

Evaluation of the safety, effectiveness, and health-related QOL impact of early rehabilitation in patients with nephrotic syndrome

岩井 宏治

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：畠中 泰彦 教授)

はじめに

日本腎臓学会の調査において、本邦の成人における慢性腎臓病（Chronic kidney disease; CKD）患者数は、約1,330万人と推計されている。透析の医療水準が高いこともあり、透析を受けながら長期延命に成功している患者も少なくない。しかし、CKD患者や透析患者の運動耐容能は低下しており、腎疾患や透析医療に関連した障害への対策として、近年腎臓リハビリテーションという包括的リハビリテーションプログラムが推奨されるようになった。一方、急性発症の腎疾患に対する腎臓リハビリテーションのエビデンスは十分ではなく、本邦におけるネフローゼ症候群のガイドラインでは、長期臥床が深部静脈血栓症や肺塞栓症のリスクとなることから、過度な安静は好ましくないとされる程度である。これは安静が相対的リスクであることを示唆しているだけで、ネフローゼ症候群に対する早期リハビリテーションの安全性、有効性に関して明確な言及はない。

目的

ネフローゼ症候群のためにステロイド治療を開始した入院患者を対象に、5週間の膝伸展筋力強化トレーニングおよび有酸素レベルでの持久力トレーニングを行い、早期リハビリテーションの安全性、有効性を検討すること。

方法

ネフローゼ症候群のためステロイド治療を目的に入院となった23例を対象とした。手順1. 膝伸展最大筋力を測定した後、膝伸展最大筋力の40-60%負荷での膝伸展筋力強化トレーニングを専用マシンを用いて実施した。5回/週、5週間の介入を行った後、膝伸展最大筋力を測定した。手順2. 心肺運動負荷試験は0-10W相当で3分間の定常ウォーミングアップ運動の後、20W/分の段階を有するランププロトコルを約50回転/分の速度で実施した。高齢者は10W/分で行った。嫌気性閾値（AT）は、Vスロープ法で分析し、次に最大酸素摂取量（Peak VO_2 ）を求めた。有酸素トレーニングは、AT-1min、15-20分/回で5回/週、5週間実施した。5週間後同様の方法で評価を行った。手順3. 腎機能は、1回/週、Creatinine (Cre), Blood urea nitrogen (BUN), Albumin (Alb) および尿蛋白を診療録より調査した。手順4. 健康関連 Quality of life (QOL) 評価にはSF-36を使用し、身体機能 (PF), 日常役割機能; 身体 (RP), 体の痛み (BP), 全体的健康感 (GH), 活力 (VT), 社会生活機能 (SF), 日常役割機能; 精神 (RE), 心の健康 (MH) を介入前後で評価した。

結果

平均体重は介入後4.6kgの有意な減少を認めたが、膝伸展筋力は7.8Nmの増加で統計学的に有意差を認めず、

年齢で調整しても有意差は認めなかった。AT, PeakVO₂ はそれぞれ 1.7, 2.2ml/min/kg と有意な改善を認め、ANCOVA にて体重の変化量で調整しても AT は有意な改善を認めた。膝伸展筋力の変化量と平均尿蛋白排泄量は有意な負の相関を認めた。Cre, BUN は明らかな変化は認めなかった。尿蛋白は有意に減少し、尿蛋白の減少に伴い、Alb は有意に改善した。尿蛋白が 3.5g/gCre 以下に減少しなかった 5 例で、腎機能と尿蛋白の推移を検討したところ、明らかな変化は認めなかった。SF-36 の 8 つの下位尺度を検討したが、有意差を認めたのは PF のみであった。

考 察

膝伸展筋力に有意差を認めなかったのは、尿蛋白排泄量が少なく筋力増強効果は得られやすいが、尿蛋白排泄量が多いと、蛋白異化が亢進し、筋蛋白合成が阻害されるため筋力増強効果が得られにくいことが要因と考えられた。そのため、筋力増強効果にバラつきが生じ、膝伸展筋力の平均値では有意差を認めなかったと考えられた。AT, PeakVO₂ は有意な改善を認めたが、体重で除するため、ANCOVA にて体重の変化量で調整したところ、AT において有意な改善が認められた。これらは、ネフローゼ症候群における早期リハビリテーションの有効性を証明するものと思われた。介入期間中、腎機能に明らかな変化は認めなかったが、ステロイド治療により早期リハビリテーションに伴う腎機能への影響が隠されている可能性も否定できない。そこで、ステロイド治療

に抵抗性を示し尿蛋白が 3.5g/gCre 以下に減少しなかった難治性群 (5 例) において、腎機能と尿蛋白の推移を検討した。結果、腎機能に明らかな変化はなく、尿蛋白の変化も認めなかった。これらの結果は、ネフローゼ症候群における早期リハビリテーションが、ステロイド治療による影響を考慮しても安全である可能性を示唆している。SF-36 を使用した健康関連 QOL 評価では、PF にのみ有意な改善を認めた。運動による介入であることから、少なくとも身体的健康感においては一定の効果を認めるが、社会的、精神的健康感への効果は期待できないと思われた。対象者は生産年齢者が多く、退院後の仕事 (学業) や生活、ネフローゼ症候群の再燃などの不安が要因と考えられた。

結 論

ステロイド治療を要するネフローゼ症候群に対し、中等度の膝伸展筋力強化トレーニングおよび有酸素レベルでの持久力トレーニングを週 5 回×5 週間実施した。血液検査、尿検査から介入期間中の腎機能に変化はみられず、運動耐容能の改善も認められた。ただ、健康関連 QOL においては、身体的 QOL には一定の改善が期待できるが、社会的、精神的 QOL の改善には課題を残した。ネフローゼ症候群に対する中等度の膝伸展筋力強化トレーニングおよび有酸素レベルでの持久力トレーニングによる早期リハビリテーションは安全であり効果的であると思われた。

