

2016. 1

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七十八号

総務課広報戦略室発行

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155号	越智 経浩	PNPLA3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through XBP1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice (PNPLA3遺伝子はXBP1と小胞体ストレスの調節を介して肝臓の脂肪酸とTG代謝に関与する)	1
甲総医博第37号	竹内 麻子	STAT5A regulates DNMT3A in CD34+/CD38- AML cells (CD34+/CD38-AML細胞におけるDNAメチルトランスフェラーゼ3A活性化機序の解析)	6
甲総医博第38号	宗景 匡哉	An artificial pancreas provided a novel model of blood glucose level variability in beagles (人工膵臓を用いた新規血糖変動モデル犬の作成)	11

氏名(本籍)	越智 経浩 (愛媛県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲医博第155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27年11月10日
学位論文題目	PNPLA3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through XBPI and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice (PNPLA3遺伝子はXBPIと小胞体ストレスの調節を介して肝臓の脂肪酸とTG代謝に関与する)
発表誌名	Hepatology Research(in press)

審査委員	主査	教授	藤本	新平
	副査	教授	椛	秀人
	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 越智 経浩

論文題目

PNPLA3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through XBP1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice (PNPLA3 遺伝子は XBP1 と小胞体ストレスの調節を介して肝臓の脂肪酸と TG 代謝に関与する)

(論文要旨)

目的

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、世界規模で慢性肝疾患の重大な原因とされています。そして NASH の発症や進行には肝臓の脂肪化に加えて小胞体 (ER) ストレスが重要な役割をしていると考えられています。2008 年 Romeo らは genome-wide association study (GWASs) の結果から、染色体 22 番に存在する PNPLA3 遺伝子の一塩基多型 (C→G : I148M) が NASH の発症や進行及び肝細胞癌の発癌に関与していることを報告しました。しかし、これまで PNPLA3 遺伝子欠損 (PNPLA3KO) マウスを使用した研究では様々な負荷 (高 sucrose 食やメチオニンコリン欠乏食、等) を加えても脂肪性肝疾患に影響はないと報告されており、PNPLA3 遺伝子の詳細な働きは依然として明らかではありませんでした。そこで、我々は PNPLA3 遺伝子の ER ストレスにおける役割を明らかにするため、PNPLA3KO マウスに ER ストレスを負荷して解析を行いました。

方法

8 週齢マウス (C57BL/6 : WT と PNPLA3KO : KO の 2 群) に対し生理食塩水 (Ctrl) 及び tunicamycin (TM) (1mg/Kg/Body) を初回とその 24 時間後に二度腹腔内投与して肝臓に ER ストレスを負荷し、初回投与から 48 時間後に肝臓や血液を採取し解析を行いました。解析には以下の 4 群 (1) WT Ctrl : 10 匹 (2) KO Ctrl : 12 匹 (3) WT TM : 10 匹 (4) KO TM : 13 匹を準備しました。

結果

ER ストレスを加えると肝酵素 (ALT) は上昇し血中脂質濃度と血糖値は低下しましたが、同負荷 2 群間で有意な差は認めませんでした。




肝組織の HE 染色では、4 群間で明らかな差は見られず、TUNEL 染色では WT TM 群より KO TM 群において TUNEL 陽性細胞を多く認めました。しかし、炎症や apoptosis を反映する遺伝子や蛋白の発現は TM 負荷 2 群間で明らかな差は認められませんでした。次に、肝臓の脂肪化を評価するため Oil Red O 染色で肝組織を観察したところ、WT TM 群において多数の微小脂肪滴が見られましたが、KO TM 群では目立ちませんでした。組織の結果と同様に、肝臓の TG 含有量は、WT TM 群において KO TM 群より有意に増加していました ($p < 0.05$)。

また、ER ストレス負荷の前後ともに、肝臓のパルミチン酸（飽和脂肪酸）／オレイン酸（不飽和脂肪酸）比が、KO 群において WT 群より有意に高値でした ($p < 0.05$)。さらに、飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸への変換に関与する stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) 遺伝子の発現は、ER ストレスを加えた 2 群ともに低下しましたが、KO TM 群は WT TM 群より更に有意に低下していました ($p < 0.05$)。一方、ER ストレスマーカーである X-box binding protein 1 (XBP1) とその下流に存在する endoplasmic-reticulum-localized DnaJ homolog 4 (ERdj4) 遺伝子の発現は、WT TM 群では有意に増加しましたが、KO TM 群では増加しませんでした ($p < 0.05$)。

