群、MI Paste 群および NaF 群と対照群との間に有意差が認められた。また、28 日目では、MI Paste 群および対照群は AP Paste 群および NaF 群と比べて有意に脱灰深さが大きかった。しかしながら、いずれの期間においても、AP Paste 群と NaF 群との間には有意差は認められなかった。

OCT 画像上では、脱灰後の全ての実験群においてエナメル質表面に脱灰深さと関連する明暗の境界が認められ、その境界は対照群の 21 日目および 28 日目で最も顕著であった。また、28 日目において、AP Paste 群と NaF 群には MI Paste 群および対照群と比較して明瞭なエナメル質表層が認められた。

28 日間脱灰した後の CLSM 画像上では、全ての実験群において OCT 画像と同様の脱灰傾向が認められた。MI Paste 群および対照群は、AP Paste 群および NaF 群よりも脱灰深さが大きかった。また、AP Paste 群において約 15μm の脱灰抵抗層に続く表層化脱灰が認められ、NaF 群では、エナメル質表面上にミネラルの沈着を認めた。さらに、MI ペースト群では一部で低密度の脱灰抵抗層が認められ、対照群では OCT 画像同様脱灰抵抗層が観察されず、脱灰深さが他の群よりも大きかった。

＜考察＞

視診のみで、エナメル質の脱灰および再石灰化の初期段階を検出することは困難である。本実験結果から、エナメル質表層化脱灰を非破壊で観察する OCT の有効性が示された。

本研究では、TTCP・DCPA 含有ペースト（AP Paste 群）を使用し、生体活性材料のエナメル質脱灰保護作用を検証した。その結果、AP Paste 群ならびに NaF 群は、他の群と比較して有意に低い脱灰進行度を示した。AP Paste 群および NaF 群では、28 日間の脱灰作業を通して、エナメル質表面の反射シグナルは強く脱灰抵抗を示した。しかしながら、MI Paste 群および対照群では、エナメル質表面の反射シグナルは経時的に減少し、ミネラル密度が低くなったことが示唆された。また、表層下脱灰部の散乱光の増加は、徐々に広がる深部への進行や（特に対照群）、表層下脱灰部におけるミネラル損失と多孔性を示している。一方、CLSM 画像上でもエナメル質表層部の脱灰抵抗層が確認された。低濃度フッ化物による、エナメル質脱灰抑制効果が報告されている。フッ化物イオンが、歯のミネラル成分に対し過飽和な状態で、遊離カルシウムイオンおよびリン酸イオンと接触するとフッ素化アパタイトおよびフルオロアパタイトを形成するように、本実験下においても脱灰抑制層にそれらのアパタイトが含まれている可能性が考えられる。さらに、AP Paste 群は、TTCP および DCPA 化合物を含有しており、HA に近似した Ca/P 比を有するミネラルを形成することが報告されている。TTCP・DCPA 含有知覚過敏抑制剤を用いた走査型電子顕微鏡（SEM）実験では、象牙質表面および象牙細管に HA 様沈着物が観察された。別の *in vitro* 実験では、この知覚過敏抑制剤を酸性条件下で象牙質の試料に適用した場合、象牙質の脱灰が抑制されることが示唆されている。さらに、千葉らは、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて、AP ペーストの脱灰エナメル質への再石灰化効果を評価したところ、TTCP および DCPA が水と反応してカルシウムイオンとリン酸イオンを放出し、両イオンが脱灰エナメル質の結晶成長を促進することを示唆している。本研究においても、TTCP および DCPA はアパタイト結晶成長を促進し、エナメル質の脱灰を抑制することが考えられる。

NaF 群では、エナメル質表面上にミネラル様構造の沈着が観察された。この要因として、NaF 水溶液中の高濃度フッ化物が考えられ、適切なカルシウムイオン・リン酸イオン存在下では、フッ化物イオンによる脱灰エナメル質の再石灰化とミネラル沈着が生じることが報告されている。

MI Paste 群は、CLSM 画像で部分的な脱灰抑制像を示した。CPP-ACP は、エナメル表層下脱灰部に存在すると、カルシウムおよびリン酸イオンを放出することが報告されており、この点が対照群と比較して脱灰進行を抑制した要因として考えられた。

本 in vitro 研究は、人工脱灰モデルを用い、各種脱灰抑制材を日々歯面塗布した場合のエナメル質脱灰抑制効果について検討した。同製品を用いることで、口腔乾燥症のようなう蝕リスクが高い患者に対してもエナメル質の歯質強化が期待できる。同様の簡便な予防アプローチを確立するため、カルシウム素材およびフッ素化合物の評価に関するさらなる研究が必要である。

＜結論＞

カルシウム含有ペーストまたは NaF 水溶液の歯面塗布は、エナメル質脱灰抑制に効果があること、またその可能性は使用材料に依存されることが示唆された。OCT は、エナメル質の脱灰深さ変化や表層部の経時的な変化の観察に有効な方法である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5536　号 | 中田　琢也 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　高橋　英和<br>副　査　三浦　宏之　　渡邊　裕 | |
| 論 文 題 目 | Effect of a calcium phosphate and fluoride paste on prevention of enamel demineralization | |

（論文審査の要旨）

う蝕は、エナメル質の脱灰と再石灰化とのバランスが崩壊することによって生じる。その過程が初期段階で中断されなければ、エナメル質表面の脱灰が生じる。このため、エナメル質表面の耐酸性を向上させることはう蝕予防に有効である。フッ化物のエナメル質脱灰抑制効果については多くの報告があるが、フッ素の過剰摂取による問題もある。近年、フッ素以外の素材としてカルシウム素材が注目され、リン酸四カルシウム（TTCP）と無水リン酸水素カルシウム（DCPA）に由来するカルシウム-リン酸イオンは、エナメル質脱灰領域に浸透しハイドロキシアパタイト結晶の成長を促進することが報告されている。TTCP-DCPA 合成物はう蝕予防剤として期待されるが、そのエナメル質脱灰抑制効果に関する検討はなされていない。

本研究は、光干渉断層計（OCT）より得られた断層画像を用い、TTCP・DCPA・950ppm NaF 含有ペーストについて、そのエナメル質脱灰抑制効果を CPP-ACP 含有ペーストおよび 950ppm NaF 水溶液と比較検討したものであり、その着眼点は高く評価できる。OCT を活用することで非侵襲的および経時的な脱灰抑制効果に関する評価が可能となったことは、国際的に類がない独創的な研究といえる。

実験には、ウシ抜去歯を用いているが、各種材料の脱灰抑制効果を検討する上で、サンプルの個体差の抑制が重要であり妥当な選択といえる。また、実験に用いた 3 種の材料についても適切に考慮された選択といえる。本研究で採用した人工脱灰モデルは、各種脱灰抑制材による表面処理および脱灰ゲルに 1 時間浸漬後、23 時間再石灰化液に浸漬するサイクルを 28 日間継続して行うもので、脱灰抑制材を日々歯面塗布した場合を想定している。このことは本療法のホームケアのプログラムとしての可能性を示すうえで、適切な条件設定である。また、脱灰抑制効果に関する形態学的観察には、OCT を用いた評価に加え、割断した試料断面を走査型レーザー顕微鏡にて直接観察を行って慎重に評価がなされている。

本研究により得られた主な結果は以下の通りである。

1. OCT を用い人工脱灰モデルにおけるエナメル質脱灰像を観察することができた。すなわち、脱灰後の全ての実験群においてエナメル質表面に脱灰深さと関連する明暗の境界が認められ、経時的に脱灰が進行してゆく様相が非侵襲的に観察された。
2. TTCP・DCPA・950 ppm NaF 含有ペースト群ならびに 950 ppm NaF 水溶液群は高い脱灰抑制効果を示し、明らかな脱灰抑制層を認めた。

3.　CPP-ACP 含有ペースト群の一部で低密度の脱灰抑制層が認められた。

特に、TTCP・DCPA・950 ppm NaF 含有ペースト群が、CPP-ACP 含有ペースト群およびコントロール群と比較して有意に高い脱灰抑制効果を示した原因については、TTCP および DCPA が水と反応してカルシウムイオンとリン酸イオンを放出し、脱灰エナメル質の結晶成長を促すことでエナメル質の脱灰が抑制されたとしている。また、この様な簡便で侵襲性の低い手法による脱灰抑制効果の獲得は、口腔乾燥症のようなう蝕リスクが高い患者に対してもエナメル質の歯質強化が期待でき、臨床的意義が高いものと結論付けている。さらに、経時的な脱灰および再石灰化のモニタリングに際しての OCT の有用性が実証されたことも特筆すべき成果である。

以上より、申請者 中田琢也が本研究領域において最先端の計測技術を駆使し、脱灰抑制材によるエナメル質脱灰抑制効果に関して新たな評価法を確立し、臨床評価の開発に資する知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士(歯学)の学位論文として相応しいものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 髙橋　彬文 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　山下　仁大　　水口　俊介 |
| 論　文　題　目 | The effect of different cleaning agents on saliva contamination for bonding performance of zirconia ceramics |

＜緒言＞

CAD/CAM 技術の成熟に伴い、高強度の歯科修復用セラミックスとして、優れた審美性、生体親和性、高い物性を有するジルコニアセラミックスによる修復が近年臨床において多用されている。間接法歯冠修復物や、インプラントアバットメントに適用されるなど、その特性を生かした臨床応用が進められている。従来のイットリア安定化正方晶ジルコニア（Y-TZP）は、その色調の特性から単独での臨床応用が困難であったが、近年では $Y_2O_3$の含有量を増加させることによって透光性や色調が改善されたイットリア部分安定化ジルコニア（Y-PSZ）が開発され、フルジルコニアクラウンなどで広く臨床に応用されている。

ジルコニアセラミックスの接着に際して、レジンとの接着性能を向上させるためにはリン酸機能性モノマーである MDP（10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate）の使用が推奨されており、近年多くのセルフアドヒーシブレジンセメントが開発されている。セルフアドヒーシブレジンセメントはリン酸機能性モノマーをセメント内に含有しており、補綴物の表面に存在する酸化物との反応性により化学的接着を促進するため、プライマー処理なしでも補綴物の装着が可能となった。しかしながら、臨床の現場で行う口腔内試適時の唾液や血液による汚染は、レジンセメントとの結合を弱める可能性がある。

従来、リン酸による補綴物の洗浄は、口腔内試適後のシリカ系セラミックスに対する汚染物質を除去するために行われてきたが、Yang らはジルコニアセラミック修復物の表面にリン酸を適用するとリン残基がジルコニアセラミックス表面に吸着し、結果として接着阻害因子となることを示唆した。さらに、汚染の除去のためには、追加のサンドブラスト、またはジルコニア粒子含有の塩基性洗浄材の使用が効果的であることを報告している。

近年、ジルコニアセラミックス用の新しい洗浄材が開発されている。既存の洗浄材についてエックス線光電子分光（XPS）を用いた洗浄効果の報告はあるが、新しい洗浄材に関する接着への影響や表面性状解析、さらにヒトの唾液汚染に対する効果についての詳細は解明されていない。本研究の目的は、3 つの異なるセルフアドヒーシブレジンセメントについて、ジルコニアセラミックスに対する接着性能に及ぼす洗浄材および唾液汚染の影響を評価することである。

＜方法＞

ジルコニアセラミックス（Zpex smile、TOSOH）焼結体表面を耐水研磨紙（＃600）にて研削した後、気圧 0.2 MPa、粒径 50 μm アルミナを 10 mm の距離から 20 秒間のアルミナサンドブラスト処理を行った。超

音波洗浄（脱イオン水 5 分、エタノール 2 分）にて被着体を洗浄した後、無処理（Con）群、ヒト唾液に 10 分間浸漬し水洗した汚染（HS）群、唾液汚染後イボクリーン（Ivoclar Vivadent）を用いて業者指示通りに洗浄した（IC）群、同様にマルチエッチャント（YAMAKIN）を用いて洗浄した（ME）群の 4 群に分け、接着面はマスキングテープを用いて直径 4 mm、セメント厚さ 100 µm に規定した。ステンレス棒の表面もサンドブラスト、洗浄後アロイプライマー処理を行い、パナビア SA セメントプラス（SACP, Kuraray Noritake Dental）、リライエックスユニセム 2（RXU2, 3M ESPE）、スピードセムプラス（SPCP, Ivoclar Vivadent）にて被着体に接着させた。光照射（Optilux501、600 mW/cm$^2$、40 秒）を行ったのち、室温にて 30 分放置し、脱イオン水中にて 24 時間保管を行った。万能試験機（AUOTOGRAPH AGS-J SHIMADZU）にてクロスヘッドスピード 2 mm/min にて引張り接着試験を行い（n=10）、光学顕微鏡（SMZ1000 Nikon)にて破壊形態の観察を行った。引張り接着試験の結果は 2 元配置分散分析（2way-ANOVA）と Bonferroni 補正を行った t 検定を有意水準 5%にて統計解析した。

表面分析においては、ジルコニアセラミックス表面を耐水研磨紙（#600）にて研削した後、超音波洗浄（脱イオン水 5 分、エタノール 2 分）を行い、同様に Con、HS、IC、ME の 4 群に分けた後、XPS による解析を行った。

＜結果＞

引張り接着試験においては、Con 群において全てのセルフアドヒーシブレジンセメントが高い接着強さを示し、HS 群では有意に低下した。IC 群では HS 群に比べて有意に接着強さの回復が認められたが、ME 群では HS 群と比較して有意な差は認められなかった。破壊形態においては Con 群と IC 群で全てレジンセメントの凝集破壊を認め、HS 群と ME 群では全て界面破壊を認めた。XPS による表面分析では、HS 群で Con 群に比べて P/Zr 比と N/Zr 比が上昇し、IC 群と ME 群で値の減少が認められたが、どちらの値も ME 群が IC 群に比べてわずかに高い値を示した。

＜考察＞

リン酸機能性モノマーである MDP は、歯質中のハイドロキシアパタイトに対する高い化学反応性を持ち、安定した高い接着強さを示すためにセルフエッチングプライマーの主成分として使用されている。また、MDP 中に存在する接着性官能基であるリン酸基は酸化ジルコニア表面の水酸基と結合し化学吸着するため、MDP を含有したプライマーをジルコニアセラミックスの表面処理剤として使用することで有効な接着性能を示すことも報告されており、現在ではジルコニアセラミックス用の市販の表面処理剤の多くに含有されている。セルフアドヒーシブレジンセメントは、MDP などのリン酸機能性モノマーを含有させることによって、プライマー処理無しでも歯質や金属、およびジルコニアに接着する能力を有する。

引張り接着試験では、Con 群では全てのセルフアドヒーシブレジンセメントで高い接着強さを示した。さらに、破壊形態は全ての試料においてレジンセメント内での凝集破壊であった。HS 群では、接着強さが有意に低下し、全ての試料においてジルコニアセラミックスとレジンセメント間での界面破壊が観察された。しかし、RXU2 は他の 2 つのセメントよりも高い接着強さを示している。これは、RXU2 には MDP とは異なるリン酸機能性モノマーが含有されているため、MDP を含有している他の二種のセメントとは異な

る挙動を示した可能性がある。XPS による表面分析においては、HS 群では Con 群よりも高い N/Zr 比を示した。したがって、ジルコニアセラミックス表面に吸着した唾液タンパク質の汚染により、セルフアドヒーシブレジンセメントの接着性能を阻害した可能性がある。

ジルコニアはリン酸基に対して強い吸着性を示すことから、ジルコニアセラミックス表面に吸着した唾液タンパク質の汚染は、水洗によって完全には除去することができない。よってジルコニア粒子を含有した塩基性洗浄材であるイボクリーンによる洗浄、もしくは追加のサンドブラストが推奨されている。イボクリーンはジルコニア粒子を含有しており、比表面積の大きくなる粒子側にリンタンパク質を吸着させることで、より確実に洗浄することが可能である。IC 群における接着強さは HS 群と比較して有意に増加し、その強さは全てのセメントにおいて同等であった。破壊形態の比較においても、全てのセメントにおいてセメント内での凝集破壊が観察された。

マルチエッチャントは、リン酸系機能性モノマーの１つである MTEP（methacryloyloxy-tetraethylene-glycol-dihydrogen phosphate）を用いた新規酸処理剤である。MTEP のジルコニアに対する吸着性がリンタンパク質の吸着性よりも上位であればリンタンパク質を除去できる可能性がある。ME 群では SPCP を用いた群において HS 群と比較して接着強さが有意に上昇したが、SACP と RXU2 においては有意な変化は認められなかった。また、全てのセメントにおいてジルコニアセラミックスとレジンセメント間での界面破壊が認められた。

XPS の解析結果より、すべての群において被着体であるジルコニアセラミックスから Zr ピークが得られた。P は付着したリン酸機能性モノマーおよび唾液中のリンタンパク質の両方に由来するが、N は唾液タンパク質のみに由来する。したがって、Zr ピーク強度によって正規化された N ピーク強度および P ピーク強度を算出することで、ジルコニアセラミックス表面上のリン酸機能性モノマーおよび唾液タンパク質の付着に関する定量的データを示すことが可能である。P/Zr 比は、HS 群で高く、IC および ME 群で低い値となったが、ME 群では IC 群よりわずかに高い値を示した。P/Zr 比は、唾液中のリンタンパク質がジルコニア表面へ吸着するために、HS 群で大きく増加した。ME 群では P/Zr 比が IC 群よりも高い値を示したが、唾液中のリンタンパク質が残留、MTEP のジルコニアセラミックス表面への吸着のどちらが影響したかは今回の実験結果からは判別することが困難である。

N/Zr 比は HS 群において高い値を示したが、IC 群と ME 群ではその値は減少した。しかしながら ME 群の方が IC 群より約 2 倍高い値となった。したがって、マルチエッチャントはイボクリーンよりも唾液汚染を除去する能力が低くジルコニアセラミックス表面にリンタンパク質が残留しており、その結果として接着強さが回復しなかったのではないかと思われる。

＜結論＞

1. 唾液による汚染はセルフアドヒーシブレジンセメント中のリン酸機能性モノマーのジルコニアセラミックスに対する反応を阻害する。

2. 洗浄材を用いることによってジルコニアセラミックスの唾液汚染の影響を改善させることができるが、製品によってその効果は異なることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5537　号 | 髙橋　彬文 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　山下　仁大　　水口　俊介 | |
| 論 文 題 目 | Effect of alumina-blasting pressure on adhesion of CAD/CAM resin block to dentin | |

（論文審査の要旨）

ジルコニアセラミックスは、その高い機械的特性と生体親和性から、修復材料として近年臨床で頻用されている。ジルコニアへの良好な接着を得るためにはアルミナブラスト処理とリン酸機能性モノマーであるMDP の使用が推奨されており、近年ではリン酸機能性モノマーを含有することで前処理を不要と謳うセルフアドヒーシブレジンセメントも開発されている。

臨床の場において想定されるジルコニアセラミックスの口腔内試適時の唾液や血液による汚染は、レジンセメントの接着を低下させる。そのため試適後の汚染を洗浄する材料は開発されているが、ヒト唾液を用いた比較検討や、XPS を用いて表面解析を行った報告は数少ない。

このような背景の下で、髙橋はジルコニアセラミックスに対する唾液による汚染の影響と洗浄材の改善効果を明らかにするため、3 種類のセルフアドヒーシブレジンセメントを用いて引張り接着強さ、ならびにXPS を用いた表面性状を比較検討した。XPS を用いてジルコニアセラミックスへのヒト唾液汚染とジルコニアセラミックス用洗浄材の比較検討に特化した研究はこれまでに報告がなく、新規性の高い研究である。評価項目は、接着強さならびに表面性状解析であり、その測定方法は過去の報告を基に、今回の研究に際して適切に設定されたものであり、妥当な手法と考えられる。得られた結果に対する統計学的な検討も適切に行われ、十分な情報と知識を背景に、周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。

得られた結果は以下のとおりである。

1．引張り接着強さ：無処理群においては、全てのセルフアドヒーシブレジンセメント間において有意に高い接着強さを示したが、ヒト唾液汚染群（HS）では有意に接着強さの低下を認めた。汚染後イボクリーンで洗浄した群（IC）において接着強さは無処理群と同等の値まで回復が認められたが、汚染後マルチエッチャントで洗浄した群（ME）では有意な回復は認められなかった。また、レジンセメントの破壊形態も、無処理群と IC 群では全てのレジンセメントでセメント内での凝集破壊を示したのに対し、HS 群と ME 群では全てのレジンセメントで、ジルコニアセラミックスとセメント間での界面破壊を示した。

2．表面性状解析：HS 群において P/Zr と N/Zr の値が上昇し、IC 群と ME 群では P/Zr、N/Zr 共に値が減少していた。しかし、無処理群と比較すると高い値であり、ME 群は IC 群と比較して P/Zr、N/Zr 共に

やや高い値を示した。

以上のそれぞれの評価結果の関連性については慎重に考察を展開し、ジルコニアセラミックスの唾液汚染により、リンタンパクがジルコニア表面に吸着しセルフアドヒーシブセメントの接着性能を低下させること、洗浄材はその種類によって表面洗浄効果が異なり接着性の回復にも差が生じることを導き出している。

以上のように本研究は、ジルコニアセラミックスに対する唾液による汚染と洗浄材の影響を明確にするために、2 種の洗浄材と 3 種のセルフアドヒーシブレジンセメントを用いて、引張り接着強さならびに表面性状について詳細に検討することで、唾液汚染されたジルコニアセラミックスに対するそれぞれの洗浄材の挙動ならびに接着前処理において果たす役割を明らかにしたものである。これにより、唾液汚染後のジルコニアセラミックスの各種洗浄材による洗浄効果について、その機序の一端も明らかとなった。これらの成果は、今後の材料の開発、改良に極めて有益なものであり、本研究は今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中村　慎太郎 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　柴田　俊一<br>副 査　　池田　通、池田　正明 |
| 論　文　題　目 | Efficacy of bone regeneration using micro-graft suspension of palatal mucosa in rats |

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

皮膚および歯周組織再生において、少量の自家組織からの micro-graft suspension の有効性が報告されている。本研究の目的は、コラーゲン膜と口蓋粘膜の micro-graft suspension の組み合わせによる骨再生の効果を調べることである。

10 週齢、雄性 Slc:Wistar / ST ラットの口蓋粘膜（2 mm × 3 mm）を採取し、組織粉砕装置（Rigenera®）で粉砕して micro-graft suspension を作成した。円形の骨欠損（直径 5 mm）を頭頂骨にトレフィンバーにて作製し、micro-graft suspension（実験群）または生理食塩水（対照群）に浸漬した円形コラーゲン膜（BIOMEND®）を欠損部位に移植した。移植後 1 週後（n = 5）、4 週後（n = 5）、および 8 週（n = 8）に、マイクロ CT 画像撮影後、骨量を測定し統計学的解析を行った。また別の標本から組織切片を作製し、組織学的に評価した。

移植後 1 週での実験群における新生骨量（3.53 ± 2.11 $mm^3$）は、対照群のもの（0.96 ± 0.18 $mm^3$）より有意に大きかった（$P < 0.05$）。しかしながら 4 および 8 週後においては、両群の骨量に有意差は認められなかった。 移植後 1 週において、実験群では新生骨形成が組織学的にも明瞭に観察されたが、対照群ではほとんど認められなかった。 4 および 8 週後では、対照群でも新生骨形成が認められ、両群の間に組織学的な差異は認められなかった。

本結果は、口蓋粘膜の micro-graft suspension に浸漬されたコラーゲン膜は、特に移植後早期の促進的な新生骨形成に有効であることを示唆した。

＜緒言＞

歯科インプラント治療は口腔機能を回復させるための有効な方法として確立されている。歯科インプラントの埋入を容易にするために骨増生が必要となる症例がしばしば認められる。骨増生のゴールドスタンダードである自家骨移植においては、拒絶反応はないもののホストへの侵襲が大きく、また骨採取量にも限りがある。一方、同種移植、異種移植、無生物材料移植ではホストに対する侵襲は少なく移植量に制限はない。しかしながら、同種移植や異種移植では拒絶反応や感染の可能性があり、無生物材料移植のみでは足場としの機能はあるものの幹細胞による十分な再生が期待できないこともあり、理想的とはいえない。

近年様々な自家移植装置が開発され、その 1 つに自家組織粉砕装置 (Rigenera®) がある。本装置は少量の組織から細胞構成成分を抽出することができ、この細胞集団は細胞分化能および組織治癒促進能力の両方を有する可能性があることが報告されている。

そこで本研究は、自家組織粉砕装置から抽出された口蓋粘膜の細胞成分と足場としてのコラーゲン膜とを組み合わせることにより、最小の侵襲、安全かつ効率的な方法で骨増生を行うことが可能になるのではないかという仮説に基づいて計画された。

＜材料および方法＞

イソフルランにて吸入麻酔を行い、次いでケタミンおよびキシラジンを筋肉内注射後、10 週齢雄性 Slc:Wistar/ST ラットの口蓋粘膜を 2 mm×3 mm の大きさで採取後、組織粉砕装置 (Rigenera®;Human Brain Wave, Torino, Italy) で粉砕し、micro-graft suspension を作成した。次に直径 5 mm の骨欠損を頭頂骨の両側にトレフィンバーにて作成し、円形に切ったコラーゲン膜 (BIOMEND®; Zimmer Dental Inc, California, America)を micro-graft suspension に浸漬したものを実験群、生理食塩水に浸漬したものを対照群とし、左右無作為に欠損部に移植した。移植後 1 週 (n=5), 4 週 (n=5) および 8 週 (n=8)でラットを安楽死させ、マイクロ CT 撮影後、欠損部位に新生した総骨量を計測した。Independent t-test にて統計学的に解析し、平均値 ± SD で評価した。その後、組織を摘出し固定、脱灰後パフラフィン包埋を行い、矢状断切片作成後にヘマトキシリン・エオジン染色を施して新生骨組織を組織学的に評価した.

＜結果＞

マイクロ CT による放射線学的観察においては, 移植後 1 週での平均新生骨量が実験群で 3.53 ± 2.11 ㎣, 対照群で 0.95 ± 0.18 ㎣であり、有意に実験群が大きかった（$P < 0.05$）。移植後 4 週 (実験群 : 14.12 ± 1.39 ㎣, 対照群 : 12.39 ± 1.32 ㎣) および 8 週(実験群 : 16.13 ± 2.62 ㎣, 対照群 : 18.13 ± 4.38 ㎣) においては両群間に有意差は認められなかった.

組織学的観察において、移植後 1 週の実験群では骨欠損部の周辺部分から新生骨の形成が明瞭に認められたのに対し、対照群では線維性結合組織が脳に面する移植膜の下面に認められるのみで、新生骨の形成はほとんど認められなかった。移植後 4 週では両群共に新生骨の形成が進み、既存骨との境界が不明瞭になっていた。骨の形成量も両群間に差は認められなかった。移植後 8 週では 4 週齢と同様に両群の骨形成状態に顕著な差は認められなかった。

＜考察＞

近年、組織幹細胞に関する研究が盛んになり、傷害組織の自己再生能力が研究されている。本研究で使用された Rigenera®プロトコールの背後にある論理的根拠として、ホスト側の間葉系幹細胞の多分化能がホスト側の細胞分化を促進する可能性が示唆されている。このプロトコールは、特に組織修復のための新しい手術戦略を開くものと推奨されている。実際例として、Rigenera®プロトコールは、移植された髪の毛の生着を促進したり、病的瘢痕を改善したりするための美容外科手術にも適用されている。また、創傷治癒を改善するこれらの micro-graft の能力は細胞が機械的解離にさらされても、高い細胞生存率が維持され得ることを示す *in vitro* の結果によって支持さ

れている。さらに、これらの micro-graft は、CD90、CD73、および CD105 などの間葉系幹細胞マーカーが発現しており、それらが高い組織再生能力を示す可能性が論じられている。しかし、硬組織再生へ応用した研究は非常に少ないのが現状である。そこで申請者らは主に軟組織の再生に有用であるとされてきたこの方法を、硬組織再生への応用を検討するために本実験を計画した。

移植後 1 週で、実験群は、マイクロ CT による放射線学的測定および組織学的所見の両者の見地から、新生骨形成の増強を示すことが明らかとなった。しかし、移植後 4 週および 8 週の新生骨形成に関しては、放射線学的測定において両群間に統計学的有意差はなく、組織学的所見でも両群間に顕著な差は認められなかった。これらの所見は、micro-graft suspension の適用が特に早期の骨治癒を促進させることを示唆するものである。

ラットに使用された critical size defect は直径 8 mm であったが、直径 8 mm の欠損を形成すると矢状縫合にまたがり、大量出血の可能性が増したため、本実験では直径 5 mm の欠損を選択した。移植後 8 週までの調査に関しては、従来から直径 5 mm で十分であることが示唆されている。

今後、この micro-graft suspension を臨床応用するためには、特に in vivo での早期骨治癒のメカニズムの解明が必要となる。さらに micro-graft suspension と骨代替材料の組み合わせが骨増強の治療期間を短縮するかどうかも興味深いテーマであり、今後の追加実験を計画している。

＜結論＞

口蓋粘膜由来の micro-graft suspension に浸漬したコラーゲン膜は，特に移植後早期の新生骨形成を促進する事が明らかとなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5538　号 | 中村　慎太郎 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　柴田　俊一<br>副 査　　池田　通、池田　正明 | |
| 論 文 題 目 | Efficacy of bone regeneration using micro-graft suspension　of palatal mucosa in rats | |

（論文審査の要旨）

皮膚および歯周組織再生において、少量の自家組織を粉砕して移植に応用する micro-graft suspension の有効性が報告されている。そこで申請者は担体としてのコラーゲン膜と口蓋粘膜の micro-graft suspension の組み合わせによる骨再生の効果を調べることを目的として本実験を計画した。

本研究ではまず 10 週齢、雄性 Slc:Wistar / ST ラットの口蓋粘膜（2mm×3 mm）を採取し、組織粉砕装置（Rigenera®）で粉砕して micro-graft suspension を作成した。その後、頭頂骨に円形の骨欠損（直径 5 mm）を作製し、micro-graft suspension （実験群）または生理食塩水（対照群）に浸漬した円形コラーゲン膜（BIOMEND®）を欠損部位に移植し、その後の経時変化をマイクロ CT 画像と組織切片にて評価した。

本研究において、申請者が先行研究で示されている micro-graft suspension の有効性を十分に理解し、骨形成再生のための実験･解析方法について事前に十分な検討を重ね、適切な研究計画の下で本実験を遂行したことは高く評価できる。

本研究の主たる結果は以下の通りである。

1. 移植後1週での平均新生骨量が実験群で3.53 ± 2.11 ㎣，対照群で0.95 ± 0.18 ㎣であり，有意に実験群が大きかった（P <0.05）。

2. 移植後 1 週の実験群では骨欠損部の周辺部分から新生骨の形成が明瞭に認められたのに対し、対照群では線維性結合組織が移植膜の下面に認められるのみで、新生骨の形成はほとんど認められなかった。

3. 移植後 4 週 (実験群：14.12 ± 1.39 ㎣，対照群：12.39 ± 1.32 ㎣) および 8 週(実験群：16.13 ± 2.62 ㎣，対照群：18.13 ± 4.38 ㎣) での新生骨量は両群間に有意差は認められなかった.

4. 移植後 4 週では両群共に新生骨の形成が進み、既存骨との境界が不明瞭になっていた。骨の形成量も両群間に差は認められなかった。

5.　移植後 8 週においても両群間の新生骨量および組織学的所見に差は認められなかった

以上の結果から口蓋粘膜由来の micro-graft suspension に浸漬したコラーゲン膜は，特に移植後早期の新生骨形成を促進する事が明らかとなった。

近年、組織幹細胞に関する研究が盛んになり、傷害組織の自己再生能力が研究されている。本研究で使用された Rigenera®プロトコールは、従来移植された髪の毛の生着を促進したり病的瘢痕を改善したりするための美容外科手術など軟組織の再生に有効であることが示唆されてきた。本研究において申請者はこの術式が骨組織の再生においても、特に早期の再生促進に有効に作用する事を明らかにした。また早期の骨再生においては特に欠損部位の周辺部から骨形成が認められる事が明らかとなり、この術式における新生骨形成の様式に関しても新しい知見を明らかにした。

歯科臨床特にインプラント治療では、インプラントの埋入を容易にするために骨増生が必要となる症例がしばしば認められる。自家骨移植は拒絶反応こそないもののホストへの侵襲が大きく、同種移植、異種移植、無生物材料移植ではホストへの侵襲は少ないものの、拒絶反応や感染の危険性が考えられる。骨形成の促進がインプラント治療の成績向上に貢献することはいうまでもないが、より低侵襲でなおかつ安全性の高い処置によりその目的を達成することが求められている。

本研究はそのような背景をもとに計画されたもので、口蓋粘膜由来の micro-graft suspension とコラーゲン膜を用いた低侵襲で安全性の高い方法が骨形成の早期新生骨形成に有効である事を明らかにした初めてのものである。

以上の結果は本手法の臨床応用へ向けた基礎研究へのエビデンスを提供するとともに、今後のインプラント治療および歯周組織等の再生医療分野に大きく貢献する可能性を示すものである。

よって本論文は博士 (歯学) の学位申請を行うにあたり、十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 松原　麻梨子 |
| 論文審査担当者 | 主査　　古屋　純一<br>副査　　原田　浩之　　下山　和弘 |
| 論　文　題　目 | High- speed jaw-opening exercise in training suprahyoid fast-twitch muscle fibers |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

摂食嚥下リハビリテーションの方法として、舌骨上筋群に対するトレーニングは重要な事項である。なかでも、最も代表的なものが頭部挙上訓練である。しかし、近年の報告から、頭部挙上訓練は、胸鎖乳突筋に疲労が蓄積するまで行わないと訓練のターゲットである舌骨上筋群に負荷がかからないことが示されている。そのため著者らは、開口筋が舌骨上筋であることに着目して、舌骨上筋群の筋力強化を目的とした開口訓練を開発した。訓練のタスクは、等尺性運動として最大限の開口を 10 秒間保持して 10 秒休むのを 5 回繰り返し、それを 1 セットとして、1 日あたり 2 セットを 4 週間継続とした。その結果、嚥下時の舌骨上方移動量、食道入口部開大の前後径が有意に増加し、さらに食塊の咽頭通過時間も短縮した。以上より、舌骨上筋のトレーニングとしての等尺性の開口運動が舌骨上筋への訓練タスクとして有用であることが明らかとなった。しかし、加齢に伴う筋線維の萎縮は、速筋線維が選択的に減少するため、速筋線維が筋組成の半数以上を占める舌骨上筋はサルコペニアの影響を受けやすく、加齢により嚥下反射時の舌骨挙上速度は低下しやすいと考えられる。従来の等尺性の最大開口を訓練タスクとした従来の開口訓練は、速筋線維を標的としたトレーニングであるとはいいがたく、速筋線維を標的とした開口訓練法が求められる。以上の背景から、本研究では、速筋の収縮を目的とした High-speed Jaw-opening Exercise（間歇的口訓練）が嚥下機能の改善に有用であるかを検討した。

<対象と方法＞

被検者は食事時のムセや食べ物がのどに残るといった嚥下障害に関連する症状を自覚して某病院を受診した地域在住高齢者（女性 11 名、男性 10 名)で、平均年齢 74.0±5.7 歳であった。被検者は可能な限り素早く最大開口位まで開口するのを 20 回行い、その後 10 秒間安静にした。これを 1 セットとして 3 セットの訓練を 1 日 2 回行い、4 週間継続させた。訓練効果は訓練前と訓練開始 4 週間後の側面像の嚥下造影検査の結果から解析した。 解析時の基準平面にはカンペル平面を用いた。カンペル平面は耳珠上縁と鼻翼下縁を通る直線であるため両部位に直径 6mm の円盤状の鉛を貼り付け、それらを通るカンペル平面を X 軸、耳珠上縁を通りカンペル平面から引いた垂線を Y 軸とした。また 14.3mm の金属球を頸部に貼付け、事後の計測時にレントゲン画像の倍率の補正を行った。嚥下時の被験者の姿勢は座位とし、透視しながらネクター状のバリウム含有液（40% w/v）5ml を 2 回嚥下させ、頸部側面から 30 コマ/秒の速さでX線映画撮影を行い、動画としてデジタルビデオレコーダーに録画し、その映像をコンピューターに取り込んで解析した。全ての結果は患者情報を伏せた状態で、検者とは別の一人の歯科医師が嚥下造影検査の評価を行った。 統計解析には SPSS Statistics20.0J を用いて、訓練前後におけ

る、安静時の舌骨位、嚥下時における舌骨の上方移動量、前方移動量、食塊咽頭通過時間、舌骨挙上時間、食道入口部開大量、舌骨の挙上速度を Wilcoxon の符号付き順位検定にて検討した。また、効果量は Cohen's *d* を用いて検討した。なお、有意水準は $p<0.05$ とした。

＜結果＞

21 人全員が 1 日 2 セットの訓練を施行することが可能であった。また、4 週間の訓練期間中、顎関節の疼痛を訴えたものはいなかった。間歇的開口訓練後、以下のような効果が有意に得られた。

・安静時の舌骨の上下的な位置における上方移動
・嚥下時の舌骨の上方移動量の増加
・嚥下時の食道入口部開大量の増加
・嚥下時の舌骨の挙上速度の増加
・嚥下時の舌骨挙上時間、食塊咽頭通過時間の短縮

なお、嚥下時の舌骨の前方移動には訓練による有意な改善は認められなかった。

＜考察＞

High-speed Jaw-opening Exercise の回数は過去の著者らの報告を参考とした。健常者に舌骨上筋群の表面電極を測定しながら、2 秒に 1 回最大開口位まで開口運動を行わせ、筋疲労時に周波数が低下する平均パワー周波数 MPF(Mean Power Frequency)を算出したところ、オトガイ下および舌骨下導出のいずれも平均 20 回で MPF が低下したため、1 訓練単位を 20 回と設定した。20 回という回数が必ずしも最良の回数とは断定できないが、今回設定した 20 回の High-speed Jaw-opening Exercise は少なくとも訓練タスクとして有用であった。また、顎関節症状を訴えた患者もおらず、脱落者もいなかったことから、安全かつ継続しやすいタスクであったと考えられた。High-speed Jaw-opening Exercise が舌骨の安静時の位置を上方へ移動させたことは、特に顎舌骨筋の筋委縮、筋の張力などを改善させた可能性がある。今後、訓練が筋肉の質や量に影響を及ぼすかを検討する必要がある。本研究では、嚥下時の舌骨挙上量も増加したため、開口という訓練タスクは舌骨を上方に移動させる効果が高い。そのため、High-speed Jaw-opening Exercise は、舌骨の安静時の位置が低下した高齢者や嚥下時の舌骨挙上量の低下が誤嚥の原因となるような高齢者に対して特に効果的な訓練であると考えられる。これまでの研究で一般的に筋力は 30 歳代から徐々に低下し始め、50 代からその低下の割合が高くなり、30 歳代から 80 歳代までで約 30−50%低下することが示されている。加齢による筋力低下を引き起こす要因は、骨格筋の要因としては筋線維の組成の遅筋化、筋量の減少があげられる。高齢になると筋線維は選択的に速筋線維に顕著な萎縮が認められるのに対し、遅筋線維は加齢の影響を比較的受けにくい。また、加齢に伴う萎縮の著しい筋に頸部筋群が含まれており、速筋線維が筋組成の半数以上を占める舌骨上筋は、サルコペニアの影響を受けやすく、加齢により嚥下反射時の舌骨挙上速度は低下するため、嚥下機能への影響は必須と考えられる。実際に、筋の収縮速度は加齢により低下するという報告は数多く、今回の訓練でも嚥下時の舌骨の挙上速度が有意に増加したため、舌骨上筋に対する間歇的な運動は速筋に作用する可能性があると考えられた。

嚥下時の舌骨挙上量を改善する訓練方法には頭部挙上訓練や開口訓練がある。舌骨挙上の速度を改善するための訓練の報告としては過去に電気刺激療法や MDTP(McNeill dysphagia therapy program)がある。電気刺激法は電気刺激装置が必要で、簡易でない。また、MDTP は食品を嚥下させるプログラムであり、経口摂取困難者には不適当であることから対象者が限定される。本法は訓練場所も限定されず器具も不要であり、経口摂取困難者にも誤嚥のリスクなく訓練可能であり安全にかつ簡易にできる訓練方法であ

る。その点からも、本訓練方法は、高齢者に対して特に効果的な訓練であると考えられ、また、嚥下時の舌骨挙上速度が低下した脳卒中患者や気管切開を有する患者に対しても有用であると考えられた。

今回の研究は健常から軽度の嚥下障害者に対して訓練効果を見たものであるため、誤嚥を呈するような重度の嚥下障害者への効果は検証していない。また、過去に我々が行った等尺性開口訓練と今回の間歇的開口訓練の適応を明確には区別できていない。さらに、筋肉の収縮速度は嚥下造影の解析により間接的に評価している。今後は嚥下造影のみならず筋力測定、またエコーなどを用いた筋量や筋肉の質などを用いて訓練効果を検討する必要がある。

＜結論＞

間歇的開口訓練により、安静時の舌骨の上方への位置移動、嚥下時の舌骨の上方移動量、挙上速度、食道入口部開大量の増加、舌骨挙上時間、食塊咽頭通過時間の短縮において有意な差を認めた。これらの結果より間歇的開口訓練は舌骨上筋群の速筋の筋力強化に対して効果的であることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5539　号 | 松原　麻梨子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　古屋　純一<br>副査　原田　浩之　　下山　和弘 | |

（論文審査の要旨）

摂食嚥下障害へのアプローチとしては、舌骨上筋群に対するトレーニングが重要であり、最も代表的なものが頭部挙上訓練である。しかし、近年の報告から、頭部挙上訓練は、胸鎖乳突筋に疲労が蓄積するまで行わないと、訓練のターゲットである舌骨上筋群に負荷がかからないことが示されている。また、頭部挙上訓練は、高齢者では行うことが困難な場合もあり、代替できる舌骨上筋群のトレーニング法が求められている。松原らの研究グループは、先行研究で舌骨上筋が開口筋であることに着目し、舌骨上筋群の筋力強化を目的とした開口訓練を開発した。訓練タスクは、等尺性運動として最大限の開口を 10 秒間保持して 10 秒間休む運動を 5 回繰り返すものであり、それを 1 セットとして、1 日あたり 2 セットを 4 週間継続した結果、嚥下時の舌骨上方移動量、食道入口部開大の前後径が有意に増加し、さらに食塊の咽頭通過時間も短縮したことが明らかとなっている。しかしながら、高齢者に多くみられる加齢に伴う筋線維の萎縮は、速筋線維が選択的に減少することから、速筋線維が筋組成の半数以上を占める舌骨上筋はサルコペニアの影響を受け、加齢により嚥下反射時の舌骨挙上速度は低下しやすいと考えられる。そのため、従来の等尺性の最大開口を訓練タスクとした開口訓練は速筋線維を標的としたトレーニングであるとはいいがたく、速筋線維を標的としたより効率的な開口訓練法が求められる。以上の背景から、松原は、速筋の収縮を目的とした High-speed Jaw-opening Exercise（間歇的開口訓練）が嚥下機能の改善に有用であるかを検討した。

被検者は食事時のムセや食べ物がのどに残るといった嚥下障害に関連する症状を自覚して某病院を受診した地域在住高齢者 21 名（平均年齢 74.0±5.7 歳）である。間歇的開口訓練として、被検者に可能な限り素早く最大開口位まで開口する運動を 20 回行わせ、その後 10 秒間安静にさせた。これを 1 セットとして 1 回 3 セットの訓練を 1 日 2 回行わせ、4 週間継続させた。訓練効果の判定は、訓練前と訓練開始 4 週間後の嚥下造影検査の結果から行った。解析方法は、先行研究に準じ、座位にてネクター状のバリウム含有液（40% w/v）5ml を用いて嚥下造影検査を行い、安静時の舌骨位、嚥下時における舌骨の上方移動量、前方移動量、食塊咽頭通過時間、舌骨挙上時間、食道入口部開大量、舌骨の挙上速度を計測し、訓練前後での値について統計解析を行った。

結果として、間歇的開口訓練により、安静時の舌骨位置の上方移動、嚥下時の舌骨の上方移動量の増加、食道入口部開大量の増加、嚥下時の舌骨挙上速度の増加、舌骨挙上時間の短縮、食塊咽頭通過時間の短縮が有意に認められた。

以上の結果より、松原は、本研究で用いた間歇的な開口訓練は舌骨を上方に移動させる効果が高く、舌骨の安静時位置が低下した高齢者や、嚥下時の舌骨挙上量の低下が誤嚥の原因となるよ

うな高齢者に対して特に効果的な訓練であると考察した。速筋線維が筋組成の半数以上を占める舌骨上筋は、サルコペニアの影響を受けやすく、加齢により嚥下反射時の舌骨挙上速度は低下する。本研究では、間歇的開口訓練により、嚥下時の舌骨挙上速度が有意に増加したことから、舌骨上筋に対する間歇的な開口運動は、速筋線維に効果的に作用する可能性を示唆している。間歇的開口訓練による速筋線維への訓練効果の詳細については、超音波診断を用いた筋質などの解析が必要ではあるが、嚥下造影検査による間接的な評価ではその効果の可能性を有意に示唆できるものであった。特に、間歇的開口訓練は、従来の訓練法の短所であるポータビリティや安全面を解決するものであり、その有用性が示唆される。

以上のように本研究は、摂食嚥下障害患者の嚥下機能訓練方法を検討した重要な研究であり、高齢者歯科学のみならず、今後の歯科医学の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられた。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小笠原　毅 |
| 論文審査担当者 | 主査　　春日井　昇平<br>副査　　宇尾　基弘　　笛木　賢治 |
| 論　文　題　目 | Shape Optimization of Bone-Bonding Subperiosteal Devices with Finite Element Analysis |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

歯科矯正用アンカレッジデバイスとして開発された骨膜下デバイスは，デバイス周囲に誘導される新生骨によって母骨表面に固定されることでアンカレッジとして使用されるため，矯正力の負荷に対抗する高い骨接合強度が必要となる．本研究は，有限要素解析を用いて様々な断面形状の骨膜下デバイスの骨接合強度を評価し，最適な断面形状を求めることを目的とした．ラット頭蓋骨骨膜下において新生骨と骨接合したチタンロッドの組織切片から得られた，新生骨および頭蓋骨形態の計測値をもとに，有限要素解析ソフトウェアを用いて，新生骨と骨接合したチタンロッドの三次元解析モデルを構築した．このシミュレーションモデルを用いて，チタンロッドの断面形状を円形，楕円形，半円形，および長方形とし，骨表面に平行な矯正力を負荷する応力解析を行った．新生骨の応力分布からチタンロッドの骨接合強度を計測するとともに，新生骨の高さを変化させた際の骨接合強度の変化についても評価を行った．その結果，長方形の断面形状を有するチタンロッドは，新生骨の高さに依存することなく最も高い骨接合強度を示した．以上より，長方形断面が骨膜下デバイスとして高い骨接合強度を得るのに最適な形状であることが示唆された．

＜緒言＞

近年，矯正歯科治療において，骨に固定源を求めるアンカレッジデバイスが広く用いられている．このうち歯槽骨内に埋入するスクリュータイプのデバイスが最も広範に使用されているが，歯根や歯胚を損傷する危険性を有することより，歯根が近接した症例や混合歯列期の症例での使用は困難と考えられる．これに対して骨膜下デバイスは，デバイス周囲に誘導される新生骨によって母骨表面に固定されるため，歯槽骨内への埋入を必要としない安全性の高いデバイスと考えられるが，現在の装置では骨接合に約 3-4 ヶ月という長時間を要する．一方，高い骨誘導能を有

するハイドロキシアパタイト/コラーゲンナノ複合体（HAp/Col）をコーティングした円形断面のチタンロッドは，ラット頭蓋骨骨膜下において設置後 4 週間という短期間で骨接合することが明らかとなり，骨膜下デバイスへの応用も期待される．しかし力学的試験の結果より，円形断面のチタンロッドはスクリュータイプのデバイスと比較して骨接合強度が小さく，アンカレッジデバイスとして用いるためには骨接合強度の増強が必要と考えられた．先行研究では，ロッドの断面形状を円形から半円形へ変更することで骨接合強度が増強したことが報告されており，断面形状を最適化することで骨膜下デバイスへの応用が実現する可能性が示唆された．よって本研究は，有限要素解析を用いて，新生骨と骨接合したチタンロッドの三次元モデルを構築し，異なる断面形状を有するチタンロッドの骨接合強度を評価することで，骨接合強度を増強する上で最適な骨膜下デバイスの断面形状を明らかにすることを目的とした．

＜方法＞

ラット頭蓋骨骨膜下において新生骨と骨接合したチタンロッドの組織切片より，画像解析ソフトウェアを用いて，頭蓋骨の厚み，新生骨の高さの最大値，最小値，およびチタンロッドへの接触角を計測した．その計測値により新生骨および頭蓋骨形態を決定し，有限要素解析ソフトウェアを用いて頭蓋骨骨膜下に設置されたチタンロッドの三次元解析モデルを構築した．解析にあたり，ロッドの断面形状は，直径 0.5 mm の円形（Cr 群），幅 1.0 mm，高さ 0.5 mm の楕円形（El 群），半円形（Sc 群），および長方形（Rc 群）の４種類とした．ロッドの長さは 12.0 mm とし，両端を 3.0 mm ずつ新生骨から突出させた．全群において，ロッド周囲の新生骨および頭蓋骨の形態は等しくなると仮定したが，ロッド周囲の新生骨は継時的に増加する可能性があるため，組織形態計測項目の一つである新生骨最大高さを，345 μm～525 μm の間で 20 μm ずつ変化させた解析モデルを各群で構築した．構築した解析モデルは四面体要素からなり，各群の要素数および節点数は，新生骨最大高さによって増減させた．材料定数として，ロッドには Grade 2 純チタン，新生骨と頭蓋骨にはラット皮質骨のヤング率，降伏応力およびポアソン比の文献値を用いた．また，全ての材料は均等な等方性線形弾性体であるとした．境界条件は，拘束条件として頭蓋骨底面を完全拘束し，荷重条件として，ロッドの両側突出部に頭蓋骨表面と平行かつロッドの長軸に垂直な方向へ 1N の負荷を行った．

骨接合強度は，骨接合した新生骨が破壊された時の荷重であると定義される．骨接合した新生骨の破壊は，ロッドと新生骨の接合界面および新生骨内の破壊により生じると考えられるため，まずロッドと新生骨が完全接着状態にあると仮定して応力解析を行い，得られた最大ミーゼス応力で新生骨の降伏応力を除して，骨接合界面の破壊強度を求めた．次にロッドと新生骨の接触面を，荷重への抵抗側は摩擦接触状態，反対側は応力自由状態の条件下で解析を行い，同様の除法を行うことで新生骨の破壊強度を求めた．その後，両破壊強度および応力分布を比較することで，骨接合強度と破壊部位を評価した．

＜結果＞

骨接合強度に関しては．全ての群で共通した結果が認められた．まず．骨接合界面の破壊強度に関しては，ロッドと新生骨の界面に最大応力が生じたことから，同部位が最初に破壊されることが示された．また，新生骨の破壊強度に関しては，抵抗側の新生骨に最大応力が生じたことから，同部位で破壊が生じると考えられた．さらに，骨接合界面の破壊強度は新生骨の破壊強度より高い値を示したことから，骨接合界面の破壊強度がデバイスの骨接合強度であり，界面の破壊後直ちに新生骨の破壊が生じると考えられた．

新生骨最大高さと骨接合強度の関係に関しては，全ての群で新生骨最大高さの増加に伴い骨接合強度も増加する傾向が認められた．また骨接合強度は，各新生骨最大高さにおいて， Rc 群が常に最大値を示し，続いて Sc 群，El 群，Cr 群の順であった．以上全ての解析において，演算処理は中断することなく遂行された．

＜考察＞

先行研究における動物実験では，円形断面ロッドは 16.4 N，半円形断面ロッドは 46.8 N の骨接合強度を有していた．一方，これらに対応する本研究のモデルでは，Cr 群では 15.1 N，Sc 群では 39.0 N の骨接合強度を有するという結果が得られた．さらに，力学試験での骨破壊部位と，本研究における Cr 群，Sc 群の骨破壊想定部位は一致していた．以上より本研究で用いた解析方法は，骨接合強度を円形断面で 92.1 ％，半円形断面で 83.3 ％の精度で推定し，新生骨破壊部位の正確な予測が可能であると言えた．断面形状の変更による骨接合強度の増強が再現されたため，本解析手法は適切であると考えられた．

しかしながら，骨接合強度の実測値と推定値に僅かながら差が生じるという問題点が認められた．その原因として，力学試験における実際の骨接合の破壊様相を，有限要素解析で詳細かつ厳密に再現することが困難であることが考えられた．さらに，解析を行う際に用いた材料定数およびロッドと新生骨の接触状態に関する仮定にも何らかの原因があると考えられた．チタンロッド周囲の新生骨は頭蓋骨と同様の lamellar 構造を有していた事から，本研究では新生骨と頭蓋骨の材料定数は等しいと仮定した．また骨接合デバイスについて有限要素解析を行った報告では，新生骨と周囲の母骨を区別して解析していないことも多い．しかし，新生骨と頭蓋骨の力学特性は異なるという報告も散見されることから，この仮定が実測値と推定値の差を生む原因となったと考えられた．また，HAp/Col コーティングチタンロッドと新生骨は，骨膜下において光学顕微鏡レベルで線維組織の介在なく直接接合することから，本研究ではロッドと新生骨の接触状態を完全接着と仮定した．しかし人工歯根では骨接合率は 50 %程度と報告されていることを考慮すると，この仮定も差を生む原因となったと考えられた．

新生骨最大高さと骨接合強度の関係については，Rc 群が新生骨高さに依存せず，常に最も高い骨接合強度を示した．よって，強固な骨接合強度を迅速に獲得するための骨膜下デバイスの断面形状として，長方形が最適であることが示唆された．長方形断面が最も高い骨接合強度を示した理由として，断面形状の剛性を表わす断面二次モーメントの値が最大であったことが挙げられる．すなわち，高い剛性を持つ長方形断面では，荷重負荷時に周囲の新生骨に及ぼす応力が小さくな

るため，結果として高い骨接合強度を示したと考えられた．

本研究の限界として，骨組織の巨視および微視的な構造を考慮すると，非線形弾塑性解析が望ましいが，この方法の適用に必要となる物性値が得られていないため，線形弾性解析を選択せざるを得なかったことが挙げられる．また，骨膜下デバイスの最適な断面形状として長方形が示唆されたが，実際に生体に設置した場合，長方形断面では角が鋭利であるため，軟組織の裂開をきたしデバイスが脱落する等の有限要素解析では知り得ない問題が生じる可能性が考えられる．したがって，臨床で用いるための最終的な形状を決定するためには，動物実験による検討が必要と考えられた．

＜結論＞

有限要素解析により 4 つの異なる断面形状を有するチタンロッドの骨接合強度を評価した結果，荷重に対して高い剛性を持つ長方形断面が，新生骨の高さに依存することなく最も高い骨接合強度を示した．長方形断面が骨膜下デバイスとして高い骨接合強度を得るのに最適な形状であることが示唆された．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5540　号 | 小笠原　毅 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　春日井　昇平<br>副査　　宇尾　基弘　　笛木　賢治 | |
| 論 文 題 目 | Shape Optimization of Bone-Bonding Subperiosteal Devices with Finite Element Analysis | |

（論文審査の要旨）

歯科矯正用アンカレッジデバイスとして開発された骨膜下デバイスは，デバイス周囲に誘導される新生骨によって母骨表面に固定されることでアンカレッジとして使用されるため，矯正力の負荷に対抗する高い骨接合強度が必要となる．本研究は，有限要素解析を用いて様々な断面形状の骨膜下デバイスの骨接合強度を評価し，最適な断面形状を求めることを目的とした．ラット頭蓋骨骨膜下において新生骨と骨接合したチタンロッドの組織切片から得られた，新生骨および頭蓋骨形態の計測値をもとに，有限要素解析ソフトウェアを用いて，新生骨と骨接合したチタンロッドの三次元解析モデルを構築した．このシミュレーションモデルを用いて，チタンロッドの断面形状を円形，楕円形，半円形，および長方形とし，骨表面に平行な矯正力を負荷する応力解析を行った．新生骨の応力分布からチタンロッドの骨接合強度を計測するとともに，新生骨の高さを変化させた際の骨接合強度の変化についても評価を行った．その結果，長方形の断面形状を有するチタンロッドは，新生骨の高さに依存することなく最も高い骨接合強度を示した．以上より，長方形断面が骨膜下デバイスとして高い骨接合強度を得るのに最適な形状であることが示唆された．

本論文で得られた結果は以下の通りである．

１．有限要素解析を用いて骨膜下デバイスの骨接合強度推定手法を構築した．この手法における円形，半円形断面の骨接合強度の推定値と骨破壊想定部位は，先行研究における動物実験で得られた，骨接合強度および骨破壊部位と高い精度で一致し，断面形状の変更による骨接合強度の増強も再現された．よって本解析手法は適切であると考えられた．

２．新生骨高さと骨接合強度の関係については，長方形断面が新生骨高さに依存せず，常に最も高い骨接合強度を示した．その理由として，長方形断面は荷重に対して高い剛性を有するため，荷重負荷時に周囲の新生骨に及ぼす応力が小さくなり，結果として高い骨接合強度を示すものと考えられた．

以上の結果から小笠原毅は本研究において，有限要素解析を用いて骨膜下デバイスの骨接合強度推定手法を構築した．また同手法を用いて，４つの異なる断面形状を有する

チタンロッドの骨接合強度を評価した結果，荷重に対して高い剛性を持つ長方形断面が，新生骨の高さに依存することなく最も高い骨接合強度を示したことから，長方形断面が骨膜下デバイスとして高い骨接合強度を得る上で最適な形状であることを明らかにした．

この成果によって，新しい歯科矯正用骨膜下アンカレッジデバイスが実現すれば，より安全性，有効性の高い矯正歯科治療を実現することができると考えられることから，本研究の着眼点とその成果は高く評価され，歯科矯正学のみならず臨床歯学の重要な学術的基盤となりうると判断された．よって，本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 保母　宏基 |
| 論文審査担当者 | 主査　荒木 孝二<br>副査　俣木 志朗、礪波 健一 |
| 論　文　題　目 | Effects of an interactive simulation material for clinical dentistry on knowledge acquisition and memory retention in dental residents |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

歯科医師に必要な知識と技術の増加に伴って、歯学教育でコンピュータシミュレーション教材が活用され、その有効性が示されてきた。しかしコンピュータシミュレーション教材のどの要素に教育効果があるかは明らかにはなっていない。そこで教材の要素のうち、学習者の意思決定に対してフィードバックが得られるという双方向性に着目し、知識の獲得、記憶の定着、不安の軽減に対する双方向性の効果を検証した。

実験群では意思決定とフィードバックを伴う双方向型教材で学習させ、対照群では双方向性を伴わない表示型教材で学習させ、結果を比較した。教材での学習の直後と３週後の学習効果測定テストの点数は、どちらも双方向型教材学習群（以下、I 群）の点数が表示型教材学習群（以下、D 群）の点数より有意に高かった(直後 $p < 0.001$、3 週後 $p = 0.016$）。被験者が受ける不安についてはI群では学習後の状態不安が有意に軽減し($p < 0.05$)、D 群では有意な変化が認められなかった。

これらの結果より、コンピュータシミュレーション教材における双方向性が、知識の獲得、記憶の定着、不安の軽減に効果があることが示唆された。

＜緒言＞

歯科医師に必要な知識と技術は年々増加しているが、教育の期間は限られている。また、臨床的な知識や技術の獲得には臨床実習が最も効果的と考えられるが、学生や臨床研修歯科医が経験できる症例数は限られている。コンピュータシミュレーション教材は、その効率性、有効性、経験の標準化等の利点から教育機関の負担の軽減や、異なる機関における教育機会の均等化に寄与できる可能性があるため、近年、歯学教材として活用され始めている。東京医科歯科大学では、コンピュータシミュレーション教材が、歯学教育で活用されており、学生から高い評価を得ている。

コンピュータシミュレーション教材による教育効果は多くの研究で示されているが、それらの教材は双方向性、視聴覚素材、疑似体験など、様々な要素から構成されており、これまでの研究では、教材のどの要素に教育効果があるかは明らかにされていない。また、教材の要素の中で双方向性に着目した研究は存在するが、これらの研究における双方向性は限定的なものであった。

そこで我々は、先行研究において、コンピュータシミュレーション教材を用いた学習で、学習者の意思決定に対してフィードバックが得られるという双方向性の要素が、学習直後の知識獲得に効果があることを報告した。しかし、双方向性の要素の、記憶の定着に対する効果は明らかになっていない。また、学習者の不安は成績や実習のパフォーマンスに影響を与えるといわれており、学習者の不安を和らげることも歯学教育における課題である。

そこで、本研究では、学習者が自ら意思決定してフィードバックを得るという、コンピュータシミュレーション教材の双方向性の要素が、知識の獲得、記憶の定着、及び不安の軽減に対して効果があるか否かを検討した。

＜材料と方法＞

コンピュータシミュレーション教材作成支援ツール(SIMTOOM)を用いて双方向型と表示型の 2 種類の展開形式でコンピュータシミュレーション教材を作成した。東京医科歯科大学歯学部附属病院 2015 年度臨床研修歯科医 64 名を対象とし、同意が得られた被験者にはシナリオを提示して症例に遭遇した場面をイメージさせた。

双方向型教材では、その場面で自分が何をすべきかを学習者に意思決定させた。次に進むと自分の決定が適切かどうかがすぐに分かり、意思決定に対する解説をフィードバックとして得ることができた。一方の表示型教材では、双方向型教材と同じ症例を用いるが、次に何をすべきかが順番に提示され、学習者に意思決定させる要素は無かった。学習者に意思決定させること以外は、2 つの教材のすべての教材内容、解説内容、資料画像は同一であり、どちらの教材で学習しても教材終了時に得られる情報に違いが無いように設計した。

学習内容の理解度測定には記述式の学習効果測定テストを用い、不安の測定には新版 STAI-JYZ 状態−特性不安検査（以下、STAI）を用いた。これは被験者が検査時点でどれくらいの不安や緊張、ストレスを感じているかを測定する「状態不安」と、被験者の不安の高まりやすさを予測する尺度である「特性不安」を用いて不安を測定する検査である。

実験は次の手順で実施した。あらかじめ、被験者を、双方向型教材で学習する双方向型教材学習群（I 群）と、表示型教材で学習する表示型教材学習群（D 群）に、無作為に 2 群に分けた。最初に STAI にて特性不安と実験開始時の状態不安を測定した。続いて被験者に、自身が対応すべき場面を想定したシナリオを提示し、その直後の状態不安を測定した後、各々の群の教材で学習させた。教材での学習終了後に、状態不安の測定、学習効果測定テスト、教材評価に関するアンケートを実施した。さらに、3 週後に、記憶の定着を評価するため、教材終了時に実施した学習効果測定テストを再度実施した。

教材実施直後(0w)および 3 週後(3w)の学習効果測定テストの点数の群間比較は Mann Whitney U-test で検定し、3 週後の学習効果測定テストの両群内の点数の変化は Wilcoxon signed-rank test で検定した。特性不安と各測定時点における状態不安の両群間比較は Mann Whitney U-test で検定した。両群内の状態不安の推移は Bonferroni の補正を伴う Wilcoxon signed-rank test で検定した。アンケート結果については、I 群または D 群の回答結果を、肯定的な回答または否定的な回答に分けて、各設問で 2×2 のカイ 2 乗検定を行った。検定には IBM SPSS（バージョン 24）を用いた。

＜結果＞

研究対象者 64 名に対し、掲示にて研究協力を呼び掛けたところ、実験 1 日目には 49 名が参加し、参加者全員から研究協力に対する同意が得られた。3 週後には 1 日目の参加者のうち 32 名が参加した。なお、実験 1 日目に参加した I 群の 1 名に未解答の設問があったため、特性不安、教材実施前の状態不安、学習効果測定テストのデータが得られなかった。その 1 名は 3 週後の実験には参加しなかった。

学習効果測定テストの点数は、教材での学習直後($p < 0.001$)も 3 週後($p = 0.016$）も I 群が D 群に比べて有意に高かった。教材での学習直後と 3 週後の学習効果測定テストの点数の推移は両群とも 3 週後の点数が直後に比べ有意に低下した（I 群：$p = 0.002$、D 群：$p = 0.003$）。

特性不安と各測定時の状態不安については、いずれも両群間に有意差は認められなかった。状態不安の経時的変化は、I 群ではシナリオ提示後に不安が有意に上昇し($p < 0.05$)、教材学習後に有意に低下した($p < 0.05$)。D 群でもシナリオ提示後に不安が有意に上昇した（$p < 0.05$)が、教材学習後は有意な低下は認められなかった。教材評価に関するアンケートの結果では、すべての項目において両群間に有意差は認められなかった。

＜考察＞

本研究の結果から、仮説の通り、コンピュータシミュレーション教材の双方向性の要素が、学習者の知識の獲得、記憶の定着、及び不安の軽減に効果があることが示された。学習者の意思決定とそれに対するフィードバックという双方向性の要素が、知識の獲得だけでなく、記憶の定着や不安の軽減に対しても有効であったと考えられる。

本研究では、学力効果測定テストに、選択式ではなく記述式を採用した。このため、被験者に十分な理解や記憶がないと正答できず、教材の展開形式がもたらす学習効果の違いをより明確に示すことができたと考える。また、あえて動画像を含めず、動画像が学習効果にもたらす影響を排除した。

教材での学習後に、I 群のみで状態不安の有意な低下が認められたことから、教材の双方向性は学習者の不安の軽減にも寄与したと思われる。実際の臨床現場で不安を感じることが多い学生や臨床経験の少ない臨床研修歯科医などが抱える不安を軽減させる方策として、双方向型シミュレーション教材での学習が有効である可能性が示された。

今後は、双方向型シミュレーション教材が技術の修得に対しても効果があるか、また教材のどのような要素が不安の軽減や学習者のパフォーマンスを最大限に発揮させ得るのかを検討したい。

＜結論＞

学習者が自ら意思決定してフィードバックを得る双方向型コンピュータシミュレーション教材は、知識の獲得、記憶の定着、及び不安の軽減に有効であった。コンピュータシミュレーション教材の双方向性の要素が学習効果を高めたと思われる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5541　号 | 保母 宏基 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　荒木 孝二<br>副　査　俣木 志朗、礪波 健一 | |
| 論 文 題 目 | Effects of an interactive simulation material for clinical dentistry on knowledge acquisition and memory retention in dental residents | |

（論文審査の要旨）

歯科医師に必要な知識と技術は年々増加しているが、教育の期間は限られている。また、臨床的な知識や技術の獲得には臨床実習が最も効果的と考えられるが、学生や臨床研修歯科医が経験できる症例数は限られている。コンピュータシミュレーション教材は、その効率性、有効性、経験の標準化等の利点から教育機関の負担の軽減や、異なる機関における教育機会の均等化に寄与できる可能性があるため、近年、歯学教材として活用され始めている。

コンピュータシミュレーション教材による教育効果は多くの研究で示されているが、これまでの研究では、教材のどの要素に教育効果があるかは明らかにされていない。そこで本研究では、学習者の意思決定と、それに対する応答というコンピュータシミュレーション教材の双方向性の要素が、知識の獲得や定着、及び不安の軽減に対して効果があるか否かを検討した。

東京医科歯科大学歯学部附属病院 2015 年度臨床研修歯科医 64 名を研究対象者として参加を募ったところ、49 名が参加した。49 名中、学習者の意思決定を伴う双方向型教材を実施する群（I 群）が 26 名、対照となる意思決定を伴わない表示型教材を実施する群（D 群）が 23 名であった。

対象者の学習効果測定には記述テストを用いた。不安の測定は新版 STAI-JYZ 状態 - 特性不安検査を用いた。これは、ストレス時にどのくらい不安な状態になるか予測する尺度である特性不安と、測定時点でどれくらい不安かを測る尺度である状態不安の 2 種類の尺度を用いて不安度を測るものである。また 4 件法による教材評価アンケートも実施した。3 週後に知識の定着を評価するための学習効果測定を行った。

学習直後ならびに 3 週間後の学習効果測定テストの成績、および特性不安・状態不安に関する両群間比較は Mann-Whitney U 検定で検定し、各時点での状態不安の分析は Bonferroni 法による多重比較後、 Bonferroni 補正を伴う Wilcoxon 符号付順位検定を行った。

その結果、主に以下の通りの結果が得られた。

1）双方向型教材で学習した群の方が、学習直後ならびに 3 週間後の学習効果測定テストの成績が有意に高かった。

2）双方向型教材で学習した群のみ、教材学習後に有意に不安度が低下した。

以上の結果から、学習者が自ら意思決定してフィードバックを得る双方向型コンピュータシミュレーション教材は、知識の獲得、記憶の定着、及び不安の軽減に有効であると結論付けら

れた。

本研究は、意思決定と、それに対する応答というコンピュータシミュレーション教材の双方向性の要素がどのような学習効果をもたらすかという点を客観的指標で評価した研究である。本研究の結果から、コンピュータシミュレーション教材の要素としての双方向性が、知識の獲得や定着、不安の軽減に効果的であることが明らかとなった。本研究の結果は、今後の歯科医学教育における教材開発に活用されることが期待されるものであり、歯科医学教育の発展に寄与すると考えられる。

よって、本論文は博士(歯学)の学位を請求するのに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 荒岡　大輔 |
| 論文審査担当者 | 主査　鈴木　哲也<br>副査　興地　隆史　　宇尾　基弘 |
| 論　文　題　目 | The strategies used for curing universal adhesives affect the micro-bond strength of resin cement used to lute indirect resin composites to human dentin |

（論文内容の要旨）

レジンセメントは、優れた接着性能や審美性、長期耐久性を有することから、間接法歯冠修復のセメンティングに広く用いられている。治療後の修復歯の予知性を高めるために、レジンセメントの接着性能は非常に重要であり、接着操作を行う際には歯質と修復物それぞれに対して適切な表面処理が必要である。近年、歯質だけでなく種々の修復材料に追加のプライマー不要で接着性を有する、「ユニバーサル」ワンステップセルフエッチングアドヒーシブが臨床応用されている。ユニバーサルアドヒーシブの中には、間接法修復のプライマーとしても用いられる商品がある。製造業社によると、これらのユニバーサルアドヒーシブは、対応するレジンセメントとタッチキュアするため、接着前のアドヒーシブへの光照射は不要とされている。先行研究によると、間接法修復において象牙質被着面に塗布したユニバーサルアドヒーシブに光照射した際にレジンセメントの接着性能が向上したことが報告されている。しかし、レジンセメント接着前の間接修復物被着面に塗布したユニバーサルアドヒーシブに対する光照射がレジンセメントの接着性能に及ぼす効果については、現在のところ報告はない。本研究では、間接法コンポジットレジン修復における、象牙質・修復物両面に対するユニバーサルアドヒーシブへの光照射が、レジンセメント接着システムの象牙質微小引張接着強さ及び耐久性に及ぼす効果について検討した。

材料と方法

実験には、Scotchbond™Universal Adhesive(以下 SBU、3M ESPE)をプライマーとして RelyX™Ultimate Adhesive ResinCement（以下 RU、3M ESPE)、CLEARFIL™ Universal Bond(以下 CUB、クラレノリタケデンタル)をプライマーとして PANAVIA™ SA CEMENT（以下 PS、クラレノリタケデンタル）の２種類のレジンセメント接着システムを用いた。

48 本のヒト抜去大臼歯の咬合面のエナメル質を、低速切断機を用いて削除し象牙質平坦面を作製した。その後、#600 の耐水研磨紙で研削し、被着面としたものをランダムに８つのグループに分類した。一方、間接法修復物として、直径 8 mm、厚さ 2 mm のコンポジットレジンディスク（以下 CRD、パールエステ、DA2、トクヤマデンタル）を作製し 37℃水中に一週間保管後、#600 耐水研磨紙を用いて研削し、超音波洗浄とリン酸処理を行い水洗した。業者指示通りに象牙質および CRD の被着面にユニバーサルアドヒーシブを塗布し、ユニバーサルアドヒーシブへの光照

射の有無で４つの群に分類した。象牙質側、CRD 側ともに光照射していないものを $NL_{(D)}NL_{(CR)}$ 群、CRD 側のみに光照射したものを $NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群、象牙質側のみに光照射したものを $L_{(D)}NL_{(CR)}$ 群、象牙質側、CRD 側ともに光照射したものを $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群とした。光照射はハロゲン照射器（Optilux、Kerr 社製）を用いて SBU、CUB どちらも 10 秒間行った。その後、レジンセメントを象牙質被着面に塗布し、CRD 側から 40 秒間光照射した。37℃水中に 24 時間保管した後、0.7×0.7 $mm^2$のビーム状試片を作成し、各グループの半数の試料は 10,000 回のサーマルサイクルを行い、クロスヘッドスピード毎分 1 mm/分で微小引張接着試験を行った。得られたデータは Three-way ANOVA およびボンフェローニの補正を用いて、有意水準５％にて統計処理を行った。微小引張試験終了後の破断試料について、走査型電子顕微鏡（以下、SEM）を用いて破断面観察を行った。CRD の凝集破壊、CRD とレジンセメントの界面破壊、レジンセメントの凝集破壊、象牙質とレジンセメントの界面破壊、象牙質の凝集破壊に分類し、総面積の 70％を超えないものについては混合破壊とした。

また、それぞれのレジンセメントシステムで接着させた象牙質と CRD の接着界面を、SEM を用いて観察し、ユニバーサルアドヒーシブ、レジンセメントの被膜厚さを測定した。

結　果

微小引張接着試験の結果、SBU では、$L_{(D)}L_{(CR)}$ 群が他の群と比較して有意に高い微小引張接着強さ（μTBS）を示し、他の 3 群に有意差は認められなかった。CUB では、$L_{(D)}L_{(CR)}$>$NL_{(D)}L_{(CR)}$>$L_{(D)}NL_{(CR)}$=$NL_{(D)}NL_{(CR)}$ の順に高いμTBS を示した。10,000 回のサーマルサイクルにより、SBU の $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群を除く全ての群でμTBS が減少した。また、破断面の SEM 観察から、$L_{(D)}NL_{(CR)}$ 群では両セメントシステムで、主にレジンディスクとレジンセメントの界面破壊が観察された。一方、$NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群では両セメントシステムで、主に象牙質とレジンセメントの界面破壊が観察された。サーマルサイクル後、PS の $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群でレジンセメント内での凝集破壊が増加し、$L_{(D)}NL_{(CR)}$ と $NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群では両レジンセメントシステムで界面破壊が増加した。象牙質－レジンセメント－CRD 界面の SEM 観察からは、平坦象牙質及び CRD に塗布したユニバーサルアドヒーシブを光照射した際の被膜厚さは SBU で 5-10 μm、CUB では 5μm 以下であり、レジンセメントと合計した接着界面の厚さは両レジンセメントシステムにおいて $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群で約 30 μm であることが判明した。

考　察

両レジンセメントシステムにおいて、$L_{(D)}L_{(CR)}$ 群が最も高いμTBS を示した。接着前に象牙質、CRD 両被着面に塗布されたユニバーサルアドヒーシブへの光照射によって、それぞれのボンド層の重合率が上昇し機械的強度が向上したことが原因と考えられる。過去には、厚さ 2 mm の CRD により、透過光強度が 92%減少したことが報告されており、レジンディスクを透過する光強度は限定的であり、重合が不十分になってしまうことが危惧される。本実験では、厚さ 2 mm の CRD を用いたが、臨床の状況に則してレジンセメントへの光照射はレジンディスク側からのみ行われた。本実験で使用したユニバーサルアドヒーシブとレジンセメントの組み合わせは、タッチキュアシステムを採用しており、光の到達が困難な状況でも重合が促進されるが、$L_{(D)}L_{(CR)}$ 群の μTBS は $NL_{(D)}NL_{(CR)}$ 群より有意に高い値を示したことから、ユニバーサルアドヒーシブに直接光照射を

行うことが、レジンセメントの接着に効果的であると考えられる。

SBU では、ユニバーサルアドヒーシブが片面のみ光照射された $L_{(D)}NL_{(CR)}$ 群と $NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群は、$NL_{(D)}NL_{(CR)}$ 群と有意差のないμTBS を示した。これは、光照射側のユニバーサルアドヒーシブの重合は改善したが、重合が改善されていない非光照射側で破壊が起きたためと考えられる。これは、$L_{(D)}NL_{(CR)}$ 群では CRD－レジンセメントの界面で、$NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群では象牙質－レジンセメントの界面での破壊が SEM で主に観察されたことと一致している。一方、CUB では、$NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群は $L_{(D)}NL_{(CR)}$ 群及び $NL_{(D)}NL_{(CR)}$ 群よりも有意に高いμTBS を示した。これは、CUB の接着強さが、CRD に塗布したユニバーサルアドヒーシブの重合挙動に依存することを示唆している。ユニバーサルアドヒーシブは酸性であるため、レジンセメントとの重合阻害を誘発すると考えられており、CUB の pH（2.3）は SBU の pH（2.7）よりも酸性度が高くなっている。ユニバーサルアドヒーシブは、スミア層の除去をする際に結晶中の Ca と反応し、pH は上昇する。一方、修復物の表面に適用する際は表面の pH は変化しないため、重合阻害が誘発されることは避けられず、より酸性度の高い CUB は SBU と比較して間接修復物への接着強さを低減させる可能性が考えられる。

サーマルサイクル後、SBU の $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群を除いて接着強さが減少した。SBU と用いる RU は疎水性だが、CUB と用いる PS は酸性機能性モノマーを含有しており、前処理不要のセルフアドヒーシブセメントとしても用いることができる。過去の文献によれば、セルフアドヒーシブセメントは、その親水性と酸性度によって吸水劣化を引き起こし、硬化後も機械的強度が低下することが報告されており、本研究においても PS はサーマルサイクル中に吸水し、機械的性質を低下させたものと考えられる。$NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群と $L_{(D)}NL_{(CR)}$ 群ではサーマルサイクル後にμTBS が低下し、非照射側での界面破壊が増加した。これは非照射側でのユニバーサルアドヒーシブ層の不完全な重合が水の拡散を促進し、レジンセメントの機械的特性を低下させ、接着強さの安定性を減少させたことが一因と推測される。

ユニバーサルアドヒーシブへの光照射を行った場合、臨床上、アドヒーシブ層の厚みによる修復物の浮き上がりが懸念される。これまで、CAD/CAM を用いた MOD セラミックインレーの限界や内部セメント厚さについて、60.6-95.2 μm という報告や、従来のクラウンのマージン適合性は 50-100μm という報告がある。本研究では、硬化したユニバーサルアドヒーシブの厚みは、SBU で 5-10 μm、CUB で 5 μm 以下であることが判明し、$L_{(D)}L_{(CR)}$ 群のように、塗布したユニバーサルアドヒーシブの両側を光硬化させた場合でも接着界面の厚さは 30 μm を超えず、間接修復における浮き上がりの影響は小さいことが示唆され、ユニバーサルアドヒーシブへの光照射臨床応用が期待され、多角的な検討が今後必要と考えられる。

結　論

本研究において、以下の結論が導かれた。

1. 象牙質およびレジンディスクに塗布したユニバーサルアドヒーシブの両側を光硬化することで、最も高い接着強さが得られた。
2. ユニバーサルアドヒーシブへの光照射の効果は、ユニバーサルアドヒーシブや被着体の種類に依存し、いずれの組み合わせでも光照射の効果が認められた。
3. サーマルサイクル後、SBU の $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群を除く全ての群でμTBS を低下した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5542　号 | 荒岡　大輔 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　鈴木　哲也<br>副　査　興地　隆史　　宇尾　基弘 | |
| 論 文 題 目 | The strategies used for curing universal adhesives affect the micro-bond strength of resin cement used to lute indirect resin composites to human dentin | |

（論文審査の要旨）

レジンセメントは、優れた接着性能や審美性、長期耐久性を有することから、間接法歯冠修復のセメンティングに広く用いられている。治療後の修復歯の予知性を高めるために、レジンセメントの接着性能は非常に重要であり、接着操作を行う際には歯質と修復物それぞれに対して適切な表面処理が必要である。近年ユニバーサルワンステップセルフエッチングアドヒーシブが臨床応用され、歯質以外の種々の修復物に追加のプライマー不要で接着性を有し、良好な接着性能が報告されている。ユニバーサルアドヒーシブの中には、間接法修復のプライマーとしても用いられる商品がある。製造業社によると、これらのユニバーサルアドヒーシブはタッチキュアするために、接着前のアドヒーシブへの光照射は不要とされている。これまでの研究で、間接法修復において象牙質に塗布したユニバーサルアドヒーシブに光照射した際にレジンセメントの接着性能が向上したという報告がある。しかしながら、レジンセメント接着前の間接修復物に塗布されたユニバーサルアドヒーシブへの光照射がレジンセメントの接着性能に及ぼす影響について、現在のところ報告はない。このような背景から、荒岡は、間接法コンポジットレジン修復に対する、レジンセメント接着システムにおけるユニバーサルアドヒーシブへの光照射が象牙質の接着強さ及び耐久性に与える影響を調べ、検討したもので、その着眼は高く評価できる。使用された２種類のレジンセメントシステムは Scotchbond™Universal Adhesive(以下 SBU、3M ESPE)をプライマーとして RelyX™Ultimate Adhesive ResinCement (以下 RU、3M ESPE)、CLEARFIL™ Universal Bond(以下 CUB、クラレノリタケデンタル)をプライマーとして PANAVIA™ SA CEMENT（以下 PS、クラレノリタケデンタル）であり、臨床的に広く用いられている。直径 8 mm、厚さ 2 mm のコンポジットレジンディスク（以下 CRD、パールエステ、DA2、トクヤマデンタル）を作製し、被着面としている。象牙質およびレジンディスクそれぞれに塗布したユニバーサルアドヒーシブへの光照射の有無で以下のように４つの群に分類している（$NL_{(D)}NL_{(CR)}$群；象牙質側、CRD 側ともに光照射していないもの、$NL_{(D)}L_{(CR)}$群；CRD 側のみに光照射したもの、$L_{(D)}NL_{(CR)}$群；象牙質側のみに光照射したもの、$L_{(D)}L_{(CR)}$群；象牙質側、CRD 側ともに光照射したもの)。その後レジンセメントを象牙質に塗布し、CRD を乗せ、CRD 側から４０秒間の光照射をしている。その後、低速切断機を用いて 0.7×0.7 $mm^2$のビーム状試片を作成し、各グループの半数の試料は 10,000 回のサーマルサイクルにかけ、クロスヘッドスピード 1 mm/分で微小引張接着強さ

（μTBS）を測定している。接着強さの測定方法は過去の文献を考慮しつつ、慎重に設定されたものであり適切な手法といえる。得られた結果に対する統計学的な検討も適切に行われ、専門的な情報と知識を背景に周到な準備のもと本研究が計画、遂行されたことが窺われる。また、それぞれのレジンセメントシステムで接着させた象牙質・CRD の接着界面を、SEM を用いて観察し、ユニバーサルアドヒーシブおよびレジンセメントの被膜厚さを測定している。臨床的にはセメンテーション前のユニバーサルアドヒーシブに光照射することで接着界面の厚さが増し、修復物の浮き上がりが危惧される。このような臨床上懸念される点について検討していることは高く評価できる。本研究で得られた主な結果は以下のとおりである。

1. SBU では、$L_{(D)}L_{(CR)}$ 群が他の群と比較して有意に高いμTBS を示し、他の 3 群に有意差は認められなかった。
2. CUB では、$L_{(D)}L_{(CR)} > NL_{(D)}L_{(CR)} > L_{(D)}NL_{(CR)} = NL_{(D)}NL_{(CR)}$ の順にμTBS を示した。
3. 10,000 回のサーマルサイクルにより、SBU の $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群を除く全ての群でμTBS が減少した。
4. $L_{(D)}NL_{(CR)}$ 群では両セメントシステムで、主にレジンディスクとレジンセメントの界面破壊が観察された。一方、$NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群では両セメントシステムで象牙質とレジンセメントの界面破壊が主に観察された。
5. サーマルサイクル後、PS の $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群でレジンセメント内での凝集破壊が増加し、$L_{(D)}NL_{(CR)}$ と $NL_{(D)}L_{(CR)}$ 群では両レジンセメントシステムで界面破壊が増加した。
6. 平坦象牙質及び CRD に塗布したユニバーサルアドヒーシブを光照射した際の被膜厚さは、SBU で 5～10 μm、CUB では 5 μm 以下であり、レジンセメントと合計した接着界面の厚さは両レジンセメントシステムにおいて $L_{(D)}L_{(CR)}$ 群で約 30 μm であった。

本研究により、象牙質および CRD に塗布したユニバーサルアドヒーシブに光照射をしてからセメンテーションすることが初期接着強さに影響を及ぼし、特に SBU においては耐久性にも影響を及ぼすことが示唆された。さらに、光照射によって生じるユニバーサルアドヒーシブの被膜厚さが間接法修復における浮き上がりに及ぼす影響は少ないことが示唆された。

以上のように、本論文は間接法修復におけるセメンテーション前のユニバーサルアドヒーシブへの光照射に関して、臨床的に極めて有益な知見を得たことは、本論文の成果として高く評価できる。本研究は今後の歯科保存学の発展に大いに寄与するものと考えられる。従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求する論文として十分に価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 三浦　杏奈 |
| 論文審査担当者 | 主査　嶋田　昌彦<br>副査　櫻田　宏一　　新田　浩 |
| 論　文　題　目 | Psychiatric comorbidities in patients with Atypical Odontalgia |

