

2013. 10

特集号



(題字：脇口宏学長)

国立大学法人

高知大学学報

## 高知大学学位授与記録第六十四号

法人企画課広報戦略室発行

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147号	諸 限 一 平	Psychoeducation for major depressive disorders: a randomized controlled trial (大うつ病に対する心理教育：無作為割り付け試験)	1
甲医博第148号	喜 安 克 仁	Differential blood contamination levels and powder-liquid ratios can affect the compressive strength of calcium phosphate cement (CPC): a study using a transpedicular vertebroplasty model (血液混入量と粉液比の違いがリン酸カルシウム骨セメント硬化体の圧縮強度に与える影響：経椎弓根的椎体形成術モデルを用いた実験的検討)	6
甲医博第149号	岡 田 浩 晋	Comparison of epidermal growth factor receptor mutation analysis results between surgically resected primary lung cancer and metastatic lymph nodes obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (外科的に切除した肺癌原発巣と超音波ガイド下経気管支的穿刺吸引法によるリンパ節転移との上皮増殖因子受容体遺伝子変異解析における比較)	12
甲総医博第16号	田 所 伸 朗	Descending spinal cord evoked potentials in cervical spondylotic myelopathy: characteristic waveform changes seen at the lesion site (頸椎症性脊髄症の下行性脊髄誘発電位：障害高位で観察される特徴的波形変化の検討)	17

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総医博第26号	福 原 秀 雄	<p>The Inhibition of Ferrochelatase enhances 5-Aminolevulinic Acid-based Photodynamic Action for Prostate Cancer</p> <p>(フェロキラーゼ阻害による前立腺癌に対する5-アミノレブリン酸塩酸塩を用いた光線力学治療の促進効果の検討)</p>	22

氏名(本籍)	諸 限 一 平 (佐賀県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第147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25年7月31日
学位論文題目	Psychoeducation for major depressive disorders: a randomized controlled trial (大うつ病に対する心理教育：無作為割り付け試験)
発表誌名	Psychiatry Research(in press)

審査委員	主査	教授	椛	秀人
	副査	教授	菅沼	成文
	副査	教授	藤枝	幹也

## 論文の内容の要旨

## 論文審査の結果の要旨

# 学位論文要旨

氏名 諸隈 一平

## 論文題目

Psychoeducation for major depressive disorders:  
a randomized controlled trial.

(大うつ病に対する心理教育：無作為割り付け試験)

(論文要旨)

### 【背景】

家族員から受ける心理的なストレスは精神疾患の経過に影響することが知られており、家族の感情表出 (Expressed Emotion) の高さとの関連性を示す研究が多くなされてきた。統合失調症と双極性感情障害では EE を減少させることをターゲットとした家族心理教育が報告されている。うつ病の再発転帰と EE との関連を示す研究がすでにおこなわれており、うつ病の家族心理教育がうつ病の再発転帰を改善させることが最近になって我が国から発表された。うつ病患者自身に対する心理教育は諸外国でも実施されているが、そのほとんどは患者自身のうつ状態への自己対処に関するものである。今回我々はうつ病の維持療法において、家族や職場の同僚あるいは上司に対するストレスの対処技能の向上を目的とした心理教育を確認するために無作為化比較対照試験を試みた。

### 【方法】

対象者は高知大学医学部の関連病院である愛宕病院と藤戸病院を受診した大うつ病患者 34 名である。診断と再発基準はアメリカ精神医学会の精神障害の診断と統計の手引き DSM-IV によった。エントリー基準は、患者の年齢は 20 歳から 70 歳で、完全寛解か部分寛解状態にあり、電気けいれん療法の既往または予定がなく、60 歳以上では認知症の除外のためミニメンタルテストが 24 点以上とした。連続例 173 名のうち条件を満たした 36 名のうち 34 名が同意し、介入群 19 名とコントロール群 15 名に無作為に割り付けた。

患者への心理教育は 1 クール 6 セッションとし、各回のテーマは「うつ病の認識と重要性」、「原因とリスク因子」、「前兆と症状」、「薬物療法」、「抗うつ薬の副作用」、「症状と経過、セッションの復習」であった。各回講義を 20 から 30 分行った後、グループでの問題解決技法を 60 分程度実施した。

うつ病の精神症状尺度はハミルトンうつ病評価尺度 (HRSD) とベックうつ

病尺度を使用し、介入前、介入後、再発が疑われる場合、9 か月後に独立評価者が実施した。寛解は HRSD スコアで 6 点以下とした。

#### 【結果】

1. 割り付け直後に介入群 1 名、コントロール群 1 名が同意を撤回した。介入群から 1 名、コントロール群から 4 名の脱落があり、各 18 名、14 名が解析対象となった。両群で人口学的属性と臨床的属性において差はなかった。平均的患者プロフィールは 30 歳から 50 歳で病歴が 3 年程度の軽度から中等度うつ病と日常よく遭遇するタイプであった。

2. 9 か月間における再発は介入群で 1 名 (6%)、コントロール群で 5 名 (36%) であった。再発までの期間は介入群がコントロール群よりも優位に長かった (Kaplan-Meier 生存分析;  $\chi^2 = 6.48$ ,  $df=1$ ,  $p=0.011$ )。9 か月の再発リスク比は 0.12 であった (95%信頼区間: 0.02 to 0.87,  $p=0.015$ )。

3. 9 か月時点での寛解率は、介入群 58.8%、対照群 20% であったが有意差は認めなかった (Fisher 直接検定;  $p=0.110$ )。Cox 比例ハザード分析では、要因としての介入のみが再発までの期間を有意に予測した (HR=0.091, 95%信頼区間: 0.01-0.87,  $p=0.038$ )。

#### 【考察】

我々の実施した患者心理教育は大うつ病における 9 か月間の再発転帰を有意に減少させた。家族や同僚、あるいは上司への EE への対処技能の向上を目的とした最初の研究であり、今後の普及が期待される。しかしながら、対象者数が少なく、今後大規模サンプルにおける効果の追試が必要と思われる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	諸 隈 一 平
審査委員	主査氏名	梶 秀人 
	副査氏名	菅沼 成文 
	副査氏名	藤枝 幹也 

題 目    Psychoeducation for major depressive disorders: a randomized controlled trial

(大うつ病に対する心理教育：無作為割り付け試験)

著 者    Ippei Morokuma, Shinji Shimodera, Hirokazu Fujita, Hiroshi Hashizume, Naoto Kamimura, Aoi Kawamura, Atsushi Nishida, Toshiaki A. Furukawa, Shimpei Inoue

