

第80卷第1号

平成15年

3月

慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

綜 説

- 最近の慢性透析療法の動向……………黒田 重臣……………(1)

学 会 展 望

- 第53回慶應義塾大学伊勢慶應病院医学会……………(9)

学 位 論 文

- 慢性心房細動症例に対する電氣的除細動後の心房電氣生理学的指標の変化……………佐藤 俊明……………(T1)

- 日本人のケラトエピセリン関連角膜ジストロフィの分子遺伝学のおよび

- 免疫組織学的解析……………小西美奈子……………(T13)

- インスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常に関与する遺伝子多型の検討……………石井 達哉……………(T25)

号 外

- 博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第166号)……………(別頁)

- 博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第167号)……………(別頁)

Vol 80 No 1
March 25, 2003

慶應醫學會

慶應医学会誌についてのお知らせ

去る平成14年5月13日開催の医学研究科委員会（博士課程）において、学位申請論文（主論文）の取り扱い方法に改訂があり、主論文としては単独名によって発表された論文（原著）の他に、英文共著論文（筆頭著者であること）、慶應医学学位申請論文が認められました。慶應医学学位申請論文により審査を受ける際には、先ず学位審査が行なわれ、その結果、必要があれば論文に追加・改訂を行い、これを慶應医学に学位論文として掲載することとなっています。これらの変更にしたがい、既に投稿されていた学位申請論文の多くは、学位審査の結果待ちとなり、今回の発刊が遅れる原因となりました。また、原著論文や英文共著論文で学位審査を受ける学位申請者も増加傾向にあり、慶應医学への学位申請論文の投稿数も減少しております。これらの事態を踏まえ、「慶應医学」もその掲載内容の改訂を行うとともに、その発行回数を年4回の季刊とすることといたしました。掲載内容の改訂といたしましては、旧来の原著、総説、講座、話題、学位申請論文、各種慶應医学会関連学会抄録に加え、北里賞、北島賞、三四会賞、などの学内の各賞受賞者の受賞対象業績の紹介、坂口記念医学振興基金奨励研究を始めとする慶應義塾の各種研究助成による成果の紹介、総合医科学研究センターでの各研究紹介、などの広い範囲にわたり、慶應義塾大学医学部における研究の最前線を掲載していきたいと考えております。発行回数の減少など、購読者の皆様には、御不便をおかけする面もあるかと思いますが、紙面の充実によりその点を補ってまいりますので、今後とも会員の皆様の御理解と、御指導、御助力のほど御願いたします。

「慶應医学」編集委員会

綜 説

最近の慢性透析療法の動向

国立東静岡病院

黒 田 重 臣

Key words : 透析機器, 透析医療, 人的資源, 疾病構造, 医療経済

はじめに

近年, 透析療法は腎不全に対する治療法として確立したといっても過言ではなからう。2001年12月末現在, わが国では約21万9千人以上の慢性腎不全患者が透析治療の恩恵を受け¹⁾, 社会復帰し, 日常生活に多少の制限はあるものの健常者と変わらない社会生活を営んでいる。この背景には, 多くの研究者による努力の集積と試行錯誤があり, 実用面からの取捨選択が行われ, 今日の透析療法が築かれてきたといえることができる。しかしながら, 最近10年間の慢性透析療法を取り巻く環境は, 以前に比べると大きく変化してきている。これにはいくつかの要因が考えられるが, 重要な要因としては, 透析療法の進歩, 疾病構造の変化, 人口構造の変化, 医療経済情勢の変化などがあげられる。透析医療に直接従事している透析専門医師は無論のこと, 慢性腎不全患者に日頃接する機会のある医師は, これらの状況を十分認識し, 今後の診療に従事して行く必要があると思われる。

1. 透析療法の進歩

1) 機器の進歩

1943年コルフが回転ドラム型人工腎臓を用い, 世界で初めて体外循環による血液透析に成功し²⁾, 本邦では1967年から本格的な慢性腎不全治療に向けて組織的な取り組みが行われた。透析治療が始まった初期の人工腎臓装置は原液と希釈水を混合して透析液を作成するポンプ部, 圧力計, ヒータ, 流量計などで構成される簡単な供給装置で, 他に血液ポンプ, ヘパリン注入器を必要とした。当初は個人用透析装置しかなく, 多くの患者に対応することは困難であった。その後透析液供給装置の技術開発が行われ, 現在では操作性, 安全性のみならず透析液の清浄化(エンドトキシンの除去), 水処理装置,

血液ポンプ, ヘパリン持続注入器, 気泡検知器, 回路遮断器, 漏血計などが組み込まれた多人数用透析装置が完成し, 同時に多数の患者に対応可能なシステムが確立された。更に, 患者の状態にそれぞれ対応する目的で, 個人用透析供給装置の開発も行われ, 現在では患者のベッドサイドにおいても特別の医療機器を必要としないで, 安全にかつ容易に透析療法が可能となっている。患者の徐水量に関しても, それまで透析医の経験に頼って設定していたが, 最近では透析装置に徐水計が内蔵されており, 簡単にまた安全に行えるようになってきている。

透析液に関しても, 大きな改善が加えられている。当初はpH調整剤として酢酸を用いた, いわゆる酢酸透析が行われていた。しかしながら, 酢酸透析液を使用した治療では急速なダイアライザの性能向上により, 酢酸負荷の増大, 心拍出量の減少, 末梢血管拡張作用が起り心循環器系に与える影響が増大し³⁾, 透析困難症に陥る症例が増加した。このような酢酸の有害な作用は, 急性, 慢性の合併症に結びつくことが疑われ, わが国では1980年頃より重炭酸透析に移行していった。重炭酸透析は, 体液の生理的な緩衝剤という点では生理的であるが, 重曹が難溶性であること, CaやMg塩が沈着すること, 長期間の保存が出来ないなどの問題点があった。これらは, Caと重炭酸を別の容器に入れ(重炭酸以外の電解質はA液, 重炭酸Na液はB液), 使用直前に混ぜること, 流路系が大気に触れないように密閉することなどで解消された⁴⁾。

透析膜に関しても, 溶質除去性の向上とともに, 生体適合性を上げるべく改良がなされている。第1表に最近血液浄化法に使用されている膜材質と主な使用用途を示す⁵⁾。最近では透析膜は孔径が大きくなってきており, 濾過膜, 透析濾過膜との隔たりがなくなりつつある。20年ほど前は, 直径が4mm程度の再生セルロース膜が一般的に使用されていた。しかし, この膜は低分子蛋白

第1表 膜材質と主な使用用途

膜材質	血液透析	血液透析濾過	血液濾過	血漿交換	腹水処理
再生セルロース 銅アンモニウムレーヨン 脱酢酸セルロース	○				
セルロースアセテート セルロースジアセテート セルローストリアセテート	○	○	○	○	○
エチレンビニルアルコール (EVAL)	○	○		○	○
ポリアクリロニトリル (PAN)	○	○	○		○
ポリアミド (PA)			○		
ポリエチルポリアリルポリマーアロイ (PEPA)	○	○			
ポリエチレン (PE)				○	○
ポリカーボネート (PC)				*	
ポリスルホン (PS)	○	○	○	○	○
ポリプロピレン (PP)				○	
ポリメチルメタクリレート (PMMA)	○	○	○	○	

* 献血用血漿採取小型モジュールに使用されている

質を除去する能力がなく、アミロイドシスの原因物質と考えられている β_2 -ミクログロブリン (以下 β_2 -MG) の除去は困難で、大量の β_2 -MG の蓄積が生じた。1980年代に入ると大孔径化が試みられるようになったが、アルブミンが大量に漏れ低アルブミン血症をきたすため好ましくなく、大孔径化の限界が模索された時代でもある。1980年代半ばには β_2 -MG が透析アミロイド症に深く関係していることが判明し、分子量1万程度の β_2 -MG 以上の物質も除去すべきであろうという考えが主流を占めるようになってからは、膜孔径のみならず、膜の三次元的な構造も種々検討されつつある。

2) ブラッドアクセスの進歩

ブラッドアクセスは、透析療法にとって透析療法のシステムと同様、重要な問題点である。慢性透析患者のように20年以上も反復治療を必要とする症例には、生命線とも考えられる。ブラッドアクセスの歴史は、1960年に Quinton らが開発した外シャントの臨床応用に始まるといえる⁹⁾。しかし、外シャントの合併症には血栓形成や出口部感染、外シャント部出血、事故などがあり、完全なものとはいえなかった。これらの外シャントの欠点を補ったものとして、Brescia ら¹⁰⁾によって橈骨動脈に動静脈瘻を作製し静脈の動脈化を図り、この静脈を直接穿刺することによって十分な血流を確保できるようになって慢性腎不全患者の長期慢性透析が可能となり、延命効果を生んだといえる。この変法として、Tabacière

法がある。この方法は解剖学的煙草盆部で橈骨動脈の手背側の分枝と橈骨皮静脈を側側吻合する方法で、慢性腎不全患者では長期間シャントを使用する関係上、出来るだけ末梢側からシャントを作製するという原則からは理にかなった方法といえる。以後、多くの患者に対して Brescia 法や Tabacière 法である内シャントで透析が行われている。また、緊急用ブラッドアクセスとしては、Shaldon ら¹¹⁾によって開発された中心静脈に挿入するカテーテルが使用されている。このカテーテルも改良され、ダブルルーメンやトリプルルーメンカテーテルが最近では使用されており、ヘパリンやウロキナーゼで表面をコーティングし血栓形成が生じないよう工夫されたものもある。材質の硬さは、テフロン>ポリウレタン>シリコンの順に軟らかく、シリコンの場合は硬質のスタイレットを必要とする。さらに最近では、高齢者や糖尿病由来の慢性腎不全患者の透析が増加している関係で、シャントトラブルが急増してきており、動脈表在化や自家血管移植・人工血管移植など機会が多くなってきている。

3) 治療法の進歩

a) 腎性貧血

腎性貧血は腎不全の代表的合併症であり、腎不全患者の動悸、息切れ、易疲労感、集中力低下、食欲不振、心不全などの原因ともなり、患者のQOLを著しく低下させるので、その対策は慢性透析患者にとっては大きな課題であった。エリスロポエチンが開発されるまでは、輸

血で対応するしか効果的な手段はなく、その副作用である肝炎の発症が透析患者においては異常に高かった。現在では、このエリスロポエチンは遺伝子組み換え技術により大量に合成が可能となり、すでに臨床応用されており、劇的な効果をおさめている。ホルモンの増量によりいくらかでも貧血を改善できるが、臨床症状改善の限界、高血圧の増悪、血栓性合併症の増加などから検討され、ヘマトクリット 25~30%が適当とされている。

b) 高リン血症・二次性副甲状腺機能亢進症・骨代謝異常

高リン血症や二次性副甲状腺機能亢進症は、慢性腎不全状態では避けがたい病態である。この原因は、腎機能低下に伴って尿細管でのリンの排泄障害が生じるためである。この結果として、低カルシウム（リン・カルシウム積を一定に維持する目的）血症を引き起こす。この低カルシウム血症の改善目的でホメオスターシスが働き、二次性副甲状腺機能亢進症が発症し骨からのカルシウム流出が引き起こされ、慢性透析患者特有の骨代謝異常が生じる。1980年代までリン吸着剤として水酸化アルミニウムの大量長期投与が行われていたが、研究の結果、これに由来するアルミニウム脳症の問題が判明した。この臨床症状としては、言語障害、筋攣縮を初発症状とし、精神症状（無関心、記憶力低下、幻覚、異常行動、譫妄）、運動障害（失調、ミオクロームス）が特徴的である。現在では、水酸化アルミニウム製剤を腎不全患者に投与することは禁忌とされており、腎不全患者を腎臓の専門家以外の医師が診ている場合には注意を要する点である。現在では、リン吸着剤としては、カルシウム製剤が主体であるが、鉄剤⁹⁾など新しいリン吸着剤の開発が試みられている。また、アルミニウム中毒が疑われる場合には、早期のデスフェロキサシン投与によるアルミニウム除去療法が有効である。

二次性副甲状腺機能亢進症・骨代謝異常に対しても、新しい治療法が開発されてきている。健康な腎臓は必要な量だけの活性型ビタミン D (1, 25-(OH)₂VD) を産生するが、腎不全になるとその産生能が低下し、活性型ビタミン D 欠乏状態が起き、更に二次性副甲状腺機能亢進症と相まって複雑な骨代謝異常が生じる。このような病態を改善する目的で、近年慢性透析患者では合成型活性型ビタミン D が日常的に使用されている。更に最近では、慢性腎不全の骨代謝異常にメナテレン製剤（ビタミン K₂ 剤）も使用されるようになってきている。

c) アミロイドーシス

透析アミロイドーシスは、長期透析患者に高頻度に合

併する手根管症候群の研究から明らかにされた病態である。長期透析患者に手根管症候群の合併が多いことが報告されたのは、今から 20 年前のことである。その後、1985 年、手根管滑膜に沈着したアミロイドの生化学分析の結果より、β₂-MG がアミロイド構成蛋白であると同定された¹⁰⁾。このような病態は透析療法開始 5~7 年以後にみられるが、12 年頃に起こる例が最も多い。透析アミロイドーシスに対する根本的治療法は現在確立されていないが、血中の β₂-MG を積極的に除去する対策が試みられている。いわゆる、ハイパフォーマンス膜を用いて β₂-MG をある程度除去できるようになってきた。また、強力に血中の β₂-MG を除去する目的で、臨床に導入された吸着カラム（リクセル）の効果にも期待が寄せられている¹¹⁾。

d) 感染症

慢性腎不全患者では免疫能の低下が認められ、特に細胞性免疫能の低下が著明であり、慢性腎不全のために透析療法を受けている患者にとって、感染症は重要な合併症である。致死的な場合も多く、血液透析患者の主たる死因の年次推移では 1983 年から 1994 年までは第 1 位心不全 (29.6%)、第 2 位脳血管障害 (14.8%)、第 3 位感染症 (13.2%) で推移していた。しかしながら、1995 年には第 1 位心不全 (26.8%)、第 2 位感染症 (14.3%)、第 3 位脳血管障害 (14.2%) と感染症と脳血管障害が逆転し、年々その差は拡大している¹²⁾。この原因としては、10 年以上の長期維持透析患者数の増加と高齢者透析患者数の増加に伴い、免疫能の低下が高度な患者が増加したことによるものと思われる。肺結核の透析患者の罹患率は一般健常人の 50~100 倍といわれている。その治療方針は、非透析患者と変わるところはないが、治療期間は少なくとも 6 カ月以上とされている。

ウイルス性肝炎も透析患者には、発生頻度の高い合併症の一つである。全国の透析患者の肝炎抗原抗体アンケート調査では、Hbs 抗原陽性 1.9%、HCV 抗体 13.5% である。血液透析療法の黎明期には、急性ウイルス性肝炎は透析患者にとっては不可避ともいえる合併症であった。当時、透析器と透析回路のプライミング量が大きく、毎回輸血を用いたこと、輸血のほとんどが売血によっていたこと、肝炎ウイルス抗体スクリーニングは行われていなかったことがあり、患者の輸血後肝炎、さらにスタッフの感染は大きな問題点であった。現在エリスロポエチンの開発により、輸血頻度が低下したこと、輸血血液は献血により供給され、更にスクリーニング方法の確立などで輸血からの感染は激減した。また、院内感染の予防法の普及により、透析患者の B 型肝炎の新規発生は

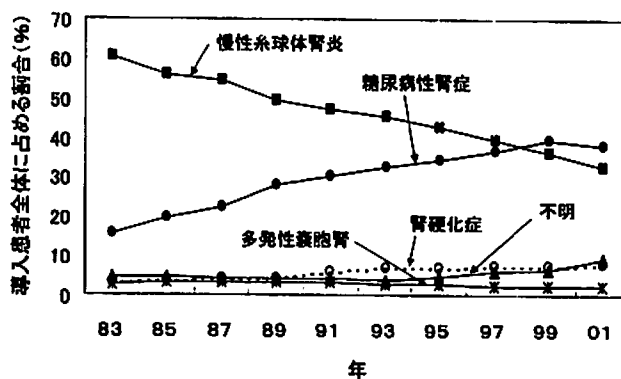
年1%以下となり、B型肝炎ウイルス感染の頻度は年々低下している。ところが、C型肝炎はスクリーニング検査法の確立が遅れたこともあって、その頻度はまだまだ高い¹⁹⁾。透析患者の院内感染の事例を調査すると、ヘパリンボトルを感染者を含む多数の患者に共用したり、患者から他の患者の操作に移動する際に手袋を交換しないなど、当然な感染予防手順を踏み外したときに起きていることが明らかになっている¹⁹⁾。

4) 人的資源の推進

最近の透析医療は、各専門職種のスタッフによって構成され、それぞれの専門職により業務が分担され運営されている。医療チームを形成している職種は、医師、看護師、透析技師（臨床工学士）、検査技師、看護助手、栄養士、放射線技師、クラークなどである。透析医療の開始当初は、医師と看護師のみで行われていたが、約30年間をかけて人的資源の推進がなされ、今日の透析療法の医療チームが形成されてきた。その中でも臨床工学士は、透析機器の複雑化、保守管理業務など、透析医療を円滑・安全に施行するためにはなくてはならない存在となり、1988年より施行された臨床工学士の法制化は透析医療の発展に大きく寄与してきたものと思われる。また臨床工学士とは別に、日本透析医学会、日本腎臓学会、日本人工臓器学会、日本泌尿器学会、日本移植学会からの代表で構成されている透析療法合同委員会が中心となって、学会レベルの資格である透析技術認定士制度も人的資源の推進に大いに役立っている。この制度は、医師の国家資格に相当するものが臨床工学士であり、内科や外科など学会レベルで認定している専門医に当たるものが透析技術認定士に相当する。透析技士認定士の第1回試験は1980年に施行され、現在まで3,598名の透析技士認定士が誕生しており、男性が2,601(72.3%)で、女性が997名(27.7%)となっている。今後の透析療法の更なる発展のためには、このような人的資源の向上や確保へ向けての更なる努力が必要であろう。

2. 疾病構造の変化

日本透析医学会は、1968年から年に1回、全国の透析施設を対象に統計調査を行っている。2000年末の統計調査は、全国の3360施設を対象に実施され、3358施設(99.94%)から回答が寄せられた。この調査結果に基づいた導入原疾患の年次推移を第1図に示した¹⁵⁾。糖尿病性腎症による年度導入患者全体に占める割合は、1998年を境にそれまで第1位を占めていた慢性糸球体腎炎を抜き、第1位となり4年連続して第1位を維持し続けている。これとは逆に、慢性糸球体腎炎患者の割



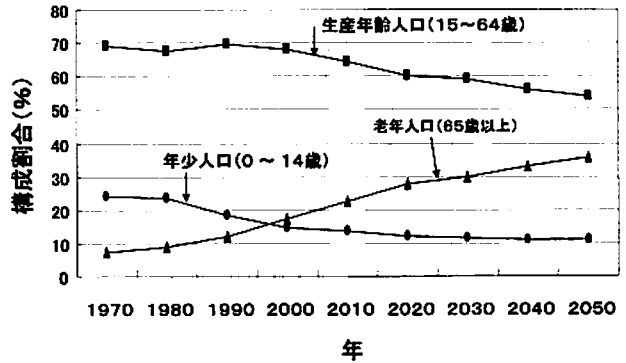
第1図 導入原疾患の年次推移 (導入患者)

合は、1983年には年度導入患者の約60%を占めていたが、2001年末には32.4%となり新規導入患者においても透析人口全体においても減少し続けている。この疾病構造の変化の大きな原因としては、一般健康診断や学校検診の普及により慢性腎炎の早期診断・早期治療が可能になったことがあげられる。一方、糖尿病性腎症の増加の原因としては、日本人の食生活の変化、肥満の増加、運動不足などにより¹⁶⁾、わが国において2型糖尿病が急速に増加した影響が大きいものと考えられる。このような疾病構造の変化が、慢性透析療法の現場で今大きな問題となっている¹⁷⁾。糖尿病が虚血性心疾患や脳血管障害、閉塞性動脈硬化症の危険因子であることはすでに明らかである^{18,19)}。すなわち、糖尿病性腎症による透析導入患者は、そこに至るまでかなり長期の糖尿病に罹患し、また腎不全に至る糖尿病患者はそれだけ糖尿病の管理が悪いことが推測される。そのような患者は、透析導入時にすでに多くの危険因子を有している。まず、慢性透析療法のライフラインともいべきブラッドアクセスの問題がある。慢性腎炎に由来する慢性腎不全の場合には、患者も比較的若く、血管病変はほとんど認められないため、シャント作成も容易であり、術後数日で使用可能となる場合が多い。しかしながら、糖尿病性腎症による慢性腎不全の場合には、血管壁の動脈硬化が強く、また血管内腔も狭いため、シャント作成が困難である。シャント作成が成功しても血流量が少ないため、血管の十分な拡張が得られず、針刺も困難な場合が多い。さらに、一度稼動しはじめたシャントでも、簡単に閉塞しやすく、緊急透析となる場合が多い。このようにシャントトラブルが多い糖尿病性腎症の患者さんに対しては、透析導入の少なくとも2~3ヶ月前にシャント作成が終了するように治療スケジュールを立てる必要がある。このことは透析専門医は十分理解しているが、糖尿病の専門医には意

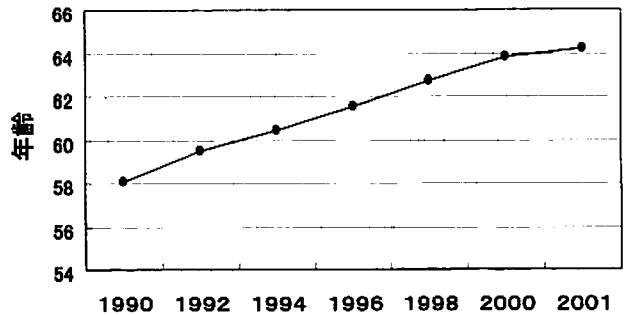
外と理解されていない場合が多い。また、糖尿病性腎症による慢性透析患者においては、シャントトラブル以外にも多くの課題が発生する。糖尿病患者においては、血管や消化管の反応性が低下しているため、少量の徐水でも低血圧発作や虚血性心疾患発作（頻脈、不整脈、狭心症、一過性脳虚血）が誘発される。また、透析患者にはかなりの頻度で便秘が認められるが、糖尿病性腎症による慢性透析患者においては、この頻度がいっそう高まることが多い。さらに、慢性透析患者においては、体外循環の凝固阻止の目的で凝固阻止剤を使用するため、糖尿病性網膜症による眼底出血、脳動脈硬化による脳出血のリスクも当然のことながら高くなる。また、元来糖尿病患者は易感染性を有しているが、慢性透析療法を開始することによって、免疫能の低下を来し易感染性が助長され、結核^{20,21)}やその他の重症感染症の合併がしばしばみられる^{22,23)}。

3. 人口構造の変化

近年、わが国の人口構造の変化が、医療の現場にも大きな影響を及ぼすようになってきている。この現象は、慢性透析医療の現場においても同様に、いろいろな問題が生じてきている。2001年のわが国の人口動態調査によると、第2図に示すように、老年人口は年々増加傾向を示し、総人口に占める割合は18.0%に達している。この傾向は、今後ますます加速され、2020年には27.8%、2030年には29.6%、2050年には35.7%になると予測されている²⁴⁾。この影響を受けて慢性維持透析患者の導入年齢は、第3図に示すように、年々増加傾向を示している。現在、慢性透析医療の現場では、この高齢者の透析が大きな問題となってきている。高齢者透析の問題点としては、身体的問題点と精神的問題点に大別される。まず身体的問題点について考えてみると、老化という現象は全身の細胞・器官・免疫能などが低下することである。したがって、健全な高齢者であっても、何らかの身体的ハンディキャップを負っている。ましてや高齢の慢性透析患者のハンディキャップは、計り知れないものがあり、多くの合併症を有する場合が多い。具体的には、動脈硬化の進展に伴うシャントトラブルや閉塞性動脈硬化症、血管の反応性の低下に伴う低血圧発作・一過性心および脳虚血性発作、高血圧や動脈硬化に伴う脳出血・脳梗塞、高度な皮膚のかゆみなどが代表的である。さらに、加齢に伴う免疫力低下に慢性透析療法に伴う免疫力低下が加味され、重症感染症の合併が起きやすい状態に置かれている。このような状況は、患者自身は無論のことであるが、まわりの家族や医療スタッフにとって



第2図 わが国の年齢3区分人口推移



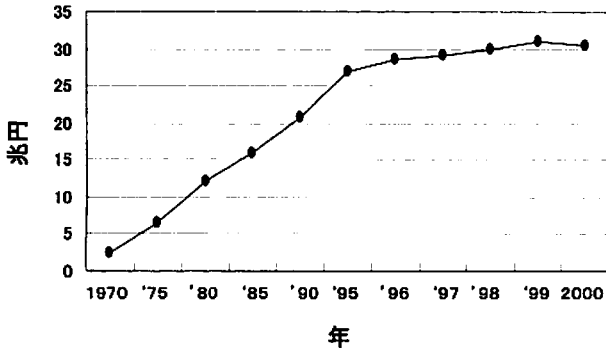
第3図 透析導入年齢の年次推移

も大きな負担となっている。

また、精神的問題点としては、高齢者特有のうつ状態や理解力不足、社会復帰への意欲低下などが多くみられる。慢性透析療法はゴールのない治療法であるため、その治療目標は単なる延命だけでなく、患者自身が感じるQOLの維持と向上であることは明らかである。このQOLの維持と向上意欲を如何に持ってもらうかが、高齢者慢性透析患者の大きな課題であろう。第2図の高齢者の年次推移予測をみても明らかなように、今後この傾向は益々増大する傾向にあると考えられる。この問題は医療のみでは解決することは不可能であり、行政を含めた地域社会と一体となって高齢者の社会への参加できるシステムの構築が必要であろう。

4. 医療経済情勢の変化

わが国の維持透析患者数はすでに約22万人に達しており¹⁵⁾、合併症を想定しない単純試算でも、維持透析に要する医療費が1兆円を超え、わが国の総医療費の1/30に相当する。また第4図に示すように、国民医療費は年々増加し、1999年には30兆円を超えた。2000



第4図 国民医療費の年次推移

年度は、介護保険制度の施行という事情から、対前年度比で-1.9%と初めて減少に転じた。国民医療費の国民所得に対する割合でみても、1955年に3.42%であったものが、2000年には7.98%にまで上昇してきている。現在のわが国の経済状況や老年人口の増加などを勘案すると、今後20~30年間で日本の財政状態が著しく改善される可能性は少なく、医療費の伸びもこれ以上期待しにくいと考えられる。現実に厚生労働省は、医療費抑制計画の一環として、患者負担分の増加、後発薬品の導入、EBMに基づいた医療など新しいシステムの導入を試み始めている。また、EBMを明らかにするために、治療を標準化し、それに照らして医療技術評価をおこなうための診療ガイドラインの作成が行われている。そのために患者を疾病や重症度などを勘案して分類する診断群(DRG: Diagnosis Related Groups)が開発されている。これを基にして、診断別に決まった額を診療報酬として支払う方式(診療群別包括払い: DRG/PPS: Prospective Payment System)が考案され、わが国においても徐々に導入されはじめている。この制度のテストケースとして、慢性透析療法の分野においては、平成12年4月の診療報酬改定で慢性維持透析患者外来医学管理料が制定され、この中に一般的な検査料が包括された。今後は更に、DRG/PPS制度の拡大の一環として、検査料のみならず慢性維持透析全体に及んでくる可能性が大きいと思われる。したがって、今後慢性透析医療の分野においては、より効率的な診療・治療システムの確立が要求されることが考えられる。

おわりに

最近の透析医療を取り巻く環境は、今後ますます厳しくなっていくものと思われる。そのような社会的、経済的、人的環境の中で、如何により安全で質の高い医療を

提供できるかが、透析医療にかかわるすべての医療従事者に課せられた大きな課題である。そのためには、高齢者透析や糖尿病由来の透析患者が急増している現状を十分認識し、相互の連携をこれまで以上に深めて行くことが必要であると考えられる。

文 献

- 1) 医学会統計調査委員会：わが国の慢性透析療法の現状(2001年12月31日現在). 78-79, 2002
- 2) Kolff WJ: First clinical experience with artificial kidney. *Ann Int Med* 62: 608-619, 1945
- 3) 山川 真, 山本忠司, 他: アセテート代謝と透析不快感. *透析会誌* 14: 147, 1981
- 4) 石原則幸: バイカーボナート透析液の製剤化の問題点. *透析フロンティア*, 2 (4): 9-14, 1992
- 5) 峰島三千男, 竹沢真吾: 血液浄化療法の工学的基礎知識. *血液浄化療法ハンドブック 改訂ダイ版 (透析療法合同専門委員会編集)*, 協同医書出版社, 東京, pp.131-166, 1998
- 6) Quinton WE, Dillard DH, Scribner BH: Cannulation of blood vessel for prolong hemodialysis. *Trans Am Artif Organs*, 6: 104-108, 1960
- 7) Brescia MJ, Cimino JE: Chronic hemodialysis using vein puncture and surgically created arteriovenous fistula. *New Engl J Med*, 275: 1089-1092, 1966
- 8) Shaldon SM, Chinandussi L, Higgs B: Hemodialysis by percutaneous catheterization of the femoral artery and vein with regional heparinization. *Lancet*: ii: 857, 1961
- 9) Kuroda S, Komori M, Nagamatsu K, et al: Effect of iron as a new type of phosphate binder in hemodialysis patients. *Japanese Society of Nephrology*, 37: 468-473, 1995
- 10) Gejio F, Yamada T, Odani S, et al: A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β_2 microglobulin. *Biochem. Biophys. Res Commun* 136: 701-706, 1985
- 11) 下条文武, 本間則行, 長谷川伸, 他: 透析アミロイドシスに対する直接血液灌流型 β_2 吸着器 (BM-01) の臨床効果. *腎と透析*, 37: 749-756, 1994
- 12) 医学会統計調査委員会：わが国の慢性透析療法の現状(2001年12月31日現在). 489, 2002
- 13) 秋葉 隆, 日台英雄, 黒田満彦, 他: 日本の慢性透析療法を行っている施設での院内感染防止の現状-院内感染防止に関する透析施設調査アンケートより. *日本透析医学会雑誌*, 28 (5): 847-856, 1995
- 14) 透析療法合同委員会: 肝炎・エイズ予防の手引き. 透析療法合同委員会. 東京, 1990
- 15) 会統計調査委員会：わが国の慢性透析療法の現状(2001年12月31日現在). 485-487, 2002
- 16) 赤沼安夫, 本田律子, 戸辺一之: 内科100年の歩み(内分泌・代謝) 糖尿病の歴史. *日本内科学会雑誌*, 91: 1195-1201, 2002

最近の慢性透析療法の動向

- 17) 吉本敬一, 飯田博行, 内藤毅郎, 青木周一: 当院における糖尿病性腎症による透析患者の合併症と予後に関する検討. 日本透析医学会雑誌, 35: 1119-1123, 2002
- 18) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 329: 977-986, 1993
- 19) Ohkubo K, et al: Intensive insulin therapy prevents the regression of diabetic micro vascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A randomized prospective 6-year study. Diabetes Res Clin Prac 28: 103-117, 1995
- 20) 稲本 元: 透析患者の結核症. 日本透析医学会雑誌, 20: 165-176, 1987
- 21) 透析医療における感染症の実態把握と予防対策に関する研究班: 透析医療における標準的な透析操作と院内感染予防に関するマニュアル. 厚生省厚生科学特別研究事業, 平成 11 年度報告書, 2000
- 22) 秋葉 隆, 川口良人, 黒田満彦, 二瓶 宏, 日台英雄, 山川 真, 山崎親雄, 丸茂文昭: 日本の透析施設における HCV 感染に関する実態調査. 日本透析医学会雑誌, 27: 77-82, 1994
- 23) 黒田満彦, 森河 浄: 透析患者における輸血関連ウイルス感染の実態調査. 平成 3 年度厚生科学研究「腎不全医療研究事業研究報告書」. p.223-230, 1992
- 24) 厚生統計協会: 国民衛生の動向. p.34-39, 2002

第53回 慶應義塾大学伊勢慶應病院医学会

日時：平成14年11月27日（水）PM4:30～

場所：7階ホール

座長：1～6 中島泌尿器科部長 山西外来婦長

7～11 新川内科副部長 真鍋整形外科リハビリテーション室主任

1. ボケの傾向と対策：手術で治る痴呆

脳神経外科(医)

堂本洋一, 大泉太郎

【傾向】痴呆（ボケ）とは、記憶力が衰え、これまでの人生で獲得した知識や能力が低下し失われ、性格が変化し人格の崩壊して、社会生活も日常生活にも支障をきたす病的な状態です。原因の6割は、脳血管性痴呆で、脳の血管に何らかの障害が起こって痴呆症状が現れます。

【タイプ】①一時的要因として、アルツハイマー型痴呆・脳血管性痴呆・その他の痴呆（慢性硬膜下血腫、正常圧水頭症、脳腫瘍、甲状腺機能低下症、薬の副作用等）②二次的要因として、精神的要因、身体的要因、環境的要因がある。

【症状】①記名・記憶力の著明な障害、見当識障害、計算力障害。②夜間せん妄、幻覚・幻聴、不安・焦燥、徘徊・多動、意欲低下、自発性低下、抑うつである。

【対策】①早期発見：「単なる物忘れ」と「ボケの物忘れ」を評価。簡単な改定長谷川式簡易知能検査で診断可能。②早期診断：MRIや脳血流シンチ、脳細胞の萎縮するアルツハイマー型痴呆やその他の痴呆を鑑別し、時に手術で治せる痴呆もある。③予防：危険因子である高血圧、糖尿病、高脂血症、心臓病などの生活習慣病を予防・治療することが脳血管性痴呆を予防することにつながる。

2. 4階病棟の動向と老人看護への第一歩

～不穏状態に陥った高齢患者の事例検討を行って～

4階病棟(看)

中村晃美, 村田愛子, 三輪安子
浅沼厚子, 北村かおり

平成14年7月、小児科病棟が閉鎖され、当病棟は大きく変化した。平成12年度では入院患者の62%が小児科であったが、平成14年度では8%と減少し、内科が53%を占めるようになった。それに伴い、年齢においても65歳以上の高齢者が16%から48%へと増加している。

このように高齢者が増えたことは看護にも大きく影響を及ぼしている。高齢者は適応能力が低下する傾向にあり、入院による環境の変化に適応できず混乱を生じ、不穏状態に陥る場合がある。当病棟でも、入院後早期に不穏状態に陥る患者をよく経験するようになった。そこで、不穏状態に陥った患者の症状とその要因を調査し、事例を含めて援助のあり方を検討した。

その結果、以下の事柄を得ることができた。1. 「高齢」「絶食」「持続点滴」「ベッド上安静」「睡眠障害」という条件は不穏状態を引き起こす可能性が高い。2. 看護者は患者のストレス因子を知り、症状への対応、悪化の予防、安全の確保に努めなければならない。3. 看護者は自身の感情を客観視し、患者と対決しないことが大切である。4. 必要な治療の継続や安全の確保のための抑制は、判断が難しく今後の課題である。

3. 習慣性喫煙者における呼気中CO濃度、尿中コチニン濃度測定の意義～習慣性喫煙症としての認識～

内科(医)

今井孝俊, 松村圭祐, 内藤広太郎
木村納子, 西山 敦, 倉田好人
新川 修, 毛利 博, 都島基夫

研究室(栄)

仲森隆子

【目的】喫煙は様々な疾患のリスクファクターとして認識されているが、習慣性喫煙症という病態としては認識されていない。今回呼気中CO濃度、尿中コチニン濃度の測定により、診断としての有用性を検討した。

【対象・方法】三重県紀勢町2001年度検診受診者のうち、喫煙者48名（平均年齢58.75歳）、非喫煙者235名（平均年齢59.44歳）において、早朝空腹時、非喫煙時にGC-MS法で尿中コチニン濃度と、定電位電解法によるCO測定器で呼気中CO濃度（COHbに換算）を測定し、比較検討した。

【結果および考察】COHbは喫煙者で2.07%（n=44）、非喫煙者で0.29%（n=216）であり、尿中コチニン濃度は喫煙者で1.40 μg/ml（n=43）、非喫煙者で0.06 μg/ml

(n=37)と有意差を認め、またHbは喫煙者で15.47g/dl、非喫煙者で13.99g/dlであった。このことより習慣性喫煙は慢性一酸化炭素中毒の状態であり、他への影響もあわせた習慣性喫煙症と認識し得る。

【結語】習慣性喫煙者においてCOHb、尿中コチニン濃度は有意に上昇し、習慣性喫煙症の病態と考えられた。

4. 上部消化管撮影におけるDigital radiographyとフィルム/スクリーン系の一検討

放射線(技)

水崎 繁, 浅野真吾, 川野聡子
山中章義, 小林正温, 扇田道行
溝井 力

放射線科(医)

佐藤浩三, 陣崎雅弘

外科(医)

米川 甫

近年の医療画像Digital化に伴ない、上部消化管撮影においてもフィルム/スクリーン系(F/S系)からDigital radiography(DR)に移行する施設が増加傾向にある。DRは、画像処理が可能でネットワークに対応し、画像保管の面においても有用である。しかし、当院ではDRを用いた上部消化管撮影の経験が乏しい。そこでDR装置の消化管撮影の画像処理条件を修正・調整し、得られた画像とF/S系で撮影した画像で比較を行なった。画像処理条件を調整した結果、F/S系に近づくことが可能となったが、解像度や視野などの問題も残った。また検査の現状やスタッフの体制など、上部消化管撮影のDigital化が困難な要因が多く存在するが、将来に向けて更なる検討が必要と考えられた。

5. 尿管遺残5例の治療経験

外科(医)

今井 俊, 山本 裕, 萬谷京子
米川 甫

当科で過去10年間に経験した尿管遺残5例につき、代表的な最近の治療経験を中心に文献的考察を含めて報告する。

症例は31歳男性。平成14年6月30日夕刻、腹痛、食欲不振のため当院内科受診、急性虫垂炎の診断で同日外科転科となる。腹部CT検査では、糞石を伴う虫垂腫瘍と診断され、同時に臍下部より骨盤腔に連続するcystic lesionを認めた。又、腹部超音波検査でも膀胱上方から臍下部につながる88×27mm大のcystic lesionを指摘された。腹膜刺激症状が増悪し、汎発性腹膜炎の診断で手術を施行した。開腹時、正中創臍下部、腹膜と腹横筋膜との間に尿管の遺残を認め、内腔には淡黄色透明の液が充満しており、感染兆候は認めなかった。切除した遺残尿管の病理組織学的検索では、鬱血、出血を伴うfibrous tissueを認めたが、起源は判別できなかった。術後経過は概ね良好で、1ヶ月後に退院した。

本例は無症候性尿管遺残症であり、Blichert-Toft分類では尿管嚢胞に分類される。

6. 2階西病棟における14年度上半期の現状報告「泌尿器科を中心に」

2階西病棟(看)

溝井くにあ, 2階西病棟スタッフ

医事課(事)

磯崎剛士

平成14年6月、5F病棟閉鎖に伴い、新しく2F西病棟に泌尿器科患者を受け入れることになった。併せて看護師の勤務交代も行われ、いかに業務をスムーズに行うかを考えながら今日まで来た。新しく泌尿器科患者を加えての病棟業務と個室の使用状況等、14年度上半期の現状報告を行い、今後役に立てたい。

2F西病棟はベッド数47床で、そのうち個室は10床である。14年4月1日からの新入院患者数は387人である。平均在院日数が泌尿器科患者を受け入れたことにより6月から少なくなっている。入院日は月曜から木曜に多く、退院日は月曜と土曜に多い。整形外科は全身麻酔、腰椎麻酔の手術が多く、泌尿器科は腰椎麻酔、形成外科は局所麻酔+静脈麻酔の手術が多い。

個室の使用状況はほぼ満床である。しかし、入院予約が早くから判っていれば、主治医や患者様との交渉で何とか可能である。

泌尿器科には手術やESWL以外にも泌尿器科独特の特殊性があり、私達看護師の専門性も必要とされる。短期入院については、クリニカルパスを使用して、個室の回転をスムーズに行ってゆくのもひとつの方法であると考えられる。

7. 電子カルテについて

医事課(事)

服部剛久

昨今のオーダリングシステムでは、いわゆるオフィスコンピュータの類はその開発自体が打ち切りとなり、すべてパソコン版に取って代わられてゆく様相で次世代への転換が伺える。現システムの機種変更時期を迎え、オーダリングによる情報伝達の機械化の善し悪しを経験した当院では、次のステップとしてやって来る時代の波、すなわち「電子カルテ」や「レセプト電算処理システム」に目を向ける必要があると考え、本発表を行った。

電子カルテとは院内のスタッフが専門分野の壁を越え「リアルタイムで情報を共有化するためのコミュニケーションツール」であり、レセプト電算処理システムは「医事レセプト点検作業の自動チェック機能」と「電子媒体を用いたペーパーレス化」の大きな二つの流れとなっている。

これまで発売された電子カルテはベンダー側の意向ばかり

を取り入れた、「オーダリングシステムの延長線」という感がある。津山中央病院では、臨床現場の Dr. が中心となり、実際に現場で使えるシステムを開発し、1999 年 12 月より稼動しており、3 年経った現在も順調に稼動している。このシステムの特長は PDF 方式の採用であり、今年より両備システムズが「TC-KARTE」として販売を開始した。これを例に「ユーザー側の視点に立ったシステム」への方向転換の必要性を説く。

今回は研究発表というよりはむしろ、教職員に対して新たなシステムの基本的な部分の理解を図り、その上で当院独自の環境整備の推進を提唱することを目的とする。

8. 褥創について～治療を中心に

形成外科(医)

石井直弘, 深津雅史

高齢化社会の到来とともに、脳血管障害や悪性腫瘍のため寝たきり状態を余儀なくされている患者が増加している。また交通事故などによる脊髄損傷の患者も増加している。

褥創はこういった患者の再生能力の衰えた皮膚に持続的な圧迫が加わることによって生じる。

褥創に苦しむ患者はここ数年で驚異的に増加し、現代医療の場で重要な問題となりつつあり、各科医師はその基本的知識、適切な治療法を身に付けていることが望まれる。さらにその予防と治療は医師のみならず、看護に携わる看護師・介護士・ホームヘルパーとともに一体となってチーム医療を行なう必要がある。

9. 輸血用血液製剤の使用状況について

中央臨床検査室(技)

辻佐江子, 西尾清孝, 山際正行

輸血療法は、現代医療において欠くことのできないものとなっているが、そういった中で、貴重な血液を無駄にすることなく、有効に利用する事が強く求められている。こうした観点から、厚生省より血液製剤使用の適正化に関するガイドラインが出され、その中で、血液管理の一元化が推奨されている。当院においても平成 9 年 5 月より、輸血業務の効率化、安全性の確保のため、検査室での一元化を始めた。

過去 5 年間の血液製剤の使用状況は、新鮮凍結血漿 (FFP)、濃厚血小板 (PC) はともにほぼすべて使用されているが、赤血球 MAP (MAP) については、供給数だけが増え続け、使用率としては減少してきている。

今年の 10 月より、血液センターへの期限切れ MAP の返品が廃止になったことを機に、今後、MAP を最大限に有効利用するため、検査室としては、不要 MAP の早期返品、T & S・ダブルクロス採用、自己血輸血の推進などに取り組んでいきたい。

10. 妊娠女性の身体状況と食習慣の検討

研究室(栄)

仲森隆子

産婦人科(医)

金杉 優, 細川知俊

内科(医)

都島基夫

研究室(事)