サルコペニアの高齢者における体幹筋力が歩行速度におよぼす影響

加藤 康太

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：畠中 泰彦 教授)

はじめに

世界の総人口に占める65歳以上の高齢者の割合は年々増加傾向にあり、今後半世紀で高齢化が急速に進展していくと予想されている。高齢化が進展する中、高齢者の虚弱を予防・改善させることが重要な課題である。サルコペニアとは「加齢に伴う骨格筋量の減少」のことであり、筋肉量の減少と筋力および身体機能の低下が特徴である。サルコペニアになると運動障害やADL能力の低下を来し、転倒や骨折のリスクが増大する。高齢者の転倒は、骨折をはじめとする外傷を受傷しやすく、我が国における転倒にかかる医療・介護費は年間9,000億円を超える。すなわち、我が国などの高齢国において、高齢者の転倒を予防することは極めて重要な課題である。高齢者の転倒は様々な場面で起こるが、約60%は歩行中に発生すると言われている。しかし、転倒と歩行の関係についての過去の調査では、転倒の危険性を予測するための調査は行われているが、具体的な理学療法の確立には至っていない。また、サルコペニアとの具体的な関連性についても未だ明らかとなっていない。したがって、転倒の一要因であるサルコペニアに着目し、転倒の発生機序である歩行との関係について明らかにし、転倒予防に対してより効果的な介入方法を確立することで高齢者の介護予防に役立つと考えられる。

我々は過去に、虚弱高齢者を対象にサルコペニアと歩行の関係についての調査を行った。その結果、サルコペニアの状態にある者は、サルコペニアの状態ではない者

と比較して、明らかな下肢筋力の低下がないにもかかわらず、歩行速度が低下していた。すなわち、サルコペニアにおける歩行速度低下の原因は下肢筋力だけではなく、他の要因も影響している可能性があると考えられた。その一つとして、体幹筋の筋力低下の可能性もある。体幹筋は姿勢の保持に重要な役割を持つため、体幹筋力が低下すると円背などの姿勢変化や腰痛を発症しやすくなり、歩行能力に影響をおよぼすと言われている。また、筋肉量の変化においては、四肢の筋肉量ほど急激な減少はみられないが、男女共に加齢により減少することが報告されている。しかし、サルコペニアと体幹筋に関する報告は少なく、詳細な調査は十分に行われていない。

目的

本研究は、虚弱高齢者を対象にサルコペニアと体幹筋の関係を調査し、サルコペニアにおける歩行の特徴について明らかにすることを目的とした。

方法

対象は、外来リハビリテーション患者または通所リハビリテーション利用者のうち、本研究への参加に同意が得られた65歳以上で歩行が自立している男女40名（男性14名、女性26名、平均年齢83.1 ± 5.7歳）とした。なお、心臓ペースメーカーや他の医療電子装置などにより生体インピーダンス法を受けることが困難な者、脳血管障害の既往のある者、外傷治療中の者、認知機能評価法（MMSE）の点数が23点以下の者は除外した。なお、

本研究は医療法人社団主体会倫理委員会にて承認を得て実施した(2017-014)。

評価および計測項目は、(1) 過去1年間の転倒歴、(2) サルコペニアの有無、(3) 下肢・体幹筋力、(4) 歩行の特性、(5) 認知機能、(6) 基本情報(性別、年齢、現病歴、既往歴)とした。

統計学的解析方法は、対象者をサルコペニアの有無により、サルコペニア群と非サルコペニア群の2群に分け、2群間における対象者の属性(性別、年齢、運動器疾患の罹患率)・身体的特徴(身長、体重)、および各評価・計測項目に差があるかどうか、 χ^2 乗検定、Fisherの直接確率法およびMann-WhitneyのU検定を行った。なお、統計解析には統計解析用ソフトJSTATを用い、有意水準は5%未満とした。

結 果

サルコペニアと判定された者(以下、サルコペニア群)は19名、非サルコペニアと判定された者(以下、非サルコペニア群)は21名であった。サルコペニア群と非サルコペニア群を比較した結果、転倒率はサルコペニア群が31.6%、非サルコペニア群が19.0%であり、サルコペニア群の方が高い傾向となった。また、下肢・体幹筋力に関しては体幹筋力において、サルコペニア群の等尺性体幹伸展筋力($0.46 \pm 0.30\text{kgf/kg}$)が非サルコペニア群($0.76 \pm 0.30\text{kgf/kg}$)に比べ、低値であった($p < 0.01$)。歩行の特性について、関節モーメントにおいては、立脚終期における股関節最大屈曲モーメント(サルコペニア群： $0.34 \pm 0.28\text{Nm/kg}$ 、非サルコペニア群： $0.66 \pm 0.35\text{Nm/kg}$ 、 $p < 0.01$)および足関節最大底屈モーメント(サルコペニア群： $0.93 \pm 0.29\text{Nm/kg}$ 、非サルコペニア群： $1.12 \pm 0.20\text{Nm/kg}$ 、 $p < 0.05$)、前遊脚期における膝関節伸展モーメント(サルコペニア群： $0.13 \pm 0.14\text{Nm/kg}$ 、非サルコペニア群： $0.31 \pm 0.25\text{Nm/kg}$ 、 $p < 0.05$)が非サルコペニア群に比べ、サルコペニア群では低値であった。また、歩行パラメータに関しては、歩行速度(サルコペニア群： $0.79 \pm 0.19\text{m/sec}$ 、非サルコペニア群： $1.08 \pm 0.27\text{m/sec}$ 、 $p < 0.01$)、歩幅(サルコペニア群： $0.21 \pm 0.10\text{m}$ 、非サルコペニア群： $0.29 \pm 0.09\text{m}$ 、 $p < 0.05$)、