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    )、    年    月  
                   Psychiatry Research(in press)

### 要 旨

心理教育 psychoeducation という用語は、Anderson らが行った介入プログラムに対して用いられたものであり、統合失調症の家族を対象に、精神疾患に対する知識や疾患の理解、対処方法の獲得、問題解決方法などを指導するものであった。その後、心理教育は気分障害に対しても行われ、その有効性が報告されている。

心理教育の基本原理となる理論基盤として、家族の感情表出 (expressed emotion, EE) 研究が挙げられる。家族の EE の強度と再発頻度との間に関連が示され、しかも EE を軽減することで再発を減らせるという結果が統合失調症や気分障害を中心に報告されている。最近、申請者らの教室では、大うつ病の家族心理教育が再発率を低下させるとの成果を日本では初めて国際誌に報告している。

うつ病患者自身に対する心理教育は諸外国でも実施されているが、そのほとんどが患者自身のうつ状態への自己対処に関するものであった。そこで申請者らは、家族や職場の同僚あるいは上司に対するストレスの対処技能の向上を目的としたうつ病患

者本人への心理教育が、経過と予後に対してどのような効果をもたらすかを明らかにするために無作為化比較対照試験を試みた。

うつ病の診断と再発基準はアメリカ精神医学会の精神障害の診断と統計の手引き DSM-IV によった。エントリー対象者は、年齢 20 歳から 70 歳で、完全寛解か部分寛解状態にあり、電気けいれん療法の既往あるいは予定がなく、60 歳以上では認知症を除外するためにミニメンタルテストが 24 点以上とした。以上の条件を満たし、かつ同意が得られた 32 名が介入群 18 名とコントロール群 14 名に無作為に割り付けられた。患者への心理教育は 1 クール 6 セッションとし、各回のテーマは「うつ病の認識と重要性」、「原因とリスク因子」、「前兆と症状」、「薬物療法」、「抗うつ薬の副作用」、「症状と経過、セッションの復習」であった。各回講義を 20 分から 30 分行った後、グループでの問題解決技法を 60 分程度実施した。独立の評価者がハミルトンうつ病評価尺度 (HRSD) とベックうつ病尺度を用いて、介入前、介入後、再発が疑われる場合、9 ヶ月後にうつ病の精神症状の重症度の判定を行った。寛解は HRSD スコアが 6 点以下とした。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 介入群とコントロール群との間に人口学的属性と臨床的属性に有意差は認められなかった。平均的患者プロフィールは 30 歳から 50 歳で病歴が 3 年程度の軽度から中等度のうつ病で日常遭遇するタイプであった。
- 2) 9 ヶ月間における再発は介入群で 1 名 (6%)、コントロール群で 5 名 (36%) であった。Kaplan-Meier 生存分析により、再発までの期間は介入群がコントロール群よりも有意に長いことが明らかとなった。9 ヶ月間の再発リスク比は 0.12 であった。
- 3) 追跡できた 27 人の患者に関して、うつ病の精神症状尺度は介入群がコントロール群より有意に良い値を示した。
- 4) 9 ヶ月時点での寛解率は、介入群で 58.8%、コントロール群で 20%であったが、二群間に有意差は認められなかった。Cox 比例ハザード分析では、要因としての介入のみが再発までの期間を有意に予測した。

以上の成績は、うつ病患者本人への心理教育が再発防止に有意に貢献することを示している。今回の研究ではサンプルサイズが小さく、また軽度から中等度のうつ病患者を対象にしたため、今後の大規模サンプルにおける効果の追試の必要性や重症患者への効果が不明であることなどが議論されている。

以上のように、本論文はうつ病の治療と再発予防の向上に大きく寄与することが期待される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士 (医学) に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	喜安克仁 (愛媛県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第148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25年9月30日
学位論文題目	Differential blood contamination levels and powder-liquid ratios can affect the compressive strength of calcium phosphate cement (CPC): a study using a transpedicular vertebroplasty model (血液混入量と粉液比の違いがリン酸カルシウム骨セメント硬化体の圧縮強度に与える影響: 経椎弓根的椎体形成術モデルを用いた実験的検討)
発表誌名	European Spine Journal (in press)

審査委員	主査	教授	山本	哲也
	副査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	小川	恭弘

## 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 喜安 克仁

## 論文題目

Differential blood contamination levels and powder-liquid ratios can affect the compressive strength of calcium phosphate cement (CPC) : a study using a transpedicular vertebroplasty model  
(血液混入量と粉液比の違いがリン酸カルシウム骨セメント硬化体の圧縮強度に与える影響：経椎弓根的椎体形成術モデルを用いた実験的検討)

(論文要旨)

### 【目的】

近年、骨粗鬆症性椎体骨折およびその偽関節症に対し、骨折した椎体内に Polymethylmethacrylate (PMMA) を充填する Kyphoplasty や椎体形成術が行われ、早期の除痛が得られることが報告がされている。日本では椎体内に充填するマテリアルとして、PMMA に代わって Calcium Phosphate Cement (CPC) の使用が認められており、我々は CPC を椎体内へ充填する椎体形成術により優れた臨床成績を得ている。CPC の特徴は、PMMA に比較して生体活性と骨親和性を持ち、重合熱を生じない点で優れているが、一方で最大圧縮強度は低いと言われている。CPC 硬化体の強度低下の原因には、液剤に対する粉剤の混合割合(粉液比)や硬化時の血液混入が関与していると言われている。従って、CPC の有用性を高めるためには、臨床に用いる際にその圧縮強度の低下を最小限にする工夫が必要である。本実験の目的は、血液存在下での CPC 充填に際し、より高い圧縮強度を得るための至適な粉液比と適切な充填方法を検討することである。

### 【方法】

実験 1. 血液を均等に混合した CPC 硬化体モデルにおける圧縮強度試験

粉液比の違いと血液混入量の違いによる硬化強度の影響を比較した。CPC 粉剤 12g に対して液剤を 3.0ml(粉液比 4.0)、3.4ml(粉液比 3.5)、3.8ml(粉液比 3.2)の 3 種類の液量で練和した。その後、各々の粉液比の練成体にそれぞれヒト新鮮静脈血 1.0、2.5、4.0ml を均等に混和させた硬化体と Control 群(Blood(-)群)を作成し、それぞれの硬化体の最大圧縮強度を計測した。