相沢洋志郎

【目的】近年、我国において、若年女性の食習慣が、過食による肥満傾向とダイエット治療と称して栄養不足に陥るといった二分化が問題となっている。新しい細胞や組織をつくらねばならない妊婦にとって、妊娠中の栄養や食生活の管理は重要である。今回、妊娠女性について、このような若年者の食生活の乱れの影響を知る目的として食習慣調査を行ったので報告する。

【対象および方法】1998 年から 2002 年 2 月の間に受診した 18~43 歳の連続症例 140 人のうち、当院で出産、平均 14 週の血液検査データが揃った妊婦 (P 群) 79 人 (平均年齢 29 歳) と、対象として 2000 年と 2001 年に健康調査を受診した健康住民女性 (I 群) 36 人 (平均年齢 30 歳) を用いた。血液検査については、外来妊娠女性群は 14 週時の随時で、血圧については、20 週時とした。I 群については、空腹時を用いた。妊婦の BMI については非妊時の体重を用い、妊娠中毒症の判定には我国の基準を使用した。P 群には食習慣調査を行った。

【結果】収縮期血圧では、妊娠中毒発症群 (G 群, 24 人, 平均年齢 30 歳) で、妊娠中毒未発症群 (N 群, 55 人, 平均年齢 29 歳), I 群より高値傾向で、ヘモグロビンでは、逆に、G 群の方が N 群, I 群より有意に低値であった。次に、経産婦は N 群 27 人 (49%), G 群 12 人 (50%) で、就業者は N 群 30 人 (55%), G 群 11 人 (46%) であった。非妊時の BMI については、N 群が $20.4 \pm 2.7 \text{ kg/m}^2$, G 群が $22.1 \pm 4.6 \text{ kg/m}^2$ であった ($p < 0.05$)。食品摂取習慣では N 群と比べ G 群の方が豚肉、鶏肉、油脂類の摂取頻度が週に 3 回以下と少なかった。

【結語】妊娠期には胎児、胎盤、母体中に蓄積される蛋白質の摂取量が必要である。妊娠前期において、豚肉、鶏肉などの蛋白質の摂取頻度が妊娠中毒症群に少なかった。

11. 頸椎低侵襲手術の経験

整形外科(医)

照屋 徹, 芦田利男, 原田大朗
川北敦夫

今回、われわれは低侵襲頸椎後方アプローチにより、外固定を用いず術後安静期間の短縮を得た症例を経験したので報告する。

【症例】症例は 50 歳、男性。主訴は四肢の脱力感で、頸椎後屈強制により受傷した。初診時は第 5 頸椎以下での

Frankel 分類Cの麻痺を呈していた。レントゲン画像上は明らかな骨傷は認めず、MRI では第4/5 頸椎レベルの椎間板ヘルニアと同レベルでの脊髄の輝度変化を認めた。頸椎損傷の診断で保存療法を施行し、自力歩行可能な状態まで回復した。頸椎後屈時の脊髄刺激症状と、これに伴う運動制限が改善しないため、手術を施行した。術後、1日目から頸椎装具は使用せず歩行を開始した。術後7カ月の現在、四肢のしびれ感は消失し、頸椎の運動制限も無く、調理師の仕事に復帰している。

【考察】従来の頸椎後方アプローチによる後方除圧手術では、頸椎の深層筋群に対する大きな侵襲があるため、これに伴う術後の安静期間と頸椎装具による外固定が必要である。低侵襲頸椎後方アプローチにより、術後超早期の離床が可能であり、頸椎後弯を来しにくいと考える。

(ポスター1)

直腸瘻および骨盤内巨大腫瘍を形成した回腸原発腫瘍の1例

外科(医)

山本 裕, 今井 俊, 萬谷京子
米川 甫

【症例】50歳, 女性。平成12年8月, 全身倦怠感を主訴として当院内科受診。Hb 3.9 FBS 395にて輸血, インスリン等にて治療し症状改善す。平成13年5月, 下痢にて内科受診し再度貧血指摘され入院となる。経過中にイレウス症状なし。CT・MRI 検査: 骨盤内腫瘍を認め, 膀胱, 子宮等への浸潤が疑われ両側水腎症を呈していた。CF: Rsにtype3の腫瘍。Angio: 上直腸・回腸・右卵巣(TAE施行)動脈よりfeeding。注腸・小腸造影: Rsと回腸に瘻孔あり。2x/週の輸血を要すため, 貧血のコントロールと食事摂取を目的として手術に踏み切った。手術所見: 腫瘍は左卵巣, 直腸, 回腸, 子宮, 尿管, 腹壁への直接浸潤を認めた。Miles手術。

回盲部, 両側卵巣, 腹壁を合併切除。病理所見: 粘液癌, 高・中分化型腺癌(回腸原発)が混在。S状結腸, 直腸への直接浸潤(+)。術後経過: 比較的良好で, 術後6日目から摂食開始。貧血も改善す。直腸瘻を形成する小腸癌は本邦初の報告例となる。

(ポスター2)

脳神経外科における施設基準設定の矛盾

脳神経外科(医)

堂本洋一

【目的】今回の改定で施設基準が設定されたが, その矛盾につき報告する。

【方法】日本脳神経外科学会が行った専門医指定訓練施設への緊急アンケートの集計結果と三重県の国民保険と老人保険のレセプト資料をもとに分析した。

【結果】脳動脈クリッピング術等の年間50例以上の施設は, 脳神経外科専門医訓練施設1176件中, 101件(8.6%)であった。三重県では1施設, 47都道府県中, 施設のない県は14県であった。特に, 二次保健医療福祉圏においては, 条件を満たす施設は17.9%であった。・脳神経外科は全患者の1%で, 医療費は全体の2%のみである。脳外科入院の31%が8万点以上の高点数レセプトとなり, その内の70%が脳血管障害症例で, 脳動脈瘤は33%も占めていた。一方, 破裂脳動脈瘤の1名あたりの入院総医療費は300~400万円で, 発症時の重傷度や合併症, 入院日数により高額となり, 手術料の影響は少なかった。

【結論】施設基準の設定による手術料の減額は, 医療費の削減に効果なく, 二次医療圏における救急医療の確保による, 地域住民に密着した高度な医療を提供する体制作りに矛盾すると思われる。(要旨は, 第61回日本脳神経外科学会総会シンポジウムと第64回日本臨床外科学会総会シンポジウムで発表)

雑 報

慶應医学会例会第 1280 回

日時 平成 14 年 10 月 16 日(水) 午前 11 時 00 分
場所 新棟 11 階大会議室
演題 記憶形成素子としてのグルタミン酸受容体の構造と機能—ミュータントマウスがもたらす新しい知見
演者 柚崎通介博士
Associate Member, Developmental Neurobiology, St. Jude Children's Research Hospital
担当 生理学教室

慶應医学会例会第 1281 回

日時 平成 14 年 10 月 17 日(木) 午後 1 時
場所 新棟 11 階中会議室
演題 SF-1 : a key mediator of endocrine development in mice and humans
演者 Keith L Paker, MD, PhD
Professor, Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA
担当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1282 回

日時 平成 14 年 10 月 17 日(木) 午後 6 時 00 分
場所 新棟大会議室
演題 The use of a novel adult stem cell in tissue engineering
演者 Charles A Vacanti, MD
Chairman and Professor, Department of Anesthesiology, Brigham & Women's Hospital, Harvard University, Boston, MA, USA
担当 整形外科学教室

慶應医学会例会第 1283 回

日時 平成 14 年 10 月 18 日(金) 午後 5 時 00 分
場所 新棟 11 階大会議室
演題 1) Gene therapy of hemophilia
2) Molecular basis of von Willebrand disease
演者 1) Gilbert C White II, MD
Chairman and Professor, Division of Hematology-Oncology, University of North Carolina, School of Medicine, Chapel Hill, NC, USA
2) Robert R Montgomery, MD
Professor, Department of Pediatrics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA
担当 中央臨床検査部

慶應医学会例会第 1284 回

日時 平成 14 年 10 月 29 日(火) 午後 5 時 00 分
場所 新教育研究棟 2 階講堂 1
演題 Clinical manifestation and cause of skin aging in Asian
演者 Jin Ho Chung, MD, PhD
Associate Professor, Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea
担当 皮膚科学教室

慶應医学会例会第 1285 回

日時 平成 14 年 10 月 22 日(火) 午後 6 時 00 分
場所 本館臨床講堂
演題 ポリビアにおける消化器病の現状
演者 神谷利明教授
Professor & Chairman, Department of Gastroenterology, Christican University of Bolivia, Bolivia
担当 内科学教室

慶應医学会例会第 1286 回

日時 平成 14 年 10 月 31 日(木) 午後 6 時 00 分
場所 新棟 11 階中会議室
演題 嗅覚：分子機構から生体における感覚調節まで
演者 倉橋 隆博士
大阪大学大学院生命機能研究科生理学研究室教授
担当 生理学教室

慶應医学会例会第 1287 回

日時 平成 14 年 11 月 1 日(金) 午後 1 時 00 分
場所 新棟 11 階中会議室
演題 神経細胞樹状突起におけるカルシウム動態とその機能
演者 井上貴文博士
東京大学医科学研究所脳神経発生・分化分野助教授
担当 生理学教室

慶應医学会例会第 1288 回

日 時 平成 14 年 11 月 5 日(火) 午後 5 時 00 分
 場 所 教育研究棟 2 階 講堂 1
 演 題 Psoriasis vulgaris : 2002 : more thought than expected
 演 者 Enno Christophers, MD
 Professor & Director, Department of Dermatology, University of Kiel, Kiel, Germany
 担 当 皮膚科学教室

慶應医学会例会第 1289 回

日 時 平成 14 年 11 月 5 日(火) 午後 7 時 00 分
 場 所 新研究棟 4 階 講堂 3
 演 題 Elbow arthroscopy : what you can and can't do
 演 者 Ken Yamaguchi, MD
 Professor, Department of Orthopaedic Surgery, Jewish & Barnes Hospital, Washington University, St. Louis, MO, USA
 担 当 整形外科学教室

慶應医学会例会第 1290 回

日 時 平成 14 年 11 月 12 日(火) 午後 6 時 00 分
 場 所 第一会議室
 演 題 Herbal Medicinal Products in the EU
 演 者 Professor Konstantin Keller
 Director, Federal Institute for Drugs and Medical Devices (BfArM) Bonn, Germany, Chairman of the CPMP working Party Herbal Medicinal Products at the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), London, UK
 担 当 ツムラ東洋医学寄附講座

慶應医学会例会第 1291 回

日 時 平成 14 年 11 月 12 日(火) 午後 6 時 00 分
 場 所 本館臨床講堂
 演 題 アルコール代謝酵素の多型と日本人における特異性と易罹病性
 演 者 原田勝二先生
 慶應義塾大学医学部医化学教室客員教授
 担 当 消化器内科教室・医化学教室

慶應医学会例会第 1292 回

日 時 平成 14 年 11 月 6 日(水) 午後 1 時 30 分
 場 所 総合医科学研究棟 2 階会議室
 演 題 Functions of the renin angiotensin system
 演 者 Gavin P Vinson, PhD, DSc
 Professor, Queen Mary, University of London, UK
 担 当 医化学教室

慶應医学会例会第 1293 回

日 時 平成 14 年 11 月 13 日(水) 午後 1 時 30 分
 場 所 新棟 11 階中会議室
 演 題 Spying on the temporal and spatial dynamics of intracellular signaling
 演 者 宮脇敦史博士
 理化学研究所脳科学総合研究センター, 細胞機能探索技術開発チーム, チームリーダー
 担 当 生理学教室

慶應医学会例会第 1294 回

日 時 平成 14 年 11 月 21 日(木) 午後 5 時 30 分
 場 所 新棟 11 階大会議室
 演 題 Isolation, induction and use of human neural progenitor cells
 演 者 Steven A Goldman, MD, PhD
 Professor, Department of Neurology and Neuroscience, Cornell University, Medical Center, New York, NY, USA
 担 当 生理学教室

慶應医学会例会第 1295 回

日 時 平成 14 年 11 月 25 日(月) 午後 6 時 00 分
 場 所 新棟 11 階中会議室
 演 題 Beta 2/ neuro D 1 transcription factor in pancreatic development and diabetes
 演 者 Ming-Jer Tsai, PhD
 Professor, Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA
 担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1296 回

日 時 平成 14 年 11 月 26 日(火) 午後 5 時 00 分
 場 所 新棟 11 階大会議室
 演 題 Roots of empathy for at risk families and difficult children
 演 者 Dr. Mary Gordon
 Head, Parenting and Family Literacy Centres, Toronto District School Board, Founder and Director, Roots of Empathy Program, Maytree Foundation, Toronto, Canada
 担 当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1297 回

日時 平成 14 年 11 月 26 日(火) 午後 5 時 00 分
場所 新教育研究棟 4 階 講堂 3
演題 Immunopathogenesis of bullous pemphigoid
演者 Zhi Liu, PhD
Associate Professor, Department of Dermatology and Immunology/Microbiology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA
担当 皮膚科学教室

慶應医学会例会第 1298 回

日時 平成 14 年 11 月 27 日(水) 午後 6 時 30 分
場所 新教育研究棟 3 階 講堂 2
演題 ① The critical role of microcirculation and angiogenesis in ulcer development and healing
② Stem cell biology and mucosal damage regulation and repair
演者 ① Sandor Szabo, MD, PhD, MPH
Chief of Staff, VA Long Beach Healthcare System, Long Beach, Professor of Pathology & Pharmacology, College of Medicine, University of California, Irvine, CA, USA
② Irvin M Modlin, MD, PhD
Professor, Surgical Gastric Pathobiology Research Group, School of Medicine, Department of Surgery, Yale University New Haven, CT, USA
担当 外科学教室

慶應医学会例会第 1299 回

日時 平成 14 年 11 月 27 日(水) 午後 6 時 30 分
場所 新教育研究棟 講堂 1
演題 Implant prosthetics : prosthetics of the future?
演者 Eduard Eisenmann, DDS, PhD
Associate Professor, Free University Berlin, Berlin, Germany
担当 歯科・口腔外科学教室

慶應医学会例会第 1300 回

日時 平成 14 年 12 月 2 日(月) 午後 5 時 00 分
場所 新棟 11 階中会議室
演題 Spinocerebellar ataxia type 10
演者 Testuo Ashizawa, MD
Chairman and Professor, Department of Neurology, The University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA
担当 生理学教室

慶應医学会例会第 1301 回

日時 平成 14 年 12 月 5 日(木) 午後 6 時 30 分
場所 第一会議室
演題 Anxiety proneness as a dimension of personality
演者 Detlev von Zerssen, MD
Professor and Former Director, Psychiatric Hospital, Max-Planck-Institute for Psychiatry, Munich, Germany
担当 精神・神経科学教室

慶應医学会例会第 1302 回

日時 平成 14 年 12 月 9 日(月) 午後 1 時 00 分
場所 総合医科学研究棟 2 階 会議室 2
演題 肥満, 糖尿病及び肝再生における細胞・時間特異的遺伝子変異法を用いた核内受容体の生体内機能解析
演者 今井 剛博士
フランス IGBMC 研究所研究員
担当 医化学教室

慶應医学会例会第 1303 回

日時 平成 14 年 12 月 13 日(金) 午後 6 時 30 分
場所 新教育研究棟 2 階 講堂 1
演題 A new sinus lifting technique using lifting drills
演者 Ferdinando Cosci, DDS, PhD
ICOI Fellow and Diplomate, Lamporecchio, Italy
担当 歯科・口腔外科学教室

慶應医学会例会第 1304 回

日時 平成 14 年 12 月 14 日(土) 午後 5 時 00 分
場所 新棟 11 階大会議室
演題 Low toxicity immunosuppressive protocols in renal transplantation
演者 Ron Shapiro, MD
Professor of Surgery, Director, Renal Transplantation, Thomas E. Starzl Transplantation Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA
担当 泌尿器科学教室

編集後記

巻頭にもありますように、学位審査の方法に改訂があり、慶應医学会誌にも大きな影響がありました。学位申請論文の減少により、発刊を季刊とさせていただきましたが、これを良い機会として、これまでの慶應医学会誌よりも読者の方々に、より幅広く、臨床から基礎にわたり、慶應医学の最先端を知っていただけるようにしていきたいと編集委員一同考えております。今回お知らせに掲載した以外にも、慶應医学会員の皆様から意見をお寄せいただき、より良い誌面を作っていきたいと考えておりますので、ぜひお願いいたします。

(編集委員 林 松彦)

編集委員 (◎副会長, ○理事)

◎相磯貞和 ○池田康夫 ○小口芳久 ○石川博通
嬰庭了 上田政和 梅澤明弘 鹿島晴雄
斎藤英胤 林 松彦 村田 満 村松太郎

平成 15 年 3 月 19 日 印刷

平成 15 年 3 月 25 日 発行

編 集 者 北 島 政 樹

発 行 者

印 刷 所 学術図書出版株式会社

電話 (3948) 7516 番

印 刷 者 富 田 進

発 行 所 慶 應 医 学 会

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

慶應義塾大学医学部企画室

電話(3353)1211(大代)内線62766

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

本誌の内容を無断で複写・作製・転載すると、著作権・
出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

複写される方へ

本誌に掲載された著作物を複写したい方は、(社)日本複写権センターと包括複写許諾契約を締結されている企業の従業員以外は、図書館も著作権者から複写権等の行使の委託を受けている次の団体から許諾を受けて下さい。著作物の転載・翻訳のような複写以外の許諾は、直接本会へご連絡下さい。

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル 学術著作権協会

TEL: 03-3475-5618 FAX: 03-3475-5619 E-mail: naka-atsu@muj.biglobe.ne.jp

アメリカ合衆国における複写については、次に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA Phone: (978) 750-8400 FAX: (978) 750-4744

Notice about photocopying

In order to photocopy any work from this publication, you or your organization must obtain permission from the following organization which has been delegated for copyright for clearance by the copyright owner of this publication.

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan

TEL: 81-3-3475-5618 FAX: 81-3-3475-5619 E-mail: naka-atsu@mju.biglobe.ne.jp

In the USA Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

Phone: (978) 750-8400 FAX: (978) 750-4744

広告掲載: 〒113-0033 東京都文京区本郷3-35-6 大石グリーンビル 株式会社 大矢商会

『慶應医学』投稿規定

本誌は原著論文、学位申請論文、綜説、講座、シンポジウム、症例報告あるいは座談会の記録、学会または研究会の抄録、話題、雑報などを掲載します。原著論文は、その内容が過去に他誌に掲載されたり（ただし、抄録のみの掲載は該当しない）、あるいは現在投稿中もしくは掲載予定でないものに限りません。新知見の所在が明確で、論旨が一貫して明解な論文をお寄せ下さい。記述は簡潔にし、類似する図表は省略して下さい。学位申請論文に関しては「学位申請論文」投稿の手引きを参照して下さい。

本誌に投稿する場合は、人を対象とする場合にはヘルシンキ宣言を遵守したものであることが必要です。また、動物実験に関しては関連の法規に従い、動物福祉の精神に基づいて倫理的に実施されたものであることが必要です。

論文の受付

原著、学位申請論文投稿は慶應医学会会員に限りません。掲載の採否は編集委員会にて決定し、採用となった場合は速やかに掲載証明書を発行し掲載巻号を通知いたします。

原稿はオリジナルとコピーを一部ずつ下記あてに届けて下さい。

〒160-0016

東京都新宿区信濃町35 信濃町煉瓦館3階
財団法人国際医学情報センター学会事務室
慶應医学会「慶應医学」編集室

TEL 03(5363)3736 (直通)

E-mail: keio-igakkai@imic.or.jp

受付時間：平日 午前9:00～午後5:00

(土曜日は受付をしません)

初校の校正は著者をお願いします。校正期間は3日間です。校正では大幅な修正はできません。図表の校正も初校のみとなります。

印刷費は著者負担ですが、著者の負担を軽減するため、当分の間、1篇につき印刷費の内3万円を本会より補助いたします。

論文原稿の作成上の注意

1. 原稿 文章は現代かなづかいにしたがって平仮名混じりとする。A4判の白紙に横書き(35字/行×23行の約800字詰)で、上下を約2.5cmずつ、左右を約3cmずつあける。外国語の原語綴は行末で切れないよ

うにする。変換できない文字や記号は手書で明瞭に書き入れる。第1ページには、表題・著者名・所属を和文と英文で記入し、図表の数、希望別刷部数(50部単位)、連絡先(郵便番号、住所、所属、電話およびFax番号、e-mailのアドレスなど)を必ず記入する。編集や印刷上の注意事項があれば朱書で指示を入れる。原稿には頁数を各頁の右下に記入する。

2. 表題 論文の内容を表記した簡潔で明瞭な表題(40字程度)をつけること。(「……の研究」というような大雑把な表記は避け、新事実を明瞭に表記する。)20字以内の略題(running title)をつける。2篇以上の原稿を同時に提出する場合はそれぞれに別の表題をつける。

3. Key Word 英語を原則としIndex Medicusのsubjectsにあるもので、5項目以内を用意する。固有名詞以外は小文字とする。

4. 英文抄録(ABSTRACT) 英語での表示とする。

1) 読者が一読して論文の主旨が明確にわかるもの。

2) 150語ないし200語以内にまとめる。

3) ダブルスペースでA4判の用紙にタイプする。

4) 題名にすでに表記されているものを最初の文章で繰り返さないこと。

5) 日本で特有の薬品テスト方法などについてふれる場合は、本文中にその説明がなくてもできるだけ説明を加えなければならない。

6) 数字が文頭にある場合はスペルアウトし、文中ではアラビア数字を用いる。

5. 緒言 見出しなしで始める。研究の位置づけを明記し、実験・研究の目的を明示する。しかし過大な歴史的考察は好ましくない。

6. 項目の記述 原則的に英文抄録(ABSTRACT)、研究・実験または検査の方法、研究成績または実験結果、考察または考案、結論または総括、謝辞、文献、のような順で記述する。ただし、綜説・講座はこの限りではない。

略語は各分野を通じて周知のもの以外は使わない。

7. 考察の内容 自己の所見と他人のものとの比較で異同を云々するだけの場合、「研究結果および考察」の一章にまとめるようにする。

8. 結論または総括 刷り上がり半頁(原稿用紙2枚半位)以内にまとめ、一読で研究方法の概略も含めて所見および結論のポイントがつかめるようにする。

9. 見出しの振り方(参照例)

研究成績

1. 臨床的事項

1) 頻度

- a) ……………
- (1)……………
- (i)……………

10. 外国語 原語もしくはカタカナで書き、原語の場合は小文字(固有名詞やドイツ語の頭文字は大文字)とする。普通名詞は文頭に限って大文字とする。

11. 図(写真) そのまま印刷できる鮮明なものを用いること。光沢のある白い印画紙の上に焼き付けたものかそれに準じたものとする。手書は受け付けない。大きさは原則として横幅8 cmもしくは16 cm, 縦(最長)23 cm以内のものを用意する。電子顕微鏡写真および光学顕微鏡写真は倍率を明示すること。原図の裏に著者名・図番号・天地の指示(矢印)を鉛筆書きし、A4判の紙に貼付する。特に大きさや配置に希望のある場合は明記すること。原寸大として図に書き込まれている字の大きさは、最低1.5 mmの高さが必要である。これ以下の大きさは印刷不可。

12. 図表の名称 第1図, 第1表として、本文中と図表の名称を統一すること。図表の題名は写真板に含めない。図表中の文字・単語は英語でもよいが、図表の題名および説明文は日本語で記載すること。なお、定量的な実験あるいは検査の記述は表よりグラフを用いたほうがよい。同一のデータを図と表の両方で示すことは避けること。また、本文中の右欄外に図表の挿入箇所を朱書きで指示する。

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

14. 文献 本文中では引用された順とし、“Smith¹⁾によれば、……という報告がある²⁾。”のように肩に番号をふる。文献表は本文とは別とする。共著者のある場合すべての著者名を書き、スタイルはバンクーバー方式とする。論文のタイトルの文頭のみ大文字とし、あとは小文字で書く。雑誌名は公式の略号を用い、頁は最初と最後を必ず書く。(下記の例を参照する。)

論文: 1) Counihan T, Messer AL, Sprague HB: The initial vibrations of the first heart sound. *Circ Res* 3: 730-732, 1968

2) 田中一郎, 山田二郎: 膠原病の成因. 慶應医学, 42: 162-198, 1965

著書: 3) Link GKK: Bacteria in relation to plant diseases. *Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology*. (Ed) Jerdan EO, Falk IS, Univ Chicago Press, Chicago, p.590-606, 1967

4) 後藤修二: 鼓室成形手術. 耳鼻咽喉科手術書(堀口申作編集). 医学書院, p.134-160, 1961

15. 略号 本誌の性格上、関連領域では周知のものであるべく避けること。やむを得ず使用する場合は、始めにスペルアウトし、以下(…と略す)と断わりを入れること。多くの略号が頻回に使用される場合は、論文の始めの方に一覧表を付けるなどの配慮をすること。

16. 単位, 符号 基本単位: $10^3 \rightarrow k$, $10^6 \rightarrow M$, $10^{-6} \rightarrow \mu$, $10^{-9} \rightarrow n$ として符号の前に付ける。略称のピリオドはつけない(gでなくg)。長さ: A, nm, μm , mm, cm, m, km。面積: mm^2 , cm^2 , m^2 , $a = m^2 \times 10^2$, $ha = a \times 10^4$ 。容積: m^3 , mm^3 , ml, dl, l。質量: pg, ng, μg , mg, g, kg。時間: hr, min, sec, msec(本文中でジ・フン・ビョウと読む場合は時・分・秒と書いてもよい)。電気諸単位: (volt); μV , mV, V, kV, MV, (ampere); μA , mA, A, kA, (ohm); $m\Omega$, Ω , k Ω , M Ω , (watt); μW , mW, W, kW, MW, (farad); pF, μF 。放射能諸単位: (becquerel); Bq, kBq, MBq, (sievert); mSv, Sv。放射性同位元素: ^{131}I , ^{14}C , 3H 。

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

18. フロッピーディスクによる入稿について 印刷工程の効率向上を図るため、フロッピー入稿を希望する。受理が決定した最終稿を入力したフロッピーディスクを印字原稿と共に提出する。入力テキスト形式で行うこと。使用したパソコン、ワープロ、ソフト名、ソフトの版等を著者名、略題とともにフロッピーディスクのラベルに記載する。

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

1) O'Connor M and Woodford FP: *Writing scientific papers in English*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1979

2) CBE Style Manual Committee: *Council of Biology Editors style manual: A guide for authors, editors, and publishers in the biological sciences*, 4th ed. Council of Biology Editors, 1978

3) Day RA: *How to write and publish a scientific paper*. ISI press, Philadelphia, 1979

20. その他 詳細に関しては事務局に問い合わせ下さい。(2003年1月)

「学位申請論文」投稿の手引き

「学位申請論文」について

「学位申請論文」は、「慶應医学」に掲載された Thesis である。学位を取得する目的で Thesis を提出することは国内外を問わず広く行われている。「慶應医学」では、従来の「原著」論文に Thesis 的要素を入れた論文を「学位申請論文」として掲載することにより、学位取得のための論文に関し、申請者の便宜をはかった。「学位申請論文」の設置に伴い、「原著」論文は学位取得をかならずしも目的とせず、むしろ一般的な原著論文として取り扱われる。「学位申請論文」は日本語を原則とするが英語での投稿も受け付ける（英文投稿規定を希望する者は事務局に申し出ること）。「学位申請論文」についての留意点を以下に説明する。

1. 学位取得の十分条件ではない。

「学位申請論文」に受理された後に行われる学位審査等の手続きは、原著論文による場合と同様に行われる。「学位申請論文」の設置は、学位審査についての手続きを変更するものではない。

2. 二重投稿が回避できる。

「学位申請論文」は原著論文ではないので、その内容の一部あるいはすべてが、他誌（使用言語を問わない）にすでに出版されているか、あるいは印刷中であっても二重投稿にはならない。

また、「学位申請論文」に使用した内容を他誌へ投稿することも許されるが、「学位申請論文」の主たる内容は、著者が中心となって行った研究で既発表（印刷中を含む）のものとする。

また、「学位申請論文」の基礎となった既発表の原著論文は、将来、他者の「学位申請論文」として二重に使用することはできない。

他誌へ投稿する予定のない原稿は、「慶應医学」の「原著」として投稿されることをお勧めする。

3. プライオリティーを主張することはできない。

「学位申請論文」は論文検索のデータベースからは除外される可能性がある。「学位申請論文」を著者の業績リストに記載する場合は、原著論文とは別にして、学位申請論文と明記すべきである。

論文作成上の注意

「学位申請論文」は、申請者がファーストオーサーである論文をまとめて、Thesis として作成されたもので

ある。

論文作成上の注意としては、従来の「慶應医学」投稿規定を範とし、論文作成上の注意のうち、2. 表題、3. Key Word、6. 項目の記述、7. 考察の内容、8. 結論または総括、9. 見出しの振り方、10. 外国語、12. 図表の名称、14. 文献、15. 略号、16. 単位、符号については同様に注意されたい。「学位申請論文」が従来の投稿規定と異なる注意点のみを以下に記載する。

1. **原稿について**：表紙ページ右上に、「学位申請論文」と記載すること。英文でのタイトル・著者名・所属は不要である。さらに、「学位申請論文」の内容の一部あるいは全部が、すでに原著として他誌に印刷中、あるいは出版済みの場合は、他誌の別刷（2部）、もしくは印刷中であることを証明する書類を添付すること。

4. **英文抄録（ABSTRACT）**は不要である。

5. **緒言について**：「学位申請論文」が「原著」論文よりも Thesis に近い性質であることを踏まえ、「原著」論文以上に研究の背景についての十分な説明が必要である。

11. **図表（写真）について**：掲載する図表はオリジナルの外、すでに原著として、他誌に印刷中、あるいは出版済みの論文から引用して用いること。これら図表の主要な部分は学位申請者が、ファーストオーサーまたは主たる貢献者である論文から引用することが必要で、かつ著作権に関する許可を出版社より得たものに限る。出版社に転載許可を求める書式は編集部に申請されたい。これらの場合（印刷中、印刷済み）には、当該論文の一部あるいは全部が、学位申請者の学位申請論文として使用されることにつき、共著者の承認が必要である。この書式も編集部に申請されたい。ただし、学位申請者がファーストオーサーでない場合には、学位申請者がその論文の主たる貢献者であることを証明する共著者の署名も必要である。これらの書類への記入はできる限り手書きを避けること。

引用した図表を用いる場合、各図表の説明文の最終部分において、次の様式によって出典を明らかにすること。英文例：(Keio T et al : Nature 690 : 76-77, 1994 の Fig 1 を許可を得て転載)、和文例：(慶應太郎, 他：内科, 87 : 112-118, 1994 の第 2 図を許可を得て転載)。また、これらの図表、データのうち学位申請者がファーストオーサーでない論文から引用した場合には「図 X は（筆頭著者氏名）の論文から引用したが、このデータに関しては学位申請者がその主たる貢献者であり、共著者の同意を得て転載した」旨を謝辞の最後に記載するものとする。

図表は印刷に耐えうる鮮明な原図を用いること。図表に関する注意点は、投稿規定に基づくものとする。

13. 謝辞について：通常の謝辞に続き、段落を変えて、次の形式で「学位申請論文」に含まれる論文を記載すること。なお、本項目に記載された論文を、「慶應医学」の「学位申請論文」のために他の申請者が再使用することはできない。「本論文は、Keio T, Yotsuya M, Shinano O : The initial vibrations of the first heart sound. Lancet 22 : 345-349, 1992 の一部, Keio T, Link GK : Bacteria in relation to plant diseases. N Engl J Med 573 : 34-38, 1993 の一部, および慶應太郎, 田中一郎, 山田二郎 : 膠原病の成因. 内科, 87 : 112-118, 1994 の一部を含む。」

14. 文献について：「学位申請論文」のもととなった原著論文を本文中で必ず引用し、文献リストにのせる。

本来、研究はオリジナルなものであり、研究者はそれを発表することが当然の務めである。「学位申請論文」は学位申請のための Thesis であり、本来の意味での論文ではない。したがって、「学位申請論文」の内容が一般の学術誌に発表されたものと同じであることは当然であろう。「慶應医学」では、オリジナルな研究は「学位申請論文」に先立って他誌へ投稿し、受理された後に「学位申請論文」として投稿されることを原則と考えている。

「慶應医学」では原著も掲載しているので、「慶應医学」への発表をもって研究を終了し、他誌へ投稿する意志のない方は「原著」としての投稿を選択されることをお薦めする。

なお、ご不明の点については事務局にお問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

明らか		その、それ、	(其の、夫れ)
あらゆる	(凡ゆる)	ただ	(只、唯)
あるいは	(或は)	ただし	(但し)
いう	(云う、言う)	たとえば	(例えば)
いずれ	(何れ)	ため	(為)
いたします	(致します)	ついて	(就て)
いたずらに	(徒に)	ないし	(乃至)
いただく	(頂く、戴く)	なお	(尚、猶)
いる	(居る)	ながら	(乍ら)
おいて	(於て)	など	(等)
行う	(行なう)	ならびに	(並びに)
おそらく	(恐らく)	ほとんど	(殆ど)
および	(及び)	ほぼ	(略之)
かかわらず	(拘、関、係らず)	また	(又)
かつ	(且つ)	まだ	(未だ)
かなり	(可成り)	まで	(迄)
かねて	(予て)	むしろ	(寧ろ)
ここ	(此処)	もし	(若し)
この	(此の)	もって	(以て)
これ	(之、是)	やすい	(易い)
ことに	(殊に)	やや	(稍々)
しかし	(併し、然し)	ゆえに	(故に)
したがって	(従って)	ように	(様に)
しばしば	(屢々)	よる	(因る、依る)
少ない		わかる	(判る、分かる)
すなわち	(即ち)	わたって	(亘って)
すべて	(総て、全て)		

慶應医学 第80巻第1号別頁
平成15年3月25日

学位論文

慶應医学会

学位論文

慢性心房細動症例に対する電氣的除細動後の
心房電気生理学的指標の変化

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：小川 聡教授)

佐藤 俊明

(平成 14 年 4 月 17 日受付)

Key words : atrial fibrillation, electrical cardioversion, atrial effective refractory period, intraatrial conduction time

心房細動の有病率は加齢とともに増加し、50 歳台の 0.5% に対して 80 歳台には 8.8% に達する¹⁾。特に高齢者の心房細動は、弁膜症、心筋症、虚血性心疾患、高血圧性心疾患といった基礎心疾患に合併することが多い。心房細動が出現すると心電図上 P 波は消失し、細動波 (f 波) が出現する。心房の有効な収縮は失われ、心室充満は受動的な左室への血液流入のみに依存するようになるため、僧帽弁狭窄症や、肥大型心筋症あるいは心膜疾患のような左室拡張障害がある症例では心室充満が低下し、血行動態が悪化しやすい。また、心房細動が遷延すると左房内の血流うっ滞により血栓が生じ、脳血栓塞栓症を合併することが問題となる。心房細動の既往がない症例と比較した場合、心房細動症例が脳塞栓症を合併する相対危険度は 50 歳台では 4.0～4.1 倍、80 歳台では 4.5～4.8 倍に達する^{1,2)}。

心房細動は、洞調律時に発作的に出現し、自然停止する発作性心房細動と、遷延し洞調律が認められない慢性心房細動に分類される。孤立性発作性心房細動の約 20% は慢性心房細動に移行するが³⁾、心房細動発作の持続時間が長い症例ほど慢性心房細動に移行しやすい⁴⁾。一方、抗不整脈薬による心房細動停止効果も心房細動が遷延するほど減弱することが知られている⁵⁻⁷⁾。これらの臨床研究は、心房細動が持続するとさらに心房細動の遷延しやすい環境が形成されることを示唆している。

心房細動の擬似実験モデルを用いた研究や臨床研究に

おいて、心房高頻度興奮が継続すると、細胞内に Ca 過負荷が生じ、二次的に細胞膜を介する内向き Ca 電流が減少するため、活動電位持続時間は短縮し心房不応期が短縮することが示唆されている⁸⁻¹²⁾。この現象は進行性で、心房高頻度刺激時間が長くなるにしたがい心房不応期は短縮し、心房細動誘発率が増加、その持続時間も延長した¹³⁻¹⁶⁾。このように心房細動などで高頻度心房興奮が持続すると、「電氣的リモデリング」と呼ばれる心房筋の一連の電気生理学的変化が進み、より心房細動が起こりやすい環境が生ずる。この影響は心房細動の除細動後にも及ぶ。心房不応期が短縮すると心房受攻性が亢進し¹⁷⁻¹⁹⁾頻脈性心房性不整脈を合併しやすくなるが、慢性心房細動症例では洞調律復帰後最初の 5 日間に再発が多い²⁰⁾。とくに、心房細動持続時間の長い症例では除細動後の再発率や除細動不成功率が高く²¹⁻²³⁾、そのような症例では短縮した不応期の回復が遅れている可能性がある。したがって発症後早期に除細動を行うことは、再発予防のための有効な手段の一つである。

電氣的リモデリングの阻止というアプローチも、除細動後の心房細動再発予防対策として考えられる。心房高頻度興奮開始前から L 型 Ca チャネル遮断薬である verapamil の投与を開始すれば、心房高頻度興奮にともなう細胞内への Ca 流入が抑制されるため不応期は短縮せず、慢性心房細動除細動後の再発は予防できる可能性がある⁹⁻¹²⁾。しかし、臨床では心房細動遷延後に徐拍

本論文は Sato T, Mitamura H, Kurita Y, Takeshita A, Shinagawa K, Miyoshi S, Kanki H, Hara M, Takatsuki S, Soejima K, Ogawa S : Recovery of electrophysiological parameters after conversion of atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 79 : 183-189, 2001 の一部を含む。

化を目的として verapamil が投与されることも多い。細胞内 Ca 過負荷が生じた後に開始された verapamil 投与が電気的リモデリングの進行を阻止できるかどうかについては知られていない。また、リモデリングが進んだ心房筋の不応期に verapamil が及ぼす影響についても知られていない。

そこで本研究では、慢性心房細動除細動後の電気的リモデリングからの回復過程において、1) その回復度が心房細動持続時間に依存するか否か、2) その進行を Ca チャネル遮断薬の投与により阻止しうるか否かを臨床例の電気生理学的検査により明らかにすることを目的とした。そのため、1) 慢性心房細動症例において、電気的除細動1時間後および24時間後の右房有効不応期と心房内伝導時間を計測し、心房細動の既往がない対照群の計測値と比較するとともに、心房細動持続時間と各指標との相関について調べた。2-1) 慢性心房細動発生後に verapamil の経口投与が開始された症例と verapamil 投与歴のない慢性心房細動の症例において、電気的除細動1時間後および24時間後の右房単相性活動電位持続時間、右房有効不応期を測定し、比較するとともに、2-2) 一部の慢性心房細動症例に対し除細動1時間後および24時間後に verapamil を静脈内投与し、投与前後の右房有効不応期を計測し比較した。

方 法

1. 対象

研究1：対象は孤立性慢性心房細動を有する15例を対象とした。慢性心房細動は洞調律に復帰することなく30日以上にわたり持続する心房細動と定義した。孤立性心房細動の診断は、現病歴、理学的所見、胸部X線写真、心エコー図検査、甲状腺機能検査に基づいて行われ、弁膜症、うっ血性心不全、心筋症、虚血性心疾患、甲状腺機能亢進症の存在が否定された症例とした。対象15例のうち14例は男性、1例は女性で、平均年齢は50±11才であった。心房細動持続時間の中央値は6ヶ月、平均は8±6ヶ月、分布は1-24ヶ月であった。11例では心電図上で心房細動が確認される以前に心房細動発生を疑わせる動悸、労作時呼吸困難を訴えており、その症状出現日を心房細動発生日とした。残る4例は定期的に当科に通院中で、明らかな症状を認めなかったが心房細動が心電図で確認された日を発生日とした。全症例において verapamil の投与歴はなかったが、4例では disopyramide、2例では digoxin の投与歴があり、抗不整脈薬は除細動施行4日前から中止された。米国

心臓学会の勧告²⁰⁾にしたがい、全症例において、除細動施行前に3週間以上 warfarin による抗凝固療法を施行した。さらに除細動施行前2日以内に経食道心エコー図検査を行い、左心耳内血栓がないことを確認した。

心房細動の既往がない15症例を対照群とした。対照群15例のうち14例は男性、1例は女性、平均年齢は51±11才であり、心房細動群との有意な差はなかった。10例は房室結節内リエントリー性頻拍、4例は特発性心室頻拍、1例は失神の検査目的で電気生理学的検査が行われた。

研究2-1：孤立性慢性心房細動を有する24例を対象とした。Verapamil 投与群の12例では、verapamil 240 mg/日を心房細動発生後平均20.7±9.5日後から経口投与し、除細動24時間後まで平均175±179日間(40-692日間)継続した。Verapamil 投与歴がない12例を verapamil 非投与群とした。

研究2-2：Verapamil 投与歴がない孤立性慢性心房細動を有する6例を対象とし、除細動1時間後および24時間後に verapamil 0.2 mg/kg を静脈内投与し、その前後で血圧、心拍数を測定し、電気生理学的検査を施行した。

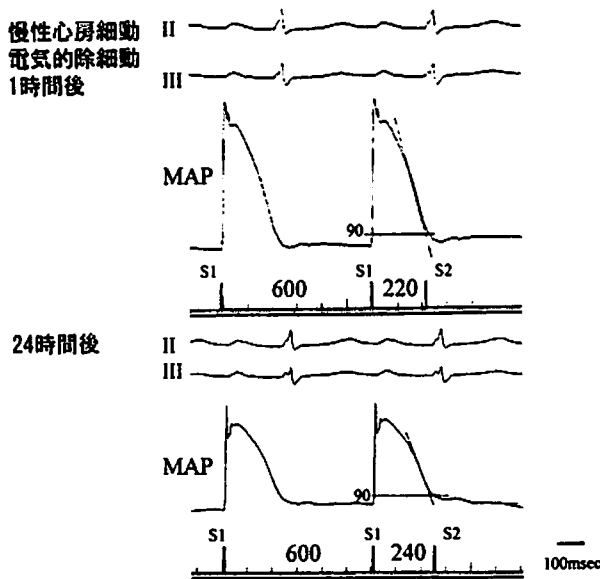
2. 電気的除細動および電気生理学的指標の計測

すべての症例から informed consent を取得後に、電気的除細動および電気生理学的検査を施行した。まず、右内頸静脈に7-F カテーテルシースを挿入し、電気的除細動成功後24時間留置した。経胸壁直流通電は、thiopental sodium (50-150 mg) の静脈内投与下で行った。通電量は100j から開始し、洞調律に復帰しなければ300j まで増加した。電気的除細動が成功した場合は1時間後および24時間後に Franz-combination カテーテル (Model 1675P, EP Technologies, Natick, MA, USA) をX線透視下に右内頸静脈から右房内に挿入し、カテーテル先端を右心耳心内膜面に押しつけ、右心耳のプログラム刺激を行うと同時に単相性活動電位を記録した(第1図)。研究2-2)では8極のカテーテル電極を用い、右心耳のプログラム刺激を行うとともに双極電位を記録した。カテーテル先端の位置はX線透視下左前斜位60度および右前斜位30度により確認し、画像を保存した。ペーシングにはプログラム刺激発生装置 (SEC-3102, 日本光電, 東京) を用い、電流量は閾値の2倍、パルス幅は2 msec の矩形波刺激を加えた。被験者から得られた信号は生体電気用増幅ユニット (Model 300, EP Technologies, Natick, MA, USA) から EP Lab computer system (Quinton Electrophysi-

ology Corp., Ontario, Canada) に入力し記録した。

電気的除細動成功後、心房有効不応期および心房内伝導時間を測定した。心房有効不応期の測定には S1-S2 期外刺激法を用いた。基本刺激周期は 600 msec と 400 msec の 2 種類とし、連続した 6 個の S1 刺激後、S2 刺激を加えた (第 1 図)。心房有効不応期は S2 刺激にともなう心房興奮を認めない最長の S1-S2 間隔とした。心房内伝導時間の計測は、EP Lab computer system において 200 mm/sec あるいは 400 mm/sec の記録速度で表示された画面上で行った。基本刺激周期 400 msec あるいは 300 msec の連続刺激中、Stimulus-P 時間 (以下 St-P 時間) は、右心耳刺激から体表面心電図の II, III, aVF 誘導において最も早い P 波の立ち上がりまでとし、P 波幅は体表面心電図の II, III, aVF 誘導において最大のものを計測した。

研究 2) では心房有効不応期に加え、右心耳における単相性活動電位持続時間を計測した。基本刺激周期 800, 600, 400, 300 msec の連続刺激中に記録された単相性活動電位の第 3 相に接線をひき、拡張期の基線と交差する点を 100%再分極とし、これから求めた 90%



第 1 図 単相性活動電位の実記録。慢性心房細動症例において、電気的除細動後単発期外刺激法により右房有効不応期を測定した。上段は電気的除細動 1 時間後、下段は 24 時間後の典型例における実記録を示す。基本刺激周期 600 msec の右房有効不応期は除細動 1 時間後では 220 msec であったが、除細動 24 時間後には 240 msec に増加した。II：体表面心電図第 II 誘導、III：第 III 誘導、MAP：単相性活動電位、S1：基本刺激、S2：期外刺激、90：90%再分極。

再分極における活動電位持続時間を単相性活動電位持続時間とした (第 1 図)²⁹⁾。

3. 統計解析

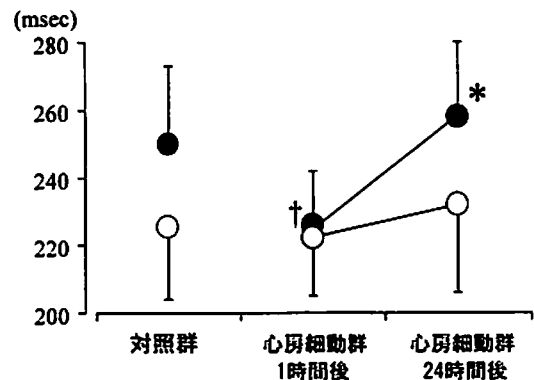
測定値は平均±標準偏差として表示した。心房細動群において連続する変数の群間比較には paired Student *t*-test を用いた。心房細動群と対照群および verapamil 投与群と非投与群の変数の群間比較には unpaired Student's *t*-test を用いた。心房細動持続時間と電気生理学的指標との相関比較には単回帰分析を用いた。Verapamil 静脈内投与前後の変数の群間比較には paired Student *t*-test を用いた。p<0.05 を統計学的に有意とした。

結 果

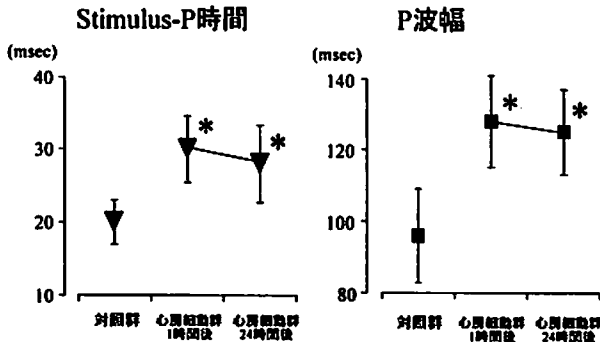
1. 心房細動群 (除細動 1 時間後) と対照群における電気生理学的指標の比較

心房細動群では、除細動 1 時間後、基本刺激周期 600 msec の心房有効不応期は対照群に比べ有意に短かった (225±189 msec vs. 250±26 msec, p<0.05) (第 2 図)。除細動 1 時間後の St-P 時間は対照群に比べ有意に長く (30±4.6 msec vs. 20±3.0 msec, p<0.01)、除細動 1 時間後の P 波幅も対照群に比べ有意に長かつ

心房有効不応期



第 2 図 心房有効不応期の比較。心房細動群では除細動 1 時間後、基本刺激周期 600 msec の心房有効不応期 (●) は心房細動の既往がない対照群に比べ有意に短かった (p<0.05)。除細動後 24 時間間に、基本刺激周期 600 msec の心房有効不応期は有意に増加した (p<0.01)。●基本刺激周期 600 msec の心房有効不応期、○基本刺激周期 400 msec の心房有効不応期、†p<0.05 vs. 対照群、*p<0.01 vs. 除細動 1 時間後。(Sato T et al: Int J Cardiol 79: 183-189, 2001 の Fig. 1 を、許可を得て転載、一部改変)



第3図 心房内伝導時間の比較. 除細動1時間後のSt-P時間(▼)およびP波幅(■)は対照群に比べ有意に長かった. 除細動24時間後においてもSt-P時間およびP波幅は対照群に比べ有意に長かった. *p<0.01 vs. 対照群. (Sato T et al: Int J Cardiol 79: 183-189, 2001のFig. 1を, 許可を得て転載, 一部改変)

た(128 ± 13 msec vs. 96 ± 13 msec, p<0.01) (第3図).