および歩行率(サルコペニア群： $117.8 \pm 11.0\text{steps/min}$ 、非サルコペニア群： $125.4 \pm 10.6\text{steps/min}$ 、 $p < 0.05$)すべてにおいて、非サルコペニア群に比べ、サルコペニア群では低値であった。

考 察

下肢・体幹筋力において、サルコペニア群は非サルコペニア群よりも等尺性体幹伸展筋力が有意に弱かった。よって、本研究の結果は、虚弱高齢者においてはサルコペニアが下肢筋のみではなく、体幹筋にも影響をおよぼしている可能性があることを示唆していると考えた。体幹筋は加齢に伴い萎縮する。中でも、歩行に介助が必要な虚弱高齢者においては、腹横筋や多裂筋、胸部脊柱起立筋の低下率が高いことが示されている。つまり、体幹筋においてもサルコペニアの影響を受けることが考えられ、サルコペニアの状態を把握するためには下肢筋のみではなく、体幹筋についても調査する必要があると考えた。

歩行の特性について、サルコペニア群と非サルコペニア群を比較した結果、関節モーメントに関して、サルコペニア群は非サルコペニア群に比べて、立脚終期における股関節最大屈曲モーメントおよび足関節最大底屈モーメントが有意に低値であった。また、歩行パラメータである歩行速度や歩幅、歩行率においても、非サルコペニア群に比べサルコペニア群の方が有意に低値であった。すなわち、サルコペニア群は歩行時に前方への推進力となる下肢の振り出しや蹴り出しが弱く、歩行速度が低下していたことがわかる。一般に歩行速度が低下する原因の一つとして、加齢に伴う筋力低下が考えられており、本研究のサルコペニア群においても、一般高齢者よりも筋力の低下がみられた。しかし、我々の過去の調査では、下肢筋力においてはサルコペニアの有無による差は見られず、本研究においても同様の結果となった。また、体幹筋について調査を行った結果、サルコペニア群は非サルコペニア群よりも体幹伸展筋力が有意に弱かった。よって、虚弱高齢者のサルコペニアにおける歩行速度低下の原因は、下肢の筋力低下のみではなく、体幹筋の筋力低下も影響していることが明らかとなった。

結 論

サルコペニア群は非サルコペニア群と比べて、下肢筋力に顕著な差はなかったが、体幹筋力においては有意に弱くなっていた。すなわち、虚弱高齢者においてはサルコペニアが下肢筋のみではなく、体幹筋にも影響をおよ

ぼしている可能性が示唆された。また、サルコペニア群は歩行時に前方への推進力となる下肢の振り出しや蹴り出しが弱く、歩行速度の低下を認めた。よって、虚弱高齢者のサルコペニアにおける歩行速度低下の原因は、下肢の筋力低下のみではなく、体幹筋の筋力低下も影響していることが明らかとなった。

人体血流ファントムを用いた Dual Energy CT における 希釈注入による造影剤低減効果の検証

富田 博信

大学院 医療科学研究科 医療科学専攻

(指導教員：柴田 幸一 教授)

はじめに

現在 CT を用いた Angiography は臨床において幅広く用いられている。しかしながら安定した画質の提供は難しい。この撮影法は被験者に造影剤を急速注入し、血管内 CT 値を上昇させ 3D-CT Angiography (3D-CTA) 画像を作成する。ここで先行研究では、造影剤注入法に関しては十分に検討されており、体重が多くなるほど単位時間当たりの造影剤注入量を増加することで安定した CT 値を得る方法が一般的である。しかし、上肢における静脈ルートの確保困難な場合や被験者の心機能低下により一概に安定した CT 値を得ることは難しい場合がある。更には腎機能が悪い場合造影剤を極力少なく使用し、3D-CTA 画像を得られれば臨床において非常に有用となる。Dual Energy (DE) 撮影法では造影剤の感度を自由に調整できるので、少量造影剤使用により、必要 CT 値の低下に関して補正できることが考えられる。しかしこの研究に関して、ファントムによる検討（人体血流ファントムを用い DE 撮影法により Time-enhancement -Curve (TEC) を導き出す）は、まだ報告されていない。

目的

DE 撮影法において取得可能な仮想単色 X 線画像 (Virtual Monoenergetic Image: VMI) を用い、3D-CTA における造影剤低減の可能性を検討した。

方法

- 1) 造影剤：生食比率を 3 : 7 ~ 10 : 0 まで 10% ずつ変化させ、造影剤と生理食塩水を混合し、血行動態模擬ファントムに注入した。造影剤注入速度は 3.5 mL/sec で 12 秒注入一定。(体重 50 kg を想定し、循環水量をファントム内にて調整)
- 2) ファントムの動脈部の撮影を行い、CT 値の経時的変化を記録した。
- 3) 得られたデータより 40keV から 5keV ごと 75keV まで VMI エネルギーを変化させ各注入条件の TEC を作成した。
- 4) ファントムの均一部位をエネルギーごとに画像 SD を測定した。
- 5) 100kV 撮影時のピーク造影 CT 値と、必要画像 SD をキープできる組み合わせを導き出し、造影剤減率を検討した。(3D-CTA 作成に必要な最低条件)