実験 2. 血液存在下に CPC を充填した場合、異なる充填方法における CPC 硬化体の圧縮強度試験

臨床場面で CPC を充填するスペースに血液が存在すると仮定したとき、CPC の充填方法で圧縮強度に変化が生じるかどうかを調べた。円筒型容器で椎体形成術モデルを作成し、このモデルにヒト新鮮静脈血を 3ml 注入した後、臨床で使用する内径 3.7mm のバイオペックス専用ガンを用いて CPC を容器内に充填した。CPC 粉液比は 4.0, 3.5, 3.2 とした。充填時、ガンのノズル先は容器底面付近に設置し、CPC を容器内に充填した群(Bottom 群)と、ノズル先を貯留血液面よりも上方に設置し、空気中から血液の中に流し込むように CPC を充填した群(Top 群)との 2 種類の方法で圧縮強度を比較した。血液がないモデルに充填したものを Control 群(Blood(-)群)とした。

### [結果]

実験 1.では、粉液比が低いほど、血液混入量が多いほど有意差をもって圧縮強度が低下していた。圧縮強度は硬化体の密度と相関していた。走査電子顕微鏡では血液混入量が多い CPC 硬化体では、結晶の成長が低く、密度にムラがあった。

実験 2.では、Bottom 群の粉液比 4.0 では、Blood(-)群  $69.9 \pm 2.8$  MPa、Blood(+)群  $65.6 \pm 4.8$  MPa、粉液比 3.2 では、Blood(-)群  $56.9 \pm 1.5$  MPa、Blood(+)群  $47.4 \pm 2.7$  MPa であった。Top 群では、粉液比 4.0 で、Blood(-)群  $50.2 \pm 5.7$  MPa、Blood(+)群  $41.2 \pm 6.0$  MPa、粉液比 3.2 では、Blood(-)群  $41.0 \pm 4.2$  MPa、Blood(+)群  $34.0 \pm 3.2$  MPa であった。粉液比が高い方が圧縮強度は高く、Top 群より Bottom 群の方が圧縮強度は高かった。

### [考察]

Top 群の硬化体には血液と空気がより多く混入しており、CPC 充填の際、粉液比と血液や空気の CPC への混入が、CPC 硬化体の圧縮強度を規定する重要な factor と考えられた。粉液比と充填方法の違いで強度は最大 49% ( $69.9$ MPa[Blood(-)群/Bottom 群/粉液比 4.0]  $\rightarrow$   $34.0$ MPa[Blood(+)群/Top 群/粉液比 3.2]) も低下していた。一方で血液が存在していても、高い粉液比(4.0)で容器底面から充填 (Bottom 群)すると、圧縮強度に差はなかった ( $69.9$ MPa[Blood(-)群] :  $65.6$ MPa[Blood(+)群])。

椎体形成術において、CPC は高い粉液比で、可能な限り血液が混入しないように椎体内深部から mass として充填することにより CPC 硬化体の高い強度を得ることができる。

## 論文審査の結果の要旨

		氏名	喜安克仁
審査委員	主査氏名	山本 哲也	
	副査氏名	降幡 睦夫	
	副査氏名	小川 恭弘	印

**題 目** Differential blood contamination levels and powder-liquid ratios can affect the compressive strength of calcium phosphate cement (CPC): a study using a transpedicular vertebroplasty model  
 (血液混入量と粉液比の違いがリン酸カルシウム骨セメント硬化体の圧縮強度に与える影響：経椎弓根的椎体形成術モデルを用いた実験的検討)

**著 者**  
 Katsuhito Kiyasu, Ryuichi Takemasa, Masahiko Ikeuchi, Toshikazu Tani

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、 年 月  
 European Spine Journal (in press)

### 要 旨

#### 【背景・目的】

近年、骨粗鬆性椎体骨折やその偽関節症に対し、骨折した椎体内に骨補填材料である Polymethylmethacrylate (PMMA) を充填する椎体形成術が行なわれ、良好な成績が挙げられているが、PMMA による合併症が報告されている。我が国においては、PMMA に比べ生体活性と骨親和性を有し、PMMA の問題点である重合熱を発生しない Calcium phosphate cement (CPC) の使用が認められているが、圧縮強度に問題があるとされており、その原因として粉液比や血液の混入が挙げられている。そこで、本研究では、CPC の臨床的有用性を高めるべく、血液存在下での CPC 充填に際しより高い圧縮強度を得るための至適な粉液比と充填方法を検討した。

#### 【対象と方法】

- 1) CPC の圧縮強度に及ぼす粉液比および血液混入の影響  
 CPC 粉剤 12g を、3.0mL (粉液比 4.0)、3.4mL (粉液比 3.5) および 3.8mL (粉

液比 3.2) の液剤で練和後、37 度で硬化させ、3 時間、12 時間、1 日、2 日、3 日、5 日および 7 日後の最大圧縮強度を測定した。さらに、練和 7 日後の CPC 硬化体の密度を測定するとともに、硬化体を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。これらとともに、各粉液比の CPC を練和する際に 1.0mL、2.5mL および 4.0mL のヒト新鮮静脈血を添加し、均等に混和した後、硬化させ、最大圧縮強度、密度ならびに SEM 像を同様に検討した。

2) 血液存在下に CPC を充填・硬化させる際の充填方法が CPC の圧縮強度に及ぼす影響

椎体形成術モデルである内径 16mm、高さ 32mm のポリ塩化ビニル製円筒型容器にヒト新鮮静脈血を 3mL 注入した後、臨床で実際に使用している内径 3.7mm の CPC 専用充填用ガンを用いて、粉液比 4.0、3.5 および 3.2 の CPC を充填した。その際、充填を充填用ガンのノズル先を貯留血液下方の円筒型容器の底面に設置して充填する方法 (Bottom 法) とノズル先端を貯留血液面よりも上方に設置して血液の中に流し込むように充填する方法 (Top 法) とで実施し、両群における CPC 硬化体の最大圧縮強度を 3 時間、12 時間、1 日、2 日、3 日、5 日および 7 日後に比較検討した。

#### 【結果】

1) CPC 硬化体の最大圧縮強度はいずれの粉液比の硬化体においても 7 日後まで有意に上昇したが、粉液比と圧縮強度は相関し、粉液比が高いほど圧縮強度は高値を示した。血液の混入は CPC 硬化体の圧縮強度を有意に低下させたが、混入量が多いほど強度はより大きく低下した。硬化体の圧縮強度は密度と相関し、SEM 像では粉液比が低いほど、血液混入量が多いほど CPC の結晶の成長が悪く、密度も不均一であった。

