

2018.4

特集号



(題字：櫻井克年学長)

# 国立大学法人 高知大学学報

## 高知大学学位授与記録第九十三号

総務課広報係発行

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、高知大学学位規則第14条に基づきその論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

\*\*\*\*\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*  
\*\*\*\*\*

# 高知大学学報

本学は、次の者に博士（医学）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲医博第161号	甫喜本 憲弘	A novel color fluorescence navigation system for intraoperative transcutaneous lymphatic mapping and resection of sentinel lymph nodes in breast cancer: comparison with combination of gamma probe scanning and visible dye methods  (乳癌におけるセンチネルリンパ節の術中経皮的リンパマッピングと切除のための新規カラー蛍光ナビゲーションシステム：ガンマプローブ走査法と可視色素法との比較)	1
甲医博第162号	藤戸 良輔	Musical deficits and cortical thickness in people with schizophrenia (統合失調症における音楽能力障害と大脳皮質厚との関係)	5
甲医博第163号	中島 紀綱	Unilateral repetitive tibial nerve stimulation improves neurogenic claudication and bilateral F-wave conduction in central lumbar spinal stenosis (腰部脊柱管狭窄症に対して片側脛骨神経反復刺激が間歇跛行に及ぼす効果と両側脛骨神経F波解析によるメカニズムの検討)	10
甲総医博第66号	石元 達士	Use of intralesional blood to determine diffusible biomarkers from skin lesions (皮疹部血を使用した皮疹部から放出されるバイオマーカーの測定)	15
甲総医博第67号	白石 久	Effect of Minerals on Intestinal IgA Production using Deep Sea Water Drinks (海洋深層水由来ミネラルはその含有バランスにより腸管免疫におけるIgA産生を亢進する)	20

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総医博第44号	沖 裕昌	Evaluation of postprandial hypoglycemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease by oral glucose tolerance testing and continuous glucose monitoring (経口糖負荷試験と24時間血糖測定を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患患者における食後低血糖の検討)	26
乙総医博第45号	戸井 慎	Hepatic stellate cells derived from the nestin-positive cells in septum transversum during rat liver development (ラット肝発生期の肝星細胞は、横中隔間充織のネスチン陽性細胞に由来する)	31

氏名(本籍)	甫喜本 憲弘 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第161号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成30年1月16日
学位論文題目	A novel color fluorescence navigation system for intraoperative transcutaneous lymphatic mapping and resection of sentinel lymph nodes in breast cancer: comparison with combination of gamma probe scanning and visible dye methods  (乳癌におけるセンチネルリンパ節の術中経皮的リンパマッピングと切除のための新規カラー蛍光ナビゲーションシステム：ガンマプローブ走査法と可視色素法との比較)
発表誌名	Oncology (in press)

<b>審査委員</b>	主査	教授	前田	長正
	副査	教授	山上	卓士
	副査	教授	降幡	睦夫




## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名	甫喜本 憲弘
論文題目	<p>A novel color fluorescence navigation system for intraoperative transcutaneous lymphatic mapping and resection of sentinel lymph nodes in breast cancer: comparison with combination of gamma probe scanning and visible dye methods          (乳癌におけるセンチネルリンパ節の術中経皮的リンパマッピングと切除のための新規カラー蛍光ナビゲーションシステム:ガンマプローブ走査法と可視色素法との比較)</p>
<p>(論文要旨)          本研究は、インドシアニンググリーン (ICG) の近赤外蛍光を利用した術中センチネルリンパ節生検 (SLNB) の新しいイメージングシステムとして、HyperEye Medical System (HEMS) を開発し、従来行われてきたガンマプローブ走査を用いた Radio Isotope 法 (RI 法) と可視色素法 (色素法) とを比較して、単一の施設における HEMS の臨床的有効性を評価・検討したものである。この研究の背景として、これまで腋窩リンパ節郭清 (Ax) は、乳癌患者の腋窩リンパ節状態を評価するための標準的な手術手技であった。しかし、残念なことに、Ax には、リンパ浮腫、過敏性、および患側上肢の運動制限などの合併症を伴うことが多かった。これらの合併症を引き起こさないようにリンパ節転移の有無を評価するために、代替的かつ低侵襲的方法として、SLNB が出現し、現在では SLNB の結果によって Ax を行うかどうか決定することが標準術式として広く行われている。しかし、センチネルリンパ節 (SLN) を同定できなければ腋窩郭清が必要となり、その結果、転移がなければ、患者にとっては不必要かつ過大な侵襲が加えられたということになるため、SLN の同定を確実にする必要がある。従来の SLNB は、インディゴカルミンのような色素を用いた色素法、放射線同位元素を用いた RI 法、ICG の近赤外蛍光を利用した蛍光法を単独、もしくはこれらの組み合わせで行われてきた。しかし、いずれの方法にもデメリットがある。色素法は簡便に行うことができるが、未熟な手術手技や肥満の患者では同定率が下がってしまうこと、RI 法は放射線管理区域が必要であること、蛍光法では術中暗視野にして確認する必要があり、頻回の明暗によって術操作がスムーズにいかないことがあげられる。これらのデメリットを改善すべく、我々は新しいカメラシステムとして HEMS を開発した。HEMS はこれまでモノクロであった近赤外蛍光画像を、手術中の明視野において鮮やかなカラー画像として視覚化できるように開発したカラー蛍光ナビゲーションシステムであり、リンパ管および SLN を容易に同定可能である。また使用において放射線管理区域は不必要であり、どこの医療施設でも使用可能である。</p> <p>この研究では、2007年4月から2009年3月まで高知医科大学病院で治療された、組織学的に確認された乳癌患者91人を対象とし、HEMSと従来のインディゴカルミンを用いた色素法と<sup>99m</sup>Tc-Snコロイドを用いたRI法とで比較・検討を行った。HEMS、色素法およびRI法の組み合わせを用いて同定されたセンチネルリンパ節 (SLN) の中央値は1.5個 (範囲1~6) であった。SLNはHEMSによってすべての患者で同定できた。しかし、2人の患者において、色素法およびRI法で同定できなかった。また別の2人の患者では、色素法で同定されなかった。したがって、SLNの同定率は、HEMS:100%、色素法:95.6%、RI法:97.8%であった。また、ICG注射部位からSLNまでのリンパ管走行をどこまで追えるかをHEMSで検討したところ、91人の患者のうち87人(95.6%)がRI法で同定したSLNの位置から2cm以内の距離まで、31人(33.7%)ではSLNまで同定可能であった。以上のように、HEMSは手術中の明視野において、センチネルリンパ節を100%同定でき、リンパ管の走行も簡単に確認できた。従来の方法のデメリットをカバーできるSLNBの新しいモダリティとして提供できると結論づけ、臨床応用されることを期待する。</p>	

## 論文審査の結果の要旨

	氏名
審査委員	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>主査氏名            前田 長正</p> <p>副査氏名            山上 卓士</p> <p>副査氏名            降幡 睦夫</p> </div> <div style="width: 5%; text-align: center;">      </div> </div>

**題 目**

A novel color fluorescence navigation system for intraoperative transcutaneous lymphatic mapping and resection of sentinel lymph nodes in breast cancer: comparison with combination of gamma probe scanning and visible dye methods

(乳癌におけるセンチネルリンパ節の術中経皮的リンパマッピングと切除のための新規カラー蛍光ナビゲーションシステム：ガンマプローブ走査法と可視色素法との比較)

**著 者**

Norihiro Hokimoto, Takeki Sugimoto, Tsutomu Namikawa, Taku Funakoshi, Toyokazu Oki, Maho Ogawa, Hideo Fukuhara, Keiji Inoue, Takayuki Sato, Kazuhiro Hanazaki

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

Oncology  
(in press)

**要 旨**

**【目的】**

本研究は、インドシアニングリーン（以下ICG）の近赤外蛍光を利用した術中センチネルリンパ節生検（SLNB）の新イメージングシステムとして、HyperEye Medical System（以下HEMS）を開発し、従来行なわれてきたRI法・色素法と比較して、HEMSの臨床的有効性を評価・検討したものである。

**【背景】**

これまで腋窩リンパ節郭清は、乳癌患者の腋窩リンパ節状態を評価するための標準的手術手技であったが、リンパ浮腫、過敏性、患側上肢の運動制限などの合併症を伴うことが多かった。こ

れら合併症を起こさないようリンパ節転移の有無を評価するため、代替かつ低侵襲の方法として、SLNBが広く行なわれている。しかし、SLNを同定できなければリンパ節郭清が必要となり、その結果転移がなければ overtreatment となり、正確な SLN 同定が必要である。

【方法】

従来の SLNB には、Indigocarmin などによる色素法、放射性同位元素による RI 法、ICG の近赤外蛍光による蛍光法が行なわれてきた。しかし、いずれにもデメリットがあり、色素法は簡便であるが肥満患者の同定率が低下すること、RI 法は放射線管理区域が必要であること、蛍光法では術中暗視野での確認が必要で、頻回の明暗により術操作がスムーズに行なえないことなどが挙げられる。

