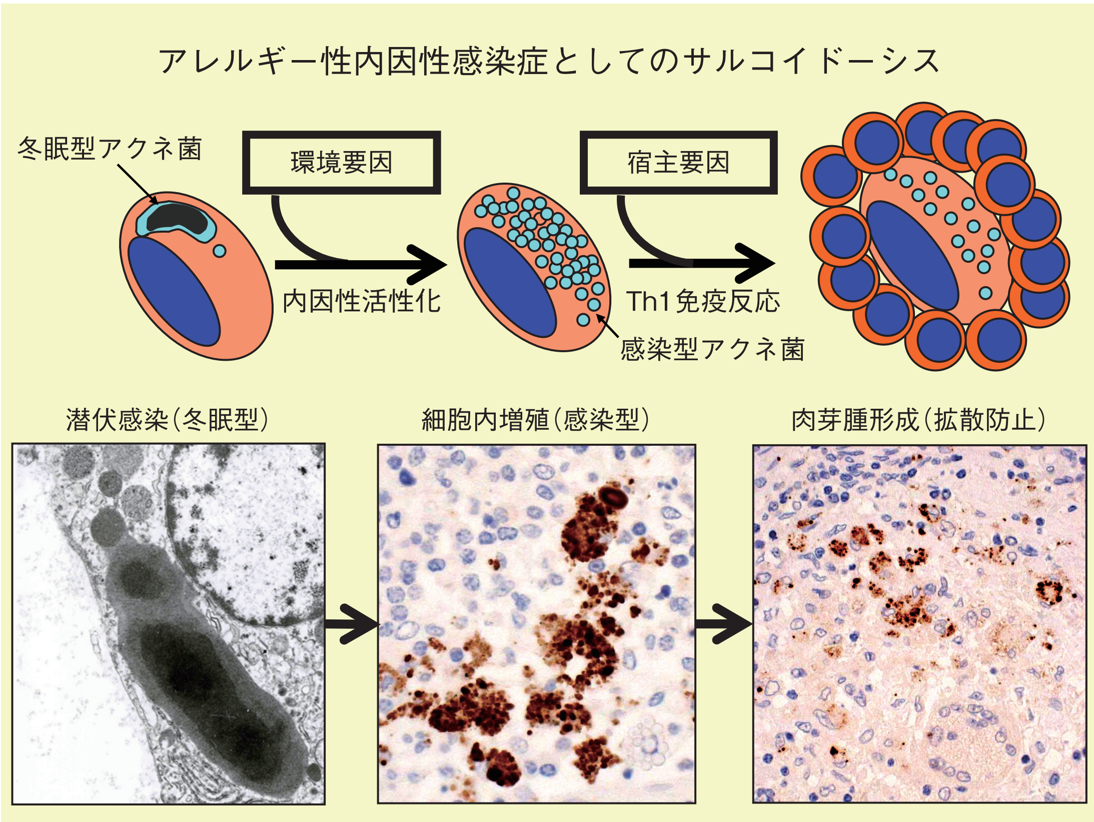
Vol.61

お茶の水醫學雜誌

Ochanomizu igaku zasshi

第61巻　第3号　2013年



東京医科歯科大学
お茶の水医学会

目　次

総　説

腎移植医療の変遷と将来展望 …… 平賀　聖悟 221

スポーツ・身体運動と睡眠 …… 内田　　直 241

オリンピックとスポーツ医療 …… 柳下　和慶 249

プレスリリース研究

アレルギー性内因性感染症としてのサルコイドーシス …… 江石　義信 259

症　例

ウロキナーゼ胸腔内注入療法が有用であった
膿胸，肺炎随伴性胸水の９例 …… 佐内　　文 他 277

剖検症例紹介

剖検症例から学ぶ疾病の転帰と病態生理 …… 285

学位論文紹介

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科医学博士学位論文紹介 …… 315

編集後記 …… 377

お茶の水醫學雜誌投稿規程 …… 378

Contents

Review article

Development of kidney transplant medicine ; Subject matter and future pathway in Japan …… Seigo Hiraga 221

Sport, physical exercise and sleep …… Sunao Uchida 241

Sports medicine and sports dentistry for the Olympic games …… Kazuyoshi Yagishita 249

Press release research

Etiology of sarcoidosis as an allergic endogenous infection caused by *Propionibacterium acnes* …… Yoshinobu Eishi 259

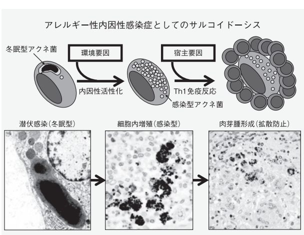
Case report

Nine cases of empyema and parapneumonic pleural effusion effectively treated with intrapleural urokinase administration …… Aya Sanai, et al 277

Brief autopsy reports

Clinical course and pathophysiology of diseases reviewed from autopsy cases …… 285

TMDU PhD Thesis from Graduate School of Medicine …… 315



表紙の図

病理組織学的解析から推察されるアクネ菌によるサルコイドーシス肉芽腫形成機構．細胞内に不顕性感染したアクネ菌は細胞壁を欠失した冬眠状態で潜伏感染しており，主に環境要因を契機として冬眠状態のアクネ菌が内因性に活性化され細胞内増殖する．宿主要因として本菌に対するアレルギー素因を有する個体では，アクネ菌の細胞内増殖を契機に過度の Th1 型免疫反応が起こり，感染型アクネ菌の拡散防止を目的とした肉芽腫形成が生じる．

総　説 Review article　　お茶の水醫學雑誌　61：221-240（2013）

腎移植医療の変遷と将来展望

平賀　聖悟　東京医科歯科大学医学部臨床教授
三島社会保険病院名誉院長

要旨：1997 年の「臓器の移植に関する法律」の成立まで，わが国の移植医療は角膜と腎臓の移植に限られていたが，同法によって心，肺，肝，膵臓や小腸移植などの多臓器移植時代の幕開けが到来した．同法の成立を軸に，社会的システムとして臓器移植ネットワークの構築や移植コーディネーターの養成が行われ，現在の体制にいたった歴史的経過について述べる．

その間経験した腎移植 232 例のうち主として合併症の概要を報告し，日本臓器ネットワークおよび日本移植学会で登録集計したわが国の臓器移植統計および腎移植統計（2011 年度 1,601 例）の成績についても供覧する．

移植医療における最近の免疫抑制療法の現況や医療体制としてレシピエント移植コーディネーターの認定制，専門医としての腎移植認定医，移植認定医制度の発足，また「改正臓器移植法」（2009 年）の問題点や今後の展望などについても言及する．

Key words：腎移植，ドナー，レシピエント，臓器の移植に関する法律，臓器移植ネットワーク，移植コーディネーター，自験例と合併症，移植の成績，免疫抑制療法，課題

Ⅰ．はじめに

わが国における移植医療のうち，角膜と腎臓の移植はもっとも早くから行われてきた医療であり，「角膜及び腎臓の移植に関する法律」（いわゆる角腎法）の施行後，法律に基づいた医療としてすでに 30 年以上の歴史を刻んでいる．

角膜などの組織移植や，臓器移植のうちでも比較的温阻血時間が長くても移植が可能である腎臓の移植は，いわゆる心停止によるドナー（donor：臓器などの提供者）からの移植で可能であったが，心臓や肺，肝臓などの移植は温阻血時間が短い脳死からのドナーでなければ，事実上移植が不可能である．早くから脳死が死として認められ，腎臓のみでなくこれらの多臓器移植が行われてきた欧米に比し，わが国の医療は偏っていたが，とくに 1997 年に成立した「臓器の移植に関する法律」（いわゆる臓器移植法）と 2009 年の同法の一部改正（改正臓器移植法）は，わが国の移植医療がやっと欧米と肩を並べる同一水準の社会的環境整備にいたったことを示している．

連絡先：平賀　聖悟　hiraga@mishimahp.jp

移植医療は，基本的にレシピエント（recipient：臓器などの受容者）とドナーの両者がなくては成り立たない医療であり，生体移植の場合はその間に家族などが深くかかわり，死体移植の場合は，脳死の容認や広く社会からのドネーションが必要であり，いずれにせよ社会性の濃い医療である．

生体移植の場合は，家族などの中からドナーが決まれば，ドナーとレシピエント両者の手術を計画的に実施すればよいので，比較的通常の臨床医学的プロセスで治療が行われる．しかし，移植医療の分野では，基本的考え方として，健常人を傷つけることには倫理的疑問が存在し，死者であるドナーからの臓器や組織の提供こそ royal road であるとされており，欧米では早くからそのための社会的体制整備が行われてきた．

わが国でも，改正臓器移植法後，書面による本人の意思表示がなくても，家族の承諾（忖度）で脳死者からの臓器提供が可能になったことから，最近ようやく脳死ドナーの増加傾向がみられるようになった．

筆者が東海大学移植学教室Ⅰへ勤務していた 1985～1997 年は，正にわが国の移植システムをつくろうという黎明期に当たり，移植医療を行うものは否応なく国の体制づくりに巻き込まれ，官民一体となって医学，医療，社会の多方面から移植体制の構築に協力せ

ざるをえなかったわけである．したがって，本稿では筆者の体験に基づいた臓器移植ネットワークの変遷や移植コーディネーターの養成，自験腎移植の内容と合併症，腎（臓器）移植の現状と課題，将来展望などについてまとめて述べる．

Ⅱ．臓器移植ネットワークの構築と移植コーディネーター

1．臓器移植に関する法律

移植医療における法的措置の嚆矢は角膜移植であり，角膜移植についての法的措置の必要性から1958（昭和33）年に議員立法で成立した．その後，同様の理由から，角膜移植と腎移植を一本の法律として1979年に「角膜及び腎臓の移植に関する法律」が成立した（表1）．一方，心臓死いわゆる三徴候死を規定した法律はなく，死産の届け出に関する規定，死亡診断書作成の義務，死亡時刻の確定といった個別法があるのみであった[1]．

その後，脳死という概念が明らかになるに伴い，臓器移植と密接な関連をもつ脳死についての判定基準（竹内基準）などを検討する「臨時脳死及び臓器移植調査会」（脳死臨調）が設けられ，1992年1月には最終答申が提出された．この答申は，その後の脳死ドナーからの臓器提供の際の法的脳死判定基準の根拠となるものであった．国会への臓器移植法提出の前夜ともいえる，このころの社会・政治的動きはめまぐるしく（表2），1988年にはきたるべき脳死からの多臓器移植体制に備え，厚生省研究班として臓器技術臨床研究開発事業が発足し，脳死臨調の最終答申を受けた同年5月には，移植関係学会合同委員会（9学会+3研究会）が設けられ，同年10月には臓器移植ネットワークのあり方などに関する検討会，国会内には議員による脳死および臓器移植に関する各党協議会（臓器移植法の検討）が設けられ，矢継ぎ早に厚生省内には臓器移植対策室（法整備等移植の推進へ向けた種々の検討を行う）が設置された．筆者はちょうどこのころ，1989〜1990年にかけて東海大学短期教員派遣計画によって米国ダラスを拠点に腎移植の臨床を経験しながら，米国の臓器移植システムの調査を行った．そして，帰国したところただちに米国の実情の報告を行う機会を与えられ[2]，厚生省臓器技術臨床研究開発事業（北川班）の分担研究者を任じられることになった．

この流れの中，1994年4月には議員立法で「臓器の移植に関する法律案」が提出されたが，政治的動向の中でこの法案はいったん廃案となり，3年後の成立まで待たねばならなかった．そしてこの法律は，法的脳死からの臓器提供の条件として本人および家族による書面による意思表示の必須条項や，15歳以下の提供は不可能といった，世界でもっともきびしい臓器移植法であったということは周知の事実である．

米国においても，当初は各地域ごとに臓器移植の推進に取り組んでおり，各地区の臓器獲得機関であるOPO（organ procurement organization）が活動していたが，1984年10月に米国臓器移植法（NOTA）が制定され（表3），1986年には米国の臓器移植ネットワーク（Organ Procurement and Transplantation Network：OPTN）を政府との契約によってUNOS（Unit-

表1．臓器移植に関連する法律

角膜及び腎臓の移植に関する法律：昭和54年（1979年）法律63号
角膜及び腎臓の移植に関する法律施行規則：昭和55年（1980年）厚生省令4号
死産の届け出に関する規定：厚生省令42号
死亡診断書作成の義務：医師法19条2項，医師法20条
死亡時刻の確定：戸籍法施行規則58条，同付録14号様式
臓器の移植に関する法律（臓器移植法）：法律104号（1997年6月17日）
臓器の移植に関する法律の一部を改正する法律（改正臓器移植法）：法律83号（2009年7月17日）

表2．臓器移植に関する社会・政治的動き

経　過	社会・政治的動向
1988年4月1日	厚生省臓器技術臨床研究開発事業　脳死臨調の答申後は，その内容を受けて活動
1992年1月22日	臨時脳死及び臓器移植調査会（脳死臨調）の最終答申
5月25日	移植関係学会合同委員会（9学会+3研究会の参加）
10月	臓器移植ネットワークのあり方等に関する各党協議会（臓器移植法の検討），厚生省内に臓器移植対策室（法整備など移植の推進へ向けた種々の検討）の設置など
1994年4月	各党協議会による「臓器の移植に関する法律案」の第129回通常国会への提出（議員立法）は廃案

表3．米国の臓器移植にかかわる法律

連邦法
National Organ Transplant Act（NOTA）（Public Law98-507）：1984年10月19日
Consolidated Omnibus Budget Reconciliation Act（COBRA）（Public Law 99-272）：1986年4月7日
Omnibus Budget Recociliation Act（OBRA）：1986年10月21日
州　法
Uniform Anatomical Gift Act　（全州）
Uniform Determination of Death ACT（UDDA）（6州以外）
Required Request Law（1986末，28州）

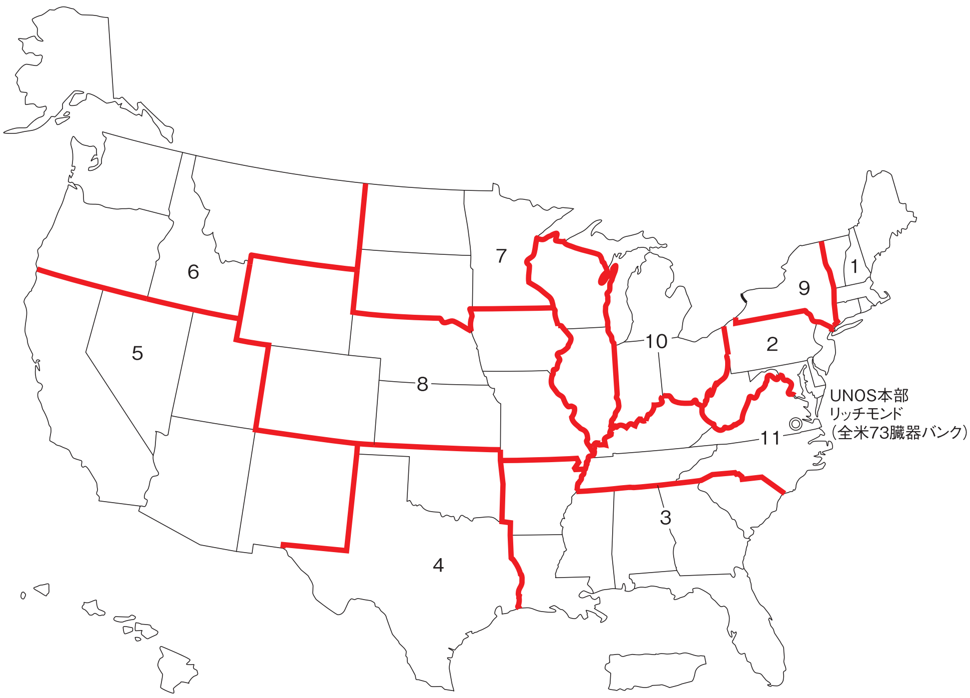


図 1．UNOS（United Network for Organ Sharing）の臓器獲得区域（臓器バンク［OPO］73 ヵ所，総人口 2 億 4,000 万人）

ed Network for Organ Sharing）が請け負うこととなった（図 1，表 4，5）．UNOS（図 2，3）の前身はヴァージニア州リッチモンドにある SEOPF（Southeast Organ Procurement Foundation）で，1977 年にはじめてコンピュータによる臓器適合システムを開発し，UNOS と名づけられたものである[3]．UNOS 創設に貢献した Gene Pierce 氏（図 4）は，日本においても移植ネットワーク構築の助言を求めるべく研究者団体が招請し，筆者の主催した第 28 回日本腎移植臨床研究会（1995 年 1 月，箱根）にも参加していただいた．

次いで 1986 年には移植関係の予算を調整する COBRA や OBRA といった法律ができ，UNOS に認定された機関のみが Medicare，Medicade などの保険機関から医療費を受けられるようになり，経済的支援体制ができあがった．そのほか，各州ごとに「Uniform Anatomical Gift Act」（臓器提供について gift of life という考え方の確立）や脳死を中心に死の定義を定めた「Uniform Determination of Death Act」，臓器提供を要請するための「Required Request Law」などが制定された．

当時，第 40 代大統領 Ronald Reagan（1981〜1988 年在任）が国民に対して，直接臓器提供を呼びかけたことがエピソードとして伝わっている．筆者は，米国ダラスにおいて，地域における UNOS のコントロールや OPO と各移植施設とのネットワーク，UNOS の規定に基づいた移植チームの編成，移植の医療費と保険会社の関与などをつぶさに調査してきたが，図 5 のようにきわめて円滑に腎移植のみならず，心臓や肝臓，膵移植時には膵腎，肝腎膵など複数の臓器移植が行われており，移植医療の円滑な遂行の裏には多数の専任移植コーディネーターという職種が活躍している実情も観察しえた．そして後の国際学会への出席を機に，リッチモンドの UNOS 本部やロサンゼルス ROPA（Regional Organ Procurement Agency）などいくつかの OPO も訪問した．

2．臓器移植ネットワーク

死者からの臓器提供と移植を円滑に行うためには，前項で述べたように社会的合意すなわち法律の整備が不可欠であり，同時に貴重なドナーの意思（gift of life）を実現してレシピエントへの生命の贈り物を成立させるために社会的な臓器推進システムの構築が不可欠である．したがって米国においては，NOTA の成立と同時に UNOS というネットワークシステムが整備されたが，ネットワークシステムの必要性は米国のみでなく世界共通のものである[4]（表 6）．

ヨーロッパにおいては，死体腎移植の最適な組織適合性ドナーを得る目的から，1967 年に ETS（Eurotransplant Service）がオランダのライデンに設立され，1976 年には角膜移植，1984 年ころから心，肝，膵臓などの多臓器ドナーの獲得と分配の業務が行われるようになった．この機関の特色は，オランダ，ドイツ，ベルギー，ルクセンブルク，オーストリアの 5 ヵ国か

表 4. UNOS の運営と実務

運営機関	人　員（名）
理事会	32
移植外科医・内科医	16
UNOS 区域代表	11
前会長	1
会　長	1
副会長	1
会　計	1
庶　務	1
非移植医	16
独立 OPO	2
移植コーディネーター	2
組織適合性検査施設	2
保険組合その他民間（倫理，法律，宗教，行動科学，社会科学，患者，一般医など）	10
実務機関	40
事務局長	1
事務局次長	1
契約および助成	1
法人連絡	5
教　育	2
専門教育コーディネーター	1
財務および管理	4
UNOS 移動およびカンファランス企画移動	1
およびカンファランスコンサルタント	2
人　事	1
操　作	2
コンピュータサービス	2
資質保全	3
ユーザー支援	3
会員資格および地域業務	2
地域管理	3
臓器センター	1
研究および施策決定	5

表 5. UNOS における諸委員会

委員会	委員数（名）
定例委員会	延 279
1. コミュニケーション委員会	14
2. 倫理委員会	17
3. 管理委員会	9
4. 財務委員会	15
5. 組織適合性委員会	19
6. 会員および専門基準委員会	20
7. 少数民族問題委員会	16
8. 臓器獲得および配分委員会	23
①小腸配分小委員会	11
②肝データ小委員会	6
③肝小委員会	23
④膵小委員会	12
9. OPO 委員会	16
10. 患者問題委員会	20
11. 小児委員会	16
12. 学術諮問委員会	19
13. 胸部臓器移植委員会	23
臨時委員会	延 46
1. 臓器配分臨時委員会	11
2. 臓器提供臨時委員会	14
3. 外務臨時委員会	5
4. 腎配分臨時委員会	3
5. 腎待機時間臨時委員会	6
6. 移植管理者臨時委員会	7

図 2. UNOS 本部（ヴァージニア州リッチモンド市）

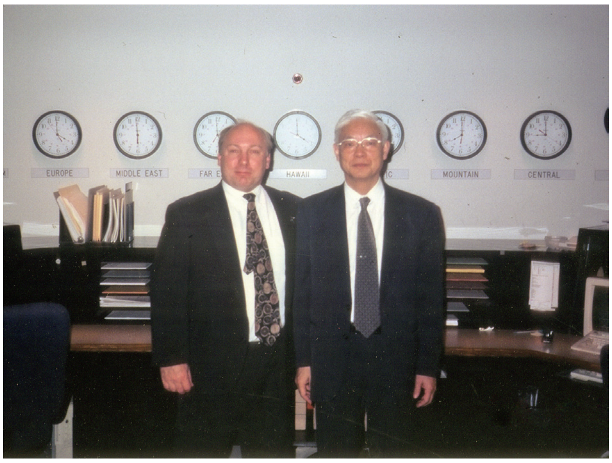


図 3. UNOS の臓器センターにて，Stockdreher 副部長と筆者
臓器搬送の際，全米の時差がただちにわかるように表示されている．

らなる国際的臓器獲得機関（図 6）ということである．似かよったドイツ語圏の協力による機関とはいえ，異なる独立国が集まって運営している点に興味をもち，筆者も本部を訪ねて（図 7，8）調査をし，きわめて精緻な組織体制が構築されており[5]，ヨーロッパの地の理を活かし，5 ヵ国内に適合したレシピエントがみつからない場合，北欧やイタリーなどにも情報を送ることが行われていた（図 9）．ヨーロッパ各国の臓器バンクも UNOS と同様に，レシピエント登録と臓器の獲得・分配を担って，最適なドナーとレシピエントの適合性を重視してレシピエントを選択する役割から OMA（organ matching agency）と呼ばれ，それぞれの歴史的背景がある．

わが国の臓器移植ネットワークも諸外国と同じ歴史的変遷をたどってきた．筆者が東京医科歯科大学泌尿器科学教室へ入局して間もなくの 1970 年代のはじめごろ，東京医科歯科大学でも生体腎移植の臨床が開始され，ほぼ同じころ全国的にも，主として米国の情報をもとに腎移植が開始された．一方，一部の大学では死体腎（献腎）移植への挑戦が行われ，臓器保存の研究などと並行して 1985 年ころから腎提供の調整役を担う移植コーディネーターも出現することとなった．それには，当時すでに移植体制が完成しつつあった米国からの情報が大きな影響を与えたといえる．厚生省臓器技術臨床研究開発事業によって移植医療における諸分野での研究がスタートし，その提言を受けて厚生省は行政における移植体制の整備を着々とすすめた．

図 4．UNOS の創設者 Gene Pierce 事務局長と筆者（1997 年 7 月ワシントン DC）
第 4 回 The Society for Organ Sharing（SOS）および第 1 回国際移植コーディネーター学会（ITCS）．

この研究事業は 10 年間ほど続けられたが，その後も免疫・アレルギー等研究事業の臓器移植部門に統括され，さらに継続された．筆者は前述したとおり 1990 年からその研究班員としておよそ 10 年間にわたり臓器移植の社会的問題に関する研究に携わり，主として臓器移植コーディネーターに関する研究班長を担当した．行政政策として 1990 年にはじめて死体腎移植ネットワークが組織された（図 10）．1 腎移植センター（国立佐倉病院），14 地方腎移植センターが指定され，そのほか 12 都道府県に腎移植推進情報センターが設

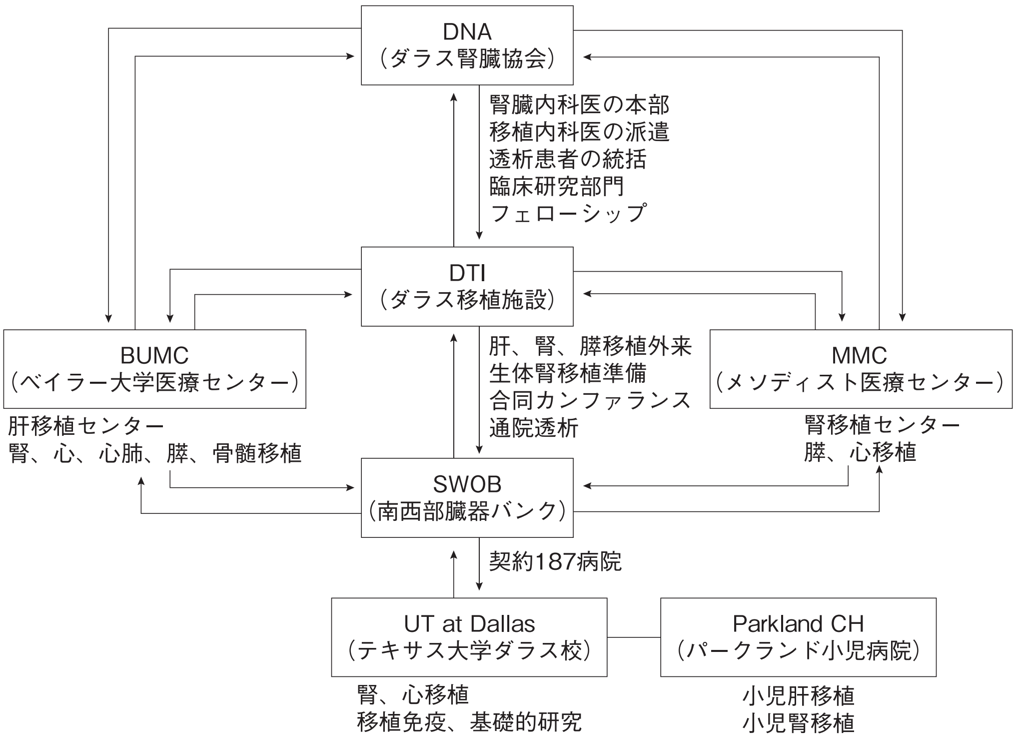


図 5．米国ダラスにおける臓器移植体制

表 6.　世界の地域別臓器移植システムと臓器バンク

機構名	加盟国	臓器バンク
UNOS（United Network for Organ Sharing）[1977 年]	米国	OPO（I-OPO*および H-OPO**）[organ procurement organization]
ETS（Eurotransplant Service）[1967 年]	オランダ，ベルギー，ルクセンブルク，ドイツ，オーストリア	OMA（organ matching agency）
Scandia Transplant Service	ノルウェー，スウェーデン，デンマーク	OMA
UKTS（United Kingdom Transplant Service）	英国，南アイルランド	OMA
France Transplant Service	フランス	OMA
Rhone Mediteranée Service	フランス	
North Italy Transplant Service	イタリア	OMA
South Italy Transplant Service	イタリア	
ONT（Organización Nacional de Transplantes [1989 年]）	スペイン	OMA
日本腎臓移植ネットワーク（1995 年）	日本	腎バンク（1 県 1 腎バンク）[1975 年]
日本臓器移植ネットワーク（1997 年）	日本	

*Independent OPO，**Hospital based OPO

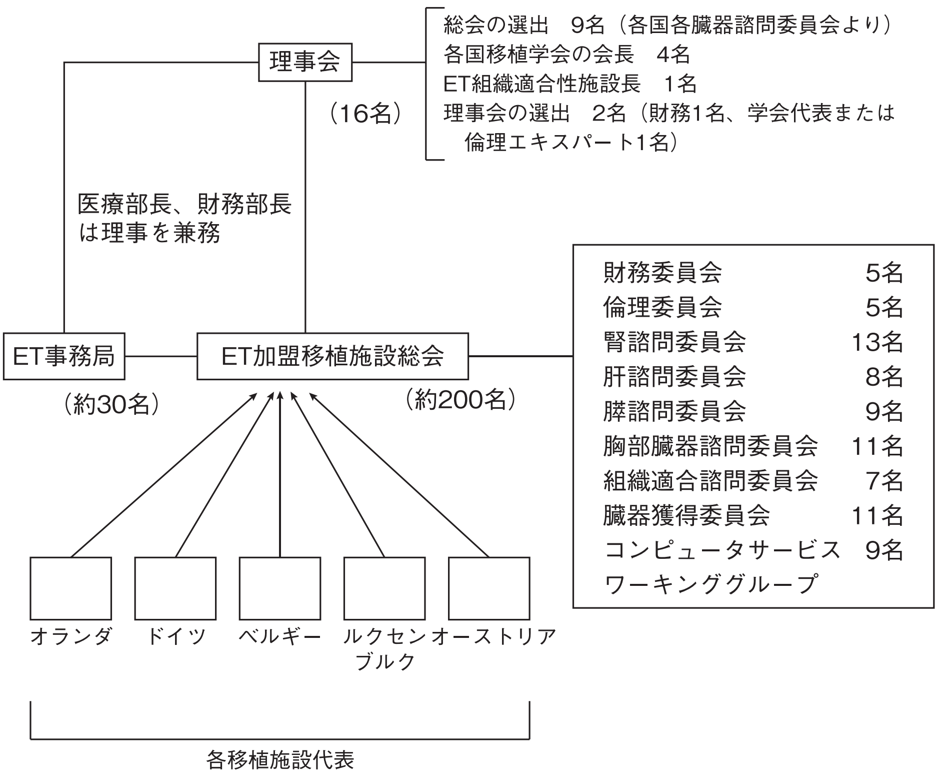


図 6.　ユーロトランスプラントの組織図（文献 5 より引用）

図 7.　ユーロトランスプラント本部がおかれているビル（オランダ，ライデン市）

図 8.　ユーロトランスプラントの Guido Persijn 所長と筆者

図 9．ユーロトランスプラントにて，ドナー発生時におけるレシピエント選択（マッチング）業務（学生がアルバイトで担当）

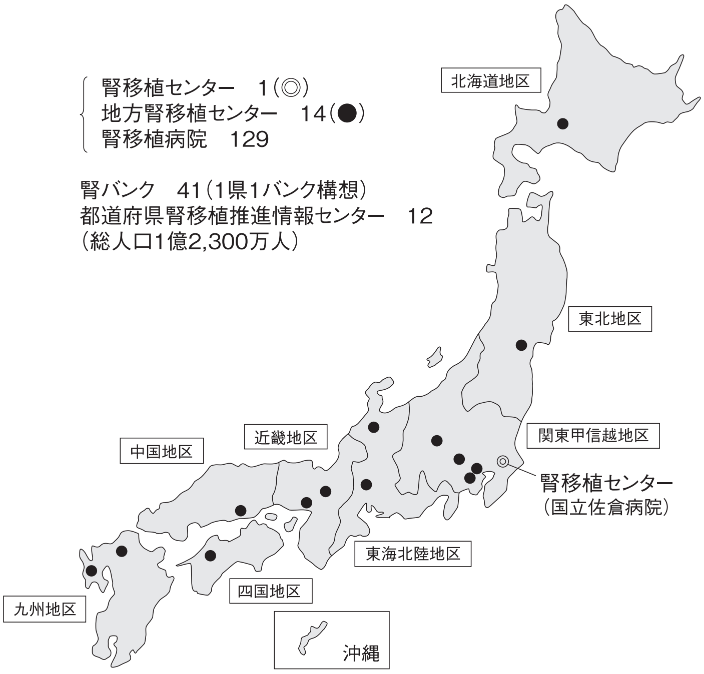


図 10．死体腎移植ネットワーク（1990〜1995 年）

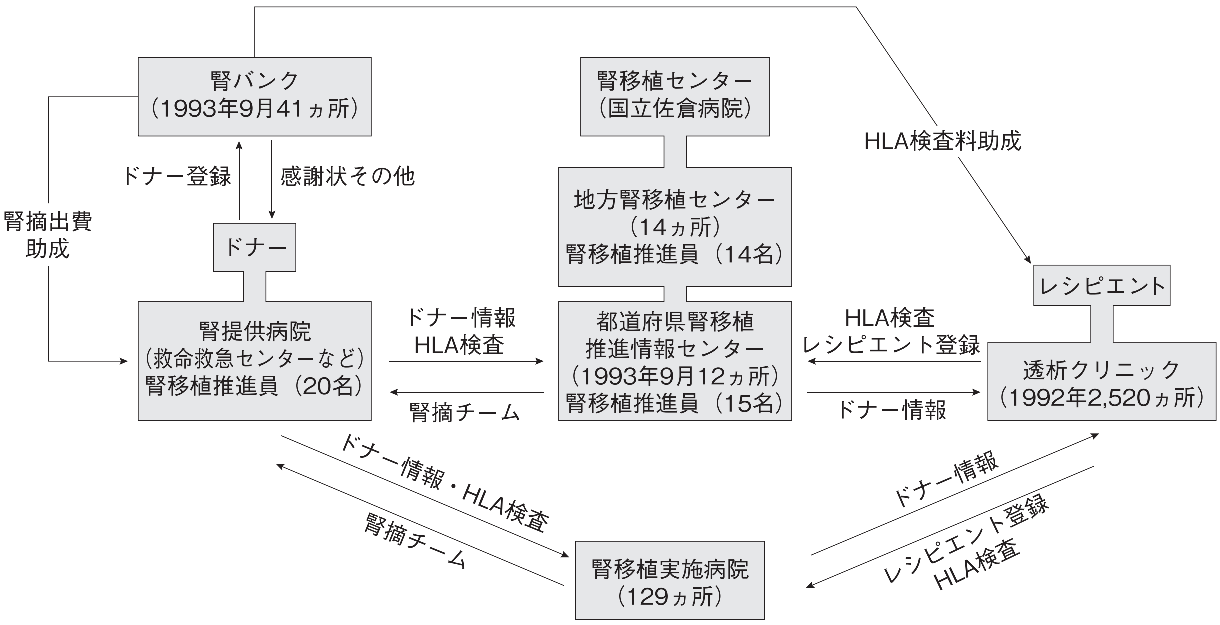


図 11．死体腎移植システム（1990〜1995 年）
腎移植推進員（移植コーディネーター：1990 年 19 名採用，1991 年 10 名増員）

けられ，1975 年から 1 県 1 腎バンク構想として推進されてきた 41 腎バンクもネットワークに組み込まれるようになった（図 11）．そして同年厚生省が予算をつけて，わが国ではじめて 19 名の移植コーディネーター（腎移植推進員と呼称）が地方腎移植センターなどに配置され，翌 1991 年にはさらに 10 名の増員が行われた[1, 3, 4]．

この体制は 1995 年まで続いたが，1994 年の「臓器の移植に関する法律案」の国会提出を期に，多臓器移植のネットワーク体制の準備が検討されるところとなり，1995 年 4 月に社団法人日本腎臓移植ネットワークが発足した（図 12）．本部は東京都の腎バンクの役割をはたしてきた虎の門にある社団法人腎臓移植普及会に委託され，腎移植センターの本部機能を担ってきた国立佐倉病院は中央情報センターの位置づけとなった．当初 5 つのブロックセンターが設置されたが，1996 年には北海道ブロックと東北ブロック，中国四国ブロックと九州沖縄ブロックが分離され 7 ブロックセンター体制となり，移植コーディネーターについてもチーフコーディネーター，コーディネーター，都道府県コーディネーターに職位が分けられ，計 64 名がブロックへ配置された[6]．

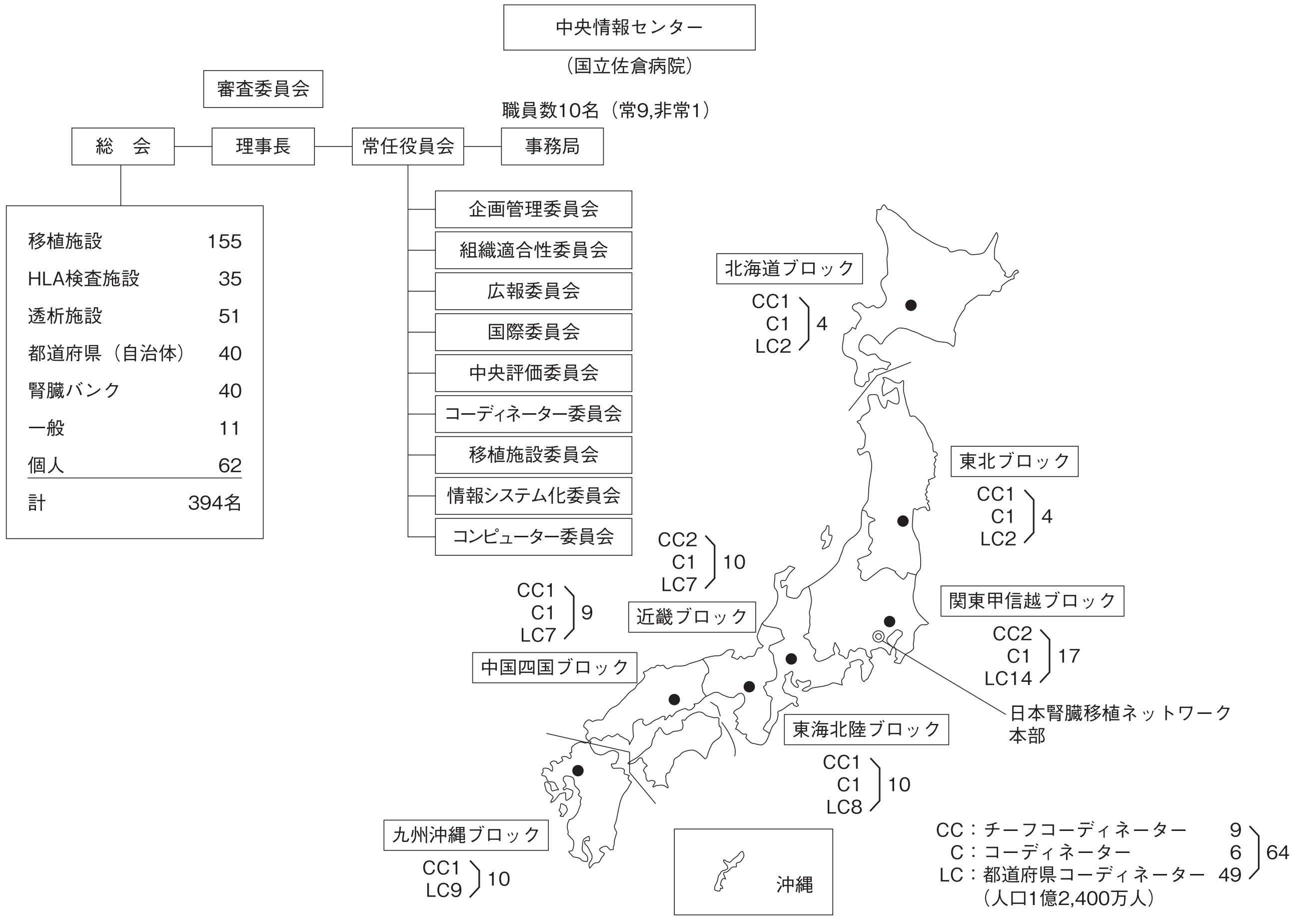


図 12.　日本腎臓移植ネットワークの組織とブロックセンター，コーディネーター配置図（1995～1997 年）

2 年間設置されたこの体制は，1997 年 10 月の「臓器の移植に関する法律」の施行に合わせて，献腎移植のみでなく多臓器移植を対象とするものに改変され，法人の名称も日本臓器移植ネットワーク（Japan Organ Transplant Network：JOT）となり[7,8]，併せて現在の体制にいたる肝移植や心移植，肺移植などの実施施設の認定が行われ（図 13），続いてメディカルコンサルタント制，脳死移植に対する検証会議の設置などが整備されることとなった．2002 年 7 月から組織改編が行われ，本部・東日本支部（東京），中日本支部（名古屋），西日本支部（大阪）の 3 支部と北海道連絡所，東北連絡所（後に改編）となり[9]（図 14），2013 年 4 月から公益社団法人に認可された．

3.　移植コーディネーター

移植医療の社会的基盤整備としてネットワークの構築とともに，不可欠の専門職として移植コーディネーターの養成や身分・資格についての取り組みが行われてきた．

米国では 1970 年ころコーディネーターの連絡会が発足し，1979 年には北米移植コーディネーター協議会（North American Transplant Coordinators Organization：NATCO）が結成された[10]（表 7）．移植コーディネーター制度についてもっとも確立しているのが米国で，業務内容から臓器の提供にかかわる procurement coordinator とレシピエント側を担当する clinical coordinator に分類され，1988 年からは米国移植コーディネーター評議会（American board of transplant coordinator：ABTC）による資格試験が行われ，CPTC（certified procurement transplant coordinator）と CCTC（certified clinical transplant coordinator）という 2 種類の資格証が与えられている．ヨーロッパでは，1979 年ころから移植コーディネーターが出現し，1982 年には ETCO（European Transplant Coordinators Organization）が結成され，1988 年オーストラリアにおいて ATCA（Australian Transplant Coordinators Association）が設立されている．

米国，ヨーロッパ，オーストラリアなどの地域以外では，移植医療の実施に伴って少数の移植コーディネーターが誕生していたが，協議会の結成まではいたっていなかった．筆者は，わが国の移植コーディネーターの草分けであった数名の人達とカナダのハリファクスで開催された NATCO 総会に出席し，その翌年 1991 年に日本移植コーディネーター協議会（Japanese Transplant Coordinators Organization：JATCO）の結成にかかわった．厚生省の研究班を担当し

図 13. 多臓器移植に対応する日本臓器移植ネットワークの体制（1997〜2002 年）［文献 8 より引用改変］

・東日本支部：北海道，青森，岩手，秋田，宮城，山形，福島，
茨城，栃木，群馬，埼玉，千葉，東京，神奈川，
新潟，山梨，長野
北海道連絡所（札幌）
・中日本支部：富山，石川，福井，愛知，岐阜，三重，静岡
・西日本支部：滋賀，京都，大阪，和歌山，兵庫，奈良，岡山，
広島，鳥取，島根，山口，香川，徳島，愛媛，
高知，福岡，大分，佐賀，長崎，熊本，宮崎，
鹿児島，沖縄

ドナー情報用全国共通連絡先　TEL.0120-22-0149
臓器移植に関する問い合わせ先　TEL.0120-78-1069
ホームページ　http://www.jotnw.or.jp
モバイルサイト　http://www.jotnw.or.jp/m

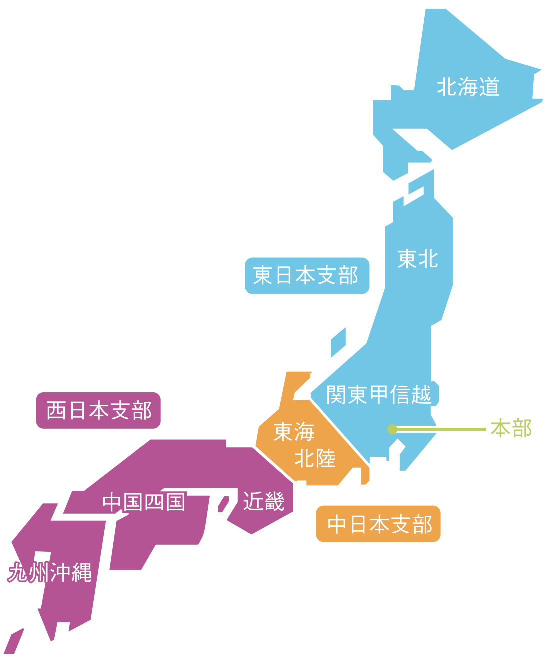


図 14. 現行の日本臓器移植ネットワークの体制（2002 年 7 月 1 日〜現在）［文献 9 より引用改変］

ていたことから内外の移植コーディネーター達と親交が深まり，1994 年 8 月，京都で開催された第 15 回国際移植学会（太田和夫会長）のおりに ITCM（International Transplant Coordinators Meeting）（図 15）を主催することになった[11]．この会議を契機に気運が盛りあがり，ITCM はやがて ITCS（International

表 7．各国の移植コーディネーター制度と協議会

西　暦	コーディネーター制度・協議会
1979	NATCO（North American Transplant Coordinators Organization） 米国では，1988 年から ABTC として CPTC，CCTC の資格制度実施
1982	ETCO（European Transplant Coordinators Organization） ヨーロッパでは 1979 年にオランダで CO1 名，次いでイギリスで 3 名スタート，ESOT（European Society of Organ Transplantation）と連携し，トレーニングコースを設定，各国ごとに CO 協議会が発足 スウェーデンでは 1983 年に CO1 名からスタート，1990 年には 10 名（4 移植施設）
1988	ATCA（Australian Transplant Coordinators Association） 1989 年に donor coordinator 21 名登録，recipient CO は各病院に 1～2 名，同年全オーストラリアの donor registry がスタート．本部は赤十字血液バンク（シドニー）
1991	JATCO（Japanese Transplant Coordinators Organization）日本では 1985 年ころから CO 専任のスタート

図 15．国際移植コーディネーター会議（ITCM）に集合した移植コーディネータのパイオニア達（第 15 回国際移植学会，1994 年 8 月京都）

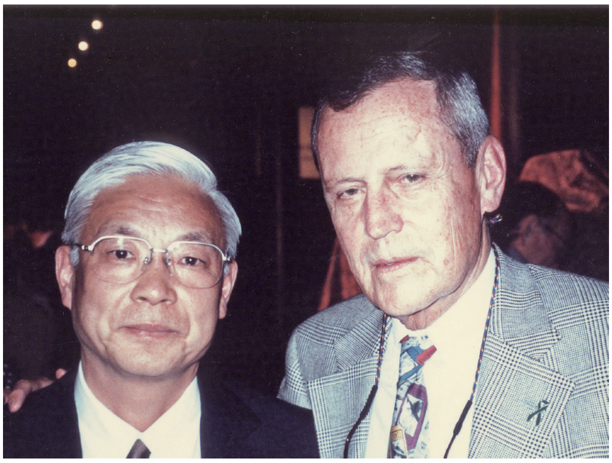


図 16．肝移植の第一人者ピッツバーグ大学 Thomas E. Starzl 教授と筆者（第 4 回 Society for Organ Sharing および第 1 回国際移植コーディネーター学会［ITCS］，1997 年 7 月ワシントン DC）

表 8．厚生省研究班による移植コーディネーターの定義（案）

①移植コーディネーターとは，医療関係者や一般人に対し正しい移植医療の普及啓発に力を尽くし，臓器移植（細胞，組織，臓器を含む広義の）が行われる全過程の中で，臓器提供者（ドナー）およびドナー家族の善意を活かして，臓器提供および臓器移植が円滑に行われるよう，ドナー家族やドナー関係者との対応，すべての移植医療関係者との連絡調整に当たる専門職である

②また，移植を希望し，または実施される患者，すなわち受容者（レシピエント）の管理，指導やレシピエント家族との対応，移植医療関係者との連絡調整に当たることも，移植コーディネーターの専門的業務である

③主としてドナー側を担当する移植コーディネーターをプロキュアメントコーディネーター（仮称），レシピエント側を担当するコーディネーターをクリニカルコーディネーター（仮称）と称する

Transplant Coordinators Society）へと組織され，1997 年 7 月には米国ワシントン DC において第 1 回大会を開催することができた．米国の OPO の一つである Life Gift 副会長の Teresa Shafer 氏の尽力のもと Oscar Salvatierra 教授や Thomas E. Starzl 教授（図 16）の支援によって実現したものである．

「コーディネーターの身分と資格に関する研究」班は，この職種をわが国の移植医療に定着させるための一翼を担ってきたと考えるが，とくに 1994 年度報告[12]で移植コーディネーターの定義（表 8）や呼称を定めたり（表 9），資格化の方針などについて研究を行ってきたことは重要な意義があったと考える[13]．臓器移植法に移植コーディネーターが記載され，わが国の法律で認知されたことは諸外国のコーディネーターに高く評価されている．諸外国では移植コーディネーターは専門職として認められているが，法律的に記載されるところまではいたっていないとのことである．医療職種としての資格付与についても調査を行ったが，国家資格が望ましい結果となった（表 10）．

その後，臓器移植ネットワーク本部でのコーディネーター採用にもかかわり，移植医療分野において JATCO をはじめとしてコーディネーターの養成や教育にも力を注いだが，きびしい条件つきの臓器移植法であったことから臓器提供は伸び悩み，一方 1999 年のわが国における脳死提供による心臓および肝臓移植の第 1 例を契機に多臓器移植時代へ踏み出すことができた．しかし，生体肝移植の進展と相俟ってレシピエントコーディネーターの必要性が確認され[14]，レシピエントコーディネーターの身分確立が先行される結果となった．日本移植学会が中心となり，2010 年に

表 9. 移植コーディネーターの呼称

a. ドナー担当

呼　称	対　象（%）					計（%）
	1	2	3	4a	4b	
プロキュアメントコーディネーター（米国）	18(18.6)	53(36.8)	41(30.6)	14(14.7)	16(19.8)	142(25.8)
ドナーコーディネーター（オーストラリア）	62(63.9)	73(50.7)	85(63.4)	45(47.4)	50(61.7)	315(57.2)
臓器獲得コーディネーター	1(1.0)	1(0.7)	0(0)	4(4.2)	1(1.2)	7(1.3)
その他	16(16.5)	16(11.1)	6(4.5)	30(31.6)	13(16.0)	81(14.7)
無回答	1(1.0)	1(0.7)	2(1.5)	3(3.2)	1(1.2)	8(1.5)
計	98(101.0)	144(100)	134(100)	96(101.1)	81(100)	553(100.4)

b. レシピエント担当

呼　称	対　象（%）					計（%）
	1	2	3	4a	4b	
クリニカルコーディネーター（米国）	18(18.6)	58(40.3)	46(34.3)	14(14.7)	16(19.8)	152(27.6)
レシピエントコーディネーター(オーストラリア)	61(62.9)	65(45.1)	71(53.0)	43(45.3)	43(53.1)	283(51.4)
臨床移植コーディネーター	6(6.2)	10(6.9)	11(8.2)	13(13.7)	6(7.4)	46(8.3)
その他	11(11.3)	11(7.6)	3(2.2)	20(21.1)	12(14.8)	57(10.3)
無回答	1(1.0)	1(0.7)	3(2.2)	5(5.3)	4(4.9)	14(2.5)
計	97(100)	145(100.7)	134(100)	95(100)	81(100)	552(100.2)

〈アンケート対象〉1：移植施設，2：日本移植コーディネーター協議会（JATCO），3：腎不全看護研究会加入施設，4a：日本救急医学会認定医指定施設，4b：脳神経外科学会専門医訓練施設（表 10 も同様）

表 10. 移植コーディネーターの資格付与

資　格	対　象（%）					計（%）
	1	2	3	4a	4b	
国家資格	56(57.7)	94(65.3)	85(63.4)	54(56.8)	41(50.6)	330(59.9)
地方自治体の免許	4(4.1)	7(4.9)	4(3.0)	4(4.2)	5(6.2)	24(4.4)
日本臓器移植ネットワーク（仮称）などの公益法人	10(10.3)	21(14.6)	8(6.0)	11(11.6)	12(14.8)	62(11.3)
移植関係学会合同委員会からの認定	18(18.6)	13(9.0)	20(14.9)	15(15.8)	12(14.8)	78(14.2)
日本移植学会からの認定	7(7.2)	4(2.8)	9(6.7)	3(3.2)	8(9.9)	31(5.6)
資格は不要	3(3.1)	1(0.7)	1(0.7)	5(5.3)	1(1.2)	11(2.0)
その他	1(1.0)	5(3.5)	4(3.0)	2(2.1)	0(0)	12(2.2)
無回答	0(0)	2(1.4)	5(3.7)	1(1.1)	3(3.7)	11(2.0)
計	99(102.1)	147(102.1)	136(101.5)	95(100)	82(101.2)	559(101.5)

は 9 学会・研究会からなるレシピエント移植コーディネーター認定合同委員会が発足し，2011 年 10 月にレシピエント移植コーディネーター（RTC）54 名の認定が行われ，RTC の認定制度が開始された[15]．この動きと同時に，2012 年 4 月には移植後患者指導管理料 300 点が保険収載されることとなった．移植コーディネーターの資格付与の観点からは，国家資格までには達していないが，公的な専門職種として認知された第一歩であり，ドナーコーディネーターの公的資格付与とともに今後さらなる移植関係職種の整備が期待される．

表 11. 腎移植自験例

施設名	例　数
東海大学	126
三島社会保険病院	21
メソディスト医療センターおよびベイラー大学医療センター（ダラス）*	80
カロリンスカ Huddinge 病院（ストックホルム）**	5
計	232

*米国：肝移植，肝・膵・腎移植，膵・腎移植（膵管膀胱吻合）を含む，**スウェーデン：膵移植（膵管十二指腸吻合）を含む

Ⅲ. 自験腎移植例と合併症

筆者は 1985 年 8 月に埼玉医科大学泌尿器科学教室から東海大学移植学教室 I へ転勤し，このころから本

格的に腎移植へ取り組んだ．1997年8月からは社会保険三島病院（現三島社会保険病院）へ移ったが，この間海外も含めて経験した自験腎移植例は232例であった（表11）．

1. 手術手技について

わが国の腎移植については，生体腎移植，心停止ドナーからの献腎移植を含め，脳死ドナーのみによる心臓などの他の臓器移植とは異なり，すでに長い臨床的経験を有するため，腸骨窩腎移植術の手術手技は確立されているといってよい．しかし，生体腎移植の際の腎摘出術については，かつての開腹腎摘出術に対し，最近は腹腔鏡下腎摘出術の割合が増加して主流になりつつある．また心停止ドナーからの腎摘出術では，心停止直後からの体内腎灌流すなわち *in situ* perfusion による en bloc 腎摘出が主であったが，脳死ドナーの場合は心摘出をまず行い，腹部大動脈からの腹腔臓器灌流による肝摘出や膵摘出を行った後，最後に両腎摘出を行うといった手順による，手術チーム編成プロセスの違いがある．

腎移植術の血管吻合，すなわち腎静脈と外腸骨静脈吻合，腎動脈と内腸骨ないし外腸骨動脈吻合の術式は各施設・各術者によってかなりバリエーションがあり，筆者も東海大学時代にご指導を受けた心臓血管外科川田志明教授（元慶応大学教授）と工夫した手技を用いている．移植腎尿管膀胱吻合術については，当初，古典的な膀胱内からの Politano–Leadbetter 法によって吻合していたが，その後米国ダラスのメソディスト医療センターで学んだ膀胱外からの Barry の変法を実施してきた．

2. 自験例の内訳

東海大学では126例の腎移植を経験し，在任中100例に達したところで患者も交えて100回記念を催した．三島社会保険病院で21例，米国では短期滞在中の4ヵ月で80例，スウェーデンでも短期に5例の移植手術を経験した．当時外国ではほとんど脳死ドナーであったことから，米国では肝移植，肝膵腎3臓器移植，膵腎移植にも加わり，ドナーからの心摘出も経験した．

外国での症例を除き，みずから執刀した症例は東海大学66例，三島社会保険病院21例の87例で，レシピエントの年齢は12〜54（平均36）歳，男性57例・女性30例，ドナーの種類は生体腎56例，献腎31例（うち脳死ドナー1例）であった．通常の一次移植のほか，特殊なタイプの腎移植としては二次移植5例，非血縁移植6例[16]（うち2例は夫婦間移植），ABO血液型不適合移植1例[17]であった．

東海大学の第1例目で，16歳時に父をドナーとして腎移植を行い，37年間生着している代表的な症例を提示する．

【症　例】53歳，男性，農業．

既往歴：29歳時，Crohn病を疑われ試験開腹を受けた．

家族歴：特記すべき事項はない．

現病歴：慢性糸球体腎炎を原疾患として13歳時に血液透析へ導入され，16歳時に42歳の父をドナーとして腎移植を行った．

経過：当時は conventional な免疫抑制薬しかない時代のためプレドニゾロン，アザチオプリンを主体に免疫抑制療法を行ったところ，12ヵ月後急性拒絶反応を発症しステロイドパルス療法と局所放射線照射を実施し奏効した．30歳代には結婚し家庭をもち1子誕生，仕事は現在も継続中である．軽度の脂質異常症，高尿酸血症がみられたが薬物投与によりコントロールし，他の重大な合併症はなく Cr1.08〜1.39 mg/d*l* で推移している．

現症：身長160 cm，体重60 kg，eGFR44 m*l*/分．血圧122/70 mmHg，血算：WBC8,000/μl，RBC479×$10^4/\mu l$，Hb16.3 g/d*l*，Hct49.2%，Plt15.9×$10^4/\mu l$，生化学：Alb4.0 g/d*l*，AST18 IU/*l*，ALT16 IU/*l*，γGTP21 IU/*l*，UN21.4 mg/d*l*，Cr1.39 mg/d*l*，UA7.2 mg/d*l*，BS125 mg/d*l*，Toch183 mg/d*l*，HDL83.4 mg/d*l*，LDL92.0 mg/d*l*，TG121 mg/d*l*，Ca9.3 mg/d*l*，P1.7 mg/d*l*，Na143 mEq/*l*，K4.4 mEq/*l*，Cl104 mEq/*l*，検尿：蛋白（+），糖（−），潜血（−）．

処方薬：プレドニゾロン（5）1T，アザチオプリン（50）1.5T，ベンズブロマロン（25）1T，ファモチジン（10）1T，ロスバスタチンカルシウム（2.5）1T，イコサペント酸エチル（EPA）3P，バルサルタン（40）1T．

東海大学に引き続き2002年より当院で2ヵ月に1度のペースで外来フォローをしている．血清Crレベルを長期経過でみると若干の上昇傾向はうかがえるが，依然として conventional な免疫抑制療法のもとで良好な移植腎生着が継続している．

3. 腎移植後の合併症

腎移植後の合併症には術後早期に生じるものと，長期にわたる免疫抑制に起因するものがある．術後早期の合併症も，腎移植術直後からの大量の免疫抑制薬投与による影響を受けるものが多い．東海大学における腎移植後の合併症は（表12），内科的合併症の割合が約80% を占めていた．

術後早期の合併症のうちもっとも問題となるのは感

染症で，アザチオプリン時代には細菌感染が多かったが，シクロスポリン（cyclosporin：CyA）が導入されてからはウイルス感染の頻度が高くなっている．感染症の頻度は36％ともっとも高く，次いで泌尿器疾患（16.2％），循環器疾患（13.2％）の順であった．しかし，透析患者と腎移植患者の10年後の合併症を調査した結果では，透析患者に対して移植患者の生活の質（QOL）は明らかに良好であるという結果も得ている．

自験例においても，サイトメガロウイルスやヘルペスウイルス感染の頻度は高く，通常発症しやすい胸腹部や顔面，大腿部，下腿部のみでなく，母指の先端（図17）や耳介の中（図18）に生じた症例にも遭遇した．前者は献腎移植，後者は弟からの生体腎移植であるが，両例とも移植腎は良好な機能を維持している．そのほか，腎移植後白血病を発症した例[18]，生体腎移植時に膀胱腫瘍を発見した例[19]，腎移植後，腹部大動脈瘤を発症し[20]，術後11年に再度両側総腸骨動脈瘤にてY字人工血管置換術を施行した例[21]，Rh血液型不適合移植例[22]，陳旧性肺結核を合併した死体腎移植例[23]など多彩な合併症を経験した．

Ⅳ．腎移植の現状と将来展望

1．臓器移植の現況

腎移植，肝，膵，肺移植は死者からの臓器提供による移植のみではなく，生体からの移植（部分移植も含む）も行われており，とくに死者からのドネーションの多くなかったわが国では生体腎移植や生体肝移植が主流となってきた．しかし，2008年の「イスタンブール宣言」で再確認されたように倫理的側面からみて，移植のroyal roadは死体からの移植であり[24]，心臓，小腸移植など脳死体からの移植でなければ不可能な臓器移植も含めて実施可能となるよう法律やネットワークなど社会的基盤の整備が行われてきたわけである．

2010年の改正臓器移植法の施行後，脳死者からの臓器提供は急増し，臓器移植法制定後の15年間で200例を超えるドナーがあったが，相対的に心停止ドナーは若干減少する現象が生じた．この間の多臓器移植件数は表13のとおりで，2009年に心肺同時移植，2012年に肝腎同時移植が各1例行われている[25]．現時点での各臓器移植の生着率は図19のごとくであり[25]，心移植95.0％，肺移植79.2％，肝移植63.3％，膵移植72.0％，膵腎同時移植81.1％，小腸移植66.7％などで，症例数が少ないのに良好な成績を示している点で諸外国から評価されている．

表12．腎移植後の内科的および外科的合併症（n=121，東海大学）

合併症	例　数（%）
内　科	107（78.7）
感染症*	49（36.0）
尿路感染	24
創および皮膚感染	13
肺炎および気道感染	10
その他	2
循環器疾患	18（13.2）
高血圧	15
心停止	2
脳出血	1
糖尿病（PTDM*2）	13（9.6）
白内障	12（8.8）
肝疾患	6（4.4）
肝炎	4
肝機能障害	2
悪性腫瘍	2（1.5）
肝癌	1
単球骨髄性白血病	1
その他	7（5.1）
外　科	29（21.3）
泌尿器疾患	22（16.2）
尿漏および尿管狭窄	10
精巣水瘤	4
膀胱尿管逆流現象（VUR）および尿管蓄膿症	3
膀胱タンポナーデ	2
膀胱腫瘍*3	2
腎細胞癌*3	1
急性胆嚢炎	2（1.5）
脳膿瘍	1（0.7）
感染性血管窄孔	1（0.7）
腹部大動脈瘤	1（0.7）
十二指腸潰瘍	1（0.7）
その他	1（0.7）
計	136（100.0）

*シクロスポリン投与例，*2 腎移植後糖尿病（post transplant diabetes mellitus），*3 腎移植手術時に発見

図17．手指へのヘルペス．36歳，女性．献腎移植後2年6ヵ月

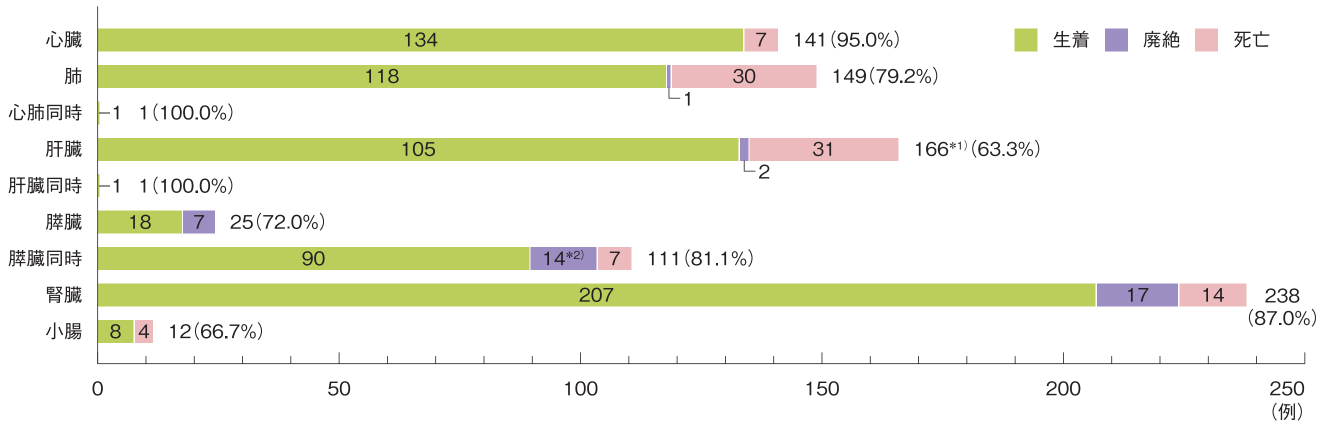
a. 生体腎移植後 9 年　　　　b. a の 3 週間後

図 18. 耳介のヘルペス．42 歳，男性

表 13. 臓器移植件数（1997 年 1 月～2012 年 9 月）［日本臓器移植ネットワーク，文献 25 より引用］

臓　器	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012 ～9 月	計
心　臓	0	0	3	3	6	5	0	5	7	10	10	11	6	23	31	21	141
肺	—	0	0	3	6	4	2	4	5	6	9	14	9	25	37	25	149
心肺同時	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	1	0	0	0	1
肝　臓	0	0	2	6	6	7	2	3	4	5	10	13	7	30	41	30	166
肝腎同時	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	1	1
膵　臓	—	—	0	0	0	1	1	0	1	1	4	4	0	2	6	5	25
膵腎同時*	—	—	0	1	6	2	1	5	5	8	8	6	7	23	29	12	113
腎　臓	159	149	158	145	145	122	135	168	155	189	179	204	182	186	182	128	2,586
小　腸	—	—	—	0	1	0	0	0	0	0	2	1	1	4	3	0	12

*心停止後の膵腎同時移植 2 件を含む



*1) 分割肝移植 13 提供 26 移植を含む，*2) 膵腎ともに廃絶，または膵もしくは腎のみ廃絶

図 19. 脳死臓器移植と生着状況（n=844，1997 年 10 月～2012 年 9 月）［日本臓器移植ネットワーク，文献 25 より引用改変］

2. 腎移植の実績

わが国の腎移植数の実績は，2000 年以前では，1989 年の年間合計 808 例をピークに減少し続け，1991 年 697 例，1992 年 609 例，1993 年 520 例とかなり落ち込んだが，2000 年に入り，700 例台に回復し（表 14），2003 年には過去もっとも多い移植が行われ

るようになった[26]．その後は移植件数が順調に増加し，2006年にはじめて1,000例を突破し，直近で集計の終了した2011年には1,601例と過去のピーク時の2倍の腎移植が行われるようになった．

最近，透析を経ずに腎移植を行う先行的腎移植（pre-emptive renal transplantation：PET）が増加傾向にあるが，腎移植の対象の大部分は透析患者であって，透析人口は増加し続けており，2011年の集計ではじめて30万人を超え304,856人にいたっている[27]．したがって，腎移植の総数は増加していても依然として透析患者の待機に追いつかない状況にある．以前外国の移植医達の意見を聞いたことがあるが，日本の人口や社会状況からいって年間3,000例程度の腎移植が行われてよいはずと推計しており，今後の目標値と思われる．

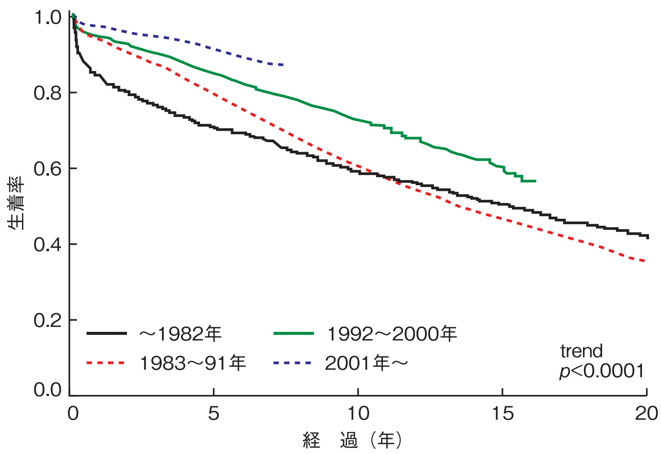
2011年度の1,601例の内訳は生体腎が1,389例（86.8%）で，献腎は212例（13.2%）と，年次的な腎移植数の増加は生体腎の増加が要因となっている．欧米では献腎の割合が約70%と主体であり，以前からこの傾向はかわらず，生体肝移植の実績も含めると，わが国の臓器移植は生体臓器移植が主流であるという点が特色ともなっている．そして，生体腎移植のうち夫婦間移植が448例（28.0%），ABO血液型不適合移植は344例（21.5%）と割合の高いことも特色となっている．また，先行的腎移植は138例（8.6%）行われた[26]．

なお，臓器移植の実績については，日本臓器移植ネットワークおよび日本移植学会登録委員会においてこれまで集計登録が行われているが，2009年5月のWHO総会で採択された「イスタンブール宣言」で移植症例については国家的あるいは地域的な登録制度が求められることとなり，日本移植学会倫理指針において登録事業が強化され，倫理指針を遵守することが診療報酬上の施設基準にも含まれていることから，移植実施施設が移植例を登録することは事実上義務化されることとなった[26]．

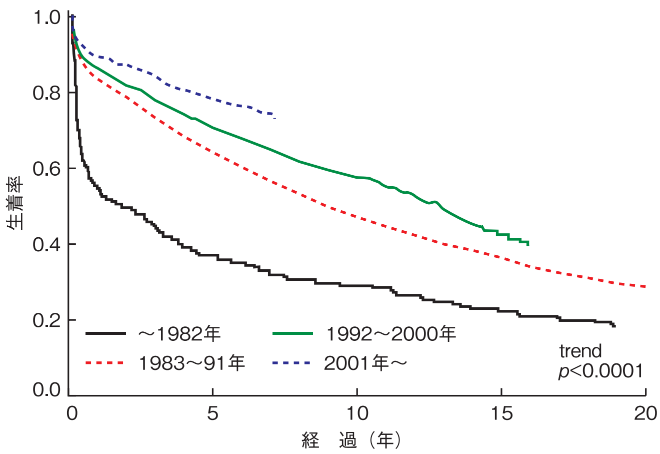
移植の成績についても，両機関から報告されているが，日本臓器移植ネットワークでは生体移植例は取り扱わないため，献腎（脳死および心臓死）移植のみの統計となっている．日本移植学会では生体腎と献腎に分け，免疫抑制療法の変遷によって年代別にレシピエントの生存率，生着率を集計している[28]．年代が新しくなるほど生存率，生着率ともに上昇し，2001年以降の1年生存率は生体腎で98.3%，献腎で95.4%，3年生存率は生体腎97.3%，献腎92.2%，5年生存率は生体腎95.9%，献腎89.1%ときわめて良好であった．生着率は（図20），シクロスポリン導入以前の1982年までは1年生着率は生体腎83.1%，献腎51.9%と低かったが，とくにミコフェノール酸モフェチル（mycophenolate mofetil：MMF）導入後の2001年以降は，1年生着率が生体腎97.0%，献腎89.2%，3年生着率は生体腎94.2%，献腎83.7%，5年生着率は生

表14. 2000年以降の腎移植実施例数（日本移植学会・日本臨床腎移植学会，文献26より引用）

西　暦	生体腎	献腎（心停止）	献腎（脳死）	計
2000	603	139	7	749
2001	554	135	16	705
2002	637	112	10	759
2003	728	134	4	866
2004	731	167	6	904
2005	835	144	16	995
2006	942	181	16	1,139
2007	1,043	163	24	1,230
2008	994	184	26	1,204
2009	1,124	175	14	1,313
2010	1,277	146	62	1,485
2011	1,389	126	86	1,601



a. 生体腎



b. 献腎

図20. 年代別の生着率（日本臨床腎移植学会・日本移植学会，文献28より引用改変）

体腎 90.7%，献腎 77.8% と明らかに向上している[28].

3. 移植医療の課題と将来展望

a. 免疫抑制療法

年代別移植腎の生着率で明らかなように，移植の成績は免疫抑療法の進展に大きく依存するものである．とくに 1976 年からのわが国へのシクロスポリンの導入は移植成績の飛躍的向上をもたらし[29]，その後同じカルシニューリン阻害薬（calcineurin inhibitor：CNI）として，わが国で開発されたタクロリムス（tacrolimus：Tac）が登場した．現在，ステロイドと CNI を柱とし，代謝拮抗薬として新しく開発された MMF などが併用され，2001 年以後さらに生着率が向上した要因に抗体製剤の実用があげられる[30].

2002 年から導入された抗 CD25（IL–2 レセプター α 鎖）モノクローナル抗体のバシリキシマブ（basiliximab）は，移植時と 4 日後に 20 mg を 2 回投与するのみでリンパ球 T 細胞の増殖を抑制し，急性拒絶反応は著明に減少した．その後 B リンパ球表面の CD20 抗原に対するモノクローナル抗体で，B 細胞リンパ腫の治療薬として用いられていたリツキシマブ（rituximab：RIT）も移植時に使用されるようになった．ABO 血液型不適合移植時に，かつては脾摘を併用していたが RIT の投与によって脾摘をせずに移植が可能となった．また，既存抗体陽性例に対して免疫グロブリン（intravenous immunoglobulin：IVIG）投与や血漿交換を併用して移植を行っていたが[31]，RIT の投与が試みられるようになった．さらに最近，マクロライド系免疫抑制薬で mTOR（mammalian target of rapamycin）阻害作用をもつ everolimus が，心臓移植のみに保険適用されていたものを[32] 2011 年 12 月から腎移植にも拡大され，その成績が報告されつつある[33]．これらの免疫抑制薬を駆使した複合的免疫抑制療法によって，1 年生着率 97%（生体腎）あるいは 89.2%（献腎）はさらに改善される可能性があり，移植医療は特殊な先端的医療から脱却して，一般的な医療になりつつあるといっても過言ではない．

しかし，年次的生着率が示すように（図 20），移植腎生着率が継時的に低下するのは，いわゆる慢性拒絶反応によるもので，慢性移植腎症（chronic allograft nephropathy）として病理組織学的検索も一部開始されたが，病態は未解明といってよく，有効な治療法も確立されておらず，今後の移植医療における大きな課題である．mTOR 阻害薬には平滑筋細胞の増殖を抑制する作用が認められており，慢性拒絶反応の予防または治療薬としての可能性もある．

2013 年 3 月には生体肝移植患者に対して，患者とドナーの白血球を混合培養して免疫操作のうえ患者体内へ戻すことにより，免疫抑制薬の投与を中止ないし減量に成功したという報告もあり，今後もさらなる免疫抑制療法の開発が期待される．

b. 異種腎移植

腎移植の待機患者数の増加に比しドナー不足が明らかであったことから，異種腎移植（xeno-renal transplantation：XRT）の研究も 1900 年代はじめから行われるようになり，1905 年にはフランスの Princeteau がウサギの腎切片を腎不全小児の腎切開部に移植し，これが XRT の臨床第 1 例とみなされる．その後 1965 年に米国の Ogden がヒヒを用いて 1 例の XRT を行うまで，筆者の集計した限り 20 例の臨床 XRT が行われ，以後実施されていない[34]．ただし，1994 年米国の Starzl（図 16）がヒヒを用いて 2 例の異種肝移植を行い，これを契機に異種移植研究が再開され，国際異種移植学会が組織され，筆者も東海大学時代に取り組んだ[35, 36].

このころ臓器移植の適応拡大を目指して膀胱移植の実験的研究など[37]も行ったが，XRT や膀胱移植などの barrier を超える手法として ES 細胞あるいは iPS 細胞など再生医療の時代に突入したと考えている．事実，2013 年 1 月にはヒト iPS 細胞から腎臓の尿細管の作製に成功したことが報じられ，腎臓の再生へと近づきつつある．

c. 病腎移植

死体からの臓器提供が少ないことがわが国の移植医療の特徴であるとともに，種々の課題を生じている．非血縁（主に夫婦間）腎移植や ABO 血液型不適合腎移植の割合が多い理由ともなっているが，2006 年ころから問題としてあがっている病腎移植もドナー不足のため実施した方策の一つということができよう．腎臓癌などの部分的切除を行い，健常な残腎を移植に用いるこの方法は目下試験的医療として実施されており，将来この方式の評価が決まることになる．

ヨーロッパでは以前からドネーション啓発のため，EDHEP（European donor hospital education program）という活動を行い，後に Celia Wight 氏や Leo Roels 氏といった移植コーディネーターのパイオニアがドナーアクションプログラム（donor action program：DAP）という方式をつくり，厚生労働省研究班でもこれを応用する試みが行われた．わが国では時期尚早とも思われたが，むしろ今後有効となる可能性があると考える．

d. 移植医療における倫理的問題

移植医療が通常の医療と異なり，ドナーの存在なくしては成り立たない医療であり，基本的に社会性を有

する医療であることから，倫理について重視されている．日本移植学会倫理指針[38]によれば，“特に生体ドナーの場合は，臓器提供後，ドナーの生涯にわたる健康管理等のケアが保証される必要がある”と謳われている．生体臓器移植におけるドナーの条件については，「WHO 指導指針」(1991 年，2010 年改訂)，「国際移植学会倫理指針」(1994 年）や「イスタンブール宣言」(2008 年）などの倫理指針に基づいて，非血縁ドナーの場合の取り扱いも含め「日本移植学会倫理指針」(改定案）が示されている．

これまでわが国で実施された約 2 万件の生体腎移植でドナーの死亡例はなく，2002 年に行われた生体肝移植でドナーの死亡が 1 例報告されていたが，2013 年 4 月沖縄の病院で行われた生体腎移植において 65 歳・女性が手術後死亡したことが報告された．その後同年 1 月，埼玉の病院で，生体腎ドナーの 60 代・男性が術後 34 日に死亡していることが判明し，日本移植学会からこの両事例に対し第三者調査委員会の設置と報告が要請された．移植医療が社会性を有する医療であるだけに，すべての移植例に疑義のない透明性が求められている．

e. 臓器移植の基盤整備

臓器移植法および改正臓器移植法によって脳死下臓器移植は 2013 年 1 月末時点で累計 207 例となり，5 月には 18 歳未満の 4 例目の臓器提供が行われた．欧米と比較し，いまだに本来の多臓器移植体制が十分に整っているとはいえないが，移植件数の増加に伴って，臓器移植ネットワークや日本移植学会による基盤整備の努力は続けられている．すなわち，2013 年 4 月日本臓器移植ネットワークの公益社団法人化に伴って，各種規約などが変更になり，腎移植施設についても新しい資格基準[39]が通知された．この資格基準では，十分な経験のある日本外科学会または日本泌尿器科学会の専門医 2 名以上を要するが，少くとも 1 人は腎摘出術および移植術を合わせて 10 例以上経験していること，また腎臓摘出医師の派遣についてこれまでより詳細に決められ，自施設の移植希望登録患者がレシピエント候補になった場合は，少くとも 1 人以上の医師を摘出に派遣できることなどが定められた．また院内にレシピエントコーディネーターがいることも要請されている．欧米の移植チーム編成にかなり近い体制の構築が要求されているといってよい．

f. 脳死下での臓器提供の問題

学術的な免疫抑制療法の開発や進歩と並行して，移植治療体制の整備も学会を中心に行われており，日本臨床腎移植学会では 2008 年から腎移植を実施する医師の専門性を高めるため，いち早く腎移植認定医制度を発足させ，その後日本移植学会においても認定医制度が発足し，2012 年 8 月に第 1 回移植認定医認定が実施された[40]．

2010 年 7 月の改正臓器移植法の施行により，本人の臓器提供の意思が不明な場合にも，家族の承諾があれば臓器提供が可能となり，したがって 15 歳未満のものからの脳死下での臓器提供が可能となり，わが国の移植医療はようやく社会的な環境が整い，歴史的に本来の移植医療の第一歩を踏み出したといってよい．しかし，「被虐待児への対応」という条文で，“虐待を受けて死亡した児童から臓器が提供されることのないよう適切に対応”という点が重視されており，小児からの提供にはきわめて慎重に対応することが求められている．この条件が現在にいたるも 18 歳未満の児童からの提供が 4 例（6 歳未満の男児 1 例，10 歳以上 15 歳未満の男児 1 例，15 歳以上 18 歳未満の男児 2 例）と少なく，小児のドナー病院となりうる施設では虐待について検証するシステムの構築などに苦慮しているところとなっている．また，7 月の法施行に先立つ 1 月には，“親族に対する優先提供”が始まっており，わが国特有の条文といえよう．

改正臓器移植法においても，臓器摘出にかかわる脳死判定の要件からは，臓器提供に限っての脳死が死と読みとれ，普遍的に脳死が死と定義されたわけではなく，家族が脳死判定を行うことを拒まないときという条文は，家族に脳死診断を行うか否かという決定をさせており，社会的に真の意味の“脳死は死である”とはなっていない．親族への優先提供は臓器移植法の第 4 条 2 項「移植術を受ける機会は，公平に与えられるように配慮されなければならない」に矛盾する，また小児の提供について「提供施設内の虐待防止委員会の承認が必要」といった要件についても現実的には困難な課題で，捜査権をもつ警察の判断が必要となろうといった指摘[41]がある．

g. 移植医療体制の体系化

改正臓器移植法はわが国の移植医療体制に大きな波紋を投げかけ，2010 年 1 月には臓器移植関連学会協議会が「臓器移植法改正後の移植医療の体制整備に関する提言」を公表し，日本臓器移植ネットワークも臓器提供にかかわる日本脳神経外科学会，日本救急医学会，日本麻酔学会などに対して，脳死下臓器提供時の法的脳死判定時の支援要請を行い，各学会がそれに応える動きがみられている．しかし臓器提供側の専門医からは，これまでの支援体制は関連学会あるいは医師個人の善意に基づくもので，移植医療の中で体系化されているわけではないことが強調されている[42]．移植医療においてはレシピエントとドナーの存在が不可

欠であり，移植を成功させるためのドナー側医療者の負担対策や体制の構築なしには移植医療の発展は望めないので，その解決に向けた体制整備は今後の重要な課題となるであろう．そして，わが国の最近の腎移植の動向からみても，献腎の割合が多い欧米型の移植医療に移行できるかは困難な課題と思われる．

V．おわりに

筆者が東海大学で移植医療にかかわることとなった1985年ころから現在までの約28年間は，ちょうど日本の移植医療の過渡的時期に当たり，それまで角膜と腎臓の移植に限られていた移植医療から，心臓や肺，肝臓，膵臓，小腸といった多臓器移植時代へ大きく舵を切ろうとする時代の潮流の中にあった．

移植医療の分野では，臓器移植を成功させるための手術手技や拒絶反応を克服する免疫抑制療法の開発といった医学面での進歩・向上を図ることは当然である．しかしながら，臓器の提供がなければ成り立たない医療であることから，広く社会からドナーを募り，そしてドナーの善意を活かして移植を成功させるという社会的システムの構築が不可欠である．そして，移植医療の関係者はその社会的動向にかかわらざるをえない立場にあり，単に医学的側面のみでなく，社会的課題についても取り組む必要がある．

筆者の体験した範囲内において，専門である腎移植を中心として，現在のわが国ににおける臓器移植体制が構築されるまでの歴史的経過と現状の課題や将来展望などについてまとめて述べた．

文　献

1) 腎移植連絡協議会（編）：腎移植新時代への展望—臓器提供の活性化・拡大を求めて，メディカ出版，大阪，1992.
2) 「移植システムを考える」組織委員会（編）：JANAMEF Review 1—移植システムを考える，国際医療専門家協会出版事務局，東京，1991.
3) 平賀聖悟：UNOSから学ぶわが国のネットワークシステムの構築．今日の移植 **7**：225–236，1994.
4) 越川昭三，長沢俊彦，小磯謙吉ほか（編）：Annual Review 腎臓 1992，中外医学社，東京，1992.
5) 平賀聖悟：ユーロトランスプラントと移植コーディネーター．透析ケア **7**：56–59，2001.
6) 長沢俊彦，川邊香月，伊藤克己ほか（編）：Annual Review 腎臓 1997，中外医学社，東京，1997.
7) Hiraga S，Mori T，Asaura Y：Current arrangement and activity of organ transplantation after new organ transplant legislation in Japan．Transplant Proc **32**：86–89，2000.
8) 雨宮　浩（編）：テキスト臓器移植，日本評論社，東京，1998.
9) 日本臓器移植ネットワーク：臓器移植とは．日本の移植事情 **6**：5–6，2012.
10) 平賀聖悟：移植コーディネーター—わが国および欧米における現況．医学のあゆみ **167**：94–98，1993.
11) Rudlow DL，Ohler L，Shafer T（ed）：A Clinician's Guide to Donation and Transplantation，Applied Measurement Professionals，Inc.，Lenexa，2006.
12) 平賀聖悟，寺岡　慧，冨田　伸ほか：コーディネーターの身分と資格に関する研究．平成5年度厚生科学研究費臓器技術臨床研究開発事業研究報告書，厚生省，p107–124，1994.
13) Hiraga S，Teraoka S，Tamaki I et al：Study of the status and certification of transplant coordinators in Japan．Transplant Proc **28**：260–263，1996.
14) 雨宮　浩，平賀聖悟，長谷川　浩ほか：移植の普及に関する研究（3）—レシピエントコーディネーターの意義と有用性に関する研究．厚生科学研究費補助金 免疫・アレルギー等研究事業臓器移植部門平成11年度総括・分担研究報告書，p313–325，2000.
15) 剣持　敬：2012年度レシピエント移植コーディネーターの認定について．移植 **47**：390–392，2012.
16) Hiraga S，Tanaka K，Watanabe J et al：Living unrelated donor renal transplantation．Transplant Proc **24**：1320–1322，1992.
17) 平賀聖悟，中島　均：ABO血液型吸着器の移植への応用．臨床透析 **9**：71–77，1993.
18) Terasaki PI（ed）：Clinical Transplants 1986，UCLA Tissue Typing Laboratry，Los Angels，1986.
19) 平賀聖悟，高宮登美，飯田宜志ほか：生体腎移植時に膀胱腫瘍を発見した1例．移植 **22**：544–550，1987.
20) Hiraga S，Satoh T，Kawada S：Surgical correction of abdominal aortic aneurysm after renal transplantation．Clin Transpl **2**：207–210，1988.
21) 阿部貴弥，藤崎智隆，福田央子ほか：生体腎移植後20年間に2度の動脈瘤を発生した1経験例．移植 **32**：180–184，1997.
22) Tanaka K，Hiraga S，Watanabe J et al：Clinical experience in Rh-incompatible kidney transplantation．Transplant Proc **24**：1318–1319，1992.
23) 武林祥裕，平賀聖悟，渡辺　順ほか：陳旧性肺結核を合併した死体腎移植の1例．移植 **29**：66–70，1994.
24) 長谷川友紀：日本移植学会の倫理指針と今後．移植 **46**：49–51，2011.
25) 日本臓器移植ネットワーク：改正臓器移植法施行後の臓器提供・臓器移植の現状．News Letter **16**：1–8，2012.
26) 湯沢賢治ほか（日本移植学会登録委員会）：日本移植学会2011年症例登録統計報告．移植 **47**：393–415，2012.
27) 中井　滋，渡邊有三，政金生人ほか（日本透析医学会統計調査委員会統計解析小委員会）：わが国の慢

性透析療法の現況（2011 年 12 月 31 日現在）．透析会誌 **46**：1–76，2013.
28）日本移植学会：腎移植臨床登録集計報告（2010）—3．2009 年経過追跡調査結果．移植 **45**：608–618，2010.
29）平賀聖悟，佐藤　威：新免疫抑制剤の波紋．綜合臨 **43**：30–32，1994.
30）昇　修治，岡本雅彦，牛込秀隆ほか：腎移植の免疫抑制剤．移植 **45**：2–7，2010.
31）日本アフェレシス学会（編）：アフェレシスマニュアル，第 3 版，透潤社，東京，2010.
32）福嶌教偉：mTOR 阻害剤の作用機序ならびに基礎的・臨床的研究．今日の移植 **19**：153–162，2006.
33）Dantal J：Everolimus；preventing organ rejection in adult kidney transplant recipients. Expert Opin Pharmacother **13**：767–778，2012.
34）平賀聖悟：異種腎移植の現状と将来展望．医学のあゆみ **183**：391–395，1997.
35）Hiraga S，Kitamura M，Kakuta T et al：Transplantation of porcine fetal organs to discordant canine recipients. Transplant Proc **28**：1406–1409，1996.
36）Hiraga S，Sato T，Kitajima N et al：Experimental study of fetal pancreatic tissue transplantation；with special reference to preservation conditions. Transplant Proc **30**：3427–3430，1998.
37）Hiraga S，Iida T，Kitamura M et al：Experimental study of urinary vesical transplantation. Transplant Proc **21**：3194–3196，1989.
38）日本移植学会：社員総会資料 2012 年度．移植 **47**：2012.
39）日本臓器移植ネットワーク：腎臓移植施設資格基準．施行期日：平成 25 年 4 月 1 日．
40）許　俊鋭，江川裕人，寺岡　慧ほか：移植認定医制度発足と第 1 回認定結果について．移植 **47**：379–389，2012.
41）高原史郎：改正臓器移植法の施行と課題．今日の移植 **24**：5–8，2011.
42）横田裕行：臓器提供側からみた改正臓器移植法の課題と解決に向けて．日医師会誌 **139**：2493，2011.