（論文内容の要旨）

**＜緒言＞**

非定型歯痛（Atypical Odontalgia; AO）とは、臨床的にもエックス線検査等の各種検査においても明らかな異常所見を認めない、原因不明の慢性歯痛を指す。本症は、非定型顔面痛(Atypical Facial Pain ; AFP) や慢性特発性顔面痛 (Persistent Idiopathic Facial Pain ;PIFP)の一亜型として分類されてきたが、その疾患単位としての独立性についてはいまだ議論がある。これらの慢性疼痛は、歴史的には“心因性”として取り扱われていることが多かったようであるが、近年では neuropathic pain としての側面も指摘されている。

本症には様々な感情・心理的因子が関与することや、うつや不安の合併が多いことが知られているが、多くは自己記入式の質問紙法によるデータである。特に精神疾患が併存するか否かで各種知覚検査や治療の結果が大きく影響を受けることが本症の疾患概念の確立や病態生理の解明に大きな障壁となっている。しかし、本症患者に、精神疾患がどのくらい併存し、それらが臨床像にどの程度影響しているかについては未だ明確なデータが報告されていない。

そこで本研究では、本症の精神疾患併存の有無とそのことによる臨床的・症候学的相違点について検討した。

**＜対象と方法＞**

*対象*

2013 年 1 月から 2016 年 8 月までに東京医科歯科大学歯学部附属病院歯科心身医療外来を受診した患者のうち、AO と診断された 383 名を対象とした。

対象患者の選定基準は、ICHD-3beta および IASP の両診断基準を満たしている 18 歳以上で歯や抜歯した部位の持続した痛みを主訴にしており、臨床的にも X 線上でも硬組織ならびに軟組織において、疼痛に相当する異常所見を認めないものとした。除外基準として、歯原性疼痛や三叉神経痛、群発性頭痛などの明確な原因があるものは除外した。

本研究は本学歯学部倫理委員会で承認を受け（D2013−005）、全ての対象患者から書面にて同意を得た。

*方法*

上記の対象の病歴、臨床所見や症状に関する臨床上の情報は、診療録をもとに retrospective に調査した。

*併存する精神科疾患*

併存する精神科疾患は、精神科主治医からの紹介状をもとに調査した。紹介状に記載されている病名は DSM5 の診断カテゴリーに基づき分類した。

*うつ状態の評価*

臨床的なうつ状態の評価尺度として SDS (Zung's self-rating depression scale) を用いた。初診時に患者自身に規定の質問紙に回答してもらった。

*疼痛尺度*

疼痛の質や強度は SF-MPQ(Short-Form McGill Pain Questionnaire )と PPI (Present Pain Intensity)を用いて初診時に調査した。SF-MPQ は 15 項目で構成されており、1－11 は感覚項目、12-15 は感情項目となっている。これらの項目は 0＝なし、1＝軽度、2＝中等度、3＝重度　とする。PPI は、0 =痛みなし、1 =軽度、2 =不快感、3 =苦痛、4 =恐ろしい、5 =悲惨さ、といった尺度を用いて 6 度の痛み強度を調査した。SF-MPQ には VAS (Visual Analogue Scale)も含まれており、0 は疼痛がない状態、100 がこれまでの経験した中でもっとも憎悪した状態として、初診時の疼痛の重症度を評価した。

*疼痛範囲*

本研究では、疼痛部位を、左右上下前歯部、臼歯部の 8 カ所に分類して集計した。疼痛部位が重複する場合は、それぞれの部位をカウントした。全顎に疼痛がある場合は、8 カ所全ての部位をカウントした。

*統計分析*

本研究で用いたデータは SPSS を用いてカイ二乗検定、マンホイットニ検定を行った。連続変数は平均（±標準偏差）およびパーセンテージを用いた。

P 値は 0.05 未満で統計学的に明らかな有意差があると判断することとした。

＜結果＞

*AO 患者の臨床的特徴*

本研究では 383 名（女性 325 名、男性 58 名）の AO の患者が対象となった。平均年齢は 53.62±13.81 歳、病悩期間の中央値は 24 か月で、従来の報告と一致していた。

初診時の SDS、VAS の平均（±SD)は、それぞれ 45.40±10.35、53.08±29.61 であった。この 383 例のうち 244 例（63.7%）では SDS スコアは正常範囲内であった。頭痛既往があったものは 215 例（56.1%）であった。217 例(56.7%)の患者は、歯科治療を契機に症状が出現していた。そのう

ち 55 例(14.4%)は根管治療、47 例(12.3%)は抜歯、46 例（12.0%）は補綴治療を契機としていた。

111 例（29.0%）には AO 以外の他の歯科心身症が併存し、最も多く認められたのは舌痛症（21.7%）であった。

精神疾患の併存は 177 例（46.2%）の患者に認められた。うつ病が一番多く 59 例（15.4%）、続いて不安症が 39 例（10.1%）、身体症状症が 17 例(4.5%)の患者に認められた。双極性障害（3%）、統合失調症（1.8%）といった重篤な精神疾患の併存は稀であった。精神疾患のため入院歴を有するものは 177 例中 15 例(3.9%)であった。

*疼痛部位*

本人の訴えをもとにして、疼痛出現部位を集計した。疼痛部位が単一部位であったものは 167 例(43.6%)、216 例（56.4%）は複数部位の疼痛を訴えていた。全顎的に疼痛を訴えるものは 30 例（7.8%）であった。右側に限局した疼痛がみられた症例が 95 例(24.8%)、左側が 137 例(35.8%)、両側性に疼痛が出現している症例が 151(39.4%)であった。前歯部と比較すると臼歯部では疼痛が頻繁に出現する傾向にあったが、疼痛は限局化せずに複数歯や口腔内全体に拡散する症例も散見された。

また、歯科治療が契機であったと申告した 217 例のうち、治療部位に痛みが限局しているのが 132 例（60.8%)、治療部位に加えて他の部位まで疼痛が波及しているものが 63 例（29.0%）、そして治療部位と全く異なる部位に疼痛が出現していると訴えるものが 22 例（10.2%）存在した。歯科治療契機であると訴えた 217 名のうち、精神科疾患併存を認めた者は 92 例(42.4%)であった。

*精神科疾患の併存と AO 患者の特徴、SF-MPQ との関連*

精神科疾患の併存群（ｎ＝177）と併存なし群（ｎ＝206）の２群にわけ、臨床的特徴と SF-MPQ スコアを比較した。臨床的特徴では、精神科疾患併存群のほうが併存なし群と比較して SDS スコアの平均値が高く、睡眠障害の併存が有意に高かった。疼痛部位と精神疾患併存との有意な関連は認められなかった。

同様に SF-MPQ のスコアを比較すると、“Fearful”（恐ろしくなるような痛み）と“Punishing-cruel”（ 耐え難い身のおきどころのない痛み）のスコアと VAS が有意に高かった。“Fearful”と“Punishing-cruel”は感情項目であるが、感覚項目では２群間で有意差は認められなかった。

**＜考察＞**

本研究では、AO における精神疾患の併存の実態とそれらが臨床的特徴にどの程度関連するかを明らかにした。主な知見は以下の３点である。

第一に、精神疾患の併存を認めるものが 46.2%であり、主としてうつ病や不安障害であった。双極性障害や統合失調症といった重篤な精神疾患の併存は稀であった。第二に、精神疾患併存群の方が、非併存群よりも、SD と VAS が高く、睡眠障害の併存が有意に多く、SF-MPQ スコアは感情項目の“Fearful”と”Punishing-cruel”のスコアが高かった。最後に、精神疾患の併存と年齢、性別、頭痛の既往歴、歯科治療部位と疼痛部位との一致率などにおいては有意差を認めなかった。

*AO 患者における精神疾患の併存*

多くの先行研究によって慢性疼痛とうつや不安との関連が示唆され、心理社会的因子の重要性は認知されている。しかし、AO や PIFP における精神疾患の関与についての研究はいまだ不十分と言える。

確立された生物学的マーカーの欠如のために、精神疾患の確実な診断は依然として困難である。単一の精神科医による診断にも限界があり、本研究では各々の患者の精神科主治医による診断を採用した。その結果、AO 患者の 46.2%に精神疾患の併存を認めた。内訳は、うつ病(15.4%)、不安症(10.1%)が多かったが、双極性障害（3%）、統合失調症（1.8%）といった重篤な精神疾患の併存は稀であった。統合失調症や双極性障害では、本症に有効とされる三環系抗うつ薬が使用できないことを考慮すると、これらの知見はより有効な薬物療法を実施するために非常に重要である。

*精神疾患の併存の予測*

本研究において、精神疾患併存群では睡眠障害の併存、SDS、SF-MPQ では感情項目の“Fearful”と“Punishing-cruel”は、精神疾患併存のない群と比較し有意に高値を示した。これは精神疾患併存群における疼痛は感覚的要素よりも感情的要素が上回っている可能性が示唆される。また VAS は精神疾患併存群のほうが有意に高かったが、PPI に有意差は認められなかった。AO 患者は言語表現より視覚尺度の方が痛みを表現しやすいのかもしれない。

これらの結果から、SDS、VAS、睡眠障害、および SF-MPQ の感情項目は AO 患者の併存する精神疾患を予知するために有用であり、臨床医が適切な治療を提供することに役立つ可能性が考えられる。本研究では約半数の患者が精神疾患の併存を認め、心理的アプローチが AO 患者に有益であるであることを示唆している。本症には、薬物療法と心理療法の併用が最適な治療戦略になるかもしれない。

*AO と PIPF との病態の違いについて*

本研究でさらに興味深い知見は、疼痛の出現範囲である。PIFP に関する先行研究では、両側性に疼痛を認めた症例が 13%であったが、本研究では 151 例（39.4%）であった。本症では解剖学的に三叉神経の支配領域を越えた痛みがより高率で出現しており、精神疾患の併存が痛みに影響する可能性を考慮すると、AO には PIFP と少し異なる病態生理や痛みのメカニズムが存在する可能性が示唆された。

歯科治療は依然として AO の発症契機として考えられており、根管治療や抜歯による神経損傷は、永続的な神経障害性疼痛の発症に関連していると報告されている。しかし、本研究の結果からは精神疾患が併存する、しないにかかわらず、歯科治療は必ずしも AO の原因因子にはなっていないことが明らかとなった。

*limitation*

第一に、単一の特殊な施設で収集されたサンプルであり一般の歯科診療所とは状況が異なるかもしれない。第二に、AO 患者のみを集計した研究であり、対照群との比較を行っていない。今

後の研究で歯髄炎などの「典型的な」歯痛と比較する必要がある。第三に、精神科診断の主治医間のばらつきがある可能性は否定できない点があげられる。

＜結論＞

本研究では AO 患者の約半数に精神疾患の併存を認めた。しかし、うつ病や不安症が主で、統合失調症や双極性障害はまれであった。VAS、SDS および SF-MPQ は AO 患者の潜在する精神疾患の併存を予測する上で有用である可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5543　号 | 三浦　杏奈 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　嶋田　昌彦<br>副　査　櫻田　宏一　　新田　浩 | |
| 論 文 題 目 | Psychiatric comorbidities in patients with Atypical Odontalgia | |

（論文審査の要旨）

非定型歯痛（Atypical Odontalgia; AO）とは、臨床的にもエックス線検査等の各種検査においても明らかな異常所見を認めない、原因不明の歯痛を指す。本症は、歴史的には“心因性”として取り扱われていることが多かったが、本症の精神疾患の併存率やそれが臨床像にどの程度影響しているかについては未だ明確なデータが乏しい。

このような背景のもと、申請者は本症の精神疾患併存の実態について調査し、併存疾患の有無による臨床的・症候学的相違点について検討した。

対象は 2013 年 1 月から 2016 年 8 月までに東京医科歯科大学歯学部附属病院歯科心身医療外来を受診した患者のうち、AO と診断された 383 名であり、患者の特徴や病歴などの臨床的情報を診療録から retrospective に調査している。併存する精神科疾患は精神科医からの紹介状をもとに分類し、うつ状態の評価は SDS、疼痛のバリエーションは SF-MPQ( Short-Form McGill Pain Questionnaire )と PPI (Present Pain Intensity)などの指標を用い、また疼痛部位を、左右上下前歯部、臼歯部の 8 カ所に分類して集計しているなど、申請者が個々の患者の臨床データを丹念に積み重ね、病態の本質に迫ろうという研究姿勢が伺われる。

本研究から得られた主な結果は以下の通りである。

１．AO 患者は女性 325 名、男性 58 名であり、平均年齢は 53.62±13.81 歳、病悩期間の中央値は 24 か月と従来の報告と一致していた。

２．初診時の SDS、VAS の平均は、それぞれ 45.40±10.35、53.08±29.61 であった。AO 患者 244 例（63.7%）の SDS スコアは正常範囲内であった。頭痛既往があったものは 215 例（56.1%）であった。

３. 歯科治療を契機に発症したのは 217 例(56.7%)であった。そのうち 55 例(14.4%)は根管治療、47 例(12.3%)は抜歯、46 例（12.0%）は補綴治療が契機であった。

４．AO 以外の他の歯科心身症を併発していたのは 111 例（29%）で、舌痛症（29%）が最多であった。

５．精神科疾患の併存は 177 例（46.2%）で確認された。うつ病が一番多く 59 例（15.4%）、続いて不安症が 39 例（10.1%）、身体症状症が 17 例(4.5%)であった。６．疼痛部位が局所的であったものは 167 例(43.6%)、216 例（56.4%）は複数部位の疼痛を訴えていた。全顎的に疼痛を訴えるものが 30 例（7.8%）であった。

７. 歯科治療が契機であった 217 例のうち､治療部位に痛みが限局しているのが 132 例(60.8%)、治療部位に加えて他の部位まで疼痛が波及しているものが 63 例（29.0%）、そして治療部位と全く異なる部位に疼痛が出現していると訴えるものが 22 例（10.2%）であった。

８．精神科疾患の併存群（ｎ＝177）と併存なし群（ｎ＝206）の二群にわけ、AO の臨床的特徴ならびに疼痛の性質の差異を比較検討した結果、精神科疾患併存群のほうが併存なし群と比較して SDS スコアの平均値が高く、睡眠障害の併存が有意に高かった。同様に SF-MPQ のスコアを比較すると、“Fearful”と“Punishing-cruel”のスコアと VAS が有意に高かった。

本論文の考察は、AO 患者の約半数に精神疾患の併存を認めたが、重篤な疾患の合併はまれであった結果をふまえ、痛みの表現型の差異や治療薬の選択など臨床的に非常に重要な示唆に富んでいる。また歯科治療が発症契機となったものが 47%であったが、精神疾患の併存にかかわらず、歯科治療部位と疼痛部位が一致しない症例もあり、歯科治療が必ずしも AO を引き起こす原因因子とは限らないことを考察しており、本症の病態生理や痛みのメカニズムの解明に一石を投じている。また VAS、SDS および SF-MPQ は、AO 患者に潜在する精神疾患の併存を知る上で有用である可能性が示唆され、診断学上の価値も高い研究であると評価される。

以上のように本研究は AO の病態を明らかにする上で極めて有益な知見を提供するものであり、得られた研究成果は、歯科心身医学のみならず歯科医学全般の発展に大きく寄与するものと評価された。従って、本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分に価値のあるものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 柴﨑　真樹 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　鈴木　敏彦<br>副 査　　和泉　雄一　　齋藤　良一 |
| 論　文　題　目 | Distribution of Single Nucleotide Polymorphisms in Protein-coding Regions of *emm*12 Group A Streptococcus from Two Scarlet Fever Outbreaks |

（論文の内容の要旨）

＜要旨＞

抗生物質の開発以来 A 群連鎖球菌（GAS）による猩紅熱の発生率は激減したが、今世紀に入り流行の頻度を増している。本菌の *emm* 遺伝子によって分類された *emm*12 型株は猩紅熱との関連が指摘されている。同型株による猩紅熱では病態発症に特定のプロファージの寄与が報告されている一方で、別の *emm* 型では GAS ゲノム上の一塩基多型（SNP）が関与しているとの報告もある。しかし、*emm*12 型猩紅熱と SNP の関連について詳細な知見はない。我々は、英国と香港、二つの猩紅熱流行株のゲノム情報から SNP を抽出・比較解析し、*emm*12 型 190 株の全てに共通なタンパク質コード領域（CDS）975 個において、2,029 箇所の塩基座位で SNP を同定した。これらの SNP を元にした系統樹では株系統が大きく 4 つに分かれ、その全てに地理的相違にも関わらず双方の流行株が分布し、かつ猩紅熱、非猩紅熱株が混在していた。また、猩紅熱株群、非猩紅熱株群間で、SNP 保有株数がもう一方の群に対して顕著に多い塩基座位はなかった。加えて、非猩紅熱特異的な SNP 塩基座位のうち、最多の株（10/95 株）に SNP が存在するものは、病原関連性の CDS 上に存在しなかった。以上から、*emm*12 型の猩紅熱流行株と、特定の遺伝子領域の塩基置換との関係は認められず、これまでの知見にあるプロファージやその他の因子の影響が示唆された。

＜緒言＞

A 群連鎖球菌（GAS）は、ヒトに置いて高度に適応した細菌種であり、その多様な臨床型を特徴とする。特に、抗生剤の開発以来減少傾向にあった猩紅熱の流行頻度が近年増している。本菌種の分類法として、細胞膜表層タンパクをコードする *emm* 遺伝子の塩基配列を用いるのが一般的である。その中でも、*emm*12 型は猩紅熱と関わりが強いと考えられている。近年、GAS による猩紅熱の流行が英国及び香港で発生し、両流行由来の猩紅熱株は高頻度でスーパー抗原 A 遺伝子（*ssa*）を保有していたとの報告がある。この *ssa* は可動性遺伝因子の一つであるプロファージ領域上に位置していた。このことと、それまでの報告を併せて、プロファージが猩紅熱の流行に関与していることが示唆された。その一方で、英国株と香港株では、*ssa* が乗っているプロファージの種類が異なっており、*emm*12 型株の地理的な多様性が示唆された。また、他の *emm* 系統では、臨床型と一塩基多型の関連性が報告されている。例として、二成分制御系のタンパク質コード領域の SNP が原因でそれまで検出頻度の少なかった *emm*89 型株の流行が生じていることや、劇症型溶血

性連鎖球菌感染症患者から採取された GAS 株の二成分制御系では無症候株と比べて有意に変異が多かったという報告がなされている。*emm*59 型株を用いた研究では、アミノ酸配列に影響を及ぼす非同義置換性の SNP を保有する株に感染したマウスは、野生型株に感染したマウスと比べて傷害の規模が大きかった。これらの知見より、*emm*12 型 GAS 株由来の猩紅熱流行においても SNP が関与している可能性が示唆されるものの、SNP の猩紅熱への関与を詳細に調べた研究はない。従って、本研究では二つの異なる猩紅熱流行期間中に採取された株より、猩紅熱株と非猩紅熱株の SNP の分布を調べた。

＜方法＞

公共のデータベースより参照株である HKU360（香港の猩紅熱患者より採取）の完全ゲノムと *emm*12 型 190 株のショットガンゲノム情報を入手した。ショットガンゲノムはいずれも Illumina 社製のプラットフォームで読まれたペアエンド配列であった。これらの株の採取地域の内訳は、英国が 63 株、香港が 125 株、オーストラリアが 3 株であった。これらの株は症状別に、次の 7 つの臨床型グループに分類された。すなわち、猩紅熱 96 株、呼吸器 46 株、皮膚 19 株、深部組織 19 株、泌尿器 3 株、生殖器 10 株、未分類 11 株である。ショットガンゲノムリードを Trimmomatic v0.36 にてトリミング、フィルタリングし、BWA v0.7.15 の BWA-mem アルゴリズムを用いて HKU360 株に対してデフォルトのパラメータを使用してマッピングした。それに先立ち、HKU360 ゲノム上の反復配列を RepeatMasker v4.0.7 にてマスクした。その後、Picard tools v2.9.2 を用いて重複リード及び indel のリアライメントによりアーチファクトを除去した。全ての株においてマップされたタンパク質コード領域(CDS)を抽出し、その中で生じている SNP を GATK v3.7-0 を使用して検出した。この時、マッピングクオリティが 30 を下回るものは除外した。得られた SNP を元に Jukes-Cantor 置換モデルを用いて系統樹を作成した。

＜結果＞

参照株を含む全 191 株の共通 CDS975 個中に、2, 029 個の SNP 座位を検出した。これを基に作成した系統樹より 4 つの大きな群(clade)と単一の株からなる系統を同定した。系統樹の形態は香港株を用いた先行研究のそれと酷似していた。臨床型の観点からすると、猩紅熱、深部組織疾患、呼吸器疾患関連の株はいずれの clade にも存在していた。皮膚疾患関連株は clade1、2、4、及び生殖器疾患関連株は clade2、3、4 に分布していた。また、猩紅熱及び深部組織疾患関連株はお互いに近い系統関係を示す傾向が強く、中でも clade2 のうち、二つのサブグループはこれら二種類の株のみで構成されていた。系統樹と株の地理的由来には関連性は見られなかった。

猩紅熱株において検出された SNP のうち同義置換性のものは 509、非同義置換性のものは 806 であった。同様に、非猩紅熱株は同義置換性が 595 で非同義置換性のものが 934 であった。全ての SNP 座位について、それを保有する猩紅熱株と非猩紅熱株の数を調べたところ、両株グループとも同様の傾向を示し、どちらかが顕著に保有していた SNP の座位はなかった。

参照株が猩紅熱株であったため、次に我々は非猩紅熱に特異的な SNP 座位に着目した。非猩紅熱株に特異的な SNP 座位は 702 個存在した。しかしながら、いずれも非猩紅熱全株において顕著に存在してはおらず、最大で 10 株が保有するにとどまった。702 個の非猩紅熱株特異的 SNP のう

ち、438 個が非同義置換性で、264 個は同義置換性であった。このうち 10 株が保有していた非同義置換性の SNP が位置していた CDS はいずれも病原性と関連していなかった。非猩紅熱株は非猩紅熱特異的 SNP を保有するもの、保有しないものに関わらず、系統樹上の全ての clades に存在し、全ての臨床型を含んでいた。単一の系統を構成していた HKU165 は保有する非猩紅熱株特異的 SNP が 156 個と特徴的であり、これらは全て本株特異的であった。

＜考察＞

近年の猩紅熱流行の再来に伴い、その遺伝的背景を明らかにすべく、多くの研究がなされている。本研究は、最近生じた二つの流行株を用いてアミノ酸配列置換性の SNP に着目した。集団構造解析より、作成した系統樹のいずれの clade にも猩紅熱株が分布しており、呼吸器疾患株も同様であった。このことは、猩紅熱が扁桃炎などに続いて生じると考えられていることと一致している。また、深部組織疾患株も全ての clade に分布しており、猩紅熱株と近縁となる傾向が見られた。特に、clade 2 のうち二つのサブグループはこれら二種類の臨床型株が独占的であった。これまでの報告で、猩紅熱と侵襲性 GAS 疾患双方への *ssa* 遺伝子の関連性が示唆されており、本研究結果もこれを支持するものである。以上に示した結果は、*emm*3 型株における、侵襲性株と咽頭炎株がどちらも同じ系統から派生しているというこれまでの結果と類似している。

非猩紅熱株に特異的な非同義置換性の SNP が病原性と関連した CDS 上に位置していなかった点、これらの SNP を保有しているか否かが株系統関係と相関していなかった点を考慮すると、これらの SNP が *emm*12 型 GAS の病原性発現において重要な役割を担っているとは考えづらい。先行する *emm*3 型に関する研究においても、臨床型を区別する単一の遺伝的な変異は同定できなかったと報告している。しかし、その一方で行くつかの変異は正の選択圧を受けていることが示唆されたとしている。実際に、本研究においても同義性と非同義置換性の SNP は類似した分布を示しており、猩紅熱特異的な SNP は同定されなかった。しかし、全ての clade において英国と香港、両地域の株が分布していたことから、双方の株が同様の選択圧を受けていた可能性が示唆される。本研究においては選択圧について解析しておらず、従って、今後は選択圧を生じている CDS に関する追加解析の有用性が示唆された。HKU165 において検出された 69 個の株特異的非同義置換性 SNP と病原性関連 CDS 及び株系統関係には相関性はなかった。これと、先行研究において本株が株特異的なプロファージを保有することが示されていることを併せると、本株は今回の研究に用いられた他の株とは異なる系統に属している可能性が示唆された。HKU165 株が保有している豊富な株特異的SNP及びそのゲノム上での偏りから、組み替えまたはhyper-mutationの可能性が示唆される。

＜結論＞

本研究の結果は、*emm*12 型 GAS 株の病原性発現において、SNP の関与は弱いことを示すと同時に、これまでのプロファージの関与を強く支持するものであった。今後の方針として、無症候患者より採取した株を含む、GAS ゲノムの包括的な解析を行い、猩紅熱発症のメカニズムを明らかにしたいと考えている。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5544　号 | 柴﨑　真樹 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　鈴木　敏彦<br>副 査　　和泉　雄一　　齋藤　良一 | |
| 論 文 題 目 | Distribution of Single Nucleotide Polymorphisms in Protein-coding Regions of *emm*12 Group A Streptococcus from Two Scarlet Fever Outbreaks | |

（論文審査の要旨）

抗生物質の開発以来、A 群連鎖球菌（GAS）による猩紅熱の発生率は激減したが、今世紀に入り流行の頻度が増えてきており社会問題となっている。本菌の *emm*遺伝子によって分類された *emm*12 型株は猩紅熱との関連が指摘されていることから、同型株による猩紅熱発症の機序を明らかにすることは同感染症の拡大を防止するとともに、細菌が病原性発症に至るメカニズムを解明するうえで肝要となると考えられる。柴﨑らは、本菌種のゲノム上の一塩基多型（SNP）に着目し、SNP が *emm*12 型株由来の猩紅熱発症に寄与している可能性について評価した。

公共のデータベースより参照株である HKU360（香港の猩紅熱患者より採取）の完全ゲノムと *emm*12 型 190 株のショットガンゲノム情報を入手した。ショットガンゲノムはいずれも Illumina 社製のプラットフォームで読まれたペアエンド配列であった。これらの株の採取地域の内訳は、英国が 63 株、香港が 125 株、オーストラリアが 3 株であった。これらの株は症状別に、次の 7 つの臨床型グループに分類された。すなわち、猩紅熱 96 株、呼吸器 46 株、皮膚 19 株、深部組織 19 株、泌尿器 3 株、生殖器 10 株、未分類 11 株である。ショットガンゲノムリードを Trimmomatic v0.36 にてトリミング、フィルタリングし、BWA v0.7.15 の BWA-mem アルゴリズムを用いて HKU360 株に対してデフォルトのパラメータを使用してマッピングした。それに先立ち、HKU360 ゲノム上の反復配列を RepeatMasker v4.0.7 にてマスクした。その後、Picard tools v2.9.2 を用いて重複リード及び indel のリアライメントによりアーチファクトを除去した。全ての株においてマップされたタンパク質コード領域(CDS)を抽出し、その中で生じている SNP を GATK v3.7-0 を使用して検出した。この時、マッピングクオリティが 30 を下回るものは除外した。得られた SNP を元に以下の解析を実施した。

1）SNP を基にした系統樹を作成し、菌株の臨床型別及び、地理的由来の系統解析
2）猩紅熱株と非猩紅熱株のゲノム上の同義/非同義置換性の SNP の分布および、それらが位置するタンパク質コード領域の機能解析

解析の結果は以下の通りである。

1）臨床型、地理的由来と系統関係に明らかな相関関係が認められ、猩紅熱が特定の株系統によって引き起こされたものではないことが明らかにされた。
2）同義/非同義置換性の SNP の中に、明らかに猩紅熱あるいは非猩紅熱株に有意に多く分布していたものは認められなかった。また、猩紅熱または非猩紅熱株に特異的な SNP と病原性のタンパク質コード領域に関連性は認められなかった。

以上のことから、柴﨑は*emm*12型A群連鎖球菌由来の猩紅熱発症に対して本菌種ゲノム上のタンパク質コード領域中のSNPの影響は弱いと結論した。本研究から得られた知見より、猩紅熱に関わる

因子としてタンパク質コード領域上のSNP以外の因子の影響が示唆された。なお、本研究は綿密な研究計画のもとに実施され、適切な解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

以上の成果は、今後の臨床医学の発展および、感染症医学研究の発展に寄与する可能性が大きいと考えられ、博士（歯学）の学位を申請するに十分に価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 佐戸川　佑弥 |
| 論文審査担当者 | 主査　小野　卓史<br>副査　水口　俊介　　豊福　明 |
| 論　文　題　目 | Short-term changes in chewing efficiency and subjective evaluation in normal dentate subjects after insertion of oral appliances with an occlusal flat table |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

治療用義歯として，オクルーザルフラットテーブルを有するオーラルアプライアンス（OA）は臨床的に広く用いられている．しかしながら，OA 装着中の咀嚼に関する短期間での影響は報告されていない．従って，本研究では，OA の実験的および連続的装着が健常歯列者の咀嚼効率および口腔関連 QoL（OHIP）に与える影響を定量化することを目的とした．被験者 20 名について OA 群およびコントロール群の 2 群に分け，5 日間で 6 回のデータ採得を行った．被験者は OHIP の回答と咀嚼効率試験を行った．得られたデータから，ベースライン（BL）と装置装着直後（0h）の変化量，および 0h から 24 時間後（24h）、48 時間後（48h）、72 時間後（72h）および 96 時間後（96h）の変化量を算出し，統計方法は Student の t 検定（有意水準: $p<0.05$）を用いて 2 群間の変化量の差を比較した．BL から 0h において，咀嚼効率および OHIP の 4 つのサブドメイン（機能の制限，痛み，身体的障害，ならびにハンディキャップ）の変化量に有意差を認めた．これらの中で，機能の制限および痛みについての OHIP スコアのみが，0h から 96h の変化量に有意差を認めた．他のパラメータの変化量の 2 群間の差は有意ではなかった．OA の装着により，咀嚼効率の低下および OHIP スコアは増加した．また，連続装着により，96 時間以内に機能の制限および痛みが改善した．

＜緒言＞

OA は，下顎位や咬合平面の修正などの咬合の改善や診断を目的として補綴治療に広く用いられている．装置の利用は，口腔内が最終補綴治療に移行可能か否かの診断の一助となり，可撤式で非侵襲的であること、オクルーザルフラットテーブルの調整が容易であるなどの多くの利点を有する．しかし、装置の装着により，咀嚼筋の不快感、咀嚼困難、ならびに頬噛みなどの咀嚼に関する問題が報告されている．これらの問題は、患者の咀嚼能力および生活の質（Quality of life: QoL）に影響を及ぼす．OA 装着を行う多くの患者は同様の問題に直面する．しかしながら，装置が咀嚼機能および生活の質に及ぼす影響は，患者において重要であるにもかかわらず十分に議論されていない．そこで本研究は，OA の健常被験者における連続装着が，咀嚼効率および口腔関連 QoL に与える影響を明らかにすることを目的とした．

＜方法＞

被験者は，東京医科歯科大学歯学部附属病院に所属する職員および学生から 20 名（男性 10 名，女性 10 名，平均年齢 27.6±2.91 歳）を募集した（東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会承認番号 1226 号）．取り込み基準は第 3 大臼歯を除く永久歯列を有することとし，除外基準は顎関節症やその他の健康問題の徴候と症状を有することとした．被験者を OA 群及びコントロール群の 2 群に分け，測定を行った（男女比率 5：5，平均年齢 26.3±2.36 歳および 28.8±2.97 歳）．

OA の装着部位は，連続装着を考慮し，違和感および発音への影響が上顎よりも少ないとされている下顎とした．咬合挙上量は，先行研究において咀嚼効率に影響を与えない，かつ装置咬合面に穿孔を伴わない厚さとして，咬合器にて切歯指導針で 6mm と設定した．ワックスアップ後，加熱重合型義歯床用レジンにて製作を行った．各被験者に対して，装置の適合状況を確認し，中心咬合位にて上顎機能咬頭が装置咬合面に均等接触となるように調整し，偏心運動時には被験者の咬合様式に準じた犬歯誘導，またはグループファンクションとなるよう咬合調整を行った．

OA 群およびコントロール群ともに連続 5 日間にわたって計 6 回測定を行った．OA 群は BL, 0h, 24h, 48h, 72h および 96h に測定を行った．コントロール群はスプリントなしの状態で同様に測定した．

測定項目は咀嚼効率として色変わりガムを，口腔関連 QoL の評価方法として広く用いられている OHIP を用いた．また，OA 群については安静空隙量および咬合挙上量を計測した．

色変わりガム（キシリトール咀嚼力判定用®，ロッテ）は，習慣性咀嚼側において 60 回の咀嚼を指示した．終了後，直ちにガムを回収し，ポリエチレンフィルムにてガムを覆い，1.5mm 厚に成形し，色彩色差計（CR−13，コニカミノルタセンシング社）にて 5 点（中央および約 3mm 上下左右）計測し，L*,a*,b*の平均値を測定した。また，色調変化ΔE を公式により CIELAB 色空間座標を算出した．

口腔関連 QoL の評価として，日本語版 OHIP である OHIP-J を用いた．質問項目は 49 項目あり，機能の制限（9 項目），痛み（9 項目），心理的不快感（5 項目），身体的障害（9 項目），心理的障害（6 項目），社会的障害（5 項目），ならびにハンディキャップ（6 項目）の 7 つのサブドメインに分けられている．それぞれの質問項目について，被験者はどのくらい頻繁に影響があったかを 5 段階（0；まったくない，1；ほとんどない，2；時折，3；かなり頻繁に，4；非常に頻繁に）で記録した．

得られた咀嚼効率および OHIP のデータの解析には，BL と 0h の変化量，および 0h と 24h, 48h, 72h および 96h の変化量を算出し，Student の t 検定（有意水準: $p<0.05$）を用いて 2 群間の変化量の差を比較した．

また，安静空隙量は発音法（/M/音）にて，咬合挙上量は「OA あり」および「OA なし」の条件で上下中切歯歯間乳頭部先端間の距離を計測することにより算出した．

＜結果＞

咀嚼効率については，2 群間において，BL から 0h の変化量に有意差があった．0h から 24h, 48h, 72h および 96h までの変化量には有意差がなかった．OHIP については，機能の制限および痛みについて，BL から 0h，ならびに 0h から 24h，48 および 72h に有意差があった．心理的不快感

について，0h から 24h, 48h, 72h および 96h に有意差があった．身体的障害およびハンディキャップについて，BL から 0h に有意差があった．また，OA 群における安静空隙量の平均は 3.1±1.6mm，咬合挙上量の平均は 4.1±1.1mm であった．

＜考察＞

本結果は，OA 装着直後に咀嚼効率が低下することを示しており，その要因は，1）咬合面の変化，2）OA の形態，ならびに 3）咬合高径の増加が考えられる．最初に，咬合面の変化について，咬合面の平坦化は解剖学的形態を有する咬合面と比較して，食物を粉砕するのにより大きな力を必要とし，咀嚼効率が低下するという報告がある．本研究においても，OA 装着により，大きな咀嚼力が必要となり，咀嚼効率が低下した可能性がある．また，上顎機能咬頭のみが接触する OA の咬合様式は，咬合接触面積および咬合接触数の減少となり，咀嚼効率の低下に寄与した可能性がある．次に，OA の形態について，下顎に装着する OA は，上顎に装着するよりも不快感および発音に対する影響が少ないとされるが，咀嚼効率に影響を与えている可能性がある．咀嚼は、舌、頬、軟口蓋の緻密な調和により成立するが，OA の形態が，咬合面に食物を保持するための舌や頬粘膜の動きを妨げたと考えられる．OA 群の被験者の多くが「食べづらい」，「咬合面に食塊を運ぶのが難しい」などとコメントしている．BL から 0h までの OHIP スコアの変化は、粉砕能力、質感および味の問題を含む咀嚼の困難さと関連している．このことは，咀嚼効率も口腔関連 QoL に影響を与える重要な因子であることを示している．最後に，咬合高径の増加について，咬合高径の変化も咀嚼効率に影響を及ぼす要因である可能性がある．OA による咬合挙上量は咀嚼効率に影響を及ぼさない範囲内に設定したものの，安静空隙量は被験者ごとに異なり，咬合高径の変化に影響を及ぼす可能性がある．

OA を 5 日間装着した後の咀嚼効率は回復しなかったが，OA 装着直後に増加した機能の制限および痛みの OHIP サブドメインは 72 時間以内に減少し口腔関連 QoL の改善を示した．これは，本研究で観察された OA への被験者の主観的かつ機能的な適応を示唆するものの，機能の制限を改善するための顎，舌および頬粘膜の実際の動きを測定するためのさらなる研究が推奨される．

過去の研究では，OA の装着直後に現れた頭痛，筋，顎関節の疲労，圧痛，頬噛み，咀嚼および発音等を含む咀嚼に関する問題が 2 日以内に解決されたこと，OA 装着よる発音問題および筋肉の不快感は装着後 4～6 日あるいは 1～2 週間で改善されたこと，ならびに補綴治療に OA を用いて咬合高径の変化を患者が許容できることを確認するには 6～8 週間の経過観察が必要であること，を報告している．今回の知見は，OA を装着してから 72 時間以内に，心理的不快感以外のすべての OHIP サブドメインの改善を示した．機能の制限および身体的障害における改善は，顎の痛みの存在や発音および痛みに関する項目が含まれており，健常歯列者において，可能な範囲での咬合高径の増加などの特定の条件下では，OA 装着後 5 日間である程度の適応または回復が進行することが示唆された．

また，倫理的および実践的な理由のために本研究には研究に制限が存在する．ランダム化臨床試験（クロスオーバー試験など）ではなく OA 群とコントロール群の比較を行ったこと，サンプルサイズは過去研究よりも小さいが 0h から 24h の咀嚼効率の変化量を除いて効果量は全ての比較に適切であることが確認された（d = 0.035）．これは咀嚼効率の変化量の結果に影響を及ぼし

た可能性がある．測定期間は実現可能性を確保するために連続 5 日間とした．OA 装着の適応期間に関するさらなる結果は，より長期間にわたる評価によって得られた可能性がある．本研究は，OHIP を連日測定しており，これまでの研究では連続での評価には使用されていない．しかしながら，被験者は連日の問題の変化を経験し，この評価方法により口腔に関する問題を特定することができ，実際にスコアとして数量化することに役立ったことから，本研究では連日測定に OHIP を採用した．

＜結論＞

健常歯列者において，OA の装着直後に咀嚼効率および口腔関連 QoL が低下し（OHIP スコアの増加），心理的不快感を除く全ての OHIP サブドメインが装着後 5 日以内に改善した．これは，OA への適応が短期間に起こり，咀嚼効率および主観的評価が OA への適応の評価のための有効な手段であることを示唆している．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5545　号 | 佐戸川　佑弥 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　小野　卓史<br>副　査　水口　俊介　　豊福　明 | |
| 論　文　題　目 | Short-term changes in chewing efficiency and subjective evaluation in normal dentate subjects after insertion of oral appliances with an occlusal flat table | |

（論文審査の要旨）

オクルーザルフラットテーブルを有するオーラルアプライアンス（OA）は，補綴治療において下顎位の修正や咬合状態等の診断に利用されている．OA は可撤式，非侵襲的，ならびに調整が容易であるなどの多くの利点を有する．OA の装着後初期には，咀嚼筋の不快感、咀嚼困難、ならびに頬噛みなどの問題が生じ，機能的変化が認められるが先行研究では系統的な報告へと至っておらず，OA が咀嚼機能および口腔関連 QoL に及ぼす影響を知ることは，臨床上極めて重要である．

佐戸川は OA の健常被験者における連続装着が，咀嚼効率および口腔関連 QoL に与える影響を検討した．除外基準は顎関節症等の歯科的全身的問題を有することと設定し，健常歯列者 20 名を OA 群およびコントロール群の 2 群に分け，咀嚼効率，口腔関連 QoL，安静空隙量，ならびに咬合挙上量を測定項目として採用し，連続した 5 日間にわたり評価を行った．OA の装着部位については，違和感等が上顎よりも少ないとされている根拠に基づき下顎に，咬合挙上量は咀嚼効率に影響を与えない範囲である 6mm を目安としている．咬合様式は中心咬合位にて上顎機能咬頭が OA 咬合面に均等接触に，偏心運動時には被験者の咬合様式に準じた犬歯誘導，またはグループファンクションを採用した．咀嚼効率については色変わりガム（キシリトール咀嚼力判定用®，ロッテ）を，口腔関連 QoL の評価は主観的評価法の OHIP を用いた．データの解析は，装着前と装着直後の変化量，および装着直後と 24, 48, 72 および 96 時間後の変化量を算出し，Student の t 検定（有意水準: $p<0.05$）を用いて 2 群間の変化量の差を比較した．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。咀嚼効率は，装着前と装着直後の変化量に有意差があった．装着直後から 24, 48, 72 および 96 時間後までの変化量は有意ではなかった．OHIP については，機能の制限および痛みのサブドメインで装着前から装着直後，ならびに装着直後から 24, 48 および 72 時間後にて有意差があった．心理的不快感では装着直後から 24, 48, 72 および 96 時間後で有意差があった．身体的障害およびハンディキャップでは装着前から装着直後で有意差があった．また，安静空隙量の平均は 3.1±1.6mm，咬合挙上量の平均は 4.1±1.1mm であった．

上記の結果は，健常歯列者において OA 装着直後に咀嚼効率が低下すること，ならびに 5 日間以内に口腔関連 QoL が改善することを示唆している．これは咀嚼効率および主観的評価が

OA への適応評価に有効である可能性を示している．咀嚼効率低下の要因については，OA 咬合面形態が咬合力に与える影響や，咬合接触面積，咬合接触点の変化，ならびに咬合高径増加による影響と考察している．また，口腔関連 QoL の改善についても，舌・頬粘膜運動の上達，咀嚼パターンの変化などの機能的適応が短期間で起きた可能性を考察しており，これらメカニズムの解明を行うための研究を発展させる足がかりとなるものである．

本研究において，OA の装着直後に咀嚼効率が減少し，5 日間以内に口腔関連 QoL が改善したこと，さらには機能的適応が短期間で起きた可能性を示したことは，補綴治療における OA 利用の根拠を示したとともに, OA 装着による機能的適応に関する研究へと今後発展, 応用できる可能性が高いという点で，臨床的意義が大きい．本研究は綿密な研究計画のもとに実施され，適切な解析により妥当性の高い結果を導いており，研究計画および考察ともに高く評価できるものである．

以上の成果は，補綴治療に用いられる OA の機能的適応ならびに主観的適応に重要な知見を与えるものであり，今後の歯科医学の発展に寄与するところが大きい．従って本論文は博士(歯学)の学位を申請するのに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 加治佐　枝里子 |
| 論文審査担当者 | 主査　　深山 治久<br>副査　　鈴木　哲也　　古屋　純一 |
| 論　文　題　目 | The relationship between jaw-opening force and the cross-sectional area of the suprahyoid muscles in healthy elderly |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

舌骨上筋群は、嚥下機能に直接関わる重要な筋肉である。我々は、その筋肉に着目し、舌骨上筋群の力を開口力として測定するための装置を開発した。その結果、開口力の測定は咽頭残留を予測するのに有用であること、開口力は加齢により低下することが示された。また、嚥下障害患者に対する開口訓練は、舌骨の上方への挙上量、食塊の咽頭通過時間および食道入口部開大量の改善、さらに咽頭残留量の減少に効果があることが分かった。そして、男性のサルコペニア群では健常高齢者と比較して有意に開口力が低下することが示された。

サルコペニアは年齢とともに力を低下させる最大の要因と考えられている。近年の論文では、サルコペニアは嚥下障害の独立したリスクファクターであることが明らかとなっており、全身の骨格筋量と嚥下機能の関連性が示されつつある。また、高齢者では下肢の筋力低下は筋量の低下に先立ってかなり早期に起こることが明らかとなっている。しかしながら、嚥下に関わる筋肉の力と量の関係は明らかになっていない。嚥下に関わる筋量について、CT を用いたオトガイ舌骨筋の筋量の計測が報告されている。また、超音波診断装置にてオトガイ舌骨筋の断面積を測定し、筋量が身長と関連があること、男性は女性よりも筋量が多いことが報告されている。これらは、嚥下に関する筋量を評価しているが、筋力と比較していない。そして、脚や腕など四肢の筋肉では、力と量の関係がすでに示されており、口腔周囲筋についても調べることが必要である。

以上の背景により、全身のサルコペニアが舌骨上筋群に影響を及ぼす可能性を考慮し、その前段階として本研究では健常高齢者を対象として、開口力が舌骨上筋群の筋量および全身の骨格筋量に関係しているかを評価した。

＜対象と方法＞

<u>デザイン</u>

この研究は、2015 年 12 月から 2016 年 8 月の間に行い、地域在住の 65 歳以上の高齢者 90 名がボランティアで研究に参加した。嚥下障害者および Asian Working Group for Sarcopenia (AWGS) の基準に基づいて診断されたサルコペニアは除外した。開口力は開口力計（リブト社）を用いて計測し、3 回測定したうちの最大開口力を測定値とした。オトガイ舌骨筋および顎二腹筋前腹の断

面積は超音波診断装置 (MySono U6 Samsung Medison, Tokyo, Japan)を用いて測定した。プローブはリニア型で広帯域周波数 5-12MHz を使用した。プローブは前頭面に置き、下顎骨のオトガイと触知可能な甲状軟骨上の間のおよそ中ほどに、常に皮膚の表面に直角に交わるように位置づけした。口を閉じた状態で静止画像を 2 回撮り、オトガイ舌骨筋および顎二腹筋前腹の断面積をそれぞれ計測した。全ての測定は同一検者が行い、2 回の平均値を測定値とした。さらに、生体電気インピーダンス法による InbodyS10 (InBody Japan, Tokyo, Japan)を使用して、骨格筋量指標を測定した。男女別に開口力と関連している因子を調べた。

解析

開口力を従属変数とし、年齢、オトガイ舌骨筋の断面積、顎二腹筋前腹の断面積および骨格筋量指標を独立変数とした相関の検定を行った。

＜結果＞

男性では、オトガイ舌骨筋の断面積が正の相関を示し、年齢と負の相関を示した。一方、女性では、オトガイ舌骨筋の断面積、年齢に加え、骨格筋量指標も開口力との相関を認めた。自由度調整済みの決定係数 ($R^2$) は男性で 0.437、女性では 0.223 だった。

＜考察＞

開口力とオトガイ舌骨筋との関係

解剖学的、生理学的に舌骨の前方移動に関連しているのは、顎二腹筋前腹ではなくオトガイ舌骨筋であることがすでに示されており、本研究より開口力は嚥下時の舌骨の前方移動を反映することが示唆された。

開口力と年齢との関係

男性のみ開口力が年齢と負の相関を示した理由の一つとして、男性の加齢に伴う筋力低下は、インスリン様成長因子 1 やテストステロンの分泌が低下することにより起こる可能性があると考えられる。一方、女性では開口力が年齢と正の相関を示し、女性の開口力は加齢によって低下しない可能性が示唆された。本研究と同様の結果を示した先行研究が幾つか報告されている。まず、高齢者層では若年者層と比較して開口力が低下するものの、高齢者層においては、男女ともに年齢は開口力との相関がみられなかったという報告である。そして、嚥下時の舌骨の移動量は、男性の高齢者層では若年者層と比較して有意に低下する一方で、女性の高齢者層ではむしろ増加するという報告もある。

開口力と全身の骨格筋量との関係

本研究では、全身の骨格筋量指標は女性のみ開口力と相関を示した。女性が骨格筋量を維持していれば、開口力が保たれる可能性があるのに対して、男性は骨格筋量に関わらず加齢とともに開口力が低下することが示唆された。男性の方が嚥下機能は低下しやすい傾向にあることを示す研究が複数報告されている。まず、解剖学的に男性は女性より咽頭が長く、さらに男女とも加齢の影響で咽頭長が長くなることに加え、喉頭蓋谷底部から声帯までの距離が男性で有意に長いことが示されている。また、男性という性別そのものが誤嚥性肺炎のリスクファクターであるとも報告されている。

口腔周囲筋と年齢および骨格筋量との関係

口腔周囲筋は舌骨上筋群以外にも、舌や咬筋でも年齢およびサルコペニアとの関係が報告されている。特に、舌圧、咬合力および開口力のいずれの口腔周囲筋も加齢の影響を受け、男性においては舌圧と開口力がサルコペニアの影響を受けることが示されている。本研究で検証した以外の他の口腔周囲筋については筋力と筋量の相関性についての報告はなく、今後の検討課題の一つである。

＜結語＞

- 健常高齢者では、男女ともにオトガイ舌骨筋の断面積と開口力が正の相関を示した。
- 男性では開口力と年齢が負の相関を示したのに対し、女性では正の相関を示した。
- 女性では開口力と骨格筋量指標が負の相関を示した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5546　号 | 加治佐　枝里子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　深山 治久<br>副査　　鈴木　哲也　　古屋　純一 | |

（論文審査の要旨）

舌骨上筋群は、嚥下に直接関わる重要な筋肉である。これらの筋肉に着目して、舌骨上筋群の力を開口力として測定するための装置がすでに開発され、その手技は確立している。この開口力は嚥下機能を反映する臨床上重要な指標の一つであり、開口力および全身の骨格筋と嚥下機能の関連性が示されつつある。特に、サルコペニアが嚥下障害の独立したリスクファクターであること、サルコペニア群では健常高齢者と比較して開口力が低下することがすでに報告されている。筋量と筋力の相関は、腕や脚といった四肢において示されているが、嚥下に関わる筋肉、つまり舌骨上筋群においてはまだ明らかになっていない。

このような背景のもと、加治佐は本学倫理審査委員会の承認（第 D2014-047 号）を得て、健常高齢者を対象として、開口力が舌骨上筋群の筋量および全身の骨格筋量に関係しているか評価した。まず、サルコペニアを Asian Working Group for Sarcopenia の基準により診断し、対象者から除外した。方法として、開口力、オトガイ舌骨筋および顎二腹筋前腹の断面積、骨格筋量指標はそれぞれ開口力測定器、超音波診断装置、InBodyS10 を用いて測定した。開口力を従属変数とし、年齢、オトガイ舌骨筋の断面積、顎二腹筋前腹の断面積および骨格筋量指標を独立変数とした相関の検定を行った。

結果として以下の所見が得られた。

1. 健常高齢者では、男女ともにオトガイ舌骨筋の断面積と開口力が正の相関を示した。
2. 男性では開口力と年齢が負の相関を示したのに対し、女性では正の相関を示した。
3. 女性では開口力と骨格筋量指標が負の相関を示した。

以上の結果を基に加治佐は、開口力は顎二腹筋前腹ではなく、オトガイ舌骨筋の影響を受けており、嚥下時の舌骨の前方移動を反映している可能性があると考察している。また、女性の開口力は加齢によって低下せず、一方男性は、骨格筋量に関わらず加齢とともに開口力が低下する可能性を示唆しているが、これらは健常高齢者の嚥下機能低下の予測において重要な知見を与えるものと評価される。さらに、他の口腔周囲筋において筋力と筋量の相関を検討した報告がないことも指摘している。

以上のように本研究は、開口力と舌骨上筋群の筋量および全身の骨格筋量との相関を検討したはじめての研究であり、高齢者歯科学のみならず、今後の歯科医学の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられた。よって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 安　珍圭 |
| 論文審査担当者 | 主査　井関 祥子<br>副査　柴田 俊一、宮新 美智世 |
| 論　文　題　目 | The relationships between the arrangement of teeth, root resorption, and dental maturity in bovine mandibular incisors |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

矯正歯科治療に際して、骨や歯などの硬組織の形成程度から成長パターンや歯根吸収などを予測することは重要である。本研究ではウシの下顎前歯部における永久歯の成熟度、歯間間隙や歯根吸収による分類と各種成長関連因子との関連を調べることを目的とした。Demirjian の歯齢を応用した歯の成熟段階と、直接試料計測・規格レントゲン写真・歯科用コーンビーム CT（CBCT）から得られた計測値などの各種成長関連因子との関連を分析した。また、乳歯の後継永久歯胚に面しない部位に認められる歯根吸収を遠心異所性歯根吸収と近心異所性歯根吸収に分類して分析した。未萌出第三・第四永久切歯歯根の成長の程度を分類の指標とした低成熟群と高成熟群の間の比較では、アーチレングスディスクレパンシーに関する成長関連因子と生理的な歯の交換に関連する因子で有意差が認められた。歯間空隙と遠心の異所性乳歯歯根吸収が認められた個体は歯の成熟度と歯冠近遠心幅径総和の値が有意に大きく、近心の異所性乳歯歯根吸収が認められた個体は隣接する永久切歯の歯冠遠心面が舌側に捻転する傾向が認められた。結論として、歯の成熟度と、混合歯列期の歯間空隙並びに異所性乳歯歯根吸収との関連が認められた。また、CBCT の画像より、異所性乳歯歯根吸収の発生とそれに隣接する永久歯歯冠の位置との関連が示唆された。

＜緒言＞

矯正歯科治療における歯の成熟度と各種成長関連因子との関連は、最も基本かつ重要な事項で、特に混合歯列期にある患者の診断、治療目標の設定および治療計画の立案の際に有用な資料になる。例えば、永久歯の抜歯や機能的矯正装置の使用など、矯正歯科治療の診断の際に、歯の成熟度は必ず評価される項目である。歯の成熟度は各個人に特徴的な体内時計によって多様性を示すことから、個別の評価が必要である。

歯の成熟度の評価には、歯の成長発育に基づいた指標を用いる方法が最も正確であり、その中で左側下顎の永久歯の形成を指標にする Demirjian の方法が広く使用され、歯の成熟度の評価に最良の方法の一つと認識されている。永久歯列期でのアーチレングスディスクレパンシーと永久歯の配列を乳歯列から得られる情報で予測できるのかを調べた研究では、乳歯列での歯冠近遠心幅径の総和と犬歯間幅径が以後の永久歯列のディスクレパンシーや配列と関連性があることが報

告されている。また乳歯列で歯間空隙が認められなかった場合、永久歯の歯冠が大きく歯列弓は有意に狭くなることも報告されている。しかし混合歯列における歯の成熟度と空隙との関連性についてはまだ不明な点が多い。

混合歯列期における歯の成熟度と萌出経路は、上顎永久犬歯の異所性萌出が誘発する永久切歯の非生理的な歯根吸収を予測する要因として研究されてきた。Ericson、Kurol らは、対照群と比べ歯根吸収症例においては、永久側切歯・永久犬歯の成熟度が高く、永久犬歯が歯列の中でより近心に位置し、やや近心水平方向の萌出経路となると報告しており、Rozylo-Kalinowska らは、永久上顎犬歯が埋伏している患者は正常に萌出した患者より歯の成熟度が有意に低かったと報告している。永久犬歯の埋伏と永久切歯の異所性歯根吸収および歯科用コーンビーム CT（CBCT）による歯の萌出の角度の関連についてはさらなる研究が必要である。しかしながら、被曝などの問題から未治療対照群を含んだ混合歯列期での多数の症例から歯の成熟度を分析した報告は多くはないのが現状である。

また歯の形成過程の様々な段階と手根骨Ｘ線写真などの成長関連因子との関係についても研究が行われてきたものの、歯根吸収組織（RRT）の活性度や乳歯の動揺度などの他の因子の役割についてはまだ明らかにされていない。そこで本研究では、混合歯列期におけるウシ下顎前歯部試料を用いて永久歯の成熟度の段階、歯間空隙、異所性歯根吸収を分類するとともにその関係を検討し、歯槽骨中での永久切歯の萌出様相とその萌出による隣接歯の歯根吸収を明らかにすることを目的とした。

＜方法＞

110 頭のウシ（和牛）の下顎前歯部試料に対して直接計測、規格レントゲン写真および CBCT を用いた計測・分類・分析等による横断的調査を行った。直接計測には電子ノギスを、CBCT では機器付属の分析プログラムを使用した。各種成長関連因子（乳歯と永久歯との位置関係、下顎骨の大きさ、アーチレングスディスクレパンシー、乳歯と永久歯の歯根長、歯根膜腔の幅、歯根吸収組織の色の分類、乳歯の動揺度、後継第四永久切歯歯胚に面しない第四乳歯の遠心または近心の異所性歯根吸収の量、歯間空隙の量など）を数値化した。そして乳歯の脱落関連因子（歯根吸収組織の活性度、乳歯歯根の吸収程度、乳歯の動揺度など）について調査した。全試料は Demirjian の方法を応用し、未萌出第三・第四永久切歯の歯根成長の程度を分類の指標として、低成熟群と高成熟群に分けた。隣接歯同士の空隙の有無を指標として、空隙群と非空隙群に分けた。また第四乳切歯遠心の異所性歯根吸収ならびに近心の異所性歯根吸収の有無を基準にして群分けを行った。二つの群間の成長関連因子の平均値の差に関して独立 2 群の t 検定とカイ二乗検定を用いて分析した。

＜結果＞

永久切歯に異所性歯根吸収は見つからなかった。第四乳切歯の遠心面（n=12）と近心面（n=2）に異所性歯根吸収が認められた。また、低成熟群と高成熟群における、下顎骨の幅径、アーチレングスディスクレパンシー、永久歯根長、第三乳切歯の歯根から第三永久切歯の歯胚までの距離、正中縫合線に対する第三永久切歯歯冠近遠心軸第三永久切歯歯冠の角度に有意差が認められた

が、永久歯の歯冠近遠心幅径の和および第四乳切歯歯根膜腔の幅には有意差が認められなかった。低成熟群は高成熟群に比べ月齢が有意に低かったが、同じ月齢区間に調整した後の比較では高成熟群が低成熟群より有意に大きい下顎骨の幅径を示した。歯間空隙が認められた個体では、下顎骨の幅径、歯列弓長、永久歯の歯冠近遠心幅径の和が大きくなる傾向があった。第四乳切歯の遠心に異所性歯根吸収が認められた個体は、第三永久切歯の歯冠近遠心幅径が有意に大きく、遠心の歯根膜腔の幅が有意に狭かった。歯間空隙が認められた個体、または遠心異所性歯根吸収が認められた個体では、歯の成熟度が有意に高かった。近心の異所性歯根吸収が認められた個体では、正常個体より第三永久切歯の遠心面が舌側に回転する傾向が認められた。

＜考察＞

CBCT の撮影に伴って発生する放射線被曝による倫理的問題を回避するためにヒトの前歯部と類似した形態を有するウシ下顎前歯部を研究対象とした。ウシの下顎前歯部における永久歯の萌出過程は乳歯の舌側面に沿って移動する点、中切歯（第一切歯）が最も早く萌出する点などでヒト下顎前歯部における永久歯の萌出と類似している。ただしウシの場合、永久切歯の萌出過程が短期間で終了する点がヒトとの大きな違いであった。

歯の成熟度の高低を基準にして試料を低成熟群と高成熟群に分けて比較した結果、多数の成長関連因子での有意差が観察され、既存の骨格の発育と歯根形成との相関に関する報告と類似した結果が得られた。第三乳切歯から第三永久切歯歯胚までの距離は、高成熟群が低成熟群より有意に短く、萌出段階を基準にして小児の頭蓋骨標本の群分けを行い乳歯から後続永久歯までの距離を調査した Saka らの研究と同様の傾向が確認された。また、本研究で乳歯の歯根吸収や動揺度などの乳歯の交換に関わる成長関連因子は、歯の成熟度と密接な関連を示しており、ヒトの乳歯の交換時期における各種因子を調査した Nanda らの報告と一致していた。Oguchi らは歯根吸収組織には活性期と休止期の二つの段階が存在することを報告したが、歯の成熟度が高くなるほど活性期になっている歯根吸収組織の割合が高くなることが本研究において新たに確認された。

また、乳歯列の歯冠空隙は、適切な永久歯の咬合の形成に関与する重要な所見である。特に空隙群は、非空隙群より大きな歯冠近遠心幅径総和で、下顎骨の幅や配列可能な空隙も大きかったことから、歯の空隙は顎と歯の大きさとの不均衡を評価する際の基準になることが示唆された。

一方、第四乳切歯遠心の異所性歯根吸収の有無と歯の成熟度との間には関連が認められた。遠心異所性歯根吸収は、相対的に第三永久切歯の歯冠幅径が大きく第四乳切歯の歯根膜腔の幅が狭い傾向を示したことから、永久歯の萌出圧が乳歯歯根を歯槽骨の方向に押して発生したと推測された。第四乳切歯近心の異所性歯根吸収が発生していた個体は、隣接する第三永久切歯の遠心面が舌側方向に回転し、歯根吸収が発生した歯の歯根表面に近接していた。以上の結果は、Ericson らが報告した永久側切歯の歯根吸収が発生した際の永久犬歯の萌出パターンと類似していた。また Guarnieri らは、前頭面上での側切歯と萌出中の犬歯の歯軸間に形成される角度を歯根吸収予測の因子として用いており、CBCT 上での歯で形成される角度を用いた点で類似していた。

＜結論＞

ウシ下顎前歯混合歯列期における歯の成熟度は、歯間空隙と異所性歯根吸収に関連していた。

また、萌出途中の隣接する永久歯歯冠の位置は異所性歯根吸収の発生を予測する因子となりうる可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5547　号 | 安 珍圭 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　井関 祥子<br>副　査　柴田 俊一、宮新 美智世 | |
| 論 文 題 目 | The relationships between the arrangement of teeth, root resorption, and dental maturity in bovine mandibular incisors | |

（論文審査の要旨）

小児歯科や矯正歯科治療の領域で、混合歯列期に発生する問題として、萌出の空間的不足や異所性歯根吸収などがあり、事前に問題発生を予測・予防しようとする努力が続いており、CBCTなどの診断方法の発展と共に多くの臨床的な検討がなされてきている。その努力の一環として手根骨X線写真を用いて骨の成熟度を評価する方法等が使用されており、抜歯や機能的矯正装置を選択する時の指標として使われている。しかしながら、骨の成熟度の評価が口腔内硬組織、特に歯の成長を忠実に反映してない場合も多く、歯の成熟度の評価が重要な意味を持つが、被曝などの問題から未治療対照群を含んだ混合歯列期での多数の症例から歯の成熟度を分析した報告は多くはないのが現状である。

このような背景のもと、安は、混合歯列期での歯科矯正学的問題を事前に予測する指標として歯の成熟度に着目し、歯の動揺度や歯根吸収組織の活性度などの各種成長関連因子や混合歯列の歯間空隙、異所性歯根吸収との関係について検討を発想した。

調査対象には、ヒトの前歯部と比較的類似した構造を持ち、個体による栄養状態などのばらつきが少ない長所があるウシ前歯を選んでいる。歯の成熟度や異所性歯根吸収の評価に、CBCT撮影と検体の直接試料計測を併用することで、低成熟群と高成熟群の分類や異所性歯根吸収発生の判別を的確に行っている。特に歯の成熟度の評価には、学術領域で幅広く使用されているDemirjian の方法を応用して使用することで、綿密な成熟度の分類を図っている。また混合歯列期で生じやすい問題の一つである異所性歯根吸収の有無を全試料の乳歯と永久歯に亘って解剖前後の CBCT と実物調査の両方で調査している。歯の成熟度、混合歯列での空隙の有無、乳歯の異所性歯根吸収の有無で群分けを行い各種成長関連因子の関連を調査するほか、分類基準間の関連性も確かめている。

このように周到な計画立案の上、適切な手法を用いて、ウシの混合歯列期で把握できる指標の関連性や異所性歯根吸収を多角的に捉えようとした同人の研究姿勢は高く評価されるものである。

以上の研究方法により、研究結果としては、以下の知見を得ている。

1. 歯の交換と顎骨の成長に関わる各種成長関連因子は、歯の成熟と有意な関連が認められた。
2. 110 個体の試料の乳歯と永久歯において、異所性歯根吸収は永久歯では認められず、乳歯では一部の最側方乳歯である第四乳切歯の歯根面の遠心と近心で認められた。
3. 第四乳切歯歯根遠心面に異所性歯根吸収が認められた群において、歯根膜の幅と Required arch length の値が同月齢対照群と比較して有意に小さかった。
4. 第四乳切歯歯根近心面に異所性歯根吸収が認められた試料において、CBCT の水平断面上で正中縫合線に対する第三永久切歯歯冠近遠心軸の角度は同月齢対照試料と比較して大きい値を示していた。
5. 歯の成熟度と混合歯列での空隙有無、乳歯の異所性歯根吸収の有無の間に有意な相関が認められた。

以上の結果から、ウシ混合歯列期における歯の成熟度は、顎骨の大きさや乳歯の歯根と後続永久歯との位置関係などの成長関連因子と深い関係を持っており、歯根吸収組織の活性度とも関係があることが明らかとなった。また乳歯の異所性歯根吸収の状態から、歯の成熟度と萌出中の歯の捻転程度が異所性歯根吸収の発生の指標として役に立つ可能性が示唆され、ウシの歯列を検討することで、混合歯列期の矯正歯科治療の予後を的確に予想できる可能性が示された。

本研究で明らかになった知見は、歯の成熟度が持つ混合歯列の空隙歯列及び異所性歯根吸収の発生との関連性を示唆しており、矯正歯科治療計画の立案や口腔内硬組織の成長様相の評価の際に意義があると評価され、今後の歯科臨床および基礎歯学の発展に大いに貢献するものと考えられる。

したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するのに十分価値があると認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | LUONG DAO Minh Nguyet |
| 論文審査担当者 | 主査　宇尾　基弘<br>副査　倉林　亨　　三浦　宏之 |
| 論　文　題　目 | New approaches in bond test and bleaching using biophotonic technologies |

（論文内容の要旨）

**Introduction:** In spite of esthetic quality, simple maneuver and strengthened mechanical properties, the Bis-GMA-based resin still bears the limit of volumetric polymerization shrinkage. The application of low-viscosity resin between adhesive and resin composite has been reported to be one of the measures to overcome contraction stress and bonding. Bond strength test are the most frequently used method to screen adhesive. The crosshead speed is the major factor to affect the bond strength value. Relatively high crosshead speed would produce an abnormal stress distribution including cohesive failures in substrate and resin composite, hence influence the bond strength value. Various crosshead speeds were used but it was not fully understood how this parameter affects bonding and the structural damage for the interface.

The major shortcoming of contemporary adhesive restoratives is their limited durability in vivo. Even though the immediate bonding effectiveness is quite favorable, in the clinical trials, the quality appears to decrease considerably because of degradation through the dentin interface. A popular technique of in vitro aging is thermal cycling(TC) using temperature oscillations to stress the interface and challenge the performance of the materials.

The previous studies utilizing conventional microscopic methods to observe the interface were invasive. Optical coherence tomography (OCT) does not require prior preparation for the sample, and it provides high-resolution subsurface detection. Therefore, OCT is suitable for the observation of the resin/dentin interfacial crack.

In among the light sources used in biophotonic therapy, light-emitting diode (LED) plays an important role thanks to its lower energy consumption and longer lifetime. It is reported that UV light is absorbed well by hydrogen peroxide, hence their reaction is effective to tooth breaching. But the application of UV-LED light source has not been fully investigated.

In the first study, the effect of crosshead speed of bond strength test on interfacial crack was assessed. In the second study, the effect of thermal stresses on crack through resin-dentin interface was evaluated. The third study mainly sought the potential of UV light from LED unit in application of bleaching *in vitro.*

**Methods and materials:** Micro tensile bond strength (MTBS) test beams (0.9 x 0.9 mm) were prepared

from flat human dentin disks bonded with self-etch adhesive (Clearfil SE Bond, Kuraray) and universal composite (Clearfil AP-X, Kuraray) with or without flowable composite lining (Estelite Flow Quick, Tokuyama).

In the first study, each beam was scanned under SS-OCT (Santec IVS-2000, Japan) at 1319 nm center wavelength before MTBS test was performed at crosshead speed of either 1 or 10 mm/min (n=10). The beams were scanned by SS-OCT again to detect and measure cracks at the debonded interface using digital image analysis software.

In the second study, the beams were aged for either 0 or 10,000 TCs, resulting in 4 groups of specimens according to the placement technique and TC (n=10). MTBS test was performed at 1 mm/min crosshead speed. 2D images of specimens were obtained before and after bonding test using SS-OCT to detect crack formed at interface. To support the crack results, Marten's hardness of eight successive layers across resin-dentin bonding area was measured using nanoindentation (ENT-1100a) and compared between specimen with or without TC.

In the third study, hematoporphyrin-stained paper was bleached with 30% hydrogen peroxide (HP) and irradiated for 10min using LED light sources with 265, 310, 365, 405 or 450nm respectively. In control group, HP was applied for 10min without light irradiation. The bleaching procedure was repeated two times. The L*a*b* values of the samples before bleaching and after each bleaching step were measured using a colorimeter. Color changes of specimens were then calculated and statistically analyzed. The results were visually confirmed with bleaching on bovine teeth model.

**Results:** In the first study, Two-way ANOVA showed that for MTBS the crosshead speed was not a significant factor ($p>0.05$), while there was a difference between placement techniques ($p<0.001$), with flowable lining yielding higher mean values. On the other hand, for crack formation, there was a significant difference between crosshead speeds ($p<0.01$), while the placement technique did not show up as a statistically significant factor ($p>0.05$). The interaction of factors were not significant ($p>0.05$).

In the second study, flowable lining significantly increased MTBS ($p<0.05$) whereas TC did not affect the bonding quality ($p>0.05$). However, TC significantly increased crack percentage in composite while there was no significant difference in dentin crack. In the nanoindentation test, thermal challenge significantly affected hardness of dentin and both resin composites ($p<0.05$).

The third study showed that there was an interaction between light sources and time of irradiation in the color change ($p<0.05$). Time and light sources significantly affected $\Delta E$ and $\Delta L$ ($p<0.05$). The light source of 256nm showed the highest bleaching effect over time followed by that of 310nm, which were statistically different from other groups ($p<0.001$). The 365nm, 450nm groups and control group showed low bleaching effect visually with no significant differences in $\Delta E$ and $\Delta L$ ($p>0.05$). A similar trend was observed on bovine teeth model.

**Conclusion** Lining with a flowable composite improved the bonding quality and increased the bond strength. Testing MTBS samples at higher crosshead speeds induced more cracks in dentin. Mechanical

properties of dentin and resin composite significantly decreased after 10,000 thermal cycles, which concurred with increased crack formation at composite after MTBS test. In both studies, OCT proved to be an effective tool to monitor interfacial crack in dentin and resin composite in microtensile bond strength test. Furthermore, the wavelengths of the light sources affected the bleaching by HP. The 310-nm light can be a good potential source for bleaching.

**[和訳]**

優れた審美性を有する一方、機械的性質を向上させるために使用されている BisGMA ベースのレジンは、重合時の収縮が問題となっている。重合収縮応力がレジン／窩壁間の接着力を上回ると界面の接着は失われる。レジンの重合収縮を緩和する対策として、接着材とコンポジットレジンの間に低粘性レジンを介在させる手法が報告されている。接着試験は接着のスクリーニングに最も使用されているが、その際のクロスヘッド速度は、試験結果に影響を及ぼす因子 1 つである。速いクロスヘッド速度は試験片内部に異常な応力分布を生じ、接着強さに影響を及ぼす可能性がある。現在、接着試験において様々なクロスヘッド速度が用いられているが、それが接着や界面構造に及ぼす影響は解明されていない。

現在の接着修復材料の大きな欠点として、臨床における耐久性が挙げられる。接着直後は優れた特性を示しても、臨床では象牙質との接着界面の劣化により接着力は低下する。In vitro にて多用される劣化試験として、温度変化を繰り返し負荷させるサーマルサイクルが行われている。

他方、従来の顕微鏡による接着界面の観察は、試験片を切断し研磨、超音波洗浄などを行うことから、侵襲的な方法であった。光干渉断層計（OCT）は観察のために試験片を加工することなく、高解像度の観察が可能な手法であることから、象牙質接着界面の亀裂を観察するのに適した手法である。

また、光線力学療法に用いられる様々な光源の中で、LED（light-emitting diode）は、低電力消費と長寿命を活かして重要な役割を担っている。審美歯科治療において、紫外光吸収による過酸化水素の分解が審美性改善に効果があることが報告されているが、紫外 LED の応用についての研究は十分ではない。

本研究の実験 1 では、微小引張接着試験におけるクロスヘッド速度がレジン - 象牙質接着界面の亀裂発生に及ぼす影響を評価した。実験 2 では、サーマルサイクルによるレジン - 象牙質接着界面の亀裂への影響を評価した。実験 3 では、紫外 LED の漂白への応用を in vitro で検討した。

**[材料と方法]**

ヒト象牙質にセルフエッチング型の接着材(Clearfil SE Bond, クラレ)を用いて コンポジットレジン (Clearfil AP-X, クラレ)を接着させ、フロアブルコンポジット(Estelite Flow Quick, トクヤマ)のライニングを行ったものと行わなかったものについて、微小引張接着(MTBS)試験用のビーム状試片（0.9 mm×0.9 mm）を作製した。

実験 1 では MTBS 試験の試片を、SS-OCT (IVS-2000, サンテック)を用いて 中心波長 1319 nm にて観察し、その後、クロスヘッド速度 1 mm/min または 10 mm/min にて接着試験を行った(n = 10)。MTBS 試験後の試片をさらに SS-OCT により観察し、破壊面に生じた亀裂を検出した。合わせて

代表的な試片を共焦点走査型レーザー顕微鏡により観察し、破壊形態の確認を行った。

実験２では、フロアブルコンポジットのライニングの有無によって区別し作成した MTBS 試験の試片に、サーマルサイクル 0 回または 10,000 回を負荷し(n = 10)、クロスヘッド速度 1 mm/min にて接着試験を行った。接着試験の前後における接着界面の 2D 断層画像を SS-OCT により撮影し、接着界面付近の亀裂の形成を観察した。亀裂の結果と比較するため、レジン- 象牙質の界面構造から 8 層を選択し、その硬さをナノ硬さ試験(ENT-1100a)により計測し、TC の有無による影響を調査した。

実験３では、ヘマトポルフィリン染色紙を調製し、それを 30%過酸化水素（HP）と波長 265, 310, 365, 405 あるいは 450 nm の LED 光の 10 分間の照射を組み合わせて漂白した。漂白処置は 2 回繰り返した。色彩計を用いて、漂白前後の測色値 L*a*b*を求め、試料の色の変化を算出し、統計学的検討を行った。また、牛歯変色歯モデルを用いて、漂白効果を視認した。

**[結果]**

実験１において、クロスヘッド速度の違いは MTBS の結果に影響をおよぼさなかったが(two-way ANOVA, $p > 0.05$)、フロアブルレジンによるライニングの使用によって接着強さが高くなった($p < 0.001$)。亀裂の発生については、クロスヘッド速度の違いによる変化がみられたが($p < 0.01$)、ライナーの使用による違いはみられなかった($p > 0.05$)。クロスヘッド速度とライナーの使用の間に相互作用はみられなかった。

実験２では、フロアブルライナーにより MTBS の試験結果が有意に向上したが($p < 0.05$)、TC による影響はみられなかった($P > 0.05$)。しかしながら TC によって亀裂の発生率が変化し、コンポジットレジンにおいて有意に増加し、象牙質では増加がみられなかった。ナノ硬さ試験では、TC によって象牙質とコンポジットレジンの値に影響がみられた（$p < 0.05$）。

実験 3 では、色の変化に対して、光源と照射回数は有意に影響した。照射回数と光源は、色差（ΔE）と明度差（ΔL）に有意な影響を与えた。波長 256nm の紫外光は最も高い漂白効果を示し、次いで、310 nm の紫外光であり、他の群に比べて有意な差が認められた。365 nm および 450 nm の LED 光源および対照群（未照射）は、肉眼でも低い漂白効果しか認められず、ΔE と ΔL のいずれにおいても有意差は認められなかった。牛歯変色歯モデルを用いた実験においても同様の結果であった。

**[結論]**

フロアブルライニングによってコンポジットレジンの接着強さは向上した。MTBS のクロスヘッド速度が速くなると、象牙質における亀裂が増加した。10,000 回の TC によって象牙質とコンポジットレジンの機械的強度は低下し、MTBS 後のコンポジットレジンにおける亀裂は増加した。実験１と実験２において、OCT は MTBS の象牙質とコンポジットレジンの接着界面における亀裂を観察するのに有効であった。波長 310 nm の紫外光は漂白に有効である可能性が示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5548　号 | LUONG DAO Minh Nguyet |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　宇尾　基弘<br>副　査　倉林　亨　　三浦　宏之 | |
| 論 文 題 目 | New approaches in bond test and bleaching using biophotonic technologies | |

（論文審査の要旨）

近年の光学技術の発展に伴い、歯科医療において新しい光学機器の導入がすすめられている。光干渉断層計（OCT）は光の干渉作用を利用して観察対象の断層画像を得る技術であり、中でも波長走査型 OCT（SS-OCT）は画像解像度と観察深度に優れ、歯科疾患の診断への利用が期待されている。また紫外線の中で波長の長い 310 nm の UVB は生体への為害作用が少なく、皮膚科領域の疾患の治療に使用されており、歯科医療現場でも利用できる可能性がある。本研究は保存修復領域における新たな取り組みとして、OCT を用いしまた接着修復材の接着性の新しい評価ならびに UVB による歯の漂白効果を検討したものであり、3 つの論文から構成されている。

論文 1 では、接着修復材料の新しい評価として、SS-OCT を用いて微小引張接着試験後の試験片内部の亀裂発生を観察し、クロスヘッド速度の値とフロアブルレジンのライナーの使用による影響を検討している。使用した材料はいずれも臨床技法を反映したものであり、適切な選択といえる。SS-OCT による内部亀裂の評価には画像処理ソフトを用い、象牙質内部の変化の半定量的計測を行っており、新しい試みとして評価できる。クロスヘッド速度は 1, 10 mm/min の２通りが設定されており、微小引張接着試験ならびに象牙質内部亀裂の評価における違いを得る上で適切な条件設定といえる。試験後試料の SS-OCT 観察の後に窩洞を半切し、走査型レーザー顕微鏡（CLSM）を用いてギャップの確認を行っているが、SS-OCT 観察の妥当性を評価する上で、適切な対応といえる。得られた主な結果は次のとおりである。

1. クロスヘッド速度の違いによる接着強さの値の変化はみられなかったが、ライナーの使用によって値が高くなった。
2. 象牙質内部亀裂はクロスヘッド速度が速くなると有意に増加したが、ライナーの使用による違いはみられなかった($p > 0.05$)。

論文 2 では論文 1 と同様、微小引張接着試験の試片における内部亀裂の評価を目的として行っているが、劣化による影響の検討を目的としてサーマルサイクルを負荷している。象牙質とコンポジットレジンの接着界面の SS-OCT 画像分析に加え、界面構造から 8 層を選択し、そのナノ硬さ試験の計測によって物性の変化も調査し、分析結果の信頼性を高めている。得られた主な結果は次のとおりである。

1. 接着強さはライナーの使用により向上し、サーマルサイクルによる影響はみられなかった。
2. サーマルサイクルにより接着試験後のコンポジットレジンの内部亀裂は増加したが、象牙質では変化がみられなかった。
3. ナノ硬さ試験では象牙質とコンポジットレジンの値がともに低下した。

論文 3 では歯のオフィスブリーチに用いる照射器に着目し、医療現場で用いられている紫外線の UVB 光源を応用して、ヘマトポルフィリン染色紙と牛歯を用いてその漂白効果を評価した研究である。実験に用いた光源波長は 265, 310, 365, 405, 450nm であり、光強度を均一にする工夫がなされている。色彩計を用いて漂白前後の色調変化を計測しており、簡便な実験系ではあるが UVB の漂白効果が明確に示されており、審美歯科領域における斬新な情報の提供に成功している。得られた結果は次のとおりである。

4. 波長 256nm と 310nm の紫外光において他の波長光よりも有意に高い漂白効果が得られた。

以上より、申請者 LUONG DAO Minh Nguyet が本研究領域において最先端の光学技術の導入をはかり、接着歯学ならびに審美歯科学における新しい知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は歯科保存学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 後村　純史 |
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　興地　隆史　　宮新　美智世 |
| 論　文　題　目 | Influence of FCP-COMPLEX on bond strength and the adhesive-artificial caries-affected dentin interface |

＜緒言＞

近年、接着技術の向上に伴い、コンポジットレジン修復がう蝕治療の第一選択となっている。う蝕治療におけるコンポジットレジン修復の被着体は、う蝕の影響を受けた象牙質（Caries affected dentin: CAD）であるが、引張り強さや硬さなどの機械的特性は、健全象牙質より劣ることが報告されている。また長期的には健全象牙質の接着強さも低下するため、CAD の接着強さも低下すると考えられている。そのため、健全象牙質と比較して、CAD は脱灰によりミネラル密度が減少していることから、物理的および化学的特性の向上が、接着に関する問題を解決する鍵となると考えられる。

Joves らは、CAD への接着を評価するためのモデルを作製し、そのミネラル成分、形態、引張り強さ、および硬さを天然のう蝕の影響を受けた象牙質（Natural caries affected dentin: NCAD）と比較し、細管内の形態の違いを除き、ほぼ同様の性質を有することを報告した。

Chow、Takagi らは、フッ素、カルシウムおよびリンの脱灰エナメル質の再石灰化への有効性について報告したが、通常、溶液中にフッ素およびカルシウム濃度として mmol / L レベルを超えて存在すると直ちにフッ化カルシウム（$CaF_2$）として沈殿する。そこで彼らは同一容器内で安定的な状態で存在できる特異的な配合比率を発見し、FCP-COMPLEX（以下 FCP）と名付けた

増子らは、ウシの歯の人工 CAD（ACAD: Artificial caries affected dentin）に FCP を塗布することによる効果を報告した。走査電子顕微鏡（SEM）観察により、FCP 処理後に象牙細管内および周囲に沈着物が確認され、さらにエネルギー分散型 X 線分析により、ACAD 表面のフッ素濃度が FCP と同濃度のフッ化ナトリウム（NaF）塗布群と比較して 14 倍高くなった事を明らかにした。また、耐酸性試験により接着界面における、CAD 底部での耐酸性が向上したことも報告した。

しかしヒト ACAD を用いた場合に FCP が接着性に及ぼす影響および長期保管による接着性や歯質の性状変化に関する報告はまだない。本研究の目的は、ヒト ACAD に対して FCP-COMPLEX 塗布後の微小引張り接着試験（μTBS）および耐酸性試験への影響を、短期および長期保管後とで比較検討することとした。

＜材料と方法＞

塗布溶液として FCP、2%NaF および蒸留水を使用した。FCP は、NaF、$CaCl_2$、$H_3PO_4$を 6：10：1 のモル比で混合し、2%NaF 溶液と同様に、フッ素濃度 9000 ppm に調整した。

ヒト抜去小臼歯の象牙質面（4×4mm）のみを露出させるようにネイルバーニッシュを塗布した後、人工脱灰液（1.5 mM $CaCl_2$, 0.9 mM $KH_2PO_4$, 50 mM acetic acid, 0.02% $NaN_3$）にて 7 日間脱灰後、脱灰の影響を受けた象牙質が 150 μm 程度になるように 600 番耐水研磨紙にて研削した。その後、各溶液 3 μl を ACAD モデル表面に 20 秒間塗布し、10 秒間水洗乾燥し、試料とした。

微小引張り接着（μTBS）試験では、被着面に対し 2 ステップセルフエッチング接着システム（クリアフィルメガボンド：クラレノリタケデンタル）を業者指示通りに使用し、約 2 mm の高さまでコンポジットレジン（エステライトフロークイック：トクヤマデンタル、クリアフィル AP-X：クラレノリタケデンタル）を築盛し、光硬化させた。その後、37℃の蒸留水中に 24 時間、または人工唾液（pH 6.3; 0.2 M $CaCl_2$, 0.2 M $NaH_2PO_4$, 1.0 M NaCl, 1.0 M acetic acid, 2.0% $NaN_3$）に 3 ヶ月保管した後、断面が 0.5×0.5 $mm^2$のビーム状試料を作製した。クロスヘッドスピード毎分 1 mm にて μTBS 試験を行った後、得られたデータは 2-way ANOVA 用いて統計解析を行った。破断面の SEM 観察（JSM-5310LV：日本電子）により破壊部位の評価も行った。

ACAD 表面観察では、各溶液処理試料をエタノール上昇系で脱水し、乾燥後、ヘキサメチルジシラザンにて 5 分間浸漬固定後、24 時間室温乾燥させ、SEM 観察した。

接着界面の耐酸性評価では、各溶液塗布試料にクリアフィルメガボンドおよびエステライトフロークイックを用いてサンドイッチ状に接着した。24 時間水中保管後、半切し、エポキシレジン包埋後、人工脱灰液（pH 4.5; 2.2 mM $CaCl_2$, 2.2 mM $Na_2HPO_4$, 50 mM acetic acid）に 90 分、6% NaOCl に 20 分間浸漬した。その後、スーパーボンド C&B（サンメディカル）でコーティングし、SEM により脱灰程度ならびに酸-塩基抵抗層（Acid-base resistant zone: ABRZ）の観察を行った。

FCP 塗布による ACAD 表面の沈着物解析を、X 線吸収微細構造解析（XAFS）を用いて行った。電子蓄積リング（300 mA、575 MeV）からの放射光を、線間隔の異なる格子（600 線/ mm）で単色化し、入射 X 線を 2 つの円筒形ミラーによって XAFS チャンバーで直径 2 mm のビームに集束させ、金メッシュ（100 メッシュ）の光電流を用いて I0 信号をモニターした。部分電子収量法およびマイクロチャネルプレートを用いて、F K エッジを 678～722 eV のスペクトル範囲で走査した。$CaF_2$および FAp の XAFS スペクトルを基準として測定した。