2. 除細動後24時間の電気生理学指標の変化

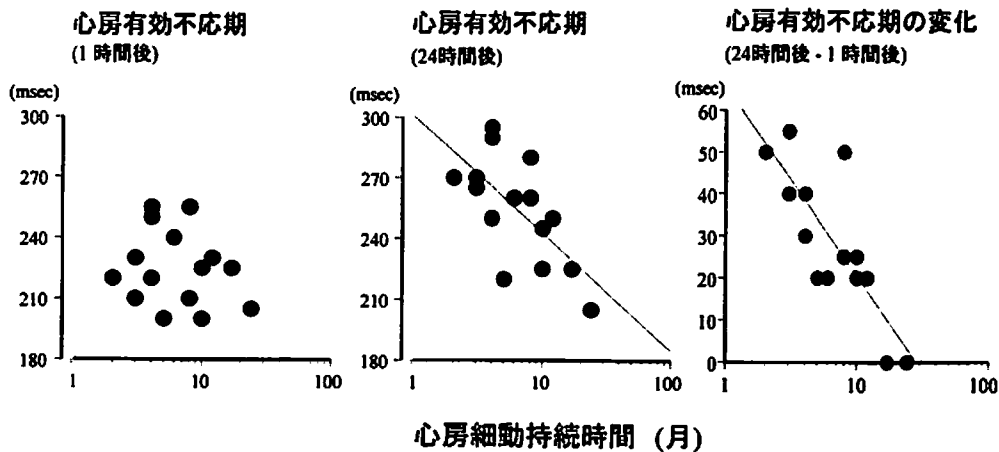
除細動24時間後, 基本刺激周期600 msecの心房有効不応期は除細動1時間後に比べ有意に増加した(254 ± 26 msec vs. 225 ± 189 msec, p<0.01) (第2図). 基本刺激周期600 msecと400 msecで測定した心房有効不応期の差は除細動後24時間の間に有意に増大した(3.0 ± 9.0 msec vs. 17 ± 12 msec, p<0.005).

一方, St-P時間は除細動24時間後においても対照群に比べ有意に長く(28 ± 5.3 msec vs. 20 ± 3.0 msec p<0.01), 除細動24時間後のP波幅も対照群に比べ有意に長かった(125 ± 12 msec vs. 96 ± 13 msec, p<0.01) (第3図).

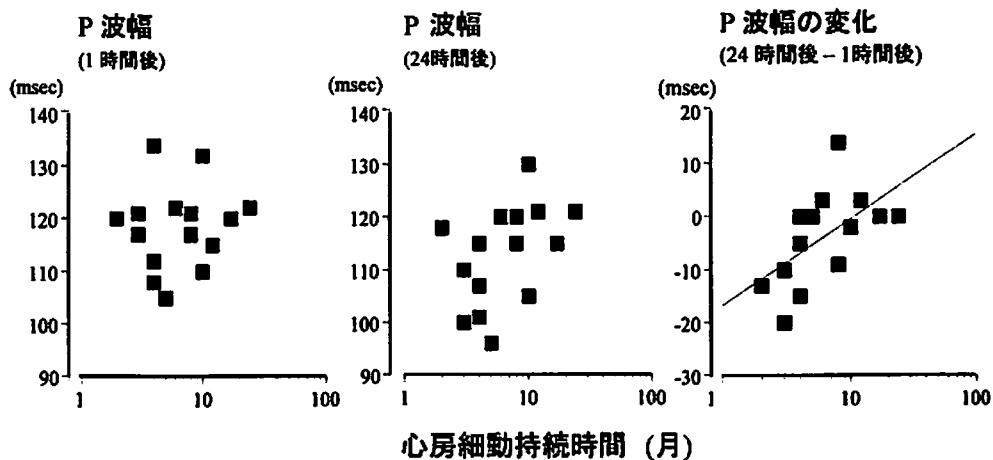
3. 心房細動持続時間が電気生理学的指標の回復過程に及ぼす影響

心房細動持続時間と除細動1時間後の心房有効不応期(基本刺激周期600 msec)の間には有意な相関を認めなかった. しかし, 除細動24時間後の心房有効不応期(基本刺激周期600 msec)は, 心房細動持続時間が長い症例ほど短く(p<0.05, r=0.52), 除細動後24時間の心房有効不応期(基本刺激周期600 msec)の変化は, 心房細動持続時間が長い症例ほど有意に小さかった(p<0.001, r=0.82) (第4図). 除細動1時間後および24時間後のいずれにおいても, 基本刺激周期400 msecの心房有効不応期と心房細動持続時間の間には有意な相関を認めなかった. また, 除細動後24時間の不応期の変化(基本刺激周期400 msec)と心房細動持続時間の間にも有意な相関を認めなかった. 年齢, 除細動総エネルギー量, thiopental sodium投与総量はいずれも心房有効不応期の変化には影響を及ぼさなかった.

心房細動持続時間と除細動1時間後および24時間後のP波幅の間には有意な相関を認めなかった. しかし, 除細動後24時間のP波幅の変化は心房細動持続時間が



第4図 除細動後の有効不応期と心房細動持続時間の相関. 除細動1時間後の心房有効不応期(基本刺激周期600 msec)と心房細動持続時間には相関を認めなかった(左図). しかし, 除細動24時間後の心房有効不応期(基本刺激周期600 msec)は, 心房細動持続時間が長い症例では有意に短かった(p<0.05, r=0.52) (中央図). 心房細動持続時間が長い症例ほど, 除細動後24時間の心房有効不応期(基本刺激周期600 msec)の回復は有意に小さかった(p<0.001, r=0.82) (右図). (Sato T et al: Int J Cardiol 79: 183-189, 2001のFig. 2を, 許可を得て転載, 一部改変)



第5図 除細動後のP波幅と心房細動持続時間の相関。除細動1時間後および24時間後のP波幅と心房細動持続時間には有意な相関を認めなかった(左図および中央図)。しかし、心房細動持続時間が長い症例ほど、除細動後24時間のP波幅の回復は有意に小さかった($p < 0.001$, $r = 0.67$) (右図)。(Sato T et al: Int J Cardiol 79: 183-189, 2001のFig. 3を、許可を得て転載、一部改変)

長い症例ほど有意に小さかった ($p < 0.001$, $r = 0.67$) (第5図)。

4. Verapamil投与群と非投与群における電気生理学的指標の比較

Verapamil投与群と非投与群の間に、年齢、心房細動持続時間、電気的除細動総エネルギー量、経胸壁心エコー図検査所見などについての有意な差を認めなかった(第1表)。

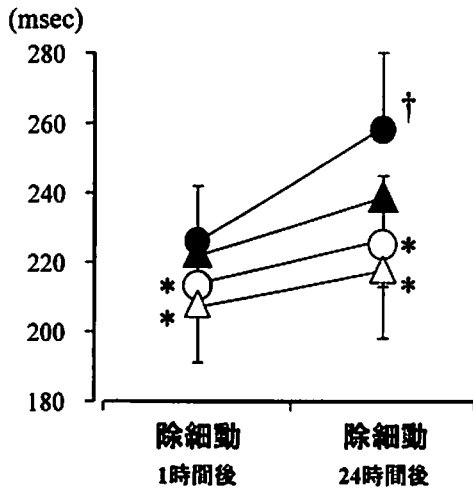
Verapamil投与群における除細動1時間後の心房有効不応期はverapamil非投与群に比べ有意に短かった(基本刺激周期600 msec; 213 ± 14 msec vs. 226 ± 16 msec, $p < 0.05$, 基本刺激周期400 msec; 208 ± 17 msec vs. 223 ± 17 msec, $p < 0.05$) (第6図)。さらに除細動24時間後においても、verapamil投与群における心房有効不応期はverapamil非投与群に比べ有意に

短かった(基本刺激周期600 msec; 225 ± 14 msec vs. 258 ± 16 msec, $p < 0.05$, 基本刺激周期400 msec; 218 ± 20 msec vs. 239 ± 26 msec, $p < 0.05$)。同様に单相性活動電位持続時間についても除細動1時間後、verapamil投与群の方が非投与群より有意に短かった(基本刺激周期800 msec; 219 ± 12 msec vs. 231 ± 11 msec, 基本刺激周期600 msec; 216 ± 12 msec vs. 228 ± 13 msec, 基本刺激周期400 msec; 209 ± 12 msec vs. 224 ± 11 msec, 基本刺激周期300 msec; 196 ± 10 msec vs. 218 ± 11 msec) (第7図)。除細動24時間後においても、verapamil投与群の方が非投与群より有意に短かった(基本刺激周期800 msec; 232 ± 17 msec vs. 262 ± 17 msec, 基本刺激周期600 msec; 227 ± 16 msec vs. 258 ± 18 msec, 基本刺激周期400 msec; 218 ± 14 msec vs. 244 ± 15 msec, 基本刺激周期300 msec; 205 ± 13 msec vs. 234 ± 16 msec)。

第1表 Verapamil投与群と非投与群の比較

	投与群	非投与群	p
症例数(男性/女性)	12(11/1)	12(11/1)	ns
年齢(歳)	53 ± 6	50 ± 8	ns
心房細動持続時間(平均値, 月)	6.5 ± 6.6	6.5 ± 4.5	ns
除細動エネルギー量(J)	410 ± 300	360 ± 170	ns
心エコー図検査所見			
左房径(cm)	4.0 ± 0.4	4.0 ± 0.2	ns
左室拡張期径(cm)	4.9 ± 0.5	5.0 ± 0.3	ns
左室収縮期径(cm)	3.5 ± 0.4	3.4 ± 0.4	ns
左室短縮率(%)	30 ± 0.7	32 ± 0.5	ns

心房有効不応期



第6図 Verapamil 投与群と非投与群における心房有効不応期の比較。電気的除細動1時間後および24時間後において、verapamil 投与群における心房有効不応期（基本刺激周期 600 msec (○), 400 msec (△)) は verapamil 非投与群の心房有効不応期（基本刺激周期 600 msec (●), 400 msec (▲)) に比べ各々有意に短かった。Verapamil 非投与群では、除細動後24時間の間に心房有効不応期（基本刺激周期 600 msec）は有意に増加した。投与群では、除細動後24時間における心房有効不応期の有意な変化は認められなかった。* p < 0.05 vs. verapamil 非投与群。† p < 0.05 vs. 除細動1時間後。

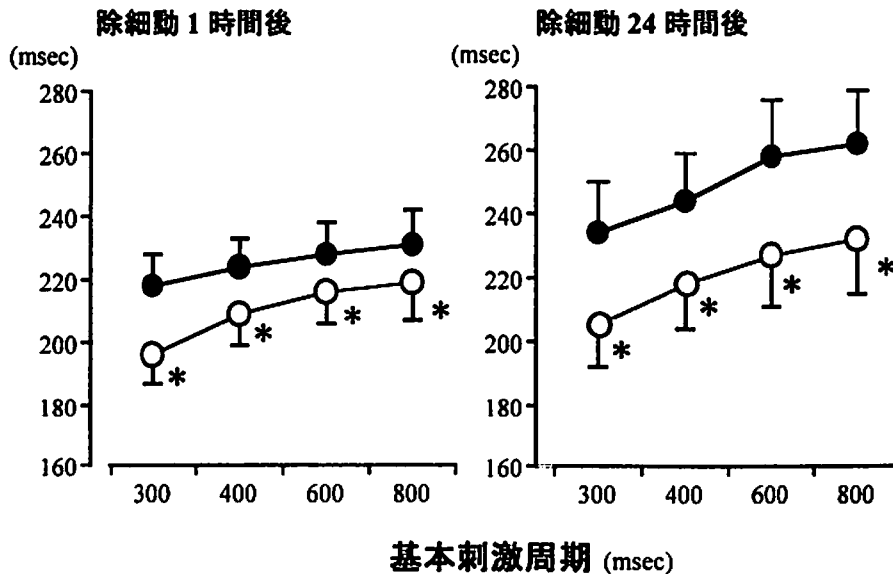
Verapamil 非投与群では、除細動24時間後の心房有効不応期（基本刺激周期 600 msec）は1時間後に比べ有意に増加した（ 258 ± 22 msec vs. 226 ± 16 msec, $p < 0.01$ ）（第6図）。それに対して verapamil 投与群では、除細動後24時間における心房有効不応期（基本刺激周期 600 msec）の有意な変化は認められなかった（ 225 ± 20 msec vs. 213 ± 14 msec）。

5. Verapamil 静脈内投与前後における心房不応期の比較

除細動1時間後、verapamil の静脈内投与により、血圧は有意に低下したが心拍数の有意な変化はなかった（ $117 \pm 11/76 \pm 9.0$ mmHg vs. $135 \pm 12/90 \pm 8.6$ mmHg, $p < 0.01$, 69 ± 8.4 bpm vs. 67 ± 11 bpm）。除細動24時間後においても、verapamil の静脈内投与により血圧は有意に低下したが心拍数の有意な変化はなかった（ $115 \pm 14/74 \pm 14$ mmHg vs. $129 \pm 18/85 \pm 15$ mmHg, $p < 0.01$, 68 ± 7.5 bpm vs. 65 ± 9.5 bpm）。

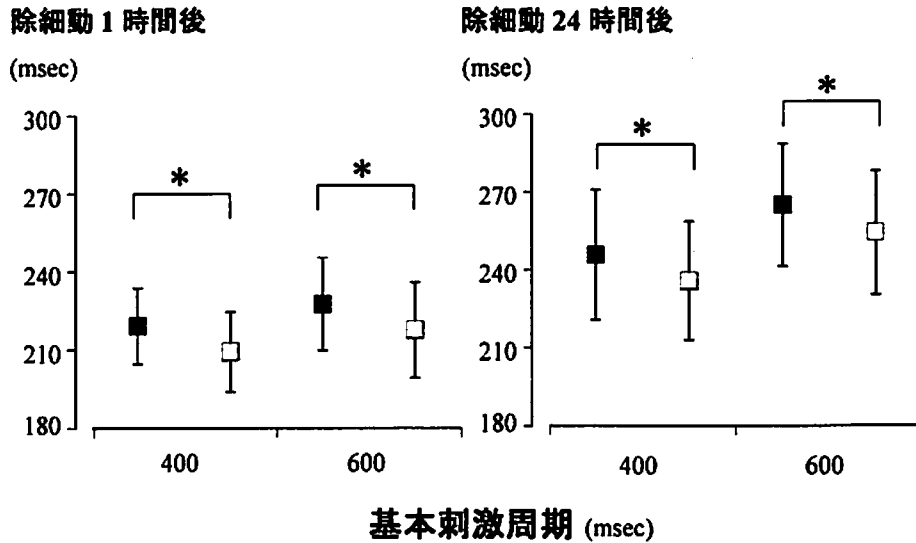
除細動1時間後において verapamil の静脈内投与後、心房有効不応期は有意に短縮した（基本刺激周期 600 msec； 218 ± 18 msec vs. 228 ± 18 msec, $p < 0.05$, 基本刺激周期 400 msec； 209 ± 15 msec vs. 219 ± 15 msec, $p < 0.05$ ）（第8図）。除細動24時間後において

单相性活動電位持続時間



第7図 Verapamil 投与群と非投与群における单相性活動電位持続時間の比較。除細動1時間後（左図）および24時間後（右図）において、verapamil 投与群 (○) における各基本刺激周期の单相性活動電位持続時間は非投与群 (●) に比べ有意に短かった。* p < 0.05 vs. verapamil 非投与群。

心房有効不応期



第 8 図 Verapamil 静脈内投与前後の心房有効不応期の比較。除細動 1 時間後 (左図) および 24 時間後 (右図) において、verapamil 静脈内投与後の心房有効不応期 (□) は投与前の心房有効不応期 (■) と比較し有意に短縮した。* $p < 0.05$ 。

も verapamil の静脈内投与後、心房有効不応期は有意に短縮した (基本刺激周期 600 msec ; 254 ± 23 msec vs. 265 ± 23 msec, $p < 0.05$, 基本刺激周期 400 msec ; 236 ± 23 msec vs. 246 ± 25 msec, $p < 0.05$)。

考 察

本研究では、まず慢性心房細動症例における電気的除細動後の心房有効不応期が、心房細動の既往がない対照群に比べ有意に短く、St-P 時間および P 波幅からみた心房内興奮伝導時間は長いことが示された。この所見は固定したものではなく、除細動後 24 時間の間に心房有効不応期は有意に増加し、対照群の値に近づいたが、St-P 時間および P 波幅は明らかな回復を示さなかった。注目すべきは心房細動持続時間が長い症例ほど除細動後 24 時間に観察された心房有効不応期と P 波幅の回復は小さかった。すなわち、これらの電気生理学的変化は心房細動の持続時間によって規定される可逆性の電気的リモデリングであり、心房細動が慢性化した症例では除細動後の電気的リモデリングからの回復も遅延する可能性が示された。

この電気的リモデリングを阻止する目的で、L 型 Ca チャンネル遮断薬である verapamil が心房細動慢性化後

に経口投与された症例では、非投与例に比べ電気的除細動 1 時間後および 24 時間後の単相性活動電位持続時間および心房有効不応期がむしろ短かった。除細動 1 時間後および 24 時間後に、verapamil を静脈内投与した別の群では心房有効不応期が有意に短縮したことから、心房細動慢性化後の verapamil 投与により心房の電気的リモデリングは阻止されないだけでなく、リモデリングされた心房の不応期はさらに短縮する可能性が示唆された。

1. 慢性心房細動除細動後の心房不応期の変化

本研究では、ヒトにおける慢性心房細動除細動直後の心房有効不応期は、心房細動の既往がない対照群と比較して有意に短かったが、その後 24 時間のうちにこの差は消失した。心房細動擬似動物モデルでも、心房持続性高頻度刺激中止後には短縮した不応期は回復することが報告されている^{13,16)}。Elvan らによると 4 週間の心房高頻度刺激を加えたイヌの慢性心房細動モデルでは、高頻度刺激中止後に心房不応期は増加したが、その変化は最初の 2 日間に顕著であった¹⁶⁾。本研究では、平均 8 ヶ月と長期間遷延した慢性心房細動症例においても電気的除細動後 24 時間の間に心房有効不応期は有意に増加した。これらの所見から、心房細動が数週間から数ヶ月以

上にわたり遷延しても、洞調律復帰後最初の数日間のうちに、短縮していた心房不応期は回復することが示唆された。

2. 慢性心房細動除細動後の心房内伝導時間の変化

心房受攻性、すなわち心房細動誘発性は心房不応期の短縮のみならず、心房内伝導速度の低下や心房の拡大、線維化などによっても増加する²⁶⁻²⁸⁾。これらの変化は心房全体を興奮させるのに要する伝播時間を延長させ、体表面心電図上のP波幅を増加させる。イヌ心房細動モデルでは、持続性高頻度刺激中止後、洞調律時の心房内伝導時間(PA時間)が延長し、同時にP波幅も増加することが報告されている¹⁶⁾。本研究においても、対照群と比較すると、慢性心房細動症例では除細動後のSt-P時間およびP波幅は有意に長かった。Gaspoらはイヌ心房細動モデルにおいて心房持続性高頻度刺激により心房内伝導速度は進行性に低下し、その背景に心房筋におけるNa電流の経時的減少が関係していたと述べている²⁶⁾。それに対してWijffelsらは、ヤギのモデルにおいて心房細動が24時間遷延した前後で、心房内伝導速度は有意な変化を示さなかったと報告した¹³⁾。心房持続性高頻度興奮が心房内伝導速度に及ぼす影響は対象となる種やその持続時間により異なる可能性がある。本研究では除細動後24時間間に心房有効不応期は回復し正常化した。St-P時間およびP波幅の正常化は認められなかった。集積したP波の平均加算分析においても、除細動後最初の24時間にはP波幅は有意な変化を示さなかった²⁹⁾。このように、慢性心房細動除細動後の心房内伝導時間と心房不応期の回復過程は必ずしも並行しなかった。電気的リモデリングが進行する過程においても両者の変化には相違が認められ、イヌ心房細動モデルでは、持続性高頻度刺激開始後2週間を過ぎると心房不応期はそれ以上有意な短縮を示さないが、心房内伝導速度はその後も低下し続けることが報告されている¹⁴⁾。その背景として、心房不応期の短縮に関連するCa電流の減少と比較し、心房内伝導速度の低下に関連するNa電流の減少はより緩徐に進行することが挙げられる²⁶⁾。それは、同時に除細動後の膜イオン電流の回復過程も異なる可能性を示唆する。その他、gap junctionの変化や心房筋の組織学的変化が除細動後の心房内伝導に影響を及ぼす可能性がある。

3. 心房細動持続時間が電気的リモデリング回復過程に及ぼす影響

心房細動持続時間の長い症例ほど、除細動後の再発率

や除細動不成功率が高いと報告されている²¹⁻²³⁾。Franzらは慢性心房細動除細動後の不応期と心房細動持続時間の間には明らかな相関を認めなかったと報告したが³⁰⁾、慢性心房細動除細動直後の心房不応期の変化を評価するだけでは、心房細動持続時間の相違に基づく再発率の違いを説明できない可能性がある。そこで、本研究では慢性心房細動が遷延した症例ほど除細動後の電気生理学的指標の回復が遅れる可能性を想定し、除細動1時間後に加え24時間後にも電気生理学的検査を行った。その結果、Franzらの報告と同様に、除細動1時間後の心房有効不応期と心房細動持続時間の間には有意な相関を認めなかったが、除細動24時間後の心房有効不応期は心房細動持続時間が長い症例ほど短いという新しい知見をえた。さらに除細動後24時間のP波幅の回復も心房細動持続時間が長い症例ほど減少していた。

心房細動が長時間持続した症例ほど、心房筋の膜イオン電流が変化し、その回復が遅れるために、洞調律復帰後の不応期の回復が遅れる可能性がある。イヌ心房細動モデルでは、心房不応期短縮の原因としてCa電流の減少が挙げられている⁶⁾。このCa電流の減少は、急性期にはCaチャンネル構成蛋白の発現は変化せず、その不活性化の促進により生じるが、慢性期においてはその発現の低下が関与している³¹⁻³³⁾。慢性心房細動症例では、Caチャンネル構成蛋白が減少している症例ほど心房不応期が短縮していたとの報告がある³²⁾。Van GelderらはCaチャンネル $\alpha 1$ subunitのmRNAは心房細動が6ヶ月以上持続した症例では、持続時間が6ヶ月未満の症例に比べ減少していたと報告している³³⁾。イヌ心房細動モデルにおいては、心房持続性高頻度刺激によりCaチャンネル構成蛋白が減少するとともに、Naチャンネル構成蛋白も減少することが報告されているほか³⁴⁾、結合織の増加や心房の拡大も認められる¹⁵⁾。心房細動が長時間遷延した症例では、膜イオン電流が減少し、さらには心房筋の解剖学的変化が出現することにより、洞調律復帰後の電気生理学的指標の回復は遅れる可能性が推察される。

4. 電気的リモデリングの進んだ心房筋におよぼすverapamilの薬理学的効果

心房高頻度興奮開始前からL型Caチャンネル遮断薬であるverapamilの予防的投与を開始すると心房高頻度興奮にともなう電気的リモデリングの進行を予防できるという報告がある⁹⁻¹²⁾。Tielemanらはヤギの心房細動モデルにおいて、高頻度刺激開始前から生理食塩水を持続投与すると、高頻度刺激開始後、心房有効不応期は有意に短縮したが、verapamilを予防的に持続投与する

と高頻度刺激後の不応期短縮は認められなかったと述べている¹⁰⁾。ヒトにおいても、高頻度刺激による心房細動誘発後に心房不応期は短縮したが、verapamilの予防的投与を行うと心房細動誘発後の不応期短縮は認められなかったと報告されている^{11,12)}。Verapamilの予防的投与は心房高頻度興奮による細胞内へのCa流入を抑制し不応期短縮を予防すると考えられている。

ところが、本研究では慢性心房細動発生後にverapamilが投与された症例において、投与歴のない症例と比較し、単相性活動電位持続時間が短縮するとともに心房有効不応期は短縮していた。Ramannaらの報告でも、慢性心房細動症例において、心房細動中にverapamilを投与すると心房局所の平均心房細動周期が短縮し、心房不応期は短縮する可能性が示された³⁵⁾。また、Pandoziらによれば除細動施行前3週間verapamilを継続投与した症例では、投与されなかった症例に比べ、除細動後の心房有効不応期が短縮していた³⁶⁾。Duytschaeverらの報告では、ヤギ心房細動モデルにおいて、24時間心房細動が遷延した後にverapamilを投与すると、細動周期は短縮し、誘発された心房細動の持続時間は増加した³⁷⁾。このように心房細動が遷延し電気的リモデリングが進行した後に投与が開始された場合、verapamilは不応期の短縮を防止できないだけでなく、L型Caチャンネルへの直接作用によりCa電流を減少させ、活動電位持続時間を短縮することにより、不応期をさらに短縮する可能性がある。不応期の短縮は心房受攻性の亢進を招くため、慢性心房細動発生後にverapamilを投与された症例では除細動後の心房細動再発率は増加する可能性が示唆される。一方、心房細動発生前からの予防的なverapamil投与は、不応期短縮を防ぐことにより心房細動慢性化を防ぎ、除細動後の再発予防に有効である可能性が示唆されている⁹⁻¹²⁾。これらの報告からverapamilの投与開始時期によりその抗細動効果は異なることが予想される。Tielemanらの報告では、心房細動発生前からCaチャンネル遮断薬の予防的投与が開始された症例では除細動後の再発率は有意に低下していたが、発生後から開始された症例では再発率の明らかな低下は認められなかった²⁰⁾。

5. 本研究の限界

本研究では、心房細動除細動後の電気的リモデリングの回復過程を分析したが、心房細動発生前には電気生理学的検査を施行しておらず、リモデリングの進行過程を観察していない。したがって、慢性心房細動の症例と心房細動の既往がない症例との間に認められた電気生理学的

指標の相違が、心房細動が遷延した結果生じたものか、あるいは発生前から存在したものを証明することはできない。発作性心房細動の症例では心房に組織学的異常が認められるという報告があり³⁸⁾、短い心房不応期が心房細動発生前から既に存在し、むしろ発生の原因となった可能性は否定できない。しかしながら、本研究では除細動24時間後に心房不応期は有意に増加し、対照群との差が消失した。これは除細動直後に認められた不応期の短縮が一時的な可逆性変化であることを示している。したがって、除細動直後に観察された短い不応期は、心房細動が発生する前から存在しその原因となったのではなく、心房細動が遷延した結果出現したと考えられる。

心房細動は心房筋全体が関与する電気現象であるが、本研究における電気生理学的指標の計測は右心耳一点でおこなっており、心房の他の部位における電気生理学的指標の変化については言及できない。イヌ心房細動モデルを用いた報告では、左房における不応期の回復度が右房やBachmann束に比べより遅延しており³⁹⁾、本研究対象例でも心房各部位における電気的リモデリングからの回復も不均一である可能性がある。また、verapamilが心房不応期へ及ぼす影響も心房局所により異なるかもしれない。ただし、慢性心房細動症例の手術時に心房4ヶ所で生検を行った研究によると、心房各部位におけるL型CaチャンネルのmRNAの発現には差が認められなかった⁴⁰⁾。

観察されたverapamilによる心房不応期短縮は、Ca電流への直接的な影響だけによるものとは限らない。Verapamilの静脈内投与により血圧が低下し、交感神経が緊張して活性化の遅い外向きK電流が促進された結果、心房不応期が短縮した可能性も考えられる。一方、臨床例で報告されているverapamilによる除細動後の心房細動再発防止効果には、心房不応期への影響以外の要素が関わっている可能性もある。Daoudらによると、除細動直後の心房細動再発例においてverapamilの静脈内投与により次の除細動後の再発を抑制したが、心房性期外収縮数がverapamil投与後有意に低下していた⁴¹⁾。このようにverapamilは心房細動再発時のトリガーとなる心房性期外収縮を抑制することにより再発を予防する可能性もある。

6. 臨床への応用

米国心臓学会の勧告では心房細動が48時間以上遷延した場合、血栓塞栓症の合併を防ぐため、少なくとも3週間以上抗凝固療法を十分に行うまでは除細動を延期すべきであるとしている²⁴⁾。一方、経食道心エコー図検査

を行い左心耳内血栓がなければ抗凝固療法を併用し、48時間以内に除細動を行えば血栓塞栓症の合併を予防できることも報告されている⁴²⁾。本研究では、心房細動持続時間が長い症例ほど、除細動後の心房不応期と心房内伝導時間の異常が遷延することが示された。この電気的リモデリングからの回復の遅延が除細動後の心房細動早期再発につながる可能性を考えれば、持続した心房細動といえども積極的に経食道心エコー図検査を行い、可能であれば早期に除細動を行うことが有益であると推察される。

早期除細動は電気的リモデリングの進行を避ける有効な手段であるが、もう一つのアプローチは電気的リモデリングそのものの阻止である。本研究では、慢性心房細動症例における verapamil の発生後の投与は期待に反して心房不応期を短縮し除細動後の再発を容易にする可能性が示された。しかし、verapamil を心房細動発生前に投与することができれば発生後の電気的リモデリングの進行を阻止できる可能性が予想される。

結 論

本研究では、慢性心房細動除細動後における電気的リモデリングからの回復過程を明らかにするため、慢性心房細動症例において電気的除細動後の右房有効不応期と心房内伝導時間を計測し、心房細動の既往がない症例の計測値と比較検討した。さらに、電気的リモデリングの進行を Ca チャネル遮断薬の投与により阻止しうるか否かを検討するため、慢性心房細動発生後 verapamil の経口投与が開始され除細動後も継続投与された症例において、右房単相性活動電位持続時間と右房有効不応期を測定し、verapamil 投与歴のない症例の計測値と比較した。また、別の慢性心房細動症例に対し電気的除細動後に verapamil を静脈内投与し、その前後において右房有効不応期を計測した。その結果、以下の結論を得た。

1. 慢性心房細動除細動後の心房有効不応期は心房細動の既往がない対照群に比べ有意に短く、St-P 時間および P 波幅は有意に長かった。除細動後 24 時間の間に心房有効不応期は有意に増加したが、24 時間後においても St-P 時間および P 波幅の有意な回復は認めなかった。

2. 心房細動持続時間が長い症例ほど、除細動後 24 時間の心房有効不応期の変化および P 波幅の変化は有意に小さかった。

3. 心房細動遷延後に verapamil の経口投与が開始された症例では、verapamil 投与歴のない症例に比べ電

気的除細動後の単相性活動電位持続時間および心房有効不応期は有意に短かった。また、慢性心房細動除細動後に、verapamil が静脈内投与された群では右房有効不応期が有意に短縮した。

以上の観察から、本研究では慢性心房細動除細動後、心房不応期と心房内伝導時間の異常が遷延し、心房細動が遷延した症例ほど除細動後の電気生理学的指標の回復が遅延することが示された。心房細動遷延後開始された verapamil の経口投与により、また除細動後の verapamil の静脈内投与により、電気的リモデリングが進行した心房の不応期は短縮する可能性が示された。不応期の短縮により心房受攻性が亢進するため、慢性心房細動発生後に verapamil が投与された症例では除細動後の心房細動再発率は増加する可能性がある。したがって、心房細動の治療においては、発生後早期の停止が重要であり、慢性心房細動に対し除細動を考慮する症例では verapamil 投与を控える必要性が示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室小川聡教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に対して直接研究指導を頂きましたサントリー寄附講座心臓病先進治療学三田村秀雄教授に感謝いたします。また本研究に終始ご協力いただいた教室の先生方に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は 48th Annual Scientific Session of American College of Cardiology (1999, New Orleans), 20th of Annual Scientific Sessions of North American Society of Pacing and Electrophysiology (1999, Toronto) において発表した。

文 献

- 1) Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB : Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke : the Framingham Study. Stroke 22 : 983-988, 1991
- 2) Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB : Atrial fibrillation : a major contributor to stroke in the elderly. The Framingham Study. Arch Intern Med 147 : 1561-1564, 1987
- 3) Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, Whisnart JP, Holmes DR Jr, Ilstrup DM, Frye RL : The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades. N Engl J Med 317 : 669-674, 1987
- 4) Godtfredsen J : Atrial fibrillation : Etiology, course and prognosis : A follow-up study of 1212 Cases. Munksgaard, Copenhagen, 1975
- 5) Crijns HJ, van Wijk LM, van Gilst WH, Kingma JH.

