

## 学位（博士）授与記録

おぎ の あき ひろ  
萩 野 晶 弘

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2667号

学位授与の日付：平成26年8月26日

主 論 文：Vascular waveform analysis of flap-feeding vessels using color Doppler ultrasonography  
(超音波カラードプラを用いた皮弁栄養血管波形解析)

著 者：Ogino A, Onishi K

公 表 誌：Plast Surg Int (DOI: 10.1155/2014/249670)

### 論文内容の要旨

【背景および目的】形成外科領域における皮弁栄養血管の血流評価法としては、血管造影や magnetic resonance angiography (MRA), multi detector-row computed tomography (MDCT) などさまざまな方法が利用され、安定した検査成績が得られている。しかし、これらの検査では血管の存在や走行は確認できるが、血流速度や血流量、血管抵抗など、真の意味での血流評価は行えない。これに対し近年、超音波カラードプラは、無侵襲、簡便、比較的低コストで1 mm以内の微細な血管の描出が可能なることから皮弁栄養血管、特に穿通枝の同定に用いられ、その有用性が報告されている。われわれは、皮弁移植に際して超音波カラードプラによる栄養血管の血管波形解析を行い、術前評価に応用している。本稿では検査法の概要を紹介し、その有用性について報告する。

【対象および方法】有茎皮弁による再建手術を施行した症例19例を対象とした。使用した皮弁は広背筋皮弁8例、腹直筋皮弁6例、大胸筋皮弁3例、大腿筋膜張筋皮弁2例であった。使用した超音波診断装置はXARIO SSA-660A・770A® [東芝メディカルシステム(株), 大田原]で、7.5~10 MHz 表在用高周波リニアプローブを用いた。血管波形から解析した項目は、血管径、血流量(F-V)、最高血流速度(Vmax)、最低血流速度(Vmin)、平均血流速度(Vmean)、resistance index (RI)、pulsatility index (PI)、acceleration time (AT)を計測した。F-Vは平均流速の時間積分値と血管を正円と仮定した断面積の積として算出し、RIは $(V_{max}-V_{min})/V_{max}$ 、PIは $(V_{max}-V_{min})/V_{mean}$ で算出した。血管波形の計測部位は、皮弁栄養血管分岐後約3 cm以内の部位で計測した。血管波形計測時の超音波の入射角度は原則60度以内とし、3心拍以上安定して描出できた波形を採用した。動脈波形はHirai et al.の血流波形分類を一部改変して5型に分類した。また、D-1a、D-1b、D-2波形を正常波形、D-3、D-4波形を異常波形とした。

【結果】術前に超音波カラードプラを施行した19例のうち、皮弁栄養血管の血管波形に異常を認めしたのは4例(D-4型1例、D-3型1例、血管描出不良例2例)であった。D-4型を呈した1例は縦隔炎に対し、左腹直筋皮弁による再建を予定し、上腹壁動脈の血管波形解析を行ったが、Vmax: 15.6 cm/sec、RI: 0.34、PI: 0.50と明らかに低値であった。内胸動脈中枢側の波形はD-2型と正常波形であったため、内胸動脈の損傷、血管狭窄を生じている可能性が疑われた。そのため、広背筋皮弁による再建へと術式を変更した。D-3型を呈した1例は縦隔炎に対し、右腹直筋皮弁による再建を予定し、右上腹壁動脈の血管波形解析を行ったが、Vmax: 15.0 cm/secと低値であり、術後筋弁末梢部に壊死を生じた。血管描出不良例の2例はともに縦隔炎に対し、腹直筋皮弁による再建を予定し、上腹壁動脈の血管波形解析を行ったが、内胸動脈から上腹壁動脈の血管描出が不良であった。1例ではその外側方向に腹直筋に流入する血管を確認したので血流評価を行った。血管径は1 mm程度とやや細いものの、FV: 4 ml/min、Vmax: 19.1 cm/sec、血管波形はD-2型と正常であり、皮弁移行は可能であると判断した。術後、皮弁遠位部の部分壊死を生じたが、原因としては胸部上方の欠損を被覆するために皮弁遠位部の緊張が強かったためと推察された。もう1例は、内胸動脈の閉塞と判断し、大網と大胸筋皮弁による再建に変更した。ほかの15例は、血流量や血流速度は十分な値で、血管波形も正常波形であり、皮弁は全生着した。

各皮弁の栄養血管別にみると、上腹壁動脈静脈茎の腹直筋皮弁4例中、D-1b型1例、D-2型1例で皮弁は全生着したが、D-2型1例、D-3型1例で皮弁の部分壊死を生じた。下腹壁動脈静脈茎の腹直筋皮弁2例の波形はD-1b型、D-2型各1例で皮弁は全生着した。胸背動脈静脈茎の広背筋皮弁8例の波形はD-1a型、D-1b型各3例、D-2型2例で皮弁は全生着した。

胸肩峰動静脈茎の大胸筋皮弁3例の波形はD-1b型3例で皮弁は全生着した。外側大腿回旋動静脈茎の大腿筋膜張筋皮弁2例の波形はD-1b型、D-2型各1例で皮弁は全生着した。

【考察】われわれは以前、約40例の皮弁栄養血管の血管波形解析を行い、血管径、FV、Vmax、RI、PIなど各計測値について基準値を設定した。現在、術前の皮弁血流評価の指標として適用しているが、安全に皮弁の挙上が可能と判断する基準値については、血管径：1 mm以上、FV：5 ml/min以上、Vmax：15 cm/sec以上、RI：0.7以上、AT≤100 msecをおおよそ目安としている。実際に皮弁移植を行った症例の血管波形解析結果とわれわれが設定した基準値とを比較検討したが、皮弁が全生着した症例の波形はD-1aかD-1b、D-2型と正常波形であり、口径、FV、Vmaxは設定値より高値で良好な血流を認め、RI、PI、ATは基準値範囲内であった。

【結語】皮弁の血行動態の解析では血管走行や血管径、血流速度などの基本的な情報のみならず、血流量や血管抵抗、動脈波形についても評価することが重要である。血管描出など技術に熟練を要し、装置の取り扱いにも経験を要するため、血管解剖を熟知している術者本人が検査に同席し、超音波装置の操作や設定を検査技師と連携して行うことが、皮弁栄養血管の走行や詳細な血行動態を把握し、安全な手術を行うために重要と思われた。

みつ い かず まさ  
三 井 一 賢

学位の種類：博士(医学) 学位番号：乙第2668号

学位授与の日付：平成26年7月24日

主 論 文：Increased TLR2 and TLR4 expression in peripheral neutrophils isolated from Kawasaki disease

(小児における好中球 TLR2、TLR4 発現と川崎病との関係)

著 者：Mitsui K, Yusa T, Miyazaki S, Ohara A, Saji T

公 表 誌：Pediatr Allergy Immunol Pulmonol 27: 24-29, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】好中球は体内に侵入した微生物など異物に最も早期に反応し、自然免疫さらには獲得免疫において極めて重要な役割を担っている。細胞表面または細胞内に存在する toll-like receptor (TLR) の多くが好中球にも存在し、特に TLR2 と TLR4 は詳細に研究されている。しかし、これらの研究は成人由来の好中球が対象であり、免疫が未熟な新生児や小児における好中球機能の研究はされていない。

川崎病は小児に好発する急性発熱性疾患である。その病態は全身性の血管炎であるが、その発症機序はいまだ明らかではない。自己免疫疾患とする考え方や感染症が発症の誘因であるとする意見がある。

今回、感染症に罹患していない小児を対象に、好中球の機能が成人と同等になる年齢を知る目的で、TLR2、TLR4 発現強度を指標として好中球機能と年齢との関係を検討した。また、小児感染症および川崎病患者の好中球の TLR2、TLR4 発現強度を非感染症小児の場合と比較し、さらに川崎病発症の原因についても解析を加えた。

【対象および方法】対象は2008年3月～2012年7月に東邦大学医療センター大森病院小児科を受診した12歳未満の小児70例(細菌感染症18例、川崎病14例、非感染症38例)。抽出した好中球に phycoerythrin を結合した抗ヒト TLR2 抗体、抗ヒト TLR4 抗体を結合させ、フローサイトメトリーにて TLR2、TLR4 の発現強度を測定した。8名の川崎病患者では、好中球 TLR2、TLR4 発現強度と血清 CRP 値を時系列に測定し、治療による変化を追跡した。