結果

仮想単色画像においてエネルギーが 5keV 下がると造影剤 CT 値は、どの造影剤濃度でも約 20% 上昇した。各エネルギーにおける TEC の最高 CT 値は、造影剤希釈率が低いほど高く仮想エネルギーが低いほど高くなった。

仮想単色画像のエネルギーの違いにより、画像 SD が変化することが確認された。その傾向は、40~65keV 領域ではエネルギーが 5keV 低くなると SD は約 25% 上昇

し、40KeV の SD は 44 で最大となったが、65keV 以上では SD11 でほぼ一定となった。

仮想単色画像の最大 CT 値は、40keV を用いた 10:0、40keV のとき 1000HU に達したが、70% 希釈の 3:7、40keV では、300HU を下回った。

3D-CTA 撮影を想定した CT 値が、Single Energy(SE) 100kVp と同等な TEC、且つ 300HU 以上保てる組み合わせは 10:0,65 kV, 4:6,40keV, 5:5,45 keV, 6:4,55 keV, 7:3,60 keV, 8:2,60 keV, 9:1,65keV の 7 本が該当した。その中より必要画像 SD15 (当院設定 SD15: スライス厚 1mm, 再構成関数 D30) 以下をキープでき、且つ造影剤使用が最小になる組み合わせは、6:4,55keV であった。

考 察

- 1) DE 撮影において SE 同様の TEC になり、Dual energy imaging composition (DIC) と VMI を比較すると VMI 画像のほうが CT 値の上昇率が大きいので、造影剤低減や安定した CT 値の調整には有用と考えた。
- 2) 70% 希釈混合比 3:7 では 40keV を用いても、SE 撮影 (100kVp) の TEC における CT 値 (300HU) を下回るので、CT 値のみで考えると 3:7 は除外した。

- 3) 仮想単色画像において CT 値は最大で、40keV (SD 44) を使用すると 1000HU 以上にも達するが、臨床においての使用は画像 SD が基準 65keV (SD 11) の 4 倍にも達し現実的ではない。通常の線量範囲で考えると 55keV 程度での運用がリミットであると考え。このことを踏まえると、SE 撮影時 100kV 撮影時の TEC と同等で 3D 画像作成画質 (SD15 以下) を得られるのは、6:4 で、且つ 55keV であった。
- 4) 現在、様々なタイプの Dual Energy CT 装置 (dual source, high-speed kV switching, dual layer detector, split filter) が存在しており、VMI の CT 値誤差は 10% 以内と報告がある。しかしながら、本研究では 300HU 以上の高いコントラスト領域を想定しているため、VMI 画像の誤差は許容範囲と考え、すべての Dual Energy CT 装置においても適応可能と思われた。

結 論

仮想単色エネルギー法は 3D-CTA 検査において最大で 4 割程度造影剤低減が可能であり、本法を用いることにより被験者の体格や造影レートの違いを均一化でき、安定した 3D-CTA 画像の提供可能なことも示唆された。

関節炎により誘導される乾燥皮膚発現のメカニズム解析

五藤 健児

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：大井 一弥 教授)

緒 論

皮膚は、主に表皮・真皮・皮下組織から成る人体最大の臓器である。表皮や真皮における天然保湿因子のヒアルロン酸やコラーゲンなどは皮膚構造の保持に重要な役割を担っており、外界との間でバリアを形成することで水分喪失を防ぎ、生体を維持している。皮膚バリア機能低下がもたらす乾燥皮膚は、掻痒を引き起こすきっかけとなり、重篤な場合には皮膚感染症を引き起こすなど二次的な疾病に繋がる。これまでに、小腸炎や大腸炎などの消化器疾患モデル動物において、炎症を起こした部位とは異なる臓器である皮膚に影響が及び、乾燥皮膚を発現することが確認されている [1, 2]。本研究では、消化器官以外の炎症性疾患である関節リウマチに着目した。関節リウマチは、関節炎や進行性関節破壊などの関節における症状を主とするだけでなく、血管や皮下組織などにおける関節外症状も生じる炎症性疾患である。臨床において関節リウマチ患者が乾燥皮膚を呈することは既知の事実として報告されているが [3, 4]、分子レベルの誘導メカニズムの詳細は明らかではない。本研究では、関節リウマチを模倣した関節炎モデルマウスを用いて乾燥皮膚を発現させ、その発現のメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

第 1 章：関節炎モデルマウスにおけるマスト細胞がもたらす乾燥皮膚への影響

10 週齢雄性の DBA/1J マウス (コントロールマウス) および DBA/1J コラーゲン関節炎誘発モデルマウス (関節

炎マウス) を使用した (各 $n = 5$)。乾燥皮膚の程度を評価するために経表皮水分喪失量 (Transepidermal water loss: TEWL) を測定し、皮膚組織の染色を行った。さらに、皮膚バリア機能に関与するヒスタミンやコラーゲンの発現を測定した。その結果、コントロールマウスと比較して関節炎マウスでは、TEWL が上昇し、乾燥皮膚が生じた。また、関節炎マウスにおける皮膚中の I 型および IV 型コラーゲンは低値であり、それらの分解酵素である Matrix metalloproteinase (MMP)-1 および MMP-9 は高値であった。さらに、関節炎マウスの皮膚におけるマスト細胞数および血漿中におけるヒスタミン量は増加していた。これらのことから、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現には、マスト細胞が関与している可能性が考えられた。次に、マスト細胞の増殖に関わる c-kit の抗体を関節炎マウスに投与することで、マスト細胞の増殖を阻害し、乾燥皮膚への影響を確認した。その結果、上昇していた TEWL を低下させ、関節炎マウスにおける乾燥皮膚が改善した。また、皮膚中の I 型コラーゲンの減少、マスト細胞数およびヒスタミン量の増加が抑制された。したがって、関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現にマスト細胞の関与が明らかとなった。

