

学位（博士）授与の記録

もり やま あや こ
森 山 彩 子

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第477号

学位授与の日付：平成25年3月28日

主 論 文：Association between genetic polymorphisms of the β_1 -adrenergic receptor and sensitivity to pain and fentanyl in patients undergoing painful cosmetic surgery
(術後痛を伴う形成外科手術における痛みやフェンタニルに対する感受性と β_1 アドレナリン受容体遺伝子 (*ADRB1*) 多型との関連解析)

著 者：Moriyama A, Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Fukuda K, Nagashima M, Katoh R, Ikeda K

公 表 誌：J Pharmacol Sci 121: 48-57, 2013

論文内容の要旨

【目的】近年、痛みや鎮痛薬感受性の個人差が生じるメカニズムとして、個人間の遺伝子の相違が関係することが明らかとなってきており、最近では個人差に関わる遺伝子と、遺伝子多型が複数同定されている。 α_2 アドレナリン受容体作動薬が偏頭痛の治療薬としてすでに臨床応用されているが、別のアドレナリン受容体サブタイプである β_1 受容体遮断薬が疼痛反応を抑制する報告や、 β 遮断薬がオピオイドと密接な関係を持つ受容体であるという報告がある。また、脳内にある分界条床核におけるノルアドレナリン神経情報伝達の役割を検討した結果からは、痛みに伴う不快情動への β 受容体の関与が示されている。またヒト β_1 受容体遺伝子 (human β_1 -adrenergic receptor gene: *ADRB1*) は、遺伝子多型のいくつか翻訳領域に位置し、これまでに臨床データとの関連が報告されている。中でも A145G (Ser49Gly), G1165C (Gly389Arg) 遺伝子多型の2多型は、それぞれアミノ酸置換を引き起こす遺伝子多型であり、心疾患や脂質代謝との関連が報告されているが、痛みや鎮痛薬感受性との関連解析の報告は一切されていない。そこで、本研究では *ADRB1* に注目し、A145G, G1165C 多型の2多型に関して、痛みや鎮痛薬感受性の個人差に及ぼす影響についての解析を行った。

【方法】術後に痛みを伴う下顎枝矢状分割術を受ける患者216名（男性78名、女性138名）を対象とし、術前に氷水に手指を浸水させ、寒冷刺激誘発痛を感じるまでの時間 (latency to pain perception: PPL) を、フェンタニルの静注内投与の前 (PPLpre) と後 (PPLpost) に測定した。その後、全身麻酔下において手術を施行した。術後痛に関しては、patient controlled analgesia (PCA) ポンプを用いて、術後24時間のフェンタニル必要量を管理し、visual analog scale (VAS) による患者の自発痛を評価した。また統計解析には Kruskal-Wallis *H*-test (3群間比較), Mann-Whitney *U*-test (2群間比較), さらにアレルの組み合わせ効果を見るためにハプロタイプ解析を用いた。

【結果および考察】 β_1 受容体の A145G 多型においては、A アレルを持たない患者群は、A アレルを持つ患者群と比較して PPLpre の値が有意に上昇 ($p=0.032$) しているという解析結果が得られたため、A145G 多型は痛み感受性に関連していると考えられた。A145G 多型において、49Gly 型の β_1 受容体は、49Ser 型と比較して cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 活性が高く、また作動薬や拮抗薬に対して高い感受性を有していることや、細胞内取り込みや cAMP 活性の脱感作が有意に亢進していることが報告されている。以上より、A アレルを持たない患者群では、A アレルを持つ患者群と比較して β_1 受容体の down regulation が増加し、cAMP のシグナルが低下しているため、分界条床核における β_1 受容体の機能が低下し、痛みを感じにくかった可能性が考えられた。

一方、G1165C 多型においては、G アレルを持つ女性の患者群は G アレルを持たない女性の患者群と比較して、PPLpost-PPLpre の値が低下 ($p=0.021$) しているという解析結果が得られたため、G1165C 多型の G アレルは女性においてフェンタニルに対する感受性の低下と関連していると考えられた。G1165C 多型では、389Arg 型は 389Gly 型に比較して、cAMP 活性や [35 S] guanosine triphosphate- γ S ([35 S] GTP γ S) 結合能が高い。以上より G1165C 多型では、G アレルを持つ女性

の患者群ではGアレルを持たない女性の患者群と比較して、 β_1 受容体を介したシグナル伝達が低下し、不快情動が生じにくくなるため、フェンタニルによる不快情動の抑制効果が表出されにくかった可能性が考えられた。また性差が認められた結果に関しては、分界条床核の容量に性差を認めることや、性ホルモンが内因性オピオイドの作用に関わるという報告があることから、性差を認めた可能性が示唆された。

さらにハプロタイプ解析では、女性において、ACハプロタイプを持つ患者では、術後鎮痛薬必要量が少ないという結果が得られた。個別多型ごとの2群間解析の結果では、女性においてA145G多型のAアレルおよびG1165C多型のCアレルはいずれも術後鎮痛薬必要量の低下と関連を示す傾向であったため、ACハプロタイプを持つ女性の患者群では両多型の効果により術後鎮痛薬感受性の低下に結びついた可能性があると考えられた。しかしA145G多型では、機能変化から考えると、逆の結果が得られたため、A145G多型よりG1165C多型の方が、より疼痛治療において重要な役割を示すと考えられた。

【結語】痛み感受性およびフェンタニル感受性と関連する*ADRB1*遺伝子多型が見いだされたので、遺伝子検査による鎮痛薬の適量予測に繋がると期待できる。

すず き み ほ
鈴 木 美 穂

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第478号

学位授与の日付：平成25年3月28日

主 論 文：Central fatigue and sympatho-vagal imbalance during night shift in Japanese female nurses

（日本人女性看護師の夜間勤務における交感迷走神経の不均衡と中枢性疲労について）

著 者：Tanaka M, Hasegawa M, Muro M

公 表 誌：Biol Rhythm Res DOI: 10.1080/09291016.2013.781420

論文内容の要旨

【背景】夜間勤務（夜勤）による身体負担は、労働者に睡眠障害や循環器系疾患などの健康障害をもたらすことが知られている。看護師の夜勤における疲労の評価は、これまで主観的な感覚尺度をもとに数多く報告されてきた。しかし、心拍変動（heart rate variability：HRV）を用いて自律神経系の活動を評価し、夜勤による疲労を検討したものは少ない。そこで本研究では、もとよりHRVのtotal power（TP）成分が減少している看護師に対して、夜勤中の交感—迷走神経活動バランスに不均衡が生じていると仮説をたて、夜勤前と後のHRVおよび中枢性疲労について測定し、女性看護師の夜勤性疲労レベルを評価することを目的とした。

【方法】被験者は健康成人女性看護師10名（平均年齢 30.9 ± 3.1 歳）を対象とした。勤務中の身体活動量と労働の質が看護師間で大きく異なるとHRVにも影響を及ぼすことから、実験フィールドを厳選して身体活動量と労働の質をほぼ均一にできる病棟とした。本研究は東邦大学倫理委員会の承認（課題番号：22004）後、被験者に書面にて同意を得て実施した。データ収集は、夜勤開始のおよそ1時間前から終了後30分までの全期間に実施した。交感—迷走神経バランスを評価するために、重さ10gの超小型ロガー心拍計を左前胸部に装着して17時間分の連続心拍間隔（R-R interval：RRI）を記録した。HRV解析を時間および周波数領域から行い、各成分との関係を比較した。夜勤による中枢性疲労を評価するために、夜勤前と夜勤後に3種類の疲労テスト（フリッカー、選択反応時間、最大ピンチ力）を実施した。疲労レベルを配慮して夜勤の身体ストレスを評価するために、被験者のHRVの違いを調べた。そして、勤務開始前に安静椅座位にてベースラインとしてのRRIを測定し、先行研究に基づきTPが 2000 ms^2 を下回る5名をGroup Low (G_L)、上回る5名をGroup Normal (G_N)の2群に分けた。