＜結果＞

μTBS 試験の結果、期間・材料間ともに統計学的有意差は認められなかった。破断面観察の結果、1 日保管の場合には蒸留水群（DW）の界面破壊は 50%程度であったが、NaF および FCP 群では界面破壊が 20%未満であった。一方、3 ヶ月保管の場合には、すべての群において界面破壊が 50%の割合で認められた。

表面観察では、DW 群および NaF 群では、沈着物がほとんど観察されなかったのに対し、FCP 群では、表面に沈着物が観察された。

接着界面の SEM 観察では、ABRZ はすべての群で明確に観察された。1 日保管においては、DW、NaF、FCP 群における ABRZ の厚さは、それぞれ約 10, 30 および 30μm であった。3 ヶ月保管では、FCP 群の厚さは約 10μm に減少した。ABRZ 直下にはそれぞれの試料において酸処理による象牙質に対する脱灰による影響が確認された。脱灰の影響を受けた象牙質の深さは、1 日保管の DW 群では約 200μm、NaF 群では約 250μm、FCP 群では約 100μm であり、FCP 群が最も抑制効果を示した。また、3 ヶ月保管の DW 群では約 250μm であったのに対し、NaF 群では約 100μm、FCP 群では約 150μm と、共に DW 群よりも脱灰の影響は少なかった。

XAFS において、FCP 塗布した試料のエッジエネルギーおよびピークバランスは、FAp よりも $CaF_2$のものと類似していたことより、試料表面上に存在する沈着物は $CaF_2$である可能性が高いことが示唆された。

＜考察＞

接着材中のフッ化物の存在は、象牙質への接着を妨げずに二次う蝕の予防に寄与し、象牙質にフッ素が取り込まれると脱灰抑制効果が得られる。本研究では、FCP を使用することにより、フッ素だけでなく、カルシウムとリンも ACAD に供給された。これにより FCP 処理した ACAD 界面での酸-塩基処理後の脱灰は、他の群と比較して減少した。このことは、修復物周囲における二次う蝕の予防を促進する可能性を示唆している。しかし、ABRZ 形成に関しては、NaF 群と FCP 群では差がなく、3 ヶ月保菅後の FCP 群の ABRZ の厚さは減少した。これらの結果は、含有されるフッ化物が ABRZ の形態や脱灰抑制効果両方に影響を及ぼすため、その厚さに変化が生じると考えられた。

μTBS 試験においては、すべての期間、材料ともに統計学的有意差は認められなかったが、フッ化物および他のイオンの塗布が、レジンモノマーの ACAD への浸透を阻害せず、短期間の接着耐久性には影響しないことが示唆された。

1 日保管では、DW および NaF 群と比較して、FCP 群で脱灰が抑制された。これは、ACAD 表面への FCP の浸透が、修復物周囲への酸による影響をより効果的に抑制するが、接着強さを向上させるほどの効果はなかったことを示している。しかし、FCP 群では、3 ヶ月保管した後に接着強さが増加する傾向があったため、長期保管後には高い接着強さが得られる可能性が示唆された。3 ヶ月の保管期間にわたって、脱灰の深さは、1 日保管と比較してすべての群で減少した。これは、複数のイオンを含む人工唾液中への長期保存により、接着界面の耐酸性が向上したことによると考えられる。

NaF および FCP 処理共に、3 ヶ月保管においては脱灰抑制をもたらしたが、1 日保管では、FCP は脱灰抑制をもたらしたのに対し、NaF は脱灰抑制効果を示さなかった。以前の研究では、脱灰抑制効果が塗布後直ちに観察されたことを考慮すると、本研究で使用した FCP は 1/10 量であるため、低用量の FCP 塗布でも効果を有する可能性があることが分かった。

FCP 塗布後、ACAD 表面に多量の $CaF_2$が存在することが XAFS 分析により確認された。しかし、耐酸性に関しては、試料の接着界面を人工脱灰溶液と次亜塩素酸ナトリウムで処理を施す影響により、歯質表層に沈着した $CaF_2$などのミネラルやコラーゲンは除去され、耐酸性であるレジンモノマー成分や歯質反応成分のみが残ることになる。よって、結果的に FCP 処理による脱灰抑制効果が得られたのは、FCP 塗布によるミネラルの沈着ではなく、FCP 塗布により、その後の接着処理におけるレジンモノマー成分の浸透が促進されたことによる可能性が示唆された。

＜結論＞

FCP は、接着界面付近の脱灰を抑制し、ACAD へのフッ化物の沈着を増加させた。これらの効果は ACAD の強化に寄与する可能性がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5549　号 | 後村　純史 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　興地　隆史　　宮新　美智世 | |
| 論 文 題 目 | Influence of FCP-COMPLEX on bond strength and the adhesive-artificial caries-affected dentin interface | |

う蝕治療においては、う蝕象牙質内層（Caries affected dentin: CAD）にコンポジットレジンを接着させることになるが、その接着強さは健全象牙質に対する接着強さより劣ることが報告されており、ミネラル密度の低下やそれに伴う物理的および化学的特性の変化が原因と考えらえている。フッ素による歯質再石灰化効果はすでに多くの報告がなされているが、フッ化ナトリウムと比べてより多くのフッ素の歯質への取り込みが期待できる新材料として、FCP-COMPLEX が開発されている。本研究は、本材を人工う蝕象牙質内層に塗布することにより、被着体象牙質を改質し、より優れたレジンの接着性を得ることを目的として計画されたものである。

実験ではヒト抜去歯を用いて、これまでに確立されている人工う蝕象牙質内層モデルを被検面とし、FCP-COMPLEX、2%NaF 溶液または脱イオン水を塗布し、接着試験と接着界面の形態観察、さらに界面を形成する象牙質の耐酸性の評価を行っている。観察期間は１日後と３カ月後について設定しており、接着界面の耐久性を考慮した条件設定となっている。2%NaF 溶液は pH など異なる条件はあるものの、FCP-COMPLEX と同等の高濃度フッ素を含む溶液として、また一般的に臨床応用可能な溶液として適切な選択といえる。微小引張り接着強さの測定に加えて、近年注目されている接着界面の酸塩基抵抗層の形成についても検討を行っていることは評価に値する。溶液処理面の SEM による形態観察や XAFS による溶液塗布時の歯質沈着物質の分析も、FCP-COMPLEX 塗布による効果を理解するためには、適切なアプローチといえる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

１．微小引張り接着試験において、FCP-COMPLEX 処理による影響は認められなかった。

２．脱灰後の接着界面の SEM 観察では、FCP-COMPLEX 処理により、１日、３ヶ月保管時共に象牙質の脱灰抑制効果が認められた。

３．FCP-COMPLEX 塗布の際、試料表層に認められる沈着物質は $CaF_2$ であることが確認された。

以上の結果について考察が展開され、FCP-COMPLEX が人工う蝕象牙質内層に浸透してミネラルの再沈着を促進し、二次う蝕に対する抵抗性の高い接着界面を形成する可能性が示されている。う蝕象牙質内層を想定した本研究の脱灰モデルの妥当性、接着界面の象牙細管の走行の違いや溶液の浸透深さ、さらには保管期間が接着強さに及ぼす影響など、今後さらに検討すべき点が残されているものの、う蝕象牙質内層表面に FCP-COMPLEX を塗布することで、レジンの接着界面をより強化させる可能性が示されたことは、本研究の成果として高く評価できる。

以上より、申請者 後村純史が本研究領域において、今後の研究ならびに臨床応用に向けての有益な知見を得たことは高く評価できる。これらの研究成果は、歯科保存学の発展に寄与するところ大であり、本論文は博士（歯学）の学位論文として相応しいものと判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 木村　佳世 |
| 論文審査担当者 | 主査　水口　俊介<br>副査　嶋田　昌彦　　秀島　雅之 |
| 論　文　題　目 | Influence of habitual mouth breathing on taste sensation |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

呼吸は生命活動に必要不可欠な機能であり、正常な呼吸は、鼻腔、咽頭、喉頭および気管を通して行われる。しかし、鼻炎による鼻気道の閉塞や、不正咬合による口唇閉鎖不全等があると、口呼吸を余儀なくされることがある。口呼吸とは、口もしくは口と鼻の両方を介して行う呼吸が6 ヶ月以上続いた状態と定義されている。習慣的口呼吸は顎顔面の発達障害や口腔乾燥、不正咬合、う蝕、歯周病や口臭に関連することが報告されており、閉塞性睡眠時無呼吸症候群の潜在的な危険因子でもある。近赤外分光法（NIRS）を用いて実験的口呼吸状態の脳機能を評価した研究では、鼻呼吸時と比較して前頭前野の酸素負荷が増加したことが報告され、口呼吸による当該領域の酸素負荷が中枢疲労を誘発する可能性が示唆されている。また、口呼吸は、鼻呼吸と比較して末梢酸素分圧の低下を引き起こすことも報告されており、感覚受容器などの末梢器官の機能不全のリスク要因であると考えられる。

一方、味覚と嗅覚は、感覚機能の中でも食物の選択と摂取という生命維持に不可欠な役割をもつ。味覚の感受性は、年齢、性別、ストレス、喫煙習慣、アルコール摂取などの要因によって変化することが報告されている。また、食物摂食時には味覚情報と嗅覚情報が中枢神経系で統合されるため、味の感じ方は嗅覚の影響を受ける。嗅覚と口呼吸の関連は深く、口呼吸の主な原因である鼻閉塞によって後鼻腔に位置する嗅上皮への匂い分子の到達が遮断されるため、嗅覚機能が直接的に影響を受ける可能性がある。したがって、味覚と呼吸様式との関連も強いと考えられるが、鼻呼吸者の鼻孔に綿パッドを詰めることによって実験的口呼吸を引き起こした場合の味覚閾値上昇が報告されているものの、習慣的な口呼吸が味覚に与える影響に関する報告は未だない。さらに、味覚感受性に影響を与える可能性のある関連因子が、口呼吸によってどのような影響を受けるのかについても検討がなされていない。そこで、本研究では、習慣的口呼吸が味覚に与える影響を明らかにするとともに、その要因を解明するために、習慣的口呼吸による唾液分泌量、口腔水分量、嗅覚同定能力などの関連因子の変化について検討することを目的とした。

＜方法＞

被験者は健康な成人 30 名（男性 18 名、女性 12 名、平均年齢 26.6±2.9（SD）歳）とした。被

験者は、日中の呼吸習慣を判別するアンケートに基づき、口呼吸（MB）群および対照群の 2 群（それぞれ 15 名ずつ）に振り分けた。味覚機能および関連要因の検討は、下記の通り行い、2 群間の比較検討を行った。

1. 味覚・生活習慣に関する質問紙調査

年齢、性別、喫煙習慣、飲酒習慣、味の嗜好性、口渇、鼻閉塞、いびき、ならびに嗅覚障害の有無について質問紙調査を実施した。

2. 濾紙ディスク法による味覚検査

8 段階の濃度の甘味、塩味、酸味、苦味およびうま味の味溶液を用い、直径 5mm の濾紙ディスクを味溶液に浸し、舌の測定部位に 3 秒間置いた後、感じた味について回答を得た。測定部位は右側のみとし、舌尖部および舌根部で測定を行った。各味について最低濃度から始めて濃度を上げていき、味を正しく認知できる最低濃度（認知閾値）を求めた。味質を変える際には、純水で十分なうがいを行い、1 分以上の間隔をあけた。

3. 味覚関連要因の測定

① 唾液分泌量の測定：被験者から吐唾法により安静時唾液を 1 分間採取した。さらに、Saxon 法により刺激時唾液を 2 分間採取した。それぞれ、1 分間あたりの唾液重量を唾液分泌量とした。

② 唾液の粘性（曳糸性）の測定：分泌量測定を行った安静時唾液のうち 60μl を用いて、NEVA METER（株式会社　石川鉄工所）により粘性の指標となる曳糸性を測定した。

③ 口腔水分レベルの測定：口腔水分計 Moisture Checker Mucus（株式会社　ライフ）を用いて舌尖および頬粘膜の口腔水分レベルを測定した。

④ 嗅覚同定能力の測定：4 件法により 12 種類の匂いの同定能力検査を行うにおいスティック（第一工業製薬株式会社）を用いて、嗅覚機能を測定した。

4. データ分析

統計解析ソフト SPSS 23（IBM 社）を用いて、Fisher の正確確立検定および Mann-Whitney の U 検定により 2 群間比較を行い、$p<0.05$ の場合を有意差ありとした。

本研究は、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認（第 1181 番）を得て実施した。

＜結果＞

1. 質問紙による被験者特性の比較

被験者の年齢、性別、喫煙習慣および飲酒習慣には、対照群と MB 群間で有意差は認められなかった。味覚の嗜好性について、濃い味を好む者の割合は、対照群（33.3%）よりも MB 群（80.0%）で有意に高かった。 また、MB 群において、すべての被験者が習慣的に口が開いているとの自覚があり、かつ 66.7%が口腔乾燥を感じており、いずれも対照群より有意に高い割合であった。MB 群では 73.3%と対照群より高い割合で鼻閉塞の自覚が認められたが、匂いの分かりにくさについて 2 群間に有意差は認められなかった。

さらに、MB 群の 66.7%が睡眠中のいびきの自覚があり、その割合は対照群より有意に高かった。

2. 味覚閾値の比較

舌尖部において、MB 群の甘味と酸味に対する閾値が対照群と比較して有意に高かった。舌根

部では、MB 群の酸味および苦味の閾値が、対照群より有意に高かった。しかし、いずれの部位においても、塩味またはうま味の閾値について 2 群間に有意差は認められなかった。舌尖部と舌根部における味覚閾値を比較した場合、酸味および苦味の閾値が、舌根部において舌尖部よりも有意に高かった。

3. 味覚感度に関係する因子の比較

安静時・刺激時唾液量、唾液曳糸性、口腔水分レベル、ならびに嗅覚同定能力のすべてにおいて、2 群間に有意差は認められなかった。

＜考察＞

本研究では、舌の異なる部位での味覚感受性を評価するため、濾紙ディスク法を用いて味覚認知閾値を調べた結果、MB 群において、いくつかの味覚閾値が対照群よりも高いことが明らかとなった。舌尖部においては、MB 群の甘味および酸味の閾値が対照群より有意に高かった。塩味および苦味で差が認められなかったのは、対照群でも閾値のばらつきが大きかったことが一因と考えられる。舌根部は舌尖部より閾値が高く、特に MB 群では大部分の者が最高濃度でも酸味および苦味を認知できず、対照群より有意に高い閾値となった。うま味は、5 基本味のうち濾紙ディスク法での認知が最も難しい味質とされており、対照群においても閾値が高かったため、2 群間に有意差がなかったと考えられる。MB 群のさらなる特徴は、対照群と比較して濃い味を好む者の割合が有意に高かったことである。これは、糖尿病患者が甘味への低感受性と糖質への高欲求を示す現象と類似しており、口呼吸習慣を有する者は、味覚閾値の上昇に伴って食物をより味気なく感じるため、濃い味を好む傾向につながった可能性が考えられる。

年齢、性別、喫煙習慣およびアルコール摂取習慣においては 2 群間に有意差がなかったため、MB 群で閾値が高くなった主要因は口呼吸習慣と考えられる。味覚機能維持に重要な因子として唾液分泌量および口腔水分レベルを測定したが、これらは 2 群間に有意差がなく、口呼吸習慣によって影響されないことが明らかとなった。しかし、MB 群では主観的に口腔乾燥を感じる者の割合が有意に高かったことから、常習的開口が口腔粘膜上皮に水分蒸発による乾燥を招き、味蕾表面の状態にも変化が生じた結果、閾値上昇につながった可能性が示唆された。

味覚は嗅覚との関連が強いため、嗅覚機能の低下は味覚障害の危険因子でもあり、味覚障害患者の多くで、味覚機能よりも嗅覚機能の低下がみられたことが報告されている。本研究では、MB 群の 73.3%が鼻閉塞を呈しており、上後鼻腔の嗅上皮まで匂い刺激が到達できない可能性が考えられたが、嗅覚同定能力には 2 群間に有意差が認められなかったことから、嗅覚機能は MB 群の味覚低下に影響しなかったと考えられる。しかし、最近の動物実験で片側性の鼻閉塞が舌の味覚乳頭と味蕾の数を減少させることが報告されており、鼻閉塞を有する MB 群では味覚乳頭や味蕾に何らかの構造的変化が生じている可能性も考えられる。

味覚低下の他の要因として、中枢神経系への影響が挙げられる。口呼吸習慣を持つ小児では学習および作業記憶の低下がみられること、また、口呼吸時には前頭前野の酸素負荷が増加することが報告されている。さらに、急性鼻閉塞は睡眠呼吸障害を誘発し、学童児の昼間の学習能力を低下させることが報告されている。本研究では、MB 群の 73.3%が鼻閉塞を感じ、66.7%がいびきを自覚していたことから、MB 群のほとんどが睡眠呼吸障害を有していた可能性がある。睡眠呼

吸障害が脳の低酸素の原因となるとの報告も併せると、口呼吸習慣は低酸素による脳機能低下を介して味覚機能低下を招く可能性も考えられる。しかし、原因を解明するためには、口呼吸習慣が味覚受容器ならびに脳機能に与える影響に関するさらなる研究が必要である。

＜結論＞

習慣的口呼吸は味覚機能の低下を引き起こすが、唾液分泌や嗅覚機能には影響しないことが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5550　号 | 木村　佳世 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　水口　俊介<br>副　査　嶋田　昌彦　　秀島　雅之 | |
| 論 文 題 目 | Influence of habitual mouth breathing on taste sensation | |

（論文審査の要旨）

習慣的口呼吸は顎顔面の発達障害や口腔乾燥、不正咬合、う蝕、歯周病や口臭に関連することが報告されており、閉塞性睡眠時無呼吸症候群との関連や脳機能に与える影響についても報告されている。一方、味覚と嗅覚は密接に関連しており、味の感じ方は嗅覚の影響を受ける。嗅覚と口呼吸の関連は深く、口呼吸の主な原因である鼻閉塞により後鼻腔に位置する嗅上皮への匂い分子の到達が遮断されるため、嗅覚機能が直接的に影響を受ける可能性がある。したがって、味覚と呼吸様式の関連は強いと考えられるが、習慣的な口呼吸が味覚に与える影響、さらに、味覚感受性に影響を与える可能性のある関連因子が、口呼吸によってどのような影響を受けるのかについては未だ明らかになっていない。

今回、木村は、習慣的口呼吸が味覚に与える影響を明らかにするとともに、その要因を解明することを目的とし、習慣的に口呼吸を行う者を口呼吸群、鼻呼吸を行う者を対照群として、味覚感受性、味覚・生活習慣に関する質問、唾液分泌、口腔水分レベル、ならびに嗅覚同定能力について、2 群間で比較検討を行った。呼吸様式に伴う味覚感受性の変化について、生活習慣、唾液および嗅覚との関連を含めて検討を行った研究はなく、本研究の新規な点である。

対象は健康成人男女 30 名とし、日中の呼吸習慣を判別する質問に基づき、口呼吸群および対照群の 2 群（それぞれ 15 名ずつ）に振り分けた。味覚および生活習慣等に関する質問紙調査として、年齢、性別、喫煙習慣、飲酒習慣、味の嗜好性、口渇、鼻閉塞、いびき、ならびに嗅覚障害の有無について回答を得た。また、濾紙ディスク法による 5 基本味の認知閾値の測定を右側の舌尖部および舌根部にて行った。さらに、味覚に影響を与える関連要因として、安静時および刺激時唾液量、唾液粘度の指標である曳糸性、舌尖および頬粘膜の水分レベル、嗅覚同定能力について測定を行った。

本研究で得られた結果は以下の通りである。

1. 口呼吸群は、濃い味の嗜好性、口呼吸の自覚、口腔乾燥の自覚、鼻閉の自覚、ならびにいびきの自覚において有意に高い割合を示した。
2. 口呼吸群では、舌尖部の甘味・酸味、および舌根部の酸味・苦味に対する認知閾値が有意に上昇していた。
3. 唾液分泌量、唾液曳糸性、口腔水分レベル、ならびに嗅覚同定能力については 2 群間に有意差は認められなかった。

以上より、木村は口呼吸習慣が唾液分泌、および嗅覚機能に影響を与えずに味覚閾値の上昇を招く可能性を明らかにした。また、この要因の一つとして開口習慣による口腔乾燥が考えられるが、さらなる要因解明のため、味覚受容器ならびに中枢の味覚情報処理機構の口呼吸による変化について検討が必要であることを示した。本研究は、呼吸様式が味覚感受性に与える影響とその要因について初めて明らかにしたものであり、今後の歯科臨床のみならず、歯科医学・医療の発展に寄与するところが極めて大きいと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 平澤　正洋 |
| 論文審査担当者 | 主査　鈴木　敏彦<br>副査　宇尾　基弘　下山　和弘 |
| 論　文　題　目 | Superhydrophilic co-polymer coatings on denture surfaces reduce *Candida albicans* adhesion - An in vitro study. |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

*Candida albicans*（*C. albicans*）は義歯性口内炎の主な原因菌として考えられており、義歯粘膜面に付着すると酵母型から菌糸型へ形態転換しバイオフィルム形成を促進する。したがって同疾患の予防及び治療には義歯表面への *C.albicans* の初期付着を抑制することが重要である。

義歯表面と *C. albicans* 表面は疎水性であり両者は疎水性相互作用によって付着する可能性がある。したがって義歯表面に親水性を付与し疎水性相互作用を阻害することは *C. albicans* の初期付着の抑制に有効と考えられてきた。これまでに親水性モノマーである 3-ヒドロキシプロピルメタクリレート（HPMA）やスルホベタインメタクリレート（SBMA）を義歯床用レジンにコーティングすることで親水性が向上し *C. albicans* の初期付着が抑制されるという報告がある。しかしこれらはエステル基を含み加水分解しやすくポリマーの安定性に不安があり、義歯表面に親水性を付与する方法は十分に確立されていない。

スルホベタインメタクリルアミド（SBMAm）は、スルホベタイン構造を含む双性イオン型モノマーであり SBMA と同様に親水性を示すが、エステル基ではなくアミド基を含む。アミド基はエステル基より加水分解しにくいことから SBMAm は SBMA と比較してより安定であると考えられる。また SBMAm は単官能であるため架橋剤が必要である。これまでに SBMAm は金やシリコン基盤表面の親水性を向上しタンパク質と線維芽細胞の付着を抑制するという報告がある。したがって義歯表面に SBMAm をコーティングすることで *C. albicans* の初期接着を抑制する可能性がある。しかし SBMAm を義歯床用レジンにコーティングし *C. albicans* の付着を検討した報告はない。

そこで本研究では、SBMAm を含むポリマーを義歯床用レジンにコーティングし *C. albicans* の初期付着と表面の特性を調査することを目的とした。

＜方法＞

加熱重合型アクリルレジンディスク（厚さ 2 mm、直径 12 mm）（ナチュラルレジン，ニッシン）を作製し、表裏を耐水ペーパー#8000 まで研磨した。SBMAm、架橋剤である N,N’-(4,7,10-Trioxa-1,13-tridecane diamine)Diacrylamide (JDA)、光重合開始剤（FAI-101L，富士フィルム）を混和したものをコーティング溶液とし、ディスクを浸漬し紫外線重合にてコーティング層を硬化した。SBMAm と JDA の割合は SBMAm : JDA を 0 : 100「SM0%」、15 : 85「SM15%」、

30：70「SM30%」、50：50「SM50%」（重量%）とし、コーティングを行なっていないものをコントロールとした。全てのディスクはエチレンオキサイドガスにて滅菌し実験に使用した。

ディスクを 12 ウェルプレートに入れ、人工唾液に浸漬しペリクルを形成させた。YPD 培地に *C. albicans*（JCM2085）の酵母型菌体が $10^7$ cell/ml 含有するように調整し、各ウェルに 2 ml 入れ 37°C、1.5 時間好気培養し菌を初期付着させた。洗浄後各ウェルに YPD 培地 2 ml を入れ 37°C、24 時間好気培養し、XTT assay と CFU assay にてバイオフィルム量を定量化した。またディスク上のバイオフィルム量を SEM で観察した。

コーティング表面の特性を評価するために表面粗さ（Ra）、膜厚、水接触角を測定し、さらに 3D 測定レーザー顕微鏡を用い表面を観察した。

＜結果＞

XTT assay および CFU assay の結果、コーティング群ではコントロールと比較してディスク表面に付着した真菌量が有意に減少した。XTT assay ではコーティング群間で SM15％が SM50％よりも有意に少ない真菌量を示し、CFU assay では SM15％が SM0％と SM30％よりも有意に少ない真菌量を示した。

SEM 画像ではコーティング群はコントロールと比較して真菌の付着量や菌糸発育が抑制される傾向を認めた。コーティング群のうち表面に皺構造を認める SM30％と SM50％では観察される真菌は菌糸型が多い傾向を示した。

コーティング表面の評価では表面粗さ Ra 値は 0.005 μm 未満であり、群間に有意差はなかった。表面の顕微鏡画像はコントロールではいくつかの傷を認めるのに対しコーティング群では滑沢な表面が観察された。膜厚は 5.0 μm 未満であった。水接触角に関してコーティング群はコントロールと比較し有意に低い値であり高い親水性を示した。またコーティング群間では SM15％が接触角の値が有意に低く最も高い親水性を示した。一方で SM0％は有意に高い値を示した。

＜考察＞

本研究では SM0%-SM50%をコーティングした義歯床用レジンディスクは *C. albicans* の初期付着を抑制する傾向を示した。これは表面の親水性の向上が関連していると考えられる。表面を親水性ポリマーでコーティングすると極性が変化し表面自由エネルギーが増加する。それによって濡れ性が増し疎水性相互作用が抑制され *C. albicans* の付着が減少する。他研究では、双生イオン型ポリマーはタンパク質等に付着する結合水を形成せず、*C. albicans* の付着を阻害する自由水層を形成することが報告されている。これらのことから SBMAm を含むポリマーのコーティングにより表面自由エネルギーが増加し濡れ性が増すことで自由水層を形成し *C. albicans* の付着が減少した可能性がある。

XTT assay と CFU assay にて SM15％が他コーティング群と比較し真菌付着量が減少する傾向を認めた。これには 2 つ理由が考えられる。第一に SM15％は他コーティング群と比較し最も親水性が高いことが挙げられる。親水性表面は *C. albicans* の付着が少ないことが報告されている。MPC ポリマーの水接触角は 31±3°であるが、SM15％はさらに低い値（6.67°）が測定された。これはエステル基を含む MPC よりアミド基を含む SBMAm の方が親水性と安定性が高いためと考えられる。したがって SBMAm を含むポリマーは従来のポリマーと比較し *C. albicans* の初期付着をより減少させる可能性がある。第二に SM15％は他コーティング群と比較しポリマー構造の安

定性が高いことが挙げられる。これまでに SBMAm の増加に伴い吸水性が増加することが報告されている。SEM 画像より SBMAm が 30%以上含有すると多くの皺構造が出現したが、これらは吸水による膨潤が生じた結果と考えられる。さらに SM30%と SM50%は多くの菌糸が観察されたため、膨潤の結果表面荒れが生じたと予想できる。したがって SM15%は SBMAm の含有量が少ないことで吸水が抑制でき、その結果表面荒れを防ぎ *C.albicans* の菌糸の増殖を抑制したと考えられる。

SM15%が最も高い親水性と安定性を示すのは親水基であるアミド基を 2 つ有する親水性多官能モノマーである JDA を架橋剤として用いたことが関与している。本研究では JDA を架橋剤として用いたことで SBMAm の高い親水性を損なわず安定したポリマー形成ができたと考えられる。さらに SBMAm の含有量が増加するに従い親水性が低下したことから、適切な比率で SBMAm と JDA を混合しコーティングすることで親水性を大幅に改善できる可能性が示唆された。

これまでに素材表面の親水性を向上させることで様々な微生物の付着を抑制することが報告されているため、SBMAm を含むポリマーは義歯床用レジンだけでなく他材料への適用も期待できる。しかしながらコーティングの機械的・化学的安定性や生体安全性に関しては更なる検討が必要である。

＜結論＞

義歯床用レジンに SBMAm を含むポリマーをコーティングすることで表面の親水性が向上し *C.albicans* の初期付着を抑制した。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5551　号 | 平澤　正洋 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　鈴木　敏彦<br>副　査　宇尾　基弘　下山　和弘 | |
| 論 文 題 目 | Superhydrophilic co-polymer coatings on denture surfaces reduce *Candida albicans* adhesion- An in vitro study. | |

（論文審査の要旨）

義歯性口内炎は口腔内清掃が困難な義歯装着患者にとって大きな問題となっている。*Candida albicans*（*C. albicans*）は義歯性口内炎の主な原因菌として考えられており、義歯粘膜面に付着すると酵母型から菌糸型へ形態転換しバイオフィルム形成を促進する。したがって同疾患の予防及び治療には義歯表面への *C. albicans* の初期付着を抑制することが重要であると考えられている。

今回、平澤は新規親水性モノマーであるスルホベタインメタクリルアミド（SBMAm）を含むポリマーを義歯床用レジンにコーティングし、*C. albicans*の初期付着と表面の特性に与える影響について検討した。義歯表面に親水性を付与することは疎水性相互作用を阻害し、*C. albicans*の初期付着の抑制に有効と考えられてきたが、これまでに報告されている親水性モノマーはエステル基を含んでいるため加水分解されやすく、義歯表面に親水性を付与する方法は十分に確立されていない。SBMAmは親水性を示す構造を2つ有するためこれまでのモノマーと比較して親水性の向上が期待でき、更にエステル基ではなくアミド基を含むため加水分解の影響を軽減でき安定性があると考えられる。これはSBMAmを含むポリマーのコーティングが*C. albicans*の初期付着を抑制する可能性を示唆しており、義歯性口内炎に対する新しい治療及び予防法として今後期待される。

試験に使用される試料は義歯床用レジンディスクにSBMAm : JDA（架橋材）を0 : 100、15 : 85、30 : 70、50 : 50の割合で混和・重合し、コーティングしたものを実験に供した（SM0%, SM15%, SM30%, SM50%）。コーティングを行なっていないものをコントロールとした。各試料上で*C. albicans*（JCM2085）を培養しXTT assay、CFU assay、SEMによる試料表面の観察により*C. albicans*の初期付着について評価した。コーティング表面の特性は表面粗さ測定、3D測定レーザー顕微鏡による観察、接触角測定、膜厚測定により評価した。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

XTT assay、CFU assayの結果より*C. albicans*の付着量はコントロールと比較してコーティング群で有意に減少し、SM15%が最も付着を抑制する傾向を示した。SEM画像ではコントロールと比較してコーティング群では*C.albicans*の付着が抑制される傾向を認めた。コーティング群のうち表面に皺様構造を認めるSM30%とSM50%は、SM0%やSM15%と比較して菌糸の発現量が多い傾向を示した。表面粗さRa値は0.005 μm未満であり、群間に有意差はなかった。3D測定レーザー顕微鏡画像ではコントロールはいくつかの傷を認めるのに対して、コーティング群は滑沢な表面が観察

された。膜厚は5.0 μm未満であった。接触角に関してコーティング群はコントロールと比較し有意に低い値であり高い親水性を示した。コーティング群間ではSM15%が接触角の値が有意に低く最も高い親水性を示した。

本研究の結果から、SBMAm を含むポリマーコーティングにより *C. albicans* の初期付着が抑制されることが示唆された。更にコーティング群間では SM15%が最も付着を抑制する傾向を認めた。またコーティングによる表面粗さへの影響はなく、表面の親水性の向上を認めた。SBMAm を含むポリマーコーティングもこれまでに報告がある親水性コーティングと同様、親水性の付与によって疎水性相互作用が阻害され *C. albicans* の付着を抑制したと考えられる。コーティング群間では SBMAm の含有量が少なく JDA の含有量が多い試料で *C.albicans* の付着をより抑制する傾向を認めたため、SBMAm と JDA の最適な含有量について今後更なる検討が必要である。また過去の報告より親水性ポリマーのコーティングによりデンタルプラーク形成に関与する細菌の付着抑制効果があることから SBMAm を含むポリマーも同様に他種の微生物付着の抑制に寄与する可能性があるが、機械的・化学的安定性や生体安全性など明らかでないことがあるため臨床応用に向けてさらに検討が必要であると考える。

本研究においてSBMAmを含むポリマーのコーティングが*C. albicans*の初期付着の抑制に効果があることを示したことは、確立した治療及び予防手段のない義歯性口内炎の新しい治療・予防法として今後応用できる可能性があることから臨床的意義が大きい。本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

以上の成果は今後の歯科医学の発展に寄与するところが大きい。従って本論文は博士(歯学)の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 井汲　玲雄 |
| 論文審査担当者 | 主査　和泉　雄一<br>副査　柴田　俊一、岸田　晶夫 |
| 論　文　題　目 | Guided bone regeneration using a hydrophilic membrane made of unsintered hydroxyapatite and poly(l-lactic acid) in a rat bone-defect model |

（論文内容の要旨）

<緒　言>

歯科用インプラントは失った歯に取って代わる信頼性の高い治療法として知られている。しかし、しばしば支持骨の欠如により治療が制限される。骨再生誘導法(Guided bone regeneration;以下GBR,と略す)は歯周病などで失った歯槽骨の幅や高さを増大させる治療法としてインプラント治療にも応用されている。GBR は、保護膜(吸収性または非吸収性)で骨欠損部を覆うことにより空間を維持し、欠損部への軟組織の侵入を防ぐと共に血餅を保持することで骨を優先的に再生させるという原理に基づいている。

GBR に使用される保護膜には、ニトロセルロースやポリテトラフルオロエチレン（e-PTFE）といった非吸収性材料が含まれる。しかし、非吸収性膜は骨増大後に膜を取り出すための手術が必要であり、患者および術者にとって負担がかかる。そのため、吸収性膜を用いることが望ましい。現在、吸収性の膜材料として主にコラーゲン膜が使用されている。しかし、コラーゲン膜は生体での吸収速度が速く賦形性を有していないため、幅広い骨欠損においては不利である。また、コラーゲンは生体適合性を有する主要なマトリックスタンパク質であるが、原料となる動物から抽出する過程において既知または未知の疾患による感染リスクを完全に排除することは困難である。

ポリ-L-乳酸（PLLA）やポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGA）などの生分解性合成ポリマーは医療用の膜や縫合糸の材料として使用されている。また、動物由来の生体材料に特有な感染や免疫応答を誘発しないため骨接合材料、組織工学、薬物送達の分野で広く研究されている。

近年、非焼結ハイドロキシアパタイト（uHA）粒子と PLLA から成る生体適合性・生分解性骨接合材料（Super-Fixsorb-MX; タキロン株式会社、大阪）が開発され、整形外科や頭蓋・顎顔面領外科域において応用されている。この材料は皮質骨に類似した弾性力、骨治癒期間に必要な高い強度、最適な分解・吸収特性、骨伝導能および骨結合能を有することが証明されている。興味深いことに、この材料への UV 照射による親水化処理は、その特性をさらに向上させることが報告されている。しかしながら、親水化された本材料を放射線学的、組織学的に他の材料と比較した報告はない。そこで、本研究ではラット頭蓋骨欠損モデルを用いて親水性 uHA / PLLA 膜の GBR における骨形成能を評価することとした。

<方　法>

本実験は東京医科歯科大学動物実験倫理委員会によって承認された(0160196A)。

コラーゲン膜(30×40 $mm^2$ BIOMEND®, Zimmer-Dental, Indianapolis, IN, USA)は直径 11mm の円形に成形した。前述の生分解性骨接合材料（Super-Fixsorb-MX, 50wt%未焼結 HA 及び 50wt%PLLA）からわずかな変更を加え､40wt％未焼結 HA と 60wt％PLLA から成る uHA/PLLA 膜 (厚さ 0.1mm、直径 11mm)を作製した。その後、UV 照射(波長:172 nm, 照明:13 mW/$cm^2$, 時間:8 分, 強度:6.26 J/$cm^2$)により親水化処理を行った。本研究で使用したすべての uHA/PLLA 膜はタキロン社（現　帝人メディカルテクノロジー株式会社）から提供された。Wister ラット(雄：12 週齢)を 24 匹用いて実験を行った。吸入麻酔として 4%イソフルラン、全身麻酔としてケタミン及びキシラジンを筋注にて投与した。8 万分の 1 アドレナリン添加型 2%リドカインにて浸潤麻酔後、頭蓋部上皮を切開し、骨膜ごと剥離を行った。歯科用エンジン及びダイヤモンド加工されたトレフィンバーにて慎重に骨切削を行い、頭蓋骨に左右にまたがる直径 8mm の骨欠損を作製した。骨切削は注水下で行い、切削速度は 900-1200rpm であった。実験群としてコラーゲン膜で被覆、uHA/PLLA 膜で被覆、対照群として欠損部の作製のみを施した群に分割し、各群 8 匹ずつに割り当てた。骨膜を 4-0 ナイロン糸にて縫合した後、切開部を 6-0 ナイロン糸にて縫合した。術後 2 週、4 週で犠牲死させ､マイクロ CT（μCT）撮影及び組織標本（脱灰及び非脱灰）の作製を行った。Bone mineral content (BMC)及び Bone mineral density (BMD)は TRI/3DBone を用いて算出し、各データを one-way ANOVA Tukey HSD tests にて統計学的に検討した。

<結　果>

すべての動物において観察期間中に術後合併症は認めなかった。全ての動物は術後３日で正常な行動を制限なく示した。

術後２､４週における μCT 画像は uHA/PLLA 膜群及びコラーゲン膜群において明らかな骨新生を認めた。 BMD は術後 2〜4 週ですべての群で増加し、uHA/PLLA 膜群が最も高い値を示した。術後 2 週における uHA/PLLA 膜群は他の群に対して有意に高い値を示した($p<0.05$)。BMC は術後 2〜4 週ですべての群で増加した。術後 2 週では、uHA / PLLA 膜群が最も高い BMC 値を示し、対照群と比較して有意差を認めた（$p<0.05$）。新生骨の面積と元の骨欠損の面積との比として計算された相対的骨成長面積は、すべての群において 2〜4 週間でわずかに増加した。術後 2 週、4 週における相対的骨成長面積は、対照群とコラーゲン膜群と比較して uHA/PLLA 膜群で有意に高い値を示した（$p<0.05$）。

組織学的には、術後 2 週において対照群で少量の新生骨が観察された。コラーゲン膜群および uHA/PLLA 膜群では対照群よりも新生骨の形成が顕著であった。 術後 4 週では、対照群の骨欠損辺縁部において新生骨の増加を認めたが、欠損中央部に骨形成は認めなかった。 術後 4 週、コラーゲン膜群の骨欠損中央部に新生骨が明瞭に観察された。術後４週の uHA/PLLA 膜群では、骨欠損の中心を含む新生骨が膜の直下で明瞭に認められ､他の群に形成された骨よりも成熟していた。

<考　察>

本研究では、新規開発された親水性 uHA/PLLA 膜の GBR における骨形成能をラット頭蓋骨欠損モデルにおいて評価した。その結果、uHA/PLLA 膜は GBR において潜在的に有効であることが示唆された。

GBR は、保護膜により維持された空間に骨が再生されるという概念に基づいている。また、外部からの軟組織の侵入を防止し、血餅を保持する役割を果たす。膜材料は空間を維持するための機械的強度を有し、骨組織に適合する必要がある。さらに、外科処置後の治癒期間中、周囲組織に損傷を与えてはならない。

近年、HA や PLLA の複合材料は口腔および整形外科領域を含む様々な分野で臨床応用されている。最近の研究では、この複合材料から成る膜材料が親水化処理により、処理前と比較して骨形成が促進することが明らかになった。また、これらの複合体は骨組織に置換され、生物活性、生体吸収性、および高い機械的強度を有し良好な組織応答をもたらすことが実証された。本研究では、uHA/PLLA 膜は固定ピンを必要とせずに欠陥周囲の骨に良好に適合した。さらに膜は実験期間を通して所定の位置に留まり、骨再生のための空間を維持した。

uHA/PLLA 材料は、骨伝導性および骨結合能力を有することが知られている。本研究で得られた μCT 画像は、コラーゲン膜群で膜内に不規則な骨形成を認めたのに対して、uHA/PLLA 膜群では初期の段階で元の欠損の 60%以上を新生骨が占めていた。組織学的分析では、uHA/PLLA 膜群において層板構造を呈した骨が欠損の辺縁から形成されたのに対して、コラーゲン膜群では層板構造は認めなかった。これらの結果により、uHA/PLLA 膜の直下に骨芽細胞が規則的に新生骨を形成し、骨再生のための空間を十分に維持することが示唆された。

本研究では、新生骨の質と強度の指標として BMD を分析した。uHA/PLLA 膜群は、術後 2 週で最も高い BMD 値を示し、術後 4 週まで維持された。さらに、BMD は、組織学的分析の所見と一致し、成熟した新生骨が早期に形成されることを実証した。このような成熟した新生骨は他の群では観察されなかった。

本研究の結果は、GBR における吸収性膜としての uHA/PLLA 膜の潜在的有効性を実証した。しかしながら、本研究で使用した uHA/PLLA 膜と同じ材料で作られた骨固定材料は、手術後の完全な吸収のために 3〜5 年かかると報告されている。したがって、保護膜による空間維持の持続時間が GBR を成功させるための重要なパラメータであることを考慮し、将来の研究で uHA/PLLA 膜の分解性を評価することが必要である。さらに、GBR の臨床状況を反映する大型動物での実験が必要である。

<結　論>

本研究の結果は、吸収性 uHA/PLLA 膜が GBR にとって潜在的に有効な膜であることを示唆している。 しかしながら、吸収期間および uHA/PLLA 膜の GBR における効果を長期間にわたり調査するためにさらなる研究が必要である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5552　号 | 井汲　玲雄 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　和泉　雄一<br>副　査　柴田　俊一、岸田　晶夫 | |
| 論 文 題 目 | Guided bone regeneration using a hydrophilic membrane made of unsintered hydroxyapatite and poly(l-lactic acid) in a rat bone-defect model | |

（論文審査の要旨）

本研究はラット骨欠損モデルを用いて親水性 uHA/PLLA 膜の GBR における骨形成能を評価した。

ポリ-L-乳酸（PLLA）やポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGA）などの生分解性合成ポリマーは医療用の膜や縫合糸の材料として使用されている。また、動物由来の生体材料に特有な感染や免疫応答を誘発しないため骨接合材料、組織工学、薬物送達の分野で広く研究されている。近年、非焼結ハイドロキシアパタイト（uHA）粒子と PLLA から成る生体適合性・生分解性骨接合材料が開発され、整形外科や頭蓋・顎顔面領外科域において応用されている。さらに、この材料への UV 照射による親水化処理は、その特性をさらに向上させることが報告されている。

井汲玲雄は、親水化した本材料を放射線学的、組織学的に、GBR に最も使用されているコラーゲン膜と比較し骨形成能を評価した。

本研究で得られた結果を以下に示す。

・放射線学的評価：

Bone mineral density (BMD)は術後 2～4 週ですべての群で増加し、uHA/PLLA 膜群が最も高い値を示した。術後 2 週における uHA/PLLA 膜群は他の群に対して有意に高い値を示した ($p<0.05$)。Bone mineral content (BMC)は術後 2～4 週ですべての群で増加した。術後 2 週では、uHA/PLLA 膜群が最も高い BMC 値を示し、対照群と比較して有意差を認めた（$p<0.05$）。新生骨の面積と元の骨欠損の面積との比として計算された相対的骨成長面積は、すべての群において 2～4 週間でわずかに増加した。術後 2 週、4 週における相対的骨成長面積は、対照群とコラーゲン膜群と比較して uHA/PLLA 膜群で有意に高い値を示した（$p<0.05$）。

・組織学的評価：

術後 2 週において対照群で少量の新生骨が観察された。コラーゲン膜群および uHA/PLLA 膜群では対照群よりも新生骨の形成が顕著であった。 術後 4 週では、対照群の骨欠損辺縁部において新生骨の増加を認めたが、欠損中央部に骨形成は認めなかった。 術後 4 週、コラーゲン膜群の骨欠損中央部に新生骨が明瞭に観察された。術後 4 週の uHA/PLLA 膜群では、骨欠損の中心を含む新生骨が膜の直下で明瞭に認められ、他の群に形成された骨よりも成熟していた。

これらの結果から井汲玲雄は以下のことを考察した。

上記の結果のように uHA/PLLA 膜がコラーゲン膜と比較してより良質な新生骨を形成する理由は明らかではない。コラーゲンは明らかに PLLA よりも生体適合性が高い材料である。 しかし、uHA は高い生体適合性を有するため、uHA を PLLA に添加することにより PLLA の生体適合性及び骨伝導性が向上し、さらに親水化処理によりこれらの特性が向上したことが考えられる。また、uHA/PLLA 膜は２週という早期の段階でコラーゲン膜よりも高い BMD 及び BMC を認めたため、uHA/PLLA 群とコラーゲン群との間の新しい骨形成のパターンは異なり、これは新しい骨の質に影響を及ぼし得ることが示唆された。

以上のように、本研究において、井汲玲雄はラット頭蓋骨欠損モデルを使用し新規に開発された親水性 uHA/PLLA 膜の GBR に対する有用性を放射線学的、組織学的観点から明らかにした。また、uHA/PLLA の吸収期間、操作性などについて大型の動物により今後さらなる研究の必要性があることが述べられている。本研究から得られた知見は、コラーゲン膜の欠点を補い、広範囲な骨欠損に対しての骨増生が可能になることが推測され、今後の歯科医学の発展に寄与するものと考えられる。よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行なうにあたって十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 宇田川　小百合 |
| 論文審査担当者 | 主 査　荒川　真一<br>副 査　鈴木　敏彦、宮新　美智世 |
| 論文題目 | Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight |

(論文の内容の要旨)

＜要旨＞

歯周炎と早産・低体重児出産との間に関係があることが報告されているが、そのメカニズムは未だ不明である。本研究の目的は、*Porphyromonas gingivalis*（*Pg*）感染がマウスの出産に与える影響を明らかにすることである。*Pg* の静脈注射により、妊娠 Slc：ICR マウス（8 週齢）に菌血症を誘発することで菌血症モデルマウスを作成し、生理食塩水を静脈注射した対照群（CO）と、妊娠 1 日目のみ *Pg* を静脈注射した群（GD1）、妊娠 15 日目のみ *Pg* を静脈注射した群（GD15）、毎日 *Pg* を静脈注射した群（ED）に分け、母親や胎仔・出生仔の体重、胎内生存率や出産時期、組織における *Pg* 感染の有無、および胎盤・臍帯における遺伝子発現を評価した。その結果、ED 群および GD15 群の仔の出生体重は、CO 群の仔よりも有意に低いことが明らかになった。 *Pg* は胎盤または臍帯のいずれからも検出されなかったが、ED および GD1 群において抗 *Pg*-IgG 抗体の顕著な上昇が観察された。胎盤における TNFαおよび IL-6、および臍帯における HIF-1αの mRNA 発現は、ED 群において有意に増加した。臍帯から単離した RNM のマイクロアレイ解析により、ED 群の ORM1、MGL2、RPS6KA3 および TRIM15 の mRNA を含む数種の mRNA の発現上昇が認められた。以上の結果から、特に妊娠後期における *Pg* 感染は、低体重児出産および胎盤・臍帯における炎症を引き起こすことが示唆された。

＜緒言＞

早産は妊娠 37 週未満での出生と定義され、一方、低体重児出産は 2500 g 未満の出生時体重として定義されている。早産・低体重児出産は、乳児の罹患率および死亡率の増加と関連している。歯周炎は、歯周病原細菌によって引き起こされる慢性感染症であり、歯周組織が破壊され、さらにアテローム性動脈硬化症、2 型糖尿病、および早産・低体重児出産など、さまざまな疾患のリスク増加に関与することが報告されている。17 の論文を対象にしたメタアナリシスにより、歯周炎が早産および低体重児出産のリスクをそれぞれ 2.3 倍および 4.0 倍に増加させることが明らかになった。歯周炎が早産・低体重児出産を引き起こす原因には 2 つの仮説がある。一つ目は、局所的な歯周組織の感染は、全身に対する炎症性メディエーターの増加につながる可能性があることである。二つ目は、歯周炎患者において深い歯周ポケット内面は潰瘍を呈しており、歯周ポケットから菌血症を発生する可能性があることである。歯周炎と早産・低体重児出産との関連は数多く報告されているが、歯周炎がどのように影響しているかは依然として不明である。本研究の目的は、*Pg* の感染がマウスの出産結果に及ぼす影響を明らかにすることである。

＜方法＞

Slc：ICR マウスを妊娠 1～18 日目に生理食塩水 100 μL を 1 日 1 回静脈注射するコントロール群（CO）、*Porphyromonas gingivalis* (ATCC33277)を妊娠 1 日目のみ $1.0\times10^{8}$ CFU 静脈注射する群（GD1）、妊娠 15 日目のみ静脈注射する群（GD15）、および妊娠 1 日目～18 日目まで毎日静脈注射する群（ED）の 4 群に無作為に分けた。妊娠した母マウスの体重、妊娠期間、および仔の出生体重を記録した。妊娠 15 日目において、マウスはイソフルラン麻酔下で胎仔数を判定し、妊娠状態を確認した。また、胎仔の体重を計測し、妊娠 17 日目で血漿、胎盤および臍帯を採取した。組織サンプルは-80 ℃で保存した。

インターロイキン（IL）-10、IL-17A、IL-6、IL-4、IL-2、腫瘍壊死因子（TNF）およびインターフェロン（IFN）-γ を含む血漿中のサイトカインレベルを、BD 社のサイトメトリックビーズアレイを用いて測定した。また、ELISA 法にて *Pg* に対する抗体レベルを測定した。mRNA 発現の解析は qPCR 法（インターカレーター法）にて行った。組織を粉砕した後、胎盤および臍帯から全 RNA を抽出し、500 ng の RNA で逆転写 PCR を行った。 *Pg* の検出は、胎盤および臍帯から DNA を抽出し、qPCR（TaqMan プローブ法）を行った。

臍帯における遺伝子発現の網羅的解析は、Agilent 社の SurePrint G3 Unrestricted Gene Expression 8×60K Microarray を用いて行った。全 RNA を CO および ED 群のマウスの臍帯から抽出し、ラベル化 cRNA を生成した。その後、cRNA をハイブリダイズさせ、蛍光シグナルを検出した。マイクロアレイデータは、R ソフトウェアを使用して 75 パーセンタイル正規化および log2 変換を行った。発現変動遺伝子（DEG）の同定は Limma Bioconductor を用いて行った。統計的有意性は、Benjamin and Hochberg の誤発見率（FDR）によって評価した。 DEGs は、FDR q <0.05 および| fold-change | > 2 を満たすものと定義した。

組織学的評価は、パラフィン切片のヘマトキシリンおよびエオシン（HE）染色にて行った。胎盤試料を 4 %パラホルムアルデヒドで 24 時間固定し、パラフィンに包埋した。 続いて厚さ 5 μm に薄切し、HE で染色した。海綿状栄養膜細胞の面積は、Adobe Photoshop CC 2017 ソフトウェアを用いて、各サンプル毎に 5 ヶ所の切片における面積を算出し、解析を行った。

データ分布の評価は Shapiro-Wilk 検定を用いた。2 群間の比較はスチューデント *t* 検定を用いた。CO 群に対する多群比較にはボンフェローニ補正によるピアソンのカイ 2 乗検定またはダネット検定に続く一元配置分散分析を使用した。抗 *Pg*-IgG 抗体レベルの評価には一元配置分散分析、続いて複数群比較にはボンフェローニ補正による *t* 検定を行った。データを分析は SPSS v.22.0 ソフトウェアを用いた。p <0.05 を統計的有意とした。

＜結果＞

妊娠期間に関しては、*Pg* 感染の有無に関わらず、全て正期産であった。ED 群および GD15 群の平均出生体重は、CO 群よりも有意に低かったが、CO 群と GD1 群の間では、仔マウスの体重に有意差は認められなかった。妊娠 17 日目における ED 群の胎仔の体重は、CO 群よりも低値を示した。妊娠マウスの体重および妊娠 17 日目における胎児生存率には有意差は認められなかった。妊娠 17 日目における血漿中の IL-10、IL-17A、TNF、INF-γ、IL-6、IL-4 および IL-2 は検出限界以下となり、*Pg* の静脈注射が強い炎症応答を誘発しなかったことを示したが、血清中の抗 *Pg*-IgG 抗体レベルの有意な増加が ED 群および GD1 群で認められた。抗 *Pg*-IgG 抗体レベルは GD1 群と比較して ED 群で劇的に増加したが、TaqMan プローブを用いた qPCR において胎盤または臍帯のいずれにおいても *Pg* は検出されなかった。持続的な *Pg* 感染は、胎盤における TNFαおよび IL-6 の mRNA 発現増加をもたらした。妊娠 15 日目に *Pg* を注射した妊娠マウスは、胎盤における IL-6 および HIF-1α の mRNA 発現の上昇を示した。GD1 群と CO 群の間の胎盤における TNFα、IL-6、および HIF-1αの mRNA レベルには有意差な差は認められなかった。

臍帯では、*Pg* 感染による TNFαおよび IL-6 の mRNA 発現の増加傾向が認められた。HIF-1αの mRNA 発現は、CO 群と比較して ED 群のマウスの臍帯で増加した。*Pg* 感染後の臍帯における遺伝子発現解析のため、CO 群および ED 群のマウスについて DNA マイクロアレイによる解析を行った。DEGs は存在しなかったが、| fold-change | > 2 かつ p<0.05 を示した 104 の遺伝子に注目して解析を行った。抽出された遺伝子のうち、炎症、出産、および胎児の成長に関連するものに焦点を当て qPCR を行ったところ、ED 群マウスの臍帯における ORM1、MGL2、RPS6KA3、TRIM15 の mRNA の発現上昇が認められた。胎盤切片の HE 染色においては、ED 群の胎盤の海綿状栄養膜細胞層に顕著な変化が観察されたが、迷路部と脱落膜には明らかな変化は認められなかった。海綿状栄養膜細胞層中の海綿状栄養膜細胞の割合は ED 群のマウスでは CO 群と比較して有意に減少した。

＜考察＞

今回の研究において、抗 *Pg*-IgG 抗体レベルは、ED 群および GD1 群で増加した。IgG は感染後約 7 日で獲得免疫応答により産生され、連続的な感染は IgG 産生を増幅する。そのため本研究では、ED 群において抗 *Pg*-IgG 抗体の顕著な増加が認められたが、GD15 群では増加しなかったと考えられる。IgG 抗体レベルの上昇にも関わらず、*Pg* は胎盤および臍帯で検出されなかった。さらに、血漿中の炎症性サイトカインレベルは、CO 群、GD1 群、GD15 群および ED 群のマウス間で有意差が認められなかった。ED 群では、TNFα および IL-6 の mRNA 発現が胎盤で有意に増加し、臍帯で上昇傾向があることが示された。また、これらの

マウスの臍帯において低酸素下で誘導される転写因子 HIF-1αの mRNA 発現が増加した。炎症状態にある組織では、炎症そのものが低酸素症を引き起こし、さらに炎症を誘発する可能性がある。*Pg* 感染が HIF-1αの mRNA 発現を誘導し、そのことが炎症を増加させる可能性を示唆している。

本マウスモデルは、胎児発育不全（Fetal Growth Restriction: FGR）の胎仔を発生させた。 FGR の病因は、母性、胎児および胎盤に大別され、本研究では、*Pg* 感染によって引き起こされたマウスの胎盤および臍帯における炎症が FGR をもたらしたと考えられる。さらに今回、マイクロアレイ解析により臍帯における遺伝子発現の網羅的解析を行い、低出生体重児出産に関連すると考えられる因子をコードする mRNA 発現を qPCR によって検証した。その結果、ED 群において、ORM1、MGL2、RPS6KA3、および TRIM15 の mRNA 発現が上昇することを見出した。臍帯における上記因子の mRNA 発現の増加は、*Pg* によって誘導される菌血症が母体 - 胎児系に影響を与え、臍帯が胎児の保護に重要な役割を果たす可能性を示唆している。

マウス胎盤は迷路部、海綿状栄養膜細胞層、脱落膜から構成され、胎児の生存に不可欠である海綿状栄養膜細胞層は海綿状栄養膜細胞、栄養膜巨細胞、グリコーゲン細胞で構成されている。グリコーゲン細胞と海綿状芽細胞の機能は完全には明らかにされていないが、海綿状栄養膜細胞は、胎盤の成熟において重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、ED 群の妊娠 17 日目の海綿状栄養膜細胞層における海綿状栄養膜細胞の割合が CO 群と比較して減少した。したがって、*Pg* 感染に起因する海綿状栄養膜細胞の減少により、胎盤の成熟が抑制された可能性が示唆された。

＜結論＞

特に妊娠後期における *P. gingivalis* 感染は、胎盤および臍帯における炎症反応および、低体重児出産の原因となる可能性が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| | | |
|---|---|---|
| 報 告 番 号 | 甲 第　5553　号 | 宇田川 小百合 |
| 論文審査担当者 | 主 査　荒川 真一<br>副 査　鈴木 敏彦、宮新 美智世 | |
| 論 文 題 目 | Effect of *Porphyromonas gingivalis* infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight | |

(論文審査の要旨)

早産・低体重児出産は、乳児の罹患率および死亡率の増加と関連しており、メタアナリシスでは、歯周炎により早産および低体重児出産のリスクがそれぞれ 2.3 倍および 4.0 倍に増加することが明らかにされるなど、歯周炎と早産低体重児出産との関係は数多く報告されているが、そのメカニズムは不明である。

そこで宇田川は、*Porphyromonas gingivalis*（*Pg*）感染がマウスの出産に与える影響を明らかにするため、本研究を行った。

本研究では、*Pg* の静脈注射により、妊娠 Slc：ICR マウス（8 週齢）に菌血症を誘発することで菌血症モデルマウスを作成した。生理食塩水を静脈注射した対照群（CO）と、妊娠 1 日目のみ *Pg* を静脈注射した群（GD1）、妊娠 15 日目のみ *Pg* を静脈注射した群（GD15）、毎日 *Pg* を静脈注射した群（ED）に分け、母親や胎仔・出生仔の体重、胎内生存率や出産時期、組織における *Pg* 感染の有無、および胎盤・臍帯における遺伝子発現を評価した。なお、本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で行った（0170246A）。

本研究の主たる結果は以下のとおりである。

1. 妊娠期間は *Pg* 感染の有無に関わらず全て正期産であった。

2. ED群およびGD15群の出生仔の平均出生体重はCO群よりも有意に低く、低出生体重であった。

3. 妊娠17日目におけるED群の胎仔の体重は、CO群よりも低値を示した。

4. 妊娠マウスの体重および妊娠17日目における胎児生存率には有意な差は認められなかった。

5. 抗*Pg*-IgG抗体レベルの有意な増加が、ED群およびGD1群で観察されたが、TaqManプローブを用いたqPCRでは胎盤または臍帯のいずれにおいても*Pg*は検出されなかった。

6. 持続的な*Pg*感染は、胎盤におけるTNFαおよびIL-6のmRNA発現の増加をもたらした。妊娠15日目に*Pg*を注射した妊娠マウスは、胎盤におけるIL-6およびHIF-1αのmRNA発現の上昇を示した。

7. 臍帯において、*Pg*感染によるTNFαおよびIL-6のmRNA発現の増加傾向が認められた。HIF-1αのmRNA発現は、CO群と比較してED群のマウスの臍帯で増加した。

8. マイクロアレイ解析により$|\text{fold-change}| > 2$かつ$p < 0.05$を示した104の遺伝子のうち、炎症・出産・胎児の成長に関連する遺伝子に焦点を当て行ったqPCRでは、ED群マウスの臍帯におけるOLM1、MGL2、RPS6KA3、TRIM15のmRNAの発現上昇が確認された。

9. 胎盤の組織学的所見として、ED群の胎盤の海綿状栄養膜細胞層における海綿状栄養膜細胞の有意な減少が観察されたが、迷路部と脱落膜には明らかな変化は認められなかった。

以上の結果より、特に妊娠後期における*P. gingivalis*感染が、胎盤および臍帯における炎症および、低体重児出産を引き起こす可能性示唆された。本研究において宇田川は、歯周炎が出産にどのように影響を及ぼすのか明らかにするために菌血症モデルマウスを用いて検討し、歯周病原細菌である*P. gingivalis*感染が胎盤・臍帯における炎症および低体重児出産を引き起こす可能性を明らかにした。

早産・低体重児は新生児の疾病罹患率、死亡率を増加させ、胎児発育不全は出生後の予後が不良となることもあり、周産期死亡率や精神発達遅滞の発症率も高く、成人後も疾病罹患率が高いなど軽視できない。宇田川は本研究での結果を基に、胎盤・臍帯での炎症の可能性、および臍帯が胎児に対し防御的に機能している可能性について十分に考察している。また、胎盤の海綿状栄養膜細胞層に着目し、海綿状栄養膜細胞の減少を確認しており、 *P. gingivalis*感染が組織学的にも胎盤に変化をもたらしたことについて考察している点も評価できる。

本研究は一過性の菌血症が低出生体重児出産を引き起こすことをマウスモデルで示した点においても非常に興味深く、歯周炎が早産・低体重児出産に影響を及ぼすメカニズム解明の一助となることが期待できる。

本研究結果は、*P. gingivalis* 感染による菌血症が胎盤および臍帯で炎症を起こし、また低体重児出産を招く可能性を新たに報告したものであり、歯周炎と妊娠の連関を理解し、妊娠前から周産期における妊婦に対する歯周治療の指針を明確にする上で極めて重要なものである。歯周病学のみならず産婦人科学の今後の発展に寄与するものと考えられる。

よって本論文は博士 (歯学) の学位申請を行なうにあたり、十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 中元　絢子 |
| 論文審査担当者 | 主査　三浦　宏之<br>副査　高橋　英和　由井　伸彦 |
| 論　文　題　目 | Effect of fluoride mouthrinse on adhesion to bovine root dentin |


【要旨】

本研究の目的は､濃度の異なるフッ化物洗口剤が2ステップセルフエッチングシステム(2-SEA)の象牙質接着性に及ぼす影響を明らかにすることである。牛歯象牙質表面に対して 450、900、9000ppmF の溶液を 30 秒間塗布、あるいは 1 か月処理後、Clearfil SE Bond を業者指示に従って接着し、微小引張接着試験を行った。また同様に作製した接着界面に対して酸－塩基処理を行い、SEM にて ABRZ の形成を観察した。さらに象牙質粉末を各フッ化物処理して X 線吸収微細構造（XAFS）を用いて表面分析を行った。その結果、450, 900ppmF のフッ化物洗口剤の塗布は接着強さに影響を及ぼさないが、9000ppmF では悪影響を及ぼすことがわかった。またフッ化物塗布は、接着界面の耐酸性を向上させ、ABRZ の肥厚が確認された。XAFS による表面分析の結果、フッ化物濃度によって象牙質表面に生成するフッ化物の性状は異なり、これが象牙質接着性に影響を及ぼす可能性が示唆された。


【緒言】

近年、高齢者の残存歯の増加とともに根面う蝕の形成も増加している。しかし根面う蝕は、処置の難しさ（唾液、浸出液の混入や保持のない窩洞形態など）から臨床的な問題となり、根面う蝕処置に対する予防法の確立が求められている。

フッ化物は、象牙質への浸透による脱灰抑制効果や石灰化促進が報告され、フッ化物の日常的な使用はう蝕予防制御に有効である。

実験的な環境下におけるレジン－象牙質接着界面の耐久性を評価する方法として、酸－塩基処理後の接着界面を SEM 観察する方法がある。Tsuchiya ら（2004）は、樹脂含浸層直下に残存する歯質様構造を確認し、これを酸－塩基抵抗層（ABRZ）として報告した。ABRZ はフッ化物含有接着材の使用により肥厚し、接着耐久性の向上に寄与する可能性が指摘されている。

XAFS 分析は、目的元素のスペクトルより生体試料中の他の元素の影響を受けずに元素の化学的な状態の情報を得ることができる。

そこで本研究では、異なる濃度のフッ化物洗口剤を用いて象牙質接着性に及ぼす効果を微小引張り接着試験、SEM 観察により評価し、さらに XAFS を用いてフッ化物洗口剤処理後の牛歯根象牙質の表面分析を行った。

【材料および方法】

材料

フッ化物洗口剤（ミラノール、BEE BRAND MEDICO DENTAL）１包に対して、脱イオン水を加えて 450 ppm F と 900 ppm F 水溶液を作製した。また 900 ppm F 溶液に対して NaF（Wako Pure Chemical）を加えて 9000 ppm F 水溶液を作製した。

接着材として、2-SEA である Clearfil SE Bond (SE, クラレノリタケデンタル)を用いた。

微小引張り接着試験

牛歯をセメントーエナメル境より 15 mm で切断し、牛歯根を得た。さらに歯軸に平行に分割して、エポキシ樹脂にて包埋した。次に＃600 耐水研磨紙にて象牙質面を研削して 2 群に分けた。各濃度のフッ化物洗口剤 100μl を象牙質表面に塗布し、30 秒後に水洗・乾燥した（直後群）。他方は、フッ化物洗口剤を 1 カ月間継続して処理した。すなわち 450 ppm F は毎日、900 ppm F, 9000 ppm F は週に 1 回塗布し、塗布時以外は 37℃人工唾液（1.0 mM $CaCl_2$, 3.0 mM $KH_2PO_4$, 100 mM acetate, 100 mM NaCl, $NaN_2$ ；pH 6.3）に保管した（１カ月群）。その後、SE を接着処理後、コンポジットレジン（Clearfil AP-X、shade A2、クラレノリタケデンタル）を築盛して接着試料を作製した。ハロゲン光照射器である Optilux 501（Demetrom, Danbury）を使用した。試料は 37℃水中に 24 時間保管後、1.0 ×1.0 mm のビーム状試験片を作製し、クロスヘッドスピード 1 mm/min で微小引張り接着試験を行った。

破断面の SEM 観察

微小引張り接着試験後、破断面を SEM 観察した。破断面を 9 分割し、界面破壊(A)、コンポジットレジンの凝集破壊（R）、象牙質の凝集破壊（D）、ボンディングレジンの凝集破壊（B）の 4 種に分類して各破壊形態の割合を計算した。

ABRZ の形態観察

上記と同様に直後群及び、1 カ月群の試料を作製した後、SE を用いて接着処理し、フロアブルコンポジットレジン（Estelite Flow Quick、トクヤマデンタル）を用いて２枚の象牙質試料からサンドウィッチ状接着試料を作製した。試料は 37℃24 時間水中保管後、エポキシ樹脂包埋し、酸－塩基処理を行った。すなわち 100 ml の人工脱灰溶液（2.2 mmol/ L $NaH_2PO_4$ , 50 mmol/L 酢酸溶液, $CaCl_2$ 2.2 mmol/L；pH 4.5）を用いて 50 分間処理後、水洗し、さらに 5%NaClO に 20 分間浸漬して、象牙質コラーゲンを除去した。その後 Super-Bond C&B（サンメディカル）を用いて試料表面を保護し、接着界面に対して垂直に切断後、鏡面研磨し、アルゴンイオンエッチング、金蒸着を行って SEM（S-4500、HITACHI）にて 3500 倍で観察した。

ABRZ 周囲の面積の測定

接着界面周囲の耐酸性を定量的に評価するため、ABRZ を含む SEM 画像に対して 15×15 μm の枠を設定した。枠の範囲は、接着界面、脱灰前の基準線で囲まれた象牙質側であり、枠内の ABRZ と象牙質を含む面積を Image J（NIH、Bethesda、MA）の ROI モードにて測定した。

XAFS 分析

牛歯根象牙質粉末（直径 75μm 以下）0.05 g を 1 mL の各フッ化物洗口剤（450、900、9000 ppm F）に 30 秒間浸漬した（直後群）。さらに 450 ppm F では 1 回/日、900、9000 ppm F では 1 回/週浸漬し、37℃人工唾液にて 2 週間保管した（2 週間群）。試料を真空乾燥後、XAFS(あいちシンクロトロン光センター)の BL 7 U ビームラインにて表面分析を行った。標準物質として $CaF_2$ と FAp についても測定した。

統計処理

微小引張り接着試験（n = 30）及び、ABRZ(n = 20)の測定結果は、two-way ANOVA、Bonferroni にて検定した（$\alpha$＝0.05）。破断面の観察結果は、Mann-Whitney の *U* 検定を行った（$\alpha$＝0.00178）。

【結果】

微小引張り接着試験

すべての群において直後群は 1 カ月群よりも有意に高い接着強さを示した($p<0.05$)。また直後群、1 カ月群ともにコントロール、450 ppm F、900 ppm F との間に有意差は認められなかった($p>0.05$)。一方、9000 ppm F の接着強さは、他群より有意に低下した($p<0.05$)。

破断面観察

直後群では 450 ppm F に比べて 9000 ppm F において有意に接着界面は増加し($p<0.00178$)、ボンディングレジンの凝集破壊が有意に低下した($p<0.00178$)。1 カ月群においては、コントロールに比べて 450、9000 ppm F では界面破壊の割合が有意に上昇した($p<0.00178$)。

ABRZ の形態観察

Outer lesion はすべての群において確認されたが、その深さはフッ化物濃度の違いにより様々であった。一方、樹脂含浸層の形成は不明瞭であった。直後群のコントロールにおける ABRZ の厚みは、約 1.5μm であった。一方、450、900、9000 ppm F ではフッ化物洗口剤塗布群においては濃度の上昇とともにスロープの肥厚が観察された。さらに 1 カ月群の場合、すべての群において直後群よりも厚い ABRZ が観察され、スロープのより顕著な肥厚が認められた。

ABRZ 周囲の面積の測定

ABRZ 周囲の面積は、直後群に比べて 1 カ月群で有意に大きい値を示した($p<0.05$)。直後群では、コントロールに比べて 450、900、9000 ppm F で有意に大な値を示した($p<0.05$)が、3 群間に有意差は認められなかった($p>0.05$)。一方、1 カ月群においては、9000 ppm F が他群に比べて有意に大きな値を示した($p<0.05$)。450、900 ppm F はコントロールに比べて有意に大きな値を示した($p<0.05$)が、両者間に有意差は認められなかった($p>0.05$)。

XAFS による表面分析

FAp、$CaF_2$はともに 2 か所にピークを示したが、高さ、バランスやわずかなエネルギー端の違いが認められた。450 ppm F と 900 ppm F で処理した象牙質試料おいては、フッ素の K 端の XAFS はともに FAp に類似した波形を示し、FAp の存在が示唆された。一方、9000 ppm F においては、エネルギー端とピークは $CaF_2$に近く、表面に $CaF_2$様の構造の形成が示唆された。

【考察】

日常的なフッ化物の使用は、う蝕予防に有効であることが報告されている。本実験では実際のホームケアの状況をシミュレートするため、象牙質試料を 1 カ月間人工唾液中に保管して用いた。

2-SEA である Clearfil SE Bond は、機能性モノマーである MDP を含むが、MDP は歯質の脱灰効果とともに歯質との化学的な結合能を有することが報告されている。

微小引張り接着試験の結果、直後群、1 カ月群ともにコントロール群で高い接着強さを示したが、450 ppm F、900 ppm F 群と有意な差はなく($p>0.05$)、業者推奨によるフッ化物洗口剤の使用は、2-SEA による象牙質接着に影響しないことがわかった。しかし、9000 ppm F では有意な接着強さの低下が認められた($p<0.05$)。また、1 カ月保管群においては、直後群と比べて接着強さの有意な低下が認められた($p<0.05$)。これは象牙質試料を人工唾液中に保管することによって、スミヤ層が石灰化し、セルフエッチングによるスミヤの除去と象牙質への浸透がより困難になったためと考えられる。破断面の観察結果においては、直後群、1 カ月群ともに 9000 ppm F においては接着界面での破壊が有意に増加しており($p<0.00178$)、高濃度のフッ化物の塗布は、接着界面に悪影響を及ぼすことを示している。

象牙質処理面の XAFS 分析から、直後群、2 週間群ともに 450 ppm F、900 ppm F のフッ化物洗口剤処理群では FAp 様構造の形成が認められたが、9000 ppm F においては $CaF_2$様構造の形成が認められた。このことからフッ化物濃度の違いによって象牙質表層に形成されるフッ化物の化学構造が異なり、これが微小引張り接着試験や SEM 観察における違いに影響する要因であると考えられる。

ABRZ の SEM 観察結果から、フッ化物洗口剤を象牙質表面に塗布することにより、フッ化物を含まない 2-SEA においてもスロープの形成が確認された。ABRZ 周囲面積の定量的な測定結果は、直後群ではコントロールに比べて 450、900、9000 ppm F は有意に大きな値を示し($p<0.05$)、3 群間に有意差は認められなかった($p>0.05$)。このことは 450 ppm F の塗布によっても接着界面の十分な耐酸性が得られることを示している。また、1 カ月群では直後群に比べて有意に耐酸性の増大が認めたことから($p<0.05$)、フッ化物の繰り返し塗布は接着界面の耐酸性を促進し、接着耐久性を向上させる可能性が示唆された。

【結論】

450 ppm F, 900 ppm F のフッ化物洗口剤は、2-SEA の接着強さに悪影響を及ぼさないが、高濃度フッ化物の塗布においては悪影響を及ぼすことがわかった。フッ化物洗口剤の塗布によって接着界面の耐酸性が向上し、ABRZ のスロープの形成が認められた。XAFS 分析から 450 ppm F, 900 ppm F 処理後には FAp 様構造、9000 ppm F 塗布では $CaF_2$様構造が形成され、この違いが接着強さ、ABRZ 形成の違いの一因になることが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5554　号 | 中元　絢子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　三浦　宏之<br>副　査　高橋　英和　由井　伸彦 | |
| 論 文 題 目 | Effect of fluoride mouthrinse on adhesion to bovine root dentin. | |

（論文審査の要旨）

高齢者の残存歯の増加とともに根面う蝕形成の増加が問題となっており、その予防は喫緊の課題である。う蝕の予防に対するフッ化物の有効性については多くの報告があり、フッ化物洗口剤を用いた根面う蝕の予防は、極めて重要な課題である。本研究では、ホームケアとして用いられるフッ化物洗口剤を長期間使用した場合を想定し、その後の象牙質に対する修復材料の接着性に及ぼす効果を検討しており、今後増大する臨床での状況に対応するために必要な研究である。

実験には 2 種類のフッ化物洗口剤を業者指示に従って作製し、さらに高濃度フッ化物水溶液である 9000ppmF NaF 水溶液を追加使用している。実験群は、牛歯象牙質を各溶液にて処理して接着した群（直後群）と、1 か月間さらに口腔内を想定した人工唾液中に保管し接着した群（1 か月群）とに分けている。接着材として 2 ステップセルフエッチング接着システムを使用し、微小引張接着試験で評価している。また接着界面への影響を検討するため、酸―塩基処理後の接着界面の SEM 観察を行っている。これらの試料の作製方法は、いずれも目的に適ったものである。さらに SEM 画像上で接着界面の耐酸性について ABRZ を含む象牙質の面積を規定して定量的評価を行っており、フッ化物による効果を議論するうえで独創的な手法として高く評価できる。またフッ化物処理した象牙質粉について XAFS を用いて表面分析を行っていることも、これまでにない手法である。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである。

1. 微小引張り接着試験の結果、直後群は 1 カ月群よりも有意に高い接着強さを示した。また直後群、 1 カ月群ともにコントロール、450 ppm F、900 ppm F との間に有意差は認められなかった。一方、9000 ppm F の接着強さは、他群より有意に低下した。

2. 破壊形態は、直後群、一カ月群ともに、9000 ppm F において界面破壊の割合が有意に増加した。

3. SEM 観察の結果、Outer lesion の深さはフッ化物濃度の違いにより様々であった。一方、樹脂含浸層の形成は不明瞭であった。直後群のコントロールにおける ABRZ の厚みは、約 1.5μm であった。一方、450、900、9000 ppm F ではフッ化物洗口剤塗布群においては濃度の上昇とともにスロープの肥厚が観察された。さらに 1 カ月群の場合、すべての群において直後群よりも厚い ABRZ が観察され、スロープのより顕著な肥厚が認められた。

４．接着界面の ABRZ 周囲の面積は、直後群に比べて 1 カ月群で有意に大きな値を示した。直後群では、コントロールに比べて 450、900、9000 ppm F で有意に大きな値を示したが、3 群間に有

意差は認められなかった。一方、１カ月群においては、9000 ppm F が他群に比べて有意に大きな値を示した。450、900 ppm F はコントロールに比べて有意に大きな値を示したが、両者間に有意差は認められなかった。

5. XAFS による表面分析の結果、450 ppm F と 900 ppm F で処理した象牙質試料おいては、フッ素の K 端の XAFS はともに FAp に類似した波形を示し､FAp の存在が示唆された｡一方､9000 ppm F においては、エネルギー端とピークは $CaF_2$に近く、表面に $CaF_2$様構造の形成が示唆された。

１カ月保管群において、直後群と比べて接着強さが有意に低下した理由として、人工唾液中に保管することでスミヤ層の石灰化が進み、セルフエッチングによるスミヤの除去と象牙質への浸透がより困難になったと考察している。このことは臨床における治療法を考えるうえで必要かつ重要な情報である。一方ではフッ化物の塗布による接着界面の耐酸性の促進は、接着耐久性の向上にも寄与する可能性ついても指摘している。

XAFS による象牙質表面分析の結果、450 ppm F、900 ppm F 処理群では FAp 様構造が認められるのに対して、9000 ppm F 処理群においては $CaF_2$様構造の形成が認められることから、フッ化物濃度の違いにより象牙質表層に形成されるフッ化物の状態が異なり、これが微小引張り接着試験や SEM 観察における結果に影響した要因の一つであると考察している｡このことは今後のフッ化物の応用に際して、極めて有益な情報であり、今後の研究への示唆に富むものである。

以上のように、本研究は異なる濃度のフッ化物洗口剤を用いて象牙質接着に及ぼす効果を微小引張り接着試験、SEM 観察により評価し、さらに XAFS を用いてフッ化物洗口剤処理後の牛歯根象牙質の表面分析を行うことにより、接着界面の形態に及ぼす影響および役割について明らかにしたものである。得られた知見は臨床的にも非常に有益な情報であり、今後の歯科保存学、歯科材料学、ならびに接着歯学の発展に大いに寄与するものと考えられる。したがって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 馬場　優也 |
| 論文審査担当者 | 主　査　若林　則幸<br>副　査　古屋　純一　　下山　和弘 |
| 論　文　題　目 | Effectiveness of a combination denture-cleaning method versus a mechanical method: comparison of denture cleanliness, patient satisfaction, and oral health-related quality of life |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

近年、口腔内の細菌が全身疾患に関与していることが注目されており、それと同様にそれら細菌の温床となりうる義歯の衛生状態にも関心が向けられている。デンチャープラークは義歯性口内炎・歯周疾患・う蝕といった口腔内に限局した影響だけではなく、誤嚥性肺炎・胃腸や胸膜への感染といった全身疾患の要因になるとされている。高齢化が進む社会ではそれらを予防するためのデンチャープラークコントロールの必要性が注目されている。

義歯表面に付着するデンチャープラークを除去する方法として、機械的清掃と化学的清掃の２つが挙げられる。近年、機械的清掃・化学的清掃のどちらか一方での方法のみでは不十分であり、両者を組み合わせた方法が有効だと言われている。

しかし、今なお化学的洗浄と機械的洗浄を評価・検討した研究は不十分であり、その原因のひとつが標準化された義歯清掃状況の評価方法がないことがあると報告されている。また、義歯清掃方法の違いが患者満足度、好み、コスト、副作用、義歯床下粘膜に与える影響はわかっていないとされている。

そこで本研究では客観的な清浄度評価として用いられているATP拭き取り検査に注目した。ATP拭きとり検査は全ての生物のエネルギー源であるアデノシン三リン酸（ATP）の量を測定することで汚染物質の総量を評価する。ATP拭きとり検査は従来の公衆衛生や病院での清浄度検査だけでなく、歯科においても口腔衛生状態の検査、カリエスリスクチェック、根管治療における細菌検査など幅広い領域において迅速かつ簡便な検査方法として用いられている。しかし、義歯清掃状況の評価法として用いられているという報告はない。

今回は予備実験として義歯清掃状況の評価方法としてのATP拭きとり検査の信頼性と妥当性について評価・検討を行った。その上で機械的清掃だけを行った清掃方法と機械的清掃・化学的清掃を併用した清掃方法の客観的な義歯洗浄効果を比較し、加えて今まで報告のない義歯清掃方法が患者満足度といった患者による主観的評価に与える影響を評価することを目的とした。

今回帰無仮説はブラシだけを用いた義歯清掃方法とブラシと義歯洗浄剤を用いた義歯清掃方法で客観的な洗浄効果と患者による主観的評価に差がないとした。

＜方法＞

・予備実験

今回予備実験としてATP拭きとり検査の義歯清掃状況の評価方法として信頼性・妥当性を評価した。

・信頼性評価

上顎総義歯装着者５名に対して、上顎義歯粘膜面にATP拭きとり検査を各３回行い、級内相関係数を算出した。

・妥当性評価

上顎総義歯装着者１２名に対して、ATP拭きとり検査・染色写真法・カンジダ菌検出用簡易検査をベースライン時と歯科医師による義歯清掃後の各２回ずつ行った。ATP拭きとり検査・染色写真法とATP拭きとり検査・カンジダ菌検出用簡易検査の組み合わせでスピアマンの順位相関係数を算出した。

・本実験

被験者は東京医科歯科大学歯学部附属病院に総義歯の新製、調整、リコールを希望し来院した無歯顎患者を対象とし、ブラシ群とブラシ＋義歯洗浄剤群の２群、各１５名にランダムに分けられた。ベースライン測定及び被験者が現在使用している義歯に歯科医師による義歯清掃を行った。その後各群それぞれに対して義歯清掃指導を行った。ブラシ群には毎食後義歯ブラシを用いて流水下にて5分間義歯を清掃し、就寝時に義歯を生理食塩水に浸漬するよう義歯清掃指導を行った。ブラシ＋義歯洗浄剤群には毎食後義歯ブラシを用いて流水下にて5分間義歯を清掃し、就寝時に義歯を義歯洗浄剤に浸漬するよう義歯清掃指導を行った。両群共に指導に従って、3週間義歯清掃を行わせた。

客観的洗浄効果評価として上顎義歯に対して染色写真法・ATP拭き取り検査・カンジダ菌検出用簡易検査を、加えて口腔粘膜に対してもカンジダ菌検出用簡易検査を行った。主観的評価として使用義歯の主観的評価を満足度・清掃性・快適性・審美性の4項目について100mmVASを用いて行い、それに加えて口腔関連QOLをOral Health Impact Profile for edentulous patients(OHIP-EDENT-J)を用いて評価した。各項目を介入前後で評価した。

介入後の測定結果をMann-Whitney U testを用いて２群間を比較・検討した。有意水準は0.05とした。

＜結果＞

・予備実験

・ATP拭きとり検査の信頼性評価

級内相関係数0.926となり、高い信頼性を示した。

・ATP拭きとり検査の妥当性評価

ATP拭きとり検査・染色写真法のスピアマンの順位相関係数は0.628となり、p=0.001と有意な相関を示した。ATP拭きとり検査・カンジダ菌検出用簡易検査は0.517となり、p=0.001とこちらも有意な相関を示した。

・　本実験

染色写真法は有意にブラシ＋義歯洗浄剤群の方が汚れは少なかった（p=0.03）。ATP拭きとり検査は有意にブラシ＋義歯洗浄剤群の方が汚れは少なかった（p=0.00003）。義歯のカンジダ菌検出用簡易検査は有意にブラシ＋義歯洗浄剤群の方が汚れは少なかった（p=0.02）。粘膜のカンジダ菌検出用簡易検査・VAS法患者主観的評価・口腔関連QOL測定においては２群間で有意差は見られなかった。

＜考察＞

予備実験では、ATP拭きとり検査を義歯や口腔粘膜の清掃状況を評価するために既存の方法と比較して信頼性と妥当性の評価を行った。信頼性の評価では級内相関係数0.92となり、高い信頼性が示された。妥当性の評価では既知の義歯清掃状況の評価法である染色写真法、ストマスタットと有意な相関を示した。以上によりATP拭きとり検査は、義歯清掃状況の評価方法として高い信頼性、妥当性を有していることが示唆された。ATP拭きとり検査は測定時間が1分程度と短く操作が簡便である。そのため染色写真法のように規格写真撮影の設備やコンピューターを用いた画像処理が必要な評価法や、24時間の恒温機による培養が必要なカンジダ菌検出用簡易検査と比較して、コストやチェアタイム、通院回数を抑えられる点が有利である。また、本体は軽量で持ち運びも容易なため、大規模な施設だけでなく、一般の診療所や在宅や施設などの介護施設を含めた幅広い状況での義歯清掃状況の評価が可能である。今後、患者指導や義歯ケアの啓蒙に利用できるツールとして期待される。

本研究の結果では、ブラシ＋義歯洗浄剤群はブラシ群と比較して、染色写真法、ATP拭きとり検査、義歯のカンジダ菌検出用簡易検査において有意に汚れが少なかった。これは、義歯洗浄剤の併用による義歯清掃は洗浄効果が高いとする、過去の研究で得られた結果と一致する。本研究は，ブラシと義歯洗浄剤との併用により洗浄効果を向上させるエビデンスを提供する。

一方，義歯の汚れと粘膜の汚れを比較すると、カンジダ菌検出用簡易検査において、義歯では介入により有意に洗浄効果がみられたのに対し、粘膜では有意差が見られなかった。これは、ブラシと義歯洗浄剤を併用により義歯に付着したカンジダを効果的に除去することは可能であるが、口腔内のカンジダを改善させるには至らない可能性が示唆された。

介入後のVAS，OHIP共に２群間に有意差が見られなかった。染色写真法、ATP拭きとり検査、義歯のカンジダ菌検出用簡易検査を用いた客観的評価では、義歯清掃により義歯の汚れが減少したが、清掃状況が改善しても患者主観評価には影響を与えない可能性が示唆された。本研究では被験者が高齢者であり、自身の義歯に対しての関心が薄いため主観評価へ影響しなかったことが考えられる。また、歯科医師と患者の間で義歯清掃状況に対する考え方に、違いが生じている可能性がある。歯科医師と患者の間で情報を共有し，互いに共通の目標に向かってメンテナンスをしていくことが重要である。

本研究は３週間と短期間の介入であるため、一度口腔内に定着してしまった粘膜のカンジダ菌や長期的な生活習慣に基づく患者による主観評価に関しては、介入による変化を十分に検出できていない可能性があるため、今後より長期にわたる研究を行う必要がある。今回のような少ない被験者数では、使用年数や修理痕などの使用義歯の差異よる義歯清掃状況への影響について、分析を十分に行うことができなかったため、実際の義歯が患者ごとに大きく異なることを考慮する

と、被験者数を増やして研究が望まれる。また、今回は２群による比較を行なったが、義歯洗浄剤のみによる義歯清掃を行う群や、近年注目されている超音波洗浄機による義歯清掃を行う群など今回比較できなかった義歯清掃に関しても比較・検討が望まれる。

＜結論＞

ブラシのみを用いた義歯清掃方法と比較して、ブラシと義歯洗浄剤を併用した義歯清掃方法は洗浄効果が高いことが示唆された。義歯清掃方法の違いにより患者による義歯の主観的評価・口腔関連 QOL に影響がないことが示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5555　号 | 馬場　優也 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　若林　則幸<br>副　査　古屋　純一　　下山　和弘 | |
| 論 文 題 目 | Effectiveness of a combination denture-cleaning method versus a mechanical method: comparison of denture cleanliness, patient satisfaction, and oral health-related quality of life | |

（論文審査の要旨）

近年、デンチャープラークが口腔内のみならず、全身疾患の原因になるとされており、デンチャープラークコントロールの必要性が注目されている。しかし、義歯清掃方法を比較する研究は十分でない、標準化された義歯清掃状況の評価法がない、患者満足度など評価されていない項目が多いことなど課題が多く残されている。

こうした状況を背景に、馬場は義歯用ブラシのみを用いた機械的洗浄方法と義歯用ブラシと義歯洗浄剤を併用した機械的・化学的義歯洗浄方法の比較検討を行った。評価には既存の義歯清掃状況の評価方法である染色写真法とカンジダ菌検出用簡易検査に加え、ATP 拭き取り検査・患者による義歯の主観的評価・口腔関連 QOL を行った。義歯清掃状況の評価方法としてこれまでに報告のなかった ATP 拭き取り検査に関しては予備実験を行い、義歯清掃状況の評価方法としての信頼性・妥当性の確認を行った。

被験者は東京医科歯科大学歯学部附属病院に全部床義歯の新製、調整、リコールを希望し来院した無歯顎患者を対象とした。被験者はブラシ群とブラシ＋義歯洗浄剤群の２群、各１５名にランダムに分けられた。ベースライン測定を行い、その後被験者が現在使用している義歯に対して歯科医師による義歯清掃を行うことで介入前の義歯の汚れを可及的に取り除いた。各群それぞれに対して義歯清掃指導を行った。ブラシ群には毎食後義歯用ブラシを用いて流水下にて5分間義歯を清掃し、就寝時に義歯を生理食塩水に浸漬するよう義歯清掃指導を行った。ブラシ＋義歯洗浄剤群には毎食後義歯用ブラシを用いて流水下にて5分間義歯を清掃し、就寝時に義歯を義歯洗浄剤に浸漬するよう義歯清掃指導を行った。両群共に指導に従って、3週間義歯清掃を行わせた。介入後の評価を行い、結果を２群間において比較検討した。

本研究は綿密な研究計画をもとに実施され、適切な統計学的解析により妥当性の高い結果を導いており、研究計画から考察に至るまで高く評価できる。

本研究で得られた主な結果は以下の通りである 。

１，染色写真法は有意にブラシ＋義歯洗浄剤群の方が汚れは少なかった（p=0.03）

２，ATP 拭きとり検査は有意にブラシ＋義歯洗浄剤群の方が汚れは少なかった（p=0.00003）
３，義歯のカンジダ菌検出用簡易検査は有意にブラシ＋義歯洗浄剤群の方が汚れは少なかった（p=0.02）
４，粘膜のカンジダ菌検出用簡易検査・VAS法患者主観的評価・口腔関連QOL測定においては２群間で有意差は認められなかった。

ブラシのみを用いた義歯清掃方法と比較して、ブラシと義歯洗浄剤を併用した義歯清掃方法は洗浄効果が高いことが示唆された。義歯清掃方法の違いにより患者による義歯の主観的評価・口腔関連 QOL に影響がないことが示唆された。洗浄効果に関しては、過去の研究の結果と一致しており、エビデンスをより強固にするものである。患者による義歯の主観的評価と口腔関連 QOL に関しては、今回有意差は見られなかったものの、過去にない取り組みであり、今後の義歯清掃方法を比較検討する研究の礎となるものである。

よって、本論文は博士（歯学）の学位を請求するのに十分価値のあるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | Mya Nandar |
| 論文審査担当者 | 主査： 柴田　俊一<br>副査： 金井　正美、青木　和広 |
| 論　文　題　目 | Transcription factor Foxc1 is involved in anterior part of cranial base formation |

（論文の内容の要旨）


**Abstract**

The cranial base is a structure mainly formed through endochondral ossification and integrated into the craniofacial complex acting as an underlying platform for developing brain. *Foxc1* is an indispensable regulator during intramembranous and endochondral ossification. In this study, anterior cranial base defects including unossified presphenoid and lack of middle part of basisphenoid bone was found in the spontaneous loss of *Foxc1* function mouse (*congenital hydrocephalous*), *Foxc1*$^{ch/ch}$. Consistently, hypoplastic presphenoid primordial cartilage and lack of middle part of basisphenoid primordial cartilage were observed at the earlier stage. *Foxc1* is expressed in the anterior cranial base forming mesenchyme from early stages. *Collagen type2A1* (*Col2a1*) expression was suppressed in the posterior tip of basal portion of trabecular cartilage (bTB) that forms presphenoid and anterior hypophyseal (aH) that forms anterior part of basisphenoid. Interestingly, persistent epithelial stalk of anterior lobe of the pituitary gland was also detected, which seemed to separate aH from the posterior portion of hypophyseal cartilage primordium (pH) derived from mesoderm. Loss of *Foxc1* function only in neural crest cell-lineage (*Wnt1-cre; Foxc1* $^{ch/flox}$) showed ossification of pH. These findings suggest that *Foxc1* is an important regulator to progress chondrogenesis and initiation of presphenoid and basisphenoid bones ossification.