結論

我々は、ER ストレス負荷した PNPLA3KO マウスでは肝の脂肪化が抑制されることを初めて明らかにしました。さらに、PNPLA3 遺伝子は ER ストレス存在下で XBP1 遺伝子を介して肝臓の脂肪酸代謝や TG 合成に重要な役割を担っていることを本研究において明らかにしました。

論文審査の結果の要旨

	氏名	越智 経浩
審査委員	主査氏名	藤本 新平 
	副査氏名	栂 秀人 
	副査氏名	花崎 和弘 

題目 PNPLA3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through XBP1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice (PNPLA3 遺伝子は XBP1 と小胞体ストレスの調節を介して肝臓の脂肪酸と TG 代謝に関与する)

著者 Tsunehiro Ochi, Kensuke Munekage, Masafumi Ono, Takuma Higuchi, Masayuki Tsuda, Yoshihiro Hayashi, Nobuto Okamoto, Katsumi Toda, Shuji Sakamoto, Jude A Oben, Toshiji Saibara

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年月
Hepatology Research(in press)

要旨

【背景・目的】非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、世界規模で慢性肝疾患の重大な原因とされている。NASHの発症や進行には肝臓の脂肪化に加えて小胞体 (ER) ストレスが重要な役割を果たすと考えられている。最近、genome-wide association studyの結果から、染色体22番に存在するPNPLA3遺伝子の一塩基多型 (C→G: I148M) がNASHの発症や進行及び肝細胞癌の発癌に関与することが報告された。しかし、PNPLA3遺伝子欠損 (PNPLA3KO) マウスを使用した研究では様々な負荷 (高蔗糖食やメチオニンコリン欠乏食など) を加えても脂肪性肝疾患に影響はないと報告されており、PNPLA3遺伝子の詳細な働きは依然として明らかではない。PNPLA3KOマウスにERストレスを負荷して表現型・関連因子を解析し、PNPLA3遺伝子の肝臓でのERストレスや脂肪化における役割を解明することが本研究の目的である。

【方法】8週齢マウス [C57BL/6 (WT) と PNPLA3KO (KO) の2群] に対し生理食塩水及びtunicamycin (TM) (1mg/kg) を初回とその24時間後に2度腹腔内投与して肝臓にERストレスを負荷し、初回投与から48時間後に肝臓を採取し解析を実施した。

【結果】WTにおいてTM投与により、肝臓においてATF4、ATF6、CHOP、XBP1などのmRNA発現が

増強し、ERストレスの増加が確認でき、組織学的に多数の微小脂肪滴が観察されTG含有量も増加し脂肪化を生じた。しかし、KOにおいてはTM投与による肝の脂肪化は顕著ではなく、肝臓のTG含有量は、KO TM群においてWT TM群より有意に低下していた ($p < 0.05$)。飽和脂肪酸から不飽和脂肪酸への変換酵素であり肝脂肪化に関与すると考えられる stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)の肝臓でのmRNA発現は、TM投与下で、KOはWTより有意に低下していた ($p < 0.05$)。またWTの肝臓においてTM投与によりmRNA発現亢進を認めたERストレスマーカーの内、X-box binding protein 1 (XBP1) とその下流に存在するendoplasmic-reticulum- localized DnaJ homolog 4 (ERdj4) mRNAの発現は、KOではTM投与により増加せず、KO TM群においてWT TM群より有意に低下していた ($p < 0.05$)。

【結論】 ERストレスを負荷したPNPLA3KOマウスでは肝の脂肪化が抑制されることが明らかとなった。さらに、PNPLA3遺伝子はERストレス存在下でXBP1遺伝子を介して肝臓の脂肪酸・TG代謝に関与すると考えられた。

本論文では、PNPLA3遺伝子の肝脂肪化における役割が解明されており、NASHの病因解明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)	竹内 麻子 (岡山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第37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27年10月20日
学位論文題目	STAT5A regulates DNMT3A in CD34+/CD38- AML cells (CD34+/CD38-AML細胞におけるDNAメチルトランスフェラーゼ3A活性化機序の解析)
発表誌名	Leukemia Research 39、897-905平成27年5月22日

審査委員	主査	教授	佐野	栄紀
	副査	教授	降幡	睦夫
	副査	教授	執印	太郎

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 竹内 麻子

論文題目

STAT5A regulates DNMT3A in CD34⁺/CD38⁻ AML cells
(CD34⁺/CD38⁻ AML 細胞における
DNA メチルトランスフェラーゼ 3A 活性化機序の解析)