【結果】非感染症群の小児では、1～5歳の好中球 TLR2、TLR4 発現強度が、1歳未満および6歳以上に比べて有意に高値であり、年齢による違いが見られた。感染症患者由来の好中球 TLR2、TLR4 発現強度は、非感染症群と比較していずれも有意に高く、川崎病患者での発現は非感染症群、感染症群の患者と比較していずれも有意に高値であった。

また、TLR2 発現は感染の有無にかかわらず TLR4 より高値であり、TLR2 と TLR4 の相関係数は感染症群で 0.8730、非感染症群では 0.8393 であった。川崎病患者においても同様の傾向がみられ、相関係数は 0.9095 であった。さらに、intravenous immunoglobulin (IVIG) 投与後の川崎病患者の好中球 TLR2、TLR4 発現強度と血清 CRP 値は、症状改善に

伴いいずれも同様な推移で低下した。

【考案】非感染症小児において、1歳未満および6歳以上に比べ1～5歳の好中球 TLR2, TLR4 発現強度が最も高く、これら TLRs の強度は成人と同等であった。この時期にさまざまな微生物等から刺激を受け、好中球機能は成人と同等になることを初めて明らかにできた。

TLR2, TLR4 は微生物の病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識し、感染防御に関与する受容体として主に単球/マクロファージにおいて詳細に研究されている。川崎病患者の単球では TLR2 が高発現しているとの報告や、川崎病発症に感染症の関与が示唆されるとの報告がある。しかし、単球よりも早期に感染防御の役割を果たすのは好中球である。そのため、今回、川崎病患者の好中球 TLR2, TLR4 発現を解析することにより、川崎病発症に感染症が関与しているかどうかを検討した。その結果、川崎病患者では感染症患者と同様に非感染症小児に比べ有意差をもって高値であった。また、TLRs 発現強度は IVIG 投与後の症状改善に伴い TLR2, TLR4 いずれの発現強度も低下した。CRP 値も TLRs の低下と同様な推移で低下した。これらの結果より、感染症が川崎病発症の誘因の1つとなっている可能性が示唆された。

【結語】好中球機能は1～5歳で十分に成熟すると考えられる。また、好中球 TLRs 発現は川崎病患者においても感染症患者と同様に有意に高く、CRP 値の推移は TLRs の発現強度、特に TLR2 とよく相関しており、感染症が川崎病発症の誘因となっている可能性が示唆された。

おおわだ さと こ  
大和田 聡 子

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2669号

学位授与の日付：平成26年7月24日

主論文：The relationship between vasomotor symptoms and menopause-associated dizziness  
(血管運動神経症状と閉経期めまいの関連)

著者：Owada S, Suzuki M

公表誌：Acta Otolaryngol 134: 146-150, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】多くの女性が50歳前後に閉経となり、そのうち何割かは閉経移行期（更年期）にさまざまな更年期症状を体験する。更年期症状としてホットフラッシュや夜間の発汗 [血管運動神経症状 (vasomotor symptoms : VMS)], めまい、動悸、頭痛、肩こり、不眠、うつ、神経過敏、不安感、倦怠感、イライラ感がある。今回われわれは VMS と更年期めまいの関連を検討するために、VMS の有無によるめまい改善時期の比較をした。またエストロゲンやプロゲステロンによるホルモン補充療法 hormone replacement therapy (HRT) は VMS に対し最も効果的であるが、VMS を持つめまい患者の早期改善に HRT が有効であるかを検討した。

【対象と方法】対象は2008年4月～2012年3月の期間に東邦大学医療センター佐倉病院の耳鼻咽喉科に更年期症状とめまいの両方を訴えて受診した40～59歳の女性85名である。めまいや更年期症状の詳しい問診や神経耳科学的検査（純音聴力検査、平衡機能検査）を施行した。治療は抗めまい薬やステロイドによる薬物治療や平衡運動療法などを施行した。更年期症状のうち特に VMS について注目し、VMS ありの症例（VMS 群）となしの症例（非 VMS 群）の両群間で自覚的なめまい改善時期を比較した。また HRT 治療ありの症例（HRT 群）と HRT 治療なしの症例（非 HRT 群）の両群間のめまい改善時期の比較も行った。

【結果】1) 神経耳科学的診断：良性発作性頭位めまい症 benign paroxysmal positional vertigo (BPPV) 44例 (51.8%)、末梢前庭障害 15例 (17.6%)、メニエール病 14例 (16.5%)、めまいを伴う突発性難聴 2例、聴神経腫瘍 1例、冠攣縮性狭心症 1例、ミトコンドリア脳筋症 1例と診断された。

2) 神経耳科学的診断 (VMS 群と非 VMS 群)：VMS の有無が不明またはめまい改善時期不明の症例を除いた、VMS 群 29例と非 VMS 群 38例を比較した。両群間の各疾患別割合の有意差は認めなかった。

3) VMS群と非VMS群の比較：めまい改善時期については非VMS群の方がVMS群に比較して2カ月以内の改善者が統計学的有意に多かった。しかし1カ月以内または3カ月以降では有意差は認めなかった。

4) HRT群と非HRT群の比較：VMS群のうち7名がHRT群であり、非HRT群に比べて改善が早い傾向にあったが統計学的有意差はなかった。

【考察】更年期女性においてVMSはめまいの改善に負の影響を与えることが本研究で判明した。2カ月以内のめまいの改善者は非VMS群の方が有意にVMS群より多かったが、それ以前と以降に有意差は認めなかった。最終的な改善者率に影響を与えなかったのは、VMSに対する治療が3カ月以降に影響していた可能性がある。

めまいやふらつきは中年女性に多くみられる症状であるが、閉経と関連していると考えた場合、婦人科を受診することもある。また心因性の不定愁訴であると誤解されることもある。本研究では更年期症状のめまいと考えていた85人中75人が末梢前庭障害と判明した。

BPPVは85例中44例であった。マウスの研究では閉経によるエストロゲンの急激な低下により内耳のエストロゲン受容体数の減少が起こり、耳石代謝機構を障害しBPPVの発症が多くなると報告している。われわれはVMS群と非VMS群にBPPVの発症率の有意差は認めなかった。これはVMSが耳石代謝機構の障害を引き起こしていないということを示唆している。運動はVMSを改善させると同様にBPPVにも有効である。運動リハビリテーションはめまいにもVMSにも有効と考えた。

更年期障害はエストロゲンの低下、社会的要因、心因的要因の3つの原因によって発症する。本研究にて85例中14例がメニエール病であった。メニエール病のめまい発作にも心因や環境因子が影響するため、抗不安薬や抗うつ薬の使用は更年期めまいに有効である可能性が考えられた。

本研究では2カ月以内の非VMS群がVMSに比べて有意にめまいの改善者が多いことが判明した。VMSのホットフラッシュや発汗により夜間の睡眠の質が低下することが、めまい改善遅延に影響すると考えられた。

HRTはVMSに最も効果的な治療である。過去の報告ではHRTが閉経後の女性の体平衡バランスの改善に有効、無効両方がある。本研究ではHRTによりめまいの改善を促進する傾向はあったが、統計学的に有意差は認めなかった。今後症例数を増やして検討することが必要である。

【結語】VMS、特にホットフラッシュはめまいの早期改善に負の影響を与えた。またHRTはめまいの改善に効果はなかった。

い が あつし  
伊 賀 淳

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2670号

学位授与の日付：平成26年10月21日

主 論 文：Transradial versus transfemoral coronary intervention for acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: Is transradial coronary intervention suitable for emergency PCI in high-risk acute myocardial infarction?

(心原性ショックを合併した急性心筋梗塞患者に対する橈骨動脈穿刺及び大腿動脈穿刺による冠動脈インターベンションの比較：橈骨動脈穿刺による冠動脈インターベンションは危険度の高い急性心筋梗塞に対する緊急PCIとして適しているか?)