Development of kidney transplant medicine ; Subject matter and future pathway in Japan

Seigo Hiraga

Clinical Professor, School of Medicine Tokyo Medical and Dental university
Emeritis President, Social Insurance Associations Mishima Hospital

Summary

Until the legislation of Organ Transplant Act in 1997, only corneal transplantation and kidney transplantation were performed in Japan. Since the enforcement of the Act organ transplantation such as heart, lung, liver, pancrease and intestine including kidney could be possible. The author describes the process of establishing the social system such as organ transplant network and of disposing transplant coordinators.

While, clinically 232 kidney transplantations were experienced by myself, and various types of post transplant complications are reported as well as results of registered cases of the incooperated Japan Organ Transplant Network and the Japan Society for Transplantation (total 1,601 kidney transplantations in 2011) are referred.

Present state of immunosuppressive therapy in the field of organ transplantation, the social system such as the certification of Recipient Transplant Coordinator (RTC) from the joint committee for RTC recognition, the certification of Japanese Board of Renal Transplantation recognized from the Japanese Society for Clinical Renal Transplantation, and the certification of Transplant Physician recognized from the Japan Society for Transplantation are commented and subject matter with the revised Japan Organ Transplant Act in 2009 and future vision of transplant medicine in Japan are discussed.

Key words : kidney transplantation, donor, recipient, Japan Organ Transplant Act (Public Law104, 83), organ transplant network, transplant coordinator, clinical cases and complications, data of organ transplantation in Japan, immunosuppressive therapy, subject matter

スポーツ・身体運動と睡眠

内田　直　　早稲田大学スポーツ科学学術院

要旨：運動をするとよく眠れるようになるということは，ごく当然のことのようにも思われるが，実験研究を行うと，必ずしも明確にそのような結果が出るわけではない．多くの研究を統合すると，一過性の運動よりも運動習慣があることが睡眠の改善には重要であり，深い睡眠である徐波睡眠が増加し，寝つきがよくなり，中途覚醒が少なくなる．一方で，過度な運動はストレス効果によって睡眠に対して，抑制的な効果を及ぼしてしまうということもある．本稿では，これらについて過去の論文と深部体温などの身体的生理学指標を測定した自己の研究を交えて総説した．

Key words：身体運動，睡眠，徐波睡眠，レム睡眠，深部体温

Ⅰ．はじめに

夜間の睡眠は，24時間を通じた人々の日々の生活の一部であり，睡眠の問題を抱えた人たちの治療にあたって，睡眠だけに焦点をあてて医療を行うことは誤りを招くことになる．睡眠と日中の活動との間には相互の関連があり，睡眠が障害されると日中の活動に大きな影響があり，また日中の活動が睡眠に対して影響を及ぼす．日中の活動には精神活動，身体活動などさまざまなものがあるが，その中で，身体活動は一般に睡眠に対して好ましい影響を与える大きな因子であると考えられており，これはさまざまな調査にも，裏づけられている．

たとえば，1988年にフィンランドで行われた1,190名を対象にした質問紙調査[1]では，“よく眠れるための方法はなんですか？”という自由回答形式の質問に対して，33％の男性と30％の女性が“運動（exercise)”と答えている．2003年の米国睡眠財団（National Sleep Foundation：NSF）による「Sleep and Aging」のテーマで行われた調査Sleep in America Polls[2]では，週に一度以上運動をする中高齢者は，ほとんどすべての項目について睡眠の問題が少ないという結果を示している．NSFは毎年このような調査を行っているが，2013年のテーマは，「Exercise and Sleep」[3]で，運動と睡眠に関するさまざまな側面の調査結果を公開している．一方，日本人を対象にした運動と睡眠に関する研究でも，高齢者に昼食後の昼寝と夕方の運動を4週間行わせたところ，睡眠効率が有意に改善したという報告[4]もある．一方で，被験者に日中運動を行わせ，その夜の睡眠をポリグラフを用いて測定するというような実験研究では，運動した日の睡眠の質が著しく改善したというような，非常に明確な結果が必ずしも出ているわけではない．

本稿では，運動と睡眠にかかわるさまざまな側面についてこれまでの研究を紹介し，運動が睡眠に与える影響について総合的に考えてみたい．

Ⅱ．2013年 Sleep in America Polls；Exercise and Sleep

先に述べたようにNSFはSleep in America Pollsと題して，毎年さまざまなテーマで睡眠に関する調査を行っているが，2013年3月上旬に「Exercise and Sleep」というテーマのもとに調査・研究が行われた[3]．本稿のテーマともタイムリーに合致しているので，まずは一般的な意識調査としてもっとも新しいこの調査について概説したい．

この調査は，自記式の質問紙調査で，対象者の主観的な回答のまとめである．したがって，ポリグラフデータなどの結果は含まれていない．回答者は，過去7日間に少なくとも10分間以上の身体運動をしたと考えている人たちで，これらの人たちを，自己申告によ

連絡先：内田　直　sunao@waseda.jp

り，高強度の運動，中等度の運動，低強度の運動，運動なしの4つのレベルに分類している．これらの4つの分類ごとに睡眠，健康に関する特徴を抽出する方法をとっている．高強度とはランニングやサイクリング，水泳など，中等度は，ヨガ，タイチー，筋肉トレーニングなど，低強度はウォーキングを示している．ここではわかりやすいように高，中，低，無とに分け，高，中，低をまとめる場合は運動群とし，無を非運動群として主な結果について紹介する．全対象者1,000名のそれぞれの割合は，高18%，中25%，低28%，無9%であった．この調査の報告書は，ホームページからサマリーをダウンロードすることができるが（http://www.sleepfoundation.org/2013poll），サマリーも94ページに及ぶ長いものであるので，ここでは主なポイントだけを紹介することとする．

1. 主観的な睡眠感

主観的な睡眠が非常によい，比較的よいと回答した人たちの割合は，非運動群が56%であるのに比して，運動群では高83%，中77%，低76%と高く，低強度であっても運動習慣のある人たちは，自覚的な睡眠の質がよいことがわかった．

2. 睡眠時間

平均睡眠時間は，4群ともに比較的類似した長さであり，全体の平均は，ウィークデーで6時間51分，休日で7時間37分であった．また，“あなたが日中もっとも効率的に活動できる睡眠時間はどのくらいですか”という質問に対しては，もっとも短いのは強の7時間10分で，もっとも長いのが非運動群の7時間28分であり，大きな違いは認められなかった．一方で，違いが出たのは主観的に睡眠が足りていると感じている人の割合である．運動群ではウィークデーの睡眠時間が十分足りているという人が70%弱であったのに対して，非運動群では53%と少なかった．これは，休日でも同様で，運動群では83〜90%が十分足りていると答えているのに対して，非運動群は休日でも75%しか足りていると答えていない．

3. 睡眠の質

運動群は，運動をした日に睡眠の質が向上すると感じている割合（高62%，中54%，低49%，無28%）が高い．注目すべきは，運動群の約半数以上が運動強度にかかわらず，運動した日は睡眠の質がよいと感じていることである．また運動群は，運動をした日には睡眠時間が改善するとより多く感じている（高32%，中29%，低30%，無11%）．さらに，前述のように睡眠時間について各群での差がほとんどないにもかかわらず，ウィークデー，休日の睡眠ともに運動群は“毎日，あるいはほぼ毎日よく眠れる”と答える人の割合が高い．

以上が，データ全体の傾向である．次に，個別的な特徴について以下に述べる．

4. 高強度運動をしている人はもっとも睡眠の質がよい

対象者の26%が高強度運動をしていると答えたが，この群が他の運動群に比べてもっとも自覚的に睡眠の質がよいと述べている．具体的には，夜間睡眠中の中途覚醒が少なく，朝の覚醒時の不快感が少なく，早朝に覚醒してその後眠りにつけないという回答が少ない．さらに高では，寝つきがよいという特徴もある．また日中の精神状態の質として，物事を完成させる集中の維持にまったく問題がないという人が高では半数（50%）である一方，非運動群では33%であった．

5. 運動をしない人の睡眠と健康度は低い

睡眠だけではなく，さまざまな健康度も運動をしない人たちは低いことがこの調査からは明らかになっている．高では，自分の健康度がよい，非常によいと答えた人が全体の91%であるのに対して，非運動群では58%であった．また運転中，社会的な活動中に眠気を週に1〜2回以上感じる人の割合が，運動群に比べて非運動群で高かった．Epworth眠気尺度を用いた検討では，日中の眠気がありとした人の割合が非運動群では24%であるのに対して，運動群は12〜15%と低かった．非運動群では，このような睡眠の問題を解決するため昼寝をする回数が多くなり，カフェイン入り飲料を飲む回数が多く，睡眠導入薬などの使用率も高くなっている．この結果，より多くの非運動群が，現状の仕事のスケジュールは十分な睡眠を確保するのに適当でないと考えている．この結果は，運動習慣があると昼間眠くなってしまう，という一部の考え方が誤っていることも示しているとも考えられる．

6. Seehan障害尺度（SDS）

この調査ではSeehan障害尺度も用いている．Seehan障害尺度は，家庭生活，勤務（職業）生活，社会生活の三つの場面で，それぞれの生活を行ううえでの機能的な障害があるかどうかをチェックする自記式質問票である．この調査では，運動と本尺度の項目との関連についても調べている．またこれらに加えて，NSFの調査では，気分についても調査している．

気分については，十分な睡眠をとっているかどうか

にかかわらず，気分が障害されている人の割合は非運動群で高かった．家庭生活の機能については，適度な睡眠がとれていないグループでは運動との関係で一定の傾向はなかったが，適度な睡眠がとれているグループで，非運動群で障害されている割合が高かった．また，SDS 全体，あるいは NSF 調査全体に関しても，適度な睡眠がとれていないグループでは，運動との関係で一定の傾向はなかったが，適度な睡眠がとれているグループでは，非運動群で障害されている割合が高かった．

7．座って過ごす時間と睡眠と健康度

本調査では，座って過ごした過去 1 週間の時間と睡眠の主観的質についても調べている．座って過ごす時間は運動量の測定そのものではないが，座って過ごす時間が多いほど活動量が少ないことを示唆するものと考えられる．10 時間以上座って過ごした人は，睡眠の質，健康度について，比較的わるい，およびわるいと答えた人の割合は，10 時間以下の人に比べて多かった．運動との比較では，非運動群は座って過ごす時間（8 時間 5 分）が運動群よりも（高 6 時間 22 分，中 5 時間 32 分，低 6 時間 27 分）長かった．

8．運動する時間帯と睡眠

就床時刻に近い時間帯の運動は，睡眠に対してわるい影響を与えるとする報告もあるが，この調査では，就床 4 時間以内に中程度あるいは（または同時に）高強度の運動をした人たちが，それ以外の時間帯に運動をした人と大きな差はなかった．

ここに解説した結果をみると，軽運動でも睡眠に対してよい効果があり，さらには気分の向上や集中力の向上に役立っていることがうかがわれる．運動を行う時間帯も，とくに 1 日の中で差はなく，どの時間帯でも睡眠に対してよい効果があるとしている．運動をすると，昼間眠くなってしまうと考えるとすれば，本調査からはこれは誤りであるということになろう．また，ポリグラフなどの生理学的指標は用いていないが，以下に述べる実験的研究結果を裏づける結果も多く含まれている．

一方で，この調査は運動習慣がある人について，運動強度別に睡眠の違いをみている研究とも解釈できる．すなわち，1 回の運動がその夜の睡眠にどのような影響を及ぼすのかをみた研究ではない．したがって，たとえば運動をする時刻についての結論などについては，習慣的に運動をしている人の睡眠の質はよいので，夜間寝る前に運動をして，その影響がわるく出たとしても，運動をしていない人よりはよいという解釈も可能かもしれない．本結果を解釈するうえでは，こういった点についてのいくつかの注意は必要であるが，運動が睡眠に対してよい影響を与えることを示した重要な調査と評価できる．このような結果を前提に，以下の実験研究の結果について考えてみたい．

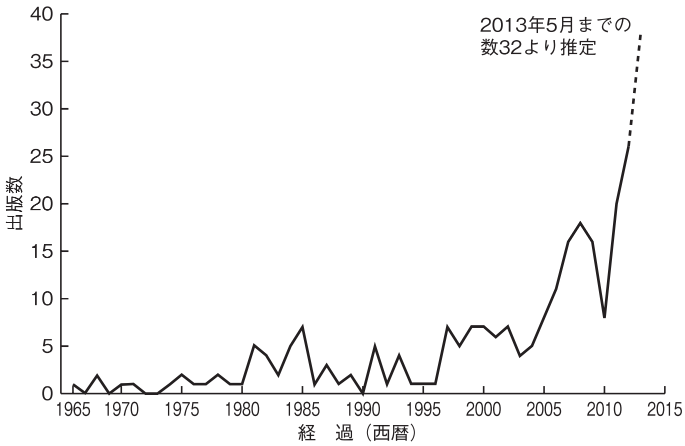


図 1．タイトルに exercise と sleep を含む文献数の推移

Ⅲ．身体運動と睡眠の関係についての これまでの研究

図 1 に PubMed で調べた，表題に exercise（身体運動）と sleep（睡眠）を含む論文の出版件数の推移を示した．この分野でのもっとも古い学術論文は後述する 1966 年のものであるが，2005 年を過ぎたころから論文数は増加し，増減はあるものの最近は非常に増加している．一方で，実際の年間の論文数は，タイトルだけで選択しているとはいえ，20 を超える程度であり，いまだに活発に研究が行われているとはいえない．また論文数増加の一つの要因は，睡眠時無呼吸症候群の運動療法についての論文が増えていることもあり，基礎研究として身体運動がその後の睡眠にどのような影響を与えているのかについての研究はいまだ十分でないとも考えられる．一方，2013 年の 5 月末までにはすでに多くの論文が出版されており，今後この分野がさらに活発になる予兆であると，よろこばしいことである．

さて，運動と睡眠に関するもっとも古い実験結果を示す科学論文は 1966 年の Baekeland と Lasky[5] によるものである．彼らは，10 名の大学生にそれぞれ三つの条件下で睡眠をとらせ，運動の影響をみている．三つの条件とはすなわち，午後の運動（時間帯は論文内で示していない），夜（測定のために実験室にくる直前）の運動，運動をしないである．結果として，午後の運動条件では，運動をしない場合に比して深いノンレム睡眠である徐波睡眠（睡眠段階 3＋4）が有意

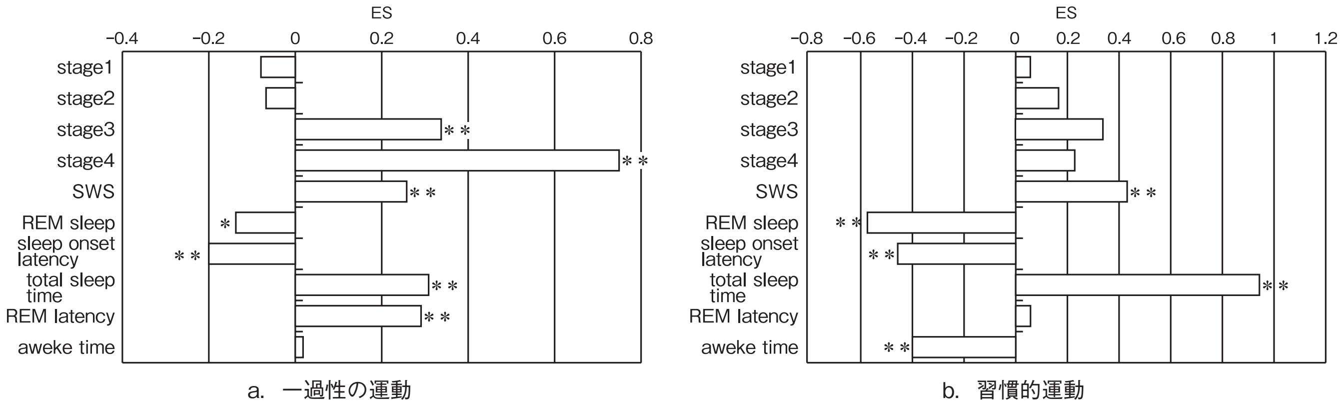


図 2. 一過性の運動（a）と習慣的運動（b）による睡眠変数の変化を，メタアナリシスによる効果の大きさ（ES）で示す（Kubitz らの論文［文献 7］から筆者が図を作成）［$^{**}p$<0.01，$^{*}p$<0.01］.

に多かった．しかし夜の運動では，平均値では午後の運動と運動をしない場合の間であるが，有意な変化はみられていない．この結果について彼らの考察は，①運動は徐波睡眠を増加させる，②睡眠直前の運動は身体的ストレスを与え，徐波睡眠の増加に対してはマイナスの影響を与える，③本研究の被験者が他の研究の被験者よりも，運動をしない基準夜で徐波睡眠の量が多いのは，運動習慣のあるアスリートを対象とした研究であり，運動習慣が徐波を増加させたのであろう，という三点であった．この研究は，運動の種類を統一していない，運動量をコントロールしていない，運動時間もきびしく限定していないなど，さまざまな問題を含んでいるものの，その後の研究で取り上げられた本質的な問題のほとんどの部分を提起している．それぞれについて，その後の研究の結果をみると次のようになる．

最初に，身体運動が徐波睡眠を増加させるのかについて考えてみる．1978 年には Walker ら[6] が，ランニングの運動習慣のある群と，運動習慣のない群の 2 群に，それぞれ，午後ランニング（2.4 km）をした場合，なにもしなかった場合の差を調べた．研究の目的は，この身体運動によって，徐波睡眠が増加するかどうかを検証することにあった．結果としては，視察判定によっても，コンピュータ分析によっても徐波睡眠の増加はみられず，「徐波睡眠–運動仮説」はこの研究からは否定された．しかしながら，ランニング運動習慣のある群は，ない群に比べて，運動をしない日のノンレム睡眠の割合が有意に多く，習慣的な運動が睡眠によい影響を与える可能性が示唆された．Walker らの研究は，午後に 2.4 km のランニングをするという負荷であるが，このような負荷は，とくに運動習慣のあるものには非常に軽微な負荷であり，必ずしも十分な影響を睡眠に与えるものではない可能性がある．

この Walker らの論文では，この時点までに出版された論文を分析しているが，9 つの研究のうち三つの研究でのみ，徐波睡眠が増加したと報告している．

一方で，過去の研究をまとめて，統計をしなおすメタアナリシスによる論文もある．Kubitz ら[7] によれば，メタアナリシスの結果として，一過性の運動も習慣性の運動も，徐波睡眠および総睡眠時間を増加させ，レム潜時（レム睡眠が出現するまでの時間）とレム睡眠時間を減少させるとしている．図 2 は，この論文から著者が作成したものであるが，急性（1 回）の運動と慢性の（習慣的）運動に分けて，その効果を分析している．急性と慢性で，効果の方向はほぼ同じであるが，慢性運動すなわち運動習慣のある人たちは，中途覚醒が少なく，睡眠が安定していることが示唆されている．したがって，Baekeland と Lasky の研究の運動習慣が徐波睡眠を増やし，睡眠を安定させる可能性は，こういったメタアナリシスでの結果とも一致し，現在では，ほぼこの結論が支持されている．さらに，これらの結果は，習慣的な運動はほぼ確実に，また一過性のものでも徐波睡眠を増加させる可能性のあることを示している．しかし，一般に受ける印象ほど，一過性の睡眠が睡眠ポリグラフ検査による睡眠の質を改善させるわけではないということをも示していると考えられた．

適度な身体運動は睡眠の質をある程度改善させるとしても，さらに運動させればより睡眠が改善するということにはならない可能性がある．つまり，過剰な身体運動負荷を与えると，今度は逆にストレス反応を引き起こし，睡眠を悪化させる結果になる可能性もある．これは，先に示した Baekeland と Lasky の論文も示しているところである．過剰な運動負荷が睡眠にどのような影響を与えるのかについての一つの研究例として，Driver らの研究[8] がある．彼女らは，運動をしない，15 km 走を行う，フルマラソン（42.2 km）を走る，ウルトラトライアスロンを走るという 4 条件に

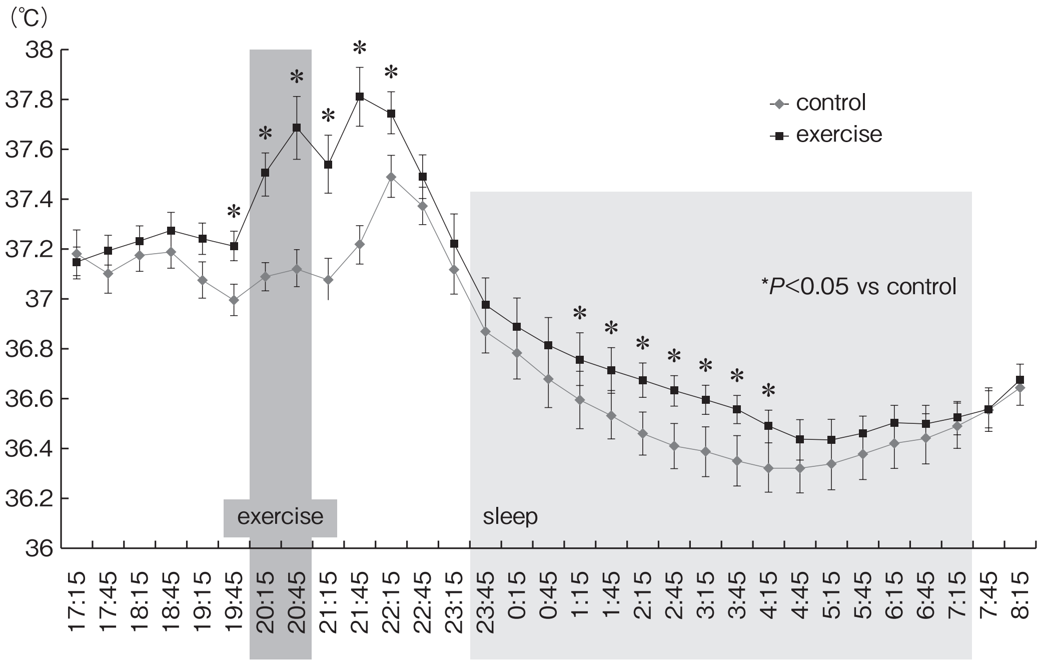


図 3．一過性の運動後の体温の変化．
直腸プローブによって連続的に深部体温（直腸温）を測定した．運動後いったん非運動時の体温と有意差がなくなるが，その後睡眠の前半で有意に体温が高い状態となっている．

ついて，同一の被験者を用いて運動後の睡眠を比較した．その結果，ウルトラトライアスロン以外の 3 条件については，ほぼ類似した睡眠内容であったが，ウルトラトライアスロンでは，睡眠中の中途覚醒が増加し，レム睡眠が減少したことから，身体ストレスによる睡眠の質の悪化が認められたという．この運動は睡眠直前ではないが，過度な身体運動負荷が睡眠に対して阻害的に働くということを示した結果であると考えられる．

一方で，睡眠直前の激しい運動は，必ずしも睡眠に対して抑制的に影響を及ぼさないという報告もある．Youngstedt ら[9]は，16 名の自転車競技選手を対象に，最大心拍数の 65～75% の自転車エルゴメータ運動を 3 時間，3,000 lux の光を浴びながら入眠直前に行わせる条件，および光のみの条件と，通常の睡眠条件の 3 条件をアクチグラムを用いて比較した．その結果，それぞれの条件後の睡眠に，統計的な差がないことを報告している．この研究は，測定法がアクチグラムであり，睡眠ポリグラフ検査による細かい睡眠構造の変化がわからないという弱点がある．

Ⅳ．運動と睡眠中の循環器系の変化，体温

アンケート調査などによる，運動による睡眠感の向上が非常に大きいにもかかわらず，実験による睡眠変数の変化が必ずしも相応するだけ大きいといえないことについて，Youngstedt ら[10]は最近の総説で，若年被験者を用いた研究では，若年者の睡眠はもともと質がよいので，改善の余地が少ないという天井効果（ceiling effect）のためであろうとしている．ここに示した睡眠の評価は主として終夜睡眠ポリグラフによるものであり，中枢神経系の睡眠変数の変化をみている．しかし，睡眠中には，そのほかの身体的な生理学的変化も起きている．この中で，心拍数や体温などの変化について調べた研究もみられる．古い研究では，先に述べた Walker ら[6]が，運動による睡眠中の生理学的指標の変化は，睡眠変数よりも心拍数の上昇が大きいことを指摘している．最近の研究[11]でも，日中の運動が睡眠中の血圧を低下させるという結果を示している．

また，運動による体温の上昇も睡眠中にみられる可能性がある．われわれも 7 名の正常被験者を対象に，睡眠前に高強度運動を行う実験を実施した[12]．図 3 はその結果の一部を示したものであるが，測定した深部体温は，運動後一過性に上昇するが，睡眠直前では対照と有意差がない．しかし，睡眠の前半では有意に高い値を保っている．一方で睡眠ポリグラフ指標に有意な差はなかった．

このような結果を総合的に考えると，運動の睡眠に対する影響は，終夜睡眠ポリグラフによる睡眠変数だけでなく，身体全体の生理学的変化としてとらえることが重要であろう．このような全身的な変化が主観的

睡眠感の向上に貢献している可能性があり，今後の研究が期待される．

Ⅴ．運動が睡眠を促進する可能性を示唆するメカニズム

運動が睡眠を促進するメカニズムについてはさまざまな仮説がある．一般には，睡眠のもつ身体回復という側面から，運動による身体疲労を回復させるために睡眠が促進されるという考え方がある[13]．また，心理学的な側面から，運動が不安のレベルを低下させるというもの，またこれと類似しているが，運動の抗うつ効果によるものも考えられている．とくに，運動の抗うつ効果については，近年研究がすすんでおり[14]，実際にうつ病の治療的効果についても研究が行われている[15,16]．

別の側面は，体温調節という観点からのものである．睡眠前の体温は高く，睡眠中の体温は低下する，この落差が大きいことが睡眠を促進するという仮説[17]に基づいて，運動による睡眠前の体温の上昇が睡眠促進の大きな要因であろうとするものである．また，物質面での変化については，サイトカインの変化についての研究[18]もある．筋活動による筋損傷によって誘導される血中サイトカインの上昇が，睡眠の促進に貢献しているというものである．しかしながら，決め手になるメカニズムについては十分に明らかにされているとはいえず，今後の研究が期待される．

Ⅵ．お わ り に

運動をすれば，よく眠れるということは感覚的には当然であろうとも思えるが，実際に研究を行うと運動と睡眠にはさまざまな側面があることがわかる．現在の研究をまとめると，適度な運動は，徐波睡眠を増加させ，睡眠を安定させ，またレム睡眠が減少すると考えられる．他方，運動強度が上昇し高強度運動になると，ストレス効果によって睡眠が悪化する可能性があるが，高強度といっても，個人の体力レベルや年齢の違いなどがあり，この境目がどこにあるのかなどについては十分にはわかっていない．

また，運動の時間帯についても研究が必要である．すなわち，朝，昼前後，午後，夕方，睡眠直前などさまざまなタイミングで運動をした場合の夜間睡眠への影響ついても，いまだ十分な見解は得られていない．さらには，睡眠の変化についての指標も検討の余地がある．これまでの研究では睡眠の評価に終夜睡眠ポリグラフを用いた研究がなされてきているが，身体運動が夜間睡眠に与える影響については，終夜睡眠ポリグラフによる睡眠段階の変化や脳波の変化だけでなく，幅広く代謝，内分泌，循環系の変化についても調べていく必要があろう．今後は，これらに焦点を当てて，身体全体のシステムとしての睡眠の変化を総合的に調べることも重要であろう．

現状では，適度な身体活動は睡眠を促進し，また不安を軽減させ，気分を改善するという精神面での効用があり，健康科学的な側面からはこれを推進していくことの重要性にかわりはないと考える．一方で，さらにそのメカニズムを明らかにする研究が推進されることが望まれる．

文　献

1) Urponen H, Vuori I, Hasan J et al：Self-evaluations of factors promoting and disturbing sleep；an epidemiological survey in Finland. Soc Sci Med **26**：443–450, 1988.
2) National Sleep Foundation：Executive summary of the 2003 Sleep in America Poll, 2003.
3) National Sleep Foundation：2013 Sleep in America Poll, Exercise and Sleep, Summary of Findings, 2013.
4) Tanaka H, Taira K, Arakawa M et al：Short naps and exercise improve sleep quality and mental health in the elderly. Psychiatry Clin Neurosci **56**：233–234, 2002.
5) Baekeland F, Lasky R：Exercise and sleep patterns in college athletes. Percept Mot Skills **23**：1203–1207, 1966.
6) Walker JM, Floyd TC, Fein G et al：Effects of exercise on sleep. J Appl Physiol Respiratory **44**：945–951, 1978.
7) Kubitz KA, Landers DM, Petruzzello SJ et al：The effects of acute and chronic exercise on sleep；a meta-analytic review. Sports Med **21**：277–291, 1996.
8) Driver HS, Rogers GG, Mitchell D et al：Prolonged endurance exercise and sleep disruption. Med Sci Sports Exerc **26**：903–907, 1994.
9) Youngstedt SD, Kripke DF, Elliott JA：Is sleep disturbed by vigorous late-night exercise? Med Sci Sports Exerc **31**：864–869, 1999.
10) Youngstedt SD, Kline CE：Epidemiology of exercise and sleep. Sleep Bio Rhythm **4**：215–221, 2006.
11) Jones H, George K, Edwards B et al：Exercise intensity and blood pressure during sleep. Int J Sports Med **30**：94–99, 2009.
12) 塩田耕平，後藤一成，内田　直：一過性の高強度無酸素運動が夜間睡眠に及ぼす影響．日臨スポーツ医会誌 **20**：306–315, 2012.
13) Adam K, Oswald I：Sleep helps healing. Br Med J **289**：1400–1401, 1984.
14) Gamble JHP, Ormerod JOM, Frenneaux MP：

Exercise can be effective therapy for depression. Practitioner **252**：19–24，2008.
15）Hoffman BM，Babyak MA，Craighead WE et al：Exercise and pharmacotherapy in patients with major depression；one-year follow-up of the Smile study．Psychosom Med **73**：127–133，2011.
16）Trivedi MH，Greer TL，Church TS et al：Exercise as an augmentation treatment for nonremitted major depressive disorder；a randomized, parallel dose comparison．J Clin Psychiatry **72**：677–684，2011.
17）McGinty D，Szymusiak R：Keeping cool；a hypothesis about the mechanisms and functions of slow-wave sleep．Trends Neurosci **13**：480–487，1990.
18）Santos RVT，Tufik S，De Mello MT：Exercise, sleep and cytokines；is there a relation? Sleep Med Rev **11**：231–239，2007.

Sport, physical exercise and sleep

Sunao Uchida, MD PhD.

Faculty of Sport Sciences, Waseda University

Summary

It has widely been considered that exercise improves sleep quality. However, experimental studies suggest that it is not necessarily a simple scheme. A single bout exercise dose not necessarily improve sleep quality, but habitual exercise dose.

Exercise increases slow wave sleep, shortens sleep latency, and wake after sleep onset in general. However, high intensity exercise could deteriorate sleep quality as it gives physiological stress effect on sleep mechanisms. This article reviews such past studies incorporating our original works.

Key words : exercise, sleep, slow wave sleep, REM sleep, core body temperature

オリンピックとスポーツ医療

柳下　和慶　　東京医科歯科大学スポーツ医歯学センター　医学部附属病院高気圧治療部

要旨：2012年夏，ロンドンオリンピックでは日本選手団の活躍により，過去最多の38種目の競技でメダルを獲得した．2011年「スポーツ基本法」が制定され，文化としてのスポーツが国として明確に位置づけられ，文部科学省マルチサポート事業によるメディカルサポートもメダル獲得に寄与したと評価されている．トップアスリートやロンドンオリンピックにおけるスポーツ医療を紹介し，2020年東京オリンピックも含めた本学のオリンピック事業におけるスポーツ医療も紹介する．

Key words：オリンピック，スポーツ医療，マルチサポート事業

Ⅰ．は じ め に

2012年7月27日～8月12日までの17日間にわたり，ロンドンで第30回オリンピック競技大会（Games of the XXX Olympiad，London，2012）が開催された．204ヵ国・地域から10,931人のアスリートが参加し，26競技302種目でしのぎを削った．日本選手団は過去最多の38種目の競技でメダルを獲得し，彼ら彼女らの活躍に勇気とパワーをもらい，多いにわれわれの心は揺さぶられた．天賦の才能を不断の努力と創意工夫によって開花・発展させ，多くの協力者とともに歩み，全身全霊をもって4年に1回の一瞬の世界の舞台で夢を実現する姿は，深い感動をもたらした．

2020年夏季オリンピック候補として東京が立候補している．2013年9月7日にオリンピック開催地が決定されるが，国民に大いなるパワーと感動をもたらす東京オリンピック開催が望まれる．

オリンピック選手を支える一部門にスポーツ医学・医療がある．今回，オリンピックにおけるスポーツ医療の位置づけについて，とくにロンドンオリンピックでのスポーツ医療事業の実際と，オリンピックに対する文部科学（文科）省プロジェクトを中心に紹介する．また，本学におけるオリンピックサポート事業についても紹介する．

連絡先：柳下　和慶　yagishita.ortho@tmd.ac.jp

Ⅱ．ロンドンオリンピックでの日本選手団の活躍

日本選手団のメダル獲得は，大会初日の柔道60 kg級・平岡拓晃選手の銀メダルからであった．その後，女子柔道では57 kg級の松本 薫選手が金メダル，体操競技では内村航平選手の男子個人総合金メダルと種目別ゆか競技で銀メダル，レスリングでは女子フリースタイル63 kg級の伊調 馨選手，55 kg級の吉田沙保里選手の金メダルなど，多くの日本選手団の活躍があった．競泳チームの活躍は目覚ましく，北島康介選手の男子4×100 mメドレーリレー，女子4×100 mメドレーリレーなど，戦後最多の11個のメダルを獲得した．さらにボクシング，卓球女子団体，フェンシング男子フルーレ団体，バドミントン女子ダブルス，ウエイトリフティング女子，アーチェリー女子団体の活躍も相次いだ．なでしこジャパンサッカー女子は特筆すべき躍進であり，また男子サッカーは4位に終わりメダルを逃したものの決勝トーナメントに進出し，1964年東京オリンピックに次ぐ良績を残した．結果，日本選手団の獲得メダル総数は38個，（金7個，銀14個，銅17個）の過去最多のメダル獲得数となり，入賞競技は80競技に及んだ（表1）．北京オリンピックでは，メダル総数は25個，（金9個，銀6個，銅10個）であり，金メダル数では及ばなかったものの，ロンドンオリンピックでの躍進はすばらしい結果であった（表2）．

表 1．ロンドンオリンピックにおけるメダリスト・入賞者数

	金メダル	銀メダル	銅メダル		4 位	5 位	6 位	7 位	8 位		計
メダリスト・入賞者数	7	14	17	(38)	5	15	7	8	7	(42)	80（入賞者総数：179）

表 2．北京オリンピックにおけるメダリスト・入賞者数

	金メダル	銀メダル	銅メダル		4 位	5 位	6 位	7 位	8 位		計
メダリスト・入賞者数	9	6	10	(25)	8	15	10	9	10	(52)	77（入賞者総数：188）

Ⅲ．スポーツは文化である —スポーツ基本法から

ロンドンオリンピックでは，メディカル部門も含めて，国と文科省からのサポート事業が展開された．背景には，スポーツ立国構想に基づく 2011 年 7 月に制定された「スポーツ基本法」がある．1961 年制定の「スポーツ振興法」を全面的に改定した「スポーツ基本法」は，スポーツを“世界共通の人類の文化”として位置づけ，下記のとおりスポーツ関連活動を文化事業として謳っている．

《「スポーツ基本法」条文》

スポーツは，心身の健全な発達，健康及び体力の保持増進，精神的な充足感の獲得，自律心その他の精神の涵（かん）養等のために個人又は集団で行われる運動競技その他の身体活動であり，今日，国民が生涯にわたり心身ともに健康で文化的な生活を営む上で不可欠のものとなっている．スポーツを通じて幸福で豊かな生活を営むことは，全ての人々の権利であり，全ての国民がその自発性の下に，各々の関心，適性等に応じて，安全かつ公正な環境の下で日常的にスポーツに親しみ，スポーツを楽しみ，又はスポーツを支える活動に参画することのできる機会が確保されなければならない．

スポーツは，次代を担う青少年の体力を向上させるとともに，他者を尊重しこれと協同する精神，公正さと規律を尊ぶ態度や克己心を培い，実践的な思考力や判断力を育む等人格の形成に大きな影響を及ぼすものである．

また，スポーツは，人と人との交流及び地域と地域との交流を促進し，地域の一体感や活力を醸成するものであり，人間関係の希薄化等の問題を抱える地域社会の再生に寄与するものである．さらに，スポーツは，心身の健康の保持増進にも重要な役割を果たすものであり，健康で活力に満ちた長寿社会の実現に不可欠である．

スポーツ選手の不断の努力は，人間の可能性の極限を追求する有意義な営みであり，こうした努力に基づく国際競技大会における日本人選手の活躍は，国民に誇りと喜び，夢と感動を与え，国民のスポーツへの関心を高めるものである．これらを通じて，スポーツは，我が国社会に活力を生み出し，国民経済の発展に広く寄与するものである．また，スポーツの国際的な交流や貢献が，国際相互理解を促進し，国際平和に大きく貢献するなど，スポーツは，我が国の国際的地位の向上にも極めて重要な役割を果たすものである．

そして，地域におけるスポーツを推進する中から優れたスポーツ選手が育まれ，そのスポーツ選手が地域におけるスポーツの推進に寄与することは，スポーツに係る多様な主体の連携と協働による我が国のスポーツの発展を支える好循環をもたらすものである．

このような国民生活における多面にわたるスポーツの果たす役割の重要性に鑑み，スポーツ立国を実現することは，二十一世紀の我が国の発展のために不可欠な重要課題である．

ここに，スポーツ立国の実現を目指し，国家戦略として，スポーツに関する施策を総合的かつ計画的に推進する．

スポーツは positive contents である．昨今の日本のニュース・新聞などメディアでは，社会，政治，経済，国際，教育，環境問題で negative contents が多いなか，スポーツの話題となると，元気，勇気，挑戦などの positive なキーワードにふれることが多い．Creative かつ aggressive な身体・精神活動であるスポーツの話題になれば，positive なエネルギーを創出することをわれわれは経験する．

スポーツは本来 positive contents であり，スポーツが有する positive energy についてより強く意識し，スポーツの価値を認識することはきわめて重要であり，社会がスポーツの positive contents，positive energy を活用することは合理的である．さらにスポーツ競技会の頂点がオリンピックであり，オリンピックの positive contents は，社会全体の positive なエネルギーを創出する重要な要素と考えられる．

Ⅳ．トップアスリートにおけるスポーツ医療

トップアスリートにおける医療は，一般患者と同様の評価診断と治療を基盤としながら，最大の特徴は，最終的な目標・ゴール設定が競技復帰と競技結果にある．そしてトップアスリートにおけるスポーツ医療には，トップアスリートに特徴的な傷害・疾病や特別留意事項がある．

1．トップアスリートにおける医療の特徴

トップアスリートに限らずスポーツ医療の共通点として，患者・選手の治療目的の多くは日常生活動作（ADL）の再獲得ではなく，従前のスポーツ競技への復帰である．さらにトップアスリート医療の特徴として，可及的早期の回復と早期競技復帰，少しでも高いレベルでの競技活動・パフォーマンスと，最終的には競技成績を目標としていることにある．よって，個々の競技別特性もしくは種目別特性を理解したうえで，高いレベルでの身体機能評価，問題点の抽出と解決方法の提示，パフォーマンス再獲得のためのアプローチが重要である．さらに，選手の所属するチーム環境や競技大会スケジュール，チーム内の立場，アスリートとしてのキャリア展望などの社会的背景も，治療や競技復帰時期の目標設定を決定するうえで，きわめて重要な要素である．

トップアスリートは全身の身体能力，精神能力を最大限発揮する．このため，スポーツ医療の対象は全身に及び，整形外科・運動器に限定されず，内科，外科，女性婦人科，脳神経外科，歯科，眼科・皮膚科などの感覚器系科，精神神経科分野など，ほぼすべての診療科に関連する．

スポーツドクターは，傷害・疾病の診断・治療のほか，予防への取り組みが重要である．また，スポーツ選手の全身的に特徴的な問題点を抽出すること，自身の専門分野での適切な評価と治療を行うことは当然ながら，対象分野が広範囲なため，専門分野外では当該専門家への適切な紹介をすることもきわめて重要である．

2．トップアスリートに特徴的な傷害・疾病

スポーツによる傷害，疾病は多数あるが，比較的トップレベル選手で多発する特徴的な傷害・疾病の発生部位は膝関節が多い．全身の中で最大筋肉量かつ最大筋力を発揮する大腿四頭筋は膝蓋骨に付着し強力なトルク負荷を生じ，膝関節は荷重関節でもあることから負担が多い．関節軟骨と半月板損傷は治療に難渋する．膝前十字靭帯損傷はトップアスリートでは再建術による治療が一般的である．また，疲労骨折やオーバーユースも多く，女子選手での疲労骨折例では，無月経，骨粗鬆症，骨代謝異常もまれではない

運動誘発性喘息も多く，大会でのプレッシャーや結果で評価されるきびしい世界なため，精神科疾患も多い．身体的な特徴はスポーツをするうえでアドバンテージとなっても，先天性疾患が潜在する症例もあり注意を要する．

3．トップアスリートにおける特別留意事項

アンチ・ドーピングはトップアスリートに限定するものではないが，ドーピング検査は競技レベル大会以上で実施されることが多い．国際競技大会ではドーピング検査は必須である，

Ⅴ．オリンピックなどの国際競技大会におけるスポーツ医療

スポーツ医療を担当する医事スタッフ・医事部門は，競技種目，競技性，競技日程，競技成績を基盤に，競技力向上を考慮しながら選手のコンディショニング向上や外傷・疾病の治療など選手の健康全般に対処する．

各競技団体は医事部門や医科学部門を有し，大会前，大会期間中，大会後において治療やコンディショニング向上のための医療活動，とくにオリンピックなどの国際競技大会ではチーム・選手に帯同し，時に移動する開催地・会場での現場対応が主たる業務となる．またオリンピックなどの国際競技大会では，主に選手村内に滞在する日本代表選手本部医務班があり，本部医務班と競技団体メディカル部門との緊密な連携を図りメディカル・デンタルサポートを行う．医療チームは医師のほか看護師，トレーナーなどの医療スタッフから構成される．

オリンピックなどの国際競技大会では，選手数に応じた役員スタッフ数が割り当てられる．医療チームのスタッフは役員スタッフに含まれるため，限定された医療チームスタッフ数をどのように配分するかは，日本選手団の重要な戦略となる．ロンドンオリンピックでは，割り当てられたスタッフ枠の中で競技に帯同可能だった医師は，6 競技 8 名のみであり，選手村外の医師 4 競技 4 名を含めても 10 競技 12 名にとどまる．すなわち世界最高峰のオリンピックでも，現場に帯同する医師不在の競技団体が多数あるのが現状である．

Ⅵ．ロンドンオリンピックにおける医療

2012 年のロンドンオリンピックにおける医療活動について紹介する[1~4]．

1．事前準備

a．メディカルチェック

国際競技大会の多くは，大会前メディカルチェックを義務づけている．ロンドンオリンピックのメディカルチェックは，オリンピック代表選手決定前に行われるため，代表候補選手計 548 名（男性 257 名，女性 291 名）が対象となった．メディカルチェックは北区西が丘の国立スポーツ科学センター（JISS）で行われ，

内科（婦人科），整形外科，歯科の診療科目ごとに，active（要治療），follow（要経過観察），inactive（問題なし，もしくは治療ずみ）で評価された．最終的な日本選手団293名（男性137名，女性156名）中，なんらかの診療科でactiveと判定された件数は101例76名（男性27名，女性49名）であった．

b．ドーピングコントロール対策

世界アンチ・ドーピング機構（World Anti-Doping Agency：WADA）が作成するprohibited listに基づき禁止薬物および禁止方法を対象として，大会期間中国際オリンピック委員会（International Olympic Committee：IOC）によるドーピング検査が実施された．選手は選手村開村日～閉会式までの居場所情報を，IOCを通しての申請を要した．ドーピングは選手団組織ではなく選手個人が対象となるため，選手への周知は重要である．治療目的使用の適用措置（TUE）申請を要する選手は，事前提出した．

c．医師登録手続き

ロンドンオリンピックでは，英国の公的医療監査であるGeneral Medical Council（GMC）に登録することで，オリンピック帯同中に自国の選手団に限定して医療行為が可能となった．従来の大会では日本オリンピック委員会（Japanese Olympic Committee：JOC）の証明書により帯同医師の資格認定が行われることも多かったが，ロンドンではGMCへの登録を要した．GMCの登録には，①登録申請書，②大学医学部の卒業証明書（和文・英文），③医師免許証写し，④医師免許証英訳文証明書（厚生労働省），⑤行政処分関係英文証明書（厚生労働省）を要した．

d．マルチサポート事業との連携

ロンドンオリンピックでは，選手村外の選手サポート拠点として「マルチサポートハウス」が設置された．文科省マルチサポート事業の一環で，JISSが中心の夏季オリンピック大会初の村外サポート拠点であり，選手村から徒歩10分程度の場所に，セルフケア・栄養補給などリカバリー・コンディショニング，診療／心理カウンセリング，メディカルケアなどをサポートする複合施設を設置した（後述）．マルチサポートハウス内には，医師，トレーナーが常在し，施設利用の選手のサポートのほか，本部や競技団体との緊密な連携によって選手村外からのメディカルサポートを行った．

2．大会期間中の医療活動

a．選手団メディカルスタッフ構成

ロンドンオリンピックでの日本選手団は293名（男性137名，女性156名），役員は225名であった．医療チームのスタッフは90名で，医師は本部5名（男性4名，女性1名），競技団体の帯同した医師8名（陸上1名，水泳2名，サッカー男子1名，サッカー女子1名，自転車1名，柔道2名）の13名であった．さらに選手村外で支援した医師は4名（ボート1名，バレーボール女子1名，フェンシング1名，トライアスロン1名）であった．帯同トレーナーは，日本選手団として本部に2名，競技団体に帯同したトレーナー23名の25名であり，また，村外のトレーナーは，マルチサポートハウスの29名を含め49名で，計74名であった．北京オリンピックではトレーナーは56名であったが，今回はとくにマルチサポートハウスでのトレーナー数の増加が際立っていた．

b．本部医務班・医務室

選手村の本部医務班は，大会に参加するすべての選手・役員を対象とする健康管理が主な業務であり，さらに大会組織委員会やIOCの定める事務手続きのほか，競技団体専属の医師・トレーナーとの連携や情報共有などの統括作業行う．

本部医務室は，日本人選手宿泊棟の下層階に設置した．選手村宿舎は将来的な有効利用のため，オリンピック終了後分譲もしくは賃貸マンションとして一般人が居住することが前提となっていた．本部医務室も居住設計された3階建てのメゾネットタイプの部屋を衣替えすることで対応した（図1）．

c．選手村内医療施設（ポリクリニック）

選手村内には，各国・地域の共同利用が可能な医療施設（ポリクリニック）があった．救急外来のほか，ほぼ全科を網羅する充実した施設であった．GMC登録医師は，ポリクリニック内の医療施設の使用が認可されており，施設内薬局で医薬品処方も可能である．MRI（3.0T/1.5T各1台ずつ），CT，超音波装置が設置され，放射線科医による読影結果も同日中にフィードバックされる．救急は24時間対応で，それ以外は8時～22時対応であった．

d．大会中の外傷・疾病

帯同医師報告も合わせた日本選手団全体の診療集計では，全受診件数は148例であり，競技別では，サッカー30件，自転車競技23件がとくに目立った．外傷・障害53例のうち，捻挫13例，打撲・血腫12例，筋損傷・肉離れ，靭帯断裂，筋膜・腱膜炎が各4例，その他16例であった．

e．ドーピング検査

日本選手団でのドーピング検査対象は75名で，ドーピング陽性選手はいなかった．IOC報告では，IOCの徹底した競技前検査により，本大会での違反は6件で，その中で競技前検査での発覚が5件であった．

a. 医務室入口

b. メゾネットタイプの部屋を衣替えした診察室

図 1. 日本選手団本部医務室

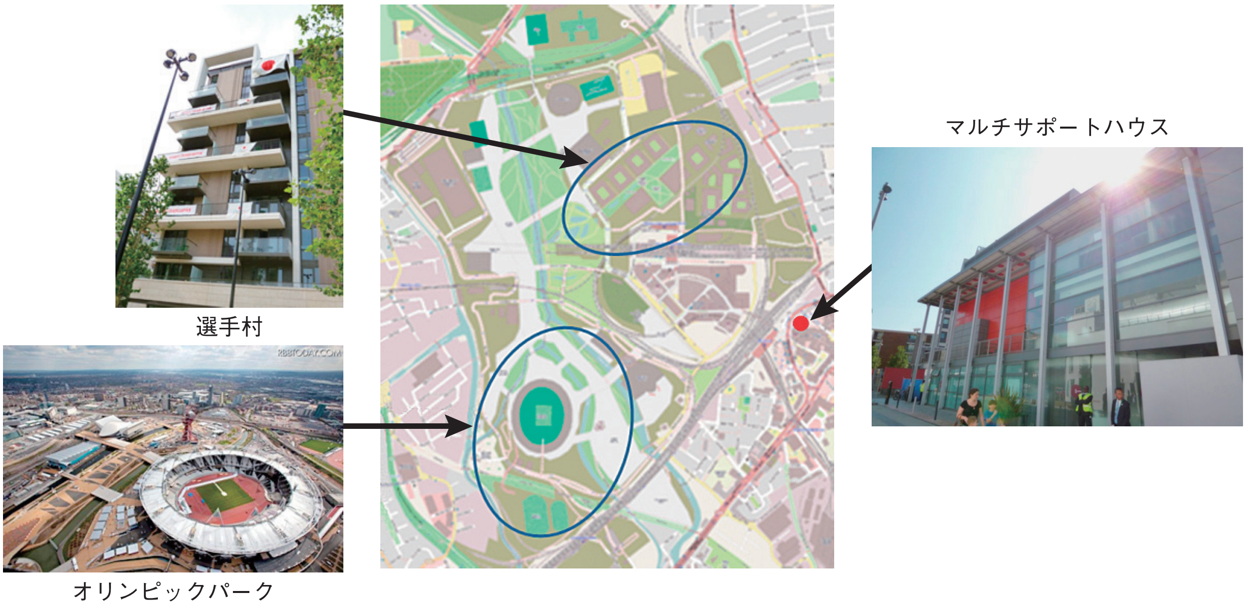


図 2. マルチサポートハウスの設置場所

Ⅶ. 文部科学省「チーム『ニッポン』マルチサポート事業」とロンドンオリンピックでのマルチサポートハウス

文科省はスポーツ基本法に基づき，“世界で競い合うトップアスリートの育成と強化”を一重点事項と位置づけ，その一事業として，2008 年度から「チーム『ニッポン』マルチサポート事業」を展開している．本事業は，第 30 回オリンピック競技大会（2012 年ロンドン）および第 22 回オリンピック冬季競技大会（2014 年ソチ）において，わが国が世界の強豪国・地域に競り勝ち，より確実にメダルを獲得するために，メダル獲得が期待されるトップレベル競技者などに対して，多方面からの専門的かつ高度な支援を戦略的・包括的に行うための事業であり，アスリート支援と研究開発プロジェクトからなる．

ロンドンオリンピックでは，いくつかの特徴的なメディカルサポートがあり，とくにマルチサポート事業のアスリート支援の一環としての村外サポート拠点であるマルチサポートハウスは特筆すべきものであった[2]．JISS が中心となり運営し，本事業は JOC のオリンピック報告書でも，特徴的かつ有効的なメディカルサポートとして高く評価された[4]．

マルチサポートハウスは複合的なメディカルサポートをコンパクトに集約したサポート施設であり，選手村から徒歩 10～15 分程度の場所に，現地の劇場施設を借り切って設置された（図 2）．施設内には GMC 登録をした医師 1 名，看護師 1 名，薬剤師 1 名およびトレーナーが常駐し，選手に対するメディカルサポートのほか，村外で活躍するトレーナーの治療拠点とし

前　目次へ　次

a. 栄養補給メニュー

b–①メディカルケア施設外観

b–②診察室

b–③超音波診断装置

b. メディカルケア施設

c. 心理調整用の個室

d. コンディショニング用炭酸泉

図 3. マルチサポートハウス内施設

て機能した．

メディカルサポートには，セルフケア（ストレッチやアドバイス），リカバリー（栄養補給，交代浴，炭酸泉），コンディショニング，診療/心理カウンセリング（個室の用意：選手村はほぼ相部屋で，一人になるスペースに乏しい），メディカルケア（診察，超音波診断装置など）を用意した（図 3）．栄養補給部門では，日本のシェフが常駐して日本食を提供し，選手の評価は高かった．JISS の電子カルテも利用可能なシステムを整え，過去の履歴を迅速に検索することも可能であった．オリンピック大会後のアンケート結果でも，選手評価はおおむね良好であった．

北京オリンピックの入賞 77 競技に比較し，ロンドンオリンピックでは入賞 80 競技と微増だったにもかかわらず，メダルは 25 個から 38 個となったのは，高確率にメダル獲得を達成したためである．今大会中のコンディショニングの維持が良好だったことが重要な一因であり，マルチサポートハウスによるサポート事業に一定の効果があったとも分析されている．

前 目次へ 次

Ⅷ．ロンドンオリンピックにおける競泳競技のメディカルサポート

ロンドンオリンピックにおけるメディカルサポートの一例として，本大会で11個のメダルを獲得した競泳チームについて，チーフドクター金岡医師の報告を引用して紹介する[3]．

日本水泳連盟医事委員会では，競技大会の救援・支援，選手へのメディカルサポート，教育・啓発・研究活動を行っている．メディカルサポート活動では，選手のコンディショニングおよび障害・疾病の管理，アンチ・ドーピング活動，指定選手のメディカルチェックおよび障害予防プログラムの実践，医事相談活動および調査研究活動などを行っている．

オリンピック競泳選手で過去に競技力が低下した傷害として，足関節捻挫2例，腰椎椎間板性腰痛1例があった．水泳動作時にはバタ足キックにより足部・足関節に負荷が生じ，通常疼痛を自覚しない程度の損傷でも競技力への悪影響があった．また，競泳選手では椎間関節障害，仙腸関節障害，椎間板障害が多くみられ，シドニーオリンピックにおいて1例が椎間板障害によって競技力が低下した．競泳競技では，4月の日本選手権でのオリンピック代表選考前までは各所属チームで管理し，代表選考後は代表チームで管理していたが，2009年から一貫したメディカルサポート体制が整えられた．

調査研究体制も充実させた．トップスイマーは椎間板変性を有するものが多く[5]，水泳時の非荷重環境における不安定性な脊椎に加わる負荷によって促進されると推察されている．このため，脊椎不安定性を改善する体幹深部筋トレーニングが推奨されている．Stabilization トレーニング時の体幹深部筋群の筋活動解析が行われ[6]，体幹深部筋トレーニングの介入の効果と，より科学的根拠に基づいたトレーニング指導が行われるようになった．ロンドンオリンピックでは，体幹深部筋トレーニングが実践され，腰部障害をはじめとする整形外科的障害によって競技力を落とす選手はいなかった．

Ⅸ．東京医科歯科大学におけるスポーツ医療とオリンピック，そして2020年東京オリンピック

2012年4月，東京医科歯科大学のスポーツ医学とスポーツ歯学の融合と，相互協力による発展，新たな研究・診療分野の開発とスポーツ分野の拠点形成を目的として，「スポーツ医歯学センター」が新設された．

ロンドンオリンピックでのメダル獲得38競技中8競技の選手（21%）にスポーツ医歯学センターが積極的に関与し，一部直接的にメダル獲得に寄与した．本学におけるスポーツ医療とオリンピック関連事業を紹介する．

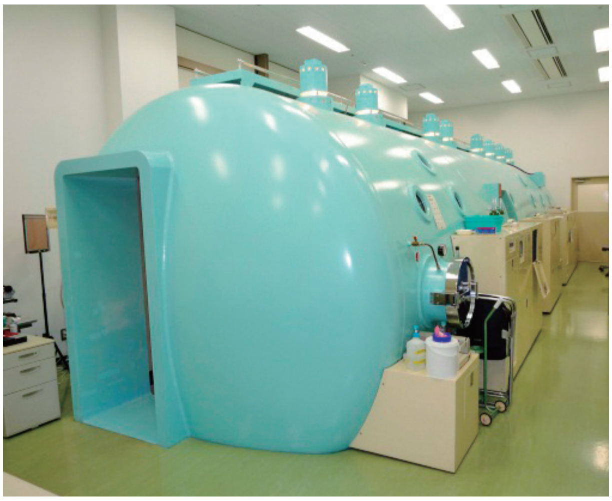


図4．第2種高気圧酸素治療装置

スポーツ医歯学センターおよび医学部附属病院高気圧治療部では，スポーツ選手の軟部組織外傷に対して，高気圧酸素治療（hyperbaric oxygen therapy：HBO）を積極的に適用し，早期回復への特徴的な治療を行っている．HBOは，2気圧以上・60分以上の100%酸素吸入により溶解型酸素量を増大させ末梢組織の酸素濃度を高める治療法であり，本学には16名同時に治療可能な日本最大の第2種高気圧酸素治療装置が設置されている（図4）．

軟部組織外傷では，急性期である炎症期，増殖期，修復期のおのおの創傷治癒段階で酸素は重要である[7~13]．コンパートメント症候群がHBOの適応疾患であるように，受傷部位が腫脹する急性期炎症期では，腫脹軽減や疼痛軽減に対してHBOが有効である．また増殖期では，線維芽細胞の増殖と細胞外基質の合成に酸素が必要であり，修復期においても瘢痕組織形成，膠原線維形成に酸素は重要といわれている．ラット膝内側側副靱帯（MCL）損傷モデルでは2〜4週で最大破断強度の増加が報告され[14~16]，自験例ではラグビートップリーグ選手のMCL2度損傷において，HBOにより約27%の治療期間の短縮，早期競技復帰が可能であった．本学では，ロンドンオリンピック選手もしくは候補選手に対して積極的なHBOを行い，またロンドン現地のHBO施設との連携を大会1年前から準備し，大会開催期間中，数名の外傷に対する現地HBO治療を主導した．

歯学部スポーツ医歯学講座では，顎位・咬合様式と筋力や静的バランスとの関連での研究・臨床を行っており，高いレベルでのスポーツパフォーマンスを実現

a. センター内概視　　b. アスレティックリハビリテーション部門

図 5. スポーツ医歯学センター

東京医科歯科大学

図 6. コンパクトな東京オリンピック会場と，選手村から 8 km 圏内に位置する東京医科歯科大学

するために歯科からアプローチし，またマウスピースやフェイスガードについても先進的医療を提供している．2004 年アテネオリンピックからオリンピック候補選手に対する歯科部門でのメディカルチェックも本学スポーツ医歯学が担当し，JISS で実施している．日本体育協会による「スポーツデンティスト」養成プログラム策定においては，中心的な役割を担った．

医学部附属病院スポーツ医学診療センター・アスレティックリハビリテーション部門では，体幹バランス，体幹機能，コア機能からアプローチする外傷治療の促進，スポーツパフォーマンスの向上，外傷予防に取り組んでいる（図 5）．疲労骨折は単にオーバーユースによって生じるものではなく，全身の静的・動的バランスや体幹機能の関与も大きく，全身・体幹からのアプローチも重要である．アスレティックリハビリテーション部門では，ロンドンオリンピック選手の疲労骨折に対する治療にも寄与した．

また，2011 年度から前述のマルチサポート事業の中のコンディショニングに関する研究・開発に参画し，歯科インプラントおよび医科高気圧酸素治療に関する研究開発に携わっている．

2020 年東京オリンピック・パラリンピック開催については，2013 年 9 月 7 日に IOC 理事会で決定される．東京オリンピックは，平和構築精神の共有と世界平和への貢献，東京精神の共有と現代社会への貢献，2020 年精神としての市民性の共有，オリンピック・パラリンピックの市民性への貢献，スポーツ精神の共有とスポーツ振興への貢献，オリンピック精神の共有とオリンピック運動への貢献を基本理念に掲げ，競技会場の多くは選手村から 8 km 圏内に位置し，コンパクトな会場が重要なコンセプトである．本学附属病院は選手村から 6.6 km に位置し，選手村から 8 km 圏内に位置する大学病院 5 病院なども含めて，後方支援病院に指定されている（図 6）．東京オリンピック開

催時には，日本のみならず世界のトップアスリートに対し，本学のスポーツ医療による支援が期待される．

X．スポーツ医療を支えるスポーツ医学

スポーツ医療の実践にはスポーツ医学による科学的根拠が重要である．スポーツ医学の対象は，整形外科・運動器系，内科，外科，女性婦人科，脳神経外科，歯科，眼科・皮膚科など感覚器系科，精神神経科分野などにおけるスポーツに特徴的な傷害・疾病のみならず，筋力，俊敏性，安定性，協調性，心理的・精神的影響，睡眠，コンディショニング，歯科分野における顎位・咬合，呼吸・循環機能，代謝内分泌，栄養，メディカルチェック，ドーピングとアンチ・ドーピングなどの運動生体力学，運動生理学，運動心理学，運動社会学など，スポーツ医学の対象は多岐に及ぶ．今後，それぞれの分野での科学的根拠の蓄積と新たなアプローチの実践および検証が必要である．

XI．おわりに

Positive contents であるスポーツは国民のプラスの力を創出し，世界最大のスポーツの祭典であるオリンピックにおける創造力はいうまでもなく，2020 年東京オリンピックの実現による社会的影響力は計り知れない．オリンピックにおけるスポーツ医療の重要性に鑑み，本分野の日本における発展と，本学における積極的取り組みが望まれる．そしてオリンピックも含めたスポーツ医療を通じて，スポーツによる文化活動の深化・発展に寄与することが望まれる．

文　献

1） 中嶋耕平：ロンドン五輪におけるメディカルサポート—日本選手団ドクターとして．整スポ会誌 **33**：3–10，2013．
2） 奥脇　透：マルチサポートハウスにおけるメディカルサポート．整スポ会誌 **33**：18–24，2013．
3） 金岡恒治：ロンドンオリンピックのメディカルサポートを終えて—競泳競技におけるメディカルサポート．整スポ会誌 **33**：14–17，2013．
4） 日本オリンピック委員会：医療報告．第 30 回オリンピック競技大会（2012/ロンドン）日本代表選手団報告書，p151–166，日本オリンピック委員会，東京，2012．
5） Kaneoka K，Shimizu K，Hangai M et al：Lumber intervertebral disk degeneration in elite competitive swimmers；a case control study．Am J Sports Med **35**：1341–1345，2007．
6） Okubo Y，Kaneoka K，Iwai A et al：Electromyographic analysis of transversus abdominis and lumber multifidus using wire electrodes during lumber stabilization exercises．J Orthop Sports Phys Ther **40**：743–750，2010．
7） Skyhar MJ，Hargens AR，Strauss MB et al：Hyperbaric oxygen reduces edema and necrosis of skeletal muscle in compartment syndrome associated with hemorrhagic hypotension．J Bone Joint Surg **68-A**：1218–1224，1986．
8） Strauss MB，Hargens AR，Gershuni DH et al：Delayed use of hyperbaric oxygen for treatment of a model anterior compartment syndrome．J Orthop Res **4**：108–111，1986．
9） Nylander G，Nordstrom H，Lewis D et al：Metabolic effects of hyperbaric oxygen treatment in post-ischemic muscle；a quantitative morphological study．Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg **22**：31–39，1988．
10） Nylander G，Lewis D，Nordstrom H et al：Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen．Plast Reconstr Surg **76**：596–603，1985．
11） Sümen G，Cimit M，Erolu L：Hyperbaric oxygen treatment reduces carrageenan-induced acute inflammation in rats．Eur J Pharmacol **431**：265–268，2001．
12） 柳下和慶，山見信夫，外川誠一郎ほか：足関節捻挫に対する高気圧酸素療法の有効性．日整外スポーツ医会誌 **27**：351–355，2008．
13） LaVan FB，Hunt TK：Oxygen and wound healing．Clin Plast Surg **17**：463–472，1990．
14） Mashitori H，Sakai H，Koibuchi N et al：Effect of hyperbaric oxygen on the ligament healing process in rats．Clin Orthop **423**：268–274，2004．
15） Horn PC，Webster DA，Amin HM et al：The effect of hyperbaric oxygen on medial collateral ligament healing in a rat model．Clin Orthop **390**：238–242，1999．
16） Ishii M，Deie M，Adachi N et al：Effects of different exposures of hyperbaric oxygen on ligament healing in rats．J Orthop Res **20**：353–356，2002．

Sports medicine and sports dentistry for the Olympic games

Kazuyoshi Yagishita

Director, Center for Sports Medicine and Sports Dentistry
Hyperbaric Medical Center, University Hospital of Medicine
Tokyo Medical and Dental University

Summary

The Japanese national team gained the 38 medals in London Olympic Games 2012, which was the largest number of the medals in the Japanese Olympic Games history. In this article, activities of sports medicine and sports dentistry related with the Olympic Games, especially with the London Olympic Games 2012, are introduced.

The national team of the London Olympic Games was consisted of 293 athletes and 225 staffs, including 5 IOC- (International Olympic Committee) approved medical doctors. In addition, 12 medical doctors supported belonging to each team or at the Multi-Support House. The Multi-Support House was planned by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and located at very near from the athlete's village and the main stadium. The Multi-Support House provided multi aspect contents for athlete supports including nutrition, physical condition and mental condition. The Multi-Support House was considered to contribute to athletes and to get many medals.

In London Olympic Games 2012, University Hospital Medicine and Dentistry, Tokyo Medical and Dental University supported the medalists in 8 out of 38 athletic events, especially at Hyperbaric Medical Center. In 2020 Olympic Games, Tokyo Metropolitan is the candidate city and our university would be a support facility because of the near location of 6.6 km from the athlete's village. I hope this project will come true for development of our university, Japanese people, and Japanese culture.

Key words：Olympic games, sports medicine, sports dentistry

お茶の水醫學雜誌　61：259-276（2013）

アレルギー性内因性感染症としてのサルコイドーシス

江石　義信　　東京医科歯科大学大学院人体病理学分野

要旨：サルコイドーシスは原因不明の全身性肉芽腫疾患で，病変部から分離培養可能な唯一の微生物であるアクネ菌（*Propionibacterium acnes*）がもっとも有力な原因細菌として注目されている．本稿では，これまでの研究経緯から想定されるアレルギー性内因性感染症としてのサルコイドーシスの病因論を概説する．アクネ菌は外部環境から経気道的に侵入して不顕性感染することから，サルコイドーシスにおける初発病変は症状の有無にかかわらず肺や肺門部リンパ節であると考えている．細胞内に不顕性感染したアクネ菌は，細胞壁を欠失した冬眠状態で潜伏感染している．これらの臓器に細胞内潜伏感染するアクネ菌は，なんらかの環境要因を契機に内因性に活性化し細胞内増殖する．宿主要因として本菌に対するアレルギー素因を有する患者では，アクネ菌の細胞内増殖を契機に過度の Th1 型免疫反応が起こり，感染型アクネ菌の拡散防止を目的とした肉芽腫形成が起こる．細胞内増殖のおりに肉芽腫による封じ込めを逃れた感染型アクネ菌は，病変部局所において新たな潜伏感染を引き起こす可能性がある．さらにリンパ向性あるいは血行性に広がり，眼，皮膚，心臓を含む肺外の全身諸臓器に新たな潜伏感染を起こす可能性もある．全身に拡散した潜伏感染を背景として，同様な環境要因を契機に再び内因性活性化は起こりうる．その場合，新たな潜伏感染局所でも同時多発的にアクネ菌の細胞内増殖が起こり，その結果として全身性肉芽腫形成を特徴とするサルコイドーシスの病態が形成されるものと考えている．細胞内アクネ菌に感受性のある抗菌薬の投与は，細胞内増殖菌の殺菌作用や内因性活性化の防止効果により，肉芽腫形成の抑制や予防に効果があるかもしれない．また，本症の完全緩解を目指すためには，活性化状態にある菌を抑制するだけではなく，代謝活性を低下させて生き残りを図る細胞内持続感染状態のアクネ菌も含めて除菌する必要がある．

Key words：肉芽腫，細胞内感染，アレルギー，潜伏感染，内因性活性化

I．はじめに

サルコイドーシスの病因に関しては，すでに国際的に合意の得られた基本的な考え方が提唱されている[1]．すなわち本症は，疾患感受性を有する患者が，なんらかの環境要因を契機に特定の原因物質に暴露されて発症するものと考えられている．このような考え方からすれば，サルコイドーシス病因論においては，病原体としての起因物質，疾患感受性としての宿主要因，発症をトリガーするなんらかの環境要因，これら三つの要因を想定する必要がある．仮に微生物が関与していたとしても単純な感染症ではない．これまで数々の感染因子に関して検索がなされてきたが，サルコイドーシス起因物質がどのようなものであるか最終的には確定されていない．

サルコイドーシスが結核と似ていることから欧米では長年の間，結核菌がサルコイドーシスの原因細菌として疑われてきたが，病変部から結核菌が培養されることはなく，肉芽腫内に結核菌を証明したとする報告もない．日本では 1978～1984 年にかけて旧厚生省難病研究班により徹底した微生物学的検索が行われた結果，病変部リンパ節からアクネ菌（*Propionibacterium acnes*）が約 8 割の症例で分離培養され，結核菌やそのほかの微生物はまったく検出されなかった．ところがアクネ菌は皮膚に常在する偏性嫌気性 Gram 陽性桿菌であり，しかも他疾患検体からも約 2 割の症例でアクネ菌が分離培養されてきたことから，本菌を原因細菌と確定するにはいたらなかった．

今回，筆者らの研究グループは，独自に開発したア

連絡先：江石　義信　eishi.path@tmd.ac.jp

クネ菌特異的な抗体を用いて病変部組織を解析し，日本およびドイツのサルコイドーシス患者の約8割前後で，病変部肉芽腫内にアクネ菌が局在していることを病理組織学的に証明した．異物肉芽腫はもとより，結核やらいなど感染性微生物が原因となる肉芽腫疾患においては，その原因物質は肉芽腫内に存在することが原則となる．サルコイドーシス肉芽腫細胞内にアクネ菌の存在を同定した本研究成果は，健常人の皮膚毛包内に細胞外棲息しニキビの原因として知られていたアクネ菌が，原因不明の難病サルコイドーシスにおいて原因細菌となっていることを示す決定的な知見となり，結核菌原因説が主流であった欧米諸国においてもアクネ菌原因説が注目されることになった．本研究成果は，2012年5月にプレスリリース[2]され，アメリカ・カナダの病理学会機関雑誌である「Modern Pathology」にオンライン版[3]で発表された．

本稿では，アクネ菌の内因性感染が原因となり過敏性免疫反応を引き起こす結果として本症が発症するというアクネ菌病因説の研究経緯を紹介する．常在菌が，いわゆる日和見感染ではなく，その菌体成分に対する過敏性免疫反応を原因として疾病を引き起こしうるというアレルギー性内因性感染症の概念は，サルコイドーシスの病因論だけにとどまらず，感染症が疑われながらいまだ原因が不明のままとなっている他の多くの難治性疾患の原因を追求するうえで，われわれが念頭においておくべき重要な病理総論であると考えている．

Ⅱ．サルコイドーシスとは

日本において難病指定を受けているサルコイドーシスは，その発見以来130年以上が経過した現在においても原因不明とされる全身性肉芽腫疾患である．患者数は年々増加傾向を呈しており，厚労省への登録患者数は2008年の時点で約2万人に達する．不思議な現象ではあるが，本症患者の約7割は発症後2年以内に自然寛解することから，サルコイドーシス発症患者数は実際にはかなりの数にのぼると推定される．発症年齢のピークは男性で20歳代後半，女性では20歳代後半と60歳代前半に二峰性のピークを呈する．

サルコイドーシスは全身諸臓器に肉芽腫が形成され多彩な臨床症状を呈する．両側肺門部のリンパ節腫脹は診断現場ではBHL（bilateral hilar lymphadenopathy）と呼ばれる．BHLは患者の9割以上に認められ，本症に特徴的な所見である．これは全世界に共通するサルコイドーシスの特徴で，後に述べる本症の病因論とも関連する重要な現象である．胸部単純X線像でははっきりしない場合も多いが，経気管支的に肺生検を行うと，多くの患者で末梢肺組織にも粟粒結核のような多発性の肉芽腫形成が認められる．組織像でみると，直径200 μm程度の小型の肉芽腫がリンパ節や末梢肺組織に多数認められる．

サルコイドーシスは概して良性の経過をたどるが，約3割の患者では慢性化や再発を繰り返す．肺の炎症が長期にわたり繰り返された症例では，間質の線維化が進行して肺線維症を呈し呼吸不全により死にいたることもある．わが国ではとくに中年女性の患者において心臓サルコイドーシスによる死亡例が多い．炎症後の線維化が生じると不可逆的な伝導系ブロックや不整脈が起こり，突然死の危険性もあることから，ペースメーカーの装着を余儀なくされる場合も多い．また広範な心筋の線維化は，心室拡張を伴う心不全を生じ死にいたる場合も多い．時に特発性拡張型心筋症と誤診される場合もあるので注意を要する．

心臓，眼，皮膚をはじめとした肺外サルコイドーシス病変の出現はきわめて多彩であり，どの臓器がおかされるかは症例によって異なる．眼では角膜の裏側や光彩，とくに隅角を主体として肉芽腫形成が認められ，緑内障を呈することもある．病変はより深部の硝子体や網膜にも形成される．皮膚では肉芽腫形成により隆起性あるいは局面形成型の病変を呈するが，肉芽腫のできる深さによっては肉芽腫かどうか肉眼ではわからない場合も多い．脾サルコイドーシスは無症状であることが多く，他疾患の検査過程で偶然発見されることも多い．脾臓に多発性の結節病変を生じて癌の転移を疑われることもある．腎臓サルコイドーシスは尿細管を巻き込むように間質主体に肉芽腫が形成され，腎機能障害として発見されることが多い．中枢神経系では，とくに視床下部・下垂体症状を呈するのが典型的で，脳表や脳実質に肉芽腫が形成されるとしびれや麻痺などの神経症状があり，ときに脳腫瘍を疑われることもある．末梢神経系の症状は多彩で，顔面神経麻痺は典型的であるが，筋肉症状や知覚過敏などの異常は不定愁訴との鑑別が困難な場合も多い．胃のサルコイドーシスはまれではあるが，消化器の中ではもっとも頻度が高い．自覚症状がなく偶然発見される場合も少なくない．小腸や大腸の病変もまれであり，Crohn病とは明らかに異なる病態を呈する．肝臓病変は無症状のことが多く，とくにアルカリホスファターゼやγ-GTPなどが上昇する．骨病変は四肢末梢骨に多く，痛みを伴うことも多い．関節は変形を伴わずに腫脹し，痛みを自覚することもある．筋肉病変は，こむら返り，筋力低下，筋肉痛などが主に下肢に出現し，筋肉に腫瘤を自覚することも多い．

Ⅲ．肉芽腫形成の病理学総論

サルコイドーシスで認められる類上皮細胞肉芽腫は免疫肉芽腫の典型像である．十分に成長・分化した類上皮細胞の形成と Langhans 巨細胞の出現は，起因物質に対する生体側の活発な Th1 型免疫反応の存在を示唆している．サルコイドーシスでは起因物質が不明ゆえにアレルギー素因としての患者の免疫異常だけが強調され，リンパ球や Th1 サイトカインを主体にその病因が論じられていた時代もあった．感作リンパ球が血行性に播種することで肉芽腫が全身に広がると主張するものもいたほどである．

感作リンパ球の存在は確かに重要ではあるが，肉芽腫形成をトリガーするのはあくまでも起因物質の存在であり，これを取り込んだマクロファージなど抗原提示細胞が存在する局所に感作リンパ球が動員されることで，その後の Th1 型免疫反応が展開される．サルコイドーシスにみるような壊死を伴わない成熟した類上皮細胞肉芽腫が形成されるためには，起因物質が細胞毒性に乏しく抗原性に富んでいるだけではなく，肉芽腫形成の駆動力となる Th1 型免疫反応が持続性に維持されている必要がある．

サルコイドーシス肉芽腫は，未知の起因物質に対する患者のアレルギー素因を背景に，強い Th1 型免疫反応が誘導される結果として形成される．したがって，未知の起因物質が検出されるとすれば，それは肉芽腫内やその周囲の炎症細胞内に認められる可能性が高い．

Ⅳ．病変部からアクネ菌を分離

故本間日臣教授を班長とする厚生省難病研究班プロジェクトチームは，サルコイドーシスの生検罹患リンパ節の組織懸濁液を各種培地で培養するとともに，無菌マウスおよびヌードマウスに接種した後，各臓器を同様に培養した．それはすべての細菌類，ウイルス類，真菌類の関与を一つひとつ除外検索することから始められた．

1970 年代研究初期には 24 例中 54% にアクネ菌を分離し，さらに全国施設からの 40 例においても 78% に分離された．しかし，結核菌やその他の微生物はまったく分離されなかった．さらに，培地の改良により分離頻度は 92% と上昇し，活動性サルコイドーシス患者病巣材料からはほぼ全例で分離された．一方では，本症患者以外の生検リンパ節からも 150 例中 25% に分離されたが，本症に比べて低率であり，分離される菌量も微量であった [4]．

これらの培養成績から，本邦ではアクネ菌がその原因細菌として一時期注目を集めたが，本菌の分離結果に疾患特異性が認められないことや，本菌が皮膚の常在菌でもあり，コンタミネーションを完全には否定できないなどの理由から，その病因的因果関係に関しては，その後長年にわたり展開がみられなかった．

Ⅴ．病変部に多量のアクネ菌 DNA を検出

1999 年 7 月に定量系 PCR 法を用いた日本人サルコイドーシス患者の解析結果が「Lancet」に掲載され [5]，

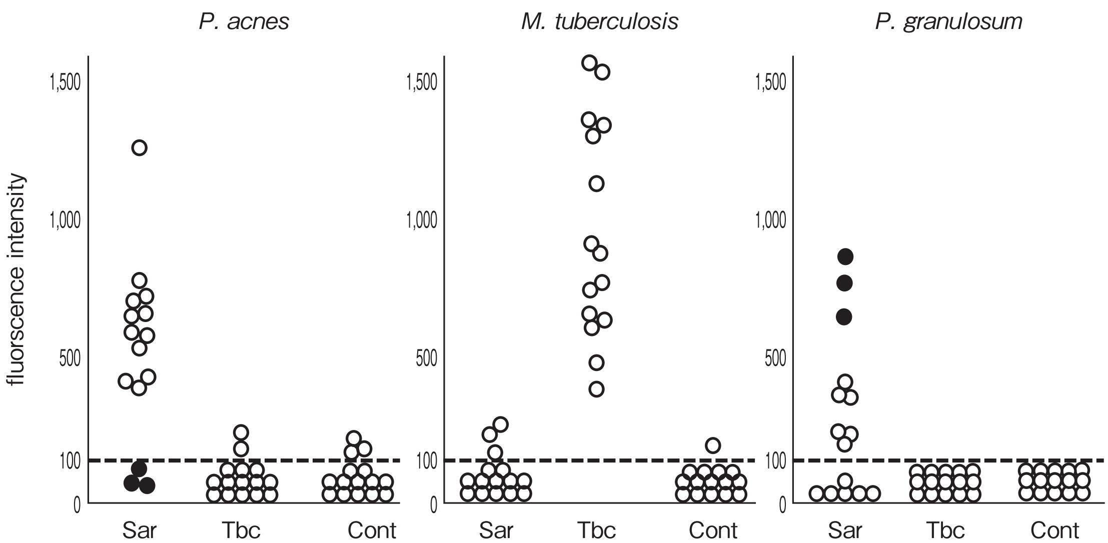


図 1．サルコイドーシス病変部リンパ節におけるアクネ菌 DNA の定量解析

サルコイドーシスリンパ節（Sar），結核性リンパ節（Tbc），および胃癌手術時に切除された転移のないリンパ節（Cont）を対象に，QPCR 法により細菌 DNA 量を定量解析した結果．横破線は検出限界を示し，これ以上を陽性と判定した．●はアクネ菌陰性で *P. granulosum* が検出されたサルコイドーシス検体を示す．

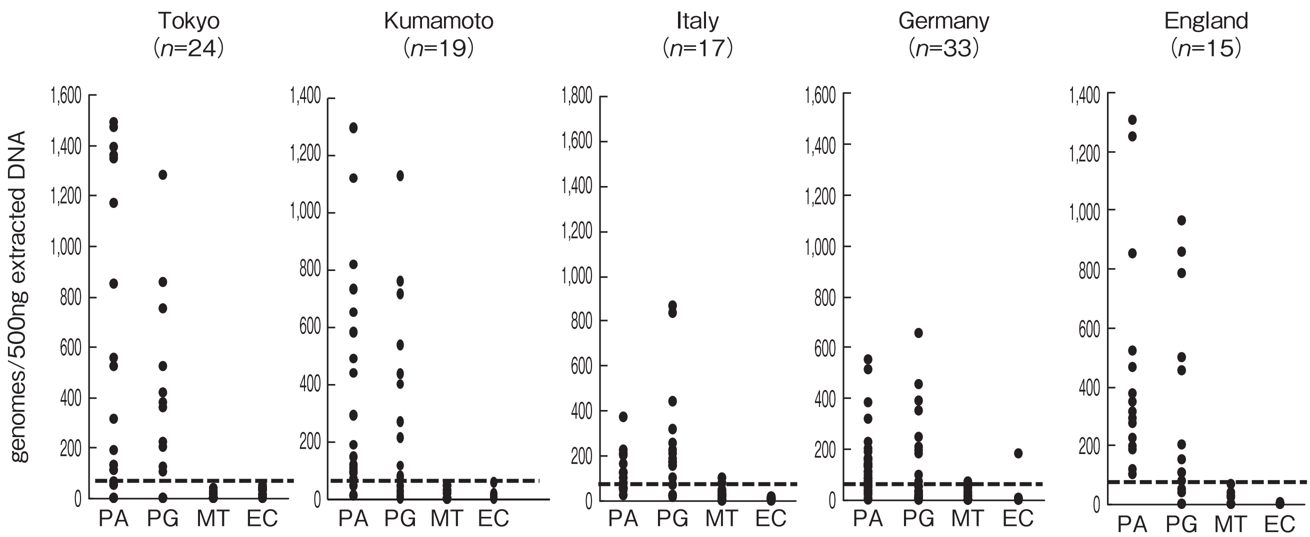


図 2. 国際共同研究によるサルコイドーシス病変部リンパ節の解析結果
日本および欧州 3 ヵ国の施設から供与されたサルコイドーシスリンパ節検体に含まれる細菌ゲノム数を real-time PCR 法で定量解析した結果．横破線は検出限界を示し，これ以上を陽性と判定した．PA：*P. acnes*，PG：*P. granulosum*，MT：*M. tuberculosis*，EC：*E. coli*.

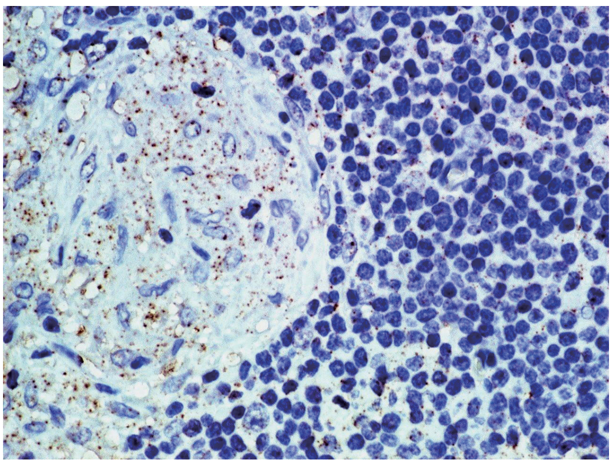


図 3. サルコイドーシス肉芽腫内に検出されるアクネ菌 DNA
Catalysed reporter deposition（CARD）という新しいシグナル増幅法を用いた高感度の ISH 法を用いることにより，アクネ菌 DNA が肉芽腫内に集積して存在することが証明された.

本症とアクネ菌の関係は再び注目を集めた．本症リンパ節からは，アクネ菌あるいは，同様の皮膚常在菌である *P. granulosum* 由来の DNA が例外なく検出され，その検出量は結核症における結核菌 DNA 量に匹敵するほど多量であった（図 1）．先の培養結果と同様，対照群リンパ節でも一部にアクネ菌が検出されたが，その検出量は微量であった．この報告を受けて，同年 11 月に熊本で開催された国際サルコイドーシス学会では国際共同研究（図 2）が企画され，結核菌原因説が主流である欧米諸国の患者においてもアクネ菌が原因となっている可能性が提唱された [6]．

その後，高感度 ISH 法を用いた解析（図 3）から，アクネ菌 DNA が肉芽腫内部に集積して存在することも明らかとなった [7]．本菌の病変内局在に関する知見は，これが肉芽腫の形成に積極的に関与していることを強く示唆している．

Ⅵ. 病変部に細胞壁欠失型アクネ菌を同定

病変部リンパ節の組織懸濁液をマウスに免疫することで，肉芽腫内部に存在するサルコイドーシス起因体に対し単クローン抗体が作成された．本抗体は，結核菌や他の一般細菌類とはまったく反応せずアクネ菌と特異的に反応する．

サルコイドーシス病変部に反応するアクネ菌・単クローン抗体はこれまでに 2 種類が完成している [3]．PAB 抗体はアクネ菌に特異的な抗体で，菌体細胞膜から細胞壁を貫いて分布するリポタイコ酸と呼ばれる糖脂質抗原を認識する．他方，TIG 抗体もアクネ菌に高い特異性を示し，細胞質内に多量に存在するリボゾーム結合性シャペロン蛋白トリガーファクターを認識する．二つの抗体はいずれも，結核菌を含むマイコバクテリアには反応せず，他の一般細菌ともまったく反応しない．

サルコイドーシスリンパ節に高率に出現する抗酸性の大型紡錘形小体（図 4）は，Hamazaki–Wesenberg（HW）小体と呼ばれ，古くから本症病因との関連性が指摘されてきた．形態学的には冬眠型の L 型結核菌に類似しているともいわれる [8]．

今回作成したアクネ菌特異的な二つの抗体は HW 小体に強い陽性反応を示す．免疫電顕を用いた解析では，小体外周を取り巻くように PAB 抗体が陽性となり，小体内部領域には細胞内リボゾームの分布に一致

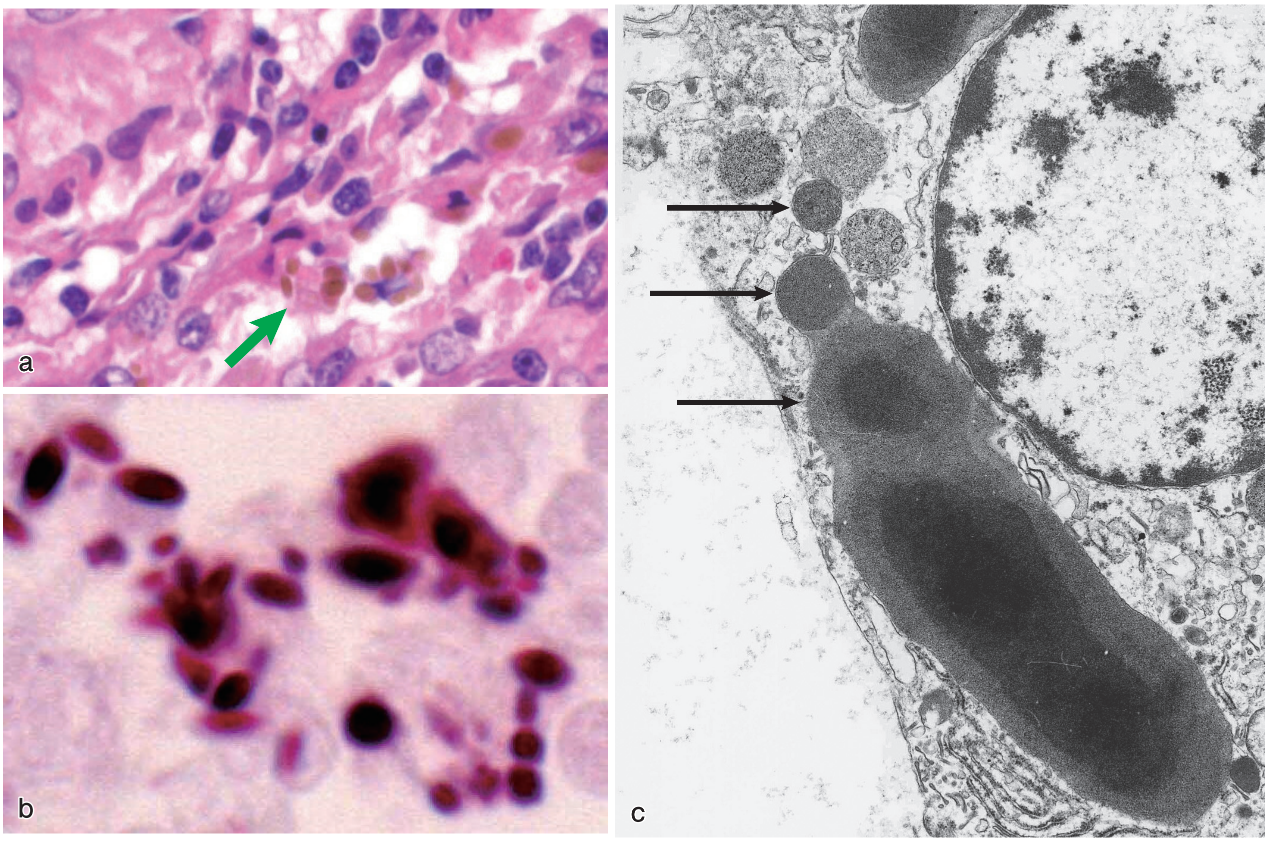


図 4. サルコイドーシスリンパ節に出現する細胞内封入体
HW 小体は過形成を呈するリンパ洞のマクロファージ細胞内に認められる細胞内封入体で，HE 染色標本（a）では黄褐色調（矢印），Fite 染色（b）で強い抗酸性を呈し，電子顕微鏡像（c）ではときに出芽様の分裂像を呈する（矢印）.