(論文要旨)

急性骨髄性白血病の再発の原因として白血病細胞の中に数%の割合で存在する白血病幹細胞の関与が示唆されている。白血病幹細胞は自己複製能と多分化能を持つ少数の細胞集団で、限られた分化と自己複製能を有する事を特徴とし、細胞周期の休止期に留まり抗がん剤に抵抗性を示し、治療後も骨髄の微小環境(ニッチ)で生きながらえながら白血病細胞を供給し、再発を引き起こすと考えられている。Signal transducer and activator of transcription (STAT) 5 は炎症性サイトカインのシグナル伝達に関わる転写因子であり、トロンボポエチンなどのサイトカインが細胞膜上のレセプターに結合すると、Janus kinase (JAK) 2 を活性化し JAK2 は STAT5 をリン酸化する。リン酸化された STAT5 は核内へ移行し、DNA 転写が開始される。血液内科では以前 CD34⁺/CD38⁻ 白血病 (AML) 細胞において、その活性が亢進していることを報告した。

本研究では STAT5 がその遺伝子発現を制御し、CD34⁺/CD38⁻ AML 細胞の生存支持、細胞周期の休眠期に留め薬剤抵抗性を導いている遺伝子群の同定と STAT5 がその遺伝子発現を抑制し CD34⁺/CD38⁻ AML 細胞の生存支持、細胞周期の休眠期に留め薬剤抵抗性を導いている遺伝子群の同定をおこなうことを目的とした。

これまでの研究で、白血病幹細胞は CD34⁺/CD38⁻ AML 細胞分画に濃縮されていると考えられている。本研究では shRNA をもちいて Signal transducer and activator of transcription (STAT) 5 の発現を抑制した CD34⁺/CD38⁻ AML 細胞とコントロール shRNA を導入した CD34⁺/CD38⁻ AML 細胞の mRNA を抽出し、STAT5 を抑制することによりどのような遺伝子発現が制御を受けているかマイクロアレイを用いて解析した。発現に変化のあった 42545 の遺伝子のうち、2 つ以上の AML サンプルにおいて 3 倍以上の変化があったもののなかで、DNA methyltransferase (DNMT) 3A のみがエピジェネティックに関与していた。

CpG 配列における DNA のメチル化は遺伝子発現調節の重要な因子の一つであり、DNA methyltransferase (DNMT) は DNA をメチル化する。白血病細胞から CD34⁺/CD38⁻ を分離したものを使用し、real time PCR をもちいて確認したところ、shRNA をもちいて STAT5A の発現を抑制した CD34⁺/CD38⁻ AML 細胞ではコントロールと比べて DNMT3A の発現レベルが低下していた。




DNMT3A が STAT5A の発現を調節しているかを確認するために、レポータージーンアッセイをおこなった。レポータージーンアッセイの結果、STAT5A の活性が増加すると、DNMT3A の転写活性が増加した。

STAT5A が DNMT3A の発現にどのような影響を与えているかを、クロマチン免疫沈降法を用いて検討した。STAT5A は DNMT3A のプロモーター領域に結合している可能性が示唆された。STAT5A が DNMT3A の発現を調節している可能性があると考えられたため、がん抑制遺伝子 Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) のプ

ロモーター領域におけるメチル化を MSP 法を用いて検討した。STAT5A を抑制するとメチル化が抑制され、STAT5A を強制発現させるとメチル化は増加した。

これらの結果から STAT5A は DNMT3A のプロモーター領域に結合し、発現を調節している可能性が示唆され、DNMT3A を介してがん抑制遺伝子 PTEN の発現レベルを調節していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

	氏名	竹内 麻子
審査委員	主査氏名	佐野 栄紀 
	副査氏名	降幡 睦夫 
	副査氏名	執印 太郎 

題目 STAT5A regulates DNMT3A in CD34+/CD38- AML cells
(CD34+/CD38-AML細胞におけるDNAメチルトランスフェラーゼ3A活性化機序の解析)