- van Gelder IC, Lie KI : Acute conversion of atrial fibrillation to sinus rhythm : clinical efficacy of flecainide acetate. Comparison of two regimens. *Eur Heart J* 9 : 634-638, 1988
- 6) Stambler BS, Wood MA, Ellenbogen KA, Perry KT, Wakefield LK, VanderLugt JT : Efficacy and safety of repeated intravenous doses of ibutilide for rapid conversion of atrial flutter or fibrillation. *Circulation* 94 : 1613-1621, 1996
- 7) Reisinger J, Gatterer E, Heinze G, Wiesinger K, Zeindlhofer E, Gattermeier M, Poelzl G, Kratzer H, Ebner A, Hohenwallner W, Lenz K, Slany J, Kuhn P : Prospective comparison of flecainide versus sotalol for immediate cardioversion of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 81 : 1450-1454, 1998
- 8) Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S : Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* 81 : 512-525, 1997
- 9) Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ : Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation* 94 : 2968-2974, 1996
- 10) Tieleman RG, De Langen C, Van Gelder IC, de Kam PJ, Grandjean J, Bel KJ, Wijffels MC, Allessie MA, Crijns HJ : Verapamil reduces tachycardia-induced electrical remodeling of the atria. *Circulation* 95 : 1945-1953, 1997
- 11) Daoud EG, Knight BP, Weiss R, Bahu M, Paladino W, Goyal R, Man KC, Strickberger SA, Morady F : Effect of verapamil and procainamide on atrial fibrillation-induced electrical remodeling in humans. *Circulation* 96 : 1542-1550, 1997
- 12) Yu WC, Chen SA, Lee SH, Tai CT, Feng AN, Kuo BI, Ding YA, Chang MS : Tachycardia-induced change of atrial refractory period in humans : rate dependency and effects of antiarrhythmic drugs. *Circulation* 97 : 2331-2337, 1998
- 13) Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA : Atrial fibrillation begets atrial fibrillation : a study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 92 : 1954-1968, 1995
- 14) Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S : Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation* 96 : 4027-4035, 1997
- 15) Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM : Chronic rapid atrial pacing : structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 91 : 1588-1595, 1995
- 16) Elvan A, Wylie K, Zipes DP : Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs : Electrophysiological remodeling. *Circulation* 94 : 2953-2960, 1996
- 17) Boutjdir M, Le Heuzey JY, Lavergne T, Chauvaud S, Guize L, Carpentier A, Peronneau P : Inhomogeneity of cellular refractoriness in human atrium : factor of arrhythmia? *Pacing Clin Electrophysiol* 9 : 1095-1100, 1986
- 18) Attuel P, Childers R, Cauchemez B, Poveda J, Mugica J, Coumel P : Failure in the rate adaptation of the atrial refractory period : its relationship to vulnerability. *Int J Cardiol* 2 : 179-197, 1982
- 19) Wang J, Liu L, Feng J, Nattel S : Regional and functional factors determining induction and maintenance of atrial fibrillation in dogs. *Am J Physiol* 271 : H148-158, 1996
- 20) Tieleman RG, Van Gelder IC, Crijns HJ, De Kam PJ, Van Den Berg MP, Haaksma J, Van Der Woude HJ, Allessie MA : Early recurrences of atrial fibrillation after electrical cardioversion : a result of fibrillation-induced electrical remodeling of the atria. *J Am Coll Cardiol* 31 : 167-173, 1998
- 21) Dittrich HC, Erickson JS, Schneiderman T, Blacky AR, Savides T, Nicod PH : Echocardiographic and clinical predictors for outcome of elective cardioversion of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 63 : 193-197, 1989
- 22) Van Gelder IC, Crijns HJ, Van Glist WH, Verwer R, Lie KI : Prediction of uneventful cardioversion and maintenance of sinus rhythm from direct-current electrical cardioversion of chronic atrial fibrillation and flutter. *Am J Cardiol* 68 : 41-46, 1991
- 23) Van Gelder IC, Crijns HJ : Cardioversion of atrial fibrillation and subsequent maintenance of sinus rhythm. *Pacing Clin Electrophysiol* 20 : 2675-2683, 1997
- 24) Laupacis A, Albers G, Dunn M, Feinberg W : Antithrombotic therapy in atrial fibrillation. *Chest* 102 : 426S-433S, 1992
- 25) Franz MR, Burkhoff D, Spurgeon H, Weisfeldt ML, Lakatta EG : In vitro validation of a new cardiac catheter technique for recording monophasic action potential. *Eur Heart J* 7 : 34-41, 1986
- 26) Gaspo R, Bosch RF, Bou-Abboud E, Nattel S : Tachycardia-induced changes in sodium current in a chronic dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 81 : 1045-1052, 1997
- 27) Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, Clark CE, Redwood DR, Itscoitz SB, Epstein SE : Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation* 53 : 273-279, 1976
- 28) Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S : Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs : atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 100 : 87-95, 1999
- 29) Stafford PJ, Kamalvand K, Tan K, Vincent R, Sulke N : Prediction of maintenance of sinus rhythm after cardioversion of atrial fibrillation by analysis of serial signal-averaged P waves. *Pacing Clin Electrophysiol* 21 : 1387-1395, 1998

- 30) Franz MR, Karasik PL, Li C, Moubarak J, Chavez M : Electrical remodeling of the human atrium : Similar effects in patients with chronic atrial fibrillation and atrial flutter. *J Am Coll Cardiol* 30 : 1785-1792, 1997
- 31) Brundel BJ, van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Deelman LE, Tieleman RG, Grandjean JG, van Gilst WH, Crijns HJ : Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 42 : 443-454, 1999
- 32) Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, Tieleman RG, Tuinenburg AE, Wietses M, Grandjean JG, Van Gilst WH, Crijns HJ : Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation* 103 : 684-690, 2001
- 33) Van Gelder IC, Brundel BJ, Henning RH, Tuinenburg AE, Tieleman RG, Deelman L, Grandjean JG, De Kam PJ, Van Gilst WH, Crijns HJ : Alterations in gene expression of proteins involved in the calcium handling in patients with atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10 : 552-560, 1999
- 34) Yue L, Melnyk P, Gaspo R, Wang Z, Nattel S : Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 84 : 776-784, 1999
- 35) Ramanna H, Elvan A, Wittkamp FH, de Bakker JM, Hauer RN, Robles de Medina EO : Increased dispersion and shortened refractoriness caused by verapamil in chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 37 : 1403-1407, 2001
- 36) Pandozi C, Bianconi L, Calo L, Castro A, Lamberti F, Scianaro MC, Gentilucci G, Santini M : Postcardioversion atrial electrophysiologic changes induced by oral verapamil in patients with persistent atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 36 : 2234-2241, 2000
- 37) Duytschaever MF, Garratt CJ, Allessie MA : Profibrillatory effects of verapamil but not of digoxin in the goat model of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 11 : 1375-1385, 2000
- 38) Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A : Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 96 : 1180-1184, 1997
- 39) Lee SH, Lin FY, Yu WC, Cheng JJ, Kuan P, Hung CR, Chang MS, Chen SA : Regional differences in the recovery course of tachycardia-induced changes of atrial electrophysiological properties. *Circulation* 99 : 1255-1264, 1999
- 40) Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS, Huang SK, Tseng YZ, Lien WP : Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca (2+)-ATPase mRNA in human atrial fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban : an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling. *J Am Coll Cardiol* 33 : 1231-1237, 1999
- 41) Daoud EG, Hummel JD, Augustini R, Williams S, Kalbfleisch SJ : Effect of verapamil on immediate recurrence of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 11 : 1231-1237, 2000
- 42) Manning WJ, Silverman DI, Keighley CS, Oettgen P, Douglas PS : Transesophageal echocardiographically facilitated early cardioversion from atrial fibrillation using short-term anticoagulation : final results of a prospective 4.5-year study. *J Am Coll Cardiol* 25 : 1354-1361, 1995

学位論文

日本人のケラトエピセリン関連角膜ジストロフィの分子遺伝学的
および免疫組織学的解析

慶應義塾大学医学部眼科学教室

(指導：小口芳久教授)

小西美奈子

(平成14年6月3日受付)

Key words : granular corneal dystrophy, lattice corneal dystrophy, avellino corneal dystrophy, *TGFBI* gene, kerato-epithelin

常染色体優性遺伝角膜ジストロフィは、進行性に角膜各層に変性物質が沈着し、角膜混濁のために年齢とともに視力低下をきたす疾患で、これまで細隙灯検査による角膜所見（混濁の形態および混濁の部位）および病理所見で分類されてきた¹⁾。その代表的な疾患が、角膜実質ジストロフィである顆粒状角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィ、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィ、シュナイダー角膜ジストロフィであり、それらは視力低下をきたした場合、角膜移植の適応となる。顆粒状角膜ジストロフィは角膜実質浅層にマッソントリクローム染色にて赤く染色される顆粒状の沈着物を認めることが特徴であるが、沈着物の本体は不明である。格子状角膜ジストロフィは3つの型に分類され、角膜実質に線状、格子状の混濁を生じ、その格子状混濁はアミロイドの沈着によって生じる。格子状の混濁が細く、角膜中央部にびまん性の淡い混濁を10代から生じるものをI型といい、中年以降の発症で、太い線状混濁を示すものはIIIA型と呼ばれている^{2,3)}。一方、全身的に家族性アミロイドポリニューロパチー4型に伴う角膜の格子状混濁

濁はII型に分類され、日本では数家系報告がある⁴⁾。

1988年に顆粒状の混濁と角膜実質深層に線状もしくは針状混濁の両方が存在する、すなわち顆粒状角膜ジストロフィと格子状角膜ジストロフィの両方の特徴を有する角膜ジストロフィが新たに報告された⁵⁾。この角膜ジストロフィは、実質浅層にはマッソン・トリクローム染色で赤染する沈着物、および深層にはコンゴレッド染色において偏光顕微鏡下で複屈折を呈するアミロイドの沈着が認められた。この角膜ジストロフィはイタリアのアベリノ(Avellino)地方に集中していたことから⁶⁻⁹⁾、当初はアベリノ地方に限られた遺伝性の角膜ジストロフィと考えられ、アベリノ角膜ジストロフィと呼ばれた⁶⁾。しかし、その後この角膜ジストロフィはイタリアのアベリノ地方だけでなく、ドイツ出身の家系例⁷⁾や日本人3例の報告から明らかとなった¹⁰⁾。

一方、分子遺伝学的には、1994年頃より顆粒状角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィI型、アベリノ角膜ジストロフィなどの常染色体優性遺伝角膜ジストロフィの疾患遺伝子が、連鎖解析により5番染色体の長

本論文は、Konishi M, Mashima Y, Nakamura Y, Yamada M, Sugiura H : Granular-lattice (Avellino) corneal dystrophy in Japanese patients. *Cornea* 16 : 635-638, 1997 の一部、Konishi M, Mashima Y, Yamada M, Kudoh J, Shimizu N : The classic form of granular corneal dystrophy associated with R555W mutation in the *BIGH3* gene is rare in Japanese patients. *Am J Ophthalmol* 126 : 450-452, 1998 の一部、Mashima Y, Nakamura Y, Noda K, Konishi M, Yamada M, Kudoh J, Shimizu N : A novel mutation at codon 124 (R124L) in the *BIGH3* gene is associated with a superficial variant of granular corneal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 117 : 90-93, 1999 の一部、Konishi M, Yamada M, Nakamura Y, Mashima Y : Varied appearance of cornea of patients with corneal dystrophy associated with R124H mutation in the *BIGH3* gene. *Cornea* 18 : 424-429, 1999 の一部、および Konishi M, Yamada M, Nakamura Y, Mashima Y : Immunohistology of kerato-epithelin in corneal stromal dystrophies associated with R124 mutations of the *BIGH3* gene. *Curr Eye Res* 21 : 891-896, 2000 の一部を含む。

腕 (5q) に位置することが報告されたが、3つの疾患が1つの遺伝子の異常により発症するのか、または異なる3つの疾患遺伝子が、この領域に存在するのかは不明であった¹¹⁻¹⁴⁾。その後1997年に、Munierらは顆粒状角膜ジストロフィ、アベリノ角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィI型、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィが共通の遺伝子の異常により発症することを報告した¹⁵⁾。すなわち、5番染色体長腕に位置する *TGFBI* (transforming growth factor beta-induced) 遺伝子 (*BIGH3* 遺伝子, OMIM Number 601692) 内において、顆粒状角膜ジストロフィは R555W 変異、アベリノ角膜ジストロフィは R124H 変異、格子状角膜ジストロフィI型は R124C 変異、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィは R555Q 変異が確認された¹⁵⁾。

TGFBI 遺伝子は肺の腺癌の細胞において TGF- β によって発現が誘発される 683 個のアミノ酸をコードする遺伝子である。このタンパクは β ig-h3 と呼ばれ、ヒトの心臓、精巣、卵巣、副腎、皮膚など多くの組織に存在する¹⁶⁾。Munier らは、角膜の *TGFBI* 遺伝子産物をケラトエピセリン (kerato-epithelin) と命名した¹⁵⁾。ウサギの角膜上皮、角膜実質、角膜内皮に存在し^{17,18)}、ヒト角膜では主に角膜上皮に発現がみられる¹⁷⁾。角膜における働きは解明されていないが、細胞の接着やインテグリンのリガンドとしての作用や、コラーゲンタイプ VI とともに検出されることから細胞外マトリクスの構成に関与していることが示唆されている¹⁹⁾。

本研究では慶應義塾大学病院眼科において臨床所見から顆粒状角膜ジストロフィ、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィI型と診断されていた症例に対し、インフォームドコンセントを得た後、まず *TGFBI* 遺伝子を解析した。顆粒状角膜ジストロフィは1家系を除き他はすべて R124H 変異をもち、日本でこれまで顆粒状角膜ジストロフィと診断していた疾患はほとんどがアベリノ角膜ジストロフィであることを分子遺伝学的¹⁹⁾および病理組織学的²⁰⁾にも明らかにした。残りの1家系は R555W 変異の顆粒状角膜ジストロフィであった²¹⁾。一方、日本人の格子状角膜ジストロフィI型はすべて R124C 変異を持ち、Munier らの報告と同じであった¹⁵⁾。さらに、臨床的にライス・ビュックラース角膜ジストロフィと診断された家系において、1999年に新規の R124L 変異を報告した²²⁾。次に、遺伝子変異と臨床所見および臨床経過の関連を検討し、遺伝子変異と臨床像はよく対応していること、また R124H 変異を呈するアベリノ角膜ジストロフィの細隙灯所見は多彩であり、病理組織所見と合わせ細隙灯所見

を2つのタイプに分類できることを報告した²³⁾。

上述の角膜実質ジストロフィが *TGFBI* 遺伝子の変異で発症することは判明したが、角膜沈着物がケラトエピセリンか否かの証明はなされていなかった。そこで本研究ではさらに、124番アミノ酸残基アルギニンの変異により発症する3つの角膜ジストロフィ、すなわちアベリノ角膜ジストロフィ (R124H)、表在型顆粒状角膜ジストロフィ (R124L)、格子状角膜ジストロフィI型 (R124C) において、免疫組織化学的に沈着物の検討を行い、沈着物がケラトエピセリンを含むことを明らかにした²⁴⁾。これらの分子遺伝学的新知見から、顆粒状角膜ジストロフィ、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィの新しい臨床分類を提唱した。

対 象

慶應義塾大学病院眼科角膜外来通院中で臨床症状、臨床所見からこれまでの分類により、顆粒状角膜ジストロフィ、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィI型と診断されていた32家系39例 (顆粒状角膜ジストロフィ27例、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィ1例、格子状角膜ジストロフィI型11例) を対象とした (第1表)。臨床診断は細隙灯所見に基づいて行われた。年齢は角膜移植手術時の年齢を示し、顆粒状角膜ジストロフィで手術未施行例は細隙灯写真撮影時の年齢とした。顆粒状角膜ジストロフィの症例は男性7例、女性20例で、平均年齢 61.0 ± 15.2 (平均 \pm 標準偏差) 歳、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィは62歳女性、格子状角膜ジストロフィI型の症例は男性10例、女性1例で、平均年齢は 49.7 ± 11.1 歳であった。症例4と5、症例29と30、症例31と32、症例33から37は同じ家系の症例である。また症例8の両親は血族結婚であった。

方 法

1. *TGFBI* 遺伝子変異の検出

第1表の顆粒状角膜ジストロフィ27例、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィ1例、格子状角膜ジストロフィI型11例の合計39例に対して、インフォームドコンセントを得た後、患者白血球からDNAを抽出し、*TGFBI* 遺伝子のエクソン4と12を polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した。PCR用のプライマーは、Munier ら¹⁵⁾ の論文に基づき、エクソン4では EXON4F (5'-CCCCAGAGGCCATCCCTCCT-3') と

角膜実質ジストロフィの解析

第1表 ケラトエピセリン関連角膜ジストロフィの症例。§1, §2, §3, §4: 同一家系。*1GCD: 顆粒状角膜ジストロフィ。*2RBCD: ライス・ビュックラース角膜ジストロフィ。*3LCD1: 格子状角膜ジストロフィ1型。*4LKP: 表層角膜移植術。*5PKP: 全層角膜移植術。*6type1a: 円形の顆粒状混濁が主なもの。*7type1b: 円形の混濁より星芒状混濁が多いもの。*8type2: 角膜実質浅層の細かい混濁が主なもの。*9 陽性: マッソントリクローム染色においては赤く染まるものを陽性, コンゴレッド染色においては偏光顕微鏡下で複屈折を呈するものを陽性とする。*10 陰性: 陽性所見以外を陰性とする。※: ホモ変異。

症例	臨床診断	性別	年齢	手術	顆粒状混濁	びまん性上皮混濁	遺伝子変異	マッソントリクローム染色	コンゴレッド染色(偏光)	ケラトエピセリン免疫染色
1	GCD ^{§1}	女	80	LKP ^{§4}	type 1a ^{§6}	有	R124H	陽性 ^{§9}	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
2	GCD	女	79	LKP	type 1a	有	R124H	陽性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
3	GCD	女	86	PKP ^{§5}	type 1a	有	R124H	陽性	陽性	施行せず
4 ^{§1}	GCD	男	69	LKP	type 2 ^{§8}	有	R124H	陽性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
5 ^{§1}	GCD	女	71	LKP	type 2	有	R124H	陽性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
6	GCD	女	72	PKP	type 1a	有	R124H	陽性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
7	GCD	女	65	LKP			R124H	陽性	陽性	施行せず
8	GCD	女	10	LKP			R124H [※]	陽性	陰性	KE-2,KE-15ともに陽性
9	GCD	男	52	施行せず	type 1a	無	R124H			
10	GCD	女	52	施行せず	type 1a	無	R124H			
11	GCD	男	72	施行せず	type 1a	有	R124H			
12	GCD	男	54	施行せず	type 1a	無	R124H			
13	GCD	女	60	施行せず	type 1a	無	R124H			
14	GCD	男	61	施行せず	type 1a	無	R124H			
15	GCD	女	50	施行せず	type 1a	無	R124H			
16	GCD	女	51	施行せず	type 1a	無	R124H			
17	GCD	女	53	施行せず	type 1a	無	R124H			
18	GCD	男	61	施行せず	type 1a	無	R124H			
19	GCD	女	50	施行せず	type 1a	無	R124H			
20	GCD	女	63	施行せず	type 1a	無	R124H			
21	GCD	女	74	施行せず	type 1b ^{§7}	無	R124H			
22	GCD	女	63	施行せず	type 1b	有	R124H			
23	GCD	女	68	施行せず	type 1b	有	R124H			
24	GCD	女	71	施行せず	type 1a	無	R124H			
25	GCD	男	50	施行せず	type 2	有	R124H			
26	GCD	女	72	施行せず	type 2	有	R124H			
27	GCD	女	39	施行せず			R555W			
28	RBCD ^{§2}	女	62	PKP			R124L	陽性	陰性	KE-2,KE-15ともに陽性
29 ^{§2}	LCD1 ^{§3}	男	63	PKP			R124C	陽性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
30 ^{§2}	LCD1	男	44	LKP			R124C	陰性 ^{§10}	陽性	KE-2陽性,KE-15陰性
31 ^{§3}	LCD1	男	48	PKP			R124C	陽性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
32 ^{§3}	LCD1	女	46	LKP			R124C	陽性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
33 ^{§4}	LCD1	男	61	PKP			R124C	施行せず	陽性	施行せず
34 ^{§4}	LCD1	男	55	PKP			R124C	施行せず	陽性	施行せず
35 ^{§4}	LCD1	男	55	PKP			R124C	陽性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
36 ^{§4}	LCD1	男	25	LKP			R124C	陽性	陽性	KE-2陽性,KE-15陰性
37 ^{§4}	LCD1	男	61	PKP			R124C	施行せず	陽性	施行せず
38	LCD1	男	49	PKP			R124C	陰性	陽性	KE-2,KE-15ともに陽性
39	LCD1	男	40	PKP			R124C	施行せず	陽性	施行せず

EXON4R (5'-CCGGGCAGACGGAGGTCATC-3'), エクソン12ではEXON12F (5'-GTTGACAGGTGACATTTCT-3')とEXON12R (5'-TATCAAAAAGGATCACTACT-3')を使用し, 以下のプロトコールで行った。94°Cで5分の後, 94°Cで1分, 55°Cで1分, 72°C

で1分を35サイクル, その後72°Cで7分とした。次にダイターミネーター法 (PRISM Dye Deoxy Terminator cycle sequencing kit ; Applied Biosystems) で自動DNAシーケンサー (ABI PRISM 377 ; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて, 増幅さ

れた PCR 産物の塩基配列を決定した^{19,21,22)}。

2. TGFBI 遺伝子変異と臨床所見の関連に関する検討

方法1で TGFBI 遺伝子変異を調べた症例 39 例に対して、角膜の細隙灯写真より、角膜混濁の特徴を検討し、その臨床的特徴と遺伝子変異の関連について検討した。撮影した角膜の細隙灯写真(角膜移植手術を施行された症例は術前の写真)を基に、遺伝子変異別に角膜の混濁の形状、程度、臨床経過を検討した。

3. ケラトエピセリン関連角膜ジストロフィにおける病理所見

第1表で角膜移植手術(全層角膜移植手術、表層角膜移植手術)を施行された14例において病理組織学的検討を行った。症例の内訳は遺伝子診断でアペリノ角膜ジストロフィと診断された6例(症例1, 2, 4, 5, 6, 8)、表在型顆粒状角膜ジストロフィと診断された1例(症例28)、格子状角膜ジストロフィI型と診断された7例(症例29~32, 35, 36, 38)である。

手術時に得られた角膜をリン酸バッファー添加ホルマリン固定、パラフィン包埋し、切片を作成した後、H-E染色、マッソントリクローム染色もしくはマロリー染色、コンゴレッド染色、ケラトエピセリンの抗体による免疫組織染色を行った。抗ケラトエピセリン抗体は Schorderet らのグループにより提供された KE-2、KE-15²⁵⁾を用いた。これらはウサギで作成されたポリクロナール抗体で、KE-2はケラトエピセリンのC末端側426番目から682番目のアミノ酸に対して作られ、KE-15はN末端側69番目から364番目のアミノ酸に対して作られたものである。それぞれウエスタンブロットでヒトのケラトエピセリンを認識することが示されている²⁵⁾。

免疫組織染色の方法としてはABC法を用いた。パラフィン包埋された切片をキシレンに通した後、100%エチルアルコールに通した。内因性ペルオキシダーゼの阻止のため、0.3%過酸化水素水とメタノールを1:9に混合した溶液内に45分間浸透させた。その後100%エチルアルコールから70%エチルアルコールで親水させ、PBS(0.01mol/Lリン酸緩衝食塩水)で洗浄した。次に0.05% Pronase(Dako社製; Glostrup, Denmark)を15分間作用させた。PBSで洗浄後、正常ヤギ血清、正常ウシ血清を各10分間作用させ、非特異的応答を抑制した。次に上記の抗ケラトエピセリン抗体を10倍希釈したものを1次抗体として30分間作用させた。陰性対照として正常ウサギ血清を10倍希釈したものをを用いた。

2次抗体としてビオチン化抗ウサギ抗体を30分間反応させ、ついでストレプトアビジン-ペルオキシダーゼを30分間反応させた。各段階での洗浄は1Mの食塩を含むPBSで行った。発色はジアミノベンチジン(DAB)を用い、ヘマトキシリンで対比染色を行った²⁶⁾。以上の過程は室温で行った。

染色された各標本は光学顕微鏡下で観察した。コンゴレッド染色された切片は偏光レンズを使用し、アミロイドの有無を偏光顕微鏡下の複屈折の有無で観察した。マッソントリクローム染色もしくはマロリー染色は赤く染色された場合を陽性所見とした。なお病理組織学的検索を行った症例は初回手術例のみである。

結 果

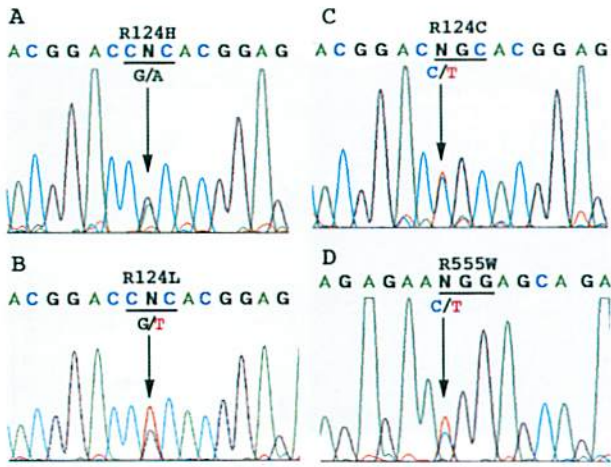
1. 常染色体優性角膜実質ジストロフィにおける TGFBI 遺伝子変異の検出

今まで顆粒状角膜ジストロフィと臨床的に診断されていた症例1から27において、124番目のアミノ酸においてアルギニンがヒスチジンに変異するR124H変異を症例1から26に認めた(第1図A)^{19,23)}。そのうち症例8はホモ変異で、ほかの症例はヘテロ変異であった。症例27は555番目のアミノ酸においてアルギニンがトリプトファンへ変異するR555W変異²⁴⁾であった(第1図D)。症例28は今まで報告されていなかった新たな変異で、124番目のアミノ酸においてアルギニンがロイシンへ変異するR124L変異²²⁾であった(第1図B)。格子状角膜ジストロフィI型と臨床的に診断された症例29から39は全例124番目のアミノ酸においてアルギニンがシステインに変異するR124C変異であった(第1図C)¹⁹⁾。

2. TGFBI 遺伝子変異と臨床所見の関連

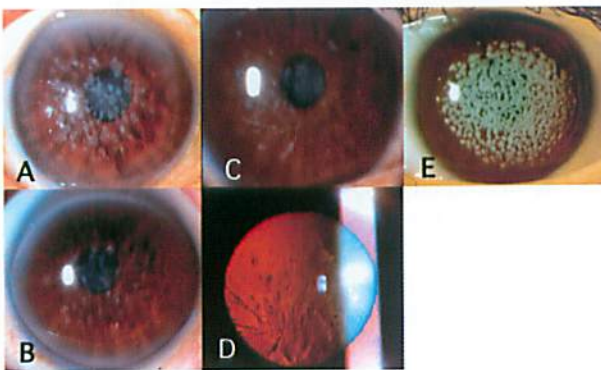
TGFBI 遺伝子においてR124H変異を認めたアペリノ角膜ジストロフィ26例のうち、症例7, 8を除く24例は角膜実質浅層の灰白色の円形、顆粒状混濁が特徴で、さらに実質深層には金平糖もしくは星芒状の混濁が認められた。これらの症例は角膜混濁による視力低下は中年以降に始まり、徐々に進行したが、角膜移植手術を必要とするほどの視力低下は60歳代以降が多かった。また経過中に角膜上皮びらんによる羞明、異物感、疼痛などを自覚した症例はなかった。

さらに詳しく角膜所見を検討したところ、この24例の症例の角膜所見は2つのタイプに分けられた。もっとも多かったのは典型的な円形の顆粒状混濁もしくは星



第1図 ケラトエビセリン関連角膜ジストロフィのDNAシーケンス。A：R124H変異のDNAシーケンス。アルギニンがヒスチジン (CGC→CAC) に変異している。B：R124L変異のDNAシーケンス。アルギニンがロイシン (CGC→CTC) に変異している。C：R124C変異のDNAシーケンス。アルギニンがシステイン (CGC→TGC) に変異している。D：R555W変異のDNAシーケンス。アルギニンがトリプトファン (CGG→TGG) に変異している。

芒状混濁を主に認めるもので (第1表の type 1a および type 1b), 20例がこれに属した。混濁の形状は円形, 顆粒状のものが多いもの (type 1a, 第2図A) とより深層にみられる星芒状混濁が多いもの (type 1b, 第2図B) があったが, 両者とも角膜上皮下混濁はびまん性でなく, 円形と星芒状の両者の形状の混濁が混在してい

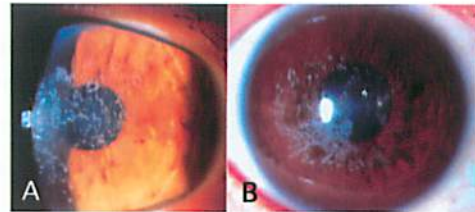


第2図 R124H変異角膜ジストロフィの細隙灯所見。A：79歳女性 (症例2)。顆粒状の混濁が主にみられ, 星芒状混濁はわずかである。B：68歳女性 (症例23)。星芒状混濁が主にみられる。C：69歳男性 (症例4)。混濁はA, Bより細かく, 角膜の表層に局限している。D：症例4の徹照法による撮影。中央のびまん性角膜上皮下混濁が顕著である。E：10歳女児 (症例8)。ホモ変異の症例で, 濃く密な角膜実質浅層の混濁を認める。

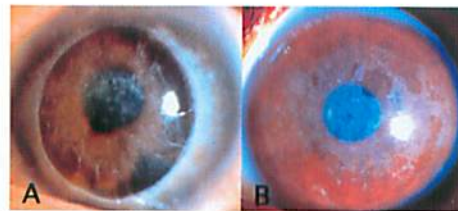
た。このタイプに属する症例の平均年齢は 63.6 ± 11.1 (平均±標準偏差) 歳であった。角膜中央部の上皮下混濁は, 顆粒状混濁の周囲に局限してみられる程度で, 上皮下混濁のない症例もあった。上皮下混濁のみられた症例の平均年齢は 74.3 ± 7.8 歳で, みられなかった症例の平均年齢は 57.8 ± 8.0 歳であった。両者の年齢は有意差があり ($p < 0.05$, Mann-Whitney's U test にて), 年齢が高くなるほど上皮下混濁は増加する傾向を示した。

2番目のタイプはびまん性の角膜上皮下の混濁が特徴的で, 顆粒状混濁は type 1より細かく, 線状の混濁も認めた (第1表の type 2, 第2図C,D)。このタイプは4例あり, 平均年齢は 65.5 ± 10.4 歳であった。混濁は主に角膜上皮下から実質浅層に局限しており, type 1にみられたような実質深層の沈着物は認めなかった。症例8はR124Hのホモ変異を持つ症例で, 角膜実質浅層の顆粒状混濁はヘテロの症例より, 濃く, 密で, 視力低下も幼少時より生じていた (第2図E)。角膜上皮びらんの既往はヘテロ変異の症例同様認めなかった²⁶⁾。

症例27のR555W変異を持つ症例は, 欧米でよくみられる顆粒状角膜ジストロフィ (Groenouw type 1) と診断された。20歳代より角膜上皮障害を繰り返しており, 細隙灯顕微鏡下で角膜の表層部に細かい, 一部輪状の表在性の灰白色沈着物がみられ (第3図A), R124H変異のアペリノ角膜ジストロフィとは臨床経過



第3図 R555W変異角膜ジストロフィの細隙灯顕微鏡写真。A：発端者の39歳女性 (症例27)。角膜に細かい, 一部輪状の表在性の灰白色沈着物を認める。B：Aの子の角膜所見。Aと同様の細かい沈着物を認める。



第4図 R124L変異角膜ジストロフィの細隙灯顕微鏡写真。A：発端者の62歳女性 (症例28)。角膜移植術後の角膜混濁の再発で, びまん性に角膜表層に混濁を認める。B：Aの孫。地図状の角膜混濁を認める。

も角膜所見も異なっていた。子(22歳)も同様な角膜所見と再発性の角膜上皮障害の既往があった(第3図B)²¹⁾。

症例28はR124L変異が新たに同定されたが、角膜上皮下がびまん性に白色に混濁していた(第4図A)。10歳代より再発性角膜上皮びらんの既往があり、20歳代より視力が低下し、他院にて表層角膜移植術を施行されていた。当科受診時は角膜移植片に角膜混濁が再発していたが、角膜移植後であったため、診断が確定しなかった。しかし症例28の子、孫の角膜所見を検査し、孫に地図状の角膜上皮混濁(第4図B)がみられたことから、臨床的にライス・ビュックラース角膜ジストロフィと診断された²²⁾。症例28の子、孫ともに幼少時よりの角膜上皮びらんによる眼痛を繰り返し、視力低下も10歳代から生じた。

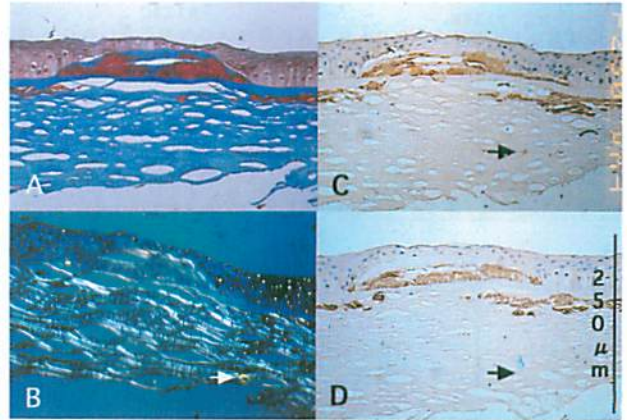
症例29から39の格子状角膜ジストロフィI型はR124C変異を持ち、角膜の格子状混濁が特徴である。幼少時より再発性角膜上皮びらんを生じ、20代から角膜中央部にびまん性、表在性の混濁が出現し、その後徐々に視力が低下し、平均51.5±11.0歳で角膜移植手術を受けた。

3. ケラトエピセリン関連角膜ジストロフィにおける病理所見

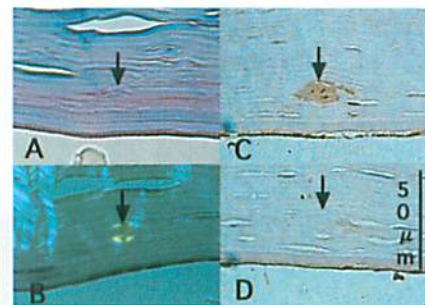
1) アベリノ角膜ジストロフィ

H-E染色にて各症例とも好酸性の無構造の沈着物が角膜上皮から実質にかけて存在した。角膜上皮は菲薄化し、ボーマン層が好酸性の沈着物によって破壊されている部分があった。これらの沈着物はマッソントリクローム染色もしくはマロリー染色で赤く染まり、従来の顆粒状角膜ジストロフィに特徴的とされる所見を示した(第5図A)。コンゴレッド染色では6例中5例が偏光顕微鏡下でapple core greenの複屈折を示し、アミロイドの沈着が証明された。このアミロイドの沈着はマッソントリクローム染色陽性の沈着部位と一致していることが多かったが、実質深層ではマッソントリクローム染色で陰性の沈着物にも認められた(第5図B、第6図A、B)。症例8は複屈折を認めなかった。

ケラトエピセリンの免疫染色の結果は、KE-2、KE-15ともに陽性で、角膜上皮とボーマン層の間と実質内に陽性の沈着物がみられた。角膜上皮とボーマン層の間および実質浅層において、KE-2、KE-15の陽性部位はマッソントリクローム染色陽性部位と一致していた(第5図C、D)。実質深層にアミロイドの沈着を認めた症例では、その部位はマッソントリクローム染色で陰性、



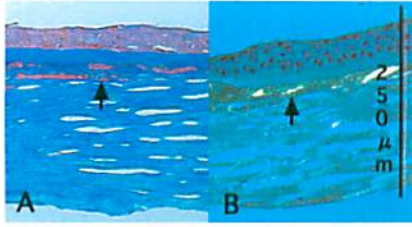
第5図 R124H変異角膜ジストロフィの病理写真(71歳女性、症例5)。バーは250μmを示す。A:マッソントリクローム染色。沈着物は赤く染色されている。B:偏光顕微鏡下でのコンゴレッド染色。マッソントリクローム染色で陽性部位と別の部位に複屈折を認める(白矢印)。C:KE-2による免疫染色。マッソントリクローム染色で陽性部位と一致して陽性所見を認める。D:KE-15による免疫染色。KE-2やマッソントリクローム染色で陽性部位と同部位が陽性に染色されている。黒矢印で示した沈着物はコンゴレッド染色とKE-2で陽性だが、KE-15は陰性である。(Konishi M et al: Curr Eye Res 21: 891-896, 2000の第1図を、許可を得て転載)



第6図 R124H変異角膜ジストロフィの72歳女性の病理写真。バーは50μmを示す。A:マッソントリクローム染色。実質深層の沈着物は染まらない(黒矢印)。B:コンゴレッド染色。沈着物は偏光顕微鏡下で複屈折を呈する(黒矢印)。C:KE-2による免疫染色。角膜実質深層の沈着物は陽性所見を示す(黒矢印)。D:KE-15による免疫染色。6B、6Cで陽性であった沈着物はKE-15による染色は陰性である(黒矢印)。(Konishi M et al: Curr Eye Res 21: 891-896, 2000の第2図を、許可を得て転載)

KE-2陽性であったが、KE-15で陰性であった(第6図C、D)。

症例4、5(第1表のtype2の細隙灯所見の症例)は実質浅層に帯状のアミロイドが沈着していた(第7図)。

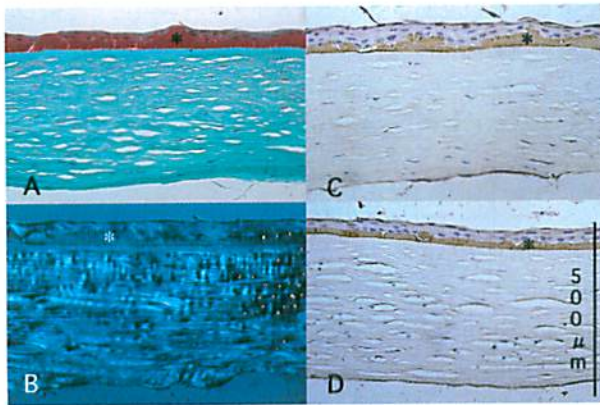


第7図 R124H 変異角膜ジストロフィの病理写真 (69歳男性, 症例4). バーは250 μmを示す. A: マッソントリクローム染色. 実質浅層に帯状の赤い染色を認める (矢印). B: 偏光顕微鏡下でのコンゴレッド染色. Aでマッソントリクローム染色陽性部位と一致して複屈折を認める (矢印).

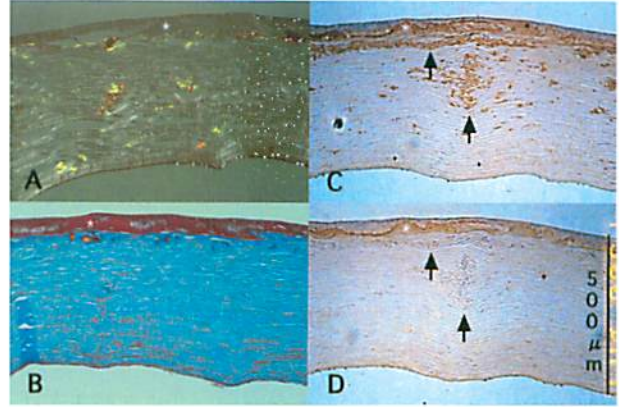
この部位はマッソントリクローム染色陽性, KE-2, KE-15 陽性であった. 実質深層には沈着物は存在しなかった.

2) 表在型顆粒状角膜ジストロフィ

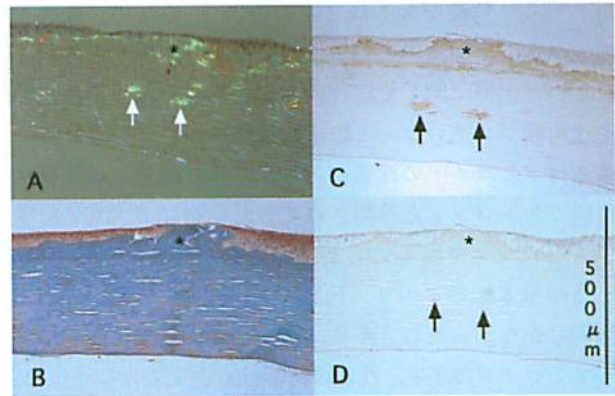
沈着物は角膜上皮とボーマン層の間に局限してみられ, 実質内には存在しなかった. この沈着物はマッソントリクローム染色陽性であったが, コンゴレッド染色で複屈折を認めず, KE-2, KE-15 はともに陽性であった (第8図, 症例28).



第8図 表在型顆粒状角膜ジストロフィの病理写真. バーは500 μmを示す. A: マッソントリクローム染色. 角膜上皮下の沈着物が赤く染色されている (*). B: コンゴレッド染色. 沈着物は複屈折を示さない (*). C: KE-2による免疫染色. マッソントリクローム染色で赤染した部位と同じ部分が陽性である (*). D: KE-15による免疫染色. 8A, 8Cで陽性であった部位に一致して陽性所見を認める (*). (Konishi M et al: Curr Eye Res 21: 891-896, 2000の第3図を, 許可を得て転載)



第9図 格子状角膜ジストロフィ1型 (63歳男性, 症例29)の病理写真. バーは500 μmを示す. A: コンゴレッド染色. 角膜実質浅層と深層の沈着物が複屈折を呈する. 角膜上皮とボーマン層の間の沈着物は複屈折を示さない (*). B: マッソントリクローム染色. 角膜上皮とボーマン層の間の沈着物が赤く染色されている (*). この沈着物の層は9Aでコンゴレッド染色陽性であった層よりも表層である. C: KE-2による免疫染色. 角膜実質内の沈着物および角膜上皮とボーマン層の間の沈着物の両者とも陽性である (*, 矢印). D: KE-15による免疫染色. 上皮とボーマン層の間の沈着物は陽性 (*) だが, 実質内の沈着物は陰性である (矢印). (Konishi M et al: Curr Eye Res 21: 891-896, 2000の第4図を, 許可を得て転載)



第10図 格子状角膜ジストロフィ1型 (49歳男性, 症例38)の病理写真. バーは500 μmを示す. A: コンゴレッド染色. 角膜実質浅層と深層の沈着物に複屈折を認める (*, 矢印). B: マッソントリクローム染色. 角膜実質内の沈着物および角膜上皮とボーマン層の間の沈着物の両者とも陰性である (*). C: KE-2による免疫染色. 角膜実質内の沈着物および角膜上皮とボーマン層の間の沈着物の両者とも陽性である (*, 矢印). D: KE-15による免疫染色. KE-2で陽性となる沈着物はすべて陰性である (*, 矢印). (Konishi M et al: Curr Eye Res 21: 891-896, 2000の第5図を, 許可を得て転載)

3) 格子状角膜ジストロフィ I 型

アミロイドの沈着は全例実質浅層から深層全層にみられた。マッソントリクローム染色は7例中5例(症例29, 31, 32, 35, 36)に陽性であったが、その染色部位は角膜上皮とボーマン層との間のごく表層であった。この5例においては、コンゴレッド染色で陽性のアミロイドの沈着部位はボーマン層より深層で、マッソントリクローム染色で陽性になる層より深いことが特徴であった。(第9図A, B)。KE-2はボーマン層より表層の沈着物も実質内の沈着物も陽性であった(第9図C)。KE-15はボーマン層より表層の非アミロイド性沈着物にのみ陽性で、アミロイドの沈着部位は陰性であった(第9図D)。

マッソントリクローム染色が陰性の2例(症例30, 38)は角膜上皮とボーマン層との間においてもアミロイドの沈着を認めた(第10図A, B)。すべての沈着物においてKE-2は陽性であったが、KE-15は陰性であった(第10図C, D)。

考 察

1. 遺伝子変異型と臨床表現型の関連

従来日本では、家族性に角膜に類円形や金平糖様の灰白色の顆粒状混濁がみられる症例は顆粒状角膜ジストロフィと臨床的に診断されていた。しかし、1988年以降のアベリノ角膜ジストロフィの報告⁸⁻⁹⁾を基に、慶應義塾大学病院に通院中の顆粒状角膜ジストロフィと診断されていた症例に関して病理所見を再検討したところ、顆粒状角膜ジストロフィと臨床的に診断されていた症例の多くはアミロイドの沈着があり、細隙灯所見上は顆粒状角膜ジストロフィと診断されていた症例はアベリノ角膜ジストロフィであることが推測された。しかし、1997年当時日本人のアベリノ角膜ジストロフィの報告¹⁰⁾は3症例しかなかったことから、当初はこの結果は加齢に伴うアミロイドの産生、沈着の可能性も否定できなかった。一方、1997年にMunierらは、*TGFBI* 遺伝子において、顆粒状角膜ジストロフィはR555W変異、アベリノ角膜ジストロフィはR124H変異、格子状角膜ジストロフィ I 型はR124C変異、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィはR555Q変異を報告した¹⁵⁾。当教室で行った遺伝子検索で従来顆粒状角膜ジストロフィと臨床診断されていた症例のほとんどがR124H変異を示し¹⁹⁾、R555W変異は1家系のみであった²¹⁾ことから、分子遺伝学的にもほとんどがアベリノ角膜ジストロフィであることが判明した。先の病理結果もアミロイドの沈着は加

齢によるものでなく、遺伝子変異によるものであることが推定された。また、血族結婚の家系である10歳の症例(症例8)はR124H変異のホモ変異で、臨床上是重症型であったが、手術時に摘出された角膜組織片ではアミロイドの沈着はなかった²⁰⁾。したがって、アベリノ角膜ジストロフィにおいてアミロイドの沈着は顆粒状混濁より遅れて出現することが考えられた。同様の病理所見が欧米人患者でも報告されている^{6,7)}。

関西地区でも同様に従来顆粒状角膜ジストロフィと診断されていた日本人症例の大多数がアベリノ角膜ジストロフィであることが明らかとなった²⁷⁾。欧米ではアベリノ角膜ジストロフィ(R124H変異)の報告例は少なく、むしろ古典的な顆粒状角膜ジストロフィ(R555W変異)の方がより多く、日本人はその逆であることも判明し、今までの概念を覆す結果となった。R555W変異の顆粒状角膜ジストロフィは日本では、非典型的顆粒状角膜ジストロフィとして報告²⁸⁾されているので稀と考えられる。

いわゆるライス・ビュックラース角膜ジストロフィは、臨床所見から二つの型がある²⁹⁾。一つはhoney-comb type と呼ばれR555Q変異を呈するもの¹⁶⁾で、欧米では一般にこの型をライス・ビュックラース角膜ジストロフィと呼んでいた。もう一つは角膜のごく表層に地図状の混濁が認められ、ライスとビュックラースが報告したオリジナルのライス・ビュックラース角膜ジストロフィである。その混濁がマッソントリクローム染色で赤染し、電顕所見も高密度の杆体様物質がみられ顆粒状ジストロフィと同じ所見を示す。Küchleは後者をI型、前者をII型と分類した²⁹⁾。これまでにこの2つの型をあわせて、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィと呼んでいるので、臨床的には混乱があった。症例28は臨床経過、細隙灯所見からはオリジナルのライス・ビュックラース角膜ジストロフィと診断したが、病理学的所見からは表在型顆粒状角膜ジストロフィと診断した。分子遺伝学的にはR124L変異²²⁾を示し、我々はライス・ビュックラース角膜ジストロフィと表在型顆粒状角膜ジストロフィは同じ疾患であると提唱した。最近同様の意見も欧米から報告された³⁰⁾。したがって、本来のライス・ビュックラース角膜ジストロフィはR124L変異をもち、1997年にMunierらにより報告されたR555Q変異は、欧米でこれまでに臨床混同されたThiel-Behnke(テール・ベンケ)角膜ジストロフィであることが明らかとなった²²⁾。

したがって、従来の遺伝性角膜実質ジストロフィの分類では診断名に混乱を生じる可能性がある。遺伝子変

第2表 ケラトエピセリン関連角膜ジストロフィの分類 (提唱)。従来の分類では診断名に混乱をきたすため、遺伝子変異に基づく分類が必要であり、遺伝子変異に基づく分類は臨床所見や臨床経過によく対応している。

従来の分類	遺伝子変異に基づく分類
顆粒状角膜ジストロフィ	古典的顆粒状角膜ジストロフィ (R555W 変異): 1 型
	アペリノ角膜ジストロフィ (R124H 変異): 2 型
	表在型顆粒状角膜ジストロフィ (R124L 変異): 3 型 (=オリジナルのライス・ビュックラース角膜ジストロフィ)
ライス・ビュックラース 角膜ジストロフィ	ティール・ベンケ角膜ジストロフィ (R555Q 変異)
格子状角膜ジストロフィ I 型	格子状角膜ジストロフィ I 型 (R124C 変異)