著 者：Iga A, Wagatsuma K, Yamazaki J, Ikeda T

公 表 誌：J Invasive Cardiol 26: 196-202, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】急性心筋梗塞（acute myocardial infarction：AMI）患者に対する冠動脈インターベンション（percutaneous coronary intervention：PCI）は薬剤療法と比べ死亡率や虚血の再発を減少させており、橈骨動脈穿刺によるPCI（transradial coronary intervention：TRI）および大腿動脈穿刺によるPCI（transfemoral coronary intervention：TFI）

の2つが世界中で広く用いられている。TRIはTFIに比べ、経験を要するが出血性合併症を減少し、これはAMI患者において死亡や虚血再発の改善に寄与していると報告されている。一方、心原性ショックはAMI患者の5~10%に発症し、早期の血行再建を行ったとしてもその死亡率は依然高率であると報告されている。AMI患者に対するTRIおよびTFIでの治療成績を比較した研究は多数報告されているが、ほとんどが心原性ショック合併例を除外項目としており、心原性ショックを合併したAMI患者に対していずれの穿刺部位による治療が望ましいかに関しては依然不明である。本研究での目的は、心原性ショックを合併したAMI患者に対して緊急PCIを施行した症例における、TRIおよびTFIでの臨床成績を比較することとした。

【対象および方法】対象は2006年1月1日~2012年8月31日に、急性心筋梗塞発症から12時間以内に緊急PCIを施行し得た連続507症例のうち、心原性ショックを合併した85症例とした。TRIを施行した60症例（TRI群）とTFIを施行した25症例（TFI群）に分け、重大な出血および血管合併症、主要心血管および脳血管イベント（major adverse cardiac or cerebrovascular events：MACCE）、総死亡、来院から責任病変拡張までの時間（door-to-balloon time）、PCIの成功率を評価項目とした。

【結果】臨床背景や治療背景、抗血小板剤や抗凝固薬などを含む投薬内容に関しては、両群で有意差を認めなかった。TRI群はTFI群と比較し、重大な出血および血管合併症に関して、30日（6.7% vs. 28.0%,  $p < 0.05$ ）および1年（log-rank  $p < 0.05$ ）でそれぞれ有意に少なかった。MACCEに関しては30日（28.3% vs. 44.0%,  $p = 0.207$ ）および1年（log-rank  $p = 0.058$ ）、総死亡に関しては30日（26.7% vs. 40.0%,  $p = 0.302$ ）および1年（log-rank  $p = 0.089$ ）でそれぞれ有意差を認めなかった。また、TRI群はTFI群と比較し door-to-balloon time（99.8 vs. 110.4 min,  $p = 0.301$ ）およびPCIの成功率（95.0 vs. 96.0%,  $p = 1.000$ ）に関しても非劣勢を示した。

【考察】1) 重大な出血および血管合併症：AMI患者では複数の抗血小板剤を投与されることが多く出血および血管合併症をしばしば認める。今回の検討での重大な出血および血管合併症の頻度は、心原性ショックを合併したAMIを対象とした過去の報告と同程度であった。また、心原性ショックに対してintraaortic balloon pump（IABP）やpercutaneous cardiopulmonary support（PCPS）のような補助循環を使用することは欧米のガイドラインでも推奨されているが、これらの補助循環は出血性合併症を増悪させる可能性があるとして報告されている。これらの補助循環を同時に使用する際には出血性合併症の危険はさらに高まると予想され、このような状況下ではTRIを選択することで各患者での総合的な出血の頻度を縮小する可能性があると考えられた。また、IABPおよびPCPSを同時に使用する際には両側の大腿動脈を使用することが多くこのような状況下でもTRIは有用であると考えられた。

2) MACCEおよび総死亡：今回の検討でのMACCEおよび総死亡の頻度は心原性ショックを合併したAMIを対象とした過去の報告と同程度であった。出血性合併症はMACCEや院内死亡の独立した危険因子と報告されている。しかし、今回の検討ではTRI群で有意に出血性合併症の減少を認めたが総死亡に関して両群で有意差は認めなかった。一般に、心原性ショックを合併したAMI患者の死亡率は高率であり、これが影響した可能性が考えられた。

3) Door-to-balloon timeおよびPCI成功率：Door-to-balloon timeは死亡の独立した予測因子と報告されている。今回の検討では両群で有意差なく、かつ全体の成功率も95.3%を示しており、これまでに報告された心原性ショック合併例を除外もしくは含めたAMIの研究結果と同程度であった。TRIがTFIに比べ治療成績を向上させる一因として術者のTRIに関する治療経験が重要であると報告されており、この条件が満たされるのであればTRIは穿刺部の第一選択肢として有用であると考えられた。

4) 研究における限界点：本研究にはいくつかの限界点が考えられた。まず、東邦大学医療センター大森病院では基本的にTRIによるPCIを行っているためTRIの手技に関して修練されており、今回の臨床結果に影響した可能性がある。次に、穿刺部の選択は術者の判断により決定しており選択バイアスが生じた可能性がある。しかし、最も重篤な症例に使用するPCPSの使用頻度に関しては両群で同等であり、より重篤な症例ではTFIを選択したということではないと考えた。最後に、今回の検討は後ろ向き、非無作為、単一の施設による研究であり症例数も比較的少数であった。今後は前向き多施設での研究が必要と考えられた。

【結語】TRI群はTFI群と比較し、重大な出血および血管合併症を有意に減少させ、また、MACCEや総死亡に関しても非劣勢を示した。以上よりTRIはより危険の高いAMI、特に心原性ショックを合併した場合にも適していると考えられた。

あん らく あや こ  
安 樂 礼 子

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2671号

学位授与の日付：平成26年10月21日

主 論 文：Baseline thickness of macular ganglion cell complex predicts progression of visual field loss

（ベースラインの黄斑部網膜神経節複合体厚は視野障害の進行を予測する）

著 者：Anraku A, Enomoto N, Takeyama A, Ito H, Tomita G

公 表 誌：Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 252: 109-115, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】緑内障は網膜神経節細胞および網膜神経線維の消失に対応した視野障害を呈する進行性の視神経症である。いったん失われた視野障害は元に戻らないため、早期診断が重要とされている。スペクトラルドメイン光干渉断層計（optical coherence tomography：OCT）により計測された網膜神経線維層（retinal nerve fiber layer：RNFL）厚や黄斑部網膜神経節複合体（ganglion cell complex：GCC）厚が緑内障の診断に有用であるという報告は過去に多数ある。視野障害の進行とRNFL厚との関連については、ベースラインのRNFL厚の非薄化が緑内障の視野障害の進行因子だった報告や、反対に緑内障による視野障害の進行を認めた群と不変群で、ベースラインのRNFL厚に有意差は認めなかったという報告がある。一方、視野障害の進行とGCC厚との関連についての報告はほとんどない。今回われわれは、ベースラインのRNFL厚およびGCC厚が原発開放隅角緑内障（primary open angle glaucoma：POAG）の視野障害の進行因子になるかを検討した。

【対象】2008～2009年に東邦大学医療センター大橋病院眼科を受診した緑内障患者のうち、POAGを認め、スペクトラルドメインOCT（RTVue100；Optovue Inc., Fremont, CA, USA）にてRNFL厚およびGCC厚を測定後2年以上経過が追え、かつ同期間に信頼性のあるハンフリー視野検査（プログラム30-2）が5回以上測定できたものとした。等価球面度数が-8 Dあるいは+3 Dを超えるもの、mean deviation（MD）が-12 dBを超える後期緑内障、OCTの画像の質が悪いもの、視野に影響を与えるような眼疾患や全身疾患を有するもの、経過中に内眼手術を受けたものは除外した。視野障害の進行判定にはMD slopeの傾きを用い、過去の報告を参照してMD slopeが-0.4 dB/Yより小さいものを視野進行が速い群、MD slopeが-0.4 dB/Yまたはそれ以上のものを視野進行が遅い群として、2群間のベースラインのOCTによる測定値、眼圧等を比較した。