2) 血液非存在下および存在下における粉液比 4.0 の CPC 硬化体の充填 7 日後における最大圧縮強度は、Bottom 法では  $69.9 \pm 2.8$  MPa および  $65.6 \pm 4.8$  MPa、Top 法では  $50.2 \pm 5.7$  MPa および  $41.1 \pm 6.0$  MPa であった。同様に、粉液比 3.2 の CPC 硬化体の圧縮強度は、Bottom 法では  $56.9 \pm 1.5$  MPa および  $47.4 \pm 2.7$  MPa、Top 法では  $41.0 \pm 4.2$  MPa および  $34.0 \pm 3.2$  MPa であり、Top 法よりも Bottom 法で充填した方が CPC 硬化体の圧縮強度は有意に高値であった。

#### 【考察】

CPC 硬化体の圧縮強度は粉液比と正に相関すること、さらには、CPC 硬化体への血液の混入はセメントの結晶の成長を阻害するとともに密度を不均一にすることによって圧縮強度を低下させることが明らかとなった。これらとともに、CPC 硬化体を Top 法により充填すると Bottom 法に比べ血液と空気がより多く混入し、圧縮強度が低下することが明らかとなった。このように、CPC 硬化体の圧縮強度を規程する因子としては粉液比、血液の混入、充填方法が挙げられるが、血液が混入しても高い粉液比の CPC 硬化体を Bottom 法を用いて充填すると、血液非混入の硬化体と同程度の圧縮強度が得られることが示された。

以上の結果は、実際の臨床における椎体形成術において、CPC を高い粉液比で、可及的に血液が混入しないように、椎体内の深部から充填することにより、より高い強度の CPC 硬化体を得ることができることを示唆しており、臨床上非常に示唆に富む研究結果と思われる。

本研究は、椎体形成術に用いられている骨補填材料の 1 つである CPC の臨床的有用性を高める手技を明らかにしたものであり、医学的に価値あるものと思われる。よって、審査員一同は申請論文が高知大学博士（医学）の学位授与に値するものと判断した。

氏名(本籍)	岡田浩晋 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第149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25年9月30日
学位論文題目	Comparison of epidermal growth factor receptor mutation analysis results between surgically resected primary lung cancer and metastatic lymph nodes obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (外科的に切除した肺癌原発巣と超音波ガイド下経気管支的穿刺吸引法によるリンパ節転移との上皮増殖因子受容体遺伝子変異解析における比較)
発表誌名	Thoracic cancer、Volume3(3)、(262～268)、2012年8月
	<b>審査委員</b> 主査 教授 横山 彰仁 副査 教授 降幡 睦夫 副査 教授 花崎 和弘

## 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 岡田 浩晋

## 論文題目

Comparison of epidermal growth factor receptor mutation analysis results between surgically resected primary lung cancer and metastatic lymph nodes obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (外科的に切除した肺癌原発巣と超音波ガイド下経気管支的穿刺吸引法によるリンパ節転移との上皮増殖因子受容体遺伝子変異解析における比較)

(論文要旨)

背景：上皮増殖因子受容体(EGFR)遺伝子に変異がある腫瘍細胞をもつ肺癌患者に対して EGFR チロシンキナーゼ阻害剤による治療が奏功することが一般に知られている。内視鏡的超音波ガイド下経気管支的穿刺吸引法(EBUS-TBNA)は肺門部と縦隔のリンパ節から低侵襲に検体を採取し、肺癌のリンパ節転移を適切に診断する事ができる。しかし、EBUS-TBNA によって肺癌転移リンパ節から採取された微小腫瘍組織の EGFR 遺伝子解析の結果が、肺癌原発巣の EGFR 遺伝子解析の結果と常に一致するかどうかはまだ確認されていない。

対象と方法： 2006年4月から2009年10月まで高知大学医学部附属病院外科(2)を受診した患者で、EBUS-TBNAにより術前に肺癌リンパ節転移陽性と診断された14例の肺癌患者を対象とした。全員に手術を行い、原発巣および転移リンパ節を切除した。EBUS-TBNAによって得られた転移リンパ節組織と手術で切除された原発巣についてそれぞれEGFR遺伝子変異解析を行い、その結果を比較した。EGFR遺伝子変異解析には、PNA-LNA PCR Clamp法を用いた。

結果：EBUS-TBNAによって得られたEGFR遺伝子解析の結果、エクソン21変異が2例、エクソン19の欠失が1例、そして野生株が11例の結果であった。手術で切除した主病変の14例のうち、13例がEBUS-TBNAで得られた組織のEGFR遺伝子解析の結果と一致していたが、1例はEBUS-TBNAでは野生株と結果が出たにもかかわらず、主病変ではExon21変異と診断された。切除した原発巣ではエクソン21に変異があるにもかかわらず、EBUS-TBNAで野生株と診断された症例について、切除した転移リンパ節をさらに組織学的・免疫組織化学的に検討した。HE染色では胞巣状を呈する組織構造を持ち、TTF-1陽性かつPE-10陽性の領域(領域Aとする)と、HE染色で胞巣を形成せず、ほぼ無構造でTTF-1陰性かつPE-10陰性の領域(領域Bとする)の免疫組織学的に違いのある領域を認めた。それぞれの領域に相当する部分を未染スライドからDEXPADを用いてマイクロサンプリングしてDNAを抽出し、EGFR遺伝子についてさらにダイレクトシーケンスで解析した結果、領域Aではエクソン21に変異のあるDNAと変異の無いDNAすなわち野生株が混在していたが、領域Bでは野生株のみであった。

結論：EBUS-TBNAで採取した転移リンパ節からPNA-LNA PCR Clamp法による高感度遺伝子変異検出法を組み合わせる肺癌のバイオマーカー検査として用いる方法は、進行肺癌患者にとってEGFR遺伝子変異検査を行う手段の一つとして有用である。主病変にEGFR遺伝子変異陽性とな

る細胞と変異陰性となる細胞が混在しているような場合、EBUS-TBNA によって得られた転移リンパ節内の腫瘍組織の EGFR 遺伝子変異の結果は、主病変での優位な癌組織の EGFR 遺伝子変異検査の結果と必ずしも一致するわけではない。今後 EGFR 遺伝子変異検査の結果の解釈についてさらなる検討を行っていく予定である。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名
	岡田 浩 晋
審査委員	主査氏名                      横山 彰仁                      印
	副査氏名                      降幡 睦夫                      印
	副査氏名                      花崎 和弘                      印

題 目    Comparison of epidermal growth factor receptor mutation analysis results between surgically resected primary lung cancer and metastatic lymph nodes obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration  
 (外科的に切除した肺癌原発巣と超音波ガイド下経気管支的穿刺吸引法によるリンパ節転移との上皮増殖因子受容体遺伝子変異解析における比較)