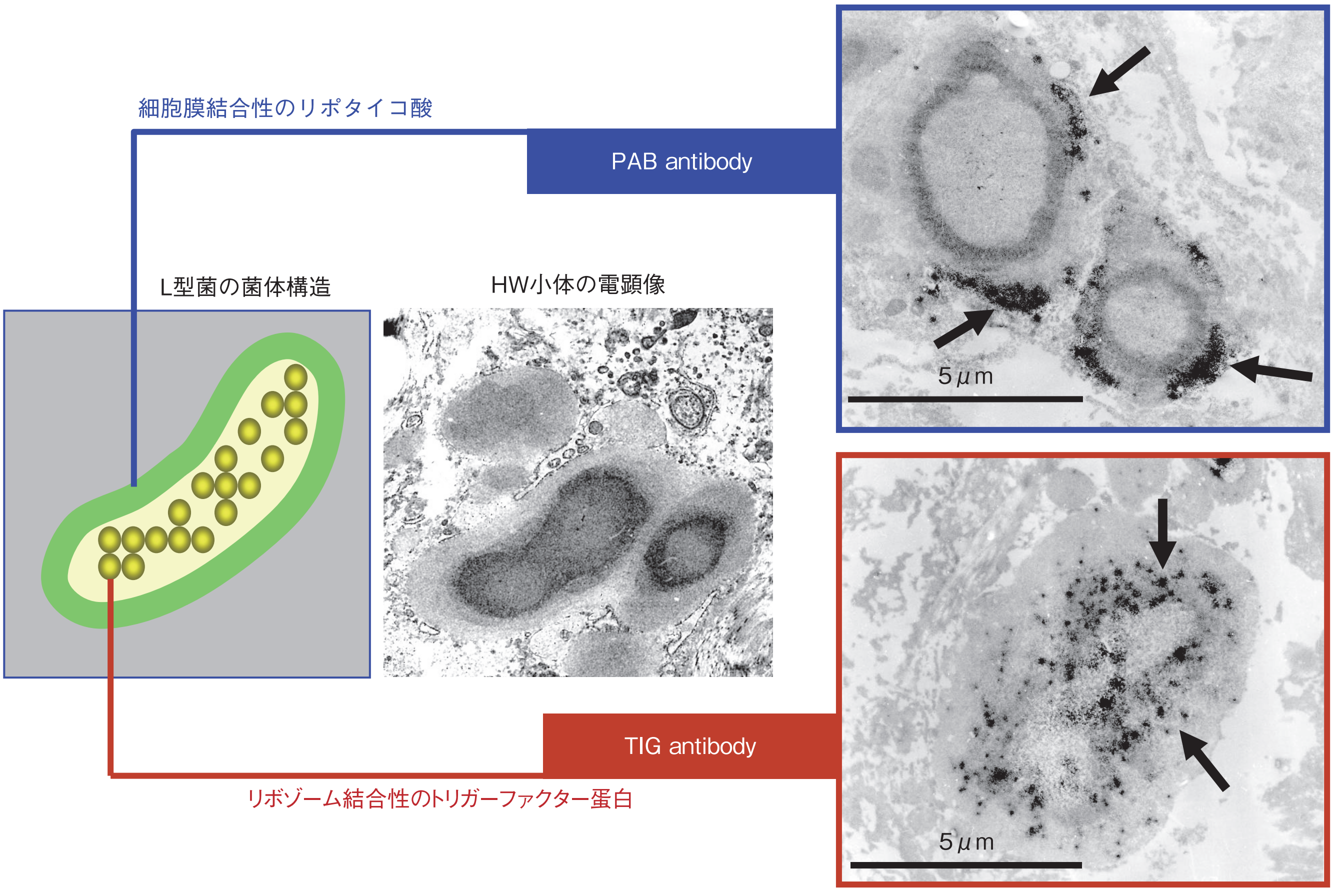


図 5. 免疫電子顕微鏡法による細胞壁欠失型アクネ菌の証明
電顕観察で HW 小体に細胞壁成分は確認できないが，細胞膜結合性のリポタイコ酸は小体の外周を取り囲むように分布し（矢印），リボゾーム結合性のトリガーファクターは小体の内部領域全体にわたりドット状に分布している（矢印）．異なる局在形式を呈する 2 種類の菌体抗原の分布様式が通常細菌とまったく同様であり，これが細胞壁欠失型のアクネ菌そのものである可能性が高い.

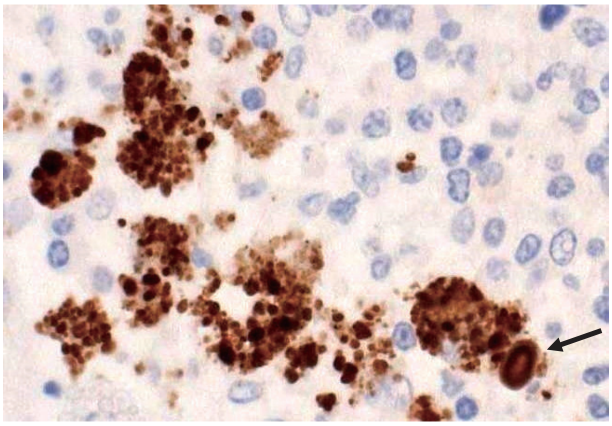


図 6．アクネ菌のマクロファージ細胞内増殖所見
サルコイドーシスリンパ節の T 細胞領域に認められたアクネ菌の細胞内増殖所見で，肉芽腫形成のもっとも初期の病変と想定している．集簇するマクロファージの中に PAB 抗体で陽性となる小型で円形の顆粒が細胞内に充満して認められる．一部（矢印）に HW 小体様の大型紡錘形小体が認められる（PAB 抗体による免疫染色）．

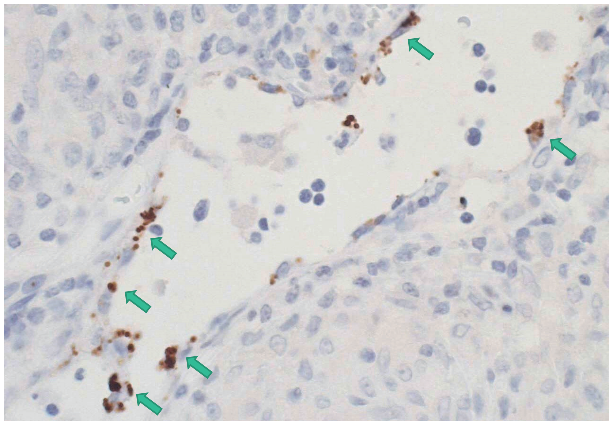


図 7．感染型アクネ菌のリンパ管内皮細胞への潜伏感染
サルコイドーシスリンパ節のリンパ管内皮に認められた PAB 抗体の陽性像（PAB 抗体による免疫染色）．小型円形の感染型アクネ菌が細胞外に漏れ出たあとリンパ流にのってリンパ管内皮細胞に取り込まれたものを想定している．

表 1．各種罹患臓器におけるサルコイドーシス肉芽腫内での PAB 抗体陽性率

臓　器	採取法	総　数	陽性数	陽性率（%）
リンパ節	生検	81	71	88
肺	VATS	27	20	74
皮　膚	生検	23	19	83
脾　臓	手術	6	5	83
脳・神経	生検	6	6	100
心　臓	切除生検	6	5	83
骨格筋	生検	7	7	100

して TIG 抗体がドット状に陽性となることから，HW 小体が単一のアクネ菌体そのものであることがわかる（図 5）．電顕観察ではこれらの病変部アクネ菌は，通常型細菌が有する細胞壁構造を欠失しており，L 型細菌に特徴的な出芽様分裂像を呈する．

病変部マクロファージ内に充満する PAB 抗体陽性の小型円形小体（図 6）も，大型紡錘形 HW 小体から出芽様に分裂増殖した L 型アクネ菌そのものであり，本菌の細胞内増殖を示唆する所見である．サイズや形態の多様性は L 型細菌の特徴でもある．また，

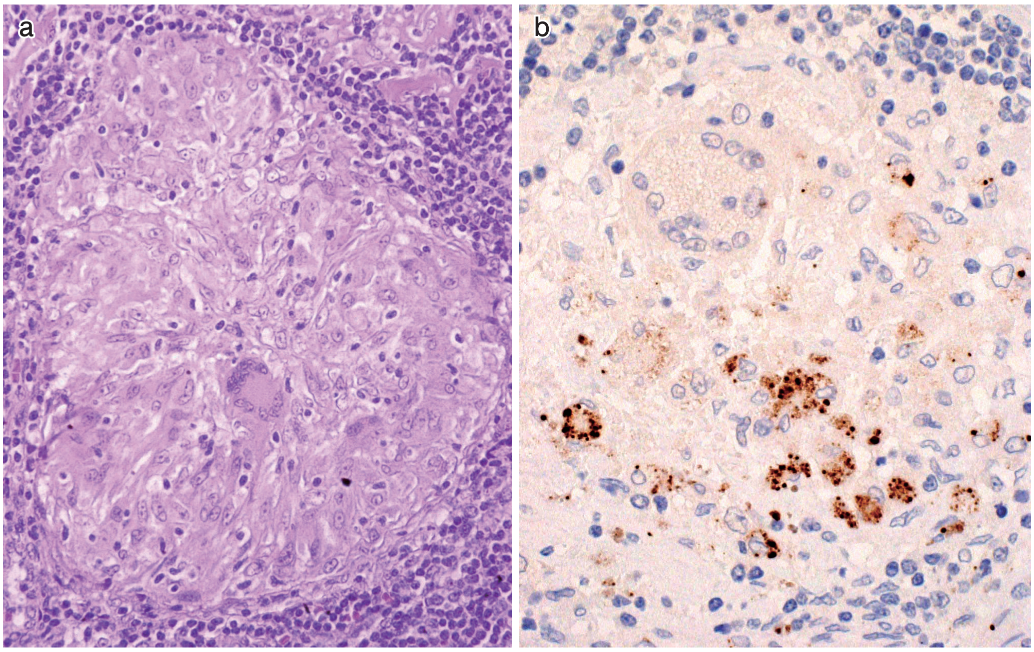


図 8．リンパ節のサルコイドーシス肉芽腫内に検出されるアクネ菌
サルコイドーシスリンパ節の HE 染色像（a）と PAB 抗体による免疫染色像（b）を示す．類上皮細胞肉芽腫を構成する細胞内に多数の小型円形顆粒を認める．

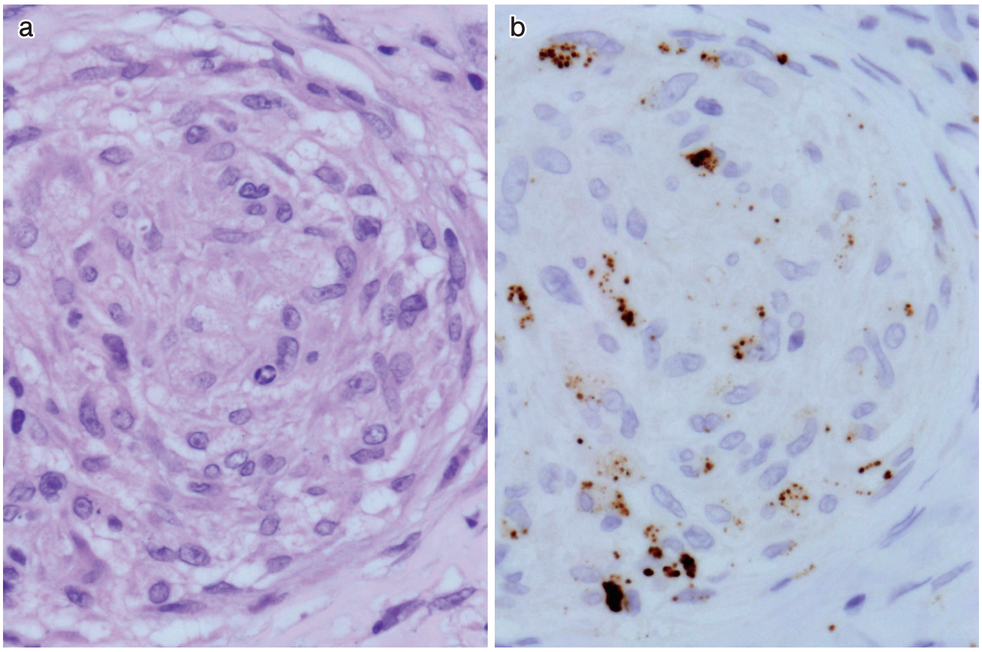


図 9．肺のサルコイドーシス肉芽腫内に検出されるアクネ菌
VATS 肺生検で認められたサルコイドーシス肉芽腫の HE 染色像（a）と PAB 抗体による免疫染色像（b）を示す．リンパ節肉芽腫内と同様の小型円形顆粒が肺肉芽腫内にも認められる．

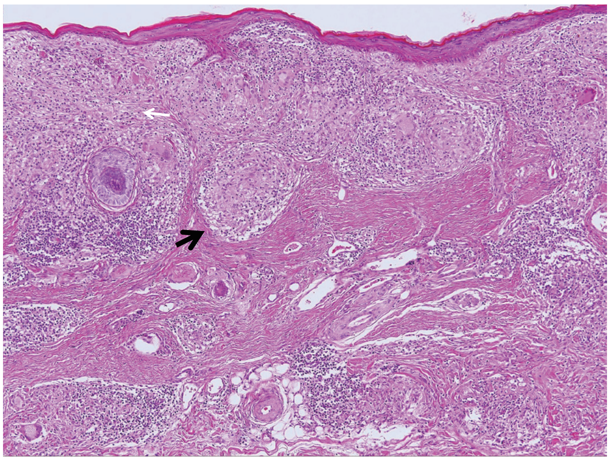


図 10．皮膚サルコイドーシス生検組織像（HE 染色）
74 歳，女性のサルコイドーシス患者．前額部皮膚に生じたサルコイドーシス肉芽腫を示す．完成途上にある類上皮細胞肉芽腫が真皮層内に広く分布しており，ところどころで緻密なリンパ球浸潤を伴っている．

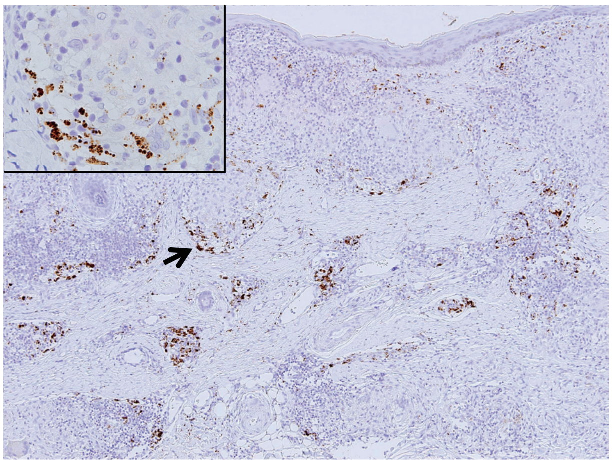


図 11．皮膚のサルコイドーシス肉芽腫内に検出されるアクネ菌
図 10 の HE 染色像とまったく同一部位の PAB 抗体免疫染色像を示す．大小さまざまな類上皮細胞肉芽腫に対して，肉芽腫の周囲および内部に多数の PAB 抗体陽性顆粒が認められる．図 10 矢印で示した肉芽腫と同一部位を矢印で示す．左上囲みは，その部位の強拡大像である．

サルコイドーシス病変部のリンパ管や血管の内皮細胞内にみられる小型円形小体は，感染型アクネ菌のリンパ行性あるいは血行性の拡散を示唆している（図 7）．

Ⅶ．PAB 抗体による肉芽腫内アクネ菌の検出

L 型アクネ菌は細胞壁の主要成分であるペプチドグリカンを欠如するが，細胞膜から細胞壁を貫通して存在するリポタイコ酸は保持（エピトープ構造はむしろ露出）されることから，リポタイコ酸を認識する PAB 抗体は細胞内の L 型アクネ菌を検出するのに適した抗体である．PAB 抗体を用いた免疫染色では，罹患臓器を問わずその 74～100% の症例で肉芽腫内にアクネ菌が検出される（表 1）．

肉芽腫の成熟に伴いリゾチーム活性や細胞内消化能は亢進することから，成熟肉芽腫よりもリンパ球浸潤の目立つ未熟な肉芽腫において陽性所見を認めることが多い．多くは類上皮細胞内や巨細胞内にサイズの異なる小型円形小体として同定される（図 8，9）．感染細胞には時に大型の HW 小体様のものを認めること

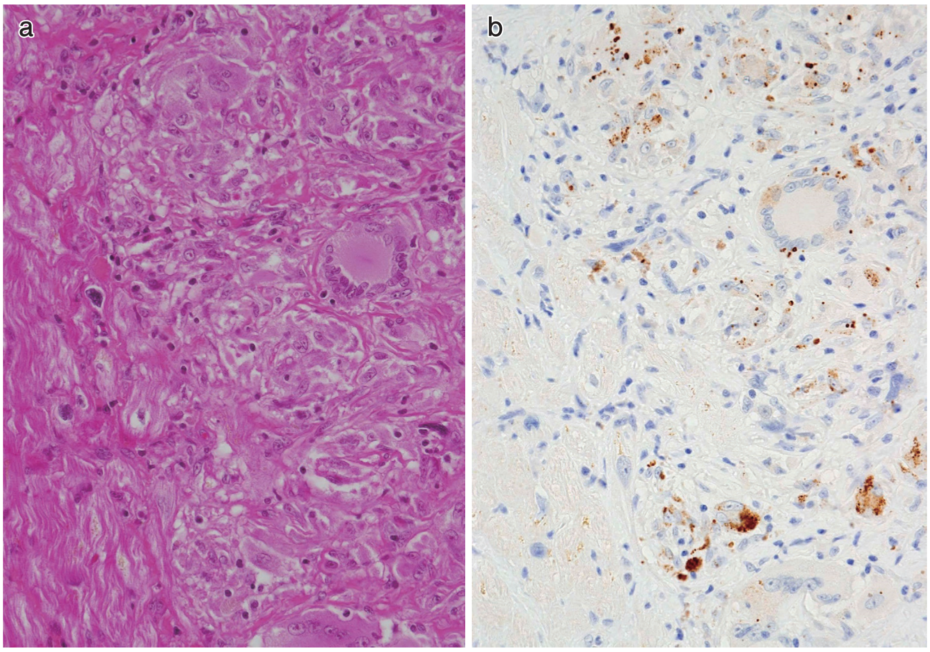


図 12．心臓のサルコイドーシス肉芽腫内に検出されるアクネ菌
拡張性心筋症の治療として左心室心筋切除術が行われた患者の病理組織像．非乾酪性類上皮細胞肉芽腫が認められサルコイドーシスと診断された症例．同一部位の HE 染色像（a）と PAB 抗体免疫染色像（b）．正常な心筋組織と肉芽腫病変の境界部を示す．肉芽腫内の巨細胞や類上皮細胞の中に小型で円形の PAB 抗体陽性像が多数認められる．

もある．

PAB 抗体はサルコイド反応と呼ばれる肉芽腫内には陰性となることから，本症とサルコイド反応を区別するうえで有用である．また結核性肉芽腫内に PAB 抗体陽性像は認められないことから，サルコイドーシスを臨床的に疑う症例で壊死を伴う肉芽腫がみられるような場合，PAB 抗体の免疫染色が鑑別診断に役立つ．

皮膚サルコイドーシスでは，83% の症例で肉芽腫内に PAB 抗体の陽性所見が確認されている（図 10，11）．皮膚では酒さや顔面播種状粟粒性狼瘡など原因不明でサルコイドーシス類似の肉芽腫を生じる疾患もあり，サルコイドーシス以外の疾患に関しても今後多数例の解析が必要となる．

外界と接することがなく完全な無菌状態とされる心臓に生じたサルコイドーシス肉芽腫内にも，同様のアクネ菌陽性像が観察されることから，アクネ菌感染と肉芽腫形成との密接な関連が示唆される（図 12）．

脳・神経サルコイドーシスの生検では，脳表近くの小血管周囲に肉芽腫性炎症が観察され，その中にアクネ菌陽性像が認められる．血行性に拡散した感染型アクネ菌の細胞内増殖が肉芽腫形成の原因であることを示唆する所見であり，おそらくは本症におけるブドウ膜炎もこれと同様な機序で起こってくるものと推察している．

筋肉サルコイドーシスでは，変性に陥っている筋肉細胞の中にアクネ菌の細胞内増殖を認め，横紋筋細胞内に肉芽腫形成が生じる理由として興味深い．同じ横紋筋組織である心臓のサルコイドーシスでもこれと同様なことが起こりうる．

Ⅷ．宿主要因

常在性のアクネ菌がサルコイドーシスの原因細菌であるとすれば，病因論の本質は宿主要因にある．すなわち，アクネ菌由来のなんらかの抗原物質に対して，アレルギー性免疫反応が存在する．アクネ菌の細胞内増殖を契機に，過度な免疫反応を引き起こす人だけがサルコイドーシスを発症し，当該抗原物質（アレルゲン）に対し無反応性の人は，仮に本菌の細胞内増殖が起こったとしても，健康でいられるのかもしれない．

PAB 抗体が認識するアクネ菌特異的なリポタイコ酸を抗原としてアクネ菌感染抗体価を測定した結果では，サルコイドーシス患者と対照群いずれにおいても高い抗体価が検出され有意差は認められない．ところが，アクネ菌生菌を用いて末梢血リンパ球の刺激試験を行うと [9]，サルコイドーシス患者の約半数近くで，健常人ではみられないほどの異常に高い Th1 型の免疫反応が認められる（図 13）．

アクネ菌遺伝子ライブラリーを患者血清で免疫スクリーニングすることにより，本菌由来のアレルゲン物質を探し出すことができた．患者血清と強く反応する

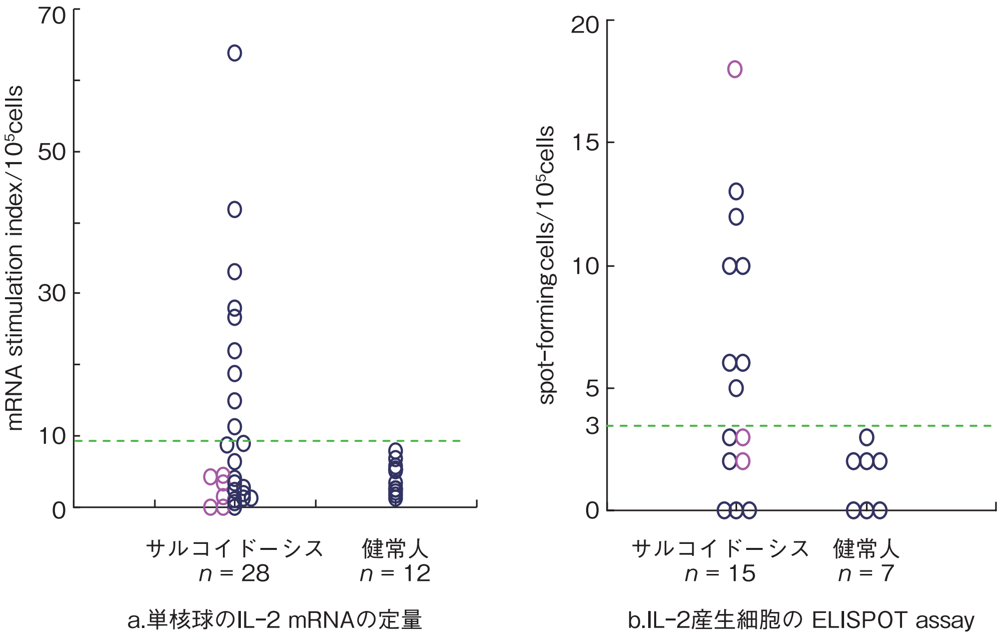


図 13. サルコイドーシス患者のアクネ菌に対する Th1 型アレルギー反応
いずれも，サルコイドーシス病変部から分離されたアクネ菌株生菌を末梢血単核球の培養液に加え，Th1 型サイトカインである IL-2 の産生（左）と産生細胞数（右）を健常人と患者とで比較した．○は治療のためにステロイドが投与されている患者を示す．患者の約 3～5 割において，健常人では認められないほどの異常に高い Th1 型免疫反応が検出されている．

本菌由来のリコンビナント蛋白は，そのアミノ酸配列からアクネ菌トリガーファクターであることが確定された．アクネ菌トリガーファクターは，その C 末端側に他菌種には存在しない本菌特有のアミノ酸配列をもっており，TIG 抗原と呼ばれる．TIG 抗原を用いて末梢血リンパ球の刺激試験を行うと[10]，約 2 割の症例で患者特異的な免疫反応性が認められる（図 14）．

内在性素因（疾病素因）としての患者の免疫異常については，これまでさまざまなサイトカイン類における遺伝子多型が調査されてきているが，病因に直結するような遺伝子異常は検出されていない．近年，肉芽腫形成性の炎症性腸疾患 Crohn 病の疾患遺伝子として注目を浴びている *CARD15*（*NOD2*）遺伝子の異常が，関節炎，ブドウ膜炎，皮膚炎を三主徴とする常染色体優性遺伝性の全身性肉芽腫疾患である Blau 症候群や，その孤発型と考えられている若年発症型サルコイドーシスでも認められることが明らかになった[11]．NOD 蛋白は，細菌や細菌産生物の細胞内センサーと呼ばれるように，細胞内に侵入した細菌や菌体成分と結合して自然免疫反応を誘導するが，最近では，その後の獲得免疫も含めた防御反応を誘導するかどうかの決定にもかかわっている可能性も指摘されている．成人型サルコイドーシスでは *NOD2* 遺伝子の異常は検出されていないが[12]，日本人サルコイドーシス患者においては *NOD1* 遺伝子異常が報告されている[13]．アクネ菌の中でも血清型 I 型に分類される菌株は上皮細胞内への侵入能を有しており[14]，アクネ菌が細胞内侵入することで炎症誘導因子である NFκ-B が活性化される．この現象は細胞内センサーである NOD1 や NOD2 の活性化を介して誘導される．サルコイドーシス患者に高頻度である *NOD1* 遺伝子変異では，本菌の細胞内感染に伴う NFκ-B 活性化能に低下がみられる（図 15）．アクネ菌の細胞内潜伏感染が生じる理由の一つに，この *NOD1* 遺伝子変異が関与している可能性がある．

Ⅸ．実験モデル

TIG 抗原をアジュバントとともにマウスに感作免疫し，本抗原に対するアレルギー素因を実験的に誘導すると，SPF 環境下で飼育された一部（25～57％）のマウスでは肺に多発性の肉芽腫形成を認める[15]．TIG 抗原のかわりに菌体そのものを用いても結果は同様である．また正常マウスの約 1/3 で肺からアクネ菌が培養可能であることから，感作免疫のみで肺肉芽腫を形成するマウスでは，肺にアクネ菌が常在性に感染している可能性がある．ヒト環境に類似した庭先で飼育されているウサギで同様の実験を行うと，マウス以上に高度でびまん性の肺肉芽腫症が誘導される（図 16）．マウスにアジスロマイシンを，ウサギにミノマイシンを実験開始まえから投与しておくと，これらの肺肉芽腫形成を抑制することができる（図 17）．

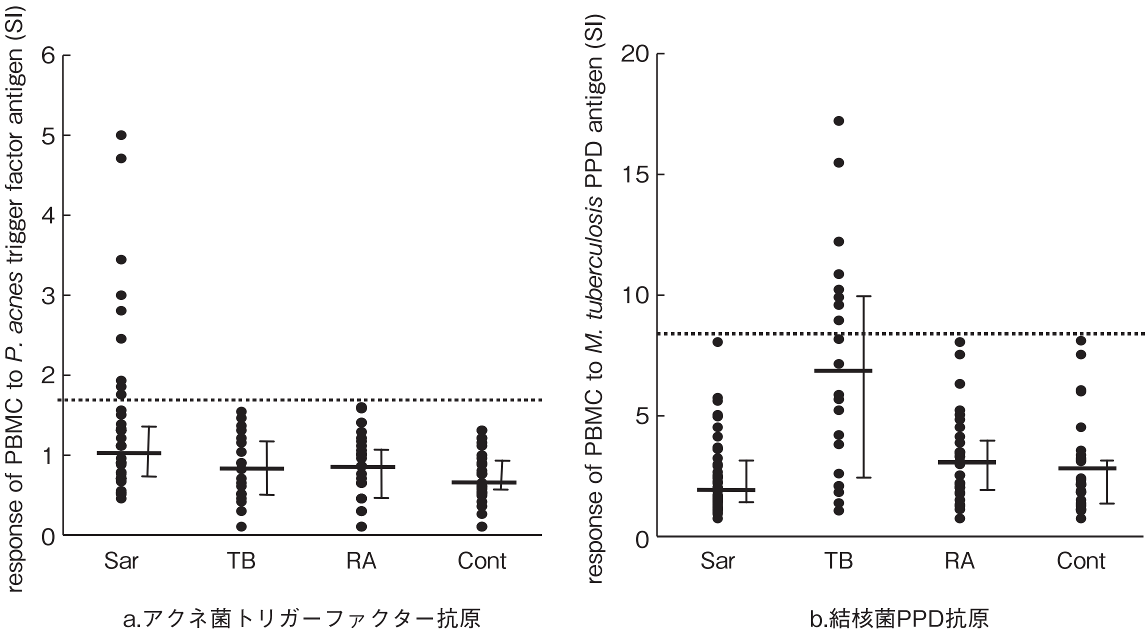


図 14. アクネ菌トリガーファクター抗原を用いた末梢血リンパ球の刺激試験
サルコイドーシス患者（Sar），結核患者（TB），関節リウマチ患者（RA），および健常人（Cont）から採取した末梢血単核球（PBMC）を用いて，アクネ菌トリガーファクター抗原（a）と結核菌 PPD 抗原（b）に対するリンパ球幼若化反応を刺激係数（SI）として示した．健常者群の SI 値の平均値± 3SD を反応性の閾値として横点線で示す．

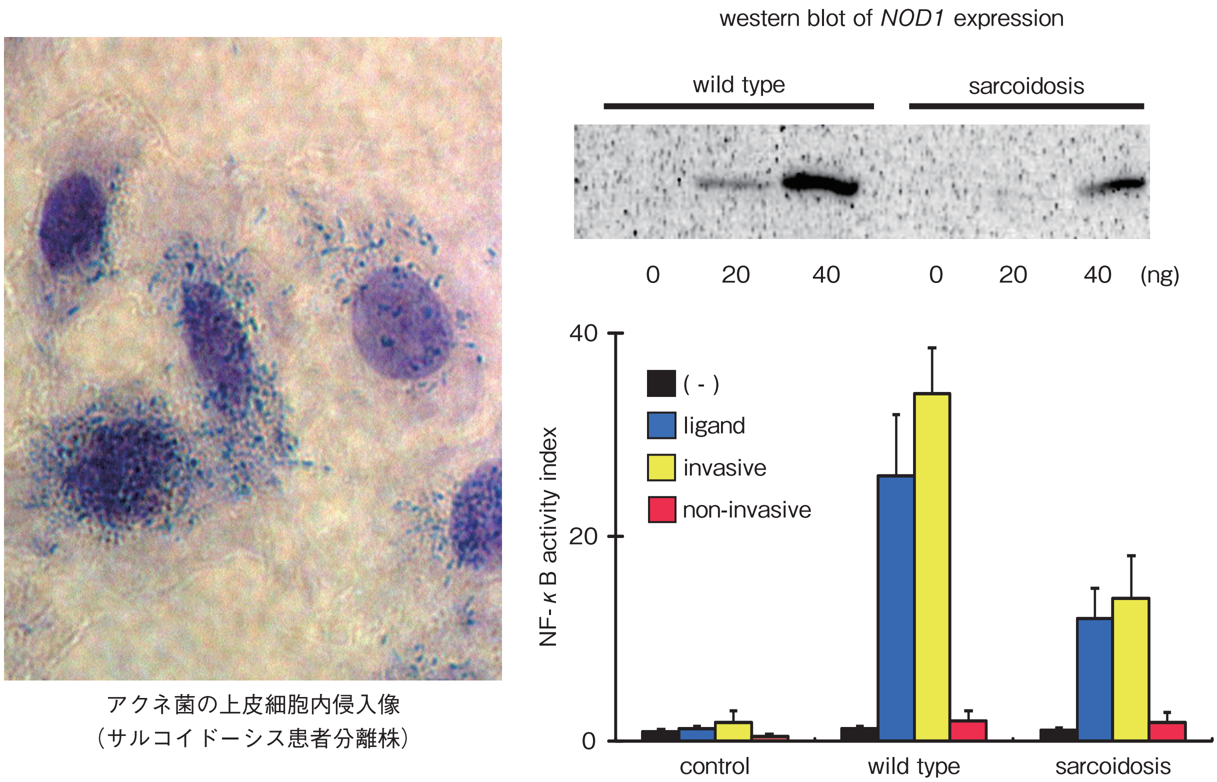


図 15. *NOD1* 遺伝子多型とアクネ菌の細胞内感染による NF-κB 活性化
上皮細胞侵入能を有する血清型 I 型のサルコイドーシス分離株（左写真：Giemsa 染色）を用いて，アクネ菌感染に伴う感染細胞の *NOD1* の発現量（Western blot）と NF-κB の活性化能を正常型 *NOD1* 遺伝子と変異型 *NOD1* 遺伝子で比較・検討した結果．実験では細胞内侵入能の有する菌株（invasive）と侵入能のない菌株（non-invasive）を使用した．サルコイドーシス患者に高頻度である *NOD1* 遺伝子変異では，本菌の細胞内感染に伴う *NOD1* 遺伝子産物の産生能低下と NF-κB の活性化能低下がみられた．

ヒトの末梢肺組織や肺門部リンパ節からも約半数の症例で本菌が培養可能であり，ほかの細菌類はほとんど検出されない（表2）．肺や肺門リンパ節はサルコイドーシスの好発部位であり，これらの臓器にはアクネ菌が不顕性感染している[16]．宿主の本菌に対する過敏性免疫反応が素因となりサルコイドーシスが発症しているという考え方からすれば，本実験系をサルコイドーシスの実験モデルとみなすことができる．細胞内細菌に有効な抗菌薬による除菌処置が，本実験モデルにおける肺肉芽腫の形成を防止できることから[17]，サルコイドーシス患者においても除菌療法が有効である可能性がある．

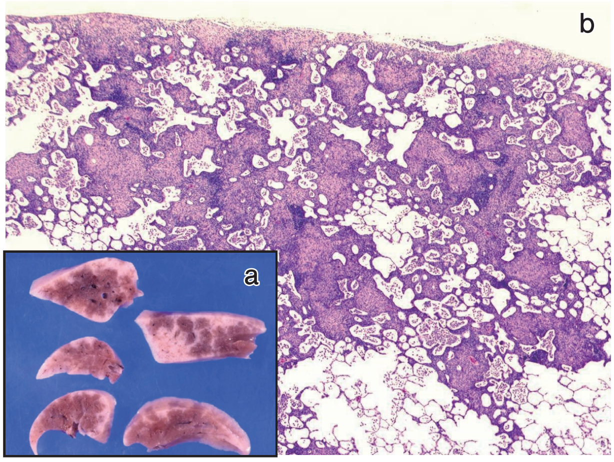


図 16．アクネ菌抗原の感作免疫によって誘導されるウサギの肺肉芽腫症
アクネ菌トリガーファクターのリコンビナント蛋白をアジュバントとともにウサギに免疫して誘導された肺肉芽腫症．実験群の約３割で肺肉芽腫症が誘導された．強い肉芽腫性炎症が認められた実験動物の肺割面像（a）とその HE 標本ルーペ像（b）を示す．外側の胸膜や葉間に沿った病変の分布様式はサルコイドーシスに酷似している．組織像で青くみえる部分は緻密なリンパ球浸潤部で，ピンク色にみえる部分が類上皮細胞肉芽腫である．

X．サルコイドーシスのアクネ菌病因説

これまでの研究経緯から想定されるサルコイドーシスのアクネ菌病因説[18]につき概要を紹介する．アクネ菌は外部環境から経気道的に侵入して不顕性感染することから，サルコイドーシスにおける初発病変は症状の有無にかかわらず肺や肺門部リンパ節と考えられる．これらの臓器に細胞内潜伏感染するアクネ菌は，なんらかの環境要因を契機に内因性に活性化し細胞内増殖する．宿主要因として本菌に対するアレルギー素因を有する患者では，アクネ菌の細胞内増殖を契機に感染臓器局所で過度の Th1 型免疫反応が起こり，感染型アクネ菌の拡散防止を目的とした肉芽腫形成が起こる（図 18）．

細胞内増殖のおりに肉芽腫による封じ込めを逃れたいわゆる感染型アクネ菌は，病変部局所において新たな潜伏感染を引き起こす可能性がある．さらにリンパ向性あるいは血行性に広がり，肺やリンパ節以外の全身諸臓器に新たな潜伏感染を起こす可能性もある．全身に拡散した潜伏感染を背景として，同様な環境要因を契機にふたたび内因性活性化は起こりうる．その場合，新たな潜伏感染局所でも同時多発的にアクネ菌の

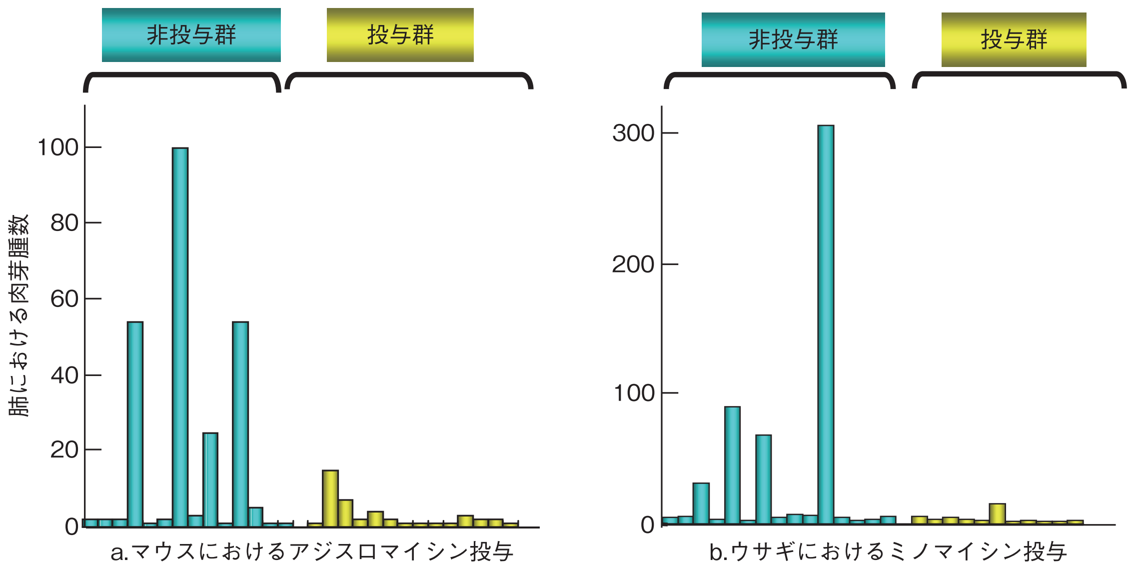


図 17．実験モデルにおける肺肉芽腫症の抗菌薬投与による抑制効果
アクネ菌抗原の感作免疫で誘導される肺肉芽腫症の実験モデルを用いて，抗菌薬投与による肉芽腫形成の抑制効果をみた．マウスではアジスロマイシンを，ウサギではミノマイシンを実験開始前から連日投与した．抗菌薬を与えない非投与群では，いずれの実験系でも約３割程度の動物で肉芽腫形成がみられた．抗菌薬投与群では，マウスとウサギいずれの実験系においても，その肉芽腫形成が抑制されている．

表 2．病変のないヒト末梢肺組織からの細菌培養結果（手術材料）

	末梢肺	縦隔リンパ節	胃リンパ節	大腸リンパ節
検索症例総数	43	11	20	12
P. acnes の培養結果				
分離症例数（%）	24（56）	8（73）	10（50）	3（25）
純培養症例数（%）	22（51）	7（64）	4（20）	0（0）
≦ 500 CFU/g	20	8	10	3
＞ 10,000 CFU/g	4			
他菌種の培養結果	*S. epidermidis*	*S. epidermidis*，CNS	*S. epidermidis*，*Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp.，*Citrobacter* sp.，*Acinetobacter* sp.，*Corynebacterium* sp.，*Morganella* sp.，*Flavobacterium* sp.，*Neisseria* sp.，NFGR，*Candida* sp.	*S. aureus*，*Streptococcus* sp.，*Enterococcus* sp.，*Citrobacter* sp.，*Pseudomonas* sp.，*E. coli*，*Proteus* sp.，*Bacteroides* sp.，*Klebsiella* sp.，*Schewanella* sp.

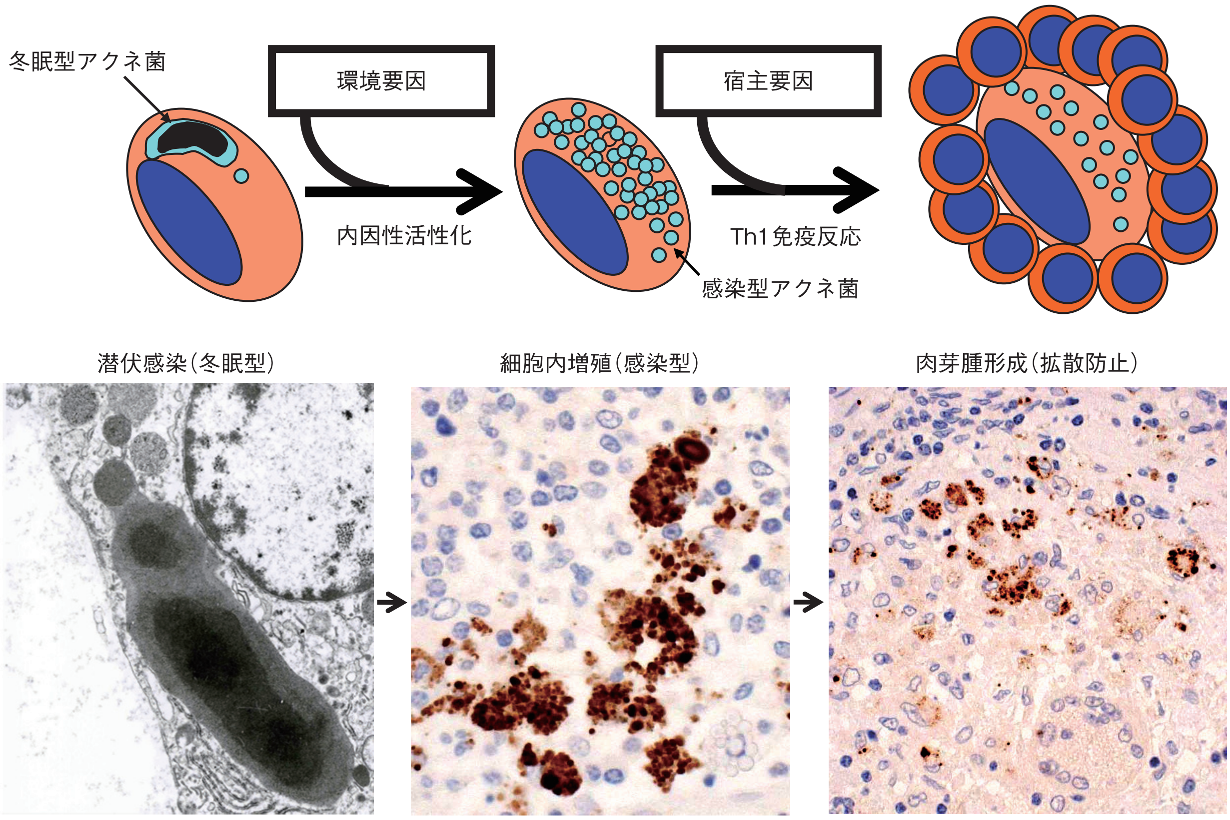


図 18．サルコイドーシスのアクネ菌病因説
病理組織学的解析からサルコイドーシスにおける肉芽腫形成機構を推察した．すなわち，細胞内に不顕性感染したアクネ菌は細胞壁を欠失した冬眠状態で潜伏感染しており，主に環境要因を契機として冬眠状態のアクネ菌が内因性に活性化され細胞内増殖する．宿主要因として本菌に対するアレルギー素因を有する個体では，アクネ菌の細胞内増殖を契機に過度の Th1 型免疫反応が起こり，感染型アクネ菌の拡散防止を目的とした肉芽腫形成が生じる．

細胞内増殖が起こり，その結果として全身性肉芽腫形成を特徴とするサルコイドーシスの病態が形成されてくるものと想定される（図 19）．

サルコイドーシスの疾病発生機構においては，感染，免疫，アレルギーそれぞれの要素が複雑に関係している．すなわちサルコイドーシスが発症するためには大きく三つの条件が満たされる必要がある．第一の条件は，細胞壁を欠失する L 型アクネ菌の潜伏感染が存在することである．アクネ菌の細胞内感染はマクロファージなど貪食系細胞だけではなく，上皮系細胞や間葉系細胞にも起こりうる．第二の条件としては，発病をトリガーする誘因として潜伏感染しているアクネ菌が内因性に活性化する必要がある．サルコイドーシスの発症には，帯状疱疹などと同様に，過労やストレスなど環境要因の関与が疑われている[19]．第三の条件は，サルコイドーシスの原因としてもっとも重要と考

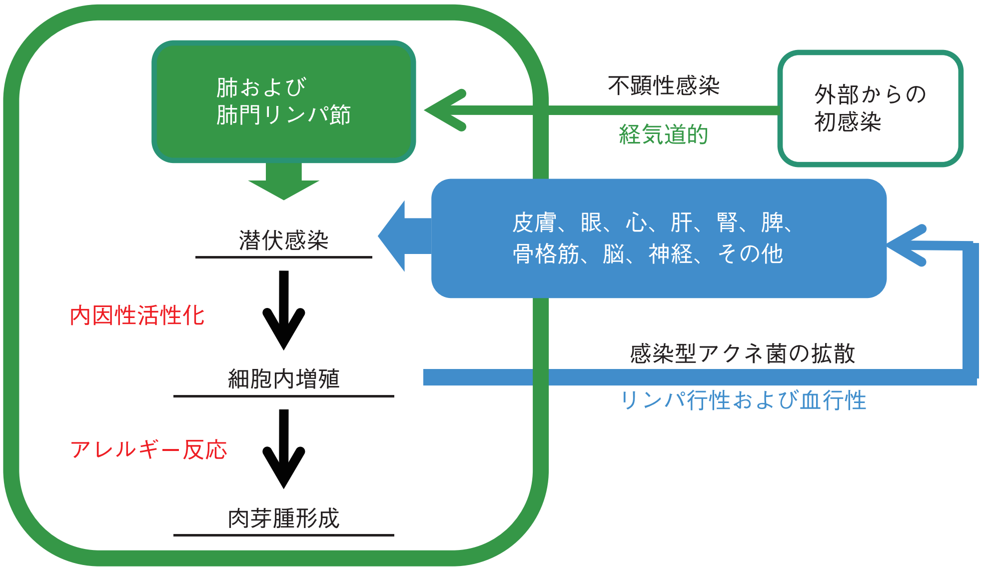


図 19. アクネ菌病因説にもとづく全身性サルコイドーシスの疾病発生機構
アクネ菌は外部環境から経気道的に侵入して不顕性に細胞内感染を起こしうることから，サルコイドーシスにおける初発病変は，症状の有無にかかわらず肺や肺門部リンパ節であると考えている．これらの胸郭内病変部から肺外の全身諸臓器に拡散した潜伏感染を背景として，同様な環境要因を契機に全身諸臓器で同時多発的に内因性活性化が起こり，患者のアレルギー素因に起因して肉芽腫形成が生じるものと考えている．

えられる宿主要因である．アクネ菌の細胞内増殖に対し病変としての肉芽腫形成を生じるためには，患者の疾病素因として，本菌に対するアレルギー素因が存在する必要がある．アクネ菌の潜伏感染を背景に，環境要因としての内因性活性化，宿主要因としてのアレルギー性免疫反応，これらの三つの要因が成立してはじめて，サルコイドーシスという全身性肉芽腫疾患が引き起こされてくるものと考えられる．

XI　アレルギー性内因性感染症の概念

結核の発見で知られる Koch が展開したような外因性感染症に対して，大腸菌の発見で知られる Escherlish がその重要性を主張した内因性感染症は，時代の流れの中でこれまであまり注目されていない．近年では，三上がその著書[20]の中で内因性感染症という概念を紹介している．それによると，Escherlich は常在菌（フローラ）によって起こる感染を endogenous infection，そして本来人体には存在しない特殊な病原体によって起こるものを exogenous infection と呼んで両者をはじめて区別している．Escherlich は常在菌がなんらかの形で宿主の病気に関係すると考えていたが，彼の考え方は長い間一般には認められなかった．Koch の病原微生物の四原則が風靡していたからである．

しかし，現在ではこの endogenous infection の事実は多くの研究によって実証されている．わが国では，訳語として体内感染症，内部感染症，自己感染症，内因性感染症が用いられている．中谷[21]は，いわゆる内因性感染症の特徴を次のように列挙している．①この病気の原因は個体に常在する菌のどれかによる，②宿主が病的状態ないし異常状態にあると，常在細菌叢の特定の菌の菌数が増加し，また正常では常在しない局所での増殖が起こる，③本感染症は本来の病原性が弱い菌によって起こる，④一定の潜伏期というものはない，⑤他の個体への伝染性はない，⑥一般に再発に対する免疫ができにくい，⑦原因となった菌の役割は小さく，あくまでも先行する他の要因が発症に重要である．以上のような内因性感染症の概念からすれば，サルコイドーシスはアクネ菌による内因性感染症とみなすことができる．

昔でいう感染症の Koch の原則からすれば，一つの生きた微生物が体内に侵入して同一の病状を呈する疾患を引き起こし，かつその微生物が病巣から分離される，それを証明することが感染症の原点であると考えられてきた．確かに，そこにも量とか時間的因子などを含めた生体の反応性の問題はあった．しかし分子生物学的あるいは免疫学的にその原因や機序がわかりつつある時代になると，いわゆる“個の反応性”の重要性が再認識されるようになってきた．一つのものが入って，ある人にはこういう反応，ある人には違った反応をするというような新しい観念が生まれている．これは古くからの感染症の概念を凌駕するものになりつつある．

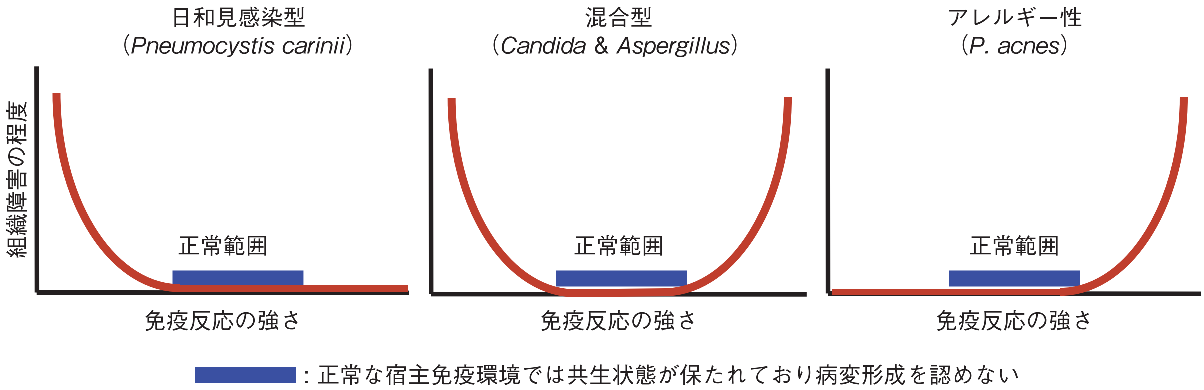


図 20. 内因性感染症の新しい分類法

宿主の免疫反応性とそれによって引き起こされる病変の程度との関連性から，内因性感染症は大きく三つに分類される．Casadevall と Pirofski の新しい感染症の分類法に従えば，日和見感染型の内因性感染症は class 1 に，アレルギー性の内因性感染症は class 6 に，両者の混合型は class 4 にそれぞれ相当する．（ ）にはそれぞれに代表的な細菌種を呈示した．感染症が疑われながらいまだ原因不明である数多くの難病の中には，今後アレルギー性内因性感染症に分類される疾患が数多く存在する可能性も高い．

微生物の感染が生体に与える影響やその機序は決して一通りではない．感染症専門医である Casadevall と，細菌学・免疫学を専門とする Pirofski は，こういった個体反応の多様性をも考慮した新しい感染症の概念を提示している[22]．彼らは，ウイルスから細菌にいたるまでのすべての感染症を宿主の免疫反応性と，それによって引き起こされる病変の程度との関連性から 6 つのクラスに分類することで，Koch の原則ではもはや包括できなくなった感染症の概念を整理しようと試みている．

彼らの分類に従えば，正常な宿主免疫環境で病変形成を認めない内因性感染症は大きく三つのカテゴリーに分類することができる（図 20）．HIV 患者の Carini 肺炎など，宿主の免疫不全に伴う日和見感染症はよく知られている．サルコイドーシス原因細菌としてのアクネ菌は，本菌に対するアレルギー反応が病変形成の原因となることから，アレルギー性内因性感染症と呼ばれる範疇に分類される．*Candida* や *Aspergillus* のような真菌類は，日和見感染症として日常よく遭遇するが，アレルギー素因を背景として過敏性肺臓炎の原因にもなることから混合型に分類される．

XII. 結核とサルコイドーシス

欧米諸国では，サルコイドーシスの原因細菌として結核菌の可能性も疑われてきた．サルコイドーシスと結核は，臨床病理像だけでなく病気の発症機構にも多くの共通点がある．成人型結核症の多くは，結核菌による潜伏感染の内因性活性化によって引き起こされる．経気道的に初感染した肺結核では，肺と肺門リンパ節に初期変化群と呼ばれる病変が形成される．結核菌の初感染は多くは小児期に起こるが，このときに結核を発病する患者は初感染した人々の約 1 割程度であり，残り 9 割は症状を自覚することもなく不顕性感染となる．顕性感染であれ不顕性感染であれ，肺内には治癒瘢痕が残り，その中には多くの場合，細胞壁欠失型の結核菌が持続性に潜伏感染しているものと考えられている．QuantiFERON 検査による最近の知見では，世界人口の約 1/3 が結核菌の潜伏感染状態にあるものと推測されている．加齢変化はもとより HIV 感染や糖尿病などの免疫能低下状態では，潜伏状態にある結核菌が内因性に活性化され，活動性の結核が生じてくる．結核は伝染性の感染症ではあるが，実際の臨床現場で遭遇する結核患者の多くは，外からの感染ではなく，体内に潜伏感染した結核菌の内因性活性化によって起こってくる．

いまだ推測の域を出ないが，サルコイドーシスと成人型結核症の類似点と相違点を列挙してみた（表 3）．サルコイドーシスにおいてアクネ菌の深部臓器への初感染は，多くは思春期以降に不顕性感染として生じる．同様の不顕性感染は成人型結核症でもその発症要因となる．アクネ菌の深部臓器への不顕性感染率は，細菌培養結果などから大人で約 3〜5 割程度と想定される．サルコイドーシスと成人型結核症の相違点は，潜伏感染状態にある原因細菌が活性化するための宿主免疫能低下の程度，すなわち内因性活性化の閾値が低いか高いかの違いであると考えている．帯状疱疹患者でよく経験するように，疲労やストレスなどの環境要因がアクネ菌活性化の原因となりうるが，結核菌の活性化にはある程度の宿主免疫能の低下状態が必要となる．他方，細胞内に感染するアクネ菌の内因性活性化は，患者以外でもかなりの頻度で起こっている可能性がある．

しかしながら，これがサルコイドーシス肉芽腫形成にいたるためには，本菌に対するアレルギー素因としての宿主要因が重要である．成人型結核症と比較した場合，サルコイドーシスではアレルギー素因という観点から宿主要因がはるかに重要である．

関節リウマチなどに使用される抗 TNF-α 製剤は，その副作用として時に結核[23]やサルコイドーシス[24]を発症することが知られている．炎症を抑える目的で使用される薬剤が逆に炎症性疾患を引き起こすという奇異な現象は，TNF-α の機能阻害による細胞内潜伏感染菌の内因性活性化に起因している可能性がある．深部臓器での結核菌やアクネ菌の潜伏感染率は一般集団でもかなり高いことから，正常な免疫機構で維持されていた潜伏感染状態が抗 TNF-α 製剤の投与で破綻をきたす可能性がある．抗 TNF-α 製剤投与による結核の再燃現象と同様に，アクネ菌の細胞内増殖を契機に，本菌に対するアレルギー素因を有する個体では，サルコイドーシス肉芽腫形成が生じてくる可能性が高い．

XIII. アクネ菌病因説に基づく治療戦略

サルコイドーシスにおいて，アクネ菌の細胞内増殖は肉芽腫形成の原因となるばかりでなく，これを契機に，病変部局所において新たな潜伏感染を引き起こす可能性がある．この潜伏感染が完全に除去されない限り炎症の再燃が起こりうる．再燃を繰り返すたびに，罹患組織は肉芽腫性炎症により破壊されていく．炎症後の線維化に加えて，新たな再燃性の炎症が加わり，病変の範囲は徐々に広がっていくことになる．

現在サルコイドーシスの治療に用いられているステロイド，メトトレキセート，抗 TNF-α 製剤などはいずれも，過剰な免疫反応による肉芽腫形成を非特異的に抑制することで治療効果を発揮する．肉芽腫形成により感染型アクネ菌の拡散が封じ込められているとすれば，肉芽腫性炎症を抑制するこれらの治療法は，一方では新たな潜伏感染を引き起こす危険性もはらんでいる．

疾病素因として本菌に対するアレルギー素因を有する患者では，内因性に本菌が活性化するたびに増菌局所で肉芽腫反応が生じてくるものと想定され，細胞内細菌に感受性のある抗菌薬の投与は，細胞内増殖菌の殺菌作用や内因性活性化の防止効果により，肉芽腫形成の抑制や予防に効果があるかもしれない（図 21）．また，本症からの完全緩解をめざすためには，活性化状態にある菌を抑制するだけではなく，代謝活性を低下させて生き残りを図る細胞内持続感染状態のアクネ菌も含めて除菌する必要がある．今後は，サルコイドーシスにおけるアクネ菌除菌療法の開発と抗菌薬の有効性検定のための臨床研究を急ぐ必要がある．

他方，免疫学的な治療法へのアプローチ法もありうる．アクネ菌由来のなんらかの抗原物質に対する Th1 型のアレルギー反応が肉芽腫形成の原因となっているものと想定されることから，そのアレルゲン物質をなんらかの方法で特定することができれば，診断や治療にも画期的な展開が期待できる．現時点でサルコイドーシスの診断は，侵襲的な病変部組織生検で非乾酪性の類上皮細胞肉芽腫を証明することで確定されているが，罹患臓器によっては生検がむずかしい場合も多い．アレルゲン物質が特定できれば，末梢血リンパ球を用いた抗原刺激試験やツベルクリン反応のような皮内テストで診断が可能となるかもしれない．また，アレルゲン物質に対するアレルギー反応をなんらかの脱感作療法で選択的に抑制することが可能であれば，理想的なサルコイドーシス治療法ともなりうる．

表 3. サルコイドーシスと成人型結核症：その類似点と相違点

比較項目	サルコイドーシス	成人型結核症
原因となる細菌	*P. acnes*	*M. tuberculosis*
伝染性	なし	あり
原因菌の毒性	弱い	強い
初感染	不顕性感染	初感染発症率 10%
肺での潜伏感染率	30〜50%	世界人口の 1/3
内因性活性化の誘因	疲労, ストレスなど	加齢, 糖尿病, AIDS など
内因性活性化の閾値	低い	高い
内因性活性化の頻度	高い	低い
宿主要因の重要性	高い	低い

XIV. 抗菌薬治療の現状

1999 年アクネ菌病因説が発表された後，2002 年にはフランスからニキビ治療に汎用される抗生物質であるミノサイクリンとドキシサイクリンによる治療効果が報告された[25]．皮膚サルコイドーシス 12 例に対して，平均 26 ヵ月間治療し，8 例は完全に効果を示し，2 例で部分的な効果がみられ，2 例では効果がなかったとの報告である．ほとんどの症例は，ミノサイクリンを 100 mg/日 2 回投与されていたが，一部の症例では，ミノサイクリンの副作用のために減量，あるいは副作用の少ないドキシサイクリンに変更された．

日本の難病研究班によるアンケート調査では，その有効例は 84 例中 36 例（43%）に認められている．米国シンシナチ大学では，ミノサイクリンとドキシサイクリンを 57 例に投与して，少なくとも 40% で治療反応性を認めている．主に皮膚病変で有効性が高いよう

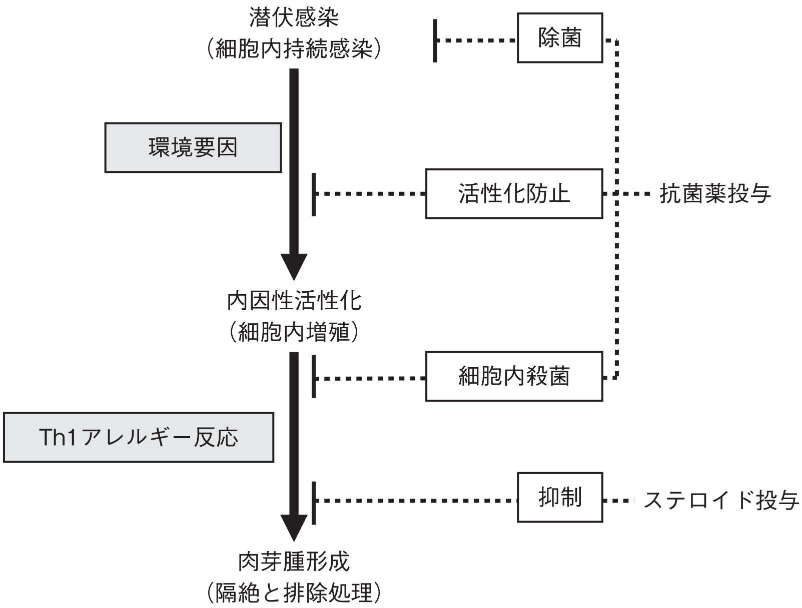


図 21．サルコイドーシスの治療戦略

サルコイドーシス肉芽腫形成過程おける各要素を，潜伏感染による細胞内持続感染，内因性活性化による細胞内増菌，アレルギー反応による肉芽腫形成の３段階に分け，それぞれに対応させて，抗菌薬投与とステロイド投与の作用機序と作用点を示す．抗菌薬投与が実際どのような機序で治療効果を発揮しているか現時点では不明な点も多い．結核菌潜伏感染の除菌と同様に，潜伏感染するアクネ菌を完全に除菌するためには，複数の抗生物質の組み合わせで長期の投与が必要となるであろう．

である．ミノサイクリンが著効を呈したとする症例報告[26~28]が多いが，そのほかにもアジスロマイシン，クラリスロマイシン，クリンダマイシン，ST 合剤などの使用による治療成功例が報告されている．Marshall プロトコール[29]とは，自身もサルコイドーシス患者である Marshall 博士により詳細に記載された細胞内細菌に対する除菌プロトコールである．ミノマイシンを主体に，アジスロマイシン，クリンダマイシンを加えた多剤併用療法を，Herxheimer 反応（梅毒の抗菌薬治療などで知られる．死滅する細胞内細菌から遊離する菌体成分に対する一種のアレルギー反応）に注意しながら長期投与する治療法である．2006 年にロサンゼルスで開催されたサルコイドーシス治験検討会では 92 例中 57 例（62%）で有効であったと報告されている[30]．

XV．おわりに

サルコイドーシスのアクネ菌病因説は日本が世界に向けて発信できる独創性の高い研究である．サルコイドーシスに対する治療法は，副作用の強いステロイドを中心とする免疫抑制薬の投与以外にこれまで治療法が確立していない．抗菌薬をはじめとした原因に対する根本的な治療法の開発が今後発展していくことを期待したい．サルコイドーシス患者に対する抗菌薬投与は現在のところ保険適用になっておらず，臨床研究を行うためには製薬会社や国の援助も必要な現状である．関係者のご理解とご協力をぜひともお願いしたい．

文　献

1) Hunninghake GW, Costabel U, Ando M et al：American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders；Statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **16**：149–173, 1999.
2) 東京医科歯科大学プレスリリース《http://www.tmd.ac.jp/press-release/20120521/》
3) Negi M, Takemura T, Guzman J et al：Localization of *Propionibacterium acnes* in granulomas supports a possible etiologic link between sarcoidosis and the bacterium. Mod Pathol **25**：1287–1297, 2012.
4) Abe C, Iwai K, Mikami R et al：Frequent isolation of *Propionibacterium acnes* from sarcoidosis lymph nodes. Zentbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **256**：541–547, 1984.
5) Ishige I, Usui Y, Takemura T et al：Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis. Lancet **354**：120–123, 1999.
6) Eishi Y, Suga M, Ishige I et al：Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes from Japanese and Europe-

an patients with sarcoidosis. J Clin Microbiol **40**：198–204，2002.
7）Yamada T，Eishi Y，Ikeda S et al：*In situ* localization of *Propionibacterium acnes* DNA in lymph nodes from sarcoidosis patients by signal amplification with catalysed reporter deposition. J Pathol **198**：541–547，2002.
8）Moscovic EA：Sarcoidosis and mycobacterial L-forms；a critical reappraisal of pleomorphic chromogenic bodies（Hamazaki corpuscles）in lymph nodes. Pathol Annu **13**：69–164，1978.
9）Furusawa H，Suzuki Y，Miyazaki Y et al：Th1 and Th17 immune responses to viable *Propionibacterium acnes* in patients with sarcoidosis. Respir Investig **50**：104–109，2012.
10）Ebe Y，Ikushima S，Yamaguchi T et al：Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinat protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **17**：256–265，2000.
11）Kanazawa N，Okafuji I，Kambe N et al：Early-onset sarcoidosis and *CARD15* mutations with constitutive nuclear factor-κB activation；common genetic etiology with Blau syndrome. Blood **105**：1195–1197，2005.
12）Schürmann M，Valentonyte R，Hampe J et al：*CARD15* gene mutations in sarcoidosis. Eur Respir J **22**：748–754，2003.
13）Tanabe T，Ishige I，Suzuki Y et al：Sarcoidosis and *NOD1* variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*. Biochim Biophys Acta **1762**：794–801，2006.
14）Furukawa A，Uchida K，Ishige Y et al：Characterization of *Propionibacterium acnes* isolates from sarcoid and non-sarcoid tissues with special reference to cell invasiveness，serotype，and trigger factor gene polymorphism. Microb Pathog **46**：80–87，2009.
15）Minami J，Eishi Y，Ishige Y et al：Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger-factor protein of *Propionibacterium acnes*. J Med Dent Sci **50**：245–252，2003.
16）Ishige I，Eishi Y，Takemura T et al：*Propionibacterium acnes* as the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **22**：33–42，2005.
17）Nishiwaki T，Yoneyama H，Eishi Y et al：Indigenous pulmonary *Propionibacterium acnes* primes the host in the development of sarcoid-like pulmonary granulomatosis in mice. Am J Pathol **165**：631–639，2004.
18）Eishi Y：*Propionibacterium acnes* as a causative agent of sarcoidosis. Sarcoidosis，ed by Eishi Y，In Tech，Croatia，p3–34，2013《http://www.intechopen.com/books/sarcoidosis》
19）Yamada Y，Tatsumi K，Yamaguchi T et al：Influence of stressful live events on the onset of sarcoidosis. Respirology **8**：186–191，2003
20）三上理一郎：Endogenous infection. 医療 **44**：559–569，1990.
21）中谷林太郎：ヒトの常在菌叢の役割—とくに腸内細菌の研究の動向．感染症 **1**：2–10，1971.
22）Casadevall A，Pirofski LA：Host-pathogen interactions；redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infect Immun **67**：3703–3713，1999.
23）Keane J，Gershon S，Wise RP et al：Tuberculosis associated with infliximab，a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med **345**：1098–1104，2001.
24）Gifre L，Ruiz-Esquide V，Xaubet A et al：Lung sarcoidosis induced by TNF antagonists in rheumatoid arthritis；a case presentation and a literature review. Arch Bronconeumol **47**：208–212，2011.
25）Bachelez H，Senet P，Cadranel J et al：The use of tetracyclines for the treatment of sarcoidosis. Arch Dermatol **137**：69–73，2001.
26）Baba K，Yamaguchi E，Matsui S et al：A case of sarcoidosis with multiple endobronchial mass lesions that disappeared with antibiotics. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis **23**：78–79，2006.
27）Park DJ，Woog JJ，Pulido JS et al：Minocycline for the treatment of ocular and ocular adnexal sarcoidosis. Arch Ophthalmol **125**：705–709，2007.
28）Miyazaki E，Ando M，Fukami T et al：Minocycline for the treatment of sarcoidosis；is the mechanism of action immunomodulating or antimicrobial effect? Clin Rheumatol **27**：1195–1197，2008.
29）Marshall TG，Marshall FE：Sarcoidosis succumbs to antibiotics；implications for autoimmune disease. Autoimmun Rev **3**：295–300，2004.
30）The Marshall Protocol Study Site，Autoimmunity Research Foundation《http://www.marshallprotocol.com》

Etiology of sarcoidosis as an allergic endogenous infection caused by *Propionibacterium acnes*

Yoshinobu Eishi

Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University Graduate School

Summary

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown etiology. *Propionibacterium acnes*, the only microorganism that has been isolated from sarcoid lesions, is one of the most commonly implicated etiologic agents of sarcoidosis. A series of our studies has provided accumulating evidence that sarcoidosis is an allergic endogenous infection caused by *P. acnes*. This indigenous low-virulence bacterium can cause latent infection in the lungs and lymph nodes and persist in a cell-wall-deficient form. This dormant form of *P. acnes* can be activated endogenously under certain environmental conditions and proliferate in cells at the site of latent infection. In patients who are hypersensitive to this endogenous bacterium, granulomatous inflammation is triggered by intracellular proliferation of the bacterium. Proliferating bacteria may escape granulomatous isolation and spread to other organs via the lymphatic and blood streams. The spread of infective *P. acnes* may cause a new latent infection in systemic organs such as the eyes, skin, and heart. Latent *P. acnes* infection in certain systemic organs can be reactivated simultaneously by another triggering event, resulting in the onset of systemic sarcoidosis. Antibiotics, that are effective against intracellular *P. acnes*, not only kill the bacteria proliferating in cells, but also prevent the endogenous activation of latent bacteria. Long-term administration of antibiotics may therefore be effective for patients with progressive sarcoidosis by preventing inflammatory relapses caused by reactivation of the latent bacteria. If latent bacterial infection persisting in organs can be eradicated by treatment with antibiotics, complete remission of sarcoidosis may be achieved, although complete eradication of latent bacteria seems to be difficult to achieve through the conventional use of antibiotics, as in the case of pulmonary tuberculosis.

Key words : granuloma, intracellular infection, allergy, latent infection, endogenous activation

症　例 Case report　　お茶の水醫學雑誌　61：277-283（2013）

ウロキナーゼ胸腔内注入療法が有用であった膿胸，肺炎随伴性胸水の９例

佐内　文[1,2)]，大河内　康実[2)]，笠井　昭吾[2)]，徳田　均[2)]，宮崎　泰成[3)]，稲瀬　直彦[3)]
三島社会保険病院呼吸器科[1)]
社会保険中央総合病院呼吸器内科[2)]
東京医科歯科大学呼吸器内科[3)]

要旨：膿胸および肺炎随伴性胸水のドレナージ困難例に対して外科的治療が考慮されるが，患者側要因で困難な場合もある．われわれは膿胸および肺炎随伴性胸水のうちドレナージ困難な９例に，生理食塩水で洗浄後に，ウロキナーゼ６万単位を胸腔内に注入し翌朝までクランプする処置（ウロキナーゼ胸腔内注入療法）をドレナージ良好となるまで連日行った．全例でドレナージ良好となり，画像・血液検査所見はともに改善し軽快・退院となった．ドレーン挿入平均期間は18.7日，処置平均期間は11.9日であった．ウロキナーゼ胸腔内注入療法は，手術困難な膿胸および肺炎随伴性胸水における有効で安全な治療と思われた．

Key words：膿胸，肺炎随伴性胸水，ウロキナーゼ，胸腔内投与

Ⅰ．緒　　言

膿胸および肺炎随伴性胸水の初期治療は適切な抗菌薬投与とドレナージであるが，これだけで改善しない症例にもしばしば遭遇する[1)]．英国胸部疾患学会（British Thoracic Society: BTS）ガイドラインでは，この場合外科的治療を考慮することとしている[2)]．しかし高齢，基礎疾患，PS（performance status）不良などの患者側要因で実施困難な場合がある．このような症例に対して線維素溶解薬の胸腔内投与（以下，胸腔内線維素溶解療法）の有用性が報告されており[3~9)]，外科的治療を回避させうる治療法であると示唆されている[10,11)]．フィブリンは通常，プラスミノーゲンが活性化したプラスミンによって分解されるが，膿胸および肺炎随伴性胸水ではこの活性化を阻害するプラスミノーゲン活性化抑制因子が多く存在し，分解されずに隔壁が形成され多房化することでドレナージが困難となる[12,13)]．胸腔内線維素溶解療法は線維素溶解薬で多房化した膿胸腔を単房化し，ドレナージ効率を高めて肺の再膨張を促すことを目的とした治療である[14~17)]．われわれはウロキナーゼを用いた胸腔内線維素溶解療法（以下，ウロキナーゼ胸腔内注入療法）を積極的に適用し，良好な治療効果を得ているので報告する．

連絡先：佐内　文　asanai@mishimahp.jp

Ⅱ．対象および方法

2003～2008年に当科に入院した膿胸および肺炎随伴性胸水の患者のうち，20Frのシングルまたはダブルルーメントロッカーカテーテルを胸腔内に挿入し，排液，肺の拡張を図ったにもかかわらず良好なドレナージが得られず，病勢のコントロールが困難であった全例にウロキナーゼ胸腔内注入療法を実施した．実施前に本治療法の治療効果と副作用について患者および家族へ口頭で十分に説明し，不成功の場合には外科的治療を検討することを前提として同意を得てから行った．

膿胸および肺炎随伴性胸水の診断は，①感染症による臨床症状の存在（急性に生じた咳，喀痰などの呼吸器症状または37℃以上の発熱），②画像上の胸水の存在，③血液検査での炎症反応（WBC，CRP）上昇所見のすべてを満たすものとした．また胸水が肉眼的に明らかに膿であるものを膿胸，それ以外で好中球優位

表 1．対象例およびその血液・胸水所見

症例	年齢・性	PS	診　断	併存症	血液所見		胸水所見			
					WBC (/μl)	CRP (mg/dl)	細胞数 (/μl)	好中球 (%)	リンパ球 (%)	好酸球 (%)
1	61・女	3	膿胸	糖尿病，統合失調症	11,660	23.5	800			
2	66・男	2	膿胸	直腸癌，糖尿病	22,120	18.3	1,100	97	3	
3	61・男	1	膿胸	う歯	12,600	5.24	5,375	94	5	1
4	78・男	1	膿胸		11,600	32.3	700	96	2	2
5	21・男	1	膿胸		16,230	5.8	900			
6	60・男	1	膿胸	う歯	19,190	20.4	1,700	77	23	
7	64・男	1	膿胸		14,380	11.8	963	87	13	
8	53・男	1	膿胸		15,330	6.9	30,750	85	15	
9	56・男	1	肺炎随伴性胸水	糖尿病	9,400	16.7	1,162	81	14	5

表 2．診断からウロキナーゼ投与開始までの期間，胸腔ドレーン留置期間，ウロキナーゼ 投与期間と転機

症例	診断からウロキナーゼ投与開始までの期間（日）	胸腔ドレーン留置期間（日）	ウロキナーゼ投与期間（日）	転　帰
1	5	9	6	軽快
2	4	29	17	軽快
3	1	24	16	軽快
4	3	5	5	軽快
5	1	36	34	軽快
6	1	13	9	軽快
7	8	13	7	軽快
8	5	20	2	軽快
9	1	19	11	軽快

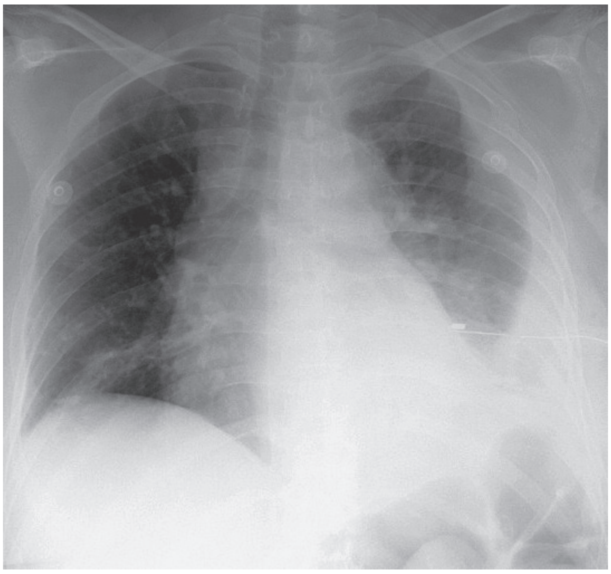
の滲出性胸水を認めるものを肺炎随伴性胸水とした[2, 18]．

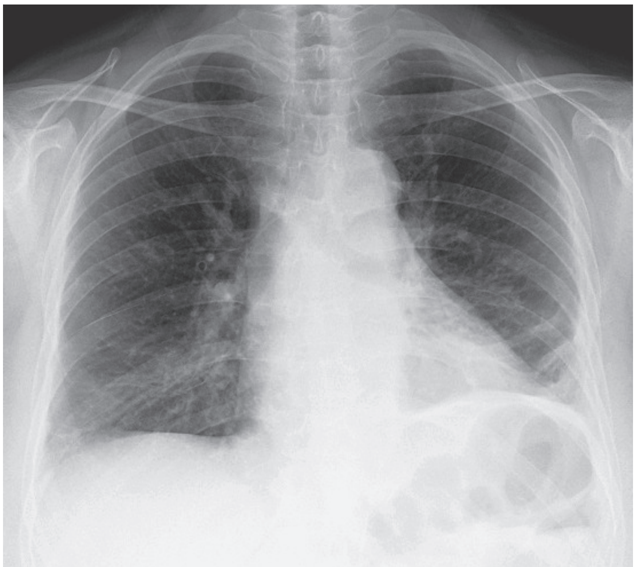
診断後ただちに胸腔ドレーンを挿入し，胸水中から起因菌が検出された場合はそれに対する，検出されなかった場合は推定される起因菌に対する十分な抗菌薬の投与下で1～2日間ドレナージの状態を観察した．排液が少量で，画像上胸腔内の多房化が疑われ，中等量ないし大量の液体の残留を認めるものをドレナージ不良と判断し，ウロキナーゼの投与を開始した．ウロキナーゼは6万単位を生理食塩水50 m*l*に溶解し，生理食塩水500 m*l*による胸腔内洗浄の後に胸腔内に注入し，投与後から翌朝までドレーンをクランプした．ドレナージ良好となり，画像上での胸水および膿胸腔の多房化の消失，血液検査で炎症反応の改善が確認できるまで連日この治療を行った．持続吸引は1日排液量が100 m*l*以下となった時点から−10 cm H_2Oで行い，1日排液量が50 m*l*以下となった時点でドレーンを抜去した．

治療効果判定は臨床症状の変化，週に2回の血液検査による炎症反応の変化，正面および左側面の2方向で撮影した胸部単純X線像による胸膜陰影の増減で行った．

Ⅲ．結　　果

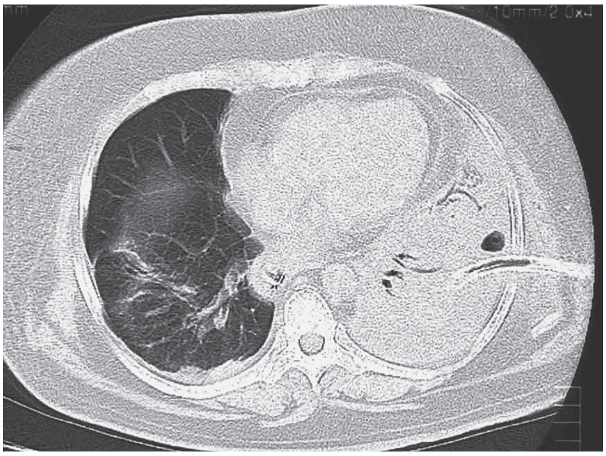
症例は全9例（男性8例，女性1例）で，8例が膿胸，1例が肺炎随伴性胸水であり，平均年齢は57.8（21～78）歳であった．うち2例がPS不良（PS2以上），1例が悪性腫瘍を伴っていた（表1）．起因菌が判明したものは1例（症例5）であり，MRSAであった．ドレーン抜去前には菌は検出されなくなった．診断～投与開始までは平均3.2日であり，全例でドレナージ良好となり，画像・血液検査所見ともに改善し軽快・退院した．ドレーン挿入期間は平均18.7日，投与期間は平均11.9日であった（表2）．以下に代表的な2例について示す．

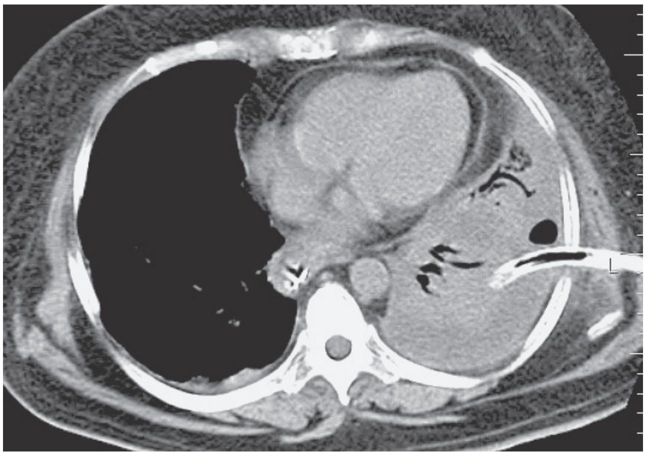




a. 治療前の胸部単純 X 線像

b. 治療後の胸部単純 X 線像





c. 治療前の胸部単純 CT

d. 治療前の胸部単純 CT

図 1．症例 1．61 歳，女．治療前後の胸部単純 X 線像および胸部単純 CT
左胸腔にドレーンが留置されており，左大量胸水を認める（a，c，d）．
治療後．胸水が消失している（b）．

Ⅳ．症 例 提 示

【症例 1】61 歳，女．糖尿病，統合失調症．

現病歴：前医で左膿胸と診断され胸腔ドレーンを留置されたが，ドレナージ不良のため留置後 3 日で転院となった（図 1a，c，d）．

入院時所見：入院時は 38℃ 台の発熱を認め，敗血症による血圧低下のためドパミンの持続投与が必要であった．血液検査では WBC 11,660/μl，CRP 23.5 mg/dl と炎症反応の上昇を認めた．

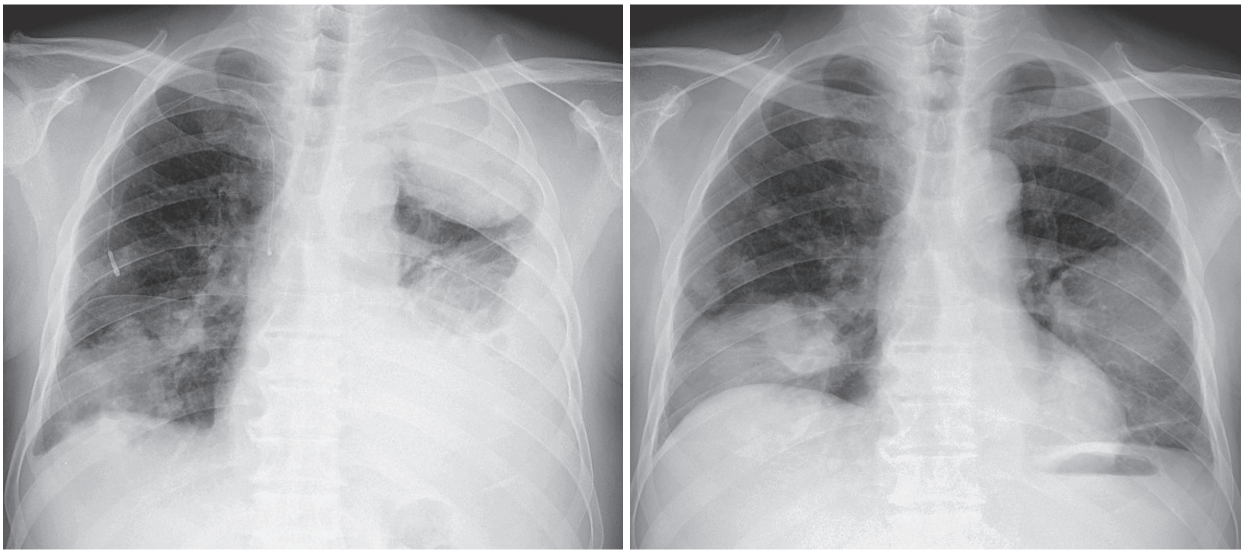
入院後経過：第 1 病日よりパニペネム/ベタミプロン（PAPM/BP）1.5 g/日およびクリンダマイシン（CLDM）2,400 mg/日の点滴投与を開始し，ドレーンを再留置したが，ドレナージ不良であった．第 3 病日よりウロキナーゼの投与を開始し，すみやかにドレナージ良好となり画像・血液検査所見ともに改善した．第 8 病日に投与を終了，第 11 病日にドレーンを抜去し，第 12 病日に抗菌薬の投与を終了した．その後発症した偽膜性腸炎の治療，糖尿病のコントロールを行い第 28 病日に軽快・退院した（図 1b）．起因菌は不明であった．

【症例 2】66 歳，男．糖尿病，直腸癌（肺内多発転移，気管支内転移）．

現病歴：抗癌薬治療による骨髄抑制中に左胸膜炎を発症し入院となった．

入院時所見：入院時は 38℃ 台の発熱を認め，血液検査で WBC 12,600/μl，CRP 5.24 mg/dl と炎症反応の上昇を認めた．

入院後経過：第 1 病日より PAPM/BP 1.5 g/日および CLDM 2,400 mg/日の点滴投与を開始したが改善は乏しく，第 5 病日に採取した胸水の性状から左膿胸と



a. 治療前．左上肺野と下肺野に胸水を認める．

b. 治療後．胸水が消失し，両肺野に直腸癌の多発転移の陰影のみ残存している．

図 2．症例 2．66 歳，男．治療前後の胸部単純 X 線像

診断した（図 2a）．同日，胸腔ドレーンを挿入したがドレナージ不良であり，胸部 CT で膿胸腔の多房化を認めたためウロキナーゼの投与を開始した．ドレナージはすみやかに良好となり，画像・血液検査所見ともに改善した．第 21 病日にウロキナーゼの投与を，第 26 病日に抗菌薬の投与を終了，第 33 病日に胸腔ドレーンを抜去し，第 36 病日に軽快・退院した（図 2b）．胸膜炎および膿胸診断時のいずれも起因菌は不明であった．

V．考　　察

BTS ガイドラインでは，適切な抗菌薬投与とドレナージで改善しない膿胸および肺炎随伴性胸水は外科的治療を考慮することとしており [2]，近年，従来の開胸より低侵襲である胸腔鏡での治療が奏功した報告や，これを推奨する意見がある [19, 20]．しかしまた，肺炎随伴性胸水は一般的に肺炎入院患者の 20〜40% に認められ，そのうち 10% が急性膿胸に進展するとされ [18]，また急性膿胸は高齢者や基礎疾患を有するものに発生することが多く [21]，外科的治療が困難な場合も少なくない．このような症例を対象に，わが国では現時点で保険適用ではないが，胸腔内線維素溶解療法を行うことがある [22]．高齢者や PS 不良例でも，重篤な副作用がなく治療できたという報告も多い [5~7]．

線維素溶解療法は 2005 年のストレプトキナーゼとプラセボの大規模比較試験で外科的治療への移行率，死亡率，在院日数において有意差が認められなかったことから [23]，2010 年の BTS ガイドラインでは線維素溶解療法の一般的な使用は推奨されていない [2]．しかし 2011 年には Rahman らが，そのほかの線維素溶解薬である組織プラスミノーゲン活性化因子（t–PA）および DNA 分解酵素（DNase）の有効性を報告しており [24]，2012 年に Janda らは，線維素溶解療法とプラセボを比較した 7 つのランダム化比較試験のシステマティックレビューおよびメタアナリシスで，線維素溶解療法に，潜在的に成人の肺炎随伴性胸水と膿胸の治療失敗（外科的治療を要する，もしくは死亡）を回避する効果がある [11] と報告しており，その有効性は最近でも議論されている．

また 2008 年の Cochrane systematic review および前述の Janda らの報告では，胸腔内線維素溶解療法が外科的治療を回避させうることが示唆されており [10, 11]，わが国でも外科的治療が実施困難な高齢者や基礎疾患を有する患者に使用し，外科的治療を回避できた報告が続いており [5~7]，外科的治療の前に線維素溶解療法による治療を試みることを推奨する意見もある [6]．自験例でも，PS 不良例［症例 1（PS3），症例 2（PS2）］，悪性腫瘍を伴う症例（症例 2）を含む全例で外科的治療を回避できた．

しかし現時点では，その投与方法について一定の見解が得られていない．これまではウロキナーゼの投与量を 10 万単位/回 [3, 4, 8, 9]，とくにわが国の報告ではウロキナーゼ製剤が 1 バイアル 6 万単位であるため 6〜12 万単位/回とする報告が多く [5~7]，注入後のクランプ時間は 2〜3 時間とするものが多かった [3~9]．また投与開始時期は定まっていなかったが，診断後 2 週間以内に投与開始された全例でドレナージが良好となった一方で，3 週間以上経過した症例では総投与量を増やしても効果不十分であったという報告があり [3, 5]，

早期の投与開始が有効であると考えられている．また線維素溶解療法の重篤な副作用の報告はまれであるが，総投与量が175万単位までは副作用が増加しなかった報告があり[4]，総投与量は少ないことが望ましいと考えられた．

このため今回は総投与量を少なくする目的で6万単位/回とし，投与開始時期は，胸腔ドレーン挿入後1～2日間の観察でドレナージ不良と判断した後ただちにとした．クランプ時間の延長で薬剤が胸腔内により行き渡り治療期間の短縮が期待できると考え，投与後から翌朝までの12～24時間クランプした．これまでに線維素溶解療法の重篤な副作用の報告はまれであるが，Godleyらは，外科的治療後に実施し全身性出血，敗血症で死亡した事例[25]，Temesらは，実施1ヵ月前に受傷した肋骨骨折部からの出血持続のため開胸手術となった事例[26]を報告しており，またウロキナーゼの胸腔内から血中への移行についての薬物動態を示した文献はなく，クランプ時間の延長で出血のリスクが高まる可能性があった．このため処置開始からドレーン抜去までの間，ドレーン排液の性状，全身の出血傾向のチェックおよび血液検査での凝固能のチェックを注意深く行い，軽度でも出血傾向を疑う徴候があればただちに処置を中止し，外科的治療を考慮することとした．

自験例では，診断後平均3.2日と早期に投与を開始し，臨床的な改善率は100％と結果は良好であった．これは早期の投与開始が有用であるという見解と一致する[3～5]．また今回はPS不良例［症例1（PS3），症例2（PS2)］，悪性腫瘍を伴う症例（症例3）にも安全に使用できた．しかし投与期間は11.9日と過去の報告の2～4日より長期であり，投与量の減量との関与が疑われた．しかし1回6万単位を連日または隔日で平均2.4回投与し，全7例のうちすべてで良好なドレナージが可能であったという報告もあり[5]，断定できない．今後もさらなる比較・検討試験を行い，投与方法を確立することが望まれる．また症例5は，そのほかの症例と比較して34日と長期の投与を行っている．この症例5は，自然気胸に対する胸腔鏡下ブラ切除術後に発症したMRSA膿胸であり，外科医の判断および患者の希望でウロキナーゼ胸腔内注入療法を選択した．処置期間が長期に及び外科的治療の介入も検討したが，病状が徐々に快方に向かっていたことから外科医と相談しつつ処置を継続した．本例は副作用なく治癒したが，前述のように本治療は，非常にまれではあるが出血の副作用の報告もあるため，処置が長期におよび治療に難渋する場合は外科的治療を考慮すべきであると考えられる．

このようにウロキナーゼを含む線維素溶解療法には検討すべき点が残されている．しかし今後の症例の蓄積・検討により，発症早期および手術困難な膿胸および肺炎随伴性胸水に対して最初に試みるべき有効かつ安全な治療となりうると考えられる．

文　献

1) Weissberg D，Refaely Y：Pleural empyema；24-year experience. Ann Thorac Surg **62**：1026–1029，1996.