**Introduction**

The cranial base is an important integral portion of craniofacial skeletal. It provides structural support to important organs such as brain and pituitary gland, and connects other craniofacial skeletal components. The cranial base of adult mouse is composed of ethmoid, presphenoid, basisphenoid and basioccipital as the midline structure with auditory capsule of temporal bone. In the contrary to other craniofacial skeleton, which are formed through intramembranous bone formation, the cranial base components are mainly formed through endochondral ossification. Previous studies proved that cranial base is derived from cranial neural crest and mesoderm. Development of cranial base is influenced by many factors such as pressure from the developing brain and genetic signaling pathways including fibroblast growth factor, bone morphogenetic protein and indian hedgehog. Transcription factors such as *Otx2, Foxc1, Foxc2* and *Gsc* are

also involved in patterning of cranial base. *Foxc1* is a member of Forkhead box transcription factors, which are evolutionarily conserved and important in various developmental processes. It is reported that *Foxc1* is involved in both intramembranous and endochondral ossification. Spontaneous loss of *Foxc1* function mouse (*congenital hydrocephalous*, *Foxc1*$^{ch/ch}$) shows distinct skeletal defects in the cranial and extra cranial skeleton. However, detailed analysis of *Foxc1* function and its expression pattern in cranial base area has not been reported yet. In this study, cranial base formation of wild type control and *Foxc1*$^{ch/ch}$ mice was examined to get some insights into *Foxc1* function.

**Materials and Methods**

Fully ossified fetal skull base at 18 days after post coitum (E18.0) and complete chondrocranium formation stage at E15.5 of wild type (wt) and *Foxc1*$^{ch/ch}$ were stained by alcian blue and alizarin red for cartilage and bone, respectively. For loss of *Foxc1* function only in neural crest cell-lineage (anterior part of cranial base) *Wnt1-cre; Foxc1* $^{ch/flox}$ mice were generated. To study the sequential development of skull base, hematoxylin and eosin staining was carried out on wild type embryos from early mesenchymal condensation stage at E11.0 to matrix maturation phase and late hypertrophic stage at E15.5. *Foxc1* and *Col2a1* expression pattern in skull base forming area was confirmed in serial developmental stages by *in situ* hybridization analysis. Cell proliferation during hypophyseal cartilage mesenchymal condensation at E12.0 was analyzed in *Sox9* expressing domain by immunohistochemical detection of Bromodeoxyuridine (BrdU). The BrdU labelling index was calculated as the ration of BrdU-positive nuclei to the Hoechst stained nuclei in representative tissue sections under pituitary gland area.

**Results**

The differential bone and cartilage staining at E18.0 wt showed all midline cranial base components were fully ossified with distinct cartilaginous synchondrosis. In contrast, *Foxc1*$^{ch/ch}$ demonstrated comparatively smaller whole skull with unossified presphenoid, lack of middle part of basisphenoid bone, and smaller lamina obturan and squamosal bone. Studies on earlier stage at E15.5 in the *Foxc1*$^{ch/ch}$ exhibited lack of cartilage primordium at the central part of hypophyseal cartilage. In wild-type mice, *Foxc1* was strongly expressed in mesenchymal tissues in the cranial base during early stages, and its expression became reduced as cartilage formation progressed, but still detectable in hypertrophic chondrocytes. Expression of *Col2a1* was reduced in basal portion of trabecular plate (bTH) and anterior hypophyseal area (aH) at E12.0 in *Foxc1*$^{ch/ch}$ mice. Expression of *Col2a1* in aH of the *Foxc1*$^{ch/ch}$ is not detectable until E14.0, although it became detectable in bTH. In addition, persistent Rathke's pouch tissue, which seemed to disturb the connection between aH and pH was found in *Foxc1*$^{ch/ch\ mice}$ at least till E14.0. A cell proliferation activity of chondrocyte cell lineage of aH was significantly higher in the *Foxc1*$^{ch/ch}$ at E12.0, but comparable in pH between wt and *Foxc1*$^{ch/c}$. Skeletal analysis in *Wnt1-cre; Foxc1* $^{ch/flox}$ mice at E18.5 showed ossified posterior part of the basisphenoid.

**Discussion**

Understanding the molecular mechanism involved in endochondral ossification of anterior cranial base could lead to better understating of the phenotype, diagnosis and subsequently the treatment for several human congenital anomalies.

Lack of ossification in the presphenoid cartilage primordium in *Foxc1*$^{ch/ch}$ suggests that *Foxc1* is required for ossification. However, basioccipital, polar cartilages, that forms lateral part of the basisphenoid shows ossification, although they are smaller in the *Foxc1*$^{ch/ch}$. From these results, it is possible to speculate that ossification process is only delayed but not prevented in the mutant.

It has been reported that cranial base components rostral to hypophyseal fenestra (till anterior portion of hypophyseal cartilage) is derived from neural crest cells and the remaining posterior portion from mesoderm. In our neural crest cell-specific deletion of *Foxc1* mice, *Wnt1-cre; Foxc1*$^{ch/flox}$ showed skeletal defects similar to congenital loss of *Foxc1* function mice but ossification of posterior part of basisphenoid has been rescued. This finding supports our hypothesis that *Foxc1* is necessary for ossification and suggests that *Foxc1* plays an important role in endochondral ossification of anterior cranial base.

*Foxc2* that is closely related to *Foxc1* shares the similar expression pattern to that of *Foxc1* in many embryonic tissues. Deletion of *Foxc2* exhibits lack or delay of the presphenoid bone ossification although other cranial base bones develop relatively normal. This suggests that development of the presphenoid bone deeply depends on both *Foxc1* and *Foxc2* expression whereas other cranial base bones predominantly requires *Foxc1*.

Absence of central portion in hypophyseal cartilage that develops into the middle part of the basisphenoid in the mutant suggests *Foxc1* function in chondrocyte differentiation. A principle regulator of cell lineage determination *Sox9* and its target *Col2a1* gene expression in bTB and aH cartilage is noticeably weak compared to other cartilage primordia. Although Foxc1 binding sequence has not been precisely determined, it is possible to speculate that *Foxc1* directly affects *Sox9* expression, and the decreased *Sox9* expression and/or reduced activity of one or more coactivators of *Sox9* regulated in the mutant results in down-regulation of *Col2a1*. Even so, it remains to be elucidated that how loss of *Foxc1* strongly affects bTB and aH.

Increased cell proliferation activity in aH of *Foxc1* mutant suggests that precursor cells in this region are in undifferentiated status which cause reduction of chondrogenic marker gene expression, and as a consequence normal chondrocyte formation is disturbed.

In wt fetuses, the epithelial stalk was found at E12.0 and the stalk detaches from the oral epithelium at E12.0, then ingress into the anterior lobe of the pituitary gland by E13.0, during which mesenchymal anterior and posterior to the stalk differentiate into chondrocytes and intermingle under the anterior lobe of the pituitary gland. Histological analysis showed persistent epithelial stalk of Rathke's pouch at least until E14.0 in the *Foxc1*$^{ch/ch}$, which appears to interrupt the connection between aH and pH to form hypophyseal cartilage in the middle part. How *Foxc1* is associated with detachment and ingression of the epithelial stalk of Rathke's pouch and affects chondrocyte differentiation have to be clarified in relation to cartilage formation.

**Conclusion**

The results suggest *Foxc1* functions in chondrocyte differentiation and ossification of anterior cranial base components, but detailed molecular mechanism is yet to be studied for better understating. In addition, *Foxc1* involvement in the surrounding structures such as pituitary gland tissue development.

<和文要旨＞

脳を支える頭蓋底は、頭蓋顔面部の一部として主に軟骨内骨化により形成される。*Foxc1* はフォークヘッド転写調節因子ファミリーに属する遺伝子で、軟骨内骨化や膜性骨化に関与すると考えられている。本研究では、*Foxc1* の自然発症変異マウスである *Foxc1*$^{ch/ch}$マウスを用いて、頭蓋底形成における *Foxc1* の機能を解析した。*Foxc1*$^{ch/ch}$マウスの胎齢 18.0 日胚では、頭蓋底前部において前蝶形骨が骨化せず、また底蝶形骨の中央部も大きく欠損していた。野生型マウスの胎齢 11.0～14.0 日胚における *Foxc1* の頭蓋底形成域の間葉での発現パターンを調べたところ、当該領域に強く遍在的な発現が認められたため、*Foxc1*$^{ch/ch}$マウスの頭蓋底に生じた表現型は *Foxc1* の欠失による直接的な影響によると考えられた。*Foxc1*$^{ch/ch}$マウスの胎齢 12.0～14.0 日胚では、軟骨形成の分子マーカーである *Collagen type2 A1* (*Col2a1*)の発現が 梁軟骨の後端部と下垂体軟骨の前半部で顕著に減少しており、この部位での軟骨形成は認められなかった。またこの部位では下垂体前葉の形成が不完全であったことから、下垂体前葉と頭蓋底の形態形成における相互作用が示唆された。*Foxc1*$^{ch/ch}$マウスの下垂体軟骨前半部形成域における細胞分裂を示す細胞の割合は野生型マウスに比べて有意に大きく、この領域では *Foxc1* の発現の消失によって未分化間葉細胞から軟骨細胞への分化が抑制されていると考えられた。さらに、神経堤細胞のみで *Foxc1* の発現が欠失する *Wnt1-cre;Foxc1*$^{ch/flox}$マウスを作出したところ、中胚葉に由来する下垂体軟骨の後半部では骨化が認められた。以上の結果より、*Foxc1* が前蝶形骨と底蝶形骨における軟骨分化の進行と骨化の開始に重要な役割を果たしていると考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5556　号 | Mya Nandar |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査：　　柴田　俊一<br>副査：　　金井　正美、青木　和広 | |
| 論 文 題 目 | Transcription factor Foxc1 is involved in anterior part of cranial base formation | |

（論文審査の要旨）

脳を支える頭蓋底は、側頭部の耳殻と正中構造である篩骨、前蝶形骨、底蝶形骨および底後頭骨からなる。膜性骨化により形成される他の頭蓋顔面骨とは異なり、頭蓋底骨は主として軟骨内骨化により形成される。また、頭蓋底の骨を形成する細胞は、頭部神経堤および中胚葉の両方に由来することが示されている。頭蓋底は脳を下方から物理的に支えると共に、各脳神経や脳を栄養する血管が通過するため、胎児期における頭蓋底の形態異常は重篤な疾患の原因となる可能性がある。頭蓋底の形成には、発生中の脳からの圧力およびツールキット遺伝子と呼ばれる発生過程の中で繰り返し発現して機能を果たすシグナル分子など、多くの因子が関与している。転写因子である *Otx2*、*Foxc2*、*Gsc* なども頭蓋底の形成に関与することが報告されている。*Foxc1* はフォークヘッド転写調節因子ファミリーに属する遺伝子で、パラログ遺伝子である *Foxc2* と共に血管形成や軟骨内骨化や膜性骨化に関与することが報告されてきたが、頭蓋底の発生への関与については調べられていなかった。

このような背景から、申請者 Mya Nandar は、*Foxc1* の自然発症機能欠失変異マウスであり、先天性水頭症を呈する *Foxc1*$^{ch/ch}$マウスの頭蓋底形成を詳細に解析し、当該部位における *Foxc1* の役割を検討した。

申請者はまず、頭蓋骨の軟骨および骨を解析するために、同腹野生型および *Foxc1*$^{ch/ch}$マウスの胎齢 15.5 日および 18.0 日胎仔についてアルシアンブルーおよびアリザリンレッドによる骨軟骨二重染色を行った。さらに詳細に表現型を解析するため、胎齢 11.0 から 15.5 日の胎仔を用いて頭部矢状断のパラフィン組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行って観察した。また、同胎齢の胎仔頭部の凍結矢状断切片を作製し、*in situ* ハイブリダイゼーション法（ISH）により、*Foxc1,* 軟骨細胞マーカーである *Collagen type2 A1* (*Col2a1*)の発現、さらに間葉系幹細胞凝集後の軟骨細胞分化初期マーカーである *Sry type high mobility group box 9*（*Sox9*）転写因子の発現を検討した。さらに軟骨細胞前駆細胞の増殖能の解析に関し、ブロモデオキシウリジン（BrdU）を妊娠マウスに投与後(100mg/kg)、胎仔を回収して凍結切片を作製し、*Sox9* の ISH を行った後に BrdU の取り込みを免疫組織化学染色によって検出した。BrdU 標識指数は、*Sox9* 発現ドメインにおける細胞数カウントし、その数に対する BrdU 陽性数の比として計算した。群間の統計学的差異を、分散分析およびそれに続くボンフェローニ補正によるスチューデント t 検定によって分析した。*Foxc1* の骨形成に対する役割をさらに検討するため、神経堤細胞においてのみ *Foxc1* の機能が完全に欠失する *Wnt1-cre;Foxc1*$^{ch/flox}$マウスを作製

して骨軟骨二重染色を行ない観察した。

Mya Nandar の研究は、論理的に考えられた研究背景のもと、*Foxc1* 遺伝子の頭蓋底形成における役割を検討するための適切な研究計画を作成し、自身が実験技術を習得して実行されたと評価できる。また、得られた実験結果を適切に分析して考察しており、学術的価値も評価できる。

本研究で得られた結果は以下である。

1. *Foxc1*$^{ch/ch}$マウス胎齢 18.0 日では、頭蓋底前部において前蝶形骨の骨化が認められず、底蝶形骨中央部の骨形成が観察されなかった。
2. *Foxc1*$^{ch/ch}$マウス胎齢 15.5 日では、底蝶形骨の原基である下垂体軟骨中央部の軟骨原基が認められなかった。
3. 野生型マウス胎齢 11.0～14.0 日では、*Foxc1* は頭蓋底形成領域の間葉に発現し、軟骨形成が進行すると軟骨膜に発現が限局した。
4. 胎齢 12～14 日 *Foxc1*$^{ch/ch}$マウスでは、*Col2a1* の発現が梁軟骨の後端部と下垂体軟骨の前部で非常に低かったが、下垂体軟骨後部での発現は野生型と同等であった。また、下垂体前葉となるラトケ嚢の上皮索の退縮が不全で、頭部神経堤に由来する下垂体軟骨前部と中胚葉に由来する下垂体軟骨後部の細胞の正中部での混合が認められなかった。
5. *Foxc1*$^{ch/ch}$マウス胎齢 12 日では、下垂体軟骨前部を形成する間葉細胞分裂の割合が、野生型に比べて有意に高かった。一方、下垂体軟骨後部では野生型との差は認められなかった。
6. 胎齢 18.5 日 *Wnt1-cre; Foxc1*$^{ch/flox}$マウスでは、中胚葉に由来する下垂体軟骨後部の骨化が認められた。

Mya Nandar は、得られた結果より、*Foxc1* が、頭蓋底前部の形態形成において、軟骨形成や軟骨内骨化に伴う骨形成に直接関与すると考察している。特に軟骨形成については、ラトケ嚢の上皮索の退縮不全と下垂体軟骨前部の軟骨細胞分化不全との関連、および下垂体軟骨後部の軟骨分化への影響がないことについて、さらなる研究の必要性が記述されている。先行研究において *Foxc1* が軟骨内骨化や膜性骨化に関与することは明らかにされていたが、本研究で示唆された頭蓋底形成における下垂体前葉と軟骨細胞分化の相互作用の存在は、当該研究領域に新たな知見を提供するものであり、大いに評価できる。頭蓋底前部を構成する前蝶形骨と底蝶形骨における軟骨分化の進行と軟骨内骨化の開始に果たす *Foxc1* の機能の解明は、ヒトにおける様々な頭蓋顎顔面の先天異常とともに先天性水頭症の原因の解明や治療法の開発の可能性に繋がる価値ある研究であり、医歯学および発生学研究領域の発展に寄与するところが大であると考えられ、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | MULATI　Aierken |
| 論文審査担当者 | 主査　樺沢 勇司<br>副査　中島 友紀、池田 正明 |
| 論　文　題　目 | Effects of osteotomy with drilling on osteocyte |

（論文内容の要旨）

Abstract: When placing dental implants, osteotomy with drilling is required. Although osteocytes control bone remodeling by producing sclerostin, an inhibitor of bone formation, effects of the osteotomy for implant placement on osteocytes has not been clear. The purpose of the present study was to evaluate the osteocytes and their sclerostin expression after the osteotomy with drilling in mice tibia. Thirty-two male C57BL/6 mice of 11weeks old were used. Right tibia was drilled with a small fissure bur whereas the left tibia was intact as control. The animals were sacrificed at 1 day, 3 ,7 and 14 days after the surgery and the bone around the osteotomy site was examined histologically and immunohistologically with an antibody against murine sclerostin.  The lacunae without osteocyte were evident at 3,7 and 14 days. At all-time points, the bone close to the defect area showed less staining of sclerostin whereas the control site showed strong positive staining. Osteotomy with drilling induces death of osteocytes reducing sclerostin expression around the bone defect. This phenomenon could promote subsequent bone formation.

Introduction: Osteocytes are the most abundant cells in mature bone and they are also the master signal sensors, integrators, and transducers. It has been extensively reported that osteocytes play important roles in bone remodeling process, controlling bone resorption and formation. They are originally derived from osteoblasts on the bone surface being enclosed in osteoid, which subsequently mineralizes during the process of bone formation. Osteocytes also play multifunctional roles in bone homeostasis. They act as mechanosensors, perceiving strain signals by developing micro cracks through their cell bodies, through their dendritic processes. Osteocytes are also thought to send signals of both bone resorption and bone formation. It has been suggested that dying or dead osteocytes send signals of resorption. There are several key proteins that identify the maturing osteocyte: alkaline phosphatase, Pi-regulating endopeptidase on chromosome X (PHEX), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), sclerostin, and fibroblast growth factor-23 (FGF-23). However, at the most mature stage osteocyte can produce sclerostin and FGF-23. It has also been known that osteocytes play a very important role in bone remodeling through the actions of the Wnt/β-catenin pathway. Sclerostin inhibits the Wnt signaling pathway in osteoblasts by binding at the LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein)5/6 receptor on the osteoblast cell

membrane. Downregulation of sclerostin is associated with increased osteogenesis and bone mass. Osteocytes may act as conductors with regard to directing both osteoclast and osteoblast activities, as orchestrators of bone remodeling.

Drilling bone is a common step of daily clinical procedure in dentistry and orthopedics. Currently, prosthodontic treatment with dental implants has become an effective and predictable modality for patients missing teeth. When placing dental implants, osteotomy with drilling is always required. Successful osseointegration process starts from the optimal osteotomy site preparation. However, it was not clear how osteocytes involve in osseointegration process after drilling for implant placement. The purpose of the present study was to evaluate the osteocytes and their sclerostin expression after the osteotomy with drilling in mice tibia.

Materials and Methods : Thirty-two male C57BL/6 mice of 11weeks old, weighing 24-28g, were used. Incision of 10mm length was made in the right tibial metaphysis. Skin and periosteum flap was elevated. Low-speed dental engine, 800 rpm, was used to create a defect with 1 mm-diameter with a straight fissure bur, under constant irrigation of sterile saline solution. The left side of tibia was intact as control. Finally, the flap was sutured and closed. The animals were sacrificed at 1, 3, 7 and 14 days after the surgery. Histologic images for hematoxylin and eosin (H&E) staining (Biozero microscope, Keyence Corporation of America, Itasca, IL, USA at 20 times magnification) were captured on the right tibia within bone area 1 mm away from the defect area, and the same area of the control side. The number of empty lacunae and total lacunae were counted with Image-J. In the same area of HE stains slide, the images of the sections of sclerostin immunohistochemical stain were also captured. All data were expressed as mean ± SD. Statistical analysis was performed with statistical software SPSS 23. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). ANOVA Tukey test was used to compare the differences between the experimental site and the control site. P value $<0.05$ was considered significant.

Results: HE staining results demonstrates the histological images of the control and the experimental sites at different time points. The empty lacunae were evident in the experimental site at day 3, 7 and 14 after the osteotomy, whereas they were rarely observed in the intact control site.

The images of the immunohistochemical staining with an antibody against mouse sclerostin are demonstrated that at all the time points, in the experimental sites the bone close to the defect showed less sclerostin staining whereas the control sites showed strong sclerostin staining. Sclerostin positive area in the experimental sites markedly decreased at day 3 and day 7.

Discussion: To achieve successful osseointegration of a dental implant, optimal osteotomy site preparation is absolutely required. Notably, high-powered surgical instruments can affect the bone tissue including osteocytes. The osteocyte is the master signal sensor, integrator, and transducer of the skeleton. In mature bone, the osteocyte body and its processes are contained within spaces called lacunae and

channels called canaliculi, respectively.

At the beginning of the 1960s Frost described the empty lacunae are the most simple and reliable determinations of death of osteocyte. In the present study, in the bone near the osteotomy defect the number of empty lacunae increased at day 3,7 and 14 after the osteotomy. It is likely that the lack of a blood supply affects the surrounding osteocytes near the osteotomy site. Many factors can promote death of osteocytes: Catastrophic environments, such as nutrient and oxygen deficiencies and inflammation; physical factors of loading and subsequent micro-fractures and programmed cell death. Based on the present results we speculate that the death signals are released at early time point, probably within 1 day, after the osteotomy and that the autophagy of osteocytes takes time. Subsequently, we observed the empty lacunae near the osteotomy site at day 3. Accelerating bone formation is a goal for osseointegration. Recently, it has been shown that the Wnt signaling pathway plays important roles in regulating the normal physiological processes of bone turnover. Genetic studies of LRP5 in humans and animals strongly suggest that Wnt signaling regulates postnatal bone formation . Further genetic studies with β-catenin and other Wnt ligands in various mouse models provided additional evidences of the critical functions of Wnt signaling in skeletal development and bone homeostasis. Sclerostin, which is encoded by the Sost gene, an antagonist of Wnt signaling, is dominantly secreted by osteocytes. This protein inhibits bone formation, both in vitro and in vivo, by directly reducing proliferation and differentiation of osteoblasts via inhibition of the Wnt signaling pathway. Sclerostin binds to LRP5/6 and inactivates the Wnt signaling pathway. Sclerostin was first identified as the disease-causing protein in sclerosteosis and Van Buchem disease, two rare bone diseases.

The administration of an anti-sclerostin-neutralizing antibody increases bone mass with increased bone formation. In the present study, at all the time points after the osteotomy, sclerostin staining was weak in the bone near the osteotomy site. Thus, it is likely that sclerostin decrease after the osteotomy stimulates osteoblasts and/or osteoblast progenitors, enhancing the subsequent bone formation.

Conclusions: Osteotomy with drilling induced death of osteocytes and reduced sclerostin expression around the bone defect. This phenomenon could promote the subsequent bone formation.

（和文による要約）

<緒言>

オッセオインテグレーションの成功は、最適なインプラント埋入窩形成の準備から始まる。しかし、ドリルを用いて骨にインプラントの埋入窩を形成する際、骨細胞へどのような影響を与えるかは明らかではない。本研究の目的は、マウス脛骨を用いて、ドリリングで小窩を形成後、骨細胞および sclerostin 発現を評価することである。

<研究方法>

32 匹の 11 週齢、雄の C57BL/6 マウス脛骨にドリル（フィッシャーバー）を用いて 800rpm のドリル速度で約 1 mm の小窩を形成したものを実験群、形成していないものを対照群とし、術後

１、３、７、１４日にマウスを安楽死させ、小窩周囲の骨組織を HE 染色により組織学的に観察した。骨細胞の消失の有無と、骨細胞が産生する sclerostin の分布を免疫染色法的に検討した。本研究は本学動物実験倫理審査委員会の承認を得て実施した（No.0170383A）。統計学的検討は ANOVA の Turkey 法（P ＜0.05）にて行なった。

<結果>

骨細胞を含まない骨小腔数は、術後 1 日では有意差が認められなかったが、術後 3、7 および 14 日目において実験群は対照群と比較し多かった（統計学的有意差あり）。マウスの sclerostin に対する免疫染色法の組織切片の全ての観察期間において対照群では強い sclerostin 染色を示したが、実験群では、欠損周囲骨の sclerostin 染色が少なかった。 観察期間中、実験群の観察部位の sclerostin 陽性領域は、減少傾向にあった。

<考察>

オッセオインテグレーションには骨形成の促進が必要である。最近、Wnt シグナル伝達経路は、骨代謝の正常な生理学的過程を調節する上で重要な役割を果たすことが示されている。Wnt シグナル伝達のアンタゴニストである sclerostin は、骨細胞によって分泌される。 抗 sclerostin 抗体の投与は、骨形成の増加とともに骨量を増加させる。本研究では、ドリリング後のすべての観察期間において、sclerostin 染色の陽性領域は、欠損部位周囲骨近くの骨では弱かった。上記の結果より、ドリリング後の sclerostin の減少は、骨芽細胞を刺激し、骨形成を増強する可能性があることが示唆された。

<結論>

ドリリングにより、小窩を形成した後、欠損骨周囲骨の骨細胞の減少が観察され、観察領域の周囲骨で sclerostin の減少が免疫染色法で観察された。 この現象はその後の骨形成を促進する現症を示している可能性があると考えている。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5557　号 | MULATI　Aierken |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　樺沢 勇司<br>副　査　中島 友紀、池田 正明 | |
| 論 文 題 目 | Effects of osteotomy with drilling on osteocyte | |

（論文審査の要旨）

本研究は、ドリルを用いてマウス脛骨にインプラントの埋入窩を形成してインプラントを埋入し、オッセオインテグレーションが成功するための要因を検討することを目的として、骨にドリルを用いて小窩を形成し、その周囲の骨細胞の消失および、成熟した骨細胞の指標の一つである、sclerostin の発現を小窩を形成しなかった部位と比較検討したものである。

骨細胞は，骨を構成する細胞の約 90% を占め，骨に埋め込まれた状態にて存在する細胞で、神経細胞様の突起 により網目状のネットワークを形成することによって、骨内の骨細胞同士や、骨表面にいる破骨細胞、骨芽細胞とも密接に連結している。この特殊な環境状態からメカニカルストレスの感受や細胞間シグナルへの応答に関わり、骨のリモデリングを制御する“指令細胞”である可能性が想定されている。その成熟には、アルカリホスファターゼ、第 X 染色体上の Pi 調節エンドペプチダーゼ（PHEX）、マトリックス細胞外ホスホグリコプロテイン（MEPE）、スクレロスチン(sclerostin)、および線維芽細胞増殖因子-23（FGF-23）の等のいくつかの重要なタンパク質の関与し、最も成熟した段階で、骨細胞は sclerostin および FGF-23 を産生することが知られている。Sclerostin は、骨芽細胞細胞膜上の LRP（低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質）5/6 受容体に結合することにより、骨芽細胞における Wnt シグナル伝達経路を阻害し、Sclerostin の抑制は、骨形成および骨量の増加と関連していることが知られている。

本研究で得られた結果は以下の 2 点である。

１）骨細胞を含まない骨小腔数は、術後 1 日では有意差が認められなかったが、術後 3、7 および 14 日目において実験群は対照群と比較し有意に増加したこと。

２）マウスの sclerostin に対する免疫染色により全ての観察期間において対照群では強い sclerostin 染色を示したが、実験群では、欠損周囲骨の sclerostin 染色領域が減少したこと。

以上の結果をもとに、Wnt シグナル伝達のアンタゴニストである sclerostin 染色の陽性領域がドリリング後に減少していることは、骨芽細胞を刺激し、骨形成を増強している過程を示している可能性があることを考察している。

本研究の結果は、ラット脛骨におけるドリリングモデルを用いて、欠損周囲骨周囲の骨細胞についての検討や，sclerostin の発現に着目した点で貴重な論文であると言える。本研究から得られた知見は、今後の歯科医学の発展に寄与するものと考えられる。また、骨欠損部周囲の組織に対してより詳細な検討が必要である事、骨細胞数の減少や、sclerostin 発現の減少について、

より詳細な追加研究が必要である点も言及されている。よって本論文は博士（歯学）の学位申請を行なうにあたって十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 星　礼子 |
| 論文審査担当者 | 主査　倉林　亨<br>副査　樺沢　勇司、坂本　啓 |
| 論　文　題　目 | Preoperative imaging findings as predictors of postoperative inferior alveolar nerve injury following mandibular cyst surgery |

（論文内容の要旨）

<要旨>

下顎嚢胞摘出術および下顎第三大臼歯抜歯術では、術後下唇やオトガイ部の感覚異常が重大な合併症の 1 つである。184 例 193 側を対象に、パノラマ X 線写真(PR)白線中断と CT 画像(CT)の下顎管周囲皮質骨欠損の有無を予測変数、手術部位における下歯槽神経血管束(IAN ： Inferior alveolar nerve)露出と術後知覚鈍麻を結果変数として解析した。予測変数は統計学的に結果変数と関連していた。陽性的中率(PPV：Positive predictive values)は CT が PR よりわずかに高かった。白線と皮質骨の有無を組み合わせてタイプ分類すると、白線と皮質骨の両方を欠くタイプⅣでオッズ比が高かった。以上より、PR 白線中断の有無および CT 皮質骨欠損の有無より下顎嚢胞における IAN 露出と知覚鈍麻の予測が可能であることが示唆された。

<緒言>

顎骨内に生じる嚢胞性病変のうち下顎第三大臼歯歯冠周囲に生じる嚢胞は比較的頻度が高い。一般的な治療法としては下顎嚢胞摘出術および下顎第三大臼歯抜歯術であるが、嚢胞や下顎第三大臼歯が下歯槽神経に近接または接触しているため神経損傷と神経感覚傷害による下唇やオトガイ部の知覚鈍麻は重大な合併症の 1 つである。下顎第三大臼歯抜歯に伴う合併症に関する報告は多数あるが、下顎嚢胞摘出術および下顎第三大臼歯抜歯術に伴う合併症に関する報告はほとんどない。

本研究では、下顎嚢胞摘出術および下顎第三大臼歯抜歯術を施行した際の、術中 IAN 露出および術後知覚鈍麻の発生を評価し、白線中断の有無、皮質骨欠損の有無を統計学的に検討した。

<方法>

研究対象

2009 年 1 月から 2016 年 3 月までに東京医科歯科大学歯学部附属病院口腔外科で全身麻酔下に下顎嚢胞摘出術および下顎第三大臼歯抜歯術を施行した 184 例 193 側を対象とした。2012 年に局所麻酔下に抜歯術を施行した 2086 例と、2012 年から 2014 年に全身麻酔下に抜歯術を施行した 141 例の下唇またはオトガイ部知覚鈍麻の発生率を参考とした。本研究は東京医科歯科大学歯学部倫

理委員会の承認を得て実施した（No. D2017-038）。

画像処理

全てのデジタル PR は Super Veraviewpocs (株式会社モリタ)を光刺激剤蛍光プレート（ST Ⅲ、富士フィルムメディカル株式会社）で撮影した。CT 撮影は 64 スライス MDCT（Somatom sensation 64; Siemens AG、Erlangen）を用いて行った。CT ワークステーション(Syngo Acquisition Workplace：Simens AG)を使用して、厚さ 1mm および間隔 1mm の断面 CT 画像とした。

観察方法

PR と CT 所見は口腔外科医と口腔放射線科医で評価した。2 人の観察者の評価に意見の相違があった場合、別の観察者(口腔外科医)が画像を評価し、多数決によって診断した。

PR における下顎管の評価

PR で白線が連続的に認められた場合は「白線あり(+)」、病変または第三大臼歯により不連続であった場合は「白線なし(-)」と分類し、予測変数とした。

CT における下顎管の評価

CT で皮質骨が下顎管周囲に連続的に認められた場合は「皮質骨あり(+)」、病変または第三大臼歯により連続性が失われた場合は「皮質骨なし(-)」と分類し、予測変数とした。

結果変数

結果変数は術中 IAN 露出および術後下唇やオトガイ部の知覚鈍麻とした。手術部位に IAN が肉眼的に確認された場合を露出とし、感覚異常は手術翌日の患者申告によって評価した。

PR 白線と CT 皮質骨に基づくタイプ分類

PR 白線 (+)、 (-)、CT 皮質骨 (+)、 (-)で次の４つのタイプに分類した。タイプ I =白線(+)皮質骨(+)、タイプⅡ=白線(+)皮質骨(-)、タイプⅢ=白線(-)皮質骨(+)、タイプⅣ=白線(-)皮質骨(-)である。タイプと結果変数との関連を統計学的に検討した。

統計分析

クロス集計と $\chi^2$検定を用いて予測変数と結果変数の間の関係を統計学的に評価した。κ 係数を用いて、白線の有無と皮質骨の有無との一致率を検討した。ロジスティック回帰分析を用いて、独立変数（タイプ、性別および年齢）と結果変数との関係を評価した。多重共線性は VIF(variance inflation factor)を用いて評価した。結果は 95%信頼区間（CI）を用いてオッズ比として算出した。すべての分析は IBM SPSS 19.0 を使用した。

<結果>

本研究で対象とした 184 例は男性 115 人(62.5%)、女性 69 人(37.5%)、男女比 1.67 であり、平均

年齢は 45.9±12.0 歳、11-37 歳の範囲であった。摘出した病変の病理組織結果は含歯性嚢胞(165 例)が最も多かった。

PR と CT における下顎管の評価

白線中断は 135 側(70.0%)、皮質骨欠損は 118 側(61.1%)であった。皮質骨欠損 118 側のうち白線中断は 107 側(90.7%)だった。また、白線中断 135 側のうち皮質骨欠損は 107 側(79.3%)だった。白線中断と皮質骨欠損との間には有意な相関を認めた($P < 0.001$)。PR と CT の κ 係数は 0.567 で中程度一致を示した。

白線と術中 IAN 露出および知覚鈍麻の関係

手術部位に IAN が露出した 84 側のうち白線中断は 69 側 (感度 0.821)だった。露出なし 109 側のうち白線ありは 43 側(特異度 0.394)だった。白線中断は、統計学的に IAN 露出と関連していた($P = 0.001$)。

感覚異常が生じた 61 側のうち白線中断は 51 側 (感度 0.836)だった。感覚異常を認めなかった 132 側のうち白線ありは 48 側 (特異度 0.364) だった。PPV は 0.378 であり、陰性的中率(NPV:Negative predictive value)は 0.828 であった。

皮質骨と術中 IAN 露出および知覚鈍麻の関係

皮質骨ありは 75 側(38.9%)、皮質骨欠損は 118 側(61.1%)であった。IAN 露出を認めた 84 側のうち皮質骨欠損は 69 側(感度 0.821)だった。IAN 露出を認めなかった 109 側のうち皮質骨ありは 60 側(特異度 0.550)だった。PPV は 0.585、NPV は 0.800 であった。皮質骨欠損と IAN 露出には統計学的に相関を認めた($P = 0.001$)。

感覚異常が生じた 61 側のうち皮質骨欠損は 48 側(感度 0.787)、知覚鈍麻が生じなかった 132 側のうち皮質骨あり 62 側(特異度 0.470)だった。PPV0.407、NPV は 0.827 であった。皮質骨欠損もまた、知覚鈍麻に統計学的な相関を認めた($P = 0.001$)

術中 IAN 露出と知覚鈍麻の関係

当初の予測変数には無いが、IAN 露出と知覚鈍麻の関係を解析した。術中 IAN 露出を認めたのは 84 側(43.5%)、知覚鈍麻が生じたのは 61 側(31.6%)だった。知覚鈍麻が生じた 61 側のうち IAN 露出は 40 側 (感度 0.656)だった。知覚鈍麻を認めなかった 132 側のうち IAN 露出なしは 88 側 (感度 0.667)だった。PPV は 0.476、NPV は 0.807 であった。IAN 露出と知覚鈍麻との間に有意な相関を認めた($P<0.001$)。

予測因子の組合せと IAN 露出、知覚鈍麻の関係

タイプⅠ47 側(24.4%)、タイプⅡ11 側(5.7%)、タイプⅢ28 側(14.5%)、タイプⅣ107 側(55.4%)だった。IAN 露出と知覚鈍麻はタイプⅣで最も多かった。IAN 露出を認めた 84 側のうちタイプⅣは 64 側(76.2%)だった。タイプⅣのうち IAN 露出を認めたのは 59.8%、知覚鈍麻を認めたのは 43%だった。年齢、性別およびタイプを独立変数として結果変数（IAN 露出と知覚鈍麻）との関係を

ロジスティック回帰分析で評価した。独立変数に多重共線性は認めなかったが、年齢と性別は変数増加法（尤度比）での解析で除外された。解析より得られたオッズ比を考慮すると、タイプⅣは IAN 露出および知覚鈍麻の両方に関してもっとも信頼できる予測因子であった。

<考察>

本研究では、術後知覚鈍麻は 31.6%で認めた。当科での第三大臼歯抜歯術後の知覚鈍麻の割合は、局所麻酔下で 0.8%、全身麻酔下で 11.3%であった。比較すると下顎嚢胞摘出術および第三大臼歯抜歯術の感覚異常の割合が高い。これは嚢胞が第三大臼歯の歯冠周囲で発生して大きくなり、下顎管を圧迫するように大きくなることが主な理由であるが、本手術における第三大臼歯抜歯術の影響は検討できなかったが、嚢胞摘出の影響が大きいと考えられた。

PR と CT の一致率は中等度であったが、白線中断と皮質骨欠損は統計学的な相関を示した。CT は情報量が多く、下顎管の観察が容易であるが、 これまでの報告で下顎第三大臼歯抜歯術では、白線中断と皮質骨欠損は関連が無いとされていた。本研究で関連が示されたのは下顎第三大臼歯歯根の形態が複雑なのに対して、下顎嚢胞が境界明瞭な放射線透過像を示し、下顎管の観察が容易であったためと考えられた。

白線中断と皮質骨欠損は IAN 露出と知覚鈍麻の発生に有意に関連する事が示された。本研究の目的は術前画像から IAN 露出と知覚鈍麻を予測する事であり、PPV が重要なパラメーターのひとつである。しかし、PPV および NPV は有病率に左右されること、また、比較する既報の参考データが無いため、評価はできなかった。

パノラマ X 線写真と CT 画像の陽性的中率に関して、CT の方がわずかに高かったが、歯科診療におけるパノラマ X 線画像の重要性を再確認する事ができた。

予測因子ではないが、手術部位における IAN 露出と感覚異常の相関を検討すると、PPV は 0.476(感度 0.656、特異度 0.667)とそれほど高くはなかった。これは IAN 露出を認めた場合は、神経損傷と知覚鈍麻の予防のために酸化セルロースによる露出部の保護を行ったためと考えられた。

CT の PPV は IAN 露出で 0.585、感覚異常で 0.407 であり、PR の PPV よりも高く、予測には CT が優れていると考えられた。しかし PR は下顎嚢胞摘出術において需要な役割を果たしており、CT と合わせて診断すべきである。タイプⅣで IAN 露出および感覚異常の頻度が高く、最も信頼できる予測因子であることが示唆された。

<結論>

術前 PR における白線の消失および CT における皮質骨の欠損は、術中 IAN 露出と術後知覚鈍麻の予測因子となりうる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5558　号 | 星　礼子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　倉林　亨<br>副　査　樺沢　勇司、坂本　啓 | |
| 論 文 題 目 | Preoperative imaging findings as predictors of postoperative inferior alveolar nerve injury following mandibular cyst surgery | |

（論文審査の要旨）

下顎第三大臼歯歯冠を含む下顎嚢胞は、口腔外科領域では比較的多く見られる疾患であるが、術後の下唇やオトガイ部の知覚鈍麻が重大な合併症の 1 つである。しかし、術中の下歯槽神経 (IAN : Inferior alveolar nerve)露出や術後神経障害による知覚鈍麻発現を術前の画像所見から予測することは難しいと考えられている。星はこの点に着目し、下顎嚢胞症例の術前画像の下顎管壁に関する所見と、術中および術後における臨床所見との対比を行った。

すなわち本研究において星は、2009 年 1 月から 2016 年 3 月までの間に本学歯学部附属病院口腔外科外来において全身麻酔下に下顎嚢胞摘出術および下顎第三大臼歯抜歯術を施行した 184 例 193 側を対象として､パノラマ X 線写真 (PR)における下顎管上壁を表す白線の消失の有無、CT 画像における下顎管骨壁の欠損の有無と、術中の IAN 露出や術後知覚鈍麻発現との関係について評価を行った。更にロジスティック回帰分析により、IAN 露出や術後の神経障害を予測するための独立した有意な因子を明らかにすることを試みた。なお本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施された(D2017-038)。

対象とした 184 症例の内訳は、男性 115 名、女性 69 名、平均年齢と SD は 45.9±12.0 歳であった。手術後に得られた病変の病理組織学的診断結果は含歯性嚢胞(165 例)が最も多かった。２つの画像所見、すなわち PR における白線の消失と CT における下顎管骨壁の欠損の間には、統計学的に有意な相関が認められた。またこれらの画像所見は、いずれも IAN 露出および知覚鈍麻の発現と統計学的に有意に関連していた。PR 所見と CT 所見の IAN 露出に関する陽性的中率は、それぞれ 0.511 と 0.585、知覚鈍麻に関しては、それぞれ 0.378 と 0.407 であった。更に患者の年齢、性別および画像所見を予測因子としてロジスティック回帰分析を行った結果、画像所見のみが IAN 露出や知覚鈍麻の発現を予測する独立した有意な因子であり、PR における白線消失と CT での下顎管骨壁欠損の両方が認められる場合に最も高い正診率を示すことが明らかとなった。

以上のように本論文は、下顎嚢胞症例の画像所見を詳細に評価し、術中の IAN 露出や術後の神経障害の発現との関係を明らかにした初めての論文であり、口腔外科学のみならず、歯科医学全般の発展に寄与するところがきわめて大きいと考えられた。よって本論文は、博士（歯学）の学位申請を行うに当たり、十分に価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| 論文提出者氏名 | 葉山　博工 |
|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　水口　俊介　吉田　恵一 |
| 論　文　題　目 | Trueness and precision of digital impressions obtained using an intraoral scanner with different head size in the partially edentulous mandible |

＜緒言＞

コンピュータ支援設計・製作(Computer Aided Design/Computer Aided Manufacturing: CAD/CAM)は，アプローチの簡易化，製造プロセスの迅速化，など既存の製作手法と比べ様々な利点を有している．CAD/CAM の工程の１つである口腔内スキャナを用いたデジタル印象は，将来的に従来の印象採得に置き換わるポテンシャルがある． ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 1: General principles and definitions では，精確度を真度および精度の面から評価を行う．ここで，真度とは基準となる物体と対象物間の系統的な誤差，精度とは工程を繰り返し行った際に偶然に生じる誤差（再現性）と定義されている．これまでの研究から，歯と歯列を対象とした場合には，口腔内スキャナを用いたデジタル印象は従来印象法と同等の精確度を有することが示されている．一方で，パーシャルデンチャーの製作に際しては，残存歯および欠損部顎堤を含む軟組織の印象を採得する．従って，パーシャルデンチャーの製作を想定した場合には，軟組織を含むデジタル印象の精確度を評価する必要があるが，これまで残存歯と粘膜部を含めた精確度に関する報告は認められない．そこで，本研究では，パーシャルデンチャーの製作を想定し，口腔内スキャナを用いたデジタル印象の臨床適用の可能性を精確度の点から明らかにすることを目的として，下顎部分歯列欠損模型を用いて口腔内スキャナを用いたデジタル印象と従来印象方の真度と精度を比較検討した．

＜方法＞

本研究では欠損部顎堤にシリコーン擬似粘膜が付与された下顎 Kennedy Ⅰ級およびⅢ級の模型を基準模型として用いた．歯科用 CAD/CAM システムの口腔外スキャナを使用して基準模型をデジタルデータ化した．各欠損型の基準模型を５回スキャンニングし，Standard Triangulated Language （STL）データ（基準データ）を得た．従来印象のデジタルデータ化では，先ず，通法に従い，研究用模型上で製作した個人トレーを用いて手指による選択的加圧印象し作業用模型を得た．この作業を各基準模型で５回行い，口腔外スキャナを用いて作業用模型の STL データ（従来印象データ）を得た．口腔内印象のデジタルデータ化では，光学式の口腔内スキャナを用いて基準模型の支台歯と粘膜の形状を直接デジタル化した．口腔内スキャナにはサイズの異なる２種類のヘッド，ヘッド大（撮像範囲 16×12 mm)とヘッド小(撮像範囲 12×9 mm)を用いて，操作に熟達した術者１名がスキャニングを行った．各欠損型の基準模型を 5 回スキャンニングして STL データ（デジタル印象データ）を得た．また，スキャニングに要した撮影枚数を記録した．

データ解析では，３Dモデリングツールを用いて，ベストフィットアルゴリズムにより２つのSTLデータの重ね合わせと偏差解析を行った．２つのデジタルデータ間の測定点で差分の二乗平均平方根（root mean square: RMS）を算出した．偏差解析は，模型全体および粘膜部に限定して行った．ISOでの定義に従い，基準データに対する従来印象データまたはデジタル印象データの RMS 値を算出し真度とした（n=5）．基準データ，従来印象データ，デジタル印象データのそれぞれにおいて，任意の２つのデータのRMS値を算出し精度とした(n=10)．統計解析は，RMS値目的変数として，各欠損型の模型全体と粘膜部それぞれで，Kruskal-Wallis検定およびMann- Whitney U testを用いた多重比較を行った．多重比較ではBonferroni法によるP値の調整を行った．口腔内スキャナのヘッド大と小のスキャニング枚数の比較には，スチューデントのt検定を用いた．有意水準は５％とした．統計解析には，IBM SPSS (22.0)を用いた．

＜結果＞

真度について偏差分布のカラーマップでは，従来印象では，顎堤頂に負の偏差（顎堤粘膜の沈み込み），歯頚部付近の歯肉部には強い正の偏差（歯頚部歯肉の膨張）が認められた．デジタル印象では，口腔内スキャナのヘッド大と小に共通して，模型の左側に負の偏差，右側に正の偏差が分布する傾向が認められた．RMS 値の中央値について，スキャナヘッド大を用いたデジタル印象データではいずれの欠損型においても，従来印象データよりも有意に小さかった（P<0.05）．スキャナヘッド小では，Kennedy Ⅲ級の粘膜部のみ従来印象データよりも有意に小さかった（P<0.05）．スキャナヘッド間の比較では，ヘッド小よりも大が有意に小さかった（P<0.05）．

精度について，偏差分布のカラーマップでは，基準データ間には偏差はほとんど認められなかった．従来印象データ間では歯冠部付近の歯肉と粘膜部に正の偏差（歯頚部歯肉の膨張）の集中が認められた．デジタル印象データ間では頬側に正の偏差，舌側に負の偏差が分布する傾向が認められた．以上の傾向は口腔内スキャナのヘッド大小に共通して認められた．RMS値の中央値について，いずれの欠損型においても，基準模型データは従来印象データとデジタル印象データよりも有意に小さかった（P<0.05）．スキャナヘッド大を用いたデジタル印象データは，Kennedy Ⅰ級の模型全体を除き，従来印象データよりも有意に大きかった（P<0.05）．スキャナヘッド小を用いたデジタル印象データは，いずれの欠損型においても，従来印象データよりも有意に大きかった（P<0.05）．スキャナヘッド間の比較では，Kennedy Ⅲ級の粘膜部を除いて，ヘッド大が小よりも有意に小さかった（P<0.05）．

口腔内スキャナのスキャニングの平均枚数について，いずれの欠損型においても，口腔内スキャナヘッド大はヘッド小よりも有意に少なかった(P<0.05).

＜考察＞

従来印象の真度のカラーマップでは，基準模型に対して，石膏模型の粘膜部が沈下していることを示した．これは，従来印象において個人トレーを用いて加圧印象した結果，疑似粘膜のシリコーンが被圧変位したことによるものと考えられる．デジタル印象データの真度のカラーマップでは，欠損型およびスキャナのヘッドの種類に共通して，右側に正の偏差が偏って分布していた．これは，本研究では歯列の左側中切歯からスキャニングを開始し，正中に戻り，右側中切歯で完了したことが関連すると考えられる．デジタル印象では，スキャニングした複数の画像の連続性を認識して重ね合わせを行う．本研究では，スキャングの進行に伴い重ね合わせによる誤差が蓄積された結果，右側で偏差が大きくなったと考えられる．

従来印象の精度のカラーマップでは，顎堤頂から頬棚近辺にかけての偏差はほとんど認められなかった．これは加圧印象時のリコーン擬似粘膜の被圧偏位量が試行間でほぼ一定であったことを示している．一方で，残存歯の舌側歯肉部や歯間歯肉部に偏差が分布した．印象を撤去した時の印象材の変位のバラツキが大きいことを示している．

補綴治療においては口腔組織の形状を正確に再現する必要がある．補綴装置の種類によって臨床的に許容される印象の正確さは異なる．単独冠のマージンギャップの許容量は 120μm とされており，支台歯の精確度の許容量の根拠とされている．一方，部分欠損歯列では，顎堤粘膜が粘弾性を有し義歯床の沈下により被圧偏位するため，パーシャルデンチャー製作における粘膜部の正確さの許容範囲は単独冠よりも大きいと考えられる．これまでの研究で，遊離端義歯は装着後に短期的に沈下し，義歯床の遠心端で最大 300μm 程度と報告されている．本研究では口腔内スキャナを用いたデジタル印象における粘膜部の真度の RMS 値（中央値）は 54-180μm，精度は 109-215μm であり，義歯床の短期的に沈下による粘膜の偏位量より小さい．義歯床沈下による粘膜の被圧変位量を印象の正確度の許容範囲の 1 つの指標とすると，本研究で用いた口腔内スキャナの精度は臨床的に許容できる範囲内にあると考えられる．

本研究では，口腔内スキャナには 1 つのシステムのみを用いて精確度を評価している．従って本研究のみで口腔内スキャナの精確度を一般化することはできない．実際の臨床では，唾液や粘膜の可動が口腔内スキャナの精確度を低下させる要因となる．本研究では CAD/CAM ワークフローの中で口腔内スキャナを用いたデジタル印象の精確度を評価したが，今後は製作されたパーシャルデンチャーの適合精度を検証する必要がある．

＜結論＞

本研究において，口腔内スキャナを用いたデジタル印象は従来印象に比べて高い真度を示す一方で，精度は小さかった．パーシャルデンチャー製作を用途として部分歯列欠損を対象としたデジタル印象の精確度は従来印象より高いとは言えないが，スキャニングヘッドを大型にすることで向上できる可能性が示唆された．

# 論文審査の要旨および担当者

| 報 告 番 号 | 甲 第　5559　号 | 葉山　博工 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主 査　　高橋　英和<br>副 査　　水口　俊介　吉田　恵一 | |
| 論 文 題 目 | Trueness and precision of digital impressions obtained using an intraoral scanner with different head size in the partially edentulous mandible | |

コンピュータ支援設計・製作(CAD/CAM)は，アプローチの簡易化，製造プロセスの迅速化など既存の製作手法と比べ様々な利点を有している．近年では，口腔インプラント，全部床義歯および顎義歯の製作においてもデジタル印象の適用が拡大しており，今後，従来の印象採得に置き換わる可能性があると考えられる．

精密な補綴装置を製作するためには，精確な印象採得が必須である．ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 1: General principles and definitions は，精確度を真度および精度の面から評価することを定めている．部分歯列欠損への補綴治療でパーシャルデンチャーを製作する場合，残存歯だけでなく欠損部顎堤粘膜などの軟組織も含めて印象採得を行うため，固定性補綴装置の製作を想定した支台歯のみを対象とした精確度の評価では不十分である．そこで本研究では，パーシャルデンチャーの製作を想定し，精確度の点から，口腔内スキャナを用いたデジタル印象の臨床適用の可能性を明らかにすることを目的として，下顎部分歯列欠損模型を用いて口腔内スキャナを用いたデジタル印象の真度と精度を評価している．現状では，部分歯列欠損を対象としたデジタル印象の精確度を評価した報告がないこと，さらに今後のデジタルデンティストリーの拡大を想定すると，デジタル印象に関する基礎的研究は必要であり，本研究は臨床的に大きな意義を有するものと考えられる．

実験では，欠損部顎堤にシリコーン擬似粘膜が付与された下顎 Kennedy Ⅰ級とⅢ級の基準模型を用いて，口腔外スキャナを使用して Standard Triangulated Language （STL）データ（基準データ）を得た．従来印象は，通法に従い選択的加圧印象を行って作業用模型を製作し口腔外スキャナを用いて STL データ（従来印象データ）を得た．デジタル印象では，大きさのことなる２種類のヘッドを有する口腔内スキャナを用いて基準模型をデジタル印象し， STL データ（デジタル印象データ）を得た．その際にスキャニングに要した撮影枚数を記録した．偏差解析では，３Ｄモデリングツールを用いて，ベストフィットアルゴリズムにより STL データの重ね合わせを行い，各測定点の偏差量の二乗平均平方根（root mean square: RMS）を算出した．模型全体および粘膜部に限定した偏差解析を行い，各欠損型の模型全体と粘膜部のそれぞれで統計解析が行われ，申請者が専門的な高い知識と技術を有すると認められた．

本研究で得られた主な結果は以下の通りである．

1. 真度について，スキャナヘッド大を用いたデジタル印象は，従来印象よりも統計的に有意に高かった（小さい RMS 中央値を示した）．またスキャナヘッド大は小よりも統計的に有意に高い真度（小さい RMS 中央値）を示した．
2. 精度について，スキャナヘッドの大小にかかわらず，デジタル印象は従来印象よりも低い傾向（大きい RMS 中央値）を認めた．またスキャナヘッド大は小よりも統計的に高い精度（小さい RMS 中央値）を示す傾向を認めた．
3. デジタル印象でスキャニングに要した平均撮像枚数は，ヘッド大が小よりも統計的に有意に少なかった．

上記の結果と過去の報告から，従来印象において加圧部位である顎堤に認められた負の偏差は加圧による粘膜の変形が原因と考えられた．残存歯付近の歯頸部で認められた強い正の偏差については，印象材の撤去時に歯間部に強い引張応力がかかり，変形や印象体の破損，石膏硬化の際の変形を招いた可能性が考えられた．口腔内スキャナを用いるデジタル印象はペン型で，手で把持するためスキャニング中に固定が不十分になりやすく，手の揺れによる誤差を生じ，結果として偏差が集中した可能性が考えられた．真度と精度共にデジタル印象ヘッド大はヘッド小よりも優れていたことについて，これまでの報告から STL データ化する際に重ね合わせる画像が多くなると精確度に影響することなどから，本研究においても撮像枚数が多いヘッド小はそれらの影響を受けた可能性が考えられた．撮像範囲を大きくすることで，撮影枚数を少なくでき，精確度を向上できる可能性が示唆され，口腔内スキャナの構造を考えるために興味深い結果である．

今後，歯科領域におけるデジタル技術の応用は拡大されると考えられる．そのため，本研究から得られた知見は様々なスキャナによる検証，多様な欠損型での検証，術者間信頼性の検証など今後の研究を進める上で基準の一つとなる．また口腔内での応用を検討する際の一助にもなることから今後の歯科臨床への貢献も期待される．以上の成果は今後の歯科医学の発展や歯科補綴臨床に寄与するところが大きく，よって本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた．

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 池田　安紀津 |
| 論文審査担当者 | 主　査　　小野　卓史<br>副　査　　倉林　亨　　上野　俊明 |
| 論　文　題　目 | Chewing stimulation reduces attentional bias toward visual food stimuli in healthy-weight individuals |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

近年、咀嚼機能の低下と肥満との間に関連があることが報告されており、咀嚼の重要性への関心が高まりつつある。摂食行動は、恒常系と報酬系の 2 つの相補的な制御機構によって調節されており、過食対策として報酬系へのアプローチが重要とみなされている。食物視覚刺激は脳内報酬回路を変容し、食物に対する指向性を増大させると考えられており、食物刺激への指向性を低減する方法を開発することは、衝動的な摂食行動を防ぐことにつながる可能性がある。そこで、本研究では、咀嚼刺激による食物視覚刺激に対する指向性への影響を検証することを目的とし、visual probe task (VPT)および eye-tracking (ET)を用い、反応時間(RT)、注視方向および注視時間の評価を行った。被験者は body mass index が 25 未満の健常成人を対象とし、VPT 施行群（21 名、平均年齢 25.9 歳；実験 1）、ET 施行群（20 名、平均年齢 25.8 歳；実験 2）の 2 群を設定した。両群ともにガム咀嚼条件と摂食条件を別日に実施し、両条件において、VPT または ET をガム咀嚼前後、または摂食前後に施行した。また、Visual analogue scales を用いた主観的食欲度の評価を行い、空腹度、満腹度、食物占有度および欲求度の 4 項目を評価した。VPT 実験からは RT バイアスが、ET 実験からは注視方向および注視時間バイアスが算出され、咀嚼前後および摂食前後で比較検討した。さらに、両実験ともに、各々同数の被験者を対象とした対照実験を実施した。この際、介入条件を安静状態とした点を除き、全て同様の実験手順にて遂行された。結果として、主観的食欲度に関しては、ガム咀嚼により、空腹度（実験 1, 2）、食物占有度（実験 1, 2）、ならびに欲求度（実験 1,2）の有意な低下または低下傾向と満腹度の有意な増大（実験 1）が認められた。摂食後には全ての食欲度に有意な変化が認められた（実験 1, 2）。VPT の結果は、ガム咀嚼後、摂食後ともに RT バイアスの有意な低下を認めた。ET では、注視時間バイアスに有意な変化は認められなかったものの、初期注意を反映する注視方向バイアスは咀嚼後、摂食後ともに有意な低下が認められた。対照実験ではい

ずれの項目においても、安静状態前後の実験結果に有意差は認められなかった。
以上より、咀嚼刺激が渇望を反映する主観的食欲度を低下することが示され、さらに、摂食後と同様に、咀嚼刺激そのものが、食物に対する指向性、特に初期注意を減じることが示された。これらの知見より、食事摂取なしでも、咀嚼刺激は報酬回路に影響し、衝動的な摂食行動の防止に寄与する可能性が示唆された。

＜緒言＞

肥満の罹患率は世界的に増加の一途をたどり、多くの疾患および早期死亡の主要な危険因子であるとされている。近年、咀嚼機能の低下と肥満との間に関連があることが報告されており、咀嚼の重要性に対する関心が高まりつつある。

摂食行動は、恒常系と報酬系の 2 つの相補的な制御機構によって調節されている。恒常系は、エネルギーバランスの制御に関与しているのに対し、報酬系は、中脳辺縁系における報酬回路内で制御され、報酬や認知、感情などの環境要因により影響をうけるとされている。近年、報酬系による制御は恒常系を凌駕すると考えられ、過食対策として報酬系へのアプローチが重要であると提唱されている。

過食や肥満は、視覚情報により引き起こされる食欲が強く関与していることが示唆されている。食物の視覚情報は報酬関連刺激となり得るとともに、これは脳内報酬回路を変容し、報酬関連刺激の hypersensitization を引き起こすとされる。報酬回路における伝達物質であるドーパミンは“欲求”の感情を引き起こし、“欲求”は“渇望”となり、結果として摂食行動を生じさせる。これら一連のサイクルにより、報酬が予測される刺激に対しさらに注意を喚起させ、報酬刺激の顕現性（salience）を増大させる。指向性は、報酬関連刺激への興味が、認知過程における優先順位を高めた時に生じる状態であり、報酬回路におけるドーパミン活性を反映すると考えられている。近年、食物刺激への指向性を減じる訓練により、body mass index（BMI）が低下したと報告された。それゆえ、食物刺激への指向性を低減する方法を開発することは、衝動的な摂食行動を防ぐことにつながる可能性が考えられる。

一方、咀嚼は、摂食量や代謝に影響を与える要因の一つであるとされており、過去の研究では、嚥下前の咀嚼回数の増加により主観的食欲度の低下や糖代謝の変化が生じたこと、またガム咀嚼により満腹関連ホルモンの動態変化が生じたことも報告されている。このように咀嚼が恒常系の摂食制御機構に影響をもたらすことが報告されているが、指向性が反映される報酬系に与える影響については、いまだ明らかとなっていない。

したがって、本研究では、visual probe task (VPT)および eye-tracking (ET)を用い、咀嚼刺激による食物視覚刺激に対する指向性への影響を検証することを目的とした。

＜被験者および方法＞

被験者は BMI が 25 未満の健常成人を対象とし、VPT 施行群［21 名（男性 11 名、女性 10 名）、平均年齢 25.9 歳；実験 1］、ET 施行群［20 名（男性 13 名、女性 7 名）、平均年齢 25.8 歳；実験 2］の 2 群を設定した。また、両群ともに、無味無臭のガムを 5 分間咀嚼するガム咀嚼条件と、簡易栄養食品を満足感が得られるまで摂取する摂食条件を別日に実施した。両条件において、VPT または ET をガム咀嚼前後、または摂食前後に施行した。さらに、Visual analogue scales (VAS)を用いた主観的食欲度の評価を行った。両群ともに、実験前 10 時間以上は絶食とした。

VAS は、各条件で VPT/ET 前、ガム咀嚼/摂食前、ガム咀嚼/摂食後、ならびに VPT/ET 後の 4 時点で評価を行った。また、10cm の VAS を用い、空腹度、満腹度、食物占有度および欲求度の 4 項目を評価した。計測値は、被験者間のばらつきを相殺するため Z 値にて標準化した。

VPT は、100 施行から成り立ち、60 施行は target trial (food・nonfood 画像を提示)、40 施行は filler trial (nonfood・nonfood 画像を提示)とした。各施行はまず固視点が提示され(1000 ms)、その後一対の food および nonfood 画像が左右に提示された(500 ms)。画像が消失した後、丸記号が、左側または右側に提示され、被験者は、丸記号が出現した側の反応入力用ボタンを直ちに押す様指示をうけ、反応時間(RT)計測を行った。Target trial における平均 RT より、RT バイアス(nonfood 画像における平均 RT から food 画像における平均 RT を差し引いた値)が算出された。食物視覚刺激に対する指向性の増大は、RT バイアスを増加させることが報告されている。

ET を用いた実験では、画像の提示時間を 2000ms とし、被験者の視線計測が行われた。注視方向または注視時間をアイトラッカーにて計測し、Target trial における注視方向バイアス（全施行中最初に food 画像に注意が向いた施行数の割合）および注視時間バイアス（全施行中、food 画像を注視している平均時間の割合）が算出された。指向性の種類は初期注意と注意維持があり、それぞれ注視方向バイアスと注視時間バイアスが反映している。

さらに、両実験ともに、各々同数の被験者を対象とした対照実験を実施した。この際、介入条件を安静状態とした点を除き、全て同様の実験手順にて遂行された。

統計は、2 元配置分散分析および事後検定(Ryan 法)を用いて検定し、有意水準は 5%とした。

＜結果＞

VAS を用いた主観的食欲度に関しては、ガム咀嚼により、空腹度（実験 1, 2）、食物占有度（実験 1, 2）、欲求度（実験 1,2）の有意な低下または低下傾向と満腹度の有意な増大（実験 1）が認められた。摂食後には全ての食欲度に有意な変化が認められた（実験 1, 2）。VPT の結果は、ガム咀嚼後、摂食後ともに RT バイアスの有意な低下を認めた。ET では、注視時間バイアスに有意な変化は認められなかったものの、注視方向バイアスには咀嚼後、摂食後ともに有意

な低下が認められた。対照実験ではいずれの項目においても、安静状態前後の実験結果に有意差は認められなかった。

＜考察＞

主観的食欲度の変化に関しては、ガム咀嚼後は、摂食後と同様の傾向を示したことから、咀嚼刺激による食欲抑制効果が示唆された。ガム咀嚼後、実験 2 の満腹度以外の全ての項目で有意な変化または有意傾向が認められた。満腹度は、代謝や胃の膨満感を反映する一方、空腹度、食物占有度および欲求度は、報酬系と関連した渇望の感情をより反映する項目であることから、咀嚼刺激の報酬回路への影響が示唆された。

また、VPT においては、ガム咀嚼後および摂食後、RT バイアスの有意な低下が、ET においては、ガム咀嚼後および摂食後、注視方向バイアスの有意な低下が認められた。対照実験では安静状態前後に有意差が認められず、以上の結果から、咀嚼刺激は食事摂取と同様に、食物に対する指向性、特に初期注意を減少させることが示唆された。報酬関連刺激の顕現性は一般的に初期注意と関連があるとみなされているため、咀嚼は食物刺激の顕現性を抑制し、食物に対する渇望を抑制する可能性が示唆された。

咀嚼が食欲抑制作用を示す機序として、咀嚼が脳を介した満腹関連ホルモン等の血液動態に影響を与えることや、満腹中枢とされる視床下部に作用し食欲抑制が生じることは既知の知見である。一方、刺激に対する指向性は脳内報酬回路の活性を反映すると考えられていることから、本研究より咀嚼刺激は食物への指向性を減少させ、報酬回路に影響を与えていることが新たに示唆された。

＜結論＞

本研究より、咀嚼刺激が渇望を反映する主観的食欲度を低下することが示された。さらに、摂食後と同様に、咀嚼刺激そのものが、食物に対する指向性、特に初期注意を減じることが示された。これらの知見より、味や匂い、食事摂取なしでも、咀嚼刺激は報酬回路に影響し、衝動的な摂食行動を防ぐことに寄与する可能性が示唆され、咀嚼運動を促すことが過食に対する効果的な予防法となり得ることが推察された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5560　号 | 池田　安紀津 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　小野　卓史<br>副　査　　倉林　亨　　上野　俊明 | |
| 論 文 題 目 | Chewing stimulation reduces attentional bias toward visual food stimuli in healthy-weight individuals | |

（論文審査の要旨）

近年、咀嚼機能の低下と肥満との間に関連があることが報告されており、咀嚼の重要性への関心が高まりつつある。摂食行動は、恒常系と報酬系の 2 つの相補的な制御機構によって調節されており、過食対策として報酬系へのアプローチが重要とみなされている。食物視覚刺激は脳内報酬回路を変容し、食物に対する指向性を増大させると考えられており、食物刺激への指向性を低減する方法を開発することは、衝動的な摂食行動を防ぐことにつながる可能性がある。以上の背景から、申請者は、咀嚼刺激による食物視覚刺激に対する指向性への影響を検証することを目的とし、visual probe task (VPT)および eye-tracking (ET)を用い、反応時間(RT)、注視方向および注視時間の評価を行った。

被験者は body mass index が 25 未満の健常成人を対象とし、VPT 施行群（21 名、平均年齢 25.9 歳；実験 1)、ET 施行群（20 名、平均年齢 25.8 歳；実験 2）の 2 群を設定した。両群ともにガム咀嚼条件と摂食条件を別日に実施し、両条件において、VPT または ET をガム咀嚼前後、または摂食前後に施行した。また、Visual analogue scales を用いた主観的食欲度の評価を行い、空腹度、満腹度、食物占有度および欲求度の 4 項目を評価した。VPT 実験からは RT バイアスが、ET 実験からは注視方向および注視時間バイアスが算出され、咀嚼前後および摂食前後で比較検討した。さらに、両実験ともに、各々同数の被験者を対象とした対照実験を実施した。この際、介入条件を安静状態とした点を除き、全て同様の実験手順にて遂行された。以上より、申請者の研究は適切な研究デザインのもと遂行されており、咀嚼が報酬系に与える影響を検討しうる実験系を構築し、認知心理学的手法を用い詳細に分析・考察している点で学術的価値は高く評価できる。

また、実験結果として、以下の知見を得ている。

主観的食欲度に関しては、主観的食欲度の変化に関しては、ガム咀嚼後は、摂食後と同様の傾向を示したことから、咀嚼刺激による食欲抑制効果が示唆された。ガム咀嚼後、

代謝や胃の膨満感を反映する満腹度以外の全ての項目（空腹度、食物占有度および欲求度）で有意な変化または有意傾向が認められた。これらは、報酬系と関連した渇望の感情をより反映する項目であることから、咀嚼刺激の報酬回路への影響が推察された。

また、VPT においては、ガム咀嚼後および摂食後に RT バイアスの有意な低下が、ET においては、ガム咀嚼後および摂食後に注視方向バイアスの有意な低下がそれぞれ認められた。注視方向バイアスは初期注意を反映しているとされることから、咀嚼刺激は食事摂取と同様に、食物に対する指向性、特に初期注意を減少させることが示唆された。報酬関連刺激の顕現性は一般的に初期注意と関連があるとみなされているため、咀嚼は食物刺激の顕現性を抑制し、食物に対する渇望を抑制する可能性が示唆された。対照実験ではいずれの項目においても、安静状態前後の実験結果に有意差は認められなかった。

以上のように、申請者は、味や匂い、食事摂取なしでも、咀嚼刺激が報酬回路に影響し、食欲抑制効果を発揮しうることを、VPT および ET を用いた認知心理学的実験により実証した。咀嚼が食欲抑制作用を示す機序として、咀嚼刺激が脳を介した満腹関連ホルモン等の血液動態に影響を与えることや、満腹中枢とされる視床下部に作用し食欲抑制が生じることは既知の知見である。一方、食物刺激に対する指向性は脳内報酬回路の活性を反映すると考えられていることから、本研究より咀嚼刺激は食物への指向性を減少させ、報酬回路に影響を与えていることが新たに示唆された。これらの知見より、咀嚼は衝動的な摂食行動を防ぐことに寄与する可能性が示唆され、咀嚼運動を促すことが過食に対する効果的な予防法となり得ることが推察された。

以上より、本研究の着眼点とその成果は高く評価され、基礎および臨床歯学の発展に大いに寄与することが期待される。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を申請するに十分値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 西井　直人 |
| 論文審査担当者 | 主査　　渡部　徹郎<br>副査　　三浦　雅彦　　池田　通 |
| 論　文　題　目 | Systemic administration of a TLR7 agonist attenuates regulatory T cells by dendritic cell modification and overcomes resistance to PD-L1 blockade therapy |

＜論文内容の要旨＞

免疫チェックポイント阻害の癌免疫研究は多大な進歩を遂げたが、この治療の恩恵をうけられる患者は限られている。本研究では、PD-L1 阻害抵抗性の２つの癌（SCCVII, Colon 26）モデルで、低濃度レシキモドの全身投与効果と PD-L1 阻害との併用効果を検討した。$CD8^+$ T 細胞の機能低下と制御性 T 細胞 (Treg)の腫瘍への浸潤が多い SCCVII におけるレシキモド単独投与は、腫瘍への $CD8^+$ T 細胞の集積と Treg の減少を促し、腫瘍増大を顕著に抑制した。 Treg の浸潤が少ない Colon 26 では、レシキモド単独の効果は SCCVII より劣っていた。PD-L1 阻害との併用投与では、どちらの癌モデルにおいても、腫瘍形成への影響、Treg の減少および CD8 T/Treg 比率の増加と関連して、明らかな併用効果が認められた。低濃度レシキモドの全身投与は、一過性で急速な活性化を形質細胞様樹状細胞（pDC）と通常の樹状細胞である conventional DC（cDC）に惹起させ、所属リンパ節での T 細胞へのプライミングを増強させた。単独では腫瘍縮小効果を発揮できないさらに低い濃度のレシキモド投与においても、PD-L1 阻害との併用効果が認められ、PD-L1 阻害剤の使用回数を減らしても同様の抗腫瘍効果が得られた。本結果から、低濃度レシキモドの全身投与は、PD-1/PD-L1 阻害療法の併用薬剤として役立つ可能性が示された。

＜緒言＞

CTLA-4 や PD-1 のような免疫チェックポイント分子阻害は、エフェクターT 細胞、Treg、制御性ミエロイド細胞 (MDSC)や腫瘍関連マクロファージ (TAM)などの免疫制御機能を解除することにより抗腫瘍免疫応答を増強させる。しかしながら、この治療効果は、臨床グレードや癌種により大きく異なる。頭頸部癌は、 T 細胞応答を惹起でき、免疫チェックポイント阻害療法の感受性に影響を与える癌特異変異抗原の発現頻度が少なく、癌微小環境での制御性細胞浸潤が多い癌である。我々は、マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVII の同系マウスへの癌接種モデル移植で、CTLA-4 あるいは PD-1 阻害は腫瘍増大を抑制するものの、腫瘍拒絶には至らないこと、免疫療法の効果は CD8 T/Treg 比率とよく相関することを報告してきた。

Toll-like receptor(TLR)は、多様な外来性および内在性リガンドを認識し、その結合は様々なサイトカインの産生を引き起こし、先天および適応免疫を増強させる。TLR7/8 は微生物由来の一本鎖 RNA(ssRNA)を認識する。TLR7/8 を介したシグナルは、 NF-κB を介した種々のケモカインと

サイトカインの産生と樹状細胞やマクロファージを介したⅠ型インターフェロンの産生を促し、エフェクターT 細胞を増強させる。レシキモドは、 TLR7/8 に対する合成アゴニストで、マウスでは TLR7 とのみ反応する。レシキモドの現時点での臨床応用は、TLR トレランスの誘導や有害なサイトカイン血症を避けるために、局所塗布や局所投与に限られている。最近、 TLR7 アゴニストの全身あるいは腫瘍内投与が TAM や MDSC による免疫抑制を解除して抗腫瘍効果を発揮する可能性が報告された。そこで、頭頸部癌の様な PD-1 阻害抵抗性の免疫抑制の強い癌において、TLR7 アゴニストと PD-1 阻害の併用は癌免疫療法として効果的でないかと考えた。本研究では、低濃度レシキモドの全身投与単独および PD-L1 阻害との併用効果を PD-L1 阻害抵抗性の 2 つの癌(SCCVII, Colon 26)モデルにおいて検討した。

＜方法＞

癌細胞接種と治療投与

6-7 週齢の雌 C3H/HeN および BALB/c マウスに扁平上皮癌細胞株 SCCVII あるいは大腸癌細胞株 Colon 26 を皮下接種し、腫瘍径を測定した。レシキモドおよび抗 PD-L1 抗体（MIH5）は、腫瘍接種時あるいは 7 日後から、単独あるいは併用で週 2 回腹腔内投与した。動物実験は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認のもとに、法令に基づいて実施した。

リンパ球サブセットとサイトカイン発現の解析

癌細胞接種 12 日後あるいは実験最終日の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）および所属リンパ節細胞を分離し、種々の抗体を用いて細胞表面および細胞内染色を行い、フローサイトメーターで解析した。

血中サイトカインおよび樹状細胞への影響の解析

未接種あるいは SCCVII（40 Gy 放射線照射）を皮下接種したマウスに、レシキモドを腹腔内投与し、一定の時間経過後の血液および所属リンパ節を採取した。炎症性サイトカインは、ELISA キットを用いて測定し、樹状細胞における IL-12 および機能抗原発現は、細胞染色後、フローサイトメトリーで解析した。

＜結果＞

２つの癌モデルにおける TIL の違いを解析したところ、SCCVII では、$CD11b^{+}Gr\text{-}1^{low}F4/80^{+}$の TAM と考えられるミエロイド系細胞の浸潤が顕著に高く、また、T 細胞中の Treg の比率が高く、逆に $CD8^{+}$ T 細胞の比率が低かった。さらに、$CD8^{+}$ T 細胞における IFN-γ発現が低いことから活性化も抑制されていた。

今回の研究で使用する低濃度レシキモド 1.7μg/mouse の投与による血中サイトカインの上昇を調べたところ、腫瘍接種有無に拘らず投与 3 時間後に IFN-αおよび IL-6 のみの一過性の軽微な上昇を認めたが、12 時間では測定限界以下であった。

PD-L1 阻害単独では、どちらの癌でも明らかな腫瘍増大抑制効果は認められなかったが、レシキモド単独では腫瘍抑制を示し、その効果は SCCVII の方が顕著であった。PD-L1 阻害との併用では、SCCVII で明らかな併用効果を示し、Colon 26 では腫瘍の大きさに変化はないものの、腫瘍内部の壊死範囲が著明に拡大した。Colon 26 の TIL 解析では、併用により顕著な Treg 集積の抑制

と CD8/Treg 比率の増強が認められた。SCCVII では、レシキモド単独で $CD8^+$ T 細胞の集積増加と Treg の減少がみられ、併用によりその効果が有意に増強された。

レシキモド投与による樹状細胞の変化を検討したところ、3 時間後で既に pDC 上の IL-12 発現が上昇しており、cDC では 12 時間後で上昇を認めた。抗原提示能力の指標となる MHC class II および CD86 発現は、12 時間後の cDC において顕著な上昇を認め、 CD86 と MHC class II の両者を共に高く発現している細胞の増加が顕著であった。pDC を除去した脾臓細胞に in vitro においてレシキモド刺激を加えたところ、pDC を除去していない群と同等の IL-12 発現上昇を認めたことから、レシキモドは pDC の活性化なしでも cDC を活性化できることがわかった。

SCCVII 接種 12 日後の所属リンパ節では、IFN-γと Ki-67 の一方あるいは両方を発現している $CD8^+$ T 細胞比率が有意に増加しており、 TIL においても IFN-$\gamma^+$Ki-$67^+$の活性化 $CD8^+$ T 細胞が顕著に増加していた。

単独では腫瘍抑制効果をみとめない濃度のレシキモド投与と PD-L1 阻害の併用においても、腫瘍縮小の併用効果がみられ、また、PD-L1 阻害剤の投与頻度を半減しても、同等の腫瘍縮小効果が認められた。

＜考察＞

低濃度レシキモドの全身投与が、癌微小環境におけるエフェクター $CD8^+$T 細胞の集積が強い Colon 26 より、免疫抑制の顕著な SCCVII において、効果的な腫瘍抑制効果を示したのは、レシキモドによる Treg 抑制効果であると考えられた。さらに、癌微小環境への Treg 集積が原因で生じている PD-L1 阻害抵抗性をレシキモド全身投与が感受性に変化させたことで、併用効果が発揮できたと思われる。我々はレシキモド刺激を受けた DC が Treg の分化を抑制することを in vitro で示しており、これがレシキモドによる Treg 減少のメカニズムであると考えられる。レシキモドは、循環中および所属リンパ節における pDC および cDC の早期の活性化を促し、所属リンパ節での $CD8^+$ T 細胞のプライミングを促進した結果、Treg の誘導が抑えられ、最終的に癌微小環境における CD8/Treg 比率が改善したと考えられた。本結果は、頭頸部癌のように免疫抑制環境が強い癌において、低濃度レシキモドの全身投与が PD-1/PD-L1 阻害療法の併用薬として使用できる有用性を示している。

＜結論＞

低濃度レシキモドの全身投与は、癌微小環境における Treg 集積の強い扁平上皮癌において Treg 集積を抑制し抗腫瘍効果を発揮した。また、PD-L1 阻害抵抗性の扁平上皮癌と大腸癌において、レシキモドを併用することで癌微小環境における CD8/Treg 比率を上昇させ効果的ながん縮小が得られた。低濃度レシキモドの全身投与は、PD-1/PD-L1 阻害療法の併用薬として有用であると思われた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5561　号 | 西井　直人 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　渡部　徹郎<br>副査　　三浦　雅彦　　池田　通 | |
| 論 文 題 目 | Systemic administration of a TLR7 agonist attenuates regulatory T cells by dendritic cell modification and overcomes resistance to PD-L1 blockade therapy | |

（論文審査の要旨）

癌免疫療法には、癌を傷害するエフェクター細胞の機能を高めることと、エフェクター細胞の機能を抑制している制御性細胞や制御性分子の働きを抑えるという２つの戦略が考えられている。特に、T 細胞の活性化を制御する負の共刺激分子である CTLA-4 や PD-１などの免疫チェックポイント分子に対する阻害抗体療法は画期的な成果をあげ、これまでの免疫療法では不可能であった再発・転移癌における生存率の延長を示し、悪性黒色腫を皮切りに、多くの癌腫に対して臨床応用されてきている。頭頸部癌に対する PD-1 阻害抗体の使用も、昨年本邦においても保険適応されたが、先行して臨床応用されている悪性黒色腫や非小細胞性肺癌と比較して、その臨床成績は劣っており、また高い薬価のために患者さん自身および医療経済への経済的負担も少なくない。西井直人は、頭頸部癌のような PD-1 阻害療法抵抗性の癌に対して、どのようなアプローチが可能であるかを思案した結果、自然免疫および適応免疫の両者を賦活できる細胞である樹状細胞の活性化を促す Toll 様受容体 (TLR)に着眼した。TLR7 に対する合成アゴニストであるレシキモドは、免疫賦活作用も強いが血中サイトカインの上昇という副反応も強いため、これまで局所投与薬としての臨床応用開発がすすめられてきた。西井は、副反応の影響を避けるためレシキモドの濃度を下げて全身投与することで、安全に効果的に使用できないかと考えた。本研究では、PD-1 阻害療法抵抗性の２種のマウス癌モデルにおいて、低濃度レシキモドの抗腫瘍効果および癌縮小のメカニズム、さらには PD-1 免疫チェックポイント阻害療法の併用剤としての可能性を実験的に検討した。

本研究で得られた結果は以下である。

１．扁平上皮癌 SCCVII では、未分化大腸癌 Colon 26 と比較して、癌周囲における制御性 T 細胞比率が高く、$CD8^+$ T 細胞比率が低く、さらに IFN-γ 陽性の活性化エフェクター$CD8^+$ T 細胞比率も低いことから免疫抑制環境にあることが示された。

２．SCCVII モデルでの低濃度レシキモド単独投与は癌への $CD8^+$ T 細胞の集積と制御性 T 細胞の減少を促し、腫瘍増大を顕著に抑制した。

３．制御性 T 細胞の浸潤が少ない Colon 26 では、レシキモド単独の効果は SCCVII より劣っていた。

４．PD-L1 阻害との併用投与では、どちらの癌モデルにおいても、腫瘍形成への影響、制御性 T 細胞の減少および CD8 T/ 制御性 T 細胞比率の増加と関連して、明らかな併用効果が認め

られた。

5．低濃度レシキモドの全身投与は、一過性で急速な活性化を形質細胞様樹状細胞（pDCs）と通常の樹状細胞（cDC）に惹起させていた。

6．レシキモド存在下で前培養した樹状細胞は、 in vitro での抗原特異的制御性 T 細胞の誘導を顕著に抑制させた。

7．レシキモド投与により、所属リンパ節および癌浸潤リンパ球における増殖マーカー Ki-67 およびエフェクターサイトカイン IFN-γ発現陽性の $CD8^+$ T 細胞の増加が 12 日後において認められた。

8．単独では腫瘍縮小効果を発揮できないさらに低い濃度のレシキモド投与においても、PD-L1 阻害との併用効果が認められ、PD-L1 阻害剤の使用回数を減らしても同様の抗腫瘍効果が得られた。

以上の結果から、西井は、特に癌微小環境における制御性 T 細胞の浸潤が強い癌において、低濃度レシキモドの全身投与は、PD-1 阻害抵抗性を感受性に転換できる可能性を実験的に明らかにした。また、低濃度レシキモドによる抗腫瘍効果の発現は、早期の樹状細胞の活性化が、制御性 T 細胞の誘導の減少と $CD8^+$ T 細胞の癌微小環境への集積を促進させているためと推察した。

本研究は、免疫抑制環境の強い頭頸部扁平上皮癌の治療に低濃度レシキモドの全身投与が有用である可能性、さらには、低濃度レシキモドの PD-1 免疫チェックポイント阻害療法の併用薬剤としての可能性を示しており、効果的ながん免疫療法の臨床応用開発に繋がる価値ある研究と高く評価できた。以上から、本研究は、医歯薬学の発展に寄与するものと考えられ、博士（歯学）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | NIKEN Adiba Nadya |
| 論文審査担当者 | 主査　　井関 祥子<br>副査　　中島 友紀、中濵 健一 |
| 論　文　題　目 | PI3K-Akt pathway enhances the differentiation of IL-27-induced type 1 regulatory T cells |

（論文内容の要旨）

Interleukin 27 (IL-27) has been identified as a potent cytokine in the differentiation of type 1 regulatory T (Tr1) cells through interactions with several key elements, including transcription factors such as aryl hydrocarbon receptor and IL-21. Autocrine production of IL-21 is known to be important for maintaining IL-10 expression by Tr1 cells. Although previous studies have shown that the PI3K-Akt axis contributes to the differentiation of helper T cell subsets, the role of the PI3K pathway on Tr1 differentiation remains to be elucidated. Here, we demonstrate that suppression of the PI3K-Akt pathway results in impairment of IL-27–induced Tr1 (IL-27–Tr1) cell differentiation *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, this suppression down-regulates IL-21 receptor expression by Tr1 cells, followed by suppression of IL-10 expression. These results suggest that the PI3K pathway enhances IL-10 expression by IL-27–Tr1 cells through up-regulation of IL-21 receptors.