著 者    Hironobu Okada, Takashi Anayama, Motohiko Kume, Kentaro Hirohashi, Ryouhei Miyazaki, Manabu Matsumoto, Kazumasa Orihashi

発表誌名、巻(号)、ページ(    ~    )、    年    月  
 Thoracic cancer、Volume3(3)、(262~268)、2012年8月

### 要 旨

肺癌は近年増加しており、我が国の死因の第1位はがん(悪性新生物)であるが、その中でも原発性肺癌が最も高い死亡数を占めている。肺癌のなかでも腺癌が増加しており、現在肺癌の約半数を占めている。この肺腺癌の化学療法の成績は、近年の上皮増殖因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)の臨床応用により、著しく改善されている。このため、治療ガイドラインにおいても、EGFR遺伝子の変異の有無をまず検索し、変異陽性であればEGFR-TKIをまず優先的に使用することが明記されるようになった。したがって、癌組織におけるEGFR遺伝子変異の検索は今日欠かすことができない検査となっている。

しかしながら、原発巣の組織採取が全例で可能というわけではなく、それが困難な場合、近年では肺門部あるいは縦隔のリンパ節から、比較的low侵襲で安全に癌組織を採取する方法として、内視鏡的超音波ガイド下経気管支的穿刺吸引法(EBUS-TBNA)が行われるようになってきた。本法で肺癌転移リンパ節から採取された微小腫瘍組織を用いることで、EGFR遺伝子解析も行うことができる。しかし、その結果が肺癌原発巣のEGFR遺伝子解析の結果と一致するのかどうかはまだ十分に検討されていない。

そこで、申請者らは、2006年4月から2009年10月まで高知大学医学部附属病院外科(2)を受診した患者で、EBUS-TBNAにより術前に肺癌リンパ節転移陽性と診断された14例の肺癌患者を対象とし、EBUS-TBNAによって得られた転移リンパ節組織と手術で切除された原発巣のEGFR遺伝子変異解析を行い、その結果を比較検討した。EGFR遺伝子変異解析には、感度の高いPNA-LNA PCR Clamp法を用いた。

結果：EBUS-TBNAによって得られたEGFR遺伝子解析の結果は、エクソン21変異が2例、エクソン19の欠失が1例、そして野生型が11例の結果であった。手術で切除した主病変の14例のEGFR遺伝子解析では、13例がEBUS-TBNAで得られた組織の結果と一致していた。1例はEBUS-TBNAでは野生型と結果が出たにもかかわらず、原発巣ではExon21変異と診断された。

この1例、すなわち切除した原発巣ではエクソン21に変異があるにもかかわらず、EBUS-TBNAで野生株と診断された症例について、切除した転移リンパ節をさらに組織学的・免疫組織化学的に検討した。HE染色では胞巣状を呈する組織構造を持ち、TTF-1陽性かつPE-10陽性の領域(領域Aとする)と、HE染色で胞巣を形成せず、ほぼ無構造でTTF-1陰性かつPE-10陰性の領域(領域Bとする)の免疫組織学的に違いのある領域を認めた。それぞれの領域に相当する部分を未染スライドからマイクロサンプリングしてDNAを抽出し、EGFR遺伝子についてさらにダイレクトシーケンスで解析した結果、領域Aではエクソン21に変異のあるDNAが認められたが、領域Bでは野生型のみであった。

以上より、進行肺癌患者においてEBUS-TBNAで採取した転移リンパ節からPNA-LNA PCR Clamp法による検査を行うことは、原発巣のEGFR遺伝子変異を推定する有用な方法である。ただし、頻度は少ないが、主病変にEGFR遺伝子変異陽性となる細胞と変異陰性となる細胞が混在しているような場合、EBUS-TBNAによって得られた転移リンパ節内の腫瘍組織のEGFR遺伝子変異の結果は、主病変での優位な癌組織のEGFR遺伝子変異検査の結果と必ずしも一致するわけではないことも明らかとなった。

これまでのEBUS-TBNAによって得られた微少検体に対してEGFR遺伝子変異解析を行った研究は過去にも数件の報告があるが、実際にEBUS-TBNAと切除した原発巣を比較し、転移リンパ節と主病変のEGFR遺伝子変異を比較検討した報告はこれまでにない。症例数は若干少ないが、本研究により、原発巣とリンパ節転移巣のEGFR遺伝子statusはおおむね一致するものの一部では差異が認められることが明らかとなり、EGFR-TKIによる化学療法を考える際に、重要な示唆を与える研究と考えられる。以上より、審査委員一同は、本論文は今後の展開も大いに期待でき、医学的に高い価値を有するものであると認め、高知大学博士(医学)の学位を授与するに値するものと判断した。

氏名(本籍)	田所伸朗 (高知県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第16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25年9月30日
学位論文題目	Descending spinal cord evoked potentials in cervical spondylotic myelopathy: characteristic waveform changes seen at the lesion site (頰椎症性脊髄症の下行性脊髄誘発電位：障害高位で観察される特徴的波形変化の検討)
発表誌名	Clinical Neurophysiology(in press)

審査委員	主査	教授	梶	秀人
	副査	教授	由利	和也
	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

氏名 田所 伸朗

## 論文題目

Descending spinal cord evoked potentials in cervical spondylotic myelopathy: characteristic waveform changes seen at the lesion site  
(頸椎症性脊髄症の下行性脊髄誘発電位：障害高位で観察される特徴的波形変化の検討)

(論文要旨)

### 【目的】

著者らはこれまでに圧迫性脊髄症において、胸椎または腰椎硬膜外腔に設置した双極カテーテル電極により脊髄または馬尾を電気刺激し椎間板または黄色靭帯に刺入した単極針電極により記録される上行性脊髄誘発電位 (A-SCEP) の波形解析をおこない、障害高位におけるA-SCEPの波形変化の特徴を明らかにした (Tani et al., 1998, 1999, 2002)。A-SCEPでは障害高位において、伝導ブロックにより陽性波の増大を伴う陰性波の減少を示した。しかし、A-SCEP単独では、A-SCEPが伝導ブロックを示す椎間よりも頭側レベルの伝導障害の有無を判定することが困難である。その欠点を補うために、A-SCEPに加え、経頭蓋電気刺激による下行性脊髄誘発電位 (D-SCEP) により脊髄運動路の伝導性を評価すればその問題を解決できる可能性がある。しかし、伝導障害によるD-SCEPの波形変化に関する詳細な研究がない。そこで、MRI上、脊髄圧迫高位が1箇所頸椎症性脊髄症 (CSM) 例を対象に、障害高位におけるD-SCEPの波形変化について分析した。