2) Davies HE，Davies RJ，Davies CW；BTS Pleural Disease Guideline Group；Management of pleural infection in adults：British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. Thorax **65**：ii41–ii53，2010.

3) Pollak JS，Passik CS：Intrapleural urokinase in the treatment of loculated pleural effusions. Chest **105**：868–873，1994.

4) Moulton JS，Benkert RE，Weisiger KH et al：Treatment of complicated pleural fluid collections with image-guided drainage and intracavitary urokinase. Chest **108**：1252–1259，1995.

5) 小林真也，新井正伸，武田研一ほか：線維素性膿胸に対するウロキナーゼ胸腔内投与の検討．奈良病医誌 **10**：21–23，2006.

6) 坪島顕司，的場保巳，小林　巖ほか：ウロキナーゼ胸腔内投与直後に改善をみた急性膿胸の2例．日臨外会誌 **71**：2547–2551，2010.

7) 樋口清一，石原真一，小林裕幸ほか：急性膿胸，肺炎随伴性胸水に対するウロキナーゼ胸腔内線維素溶解療法．日胸臨 **71**：77–84，2012.

8) Bouros D，Schiza S，Tzanakis N et al：Intrapleural urokinase versus normalsaline in the treatment of complicated parapneumonic effusions and empyema；a randomized，double-blind study. Am J Respir Crit Care Med **159**：37–42，1999.

9) Tuncozgur B，Ustunsoy H，Sivrikoz MC et al：Intrapleural urokinase in the management of parapneumonic empyema；a randomised controlled trial. Int J Clin Pract **55**：658–660，2001.

10) Cameron R，Davies HR：Intra-pleural fibrinolytic therapy versus conservative management in the treatment of adult parapneumonic effusions and empyema. Cochrane Database Syst Rev 2008：CD002312.

11) Janda S，Swiston J：Intrapleural fibrinolytic therapy for treatment of adult parapneumonic effusions and empyemas；a systematic review and meta-analysis. Chest **142**：401–411，2012.

12) Idell S，Girard W，Koenig KB et al：Abnormalities of pathways of fibrin turnover in the human pleural space. Am Rev Respir Dis **144**：187–194，1991.

13) Philip-Joët F，Alessi MC，Philip-Joët C et al：Fibrinolytic and inflammatory processes in pleural

effusions. Eur Respir J **8**：1352–1356, 1995.
14) Colice GL, Curtis A, Deslauriers J et al：Medical and surgical treatment of parapneumonic effusions；an evidence-based guideline. Chest **118**：1158–71.
15) Davies CW, Gleeson FV, Davies RJ：Pleural Diseases Group, Standards of Care Committee, British Thoracic Society：BTS guidelines for the management of pleuralinfection. Thorax **58**：ii18–ii28, 2003.
16) Girdhar A, Shujaat A, Bajwa A：Management of infectious processes of the pleural space；a review. Pulm Med 2012：816502.
17) Koegelenberg CFN, Diacon AH, Bolliger CT：Parapneumonic pleural effusion and empyema. Respiration **75**：241–250, 2008.
18) Light RW：Parapneumonic effusions and empyema. Proc Am Thorac Soc **3**：75–80, 2006.
19) Wurnig PN, Wittmer V, Pridun NS et al：Videoassisted thoracic surgery for pleural empyema. Ann Thorac Surg **81**：309–313, 2006.
20) 手塚憲志，山本真一，遠藤俊輔：病態に基づいた膿胸の外科治療．呼吸 **30**：230–236, 2011.
21) 松本和也，白石伊都子，寺町政美ほか：急性膿胸に対する胸腔鏡下手術の検討．日呼外会誌 **21**：770–775, 2007.
22) 橋口波子，原田英治，中西洋一：呼吸器疾患の病態と診断・治療（III）―膿胸（empyema）．医と薬学 **64**：479–484, 2010.
23) Maskell NA, Davies CW, Nunn AJ et al：UK controlled trial of intrapleural streptokinase for pleural infection. N Engl J Med **352**：865–874, 2005.
24) Rahman NM, Maskell NA, West A et al：Intrapleural use of tissue plasminogen activator and DNase in pleural infection. N Engl J Med **365**：518–526, 2011.
25) Godley PJ, Bell RC：Major hemorrhage following administration of intrapleural streptokinase. Chest **86**：486–487, 1984.
26) Temes RT, Follis F, Kessler RM et al：Intrapleural fibrinolytics in management of empyema thoracis. Chest **110**：102–106, 1996.

Nine cases of empyema and parapneumonic pleural effusion effectively treated with intrapleural urokinase administration

Aya Sanai[1,2], Yasumi Okochi[2], Shogo Kasai[2],
Hitoshi Tokuda[2], Yasunari Miyazaki[3], Naohiko Inase[3]

[1] Department of Respiratory Medicine, Mishima Social Insurance Hospital
[2] Department of Respiratory Medicine, Social Insurance Central General Hospital
[3] Department of Integrated Pulmonology, Tokyo Medical and Dental University Graduate School

Summary
Surgical intervention is a treatment option in empyema and parapneumonic pleural effusion patients when drainage is impracticable. Patient factors, however, sometimes preclude surgery. The following treatment was administered to empyema and parapneumonic pleural effusion patients with difficult-to-drain. After irrigation with normal saline, 60,000 UI of urokinase was administered intrapleurally and the drainage tube was clamped until the next morning (intrapleural urokinase administration). The same procedure was repeated daily until sufficient drainage conditions were confirmed. All 9 patients achieved sufficient drainage with improved imaging and laboratory findings, and were discharged from the hospital. The drains were left in place for an average of 18.7 days and the procedure was continued for an average of 11.9 days. Intrapleural urokinase administration seems to be an effective and safe treatment for empyema and parapneumonic pleural effusion patients in patients ineligible for surgery.

key words : empyema, parapneumonic pleural effusion, urokinase, intrapleural administration

剖検症例から学ぶ疾病の転帰と病態生理

剖検症例 No.53～66

症例 No.53　びまん性肺胞傷害を呈して死亡した amyopathic dermatomyositis

剖検依頼科：膠原病リウマチ内科

【概要】 呼吸器症状で発症，その後呼吸器症状の悪化とともに皮膚・粘膜症状が出現し，amyopathic dermatomyositis と診断した症例である．発症以来呼吸器症状が徐々に進行し，末期にはステロイドパルス療法を導入したが奏効せず，呼吸状態の急激な悪化をきたし死亡した．剖検時，肺はびまん性肺胞傷害の状態であり，原病に合併したびまん性肺胞傷害と考えられたが，同時に侵襲性肺アスペルギルス症も認められ，びまん性肺胞傷害が感染により引き起こされた可能性も否定はできなかった．

【症例】 54 歳，女性．

主　訴：咳嗽・呼吸困難，皮膚潰瘍，口腔内潰瘍．

家族歴：妹がリウマチの疑い．

既往歴：頸肩腕症候群．

生活歴：喫煙歴はなし，飲酒歴はビール 1,500 ml/日（4～5 年前より）．

【臨床経過】

死亡 3 年前：頸肩腕症候群の精査のため他院に長期入院後，労作時の息切れ，乾性咳嗽が出現した．

6 月前：咳嗽のため入眠困難となる．

1 ヵ月前：咳嗽がさらに増悪し，安静時の呼吸困難感が出現した．胸部 CT では両側多発すりガラス影と下肺野主体の airbronchogram を伴う consolidation を認めた（図 1）．そのほか，頸部や MP 関節周囲の紅斑，爪床梗塞，Gottron 徴候，口腔内潰瘍なども出現した．筋力低下や CK 上昇はなく，他院で amyopathic dermatomyositis と診断されステロイドパルス療法を施行された．

3 週前：当院に転院．ステロイド・免疫抑制薬投与，非侵襲性陽圧換気法で治療を行ったが呼吸状態，胸部陰影は徐々に悪化した．また，入院時，ビリルビン高値，アルブミン低値，腹部エコー所見などにより肝硬変が 疑われた．

1 週前：両側上中肺野末梢にすりガラス影が新たに多発した（図 2）．原病の増悪と判断しステロイドパルス療法を行う．

4 日前：β-D グルカンが高値を示し，抗真菌薬投与を開始した．呼吸状態の急激な増悪のため人工呼吸器管理を開始した．

死亡前日～死亡：呼吸不全がさらに進行し全身状態が悪化し，死亡した．

【検索希望事項】

急激な呼吸不全の進行をきたした病態について，肝硬変の原因，悪性腫瘍の有無，真菌感染症の局在．

【剖検診断】

びまん性肺胞傷害，侵襲性肺アスペルギルス症，左肺原発性腺癌，amyopathic dermatomyositis，アルコール性肝硬変．

【剖検所見】

1. びまん性肺胞傷害（690/735 g）：割面は全体にぬめりを伴って硬度が増しており（図 3），肺野全体に肺胞壁に沿った硝子膜形成がみられる（図 4）．一部には腔内の器質化や幼若な線維化も確認され，びまん性肺胞傷害滲出期～器質化期に相当する．
2. 侵襲性肺アスペルギルス症：左肺下葉，右肺中葉に空洞化した膿瘍があり．そのほかの領域にも癒合傾向を示す巣状の気管支肺胞性肺炎が散見され，これらの病変中にはアスペルギルス菌糸が多数存在する（図 5）．また，左肺組織と血液の培養からは，*Aspergillus fumigatus* が検出された．
3. 左肺原発性腺癌：左肺上葉に最大径 2.5 cm の混合型腺癌（乳頭型＞細気管支肺胞上皮型）がある．（図 7）．
4. Amyopathic dermatomyositis
   1）前胸部，肘関節伸側皮疹：前胸部に 17×8 cm 大の赤紫色皮疹が（図 6），肘関節伸側にも色素沈着があり．組織学的には，液状変性を伴った表皮の萎縮，乳頭血管周囲の単核球浸潤，真皮へのムチン沈着が認められ，皮膚筋炎に矛盾しない．
   2）筋：筋束辺縁の筋線維の萎縮，血管周囲性の単核球浸潤など，皮膚筋炎に特徴的とされる所見はみられない．
5. アルコール性肝硬変（1,365 g）：凹凸不整で弾性硬．肝組織は線維性隔壁と再生結節からなり，肝細胞の著明な脂肪変性と細胞周囲線維化を認める．Mallory 小体がある．好中球は目立たない．胆汁栓が多数見出される．脾腫（305 g）を伴う．

【病理所見まとめ】

1. 肺はびまん性肺胞傷害の状態であり，直接死因となった呼吸不全の急激な悪化に対応する所見であった．Amyopathic dermatomyositis ではステロイド治療抵抗性の急速進行性間質性肺炎を合併しやすいとされており，原病に合併したびまん性肺胞傷害と考えられた．しかしながら，侵襲性肺アスペルギルス症の合併からは，感染によりびまん性肺胞傷害が引き起こされた可能性も否定できないと考えられた．
2. 皮膚所見は皮膚筋炎として矛盾しなかった．その一方で，筋に皮膚筋炎に特徴的とされる所見はみられず，amyopathic dermatomyositis の臨床診断に合致する所見であった．また，左肺上葉には原発性腺癌が認められ，皮膚筋炎に関連した悪性腫瘍と考えられた．生前に肺癌は指摘されていなかったが，原病や感染に伴った肺病変により画像上病変の検出が困難であったものと思われた．
3. 肝は肝硬変の像を呈しており，飲酒歴，肝炎ウィルス抗体陰性であること，そして肝細胞の脂肪変性，肝細胞周囲性の線維化などの組織所見から，アルコール性肝硬変と考えられた．

臨床画像

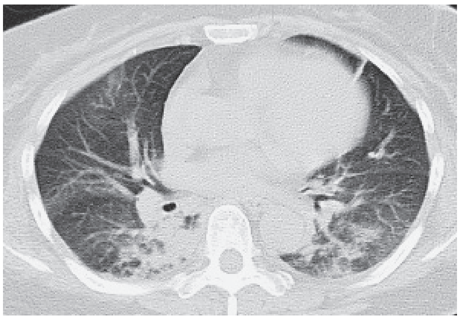


図 1．死亡 1 ヵ月前の胸部 CT．両側背側優位にすりガラス影の多発を認める．

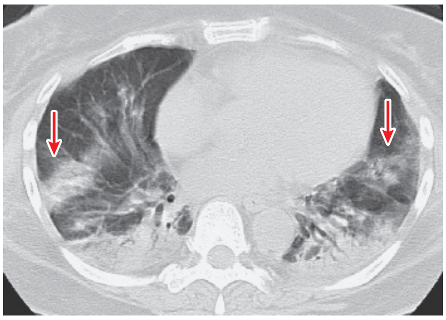


図 2．死亡 1 週前の胸部 CT．上中肺野末梢に新たにすりガラス影が出現している（矢印）．

病理画像

図 3．摘出肉眼標本（1）．肺の割面．全体にぬめりを伴い硬度が増している．左下葉には空洞形成がある（矢印）．

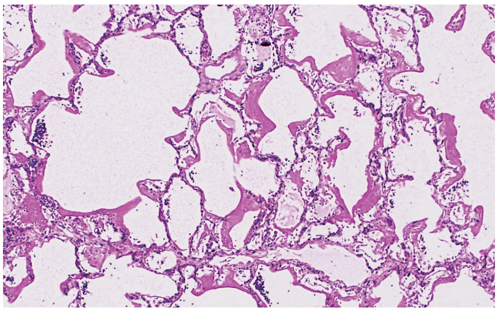


図 4．代表的な肺の病理組織像（HE 染色）．肺隔に沿った硝子膜形成がある．

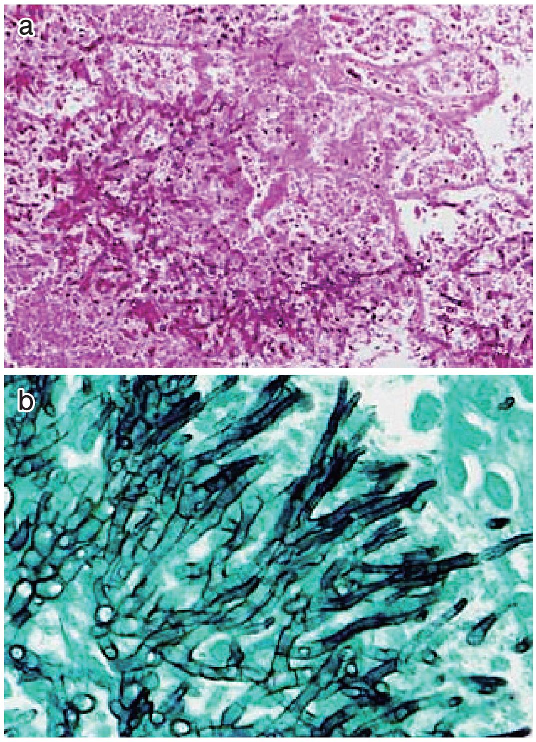


図 5．左下葉空洞部の病理組織像（a．HE 染色，b．Grocott 染色）．強い壊死・炎症反応がみられ（a），Grocott 染色ではアスペルギルス菌糸が確認される（b）．

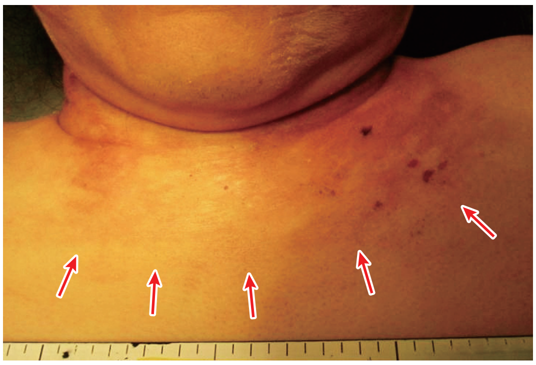


図 6．前胸部の外観所見．赤紫色の皮疹が認められる（矢印）．

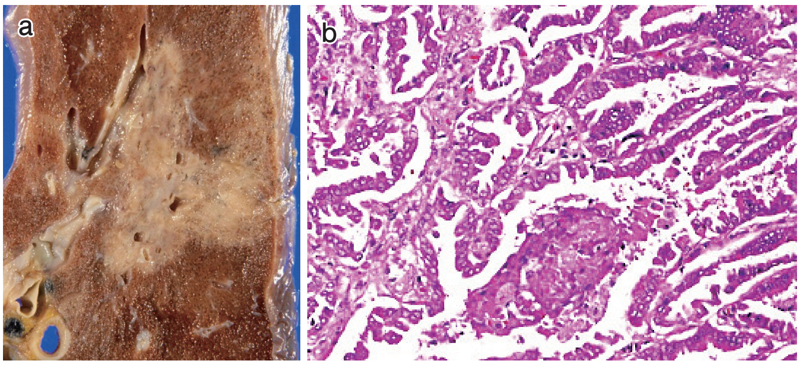


図 7．摘出肉眼標本（2）．左肺上葉に最大径 2.5 cm の腫瘤がある（a）．組織学的には乳頭型主体の混合型腺癌（b：HE 染色）である．

症例 No.54　子宮頸部扁平上皮癌の広範な進展をきたし，制御不良な感染症状により死亡した 1 例

剖検依頼科：周産女性診療科

【概要】死亡 4 年前に不正性器出血が出現，3 ヵ月前から再度出現し，疼痛が徐々に増悪した．1 ヵ月前の検査で子宮頸部に 8 cm 大の腫瘍を認め，炎症反応の上昇もあり入院となった．腫瘍に対し一時放射線治療を行ったが，感染症状の悪化により中止した．その後播種性血管内凝固症候群（DIC）を発症し，感染が制御不良となり死亡した．剖検では子宮頸部から周囲圧排性に進展する腫瘤が認められ，右尿管，膀胱へ浸潤していた．また腸管の広範な感染・壊死，腹膜炎の所見がみられ，これが直接死因になったと考えられた．腸炎および腹膜炎については，臨床的に子宮癌巣内の感染が強く疑われたが，癌巣感染とは直接関連しない腸管感染症が生じた可能性も考えられた．

【症例】46 歳，女性．
主　訴：不正性器出血，下腹部痛．
家族歴：父，弟が気管支喘息．
既往歴：胃潰瘍，子宮筋腫，帝王切開．
生活歴：喫煙は 20 本/日 ×25 年，飲酒は機会飲酒．

【臨床経過】
死亡 4 年前：不正性器出血により近医で細胞診を行い，class III であった．他院で精査したが異常はなく，その後受診しなかった．
3 ヵ月前：再度不正出血が出現，腰部〜右下腹部の疼痛があったが市販の鎮痛薬で制御可能であった．
1〜2 ヵ月前：残尿感，頻尿，嘔気が出現し，疼痛は増悪した．
1 ヵ月前：疼痛はさらに増悪し当院に救急搬送された．子宮頸部に 8 cm 大の腫瘍を認め，右尿管・膀胱浸潤を疑った（図 1, 2）．また右腎静脈血栓を認めた．WBC，CRP の上昇を認め，入院し抗生物質投与を開始した．
4 週前：下痢症状が増悪した．
22 日前：38℃ 台をピークとする弛張熱が出現した．
19 日前：炎症反応は著明に上昇．CT で腸管壁の浮腫性肥厚，腹水を認める．腫瘍の周囲浸潤と骨盤内感染による二次性イレウスを疑い抗生物質を投与，また腎機能も悪化し，輸液，アルブミン投与を開始した．
18 日前：放射線療法開始も下痢・便失禁が増悪した．便培養から MRSA 検出．バンコマイシン投与を開始し，放射線療法を中止した．
17 日前：アンチトロンビン III 25.2% と低下，アンチトロンビン製剤点滴を開始した．血小板減少，DIC スコア上昇も認められ，トロンボモジュリン製剤の投与を開始した．その後症状は軽快・増悪を繰り返した．
6 日前：下痢が再度出現した．
2 日前：抗生物質治療，DIC 治療を継続したが感染制御不良で，疼痛制御のみに変更した．翌日には努力呼吸となり，翌々日死亡した．

【検索希望事項】
直接死因，腫瘍の状態，感染の状態，血栓・塞栓の有無，腸管壊死の原因．

【剖検診断】
子宮頸部癌（扁平上皮癌），細菌性壊死性腸炎および慢性化膿性腹膜炎，多発肝膿瘍．

【剖検所見】
A. 子宮頸部癌（扁平上皮癌，85 mm 大）および右水腎症・閉塞性腎症
1. 既往検体（腹膜播種）：Squamous cell carcinoma，invasive，of the uterine cervix，biopsy.
2. 子宮および骨盤臓器：内腔に最大径 8.5 cm，白色調で部分的に壊死した腫瘤を認め，大小の胞巣を形成し浸潤する角化が著明で，角化型扁平上皮癌の所見（図 3, 4）である．癌は子宮筋層，周囲結合組織へ浸潤し，右尿管と膀胱にも及ぶ．付属器，直腸への浸潤はない．
3. リンパ行性および血行性転移：転移はない．
4. 腎臓（180/165 g）：右は腎盂が拡張する．右腎静脈に器質化血栓を認めたが内腔の閉塞はない．右腎実質では尿細管は高度に萎縮し，一部は拡張し管腔内に PAS 陽性の円柱を入れる．
5. 尿管：上記癌病変により，右尿管閉塞部から上部は著明に拡張し尿が貯留する．

B. 細菌性壊死性腸炎および慢性化膿性腹膜炎
　上行〜下行結腸で粘膜が菲薄化・壊死し，S 状結腸〜直腸にかけては粘膜面が潰瘍化し厚い壊死組織で被覆される．壊死部に好中球浸潤は乏しく，桿菌様菌体が多数認められる．腹部は著明な膨隆と波動を伴い，開腹すると大量の混濁腹水（7,000 m*l*）が存在した．腸管は腹腔内臓器や大網と高度に癒着し腹膜炎の状態を呈している（図 5）．

C. 多発肝膿瘍
　肝臓（1,180 g）：1 cm 大までの黄白色膿瘍が複数存在し，肝細胞が凝固壊死に陥っている．また赤色領域が地図状に存在し，小葉中心性に肝細胞の脱落，脂肪変性などが認められる．

【病理所見まとめ】
1. 子宮頸部原発の腫瘤が認められ，組織学的には角化型扁平上皮癌の所見であった．圧排性・膨張性の進展形式を示し右尿管および膀胱に浸潤しており，尿管閉塞とそれに伴う水腎症の原因となったと考えられた．転移や播種は認められなかった．
2. 腸管において広範囲に感染・壊死が認められた．好中球浸潤には乏しかったが，高度な炎症により免疫抑制状態であったためと推測される．また肝臓にも膿瘍が存在し，敗血症を反映した所見と考えられた．
3. 本例では，制御不良な高度の感染が直接死因となったと考えられる．腸管および腹膜にみられた感染所見に関しては，病理組織学的には腸炎，腹膜炎とも高度で，かつ比較的時間の経過した病変であることから，臨床的に炎症所見が出現した死亡 1 ヵ月前から発症していたと推察される．感染の成因に関しては，子宮癌巣内からの波及か，それとは別に生じた腸管感染症かは同定が困難であった．

臨床画像

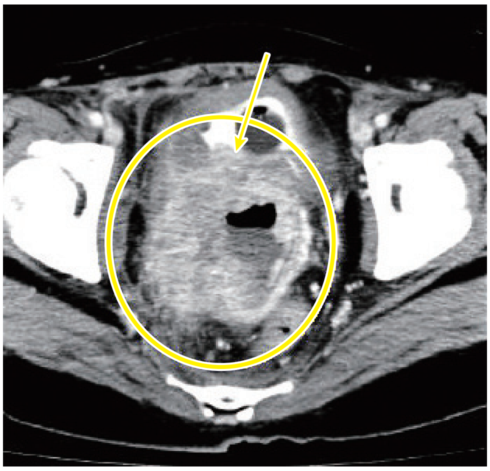


図 1．死亡 1 ヵ月前の腹部 CT．子宮頸部主体に 80 mm 大の腫瘤が認められる（矢印）．

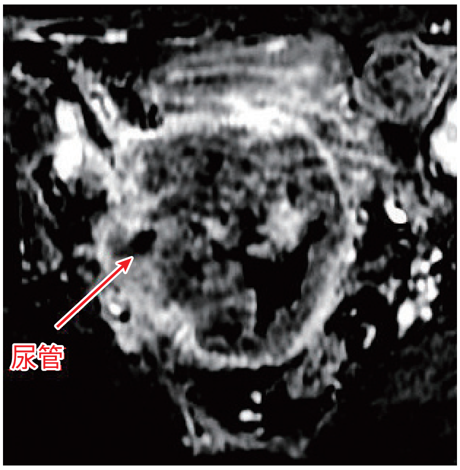


図 2．死亡 1 ヵ月前の骨盤 MRI．腫瘍の右尿管への浸潤が認められる．

病理画像

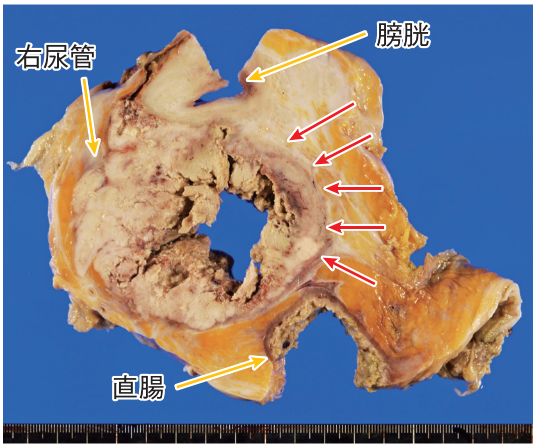


図 3．摘出肉眼標本（1）．子宮および周囲臓器（水平断）．壊死を伴う充実性腫瘍（赤矢印）．膀胱，右尿管浸潤を認める．

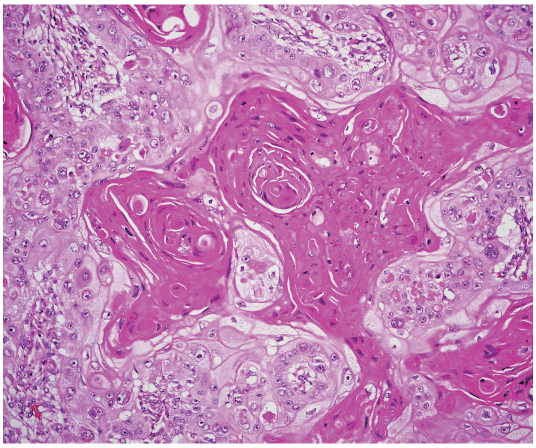


図 4．腫瘍の病理組織像（HE 染色）．著明な角化を示す角化型扁平上皮癌が認められる．

図 5．摘出肉眼標本（2）．腸管は腹腔内臓器や大網などと癒着し，腹膜炎の状態である．

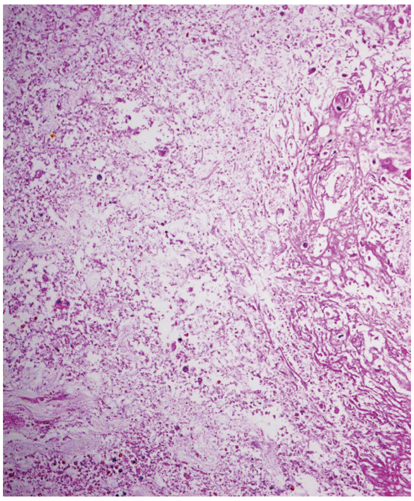


図 6．上行結腸の病理組織像（HE 染色）．全層性に壊死に陥り壁構造が消失している．

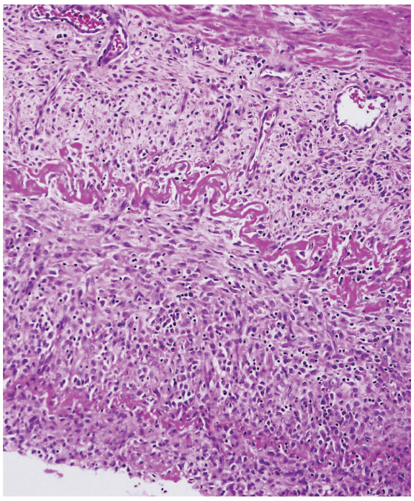


図 7．腹膜の病理組織像（HE 染色）．線維化を伴ったやや時間の経過した腹膜炎の所見である．

症例 No.55　肺気腫の急性増悪をきたして死亡した 1 例

剖検依頼科：救急科

【概要】Chronic obstructive pulmonary disease（COPD）で約 4 年前から在宅酸素療法を導入されていた．COPD 急性増悪の診断で前医に入院，ステロイド治療により呼吸状態は改善がみられていたが，その後 40℃ の発熱をきたし，呼吸停止がみられたため当院救急外来に搬送された．重症肺炎の診断で抗生物質治療を開始した．発熱は徐々に落ち着き，炎症反応も改善傾向であったが，抜管後から呼吸性アシドーシスが進行，徐々に血圧も低下し，死亡した．剖検で高度の肺気腫が認められ，左肺上葉背側には慢性壊死性肺アスペルギローシスも合併していた．肝臓には循環障害による変化がみられた．肺気腫による呼吸不全の悪化に加え，多量の乳び腹水（蛋白漏出に伴う低栄養状態の進行），および循環障害を合併し，死亡にいたったと考えられる．

【症例】74 歳，男性．

主　訴：呼吸困難．

既往歴：COPD，うつ病（2011 年から内服），十二指腸潰瘍に対し手術（詳細不明）．

生活歴：喫煙歴あり（詳細不明）．

【臨床経過】

4 年前：COPD（図 1, 2）に対し在宅酸素療法が導入された．

半年前：原因不明の発熱があり．クオンティフェロンが強陽性であったため，抗結核薬治療が行われていた．その後 COPD 急性増悪の診断で前医に入院中であった．

入院前日：呼吸状態が悪化したが，ステロイド治療によりいったんは改善がみられた．

入院当日：40℃ の発熱をきたし，呼吸停止にいたったため，当院救急外来に搬送された．重症肺炎と診断し，抗生物質による治療を開始した．

2 週後：発熱は徐々に落ち着き，炎症反応も改善傾向であったが，抜管後より呼吸性アシドーシスが進行した．

3 週後：徐々に血圧低下をきたし，死亡した．

【検索希望事項】

1. 多臓器不全にいたる原因疾患について，2. 乳び腹水の原因について．

【剖検診断】

1. 高度肺気腫．
2. 慢性壊死性肺アスペルギローシス（左上葉）．
3. 肝小葉中心性壊死・肝線維症．
4. 乳び腹水症．

【剖検所見】

1. 高度肺気腫（図 3）：肉眼的に，両肺に小葉中心～汎小葉性の気腫性変化を中等度に認める．組織学的にも，肺胞壁の破壊を伴って，末梢気腔は中等度までに拡張する．弾性線維の減少が目立つが，線維化は目立たない．両側胸水貯留（900/750 m*l*），淡黄色透明．
2. 慢性壊死性肺アスペルギローシス（左上葉）（図 4）：左肺上葉背側には 10 mm 大までの褐色領域が散見される．組織では，肺胞腔内を充満する炎症巣からなっており，滲出物・好中球浸潤を著明に伴う．一部にアスペルギルス真菌塊を認める．肉芽腫の形成はなく，結核を示唆する所見は認められない．Ziehl-Nealsen 染色により抗酸菌（-）．
3. 肝小葉中心性壊死・肝線維症：表面は平滑，割面では小葉構造は比較的保たれるが，組織学的には，中心静脈周囲を主体に，肝細胞の軽度脱落，出血，ヘモジデリンの沈着とともに，中心静脈から小葉へ伸び出す放射状の線維化が目立つ．部分的に C–P 架橋線維化にいたる．門脈域には軽度の線維性拡大を認めるのみである．炎症細胞浸潤もごく軽度．脂肪沈着は乏しい．
4. 乳び腹水症：乳び調の腹水を 400 m*l* 認める．

【病理所見まとめ】

1. 肺には中等度までの末梢気腔の拡張とともに，弾性線維の減少・消失が目立ち，高度肺気腫の所見であった．左肺上葉背側にはステロイド投与に関係すると思われる慢性壊死性肺アスペルギローシスも認められた．肝臓には中心静脈周囲を主体に肝細胞の脱落を認め，循環障害による変化と考えられる．肺気腫による呼吸不全の悪化に加え，多量の乳び腹水（蛋白漏出に伴う低栄養状態の進行），および循環障害を合併し，死亡にいたったと考えられる．
2. 乳び胸水，腹水は進行癌，悪性リンパ腫に伴う胸管の破裂が原因であることが多いが，肝・膵切除後に乳び腹水を比較的まれに合併することが報告されている．膵切除の際には大動脈周囲または上腸間膜動脈周囲の郭清を行うため，それに伴う中枢のリンパ管の損傷が原因と考えられる．本例では，十二指腸潰瘍に対し，幽門側胃切除，および膵体尾部切除の既往があるものの，手術時期が不明であり，術後合併症の可能性としては考えにくい．

臨床画像

図 1. 4 年前の胸部 X 線像.
両肺の過膨張を認める.

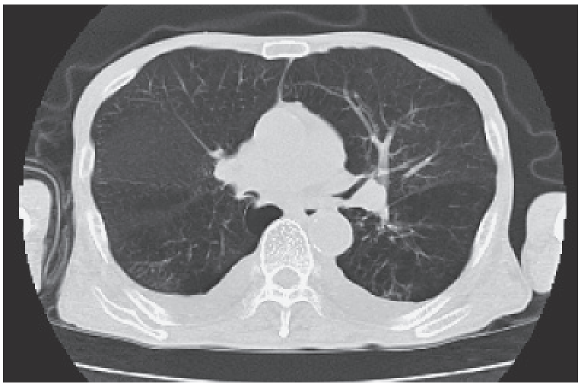


図 2. 4 年前の胸部 CT. 低吸収領域が散在性に広がる.

病理画像

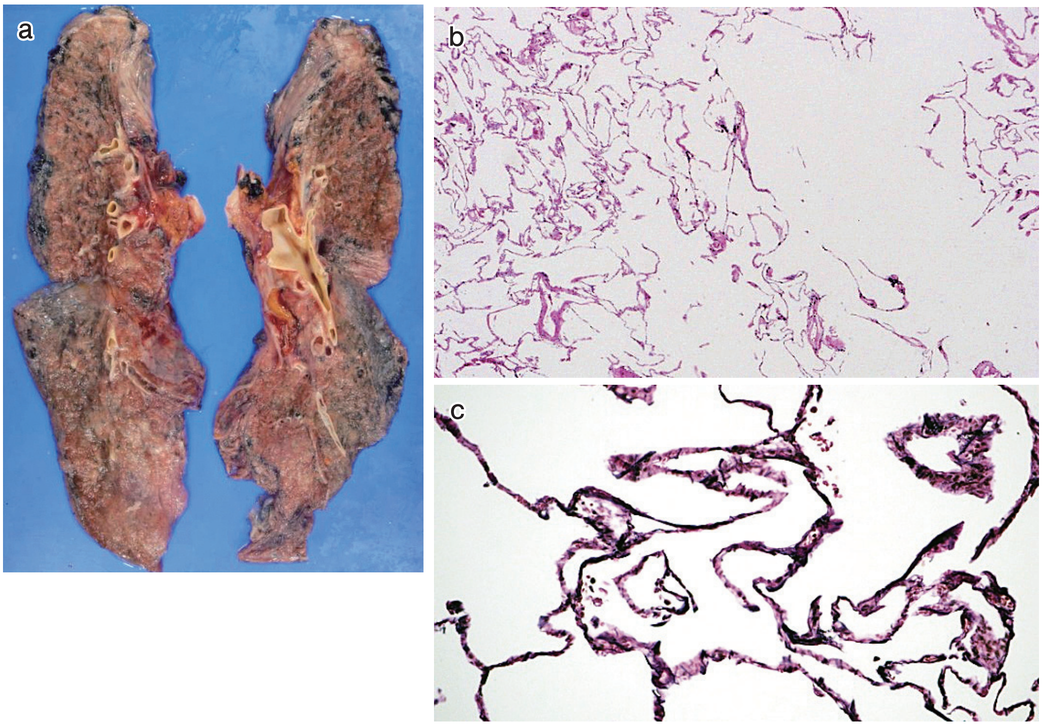


図 3. 剖検時の肺. a. 摘出肉眼標本, b. 病理組織像（HE 染色）, C. EVG 染色. 末梢気腔は拡張し，肺胞壁の弾性線維は減少する. 高度肺気腫の所見である.

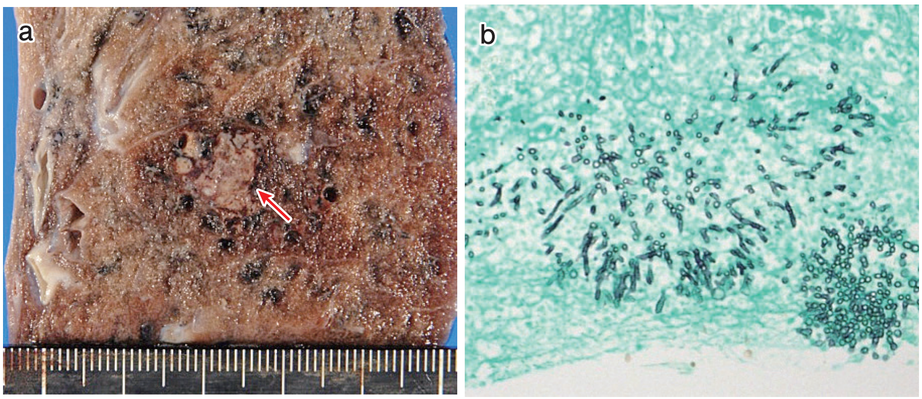


図 4. 剖検時左肺上葉背側にみられた褐色病変の摘出肉眼標本（a：矢印）および組織像（b：Grocott 染色）. アスペルギルス真菌塊が認められる. 慢性壊死性肺アスペルギローシスの所見である.

症例 No.56　全脳にわたる広範な浸潤を示した gliomatosis cerebri，type 2 の 1 例

剖検依頼科：脳神経外科　　臨床担当医：稲次基希，前原健寿

【概要】右前頭葉に広がる脳腫瘍の摘出と放射線化学療法を施行したが，その後も明らかな腫瘤を形成することなく全脳にわたりびまん性に腫瘍が浸潤し，1 年 9 ヵ月の経過で死亡した 20 歳・女性．剖検時には左右内包および左小脳に腫瘤形成がみられ，そうした個所では glioblastoma に相当する所見が得られた．さらに全脳，および脊髄の白質を中心に腫瘍細胞が広範に浸潤していた．手術時には anaplastic astrocytoma の診断であったが，解剖所見と臨床経過を合わせ gliomatosis cerebri，type 2 に相当すると考えられた．

【症例】 20 歳，女性．

主　訴：左上肢が使いにくい．

家族歴・既往歴：特記すべきことはない．

生活歴：喫煙 20 本/5 年，機会飲酒．

【臨床経過】

入院 1 年 6 ヵ月前：左上肢の使いづらさを自覚した．

1 年 5 ヵ月前：症状が増悪し，かつ左下肢にも症状が出現した．また頭痛もするようになった．

1 年 4 ヵ月前：他院 MRI で右前頭葉に広範な flair high 領域を指摘され（図 1），当院を紹介され受診した．緊急入院となり腫瘍摘出術を施行した．Anaplastic astrycytoma の診断となる．術後放射線療法（拡大局所 54Gy），化学療法（TMZ 10 クール）を施行した．症状がほぼ無症状にまで回復した（図 2）．

3 ヵ月前：左上肢脱力を自覚，MRI FLAIR にて high signal area が出現した．

2 ヵ月前：入院し精査．ステロイド点滴にて症状の変化なし．画像上，γナイフのよい適応とはいえず経過観察となる．

1 ヵ月前：麻痺の増悪により自力歩行が困難となり入院．広範囲かつ急速な病変の進行があり治療困難な状態であったため，ステロイドおよび TMZ 点滴のみで経過観察となる．

入院当日：嚥下障害，意識障害が出現し入院となり，脳腫脹の悪化を認めた（図 3）．TMZ 点滴のみで経過観察とし，徐々に状態が悪化した．

3 ヵ月後：死亡した．

【検索希望事項】

1. 腫瘍の性状の変化，2. 初回の治療効果，3. 進展範囲．

【剖検診断】

Gliomatosis cerebri，type 2，infiltrated to the brain and spinal cord，state after tumorectomy and chemoradiational therapy.

【剖検所見】

A. 膠芽腫

1. 手術材料（11B03114）：短紡錐形～多辺形核ときに多核のものもみられる腫瘍細胞の密な増殖がある．一部の細胞は Gfap 陽性突起を有する．細胞分裂像は多数みられる．明瞭な微小血管増生（microvascular proliferation）はみられず，壊死も認めない．Ki-67 陽性率は高い個所で 19.5% 程度である．IDH1（－），p53 半数程度（＋）．WHO の診断基準では anaplastic astrocytoma に相当するが，細胞密度や核異型，ki-67 陽性率から glioblastoma の一部像である可能性も否定できない像であった．

2. 剖検時の状態（脳腫瘍摘出術後，化学療法・放射線療法後）：脳重量は 1,435 g で，肉眼的に高度の浮腫が両側大脳半球，大脳脚，小脳半球，橋まで及び，左優位である．脳ヘルニアはない．右前頭葉の人工硬膜付着部近傍に 3 cm 大の組織欠損があり（図 4），割面にて左小脳半球に 5 cm 大の腫瘤を形成する個所を認める．大脳半球に関しては白質肥厚があり，色調は一部不均一となるが，明らかな腫瘤形成は認めない．

　組織学的には，白質優位に腫瘍細胞が広範に浸潤しており（図 5），左右大脳半球，中脳，小脳，脳幹，および脊髄に及んでいる．左右の内包および左小脳の腫瘤部では細胞密度が高く，核の異型も目立つ．同部位では微小血管増生および壊死が確認され，glioblastoma に相当する（図 6）．免疫染色にて，Gfap（＋），p53（70% 以上に強陽性），Ki-67 陽性率 33.4%．腫瘤形成部以外ではやや細胞密度が低くなり，細胞異型はやや弱くなる（図 7）．組織欠損のある部位近傍ではグリオーシス，泡沫状マクロファージやヘモジデリンが出現する．

B. その他

　下垂体は 0.8 g で，前葉に著変はない．Willis 動脈輪を形成する動脈に著変はない．身長 160 cm，体重 37 kg，BMI 14.4．脳のみの局所解剖．

【病理所見まとめ】

1. 腫瘍の性状について：内包周囲および左小脳の病変では壊死や微小血管増生がみられ glioblastoma に相当する．
2. 初回の治療効果：組織欠損部周囲には手術および放射線化学療法に対応する所見がみられた．
3. 進展範囲：上記所見文参照．なお，3 葉以上の脳葉にわたり異型グリア細胞が浸潤する状態は gliomatosis cerebri に相当するが，古典的な gliomatosis cerebri（primary gliomatosis cerebri，type 1）は腫瘤を形成せず，かつ組織像は anaplastic astrocytoma 相当のことが多いとされる．本例は剖検時に腫瘤を形成しており，かつ glioblastoma 相当の組織像であることから，びまん性浸潤とともに腫瘤を形成する型（primary gliomatosis cerebri，type 2）とした．

臨床画像

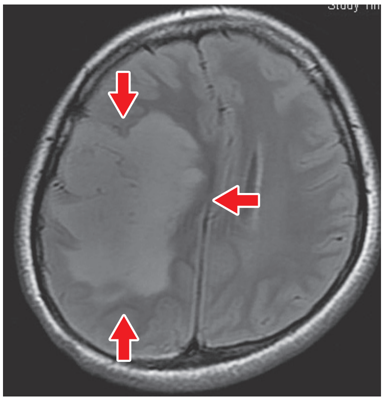


図 1．入院時 MRI FLAIR 像．右前頭葉の巨大な高信号域がある（矢印）．

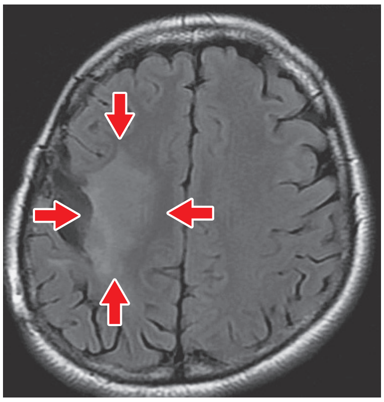


図 2．腫瘍摘出，CRT 後 MRI FLAIR 像．高信号域の縮小（矢印）を認め，症状も消失している．

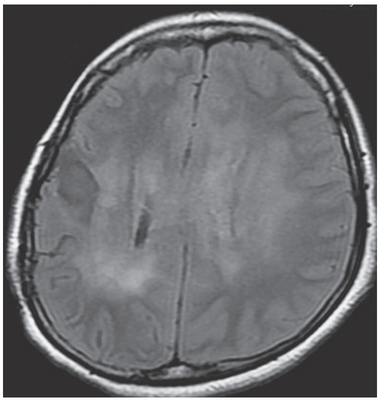


図 3．入院 1 年 4 ヵ月後 MRI FLAIR 像．白質のびまん性高信号域と強い脳浮腫を認める．

病理画像

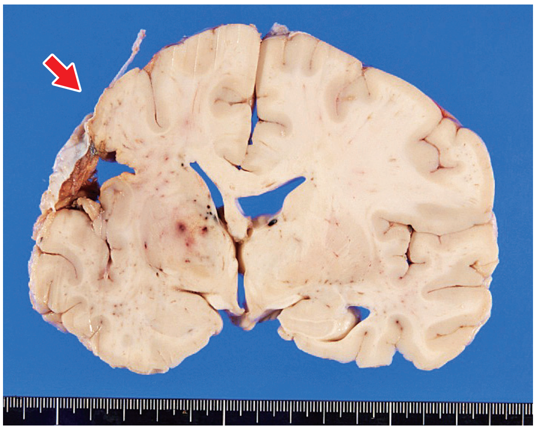


図 4．摘出肉眼標本．手術部を含む冠状断．左葉優位の浮腫，全域にわたる白質の拡大．赤矢印は手術部位である．

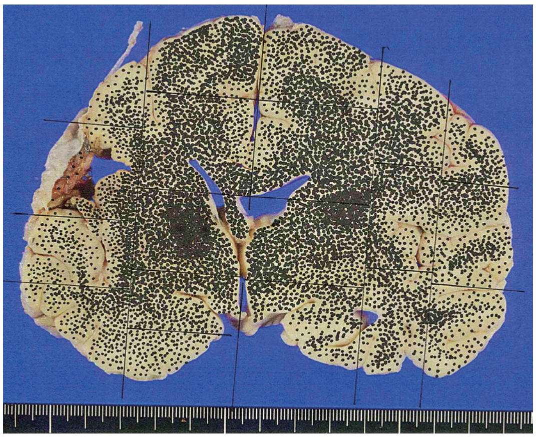


図 5．図 4 の割面における腫瘍 mapping．黒点の密度は腫瘍の密度を表す．白質中心にびまん性に浸潤している．

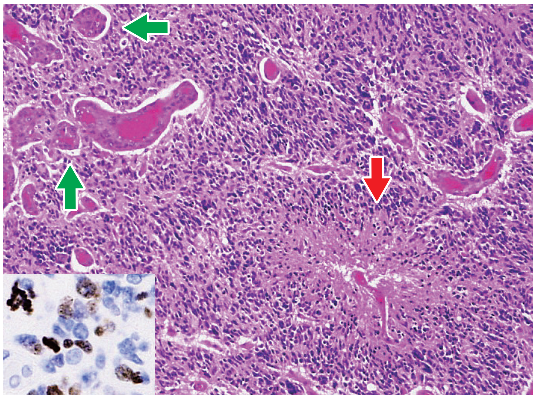


図 6．小脳腫瘤部病理組織像（HE 染色）．赤矢印：凝固壊死，緑矢印：微小血管増生がある．glioblastoma に相当する．左下は ki-67 免疫染色．陽性率は 33% である．

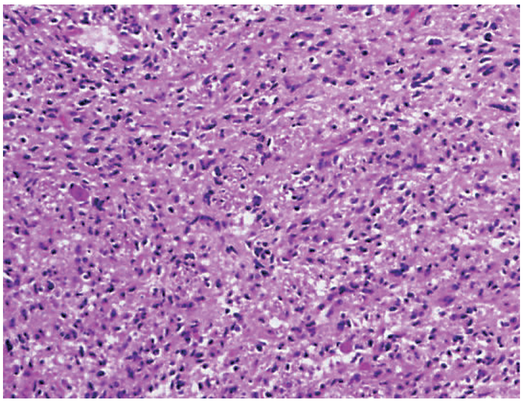


図 7．大脳白質病理組織像（HE 染色）．神経線維間にびまん性に腫瘍が浸潤している．

症例 No.57　パラインフルエンザウイルス３型（PIV3）感染を契機として呼吸不全で死亡した Di George 症候群の１例

剖検依頼科：小児科

【概要】Di George 症候群による免疫不全により PIV の呼吸器感染が疑われた 1 例である．経過中と剖検時に PIV3 が検出され，解剖時には多核巨細胞を伴う隔壁の線維性肥厚を認めており，PIV3 感染に伴う変化として矛盾しない所見であった．またびまん性に肺胞蛋白症の所見を呈しており，PIV3 感染に伴って肺胞蛋白症を呈した小児の症例報告もあることから，本例も同ウイルス感染に伴う二次的な肺胞蛋白症である可能性が考えられる．免疫不全の患者例においては PIV3 感染に伴い重篤な肺合併症をきたす可能性も考えられるため，厳重な注意が必要である．

【症例】0 歳 6 ヵ月，女性．

主　訴：全身の紅斑を伴う皮疹．

家族歴・既往歴：特記すべきことはない．

生活歴：特記すべきことはない．

【臨床経過】

皮疹で受診した前医にて T 細胞減少を認め，重症複合型免疫不全症（SCID）の診断により紹介入院となった．

入院後：胸腺低ないし無形成（図 1），副甲状腺機能低下，22q11,2 ヘテロ欠損，末梢血 T 細胞減少により Di George 症候群と診断する．

1 週間後：発熱があり，その後喘鳴，呼吸障害が出現した（図 2）．

7 週間後：呼吸状態が徐々に悪化したため，mPSL パルス療法を行い一時改善したが再び悪化した．

9 週間後：人工呼吸器管理として mPSL パルス療法を再開，パラインフルエンザウイルス 3 型（PIV3）を検出したが，ステロイド離脱はできなかった．

10 週間後：酸素化が悪化し，mPSL パルス療法を追加した．

11 週間後：呼吸状態がさらに悪化し，翌日に末梢血幹細胞移植を施行したが，その 3 日後に死亡した．

【検索希望事項】

胸腺の状態確認，肝腫大の原因，肺の状態，血管奇形の有無．

【剖検診断】

1. 肺胞蛋白症および多核巨細胞を伴う肺胞隔壁の線維性肥厚（PIV3 感染［＋］）．
2. Di George 症候群：胸腺/副甲状腺形成不全，血管奇形，顔面奇形．
3. 脂肪肝．

【剖検所見】

A. 肺胞蛋白症および巨細胞を伴う肺胞隔壁の線維性肥厚（PIV3＋）

肺：左 100/ 右 110 g．体重換算による平均値：左 74.4/右 77.5 g，重量増加と硬化がある．両全葉にわたり白色調で不規則に暗赤色変化を伴う（図 3）．肺胞腔内には好酸性物質（SP-A［＋］）の貯留が目立ち，組織球を少数含む（図 4）．肺胞隔壁には浮腫状の線維性肥厚がある．隔壁内の炎症細胞浸潤は目立たない（CD68＋，MPO＋細胞が主体で，CD3＋，CD20＋細胞はごく少数のみ）．肺胞蛋白症を考える所見である．一部に肺胞出血（＋）．そのほか肺胞内腔を lining，あるいは内腔に突出するような多核巨細胞が散見され（図 5），剖検時 PIV3 を検出した（5.6×10（7）copy/μgRNA）．

B. Di George 症候群に関連する所見

1. 胸腺および副甲状腺の状態：両者とも肉眼的，組織学的に確認できない．
2. 血管奇形：右側大動脈弓であり，右総頸動脈，右鎖骨下動脈を分岐した後，食道の後面を通って左側へ向かう枝を分岐し，その後食道の右側を下行する．左側へ向かう枝はさらに左総頸動脈と左鎖骨下動脈へと分岐する．
3. 顔面奇形：小顎症，耳介低位，鼻根部低位，内眼角贅皮がある．
4. 全身の造血/免疫装置（リンパ節，脾臓，骨髄，Peyer 板など）では，CD3 陽性の T 細胞は少数散在性に認めるのみである（図 6）．白脾髄やリンパ節・Peyer 板の濾胞はやや萎縮性．

C. 脂肪肝：肝 490 g，体重換算による平均値 249.3 g．表面平滑で腫大し割面は黄色調（図 7）である．著明な脂肪肝の状態であり，大滴性脂肪変性が目立つ（図 8）．類洞のうっ血を認める．

【病理所見まとめ】

1. Di George 症候群による免疫不全により PIV の呼吸器感染が疑われた 1 例である．解剖時，肺胞隔壁の線維性肥厚と多核巨細胞の出現を認めた．経過中および剖検時に PIV3 が検出され，文献的に PIV3 感染では多核巨細胞が出現し，しばしば器質化期のびまん性肺胞傷害に類似した所見を呈するとの記載があることから，PIV3 感染に伴う変化として矛盾しない．
2. また肺胞内には好酸性無構造物の貯留が目立ち，肺胞蛋白症の所見と考えられた．肺胞蛋白症の原因としては呼吸器感染や免疫不全，血液系腫瘍，粉塵吸入などが知られており，PIV3 感染に伴って肺胞蛋白症を呈した小児の症例報告もあることから（Arch Pathol Lab Med，2003），本例も同ウイルス感染に伴う二次的な肺胞蛋白症である可能性が考えられる．
3. 肝臓は著明な脂肪肝の状態であり，ステロイド使用による影響を考える．死因は肺病変による呼吸不全と思われる．

臨床画像

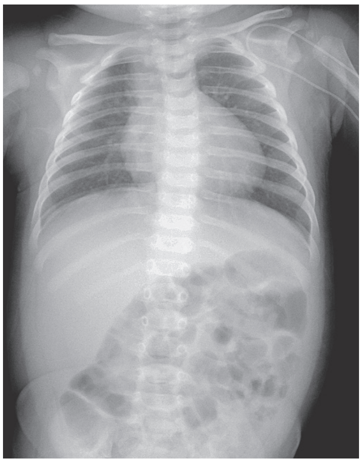


図 1．入院時胸腹部 X 線像．胸腺低形成を認める．

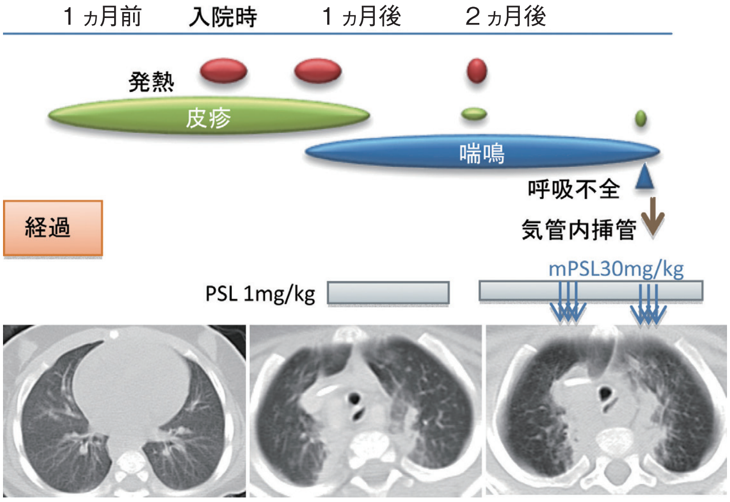


図 2．臨床経過

病理画像

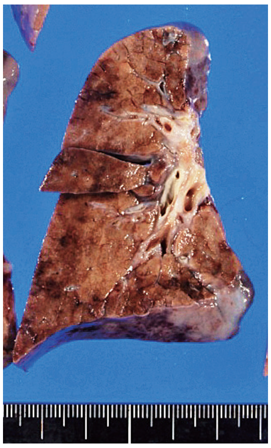


図 3．摘出肉眼標本（肺）

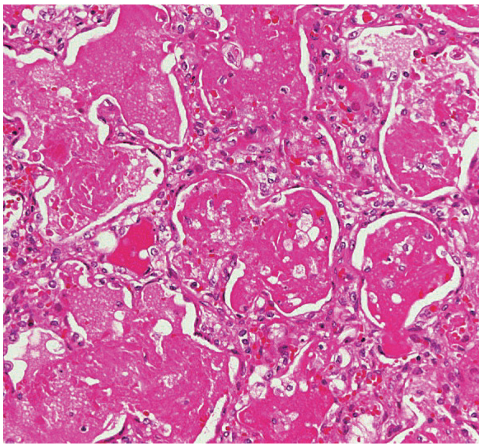


図 4．肺の病理組織像（1）［HE 染色］．肺胞腔内には好酸性物質貯留が目立つ．肺胞蛋白症の所見である．

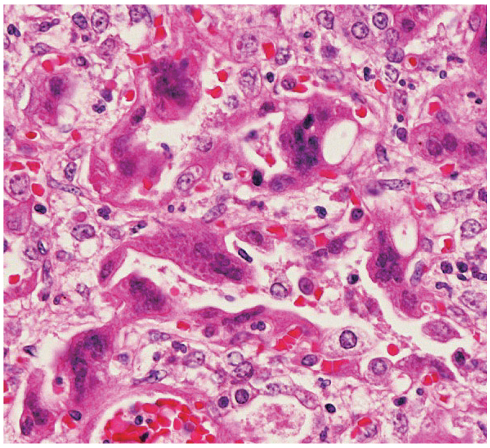


図 5．肺の病理組織像（2）［HE 染色］．多核巨細胞が目立つ．

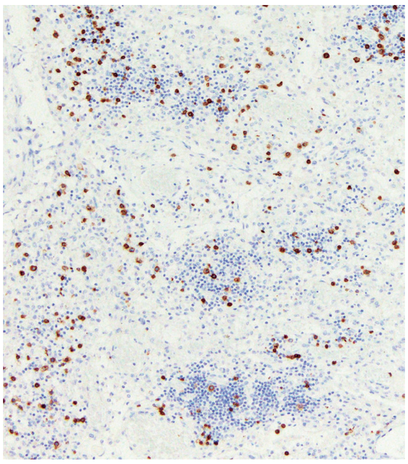


図 6．リンパ節の病理組織像（CD3 免疫染色）．CD3 陽性の T 細胞は少量のみである．

図 7．摘出肉眼標本（肝臓）．黄色調変化と腫大がある．

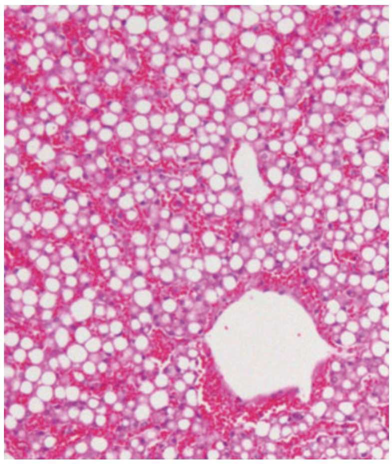


図 8．肝臓の病理組織像（HE 染色）．著明な脂肪肝を呈する．

症例 No.58　HTLV-1-associated myelopathy（HAM）に対する長年のステロイド投与で良好に制御を得た 1 剖検例

剖検依頼科：川口工業総合病院神経内科

【概要】長年にわたる HTLV−1−associated myelopathy（HAM）に対し，ステロイド治療を受けていたが，S 状結腸癌穿孔の 4 ヵ月後に副腎不全による死亡が臨床的に疑われた症例である．胸髄，腰髄の側索に神経線維の脱落があり，HAM として矛盾しないが，長年の経過としては変化が軽度である点，脱落部で gliosis などの修復反応に乏しい点，少量のステロイド治療により病勢が制御されていた点が非典型的である．肝硬変に伴う出血傾向と門脈圧亢進を背景とした胃からの点状出血が死因と考えられた．

【症例】80 歳代，女性．

主　訴：意識障害，呼吸困難．

家族歴：長女，長女の息子が HTLV−1 抗体陽性．

既往歴：胆石手術（40 歳）．

社会生活歴：宮城県出身，輸血歴は不明．

【臨床経過】

24 年前：両足をひきずるようになり，次第に悪化した．

6 年前：受診時，痙性対麻痺，両側錐体路障害があり，脳脊髄 MRI で異常はなかった．血清・髄液 HTLV−1 抗体陽性により，HTLV−1 関連脊髄症と診断した．外来でプレドニゾロン 5 mg/日を継続投与した．

4 ヵ月前：左側腹部痛が出現した．S 状結腸癌の大腸穿孔（図 1）により緊急 Hartmann 手術を行う．併発した腹膜炎，敗血症性ショックに対し集中治療し，改善した．

10 日前ころ：食欲低下．

死亡当日：外来受診したが，診察待ち時に意識レベルが低下し，呼吸困難が出現した．緊急入院し（表 1）治療したが，同日死亡した．副腎不全が疑われたが，死亡後判明した血液検査データでは，ACTH 低値，コルチゾル高値であり，否定的であった．

【検索希望事項】

1. HTLV−1 関連脊髄症について，2. 消化管病変について，3. 脳の器質的病変の有無，4. 副腎の状態，5. 肝臓の状態．

【剖検診断】

1. HTLV−1 関連脊髄症（HAM），2. S 状結腸癌術後再発なし，3. S 状結腸穿孔による腹膜炎後の広汎な腹膜癒着，4. 広汎な胃出血．5. 肝硬変，6. 副腎萎縮（出血を伴う，長期ステロイド投与後）．

【剖検所見】

1. HTLV−1 関連脊髄症（HAM）：胸髄，腰髄側索の神経線維の軽度脱落，軟膜の線維性肥厚があり，HAM としても矛盾しない（図 3）．脱落部での gliosis や組織球浸潤に乏しく（図 4），延髄錐体にも神経線維の脱落がみられた点は非典型的である．CD8 リンパ球は少量で，病勢は制御されていたと考える．
2. S 状結腸癌術後再発なし：手術検体は adenocarcinoma（tub2＞＞tub1）with perforation of the sigmoid colon．S，6×2.5 cm，pSE，pPM0，pDM0，pRM0，pN0 であった（図 2）．剖検時，結腸癌の再発所見はなかった．
3. S 状結腸穿孔による腹膜炎後の広汎な腹膜癒着：腹腔の線維性癒着が高度であり，漿膜面では桿菌があった．腹膜炎後の変化を反映する．
4. 胃に多発点状出血があり，胃〜下部腸管まで血性内容物の充満がある．潰瘍はない．胃静脈の拡張はあるが，明らかな破綻はない．
5. 肝硬変：再生結節と肝細胞の脂肪沈着が目立つ．Non-alcoholic steatohepatitis（NASH）に伴う変化と考える．
6. 副腎萎縮：副腎皮質の萎縮がある（図 5）．下垂体の ACTH 産生細胞は保たれている．
7. 右下葉に巣状気管支肺炎がある．

【病理所見まとめ】

1. 胸髄，腰髄の側索に神経線維の脱落があり，HAM として矛盾しないが，長年の経過としては変化が軽度である点，脱落部で gliosis などの修復反応に乏しい点が非典型的である．病勢はコントロールされていたと判断する．
2. S 状結腸癌の再発所見はない．腹膜炎後の変化を反映して，腹腔内の線維性癒着が高度であった．
3. NASH に伴う肝硬変と推測する．長期ステロイド投与が NASH のリスクファクターとする報告もある（Liver International, 2011，p1,240）．
4. 肝硬変による出血傾向と門脈圧亢進を背景とした胃からの出血が死因に関与したと考える．

臨床画像

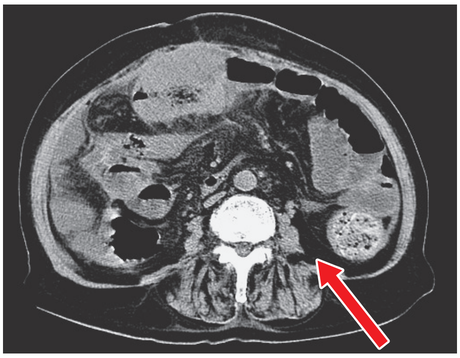


図 1．大腸癌穿孔時の腹部 CT．腸管拡張と free air の貯留（矢印）が疑われる．

表 1．急変時の採血データ（死後判明）．ショック，低血糖があることから，急性副腎不全が疑われたが，コルチゾル高値，ACTH 低値からは否定的である

血算	生化学	内分泌機能
WBC 3,870/μl Neu 69.5% Lymph 28.7% Eo 0.0% Hb 9.6 g/dl MCV 95 fL MCHC 34 g/dl Plt 11.9 万/μl	T-Bil 1.9 mg/dl AST 41 IU/l ALT 13 IU/l ALP 771 IU/l AMY 31 IU/l LDH IU/l BUN 22.7 mg/dl Cr 0.4 mg/dl Na 137 mEq/l K 3.8 mEq/l Cl 103 mEq/l Glu 血清 27 mg/dl BNP 48.6 pg/ml	GH 86.0 ng/ml 血中 C-peptide≦0.03 ng/ml レニン活性 19 ng/ml レニン定量≧400 pg/ml コルチゾル 22.1 μg/dl アルデステロン 362 pg/ml インスリン 0.38 μIU/ml ACTH≦2.0 pg/ml

病理画像

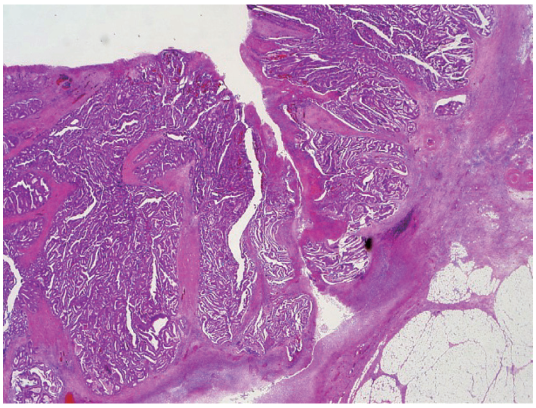


図 2．既往 S 状結腸切除検体の病理組織像（HE 染色）．癌性穿孔と腹膜炎の所見がある．

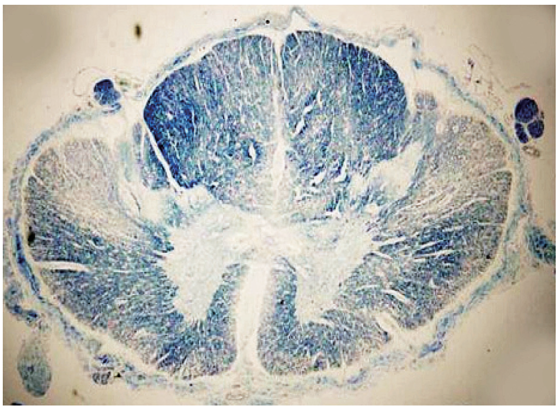


図 3．胸髄の病理組織像（KB 染色）．皮質脊髄路である側索の神経脱落と，軟膜の肥厚がある．

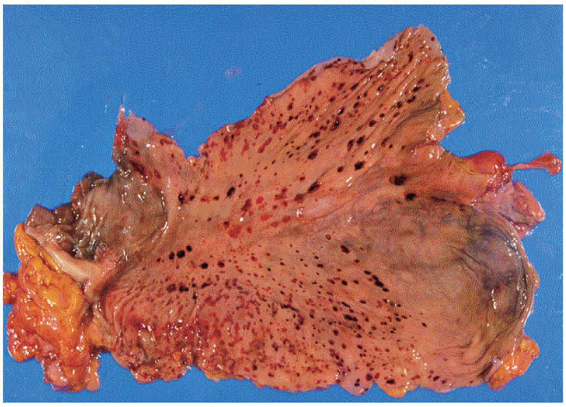


図 4．摘出肉眼標本．胃の点状出血

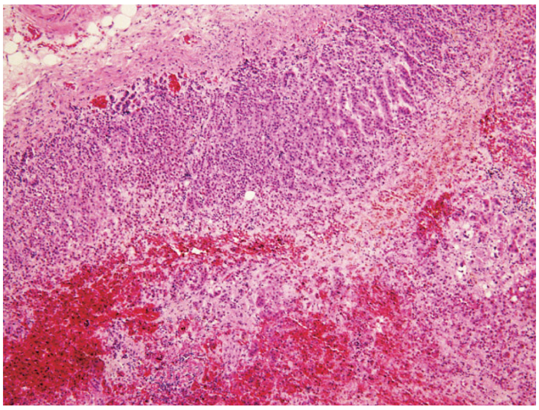


図 5．副腎の病理組織像（HE 染色）．皮質の萎縮と出血がある．

症例 No.59　間質性肺炎の急性増悪で死亡した 1 例

剖検依頼科：呼吸器内科

【概要】 胸部異常陰影，呼吸困難を契機に発見された間質性肺炎である．臨床的には間質性肺炎の原因特定にはいたらず，在宅酸素療法で安定していた．死亡 6 ヵ月前に急性増悪をきたしたが，ステロイドパルス療法で呼吸状態の改善を認めた．死亡 2 カ月前，再度急性増悪をきたし，ステロイドパルス療法や免疫抑制薬による治療を行ったが呼吸状態の改善はみられず死亡した．剖検では左右差のある，葉内で不均一な分布を示す間質性肺炎がみられ，UIP 型の間質性肺炎とその急性増悪と診断した．

【症例】 70 歳代，男性．

主　訴：呼吸困難．

既往歴：2 型糖尿病（60 代後半より）．

生活歴：喫煙は 30 年（20〜50 歳×30 本/日）．

【臨床経過】

4 年前：健診で胸部陰影を指摘される．

3 年前：呼吸困難が出現し，徐々に増悪した．

1 年半前：当院呼吸器内科を受診した．過敏性肺炎を疑われたが抗原回避は陰性，気管支洗浄液は lym3.7% であり，経過観察となっていた．その後，在宅酸素療法で病態は安定していた．

半年前：急性増悪をきたし，ステロイドパルス療法を行い著効し呼吸状態は改善し，外来でステロイドを漸減していた．

入院時：突然の呼吸困難が出現した．急性増悪と診断し入院となった（図 1）．ステロイドパルス療法，シクロスポリン併用療法を行ったが呼吸状態は悪化し，入院 8 週間後に死亡した（図 2）．

【検索希望事項】

呼吸不全の原因．

【剖検診断】

間質性肺炎の急性憎悪．

【剖検所見】

A．間質性肺炎の急性増悪（355/755 g）

1. マクロ所見：臓側胸膜面は凹凸が目立ち，割面では 3〜5 mm 程度の拡張気腔を伴った蜂巣肺を認める．分布は左肺優位に胸膜下主体にみられる．蜂巣肺の占める割合は左上葉 70%，左下葉 90%，右上葉 20%，右中葉 10%，右下葉 50% 程度である．肺中枢方向は蜂巣肺形成は目立たないものの，発赤を伴う部分が広がっている（図 3，4）．
2. ミクロ所見：蜂巣肺の領域と比較的肺胞構造の保たれた領域は隣接して認められる．蜂巣肺の目立つ領域には，虚脱，線維化，細気管支や肺胞道の拡張，平滑筋の増生を認める．拡張した気腔には細気管支上皮化生，一部扁平上皮化生，膜状の硝子化が認められる．蜂巣肺周囲の線維化部分にはリンパ球と好中球の混在した炎症細胞浸潤を軽度〜中等度認める．そのほか，胸膜下には拡張気腔の目立たない虚脱線維化巣を認める（図 5）．比較的肺胞構造の保たれた部分でも，肺胞隔壁は肥厚しリンパ球を主体とする炎症細胞浸潤を中等度〜高度認める．小葉内では斑状の線維化を認め，一部は小葉中心性瘢痕が疑われる．壁在性，腔内充満性の幼若な腔内器質化を認める（図 6）．発赤部の一部には肺胞上皮の脱落と硝子膜の形成，組織球の集簇があり，びまん性肺胞傷害（DAD）様となっており，その周囲の拡張気腔，細気管支内に出血，好中球浸潤を認める．
3. 肺動脈所見：肉眼的には肺動脈幹の明らかな拡張，壁の肥厚，粥状硬化は認めない．心臓の右室内腔は 35×20 mm と軽度拡張し，右室壁は 7 mm と軽度肥厚する．組織学的には肺動脈に線維性の内膜肥厚は明らかではない．また右室心筋線維径は平均 11.5 μm と肥大は認めない．

B．その他の所見

1. 腎（150/160 g）：残存する糸球体は肥大していて，メサンギウム領域の拡大と細動脈の硝子化を認める．
2. 160 cm，56 kg の男性．結膜は貧血調でばち指を認める．

【病理所見まとめ】

A．呼吸不全の原因について

1. 剖検では明らかな左右差をもった間質性肺炎を認める．線維芽細胞増生巣は目立たないが，病変が不均一に広がり，病変部と正常肺が混在することと病変の多彩な時相性からは UIP pattern と考えられる病変である．小葉中心性の線維化は少数疑われるのみであり，吸入性抗原の関与は考えにくい．
2. DAD に類似した所見や，その周囲には好中球浸潤の所見がみられるが，範囲は限局している．剖検時には広範な硝子膜形成といった典型的な DAD の所見は指摘できないが，気腔の保たれた領域が隣接しており，治療に反応した部分をみている可能性も考えられ，DAD の存在を否定することはできない．臨床的にも急速な呼吸状態の悪化がみられていることから，間質性肺炎の急性増悪と診断した．

臨床画像

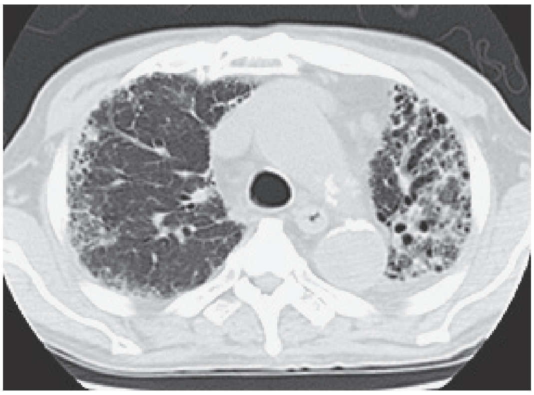


図 1．入院時の胸部 CT

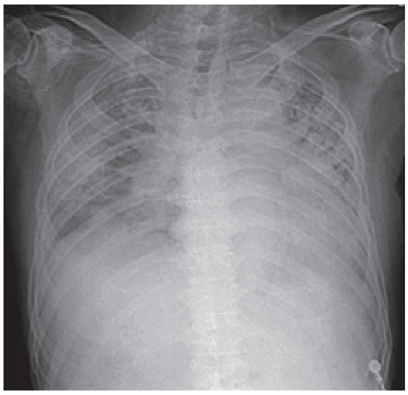


図 2．死亡時の胸部 X 線像

病理画像

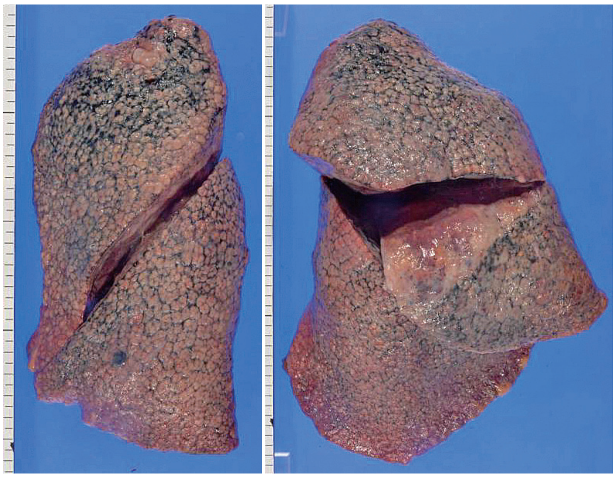


図 3．摘出肉眼標本（1）．肺の外表像．表面は鮫肌状である．

図 4．摘出肉眼標本（2）．肺の割面．左優位に病変を認める．末梢には蜂巣肺の形成がある．

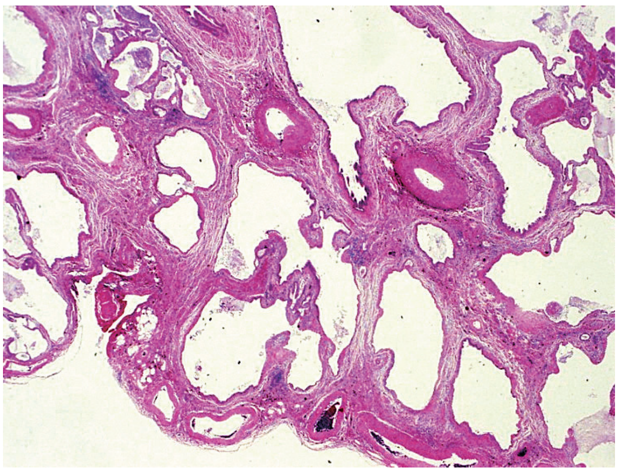


図 5．肺の病理組織像（1）［HE 染色］．胸膜下に蜂巣肺を認める．

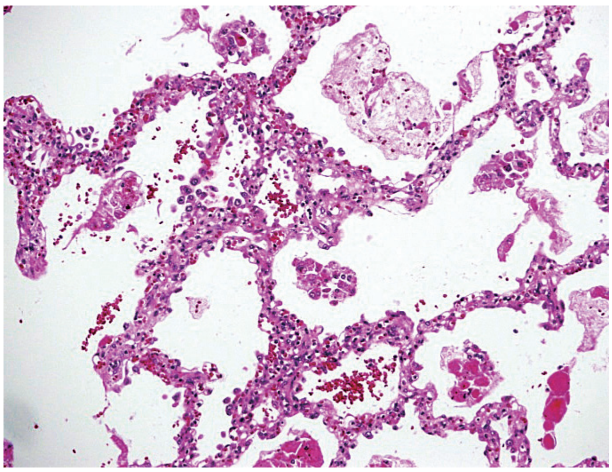


図 6．肺の病理組織像（2）［HE 染色］．肺胞隔壁の肥厚と高度の炎症細胞浸潤を呈する間質性肺炎を認める．

症例 No.60　人工血管置換術および CABG（coronary artery bypass grafting）施行後，肺炎や尿路感染を反復し死亡した 1 例

剖検依頼科：心臓血管外科

【概要】人工血管置換術および CABG 施行後，肺炎や尿路感染を反復し死亡した 72 歳・男性例である．剖検時，縦隔術後膿瘍（人工血管周囲）および肝前膿瘍を認めた．脾炎があり，血液培養で菌が検出された．心臓に関しては，左室に壁肥厚，左室乳頭筋～内膜および血管周囲に線維化を認め，冠動脈については 3 枝に高度な狭窄を認め，死因に関しては，人工血管周囲膿瘍を起因とする敗血症を考える．本例は，人工物に生じた感染のコントロールは非常に困難で，死に直結しうることを再認識させてくれた貴重な症例である．

【症例】72 歳，男性．

主　訴：傾眠傾向，嘔吐．
家族歴：不明．
既往歴：高血圧．
生活歴：不明．

【臨床経過】

入院前の詳細な経過は不明．

入院時：傾眠傾向，嘔吐により近医を受診し，敗血症性ショックの診断で当院に救急搬送された．CT および心嚢穿刺で上行大動脈解離と診断した（図 1）．

1 日後：上行大動脈解離性大動脈瘤および冠動脈狭窄に対し，人工血管置換術，CABG を行う．以後経過中，肺炎や尿路感染，敗血症性ショックを繰り返し，抗生物質を使用したがコントロールは不良であった．

8 ヵ月後：胆嚢炎や肝前膿瘍が指摘され，肝前膿瘍に対してドレナージを施行した（図 2）．

13 ヵ月後：死亡した．

【検索希望事項】

感染巣の検索，冠動脈や心臓の状態．

【剖検診断】

1. 上行大動脈解離（Stanford type A），人工血管置換術後，縦隔術後膿瘍（人工血管周囲），人工血管の感染性血栓性動脈炎．
2. 敗血症．
3. 肝前面膿瘍．
4. 冠動脈硬化症，CABG 後の状態．

【剖検所見】

A. 上行大動脈解離（Stanford type A），人工血管置換術後，縦隔術後膿瘍（人工血管周囲）
  1. 縦隔術後膿瘍（人工血管周囲），人工血管の感染性血栓性動脈炎：大動脈弁直上から 5 cm が人工血管に置換されている．人工血管吻合部に縫合不全はない．中枢側縫合部周囲に，球菌の集塊を認める淡血性膿瘍形成がある（図 3，4）．人工血管腔内に 2.5×1.5×0.5 cm 以下血栓を複数認める．眼瞼結膜に米粒大以下の溢血点を多数認める．
  2. 敗血症
    ・脾炎：重量 165 g，軟化が著明である．
    ・剖検時培養結果：
      血液（心臓血）：*C. freundii*，*Enterococcus sp.*
      人工血管周囲膿瘍：MRSA，*P. aeruginosa*（ムコイド型），*C. freundii*，*γ-Streptococcus*，*Enterococcus sp.*

B. 肝前面膿瘍
  1. 肝臓（1,700 g）：表面は平滑である．肝左葉前面に周囲に器質化を伴う 6×4.5 cm 大の膿瘍を認める．組織学的に膿瘍部分は，肝臓前面～一部実質内に食い込むような菌塊を混じる膿瘍形成があり，周囲に膠原線維の増生を伴う（図 5，6）．
  2. 腹腔内は用手剝離可能の癒着が全体的に認められ，肝前面～結腸肝弯曲部にかけては用手剝離不可能な癒着がある．

C. 冠動脈硬化症，CABG 後の状態
  1. 左室は内腔の軽度拡張と壁肥厚があり，左室乳頭筋に比較的高度な線維化，内膜および血管周囲に軽度の線維化を認める．
  2. 冠動脈は LAD に対し CABG 後である．冠動脈に，LAD100%，LCX90%，RCA90% の狭窄を認める．グラフト血管は #8 に吻合されており，吻合部で 50% 狭窄を認めるが，以後末梢側に狭窄はない．吻合部に縫合不全はなく，グラフト血管内腔に狭窄・閉塞はない．