<Introduction>

Foxp3$^-$ IL-10-producing type I regulatory T (Tr1) cell is one of the helper T (Th) subsets that has strong immunosuppressive properties and helps to control excessive inflammatory responses such as tissue inflammation or autoimmunity. Therefore, it is important to clarify the molecular mechanism of Tr1 differentiation for the regulation of the inflammatory responses, which has not been yet characterized. In this study, we investigated the signaling pathway involved in Tr1 differentiation, especially by focusing on the role of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), a lipid kinase that generates phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) to change cell activities such as translation or cell survival. Our previous study showed that the inhibition of PI3K-mTORC1 signals impaired Th17 differentiation. In contrast, another study showed that the inhibition of PI3K and mTORC1 increased inducible regulatory T (iTreg) cell differentiation. In the context of IL-10, we showed that the PI3K-Akt pathway upregulates IL-10 production by DCs after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. However, the role of the PI3K pathway on IL-10 production by Tr1 cells still rem　ains unclear. Thus, we analyzed the role of the PI3K pathway in the differentiation of Tr1 cells.

<Materials and Methods>

Generation of IL-10-producing Tr1 cell *in vitro*; After single-cell suspension of splenocytes from BALB/c mice was isolated, we negatively isolated $CD25^{-}CD4^{+}$ T cells. After that, $CD62L^{+}$ cells were purified with anti-PE microbeads by magnetic separation using magnetic-activated cell sorting (MACS) microbeads; the purity of each population was confirmed by FACS to be routinely greater than 95%. $CD62L^{+}$ and $CD62L^{-}$ were used as naïve and memory $CD4^{+}$ T cells, respectively. Each population was cultured in triplicate and stimulated for 3 days with plate-bound αCD3ε and αCD28 Abs in the presence of IL-10 or IL-27. To investigate the involvement of PI3K pathway in Tr1 differentiation, the pan-PI3K inhibitor LY294002 and IC87114, a specific inhibitor for class-$I_A$-PI3K, were used in Tr1 differentiation. For the IL-27–induced Tr1 cells proliferation assay, naïve or memory T cells were labeled with CFSE or with violet tracker, respectively. Both populations were then cultured together at a ratio representing the initial $CD4^{+}CD25^{-}$ T cell population. To investigate the involvement of IL-21 and IL-21 receptor, recombinant mouse IL-21 or neutralizing IL-21 monoclonal antibody was added when we started to differentiate Tr1 cell by IL-27. The ratio of IL-10-producing Tr1 cells was measured by FACS. We investigated the expression of Tr1-related molecules by RT-PCR and western blotting analyses.

Anti-CD3 antibody treatment *in vivo*; *Il10*$^{Venus}$ *Foxp3*$^{hCD2}$ mice were treated intraperitoneally with αCD3 or isotype-matched control antibody, in the presence or absence of IC87114. Mice were sacrificed three days after injection, and single-cell suspensions were prepared from spleens, mesenteric lymphnodes (mLNs), Peyer's patches (PPs) and colonic lamina propria (cLP). The isolated cells were subjected to flow cytometry analysis. Venus (IL-10) and hCD2 (Foxp3) expression was analyzed using FACSVerse (BD Biosciences).

Statistical analysis; Statistical analyses were performed by Mann-Whitney U-test using Prism 6. The significance threshold was set at $*p < 0.05$ or $**p < 0.01$.

<Results>

Our *in vitro* experiments demonstrated that $Foxp3^{-}$ IL-10-expressing T cells were highly induced with IL-27 stimulation, especially in $CD25^{-}CD4^{+}$ T cells. We found that adding IL-10 to naïve T cells enhanced IL-10 expression by IL-27-induced Tr1 (IL-27-Tr1) cells. In accordance with this result, adding a neutralizing antibody against IL-10 to the $CD25^{-}CD4^{+}$ T cell population dampened IL-10 expression by IL-27-Tr1 cells. In the $CD25^{-}CD4^{+}$ T cell population, which consists of both $CD62L^{hi}CD44^{lo}$ (naïve T cells) and $CD62L^{lo}CD44^{hi}$ (memory T cells) populations, total IL-10 expression by IL-27–Tr1 cells might be influenced by IL-10 cytokine that is spontaneously expressed by memory T cells. Henceforth, $CD25^{-}CD4^{+}$ T cell population is used for the generation of IL-27-Tr1 cells.

We then examined the involvement of the PI3K pathway in Tr1 cell differentiation *in vitro* by adding LY294002 or IC87114 to the initial culture used for IL-27-Tr1 cell differentiation. Both inhibitors suppressed IL-10 expression by IL-27-Tr1 cells. Furthermore, when we generated Tr1 cells using

$CD25^-CD4^+$ T cells from splenocytes of Akt-mer transgenic mice in which a fusion protein of Akt and mutated estrogen receptor can be activated by 4-HT, hyper-activation of Akt by 4-HT enhanced IL-10 expression by Tr1 cells. These results suggested that PI3K activity was essential in IL-27–Tr1 cell differentiation.

We found that adding IC87114 during IL-27-Tr1 cell differentiation dampened the phosphorylation of Akt at Ser473 at 24 hours, but not Thr308. Furthermore, FoxO1 (Ser256) phosphorylation was suppressed at 24 hours after IC87114 addition during IL-27-Tr1 cell differentiation. These results suggest that the PI3K-Akt-FoxO1 pathway might regulate differentiation of IL-27-Tr1 cells *in vitro*.

To address the involvement of the PI3K pathway on Tr1 cell differentiation *in vivo*, we administered αCD3 antibody intraperitoneally to *Il10*$^{Venus}$ *Foxp3*$^{hCD2}$ mice and assessed $Venus^+$ IL-10-producing T cells in the spleen, MLNs, PPs, and cLP at 3 days after injection. We found that the inhibition of the PI3K pathway resulted in attenuation of IL-10 expression by $Foxp3^-$ Tr1 cells, but not $Foxp3^+$ Treg cells.

Next, we investigated IL-10 and IL-21 expression in Tr1 cells by RT-PCR. The addition of IC87114 enhanced IL-21 expression in IL-27-Tr1 cells. The addition of IC87114 also enhanced AhR expression and likely c-Maf expression by IL-27-Tr1 cells on day 1. In contrast, IL-21 receptor expression was down-regulated by IC87114 on day 1 of IL-27-Tr1 cell differentiation. Furthermore, the addition of IL-21 enhanced IL-10 expression by IL-27–Tr1 cells, but not in IC87114-treated ones. Similarly, IL-10 expression by IL-27–Tr1 cells was dampened by neutralizing IL-21 Ab, but not in IC87114-treated ones. Together, our results indicate that inhibition of PI3K activity down-regulates IL-21 receptor expression in IL-27-Tr1 cells.

<Discussion>

As one of the suppressive T-cell subsets, Tr1 cells have been described to regulate inflammation, graft-versus-host disease, and autoimmunity by producing high levels of IL-10. IL-27, a potent inducer of Tr1 cell differentiation, is known to be produced by macrophages and DCs after toll-like receptor ligation. But precise mechanism has not been clarified.

Our findings showed that using the $CD25^-CD4^+$ T cell population that included naïve and memory populations was the best source for generating Tr1 cells using IL-27 stimulation. This might be due to IL-10 production by the memory population, which further contributes to the differentiation of IL-27-Tr1 cells, especially of those derived from naïve populations. This result emphasizes the importance of IL-10 for generating Tr1 cells, which has already been shown to be essential for maintaining IL-10 production in human Tr1 cells.

The PI3K-Akt axis generally increases Th cell differentiation. Here, we clearly demonstrated that the PI3K-Akt axis positively regulates IL-27-Tr1 cell differentiation. Especially in *in vivo* experiments, IL-10 expression from $Foxp3^-$ Tr1 but not $Foxp3^+$ Treg cells was affected by PI3K inhibition, inferring several different pathways for IL-10 expression by Th cells. It has been demonstrated that upon antigen

stimulation, protein kinase C θ (PKCθ), which requires mTORC2 for phosphorylation, was essential for inducing IL-10-secreting T cells. Upon activation, mTORC2 may activate Akt by phosphorylation at Ser473, followed by phosphorylation of FoxO1. This explains that PI3K inhibition in IL-27-Tr1 cells suppressed phosphorylation of Akt at Ser473, but not at Thr308. In the present study, we found a positive correlation with FoxO1 phosphorylation during IL-27-Tr1 cell differentiation, while PI3K-Akt-FoxO1/3a signaling has been known to down-regulate Treg differentiation. Therefore, the PI3K-Akt-FoxO1 axis might play an essential role in the differentiation of IL-27-Tr1 cells.

The role of IL-27 in the generation of IL-10-producing Tr1 cells has been clarified in both *in vitro* and *in vivo* studies. During IL-27-Tr1 cell differentiation, cMaf and AhR act synergistically to promote Tr1 cell development through transactivation of *Il10* and *Il21* promoters. In addition, autocrine production of IL-21 acts as a growth factor for Tr1 cells, which is essential for maintaining Tr1 cell differentiation. In the present study, we demonstrated that inhibition of the PI3K pathway significantly enhanced Ahr expression, followed by IL-21 expression during the Tr1 differentiation process. Enhancement of IL-21 expression by PI3K inhibition was expected to enhance IL-10 expression by Tr1 cells, but IL-10 expression by Tr1 cells was dampened. In fact, we showed that IL-21 receptor expression, which is important for IL-21 signaling, was inversely suppressed when the PI3K pathway was inhibited, indicating that the PI3K pathway is involved in the up-regulation of IL-21 receptor expression. Thus, these data collectively suggest that the PI3K pathway positively regulates IL-21 receptor expression, and hence down-regulates IL-21 signaling despite the abundance of IL-21.

In summary, we demonstrated the importance of the PI3K-Akt pathway in the differentiation of IL-27-Tr1 cells through the down-regulation of IL-21 receptors. Manipulation of this pathway might offer great opportunities to enhance Tr1 cell function in controlling immune responses, such as in autoimmune disease and inflammatory condition.

＜和文要約＞

インターロイキン 27 (IL-27) は、IL-21 の産生や転写因子 Ahr の発現を介して、IL-10 を産生する 1 型制御性 T 細胞を分化誘導するサイトカインである。この Tr1 細胞の IL-10 産生を維持するために、IL-21 によるオートクリン機構が重要であることが知られている。これまでの研究から、phosphoinositide 3-kinase (PI3K) およびその下流分子 Akt を介する経路によって、いくつかのヘルパーT 細胞サブセットへの分化が制御されることが明らかとなっているが、Tr1 細胞分化におけるこの経路の役割は明らかになっていなかった。我々は、*in vitro* および *in vivo* において、PI3K-Akt 経路を阻害することによって IL-27 誘導による Tr1（IL-27 誘導性 Tr1）細胞分化が抑制されることを示した。また、この抑制作用は、Tr1 細胞における IL-21 受容体発現が低下することにより、IL-27-Tr1 細胞の IL-10 産生が減少することに起因すると考えられた。これらの結果から、PI3K 経路は IL-21 受容体の発現を上昇させることにより IL-27-Tr1 細胞の IL-10 産生を促進し、Tr1 細胞の分化を促進する機構が明らかとなった。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5562　号 | NIKEN Adiba Nadya |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　　井関 祥子<br>副査　　中島 友紀、　中濵 健一 | |
| 論 文 題 目 | PI3K-Akt pathway enhances the differentiation of interleukin-27-induced type 1 regulatory T cells | |

（論文審査の要旨）

ヘルパーT (Th) 細胞は、ナイーブ Th から作用するサイトカインの種類によって、免疫応答を促進する Th1, Th2, Th17 細胞に分化する。それ以外にも、免疫抑制にかかわる細胞として Foxp3 陽性で TGFβ, IL-10 などを産生する Treg 細胞や、Foxp3 陰性で IL-10 を産生する誘導性制御性 T 細胞の 1 つである type 1 regulatory T (Tr1) 細胞に分化することが知られている。これまでに、脂質リン酸化酵素である phosphoinositide 3-kinase (PI3K) によって Th17 および Treg 分化がそれぞれ正および負に、またリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) 刺激による樹状細胞からの IL-10 産生が正に制御されることが知られていたが、Tr1 細胞分化における PI3K の関与は不明だった。そこで NIKEN Adiba Nadya は、Tr1 細胞分化と PI3K 活性との関係を検討した。まず *in vitro* において、PI3K 阻害剤によって IL-27 誘導による Tr1 (IL-27 誘導性 Tr1) 細胞分化が阻害され、逆に PI3K の下流分子 Akt を活性化すると分化が促進することから、PI3K 活性と IL-27 誘導性 Tr1 細胞分化に正の相関があることを見いだした。次に、PI3K-Akt 経路のどの下流分子に影響が及ぶかを western blot で調べるとともに、*in vivo* における Tr1 細胞分化についても検討を加えた。また、PI3K 経路がどのような分子メカニズムで Tr1 細胞分化を制御するかについて、Tr1 細胞関連遺伝子の発現に着目し、いくつかの新しい知見を得た。研究の着眼点は良く、機能解析の実験は手法を含めて適切に計画されていた。

本研究で得られた結果は以下である。

1．$CD4^+$ T 細胞から naturally-occurring regulatory T (nTreg) 細胞を除いた $CD25^-CD4^+$ T 細胞を使うと、*in vitro* において IL-27 を用いた場合に、最も効率よく IL-27 依存的に Tr1 細胞を分化誘導できる。
2．この IL-27 誘導性 Tr1 細胞の分化は、PI3K 阻害剤によって濃度依存的に抑制される。
3．PI3K の下流に存在する Akt が恒常的に活性化されている $CD25^-CD4^+$ T 細胞を用いると、Tr1 細胞分化がより促進される。
4．PI3K 阻害剤に最も影響を受ける細胞画分は、$CD25^-CD4^+$ T 細胞中の $CD62L^+$ (ナイーブ) 細胞画分由来細胞である。
5．IL-27 誘導性 Tr1 細胞分化においては PI3K 阻害剤によって、Akt (Ser473) のリン酸化とその下流分子である Foxo1 (Ser256) のリン酸化が抑制される。

６．マウスに抗 CD3ε抗体を投与すると *in vivo* で IL-27 依存的に Tr1 細胞を誘導できるが、同時に PI3K 阻害剤を投与することによって、脾臓，パイエル板，大腸粘膜固有層内のいずれの Tr1 細胞分化も抑制される。一方で Treg 細胞からの IL-10 産生は、PI3K 阻害剤の影響を受けない。

７．IL-27 誘導性 Tr1 細胞分化には、自身が産生する IL-21 によるオートクリン作用が関与することが分かっているが、PI3K 阻害剤によって IL-21 産生は増加し、IL-21 受容体 (IL-21R) の発現は抑制される。

８．IL-27 による Tr1 細胞分化の際に IL-21 を加えると分化が促進され、この促進は PI3K 阻害剤によりキャンセルされる。

９．IL-27 による Tr1 細胞分化の際に抗 IL-21 抗体を加えると分化が抑制されたが、この抑制も PI3K 阻害剤によりキャンセルされる。

以上の結果から、NIKEN Adiba Nadya は、*in vitro* および *in vivo* のいずれにおいても、IL-27 誘導性 Tr1 細胞分化が、PI3K-Akt 経路によって促進されることを明らかにした。 また、この経路において、複数ある下流分子のうち FoxO1 を介している可能性が示された。さらにこの PI3K-Akt 経路によって、細胞表面上の IL-21R 発現が促進され、Tr1 細胞分化が亢進するという分子メカニズムが明らかになった。IL-21 がオートクリン作用で Tr1 細胞分化を制御することは知られていたが、本研究によって、その受容体側を調節することで Tr1 細胞分化を制御でき、これを PI3K-Akt 経路が担っていることを明らかに示したことは画期的な発見であり、高く評価できる。また、*in vitro* のみならず *in vivo* においても実際に PI3K 阻害剤の効果が得られたことは、生体内で PI3K 経路が確かに Tr1 細胞分化を制御していることが強く示唆される。

本研究は、これまで知られていなかった Tr1 細胞分化制御機構を明らかにすると共に、Tr1 細胞と同様に免疫抑制能をもつ Treg 細胞とは異なるシグナル経路で、IL-10 産生が制御されることを明確に示したものである。本研究は、口腔をはじめとする粘膜における免疫制御メカニズムの解明に繋がるとともに、Tr1 細胞をターゲットとする新たな免疫制御製剤の開発の可能性を秘めた価値ある研究であり、医歯学および生物学の発展に寄与するものと考えられ、博士（学術）の学位を請求するに十分価値あるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | SHAGDARSUREN Tserendulam |
| 論文審査担当者 | 主査　藤原　武男<br>副査　西川　徹、近藤　暁子 |
| 論　文　題　目 | Association between perceived neighborhood environment and health of middle-aged women living in rapidly changing urban Mongolia |

（論文内容の要旨）

**Introduction**

Outstanding economic growth together with population growth has been observed in recent 15 years in Ulaanbaatar, the capital city of Mongolia. While re-development of existing housing areas has made progress, new towns consisting of modern houses with amenities are emerging to accommodate growing middle- and upper-class families.

While urban scenery in UB is rapidly changing and many citizens look for new residence to seek their better life, if neighborhood environment, including both physical and social environmental aspects, is supportive to health of urban dwellers is a concern. Studies have discussed association between physical and social environment in neighborhood and health of residents. Perception of neighborhood environment has been discussed to be associated with health of individuals.

This study was conducted in rapidly urbanizing Ulaanbaatar, Mongolia, to examine patterns of perceived neighborhood quality by residents, and their relationships with self-reported general and mental health of middle aged women.

**Methods**

The study was conducted in Ulaanbaatar, capital city of Mongolia. Subjects were selected from four types of residential area: summer house area, *ger* area, apartment area, and luxury residential area in Ulaanbaatar, Mongolia. Summer house area is recently developed Mongolian traditional residence area characterized by residents' exposure to natural atmosphere, located in peri-urban green zone of the city.

Interview survey was conducted at households of the subjects from August to September 2015. Six teams were assigned to conduct interviews.

Variables include demographic and socio-economic characteristics, subjects' perception on neighborhood environment, general health status, and mental health measured by General Health Questionnaire 12-item version (GHQ12) were reported. GHQ12 score ≥ 16 was regarded as psychological distress or severe distress.

Data was analyzed using principal component analysis, one-way ANOVA analysis, logistic regression

analysis and generalized linear regression analysis.

**Results**

A total of 830 women completed the questionnaire. Principal component analysis of perceptions of neighborhood environment by residents identified six qualities: physical environment, designed environment, neighborhood community, public safety, natural environment, and citizen services. Those perception of neighborhood environment qualities varied according to household income, education, residential areas.

Percentages of subjects reported their general health as very good or good in four types of residential areas, i.e. summer house, *ger* (Mongolian traditional residence), apartment, and luxury residence, were 76.3%, 78.5%, 77.6%, and 91.9%, respectively.

Perception of quality citizen services in neighborhood was associated with better self-reported general health (OR=1.330, 95%CI 1.093-1.618); and perception of quality neighborhood community and public safety were associated with better mental health (*B*(SE)=-0.572 (0.190); *B*(SE)=-0.702 (0.188)); independent of income, education, and type of residential areas, respectively.

**Discussion**

Ulaanbaatar is an important example of the health impacts directly associated with living in a rapidly developing and urbanizing community, within the context of a city and country's social and economic development. The living environment and its associated social life can have substantially impact people's mental health – and as such, addressing these factors offer an important opportunity for improving mental health in the city.

People living in newly develop luxury residential area, they are educated, earn high income, and report good health, and report less mental health problems. However, variations of self-reported general health and mental health are explained by education and income level difference rather than difference of residential areas. Further to this, selected perceived neighborhood environment quality associated with self-reported general health and mental health, independent of education, income and residential areas.

Previous studies that have considered mental health in this context have mostly been conducted in developed countries. Our findings from Mongolia support previous research on this topic from other locations that has shown significant associations between GHQ score and social cohesion, trust, social relationships and psychological environment.

The perceived friendliness of neighbors is of particular relevance in Mongolian culture. This reflects the challenges of a society transitioning from a traditionally nomadic way of life where families knew each other intimately to an urban setting where that same family may no longer know even their closest neighbors.

Regarding perceived neighborhood environment and self-rated health, our results elucidated relationship between perceived quality of citizen services and self-rated health. Two studies from Brazil showed quality

of public services with better self-reported health, and those reports from middle income countries suggest importance of social services for self-rated health in similar situations. Perception about citizen services in summer house area and luxury residential area, both of them are newly developed areas. Not only the physical remoteness of the area, but also arrangement of services by considering the development of new residential areas might fill the gap between urban development and perceived health status of residents.

There are number of environmental problems along with urbanization in Ulaanbaatar, such as indoor and outdoor air pollution, waste management, water quality, indoor energy use, and automobile traffic that have impact on health of the residents. These environmental matters should be well recognized and projection of the scale of problems according to the city development should be carried out to minimize negative impact on health of the residents brought by urbanization.

**Conclusion**

While good planning to manage urban physical environment supportive to health of the population is emphasized, neighborhood environment quality should be taken care of because it makes a difference in health of urban dwellers even after accounting for type of residential area and socio-economic status of individuals.

＜要約＞

2000 年から 15 年間に人口が 1.8 倍、GDP が 24 倍となり急速な都市化が進行しているモンゴルの首都ウランバートルでは、新たな住宅地域の開発が進みそこへの住民の定住が進んでいる。遊牧を主な生業形態としていたモンゴルにおいて、都市の新たな住宅地に定住し村落を形成して生活することは、生活環境の大きな変化であり、新たな環境下での人々の近隣環境の認識が注目される。さらに、近隣環境の認識と主観的健康との関係を解明することにより、市民の健康を支える地域環境の形成に資することが期待される。本研究の目的は、急速に都市化が進行するモンゴルの新旧住宅地に居住する住民の近隣環境の認識の様相を分析し、壮年女性の主観的健康観、精神健康調査尺度（GHQ12）による psychological distress との関係を明らかにすることである。2015 年 8～9 月にウランバートルの 40～60 歳女性 960 人を対象に世帯訪問調査を実施した。対象者の社会経済的状況、近隣環境の認識、主観的健康観、GHQ12 得点の評価を行った。830 人から有効回答が得られた。近隣環境の認識について主成分分析を行ったところ、近隣環境について物理的環境(physical environment)、 都市景観(designed environment)、 近隣コミュニティの社会的関係(neighborhood community)、地域安全(public safety)、自然環境(natural environment)、市民サービス(citizen services)の 6 つの独立した質の認識で構成されることが明らかになった。これらの地域環境の認識得点は世帯収入、教育水準、居住地区によって異なった。主観的健康観は居住地区によって異なり、郊外型伝統住居地区、都市型伝統住居ゲル地区、団地地区、高級住宅地区の主観的健康観が良好な群の割合は、それぞれ、76.3%、78.5%、77.6%、91.9%であった。GHQ12 得点が 16 以上の高い psychological distress 表出者の割合は、それぞれ、17.3%、16.6%、17.5%、11.3%であった。主観的健康観と近隣環境の市民サービスの質(OR=1.330, 95%CI 1.093-1.618)、psychological

distress と近隣地域の安全の質(OR=0.718, 95%CI 0.589-0.876)との間には、世帯所得、教育水準、居住地域の影響を調整した上で、統計学的に有意な関連性を認めた。本研究は、急速な都市化と新たな都市開発が進行するウランバートルにおいて、社会経済的な水準とは独立に、近隣環境の質が市民の主観的健康観、psychological distress に影響をもたらすことが明らかにした。都市の物理的な環境の整備の計画と管理が必要である一方、近隣環境の質の確保にも配慮した地域開発により、市民の健康推進に貢献することが示された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5563　号 | SHAGDARSUREN Tserendulam |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　藤原　武男<br>副　査　西川　徹、近藤　暁子 | |

【論文審査の要旨】

**１．論文内容**

本論文は、モンゴル都市部における中年女性における認識的住環境と健康状態に関する研究である。

**２．論文審査**

１）研究目的の先駆性・独創性

モンゴルは急激な経済成長の最中にあり、その都市部に居住する人々が住環境からどのような健康影響を受けているのかを明らかにしようとする試みは先駆的であるといえる。

２）社会的意義

住環境の評価は途上国においては困難を伴うことが多いが、認識としての住環境を調査することでそれが可能である可能性を示した点は意義深い。健康との関連を示した意義については多くの限界があるものの、途上国の都市計画においてなんらかの示唆を与えるエビデンスを示したことは社会的意義があると考えられる。

３）研究方法・倫理観

対象者は層化無作為抽出によってなされ、インフォームドコンセントを得た参加者に実施している。その内容は東京医科歯科大学の倫理委員会で承認されたものである。

解析手法については論文として出版されているものの不適切な部分があり、レポートによって適切な解析がなされた。

４）考察・今後の発展性

どちらも主観的な尺度での測定であり、その考察は不十分であったが、今後、これらを客観的な尺度で明らかにしていく必要性を示したということで今後の発展性があると考えられた。

**３．その他**

統計解析手法および考察について指摘があり、より正確な関係性の推定ができる手法での再解析と本研究の限界点についてレポートの提出を求め、１度では不十分であり２度目に具体的な指摘により再度レポートを求めたところ、可と考えられるものであった。

**４．審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（学術）の学位を申請する価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 古寺 敏子 |
| 論文審査担当者 | 主査：　柴田 俊一<br>副査：　金井 正美　石野 史敏 |
| 論　文　題　目 | Differing contributions of the first and second pharyngeal arches to tympanic membrane formation in the mouse and chick |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

陸生脊椎動物の聴覚器官の一部である中耳は、鼓膜とそれに付着する骨要素より構成される。鼓膜は、表皮外胚葉由来の外耳道と咽頭内胚葉由来の第 1 咽頭嚢が、主に神経堤細胞から生じる骨要素を挟み込むことにより形成される。この鼓膜の形成過程は哺乳類と爬虫類・鳥類で類似しているものの、両系統で独立に進化したと考えられてきた。しかし、先行研究はマウスとニワトリの外耳道形成では共に第 1 鰓弓が重要な役割を果たすことを示唆してきた。そこで本研究では、哺乳類と爬虫類・鳥類の鼓膜形成における共通点や相違点を明らかにするため、マウスとニワトリをモデルとし、鼓膜形成における第 1、2 鰓弓の役割について比較発生学的解析を行った。第 2 鰓弓要素が消失し、代わりに第 1 鰓弓要素が重複する表現型を示す（ここでは第 1 鰓弓重複胚と呼ぶ）*Hoxa2* ノックアウトマウス胚では、鼓膜が重複していた。次に、*Hoxa2* が発現する第 2 鰓弓以降の神経堤細胞が標識されている遺伝子組み換えマウス胚を用いて、第 1、2 鰓弓領域の境界と鼓膜の位置関係を調べたところ、マウスの外耳道の陥入開始と鼓膜形成が第 1 鰓弓内で生じていることがわかった。これらの結果から、マウスでは鼓膜形成に第 1 鰓弓が中心的な役割を果たすことが示唆された。一方、ニワトリで *Hoxa2* の発現パターンを調べたところ、外耳道の陥入開始と鼓膜形成が第 2 鰓弓内で生じていた。ニワトリとウズラを用いて神経堤の交換移植により第 1 鰓弓重複胚を作製したところ、外耳道が縮小して鼓膜が消失し、また異所性の外耳道様陥凹が形成された。このことから、ニワトリの鼓膜形成では第 2 鰓弓が中心的な役割を果たし、第 1 鰓弓は外耳道形成の一部にのみ関与すると考えられた。以上の結果より、マウス・ニワトリ双方において、「鼓膜は、第 1 咽頭溝と第 1 咽頭嚢が第 1 鰓弓と第 2 鰓弓の境界に沿って会合することで形成される」という従来の理解とは異なることを明らかにした。また、マウスとニワトリにおける鼓膜の発生プログラムが異なることから、鼓膜は哺乳類系統と爬虫類・鳥類系統で独立に進化したという仮説を支持する新たな発生学的証拠を得ることができた。

＜緒言＞

哺乳類及び爬虫類・鳥類の鼓膜は、表皮外胚葉の陥入による外耳道と、咽頭内胚葉の膨らみである第 1 咽頭嚢が、第 1、2 鰓弓に移動した神経堤細胞由来の骨組織を挟み込んで形成される薄

い膜状組織である。古生物学的研究から、鼓膜は哺乳類系統と爬虫類・鳥類系統で独立に獲得されたと考えられてきたが、その発生学的背景は不明であった。しかし、近年、それぞれの系統の代表的なモデル動物であるマウスとニワトリを用いた、鰓弓の背腹軸に沿った形態パターニングに着目した比較発生学的研究により、哺乳類では鰓弓腹側に、爬虫類・鳥類では鰓弓背側に関連して独自の鼓膜発生メカニズムを獲得したことが示唆された。

鰓弓の前後軸に沿った形態パターニングは、鰓弓の神経堤細胞での Hox 遺伝子群の発現の組み合わせによって決定される。第 1 鰓弓にはどの Hox 遺伝子も発現せず、第 2 鰓弓以降では *Hoxa2* が発現することで第 1、2 鰓弓の形態アイデンティティが決定される。したがって、*Hoxa2* のノックアウトマウス胚、及び第 2 鰓弓の神経堤細胞を由来する神経堤領域に *Hoxa2* を発現しない神経堤領域が移植されたニワトリ胚では、第 2 鰓弓要素が第 1 鰓弓要素に置換され、第 1 鰓弓要素が重複する（第 1 鰓弓重複胚）。先行研究より、これら第 1 鰓弓重複マウス胚と第 1 鰓弓重複ニワトリ胚ではともに外耳道が重複するため、両者の鼓膜形成には第 1 鰓弓の関与が示唆されるものの、これまで詳細な解析は行われてこなかった。そこで本研究では、マウス胚とニワトリ胚において、第 2 鰓弓神経堤細胞に発現する *Hoxa2* の発現に着目し、鰓弓の前後軸に沿った鼓膜の形成位置および第 1 鰓弓重複胚における鼓膜の表現型を詳細に比較検討した。

＜方法＞

（1）マウス・ニワトリ胚における鼓膜形成過程の詳細解析

マウス野生型の胎齢 18.5 日胚をブアン溶液にて固定、パラフィン包埋後に連続組織切片を作製し、これらの切片画像を元にソフトウエア（Avizo ver. 6.3）を用いて中耳形成域の三次元再構築を行った。ニワトリは、5-11 日胚についてカルノア溶液による固定後に体表面観察により外耳道の形成過程を観察した。11 日胚については、固定後にパラフィン包埋して連続組織切片を作製し、切片画像から中耳形成域の三次元再構築を行った。

（2）マウス・ニワトリ胚における第 1、2 鰓弓境界の可視化

*Hoxa2* 発現細胞で EGFP が発現（*Hoxa2*$^{EGFP/+}$）、または第 2 鰓弓神経堤細胞で tdTomato が発現する（*R4::Cre;Roza-CAG-LSL-tdTomato*）遺伝子改変マウスの胎齢 12.5~18.5 日胚を、カルノア溶液により固定し、パラフィン包埋後に連続組織切片を作製し、EGFP 抗体または RFP 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。胎齢 12.5 日胚の切片は、同一切片上で軟骨細胞マーカーの *Aggrecan* の発現も *in situ* hybridization 法により調べた。胎齢 18.5 日胚については、連続組織切片から三次元再構築を行った。ニワトリの 6, 7 日胚は 4%パラホルムアルデヒド溶液による固定後にパラフィン包埋、8-11 日胚は無固定で凍結包埋し、それぞれ連続組織切片を作製し、*Hoxa2* の発現を *in situ* hybridization 法により調べた。

（3）マウス・ニワトリ胚における第 1 鰓弓重複胚の解析

*Hoxa2* 欠失マウスの胎齢 18.5 日胚をブアン溶液により固定、パラフィン包埋後に連続組織切片を作製し、切片画像から三次元再構築を行った。ニワトリは、ウズラの左側中脳後脳境界の神経堤（第 1 鰓弓を構成する神経堤細胞の出現領域）を神経堤細胞が遊走を始める直前（約 1.5 日胚）に切り出し、同発生時期にあるニワトリ胚のロンボメア 4 の神経堤（第 2 鰓弓を構成する神経堤細胞の出現領域）と交換移植した第 1 鰓弓重複胚を作出した。3-12 日胚まで発生させた後に

カルノア溶液で固定し、パラフィン包埋後に連続組織切片を作製した。これらの切片において移植されたウズラ細胞をウズラ細胞特異的な QCPN 抗体で染色し、9-12 日胚については切片画像から三次元再構築を行った。

＜結果＞

第 1 鰓弓要素が重複する *Hoxa2* 欠失マウスの胎齢 18.5 日胚では、不完全な形態と大きさではあるものの、鼓膜が重複していた。また、*Hoxa2*$^{EGFP/+}$マウスの胎齢 12.5-18.5 日胚と *R4::Cre;Roza-CAG-LSL-tdTomato* マウス の胎齢 14.5、16.5 日胚では、外耳道が第 1 鰓弓領域で陥入を開始し、鼓膜の大部分が第 1 鰓弓領域に形成されていた。

ニワトリ 5-11 日胚における観察では、ニワトリの外耳道は第 2 鰓弓領域で陥入を開始して尾側方向へと進み、第 2 鰓弓に形成される耳小柱に向かっていた。第 1、2 鰓弓の境界を示す *Hoxa2* の発現パターンより、鼓膜は第 2 鰓弓領域内に形成されるが、外耳道の最外側部は第 1 鰓弓領域で側壁様の構造を形成していた。これらの結果より、ニワトリの外耳道は、第 1 鰓弓領域に形成される「壁部」と第 2 鰓弓領域に形成される「鼓膜部」に区分できると考えられた。

上記の観察より、ニワトリの鼓膜形成には第 2 鰓弓が中心的な役割を果たすと考えられたことから、ニワトリ胚とウズラ胚の神経堤の交換移植による第 1 鰓弓重複胚を作出した。この胚では第 2 鰓弓由来の耳小柱が消失していた。また、外耳道が縮小して不完全な陥入を示し、第 1 咽頭嚢との間に鼓膜は形成されなかった。縮小した外耳道は第 1 鰓弓領域内に形成されていたため、この第 1 鰓弓重複胚では鼓膜の壁部のみが形成され、鼓膜部は形成されなかったと考えられた。また、縮小した外耳道とは別に、ウズラ由来の神経堤細胞が占める領域に異所性の外耳道様の陥凹が見られ、外耳道の壁部が重複していると考えられた。

＜考察＞

本研究より、*Hoxa2* 欠失マウス（第 1 鰓弓重複胚）では鼓膜が重複すること、またマウスでは外耳道陥入の開始と鼓膜形成が第 1 鰓弓領域で生じることから、マウスの鼓膜形成には第 1 鰓弓が中心的な役割を果たすと考えられた。一方、ニワトリでは、外耳道陥入の開始と鼓膜形成が第 2 鰓弓領域で見られたが、外耳道の一部は第 1 鰓弓領域に形成された。ニワトリとウズラのキメラによる第 1 鰓弓重複胚は、鼓膜が消失して外耳道の一部のみが重複することから、ニワトリでは鼓膜の形成に第 2 鰓弓が中心的な役割を果たし、第 1 鰓弓は外耳道の一部の形成にのみ関与すると考えられた。これらの結果から、マウスとニワトリ双方とも、「第 1 鰓弓と第 2 鰓弓の境界に位置する第 1 咽頭溝と第 1 咽頭嚢が、外側と内側からこの境界に沿って会合した面に鼓膜が形成される」という従来の理解とは異なることが明らかとなった。また、マウスとニワトリの鼓膜形成では、鰓弓の前後軸に沿った形態パターニングにおいて同様の発生メカニズムの関与が示唆されてきたが、本研究により、マウスとニワトリの鼓膜形成では異なる鰓弓が中心的な役割を果たしていると結論づけられた。

鼓膜形成には上皮－間葉間の相互作用が重要であると考えられている。マウスでは、後に外耳道となる第 1 鰓弓の表皮外胚葉と、鼓骨を形成する第 1 鰓弓の神経堤細胞における組織間相互作用が重要であると考えられてきたが、ニワトリの鼓膜形成における相互作用は長らく不明であっ

た。本研究で解析した第 1 鰓弓重複ニワトリ胚では耳小柱と鼓膜が共に消失することから、耳小柱と鼓膜の発生は相互依存的であり、後に外耳道鼓膜部となる第 2 鰓弓の表皮外胚葉と、耳小柱を形成する第 2 鰓弓の神経堤細胞との組織間相互作用が鼓膜形成に重要であることが示唆された。また、本研究から得られたデータは、哺乳類と爬虫類・鳥類の鼓膜が独自の発生プログラムによって進化したという仮説を支持するものであった。

＜結論＞

マウスとニワトリでは異なる鰓弓が鼓膜形成に中心的な役割を果たしていることを明らかにした。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5564　号 | 古寺 敏子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査：柴田 俊一<br>副　査：金井 正美　石野 史敏 | |
| 論 文 題 目 | Differing contributions of the first and second pharyngeal arches to tympanic membrane formation in the mouse and chick | |

（論文審査の要旨）

＜要旨＞

哺乳類の中耳は鼓膜とそれに付着する骨要素により構成される。鼓膜は表皮外胚葉由来の外耳道、咽頭内胚葉由来の第 1 咽頭嚢、そしてそれらに挟まれる間葉から成る 3 層の薄い膜状組織である。従来、鼓膜は「第 1 鰓弓と第 2 鰓弓の境界に位置する第 1 咽頭溝と第 1 咽頭嚢が、外側と内側からこの境界に沿って陥入し、会合した面に形成される」と考えられてきた。しかし近年、マウスとニワトリの鰓弓の背腹軸に沿った形態パターニングに着目した比較発生学的研究により、哺乳類系統と爬虫類—鳥類系統は独自の発生メカニズムにより鼓膜を形成することが示唆された。この結果は、鼓膜を伴う中耳が進化の過程でそれぞれの系統で独自に獲得されたという古生物学的研究を支持するものであり、鼓膜の形成過程が両系統において大きく異なる可能性を示唆する。一方、鰓弓の前後軸に沿った形態パターニングに着目した解析においては、マウスおよびニワトリとも鼓膜の形成に第 1 鰓弓の関与が示唆されているものの、これまで詳細な解析は行われてこなかった。本研究において、古寺敏子は、鰓弓の前後軸に沿った形態パターニングに着目し、マウスとニワトリの鼓膜の形成過程の相違について詳細に比較検討した。

本研究で明らかになったことは以下である。

1.マウスの鼓膜形成

a）第 1 鰓弓が重複し、第 2 鰓弓が消失した第 1 鰓弓重複マウス胚（*Hoxa2* ノックアウトマウス胚）においては、鼓膜が重複することから、マウスの鼓膜の形成には第 1 鰓弓が関与することが示唆された。

b）第 2 鰓弓が蛍光タンパク質により標識された 2 種類の遺伝子組み換えマウス胚を用い、第 1 鰓弓と第 2 鰓弓の境界を可視化したところ、マウスの外耳道の陥入は第 1 鰓弓内で開始し、鼓膜自体も第 1 鰓弓領域内に形成されることがわかった。

以上より、マウスの鼓膜形成には第 1 鰓弓が中心的な役割を果たすことが強く示唆された。

2.ニワトリの鼓膜形成

a）ニワトリの体表面観察と、連続組織切片に対して第 2 鰓弓領域の神経堤細胞に発現する *Hoxa2* の *in situ* hybridization 解析を行った結果から、ニワトリの外耳道の陥入は第 2 鰓弓内で開始し、鼓膜は第 2 鰓弓領域内に形成されることが示された。

b）ニワトリの外耳道は第 1 鰓弓に位置する『壁部』と第 2 鰓弓領域で鼓膜形成に関与する『鼓膜部』に分けられると考えた。

c）以上の結果から、ニワトリの鼓膜形成には第 2 鰓弓の関与が示唆されたため、第 1 鰓弓 が重複し、第 2 鰓弓が消失したニワトリ—ウズラキメラ胚（第 1 鰓弓重複キメラ胚）を作出したところ、耳小柱と鼓膜が消失した。

d）第 1 鰓弓重複キメラ胚では、鼓膜を形成しない外耳道部分に相当する『壁部』が重複した。

これらの結果から、ニワトリの鼓膜形成では第 2 鰓弓が中心的な役割を果たすものの、外耳道の一部の形成に第 1 鰓弓が関与すると考えられた。

古寺は、今回の鰓弓の前後軸に沿った形態パターニングに着目した鼓膜の形成過程の解析より、マウス、ニワトリとも鼓膜の形成過程が「第 1 鰓弓と第 2 鰓弓の境界に位置する第 1 咽頭溝と第 1 咽頭嚢が、外側と内側からこの境界に沿って陥入し、会合した面に形成される」という従来の理解とは異なること、また鼓膜形成においてマウスでは第 1 鰓弓が、反対にニワトリでは第 2 鰓弓が中心的な役割を果たすことを明らかにした。

本研究の結果は、鼓膜形成のメカニズムが哺乳類系統、爬虫類—鳥類系統で独自に獲得されたことを示す新たな発生学的証拠としても重要でこの分野の発展に大いに貢献するものである。また、本研究により哺乳類の中耳や外耳の構成要素が第 1、第 2 鰓弓のどちらから形成されるかについて整理されたことから、ヒトの顎や耳領域に形態異常を示す先天性疾患である第 1 第 2 鰓弓症候群等の発生学的成因の理解につながるものであり、今後の疾患原因究明など臨床医学の発展に寄与するところもたいへん大きいと考えられた。よって本論文は博士（学術）の学位の授与に値するものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 野亦 久彌 |
| 論文審査担当者 | 主　査　柴田 俊一<br>副　査　原田 浩之　　宇尾 基弘 |
| 論　文　題　目 | Enhanced biological fixation of ligaments to bone tissues utilizing chitin fabrics |

1. 緒言

靭帯再建手術において、移植靭帯の骨組織への強固な生物学的固定は良好な予後を得るために重要である。本論文では、生物由来材料であるキチンの適用によりこのような生物学的固定を促進する可能性について研究した。実験ではラットの膝蓋靭帯に対して靭帯移行術を実施し、微細繊維不織布状のキチンを適用した骨孔内における骨組織およびコラーゲン線維組織の観察、および移行靭帯の固定強度の測定を行って固定性を定量的に評価し、キチンの有効性について検討した。

2. 材料および方法

2.1　実験材料

実験材料には、創傷被覆材として市販されている微細繊維不織布状に加工されたキチンを用いた。本材料の 10 mm × 10 mm 中には、脱アセチル化度 35%のキチン 0.0153 mg とポリビニールアルコール 0.0017 mg が含まれている。

2.2　実験動物

実験動物として 40 頭の Sprague-Dawley 系ラット雄 8 週齢（260 – 310 g）を使用した。40 頭のうち 30 頭が力学試験による評価に使用され、残りの 10 頭が組織学的観察のために使用された。靭帯移行術にあたって、動物はまずペントバルビタールと塩酸メデトミジンの筋肉内投与により麻酔を施された。剃毛・消毒の後、左後肢膝部に約 3 cm の皮膚切開を行って膝蓋靭帯を露出させた。膝蓋靭帯の走行に沿って中心に切開を入れ、5−0 ナイロン糸によってバンネル腱縫合を施した後に脛骨粗面より分離した。大腿骨外側顆から内側顆に貫通する直径 1 mm、長さ 7 mm の骨孔を作製し、分離した膝蓋靭帯を骨孔内に移行した。移行した靭帯は膝の不安定性がみられず、かつ屈曲運動に支障をきたすことのないように保定し、腱縫合からのナイロン糸を用いて大腿骨内側顆に直径 5 mm の塩化ビニール製エンドボタンによって固定した。骨孔内にキチンを適用したものを実験群とし、適用しなかったものを対照群とした。実験期間中、実験動物は個々のケージにて運動制限を受けることなく飼育された。

2.3　力学試験

力学試験に供する各群の実験動物からの試料摘出は術後 2 週、4 週、6 週に行い、膝蓋骨～移行膝蓋靭帯～大腿骨を一塊として採取した。大腿骨側は常温重合レジンにて包埋した後に、膝蓋骨側はその

ままの状態でジグにて把持し、試料を力学試験機に固定した。試験は 2 mm/min の送り速度で試験片が破断するまで行ない、荷重-変位曲線を記録した。

2.4　組織学的観察

組織学的観察に供する試料として術後 4 週に大腿骨の採取を行った。標本は 10%ホルマリンによる固定の後、10%のギ酸により脱灰し、パラフィンに包埋した。大腿骨遠位部に設けた骨孔の中心軸を通るように冠状面断の標本を薄切し、ヘマトキシリン・エオジンにて染色した。組織標本は CCD カメラを装備した偏光顕微鏡で観察を行い、記録された画像より骨孔径や骨孔内のコラーゲン組織の計測を行った。画像の処理や計測には画像解析ソフトウェア image J を用いた。

2.5　統計分析

統計分析は固定強度、骨孔の直径、骨孔内のコラーゲン組織の幅の比率について行われた。多重比較のためにボンフェローニ・ホルム法と組み合わせた Welch の t 検定を用い、$p < 0.05$ にて統計学的有意差ありと判定した。

3. 結果

3.1　肉眼所見

すべての実験例において、移行した膝蓋靭帯が骨孔から外れていることはなかった。移行靭帯に炎症はみられず健常な靭帯様の外観であった。術後 2 週目では実験群と対照群のどちらにも顕著な変化は観察されなかった。術後 4 週目の実験群では骨孔周囲に肉芽組織の増殖が認められ骨孔を視認することが難しくなったが、対照群ではそのような肉芽組織の増殖は認められなかった。術後 6 週目の実験群では観察された肉芽組織の量は減少していたが、骨孔と移行靭帯の間は軟組織によって満たされていた。これに対し対照群ではそのような組織は認められなかった。

3.2　力学試験

力学試験における試料の破断は、すべて骨孔から移行靭帯が引き抜かれることにより生じた。術後 2 週目における固定強度は実験群で 2.08 N、対照群で 2.48 N であり統計学的有意差は認められなかった（$p > 0.05$）。 術後 4 週目における固定強度は実験群で 5.84 N、対照群で 4.1 N で、実験群の固定強度が有意に大きかった（$p < 0.05$）。術後 6 週目における固定強度は実験群で 10.82 N、対照群で 7.34 N で、実験群の固定強度が有意に大きかった（$p < 0.01$）。

3.3　組織学的観察

術後 4 週目の組織標本の光学顕微鏡観察では、適用したキチンはほぼ吸収されており骨孔内では新生骨の形成が観察された。偏光顕微鏡による観察では、骨孔内はコラーゲン線維性の組織で満たされ、骨孔に平行に配向する紡錘形の線維芽細胞様細胞が認められた。さらに移行靭帯のコラーゲン線維は骨組織に引張力を伝達しているように観察された。しかしながら、対照群においてはこのような線維組織は観察されなかった。骨孔径の測定では実験群で 688 μm、対照群で 849 μm となり、実験群の骨孔径は対照群より有意に小さかった（$p < 0.05$）。骨孔内においてコラーゲン線維組織が占める幅の比については、実験群が 92.5% であって対照群の 61.7% より有意に大きかった（$p < 0.05$）。

4. 考察

靭帯移植術において移植靭帯の骨組織への生物学的固定はきわめて重要であるため、これまでにも

種々の生体材料を用いた促進方法が研究されてきた。キチン・キトサンは細胞外マトリックスの産生を亢進する生理活性が報告されていることから、このような目的に効果的に応用できると期待できる。そこで本研究では、微細繊維不織布状に加工されたキチンが生物学的固定を促進する可能性について、ラットの膝蓋靭帯を利用した動物実験系により検討した。

生物学的固定においては力学的環境が重要な因子となる。イヌやヒツジを用いて前十字靭帯再建を行った実験において、移行靭帯と骨組織の間に成熟した靭帯付着部を形成させるためには、靭帯と骨の間に生理的なレベルの引張力が作用することが必要であることが報告されている。本研究では移行した靭帯は膝の不安定性がみられず、かつ屈曲運動に支障をきたすことのないように骨孔に固定したことから、移行靭帯は生理的な引張力を骨組織に伝達していたものと考えられる。実際に、試料採取時の肉眼所見においては正常な靭帯様の外見が保たれていた。

実験群では肉眼所見において骨孔周辺に顕著な肉芽組織形成が観察され、組織学的観察においてはコラーゲン線維に富む組織が移行靭帯と骨の間に確認された。このことからキチンの適用により線維芽細胞が活性化され、線維組織の形成を亢進して移行靭帯と骨組織の間を埋め尽くすことで固定強度を増加させたと考えられる。これらの所見は、ポリエステル不織布にキチンをコーティングし人工靭帯として利用した実験における報告と一致している。更に骨組織に関しても同様にキチンの適用により骨形成が促進され移行靭帯の固定強度が増加したものと考えられる。

これらの反応を生じる機構としては、キチンが引き起こす穏やかな炎症によりマクロファージが活性化され、インターロイキン-6 のようなサイトカインが分泌されることで骨芽細胞が活性化されるという可能性がある。このような機構はキトサンが骨芽細胞によるコラーゲン合成を促進したという報告とも整合している。しかしながら機構の詳細を明らかにするには、より精密な研究が必要である。

本論文では、キチンの適用が移行靭帯の生物学的固定に役立つことが証明された。しかしながら、脱アセチル化度の影響などを検討していないことから最適な材料構成かどうかは不明であり、また実験期間も術後の亜急性期に限られていることから、さらに長期的な観察による有効性の検証も必要である。

5. 結論

靭帯移行術におけるキチンの適用が移行靭帯の骨組織への生物学的固定を促進することが示された。しかし、本研究はラットを実験動物とした短期間の研究であり、臨床応用にはさらなる研究が必要である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5565　号 | 野亦 久彌 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　柴田 俊一<br>副　査　原田 浩之　　宇尾 基弘 | |
| 論 文 題 目 | Enhanced biological fixation of ligaments to bone tissues utilizing chitin fabrics | |

（論文審査の要旨）

靭帯再建術において、移植靭帯の骨組織への強固な生物学的固定は良好な予後を得るために重要である。これまでにも種々の生体材料を用いた促進方法が研究されているが、キチン・キトサンは細胞外マトリックスの産生を亢進する生理活性が報告されていることから、このような目的に効果的に応用できる可能性がある。野亦はラットの靭帯移行モデルにおいて靭帯の固定強度を力学試験および組織学的観察により定量的に評価することでキチンの有効性を検討した。このようなテーマの設定は研究の意義が大きいと言える。

実験においては、創傷被覆材として市販されている微細繊維不織布状に加工されたキチンを使用した。本材料の 10 mm×10 mm 中には、脱アセチル化度 35%のキチン 0.0153 mg とポリビニールアルコール 0.0017 mg が含まれている。実験動物には SD 系ラットを使用した。靭帯移行術にあたっては、左後肢膝部に約 3 cm の皮膚切開を行って膝蓋靭帯を露出した。膝蓋靭帯の走行に沿って中心に切開を入れ、5–0 ナイロン糸によってバンネル腱縫合をかけて脛骨粗面より分離した。大腿骨外側顆から内側顆に直径 1 mm、長さ 7 mm の骨孔を作製し、分離した膝蓋靭帯を骨孔内に移行した。移行した靭帯は膝の屈曲に支障をきたさないよう保定し、その断端からつながるナイロン糸によって大腿骨内側顆に直径 5 mm の塩化ビニール製エンドボタンによって固定した。骨孔内にキチンを適用したものを実験群、適用しないものを対照群とした。

力学試験は術後 2、4、6 週目に行い、膝蓋骨～移行膝蓋靭帯～大腿骨を一塊として採取することで移行靭帯の固定強度の測定を行った。試験は 2 mm/min の送り速度で試験片が破断するまで行ない荷重変位曲線を記録した。組織学的観察は術後 4 週目の試料について行った。組織標本は大腿骨遠位部に外側から内側に貫通する骨孔の中心軸を通る冠状面断で作製され、ヘマトキシリン・エオジンで染色された。組織標本は CCD カメラを装備した偏光学顕微鏡で観察を行い、読み込まれた画像より骨孔径や骨孔内のコラーゲン組織の計測を行った。統計解析では固定強度、骨孔径、骨孔内のコラーゲン組織の幅比率について、ボンフェローニ・ホルム法と組み合わせた Welch の t 検定により多重比較を行った。これらの実験方法は妥当であり、実験計画は周到に計画され準備されたものと認められる。

本論文で得られた主な結果は以下のとおりである。

・すべての実験動物において移行した膝蓋靭帯が骨孔から抜け落ちることはなかった。また移行した靭帯に炎症は観察されず、健常な靭帯様の外観であった。これらより移行靭帯には成熟

のために必要な生理的レベルのメカニカルストレスが作用していたものと考えられる。

・骨孔にキチン織布を適用することにより、術後 4 週において骨孔内の移行靭帯組織のコラーゲン線維組織が占める幅の比率が有意に増加し、骨孔の直径も有意に減少した。キチンにより線維芽細胞が増殖して線維組織の産生が亢進するとともに、キチンの引き起こす穏やかな炎症反応により誘導されるマクロファージが何らかの生理活性物質を分泌し骨形成を促進したと考えられる。

・骨孔にキチン織布を適用することにより、術後 4 週目と 6 週目において移行靭帯の骨への固定強度が有意に増加した。これはコラーゲン線維や骨組織の形成が促進されたのみならず、移行靭帯から骨組織に引張力を伝達するコラーゲン線維が形成されたことによるものと考えられる。

これらの結果より、野亦はラットの膝蓋靭帯を利用した靭帯移行術モデルを用いた本論文において、キチンの適用がコラーゲン線維組織や骨組織の形成を亢進させ、また機能的なコラーゲンセ線維を形成させることで生物学的固定の強化を促進することを示した。これらの考察および結論は妥当であると評価できる。

このように本論文ではキチンの適用が移行靭帯の生物学的固定に有効であることが示された。これらの研究成果は医学、歯学、獣医学にかかわる基礎研究の進展に寄与するところが大きいことに加え、各分野の臨床応用へも道を開くものと高く評価できる。よって、本論文は博士（学術）の学位を請求するのに十分価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 富岡　晶子 |
| 論文審査担当者 | 主査　田中　真琴<br>副査　大久保　功子　　岡光　基子 |
| 論　文　題　目 | Physical and social characteristics and support needs of adult female childhood cancer survivors who underwent hormone replacement therapy |

（論文内容の要旨）

＜結言＞

小児がんの長期予後の改善に伴い、日本の小児がん経験者の総数は 5 万人を超え、20 歳以上の成人の 700 人に 1 人が小児がん経験者であると推定されている。一方、成長発達の途上でがんの治療を受けた小児がん経験者の半数以上に何等かの晩期合併症が認められ、低身長や性腺機能障害などの内分泌系の問題が多く報告されている。

性腺機能障害を来した女性小児がん経験者は第二次性徴の発現異常や骨密度減少を来たす可能性があり、思春期から閉経年齢まで長期にわたって女性ホルモン補充療法（以下、HRT とする）を必要とする。結婚や出産などのライフイベントを迎える成人後の女性小児がん経験者が HRT を継続することは、身体面だけでなく心理社会的な影響を経験し、特別なニーズを有すると考えられる。しかし、HRT を受けた成人後の女性小児がん経験者の身体的・社会的特徴及び支援ニーズはこれまで十分に明らかとなっていない。そこで、本研究では、HRT を受けた群と受けていない群を比較し、HRT を受けた成人女性小児がん経験者の身体的・社会的特徴を明らかにすること、さらに、HRT を受けた女性小児がん経験者の支援ニーズを記述することを目的とした。

＜対象と方法＞

<u>対象</u>：対象の選定基準は、①0～15 歳に小児がんと診断され、②治療終了後 2 年以上経過した 20 歳以上の女性で、③原疾患及び性腺機能障害を含む晩期合併症のリスクについて説明を受けている者とした。除外基準は、①主治医の判断によりアンケートに回答することで心理的な影響が大きいと予測される者、②精神・心理的な問題や認知機能障害により自記式質問紙への回答が困難な者とした。

<u>調査方法</u>：自記式質問紙による横断的調査を実施した。小児がんの長期フォローアップを実施している日本国内の 7 医療機関に調査協力を依頼した。外来診療を実施している医師が対象者を選定したのち、研究の主旨と方法を説明し、研究参加の承諾を得て質問紙を配布した。外来受診日が未定の場合は研究の説明と研究協力依頼の文書を郵送し、承諾が得られた場合に質問紙を郵送した。質問紙は無記名で回答を依頼し、郵送にて回収した。本研究は研究者の所属施設及び全ての研究協力施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

調査内容：質問紙により対象者の年齢、診断名、診断時年齢、治療歴、HRT 経験の有無を尋ねた。診断名、治療歴、晩期合併症については主治医に医師調査票への記入を依頼し、対象者の回答との整合性を確認した。

身体的特徴については、月経周期、月経前症候群、妊娠・出産歴、現在の身体症状と気になる健康問題の有無を尋ねた。社会的特徴については学歴、就労状況、家族構成、婚姻状況を尋ねた。

HRT を受けた女性小児がん経験者には、HRT を開始した年齢、HRT を受けた診療科を尋ねた。服薬状況について「指示通り服薬している」から「全く服薬していない」の 4 段階で回答を依頼した。また、副作用の有無、副作用を有する場合はその内容と日常生活の支障の有無を尋ねた。HRT に対する認識については、「必要な治療と思う」、「治療継続が困難である」、「治療したくない」の 3 つの選択肢からの回答とその理由について記述を依頼した。さらに、希望する医療サービスや支援について自由記述による回答を依頼した。

分析方法：HRT を受けた群と受けていない群の比較には、Fisher's exact test を用いて分析した。統計ソフトは JMP® 11 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行い、有意水準を 5%とした。 自由記述は全て書き起こし意味内容ごとにまとめ、整理分類した。

＜結果＞

対象者の概要：60 名に質問紙を配布し、51 名から返送があった（回収率 85.0%）。15 歳以後に発病した 2 名を除き、49 名を分析の対象とした（有効回答率 81.7%）。対象者の平均年齢 *(SD)* は 26.3 *(5.0)* 歳、診断時の平均年齢 *(SD)* は 7.4*(4.0)*歳であった。診断名は血液腫瘍が 34 名（69.4%）、固形腫瘍が 15 名（30.6%）であった。放射線療法を受けたものが 32 名（65.3%）、造血幹細胞移植を受けたものが 18 名（36.7%）であった。晩期合併症を有している者は 29 名（59.2%）であり、そのうち性腺機能障害を有している 20 名（40.8%）が HRT を受けていた。対象者の 21 名（42.9%）が大卒以上、31 名（63.2%）が就労していた。29 名（53.2%）が親と同居しており、11 名（22.4%）が婚姻していた。

HRT を受けた女性小児がん経験者の身体的・社会的特徴：HRT を開始した年齢は 9～32 歳であり、平均 *(SD)* は 16.0 *(3.1)* 歳であった。HRT を受けた者は放射線療法（$p<0.01$）、造血幹細胞移植($p<0.001$)を受けた者に有意に多く、妊娠出産歴を有する者はみられなかった($p<0.05$)。HRT と月経周期及び月経前症候群との関連はみられなかった。HRT を受けていない者のうち 9 名（31.0%）が月経不順であると回答していた。31 名（63.3%）が身体症状を有し、29 名（59.2%）が、気になる健康問題があると回答したが、いずれも HRT との関連はみられなかった。HRT を受けた群では気になる健康問題として、4 名が「将来の健康問題のリスク」、3 名が「倦怠感」、2 名が「妊孕性に関すること」を挙げていた。両群の間で教育・就労状況、家族背景、婚姻状況に有意差はみられなかった。

HRT に対する認識及び支援ニーズ：HRT を受けた 20 名のうち、18 名が HRT は「必要な治療と思う」と回答していた。その理由は、【規則的な月経周期を得るため】、【ホルモンバランスを保つため】、【将来の妊娠・出産のため】、【体調管理のため】であった。2 名は「実施したくない」と回答し、その理由として【副作用による苦痛】、【治療継続の負担】を挙げていた。「実施が困難である」と回答した者はいなかった。HRT を受けた者のうち、支援ニーズについて

記載のあった 5 名の記述内容を整理分類した。その結果、【HRT に関する情報】、【悩みを共有する場】、【心理的支援】、【医療体制の連携】の 4 つが挙げられた。

＜考察＞

性腺機能障害のリスクを有する女性小児がん経験者に対する継続的支援：本調査における対象者の約 4 割が HRT を受けた経験を有していた。HRT を受けた者は造血幹細胞移植と放射線療法を受けた者に有意に多く、性腺機能障害のリスク要因に関する先行研究と同様の結果であった。

HRT と月経周期及び月経前症候群との関連はみられず、HRT の適応となっていない者のうち約 3 割が月経不順があると回答していた。月経不順は健康な一般女性においても同様の割合でみられるが、小児がん経験者の晩期合併症は経年的に増加し、20 歳時に正常月経周期であった女性小児がん経験者の 8%が 40 歳までに閉経を迎えることが報告されている。そのため、現在 HRT の適応となっていない女性小児がん経験者の中に潜在的なリスクを有する者が含まれている可能性がある。女性小児がん経験者に対し、思春期から月経に対する正しい知識を提供するとともに、治療の長期的影響を理解し月経異常に早期に対応できるよう支援することが必要といえる。

HRT の副作用を認識している者は 3 名であり、そのうち 1 名が副作用による身体的苦痛や長期的影響を心配していた。晩期合併症を有する小児がん経験者にとって服薬の副作用は健康問題を増加させる要因となる。また、HRT を開始した 10 代には治療の理解が十分でなく、成人後に HRT に関する情報を必要としている者もみられた。治療薬による副作用や治療効果に対する認識の欠如、治療の複雑さなどはアドヒアランス低下の要因となりうる。そのため、HRT を必要とする女性小児がん経験者に対し、服薬に伴う症状や治療に関する理解度を把握し、治療を適切に継続できるよう支援することが求められる。

妊孕性の問題を抱える女性小児がん経験者の支援ニーズ：本調査における女性小児がん経験者の妊娠出産率は 14.9%であり、海外における先行研究と比べて低い傾向にあった。本調査の対象者の婚姻率は 23.4%であり、日本の一般女性より低いことも妊娠出産率が低い要因の一つと考えられた。HRT を受けた者の妊娠出産歴は皆無であり、HRT を受けていない群と有意な差がみられた。幼少期に発症した小児がん経験者の多くは、治療を受けていた時期に疾患や治療の影響を理解することが困難であり、妊孕性のリスクについて説明されたかどうかも明確に覚えていないことが報告されている。本調査においても、妊孕性に関することを気がかりに感じており、HRT を必要とする理由に「将来の妊娠・出産のため」という回答がみられた。20 代は結婚や妊娠・出産について現実的に考えはじめ、将来の妊孕性について不安が高まる時期であると考えられる。

治療の影響により、すでに妊娠出産の希望が持てなくなった女性小児がん経験者は、苦悩とあきらめを同時に抱えていた。さらに、これらの悩みを友人や医療者に相談できないと感じていた。小児がん経験者は小児期という人生の貴重な時間を闘病に費やし、さらに思春期・若年成人期に不妊の事実を知らされ、将来の夢や希望までも失うような体験をしていることが推察される。女性小児がん経験者が抱える苦悩や葛藤に対し、性や生殖に関わる専門職、心理士などの多職種が連携し、一人ひとりの価値観やニーズに沿った支援を提供していくこと、ピアサポートをはじめとする心理的支援を充実させていくことが求められる。

＜結論＞

本調査対象者の約 4 割が HRT を受け、HRT の平均開始年齢は 16.0 歳であった。HRT を受けた者は放射線療法及び造血幹細胞移植を受けた者に有意に多く、妊娠出産歴との関連がみられた。HRT の経験の有無と社会的特徴及び身体症状との関連はみとめられなかったが、HRT を受けた女性小児がん経験者は妊孕性に対する不安や不妊の悩みを抱えていた。10 代で HRT を開始する小児がん経験者が適切に HRT を継続できるよう教育的支援を行うとともに、成人期を迎える女性小児がん経験者特有の不安や苦悩を理解し、心理的支援の充実を図ることが必要と考えられた。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5566　号 | 富岡　晶子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　田中　真琴<br>副　査　大久保　功子　　岡光　基子 | |

（論文審査の要旨）

博士号審査論文 “Physical and social characteristics and support needs of adult female childhood cancer survivors who underwent hormone replacement therapy” (Int J Clin Oncol, DOI 10.1007/s10147-017-1120-3)について審査した。

小児期にがんの治療を受けたがんサバイバーは、晩期合併症として内分泌系障害の頻度が高く特に女性においては、卵巣機能障害のために思春期から閉経まで長期にわたり女性ホルモン補充療法(Hormone Replacement Therapy: 以下 HRT)が必要となる患者も多く、小児がんの長期成績の改善に伴い、小児がん経験者への支援の重要性は増している。

そこで申請者は、卵巣機能障害のために HRT を受けた女性小児がん経験者に着目し、身体的・社会的特徴と支援ニーズを明らかにすることを目的に本研究を行った。

方法は、成人女性小児がん経験者を対象とした自記式質問紙および主治医調査票を用いた多施設横断調査で、小児がんの長期フォローアップを実施している日本国内の 7 医療機関より協力を得て行った。分析対象となった 49 名分(年齢 中央値 25,範囲 20-41)の回答より、40.8%が晩期合併症として卵巣機能障害があり 20 名全員が HRT を経験していたことが明らかになった。HRT 経験の有無で要因を比較した結果では、放射線療法、造血幹細胞移植を受けたことが HRT と関連しており、HRT 群には妊娠出産歴ありの者はなく、有意差が認められた(0 vs 24.1, $p$=0.032)。支援ニーズとして記載された内容の分析から「HRT に関する情報」「悩みを共有する場」「心理的支援」「医療体制の連携」といった支援ニーズがあることを明らかにした。

サンプルサイズが小さいという限界があるが、本研究は、本邦での情報集積が重要な課題となっている希少疾患である小児がんを経験した成人女性の卵巣機能障害の問題と支援ニーズを明らかにした点で貴重であり、今後、女性小児がん経験者の支援の充実を図る上で手がかりとなる重要な論文であると考えた。

以上を踏まえ、申請者が博士の学位（看護学）に値すると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 小玉　淑巨 |
| 論文審査担当者 | 主査　緒方　泰子<br>副査　大久保功子　　深堀　浩樹 |
| 論　文　題　目 | Nurse managers' attributes to promote change in their wards: a qualitative study |

（論文内容の要旨）

Ⅰ．緒言

近年、世界的に患者の高齢化による看護ケアニーズの増加、在院日数の短縮などの影響により、看護の質の向上と効率化が求められている。このような背景のもと、看護師長は病棟の管理者として看護ケアの改善や職場環境を主体的に変革していく責任を担っている。しかし、日本の看護師長は病棟で生じている問題を把握し、変革していくことに困難を感じていることが明らかとなっている。

組織変革に関する先行研究は、看護分野以外で行われた研究、もしくは欧米の看護管理者を対象に、あらかじめ問題が組織的に把握され、その問題を解決するためのプロジェクトを導入した経験を記述したものである。つまり、日本の看護師長が病棟で起きている問題を見つけ、変革していくプロセスやそのプロセスを促進する要素は明らかになっていない。

そこで、本研究は、日本の看護師長が病棟を変革したプロセスを明らかにすることを目的とする。

Ⅱ．研究方法

研究デザイン

看護師長とスタッフの相互作用および病棟変革のプロセスを明らかにするためにグラウンデッドセオリーアプローチを採用した。

研究参加者と分析方法

変革プロセスにおける相互作用を理解するために、看護師長とその部下であるスタッフナースにインタビューを行った。対象となる看護師長は看護師長として半年の経験を有し、病棟変革を経験したことのあるものとした。スタッフナースは看護師の経験が 1 年以上あるものとした。本研究では、看護師長から得られたデータを中心に分析し、看護師長の視点からとらえた病棟の変革のプロセスを記述した。スタッフナースのデータは、病棟の状況をより深く理解するために補足的に使用した。

データ収集方法

1 対 1 の半構造化面接を 2014 年の 3 月から 2015 年 12 月まで行った。インタビューの内容は、

病棟で変革に取り組んだ事例、変革を行った理由についての質問を含むものだった。本研究で作成したインタビューガイドに基づき質問したが、インタビューの内容に応じて柔軟に質問を変更した。23 人の看護師長とそれぞれの部下 17 人に対してインタビューを行った。

質的研究としての厳密性を確保するために、1)メモ、 2)ダイアグラミング、 3)メンバーチェッキング、 4）セカンドオーサーとのピアデブリーフィング、 5）研究の過程で作成した文書の保持を行った。

## Ⅲ．結果

本研究で明らかになった変革のプロセスは、“看護師長は信念とスタッフナースへの共感を持ち、看護師長が見出したゴールを達成していく”であった。さらに、変革のプロセス全体を通じて、病棟の変革を促進するために必要な看護師長の 4 つの特性が導き出された。

### 変革を促進する看護師長の 4 つの特性

看護師長は、4 つの特性を用いて病棟の変革を促進していた。4 つの特性は、“ミクロとマクロの両方の視点を持つ”、“信念と外的基準を重視する”、“先見性を持つ”、“スタッフナースに対する共感性を持つ”であった。4 つの特性は変革のプロセスの段階によって重要度が異なる。例えば、変革の初期段階（問題を特定する段階）では、4 つの特性のうち 3 つの特性（“ミクロとマクロの両方の視点を持つ”、“信念と外的基準を重視する”、“先見性を持つ”）が特に重要であった。

### ミクロとマクロの両方の視点を持つ

看護師長は、病棟の詳細な情報を収集し、それを統合する努力を行っていた。具体的には、インシデントの数や離職率などのデータ、病棟のスタッフの特性（年齢や経験年数など）、医師と看護師の関係などについての情報を得る努力をしていた（ミクロの視点）。そして、得た情報を分析し、さらに事象の背景や原因を推測していた（マクロの視点）。看護師長はこのような判断を通じて、一部ではなく病棟全体の状況を把握していた。例えば、ある看護師長は病棟で患者の急変が連続して生じていることに疑問をもち、複数の看護師に聞き取り調査を行い、なぜ病棟で急変が起こるのかについての背景を分析した。その結果、スタッフナースの急性期ケアが未熟であることが原因ではないかと推測した。

### 信念と外的基準を重視する

病棟の問題を特定する時や結果を評価する時に、看護師長は複数の判断基準をもとに行っていた。これらの判断基準は、看護師長の看護ケアやリーダーシップに関する信念や病院のミッションなどの外的基準であった。看護師長の信念は、看護師や看護師長としての経験から作られていた。例えば、ある男性の看護師長は、病棟の問題を特定する時に、病院のミッションである健全な職場環境づくりと自身の時間外労働をしないという信念の両方を重視して判断していた。

### 先見性を持つ

看護師長は、病棟変革を行わなかった場合、病棟の状況が悪化する可能性について予測していた。この特性は、変革する問題の優先度の決定、病棟の長期的な目標の設定、変革に対するスタッフナースの抵抗を予測し戦略を立てる時に必要なものであった。ある看護師長は、人員不足が医療安全上の問題となりうることを認識し、同時にスタッフナースの人員不足に対する怒りも感じ、それが将来的なスタッフナースの大量離職につながることを予測していた。

**スタッフナースに対する共感性を持つ**

看護師長は変革プロセス全体を通して、スタッフナースの思いを理解しようと努力し、彼らの経験やプライドを尊重しようとしていた。そして、看護師長は変革を成功するためには、スタッフナースに共感することが必要であると感じていた。看護師長はスタッフナースとの責任の違いが変革に対する意見の違いを生じさせていると感じていた。看護師長は組織のリーダーとして組織の方針を立て、組織の成果に責任を持つ。一方で、スタッフナースは主に患者ケアに責任を持つ。看護師長はスタッフナースとの責任の違いが変革に対する意見の違いを生じさせていると感じ、スタッフナースが変革を受け入れるための戦略を立てていた。ある看護師長は、ルーティーンワークとなっていた不必要な体重測定を中止したいと考えていた。その際に、看護師長はそれらの業務を行っていたスタッフナースのこれまでの努力を否定したりプライドを傷つけたりしないように注意しながら不必要な体重測定の中止の必要性を伝えていた。

以下、これらの特性により推進される変革プロセスを記述していく。

**【病棟全体を把握することで問題を特定する】**

看護師長は、新しい病棟への着任や所属病棟での昇進を契機とし、病棟の問題を見つけていた。病棟の状況を理解するために、看護師長はさまざまな情報源から病棟についての情報を収集していた。さらに、看護師長はスタッフナースとのコミュニケーションを通じて、多くの情報を集める努力をしていた。看護師長は、ミクロとマクロの両方の視点を持つことによって把握した病棟の現状と看護師長の信念、病院のミッションなどの外的基準を比較することで、問題を特定していた。

**【優先順位と解決策を決定する】**

看護師長は病棟の問題について、緊急性、および患者やスタッフに与える影響から優先順位を決めていた。そして、看護師長は、看護師長の経験や先輩看護師からの意見を参考に解決策を選択していた。

**【受け入れ可能な方法で解決策を提案する】**

看護師長は、スタッフナースに拒否されず変革を実現するために、慎重に解決策の提案を行っていた。具体的には、看護師長は、影響力のあるスタッフを巻き込むことで、抵抗を回避していた。さらに、看護師長はスタッフナースの変革によって生じる負担に共感する必要性を認識し、達成可能なゴールの設定や問題や解決策の提案のタイミングをはかっていた。

**【今後に向けて変革の結果を評価する】**

看護師長はデータやスタッフナースの看護ケアに対する態度、病棟の雰囲気の情報をもとに変革の結果を評価していた。ある看護師長はスタッフナースに対してポジティブな結果をフィードバックし、変革によってもたらされるスタッフナースへの負担に労をねぎらっていた。看護師長は、このような共感が変革によってもたらされるスタッフナースの負担を軽減するのではないかと考えていた。

**Ⅳ．考察および看護実践への示唆**

本研究は、日本の看護管理実践に則した看護師長が病棟を変革するプロセスと、変革を促進する看護師長の 4 つの特性を明らかにした。変革を促進する看護師長の特性の中でも、特に日本の看護師長に特徴的と思われた“スタッフナースに対する共感性を持つ”について論ずる。

先行研究では、看護師長の共感性が変革に対する他者（部下やチームメンバー）のモチベーションの向上に効果があることを示されているが、本研究結果である看護師長の“スタッフナースに対する共感性を持つ”ことがスタッフナースの変革に対する抵抗を回避することに効果的であったという点は、今回新たに明らかとなった知見である。本研究結果は、看護師長の他者への共感性の効果に新しい知見を加えるものであり、日本の看護の臨床の特徴を反映していると考えられる。海外の看護師長と比較すると、日本の看護師長に与えられている権限は限られているため、“スタッフナースに対する共感性を持つ”ことが限られた権限の中で行えるスタッフナースの変革への抵抗を回避する戦略の一つであったと考えられる。さらに、他者への共感性の重視は、日本文化の特徴である調和を重んじることが影響した可能性が考えられる。

今後は、本研究の結果に基づき看護師長の 4 つの特性を向上させるような教育・研修の開発を行う必要がある。そして、病院管理者は看護師長が 4 つの特性を向上するための研修に参加できるように環境を整える必要がある。

**Ⅴ．結論**

本研究は、日本の看護師長の視点から病棟を変革するプロセスと病棟の変革を促進する看護師長の特性を明らかにした。病院管理者は変革を促進する 4 つの能力を向上させるような教育・研修を看護師長に提供していく必要がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5567　号 | 小玉　淑巨 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　緒方　泰子<br>副査　大久保功子　　深堀　浩樹 | |

（論文審査の要旨）

患者の高齢化による看護ケアニーズの増加、在院日数の短縮、コスト削減などの影響を受けながらも、看護の質の向上と効率化が求められている中、看護師長は、病棟管理者として看護ケアの改善や職場環境を変革していく責任を担っている。しかしながら、看護師長が病棟の問題を見つけ変革していくプロセスやそれを促進する要素は明らかになっていない。そこで、申請者は、日本の看護師長が病棟を変革したプロセスを明らかにすることを目的として研究に取り組んだ。

対象は、大学病院・リハビリテーション病院・急性期病院といった特性や規模の異なる病院の看護師長 23 名、師長と同じ病棟のスタッフナース 17 名である。半構造化面接を行って逐語録を作成し、意味のまとまりごとに切片化し、内容を表すコードの作成・類似性に元づくカテゴリー化を経て、演繹的・帰納的思考を繰り返してカテゴリー間の関連性を比較検討し、本質を最もよく説明する抽象度の高いカテゴリーを同定しストーリーラインを作成した。師長のインタビューデータを主に分析し、スタッフナースのデータは、病棟の状況をより深く理解するために補足的に使用した。

対象となった看護師長は、30～60 歳代、看護師長経験は 0.5～25 年であった。スタッフナース 17 名は、副看護師長 9 名、看護師 8 名であり、年齢は 20～40 歳代、平均看護師経験 13.4 年であった。逐語録の質的分析により、看護師長による変革のプロセスと変革を促進する看護師長の特性が明らかになった。変革のプロセスは「病棟全体を把握することで問題を特定する」「優先順位と解決策を決定する」「受け入れ可能な方法で解決策を提案する」「今後に向けて変革の結果を評価する」の 4 段階であった。変革を促進するための看護師長の特性は「ミクロとマクロの両方の視点を持つ」「信念と外的基準を重視する」「先見性を持つ」「スタッフナースに対する共感性を持つ」の 4 つであった。

本研究で明らかになった看護師長による変革プロセスは先行研究と矛盾がなく、4 つの特性のうち、特に共感性がもたらす効果として、先行研究で示されていた「モチベーションの向上への効果」に加え「スタッフナースの変革に対する抵抗を回避することに効果的であった」という点は、本研究によって得られた新たな知見である。申請者は、今後、本研究結果にもとづき、看護師長の 4 つの特性を向上させるような教育・研修の開発が求められる、と考察している。

論文審査では、明快なプレゼンテーションがなされ、質的研究の基本的知識、分析方法や要改善点、今後の発展等に関する審査員からの質問に適切に解答された。審査会後、本研究の特徴が十分反映されるよう要旨の修正と、今後の研究者としてのコミュニケーションのあり方に関する追加レポートを課したが、申請者は何れにも適切に対応した。審査全体を通じ、申請者がこの分野における十分な知識・実践を有することが確認された。

以上より、申請者は、博士（看護学）の学位授与に値すると判定した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 岩﨑　孝子 |
| 論文審査担当者 | 主査　佐々木吉子<br>副査　緒方　泰子　　田中　真琴 |
| 論　文　題　目 | A purposeful yet nonimposing approach: How Japanese homecare nurses establish relationships with older clients and their families |

（論文内容の要旨）

＜結言＞

要介護高齢者の介護は他国と同様に日本においても家族が多くの役割を担っている。介護負担とそれに関連したストレスは家族の心身の健康にネガティブな影響を及ぼし、要介護高齢者家族への支援は喫緊の課題として取り組まれている。

家族支援のためには、看護師-家族関係を理解することが重要である。関係性構築は看護の基盤であり、ポジティブな関係は患者・家族、看護師の双方に恩恵をもたらす事が明らかにされている。関係性構築についての知見は、国内外とも病院・施設での看護師 - 患者関係についての研究がほとんどであり、在宅での家族との関係性構築の研究は少ない。プライベートな空間であり、家族の生活の場である家という文脈の中の関係性構築は複雑である事が指摘されており、病院とは違った関係性構築の方略が必要とされる。またどのように看護師が利用者・家族と相互作用するかは文化によって異なる。しかし、実際にどのように日本の訪問看護師が家という文脈の中で利用者を含む複数の家族成員と関係性を構築しているかその構造は明らかにされていない。個々の訪問看護師が経験的に実施している家族との関係性構築のプロセスを集約・構造化し可視化していくことは、訪問看護における関係性構築のスキルを向上し質の高い看護実践を提供する上で、貴重な示唆をもたらすと考える。

＜目的＞

訪問看護師による在宅要介護高齢者の家族への看護実践のうち、本研究では訪問看護師と在宅要介護者・家族との関係性構築に焦点をあて、その構造とプロセスを明らかにする事を目的とする。

＜方法＞

・研究デザイン：対象となる現象の構造とプロセスを理解し、現象に根差した理論化をする事を目的としていることから、グラウンデッドセオリーアプローチ(Corbin & Strauss 2008)を用いた。