これらを改善すべく、申請者らは新カメラシステム HEMS を開発した。HEMS はこれまでモノクロであった近赤外蛍光画像を、術中明視野においても鮮明なカラー画像として視覚化出来るよう改善したカラー蛍光ナビゲーションシステムであり、リンパ管と SLN が同定可能である。また、放射線管理区域は不必要でどの医療施設でも使用可能である。

本研究では、2007 年 4 月～2009 年 3 月まで当大学病院で治療し、組織学的に確認された乳癌患者 91 人を対象とした。腫瘍は 3cm 未満、臨床的にはリンパ節陰性例で、進行期は IIA 期までの症例である。センチネルリンパ節の同定は、同一患者につき HEMS・従来の色素法・RI 法全てを組み合わせで施行しそれぞれの効果を比較検討することで、HEMS の有用性について考察した。

【結果】

HEMS と従来の色素法・RI 法の組み合わせで同定された SLN の中央値は 1.5 個（範囲 1～6）であった。HEMS により、SLN は全ての被験患者に同定可能であった。しかし、2 人の患者において色素法・RI 法とも同定できず、さらに 2 人の患者では色素法で同定されなかった。このため、SLN の同定率は、HEMS: 100%、RI 法: 97.8% (2 名陰性)、色素法: 95.6% (4 名陰性) であった。また HEMS では、ICG 注射部位から SLN までのリンパ管走行において、91 人中 87 人 (95.6%) が RI 法の同定位置より更に先で SLN の 2cm 以内までが同定可能であり、31 人 (33.7%) は SLN まで連続して同定可能であった。

【結論】

以上のように、HEMS は手術中の明視野においても、SLN を 100% 同定可能かつリンパ管走行も簡便に確認できた。以上、HEMS は従来法のデメリットをカバーできる SLNB のための新しい方法として、今後臨床応用されることが期待される。

氏名(本籍)	藤戸 良輔 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第162号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成30年2月20日
学位論文題目	Musical deficits and cortical thickness in people with schizophrenia  (統合失調症における音楽能力障害と大脳皮質厚との関係)
発表誌名	Schizophrenia Research (in press)

<b>審査委員</b>	主査	教授	山口	正洋
	副査	教授	上羽	哲也
	副査	教授	山上	卓士

### 論文の内容の要旨

### 論文審査の結果の要旨






# 学 位 論 文 要 旨

	氏 名	藤戸良輔
論文題目	Musical deficits and cortical thickness in people with schizophrenia (統合失調症における音楽能力障害と大脳皮質厚との関係)	
<p>(論文要旨)</p> <p>音楽活動は言語と同様に、対人関係や社会的コミュニケーションにおいて重要な役割を果たす。脳損傷による後天的失音楽症研究は、右半球の皮質病変が音楽的能力低下に影響していることを示唆し、先天的失音楽症でも右半球の下前頭回および聴覚皮質の白質量の減少と同じ領域における皮質厚の増加があることが示されている。先行研究では、統合失調症において、音楽的能力低下を報告した。この機能低下は、統合失調症における認知機能障害および陰性症状などの臨床症状と関連していた。しかしながら、統合失調症の音楽的障害の根底にある神経基質は不明なままである。我々は、統合失調症において、右下前頭回と上頭側回の皮質の厚さの減少があると仮定し、皮質厚を測定して、音楽能力との関係を研究することとした。</p> <p>本研究では、構造的磁気共鳴画像法(MRI)を用いて統合失調症患者の音楽的能力低下と皮質厚との関係を調査した。24名の統合失調症患者、および22人の健常対象が研究に同意した。参加者の音楽的能力は、Montreal Battery for the Evaluation of Amusia(MBEA)で評価された。統合失調症の重症度は、陽性・陰性症状評価尺度(PANSS)、Global Assessment of Functioning(GAF)で評価し、認知機能は統合失調症認知機能簡易検査(BACS)を用いた。全ての参加者のMRI画像はあき総合病院で取得し、FreeSurferを用いて、皮質表面の自動再構築を行った。</p> <p>MBEA総合得点から評価すると、統合失調症患者10名と健常対照者1名が失音楽を有すると分類された。統合失調症では、MBEA総合得点が低いほどBACSスコアが低かった。PANSS陰性症状の重症度とMBEA総合得点の低下との間に相関がみられた。左右の平均皮質厚については、統合失調症患者と対照との間にMBEAスコアとの関係において有意差があった(フィッシャー-r-z検定, <math>p &lt; 0.01</math>)。皮質厚とMBEAスコアとの間の相関における群間の相関の差は、左縁上領域において最も顕著であった(フィッシャー-r-z検定, <math>p &lt; 0.001</math>)。脳皮質表面ベースの分析では、左下前頭領域および側頭領域の皮質の厚さが薄いほど統合失調症の音楽的能力が低いことが示され、対照者においては左縁上領域のより厚い皮質がより低い音楽能力と関連していた。</p> <p>本研究では、統合失調症患者の音楽的能力が健常対照者と比較して低く、この音楽的能力の障害は認知機能の低下および精神症状の悪化と関連するという以前の知見を追試した。最初の仮説と異なり、統合失調症の音楽能力低下は、右は前頭葉内側部の皮質厚、左は上側頭回から縁上回にかけ</p>		

ての言語領域の皮質厚との相関が強かった。音楽的能力と皮質厚の関連において、患者と健常対照者の両方において音楽的能力と皮質厚との間に有意な相関があったが、相関の方向は異なっていた。特に、下前頭領域や縁上回領域などでの左言語領域での相関の方向の違いが顕著で、音楽能力の低下は、健常対照者では大脳皮質厚の増大を示す傾向があるに対して、統合失調症患者では大脳皮質厚の減少と相関をしていた。音楽的能力の定量化は、認知機能および症状スコアの測定よりも統合失調症における皮質病理のより有用な評価となる可能性がある。また、今回の結果は、統合失調症の危険にさらされている人々に音楽教育や訓練が保護効果をもたらす可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名		藤戸 良輔
審査委員	主査氏名	山口 正洋	
	副査氏名	上羽 哲也	
	副査氏名	山上 卓士	

**題 目**

Musical deficits and cortical thickness in people with schizophrenia

(統合失調症における音楽能力障害と大脳皮質厚との関係)

**著 者**

Ryosuke Fujito, Masayoshi Mineose, Sanae Hatada,  
Naoto Kamimura, Shigeru Morinobu, Donna J. Lang, William G. Honer, and  
Ken Sawada

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

Schizophrenia Research (in press)

**要 旨**

背景・目的:

音楽活動は言語と同様に、対人関係や社会的コミュニケーションにおいて重要な役割を果たす。脳損傷による後天的失音楽症研究では、右半球の皮質病変が音楽的能力低下に影響していることが示唆され、先天的失音楽症では右半球の下前頭回および聴覚皮質の白質量の減少と同じ領域における皮質厚の増加が示されている。申請者が所属する研究室は、統合失調症における音楽的能力の低下を報告してきた。この能力低下は統合失調症における認知機能障害および陰性症状などの臨床症状と相関していた。しかし、統合失調症の音楽的能力障害の根底にある神経基質は未だ不明である。申請者は、様々な失音楽症患者において大脳皮質厚変化の報告例があることから、統合失調症患者の大脳皮質厚を測定し、音楽能力との関連を検討した。

方法:

研究への同意を得た24名の統合失調症患者および22人の健常者を対象とした。あき総合病院において脳の構造的磁気共鳴画像(MRI 画像)を取得し、ソフトウェア FreeSurfer を用いて大脳皮質表面の自動再構築を行い、皮質厚を測定した。参加者の音楽的能力は Montreal Battery for the Evaluation of Amusia(MBEA)で評価した。統合失調症の重症度は、陽性・陰性症状評価尺度(PANSS)、

Global Assessment of Functioning(GAF)で評価し、認知機能は統合失調症認知機能簡易検査(BACS)にて評価した。統合失調症患者および健常者の大脳皮質厚、音楽的能力、また上記機能・症状評価の関連性を解析した。

結果：

MBEAにより、統合失調症患者10名と健常対照者1名が失音楽症を有すると判定された。統合失調症では、MBEA総合得点が低いほどBACSスコアが低く、MBEA総合得点の低下とPANSS陰性症状の重症度との間に相関がみられた。

患者と健常対照者の両方において、音楽的能力と皮質厚は有意な相関があったが、相関の方向が異なっていた。この違いは左縁上領域において最も顕著であり、統合失調症患者では音楽的能力の低下は左縁上領域皮質厚の減少と相関し、健常対照者では音楽的能力の低下は同領域皮質厚の増大と相関していた(フィッシャー-r-z検定,  $p < 0.001$ )。