### 【方法】

MRI 画像上、単椎間のみに脊髄圧迫を認める CSM19 例 (C3-4 障害：6 例、C4-5 障害 8 例、C5-6 障害：5 例) を対象とした。平均年齢は 62 歳 (35~90 歳) で男性 11 名、女性 8 名であった。全例、単椎間前方除圧固定術の術中に、術野展開後に D-SCEP を多椎間同時記録した。刺激電極は、頭皮上の Cz (国際 10-20 法) から 2cm 前方、5cm 外側の両側にコルクスクリュー電極を設置し 400V 程度で極性を変えて 25 回ずつ刺激した。記録は、椎間板内に前方から後方へ向けて刺入した単極針電極 (関電極) と術野の尾側皮下に刺入した単極針電極 (基準電極) を用いて単極誘導により多椎間同時記録した。刺激には Digitimer 社製 Digitimer D185 を用い、記録には日本光電社製ニューロパック MEB2200 を用いた。各椎間から記録された D-SCEP の初期陽性波と陰性波の振幅および面積を評価する際、脊髄圧迫高位の 1 椎間頭側レベルから記録された D-SCEP を基準 (100%) としてそれに対する相対値を用いて検討した。また MRI 画像により脊髄前後径、脊髄横断面積についても圧迫高位と隣接椎間で計測した。

### 【結果】

障害高位では脊髄の前後径、断面積とも頭尾側の椎間に比べ有意に小さい ( $P \leq 0.001$  ことが確認された。全身ガス麻酔下にもかかわらず、400V 以下の刺激強度により椎間板から D-SCEP が

安定して記録された。左右の刺激電極の極性を逆転させて同数ずつ刺激することにより、短潜時波形を単極誘導で記録する際の基線偏位が解消され、初期陽性波と陰性波を分離して評価することができた。

障害高位では、初期陽性波は振幅( $171 \pm 96\%$ )、面積( $279 \pm 201\%$ )とも有意に増大し ( $P < 0.01$ )、逆に、陰性波は振幅( $48 \pm 18\%$ )、面積( $48 \pm 24\%$ )とも有意に低下した ( $P < 0.001$ )。陰性波の振幅、面積の低下の程度は障害高位の違いにより差はなかったが、陽性波の増大の程度は下位椎間ほど小さく、C5-6 障害では C3-4 障害よりも陽性波の増大程度が有意に小さかった ( $P = 0.03$ )。

#### [考察]

本研究で記録された D-SCEP は、400 V 以下の経頭蓋刺激で全身麻酔下でも安定して記録されること、および、その潜時 (C4-5 高位で  $3.2 \pm 0.1\text{ms}$ ) や伝導速度 ( $60.9\text{m/s}$ ) などの結果から、大脳皮質付近で錐体路の軸索が直接刺激されて誘発されるいわゆる D-wave と考えられる。A-SCEP の場合と同様、D-SCEP は障害高位において陽性波の増大を伴う陰性波の低下という特徴的な波形変化を示し、伝導ブロックの高位診断に有用である。この陽性波の増大は位相相殺現象 (phase cancellation) の理論により説明可能である。しかし A-SCEP の場合と異なり、伝導ブロックが C5-6 レベルの場合には陽性波の増大程度がわずかであり、この高位では D-SCEP による伝導ブロックの診断には注意が必要である。このレベル付近には脊髓頸膨大が存在し、ここでは運動路内の軸索の多くが上肢筋を支配する前角細胞とシナプスを形成するために D-SCEP への関与を失うことがその要因と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

	氏名	田所伸朗
審査委員	主査氏名	梶 秀人 
	副査氏名	由利 和也 
	副査氏名	上羽 哲也 

題目 Descending spinal cord evoked potentials in cervical spondylotic myelopathy: characteristic waveform changes seen at the lesion site  
(頰椎症性脊髄症の下行性脊髄誘発電位：障害高位で観察される特徴的波形変化の検討)

著者 Nobuaki Tadokoro, Toshikazu Tani, Masahiko Ikeuchi, Ryuichi Takemasa, Kazunobu Kida, Tatsunori Ikemoto, Takahiro Ushida, Shinichirou Taniguchi, Jun Kimura

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月  
Clinical Neurophysiology(in press)

### 要旨

頰椎症性脊髄症 (cervical spondylotic myelopathy: CSM) とは、頰椎の椎間板、Luschka 関節、椎間関節などに生じた加齢変性が原因で椎間板膨隆、靱帯の肥厚、骨棘の形成などが起こり圧迫性脊髄症をきたすものである。診断はおもに神経症状と画像診断によってなされるが、画像上の異常がどの程度の機能障害を及ぼしているかは明らかではない。また、画像上それぞれの異なった部位に異常が存在する際には、その責任病巣を明らかにすることは容易ではない。このようなとき責任病巣を診断するうえで電気診断を含めた機能診断法が不可欠となる。申請者が所属する講座では、これまでに圧迫性脊髄症において、胸椎または腰椎硬膜外腔に設置した双極カテーテル電極により脊髄または馬尾を電気刺激し、椎間板または黄色靱帯に刺入した単極針電極により記録される上行性脊髄誘発電位 (ascending spinal cord evoked potential: A-SCEP) の波形解析を行い、伝導ブロックレベルでの陽性波の増大と陰性波の低下という波形変化の特徴を明らかにしている。しかし、A-SCEP 単独では、伝導ブロックレベルより頭

側で伝導障害の有無を判定するのが困難となる。この問題は、A-SCEPに加え、経頭蓋電気刺激による下行性脊髄誘発電位（descending spinal cord evoked potential: D-SCEP）を解析することによって克服されうる。しかし、伝導障害による D-SCEP の波形変化に関する詳細な研究はなされていない。

そこで申請者らは、MRI 画像上、脊髄圧迫高位が 1 箇所（頸椎症性脊髄症 19 例（C3-4 障害：6 例、C4-5 障害：8 例、C5-6 障害：5 例）を対象に、障害高位における D-SCEP の波形変化を解析した。具体的には、単椎間前方除圧固定術の術中に、国際 10-20 法に基づいて頭皮上の正中中心部から 2 cm 前方、5 cm 外側の両側にコルクスクリュー刺激電極を設置し、400 V 程度で極性を変えて 25 回ずつ刺激を与え、椎間内に刺入した単極電極を用いて誘発電位の多椎間同時記録を行った。D-SCEP の初期陽性波と陰性波の振幅および面積の評価に当たっては、脊髄圧迫高位の 1 椎間頭側から記録された D-SCEP を基準（100%）としてそれに対する相対値を用いて検討した。また、MRI 画像からの脊髄前後径と脊髄横断面積の計測も圧迫高位と隣接椎間で行った。