・研究参加者：3 年以上の訪問看護の経験をもつ 23 名の訪問看護師を対象とした。

・データ収集：2012 年 8 月～2014 年 3 月に半構造化面接を用いてデータ収集を行った。インタビュー内容は、在宅要介護高齢者の家族支援でケアによって良い結果が得られた事例について、経過に沿ってケア実践内容を自由に語ってもらった。
・分析：継続比較法を用いて分析を行った。インタビュー内容を逐語録とし熟読、データを意味内容に基づいてコード化した。コードの類似性と相違性を比較しながらカテゴリー化し、カテゴリーの特性と次元を基にカテゴリー間の関係性を検証した。データに立ち戻りながら、中心となる現象としてコアカテゴリーを統合した。

＜結果＞

概要

訪問看護師による利用者を含む家族との関係構築へのアプローチは『押しつけない意図的な歩みより』と概念化された。訪問看護師は【家族との注意深い距離を保つ】、【家族の生活を脅かさない】ことを基盤として、【心地よい隣人となる】、【看護師の能力としての信頼を得る】ことをお互い循環させながら、それぞれの家族成員とできるところから関係性を培っていた。【心地よい隣人となる】【看護師の能力としての信頼を得る】は、利用者や家族の状態によってどちらを先に行うか選択、あるいは同時に行われていた。これらのプロセスを循環させる事で、利用者・家族を巻き込みながら、関係性および今後に続く看護ケアを発展させていった。

家族との注意深い距離を保つ

訪問看護師と利用者・家族が出会った時は、お互い未知の存在である。家族は家という空間に外部から入る訪問看護師は生活の中の異物ともなり得る。訪問看護師の受け入れには、訪問看護のニーズの高さや過去のサービス利用に対する印象、利用者や家族の性格などが影響した。また家族成員の中には心理的距離が遠い方がよいと感じている利用者・家族もいた。同時に、利用者・家族との心理的距離が近すぎると訪問看護師として客観的に全体をみる事を阻んだり、家族が依存的になり家族本来の力を奪う事にもつながりかねない事を訪問看護師は予測していた。訪問看護師と利用者・家族との関係構築には、常に訪問看護師自身がそれぞれの家族成員にとってほどよい心理的距離にいるのか、家族内のどの立ち位置にいるのがよいのかを見極める事が必要とされた。

家族の生活を脅かさない

もう一つの関係性構築における基盤は、訪問看護師自体が利用者・家族の生活を脅かさないことであった。訪問看護師は＜押しつけない＞、＜利用者・家族を否定しない＞、＜踏み込んではいけない領域があることをわきまえる＞、＜訪問看護が何をするかを定義する＞ことを行い、訪問看護師が生活を脅かさない大丈夫な存在であることを利用者・家族に認識してもらえるように意図的にアプローチしていた。

これらの二つのアプローチは利用者・家族と関わりをもつ間、常に継続して行われた。

心地よい隣人となる

利用者・家族を知る事は、限られた訪問時間の中で彼らの意向を叶えるために必要とされた。そのため、訪問看護師は利用者・家族に心地よい隣人と認識してもらうための方略を展開してい

った。まず訪問看護師は利用者・家族の心地よさを感じる＜エントリーポイントを見極め＞ていた。そのエントリーポイントから＜利用者・家族成員の心地よさをつくる＞ことを行っていく中で、＜家族の生活にいれてもらう＞事が可能となり、利用者・家族が思いを自ら開示する事に繋がっていた。訪問看護師は語られた利用者・家族の生活・歴史の中で彼らの強みを認識したり、利用者・家族の本音が開かれることで、健康問題・介護に関する困り事や不安、その源になっているもの、家族成員を気遣い言えていなかった意向など、より深く利用者・家族を知ることができた。

看護師の能力としての信頼を得る

訪問看護師と利用者・家族との関係性構築には【心地よい隣人となる】のみでは不十分で、【看護師の能力としての信頼を得る】事が必要不可欠であった。利用者・家族が利用者・家族の開示のあった事柄に対して、看護師の価値観を押し付けずに＜一緒に考え＞、その結論に基づいて、＜質の高いケアの提供＞を積み上げていく。その効果を利用者・家族が感じた時、＜看護師としての能力の信頼を得る＞事ができた。これらのケアプロセスを通して、利用者・家族との心理的距離を縮めていくことに繋がっていた。

＜考案＞

本研究は、家という文脈の中で訪問看護師がどのように高齢者と家族との関係性構築しているのか、その構造とプロセスを現した。これらは熟練訪問看護師の経験に基づく知識体系の集約であり、実践への使用可能性は高いと考える。

関係性構築の基盤のうち【家族との注意深い距離を保つ】は、訪問看護師たちが関係性構築の方略を選ぶために、それぞれの家族員の心理的距離感を注意深く感知している事を示した。この心理的距離感の注意深い正確なアセスメントは、複数の家族成員が関連し合っている家で、関係性構築の手段を計画し、実施、評価していくために必須であることを示した。もうひとつの基盤は【家族の生活を脅かさない】事を利用者・家族に示し、関係性における安全の感覚を知覚してもらう事であった。病院や施設では家族を快く迎え入れる事が最初のアプローチであるが、医療の文脈を家に持ち込む在宅においては、訪問看護師が多様な家族の歴史や文化に対する脅威とならない存在である事を示す重要性を結果は示した。

これらを基盤として、訪問看護師は利用者・家族と近づくために二つのアプローチを行っていた。そのうちの一つである【心地よい隣人となる】事によって、訪問看護師は人として家族の領域に受け入れてもらう事ができた。日本人の相互理解は文脈に依存し、また利用者・家族は彼らの感情や問題をしばしば言語化するのをためらう傾向がある。本研究は心地よさをつくる事が利用者・家族の自己開示を促すひとつの効果的な方法である事を示した。 信頼が関係性構築の主要な要素である事は過去の知見と一致する。ひとつひとつの質の高いケアが【看護師の能力としての信頼を得る】事につながり、関係性を促進する事を本研究は強調した。それは心理的距離が遠いのを好む利用者・家族に対しても有効な方略となっていた。関係性構築は質の高い看護の基礎となると共に、よい看護提供は関係性構築の基礎となる循環構造である事を示唆した。

本研究は利用者を含めた複数の家族成員と看護師の関係構築について明らかにした。訪問看護師は直接関われる家族成員からポジティブな関係を築く事と、良い看護を提供する事によって、

他の家族成員の関係性にもポジティブな影響を与えていた。心理的距離が遠い家族成員や会えない家族成員にも気にかけているサインを送り、関係性構築に向けたフィールドを整えていた。日本ではグループに方向づけられた感覚が文化的に強調されており、家族全体を踏まえた関係性構築の視点が重要である。個人主義が尊重される国々でも、看護師と家族間の関わりはケアプロセスの中のすべての参加者によって影響され、家族をユニットとして捉える重要性は他の国と同様であり、これらのアプローチは日本以外の国でも適応可能と考える。

＜結論＞

訪問看護師による利用者・家族との関係性構築は『押しつけない意図的な歩みより』と概念化され、【家族との注意深い距離を保つ】【家族の生活を脅かさない】を基盤とし、【心地よい隣人となる】【看護師としての能力の信頼を得る】を循環させながら、それぞれの家族成員と関係性を構築し、利用者・家族の生活に涵養していくプロセスであった。関係性構築には、家族の文化への安全の保障と、質の高い看護提供が関係性構築に重要である事が示唆された。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5568　号 | 岩﨑　孝子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　佐々木吉子<br>副　査　田中　真琴　　緒方　泰子 | |

（論文審査の要旨）

提出された論文「A purposeful yet nonimposing approach: How Japanese homecare nurses establish relationships with older clients and their families（押しつけない意図的な歩みより：日本の訪問看護師は要介護高齢者・家族とどのように関係性を構築しているか）」について、博士の学位論文に相応しいかの審査を行った。

日本において、超高齢社会が現実となった今、国家施策として施設内医療・介護から在宅医療・介護への移行が進められている。在宅における要介護高齢者の介護は家族が多くの役割を担っており、介護負担とそれに関連したストレスは、家族の心身の健康にネガティブな影響を及ぼすことから、要介護高齢者家族への支援は喫緊の課題となっている。訪問看護師はこのような要介護高齢者やその家族を直接的に支援する重要な役割を担うが、効果的な支援の提供には、看護師と要介護高齢者・家族との間での関係性構築が基盤となる。しかし、施設とは異なり、看護師が利用者の生活の場であるプライベート空間において関係性を構築することにおいては複雑さが指摘されており、その構築のためのスキルは訪問看護師にとって重要でありながらも、これまでその構造は示されていなかった。申請者は、個々の訪問看護師が経験的に実施している家族との関係性構築のプロセスを集約・構造化し可視化していくことで、訪問看護における関係性構築のスキルを向上し質の高い看護実践を提供する上で、貴重な示唆をもたらすと考えて、本研究に取り組んだ。

質的記述的研究デザインで、グラウンデッドセオリーアプローチ(Corbin & Strauss,2008)により分析が行われた。対象者は 3 年以上の訪問看護の経験をもつ看護師で、2012 年 8 月～2014 年 3 月に半構造化面接を用いてデータ収集が行われた。インタビュー内容は、在宅要介護高齢者の家族支援でケアによって良い結果が得られた事例について、経過に沿ってケア実践内容についての語りが引き出された。インタビュー・データは、コード化を行い、継続比較法によりコードの類似性と相違性を比較しながらカテゴリー化し、カテゴリーの特性と次元を基にカテゴリー間の関係性が検証された。

理論的飽和に達するまで、23 名の参加者に対してサンプリングとインタビューが実施された。データに立ち戻りながら、訪問看護師による利用者を含む家族との関係構築へのアプローチの中心となる現象としてコアカテゴリー；『押しつけない意図的な歩みより』が概念化された。この包括的なコアカテゴリーのもと、訪問看護師は【家族との注意深い距離を保つ】、【家族の生活を脅かさない】ことを基盤として、【心地よい隣人となる】、【看護師の能力としての信頼を得る】ことをお互い循環させながら、それぞれの家族成員とできるところから関係性

を培っていた。また、【心地よい隣人となる】【看護師の能力としての信頼を得る】は、利用者や家族の状態によってどちらを先に行うか選択、あるいは同時に行われていた。これらのプロセスを循環させる事で、利用者・家族を巻き込みながら、看護師は関係性および今後に続く看護ケアを発展させていったことが示された。

考察として、病院や施設では家族を快く迎え入れる事が最初のアプローチであるが、医療の文脈を家に持ち込む在宅においては、訪問看護師が多様な家族の歴史や文化に対する脅威とならない存在である事を示す重要性が結果から示されたこと、また関係性構築は質の高い看護の基礎となると共に、よい看護提供は関係性構築の基礎となる循環構造である事等が、結果に基づいて述べられた。また生成された理論モデルの在宅看護実践における使用可能性や、日本以外の国での適応可能性についても示された。

口頭試問においては、申請者が本研究に取り組むことに至った動機や、本研究の新規性、真実性の確保のために具体的に実施したことなどについて質疑応答がなされたが、いずれも真摯で的確な応答がなされた。

以上より、審査員３名が、当該論文は博士(看護学)の学位論文として相応しいと判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 申　于定 |
| 論文審査担当者 | 主査　本田　彰子<br>副査　石川　欽也　　田中　真琴 |
| 論　文　題　目 | Intention Formation Process for the Use of Tracheostomy and Invasive Ventilation In Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis |

（論文内容の要旨）

＜背景＞

筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis, 以下 ALS）は治療法のない神経変性疾患である。ALS 患者は全身の筋力低下を主症状とする不可逆的な進行により、発症から２－５年で主に呼吸不全により死に至る。ALS 患者の呼吸障害の改善として、気管切開を伴う人工呼吸器(tracheostomy and invasive ventilation , 以下 TIV)が導入される。この TIV の使用は ALS 患者の予後を改善し、患者の延命を可能にする。

一方、ALS 患者の TIV 装着率は、世界的に 0.5－30％程度であり、日本人を含む多くの患者が TIV を装着しない現状である。ALS 患者の TIV 装着に影響を与える要因は、国の保険医療制度や宗教観、文化の違いがあるといわれている。患者は、家族の介護負担に対する懸念、症状進行への恐怖をもっており、TIV 装着後の離脱が不可能な現状が患者の TIV 装着に対する意思決定に影響を与えている。

ALS 患者は TIV 装着の有無に対して考え、いずれかはどちらかを決定する必要がある。ALS 患者の TIV 装着に対する意思決定は、最終決定、つまり装着又は非装着のみに重点を置かれる傾向にある。一方、ALS 患者の TIV 装着に関する意思は、時間経過とともに変化しうることも言われている。しかし、病気が進行する過程において、TIV に対する決定がいつ形成され、変化するのかは知られていない。さらに、このような意向形成に影響を与える要因についても不明である。これら知見は ALS 患者の TIV に対する意思決定に対して、医療従事者が支援を行ううえで重要である。本研究では、ALS 患者の TIV 装着に関する意向形成の過程と変化、そして意向形成に影響を与える要因について明らかにすることを目的とした。

＜方法＞

<u>研究デザイン</u>

多角的な視点を用いることで詳細に分析を行う Yin による case study research を用いた。

<u>対象と環境</u>

2016 年 2 月から 2017 年 1 月まで追跡調査を行った。首都圏の 2 箇所の調査施設にて、ALS 患者特有の身体機能低下度測定尺度(ALSFRS-R)を用い、多様な患者を募集するために合目的 sampling

を採用した。選定基準として、成人患者、改訂 EL Escorial 基準により probable ALS 以上と診断された患者、TIV 未使用患者、著明な認知障害や精神疾患がないことを設けた。

手順

選定基準に従って、施設の入院中または外来通院中の患者を募集した。研究期間中における参加者の対象施設への外来受診または入院時期に合わせ、調査を実施した。研究期間中に TIV 装着が行われた場合、調査は終了とした。面接では、研究目的に合わせ ALS の診断から現在までの経験と TIV 装着に関する考えを内容としたインタビューガイドを用いた。診療録調査では参加者の基本所属性と現病歴について収集した。参加観察では、参加者の面接内容と治療経過の理解のため、参加者の外来受診時や入院中の医師や看護師の治療経過に関する説明する場面を観察した。

データ分析

参加者の TIV 装着に関する意向の形成過程を明らかにする目的から時系列分析を行った。面接データを個別と全体で分析し、面接データの分析結果と診療録データの分析結果を統合した。面接内容の個別分析では、参加者個々人の逐語録から発症から現在までの TIV 装着に関する意向の変化とその理由、思い、症状に焦点を当て、簡潔な文章で表現するコード化を行った。次に全体分析では、個別分析の結果をもとに、全参加者のコードを同一内容ごとに分類し、サブカテゴリーを生成した。診療録分析は個別分析と同時に行った。個別分析の内容に準じて、全参加者の ALSFRS-R、症状の経過、医師の TIV に関する意向の変化を診療録より確認した。全体分析で生成したサブカテゴリーを診療録情報分析の結果と合わせ、共通するパターンにより並べ替え、カテゴリーとして命名した。共通するカテゴリーを側面として定義した。そして、面接内容、診療録内容の分析結果をもとに側面、カテゴリー間の関係性を図式化した。

＜結果＞

研究参加者の背景

研究参加者 14 名の背景は表 1（学位論文参照）のとおりである。調査期間中 TIV を装着した参加者はいなかった。

TIV 装着に関する意向

TIV 装着に関する意向は 6 つのカテゴリー　**A：装着するかどうか今はわからない、B:装着するかどうか考えたくない、C：装着したいが、するとは決めきれない、D:装着したくないが、しないとは決めきらない、E:装着しないと決めている、F:装着すると決めている、**で構成され、症状の進行とともに内容が変化していた。

TIV 装着に関する意向に影響する要因

患者の TIV 装着に関する意向は、症状進行を自覚する経験と、TIV 装着後の生活を吟味する事が影響していた。

**A:症状進行の経験**

症状が進行する経験は 4 つのサブカテゴリー(学位論文表 2)で構成された。参加者は、運動機能低下・嚥下機能低下・呼吸機能低下、呼吸機能の限界から症状の進行を自覚していた。 この参加者の症状が進行する経験には、進行の速度が速いと感じているパターンと、遅いと感じているパターンがあった。

B:TIV 装着後の生活の吟味

参加者の TIV 装着に関する意向には、TIV 装着後も生活できる保障があるかどうかを考える、吟味が影響していた。それは 5 つのサブカテゴリー(学位論文表 3)で構成された。その内容として、TIV 下でのコミュニケーション方法、TIV 後の専門職による支援の程度、家族の多大な負担、身体的苦痛の緩和、TIV 後の生きる価値に関するものがあった。参加者の TIV 後の生活の吟味に規則性はなく、その考えは繰り返し行われていた。人工呼吸器装着後の生活を吟味する結果は、納得していないパターンと納得するパターンが存在していた。

診療録調査

診療録調査では、参加者全員の症状進行の共通性をもって分析を行った。診断時に参加者の症状は異なっていたが、運動機能低下、嚥下機能低下、呼吸機能低下、呼吸機能の限界の順番は同じであった。

TIV 装着/非装着決定までの意向形成過程と影響要因の構造化

面接調査と診療録調査の結果を統合した結果、TIV 装着に関する意向は、症状進行の経験と TIV 装着後の生活の吟味により形成される過程があった。症状進行の経験の順番と TIV 装着に対する意向の変化、TIV 装着後の生活に関する吟味の関係性を図式化（学位論文図 1）した。

診断時は、TIV を装着するかどうかわからない場合が参加者 14 名中 11 名であり、3 名が装着したくないが、しないと決めきれない意向であった。参加者のこれら TIV 装着に関する意向は、症状の進行（運動機能の低下、嚥下機能の低下、呼吸機能の低下、呼吸機能の限界）とともに変化していた。最終的に、参加者 3 名の TIV 装着/非装着の決定は、症状進行を経験する過程と TIV 装着後の生活に対する吟味として納得を伴う結果が得られた場合のみ行われた。その時期は、呼吸機能の限界を経験したときのみであった。診断時からこの決定の時期まで意向が一度も変化しなかった参加者はいなかった。

＜考察＞

本研究の結果より、ALS 患者の TIV 装着に関する意向は多様であり、装着／非装着の決定は、症状進行の経験と、TIV 装着後の生活の吟味により納得を伴う過程の結果であることがわかった。

本研究で示した 6 種類の TIV 装着の意向は、決定、未決定に限らない ALS 患者の TIV 装着に関する考えの多様性を示す内容だと考えた。この意向は、症状の進行とともに変化しており、ALS 患者の TIV 装着に関する意向は一定ではなく、TIV 装着への迷いや葛藤の過程と同様、変遷するものといえる。そして、症状進行の経験により意向が形成されていた結果から、身体機能に変化がある時が TIV 装着を考えるきっかけとなり、ALS 患者は、現時点の身体機能に着目し症状が進行する度に繰り返し意向を確認していると考えられた。さらに、意向形成に影響していた TIV 装着後の 5 つの生活の吟味の内容は、ALS 患者自身が守り続けたい尊厳の内容であり、生活の保障を判断する材料であったと考えた。最後に、患者の TIV 装着に関する決定には、TIV 装着後の生活の吟味の結果としての納得が必要であった結果からも、ALS 患者本人が家族や医療者との話し合いを行うことの重要性を強調するともいえよう。

本研究を、臨床における ALS 患者の TIV 装着に関する意思決定支援について次のように考える。研究結果の身体機能の低下項目を指標とした診断時からの定期的な観察により、ALS 患者の TIV

装着に関する意向の形成/変化時期を判断できる。身体機能低下時の意向の内容を本研究の多様な意向から参照することができる。ALS 患者が TIV 装着に関して疑問に思う吟味内容を、情報提供の基本的な項目として設けることができると考える。

ALS 患者が、TIV 装着に関して納得した自己決定のためには、患者本人の症状進行の理解過程が必須である。また、TIV 装着が自分の人生にとってどのような意味や価値があるか、患者自身が考えられるよう、早期からの患者教育が必要とされる。

本研究にはいくつか限界があるが、10 ヵ月間多様な状況の患者に対して、多くの面接調査を行い、多様なデータを収集した点において意義がある。ALS 患者の人工呼吸器装着に関する意思決定への効果的な支援の提供のためには、ALS 患者の人工呼吸器装着に関する意思決定の過程において、医療従事者や家族を含めたさらなる研究が必要とされる。

＜結論＞

ALS 患者の TIV 装着に関する意向は、多様であり、変化するものであった。そして、ALS 患者の TIV 装着/非装着の納得する決定には、症状が進行する経験と、TIV 装着後の生活に関する吟味を行う過程が必要であった。ALS 患者の TIV 装着に関する意思決定支援として、臨床家は継続的かつ定期的な症状進行の評価と患者本人に合わせた早期からの患者教育を行う必要がある。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5569　号 | 申　于定 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　本田 彰子<br>副　査　　田中 真琴　石川 欽也 | |

（論文審査の要旨）

申請者は博士前期課程で、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の病初期の診断・受療の時期の患者体験についてインタビューデータをもとに質的に分析、構造化する研究に取り組み、疾患受容とともに生きることに対する選択を迫られる ALS 患者の体験を明らかにした。そして、さらに進行した ALS 患者においては、人工呼吸器装着の選択が求められる厳しい状況での意思決定がなされていることに注目し、今回の研究に発展させている。

本論文は、ALS 患者の気管切開を伴う人工呼吸器（TIV）装着に関する意向形成の過程とその変化、加えて意向形成に影響を与える要因について明らかにすることを目的としたもので、TIV 未使用の ALS 患者に診断から現在までの経験、及び TIV 装着に関する思い考えを面接により調べたものである。身体機能について評価尺度を用いて適切に評価して調査対象者とし、また、呼吸状態を考慮しての筆談や文字盤を使用したり、同席家族の援助も受けるといった面接であったが、対象者の十分な理解が得られ、14 名より研究参加の協力が得られた。対象者に対して平均 3.5 回、計 49 回の面接を実施し、その語られた内容を分析し、TIV 装着に関する意向のプロセスを示しており、6 つの意向の様相があること、その意向には、病状進行の経験と装着後の生活の吟味が影響していることを示した。6 つの意向の様相は【装着するかどうか今はわからない】【装着するかどうか考えたくない】【装着したいが、するとは決められない】【装着したくないが、しないとは決められない】【装着しないと決めている】【装着すると決めている】があり、意向の変化には意向形成にはいくつかのパターンがあることも示された。また、病気進行は意向形成の重要な要因、きっかけであり、その際の医療者のかかわりが重要であることも示された。

審査に先立って、英文誌に公表された論文、論文の要旨等の提示があり、審査においては、具体的な研究経過、及び結果、考察のプレゼンテーションがあった。その後、ALS 患者の TIV 装着の課題は重要で医療従事者のみならず、多方面から取り組まれていることから、先行研究等との比較の必要性の意見があった。次いで、面接調査による対象者の意思決定への影響、すなわち研究者の立場についての確認、また、意向の様相及び変化のパターンを示したことは独創的であるがこれをどのように意思決定に活かすか、【考えたくない】という意向の様相をどう解釈するか、「納得」をどのように定義し見極めるのか、意向の様相をどのように支援に繋げるか等について質疑応答があった。質問には明解、適切に応答することができた。

先行研究等との比較に関する課題が出されたが、文献レビュー論文を提示し、本研究テーマに係る社会的、及び専門領域における主要な意見を既に概観されていることがわかり、本論文の学術的な位置づけを固めるものとなった。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 瀧口　千枝 |
| 論文審査担当者 | 主査　緒方　泰子<br>副査　佐々木　吉子　　田中　真琴 |
| 論　文　題　目 | Development of the Nurses' Care Coordination Competency Scale for mechanically ventilated patients in critical care settings in Japan: Part 2　Validation of the scale |

（論文内容の要旨）

**＜結言＞**

クリティカルケア領域の人工呼吸器装着患者に対する多専門職による包括管理の有効性が明らかになり、多くの施設で多職種チームアプローチが実践されている。しかしながら、しばしば、実際提供されているケアと望ましいケアとの間にはギャップが生じており、その要因の一つとして、多職種チームケア活動のプロセス的問題が指摘されている。

効果的な多職種チームケア提供のためには、患者のニーズと優先事項に焦点を当てたチームケア活動の組織化が課題となる。care coordination はこの課題の解決策の一つとされている。特に看護師は、ベッドサイドを拠点に継続して患者に関わることから、患者のニーズと行われているケアとの間のギャップを敏感に捉えるためのベストポジションにいること、日常的に専門科を超えて多様な専門職種と協働し組織的 context を理解していることから、care coordinator の担い手として期待されている。

Intensive Care Unit（ICU）の人工呼吸器装着患者管理に関わる看護師は、適切なケア提供を目指し、患者・家族、関連職種に働きかけて care coordination 機能を発揮している。先行研究では、看護師の care coordination には、専門職種間連携の促進、入院・人工呼吸器装着期間の短縮、患者満足度向上などのアウトカムが報告されており、看護師の care coordination の行動特性、すなわち competency を査定し向上させていくことは課題といえる。

しかしながら、看護師の care coordination competency の評価基準は国内外ともに存在しない。そこでクリティカルケア領域の人工呼吸器装着患者管理における看護師の Care Coordination Competency を評価できる尺度“Nurses' care coordination competency scale (NCCCS)”の原案を開発した（参考論文１）。本研究は、その信頼性・妥当性の検証を目的とした。

**＜対象と方法＞**

<u>研究参加者</u>

日本看護協会ホームページに公開（2015 年 9 月時点）の急性重症患者看護専門看護師（以下、CNS）が所属、もしくは、集中ケア認定看護師（以下、CN）が所属しかつ病床数 400 以上の集中治療室（以下、ICU）387 ユニットのうち研究参加に同意した 73 ユニットを対象ユニットとし

た。対象ユニットで日常的に人工呼吸器装着患者管理に携わる看護師 2189 名に NCCCS 原案と Performance Maintenance Survey（以下、PMS）、対象看護師と共に人工呼吸器装着患者管理に携わる看護師以外の職種（以下、他職種）1030 名に、Japanese version of the Relational Coordination Scale（以下、J-RCS）への回答を依頼した。

妥当性検証

NCCCS の妥当性検証のために 4 つの仮説を検証した。

構成概念妥当性検証

＜仮説１＞

**クリティカルケア領域の人工呼吸器装着患者管理における Nurse's Care Coordination Competency は原案の 6 因子構造示す。**

探索的因子分析（プロマックス回転を用いた最尤法）により因子数と項目を決定後、確認的因子分析として、すべての因子間に共分散を仮定したモデルでの共分散構造分析により適合性を確認した。

既知グループ妥当性検証

＜仮説２＞

**care coordination には、患者の全体像把握や他職種との交渉など熟練したスキルが求められるため、属性（経験年数・認証の有無・職位）により NCCCS 得点に差がみられる。**

看護師の属性による NCCCS 得点の有意差を検定した。

併存妥当性検証

＜仮説３＞

**ICU 看護師は患者に合った適切な人工呼吸管理を導くために多職種チーム内でリーダーシップをとっているため、care coordination competency の程度は、多職種チーム活動におけるリーダーシップの程度と正の相関を示す。**

NCCCS 得点と PMS 得点の相関を分析した。

＜仮説４＞

**care coordination competency の高い看護師で構成される看護チームは、ともに人工呼吸管理に携わる他職種からみて意思疎通と関係性が良好である。**

ユニットごとの NCCCS 得点と他職種からみた看護チームに対する J-RCS 得点の相関を分析した。

信頼性検証

各因子のクロンバックα係数および I-T 相関係数より、内的一貫性を分析した。

＜結果＞

看護師 70 ユニット 887 名（40.5%）、他職種回は 53 ユニットの全 7 職種 424 名（41.2%）から有効回答を得た。

仮説１

探索的因子分析では、NCCCS 原案の 6 因子のうち【リソースの充填】と【状況に適した効果的な交渉】は【チームの凝集性の促進】に吸収された。最終的に 4 因子 22 項目、【チームの凝集性の促進】（7 項目）、【care coordination ニーズの把握】（5 項目）、【情報の集約と分配】（6 項目）、【care vision の考案と明示】（4 項目）を NCCCS とした。因子間相関は $\rho$=0.611~0.741 だった。確認的因子分析では、適合性指標 comparative fit index : CFI＝0.942、root mean square error of approximation : RMSEA＝0.062 と一定の適合性が確認された。

仮説２

NCCCS 得点は当該 ICU 経験年数と弱い正の相関（$\rho$=0.313）を示し、5 年未満 or 以上で有意差を認めた（p<0.01）。5 年以上のみ（n=358）の分析では、NCCCS 得点は職位・認証の有無を弁別し、職位・認証のない者（n=224）に限定すると、ICU 経験年数と NCCCS 得点に相関はなかった。

仮説３

NCCCS と PMS の得点は正の相関（$\rho$=0.440-0.621）を認めた。

仮説４

ユニットごと（n=53）の J-RCS と NCCCS の得点には相関を認めなかった。質問紙の自由記載欄に「看護師のアプローチは ICU 専従職員に集中する」という意見（n=15）があったため、ユニットを ICU 専従職員の有無で 2 郡に分けて再分析すると、専従無ユニット（n=20）の J-RCS 得点は【care coordination ニーズの把握】と正の相関（$\rho$=0.466）、専従有ユニット（n=33）の非専従職員の J-RCS 得点は NCCCS 総得点（$\rho$=－0.406）および【care coordination ニーズの把握】（$\rho$=－0.403）、【care vision の考案と明示】（$\rho$=－0.406）と負の相関を認めた。また、非専従職員の J-RCS 得点は専従職員の J-RCS 得点より低かった（p=0.005）。

内的一貫性

各因子のクロンバック $\alpha$ 係数は、因子 I から順に、0.890, 0.848, 0.883, 0.812 で、NCCCS 全体で 0.947 であった。

＜考察＞

NCCCS の信頼性・妥当性と各因子

NCCCS の信頼性・妥当性を検証した。因子分析により原案の 2 因子が【チームの凝集性を促進する力】に吸収されたが、吸収された 2 因子は【チームの凝集性を促進する力】の下位概念といえるため本尺度は 4 因子構造が妥当と判断した。4 因子は高い相関を示しつつ、それぞれ別々の既知グループを明瞭に弁別したことから、NCCCS は内的一貫性と弁別性を兼ね備えていると

いえる。

第 1 因子【チームの凝集性の促進】は、4 因子中最も得点が低く、職位・認証の有無を弁別したことから相対的に難易度の高い competency といえる。ICU では多職種カンファレンスの実施が望ましいケアを具現化する特徴があり、この因子はこうした領域の特殊性を反映した competency であるといえる。

第 2 因子【care coordination needs の把握】は、呼吸療法士を弁別した。医療依存度が高い ICU 人工呼吸器装着患者の care coordination needs の把握には、現状把握できるだけの病態に関する知識とアセスメントスキルの基盤が求められるといえる。

第 3 因子【情報の集約と分配】は、職位の有無を弁別した。ケア活動の組織化は、ケアの違った側面に責任を負う者同士の情報交換によって管理され、情報の連続性は care coordination の鍵となる。職位をもつ者は、他職種との情報交換窓口としての役割を担っており、このような役割認識が care coordination competency の程度に影響することが示唆される。

第 4 因子【care vision の考案と明示】は認証の有無を弁別した。多職種チームの中で専門性の高い看護師が率先して care vision を打ち出し、より良いケアの遂行に奮闘しているといえる。

<u>NCCCS で測定される competency の特徴</u>

仮説検証の過程で、NCCCS で測定される competency の特徴が示唆された。

第 1 に、care coordination competency 獲得には、経験のみならず、教育・訓練、役割認識が必要なことである。これは NCCCS 得点が、ICU 経験 5 年未満 or 以上を弁別した一方で、5 年以上のみの分析では経験年数ではなく、認証と資格の有無、職位により弁別されたことからいえる。

第 2 に、care coordination competency が、リーダーシップを内在していることである。NCCCS は PMS と収束的妥当性を示した。人工呼吸器装着患者管理では、ICU 入室中のケアが退院後の機能的転帰や QOL を左右する。care coordination competency の高い看護師はケアによる患者の回復促進への責務を自覚し、ケア遂行や変革においてリーダーシップを発揮しているといえる。

第 3 に、care coordination の様相はユニットの管理形態により異なることである。J-RCS と NCCCS の相関は、ユニットの専従職員の有無により相違があった。専従無ユニットでは【care coordination ニーズの把握】が J-RCS 得点と正の相関を示し、他職種がこの因子を重視していた。看護師の立ち位置を活かして、患者のニーズや care coordination の必要性を迅速に察知するこの因子こそ、看護師が care coordinator として役割構築すべき理由であるといえる。一方、専従有ユニットの非専従職員の J-RCS は NCCCS と負の相関を認めた。看護師は専従職員を窓口として積極的に care coordination を試みる反面、非専従職員は看護師からの情報提供や看護師との連携に不足を感じている可能性がある。専従、非専従職員間の情報共有や連携について検討の余地がある。

<u>NCCCS の活用可能性</u>

NCCCS 開発は、多職種チームに care coordinator としての看護師の役割を宣言し、教育と評価を保証することの表明である。NCCCS の存在により、看護師は care coordinator としての役

割を自覚し、他職種は看護師を coordinator として認識、活用できる。NCCCS の活用可能性として 3 点あげられる。

まず、care coordination competency 教育プログラム立案のための基礎資料としての活用である。NCCCS の因子および項目は、教育の目標として活用できる。また、看護師は NCCCS を用いて自己評価、改善のために努力もできる。

第 2 に、nursing-sensitive-indicator としての活用がある。 coordinated care は、‘process’ quality indicator になりうる。NCCCS を用いた看護の評価と患者の離床率や人工呼吸器装着期間の比較は、患者アウトカムに対する看護の貢献を考察する資料となり、新たな課題や役割の発見にも繋がる。

第 3 に、チーム医療発展のための礎としての活用がある。care coordination は看護師の中心的な専門性とされながらも、評価指標は存在しなかった。NCCCS は初の測定用具として、他領域の care coordination を検討する際の参考になる。NCCCS の各項目は ICU の人工呼吸器装着患者管理に密着しているが、因子は care coordination の基本的要素である。NCCCS の 4 因子を参考にして他領域に特化した項目を検討したり、領域特有の新たな因子を見出すことは care coordination competency の体系化、さらに NCCCS 自体の洗練にもつながるといえる。

＜結論＞

NCCCS は信頼性・妥当性のある尺度である。NCCCS の活用と患者アウトカムとの関係について明らかにすることが課題である。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5570　号 | 瀧口　千枝 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　緒方　泰子<br>副　査　佐々木　吉子　　田中　真琴 | |

（論文審査の要旨）

クリティカルケア領域の人工呼吸器装着患者への多職種連携による管理の有効性が明らかになっているが、提供されているケアと望ましいケアの間にはギャップがあり、そのギャップを埋めるようなケアコーディネーション役割が看護師に期待されている。しかしながら、そうしたケアコーディネーションのコンピテンシーを評価する基準はない。

本研究では、クリティカルケア領域の人工呼吸器装着患者管理における看護師のケアコーディネーションコンピテンシーを評価する Nurses' Care Coordination Competency Scale (NCCCS) の尺度原案（参考論文 1）を用い、その信頼性と妥当性を検証することを目的とした。

尺度原案 6 領域 51 項目は、4 職種 28 人（うち看護師 14 人）への半構造化面接の逐語録を用いたグラウンデッド・セオリー・アプローチ、2 回のパイロットテストに基づいて作成された（参考論文 1）。

審査対象論文では、この 6 概念 51 項目を用いて、急性重症患者看護専門看護師または集中ケア認定看護師が所属する 400 床以上の全病院の ICU73 ユニットの看護師 2,189 人・他職種 1,030 人を対象とした質問紙調査への回答をもとに NCCCS 開発のための量的分析を行った。有効回答者は、看護師 887 人（40.5%、ICU70 ユニット）・同他職種 424 人（41.2%、53 ユニット）であり、看護師の回答を用いて探索的因子分析（n=444）の後に確認的因子分析（n=443）を行って得られた 4 因子 22 項目について、信頼性と妥当性を検討した。具体的には、内的一貫性を確認し、外的基準であるリーダーシップ尺度の得点との関連（併存妥当性）、看護師属性と NCCCS 得点との関連（既知集団妥当性）を検討し、4 因子 22 項目の NCCCS を完成させた。

本研究は、本学倫理審査委員会による承認を得た上で実施された。

考察では、NCCCS の信頼性と妥当性、NCCCS で測定されるコンピテンシーの特徴、NCCCS の活用可能性について述べられた。

論文審査では、明快なプレゼンテーションがなされ、研究対象の選定・主要概念・本研究の特徴・研究の限界と今後の展開等に関する審査員からの質問に適切に解答された。研究計画・実施に際し十分に学習し、綿密にたてた計画に基づいて、尺度開発に必要な手順を丁寧にクリアしながら、十分な例数の回答を用いて新しい尺度を開発したことが審査を通じて確認された。

審査の過程を通じ、申請者がこの分野の十分な知識・実践・研究遂行能力を有することが確認された。

以上より、申請者は、博士（看護学）の学位授与に値すると判定した。

※当該研究は、パート 1（参考論文 1）とパート 2 の論文 2 編として英文誌に掲載されたが、審査は、パート 1 を含む研究全体のプレゼンテーションをもとに、パート 2 について行われた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 西村　礼子 |
| 論文審査担当者 | 主査　佐々木　吉子<br>副査　大久保　功子、深堀　浩樹 |
| 論　文　題　目 | Effect of demonstrating situation awareness on nurses' gaze and judgment in a computer-based task for environmental management: a randomized controlled trial |

（論文内容の要旨）

**背景：**

患者の生活環境を整備することは、患者の安全と安楽の向上において重要な看護技術である。看護師は、患者の療養環境である病室を訪れる毎に、観察を通じて情報を集め、患者の安全と安楽の観点から環境整備の必要性を決定する。そのため、患者の環境を評価し、看護師の行動を決定する出発点として観察が重要である。

しかし、看護師は環境整備の重要性に気づきながらも、日常業務において注意深く観察することなく、環境整備が必要な項目を見過ごすことがある。その結果、様々な事故への発展や患者の欲求を満たせない可能性がある。この問題に加えて、臨床現場において、看護師は観察からの判断に対するフィードバックやトレーニングを受けていないという問題がある。このことから、看護師は視覚的な観察とその後の判断を向上させる必要があり、観察では環境の安全性と快適性の観点から注意を向けながら判断される必要があると考えた。

視覚的な観察による場面知覚を通じた情報の収集は、眼球運動を用いた研究により報告されてきた。場面知覚は周辺視野と中心視野によって行われているが、中心視野が一定時間、対象物にとどまるという注視は、対象者が対象物に注意を向けるために視線を向ける指標である。一方で、周辺視野は対象物における解像度と空間方位が低いと言われている。つまり、看護師が視覚的観察による場面知覚を通じて正確な情報収集をするためには、環境を注視し、注視によって収集した情報に基づき判断することが必要である。

また、状況認識は意思決定において重要であり、状況認識の欠如は、エラーを引き起こす。意思決定と実践の基になる状況認識の重要性は、世界中の様々な分野で報告されており、医療の分野でも、状況認識の分析は、場面知覚と認知機能の強化が必要な場面における意思決定の評価として用いられてきた。

このことから、環境整備に関する看護師の注視と判断に対する状況認識を示すことは観察技術の向上に役立つのではないかと考えた。

**目的**

環境整備に関する看護師の注視と判断に対する状況認識を示すことの効果として、環境整備に

関するコンピュータを使用した課題において「注視し判断する」項目に影響があるかを明らかにすることを目的とし、介入群と対照群を比較した。

研究方法

1. 研究デザイン

本研究は介入群と対照群の比較によるランダム化比較実験である。介入群は書くことや話すことによって状況認識を示すことを指示され、対照群は頭の中で状況認識を考えることを指示された。

本研究は環境整備場面において看護師が安全と安楽な観点から環境整備に関する対象物に注意を向けながら判断するという意識的な観察をアウトカムとした。看護師は環境管理が必要な対象物に対して注意を払うために目を向けることで情報を獲得し、判断するという看護師の観察技術を「注視して判断する」にて測定した。主要アウトカムは、患者の生活環境に対しての安全と安楽の観点からの環境整備に関する 20 項目に対して、介入後に「注視して判断する」項目の数であった。副次アウトカムは、介入後に「注視せずに判断する」項目があるかどうかであった。仮説は、介入群は介入後に「注視し判断した」項目が対照群より多く、「注視せずに判断する」項目をもたないことであった。

2. 対象者と対象者の割り付け方法

対象者は実験時に、環境整備を実施している看護師もしくは実験時期より 3 年以内に実施したことのある看護師とし、61 名が実験に参加した。実験は 2014 年 1 月 9 日～3 月 3 日に行った。乱数表を用いて、21 名を記述群（状況認識を書くよう指示された群）、20 名を口頭群（状況認識を話すように指示された群）、黙示群（状況認識を書いたり話したりせずに頭の中で考えるよう指示された群）に割り付けた。

3. 実験環境

大学の実験室に、タッチパネル型パソコンと机、眼球運動測定器を取り付けた顎台を配置した。対象者にはパソコンより４０cm 離れた机に座ってもらった。

4. 実験プロトコル

自記式質問紙に回答後、実験環境の椅子に座ってもらい EMR のキャリブレーションを行った。課題は机に配置した PC からの音声、文字、画像情報によって提示した。対象者は５分間練習を行い、安静１分後、画面上に課題を提示した。

対象者は１回目の課題実施後、それぞれの方法で状況認識に関して回答した。再度 EMR のキャリブレーションを行い、安静１分間をとってもらい、２回目の課題実施後、実験終了とした。

5. 実験課題

対象者はタッチパネル型パソコンに映し出された病室環境の画像を観察し、判断することを指示された。病室環境は日本の標準的な病院の患者の部屋で看護介入分類（NIC）によって定義された 20 個のアイテムによって構成されていた。課題は、「これからあなたは病室の環境整備をするところです。観察をする中あなたが環境整備を行いたいと思った物にタッチして下さい。」であった。

**6. 介入方法**

介入は対象者が１回目の課題終了後、課題写真を見ながら Endsley の Situation awareness モデルに従った４つの設問に対し、割り付けされた方法を用いてそれぞれ 60 秒で回答することとした。習慣化のプロセスにおけるニューロンの働きが同じであるとされる口頭群と記述群を介入群とし、状況認識を書いたり話したりせずに頭の中で考えるよう指示された黙示群を対照群と分類した。

**７．測定指標**

EMR-9 により、対象者が画像を観察している際の眼球運動の注視を記録した。測定データは対象物に目を向けた回数「注視回数」と、目を向けた対象物の項目数「注視項目数」を集計した。また、対象者が課題中、環境整備をすべきと判断したものをタッチパネルにタッチしてもらうことで「判断」の項目数を測定した。

さらに注視と判断との組み合わせで計算される「注視と判断」の項目数を介入前後で測定した。対象者が対象物に注視を向け注視したかどうかで「注視した」「注視しなかった」、対象物を環境整備項目と判断したかどうかで「判断した」「判断しなかった」に分類した。

「注視し判断した」は看護師が環境整備を必要な項目を注視し、判断したことを示し、「注視せずに判断した」は看護師が注視せずに判断したことを示した。

**8. 分析方法**

対象者の属性は Pearson's chi-square test もしくは Fisher’s exact test を行い、群間比較は、Mann-Whitney 検定を行った。統計分析には IBM SPSS Statistics22 を使用し、有意水準を 5%とした。

**9. 倫理的配慮**

東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を得て行った（承認番号 1570）。

**結果**

**1. 対象者の特徴**

全対象者は年齢中央値 29.0（四分位偏差 Q3.0）歳、看護師経験年数 5.1（Q2.5）年、病棟勤務経験年数 5.0（Q2.5）年、性別は男 4 名(6.5%)女 57 名(93.5%)であった。最終学歴は専門学校 6 名（9.8%）、短期大学 5 名（8.2%）、大学 46 名（75.4%）、大学院 4 名（6.6%）であった。環境整備について考える機会、環境整備に関するレポートを書く機会、タッチパネルを使う頻度、現在の眠気、現在の疲労度に、介入群および対照群に差はなかった。

**2. 介入群と対照群における注視と判断の比較**

注視回数、注視項目数、判断項目数を介入前後で、介入群と対照群で比較したところ、介入前及び介入後において 2 グループ間に有意差はなかった。

**3. 介入群と対照群における注視と判断の組み合わせによって計算される項目数の比較**

主要アウトカムと副次アウトカムである「注視し判断した」と「注視せずに判断した」の項目の変化を見るために、介入前の注視と判断の組み合わせによって分類し、比較した。

主要アウトカムである介入前「注視せずに判断した」で介入後「注視し判断した」に変化した項目数は、介入群で 1.0（Q0.5）項目、対照群で 0.0（Q0.0 ）項目であり、有意差が見られた（p

< .01）。しかし、介入後に「注視し判断した」に変化した他の分類に有意差はなかった。

副次アウトカムである介入後「注視せずに判断した」の項目の介入群と対照群の比較では、全ての分類において有意差は見られなかった。しかし、介入前も介入後も「注視せずに判断した」の項目は、介入群 1.0（Q1.0）項目、対照群 1.0（Q1.0）項目であり、介入前「注視し判断した」で介入後「注視なしで判断した」の項目は、介入群 1.0（Q2.5）項目、対照群 1.0（Q1.0）項目であった。介入の後でも、「注視せずに判断した」項目があった。

**考察**

本研究は、看護師の注視と判断に対する状況認識を示すことがコンピュータを使用した環境整備場面の課題において「注視し判断すること」に効果があるかを検討するため、介入群と対照群でランダム化比較実験を行った。

介入前に「注視せずに判断した」のにも関わらず介入後に「注視し判断した」項目が介入群にて多かった結果は、状況認識を示すことが、環境整備場面の課題において対象物に注意を向けた後で判断したことを示した。これは、看護師に意識的な観察を促進させ、看護師の観察スキルに影響を与えたことを示唆した。

一方で、介入後の観察で「注視せずに判断した」項目が、介入群及び対照群の両群で見られた。この結果は、看護師は観察を繰り返すことで注視せずに判断する場合があることを示し、判断や行動の意味づけなしに、自動的に実践する場合があること予測させた。

本研究において、状況認識を示すことは看護師がまず注視をすることによって意識的に情報を獲得し、その後環境整備の必要性を決定することに影響することが分かった。そのため、看護師が環境整備場面において患者の安全と安楽の観点から対象物に注意を向けながら判断するという意識的な観察は、状況認識を示すことによって促進されることが示唆された。

**結論**

環境整備場面における状況認識を示すことは、看護師に環境整備が必要な項目に対する「注視し判断すること」と促進させた。これは、介入によって看護師は環境整備が必要な項目に意識的に観察したことを示す。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5571　号 | 西村　礼子 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　佐々木吉子<br>副　査　大久保功子、深堀　浩樹 | |

（論文審査の要旨）

提出された論文「Effect of demonstrating situation awareness on nurses' gaze and judgment in a computer-based task for environmental management: a randomized controlled trial（環境整備に関するコンピュータを使用した課題での看護師の注視と選択に対する状況認識を示すことの効果）について、博士の学位論文に相応しいかの審査を行った。

患者の生活環境の整備は、療養する患者に安全と快適さを提供する重要な看護介入である。申請者は、文献検討を通して、環境整備においては看護師が患者の環境を評価し、環境整備するかどうかの決定を行うための出発点として観察することが重要であると結論づけた上で、看護師は環境整備の重要を十分に認識していても、注意深く観察することなくその必要性を見落とし、その結果、事故に至ることや、患者の要望に応えられない可能性があることに着眼した。そして、看護師が状況認識するためには、まず正確に詳細な情報を収集するために「注視」することが必要であり、さらに注視を通して収集した情報に基づいて、環境整備において必要な項目を「判断」することが重要であるとの前提を示した。そして、この「注視して判断する」という行為は、看護師が状況認識したことを「言葉もしくは筆記によって表示すること」によって促進されるとの仮説を立て、以下の実験研究を通して比較した。

研究デザインは、ランダム化比較試験であり、対象者は、公募に対して応募した 61 名の看護師で、日常的に患者室の環境整備を行っている、もしくは一般病棟で 3 年以内に環境整備を実施した経験のある看護師であった。飲酒や運動などの身体状況についてコントロールされた対象者は 2 群に無作為に割り付けられた。両群とも対象者は実験室の椅子に座り、眼球測定器（EMR；Eyemark Recorder-9）を装着し頭部を固定された状況で、タッチスクリーン式のコンピュータ画面に示された課題を提示された。課題とは、ベッド、床頭台など、日本の一般的な病院の患者室の画像を見て、環境整備の観点から整備が必要と考えるものをスクリーン上でタッチするというものであった。その間、EMR によって、被験者の眼球運動が記録された。そして、介入群（41 名）は、課題修了後に、状況認識したことを声に出す、または記述することを指示され、対照群（20 名）は、状況認識したことについて回想するが表示はしないよう求められた。その後、両群とも再度、同じコンピュータ上の課題に取り組んだ。

結果、介入前に「注視せずに判断した」項目で、介入後に「注視し判断した」に変化した項目数は、介入群において有意に増加した。すなわち、状況認識したことを表示することは、環境整備の課題において、対象物に着目した上で判断するようになることが実証され、これは看護師の意識的な観察を促し、観察技術に影響を及ぼすことが示唆された。この知見は、臨床において、

看護師が意識的に観察することを促し、事故の防止や、患者へのより快適な環境の提供に貢献しうるものであると結論づけられた。

申請者は、博士課程における一連の研究プロセスにおいて、上記に加えて、状況認識したことの表示方法の違いが、注視や判断に影響するのではないかという、もう一つの異なるリサーチ・クエスチョンも見出し、その結果についても分析して、国際誌である「Journal of Clinical Nursing」に投稿し、2017 年に Original Article として公刊されている。この結果は、本学位申請論文においても引用され、多角的な視点からデータの解析が行われている。

公開審査においては、プレゼンテーションは丁寧になされたが、研究の枠組みや、理論的背景などについて尋ねたところ、全てについての明確な回答は困難であった。特に、研究デザインにおいて、枠組みにしようとした、Model of situation awareness (Endsley,1995)の理解が十分でなく、実験に用いられた課題が静的なもので、ダイナミックな状況変化の認識プロセスを示す同モデルの取り込み方を誤っていた。また、研究計画のプロセスにおいて、指導教員等の関係者との討議が十分に行われなかったことも拝察された。そこで、Nursing research 10th ed (Polit,2016)に沿って、「量的研究の主要概念とステップ」、「理論的枠組み」、「量的研究デザイン」についての再学習と、それを踏まえての自身の博士論文研究の省察、さらには今後の研究者としての展望について、レポート課題を課した。提出後に一度再提出を求めたが、二度目の提出では、非常に丁寧に、学習の軌跡、自身の研究に対する省察と今後の研究に向けた改善策の提示、研究者としての展望が示された。そこで、審査員 3 名が、Journal of Clinical Nursing での論文採用実績も含めて、一連の研究における着眼点、独創性、学際性は、本学の求める基準に達していると評価し、当該論文が博士(看護学)の学位論文として相応しいと最終判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 杉本　健太郎 |
| 論文審査担当者 | 主査　佐々木　明子<br>副査　緒方　泰子、深堀　浩樹 |
| 論　文　題　目 | Factors associated with deaths in 'Elderly Housing with Care Services' in Japan: a cross-sectional study |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

高齢化の進展に伴い、わが国は急速な死亡者数の増加に直面している。しかし、死亡場所の大部分を占める病院は、社会保障費抑制のため病床数が削減される予定である。このことは、今後増加する死亡を病院以外の場所で受け入れる必要があることを示している。

死亡場所を確保するため、政府は、在宅サービス事業所（訪問看護事業所など）や高齢者施設（特別養護老人ホームなど）が提供する終末期ケアに対し保険制度上の加算を設け、自宅・高齢者施設での看取りを推進している。そのうち、自宅では、世帯構成の変化や女性の社会進出により看取りを行う際に家族介護者を確保することが困難であることから、常時介護を受けながら最期まで過ごすことできる高齢者施設サービスの需要が高まっている。しかし、現在約 30 万人が入居を待っている状況であるものの、施設に対する介護給付費が介護保険財政を圧迫していることから、施設数を大きく増加させることが難しい。

そこで政府は、今後「サービス付き高齢者向け住宅（以下、サ高住）」が死亡場所として機能することを期待している。サ高住とは、2011 年に創設された 60 歳以上の高齢者向け住宅であり、常駐する職員による安否確認や生活相談サービスの提供が義務付けられている。職員は看護師などの医療職である必要はなく、実際に 6 割程度のサ高住は看護職を雇用していない。入居者が医療を必要とした場合は、自宅で在宅サービスを受けるときと同様、各入居者が訪問看護事業所や診療所などと契約し、保険適用されるサービスを受ける。介護保険施設とは異なり、サ高住から提供される安否確認・生活相談サービスは介護保険の支給対象とならず、原則入居者がその利用料の全額を支払うこととなる。政府は、こうした特徴を持つサ高住を整備することにより、介護保険制度の持続可能性を維持しながら死亡場所を確保しようとしている。

しかし、現在までに入居者の施設内看取りを経験したサ高住は全体の 30%未満である。サ高住が今後死亡場所としての役割を担うためには、サ高住が施設内看取りを行うことに関連する要因を特定する必要がある。先行する報告では、施設内看取り経験のないサ高住よりも経験のあるサ高住において、サ高住職員に占める看護職の割合や地域の診療所・訪問看護事業所からサービスを受けている割合が高いことが示されていた。サ高住以外の高齢者施設における看取りでは、施設特性及び看取りに対する取り組み（開設してからの年数、入居者に対する終末期の希望確認、

スタッフ教育など）、入居者特性（年齢、性別、身体・認知機能など）、地域特性（病院との近接性など）が関連しているとされている。これを踏まえるとサ高住で施設内看取りを行うことには、看護職の雇用や地域の診療所・訪問看護事業所等との連携のほかにも影響する要因があると考えられる。また、それらの要因の中からサ高住施設内看取りの関連要因を特定するためには、各要因の影響を調整した分析を行う必要がある。

そこで本研究は、サ高住に対する調査を行い、施設内看取りに関連する要因を多変量解析により特定することを目的とした。

＜対象と方法＞

対象：2015 年 7 月 31 日時点で東京都・神奈川県で開設していたサ高住全 412 施設を対象とした。東京都、神奈川県は今後増加する高齢者数が全国的に最も多い地域であるとされているが、65 歳以上人口あたりの病床数・介護保険施設定員数はいずれも全国平均以下であり、新たな死亡場所の確保が喫緊の課題となっている地域である。

調査：本研究では、対象施設への質問紙調査及び公開されている統計調査結果から必要な情報を得た。質問紙では、施設管理者に対して主に次の項目の回答を依頼した：施設内看取りの経験の有無、地域の病院・診療所や訪問看護事業所からのサービス提供の有無、および終末期ケア提供の有無、施設特性（看護職の常駐の有無、入居者・家族に対する終末期を過ごす場所に関する希望確認の有無、スタッフ教育の有無、開設してからの年数）、入居者特性（入居者総数、平均年齢、女性割合、要介護度 3 以上の入居者割合など）。なお、施設内看取りは「施設内で入居者が死亡診断されたこと」とし、事故死などは除いた。質問紙は、2015 年 9 月～10 月に対象施設に電話で協力依頼したうえで送付し、2016 年 1 月までに調査員が協力の得られた各施設を訪問して回収した。

公開されている統計調査からは、各サ高住が立地している自治体（特別区及び市町村）の地域特性として、60 歳以上人口割合、60 歳以上人口 10 万人あたりの病床数・診療所数・訪問看護事業所数、所得水準（課税対象所得/納税義務者数）を抽出した。

分析：施設内看取り有無を従属変数、その他の変数を独立変数とした。$\chi^2$検定・ウィルコクソンの順位和検定を行い、多重共線性を確認した後、多重ロジスティック回帰分析を行った（すべての独立変数が従属変数に関連している可能性があるため、単変量解析で得られた有意差に関わらず全変数を投入した）。多重ロジスティック回帰分析では、施設内・施設外からの医療提供の影響を慎重に確認するため、逐次投入法を用いた。モデル 1 は施設特性、入居者特性、地域特性を投入し、モデル 2 では訪問看護事業所からのサービスの提供を加え、最終のモデル 3 では病院・診療所からのサービス提供の有無を加えた。

＜結果＞

154 施設から回答が得られ（回収率 37.4%）、回答に不備のあったものを除いた 114 施設分の回答を最終分析対象とした。入居者の施設内看取りを経験していたのは 62 施設（54.4%）だった。モデル 1 では終末期の希望確認有無が、モデル 2 では訪問看護事業所からの終末期ケア提供が、そしてモデル 3 では病院・診療所からの終末期ケア提供が、施設内看取りを経験していたことと

有意に関連していた。入居者総数と開設してからの年数については、すべてのモデルで正の有意な関連が見られた。

＜考案＞

施設内看取りの経験があることは、病院・診療所から終末期ケアが入居者に提供されていることと強く関連していた。この知見は、他の高齢者施設を対象にした国内外の研究において、施設内死亡が、医師やその終末期ケアチームの入居者への関与と関連していたこと矛盾しない。先行研究によると、医療職者が入居者に関与することにより、入居者の疼痛軽減、病院への入院減少などの効果があるとされている。これ以外にも、入居者の終末期に医師が関わることは、施設内での死亡診断の発行も可能にすると想定される。こうしたメリットがサ高住においても施設内看取りを可能にしていると考えられる。しかし、医療職の配置義務がある高齢者施設では施設内で終末期医療を完結できるものの、医師の配置義務がないサ高住では地域の病院・診療所と連携することが不可欠となる。サ高住が施設内看取りを行っていくためには、本研究が示したように、病院・診療所とサ高住の連携を強化していく必要がある。

先行研究では訪問看護事業所とサ高住の連携が施設内看取りに関連していることが示唆されていたが、本研究においてその関連はモデル 2 のみで確認された。わが国では、訪問看護師は医師の指示に基づいてサービスを提供することになっている。病院・診療所からのサービス提供に関する影響を調整したことが訪問看護事業所の影響を打ち消したことは、この医療システムを表しているものと考えられる。しかし、この結果は、訪問看護師の関わりがサ高住施設内看取りの決定要因ではないものの、訪問看護師が病院・診療所の医師と連携しながら施設内看取りに対し役割を果たしていることを示唆している。一方で、サ高住施設内の看護職の常駐有無はいずれのモデルにおいても有意な関連が見られなかった。わが国では、8 割以上の訪問看護事業所が 24 時間体制でのサービス提供を行っているが、サ高住において夜間に看護職を配置しているのは 6%程度であることが報告されている。このことを踏まえると、看護職が 24 時間体制でサービスを提供できるかどうかが施設内で入居者が最期まで過ごせるかどうかに関連している可能性がある。しかし、サ高住では、医師同様、看護職配置が義務付けられていない。施設内看取りを行っていくうえでは、サ高住施設内で 24 時間の看護職配置を推進するよりも、サ高住と訪問看護事業所との連携を強化していくことが効果的であると考えられる。

終末期を過ごす場所に関する希望確認をしていることは、地域からのサービス提供に関する変数を調整する前のモデル 1 においてのみ、施設内看取りの経験があることと有意に関連していた。この結果は、サ高住での最期を過ごす場所の希望確認に、連携する訪問看護事業所や病院・診療所が関わっている、もしくは、施設内での希望確認がそうした事業所等との連携につながっていることを示している可能性がある。終末期の希望確認を行っている主体やその時期なども確認していく必要がある。

入居者総数が多いことや開設してからの年数が長いことも施設内看取りと有意に関連していた。こうした特徴を持つサ高住では、入居者を看取る機会が多くあり、看取りにあたってのマンパワーやノウハウもあると考えられる。しかし、さらに年月が経過し、地域の訪問看護事業所や病院・診療所との連携体制が強化されれば、入居者総数や開設してからの年数による影響は変化

していくと考えられる。

＜結論＞

サ高住での施設内看取りの関連要因を特定することを目的とした調査・分析の結果、入居者に対する病院・診療所からの終末期ケアの提供が強く関連していることが明らかになった。今後死亡場所を確保するためには、サ高住とこうした医療機関との連携を強化していく必要がある。加えて、医療機関による終末期ケアの提供を支えるため、訪問看護事業所とサ高住の連携も促進することが求められる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5572　号 | 杉本　健太郎 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　佐々木　明子<br>副　査　緒方　泰子、深堀　浩樹 | |

（論文審査の要旨）

超高齢社会を迎え、わが国は急速な高齢者の死亡者数の増加に直面している。その死亡場所を確保するため、政府は、自宅・高齢者施設での看取りを推進している。中でも今後「サービス付き高齢者向け住宅（以下、サ高住）」が死亡場所として機能することが期待されている。しかし、現在までに入居者の施設内看取りを経験したサ高住は全体の 30%未満であり、サ高住が今後死亡場所としての役割を担うためには、サ高住が施設内看取りを行うことに関連する要因を明らかにする必要がある。そこで申請者は、サ高住における看取りに関連する要因を特定することを目的とした研究を行った。

東京都・神奈川県内のサ高住全 412 施設（2015 年 7 月 31 日時点）を対象とし、施設管理者への質問紙調査及び公開されている統計調査から必要な情報を得た。質問紙調査内容は、施設内看取りの経験の有無、地域の病院・診療所や訪問看護事業所からのサービス提供の有無、および終末期ケア提供の有無、施設特性（看護職の常駐の有無、入居者・家族に対する終末期を過ごす場所に関する希望確認の有無、スタッフ教育の有無、開設してからの年数）、入居者特性（入居者総数、平均年齢、女性割合、要介護度 3 以上の入居者割合など）であった。統計調査内容は、各サ高住が立地している自治体（特別区及び市町村）の 60 歳以上人口割合、60 歳以上人口 10 万人あたりの病床数・診療所数・訪問看護事業所数、所得水準（課税対象所得/納税義務者数）を抽出した。

分析は、施設内看取り経験の有無を従属変数、その他の変数を独立変数とした。$\chi^2$検定・ウィルコクソンの順位和検定を行い、多重共線性を確認した後、多重ロジスティック回帰分析を行った（すべての独立変数が従属変数に関連している可能性があるため、単変量解析で得られた有意差に関わらず全変数を投入した）。多重ロジスティック回帰分析では、施設内・施設外からの医療提供の影響を確認するため、逐次投入法を用いた。モデル 1 は施設特性、入居者特性、地域特性を投入し、モデル 2 では訪問看護事業所からのサービスの提供を加え、最終のモデル 3 では病院・診療所からのサービス提供の有無を加えた。

その結果、154 施設から回答が得られ（回収率 37.4%）、不備のある回答を除外した 114 施設分の回答を最終分析対象とした。入居者の施設内看取りを経験していたのは 62 施設（54.4%）だった。モデル 1 では終末期の希望確認有無が、モデル 2 では訪問看護事業所からの終末期ケア提供が、そしてモデル 3 では病院・診療所からの終末期ケア提供が、施設内看取りを経験していたことと有意に関連していた。入居者総数と開設してからの年数については、すべてのモデルで正の有意な関連がみられた。

以上のように、申請者は、入居者に対する病院・診療所からの終末期ケアの提供が強く関連していることが明らかになったことから、今後死亡場所を確保するためには、サ高住と医療機関との連携を強化していく必要があること、医療機関による終末期ケアの提供を支えるため、訪問看護事業所とサ高住の連携も促進することが求められると結論づけた。

論文は、これまで明らかにされていなかったサ高住における看取りに関連する要因の解明をするため、緻密な研究計画の上、質問紙調査及び統計情報の収集を行い、その結果を多変量解析により特定し、先行研究と比較しながら考察して論理的に記述されていることが高く評価された。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 廣岡　佳代 |
| 論文審査担当者 | 主査　本田　彰子<br>副査　山﨑　智子　　深堀　浩樹 |
| 論　文　題　目 | Quality of death, rumination, and posttraumatic growth among bereaved family members of cancer patients in home palliative care |

（論文内容の要旨）

＜結言＞

日本において、がんは死亡原因の第一位であり、多くの患者が自宅で最期を過ごすことを望んでいる。日本では在宅ケアが推進されているが、がん患者の在宅死亡率は10.4%と改善の余地がある。がん患者、及び、その家族にとって、終末期を自宅で過ごすことは様々な心理的な課題を伴う。しかしながら、自宅で過ごせることが患者にとっての質の高い看取りにつながると考えられる。自然であり、予期された死は、事故のような予期しない死と比較して、遺族が意味の感覚を獲得することにつながることが示されている。

予期された死であっても、大切な人との死別はトラウマ的な体験である。遺族は、患者との死別後に複雑性悲嘆などのネガティブな経験をする一方で、心的外傷後成長（Posttraumatic Growth、以下 PTG）と呼ばれる心理的な成長を経験することがある。Calhoun らが提唱した PTG モデルでは、個人特性、反芻、自己開示、社会的影響などの心理的な要因が PTG を導くプロセスに影響するとされている。

緩和ケアの重要な目標のひとつに「質の高い看取り」がある。先行研究によると、質の高い看取りには、痛みや症状マネジメントがなされていること、家族と良い関係を持てること、その人が望んだ場所で最期を迎えられることなどの要素が含まれる。質の高い看取りの実践に向け、終末期ケアにおける専門的緩和ケアの提供は重要である。

＜看取りの質の概念＞

PTG モデルでは、大切な人の死などの出来事の主観的な深刻さは、PTG を予測するとされている。遺族が認識する看取りの質（「質の高い看取り」であるか否か）は、死別の深刻さに影響を与えるものであり、PTG のメカニズムの検討に必要な概念である。大切な人の死は、遺族にとってトラウマ的な出来事となりうる。例えば、質の低い看取りの場合（遺族から見て、痛みやその他の症状が十分にコントロールされていない）、遺族は心残りや後悔、侵入的な思考を経験するだろう。質の低い看取りの場合、意図的反芻と PTG は妨げられるが、質の高い看取りであった場合、構造的で意図的な反芻が起こると考えられる。

＜反芻の概念＞

反芻には、侵入的反芻と意図的反芻の 2 種類があり、PTG モデルにおいて主要な役割をもつ。侵入的な反芻はネガティブである一方、意図的反芻は構造的で内省的である。侵入的反芻は、出

来事（本研究では、死別）の直後に起こり、意図的反芻はその後生じる傾向にある。先行研究では、反芻と PTG の関連について検討されており、侵入的反芻が直接的に PTG に影響することや、最近の侵入的反芻は苦痛につながることが示されている。一方、出来事（死別）直後の意図的反芻は PTG に関連することが示されている。

在宅死を選択した患者の遺族は、看取りの質が高いことが先行研究で報告されており、著者らは、看取りの質は反芻と PTG に関連すると考えた。本研究では、看取りの質が、侵入的、意図的反芻を媒介し、PTG に関連するというモデルを仮説として構築し、構造方程式モデリングを用いてそのモデルの検証を行った。

＜方法＞

対象：本研究の対象は、在宅がん患者の遺族である。2008 年 1 月から 2012 年 12 月までの間に、在宅緩和ケア施設 3 か所による在宅緩和ケアを受け、自宅死亡した患者の遺族 1861 名に 2013 年 12 月にアンケートを送付した。955 名からの返送があり、回答拒否、データ欠損等の 136 名を除く、805 名を解析対象とした。

尺度：看取りの質、反芻、PTG、個人属性を測定した。

○看取りの質：看取りの質は、信頼性と妥当性がある日本語版 Good Death Inventory の短縮版 10 項目を用いて測定した。

○反芻：日本語版出来事の反芻尺度を用いて、死別後の反芻（侵入的、意図的）を 2 時点（死別直後と最近 2 週間）で測定した。

○PTG：日本語版心的外傷後成長尺度を使用した。日本語版の信頼性、妥当性が検証されている。

統計解析：個人属性、GDI、ERRI、PTGI スコアの相関を確認するためにピアソンの積率相関係数を用いた。仮説検定には、構造方程式モデリングを使用した。モデルの適合度指標には、comparative fit index (CFI), Tucker - Lewis index (TLI), rootmean square error of approximation (RMSEA), and Akaike informationcriterion (AIC)を用いた。CFI と TLI は 0.9 以上、RMSEA は 0.05-0.08、AIC は 0 に近いほど適合度がよいとされる。有意確率は両側 $p<0.05$ とした。統計解析には、統計パッケージ SPSS と AMOS を使用した。

＜結果＞

個人属性：遺族の平均年齢は 63.0（標準偏差 12.5）歳、死別後期間は平均 2.6（標準偏差 1.3）年、女性 578 名（71.8%）、配偶者 419 名（52.0%）、信仰宗教あり 439 名（54.8%）、PTGI 合計得点は 44.2（標準偏差 22.8）であった。

単変量解析：女性であること、信仰宗教を持つことは、高い PTG に有意に関連していた。また、高い看取りの質、死別直後の意図的、侵入的反芻、最近の意図的、侵入的反芻は、高い PTG に有意に関連していた。

構造方程式モデリング：初期モデルの適合度指標は CFI=0.84、TLI＝0.86、RMSEA＝0.06、AIC＝4910.74 であった。同時期の侵入的、意図的反芻への誤差共分散追加後、CFI=0.86、TLI＝0.88、RMSEA＝0.06、AIC＝4367.31 となった。看取りの質から PTG の直接的なパスは有意（$\beta=0.23$、$P<0.001$）であった。死別直後と最近の意図的な反芻を介した看取りの質と PTG の間接的なパスは

有意（β＝0.053、P＜0.001）であった。看取りの質と PTG は、死別直後の侵入的反芻と最近の意図的反芻により媒介されていた（β＝-0.01、P＜0.05）。最近の侵入的反芻は、PTG に有意にネガティブに影響していた（β＝-0.15、P＜0.001）。

＜考案＞

意図的反芻（死別直後、最近）を介した看取りの質から PTG へ間接的なパスに関する仮説は支持された。本研究結果は、意図的反芻が PTG を予測するという先行研究の結果と一致する。予期された自然な死が遺族に意味付けを与えたことから、看取りの質が意図的反芻を介して PTG に影響したと考えられる。本研究の対象は、在宅での看取りを希望したがん患者の遺族であり、予測される死に対する心理的な準備ができていたと考えられる。そのため、良い死と認識した遺族は自宅でがん患者と一緒の時間を過ごした達成感を得たのであろう。さらに、看取りの死は PTG と直接的に関連しており、看取りの質ががん患者と家族にとって穏やかな終末期ケアの達成のために重要であるとともに、遺族の PTG において決定的な役割を果たすことが示唆された。

本研究では、看取りの質と PTG は、死別直後の侵入的反芻と最近の意図的反芻により媒介されていた。PTG モデルでは、遺族は死別直後に侵入的反芻を経験し、意図的反芻が世界観の再構成を提供するにしたがって侵入的反芻は減少し、経験の意味を見出すといわれている。本研究の結果は PTG モデルを支持するものであった。PTG モデルや先行研究では、自己分析や自己開示、社会的な要因などの影響により侵入的反芻から徐々に意図的反芻に移行するといわれている。遺族のなかには、他の家族と患者について話すことで、または、遺族会に参加することで、患者との思い出を振り返っていた人もいたと考えられる。良い看取りとなるよう目指すだけでなく、遺族が患者の死を開示することを通じて、意図的反芻が促されていたと推察される。

看取りの質と PTG は、死別直後と最近の侵入的反芻により媒介されていた。単変量解析では弱くポジティブに影響していたが、構造方程式モデリングを用いた結果、最近の侵入的反芻は PTG にネガティブに影響することが示された。PTG モデルでは、死別直後の侵入的反芻は、PTG を導く意図的反芻を活性化させる一方、長く続く侵入的反芻は PTG を抑制するといわれている。そのため、本研究でも最近の侵入的反芻は PTG を抑制する効果があったと考えられる。

＜臨床への示唆＞

看取りの質が PTG に関連していたことから、医療者は、患者が質の高い看取りを迎え、遺族の PTG につなげるために、質の高い終末期ケアを提供する必要があるといえる。遺族は患者の死の自己開示を通じて意図的反芻をしていると考えられた。そのため、医療者は、遺族の認識が侵入的反芻から意図的反芻に移行するような支援を行う必要がある。例えば、遺族の自己開示に対して、医療者が共感することが意図的反芻を促し、遺族の PTG につながる可能性がある。

＜結論＞

本研究の結果から、遺族が認識する看取りの質は、意図的反芻を介して、PTG に関連することが示された。医療者には、良い看取りとなるよう質の高い終末期ケアを提供することと、遺族が PTG を経験できるように支援することが求められる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5573　号 | 廣岡　佳代 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　本田　彰子<br>副査　山﨑　智子　　深堀　浩樹 | |

（論文審査の要旨）

本論文は、この心的外傷後成長の理論的基盤、すなわち Posttraumatic Growth：PTG モデルに基づいて、看取りの質が侵入的反芻、意図的反芻を媒介し TPG に関連するという仮説を立て、それを検証するものである。反芻とは、繰り返しよく考えることで、侵入的反芻は自動的であり、否定的な思考であり、意図的反芻とは構造的であり、内省的な思考であるとしている。この概念を用いた仮説モデルを、看取りの質については日本語版 Good Death Inventory、反芻については日本語版出来事反芻尺度、PTG については日本語版心的外傷後成長尺度を用いて検証する計画を立てた。調査対象は在宅緩和ケア施設 3 か所でケアを受けたがん患者の遺族 1861 名である。

調査の結果、805 名から回答を得ることができた。高い看取りの質は高い PTG に有意に関連していること、すなわち、死別直後の意図的・侵入的反芻を経由して最近の意図的反芻は高い看取りの質に関連し、最近の侵入的反芻は看取りの質に負の関連があることを示した。また、考察では、本結果をもとに臨床実践における PTG を意識したかかわり方の示唆も含めていた。

論文審査においては、PTG モデルの説明、具体的な研究経過、結果および考察のプレゼンテーションがあった。その後、質問紙による対象者心理の解明に重点を置いた心理学研究となっていることの中で、看護支援にどのようにつなげることができるのかということを中心に質疑応答があった。遺族ケアの観点から、看護師がどのような支援ができるのかということ、予期悲嘆、終末期の段階での家族へのかかわり方、グリーフケアの視点で反芻をどのように捉えて関わることができるのか等の質問がなされたが、具体的な看護実践の提示には至らないが、新たな概念である PTG を理解することの必要性は十分説明され、受け入れられるものであった。終末期がん患者の家族や遺族に対するケアについて、PTG という新たな見方を加えることができ、本研究テーマに係る社会的、及び専門領域における主要な意見を既に概観されていることがわかり、本論文の重要性を確認することができた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 市村　直也 |
| 論文審査担当者 | 主査　角　勇樹<br>副査　戸塚　実　　齋藤　良一 |
| 論　文　題　目 | High-Density Lipoprotein Binds to *Mycobacterium avium* and Affects the Infection of THP-1 Macrophages |

（論文内容の要旨）

＜結言＞

高比重リポタンパク（HDL）は、コレステロール逆転送系により抗動脈硬化作用を示すリポタンパクとして知られる。HDL は本作用以外にも多様な機能を有しており、自然免疫への関与もその一つである。HDL がリポ多糖(LPS)の活性中心と結合し、その生理作用を中和することや、*Yerisinia enterocolitica* O:3 では、HDL が補体系を介して殺菌作用を発揮することが報告されている。我々は、HDL の自然免疫機構の詳細を明らかにすることを目的に、HDL が結合する細菌を検索し、*Mycobacterium avium* (MAV)が LPS を有するグラム陰性菌よりも多量の HDL と結合する結果を得た。HDL が MAV を含めた Mycobacterium に結合するという報告はこれまでになく、その結合機序は不明である。

本研究は HDL の MAV に対する作用を明らかにすることを目的に、HDL と MAV の結合機序およびその生理的意義を検討した。

＜対象と方法＞

<u>HDL とアポリポタンパク A-I (ApoA-I)</u>：HDL および ApoA-I は、インフォームドコンセントの得られた健常人より採血した血液から得た。本研究は東京医科歯科大学医学部倫理委員会より承認を得ている（番号 1491）。HDL (d=1.063-1.210 g/mL)は超遠心法にて血清より分離した。ApoA-I は、HDL を脱脂後、ゲルろ過法により単離・精製した。

<u>細菌株</u>：*Mycobacterium avium* (ATCC 700737)を使用した。グラム陰性菌は東京医科歯科大学医学部附属病院で分離された菌株を使用した。

<u>細胞株</u>：THP-1 細胞は、Phorbol myristate acetate で THP-1 マクロファージ(THP-1 Mφ)に分化させた。THP-1 Mφへの MAV 感染は、無血清条件下のもと HDL を添加し、Multiplicity of infection(MOI) 20:1 の条件で 35℃、24 時間かけて実施した。

<u>HDL 結合実験</u>：細菌(3×$10^8$/mL)と健常人血清を混合したのち、菌体を洗浄、溶菌した。lysate 中の ApoA-I を Western blotting で検出した。

<u>Dot blotting と TLC blotting</u>：MAV 細胞壁脂質を Folch 法により抽出し、ニトロセルロース膜(NC 膜)に点着した。その膜を HDL 溶液中でインキュベーション後、菌体脂質に結合した HDL を POD 標識 ApoA-I 抗体で検出した。MAV 細胞壁脂質を薄層クロマトグラフィ(TLC)で分画後、

PVDF 膜に転写した。その膜を ApoA-I 溶液中でインキュベーション後、脂質分画に結合した ApoA-I を POD 標識 ApoA-I 抗体で検出した。さらに ApoA-I 結合分画から菌体脂質を抽出し質量分析により分子の同定を行った。

増殖曲線：MAV を HDL 添加 7H9 broth に接種し、その濁度(530 nm)を 144 時間まで経時的に測定した。

Flow cytometry による Phagocytosis assay および CFU assay：熱殺菌した FITC 標識 MAV (F-MAV)を THP-1 Mφと HDL 添加条件下で共培養後、THP-1 Mφに貪食された F-MAV を Flow cytometry により検討した。また生きた MAV と THP-1 Mφを HDL 添加条件下で共培養後、貪食された MAV を THP-1 Mφから回収し、7H11 agar に接種した。3 週間培養後、発育したコロニー数を計数した。

脂肪滴(LDs)の定量分析：MAV と THP-1 Mφを HDL 添加条件下で共培養した。THP-1 Mφを Oil red O(ORO)で染色し、細胞内の LDs を光学顕微鏡で観察した。また THP-1 Mφから ORO を抽出し、540nm で吸光度を測定した。

統計：増殖曲線、CFU assay の結果はスチューデントの t 検定、Flow cytometry による Phagocytosis assay および LDs 生成量の多重比較は、ANOVA で差の有無を検定したのち Tukey 法を用いた。有意水準 0.05 未満で、統計学的に有意差があると判断した。

＜結果＞

ApoA-I と MAV の結合：HDL が結合する細菌を探索的に検討した結果、MAV が LPS を有するグラム陰性菌よりも HDL と強く結合することを認めた。さらに通常血清、非働化血清、HDL, ApoA-I と MAV とのインキュベーションによって、すべての条件で MAV が ApoA-I と結合することを確認した。

ApoA-I と細胞壁外層脂質の結合：MAV 細胞壁外層脂質と HDL の結合を確認するため、NC 膜に点着した菌体脂質に HDL を作用させ、膜上の ApoA-I を Dot blotting により検討した。ApoA-I 検出シグナルは菌体脂質量依存的に増大することを確認した。さらに TLC blotting により特定の脂質分画に ApoA-I が結合することを確認した。この分画から抽出した菌体脂質は、質量分析により *m/z* 1243.8 と 1271.8 で最大スペクトルを示し、また炭化水素鎖の存在を示唆する 28 Da ごとのスペクトルパターンを検出した。MS/MS で分子の同定を試みたが、脂質分子の同定には至らなかった。

HDL の殺菌作用：HDL の MAV に対する殺菌作用の有無を、MAV 増殖曲線で検討した。7H9 broth に MAV 接種後 144 時間までの培地濁度は、HDL の添加の有無による有意差を認めなかった。

MAV の貪食に対する HDL の影響：THP-1 Mφによる F-MAV 貪食率を Flow cytometry により検討した。コントロールの貪食率を 100%とした場合の HDL または ApoA-I 添加時の貪食率は、HDL で 68.7±1.5 %、ApoA-I で 83.3±0.4 %と有意に低下した。

生菌を使用した CFU assay では、HDL 無添加では $11.7\pm0.6\times10^4$ CFU であったが、HDL 添加で $8.5\pm1.2\times10^4$ CFU に有意に減少した。貪食後の THP-1 Mφ内での殺菌に対する HDL の影響の有無を検討するため、THP-1 Mφを貪食後 48 時間培養後に MAV を回収し、CFU assay を実施した。その結果、HDL 添加の有無によるコロニー数に有意差を認めなかった。

LDs 形成に対する HDL の影響：HDL および MAV の有無による THP-1 Mφ内の LDs 形成に対する影響を検討した。LDs 形成数は、THP-1 Mφに HDL(2.9±0.57 /cell)と MAV(1.6±0.33 /cell)をそれぞれ単独で添加した場合よりも、共存した場合(5.6±0.91 /cell)で最も増加した。また LDs を染色した THP-1 Mφから ORO を抽出し、その吸光度を計測した結果、HDL(2.7±0.26 $\times 10^{-7}$ Abs/cell)と MAV(3.2±0.46$\times 10^{-7}$ Abs/cell)をそれぞれ単独で添加した場合よりも、共存した場合(4.6±0.31$\times 10^{-7}$ Abs/cell)に有意に増加した。

＜考案＞

HDL と LPS の結合は、LPS の Lipids A が ApoA-I に包含されているリン脂質と疎水結合するモデルが提唱されている。しかし MAV 細胞壁外層脂質は ApoA-I と直接結合することから脂質-蛋白質間の結合であり、LPS とは異なる機序で結合していることを示唆している。この脂質分子は、TLC の動態から極性が極めて弱く、炭化水素鎖を有することを明らかにした。MAV 特異的な細胞壁外層脂質として知られる Glyco-peptide-lipids や、他の Mycobacterium が有する既知の脂質に一致するマススペクトルを得られず、分子種の同定はできなかった。

MAV に対する HDL の生理的意義について検討した。HDL が MAV を直接殺菌することは観察できなかったが、THP-1 Mφにより貪食される菌量の減少を見出した。HDL の結合は菌の生死に関わらず MAV 貪食量を有意に低下させた。Scavenger receptor class B type I (SR-BI)は ApoA-I 受容体であり、かつ Mycobacterium の非オプソニン化貪食受容体である。HDL との競合阻害により、MAV と SR-BI の結合が阻害されたことが HDL 結合 MAV の貪食が低下した原因であると考える。

Mycobacterium は Toll-like receptor 2/6 (TLR2/6)に認識され、TLR シグナル伝達経路を介して宿主細胞内の LDs 形成や各種 Scavenger receptor の発現を亢進する。本研究では、無血清条件下で MAV 単独よりも HDL と MAV を同時に添加した場合に THP-1 Mφの LDs 生成量が増加した。これは、MAV 感染により THP-1 Mφの SR-BI 発現亢進につづき、HDL から Cholesterol-ester の influx 量が増加、その結果 LDs 生成の増加につながったと考えることができる。HDL 結合 MAV による THP-1 Mφからの貪食回避や LDs 生成の増加について、今後 HDL-MAV-SR-BI の連関について実証するための解析が必要である。

＜結論＞

MAV 感染により惹起される炎症により、血管内から漏出した HDL と菌体が結合することが考えられる。MAV は細胞壁外層脂質を介して HDL と結合し、貪食細胞による排除から逃れることを示した。HDL の存在は MAV 感染を助長する可能性があることを示唆していると結論する。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5574　号 | 市村　直也 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　角　勇樹<br>副査　戸塚　実　　齋藤　良一 | |

（論文審査の要旨）

【背景、目的】高比重リポタンパク（HDL）は一般的には善玉コレステロールと呼ばれ、動脈硬化進展抑制作用を示す。HDL は自然免疫系にも作用することが知られている。申請者は、HDL の自然免疫機構の詳細を明らかにすることを目的に HDL が結合する細菌を検索する過程で *Mycobacterium avium* (MAV)が多量の HDL と結合する事を発見し、HDL と MAV の結合機序およびその生理的意義を検討した。

【試薬、細胞】HDL とアポリポタンパク A-I (ApoA-I)は、健常人より採血した血液から得た。HDL (d=1.063-1.210 g/mL)は超遠心法にて血清より分離し、ApoA-I は、HDL を脱脂後、ゲルろ過法により単離・精製した。*Mycobacterium avium* (ATCC 700737)を使用した。グラム陰性菌は東京医科歯科大学医学部附属病院で分離された菌株を使用した。マクロファージは THP-1 細胞を Phorbol myristate acetate いて分化させた細胞を用いた。(THP-1 Mφ)

【方法、結果】

(1) ApoA-I と MAV の結合：HDL が結合する細菌を探索的に検討するため、菌($3\times10^8$/mL)と血清を混合して作用させ、菌体を洗浄、溶菌して ApoA-I を Western blotting で検出した。その結果、MAV が LPS を有するグラム陰性菌よりも HDL と強く結合することを認めた。さらに通常血清、非働化血清、HDL、ApoA-I すべてにおいて MAV が ApoA-I と結合することを確認した。