【結果】対象の内訳は狭義のPOAGが12例、正常眼圧緑内障が44例の計56例。男性25例、女性31例、平均年齢は55.4歳、平均観察期間は32.3カ月、平均の球面等価度数は-3.6 Dであった。平均のMD値は $-3.26 \pm 3.0$  dB、平均のpattern standard deviation（PSD）値が $6.94 \pm 4.2$  dBと早期の緑内障であった。経過観察開始時の平均眼圧は14.6 mmHgと、POAGの症例も含めてすでに治療が開始されており、低めの値であった。56例中、視野進行が速かった群は15例、遅かった群は41例であった。2群間において、年齢、性別、観察期間、屈折、MD値、PSD値、ベースラインの眼圧と経過観察中の眼圧において、進行群と不変群で有意差は認めなかった。一方OCTの計測値では、下耳側のRNFL厚は視野進行が速かった群で薄い傾向があったが、2群間で有意差を認めなかった。GCC厚は平均GCC厚（ $74.0 \pm 7.2$   $\mu\text{m}$  vs.  $80.3 \pm 8.6$   $\mu\text{m}$ ）と下方半視野のGCC厚（ $68.0 \pm 6.6$   $\mu\text{m}$  vs.  $78.2 \pm 11.6$   $\mu\text{m}$ ）が視野進行の速かった群で有意に薄くなっていた。また、GCC厚のパラメータであり全体の非薄化を表すglobal loss volume（GLV）、局所の非薄化を表すfocal loss volume（FLV）はともに視野進行の速かった群で高くなっていた。多重ロジスティック回帰では、下方のGCC厚が薄いほど、視野の進行に影響するという結果が得られた。

【考察】緑内障では下方のRNFL厚が最初に障害されやすく、また進行の変化も下方に認められやすいと報告されている。今回の結果では有意差は認めなかったものの、視野障害が速かった群ではベースライン時に下耳側のRNFL厚が非薄化している傾向があり、その部位はLeung et al.の報告で最もRNFL厚の進行が認められたという部位と一致していた。GCC厚に関しては、進行の早い群でベースラインの平均GCC厚、下方のGCC厚が有意に薄く、GCC厚の方がRNFLより初期の構造変化を捉えている可能性が示唆された。GCCのパラメータであるGLVとFLVは、最近の報告でRNFL厚

よりも緑内障の構造変化をより早く検出している可能性が指摘されており、今回の結果でも、視野障害の早い群においてベースライン時から GLV, FLV が高くなっていた。

【結論】比較的早期の緑内障では、ベースラインの GCC 厚（特に下方の GCC 厚）が薄いものは視野進行が早い可能性が示唆された。

なが やま だい じ  
永 山 大 二

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第 2672 号

学位授与の日付：平成 26 年 10 月 21 日

主 論 文：Effects of serotonin on expression of the LDL receptor family member LR11 and 7-ketocholesterol-induced apoptosis in human vascular smooth muscle cells  
（セロトニンがヒト血管平滑筋細胞における LR11 発現と、7-ketocholesterol が誘発するアポトーシスに与える影響）

著 者：Nagayama D, Ishihara N, Bujo H, Shirai K, Tatsuno I

公 表 誌：Biochem Biophys Res Commun 446: 906-910, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】近年、血管平滑筋細胞（vascular smooth muscle cells：VSMCs）の血管中膜から内皮への遊走に low-density lipoprotein（LDL）受容体ファミリーである LDL receptor relative with 11 ligand-binding repeats（LR11）の発現が関与し、内皮肥厚の一因となりうることが報告されている。また、不安定プラークにおいては周辺の VSMCs 消失を伴ったコレステロール酸化物（オキシステロール）の蓄積が認められ、その機序としてオキシステロール自体が VSMCs のアポトーシスを惹起することをわれわれは報告している。VSMCs の遊走、増殖、アポトーシスは動脈硬化の進展において主要な変化といえるが、しかしその制御機構はまだ不明な点が多い。一方、セロトニン（5-hydroxytryptamine：5-HT）は VSMCs の増殖因子として作用し、動脈硬化と関連することが知られている。われわれは選択的 5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗薬であるサルボグレラートが、血管弾性指標である cardio-ankle vascular index を低下させる（血管弾性能を改善させる）ことを報告している。しかし、5-HT が動脈硬化の進展において果たす役割は十分解明されていない。われわれは今研究において VSMCs を用い、LR11 の発現およびオキシステロールが誘発するアポトーシスに対して 5-HT が与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト大腿動脈由来の VSMCs を用い、*in vitro* における細胞増殖（hemocytometer にて測定）および、LR11 の発現ならびに 7 ケトコレステロール（7-ketocholesterol：7KCHO、オキシステロールの 1 種）が誘発するアポトーシスに対して 5-HT が与える影響を検討した。細胞増殖および LR11 発現に関してはサルボグレラートが 5-HT の作用に与える影響も同時に検討した。LR11 は reverse transcription polymerase chain reaction（PCR）法による messenger ribonucleic acid（mRNA）発現をもって評価した。アポトーシスはフローサイトメトリーを用いた propidium iodide 法にて Sub-G<sub>1</sub> 期細胞の定量を行うことでその割合を測定し、カスパーゼ活性は FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit（BD Pharmingen, La Jolla, CA, USA）および Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay（Promega, Corp., Fitchburg, WI, USA）の 2 種類の手法をそれぞれ用い測定した。

【結果】VSMCs 培養開始 8 日目までの時点で、5-HT は濃度（1~100 μM）依存的に VSMCs の増殖を促進させ、その効果はサルボグレラート（10 μM）同時添加にて有意に抑制（-22%）された。また、VSMCs 培養開始 72 時間後に 5-HT（1~100 μM）およびサルボグレラート（10 μM）を 72 時間同時添加したところ、5-HT は単独で濃度依存的に LR11 mRNA 発現を促進し、その効果はサルボグレラート同時添加にて抑制された。VSMCs 培養開始 48 時間後より 5-HT（100 μM）を 96 時間単独添加した場合、VSMCs におけるカスパーゼ 3（/7）活性およびアポトーシスの程度に差は認めなかったが、培養開始 72 時間後より 7KCHO（50 μM）を 72 時間単独添加した場合にはそれぞれ明らかな増加を認めた。培養開始 48 時間後より 5-HT（100 μM）を 96 時間、7KCHO（50 μM）を 72 時間（5-HT 添加 24 時間後より同時に）添加したとこ

る、7KCHO 単独添加で増加したカスパーゼ3 (/7) 活性およびアポトーシスの程度は低下した。

【考察】5-HT は VSMCs の増殖促進および、LR11 発現促進を介した血管中膜から内皮への VSMCs 遊走促進によって血管内皮肥厚を引き起こす。内皮の器質的損傷を契機に局所に凝集した血小板より放出された 5-HT は、このようにして損傷部位を補修しているものと想定できる。サルボグレラートはこういった 5-HT の作用を抑制することで血管内皮の肥厚を防ぎ、抗動脈硬化作用を発揮しうるものと考えられる。一方、7KCHO はカスパーゼ3 (/7) を介した VSMCs のアポトーシスを誘発し不安定プラークの形成に寄与しうるが、5-HT 添加はその効果を抑制する作用を有していた。5-HT による血管内皮肥厚の促進作用および不安定プラーク形成の抑制作用は、動脈硬化の進展を考える上では一見相反するようと思われるが、いずれも血管の器質的な障害を修復・防御する 5-HT 特有の作用とみなすことができ、これらは血管リモデリングのメカニズムにおける新たな知見といえる。

きた むら のり こ  
北 村 範 子

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第 2673 号

学位授与の日付：平成 26 年 10 月 21 日

主 論 文：Basic fibroblast growth factor as a potential stent coating material inducing endothelial cell proliferation  
(次世代薬剤溶出性ステント開発における基礎検討～bFGF の血管壁細胞に対する反応性評価)

著 者：Kitamura N, Hasebe T, Matsumoto T, Hotta A, Suzuki T, Yamagami T, Terada H  
公 表 誌：J Atheroscler Thromb 21: 477-485, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】動脈硬化症を原因とした血管狭窄に対する低侵襲治療技術として血管内治療が広まっているが、治療に用いるステントは、器具を構成する金属材料の生体適合性が不十分であり、留置後に発生する血管の再狭窄が問題となっている。再狭窄を引き起こさないステント材料の開発は、治療技術の向上に寄与する重要な課題である。再狭窄の発生は、ステント表面での血液細胞成分の付着・凝固やステント拡張に伴い発生する血管壁の創傷を起点とした平滑筋細胞の過剰増殖が主要因とされ、これらを抑制する手法・材料が研究されてきた。薬剤溶出性ステント (drug eluting stent : DES) は、従来の金属ステントの表面に細胞増殖を抑制する薬剤を含浸させたポリマーを被覆し徐放することで再狭窄を防ぎ、薬剤徐放が続くかぎり効果を発揮する。一方で、この薬剤は創傷治療に寄与する内皮細胞の増殖も阻害するため、薬効が切れた後、治癒しなかった創傷を起点とした再狭窄が数多く報告されており、恒久的な高い生体適合性のある再狭窄を防ぐステントの研究開発は、いまだ重要なテーマである。