【結果】 G_L と G_N の両群間において年齢やbody mass index（BMI）に差異はなかったが、看護師経験年数は G_L が有意に長かった。夜勤中の身体活動量、心拍数、HRVのlow-frequency/high-frequency（LF/HF）比（交感神経活動指標）と、HF norm（副交感神経活動指標）の各々5分ごとの平均値を算出し勤務の時系列でみると、身体活動量については両

群ともほぼ同様に推移していたが、 G_L は G_N に比して心拍数が高く、HRV のゆらぎも平坦であった。両群ともに身体活動量に対する心拍数、LF/HF 比、HF norm の関係に強い相関がみられた。LF/HF 比と HF norm の相関図は活動中も仮眠中も同様の双極曲線を呈したが、 G_N は G_L より副交感神経優位の自律神経活動バランスを示した。仮眠中と起床直後の覚醒 10 分間の自律神経の応答を比較すると、心拍数では両群に差がないにもかかわらず、 G_N のみに仮眠中の TP や副交感神経成分が高く、覚醒とともに身体活動量の増加に伴った速やかな交感神経成分の増加がみられた。疲労テストでは、 G_N 群に夜勤による中枢性疲労が認められた。そして、両群間で有意な差を認められたのは最大ピンチ力の疲労テストのみで、 G_L にはほとんど認められなかった。

【考察】夜勤中（仮眠含む）の身体活動変動と HRV 成分の増減の変化から、 G_N は睡眠—覚醒状態に見合った交感—迷走神経活動バランスを保ち、高いパフォーマンス状態で勤務していたものと考えられる。一方、 G_L は身体活動に対して G_N よりも交感神経活動優位に推移し、交感—迷走神経活動がインバランス状態であったものと考えられる。また、疲労テストの結果より G_N は夜勤の急性疲労がはっきり検出でき、休日等の長時間の休息で累積疲労を除去している傾向にあると考えられる。しかし、 G_L は急性疲労がはっきり検出できず、日常的に過緊張状態が持続している傾向にあるものと考えられる。これらの結果から、夜勤中の交感—迷走神経活動バランスが交感神経活動優位にある TP 成分の低い看護師の中枢性疲労テストの評価について十分考慮する必要があると示唆された。

さわともか
澤友歌

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第 479 号

学位授与の日付：平成 25 年 3 月 28 日

主論文：Diagnostic usefulness of ribosomal protein L7/L12 for pneumococcal pneumonia in a mouse model

（肺炎球菌性肺炎マウスモデルを用いた L7/L12 リボソーム蛋白の診断への応用）

著者：Sawa T, Kimura S, Honda NH, Fujita K, Yoshizawa S, Harada Y, Sugiyama Y, Matsuyama K, Sohka T, Saji T, Yamaguchi K, Tateda K

公表誌：J Clin Microbiol 51: 70-76, 2013

論文内容の要旨

【目的】肺炎球菌感染症を診断する際、肺炎球菌莢膜抗原検出キット（capsular antigen detection kit：CAD kit）は迅速かつ簡便であるため広く使用されている。しかしながら、小児では鼻咽頭での保菌による偽陽性があるだけでなく、症状が改善された後もしばらく陽性反応が持続するなどの問題があり、特異性が低い。今回われわれはその特異性を上げることを目的に、莢膜抗原に代わるものとして L7/L12 リボソーム蛋白に着目した。L7/L12 リボソーム蛋白は 50s リボソームを構成する蛋白質であり、すべての細菌が保有し、菌種ごとに特異的なアミノ酸配列をもつ。また細菌内に大量に存在し、増殖期にはさらに増加することが知られている。本研究では、まず、肺炎球菌に特異的な L7/L12 リボソーム蛋白（RP-L7/L12）に対する抗体を作成した。その抗体を用いて肺炎球菌感染マウスモデルにおける RP-L7/L12 を測定し、その体内動態について検討、さらに抗体を迅速検査法へと応用し臨床上的有用性を検討した。

【方法】臨床分離株である *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) 741 株を、肺炎球菌性肺炎モデルとして CBA/JN マウスに、保菌モデルとして CBA/N マウスにそれぞれ感染させ、肺・鼻腔洗浄液・血清・尿を採取した。肺破碎上清、鼻腔洗浄液を用いて肺内菌数、鼻腔内菌数を測定し、各検体に含まれる RP-L7/L12 は enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて測定した。さらにイムノクロマト法を利用した尿中 RP-L7/L12 検査法 (immunochromatographic strips test：ICS test) を作製した。

【結果】まず、RP-L7/L12 の測定が有用であることを評価するため、マウスモデルを用いて実験を行った。肺炎モデルでは、肺内菌数の増加に伴い肺破碎上清、尿、血清中の RP-L7/L12 が上昇した。保菌モデルでは、肺内菌数が減少していく一方、鼻腔内菌数は一定量認められた。RP-L7/L12 は鼻腔洗浄液中から検出されたが、尿中と肺破碎上清中で検出限界

以下であった。肺炎モデルに抗菌薬 (imipenem/cilastatin : IPM/CS) を投与して肺内菌数を減少させた肺炎治療モデルでは、肺内菌数の減少に伴って肺破砕上清、尿、血清中の RP-L7/L12 が減少した。

次に、RP-L7/L12 を検出する ICS test を作製し、既存の CAD kit を対照としてマウスモデルを用いて評価した。肺炎モデルでは肺内菌数の増加に伴い ICS test が陽性となり、CAD kit の反応と同等であった。保菌モデルでは感染後 6 日目には鼻腔内から肺炎球菌が検出されたが、肺内では検出限界以下であった。ICS test はすべての検体で陰性を示す一方、CAD kit は陽性反応をみとめた。肺炎治療モデルでは、感染後 7 日目には肺内菌数が測定限界以下となり、ICS test ですべての検体で陰性となったのに対し、CAD kit では陽性反応が持続した。

【考察】今回、マウスモデルを用いて RP-L7/L12 の有用性を検討し、さらに ICS test へと応用し評価を行った。肺炎モデルでは、肺内菌数の増加に応じて肺内、尿、血清の順で RP-L7/L12 が上昇することが判明し、肺内から血中に入った抗原は尿中で濃縮されると考えられた。肺炎治療モデルでは治療を開始すると、肺内菌数が確認されているにもかかわらず、速やかに各検体中の RP-L7/L12 が減少するという結果が得られた。RP-L7/L12 は細菌の蛋白合成に関与し、細菌の増殖によりその量も増加することが知られている。上述の機序として肺炎球菌の増殖が抑制されたことで RP-L7/L12 が減少したと考えられた。これらの結果から尿中の RP-L7/L12 測定が肺炎球菌性肺炎の病勢を反映されることが示唆され、簡便な検出方法として ICS test を作製した。ICS test は、肺炎モデルにおいて肺内菌数に応じて陽性反応をみとめた。保菌モデルでは、CAD kit で陽性反応を認める一方 ICS test ではすべての検体で陰性を示した。鼻腔内での保菌が多く CAD kit で偽陽性が問題となる小児に対しても ICS test が有用な検査となると考えられる。

以上より、RP-L7/L12 の測定は肺炎球菌性肺炎の状態を反映することが示唆された。また、ICS test は保菌状態での偽陽性がなく、治療後に陽性反応が持続することもなく、検査法として有用であった。今回の研究は RP-L7/L12 を診断に応用するはじめての知見であるが、臨床応用へ向けてヒトでの検討が必要である。ICS test は、臨床でも保菌による偽陽性や陽性反応が長引くことなどを考慮せずに使用できる簡便な肺炎球菌性肺炎の検査法になると考えている。

まえ だ ただし
前 田 正

学位の種類：博士 (医学) 学位番号：甲第 480 号

学位授与の日付：平成 25 年 3 月 28 日

主 論 文：Genotyping of skin and soft tissue infection (SSTI)-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains among outpatients in a teaching hospital in Japan: Application of a phage-open reading frame typing (POT) kit
(日本の外来患者における MRSA 皮膚軟部組織感染症の遺伝子学的検討と POT キットの有用性)