(2) ApoA-I と MAV 細胞壁外層脂質の結合:MAV 細胞壁外層脂質と HDL の結合を確認するため、MAV 細胞壁脂質を Folch 法により抽出し、ニトロセルロース膜(NC 膜)に点着、その膜を HDL 溶液中でインキュベーション後、菌体脂質に結合した HDL を POD 標識 ApoA-I 抗体で検出した。ApoA-I 検出シグナルは菌体脂質量依存的に増大した。さらに MAV 細胞壁脂質を薄層クロマトグラフィ(TLC)で分画後、PVDF 膜に転写し、その膜を ApoA-I 溶液中でインキュベーション後、脂質分画に結合した ApoA-I を POD 標識 ApoA-I 抗体で検出した。その結果、特定の脂質分画に ApoA-I が結合することを確認した。この ApoA-I 結合分画から菌体脂質を抽出し、質量分析を行った結果 m/z 1243.8 と 1271.8 で最大スペクトルを示し、また炭化水素鎖の存在を示唆する 28 Da ごとのスペクトルパターンを検出した。MS/MS で分子の同定を試みたが、脂質分子の同定には至らなかった。

(3) HDL の殺菌作用： HDL の MAV に対する殺菌作用を、MAV 増殖曲線で検討した。7H9 broth に MAV 接種後 144 時間までの培地濁度(530nm)は、HDL の添加の有無による有意差を認めなかった。

(4) マクロファージの熱殺菌 MAV 貪食に対する HDL の影響：THP-1 Mφへの MAV 感染を、無

血清条件下のもと HDL を添加し、Multiplicity of infection(MOI) 20:1 の条件で 35℃ 24 時間で行った。熱殺菌した FITC 標識 MAV (F-MAV)を THP-1 Mφと HDL 添加条件下で共培養後、THP-1 Mφに貪食された F-MAV を Flow cytometry により検討した。コントロールの貪食率を 100%とした場合の HDL または ApoA-I 添加時の貪食率は、HDL で 68.7±1.5 %、ApoA-I で 83.3±0.4 %と有意に低下した。

(6) CFU assay：生きた MAV と THP-1 Mφを HDL 添加条件下で共培養後、貪食された MAV を THP-1 Mφから回収し 7H11 agar に接種、3 週間培養後、発育したコロニー数をカウントする CFU assay を行った。その結果 HDL 無添加で $11.7\pm0.6\times10^4$ CFU、HDL 添加で $8.5\pm1.2\times10^4$ CFU と有意に減少した。さらに貪食後の THP-1 Mφ内での殺菌に対する HDL の影響の有無を検討した。THP-1 Mφを貪食後 48 時間培養後に MAV を回収し、CFU assay を実施した。その結果、HDL 添加の有無によるコロニー数に有意差を認めなかった。

(7) 脂肪滴(LDs)の定量分析：THP-1 Mφ内の LDs 形成に対する HDL の影響を検討した。MAV と THP-1 Mφを HDL 添加条件下で共培養、Oil red O(ORO)で染色して細胞内の LDs を光学顕微鏡で観察した。また THP-1 Mφから ORO を抽出し 540nm で吸光度を測定した。LDs 形成数は、THP-1 Mφに HDL(2.9±0.57 /cell)と MAV(1.6±0.33 /cell)をそれぞれ単独で添加した場合より、共存した場合(5.6±0.91 /cell)で最も増加した。吸光度を計測した結果でも、HDL($2.7\pm0.26\times10^{-7}$ Abs/cell)と MAV($3.2\pm0.46\times10^{-7}$ Abs/cell)をそれぞれ単独で添加した場合より、共存した場合($4.6\pm0.31\times10^{-7}$ Abs/cell)に有意に増加した。

【考察、意義】

MAV 細胞壁外層脂質が ApoA-I と直接結合することから脂質-蛋白質間の結合である。この脂質分子は、TLC の動態から極性が極めて弱く炭化水素鎖を有することが明らかになったが、分子種の同定はできなかった。

生理的意義については HDL 存在下で THP-1 Mφにより貪食される菌量の減少を見出した。HDL が MAV を直接殺菌することは観察できなかった。申請者は、「Scavenger receptor class B type Ⅰ (SR-BI)は ApoA-I 受容体であり、かつ *Mycobacterium* の非オプソニン化貪食受容体である。HDL との競合阻害により、MAV と SR-BI の結合が阻害されたことが HDL 結合 MAV の貪食が低下した原因」と考察した。無血清条件下で MAV 単独よりも HDL と MAV を同時に添加した場合に THP-1 Mφの LDs 生成量が増加した。申請者は、「*Mycobacterium* は Toll-like receptor 2/6 に認識され、そのシグナル伝達経路を介して宿主細胞内の LDs 形成や各種 Scavenger receptor の発現を亢進する。MAV 感染により THP-1 Mφの SR-BI 発現亢進につづき、HDL から Cholesterol-ester の influx 量が増加、その結果 LDs 生成の増加につながったと考えることができる。」と考察した。さらに「MAV は細胞壁外層脂質を介して HDL と結合し、貪食細胞による排除から逃れ、感染を助長する可能性があることを示唆する」と結論付けた。

申請者は MAV が HDL 中の ApoA-I と結合する事を発見し、HDL により貪食細胞による貪食が低下することを発見した。MAV 感染症は薬物療法が効きにくく、10 年生存率 4 割とのデーターがある。MAV 感染症患者は体重減少や栄養不良が問題となる患者が多い。本研究はこれまで不明であった非結核性抗酸菌感染症の病態について新たな知見を提供するものであり、臨床的に

非常に有意義な研究である。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 名倉　豊 |
| 論文審査担当者 | 主査　窪田　哲朗<br>副査　星　治　　戸塚　実　　新井　文子 |
| 論　文　題　目 | Regulation of the lysophosphatidylserine and sphingosine 1-phosphate levels in autologous whole blood by the pre-storage leukocyte reduction |

（論文内容の要旨）

＜結言＞

同種血輸血による非溶血性輸血副作用（NHTRs）の発症には、同種抗原への暴露や保存期間中に蓄積するサイトカインやリゾリン脂質（LPL）が関与すると考えられている。LPL にはリゾホスファチジルコリン（LPC）、リゾホスファチジン酸（LPA）やスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）など、様々な種類が存在する。LPC は重篤な NHTRs である輸血関連急性肺障害（TRALI）の発症に関与することが示唆されている。一方、LPC はリゾホスホリパーゼ D 活性をもつオートタキシン（ATX）の作用により、LPA に変換され、この LPA も様々な生理活性作用を有することが報告されている。これまで私は LPL の NHTRs への関与の可能性、また保存前白血球除去処理（白除）が血液中 LPL に及ぼす影響に着目し、全血保存する自己血液を用いて検討を行ってきた。その結果、白除により、LPA 濃度は有意に減少し、一方でその前駆体である LPC は増加していた。また、LPA および LPC の濃度変化は、ATX に依存するものでないことを確認した。

本研究では他の生理活性を有する LPL であるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)および S1P に着目し検討をおこなった。LysoPS は細胞膜内側に存在しアポトーシスにより細胞膜外に移動するホスファチジルセリン（PS）の 1 つのアシル基が切り出された構造を有し、肥満細胞の脱顆粒反応やマクロファージの好中球貪食作用の促進などに関与することが知られている。一方、S1P は赤血球や血小板においてスフィンゴシンキナーゼによるスフィンゴシンのリン酸化によって産生、血漿中に分泌され、炎症性疾患や免疫反応に重要な役割を担っていることが知られている。これらより、LysoPS や S1P はアレルギー反応や輸血関連免疫修飾作用（TRIM）などの NHTRs の発症に関与する可能性があり、今回、全血保存の自己血液を用いて、これら製剤の保存期間および白除による LysoPS 及び S1P の変化について検討した。

＜対象と方法＞

<u>保存期間や白除が自己血液中の LysoPS 及び S1P 濃度に及ぼす影響</u>

対象は自己血貯血を実施した整形外科患者 26 症例（46 バッグ）とした。CPDA-1 加バッグに採血後、白除処理前の検体（白除前検体）を一部採取した後、白除処理を行い、白除済み製剤を未白除検体とともに冷蔵保存した。手術前日または当日に白除済み製剤より検体（白除後検体）

を採取し検討に用いた。すなわち今回の検討では、同一患者で同一日に採取された自己血液より、白除処理した検体（白除後検体）および白除未処理検体（白除前検体）を採取し検討に用いた。自動血球計数装置（XE-5000）にて各血液細胞数を測定し、Liquid Chromatography –tandem Mass Spectrometry（LC-MS/MS）を用いて LysoPS 及び S1P 濃度を測定した。保存期間および白除の影響について解析し、両群間の差異について検討を行った。

LysoPS 及び S1P の産生機序の解明のための検討

LysoPS 及び S1P の産生・放出に主に関与する血球細胞を確認するため、in vitro 系で健常人血液を白除フィルターの材料と接触させた後、これら濃度を確認した。健常人血液は、全血または PRP（Platelet rich plasma）を分離して用い、フィルター材料との接触時間は 20 分、40 分、60 分および 90 分間とした。LysoPS 及び S1P 濃度を LC-MS/MS にて測定し、β-Thromboglobulin（β-TG）を ELISA にて測定した。

統計学的解析方法

自己血液保存期間と LysoPS 及び S1P 濃度との相関関係は、スピアマンの順位相関分析を用いて検定し、白除処理による濃度比較にはマン-ホイットニーの U 検定で評価した。さらに in vitro によるフィルター接触試験の LysoPS 及び S1P 濃度変化およびβ-TG 濃度比較には paired- t 検定を用いた。いずれも $p < 0.05$ を有意差ありとした。

＜結果＞

1）保存期間や白除による自己血液中の LysoPS 及び S1P 濃度の変化

自己全血貯血患者の背景因子

患者年齢は平均 63 歳（31~77 歳）、貯血量は平均 375.6 ml（300-400 ml）であり、中央値は 400 ml であった。貯血後の保存期間の平均は 20 日間（6-35 日）で中央値 21 日間であった。白除に要した時間は平均 16 分 53 秒（10-49 分）で中央値 15 分であった。

白除実施前後の血液細胞数の変化

白除により自己血液中の白血球数および血小板数は大幅に減少した。一方、赤血球数は白除の影響をほとんど受けなかった。

保存期間による LysoPS 及び S1P 濃度の変化

白除前検体、白除後検体いずれにおいても、総 LysoPS 濃度は保存日数依存的に増加した。しかし、白除後検体の総 LysoPS 濃度は白除前検体のそれと比べ、全体的に減少していた。一方、S1P 濃度は白除前検体、白除後検体ともに保存期間中の有意な変化を認めなかった。

白除による LysoPS 及び S1P 濃度の変化

白除により総 LysoPS 濃度は有意に減少した（白除前検体 vs 白除後検体 0.284 ± 0.126 vs 0.085 ± 0.134 μM、$p < 0.01$）。一方、S1P 濃度は白除によって有意に増加した（白除前検体 vs 白除後検体、0.72 ± 0.19 vs 1.31 ± 0.35 μM、$p < 0.01$）。LysoPS の各分子種の変化をみると、C18:0、C18:1、C18:2、C20:4、C22:6 が白除前検体で検出され、白除処理により減少した（$p < 0.01$）。一方、C14:0、C16:0、C16:1、C18:3、C20:3、C20:5、C22:5 は白除前検体、白除後検体いずれも検出されなかった。

2）LysoPS 及び S1P の産生機序の解明のための検討

フィルター材料との接触による LysoPS 及び S1P 濃度変化の検討では、全血を用いた場合、総 LysoPS 濃度がフィルター接触 90 分後に有意（$p < 0.05$）な増加を示し、PRP を用いた場合は S1P 濃度がフィルター接触後 90 分後に有意（$p < 0.05$）に増加した。また、β-TG はフィルター接触により、全血及び PRP のいずれにおいても時間依存的な増加を認めた。一方、フィルター材料未接触の全血、および PRP においては、総 LysoPS、S1P およびβ-TG の濃度変化を認めなかった。

＜考案＞

現在、自己血輸血は適切に実施された場合、最も安全な輸血と考えられている。しかし、同種血液に施されている白除は自己血液には施されておらず、製剤中の白血球や血小板が保存期間中に産生するサイトカインや LPL などが原因となる NHTRs が起こる可能性は残っている。

今回の検討では、冷蔵保存で自己血液中の LysoPS 濃度が保存期間中に増加し、白除を施すことにより、その蓄積は抑制された。一方で S1P 濃度は保存期間中に変化しなかったが、白除により濃度の増加が認められた。また、白除に伴って認められた S1P 濃度の増加は、白除処理中に血液細胞、特に血小板のフィルター接触により起こったものであると考えられた。

LysoPS は、細胞のアポトーシスや活性化刺激によって細胞表面に発現する PS に PS 特異的ホスホリパーゼ $A_1$（PS-$PLA_1$）やペルオキシレドキシン 6（Prdx6）の酵素が作用し産生されると考えられている。製剤中の白血球や血小板は冷蔵保存によりアポトーシスが誘導され、細胞表面上に PS が発現する。この PS 量に依存し LysoPS が産生されると考えられる。しかし、ヒト血液細胞上には PS-$PLA_1$の mRNA が確認されず、さらに血液細胞数と PS-$PLA_1$抗原濃度は非依存性である。よって、LysoPS の増加は、主に冷蔵保存中の白血球や血小板が原因と考えられ、細胞表面に多量の PS が漏出し、血漿中の PS-$PLA_1$や Prdx6 の作用により LysoPS 濃度が増加したと考えられた。白除により、この PS のソースである白血球や血小板が除去され、LysoPS 濃度が減少したと考えられる。そのほか白血球自身の関与として、マクロファージやリンパ球等に発現する PS リパーゼ活性をもつ □/□hydrolase fold domain 16A や、好中球の NADPH オキシダーゼが細胞内において LysoPS 産生に関与しているという報告があることから、白除は白血球自身からの LysoPS 産生も抑える可能性がある。一方、in vitro の検討で白除フィルターへの接触により、LysoPS の放出が確認されたが、その濃度は保存中の製剤で認められた蓄積量に比べると極めて低かった。LysoPS の産生には白血球や血小板が重要であり、白除は LysoPS 蓄積の予防に重要な役割を果たすと考えられる。各 LysoPS 分子種の内、C18:1 が白除により最も減少した。特に C18:1 は C18:0 と比較し、受容体との感受性が高いことが報告されている。LysoPS の輸血副作用への関与が確認された場合、自己血輸血でも NHTRs 予防を目的に白除の導入を検討する必要がある。

NHTRs を含む輸血副作用の発症には、主に抗 HLA 抗体などの同種抗体の関与が大きいが、その他の蛋白や脂質などのメディエーターの関与も示唆され、赤血球製剤中に蓄積する脂質成分が輸血副作用に関与する可能性が報告されており、これらメディエーター蓄積の抑制は輸血副作用の予防につながると考えられ、白除が輸血副作用防止効果の一つとなる。LysoPS は肥満細胞の脱顆粒反応の促進やヒスタミン放出、T リンパ球増殖抑制やマクロファージによるアポトーシス細胞貪食の増強など、様々な反応を誘導することが報告されている。従って、高濃度 LysoPS の

蓄積は、重篤な輸血副作用であるアナフィラキシーショックやTRIMなどを引き起こす可能性があり、白除はこれらの抑制に重要な役割を果たす可能性がある。今後、これら副作用との因果関係を明らかにする必要がある。

一方、S1Pは活性化血小板より放出されることから、保存期間中の濃度上昇および白除による濃度減少を予測した。しかし、保存期間中は変化せず、白除によって濃度上昇が確認された。S1Pは活性化血小板より放出されることが知られている。今回の検討で白除フィルターとの接触により、PRP中のS1P濃度は有意に増加し、他の血小板活性化マーカーであるβ-TGも同様に増加したため、白除によるS1P濃度の増加は主に白除処理中のフィルター通過時の血小板が活性化しS1Pが放出されたためと考えられた。このS1P増加と副作用との関連はまだ不明な点が多いが、今回の検討によりin vitroにおいてその濃度上昇があったものの、大きな差ではなかったこと、また、S1Pは内皮細胞上のlipid phosphate phosphataseにより速やかに代謝されることから、S1Pが輸血副作用に関係する可能性は低いと考えられる。

＜結語＞

白除はLysoPSの蓄積を効果的に抑制することができると考えられた。しかし、LysoPSやそのほかのリゾリン脂質と輸血副作用との直接的関係については未だ不明な点があり、この関係性について今後明らかにすることにより、自己血輸血に伴うNHTRsのリスク軽減のための対策を講じることが可能となる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5575　号 | 名倉　豊 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　窪田　哲朗<br>副査　星　治　　戸塚　実　　新井　文子 | |

（論文審査の要旨）

学位申請論文 “Regulation of the lysophosphatidylserine and sphingosine 1-phosphate levels in autologous whole blood by the pre-storage leukocyte reduction. (Transfusion Medicine, 2016;26:365-372)”について審査した。

同種血輸血による非溶血性副作用(NHTRs)の発症には，同種抗原への暴露や，保存期間中に蓄積するサイトカインやリゾリン脂質が関与すると考えられている。リゾリン脂質には，リゾホスファチジルコリン，リゾホスファチジルセリン(LysoPS)，リゾホスファチジン酸，スフィンゴシン 1-リン酸(S1P)など，様々なものがある。LysoPS は細胞膜の内側に存在してアポトーシスにより細胞膜の外側に移動するホスファチジルセリンのアシル基が切断された構造を有し，肥満細胞の脱顆粒やマクロファージの好中球貪食作用の促進に関わることが知られている。また，S1P は赤血球や血小板において，スフィンゴシンキナーゼによるスフィンゴシンのリン酸化によって生じ，血漿中に遊離して炎症や免疫に関わることが知られている。したがって，LysoPS や S1P も NHTRs の原因となる可能性が考えられる。本研究では全血保存の自己血を用いて，これらの製剤中に検出される LysoPS と S1P の濃度の，保存および白血球除去（白除）による影響が検討された。

自己血貯血を実施した整形外科患者 26 症例，46 バッグの検体を用いた。CPDA-1 加バッグに採血後，白除前の検体を一部採取した後，白除処理を行い，冷蔵保存した。手術時に白除後検体の一部を採取し，白除前検体とともに検討に用いた。その結果，白除前検体，白除後検体，いずれにおいても，保存日数が長くなるにしたがって LysoPS 濃度が増加したが，S1P 濃度は有意な変化を認めなかった。白除処理によって，LysoPS 濃度は低下し，S1P 濃度は上昇した。健常人血液を白除フィルターに接触させる検討では，全血を用いた場合にはフィルターとの接触によって LysoPS と β-thromboglobulin が増加し，多血小板血漿ではフィルターとの接触によって，S1P と β-thromboglobulin が増加した。

以上の結果から，血液製剤は保存中にアポトーシスを起こす白血球や血小板に由来するホスファチジルセリンから LysoPS が作られて蓄積すること，白除処理はこの原因を除くことから LysoPS の減少に有効であること，白除処理は血小板を活性化させて LysoPS の増加をもたらすが，その濃度は保存中に蓄積する LysoPS の濃度に比べると著しく低値であることなどが明らかにされた。したがって，現状では白血球除去が行われていない自己血輸血においても，白血球を除去することが NHTRs のリスクの軽減に役立つ可能性が示唆された。

臨床現場の問題点に起因する研究課題に取り組んだ優れた研究であり，博士（保健学）論文としてふさわしいものと判断できる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 楾　清美 |
| 論文審査担当者 | 主査　窪田　哲朗<br>副査　宮坂　尚幸　　沢辺　元司 |
| 論　文　題　目 | Knowledge and attitude toward cervical cancer and its prevention among female workers in the Vientiane Capital, Lao PDR |

（論文内容の要旨）

＜結言＞

子宮頸癌は、高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染による発癌が知られており、子宮頸癌の 90%以上からこのウイルスが検出される。全世界の女性において、528,000 名が新たに子宮頸癌に罹患し、今なお 266,000 名が死亡している。子宮頸癌新規罹患者の 84%と子宮頸癌死亡者の 87%は、後発開発途上国に居住しており、後発開発途上国であるラオス人民民主共和国においても新規罹患者数・死亡者数はともに肝癌、乳癌に続き多く、ラオス人女性の健康を脅かす疾患の１つであると世界保健機構（WHO）から報告されている。しかし、ラオスでは国家レベルでの子宮頸癌対策プログラムは未だ確立されていない。現在、子宮頸癌予防プログラム実施に向け草案が作成されつつあるが、プログラムを成功へ導くためには、プログラム対象者が子宮頸癌とその予防に関する十分な知識と意識を持つことが不可欠である。そのため、知識レベル向上を目指した健康教育プログラムの開発が必要であるが、ラオス人女性の子宮頸癌に関する知識、認識、態度に関する研究はごく少数であり、現状の知識レベルの詳細は明らかになっていない。

今回の調査は、首都ビエンチャンのラオス人女性労働者の子宮頸癌とその予防に関する知識、認識レベルを評価した。

＜対象と方法＞

対象者：ラオスの首都ビエンチャンに位置するラオス国保健省（2 名）、ラオス国立保健科学大学（23 名）、ラオス国立友好病院（71 名）、ラオス国立マホソット病院（47 名）、Lao Brewery Company（80 名）、Electric du Laos（133 名）で働いている女性 356 名を対象とした。対象者 356 名の職業別内訳人数は、医療従事者群 95 名、事務員群 209 名、工場労働者＋清掃員群 52 名であった。

データ収集：

4 つのセクション：１）人口統計学的特性（年齢、民族、宗教、教育レベル、月収）、２）リスク行動（婚姻歴、妊娠歴、出産歴、避妊歴、喫煙歴）、３）子宮頸癌とその予防方法に関する知識、４）子宮頸癌の予防と癌スクリーニングに関する認識・行動で構成された質問票を用いて、

ラオス人医師がインタビュー形式でデータを収集した。セクション 2 のリスク行動に関する避妊具の使用状況については、45 歳以下の 260 名の参加者を評価対象とした。知識レベルの採点は、“いいえ”または“分からない”を 0 点、“はい”を 1 点とし、“はい”と答えていてもその詳細が不正解の場合は 0 点とした。知識レベルを評価する質問１３項目のうち “Do you know what are genital warts?”の回答の多くが、その詳細ではなく情報源を回答していたため採点項目から除外し、12 点を満点とし評価した。認識に関しては、“はい”“いいえ”“分からない”で評価した。

データ解析：収集したデータは、医療従事者群、事務員群、工場労働者＋清掃員群の３群間で比較検討した。質的変数の解析は、$\chi^2$検定もしくはフィッシャーの正確検定を行い、量的変数の解析は、分散が等しい場合は ANOVA、分散が不均等な場合は Kruskal-Wallis 検定を行った。各群間での知識レベルと認識に関する評価のため、Steel-Dwass 法による多重比較を行った。

＜結果＞

人口統計学的特性：対象者の平均年齢は、38.2±9.8 歳（範囲 21-69 歳）であり、民族は Lao 族（99.4%）、宗派は仏教徒（99.2%）が最も多かった。教育レベルに関しては、医療従事者全員が高卒以上、事務員群の 73%が大卒以上、工場労働者と清掃員の 90.4%が高卒以下であり、就学歴のない人（3.8%）もみられた。1 か月の平均収入の中央値は事務員群が最も高かった。

リスク行動：対象者の 92.6%に婚姻歴があり、独身者は 3 群のうち事務員群（11.5%）が最も多かった。出産経験者は 82.6%であり、平均妊娠回数は 2.2 人であった。妊娠経験のある 294 名中、この質問に答えた 293 名の初出産平均年齢の分布では、21－30 歳間が 81.6%で最も多かったが、20 歳以下での妊娠経験者（7.5%）もみられた。避妊方法のなかでコンドームの使用率がもっとも高かったが、53.5%は全く避妊をしていなかった。喫煙歴については、0.6%のみが喫煙していた。過去に Pap スメア検査を受けたことがない人は 53.7%であり、特に工場労働者＋清掃員群において有意に高かった（$P<0.01$）。

子宮頸癌とその予防に関する知識と態度：知識レベルスコアは 12 点満点で、平均スコアは、4.9 ± 2.6 だった。平均スコアは医療従事者群が最も高かった。短期大学卒業以上の高学歴群の知識レベルの平均点は 5.3 点であり、高校卒業以下の低学歴群の平均点 3.2 点より有意に高かった（$P<0.001$）。Pap スメア検査を受けたことのある人の知識のレベルの平均点は（5.8 点）で、受けたことのない人の平均点（4.1 点）より有意に高かった（$P<0.001$）。子宮頸癌、HPV、HPV ワクチンについてそれぞれ全体の 89.9%、34.0%、27.8%が聞いたことがあり、3 群間では３つのすべての項目において工場労働者＋清掃員群（21.2%）がもっとも低かった。子宮頸癌の原因である HPV 感染と答えた人は 3.4%で、リスク行動に関しては、性行為と答えた人(14.6%)がどの群においても最も多かった。子宮頸癌の症状に関する質問では、無症状と答えた人は、医療従事者群 3 名（3.2%）のみであった。どの群においても 80%以上が複数のセクシャルパートナーを持つことは子宮頸癌のリスクであると答えた。HPV の伝搬経路に関する質問では、性行為が 29.2%で最も多い答えだった。子宮頸癌、HPV、HPV ワクチンの情報源は、医療専門職とメディアが主要な情報源であった。ラオスにおいて子宮頸癌は一般的な疾患であると思っている人は、医療従事者群（84.2%）が工場労働者＋清掃員群（51.9%）より有意に高かった（$P<0.001$）。対象者自身が

子宮頸癌のリスクがあると感じている人は、3 群ともにそれぞれ約 50%であった。コンドームを使用しない性行為は子宮頸癌のリスクであると思っている人は 80.9%で、医療従事者群が他の 2 群より有意に高かった（*P*<0.05）。複数のセックスパートナーを持つことは子宮頸癌のリスクであると思っている人は 91.0%で、医療従事者群が工場労働者＋清掃員群より有意に高かった（*P*<0.05）。喫煙は子宮頸癌のリスクであると思っている人は 46.1%で、医療従事者群と工場労働者＋清掃員群は事務員群より有意に高かった（*P*<0.05）。90%以上の人がラオス政府による HPV 感染に対するワクチン実施、ワクチン後の婦人科医による診察を希望した。低価格であれば自分でワクチン接種をしたいと思った人は 92.1%であった。性行為を経験する前の女子に HPV ワクチンを接種した方がよいと思った人は、90.4%であった。

過去に子宮頸癌を受診しなかった理由：

過去に Pap スメア検査を受けたことがない人は 191 名（53.7%）であり、その理由は、“症状がない”（55 名：28.8%）が最も多かった。子宮頸癌のリスクがあると思っていても、過去に Pap スメア検査を行ったことがない人は、84 名（23.6%）で、検査を受けなかった理由は、“検査をうけることが恥ずかしい”（29 名：8.1%）が最も多かった。

＜考案＞

今回の調査は、子宮頸癌とその予防に関する知識、態度に関して都市部のラオス人女性労働者（医療従事者、事務職員、工場労働者＋清掃員）を対象として初めて実施された調査である。子宮頸癌とその予防に関する知識レベルは、工場労働者＋清掃員群が最も低かったが、全体的に知識の欠如がみられた。約 90%の対象者が子宮頸癌という言葉を聞いたことがあったが、その詳細に関して知らない人が大多数であった。

子宮頸癌は、Pap スメア検査により前癌病変を検出し早期発見・早期治療により予防できる疾患である。一部の先進国においては、国家子宮頸癌予防プログラムが確立され HPV ワクチン、Pap スメア検査や HPV 検査が実践されているが、低所得国ではこれらの重要性を認知しながらも未だ確立されていない国が多い。子宮頸癌予防のためには、Pap スメア検査は非常に有用かつ効果的な検査方法の 1 つである。ラオスにおいては、Pap スメア検査実施可能施設はわずかであり、また、Pap スメアスクリーニングを行う細胞検査士や細胞診断を行うことのできる病理医も少数である。そのため、ハード面においては、検体採取後、検体を細胞診断可能施設へ輸送するシステムおよび細胞診断を行うための標本作製システムの確立により Pap スメア検査の普及率増加が示唆される。また、ソフト面においては国内外での病理診断医、細胞検査士、病理検査専門技師の育成を行うことも同時に行う必要があると思われる。

Pap スメア検査を受けない理由として、恥ずかしさを理由として挙げる女性がいたため、女性産婦人科医による検体採取推進や、女性看護師や検査技師に検体採取のトレーニングを行うことにより改善が期待される。

子宮頸癌予防プログラムを成功させるためには、ラオス女性の子宮頸癌やその予防に関する知識レベルの向上が必須である。今回の子宮頸癌に関する情報源は、医療専門職、メディアなどであったが、医療情報を提供する役割を担う医療従事者群の知識レベルは高くなかったため、子宮頸癌に関する健康教育を実践できる医療専門職の育成も急務と思われる。一方で、職場レベルで

の子宮頸癌教育および検診促進プログラムも子宮頸癌罹患率および死亡率を減少させる重要な因子となり得ると考える。

以上から、ラオス国家子宮頸癌予防政策制定へ向け、 1 )Pap スメア検査を含む子宮頸癌病理診断システムの確立、2) 子宮頸癌の診断にかかわる病理医・技師と健康教育実施のための人材育成、3) ラオス人女性や彼女たちを取り巻く人々の子宮頸癌に関する知識向上のための健康教育の実施が必要である。

＜結論＞

今回、我々はラオス都市部の女性労働者の子宮頸癌とその予防に関する知識レベルが低いこと、特に工場労働者＋清掃員群で低かったことを明らかにした。職場レベルでの子宮頸癌に関する定期的な健康教育を実施することにより、労働者における知識レベルの向上を導くとともに検診受診率の増加へ繋がると思われる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5576　号 | 楾　清美 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主査　窪田　哲朗<br>副査　宮坂　尚幸　　沢辺　元司 | |

（論文審査の要旨）

学位申請論文 “Knowledge and attitude toward cervical cancer and its prevention among female workers in the Vientiane Capital, Lao PDR. Journal of Medical and Dental Sciences, in press.”について審査した。

子宮頸癌は女性の悪性腫瘍関連死亡原因の上位を占めている。先進国では原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)に対するワクチン接種などによって，ある程度制圧が進んでいるが，途上国では患者が多く，対策の強化が求められている。本研究はラオス人女性労働者の子宮頸癌に関する知識や認識状況を調査して，ラオスにおける子宮頸癌予防対策の立案に必要な基礎データを得ることを目的として実施された。

申請者らは 2016 年 9 月から 10 月にかけて，首都ビエンチャンで働く健常人女性 356 名を対象として聞き取り調査を実施し，結果を医療従事者群，事務職群，工場労働者および清掃員群の 3 群に分けて解析した。その結果，子宮頸癌に関する知識レベルは，最も高い医療従事者群においても，平均スコアが 12 点満点中 6.8 点と低いレベルに留まっていることが明らかにされた。子宮頸癌，HPV，HPV ワクチンに関する情報源としては，医療従事者から得たという回答が最も多かった。対象者の 53.7%は Pap スメア検査を受けた経験がなく，その理由としては，症状がない，恥ずかしい，などが多かった。これらの結果や文献的考察を踏まえて申請者らは，子宮頸癌に関する健康教育，医療従事者への子宮頸癌に関する情報提供，健康教育実施者の育成および効果的な教育手法の開発，Pap スメア検査の啓蒙活動，病理医および臨床検査技師の育成，女性の医師，看護師，臨床検査技師による検体採取トレーニング，農村部を含めた検診システムの確立などを推進する必要があるとの提言をまとめている。

本論文は，ラオス都市部の女性労働者を対象として行われた初めての子宮頸癌とその予防法等に関する認識を調査した研究であり，ラオス国家子宮頸癌予防対策事業の計画作成に向けた重要な基礎データを提供するもので，博士（保健学）審査論文としても相応しいものと判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 緒方　勇亮 |
| 論文審査担当者 | 主査　沢辺　元司<br>副査　淺原　弘嗣　　赤澤　智宏 |
| 論　文　題　目 | Anterior cruciate ligament-derived mesenchymal stromal cells have a propensity to differentiate into the ligament lineage. |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

ヒト膝前十字靭帯（hACL）は、大腿骨と脛骨をつなぐ、膝関節を構成する組織である。hACL は再生力に乏しいため、治療には自家移植、同種移植、異種移植や生体材料を使った方法が用いられる。現在は、自家腱を使った再建術が主な方法となっており、良好な治療成績も得られているが、この方法は代替組織が限られていることや患者への負担が大きいため、新たなる治療法の開発が求められている。

体内には、組織の再生に関わる組織幹細胞が存在し、組織の恒常性に関与していると考えられている。近年では、それら幹細胞を利用した細胞治療の開発が試みられている。その中でも、体内のあらゆる部位に存在する間葉系幹細胞（MSC）は高い安全性と増殖性を持つことから、様々な基礎・臨床研究に用いられている。MSC は幹細胞の一般的な定義である増殖能力（自己複製能）と骨・軟骨・脂肪への分化能力（多分化能力）で定義される。過去の報告において、hACL 組織中には、増殖能力の高い細胞集団が確認されており、間葉系マーカー（CD29, 44, 90, 105）を発現していることが報告されている。しかし、hACL 組織にはコラーゲン、弾性繊維、線維芽細胞といった様々な成分が含まれており、組織に存在する MSC の詳細な性状・局在の解明には未だ至っていない。

本研究では､hACL 由来細胞集団から靭帯 MSC 特異的なマーカー(CD73 及び CD90)を同定した。また、CD73, 90 共陽性細胞は、MSC の能力を持っている細胞集団であることを明らかにした。さらに、ACL 由来 MSC の靭帯細胞分化能力の解析を行ったところ、骨髄由来 MSC と比較して、高い分化指向性を有していた。CD73, 90 共陽性 ACL 由来 MSC を解析することで、靭帯特有の幹細胞特性及び靭帯再生能力の解析が可能になると考えられる。

＜対象と方法＞

<u>組織の収集と処置</u>：変形性膝関節症と診断された 14 名（男性 5 名、年齢中央値 73 歳）に対し、本学医学部附属病院にて行われた人工膝関節置換術の際に得られた廃棄予定の hACL と大腿骨骨片（hBM）を使用した。本研究は本学倫理委員会の許可の元（1030 番）、本学のガイドラインに従い、インフォームド・コンセントの後に許可が得られたサンプルのみ使用している。得られた

組織は洗浄後、2 mg/mL コラゲナーゼ溶液にて 1 時間 37℃で振盪した。振盪後 70 μm セルストレイナーにて破片を除去し、遠心して細胞を集めた。

細胞の分離：コラゲナーゼ処理後に得られた細胞を 1.0–5.0 × $10^7$ 個/mL に調整し、蛍光標識された各表面抗原に対する抗体を用いて、氷上で 30 分染色を行った。染色後洗浄を行い、フローサイトメーターにて解析を行った。

コロニー形成能の解析：フローサイトメーターにて細胞を分取し、6-well プレートの 1 ウェルに 500 細胞ずつ、培養液（Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) + 20%ウシ胎児血清（FBS） + 5 ng/mL basic fibroblast growth factor とともに播種した。培養は 37℃、5% $CO_2$ 下で行い、培地交換は 1 週間に 2 回の頻度で行った。3 週間培養した後クリスタル紫染色を行い、50 細胞以上確認されたものを 1 コロニーとして計測した。

MSC の脂肪・骨・軟骨分化誘導：フローサイトメーターにて細胞を分取し 3 継代した後、24-well プレートの 1 ウェルに対し、脂肪分化誘導では 2.0 × $10^4$、骨分化誘導では 1.5 × $10^4$細胞を播種し、脂肪・骨分化誘導培地（Lonza 社、スイス）、37℃、5% $CO_2$ 下で 2 週間培養を行った。軟骨分化誘導は 2.0 × $10^5$細胞を 1.5 mL チューブへ分注し、軟骨分化誘導培地（Lonza 社、スイス） + 500 ng/mL bone morphologic protein (BMP)-6、37℃、5% $CO_2$ 下で 3 週間培養を行った。いずれの分化誘導も培地交換は 1 週間に 2 回行った。

免疫組織化学染色：即時凍結した hACL は川本法にて切片作製を行った。切片の厚さは 12 μm で統一し、薄切後すぐに低温エタノールにて固定した。洗浄後傾向標識された抗体にて、室温下で 1 時間抗体染色を行った。

腱・靭帯分化誘導：フローサイトメーターにて細胞を分取し 3 継代した後、24-well プレートの 1 ウェルに対し 2.0 × $10^4$細胞を播種し、37℃、5% $CO_2$ 下で 6 日間培養を行った。培養液は DMEM + 10% FBS + 50 ng/mL BMP-12（Sigma-Aldrich 社、米国）を用い、培地交換は培養 3 日目に行った。

mRNA 発現量解析：腱・靭帯分化誘導を行った細胞に TRI Reagent（Sigma-Aldrich 社、米国）を加え細胞を溶解後、RNA を得た。cDNA を合成後、TaqMan probe を用い StepOne Real-Time PCR システム（Life Technologies 社、米国）にて解析し、β-Actin で発現量を補正した。

統計：有意差検定には Student の T 検定、もしくは Mann-Whitney の U 検定を用い、多重比較の場合は Bonferroni 法を用いて補正を行い、p 値が 0.05 未満となるものを有意とした。

＜結果＞

hACL 由来細胞における MSC マーカーの発現：hACL をコラゲナーゼ処理後蛍光標識された抗体による染色を行い、フローサイトメーターにて解析を行ったところ、CD29, 44, 73, 90 は高発現細胞が確認された。一方、CD105, 106, 140a, 146, 166, 271 の発現は低い、あるいはほとんどなかった。表面抗原の発現をもとにコロニー形成能を比較すると、全生細胞を播種した時に比べ、CD29, 73, 90 陽性細胞が有意に高いコロニー形成能を持っていた（*$p < 0.05$）以上のことから、CD29, 73, 90 が hACL からコロニー形成細胞を純化することが可能であることが示唆された。

CD73,-90 共陽性細胞を用いた MSC の新鮮純化：コラゲナーゼ処理後の hACL に対し、蛍光標識された抗 CD29, 73, 90 抗体にて染色を行い、フローサイトメーターにて解析を行ったところ、CD73 陽性細胞分画は CD29 陽性細胞分画とほぼ一致することがわかった。CD73, 90 共陽性細胞

をフローサイトメーターにて分取し、コロニー形成能を他の分画と比較すると、有意にコロニー形成能が高かった（*p < 0.05）。さらに CD73, 90 共陽性細胞を培養したところ、MSC マーカーとされる細胞表面抗原の発現が確認され、骨・軟骨・脂肪分化誘導を行うと、それぞれの細胞に分化したことから、CD73, 90 共陽性細胞は MSC と同様の能力を有した細胞集団であることが確認された。

CD73,-90 共陽性細胞の hACL における局在：即時凍結後切片作製を行った hACL に対し、蛍光標識した各抗体で蛍光染色を行ったところ、CD73,90 共陽性細胞は hACL 表面近くの小さな類洞構造付近に位置していることがわかった。さらに血管内皮細胞マーカーである CD31 との共染色を行うと、類洞構造は血管ではないことが示唆された。また、靭帯・腱マーカーである 1 型コラーゲン(Col1A1)や Mohawk(Mkx)との共染色の結果、CD73,90 共陽性細胞が Mkx を発現し、その周囲を 1 型コラーゲンが囲っていることも確認された。

由来組織の違いによる MSC 細胞表面抗原の解析：hACL 由来 MSC（CD73, 90 共陽性、hACL-MSC）と hBM 由来 MSC（CD90, 271 共陽性、hBM-MSC）について、培養前（コラゲナーゼ処理後すぐ）と培養後の細胞表面抗原を比較した。培養前において、hACL-MSC で CD73 の発現が有意に高く、hBM-MSC で CD106, 146, 271 の発現が有意に高かった（*p < 0.05）。一方培養後では、hACL-MSC と hBM-MSC の細胞表面抗原の発現パターンが、ほとんど同様のものであることが確認された。これらに基づいて主成分解析（PCA）を行うと、hACL-MSC と hBM-MSC が培養前は別の集団として識別されるが、培養後は同じ集団に含まれてしまうことがわかった。つまり、培養により細胞表面抗原発現パターンが変化し、生体内の表面抗原の特性が維持されないことが示唆された。

由来組織の違いによる分化指向性の解析：hACL-MSC と hBM-MSC を培養後、脂肪・骨への分化誘導を行ったところ、hACL-MSC では hBM-MSC に比べ脂肪分化能が低いことがオイルレッド O 染色像から確認された。また腱・靭帯への分化誘導を行い、これらの分化マーカーである *COL1A1*, *MKX*, Scleraxis(*SCX*)の mRNA 発現量を比較したところ、*COL1A1* では両者に有意な差は見られなかったが、*MKX* は約 10 倍、*SCX* は約 6 倍、hACL-MSC において有意に発現量が高かった（**p < 0.01）。以上より、由来組織の違いが分化指向性に影響を与えていることが示唆された。

＜考察＞

本研究では靭帯組織及び骨髄組織に存在する MSC の分化能力の解析を行った。ACL 由来 MSC の表現型（表面抗原の発現）は今まで明らかになっていなかったが、本研究において CD73, 90 共陽性分画に高頻度に濃縮されていることが明らかとなった。

hACL-MSC（CD73, 90 共陽性細胞）が hACL の表面付近の血管ではない類洞構造に位置していることが確認された。この類洞構造は hACL のいたるところに張り巡らされているが、hACL-MSC が組織内でどのような役割を果たしているかは未だ不透明である。hACL-MSC が高い腱・靭帯分化能をもっていることから、組織内では靭帯の前駆細胞として存在し、損傷等に応じて靭帯の再生に寄与することが考えられる。

hACL-MSC は CD271 の発現が hBM-MSC に比べ有意に低かったことが確認されている。CD271 は神経堤細胞マーカーであり、hACL が中胚葉由来であり、hBM が神経堤由来であることを示唆

している。これら由来の違いが、分化指向性に影響を与えている可能性がある。

靭帯分化能力の比較について、BM-MSC と比較し、ACL-MSC では靭帯細胞への分化能が高いことが分かった。一方で、RT-qPCR の結果の中で、*COL1A1* は ACL 由来、BM 由来ともに大きな差は見られなかった。過去の報告によると、変形性膝関節症患者由来の ACL は正常の ACL に比べ *COL1A1* の発現量が低いことが報告されている。本研究で使用した検体が変形性膝関節症患者由来であり、炎症反応や高齢者の組織であるという理由から、大きな違いが見られなかった可能性がある。また、正常な若齢サンプルでも同様の傾向があるのかについても検討する必要がある。

hACL-MSC と hBM-MSC の細胞表面抗原のパターンは培養前で異なるものの、培養後は似たものになってしまう。一方で培養後であっても、腱・靭帯への分化能は hACL-MSC で有意に高く、脂肪への分化能は hBM-MSC で高かった。分化指向性については過去の報告で、ヒト膝滑膜由来 MSC と hBM-MSC においても違いが報告されている。これらから、MSC を再生医療として用いる場合には、培養をどの時期まで行うべきか、また目的とする組織によって MSC の採取元を考慮した方が、より良い治療効果が望めることとなるだろう。

＜結論＞

異なった組織由来の MSC であっても、培養によって細胞表面抗原の発現パターンは似たものに変化してしまうが、分化指向性だけは組織ごとに維持されており、hACL における CD73, 90 共陽性細胞は靭帯の再生において重要な役割を果たすと考えられる。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5577　号 | 緒方　勇亮 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　沢辺　元司<br>副　査　淺原　弘嗣　　赤澤　智宏 | |

（論文審査の要旨）

現在、造血幹細胞の移植が造血器腫瘍などの治療に広く用いられている。間葉系幹細胞が骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞などに分化可能なことから、変形性関節症、心筋梗塞などの疾患への応用研究が期待されている。申請者らのグループは骨髄由来および滑膜由来の間葉系幹細胞(MSC)の単離技術を確立し、表面マーカーを同定し、移植実験を行ってきた。一方、膝関節の前十字靭帯損傷はスポーツ外傷などで見られるが、靭帯損傷の自然修復は期待できず、自家腱移植手術が行われている。これまで靭帯や腱由来の MSC に関してはほとんど研究されておらず、研究結果は直接、靭帯や腱損傷の再生医療に有用と考えられる。申請者は前十字靭帯由来の MSC の単離およびその性質に関して研究を行った。対象は変形性膝関節症で人工膝関節置換術を行った高齢患者である。一部で骨髄由来 MSC も同時に単離し、靭帯由来 MSC と比較した。骨髄由来および滑膜由来の MSC の FACS 単離にあたっては CD90, CD271 共陽性細胞を用いる。前十字靭帯由来細胞でコロニー形成能を指標として幹細胞単離を試みたが、CD271 陽性細胞のコロニー形成能は低く、CD29, CD73, CD90 陽性細胞でコロニー形成能が高かった。CD29 陽性細胞と CD73 陽性細胞はほとんど同じ細胞集団なので、CD73, CD90 が靭帯由来 MSC の表面マーカーと考えられた。CD73, CD90 共陽性細胞の組織的局在を検討したところ、小管腔様スペースの周辺に局在していると推定された。単離した靭帯由来 MSC の分化能を骨髄由来 MSC と比較したところ、単離直後では靭帯細胞のマーカーである MKX, SCX を有意に多量に発現していたが、COL1A1 の発現は低かった。一方、骨髄由来 MSC では脂肪細胞、骨細胞への分化が有意に見られた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 石井　佳菜 |
| 論文審査担当者 | 主査　窪田　哲朗<br>副査　畑　裕　　赤澤　智宏 |
| 論　文　題　目 | Recapitulation of extracellular LAMININ environment maintains stemness of satellite cells *in vitro* |

（論文内容の要旨）

＜結言＞

体性幹細胞の移植は、再生医療での治療のための多くの可能性を秘めたアプローチ法の一つである。骨格筋の組織再生を担うのが骨格筋の体性幹細胞である筋サテライト細胞である。正常時、筋サテライト細胞は細胞分裂を停止しており、休眠状態にある。筋繊維に過負荷や損傷、進展刺激などが加わることによって筋サテライト細胞は活動を開始し、損傷骨格筋を再生することが知られている。難治性筋疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーは筋繊維の壊死・再生を繰り返しながら次第に筋萎縮と筋力低下を来していく。また、老化に伴って筋サテライト細胞の恒常性の維持が損なわれることが、筋萎縮やサルコペニアの要因の一つだと考えられている。筋サテライト細胞を用いた骨格筋への細胞移植は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーおよびサルコペニアのような筋障害の治療のための手段となりうる。しかし、筋サテライト細胞の幹細胞性・未分化性を維持したままの培養には限界がある。筋サテライト細胞の未分化性を維持させたまま培養する技術が必要とされている。

生体内において、筋サテライト細胞は筋繊維と基底膜に挟まれるように存在しており、基底膜蛋白質と相互作用することによって未分化性が維持されていると考えられる。ラミニンは基底膜の細胞接着蛋白質であり、特にサブユニットの一つであり、5 種類存在するα鎖が、組織特異性と細胞接着活性に寄与している。骨格筋組織において、筋繊維周囲の基底膜にはラミニンα２鎖が発現していることが知られているが、筋サテライト細胞周囲でのラミニンの発現解析はされていない。私たちは、基底膜の主要構成蛋白質であるラミニンが構成する筋サテライト細胞の未分化性維持に環境に注目し解析を行った。

＜結果＞

私たちは、マウス筋サテライト細胞周囲にラミニンα３、４、５鎖が発現していることを発見した。そこで、ラミニンのインテグリン結合活性を保持した最小単位である組換え E8 フラグメントを用いて、筋サテライト細胞の生体内微小環境を模倣した培養条件において未分化性への影響を調べた。ラミニン-２１１E8、-３３２E8、-４１１E8、-５１１E8 フラグメントを組み合わせで作用させて培養した筋サテライト細胞は、未分化マーカーである Pax7 の発現が保持された。ラ

ミニン E8 フラグメントを用いて培養した筋サテライト細胞は、JNK や p38 のリン酸化が抑えられることにより Pax7 の発現を維持した。さらに、この条件で培養した筋サテライト細胞の移植において、効果的な組織再生を観察した。

続いて、ヒト骨格筋組織においてラミニンの発現を解析した。ヒト筋サテライト周囲にもラミニンα３、４、５鎖が発現していることを確認した。そこでヒト筋サテライト細胞を分離し、ラミニン-２１１E8、-３３２E8、-４１１E8、-５１１E8 フラグメントを組み合わせて培養した。ラミニン-２１１E8、-３３２E8、-４１１E8、-５１１E8 フラグメントを組み合わせで作用させて培養した筋サテライト細胞は、免疫不全マウス(NSG mice)および免疫不全筋ジストロフィーモデルマウス(DMD-null/NODscid mice)への移植において、高い再生能力とジストロフィン回復を示した。

＜考察＞

本研究により、筋サテライト細胞においてラミニンα３、４、５鎖はラミニンα２鎖と同様に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに、ラミニン２１１、３３２、４１１、５１１E８フラグメントを用いて筋サテライト細胞を培養することにより、未分化性を維持した培養系が確立された。筋サテライト細胞の未分化性を維持する因子としては、他の細胞外マトリックスやサイトカインなどが挙げられる。今後それらを組み合わせて培養することにより、より未分化性の高い筋サテライト細胞の獲得が期待される。

＜結論＞

本研究より、ラミニン E8 フラグメントを用いた筋サテライト細胞の新規培養法確立の可能性が示された。本研究結果は、ヒト骨格筋幹細胞の未分化維持機構の解明だけではなく、細胞移植治療などの応用研究につながることが期待される。

# 論文審査の要旨および担当者

| 報　告　番　号 | 甲 第　5578　号 | 石井　佳菜 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査　　窪田　哲朗<br>副　査　　畑　裕　　赤澤　智宏 | |

（論文審査の要旨）

学位申請論文 “Recapitulation of extracellular LAMININ environment maintains stemness of satellite cells *in vitro*. Stem Cell Reports （2017）.”について審査した。

筋サテライト細胞は骨格筋の筋繊維と基底膜に挟まれるように存在しており，平常時には休眠状態にあるが，筋繊維に過負荷や損傷，進展刺激などが加わると活性化して，損傷骨格筋を再生する。このため筋ジストロフィーなどの筋疾患に対する再生医療に用いることができる可能性があるが，筋サテライト細胞を幹細胞性と未分化性を維持したまま培養することは困難である。そこで本研究では，筋サテライト細胞を取り囲む微小環境を模した培養法を工夫し，再生医療に用いることができるような筋サテライト細胞の培養法を検討した。

申請者らはまず，マウスの筋サテライト細胞周囲にラミニンα3，α4，α5 鎖が発現し，成熟した筋繊維の基底膜にはラミニンα2 が発現していることを観察した。次にラミニンのインテグリン結合活性を保持した最小単位である組換え E8 フラグメントを用いて，筋サテライト細胞の生体内微小環境を模倣した培養条件において，幹細胞性，未分化性への影響を調べた。その結果，ラミニン-332E8, -411E8, -511E8 フラグメントで前処理 (Pre3/4/5)した後にラミニン-211E8 上で培養(-on2)した細胞では，未分化マーカーである Pax7 の発現が保持されたまま増殖した。未分化性の保持に関わる細胞内シグナル伝達系の検討では，Pre3/4/5-on2 培養した筋サテライト細胞で JNK および p38 の脱リン酸化が観察され, 阻害薬を用いた実験でも JNK および p38 の適度な抑制が細胞の未分化性の保持に有効であることが判明した。引き続き *in vivo* の実験を行い，Pre3/4/5-on2 培養した筋サテライト細胞を，筋組織を傷害させたマウスに投与すると，筋組織の再生が観察された。さらに手術時に得られたヒトの骨格筋組織を用いて検討したところ，ヒト筋サテライト細胞の周囲にもラミニンα3，α4，α5 鎖が発現していることが確認された。Pre3/4/5-on2 培養したヒト筋サテライト細胞を，骨格筋の傷害を起こした免疫不全マウス，および免疫不全筋ジストロフィーモデルマウスに移植すると，ヒト細胞による筋組織の再生が観察された。

これらの結果は，筋サテライト細胞を，幹細胞性と未分化性を維持したまま培養する方法を開発し，*in vivo* 動物実験で傷害筋組織の再生に利用できることを示し，さらにヒトの筋疾患の治療にも利用できる可能性を示したもので，再生医療への応用が期待される価値の高い研究成果である。研究方法や結果の解析も適切であり，本論文は博士（保健学）の学位論文としても相応しい。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | YU Ruoxing |
| 論文審査担当者 | 主査： 鍔田　武志<br>副査： 清水　重臣<br>副査： 信久　幾夫 |
| 論　文　題　目 | Evaluation of the Toxicity Effects of Drugs on Early Embryogenesis<br>（薬剤の初期杯に与える毒性評価） |

（論文内容の要旨）

**[Introduction]**

Mammalian fetal development is easily disrupted by exogenous agents, making it essential to test new drug candidates for embryotoxicity and teratogenicity. Summarized the data on animal model and human case report under organ level, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) formulated special grade categories, labeled A, B, C, D and X, that define the level of risk associated with the use of a specific drug during pregnancy. Drugs in categories (Cat.) D and X are those with embryotoxic and/or teratogenic effects on humans and animals. The cellular level test using ES cells named embryonic stem cell test (EST) is widely used to confirm drug toxic effects in vitro. However, which stages of pregnancy are affected by these agents and their molecular mechanisms are hard to know by the convential EST.

**[Methods]**

As the foundation of three germ layer differentiation, the primitive streak plays important role in early embryogenesis. I describe here a modified EST that classifies FDA pregnancy Cat.D and Cat.X drugs into 4 classes based on their differing cell responses on primitive streak formation.

**[Results]**

The results showed that ~84% of Cat.D and Cat.X drugs target this period of embryogenesis. Furthermore, among class II drugs, I focus on stains, the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) inhibitors. Firstly, I confirmed its function on PrS formation. Statins block the PrS formation then enhanced the ectodermal differentiation. Secondly, I proved that among the downstream of mevalonate pathway, it is the protein farnesylation which promoted PrS formation rather than cholesterol synthesis. Thirdly, via bioorthogonal chemical reporter assay, I confirmed the small G proteins were involved in PrS formation.

**[Conclusion]**

My results demonstrate that my modified EST can identify how a drug affects early embryogenesis, when it acts, and its molecular mechanism. moreover, these results showed that my EST can estimate the toxic effect on PrS period and its molecular mechanisms. My test may thus be a useful addition to the drug safety testing armamentarium.

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | YU Ruoxing |
| 論文審査担当者 | 主査：鍔田　武志<br>副査：清水　重臣<br>副査：信久　幾夫 |
| 論　文　題　目 | Evaluation of the Toxicity Effects of Drugs on Early Embryogenesis<br>（薬剤の初期杯に与える毒性評価） |

（論文審査の要旨）

これまで薬剤の催奇形性や胎児への毒性については、ES 細胞でのスクリーニングと動物個体を用いた試験が行われてきた。申請者は今回、ES 細胞に in vitro で分化を誘導することで、primitive streak 形成を誘導する系を用いて催奇形性や胎児毒性を有する化合物のスクリーニングに適しているかを検討し、優れた感度と共に薬剤が細胞分化に影響を与えるかもスクリーニングできた。さらに、このスクリーンングにより分化に影響を与えることが明らかになった化合物について、さらにそのメカニズムの解明を行い、スタチンがタンパク質のファルネシル化を阻害することで、primitive streak 形成を阻害することを明らかにした。これらの知見は、薬剤の催奇形性や胎児毒性のスクリーニングなどに資するもので、学位論文にふさわしい。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | Kruthi Sharanjeet Suvarna |
| 論文審査担当者 | 主査：仁科　博史<br>副査：石野　史敏<br>副査：浜本　隆二 |
| 論　文　題　目 | Targeting carcinoma associated fibroblasts (CAFs) for treatment of breast cancer metastasis<br>（乳がん転移治療を目指した、がん関連線維芽細胞の標的化に関する研究） |

（論文内容の要旨）

**Abstract**

Targeting stromal fibroblasts activated by cancer cells (Carcinom associated fibroblasts; CAFs) might aid in complete treatment of cancer metastasis. *In vitro* wound healing co-culture assay showed enhanced migration of NIH3T3 mouse embryonic fibroblasts when co-cultured with MCF7 breast cancer cells. β-arrestin and snail1 was predicted to have important role in enhancing the migration of fibroblasts. Therefore, high throughput chemical array was used to identify the small molecule ligands which bind to these target proteins. In the secondary screening, small molecule ligands were screened using wound healing co-culture assay to identify inhibitors of accelerated fibroblasts migration by cancer cells.

In addition to screening small molecules binding to target protein, 16,000 compounds of RIKEN NPdepo library were screened. The purpose of screening additional compounds is to identify the ligands of unknown proteins that are involved in activation of fibroblasts, since the mechanism of CAF activation is not yet clear. Using secondary screening, three hit compounds were identified. RKN5755 inhibited the enhanced migration of co-cultured NIH3T3 by binding to β-arrestin1 and thus interfering with β-arrestin1-cofilin signaling pathway. Mechanism of snail1 hit RKN274 in inhibition of accelerated migration of fibroblasts is yet to be elucidated. RKN8733 was identified to inhibit the accelerated migration of fibroblasts by binding to valosin containing protein (VCP). Thus small molecules that inhibit the accelerated migration of fibroblasts by cancer cells were successfully identified. Therapy targeting specifically CAFs along with conventional therapy may be beneficial in treating cancer metastasis.

**Introduction**

CAFs are known to guide the cancer cells in migration by mechanically modifying tumor stroma. A few researches have pointed out high expression of β-arrestin1, an adaptor protein and Snail1, a transcription factor in stromal cells. Recently role of β-arrestin in activation of the actin filament severing protein, cofilin upon the initiation of migration has been studied. Snail is also known to be involved in mechanically modifying tumor stroma by repression of the expression of 15-prostaglandin dehygrogenase enzyme (15-PGDH). Thus inhibiting β-arrestin and Snail depending signaling involved in migration might be one of the ways for targeting fibroblast activation by cancer cells.

**Material & Methods**

NIH3T3 and MCF7 (RIKEN Cell Bank) was cultured in D-MEM (Invitrogen) and 10% fetal calf serum (FCS). Stably GFP transfected MCF7 cells were established using mammalian expression vector encoding EGFP by using Effectene reagent (Qiagen). Wound healing assay co-culture assay was done using NIH3T3 cells (20 x $10^4$) and $MCF7^{GFP}$ cells (4 x $10^4$). Cell proliferation assay using WST-8 reagent (Nacalai Tesque). Transwell migration assay performed by using 24-well chambers (Iwaki) and a polycarbonate filter with an 8μm pore size (Chemotaxicell). GST -β-Arrestin1 in pGEX-5X-1 vector was expressed in BL21 star (DE3) and GST -Snai1 in pCMV vector was expressed in HEK293 cells. These proteins were purified using Glutathione sepharose beads (GE Healthcare). Western blot analysis was performed using following antibodies: Mouse anti-GST antibody (Santacruz biotechnology, 1:1000), Rabbit anti-β-Arrestin1 antibody (Abcam,1:1000), rabbit anti-phospho($ser^3$)-cofilin (Santacruz Biotechnology, 1:1000), rabbit anti-cofilin antibody (Cell Signaling technology, 1:1000), Mouse anti-Snail antibody (cell signaling technology, 1:1000) and rabbit anti-prostaglandin dehydrogenase 1 antibody ( Abcam, 1:1000).

**Results**

Co-cultured NIH3T3 showed enhanced migration when compared to NIH3T3 alone. Expression of β-Arrestin1 and Snail1 was increased in co-cultured NIH3T3. There was decrease in β-arrestin1 downstream signaling protein cofilin (inactive form) and we also observed decrease of 15-PGDH downstream signaling protein of Snail. GST-β-Arrestin1 and GST-Snail1 were expressed and purified using Glutathione beads. From chemical array analysis, we got 377 and 218 hits for β-Arrestin1 and Snail1 respectively. RKN5755 and RKN274 were obtained as hit compounds for β-arrestin1 and Snail1 respectively. Pull down assay results showed that GST-β-Arrestin1 was co-precipitated only with RKN5755-beads but not with control beads. Treatment of RKN5755 to co-cultured NIH3T3 restored the levels of phosphorylated cofilin, suggesting that RKN5755 inhibited β-Arrestin1 mediated dephosphorylation of cofilin. We got RKN8733, as a hit compound from 16,000 compounds screening against wound healing co-culture assay. RKN8733 shows inhibition of co-cultured NIH3T3 migration when compared to NIH3T3 alone. Pull down assay using RKN8733 beads from cell lysate showed that it binds to Valosin-containing protein (VCP).

**Discussion**

Most of the research so far has focused on enhanced migration of breast cancer cells when co-cultured with fibroblasts. By using established wound healing and transwell co-culture system, we showed that cancer cells also promote enhanced migration of fibroblast. We then examined the level of β-arrestin1 and its binding protein cofilin in co-cultured NIH3T3, and observed increased expression of β-arrestin1 as well as decreased expression of phosphorylated (inactive) cofilin. The increased β-arrestin1 expression in co-cultured NIH3T3 might be due to increased expression of PAR-2 receptor in response to growth factors secreted by cancer cells. Increased expression of β-arrestin1 promotes dephosphorylation of cofilin, thus initiating enhanced migration of fibroblasts. Targeting β-arrestin1-cofilin signaling pathway might help in inhibiting the activation of fibroblast involved in cancer metastasis. We identified compound RKN5755 binding to β-arrestin1 and it restores the expression of phosphorylated cofilin in co-cultured NIH3T3. Thus indicating that compound RKN5755 interferes with β-arrestin1-cofilin scaffolding pathway thus inhibiting the enhanced migration of co-cultured NIH3T3. We found high expression of Snail1 in co-cultured NIH3T3. Recently a few papers suggested that role of prostaglandin degrading enzyme in activation of fibroblasts. Snail1 also acts as a repressor of 15-PGDH. Thus we examined

expression of 15-PGDH and found it to be decreased in co-cultured NIH3T3. We got one hit compound RKN274 from Snail1 hits cell based screening. Study of binding of RKN274 to Snail1 is in progress.

We try to identify novel chemical inhibitors of CAF activator for treating cancer metastasis. We identified compound RKN8733 and found that it binds to VCP involved in autophagy. Autophagy also plays a role in cell migration. Thus role of VCP in activation of fibroblast will be elucidated in future.

**Conclusion**

Our current results imply that, fibroblasts activated by cancers cells shows a characteristic of enhanced migration and it can be targeted using small molecule inhibitors.

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | Kruthi Sharanjeet Suvarna |
| 論文審査担当者 | 主査：仁科　博史<br>副査：石野　史敏<br>副査：浜本　隆二 |
| 論　文　題　目 | Targeting carcinoma associated fibroblasts (CAFs) for treatment of breast cancer metastasis<br>（乳がん転移治療を目指した、がん関連線維芽細胞の標的化に関する研究） |

（論文審査の要旨）

申請者は、Targeting carcinoma associated fibroblasts (CAFs)に注目して、抗がん剤の開発の基盤研究を行った。最初にがん細胞と CAF の共存状態を模倣するアッセイ系の構築を、乳がん細胞 MCF7 と線維芽細胞 NIH3T3 を共培養することで行った。その結果、傷修復試験（wound healing assay）において NIH 細胞の移動度が亢進することが観察された。そこで申請者はこのアッセイ系を用いて、理研が保持しているケミカルライブラリーを用いたスクリーニングを行い、CAFs の増殖を抑制する化合物として、RKN8733 を同定し、類似の RKN8732 が valosin containing protein (VCP)と結合していることを突き止め、RKN8732 は VCP を制御することで、CAFs の増殖抑制を担っている可能性を明らかにした。また、CAFs の細胞移動亢進を阻害する化合物の単離も行った。その結果、β-arrestin1 に結合してその機能を阻害する RKN5755 の同定や、Snail1 に結合してその機能を阻害する化合物の単離に成功した。以上のように、CAFs の細胞移動亢進の全体像を明らかにするまでには至っていないが、興味深い化合物を複数単離することに成功した優れた研究成果である。本研究成果は、CAFs を標的とした新しい分子標的治療薬開発に貢献すると期待される。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | 大坪　香澄美 |
| 論文審査担当者 | 主査：　清水　重臣<br>副査：　石野　史敏<br>副査：　増富　健吉 |
| 論　文　題　目 | Induction of Macropinocytic Cell Death by Oncogenic RAS in Human Epithelial Cells and Its Suppression by MYC Overexpression<br>（ヒト上皮細胞における活性化型 RAS に対するマクロピノサイトーシスを伴う細胞死の誘導と MYC 過剰発現によるその抑制） |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

RAS の活性化型変異はヒトのがんの約 30%でみられ、発がんにおいて重要な役割を担っている。活性化型 RAS はヒトやマウスの正常線維芽細胞においては細胞老化を誘導することが知られているが、本研究ではヒト正常上皮細胞において活性化型 RAS に対して誘導される細胞応答を調べた。種々の正常上皮細胞において活性化型 RAS により細胞質に大きな空胞が生じ細胞死が誘導されたが、野生型 RAS ではこれらの変化は僅かしか見られなかった。この空胞化と細胞死は線維芽細胞における細胞老化と異なる現象であり、空胞が培養液に添加した高分子デキストランで標識されたことからマクロピノソームを伴う細胞死が誘導されていることが判明した。活性化型 RAS にこの細胞死は 16 型ヒトパピローマウイルス E6E7 (E6E7)を発現させても誘導されたが、MYC の高発現により抑制され、E6E7 と MYC の共発現はほぼ完全に消失した。逆に、RAS に活性化型変異を持つがん細胞の MYC を抑制するとマクロピノソームが蓄積し細胞死が誘導された。また、活性化型 RAS を持つ細胞において、rapamycin は単独でマクロピノソームの蓄積と細胞死を誘導し、MYC の抑制による効果をさらに促進することが示された。以上の結果より、正常ヒト上皮細胞においては RAS の活性化型変異はマクロピノサイトーシスを伴う細胞死を誘導し、がん抑制的な機能を果たしていることが示唆された。RAS に活性化型変異があるがん細胞においては、MYC の高発現などがこの細胞死を回避させており、MYC の抑制や rapamycin などによる細胞死誘導機構の再顕在化が、これらのがんに対する新たな治療戦略に応用できる可能性がある。

＜緒言＞

RAS ファミリータンパク(HRAS, KRAS, NRAS)は低分子量 GTP 結合タンパクの一種であり、その遺伝子変異は約 30%のヒトがんで見つかりヒトがんにおける主要なドライバー変異のひとつである。しかし、活性化型 RAS に特異的な分子標的薬は未だ開発されていない。

これまでに活性化型 RAS に対しては、線維芽細胞で細胞老化(oncogene-induced cellular senescence: OIS)の誘導が報告されている他、神経芽細胞腫細胞株ではカスパーゼ非依存的な細胞死、神経膠芽腫細胞株ではマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導されると報告されている。多くのがん細胞の起源と考えられている上皮細胞においては、hTERT と E6E7 により不死化されたヒト卵巣由来の細胞でオートファジーを伴う細胞死が誘導されることが報告されている。

所属研究室では、活性化型 RAS、MYC、E6E7 の組み合わせは、子宮、舌、膵臓の上皮細胞をがん化させるのに十分だと先行論文で報告している。また、活性化型 RAS と E6E7 の発現により正常子宮頸部角化細胞をがん化するには、内在性の MYC レベルが高いことが重要であると考察している。実際、MYC のドミナントネガティブ変異体の OmoMYC による内在性の MYC の抑制や rapamycin により造腫瘍性が抑えられることが報告されている。本研究ではこれまで詳細な解析がされてこなかったヒト正常上皮細胞を用い、活性化型 RAS を発現させることによりマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導されることを初めて示した。更にこの現象は正常上皮細胞のもつ新たながん抑制機構の 1 つであり、がん細胞では更なる異常が重なることでこれを乗り越えているのではないかと仮説をたて検証した。

＜方法＞

子宮頸部の角化細胞を単離後、hTERT の導入により不死化し樹立された HCK1T 細胞を用いて、tamoxifen 特異的変異型エストロゲン受容体($mER^{T2}$)融合タンパクにより 4-hydroxytamoxifen(4-OHT)依存的に活性化型 KRAS ($ER\text{-}KRAS^{G12V}$)を発現する細胞を作製した。100 nM 4-OHT 添加 4 日後に死細胞数の計測と蛍光標識された高分子 dextran の取り込み量の測定を行った。次に、活性化型 RAS 発現細胞に野生型 MYC を高発現する細胞や、100 nM rapamycin を処理した細胞において、同様の測定を行った。RAS に活性化型変異を持つがん細胞株(A549, AsPC-1)と野生型 RAS を持つがん細胞株において、テトラサイクリン発現誘導(tetON)システムにより doxycyclin (DOX)依存的に GFP-OmoMYC が発現する細胞を作製した。この細胞に DOX または rapamycin を処理し、死細胞数とあらかじめ取り込ませた dextran の細胞内残留量を測定した。

＜結果＞

種々のヒト正常上皮細胞に活性化型 RAS を誘導すると細胞質に多数の空胞が生じ、細胞死が誘導された。細胞死の誘導機構としてアポトーシスとネクロプトーシスの可能性を検討したが、いずれの阻害剤もこの空胞化を伴う細胞死を抑制しなかった。また、LC3B の凝集は活性化型 RAS により形成された空胞以外の位置にも見られたことより、オートファジーは空胞化の主要な原因ではないと結論した。活性化型 RAS を発現誘導後、継時的に細胞を観察すると細胞外から培養液を取り込む像が観察されたことから、マクロピノサイトーシスが亢進していることが示唆された。細胞培地にマクロピノサイトーシスのみでとり込み可能な分子量の蛍光標識高分子 dextran を添加すると細胞内の蛍光輝度が増加し、更に dextran により蛍光標識された位置は空胞の位置と一致していた。また、マクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導されている細胞では RAS タンパクの蓄積が見られ、免疫染色の結果から細胞膜直下に加えて形成されたマクロピノソーム周辺に分布していた。野生型の RAS の過剰発現によってもマクロピノソームの蓄積が僅かに誘導されたことから、過剰な GTP 結合型 RAS により引き起こされる現象であることが強く示唆された。更に、マクロピノサイトーシス誘導に RAC1 が重要であることが報告されており、本研究で用いた上皮細胞でも活性化型 RAS の下流で RAC1 が活性化しており、活性化型 RAC1 単独でもマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導された。従って、ヒト正常上皮細胞において RAS-RAC1 経路によりマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導されることが明らかになった。

活性化型 RAS を発現する上皮細胞に E6E7 を高発現させた細胞ではマクロピノサイトーシスを伴う細胞死は抑制されなかったが、MYC の高発現によりマクロピノソームの蓄積が抑制され細胞死が緩和された。MYC に加えて E6E7 を高発現することでより強く細胞死を抑制し、細胞内に取り込まれたマクロピノソームの排出が促進されていた。一方で、rapamycin を処理するとマクロピノソームの蓄積が亢進し、このとき RAC1 の活性が増加していた。

RAS に活性化型変異をもつがん細胞において、OmoMYC による MYC 機能の抑制や rapamycin 処理によ

りマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導され、これらを組み合わせることで細胞死が増強された。従って、RAS 活性化型変異があるがん細胞でもマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導されることが示された。

＜考察＞

本研究は種々のヒト正常不死化上皮細胞を用い、がん遺伝子 RAS の活性化型変異に対する細胞応答を詳細に解析した初めての研究である。活性化型 RAS の発現誘導により誘導されるマクロピノサイトーシスを伴う細胞死は、正常上皮細胞が持つがん抑制機構のひとつであると考えている。しかし、正常細胞と同様の細胞死誘導機構は一部のがん細胞株でも保存されていることが既に報告されており、RAS が活性化しているがん細胞では、このがん抑制機構を乗り越えるのに必要な異常を蓄積し発がんに至っていると考えている。本研究では、活性化型 RAS により誘導される細胞死は、がんの 70%以上で過剰に発現している MYC を高発現させることにより抑制されること、さらに E6E7 の発現によりほぼ完全に回避されることを明らかにした。逆に、RAS に活性化型変異を持つがん細胞株において MYC を抑制すると、正常細胞同様にマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導された。RAS に活性化型変異を持つ割合はがん種により大きな差がある。例えば、膵がんで 95%以上であるのに対して、胃がんや乳がんでは稀である。後者のがんの起源上皮細胞では活性化型 RAS 対して感受性が高く発がん抑制機構が強く働く可能性が想定される。TCGA データベースによると、肺腺がんなどで MYC 遺伝子の高発現と KRAS の活性化型変異が共在する傾向にある。従って、RAS に変異を持つがん細胞の少なくとも一部においては、MYC の発現上昇により活性化型 RAS の高発現が許容されていると考えている。反対に、RAS は MYC によるアポトーシスの誘導を抑制するという報告があるため、活性化型 RAS の高発現は MYC の発現上昇を許容している可能性も考えられる。この RAS と MYC の協調関係を破綻させる本研究のような試みが、がん治療の新しい戦略になることを期待している。

本研究では MYC(と E6E7)の高発現で活性型 RAS により取り込みが促進されたマクロピノソームを細胞外へ排出するリサイクリングが促進されている可能性を示した。また、rapamycin は活性化型 RAS 存在下で RAC1 の活性化とマクロピノソームの蓄積を亢進させたが、rapamycin によりエンドソームのリサイクリングが抑制されるという報告もある。MYC や rapamycin がマクロピノサイトーシスを伴う細胞死に影響する機序の詳細はまだ明らかになっていない。MYC は転写に広く関与する因子として報告されており、rapamycin は mTORC1 阻害剤として翻訳を広く抑制することが知られており、両者により多くの遺伝子が影響を受ける。rapamycin は抗がん剤として使われてきたが、最近では rapamycin や Torin1 による mTORC1 の抑制は栄養飢餓状態ではむしろ増殖に有利に働く可能性が指摘されている。今後、MYC の抑制や rapamycin によるマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導される詳細な機構や、活性化型 RAS の下流で細胞死を誘導する因子の同定が重要になってくるだろう。

＜結論＞

ヒト正常上皮細胞において活性化型 RAS を発現させると、RAC1 の活性化を介してマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導された。この細胞死は MYC (+E6E7)により抑制され、マクロピノソームの蓄積は rapamycin により増強された。RAS に活性化型変異を持つがん細胞においても、MYC の機能抑制や rapamycin によりマクロピノサイトーシスを伴う細胞死が誘導された。

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 大坪　香澄美 |
| 論文審査担当者 | 主査：清水　重臣<br>副査：石野　史敏<br>副査：増富　健吉 |
| 論　文　題　目 | Induction of Macropinocytic Cell Death by Oncogenic RAS in Human Epithelial Cells and Its Suppression by MYC Overexpression<br>（ヒト上皮細胞における活性化型 RAS に対するマクロピノサイトーシスを伴う細胞死の誘導と MYC 過剰発現によるその抑制） |

（論文審査の要旨）

本論文は、正常上皮細胞に活性型 RAS を発現させるとマクロピノサイトーシスを伴う非アポトーシス細胞死(Methuosis)が誘導されること、この細胞死はがん抑制的に機能していることを明らかにしたものである。

RAS の活性化変異はヒトがんの約 30%で認められるが、正常上皮細胞に発現した時の作用に関しては不明確な部分が多い。申請者はこの課題に取り組み、以下の実験事実を明らかにした。即ち、⑴正常上皮細胞に、活性型 RAS を発現させると Methuosis が誘導されること、⑵Methuosis は、MYC の発現増強により抑制され、ラパマイシン投与によって促進されること、⑶MYC の発現抑制やラパマイシン投与は、活性型 RAS 変異を有するがん細胞に対して Methuosis を誘導すること、を見出した。

これらの結果は、正常上皮細胞における活性型 RAS の役割を明らかにしただけでなく、RAS と MYC の新たな相互作用の存在、活性型 RAS 変異を有するがん細胞に対する新規治療法の可能性を示したものとして高く評価できる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | 五領田　小百合 |
| 論文審査担当者 | 主査：仁科　博史<br>副査：村松　正明<br>副査：中村　桂子 |
| 論　文　題　目 | Dietary intakes and social capital in Great East Japan Earthquake and Tsunami<br>（東日本大震災被災者における食事摂取状況とソーシャル・キャピタルとの関連） |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

東日本大震災により生じる食糧不足により誘発される食事摂取不良は、健康を害する危険要因の一つである。本研究では、近年健康への寄与が注目されている人々の絆、繋がり (ソーシャル･キャピタル：SC)に着目し、暮らし向きや居住環境などの他の社会的要因を考慮し、食事摂取状況とSCの関連を検討することにした。その結果、食事摂取状況と SC のみ（他の要因を調整する前）の分析では、男女ともに食事摂取状況とSCの関連が確認された。しかしながら、他の要因を調整後は、これらの関連は女性でのみ認められた。SCはとりわけ女性の被災者における健康的な食事摂取に寄与していることが示唆された。

＜緒言＞

東日本大震災では食糧配給においても甚大な被害を受けた。大規模災害による食糧不足により、誘発される食事摂取不良は健康を害する危険要因の一つである。先行研究では、被災者のうち女性と高齢者は野菜、果物、魚、大豆製品、乳製品などを特徴とする健康的な食事パターンが多く、一方、男性と若者では肉や卵の摂取量が多かったことが報告されている。また食事摂取状況と社会的要因に関する調査では、仮設住宅に住む被災者は、野菜、果物、肉、大豆製品と乳製品の摂取量が少ないことが報告されている。災害後の食事摂取状況には、転居、経済苦、食料品店へのアクセス環境など様々な社会的要因が影響する可能性があり、なかでも人々の絆、繋がり (ソーシャル･キャピタル：SC)の役割が注目されている。

しかしながら、東日本大震災被災者における食物摂取状況と SC の関連については報告がない。そこで本研究では、被災者における食事摂取不良と SC との関連を検討することにした。

＜方法＞

被災直後の急性期を過ぎた 2011 年 9 月から岩手県の 4 地域(山田町、大槌町、釜石市、陸前高田市)を対象として健康診断とアンケート調査が実施されている。本研究では、主に震災 3 年目にあたる 2014 年(平成 25 年度)に実施された被災者健康診断受診者 7,136 名のうち、欠損値のない 18 歳以上の男女 6,724 名(男性 2,502 名、 女性 4,222 名)を解析対象とした。

目的変数 (食事摂取状況)

食事については、各食品群 (ごはん等の主食、肉、魚介、卵、豆腐等、野菜、果物、牛乳等)のここ数日を振り返って、1 日当たりの摂取頻度について、「1 回未満、1 回、2 回、3 回、4 回以上」の選択肢から回答を得た。ごはん等の主食については 3 回以上、肉、魚介、卵、豆腐等のたんぱく源となる食品群についてはこれらの食品単独、もしくは組み合わせて 2 回以上、野菜については 2 回以上、果物と牛乳等については 1 回以上、これら全ての基準を満たした者を「食事摂取良好」、これらの基準を 1 食品群でも満たさない者を「食事摂取不良」と定義した。これらの定義は食事バランスガイドを基準として設定した。

説明変数 (社会的要因)

SC については、「1.まわりの人々はお互いに助けあっている」「2.まわりの人々は信頼できる」「3.まわりの人々はお互いにあいさつをしている」「4.何か問題が生じた場合、まわりの人々は力を合わせて解決しようとする」の 4 つの質問に対して、1.強くそう思う、2.どちらかといえばそう思う、3.どちらかともいえない、4.どちらかといえばそう思わない、5.全くそう思わないから回答を得た。各質問について 1〜2 を「高」、3〜5 を「低」に区分した。また点数を合算(範囲 4〜20 点) し、10 点以下を「高値群」、11〜20 点を「低値群」に区分した。暮らし向きについては、「大変苦しい・苦しい」を「苦しい」とし、その他の「やや苦しい」と「普通」に区分した。居住環境については、「震災前から同じ」、「仮設住宅」、「転居・再建」、「家族・友人・親戚宅」、「その他」に区分した。こころの健康の評価には K6 を用いた(範囲 0〜24 点)。良好 0〜4 点、不良 5 点以上に区分した。婚姻状況については、既婚、離婚、死別、独身に区分した。地域は山田町、大槌町、釜石市（下平田地区）、陸前高田市とした。

食事摂取状況と性、年齢の関連をカイ 2 乗検定で検討した。食事摂取状況と SC の関連について、1)他の要因の影響を調整する前の分析、2)食事摂取状況と SC と他の 1 項目を説明変数に加えた分析、3) 他の要因を調整の 3 種類の分析を行った。説明変数、及び調整変数は年齢(65 歳未満・65 歳以上)、暮らし向き、居住環境、こころの健康、婚姻状況、地域（市町）とした。解析には SPSS version 24 を用い、有意水準は両側検定で 5%とした。

＜結果＞

本調査の対象者数(協力率)は山田町 2,223 名(69.1%)、大槌町 1,492 名(71.8%)、釜石市 160 名(58.8%)、陸前高田市 3,261 名(66.4%)であった。平均年齢(女性割合)は山田町 62.6 歳 (60.5%)、大槌町 64.1 歳 (63.8%)、釜石市 67.6 歳(63.9%)、陸前高田市 66.5 歳(63.8%)であった。

本研究の対象者の 65.1%の男性、52.9%の女性は 65 歳以上の高齢者であった。食事摂取不良者は全体の 31.6 % (男性 39.7%、女性 26.8%)、SC に関する質問 1 で「低」であった者は、男性 26.1%、女性 24.3%、質問 2 は男性 31.8%、女性 24.3%、質問 3 は男性 12.4%、女性 9.9%、質問 4 は男性 28.7%、女性 28.8%であった。SC 低値群の者は男性 19.7%、女性 18.4%、暮らし向きが苦しいと答えた者は男性 18.9%、女性 16.2%、仮設住宅の居住者は男性 30.8%、女性 30.4%、こころの健康不良者は男性 23.1%、女性 31.6%であった。

両年齢階級において女性に比べ男性で食事摂取不良者の割合が多かった。65 歳未満の男性では 53.9%が食事摂取不良に分類された。

食事摂取状況と SC の関連について、他の要因を調整する前の分析では、男女ともに食事摂取不良と SC 低値群の関連が確認された。食事摂取状況と SC と他の 1 項目を説明変数に加えた分析では、男女ともに食事摂取不良と SC、食事摂取不良と年齢(65 歳未満)、暮らし向き(やや苦しい、苦しい)、仮設住宅、こころの健

康不良、婚姻状況(離別、死別、独身)で関連が認められた。地域(陸前高田市)では食事摂取状況が良い傾向があった。他の要因を調整後は、女性のみで食事摂取不良とソーシャル・キャピタル低値群の関連が認められた。この傾向は現時点で解析が終了している震災 5 年目まで継続していることを確認している。また食事摂取不良との関連が認められた他の要因は、男女ともに(65 歳未満)、暮らし向き(苦しい)、婚姻状況(離婚、死別、独身)であった。

＜考察＞

本研究により東日本大震災の被災者において食事摂取状況と SC の関連が初めて明らかとなった。

先行研究では、一般住民において食事摂取状況と SC の関連が報告されている。例えば、日本の農村部(秋田県北部地域)を対象に行われた調査では、野菜摂取不足と低い SC との関連を認めている。この報告では、昔ながらの日本の文化的な生活が保存されており、近所の人におすそ分けをする風習や食事を家族や近所の人と一緒にとることも多いことが理由として挙げられていた。私たちの調査対象地域も同じメカニズムが適用できるとして仮説を立て検討を行った結果、食事摂取状況と SC の関連には性差があることを見出した。男性は女性に比べ食事摂取不良である割合が高かったが、食事摂取不良と SC 低値群との関連は女性でのみ有意であった。先行研究では、女性は地域社会に帰属しやすいと報告されている。日本では、依然として女性が家庭の食料品買い物や食糧調達を担当している傾向があり、災害によって近所の人と一緒食料を調達する機会や食事をする機会が減少したことから、男性に比べ女性の生活がより混乱した可能性が考えられる。

他の研究では独居男性では孤食(独りで食事)になりやすく食事頻度が低下 (欠食) する傾向にあり、共食(誰かと一緒に食事)している人と比較すると欠食率が 3.74 倍、肥満割合が 1.34 倍高いことが報告されている。これらの報告では人との交流によってその人自身の食行動に変化が起こることが示されており、独居や欠食によって食事摂取不良が生じる可能性を示唆している。また本研究において、食事摂取不良は男女ともに 65 歳未満であることと関連が認められた。これらは、内閣府・農林水産省による日本の一般集団を対象とした調査で報告されている、若い世代では栄養バランスに配慮した食生活をしていない傾向があることと類似していた。

陸前高田市の住民は他の地域に比べ食事摂取状況が良好であり、なかでも野菜の摂取頻度が高かった。農業活動が盛んかつ震災後再開が良好であったこと、また陸前高田市の脳血管疾患の有病率は、岩手県全体の有病率よりも低いこと(東日本大震災直後の 4 週間を除く)が報告されている。これらの報告は陸前高田市で、食事摂取状況が良好であった結果をサポートしていると考えられる。SC 良好者の割合も高く、SC が希薄な者では特に野菜の摂取頻度が低いと報告している先行研究の結果とも一致している。

本研究の限界点は、食事摂取量や不健康な食品(インスタントラーメン等)の過剰摂取、食品へのアクセスについては調査できていないことなどが挙げられる。陸前高田市の 65 歳以上の被災者を対象とした調査では、小売店やバスの停留所が近所にないことが引きこもりのリスクを高めているとの報告があり、被災者の食事摂取不良に食品へのアクセスが影響している可能性がある。また、横断研究であるため食事摂取不良と SC の因果関係を明らかにすることはできない。

＜結論＞

本研究結果は、地域社会における社会関係（地域社会の結束）がとりわけ女性の被災者における健康的な食事摂取に寄与していることを示唆している。

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 五領田 小百合 |
| 論文審査担当者 | 主査：仁科 博史<br>副査：村松 正明<br>副査：中村 桂子 |
| 論　文　題　目 | Dietary intakes and social capital in Great East Japan Earthquake and Tsunami<br>（東日本大震災被災者における食事摂取状況とソーシャル・キャピタルとの関連） |

