

氏名・(本籍)	まき けんじ (宮崎県)		
学位の種類	博士 (医学)		
報告番号	甲第1552号		
学位授与の日付	平成27年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)		
学位論文題目	CD4+T-lymphocytes are activated by surgical stress following colorectal resection in cancer patients (大腸癌切除術後の手術侵襲によってCD4陽性T細胞は活性化される)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	山下 裕一
	(副査) 福岡大学	教授	黒木 政秀
	福岡大学	教授	鍋島 一樹
	福岡大学	教授	前川 隆文

内容の要旨

目的：

手術侵襲は、術後の免疫能を低下させることが報告されており、術後合併症や再発、予後との関連が議論されてきた。これまで術後免疫能を評価する項目としてインターロイキン、コルチゾール、CRP値などが用いられてきた。2002年に移植患者の免疫能を評価する目的で the Immuknow Assay が米国のFDAで承認された。これは、CD4陽性細胞のATP値を用いて移植患者の免疫能を評価するものである。これまでの報告では、CD4陽性細胞のATP値を用いた術後免疫能を評価した文献はない。今回我々は、大腸癌手術症例においてCD4陽性細胞のATP値を用いて術後免疫機能の推移を評価した。

対象と方法：

2012年8月から12月の間に大腸癌において福岡大学消化器外科で手術を受けた症例は49例であった。このうち免疫抑制剤やステロイド内服、移植患者を除外して、informed consentの同意が得られた16人を対象とした。術前及び術後1日目、4日目、8日目に白血球数、リンパ球数、CRP値、Immuknow Assay Kitを用いてCD4陽性細胞のATP活性を測定した。

結果：

年齢は41歳から84歳で平均年齢は62.4歳であった。男性が13例で女性が3例であった。

結腸が12症例、直腸が4症例であった。9症例が開腹手術、7例が腹腔鏡手術であった。7人がstage I、5人がstage II、2人がstage III b、2人がstage IVであった。白血球数 ($p < 0.001$) とCRP値 ($p < 0.0001$) は術後1日目に有意差をもって上昇し経過と共に低下した。リンパ球数は術後1日目に有意

差をもって低下し ($p < 0.001$)、経過と共に回復した。Immuknow assay level は術後1日目に有意差をもって上昇し ($p < 0.01$)、経過と共に術前レベルに推移した。開腹手術と腹腔鏡手術と比較すると、術後1日目に腹腔鏡手術群で Immuknow assay level が低い傾向を認めた。 ($p = 0.08$)

結論：

手術侵襲は術後の免疫能を抑制すると報告されてきた。我々の研究では、今までの報告とは対照的に CD4 陽性細胞の活性は術後1日目で有意差をもって上昇していた。この結果は、術後免疫抑制に伴い CD4 陽性細胞は減少するが、それを代償しようとして CD4 陽性細胞はより刺激を受ける状態にあると推測される。それ故に Immuknow assay は、術後の免疫状態のモニタリングに応用し得るかもしれない。

審査の結果の要旨

本論文は、漢方の睡眠薬の代表である酸棗仁湯の睡眠改善作用について、単独隔離飼育ストレスマウスを用いて研究したものである。酸棗仁湯が心理社会的なストレスによるマウスの行動変化や睡眠障害を改善する作用があることが示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、審査委員との質疑応答は以下の通りである。

1. 斬新さ

酸棗仁湯の動物モデルを用いた研究の報告としては、ストレス負荷動物において正向反射消失時間を延長することは分かっているが、睡眠解析を行った報告はない。本研究では実験動物を長期間、単独隔離飼育することによって一種の社会心理的なストレスを与え、睡眠解析を行うことによって、酸棗仁湯に睡眠改善作用があることを示唆した最初の研究である。

2. 重要性

心理社会的なストレスによる睡眠障害に対して改善作用を示したことから、酸棗仁湯は睡眠障害の治療薬を選択する場合の選択肢の一つになりえる。

3. 実験方法の正確性

本研究では実験動物の作成方法として単独隔離飼育ストレス負荷を用いた。ストレス負荷の方法として、このモデルはすでに多くの論文に掲載されている。また睡眠障害の評価方法として脳波を用いた。睡眠を評価する方法の一つとして、脳波を測定することは確立されている方法である。実験目的に応じて適切で確立された実験手技を用いて証明しており、十分な確実性があると考えられる。