異型と臨床表現型は良く対応しているため、今後は遺伝子変異型による分類が必要と思われる (第2表)。たとえば、顆粒状角膜ジストロフィは少なくとも3つの型に分類し、顆粒状角膜ジストロフィ1型はいわゆる古典的顆粒状角膜ジストロフィで、R555W 変異の遺伝子型を持ち、幼少時より角膜上皮びらんを呈し、角膜混濁は微細な顆粒状で表層に限局し、深層には沈着物は認めない。欧米で顆粒状角膜ジストロフィと呼ばれているものはこのタイプである。顆粒状角膜ジストロフィ2型はアペリノ角膜ジストロフィで、R124H 変異の遺伝子型を持ち、実質浅層の灰白状の円形顆粒状混濁とさらにその深層に認められる星芒状混濁が特徴で、角膜上皮びらを生じず、比較的高齢になってから視力低下を生じる。深層の星芒状混濁はアミロイドで、顆粒状混濁より遅れて出現する。日本人の顆粒状角膜ジストロフィはほとんどがこのタイプである。顆粒状角膜ジストロフィ3型は病理所見からは表在型顆粒状角膜ジストロフィで、R124L 変異の遺伝子型を持ち、上皮下に地図状の混濁がみられ幼少時より再発性角膜上皮びらんがあり、早期に視力低下を生じる。

R124H 変異のアペリノ角膜ジストロフィにおいて、実質浅層の灰白状の円形顆粒状混濁は共通にみられる所見であるが、主に顆粒状混濁、星芒状混濁が中心のタイプとびまん性の角膜表層の混濁が中心のタイプにさらに分けられる。原因として、アミロイドの沈着の仕方の違いがあると思われる。最初のタイプも高齢になると顆粒状混濁間に表層のびまん性に近い混濁を呈するが、顆粒状混濁や深層の星芒状混濁ははっきりと残っている。後者は角膜深層の沈着物はなく、年齢がより若いにも関わ

らず、顆粒状混濁は淡く、びまん性の混濁が主体である。病理組織において後者の場合、角膜実質浅層に帯状にマッソントリクローム染色で赤く染まる沈着物があり、同じ部位がコンゴレッド染色において偏光顕微鏡下で複屈折を呈した。一方前者はマッソントリクローム染色が実質浅層でも陽性であるが、コンゴレッド染色での複屈折は主に実質深層に認められた。アミロイドの沈着部位の違いによって混濁の深さが変わり、角膜所見の違いとなってくることが推測される。実質中層から深層の星芒状混濁はアミロイドが主体と考えられ、浅層の顆粒状混濁はマッソントリクローム染色で赤染する沈着物が主体と思われる。

格子状角膜ジストロフィI型に関しては、慶應義塾大学病院通院中の患者で調べたところ全例R124C 変異を持っていた¹⁹⁾。日本においては他施設からの報告も同様であった²⁷⁾。R124C 変異の格子状角膜ジストロフィI型は臨床的には幼少時より再発性角膜上皮びらを生じ、格子状角膜混濁以外にびまん性の角膜表層混濁を生じて視力が低下する。角膜の混濁の形状である程度の診断は可能であるものの、びまん性に角膜混濁が強くなってしまった場合や角膜移植術後の症例では混濁の形状のみでの診断は困難であり、遺伝子診断が有用となると思われる。

2. ケラトエピセリン関連角膜ジストロフィ患者の角膜におけるケラトエピセリンならびにアミロイドの沈着
免疫組織染色の結果から、TGFBI 遺伝子関連の角膜ジストロフィは沈着物にはケラトエピセリンそのものか、それを含むものであることが示唆されたが、各角膜ジス

トロフィによって染色結果は多少異なっていた。アベリノ角膜ジストロフィでは実質浅層から中層にかけてマッソントリクローム染色にて赤く染まる顆粒状の沈着物が存在し、KE-2、KE-15ともに陽性であった。しかし実質中層から深層のアミロイドの沈着物は沈着物はKE-2で陽性だが、KE-15で陰性で、マッソントリクローム染色で陰性であった。一方、R124L変異の表在型顆粒状角膜ジストロフィでは角膜表層のみに沈着物が存在し、マッソントリクローム染色陽性、KE-2およびKE-15陽性、コンゴレッド染色陰性で、アベリノ角膜ジストロフィの顆粒状の沈着物と同じ結果であり、ほぼ全長のケラトエピセリンが存在すると考えられる。

格子状角膜ジストロフィI型はボーマン層より表層の沈着物と実質の沈着物とでは染色結果が違っており、2つの染色パターンが観察された。ボーマン層より表層では、KE-2もKE-15も陽性であったのは7例中5例、KE-2は陽性だがKE-15は陰性のものが2例あった。両者とも実質の染色パターンは共通であった(KE-2陽性、KE-15陰性)。前者はマッソントリクローム染色でもボーマン層より表層では染色陽性を示し、コンゴレッド染色において複屈折はみられず、沈着物はアミロイドではないことが示唆された。一方、後者においては同部位はマッソントリクローム染色陰性で、コンゴレッド染色にて複屈折を呈し、沈着物はアミロイドであることが考えられた。Korvatskaらも格子状角膜ジストロフィI型で角膜上皮下にKE-15で染色される非アミロイド性の沈着物を観察しており²⁹⁾、TakacsらもN末端側の抗体を用いて角膜上皮下の陽性所見と実質内の沈着物における陰性所見を報告している³¹⁾。Takacsらは格子状角膜ジストロフィI型では再発性角膜上皮障害があることから、この所見を角膜ジストロフィの特徴に由来するというより、角膜上皮障害の創傷治癒に由来するとし³¹⁾、創傷治癒により正常のケラトエピセリンの産生が増加した結果、角膜表層はケラトエピセリン全長が沈着した可能性は否定できない。

以上より、アベリノ角膜ジストロフィや格子状角膜ジストロフィI型において、マッソントリクローム染色陽性である部位はKE-2もKE-15も陽性であり、ケラトエピセリンの全長もしくは切断や変形をしてもC末端側、N末端側の両方が沈着していると考えられた。同部位はコンゴレッド染色において偏光顕微鏡下で複屈折は認めず、非アミロイド性の物質が沈着していることが考えられる。一方、アミロイドはマッソントリクローム染色陰性で、KE-2は陽性だがKE-15は陰性であったことから、今回使用した抗ケラトエピセリン抗体から

はケラトエピセリンのN末端が消失した形で、アミロイドが沈着したことが考えられた。しかしながら、Korvatskaらは格子状角膜ジストロフィI型の角膜移植片から抽出された蛋白の一次元および二次元電気泳動後のウェスタンブロット解析し、結果は、予想に反して免疫染色結果とは一致せず、ケラトエピセリンのN末端の断片が存在していた³²⁾。おそらく、アミロイドに転換する時に大きく構造が異なり、抗体で反応し難いことが考えられた。

同じ124番目のアミノ酸の1塩基の違いによりアミノ酸が異なり、それによりアミロイドの沈着のある角膜ジストロフィ(R124H変異、R124C変異)と沈着のない角膜ジストロフィ(R124L変異)があることは興味深く、ケラトエピセリンN末端側の有無や同部位の構造の変化がアミロイドの形成に関与している可能性があると考えられた。

総 括

1. 慶應義塾大学病院眼科通院中の常染色体優性遺伝角膜実質ジストロフィの患者39例に対して、*TGFBI*遺伝子の遺伝子変異検索を行った。従来顆粒状角膜ジストロフィと診断されていた症例の多くは分子遺伝学的にR124H変異を持ち、欧米でいわれていたアベリノ角膜ジストロフィであった。欧米に多いR555W変異を持つ顆粒状角膜ジストロフィは1家系だけであった。格子状角膜ジストロフィI型と診断されていた症例はすべてR124C変異を持ち、欧米の報告と一致した。当初ライス・ビュックラース角膜ジストロフィと臨床診断された症例は新規R124L変異を持ち、病理学的所見から表在型顆粒状角膜ジストロフィと考えられた。

2. *TGFBI*遺伝子変異と臨床所見の関連に関する検討を行った。R124H変異のアベリノ角膜ジストロフィは、灰白状の円形顆粒状混濁と星芒状混濁が特徴で、角膜上皮びらんを生じず、R555W変異の顆粒状角膜ジストロフィは角膜表層の微細な顆粒状混濁が特徴で角膜上皮びらんを呈する。R124L変異の表在型顆粒状角膜ジストロフィは幼少時より再発性角膜上皮びらんを認め、早期に視力低下を生じる。R124C変異の格子状角膜ジストロフィI型は格子状角膜混濁、びまん性の角膜表層混濁が特徴である。遺伝子変異と臨床所見はよく対応していた。

3. R124H変異の角膜ジストロフィにおいて角膜所見は主に2つに分類された。第一は顆粒状、星芒状の混濁が主体で、その個々の混濁間に高齢になるほど角膜

表層のびまん性の混濁がみられた。第二は角膜表層のびまん性の混濁が主体で、角膜表層の顆粒状の混濁は存在したが、角膜深層には混濁を認めなかった。

4. アベリノ角膜ジストロフィ、表在型顆粒状角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィ I 型の症例に対して、抗ケラトエピセリン抗体による免疫組織染色を含む患者角膜の病理組織学的検討を行った。アベリノ角膜ジストロフィの症例の多くにおいては、角膜表層の沈着物はコンゴレッド染色の偏光顕微鏡下にて複屈折を呈することから沈着物はアミロイドを含み、また KE-2 (C 末端側の抗体)、KE-15 (N 末端側の抗体) はともに陽性であった。角膜実質深層のアミロイドの沈着物は KE-2 陽性、KE-15 陰性であった。表在型顆粒状角膜ジストロフィはアミロイドの沈着はなく、KE-2、KE-15 はともに陽性であった。格子状角膜ジストロフィ I 型はアミロイドの沈着部位はマッソントリクローム染色陰性、KE-2 陽性、KE-15 陰性であり、角膜表層の非アミロイド性の沈着物はマッソントリクローム染色陽性、KE-2、KE-15 とともに陽性であった。

5. 抗ケラトエピセリン抗体による免疫組織染色の結果からマッソントリクローム染色で赤く染まる沈着物はケラトエピセリンの全長もしくは切断や変形をしているも C 末端側、N 末端側の両方が沈着していると考えられた。アミロイドの沈着部分は KE-15 が陰性で、ケラトエピセリンの N 末端側が変形もしくは切断により認識できない状態で沈着していることが示唆され、ケラトエピセリンの N 末端側の有無や構造の変化がアミロイドの形成に関与している可能性があると考えられた。

6. 従来の角膜ジストロフィの分類では混乱を生じる可能性があり、遺伝子変異は臨床表現型によく対応していることから、遺伝子変異に基づいた角膜ジストロフィの新しい臨床分類を提唱した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室小口芳久教授に深謝いたします。また、直接の御指導を賜りました慶應義塾大学医学部眼科学教室真島行彦助教授、同山田昌和講師、中村眼科中村裕院長に深甚なる謝意を表します。またご指導、ご助言を頂きました慶應義塾大学医学部分子生物学教室清水信義教授、同工藤純講師、国立成育医療センター生殖医療研究部梅澤明弘部長、川崎市立川崎病院検査科杉浦仁部長に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mannis MJ, De Sousa LB, Gross RH : The stromal dystrophies. *Cornea : cornea and external disease : clinical diagnosis and management. Vol II, (Ed) Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, Mosby Inc, St. Louis, p. 1043-1062, 1997*
- 2) Stock EL, Feder RS, O'Grady RB, Sugar J, Roth SI : Lattice corneal dystrophy type IIIA. *Arch Ophthalmol* 109 : 354-358, 1991
- 3) Yamamoto S, Okada M, Tsujikawa M, Shimomura Y, Nishida K, Inoue Y, Watanabe H, Maeda N, Kurahashi H, Kinoshita S, Nakamura Y, Tano Y : A kerato-epithelin (β ig-h3) mutation in lattice corneal dystrophy type IIIA. *Am J Hum Genet* 62 : 719-722, 1998
- 4) Akiya S, Nishio Y, Ibi K, Uozumi H, Takahashi H, Hamada T, Onishi A, Ishiguchi H, Hoshii Y, Nakazato M : Lattice corneal dystrophy type II associated with familial amyloid polyneuropathy type IV. *Ophthalmology* 103 : 1106-1110, 1996
- 5) Folberg R, Alfonso E, Croxatto O, Driezen NG, Panjwani N, Laibson PR, Boruchoff SA, Baum J, Malbran ES, Fernandez-Meijide R, Morrison JA, Bernardino VB, Arbizo VV, Albert DM : Clinically atypical granular corneal dystrophy with pathological features of lattice-like amyloid deposits : a study of three families. *Ophthalmology* 95 : 46-51, 1988
- 6) Holland EJ, Daya SM, Stone EM, Folberg R, Dobler AA, Cameron D, Doughman DJ : Avellino corneal dystrophy : Clinical manifestations and natural history. *Ophthalmology* 99 : 1564-1568, 1992
- 7) Rosenwasser GOD, Sucheski BM, Rosa N, Pastena B, Sebastiani A, Sassani JW, Perry HD : Phenotypic variation in combined granular-lattice (Avellino) corneal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 111 : 1546-1552, 1993
- 8) Lucarelli MJ, Adamis AP : Avellino corneal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 112 : 418-419, 1994
- 9) Folberg R, Stone EM, Sheffield VC, Mathers WD : The relationship between granular, lattice type 1, and Avellino corneal dystrophies : a histopathologic study. *Arch Ophthalmol* 112 : 1080-1085, 1994
- 10) Santo RM, Yamaguchi T, Kanai A, Okisaka S, Nakajima A : Clinical histopathologic features of corneal dystrophies in Japan. *Ophthalmology* 102 : 557-567, 1995
- 11) Eiberg H, Møller HU, Berendt I, Mohr J : Assignment of granular corneal dystrophy Groenouw type 1 (CDGG1) to chromosome 5q. *Eur J Hum Genet* 2 : 132-138, 1994
- 12) Stone EM, Mathers WD, Rosenwasser G, Holland EJ, Folberg R, Krachmer JH, Nichols BE, Gorevic PD, Taylor CM, Streb LM, Fishbaugh JA, Daley TE, Sucheski BM, Scheffield VC : Three autosomal domi-

- nant corneal dystrophies map to chromosome 5q. *Nature Genet* 6 : 47-51, 1994
- 13) Gregory CY, Evans K, Bhattacharya SS : Genetic refinement of the chromosome 5q lattice corneal dystrophy type I locus to within a 2 cM interval. *J Med Genet* 32 : 224-226, 1995
 - 14) Small KW, Mullen L, Barletta J, Graham B, Stern G, Yee R : Mapping of Reis-Bücklers' corneal dystrophy to chromosome 5q. *Am J Ophthalmol* 121 : 384-390, 1996
 - 15) Munier FL, Korvatska E, Djemai A, Paslier DL, Zografos L, Pescia G, Schorderet DF : Kerato-epithelin mutations in four 5q31-linked corneal dystrophies. *Nat Genet* 15 : 247-251, 1997
 - 16) Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennet K, Plowman GD, Purchio AF : cDNA cloning and sequence analysis of β ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor- β . *DNA Cell Biol* 11 : 511-522, 1992
 - 17) Escabrino J, Hernando N, Ghosh S, Crabb J, Coca-prados M : cDNA from human ocular ciliary epithelium homologous to β ig-h3 is preferentially expressed as an extracellular protein in the corneal epithelium. *J Cell Physiol* 160 : 511-521, 1994
 - 18) Rawe IM, Zhan Q, Burrows R, Bennet K, Cintron C : Beta-ig. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : 893-900, 1997
 - 19) Mashima Y, Imamura Y, Konishi M, Nagasawa A, Yamada M, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N : Homogeneity of kerato-epithelin codon 124 mutations in Japanese patients with either of two types of corneal stromal dystrophy. *Am J Hum Genet* 61 : 1448-1450, 1997
 - 20) Konishi M, Mashima Y, Nakamura Y, Yamada M, Sugiura H : Granular-lattice (Avellino) corneal dystrophy in Japanese patients. *Cornea* 16 : 635-638, 1997
 - 21) Konishi M, Mashima Y, Yamada M, Kudoh J, Shimizu N : The classic form of granular corneal dystrophy associated with R555W mutation in the *BIGH3* gene is rare in Japanese patients. *Am J Ophthalmol* 126 : 450-452, 1998
 - 22) Mashima Y, Nakamura Y, Noda K, Konishi M, Yamada M, Kudoh J, Shimizu N : A novel mutation at codon 124 (R124L) in the *BIGH3* gene is associated with a superficial variant of granular corneal dystrophy. *Arch Ophthalmol* 117 : 90-93, 1999
 - 23) Konishi M, Yamada M, Nakamura Y, Mashima Y : Varied appearance of cornea of patients with corneal dystrophy associated with R124H mutation in the *BIGH3* gene. *Cornea* 18 : 424-429, 1999
 - 24) Konishi M, Yamada M, Nakamura Y, Mashima Y : Immunohistology of kerato-epithelin in corneal stromal dystrophies associated with R124 mutations of the *BIGH3* gene. *Curr Eye Res* 21 : 891-896, 2000
 - 25) Korvatska E, Munier FL, Chaubert P, Wang MX, Mashima Y, Yamada M, Uffer S, Zografos L, Schorderet DF : On the role of kerato-epithelin in the pathogenesis of 5q31-linked corneal dystrophies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 2213-2219, 1999
 - 26) Mashima Y, Konishi M, Nakamura Y, Imamura Y, Yamada M, Ogata T, Kudoh J, Shimizu N : Severe form of juvenile corneal stromal dystrophy with homozygous R124H mutation in the keratoepithelin gene in five Japanese patients. *Br J Ophthalmol* 82 : 1280-1284, 1998
 - 27) Mashima Y, Yamamoto S, Inoue K, Yamada M, Konishi M, Watanabe H, Maeda N, Shimomura Y, Kinoshita S : Association of autosomal dominantly inherited corneal dystrophies with *BIGH3* gene mutations in Japan. *Am J Ophthalmol* 130 : 516-517, 2000
 - 28) Kumagai S, Kondo T, Tazawa Y, Takayama K : Histologic features of an atypical case of granular corneal dystrophy. *Folia Ophthalmol Jpn* 32 : 1595-1602, 1981
 - 29) Kühle M, Green WR, Völcker HE, Barraquer J : Reevaluation of corneal dystrophies of Bowman's layer and the anterior stroma (Reis-Bücklers and Thiel-Behnke Types) : a light and electron microscopic study of eight corneas and a review of the literature. *Cornea* 14 : 333-354, 1995
 - 30) Ridgway AEA, Akhtar S, Munier FL, Schorderet DF, Stewart H, Perveen R, Bonshek RE, Odenthal MT, Dixon M, Barraquer R, Escoto R, Black GC : Ultrastructural and molecular analysis of Bowman's layer corneal dystrophies : an epithelial origin? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3286-3292, 2000
 - 31) Takacs L, Boross P, Tözser J, Modis L, Toth G, Berta A : Transforming growth factor- β induced protein, β IG-H3, is present in degraded form and altered localization in lattice corneal dystrophy type I. *Exp Eye Res* 66 : 739-745, 1998
 - 32) Korvatska E, Henry H, Mashima Y, Yamada M, Bachmann C, Munier F, Schorderet DF : Amyloid and non-amyloid forms of 5q31-linked corneal dystrophy resulting from kerato-epithelin mutations at Arg-124 are associated with abnormal turnover of the protein. *J Biol Chem* 275 : 11465-11469, 2000

学位論文

インスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常に関与する
遺伝子多型の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田亨男教授)

石井達哉

(平成 14 年 6 月 6 日受付)

Key Word : insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, hyperlipidemia, gene polymorphism, TNF- α

肥満、糖尿病、高脂血症および高血圧は、インスリン抵抗性を基盤として、動脈硬化性心血管障害の発症や進展に重要な役割を担っている¹⁻³⁾。このような病態において中心的な役割を果たしている、インスリン抵抗性の発生機構の詳細はいまだ明らかでなく、諸種の遺伝的因子と環境因子とが複雑に関与しているものと考えられている。これまでの諸家の研究により、インスリン抵抗性の発生に関与する遺伝的因子として多くのものが挙げられており、たとえば小腸における脂肪酸の吸収に関与する脂肪酸結合蛋白(以下 FABP2 と略す)の遺伝子多型(Ala54Thr 変異)⁴⁵⁾、脂肪組織の調節に関与する β_3 -アドレナリン受容体(以下 β_3 AR と略す)の遺伝子多型(Trp64Arg 変異)⁶⁻¹¹⁾、さらに近年、腫瘍壊死因子として発見された tumor necrosis factor- α (以下 TNF- α と略す)が脂肪細胞からも産生されることが明らかとなり¹²⁾、この遺伝子多型(G-308A 変異)とインスリン抵抗性との関係も注目されている¹³⁻¹⁶⁾。以上のほか、脂質代謝との関連で以前から注目されているのが、低比重リポ蛋白受容体(以下 LDL-R と略す)遺伝子であり、この受容体の遺伝子変異が、家族性高コレステロール血症と関係していることも明らかにされている¹⁷⁻²⁰⁾。

本研究では、このようなインスリン抵抗性との関与が想定されている FABP2, β_3 AR, TNF- α および LDL-R の遺伝子多型と BMI, 血圧, 血糖, 脂質, 血清インス

リン濃度, および脂肪細胞から分泌されるレプチン濃度との関係を、広範な年齢層の日本人男性を対象に検討し、これらの遺伝子多型の臨床的意義を明らかにすることを試みた。

対 象

1. β_3 AR 遺伝子の Trp64Arg 多型および FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型の検討

定期健康診断を受診した、21~39 歳の若年男性 196 名、40~65 歳の中老年男性で、空腹時血糖値が 110 mg/dl 未満の正常血糖群 186 名と 110 mg/dl 以上の高血糖群 45 名、および当院内科外来の通院者で 65 歳未満の時に糖尿病と診断された 77 名を高血糖群の対象に加えて検討した。なお対象の選択において、内分泌疾患、ウイルス性、薬剤性および自己免疫性肝機能障害、血清クレアチニン 1.5 mg/dl 以上の腎機能障害を有する者、または全身のステロイド投与を受けている者は除外した。これらの対象において、 β_3 AR 遺伝子の Trp64Arg 多型および FABP2 遺伝子の Ala54Thr 多型を検討した。さらに、40~65 歳の中老年男性 231 名を、次のようなサブグループに分けて検討した。すなわち、低比重リポ蛋白コレステロール(以下 LDL-C と略す)の値が 160 mg/dl 以上であるか、肝の 3-ヒドロキシメチル 3-グル

本論文は Ishii T, Hirose H, Saito I, Nishikai K, Maruyama H, Saruta T : Tumor necrosis factor alpha gene G-308A polymorphism, insulin resistance, and fasting plasma glucose in young, older, and diabetic Japanese men. *Metabolism* 49 : 1616-1618, 2000 および Ishii T, Hirose H, Kawai T, Hayashi K, Maruyama H, Saito I, Saruta T : Effects of intestinal fatty acid-binding protein gene Ala54Thr polymorphism and β_3 -adrenergic receptor gene Trp64Arg polymorphism on insulin resistance and fasting plasma glucose in young to older Japanese men. *Metabolism* 50 : 1301-1307, 2001 の一部を含む。

タリル補酵素 A (HMG-CoA) 還元酵素阻害薬などの高脂血症治療薬の投与を受けている者を高脂血症群とした。一方、治療薬なしで LDL-C 値が 160 mg/dl 未満の者を正脂血症群として検討した。

2. TNF- α 遺伝子 G-308A 多型の検討

定期健康診断を受診した、21~29 歳の若年男性 122 名、45~65 歳の中老年男性 177 名 および当院内科外来に通院中の 42~78 歳の男性 2 型糖尿病患者 71 名を対象とした。

3. LDL-R 遺伝子 C1773T 多型の検討

定期健康診断を受診した、40~65 歳の中老年男性 246 名を対象とした。さらに、この対象者を前記と同様に、高脂血症群と正脂血症群の 2 群に分けて検討した。

なお、 β 3AR および FABP2 の遺伝子多型では、その主たる病態機序がインスリン抵抗性を直接引き起こすのではなく、内臓脂肪蓄積がまず先行し、それに引き続いて糖、脂質代謝異常が徐々に形成されるものと考えられる。そこで、その代謝異常がどの年齢層から発症してくるかを検討するため、全年齢層を対象とした。一方、TNF- α はインスリン抵抗性を、LDL-R は高コレステロール血症を、直接引き起こすのが病態機序である。そこでこの両者は、疾患感受性遺伝子となるか否かを検討する目的で、その疾患罹患率の高い中高年者に対象を絞った。ただし、TNF- α に関しては、若年者での検討も加えた。

以上の対象者全員に対して、事前に十分な説明と同意によるインフォームドコンセントを得た。また、本研究計画は、慶應義塾大学医学部倫理審査委員会で承認を得た。

方 法

1. 測定

前述の対象者において、身長、体重、血圧 (収縮期および拡張期)、心拍数を測定し、空腹時採血にて採取された血液を用いて、血糖、血清脂質 (TC, TG, HDL コレステロール, LDL-C, 遊離脂肪酸)、尿酸値を測定した。このほか、血清インスリンとレプチン濃度を、radioimmunoassay 法にて測定した^{21,22)}。またインスリン抵抗性指数は、homeostasis model assessment (以下 HOMA-IR と略す)^{23,24)}を用いて計算した。HOMA-IR = 空腹時血糖 (mmol/l) x 空腹時インスリン (μ U/ml) / 22.5

2. 検体収集と遺伝子多型の解析

EDTA を含むチューブに静脈血 5 ml を採取し、東洋紡績株式会社 (大阪) の核酸分離キット (Mag-Extractor-Genome) を用いて、末梢血液から DNA を抽出した。抽出した DNA のうち、約 500 ng を鋳型として使用した。

FABP2 の 54 番目のアミノ酸のアラニンからスレオニンへの変異は、以下のようにして同定した。プライマーは Baier らの方法⁹⁾により、5'-ACA GGT GTT AAT ATA GTG AAA AG-3' および 5'-TAC CCT GAG TTC AGT TCC GTC-3' を使用した。MgCl₂ 2 mmol/l, dNTP 各 0.2 mmol/l, プライマー各 5 pmol, Taq DNA polymerase 0.5U を合わせ、全体で 20 μ l として反応させた (タカラ社, 東京)。DNA は 94°C で 2 分間脱重合し、94°C 45 秒, 55°C 1 分のアニーリング, 72°C 45 秒の伸長反応のサイクルを 35 回繰り返して増幅した。その後、72°C 10 分の伸長反応を行った。

β 3AR の 64 番目のアミノ酸のトリプトファンからアルギニンへの変異は、以下のようにして同定した。プライマーは 5'-CGC CCA ATA CCG CCA ACA C-3' および 5'-CCA CCA GGA GTC CCA TCA CC-3' を使用した。MgCl₂ 2 mmol/l, dNTP 各 0.2 mmol/l, プライマー各 5 pmol, Taq DNA polymerase 0.5U を合わせ、全体で 25 μ l として反応させた。DNA は 94°C 5 分で脱重合し、94°C, 61°C, 72°C 各 30 秒のサイクルを 35 回繰り返して増幅した。その後、72°C 10 分の伸長反応を行った。

TNF- α 遺伝子の -308 位のグアニン (G) からアデニン (A) への変異は、以下のようにして同定した。プライマーは 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' および 5'-TCC TCC GTG CTG CTC CGA TTC CG-3' を使用した。MgCl₂ 2 mmol/l, dNTP 各 0.2 mmol/l, プライマー各 5 pmol, Taq DNA polymerase 0.5U を合わせ、全体で 20 μ l として反応させた。DNA は 94°C で 2 分間脱重合し、94°C 1 分, 60°C 1 分, 72°C 1 分の伸長反応のサイクルを 35 回繰り返して増幅した。その後、72°C 4 分の伸長反応を行った。

LDL-R 遺伝子の 1773 番塩基のシトシン (C) からチミン (T) への変異は、以下のようにして同定した。プライマーは 5'-TCT CCT TAT CCA CTT GTG TGT-3' および 5'-CTT CGA TCT CGT ACG TAA GC-3' を使用した。MgCl₂ 2 mmol/l, dNTP 各 0.2 mmol/l, プライマー各 5 pmol, Taq DNA polymerase 0.5U を合わせ、全体で 20 μ l として反応させた。DNA は 94°C 5 分で脱重合し、94°C 1 分, 56°C 1 分, 72°C 1 分の伸長反

応のサイクルを 35 回繰り返して増幅した。その後、72 °C 5 分の伸長反応を行った。

PCR 産物を、約 10 倍量の制限酵素で消化させた。制限酵素は FABP2 では Hha I, β 3AR は Mva I, TNF- α は Nco I, LDL-R は Hinc II を使用し、酵素消化は 37°C で 3 時間行った。そして 0.5x トリス-ホウ酸-EDTA バッファーを用いて、3%のアガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して確認した。 β 3AR の PCR 産物は、Mva I の切断部位で 99 塩基と 62 塩基の断片に分けられるが、Trp64Arg 変異があると切断されなくなる。一方、FABP2 の PCR 産物は、Hha I の切断部位で 99 塩基と 81 塩基に分けられるが、Ala54Thr 変異があると切断されなくなる。また、TNF- α の PCR 産物は、Nco I の切断部位で 87 塩基と 20 塩基に分けられるが、G から A への変異があると、切断されなくなる。LDL-R の PCR 産物は、Hinc II の切断部位で 98 塩基と 35 塩基の断片に分けられるが、C1773T 変異があると切断されなくなる。

3. 統計学的解析

すべてのデータは、平均値±標準偏差として表した。ノンパラメトリックな検定法として、2 群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を、3 群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を使用した。また、比率の比較には、 χ^2 検定を用いた。P 値 0.05 未満を統計学的に有意

と解釈した。

結 果

1. β 3AR 遺伝子 Trp64Arg 多型および FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型と 2 型糖尿病、高脂血症との関係について

第 1 表は、中高年者を高血糖群および正常血糖群の 2 群に分けて、 β 3AR および FABP2 遺伝子多型のゲノタイプとアリアル頻度を比較したものである。高血糖群において β 3AR 遺伝子の Arg64 アリアル頻度が低い傾向であり、FABP2 遺伝子の Thr/Thr 型の頻度が高い傾向であったものの、ともに有意差には至らなかった。さらに、同二多型につき、高脂血症群と正脂血症群の 2 群間においてゲノタイプとアリアル頻度を比較したものが第 2 表である。しかし両群間において、各々の多型のゲノタイプとアリアル頻度には有意差を認めなかった。

1) β 3AR 遺伝子の Trp64Arg 多型

第 3 表に β 3AR 遺伝子の Trp64Arg 多型と臨床指標、代謝指標との関係を示す。21-39 歳のグループでは 137 名が正常型で、55 名がヘテロ変異 (28.1%)、4 名がホモ変異 (2.0%) であった。本研究では、ゲノタイプの頻度はどの対象群においても Hardy-Weinberg の式に合致していた。この若年者のグループでは、Arg64 を有するヘテロ変異群において、正常群と比し HOMA-IR

第 1 表 40~65 歳の中高年男性 308 名における、 β ₃ アドレナリン受容体遺伝子 Trp64Arg 多型や小腸脂肪酸結合蛋白遺伝子 Ala54Thr 多型と耐糖能異常との関係

	対 象 者		
	高血糖群	正常血糖群	
β 3AR genotype			
Trp/Trp	89 (73.0%)	125 (67.2%)	$\chi^2 = 1.15$
Trp/Arg + Arg/Arg	33 (27.0%)	61 (32.8%)	P = 0.284
Total (n)	122	186	
β 3AR allele			
Trp	210 (86.1%)	304 (81.7%)	$\chi^2 = 2.01$
Arg	34 (13.9%)	68 (18.3%)	P = 0.156
FABP2 genotype			
Ala/Ala	50 (41.0%)	66 (33.5%)	$\chi^2 = 3.24$ P = 0.198
Ala/Thr	53 (43.4%)	106 (53.8%)	
Thr/Thr	19 (15.6%)	25 (12.7%)	
Total (n)	122	197	
FABP2 allele			
Ala	153 (62.7%)	238 (60.4%)	$\chi^2 = 0.34$
Thr	91 (37.3%)	156 (39.6%)	P = 0.562

数字は検査対象者数、() 内は比率。

(Ishii T et al: Metabolism 50: 1301-1307, 2001¹⁾ の Table 1 より許可を得て転載)

第2表 40~65歳の中老年男性231名における、β₃アドレナリン受容体遺伝子 Trp64Arg 多型や小腸脂肪酸結合蛋白遺伝子 Ala54Thr 多型と高LDLコレステロール血症との関係

	対 象 者		
	高脂血症群	正脂血症群	
β3AR genotype			
Trp/Trp	20 (74.1%)	139 (68.1%)	$\chi^2 = 0.39$
Trp/Arg + Arg/Arg	7 (25.9%)	65 (31.9%)	P = 0.531
Total (n)	27	204	
β3AR allele			
Trp	45 (83.3%)	337 (82.6%)	$\chi^2 = 0.18$
Arg	9 (16.7%)	71 (17.4%)	P = 0.893
FABP2 genotype			
Ala/Ala	11 (40.7%)	60 (29.4%)	
Ala/Thr	13 (48.1%)	112 (54.9%)	$\chi^2 = 1.53$
Thr/Thr	3 (11.1%)	32 (15.7%)	P = 0.466
Total (n)	27	204	
FABP2 allele			
Ala	35 (64.8%)	232 (56.9%)	$\chi^2 = 1.24$
Thr	19 (35.2%)	176 (43.1%)	P = 0.266

数字は検査対象者数、()内は比率。

(Ishii T et al : Metabolism 50 : 1301-1307, 2001¹¹⁾の Table 2 より許可を得て転載)

第3表 21~39歳の男性196名における、β₃アドレナリン受容体遺伝子 Trp64Arg 多型と臨床指標、代謝指標との関係

	β3AR genotype			P for 3 groups	P for Arg-positive
	Trp/Trp	Trp/Arg	Arg/Arg		
No. of subjects	137 (69.9%)	55 (28.1%)	4 (2.0%)		
Age (years)	25.9±5.0	25.2±4.9	27.0±6.2	NS	NS
Body mass index (kg/m ²)	22.0±3.0	21.9±3.3	21.3±2.5	NS	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	123±17	123±12	112±11	NS	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	72±10	72±9	65±10	NS	NS
Heart rate (/min)	75±12	79±15	69±10	NS	NS
Glucose (mg/dl)	89.2±8.0	89.2±8.2	91.5±6.6	NS	NS
Insulin (μ U/ml)	5.6±3.5	5.7±4.1	7.7±7.3	NS	NS
HOMA-IR (-)	1.2±0.8	1.3±0.9	1.8±1.7	NS	NS
Leptin (ng/ml)	2.5±2.0	3.1±3.0	2.3±1.5	NS	NS
Total cholesterol (mg/dl)	172±31	175±30	157±9	NS	NS
Triglycerides (mg/dl)	85±62	91±38	75±36	NS	0.067
HDL cholesterol (mg/dl)	53±10	54±13	51±14	NS	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	106±25	105±27	91±14	NS	NS
Free fatty acids (mEq/l)	0.36±0.15	0.35±0.17	0.32±0.13	NS	NS
Uric acid (mg/dl)	5.6±1.2	5.7±1.0	6.0±1.6	NS	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。

心拍数数の検査対象者数：85名。LDLコレステロール、遊離脂肪酸の検査対象者数：159名。

(Ishii T et al : Metabolism 50 : 1301-1307, 2001¹¹⁾の Table 3 より許可を得て転載)

や血清インスリン、レプチン、中性脂肪の濃度が高値傾向にあった。しかし、その差は統計学的有意差には至らなかった。

40~65歳の中老年者では、125名が正常型で、54名

がヘテロ変異(29.0%)、7名がホモ変異(3.8%)であった(第4表)。このグループで Arg64 を有する者は、正常型より心拍数のみが有意に低値であった (P=0.037)。しかし、本所見の意義に関しては不明である。

第4表 正常血糖の40~65歳の男性186名における、β₃アドレナリン受容体遺伝子 Trp64Arg 多型と臨床指標、代謝指標との関係

	β3AR genotype			P for 3 groups	P for Arg-positive
	Trp/Trp	Trp/Arg	Arg/Arg		
No. of subjects	125 (67.2%)	54 (29.0%)	7 (3.8%)		
Age (years)	51.9±7.4	52.1±7.4	50.4±5.9	NS	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.1±2.7	23.5±2.8	23.1±2.4	NS	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	119±16	121±21	121±9	NS	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	75±11	78±14	76±3	NS	NS
Heart rate (/min)	75±12	72±12	68±17	NS	0.037
Glucose (mg/dl)	96.6±5.8	97.8±6.5	95.0±4.8	NS	NS
Insulin (μU/ml)	7.6±4.4	8.2±3.8	5.7±1.6	NS	NS
HOMA-IR (-)	1.8±1.1	2.0±0.9	1.3±0.4	NS	NS
Leptin (ng/ml)	3.7±1.7	3.7±1.7	4.6±3.7	NS	NS
Total cholesterol (mg/dl)	206±31	199±29	210±27	NS	NS
Triglycerides (mg/dl)	134±92	149±151	156±102	NS	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	55±16	52±13	53±20	NS	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	124±29	118±30	126±25	NS	NS
Uric acid (Mg/dl)	6.3±1.3	6.3±1.3	6.7±0.9	NS	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。

Insulin, HOMA-IR, Leptin の検査対象者数：108名。

(Ishii T et al : Metabolism 50 : 1301-1307, 2001⁴¹⁾の Table 4 より許可を得て転載)

第5表 空腹時血糖110以上の40~78歳の男性122名における、β₃アドレナリン受容体遺伝子 Trp64Arg 多型と臨床指標、代謝指標との関係

	β3AR genotype		*P for Arg-positive
	Trp/Trp	Trp/Arg+/Arg/Arg	
No. of subjects	89 (73.0%)	32+1 (27.0%)	
Age (years)	59.9±8.2	58.3±7.6	NS
Duration of diabetes (years)	7.4±6.9	7.3±5.7	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.7±2.9	23.9±2.5	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	132±19	133±24	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	78±11	76±13	NS
Heart rate (/min)	82±14	79±20	NS
Glucose (mg/dl)	144±40	136±34	NS
HbA _{1c} (%)	7.4±1.6	7.3±1.4	NS
Insulin (μU/ml)	9.8±6.8	10.5±6.7	NS
Leptin (ng/ml)	3.7±1.4	4.5±1.8	NS
Total cholesterol (mg/dl)	198±28	201±33	NS
Triglycerides (mg/dl)	160±96	151±70	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	50±14	43±8	0.024
LDL cholesterol (mg/dl)	123±25	134±29	NS
Free fatty acids (mEq/l)	0.53±0.26	0.40±0.19	0.043
Uric acid (mg/dl)	5.7±1.4	6.1±1.7	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。 *Mann-Whitney U test.