著者 Asako Takeuchi, Chie Nishioka, Takayuki Ikezoe, Jing Yang, Akihito Yokoyama

発表誌名、巻(号)、ページ(~)、年 月
Leukemia Research 39、897-905
平成27年5月22日

要旨

背景と目的

急性骨髄性白血病(AML)の再発には白血病幹細胞(LSCs)の関与が示唆されている。少数集団である LSCs は自己複製能、多分化能、薬剤耐性能がありニッチで生き長らえることでAMLの再発を引き起こすと考えられている。著者らのグループは、LSCはCD34+/CD38-の表面形質を示し、その多くでsignal transducer and activator of transcription (STAT)5が活性化していることを見いだした。過去の報告では、慢性骨髄性白血病(CML)において薬剤耐性や細胞死抵抗性にSTAT5Aが関与すること、正常の造血幹細胞においてもSTAT5Aが生存、自己複製などに重要であることが示されている。DNA methyltransferase (DNMT)はメチル基を付与することにより標的遺伝子の転写を抑制できる epigenetic regulatorとして重要である。AMLにおいてDNMT3Aの変異は再発や予後悪化と相関することが報告されている。最近、著者らのグループによって、白血病細胞をイマチニブで長期間処理するとDNMT3Aが誘導され、癌抑制遺伝子PTENの発現をepigeneticに抑制することが薬剤耐性化に関与していることを明らかにした。本論文ではこれらの知見をもとに、AMLのLSCsにおけるSTAT5活性化がDNMTなどを介したepigenetic制御に関与するかを検討した。

方法

高知大学倫理委員会の承認のもと、11例のAML患者の白血病細胞をmagnetic sortingにより、CD34+/CD38-細胞をLSCs、CD34+/CD38+細胞を対照群として分離した。用いた細胞株は、イマチニブへの長期間暴露によって樹立した慢性好酸球性白血病細胞株EOL-1R細胞、AML細胞株であるMOLM13細胞である。解析方法は、microarray hybridization法、レンチウイルスベクターを用いたshort hairpin RNA遺伝子サイレンシングおよび過剰発現、遺伝子発現検定にはreal time RT-PCR法、ウエスタンブロット法によるタンパク発現検定、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイでDNMT3A転写活性の検定、クロマチン免疫沈降法によるSTAT5とDNMT3Aのプロモーター領域における結合部位の同定、PTEN遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化はmethylation specific PCR (MSP)で検定した。

結果と考察

1. 代表的なAML3症例由来のCD34+/CD38- AML細胞にshRNAによるSTAT5A発現のサイレンシングを行いmicroarrayプロファイルし対照shRNA処理群と比較して、シグナルが3倍以上増加あるいは1/3以下に減少した遺伝子を有意とした。結果、3症例中少なくとも2例においてSTAT5Aサイレンシングにより減少していた488遺伝子のなかで、epigenetic regulator 遺伝子としてDNMT3Aを特定した。
2. DNMT3AがSTAT5Aの標的遺伝子であることを確認する目的で、5例のCD34+/CD38- AML細胞あるいはEOL-1R, MOLM13白血病細胞株を用いて、STAT5AをshRNAにてサイレンシングあるいは過剰発現させると、DNMT3Aの遺伝子発現がそれぞれ減少、増加したことをRT-PCRおよびウエスタンブロット法で確認できた。これにより、DNMT3AはSTAT5Aにより調節されている標的分子であることが示された。
3. DNMT3Aの転写がSTAT5Aに依存しているか確かめるために、レポータージーンアッセイをおこなった。EOL-1R, MOLM13細胞においてshRNAによるSTAT5サイレンシング、あるいはIL-10添加によるSTAT5活性化に応じてそれぞれ転写が減少、増加した。またIL-10刺激によるDNMT3A転写活性上昇はJAK2阻害薬で抑制された。これにより、DNMT3Aの転写はSTAT5Aによって活性化されることが示された。またChip assayにより、STAT5AはDNMT3Aのプロモーター領域、とくに-509から-309の塩基配列領域に結合することが、EOL-1R細胞へのSTAT5A shRNAおよび過剰発現系の結果明らかになった。
4. 白血病細胞株を使って、STAT5Aの遺伝子発現に応じてPTENのプロモーター領域におけるメチル化が増加することをMSPで確認した。またウエスタンブロット法で、STAT5の発現量に相関してDNMT3Aが増減する一方、PTENが逆相関することを確認した。DNMT3A発現に一致してPTENのメチル化が増減することを確認できた。5例の患者より分離したCD34+/CD38-細胞においても、STAT5A発現にPTENは逆相関する傾向を示した。

これらの結果より、STAT5AはDNMT3Aのプロモーター領域に結合し、発現を調節している可能性が示唆され、さらにDNMT3Aによるメチル化が癌抑制遺伝子PTENの発現レベルを調節していると考えられる。STAT5/DNMT3A軸を抑制することが、薬剤耐性を獲得したLSCsの感受性回復が期待され、あらたな白血病治療への手がかりとなる。