（論文審査の要旨）

震災時に生じる食料不足問題は世界的な課題である。申請者は、東日本大震災後に岩手県の４地域で実施された男女合計 6,724 名の健康に関する質問紙調査のデータに基づき、人々の絆・繋がり（ソーシャル・キャピタル；SC）と食生活の関係をポアソン回帰分析により分析した。その結果、１）大規模災害の被災に伴う社会経済的な環境変化を認める条件下において、ソーシャル・キャピタルが高く身のまわりの人々との社会的な関係性を重視していることと、２）４つの食品群からの食品をバランスよく含む食事を摂ることの関係を、他の社会的な条件の変数の影響を調整した上でも統計学的に有意な関係を認めることを、初めて明らかにした。大規模災害後の地域住民における、人々との社会的な関係性の維持、再構築、構築と健康との関連性を考察した、有意義な学術研究である。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | 杉山　香織 |
| 論文審査担当者 | 主査：　鍔田　武志<br>副査：　澁谷　浩司<br>副査：　岡澤　均 |
| 論　文　題　目 | Dysfunction of glial glutamate transporters contributes to spinal motor neuron death in vivo<br>（グリア型グルタミン酸輸送体の機能不全は脊髄運動神経細胞死に in vivo で寄与する） |

（論文内容の要旨）

＜要旨＞

細胞外グルタミン酸濃度を制御するグリア型グルタミン酸輸送体(GLT1, GLAST)は神経細胞をグルタミン酸興奮毒性から保護する役割を果たし、これらの発現減少や機能不全は複数の神経疾患の病態へ関することが報告されている。しかし、グルタミン酸輸送体の異常が神経細胞死の直接の原因か、あるいは単なる二次的な影響にすぎないかは未だ不明である。今回、筋萎縮性側索硬化症患者で発現減少が報告されている大脳皮質・脊髄特異的に GLT1 を欠損したマウスをそれぞれ作成し、 GLT1 欠損が皮質・脊髄運動神経細胞に与える影響を解析した。その結果、大脳皮質での GLT1 欠損は運動能と皮質運動神経細胞数に影響しない一方、脊髄での GLT1 欠損は軽度の運動障害と脊髄運動神経細胞死を引き起こした。また、脊髄 GLT1 欠損に加え、GLAST を減少させると運動障害と脊髄運動神経細胞死の程度は悪化した。さらに、脊髄での GLT1, GLAST 欠損により脊髄運動神経細胞では核の形態異常と核-細胞質輸送に関与する核膜孔複合体(NPC)の構成タンパク(NUP)の分解が認められた。この核の異常は AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPAR)阻害剤と $Ca^{2+}$依存性タンパク分解酵素カルパイン阻害剤により改善され、これら阻害剤は運動障害と脊髄運動神経細胞死に対しても長期的な治療効果が認められた。以上の結果から、脳部位により GLT1 欠損が神経細胞死に与える影響が異なる事と、カルパインによる NPC の異常が AMPAR 過剰活性化を介した神経細胞死に関与しうる可能性が示された。

＜諸言＞

グルタミン酸は主要な興奮性の神経伝達物質として脳高次機能に必須の役割を果たす一方、過剰なグルタミン酸神経伝達は興奮毒として働き神経細胞死を誘導する。そのため、グルタミン酸興奮毒性は、脳卒中やてんかん、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの様々な神経疾患の病態への関与が示唆されている。グリア型グルタミン酸輸送体(GLT1, GLAST)は細胞外のグルタミン酸をアストロサイト内に取り込み、グルタミン酸興奮毒性から神経細胞を保護する。神経疾患の患者やモデル動物で GLT1 や GLAST の発現減少や機能不全は疾患毎に異なった脳領域で報告されているが、これらの異常が神経細胞死の直接の原因か、あるいは神経細胞死の二次的な影響によるものかは不明である。この事から脳領域特異的なグリア型グルタミン酸輸送体の役割を明らかにすることは疾患病態の理解を深める上で重要である。また、グリア型グルタミン酸輸送体減少が神経細胞死を誘導しうるのであれば、病態時に生じている

と考えられる慢性的なグルタミン酸興奮毒性下での神経細胞死の分子機構を解明することは、疾患の治療戦略を検討する上で有益であると考えられる。

ALS は大脳皮質から脊髄に投射する上位運動神経と脊髄から筋肉へ投射する下位運動神経が選択的に脱落する難病であり、その病態は未解明な点も多く有効な治療法は確立していない。ALS 患者では GLT1 の発現減少が大脳皮質、脊髄といった異なる脳部位で報告されている。そこで、本論文では、運動神経細胞死に対して GLT1 欠損の脳部位における影響の違いの検証を行った。さらに、グリア型グルタミン酸輸送体 GLT1 と GLAST の脊髄での減少が脊髄運動神経細胞死を誘導する機構の一端を見出した。

＜方法＞

GLT1 の全身性欠損マウスはてんかん発作により生後３週齢で死亡するため、GLT1 の欠損が運動神経に与える長期的な影響を検討することができなかった。そこで、Cre-loxp システムを活用し、皮質特異的 GLT1 欠損マウス(Emx1-Cre/GLT1$^{flox/flox}$)、脊髄特異的 GLT1 欠損マウス(Hoxb8-Cre/GLT1$^{flox/flox}$)を作製しグルタミン酸興奮毒性が皮質・脊髄運動神経細胞に与える長期的な影響を解析した。運動機能の評価には Hanging wire test, Hindlimb reflex score を用いた。逆行性の蛍光トレーサーFluoro-Gold を脊髄に注入して皮質運動神経細胞を可視化した。脊髄運動神経細胞については、既知のマーカーである Choline acethyl transferase(ChAT)の免疫染色を行い、陽性細胞数を定量した。薬剤は適宜溶媒と混和し、経口投与もしくは腹腔内投与を行った。

＜結果＞

Emx1-Cre/GLT1$^{flox/flox}$マウスは正常な運動能を呈し、Fluoro-Gold で標識した皮質運動神経細胞の数も対照(GLT1$^{flox/flox}$)マウスと同程度だった。一方で、Hoxb8-Cre/GLT1$^{flox/flox}$マウスは、軽度の運動障害と脊髄運動神経細胞死を誘導した。さらに、Hoxb8-Cre/GLT1$^{flox/flox}$マウスと GLAST 欠損マウスを交配させ（GLAST$^{+/-}$/GLT1-cKO マウス）、脊髄で GLT1 と GLAST を共に減少させた結果、脊髄運動神経細胞死と運動障害の程度が悪化した。

GLAST$^{+/-}$/GLT1-cKO マウスに対するグルタミン酸受容体のサブタイプ特異的阻害剤の投与実験から、運動障害と脊髄運動神経細胞死は AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPAR)阻害剤 perampanel 投与での改善が認められた。一方で、NMDA 型グルタミン酸受容体阻害剤の memantine と MK-801 は運動障害と脊髄運動神経細胞死に対して無効だった。

GLAST$^{+/-}$/GLT1-cKO マウスの脊髄運動神経では、核膜孔複合体タンパク(NPC)の構成タンパク(nucleoporin; NUP)の分解と核膜の形態異常が認められ、この異常を呈する脊髄運動神経の割合は病態が悪化するにつれて増加した。in vitro の実験系から、NUP の分解には $Ca^{2+}$依存性タンパク分解酵素カルパインが関与する事を確認した。実際に、GLAST$^{+/-}$/GLT1-cKO マウスの脊髄ではカルパインの過剰活性化が認められた。カルパイン阻害剤投与により、GLAST$^{+/-}$/GLT1-cKO マウスの運動障害と脊髄運動神経細胞死に加え、NUP の分解が抑制されることも見出した。NUP の分解は AMPAR 阻害剤でも抑制された。

NPC は核-細胞質輸送に必須の役割を持ち、NUP の減少は核-細胞質輸送障害を誘導しうる事や神経細胞死への寄与が近年の報告から示唆されている。核から細胞質への輸送を阻害する nuclear export inhibitor KPT-350 を GLAST$^{+/-}$/GLT1-cKO マウス投与した結果、一過的に運動障害と脊髄運動神経細胞死が抑制されたが、NUP 分解は改善されなかった。

各種阻害剤の長期投与実験では、AMPAR 阻害剤とカルパイン阻害剤で長期的な治療効果が認められた。

＜考察＞

今回、大脳皮質でのグリア型グルタミン酸輸送体 GLT1 欠損は皮質運動神経細胞の生存には影響しない一方、脊髄での GLT1 欠損は脊髄運動神経細胞死に寄与する事が in vivo で証明された。また、脊髄での GLT1 欠損に加えて GLAST も減少させる事で脊髄運動神経細胞死の程度が増悪することから、GLT1 だけでなく GLAST も脊髄神経細胞に保護的に働くことを新たに見出した。この事から、GLT1 と GLAST 双方の発現を上昇させる arundic acid のような薬剤はグルタミン酸興奮毒性が関わる神経細胞死の治療に有益である可能性が考えられる。

阻害剤投与実験の結果から、GLT1 と GLAST 減少の下流では AMPAR の過剰活性化とそれに伴うカルパイン過剰活性化が脊髄神経細胞死に寄与する事が示唆された。また、この過程で脊髄運動神経細胞が NUP の分解と核の形態異常を呈した。近年、NPC の機能不全による核-細胞質輸送障害は ALS や traumatic brain injury、ハンチントン病でも報告されている。これら神経疾患にはグルタミン酸興奮毒性の関与も示唆されており、NPC の機能不全による核-細胞質輸送障害は、興奮毒性による神経細胞死に共通した病態の可能性が高い。GLAST$^{+/-}$/GLT1-cKO マウスでは NUP 分解を抑制できなかった nuclear export inhibitor の効果が一過的だった一方で、NUP 分解を抑制できた AMPAR 阻害とカルパイン阻害の効果が長期に持続した。この結果から、NUP 分解の抑制による NPC の機能維持が AMPAR 過剰活性化を介するグルタミン酸興奮毒性が関わる神経細胞死の治療標的として有効である可能性が考えられる。AMPAR 過剰活性化は脳卒中や traumatic brain injury、ALS などの神経疾患との関与が深い事から、今回の結果はこれらの疾患の新規治療戦略を考える上で有益な知見を提供しうると考えられる。

＜結論＞

大脳皮質での GLT1 欠損は皮質運動神経細胞死を誘導しない一方で、脊髄での GLT1 欠損は運動障害と脊髄運動神経細胞死に寄与する事を in vivo で証明した。脊髄での GLT1 欠損に加えて GLAST を減少させると運動障害と脊髄運動神経細胞死が悪化した事から GLAST も GLT1 と同様に脊髄運動神経細胞に保護的に働いている可能性を見出した。また、今回の知見から、AMPAR の過剰活性化を介するグルタミン酸興奮毒性による神経細胞死にはカルパインによる NPC 分解が関与する可能性も示唆された。

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 杉山　香織 |
| 論文審査担当者 | 主査：鍔田　武志<br>副査：岡澤　均<br>副査：澁谷　浩司 |
| 論　文　題　目 | Dysfunction of glial glutamate transporters contributes to spinal motor neuron death in vivo<br>（グリア型グルタミン酸輸送体の機能不全は脊髄運動神経細胞死に in vivo で寄与する） |

（論文審査の要旨）

神経伝達物質グルタミン酸の過剰により神経細胞が細胞死を起こすグルタミン酸興奮毒性が知られており、また、神経細胞から分泌されたグルタミン酸を回収する GLT1 などのグルタミン酸輸送体の発現低下が ALS など変性疾患で知られている。そこで、申請者は、大脳皮質や脊髄など組織特異的に GLT1 を欠損するマウスを作出した。さらに別のグルタミン酸輸送体 GLAST 欠損マウスと交配して脊髄特異的 GLT-1 欠損 GLAST ヘテロ欠損マウスで脊髄神経細胞の細胞死が起こり、下肢などの麻痺など ALS 様の症状をきたすことを明らかにした。さらに、そのメカニズムの解析により、カルパインの活性化による核膜孔タンパク質の分解とタンパク質の核細胞質間輸送の異常を明らかにし、さらに、神経細胞の脱落と麻痺が AMPA 型グルタミン酸受容体阻害剤やカルパイン阻害剤で抑制されることを明らかにした。グルタミン酸輸送体の発現異常により神経細胞死を起こすことを実際に示し、そのメカニズムを明らかにすることで ALS などの神経変性疾患の病態の一端を明らかにし、さらに、このメカニズムを標的にして治療法開発の可能性を示したことは、博士の学位論文として十分に価値がある。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | 外山　桂 |
| 論文審査担当者 | 主査：伊藤　暢聡<br>副査：袖岡　幹子<br>副査：平野　智也 |
| 論　文　題　目 | Studies on New Peptide Inhibitors of Kinase Activity and Vehicles for Intracellular Drug Delivery Based on the EGF Receptor Dimerization Arm<br>（上皮成長因子受容体二量体化アームを基盤とした新規ペプチド性阻害剤／細胞内薬物送達分子に関する研究） |

（論文内容の要旨）

**[Introduction]**

Cancer is one of the most serious health problems in the world. Recently, several cancer drugs, which target cancer-specific receptors, enzymes, and lower pH condition, have been developed and contributed to improve our quality of life. In addition, peptide drugs have attracted attention, because they have promising potency to compensate for disadvantages of small-molecule drugs or antibodies. Particularly, cyclic peptides have more advantages in structural stability, biological stability, membrane permeability, and selectivity compared to linear peptides.

The epidermal growth factor (EGF) receptor (EGFR) is a single-spanning membrane protein with a tyrosine kinase. The ligand-dependent dimerization causes intracellular autophosphorylation, followed by activation of an intracellular signaling pathway which induces cell proliferation and differentiation. Since overexpression or unregulated activation of the receptor is known to initiate a cancerous change in many cells, EGFR is an important target of anticancer drugs to inhibit the kinase activity of EGFR. Although tyrosine kinase inhibitors are effective at the first trial in general, drug-resistance rapidly arises after following repeated treatments. On the other hand, the extracellular domain of EGFR has a potential to become divergent compared to the ATP-binding site. In addition, the binding of its ligands and downstream signaling results in endocytosis and intracellular trafficking of EGFR. This is the reason, fundamental internalization of EGFR is a useful target for the intracellular drug delivery. An antibody drug, Cetuximab, targets the EGFR ectodomain and blocks ligand binding, resulting inhibition of EGFR activation. Since it also induces internalization of EGFR, an antibody-drug conjugate has been developed, and improved to increase therapeutic efficacy. Thus, discovery of new inhibitors or ligands for the receptor ectodomain can lead to the development of promising intracellular delivery molecules for improvement of the quality of cancer treatment.

In the crystal structure of the dimerized ectodomain of EGFR, the ‘dimerization arm’ might be responsible for the dimerization. An inhibitory cyclic decapeptide, peptide **1** (CYNPTTYQMC), which mimics a part of the β-hairpin loop structure of the arm, was previously reported. This may act on the extracellular region of EGFR and block the receptor dimerization, which is a key step in the

activation cascade. Therefore, the sequences of dimerization arm could be useful as a template to design novel compounds with inhibitory activity toward the EGFR activation. In this thesis, peptide derivatives based on the sequences of the dimerization arm were developed for inhibitors of the EGFR kinase activation. Furthermore, their ability of internalization into cells were examined to develop a new vehicle for intracellular delivery with selectivity to EGFR-positive cells.

**[Results and Discussion]**

Structure-activity relationship (SAR) study of peptide **1** has been examined, however, no potent peptides with higher inhibitory activity than that of **1** have been found. Therefore, Chapter 1 described the development of fluorescein-labeled peptide derivatives based on the arm sequences to search for new potent peptides, and the evaluation of their inhibitory activity against autophosphorylation of EGFR. Peptide **2**, which was labeled with fluorescein at the N-terminus of **1**, was synthesized. Six derivatives of peptide **2**, in which the composed amino acid residues with the exception of two cysteines and proline were randomized, were synthesized and used to treat the epidermoid carcinoma A431 cells, which abundantly express EGFR on the cell surface. Peptide **6** showed the highest binding affinity for EGFR-positive cells. From the results of the EGFR autophosphorylation assay, this peptide was proven to have higher inhibitory activity than peptide **2**, which would be useful to find new inhibitors against the EGFR. Therefore, peptide **6** has potential for a new kinase inhibitor.

Cell-penetrating peptides (CPPs) have become important tools to promote cellular uptake of cargo across the plasma membrane. However, CPPs are not enough to carry the molecules into specific cells, especially for cancer treatment. Therefore, there is a need to develop CPPs capable of selective delivery of desired medicines to cancer cells. Chapter 2 includes the evaluation of capability of internalization and selectivity to EGFR and application to a vehicle for intracellular delivery by conjugation with a membrane-impermeable pro-apoptotic domain (PAD) peptide *via* an enzymatically cleavable linker. As a result, the involvement of EGFR in the cellular uptake of peptide **6** was verified by EGFR knockdown using A549 cells. To investigate the ability of peptide **10** (non-labeled peptide **6**) as a vehicle for intracellular delivery, conjugate **20**, which is conjugated with a PAD peptide *via* a cleavable linker, was synthesized and its bioactivity was evaluated. Conjugate **20** showed clear suppression of the cell viability of EGFR-positive cell lines A549 and A431, whereas conjugate **21** containing a Gly linker had no inhibitory activity. Furthermore, conjugate **20** did not showed significant effect on the cell viability in HEK293, a normal cell line with minimal expression of the receptor, at an optimum concentration for intracellular delivery. In the apoptosis detection in A549 using FITC-Annexin V, conjugate **20**-treated cells showed apoptotic behavior. These results indicated that peptide **10** might become a lead for a vehicle for intracellular drug delivery with selectivity to EGFR-positive cells. Furthermore, conjugate **20** having apoptosis induction activity would contribute to the development of anticancer reagents based on the antimicrobial peptide, PAD, functions.

According to recent researches, as the clusters of EGFR could increase the possibility of their dimerization and activation, the dimerization state of EGFR on the cell surface is important. When a bivalent inhibitor with an optimized linker length is designed, the clusters of EGFR are recognized with high affinity and kinase activation depending on EGF could be suppressed. In Chapter 3, bivalent ligands based on a peptide **10** derivative with poly(L-proline) or poly[(glycine)$_4$(L-serine)] linkers

have been designed and synthesized. The inhibitory activity against EGFR autophosphorylation increases as the linker length increases up to the 15-mer proline linker. The inhibitory activity in these ligands is increased compared to the monomeric peptide **20**. Bivalent ligands with polyproline linkers might maintain the distance between the ligand moieties that is optimum to the unliganded dimeric receptor.

**[Conclusion]**

These results based on the dimerization arm of EGFR make it possible to provide a variety of useful tools that work as inhibitors for kinase activity of EGFR and as vehicles for intracellular delivery with selectivity to EGFR-positive cells.

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 外山　桂 |
| 論文審査担当者 | 主査：伊藤　暢聡<br>副査：袖岡　幹子<br>副査：平野　智也 |
| 論　文　題　目 | Studies on New Peptidic Inhibitors for Kinase Activity and Vehicles for Intracellular Drug Delivery Based on the EGF Receptor Dimerization Arm<br>（上皮成長因子受容体二量体化アームを基盤とした新規ペプチド性阻害剤／細胞内薬物送達分子に関する研究） |

（論文審査の要旨）

皮成長因子受容体（EGFR）は、細胞外ドメインに存在する二量体化アームというループを介して会合することにより活性化する。申請者は、この二量体化アームに着目し、それを模倣した環状ペプチドを基盤として（１）癌治療薬として機能しうるペプチド性阻害剤の開発、（２）EGFR を過剰発現している細胞選択的に治療薬等を運搬するための分子ツールの開発、（３）開発したペプチドを二量体化することによる効果の増強、という３つの研究を展開した。

（１）では、もともとのアーム部分に相当するペプチド配列を S-S 結合でつないだ環状ペプチドの配列をランダムに入れ替えたペプチドを種々合成し、その中から、天然配列を超える阻害活性をもつものを見出した。（２）では、EGFR に抗体が結合するとエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる事から、本ペプチドが EGFR 発現細胞に選択的な輸送体として機能するのではないかという着想を得てさらに研究展開を行った。すなわち、本ペプチドに細胞膜非透過性でミトコンドリア膜に直接作用してアポトーシスを誘導するペプチドを、リソソームにある酵素で切断されるリンカーを介して結合させたペプチドを設計した。この融合ペプチドは、狙い通り EGFR 高発現細胞で選択的にアポトーシスを誘導する事を示し、本ペプチドが EGFR 発現細胞選択的な輸送体となりうる事を示した。（３）本ペプチドを剛直なプロリンリンカーでつないだ二量体の設計・合成・評価も行い、モノマーより強い EGF 活性化阻害を示す化合物を見出した。

このように申請者は３つのいずれの研究においても、興味深い知見と有用な分子が得られており、これらはペプチドを基盤とする中分子創薬研究における重要な研究成果となる。

以上により、この学位論文が博士号に十分値するものであると判断した。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | 細井　勇輔 |
| 論文審査担当者 | 主査：稲澤　譲治<br>副査：仁科　博史<br>副査：田中　光一 |
| 論　文　題　目 | Analysis of lncRNA *Fat60*-deficient mice showing female-specific developmental abnormalities<br>（表現型に性差を示す Long non-cording RNA *Fat60* 欠損マウスの解析） |

（論文内容の要旨）

〈要 旨〉

Long non-coding RNA（lncRNA）は *in vitro* での研究から、発生および分化過程における様々な遺伝子発現制御に重要な機能を持つと考えられている。しかし、*in vivo* における機能は大部分が未解明のままである。本研究室所属の小林らのグループが作製した lncRNA *Fat60* 欠損マウスは、メスの個体だけで眼球形成に重篤な異常を示した。本研究ではこの *Fat60* 欠損による眼球形成異常を詳細に調べ、性差による表現型の違いの原因について検討した。その結果、*Fat60* 欠損マウスの表現型はヒト疾患である小眼球症と酷似していることを示した。さらに *Fat60* 欠損のメスマウスでは、X 染色体不活性化（XCI）の異常が生じたことが明らかにした。この XCI 異常の程度は、個体ごと（さらには眼球ごと）にばらついており、そのばらつきの程度は XCI を制御する lncRNA *Xist* の発現量の低下と負の相関がみられた。本研究は、Fat60 は XCI における Xist の適正な発現に必要であり、*Xist* 発現量の厳密なコントロールが正常な XCI に必要であることを示唆している。

〈緒 言〉

ncRNA の中でも 200 nt 以上のものは long non-coding RNA（lncRNA）と言われ、 *in vitro* での研究から発生および分化過程における様々な遺伝子発現制御に重要な機能を持つことが示唆されている。しかし、これらを欠損させたマウスによる *in vivo* の解析から、個体における明確な生物学的機能が示された例は少ない。マウスにおいて機能が判明した数少ない lncRNA の一つに *Xist* がある。*Xist* は X 染色体不活性化（XCI）に必須機能を持つことが判明しており、これを欠失したマウスは初期胚致死となる。XCI は哺乳類のメスにおいて二本ある X 染色体の一本を不活性化する機構で、これにより雄と雌の X 染色体連鎖遺伝子の発現量の量的補正を行なっている。マウスの XCI にはインプリント型とランダム型の２種類がある。着床前胚ではインプリント型 XCI により父親由来の X 染色体が選択的に不活性化される。このインプリント型 XCI は、胚盤胞期において将来、胎仔を構成するエピブラストにおいて一度消失し、着床後にはランダム型 XCI により父親由来または母親由来の X 染色体がランダムに選ばれ不活性化される。*Xist* は不活性化される X 染色体から発現し、染色体全体を *cis* に不活性化する。しかし、どのように *Xist* が正確に X 染色体１本分の遺伝子を不活性化しているのか不明な点が多い。

我々は *Xist* 以外の XCI 制御因子を探索し、*Xist* と同様に着床前の父親由来 X 染色体から発現するインプリント遺伝子群[3 つの lncRNA（*Xist, Jpx,* and *Fat60*）と 2 つの miRNA（*Far2* and *Far3*）と 1 つのプロテイ

ンコーディング遺伝子 *Zcchc13*]を発見した。この中で、着床前において *Xist* の次に発現量の高い lncRNA *Fat60* に注目し、インプリント型 XCI への関与を調べる為に *Fat60* 欠損マウスを作製した。しかし調べた範囲では、*Fat60* 欠損マウスには着床前インプリント型 XCI の異常は見つからなかった。ところが驚いたことに、*Fat60* ホモ欠損マウス（*Fat60*$^{-/-}$）を詳しく観察してみると眼に異常があることが分かった。離乳時における眼球異常の発生頻度を比較すると、*Fat60* ヘテロ欠損のメスマウスで 7.6%、ホモ欠損のメスマウスで 17%の個体が異常であることが分かった。そして *Fat60* 欠損のオスマウス（-/Y）ではほぼ異常は認められず、異常の発生頻度には明確な性差があった。本研究では *Fat60* 欠損による眼球形成異常の原因と、性差による表現型の違いについて検討した。初めに *Fat60* 欠損マウスの発生時期を遡り、異常の発症過程を詳細に解析した。次に表現型の性差は XCI の異常に起因するのではないかと仮説を立て、未解析であった着床後ランダム型 XCI への影響を検討した。

＜方法および結果＞

**1,*Fat60* 欠損マウスはヒト小眼球症に酷似した異常を示した**

*Fat60*$^{-/-}$の眼の異常を発生時期を遡って観察した結果、発生 15.5 日および 13.5 日にはすでに眼の異常が認められた。より詳細に異常の特徴を調べるために、切片作製および HE 染色から形態学的解析を行った。その結果、眼球異常はヒトの小眼球症と似ていることが明らかになった。そこで切片から眼の断面の面積を測定したところ、確かに *Fat60*$^{-/-}$の異常な眼は WT の眼より小さいことが分かった。以上の結果から、*Fat60*$^{-/-}$がヒト小眼球症に酷似した眼の異常を示すと結論づけた。

**2,*Fat60* 欠損メスマウスはランダム型 XCI の異常を示した**

*Fat60*$^{-/-}$の眼の異常がメスにおいてのみ現れることから、メスだけにある XCI 機構に異常があると仮説をたてて検証した。マイクロアレイを用いて WT および *Fat60*$^{-/-}$の発生 13.5 日の眼について発現遺伝子を比較すると、WT に比較して *Fat60*$^{-/-}$では一部の X 連鎖遺伝子（93 遺伝子）の発現量が 1.2 倍以上に上昇していることが分かった。この遺伝子群は XCI を受けない異常な遺伝子（XCI 異常）の候補だと考えられる。なぜならばこの実験系で WT のメスとオスを比べると①ほとんどの遺伝子は 0.8<Fold Change<1.2 の間に集束し、②更に XCI を逃れる既知の５つのエスケープ遺伝子は Fold Change>1.2 の範囲で正確に検出できるからである。更に RT-qPCR からも３つの遺伝子（*Tmem29, Mecp2,* および *Ogt*）について、確かに *Fat60*$^{-/-}$で発現量が有意に増加することが分かった。この３遺伝子について XCI 異常の有無を検証する為に、RNA-FISH によって新生鎖 RNA の検出を行った。その結果、*Fat60*$^{-/-}$の細胞でのみ WT では見られない、*Xist* のシグナルと重なる新生鎖 RNA が検出された。これは本来不活性化される X 染色体から X 連鎖遺伝子が発現していることを示し、直接ランダム XCI 異常を示す証拠である。

**3,*Fat60* は *Xist* 発現量の厳密なコントロールに必要である**

XCI に必須な *Xist* 発現量をマイクロアレイを用いて WT と *Fat60*$^{-/-}$を比較すると、バラツキはあるが低下する傾向があった。RT-qPCR で確かめると、*Fat60*$^{-/-}$の *Xist* 発現量が有意に低下することが判明した。更に *Fat60*$^{-/-}$における *Xist* 発現量と XCI 異常の遺伝子数の間には負の相関がみられた。次に発現量が変化した遺伝子の Gene Ontology 解析をした結果、XCI 異常の遺伝子群及び、常染色体で発現量が増加した遺伝子群には、目の発生に関わる遺伝子は見つからなかった。一方、常染色体において発現量が低下した遺伝子群では、眼の発生に関わる遺伝子が有意に多かった。これら目の発生に関わる遺伝子の発現異常はオスの *Fat60* 欠損には見られない。これらを総合して考えると、眼の異常は *Fat60* 欠損によって *Xist* 発現量が低下することで、メスでのみ XCI 異常が発生し、その下流において眼の異常が発生した可能性があると結論した。

＜考察＞

*Fat60* 欠損マウスの表現型は雌でのみ出現するが、*Fat60* は着床後にインプリントが消去され雌雄共に発現するため、表現型の雌雄差はインプリントが原因ではない。また眼は雌雄共に持つ組織であり、生殖器のようにその形成に性ホルモンが関与するとは考えにくい。本研究では、*Fat60* 欠損メスマウスで XCI 異常が起こっていることを明らかにした。*Fat60* 欠損マウスの遺伝子発現解析の結果は、異常な発現を示す遺伝子数に明確な雌雄差を示した。すなわち、雌で多くの遺伝子発現異常がみられる一方、雄では遺伝子発現異常がほとんど検出されない。これは、*Fat60* が XCI を介さず直接常染色体の遺伝子発現を制御する可能性は低いことを示している。一方、雌において検出された多くの常染色体の遺伝子発現異常は、X 染色体の不活性化の異常が引き金となり、一部の X 連鎖遺伝子の発現が約２倍に増えたことにより生み出される二次的、三次的遺伝子発現の変化を検出していると考えられる。

また *Fat60*$^{-/-}$の眼の異常には重篤度にバラツキがあるが、*Fat60*$^{-/-}$は純粋な C57/BL6 バックグラウンドで維持されており、この表現型が現れる確率的性質は遺伝的背景の違いによって単純に説明することはできない。一方、この表現型のバラツキは、*Xist* 発現量の減少度合いにより説明できる可能性がある。すなわち *Xist* の発現量が低いほど、深刻な表現型が現れると予想される。*Fat60* が *Xist* 発現量を調節する正確な分子機構は精査すべき課題だが、本研究は *Fat60* がランダム型 XCI における *Xist* の発現を制御し、*Xist* 発現量の厳密なコントロールが、正常なランダム型不活性化に必要であることを示唆している。これまでに ES 細胞を用いた *in vitro* の研究では、*Fat60* が *Xist* を制御することが提唱されていた。しかし、その報告はオスの ES 細胞を用いた結果であり、*Fat60* の XCI への関与は未解明のままであった。実際にランダム XCI が起きる *in vivo* のメスで *Fat60* が XCI に必須であること示したのは本研究が初めてである。

〈結 論〉

本研究は lncRNA である *Fat60* が *Xist* の適切な発現量の制御に必須であり、個体発生における正常なランダム型不活性化に重要な役割をはたしていることを明らかにした。

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 細井　勇輔 |
| 論文審査担当者 | 主査：稲澤　譲治<br>副査：仁科　博史<br>副査：田中　光一 |
| 論　文　題　目 | Analysis of lncRNA *Fat60*-deficient mice showing female-specific developmental abnormalities<br>（表現型に性差を示す Long non-cording RNA *Fat60* 欠損マウスの解析） |

（論文審査の要旨）

申請者の所属する研究室では、X 染色体不活性化（XCI）に必須機能をもつ Long non-coding RNA（lncRNA）である *Xist* と同様に着床前の父親由来 X 染色体から発現する lncRNA として *Jpx* と *Fat60* を発見した。*Fat60* 欠損マウスを作成したところ、メス個体にだけ眼球形成に重篤な異常を示した。このため、申請者の研究ではこの *Fat60* 欠損による眼球形成異常を詳細に調べ、性差による表現型の違いの原因について検討した。

形態学的解析から、*Fat60*$^{-/-}$がヒト小眼球症に酷似した眼の異常を示すと結論づけた。

また、マイクロアレイを用いた WT および *Fat60*$^{-/-}$の発生 13.5 日の眼組織の遺伝子発現の比較と RNA-FISH 解析の結果から、*Fat60*$^{-/-}$で XCI を免れ発現量が上昇する３つの遺伝子（*Tmem29, Mecp2,* および *Ogt*）を同定した。さらに *Fat60*$^{-/-}$で発現量が変化した遺伝子の Gene Ontology 解析では、発現量が低下した常染色体遺伝子群において、眼発生関連遺伝子が有意に多かった。したがって、*Fat60* 欠損によって *Xist* 発現量が低下することでメスでのみ XCI 異常が発生し、その下流において眼の異常が発生した可能性を結論した。

本研究により申請者は、lncRNA である *Fat60* が *Xist* の適切な発現量の制御に必須であり、個体発生における正常なランダム型不活性化に重要な役割をはたしていることを明らかにした。

以上より、本論文は博士（理学）の学位を申請するに十分に価値があるものと認められた。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | 山本　由姫 |
| 論文審査担当者 | 主査：　石川　俊平<br>副査：　角田　達彦<br>副査：　安永　正浩 |
| 論　文　題　目 | Pancreatic Tumor-targeting Oncolytic Adenovirus Showed High Infectivity and Strong Antitumor Effect for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Neuroendocrine Tumor<br>（膵腫瘍標的型溶解アデノウイルスは膵管がんおよび膵内分泌腫瘍において高い感染効率と腫瘍溶解効果を示す） |

（論文内容の要旨）

【要旨】

本研究において、膵がん標的配列(SYENFSA)をキャプシド上に提示する腫瘍溶解型アデノウイルスベクター(AdSur-SYE)の開発に成功した。また、膵がん標的配列を持たないウイルス AdSur に比べ、標的配列を有する AdSur-SYE は膵管がんおよび膵内分泌腫瘍に対してともに有意に高い感染効率と強い腫瘍溶解効果を示すことを細胞株やマウスモデル及び外科切除標本を用いて検証した。

【背景】

アデノウイルスは正二十面体のキャプシド構造を持つ DNA ウイルスであり、風邪やプール熱の原因ウイルスである。キャプシド上に存在するファイバーの先端部位ノブが、自然の受容体であるコクサッキーウイルス・アデノウイルス受容体(CAR)分子を認識し、ウイルスの細胞への感染が始まる。アデノウイルスベクターは、その高い感染力や広範な感染域から、遺伝子治療の領域で臨床的に最も用いられているベクターであり、また、がん特異的プロモーターを用いて選択的に増殖するように改変した腫瘍溶解アデノウイルスも広く研究されてきた。一方で、アデノウイルスは広い感染域を持つがゆえに、かえって腫瘍への感染特異性が低く、このことが臨床応用上の課題の一つとなっていた。そこで、我々は、5 型アデノウイルスのファイバーノブに 7 つのランダムなペプチドを提示するアデノウイルス・ライブラリーを構築した。これまでに、このライブラリーを用いて、種々のがん種に対する腫瘍標的リガンドをスクリーニングすることに成功している。

膵がんは、日本におけるがん死因の第 4 位を占め、早期発見の難しさ、生物学的悪性度の高さ、効果的な治療法に乏しいことなどから新規の治療法の開発が待たれている。膵管を原発とする膵管がんにおける現在の標準治療の第一選択は外科切除であるが、多くの患者は切除不能な状態で発見され、化学療法が適応となることが多い。しかし、ゲムシタビンや TS1 療法などの化学療法が標準治療として用いられるが、平均余命は 1 年程度である。免疫チェックポイント阻害剤も膵がんに対しては有効性を示していない。膵内分泌細胞を原発とする膵内分泌腫瘍は、近年検査技術の発展から患者数が 3 倍に増えてきており、膵管がんほど悪性度は高くないものの、進行した症例においてはやはり新規治療法の開発が必要とされている。

我々は、先行研究として、膵がん細胞株 AsPC-1 細胞を用いてアデノウイルス・ライブラリーをスクリ

ーニングすることにより、SYENFSA 配列(SYE)をファイバー上に提示するアデノウイルスが、膵がん選択的に感染することを見出してきた。

【目的】

Survivin promoter により増殖を制御された従来型腫瘍溶解アデノウイルスに、膵がん標的配列 SYE を組み合わせることで(AdSur-SYE)、より効果と安全性に優れた腫瘍溶解ウイルス療法の開発を目指す。具体的には、症例数が多く悪性度の高い膵管がん(pancreatic ductal adenocarcinoma; PDAC)および近年症例数が増加傾向にある膵内分泌腫瘍(pancreatic neuroendocrine tumor; PNET)において、AdSur-SYE の感染性や腫瘍溶解効果を細胞株・動物モデル・外科切除標本を用いて検討し、PDAC および PNET における有用性を検証する。

【方法】

まず、Survivin promoter により増殖を制御する AdSur と、AdSur に膵がん標的配列を組み合わせたウイルス AdSur-SYE を構築した。細胞株として、4 種類の PDAC 細胞株(AsPC-1, BxPC-3, Panc-1, MiaPaCa-2)、2 種類の PNET 細胞株(QGP-1, A99) および 1 種類の前立腺がん細胞株(PC3)を用意し、感染効率や腫瘍溶解効果を *in vitro* で解析した。感染効率の解析は、ウイルス感染 24 時間後に、ウイルスが発現する EGFP を指標としてフローサイトメトリー(FCM)により解析した。細胞溶解効果は、感染後の生細胞数を WST assay により解析した。BxPC-3 および QGP-1 をそれぞれマウスに皮下投与したマウスモデルを用いて、ウイルスの腫瘍内投与による抗腫瘍効果や腫瘍内ウイルス分布の経時的変化の解析も行った。ヒトの外科手術標本（正常膵 3 例、他のがん 3 例、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN） 3 例、膵管がん 8 例、膵内分泌腫瘍 10 例）は、国立がん研究センターの研究倫理審査委員会の承認に基づいて入手し、シングルセル化して *ex vivo* の解析用として使用した。

【結果】

まず、各膵腫瘍に対する感染効率を検討するため、ヒト外科切除標本をシングルセル化した後、それぞれのウイルスを MOI10 にて感染させた。24 時間後、SYE を挿入しない批評的ウイルスに対する標的ウイルスの感染効率を FCM により測定したところ、正常膵や他のがんでは感染効率は上昇しなかったが、PDAC および PNET でそれぞれは平均して 4.3 倍、8.8 倍の感染効率の増強が認められた。

PDAC および PNET 細胞株の感染実験にて AdSur-SYE が著明な感染効率の上昇を示したのに加え、WST-1 assay において AdSur-SYE が AdSur に比べてより強い細胞障害活性を示すことを確認した。BxPC-3 や QGP-1 細胞の皮下腫瘍マウスモデルにおいて各ウイルスを腫瘍内に直接注入したところ、AdSur-SYE を投与した腫瘍内は腫瘍の増殖が強く抑制された。特に QGP-1 腫瘍においては腫瘍をほとんど排除することができた。一方、非膵臓がんである PC3 腫瘍に対しては抗腫瘍効果を認めなかった。

ヒト外科切除標本における治療効果を確認するため、外科切除標本からシングルセル化した細胞を mouse embryonic fibroblast(MEF)と共培養し、ウイルス感染 5 日後に WST-1 assay を行ったところ、AdSur-SYE は AdSur と比較して強い腫瘍溶解効果を示した。

【考察】

膵がん特異的標的配列(SYENFSA)を挿入した制限増殖型アデノウイルス AdSur-SYE は、膵管がん(PDAC)に加えて膵内分泌腫瘍(PNET)の臨床検体においても、高い感染性を示した。また、感染性の増強だけでなく、強い抗腫瘍効果を発揮することが、PDAC/PNET 細胞株を用いた *in vitro* および *in vivo* 実験に

おいても確認することができた。これらの結果から、当初 PDAC の新規治療法として開発を進めてきた AdSur-SYE は PDAC だけでなく PNET への応用も期待できるウイルスであることが明らかとなった。

AdSur-SYE が、PDAC と PNET で同様に高い感染性を示すことは、SYE 配列に対する receptor が、PDAC においてのみならず PNET においても共通するものであることを示唆する。一方で、ヒト正常膵臓の組織や IPMN(膵管内乳頭粘液性腫瘍)においては感染の増強が認められなかった。PNET は islet 細胞が、PDAC は膵管上皮細胞から発生すると考えられていることから、発生細胞は異なるものの、膵臓で発生・進展する悪性腫瘍においては発現が共通する細胞表面分子が存在している可能性がある。

Survivin は胎児の発生に関わる分子の一つであり、PDAC および PNET においてはその発現が患者のがんの悪性度に相関する。本研究において開発された AdSur-SYE は、Survivin の発現が高い腫瘍においてより増殖能が高いことが予想されるので、悪性度が高く治療が困難な患者においてより効果を発揮することが期待できる。あらかじめ生検サンプルを用いて、感染効率や Survivin の発現状態を確認することにより治療に奏功する可能性の高い患者を選別することは十分実行可能であり、臨床試験の成功に結び付くと考えられる。

これらの結果より、AdSur-SYE はより安全性が高く強力な腫瘍溶解効果を発揮する新規治療法として、PDAC だけでなく PNET への応用も考えられるウイルスとして今後の臨床開発に資するものと考えられた。特に、超音波内視鏡や経皮超音波ガイド下で直接ウイルスを注入できる局所進展型膵がんに対する有効な治療戦略になりうるだろう。

【結論】

膵がん標的型腫瘍溶解ウイルス AdSur-SYE は、膵管がんや膵内分泌腫瘍に対する有望な治療戦略になりうる。

【Key word】
膵がん標的型腫瘍溶解アデノウイルスベクター、膵管がん、膵内分泌腫瘍

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 山本　由姫 |
| 論文審査担当者 | 主査：石川　俊平<br>副査：角田　達彦<br>副査：安永　正浩 |
| 論　文　題　目 | Pancreatic Tumor-targeting Oncolytic Adenovirus Showed High Infectivity and Strong Antitumor Effect for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Neuroendocrine Tumor<br>（膵腫瘍標的型溶解アデノウイルスは膵管がんおよび膵内分泌腫瘍において高い感染効率と腫瘍溶解効果を示す） |

（論文審査の要旨）

本博士論文研究は、膵腫瘍標的型溶解アデノウイルスが膵管がんおよび膵内分泌腫瘍において高い感染効率と腫瘍溶解効果を持つことを示した研究である。

背景として、膵がん細胞株 AsPC-1 細胞を用いてアデノウイルス・ライブラリーをスクリーニングすることにより、SYENFSA 配列（SYE）をファイバー上に提示するアデノウイルスが膵がん特異的に感染することを見出していた。申請者は膵臓がんを含むがん細胞で特異的に活性化される Survivin に着目して、Survivin プロモーター下流にアデノウイルス蛋白 E1 の発現が可能なコンストラクトを作製してアデノウイルスベクターに組み込んだ。この技術を前述の SYENFSA を用いたアクティブターゲッティングと組み合わせること（AdSur-SYE）によりウイルス遺伝子治療でしばしば問題とされるオフターゲティングを克服して、膵臓がん特異性で尚且つ殺細胞効果を上げようと試みた。その結果 SYENFSA を用いたアクティブターゲッティングと Survivin プロモーターの組み合わせは、相乗的かつ有意に膵臓がん細胞の in vitro 殺細胞効果と in vivo 抗腫瘍効果を上げることができ、作業仮説の正しさが証明された。また、本法は膵臓がんの大多数を占める ductal adenocarcinoma(PDAC)のみならず、pancreatic neuroendocrine tumor(PNET)にも有効であることを示すことにも成功し、細胞株以外にも実際の臨床外科切除検体を用いてもその有効性を証明できた。

AdSur-SYE はより安全性が高く強力な腫瘍溶解効果を発揮する新規治療法として、PDAC だけでなく PNET への応用も考えられるウイルスとして今後の臨床開発に資する研究結果と考えられる。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | 今泉　祐輝 |
| 論文審査担当者 | 主査：　三林　浩二<br>副査：　由井　伸彦<br>副査：　木村　剛 |
| 論　文　題　目 | The development of cell membrane disorder assay by active pH sensing using Ion-Sensitive Field-Effect Transistor<br>（イオン応答性電界効果トランジスタを用いたアクティブ型 pH 計測による細胞膜障害性測定法の開発） |

（論文内容の要旨）

＜緒言＞

細胞膜は細胞内と細胞外を隔てる半透膜であり、溶存ガスや疎水性の小分子は細胞膜を透過することができるが、イオンのような親水性分子や蛋白質のような大きな分子は透過することができない。細胞膜が外的要因により傷つけられた際、細胞内外において保たれていた分子やイオンの分配が失われ、細胞質から様々なイオンや蛋白質が漏出し、急性の細胞毒性 (ネクローシス) が誘導される。既存の細胞膜障害性測定法は細胞質から漏出したタンパク質や蛍光色素を指標とするため、指標とする分子よりも小さなサイズの空孔形成を検出できないという原理的な問題がある。さらに終端計測であるため、経時的な細胞膜障害性の評価を行うことができない。

本研究では、半導体技術を生体分子の認識や細胞の解析に応用したバイオトランジスタによる、細胞膜障害性の評価法を提案する。バイオトランジスタの特長として、高感度・ラベルフリー・リアルタイム・高スループットな測定系の確立が容易である点が挙げられる。これまでのバイオトランジスタの報告例では、細胞外のイオン濃度を測定することで、細胞や膜タンパク質の活性評価に成功している。しかし、これらの測定法は細胞自体の活性によって引き起こされる、いわば受動的なイオン濃度変化の測定を行うもの（パッシブ型）である。トランスポーターなどの活性によってイオン濃度が経時的に変化してしまうため、細胞膜障害性を評価する方法としては不向きである。これまでの報告で、$NH_4Cl$ を細胞周辺微小環境に添加することで、細胞膜のイオンバリア性に起因する pH 変動が細胞周辺において起きることが明らかになった。そこで本研究では、イオン応答性電界効果トランジスタ(Ion-Sensitive Field-Effect Transistor (ISFET))と流路系を組み合わせ、人為的に細胞周辺における pH 変動を引き起こす（アクティブ型）ことで細胞膜障害性を評価する新たな方法 (ISFET 測定法)を考案し、開発を行った。

＜方法＞

ISFET による pH 測定には我々の研究室で作製した ISFET analyzer を用いて行った。$Ta_2O_5$薄膜（膜厚 ：40 nm）を絶縁層とした ISFET を ISFETCOM 社より購入した。Ag/AgCl ペレット電極は Warner Instruments 社より購入した。ドレイン-ソース間を 0.5 mA, 0.5 - 1.0 V で一定に保ち、Ag/AgCl 参照電極を用いて、ゲート絶縁膜/溶液間の界面電位変化を測定した。ISFET のゲート部分 (10 μm × 340 μm)の周辺に、内径 5 mm の円筒ガラスを熱硬化性エポキシ樹脂で固定することで、ゲート電極に直接細胞を播種することを可能に

した。細胞接着をより強固にするため、poly-L-lysine でゲート表面をコーティングした。その後、HepG2 細胞 ($1 \times 10^5$ cells /well)をセンサ上に播種し、37 °C, 5% $CO_2$ 条件下で一晩培養した。細胞の洗浄およびコンディショニングには、BTP buffer (1 mM BTP, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM Sucrose ; pH 7.4)を用いた。また、20 mM Sucrose の代わりに 10 mM $NH_4Cl$ を加えた $NH_4Cl$ buffer (pH 7.2) を用いた。BTP buffer と $NH_4Cl$ buffer を交互に 1 分間ずつ ISFET 上の細胞に曝露した。溶液の流速は、50 - 120 μL/min で一定にし、測定は 37 °C で行った。

＜結果・考察＞

**1. ISFET 測定法の確立**

細胞膜のイオンバリア性を評価するために、微小流路系と ISFET を組み合わせた細胞外 pH 測定系を構築した。この pH 測定系は細胞存在下において、pH6.0 – 8.5 の範囲で-41.9 ± 2.1 mV/pH (n = 5) の電位応答を示した。細胞周辺微小環境において $NH_4Cl$ 含有/非含有の溶液交換を行うと、10 秒以内に過渡的な pH 変動 (ΔV) が生じた。ΔV はセンサ表面に細胞が存在するときにのみ生じ、再現性が高いことがわかった (SD/MEAN = 4.3%, n = 10)。まず $NH_4Cl$ を曝露すると、$NH_3$のみ細胞外から細胞膜を透過し細胞質へ受動拡散し、細胞外で $NH_3$の平衡状態が崩れるため $H^+$濃度が上昇する。やがて細胞内が $NH_3$で満たされると、細胞内外で $NH_3$が平衡状態になり細胞外では $NH_4Cl$ buffer の pH 7.2 に収束する。次に、細胞外を BTP buffer に溶液交換をすると、細胞内に充てんされた $NH_3$が細胞外へ拡散し、再度 $NH_3$の平衡状態が崩れ $H^+$濃度が下降する。充てんされた $NH_3$が尽きると、BTP buffer の pH 7.4 に安定する。このようにして $NH_4Cl$ 含有/非含有の溶液交換によって、ΔV を引き起こすことができ、この現象は細胞膜のイオンバリア性による $NH_3$の選択的透過に起因する。次に強い細胞膜障害性を持つ Polyethylenimine 25 ($PEI_{25}$) を ISFET 上に播種した細胞に作用させた。すると $PEI_{25}$を細胞に曝露することで pH 変動が減少した。これは細胞膜障害性によって $NH_3$の選択的透過性が失われ、$NH_4^+$や $H^+$などイオンの細胞膜透過性が増大したため、細胞外での非平衡状態が小さくなり pH 変動が小さくなった。以上から pH 変動の減少率 ($1-\Delta V_2/\Delta V_0$) を指標とすることで、細胞膜障害のリアルタイム測定を行った。

様々な化合物においても測定を行い、従来法である赤血球溶血試験と比較を行ったところ相関性があることが明らかとなった（r = 0.88）。また ISFET 測定法は、溶血試験で識別できない領域においても細胞膜障害性を識別可能であることがわかった。これはそれぞれの測定法の指標であるヘモグロビン(≥ 3.1 nm) (J. Biol. Chem., 1972, 247, 895) とイオンの水和半径 (≤ 0.33 nm) (J. Phys. Chem., 1959, 63, 1381) に起因する感度の差であり、溶血試験に比べ高感度であることが示された。さらにアニオン性界面活性剤の SDS の結果において、細胞膜からのヘモグロビンの漏出は確認されたものの、イオン漏出は確認されなかった。SDS は細胞膜の極性を変化させ、タンパク質の細胞膜透過性を向上させることが知られている (Biophysical Journal, 2002, 83, 1547) 。このような SDS の作用機序により、イオンバリア性を損なうことなくヘモグロビンを引き起こしたと考えられる。

**2. ISFET 測定法による細胞膜障害性と細胞死の分類**

前項で述べた ISFET 測定法と従来法である赤血球溶血試験法を比較することで、イオンは漏出しないがタンパク質は漏出する細胞膜の状態があることがわかった。そこで細胞膜障害性の詳細を調べるため、ISFET 測定法と培養細胞を用いた細胞膜障害性測定法である乳酸脱水素酵素（LDH）漏出試験、または細胞毒性測定法である WST-8 試験とを比較した。その結果、カチオン性化合物である PEI を３分間曝露したところ、LDH 漏出は引き起こされないのに対し、イオン漏出は引き起こされることがわかった。これはそれぞれの測定法の指標である LDH (≥ 4.2 nm) (J. Biol. Chem., 1972, 247, 895) とイオンの水和半径 (≤ 0.33

nm) (J. Phys. Chem., 1959, 63, 1381) に起因している。そこで曝露時間を延ばしたところ、LDH 漏出も引き起こされた。これは PEI による細胞膜孔が時間経過により、成長したことを示している。さらに WST-8 試験の結果から、イオン漏出のみ引き起こす PEI は細胞死を誘導しないことがわかった。この結果は細胞膜障害性のなかには、修復可能であるものが存在することを示している。

さらに非イオン性界面活性剤である Tween20（TW20）と Tween80（TW80）は LDH の漏出は誘導する一方で、イオンの漏出は誘導しないということがわかった。TW20 は細胞膜を透過し、遺伝毒性を示すことでアポトーシスを誘導する (DNA. Cell. Biol., 2013, 32, 498) 。そこで、ISFET 測定法を用いて長時間の曝露を行い、TW20 は約 1 時間後から細胞膜からのイオン漏出を引き起こすことが明らかになった。一方、TW80 はイオン漏出を引き起こさなかった。さらにカスパーゼ-3 活性測定法を行ったところ、TW20 によるカスパーゼ-3 の活性化は 1 時間後に起きており、また TW80 はカスパーゼ-3 を活性化していなかった。これらの結果から TW20 によるイオン漏出はアポトーシス由来の細胞膜障害性であると考えられた。このように ISFET 測定法を用いることで、従来法のみでは行えなかった様々な細胞膜障害性・細胞毒性の識別を行えることが示された。

**3. 浮遊細胞 ISFET 測定法の確立**

ISFET 測定法を浮遊細胞に適応するため、自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer ; SAM) を ISFET 表面上に作成した。自己組織化単分子膜には末端オレイル基のホスホン酸を合成して用いた。オレイル基は細胞毒性を伴わずに細胞膜中に取り込まれ、ホスホン酸は ISFET 表面の $Ta_2O_5$ と共有結合することで細胞を ISFET 上に捕捉することを可能にした。この浮遊細胞/ISFET 測定系を用いて $NH_4Cl$ 含有/非含有溶液を交換したところ、細胞膜のイオンバリア性による過渡的な pH 変化が誘導され、この系においてもリアルタイム細胞膜障害性の測定が可能であることが明らかとなった。本測定系を用いて、非イオン性界面活性剤である TritonX-100 を細胞に曝露した際の細胞膜障害性を検出した。ISFET による測定結果を溶血試験と比較することで、浮遊細胞 ISFET 測定法も高感度かつリアルタイムに細胞膜障害性の測定が可能であることがわかった。

＜結言＞

ISFET 測定法は、細胞膜のイオンバリア性を評価できることが明らかとなった。この系では $H^+$ を指標としているため、非常に微小な細胞膜障害の定量化が可能であることが示唆される。また従来法と比較することで、これまでの細胞膜障害性測定法のみでは識別できなかった細胞膜障害性を検出することが可能となった。さらに ISFET 表面に機能性界面を作ることで浮遊細胞への応用も可能である。この技術は、細胞膜透過機構が不明なナノマテリアルや遺伝子導入剤による細胞膜障害性などの研究について寄与できる。今後本技術は、ナノ材料の評価、新規薬剤スクリーニング法、および細胞治療の非侵襲性の定量的評価への応用が期待できる。

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 今泉　祐輝 |
| 論文審査担当者 | 主査：三林　浩二<br>副査：由井　伸彦<br>副査：木村　剛 |
| 論　文　題　目 | The development of cell membrane disorder assay by active pH sensing using Ion-Sensitive Field-Effect Transistor<br>（イオン応答性電界効果トランジスタを用いたアクティブ型 pH 計測による細胞膜障害性測定法の開発） |

（論文審査の要旨）

細胞膜は外的要因により傷つけられことで、細胞質から様々なイオンや蛋白質が漏出し、急性の細胞毒性 (ネクローシス) が誘導される。既存の細胞膜障害性測定法ではタンパク質や蛍光色素を指標とすることから、指標分子よりも小さなサイズの空孔形成は検出できず、経時的な細胞膜障害性の評価を行うことができない。一方、先行研究においてバイオトランジスタを用いることで、細胞外のイオン測定による細胞や膜タンパク質の評価の可能性が示され、また $NH_4Cl$ の細胞周辺微小環境への添加による評価法も提案されている。そこで申請者は、イオン応答性電界効果トランジスタ（ISFET）と流路系を組み合わせ、人為的に細胞周辺における pH 変動を引き起こす方法にて、細胞膜障害性を評価する新たな方法 (アクティブな ISFET 測定法)を検討した。

実験では、ISFET のゲート部分に円筒ガラスを固定し、ゲート電極部に直接細胞を播種し、ドレイン-ソース間を 0.5 mA, 0.5 - 1.0 V で一定に保ち、Ag/AgCl 参照電極を用いて、ゲート絶縁膜/溶液間の界面電位変化を測定した。細胞刺激として、BTP buffer と $NH_4Cl$ buffer を交互に 1 分間ずつ ISFET 上の細胞に曝露し、界面電位変化の測定を行った。まず細胞膜のイオンバリア性を評価するため $NH_4Cl$ 含有/非含有の溶液交換を行ったところ、10 秒以内に再現性を有する過渡的な pH 変動が観察され、この現象が細胞膜のイオンバリア性による $NH_3$の選択的透過に起因するものと考察した。また強い細胞膜障害性を持つ Polyethylenimine 25 ($PEI_{25}$) を作用することで、細胞膜障害性によって $NH_3$の選択的透過性が失われることによる pH 変動の減少を示し、この減少率を指標とした細胞膜障害のリアルタイム測定の可能性を明らかにした。また本法は、従来法である「赤血球溶血試験」と相関性があり、さらに溶血試験で識別できない領域においても識別の可能性を示した。加えて「乳酸脱水素酵素（LDH）漏出試験」や「WST-8 試験」等とも比較し、様々な細胞膜障害性・細胞毒性が識別できることを提案した。さらに浮遊細胞についても、自己組織化単分子膜を ISFET 表面上に作製し、$NH_4Cl$ 含有/非含有溶液による刺激を行い、細胞膜障害性の評価が可能であることも明らかにした。

以上、申請者は細胞膜障害の評価において、$NH_4Cl$ 含有/非含有溶液による刺激によりアクティブに ISFET での界面電位の変化を測定することで、細胞膜のイオンバリア性を調べることに成功した。また細胞膜障害のリアルタイム測定の可能性ならびに浮遊細胞での評価の有効性を示しており、本研究成果は細胞膜障害性をリアルタイムかつハイスループットに評価しうる新たな方法を提案する意義あるものと評価された。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | 金本　和也 |
| 論文審査担当者 | 主査：　影近　弘之<br>副査：　玉村　啓和<br>副査：　野村　渉 |
| 論　文　題　目 | チオスルホナートを硫黄源とする多彩な含硫黄化合物の合成法の開発 |

（論文内容の要旨）

**【緒言】**

有機硫黄化合物は、医薬品や機能性材料として重要な化合物群である。これらの合成において、取り扱いやすい試薬を用いる、様々な官能基に影響されない、信頼性の高い合成法が求められている。

C–S 結合形成反応による有機硫黄化合物の合成は、チオ基を導入する炭素の結合様式から $Csp^3$–S 結合形成、$Csp^2$–S 結合形成、Csp–S 結合形成に分類される。これらの中で、$Csp^3$–S 結合の形成には、求核置換反応や付加反応などが幅広い有機硫黄化合物の合成に利用されてきた。一方で、$Csp^2$–S 結合形成、Csp–S 結合形成の手法として知られている、有機リチウム反応剤を用いたジスルフィドの置換反応や、チオールを用いた付加脱離による置換反応などは、基質の電子的性質による制限や、官能基の共存性などの観点で課題を抱えており、新手法の開発が望まれてきた。

以前は、窒素や酸素置換基の導入にも同様の課題があったが、Pd 触媒や Cu 触媒などを用いる反応の発展により、有用な手法が開発され、今では医薬品分野や機能性材料分野などに応用されている。一方で、同様の手法による、C–S 結合形成反応の開発も盛んに試みられているが、その開発は発展途上である。その要因として、チオールなどの古典的なチオ化剤が金属触媒と強く結合して被毒してしまうことや、強い求核性による副反応の誘発、酸化されやすさ、強い悪臭による取り扱いにくさなどが挙げられる。これに対して、近年、求電子的なチオ化剤の利用に注目が集まっている。求電子的なチオ化剤は、硫黄原子上に脱離基として電子求引基を配置することにより、硫黄上を「マスク」し、また電子密度を下げることで、求電子的に振る舞うだけでなく、金属触媒の被毒や副反応、チオ化剤の酸化、悪臭などのこれまでの問題点を改善できると期待されている。しかし、これまでに、チオイミド、Bunte 塩、チオシアネートなど様々なチオ化剤の利用が試みられているが、反応性の高さと分解のバランスや、チオ化剤の合成のしやすさなどの点でどれも一長一短であり、様々な反応系に広く利用できるチオ化剤の開発が求められていた。

このような背景のもと、本博士論文研究において筆者は、硫黄原子上にスルホニル基を有するチオスルホナートに着目した。チオスルホナートは、上述のような求電子剤に共通する特徴を兼ね備えていることに加え、様々な方法で容易に合成できる。さらに、筆者は、脱離基のスルホニル基上の置換基の変更によって反応性が調節しやすいため、様々な反応系への拡張が期待できると考えた。

チオスルホナートはこれまでに、有機リチウム反応剤などとの反応や、Friedel–Crafts 反応、チオールとの反応等の古典的な変換に用いられてきたが、触媒反応などへの利用はわずかであった。これに対して、筆者は、上述のような優れた性質を示すと期待されるチオスルホナートを、最新の有機化学の潮流に取り入れる

ことで、様々な活性種を用いた幅広い合成反応の開発や、温和な金属活性種の利用による官能基許容性の向上などが期待できると考えた。

所属研究グループでは以前に、チオスルホナートを硫黄源として銅触媒を用いる脱ホウ素チオ化反応が効率良く進行することを見いだしている。このとき、メタノール中で、弱塩基の炭酸水素ナトリウムを用いて室温で攪拌するだけで、効率良くアリールスルフィドを与えることを明らかにしている。

このような萌芽的な結果を踏まえ、本研究では、チオスルホナートを硫黄源として用い、これまで充足度の低かった $Csp^2$–S 結合および Csp–S 結合の形成反応による幅広い含硫黄化合物の簡便合成の実現を目指して、多彩な形式での反応開発に取り組んだ。具体的には、１）異なる遷移金属触媒、２）配位子や塩基の添加による触媒活性向上、３）末端アルキンを求核的試薬とするチオ化への展開によってチオスルホナートを触媒反応で利用するための共通する指針を得るとともに、４）アラインとチオスルホナートとの反応開発にも併せて取り組むことで、従来は古典的条件での反応ばかりであったチオスルホナートを求電子的チオ化剤とする化学を、多彩な含硫黄化合物合成を可能にする最先端の合成化学へと昇華させることを目指した。

**第２章　アリールボロン酸とロジウム触媒を用いたジアリールスルフィド類の合成法の開発**

ジアリールスルフィド及びその誘導体は、多くの医農薬、電子材料に共通してみられる重要な化合物群であるが、穏和な反応条件下で行える汎用性の高い合成法は少なく、信頼性の高い手法の開発が求められていた。これに対し、以前所属研究グループでは、チオスルホナートを用いるアリールボロン酸の脱ホウ素チオ化反応が銅触媒存在下で、効率よく進行することを明らかにしている。しかし、ヘテロ環を含む基質は不得意であったため、異なる触媒系の探索に着手した。

検討の結果、ロジウム触媒系を用いることで、銅触媒系では反応が進行しない、2-チエニルボロン酸のチオ化反応が円滑に進行することを見いだした。本反応は、含窒素置換基やヘテロ環を含むボロン酸やチオスルホナートなど幅広い基質に適用できた。さらに、本反応と、アラインを経る変換の組み合わせや、2 度の C–S 結合形成を経る、2 つのヘテロ環を有するジアリールスルフィドの迅速合成によって、多様性に富んだ有機硫黄化合物の効率合成へと展開できた。

**第 3 章　銅触媒系の改良によるアリールボロン酸エステルの高効率チオ化反応の開発**

アリールボロン酸エステルは、近年のジボロンを用いたボリル化反応の発展により、様々な出発原料から容易に合成できるため、これらをチオ化できればアリールスルフィドの入手性を大きく向上できると考えられる。しかし、アリールボロン酸エステルは、対応するボロン酸と比較して反応性が低く、これらのチオ化は容易ではなかった。これに対し、これまでに開発したチオスルホナートを用いるアリールボロン酸のチオ化反応の銅触媒系を改良することにより、ボロン酸エステルへの拡張を試みた。

検討の結果、CsF と触媒量の TMEDA の添加により著しく反応の効率が向上し、広範なボロン酸エステルを様々なチオスルホナートを用いて、対応するアリールスルフィドへと効率よく変換できることを見いだした。さらに、C–H ボリル化反応との連続反応にも成功し、本手法が、多彩な原料からジアリールスルフィドを迅速に合成できる有用な反応であることを明らかにできた。

**第 4 章　末端アルキンと銅触媒を用いたアルキニルスルフィド類の合成法の開発**

アルキニルスルフィドは、ヨード環化、環化付加、付加反応などにより多様な含硫黄化合物に変換でき

る有用な合成中間体である。しかし、その合成法の選択肢は少なかった。これに対し、チオスルホナートを硫黄源とするアリールホウ素化合物の触媒的チオ化反応の概念を、入手容易な末端アルキンのチオ化へと拡張することで、直接的な触媒的アルキニルスルフィド合成法の開発を試みた。

検討の結果、チオスルホナートと末端アルキンの DMSO 溶液に、炭酸カリウムと触媒量の CuI、Xantphos を加え、室温で撹拌するだけで、対応するアルキニルスルフィドが高収率で得られることを明らかにした。本反応は、穏和な条件で進行し、広範な基質から多彩なアルキニルスルフィドを効率よく合成できる。さらに、引き続く環化反応と組み合わせることで、スルフィド部位を有するヘテロ環化合物など、多彩な含硫黄化合物へと簡便に誘導できた。

**第５章　求核部位を有するチオスルホナートとアラインを用いた**
**フェノキサチイン類の合成法の開発**

フェノキサチイン類は、生物活性や、物理的性質から注目を集めている化合物群である。しかし、これらの合成は容易ではなく、直裁的に合成できる手法が求められている。これに対し、本研究では、高反応性の反応中間体であるアラインと、ヒドロキシ基を分子内に有するチオスルホナートとの反応により、C–O 結合と C–S 結合を連続的に形成することで、フェノキサチイン類を直裁的に合成できると考え検討を行った。

その結果、*o*-シリルアリールトリフラートとフッ化物イオンを用いて穏和にアラインを発生させることにより、対応するフェノキサチイン類が得られることを明らかにした。本手法により、既存法では合成しにくかった電子供与基を有するフェノキサチイン類も効率よく合成できた。

**【結論】**

本研究では、チオスルホナートが、幅広い有機硫黄化合物の合成に利用できる優れたチオ化剤であることを明らかにした。具体的には、チオスルホナートを用いる脱ホウ素チオ化反応がロジウム触媒系においてもよく機能すること、銅触媒系の改良により反応性の低いアリールボロン酸エステルにも適用できること、求核剤として末端アルキンを適用できることを明らかにした。さらに、チオスルホナートの利用範囲は触媒反応にとどまらず、アラインを用いたフェノキサチイン類合成にも拡張できることを示した。これらの結果から、本研究によって、従来はカルボアニオンなどとの単純な反応性しか知られていなかったチオスルホナートが、炭素–遷移金属触媒結合を有する触媒的に発生する活性種や、極めて反応性の高いアライン中間体といった多彩な活性種との良好な反応性を示す有用な合成中間体であることを明らかにできた。本研究で得られた知見は、発展性が高く、様々な最新の活性種を用いることによって、さらに幅広い有機硫黄化合物の合成への展開が期待される。加えて、本研究で開発した、$Csp^2$–S 結合形成および Csp–S 結合形成反応によって、創薬研究において有機硫黄化合物の設計・合成が容易となり、構造最適化の効率が向上し、新たな含硫黄機能性分子の創出に繋がると期待される。

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | 金本　和也 |
| 論文審査担当者 | 主査：　影近　弘之<br>副査：　玉村　啓和<br>副査：　野村　渉 |
| 論　文　題　目 | チオスルホナートを硫黄源とする多彩な含硫黄化合物の合成法の開発 |

（論文審査の要旨）

有機硫黄化合物は機能性分子や生理活性物質等の開発において重要な化合物であり、例えば、医薬品における含硫黄化合物の割合は２０％以上である。一方で、例えば、芳香環もしくは三重結合上のチオ化反応は限られているか、もしくは汎用性に乏しいのが現状である。硫黄化合物のもつ、悪臭、毒性、触媒反応における被毒化等がその要因にあげられる。申請者は、これらの問題をふまえ、有機硫黄化合物の新規合成法の開発を行った。具体的には、求電子的なチオ化剤として芳香族チオスルホナートに着目し、種々の反応剤との反応を検討した。

まず、申請者はアリールボロン酸とチオスルホナートの反応によるジアリールスルフィドの合成反応を検討した。所属研究室で見いだした銅触媒を用いる反応をもとに、種々の金属錯体を用いた反応を精査することで、ロジウム錯体が有用な触媒となることを見いだし、様々なジアリールスルフィド誘導体の合成が可能なことを示した。さらに、ジアリールスルフィドの合成において、より有用性の高い反応剤であるアリールボロン酸エステルを用いたチオ化反応を検討した。銅触媒を用いる系で、共存する塩基、リガンド、溶媒等の条件を詳細に検討することで、リガンドとして TMEDA を添加することで収率良く目的とするジアリールスルフィドが得られることを見いだした。

次に、申請者は、これまでのほとんど報告例のないアルキン上での求電子的なチオ化反応を検討した。本反応では、チオスルホナートに対して、銅触媒、Xantphos を用いることで目的とする反応が進行すること、また、芳香族アルキン上へのチオ化の後、これらを各種ヘテロ環誘導体へと変換しうることを示した。最後に、申請者はチオスルホナートとアラインの反応でフェノキサチインを合成する反応へと応用した。

以上のように、本研究はチオ化剤としてのチオスルホナートを用いる、新規で、汎用性の高い反応を種々開発し、医薬化学や材料科学等の分野における機能性硫黄化合物の合成へ応用しうる新たな合成手法を確立した点で大変、優れた研究である。

# 学位論文の内容の要旨

| | |
|---|---|
| 論文申請者氏名 | HAI WENFENG（海　文峰） |
| 論文審査担当者 | 主査：　岸田　晶夫<br>副査：　川嶋　健嗣<br>副査：　堤　祐介 |
| 論　文　題　目 | Study on electrochemical detection of human influenza virus using conducting organic material<br>（導電性有機材料を用いたヒトインフルエンザウイルスの電気化学的検出の研究） |

（論文内容の要旨）

季節性インフルエンザの流行は、全世界で約 300～500 人の重篤な罹患者、および約 50～250 万人の死亡をもたらすと推定されている。抗ウイルス薬は発症後 48 時間以内の投与が有効とされているため、罹患の早期診断は不可欠である。また、ヒトの高病原性感染を予防するためには、インフルエンザウイルスの亜型の同定も重要である。従来の診断法としては、RT-PCR、血清学、ウイルス培養およびイムノクロマト法などがあるが、それぞれアッセイ時間、感度、コスト効率、ユーザーインターフェースの面で改善が必要といわれている。インフルエンザウイルスは、ウイルス表面上で三量体を形成するヘマグルチニンタンパク質（HA）と細胞表面に存在するシアル酸（SA）の結合を介して感染する。ヒトインフルエンザウイルスは α2,6 結合 SA(2,6-sialyllactose)と選択的に結合するが、鳥インフルエンザウイルスは α2,3 結合 SA (2,3-sialyllactose)と結合する。この違いに基づいて、ヒトインフルエンザウイルスと鳥インフルエンザを選別可能である。近年、インフルエンザウイルスを高感度検出するため、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)センサー、水晶振動子マイクロバランス(Quartz Crystal Microbalance: QCM)センサー、電界効果トランジスタ(Field Effect Transistor: FET)センサーなどのバイオセンサーが開発された。しかし、これらのセンサーは適切なメンテナンスが必要であり、装置全体を含めると高コストである。これらの問題を解決するため、導電性有機材料を用いた高感度センサーの開発を試みた。Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)：poly(styrenesulfonate)（PEDOT：PSS）などのポリチオフェン系導電性高分子は電気伝導度が高く（＞数百 S/cm）、化学的に安定であり、希少元素・有毒元素を含まない。また、水分散液として用いることができるため塗布・加工に適し、安価で大量生産できる。さらに、トランジスタ型に応用することも可能で、小型化・微細化も期待できる。本論文では、導電性有機材料を用いてヒトインフルエンザ A ウイルスの電気化学的検出を目的とした。

本論文は、導電性有機材料を用いたヒトインフルエンザウイルスの電気化学的検出を含む全 5 章で構成されている。下記に本論文の構成と各章の要約を示す。第 1 章は序論として、感染症の背景、インフルエンザウイルスの感染及び主な検出方法を紹介し、存在するニーズを割り出した。また、これまでの研究動向を概観し、そこから本研究の目的を導出し、学術的位置づけを述べる。第 2 章「オキシルアミン(OA)基を有する EDOT 誘導体の合成」では、PEDOT の側鎖に糖鎖を導入するため、リンカーとして側鎖にオキシルアミン(OA)官能基を有する EDOT 誘導体の合成について述べる。第 3 章「シアル酸糖鎖を有する PEDOT によるヒトインフルエンザ A ウイルスの電位的検出」では、材料の評価とヒトインフルエンザウ

イルスをモデルウイルスとして電位的検出実験と考察について述べる。第 4 章「有機電気化学トランジスタによるヒトインフルエンザ A ウイルスの検出」では、バイオセンサーの信号変換素子として OECT を用いたインフルエンザウイルス A ウイルス検出の結果、考察について述べる。最後に第 5 章では「結論と今後の見通し」として本論文の主たる結果と、本研究の拡張として考えられる今後の展望について触れる。

本論文の第 2 章、第 3 章、第 4 章の内容は下記の通りである。

**第 2 章　オキシルアミン(OA)基を有する EDOT 誘導体の合成**

PEDOT に分子認識部位を導入するには、ドーピングやモノマーの側鎖に共有結合で導入するなどの方法が挙げられる。ドーピング法は分子認識部位の密度のコントロールが困難である。分子認識部位を PEDOT 骨格の側鎖に共有結合で導入するアプローチの利点は分子認識部位の密度を制御できることである。本章では(3,4-ethylenedioxythiophene(EDOT)の側鎖に糖鎖を導入するため、リンカーとして側鎖に OA 基を有する EDOT 誘導体(EDOTOA)の合成を試みた。2,6-sialyllactose はオキシルアミン（OA）基と反応性が高く、導入が容易である。EDOTOA を５つのステップで合成した。モノマーの合成は核磁気共鳴分光法（NMR）とエレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）で評価を行い合成を確認した。

**第 3 章　シアル酸糖鎖を有する PEDOT によるヒトインフルエンザ A ウイルスの電位的検出**

本章では、第 2 章で合成した EDOTOA と市販の EDOT モノマーを混合し、種々の条件で電解共重合させ、分子認識素子と電気伝導性を重ね備えた poly(EDOTOA-co-EDOT)共重合膜が得られた。Poly(EDOTOA-co-EDOT)共重合膜の評価には XPS、サイクリックボルタンメトリー（CV）、SEM、インピーダンス測定、膜厚測定などによる評価を行った。XPS の定量分析により、poly(EDOTOA-co-EDOT)共重合膜中に EDOTOA 組成と EDOT 組成がモノマー仕込み量と近い量で存在する結果が得た。poly(EDOTOA-co-EDOT)共重合膜中 EDOTOA 組成が増加すると膜のインピーダンスが上昇し、膜厚が減少した。この現象の原因として、電解重合における混合モノマー中の EDOTOA 組成が増えると OA 基の立体障害により共重合ポリマーの不導化が進む。これによって析出したポリマー内のラジカルカチオンが減少し、早期に重合反応が停止し、膜厚が薄くなったと考えられる。これ以降の糖鎖導入実験およびインフルエンザウイルス検出には EDOTOA 25 mol%組成の膜を用いた。poly(EDOTOA-co-EDOT)共重合膜に 2,6-sialyllacotse を化学的に導入した。導入の確認は QCM センサーと接触角計を用いて行った。ヒトインフルエンザ A ウイルス HA の 2,6-sialyllactose に対する選択性は QCM センサーを用いて確認を行った。2,6-sialyllactose 修飾した poly(EDOTOA-co-EDOT)電極によるヒトインフルエンザ A ウイルスの電位的検出のメカニズムは末端の 2,6-sialyllactose がインフルエンザ A ウイルスを特異的に結合し、固液電気二重層内の HA 由来の正電荷の増加によって電位が上昇したため考えられる。本測定の検出限界が、従来の免疫クロマト試験より 2 桁低いことがわかった。

**第 4 章　有機電気化学トランジスタによるヒトインフルエンザ A ウイルスの検出**

第 3 章までにヒトインフルエンザ A ウイルスを高感度に検出できる 2,6-sialyllactose を修飾した poly(EDOTOA-co-EDOT)電極を開発し、電位測定によるバイオセンサーの可能性を明らかにした。本章では、バイオセンサーの信号変換素子に有機電気化学トランジスタ（OECT）を用いたヒトインフルエンザウイルス検出について検討した。トランジスタは電位測定と比較して、より軽量、安定であり、フレキシブルなウェアラブルセンサーとしても可能性がある。電位測定では電極を小型にするとインピーダンスが高くなり、出力信号に対し誘導ノイズを受けやすい。しかし、電極をトランジスタ型（電流測定）にすると出力インピーダンスが低く、ノイズに強いためデバイスの小型化に向いている。本章では、poly(EDOTOA-co-EDOT)の特性を生かした有機電気化学トランジスタ(Organic Electrochemical Transistor: OECT)の開発について検討した。具体的には、OECT のチャネル領域に 2,6-sialyllactose を導入するために、EDOTOA および EDOT をスピンコーティングされた PEDOT：PSS 膜上に電気化学的に共重合させた。こ

のプロセスによって poly（EDOTOA-co-EDOT）/ PEDOT：PSS の複合体を生成させる。複合体のオキシルアミン基と 2,6-sialyllactose の還元末端を反応させ、インフルエンザウイルスレセプターとして機能させる。ヒトインフルエンザ A ウイルスの特異的な認識は、OECT のドレインーソース電流の変化によって検出することができると期待される。本手法の有効性、有用性について検討を行った。poly（EDOTOA-co-EDOT）/ PEDOT：PSS 複合膜の評価には XPS、SEM、トランジスタの特性評価など行った。ヒトインフルエンザ A ウイルスの特異的な認識は、OECT のドレインーソース電流の変化によって検出された。OECT デバイスの感度は、従来の免疫クロマト試験よりも 2 桁以上優れており、QCM 法、比色法、および電気化学センサーを含む他のタイプのインフルエンザウイルスアッセイに匹敵した。

本博士論文ではヒトインフルエンザ A ウイルスと特異的相互作用する糖鎖を修飾した導電性有機材料を開発した。この材料は QCM 法によってインフルエンザ A ウイルスを 2,6-sialyllactose に対する選択性によって検出できることが確認された。電位測定法によるインフルエンザウイルスの検出限界（0.01 HAU）は、市販の免疫クロマトグラフィ法と比べて 2 桁程度高感度であった。さらに、将来の応用を見据え、センサーの小型化を目指して、バイオセンサーの信号変換素子に有機電気化学トランジスタ（OECT）を用いてヒトインフルエンザウイルス検出を行った。2,6-sialyllactose とヒトインフルエンザ A ウイルス HA との親和性に基づき作製したチャネルに、2,6-sialyllactose を結合した poly（EDOTOA-co-EDOT）を修飾した OECT はヒトインフルエンザ A ウイルスを特異的に認識できた。

この検出法は、これまで偽陰性が問題となっていていたイムノクロマト法の代替法としてインフルエンザウイルスの早期診断が可能であると期待できる。取扱いが容易なため、将来的に病院だけではなく、学校や企業内、あるいは、フィールドでの使用も考えられる。さらに、フレキシブルなウェアラブルセンサーとしての可能性も考えられる。また、季節インフルエンザと新型インフルエンザの区別や感染の地域的な広がりの様子をモニタリングできれば、感染拡大防止など疫学的知見を得ることが可能になる。さらに、インフラ設備が不要であることから過疎地域、アジア、アフリカなどの発展途上国におけるウイルス検査という新たなニーズを発掘できるものと見込まれる。

# 学位論文の審査の要旨

| | |
|---|---|
| 論文提出者氏名 | HAI WENFENG（海　文峰） |
| 論文審査担当者 | 主査：　岸田　晶夫<br>副査：　川嶋　健嗣<br>副査：　堤　　祐介 |
| 論　文　題　目 | Study on electrochemical detection of human influenza virus using conducting organic material<br>（導電性有機材料を用いたヒトインフルエンザウイルスの電気化学的検出の研究） |

（論文審査の要旨）

インフルエンザの早期診断およびインフルエンザウイルスの亜型の同定はパンデミック対策として重要である。従来の診断法である RT-PCR 法、血清学的方法、ウイルス培養およびイムノクロマト法はそれぞれ、アッセイ時間、感度、コスト等について一長一短があり新規な高感度測定法が望まれている。インフルエンザを特定する分子としてインフルエンザウイルスヘマグルチニンタンパク質（HA）が知られている。HA は、標的細胞鏡面にあるシアル酸（SA）を認識して細胞に感染する。ヒトインフルエンザウイルスはガラクトースが α2,6 結合した SA である 2,6-sialyllactose と選択的に結合し、鳥インフルエンザウイルスはガラクトースが α2,3 結合した SA である 2,3-sialyllactose と結合する。この認識機構を応用してインフルエンザウイルスを高感度検出するため、申請者はバイオセンサーを構成する要素材料として導電性有機材料に注目した。Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) : poly(styrenesulfonate)（PEDOT：PSS）などのポリチオフェン系導電性高分子は電気伝導度が高く、化学的に安定であり、水分散液として用いることができるため塗布・加工に適し、安価で大量生産できる。さらに、デバイスをトランジスタ型にすることでデバイスの小型化・微細化が実現できるなどの利点がある。本論文では、この導電性有機材料の特長を生かした新しいヒトインフルエンザ検出のための高感度なバイオセンサーの開発を目的としている。

第 1 章では序論として、感染症の背景、インフルエンザウイルスの感染及び主な検出方法を紹介し、存在するニーズを割り出した。また、これまでの研究動向を概観し、そこから本研究の目的を導出し、学術的位置づけを述べている。

第 2 章ではオキシルアミン(OA)基を有する EDOT 誘導体の合成について、PEDOT の側鎖に糖鎖を導入するため、リンカーとして側鎖に OA 官能基を有する EDOT 誘導体（EDOTOA）の合成について述べている。EDOTOA を５つの反応ステップで合成した。核磁気共鳴分光法（NMR）とエレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）で評価を行い目的化合物の合成を確認した。

第 3 章ではシアル酸糖鎖を有する PEDOT によるヒトインフルエンザ A ウイルスの電位的検出について検討している。第 2 章で合成した EDOTOA と EDOT モノマーを混合し、電解共重合を行った。これによって、分子認識素子と電気伝導性を重ね備えた poly(EDOTOA-co-EDOT)共重合膜が得られた。Poly(EDOTOA-co-EDOT)共重合膜中で EDOTOA 組成が増えると膜のインピーダンスが上昇し、膜厚が減少した。この理由として、EDOTOA の OA 基の立体障害による共重合体の導電性の低下の影響が考

えられた。以後の実験には導電性と OA 基導入率の最適な組成として EDOTOA 25 mol%組成の膜を用いた。Poly(EDOTOA-co-EDOT)共重合膜に 2,6-sialyllacotse を化学的に導入した。2,6-sialyllactose で修飾した poly(EDOTOA-co-EDOT)電極によるヒトインフルエンザ A ウイルスの電位的検出ができた。このメカニズムは末端の 2,6-sialyllactose がインフルエンザ A ウイルスと結合した際に固液電気二重層内において HA 由来の正電荷が増加することによって電位が上昇したためと考えられた。本システムによる検出限界は従来の免疫クロマト試験より 2 桁低いことがわかった。

第 4 章では有機電気化学トランジスタ（OECT）によるヒトインフルエンザ A ウイルスの検出について検討している。Poly（EDOTOA-co-EDOT）/ PEDOT：PSS の複合体を調製し、複合体の OA 基に 2,6-sialyllactose を結合した。Poly（EDOTOA-co-EDOT）/ PEDOT：PSS 複合膜の評価には XPS、SEM、トランジスタの特性評価など行った。ヒトインフルエンザ A ウイルスの特異的な認識は、OECT のドレインーソース電流の変化によって検出できた。OECT デバイスの感度は、従来の免疫クロマト試験よりも 2 桁以上優れており、QCM 法、比色法、および電気化学センサーを含む他のタイプのインフルエンザウイルスアッセイに匹敵した。

第 5 章では本論文の主たる結果をまとめ、本研究の拡張として考えられる今後の展望について述べている。

本論文ではヒトインフルエンザ A ウイルスと特異的に相互作用する、糖鎖を修飾した導電性有機材料を開発した。この材料を電極とした電位測定法によるインフルエンザウイルスの検出限界（0.01 HAU）は、市販の免疫クロマトグラフィ法と比べて二桁程度高感度であった。さらに、将来の応用を見据え、センサーの小型化を目指して、バイオセンサーの信号変換素子に有機電気化学トランジスタ（OECT）を用いてヒトインフルエンザウイルス検出を行った。2,6-sialyllactose 結合 poly（EDOTOA-co-EDOT）で修飾した OECT は、ヒトインフルエンザ A ウイルスを特異的に認識できた。この検出法は、取扱いが容易なため、将来的に病院だけではなく、学校や企業内、あるいは、フィールドでの使用も考えられる。さらに、フレキシブルなウェアラブルセンサーとしての可能性も考えられる。また、季節インフルエンザと新型インフルエンザの区別や感染の地域的な広がりの様子をモニタリングできれば、感染拡大防止など疫学的知見を得ることが可能になる。本研究で開発した技術を他のウイルスセンシングに拡大することで、簡便・安価なウイルス検査という新たなニーズを発掘できる可能性も示された。