Insulin, Leptin の検査対象者数：43名。糖尿病罹患期間, HbA_{1c}, 遊離脂肪酸の検査対象者数：69名。

(Ishii T et al : Metabolism 50 : 1301-1307, 2001⁴¹⁾の Table 5 より許可を得て転載)

第5表は、空腹時血糖110 mg/dl以上のグループにおいてβ3AR遺伝子のTrp64Arg多型と臨床指標、代謝指標との関係を示したものである。89名が正常型で、ヘテロ変異は32名(26.2%)、ホモ変異は1名のみ(0.8%)であった。このグループでArg64を有する者

は、正常型より血中HDLコレステロール濃度と遊離脂肪酸が有意に低値であった(各々P=0.024, P=0.043)。

2) FABP2遺伝子のAla54Thr多型

第6および7表にFABP2遺伝子のAla54Thr多型

第6表 21~39歳の男性196名における、小腸脂肪酸結合蛋白遺伝子 Ala54Thr 多型と臨床指標、代謝指標との関係

Parameter	FABP2 genotype			P for 3 groups	P for Thr/Thr
	Ala/Ala	Ala/Thr	Thr/Thr		
No. of subjects	83 (42.3%)	78 (39.8%)	35 (17.9%)		
Age (years)	25.6±5.2	25.9±5.0	25.6±4.6	NS	NS
Body mass index (kg/m ²)	22.1±2.5	22.1±3.7	21.3±2.7	NS	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	123±13	122±18	123±13	NS	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	71±10	72±10	71±8	NS	NS
Heart rate (/min)	74±13	79±17	76±9	NS	NS
Glucose (mg/dl)	89.6±7.6	89.5±8.2	87.8±8.7	NS	NS
Insulin (μU/ml)	5.8±4.2	5.5±3.3	5.7±3.8	NS	NS
HOMA-IR (-)	1.3±0.9	1.2±0.8	1.2±0.7	NS	NS
Leptin (ng/ml)	2.4±1.7	3.0±2.9	2.5±2.2	NS	NS
Total cholesterol (mg/dl)	173±31	172±29	173±33	NS	NS
Triglycerides (mg/dl)	90±43	172±36	102±99	NS	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	54±13	53±9	54±10	NS	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	105±26	106±25	105±26	NS	NS
Free fatty acids (mEq/l)	0.36±0.15	0.36±0.14	0.35±0.20	NS	NS
Uric acid (Mg/dl)	5.5±1.1	5.8±1.2	5.7±1.0	NS	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。

心拍数等の検査対象者数：85名、LDL コレステロール、遊離脂肪酸の検査対象者数：159名。
(Ishii T et al : Metabolism 50 : 1301-1307, 2001¹⁴⁾の Table 6 より許可を得て転載)

第7表 正常血糖の40~65歳の男性186名における、小腸脂肪酸結合蛋白遺伝子 Ala54Thr 多型と臨床指標、代謝指標との関係

Parameter	FABP2 genotype			P for 3 groups	P for Thr/Thr
	Ala/Ala	Ala/Thr	Thr/Thr		
No. of subjects	60 (32.3%)	101 (54.3%)	25 (13.4%)		
Age (years)	51.7±7.8	51.7±6.9	52.9±7.8	NS	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.1±2.4	23.4±2.6	23.0±3.7	NS	NS
Systolic blood pressure (mm Hg)	118±17	120±17	121±20	NS	NS
Diastolic blood pressure (mm Hg)	75±11	76±12	78±12	NS	NS
Heart rate (/min)	74±11	73±13	77±16	NS	NS
Glucose (mg/dl)	96.5±6.1	96.5±5.9	99.8±5.6	0.037	0.010
Insulin (μU/ml)	7.4±3.8	8.1±4.5	6.3±2.5	NS	NS
HOMA-IR (-)	1.8±0.9	1.9±1.1	1.5±0.6	NS	NS
Leptin (ng/ml)	3.5±1.5	3.8±2.0	4.0±1.9	NS	NS
Total cholesterol (mg/dl)	205±33	203±29	207±27	NS	NS
Triglycerides (mg/dl)	147±154	130±73	159±126	NS	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	54±16	53±14	58±15	NS	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	122±32	124±28	117±26	NS	NS
Uric acid (mg/dl)	6.5±1.2	6.4±1.3	5.9±1.6	NS	NS

平均±標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。

Insulin, HOMA-IR, Leptin の検査対象者数：108名。

(Ishii T et al : Metabolism 50 : 1301-1307, 2001¹⁴⁾の Table 7 より許可を得て転載)

と臨床指標、代謝指標との関係を示した。FABP2 遺伝子のゲノタイプは Ala/Ala, Ala/Thr, Thr/Thr の3つに分けられ、本研究でのゲノタイプの頻度は、すべて Hardy-Weinberg の式に合致していた。21~39歳のグ

ループでは、各群間で有意な差は認められなかった (第6表)。

第7表に示すように、40~65歳の男性における Thr/Thr のホモ変異群では、他の群に比し空腹時血糖

第8表 21~29歳の若年男性122名における、TNF- α 遺伝子プロモーター領域G-308A多型と臨床指標、代謝指標との関係

TNF- α genotype	TNF1 (Normozygote)	TNF2 (Heterozygote)	P*
n (%)	118 (96.7)	4 (3.3)	
Age (years)	23.5 \pm 1.5	23.3 \pm 0.5	NS
Body mass index (kg/m ²)	21.8 \pm 3.2	21.2 \pm 2.2	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	125 \pm 13	122 \pm 16	NS
Diastolic blood pressure (mmHg)	72 \pm 9	66 \pm 6	0.10
Glucose (mg/dl)	89 \pm 6	84 \pm 7	NS
Insulin (μ U/ml)	5.3 \pm 3.9	4.8 \pm 1.9	NS
HOMA-IR (-)	1.2 \pm 0.9	1.0 \pm 0.4	NS
Leptin (ng/ml)	2.8 \pm 2.7	1.7 \pm 0.3	NS
Total cholesterol (mg/dl)	171 \pm 29	156 \pm 14	NS
Triglycerides (mg/dl)	78 \pm 36	56 \pm 11	NS
HDL-cholesterol (mg/dl)	53 \pm 11	51 \pm 3	NS
LDL-cholesterol (mg/dl)	102 \pm 25	94 \pm 4	NS
Free fatty acids (mEq/l)	0.38 \pm 0.14	0.42 \pm 0.16	NS
Uric acid (Mg/dl)	5.5 \pm 1.2	5.3 \pm 0.3	NS

平均 \pm 標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。* Mann-Whitney U test.
(Ishii T et al : Metabolism 49 : 1616-1618, 2000¹²⁾の Table 1 より許可を得て転載)

第9表 45~65歳の中老年男性177名における、TNF- α 遺伝子プロモーター領域G-308A多型と臨床指標、代謝指標との関係

TNF- α genotype	TNF1 (Normozygote)	TNF2 (Heterozygote)	P*
n (%)	172 (97.2)	5 (2.8)	
Age (years)	54.7 \pm 5.8	54.6 \pm 3.8	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.4 \pm 2.7	24.0 \pm 1.5	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	122 \pm 19	117 \pm 12	NS
Diastolic blood pressure (mmHg)	77 \pm 13	78 \pm 6	NS
Glucose (mg/dl)	99 \pm 9	108 \pm 7	0.042
Insulin (μ U/ml)	8.0 \pm 5.1	9.0 \pm 2.6	NS
HOMA-IR (-)	2.0 \pm 1.3	2.3 \pm 0.6	NS
Leptin (ng/ml)	3.9 \pm 1.9	4.0 \pm 0.5	NS
Total cholesterol (mg/dl)	206 \pm 29	208 \pm 10	NS
Triglycerides (mg/dl)	143 \pm 113	221 \pm 112	0.06
HDL-cholesterol (mg/dl)	55 \pm 15	43 \pm 7	0.07
LDL-cholesterol (mg/dl)	123 \pm 30	121 \pm 25	NS
Uric acid (mg/dl)	6.3 \pm 1.4	6.8 \pm 1.3	NS

平均 \pm 標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。* Mann-Whitney U test.
(Ishii T et al : Metabolism 49 : 1616-1618, 2000¹²⁾の Table 2 より許可を得て転載)

が有意に高値であった (P=0.010)。また、血清レプチンとトリグリセライド値もこの群で高値傾向にあったが、統計学的有意差には至らなかった。

高血糖群においては、FABP2のThr/Thr変異とThrアレルの頻度は、40から65歳までのコントロール群 (FPG<110mg/dl) と比し有意な差は認めなかった (第1表)。また、各種代謝指標においても、この3群間で有意差は認められなかった。

2. TNF- α 遺伝子G-308A多型

TNF- α 遺伝子のプロモーター領域である-308位がGからAに変異したものは、TNF2アレルと呼ばれている¹³⁾。今回の検討では、TNF2アレルのホモ変異は認められなかったため、本研究の対象をTNF1のホモ (正常型) とTNF2のヘテロ変異の2群に分けた。また、本研究でのゲノタイプの頻度は、すべてHardy-Weinbergの式に合致していた。

第10表 42~78歳の男性2型糖尿病患者71名における、TNF- α 遺伝子プロモーター領域G-308A多型と臨床指標、代謝指標との関係

TNF- α genotype	TNF-R Genotype		P*
	TNF1 (Normozygote)	TNF2 (Heterozygote)	
n (%)	69 (97.2)	2 (2.8)	
Age (years)	58.8 \pm 7.0	57.5 \pm 2.1	NS
Duration of diabetes (years)	7.8 \pm 7.2	3.0 \pm 2.8	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.8 \pm 3.2	26.0 \pm 3.2	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	133 \pm 21	121 \pm 24	NS
Diastolic blood pressure (mmHg)	76 \pm 11	75 \pm 18	NS
Glucose (mg/dl)	155 \pm 45	144 \pm 25	NS
HbA _{1c} (%)	7.8 \pm 7.2	8.1 \pm 2.6	NS
Total cholesterol (mg/dl)	193 \pm 32	228 \pm 64	NS
Triglycerides (mg/dl)	163 \pm 103	116 \pm 10	NS
HDL-cholesterol (mg/dl)	45 \pm 11	34 \pm 1	0.10
LDL-cholesterol (mg/dl)	127 \pm 29	152 \pm 20	NS
Free fatty acids (mEq/l)	0.51 \pm 0.23	0.38 \pm 0.35	NS
Uric acid (mg/dl)	5.7 \pm 1.6	5.3 \pm 2.1	NS

平均 \pm 標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。 *Mann-Whitney U test.
(Ishii T et al : Metabolism 49 : 1616-1618, 2000²⁷)の Table 3 より許可を得て転載)

第11表 中高年男性246名における、LDL受容体遺伝子C1773T多型と臨床指標、代謝指標との関係

	LDL-R Genotype		P*
	CC	CT+TT	
n (%)	185 (75.2%)	56+5 (24.8%)	
Age (years)	52.5 \pm 7.1	53.6 \pm 7.2	NS
Body mass index (kg/m ²)	23.5 \pm 2.7	23.1 \pm 2.4	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	124 \pm 19	121 \pm 19	NS
Diastolic blood pressure (mmHg)	78 \pm 12	77 \pm 13	NS
Heart rate (/min)	75 \pm 13	77 \pm 16	NS
Glucose (mg/dl)	104 \pm 14	101 \pm 14	NS
Insulin (μ U/ml)	8.4 \pm 5.0	7.7 \pm 5.5	NS
HOMA-IR (-)	2.2 \pm 1.4	2.0 \pm 1.7	NS
Leptin (ng/ml)	3.8 \pm 1.8	3.6 \pm 1.6	NS
Total cholesterol (mg/dl)	203 \pm 29	213 \pm 27	0.006
Triglycerides (mg/dl)	147 \pm 138	145 \pm 73	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	54 \pm 15	54 \pm 15	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	120 \pm 29	131 \pm 29	0.015
Uric acid (mg/dl)	6.3 \pm 1.4	6.3 \pm 1.3	NS

平均 \pm 標準偏差。NS：有意差なし (P>0.1)。 *Mann-Whitney U test.

第8表に示したように、21~29歳の若年者では4名がTNF2アレルのヘテロ変異であった(3.3%)。このTNF1ホモとTNF2ヘテロの2群間において、各種代謝指標に有意差は認められなかった。

45~65歳の中高年者では、TNF2ヘテロ変異の頻度が2.8%であり、空腹時血糖値がTNF2の方でTNF1に比し有意に高値であった(108 \pm 7 vs. 99 \pm 9 mg/dl, P=0.042)。また、血中トリグリセライド値とHOMA-IRはTNF2の方で高値傾向にあり(各々P=0.06, 0.20)、一方HDLコレステロール値は低値傾向であ

た(P=0.07)、統計学的な有意差は認められなかった。血中レプチン濃度を含むその他の指標では、この2群間で有意差は認めなかった(第9表)。

2型糖尿病患者においても、TNF2ヘテロ変異の頻度は2.8%であり、同じ年齢層の健常者(FPG<110 mg/dl)と比較しても、有意な差は認められなかった。またTNF1ホモとTNF2ヘテロの2群間において各種代謝指標に関して有意差は認められなかった。HDLコレステロールがTNF2群で低値傾向にあったが、統計学的な有意差には至らなかった(第10表)。

第12表 中高年男性246名における、LDL受容体遺伝子C1773T多型と高LDLコレステロール血症との関係

Genotype	対象者		
	高脂血症群	正脂血症群	
CC	19 (59.4%)	166 (77.6%)	$\chi^2 = 4.94$
CT+TT	13 (40.6%)	48 (22.4%)	P = 0.034
Total (n)	32	214	
Allele			
C	48 (75.0%)	378 (88.3%)	$\chi^2 = 8.50$
T	16 (25.0%)	50 (11.7%)	P = 0.004

数字は検査対象者数。()内は比率。

3. LDL-R 遺伝子 C1773T 多型

対象者を、LDL-R 遺伝子の C1773T 多型によって 3 群に分けた。CC, CT, TT のゲノタイプの頻度は、各々 75.2, 22.8, 2.0% であった (第 11 表)。本研究でのゲノタイプの頻度は、すべて Hardy-Weinberg の式に合致していた。

血中総コレステロールと LDL コレステロールの両者とも、CC 群より、CT+TT 群の方が有意に高値を示していた (各々 P=0.006, 0.015)。ただし、この検討の中には、18 名 HMG-CoA 還元酵素阻害薬の投与を受けている対象者も含まれている。

そこで第 12 表に示すように、高脂血症群と正常群との間でゲノタイプの頻度を検討したところ、有意差が認められた (P=0.034)。また、1773T アリール頻度が、高脂血症群の方が正脂血症群よりも有意に高値であった (P=0.004)。

考 察

本研究では、インスリン抵抗性の発生に何らかの関与が想定されている FABP2 遺伝子、 β 3AR 遺伝子、TNF- α 遺伝子および LDL-R 遺伝子の多型と、インスリン抵抗性を基盤として発症すると考えられる肥満や糖・脂質代謝異常、高血圧との関係を、広範な年齢層の日本人男性を対象に検討した。以下に、各遺伝子多型との関係について考察する。

1. β 3AR 遺伝子の Trp64Arg 多型に関して

Yoshida ら²⁵⁾は、この多型を持った日本人肥満女性では基礎代謝率がより低く、ヘテロ変異であっても食事、運動療法の効果が少ないことを示した。同多型と 2 型糖尿病との関連が認められたとする報告もあれば²⁶⁾、

明らかな関連を認めなかったとする報告も多い^{27,28)}。Kawamura ら²⁹⁾はこの多型が、耐糖能異常を有した日系アメリカ人の血中インスリン濃度や HOMA-IR と関連のあることを報告している。本研究では、血中インスリン濃度や HOMA-IR が、 β 3AR の Arg/Arg 型を有した 21~39 歳の中年男性において高値傾向にあった。それ以外の群では、この多型はどの代謝指標とも統計学的な有意差は認められなかった。この多型がインスリン抵抗性を惹起する機序についてはいまだ明らかとなっていないが、細胞内のサイクリック AMP 濃度を低下させる機序が考えられている³⁰⁾。これにより、エネルギー産生と脂肪分解の減少をきたし、内臓脂肪蓄積とインスリン抵抗性の増悪を引き起こすものと考えられる^{28,31)}。しかし、メタ分析³²⁾を含む他の報告^{25,26,28)}とは違い、我々の結果では BMI の差は認められなかった。Mitchell ら³³⁾は、470 人のメキシコ-アメリカ人において BMI に影響を及ぼす遺伝子座位が β 3AR の領域にあることを報告している。

日本人の集団では、このアリール頻度は比較的高く、この多型と肥満やインスリン抵抗性、内臓脂肪蓄積との関連も示唆されている^{28,31)}。我々の結果では否定的であったが、今後、この多型と内臓脂肪面積およびウエスト周囲径との関連を検討することが必要と考えられる。

2. FABP2 遺伝子の Ala54Thr 多型に関して

ピマインディアン (0.29) に比して、本邦における FABP2 の Thr54 アリール頻度は、比較的高く、Yamada らの報告³⁴⁾では 0.34、本研究の 3 群では 0.37 から 0.40 というアリール頻度であった。本研究では 40~65 歳の正常血糖群の男性において、FABP2 の Thr/Thr ホモ変異群で空腹時血糖が有意に高値であった。この FABP2 遺伝子の Ala54Thr 多型が、内臓脂肪蓄積を引き起こすことを Yamada ら³⁴⁾が報告しており、我々はこの変異によってインスリン抵抗性が増大し、その結果として空腹時血糖値の上昇を招いたと推測している。しかし本研究では、Baier らのピマインディアンにおける報告³⁾と異なり、FABP2 遺伝子のゲノタイプ間で、血中インスリン濃度や HOMA-IR には有意差は認められなかった。さらに、中高年男性の高血糖群でもゲノタイプ間で各種指標に有意差を認めるものはなかった。これは、本検討におけるインスリン抵抗性の指標に、最も信頼のおけるグルコスクランプ法を用いず、その数式モデルである HOMA-IR を使用したことが、予測に反した結果をもたらしたものとも考えられる。しかし全例にグルコスクランプ法を施行することは困難であ

り、また HOMA-IR とグルコースクランプ法では、空腹時血糖 140mg/dl までには有意に相関しているとされる²³⁾。そこで、信頼性の高い HOMA-IR を得るためには、空腹時血糖、インスリンともに基底状態にある厳しいサンプリング条件として、完全空腹時採血(14~18時間の絶食)を徹底することが必要と考えられる。

3. TNF- α 遺伝子の G-308A 多型に関して

肥満者の脂肪細胞では、TNF- α の発現量と蛋白合成が亢進しており¹²⁾、最近では肥満と2型糖尿病とを結び付ける重要な因子として、この TNF- α の役割が注目されている³⁵⁾。TNF- α がインスリン抵抗性を惹起する機序は、以下のように考えられている。TNF- α は TNF- α の受容体に結合し、インスリン受容体基質のセリン残基をリン酸化し、それにひき続きインスリン受容体のチロシンキナーゼの活性を阻害する³⁶⁾。これにより、インスリン受容体以降のシグナル伝達経路が阻害され、糖輸送担体の移動や最終的な糖取り込みを減少させる。

TNF- α 遺伝子のプロモーター領域である-308位のGからAへの変異は、TNF2 アリールと呼ばれ¹³⁾、白人における検討ではこの変異がインスリン抵抗性を惹起し、体脂肪率や血中レプチン濃度を上昇させることが報告された¹⁵⁾。さらに、この変異が存在すると、TNF- α 遺伝子の転写活性が高められることが報告されている³⁷⁾。しかし、この G-308A 多型に関して、肥満やインスリン抵抗性に及ぼす影響をみた欧米人での大規模研究では否定的な結果が得られている¹⁶⁾。

本研究では、日本人での TNF2 アリールの頻度は 1.4%と欧米人に比し低かったが、日本人中高年男性の空腹時血糖が TNF2 群で有意に高値であった。一方、2型糖尿病患者の集団では TNF1 と TNF2 の2群間で、どの代謝指標においても明らかな有意差は認められなかった。この結果より、この多型は、糖尿病が進展した状態ではなく、正常血糖から耐糖能異常に至るまでのインスリン抵抗性増大に、より関与していることが考えられる。また本研究では、TNF1 と TNF2 の2群間で、ノンパラメトリックの Mann-Whitney の U 検定により有意差を認めたが、TNF2 群は5例と少なかったため、第1種過誤をきたしている可能性も否定はできない。そこで今後は、より大規模な集団での検討や、糖尿病発症前の耐糖能異常者への介入、さらに内臓脂肪蓄積の指標との関連の検討が必要と思われる。

4. LDL-R 遺伝子の C1773T 多型に関して

LDL コレステロールは LDL 受容体を介して細胞に取

り込まれ、肝細胞やその他の末梢組織で利用される。LDL 受容体の数あるいは活性の減少が、血中 LDL コレステロール濃度の増加につながり得る。その数が減少する機序は、コレステロールや飽和脂肪酸の食餌からの過剰摂取によって、コレステロールプールが増加することが関与すると考えられている。一方、後者の機序、すなわち LDL 受容体の活性が低下する機序は、LDL 受容体遺伝子の変異がそれ自身の変形を来すことにより引き起こされるものと推測される。本検討では、血中総コレステロールと LDL コレステロール濃度の両者が、CC 群よりも CT+TT 群で有意に高いことが示された。さらに 1773T アリール頻度もまた、高脂血症群の方が正脂血症群に比し有意に高値であった。このことより、日本人においても 1773T アリールが血中 LDL-C 濃度の上昇を引き起こしていると考えられる。Boright ら³⁸⁾は以前、高脂血症のない白人の集団であっても、血中 LDL-C 濃度が CT+TT 群で有意に高いことを報告している。しかし、日本人を対象とした本検討では、白人の検討とは逆に、1773C アリール頻度の方が T アリール頻度よりはるかに多く認められた。Boright らの報告³⁸⁾で示された T アリールの頻度(0.56)は、我々の検討で得られた頻度(0.12)の 4.7 倍であった。もし、この T アリールが LDL コレステロール濃度の上昇を引き起こしているとすれば、白人において虚血性心疾患の罹患が非常に高いことは、この T アリール頻度が高いという遺伝因子と、また一方、この集団では食事からの脂肪摂取が多いという環境因子の両者が関与している可能性が考えられる。日本人では、T アリールの頻度が白人に比べるとかなり低いが、この遺伝因子によって引き起こされた高 LDL コレステロール血症が、虚血性心疾患の進展を規定する冠危険因子になっている可能性がある。また最近では、脂質代謝異常のみが注目されてきた LDL-R ノックアウトマウスにおいて、高血圧も発症することが報告されている³⁹⁾。これは、LDL-R が脂質代謝異常のみならずインスリン抵抗性や血圧調節にも関与していることを示唆するものである。また、インスリン受容体遺伝子は LDL-R 遺伝子の存在する染色体 19p13.2 の領域に位置しているため、連鎖不平衡によりインスリン受容体の遺伝子多型と LDL-R の遺伝子多型が関連している可能性も考えられ、興味深い。すなわち、LDL-R の C1773T 多型は、LDL-R 遺伝子自身の他の部位やインスリン受容体遺伝子との連鎖不平衡により、インスリン抵抗性や本態性高血圧⁴⁰⁾と関連している可能性が考えられる。

今後、LDL-R 遺伝子多型の重要性を明らかにするた

めに、他の様々なアレルと組み合わせたり、異なった年齢層や性別、人種でのさらなる検討が重要と思われる。以上をまとめると、LDL-RのC1773T多型は、血中LDLコレステロールおよび総コレステロール濃度の上昇と関連があることが示唆された。また、Tアレル頻度は白人に比して本邦では0.12と低かったが、それが中高年日本人男性において高脂血症を引き起こしている可能性が示唆された。

以上より、インスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常に関与する遺伝子多型は2型糖尿病や高血圧、高脂血症を含む代謝症候群の危険因子（予知マーカー）となる可能性があり、今後さらに検討していくことが必要であると考えられる。

総 括

β_3 -アドレナリン受容体 (β_3 AR) 遺伝子の Trp64Arg 多型、小腸脂肪酸結合蛋白 (FABP2) 遺伝子の Ala54Thr 多型、tumor necrosis factor- α (TNF- α) 遺伝子の G-308A 多型、および低比重リポ蛋白受容体 (LDL-R) 遺伝子の C1773T 多型が、BMI、血圧、血糖、脂質、血清インスリンやレプチン濃度に及ぼす影響を明らかにするため、種々の年齢層の日本人男性を対象にこれらの関係を検討し、以下の結果を得た。

1. β_3 AR 遺伝子 Trp64Arg 多型と FABP2 遺伝子 Ala54Thr 多型はともに、若年、中高年男性において2型糖尿病や高脂血症との関連は認められなかったが、中高年男性において FABP2 の Thr/Thr ゲノタイプを持つ者は、空腹時血糖の有意な高値が認められた⁴¹⁾。

2. TNF- α 遺伝子 G-308A 多型は、若年、中高年、および糖尿病患者のどの群においても、TNF1 と TNF2 の2群間で、肥満、糖尿病、高血圧、高脂血症のどの観点においても、明らかな有意差は認められなかった。ただし、中高年男性で空腹時血糖のみ有意に高値であり、おそらくインスリン抵抗性の増大を介したものと考えられる⁴²⁾。

3. LDL-R 遺伝子の C1773T 多型は、血中 LDL コレステロールおよび総コレステロール濃度の上昇と関連があることが示唆された。また、Tアレル頻度は白人に比して本邦では0.12と低かったが、それが中高年日本人男性において高脂血症を引き起こしている可能性が示唆された。

以上より、インスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常に関与する遺伝子多型は2型糖尿病や高血圧、高脂血症を含む代謝症候群の危険因子（予知マーカー）となる

可能性があり、今後さらに検討していくことが必要であると考えられる。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深謝いたします。また、本研究を直接御指導下さり、論文の御校閲をいただきました慶應義塾大学保健管理センター広瀬 寛講師に感謝いたします。

本研究の一部は、第42回日本糖尿病学会年次学術集会(1999年、横浜)、第43回日本糖尿病学会年次学術集会(2000年、名古屋)および第61回米国糖尿病学会(2001年、フィラデルフィア)において報告した。

文 献

- 1) Reaven GM : Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37 : 1595-1607, 1988
- 2) Kaplan NM : The deadly quartet : upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension. *Arch Intern Med* 149 : 1514-1520, 1989
- 3) DeFronzo RA, Ferrannini E : Insulin resistance : a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14 : 173-194, 1991
- 4) Lowe JB, Sacchettini JC, Laposata M, McQuillan JJ, Gordon JI : Expression of rat intestinal fatty acid-binding protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 262 : 5931-5937, 1987
- 5) Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M : An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* 95 : 1281-1287, 1995
- 6) Emorine LJ, Malluro S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD : Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 245 : 1118-1126, 1989
- 7) Enocksson SE, Shimizu M, Lönnqvist F, Nordenström J, Arner P : Demonstration of an *in vivo* functional β_3 -adrenoceptor in man. *J Clin Invest* 95 : 2239-2245, 1995
- 8) Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, Sorkin JD, Roth J, Shuldiner AR : Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the β_3 -adrenergic-receptor gene. *New Engl J Med* 333 : 343-347, 1995
- 9) Widén E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC : Association of a polymorphism in

- the β_3 -adrenergic-receptor gene with features of insulin resistance syndrome in Finns. *New Engl J Med* 333 : 348-351, 1995
- 10) Clemént K, Vaisse C, Manning BSJ, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD : Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *New Engl J Med* 333 : 352-354, 1995
 - 11) Urhammer SA, Clausen JO, Hansen T, Pedersen O : Insulin sensitivity and body weight changes in young white carriers of the codon 64 amino acid polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor gene. *Diabetes* 45 : 1115-1120, 1996
 - 12) Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM : Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95 : 2409-2415, 1995
 - 13) Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW : An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 177 : 557-560, 1993
 - 14) D'Alfonso S, Richiardi PM : A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 39 : 150-154, 1994
 - 15) Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernandez-Castaner, Vendrell J, Richart C, Soler J : The TNF- α gene *Nco* I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes* 46 : 1468-1472, 1997
 - 16) Walston J, Seibert M, Yen CJ, Cheskin LJ, Andersen RE : Tumor necrosis factor- α -238 and -308 polymorphisms do not associated with traits related to obesity and insulin resistance. *Diabetes* 48 : 2096-2098, 1999
 - 17) Brown MS, Goldstein JL : Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232 : 34-47, 1986
 - 18) Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL : The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia : mutational analysis of a membrane protein. *Annu Rev Genet* 24 : 133-170, 1990
 - 19) Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL : Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1 : 445-466, 1992
 - 20) Dammerman M, Breslow JL : Genetic basis of lipoprotein disorders. *Circulation* 91 : 505-512, 1995
 - 21) Hirose H, Saito I, Kawai T, Nakamura K, Maruyama H, Saruta T : Serum leptin level, possible association with haematopoiesis in adolescents, independent of body mass index and serum insulin. *Clin Sci* 94 : 633-636, 1998
 - 22) Hirose H, Saito I, Tsujioka M, Mori M, Kawabe H, Saruta T : The obese gene product, leptin : possible role in obesity-related hypertension in adolescents. *J Hypertens* 16 : 2007-2012, 1998
 - 23) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC : Homeostasis model assessment : insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28 : 412-419, 1985
 - 24) Rudenski AS, Matthews DR, Levy JC, Turner RC : Understanding 'insulin resistance' : both glucose resistance and insulin resistance are required to model human diabetes. *Metabolism* 40 : 908-917, 1991
 - 25) Yoshida T, Sakane N, Umekawa T, Sakai M, Takahashi T, Kondo M : Mutation of β_3 -adrenergic-receptor gene and response to treatment of obesity. *Lancet* 346 : 1433-1434, 1995
 - 26) Fujisawa T, Ikegami H, Yamato E, Takekawa K, Nakagawa Y, Hamada Y, Oga T, Ueda H, Shintani M, Fukuda M, Ogihara T : Association of Trp64Arg mutation of the β_3 -adrenergic-receptor with NIDDM and body weight gain. *Diabetologia* 39 : 349-352, 1996
 - 27) Li LS, Lonnqvist F, Luthmann H, Arner P : Phenotypic characterization of the Trp64Arg polymorphism in the β_3 -adrenergic receptor gene in normal weight and obese subjects. *Diabetologia* 39 : 857-860, 1996
 - 28) Kadowaki H, Yasuda K, Iwamoto K, Otabe S, Shimokawa K, Silver K, Walston J, Yoshinaga H, Kosaka K, Yamada N, Saito Y, Hagura R, Akanuma Y, Shuldiner A, Yazaki Y, Kadowaki T : A mutation in the β_3 -adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 215 : 555-560, 1995
 - 29) Kawamura T, Egusa G, Okubo M, Imazu M, Yamakido M : Association of β_3 -adrenergic receptor gene polymorphism with insulin resistance in Japanese-American men. *Metabolism* 48 : 1367-1370, 1999
 - 30) Pietri-Rouxel F, St John Manning B, Gros J, Strosberg AD : The biochemical effect of the naturally occurring Trp64 \rightarrow Arg mutation on human β_3 -adrenoceptor activity. *Eur J Biochem* 247 : 1174-1179, 1997
 - 31) Kim-Motoyama H, Yasuda K, Yamaguchi T, Yamada N, Katakura T, Shuldiner AR, Akanuma Y, Ohashi Y, Yazaki Y, Kadowaki T : A mutation of the β_3 -adrenergic receptor is associated with visceral obesity but decreased serum triglyceride. *Diabetologia* 40 : 469-472, 1997
 - 32) Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Ogihara T : Meta-analysis of the association of Trp64Arg polymorphism of β_3 -adrenergic receptor gene with body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* 83 : 2441-2444, 1998
 - 33) Mitchell BD, Cole SA, Comuzzie AG, Almasy L, Blangero J, MacCluer JW, Hixson JE : A quantitative trait locus influencing BMI maps to the region of the β_3 adrenergic receptor. *Diabetes* 48 : 1863-1867,

- 1999
- 34) Yamada K, Yuan X, Ishiyama S, Koyama K, Ichikawa F, Koyanagi A, Koyama W, Nonaka K : Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. *Diabetologia* 40 : 706-710, 1997
- 35) Hotamisligil GS, Spiegelman BM : Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43 : 1271-1278, 1994
- 36) Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM : IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271 : 665-668, 1996
- 37) Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW : Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 3195-3199, 1997
- 38) Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Morgan K, Hegele RA : Association and linkage of LDLR gene variation with variation in plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Hum Genet* 43 : 153-159, 1998
- 39) Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, Reaven PD : Western-type diets induce insulin resistance and hyperinsulinemia in LDL receptor-deficient mice but do not increase aortic atherosclerosis compared with normoinsulinemic mice in which similar plasma cholesterol levels are achieved by a fructose-rich diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 : 1223-1230, 1999
- 40) Fu Y, Katsuya T, Higaki J, Asai T, Fukuda M, Takiuchi S, Hatanaka Y, Rakugi H, Ogihara T : A common mutation of low-density lipoprotein receptor gene is associated with essential hypertension among Japanese. *J Hum Hypertens* 15 : 125-130, 2001
- 41) Ishii T, Hirose H, Kawai T, Hayashi K, Maruyama H, Saito I, Saruta T : Effects of intestinal fatty acid-binding protein gene Ala54Thr polymorphism and β_2 -adrenergic receptor gene Trp64Arg polymorphism on insulin resistance and fasting plasma glucose in young to older Japanese men. *Metabolism* 50 : 1301-1307, 2001
- 42) Ishii T, Hirose H, Saito I, Nishikai K, Maruyama H, Saruta T : Tumor necrosis factor alpha gene G-308A polymorphism, insulin resistance, and fasting plasma glucose in young, older, and diabetic Japanese men. *Metabolism* 49 : 1616-1618, 2000

慶應医学 第80巻第1号号外
平成15年3月25日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第166号

慶應義塾大学

論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科博士課程修了の次の者に対し、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条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成14年11月11日 慶大博士甲第2065号	佐藤 範英	昭和43年 4月20日
同 第2066号	篠田 昌宏	昭和44年 9月16日
平成14年12月 9日 慶大博士甲第2070号	矢部 寛樹	昭和42年 4月27日

論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科の行う論文博士の審査および試験に合格した次の者に対し、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条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成14年11月11日 慶大博士乙第3627号	石井 達哉	昭和40年 8月 5日
同 第3628号	小澤 伸晃	昭和38年 8月22日
同 第3629号	冨田 裕	昭和42年 6月24日
同 第3630号	飛弾 麻里子	昭和41年 9月24日
同 第3631号	本多 正典	昭和40年12月30日
同 第3632号	森山 一郎	昭和40年 7月17日
平成14年12月 9日 慶大博士乙第3638号	小室 優貴	昭和40年 9月26日
同 第3639号	宮坂 敏幸	昭和36年 5月12日

目 次

佐藤 範英	Functional conservation of platelet glycoprotein V promoter between mouse and human megakaryocytes. (マウスおよびヒト巨核球で機能保存された血小板膜糖蛋白V (GPV) プロモーター領域の解析)	3
篠田 昌宏	TNF suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning. (ラット肝虚血再灌流障害におけるイスキミックプレコンディショニングのティーエヌエフ産生と微小循環障害抑制効果)	4
矢部 寛樹	Lack of matrix metalloproteinase (MMP) -1 and -3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo. (Ewing肉腫特異的EWS-FLI-1によるmatrix metalloproteinase (MMP) の転写活性化と調節領域への結合能)	5
石井 達哉	インスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常に関与する遺伝子多型の検討	6
小澤 伸晃	精巣での誘導型ヘムオキシゲナーゼによるストレス応答と精細胞へのアポトーシス誘導を介した造精機能制御	7
冨田 裕	ラット脳皮質小領域におけるSpreading Depression、および脳軟膜細動脈分枝閉塞後の血流動態	8
飛弾麻里子	ラット腎発生分化におけるMAPキナーゼファミリーの役割	9
本多 正典	カルシウム拮抗薬によるナトリウム利尿の機序に関する検討	10
森山 一郎	力学的負荷の減少が骨代謝におよぼす影響と副甲状腺ホルモン間歇投与の効果	11
小室 優貴	バクリタキセルおよびイリノテカン活性体によるシスプラチン耐性克服に関する卵巣癌由来培養細胞株を用いた検討	12
宮坂 敏幸	Coordination of the anterior and posterior cruciate ligaments in constraining the varus-valgus and internal-external rotatory instability of the knee. (内外反ならびに内外旋不安定性に対する膝前および後十字靭帯相互の制御機能分担について)	13

Functional conservation of platelet glycoprotein V promoter between mouse and human megakaryocytes.

(マウスおよびヒト巨核球で機能保存された血小板膜糖蛋白V (GPV) プロモーター領域の解析)

佐藤 範 英

内容の要旨

巨核球、血小板の分化機構を理解するため、血小板・巨核球系に特異的に発現する血小板特異膜糖蛋白の発現機構の解析が行われているが、巨核球の成熟過程における一連の遺伝子群の発現制御機構の研究には、巨核球成熟に伴って発現が上昇する分子を対象として解析を行うのが適していると考えられる。

血小板特異膜糖蛋白であるGPVは巨核球のより成熟した段階になって発現してくることが明らかとされ、その発現調節機構の解析は巨核球特異的、分化段階依存性の蛋白発現の制御機構の研究に適している。本研究では、マウスGPV遺伝子の5'非翻訳領域を含んだ遺伝子配列を用いて、そのプロモーター活性に関する解析を行った。方法として、マウスGPVの-481/+22 5'側遺伝子断片の正常マウス骨髓細胞と種々のヒト細胞株におけるプロモーター活性をルシフェラーゼおよびgreen fluorescence protein (GFP) の2つのレポーター遺伝子系を用いて測定した。

TPO添加マウス骨髓細胞培養系においてGFPをレポーターとして、GPV5'遺伝子断片のプロモーター活性を解析したところ、GFP発現は、巨核球のみに認められた。ヒト巨核球細胞株Damiを用いた解析においても高度のGFP発現が認められ、遺伝子断片が巨核球において十分なプロモーター活性を有することが明らかとなった。次に、デュアルルシフェラーゼアッセイを用いて解析を行ったところ、全長-481/+22 5'遺伝子断片は、ヒトおよびマウス巨核球細胞株において、種々のプロモーター活性を示したが、非巨核球系細胞株においてはプロモーター活性を示さず、プロモーター活性は巨核球系細胞に特異的であることが示唆された。また、十分なプロモーター活性は、明らかなGPVmRNAの発現を認める細胞株にのみ認められ、各細胞株における血小板特異抗原の細胞表面への発現パターンと、GPVプロモーター活性との間に一定の相関が認められたことから、解析に用いたGPV5'遺伝子断片は、分化段階依存性の発現調節に十分な機能を有していることが示唆された。

GPV5'遺伝子断片のdeletion mutantおよびpoint mutationを用いた解析では、血小板特異的遺伝子に普遍的に認められるcis-acting motifである-75と-46に位置するGATAとEts motifがプロモーター活性に必須であることが示唆された。

以上の解析の結果、GPVプロモーターは血小板特異的遺伝子の普遍的特徴を有し、巨核球特異的かつ分化段階依存性のGPV遺伝子発現調節機構は、ヒトとマウスの間で高度に保存されていることが明らかとなった。細胞株あるいは骨髓細胞培養系を用いたGPV遺伝子転写調節機構の解析は巨核球の成熟過程の解明に有用な情報をもたらすことが期待される。

論文審査の要旨

巨核球系細胞は、核多倍体化、血小板形成といった特異な分化様式を示し、その分化には非常に特異なメカニズムが働いていると考えられているが、その詳細を明らかになっておらず、その分化機構の詳細を明らかにすべく、血小板特異膜糖蛋白の発現機構の解析が行われている。本研究では、マウス遺伝子を用いて巨核球分化後期の分子マーカーである血小板特異膜糖蛋白GPVのプロモーター解析を行い、巨核球特異的かつ分化段階依存性のGPV遺伝子の発現調節機構が種の違いを越えて高度に保存されていることを示した。また、その転写活性には、GATAおよびEts認識配列が重要であることを示し、巨核球特異的な転写調節機構の一端を明らかにした。

審査ではまず、GPV遺伝子の上流および下流にわたる広範囲な遺伝子領域に関しては検討がなされておらず、一部の領域のみに絞った限定的な解析結果であるとの指摘とともに、各細胞株において、EMSAの系を用いた転写因子モチーフの解析や、PMAを使用したプロモーター活性の解析等を行うことによって転写調節機構について、さらなる知見が得られる可能性があるとの指摘がなされた。ヒトGPVとマウスGPVのプロモーター解析結果の違いについて質問がなされ、解析した範囲については、概ね同様であるとの回答がなされた。これに対し、両者の解析結果は、保存された転写因子モチーフの重要性が示された点で共通しているが、幾つかの相違点も認められ、それらの相違が生体内において、より明確な差として現れる可能性もあり、その評価は慎重に行うべきとの指摘がなされた。また、今回の解析結果が、どの程度生体における発現機構を反映すると予測しているかとの質問がなされ、実際の遺伝子発現機構は、ゲノムの高次構造のレベルから調節がなされており、今回の解析結果がそのまま生体内に反映される保証はないが、それに対して結論を出す一つの手段としてtransgenic mouseの系が考えられていると回答された。今後の方向性についての質問がなされ、今回の解析結果から重要性が示された、GATAやEts familyの転写因子と相互作用を示す転写因子を対象として解析を行って行きたいとの回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題は残しているが、巨核球特異的な転写調節の一端を明らかにし、それが種の違いを越えて保存されている可能性を示したことから、造血研究の立場から非常に有意義で価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫
先端医科学 河上 裕 病理学 岡田 保典
微生物学 小安 重夫 分子生物学 清水 信義
学力確認担当者:

審査委員長: 河上 裕

試問日: 平成14年9月18日

TNF suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning.

(ラット肝虚血再灌流障害におけるイスキミックプレコンディショニングの
ティーエヌエフ産生と微小循環障害抑制効果)

篠田 昌宏

内容の要旨

【緒言】短時間の虚血が、その後の長時間の虚血による再灌流障害を軽減する、すなわち虚血耐性を誘導するという現象があり、ischemic preconditioning (以下IPC) と呼ばれる。今回ラット肝を用いてIPCの肝虚血再灌流障害に対する効果を、TNF- α 産生と微小循環障害に着目して検討した。

【材料、方法】Wistar系雄性ラット (200~250 g) を使用。開腹10分後に30分間全肝虚血するcontrol群と、開腹直後より5分間全肝虚血し一旦再灌流して5分後再び30分間虚血するIPC群の2群を作成した。このモデルにおいて、肝障害、微小循環障害、TNF- α の産生、mRNA発現を比較検討した。肝障害の評価としては、肝逸脱酵素、肝組織光顕像、アポトーシス (TUNEL染色)、生体顕微鏡下propidium iodide陽性細胞の観察を行った。微小循環障害の評価としては、ICAM-1免疫染色、生体顕微鏡下接着白血球の観察を行った。TNF- α の評価としては、血漿中と組織中TNF- α を測定し、組織中TNF- α のmRNAをRT-PCR法にて半定量した。

【結果】肝障害の指標はいずれも、control群に比べIPC群で障害が軽度であることを示していた。ICAM-1免疫染色は、再灌流360分後においてcontrol群で多数の陽性細胞を類洞沿いに認めたのに対して、IPC群ではcontrol群ほど多くは認めなかった。接着白血球数は、再灌流180分後においてcontrol群で著明な上昇を認め、IPC群で有意な上昇の抑制を認めた。血中、組織中TNF- α は、再灌流60分後においてcontrol群で著明な上昇を認め、IPC群で有意な上昇の抑制を認めた。再灌流60分後の組織中TNF- α のmRNAの発現は、control群に比べIPC群で減弱していた。

【考察】肝障害の評価は様々な方向からなされ、そのいずれもがIPCが肝虚血再灌流障害に抑制的に働くことを示していた。微小循環の指標は、IPC群における微小循環障害が軽度であったこと、TNF- α の解析は、IPC群において血中、組織中蛋白産生、さらに肝組織中mRNA発現が抑制されていたことを示した。肝虚血再灌流障害の機序にはTNF- α などの炎症性サイトカインの産生やそれに引き続く微小循環障害が重要な役割を担っているという報告が多く見られるが、こうした報告と今回のわれわれの結果は、IPCの肝虚血再灌流障害抑制効果の機序には、TNF- α のmRNA転写抑制によるTNF- α 蛋白産生低下、それによってもたらされる微小循環障害の抑制が関与しているということを示唆するものである。

【結論】ラット肝虚血再灌流後のIPCによる障害抑制効果が認められた。その作用機序のひとつとして、微小循環障害の抑制、さらにTNF- α のmRNA転写抑制によるTNF- α 産生低下が示唆された。

論文審査の要旨

薬物を用いず短時間のシンプルな手技によって施行可能なIschemic Preconditioning (IPC) は、外科手術への応用の有用性が非常に高いものと期待されている一方メカニズムの解明は十分とは言えず、これまでadenosineやnitric oxideを因子とする報告が散見されるのみであった。本研究は、肝虚血再灌流障害において中心的役割を担っているとされる微小循環動態やpro-inflammatory cytokineであるTNF- α に着目してIPCのメカニズムの究明を行うことを目的とした。

審査では、TNF- α に関する質問が多くなされた。TNF- α の転写抑制がいかなる機序で引き起こされるのかという質問に対しては、短時間のストレスが細胞に不応期をもたらすという概念が提唱されていることや、TNF- α の上流で働いているといわれるnuclear factor- κ Bやmitogen-activated protein kinaseなども今後の研究対象として興味深いという展望が述べられた。次に、TNF- α がどの程度IPCのメカニズムに関与しているのかという質問がなされたが、adenosineやnitric oxideの役割を報告した文献があること、さらには他の炎症性サイトカインの関与の可能性が示唆されていることから、TNF- α がIPCメカニズムの単一の因子ではないという点が強調された。さらに、膜型TNF- α が分泌型になる際に作用する酵素TACE (TNF-alpha converting enzyme) への着目も興味深いとの指摘や、TNF- α がIPCのメカニズムに実際に関わっているか否かの検証のためにはKupffer細胞を薬物によって肝臓から除去したモデルでの実験が有用であろうとの指摘がなされた。次に、微小循環障害の評価に関し、生体顕微鏡下に観察された接着白血球の分布は一様であるが、酸素供給の少ないとされる小葉内Zone3に集中する可能性はないのかという質問がなされた。接着している白血球は非灌流類洞内に停滞しているだけである可能性があること、生体顕微鏡による肝表面からの観察は門脈域の観察が困難であり、HE染色標本等による切除断面の所見との比較が必要であると指摘され、今後、小葉内Zone別の比較解析をより適切な方法で行うことが期待された。最後に、実験モデルに関して、全肝虚血モデルでは腸管うっ血の影響が無視出来ないのではないのかという質問がなされた。腸管うっ血の影響を無視出来る部分肝虚血モデルが実験初期に試行されたが、手術手技の複雑さからデータのばらつきが大きく、より簡便なモデルを選択した経緯が説明された。

以上のように、本研究はなお検討すべき点を残しているものの、これまでのIPCに関する研究とは異なったメカニズム、すなわち微小循環障害やTNF- α に焦点を当てIPCの作用機序を究明した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 石井 裕正 医化学 末松 誠
解剖学 相磯 貞和 病理学 岡田 保典
学力確認担当者：
審査委員長：石井 裕正

試問日：平成14年10月15日

Lack of matrix metalloproteinase (MMP) -1 and -3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo.