【病理所見まとめ】

1. 死亡時に認められた感染巣は，縦隔術後膿瘍（人工血管周囲）および肝前膿瘍が主であった．
2. 左室は内腔の軽度拡張と壁肥厚があり，左室乳頭筋に比較的高度な線維化，内膜および血管周囲に軽度の線維化を認めたが，急性心筋梗塞巣は明らかでなかった．冠動脈に，LAD100%，LCX90%，RCA90% の狭窄を認め，グラフトは #8 に吻合されていた．吻合部で 50% 狭窄を認めたが，以後末梢側に狭窄は認めなかった．
3. 死因に関しては，人工血管周囲膿瘍を起因とする敗血症を考える．

臨床画像

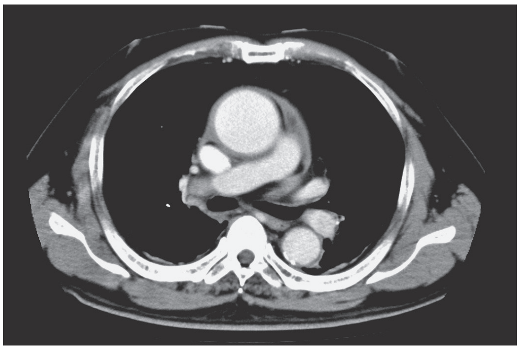


図 1．入院時胸部 CT．上行大動脈の拡大が認められる．

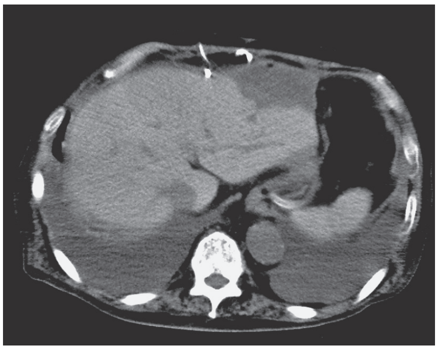


図 2．入院 8 か月後腹部 CT．ドレナージチューブ挿入後．肝前面に膿瘍形成を認める．

病理画像

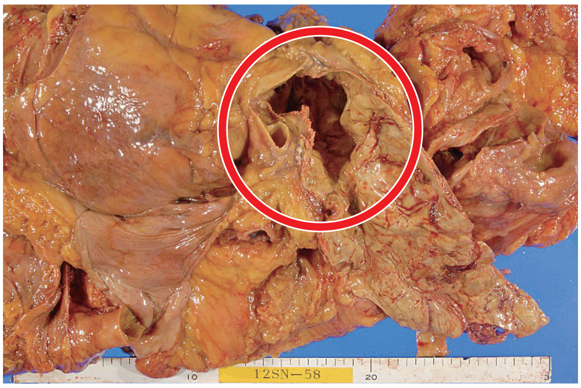


図 3．摘出肉眼標本（心臓）．人工血管吻合部周囲に膿瘍形成がある（円内）．

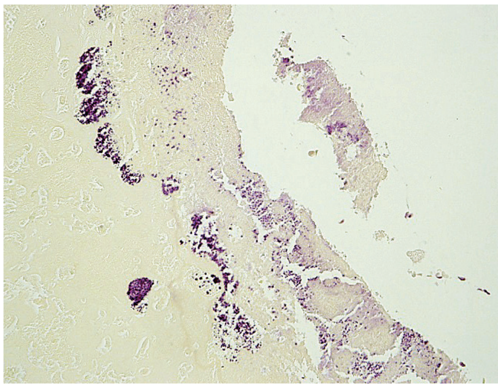


図 4．人工血管内血栓の病理組織像（Gram 染色）．血栓内に石灰化と球菌の集塊を認める．

図 5．摘出肉眼標本（肝臓）．肝前面（円内）に膿瘍形成がある．

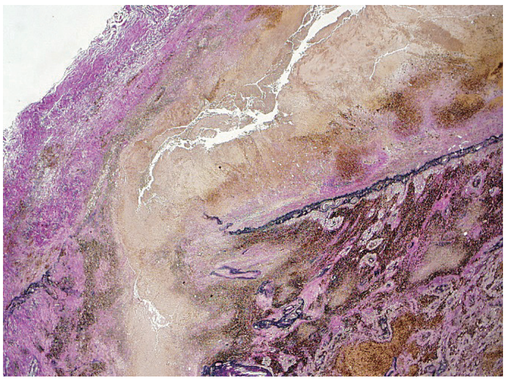


図 6．肝臓の病理組織像（EVG 染色）．肝前面膿瘍は一部肝被膜（黒色に染色される弾性板）を超えて，下方（肝実質）への炎症波及像を呈する．

症例 No.61　肺腺癌術後，肺癌が再発し呼吸不全により死亡した間質性肺炎を基礎疾患にもつ１例

剖検依頼科：呼吸器内科

【概要】間質肺炎の経過中に肺腺癌を発症し，右上葉区域切除（S2）と術後化学療法を施行したが肺癌の再発をきたし，再度の化学療法施行中に呼吸不全より死亡した1剖検例である．残存右上葉内3ヵ所にviableな腺癌の病巣を認めたが，左肺や諸臓器への転移や胸膜への播種は認めなかった．両肺はdiffuse alveolar damageの像を呈し，一部には巣状肺炎像が認められた．肺癌の治療中に細菌性肺炎を契機として背景疾患である間質性肺炎が急性増悪をきたした症例である．

【症例】71歳，男性．

主　訴：咳嗽，喀痰，呼吸困難．

家族歴：父は上咽頭癌，母は癌（詳細不明）．

既往歴：虫垂炎，椎間板ヘルニア，高血圧，脂質異常症．

生活歴：喫煙20本×47年，飲酒（－）．

【臨床経過】

5年前：間質性肺炎（図1）の診断で当院呼吸器内科に通院を開始した．

3年前：胸部CTでS2に12 mm大の結節影を指摘され，増大傾向があった．

2年前：右上葉区域切除（S2）施行，stage ⅢAにて術後化学療法（CBDCA＋TS－1×4）を行う．

1年前：右肺残存肺内再発，術後化学療法（CBDCA＋PAC×4）施行，呼吸状態悪化のためHOT導入，術後化学療法（CBDCA＋PAC×3）を行ったが増大傾向であった．

入院時：咳嗽・喀痰・呼吸困難増悪のため当院に緊急入院し（図2），抗生物質などで治療したが次第に呼吸状態は悪化した．

3日後：死亡した．

【検索希望事項】

急性の呼吸不全の原因，死因の検索，肺癌の評価．

【剖検診断】

1. 右肺腺癌術後再発．
2. 間質性肺炎およびびまん性肺胞傷害（DAD）．

【剖検所見】

A. 右肺腺癌術後再発，viableな癌細胞あり

1. 既往：原発性肺腺癌に対する右S2区域切除標本（図3）．Adenocarcinoma of the right lung．rtU，B2aiおよびii，1.8×1.5×1.2 cm，adenocarcinoma（papillary≫acinar），ly1，v2，p0，pm0，br（－），pa（－），pv（－），pN2．
2. 剖検時：右肺S2区域切除後．割面には，炭粉沈着を伴う白色調の境界やや不明瞭な2×2 cm大以下腫瘤性病変が，残存する右上葉の3ヵ所に認められる（図4）．組織学的には，adenocarcinoma（papillary～acinar）の所見（図5）である．一部に面皰壊死様の壊死巣が認められるが，腫瘍の変性や多核巨細胞の集簇巣は認めない．右中葉～下葉，左肺に明らかな腫瘍性病変はない．

   胸膜，横隔膜，腹膜播種はなく，リンパ節転移はない．検索した腹部臓器などに明らかな血行性転移を示唆する所見はない．

B. 間質性肺炎およびびまん性肺胞傷害

1. 既往：原発性肺腺癌に対する右S2区域切除標本（上記A1と同じ手術材料で評価），Interstitial pneumonia，UIP pattern．
2. 剖検時：右肺S2区域切除後，右胸膜の癒着は高度である．肺重量975/835 gと重量は増加している．両肺ともに含気は低下しうっ血調で，割面で牽糸性がある．両側背側～下葉を中心とする胸膜直下に，0.5 cm大以下の気腔よりなる蜂巣肺が認められる（図4）．組織学的には，左右肺尖部を除く広い範囲に，肺胞腔内の硝子膜の形成と肺胞腔内器質化を認める．滲出期～増殖期のびまん性肺胞障害の所見（図6）である．蜂巣肺を呈する部分は，平滑筋増生を伴い線維性に肥厚した嚢胞壁よりなり，内腔には線毛上皮化生や扁平上皮化生が認められる．一部，線維芽細胞巣と考えられる部分を含む．背景の細気管支内には，一部粘液貯留や多核巨細胞が認められる（図7）．左上葉の一部には肺胞腔内に好中球浸潤が目立つ部分が含まれる．
3. 剖検時培養結果：左肺は陰性，右肺は*S. aureus*以外の*Staphylococcus*，*Corynebacterium sp.*，血液（心臓血）は*S. aureus*以外の*Staphylococcus*．

【病理所見まとめ】

1. 肺癌に関しては，残存右上葉内3ヵ所にviableな腺癌の病巣を認めた．腫瘍の変性を疑う部分や異物巨細胞の集簇などは明らかでなく，背景の線維化などにより詳細な検討はむずかしいが，再発確認後に施行された術後化学療法の効果は明らかでない．そのほか，左肺，リンパ節，胸膜などへの播種，血行性転移を示唆する所見は認めなかった．
2. 背景の肺に関してはDADの像を呈し，全体に含気は低下し，一部には巣状肺炎像が認められた．死因に関しては，細菌性肺炎を契機とする間質性肺炎の急性増悪が呼吸状態の悪化を招いたと考えられる．

臨床画像

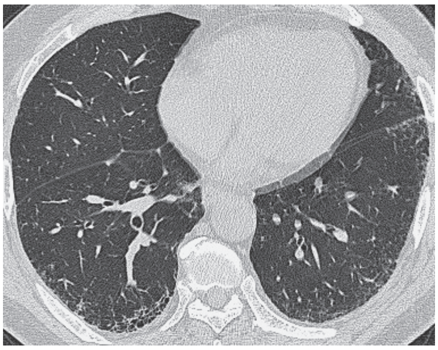


図 1．通院開始時（入院 5 年前）胸部 CT．右下葉背側，左下葉背側～腹側胸膜下の一部に網状影を認める．

図 2．入院時胸部 CT．胸膜下に蜂巣肺，牽引性気管支拡張，びまん性のすりガラス状陰影が認められるほか，結節影（丸内）を認める．

病理画像

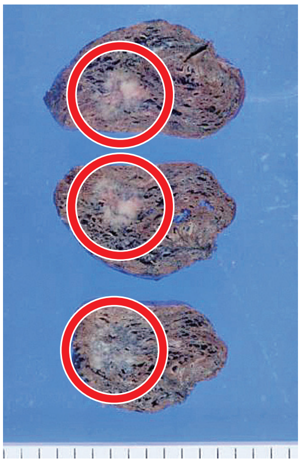


図 3．既往の摘出肉眼標本．（右 S2 区域切除）．炭粉沈着を伴う境界やや不明瞭な腫瘤性病変（adenocarcinoma）を認める（丸内）．

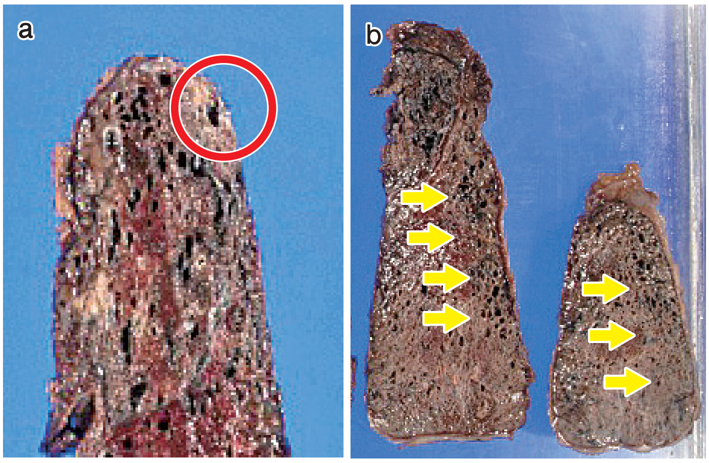


図 4．剖検時摘出肉眼標本．右肺（固定後）．全体に含気不良でうっ血調で，牽糸性がある．残存する右上葉に，白色調の境界やや不明瞭な，2 cm 大以下腫瘤性病変を認める（a．丸内）．胸膜下を中心とする蜂巣肺が認められる（b．矢印）．

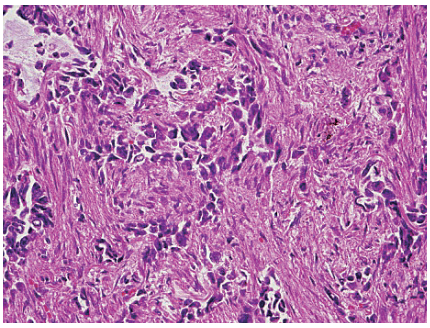


図 5．肺病理組織像（1）［HE 染色］．右上葉の腫瘤性病変には，adenocarcinoma（papillary～acinar）の再発を認める．

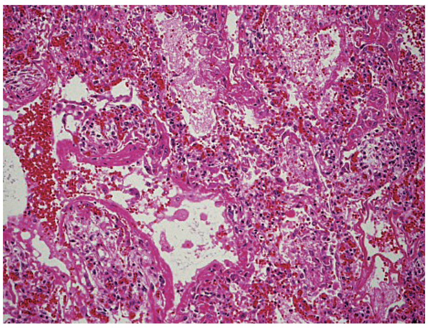


図 6．肺病理組織像（2）［HE 染色］．広い範囲に，肺胞腔内の硝子膜の形成と肺胞腔内器質化を伴う，滲出期～増殖期のびまん性肺胞傷害の所見がある．

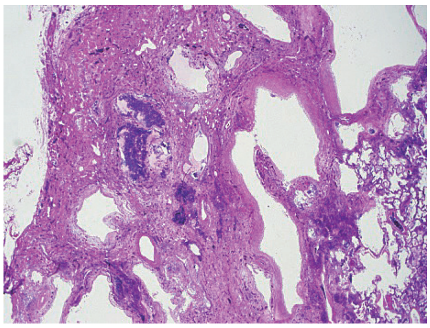


図 7．肺病理組織像（3）［HE 染色］．胸膜下には，平滑筋増生を伴い線維性に肥厚する嚢胞形成（蜂巣肺）があり，内腔には線毛上皮化生や扁平上皮化生が認められる．

症例 No.62　髄芽腫の再発により，全経過 4 年 9 ヵ月で死亡した 1 例

剖検依頼科：脳神経外科

【概要】成人後に小脳失調の出現を契機に髄芽腫を発症し，腫瘍摘出術，放射線療法・化学療法を繰り返し行ったが再発し，全経過 4 年 9 ヵ月で死亡した症例である．腫瘍は脳室内を主体として広がり，頭蓋内，脊髄に播種性に広がっていた．腫瘍摘出術後，放射線，化学療法を行ったが，その治療効果はほとんど認められなかった．髄芽腫は主に小児の小脳に発生する悪性脳腫瘍で，浸潤能が高く，早期に髄液播種をきたしやすいことを特徴とする．本例は，増殖マーカーである Ki-67 の陽性率に著明な変化はみられなかったが，頭蓋内から脊髄において広範な播種性の広がりを示していた．腫瘍摘出後に播種の予防のため全脳脊髄照射を行ったが，根治がむずかしかった症例である．

【症例】26 歳，女性．

主　訴：腰痛，視力低下．
家族歴：特記すべきことはない．
既往歴：特記すべきことはない．
生活歴：特記すべきことはない．

【臨床経過】

4 年前：小脳失調の出現を主訴に当科に来院し，髄芽腫の診断（図 1）であった．2 ヵ月後，腫瘍摘出術を施行し，以後，化学療法と全脳全脊髄に対し放射線療法を行った．

1 年前：腰痛で発症し，MRI で腫瘍性病変の再発を認める．MRI で原発部位付近の造影病変，脊髄に広範な線状の造影病変と，胸椎，腰椎，仙椎レベルに塊状の病変を認める．化学療法を行ったが，一過性の外転神経麻痺症状の出現があり，橋～延髄周囲に播種と考えられる所見があった（図 2）．以後，化学療法を繰り返し施行した．

入院時：腰痛，視力低下を主訴に来院した．全身倦怠感が著明で，疼痛発作があった．

2 ヵ月後：痙攣または疼痛発作が頻発し，意識障害が徐々に進行する．化学療法による苦痛緩和と終末期看護の方針となる．痙攣に伴い，血圧の低下，呼吸停止，asystole になり死亡した．

【剖検診断】

髄芽腫の術後再発，髄膜播種，転移．

【検索希望事項】

1. 腫瘍の進展度．
2. 死因，全身検索（他臓器に meta がないか）．

【剖検所見】

A. 既往標本：Medulloblastoma（第 4 脳室からの生検）：組織学的に，N/C 比の高い腫瘍細胞が密に増殖する．核は卵円形～類円形に腫大し，粗造なクロマチンを有する．Homer-Wright 型ロゼット様の細胞配列を認め，その中心に向かって突起を伸ばす腫瘍細胞が散見される．Synaptophysin は強陽性，NSE は強陽性，Ki-67 陽性率はおおむね 12% であった．

B. 剖検時の所見：髄芽腫の術後再発，髄膜播種，転移

1. 脳（1,265 g）：全体的に浮腫状で脳回が平坦となる．大後頭孔，テント切痕にヘルニア痕がある（図 3）．大脳の割面では，側脳室周囲主体に，灰白色調の腫瘍が不規則充実性，乳頭状に広がり，透明中隔，脳弓柱，尾状核，内包，前交連，海馬に浸潤する．腫瘍の浸潤に伴い脳梁は菲薄化し，中隔は肥厚，やや右側に変位する（図 4）．小脳の割面では，第 4 脳室周囲に灰白色調の腫瘍を認める．組織学的に，クロマチン濃染性の核を有する N/C 比の高い腫瘍細胞が増殖し，Homer-Wright 型ロゼット様の細胞配列を認める（図 5）．腫瘍細胞に synaptophysin が部分的に弱陽性，NSE が部分的に弱陽性．既往標本と比較すると，形質発現が減弱しているが，medulloblastoma の再発である．Ki-67 陽性率は 14.1%．腫瘍は脳表，脳溝に播種性に広がり，脳脊髄液の循環経路に沿うように，脳室内，脊髄中心管周囲に増殖し，大脳（側脳室周囲から透明中隔，脳弓柱，尾状核，内包，前交連，海馬），小脳（第 4 脳室周囲～中小脳脚，後葉虫部），橋の被蓋，脊髄に浸潤する．視神経・視交叉への直接浸潤がある．
2. 脊髄：肉眼的に，脊髄全体が浮腫状である．腰膨大レベルで脊髄は軽度に腫大する．組織学的に，胸椎（T2），腰髄，馬尾に本体と同様の腫瘍細胞の増殖を認める．腫瘍は中心管周囲～前索，側索，後索に広がる（図 6）．馬尾への播種性の腫瘍の進展がある．

【病理所見まとめ】

1. Medulloblastoma の術後再発で，広範な髄膜播種，脊髄への浸潤を伴う．
2. 腫瘍の再発・増殖に伴う頭蓋内圧亢進症の合併が血圧低下，心肺停止につながったと考えられる．
3. 他臓器への腫瘍の転移は認めない．

臨床画像

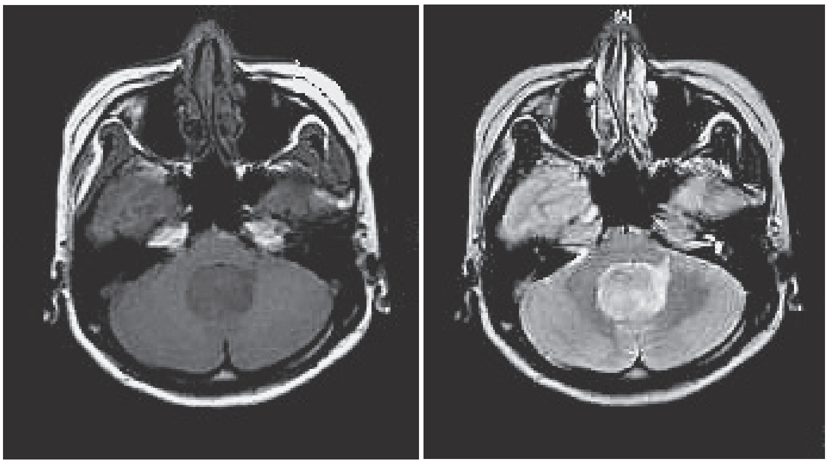


図 1. 術前（2008 年）の頭部 MRI

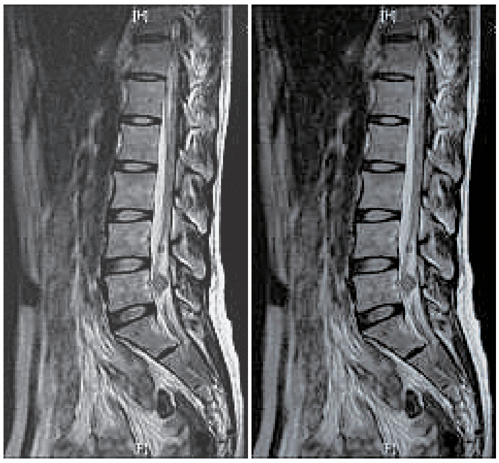


図 2. 再発時（2011 年 9 月）の脊椎 MRI. 脊髄に広範な線状の造影病変を認める.

病理画像

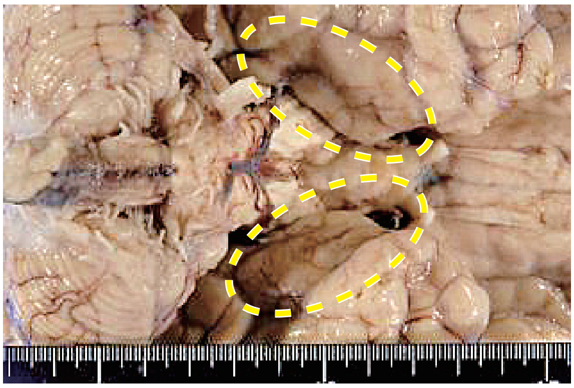


図 3. 摘出肉眼標本（1）[固定後]. 脳底部のヘルニア痕（丸囲み）

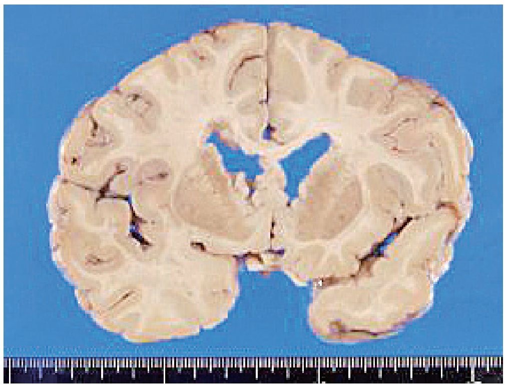


図 4. 摘出肉眼標本（2）[固定後]. 大脳の割面. 脳室内に灰白色調の腫瘍を認める.

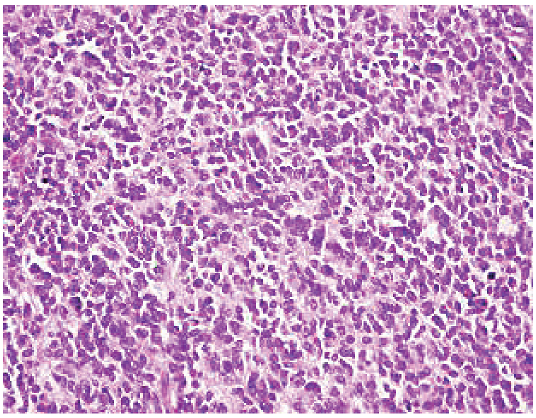


図 5. 病理組織像（1）[HE 染色]. クロマチン濃染性の核を有する N/C 比の高い腫瘍細胞が増殖し, Homer-Wright 型ロゼット様の細胞配列を認める.

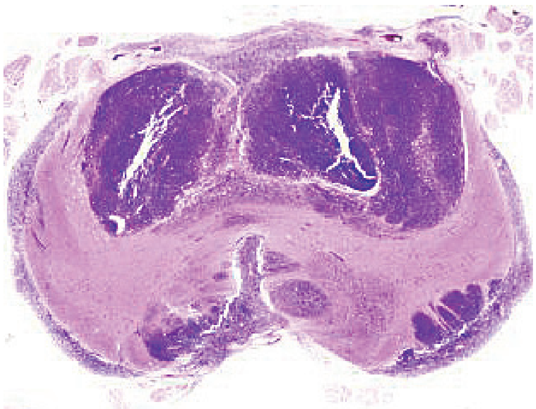


図 6. 病理組織像（2）[HE 染色]. 脊髄（腰髄）の髄膜播種と実質浸潤. 腫瘍は中心管周囲～前索・側索・後索に浸潤する.

症例 No.63　急速に進行し，死亡にいたった肺大細胞神経内分泌癌（large cell neuroendocrine carcinoma：LCNEC）の 1 例

剖検依頼科：呼吸器内科　　臨床担当医：岡本　師

【概要】咳嗽の出現から 5 ヵ月で死の転帰をとった 1 剖検例である．超音波気管支鏡ガイド下針生検（EBUS-TBNA）では採取組織片が小さく，また変性も強いことから確定診断が困難なことが多く，本例も同様であった．リンパ節転移があったことにより LCNEC との確定診断にいたった．LCNEC は治療抵抗性で脳転移などをきたすことも多く，比較的予後不良であり，本例においても，急速な癌の進行がみられた．

【症例】57 歳，男性．

主　訴：食欲不振．

家族歴：父は前立腺癌，食道癌，母は肺気腫．

既往歴：小児喘息．

生活歴：喫煙 20 本×38 年，機会飲酒（－）．

【臨床経過】

入院 5 ヵ月前：咳嗽が出現した．

3 ヵ月前：近医で胸部 X 線像で右中肺野に結節影を認める．当院を受診して，造影 CT では縦隔腫瘤による気管狭小化，右中葉の無気肺および心嚢水貯留を認めた（図 1）．

2 ヵ月前：EBUS-TBNA を施行し，異型細胞認めたが確定診断にいたらなかった．胸水細胞診にて class V，NSE:892 ng/m*l* と高値であった．化学療法（CBDCA：AUC＝5＋VP－16：80 mg/m^2）を開始した．左腋窩リンパ節生検により肺大細胞神経内分泌癌（LCNEC）と診断し，放射線治療を開始した（総線量 30 Gy）．

入院時：頭部 MRI で多発脳転移または髄膜播種と考えられ緊急入院となった（図 2）．髄液にて class V．

28 日：胸水貯留，意識レベル低下（DNR のため，積極的な治療行わなかった）．

32 日後：死亡した．

【検索希望事項】

癌の広がり，治療の効果，死因の検索．

【剖検診断】

肺大細胞神経内分泌癌．

【剖検所見】

肺大細胞神経内分泌癌とその広がり．

A．既往

1. EBUS-TBNA 材料：少量の核線を伴う異型細胞がみられる（図 3）．
2. 腋窩リンパ節生検：明瞭な核小体を伴う大型の腫瘍細胞がシート状に増殖している（図 4）．クロモグラニン A 陽性，シナプトフィジン陽性（図 5），CD56 は一部陽性を呈する．

B．剖検時

1. 右肺癌原発巣：右胸腔は大量（4,500 m*l*）の黄色混濁する胸水を有する．右中葉を主体に広範囲に灰白色調の腫瘍が広がっている．気管支周囲を主体とした進展パターンが目立つ（図 6）．組織学的に腫瘍はやや変性を伴うが，大型の腫瘍細胞が認められる．部分的にやや小型の細胞もみられる．免疫染色では，クロモグラニン A 陽性，シナプトフィジン陽性，CD56 陽性を呈する．左肺上葉に 直径5 mm 大の転移巣がある．
2. リンパ節転移：肺門部リンパ節，縦隔リンパ節，両側頸部リンパ節，両側鎖骨下リンパ節，両側腋窩リンパ節，傍大動脈周囲リンパ節．
3. 腰椎に腫瘍の転移を認める．精巣に微小転移がある．
4. 両側の胸膜，心膜に腫瘍の播種巣を認める（図 7）．

【病理所見まとめ】

1. 肺癌に関しては，右中葉を主体に，気管支周囲を主体に広範に腫瘍の進展がみられた．剖検材料では組織の変性がみられるが，腋窩生検材料と併せて判断すると，組織亜型は肺大細胞神経内分泌癌（LCNEC；large cell neuroendocrine carcinoma）と考えられる．元来壊死を伴いやすい腫瘍亜型であり，治療効果の判定はむずかしい状態である．
2. 死因に関しては，DNR（do not resuscitate）であったため，詳細な検証はむずかしいと思われるが，脳に広汎な腫瘍の進展があったと考えられ，脳浮腫の可能性や，腫瘍に伴った二次的な変化の可能性が考えられる．

臨床画像

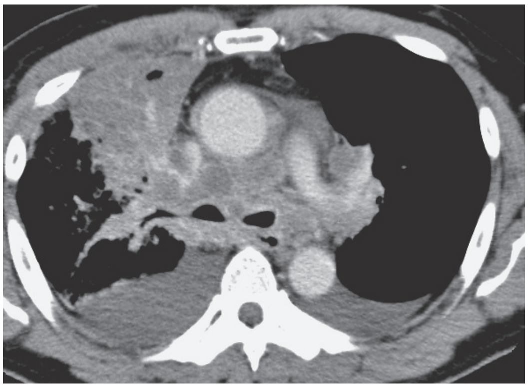


図 1. 入院３ヵ月前胸部 CT. 縦隔腫瘤による気管狭小化，右中葉の無気肺を認める.

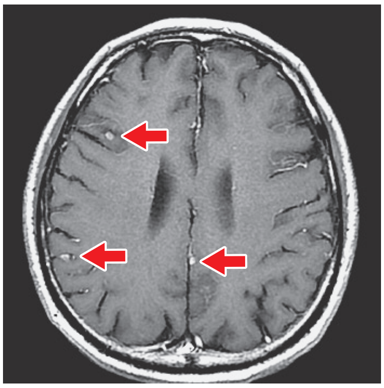


図 2. 入院時 MRI. 多発脳転移または髄膜播種が疑われる（矢印）.

病理画像

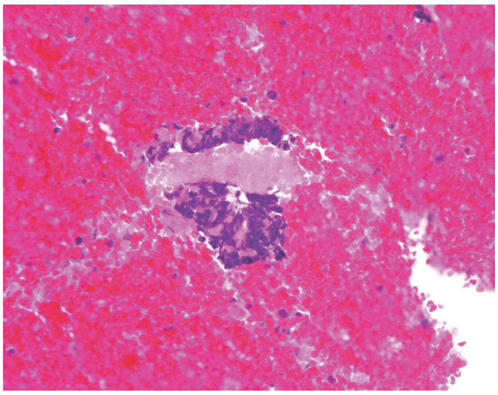


図 3. 病理組織像（1）[HE 染色]. EBUS-TBNA 材料. 末梢血中に，ごく少量の核線を伴う異型細胞がみられる.

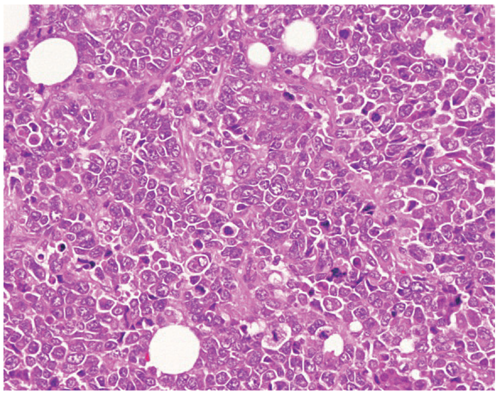


図 4. 病理組織像（2）[HE 染色]. 腋窩リンパ節生検組織. 明瞭な核小体を伴う大型の腫瘍細胞がシート状に増殖している.

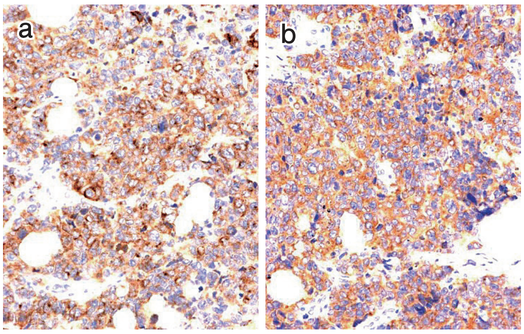


図 5. 病理組織像（3）. 図 4 の免疫染色. クロモグラニン A 陽性（a），シナプトフィジン陽性（b）.

図 6. 摘出肉眼標本. 気管支周囲を主体とした進展パターンが目立つ.

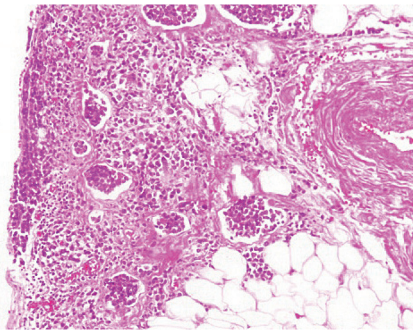


図 7. 病理組織像（4）[HE 染色]. 心膜組織. 心膜に腫瘍の播種巣を認める.

症例 No.64　上行結腸癌術後 3 日目に心肺停止となった 1 例

剖検依頼科：練馬光が丘病院外科

【概要】大腸癌に対して腹腔鏡補助下右半結腸切除を施行後，経過は非常に良好で，経口摂取まで回復していたが，術後 3 日目に突然の心肺停止をきたし，死亡した 70 歳代・男性の症例である．剖検所見では，心臓の左前下行枝に粥腫の破綻と，それに伴う閉塞，広範囲に及ぶ心筋変性が認められ，急性心筋梗塞が急変の原因と考えられた．心臓リスクとされる背景疾患がとくに指摘されておらず，心臓リスクが高い群としての術前評価が困難な症例であった．

【症例】70 歳代，男性．

主　訴：転倒．

既往歴：右大腿骨頸部骨折（人工関節置換術後），認知症．

生活歴：不明．

職業歴：不明（生活保護）．

【臨床経過】

入院時：自宅内で転倒し左大腿骨頸部骨折の診断で近医より紹介され転院した．貧血を指摘（Hb9.2 g/d*l*）され，輸血を行う．

6 日後：大腿骨整復術を施行する．

9 日後：腸閉塞症状にて外科を紹介する．精査により上行結腸に進行癌があり（図 1），狭窄部にステントを留置した．

27 日後：腹腔鏡補助下右半結腸切除術を施行する（図 2）．術後経過は良好で，食事開始まで回復した．

30 日後：朝回診時は元気であったが，昼の検温時に心肺停止の状態で発見される．蘇生処置を行ったが死亡した．

【検索希望事項】

1. 死因（急性冠症候群，大動脈解離，肺塞栓の有無），2. 術後の評価（穿孔や縫合不全の有無，癌遺残の評価など）．

【剖検診断】

1. 急性心筋梗塞，2. 結腸二重癌，右半結腸切除後，癌残存なし．

【剖検所見】

1. 急性心筋梗塞

心筋割面では，肉眼的に梗塞を指摘できない（図 3）．左前下行枝近位部に粥腫の破綻とこれによる閉塞像がある（図 4）．心筋には，contraction band，wavy fiber などの超早期の心筋梗塞を示唆する所見が，左前下行枝灌流域よりも広範囲にみられる（図 5）．心内膜下では，一部で組織球の浸潤がある．冠動脈は 3 枝病変がある．冠動脈の動脈硬化が目立つ反面，全身血管の動脈硬化は軽微であった．

2. 結腸二重進行腺癌，右半結腸切除後，癌残存なし

既往手術検体では，double adenocarcinomas of the ascending and transverse colon，resection.

① A，50×40 mm（全 周 性），type 3，adenocarcinoma，tub2>tub1，ly0，v1，pSE，int/sci，INFb，pPM0（26 cm），② T，30×28 mm（1/3 周性），type 1，adenocarcinoma，pap>tub2，ly0，v1，pSS，int，INFb，pDM0（5 cm）．リンパ節に転移なし，pT4aN0M0．剖検時には癌の遺残所見はなく，穿孔や縫合不全はみられない．

【病理所見まとめ】

1. 前下行枝の閉塞，心筋の変性から，急性心筋梗塞が急変の原因と考える．ほかに突然死をきたしうる肺梗塞，大動脈解離，頭蓋内病変の所見はない．冠動脈三枝病変を背景にして，前下行枝の閉塞直後に，急性のポンプ失調あるいは心室性不整脈が起こったために，広範囲で心筋虚血に陥ったと考える．糖尿病や高血圧など心臓リスクとなりうる背景疾患は臨床的に指摘されておらず，心臓リスクの高い群として術前に評価することは困難であった．手術に伴う血行動態の変化が関与した可能性も考えられる．大動脈解離や肺塞栓は認めなかった．
2. 上行結腸癌は切除されており，剖検時には遺残はない．縫合不全や穿孔を示唆する所見はなく，手術自体には問題点は見当たらない．

臨床画像

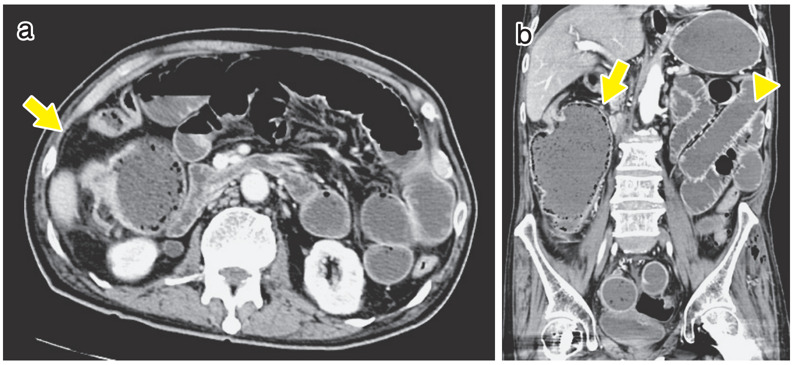


図 1．腹部 CT（a：水平断，b：冠状断）．上行結腸に壁肥厚があり（a：矢印），その口側腸管は著明に拡張している（b：矢頭）．

病理画像

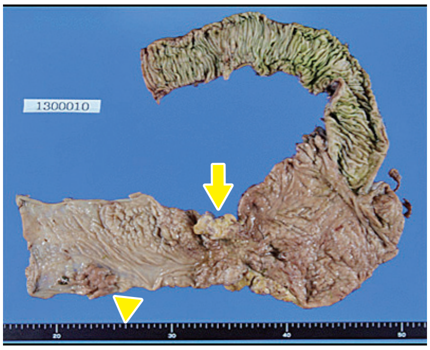


図 2．摘出肉眼標本（1）右半結腸．（固定後）．上行結腸に全周性 3 型病変（矢印），横行結腸に 1/3 周性 1 型病変がある（矢頭）．

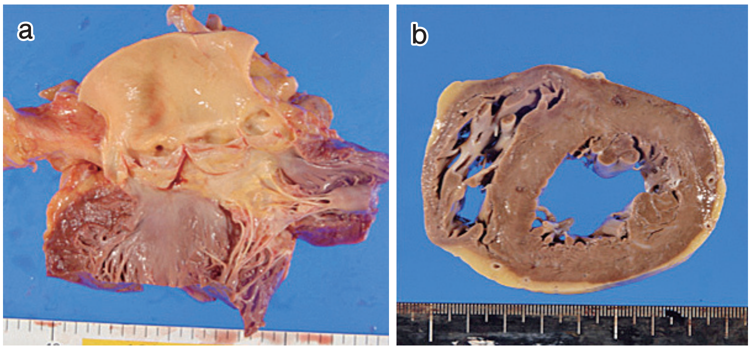


図 3．摘出肉眼標本（2）心臓．a：左室大動脈弁（固定前），b：心室割面（固定後）．大動脈の動脈硬化は目立たない，明らかな心筋梗塞巣を指摘できない．

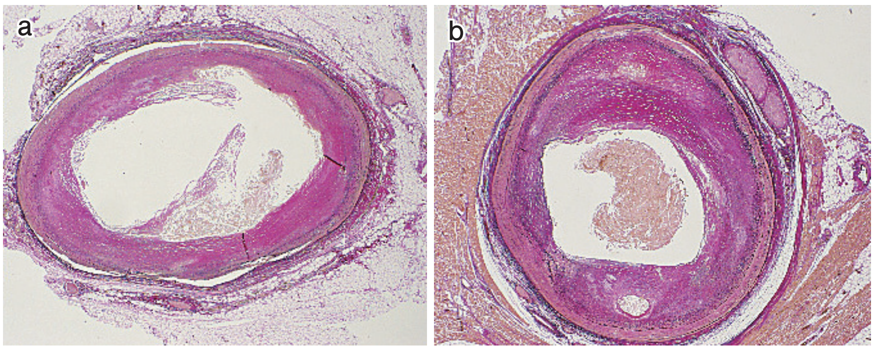


図 4．左前下行枝の病理組織像（EVG 染色）．近位部での粥腫の破綻（a）と，その遠位部での粥腫による閉塞（b）．冠動脈では動脈硬化による三枝病変の形成がある．

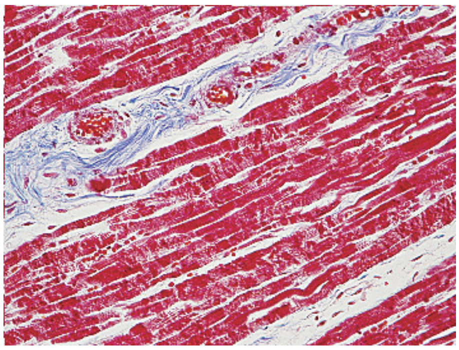


図 5．心室筋の病理組織像（Masson trichrome 染色）．Contraction band が目立つ．

表 1．心筋梗塞の肉眼，組織所見の経時的推移（病理と臨床 **31**，2013 より引用改変）

発症後の経過	肉眼所見	組織所見
発症～ 6 時間	変化不明	変化不明
6～12 時間	蒼白，混濁	contraction bend necsis, waviness，断裂，好酸性変性，核消失
12 時間～4 日	混濁，軟化，黄色化	凝固壊死，白血球浸潤
1 週間～	軟化，透明感のある色調，黄色調	組織球浸潤，肉芽出現
約 1 ヵ月	紫青色，白色調，収縮	肉芽増生，線維化
約 2 ヵ月	白色，収縮，硬化	線維化，瘢痕化
その他	瘢痕化	瘢痕化

症例 No.65　透析導入時の画像検査で当初肝 S1 の腫瘤として認識された結核症の 1 例

剖検依頼科：腎臓内科

【概要】良性腎硬化症による慢性腎不全に対する透析導入時の画像検査で，肝 S1 に長径 24 mm の腫瘤が認められ，経過観察とされていた．4 ヵ月後の吐血で入院後，発熱炎症反応の高値が継続し，画像検査で同腫瘤内部に low density area（LDA）が存在することから，結核が疑われ，抗結核薬で改善傾向をみた．その後，誤嚥性肺炎などを繰り返し，呼吸不全により死亡した．剖検では著明な結核性腹膜炎が認められ，それに加えてリンパ節結核，肺結核，および結核性胸膜炎が確認された．S1 の腫瘤は肝実質を圧排するリンパ節結核病巣であった．透析に関連する細胞性免疫低下が非定型的な病変分布に関与したものと推測される 1 例であった．

【症例】86 歳，女性．

主　訴：透析導入目的．

家族歴：特記すべきことはない．

既往歴：結核の既往はない．2 年前，大腸憩室出血．

生活歴：特記すべきことはない．

【臨床経過】

4 ヵ月前：腎硬化症を原疾患とする腎不全で透析を開始した．導入期の CT で肝 S1 に 24 mm 大の腫瘤を指摘され（図 1），肝胆膵外科で経過観察が行われた．

2 ヵ月前：腹部大動脈瘤に対して，ステント留置術を施行した．

入院時：吐血で肝胆膵外科入院後，DRPM 無効の発熱炎症反応の高値が続いた．その際の CT では S1 腫瘤内部に LDA が認められ（図 2），結核が疑われ，抗結核薬で改善傾向となった．

2 ヵ月後：以後，誤嚥性肺炎を繰り返し，感染のコントロールもわるく，全身状態が徐々に悪化し，呼吸不全により死亡した．

【検索希望事項】

1. 肝の腫瘤は結核か腫瘍か，2. CRP 上昇のフォーカスとなる病変が肺炎以外にあったか．

【剖検診断】

1. 結核症［肺結核，結核性胸腹膜炎，リンパ節結核（全身）］．
2. 肺炎（器質化した誤嚥性肺炎＋細菌塊を伴う肺胞性肺炎）．
3. 良性腎硬化症（透析導入後）．
4. 腹部大動脈瘤，ステント留置後．

【剖検所見】

［既往標本］

死亡 5 日前に行った CF では非特異的な炎症のみで，死亡 1 ヵ月前の骨髄穿刺では正形成性骨髄（肉芽腫なし）．

［剖検時の所見］

A. 結核症：下記の白色結節は顕微鏡的には種々の程度の乾酪壊死を伴う肉芽腫性病変である．

1. 結核性腹膜炎：腸間膜や腸管漿膜面など腹膜表面には，4 mm 大程度までの白色結節が無数に認められる．結節は癒合傾向を示していた（図 6）．
2. 結核性胸膜炎：左側の臓側・壁側胸膜は強く癒着している．臓側・壁側胸膜表面には 10 mm 大までの白色結節が無数にみられる．右側の胸膜癒着は軽度で，臓側胸膜表面には数ミリ大までの白色結節が中葉表面を主体に複数認められる．
3. 肺結核：左肺割面には長径 30 mm 大までの白色結節が上葉を中心に複数認められる．右肺には顕微鏡的な肉芽腫が散見される．
4. リンパ節結核：全身のリンパ節に種々の程度の乾酪壊死を伴った類上皮細胞肉芽腫を認める．肝 S1 の病変は肝外から肝実質を圧排するリンパ節結核病巣であった（図 3，4，5）．
5. 特殊染色・免疫染色：Ziehl-Neelsen 染色陰性．肺病変に Tb1 陽性（Tb1；当講座で開発した抗体で，抗酸菌に特異的に陽性）．

B. 肺炎：右肺上葉優位の器質化肺炎，左肺下葉優位の細菌塊を伴った肺胞性肺炎を認める．

C. 良性腎硬化症：両側腎は萎縮．副甲状腺には 1 腺に oxyphilic cell の密な分布をみるが過形成は明らかでない．

D. 腹部大動脈瘤，ステント留置後：粥状硬化性の瘤であり，ステント内腔は intact である．

【病理所見まとめ】

1. 非定型的な病変分布を示す結核症である．骨髄，脾臓，肝実質などに肉芽腫はなく，粟粒結核とはいえない．
2. 透析導入時の画像検査で発見された肝 S1 の腫瘤は，肝実質を外から圧排するリンパ節結核病巣である．
3. 著明な結核性腹膜炎を伴っており，胸膜病変よりも明らかに強い変化である．
4. 肺結核の所見を左優位に認めるが，古い結核病巣はみられない（肺門リンパ節を含め）．
5. 誤嚥性と考えられる器質化肺炎と新しい肺胞性肺炎を認めた．
6. 結核症に伴った全身状態悪化に反復する肺炎（誤嚥性や細菌性）が加わり，呼吸不全により死亡したものと考えられる．非定型的な病変分布には慢性腎不全状態における細胞性免疫の低下が関与しているものと推測される．

臨床画像

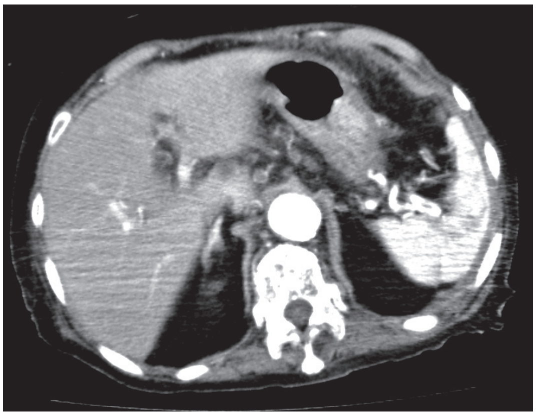


図 1．透析導入時 CT

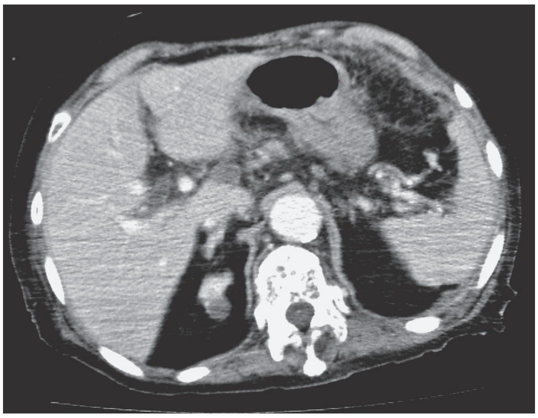


図 2．吐血により入院時 CT

病理画像

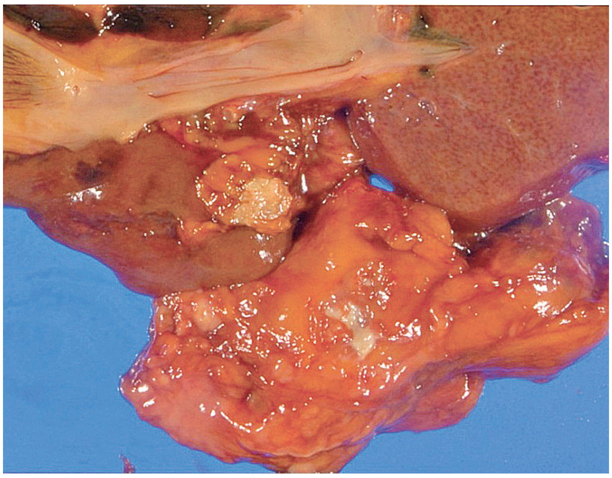


図 3．摘出肉眼標本（1）．S1 の腫瘤．剖検時に図右下の連続する腫瘤がはずれた．

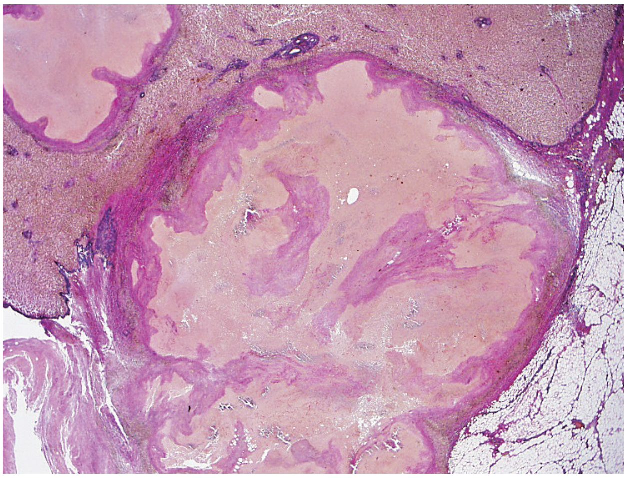


図 4．病理組織像（1）［EVG 染色］．S1 を圧排する腫瘤．漿膜を破り，肝実質を圧排している．

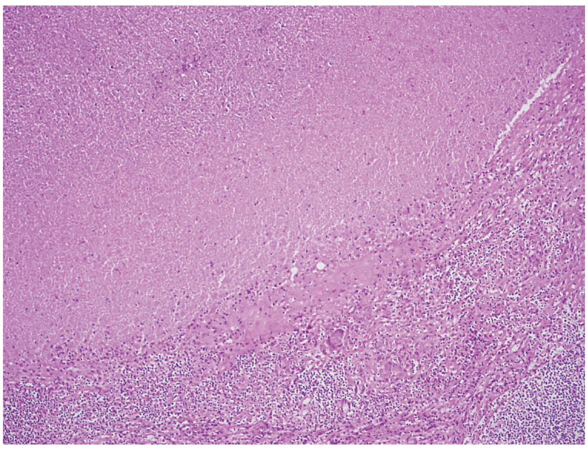


図 5．病理組織像（2）．図 4 の拡大（HE 染色）．肝周囲の腫瘤は乾酪壊死を伴うリンパ節結核病巣である．

図 6．摘出肉眼標本（2）．腸管表面には無数の黄白色調の結節がみられるが，これらはいずれも肉芽腫である．腸管の癒合を伴う．

症例 No.66　Churg–Strauss 症候群により心不全をきたし死亡した 1 例

剖検依頼科：膠原病内科

【概要】 気管支喘息の既往をもち，原因不明の心不全を精査した結果，Churg–Strauss 症候群による心不全と診断され，half pulse 療法含むステロイド治療を開始したが，心室細動をきたし蘇生したものの ICU 管理となった．その後，サイトメガロウイルス（CMV）感染症および侵襲性アスペルギルス症を発症した．重症心不全の状態にこれらの感染症が加わり死にいたったと考えられた症例である．

【症例】 55 歳，女性.
主　訴：胸部圧迫感，呼吸困難感.
家族歴：父に高血圧，狭心症，脳出血がある.
既往歴：36 歳時から気管支喘息．高血圧，脂質異常症がある．52 歳時に大腸癌手術を行った.
生活歴：喫煙 15 本/14 年，機会飲酒.

【臨床経過】
10 年前：定期検診で心拡大を指摘され，精査したが経過観察となる.
4 年前：心不全症状が出現，精査したがこの時点では原因不明であった.
8 ヵ月前〜：好酸球増多と連動した心不全症状，喘息の悪化がみられ入院し，PSL 内服を繰り返していた.
入院 1 週間前：呼吸困難により他院救急科を受診した．著明な心拡大（図 1），両下肢紫斑（図 2），四肢感覚異常，右脛骨筋筋力の低下があった．心筋生検で間質への好酸球の著明な浸潤を認めた.
入院当日：Churg–Strauss 症候群の疑いで当院膠原病内科に転院した．mPSL, half pulse 含むステロイド投与を開始した.
8 日後：意識レベル低下，下肢筋力低下が出現した．頭部 MRI では慢性虚血性変化のみであった.
15 日後：38℃ 以上の発熱および全身痙攣出現．腰椎穿刺や頭部 CT で異常なし，培養は陰性であった.
18 日後：心室細動をきたし蘇生したが ICU 管理となる．入院 20 日後，CMV アンチゲネミア陽性となり治療を開始した.
23 日後：DIC の状態となり徐々に状態が悪化，入院 29 日後には β-D グルカンも高値となる.
31 日後：死亡．全経過 10 年間.

【検索希望事項】
1. 全身の炎症所見，とくに好酸球浸潤の評価，2. 心筋の状態，3. 感染症の評価.

【剖検診断】
1. Churg–Strauss 症候群（ステロイド治療後），2. 心筋炎（ステロイド治療後），心内血栓症，3. 侵襲性アスペルギルス症，4. サイトメガロウィルス感染症，5. 大腸癌手術後.

【剖検所見】
A. Churg–Strauss 症候群
1. 既往標本（他院施行）
心筋生検材料では心筋の変性所見と軽度の線維化を認め，中等度の好酸球浸潤を伴う（図 3）．明らかな血管炎の所見はない．皮膚生検材料では真皮浅層〜網状層の脈管周囲に軽度の好酸球および好中球の浸潤，出血を認める（図 4）．血管にフィブリノイドな変化が疑われる.
2. 剖検時の状態
1）心臓（445 g）：著明に重量を増す．両心房，心室ともに拡張が著明である．心室壁の菲薄化があり，透明感のある斑状の変性像が多発している（図 5）．心尖部に血栓の付着がある．組織学的には心筋が斑状に脱落し膠原繊維でおきかわる古い心筋壊死が目立つ（図 6）．比較的新しい心筋壊死巣も少量混在する．こうした病変近傍に治癒後の動脈炎と思われる像が少数ある（図 7）．肉芽腫や好酸球の浸潤はない．冠動脈に優位狭窄はない.
2）そのほかの臓器：胆囊，肝臓に陳旧性動脈炎がある（図 8）.
3. 治療に関連した所見
1）侵襲性アスペルギルス症：肺（610/695 g）は両側とも重量を増しており，割面では肉眼的に左右とも 4.5 cm 大までの出血性梗塞が散在している（図 9）．組織学的には同部位にアスペルギルスと思われる真菌が組織破壊性に増殖しており，侵襲性アスペルギルス症の状態である.
2）CMV 感染症：中咽頭，胃，上行結腸，胆嚢や気管に潰瘍形成がある．組織学的にはこれらの潰瘍近傍や，そのほか食道，肺，副腎において上皮細胞および血管内皮細胞に核内封入体をもつ細胞を認め（図 10），CMV 免疫染色により陽性所見が得られた.
B. 大腸癌手術後の状態
既往標本なし．剖検時には S 状結腸に吻合部が確認できる．局所再発およびリンパ節，遠隔転移は指摘できなかった.

【病理所見まとめ】
1. 心臓は両心ともに斑状の心筋壊死巣が多発している．剖検時にはステロイド治療後であり好酸球浸潤や肉芽腫性の活動性血管炎は確認できないが，臨床情報や過去検体の所見，陳旧性動脈炎の所見から Churg–Strauss 症候群による変化と考えられる．心内血管の変化は軽度であり，好酸球による心筋の障害が主体であったと推測される.
2. ステロイド治療による免疫不全状態を背景に，侵襲性アスペルギルス症，CMV 感染症を発症した．重症の心不全の状態にこれらの感染症が加わることで状態が悪化し，死にいたったと考えられる.

臨床画像

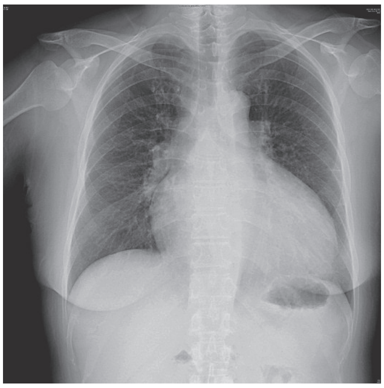


図 1．入院時胸部 X 線像．著明な心拡大を認める．

図 2．入院時外観所見．右下肢紫斑．一部は痂皮化している．

病理画像

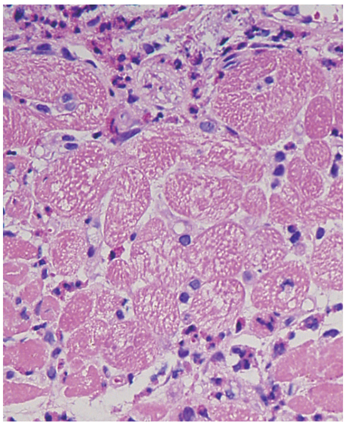


図 3．既往検体の病理組織像（1）［HE 染色］．心臓．間質への好酸球浸潤，軽度心筋変性を認める．

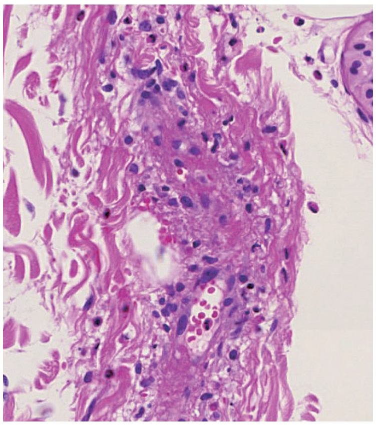


図 4．既往検体の病理組織像（2）［HE 染色］．皮膚．血管周囲の好酸球浸潤，出血，フィブリン析出を認める．

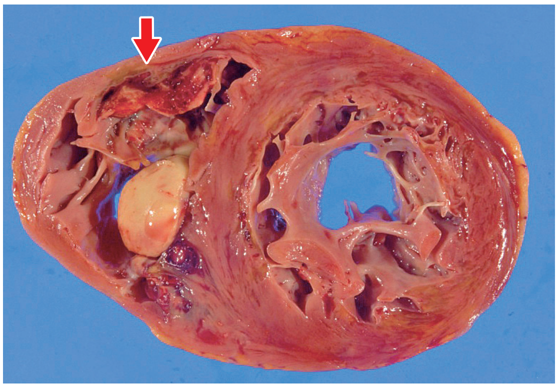


図 5．摘出肉眼標本．心臓の代表的割面．壁の軽度菲薄化と透明感のある変性像，血栓（矢印）．

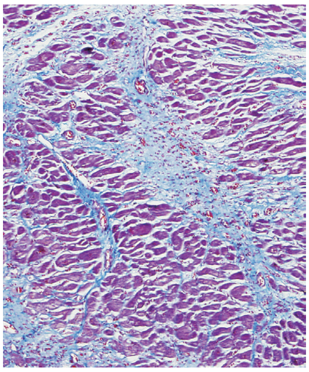


図 6．心筋病理組織像（Masson 染色）．やや時間の経過した斑状の心筋壊死巣．

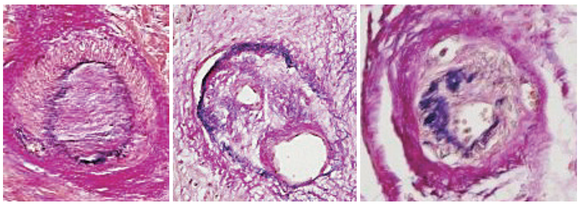


図 7．心臓細血管病理組織像（EVG 染色）．左から血管の閉塞，再疎通，弾性線維断裂．

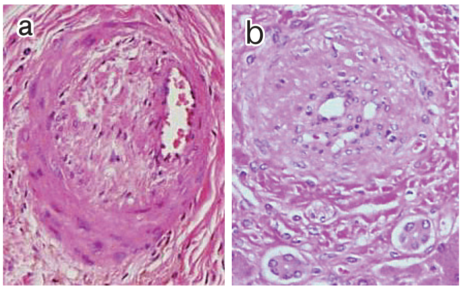


図 8．陳旧性動脈炎病理組織像（HE 染色）．a：胆嚢の動脈狭窄，b：肝内の動脈再疎通．

図 9．摘出肉眼標本．右肺尖部の出血性梗塞（矢印）．左下囲み：Grocott 染色により真菌が確認される．

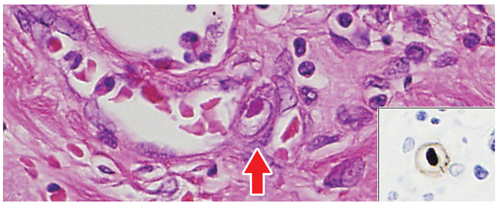


図 10．上行結腸潰瘍部の病理組織像（HE 染色）．血管内皮細胞に核内封入体（矢印）．右下囲み：CMV 免疫染色陽性．

岸本　太郎 博士（医学）　Taro Kishimoto

学位記番号　／甲第 1915 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日
研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系（生命情報学）専攻
学位論文　／Accurate mass comparison coupled with two endopeptidases enables identification of protein termini（エンドペプチダーゼ 2 種を用いたペプチド断片の精密質量比較による蛋白質末端の新規同定法の開発）
Proteomics　第 11 巻第 3 号　485–489 頁　平成 23 年 2 月発表
論文審査委員／主査：三木　義男　　副査：仁科　博史　　副査：笠間　健嗣

〈論文要旨〉
蛋白質の末端は生体内において重要な役割を果たしているが，これまでの手法では末端を網羅的に解析することは出来なかった．本研究においてアミノ末端とカルボキシル末端を同時に網羅解析する新規手法を開発した．この手法ではリジルエンドペプチダーゼ（Lys-C）とメタロエンドペプチダーゼ（Lys-N）の 2 種のエンドペプチダーゼを用いて蛋白質を消化し，生じたペプチドをそれぞれ質量分析する．蛋白質末端より遊離したペプチド（末端ペプチド）は，以下のようにペプチドの質量を比較することによって見出される：(1) Lys-C で消化されたペプチドのうちアミノ末端ペプチドは，Lys-N で消化された同じアミノ末端ペプチドよりもリジン残基の分だけ大きな質量を示す．(2) 同様に Lys-N で消化されたペプチドのうちカルボキシル末端ペプチドは，Lys-C で消化された同じカルボキシル末端ペプチドよりもリジン残基の分だけ大きな質量を示す．(3) 内部配列に由来するペプチドは Lys-C 消化物と Lys-N 消化物で全く同じ質量を示す．本研究において，この手法の有効性をいくつかの蛋白およびペプチド混合物において証明した．既知の蛋白質末端の同定だけでなく，アミノ末端におけるアセチル化や蛋白質アイソフォームの同定にも成功した．これらの結果により，この新規手法は蛋白質混合物においても蛋白質末端を正確に同定することが出来ることが証明された．

〈緒言〉
液体クロマトグラフィと接続したタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）はプロテオミクスにおける重要な手法であり，複雑な蛋白質混合物の消化物を網羅的に同定することが広く行われている（ショットガンプロテオミクス）．また，リン酸化やアセチル化などを含む様々な翻訳後修飾（PTMs）を検出する手法としても使われている．LC-MS/MS による蛋白質の同定は，検出ペプチドがデータベース上のアミノ酸配列に帰属されることによって試料中の蛋白質存在が証明されることになるが，その検出ペプチドが末端であるかどうかは決定することが出来ない．
多くの生体内の反応において蛋白質の末端の区別は重要である．いくつかのプロテアーゼは翻訳されたままでは未活性化状態であり，消化酵素による切断が活性の発現に必須である．分泌蛋白や膜蛋白はシグナル配列を持っており，輸送の目印となった後，切断されて成熟蛋白となる．翻訳後修飾に目をむけると，アミノ末端におけるアセチル化やカルボキシル末端へのアミド化は蛋白質やペプチドの安定化に寄与しており，ミリストイル化なども蛋白局在や機能への重要な役割を担っている．しかしながら，蛋白質末端そのものや末端への翻訳後修飾を網羅的に研究した例は今までない．
蛋白質末端の特異的解析はいくつかの方法が知られているが，既存の方法論ではアミノ末端とカルボキシル末端を同時に測定することは出来ない．さらにこれらの手法は特異的濃縮もしくは化学的修飾を必要とする．このようなステップは実験誤差を大きくし，感度と定量性の低下をもたらしてしまう．
本研究において，蛋白質の消化を行うだけでアミノ末端およびカルボキシル末端の両方を検出することができる新規手法を開発したので報告する．

〈原理〉
末端ペプチド検出のアルゴリズムを説明する．蛋白質を Lys-C および Lys-N を用いてそれぞれ消化する．Lys-C による消化で得られるペプチドおよび Lys-N 消化ペプチドの質量を比較すると，アミノ末端に相当するペプチドはリジン残基分だけ Lys-C 消化ペプチドの方がリジン残基分だけ大きく，カルボキシル末端に相当するペプチドは Lys-N 消化ペプチドの方が大きいものとして検出される．内部配列由来のペプチドはリジンの位置が違っているだけで，質量は一致する．
精密質量により見出されたペプチドの組は，MS/MS（質量分析装置内におけるペプチドの開裂および開裂フラグメントの質量分析）を行うことにより末端ペプチドの確認を行うことが出来る．アミノ末端ペプチドにおいては b 系列（N 末端側からの開裂フラグメント）が一致し，y 系列（C 末端側からの開裂フラグメント）がリジン残基分ずれている．また，カルボキシル末端ペプチドにおいては y 系列が一致し，b 系列がずれている．このようにフラグメントの質量を比較することによって末端ペプチドの検出を確認することが可能である．

〈方法〉
ウシ血清アルブミン・卵白オボアルブミン・ウマミオグロビン・卵白リゾチームの 4 種の蛋白質を等モルずつ 0.5 M TEAB（Triethylammonium bicarbonate），1 M 尿素に溶解し，TCEP（Tris（2-carboxyethyl）phosphine）による還元と MMTS（methyl methanethiosulfonate）によるアルキル化の後，等量に分割した．各々の蛋白質溶液は終濃度 1 mM になるように塩化カルシウムを加え，それぞれ Lys-C と Lys-N で酵素/基質比 1:10 の条件で消化した．消化後の試料は TFA（Trifluoroacetic acid）によって反応を停止し，減圧乾固したのち 0.3% ギ酸で溶解して LC-MS/MS の試料とした．LC-MS/MS は日立ハイテクノロジーズ社製ナノフロー液体クロマトグラフィとサーモフィッシャーサイエンティフィック社製電場型フーリエ変換質量分析計（Orbitrap）を用いた．質量分析計から得られた生データ（.raw ファイル）は Proteowizard を用いて mgf 形式（mascot generic file）に変換したのち，in house で作成したソフトウェアを用いて蛋白質末端ペプチドの検出・検証を行った．また，mgf 形式の MS/MS データは MASCOT（マトリックスサイエンス社）で Sprot もしくは Sprot_varsplic データベースに対して検索を行い，蛋白質名を確定した．

〈結果〉

4種の蛋白質標品混合物による手法の検証実験により，下記のような結果が得られた．ウマミオグロビンのアミノ末端は翻訳開始メチオニンが除去されたのちアセチル化されることが知られているが，今回の方法でアセチル化されているものだけでなく非アセチル化のアミノ末端も検出された．また，既知の末端だけでなくいくつもの新規末端を検出した．この新規末端のうち例えばウマミオグロビンの LEFI から始まるペプチドはアミノ末端が一残基ずつ切断されたラダー状に検出されていることからアミノペプチダーゼによるプロセシングが示唆された．

〈考察〉

既知のアミノ末端およびカルボキシル末端が今回の方法で検出・同定されたことから，この方法は蛋白質の末端解析を混合物中において行うことが可能であることが示された．代表的なアミノ末端修飾であるアセチル化も同様に検出できたことから，この方法は翻訳後修飾解析にも適用可能であることが証明された．また，既知の末端だけでなくこれまでに報告のない切断部位も検出可能であった．リジンが末端アミノ酸に近い部位にあり，遊離するペプチドが LC-MS/MS の検出に適さない程度短い場合には末端の同定は難しいが，逆に末端アミノ酸がリジンである場合には，エンドプロテアーゼである Lys-C および Lys-N の切断は起こりにくいことから検出・同定が出来た．また，検出された末端の配列を比較することで，切断に関与するプロテアーゼの種類を推定することが可能であることが示唆された．

〈結論〉

本研究で蛋白質のアミノ末端およびカルボキシル末端の両方を検出する新しい手法を確立した．この方法では同一蛋白における異なった末端配列や修飾された末端なども全く同様に解析が可能である．この方法は非常に簡便であり，2種類のエンドペプチダーゼと LC-MS/MS しか必要としない上，ショットガン法の応用であるため，ほぼ全ての生体試料に適用することが可能である．また，特異的な化学修飾や特殊な精製法といった前処理は必要ではないため網羅性・定量性が担保できる．この手法を用いることで，複雑な生体内の蛋白質末端を網羅的に解析し，生化学的プロセスを理解する新たな領域が期待できる．今後，蛋白質の末端を解析することにより新たなバイオマーカーの発見や疾患の機序解明に強力なツールとしての利用が期待される．

井上　和久 博士（医学）　Kazuhisa Inoue

学位記番号　／甲第 1916 号　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）老化制御学系専攻

学位論文　／Influence of lower limb muscle fatigue on balance function（下肢筋群疲労がバランス機能に及ぼす影響）
Journal of Physical Therapy Science　第 25 巻第 3 号　331-335 頁　平成 25 年 3 月発表

論文審査委員／主査：宗田　大　　副査：秋田　恵一　　副査：神野　哲也

〈論文要旨〉

転倒は，加齢によるバランス機能や足部機能および感覚機能などの低下により生じやすくなり，バランストレーニングを実施した方が転倒の危険性が低くなる．そこで，これまでの先行研究を参考に下肢関節の屈筋・伸筋群を個別に等尺性随意収縮で筋疲労を生じさせ，どの筋群がバランス機能低下に影響を及ぼすかについて分析・検討した．結果，総軌跡長において股関節伸筋群，足関節底屈筋群の疲労前と疲労後において有意差が認められ，単位面積軌跡長は，股関節屈筋群，股関節伸筋群，膝関節屈筋群，足関節背屈筋群において有意差が認められた．総軌跡長と単位面積軌跡長ともに有意差が認められたのは，股関節伸筋群のみであった．若年健常成人を対象とした今回の結果から，筋疲労により股関節伸筋群がバランス機能低下に大きく影響することが示唆された．今後，バランストレーニングとして特に股関節伸筋群を使用したプログラムを積極的に取り入れたほうがよいと考えられた．

〈緒言〉

高齢者は，日常生活において転倒の危険性が高くなり，歩行中や立位時バランスを崩して転倒することがある．転倒は，加齢によるバランス機能や足部機能および感覚機能などの低下により生じやすくなり，バランストレーニングを実施した方が転倒の危険性が低くなる．従って，高齢者の転倒を予防することは重要な研究課題となる．高齢者の転倒予防として，バランス機能に関する研究が報告されている．現在，バランス機能低下の予防についての方策や運動プログラムで転倒が予防できるかどうかについて，様々な見解がある．バランス機能向上のために予防体操や運動プログラムが提案されており，バランス機能を向上させる効果的なトレーニング方法として，主にバランス訓練を数週間継続的に実施したものや片麻痺患者に対しての体重移動訓練など種々のトレーニングを組み合わせた方法が多い．これらの研究報告では，バランス訓練としてどの筋力を強化すればバランス機能が向上するのか具体的なプログラムとなっていない．

Yaggie らは，足関節底屈筋群及び背屈筋群を等速性運動で筋疲労させた場合，筋疲労後約 10 分後まで持続的にバランス機能低下が認められ，20 分後には通常のバランス機能に回復すると報告した．また，別の研究報告として，足関節はバランス機能低下に若干影響はあったがより影響の大きかったのは股関節・膝関節に関与する筋疲労であったとの報告もある．さらに，Vuillerme らの筋疲労の方法としては，両側の下腿三頭筋のみを立位でつま先立ちが出来なくなるまで随意運動させ実施させた．これらの先行研究として多くは，足関節の底屈・背屈筋群および股・膝関節の屈筋群・伸筋群の影響があったと報告されている．先行研究における筋疲労の方法は，屈筋群・伸筋群を同時に疲労させたものや下肢のある特定の筋群のみを筋疲労させた研究である．

この論文では，高齢者の転倒を予防するためにどの筋群がバランス機能に影響を与える可能性があるかについて検証する事を目的とした．また，若年健常成人が筋疲労によりバランス機能に影響があるとすれば，高齢者でもある特定の筋群が筋力低下によりバランス機能に影響が生じる可能性があることが考えられるため，今後の転倒予防として介入することを目的に分析・検証した．

〈方法〉

対象は，骨・関節系の既往歴のない若年健常成人 21 名 42 肢（男性 10 名，女性 11 名）とした．被験者には最初に重心動揺計（グラビコーダ GS5500, ANIMA 社製）にて重心動揺をサンプリング周波数 50Hz で開眼閉足裸足にて 30 秒間測定した．また測定時，ホワイトボードに記載した目線と同じ高さの十字視標を目視させ，静的立位を保持させた．視標までの距離は約 2m に設定した．重心動揺の評価指標として，総軌跡長（cm）と単位面積軌跡長（1/cm）とした．その後，多用途筋機能評価訓練装置（BIODEX SYSTEMS3, BIODEX MEDICAL SYSTEMS 社製）を使用し，左右の股関節屈筋群・股関節伸筋群・膝関節屈筋群・膝関節伸筋群・足関節背屈筋群・足関節底屈筋群の 6 筋群をそれぞれ等尺性随意収縮により片脚 1 関節 1 運動のみ実施し，その筋群を筋疲労させた．等尺性随意収縮の方法は，随意的に最大筋力を常に発揮させながら最大筋力の 30% 以下になるまでの疲労とした．なお，対象筋群の筋疲労を考慮し，計測は 1 日 1 回行い，各筋群の経時的疲労が重複しないように次の測定まで 1 日以上あけて測定した．最大随意収縮による筋疲労直後に再度重心動揺を測定し，また経時的な影響を分析するため 5・15・60 分後も測定した．

〈結果〉

今回のパラメーターの一つである総軌跡長は，股関節伸筋群，足関節底屈筋群の疲労前と疲労後において有意差が認められた．また，これらの筋群総軌跡長の股関節伸筋群と足関節底屈筋群において測定直前（筋疲労前）と測定直後（筋疲労後）に有意差が認められ，その後の 5 分後以降においては測定直後（筋疲労後）と比べて有意に回復傾向が認められた．単位面積軌跡長は，股関節屈筋群，股関節伸筋群，膝関節屈筋群，足関節背屈筋群において有意差が認められた．特に股関節伸筋群は，測定直前（筋疲労前）と比べて測定直後（筋疲労後）から 15 分後まで持続して有意に減少傾向が認められ，60 分後においては測定直後（筋疲労後）および 5 分後に比べて有意に増加（回復）傾向が認められた．なお，膝関節屈筋群・足関節背屈筋群においても同様な傾向が認められたが，持続して有意な減少傾向は 5 分後までであった．本研究により総軌跡長と単位面積軌跡長ともに有意差が認められたのは，股関節伸筋群のみであった．

〈考察〉

今回の研究結果において得られた主な結果として，若年健常成人が対象の場合，下肢の筋疲労を生じることによりバランス機能に影響を与えることが示唆された．

本研究結果と先行研究の結果を比較すると，先行研究の場合，重心動揺中心変位を評価の指標としており，X 方向（前後）と Y 方向（左右）の中心変位によりバランス機能を判断している．今回の研究の指標と異なるが，われわれの実験結果では，股・膝関節の屈筋・伸筋群の筋疲労において，有意にバランス機能が低下し，また足関節の筋疲労も同様に有意にバランス機能が低下した．但し，今回の結果からは下腿三頭筋つまり足関節底屈筋群の疲労が Yaggie らの報告と異なり，筋疲労直後のみバランス機能に影響を与え，先

行研究と同様な10分後までの影響は認められなかった．この結果は，筋疲労の方法が本研究では等尺性随意収縮運動であったのに対して，先行研究では等速性随意収縮運動を行ったことによる方法の違いが原因だと考えられる．等速性随意収縮運動による筋疲労の方法は，等尺性随意収縮運動に対して，筋に対して負荷量が大きく筋疲労直後においても回復がしにくい傾向のため，今回のように先行研究と異なった結果に至ったと推測される．

バランス機能における静的立位重心動揺の大きさを示す総軌跡長に関して，有意に増加傾向を示したのは，股関節伸筋群・足関節底屈筋群で，有意にバランス機能を低下させた．抗重力筋として作用している股関節伸筋群の結果は，立位保持において重要な姿勢保持筋であり静的立位においても股関節戦略が作用していることが改めて示唆された．

固有受容性姿勢制御度を示す評価指標といわれる単位面積軌跡長の結果において，股関節屈筋群・股関節伸筋群・膝関節屈筋群・足関節背屈筋群に有意な減少傾向が認められた．これらバランス機能低下を生じさせた筋群に与えた影響として，先行研究と同様に各関節の固有受容器における姿勢制御機構の働きが減少し，バランス機能に影響を及ぼすことが考えられた．なかでも今回の結果から股関節伸筋群の筋疲労が与えた影響により持続的にバランス機能低下を生じている．従って総軌跡長の結果では，筋疲労後，短時間のバランス機能低下としか判断出来ないが，単位面積軌跡長の結果も含めて考えれば，股関節伸筋群の筋疲労は，より長時間バランス機能低下に関与することが示唆される．これらの結果から考えられることは，総軌跡長の結果のみでバランス機能を判断するのは危険なため単位面積軌跡長の結果も含めて結果を検討する事が重要である．

今回一側の下肢筋群の筋疲労が与えた影響として，股関節伸筋群が関与しており，通常股関節伸筋群は立位を保持するために重要な筋群である．人は身体が後方に転倒しそうになった際，姿勢反射機構が働き足関節の背屈が生じ，次いで一側の股関節が伸展する．これは本来人間に備わった立ち直り反射の１つである．この姿勢反射が生じる理由として，まず足底の触覚受容器が床に接地している刺激を入力し，その入力をもとに足関節の固有受容器で姿勢制御している．また，体幹が後方に倒れることにより床に接地している足底が床から離れ転倒するという危険信号が足底の触覚受容器から入力され足関節が背屈し次いで股関節が伸展して初めて転倒を未然に防ぐ動作となり姿勢を保持する動作につながる．この姿勢反射機構の働きを考えれば，足底接地による触覚受容器からの入力により出力としての足関節背屈動作，その後の動作である股関節伸展動作に支障をきたせば明らかに転倒の危険が生じる．

〈結論〉

今回の研究結果により主に股関節伸筋群がバランス機能低下に大きく影響することが示唆された．但し，今回の結果は若年健常成人の場合であり，高齢者にも当てはまるかどうかを今後検討する必要がある．さらに，足関節の筋疲労の影響については，筋疲労の方法や視標の位置など先行研究結果と違いがあるため再度測定時の条件設定を考慮し検証しなければならない．

林　達哉 博士（医学）　Tatsuya Hayashi

学位記番号	／甲第1917号　　学位授与　／平成25年3月26日
研究科専攻	／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）器官システム制御学系（循環制御内科学）専攻
学位論文	／Preprocedural therapeutic international normalized ratio influence on bleeding complications in atrial fibrillation ablation with continued anticoagulation with warfarin（治療域INRを示すワーファリン継続心房細動アブレーションにおける，術前PT-INR値の出血性合併症に対する影響についての研究） Circulation Journal　第77巻第2号　338-344頁　平成25年1月発表
論文審査委員	／主査：荒井　裕国　　副査：古川　哲史　　副査：安原　眞人

〈論文要旨〉

治療域INRを示すワーファリンとヘパリンを組み合わせた心房細動アブレーションの安全性は未だ確立されておらず，また術前INR値の出血性合併症への影響も明らかにはなっていない．治療域INRを示すワーファリン内服継続のまま心房細動アブレーションを行った連続150人を対象とし，出血（Bleeding Complications）の有無によりGroup BCとGroup No BCとに分け，術前術後のINR値，APTTを含む臨床背景を比較した．本研究中一例も脳梗塞や一過性脳虚血の発症を認めなかった．22人（15%）でおいて出血性合併症を認めた（Group BC）．うち3人がmajor complicationsであり，19人がminor complicationsであった．Group NO BCとの両群間において術前のINR値，APTT値，術中ヘパリン投与量において有意差を認めなかったが，術後のINR値とAPTT値はGroup BCにおいて有意に延長を認めていた（INR 2.5±0.5 vs 2.2±0.5, p＝0.016, APTT 65±45 vs 44±11, p＜0.0001）．多変量解析では，術後のAPTTのみが唯一の出血危険因子であった（p＝0.022）．治療域INRを示すワーファリンとヘパリンの併用下心房細動アブレーションは安全に行うことが出来ると考えられる．出血性合併症の有無は術前のINR値ではなく，術後APTT値がより関係している．

〈緒言〉

心房細動に対するカテーテルアブレーションは現在広く行われおり，一般的には安全であるが，稀に脳梗塞などの重篤な合併症が起こることが知られている．周術期における血栓塞栓症の発症率は1.6-2.2%程度とされ，その改善が望まれている．現在多くの施設では出血性合併症増加の恐れから術前にワーファリン内服を中止しヘパリン点滴に置換し，術後にワーファリン内服を再開する "bridging therapy" が行われているが，近年になりワーファリンを継続したままで手術を行う方法が報告され，その安全性が認められてきている．しかし未だ出血性合併症の危険因子については詳細に調べられていない．また，血栓塞栓症を防ぐ上でヘパリン投与を併用することがより強力に血栓症予防になると考えられるが，術後にヘパリン投与を行った場合の効果についても調べられていない．本研究では，治療域INRを示すワーファリンとヘパリンを組み合わせた心房細動アブレーションにおける血栓塞栓症，出血性合併症の発生頻度を調べ，また出血性合併症の危険因子を検討した．

〈方法〉

心房細動アブレーションを施行した，術前PT-INR値が1.8以上の150人（男性118人女性32人，平均年齢は62±10歳，年齢30-79歳，発作性心房細動121人，持続性心房細動29人）を対象とした．周術期に出血性合併症を起こした群（Group BC）と起こしていない群（Group No BC）とに分け，両群における各臨床項目を比較した．全例周術期にワーファリン内服が同量で継続され，ヘパリンは心房中隔穿刺後に5000単位，以後はACTが300秒を超えるように30分適宜追加された．術後止血時にプロタミンが5-10mgの範囲で使用された．また帰室後より血栓予防のためヘパリン投与が24時間のみ再開された．なおこの時のヘパリン投与量は術前のPT-INR値により調節された．major bleeding complicationsは症状を伴い積極的治療を必要とした例（心タンポナーデや，血腫，喀血，血気胸，後腹膜血腫）と定義され，またminor bleedingは無症状で積極的治療を必要としない血腫や再出血と定義された．塞栓性合併症は脳梗塞や一過性脳虚血，または深部静脈血栓症と定義された．

〈結果〉

脳梗塞や一過性脳虚血は一例も起きなかった．22人（15%）で出血性合併症を起こした．うち3人がmajor complicationsであり，19人がminor complicationsであった．major complicationsは心タンポナーデが1人，仮性動脈瘤が2人であった．minor bleedingは血腫が2人，動静脈瘻が2人，残り15人が再圧迫を必要とした穿刺部の小出血であった．これら22人の患者をGroup BCとし，残り128人をGroup No BCとした．なお心タンポナーデを起こした患者はプロタミンとビタミンKの投与により速やかにリバースされ，心嚢穿刺後に良好に回復した．仮性動脈瘤はいずれも用手的圧迫にて消失し，外科手術不要であった．全例で輸血は行われなかった．

全患者において，術後有意にINR値とD-dimer値の上昇を認めていた（2.2±0.4 vs 2.3±0.5, p＝0.039, 0.36±0.16 vs 0.44±0.25, p＜0.0001）．APTT値は不変であった．Group BCとGroup No BCの臨床背景を比較した場合，Group BCは有意に女性が多く（41% vs 17%, p＝0.02），また左房の拡大を認めた（45±8 vs 42±7, p＝0.032）．両群における術前のINR, APTT, D-dimer値は有意差を認めず，術中ヘパリン投与量も有意差を認めなかった．しかし術後はGroup BCにおいて有意にINRとAPTTが延長を認めていた（2.5±0.5 vs 2.2±0.5, p＝0.016, 65±45 vs 44±11, p＜0.0001）．多変量解析では，術後APTTが単独の出血危険因子であった（p＝0.022）．

なお術前INR値を2.0以上と2.0未満との2群間に分けて術中ヘパリン投与量を比較したところ，INR2.0以上の群で有意に少なかった（8582±329 vs 7272±190, P＜0.0005）．

〈考察〉

この研究では治療域INRを示すワーファリンとヘパリンを組み合わせた心房細動アブレーションの出血危険因子を検討した．15%の患者が出血性合併症を起こしたが術前のINR値はGroup No BCと比しても不変であり，術前INR値は出血の危険因子とはならないことが示された（2.2±0.4 vs 2.2±0.4, p＝0.79）．この結果から，治療域INRを示すワーファリン内服患者においても術後の止血は十分に得られることが示された．本研究におけるmajor bleeding complicationsの発生率は2%と少なく，またより重篤な合併症として心タンポナーデに限局した場合の発生率は0.67%であり，これはbridging therapyにおける1.22%という発生率と比してもより少なく，安全に行われることが示唆された．脳梗塞や一過性脳虚血は一例も起きなかった．術前INRをそのまま保っていた方が安定し

た抗凝固効果が得られ，かつ結果的に術中投与ヘパリン量を減らせるため，血栓予防と同時に出血予防にも有用である可能性が示唆された．

ワーファリンの内服量は同様であったにもかかわらず，全患者における INR 値は 2.2 から術後に 2.3 へと 4.5% 有意に延長を認めていた．この理由は明らかではないが，術中ヘパリンが直接的，あるいはワーファリン代謝を拮抗し間接的に INR を延長させた可能性，あるいは周術期に投与された抗生剤等がやはりワーファリン代謝を阻害し間接的に効果を増強させたものと推察した．なお術後 INR 値は上昇し抗凝固療法は強まっていたにも関わらず，術後 D-dimer 値は術前と比し有意に上昇を認めており，アブレーションによる凝固傾向，あるいは微小血栓の生成が示唆された．D-dimer 値の検討からは，治療域 INR を保ったワーファリン内服とヘパリンの併用でも術中の血栓傾向を完全には抑制出来ないことが示唆された．なお全患者においては術前と比し術後 APTT は延長を認めておらず，この結果から多くの患者においてヘパリン効果は翌日までに不活化されることが示された．