著 者：Maeda T, Saga T, Miyazaki T, Kouyama Y, Harada S, Iwata M, Yoshizawa S, Kimura S, Ishii Y, Urita Y, Sugimoto M, Yamaguchi K, Tateda K

公 表 誌：J Infect Chemother 18: 906-914, 2012

論文内容の要旨

【背景】黄色ブドウ球菌は皮膚軟部組織感染症をはじめ膿瘍形成、感染性心内膜炎などの血流感染、人工物関連感染症、食中毒など多岐にわたる感染症を引き起こす。なかでもメチシリン耐性ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA) は院内感染の重要な原因菌で、解決が難しい抗菌薬耐性菌である。従来、院内の日和見感染の原因菌として認知されていた MRSA は、病原性が比較的弱く、問題となるのは日和見宿主に限られていた。しかし 2000 年頃より、合併症のない小児や成人への MRSA 感染が報告され注目を集めている。これらは院内型 MRSA (hospital associated MRSA : HA-MRSA) に対し市中型 MRSA (community associated MRSA : CA-MRSA) と呼ばれている。CA-MRSA は多くの場合皮膚軟部組織感染症を引き起こすが、時に壊死性肺炎等の重症感染症を起こし致死的な転帰をとると報告されている。

MRSA は *SCCmec* と呼ばれる DNA 断片を水平伝播することによりメチシリンに耐性化すると考えられているが、その型は HA-MRSA では type II を、CA-MRSA は type IV, type V を保有するという報告が多い。米国では、USA300 とよばれる *SCCmec* IV を保有する特定の MRSA 株の感染が拡大し、市中ブドウ球菌感染の大部分を占めている。USA300 の病原性の特徴は Panton-Valentine leukocidin (PVL) や arginine catabolic mobile element (ACME) と呼ばれる毒素因子を保有することとされる。一方でヨーロッパやオーストラリアにおける CA-MRSA 感染症は、USA300 のような単一クローンによる発生ではなく、多クローン性に引き起こされているようである。

本邦では CA-MRSA の報告はあるが症例報告レベルが大部分であり、一定期間、特定施設において臨床的・分子学的特徴を評価したものはほとんどない。そこで本邦の外来患者における MRSA 感染の疫学的現況を評価するため本研究を行った。同時に、本邦で開発された phage open reading frame typing 法 (POT 法) の疫学調査における有用性についても評価した。[POT 法: マルチプレックス polymerase chain reaction (PCR) を用いて、22 個の特定遺伝子を同時に増幅しアガロース電気泳動で分離し、検出された増幅バンドパターンを解析しスコア化することで MRSA クローンを簡便に同定する。国内でキット製品が利用可能であるが、主に院内感染の調査に用いられてきた。]

【対象と方法】2008 年の東邦大学医療センター大森病院外来患者の皮膚検体から分離されたすべての MRSA 合計 57 検体を対象とした。同一患者から複数の検体が分離された場合は、最初の検体のみを対象とした。

遺伝子学的解析として *SCCmec* typing, spa typing, multi locus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), POT 法による遺伝子型解析を行った。型別法の評価および相関は Simpson's index, Rand's index, Wallace's coefficients を用いた。さらに抗菌薬感受性検査、病原遺伝子 Panton-Valentine leukocidin (PVL)・arginine-catabolizing mobile element (ACME) の保有状況を検索した。

【結果】*SCCmec* typing では従来型 MRSA に特徴的とされる type II が 39/57 (68%) と最も多く、次いで市中感染型 MRSA に特徴的な type IV が 17/57 (30%) であった。*SCCmec* type IV 保有株は spa typing や POT 法においても *SCCmec* type II 保有株に比較し多クローン性の傾向を示していた。PVL 陽性株は 6 株 (*SCCmec* type IV 5 株, type V 1 株) のみであり、PFGE では USA300 が 1 株同定された。また抗菌薬感受性は *SCCmec* type IV, type V 保有株が *SCCmec* type II 保有株と比較し良好であった。POT score は *SCCmec* typing と 95% で一致し、spa typing とも高い相関性がみられた。

【考察】本邦における外来患者の皮膚軟部組織感染に関連する検体から分離された MRSA を検討した。その中には、オーストラリアなどで多く分離される ST93 や、台湾で報告の多い ST59 も含まれていたが、特定クローンへの収束はなく、遺伝子学的にはヨーロッパやオーストラリアと同様に多様であった。USA300 は 1 株のみであったが、この株の世界各地での報告は多く、薬剤耐性化さらには院内への伝播も報告されている。本邦においてもすでに USA300 によるアウトブレイクが報告されていることから注意する必要がある。

抗菌薬感受性結果を治療の観点からみると、ST 合剤はすべての MRSA に対して薬剤感受性が保たれており、今後 *SCCmec* type IV 保有株が外来株において増加した場合に、治療の選択肢となる可能性が示唆された。またメロペネムとミノサイクリンに対する感受性は type IV 保有株を選別するスクリーニングとして有用である可能性が示唆された。

本研究では外来患者の皮膚軟部組織感染症で、院内株に多い *SCCmec* type II 保有株が最も多く分離されたが、その理由として、外来患者ではあるものの入院歴や医療関連歴のある患者が含まれていたことが一因と考えている。

POT キットは、これまで感染制御の観点から院内アウトブレイク調査に用いられてきたが、疫学調査でスタンダードとされる spa typing とも高い相関性を示した。シーケンス反応を用いない簡便さもあり、疫学調査においても有用であると思われた。

本研究は菌株を対象としているため臨床情報や臨床診断が不足しており、また一施設の一時期に限られた調査である。しかし 1 年間にわたり全検体を前方視的に収集しており、選択バイアスは極めて少ない。本邦においても今後諸外国と同様 CA-MRSA が臨床現場でよりインパクトを与えるのか、またどのような臨床的特徴を示すのかを注意深くみていく必要がある。その上でわれわれのデータは世界における MRSA の疫学情報の一部として有用であると自負している。

なか つか とも や
中 塚 智 也

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第481号

学位授与の日付：平成25年3月28日

主 論 文：Discrimination of dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease using voxel-based morphometry of white matter by statistical parametric mapping 8 plus diffeomorphic anatomic registration through exponentiated Lie algebra
(SPM8-DARTELを用いた白質の voxel-based morphometry によるレビー小体型認知症とアルツハイマー病の判別)

著 者：Nakatsuka T, Imabayashi E, Matsuda H, Sakakibara R, Inaoka T, Terada H

公 表 誌：Neuroradiology 55: 559-566, 2013

論文内容の要旨

【背景】変性性認知症の鑑別に、さまざまな画像診断が有用であることが報告されている。例えば、ドパミン系障害の有無を調べる核医学検査である¹²³I-meta-iodobenzylguanidine (MIBG) 心筋シンチグラフィは、交感神経系の障害を伴う疾患であるレビー小体型認知症 (dementia with Lewy bodies : DLB) と、障害を伴わない疾患であるアルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) の鑑別に有用である。また近年、非侵襲的に施行できる magnetic resonance imaging (MRI) を用いた voxel-based morphometry (VBM) による検討もされている。ADでは、海馬傍回の灰白質・白質に特異的な萎縮がみられることが知られており、診断にも広く利用されている。しかし、DLBにおいては、特異的な萎縮領域の定まった報告はなく診断への利用にはいたっていない。今回われわれは、新しいアルゴリズムである diffeomorphic anatomical registration through exponentiated Lie algebra (DARTEL) を用いた、標準脳への変換精度の高いソフトウェアである SPM8 plus DARTEL を使用して、DLBにおける、白質VBMの脳幹部萎縮に着目し、ADとの判別能に関して検討を行った。