脳皮質表面ベースの分析では、統合失調症患者の音楽能力の低下は左下前頭領域および左側頭領域の皮質厚減少、また右前頭葉内側部の皮質厚減少と相関していた。これは、これまでの様々な失音楽症患者の報告例(右下前頭回および上頭側回の皮質厚の減少)とは異なる結果であった。

結論、考察：

本研究ではまず、統合失調症患者の音楽的能力が健常対照者と比較して低く、この低下は認知機能の低下および精神症状の悪化と相関するという以前の知見と同様の結果を得た。皮質厚の解析では、過去の様々な失音楽症の報告とは異なり、統合失調症の音楽的能力低下は左下前頭領域および左側頭領域の皮質厚減少、右前頭葉内側部の皮質厚減少と相関していた。この左半球の2領域は言語野との重なりが大きい領域であった。また、統合失調症患者と健常対照者では音楽的能力と皮質厚の相関の方向(皮質厚の減少または増大)が異なっていることが判明した。以上のことから、統合失調症における音楽的能力の定量化は本疾患の皮質病理の有用な評価となる可能性が考えられた。また今回の結果は、統合失調症患者や発症の可能性のある人々に対する音楽教育や訓練が保護効果をもたらす可能性を示唆している。

申請者は本論文において、統合失調症患者の大脳皮質厚を脳全体に亘って詳細に計測し、音楽能力の低下と相関する脳領域を同定した。この知見は統合失調症の機能低下の根底にある神経基質を理解する上で大きな進展であり、特に統合失調症において音楽能力に着目することの重要性を示唆し、将来的には音楽療法による治療に科学的根拠を与えその方法の発展に寄与するものと考えられる。以上のことより本論文は、高知大学博士(医学)に値すると判断した。

氏名(本籍)	中島 紀綱 (兵庫県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第163号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成30年3月5日
学位論文題目	Unilateral repetitive tibial nerve stimulation improves neurogenic claudication and bilateral F-wave conduction in central lumbar spinal stenosis (腰部脊柱管狭窄症に対して片側脛骨神経反復刺激が間歇跛行に及ぼす効果と両側脛骨神経F波解析によるメカニズムの検討)
発表誌名	Journal of Orthopaedic Science, volume23 No. 2 (in press)

<b>審査委員</b>	主査	教授	山口	正洋
	副査	教授	古谷	博和
	副査	教授	上羽	哲也

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

論文題目	<p>氏名 中島紀綱</p> <p>Unilateral repetitive tibial nerve stimulation improves neurogenic claudication and bilateral F-wave conduction in central lumbar spinal stenosis</p> <p>(腰部脊柱管狭窄症に対して片側脛骨神経反復刺激が間歇跛行に及ぼす効果と両側脛骨神経F波解析によるメカニズムの検討)</p>
<p>(論文要旨)</p> <p><b>【目的】</b> 腰部脊柱管狭窄症 (Lumbar spinal stenosis [LSS]) において下肢末梢神経反復刺激により間歇跛行 (Neurogenic claudication [NC]) が改善することが報告されているがそのメカニズムは不明である。本研究では、足関節部脛骨神経反復電気刺激 (repetitive tibial nerve stimulation at the ankle [RTNS]) によるNC改善効果を確認し、またその背景に存在する神経生理学的変化を明らかにするためにRTNSがRTNS刺激側および非刺激側の脛骨神経F波に及ぼす影響について調査した。</p> <p><b>【対象および方法】</b> 対象は (1) 両下肢症状を呈しMRIで硬膜管圧迫所見を示した中心性LSS症例で、(2) 連続歩行距離 (Claudication distance [CD]) が500m以下の馬尾性NCを有し、(3) 足関節部脛骨神経刺激により母趾外転筋 (Abductor hallucis [AH]) から複合筋活動電位 (M波) が導出可能であった26症例である。 受診順で、最初の16例をRTNS(+)群 (平均72.6歳、男10、女6)、あとの10例をRTNS(-)群 (平均75.3歳、男5、女5) として振り分けた。 RTNS(+)群では、まず、歩行テストによりCDを測定し、次に仰臥位にて、足関節部脛骨神経刺激 (0.2 ms、1 Hz、最大上強度、100回) でAH記録によるF波検査、次に膝窩部脛骨神経刺激でAH記録によるM波検査を一側ずつ両側に行った。その後直ちに、一側 (下肢症状がより重度な側) の足関節部脛骨神経に条件刺激RTNS (0.3 ms、5 Hz、運動閾値の120%の強度、5分間) を加え、引き続いて再度F波検査、M波検査を一側ずつ両側について行い、最後に再度歩行テストによるCD測定を行った。RTNS(-)群では条件刺激RTNSを行わず、それに相当する5分間は仰臥位で安静とし、それ以外はRTNS(+)群と同一の検査手順で行った。</p> <p><b>【結果】</b> 両群の年齢、身長、硬膜管圧迫高位、CDに有意差はなかった。RTNS(+)群においてCDはRTNSにより有意に延長した (176±96 m vs 329±133 m; p=0.0004)。一方、RTNS(-)群においてCDは有意な変化を認めなかった (139±110 m vs 151±112 m; p=0.14)。 RTNS(+)群では、RTNS刺激側におけるF波はRTNSにより平均潜時 (P=0.026)、最短潜時</p>	

( $P=0.00081$ ) が有意に短縮し、伝導速度は有意に増加した ( $49.7\pm 4.2$  m/s vs  $51.6\pm 4.4$  m/s;  $P=0.00081$ )。また、非刺激側におけるF波も、最短潜時は有意に短縮し ( $P=0.011$ )、伝導速度は有意に増加した ( $50.1\pm 4.6$  m/s vs  $53.0\pm 5.1$  m/s;  $P=0.0019$ )。

一方RTNS(-)群では、5分間の安静前後で、両側ともF波の各パラメーターに有意な変化を認めなかった。


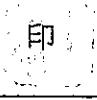
膝窩部刺激によるM波は、RTNS(+)群ではRTNS前後で、RTNS(-)群では5分間の安静前後で、両側とも振幅、潜時に有意な変化を認めなかった。

#### 【考察】

LSSにおけるNCの発生メカニズムは、立位や歩行によって腰椎部脊柱管内圧が上昇し、これに伴う神経虚血の増強がすでに易損性の高い病的状態にあった馬尾に伝導ブロックや伝導遅延が生じてNCを来すと考えられる。本研究では、馬尾性NCを呈するLSS患者において、一側下肢にRTNSを加えた群でのみCDが有意に改善し、さらに脛骨神経F波伝導速度が両側で有意に増加することを明らかにした。従って、一側RTNSにより馬尾性NCが改善した背景には馬尾伝導性が両側性に改善するメカニズムが存在すると考えられる。RTNSにより少なくとも対側にまで及んだ影響は、電気刺激の効果に関する過去の研究データに基づいて推測すると自律神経を介したものと考えられる。すなわち、RTNSにより比較的広範囲に交感神経の緊張低下が生じ、その結果、両側馬尾の血管拡張と血流増加が生じた可能性が考えられる。

RTNSによりM波潜時が変化しなかった理由は、RTNSが交感神経活動の変化を介して神経の単位長当たりには及ぼす影響が小さいため、伝導距離の短いM波ではそれを検知できず、伝導距離の長いF波では影響の累積効果によって変化を捉えることができるためと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	中島 紀綱
審査委員	主査氏名	山口 正洋 
	副査氏名	古谷 博和 印
	副査氏名	上羽 哲也 

**題 目** Unilateral repetitive tibial nerve stimulation improves neurogenic claudication and bilateral F-wave conduction in central lumbar spinal stenosis  
 (腰部脊柱管狭窄症に対して片側脛骨神経反復刺激が間歇跛行に及ぼす効果と両側脛骨神経F波解析によるメカニズムの検討)

**著 者** Noritsuna Nakajima, Toshikazu Tani, Katsuhito Kiyasu, Masashi Kumon, Shinichirou Taniguchi, Ryuichi Takemasa, Nobuaki Tadokoro, Kazuya Nishida, Masahiko Ikeuchi

**発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月**  
 Journal of Orthopaedic Science, volume23 No.2  
 (in press)

### 要 旨

#### 背景・目的：

腰部脊柱管狭窄症 (Lumbar spinal stenosis [LSS]) において下肢末梢神経反復刺激により間歇跛行が改善することが報告されているがそのメカニズムは不明である。本研究では、足関節部脛骨神経反復電気刺激 (repetitive tibial nerve stimulation at the ankle [RTNS]) による間歇跛行改善効果を確認し、その背景に存在する神経生理学的変化を明らかにするため、RTNS が RTNS 刺激側および非刺激側の脛骨神経 F 波に及ぼす影響について検討した。

#### 対象および方法：

対象は (1) 両下肢症状を呈し MRI で硬膜管圧迫所見を示した中心性 LSS 症例で、(2) 連続歩行距離が 500m 以下の馬尾性間歇跛行を有し、(3) 足関節部脛骨神経刺激により母趾外転筋から複合筋活動電位 (M 波) が導出可能であった 26 症例である。受診順で、最初の 16 例を RTNS(+)群 (平均 72.6 歳、男 10、女 6)、あとの 10 例を RTNS(-)群 (平均 75.3 歳、男 5、女 5) として振り分けた。