Group BC の大部分は再圧迫を必要とした小出血の患者であったが（15%），Group No BC と比し有意に APTT 値の延長を認めており，ヘパリン効果の違いにより引き起こされたものと推察された．しかし術中投与ヘパリン量に有意差はなかったため，ヘパリン代謝の個人差がこれらの違いをもたらしたものと考えた．再圧迫を必要とした小出血の多くは，この様なヘパリン代謝の遅延による効果過剰による二次止血の抑制によるものと考えた．なお小出血の発症率は過去の文献発表とほぼ同様であった．

この研究においては，術後 24 時間ヘパリン投与を行った．血栓はアブレーション中か直後に起こることが多いと考えられるが，稀に遅発性に起きる．心房細動から洞調律に復した際に心房は stunning しており，数分から数週間かかかって回復する．この stunning 期間における血栓症を予防する目的でヘパリンの追加投与が行われた．結果として本研究においては脳梗塞，一過性脳虚血の発症を認めなかった．

〈結論〉

治療域 INR を示すワーファリンとヘパリン併用心房細動アブレーションは安全に行うことが出来ると考えられる．出血性合併症の有無は術前の INR 値ではなく，術後 APTT 値がより関係している．

江原　達弥 博士（医学）　Tatsuya Ehara

学位記番号　／甲第 1918 号　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系（分子内分泌内科学）専攻

学位論文　／Role of DNA methylation in the regulation of lipogenic glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene expression in the mouse neonatal liver（マウス新生仔肝臓における脂肪合成酵素グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素 1 の DNA メチル化による遺伝子発現制御）

Diabetes　第 61 巻第 10 号　2442–2450 頁　平成 24 年 10 月発表

論文審査委員／主査：淺原　弘嗣　副査：石野　史敏　副査：佐藤　憲子

〈論文要旨〉

胎児期～新生児期の栄養環境が成人期に発症する生活習慣病の発症に影響する可能性が指摘されており，その分子基盤として代謝関連遺伝子のエピジェネティクス制御が想定される．一方，肝臓における脂質代謝障害は多彩な生活習慣病の発症に関連するため，その制御機構を理解することは極めて重要である．本研究では，胎児期～新生児期の代謝関連遺伝子のエピジェネティクス制御を理解する上で，出生後の栄養環境変化に応じて変化する肝臓脂肪合成の分子機構に着目し，肝臓の中性脂肪合成の律速酵素 Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1（GPAT1; *Gpam*）遺伝子の DNA メチル化制御の可能性を検討した．

マウス肝臓の *Gpam* のプロモーター領域は，成獣と比較して新生仔で高メチル化状態であり，遺伝子発現と逆相関した．成獣の初代培養肝細胞において，*Gpam* プロモーターを DNA メチル化することにより転写因子 SREBP-1c のプロモーターへのリクルートと GPAT1 の遺伝子発現が減少し，中性脂肪合成が低下した．また，*Gpam* は DNA メチル化酵素 Dnmt3b により DNA メチル化された．さらに，胎仔期～新生仔期における母獣の過栄養の環境が新生仔の *Gpam* プロモーターの DNA メチル化を減少させた．以上より，肝臓の中性脂肪合成の律速酵素 GPAT1 は新生仔期に DNA メチル化によるエピジェネティックな制御を受けることが明らかとなった．

〈緒言〉

胎児期～新生児期の栄養環境が成人期に発症する肥満や生活習慣病の発症に影響を与えることが明らかとなりつつある．すなわち，妊娠・授乳期の母親の低栄養や肥満，摂取する栄養素の偏りなどが胎盤や母乳を介して子に伝わり，これら栄養環境の情報が何らかの形で子の細胞内にメモリーとして残り，将来の生活習慣病の発症を少なからず規定していると考えられる．その分子基盤の一つとして，栄養環境の変化によりもたらされる代謝関連遺伝子の DNA メチル化によるエピジェネティクス制御の重要性が示唆されている．しかしながら，胎児期や新生児期にエピジェネティクス制御を受ける代謝関連遺伝子の報告はまだ殆どない．

肝臓における脂質代謝障害は多彩な生活習慣病の発症に関連するため，その制御機構を理解することは極めて重要である．従来，肝臓における脂質代謝は出生後の栄養環境の変化に応じてダイナミックに変化することが知られている．離乳は哺乳類が出生後に経験する栄養環境の生理的変化の一つであり，脂質が豊富なミルクから炭水化物主体の固形食に栄養源が変化する．一方，肝臓における新規脂肪合成は離乳前までは抑制されており，離乳期に急激に増加する．これは食事由来の脂質摂取量の減少という栄養環境の変化に対する，肝臓の脂肪合成機能の適応・成熟プロセスと考えられるが，制御機構の詳細は十分に解明されていない．

本研究では，代謝関連遺伝子のエピジェネティクス制御機構を理解する上で，この出生後の栄養環境に応じた肝臓脂肪合成の制御機構に着目し，肝臓の中性脂肪合成における律速酵素 GPAT1 の，DNA メチル化による遺伝子発現制御が関与する可能性を検討した．

〈方法〉

新生仔及び成獣の雄性 C57BL6 マウス肝臓を用い，*Gpam* を含む複数の脂肪合成関連遺伝子の DNA メチル化状態と遺伝子発現を解析した．また，*Gpam* のプロモーター領域への DNA メチル化酵素のリクルート及びヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法により解析した．初代培養肝細胞を用い，*Gpam* プロモーターの DNA メチル化による，SREBP-1c のリクルートと中性脂肪合成の変化を解析した．さらに，妊娠・授乳期間中の母獣を高脂肪・高ショ糖食により飼育して過栄養状態とし，出生仔の *Gpam* の DNA メチル化状態を解析した．

〈結果〉

マウスの肝臓における中性脂肪合成活性は，新生仔で低く，成獣で高かった．新生仔マウス肝臓において，脂肪合成のマスターレギュレーターの転写因子 SREBP1-c は発現しているにも関わらず，そのターゲットである律速酵素遺伝子 *Gpam* の発現は非常に低かった．新生仔では，*Gpam* プロモーターの SREBP 応答配列（SRE）（GPAT1-SRE）周辺領域の DNA が高メチル化状態であるのに対して，成獣では，低メチル化状態であり，メチル化の程度が遺伝子発現と逆相関した．レポーターアッセイとクロマチン免疫沈降法により，GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化が SREBP-1c のリクルートを阻害することにより，SREBP-1c による転写活性化を直接抑制することが明らかとなった．

クロマチン免疫沈降法による解析の結果，新生仔マウスの肝臓では DNA メチル化酵素 Dnmt3b が GPAT1-SRE 周辺領域にリクルートされる一方，成獣期の肝臓ではリクルート量は著しく低下していた．更に，新生仔期には GPAT1-SRE 周辺領域は転写抑制型のヒストン修飾（H3K9 メチル化）を受けるが，成獣期には転写活性型のヒストン修飾（H3K4 メチル化，H3K9 アセチル化）を受けることが明らかになった．

初代培養肝細胞を用い，GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化と中性脂肪合成に与える，Dnmt3b 及び DNA メチル化の役割を解析した．Dnmt3b 過剰発現により GPAT1-SRE 周辺領域が DNA メチル化され，SREBP-1 のリクルート量と GPAT1 の遺伝子発現が減少し，さらに中性脂肪合成活性が低下した．

妊娠～授乳期間中の母獣を高脂肪・高ショ糖食により飼育し，過栄養の栄養環境が，仔マウス肝臓の DNA メチル化に与える影響を解析した．過栄養群の仔マウスでは，新生仔期に GPAT1-SRE 周辺領域の DNA メチル化が低下しており，SREBP-1 のリクルート量と GPAT1 の遺伝子発現，肝臓の中性脂肪含量の増加が認められた．

〈考察〉

以上の成績より，次のようなモデルが考えられる．新生仔期の肝臓では，Dnmt3b により GPAT1-SRE 周辺領域が DNA メチル化さ

れることにより，SREBP-1cのリクルートが阻害され，GPAT1の遺伝子発現が誘導されない．一方，離乳期には脱メチル化されてSREBP-1cがリクルートされるようになり，脂肪合成の律速酵素であるGPAT1の遺伝子発現が誘導され，脂肪合成が行われるというものである．DNA脱メチル化の分子機構の解明は今後の課題であるが，過栄養にした母獣より産まれた仔マウスを用いた検討により，少なくとも一部は栄養環境の影響を受けるものと考えられる．

本研究は，新生仔マウスの肝臓における脂肪合成遺伝子のDNAメチル化制御に関する最初の報告である．可塑性の高い胎児期・新生児期の代謝臓器において，栄養環境に応じて変化する代謝機能にエピジェネティクス制御が果たす役割を解明することにより，胎児期から新生児期の栄養環境の変化が成人後の生活習慣病の発症を左右する分子機構を知る手掛かりとなることが期待される．

〈結語〉

肝臓の中性脂肪合成の律速酵素GPAT1は新生仔期にDNAメチル化によるエピジェネティクス制御を受けることが明らかとなった．

木田　道也 博士（医学）　Michiya Kida

学位記番号　／甲第1919号　学位授与　／平成25年3月26日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系専攻

学位論文　／Hydrogen sulfide increases nitric oxide production with calcium-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells（硫化水素は血管内皮細胞においてカルシウム依存性にeNOSを活性化しNO産生を増加させる）
European Journal of Pharmaceutical Sciences　第48巻第1-2号　211-215頁　平成25年1月発表

論文審査委員／主査：吉田　雅幸　副査：下門　顕太郎　副査：黒川　洵子

〈論文要旨〉

従来，硫化水素（H_2S）は有毒ガスとして知られていたが，哺乳類の生体内で合成され，全身における様々な作用を持つことが近年報告されてきている．心血管系においてはH_2Sが血管拡張作用，降圧作用を持つことが報告され，一酸化窒素（NO）等とともに内皮由来弛緩因子の一つと考えられている．しかしながら，それらの作用の細胞内機序やNOとの相互作用については不明な点が多い．本研究では血管内皮細胞において，内皮型NO合成酵素（eNOS）活性およびNO産生に対するH_2Sの影響について検討した．その結果，H_2Sが血管内皮細胞に直接作用し，主として細胞内小胞体からのカルシウム放出によって細胞内カルシウム濃度の上昇が起こり，カルシウム依存性にeNOSが活性化することでNO産生を増加させると考えられた．以上により，H_2Sによる血管拡張作用の機序の一部に，血管内皮におけるNO産生を介している可能性が示唆された．

〈緒言〉

従来，硫化水素（H_2S）は腐卵臭を持つ有毒ガスとして知られていたが，近年哺乳類の生体内においてもcystathionineγ-lyase（CSE），cystathionineβ-synthase（CBS），3-mercaptopyruvate sulfurtransferase（3-MST）などの酵素により合成され，種々の生理活性を持つことが明らかとなってきている．H_2Sの全身作用としては，種々の組織においてATP感受性Kチャネルを介して白血球の浸潤を抑制することによる抗炎症作用，酸素消費量や心拍数を低下させる代謝抑制作用，脳における認知機能やシナプス活性の制御作用，神経細胞でのグルタチオンの増加に伴う酸化ストレスからの保護作用，膵島細胞の糖毒性からの保護作用などが報告されている．特に心血管系においては心筋細胞における虚血再灌流障害の軽減作用や血管新生促進作用が報告されている以外にも，血管拡張作用や降圧作用が示されており，一酸化窒素（NO）や一酸化炭素（CO）とともに内皮由来弛緩因子（EDRF）の一つと考えられてきている．

最も主要なEDRFであるNOとH_2Sの相互作用に関しては様々な見解があり，NOとH_2Sの化学反応によってnitrosothiolが産生されNOとH_2Sの生理活性を調節しているという報告や，H_2SがNOの合成およびNOによる血管拡張作用を増強する，あるいは逆に抑制するという報告がいずれもなされており，これらの相互作用についてはその細胞内機序も含めて未だに不明瞭な点が多い．本研究では，H_2Sの血管拡張作用のメカニズムを解明するために，血管内皮細胞における内皮型NO合成酵素（eNOS）活性とNO産生に対するH_2Sの影響を検討した．

〈方法〉

培養ウシ大動脈血管内皮細胞（BAEC，継代数5～10）にH_2SのドナーであるNaHSを添加し，培地中へのNO産生量を2,3-diaminonaphthaleneを用いた蛍光法にて測定した．細胞内カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の測定は，カルシウム蛍光色素（Fura2-AM）を用いた蛍光測定法で行った．eNOS活性はウェスタンブロット法にて解析した．

〈結果〉

NaHSの添加30分後のBAEC培地中のNO産生量は濃度依存性（12.5 - 200μM）に増加した．この効果は細胞内カルシウムキレーターであるBAPTA-AM（20μM）の前処置により消失した．しかし，細胞外カルシウムの有無にかかわらずNaHSによるNO産生促進作用は認められた．また，この効果は細胞内小胞体上に存在するリアノジン受容体（RyR）の阻害薬であるdantrolene（20μM）やIP_3受容体（IP_3R）の阻害薬であるxestosponginC（10μM）の前処置下において減弱した．NaHS（200μM）の添加によりBAECの$[Ca^{2+}]_i$は緩徐であるものの有意な上昇を認め，この効果はdantrolene（20μM）やxestosponginC（10μM）の前処置により有意に減弱した．さらに，NaHSはeNOSの活性的リン酸化部位（Ser^{1179}）のリン酸化を促進したが，この効果はPI3キナーゼ阻害剤であるwortmannin（1μM）の前処置下では変化しなかった．同様に，wortmannin（1μM）前処置によりNaHSのNO産生促進作用にも変化はなかった．

〈考察〉

本研究により，H_2Sによるカルシウム依存性のNO産生促進作用が示された．H_2SがNOの血管拡張作用を増幅するという報告や血管内皮の除去でH_2Sの血管拡張作用が消失したという報告があることからも，H_2Sによる血管拡張作用の機序の一部に血管内皮におけるNO産生を介している可能性が強く示唆される．

$[Ca^{2+}]_i$の調節には細胞外からのカルシウム流入と小胞体ストアからのカルシウム放出が主要な役割を果たしており，後者には小胞体上のIP_3RおよびRyRを介した作用が関与していると考えられている．本研究ではIP_3RとRyRの阻害のいずれにおいてもNaHSによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇が部分的に抑制されたが，細胞外カルシウム濃度の影響は受けなかったことより，小胞体からのカルシウム放出が主要な役割を果たしていると考えられた．しかし今回IP_3RとRyRの阻害により$[Ca^{2+}]_i$の上昇は完全に抑制されておらず，H_2Sによる$[Ca^{2+}]_i$の上昇に細胞外からのカルシウム流入も関与しているという報告も存在することより，細胞外からの流入の部分的関与も否定はできない．H_2Sの$[Ca^{2+}]_i$の上昇作用の標的分子は未だ明らかではなく，さらなる検討が必要と考えられる．

血管内皮細胞においては，$[Ca^{2+}]_i$の上昇に伴い，カルシウム/カルモジュリン（Ca^{2+}/CaM）依存性にeNOSのSer^{1179}のリン酸化およびeNOSの活性化がなされ，NOが合成される．eNOSはCa^{2+}/CaMを介した経路の他にもPI3K/Aktを介した経路により活性化されるが，本研究ではH_2SのNO産生促進作用に対するPI3K/Akt経路の阻害の影響は認められず，Ca^{2+}/CaM依存性経路のみが関与していると考えられた．しかしながら，PKAやAMPKといったプロテインキナーゼもeNOSのリン酸化に関与するとされており，今後の検討が必要である．

〈結論〉

本研究により，H_2S が血管内皮細胞に直接作用し，主として細胞内小胞体からのカルシウム放出によって［Ca^{2+}］$_i$ の上昇が生じ，カルシウム依存性に eNOS が活性化することにより NO 産生を増加させると考えられた．

石川　泰輔 博士（医学）　Taisuke Ishikawa

学位記番号 ／甲第 1920 号　学位授与 ／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻 ／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系専攻

学位論文 ／A novel disease gene for brugada syndrome sarcolemmal membrane-associated protein gene mutations impair intracellular trafficking of hNav1.5（新規ブルガダ症候群原因遺伝子 SLMAP の同定：SLMAP 変異は hNav1.5 の細胞内トラフィッキングを変えることにより，ブルガダ症候群を発症させる）
Circulation：Arrhythmia and Electrophysiology　第 5 巻第 6 号　1098-1107 頁　平成 24 年 12 月発表

論文審査委員／主査：古川　哲史　副査：吉田　雅幸　副査：笹野　哲郎

〈論文要旨〉

ブルガダ症候群（BrS）は突然死や失神を引き起こす遺伝性致死性不整脈疾患の一つであり，これまでに一部の患者がナトリウムイオンチャネルをコードする *SCN5A* 遺伝子などに病因となる変異を有することが報告されているが，大半の患者では未だ原因が不明である．我々は原因不明の BrS 患者の病因を究明する目的で，筋小胞体や横行小管に発現する SarcoLemmalMembrane-Associated Protein（SLMAP）タンパクをコードする *SLMAP* 遺伝子について，BrS 患者 190 名を対象とした変異スクリーニングを行い，2 名の患者に変異（Val269Ile および Glu710Ala）を見出した．*SLMAP* 遺伝子とともに，hNav1.5 をコードする *SCN5A* 遺伝子を HEK293 細胞内にて共発現させ，免疫染色を行ったところ，正常 SLMAP 存在下では hNav1.5 は細胞膜表面に発現するのに対して，変異 SLMAP 存在下では，いずれの変異の場合とも，hNav1.5 が細胞質内に存在し，細胞膜表面の発現が減少していた．また，*SLMAP* 特異的 siRNA によって変異 SLMAP 遺伝子の発現を抑制すると，変異 SLMAP による hNav1.5 の細胞質局在から細胞膜表面発現へと復帰したことから，変異 SLMAP は hNav1.5 の細胞内輸送障害を来すと考えられた．さらに，*SLMAP* 遺伝子と *SCN5A* 遺伝子を tsA201 細胞内にて共発現し，パッチクランプ法を用いてナトリウム電流（I_{Na}）の測定を行ったところ，いずれの変異の場合とも，変異 *SLMAP* 遺伝子によって I_{Na} の抑制が観察された．以上のことから，*SLMAP* 遺伝子変異は，hNav1.5 の細胞内輸送の阻害により細胞膜表面発現を減少させて I_{Na} の低下を来すことで，BrS の原因となると考えられた．

〈緒言〉

BrS は，右側胸部誘導心電図における J 波の出現と ST 上昇を特徴とする不整脈疾患であり，心室細動や心室頻拍によって，失神や突然死をもたらすことがある．BrS の発症には遺伝子異常の関与が示唆されており，これまでに心筋ナトリウムイオンチャネル α サブユニット hNav1.5 をコードする *SCN5A* 遺伝子を始めとする 12 種類の遺伝子群が BrS 原因遺伝子として報告されている．しかしながら，現時点では大半の患者において原因となる遺伝子変異が同定されておらず，さらなる原因遺伝子の究明が急務である．これまでに同定されている原因遺伝子群のうち，*SCN5A* 遺伝子以外には，ナトリウムイオンチャネル β サブユニットをコードする *SCN1B* 遺伝子や *SCN3B* 遺伝子，さらには hNav1.5 の細胞内輸送に関与するタンパクをコードする *GPD1-L* 遺伝子や *MOG1* 遺伝子で変異が報告されているが，これらの遺伝子の変異が hNav1.5 の機能を変化させることで BrS 発症に関与することから，I_{Na} の変化が BrS 発症機序における主な原因の一つであることが推測される．

一方，遺伝性心室性不整脈の原因遺伝子の一部が筋小胞体や横行小管に局在するタンパクをコードすることから，筋小胞体や横行小管に局在するタンパクをコードする遺伝子が BrS 発症機序に関与する可能性がある．

そこで本研究では，筋小胞体や横行小管に発現する SLMAP タンパクをコードする *SLMAP* 遺伝子について，BrS 患者集団を対象に変異を検索し，見出された変異によってもたらされる機能変化を解析した．

〈方法〉

BrS 患者の末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出し，遺伝子解析に供した．BrS の主要原因遺伝子である *SCN5A* 遺伝子に変異が見つかっていない 190 名（日本人 85 名，韓国人 3 名，白人 102 名）の BrS 患者について，配列特異的プライマーを用いて PCR 反応を行った後，ダイレクトシークエンス法や温度変性高速液体クロマトグラフィーを用いて変異検索を行った．

対照群は人種を合致させた健常者 94～380 名を用い，さらに 1000 人ゲノムプロジェクトに基づくデータベースを照合した．また変異が同定された患者については，既知のすべての BrS 原因遺伝子について，ダイレクトシークエンス法で変異を探索した．患者集団に見出された SLMAP 変異による機能変化を解析するために，ヒト心室筋より抽出した mRNA をもとに *SLMAP* 遺伝子と *SCN5A* 遺伝子を逆転写反応によって cDNA を作成し，ベクターに組み込んだ．

SLMAP 遺伝子は選択的スプライシングや開始コドンの選択により，複数のアイソフォームが存在することが知られているが，本研究ではエクソン 1 に開始コドンを持つ SLMAP3 とエクソン 16 に開始コドンを持つ SLMAP1 を作成した．また C 末端の膜貫通領域として，選択的スプライシングにより 2 種類の膜貫通領域（TM1,TM2）のいずれかを持つため，SLMAP3 および SLMAP1 について，それぞれに TM1 を持つコンストラクトと TM2 を持つコンストラクトを作成した．

まず初めに，HEK293 細胞やラット心室筋細胞 H9c2 において GFP タグを付加した *SLMAP* 遺伝子と FLAG タグを付加した *SCN5A* 遺伝子を共発現させ，免疫細胞染色を行い，それぞれの局在を観察した．また，SLMAP 特異的 siRNA を同時にトランスフェクションし，それぞれの局在を観察した．さらに，ナトリウムイオンチャネルの機能を評価するために，tsA201 細胞に GFP タグ付加 *SLMAP* 遺伝子と *SCN5A* 遺伝子とを共発現させ，ホールセル・パッチクランプ法を用いて I_{Na} の測定を行った．

hNav1.5 と SLMAP との結合を検討するために，HEK293 細胞に GFP タグ付加 *SLMAP* 遺伝子と FLAG タグ付加 *SCN5A* 遺伝子を共発現させた後に細胞質を回収し，各遺伝子の発現を確認後，免疫共沈降を行って得られたサンプルをウエスタンブロットに供した．

〈結果〉

SLMAP 遺伝子の変異を検索したところ，8 つの同義置換と 5 つの非同義置換を同定した．そのうち，失神歴のある 46 歳男性に見つかった Val269Ile と，失神歴のある 57 歳男性に見つかった Glu710Ala は，いずれも健常者集団 380 名には見出されず，1000 人ゲノムプロジェクトに基づくデータベース上にも見出だされなかった．変異の存在する Val269 と Glu710 はいずれも進化上高度に保存されたアミノ酸である．また，これらの患者について既知のすべての BrS 原因遺伝子についてダイレクトシークエンス法で変異を検索したが，病因となる可能性のある変異は見つからなかった．

HEK293細胞に*SLMAP3-TM1*遺伝子と*SCN5A*遺伝子を共発現させ，免疫細胞染色を行ったところ，正常SLMAP3-TM1存在下ではhNav1.5は細胞膜表面に発現したのに対して，いずれの変異の場合とも，変異SLMAP3-TM1存在下ではhNav1.5は細胞質内に分布していた．また，変異SLMAP3-TM1によるhNav1.5の局在の変化は，ラット心室筋細胞H9c2においても観察された．一方，*SLMAP3-TM1*遺伝子と*SCN5A*遺伝子，*SLMAP*特異的siRNAをHEK293細胞に共発現させ，変異SLMAP3-TM1の発現を抑制したところ，変異SLMAP3-TM1によるhNav1.5の細胞質局在は抑制され，hNav1.5は細胞膜表面に発現した．続いて，HEK293細胞由来のtsA201細胞に*SLMAP3-TM1*遺伝子と*SCN5A*遺伝子を共発現させ，I_{Na}を測定すると，変異SLMAP3-TM1存在下ではI_{Na}が抑制された．しかしながら，開口期曲線や不応期曲線，不活性化からの回復時間にはSLMAP変異による有意な影響は認められなかった．

SLMAPにはスプライシングや開始コドンの違いにより複数のアイソフォームが存在するが，SLMAP1アイソフォームについても，変異SLMAPによるhNav1.5の細胞内局在変化とI_{Na}抑制が観察された．また，免疫共沈降法でhNav1.5とSLMAPの結合を評価したが，直接の結合は確認されなかった．

〈考察〉

本研究より，SLMAP変異はナトリウムイオンチャネルの細胞内輸送を阻害することで，BrS発症をもたらすことが示唆された．ナトリウムイオンチャネルは，ゲート領域を構成するhNav1.5以外に複数のサブユニットやアンカータンパクが細胞膜上で複合体を形成することによってはじめて，細胞の脱分極に十分なI_{Na}を発生させることができると考えられている．一方，ナトリウムイオンチャネルの細胞内輸送に複数のタンパクが関与することが報告されているが，その全容は明らかでない．

既知のBrS原因遺伝子であるMOG1はhNav1.5に直接的に結合し，変異MOG1はINaを減少させることが知られているが，SLMAPはhNav1.5に結合することなく，INaを減少させた．また一方で，Z帯タンパクであるZASPもSLMAP同様にhNav1.5に直接結合しないが，ZASP変異はhNav1.5の細胞内局在を変えることなく，INaを減少させることが報告されている．以上のことから，ナトリウムイオンチャネル複合体の機能は，種々の分子と様々な調節メカニズムによって維持されていることが推測され，hNav1.5の細胞内輸送に関与するタンパク群をコードする遺伝子群はBrS原因遺伝子の候補となりうる．

SLMAPはそのカルボキシル末端に膜貫通領域を持つ尾部繋留タンパクの一つであり，この膜貫通領域がSLMAPの細胞内局在を規定していると考えられている．尾部繋留タンパクが局在する細胞内小器官は様々であり，SLMAPをCOS-7において強制発現させた実験から，TM1アイソフォームSLMAPはゴルジ体と小胞体に，またTM2アイソフォームSLMAPは小胞体に局在することが報告されている．本研究では，膜貫通領域がTM1であろうとTM2であろうと，いずれもhNav1.5の細胞内局在を変え，I_{Na}を抑制したことから，TM1アイソフォームSLMAPとTM2アイソフォームSLMAPの両方が局在する小胞体上において，SLMAPがhNav1.5のトラフィッキングに関与することが示唆される．興味深いことに，SLMAPは脂肪組織においてインスリン調節性グルコーストランスポーターGLUT4を細胞質内から細胞膜表面へと転位させると報告されていることから，SLMAPは脂肪組織におけるGLUT4の細胞膜表面発現と心室筋におけるhNav1.5の細胞膜表面発現を同様のメカニズムで制御していると考えられる．

〈結論〉

BrS患者に同定された2種類のSLMAP変異は，hNav1.5の細胞表面発現を減らし，I_{Na}を減少させることでBrSの病態をもたらす．

Katarina Macuhova 博士（医学） Katarina Macuhova

学位記番号	／甲第 1921 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日
研究科専攻	／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）環境社会医歯学系専攻
学位論文	／Contamination, distribution and pathogenicity of Toxocara canis and T. cati eggs from sandpits in Tokyo, Japan （首都圏の砂場を汚染するイヌ回虫とネコ回虫虫卵の疫学調査と病原性についての研究） Journal of Helminthology　平成 24 年 6 月 online 発表
論文審査委員	／主査：髙野　健人　　副査：村松　正明　　副査：奈良　信雄

〈論文要旨〉

ヒトのトキソカラ症は環境中に散布されたイヌ回虫とネコ回虫の虫卵が幼虫包蔵卵となってヒトに経口感染することで発症する．発症すると，内臓型，眼型，中枢神経型などの病型を引き起こし，失明にいたる場合もある．幼虫包蔵卵は土壌中で長期間感染力を持ち続ける．本研究では，公園砂場におけるイヌ・ネコ回虫の汚染状況を調査し，虫卵の分布状況，病原性，虫卵の種別を遺伝子レベルで解析した．

その結果，ショ糖浮遊遠心法による検査で，34 カ所の公園砂場のうち 14 カ所でトキソカラ属虫卵が確認された．検出できた 239 個の虫卵の 63.2% は幼虫包蔵卵であった．このうち 102 個について PCR 法で DNA を増幅させたあと塩基配列を解析したところ，増幅できた 66 個の虫卵はすべてネコ回虫であった．砂場における虫卵の水平あるいは垂直分布を調べたところ，表面の砂に含まれる虫卵は他の深さの砂に含まれる虫卵よりも推計学的に有意に多いことが判明した．回収できた虫卵をマウスに経口投与したところ，抗体価の上昇や全身の筋肉内への幼虫移行が見られた．また，2 匹のマウス脳からは 3 隻の幼虫が回収でき，これについて遺伝子解析を行ったところ，イヌ回虫であることが判明した．

本研究によって，砂場を汚染する虫卵の多くはネコ回虫であるとする従来の形態学的研究結果をもとにした説を遺伝子解析によっても追認することができたことに加え，ヒトのトキソカラ症の原因として重要なイヌ回虫卵も少数ながら公園砂場を汚染していることが証明された．

Introduction

Toxocaracanis and *T. cati* are the main causative agents of human toxocariasis. Both species are common parasites (roundworms) found in dogs and cats, respectively. Human are most often infected with eggs of these parasites, which are distributed to environment through faeces of infected dogs or cats. The eggs are not infective immediately after their expulsion to the environment, but need some time, so that a larvae can be formed inside the eggs. Such infective eggs can persist in the environment for many months or even years depending on the conditions such as temperature and humidity. If such an embryonated egg is ingested by man, the larva hatched from the egg and would migrate through the tissues and possibly can cause different types of toxocariasis, such as neurological, ocular or visceral toxocariasis. It can cause symptoms such as fever, hepatomegaly, eosinophilia, abdominal pain, cough and general weakness. In the case of ocular toxocariasis an ocular lesion can lead to sudden loss of vision.

In our study we investigated the presence of *T. canis* and *T. cati* eggs in children sandpits, located in Tokyo. The vertical and horizontal distribution of eggs in two naturally contaminated sandpits was also determined. Moreover we examined the pathogenicity of these eggs to paratenic host, using ICR mice inoculated with eggs recovered from the children sandpits.

Materials and methods

Sand samples were collected from 34 sandpits in Tokyo, Japan. From each sandpit sand was collected at 6 different sites and 3 different depths at each site. After mixing well the sand from all sites, 200g of sand were taken for the examination of each sandpit. For the study on the vertical and horizontal distribution of *Toxocara* spp. eggs, two contaminated sandpits were chosen. Sand samples of 200g were collected from 13 different sites in each sandpit and at four different depths at each site (0–1 cm, 2–5 cm, 5–10 cm, more than 10 cm). All sand samples were dried and sieved through a set of two meshes (pore diameters: 1 mm and 150 μm), allowing the concentration of eggs in smaller amount of sand. The obtained powdery sand was washed with a 0.05% Tween20 water solution. To separate the eggs from the sand a flotation method using a sucrose solution with a specific gravity of 1.200 was performed. The presence of *Toxocara* spp. eggs was examined microscopically. Statistical analysis of the egg distributions in the sandpits was performed using a Kruskal-Wallis rank sum test or a one-way ANOVA with a Bartlett test. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

Recovered eggs microscopically identified as *Toxocara* spp. were subjected to DNA analysis using the PCR reaction performed with amplifi*cati*on of the ITS2 gene. DNA was extracted by incubating samples with 100 μl of 50 mMNaOH in a dry bath at 95℃ for 45 min. After centrifugation at 15000 rpm for 5 min at 4℃, 50 μl of supernatant was taken to a separate tube and neutralized with 50 μl of 1 M TrisHCl (pH 8.0). This solution was stored in a freezer at -20℃ and 1 μl of it was used as a template for the PCR assay.

To ascertain the pathogenicity of the eggs recovered from sandpits nine 6-week-old female ICR mice were used. The mice were divided into three groups of three individuals: group 1 comprised mice inoculated with *T. canis* eggs, group 2 comprised mice infected with the eggs isolated from sandpits, and group 3 comprised the uninfected controls. Each mouse was inoculated with a single dose of 300 eggs and was sacrificed on day 21 after infection. Blood and tissue from the brain, lung, and carcass, were examined. Tissues, except those from the brain, were digested with artificial gastric juice and the number of migrating larvae was determined microscopically. The larvae in brain were directly counted under microscope, without prior digestion. Eosinophils in the peripheral blood films were counted. Statistical analyses were performed using an unpaired Student's t-test. P values of less than 0.05 were considered to be significant.

Results

Fourteen of the 34 sandpits (9 from 28 parks) were found to be contaminated with eggs of *Toxocara* spp. In total, 239 eggs were recovered from all sandpits. The recovered eggs were at different stages of development, with 63.2% of eggs being fully embryonated. We examined 102 eggs originating from all infected sandpits by PCR analysis. Sixty-six eggs were determined to be *T. cati,* while none were *T. canis*. The remaining 36 samples failed to amplify.

The horizontal and vertical distribution of *Toxocara* eggs in the sand was evaluated in two sandpits. In both sandpits, the horizontal distribution of eggs showed no correlation with the lo*cati*on, such as being sampled from a corner, edge, or middle of the sandpit. By contrast, there were marked differences in the vertical distribution of eggs in four different depth layers. In both sandpits, the number of eggs decreased significantly as depth increased, so that the superficial layer of sandpit contained the highest number of eggs.

To confirm the pathogenicity of the eggs recovered from sandpits, 300 eggs were orally inoculated into ICR mice. In the mice infected with *T. canis* (group 1), the larvae distributed almost evenly in the brain and carcass. By contrast, in the mice infected with the eggs from the sandpit (group 2), almost all the larvae were recovered from the carcasses. Only three larvae were found in the brain of two mice in group 2. These three larvae were subjected to a PCR assay. The results of PCR revealed that they were *T. canis*, not *T. cati* larvae. We further applied PCR analysis to 30 eggs, from the same sample as the eggs inoculated to mice. Twenty-seven of these eggs were determined to be *T. cati*, and three failed to amplify. None were determined to be *T. canis*.

Discussion

Contamination of public parks, especially sandpits, with eggs of *Toxocara* spp., has been a worldwide health concern of not only developing but also developed countries. Previous epidemiological surveys have mostly failed to adequately identify the species of *Toxocara* eggs recovered from the environment due to their morphological similarities. In the present study, we combined the flotation method, followed by microscopic counting of eggs, with the PCR method to identify the recovered eggs. This allowed us to quantitatively determine the number of eggs present in sand samples and their developmental stage, as well as to qualitatively estimate which species of *Toxocara*were existed.

The present study on horizontal and vertical distribution of eggs in sandpit showed that the number of *Toxocara* eggs was highest in the superficial layer. Currently, the depth of sandpit sampling varies greatly across studies and some authors even do not examine the superficial layer at all. So our finding may be useful in guiding future environmental studies to focus the sampling on the superficial layer of the sandpit.

The pathogenic potential of *T. cati* is usually underestimated and the most important agent of toxocariasis is considered to be *T. canis*. However, our findings indicate that embryonated eggs in sandpits (most of which were identified as *T. cati*) are capable of invading mouse tissue and can induce viceral larva migrans. Further, the method we used here was able to distinguish only a few *T. canis* eggs among *T. cati* eggs by using an experimental infection to mice and a molecular method. These findings suggest that *T. canis* remains an important pathogen for human neurological toxocariasis. However also *T. cati* eggs are higly infective and may play important role in human toxocariasis.

常盤　俊大 博士（医学）　Toshihiro Tokiwa

学位記番号	／甲第 1922 号　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日
研究科専攻	／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）環境社会医歯学系（国際環境寄生虫病学）専攻
学位論文	／Phylogenetic relationships of rat lungworm, Angiostrongylus cantonensis, isolated from different geographical regions revealed widespread multiple lineages（異なる地域より得られた広東住血線虫 Angiostrongylus cantonensis の系統関係から明らかになった拡散した複数の系統） Parasitology International　第 61 巻第 3 号　431-436 頁　平成 24 年 9 月発表
論文審査委員	／主査：木村　彰方　副査：中村　桂子　副査：中川　一路

〈論文要旨〉

広東住血線虫 *Angiostrongyluscantonensis* の核リボソームの small subunit ribosomal rRNA（SSU）とミトコンドリアの cytochrome *c* oxidase subunit I（*coxI*）の遺伝子配列を用いて，異なる地域から得られた広東住血線虫の遺伝的変異について解析した．SSU 配列を用いた解析では，日本，中国本土，台湾，タイの 17 地域 17 個体を解析し，2 つの異なる配列（G1 および G2）を検出した．

日本，中国本土，台湾，タイの 18 地域 83 個体の *coxI* 配列と，データベース上のブラジル産の配列を比較したところ，8 つのミトコンドリアハプロタイプ（ac1〜ac8）を検出した．地域内のハプロタイプの多様性は低く 1〜2 種類のハプロタイプのみが検出されたが，ハプロタイプ ac1 は東京，千葉，神奈川，奄美大島，台湾から，ac2 は石川，中国本土から，ac5 は沖縄本島と小笠原諸島から，ac7 は宮城，愛知，神奈川から，それぞれ同じハプロタイプが検出された．これらの地域は，山や海などにより大きく隔たれた地域であり，宿主動物の人為的な移動により，複数の異なる起源をもつ広東住血線虫が流行地を拡大している可能性が示唆された．

〈緒言〉

広東住血線虫は家住性ネズミ類を終宿主とし，腹足類を中間宿主とする寄生性の線虫で，人に感染すると好酸球性髄膜炎を主症状とする広東住血線虫症を引き起こす．従来，本虫の分布域は，アジア，太平洋諸島，カリブ諸島などが知られていたが，近年になって新たな流行地域が報告されるようなり，分布地域の拡大が懸念されている．分布域の拡大には，感染した宿主動物の移動と関連していることが示唆されているが，十分に明らかになっていない．

近年，遺伝子マーカーを用いて，各地の地域集団の遺伝的多様性を比較することで，その種の本来の分布地域や移入経路を推定することが可能となった．住血線虫属においては，外部形態だけでは正確な種の同定が困難な場合が多い一方で，SSU 遺伝子や *coxI* 遺伝子の配列情報を用いた解析が，種の同定や種内変異を検出するための有用なマーカーに成りうる可能性が示唆されている．しかしながら，解析に用いる分類群が未だ十分ではなく，また国内に定着している個体の遺伝子情報は一切明らかとなっていない．今回，我々は，日本，中国本土，台湾，タイの宿主動物から住血線虫を回収し，SSU と *coxI* の部分配列を決定し，広東住血線虫の遺伝的特徴について調査した．

〈方法〉

日本と台湾において，ドブネズミとクマネズミを捕獲し，肺動脈から成虫を，肺組織から第 1 期幼虫を回収した．小笠原諸島と沖縄本島ではアフリカマイマイを，神奈川県ではチャコウラナメクジを捕獲し，その体内から第 3 期幼虫を回収した．中国本土とタイの広東住血線虫は，共同研究者により提供を受けた．採集した 83 個体は核酸抽出後，PCR 反応の鋳型として用いた．ターゲット領域は，SSU 遺伝子と *coxI* 遺伝子とした．83 個体のうち 17 個体の SSU 部分配列を，ユニバーサルプライマーを用いて増幅した．また，全 83 個体の *coxI* の部分配列を，新たに設計したプライマーを用いて増幅した．PCR 産物は Exosap-IT で精製し，ダイレクトシークエンスにより配列を決定した．得られた SSU と *coxI* 配列の解析には系統解析用ソフト MEGA 5.0 を使用した．最尤系統樹の作製には，PAUP 4.0b10 ソフトを用いた．ベイズ系統樹は MrBayers 3.1.2 を使用して作製した．ハプロタイプ解析には TCS 1.2 を使用した．得られた配列とデータベースに登録されている配列との相同性の解析には BLAST 解析を用いた．広東住血線虫 *A. cantonensis*，コスタリカ住血線虫 *A. costaricensis*，マレー住血線虫 *A. malaysiensis,A. vasorum*（和名なし），豚肺虫 *Metastrongylussalmi* の配列は GenBank/DDBJ/NCBI/ データベースから入手し解析に用いた．

〈結果〉

日本（千葉，神奈川，東京，小笠原諸島，宮城，石川，愛知，奄美大島，沖縄諸島），中国本土（深圳，温州，連江），台湾（台中），タイ（バンコク）で採取した 17 個体について，SSU の部分配列（805 bp）を決定した．その結果，1 塩基置換が見られる 2 つの異なる遺伝子配列（G1 と G2）が見いだされた．G1 は，日本（千葉，神奈川，東京，石川，奄美大島，沖縄，小笠原諸島），中国本土（深圳，連江），台湾（台中），タイ（バンコク）の個体でみられた．この G1 は，データベースに登録されているカナリア諸島産の広東住血線虫とハワイ産の広東住血線虫の配列と 100% 一致した．G2 は日本（宮城，愛知）および中国本土（温州）からのみ検出された．G1 と G2 の系統関係の住血線虫科における系統的位置について解析する目的で，広東住血線虫，広東住血線虫と系統的に近縁な 4 種および外群の *M. salmi* を用いて系統樹を作成したところ，G1 と G2 は，データベースより得た広東住血線虫とともに単系統性を示した．このクレードは，マレー住血線虫とコスタリカ住血線虫のクレードと姉妹群の関係で示された．

83 個体より得られた *coxI* 部分配列は 565 bp であった．アライメント解析の結果，7 つの異なるハプロタイプ（ac1〜ac7）が確認された．これらのハプロタイプのうち，日本の 13 地点から得た 69 個体からは 5 つのハプロタイプ（ac1, ac2, ac3, ac5, ac7）が，中国本土から 2 つのハプロタイプ（ac2 と ac6）が，台湾（ac1）とタイ（ac4）からそれぞれ 1 つのハプロタイプが検出された．得られた配列を BLAST で相同性検索をしたところ，ハプロタイプ ac2 が中国本土の広東住血線虫と 100% 一致したが，残りの 6 つのハプロタイプは広東住血線虫の配列と高い相同性を示したが，いずれも新規の配列であった．データベース上のブラジル産のハプロタイプ（HQ440217）は，ac8 として解析に用いた．広東住血線虫と，その近縁種からなる *coxI* 配列の 360 bp を用いて遺伝子解析を行ったところ，広東住血線虫と住血線虫属に属する種の種間距離は 11.1 から 15.0% であった．広東住血線虫の種内距離は 0.8 から 5.0% であった．最尤法およびベイズ法により作成した系統樹では，広東住血線虫が 1 つのクレードを形成した．広東住血線虫のクレードは，さらに 2 つのクレード（ac1-ac2-ac3-ac4-ac5-ac8 と ac6-ac7）に別れた．広東住血線虫のクレードは，コスタリカ住血線虫と *A. varorum* のクレードと姉妹群の関係にあった．広東住血線虫の *coxI* 配列を基に作製したハプロタイプネットワーク図でも，同様の 2 つのグルー

プに別れた.

〈考察〉

本研究では，広東住血線虫から2つの異なるSSU配列を見いだした．このうち，G1タイプは既存の配列と一致していたが，G2タイプは本研究で初めて見つかったものである．SSU遺伝子の種内変異は，ミトコンドリアの*coxI*遺伝子にみられる変異と比較するとかなり小さいことが，他の寄生性線虫類の研究から明らかとなっている．

今回の解析から，住血線虫属においても同様の結果が得られ，SSU配列による解析は，住血線虫の種内変異の検出には有用ではないが，種の同定や種間関係を解析するための有用なマーカーとなることが示された．その一方，ミトコンドリア*coxI*遺伝子の解析では，広東住血線虫の種内に8つのハプロタイプを検出した．このハプロタイプの間に見られる遺伝子変異は，Blounin（2002）が提唱する種内変異の範囲内（<10%）であることから，種内範囲であるものと考えられた．8つのハプロタイプのうち，5つ（ac1, ac2, ac3, ac5, ac7）が本邦から検出された．興味深いことに，地域内での遺伝的多様性は低いものの，地理的に離れた場所から共通のハプロタイプが見いだされた．他の外来種生物を用いた研究では，起源集団と共通の遺伝的特徴をもつ侵入集団が創始者効果の影響を受けて，侵入先で遺伝的多様性の低下を示す現象が知られている．広東住血線虫の同一地域内における遺伝的多様性の低さも，創始者効果を経た侵入集団が定着した結果である可能性がある．また，ハプロタイプac1は，日本本土の太平洋側の地域（東京，千葉，神奈川），奄美大島，台湾から，ハプロタイプac5は沖縄，小笠原から，ac2は中国本土と日本の日本海側の地域（石川）からそれぞれ見いだされており，地域間で異なる起源集団が存在する可能性が考えられた．しかしながら，さらなる解析を進めるためには，他の遺伝子マーカーの検討や，地域数とサンプル数の集積が必要であり，今後の課題とした．

〈結論〉

今回，日本に分布する広東住血線虫の遺伝的特徴について解析したところ，国内には複数の異なる系統が定着していることが明らかとなった．距離的に離れた地域から，共通の特徴をもつ個体が検出されたことから，特定の系統が，流行地を拡大している可能性が考えられた．

八木　慶子 博士（医学）　Keiko Yagi

学位記番号　／甲第 1923 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）老化制御学系専攻

学位論文　　／Expression of multidrug resistance 1 gene in B-cell lymphomas: association with follicular dendritic cells（B 細胞性悪性リンパ腫における薬剤耐性遺伝子（multidrug resistance 1）の発現と濾胞樹状細胞との関連について）
Histopathology　第 62 巻第 3 号　414-420 頁　平成 25 年 2 月発表

論文審査委員／主査：三浦　修　　副査：安原　眞人　　副査：東田　修二

〈論文要旨〉

B 細胞性リンパ腫に対する化学療法は rituximab が使用されるようになって治療成績が向上したが，現在もなお薬剤耐性の問題は大きな障害となっている．そこで，本研究では，B 細胞性悪性リンパ腫における薬剤耐性遺伝子発現を解析する目的で，反応性リンパ節腫大（RL），濾胞性リンパ腫（FL），びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）症例のリンパ節切除材料を用いて検索を行った．

B 細胞性リンパ腫細胞株（Raji），RL, FL, DLBCL 症例のリンパ節における ABC-transporter family 遺伝子（*MDR1*，*MRP1*，*BCRP*）の mRNA 発現を real-time RT-PCR を用いて定量的に解析したところ，RL, FL, DLBCL ともに Raji 細胞より発現が高いこと，DLBCL と比較して FL では有意に発現が高いことが明らかとなった．また，免疫組織化学的染色を用いて MDR1 発現の局在を調べたところ，RL では胚中心に，FL では濾胞状結節病変に陽性細胞が認められた．免疫組織化学的二重染色により，MDR1 陽性細胞は CD21 陽性の濾胞樹状細胞（FDC）に接して存在していることが分かった．

次に，培養細胞を用いた実験で，Raji 細胞を FDC sarcoma 由来の細胞と共培養し，Raji 細胞における *MDR1* 発現の変化を解析した．その結果，Raji 細胞を FDC 細胞と共培養すると *MDR1* の発現が有意に亢進したが，このような変化は HeLa 細胞との共培養では認められなかった．また，*MDR1* 発現上昇に伴って doxorubicin 誘発性のアポトーシスに対する抵抗性の亢進が認められた．

以上より，FDC との相互作用により B 細胞の MDR1 の発現亢進が起きていることが示唆された．FDC とリンパ腫細胞の相互作用を抑制することによって B 細胞性リンパ腫の薬剤抵抗性を克服できる可能性が期待される．

〈緒言〉

CHOP（cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone）療法は，FL や DLBCL を含む B 細胞性リンパ腫の治療において，rituximab が使用されている現在においても主要な役割を果たしている．近年，悪性リンパ腫の治療成績は着実に向上しつつあるが，難治・再発症例は少なからず存在している．そのような症例において治療効果が十分得られない理由の一つは抗腫瘍薬に対する薬剤耐性がある．

薬剤耐性機構は複数存在し，未だ十分に明らかにされているとはいえないが，薬剤の細胞外への排出の亢進がその一つとして挙げられる．主要な薬剤排出トランスポーターには ATP-binding cassette（ABC）トランスポーターがあり，抗腫瘍薬を含む各種薬剤の細胞外への輸送に関与する．これまで多数の分子が同定されているが，臨床的重要性が示されているものには p-glycoprotein（Pgp, MDR1, ABCB1），MDR-related protein1（MRP1, ABCC1），MDR-related protein2（MRP2, ABCC2），breast cancer resistance protein（BCRP, ABCG2）などがある．これまでに，p-glycoprotein（Pgp, MDR1, ABCB1）の発現と治療効果に関する関連については様々な悪性疾患において報告があり，一般的に予後が悪いとされている．

本研究では反応性リンパ節腫大（RL），濾胞性リンパ腫（FL），びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）症例のリンパ節検体を用い，FDC と MDR1 の発現量・組織学的局在について検索した．

〈材料と方法〉

東京医科歯科大学医学部附属病院において採取された反応性リンパ節腫大（RL）7 例，濾胞性リンパ腫（FL）21 例，びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）31 症例のリンパ節検体を用いた．ABC-transporter family 遺伝子の mRNA 発現の定量を前述の凍結検体を用いて real-time RT-PCR を用いて行った．また，ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いて免疫組織化学染色を行った．本研究の実施計画については倫理審査委員会の承認を得ており，実験は倫理的指針にのっとって行われた．

培養細胞を用いた実験で，ヒト B 細胞性悪性リンパ腫細胞株の Raji 細胞とヒト FDC sarcoma 由来の細胞，また，コントロールとして HeLa 細胞を用いて共培養を行った．48 時間の共培養の後に Raji を回収し，それぞれの MDR1 の発現を real-time RT-PCR を用い定量した．また doxorubicin 誘発性のアポトーシスに対する抵抗性についても annexinV を用いて解析した．

〈結果〉

ABC-transporter family 遺伝子の mRNA 発現の定量を前述の凍結検体を用いて real-time RT-PCR を用いて行った結果，*MDR1*，*MRP1*，*BCRP* の全てにおいて，RL, FL, DLBCL では control の Raji 細胞と比較して有意に発現が高く，DLBCL と比較して FL での発現が有意に高いことが分かった．MDR1 の発現について，FL と DLBCL を subtype に分類して定量したところ，FL は grade 1 から grade 3 で発現に有意差は認められず，DLBCL においても germinal center（GC）type と activated B-cell（ABC）type で有意差は認められなかった．

免疫組織化学的染色を用いて MDR1 の発現の局在を調べた結果，RL では胚中心に，FL では濾胞状結節病変に陽性細胞が認められた．また，免疫組織化学的二重染色により，それらは CD21 陽性の濾胞樹状細胞に接して存在していることが分かった．

これまでの結果より，MDR1 の発現は B 細胞の形質よりもリンパ節を構成する微小環境，具体的には FDC によって発現が制御されている可能性が考えられた．そこで，FDC 細胞と Raji 細胞と共培養した後に Raji の MDR1 の発現の変化について定量を行った結果，Raji のみ，あるいは HeLa と共培養した時と比較して，FDC と共培養した際に Raji の MDR1 の発現亢進が認められた．一方で FDC あるいは HeLa と共培養せずにそれらの培養上清のみを用いて Raji 細胞を培養した場合には MDR1 の発現亢進は認められなかった．

Doxorubicin 誘発性のアポトーシスに対する抵抗性についても Raji のみ，あるいは HeLa と共培養した時と比較して，FDC と共培養した際に doxorubicin に対する抵抗性の亢進が有意に認められた．

〈考察〉

B 細胞性リンパ腫は生物学的にきわめて不均一な疾患であり，様々な臨床像を呈する．B 細胞性リンパ腫の化学療法に対して，ABC-transporter による薬剤耐性は障害の一つとなっている．CHOP 療法における doxorubicin と vincristine は p-glycoprotein（Pgp, MDR1, ABCB1）の基質となり，細胞外へ排出されることが知られている．本研究においては RL, FL, DLBCL の MDR1 の *de novo*（未治療の状態）における発現について示した．一般的に DLBCL は FL よりも予後が不良とされるため，DLBCL において FL より MDR1 の発現が低いという結果は意外な結果であった．FL は緩徐に進行し，化学療法への反応性は比較的良いとされているが，再発や進行をしばしばおこし，一部の症例では薬剤への反応が悪く長い経過をたどることがある．このような FL の性質に MDR1 の *de novo* での高発現が関与している可能性がある．

次に，DLBCL における germinal center（GC）type では FL と類似した結果となるかどうかを activated B-cell（ABC）type とで *MDR1* の発現を比較した．ところが，予想に反し発現強度に有意差は認められなかった．これらの結果より，B 細胞そのものの形質ではなく他の因子によって *MDR1* の発現が規定されていると考え，リンパ節の微小環境による影響の可能性を考えた．

胚中心の微小環境において，T 細胞と FDC は胚中心 B 細胞の成熟や選択に重要な役割を果たしている．リンパ濾胞の胚中心には FDC が網目状構造を形成し存在しているが，FDC の機能や細胞起源については未だ不明な点が多い．病理組織学的には，FL，血管免疫芽球型 T 細胞性リンパ腫など様々な悪性リンパ腫において FDC は特徴的な分布を呈することが知られている．また，DLBCL に transform した FL では，FDC の網目状構造は失われる．これらの所見より，FDC はリンパ腫の発生や進行に様々な役割を果たしていることが窺われる．

本研究においては，B 細胞性悪性リンパ腫細胞における MDR1 の発現亢進に FDC の培養上清ではなく，直接的な相互作用が必要であることが示唆されたが，その詳細なメカニズムに関しては，今後のさらなる研究が必要である．

〈結論〉

DLBCL と比較して FL では ABC-transporter family 遺伝子（MDR1, MRP1, BCRP）が有意に高く発現していた．
FDC 細胞株と共培養した場合に Raji 細胞の MDR1 の発現が有意に上昇し，doxorubicin 誘発性のアポトーシスに対する抵抗性の亢進が認められた．

小林　元紀 博士（医学）　Motonori Kobayashi

学位記番号　／甲第 1924 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）全人的医療開発学系（心療・緩和医療学）専攻

学位論文　／The validity and usefulness of the Japanese version of the Calgary Sleep Apnea Quality of Life Index in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome（閉塞性睡眠時無呼吸低呼吸症候群患者における日本語版カルガリー睡眠時無呼吸症候群 QOL 質問票の妥当性と有効性）

Internal Medicine　第 52 巻第 3 号　309–315 頁　平成 25 年 2 月発表

論文審査委員／主査：下門　顕太郎　　副査：俣木　志朗　　副査：松浦　雅人

〈論文要旨〉

閉塞性睡眠時無呼吸低呼吸症候群（obstructive sleep apnea hypopnea syndrome: OSAHS）は，睡眠中に部分的または完全に上気道の閉塞することで特徴づけられる疾患である．このため，夜間には低酸素や睡眠中の頻回の覚醒，血圧の上昇などが生じ，また，過度な日中の眠気や集中力・記銘力の低下，疲労感，抑うつ症状なども生じる．

近年になり，疾患特異的な生活の質（Quality of life: QOL）を評価する質問票としてカルガリー睡眠時無呼吸症候群 QOL 質問票（the Calgary Sleep Apnea Quality of Life Index: SAQLI）が作成された．本論文において，SAQLI の日本語版を作成し，その信頼性，妥当性，反応性を検証し，日本語版 SAQLI が臨床の場面で有効に用いられることを確認した．

〈緒言〉

OSAHS 患者の多くは，過度な日中の眠気や疲労感，抑うつ症状，認知機能の低下などに悩まされ，健康関連の QOL が低下している．OSAHS 治療のゴールドスタンダードは持続式陽圧呼吸療法（continuous positive airway pressure: CPAP）である．そして，これまでの研究から，CPAP 治療により，OSAHS 患者の過度な日中の眠気や日中の認知機能，健康状態の改善が改善されることが明らかになっている．以前から，眠気を評価する質問紙は使用されてきたが，SAQLI が作成されるまでは OSAHS 患者の疾患特異的な QOL を評価する質問紙はなく，包括的健康関連 QOL 尺度である MOS 36-Item Short Form Health Survey（SF-36）などが用いられてきていた．しかし，包括的健康関連 QOL 尺度は，疾患特異性はなく，CPAP をはじめとした治療によって OSAHS 患者が実際に体験する重要な変化をとらえがたいことが指摘されていた．

これらを背景に，Flemons らは OSAHS に特異的な健康関連 QOL 尺度，すなわちカルガリー睡眠時無呼吸症候群 QOL 質問票（SAQLI）を作成し，その信頼性や妥当性を確認している．SAQLI は理解しやすく，また信頼性もあるため，作成されてから 10 年以上にわたって英語圏において，臨床の場面で用いられている．また，非英語圏においても，フランス語や中国語などにそれぞれ翻訳および，信頼性・妥当性研究がなされ，広く使用されている．一方で，日本においては，OSAHS 患者に疾患特異的な QOL 評価尺度はいまだになく，治療の継続の点などからも，疾患特異的な QOL 尺度の必要性が議論されてきていた．

そこで，本論文では，(1) SAQLI の原文を翻訳し（SAQLI-J の作成），(2) 日本人患者において SAQLI-J の信頼性・妥当性そして反応性を評価することとした．

〈方法〉

1. 対象

東京都保健医療公社荏原病院に通院している患者を対象とした．研究に参加した 115 名の患者の内訳は，既に CPAP 治療を導入し定期的に受診している患者 70 名（Group1），OSAHS の診断のもと CPAP 治療を開始した患者 34 名（Group2），OSAHS の診断を受けたものの治療を始めなかった患者 11 名（Group3）である．全ての患者は，研究参加時（Time1）に，SAQLI－J, SF-36，エップワース眠気尺度（Epworth Sleepiness Scale: ESS）にインタビュー形式または自記式で答えた．また，研究参加時より 3 か月後（Time2）に，同じ質問票に答えた．医学的情報及び人口統計学情報は診療録を参照した．

本研究は，東京都保健医療公社荏原病院倫理委員会の承認を経て，ヘルシンキ宣言に基づき施行された．また，研究参加に先だって，全ての患者よりインフォームド・コンセントを得た．

2. 評価尺度

SAQLI-J

SAQLI はインタビュー形式の質問票である．下位項目として，ドメイン A：日常生活についての 11 個の質問項目，ドメイン B：社会的な交流についての 13 個の質問項目，ドメイン C：情緒的な機能についての 11 個の質問項目，ドメイン D：症状についての 5 個の質問項目に分けられる．最終的な SAQLI のスコア（SAQLI-J total）はこれら 4 つのドメインを合計し，4 で除したものである．

SAQLI-J の作成に際し，原著の作成者である Flemons に許可を得た．Guillemin によって提唱されているガイドラインにそって，原著の SAQLI を日本語版 SAQLI（SAQLI-J）へ翻訳した．

SF-36

SF-36 は患者の視点から健康状態を自記式に評価するものであり，36 項目からなる．日本語版があり，妥当性も評価されている．また，身体機能（Physical functioning: PF），日常役割機能（身体）（Role physical RP），体の痛み（Bodily pain: BP），全体的健康感（General health perception: GH），活力（Vitality: VT），社会生活機能（Social functioning: SF），日常役割機能（精神）（Role emotional: RE），心の健康（Mental health: MH）の 8 つの下位尺度に分類される．

ESS

ESS は，日常生活でよく行う活動において，うとうとする可能性を測定する尺度であり，8 項目からなる．

3. データの評価

信頼性の評価

信頼性は，内部一貫性と再検査法により評価した．SAQLI-J の内部一貫性は全患者に対して研究開始時（Time1）に施行した SAQLI-J のスコアより Cronbach's α を算出して評価した．再検査法による SAQLI-J の信頼性は，級内相関係数（Intra-class correlation coefficient: ICC）により確認した．

妥当性の評価

妥当性は，Time1 において全患者に施行した SAQLI-J の各ドメイン（A, B, C, D）および SAQLI-J total と SF-36 の相関係数にて評価した．

反応性の評価

反応性は Group2 群の Time1 と Time2 での SAQLI および SF-36 の変化を standardized response mean（SRM）を用いて評価した．

全ての統計学的処理は，PAWS Statistics version 18.0 にて行った．

〈結果〉

対象患者 115 名の年齢は 46.9 歳（SD11.9），無呼吸低呼吸指数（apnea hypopnea index: AHI）は 39.1/hr（18.4），ESS は 6.7（3.8），BMI は 26.4（4.0）であった．

信頼性の評価：SAQLI-J の Chronbach's α 係数は各ドメインごとに，A: 0.93, B: 0.89, C:0.92, D:0.82, SAQLI-J total: 0.93 であった．また，ICC は A: 0.76, B: 0.83, C:0.71 D:0.81 SAQLI-J total: 0.88 であった．

妥当性の評価：SAQLI-J total については SF-36 の 8 つの各下位尺度とも有意な相関を認め，SAQLI-J のほかの下位尺度についても同様に SF-36 の下位項目いくつかと相関をみとめた．

反応性の評価：OSAHS の診断のもと CPAP 治療を開始した群（Group2）においては，治療開始後 3 カ月後において SAQLI-J total，ドメイン A・B・C にて有意に改善を認めた．

また，SF-36 の下位項目よりも SAQLI-J total の下位尺度の方が，SRM の値が大きいものが多かった．

最後に，SAQLI-J の下位尺度間の相関を調べたが，相関係数はすべて 0.7 未満であった．

〈考察〉

本稿において，筆者らは SAQLI の日本語版を作成し，その信頼性，妥当性，反応性を評価した．まず，信頼性についてであるが，内的整合性および再現性ともに高かった．SAQLI-J の各下位尺度の Cronbach's α 係数は，先行研究であるフランス語版・中国語版 SAQLI と同等であった．再現性についても，SAQLI-J の各下位尺度の ICC はフランス語版・中国語版 SAQLI と同等であった．

次に，妥当性であるが，Flemons らが作成した SAQLI 原著で用いられていた SF-36 との相関にて評価をした．原著では SAQLI total と SF-36 の下位尺度の「活力」のみが有意な相関を示したのに対し，本研究においては，SAQLI-J total のみならず，SAQLI-J の各下位尺度においても，ドメイン A と SF-36 の下位尺度すべてと，ドメイン B・C・D は F-36 の下位尺度 PF を除くすべてと有意な相関を示した．

そして，新たに OSAHS と診断をされ，CPAP 治療を始めた患者において治療の開始前後で QOL を比較することで反応性を評価した．SAQLI はドメイン D を除く下位尺度および SAQLI-J total で，治療開始 3 カ月後に有意な改善を示した．ドメイン D は症状についての尺度であるが，他の尺度と異なり，提示されている 21 個の症状から，患者が経験した 5 症状だけ選択する方式となっている．このため同一患者でも，また患者間でも正確な比較が困難となり，治療の前後での差が捉えにくかったかもしれない．SAQLI-J total の SRM は 0.73 であり，治療による QOL の変化を充分に分別できていると考えられる．また，SF-36 の下位尺度の SRM は 0.2 以上のものは 2 項目のみであったのに対し，SAQLI-J では全下位尺度の SRM が 0.2 以上であった．この結果は，SF-36 より SAQLI-J の方が，OSAHS 患者の QOL の変化をより鋭敏にとらえることができるためであったと考えられる．

さらに，SAQLI-J の下位尺度間の相関を調べたが，いずれも相関係数は 0.7 未満であり，各下位尺度は独立していると考えられた．

本研究の限界としては以下の 2 点がある．まずは，患者背景として，治療を受けていた患者の AHI が 20 以上であったことが挙げられる．日本では CPAP 治療の適応は，AHI20 以上であるため，中等症から重症の患者のみが研究に参加することとなった．次に，対象患者が受けた治療が CPAP 治療に限られていた点である．マウスピースや口蓋垂口蓋咽頭形成術（uvulopalatopharyngoplasty: UPPP）などといったほかの治療法もあることから，今後はより多様な重症度の患者やほかの治療法を受けている患者の QOL を評価していくことが必要になると考えられる．

〈結論〉

SAQLI-J を作成し，その信頼性，妥当性，反応性を検証した．SAQLI-J は OSAHS 患者の QOL の変化をとらえるのに大変有効であり，日常の診療でも簡便に施行できるものである．

石渡　小百合 博士（医学）　Sayuri Ishiwata

学位記番号　／甲第 1925 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）認知行動医学系（精神行動医科学）専攻

学位論文　／Modulation of extracellular D-serine content by calcium permeable AMPA receptors in rat medial prefrontal cortex as revealed by in vivo microdialysis（ラット内側前頭葉皮質における AMPA 型グルタミン酸受容体作用薬の細胞外 D-セリンに対する影響）

The International Journal of Neuropsychopharmacology　平成 25 年 1 月 online 発表

論文審査委員／主査：田中　光一　　副査：田邊　勉　　副査：安原　眞人

〈論文要旨〉

脳内 D-セリンは，NMDA 型グルタミン酸受容体の内在性コアゴニストとして，様々な脳高次機能の発現に極めて重要と考えられている．しかし，シナプスで NMDA 受容体に直接作用する細胞外 D-セリンの調節機構には未だ不明な点が多い．特に in vivo での解析が進んでいない．そこで本研究では，グルタミン酸伝達系による細胞外 D- セリンの調節を明らかにする一環として，AMPA 型グルタミン酸受容体と D-セリンの関係を，in vivo 脳内微小透析法を用いて自由運動下の動物で検討した．

ラットの内側前頭葉皮質に AMPA 受容体の選択的作動薬である s-AMPA を灌流すると，その濃度に依存して，細胞外 D-セリン濃度が有意に減少した．この反応は，AMPA 受容体の脱感作阻害薬である CTZ の共処置により有意に増強され，AMPA/kainate 受容体選択的競合的拮抗薬である NBQX もしくはカルシウム透過型 AMPA 受容体選択的阻害薬である NASPM の同時灌流により消失した．以上の結果から，ラットの内側前頭葉皮質においては，少なくともカルシウム透過型 AMPA 受容体が，細胞外 D-セリン量の抑制性制御に関与することが示唆された．

〈緒言〉

NMDA 受容体グリシン調節部位に選択的に結合する D-セリンは，哺乳類において，脳優位で本受容体と類似した分布を示し，脳組織で選択的に枯渇すると NMDA 受容体が十分活性化しないことから，脳内 NMDA 受容体の内在性コアゴニストとして重要な役割を果たすと考えられている．NMDA 受容体および D-セリンと，高次脳機能や精神神経疾患との密接な関連を示す所見も蓄積されている．したがって，NMDA 受容体に結合することのできる細胞外 D-セリン濃度の調節機構は，高次脳機能の発現・制御メカニズムの解析のほか，精神神経疾患の病態解析や治療法開発の研究標的として注目されているが，その分子機構は未解明な点が多い．

近年，この細胞外 D-セリン濃度をグルタミン酸伝達系が調節する可能性が指摘されてきた．主に初代培養系の神経細胞やアストログリア，脳切片等の in vitro の実験系において，グルタミン酸，AMPA，カイニン酸等により，細胞外 D-セリン量が増加することが報告されている．脳の D-セリン濃度が，神経細胞とグリアの双方の影響を受けることを考慮すると，両者の相互作用が維持される in vivo の実験が不可欠であるが，殆ど進められておらず，カイニン酸の効果を調べた in vivo の実験結果は，in vitro とは大きく異なっている．そこで本研究では，グルタミン酸伝達系と D- セリンの関係をさらに明らかにする目的で，in vivo では未検討であった AMPA 受容体の細胞外 D-セリンの調節に対する関与について，自由運動下の動物における in vivo 脳内微小透析法を用いて検討した．

〈方法〉

動物は Wistar 系雄性ラットを使用した．ラットを麻酔下でステレオタキシーに固定後，内側前頭葉皮質（AP;＋2.2mm, VP;＋5.0; LP;－0.7: Paxinos& Watson, 2005）に脳内透析プローブを埋め込み，2 日後に自由運動下でリンゲル液または薬液を灌流し細胞外液を 20 分毎に回収した．

今回の実験条件では，神経細胞やグリアの機能障害を伴わずに，脳の細胞外液中生理活性物質の反応を観察できることを確認している．本実験においては，4 番目のサンプルを回収した時間を 0 分とし，s-AMPA（10〜500μM）は 20〜40 分，CTZ（100μM）, NBQX（100μM）, NASPM（300μM）は 0〜終了時間まで灌流した．回収した細胞外液のアミノ酸は，D 型と L 型を区別して一斉に分析するため，N-tert-butyloxycarbonyl-L-cysteine と o-phthaldialdehyde を加え誘導化した後に，蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィーで分離定量した．本測定では，D-セリンとして検出されたピークの特異性を検証する目的で，各アミノ酸を含む標準溶液および細胞外液サンプルを，D-セリンを分解する human D-amino acid oxidase で処理し，このピークが完全に消失することを確認した．

データは，0 分より前の 3 サンプル中各アミノ酸濃度の平均値をベースライン（100%）とし，薬液処置後の変化をこれらに対する % 値として算出した．薬物の影響は，各時点の濃度と Area Under Curve（AUC: 40〜180 分）の双方の平均値について，(1) 2 群間では Student の t 検定（データが等分散の場合）または Aspin-Welch の t 検定（不等分散）を行い，(2) 3 群以上では Dunnet 法，あるいは Bonferroni 法によって補正する多重比較法検定を用いて，統計学的に解析した．

〈結果〉

透析チューブ内を灌流した s-AMPA の透過率を in vitro で検討したところ，平均 10.4%（SEM, ± 0.17; n＝4）であり，本実験では透析プローブに接する脳組織の s-AMPA 濃度は，灌流液中の 10〜500μM の 10 分の 1 程度と推測された．

s-AMPA（10,30,100 および 500 μM）を 20 分間灌流すると，終了 20 分後より濃度依存的な細胞外 D-セリン濃度の減少が見られた．100 および 500μM では，AUC が有意に低下し，各時点の比較でも統計学的に有意な低値が 80 分間以上持続した．100μM の s-AMPA の灌流による D-セリンの低下反応は AMPA 受容体の脱感作阻害薬である CTZ を共処置することにより有意に増強された．また，AMPA/kainate 受容体遮断薬である NBQX またはカルシウム透過型 AMPA 受容体選択的阻害薬である NASPM の共処置により消失した．

一方，細胞外タウリン濃度は，従来の報告と一致して s-AMPA 灌流後有意に増加した．この効果は，CTZ の共処置により増強され，NBQX により完全に抑制されたのに対して，NASPM では影響を受けなかった．また，D-セリンの前駆体である L-セリンおよび NMDA 受容体コアゴニストのグリシンの細胞外濃度は s-AMPA 処置により有意に増加した．この増加に対して，NBQX は拮抗したが，CTZ および NASPM は影響を与えなかった．L-グルタミンと L-グルタミン酸には s-AMPA 処置による有意な変化は認められなかった．

〈考察〉

本研究から，ラットの内側前頭葉皮質においてAMPA受容体選択的作動薬が細胞外D-セリン濃度を有意に減少させることが初めて明らかとなった．さらに，この反応は，本受容体の脱感作阻害薬によって増強され，AMPA/kainate受容体遮断薬やカルシウム透過型AMPA受容体遮断薬により消失することがわかった．

AMPA受容体の過剰刺激による細胞死が報告されているが，次の点から，本実験で用いたs-AMPAの濃度では神経細胞またはグリアの機能障害や細胞死は生じていないと推察される．すなわち，（1）tetrodotoxinによる神経活動阻害時には細胞外D-セリン濃度が軽度に上昇し，（2）fluorocitrateによるグリア細胞機能障害時には細胞外L-グルタミンの著明に減少するが，本実験ではいずれも観察されなかた．また，各アミノ酸濃度の変化は可逆性である．さらに，in vitroで，高濃度のs-AMPA（600μM～1mM）を4時間以上処置した初代培養系神経系では細胞死を認めないという報告がある．

今回の結果は，AMPA受容体刺激により細胞外D-セリン量が増加するという，これまでのin vitroの実験データと矛盾する．本研究では，既報のin vivoの実験と同様に，AMPA受容体作動薬が細胞外タウリン濃度を著しく増加させ，これをAMPA/kainate受容体遮断薬が抑制したことや，D-セリンの代謝に神経細胞とグリアの双方が影響し，両細胞のin vivoにおける関係がin vitroでは保持されないこと等を考え合わせると，上述の不一致は，in vitroとin vivoの実験系間の細胞構築の違いに起因すると推測される．一方，s-AMPAが引き起こす細胞外D-セリン濃度の低下がAMPA受容体の脱感作に基づく可能性は，CTZで脱感作を阻害した条件で，この低下が却って増強した結果によって否定される．

以上のことから，ラットの前頭葉皮質では，カルシウム透過型AMPA受容体が，D-セリンの細胞外放出の抑制性制御に関与することが示唆される．これに対して，細胞外のタウリンはカルシウム非透過型AMPA受容体による促進性制御をうけることが示され，他のアミノ酸もAMPA受容体刺激による減少が認められないことより，カルシウム透過型AMPA受容体による抑制性制御はD-セリン放出に特異的な可能性がある．NBQXまたはNASPM単独ではD-セリン濃度が変化せず，この抑制性調節はphasicと考えられる．

本研究で見出された前頭葉皮質のAMPA受容体による細胞外D-セリン濃度の抑制は，NMDA受容体調節系として機能する可能性があり，今後，この抑制性制御の分子細胞機構とともに，NMDA受容体機能との関連性を検討する必要がある．

〈結論〉

ラットの内側前頭葉皮質において，in vivoでは，AMPA受容体が細胞外D-セリン濃度を抑制性に調節し，この調節には少なくともカルシウム透過型AMPA受容体サブタイプが関与することが明らかになった．

略語：

AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropioinic acid; CTZ, cyclothiazide; NBQX, 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo-［f］quinoxaline-7-sulfonamide disodium salt; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NASPM,1-naphthyl acetyl spermine

江川　真由美 博士（医学）　Mayumi Egawa

学位記番号　／甲第 1926 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）生体環境応答学系（免疫アレルギー学）専攻

学位論文　／Inflammatory monocytes recruited to allergic skin acquire an anti-inflammatory M2 phenotype via basophil-derived interleukin-4（皮膚アレルギー炎症部位に浸潤した炎症性単球が，好塩基球由来 IL-4 の作用により抗炎症性の M2 表現型を獲得する）
Immunity　平成 25 年 2 月 online 発表

論文審査委員／主査：樗木　俊聡　　副査：横関　博雄　　副査：稲瀬　直彦

〈論文要旨〉

炎症の誘導や制御に関わる単球とマクロファージには，それぞれその表現型によっていくつかのサブセットが存在する．マクロファージは単球から派生・分化するが，単球とマクロファージのサブセット間の相関関係はほとんどわかっていない．本研究において，我々は皮膚アレルギー性炎症局所に，Ly-6C^{+}CCR2^{+}の炎症性単球の表現型を示す単球 / マクロファージが多数浸潤していることをみいだした．ところが予想に反して *Ccr2*$^{-/-}$ マウスでは炎症性単球の浸潤がないにも関わらず，アレルギー性炎症が悪化した．この *Ccr2*$^{-/-}$ マウスに野生型マウス由来の炎症性単球を移入すると，過度の炎症が緩和することから，炎症性単球が抗炎症作用を示すことが判明した．この抗炎症性作用は，好塩基球が産生する IL-4 によって炎症性単球が 2 型マクロファージ（M2）の表現型を獲得することに起因することが分かった．以上，アレルギー性炎症において，浸潤してきた炎症性単球が好塩基球由来の IL-4 によって M2 様の表現型を獲得し，抗炎症性作用を示すことが明らかとなった．

〈緒言〉

単球は血中を循環する白血球の一種で，末梢組織へ浸潤したのちマクロファージや樹状細胞に分化し，死細胞や病原体の除去，組織修復など，自然免疫や獲得免疫の制御に重要な役割を果たしている．マウス単球は Ly-6C^{+}CCR2^{+}の炎症性単球と，Ly-6C^{-}CX3CR1^{+}の常在性単球に分類され，前者は感染や炎症組織に浸潤し，TNF-α や IL-1 などの炎症性サイトカインを産生する．一方，後者は血中を循環して全身をパトロールしているとされる．マクロファージも活性化シグナルと機能によって分類されており，LPS や IFN-γ などで活性化した M1 マクロファージと，IL-4 や IL-13 といった Th2 サイトカインによって誘導される M2 マクロファージがある．前者は IL-1 などの炎症性サイトカインや NO を産生し細胞内病原体を破壊する．一方，後者は寄生虫感染防御や腫瘍形成，血管新生，創傷治癒，組織のリモデリングや線維化に関与しているという報告があるが，生体における詳細な機能は不明な点が多い．さらに単球の各サブセットとマクロファージの各サブセットの間の相関関係についても，不明な点が多い．これまでの報告によると，Ly-6C^{+}CCR2^{+}の炎症性単球は CCR2 依存的に骨髄から血中へ出て炎症組織へ浸潤したのち，M1 マクロファージや樹状細胞に分化・活性化するとされる．一方，Ly-6C^{-}CX3CR1^{+}の常在性単球は炎症組織に浸潤したのち M2 マクロファージに分化して，創傷治癒に関わることが示唆されている．しかし最近の寄生虫感染モデルを用いた研究において，組織常在性のマクロファージが IL-4 によって増殖，分化・活性化し，M2 マクロファージになるという報告がなされた．このように，特に M2 マクロファージの由来や発生の経路については不明な点が多々ある．

好塩基球は末梢血白血球のうち 0.5% 程度を占める最も少ない顆粒球であり，その数の少なさと肥満細胞に特徴が似ていたことから，ほとんど研究が進んでいない免疫細胞のひとつであった．しかし近年，IL-4 などの Th2 サイトカインの産生細胞としての機能が判明すると，Th2 細胞の分化や B 細胞の活性化などによって獲得免疫の制御に関与することや，アレルギー反応の誘導，寄生虫感染に対する防御機能などが報告され，一躍，注目を集めるようになった．一方で，単球やマクロファージを含む自然免疫系の細胞に対する好塩基球の作用についてはほとんどわかっていない．

本研究では，IgE 依存性慢性アレルギー性炎症（IgE-CAI）において，皮膚の炎症局所に浸潤した炎症性単球が，好塩基球由来の IL-4 によって M2 型の表現型を獲得し，抗炎症作用を示すことを証明した．これにより，アレルギー状況下における単球/マクロファージの分化の新しい経路と機能，そして好塩基球との関係を明らかにした．

〈方法〉

TNP 特異的 IgE 抗体を静脈注射して受動感作させた各マウスの耳介に，TNP-OVA またはコントロールを投与して IgE-CAI を誘導し，耳介腫脹の変化を測定，その耳介の細胞をフローサイトメトリーおよびリアルタイム PCR にて解析した．さらに，野生型マウスの抗原投与後 3 日目の耳から各細胞集団をセルソーターにて分離し，cDNA を作製して各遺伝子の mRNA の発現をリアルタイム PCR にて解析した．*ex vivo* における炎症性単球の分化を調べるため，好塩基球を IgE と抗原で刺激した上清を用いて，マウス骨髄から分離した炎症性単球を培養した．その後培養した単球を回収し，フローサイトメトリーとリアルタイム PCR にて解析した．*in vivo* での炎症性単球の表現型の変化と機能を調べるため，マウス骨髄から CD115 陽性/陰性細胞，炎症性単球を分離し，実験に応じて CFSE でラベルした後，IgE-CAI を誘導したマウスに静脈投与または皮内投与にて移入した．その後耳介腫脹の測定と，フローサイトメトリーにて耳介内に浸潤した CFSE 陽性細胞の解析を行った．

〈結果〉

IgE-CAI の炎症局所では多数の単球/マクロファージの浸潤を認め，その 9 割近くが Ly-6C^{+}CCR2^{+}であり，これらは炎症性単球由来と考えられた．浸潤細胞中では単球/マクロファージと好塩基球がケイモカイン受容体 CCR2 を高発現していたため，*Ccr2*$^{-/-}$ マウスで IgE-CAI を誘導したところ，単球/マクロファージの浸潤がないにも関わらず，耳介腫脹の悪化と好塩基球や好中球の増加が確認された．耳介内の単球/マクロファージの表現型を解析したところ，半分以上が M2 マクロファージのマーカーである PD-L2 を発現していた．リアルタイム PCR の解析の結果，PD-L2^{+}細胞では PD-L2^{-} 細胞に比べて M2 マーカーである *Arg1*，*Chi3l3*，*Fizz1* の発現が上昇しており，IgE-CAI の炎症局所でみられる単球 / マクロファージは，炎症性単球と M2 マクロファージ両方の表現型を持つことが明らかになった．

IgE-CAI の炎症局所では IL-4 が高発現しており，浸潤細胞中では好塩基球が他の細胞に比べて IL-4 を高発現していた．*ex vivo* において，刺激した好塩基球の上清と炎症性単球を共培養したところ，炎症性単球の PD-L2 の発現および *Arg1*，*Chi3l3*，*Fizz1* の発現が

上昇した．しかし共培養時にIL-4中和抗体を加えると，これらの発現上昇が完全に抑制された．さらに*in vivo*において，*Il4ra*$^{-/-}$もしくは野生型マウス由来のCD115^{+}骨髄単球をIgE-CAIを誘導したマウスに静脈投与した結果，*Il4ra*$^{-/-}$マウス由来の単球では野生型に比べてPD-L2^{+}細胞が減少した．一方，好塩基球を一時的に除去できる*Mcpt8*^{DTR}マウスでIgE-CAIを誘導し，抗原投与後2日目に好塩基球を除去すると同時にCD115^{+}骨髄単球を静脈投与したところ，好塩基球を除去したマウスでは移入した単球にPD-L2の発現が見られなかった．これらの結果から，好塩基球由来のIL-4によって炎症性単球がM2表現型を獲得することが示唆された．

最後に，*Ccr2*$^{-/-}$マウスにCD115^{+}細胞またはCD115^{-}細胞を静脈投与したところ，CD115^{+}細胞を移入したマウスで耳介腫脹の緩和が見られた．さらに*Il4ra*$^{-/-}$または野生型マウス由来の炎症性単球を耳介に皮内投与したところ，*Il4ra*$^{-/-}$マウス由来の炎症性単球を移入したマウスでは野生型マウス由来の場合とは異なり，緩和が認められなかった．この結果から，皮膚炎症局所に浸潤した炎症性単球がIL-4Rを介してM2表現型を獲得し，抗炎症性機能を発揮することが証明された．

〈考察〉

M2マクロファージはM1マクロファージに比べてその機能や分化経路には不明な点が多く，特にアレルギー性炎症における役割についてはほとんどわかっていない．本研究では，アレルギー性炎症時に炎症性単球が組織に浸潤し，M2マクロファージの表現型を得て，抗炎症に働くという，新たな機能と分化経路が明らかとなった．

今回の結果では，M2表現型を持つ単球/マクロファージがアレルギー性炎症を減弱させた．その詳細なメカニズムを調べるため，寄生虫感染でTh2タイプの炎症を抑制するarginase-1の阻害剤や，Th2反応を増強する抗PD-L2抗体を用いた実験を行ったが，IgE-CAIに変化はなかった．また，骨格筋の傷害時に炎症性単球がIL-10やTGF-βを産生する抗炎症性マクロファージになる報告もあるが，IgE-CAIでは炎症緩和にIL-10やTGF-βの関与はないと推測された．IgE-CAIの炎症局所に集積しているPD-L2^{+}単球/マクロファージでは，マンノースレセプターの一種であるCD206が高発現していることが認められた．マンノースレセプターはエンドサイトーシスの作用を増強することが報告されており，IgE-CAIでも同様の作用が関連している可能性がある．実際，PD-L2^{+}単球/マクロファージはPD-L2^{-}単球/マクロファージなどと比較して，より強い抗原の取り込みが認められた．IgE-CAIでは好塩基球のIgE/抗原による活性化が重要であるため，M2型単球/マクロファージが抗原取り込みと除去を行うことで好塩基球の活性化が十分に起こらず，結果として抗炎症作用を示している可能性が推測される．

M2マクロファージの分化にはTh2サイトカインが重要であり，その産生細胞としてメモリーTh2細胞やNKT細胞，好酸球などが報告されてきた．今回我々は好塩基球由来のIL-4がM2型の単球/マクロファージを誘導することを明らかにし，好塩基球が単球・マクロファージの分化・活性化に関与するという新事実を明らかにした．寄生虫の再感染時には宿主内で寄生虫に対するIgEが上昇することから，IgE-CAIのようなIgE依存性の好塩基球の活性化が起こる可能性は十分考えられる．一方，好塩基球には，プロテアーゼや病原体による産生物などによるIgE非依存的な活性化も存在する．このことから，様々な状況下において好塩基球由来IL-4によるM2型単球/マクロファージの誘導が見られる可能性があり，今回の研究結果は多様な状況下でのこれらの細胞の機能解析につながるものと期待される．

〈結論〉

アレルギー性炎症において，炎症局所に浸潤した炎症性単球が，好塩基球由来のIL-4によってM2型単球/マクロファージに分化・活性化し，抗炎症性の作用を示すことが明らかとなった．

PHAM　NGUYEN　QUY 博士（医学）

学位記番号　／甲第 1927 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）器官システム制御学系専攻

学位論文　／Proteasome-dependent activation of mammalian target of rapamycin complex 1（mTORC1）is essential for autophagy suppression and muscle remodeling following denervation（プロテアソーム依存的 mammalian target of rapamycin complex 1（mTORC1）の活性化は脱神経に伴うオートファジーの抑制と骨格筋のリモデリングに重要である）

The Journal of Biological Chemistry　第 288 巻第 2 号　1125–1134 頁　平成 25 年 1 月発表

論文審査委員／主査：清水　重臣　　副査：小川　佳宏　　副査：横田　隆徳

〈論文要旨〉

脱神経，絶食，不動，そして様々な全身疾患による筋委縮の過程ではタンパク質代謝が劇的に起こる．脱神経筋では，ユビキチン・プロテアソーム系が高度に亢進しているが，オートファジーを含めた他のタンパク質代謝系がどのように変動しているかはよく理解されていなかった．今回，脱神経によりオートファジーがむしろ抑制されることを見出した．これは，オートファジーの主要な抑制因子である mammalian target of rapamycin complex 1（mTORC1）が脱神経に伴って活性化されるためである．更に，プロテアソーム阻害剤 Bortezomib の投与実験と細胞内アミノ酸濃度の測定実験を行った結果，脱神経筋の mTORC1 の活性化はユビキチン・プロテアソーム系によって分解される筋タンパク質に由来する過剰なアミノ酸に依存する可能性が示唆された．

活性化 mTORC1 はオートファジーを抑制する一方で，リボゾーム生合成やタンパク質合成を促進させることも明らかになった．すなわち，脱神経による筋萎縮の過程では，タンパク質異化反応だけではなく，同化反応も同時に活性化され，それによって適応的なリモデリングが起こっていることが予想される．

Background

Drastic protein degradation occurs during muscle atrophy induced by denervation, fasting, immobility, and various systemic diseases. While the ubiquitin-proteasome system is highly upregulated in denervated muscles, the involvement of autophagy and protein synthesis has been controversial.

Method

Mice. Sciatic denervation was performed on the right side of C57BL/6J mice or the autophagy indicator GFP-LC3 transgenic mice. Animals were anesthetized using Avertin（Sigma）. Under sterile conditions, a 0.5 cm incision was made at middle-thigh level and 0.5 cm portion of the sciatic nerve was excised. The incision was then closed with surgical clips. Sham operation was performed on the left side for control. For inhibitor experiments, bortezomib（Selleck Chemicals）, rapamycin（LC Laboratories）and colchicine（Sigma）were injected at a dose of 1 mg/kg（i.v.）, 5 mg/kg（i.p.）and 0.4 mg/ kg（i.p.）, respectively.

Histological procedures. Mice were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in PBS（pH 7.4）. Hindlimb muscles were harvested and further fixed with the same fixative overnight. After histological procedures for frozen sections, GFP signals in muscle of GFP-LC3 transgenic mice were observed under a fluorescence microscope（IX81; Olympus）. Images were acquired using MetaMorph analysis software.

Immunoblotting. Mouse tissues were homogenized in 9 volumes of ice-cold PBS supplemented with protease inhibitors. The homogenates were centrifuged at 2,300 x g at 4° C for 10 min. Protein extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. The amount of protein was quantified using densitometric measurements for each lane by ImageJ software.