氏名(本籍)	宗景 匡哉 (岡山県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲総医博第38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27年11月10日
学位論文題目	An artificial pancreas provided a novel model of blood glucose level variability in beagles (人工膵臓を用いた新規血糖変動モデル犬の作成)
発表誌名	Journal of artificial organs, 2015 Aug 8[Epub ahead of print]

審査委員	主査	教授	藤本	新平
	副査	教授	西原	利治
	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 宗景 匡哉

論文題目

An artificial pancreas provided a novel model of blood glucose level variability in beagles

(人工膵臓を用いた新規血糖変動モデル犬の作成)

(論文要旨)

緒言：高血糖が感染症リスクを増大させ、予後を悪化させることが知られている。さらに、近年血糖変動が病態の予後に与える影響が注目を集めており、集中治療領域で予後不良群は血糖変動幅がより大きかったことが報告されている。しかし、周術期血糖変動とその予後の関連性については依然解明されていない。血糖変動を高い再現性をもって行えることが、血糖変動の研究を行う上では重要である。我々は人工膵臓を用いることで再現性の高い血糖変動を実現できると考え、血糖変動が病態の予後に与える影響を評価するために人工膵臓を用いて周術期血糖変動モデルを作成した。




方法：6頭の健康なビーグル犬を用いた。全身麻酔下に右内頸静脈に中心静脈カテーテルを留置し、左大腿動脈に動脈ラインを留置した。次に右大腿静脈に20Gのルートをキープし人工膵臓(STG-22、日機装社、東京)を接続した。膵全摘を施行し、1時間の安定化を行った後に、人工膵臓を用いて血糖値を170mg/dL-70mg/dLの範囲で変動を与えた。血糖値が160mg/dLに到達すると、目標血糖値を70mg/dLに設定変更し、血糖値が80mg/dLに到達すると、目標血糖値を170mg/dLに設定変更した。8時間の実験を行い、2時間毎に動脈血pH、乳酸値、カリウム値を安全性の検討のために測定した。血糖変動回数は70mg/dLと170mg/dL両方達成して1回、血糖変動は血糖値の標準偏差と定義した。検査値の変化はANOVA法を用いて解析を行い、P値が0.05未満で統計学的有意差ありとした。

結果：膵全摘時間は平均 62 ± 13 分で、血糖変動回数は平均 9.8 ± 2.3 回であった。平均血糖値は 128.1 ± 5.1 mg/dLで血糖変動幅は 44.6 ± 3.9 mg/dLであった。人工膵臓から投与されたインスリン総量は 23 ± 5 単位(1.8 ± 0.4 単位/kg)、グルコース総量は 95 ± 18 g(7.5 ± 1.4 g/kg)であった。動脈血pHは血糖変動前及び2時間後で 7.37 ± 0.07 、 7.26 ± 0.02 と有意差を認めた(P=0.01)。血清K値は血糖変動前が 3.5 ± 0.3 mmol/Lであった。2時間後、及び4時間後は 3.0 ± 0.4 mmol/L、 3.1 ± 0.5 mmol/Lと有意に低下した(P=0.01,0.04)。血清乳酸値は血糖変動前後で有意差を認めなかった。

考察：今回人工膵臓を用いて血糖値を管理することで血糖変動モデル犬を作成できた。生体においては血糖値変動に対して、膵臓からグルカゴン、またはインスリンが放出され血糖値が維持される。今回その影響を排除するため膵全摘を行った。さらに、血糖値変動を手動で再現することは困難と考え、人工膵臓を用いて、血糖管理を行い、インスリンおよびグルコースを投与した。これまでの集中治療室での検討で非生存者の血糖変動幅が $41.4 \pm 28.8 \text{mg/dL}$ であったとの報告があり、本モデルでは $44.6 \pm 3.9 \text{mg/dL}$ と十分な血糖変動幅を達成することができた。さらに、低血糖も高血糖も予後に影響を与える可能性があり、これら回避する必要がある。本モデルでは平均血糖値は $128.1 \pm 5.1 \text{mg/dL}$ と低血糖も高血糖もなく、血糖変動自体の影響を検討するのに適した血糖値を達成した。また、血清 pH レベル、乳酸値は安定しており、安全性を担保した血糖変動モデルを作成できた。本研究には 2 つの問題がある。1 つはビーグル犬の使用を最小限にするために対照群を設定しなかった。また、モデル作成に膵全摘が必要なため煩雑という欠点があり、人工膵臓のパラメーターの変更で同様の変動を再現できないか検討する必要がある。