(Ewing肉腫特異的EWS-FLI-1によるmatrix metalloproteinase (MMP) の転写活性化と調節領域への結合能)

矢部 寛樹

内容の要旨

Ewing肉腫は青少年期に骨および軟部に発生し周囲への浸潤と遠隔転移を示す悪性度の高い腫瘍である。本腫瘍は特異的な融合遺伝子 (EWS-FLI-1, EWS-ERG, EWS-ETV1およびEWS-E1AF) をもち、その下流側の遺伝子はすべてetsファミリーに属している。ERGおよびE1AFをはじめとするets関連蛋白は腫瘍の浸潤、転移の過程で重要な役割を演じるMMP1, MMP3などのMMP遺伝子のプロモーターを転写活性化するとされている。そして、特にMMP-3がEWS-FLI-1の標的遺伝子の候補としてあげられている。そこで本研究では、Ewing肉腫特異的融合蛋白がMMP遺伝子を転写活性化し、浸潤、転移に影響を及ぼしているという仮説を立てた。まず最初に、Ewing肉腫細胞株8株においてMMPの発現を検討した。その結果、MMP-1およびMMP-3の発現は予想に反してすべての細胞株で認められなかった。一方、MMP-9の発現は8細胞株中4株にみられ、MMP-2およびMT1-MMPはほとんどすべての細胞株で発現していた。MMP-1, MMP-3の発現がみられないことはEwing肉腫腫瘍検体においても同様であった。Ewing肉腫特異的融合蛋白はCATアッセイによる転写解析の結果、MMP-1およびMMP-3遺伝子のプロモーターを転写活性化することが示され、またゲルシフトアッセイによりMMP-1遺伝子の転写調節領域の認識配列に結合することが示された。しかしながらin vivo formaldehyde cross-linking法を用いた解析では、融合蛋白はEwing肉腫細胞内においてMMP遺伝子の転写調節領域の認識配列に結合していないことが明らかとなった。これらの結果から、Ewing肉腫において予想されたMMP-1およびMMP-3の発現がみられなかったことは、in vivoにおいてEwing肉腫特異的融合蛋白がMMP遺伝子の転写調節領域内のets認識配列に結合できないことによると考えた。本研究において、腫瘍細胞特異的融合蛋白の転写調節領域への結合はin vivo (腫瘍細胞そのもの) における転写調節領域のエピジェネティクスに影響されている可能性が示された。

論文審査の要旨

Ewing肉腫は高浸潤、高悪性を示す骨軟部腫瘍であり、本腫瘍にみられる特異的融合遺伝子のターゲット遺伝子候補として腫瘍の浸潤、転移の過程で重要なMMP-1, MMP-3などのMMP遺伝子が考えられている。本研究では、Ewing肉腫特異的融合蛋白がMMP-1およびMMP-3の転写を活性化し、その発現に関与し、浸潤、転移に影響を及ぼしているという仮説を立てた。Ewing肉腫細胞株では予想されたMMP-1およびMMP-3の発現は全く認められず、主としてMMP-2およびMT1-MMPの発現がみられ、一部にMMP-9の発現を認めた。腫瘍検体においてもほぼ同様の発現様式であった。CATアッセイによる転写解析により特異的融合蛋白がMMP-1およびMMP-3遺伝子のプロモーターを転写活性化するにもかかわらず、本腫瘍でMMP-1, MMP-3の発現がみられないメカニズムを解明するためにin vivo formaldehyde cross-linking法を用いた解析を行った。この結果、融合蛋白はin vivo (Ewing肉腫細胞内) においてMMP遺伝子の転写調節領域のets認識配列に結合していないことが明らかとなり、本腫瘍におけるMMP-1, MMP-3の発現は転写調節領域のエピジェネティクスに影響されている可能性が示された。

審査においては、過去に報告されたets転写因子のターゲット遺伝子同定の手法と、その発現をみる必要性について質問された。これに対し、サブトラクション法、プロモーターアッセイなどが用いられていたこと、Ewing肉腫細胞の様に腫瘍発生に重要な特異的転写因子をもつ場合はターゲット遺伝子の発現を検討する必要があると回答された。次に、本研究の結果から本腫瘍において、どの種類のMMPが浸潤、転移に重要であるかと質問され、基底膜浸潤に関わるMMP-2, MMP-9およびMT1-MMPが重要と考えられると回答された。さらに、浸潤能、転移能を論じるにはMMP蛋白の発現、酵素活性などを調べる必要があると指摘された。次に、in vivo formaldehyde cross-linking法およびslot blot analysisにおいて、プロットを定量的にとらえているかとの質問に対し、今回はFLI-1抗体での免疫沈降でMMP-1, MMP-3のプロモーターDNAが濃縮されていないことから、定性的に結果をとらえていると回答された。また、in vivoで融合蛋白が転写調節領域に結合していない理由として、DNAメチル化、クロマチン高次構造変化等、転写調節領域のエピジェネティクスに原因を求めるとすれば、それを証明する実験の必要性を指摘された。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、Ewing肉腫において特異的融合蛋白のターゲット遺伝子として発現が予想されたMMP-1, MMP-3が実際の腫瘍で発現していないメカニズムを解明した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 亨宇
先端医科学 河上 裕 産婦人科学 野澤 志明
学力確認担当者：
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成14年11月18日

インスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常に關与する遺伝子多型の検討

石井 達哉

内容の要旨

(目的) 肥満、糖尿病、高脂血症および高血圧症は、インスリン抵抗性を基盤として、動脈硬化性心血管系障害の発症や進展に重要な役割を担っている。この病態の中心となるインスリン抵抗性の発症機序は、いまだ明らかでなく、遺伝因子と環境因子の両者の関与が考えられている。本研究では、この遺伝因子の病態との関連を検討した。

(対象と方法) 日本人男性(年齢21-78歳)504名を対象とした。これらの対象において、以前からインスリン抵抗性への関与が想定されている小腸脂肪酸結合蛋白(FABP2)遺伝子のAla54Thr多型、 β_3 -アドレナリン受容体(β_3 AR)遺伝子のTrp64Arg多型、tumor necrosis factor- α (TNF- α)遺伝子のG-308A多型、さらに脂質代謝と関連がある低比重リポ蛋白受容体(LDL-R)遺伝子のC1773T多型に注目し、これらの遺伝子多型がBMI、血圧、血糖、脂質、血清インスリンやレプチン濃度に及ぼす影響を検討した。方法は、この対象者の末梢白血球から抽出したDNAを用い、PCR-RFLP法にて遺伝子多型の検出を行った。

(結果と考察)

1. β_3 AR遺伝子Trp64Arg多型とFABP2遺伝子Ala54Thr多型はともに、若年、中高年男性において2型糖尿病や高脂血症との関連は認められなかったが、中高年男性においてFABP2のThr/Thrゲノタイプを持つ者は、空腹時血糖の有意な高値が認められた。

2. TNF- α 遺伝子G-308A多型は、若年、中高年、および糖尿病患者のどの群においても、TNF1(正常型)とTNF2ヘテロ変異の2群間で、肥満、糖尿病、高血圧、高脂血症のどの観点においても、明らかな有意差は認められなかった。ただし、中高年男性でTNF2アレルを持つ者は、空腹時血糖が有意に高値であり、おそらくインスリン抵抗性の増大を介したものと考えられる。

3. LDL-R遺伝子C1773T多型のTアレルを持つ者は、血中LDLコレステロールと総コレステロール濃度が上昇しやすいことが示唆された。また、Tアレル頻度は白人に比して本邦では0.12と低かったが、それが日本人中高年男性において高脂血症を引き起こしている可能性が示唆された。

以上より、インスリン抵抗性および糖・脂質代謝異常に關与する遺伝子多型は2型糖尿病や高脂血症を含む代謝症候群の予知マーカーとなる可能性があり、今後のさらなる検討が必要と考えられた。

論文審査の要旨

肥満、糖尿病、高血圧および高脂血症の発症・進展、さらに動脈硬化性心血管障害の発生にインスリン抵抗性が重要な役割を果たしている。このインスリン抵抗性の発症機序として、遺伝因子と環境因子の両者の関与が考えられているが、その詳細は未だ明らかでない。そこで本研究では、日本人男性を対象として、インスリン抵抗性に關与すると考えられる遺伝因子と病態との関連を検討した。

これまでの多くの動物実験および臨床研究とから、インスリン抵抗性への関与が想定されている小腸脂肪酸結合蛋白(FABP₂)遺伝子のAla54Thr多型、 β_3 -アドレナリン受容体(β_3 AR)遺伝子のTrp64Arg多型、tumor necrosis factor- α (TNF- α)遺伝子のG308A多型、および低比重リポ蛋白受容体(LDL-R)遺伝子のC1773T多型と、BMI、血圧、血糖、脂質、血清インスリンおよびインスリン抵抗性との関係を、II型糖尿病患者を中心に、年齢21-78歳の男性504名を対象に検討した。その結果、中高年男性でFABP₂のThr/Thrゲノタイプをもつ者は、空腹時血糖が有意に高値であり、TNF- α 遺伝子G-308A多型に関しても、中高年男性で空腹時血糖が高値であった。しかし、 β_3 AR遺伝子Trp64Arg多型とLDL-R遺伝子のC1773T多型は、血糖との関連はなかった。ただしLDL-R遺伝子のC1773T多型は、血中LDLコレステロールと総コレステロール濃度と関連していた。このような検討結果から、今回検討された諸因子の遺伝子多型が、II型糖尿病や高脂血症等の代謝症候群の予知マーカーとなる可能性がある」と結論した。

以上の研究において、まずインスリン抵抗性の発生に關与する可能性のある遺伝因子としてとりあげた4つの因子を、なぜ選択したかが問題となった。当研究者はこれまでの諸家の研究成績を勘案して選択したとした。しかし、新知見を得るには、これまであまり注目されていなかった因子にも目を向け、何らかの関与が想定される因子についても検討してみる必要があったと助言された。次に今回の研究対象の条件に関して、インスリン抵抗性についての研究であることから、アルコール摂取量の調査がなされるべきであったと付言された。また肝障害や腎障害を有するものを対象から除外したが、その基準をはっきりと示すべきであったと付言された。

研究方法では、本研究の基本であるインスリン抵抗性の評価方法としてhomeostasis model assessmentが用いられたが、その計算式や信頼性について論文中に詳細に記載すべきであるとされた。また論文の考案で、今回の研究の限界や今後の課題についての記載が必要であったと助言された。

以上のように本研究の計画のたて方や方法に若干の問題があったり、論文の書き方にも工夫が必要であったが、多数例での検討で、インスリン抵抗性の発生に關与する遺伝子多型の重要性を明らかにした点で、価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
医化学 末松 誠 分子生物学 清水 信義
内科学 石井 裕正 内科学 小川 聡

学力確認担当者:北島 政樹、末松 誠

審査委員長:末松 誠

試問日:平成14年10月9日

精巣での誘導型ヘムオキシゲナーゼによる ストレス応答と精細胞へのアポトーシス誘導を介した造精機能制御

小澤 伸晃

内容の要旨

Heme oxygenase (HO) は遊離ヘムの解毒酵素であると同時に、その反応生成物である鉄、一酸化炭素 (CO)、ビリルビンなどの生理学的作用を通じて、生体防御機構など様々な生物学的役割を生体内で担っている。精巣ではHO活性が高いことが知られていたが、その詳細な発現部位や存在意義に関してはこれまでほとんど解明されていなかった。本研究では重金属ストレス負荷時における精巣でのHOアイソザイムの発現と精細胞でのアポトーシスの誘導を中心とした造精機能制御への可能性に関して解明することを目的とした。誘導型であるHO-1はコントロールにおいてはSertoli細胞と間質マクロファージにのみ発現が認められていたが、カドミウム暴露によりLeydig細胞を中心にその発現が顕著となり、酵素活性ならびに蛋白質の変化も同様の傾向であった。一方構成型であるHO-2はコントロールでは成熟した精細胞であるelongated spermatidや遺残体に発現が認められ、総活性の約2/3を占めていたが、カドミウム暴露に伴い次第に発現は減弱した。HOの反応生成物であるビリルビンの染色性はHO-1発現細胞で陽性となり、カドミウム暴露時には間質を中心にHO活性が生体内で高まっていることが推察された。またHOに対する特異的阻害剤を用いた実験により、HO-1活性の上昇によりミクロソーム分画中のP450量が低下することが明らかとなり、精巣における性ステロイドホルモンの産生調節をHOが行っている可能性も考えられた。一方カドミウム暴露により精細管周囲の精細胞であるspermatogoniaやprimary spermatocytesなどでアポトーシスが検出され、その出現頻度は暴露12時間後の検討ではHO活性の特異的阻害により抑制されたが、CO供与体の追加投与によりその抑制効果は明らかに抑えられた。鉄キレート剤やテストステロンによるアポトーシス抑制効果は認められなかった。またFasは精細胞全体に発現が認められたものの、Fas ligandはカドミウムの投与さらにはHO活性阻害時でもCO供与体の追加投与によりSertoli細胞あるいはspermatogonia, primary spermatocytesなどの精細胞で発現が増強した。以上よりカドミウム暴露後急性期においてはHO-1誘導により生成されたCOによりFas/Fas ligand系を介して減数分裂直前の精細胞がアポトーシスに陥り、精子形成が制御されている可能性が考えられた。さらに停留精巣モデルの実験ではHO-1の発現増強がSertoli細胞を中心に起きていることより、精巣では各ストレスに応じてLeydig細胞あるいはSertoli細胞がストレス感知細胞として働き、HO-1の発現を通じて性ステロイド産生や精子形成を制御していると考えられた。

論文審査の要旨

本研究は、精巣でのHeme oxygenase (HO) の発現と造精機能に対する存在意義を解明するために、重金属であるカドミウムをラットに暴露し、HOアイソザイムの発現動態と精細胞でのアポトーシスの誘導を中心とした造精機能への関与について検討したものである。その結果、コントロールではSertoli細胞と間質マクロファージに発現の認められていた誘導型であるHO-1は、カドミウム暴露によりLeydig細胞を中心にその発現が顕著に増加することが明らかにされ、HO-2は成熟した精細胞で認められることが示された。またHO-1活性の上昇に伴う造精機能への影響として、P450量の減少によりステロイド産生能が制御されること、ならびにHO反応生成物であるCOによりFas/Fas ligand系を介して精細胞でのアポトーシス誘導が引き起こされる可能性が示された。

審査においては、まず本研究で使用したカドミウムについて、その暴露が持たす生理的な意義に関して質問がなされた。これに対して、カドミウムはHOを顕著に誘導すると同時に精子形成などの生殖能力を抑制することが示されており、HOと造精機能との関係を解明するためには適切な化学物質であると述べられた。一方、慢性暴露では金属を捕捉するメタロチオネインの誘導のためにHO自体の誘導が生じにくくなることも追加された。また、定常状態でのHOアイソザイムの存在意義に関しても質疑がなされ、Sertoli細胞のHO-1は通常の精子形成過程における精細胞のアポトーシスを誘導している可能性があり、HO-2に関してはHO反応生成物であるビリルビンの染色性の欠如よりその意義は不明であると回答された。これに対し審査担当者から成熟精細胞できわめて顕著に発現していることより、HO活性自体に関与しない生理学的役割に関しても検討すべきであるとの指摘があった。さらに停留精巣や抗拮剤投与などの病態での造精機能への影響についても質問があったが、両者において精細胞でアポトーシスが出現し、ステロイド産生が抑制されているとの報告があることが述べられた。最後にヒトの生殖機能への応用の可能性に関しても質疑がなされた。精細胞でアポトーシスが生じる種々の動物実験モデルにおいてHO-1が誘導されている可能性があることより、各病態でのHOと造精機能との関係をさらに追求していくと回答されたが、男性不妊症や抗拮剤による精子減少など実際の臨床に直結する病態でのHOの存在意義を解明し、臨床への応用を考えていく必要性についての指摘を受けた。

以上のように本研究は、更に発展させて検討すべき幾つかの課題を残してはいるものの、ストレス負荷時に造精機能が制御されるメカニズムとしてHO-1/COシステムの存在意義をはじめ指摘できた点で、生殖医学の発展に寄与する有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典
医化学 末松 誠 産婦人科学 野澤 志朗
泌尿器科学 村井 勝 解剖学 相磯 貞和
学力確認担当者：北島 政樹、末松 誠
審査委員長：末松 誠

試問日：平成14年10月10日

ラット脳皮質小領域におけるSpreading Depression、 および脳軟膜細動脈分枝閉塞後の血流動態

富田 裕

内容の要旨

脳梗塞の虚血病巣の病態はいまだ十分に解明されていない。それは虚血病巣の血流変化を詳細に測定し得る方法がなかったことも一因である。本研究では、神経細胞脱分極と微小虚血巣の血流変化について、我々が開発した高分解能を有する新しい脳血流測定法 (2-D Flow Map法) を用いて検討することを試みた。

方法：1. Sprague-Dawleyラットの脳皮質に、ごく少量の濃厚塩化カリウム (K⁺) 溶液を注入した後の経時的な透過光画像変化を、我々が新しく開発したtransillumination法により検討した。関心領域 (ROI: ラット脳 2mm×2mmの領域) の変化を8ビットフレームグラバーカード (Scion LG-3) を通したデジタル画像として連続的に記録し、サブトラクション法により解析した。

2. Sprague-Dawleyラットの脳表細小軟膜動脈分枝を赤外線凝固によって閉塞・局所虚血を作成した。カーボンブラック色素希釈曲線による2-D Flow Map法を用いてROI内の2次元microflowマップの経時的な変化を観察し、動脈閉塞10分以内の急性期および約2時間後の閉塞成熟期の2つの時期で透過光画像形態変化および各々の微小循環パラメーターを検討した。

結果：

1. カリウム注入部を中心とした虚血、充血の波状の拡がりが見られた。その速度は約2.2mm/minであり、spreading depressionの際の神経細胞脱分極の伝播に随伴するものと考えられた。
2. 細動脈閉塞による脳小虚血病巣では血流が極度に低下し、血流障害による神経細胞の脱分極の遅延、回復遅延が考えられた。microflowは小虚血病巣にもかかわらず、著しく不均一な血流変化を示し、部分的には重度の虚血がみられた。しかし平均としては中等度の血流の減少にとどまり、時間とともに回復傾向を示した。
3. 脳細小動脈の閉塞により生じる虚血初期には、ROI内の血液分布およびmicroflowの平均値は減少した。microflowの頻度曲線の空間的分布の不均一性を示す γ インデックスは増加、skewnessは左に偏倚し、遅い血流成分の増加を認めた。
4. 閉塞後の時間経過とともに、カーボンブラック色素の血管内通過が阻害され、虚血初期の遅い成分が計算に含まれなくなり、見かけ上血流の増加が認められた。

結論：spreading depressionの際の組織光透過性の増加は、一時的な細胞の脱分極および細胞の腫大による微小血管の圧迫を反映している可能性が示唆された。また、脳虚血組織における血流は極めて不均一であり、Perfusion MRIやPETなどで得られる比較的大きな関心領域の血流値を臨床例で評価する際に留意すべきであると考えられた。

論文審査の要旨

脳梗塞の虚血病巣の病態はまだ不明な点が多い。本研究では、生理的な状態での神経細胞脱分極と微小虚血巣の血流変化について検討した。まずSprague-Dawleyラットの脳皮質の微小関心領域 (ROI: 2mm×2mm) に、微量のK⁺を注入して誘発したspreading depression (SD) の際の経時的な透過光画像変化をtransillumination法にて調べた。次に、ラット脳表細小軟膜動脈分枝を赤外線凝固によって閉塞・局所虚血を作成し、我々が開発した高分解能を有する新しい脳血流測定法 (2-D Flow Map法) を用いて、ROIの2次元microflowマップの経時的な変化を解析し、各微小循環パラメーターを検討した。その結果、K⁺注入部を中心とした虚血、充血の波状の拡がりが見られ、SDの際の組織光透過性の増加は、一時的な脳血液量の変化のみならず細胞の脱分極および腫大による微小血管の圧迫を反映している可能性が示唆された。また、微小脳虚血組織における血流が極めて不均一である結果が得られ、perfusion MRIやPETなど比較的大きな関心領域の血流値を臨床例で評価する際に留意すべき点と考えられた。

論文審査では、K⁺誘発SDにおいて、神経細胞の脱分極を示すevidenceは何かとの質問がなされた。本実験モデルの結果は、従来報告されている切り出し脳組織切片におけるSDの透過光像と一致し、進展速度も合致していた。さらに電極によるDC potentialの記録では一過性のnegative shiftが観察されたが、微小領域では記録電位との時間的、空間的同一性の同定が困難で、今後の検討課題であると回答された。続いて、K⁺の注入法についての質問がなされた。本法ではROIが小さく、汎用される綿芯法はK⁺の脳表での拡散が著しいため、マイクログラスビベットによるK⁺の局所注入法を用いたと回答された。また、酸化還元ヘモグロビンのisosbestic pointとして550nmを選択した理由、またモーメント解析の具体的な各計算式を詳述すべきとの指摘がなされた。また、細動脈閉塞後の2-D Flow Map像において、限局する明るいspotは脳表に垂直に上行するmedullary arteryではないかとの指摘がなされ、その可能性があると回答された。また、脳血液量の測定についての質問がなされた。脳血液量の絶対値の測定は困難であり、ここでは平均通過時間の逆数をmicroflowと定義したとの回答がなされた。

以上、本研究には今後さらに検討すべき点があるものの、SDの際の血流動態を解析し、極めて微小領域の微小虚血の血流変化が不均一であることを明らかにした点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 福内 靖男
外科学 河瀬 斌 解剖学 仲嶋 一範
生理学 岡野 栄之 医化学 末松 誠
学力確認担当者：北島 政樹、河瀬 斌
審査委員長：河瀬 斌

試問日：平成14年9月30日

ラット腎発生分化におけるMAPキナーゼファミリーの役割

飛 弾 麻 里 子

内容の要旨

【背景】腎ネフロンは、間葉細胞と尿管芽上皮細胞の増殖分化によって形成される。これらの発生過程は相互に影響し合いながら進行する。すなわち、一方が分泌する細胞外因子が他方の増殖、分化の制御に必須と考えられている。また腎の形態形成には広汎なアポトーシスも関与している。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) スーパーファミリーは細胞内信号伝達における主要酵素であり、主に以下の3つのファミリーが知られている。Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) は細胞増殖、分化誘導に、p38 MAPK (p38) とc-Jun N-terminal kinaseは細胞増殖、アポトーシスに関与する。従って、MAPKが腎発生において重要な役割を果たしていると考えられる。筆者らは幼若ラット腎ではERKとp38の発現・活性が高いこと、ERKの発現パターンとネフロンの発生過程が良く相関することを報告している。本研究では、ラット後腎を器官培養しERK活性化酵素阻害薬、p38阻害薬の存在下で器官培養し、腎発生におけるp38、ERKの機能的意義について検討した。

【方法】胎齢15日ラット後腎を24時間培養したのち、p38またはERK活性化酵素の阻害薬を添加してさらに96時間培養、対照腎(阻害薬なし)と以下の項目について比較検討した：間葉細胞の増殖(後腎表面積、トリチウム標識チミジンの取り込みなど)、間葉細胞の糸球体上皮への分化(Wilms' tumor1免疫組織染色)、尿管芽上皮細胞の増殖、分化(Dolichos biflorus lectin染色)、アポトーシス(核断片化など)、糸球体原基の数(peanut agglutinin染色)および微細構造の成熟度(HE染色)。

【結果】p38阻害により、主に間葉細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが増加した。さらに、間葉細胞の糸球体上皮への分化は抑制され、糸球体原基は認められなかった。ERK阻害でも、間葉細胞の増殖抑制、アポトーシスの増加、糸球体原基数の減少を認めた。これらの効果はp38阻害腎に比して軽度であった。間葉細胞の糸球体上皮への分化については対照腎と有意差を認めなかったが、微細構造が未熟な糸球体原基が多く、糸球体成熟過程の遅延が示唆された。尿管芽細胞の増殖、分化については、p38阻害、ERK阻害により、いずれも有意な変化を認めなかった。

【結論】p38が主に間葉細胞の増殖促進、分化誘導、アポトーシスの抑制を介して腎の成長と糸球体形成に関与することが確認された。一方、ERK阻害の影響はp38阻害に比して軽度であった。ERKはむしろ糸球体微細構造の成熟過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査の要旨

腎発生は、後腎間葉細胞と尿管芽上皮の発生が並行して、互いに影響しあいながら進行する。本研究では、間葉細胞と尿管芽上皮から分泌され、互いの発生に関わる細胞外因子のシグナル伝達機構について検討した。ラット後腎を器官培養し、シグナル伝達の主要酵素であるMAPキナーゼ(MAPK)の阻害剤(p38阻害剤およびERK活性化酵素であるMEKの阻害剤)を培養液中に添加することにより、1) p38は主に間葉細胞の増殖促進、分化誘導、アポトーシスの抑制を介して腎の成長と糸球体形成に関与すること、2) ERKは糸球体微細構造の成熟過程において重要な役割を果たしていることが示された。

審査では、MAPK阻害剤の濃度設定の根拠、特異性、非特異的細胞毒性について問われた。実験を低濃度から開始し、p38阻害剤では腎表面積に、MEK阻害剤では尿管芽内径に有意な変化を認めた最低濃度を採用したと回答された。また薬剤の細胞毒性については組織像から判断し、特異性については今後の課題であると回答された。それに対し、構造の類似した不活性薬剤による組織損傷の検討、培養細胞での特異性の検討、他臓器の組織培養で使用される濃度との比較検討などが有用である、とのコメントがなされた。実験開始日を胎齢15日に設定した理由が問われ、技術的に可能な最も早い胎齢と選んだと回答された。尿管芽分枝がMAPK阻害による影響を受けなかった理由が問われ、胎齢15日では既に分枝が進行しており、影響を受けにくいと判断したと回答された。やはりMAPKの一つであるJNKについて検討しなかった理由が問われ、JNKの発現はむしろ成熟腎で強いためと回答された。p38阻害剤を短期間使用した場合の効果を「可逆的」と表現した点について説明が求められ、アポトーシスを起こさなかった残存間葉細胞による腎組織形成を「可逆的」とした、との回答がなされた。MAPKを介して腎発生に影響を及ぼす具体的な細胞外因子について問われた。繊維芽細胞成長因子、肝細胞成長因子により培養細胞のMAPKが活性化され、MAPK阻害剤によりこれら成長因子による細胞遊走促進作用が阻害される、との回答がなされた。本研究をさらに発展させてゆくための実験計画について問われ、MAPKの過剰発現実験を行う予定との回答がなされた。今回の研究結果と腎疾患の関連について問われた。p38阻害による腎成長障害と矮小腎、p38阻害によるネフロン形成異常とoligomega-nephronia、ERK阻害による尿管芽内腔の異常と嚢胞性腎疾患の関連が想定されるとの回答がなされた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき課題はあるものの腎の発生、成長とネフロン形成におけるMAPKの機能的役割を明らかにした点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 孝雄
泌尿器科学 村井 勝 内科学 猿田 享男
解剖学 相磯 貞和 病理学 岡田 保典
学力確認担当者：北島 政樹、村井 勝
審査委員長：村井 勝

試問日：平成14年10月3日

カルシウム拮抗薬によるナトリウム利尿の機序に関する検討

本 多 正 典

内容の要旨

カルシウム拮抗薬は血管拡張により降圧作用を示す薬剤であるが、従来の血管拡張薬と異なりナトリウム排泄性に作用すると報告されている。このようなカルシウム拮抗薬によるナトリウム排泄促進の機序としては、腎血行動態の変化、尿管に対する直接作用、脈管作動性物質の活性化などが関与するとされているが、その詳細は不明な点が多い。本研究では、カルシウム拮抗薬による尿中ナトリウム排泄の機序を検討する目的で、腎細動脈への作用の違いが報告されている三種のカルシウム拮抗薬、ニフェジピン、エホニジピン、およびミベフラジルを雑種生犬に投与し、腎血行動態の評価ならびに生体内ニードル型charge-coupled device (CCD) カメラによる腎微小循環の観察、さらにナトリウム排泄に関与する脈管作動性物質として一酸化窒素 (NO) やプロスタグランジン (PG) の尿中排泄量を検討した。

その結果、ニフェジピンは軽度、ミベフラジルは中等度、エホニジピンは著明なナトリウム排泄作用を示し、カルシウム拮抗薬の種類によりナトリウム排泄作用の程度に差異がみられた。腎血行動態に関しては、いずれのカルシウム拮抗薬も腎血漿流量を増加させたが、濾過係数はニフェジピンで増加、エホニジピンで不変、ミベフラジルでは逆に減少傾向を示した。次に、各種カルシウム拮抗薬の糸球体血行動態に対する作用を詳細に評価する目的で、生体内ニードル型CCDカメラを用いて腎微小循環を直接観察した。その結果、ニフェジピンは輸入細動脈を優位に拡張するのに対し、エホニジピンならびにミベフラジルは輸出細動脈を輸入細動脈と同程度に拡張した。この結果は、腎血行動態の変化に一致するものであった。さらに、脈管作動性物質の関与を検討したところ、尿中一酸化窒素代謝物 (NOx) の排泄量は、ニフェジピンでは不変であったが、エホニジピンおよびミベフラジルでは増加し、ナトリウム排泄量と有意な相関がみられた。しかしながら、カルシウム拮抗薬間で尿中NOx排泄量に差異は認められなかった。また、尿中PG排泄量は、カルシウム拮抗薬により影響を受けなかった。

以上の結果より、カルシウム拮抗薬の種類により、腎血行動態ならびに腎微小循環への作用が異なり、この作用の差異が腎ナトリウム排泄作用に重要な影響を与えることが示唆された。さらに、カルシウム拮抗薬による尿中NO排泄の増加もナトリウム排泄に関連するが、その役割は腎血行動態の作用に比べて少ないと考えられた。

論文審査の要旨

カルシウム (Ca) 拮抗薬は、末梢血管の拡張作用とともに利尿作用を呈する。しかし、この利尿作用の機序の詳細は明らかでない。本研究では、3種のCa拮抗薬を雑種成犬に注入し、腎血行動態、ナトリウム (Na) と水分排泄量、Na利尿に関与すると考えられる一酸化窒素 (NO) およびプロスタグランジン (PG) の排泄量を測定した。さらに腎の微小循環動態を、生体内ニードル型charge-coupled device (CCD) カメラで観察した。

用いたCa拮抗薬は、L型Caチャンネル拮抗薬のニフェジピン、L型とT型Caチャンネルの両者の拮抗作用を有するエホニジピンおよび主としてT型チャンネル拮抗薬のミベフラジルで、それぞれ血圧と心拍数に著明な変化をきたさない程度の量を注入した。その結果、Na利尿はエホニジピンが最も強く、次いでミベフラジル、ニフェジピンの順であった。いずれのCa拮抗薬も腎血漿流量を増加させたが、糸球体濾過係数は、ニフェジピンで増加、エホニジピンで不変、ミベフラジルで減少傾向を示した。腎微小循環の観察では、ニフェジピンは輸入細動脈を特に著明に拡張し、エホニジピンとミベフラジルは、輸入・輸出細動脈を同等に拡張させた。腎微小循環とNa利尿との間には一定の関係がみられた。Ca拮抗薬の投与でPG排泄には著明な変化がなく、NO排泄は、エホニジピンとミベフラジル投与群で増加し、この増加とNa排泄の間には相関がみられた。このような結果から、Ca拮抗薬の腎微小循環への影響は各薬剤で異なり、この差がCa拮抗薬のNa利尿に強く関係し、腎におけるNO産生よりもNa利尿への関与の方が重要と考えた。

以上の研究に関して、まずこの研究で最も重要なCCDカメラによる腎微小循環の観察において、輸入・輸出細動脈径の変化をどの部位で計測したのか、その詳細を示すべきであったと助言された。さらに両細動脈の径の変化に関して、最大拡張径の何%程度まで拡張させたのかを示す方法もあったのではないかと付言された。Ca拮抗薬による腎でのNO産生機序についても議論があった。当研究者は、Ca拮抗薬の内皮への直接作用ではなく、腎血流の増加等によるずり応力がNO合成酵素を刺激した可能性があると考えた。このほかCa拮抗薬の投与量と利尿効果との関係も問題となり、各Ca拮抗薬の増量に伴って利尿作用が強くなるものの、必ずしも用量依存性になっておらず、当研究者がCa拮抗薬の増量に伴って用量依存性に利尿効果が増加したと表現したことは正しくない指摘された。また今回用いたCa拮抗薬の注入量がかかり多いことから、ヒトへの通常投与量でみられる効果と異なる反応がみられている可能性にも注意すべきであると付言された。

以上のほか、本論文の書き方に工夫すべき点があったことも指摘されたが、新しい技術によりin vivoで腎微小循環を観察して貴重な成績が得られた点で、価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
泌尿器科学 村井 勝 薬理学 西本 征央
医化学 末松 誠 内科学 小川 聡
学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝
審査委員長: 村井 勝

試問日: 平成14年10月22日

力学的負荷の減少が骨代謝におよぼす影響と副甲状腺ホルモン間歇投与の効果

森 山 一 郎

内容の要旨

骨量や骨強度の維持には荷重や筋運動などの力学的負荷が重要である。しかし荷重の減少と筋力の減少のいずれが、骨量すなわち骨代謝により大きな影響をおよぼすかについては、詳細に比較検討した報告が少なく、いまだ明らかにはされていない。また力学的負荷の減少が骨量の減少をきたす機序そのものについても同様である。そこで、ラットを用い荷重が著明に減少する尾部懸垂モデルと筋運動が著明に減少する坐骨神経切除モデルを作成し、力学的負荷減少の性状の相違が骨におよぼす影響について骨形態計測の手法を用いて検討した。次いで、副甲状腺ホルモン (human PTH (1-34)) の間歇投与が、それぞれの骨量減少を予防しうるか否かについても検討した。

6週齢Wistar系雄性ラット48匹を各々8匹ずつ以下の6群に分けた。すなわち、対照群、尾部懸垂群、坐骨神経切除群、対象+PTH投与群、尾部懸垂+PTH投与群、および坐骨神経切除+PTH投与群である。坐骨神経切除は両側の後肢に対して行い、他の群には偽手術を行った。溶媒またはhuman PTH (1-34) (80 μ g/kg) を連日皮下注射した。屠殺7日前にカルセイン、3日前にテトラサイクリンで二重標識した後、実験15日目に脱血屠殺し、脛骨を採取した。脛骨近位部二次海綿骨および脛腓癒合部皮質骨の骨形態計測を行った。尾部懸垂群および坐骨神経切除群はともに、海綿骨において、骨形成を低下させ骨量を減少させたが、その程度は坐骨神経切除群より尾部懸垂群の方が大きかった。皮質骨において骨形成の低下は外骨膜面では尾部懸垂群が、内骨膜面では坐骨神経切除群が有意に大きかったが、骨量の減少は同程度であった。Human PTH (1-34) の間歇投与は海綿骨において尾部懸垂および坐骨神経切除により生じた骨量減少を、骨形成を増加させることにより完全に予防した。一方、皮質骨においては尾部懸垂群、坐骨神経切除群とも内骨膜面での骨形成の増加を促したが、外骨膜面での骨形成の低下に対しては有意な変化を与え得なかった。また内骨膜面での骨形成の増加は坐骨神経切除群で有意に大きかった。結果として、坐骨神経切除による骨量減少については完全には予防し得ないまでも緩和したが、尾部懸垂による骨量減少に対しては有意な効果をおよぼさなかった。

以上のことから、海綿骨においては、明らかに荷重の減少の方が骨量により大きな影響をおよぼすのに対して、皮質骨においては、骨量に対する影響は両者間に差がないことを示すものと考えられた。Human PTH (1-34) の間歇投与は、力学的負荷の減少による海綿骨の骨量減少を、骨形成を増加させることにより完全に予防しうるが、皮質骨の骨量減少は予防することはできないことが示された。

論文審査の要旨

骨量や骨強度の維持には荷重や筋運動などの力学的負荷が重要である。しかし荷重の減少と筋力の減少のいずれが、骨量すなわち骨代謝により大きな影響をおよぼすかについては、いまだ明らかにはされていない。また力学的負荷の減少が骨量の減少をきたす機序そのものについても同様である。そこで本研究では、ラットを用い荷重が著明に減少する尾部懸垂モデルと筋運動が著明に減少する坐骨神経切除モデルを作製し、力学的負荷減少の性状の相違が骨におよぼす影響について検討した。次いで、副甲状腺ホルモン (human PTH (1-34)) の間歇投与が、それぞれの骨量減少を予防しうるか否かについても検討した。その結果、海綿骨においては明らかに荷重の減少の方が骨量により大きな影響をおよぼすのに対して、皮質骨においては骨量に対する影響は両者間に差がないことが示された。またhuman PTH (1-34) の間歇投与は、力学的負荷の減少による海綿骨の骨量減少を、骨形成を増加させることにより完全に予防しうるが、皮質骨の骨量減少は予防できないことが明らかとなった。

審査では、骨量減少あるいは骨粗鬆状態はヒトでは中高年以降の年齢に多いが、今回6週齢と若齢のラットを用い、15日間の研究を行った意義について質問された。これに対し、成長期のラットは骨形成、骨吸収とも活発に行われ、尾部懸垂や坐骨神経切除に対する骨代謝の変化も速やかなので、骨量の減少を適確に観察しやすいこと、また薬物に対する反応も速やかであることが理由として回答された。次に、今回の研究ではhuman PTH (1-34) は予防的に実験1日目より投与されているが、骨量が減少した状態から治療的に投与された場合の骨量の回復に関して想定される結果について質問された。これに対し、過去の報告から骨量が減少した状態からの投与では十分な骨量の回復は難しいと回答された。また、今回の研究ではhuman PTH (1-34) が投与されているが、日常の診療で使用されることの多いVitamin Dなどの薬物についての効果も検討されるべきであったと指摘された。これに対し、Vitamin Dでは十分な骨量の回復が難しいことが過去に報告されていると回答された。次に、骨形成、骨吸収の評価では15日目で採取された血清を用い評価を行っているが実験初期での骨代謝状態の評価も尿中のマーカーを用いて計測するべきであると指摘された。さらにhuman PTH (1-34) を投与していることから血液中のPTH濃度、血清、尿中のCa、Pなどの変動についても評価すべきであると指摘された。

以上のように本論文についてはさらに検討すべき課題を残しているものの、力学的負荷の減少が骨におよぼす影響は、その減少の性状の相違により異なることを明らかにした点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科 戸山 芳昭
リハビリテーション医学 千野 直一 病理学 岡田 保典
内科学 猿田 享 男 解剖学 相磯 貞和
学力確認担当者: 北島 政樹、千野 直一
審査委員長: 千野 直一

試問日: 平成14年10月16日

パクリタキセルおよびイリノテカン活性体による シスプラチン耐性克服に関する卵巣癌由来培養細胞株を用いた検討

小室 優 貴

内容の要旨

【背景および目的】卵巣癌は、女性癌死亡の重要な位置を占めているおり、進行癌が多いことから、化学療法が重要な役割を担っている。従来卵巣癌には、シスプラチン（DDP）をkey drugとして種々の多剤併用療法が行われてきたが、DDPに元来耐性である卵巣癌症例（自然耐性）や、化学療法施行後再発した卵巣癌症例（獲得耐性）の治療が重要な課題となっている。新規抗腫瘍剤paclitaxel、CPT-11は、そのような卵巣癌DDP耐性症例に対し臨床的に高い奏効率を示すことから、その有用性が期待されているものの、DDP耐性に関する両薬剤の基礎的解明はまだまだ十分にされていない。DDPの耐性機序については、1) DDP取り込みの減少もしくはDDP排出の亢進による細胞内のDDP量の減少、2) DDP解毒機序の亢進、3) DDPによって傷害を受けた後のDNA修復の亢進、修復の亢進によるDNA傷害の減少などが示唆されている。そのような耐性機序の中でも、ことに細胞内Pi量はDDP耐性の重要な要因であると考えられている。そこで、本研究では、卵巣癌由来DDP自然耐性株RTSG、獲得耐性株KFraおよびその親株KFを用いて、DDPとpaclitaxelあるいはDDPとSN-38（CPT-11の活性体）の相互作用を明らかにすることを目的とした。すなわち、各細胞における各組み合わせの併用抗腫瘍効果を検討し、併用により相乗効果が得られる機序として、細胞内DDP取り込み機序および排出機序として細胞膜に存在しDDPの排出ポンプと考えられるmultidrug resistance-associated protein（MRP）に着目し、DDP耐性におけるDDPとpaclitaxelあるいはSN-38の相互作用が、DDP取り込み機序およびMRP発現の変化に及ぼす影響を解明することとした。

【結果】耐性株RTSG、KFraおよびそのwild-type KFを用い、DDP耐性機序と薬剤併用（DDP+paclitaxelまたはDDP+SN-38）効果について検討し以下の結果を得た。

1. DDP+paclitaxelまたはDDP+SN-38の組み合わせによる併用抗腫瘍効果は、各細胞においてisobologramにより相加的ないしは相乗的と評価された。したがって、DDP感受性細胞KFのみならず、DDP耐性細胞RTSG、KFraにおいても、上記薬剤による組み合わせは有効と考えられた。
2. paclitaxelまたはSN-38前接触により細胞内Pi蓄積量の増加が認められ、この増強はNa⁺/K⁺-ATPaseポンプ阻害剤であるouabainにより阻害された。このことは、paclitaxelまたはSN-38前接触は、Na⁺/K⁺-ATPaseを介することにより細胞内Pi蓄積量を増加させることを明らかにした。
3. DDP単剤投与で増強されたMRP mRNAは、DDPにpaclitaxelまたはSN-38を併用することにより減弱した。したがって、DDPにpaclitaxelまたはSN-38を併用投与することにより、MRP mRNAを抑制し、DDP耐性を克服し得ることが示唆された。

以上のことから、卵巣癌由来細胞株においてpaclitaxelまたはSN-38接触後のDDPによるPi蓄積量の増加とMRP発現の減弱がこれらの薬剤の併用効果に関与していることが示された。細胞内Pi蓄積量がouabainにより阻害されたこと、薬剤併用によりMRP mRNAの減弱が認められたことから、paclitaxelおよびSN-38による細胞内Pi蓄積量の増加がDDPとの併用効果に関与していることが明らかとなった。したがって、paclitaxelおよびSN-38はMRP mRNAを減弱させることにより卵巣癌細胞のDDP耐性を克服し得ることが示された。この成績は、臨床におけるDDP耐性卵巣癌患者の今後の治療戦略に光明をもたらすものと考えられる。

論文審査の要旨

卵巣癌化学療法において、臨床に大きな問題であるcisplatin（DDP）耐性症例に対し、DDPと新規抗腫瘍剤タキサン化合物あるいはDDPとトポイソメラーゼ阻害剤との併用療法は高い奏効率を示すものの、併用効果とDDP耐性との関係は未だ解明されていない。そこで本研究ではこれらの薬剤の併用が、細胞内Pi量や抗腫瘍剤排出ポンプといわれるmultidrug resistance-associated protein（MRP）、multidrug resistance protein（MDR-1）などの抗腫瘍剤感受性規定因子に及ぼす影響を及ぼすかについて検討した。材料としては卵巣癌由来獲得耐性株KFra、感受性株KFおよび当教室にて樹立した自然耐性株RTSGなどを用いて、DDP+paclitaxelおよびDDP+SN-38（トポイソメラーゼI阻害剤CPT-11の活性体）の*in vitro*における併用効果の検討を行った。まず、併用殺細胞効果については耐性株、感受性株ともにほぼ相乗的な殺細胞効果を示した。DDP耐性の要因とされる細胞内Pi濃度については、併用により細胞内Pi濃度の増加が認められ、その増加はDDP流入ポンプであるNa⁺/K⁺-ATPaseの阻害剤ouabainにより阻害された。このことにより併用による細胞内Pi量の増加はNa⁺/K⁺-ATPaseを介する可能性が示された。一方、元来正常の卵巣には発現が認められないとされるMRPは、DDP排出ポンプと推定されているものの十分な検討はなされていなかった。本研究では薬剤単独と併用によるMRP-1 mRNAの変化を系統的に検討し、DDP単剤投与で増強されたMRP mRNAが併用により減弱もしくは抑制される傾向を各細胞で示した。このことによりDDP排出にはMRPが関与し、併用によりMRP mRNAを抑制し細胞内Pi濃度が高まる可能性が示唆された。一方、MDR-1についてはDDP耐性や併用の増強には関与していないことが明らかになった。

審査では併用効果判定に用いたisobologram法について質問があり、同法が最も信頼性のある判定法として一般的に用いられていることやその描出法・解釈について説明がなされた。ouabainによる阻害実験については薬剤無処理群とも比較するべきであるという指摘がなされ、より流入機序を明確にするにはNa⁺/K⁺-ATPase mRNAやアイソトープを用いた検討も用いるべきとの助言があった。DDPにより増強されたMRP mRNAが、併用により減弱もしくは抑制される現象は極めて興味深いと評価されたものの、①MRP発現が併用により抑制されるのは細胞が障害を受けたからではないかという可能性、②併用によりMRP mRNAの発現が現象減弱する理由、③定量的にPCRを用い、time courseをみればmRNAの変化が直接追えるのではないかの助言がなされた。①については、細胞の障害が非常に少ないよう薬剤の濃度や接触時間を設定しており、MTT法にて細胞への障害を検討していることが説明された。②については明らかな現象の解明が現段階では難しく、今後③の定量的PCRにより、現象を検討していきたいと抱負が述べられた。また、今後の課題として、各細胞株でp53の変異の有無やDDP抵抗性といわれる明細胞腺癌など他の細胞株でも試みることに有意義ではないかとの指摘がなされた。

以上、本研究は個々の実験の結果からさらに踏み込んだ実験の展開と理論づけが望まれるものの、MRPとDDP耐性の関係やDDPとの併用効果について新しい知見を与え、今後大きく発展する可能性があるものと評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 野澤 志朗
病理学 坂元 亨宇 先端医学 河上 裕
病理学 岡田 保典 産婦人科学 吉村 泰典
学力確認担当者：北島 政樹、坂元 亨宇
審査委員長：坂元 亨宇

試問日：平成14年11月19日

Coordination of the anterior and posterior cruciate ligaments in constraining the varus-valgus and internal-external rotatory instability of the knee.