In vivo SUnSET. For in vivo measurements of protein synthesis, mice were given an intraperitoneal injection of 0.04 μmol/g puromycin exactly 20 min before tissue sampling. Extracted tissues were stored and processed for immunoblot analysis with anti-puromycin antibody.

Measurement of amino acid concentration. Muscle samples were weighed while frozen and homogenized in 5 volumes of ice-cold 5% sulphosalicylic acid. After centrifugation at 10,000 x g for 15 min at 4° C, free amino acids in the supernatant were measured using an L8500 amino acid analyzer（Hitachi, Ltd.）.

Statistical analysis. All numerical data including error bars represent the mean ±s.e.m. Statistical comparisons were made using the paired Student's t test.

Result

Muscle autophagy is suppressed by denervation

In the autophagy indicator GFP-LC3 transgenic mice, denervated muscles showed a decreased number of GFP-LC3 puncta. We further investigated autophagic flux using colchicine to inhibit consumption of autophagosomes. Admistration of colchicine increased the number of GFP-LC3 puncta in sham-operated muscles but not in denervated muscles. These results suggest that autophagy is indeed suppressed in denervated muscles.

Denervation induces constitutive mTORC1 activation in muscle

Since mTORC1 is a major suppressor of autophagy, we investigated mTORC1 activity in denervated muscles. Phosphorylation level of mTORC1 substrates S6K1 and 4E-BP1 was increased by denervation even under starvation conditions. These results suggest that mTORC1 is constitutively activated in denervated muscles, leading to the suppression of autophagy.

Denervation-induced mTORC1 activation is proteasome dependent

Because denervation upregulates proteasome-mediated muscle proteolysis, which can generate high levels of amino acids, we hypothesized that mTORC1 could be activated by a proteasome-dependent release of amino acids in denervated muscles.

Intravenous injection of bortezomib, a proteasome inhibitor, diminished denervation-induced increase in 4E-BP1 and S6K1 phosphorylation. This result suggests that proteasome activity is required for the activation of mTORC1 in denervated muscles.

Intracellular amino acids levels increased in denervated muscles

Measurement of amino acid concentration revealed that intramuscular leucine and glutamate were increased after denervation. We still observed an 80% increase in glutamate in denervated muscles under starvation and these changes were canceled by bortezomib. These data suggest that the proteasome is the cause of the increase in amino acid concentrations in denervated muscles and support our hypothesis.

mTORC1 activation is essential for increased protein synthesis after denervation

Utilizing the surface sensing of translation（SUnSET）method, we revealed that denervation induced an increase of ～40% in the amount of puromycin-labeled peptides. Daily injection of rapamycin, an mTORC1 inhibitor, inhibited this phenomenon, suggesting that protein synthesis was increased in denervated muscles in an mTORC1-dependent manner.

We also revealed that mTORC1 is essential for the increased level of ribosomal proteins S6 and L7, members of the 40S and 60S ribosomal subunit, in denervated muscles. This result suggests that mTORC1 activation upregulates the expression of ribosomal proteins and contributes to adaptive metabolic changes following denervation.

Discussion

Proteasome-derived amino acids activate mTORC1 and suppress autophagy in denervated muscles

We have shown that autophagy is suppressed in denervated muscles due to constitutive activation of mTORC1. This suggests that autophagy has almost no role in the atrophic process following denervation. This is consistent with a previous report that genetic ablation of muscle autophagy does not protect but exacerbates denervation atrophy. This may be caused by impaired cellular function due to constitutive blockade of intracellular quality control by basal autophagy.

It has been suggested that mTORC1 is activated in denervatedhindlimb and diaphragm muscles, although the mechanism of this has not been investigated. From our findings, we propose that the release of amino acids produced by proteasomal proteolysis is the major cause of the constitutive mTORC1 activation. However, since bortezomib may not be strictly specific to the proteasome; these results may need to be confirmed in the future using genetic approaches.

mTORC1 activation induces anabolic responses in denervated muscles

Consistent with mTORC1 activation, we observed that protein synthesis is upregulated in denervated muscles using the recently developed SUnSET method. This finding supports previous observations using radioisotope-labeled amino acids and confirms that denervated muscles show both catabolic and anabolic features..

Our data showed that mTORC1 activation contributes to the anabolic process in denervated muscles. However, how mTORC1-dependent protein synthesis produces a beneficial effect in denervated muscle remains unclear. We have shown that the increase in expression of ribosome subunits depends on mTORC1. Ribosome biogenesis may generally support the anabolic responses following denervation. Furthermore, since more than 200 proteins are reported to be upregulated in denervated muscles, many of these might require mTORC1 activation for proper synthesis.

Conclusion

We found that after denervation, autophagy is suppressed by constitutive activation of mTORC1, which is caused by amino acids derived from proteasomal proteolysis. mTORC1 activation might be an adaptive response to denervation to aid protein synthesis, ribosome biogenesis and muscle remodeling.

大方　信一郎 博士（医学）　Shinichiro Okata

学位記番号 ／甲第 1928 号　学位授与 ／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻 ／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）器官システム制御学系専攻

学位論文 ／The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with KCNH2 G603D, without LQT2 disease associated symptom（KCNH2 G603D 変異を持つが LQT2 関連症状を持たない患者からの iPS 細胞の樹立）

Journal of Medical and Dental Sciences　第 60 巻　17-22 頁　平成 25 年 3 月発表

論文審査委員／主査：西村　栄美　副査：木村　彰方　副査：平尾　見三

〈論文要旨〉

QT 延長症候群 2 型（LQT2）は致死性の遺伝性不整脈疾患でありQT 延長症候群の内で最も一般的な遺伝子変異の一つである．LQT2 に対する治療法としていくつかの方法が示唆されているが，致死性の不整脈を完全に防ぐことは不可能である．LQT2 に対する新たな治療法を開発するために疾患特異的かつ患者特異的な病態モデルの作成が強く望まれる．ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は体細胞から作成された自己複製能及び多分化能を有した幹細胞である．患者特異的 iPS 細胞は患者由来体細胞から樹立することが可能であり，変異や全ての遺伝子多型を含む患者ゲノム情報を有しているのでその患者に対する理想的な病態モデルとなり得る．iPS 細胞による LQT2 病態モデルを作成するため，LQT2 患者より iPS 細胞を作成し iPS 細胞において遺伝子変異を確認する必要がある．本研究で我々は *KCNH2* に G603D の変異をもつ患者より iPS 細胞を樹立したことを示す．この患者特異的 iPS 細胞は NANOG や OCT3/4 といった幹細胞マーカーを適切に発現していた．また，我々は *KCNH2* G603D 変異が患者特異的 iPS 細胞に受け継がれていたことを確認した．これらの患者特異的 iPS 細胞は今後の病因解析や新薬開発に貢献することが期待される．

〈緒言〉

iPS 細胞は 2006 年に樹立された．ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と増殖と分化能の観点で同様の性質を持ち，成人の体細胞から樹立することが出来る．現在，我々は患者の体細胞から容易に iPS 細胞を樹立することが可能でありそれらの細胞は患者のゲノム情報を全て含んでいる．多くのヒトの疾患は遺伝子の変異によって引き起こされる．ヒト iPS 細胞を用いた疾患モデリングは遺伝性の疾患を解析するための新たに登場した研究領域である．実際，効果的な治療法のない致死的な遺伝性疾患は多く存在する．このような疾患の効果的な治療法を確立するために我々はまず疾患モデルを作成する必要がある．これまでは動物モデルが存在しヒトの遺伝性疾患のメカニズムなど多くの有用な情報を得ることが出来た．しかしヒトを用いたモデルではないため完全に病態を再現するのはしばしば困難であった．また，同じヒト同士であっても個々人によって遺伝子は異なっている．そこで，疾患特異的だけでなく患者特異的な疾患モデルの作成が望まれていた．患者から iPS 細胞を樹立することでこのような患者特異的疾患モデルを作成することが出来る．

QT 延長症候群は最も一般的な致死性の不整脈疾患の一つである．最近の研究によって疾患の基礎は明かされてきた．しかし，動物モデルや強制発現系の疾患モデルでは決定的な治療薬は発見されていない．QT 延長症候群 2 型（LQT2）は QT 延長症候群の内，約 40% を占めるタイプの疾患である．LQT2 は IKr チャネルの α-サブユニットをコードする *KCNH2* の変異によって引き起こされる．臨床上の特徴として LQT2 は運動や情動ストレス（特に聴覚刺激）が存在した際に発作を起こすことが半数以上で安静時や睡眠時にはまれである．β ブロッカーの使用やサプリメントによる細胞外カリウム濃度の調節は有効であるとされるが完全に心臓突然死を防ぐことは出来ない．従って我々は LQT2 の疾患モデルを用いて LQT2 に対する治療薬開発を行わなくてはならない．今回我々は *KCNH2* に G603D 変異を持つ患者より iPS 細胞を樹立したことを報告する．これらの患者特異的 iPS 細胞は将来，病態や新薬の解析に貢献することが期待される．

〈方法〉

インフォームド・コンセントを得た上で遺伝子検査の結果 LQT2 と診断された 10 歳の患者より採血を行った．患者より得た末梢血から T リンパ球を単離し，以前に報告された Sendai virus vector を用いる方法で *OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC* を導入した．4 つの遺伝子を導入した T リンパ球をマウス胎児線維芽細胞上に播種し 25 日間培養し ES 細胞様コロニーを得てピックアップすることで iPS 細胞を樹立した．それぞれの iPS 細胞をヒト ES 細胞培地で培養し，免疫染色によって未分化マーカーである Oct3/4 と Nanog の発現を確認した．また，iPS 細胞より DNA を抽出し元々の患者と同一の変異が保存されているか確認した．

〈結果〉

発端者は漏斗胸の手術の際，心電図検査を受け QT 延長を指摘された．失神発作や他の心血管イベントを起こしたことはなかったが，母親は大きな安静時に大きな音を聞くことで失神発作を起こしていた．母親の遺伝子検査を行ったところ *KCNH2* に G603D 変異が発見された．そこで発端者の遺伝子検査も行ったところ *KCNH2* に G603D が発見された．

iPS 細胞を樹立するために患者由来体細胞として末梢血 T 細胞を使用した．抗 CD3 抗体及び IL2 で活性化された T 細胞に *SOX2, OCT3/4 , KLF4, MYC* を Sendai virus vector で導入した．いくつかのクローンを拡大，保存した．免疫染色の結果 Oct3/4 と Nanog の発現が確認された．

患者と同一の遺伝子変異を iPS 細胞が保持しているかを確認するためシーケンス解析を行ったところ，iPS 細胞は患者と同一の *KCNH2*　G603D 変異を受け継いでいることが確認された．

〈考察〉

今回の研究で我々は *KCNH2* G603D 変異を持つが QT 延長以外の症状を呈さない患者より iPS 細胞を樹立する事に成功した．患者はまだ若く今後何らかの症状を呈す可能性がある．実臨床上で患者の遺伝子変異が将来重篤な症状を呈するかどうかを予測することは非常に重要である．もし，将来の重篤度を予測できるなら我々は容易に治療方針を定めることが出来る．このような観点から患者特異的 iPS 細胞は極めて有用と考えられる．

疾患モデル iPS 細胞として LQT2 は最初に報告されている．今回の研究で我々は *KCNH2* G603D 変異を持つ患者を選んだが，適切に治療し致死性の不整脈を防ぐためにどのような刺激が致死性の不整脈を起こしうるのかを予測する実験系を持つことは価値のあることだと信じている．一塩基多型等の遺伝子多様性が遺伝子変異に影響を与える事もあり，それが QT 延長症候群の浸透率の低さの原

因となっている可能性がある．従って遺伝子変異だけから患者の重篤度を判断することは難しい．患者特異的 iPS 細胞は患者ゲノムの全ての情報を保持しているので理想的なモデルである．個別化医療の観点から患者特異的 iPS 細胞に多くの薬剤を試し有効性を確認することも出来る．このように我々は非常に有効なツールとなり得る患者特異的 iPS 細胞を樹立し，患者と同一の遺伝子変異を維持していたことを確認できた．

Smriti ARYAL A.C 博士（医学）

学位記番号 ／甲第 1929 号　　学位授与 ／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻 ／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）器官システム制御学系専攻

学位論文 ／Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss（Nck1 欠乏は力学的負荷の減少によって誘発される骨の損失を加速する）
Journal of Cellular Physiology　平成 24 年 12 月 online 発表

論文審査委員／主査：宗田　大　　副査：北川　昌伸　　副査：田畑　純

〈論文要旨〉

機械的ストレスは骨量のレベルを決定する重要なシグナルである．運動機能の低下による廃用性骨粗しょう症は，心臓血管，脳，骨格疾患などによって寝たきりとなった患者にとって，あるいはまた宇宙飛行士にとっても重要な問題とされる．

骨における機械的ストレスの感知には，多くの分子が関与することが示唆されてきたが，この現象に関与する機序は完全には理解されていない．

Nck1 は，活性化された細胞膜受容体から細胞質のエフェクターにシグナル伝達を仲介することが知られるアダプタータンパク質であり，アクチン細胞骨格のリモデリングを調節する． Nck1 はまた小胞体ストレスに対する細胞応答に関与することも示唆されてきた．インビトロにおける細胞ストレスの場合でアクチン細胞骨格が中断された場合には，Nck1 は核内のアクチン重合を媒介するために，細胞の核に入ることが報告されている．しかし，インビボにおける機械的刺激に対する骨応答中での Nck1 の役割は不明である．

本研究の目的は，生体レベルの除負荷によって誘発される骨喪失における Nck1 の役割を検討することである．

坐骨神経と大腿神経の切除を行なった．神経切断術に基づいた除負荷は骨における Nck1 遺伝子発現を 2 倍程度増加させた． Nck1 欠損マウス（Nck1-KO）と同腹コントロールの Nck1 ＋／＋（野生型／WT）を用いて，骨構造に及ぼす神経切断術による除負荷の効果を，3 次元マイクロコンピュータ断層撮影（μCT）分析により検討した．神経切断術に起因する 30 日後の海綿骨喪失の程度は，Nck1 欠損マウス（Nck1-KO）では 50% 悪化したのに対し，野生型マウスにおいては 30% の減少であった．これらのデータは，Nck1 遺伝子欠損が力学的負荷の低減による骨量減少を加速させることを実証し，Nck1 が生体内のメカニカルストレス媒介による骨代謝調節において重要な分子であることを示唆している．

Summary

Mechanical stress is an important signal to determine the levels of bone mass. Unloading-induced osteoporosis is a critical issue in bed- ridden patients and astronauts. Many molecules have been suggested to be involved in sensing mechanical stress in bone, though the mechanisms involved in this phenomenon are not fully understood. Nck1is an adaptor protein known to mediate signaling from plasma membrane-activated receptors to cytosolic effectors regulating actin cytoskeleton remodeling. Nck1 has also been implicated in cellular responses to endoplasmic reticulum stress. In vitro, in case of cell stress the actin cytoskeleton is disrupted and in such cases Nck1 has been reported to enter the nucleus of the cells to mediate the nuclear actin polymerization. However, the role of Nck1 in vivo during the bone response to mechanical stimuli is unknown. The purpose of this study is to examine the role of Nck1 in unloading- induced bone loss in vivo. Sciatic and femoral nerve resection was conducted. Neurectomy- based unloading enhanced Nck1 gene expression in bone about two fold. Using the Nck1 deficient mice and control Nck1＋/＋, effects of neurectomy-based unloading on bone structure were examined. Unloading reduced bone volume in wild type mice by 30% whereas the levels in bone loss were exacerbated to 50% in Nck1 deficient mice due to neurectomy after four weeks. These data demonstrate that Nck1 gene deficiency accelerates the mechanical unloading-induced bone loss suggesting Nck1 to be a crucial molecule in mechanical stress mediated regulation in bone metabolism.

Introduction

Bone is a tissue which provides a structural framework that facilitates locomotion and activities of daily life. Bone is responsive to mechanical stimuli. Presence of mechanical stimuli induces bone formation, whereas lack of stimuli results in loss of bone as seen in the case of disuse osteopenia or osteoporosis.

Nck（non catalytic region of tyrosine kinase）adaptor proteins are known to mediate signaling from plasma membrane-activated receptors to cytosolic effectors regulating actin cytoskeleton remodeling. In Mammals, Nck represents two closely related proteins encoded by independent genes Nck1 and Nck2, which are composed of three NH_2-terminal Src homology 3（SH3）domains followed by a COOH- terminal Src homology 2（SH2）domain. In case of DNA damage Nck rapidly accumulates in the nucleoplasm, along with a dramatic dissolution of the actin cytoskeleton, releasing a large pool of G-actin that provides an opportunity for Nck to mediate nuclear actin polymerization. The relationship between the translocation of Nck to the nucleus and de-polymerization of the actin cytoskeleton has been reported. Beside the translocation of Nck proteins in the presence of DNA damage there are many reports about the critical role of Nck in mediating the endoplasmic reticulum（ER）stress signaling and cell survival via the MAPK pathway. Although Nck is a pivotal molecule which provides the linking between the stress signaling and actin polymerization, the role of Nck in the mechanical stress signaling in bone has not been known yet. Thus, the objective of this study was to examine in vivo role of Nck1 in unloading- induced bone loss in the hind limb of neurectomized mice（mechanical unloading mouse model）.

Methods and Results

Nck1 relocalizes to the nucleus in osteoblasts after actin depolymerization

To test the localization of Nck1 in osteoblastic cells during actin depolymerization, MC3T3-E1 cells were treated with cytochalasin D（which is depolymerizing F-actin agent to transiently disrupt the actin cytoskeleton）for 48 hours. Immunocytochemistry showed that Nck1 was localized in the cytoplasm and nucleus of the MC3T3-E1 osteoblastic cells under control condition（without treatment with cytochalashin D）. Cytochalashin D treatment for 48 hours induced Nck1 signals to be mainly localized to the nucleus rapidly after actin depolymerization in MC3T3-E1 osteoblastic cells. These data suggest that Nck1 enters the nucleus of

MC3T3-E1 cells during actin cytoskeletal dissolution.

Unloading by neurectomy increased Nck1 expression in bone tissue

As we observed that Nck1 is present in osteoblasts and it moves along with the cytoskeletal changes, we wonder if Nck1 may also involved in a certain regulation of bone physiology. Bone is known to be regulated by the levels of loading stress and this could be seen in the changes in bone mass in disuse osteoporosis. One of the experimental models is neurectomy. To knowwhether unloading of bone by neurectomy altersthe levels of Nck1 gene transcripts in bone tissuesin vivo, mRNAs were obtained from whole tibia on the neurectomized (Ntx) side and sham-operated side of wild type mice. Nck1 mRNA expression levels were normalized against GAPDH levels based on quantitative real-time PCR. Unloading increased Nck1 mRNA expression levels about two fold in adult bone tissues in vivo compared tothe sham-operated side suggesting that the levels of Nck1 expression in bone tissue are under regulation by unloading condition in bone.

Nck1 deficiency accelerates unloading- induced suppression of bone mineral density

To elucidate whether Nck1 deficiency affects the bone mineral density in the unloading condition, bone mineral density (BMD) of the sham and neurectomized side, whole and distal femur were analyzed by using dual X-ray absorptiometry (DEXA). Quantification of the bone mineral density of the femur of neurectomy and sham side Nck1-KO and Wt was done and the percentage of suppression in BMD was calculated by using BMD values obtained from neurectomy side from that of sham side. Neurectomy -induced unloading suppressed the BMD by 14 and 15% in wild type and Nck1-KO mice significantly enhanced the suppression of BMD to 21 and 25% for whole and distal femur respectively. Thus, deficiency of Nck1enhances the unloading (neurectomy-induce) suppression of bone mineral density.

Nck1 deficiency exacerbates bone loss induced by unloading due to neurectomy

To determine the effects of unloading on bone mass, 3D μCT analysis of the neurectomy and sham side in WT and Nck1-KO distal femur was done. Quantification of the trabecular bone volume of distal femur of neurectomyand sham side Nck1-KO and Wt was done and the percentage of suppression in BV/TV was calculated by using BV/TV values obtained from neurectomy side from sham side. The data indicated about 31% suppression in BV/TV in wild type and this loss was enhanced in Nck1-KO upto 50%. Trabecular number (Tb.N) was suppressed by 33% in wild type and Nck1-KO enhanced this suppression to 38%. Neurectomy -induced increase in trabecular separation (Tb.Separation) was 32% in wild type, while Nck1 deficiency enhanced this separation up to 48%. Neurectomy induced trabecular spacing (Tb. Space) by 33% in Wt, but Nck1-KO increased up to 45%. Thus, these data suggest that unloading-induced suppression in bone mass was significantly exacerbated in Nck1-KO mice compared to Wt.

Neurectomyincreases Nck1 gene expression in calf muscle.

Unloading induces loss of skeletal muscles in addition to bone loss. We therefore examined the effects of unloading (neurectomy) on Nck1 expression in calf muscle. We found that neurectomy enhanced Nck1 expression is calf muscle in wild type mice. The directions of such unloading effects were similar to those seen in bone.

Nck1 deficiency exacerbates unloading-induced reduction in calf muscle mass.

As muscle may contribute to control bone mass by altering the force in the case of unloading (neurectomy)-induced events, muscle mass per se could be an important component that determine bone mass. Since we have seen that Nck1 expression in muscle is enhanced by unloading, we wondered whether the unloading-induced alteration in the mass of muscle may also be affected by the presence or the absence of Nck1. Examination of calf muscle weight indicated that unloading (neurectomy) reduced the weight of calf muscle in wild type while Nck1 deficiency exacerbated the unloading-induced loss of muscle weight.

Discussion

In this paper, we reported that Nck1 gene is required to reduce bone loss in the absence of mechanical stimuli. Unloading is one of the major causes of osteoporosis in bed-ridden patients or astronauts. Neurectomy -(Ntx) induced unloading is a model which mimics the bone loss in patients with paralysis -induced unloading including spinal cord injuries. However, the mechanisms underlying such unloading-induced bone loss are not fully elucidated. Thus, understanding the mechanism of the effects of unloading on bone is important to contemplate the strategies to treat or prevent the diseases like osteoporosis. Our data indicate for the first time the role of Nck in disuse osteoporosis.

Expression of Nck1 was increased in bone tissue after unloading by neurectomy in Wt mice, showing that Nck1gene expressionis controlled by unloading in vivo. This is the first observation that the mechanical unloading is affecting this cytoskeletal modulator. This raises an interesting possibility that cytoskeletal regulators are communicating with the extracellular stimuli, such as mechanical force, to coordinate the regulation of tissues such as bone.

Furthermore, Nck1 was found to translocate into the nucleus after disruption of actin cytoskeleton in the osteoblastic MC3T3-E1 cells by the treatment with cytochalasin D as it was reported in other cells. Actin turnover exists as a dynamic equilibrium between monomers and polymers within the living cells. It is utilized by the cell for many aspects of gene regulation, including mRNA processing, chromatin remodeling and global gene expression. The information regarding the homeostatic state of the cell is contained within its actin cytoskeleton, and that fluctuation in cellular actin dynamics caused by disruption of homeostasis may signal stress in cellular conditions to the genome through actin-dependent mechanisms, but the reverse situation, where cell stimuli induce the rapid depolymerization of the actin cytoskeleton, resulting in a very high cytoplasmic G-actin levels, also provides the conditions necessary to transduce signals to the nucleus. This form of signaling is observed in the DNA damage response pathway, where cytoskeleton dissolution is linked to the rapid nuclear translocation of the N-WASP activator Nck. A similar mechanism may be generally involved in signal transduction during stress - induced cytoskeletaldepolymerization. Nck has beenimplicated in the cellular processes to endoplasmic reticulum stress, which leads to the inhibition of translation. Thus, Nck may function as a pivotal integrator between mitogen-stimulated growth signals and a variety of stresses that inhibit cell growth and division. The mechanism how this type of Nck function relates to bone maintenance needs more signaling analysis in bone cells.

As neurectomy-induced bone volume reduction was more in Nck1-KO mice, the loss of Nck1 gene could either increase the osteoclastic activity or could suppress the osteoblastic activity due to unloading induced by neurectomy. As neurectomy could also induce many other stresses in addition to unloading, we cannot attribute the phenotype to the unloading alone. It is intriguing that unloading also increases the expression of Nck1 in muscle. As bone and muscle are mutually affecting each other, this observation could lead to a novel insight into the regulation of bone by muscle. In addition, Nck1 deficiency also exacerbates the loss of muscle mass by unloading. Whether, this is due to the presence of similar cellular mechanism that is controlled by Nck or any organ to organ relationship exist would be a interesting and important open question to be answered.

Conclusion

In conclusion, our data demonstrated that loss of Nck1 gene accelerates the mechanical unloading induced bone loss suggesting Nck to be a crucial molecule in mechanical stress mediated regulation in bone metabolism in vivo.

村松　智輝 博士（医学）　Tomoki Muramatsu

学位記番号	／甲第1930号　学位授与　／平成25年3月26日
研究科専攻	／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系専攻
学位論文	／YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma（食道扁平上皮がんにおいてYAPはがん遺伝子候補である） Carcinogenesis　第32巻第3号　389-398頁　平成23年3月発表
論文審査委員	／主査：三木　義男　副査：三宅　智　副査：中村　正孝

〈論文要旨〉

Yes-associated protein（YAP）は，細胞増殖や発生過程の制御を担うHippoシグナル経路の転写共役因子として働く重要な因子の一つであるが，本経路の標的分子や生理的・病態生理的意義については不明な部分が多い．我々は以前，食道扁平上皮がん（ESCC）細胞株の11q22増幅領域からがん遺伝子候補としてアポトーシスインヒビターである*cIAP1*を同定した．その後，ヒトゲノム計画が終了し，ゲノム情報が整備されたことにより，同領域に*YAP*が座位していることが明らかとなった．また，複数のグループから*YAP*増幅が腫瘍の増大に寄与する可能性を示す報告がなされたことから，ESCCでの*YAP*増幅の意義を解明することを目的に，ESCC臨床検体での免疫組織学的検討，*YAP*の過剰発現実験系ならびに発現抑制実験系を用いた機能的解析を行った．

まず，ESCC臨床検体120例での免疫組織化学染色による臨床病理学的検討により，YAPの核陽性群が陰性群に比べ予後不良であり，独立した予後因子となることを明らかにした．また，本研究では既知の2種類の*YAP* isoformに加え，2種類の新規isoformを同定したので，計4種類の*YAP*遺伝子の発現コンストラクトを作製し，コロニーフォーメーションアッセイを行い，全てのisoformにおける細胞増殖能の亢進を確認した．一方，*YAP*の増幅・発現亢進を認めたESCC細胞株（KYSE170）では，*YAP*特異的siRNAを用いた内在性*YAP*の一過性の発現抑制により，G0/G1期分画の蓄積を伴う著明な細胞増殖の抑制が観察された．さらに，*YAP*発現の抑制により転写レベルでの*p21*の発現上昇と*survivn*の発現低下が認められたことから，YAPはESCCにおける診断・治療の標的となりうることが示唆された．

〈緒言〉

近年，がん研究の飛躍的な進展によって，各種の分子標的治療薬やがんワクチンの開発などの成果が挙げられつつある．食道がんは，本邦における悪性新生物による死亡者数の約4%を占め，年間約1万人が死亡し，且つ増加傾向を示している．本邦では食道がんの95%はESCCであり，ESCCは早期からリンパ節転移を生じ，また5年生存率が30%前後と予後不良であるため，その改善に直結する新たな診断法や治療法の確立が待望されている．

申請者が所属する研究室では，がん細胞株を対象にCGH法による網羅的ゲノム解析を展開し，ESCC細胞株で11q22領域の遺伝子増幅を見出すとともに，その責任遺伝子としてアポトーシスインヒビター*cIAP1*を同定した（Imoto I *et al.Cancer Res.* 2001）．同報告の後，全ヒトゲノム配列の解読が完了し，同増幅領域にYAP遺伝子が座位することが明らかとなった．その後，肝臓でのマウス発がんモデルを用いた実験で*cIAP1*と*YAP*が共増幅・共発現することにより腫瘍増大を促進し，さらにヒト肝細胞がんにおいても*cIAP1*と*YAP*の共増幅・共発現が確認されたことから（Zender L et *al. Cell* 2006），*YAP*が*cIAP1*とともに11q22増幅領域の責任遺伝子である可能性が示唆された．これまでにYAPに関しては，細胞増殖や発生過程の制御を担うHippoシグナル経路の転写共役因子として機能することが明らかにされており，複数の結合転写因子も同定されている．しかし，がん細胞における分子機序については未解明な部分が多く，転写標的遺伝子も不明である（Saucedo LJ *et al. Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007, Bin Zhao *et al. Gene Dev.* 2010）．以上の背景の下，本研究では，ESCCを対象としてESCC病態形成への関与を明らかにすることを目的に1）YAPのがん遺伝子としての機能，ならびに2）ESCC臨床症例による臨床病理学的解析を行った．

〈方法〉

東京医科歯科大学食道・胃外科で切除手術を受けたESCC臨床検体120例において，抗YAP抗体を用いた免疫組織学的検討を施行した．ESCC細胞株を用いた*in vitro*実験系では，既に11q22増幅を報告したYAP高発現株KYSE170での*YAP*特異的siRNAによる発現抑制実験系（細胞増殖試験，下流遺伝子の発現解析）とYAP低発現株KYSE1240での*YAP*過剰発現実験系（コロニーフォーメーションアッセイ）による機能解析を施行した．

〈結果〉

ESCC臨床検体の免疫組織化学染色による検討では，解析した120例中57.5%で核における著明な染色性を認め，且つ予後に関しては核での染色性の違いによる二群間に有意差を見出した．また，核内におけるYAP発現と各種臨床病理学的因子の検討では，YAPが独立した予後因子となることが示された．

*YAP*遺伝子は既に2種類のisoformが報告されていたが，本研究では*YAP*遺伝子のcDNAクローニングの過程において2種類の新規isoformを同定し，各isoformを分子量が小さい順にα，β，γ，δ（β，δが新規isoform）と名付けた．申請者は，全てのisoformの発現コンストラクトを作製し，YAP低発現株KYSE1240での過剰発現系による検討を行い，全てのisofomで細胞増殖促進効果を認めた．一方，全ての*YAP* isoformを一様にノックダウンする*YAP*特異的siRNAを用いた発現抑制実験では，11q22増幅を報告したYAP高発現株KYSE170で顕著な細胞増殖抑制効果を認めた．また，その増殖抑制機構については，細胞周期停止を引き起こす*p21*と細胞周期を亢進させる機能を持つ*survivin*の転写レベルでの制御機構に関与していることを見出した．さらに，siRNAが結合不可能な各変異isoformの発現コンストラクトをYAP高発現株KYSE170に導入した安定発現株での*YAP*特異的siRNAによる発現抑制実験では，全ての安定発現株で細胞増殖抑制効果が認められなかった．

〈考察〉

本論文において申請者は，2種類の新規*YAP* isoform（β，δ）を同定した．また，所属する研究室が保有するESCC細胞株43株と正常ヒト食道上皮不死化細胞株Het1Aにおける発現解析によって，全ての細胞株が4種類のisoform全てを発現していることを確認した．さらに，全てのisoformが細胞増殖を亢進させる働きを持つことを明らかにした．しかし，本研究において個々のisoformの

機能の違いを見出すには至っていない．特に，これら isoform の顕著な違いである WW ドメインの個数の違い（α，β は１つ，γ，δ は２つ）は，YAP に結合する転写因子の選択制に関与しているのではないかと考えられ，今後は各 isoform における結合因子の違いなどに関する詳細な研究も必要と考えられる．

YAP は核内で転写共役因子として働き，様々な転写因子と結合して転写制御を行うことが知られている．YAP と結合する多くの転写因子は，細胞増殖を促進する働きを持つことが報告されているが，神経細胞においては p73 と結合し細胞死を引き起こすという報告もある．申請者は，YAP の発現抑制実験において，YAP が *p21* や *survivin* の発現を転写レベルで制御していることを明らかにしたが，これら遺伝子の発現調節を担う YAP と結合しうる転写因子の同定には至らなかった．しかし，転写因子である RUNX2 へ YAP が結合することにより *p21* の転写を制御することが報告され（Vitolo MI *et al. Cancer Biol Ther.* 2007），また申請者も免疫沈降法によって YAP と RUNX2 の結合を確認できたことから，YAP による *p21* の発現制御は YAP と RUNX2 との結合によるものである可能性が強く示唆された．しかし，詳細な制御機構については不明であり，更なる検討が必要である．

ESCC 臨床検体を用いた臨床病理学的解析では，YAP の核陽性群において予後不良であり，独立した予後因子となることを明らかにした．今後，申請者が決めた判断基準によって，他のがん種の臨床病理学的解析も検討中である．

〈結論〉

申請者は，11q22 増幅によって YAP が発現亢進している ESCC 細胞株を見出した．また，*YAP* の新規 isoform を２種類同定し，*in vitro* において *p21* と *survivin* の発現制御を介して細胞増殖を調節していることを明らかにした．さらに，ESCC の臨床病理学的解析において，YAP の核陽性群が予後不良であること，さらには独立した予後因子となることを明らかにした．

佐藤　公太 博士（医学）　Kota Sato

学位記番号　／甲第 1931 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 26 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系専攻

学位論文　／Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography for vascular imaging of hepatocellular carcinoma：clinical and biological significance（術中造影超音波検査による肝細胞癌腫瘍血管像の臨床病理学的および分子生物学的解析に関する研究）

Hepatology　平成 24 年 11 月 online 発表

論文審査委員／主査：稲澤　譲治　　副査：杉原　健一　　副査：澁谷　均

〈論文要旨〉

【目的】肝切除術において術中超音波検査はルーチンに行われる検査で，切除範囲・術式を決定する上で必須の情報である．われわれは，第二世代超音波造影剤である Sonazoid® 用いた造影超音波検査を行っている．その中で肝細胞癌の腫瘍血管像において特徴的な所見が存在することを見出した．本研究では術中造影超音波血流パターンによる臨床病理学的及び分子生物学的解析を行いその意義を検討した．

【方法】当科における 2007 年 8 月から 2010 年 3 月までの肝細胞癌切除症例 167 例中，術中造影超音波検査を施行した 135 例を対象として腫瘍血管像にて分類し，臨床病理学的解析を施行した．その中で，DNA microarray data が存在する 27 症例（Reticular pattern:11 例，Thunderbolt pattern:16 例）を対象として DNA microarray を行い，癌部の遺伝子発現を網羅的に解析した．さらに抽出された遺伝子を対象とし，肝癌細胞株を用いた分子生物学的解析及び病理組織を用いた蛋白発現解析を施行した．

【結果】対象を腫瘍血管像により Reticular type 26 例，Thunderbolt type 56 例，対象外 53 例（血流評価不能例等）に分類し，前者 2 群間にて臨床病理学解析を施行した．Thunderbolttype は，術前 AFP 値，腫瘍径，分化度，門脈侵襲，TNM Stage と相関しており，無再発生存期間（$p=0.0193$），全生存期間（$p=0.0362$）に関しても Reticular type と比較して有意に不良であることが示された．

DNA microarray では，Thunderbolt type の癌部において，DNA 複製に関与する geminin 遺伝子の発現亢進を認めた（$p=0.00326$）．ヒト肝癌細胞株においても geminin 蛋白の発現が確認され，siRNA を用いた geminin 抑制試験では，細胞増殖抑制効果ならびに細胞周期抑制効果を認めた．免疫染色では，Thunderbolt type で癌部特異的な geminin 蛋白の発現亢進を認め（$p<0.0001$），全生存率に対する多変量解析にて geminin が独立規定因子として同定された（$p=0.0170$）．

【結語】術中造影超音波の腫瘍血管像は，肝細胞癌の悪性度を反映し，再発・予後の予測に有用である可能性が示された．また，DNA microarray による網羅的遺伝子解析により抽出された geminin 遺伝子は，肝癌細胞の増殖・分裂への関与が示唆され，肝細胞癌の予後予測因子や新たな分子標的治療の候補となりうる可能性が示された．

〈緒言〉

肝細胞癌に対して外科的切除を施行する際，術中超音波検査は必須の検査であり，その有用性が報告されてきた．近年，microbubble を用いた超音波造影剤の開発が進み，その中でも Sonazoid® は Kupffer 細胞に取り込まれる性質を有することで知られている．当科においても術中超音波検査に Sonazoid® 造影剤を使用しており，その有用性を報告している．

また肝細胞癌は，典型的な血管新生を呈する腫瘍の一つとして知られ，腫瘍血管像と分化度が相関すると報告されているが，リアルタイムに詳細な腫瘍血管像を分析することは困難であった．しかし近年では，造影超音波検査において肝細胞癌の腫瘍血管像を評価が可能であるとの報告がされるようなってきている．

そこで本研究では，術中造影超音波にて得られる肝細胞癌の血管像を分析し，腫瘍血管像による臨床病理学的解析を施行した．さらに，腫瘍血管像による遺伝子学的発現を施行し，腫瘍血管像の遺伝子学的背景を検討，解析した．

〈方法〉

【対象】当科における 2007 年 8 月から 2010 年 3 月までの肝細胞癌切除症例 167 例中，術中造影超音波検査を施行した 135 例を対象として腫瘍血管像の解析を施行した．このうち，82 例は血管画像解析が可能であり，53 例は前治療などの影響により血管画像解析が不能であった．82 例の観察中央値は 784 日であった．

【術中造影超音波】超音波画像診断装置 Xario-XG（東芝メディカル）と 7MHz の T 字型リニアプローブ（; 東芝メディカル PLT-705BTH）を用いて全術中超音波検査を施行した．Sonazoid® の使用量は 0.5μL/body とし，注入後の 2 分間は Dynamic study，その後，腫瘍血管像評価のために micro flow imaging（MFI）を施行した．MFI は主病変を対象として 3 回行い，そのなかで特徴的な MFI pattern をその症例の腫瘍血管像とした．

【DNA microarray】腫瘍径の影響を排除するため，直径 4cm 以下の症例に限定してその癌部の遺伝子発現解析を施行した．その結果，27 例で遺伝子発現解析であった．

【In Vitro assay】ヒト肝癌細胞株を用いて geminin 蛋白の発現解析を施行した．siRNA を用いた geminin 発現抑制試験を施行した．

【免疫組織学的解析】光顕微鏡下で 3 つの異なる視野（100× 倍率）で少なくとも 500 個の細胞を計測し，目的の蛋白発現量を定量的に評価した．

〈結果〉

82 例は，細い網目状の血管を有する Reticular type 26 例と太い直線的な血管を有する Thunderbolt type 56 例に分類可能であった．その 2 群間の臨床病理学的解析にて Thunderbolt type は AFP 値（$p=0.0003$），腫瘍径（$p=0.0048$），分化度（$p=0.0004$），Ig（$p=0.0215$），門脈侵襲（$p<0.0001$），TNM Stage（$p<0.0001$）と相関し，無再発生存期間（$p=0.0193$），全生存率（$p=0.0362$）ともに予後不良であった．腫瘍径の影響を排除するために，直径 4cm 以下の症例に制限して解析を施行したが，やはり Thunderbolt type は AFP 値，分化度，門脈侵襲，TNM Stage にて相関を認めた．

27 例による遺伝子発現解析（Reticular type11 例，Thunderbolt type 16 例）では，両群間で発現差を認める遺伝子（$p<0.001$, FC>2）として 72 probe set が該当した．その中で，Thunderbolt pattern で発現が亢進している遺伝子は 14 set あり，DNA 再複製抑制遺伝子として知られている geminin が最も相関の強い遺伝子として同定された．

肝癌細胞株を用いて geminin 蛋白の発現を western blot にて確認したところ，すべての細胞株にて geminin 蛋白の発現が確認でき，siRNA による geminin 発現抑制試験にて肝癌細胞増殖抑制効果が確認された（p<0.01）.

82 症例の病理組織にて geminin の免疫染色を施行すると，癌部での geminin 陽性細胞率は Reticular pattern では 3.1%，Thunderbolt type では 9.3% であり（mean±SD），両群間にて有意な発現差を認めた（p<0.0001）．また，多変量解析にて geminin 陽性細胞率（p=0.0180）は肝細胞癌腫瘍血管像の独立規定因子として同定された.

さらに，全生存率に関して多変量解析を施行すると，肝静脈侵襲（p=0.0113），geminin 陽性細胞率（p=0.0170）が独立規定因子として同定された.

〈考察〉

本研究では，肝細胞癌に対して術中造影超音波を施行し腫瘍血管構造を解析した．その結果，腫瘍血管像は Reticular type と Thunderbolt type に分類され，Thunderbolt type は癌の悪性度と予後に有意に相関していた．また，Thunderbolt type は術前画像では検出不可能であった門脈の微小侵襲を予測するために有用であることが明らかになった．腫瘍径を限定した解析においても Thunderbolt type は癌の悪性度に相関し，腫瘍血管像は臨床病理学的意義を有することが示唆された．また，網羅的遺伝子解析では Thunderbolt type と相関する遺伝子として geminin が同定された．Geminin は G2,S と M 期に発現する DNA 再複製の阻害剤として知られており，正常細胞ではリンパ球，陰窩上皮細胞，精子細胞に発現が認められている．また，乳腺，肺，腎臓および大腸の悪性新生物に関してその過剰発現が報告されている．本研究では，ヒト肝癌細胞株を使用した geminin 抑制試験において細胞増殖が抑制されることが確認されている．病理組織学的検討において，geminin 陽性細胞は Thunderbolt type において高発現しており，その増殖能との相関が示唆された.

〈結論〉

術中造影超音波の腫瘍血管像は肝細胞癌の悪性度を反映する可能性が示された．また，網羅的遺伝子解析によって，腫瘍血管の遺伝子学的背景が同定された.

小泉　文 博士（医学）　Aya Koizumi

学位記番号　／甲第 1932 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）全人的医療開発学系専攻

学位論文　／Changes in the psychological characteristics of oral cancer patients in the perioperative period: a quantitative evaluation（口腔がん患者の心理特性の周術期における変化とそれに関連する因子）
Journal of Medical and Dental Sciences　第 60 巻　41–53 頁　平成 25 年 3 月発表

論文審査委員／主査：岸本　誠司　　副査：松浦　雅人　　副査：岡崎　睦

〈論文要旨〉

口腔がん患者は，他部位のがん患者より不安や抑うつを含めた精神的な苦痛が強く，自殺率も高い．本研究の目的は，周術期における心理特性の特徴や時間的変化，心理特性に関与する因子とその時期を明らかにし，口腔がん患者苦痛に取り組む医療者の一助とすることである．

方法：初発の口腔がんの手術を受ける患者 50 名について，不安，抑うつに関する心理テストとして HADS，QOL 調査票として FACT-H&N，スピリチュアリティの調査票として FACIT-Sp を用いて術前・術後・退院後の 3 時点について調査を実施した．

結果：不安は術前に最も高値を示し，感情面と機能面と関連を示した．抑うつは，術後に最も高値を示し，頭頸部面以外の QOL 面およびスピリチュアリティと関連を示した．

考察：口腔がん患者の精神的な苦痛は高く，時間的な変化があり，QOL に関連する．患者対応には，多職種による患者へのアプローチが必要であると考えられた．

緒　言

口腔がんは，近年増加傾向を示している．口腔がんは病変を自己で確認でき，日常生活で重要な役割を果たす部位に発症し，治療により口腔の複合した機能喪失や審美障害が生じるため，他部位のがん患者より不安や抑うつを含めた精神的な苦痛が強く，自殺率も高い．本研究の目的は，周術期における心理特性の特徴や時間的変化，心理特性に関与する因子とその時期を明らかにすることである．

方　法

対　象

2008 年 10 月から 2010 年 5 月まで，初発の口腔がんの手術を受ける目的に東京医科歯科大学歯学部付属病院口腔外科病棟に入院し，本研究の趣旨を説明し同意が得られた 57 名を対象とした．

手　順

手術前 1–7 日（術前）・手術後 7–10 日（術後）・退院後 1 カ月（退院後）の 3 時点において調査を行った．心理テストとして①日本語版 HADS（Hospital Anxiety and Depression scale），QOL 調査票として②日本語版 FACT-H&N（Functional Assessment of Cancer Therapy Head and Neck）Version 4　③スピリチュアリティの調査票として日本語版　FACIT-Sp（Functional Assessment of Chronic Illness Therapy scale-Spiritual Well Being）を実施した．カルテより医学的な情報や人口統計学的データを得た．

調査票

①日本語版 HADS

HADS は身体疾患を有する患者の精神症状を測定する自己記入式調査票である．不安（HADS-A）7 項目と抑うつ（HADS-D）7 項目からなる．

②日本語版 FACT-H&N Version 4

FACT-H&N は身体面（PWB）7 項目，社会・家族面（SWB）9 項目，心理面（EWB）6 項目，機能面（FWB）7 項目，計 29 項目を有するがん患者全般を対象とした自己記入式 QOL 調査票“FACT-General”に，頭頸部がん患者の特異的な QOL に関する 11 項目を追加したものである．

③日本語版 FACIT-Sp

FACT-G に，人生の意味や心の平安，信念など 12 項目を追加したものである．

統計学的解析方法

①心理特性および QOL の経時的変化

HADS および FACT-H&N のスコアの術前・術後・退院後の経時的変化を，一元分散分析および
その後の多重比較（Scheffe:$p<.05$）により行った．

②心理特性と QOL および臨床要因との関連

不安と抑うつの悪化している時点において，Kugaya らによる報告より cut off point を採用し，HADS-A 高スコア群（>8）低スコア群（<7），HADS-D 高スコア群（>5），低スコア群（<4）および HADS-total 高スコア群（>11）　低スコア群（<10）の 2 群に分けた．2 群間の臨床要因（性別・年齢・婚姻・教育レベル・職業・発症部位・Stage・術式・喫煙および飲酒の有無）に関する比較は chi-square test ないし Mann-whitney U 検定にて，FACT サブスケール 6 面との比較は Mann-whitney の U 検定を行った．

統計解析には IBM statistics SPSS ver20.0 を用いた．

結　果

1 対象者の属性

対象者は男性 34 名，女性 16 名，平均年齢は 60.28 ± 13.84 歳であった．7 名は除外された．半数以上が既婚で有職者，高学歴であった．部位は舌と下顎歯肉で 86%，臨床病期は，早期例が 29 例，進行例が 21 例，約半数の患者で根治的な腫瘍切除，頸部郭清術と遊離皮弁による再建術が施行されていた．

2 心理特性および QOL の経時的推移

不安は術前に最も高く，抑うつは手術前後で高くなるが，いずれも退院後には改善を認めた．

QOL は，PWB,FWB および H&N のみに有意な相違を示した．PWB では，術前が最も悪く，手術後，退院後にかけて有意に改善した．FWB と H&N では，術後に悪化し，退院後に術前のレベルまで達する有意な改善がみられた．

3　心理特性と QOL および臨床要因との関連

① HADS-A

術前では，低スコア群が EWB，FWB において，有意に高スコアを示した．また H&N と Sp は高スコアを示す傾向を認めた．術後では Sp を除くすべての面において低スコア群が有意に高スコアを示した．

② HADS-D

術前では，低スコア群が EWB，FWB において，有意に高スコアを示し，H&N と Sp においては高スコアを示す傾向を認めた．術後はすべての面において低スコア群が有意に高スコアを示した．

③ HADS-total

術前では低スコア群が EWB，FWB，H&N Sp，術後では H&N をのぞくすべての面において，低スコア群が有意に高スコアをしめした．PWB，SWB，EWB，FWB，Spirituality，H&N は高スコアを示す傾向を認めた．

④臨床要因

HADS-A 術後，HADS-D 術前，HADS-total 術前と術後で，職業面において有職者が有意に低スコア群で多く認められた．他の要因では関連性が認められなかった．

考　察

①心理特性の経時的変化.

本研究では，周術期における口腔がん患者は術前と術後に強い精神的苦痛があり，退院後 1 カ月で回復することが明らかになった．

術前の不安は，外科的治療をうける患者に共通であるが，口腔がんでは術後の予期される容貌の変化や機能障害により強い不安を生じる．また効果的なコーピングストラテジーの欠如や低い QOL が術前の不安に関連すると報告されており，本研究と一致した．

抑うつは，生検前から認められ，がんとの診断後に確立する．また Haisfeld らは，1986–2008 年までの頭頸部がん患者の抑うつについての文献を調査し，高い抑うつは，診断から治療中，治療終了後の最初の 6 カ月まで，中等度の抑うつは診断後 3–6 年まで継続すると報告している．本研究では，術前と術後に病的な抑うつを認め，退院後には正常範囲まで回復し，Haisfeld の報告より短期間で回復した．Jacobsen は手術の影響が大きい場合には強い抑うつを生じると報告している．Haisfeld の報告は 1980 年代の局所皮弁による再建が行われていた時代の結果も含まれており，術後の審美・機能障害が大きかったと思われる．近年では，患者の QOL を考慮した術前の化学療法や放射線療法による腫瘍の縮小や，遊離皮弁を用いた再建術や術後の歯科インプラント治療などが行われ，手術による審美・機能障害が以前より軽度になってきているためと推察された．

②術前・術後の心理特性に関連する因子

術前の不安と抑うつは QOL の EWB と FWB で，HADS-total では EWB と FWB に加えて，H&N と Sp にも有意な差がみられた．また臨床要因では抑うつと HADS-total において，職業の有無が関連していた．術後の不安では Sp 以外の 5 面で，術後の抑うつと HADS-total ではすべての面で関連していた．

Shu-Ching Chen et al は，頭頸部がん患者の不安は，がんとの診断や急激な身体変化による活動制限への衝撃，治療に伴う疼痛に強く関連すると報告しており，本研究と関連する．

また抑うつは QOL 全体に関与し，特に身体面，機能面および頭頸部面に強く関連すると Hassanein KA，et al は報告しており，本研究と一致した．よって抑うつは QOL の重要な予後因子と考えられ，抑うつにとって QOL は重要な関連因子であろう．不安と抑うつは特に機能障害に関連し，ケアの必要性が報告されている．

精神的な苦痛の予測因子は，教育レベル，職業の有無，腫瘍とリンパ節転移，飲酒である．本研究では，職業の有無についてのみ有意差をみとめた．手術前に無職だった頭頸部がん患者の QOL スコアは低く，特に身体面・機能面での低下が認められるとの報告もあり，心理特性にも関与すると考えられた．

Spirituality は，不安と抑うつ，FACT-H&N の 5 面と関連するとされ，本研究でも同様であった．

日本人は spirituality に気付かず生活しているが，がんという生命をおびやかす疾患に直面し重要性が増す．また周術期では適切な spiritual ケアで術後の治癒が促進される．よって今後は spirituality も含めた患者への対応を考慮すべきであろう．

まとめ

口腔がん患者の精神的苦痛の程度は治療の過程によってことなり，その時期によって関連する QOL 面が異なることが判明した．特に術前では不安，術後では特に 10 日以内での抑うつをふまえた心理的援助が必要と考えられた．

精神的苦痛の軽減のために身体症状の変化を注意深くモニタリングし，悪化防止を図ることが重要であり，また各分野の専門的な知識をもった多職種による患者へのアプローチや家族のバックアップ体制が必要であろう．

新美　祐介 博士（医学）　Yusuke　Niimi

学位記番号　／甲第1933号　　学位授与　／平成25年3月31日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）認知行動医学系専攻

学位論文　／Abnormal RNA structures（RNA foci）containing a penta-nucleotide repeat（UGGAA）n in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis（プルキンエ細胞核内に出現するUGGAAの繰り返しを含むRNA fociが，脊髄小脳失調症（SCA31）の病態と関係する）
Neuropathology　doi：10.1111/neup.12032　平成25年3月online発表予定

論文審査委員／主査：岡澤　均　　副査：田中　光一　　副査：黒柳　秀人

〈論文要旨〉

脊髄小脳失調症31型（SCA31）は優性遺伝性の神経変性疾患で，その原因遺伝子は*BEAN1*（brain expressed, associated with Nedd4 1）および*TK2*（thymidine kinase 2）に共通したイントロン内に存在する挿入配列である．この挿入配列は（TGGAA）$_n$，（TAAAA）$_n$，（TAGAA）$_n$（TAGAATAAAA）$_n$を含む複雑な配列をしている．このうちで（TGGAA）$_n$以外の配列は健常人でも認められており，（TGGAA）$_n$がSCA31発症に重要な働きをしていると考えられている．また人の小脳ではFISH（fluorescence in situ hybridization）にて，UAGAAUAAAAを含むRNA fociを認めることが分かっているが，SCA31に特異的な（TGGAA）$_n$の転写産物である（UGGAA）$_n$がRNA fociに含まれているかは分かっていない．今回新たにUGGAAを検出するようなプローブを用いてFISHを行い，また（UGGAA）$_n$を一過性および恒常性に発現するような細胞モデルを作製し，原因遺伝子の細胞に与える影響を評価した．その結果人の小脳ではSCA31においてのみUGGAAを含むRNA fociをプルキンエ細胞核内に認め，他の疾患では認めなかった．また細胞モデルでは（UGGAA）$_n$を発現する細胞において毒性が認められ，それらの細胞核内にはRNA fociが確認できた．以上から（TGGAA）$_n$の*BEAN1*方向の転写産物である（UGGAA）$_n$を含むRNA fociはSCA31のプルキンエ細胞変性に関係していると考えられた．

〈緒言〉

SCA31は日本において頻度の高い優性遺伝性脊髄小脳変性症である．病理学的にはプルキンエ細胞が特異的に委縮し，その周囲に好酸性の均一な物質の沈着を認めるのが特徴である．SCA31の原因遺伝子は複雑な構造をした挿入配列で，基本的には5塩基の繰り返しであるが，（TGGAA）$_n$，（TAAAA）$_n$，（TAGAA）$_n$といった複数の挿入配列で構成されている．またこれは反対方向に転写される遺伝子である*BEAN1*と*TK2*に共通するイントロン内にあり，挿入配列が両方向ともに発現する可能性がある．ごくまれであるが，健常人のなかにもSCA31と同部位に挿入配列を認めることがあるが，この配列には（TGGAA）$_n$がなく，この繰り返しがSCA31の病態に関係していると考えられている．われわれの以前の報告ではFISHにて人の小脳プルキンエ細胞核内にUAGAAUAAAAからなるRNA fociを認めているが，この繰り返し配列は健常人にも存在しており，疾患特異的とは言い切れない可能性がある．今回新たにSCA31患者2例においてFISHを行い，患者特異的配列である（UGGAA）$_n$を検出するようなプローブを用いてfociの有無について調べた．また挿入配列を発現するような細胞モデルを作製し，（UGGAA）$_n$が毒性を発揮しRNA fociを形成するかどうかを検討した．

〈方法〉

人の病理検体としてSCA31患者2例の小脳および，比較対象としてパーキンソン病やSCA6などの疾患6例の小脳を用いてヘマトキシリン・エオジン染色などを行った．また（UGGAA）$_n$を検出するようなプローブを用いてFISHを行った．

細胞モデル作製のために，挿入配列を含むDNA領域をPCR法で増幅し，一過性発現ベクターに挿入した．使用した配列はSCA31挿入配列の*BEAN1*方向（UGGAAが発現する）と健常人由来挿入配列の*BEAN1*方向（UAGAAUAAAAが発現する）で，それぞれのベクターを"SCA31"，"Control"と名付けた．このベクターは別のプロモーターでgreen fluorescent protein（GFP）が発現するように設計されており，導入効率が可視化できた．これをHEK293T細胞にリポフェクション法で導入し細胞に与える影響をフローサイトメトリーによる細胞死アッセイ，細胞死アッセイ（LDHアッセイ），細胞増殖アッセイ（MTSアッセイ）で調べた．挿入配列が発現しているかどうかの確認はRNAを抽出しcDNA合成を行い，配列を解析することで行った．

同様にSCA31挿入配列と健常人挿入配列を恒常的に発現するようなベクターを，PC12細胞に導入し作製した．これはドキシサイクリンで遺伝子の発現がOn/Offできるように設計されており，発現させた場合とさせない場合とでの比較が可能であった．さらにこれらの細胞を用いてFISHを行った．

〈結果〉

SCA31患者小脳はプルキンエ細胞に限局した萎縮と，その周囲を取り囲む厚い好酸性の構造（halo-like amorphous material）が見られる．FISHでは，プルキンエ細胞の核内にRNA fociの形成を認め，それは（UGGAA）$_n$を含むと考えられた．このfociはRNase A処理で消失し，RNA由来のものと考えられた．

細胞モデルでは，ベクターを導入し一定期間後にPI染色を行い，GFPとPIが両方陽性の細胞をフローサイトメトリーで検出すると，"SCA31"細胞（UGGAAが発現する）において，"Control"細胞（UAGAAUAAAAが発現する）と比較し有意な細胞死を認めた．またLDHアッセイでは"SCA31"細胞でmockや"Control"細胞と比べ優位に細胞毒性を認めた．一方"Control"細胞とmockでは差はなかった．また細胞増殖を見るMTSアッセイでも同様の結果であった．

恒常的発現細胞では細胞へベクターを導入後抗生物質で選択し，単一細胞からなるSCA31およびControlの挿入配を持つ細胞株を複数得ることが出来た．そのなかから，qRT-PCRで発現量が同等のものを選んで解析を行った．LDHアッセイではSCA31挿入配列を発現させた場合に有意に細胞死が増加した．一方Control挿入配列を発現させると，細胞死は減少した．MTSアッセイでは同様の傾向があったが有意差は認めなかった．

一過性および恒常性に発現させた培養細胞でのFISHでは"SCA31"細胞のみでUGGAAからなるRNA fociを核内に認めた．一方他の細胞ではRNA fociを認めなかった．

〈考察〉

SCA31患者のみに認められる（TGGAA）$_n$ を発現するような細胞において細胞毒性を認め，Controlの挿入配列では明らかな毒性は認めなかったことや，SCA31患者の小脳プルキンエ細胞においてUGGAAからなるRNA fociが新たに確認できたことから，TGGAAの転写産物であるUGGAAがSCA31発症に関与していると考えられた．

その機序としては現時点では不明であるが，（TGGAA）$_n$ が（UGGAA）$_n$ へ転写されRNA結合蛋白の機能障害などを引き起こしている可能性もあり，今後人組織や細胞モデルを用いて検討していく予定である．

それ以外にもBEAN1の機能異常や挿入配列を介したクロマチン構造の異常，また挿入配列が両方向性に転写される可能性も否定はできておらず，今度の検討が必要と考えられる．

〈結論〉

TGGAAを含むSCA31患者の挿入配列が，細胞モデルにおいて毒性を与えることが初めて示された．FISHではプルキンエ細胞核内にUGGAAからなるRNA fociの形成を認め，SCA31における病理的な特徴と考えられた．

朴　文英 博士（医学）　Wenying　Piao

学位記番号	／甲第1934号　学位授与　／平成25年3月31日
研究科専攻	／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）認知行動医学系専攻
学位論文	／Efficient in vivo delivery of antisense oligonucleotide to choroid plexus（アンチセンスオリゴヌクレオチドの脈絡叢への効率的なデリバリーに関する研究） Journal of Medical and Dental Sciences　第60巻　9–16頁　平成25年3月発表
論文審査委員	／主査：小川　佳宏　　副査：下門　顕太郎　　副査：北嶋　繁孝

〈論文要旨〉

脈絡叢は各脳室壁に存在し，脳を保護する脳脊髄液を産生している血管に富んだ組織である．脈絡叢は，血液脳脊髄液関門（BCSFB）を構成する主要な機能コンポーネントであり，アルツハイマー病や髄膜アミロイドーシスを含む様々な神経疾患に強く関与している．

我々はアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を用いて，生体内の脈絡叢における遺伝子発現抑制を試みた．12塩基の短いASOをラット尾静脈より投与した．ASOは中枢神経系において，神経細胞やグリア細胞にはデリバリーされず，脈絡叢のみにデリバリーされた．また20 mg/kgの投与量で，脈絡叢上皮細胞における内因性標的遺伝子の有意な抑制も認められた．ASOが脈絡叢に取り込まれるメカニズムについては解明できていないが，ASOが生体内でAlbuminに結合すること，ASOのデリバリー分布はAlbumin自体のデリバリー分布と類似していることの二点から，ASOが血清Albuminへの結合を介して脈絡叢上皮細胞にデリバリーされ，同細胞における標的遺伝子発現抑制に成功したものと考えられた．この戦略は，脈絡叢の機能に対する研究法や脈絡叢が関与する疾患に対する遺伝子治療法の確立に有用である．

〈緒言〉

脈絡叢は，脳の各脳室に存在する血管の発達した構造で，BCSFBを構成している．脈絡叢の主な機能は，小イオンや水の血液側から脳脊髄液側への能動輸送による脳脊髄液の分泌である．脈絡叢は栄養素，ホルモン及び金属イオン等を脳へ供給するとともに，脳脊髄液からの代謝物を除去する．

ASOは遺伝子発現抑制方法として以前から用いられてきたが，その有効性は不十分であった．しかし，最近の人工核酸の化学修飾の進歩により有効性が大きく改善された．化学修飾の中でも，架橋核酸であるlocked nucleic acid（LNA）の開発は標的RNAに対するASOの結合親和性を著しく向上させ，より効率的な立体制御を可能にした．LNAを用いたASO（LNA-ASOs），特に中央に5–10塩基のDNA，隣接する両末端には2–5塩基のLNA等の化学修飾核酸を含むギャップマー型のASOは，標的遺伝子のメッセンジャーRNA（mRNA）と結合した際に，ASOの中央部分で形成されるDNA/RNAハイブリッド二本鎖が細胞内のRNase Hにより認識されて，標的mRNAの切断を可能にする．LNAの高い結合親和性は従来型と比較して遥かに短いASOの開発を可能にし，短いASOは細胞内での有効性を増加させるため，遺伝子抑制効果を増加させることが報告されていることから，有用性が高い．

過去の研究からASOをマウスの脳室内に投与することで脈絡叢における標的遺伝子の発現を抑制することが報告されている．しかしこのような方法は侵襲性や危険性が非常に高く，臨床応用は困難である．従って，臨床的に実現可能である代替戦略を開発する必要がある．

ASOの脈絡叢へのデリバリー方法を開発するための概念を証明するために，我々はSuperoxide dismutase 1（*SOD1*）を標的遺伝子として選択した．*SOD1*は脈絡叢で発現している内因性遺伝子で，*SOD1*ノックアウトマウスは不妊以外の症状は示していないため，このデリバリー方法の副作用を正確に評価することが可能である．

本研究では，全ての核酸間に化学修飾の一種であるホスホロチオエート修飾を加えたギャップマー型LNA-ASO（PS）を静脈注射することにより，ASOの脈絡叢へのデリバリーに成功した．また，ラット脈絡叢における内因性遺伝子*SOD1*の発現を減少させることに成功した．

〈方法〉

ラット*SOD1*に対するLNA-ASOsを合成した．蛍光標識したLNA-ASOs（PS）または蛍光標識マウスAlbuminを尾静脈より投与して共焦点顕微鏡で脳内での取り込みを観察した．

LNA-ASOs（PS）には全ての核酸間にホスホロチオエート修飾を加えており，修飾を加えていないLNA-ASOs（PO）と比較して，これが体内蛋白と相互作用を引き起こしてデリバリー経路に関与している可能性について蛍光相関分光法（FCS）を用いてLNA-ASOs（PS）と血清蛋白との結合を調べた．さらに，FCSの結果に基づいてラット血清AlbuminとLNA-ASOの結合をGel-shift assayで確認した．

合成した核酸の遺伝子発現抑制効果を調べるため，条件的不死化ラット脈絡叢上皮細胞株（TR-CSFB）を用いて，10nM及び50nMの導入濃度で解析を行った．

最後に，このLNA-ASOs（PS）を20 mg/kg投与量でラットに静脈注射することで脳脈絡叢における*SOD1*遺伝子の発現抑制効果を確認した．

〈結果〉

LNA-ASO（PS）は中枢神経系において，神経細胞やグリア細胞にはデリバリーされず，脈絡叢のみにデリバリーされた．また，そのデリバリー分布はAlbumin自体のデリバリー分布と類似していた．

FCSでは，AlbuminまたはHDLと混合したLNA-ASO（PO）はどちらもPBS中でのLNA-ASO（PO）の拡散時間と同程度であった．LNA-ASOs（PS）は，HDLと混合したものはPBS中での拡散時間と同程度であったが，Albuminと混合したものはAlbumin単独と同程度の拡散時間が測定された．またそれは血清中でのLNA-ASO（PS）の拡散時間と同程度であった．

Gel-shift assayにおいてもLNA-ASO（PO）はAlbuminと結合しないが，LNA-ASO（PS）はAlbuminと結合されることが確認された．

TR-CSFB細胞では10 nM, 50 nMのLNA-ASO（PS）導入濃度で，それぞれ40%と53%の標的遺伝子発現抑制効果が示された．

LNA-ASO（PS）を静注した時のラットの脈絡叢では約 47.8% の標的遺伝子発現抑制効果を認めた．

〈考察〉

本研究の結果，*SOD1* を標的とした LNA-ASOs を静脈内投与することによりラット脈絡叢における標的遺伝子である *SOD1* mRNA の発現を大幅に抑制できることを実証した．20 mg/kg の投与量で，*SOD1* mRNA レベルが約 50% 有意に減少された．過去に ASO の皮下投与で脈絡叢においての内因性遺伝子発現が抑制できなかったという報告がある．彼らの用いた 2'-O- メトキシ-エチル修飾 RNA を用いた 20 塩基の RNase H 非認識型 ASO の替わりに，12 塩基の短い RNase H 認識型 LNA-ASO を用いたことが発現抑制効果を得られた一因と思われる．

脈絡叢への LNA-ASO デリバリーメカニズムについての解明は，より多くの LNA-ASO を脈絡叢へデリバリーさせるために有用である．特に，血清タンパク質と LNA-ASO の結合特性は ASOs の全体的な薬物動態学的挙動の理解に役に立つ．渡辺らは，ホスホロチオエート修飾 ASO は血清中で Albumin と主に結合していると報告しており，我々の結果はこの知見を確認した．FCS の解析では LNA-ASO（PS）は HDL ではなく，マウス Albumin と結合し，また Albumin 中の拡散時間はマウス血清中の拡散時間と明らかな差は認められなかった．さらに静脈内投与により脈絡叢にデリバリーされた蛍光標識マウス Albumin は，静脈内投与した LNA-ASO と同様な分布を示した．

脈絡叢上皮にはアルツハイマー病や髄膜アミロイドーシス等の様々な疾患に関連する遺伝子が特異的に発現している．脈絡叢における疾患関連遺伝子の発現抑制はこれらの疾患を治療するための有用なアプローチである．アルツハイマー病の場合，脈絡叢における Aβ 蓄積の減少はアミロイド β（Aβ）トランスポーターの活性の変化と関連しているかも知れない．加齢に伴って，脈絡叢上皮細胞における Aβ 排出（脳脊髄液から血液へ）トランスポーターである lipoprotein receptorrelated protein（LRP)-1 や P-glycoprotein は増加し，Aβ 流入（血液から脳脊髄液へ）トランスポーターである lipoprotein receptorrelated protein（LRP)-2 は減少する．Aβ の流入トランスポーターである LRP-2 の強力な阻害は血液と脳脊髄液の間の Aβ の平衡を血液側へとシフトさせ，脳内 Aβ の減少につながることが予想される．

トランスサイレチン（TTR）はプレアルブミンとも呼ばれる血漿タンパク質で，中枢神経系では主に脈絡叢で合成され，脳脊髄液中に分泌される．血液中と脳脊髄液中では TTR の発現と合成が独立している．TTR はアポリポタンパク質 E，クラステリンの次となる，Aβ との相互作用が発現された脳脊髄液タンパク質である．これらの蛋白質は Aβ を「隔離」させることにより，神経損傷を防ぐことができるという仮設がある．Stein らはアルツハイマー病のモデルマウスである Tg2576 マウスにおける神経変性の欠如は海馬においての TTR レベルの増加と関連していること，TTR に対する抗体を Tg2576 マウスの海馬に持続的注入することにより海馬 CA1 野内における Aβ の沈着やタウの過リン酸化，ニューロンの損失，およびアポトーシスを増加させたことを報告した．一方 Tg2576 マウスを TTR 欠損マウスと交配させて得られた Tg2576/TTR$^{-/-}$ マウスでは脳内の Aβ 量や老人斑が減少されることから，TTR が Aβ 負荷を加速するという主張もある．脈絡叢より分泌された TTR のアルツハイマー病における役割については未だに議論があるが，脈絡叢での TTR 発現抑制はアルツハイマー病の病状を改善させる可能性がある．従って，脈絡叢上皮細胞はアルツハイマー病の遺伝子治療のための有力な候補標的部位である．

TTR 遺伝子の変異は一般的に家族性アミロイドニューロパチーと呼ばれる感覚運動性末梢神経障害に関与している．しかし，特殊な変異（D18G, G53E, A25T, L12P）は軟膜・クモ膜やクモ膜下腔の血管壁へのアミロイド沈着を主な病理学特徴とする遺伝性眼髄膜アミロイドーシスや髄膜アミロイドーシスと関連している．この常染色体優性疾患では，脈絡叢由来の変異 TTR が四量体に有害な構造変化を引き起こして脳内に TTR が沈着され，神経症状を来すとみられる．TTR 変異のある患者において脈絡叢の TTR 発現を抑制させることは病気の治療や予防が期待できる．

脈絡叢は BCSFB の主な機能構造として血液脳関門と共に中枢神経系を血液から保護する働きをする．BCSFB は病原体だけでなく，医薬品の血液から脳への通過も防ぐ．薬物を BCSFB や BBB を通過させることは脳疾患の治療において主要な問題の一つである．我々は LNA-ASO の尾静脈投与により BCSFB を通過させることはできなかったが，脈絡叢にデリバリーできた．我々の開発したデリバリー方法を応用し，LNA-ASO を用いて脈絡叢で発現している BCSFB のバリア機能関連遺伝子を制御することにより，BCSFB のバリア機能を調節することも可能である．

〈結論〉

我々は LNA-ASOs をラットに静脈注射することで脳脈絡叢における標的遺伝子発現を抑制させることに成功した．本研究は脈絡叢を標的とした全身投与による ASO デリバリーの最初の報告である．この ASO デリバリー方法は，脈絡叢に関連する様々な疾患の遺伝子治療のための有望な方法として期待できる．

堀　匠 博士（医学）　Takumi Hori

学位記番号　／甲第 1935 号　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日
研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）認知行動医学系専攻
学位論文　／Visual reproduction on the Wechsler Memory Scale-Revised as a predictor of Alzheimer's disease in Japanese patients with mild cognitive impairments（日本人軽度認知機能障害患者のアルツハイマー病への転化予測における改訂版ウェクスラーメモリースケール視覚性再生検査の特徴）
Dementia and Geriatric Cognitive Disorders　第 35 巻第 3-4 号　165-176 頁　平成 25 年 1 月発表
論文審査委員／主査：西川　徹　副査：岡澤　均　副査：泰羅　雅登

〈論文要旨〉
背景：改訂版ウェクスラーメモリースケール（WMS-R）で，日本人健常者では米国人に比べ視覚性再生（Visual Reproduction: VR）検査が高得点であることが報告されているが，日本人の軽度認知機能障害（mild cognitive impairment: MCI）患者での特徴は明らかでない．MCI 患者における VR の特徴を解析した．

方法：大学病院神経内科の物忘れ専門外来を 2007 年 4 月からの 4 年間に受診した患者のうち，日本版 WMS-R を施行され，MMSE（mini-mental state examination）が 24 点以上であった 157 例を対象とし，MCI と診断された 27 例（72.4 ± 5.8 歳，男性 66.7%）の VR について解析した．

結果：MCI 群の平均フォローアップ期間は 26.1 ± 16.1 ヶ月で，AD への年次転化率は 27.3% であった．VR の基礎値は即時再生（VR-I）が 33.3 ± 5.6 点，遅延再生（VR-II）が 20.5 ± 14.0 点であった．2 年以上のフォローアップがあった MCI 患者を 2 年以内の AD への転化群（n = 8）と非転化群（n = 8）に分けて比較すると転化群の VR-II が 4.0 ± 6.0 点に対し非転化群では 26.4 ± 9.8 点と転化群で有意にかつ著明に低下していた．ROC 解析での曲線下面積は言語性記憶である Logical memory の遅延再生と比較して高値で，0.97 であった．

考察：既報の健常群との比較では MCI 群の VR 平均点は米国人健常者よりも高かった．さらに既報の MCI 群との比較では日本人 MCI に対する VR 検査は米国人に対するよりも転化予測における有用性が高い可能性が考えられた．

結論：日本人 MCI 患者への VR 検査は 2 年以内に AD へ転化する症例の記憶力低下を鋭敏に反映しており，有用性が高い可能性が考えられる．

〈緒言〉
改訂版ウェクスラーメモリースケール（Wechsler Memory Scale-Revised: WMS-R）は，最も汎用されている記憶検査の一つであり，アルツハイマー型認知症（Alzheimer's disease: AD）を含めた認知症を診断する際の客観的な記憶力の低下の指標としても利用されている．軽度認知機能障害（mild cognitive impairment: MCI）は認知症の診断基準は満たさないが正常でもない，境界域を表す概念として知られているが，記憶力の低下は MCI 患者において AD への進行（転化）を予測する最も重要な要素のひとつとして知られている．記憶力低下に関する MCI の操作的な診断基準として，WMS-R に含まれる言語性記憶検査のひとつである論理的記憶（Logical Memory: LM）の遅延再生（LM-II）の低下は良く利用されているが，視覚性再生（Visual Reproduction: VR）の遅延再生（VR-II）も非言語的な記憶力検査として MCI から AD への転化予測についての有用性がいくつか報告されている．2011 年に提案された新しい MCI の診断基準の中でも VR は非言語的なエピソード記憶の低下を確認するテストの 1 例として LM と対になって推奨されている．
日本語版改訂版ウェクスラーメモリースケール（WMS-R-J）は 2001 年に杉下らによって標準化され出版された．この結果は米国での結果と比較されほぼ同等であったが，VR 検査については即時再生（VR-I），30 分以上経過後の遅延再生（VR-II）共に，比較された 6 つの年代すべてで日本人が有意に高得点であることが示された．VR 検査は 10 秒間ずつ見せられた簡単な幾何学的図形を，記憶を頼りに書くことを求められる検査であり，視覚性非言語性の材料の再生検査である．日米で同じ図形が使用されており，翻訳による差は生じない．日本人健常者で VR が有意に高得点であった理由は明らかではないが，漢字の学習や使用が視覚性の記憶力を向上させるのではないかという仮説が提示されている．
日本人 MCI を対象とした VR の得点および MCI から AD への転化の予測を論じた報告はこれまでなく，本研究は，日本人 MCI 患者における VR の特徴と，近い将来に AD へ転化する患者の予測における VR の有用性を評価することを目的として行なわれた．

〈対象と方法〉
本研究は単一施設での後ろ向き縦断研究である．東京医科歯科大学神経内科の物忘れ専門外来を 2007 年 4 月から 2011 年 4 月までの 4 年間に受診し mini-mental state examination（MMSE）と WMS-R の両方を施行された 240 例中，MMSE24 点以上の正常範囲にあった 157 例（男性 52.9%，年齢 69.1 ± 12.0 歳，教育歴は 39.5% が大卒）について，外来電子カルテの記載を参照し解析した．
認知症の存在診断については DSM-Ⅳの基準に従い，AD の診断については NINCDS-ADRDA の probable AD の基準に従った．MCI の診断基準はスクリーニング検査で明らかな認知症の原因になりうる異常が認められないこと，物忘れの訴えがあること，clinical dementia rating（CDR）0.5 を満たすこと，しかし認知症ではないことを基準に診断され，各症例は正常ないしうつ病等の非認知症群（non-dementia group: ND），MCI 群，AD 群，その他の認知症群（other dementias group: OD）の 4 群のいずれかに振り分けられた．
MCI と診断された 27 例については基本的に外来診療が継続されており，うち 16 例については 2 年以上の follow up 期間があった．これらの症例は 2 年以内に AD に転化した転化群（MCI converters within 2 years: 2y-MCI-C）と，MCI のままであった非転化群（MCI nonconverters within 2 years: 2y-MCI-NC）の 2 群に分けて解析した．
WMS-R-J のうち，LM，視覚性対連合（Visual Paired Associates: VIPA），言語性対連合（Verbal Paired Associates: VEPA），VR のそれぞれ即時記憶（-I）と遅延記憶（-II），計 8 つの下位項目が解析の対象となった．さらに総合的な記憶力を確認する目的で，遅

延再生インデックスの素点（raw score of delayed recall index: rDRI; LM-II＋VIPA-II×2＋VEPA-II×2＋VR-II）と rDRI に対応して独自に定義した即時再生インデックスの素点（raw score of immediate recall: rIRI; LM-I＋VIPA-I×2＋VEPA-I×2＋VR-I）を算出し，さらに記憶保持能力をみる目的で，遅延再生項目の得点を対応する即時再生項目の得点で割った保持スコアを算出（-II/I: LM-II/I, VR-II/I, rDRI/rIRI など）して解析を行った．

〈結果〉

ND が 67 例，MCI が 27 例，AD が 50 例，OD が 13 例であった．平均 MMSE 値は ND 28.3, MCI 27.6, AD 25.9, OD 26.2 で，ND と MCI の間に有意差はなく，MCI と AD の比較では MCI が有意に高得点であった．LM-I, LM-II に関しては ND と MCI の間で有意差がついたが MCI と AD の間では有意差はなかった．一方で VR-I, VR-II に関しては，MCI と AD の間で有意差がつき，VR-II については ND と MCI の間でも有意差をみとめた．LM-II/I, VR-II, VR-II/I, rIRI, rDRI, rDRI/rIRI については ND と MCI,MCI と AD の両方の比較で有意差をみとめた．

MCI27 例のフォローアップ期間は 26.1±16.1 ヶ月で，期間内に MCI から AD に転化していたのは 11 例（40.7%），年次転化率は 27.3%/ 年であった．2 年以上のフォローアップがあった 16 例では，2y-MCI-C が 8 例（50%）であった．2y-MCI-C と 2y-MCI-C の比較では MMSE 値に有意差は無く，LM-I（p＝0.041），VIPA-I（p＝0.010），VEPA-I（p＝0.033），VR-I, VR-II/I, rIRI, rDRI, rDRI/rIRI（p＜0.001）で有意差がみられた．

有意差を認めた項目について転化予測についての Receiver Operating Characteristic（ROC）解析を行った．群間比較の p 値が＜0.001 であった VR-II, VR-II/I, rIRI, rDRI, rDRI/rIRI の曲線下面積（AUC）は順に 0.97, 0.98, 0.97, 1, 0.95 であった．単変量のロジスティックモデル回帰解析を用いて基準値を検討した結果，2 年後の転化予測についてのカットオフ値は VR-II は 13.6 以下，VR-II/I は 41.1% 以下，rIRI は 82.8 以下，rDRI は 36.5 以下，DR/IR は 41.4% 以下となり感度，特異度はすべて 87.5% 以上であった．

MCI 群の VR-II, VR-II/I, rDRI, rDRI/rIRI は相互に相関が強く，相関係数はすべて 0.9 以上であった．

〈考察〉

本研究の ND,MCI,AD と日本および米国の健常者群の VR-I, VR-II の年代別の比較を行ったところ，ND 群の各年代の平均点は日本人の健常者群とおおむね矛盾しない結果であった．MCI 群では VR-I, VR-II とも米国人の健常者群より各年代で高得点で，特に VR-I は日本人の健常者群とほぼ同等の得点であった．AD 群でも VR-I は米国人健常者よりも高得点であったが，VR-II は低得点であった．

本研究の MCI 群の VR-II 得点を米国の 3 つの MCI に関する既報と比較した．米国既報の 1 つと直接比較した本研究の MCI 群の VR-II 得点は約 3 倍であったが，MCI 診断基準や年齢などの背景の違いが関わっている可能性が考えられ，背景の差を除くために，言語性記憶である LM-II と視覚性記憶である VR-II について，それぞれ ND 群の得点と MCI 群の得点を比較して，ND 群に対する相対的な MCI 群の得点の比を算出することを試みた．本研究での VR-II 得点の比は ND 群 29.2 点，MCI 群 20.5 点で 70.2% であったが，LM-II 得点については 37.5% であり，相対的に VR-II の方が保たれていた．しかし米国の既報では LM-II の方が保たれていた．このことから，日本人では米国人と比較して MCI の VR-II 得点が高いのみならず，LM と比較した場合の VR の低下の始まりが遅い可能性が推測された．

さらに MCI 群のうち転化群と非転化群を比較した場合，本研究の VR-II の平均点は 2y-MCI-C が 4.0 点に対し 2y-MCI-NC が 26.4 点と基礎点比が 6.6 倍であったが，Tabert らの報告では 3.0 点対 6.9 点で 2.3 倍（但しバッテリーは WMS,3 年以内），Griffith らの報告では 12.9 点対 27.7 点で 2.1 倍（但しバッテリーは WMS-III, 1–2 年以内）にとどまっていた．

このように日本人 MCI では VR 得点が高く，しかし近い将来に AD に転化する症例については著しく点数が低いという結果になった明確な理由は不明である．杉下らは健常人の VR が高い理由を漢字の学習と使用にあるかもしれないと仮説を立てていたが，教育歴が高い人は AD になりにくいが一方で AD 発症時の記憶力低下の程度が大きくなることが報告されており，教育歴を漢字の学習と使用に置き換えると同様に考えられるかもしれない．

また，MCI 群で VR-II および VR-II/I が rDRI に強く相関していたことは，VR-II または VR-II/I を確認するだけで，被検者の全般的な近時記憶力がどの程度保たれているかをも推定できるという意味で，重要な結果であると思われる．

今回の，VR が日本人 MCI 患者の転化予測マーカーとなるという研究結果は，MCI 患者や家族にとって，将来設計や治療の決定のために利益となると思われる．具体的には MCI の診断マーカーとして LM-II を用い，MCI から AD への転化予測マーカーとして VR-II を用いるといった使い方が可能であろう．これまで日本人 MCI 群に対して VR-II および VR-II/I が転化予測因子となる報告は無く，大規模な観察研究である ADNI が日本および海外で進行中であるが，ここでも VR は診断基準にも評価基準にも取り入れられていない．今回の結果は日本人 MCI の特別な特徴を表しており，今後の研究での検討と海外報告との比較が期待される．

〈結論〉

VR は MCI 患者においても日本人では米国人よりも得点が高かった一方，早期に AD に転化する MCI 患者では大きく低下しており転化予測因子として有意であった．日本人 MCI 患者の VR 検査は，近い将来に AD へ転化する症例の全般的な記憶力低下をよく反映している可能性があり，有用性が高いと思われる．

幾世橋　佳 博士（医学）　Kei　Kiyohashi

学位記番号　／甲第 1936 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）器官システム制御学系専攻

学位論文　／Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice（Wnt5a シグナルは胎仔肝幹・前駆細胞における胆管分化を調節する）
Hepatology　doi: 10.1002/hep. 26293.　平成 25 年 2 月 online 発表

論文審査委員／主査：仁科　博史　　副査：田中雄二郎　　副査：澁谷　浩司

〈論文要旨〉

肝幹・前駆細胞は肝臓の臓器形成に主たる役割を担う重要な細胞であるが，その分化機構は不明の点が多い．Wnt は，様々な臓器において幹細胞の分化・増殖を調節する分泌タンパクである．しかし，細胞運動・極性制御に重要な β-catenin 非依存的経路（Non-canonical Wnt 経路）の肝幹・前駆細胞における機能は不明である．我々は，Non-canonical Wnt 経路のリガンドである Wnt5a に関して，マウス胎仔肝臓由来肝幹・前駆細胞の分化における機能について検討した．Wnt5a は胎生期から新生児期の肝臓に発現を認め，間葉系細胞を含む多くの細胞種に発現し，初代肝幹・前駆細胞自身も発現していた．Wnt5a 欠損マウスを用いた解析では，野生型に比べ胆管細胞系譜へ分化決定された細胞数が増加し，胆管の管腔構造形成が促進されていた．肝幹・前駆細胞の分化誘導培養系においては，Wnt5a は，胆管様構造の形成を遅延させる一方で，肝細胞成熟化マーカーの発現上昇を誘導した．他臓器において Wnt5a 制御下にあることが既知である Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II（CaMKII）に着目すると，Wnt5a は胎仔肝臓の定常状態においてリン酸化 CaMKII を増加させており，CaMKII 活性の抑制により in vitro の胆管様構造の形成は有意に増大した．以上より，Wnt5a シグナルが胎仔肝幹・前駆細胞において胆管への分化を抑制することが示された．さらに Wnt5a シグナルに制御される CaMKII 活性が胆管への分化を抑制することが示唆された．

〈緒言〉

肝幹細胞は，肝細胞と胆管上皮細胞への二方向性の分化能を有し，自己複製能をもつ細胞として定義され，前駆細胞は高い増殖能をも肝細胞と胆管上皮細胞へ分化する細胞と定義される．肝幹・前駆細胞は肝臓の臓器形成に主たる役割を担う重要な細胞であるが，肝幹・前駆細胞の分化・増殖にかかわる分子メカニズムは，未だ不明な点が多い．Wnt ファミリーは，多種の幹細胞の分化，増殖，自己複製に関与する分泌タンパクで，細胞表面のレセプターである Frizzled ファミリーに結合して機能を発現する．Wnt 下流経路は，機能的な側面から βcatenin 依存性経路である canonical Wnt 経路と βcatenin 非依存性の non-canonical Wnt 経路に分類される．Canonical Wnt 経路は，肝幹・前駆細胞の増殖，生存に関与すると報告されている一方で，non-canonical Wnt 経路の肝臓における生理的な機能は全く不明である．Non-canonical Wnt 経路の代表的なリガンドである Wnt5a の欠損マウスは，体幹構造，肺の形成，腸管形成の異常が報告されている．また Wnt5a は，血液，間葉系，神経の幹細胞の分化に関与しているとの報告がある．一方，Wnt5a は成体マウス肝臓の肝細胞および胆管上皮細胞で発現しており，肝臓においてもなんらかの機能をもつと予想されるが，Wnt5a およびその下流経路の生理的機能は全くわかっていない．本研究では，マウス胎仔肝幹・前駆細胞における Wnt5a およびその下流経路の機能について解析を行った．

〈方法〉

発生過程の肝臓及び E14.5 肝幹・前駆細胞において，Wnt5a 及びレセプターの Frizzled の発現を解析した．Wnt5a 欠損マウスは出生直後に死亡するため胎生期肝臓を用いてその形質を解析した．野生型マウス胎仔肝臓から初代肝幹・前駆細胞を分離，培養し，胆管細胞分化誘導系及び肝細胞分化誘導系において Wnt5a の効果を検討した．肝前駆細胞株（HPPL）を用いた胆管分化モデルで，Wnt5a の機能を解析した．最後に，下流分子の解析として肝前駆細胞株（HPPL）を用いた胆管分化モデルを用いて Wnt5a の候補となる下流分子の解析を行ない，そのリン酸化蛋白に関して検討した．

〈結果〉

胎生中期から新生児期の肝臓では Wnt5a の発現は発生の進行に伴い徐々に増加していた．E14.5 肝臓において構成する各種の細胞を FACS によって分画し，定量 PCR によって解析したところ，肝幹/前駆細胞，間葉系細胞，中皮細胞，内皮細胞，血球細胞の全てにおいて Wnt5a の発現を認め，間葉系細胞において他の細胞種よりも有意に発現レベルが高いことがわかった．E14.5 肝幹・前駆細胞では，レセプター分子である Frizzeld の発現を認めた．

Wnt5a 欠損マウス肝臓での解析では，E16.5 において，定量 PCR において胆管細胞マーカーである Sox9 および Notch 経路において働く Notch1, Notch2, Jagged1 の発現が Wnt5a 欠損マウスで有意に増加し，胆管細胞系譜へ分化決定された HNF1b＋HNF4a-細胞数が野生型と比較し有意に増加していた．E18.5 においては，HNF1b＋HNF4a-細胞または CK19 陽性細胞により形成される胆管原基（Primitive ductal structure）の数が Wnt5a 欠損マウスで有意に増加し，Wnt5a 欠損マウスにおいて胆管の管腔構造形成が促進することが示された．