4. 表現の明確さ

本論文は福岡大学医学紀要に2014年10月6日付けで採択されている。明確な表現による質の高い論文である。

5. 主な質疑応答

Q：酸棗仁湯の副作用には下痢症状などがあるので、セロトニン系を活性化させる作用があるのではないか。またメラトニンは測らなかったのか。

A：セロトニン活性化の可能性はある。メラトニンは今回の研究では測定していない。

Q：コルチコステロンを測定している時間が朝の10時であるが、その根拠はあるのか。

- A：どの時間が適しているのか検討は行った。休息期での睡眠を評価しようと考えた。
- Q：Figure 1A について、繰り返しのある検定は行わなかったのか。
- A：マウスは数分置きに寝たり起きたりするので、1時間ごとには検定を行っていない。12時間ごとに検定をし、Figure 1B,1C は12時間の積算で検定を行った。
- Q：REM睡眠時間に有意差が出ていないが、エラーバーが大きく、個体ごとにばらつきがあったのではないか。
- A：個体差がある可能性は否定できないが、出来るだけ個体差が少なくなるように同じ系統のマウスを同じ条件で飼育した。
- Q：Figure 3 について、占有率に差がなくても、それぞれの持続時間や出てくる順番などは測定していないのか。質的な評価を今回の占有率の結果だけで行うのは言い過ぎなのではないか。
- A：今回の研究ではそこまでの解析は行っていない。今後改めて検討する必要がある。
- Q：メラトニンやセロトニン受容体に作用している可能性はあるか。ベンゾジアゼピン系も含めて、複合的に作用している可能性はあるのではないか。
- A：酸棗仁の主要成分であるスピノシンにはセロトニン系に作用しているという報告がある。酸棗仁湯は5つの生薬から成り立っており、複合的に作用している可能性は高い。しかし明確な作用機序を解明するには至っていない。
- Q：睡眠障害のモデルとして、他に何かあるのか。
- A：確立されたものはない。急性ストレスなのか慢性ストレスなのかによってもまた違ってくると考えられる。
- Q：筋電図や脳波はテレメトリーなのか。
- A：有線コードを使用した。
- Q：酸棗仁湯には抗めまい作用もあるが、脳血流増加などの作用はないのか。
- A：本研究では検討していない。
- Q：マウスの NREM睡眠はどうやって判定をしたのか。
- A：脳波と筋電図から判定を行った。
- Q：9週間という期間や酸棗仁湯の投与量に関して、どのように決定したのか。また投与量を増やすとどうなるのか。
- A：隔離する期間に関しては基礎検討を行い、判断した。施設によって隔離する期間は若干異なるが、飼育されている環境の影響と考えられる。用量依存性に関しては現在検討しているところである。
- Q：Figure ごとの n の数が違うのかなぜなのか。再現性をどのようにしているのか。
- A：脳波を測定した3群、血漿中コルチコステロン濃度を測定した3群は、それぞれに研究を行っているために n の数が違う。それぞれの研究では自発運動量をみることによってストレスが負荷されているかを確認している。
- Q：NREM睡眠が障害されることによって学習障害が起こるといえるが、酸棗仁湯は学習障害を改善するといった報告はないのか。
- A：知る限り、報告はない。
- Q：臨床では酸棗仁湯の効果発現にどの程度かかるのか。
- A：人にもよるが、2週間程度は使用してから効果判定を行うことが多い。

Q：人で睡眠潜時などの睡眠脳波を調べた報告はないのか。

A：健常人で脳波を調べた報告はあるが、催眠作用があるといった報告にとどまっている。

Q：ペントバルビタールと酸棗仁湯の相互作用はどのようになっているのか。

A：現段階では、はっきりしたことはわかっていない。

Q：臨床ではベンゾジアゼピン系がREM睡眠を抑えるというような印象があるか。

A：臨床でREM睡眠とNREM睡眠を区別することは難しい。

Q：マウスにセロトニン症候群はおきるのか。

A：用量によると考えられる。

Q：遺伝子改変された睡眠障害マウスはないのか。

A：存在しない。

以上の質疑を中心に活発な討議が行われ、申請者はそれらの質問に適切に回答した。以上の審査の結果、本論文は酸棗仁湯が睡眠障害に有効であることを証明した研究であり、学位論文に値すると判定された。