そこで、本研究課題では、大きなテーマとして、薬剤含浸ポリマーを金属表面に被覆し、薬剤徐放速度制御および長期的生体適合性の確保できるステントの開発を目標として掲げた。本研究では、その重要な一端を担う薬剤徐放の制御に重点を置き、薬剤の至適濃度の評価を行った。また、材料表面の内皮細胞適合性を向上させ、患部の内皮化を増進することで平滑筋細胞の増殖を抑えられると考え、徐放薬剤には細胞増殖因子である basic fibroblast growth factor (bFGF) を選定し、内皮細胞増殖に与える影響を評価した。

【方法】使用する細胞としては、細胞研究で汎用されているヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell : HUVEC) およびヒト大動脈血管平滑筋細胞 (human aortic smooth muscle cell : HASMC) を用いた。HUVEC に関しては、帝王切開患者から同意を得た後、臍帯から細胞を分離し使用した。

1) 細胞増殖はマルチプレートに 20000 cell/ml で細胞を播種し、bFGF を添加後 1, 2, 3 日目の増殖を Cell Counting Kit-8 [CCK-8 ; (株) 同仁化学研究所, 益城町, 熊本] を用いて吸光度を測定した。

2) 細胞遊走はメンブレン付きマルチプレートに 1000000 cell/ml で細胞を播種し、メンブレン下部に遊走した細胞を蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察し、画像解析ソフトで遊走した細胞の面積比として換算した。



3) bFGF 濃度 1, 10, 100 ng/ml で培養した HUVEC から蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法で各濃度における endothelial nitric oxide synthase (eNOS) の発現を評価した。

【結果】血管内皮細胞は bFGF 10 ng/ml をピークに濃度依存性に増殖および遊走を示した。一方で血管平滑筋細胞は増殖および遊走を示すが、濃度による差はみられなかった。また、血管拡張作用の指標として eNOS の発現をみたところ、bFGF 10 ng/ml で最も発現が高かった。

【考察】これまでステントにおける薬剤徐放を考える際、細胞を増殖させないことを前提に研究されてきたが、本研究では逆に、細胞増殖因子と呼ばれる細胞の増殖を促す物質を用いることを考えた。bFGF は生体内に存在し、細胞の増殖や分化の調節を行っているタンパク質の 1 種である。創傷治癒・再生医療の分野ですでに多く研究され、血管新生作用に注目した研究も多く行われている。血管新生因子にはこのほか血管内皮細胞増殖因子や肝細胞増殖因子などがあるが、毛細血管レベルの新生であったのに対し、bFGF では小動脈のレベルであり、新生される血管の質が違うことが分かっている。bFGF は線維芽細胞の増殖を促進する物質として発見されたが、その後の研究でこれ以外にもいくつかの増殖促進作用があることが明らかになった。とくに血管内皮細胞に対する強い増殖、遊走促進作用が注目され、分化因子、栄養因子としての働きも報告されている。正常な血管を構築するためには血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞の相互作用が必要であるものの、bFGF は血管壁細胞すべての増殖に関与しており、ステント再狭窄の原因となる平滑筋細胞や線維芽細胞を増殖するとされてきたが、本研究において、bFGF の投与後、平滑筋細胞の過剰増殖はせず、また内皮細胞も早期増殖は励起されるが、ピークを超えた後にはさらなる増殖はしないことが分かった。

【結語】bFGF は内皮細胞の増殖性に対して濃度依存的に影響を及ぼす一方、平滑筋細胞に対しては濃度依存性を示さなかった。したがって、bFGF は至適濃度 10 ng/ml で平滑筋細胞の過増殖なく、ステント内腔の内皮細胞の早期被覆に有用であると考えられた。さらに再狭窄を励起する反応の抑制とともに留置したステントを取り巻く血管の新生に寄与する可能性もあり、創傷治癒の回復と末梢虚血の予防が期待される。

さ さ き ゆう き  
佐々木 雄 毅

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第 2674 号

学位授与の日付：平成 26 年 11 月 27 日

学位審査論文：The *in vitro* research of bacterial invasion of prosthetic vascular grafts: Comparison of elastomer-sealed and gelatin-coated Dacron vascular grafts  
(人工血管への細菌進入に関する研究：エラストマーシールドダクロンとゼラチンコーティングダクロンの比較)

著者：Sasaki Y

公表誌：Surg Today 44: 1542-1547, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】人工血管感染は難治性で致死的な合併症である。細菌感染に関する人工血管側の因子は、細菌の外側から内側への通過と人工血管への付着で決定されると考えられる。人工血管への付着に関する論文はしばしば散見されるが人工血管への細菌の通過に関する文献はほとんどない。本実験では人工血管感染モデルを作成し人工血管外側から内側へ侵入する細菌の量と時間の関係を調査した。さらに人工血管断面の電子顕微鏡所見を観察した。

【方法】1) 細菌の侵入量と時間の関係：人工血管素材として日本でのみ販売されている新しい人工血管で低い通過性が特徴のエラストマーシールドダクロングラフト (elastomer-sealed Dacron vascular graft : ESDVG) と従来から使用されているゼラチンコーティングダクロングラフト (gelatin-coated Dacron vascular graft : GCDVG) を選択しデータを比較した。細菌は緑膿菌を選択し、約  $1.0 \times 10^8$  colony forming units (CFU)/ml の生食懸濁液として使用した。以下のようにして人工血管感染モデルを作成した。8 mm ストレートの人工血管を 6 cm 長に切断し 6-well culture plate に U 字に挿入。人工血管内側に清潔な生食 2 ml を、外側に緑膿菌生食懸濁液を 5 ml 注入した。60 時間まで 9 つのタイムポイントで人工

血管内側の生食を採取し、寒天培地に塗布、培養することで各時間の細菌数を測定した。ESDVGで18モデル、GCDVGで12モデル作成した。両群間の各時間帯での細菌数の比較にはMann-Whitney *U*-testを人工血管内側に菌が出現するまでの時間をKaplan-Meier curveで比較した。 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

2) 電子顕微鏡による人工血管の観察：1)で60時間細菌生食懸濁液に浸漬された人工血管を処理し、電子顕微鏡で観察できる試料とした。コントロールとして細菌汚染されていない人工血管も観察した。

【結果】1) GCDVGは6時間後から人工血管内側より細菌を検出したモデルが出現し、30時間までにすべてのモデルの人工血管内側より菌を認めた。人工血管内に菌が出現するまでの平均時間は $15.5 \pm 7.0$ 時間であった。ESDVGは実験開始直後に採取した検体から菌の検出を認めたものが2つあった。しかし60時間でようやく菌の検出を認めたモデルが1つと60時間でも菌が出現しなかったモデルが1つあった。人工血管内に菌が出現するまでの平均時間は $22.0 \pm 19.7$ 時間であった。両群とも平均人工血管内細菌数は時間経過で増加していった。両群間で各時間帯における人工血管外の菌量に有意差は認めなかった。人工血管内の菌量にも有意差は認めなかった。Kaplan-Meier curveで表わした人工血管内に細菌が出現するまでの時間も有意差はなかった。

2) 細菌汚染されていない人工血管の電子顕微鏡による観察ではGCDVGは平織りダクロンの構造を示しており、ESDVGは綾織りダクロンに通過性の低いエラストマーが挟まれた構造をしていた。エラストマーの層は均一ではなく薄い部分や内部に欠損を認めた。このような部分が1)における細菌通過時間に影響を及ぼしたと考えられる。細菌汚染後の人工血管では両群とも人工血管の断面に細菌を認めた。