E14.5 初代肝幹・前駆細胞を用いた胆管細胞系譜への分化誘導培養系においては，Wnt5a 添加により CK19 陽性細胞で形成される branching structure を呈する胆管様コロニーの形成遅延を認めた．さらに肝前駆細胞株（HPPL）を用いた胆管分化モデルにおいても同様に，Wnt5a 添加により，HPPL により形成された胆管様 cyst の数と径が有意に減少し，Wnt5a 添加が胆管様構造の形成を抑制することが示された．Wnt5a を添加して形成された胆管様コロニーの細胞を回収し，定量 PCR にて解析したところ，胆管の運命決定に関わる HNF1β 及び，胆管細胞の物質輸送にかかわるポンプ機能分子の 1 つである multidrug resistance associated protein3（MRP3）の発現が有意に低下していた．また同じ系において Wnt5a 中和抗体を添加したところ，Wnt5a 投与と反対に胆管様構造の数を増加させた．加えて E14.5 初代肝幹・前駆細胞を用いた肝細胞への分化誘導培養系では，Wnt5a を添加すると肝細胞成熟化マーカーの発現上昇を認めた．

Wnt5a が制御する分子として他臓器で報告される分子を候補とし，マウス肝幹・前駆細胞においてどの分子が Wnt5a の制御下にあるかを検討するため，HPPL を用いた胆管分化モデルを用いてこれら候補分子の阻害剤の効果を検討した．その結果，CaMKII 阻害剤のみが，胆管様 Cyst の数と径を有意に増大させた．CaMKII 阻害剤を添加して形成された胆管様 cyst の細胞を回収し，定量 PCR に

て解析したところ，MRP3 の発現は有意に上昇した．

CaMKII について，活性化状態であることを示すリン酸化タンパクの存在を解析したところ，胎仔肝幹・前駆細胞においてリン酸化 CaMKII は検出された．HPPL に Wnt5a を添加すると，リン酸化 CaMKII は Wnt5a 添加により量的に増大した．さらに Wnt5a 欠損マウスの E16.5 肝臓において p-CaMKII のタンパクレベルは，野生型と比較して低下していた．以上より胎仔肝臓においては CaMKII のリン酸化が Wnt5a 依存的なシグナルにより調節されていることが示唆された．

〈考察〉

本研究において，肝幹・前駆細胞の分化において Wnt5a が胆管形成に抑制的に作用することが示され，Non-canonical Wnt 経路の肝臓における生理的機能の 1 つが初めて明らかになった．肝内胆管の発生は，肝幹・前駆細胞から胆管細胞系譜へ分化決定される段階（運命決定）と運命決定された細胞が肝内胆管の原基となる管腔を形成する「形態形成」の二段階で進むことが提唱されている．本研究において Wnt5a 欠損マウス肝臓において Sox9 の発現レベルが上昇し，免疫染色において HNF1b 陽性細胞数が増加していたこと，また初代肝幹・前駆細胞培養系において Wnt5a 添加により胆管分化が遅延し肝細胞分化が促進されたことから，Wnt5a が肝幹・前駆細胞の分化の運命決定に作用することが示唆された．

CaMKII は，ほぼ全ての臓器で発現するタンパク質であり，神経細胞において重要な機能をもつ．骨髄においては Wnt5a-CaMKII 経路は間葉系幹細胞に対して，脂肪細胞形成を抑制する一方で骨形成を促進することが報告されている．肝臓における CaMKII の機能に関してはこれまで報告がないが，本研究では，Wnt5a 制御下に肝幹・前駆細胞の胆管分化の抑制に寄与することが示唆された．CaMKII の下流としてどの分子が機能しているのか不明であるが，他臓器において Nemo-like kinase を介して canonical Wnt 経路を抑制することが知られており，肝幹・前駆細胞においても Wnt5a-CaMKII 経路が canonical Wnt 経路の抑制を介して胆管形成を抑制している可能性が考えられた．一方で骨髄の間葉系幹細胞においては Wnt5a-CaMKII 経路は canonical Wnt 経路の抑制を介さず，独自の経路により骨形成促進に機能していることが示されており，肝幹・前駆細胞における Wnt5a-CaMKII の下流経路の解析にあたり今後さらなる研究が必要と考えられた．

〈結論〉

Wnt5a シグナルが胎仔肝幹・前駆細胞から胆管細胞への分化を抑制することが示された．さらに Wnt5a 経路により調節される CaMKII の活性が胆管細胞への分化を抑制することが示唆された．

藤森　喜毅 博士（医学）　Yoshitaka　Fujimori

学位記番号　／甲第 1937 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）器官システム制御学系専攻

学位論文　　／Prognostic value of RKIP and p-ERK in gastric cancer（胃癌における RKIP と p-ERK の発現の予後的意義に関する研究）

Journal of Experimetal & Clinical Cancer Research　第 31 巻第 30 号　平成 24 年 3 月 online 発表

論文審査委員／主査：河野　辰幸　　副査：仁科　博史　　副査：中村　正孝

〈論文要旨〉

細胞内シグナル伝達系の Mitogen-activated protein kinase（MAPK）経路は腫瘍の進展のいくつかの段階に関わっており，重要な抗腫瘍治療薬の対象として考えられている．われわれは胃癌について，この経路におけるそれぞれのタンパク，すなわち extracellular signal-regulated kinase（ERK），ERK の上流の mitogen-activated protein kinase（MEK），Raf kinase inhibitor protein（RKIP）の発現を調べ，臨床病理学的特徴および予後との関係を解析した．

腫瘍の標本は，根治的胃切除術がおこなわれた胃腺癌の 105 人の患者から得られた．免疫組織学染色をおこないリン酸化 ERK（p-ERK），リン酸化 MEK（p-MEK），RKIP の発現を評価した．

RKIP は 69 例（66%），p-MEK は 54 例（51%），p-ERK は 64 例（61%）の症例で高い発現がみられた．RKIP の発現は深達度，リンパ節転移，および UICC の進行度病期と有意に逆相関を示していた（それぞれ p<0.001, p = 0.028, p = 0.007）．また，RKIP の発現は Relapse-free survival（RFS）と有意に相関を示した（p = 0.0033）．一方で p-MEK は予後との相関は示さなかった（p = 0.79）．有意差はなかったが，p-ERK が陽性の症例は発現陰性の症例よりも RFS が短縮していた（p = 0.054）．p-ERK が陽性かつ RKIP が陰性である症例群は RFS が有意に短縮していた（p<0.001）．RKIP と p-ERK の発現の組み合わせは独立した予後因子であった（ハザード比 2.4, 95% 信頼区間 1.3 − 4.6, p = 0.008）．

胃癌において RKIP 発現陰性かつ p-ERK 発現陽性の組み合わせは，予後に関して独立した規定因子であることが示唆された．

〈背景〉

胃癌は世界的にも死因の上位にあり，局所の進行や転移病変のある例では抗癌剤治療を施しても依然として予後がよくない．モノクローナル抗体のトラスツズマブは胃癌に対して有効とされるが，標的になる human epidermal growth factor receptor 2（HER 2）が発現しているのは 22% ほどとされる．セリン／スレオニンキナーゼである MAPK は外的刺激に応じて活性化する．ERK は MAPK のサブクラスのひとつであるが，MAPK 経路の活性化の過程で上流のリン酸化酵素である MEK によりリン酸化を受けて活性化し，核内へ移行して転写因子などを賦活化させる．ERK はさまざまな細胞内プロセス，すなわち増殖，分化，アポトーシス，転移などに関わっているとされる．RKIP は MEK をリン酸化する Raf-1 の働きを抑制することで，MAPK 経路に抑制的に作用する．アルツハイマー病やパーキンソン病あるいは ALS などの神経変性疾患で MAPK 経路に異常をきたすことが知られているが，ヒトの癌でも同様で，その多くは MAPK 経路のうち Ras あるいは B-Raf の mutation がおこっていることが知られている．

この研究では，MAPK 経路の最終産物である p-ERK および経路の上流の p-MEK および RKIP の発現と，臨床病理学的因子や予後との関連を調べることを目的とした．

〈方法〉

東京医科歯科大学腫瘍外科で 2004 年から 2007 年の間に根治的手術が行なわれた症例のうち検体が得られた 105 の症例を対象とした．すべての患者は UICC により定められた TNM 分類で病期が評価され，手術後再発に関しては腫瘍マーカー，CT，超音波，MRI などの画像診断を施行して定期的に経過観察がなされた．術前化学療法が行なわれた患者は含まれない．平均観察期間は 55 ヶ月（37 − 84）．45 人の患者に再発がみられた（43%）．また 40 人（38%）が胃癌に関連して死亡した．

免疫組織化学染色をおこなって発現の解析をした．それぞれのタンパクに対する抗体は市販されているものを用いた．細胞質の染色と，核の染色は別々に評価した．染色の強度 intnsity は 0〜3 の 4 段階，染色の範囲 extent も 0〜3 の 4 段階にわけて，それぞれを乗算して 4 以上のスコアの症例を陽性とした．核の染色については 20% 以上の発現を陽性，それ未満を陰性とした．RKIP と p-MEK は細胞質の染色を，p-ERK は核の染色について評価をした．統計解析は SPSS を用いた．RFS の評価には Kaplan-Meier curve をもちいて，log-rank-test で検定した．予後因子の規定については Multivariate Cox proportional-hazards regression model にておこなった．

〈結果〉

RKIP, p-MEK, p-ERK はそれぞれ 69 例（66%），54 例（51%），64 例（61%）で発現陽性となった（Fig. 1A - C）．正常胃粘膜においては p-ERK および p-MEK の発現はみられなかった．RKIP の発現と p-ERK の発現には相関が見られなかったが（p = 0.98），p-MEK と RKIP（p = 0.042），p-MEK と p-ERK（p = 0.042）の間には相関がみられた（Table 1）．RKIP の発現は，深達度（p = 0.007），リンパ節転移（p = 0.028），病期の進行（p = 0.007）と逆相関を示した．RKIP は diffuse type よりも intestinal type の組織型の胃癌に発現している傾向があった（p = 0.042）．p-ERK と p-MEK の発現は性差があったが（p = 0.027, p = 0.036），他の臨床病理学的因子については有意差がみられなかった（Table 2）．

RKIP 発現が陽性の群では有意に RFS が延長していた（p = 0.003）．一方で，p-MEK が陽性の群ではそうではなかった（p = 0.79）．p-ERK が陽性の群では，有意差はみられなかったが RFS が短縮している傾向がみられた（p = 0.054）（Table 3）．p-ERK 発現陽性かつ RKIP 発現陰性の群では有意に RFS が短縮していた（p<0.001）（Fig 2）．多変量解析にて RKIP 陰性かつ p-ERK 陽性のであることは有意な独立予後因子として規定された（ハザード比（HR）2.4, 95% 信頼区間（95%CI）1.3 − 4.6, p = 0.008）．また，組織学的分類および深達度がそれぞれ有意な独立予後因子となった（それぞれ HR 2.1, 95% CI,1.0 − 4.2, p = 0.043 HR 4.7, 95% CI 1.0 − 22, p = 0.048）（Table 3）．

〈考察〉

本研究において，RKIP の発現低下と ERK の過剰発現が胃癌の進展に関わっていることを示した．ヒトの癌においては，RKIP お

よび MEK と ERK の発現についてそれぞれの相関について論じた研究は少数のみである．RKIP の欠失は MEK と ERK の過剰発現を引き起こすとは考えられるが，今回これを証明するには至らなかった．ヒトの乳癌あるいは大腸癌においては転移病変で RKIP の発現が低下しているとの報告がある．また，RKIP 発現はリンパ節転移では欠失しているが，原発巣では欠失していないとも報告がある．このことは転移が進む段階で RKIP 作用が抑制している可能性が示唆される．GIST の症例では RKIP の発現が臨床病理学的因子と関係しており，RKIP の発現が低下していると生存率が低いという報告がある．また，胃癌に関しても，正常胃粘膜組織に比較すると胃癌組織では RKIP 発現が低下していて，さらに細胞質の RKIP 発現が低いと胃癌患者の生存率が有意に低いという結果も報告されている．われわれが得た結果もこれらに一致するものであった．細胞質の RKIP 発現について，は intestinal type の胃癌では，発現陽性であれば生存率が高いという相関があったが，diffuse type だと相関がないということも報告されている．

MAPK 経路，STAT3 の経路，PI3K/AKT/mTOR 経路などの細胞内シグナル伝達経路は，さまざまな細胞過程を制御するものであり，それぞれの経路は概念としては独立している系であるが，MAPK 経路との間で互いに作用している部分もかなりある．これらの経路のうちでも MAPK は細胞成長因子に反応して細胞の生存や寿命，細胞浸潤などを調節する中心的な役割を果たしていると考えられており，その最終産物の ERK は胃癌の症例においても臨床的病理学的因子のうち癌の進展，転移，予後などに関連しているとされている．すなわち，ERK の発現は胃癌の組織では過剰に発現しており，漿膜浸潤などの深達度，リンパ節転移，TNM 病期分類などと相関するものであるとされている．しかし一方では，MAPK の活性化は胃癌においては比較的抑制されているという研究結果もみられる．本研究では，p-ERK の発現は予後とは相関しないという結果であった．しかし p-ERK や p-MEK の発現は腫瘍細胞では比較的高い頻度で観察された．p-MEK の発現は，p-ERK の発現と相関していたが，p-ERK も p-MEK もどちらも腫瘍進展あるいは生存率などの予後などの因子には関連がみいだせなかった．他の研究でも同様に MEK の発現は癌患者の予後には関連しないとするものがある．

多くの正もしくは負の刺激を受ける複雑な MAPK 経路において，ERK の活性化は protein tyrosine phosphatase（PTP）や他のリン酸化酵素などにより抑制される．その結果，ERK は必ずしも上流の MEK が活性化したときのみに活性化をするものではないといえる．p-MEK の局在が腫瘍の進展にとって重要であると推定する．ERK は細胞内シグナル伝達経路において細胞外の刺激を細胞表面から核に転送する分子であるからである．加えて，p-ERK の細胞質の発現は生存率には関与しなかったということもその推定の理由のひとつである．

ERK あるいは MEK の活性化は Raf-1 や RAS などの一連の protein kinase の活性化によって起こる．ヒトの癌のおおよそ 30% は RAS 遺伝子の mutation がおこっているとされる．とくに KRAS mutation は最も頻繁におこりうる遺伝子異常であり，膵癌，結腸癌，肺癌などでは高率にみられる．対照的に，胃癌においては RAS mutation はあまり高率にはおこっておらず，RAS シグナル伝達の活性化には他の機序が関与していることが示唆される．また，B-RAF mutation についても，メラノーマや甲状腺癌，卵巣癌などの限られた癌でのみみられていると報告されている．今回の研究においては，MEK, ERK, RKIP などの伝達経路のより下流のタンパクに焦点をおき，RAS や RAF の発現については評価をしていない．われわれは以前に RAS/RAF/MAPK あるいは他のチロシンキナーゼ経路の上流の HER1 および HER3 の発現が胃癌において高率に発現し，かつ発現が高いと生存率が低いという研究結果を示した．加えて PI3K/AKT/mTOR 経路の m-TOR の発現が胃癌の予後に関わるという結果を示した．これらの結果からは，チロシンキナーゼを含むシグナル伝達経路は胃癌の浸潤，転移，予後に密接に関わっているようであるが，これらの経路を対象として抑制する抗腫瘍薬としては HER2 antagonist のトラスツズマブ以外には臨床的には有用化されていない．ERK のような伝達経路の下流にある分子が，進行した胃癌あるいは転移性病変のある胃癌における抗癌剤療法の標的になりうると考えられる．MEK inhibitor や Raf inhibitor のような MAPK 経路でのさまざまな段階での抑制する治療薬については臨床試験がおこなわれているが，直接に ERK の作用を抑制するような治療剤はいまだに評価されていない．

〈結論〉

胃癌において，RKIP の発現低下は腫瘍の進展および予後の低下に関わり，さらに RKIP 発現陰性かつ p-ERK 発現陽性であることは有意な独立予後因子となりえた．MAPK 経路を抑制することが胃癌の治療において重要な意義をもつことが示唆された．

片山　有紀 博士（医学）　Yuki　Katayama

学位記番号　／甲第 1938 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系専攻

学位論文　　／Identification of pathogenesis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma by expression profiling（発現プロファイリングによる肝細胞癌における様々な疾患発生に関するマイクロ RNA の同定）
Oncology Letters　第 4 巻第 4 号　817‒823 頁　平成 24 年 10 月発表

論文審査委員／主査：三木　義男　　副査：木村　彰方　　副査：杉原　健一

〈論文要旨〉

肝細胞癌は，肝臓に発生する悪性腫瘍では最も頻度が高く，外科手術後でも再発が起こりやすいため 5 年生存率が低い．肝細胞癌の分子的メカニズムに関しては，mRNA やタンパク質の解析だけでなく，近年ではマイクロ RNA（miRNA）の発現レベルについても報告が増えつつある．しかし，さまざまな臨床病理学的特徴をもつ肝細胞癌症例において，癌部組織，その周辺の非癌部組織，さらには正常肝組織のサンプルを用いて網羅的に miRNA の発現を調べた研究はまだ行われていない．本研究において，我々は肝細胞癌 40 症例の癌部組織およびその周辺の非癌部組織，さらに 6 症例の転移性肝癌症例の周辺正常肝組織から抽出した miRNA の発現を解析した．それぞれの病因について特異的な miRNA を同定するため，我々はさまざまな組み合わせで miRNA 発現プロファイルを網羅的に比較した．その結果，C 型肝炎ウイルスに感染している症例では，B 型肝炎ウイルスに感染している症例やウイルスに感染していない症例と比較して，既知のものだけでなく新規の miRNA についての発現変化が見いだされた．そのほかにも，慢性肝疾患に関わる miR-18b* や miR-296‒5p，肝発癌に関わる miR-129* や miR-146b-3p など，新規の miRNA 群を同定した．

〈緒言〉

肝細胞癌は肝臓に発生する悪性腫瘍のひとつであり，東アジアでは部位別癌死亡率第 3 位である．肝細胞癌の 85% 以上が B 型肝炎ウイルスあるいは C 型肝炎ウイルスによる感染が原因といわれており，その他の原因としてはアフラトキシン暴露，塩化ビニル，タバコ，慢性アルコール摂取などがあげられる．これらの多くは肝炎や肝硬変の原因としても知られており，肝硬変は肝細胞癌の前腫瘍状態とも表現される．遠隔転移がない場合は外科的手術は効果的であるが，外科手術後の再発や肝内転移が発生する確率が高く 5 年生存率は 30〜40% と低い．

マイクロ RNA（miRNA）は細胞内に存在する，19〜25 塩基の短い 1 本鎖 RNA の一種であり，70〜100 塩基の miRNA 前駆体から切り出されてできる．miRNA は転写あるいは翻訳のレベルで他の遺伝子の発現を調節する機能を有すると考えられている．最近の報告によると，癌組織におけるマイクロアレイを用いた miRNA 発現プロファイリングにより，乳癌，肺癌，膵臓癌，肝細胞癌に関する miRNA が見つかっている．

肝細胞癌の miRNA 発現プロファイリングを最初に報告したのは Murakami ら（Oncogene, 2006）である．彼らは，肝細胞癌と非癌部組織での miRNA 発現を網羅的に分析し，癌部組織（高分化癌・中分化癌・低分化癌）と非癌部組織，さらに肝炎や肝硬変由来サンプルとの発現パターンを比較した．その報告以降，いろいろなグループが肝細胞癌組織とその周りの非癌部組織での miRNA 発現を調べており，Ladeiro ら（Hepatology, 2008）は正常肝組織を含めたさまざまな臨床病態の肝細胞癌症例に関する miRNA プロファイル解析を報告している．しかしながら，彼らの比較では肝細胞癌組織周辺の非癌部組織由来のサンプルを用いた解析は行われていない．Ura ら（Hepatology, 2009）は肝細胞癌組織において B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス感染を伴ったサンプルに関して miRNA 発現の比較を行っている．しかし，彼らの比較では正常肝組織由来のサンプルを用いた比較やウイルス感染していない症例由来のサンプルを用いた比較がなされていなかった．このように，さまざまな臨床病態の肝細胞癌症例に関して，癌部とその周辺の非癌部組織および正常肝組織について網羅的に miRNA 発現を比較している報告がこれまでになかったため，本研究では我々は病因の異なる肝細胞癌 40 症例の癌部組織およびその周辺の非癌部組織，さらに 6 症例の転移性肝癌症例の周辺組織（それらを正常肝組織として扱う）から抽出した miRNA の発現を調べた．それぞれの臨床病態について特異的な miRNA を同定するため，我々はさまざまな組み合わせで miRNA 発現プロファイルを網羅的に比較した．

〈材料と方法〉

臨床検体

2005 年 11 月から 2008 年 5 月にかけて東京医科歯科大学医学部付属病院肝胆膵・総合外科にて外科的手術されインフォームドコンセントの得られた，肝細胞癌 40 症例と転移性肝癌 6 症例の肝臓組織を用いた．肝細胞癌 40 症例のうち 12 症例が B 型肝炎ウイルス感染，12 症例が C 型肝炎ウイルス感染，16 症例がウイルス感染していない症例である．正常肝組織由来の 6 サンプルは原発巣が大腸の転移性肝癌症例で，コントロールとして使用した．すべての検体は液体窒素で凍結保存し，サンプルは分析を行うまで −80℃ で保存した．

RNA 抽出

組織検体からの miRNA の抽出は，miRNeasy Mini Kit（Qiagen 社）を用いて行った．抽出した RNA の濃度は，NanoDrop ND-1000 を用いて測定した．さらに，Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay を用いて RNA の品質確認を行い，RNA Integrity Number（RIN）>4.0 の品質のものを以後の分析に用いた．その後，3D-GenemiRNA マイクロアレイ（東レ社）による発現解析を行い，GenePix 4000B でスキャンし画像分析した．

統計学的分析

マイクロアレイデータのバックグラウンド補正を行った後，統計学的解析には統計処理ソフトウェア R を用いた．癌部組織と非癌部組織との間で 5 通りのウィルコクソンの符号付き順位検定（ペアード解析）を行い，miRNA 発現の比較を行った．さらに正常肝組織由来の 6 サンプルでの miRNA 発現を用いて 8 通りのウィルコクソンの順位和検定（アンペアード解析）を行い，miRNA 発現の比較を行った．$p<0.05$ かつ fold change（FC）>1.5 を満たす miRNA を，有意な発現変動を示すものとして抽出した．また，これらの 13 通りの比較をさらに組み合わせ，miRNA 発現を比較検討した．

〈結果〉

13 通りの比較のうち，一例として全ての肝細胞癌症例由来の 40 サンプルと正常肝組織由来の 6 サンプルの miRNA 発現を比較したときに発現変動のある miRNA を解析したところ，癌部では 18 の miRNA が亢進，33 の miRNA が抑制を示していた．亢進していた 18 の miRNA のほとんどは，すでに肝細胞癌や他の癌との関連が報告されていた．たとえば miR-15b は肝細胞癌で亢進しており，miR-18a はエストロゲンレセプター ESR1 の mRNA を標的にするため肝細胞癌の細胞を増殖させる一因となることが知られている．また，miR-21 は肝細胞癌で非常に強く発現していることが知られており，そのターゲット遺伝子についての報告もある．一方，癌部で抑制されている miRNA について既知の報告との共通性が少なく，大部分が新規の miRNA であった．

また，miR-2116* は，正常肝に対して癌部・非癌部のいずれにおいても著しく低下していた．したがって，miR-2116* は肝細胞癌における癌抑制 miRNA として重要な役割を担っているものと考えられる．

〈考察〉

miR-30d, miR-124, miR-200b, miR-378 などの miRNA については既に癌との関連が報告されていたが，本研究により非癌部組織でも発現変動を示していることが新たに分かった．すなわち，前癌病変である慢性肝疾患や肝硬変の状態からすでに発現が変化していることが示唆される．また，ウイルス因子を中心としたさまざまな条件の miRNA を解析し，さらに正常肝組織由来のサンプルとの比較も行ったことにより，複数の条件の組み合わせにより特異的に発現変動を示す miRNA の候補を示すことができた．

さらに，miR-2116* の発現は，正常肝と比較すると非癌部でも減少しているため，この miRNA は発がんの初期段階での癌抑制機能の消失に関わっている可能性がある．今後，これらの miRNA のバリデーション研究を行うことにより，臨床における有用性を確認することで，肝細胞癌の早期発見や新規治療法の開発などに応用していくことが期待される．

〈結論〉

本研究で見出した miR-2116*，miR-18b, miR-296-5p, miR-557, miR-581, miR-625, miR-1228, miR-1249 は，肝硬変の新しいバイオマーカーの候補となることが期待される．また，ウイルス感染に関係ない肝細胞癌および C 型肝炎ウイルス感染を伴った肝細胞癌の新しいバイオマーカーの候補もいくつか同定することができた．このように miRNA 発現プロファイリングにより，我々は肝細胞癌において条件特異的なバイオマーカーとしての利用が期待できる miRNA を見つけることができた．

野上　ひろみ 博士（医学）　Hiromi　Nogami　Matsumae

学位記番号　／甲第 1939 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日
研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系専攻
学位論文　／A methodical microarray design enables surveying of expression of a broader range of genes in Ciona intestinalis
（カタユウレイボヤにおける，大規模な遺伝子発現解析を可能とするマイクロアレイの開発に関する研究）
Gene　doi: 10.1016/j.gene.2013.01.042.　平成 25 年 2 月 online 発表
論文審査委員／主査：稲澤　譲治　　副査：石野　史敏　　副査：村松　正明

〈論文要旨〉

［要旨］
今回，我々は，脊索動物であるカタユウレイボヤのオリゴマイクロアレイを新規に開発した．このチップには，106,285 プローブが配列されており，従来のホヤのマイクロアレイの二倍以上のサイズである．このチップは，ホヤの最新の遺伝子モデルである KH モデルの 99.2% と，KH モデルに含まれない UniGene の配列データの 81.1% を含んでいる．この新しいアレイについて，旧バージョンのマイクロアレイと発現を比較したところ，共通に配列されている遺伝子の発現は異なるチップ間でも高い相関を示していた．また，組織別の発現解析を行ったところ，いずれの組織においても，既知の組織特異的な遺伝子や恒常発現遺伝子が抽出でき，このチップの精度は保証された．さらに，この新しいマイクロアレイは，従来プローブ設計の際に重視されていなかった，機能未知の遺伝子などもカバーしており，そうした遺伝子が数多く高発現していることが分かった．したがって，このマイクロアレイは，カタユウレイボヤを使った研究の幅を広げる上で，有用であることが示唆された．

［背景］
マイクロアレイは，ゲノムワイドな遺伝子発現解析において重要な技術である．通常の遺伝子発現解析に加え，SNPs やコピー数多型などの集団遺伝解析，DNA とタンパク質の相互作用の解析，エピジェネティクスなどに応用され，その利用分野は医学から進化生物学に渡る．それに伴い，ユーザが自由にデザインできるカスタムアレイなど幅広い形態のマイクロアレイが開発された結果，高精度で低価格なプラットフォームが実現している．さらにマイクロアレイデータの統計的な解析方法が次々に開発されている．このような状況で，非モデル生物においても，カスタムアレイが容易にデザインできる時代になっている．
脊椎動物の姉妹群にあたる尾索動物のカタユウレイボヤは，脊椎動物の進化を探る上で重要な位置を占めており，特に進化発生学の立場からよく研究されてきた．その結果，2002 年に，前年のヒトゲノムに続いて，脊椎動物とそれ以前に解読されていた無脊椎動物とのミッシングリングを繋ぐ存在として，カタユウレイボヤのドラフトゲノムが解読された．純系の確立していない動物としては極めて早い時期にゲノムが解読されたことがあり，カタユウレイボヤの分子生物学的な手法やリソースの開発は進んでいる．例えば，染色体マップ，大量の EST と cDNA リソースなどが挙げられる．そして 2008 年には従来の遺伝子モデルに対して，実験的に確かめられた精度の高い遺伝子モデル（KH モデル）がリリースされた．カタユウレイボヤのマイクロアレイは，cDNA マイクロアレイから oligo マイクロアレイまで，何度か開発されてきたが，新しい KH モデルに準拠していなかったため，新規に解析する上で不便であった．そこで今回我々は，この KH モデルを基にしたカタユウレイボヤのマイクロアレイを新規に作成し，その発現データの検証と解析を行った．なお，この研究は，沖縄科学技術大学院大学マリンゲノミクスユニットおよびゲノムシーケンシングセンターとの共同研究である．

［マイクロアレイデザイン］
以前のカタユウレイボヤのマイクロアレイは Agilent Technologies 社の 44,000（44k）プローブを配列できるアレイを利用していたが，今回は 135,000（135k）プローブが配列できる Roche 社 NimbleGen のプラットフォームを用いた．このマイクロアレイに，カタユイレイボヤの 29,415 の転写産物配列から，106,285（約 106k）のプローブを設計した．この 29,415 の転写産物配列は，KH モデルの全転写産物のうち 99.2% に相当する 23,842 転写産物と，KH モデルに含まれない UniGene の 5,573 配列という二種類の遺伝子モデルを含んでいる．UniGene は，KH モデルに含まれないような遺伝子配列のみ，今回のデザインに含めた．これらの 106k のプローブは，ターゲットとなる配列やデザイン方法の違いにより，5 種類（CKH, KH（u）, KH（l）, KH（n）, UG）に分けた．このうち，CKH は検証用のコントロール配列として用い，残りの 4 グループは発現解析用の配列とした．
まず，CKH のプローブは，プローブが転写産物の 3' 末端から遠ざかるとシグナル強度が弱まるバイアスを調べる目的で設計した．CKH には，過去の 44k のマイクロアレイの結果から，さまざまな組織や臓器で恒常的に発現している遺伝子のプローブを設計した．また，今回我々は，逆転写の際に oligodT プライマーとランダムプライマーの混合物を用いたため，配列の全長にわたってシグナル強度が一定であるかどうかをこのエリアのプローブを用いて調べた．通常，プローブは，3' 末端から 1000〜1500 bp 以内に設計するが，前述の目的のため CKH のプローブについては，転写産物の全長からまんべんなく設計した．
次に，KH モデルと UniGene からプローブを設計した（手法）．KH モデルの転写産物内で完全にユニークなプローブ配列を設計したところ，37,635 のプローブを，13,597 転写産物について設計でき，これは KH（u）とした．次に各転写産物のうち，同じ遺伝子座由来の転写産物をアラインメントし，遺伝子座毎に保存された領域の中から，遺伝子座特異的なプローブを設計した．この結果，複数の転写産物を含む遺伝子座は 4,360 あり，これらに 43,272 のプローブを設計し，これらを KH（l）と名付けた．KH（u）と KH（l）ではカバーされない転写産物については，非特異的プローブを設計した．KH モデルに含まれない UniGene の 7,334 配列についても，KH（u）と同様に各遺伝子に特異的なプローブを設計したところ，81.1% にあたる 5,573 配列について，30,774 プローブを設計できた（UG）．

［マイクロアレイの検証］
デザインしたマイクロアレイの検証は，ホヤの成体から卵巣と神経複合体（中枢神経系）の 2 つの組織を用い，1 個体毎に組織別 RNA を抽出した．直接 135k と 44k を比較するため，44k についても 135k で用いたサンプルと同じ RNA を利用して解析を行った．
まず，CKH について，3' 末端から 1500bp 以内と，1500bp 以降のプローブにわけ，同じ標的転写産物の発現量を比較したところ，ほぼ一定であることが示された．

次に，過去の44kとの整合性を調べるために，44kのプローブの中からKHモデルに相当するものを選び出し，135kと44kの間の発現量を比較した．その結果，44k全体と135k全体で発現量の順位相関係数を調べたところ，0.67以上の相関が見られた．この結果から，異なるプラットフォームで異なるプローブであっても，遺伝子発現データは一定の割合で相関することが分かった．

次に，135kで新しく設計されたプローブを検証するべく，135kにおいて組織別の発現解析を行った．統計的手法（RankProducts,手法）を用いて2つの組織間で有意な発現差がある遺伝子のリストを抽出した．すると，卵巣や神経複合体いずれにおいても，既知の組織特異的な遺伝子が抽出された．また，いくつかの神経特異的な遺伝子が卵巣においても高発現していた．これは一般に卵では多くの遺伝子が発現している傾向があるためだと考えられる．これらの結果から，このマイクロアレイは既知の遺伝子発現を網羅していることが分かった．

またKHモデルからデザインされたプローブに対して，UniGeneから得られたプローブの発現量は有意に低い傾向であることが示された．しかしながら，前述の組織別発現解析の中で，一部のUniGeneの配列が組織特異的，あるいは両方の組織で，有意に高い発現量を示していた．これらの結果から，KHモデルに含まれないUniGeneの遺伝子の中には，機能的に意味のある遺伝子が含まれていることが示唆された．

［まとめ］

このマイクロアレイは，進化的に保存された遺伝子から，KHモデルに含まれない遺伝子まで広範囲にわたって公平に設計してあるため，今後，ホヤを使った研究の新たなアプローチとして重要になると思われる．これまでは進化発生学の観点から，ホヤと脊椎動物との間で保存された発生に関わる遺伝子が注目されており，こうした遺伝子がマイクロアレイの開発でも重視されてきた．一方で，尾索動物の組織や生理現象における系統特異性を遺伝子発現レベルで調べた研究は少ないため，進化的に保存されていない遺伝子の研究こそが，脊索動物の分岐を検討する上で必要である．そのような研究においても，このマイクロアレイは威力を発揮すると考えられる．

［手法］

<u>プローブデザイン</u>

まず，プローブ候補となる60bpの配列をその遺伝子モデルに存在する全ての転写産物から作成し，その60bpの配列のユニーク性を配列検索プログラムであるBowtieを用いて調べた．得られた候補プローブについて，GC%や技術的な問題から設計できないプローブなどを除去するフィルタリングを行い，最終的にCKHを除くプローブでは，各転写産物の3' 末端から1500bp以内からプローブ配列を選択した．KH（u）とUGについては，各遺伝子モデル内でプローブがユニークであるものを最大で3プローブ選択した．

<u>サンプル</u>

今回，我々はナショナルバイオリソースセンターより提供された，日本産の性成熟をした成体カタユウレイボヤを用いた．解析には，卵巣と神経複合体を用いた．1個体由来の1組織毎にRNAを抽出し，135kには合計で8 replicateをとった．このうち2サンプルは44kでの解析にも用いた．Total RNAは，トライゾール処理，海産無脊椎動物に多く含まれる多糖類の除去のための高塩処理，そしてカラム精製を経て抽出した．

<u>マイクロアレイ実験</u>

Agilentマイクロアレイのためのラベリングと増幅には，200ngのtotal RNAからAgilent Technologies社のQuick Amp Labeling Kitを用いて行った．神経複合体から抽出可能なRNA量がNimbleGenのマイクロアレイ解析には不足していたため，全てのサンプルにおいて，30ngのtotal RNAからOvation Pico WTA system SL（NuGEN）を用いてRNA増幅を行った．マイクロアレイ実験は，AgilentおよびNimbleGenの公式プロトコルに従い行った．

<u>マイクロアレイ解析</u>

まず，マイクロアレイの前処理と正規化を行った．44kはRパッケージ，135kではNimbleScan（Roche）によって処理した．これらのデータは，NCBI GEOに登録した（GSE33498, GSE31902）．遺伝子発現解析は全てRのパッケージを用いて解析した．RankProductsは，Breitling et al.（2004）とJeffery et al.（2006）を参考にした．

村松　俊輔 博士（医学）　Shunsuke　Muramatsu

学位記番号　／甲第 1940 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）先端医療開発学系専攻

学位論文　／Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication（肝癌細胞の幹細胞性の可視化による生体内における腫瘍，宿主相互作用の重要性およびその臨床的意義の解明）
Hepatology　平成 25 年 2 月 online 発表

論文審査委員／主査：稲澤　譲治　　副査：北川　昌伸　　副査：渡邉　守

〈論文要旨〉

（要旨）

癌根治治療後の再発，遠隔転移の発症機序の一つとして癌幹細胞仮説が挙げられる．

根治治療後の癌幹細胞の残存が癌再発の原因とされ，癌幹細胞こそが癌治療の真の標的と考えられている．癌幹細胞研究は表面マーカーや SP 細胞を主体として行われていたが，分離後の階層的分化によって不均一な細胞集団となり癌幹細胞性が担保できないことや，表面マーカーが十分な生物学的意義の理解に基づいていないことが問題点となっていた．我々は幹細胞の特徴である，休眠性，低活性酸素に着目し，可視化することで肝癌癌幹細胞解析を行った．プロテアソーム活性，をリアルタイムに可視化することで肝癌細胞株内の癌幹細胞性の高い細胞を可視化し，分離する事が可能となった．プロテアソーム活性低下，細胞内活性酸素低下細胞が高い腫瘍造成能を有することを示した．遺伝子解析によって，肝癌の微小環境形成に関与する，癌幹細胞性の発現機序が示唆されたので報告する．

（緒言）

肝細胞癌（HCC）に対しては，根治的切除が第一の治療選択肢であるが，切除後の高い肝内再発率が予後不良の一因であり，術後の遠隔転移も難治性の原因の一つとされる．再発，遠隔転移の発症機序の一つとして癌幹細胞仮説がある．

癌組織には自己複製能，多分化能，腫瘍形成能，治療抵抗性を有する少数の癌幹細胞が内在しており，癌幹細胞は階層的に分化するとされる．癌幹細胞の残存が癌再発の原因とされ，癌治療の真の標的と考えられている．癌幹細胞研究は表面マーカーや SP 細胞を主体として行われていたが，分離抽出後の階層的分化によって不均一な細胞集団となり癌幹細胞性が担保できないことや，表面マーカーの十分な分子生物学的意義の理解に基づいていないことが問題点となっていた．

我々は幹細胞の特徴である，休眠性，低活性酸素に着目し，それを可視化し，HCC 癌幹細胞解析を行った．プロテアソームは多くの細胞機能の調整因子である．増殖，代謝が盛んである癌細胞はプロテアソーム活性が亢進状態にある，幹細胞は休眠状態にある細胞であり，プロテアソーム活性は低下している．乳癌においてプロテアソーム活性低下細胞に癌幹細胞様の特徴を認めたと報告されている．細胞内活性酸素種（ROS）は恒常性維持に必須だが，過剰の ROS は細胞障害や癌化にいたる遺伝子変異を引き起こすとされる．血液幹細胞では成熟細胞にくらべ細胞内 ROS 濃度は低く，それが幹細胞性の維持に必須であるとされる．乳癌幹細胞では細胞内 ROS 濃度が低いことが報告されている．

（方法）

HCC 細胞株にレトロウイルスを用いて 26S プロテアソームの認識部位であるデグロン部位のオルニチン脱炭酸酵素に緑色蛍光蛋白である Zs-green を導入した．プロテアソーム低下細胞内では緑色蛍光蛋白の蓄積がおこり，発光し，細胞内プロテアソーム活性が観察可能になった．

ミトコンドリア内スーパーオキシドインジケーターである，MitoSOXRed^{TM}（Invitrogen）を用いて細胞内 ROS を可視化した．

幹細胞性に関わる二つの細胞機能を可視化することで癌細胞株から癌幹細胞性の高い細胞株を抽出し，癌幹細胞性解析，網羅的遺伝子解析，マクロファージ走化能解析，腹膜転移能解析を行った．癌幹細胞の網羅的遺伝子解析によって導かれた幹細胞癌幹細胞特異的な遺伝子シグネチャーと臨床症例（2004 年から 2007 年の間に当院肝胆膵外科で幹細胞癌に対して根治切除術をおこなった 153 例の癌部，100 例の非癌部の遺伝子データ）との相関関係を解析した．

（結果）

HCC 細胞における緑色発光細胞比率は 0.4～1.7% をしめるのみだった．FACS を使用して緑色発光細胞（Gdeg^{high}）と非発光細胞（Gdeg^{low}）の分離を行った．分離された Gdeg^{high} をタイムラプス観察したところ，プロテアソーム活性低下細胞に癌幹細胞の特徴である多様性分化を示唆する非対称性分裂像が観察された．

プロテアソーム活性低下細胞内の ROS 濃度を MitoSOX RED を用いて可視化し，FACS にて測定した．unsorted 分画は ROS 陽性細胞比率が 48% で，Gdeg^{high} 分画は 18% であり，プロテアソーム活性低下細胞内にミトコンドリア内 ROS 濃度が低い分画が内在することが示された．（Gdeg^{high}ROS^{low} 分画）．また，癌幹細胞マーカーとして報告されている CD44 について解析したところ，unsorted 分画では 12.4% が CD44 陽性であったのに対して，Gdeg^{high}ROS^{low} 分画では 80.7% が CD44 陽性であった．

NOD/SCID マウスをもちいた皮下腫瘍モデルにて腫瘍造成能を評価した．Gdeg^{high}ROS^{low} 細胞は control 細胞に比べて高い腫瘍造成能を示した．Gdeg^{high}ROS^{low} 細胞は注入数 100 個でも腫瘍形成した．これを Limiting dilution analysis によって解析すると Gdeg^{high-}ROS^{low} 細胞では 2,083 個の細胞中に 1 個の癌幹細胞が，Control 細胞では 79,189 個の細胞中に 1 個癌幹細胞が認められることが示された（P 値＜$2.2x10^{16}$）．

FACS Aria Ⅱにて Gdeg^{high}ROS^{low}，Gdeg^{low}ROS^{high} 細胞を分離し，網羅的遺伝子解析を行った．癌幹細胞性の高い細胞群に特異的に発現増強した遺伝子シグネチャーが示された．Reactome データベースに基づく Gene set enrichment analysis（GSEA）によると，癌幹細胞性の高い Gdeg^{high}ROS^{low}HCC 細胞ではケモカイン，ケモカインレセプター関連遺伝子との相関関係が示された．

Gdeg^{high}ROS^{low}HCC 細胞ではケモカイン遺伝子群が発現亢進でいていることが示されたため，ヒトマクロファージ様細胞である RAW264 をもちいてマクロファージ走化性解析を行った．Gdeg^{high}ROS^{low}HCC 細胞では Gdeg^{low}ROS^{high}，control,medium に比べて RAW264 の走化性が有意に亢進していることが示された．

腫瘍細胞を NOD/SCID マウスに腹腔内注入し腹膜播種モデルを作成した．Gdeg^{high}ROS^{low} 細胞は control にくらべて腫瘍形成個数，

腫瘍重量において高値であった．腹膜播種モデルにおけるF4/80抗体の蛍光免疫染色によって腫瘍辺縁部のプロテアソーム活性低下細胞周囲にマウスマクロファージの誘導が観察された．

$Gdeg^{high}ROS^{low}$，$Gdeg^{low}ROS^{high}$HCC細胞における遺伝子発現変動の臨床症例における関連を当科におけるHCC切除症例の切除組織を用いて解析した．発現上昇遺伝子43セット，発現低下遺伝子96セットを同定した．二つの遺伝子シグネチャーを用いてGSEA解析をおこなったところ，HCC切除症例の非癌部における発現遺伝子と正の相関関係にあることが示された（$p=0.004$, $FDR=0.005$）．

次に，HCC切除患者を非癌部における発現上昇遺伝子43セットについての発現レベルに応じて，3群に分類した．3群は無再発生存期間において有意差を示した（$p=0.002$）．

（考察）

今回の研究では，幹細胞の休眠性を反映する低プロテアソーム活性を可視化することで，HCC細胞に多分化能，自己複製能を反映する非対称性分裂像を示す小集団が存在することを確認した．
またプロテアソーム活性低下細胞に，幹細胞の特徴である細胞内ROS濃度の低下が認められた．プロテアソーム活性低下，細胞内ROS低下分画に，マウス皮下腫瘍モデルにて高い腫瘍増性能を有するtumor initiating cellが高濃度で濃縮されていることが示された．

HCC幹細胞モデルの分子的機序を解析する為，網羅的遺伝子解析をおこなったところ，HCC幹細胞に特異的な遺伝子シグネチャーが示された．GSEA解析の結果，我々のHCC幹細胞モデルとケモカイン・ネットワークに有意な相関を認めた．ケモカインを含む炎症性メディエーターは，癌微小環境の重要な構成要素であるといわれている．癌細胞の産生物質が周囲に炎症性の微小環境変化をきたし，癌の進行や転移に影響をもたらすことは知られており，glioma initiating cellがケモカインを分泌することで腫瘍関連マクロファージを誘導し，ニッチを形成することや，癌転移ニッチに誘導されたマクロファージが転移巣形成に関与することが報告されている．

我々は，HCC幹細胞が，マクロファージの高い走化誘導性を示すことを見出した．マウス播種転移モデルにおいて，高い播種形成能を有し，組織免疫学的染色によって腫瘍辺縁に見られた癌幹細胞周囲に，マウスマクロファージの集積を認めた．癌幹細胞が周囲微小環境変化を誘導してmetastatic colonizationを促進することが報告がされており，我々がHCC幹細胞により形成された微小環境がmetastatic colonizationに関与する可能性を示したことは注目に値する．

HCC，肺腺癌において非癌部における遺伝子シグネチャーの変動が予後に関連し，非癌部における発癌ポテンシャルが微小環境の影響を受けることが報告されている．本研究において示した癌幹細胞特異的な遺伝子シグネチャーを用いて，HCC切除症例の非癌部遺伝子データを解析した．HCC幹細胞遺伝子シグネチャーが術後無再発生存率と有意な相関を示すことが示された．我々のHCC幹細胞モデルが，臨床症例においても重要であり，本システムの妥当性が示唆された．

（結論）

我々が用いた細胞機能を可視化した肝癌幹細胞モデルは，生体内微小環境変化解析に有用である．

大友　潔 博士（医学）　Kiyoshi Otomo

学位記番号　／甲第 1941 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）器官システム制御学系専攻

学位論文　　／Local unipolar and bipolar electrogram criteria for evaluating the transmurality of atrial　ablation lesions at different catheter orientations relative to the endocardial surface（心内膜面に対するさまざまなカテーテル角度において心房焼灼創の貫壁性を評価するための局所単極および双極電位クライテリア）
Heart Rhythm　第 7 巻第 9 号　1291-1300 頁　平成 22 年 9 月発表

論文審査委員／主査：古川　哲史　　副査：荒井　裕国　　副査：平尾　見三

〈論文要旨〉

焼灼中に貫壁性焼灼創（TL）が形成されたかどうかを認識することは重要である．研究目的は TL から様々なカテーテル角度において記録される単極（UE）および双極電位（BE）の特徴を調査することである．豚 13 頭の心房において点状焼灼（125 点）を行い焼灼前後で UE および BE を比較した．カテーテル角度は心内膜面に対し垂直もしくは斜め（非平行部位，80 部位）および平行（平行部位，75 部位）に調節した．TL（54 部位）および非貫壁性焼灼創（NTL）（71 部位）が認められた．カテーテル角度に関係なく，TL において遠位電極で記録された UE では，焼灼後に陰性波成分が消失していたが NTL では消失しなかった．非平行部位の TL から記録された BE では陽性波成分が消失していたが，平行部位の TL からは以下の二つの変化様式のどちらかが認められた：(1) 焼灼前の BE が QRS 型を示した部位では R 波優位の減高（75% 以上），(2) 焼灼前の BE が RSR' 型を示した部位では R' 波の完全消失．カテーテル角度によって BE の変化様式が異なった理由は，近位電極から記録される UE が BE へ与える影響度の違いがカテーテル角度によって異なっていたためであった．この UE および BE クライテリアを用いることにより，TL および NTL を鑑別することに成功した．TL を認識する際に，カテーテル角度が異なる場合はそれぞれ別の BE クライテリアを用いる必要がある．

〈緒言〉

カテーテルアブレーションは様々な心房性不整脈に対する根治治療として認められている．これらの心房性不整脈の治療において，焼灼線に沿って完全伝導ブロックを作成するために連続的貫壁性焼灼創（TL）を作成する必要がある場合がある．線状焼灼において重要なのは，全ての焼灼部位において TL を形成し，同時に過度の焼灼による隣接臓器への傷害などの合併症を避けることである．過去の報告では，局所心房電位の全振幅減高を指標として焼灼出力を調節することによって焼灼部位の合併症を避けることが可能であったと報告されているが，焼灼後の局所双極（BE）または単極電位（UE）における全振幅減高が信頼性をもって TL 形成を予測するかどうかについては，未だに議論の分かれるところである．BE は遠位および近位電極間の電位差を表すため，BE の形態は心内膜面や興奮波の進行方向に対するカテーテルの角度によって大きな影響を受ける．心内膜面に対する様々なカテーテル角度や興奮波伝導方向が，TL および非貫壁性焼灼創（NTL）において記録される BE にどのような影響を与えるかは，未だに明らかではない．

本研究の目的は，動物実験モデルを用いてそれぞれのカテーテル角度において，TL 形成に関する UE および BE の診断基準を確立することである．

〈方法〉

13 頭の雌豚が鎮静下に挿管され，大腿および内径静脈よりカテーテルが挿入され，透視下に 7Fr 4mm アブレーションカテーテルを用いて，右房および左房内の平滑心筋領域に対して点状焼灼が行われた．透視画像および造影所見を参考にして，カテーテルが心内膜面に対して平行（平行部位，6 頭）または非平行（垂直および斜め）（非平行部位，7 頭）になるようにして焼灼を行った．平行部位の場合は遠位および近位電極両方が心内膜面に接触し，一方で非平行部位の場合は遠位電極のみが心内膜面に接触し，近位電極は浮くようにした．心臓摘出後，各焼灼創を Masson trichrome 染色し光顕にて貫壁性を評価した．

焼灼前後にカテーテルから記録された BE および遠位および近位 UE（UEdist および UEprox）を解析した．UEdist および UEprox の局所興奮時点は，UE が等電位線を交差した時点とした．UEdist および UEprox の局所興奮時点の順序により興奮波の伝導方向を推定した．焼灼前後の局所電位形態を，QS,QR,QRS,R，RS または RSR' 型のいずれかへと分類した．

〈結果〉

焼灼創の特徴

合計 155 箇所において点状焼灼が行われ，そのうち肉眼的に平滑心筋領域内に同定された 125 個の焼灼創に関してデータ解析が行われた．

上述の 125 個の焼灼創（非平行部位 66 個，平行部位 59 個）のうち 54 個は TL であり残りの 71 個は NTL であった．非平行部位 66 個のうち 30 個が TL で残りの 36 個が NTL であった．平行部位 59 個のうち 24 個が TL で残りの 35 個が NTL であった．

局所電位の特徴

1）非平行部位（66 カ所）

全ての非平行部位では焼灼前の UEdist および UEprox はともに RS 型を呈し，BE は QR 型を呈した．焼灼前の UEdist および UEprox の局所興奮時点はほぼ同時であり，UEdist の全振幅は UEprox よりも有意に大きかった（3.2 ± 1.0 mV vs. 1.1 ± 0.8 mm, P <.0001）．下行脚の傾きは UEdist において常に急峻であったが，UEprox では緩徐であった．これは非平行部位において遠位電極が心内膜面と接触する一方で近位電極は接触しておらず，カテーテルが心内膜面に対し垂直もしくは斜め方向に向いていたことを示唆すると考えられた．焼灼前 UEdist の R および S 波はそれぞれ BE の Q および R 波の時相と一致していた．

焼灼後 TL から記録された UEdist は一貫して S 波の完全消失を呈したが，NTL では全く認められなかった．全ての TL では焼灼後 UEdist の形態が R 型へと変化したが，NTL ではその様な変化は認められなかった．UEprox の形態は TL および NTL 双方において変化しなかった．TL から記録された BE は R 波の完全消失を呈した．

非平行部位の場合，UEdist の S 波完全消失および BE の R 波完全消失が TL 形成を示す最善の指標であった．

2）平行部位（59 カ所）

UEdist および UEdist の焼灼前の形態は，非平行部位と同様に RS 型を呈した．焼灼前の UEdist および UEdist において電位波高に有意差を認めず，下行脚の傾きは双方とも同様に急峻であった．これらの所見は遠位および近位電極が両方とも心内膜面と接触しカテーテルが心内膜面に対し平行であったことを示唆すると考えられた．焼灼前の BE の形態は 2 種類認められた；(1）QRS 型（32 カ所）および（2）RSR' 型（27 カ所）．焼灼前の BE が QRS 型を呈した部位では，UEdist の局所興奮時点が UEprox のそれに 7 ± 4ms 先行しており，興奮波は遠位から近位電極方向へ伝導していると考えられた．一方焼灼前の BE が RSR' 型を呈した部位では，UEprox の局所興奮時点が UEdist のそれに 7 ± 5ms 先行しており，興奮波は近位から遠位電極方向へ伝導していると考えられた．焼灼前の BE が QRS 型を呈した部位では，UEdist の R および S 波の時相が，BE の Q および R 波の時相と一致していた．一方焼灼前の BE が RSR' 型を呈した部位では，UEdist の R および S 波の時相が，BE の S および R' 波の時相と一致していた．

焼灼後 TL における UEdist は，非平行部位と同様に一貫して S 波の完全消失を呈したが，NTL では全く認められなかった．TL から記録された BE は，焼灼前の BE の形態によって以下の 2 種類の変化様式を示した．1）焼灼前 QRS 型を呈した 13 カ所では，R 波に優位な減高（7 カ所，75% 以上）もしくは R 波の完全消失（6 カ所）を呈した．2）焼灼前 RSR' 型を呈した 11 カ所では，R' 波の完全消失と形態の RS 型への変化を呈した．NTL では焼灼後 BE に形態変化を伴わない非特異的波高減高が認められたのみであった．

平行部位では，UEdist における S 波の完全消失，焼灼前 BE が QRS 型を呈した部位における焼灼後 BE の R 波の減高（75% 以上）（特異度 85%，感度 95%），および焼灼前 BE が RSR' 型を呈した部位における焼灼後 BE の R' 波の完全消失が TL を示す最善の指標であった．

〈考察〉

本研究では豚心臓を用いて心内膜面に対する様々なカテーテル角度において作成された心房筋焼灼創の貫壁性の有無と，焼灼前後に記録された UE および BE の特徴を相関させ評価した．UE の解析では，カテーテル方向に関わらず，TL は UEdist における S 波の消失を伴っていた．一方 BE の解析では，TL は QR から QS 型への変化（非平行部位），QRS から QS 型への変化，および RSR' から RS 型への変化（平行部位）を伴っていた．このように TL から記録される BE 形態の変化様式がカテーテル角度により異なる原因は，それぞれのカテーテル角度によって UEprox が BE に与える影響が異なることに由来すると考えられる．UE および BE の焼灼後の形態変化を解析することにより，焼灼創が TL であるかどうかを判定することが可能であった．

過去の研究において，焼灼後の UEdist および BE の全振幅の減高度が TL 形成を示唆する間接的所見であると報告された．この点では本研究の結果も過去の研究と一致しているが，過去の研究では局所電位波形の形態変化などの定性的変化は着目されておらず，心内膜面に対するカテーテル角度や興奮伝導方向の違いが局所電位に及ぼす影響などは論じられていない．本研究では心内膜面に対するカテーテル角度や興奮伝導方向には関係なく，UE の RS から R 型への形態変化が TL 作成を示唆する本質的所見であり，過去に報告されていた UE の全振幅の減高度と比較してより特異的な所見であることを明らかにした．またカテーテル方向や興奮伝導方向によって UEprox の BE に対する影響が異なるため，TL における BE の形態変化様式が異なることを示した．

本研究の臨床的意義としては，本研究で得られた局所電位基準を指標として焼灼を行うことにより，既に TL が形成された部位に対する過分な焼灼による近隣臓器への熱性傷害を予防し，手技時間を短縮することが可能となるという点が上げられる．また本研究で得られた局所電位基準は定性的指標であり，実際のアブレーション手技中の電位判断がより明確かつ容易となる可能性がある．

〈結論〉

本研究は焼灼後の UE および BE の形態的変化を解析することが，焼灼創の貫壁性を評価する上で有用であることを示した．焼灼後の電位変化の機序を理解することにより，アブレーション治療の有効性および安全性を高めることが可能かもしれない．

小林　秀一郎 博士（医学）　Shuichiro　Kobayashi

学位記番号　／甲第 1942 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）器官システム制御学系専攻

学位論文　／Diagnostic performance of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in bladder cancer: potential utility of apparent diffusion coefficient values as a biomarker to predict clinical aggressiveness（拡散強調 MRI の膀胱癌診断能：ADC 値の生物学的悪性度予測に対する有用性）
European Radiology　第 21 巻第 10 号　2178–2186 頁　平成 23 年 10 月発表

論文審査委員／主査：澁谷　均　　副査：江石　義信　　副査：大橋　勇

〈論文要旨〉

膀胱癌における拡散強調 MRI の診断能と，拡散係数（ADC 値）の生物学的悪性度の予測能について検討した．104 例の膀胱癌患者について拡散強調 MRI と T2 強調 MRI を撮影し画像を 2 名の放射線科医が評価した．ADC 値は 121 腫瘍で測定した．拡散強調 MRI は T2 強調 MRI と同等（90% 以上）の感度で膀胱癌を検出可能であった．読影医間の読影一致度は拡散強調 MRI で高い一致（κ 係数 0.88）に対し T2 強調 MRI は中等度の一致（0.67）であった．ADC 値は high-grade（vs. low-grade, $P<0.0001$），high-stage（T2 vs. T1 vs. Ta, $P<0.0001$）で有意に低かった．ADC 値のカットオフ値を 0.86×10^{-3} mm^2/s にすると感度 88%，特異度 85%，正確度 87% で生物学的悪性度が高い筋層浸潤癌および high-grade T1 癌とそれら以外を鑑別することができた．拡散強調 MRI は高い検出能かつ優れた客観性を持って膀胱癌を診断できた．ADC 値は膀胱癌の生物学的悪性度を反映するバイオマーカーである可能性が示唆された．

〈緒言〉

grade と T stage は膀胱癌の予後因子として重要である．非筋層浸潤癌（NMIBC，病期 T1 以下）のうち Ta 癌や low-grade T1 癌では癌特異生存率は極めて良好である一方，high-grade T1 癌は 1/3 が筋層浸潤癌（MIBC，病期 T2 以上）となると言われている．また MIBC の半数は根治的膀胱全摘除術を施行しても後に他臓器転移をきたし 5 年生存率は約 50% である．よって grade や T stage といった病理学的表現型が膀胱癌の生物学的悪性度を表していると考えられる．生物学的悪性度が高い high-grade T1 癌や MIBC は膀胱全摘除術や化学療法，放射線治療といった集学的治療が必要になるため，これらを正確に診断できる方法が望まれる．

近年新たな画像検査として PET や拡散強調 MRI といった機能的画像診断法の有用性が注目されている．拡散強調 MRI は水分子の拡散運動を画像化したもので造影剤を使用せず放射線被曝もない非侵襲的な検査である．悪性腫瘍など細胞密度が高い組織では拡散係数（ADC 値）が低く，拡散強調画像が高信号を呈する．今回我々は，膀胱癌における拡散強調 MRI の診断能（存在診断および深達度評価）を評価した．さらに，ADC 値が grade や T stage といった予後因子を反映するバイオマーカーとなり得るか検討した．

〈方法〉

2007 年 2 月から 2010 年 5 月までの期間に膀胱癌の臨床診断で MRI を施行し膀胱癌の病理組織診断の確定した 104 例を対象とした．症例コホートは無作為に 52 例ずつ 2 群に分け，各群につき 2 名の放射線科医が独立して拡散強調 MRI と T2 強調 MRI を読影し腫瘍の存在，T stage を判定した．T stage は薄い平らな高信号の腫瘍，または高信号の腫瘍に低信号の茎が存在し尺取虫のように見える場合（尺取虫サイン）を T1 以下とし，粘膜下組織が存在せず腫瘍の境界が平滑であるものを T2，腫瘍が膀胱周囲脂肪組織まで浸潤し境界が不明瞭であるものを T3，腫瘍が周囲臓器に広がっているものを T4 とした．ADC 値は腫瘍全体を囲むように ROI を設定して測定した．拡散強調 MRI で検出できなかった腫瘍と ROI の大きさが 20mm^2 未満の小さい腫瘍を除いた計 121 腫瘍で ADC 値を測定し，病理組織学的所見との関連を検討した．

〈結果〉

拡散強調 MRI の膀胱癌検出感度は各読影医で 92/91% であり T2 強調 MRI は 91/89% と同程度であった．読影医間の読影一致度は拡散強調 MRI で優れており（κ 係数 0.88）T2 強調 MRI で中等度（0.67）であった．MIBC の 38 例は拡散強調 MRI では全例検出可能であったが T2 強調 MRI では 2 例が検出できなかった．膀胱癌を検出できる大きさの最もよいカットオフ値は 7mm であった．7mm 以上の膀胱癌の 99% が拡散強調 MRI で検出可能であった．深達度評価については拡散強調 MRI が感度 66/71%，特異度 91/83%，正確度 82/79% と T2 強調 MRI と同等の精度で NMIBC と MIBC を鑑別可能であった．尺取虫サインを元に 22 例，24 例について各読影医が NMIBC と診断したが，これらのうち 6 例が MIBC でありアンダーステージング率は 27/25% であった．

質的評価については 121 腫瘍の ADC 値（$\times10^{-3}$ mm^2/s）は 0.39–2.07（中央値 0.86）であった．ADC 値は high-grade（中央値 0.79）が low-grade（中央値 0.99）より有意に低く（$P<0.0001$），high-stage も有意に低かった（T2 vs. T1 vs. Ta,$P<0.0001$）．ADC 値により生物学的悪性度の高い癌（MIBC と high-grade T1 癌）の存在を高い精度（AUC 0.902）で予測可能であり，ADC 値のカットオフを 0.86 に設定すると感度 90%，特異度 80%，正確度 86% で鑑別し得た．尺取虫サインを呈する癌のうち MIBC は有意に NMIBC より ADC 値が低く，ADC 値のカットオフを 0.80 とすると尺取虫サインを呈する癌のアンダーステージング率が 5/4% に改善した．

〈考察〉

本研究では ADC 値が grade だけでなく T stage とも逆相関を認めた．これまで ADC 値が grade と関連するという論文は見られたが，grade だけでなく T stage についても ADC 値が客観的かつ質的評価ができると報告した論文はこれまで認めていない．grade と T stage は膀胱癌特異生存率に関与する因子であり，ADC 値は生物学的悪性度を反映するバイオマーカーになり得ると考えられる．実際に本研究では生物学的悪性度が高い癌を高い精度で予測することができた．

他の機能的画像診断法として PET/CT における悪性腫瘍の質的診断に関する有用性が報告されている．しかし PET/CT はトレーサーが膀胱に蓄積するため膀胱癌の局在診断は困難である．この点は拡散強調 MRI が膀胱癌の局在診断法として PET/CT より優位であることを示している．

読影医間の読影一致度については拡散強調 MRI が T2 強調 MRI より優れていた．これは拡散強調 MRI で腫瘍が明るい白色調信号を呈し明瞭なコントラストで周囲組織から区別できることが要因であると考えられた．しかし拡散強調 MRI は周囲組織の信号が弱ま

るため解剖学的情報は乏しくなり深達度評価の精度が低くなるという欠点がある．本研究でも尺取虫サインをNMIBCとしたところ，30％弱のMIBCをアンダーステージングしてしまった．解剖学的情報にADC値を加えたところ深達度評価の精度が改善し，アンダーステージング率が5％未満にできたことから，解剖学的情報に質的情報であるADC値を加えることで拡散強調MRIの深達度評価の精度を高めることができると考えられた．

〈結論〉

膀胱癌の存在診断と深達度評価において拡散強調MRIはT2強調MRIと比較し同等であり，読影医間の読影一致度は優れていた．ADC値はgradeとT stageと逆相関し高い精度で生物学的悪性度が高い癌を鑑別できた．拡散強調MRIは生物学的悪性度を反映するバイオマーカーである可能性が示唆された．

全田　貞幹 博士（医学）　Sadamoto　Zennda

学位記番号　／甲第 1943 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日

研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）顎顔面頸部機能再建学系専攻

学位論文　／Proton beam therapy for unresectable malignancies of the nasal cavity and paranasal sinuses（手術不能鼻/副鼻腔腫瘍に対する陽子線治療に関する研究）
International Journal of Radiation Oncology・Biology・Physics　第 81 巻第 5 号　1473–1478 頁　平成 23 年 12 月発表

論文審査委員／主査：澁谷　均　　副査：喜多村　健　　副査：前原　健寿

〈論文要旨〉

切除不能な鼻腔腫瘍に対する従来の治療法の成績は極めて不良である．陽子線は従来の放射線治療より線量集中性が高く，今まで高い線量を投与できなかった頭蓋底の腫瘍に対してもよりアグレッシブな治療が可能である．今回我々は陽子線治療を用いて当該腫瘍を治療したのでその成績を報告する．

1）鼻副鼻腔　頭蓋底が原発の腫瘍で切除が困難である．
2）リンパ節転移，遠隔転移を認めない．
3）1999 年 1 月から 2006 年 12 月までに 60GyE 以上の陽子線治療を受けた

39 例を対象に後ろ向き検討を行った．

患者背景は年齢中央値 57（22–84）歳，男性/女性：22/17，鼻腔原発の腫瘍が最も多かった（26 例）．局所制御率（6 ヶ月，1 年）はそれぞれ 84.6%，77% であった．観察期間中央値 45.4 ヶ月時点で 3 年無増悪生存率 49.1%，3 年全生存率 59.3% であった．

急性毒性で最も頻繁だったのは皮膚炎であったが，grade3 以上の重篤なものは認めなかった．晩期有害事象は 5 人に認め，1 人が脳脊髄液瘻のため死亡し，治療との因果関連が否定できなかった．

切除不能鼻副鼻腔/頭蓋底腫瘍に対する陽子線治療の治療成績は良好であり，これらの領域での有望な治療法であることが示唆された．

〈緒言〉

鼻腔腫瘍は他の疾患に比べて希少であり，治療法にも難渋する場合が多い．

多くの場合，これらの腫瘍に対して外科手術（＋術後放射線療法）が行われる．外科手術の場合頭蓋内浸潤があると完全切除が難しく，また顔面の変形を余儀なくされ審美性においても大きく損なう部分が多い．一方そういったケースに対して放射線治療が施行されることもあるが，頭蓋内に後半に照射した場合晩期有害事象は無視できない状況である．

陽子線治療はブラッグピークおよび急峻な半影の減少などの物理特性を活かし，従来の放射線治療に比べて非常に優れた線量分布を作成することができる．

この性質を利用すれば効果を最大限に発揮し，晩期有害事象を最小限に抑えることも可能ではないかと考え，頭蓋底腫瘍に対して陽子線治療を用いるようになった．

今回我々は当院での鼻副鼻腔/頭蓋底腫瘍に対する陽子線治療の成績を明らかにし陽子線治療の有用性を検証する．

〈方法〉

1）　鼻副鼻腔　頭蓋底が原発の腫瘍で切除が困難である．
2）　リンパ節転移，遠隔転移を認めない
3）　1999 年 1 月から 2006 年 12 月までに 60GyE 以上の陽子線治療を受けた．

39 例を対象に後ろ向き検討を行った．

治療前の staging は UICC-TNM 分類第 6 版を用い，画像検査は CT/MRI を必須とし，適宜 PET-CT の所見を参照した．

局所制御の達成は原発巣に増悪，再発が見られないことを条件とした．

陽子線治療は RBE1.1 で計算し，GTV/CTV/PTV は以下のように設定した．

GTV: CT/MRI もしくは PET—CT で視認できる領域．

CTV: GTV に 5mm のマージンを加え，さらに隣接する副鼻腔を含めた領域

頭蓋内浸潤がある場合には MRI で T2prolongation を認める領域も含める．

PTV: 基本的には CTV に 3mm のマージンを設定した領域とするが，視神経や脳幹などの重要臓器が近接する場合はそれらに合わせて加工することは許容される．

PTV 領域に対して 90% 以上の処方線量が投与されることを努力目標とした．

標準処方線量は 65GyE/26fr（2.5GyE/1fr）とし，術後照射の場合は 2GyE/1fr，悪性黒色腫の場合は 4GyE/1fr とした．

全生存期間は治療開始日を起算日として死亡日もしくは最終診察日までの期間と定義した．無増悪生存期間は治療開始日を起算日として死亡日，再発確認日もしくは最終診察日の中で最も短いものと定義した．

単変量解析は Log-rank 検定を，多変量解析は Cox-propotional hazard ratio を用いて計算した．

〈結果〉

患者背景は年齢中央値 57（22–84）歳，男性/女性：22/17，鼻腔原発の腫瘍が最も多かった（26 例）．局所制御率（6 ヶ月，1 年）はそれぞれ 84.6%，77% であった．観察期間中央値 45.4 ヶ月時点で 3 年無増悪生存率 49.1%，3 年全生存率 59.3% であった．

23 例に増悪を確認したが，原発巣増悪 9 例，頸部リンパ節再発 5 例，遠隔臓器再発 9 例であった．増悪/再発までの期間は局所，領域リンパ節，遠隔臓器転移でそれぞれ 9.4 ヶ月 ,12.1 ヶ月そして 11.3 ヶ月であった．

予後予測因子として年齢，性別，組織型，原発巣，治療スケジュールを単変量解析した．

組織型（扁平上皮癌）がやや予後不良な傾向が有り（P＝0.1），鼻腔原発腫瘍は他の部位発生の腫瘍より有意に治療成績が良好であっ

た．両者を多変量解析したところ優位な因子は見いだせなかった．
急性毒性で最も頻繁だったのは皮膚炎であったが，grade3 以上の重篤なものは認めなかった．晩期有害事象は 5 人に認め，1 人が脳脊髄液瘻のため死亡し，治療との因果関連が否定できなかった．

〈考察〉
施設が限られており，直接比較のランダム化試験はできないが，効果において，陽子線治療は手術先行もしくは従来の放射線治療と比較しても遜色はなく，とくに放射線治療に対しては明らかに優越していると考えられる．
毒性に関しても，同様に他のモダリティーでの報告と比較しても遜色はなくこの領域における陽子線治療は非常に有望な治療であるといえるだろう．
経過のなかで画像上消失しないものの 3 年以上増悪しない症例も見受けられ，鼻副鼻腔腫瘍に対する治療の効果判定は消失の割合ではなく無増悪の割合で算出したほうが正確であると思われた．
また，予後予測因子についても検討を行ったが，現時点では優位な因子は見いだせず，今後症例がさらに集積した後再解析する必要がある．

〈結論〉
切除不能鼻副鼻腔/頭蓋底腫瘍に対する陽子線治療の治療成績は良好であり，これらの領域での有望な治療法であることが示唆された．

村井　秀樹 博士（医学）　Hideki　Murai

学位記番号　／甲第 1944 号　　学位授与　／平成 25 年 3 月 31 日
研究科専攻　／東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（博士課程）認知行動医学系専攻
学位論文　／Positive correlation between the degree of visual field defect and optic radiation damage in glaucoma patients（緑内障患者の視野障害と視放線変化との相関に関する研究）
Japanese Journal of Ophthalmology　平成 25 年 2 月 online 発表
論文審査委員／主査：澁谷　均　　副査：寺田　純雄　　副査：水澤　英洋

〈論文要旨〉
目的：緑内障患者の視放線を拡散テンソル MRI の fractional anisotropy（FA）を用いて評価した．
方法：緑内障患者 29 例と健常者 19 例を対象とした．左右の視放線の前方と後方とに関心領域を設定し，FA 値を測定した．
結果：緑内障群の FA 値は，それぞれ健常群より有意に減少していた（前・右 $P=0.0002$，前・左 $P=0.00028$，後・右 $P=0.0004$，後・左 $P=0.0001$）．更に緑内障群において，視放線の FA 値と対側の視野のトータル偏差との間に有意な相関を認めた（左半視野と前・右視放線相関係数（r）= 0.46（$P=0.013$），右半視野と前・左視放線 r = 0.43（$P=0.021$），左半視野と後・右視放線 r = 0.54（$P=0.0027$），右半視野と後・左視放線 r = 0.46（$P=0.012$））．
結論：緑内障患者の視放線全域において FA 値が減少しており，視野障害は視放線の FA 値と相関していた．

〈緒言〉
緑内障では網膜神経節細胞の減少に伴い，それらに対応した視野が障害される．近年，緑内障は眼球のみならず中枢神経にも影響を与えることが報告されている．サルの緑内障モデルで外側膝状体が萎縮していたという報告，緑内障患者の一次視覚野の活動が低下していたという報告などがある．脳白質の変化を非侵襲的に評価できる拡散テンソル MRI は，これまでにも緑内障患者の視放線の評価に用いられてきた．拡散テンソル MRI の fractional anisotropy（FA）は水分子が特定の方向に拡散しようとする傾向を定量可能である．神経の線維構造に囲まれた水分子は神経線維に沿った方向に拡散しようとするので，FA 値を測定することで視放線を含む脳白質の変性を評価できる．FA 値は 0–1 の値を取り，0 は完全にランダムな水分子の拡散，1 は完全に特定方向の拡散を反映している．緑内障患者の視放線に萎縮を認めることは過去にも報告されているが，視野障害との相関は調べられていない．我々は視野障害が進行するに従い FA 値が低下するという仮説を立て，これを証明するために緑内障患者の視放線を拡散テンソル MRI の FA 値を用いて評価し，対応する視野障害との相関を調べた．

〈方法〉
この研究は東京都健康長寿医療センター倫理審査委員会の承認を得ており，全ての手続きはヘルシンキ宣言に合致している．全ての被験者は書面によるインフォームドコンセントを取得されたうえで研究に参加した．
これは緑内障群と健常群を対象とする症例対照研究である．全ての視野検査はハンフリー視野計（Carl Zeiss Meditec 社）30–2 プログラムを用いて行った．緑内障群は 29 例（男性 16 例，女性 13 例，平均年齢 59 歳（34–81 歳））で，2009 年 7 月から 2011 年 2 月に清澤眼科医院（東京都）の外来患者から募集された．緑内障の診断は Foster（2002）の報告に従い，視野異常の判定は Anderson（1999）の基準に従った．視野は 2 回以上の測定で再現性があったものを用いた．視野を正確に測定するために，中心視野を失っている患者は除外した．強度近視症例は緑内障群および健常群に含めた．緑内障以外の眼内病変・頭蓋内病変を持つ症例は除外したが，T2 強調 MRI で年齢相応の白質変化を認める症例は含めた．
緑内障群における視野の平均偏差（視野全体の感度を反映）の平均は右眼 −5.64dB，左眼 −7.73dB であった．片側の視放線は，両眼における反対側の視野に対応する．例えば右の視放線は，両眼の左半視野に対応する．我々は両眼の視野のそれぞれの測定点におけるトータル偏差（測定点における感度を反映）の平均を半視野ごとに算出し，対側の視放線と比較した．患者群のトータル偏差の平均は右半視野 −6.50dB，左半視野 −5.94dB であった．患者群の眼圧は点眼治療されており，その平均は右眼 11.4mmHg，左眼 11.7mmHg であった．視力は両眼とも 0.7 以上で，屈折値の平均は右眼 −3.3D，左眼 −3.2D であった．
健常群は 19 例（男性 12 例，女性 7 例，平均年齢 56.5 歳（33–85 歳））で，視野検査を含む眼科検査が正常な症例のみ研究に参加した．平均偏差の平均は右眼 0.65dB，左眼 0.51dB で，トータル偏差の平均は右半視野 0.49dB，左半視野 0.55dB であった．視力は両眼とも 0.7 以上で，屈折値の平均は右眼 −0.22D，左眼 −2.0D であった．

MR データの撮像条件
全ての症例に 1.5 テスラの磁場を持つ Signa Excite HD scanner（General Electric 社）を用いて，軸位断で T1 強調画像（三次元スポイルドグラディエントエコー法；TR 22ms,TE minimum full，撮像範囲 23×23cm，マトリックスサイズ 256×256 ×124），T2 強調画像（ファストスピンエコー法；TR 4300ms,TE 90ms，撮像範囲 22×22cm，マトリックスサイズ 256×256×20），拡散強調画像（スピンエコー・エコープラナー法；TR 6000ms,TE minimum，b 値 1000s/mm^2，25 軸，撮像範囲 22×22cm，マトリックスサイズ 256×256×20；ベースライン画像（b= 0）も取得）を撮影した．撮影時間は 20 分未満であった．

データ解析
データ解析は MR コンソール（GE Advantage Work Station）で行った．25 組の拡散強調画像を用いて各症例のトレース画像および FA マップを作成した．T2 強調画像をガイドに直径 2.5mm の関心領域を両側の視放線の前方と後方に設定し FA 値を測定した．視放線が外側膝状体を出て湾曲した直後を視放線の前方と定義し，視放線が一次視覚野の手前で拡散する直前を視放線の後方と定義した．関心領域の設定は，緑内障群か健常群か，および患者データが隠蔽された状態で行った．

統計解析
緑内障群と健常群の FA 値を 2 サンプル t-テストを用いて比較し Bonferroni の補正を行った（$P<0.05/4$）．緑内障群と患者群それぞれの視放線の前方と後方とを paired t-テストで比較し Bonferroni の補正を行った（$P<0.05/2$）．更に両眼の半視野のトータル偏差

の平均と，対側の視放線の前方と後方のFA値との間で回帰分析を行った．

視放線を含む白質は加齢に伴い萎縮することが報告されており，我々は回帰分析に年齢変化を考慮した．健常群において年齢とFA値との間に負の相関があった（前・右相関係数（r）＝－0.49（P＝0.034），前・左r＝－0.49（P＝0.033），後・右r＝－0.53（P＝0.019），後・左r＝－0.52（P＝0.021））．回帰直線の傾き（FA値の年間変化量）は－0.0017（前・右），－0.0018（前・左），－0.002（後・右），－0.0018（後・左）で，それぞれ0.31%，0.32%，0.35%，0.33%の減少に相当した．我々は緑内障群のFA値を平均年齢である59歳を基準に補正し，年齢補正FA値として回帰分析に用いた．計算式は以下の通りである：(緑内障患者の年齢補正FA値)＝(年齢補正前のFA値)－(健常群のFA値の年間変化量)×(年齢－59)．

〈結果〉

緑内障群の視放線のFA値は，健常群より有意に減少していた（前・右P＝0.0002，前・左P＝0.00028，後・右P＝0.0004，後・左P＝0.0001）．視放線の前方と後方との比較では緑内障群・健常群ともに有意な差を認めなかった．

緑内障群における回帰分析では，半視野のトータル偏差の平均と対側の年齢補正FA値との間に有意な相関を認めた（左半視野と前・右視放線r＝0.46（P＝0.013），右半視野と前・左視放線r＝0.43（P＝0.021），左半視野と後・右視放線r＝0.54（P＝0.0027），右半視野と後・左視放線r＝0.46（P＝0.012））．

〈考察〉

今回の我々の研究において，緑内障群のFA値は，両側の視放線の前方・後方で健常群より有意に減少していた．緑内障群・健常群ともに視放線の前方と後方とでFA値の差を認めなかった．緑内障における視放線の萎縮に関しては過去にも報告があり，緑内障群の視放線の体積は健常群より減少していたという報告，緑内障群の視放線のFA値は健常群より減少していたという報告がある．また1年以上持続した視神経炎患者の視放線のFA値は平均0.46で，健常者は0.50であったという報告もある．

過去に視放線の前方・後方のFA値を調べた報告は無く，我々はそれらの比較を試みたが，前後の差を認めなかった．これは我々が対象とした緑内障群は疾患の進行が緩徐であり，視放線の変化も慢性的に進行していたからかもしれない．緑内障患者の視神経と外側膝状体の萎縮は以前から報告されているが，近年では緑内障患者の視神経・視交叉・視索・外側膝状体・視放線の体積が減少していたという報告や，一次視覚野の灰白質密度が減少していたという報告がある．それらの報告から，緑内障の進行に伴って視神経から一次視覚野に至る視路の全てが萎縮することが想定される．また緑内障では外側膝状体の萎縮は視神経や網膜神経節細胞の変化より早期に起こるという報告もある．ラットの外側膝状体を選択的に破壊すると視放線と一次視覚野に萎縮がみられたという報告があり，緑内障では外側膝状体の萎縮に伴いその軸索である視放線も萎縮すると考えられる．

視放線の加齢に伴う萎縮は過去にも報告されており，拡散テンソルMRIを用いた解析では80歳時の視放線の体積は50歳時の30%減少するとされている．今回の我々の研究では年齢と視放線のFA値とに負の相関を認め，その減少率は1年当たり約0.3%であった．

我々の知る限り緑内障患者の視野障害と視放線の変化との相関を調べた報告は無い．先に述べた緑内障群のFA値が健常群より減少しているという報告では，緑内障の病期を6つに分類し，両眼の病期が等しい患者のFA値と病期との比較を試みたが，両眼の病期が等しい患者を十分に集められなかったため断念している．網膜のコントラスト感度と視放線のFA値とに相関を認めたとする報告もあるが，その研究において視野を半分ずつに分割する手法は採られていない．

今回我々は，視放線のFA値と対側の両眼の半視野のトータル偏差の平均値とを比較することで，視野障害と視放線変化との間に相関を見いだした．我々は拡散テンソルMRIを緑内障患者の中枢神経を評価する方法の一つとして推奨したい．現状では，低い特異度，高いコスト，長い検査時間といったデメリットがあり，臨床の現場で用いるのは困難と考えられる．しかし，このような研究を続けていくことで緑内障に対する理解が深まり，将来，緑内障の診断や治療に寄与することが可能かもしれない．

〈結論〉

緑内障患者の視放線全域においてFA値が減少しており，FA値は視野障害と相関していた．

編集後記

「お茶の水醫學雑誌」はお陰さまで今年度は既に3号まで発行し，年内の発行は第4号を残すのみとなりました．これもひとえに，ご執筆下さる先生方や，運営にあたり時にお褒めの言葉を，時に厳しい戒めの言葉を下さいました皆様のご支援故と心より感謝申し上げます．勿論，現在でも暗中模索の状態ではありますが，昨年に比べて一歩足を前に出し，新しい企画を考えられるようになりました．その1つが5月にアクセス可能になったお茶の水医学会ホームページ（HP）です．このHPからは，今まで発行された新生「お茶の水醫學雑誌」の電子版を読んでいただくことができます．大学HPからも本誌の電子版を読めますが，より簡単なプロセスで本誌にアクセスしたいというご希望がありましたので，お茶の水医学会，お茶の水醫學雑誌，編集委員の紹介をさせていただく良い機会と捉え，HPを立ち上げた次第です．是非ご活用いただき，お気づきの点等ございましたら事務局までお知らせ下さい．

掲載論文に関しましても，これからプレスリリース研究論文や医科同窓会研究奨励賞論文を継続的・定期的に掲載する計画です．プレスリリース研究論文は，第60巻4号より毎号掲載されましたが，それを恒常的なものとしたいと思い，本号は私が中継ぎをする形で執筆させていただきました．これから過去5年分にあたるプレスリリース研究論文執筆者の先生方と同窓会研究奨励賞受賞の先生方に原稿執筆を順次お願いをしてまいりますので，依頼がございましたら，ご執筆を宜しくお願い申し上げます．

本号は，総説論文3編，プレスリリース研究論文1編，症例報告論文1編，剖検症例14症例，学位審査合格者論文公開30編となっています．東京へのオリンピック招致活動が活発になる中，スポーツ医学関連の総説が2編掲載されており，はからずもタイムリーな構成となりました．また，本号では久しぶりに症例報告論文が掲載されました．学内外施設会員制度をご利用いただき，多くのご投稿をお待ちしています．

末筆とはなりましたが，これほどの活動を資金面から支えて下さっていただいているお茶の水医科同窓会，和同会，公益財団法人となりました薬力学研究会の関係者の皆様に，この場を借り心より御礼申し上げます．同窓会には本誌の配布もしていただいており，文字通り皆様のお陰をもって雑誌の発行を継続しております．さらに質の高い雑誌作りを目指し，本誌の内容については勿論ですが，それを支える財政的基盤も考慮していきたいと存じます．

平成25年8月　編集委員長
江 石 義 信

お茶の水醫學雑誌投稿規程

1. 投稿は原則としてお茶の水医学会会員に限る．
2. 日本語で書かれた学位申請論文，および総説，原著論文，症例（事例）報告，資料，教室研究業績等を受け付ける．
3. 論文の採否は編集委員会が決定する．掲載は採択順とする．特別掲載については別途考慮する．
4. 原稿は，A4の用紙を用い，ワードプロセッサーを用いて作成する．原文と複写2部，計3部を投稿する．原稿の構成は表紙，要旨，本文，引用文献表，図の説明，表，図の順序とする．
   1）表紙：分類，論文題名，著者名，所属，連絡先，別冊希望部数を明記する．
   2）和文要旨：400字以内で作成し（ダブルスペース），下に5語以内のkey wordを日本語と英語で付記する．
   3）英文要旨：300語以内で作成する（ダブルスペース）．これに英文題名，ローマ字による著者名および所属名を付記する．なお英文については，native speakerによる校閲済の証明を必要とする．この証明が無い場合には編集委員会が校閲を依頼し，その費用を別途著者に請求する．
   4）本文：ダブルスペースで作成する．新かなづかい，横書で原稿サイズはA4判，文字サイズは12ポイントとする．改行は1字下げ，大見出しはⅠ．Ⅱ．Ⅲ.・・・，中見出しは1. 2. 3. ・・・，小見出しはⅰ．ⅱ．ⅲ．・・・，細見出しはa. b. c. ・・・とする．文中を欧文およびその仮名書きはできる限り避ける．
   なお省略語は初筆時に「正式名（省略語）」の形で記述することにより，それ以降用いても良い．
   5）文献表：引用文献は既刊あるいは掲載決定（要掲載証明）の著書，原著，総説に限る．本文中に引用順に1)，2)，3）と番号を入れ，その順に整理する．
   ＊原著（雑誌名の省略は，医学中央雑誌およびIndex Medicusに準ずる.）
   例：1） 鈴木太郎，山田花子：糖尿病性神経障害の発生機序について．糖尿病 **29**：975–982,1986.
   2）Suzuki T, Yamada H: A study of mechanisms causing diabetic disorders of peripheral neurons. Diabetes **29**：975–982, 1986.
   ＊著書（分担執筆）
   引用文献の著者に関しては，3名まで記述する．
   和文では，4名以下の方は，ほか．
   英文では，4名以下の方は，et alと表記する．
   6）図，写真，表
   ①そのまま縮小して印刷できる大きさ・画質の原画または表を本文とは別に作成する．
   ②図については，その上に図の番号を「図1」,「図2」のように記載する．なお図の説明は別紙にまとめて記載することとし，図番号，図の表題，図の説明文を和文で記載する．
   ③写真については，縮小印刷にも耐える鮮明な写真（デジタル写真の場合は十分な解像度で撮影した写真）として作成する．なおカラー写真の場合は別途費用を請求する．
   ④表については表番号，表題をまず記し，その下に表，表の下に表の説明を入れる．
5. 費用
   ①掲載料は1頁12000円とする．ただし編集委員会から依頼した原稿については徴収しない．
   ②別刷代は実費を著者が負担する．
   ③カラー図版がある場合はその印刷にかかる実費を著者が負担する．
   ④英文要旨の校閲を編集委員会から依頼する場合には，その費用を別途著者が負担する．

6. 症例における患者情報保護に関する指針
   社団法人日本病理学会より症例報告における患者情報保護に関する指針が，診断病理
   vol.29 No.1 January 2012に公表されている．
   従って，以下の基準を順守のこと．

   ①患者の氏名，イニシャル，雅号は記述しない．
   ②患者の人種，国籍，出身地，現住所，職業歴，既往歴，家族歴，宗教歴，生活習慣・嗜好は，報告対象疾患との関連性が薄い場合は記述しない．
   ③日付は，記述せず，第一病日，3年後，10日前といった記述法とする．
   ④診断科名は省略するか，おおまかな記述とする（たとえば，第一内科の代わりに内科）
   ⑤既に診断・資料を受けている場合，他病名やその所在地は記述しない．
   ⑥顔面写真を提示する際には目を隠す．眼疾患の場合は，眼球のみの拡大写真とする．
   ⑦症例を特定できる生検，剖検，画像情報の中に含まれる番号などは削除する．

7. 施設会員
   お茶の水医学会の施設会員となっている病院に勤務する職員による投稿は，原則これを無料とする．又，二人以上の投稿があった場合も追加で料金を請求することはない．

東京医科歯科大学
お茶の水医学会

The Ochanomizu Medical Society
Tokyo Medical and Dental University, School of Medicine
Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo
Japan

お茶の水醫學雑誌　第 61 巻　第 3 号

発　行　2013 年 8 月 20 日

編集権
発　行　お茶の水医学会
会 長 湯浅 保仁
〒113-8519
東京都文京区湯島 1-5-45
東京医科歯科大学
人体病理学分野研究室内
TEL:03-5803-5172
ochamed.aps@tmd.ac.jp

印　刷　理想社

前　目次へ