第 2 章：関節炎モデルマウスにおけるマスト細胞を介した Reactive Oxygen Species およびストレスホルモンの乾燥皮膚への影響

第 1 章と同様の関節炎マウスを用い、マスト細胞を活性化する因子による乾燥皮膚への影響を確認した。マスト細胞を活性化する因子としては Thymic stromal

lymphopoietin(TSLP), その上流にある好中球や Reactive oxygen species (ROS) が予測される [5]。また, TSLP はストレスホルモンであるグルココルチコイドからの影響も受ける [6]。本章では, 抗 TSLP 抗体, 抗好中球抗体, ROS 消去剤である N- アセチルシステイン (NAC) それぞれの投与を試みた。それらの投与により, 関節炎マウスにおける乾燥皮膚は改善し, 皮膚中マスト細胞数が減少した。さらに, NAC の投与に加えてグルココルチコイドの受容体遮断薬を併用した場合には, より一層の乾燥皮膚の改善と皮膚中マスト細胞数の減少効果が得られた。したがって, TSLP, 好中球, ROS およびグルココルチコイドはマスト細胞を介して, 関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現を誘導していることが明らかとなった。

第 3 章：関節炎モデルマウスにおける乾燥皮膚発現に Th2 細胞および Th17 細胞が及ぼす影響

第 2 章では, マスト細胞をはじめ, 様々な免疫担当細胞を刺激する TSLP が関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に関わることを明らかにした。本章では, TSLP から刺激を受けるマスト細胞以外の免疫担当細胞として樹状細胞に着目し, 樹状細胞の刺激により分化する Th2 細胞および Th17 細胞が関節炎マウスにおける乾燥皮膚の発現に与える影響を検討した。Th2 および Th17 阻害剤を投与した際, 関節炎マウスにおける乾燥皮膚が改善され

た。Th2 細胞によって引き起こされる乾燥皮膚は, IL-6 および TNF- α などの炎症性サイトカインの増加により起こるのに対して, Th17 細胞は, IL-17 の分泌増加およびマスト細胞の活性化を介して起こすことが考えられた。このことから, 樹状細胞により分化が促進されるヘルパー T 細胞といえども, Th2 細胞および Th17 細胞それぞれに異なるメカニズムで乾燥皮膚の発現を誘導することが明らかとなった。

以上の結果より, 関節炎マウスにおいて乾燥皮膚の発現が誘導されることが明らかとなった。その誘導のメカニズムとしては, 活性酸素やストレスホルモンによって活性化される TSLP を介したマスト細胞および樹状細胞の関連が考えられた。これらの因子を抑えることは, 関節リウマチ患者における乾燥皮膚症状を緩和することに繋がる可能性が示唆された。

引用文献

- [1]Yokoyama S.et al.Exp Dermatol.2014;23:659-663.
- [2] Yokoyama S.et al. Exp Dermatol. 2015;24:779-784.
- [3] Lora V. et al G Ital Dermatol Venereol. 2018;153:243-255.
- [4] Ghosh SK.et al.Indian J Dermatol 2017;62:411-417.
- [5] Shen S. et al. Food Chem Toxicol. 2017;99:60-69.
- [6]MizunoK. et al. J Dermatol Sci. 2015; 80:45-53.

NETosis 誘導機構の解析

— NADPH oxidase 非依存性 NETosis におけるミトコンドリアの関与と女性ホルモンの影響 —

瀧下 裕

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：佐藤 英介 教授)

序 章

好中球は、自然免疫において重要な役割をはたす。通常は血液中を循環しているが、炎症など惹起されると、その局所に集積して生体防御反応をしめす。好中球の生体防御反応には、活性酸素種 (ROS) 産生や貪食があるが、それらの役割を果たすと好中球は細胞死を起こしてしまうことが知られている。一般に細胞死としてアポトーシスやネクローシスがよく知られているが、好中球はそれ以外の細胞死として好中球細胞外トラップ (NETs) を伴う細胞死を起こすことが明らかとなった。これは、DNA を網のように細胞外に放出して細菌などの異物を捕獲・殺菌する細胞死である。

この NETs を形成することによって誘導された好中球細胞死は NETosis と呼ばれている。NETosis は自然免疫において重要な役割を持ち、細胞外に遊出した DNA やタンパク質がその後の炎症病態に大きく影響を与えることが知られている。例えば、NETosis は、関節リウマチや全身性エリトマトーゼスなどの炎症性疾患や自己免疫疾患などの増悪、血小板結合によるアテローム性硬化症、血管損傷に関与していることが報告されている。NETosis 誘導には、ROS の産生酵素である NADPHoxidase (NOX) が重要であると報告されているが、細胞にはその他にも ROS を産生する経路が存在し、特にミトコンドリアはエネルギー産生を担うだけでなく、細胞内で ROS 産生を通してシグナル伝達などに影響を与える。しかしながら、ミ

トコンドリアが NETosis 誘導にどのように関与するかについては明らかにされていない。本研究では、NETosis 誘導におけるミトコンドリアの関与を明らかにすることを主な目的とする。また、関節リウマチや全身性エリトマトーゼスなどの女性に好発する自己免疫疾患において NETosis 誘導が亢進していることが報告されているが、その理由は明らかになっていない。そこで、女性に多い疾患の病態メカニズムの一端を明らかにするため、女性ホルモン添加時の NETosis 誘導メカニズムを解析することを目的とした。