【方法】認知症にてMRIを施行された54~86歳の患者群から後方視的に60例のDLB群(77.3±5.8歳)と、30例のAD群(76.7±5.7歳)を無作為に抽出した。SPM8 plus DARTELを搭載した早期アルツハイマー型認知症の診断を支援するためのソフトウェアであるVSRADにて、SPM8による灰白質、白質、cerebrospinal fluid (CSF) spaceの分割とDARTELによる形態変換を行った後、8mm立方の正規分布野で平滑化を行い、白質についてVSRAD付属の健常者群(54~86歳)に対するZスコア画像を求めた。その後、DLB群を無作為に30例ずつの2群に分け、まず、一方の30例のZスコア画像から全脳の有意の白質萎縮の割合の絶対値(%)を求めた。次にSPM8による回帰分析にてこの数値と相関する白質の萎縮領域を検出し、有意の負の相関がみられる萎縮領域に関心領域(volumes of interest : VOI)を設定した。その後、他の30例のDLB群とAD群の白質のZスコア画像にて上記VOI内における正のZスコアの平均値を求めた。この平均値を閾値としてROC曲線を作成し、判別能を評価した。

【結果】DLB群の白質萎縮の程度の絶対値と、中脳・橋・小脳の容積に負の相関がみられた。中脳と橋の有意の萎縮領域にVOIを設定した。Receiver operating characteristic (ROC) 曲線の曲線下面積(area under the curve : AUC)と診断能は中脳のVOIではAUC 0.75、感度80%、特異度64%、正診率72%、橋のVOIではAUC 0.68、感度47%、特異度93%、正診率70%、中脳と橋両方のVOIではAUC 0.74、感度60%、特異度90%、正診率75%であった。

【考察】DLBにおけるレビー小体は、脳幹を上行し、皮質に広がる前に中脳から前脳基底部に広がることが病理学的に推測されている。われわれの研究でもDLBでは全脳の白質が萎縮すればするほど中脳や橋の萎縮が強い傾向にあり、病理学的推測に矛盾しないと考えられる。また、¹²³I-MIBG心筋シンチグラフィと比較して診断能は劣るが、非侵襲的でスクリーニングを兼ねて撮像できることを考慮すると、補助診断として役立つと考えられる。

【結語】VSRADの白質Zスコア解析にて、DLBにおいては中脳と橋の萎縮は特異性のある所見と考えられた。認知症におけるDLBの判別において、非侵襲的なMRIによるVBMは有用である。

しよく ぎよく しゅ
職 玉 珠

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第482号

学位授与の日付：平成25年3月28日

主 論 文：Comparison between the effectiveness of polymerase chain reaction and *in situ* hybridization in detecting the presence of pathogenic fungi by using the preserved DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues
(ポリメラーゼ連鎖反応と *in situ* hybridization 法における真菌検出精度の比較によるホルマリン固定・パラフィン包埋組織内の核酸保存状態の検証)

著 者：Zhi Y, Sasai D, Okubo Y, Shinozaki M, Nakayama H, Yamagata Murayama S, Wakayama M, Ide T, Zhang Z, Shibuya K

公 表 誌：Jpn J Infect Dis 66: 173-179, 2013

論文内容の要旨

【背景】化学療法や臓器移植などの高度医療の普及に伴って、免疫抑制状態の患者は増加しており、重篤な感染症である深在性真菌症が大きな問題となっている。それゆえ、深在性真菌症の早期かつ精確な診断が望まれている。しかし、従来の培養法や血清診断法などは感度が低い上に、偽陽性を示すこともまれではない。こうした現状にあっては、補助的診断法として、ホルマリン固定・パラフィン包埋 (formalin-fixed and paraffin-embedded: FFPE) 組織標本を用いた分子生物学解析法が期待されている。その中でも、polymerase chain reaction (PCR) 法は最も用いられている手法であるが、近年、遺伝子を増幅しない *in situ* hybridization (ISH) 法も注目を浴びている。しかし、PCR 法と ISH 法を比較検討し、FFPE 材料の遺伝子保存状態について行われた基礎的な研究はこれまでにほとんど報告されていない。本研究の目的は、真菌の組織学的診断の補助としての PCR 法と ISH 法の有用性を比較することである。

【材料と方法】1971～2006年までに、東邦大学医療センター大森病院で施行された剖検例のうち、アスペルギルスあるいは菌種不明の深在性真菌症と記録されている症例を抽出した。各々、肺のブロックから標本作製し、光学顕微鏡下にアスペルギルスを確認できた65症例を対象とした。同時に、剖検記録からパラフィンブロックの保存期間と剖検時死後時間を収集した。

剖検例のFFPE材料における遺伝子保存度について、 β globin と汎真菌プライマー (panfungal primer) それぞれ2種類でPCRを施行、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識の汎真菌プローブ1種類でISHを行い、両者の有用性を比較した。ISHの結果については、従来、免疫組織化学の評価で用いられている Allred score を用いてシグナルのintensity (強度) と proportion (分布と割合) を数値化することで半定量的評価を試みた。本研究計画は東邦大学医学部倫理委員会承認を受けた (承認番号20047)。

【結果】PCR法の結果について、110 bp の β globin では23.1% (15/65) の陽性率を得たが、250 bp の β globin, 230 bp および 300 bp の汎真菌プライマーではそれぞれ1.5, 4.6, 0%と、いずれも陽性率は極めて低かった。一方で、汎真菌プローブを用いたISHでは、標本上のいずれかの場所で真菌に一致した信号を検出した試料は80.0% (52/65) に上った。また、Allred score で評価したところ、66.2%の症例がintensity score 2以上、63.1%の症例がtotal score 4以上であった。また、PCR法として最も陽性率の高かった110 bp β globin の陽性率とパラフィンブロックでの保存期間や剖検時死後時間との関係を検証したが、これらの因子との相関は得られなかった。

【考察】FFPE組織内における核酸の賦活処理はPCR法とISH法を効率よく行うために重要な過程であり、本研究ではPCR法、ISH法ともに、すべてのサンプルに前処理として弱塩基液を用いた加熱処理を行った。しかし、PCRは依然として低い感度であった。そこでPCR法として最も陽性率の高かった110 bp β globin の陽性率とパラフィンブロックでの保存期間や剖検時死後時間との関係を検証したが、これらの因子との相関は得られなかった。以上の結果より、ホルマリンで長期にわたり固定されることで、目標としたDNA sequenceにnickやgapが生じ、これを認識して誤ったPCR産物が幾何級数的に優勢となることで目標としたDNA sequenceが増幅されない、あるいは増幅されてもその産物が相対的に検出限度以下になってしまうのではないかと考えた。

この一方、われわれの研究では、全く同じ剖検例の FFPE 組織に対する汎真菌プローブを用いた ISH 法により、高い組織内真菌の検出率を得ることが可能であった。ISH 法が、鋳型 DNA の抽出や DNA 増幅を行わないことが大きな要因であると推察された。しかし、ISH でも、いくつか偽陰性の症例があり、その原因の 1 つとして、塩基配列そのものが高度に断片化されている可能性が挙げられた。また、FFPE 組織内の ribonucleic acid (RNA)-protein cross linkage がプローブの浸透およびプローブと核酸との結合に影響を与えていることも否定できない。

【結論】剖検例の FFPE 材料を用いて施行する PCR 法は偽陰性の割合が高い一方、ISH 法は、パラフィン包埋ブロックの作成行程の影響を受けにくく、真菌症の補助診断法としてのより高い有効性が示唆された。

すぎもと もと かず
杉 本 元 一

学位の種類：博士（医学） 学位番号：甲第 484 号

学位授与の日付：平成 25 年 3 月 28 日

主 論 文：Risk factor analysis and prevention of postoperative pancreatic fistula after distal pancreatectomy with stapler use

（自動縫合器を使用した膵体尾部切除術における膵瘻リスク因子と対策）

著 者：Sugimoto M, Gotohda N, Kato Y, Takahashi S, Kinoshita T, Shibasaki H, Nomura S, Konishi M, Kaneko H