結果：

両群の年齢、身長、硬膜管圧迫高位、連続歩行距離に有意差はなかった。RTNS(+)群において連続歩行距離はRTNSにより有意に延長した ( $176 \pm 96$  m vs  $329 \pm 133$  m;  $p=0.0004$ )。一方、RTNS(-)群において連続歩行距離は有意な変化を認めなかった ( $139 \pm 110$  m vs  $151 \pm 112$  m;  $p=0.14$ )。

RTNS(+)群では、RTNS刺激側におけるF波はRTNSにより平均潜時 ( $P=0.026$ )、最短潜時 ( $P=0.00081$ ) が有意に短縮し、伝導速度は有意に増加した ( $49.7 \pm 4.2$  m/s vs  $51.6 \pm 4.4$  m/s;  $P=0.00081$ )。また、非刺激側におけるF波も、最短潜時は有意に短縮し ( $P=0.011$ )、伝導速度は有意に増加した ( $50.1 \pm 4.6$  m/s vs  $53.0 \pm 5.1$  m/s;  $P=0.0019$ )。一方RTNS(-)群では、5分間の安静前後で、両側ともF波の各パラメーターに有意な変化を認めなかった。

膝窩部刺激によるM波は、RTNS(+)群ではRTNS前後で、RTNS(-)群では5分間の安静前後で、両側とも振幅、潜時に有意な変化を認めなかった。

考察：

LSSにおける間歇跛行の発生メカニズムは、立位や歩行によって腰椎部脊柱管内圧が上昇し、これに伴う神経虚血の増強がすでに易損性の高い病的状態にあった馬尾に伝導ブロックや伝導遅延が生じて間歇跛行を来すと考えられる。本研究では、馬尾性間歇跛行を呈するLSS患者において、一側下肢にRTNSを加えた群でのみ連続歩行距離が有意に改善し、さらに脛骨神経F波伝導速度が両側で有意に増加することを明らかにした。従って、一側RTNSにより馬尾性間歇跛行が改善した背景には馬尾伝導性が両側性に改善するメカニズムが存在すると考えられる。RTNSにより少なくとも対側にまで及んだ影響は、電気刺激の効果に関する過去の研究データに基づいて推測すると自律神経を介したものと考えられる。すなわち、RTNSにより比較的広範囲に交感神経の緊張低下が生じ、その結果、両側馬尾の血管拡張と血流増加が生じた可能性が考えられる。

RTNSによりM波潜時が変化しなかった理由は、RTNSが交感神経活動の変化を介して神経の単位長当たりには及ぼす影響が小さいため、伝導距離の短いM波ではそれを検知できず、伝導距離の長いF波では影響の累積効果によって変化を捉えることができるためと考えられた。

申請者は本論文において、腰部脊柱管狭窄症患者の脛骨神経反復電気刺激を行い、間歇跛行の改善に伴う脛骨神経F波の変化を解析し、F波の潜時短縮と伝導速度増加が電気刺激を行った側だけでなく反対側にもおこることを明らかにした。この知見は、当該患者に対する脛骨神経反復電気刺激の有用性を確かなものとし、この治療効果のメカニズムの理解を大きく進展させるものである。今後さらに基礎的メカニズムに基づいて効果の高い電気刺激療法の開発に結びつくと考えられる。以上のことより本論文は、高知大学博士(医学)に値すると判断した。

氏名(本籍)	石元 達士 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第66号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成30年3月23日
学位論文題目	Use of intralesional blood to determine diffusible biomarkers from skin lesions (皮疹部血を使用した皮疹部から放出されるバイオマーカーの測定)
発表誌名	Journal of Dermatological Science (in press)

<b>審査委員</b>	主査	教授	宇高 恵子
	副査	教授	福島 敦樹
	副査	教授	仲 哲治

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

	氏名	石元 達士
論文題目	Use of intralesional blood to determine diffusible biomarkers from skin lesions. (皮膚部血を使用した皮膚部から放出されるバイオマーカーの測定)	
(論文要旨)		
<p>皮膚疾患の病勢はしばしば、末梢血中における細胞組成や液性因子の変化でモニターされてきた。これらのメディエーターに求められる特性としては、感受性と特異度が高く再生可能であり、できる限り非侵襲的に患者から採取できるという点が挙げられる。また、メディエーターは産生される過程を考えると大きく2種類に分類できる。1つ目は天疱瘡における抗デスマグレイン抗体のように全身から循環系への流れを反映する場合(type1)で、もう一方はアトピー性皮膚炎における thymus and activation-regulated chemokine(TARC)のように皮膚部から全身循環系への流れが反映される場合(type2)である。このうち type2 のメディエーターについては皮膚部から産生されるため、皮膚部から全身循環系への濃度勾配が生じ、末梢血(circulation blood:CB)では希釈される。そのため皮膚の重症度や範囲が一定以上ではじめてCB中で検出が可能になる状況も考えられ、病勢を正確に反映しない可能性がある。このような背景のもと、我々は皮膚部のメスによる切創から流出する微量血液を採取し、これを末梢血に対して皮膚内血(intralesional blood:ILB)と命名した。本研究では type2 のメディエーターについて、CBとILB中の濃度を比較することで、ILBの検体としての優位性を示す事を目的とした。</p> <p>まず初めに、メディエーターが皮膚部から確実に産生されている疾患として肥満細胞腫の小児2人からCBとILBを採取し、血中のヒスタミン値を比較した。我々の予想通り、CBと比べてILBではヒスタミンは数百倍も高値を示した。また1例においては、肥満細胞腫の皮膚部から1cm離れた無疹部からも採血(extra-lesional blood:ELB)をしたところ、ELBはCBとILBの中間値を示した。この実験結果は、皮膚部由来のメディエーターであるヒスタミンは産生現場である皮膚から、周囲の皮膚、そして末梢循環系へと拡散している事を示していた(Fig. 1c and 1d)。</p> <p>次に我々は乾癬患者の皮膚部から産生されている事が知られている、代表的なtype2メディエーターであるIL-8に注目した。IL-8は鱗屑や角層を含む表皮で高発現しており、好中球の遊走に関わることで乾癬の病態に関与しているとされている。まず、免疫染色にて乾癬患者の表皮でIL-8が高発現していることを確認した(Fig. 2b and 2c)。次にIL-8のmRNAレベルを測定したところ、皮膚部と無疹部では統計学的優位に皮膚部組織中でIL-8が増加していた(Fig. 2a)。乾癬患者10名についてCBとILB中のIL-8を測定したところ、その全てでCBよりもILBにおいてIL-8が高値を示し(Fig. 3a)、統計学的に優位な差を認めた(Fig. 3b)。そして、ILB中のIL-8と乾癬の重症度の評価法であるPsoriasis Area and Severity Index(PASI)スコアには明らかな相関を認めなかった(Fig. 3a)。しかしながら、ILBを採取した局所の皮膚をlocal PASIスコア(紅斑1-4点、浸潤1-4点、鱗屑1-4点)で評価し、ILB中IL-8と比較したところ、統計学的に優位な相関を示した(Fig. 3c)。さらに、乾癬患者2例について治療前後でIL-8を比較した実験では、治療前後でCB中IL-8には殆ど変化を認めなかったが、ILB中IL-8は治療前にはCB</p>		

中IL-8を大きく上回っており、かつ治療後にはCB値と同程度まで低下していた(Fig. 4a, 4b, 4c, 4d)。これらの結果はILB中のIL-8は局所的な病勢をよく反映する事を示唆していた。

さらに、乾癬患者皮疹部において増加している事が知られているケモカインである $\beta$ -Defensin2(hBD2)についても調べたところ、健常人のCBよりも乾癬患者CBで優位に増加し、さらに乾癬患者CBよりもILBで優位に増加している事が分かった(Fig. 5)。

最後に乾癬患者の皮疹部組織中で高発現していることが知られているmicroRNA-203について、ILBを用いて測定可能か検討を行った。乾癬患者のILBにおいてはCBに比べmicroRNA-203が有意に上昇していた(Fig. 6c and 6d)。

以上の結果から、ILBは化学物質(ヒスタミン)のみならず、タンパク質(IL-8, h $\beta$ D2)や核酸(microRNA-203)の検索にも使用可能であり、肥満細胞腫や乾癬にとどまらず表皮由来のメディエーターの情報を得るために非常に汎用性のあるツールとなりうると考えた。

## 論文審査の結果の要旨

		氏名	石元 達士
審査委員	主査氏名	宇高 恵子	印
	副査氏名	福島 敦樹	印
	副査氏名	仲 哲治	印

題 目 Use of intralesional blood to determine diffusible biomarkers from skin lesions