第一章 NADPH オキシダーゼ非依存性 NETosis の刺激物質の同定

NOX は好中球における ROS の主な産生酵素である。NETosis 誘導には NOX 由来の ROS が重要であり、NOX 依存性に誘導される NETosis を NOX 依存性 NETosis と定義している。しかしながら、最近、NETosis 誘導に NOX の活性化に関与しない機構も明らかになり、NOX 非依存性 NETosis と定義された。本研究では、NETosis 誘導機構における NOX 依存性と NOX 非依存性 NETosis の違いを明らかにするために、NOX 欠損マウスとミトコンドリア欠損細胞を用いて詳細に解析した。NOX のノックアウトマウスである gp91phox ノックアウトマウスから腹腔に浸潤した好中球を回収して実験を行った結果、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 刺激では NETosis は誘導されなかったが、カルシウムイオノフォアである

A23187 刺激においては誘導された。PMA は PKC を介して NOX を活性化する刺激物質であるため、gp91phox ノックアウトマウスでは、ROS が産生されず NETosis 誘導がおこらなかったと考えられた。また、A23187 刺激では NOX の活性化を介さずに NETosis を誘導することが判明した。したがって、PMA を NOX 依存性 NETosis 誘導剤、A23187 を NOX 非依存性 NETosis 誘導剤として以後の研究に用いた。

第二章 NETosis におけるミトコンドリアの役割

ミトコンドリアは、NOX とは異なる ROS 産生酵素をもつ。そのため、ミトコンドリアから産生される ROS の影響について検討した。ミトコンドリアの ROS 産生を抑制する mito TEMPO を用いて、PMA, A23187 両刺激の影響を調べた結果、どちらの刺激剤も部分的に NETosis 誘導を抑制した。したがって、ミトコンドリアは、NOX 依存性、NOX 非依存性 NETosis の両者に関与することが明らかになった。そこで、さらにミトコンドリアの関与を明らかにするため、ミトコンドリア欠損細胞 (ρ^0 細胞) を作成した。本研究ではより早期にミトコンドリア遺伝子を欠損させる新たな方法として、HL-60 細胞に 2',3'-dideoxycytidine を加え、7 日間培養する方法を確立した。本細胞を用いた解析の結果、好中球に分化させた ρ^0 細胞では、A23187 刺激において NETosis は誘導されなかったが、PMA 刺激においては誘導された。この際、NETosis 誘導において鍵となる分子である peptidyl argininedeiminase 4 (PAD4) の発現、ヒストンのシトルリン化についてはミトコンドリア欠損の影響はなかった。したがって、ミトコンドリアは NOX 非依存性の NETosis 誘導に大きく関与し、それは、細胞内での PAD4 の活性化やヒストンのシトルリン化には影響せず、細胞膜崩壊に影響していると考えられた。

第三章 NETosis における細胞膜崩壊機構の解析

ミトコンドリア欠損細胞での実験から、NOX 依存性、NOX 非依存性 NETosis では細胞膜の崩壊機構が異なることが考えられたため、細胞膜崩壊に関わる因子について詳細に解析した。NETosis の細胞膜崩壊には、ミエロ

ペルオキシダーゼ (MPO) の活性化あるいは Necroptosis の細胞膜崩壊作用に関与している MLKL が関与することが考えられた。そこで、それぞれの阻害剤を用いて解析した。解析の結果、MPO 阻害剤処理により、PMA 刺激では NETosis 誘導は著明に抑制されたが、A23187 刺激では抑制されなかった。従って、NOX 依存性 NETosis は、MPO から産生される ClO^- が細胞膜崩壊に関与し、NOX 非依存性 NETosis においては関与しないことが明らかとなった。Necroptosis 細胞膜崩壊作用に関与している MLKL の阻害剤を用いて解析した結果、NOX 依存性、非依存性 NETosis どちらも部分的に抑制された。以上のことから NOX 依存性 NETosis は MPO と一部 Necroptosis 様細胞膜破壊が関与していること、NOX 非依存性 NETosis においては、MPO は関与せず、一部 Necroptosis 様細胞膜破壊が関与していることが考えられた。

第四章 NETosis におけるエストロゲンの影響

女性に多い疾患の病態メカニズムの一端を明らかにするため、女性ホルモン添加時の NETosis の誘導メカニズムについて検討した。本研究では、女性ホルモンとして 17- β -estradial (E2) を用いた。E2 を添加することで A23187 刺激による NETosis 誘導は著明に亢進した。本機構を解析した結果、E2 添加により NETosis 誘導マーカーのヒストンシトルリン化が亢進し、同時にヒストンシトルリン化酵素である PAD4 の発現も亢進していた。NETosis 誘導には ROS が関与していることから L-012 を用いた ROS 産生量を測定したところ、E2 添加により ROS は減少した。さらに、エストロゲンの膜受容体である GPR30 のアゴニストを添加することにより E2 と同様の効果が得られた。そのため、E2 の効果は膜受容体を介している可能性が示唆された。これらの結果より、エストロゲンは膜受容体である GPR30 を介し、PAD4 の発現を亢進させ、ヒストンシトルリン化を誘導させることで、ROS 非依存的に A23187 誘導性 NETosis を亢進させていることが示唆された。

結 論

本研究では、NETosis の誘導機構を詳細に検討した。

解析の結果、NOX 非依存性 NETosis には Ca^{2+} が関与していること、NETosis の誘導機構にミトコンドリアが関与し、その欠損細胞の実験から特に NOX 非依存性の NETosis 誘導機構にミトコンドリアが関与すること、さらには NOX 依存性と非依存性では細胞膜崩壊機構が異なることが明らかとなった。また、NETosis は、様々な炎症病態に関与し、とくに $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ が関与する病態悪化には NETosis の亢進が関与する可能性があることが判明した。これらの発見は自己免疫疾患や炎症病態を治療するうえで NETosis の制御が重要な鍵を握ること、その制御にミトコンドリアがターゲットとなる可能性を示唆している。