公 表 誌：J Hepatobiliary Pancreat Sci 20: 538-544, 2013

論文内容の要旨

【背景】膵瘻は膵切除手術において最も重要な術後合併症であり、腹腔内膿瘍、腹腔内出血、腸管麻痺など重篤な二次的合併症を起こしうる難治性の病態である。膵瘻予防のために膵切離手技や術後管理の工夫もなされてきているが、膵体尾部切除術後膵瘻の発生頻度は一般に 5~40% 程度と報告されており、いまだ克服できていない。最近ヨーロッパで行われた大規模無作為化比較試験では自動縫合器による膵切離・閉鎖と、手縫い縫合閉鎖とを比較して優越性は得られず、大規模なメタアナリシスでも確実に安全な膵切離法は見いだされなかった。また自動縫合器の種類、ステープル高や膵の形状との関係について膵瘻予測解析を行った報告は過去にみられないため、今回われわれは自動縫合器を使用して膵切離を行った膵体尾部切除症例における膵瘻危険因子を明らかにし、適切な対策を講じることを目的として本研究を計画した。

【方法】2006 年 8 月より 2011 年 12 月の間に国立がん研究センター東病院にて自動縫合器で膵切離を行った膵体尾部切除連続 106 例を対象とし後方視的に解析した。膵体尾部切除術の適応症例は膵体部または尾部に存在する原発性膵腫瘍、あるいは膵体尾部に浸潤する消化管癌や転移性膵腫瘍で画像上根治切除可能と考えられたものである。手術手技においては膵周囲剥離後に脾動静脈を結紮切離の後、病変から十分に離れた位置で自動縫合器を用いて膵切離が行われ、膵断端近傍にドレーンが留置された。使用する自動縫合器の列数（2 列または 3 列）やステープルの高さは、術中に認識される膵の性状や厚さなどの所見から術者によって選択された。術後 1, 3, 5, 7 日目にドレーン中のアミラーゼ濃度（drainage fluid amylase : D-Amy）が測定され、膵瘻の国際的診断基準である International Study Group on Pancreatic Fistula (ISGPF) 基準に基づき膵瘻の有無、程度が診断された。残膵容量が大きな症例や膵の厚い症例は膵瘻のハイリスクとなることから、膵の形態的特徴を明確にするべく膵切離断面での腹背側方向の長さを厚さと規定し術前 computed tomography (CT) で計測した。また膵形状に応じた自動縫合器のステープル高と膵瘻との関係を見るためステープル高と膵の厚さ（膵厚）の商を圧縮係数と定義し解析に使用した。膵瘻予測に関する単変量および多変量解析はロジスティック回帰分析を用いた。本検討は国立がん研究センターの倫理審査委員会の承認を得て行った。

【結果】臨床的に問題となる膵瘻（ISGPF 基準における Grade B/C）は 52 例（49.1%）に生じた。D-Amy 値の推移は、膵瘻症例では術後 3 日以降著増傾向にあった。膵形状について膵厚さは膵瘻の危険因子であり、その他臨床病理学的所見とともに膵瘻に関する多変量解析を行ったところ、2 列自動縫合器の使用と膵厚が膵瘻 Grade B/C に関する独立した危険因子であった。また欠損データを除いた母集団において膵厚と圧縮係数とを入れ替えて多変量解析を行ったところ、2 列

自動縫合器の使用と圧縮係数が独立した臍瘻危険因子であった。

【考察】臍体尾部切除術における臍瘻予防には臍断端の切離・閉鎖手技が重要である。今回の検討から、自動縫合器による臍切離では2列よりも3列の自動縫合器がより強固に閉鎖できるため優越性を示したと考えられる。しかし圧縮係数がまた危険因子であったことから、特に臍外分泌能が高く残臍容量が大きく厚い臍においては自動縫合器で十分に断端閉鎖しきれない可能性や、比較的厚い臍に対しステープル高の低い自動縫合器で強く圧縮した場合には残臍が挫滅し、分枝臍管より漏出した臍液が徐々に周囲組織を融解して遅発性に主臍管の破綻を引き起こす可能性も考えられる。3列自動縫合器は2列自動縫合器に勝ると考えられたが、その使用に際しては臍厚に応じて適切なステープル高を選択し、臍の脆弱性を考慮してきわめて愛護的な器械操作が必要となる。今後腹腔鏡手術の更なる適応拡大も見込まれるため、自動縫合器による安全な臍切離・閉鎖手技は重要である。

本検討は単施設の後方視的検討で、自動縫合器の選択は経時的な制限もあることから、臍瘻の結果に影響を与えている可能性もある。3列自動縫合器は最近の機器の開発により使用されるようになったもので、本検討でも19例と、その経験は十分とは言えないため今後さらに症例を集積する必要がある。より安全な臍切離手技の検討には、特に厚い臍において3列自動縫合器とその他の方法を比較する研究が必要と思われる。また3列自動縫合器使用例のみにおける圧縮係数の検討も必要である。3列自動縫合器はいかなる症例にも安全というわけではないが、最近の報告では術前に内視鏡的な主臍管減圧処置を行うと臍瘻が抑制されるとの報告もあることから、ハイリスク症例ではこのような付加処置の併用も検討すべきと考えた。

かな やま まさ ひろ
金 山 政 洋

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2636号

学位授与の日付：平成24年6月27日

主論文：Influence of the etiology of liver cirrhosis on the response to combined intra-arterial chemotherapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma
(進行肝細胞癌における肝動注化学療法の背景肝別治療効果の検討)

著者：Kanayama M, Nagai H, Sumino Y

公表誌：Cancer Chemother Pharmacol 64: 109-114, 2009

論文内容の要旨

【背景】われわれはこれまでに、肝動注化学療法が進行肝細胞癌（advanced hepatocellular carcinoma：aHCC）合併肝硬変（liver cirrhosis：LC）症例の予後を延長することを報告してきた。しかしながら、aHCCを合併したLC症例に対する持続肝動注化学療法の背景肝別の有効性については、まだ検討の余地が残されている。

【目的】持続肝動注化学療法を導入したaHCC合併LC症例を背景肝別に検討する。

【対象】2002～2007年までに東邦大学医療センター大森病院で持続肝動注化学療法を行ったaHCC合併LC患者で、背景肝別に統計可能であった、手術適応なしと診断されたJapan Integrated Staging（JIS）score 3または4の53症例（男性46例、女性7例）を対象とした。

【方法】Leucovorin 12 mg/hrとCisplatin 10 mg/hrを投与した後に5-Fluorouracil 250 mg/22 hrを投与し、5日間連続投与後2日間休薬を4週間施行、これを可能な限り繰り返した。

【結果】平均年齢66.1歳、男女比は46：7例。LCの背景肝はB型LC 15例（BLC群）、C型LC 29例（CLC群）、アルコール性LC 9例（ALC群）であった。Child-Pugh分類では、BLC群はA 6例、B 9例、CLC群はA 14例、B 15例、ALC群はA 4例、B 5例であった。奏効率は、BLC群0%、CLC群31.0%、ALC群44.4%であった。生存期間の中央値は、BLC群211日、CLC群368日、ALC群688日であり、ALC群およびCLC群は、BLC群に比し有意に生存期間の中央値の延長を認めた。また、腫瘍マーカーの検討において、protein induced by vitamin K absence of antagonists-II（PIVKA-II）はALC群で治療前後において有意な低下を認めたが、alpha-fetoprotein（AFP）およびL3-lectin binding

AFP (AFP-L3) 分画は各群において治療前後で有意差を認めなかった。

【考案】 aHCC の予後は 6 カ月以内とされ、平均生存期間は発症から 4 カ月、入院してから 2 カ月であると言われている。われわれはすでに、持続肝動注化学療法において 6 時間法よりも 24 時間法がより効果的であることを報告している。今回の検討において奏効率は、BLC 群 0%、CLC 群 31.0%、ALC 群 44.4% であり、また生存期間の検討では、生存期間の中央値はそれぞれ ALC 群 688 日、CLC 群 368 日であり、ALC 群と CLC 群は BLC 群の 211 日に比し有意に延長を認めた。