(皮疹部血を使用した皮疹部から放出されるバイオマーカーの測定)

著 者

Tatsushi Ishimoto, Sayo Kataoka, Takeo Shiga, Mikiro Takaishi, Shigetoshi Sano

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

Journal of Dermatological Science (in press)

要 旨

石元達士氏の学位審査は、2018年2月6日17時より、約1時間にわたって行った。

### 【背景と目的】

皮膚疾患には、自己抗体のように全身性に産生された液性因子が皮膚症状を起こすものと、皮膚局所の炎症に由来するサイトカインやケモカインが末梢血中に反映されるものがあり、全身的な静脈血を採取して測定するバイオマーカーの解釈にはそれぞれに応じた考慮が必要である。石元氏は、後者の疾患において皮疹局所の末梢血を得ることで、全身的な静脈血に比べてより直接的に可溶性因子を把握することが可能ではないかと考え、皮疹局所から得た血液を用いてバイオマーカー等の測定し、病勢との対応を調べた。

### 【方法と結果】

良性マストサイトーマ2名、尋常性乾癬23名の患者および健常人4名を対象とした。局所

麻酔の後、皮疹部に剪刀で5mmの切り目を入れ、皮疹血(ILB)を0.5ml程度採取し、血漿を分離した。抗凝固剤として、可溶性因子の解析にはヘパリン、miRNAの解析にはEDTAを用いた。ELISA法によりhistamineとhuman  $\beta$ -defensin 2(hDB2)の測定を、蛍光ビーズアレイを用いたflow cytometryによりIL-8の測定を行った。その結果、マストサイトーマのILBでは、静脈血に比べてhistamineが100倍以上高く検出され、診断価値が高いことがわかった。一方、乾癬患者では、静脈血に比べてILBには有意にIL-8の上昇が見られた。IL-8濃度は乾癬の重症度を表すPASIスコアや病理組織像と相関があった。また、ILBでは治療前後のIL-8の変化も敏感に検知することができた。血液中のhDB2濃度もILBではより高い感度で測定でき、乾癬患者では有意に上昇していた。

miRNAの解析においては、乾癬患者で増加すると報告されたmiR-203の発現が上昇しており、静脈血に比べてILBでより高い増加が確認された。同じ乾癬患者の皮膚であっても、健全な皮膚と皮疹部では血液中のmiR-203量に有意な違いがあり、皮疹局所の情報を得ることの重要性が示唆された。

#### 【考察】

ILBを採取して炎症部位のバイオマーカーを測定することの有用性が示された。IL-8やhBD2のような可溶性因子はもとより、今回解析したmiR-203は炎症を抑えるSOCS3の発現を制御していることから、その上昇はSTAT3の活性を高め、炎症の増強や再燃を示唆するバイオマーカーとして有用である。この簡便な方法により、診断においても経過を観察する上でも、患者に与える負担を最小限にとどめたまま、感度よくバイオマーカーを検出することが可能になった。

#### 【審査員からの質疑とそれに対する応答】

審査員からは、炎症局所の特性を考えることの重要性について共感の意見が述べられた。ILBを採取することで、皮疹局所で分泌された液性因子が全身血に拡散する前に測定が可能となる一方で、皮疹部に切開を入れることで血液に混入する皮疹部の組織液が混じることによる測定値への影響が議論された。また、乾癬の病態形成に重要な役割を果たすIL-17等の測定をしたか、またSOCS1への影響について調べたか質問があった。これらに関して石元氏は、蛍光ビーズアッセイおよびELISAで調べたが、検出できなかったと説明した。審査員からはさらに、ILBのサンプリングの方法や皮疹の選び方によるばらつき、切開時の周辺細胞の混入について質問があった。また、過去に関連する研究や論文がないかどうかについても質問があった。これらの質疑についても、石元氏は経験したことを説明し、適切に答えることができた。

審査員からは、このように簡便な方法で従来の静脈血解析を大きく上回る感度でバイオマーカーの検出ができるのは驚きであり、今後、診断法として開発できるところまで持っていけると望ましいとコメントがあった。以上の結果を総じて、審査員一同、石元氏の研究は高知大学博士(医学)の称号を与えるに値する内容の研究であると判断した。

氏名(本籍)	白石 久 (愛媛県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第67号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成30年3月23日
学位論文題目	Effect of Minerals on Intestinal IgA Production using Deep Sea Water Drinks (海洋深層水由来ミネラルはその含有バランスにより腸管免疫におけるIgA産生を亢進する)
発表誌名	Biological and Pharmaceutical Bulletin, 40(10), 1700~1705 2017年10月
	<b>審査委員</b> 主査 教授 松村 敬久 副査 教授 菅沼 成文 副査 教授 西原 利治

### 論文の内容の要旨

### 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

	氏名	白石 久
論文題目	Effect of Minerals on Intestinal IgA Production using Deep Sea Water Drinks ( 海洋深層水由来ミネラルはその含有バランスにより 腸管免疫におけるIgA産生を亢進する )	
<p>【目的】</p> <p>超高齢化時代の到来により、認知症、生活習慣病、サルコペニアや関節疾患を伴う高齢者の増加による疾病の治療や介護需要の増大が問題となっている。また、医療経済的な面から観れば、2025年問題も伴い高騰する医療費による社会的負担の回避は喫緊の課題である。その為、健康寿命を伸延し、疾病の発病を予防する「一次予防」に適応する機能性食品への国民の関心及びニーズは高まっている。この様な背景から、我々の教室では、天然素材の医療への応用を目指し、特に産官学連携体制において、高知県特産品の中から生体調節作用を担う機能性物質の特定、作用メカニズムの解析、臨床研究等により、天然素材の探索・評価を行ってきた。</p> <p>一方で、生体調節作用の中でも腸管免疫と健康寿命との関連性が注目されている。腸管をはじめとする粘膜組織において免疫システムや上皮細胞のバリア機能によって維持されている恒常性の破綻は、がんや感染症などの疾患に結びつき、また、腸管における免疫システムは、炎症性腸疾患をはじめとする腸管及び全身性疾患発症に影響する。腸管免疫の恒常性の維持には、プロバイオティクス、ビタミン、ミネラル等の機能性成分が関与しており、これらを含む素材の摂取は、健康寿命を伸延し、疾病の発病を予防する「一次予防」に有用と考えられる。</p> <p>高知県特産品の中でも、室戸海洋深層水は、表層水域の海洋水に比較して海洋汚染が少ない清浄性など様々な特性があり、特に必須微量元素や各種ミネラルがバランス良く含まれているミネラル特性を有している。その為、ミネラルバランス異常により起こる腸管免疫の恒常性の破綻は各種疾患を誘引することから、海洋深層水由来素材の摂取が、腸管免疫においても有用な効果を示す可能性がある。</p> <p>本論文では、まず、採水地や硬度、製造方法の異なる海洋深層水由来飲料中の各種ミネラル含量を測定し、多変量解析である主成分分析(以下PCAと称する)を用いてミネラルバランスの評価を行い、さらにその評価を基に各種海洋深層水由来飲料をミネラル欠乏病態モデル動物に投与し、腸管免疫の一つの指標であるイムノグロブリンA(以下IgAと称する)産生亢進作用について判別分析(以下OPLS-DAと称する)を行い、海洋深層水由来飲料のミネラルバランスとIgA産生亢進作用との関係性を検討した。</p>		



## 【方法】

海洋深層水由来試料飲料は、採水地（日本における A、B、C の三箇所）、硬度（0～1500mg/L）、濾過膜の相違等による製造方法の異なる 21 種類の試料飲料を用いた。各試料飲料を誘導結合プラズマ質量分析法、誘導結合プラズマ発光分光法、イオンクロマトグラフィー分析を用いて、72 種のミネラルの定量分析を行った。各種ミネラル定量結果は PCA を用いて PC1 軸、PC2 軸に二次元マッピングし、採水地、硬度や製造方法によるミネラルバランスの相違を評価した。ミネラル欠乏病態モデル動物は、抗酸化活性や免疫機能の維持に影響を及ぼす鉄・銅欠乏病態モデルラットを選択し、投与する試料飲料は、PCA による評価をもとに、7 種の試料飲料を選択した。ラット（雄性、4 週齢）に鉄・銅欠乏飼料投与開始と同時に試料飲料を 8 週間投与した。8 週間経過後、個体ごとに糞便を採取し、腸管免疫の指標として糞便中の IgA 濃度を ELISA kit を用いて測定した。PCA により二次元化した各種試料飲料のミネラルバランスと糞便中の IgA 濃度の関係について評価するために、Bonferroni 法にて多重比較を行い、IgA 濃度が高い試料飲料と低い試料飲料に分類した。OPLS-DA を用いて IgA 濃度に差のある二つの試料飲料間の差と各飲料試料のミネラルバランスを座標に置き換え、視覚化し、ミネラルバランスと IgA 産生亢進作用の関係性について評価した。また、腸管免疫に影響を及ぼすミネラルを特定するために、IgA 濃度と各試料飲料のミネラル含有量との相関をピアソンの積率相関分析にて検定した。