結語：今回人工膵臓を用いた血糖変動モデル犬を高い再現性を持って作成できた。この研究に基づき血糖変動自体が病態の予後を悪化させるのか、病態の悪化の結果として血糖変動が起こるのか検討することが必要である。

論文審査の結果の要旨

		氏 名	宗景 匡哉
審 査 委 員	主 査 氏 名	藤本 新平	
	副 査 氏 名	西原 利治	
	副 査 氏 名	渡橋 和政	

題 目 An artificial pancreas provided a novel model of blood glucose level variability in beagles
(人工膵臓を用いた新規血糖変動モデル犬の作成)

著 者 Masaya Munekage, Tomoaki Yatabe, Hiroyuki Kitagawa, Yuka Takezaki, Takahiko Tamura, Tsutomu Namikawa, Kazuhiro Hanazaki

発表誌名、巻(号)、ページ(~), 年 月
Journal of Artificial Organs (Published online: Aug 8, 2015)

要 旨

【背景・目的】高血糖が感染症リスクを増大させ、予後を悪化させることが知られている。さらに、近年血糖変動が病態の予後に与える影響が注目を集めており、集中治療領域で予後不良群は血糖変動幅がより大きかったことが報告されている。しかし、周術期血糖変動とその予後の関連性については依然解明されていない。血糖変動の再現性の高さが、血糖変動の研究を行う上では重要である。人工膵臓を用いることで再現性の高い血糖変動が実現できる可能性があり、ビーグル犬において人工膵臓を用いて周術期血糖変動モデルを確立することを本研究の目的とした。

【方法】6頭の健康なビーグル犬を用いた。全身麻酔下に右内頸静脈に中心静脈カテーテルを留置し、左大腿動脈に動脈ラインを留置した。次に右大腿静脈ラインに人工膵臓(STG-22、日機装社、東京)を接続した。膵全摘を施行し、1時間の安定化を行った後に、人工膵臓を用いて血糖値を170~70mg/dLの範囲で変動させた。血糖値が160mg/dLに到達すると、目標血糖値を70mg/dLに設定変更し、血糖値が80mg/dLに到達すると、目標血糖値を170mg/dLに設定変更した。8時間の実験を行い、2時間毎に動脈血pH、乳酸値、カリウム値を安全性の検討のために測定した。血糖変動回数は70mg/dLと170mg/dLの両方を達成して1回、血糖変動は血糖値の標準偏差と定義した。検査値の変化はANOVAを用いて解析を行い、P値が

0.05未満で統計学的有意差ありとした。

【結果】膵全摘時間は平均 62 ± 13 分で、血糖変動回数は平均 9.8 ± 2.3 回であった。平均血糖値は 128.1 ± 5.1 mg/dLで血糖変動は 44.6 ± 3.9 mg/dLであった。人工膵臓から投与されたインスリン総量は 23 ± 5 単位(1.8 ± 0.4 単位/kg)、グルコース総量は 95 ± 18 g(7.5 ± 1.4 g/kg)であった。動脈血pHは血糖変動前及び2時間後で 7.37 ± 0.07 、 7.26 ± 0.02 と有意差を認めた($P=0.01$)。血清K値は血糖変動前が 3.5 ± 0.3 mmol/Lであった。2時間後、及び4時間後は 3.0 ± 0.4 mmol/L、 3.1 ± 0.5 mmol/Lと有意に低下した($P=0.01, 0.04$)。血清乳酸値は血糖変動前後で有意差を認めなかった。

【結論・考察】人工膵臓を用いて血糖値を管理することで血糖変動モデル犬を作成できた。これまでの集中治療室での検討で非生存者の血糖変動幅が 41.4 ± 28.8 mg/dLであったとの報告があり、本モデルでは 44.6 ± 3.9 mg/dLと十分な血糖変動幅を達成することができた。さらに、低血糖や高血糖も独立して予後に影響を与える可能性があるが、本モデルでは平均血糖値は 128.1 ± 5.1 mg/dLと低血糖も高血糖もなく、血糖変動自体の影響を検討するのに適した血糖値を達成した。また、血清pHレベル、乳酸値は安定しており、安全性を担保した血糖変動モデルを作成できた。

本論文において、周術期血糖変動モデルが確立できた。今後、このモデルを用い詳細な検討をすすめることにより血糖変動と予後の関係について新しい知見が得られ、病態把握、予後改善のための介入法の確立に大いに寄与する可能性がある。よって本論文は、高知大学博士(医学)に値すると判断した。