得られた成績を纏めると次のようになる。

- 1) 脊髄前後径と断面積の両方とも障害高位では頭尾側より有意に小さいことが確認された。
- 2) 左右の刺激電極の極性を逆転させて刺激することにより、基線偏位が解消され、初期陽性波と陰性波を分離して評価することができた。
- 3) 障害高位では、初期陽性波の振幅（171%）と面積（279%）の両方とも有意に増大し、逆に陰性波の振幅（48%）と面積（48%）の両方とも有意に低下した。陰性波の振幅・面積の低下の程度は障害高位レベルの差による有意な影響を受けなかったが、初期陽性波の増大の程度は下位椎間ほど小さく、C5-6 障害と C3-4 障害との間には初期陽性波面積の増大の程度に有意差が認められた。

以上の成績は、A-SCEP と同様に D-SCEP においても障害高位での陽性波の増大と陰性波の低下という波形変化の特徴が明らかになったことから、D-SCEP が伝導ブロックの高位診断に有用であることを示している。申請者らは、障害高位における陽性波の増大と陰性波の減少が A-SCEP と同様に位相相殺現象から説明できること、また、今回記録された D-SCEP は波形、潜時、伝導速度などから錐体路の軸索を直接刺激した結果得られた電位であることなどを考察している。

本論文は脊髄疾患の機能診断法の確立のみならず、治療の向上にも大きく寄与することが期待される。よって、審査員一同は本論文が高知大学博士（医学）に相応しい価値あるものと判断した。

氏名(本籍)	福原秀雄 (広島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙総医博第26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25年7月2日
学位論文題目	The Inhibition of Ferrochelatase enhances 5-Aminolevulinic Acid-based Photodynamic Action for Prostate Cancer (フェロキラーターゼ阻害による前立腺癌に対する5-アミノレブリン酸塩酸塩を用いた光線力学治療の促進効果の検討)
発表誌名	Photodiagnosis and photodynamic therapy(in press)

審査委員	主査	教授	麻生	悌二郎
	副査	教授	佐野	栄紀
	副査	教授	渡橋	和政

## 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 福原秀雄

## 論文題目

The Inhibition of Ferrochelatase enhances 5-Aminolevulinic Acid-based Photodynamic Action for Prostate Cancer(フェロキータラーゼ阻害による前立腺癌に対する 5-アミノレブリン酸塩酸塩を用いた光線力学治療の促進効果の検討)

(論文要旨)

### (目的)

現在の前立腺癌に対する focal therapy は、Radiofrequency ablation や Cryoablation などを用いた低侵襲な治療法が開発されている。さらに前立腺癌は PSA 検診の普及により日本における前立腺癌罹患患者数は増加傾向にあり全癌種の中で第3位を占める。特に若い low risk 患者が増加傾向を示し、より低侵襲で性機能や排尿機能を中心とした機能温存可能な新規治療法の開発が望まれている。5-aminolevulinic acid (ALA) は天然アミノ酸であり、生体内でヘムやビリルビンへと代謝される。この ALA は主にミトコンドリア内で代謝され、その代謝過程で Protoporphyrin IX (PpIX) が合成される。この PpIX は腫瘍細胞内で過剰に集積しており、青色励起光に反応して赤色蛍光発光を示し、赤色励起光により活性酸素が誘導され細胞死に至る。本研究では前立腺癌細胞株を用いて、5-aminolevulinic acid (ALA) による光線力学治療 photodynamic therapy (PDT) の新規治療法の開発をめざし、研究を行った。さらに ALA-PDT は、肺癌や胃癌などの管腔臓器に発生する表在性腫瘍に対しては有効性が報告されているが、その効果は限定的であり、十分な治療効果を得られない場合がある。そこで、この ALA-PDT の治療効果をさらに向上させる事を目的にして、特に腫瘍細胞でのポルフィリン代謝において重要な役割を果たしている Ferrochelatase に注目して研究を行った。

### (方法)

腫瘍細胞内での PpIX 蓄積機構および ALA-PDT のメカニズムについて重点的に検討を行った。主に前立腺癌細胞株 PC-3 細胞を用いて、flow cytometer を用いて PpIX 蓄積能を測定し、続いて ALA-PDT により誘導される細胞死に関わる要因として、細胞死 population の測定・caspase-3 活性の測定・ミトコンドリア膜電位の測定などの手法を用いて、その細胞死の経路の同定・解析を行った。これらの結果から、マウスの担癌モデルを用いて ALA-PDD/PDT を行い、治療後組織

(腫瘍)における不可逆変性部位の割合を2次元で評価するとともに、anti-single stranded DNA(ssDNA)抗体を用いた免疫染色法による組織学的評価を行い、その抗腫瘍効果を解析した。

(結果)

蛍光顕微鏡にて細胞内 PpIX は主に PC-3 細胞のミトコンドリア内に蓄積を認めた。さらに細胞内 PpIX 蓄積量は、ferrochelataase inhibitor である NOC-18/deferrioxamine による促進効果を認めた。ALA-PDT により PC-3 細胞には apoptosis・necrosis が誘導され、ミトコンドリア膜電位の低下を認めた。さらにこの殺細胞効果は NOC-18/deferrioxamine による促進効果を認めた。得られた結果からヌードマウスに作成した皮下腫瘍に対して ALA-PDT を行い、病理学検討では腫瘍の中心部に組織変性を引き起こし、その周囲には ssDNA 染色陽性の変性細胞を認めた。ALA-PDT 治療群において Apoptosis index は有意に増加を示した。

(結論)

本研究により ALA-PDT は、前立腺癌に対する新規治療法となる可能性が示された。さらに Ferrochelataase は ALA-PDT において治療効果に影響を与える重要な因子である可能性があり、さらなる詳細な検討が必要であると思われた。

## 論文審査の結果の要旨

		氏名	福原 秀雄
審査委員	主査氏名	麻生 悌二郎	
	副査氏名	佐野 栄紀	印
	副査氏名	渡橋 和政	

題目 The Inhibition of Ferrochelatase enhances 5-Aminolevulinic Acid-based Photodynamic Action for Prostate Cancer

(フェロキラーゼ阻害による前立腺癌に対する5-アミノレブリン酸塩酸塩を用いた光線力学治療の促進効果の検討)