## 【結果・考察】

PCA を用いて二次元化した各種試料飲料のミネラルバランスは、採水地の違いにより大きく異なり、物性の把握が可能となった。二次元マッピングした場合、採水地 A は PC1: -2.4～8.3、PC2: -1.1～0.9、採水地 B は PC1: -2.2～-1.0、PC2: 3.7～6.2、採水地 C は PC1: -1.5～4.1、PC2: -1.4～-0.9 に分布した。採水地 B の試料飲料は、他の採水地よりも亜鉛の含有量が多く、亜鉛は PC2 の正の因子負荷量が大いため、PC2 の正の領域にプロットされた。採水地 C の試料飲料は、C のみで検出された PC2 の負の因子負荷量の大きいバナジウムの影響を受け、PC2 の負の領域にプロットされた。硬度の換算に用いられるカルシウム、マグネシウムは、PC1 の正の因子負荷量が大いため、硬度の高い試料飲料は PC1 の正の領域にプロットされた。これらのことから、各種海洋深層水由来試料飲料が、採水地、ミネラルバランスにより分類できることが明らかとなった。



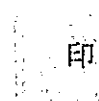
鉄・銅欠乏病態モデルにおいて、蒸留水投与群の糞便中 IgA 濃度は、健常動物と比較して低値を示すことを確認した (data not shown)。PCA の二次元マッピング位置の異なる試料飲料 7 種を鉄・銅欠乏病態モデルラットに投与した結果、糞便中の IgA 濃度は、蒸留水投与群よりも高値を示し、また、試料飲料毎に相違が認められた。OPLS-DA により、糞便中 IgA が高い試料飲料と低い試料飲料は、ミネラルバランスで明確に分類され (説明変数:  $R^2=0.989$ 、予測変数:  $Q^2=0.797$ )、IgA 産生亢進作用の相違はミネラルバランスに起因することが明らかとなった。さらに、海洋深層水由来試料飲料に含有されるミネラルの中で糞便中の IgA 濃度と有意な正の相関を示すミネラルは鉄 ( $r=0.912$ ,  $p=0.0042$ ) であった。

本研究の結果から、多変量解析を用いた手法によって、海洋深層水由来飲料の試料間におけるミネラル欠乏病態での腸管免疫賦活の差に影響を与えるミネラルとして鉄を見い出した。海洋深層水由来飲料

は、IgA 産生を亢進し、獲得免疫系の液性免疫系を活性化する作用を有していると考えられ、日常摂取可能な腸管免疫を賦活する有用な天然素材であり、「一次予防」に有用と考えられる。また、今回、海洋深層水由来飲料に含有されるミネラルバランスと臨床効果を評価するために用いた PCA 及びそれに関連する OPLS-DA は、多次元のデータをより少ない次元に集約するため、多成分系である海洋深層水等、天然素材の評価に有用である。

今後、今回得られた知見を基に、臨床研究等を視野に入れ、海洋深層水における免疫賦活作用等の生体調節作用を明確にし、疾病の発症を予防する「一次予防」のみならず、疾病治療を含めた「天然素材の医療への応用」を目指していきたいと考える。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	白石 久
審査委員	主査氏名	松村 敬久 
	副査氏名	菅沼 成文 
	副査氏名	西原 利治 

題 目    Effect of Minerals on Intestinal IgA Production using Deep Sea Water Drinks

（海洋深層水由来ミネラルはその含有バランスにより腸管免疫におけるIgA産生を亢進する）

著 者    Hisashi Shiraishi, Maho Fujino, Naoki Shirakawa, Nanao Ishida, Hiroki Funato, Ayumu Hirata, Noriaki Abe, Michiro Iizuka, Kohei Jobu, Junko Yokota, Mitsuhiro Miyamura

発表誌名、巻（号）、ページ（ ～ ）、年 月

Biological and Pharmaceutical Bulletin, 40(10), 1700～1705 2017年10月

### 要 旨

#### 【背景】

腸管における免疫システムは、炎症性腸疾患をはじめとする腸管および全身性疾患発症に影響する。必須微量元素やミネラルがバランス良く含まれている海洋深層水由来飲料の摂取は、腸管免疫においても有用な効果を示す可能性が考えられる。しかし、海洋深層水由来飲料の腸管免疫機能に対する効果は明らかでない。

#### 【目的】

海洋深層水由来飲料の摂取による腸管免疫機能の改善効果（腸管粘膜IgA産生亢進）を検討し、腸管粘膜IgA産生亢進と海洋深層水由来飲料含有ミネラルバランスの関連性を検討する。

## 論文審査の結果の要旨

### 【方法】

日本の3箇所の採水地の海洋深層水由来試料飲料21種類において、72成分のミネラル含量分析を行った。多変量解析主成分分析法 (Principal Component Analysis ; PCA) を用いて二次元マッピングしミネラルバランスの相違を評価した。この結果に基づき7種類の海洋深層水由来飲料をミネラル欠乏病態モデル動物に投与し、判別分析法 (Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis ; OPLS-DA) を用いて、海洋深層水由来飲料のミネラルバランスとIgA産生亢進作用との関係性を検討した。

鉄・銅欠乏病態モデルラット (雄性、4週齢) に鉄・銅欠乏飼料投与開始と同時に試料飲料を8週間投与した。その後、個体ごとに糞便を採取し、糞便中のIgA濃度を測定した。試料飲料のミネラルバランスと糞便中IgA濃度の関係をBonferroni多重比較法を用いて、IgA濃度が高い試料飲料と低い飲料に分類した。OPLS-DAを用いて、ミネラルバランスとIgA産生亢進作用の関係性について評価した。また、IgA濃度と各試料飲料のミネラル含有量との相関を検定した。

### 【結果】

海洋深層水由来試料飲料におけるミネラル含量定量分析では、32成分のミネラルが検出された。鉄・銅欠乏病態モデルラットにおいて、蒸留水投与群の糞便中IgA濃度は、健常動物と比較して低値を示すことを確認した (data not shown) 。試料飲料をモデルラットに投与した結果、糞便中のIgA濃度は、7種類全ての海洋深層水由来試料飲料において蒸留水投与群よりも高値を示したが、試料飲料毎に相違が認められた。OPLS-DAにより、糞便中IgAが高い試料飲料と低い試料飲料は、ミネラルバランスで明確に分類され (説明変数 :  $R^2=0.989$ 、予測変数 :  $Q^2=0.797$ ) た。さらに、海洋深層水由来試料飲料から検出できた32成分のミネラルの中で糞便中のIgA濃度と有意な正の相関を示すミネラルは鉄 ( $r=0.912, p=0.0042$ ) だけであった。

### 【考察】

本研究では、海洋深層水由来試料飲料の腸管免疫機能への改善効果を初めて明らかにした。いずれの海洋深層水由来試料飲料も腸管免疫機能の改善作用を示唆する腸管粘膜IgA産生亢進を示した。さらに、海洋深層水由来試料飲料投与におけるIgA産生亢進作用の相違はミネラルバランスに起因することを明らかにし、このミネラルの中で最も腸管免疫賦活作用のあるのが鉄であることを初めて明らかにした。海洋深層水由来飲料は、腸管免疫を賦活する日常摂取可能な有用な天然素材であり、様々な疾患の「一次予防」に有用である可能性が示唆された。

### 【結論】

鉄・銅欠乏病態モデルラットにおいて、海洋深層水由来飲料の摂取により、腸管免疫機能改善効果を認めた。腸管免疫機能改善効果と海洋深層水由来飲料含有ミネラルバランスには関連性がみられ、特に含有鉄成分が強く関連性を示した。

氏名(本籍)	沖 裕昌 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第44号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成30年3月5日
学位論文題目	Evaluation of postprandial hypoglycemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease by oral glucose tolerance testing and continuous glucose monitoring (経口糖負荷試験と24時間血糖測定を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患患者における食後低血糖の検討)
発表誌名	European Journal of Gastroenterology & Hepatology (in press)