Hepatitis B virus (HBV) または hepatitis C virus (HCV) 感染している患者では、HCC の遺伝子発現が異なると報告されている。また各種蛋白は、HB 表面抗原陽性 HCC または HC 表面抗原陽性 HCC で役割が異なることが報告されており、異なった蛋白質が発癌の機序に違いをもたらしている可能性が示唆されている。われわれは肝硬変の発癌における宿主免疫の検討において、F1~F3 の肝炎症例は健常人に比し T helper 1 (Th1) および T helper 2 (Th2) 細胞分画の明らかな変動を認めず、発癌症例は健常人に比し有意な Th2 細胞分画の高値を認めたことから、Th1/Th2 細胞バランスの Th2 細胞分画優位な状況が肝癌の発癌に寄与している可能性を示唆している。CD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte: TIL) は腫瘍の進行に対する宿主の防御に重要な役割を果たしており、CD8 陽性 TILs の増加と腫瘍細胞のアポトーシスの発生に正の相関があることが示されている。Ikeguchi et al. は、CD8 陽性 T 細胞が、腫瘍の周囲も含めた健常肝の線維組織と類洞毛細血管に著明に浸潤し、逆に腫瘍内では健常肝に比べて少ないことを報告している。また、CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞 (regulatory t cell: Treg) は自己寛容を維持し、生理学的そして病理学的条件の両方で免疫応答の調節に重要な役割を担っている。HCC 症例では、Treg は末梢血および腫瘍組織で増加しており、CD4 陽性ヘルパー T 細胞の反応を抑制し、HCC の進行を促進していると言われている。aHCC 合併 LC 症例に対する肝動注化学療法の効果予測において、われわれはすでに Th1/Th2 バランスが有用な指標になることを報告している。Progressive disease (PD) 症例では、Treg と Th2 細胞分画の有意な上昇を認めることを明らかにし、これによる Th1/Th2 バランスにおける Th1 細胞分画の相対的な低下が、CD8 陽性 TILs の減少と腫瘍周囲の CD8 陽性 T 細胞の浸潤の減少を引き起こす可能性を推察した。今回の検討では、BLC 群の奏効率が非常に悪く、ALC および CLC 群に比し生存期間の有意な短縮を認めたことは、上述した背景肝における HCC の遺伝子発現および異なる蛋白質発現、そして宿主免疫の相違により、今回の結果をきたした可能性が考えられた。

【結語】 JIS score 3 もしくは 4 の aHCC 症例に対する肝動注化学療法は、BLC に比べて ALC および CLC において、より効果的であることが示唆された。肝動注化学療法の背景肝別奏功の検討のため、さらなる症例の集積が求められる。

しごか ひろ あき
新後閑 弘 章

学位の種類：博士 (医学) 学位番号：乙第 2638 号

学位授与の日付：平成 24 年 8 月 24 日

主 論 文：Comparison of modified introducer method with pull method for percutaneous endoscopic gastrostomy: Prospective randomized study
(PEG (経皮内視鏡的胃瘻造設術) における introducer 変法と pull 法の比較：無作為化比較試験)

著 者：Shigoka H, Maetani I, Tominaga K, Gon K, Saitou M, Takenaka Y

公 表 誌：Dig Endos 24: 426-431, 2012

論文内容の要旨

【目的】 経皮内視鏡的胃瘻造設術 (percutaneous endoscopic gastrostomy: PEG) は、経口摂取不能症例に対する経腸栄養手段として不可欠である。その方法としてチューブを経口的に挿入する pull 法が最も一般的な手法であるが、瘻孔周囲感染の発生が多い点が問題である。チューブが口腔咽頭を経由しない introducer 法では感染が少ないことが示されているが、introducer 法ではチューブ径が細い点、一次的ボタン化ができないなどの問題があった。2002 年に日本で introducer 法を改良した introducer 変法が開発されたが、この方法では①経皮的留置、②太径カテーテル、③一次的ボタン化の 3 点

を満たした手法となっているが、まだその評価は定まっていない。そこで瘻孔周囲感染を始めとした早期偶発症に関して、introducer 変法と pull 法との比較を目的とし前向きランダム化比較試験(randomized controlled trial : RCT)で検討した。

【方法】対象は2008年4月から2010年4月までに、PEGが予定された症例に対して、pull法(Group I)あるいはintroducer変法(Group II)のいずれかに無作為割付を行い、それぞれ指定どおりのPEG造設を行った。本研究へのinclusion criteriaは18歳以上の経口摂取困難症例、exclusion criteriaは咽頭、食道に閉塞のあるもの、過去1週間以内に抗生剤投与が行われているもの、減圧目的のPEGとした。全例PEG造設前に、本人もしくは家族より書面でのinformed consentを得た。RCTの方法は封筒法にて行った。なお、本研究はあらかじめ東邦大学医療センター大橋病院の施設倫理委員会の承認を得て行われた。

胃瘻造設手技：Pull法はOne Step Button™ (Boston Scientific Corp., Natick, MA, USA), 24 Fr, 1.7~4.4 cmを用いた。従来のpull法と同様の方法で行いカテーテルが適正な位置に留置されたら、フラップ部分を覆ったシースをピールアウェイし、カテーテルをボタン化した。一方、introducer変法はDirect Ideal PEG kit™ (Olympus Corp., Tokyo, Japan), 24 Fr, 2.0~4.5 cmを用いた。同梱された胃壁固定具を用い平行した2箇所胃壁固定を行い、その後は経皮的にダイレクターを用いて瘻孔を拡張し、胃瘻カテーテルを経皮的に挿入し完了する。

主評価項目はPEG後の瘻孔感染発生率とした。創部感染の評価はJainの基準を用いて評価した。Jainの基準に従い、発赤、硬結、滲出液のそれぞれの点数の合計が8点以上もしくは細菌学的根拠のある膿性滲出液の検出により瘻孔感染と診断した。また副次的評価項目として、白血球、C-reactive protein (CRP)と患者体温を感染のパラメーターとして評価し、その他の合併症の発生および手技時間についても併せて検討した。

【結果】62症例が登録され、31人がGroup I、31人がGroup IIに割り付けされた。Group Iの1例にPEG造設翌日に死亡例がある。画像診断はなく死因は特定できておらず、PEGとの因果関係も不明である。この1例を除外した61例でperprotocol解析を行った。PEG造設1週間以内の瘻孔感染の発生率は「Group I 23.3% (7人) : Group II 12.9% (4人)」でGroup IIの方が少ない傾向にあったが有意差はなかった ($p=0.3354$)。膿性滲出液は瘻孔感染と診断した11人すべてに認めた。Jainの基準の合計点はGroup IIの方が少ない傾向にあったが有意差はなかった ($p=0.0689$)。また両群間のパラメーターでは有意差をもってGroup IIで発赤は少なく ($p=0.0129$)、硬結症例はなく、滲出液についてはGroup IIの方が少ない傾向にあったが有意差はなかった ($p=0.3449$)。1日おきに、白血球 (white blood cell : WBC)、CRPを計測したところ、Group IIで有意差をもって低値であった (WBC $p=0.0345$, CRP $p=0.0346$)。また連日の体温には差はなかった ($p=0.2186$)。瘻孔感染と診断した症例は創部管理および抗菌薬の投与で改善した。両群とも感染予防目的でCefazolin (CEZ) 1回投与を行ったが、それ以外の抗菌薬の使用は担当医の判断で行った (症例数は各群で1例ずつ)。また瘻孔感染によって外科的治療を要した症例はなかった。

【考察】Introducer変法における胃瘻造設は、pull法に比較して有意差は認めないものの、瘻孔感染リスクが少なくなる可能性が示唆された。

もりもと しんいち
守本 慎一

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2640号

学位授与の日付：平成24年10月25日

主論文：Spinal mechanism underlying the antiallodynic effect of gabapentin studied in the mouse spinal nerve ligation model

（マウス脊髄神経結紮モデルにおけるガバペンチンの抗アロディニア作用の脊髄内メカニズム）

著者：Morimoto S, Ito M, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, Adachi-Akahane S