著者

Hideo Fukuhara, Keiji Inoue, Atsushi Kurabayashi, Mutsuo Furihata, Hirofumi Fujita, Kozo Utsumi, Junzo Sasaki and Taro Shuin

発表誌名、巻(号)、ページ( ~ )、年 月

Photodiagnosis and photodynamic therapy  
(in press)

要旨

### 【背景・目的】

前立腺癌は、欧米諸国では男性の癌死の原因の2番目に位置する頻度の高い悪性腫瘍であるが、我が国においても PSA 検査の導入により増加傾向にあり、中でも若年者で病初期に発見される症例の増加が顕著である。そのため、従来の手術と比べて尿失禁や性功能障害等の術後 QOL の低下をきたす可能性の少ないより低侵襲な治療法の開発が望まれている。

5-aminolevulinic acid (ALA) は内因性のアミノ酸であるが、体外から投与すると速やかに細胞内に取り込まれ、ミトコンドリア内で Protoporphyrin IX (PpIX) に代謝され、さらに ferrochelatase の触媒作用により鉄(II)が挿入されてヘムに代謝される。正常細胞では ALA からヘムへの代謝が速やかに進行するが、腫瘍細胞では ferrochelatase の活性が低いために ALA から代謝された PpIX が高濃度に集積することが知られている。また、PpIX は光感受性物質であり、PpIX を過剰に蓄積した細胞に青色光を照射する

と赤色光を発生し、赤色光の照射により活性酸素種 (ROS) が産生されて細胞死が誘導されることが知られている。この特性から ALA は、各種の固形腫瘍に対する光線力学治療 (photodynamic therapy; PDT) に利用されている。

今回申請者らは、ALA 依存性 PDT (ALA-PDT) の前立腺癌への応用を目指し、その前段階として前立腺癌細胞株である PC-3 に対する ALA-PDT の殺細胞効果とそのメカニズム、さらには ferrochelatase 阻害剤の細胞内 PpIX 集積と ALA-PDT の効果への影響について検討を行った。

### 【対象と方法】

被験細胞としてヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を用いた。ALA-PDT では、ALA を加えて数時間後に可視光を10分間照射、その後経時的に細胞の状態を解析した。PC-3 細胞における PpIX の集積は蛍光顕微鏡とフローサイトメーターにより解析した。細胞死のメカニズムの解析は、annexin V/PI 染色、caspase-3 活性ならびにミトコンドリア膜電位の測定等により行った。ferrochelatase の阻害剤として、鉄キレート剤である deferoxamine と一酸化窒素 (NO) 発生剤である NOC-18 とを用いた。in vivo の解析には PC-3 細胞移植ヌードマウスを用いた。

### 【結果】

(1) PC-3 細胞における PpIX の集積は、添加する ALA の濃度 0.5~2.0 mM の範囲で濃度依存性に増加した。また、経時的観察では ALA 添加後1時間で最高に達し、その後4時間まではほぼ一定であった。

(2) 産生される PpIX の細胞内分布の解析では、ALA 添加後1時間では主にミトコンドリアに局在し、3時間ではミトコンドリアと細胞質の両方に分布することが明らかとなった。

(3) ferrochelatase 阻害剤である deferoxamine ならびに NOC-18 の添加は、ALA 単独では PpIX 集積をきたさないような 0.1 mM~0.25 mM の低濃度の ALA 添加時においても細胞内 PpIX の集積を顕著に促進した。

(4) ALA-PDT では光照射後1時間から3時間にかけて細胞傷害の進行が認められ、annexin V/PI 染色の結果、その傷害はアポトーシスおよびネクローシスによるものであることが判明した。また、ferrochelatase 阻害剤である deferoxamine あるいは NOC-18 の併用は、この ALA-PDT による細胞死誘導作用を著明に促進した。

(5) ALA-PDT 後のミトコンドリア膜電位の解析では、死細胞数増加の経時変化と一致して光照射後1時間から6時間にかけて膜電位低下の進行が認められた。また、deferoxamine、NOC-18 共に、その併用が膜電位低下に対して促進作用を示したが、NOC-18 の作用がより強力であった。

(6) ALA-PDT 後3時間、6時間の細胞の caspase-3 活性を測定した。時間経過とともに

に軽度の caspase-3 活性の増加は認められたが、ferrochelatase 阻害剤併用群においてもその程度は軽度に留まった。次いで、pan-caspase 阻害剤である z-VAD-fmk を加えて ALA-PDT を実施してみたが、細胞傷害、ミトコンドリア膜電位の低下共に抑制されなかった。以上から、ALA-PDT により PC-3 に誘導される細胞死は caspase-3 非依存性であることが示唆された。

(7) PC-3 細胞移植ヌードマウスを用いて ALA-PDT と ferrochelatase 阻害剤併用の *in vivo* における有用性について検討した。ALA の腹腔内投与2時間後、産生された PpIX が PC-3 細胞内に集積することが判明した。そこで、ALA の投与2時間後に光照射を行い、その24時間後に腫瘍を摘出して ALA-PDT の効果を検証した。ALA-PDT 群では腫瘍の特に中心部分の細胞にアポトーシスならびにネクローシスが確認され、コントロール群と比べて軽度の腫瘍縮小が確認されたが、deferoxamine 併用群において抗腫瘍効果の増強は認められなかった。

#### 【まとめ】

本論文で申請者らは、ferrochelatase 阻害剤である deferoxamine ならびに NOC-18 が ALA 処理後の前立腺癌細胞株 PC-3 内の PpIX 濃度を著しく高め、ALA-PDT による PC-3 の細胞死を顕著に促進することを示した。担癌モデルマウスを用いた *in vivo* の検討では、deferoxamine による ALA-PDT の抗腫瘍作用の増強を確認できなかったが、今回のマウスへの ALA の投与量 (500 mg/kg) が過剰であった可能性があり、今後 ALA の減量、ferrochelatase 阻害剤の先行投与、さらには産生された PpIX を細胞外へ排出するトランスポーター ABCG2 の阻害剤である Fumitremorgin C の併用等により改善していくことが期待される。また、ALA-PDT により PC-3 に誘導された細胞死は caspase-3 非依存性であることが示唆されており、メカニズムの解明が待たれる。

以上のように本論文は、ferrochelatase 阻害剤を併用する ALA-PDT が前立腺癌に対する新規の治療法となり得る可能性を世界に先駆けて提示したものであり、医学的に高い価値を有すると認められた。したがって、審査員一同は本論文が高知大学博士(医学)の学位授与に値するものと判断した。