**審査委員**

主査	教授	藤本	新平
副査	教授	花崎	和弘
副査	教授	山口	正洋

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨




	氏名	沖 裕昌
論文題目	Evaluation of postprandial hypoglycemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease by oral glucose tolerance testing and continuous glucose monitoring (経口糖負荷試験と24時間血糖測定を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患患者における食後低血糖の検討)	
<p>(論文要旨)</p> <p>目的：          非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症病態はインスリン抵抗性と糖代謝異常に関連が深いことはよく知られており、食後低血糖も頻繁に見られるものの、その詳細については明らかでない。そこで今回私は NAFLD 患者における低血糖の特徴につき 75g 経口糖負荷試験 (75gOGTT) と 24 時間血糖測定 (CGM) を行いた結果にて解析、比較検討した。</p> <p>対象と方法：          肝組織生検で診断された 502 人の NAFLD 患者に 75gOGTT を施行し、糖負荷後 0 分・30 分・60 分・120 分・180 分の血糖値と血中インスリン濃度を測定し、耐糖能別に正常型 (NGT)・境界型 (IGT/IFG)・糖尿病型 (DM) に群別した。また、空腹時血糖 (FPG) と糖負荷 180 分後血糖 (PG(180min)) の値から <i>Hypo</i> 群 (PG(180min) &lt; FPG)、<i>Hyper</i> 群 (PG(180min) ≥ FPG)、≤ 70 群 (PG(180min) ≤ 70mg/dL) に群別して、低血糖に関連する臨床的・生化学的特徴について検討した。次に、その中の 20 人の NAFLD 患者に CGM を施行し、通常食での食後低血糖の特徴・原因について検討するとともに 75gOGTT の結果と比較検討した。</p> <p>結果：  <i>Hypo</i> の割合は NGT 群の方が DM 群・IGT/IFG 群より優位に高かった (NGT: 58% IGT/IFG: 36% DM: 16%)。NAFLD 患者全体では FPG と HbA1c は <i>Hypo</i> が <i>Hyper</i> より低く、負荷 120 分後までの累積インスリン分泌量 (area under the curve of total insulin secretion within 120 min: AUC-IRI(120 分)) は <i>Hypo</i> の方が高かった。耐糖能群別での比較では、NGT 群と IGT/IFG 群において、FPG と糖負荷 30 分後血糖は <i>Hypo</i> が <i>Hyper</i> より高かったが、空腹時インスリン (f-IRI)・HOMA-IR・insulinogenic index は両群に差はなかった。また NGT 群において HOMA-β は <i>Hypo</i> が <i>Hyper</i> より低かった。そして同 NGT 群において、≤ 70 の AUC-IRI (≤ 120min) は <i>Hyper</i> より有意に高く、さらに DM 群と IGT/IFG 群においても ≤ 70 の AUC-IRI (≤ 120min) は <i>Hyper</i> より高い傾向を示していた。NAFLD における <i>Hypo</i> 群を予測する因子の解析目的で多変量ロジスティック回帰分析を行ったところ、HbA1c 低値 (p=0.004; OR: 0.425; 95%CI: 0.237- 0.763)・f-IRI 低値 (p=0.038; OR: 0.959; 95%CI: 0.921-0.998)・AUC-IRI (120 分) 高値 (p=0.028; OR: 1.000; 95%CI: 1.000- 1.000) が低血糖に寄与する独立因子であった。次に NAFLD 20 例 (DM 群 6 例、IGT/IFG 群 5 例、NGT 群 9 例) に対し CGM を施行し血糖変動を検討した。CGM 施行例の 70% において昼食までに食後低血糖がみられたが、75gOGTT の結果と CGM での結果の間では関連性は認められなかった。</p> <p>考察：          本研究において私は 75gOGTT と CGM によって NAFLD 患者における食後低血糖と高インスリン血症の関係及び機序につき解析した。NGT 群では <i>Hypo</i> は <i>Hyper</i> と比べ FPG が高いにも関わらず HOMA-β は低いことから、同群の <i>Hypo</i> においては空腹時のインスリン分泌は血糖値の割には比較的低下していると思われた。さらに糖負荷 30 分後血糖は、<i>Hypo</i> が <i>Hyper</i> より高いにも関わらず insulinogenic index は両者に明らかな差がなかった事から、食後のインスリン初期分泌は <i>Hypo</i> において比較的低下していると考えられた。また、AUC-IRI (≤ 120min) が <i>Hypo</i> において <i>Hyper</i> より高値であった事よ</p>		

り、*Hypo*では遅延性の高インスリン過分泌および遷延化の存在が示唆された。多変量解析からは低HbA1c・低f-IRI・高AUC-IRI(<120 min)が低血糖に寄与する独立因子であることが明らかになったが、その一方で肝線維化マーカーや肝組織学的線維化進展は低血糖の関連因子とならず低血糖には肝線維化進展は重要でないことが明らかとなった。CGMと75gOGTTそれぞれにおいて認められた食後低血糖の頻度とパターン、患者についても両者とも一致しておらず、必ずしも相関はしていなかった。一方、CGM施行例の70%に朝食後に低血糖を認めており、その時間の平均は朝食後180分前後に集中していたことが明らかとなった。

結論：

75gOGTTとCGMを用いた検査により、多くのNAFLD患者には食後低血糖を認めることが明らかとなった。HbA1c低値・早期血糖上昇・空腹時および早期のインスリン分泌の相対的低下、さらには遅延性インスリン過分泌がNAFLD患者における食後低血糖の重要な原因であることが本研究により明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

	氏 名	沖 裕昌
審 査 委 員	主 査 氏 名	藤本 新平 
	副 査 氏 名	花崎 和弘 
	副 査 氏 名	山口 正洋 

題 目 Evaluation of postprandial hypoglycemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease by oral glucose tolerance testing and continuous glucose monitoring (経口糖負荷試験と24時間血糖測定を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患患者における食後低血糖の検討)

著 者 Yusuke Oki, Masafumi Ono, Hideyuki Hyogo, Tsunehiro Ochi, Kensuke Munekage, Yasuko Nozaki, Akira Hirose, Kosei Masuda, Hiroshi Mizuta, Nobuto Okamoto, Toshiji Saibara

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ ), 年 月  
European Journal of Gastroenterology & Hepatology (in press)

### 要 旨

【背景・目的】非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)はしばしばインスリン抵抗性や耐糖能異常に関連している。NAFLD患者では食後低血糖が頻繁に見られるが、その詳細については明らかでない。本研究では、NAFLD患者における低血糖の特徴につき経口ブドウ糖負荷試験(oral glucose tolerance testing: OGTT)や持続血糖モニター(continuous glucose monitoring: CGM)を実施し詳細を明らかにすることを目的とした。

【対象・方法】肝組織生検で診断された502人のNAFLD患者に75gOGTTを施行し、ブドウ糖負荷前後の血漿ブドウ糖(plasma glucose: PG)と血漿インスリン(immunoreactive insulin: IRI)を測定した。耐糖能を正常型(normal glucose tolerance: NGT)・境界型(impaired glucose tolerance/impaired fasting glucose: IGT/IFG)・糖尿病型(diabetes mellitus: DM)に分類した。インスリン抵抗性の指標としてHOMA-IRをインスリン分泌の指標としてinsulinogenic indexを算出した。また、空腹時血漿ブドウ糖(Fasting PG: FPG)と負荷後180分血漿ブドウ糖(PG<sub>180</sub>)の値からHypo群(PG<sub>180</sub><FPG)、Hyper群(PG<sub>180</sub>≥FPG)に分類して、低血糖に関連する臨床的・生化学的特徴について検討した。Hypo群を予測する因子の解析のため多変量ロジスティック回帰分析を行った。さらに、その中の20人(DM群6例、IGT/IFG群5例、NGT群9例)のNAFLD患者にCGMを施行し、通常食での食後低血糖の特徴について検討するとともに75gOGTTの結果と比較検討した。



【結果】Hypo 群の割合は NGT 群の方が DM 群・IGT/IFG 群より有意に高かった (NGT:58%, IGT/IFG: 36%, DM: 16%)。NAFLD 患者全体では FPG と HbA1c は Hypo 群が Hyper 群より低く、負荷 120 分後までの累積インスリン分泌量 (area under the curve of total insulin secretion within 120 min: AUC-IRI<sub>120</sub>) は Hypo 群の方が高かった。耐糖能群別での比較では、NGT 群と IGT/IFG 群において、FPG と負荷後 30 分血漿ブドウ糖 (PG<sub>30</sub>) は Hypo 群が Hyper 群より高かったが、空腹時インスリン (fasting IRI: f-IRI)、HOMA-IR、insulinogenic index は Hypo・Hyper 群間で差はなかった。多変量ロジスティック回帰分析では、HbA1c 低値、f-IRI 低値、AUC-IRI<sub>120</sub> 高値が Hypo 群に関連する独立因子であった。CGM 施行例の 70%において昼食までに食後低血糖がみられたが、75gOGTT と CGM の結果間で関連性は認められなかった。

【結論】多くの NAFLD 患者においてブドウ糖負荷後及び食後低血糖を認めることが明らかとなった。HbA1c 低値、空腹時インスリン値低下、ブドウ糖負荷後インスリン高値が NAFLD 患者におけるブドウ糖負荷後低血糖と関連していた。

本論文では、非アルコール性脂肪性肝疾患における糖代謝障害の新たな特徴を明らかにし、病態の理解に大いに寄与すると考えられる。よって本論文は、高知大学博士 (医学) に値すると判断した。

氏名(本籍)	戸井 慎 (岡山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第45号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成30年3月5日
学位論文題目	Hepatic stellate cells derived from the nestin-positive cells in septum transversum during rat liver development (ラット肝発生期の肝星細胞は、横中隔間充織のネスチン陽性細胞に由来する)
発表誌名	Medical Molecular Morphology (in press)