公表誌：J Pharmacol Sci 118: 455-466, 2012

論文内容の要旨

マウスの片側 L5 脊髄神経を結紮することにより，傷害側足蹠において触刺激に対する持続的疼痛過敏反応（アロディニア）を発現する神経因性疼痛モデルを作製した。神経因性疼痛の発現メカニズムの重要な因子として，脊髄ミクログリアの活性化が知られているが，本モデルにおいても，傷害側の L5 脊髄後角において，ミクログリアのマーカー蛋白である CD11b の発現が上昇し，その形態学的観察結果からもミクログリアが活性化していることが確認された。抗痙攣薬のガバペンチンは，慢性疼痛の治療にも汎用されているが，その作用メカニズムについては不明な点が多い。今回，上記のマウス疼痛モデルを用いて，ガバペンチンの鎮痛作用メカニズムの解析を行うことにより，神経因性疼痛の発現メカニズムについての検討を行った。

持続的な安定した疼痛反応が発現している神経結紮 14 日後の動物において，ガバペンチンの単回投与は一過性の鎮痛効果を示し，その効果は約 3 時間持続した。また，浸透圧ポンプを用いたガバペンチンの 7 日間の持続投与は，投与期間中において弱い鎮痛効果を示し，その作用は投与終了の翌日には消失した。それに対して，神経結紮の直前より開始したガバペンチンの持続投与は，疼痛発現に対する強い抑制効果を示し，さらに興味深いことには，投与終了後においても作用が数日間持続した。この持続的な疼痛発現抑制作用のメカニズムとして，われわれはまず，疼痛発現の重要な因子の 1 つである脊髄ミクログリア活性化に，ガバペンチンが影響を与えている可能性を考えた。そこで，神経傷害後の脊髄ミクログリアの活性化過程におけるガバペンチンの作用を検討した結果，ミクログリアの活性化に対しては影響しないことが確認された。

ガバペンチンは電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2/\delta-1$ サブユニットに高い親和性を示すことが知られている。また，最近，ガバペンチンが細胞膜表面への $\alpha_2/\delta-1$ サブユニットの移行を阻害することにより，神経におけるカルシウムチャネルの機能に影響を与えるとの報告がある。そこで，脊髄後角における $\alpha_2/\delta-1$ サブユニットの蛋白発現について検討した結果，傷害側の L5 脊髄後角の浅層において $\alpha_2/\delta-1$ サブユニットの発現が上昇していた。結紮直前からのガバペンチンの持続投与はこの発現上昇を抑制することが確認された。次に，傷害された L5 脊髄神経の細胞体が存在する後根神経節およびこの神経が投射している脊髄後角における $\alpha_2/\delta-1$ サブユニットの messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現レベルについて確認した結果，神経傷害により，後根神経節において mRNA の発現上昇がみられたが，脊髄後角では発現レベルに変化はみられなかった。よって，神経傷害による脊髄後角での $\alpha_2/\delta-1$ サブユニット蛋白の発現レベルの上昇は，後根神経節で生成されて一次求心性神経終末へと輸送された $\alpha_2/\delta-1$ サブユニット蛋白の上昇によることが示唆された。一方，ガバペンチンは後根神経節および脊髄後角の $\alpha_2/\delta-1$ サブユニット mRNA の発現レベルに対して影響を与えなかった。

N 型カルシウムチャネル阻害薬の ω -conotoxin MVIIA を神経結紮の直前から持続投与し，疼痛の発現過程における作用をガバペンチンと比較した結果，投与期間中はガバペンチンと同様に疼痛発現を強力に抑制したが，投与終了後の翌日には疼痛抑制作用が完全に消失した。これは， ω -conotoxin MVIIA はカルシウムチャネルの活性を抑制するが，カルシウムチャネル蛋白の発現レベルに対しては影響しないためであると考えられた。また，ナトリウムチャネルの阻害は，傷害部位から脊髄への異常な神経活動の入力を阻害することによりミクログリアの活性化を抑制し，疼痛発現を抑制することが報告されている。しかし，N 型カルシウムチャネル阻害薬は，ガバペンチンと同様に脊髄ミクログリアの活性化に影響しないことが確認された。

これらの結果から、ガバペンチンの作用メカニズムとして、軸索の順行性輸送による後根神経節から一次求心性神経末梢への α_2/δ -1サブユニットの移動を抑制することにより、疼痛発現の初期課程における神経終末でのN型カルシウムチャネルの発現上昇を抑制し、疼痛の発現を抑制することが考えられた。さらに、今回の結果は、神経因性疼痛の発現メカニズムにおいて、神経傷害による一次求心性神経終末における α_2/δ -1サブユニット発現レベルの上昇が、神経因性疼痛の発症機構において重要なイベントの1つであるミクログリアの活性化の下流で起こっている可能性が示唆された。

きた むら まもる
北 村 衛

学位の種類：博士（医学） 学位番号：乙第2642号

学位授与の日付：平成24年11月26日

主論文：Scanning electron microscopic analysis of the zona pellucida in mouse blastocysts cryopreserved by vitrification
(Vitrification法により凍結融解したマウス胚盤胞における走査型電子顕微鏡による透明帯観察)

著者：Kitamura M, Katagiri Y, Sato K, Morita M

公表誌：Reproduct Immunol Biol 26: 12-20, 2011

論文内容の要旨

【背景および目的】近年、生殖補助医療（assisted reproductive technology：ART）が社会的に認知されるようになり、さまざまな技術も進歩とともに臨床の現場で応用され、より身近な治療となっている。その過程において、胚における凍結融解の技術の進歩もその1つである。胚凍結は1972年にマウス胚による緩慢凍結法が報告されてから、技術の進歩とともに体外受精胚移植に広く応用されてきた。近年では緩慢凍結法よりも高濃度の耐凍剤を用いて急速に冷却することで細胞内外の氷晶形成を抑制し、細胞に与える傷害が少ない凍結法であるvitrificationが開発され、その有用性が報告されている。今日のARTにおけるvitrificationを用いた胚凍結は欠かせない方法となっているが、胚の透明帯が硬化する質的変化が起り孵化過程の障害となる可能性があるという報告もされている。日常診療ではvitrification後の融解胚に対して、孵化過程の補助としてassisted hatching（AHA）も行われている。今回、体外受精によって得られたマウス胚盤胞をvitrificationで凍結融解し、透明帯の微細構造を走査型電子顕微鏡を用いて検討を試みた。

【材料および方法】8週齢以上のICR雄マウス精巣上体尾部から精子を回収し、過排卵処理した8~11週齢のICR雌マウスから排卵卵子を回収し、human tubal fluid+bovine serum albumin（HTF+BSA）を用いて体外受精を施行した。翌日にKSOM+AAに培地を交換し体外培養を行い、4日後に胚盤胞を回収した。得られた胚盤胞に対してvitrification法で凍結処理を行った。ガラス化液、融解液は市販のVitrification Kit〔(株)北里サプライ、富士〕を用いて、凍結保存はCryotop（北里サプライ）を使用した。凍結方法は、平衡液（equilibration solution：ES）とガラス化液（vitrification solution：VS）を室温で加温し、ES内で15分間平衡化させた後、VS内で1分間を目安にESを除去しCryotop先端シートに胚を乗せ、液体窒素内で保存した。融解方法は融解液（thawing solution：TS）を37℃に加温し、TS内にCryotopシートを浸し1分間混和し、次に希釈液内に胚を移動し3分間静止、次に洗浄液で5分間ずつ2回洗浄し、KSOM+AAに移し回復培養を行った。次に走査型電子顕微鏡での観察のために試料作製を行った。融解した胚をポリLジリンにてコーティングしたカバーガラス上に接着させた。次に前固定として2%グルタルアルデヒドで固定し、phosphate buffered saline（PBS）で洗浄後、2%タンニン酸を用いて導電染色を行い、後固定として1%四酸化オスミウムで固定し、PBSで洗浄後にエタノール上昇系列で脱水し、酢酸イソアミルで置換後に臨界点乾燥器で乾燥処理をし、Sputter Coaterを用いてイオンコートを行い、試料を作成した。今回、凍結処理を行っていない新鮮胚盤胞および凍結融解し回復培養を行わない胚盤胞、回復培養を2、4、6、12、24時間行った胚盤胞の透明帯を走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果および考察】新鮮胚盤胞における透明帯の構造が網目様であるのに対して、凍結融解し回復培養を行わなかった胚盤胞では網目が融合し多孔状態となり小孔の密度が低下していた。凍結することにより透明帯が収縮し圧縮されることに