引用文献

- Yutaka Takishita, Hiroyuki Yasuda, Mio Shimizu, Akane Matsuo, Akihiro Morita, Tomonari Tsutsumi, Masahiko Tsuchiya, and Eisuke F. Sato “Formation of neutrophil extracellular traps in mitochondrial DNA-deficient cells” *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 1: 15-23 (2020)
- Hiroyuki Yasuda, Maki Yamamoto, Yuna Kawashima, Yutaka Takishita, Akihiro Morita, Masahiko Tsuchiya, Eisuke F Sato “ $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ (E2) enhances neutrophil extracellular trap formation by increasing peptidylarginine deiminase 4 expression via interaction with estrogen membrane receptor” *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 663:64-70 (2019)

高齢者における乾燥皮膚の誘発要因とフレイルに関する研究

出口 昌孝

大学院 薬学研究科 医療薬学専攻

(指導教員：大井 一弥 教授)

緒 論

本邦では、高齢者人口の増加に伴い介護予防が大きな課題となる中、フレイルという概念が注目されている。フレイルは、健康な状態と要支援・要介護との中間の状態をいい [1]、適切な介入を行えば、高齢者が要介護状態に陥ることを低減させることが可能になると考えられている。

地域住民の高齢化が進む中で薬局薬剤師には、高齢者の健康延伸の実現に向けた支援に対する期待が一層高まり、患者の状態や訴えに応じたきめ細かい対応を行うことが求められている。

我々は、薬局薬剤師が高齢者の健康延伸に関与する適切な介入方法を探るため、第1章では、服薬剤数と乾燥皮膚及び歩行速度との関連について検討した。

先行研究では、乾燥皮膚がフレイルの指標の一つである体重減少と関連する可能性があることが示唆されている [2]。そこで、高齢者における乾燥皮膚の誘発要因を探るため、第2章では、高齢者に対する亜鉛補充療法の皮膚に対する有用性を、第3章では高齢者と類似した乾燥皮膚を伴う掻痒が特徴的にみられる血液透析患者の血中金属濃度と乾燥皮膚の関連を検討した。

第1章

本章では、薬局薬剤師がフレイルのリスクが高い高齢患者をスクリーニングする方法を探ることを目的とし、患者の処方内容と角層水分量及び歩行速度の関連を検討

した。

対象は、はあと薬局在宅センター（三重県松阪市）に来局し、内服薬を5剤以上服薬している65歳以上の患者31例とした。全ての医療機関から投薬されている薬剤を調査し、服薬剤数を算出した。また、直線5mの歩行に要した時間から歩行速度を算出し、前腕部の角層水分量を携帯型皮膚水分計で非侵襲的に測定した。次いで、フレイルの評価基準の一つであるJ-CHS基準で採用されている1.0m/sにおいて歩行速度が速い群（以下、高歩行速度群）と遅い群（以下、低歩行速度群）に分け、処方内容を比較した。

解析の結果、歩行速度と服薬剤数の間に相関が認められた。次に、処方内容を精査したところ、低歩行速度群では高歩行速度群に比して、カルシウム拮抗薬（Calcium Channel Blocker:CCB）を服薬している患者の割合が有意に高いことが示された。また、便秘薬の服薬群と非服薬群に分けたところ、角層水分量及びBody Mass Index (BMI)は便秘薬の服薬群において有意に低いことが明らかになった。

以上の結果から、服薬剤数が多くなるほど歩行速度が遅くなる傾向が示され、その中でも特にCCBが歩行速度と関連している可能性が示唆された。また、便秘薬を服薬している高齢患者では角層水分量が低下していることが明らかになった。近年、世界的にポリファーマシーに関する報告が多数なされているが [3-6]、本研究において我々が高齢患者に対する処方内容に言及したことは、服薬剤数だけでなく薬剤の種類にも注意すべき可能性を

拓いたと考えられた。

第2章

亜鉛は、必須微量元素の1つであり [7], 幅広い生理機能を担う中で、皮膚とも密接な関連があることが知られている。高齢者では皮膚のかさつきを伴う慢性的な掻痒を訴えることが多い。また、血清亜鉛濃度は加齢とともに低下することが知られている [8-11]。そこで我々は、乾燥皮膚及び掻痒に対する亜鉛補充療法の有用性を検討した。

対象は、Aクリニックを受診した65歳以上の患者のうち、血清亜鉛濃度が80mg/dL未満の患者（以下、低亜鉛値群）9例とした。対象者には酢酸亜鉛水和物を12週に亘り投与し、4週ごとに採血、皮膚測定及び掻痒の評価を実施し、血清亜鉛濃度の測定を行った。コントロール群は、血清亜鉛濃度が80mg/dL以上の群（以下、正常亜鉛値群）9例とした。

低亜鉛値群のTEWLは正常亜鉛値群と比較して有意に高く、血清亜鉛濃度は有意に低かった。12週の酢酸亜鉛水和物投与により、血清亜鉛濃度は有意に増加し、TEWLは有意に低下した。正常亜鉛値群9例と、低亜鉛値群9例×4時点（ベースライン、服用4週、8週、12週）の全45検体について解析したところ、血清亜鉛濃度とTEWLの間には負の相関がみられた。