【考察】緑膿菌は人工血管感染の原因菌としては典型的でないが自動性があり、生食中でも長期間生存できるため今回の実験に適していると考えた。また、日本でのみ販売されている新しい人工血管のエラストマーシールドダクロンを使用した。通過性の低いエラストマーを綾織りダクロンで挟んだ構造をしており、標準的なコーティング人工血管に比較すると水の通過性が非常に低くなっている。そのため、細菌の通過性も低いと考えた。今回の実験では両群間の有意差は認められなかったが、人工血管外側に高濃度の細菌汚染がある状態でも汚染直後より菌が内側へ通過するとは限らず、また時間経過とともに人工血管内側の菌量平均値が増加することが判明した。これより臨床的には人工血管外側に高濃度の細菌汚染がある状態においても、敗血症やグラフト除去に発展する前に早急に洗浄、ドレーン挿入、創部陰圧吸引療法を施行すべきである。近年、感染人工血管をなんとか保存的に治療するためにさまざまな努力がなされている。Dosluoglu et al.は鼠径部の創離開で人工血管が露出した症例をグラフト除去せず、創部陰圧吸引療法で治療できたことを報告している。外傷や感染性動脈瘤など汚染が疑わしい術野において、十分な洗浄、人工血管周囲への陰圧吸引ドレーン挿入は人工血管への細菌侵入を防ぐと考えられる。また、エラストマーシールドダクロングラフトはエラストマー層を均一に厚く改良することで細菌の侵入を防ぐことができる可能性が示唆された。

ひろ た なお  
廣 田 直

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2675号

学位授与の日付：平成27年1月29日

学位審査論文：Gene expression profiling of lung myofibroblasts reveals the anti-fibrotic effects of cyclosporine

（肺筋線維芽細胞に対するシクロスポリンの抗線維化作用とその遺伝子発現プロファイル）

著者：Hirota N, Ito T, Miyazaki S, Ebina M, Homma S

公表誌：Tohoku J Exp Med 233: 283-293, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は、原因不明な慢性進行性間質性肺炎であり、呼吸困難と呼吸機能の悪化を来し、非常に予後不良な疾患である。組織学的には、密なコラーゲン線維と（筋）線維芽細胞の増生を特徴とした線維芽細胞巣がみられ、この数は病勢との相関が言われている。筋線維芽細胞は紡錘、星形の

形態をとり、さまざまな間葉系マーカーを発現する。なかでも内部に発現する、 $\alpha$ 平滑筋アクチン (alpha-smooth muscle actin:  $\alpha$ SMA) はもっとも特徴的なものとされている。トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor-beta: TGF- $\beta$ ) は、筋線維芽細胞への分化を誘導し、コラーゲンなどの細胞外基質の過剰な産生により、強力な線維化促進作用を持つ。カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンは、Tリンパ球を不活化することにより免疫阻害作用を示し、移植拒絶反応の予防に利用されている。いくつかの臨床試験により、シクロスポリンの線維性肺疾患に対する有効性が言われているものの、その潜在的なメカニズムは不明なままである。また最近になり、急性心筋梗塞における梗塞巣縮小作用や、ネフローゼにおけるタンパク尿抑制作用といった、従来の免疫抑制作用とは異なる新たな作用が言われ始めている。

【方法】われわれは、シクロスポリンが肺の筋線維芽細胞に対し直接的に作用するとの仮説のもと、そのメカニズムについて、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルにより明らかにした。実験は胎児性肺線維芽細胞株 (MRC5) を用いて *in vitro* で行った。

【結果】線維芽細胞において、TGF- $\beta$  により誘導される  $\alpha$ SMA と I 型コラーゲンの発現は、シクロスポリン投与により濃度依存的に抑制された。これらをリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 相対定量およびウエスタンブロットを用い、それぞれ messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現レベル、タンパク発現レベルについて明らかにした。また、免疫染色により、視覚的にも証明した。さらに、このときの遺伝子発現プロファイルについて、DNA マイクロアレイを用いて調べたところ、TGF- $\beta$  により発現増強された遺伝子のうち、57 個の遺伝子がシクロスポリン投与により発現抑制された。その反対に、TGF- $\beta$  投与により発現抑制された遺伝子のうち、73 の遺伝子が発現増強された。おのおの発現抑制された 57 個、発現増強された 73 個の遺伝子について、Web ツールである Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) を用い、機能的なクラス分類を行った。その結果、これらの遺伝子は自然免疫、サイトカイン相互作用、増殖因子、がんに関する経路などのカテゴリに分類された。さらに、抽出されたこれらの遺伝子のうち、線維化に関連すると報告されている遺伝子 3 つ (*IGFBP2*, *ID1*, *PPARG*) について、その遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 相対定量により確認した。シクロスポリンの作用により、*IGFBP2*, *ID1* の発現は減少し、*PPARG* の発現は増加していた。

【考察】*IGFBP2* は IPF 患者の肺組織で強発現しており、肺胞洗浄液でも増加していることから、その不良な予後と関係しているとされている。また、*ID1* は、TGF- $\beta$  により誘導され、下流の転写因子として筋線維芽細胞の分化に関与している。シクロスポリンの投与によりこれらの発現が抑制されたことから、抗線維化作用との関連が示唆された。また、*PPARG* は TGF- $\beta$  による筋線維芽細胞の分化を直接的に阻害することが言われており、この発現増加は線維化抑制に働くとされている。シクロスポリンは *PPARG* の発現を増強することにより、抗線維化作用を示す可能性が考えられた。

【結語】これらの結果から、シクロスポリンは筋線維芽細胞における組織線維化作用を調節することにより抗線維化作用を示し、線維性肺疾患に対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

なが さわ みつ あき  
長 沢 光 章

学位の種類：博士 (医学) 学位番号：乙第 2676 号

学位授与の日付：平成 27 年 2 月 24 日

学位審査論文：Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria

(Loop-mediated isothermal amplification 法によるグラム陰性菌の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子検出)

著者：Nagasawa M, Kaku M, Kamachi K, Shibayama K, Arakawa Y, Yamaguchi K, Ishii Y

公表誌：J Infect Chemother 20: 635-638, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】アミノ配糖体系薬に対する高度耐性株は、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)、*Serratia marcescens*

などのグラム陰性桿菌に認められるが、日本では2003年に初めて報告された。これらアミノ配糖体系薬高度耐性株は16S rRNA methylase 遺伝子を獲得することにより、臨床で用いられるゲンタマイシン、アミカシンなどを含むすべてのアミノ配糖体系薬に薬剤耐性を示す。現在までに、10種の異なる16S rRNA methylase 遺伝子が見つかり、プラスミド上に存在することが多く他菌種に伝播・拡散する可能性がある。特に、カルバペネム系薬とフルオロキノロン系薬に耐性を示す *P. aeruginosa* が、アミノ配糖体系薬高度耐性を獲得した菌株による感染症では抗菌薬治療は極めて困難となる。

これらのことから、臨床分離株が保有する16S rRNA methylase 遺伝子の状況を把握することは、経験的抗菌薬治療や感染制御を適切に実施する上での意義は大きい。さらに、迅速かつ簡便な検出方法の開発により、アミノ配糖体系薬高度耐性株による感染症に対して迅速かつ適切に対応できると考えられる。これまで polymerase chain reaction (PCR) 法が開発されているが、サーマルサイクラーなどの機器を必要とするため、限られた施設で実施され広く普及していない。

【対象と方法】今回、アミノ配糖体系薬に対して高度耐性を付与する16S rRNA methylase 遺伝子のうち、日本でその検出が報告されている *rmtA*、*rmtB* および *armA* を検出する loop-mediated isothermal amplification (LAMP) プライマーを設計し、新規検出法を開発した。

LAMP プライマーは、各遺伝子の特異配列に対し、設計支援ソフト Primer Explorer Version 3 [栄研化学(株)、東京] を使用して設計した。LAMP 反応の基本試薬は、Loopamp® DNA amplification kit (栄研化学) を用いた。具体的には、反応チューブに2×reaction mixture 12.5 μl、各プライマー 1 μl、Bst-DNA polymerase 1 μl、検体菌株を95℃、10分で抽出し遠心して得た上清液 2 μl、Loopamp® fluorescent detection reagent (栄研化学) 1 μl、蒸留水 2.5 μl を混合した。LAMP 反応は、65℃、60分間実施し、結果は目視にて緑の蛍光色を陽性と判定した。