より、個々の網目が塞がることによるものと推察された。これは凍結による透明帯の硬化という質的变化を示唆する所見であると考えられた。回復培養を2, 4, 6時間行った胚盤胞では多孔状態から網目状構造に近づく傾向にあり、時間とともに小孔の密度も高くなっていった。回復培養により透明帯の構造は徐々に新鮮胚盤胞に近づくことが確認されたが、12, 24時間行った胚盤胞は大きな差は認めなかった。培養時間を延長しても完全に回復した網目状構造は観察されなかった。以上により、凍結による透明帯への構造上の影響が確認され、回復培養によりある程度の回復は見込めるものの、完全に修復されることは困難であることが推察された。今回、vitrificationを用いた凍結融解前後の胚盤胞の透明帯を走査型電子顕微鏡で観察することにより、凍結融解後に回復培養を行うことにより胚盤胞の透明帯は新鮮胚盤胞の状態に近づく可能性があることが示唆された。しかし、培養時間を延長し追加培養を行っても、新鮮胚盤胞と同様な所見は得られず、マウス胚における検討であるが、臨床におけるAHAの必要性も示唆された。現在のARTにおいて、胚凍結技術は肉体的、経済的負担の軽減、医原性疾患の回避、胚移植の個数を限定することでの多胎の防止などのメリットがある。しかし、ARTの進歩の中で、発生異常を指摘する報告も散見される。凍結胚による症例とは限らないが、二卵性一絨毛膜双胎の報告や、Beckwith-Wiedemann症候群やAngelman症候群などのインプリント遺伝子の異常が原因とされる疾患とARTの関連性も報告されている。透明帯の変化が個体に影響を与えるのか否かは不明であるが、凍結融解技術は現在のARTの発展に大きく寄与してきた。今回は凍結融解の透明帯の変化を走査型電子顕微鏡により形態学的に検討したが、今後は細胞質や核への影響など、凍結融解と胚のクオリティについてすすめていくことが大切であり、安全性の確認も必要であると考えられる。

つち や まさる
土 屋 勝

学位の種類：博士(医学) 学位番号：乙第2643号

学位授与の日付：平成24年11月26日

主 論 文：Efficacy of laparoscopic surgery for recurrent hepatocellular carcinoma
(再発肝臓に対する腹腔鏡手術の有効性)

著 者：Tsuchiya M, Otsuka Y, Maeda T, Ishii J, Tamura A, Kaneko H

公 表 誌：Hepatogastroenterology 59: 1333-1337, 2012

論文内容の要旨

【背景】肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) は高率に再発をきたしやすいことが知られているが、実際に再肝切除が施行できる症例は限られ経皮的局所療法などの治療が選択されることが多い。当科ではHCCに対して初回治療のみならず再発時においても積極的に腹腔鏡下肝切除 (laparoscopic hepatectomy: LH) や腹腔鏡下凝固壊死療法を導入し、初回治療におけるLHの成績は開腹肝切除と比べ、術後回復などの短期的成績に優れ、HCCに対する長期予後にも差は認めなかったことを報告してきた。近年HCCに対するLHの報告数は増加傾向にあるが、再発HCCに対する肝切除術を含めた腹腔鏡手術の報告はほとんどない。今回われわれは再発HCCに対して腹腔鏡手術の臨床経験からその有効性について検討したので報告する。

【対象】2002年1月から2009年12月までに外科的治療を行った123例の症例のうち43例に腹腔鏡手術を施行した。43例のうち16例が再発HCCに対する治療であった。この16例の術前因子および術後成績に関してretrospectiveに検討した。

【結果】初回治療時と再発腹腔鏡治療時において、年齢のみ有意差を認めたがその他の患者背景 (T-bil や ICGR15などの肝予備能) と腫瘍因子 (腫瘍径、数、腫瘍マーカー) に差はなかった。初回治療は経皮的ラジオ波凝固療法 (radiofrequency ablation: RFA) 9例、経皮的マイクロ波凝固壊死療法1例、経肝動脈塞栓術2例、LH 4例が行われていた。再発時の腹腔鏡治療はLH 7例、腹腔鏡下RFA 1例、肝外転移巣切除7例、診断のみ1例であった。肝内再発8例のうち7例にLH (完全腹腔鏡下肝切除3例、用手補助下肝切除術3例、腹腔鏡補助下肝切除手術1例)、1例に腹腔鏡下RFAを行った。肝外再発例7例のうち2例は完全腹腔鏡下腫瘍切除を行い、その他5例は腹腔鏡補助下もしくは小切開下に腫瘍切除を行った。平均手術時間は217分、平均出血量は211 ml、術後平均在院日数は9.5日であった。腹腔鏡治療を行った

15 例中 12 例に手術後の再々発を認めましたが、腹腔鏡手術に起因する断端再発やポート再発は認めなかった。術後の観察期間中央値は 32.8 カ月。1 年、2 年生存率は 86.7, 73.3% であった。肝内再発と肝外再発別にみると 1 年生存率に有意差はなかったが (100% vs. 71.4%), 2 年生存率は肝内再発例において優位に高かった (100% vs. 42.9%)。また無再発生存 (disease free survival : DFS) に差はなかったが (19.2 vs. 10.6 カ月 ; $p=0.15$)、全生存 (overall survival : OS) は有意に肝内再発例が長かった (51.2 vs. 23.0 カ月 ; $p=0.01$)。

【考察】 LH は肝腫瘍に対する低侵襲な治療法として、当初は腹腔鏡的にアプローチが容易な局在に対して肝部分切除や外側区域切除を施行してきた。その後、LH の適応は徐々に難易度の高い腫瘍や術式に対しても拡大してきている。本研究において、初回治療が開腹肝切除後の再発例に対しては初回手術時の手術創が非常に大きいため強固な癒着などの問題から再発時の腹腔鏡手術は選択されなかった。一方、初回治療に LH を行い再発時にも LH を行った症例を 3 例経験したが、LH は開腹肝切除手術に比べ腹腔内癒着は少なく軽度であり、再発 HCC に対しての再腹腔鏡手術は十分適応になり得ると思われた。

再発 HCC に対する開腹再肝切除の有効性はすでに報告されているが、今回術前診断および術中所見からはいずれも肝内転移 (intra-hepatic metastasis : IM) の定義に合致するものではなく、多中心性発生 (multicentric carcinogenesis : MC) による再発と判断し再肝切除術の適応と考えられた。肝内再発病変における再肝切除および RFA を含む腹腔鏡的治療後の短期成績および 2 年生存率は良好な結果が得られたが、症例数が少なく観察期間も短いため今後もさらなる症例の蓄積と観察が必要と思われる。

一方で肝外に発生した再発 HCC の予後は極めて悪いと言われているが、肝内再発がコントロールされている場合には肝外転移の外科切除例は非切除例に比して予後が向上するとされている。初回に凝固壊死療法を行った 10 例のうち 5 例が肝外再発をきたしており、うち 2 例は経皮的凝固治療後の seeding によるものであった。腹腔鏡手術は凝固壊死療法後の再発が seeding なのか否かを低侵襲に診断することが可能であった。さらに肝外再発においても切除可能か、腹膜転移の存在などにより切除不可能で試験的腹腔鏡手術にとどめるかの判断にも腹腔鏡手術は低侵襲で極めて有用な方法であった。

再発 HCC に対する腹腔鏡手術は出血量や歩行開始時期、在院日数からも明らかに低侵襲で、正確な腫瘍の局在や術中診断が可能であり、術後の QOL にも貢献し早期に集学的治療に移行することができた。再発 HCC に対して初回手術が通常開腹であれば腹腔鏡手術の選択は難しくなるが、初回治療が LH や RFA, transcatheter arterial embolization (TAE) であれば腹腔鏡手術は積極的な局所療法として有効な治療選択肢になり得るものと考えられた。

【結語】 再発 HCC に対する腹腔鏡手術は低侵襲でかつ診断治療において有効な選択肢になり得ることが示唆された。