本研究は、高齢者における亜鉛の皮膚バリア機能に対する作用を明らかにし、新たな知見を提供したと考えられた。

第3章

高齢者と同様に血液透析患者は特徴的な乾燥皮膚を呈し、血清亜鉛の低下を含む血中金属濃度の様々な変動をきたすことが知られている [12, 13]。そこで、B病院において血液透析治療を受けている患者を対象に、血清中ならびに全血中の金属濃度と掻痒及び皮膚の状態との関連を検討することとした。

対象はB病院において6か月以上に亘り血液透析療法を受けた患者44例とした。白取基準を用いて掻痒を評価し、同時にTEWL、角層水分量を測定した。その際

採血を行い、血中の金属元素（Mg, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn）濃度を測定した。コントロール群は、掻痒の無い非透析患者12例とした。

血中金属濃度の測定の結果、多くの金属元素は対象群とコントロール群間で有意に変動していることが明らかになった。特に全血Mnは、対象群ではコントロール群と比較して約8倍と顕著な高値を示し、さらに角層水分量との間に負の相関がみられた。掻痒の強い群では、弱い群と比較して角層水分量が有意に低かった。

血液透析患者の掻痒は、乾燥皮膚を含む多様な要因により引き起こされるが [14-16], Mnとの関連についての報告はまだ全くない。このように我々の研究は、Mnが乾燥皮膚の発現を誘発し、掻痒を引き起こす一つの要因となる可能性を示したものであり、新たな知見であると考えられた。

結論

我々は一連の研究を通し、処方内容、血清Zn及び全血Mnと乾燥皮膚との関連性を見出した。

これらの結果から、乾燥皮膚は必ずしも皮膚に限定した問題ではないことが示唆された。そのため我々は、乾燥皮膚に対して、保湿剤の適正使用に留まらず生体内の変化に応じたサポートを行うことが必要であることが明らかとなった。

薬局及び在宅で薬剤師が患者の皮膚の状態を見ることは、非侵襲的に実施可能である。そこで我々は、乾燥皮膚を代表とした脆弱な皮膚を、スキンプレイルと提唱する。

本研究結果を基にスキンプレイルの評価方法を定型化することは、皮膚の状態から全身性の疾患を見出す可能性を示唆するものであり、薬局薬剤師の新たなアセスメントツールとなると考えられた。

引用文献

1. 厚生労働省 . 後期高齢者の保健事業のあり方に関する研究 <<https://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do?resrchNum=201504009A>> 2019年8月8日閲覧
2. Iizaka S. Frailty and body mass index are associated

- with biophysical properties of the skin in community-dwelling older adults. *J Tissue Viability*, 27, 141-145, (2018).
3. Kojima T., Akishita M., Nakamura T., Nomura K., Ogawa S., Iijima K., Ouchi Y. Polypharmacy as a risk for fall occurrence in geriatric outpatients. *Geriatr Gerontol Int*, 12, 425-430, (2012).
 4. Kojima T., Akishita M., Kameyama Y., Yamaguchi K., Yamamoto H., Eto M., Ouchi Y. High risk of adverse drug reactions in elderly patients taking six or more drugs: analysis of inpatient database. *Geriatr Gerontol Int*, 12, 761-762, (2012).
 5. Leelakanok N, Holcombe AL, Lund BC, Gu X, Schweizer ML. Association between polypharmacy and death: A systematic review and meta-analysis. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 57, 729-738, (2017).
 6. Guthrie B, Makubate B, Hernandez-Santiago V, Dreischulte T. The rising tide of polypharmacy and drug-drug interactions: population database analysis 1995-2010. *BMC Med.*, 13, 74, (2015).
 7. Prasad AS. Zinc: an overview. *Nutrition.*, 11, 93-99, (1995).
 8. Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K. Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *J Clin Invest.*, 122, 722-732, (2012).
 9. Najafabadi MM, Faghihi G, Emami A, Monghad M, Moeenzadeh F, Sharif N, Davarpanah Jazi AH. Zinc sulfate for relief of pruritus in patients on maintenance hemodialysis. *Ther. Apher. Dial.*, 16, 142-145, (2012).
 10. Sanada S, Kuze M, Yoshida O. Beneficial effect of zinc supplementation on pruritus in hemodialysis patients with special reference to changes in serum histamine levels. *Hinyokika. Kyo.*, 33, 1955-1960, (1987).
 11. Takai Y, Hiramoto K, Nishimura Y, Uchida R, Nishida K, Ooi K. Association between itching and the serum zinc levels in patients with varicose veins. *J Pharm Health Care Sci*, 3, 24, (2017).
 12. Tonelli M, Wiebe N, Hemmelgarn B, Klarenbach S, Field C, Manns B, Thadhani R, Gill J; Alberta Kidney Disease Network. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 19, 25, (2009).
 13. Filler G, Felder S. Trace elements in dialysis. *Pediatr Nephrol.*, 29, 1329-1335 (2014).
 14. Biró T, Ko MC, Bromm B, Wei ET, Bigliardi P, Siebenhaar F, Hashizume H, Misery L, Bergasa NV, Kamei C, Schouenborg J, Roostermann D, Szabó T, Maurer M, Bigliardi-Qi M, Meingassner JG, Hossen MA, Schmelz M, Steinhoff M. How best to fight that nasty itch - from new insights into the neuroimmunological, neuroendocrine, and neurophysiological bases of pruritus to novel therapeutic approaches. *Exp Dermatol.*, 14, 225-240 (2005).
 15. Keithi-Reddy SR, Patel TV, Armstrong AW, Singh AK. Uremic pruritus. *Kidney Int.*, 72, 373-377, (2007).
 16. Ozen N, Cinar FI, Askin D, Mut D. Uremic pruritus and associated factors in hemodialysis patients: A multi-center study. *Kidney Res Clin Pract.*, 37, 138-147 (2018).