<b>審査委員</b>	主査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	由利	和也
	副査	教授	西原	利治

## 論文の内容の要旨




## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

	氏名	戸井 慎
論文題目	Hepatic stellate cells derived from the nestin-positive cells in septum transversum during rat liver development (ラット肝発生の肝星細胞は、横中隔間充織のネスチン陽性細胞に由来する)	
(論文要旨) <b>【要約】</b> ヒト肝星細胞は、静止期ではビタミンAの代謝、そして障害肝では活性化し、主要な細胞外マトリックス産生細胞に形質転換することが知られている。ラット肝星細胞の免疫組織化学的なマーカーが筋系 (desmin)、神経系 (glial fibrillary acidic protein:GFAP) タンパクの検出であったことから、その起源は、筋系もしくは神経系であると議論されてきた。最初、nestinはラットの神経幹細胞で同定され、その後は成体肝幹細胞を含む多くの幹細胞のマーカーとして用いられているが、胎仔期肝星細胞の nestin 発現に関する報告はない。本研究では、胎齢 (embryonic day:ED) 10.5、肝原基に近接する横中隔の desmin 陽性間葉系細胞に nestin の発現が免疫組織化学的に検出された。ED11.5 には、一部の desmin 陽性間葉系細胞に nestin 発現を認め、ED16.5 まで desmin と nestin 共陽性細胞が増加した。しかし、ED20.5 までに肝実質内の nestin 陽性細胞は、著しく減少した。一方、障害肝では desmin 陽性活性化肝星細胞が nestin を再発現する現象を見出した。これらの観察結果は、肝発生の肝星細胞が横中隔間充織の nestin 陽性細胞に由来していることを示唆している。 <b>【材料および方法】</b> ラット胎仔肝 ED10.5~20.5、成体肝を免疫組織化学的解析のために 20% 中性緩衝ホルマリン、免疫電顕法および全胚免疫組織化学法には、4%パラフォルムアルデヒド固定、透過電子顕微鏡観察目的には、2.5%グルタルアルデヒド固定を施し、定法に従って標本を作製した。また、RT-PCR による mRNA 発現解析試料は、RNA-later 中で保存し、ラット急性肝障害モデルは、CC14 を腹腔内投与により作製し、投与後 24、48 時間後の摘出肝を試料に供して、各手法を用いて解析した。 <b>【結果】</b> 全胚免疫組織化学による胎仔の nestin は、神経管、肝臓領域と体節等に陽性像を認めた。ラット肝発生開始期 (ED10.5) には、肝原基に近接する間葉系細胞に、ED11.5 では、間充織内の肝芽細胞と混在する間葉系細胞が nestin 陽性であった。その後、ED16.5 までは、未熟な肝類洞壁細胞 (肝類洞内皮細胞と肝星細胞) に nestin 発現を認めたが、ED20.5 には、nestin 陽性肝類洞壁細胞は著しく減少した。また、ED10.5 の二重蛍光免疫染色観察では、肝原基を取り囲む様に desmin と nestin 共陽性細胞が見られ、ED11.5 では、一部の desmin 陽性細胞に nestin の発現を認めた。ED12.5 胎仔肝の抗 nestin 抗体による免疫電顕では、類洞内皮細胞下に横たわる肝星細胞が nestin 陽性であった。それに加えて、ラット急性障害肝では、静止期肝星細胞は nestin 陰性であるが、CC14 投与 24 時間後、中心静脈周囲の活性化した肝星細胞が nestin を発現、48 時間後には著しく nestin 陽性細胞が増加し、二重蛍光免疫染色では、desmin 陽性肝星細胞の大部分は nestin を発現していることが示された。 <b>【考察】</b> 肝星細胞は、肝臓内の類洞内皮細胞を取り囲むように存在するペリサイトで、肝細胞が障害を受けると活性化し筋線維芽細胞様に形質転換する。また、ラット肝星細胞は筋系および神経系タンパクを発現するが、その起源は、明確にはなっていない。ヒトやマウス肝星細胞の起源は、神経外胚葉、		

内胚葉もしくは肝被膜の中皮細胞等が報告され、神経堤細胞起源ではないという論文も見られる。最近、マウス肝星細胞は mesothelial cells 下に存在する submesothelial cells に由来するという報告がされたが、我々の観察でもラット submesothelial cells に desmin が発現しており、肝星細胞の起源細胞の一つかもしれない。本論文は、ラット肝星細胞の一部は、肝原基を取り囲むように存在する横中隔間充織の nestin 陽性細胞が起源であることを示す初めての報告であるとともに、nestin は、ラット未分化肝星細胞と活性化肝星細胞を検出する重要なマーカーとなることを証明した。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	戸井 慎
審査委員	主査氏名                      降幡 睦夫	
	副査氏名                      由利 和也	
	副査氏名                      西原 利治	

題 目                      Hepatic stellate cells derived from the nestin-positive cells in septum transversum during rat liver development

(ラット肝発生期の肝星細胞は、横中隔間充織のネスチン陽性細胞に由来する)

著 者                      Makoto Toi, Yoshihiro Hayashi, Ichiro Murakami

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    )、    年    月  
    Medical Molecular Morphology (in press)

### 要 旨

#### 【背景・目的】

ヒト肝星細胞はビタミン A 代謝を担い、一方障害肝では活性化し、主要な細胞外マトリックス産生細胞に形質転換する。その発生起源は、ラット肝星細胞の免疫組織化学的なマーカー検索では、筋系の desmin、もしくは神経系の glial fibrillary acidic protein (GFAP) が陽性となることから、筋系及び神経系説が論議されてきた。Nestin はラットの神経幹細胞で同定され、幹細胞マーカーとして用いられているが、肝発生期肝星細胞での発現に関する報告はない。今回我々はラット胎仔肝を用いて肝星細胞の起源についてその nestin 発現に着目し、免疫組織化学的、分子生物学的に検討した。

**【材料および方法】**

ラット胎仔肝(ED10.5~20.5)を用い、免疫組織化学的解析のため 20%中性緩衝ホルマリン、免疫電顕法および全胚免疫組織化学法には 4%パラフォルムアルデヒド固定、透過電子顕微鏡観察目的には 2.5%グルタルアルデヒド固定を施し、定法にて標本を作製した。肝発生組織で抗 nestin 抗体により陽性細胞を同定し、肝星細胞マーカーである抗 desmin 抗体陽性の星芒状細胞を検出して、両者を比較検討した。RT-PCR による nestin mRNA 発現解析試料は、RNlater 中で保存し、ラット急性肝障害モデルは CCl<sub>4</sub> 腹腔内投与により作製し、投与後 24、48 時間後の摘出肝を試料に供し解析を行った。

**【結果】**

胎仔全胚免疫組織化学では、nestin は神経管、肝臓領域と体節等に陽性像を認めた。ラット肝発生開始期 ED10.5 では肝原基に近接する間葉系細胞に、ED11.5 では間充織内の肝芽細胞と混在する間葉系細胞に nestin 陽性であった。その後 ED16.5 までは未熟な肝類洞壁細胞(肝類洞内皮細胞と肝星細胞)に nestin 発現を認めたが、ED20.5 には nestin 陽性肝類洞壁細胞は著しく減少した。また、ED10.5 の二重蛍光免疫染色観察では、肝原基を取り囲む様に desmin と nestin 共陽性細胞が見られ、ED11.5 では一部の desmin 陽性細胞に nestin の発現を認めた。ED12.5 胎仔肝の抗 nestin 抗体による免疫電顕では、類洞内皮細胞下に横たわる肝星細胞が nestin 陽性であった。ラット急性障害肝では、静止期肝星細胞は nestin 陰性であるが、CCl<sub>4</sub> 投与 24 時間後、中心静脈周囲の活性化した肝星細胞が nestin を発現、48 時間後には著しく nestin 陽性細胞が増加し、二重蛍光免疫染色では desmin 陽性肝星細胞の大部分は nestin を発現していることが示された。

**【考察及び結語】**

肝星細胞は、肝臓内の類洞内皮細胞を取り囲むように存在するペリサイトで、肝細胞障害時に活性化し、筋線維芽細胞様に形質転換する。また、ラット肝星細胞は筋系および神経系タンパクを発現するが、その起源は明確にはなっていない。ヒトやマウス肝星細胞の起源は、神経外胚葉、内胚葉もしくは肝被膜の中皮細胞等が報告され、神経堤細胞起源ではないという論文も見られる。最近、マウス肝星細胞は mesothelial cells 下に存在する submesothelial cells に由来するという報告がある。今回申請者らは、ラット肝星細胞の一部は、肝原基を取り囲むように存在する横中隔間充織の nestin 陽性細胞が起源であることを示唆するとともに、nestin は、ラット未分化肝星細胞と活性化肝星細胞を検出する重要なマーカーとなり得ることを示した。