【結果】検出感度は、*rmtA*、*rmtB* および *armA* とともに 102 copies/tube であった。検出時間は、*rmtA* は  $1.0 \times 10^7$  copies/tube で15分、 $1.0 \times 10^2$  copies/tube で32分、同様に *rmtB* は23分、52分、*armA* では27分、41分であった。また、DNA シークエンスで *rmtA*、*rmtB*、および *armA* の保有が確認されている保存株9菌種65株を用いて測定した結果、感度および特異性は100%であった。今回開発したLAMP法は、特別な機器を必要とせず、簡便で、高い感度・特異性を有し、迅速に検出することを可能とした。

次に、臨床分離株の16S rRNA methylase 遺伝子の保有状況について調査した。全国36施設の2008年および2013～2014年の臨床分離株8447株のうちアミノ配糖体系薬に耐性(ゲンタマイシンのminimum inhibitory concentration (MIC) が16 μg/dl以上、またはアミカシンのMICが64 μg/dl以上)を示す191株について測定した。*rmtB* 陽性は0.06% (3株/4929株)で認められ、その内訳は *Escherichia coli* (*E. coli*)、*Enterobacter cloacae* および *Citrobacter freundii* とすべて腸内細菌科細菌であった。一方、*rmtA* は0.10% (3株/3284株)の *P. aeruginosa* で、*armA* は0.85% (2株/234株)の *Acinetobacter* spp. から検出された。これらの結果は、2004年に16S rRNA methylase 遺伝子の保有状況を調査した既報と比較して、その検出率に増加傾向を認めなかった。しかし、既報では腸内細菌科細菌が保有する16S rRNA methylase 遺伝子のほとんどが *armA* で *rmtB* は1株のみであった。今回の結果から、*armA* から *rmtB* へ変化した理由は不明であるが、腸内細菌科細菌に拡散し始めている可能性が示唆された。

【結語】今回の研究から、広域のアミノ配糖体系薬に対して高度耐性を付与する16S rRNA methylase 遺伝子の臨床分離株の保有状況を調査・把握することの重要性が認識された。そのためには、どの医療施設でも簡便かつ迅速に実施できる検査方法を構築することが必要で、LAMP法による16S rRNA methylase 遺伝子検出法は、そのための有望なツールの1つとして期待される。

なか むら ゆう じ  
中 村 裕 二

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2678号

学位授与の日付：平成27年2月24日

学位審査論文：Assessment of testing methods for drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS cell-derived cardiomyocyte sheet: Multi-site validation study  
(iPS細胞由来心筋細胞シートを用いた薬物性再分極遅延評価法の分析：多施設間バリデーション)

著者：Nakamura Y, Matsuo J, Miyamoto N, Ojima A, Ando K, Kanda Y, Sawada K, Sugiyama A, Sekino Y

公表誌：J Pharmacol Sci 124: 494-501, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】新薬の開発における薬物の催不整脈性は大きな関心事である。日米欧の国際会議（日米欧医薬品規制調和国際会議：International Conference on Harmonization：ICH）でICH E14およびS7Bガイドラインが採択され、新薬が致死性不整脈を起こすリスクは格段に低下したが、催不整脈リスクが証明されないにもかかわらずガイドラインで陽性と判定される化合物もあり問題となっている。2013年の国際会議では幹細胞を利用した評価系にも注目が集まったが、ヒトにおける催不整脈性を正確に予測するには多くの課題が残っている。われわれはヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells：iPS細胞）由来心筋細胞シートモデルを用いたより簡便で信頼性の高いプロトコルを開発した。今回、開発した標準プロトコルの有用性と再現性の確認を目的として、同一ロットのヒトiPS細胞由来心筋細胞で選択的IKr遮断薬であるE-4031の作用を産官学の3施設（E, N, T）で評価した。

【方法】0.1%ゼラチンコートした6-wellプレートに $1.3\text{-}2.6 \times 10^6$  cell/wellで細胞を播種し $3.7 \pm 1.4$ 日培養した。次いで細胞を回収し、多電極プローブ上に30000 cell/ $2 \mu\text{l}$ で再播種後 $5.2 \pm 1.6$ 日培養して得られた、同期して自発拍動する心筋細胞シートを実験に用いた。測定前に培地交換した後30分以上安定化させ、95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>雰囲気下36~37°CでMED64システムを用いて測定を行った。薬物投与前の記録を取得後、E-4031 1, 3, 10, 30, 100 nMを累積的に投与し細胞外電位波形を記録した。各濃度のE-4031投与後10分以上測定を行い、最後の30拍動を解析の対象とした。細胞外電位波形における拍動と拍動の間隔をinter-spike interval, 最初の鋭い振れからピークのドームの頂点までの時間をfield potential duration (FPD), 細胞外電位波形のプラトー相に発生する振れを早期後脱分極, 早期後脱分極から発生した鋭い振れを激発活動と定義した。Inter-spike intervalおよびFridericiaの式で補正したFPD (FPDcF)それぞれの30拍動の平均を測定値とし、E-4031が上記指標に与える変化および早期後脱分極/激発活動の発生を解析した。

【結果】Inter-spike interval：実測値と比較したところ、施設Tと他の2施設との間に有意差を認めたが、E-4031の投与による有意な変化は認めなかった。投与前値を基準にした%変化で比較したところ、どの施設間にも有意な施設間差を認めなかったが、施設NにおいてE-4031によるinter-spike intervalの有意な延長作用を認めた。

FPD：実測値で比較したところ施設Nと他の2施設との間に有意差を認め、施設E, TにおいてE-4031による有意な延長作用を認めた。投与前値を基準にした%変化で比較したところ、どの施設間にも施設間差を認めず、施設E, TにおいてE-4031によるFPDcFの有意な延長作用を認めた。施設NはFPDcFの延長傾向を認めたが統計的解析を行わなかった。

早期後脱分極/激発活動：施設Nでは10 nM以上、施設E, Tでは30 nM以上で早期後脱分極/激発活動の発生を認めた。

カテゴリカル解析：FPDcFが500 ms以上を示したのは、施設Nで3 nM以上、施設Eで10 nM以上であった。△FPDcFが60 ms以上を示したのは、施設E, Nで3 nM以上、施設Tで10 nM以上であった。

【考察】Inter-spike intervalは3 nM以上で濃度依存的な延長傾向を示したが、より高濃度では早期後脱分極/激発活動が発生したために統計的解析は行わなかった。この濃度は心房性の頻脈性不整脈患者において心拍数変化を起こした濃度とよく一致し、ウサギ洞房結節細胞等の動物モデルで徐拍を生じた濃度より低濃度であった。早期後脱分極/激発活動を

10~30 nM 以上で認めしたが、この濃度はヒト ES 細胞由来の心筋組織モデルにおける濃度とほぼ一致し、ウサギ Langendorff 灌流心等の動物モデルより低濃度であった。FPDcF の延長を 3~10 nM 以上で認めしたが、この濃度は臨床において QT/QTc 延長を発生させた濃度にほぼ一致し、他の動物モデルや iPS 細胞を用いたモデルよりも低濃度であった。以上より、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたわれわれのプロトコールは E-4031 の陰性変時作用、催不整脈作用、再分極延長作用をヒトに近い感度で検出できると考えられた。Inter-spike interval および FPDcF の結果で観察された施設間差は投与前値を基準にした%変化で比較することにより最小化することができた。われわれが開発したヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたプロトコールは薬物誘発性再分極遅延および催不整脈性を予測する一助となるであろう。

うぶ か まこと  
産 賀 真

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第 2679 号

学位授与の日付：平成 27 年 2 月 24 日

学位審査論文：Changes in the blood flow of the optic nerve head induced by different concentrations of epinephrine in intravitreal infusion during vitreous surgery  
(硝子体手術中のエピネフリン眼内灌流によって惹起される視神経乳頭血流の変化)

著 者：Ubuka M, Sugiyama T, Onoda Y, Shiba T, Horii Y, Maeno T

公 表 誌：Invest Ophthalmol Vis Sci 55: 1625-1629, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】硝子体手術中の眼内灌流液に散瞳維持のためエピネフリンを添加することは一般的に行われているが、エピネフリンは血管収縮作用を有する。しかしながら、硝子体手術中に添加されたエピネフリンの眼血流への影響を検証した報告はこれまでほとんどない。今回、レーザースペckルフローグラフィ（laser speckle flowgraphy：LSFG）を使用して硝子体手術中の灌流液内エピネフリンの濃度の違いが視神経乳頭部血流に与える影響を測定し検証した。LSFG はレーザースペckル法を応用した血流測定装置であり、非侵襲的、定量的に視神経乳頭や網脈絡膜の血流を評価することが可能な装置である。われわれは仰臥位のまま眼血流が測定できるように改良されたレーザースペckルフローグラフィ [LSFG-NAVI-OPE；ソフトケア（有）、飯塚] を用いた。

【対象および方法】黄斑上膜 15 例 15 眼、黄斑円孔 7 例 7 眼、計 22 例 22 眼で、眼内灌流液 500 ml 当り 0.5 mg と 1.0 mg の 2 濃度のエピネフリン各 11 例で検討した。最初にエピネフリン無添加の眼内灌流液を使用し硝子体手術を施行し眼内を灌流液で満たし、硝子体手術装置を用いて能動的に眼内灌流圧を 10 mmHg に設定し、LSFG-NAVI-OPE で眼血流を測定。次に、各 11 例でエピネフリン 0.5、1 mg 添加とした眼内灌流液に交換し 50 ml 灌流した。その後 10 分経過してから同様に眼血流を測定した。また、各測定時に瞳孔径、血圧、脈拍数、眼圧を測定した。血流解析は、合成血流マップを作成し、その合成血流マップ上で乳頭周囲境界線に沿って楕円の血流解析領域を設定した。次に血流解析をして血流量を表す mean blur rate (MBR) 値を得た。

【結果】視神経乳頭の全血流 (MBR-A) はエピネフリン 1.0 mg 群で統計学的に有意差をもって減少し、0.5 mg 群では有意な差を認めなかった。また視神経乳頭の組織血流 (MBR-T) はいずれの場合も有意に減少し、血管領域の血流 (MBR-V) は両群間で有意差を認めなかった。また、術中瞳孔径は両群とも有意に増加し、一方、眼圧、血圧、眼灌流圧、脈拍数には両群間で有意差を認めなかった。

【考察】本研究では、眼内灌流液に添加したエピネフリンは、1.0 mg 群で視神経乳頭全血流の有意な低下を認めしたが、0.5 mg 群では低下を認めなかった。しかし、瞳孔径、眼圧、血圧、脈拍数に関しては両群間で有意な変化を認めなかった。これにより硝子体手術中の散瞳維持のために眼内灌流液に添加するエピネフリンは 0.5 mg/500 ml で充分であることが示唆された。また、血管領域の血流は有意差を認めなかったが、これはエピネフリンが腔外で使用されるより腔内で使用された方が動脈血管の収縮が強くなるとの報告があり、網膜血管はある程度エピネフリンの効果に対し抵抗性を持っているものと考えられた。一方で、視神経乳頭の組織血流は両群ともに減少したが、これは組織血流が毛細血管から供給さ

れているためだと考えられた。また、LSFG-NAVI-OPE は再現性が高く、手術中に限らず仰臥位での眼血流変化を検証することが可能で、今後、種々の臨床研究への応用が期待される。

【結論】硝子体手術中に使用される眼内灌流液のエピネフリンは、濃度により視神経乳頭部血流に対して悪影響を及ぼし得ることに十分注意を払って使用すべきである。

うえ くさ ひろ ゆき  
植 草 啓 之

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2680号

学位授与の日付：平成27年3月24日

学位審査論文：Hydroperoxide in internal jugular venous blood reflects occurrence of subarachnoid hemorrhage-induced delayed cerebral vasospasm  
(内頸静脈中のhydroperoxideは、くも膜下出血に起因する遅発性脳血管攣縮の発生を反映する)

著者：Uekusa H, Miyazaki C, Kondo K, Harada N, Nomoto J, Sugo N, Nemoto M

公表誌：J Stroke Cerebrovasc Dis 23: 2217-2224, 2014

## 論文内容の要旨

【背景および目的】くも膜下出血後の遅発性脳血管攣縮（delayed cerebral vasospasm：DCVS）は予後を決定する最も重要な合併症である。しかしながら、その病態はいまだ未解決であり完全に抑制する治療法も確立していない。過去の研究から、赤血球に含まれるオキシヘモグロビンから放出されるフリーラジカルが平滑筋細胞膜の脂質過酸化反応を引き起こし、その結果、calcium channelやprotein kinase C, Rho-kinase等が活性化され、脳血管攣縮を引き起こす機序の1つになりうると報告されている。しかし、フリーラジカル自体の不安定な性質により、生体における酸化ストレスの評価は難しく、それを定量化した研究はまだ少ない。そこで、われわれは、酸化生成物の1つであるhydroperoxideの濃度を簡易に測定することが可能なfree radical analytical system（FRAS）を用いて、くも膜下出血症例における末梢動脈血、脳脊髄液、内頸静脈血の3検体の酸化ストレスを定量的に評価した。また、それらのhydroperoxideの値と、DCVSおよびそれによる脳梗塞発症との関連を検討した。

【方法】Hydroperoxideの測定は、diacron-reactive oxygen metabolites（d-ROMs）testを用いた。d-ROMs test値は個体差が大きいため、第3病日のd-ROMs test値をコントロールとして、第6病日のd-ROMs test値の経時的変化率（d-ROMs変化率）を検討した。まず、第6病日でのDCVSの有無と、d-ROMs変化率を比較した。次に、各患者の最終的な経過によってDCVSを生じなかった群（A群）、DCVSを生じたが脳梗塞を来さなかった群（B群）、DCVSを生じ、脳梗塞まで至った群（C群）に分け、その3群とd-ROMs変化率を比較した。

【結果】対象症例は全20例であった。その内訳は年齢41～86歳、男性5例、女性15例で、World Federation of Neurosurgical Societies（WFNS）分類ではGrade III 4、Grade IV 9、Grade V 7例であった。d-ROMs変化率の基準となる第3病日にすでにDCVSを来している3例については、本検討から除外し、残りの17例で評価した。第6病日においてDCVSを生じた群（n=12）では、生じなかった群（n=5）に比較して、内頸静脈血のd-ROMs変化率が有意に高かった（ $p<0.01$ ）。次に、全臨床経過において、A群（n=4）、B群（n=6）、C群（n=7）の3群のd-ROMs変化率を検討したところ、内頸静脈血のd-ROMs変化率は、C群で最も高く、次いでB、A群の順であった（ $p<0.01$ ）。末梢静脈血および脳脊髄液のd-ROMs変化率は、DCVSの発生とは関係しなかった。なお、3群の年齢、性別、WFNS Grade、Fisher Grade、破裂脳動脈瘤の部位、外科的治療の方法、Glasgow outcome scaleを比較したところ、明らかな差異を認めなかった。

【考察】DCVSを来している症例における内頸静脈血のd-ROMs変化率は有意に高値を示していたことから、頭蓋内酸化ストレスとDCVS発生における高い関連性を認めた。すなわち、内頸静脈血のd-ROMs test値は、DCVS発生のマーカーとなり得ると考えられた。次に、くも膜下出血発症後早期のd-ROMs test値が、その後の脳梗塞の発症と相関するかについて検討した。すると、第6病日にDCVSを来したもののうち、それ以後に脳梗塞に至ったものは、脳梗塞を来す前

から内頸静脈血の d-ROMs 変化率がより高く、くも膜下出血発症早期から酸化ストレスが高いという結果が得られた。これらのことは、頭蓋内酸化ストレスが DCVS 発生に関与し、その程度の高いものほど、より重篤な DCVS 発生を引き起こして脳梗塞に至ることを示していた。また、くも膜下出血発症後早期の内頸静脈血の d-ROMs test value は、DCVS に起因する脳梗塞発症を予測するマーカーになり得ると考えられた。

【結語】本研究から、くも膜下出血発症後早期に内頸静脈血の hydroperoxide の値が高いものほど、より重篤な DCVS を発生し、脳梗塞に至りやすいことが示された。