(内外反ならびに内外旋不安定性に対する膝前および後十字靭帯相互の制御機能分担について)

宮坂 敏幸

内容の要旨

膝関節前十字靭帯（以下ACL）および後十字靭帯（以下PCL）の制御機能については以前から多くの報告がなされているが、そのほとんどは両靭帯の機能をそれぞれ個別に解析したものである。しかしながら実際にはこの両者が1つのunitとして機能し、外力の種類によっては互いに役割を分担しながら制御をしていると考えられる。本研究では3次元計測が可能な張力測定システムを用いて、膝関節運動に伴うACLおよびPCLの張力の変化を同時に計測し、相互の制御機能分担について検討した。

膝関節に明らかな外傷や変形性変化を認めない新鮮凍結大腿切断肢6肢を用いた。ACLおよびPCLの大腿骨付着部をブロックとして周囲の母床から完全に切離し、これを計12枚のstrain gaugeを装着した金属プレート（張力センサー）を用いてそれぞれ元の位置に正確に再固定した。この操作によって各々の靭帯が付着する骨片は張力センサーを介して大腿骨に固定されるので、各靭帯の張力はstrain gaugeの出力値から求められる。まず膝関節を無負荷の状態 0° から 90° まで屈曲させて、ACLおよびPCLの各strain gaugeの出力値を屈曲 15° 毎に同時に記録した。次に重錘を用いて脛骨に2 Nmの内・外反トルクおよび0.6 Nmの内・外旋トルクを順次負荷して同様の計測を行った。

ACLの張力は無負荷時では屈曲 0° で最大となり、その後屈曲が進むにつれて減少し、一方PCLでは無負荷時には 0° から 45° まではほぼ張力は認められず、屈曲 60° 付近から張力が増加した。内反トルクを負荷するとACLでは全可動域で無負荷時に比べて張力の増加が認められ、その増加量は伸展位に近づくほど大きく、PCLでは屈曲 60° 以上で徐々に張力が増加した。外反トルク下でもACLの張力は増加したがその増加量は小さく、PCLでは屈曲が進むにつれ張力が増加した。内旋トルク下ではACLは屈曲 0° から 45° 付近で、PCLは屈曲 75° 以上で無負荷時に比べて張力が増加したが、外旋トルク下ではACLは軽度屈曲位で、PCLは屈曲 75° 以上で徐々に張力が増加した。

今回の結果では無負荷時にはACLは伸展位で、PCLは屈曲位で張力が増加しており、これは従来いわれている十字靭帯のtension patternと一致していた。また膝関節に加わる内・外反トルクおよび内旋トルクに対してはACLとPCLが協調して制御し、伸展位ではACLの張力の増加量が大きく、屈曲位ではPCLの張力の増加量が大きかったことから、その制御機能は膝関節が屈曲するに従いACLからPCLに移り変わっていくことが判明した。

論文審査の要旨

膝関節前十字靭帯（以下ACL）および後十字靭帯（以下PCL）は両者が1つのunitとして機能し、互いに役割を分担しながら様々な外力に対して制御をしている。しかしこの両靭帯の制御機能についてはそれぞれ個別に解析されたものがほとんどで、相互の機能分担については明らかにされていない。本研究では3次元計測が可能な張力測定システムを用いて、膝関節運動に伴うACLおよびPCLの張力の変化を同時に計測し、両靭帯の機能分担について検討した。本研究の結果では無負荷時にはACLは伸展位で、PCLは屈曲位で張力が増加しており、従来いわれている十字靭帯のtension patternと一致していた。また膝関節に加わる内・外反トルクおよび内旋トルクに対してはACLとPCLが協調して制御し、その張力の増加量は伸展位ではACLが、屈曲位ではPCLが大きかったことから、その制御機能は膝関節が伸展から屈曲するに従いACLからPCLに移り変わっていくことが判明した。

審査では、使用された張力センサーはoriginalかとの質問がなされ、他施設で報告されたものを改良して独自に作製したとの回答があった。また左右差や性差、年齢の差による違いはないかとの質問に対しては、ACLは伸展位で、PCLは屈曲位で多少ばらつきが大きかったが、これは個体差によるものと思われるとの回答された。次に靭帯を破断させるための負荷の検討は可能かとの質問がなされ、靭帯の破断に際しては加わる負荷の大きさだけでなく速さ（加速度）が重要であるため、これを実験で再現し計測するのは困難であるとの回答があった。また実際の計測時に伸展・屈曲以外の回旋や前後、内外側の変位などの要素はどのように設定したかとの質問には、屈伸以外の要素は全て拘束せずに自由度を与えたとの回答された。さらにこのような解析にコンピューターを使用した方法はないかとの質問に対しては、ロボティクスを用いた報告があり我々の研究グループでもその応用を進めているとの回答があった。最後に今回の結果をどのように臨床で応用するかについての質問がなされ、複合靭帯損傷などに行われる靭帯再建術に際して術式選択の裏づけになることや、手術後の後療法の進め方、受傷後の徒手検査にも応用できると回答された。

以上のように本研究はさらに検討すべき課題を残しているものの、膝関節に加わる外力に対して前および後十字靭帯が互いに機能を分担しながら制御していることを明らかにした点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
リハビリテーション医学 千野 直一 解剖学 相磯 貞和
形成外科学 中島 龍夫 病理学 岡田 保典
学術確認担当者: 北島 政樹、千野 直一
審査委員長: 千野 直一

試問日: 平成14年11月20日

慶應医学 第80巻第1号号外
平成 15 年 3 月 25 日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第167号

慶應義塾大学

論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科博士課程修了の次の者に対し、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条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成15年 2月10日 慶大博士甲第2090号	金城 謙太郎	昭和46年 3月12日
同 同 第2093号	脇田 哲矢	昭和43年 5月 8日

論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科の行う論文博士の審査および試験に合格した次の者に対し、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条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成15年 1月20日 慶大博士乙第3642号	小川 祐人	昭和42年12月12日
同 同 第3643号	烏村 知里	昭和42年10月 3日
同 同 第3644号	城下 晃子	昭和42年 4月16日
同 同 第3645号	田村 明彦	昭和33年11月22日
同 同 第3646号	中村 邦彦	昭和41年 1月11日
同 同 第3647号	伯野 大彦	昭和44年11月26日
同 同 第3648号	瀧本 康史	昭和36年10月14日
平成15年 2月10日 慶大博士乙第3654号	加藤 隆弘	昭和42年 3月 7日
同 同 第3655号	小西 美奈子	昭和40年 8月25日
同 同 第3656号	佐藤 俊明	昭和40年 5月 5日
同 同 第3657号	竹内 哲	昭和40年 8月10日

学位授与年月日号	氏名	生年月日
平成15年2月10日 慶大博士乙第3658号	長沼誠	昭和42年5月28日
同同 第3659号	南雲美也子	昭和38年7月15日
同同 第3660号	堀江義則	昭和38年8月10日
同同 第3661号	山本裕	昭和25年5月30日

目 次

金城謙太郎	レチノイン酸によるトロンボポイエチン発現促進機構 —分化誘導療法による血小板増多症例からの考察— …………… 4
脇田 哲矢	炎症性サイトカインの混合投与によるラット視床下部室傍核における 一酸化窒素代謝産物の変化 …………… 5
小川 祐人	Transplantation of <i>in vitro</i> expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. (試験管内で増殖させた胎児神経前駆細胞の移植による成体ラットにおける 脊髄圧挫損傷後のニューロン新生と機能回復) …………… 6
島村 知里	運動およびその中止が骨量におよぼす影響 …………… 7
城下 晃子	心房高頻度興奮ともなう心房筋の電気的リモデリングとその形成過程における Kチャンネル遮断薬の効果 …………… 8
田村 明彦	ラット肝移植におけるFTY720とタクロリムスの相乗効果 …………… 9
中村 邦彦	Injured corneal epithelial cells promote myodifferentiation of corneal fibroblasts. (角膜実質細胞の筋線維芽細胞への変化に及ぼす角膜上皮細胞の影響) …………… 10
伯野 大彦	Bone Marrow-Derived Regenerated Cardiomyocytes (CMG Cells) Express Functional Adrenergic and Muscarinic Receptors. (骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞 (CMG細胞) における アドレナリン・ムスカリン受容体の発現および機能解析) …………… 11
測本 康史	Mixed chimerism and tolerance without whole body irradiation in a large animal model. (大動物モデルにおける全身照射を使用しない混合キメリズムと免疫寛容) …………… 12
加藤 隆弘	Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats. (白血病阻止因子誘発性心肥大におけるカルモデュリン依存性キナーゼII、 IVおよびカルシニューリンの役割) …………… 13
小西美奈子	日本人のケラトエビセリン関連角膜ジストロフィの分子遺伝学および 免疫組織学的解析 …………… 14
佐藤 俊明	慢性心房細動症例に対する電気的除細動後の心房電気生理学的指標の変化 …………… 15
竹内 哲	Phorbol myristate acetate惹起性胃潰瘍におけるnuclear factor kappa BとTumor necrosis factor- α の役割 …………… 16
長沼 誠	Characterization of Structures with T-Lymphocyte Aggregates in Ileal Villi of Crohn's Disease. (クローン病回腸絨毛内におけるT-リンパ球の集簇) …………… 17
南雲美也子	電気的除細動後の左房機能回復過程と血栓塞栓症の危険因子 …………… 18
堀江 義則	Role of ICAM-1 in chronic ethanol consumption-enhanced liver injury after gut ischemia-reperfusion in rats. (ラット腸管虚血再灌流惹起性肝障害モデルにおける慢性エタノール投与の影響 とその反応におけるICAM-1の役割) …………… 19
山本 裕	体腔内凝血の凝固線溶系に及ぼす影響と再出血発現機序に関する検討 …………… 20

レチノイン酸によるトロンボポイエチン発現促進機構

—分化誘導療法による血小板増多症例からの考察—

金城 謙太郎

内容の要旨

ビタミンAの誘導体であるオールトランスレチノイン酸 (ATRA) を用いた分化誘導療法は、急性前骨髄球性白血病 (APL) に対する標準的療法として確立された。従来の化学療法と比較して、完全寛解率、生命予後などが著しく改善されるも、ATRA症候群といわれる致死的な副作用や、血小板増多症例が報告された。また、近年、血小板産生調節機構を担うサイトカインとして、トロンボポイエチン (TPO) 遺伝子がクローニングされた。そこで、ATRA療法中の血小板増多機構の解明を目的として、ATRA療法中のAPL症例における各種血清サイトカイン濃度を測定したところ、血小板増多症例において、平均血清TPO濃度は、ATRA投与後約16日目をピークに上昇し、その後血小板数の増加を認めた。また、血清エリスロポイエチン濃度がTPOと類似した挙動を示すも、他の各種血清サイトカインは明らかな変動を認めなかった。

以上の結果より、ATRAが直接TPOの発現調節に寄与し、血小板増多をもたらす可能性を探索した。TPOの産生細胞である骨髄間質細胞の細胞株を、ATRA刺激により培養後、定量的RT-PCR法にてTPOのmRNAレベルでの発現を解析したところ、ATRA濃度、刺激時間依存性にTPO mRNAの上昇を認めた。一方、TPOを恒常的に発現する肝細胞株をATRA刺激前後で同様に解析するもTPO mRNAの上昇は認められなかった。更に、ATRAが直接的にTPOの転写発現活性を上昇させると仮定し、TPO遺伝子の5'側プロモーター領域配列をデータベースで検索したところ、従来のレチノイン酸応答領域配列と3塩基異なる配列 (TPO-RARE) を見いだした。そこで、TPO-RAREがレチノイン酸応答領域配列として機能し、ATRAにより直接的にTPOの発現が上昇したのかを検討した。第1に、レチノイン酸受容体 (RAR α) との結合実験により、TPO-RAREはレチノイン酸受容体が特異的に結合することを確認した。第2に、EMSA法により、ATRA刺激による骨髄間質細胞株抽出蛋白とTPO-RAREとの結合変化を解析したところ、ATRA刺激により、TPO-RAREと蛋白複合体との結合が変化することを証明した。第3に、レポーターアッセイ法により、TPO-RAREを介したATRA刺激は骨髄間質細胞株において直接的なTPO遺伝子の転写活性増強をもたらすことを明らかにした。

以上の実験結果より、臨床的に認められたATRAによる分化誘導療法におけるAPL症例の血小板増多は、骨髄間質細胞においてATRAによる直接的なTPO遺伝子の転写活性、発現の増強により、血清TPO濃度が上昇し、血小板増多を来した可能性が示唆された。本研究は血小板増多、および、TPO発現調節機構においてATRAの重要性を見だし、巨核球、血小板造血機構に新たな知見を付け加えるものと考えられた。

論文審査の要旨

急性前骨髄球性白血病 (APL) に対するオールトランス型レチノイン酸 (ATRA) による分化誘導療法は第一選択療法として確立されたが、ATRA症候群といわれる致死的な副作用例や、血小板増多症例が報告されている。しかし、その血小板増多機構の詳細は明らかでない。本研究では、ATRA療法中血小板増多APL症例において種々の血清中サイトカイン濃度を経時的に測定した。血小板増多症例において、血小板産生調節機構の代表的なサイトカインである血清トロンボポイエチン (TPO) 濃度の上昇を認めた。また、骨髄間質細胞株においてATRA刺激によるTPO mRNAレベルでの発現上昇を定量的RT-PCR法にて明らかにした。更に、TPO遺伝子プロモーター領域にレチノイン酸応答領域が存在することを1. レチノイン酸受容体と特異的に結合すること、2. 骨髄間質細胞株蛋白抽出物と特異的に結合し、ATRA刺激でその配列を含む蛋白複合体に変化が生じること、3. 骨髄間質細胞株において、レポーターアッセイ法によりATRA刺激下でその配列を特異的に介してレチノイン酸標的遺伝子の転写活性が増強することにより証明した。

審査においてはATRAが血清TPO濃度を上昇させる機構として、骨髄間質細胞に作用したのか、APL細胞自体に作用したのかを明確にすべきであると言及された。それに関連し、正常人、APLマウスモデルにおいてATRA投与により、血小板増加をきたすのかにつき質問があった。これに対し、APL細胞、正常人、APLマウスモデルにおけるATRA刺激後のTPO濃度については検討していないが、正常ヒト由来骨髄間質細胞株においてATRA刺激でTPO mRNAレベル、蛋白レベルでの発現増強を確認したと回答された。また、ATRA療法による血小板増多APL症例と、ATRA療法による他疾患における血小板増多症例の頻度について質問があった。それに対して、ATRA投与後の血小板増多症としての報告は少ないが、血小板増加例は少なくないと回答された。また、ATRA治療中に正常クローン由来血小板が発現するのはいつ頃かとの質問があった。それに対し完全寛解としてAPL細胞が検出されなくなり、APLに特徴的なPML/RAR α 染色体、または転座遺伝子がPCR法でも検出不可能後に発現すると推測されると回答された。

以上、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、ATRA療法中APL症例の血小板増多に注目し、新たなATRAの役割として骨髄間質細胞におけるTPO遺伝子転写活性上昇に伴う発現促進機構と、それによる血小板増加作用の存在を示唆した点において臨床的にも価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫

生理学 岡野 栄之 薬理学 西本 征央

発生・分化生物学 須田 年生 病理学 岡田 保典

学力確認担当者:

審査委員長: 岡野 栄之

試問日: 平成15年1月7日

炎症性サイトカインの混合投与による ラット視床下部室傍核における一酸化窒素代謝産物の変化

脇田 哲矢

内容の要旨

中枢神経系において一酸化窒素(NO)は微小血管の拡張作用や神経伝達作用を持つとされる一方で、酸化力の強いペルオキシナイトライトとなり細胞膜の脂質過酸化やDNA傷害を起こすことが知られている。これらの神経毒性としての性質から、脳外傷、感染症などの中枢神経系疾患に関与する報告がなされている。炎症性サイトカインは*in vitro*の実験にて誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を発現させる物質であり、中枢神経疾患におけるNOの産生には炎症性サイトカインが介在している可能性があるが、直接生体局所にサイトカインを投与しNO動態を検討した報告はない。本実験はストレス中枢でありサイトカイン産生部位である視床下部室傍核(PVN)に炎症性サイトカインを投与し、NO動態の変化を検討した。

〈方法〉①PVNにおける炎症性サイトカイン投与によるNO代謝産物(NOx)の変化生体局所での微量物質の回収が行えるマイクロダイアリシス法を用いてNOxの計測を行った。無麻酔自由行動のラットのPVNにおけるNOx値を測定し、さらに同部位にサイトカイン(TNF α (10ng)、IL-1 β (2ng)とIFN γ (2ng))を単独または混合投与しその後の変化を計測した。

②PVNにおける炎症性サイトカイン投与によるiNOS mRNAの検索
サイトカインの混合投与後にPVNからtotal RNAを抽出し、iNOSのmRNAの発現をRT-PCRを用いて行った。

③PVNにおける炎症性サイトカイン投与によるiNOSタンパク質の同定

サイトカインの混合投与後にPVNの凍結切片を作成し、抗iNOS抗体を用いて免疫組織学的検索を行った。

〈結果〉①TNF α 、IL-1 β とIFN γ のそれぞれを単独で視床下部室傍核へ投与したが、いずれも投与8時間後までNOx値に変化は認められなかった。TNF α とIFN γ の混合投与ではNOx値は140分後から漸増し、380分でコントロール値の1.8倍に達した。TNF α とIL-1 β の混合投与では、NOx値は最大でコントロール値の1.7倍になった。3種のサイトカインを混合投与するとNOx値は120分後から漸増し最大でコントロール値の3.3倍に達した。またiNOSの選択的阻害薬であるアミノグアニジンは、炎症性サイトカイン投与後のNOxの産生を有意に抑制した。

②RT-PCRの結果、混合サイトカインを投与したPVNでは、コントロールに対しiNOSのmRNAの発現が有意に強く認められた。

③炎症性サイトカインを混合投与したPVNにおいて、プローブ挿入部の先端を中心に抗iNOS抗体陽性の細胞が認められた。しかしコントロール群においても抗iNOS抗体陽性細胞は存在し、陽性細胞数に有意差は認められなかった。

以上の実験により、内因性の物質である炎症性サイトカインの相乗効果によって、無麻酔自由行動のラットPVNでは、iNOSを介してNOの産生が増加することが示唆された。

論文審査の要旨

ラジカルである一酸化窒素(NO)は、NO合成酵素(NOS)によって産生され、中枢神経系において血管拡張作用・神経伝達作用を持つとされる一方で、酸化力の強いペルオキシナイトライトとなり細胞膜の脂質過酸化やDNA傷害を起こすことが知られている。中枢神経系由来の培養細胞への炎症性サイトカインの刺激によりNOの産生増加が認められるが、生体の中枢神経に直接サイトカインを投与してNO動態を検討した報告はない。本研究では、自由行動下のラットに対し、ストレス中枢である視床下部室傍核(PVN)にTNF α 、IL-1 β 、IFN γ を投与しNO動態の変化を検討した。脳実質の局所の微量物質が回収できるマイクロダイアリシス法(MD法)を用いて行った実験では、サイトカインの単独投与ではNO代謝産物(NOx)の産生増加は認められないものの、TNF α とIFN γ の混合投与では対照群の1.8倍に、TNF α とIL-1 β の混合投与ではNOxは1.7倍に増加した。三種混合投与では、NOxは3.3倍に達し、それらの反応はサイトカインの相乗効果であると考えられた。さらに誘導型iNOSに対し選択的な阻害剤であるアミノグアニジンの腹腔内投与によりサイトカインによるNOxの産生増加は有意に抑制され、さらにPVNにおけるiNOS mRNAの転写促進があることから、NOxの産生増加はiNOSの作用によるものと考えられた。また、対照群と密度に有意差を認めなかったものの、免疫組織学的検討よりサイトカイン投与部位近傍での抗iNOS抗体陽性細胞が認められた。以上よりPVNへのサイトカインの投与によりiNOSが産生されNOの産生が増加する可能性が示された。

審査では、本実験に至った経緯について質問がなされ、ストレス中枢と性ホルモン動態の解明の実験に取り組んだ過程であると回答された。それに対し、直接的にアプローチする実験を計画すべきだとの意見が述べられた。また、半定量的RT-PCRについて、定量性を得るためにリアルタイムPCR等を利用して精度を向上すべきとの意見が述べられた。また、MD法でNO活性が上昇したにも関わらず、免疫組織化学法にて抗iNOS抗体陽性細胞数が対照群と比較して有意差がなかったことについて質問がなされた。免疫組織化学法では、任意の断面の陽性細胞数の比較は酵素の活性化を直接反映しないとの回答がなされたが、より客観的に論文上で考察すべきであるとの意見が述べられ、論文に加筆が要請された。さらには、「実験で産生されたNOの生理学的作用についても今後検討すべきである」という意見が述べられた。

以上のように、本研究はなおいくつかの検討を要する点は残されたものの、生体におけるサイトカイン投与によるNO産生を経時的に観察し、サイトカインの相乗効果を確認したこと、さらにその機序の一部を明らかにした点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 野澤 志朗

医化学 末松 誠 生理学 岡野 栄之

神経精神医学 鹿島 明雄 内科学 福内 靖男

学力確認担当者：

審査委員長：末松 誠

試問日：平成14年11月12日

Transplantation of *in vitro* expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats.

(試験管内で増殖させた胎児神経前駆細胞の移植による
成体ラットにおける脊髄圧挫損傷後のニューロン新生と機能回復)

小川 祐人

内容の要旨

論文審査の要旨

外傷性脊髄損傷は四肢に重篤な障害を残す疾患である。現在、機能回復を目的とした様々な治療法の開発が試みられており、その一つに損傷脊髄組織を再生させることで機能回復を得ようとする試みがある。近年のneuroscienceの目覚ましい進歩によりin vitroでの中枢神経系神経幹細胞の培養法が確立され、少量の胎児組織より大量の神経幹細胞を確保することが可能となってきた。この培養神経幹細胞を移植材料として用いることで損傷脊髄組織の再生が得られる新規の治療法を確立できる可能性がある。そこでわれわれは本研究において、胎児脊髄由来の主に培養中枢神経系神経幹細胞を含む神経系前駆細胞を脊髄損傷部に移植することで組織再生及び運動機能回復が得られるかについて検討した。

神経幹細胞の培養はラット胎児脊髄を用いて行った。ラット脊髄損傷モデルは、成体ラット雌を用い頸髄部に重錘を静置する事により作製した。移植は損傷後9日目に行い、培養細胞を標識した後に損傷部に注入した。また、移植後のニューロンの新生を検討するために、ニューロンに特異的に発現する α ubulinであるT α -1のプロモーター制御下にenhanced yellow fluorescent protein (EYFP)を発現するT α -1-EYFPトランスジェニックラット由来の培養細胞を移植した。次に移植後に分裂した細胞を標識するために、bromodeoxyuridine (BrdU)をホストのラットに対して移植後投与した。移植後5週でラットを還流固定し、移植部脊髄を免疫組織学的に、また電子顕微鏡を用いて検討した。運動機能評価は移植後5週で行った。

移植細胞は移植部に生着しており、移植細胞由来のニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトが存在していた。またT α -1-EYFPトランスジェニックラット由来の細胞を移植した検体を抗BrdU抗体とEYFPと交叉反応のある抗green fluorescent protein (GFP)抗体で二重染色すると共陽性の細胞が存在していた。このことより、移植後ホスト脊髄内において移植細胞が増殖した後にニューロンへ分化したことが証明された。さらに抗GFP抗体で移植細胞由来のニューロンを染色した後に電子顕微鏡で組織を観察したところ、移植細胞由来のニューロンの軸索に髓鞘化が認められ、移植細胞由来のニューロンとホストのニューロンとの間にシナプス形成が認められた。運動機能評価では対照群に比し、移植群で有意な改善がみられた。

本研究においてわれわれは、胎児脊髄由来培養神経系前駆細胞を損傷脊髄に移植することで、損傷部にニューロンを含む神経系細胞を新たに導入することができた。また、移植により運動機能が改善することを確認した。

外傷性脊髄損傷は四肢に重篤な障害を残す疾患である。現在、機能回復を目的とした様々な治療法の開発が試みられており、その一つに損傷脊髄組織を再生させることで機能回復を得ようとする試みがある。近年のneuroscienceの目覚ましい進歩により、in vitroでの中枢神経系神経幹細胞の培養法が確立され、少量の胎児組織より大量の神経幹細胞を確保することが可能となってきた。この培養神経幹細胞を移植材料として用いることで損傷脊髄組織の再生が得られる新規の治療法を確立できる可能性がある。そこでわれわれは本研究において、胎児脊髄由来の主に培養中枢神経系神経幹細胞を含む神経系前駆細胞を脊髄損傷部に移植することで組織再生及び運動機能回復が得られるかについて検討した。その結果、移植細胞由来のニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトを損傷脊髄内に生着させることができた。また、移植細胞由来のニューロンの一部は移植後ホスト脊髄内において分化したものであることが証明された。さらに、移植細胞由来のニューロンの髓鞘化と、移植細胞由来のニューロンとホストニューロンの間にシナプス形成が認められた。運動機能評価では対照群に比し、移植群で有意な改善がみられた。

審査では、まず機能評価の時期について質問された。これに対し、本研究においては移植後5週目でのみ行なったと回答された。しかし、移植後5週目に損傷組織の十分な組織再生が得られるのかと指摘された。さらに機能評価を他の時期にも行うことで、機能回復の機序について、より詳細に検討が加えられると指摘された。また運動機能評価法について、機能改善の機序を検討するためには感覚機能を独自に評価する方法、例えば体性感覚誘導電位を用いるべきではなかったかと指摘された。いずれも検討すべき重要な点であり、今後、検索を進めていくと回答された。次に移植細胞がニューロンに分化した後、ホスト脊髄内でどのように機能しているのかについて質問された。本実験では損傷モデルが圧挫損傷モデルのためトレーサー実験は難しく検討していないと回答された。最後に内因性の神経幹細胞による組織再生の可能性について質問された。これに対し、脊髄では大脳とは異なり、損傷後に賦活化される内因性の神経幹細胞はニューロンに分化しないこと、未分化なオリゴデンドロサイトは出現するが成熟しないことなどから、その応用は困難ではないかと回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題は残しているものの、中枢神経系神経幹細胞を含む胎児脊髄由来培養神経系前駆細胞を損傷脊髄内に移植することで、損傷部にニューロンを含む神経系細胞を新たに導入することができ、運動機能が改善することを確認した点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭

外科学 河瀬 斌

解剖学 仲嶋 一範

内科学 堀内 靖男 リハビリテーション医学 千野 直一

学力確認担当者:北島 政樹、河瀬 斌

審査委員長:河瀬 斌

試問日:平成14年11月20日

運動およびその中止が骨量におよぼす影響

島村 知里

内容の要旨

運動は骨量を増加させると考えられているが、運動中止により骨重が維持されるか否かは不明である。本研究では、中強度トレッドミル走行運動がgrowth spurtの時期の若年ラットの脛骨近位部・骨幹部・遠位部および腰椎の骨量におよぼす影響について検討し、また、その後の運動の中止や運動の強度や頻度の減少により骨量は維持されるか否かについて部位別に検討をおこなった。

35匹の6週齢雌性Wistar系ラットを無作為に各々5匹ずつ7群に分けた。すなわち、7週間運動負荷群、7週間非運動負荷群、11週間運動負荷群、7週間運動負荷後4週間非運動負荷群、7週間運動負荷後4週間運動頻度減弱群、7週間運動後運動強度減少群、11週間非運動負荷群の7群である。運動は、小動物用トレッドミルを用いた走行運動とした。その通常の強度（速度）は毎分25m、時間は1日1時間、頻度は週5日とした。運動頻度減弱群における後半4週の運動頻度は週1日に、運動強度減少群における後半4週の運動強度は毎分12mに減少させた。それぞれの運動負荷後に、骨代謝マーカーおよび骨代謝関連ホルモンの測定、大腿骨長の測定、第5腰椎および脛骨（全体、近位部、骨幹部、遠位部）の骨量（BMC）を測定した。

その結果、成長期ラットにおける中強度の走行運動は、脛骨や大腿骨において主に骨形成の促進により、骨量と骨のサイズを有意に増加させることが示唆された。しかし、腰椎では、走行運動により有意な骨量の増加は得られなかったことから、中強度の走行運動により骨量を増加させるためには荷重負荷が重要であることが示唆された。また、脛骨の部位別における検討では、脛骨遠位部で最も骨量の増加が大きく、近位部で最も小さかった。すなわち、運動に対する骨の反応は、脛骨の部位によって異なることが明らかとなった。また、運動の中止により、運動により獲得された骨量は脛骨のすべての部位で失われることが判明した。一方、運動の強度や頻度の減少による骨の反応は、脛骨の部位により異なることが明らかとなった。すなわち、脛骨近位部、骨幹部では運動で得た骨量は失われたが、脛骨遠位部では運動により獲得された骨量は維持されていた。また、運動が骨量におよぼす作用として、力学的負荷による局所性作用のほかホルモンを介した全身性作用が挙げられるが、骨代謝関連ホルモンの測定結果から、運動による骨量の増加には1,25-dihydroxyvitaminD₃の増加と副甲状腺ホルモンの減少が関与していることが示唆された。

以上の結果から、成長期のラットにおける運動と運動強度や頻度の減少が骨量におよぼす影響は部位により異なるが、運動により獲得された骨量は運動中止により失われることが明らかとなった。運動により獲得された骨量を維持するためには、運動を継続する必要がある。

論文審査の要旨

運動は骨量を増加させると考えられているが、運動中止により骨量が維持されるか否かは不明である。本研究では、中強度トレッドミル走行運動がgrowth spurtの時期の若年ラットの脛骨近位部・遠位部・骨幹部および腰椎の骨量におよぼす影響について検討し、また、その後の運動の中止や運動の強度や頻度の減少により骨量は維持されるか否かについて部位別に検討した。その結果、成長期ラットにおける中強度の走行運動は、荷重骨において骨形成の促進と骨吸収の抑制により骨量と骨のサイズを有意に増加させるが、その反応は部位により異なることが明らかとなった。また、運動を中止すると、骨形成の抑制と骨吸収の促進により運動により獲得された骨量は失われるが、運動の強度や頻度を減少させると、部位により運動の効果が残ることが明らかとなった。以上の結果から、運動により獲得された骨量を維持するためには、運動を継続する必要があることが明らかとなった。

審査では、大腿骨長の増加がより著明である低週齢ラットを用いて本実験を行うべきであったと指摘された。これに対し、走行運動可能な最低週齢で運動負荷を開始し、運動を中止する時期を成長が緩やかになった時期と設定したためであると回答された。次に、今回の研究では測定項目の中には臨床で汎用される血中イオン化カルシウムや骨型アルカリホスファターゼが含まれていなかったことが指摘された。これに対し、今回測定されたオステオカルシンは骨型アルカリホスファターゼとよく相関し微小な変化を捉えやすいとされているため、これを測定項目としたが、骨型アルカリホスファターゼと血中イオン化カルシウムの測定も同時に行うべきであったと回答された。次に、今回の研究は骨量測定と骨代謝マーカー測定の手法のみを用いて行われたため、病理組織学的にも検討されるべきであったと指摘された。これに対して、骨代謝マーカーの手法を用いて運動中止の効果を調査したのは本研究が初めてであること、しかし、形態計測も合わせて行うべきであったとの回答がなされた。

以上のように、本論文はさらに検討されるべき課題を残しているものの、運動により獲得された骨量を維持するためには、運動を継続する必要があることを明らかにした点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
リハビリテーション医学 千野 直・病理学 岡田 保典
解剖学 相磯 貞和 内科学 猿田 享男
学力確認担当者：北島 政樹、千野 直一
審査委員長：千野 直一

試問日：平成14年11月18日

心房高頻度興奮にともなう心房筋の電氣的リモデリングと その形成過程におけるKチャンネル遮断薬の効果

城 下 晃 子

内容の要旨

心房細動 (AF) は心房筋内に多数の小さな興奮波が同時に旋回することにより成立すると考えられており、その発生や維持には興奮波長 (不応期の間に興奮波が進む距離) の短縮、即ち不応期の短縮や伝導速度の低下が不可欠となる。近年、心房高頻度興奮の持続により、心房の電氣生理学的性質が変化し (電氣的リモデリング)、AFが持続しやすくなると報告されたが、電氣的リモデリング形成および回復過程での電氣生理学的因子の経時変化と、そのAF誘発性との関連については十分に解明されていない。そこで、イヌ心房高頻度刺激モデルを用いて、この点を検討した。

また、AFの治療では、興奮波長を規定する因子の一つである心房不応期を延長することが重要となる。Kチャンネル遮断薬は不応期を延長するが、電氣的リモデリングが生じた心房筋における効果、特にK電流のサブタイプ (IKrおよびIKs) 特異性による効果の差異については明らかではない。そこで、電氣的リモデリングの形成過程において、純粋なIKr遮断薬E4031とIKr+IKs遮断薬azimilideの効果を経時的に検討した。

電氣的リモデリング形成過程においては、心房高頻度興奮の持続に伴い、心房有効不応期は短縮、心房内伝導速度は低下し、結果として興奮波長が短縮した。また、不応期の短縮は、高頻度刺激開始後2日目から認められ、7日目以降は定常状態に達したが、伝導速度の低下および興奮波長の短縮は7日目以降も緩徐に進行し、不応期と伝導速度の変化に時間的解離を認めた。また、心房高頻度刺激中止後、不応期はほぼ1日で回復したが、伝導速度および興奮波長の回復には7日を要し、リモデリングの回復過程においても同様に時間的解離を認めた。AFは、興奮波長が8.7cm以下を示した心房高頻度刺激開始7日目以降で誘発可能であり、AFの誘発性は心房高頻度興奮の持続期間の増大に伴う興奮波長の短縮によって規定されると考えられた。

また、電氣的リモデリングの形成過程においてKチャンネル遮断薬の電氣生理学的効果は減弱することなく保持された。E4031の不応期延長効果は逆頻度依存特性を呈するため、高頻度刺激によるAFの誘発抑制は困難であったが、azimilideではAF誘発を抑制し、その持続時間を著明に短縮した。

以上より、AFの治療においては、その持続期間や電氣的リモデリングの程度を念頭にいれる必要があることが示された。また、電氣的リモデリングが生じた心房筋においてもKチャンネル遮断薬の効果は減弱することなく保持されることが示された。さらに、azimilideのようなIKs遮断作用をあわせもつ薬剤は、AFの再発予防のみならず停止にも有効である可能性が示唆された。

論文審査の要旨

心房細動は日常診療で頻繁に遭遇する不整脈であり、心不全や血栓塞栓症などの合併症を生じうる。電氣的リモデリングの形成と回復の過程での電氣生理学的因子の経時変化と心房細動誘発性との関連はまだ解明されておらず、心房細動の治療法もまだ確立されていない。申請者はイヌ心房高頻度刺激モデルを用い、電氣的リモデリングの形成と回復の過程での電氣生理学的因子の経時変化と心房細動誘発性との関連を検討した。電氣的リモデリング形成および回復過程での心房不応期、伝導速度、興奮波長の変化には時間的解離を認め、心房細動は心房高頻度刺激開始7日目から刺激中止後1日目までに興奮波長が8.7cmを下回った際に誘発可能であり、心房細動誘発性は電氣的リモデリングの程度に伴う興奮波長の短縮によって規定されていた。また、およそ1ヶ月間で形成された電氣的リモデリングは7日間ではほぼ完全に回復することも示した。さらに、同モデルを用いて電氣的リモデリング形成過程での純粋なIKr遮断薬E4031とIKr+IKs遮断薬azimilideの効果を経時的に検討し、それらの効果が保持されていることを示してKチャンネル遮断薬の心房細動治療への有効性を示すと共に、azimilideのようなIKs遮断作用をもつ薬剤が心房細動の再発予防や停止に有効である可能性を示した。

審査において本研究の新知見の総括が求められ、電氣的リモデリングの形成と回復過程を検討し心房細動誘発性との関連を明らかにし、電氣的リモデリングを生じた心房筋へのKチャンネル遮断薬の有効性を示したことでありと説明された。長期モデルでの心房筋へのKチャンネル遮断薬の効果についても検討した方が慢性心房細動例への臨床的応用があったのではないかと助言がなされた。本研究における8.7cmという興奮波長と心房細動誘発性との関連における意義を問われたが、本モデルでは、Kチャンネル遮断薬投与群や他剤検討例でも8.7cmを下回る興奮波長で有意に心房細動が誘発され、一般への応用には直結しないまでも、本モデルでの普遍性は認められたとの説明がなされた。心房細動類似モデルとして、1点刺激ではなく多点刺激のモデルも検討すべきではとの助言がなされ、現段階まで多点刺激モデルの報告はないものの今後検討したいとの説明がなされた。薬剤の選択理由を問われたが、同モデルでNaチャンネル遮断薬の効果が電氣的リモデリングの過程で減弱することがすでに報告されており、次の可能性としてKチャンネル遮断薬の検討を行ったとの説明がなされた。Azimilideには微弱ながらもNaチャンネルやCaチャンネルの遮断作用が報告されており、用量依存性の効果についても検討すべきであったという助言がなされた。

以上のように、本研究には今後の課題がいくつか残されたが、心房細動の機序の解明および心房細動治療の研究に貢献する価値がある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
生理学 金子 章道 外科学 四津 良平
臨床麻酔学 武田 純三 薬理学 西本 征央
学力確認担当者: 北島 政樹、金子 章道
審査委員長: 金子 章道

試問日: 平成14年12月9日

ラット肝移植におけるFTY720とタクロリムスの相乗効果

田村 明彦

内容の要旨

臓器移植においてまず問題となるのは、Tリンパ球を中心とした細胞性免疫が主体となる急性拒絶反応である。臓器が移植されるとレシピエントのヘルパーT細胞(Th)が活性化されIL-2を産生する。このIL-2がThの自己増殖因子として作用することにより持続的にIL-2を産生するTh0となる。その後、マクロファージなどの産生するIL-12が多量に存在するとTh1となり、IL-2、IFN- γ 等を産生ようになる。これらのサイトカインは細胞障害性T細胞(CTL)を活性化し拒絶反応を発現させる。

現在主に使用されているサイクロスポリン、タクロリムスは、IL-2の産生を抑制することにより拒絶反応を抑制する。しかし強い免疫抑制作用を示す一方さまざまな副作用も有することから、投与量減量のため数種類の薬剤を少量ずつ組み合わせた多剤併用療法を行うことが通常となっている。新しく開発されたFTY720(以下FTY)は*in vivo*において末梢血中のリンパ球の数そのものを減少させることにより免疫抑制作用を発揮する作用機序を有している。したがって従来の免疫抑制剤とは全く作用機序が異なることから他剤との併用による相乗効果が期待される。本研究ではラット肝移植モデルでタクロリムスとの併用投与を行い、その効果と機序について検討した。

異系移植群としてDAラット(RT1^a)からLEWラット(RT1^l)への同所性肝移植を行った。同系の対照群としてLEWラット間で移植を行った。FTY0.01, 0.03, 0.1, 0.5mg/kg, タクロリムス0.1, 0.3, 1.0mg/kgをそれぞれ単独で移植後15日間連日経口投与したところ、用量依存性に生着日数は延長した。FTYについては延長効果が緩徐となりはじめる0.1mg/kgを最低有効量(低用量)とし、タクロリムスについては同様の生着延長効果を示す1.0mg/kgを低用量と設定した。これらの約1/3量のFTY0.03mg/kgとタクロリムス0.3mg/kgを併用投与して効果を検討した。各用量について生存実験を行うとともに、移植後第5, 8日目に各用量群3-5例ずつを犠牲死させて移植肝を摘出し、サイトカインmRNA(IL2, IL6, IL10, IFN- γ , perforin, granzymeB, β -actin)の発現について検討した。また免疫組織染色を行い、アポトーシス(TUNEL法)、リンパ球浸潤(抗CD2抗体)の変化について検討し、以下の結果を得た。1. 低用量のFTYと低用量のタクロリムスの併用投与は相乗効果を示し、それぞれの単独投与の3倍量に相当する生着延長効果が得られた。組織所見においても、単独投与に比較しリンパ球浸潤を抑制した。2. サイトカインmRNAの発現からは、併用療法においてCTLとTh1が抑制され、Th2が温存されていることが示唆された。3. FTYによるリンパ球のアポトーシス誘導作用がタクロリムスの併用投与により増強された。4. 15日間の併用投与期間中に拒絶は見られず、明らかな副作用もなく、投与終了後も著明な生着延長効果が得られた。

実際の臨床では、長時間にわたって免疫抑制剤の投与が行われることを考えると、FTYとタクロリムスの併用はきわめて有効な免疫抑制療法となりうることを示唆された。

論文審査の要旨

臓器移植において急性期拒絶反応抑制のためにはTリンパ球を主体とした細胞性免疫の抑制が重要である。新たに開発された免疫抑制剤FTYは末梢血中のリンパ球を減少させることにより効果を発現する。リンパ球が減少する機序についてはアポトーシスとリンパ組織へのホーミングによるものであることが最近の研究で明らかになってきている。他の薬剤と作用機序が異なることから、併用による相乗効果が期待できる。本研究では現在臓器移植において併用されているタクロリムス(FK)との少量併用投与についてラット肝移植モデルを用いて検討した。生存実験では少量併用投与による相乗効果が認められた。この作用機序として移植肝組織におけるサイトカインの検討から細胞障害性T細胞(CTL)とTh1タイプのヘルパーT細胞の抑制によることが解明された。また、組織像からはリンパ球浸潤の減少とアポトーシスの増加が示された。

審査ではまず、RT-PCRの条件設定と結果の評価についての問題点が指摘された。肝臓の組織全体からRNAを抽出しているのどの細胞由来のサイトカインを測定しているのかが明確でないため、より多量の肝組織を用いてリンパ球を分離し、測定すべきであるとの助言がなされた。また病理組織像におけるリンパ球浸潤の評価については免疫組織染色の写真のみでは客観性にかけるとの指摘がなされ、リンパ球数の定量化を検討すべきであるとの助言がなされた。相乗効果機序に関しては今回の実験成績からは十分説明し得ないとの指摘がなされた。併用効果に関しては移植臓器を灌流するリンパ球の数が減少することにより、反応するリンパ球の数が抑制され、さらにFKがリンパ球の活性化を抑制することにより相互作用が発現することが想定された。

臨床応用の可能性についての質疑があり、ヒトでの治験がすでに施行されていること、さらにFTYの作用機序の解明が進んでおり、これまでの動物実験からも長期投与に関しても安全性が高いので可能性が高いとの回答がなされた。今後臨床応用を行うに際し、薬物動態、相互作用による副作用や投与濃度の検討などの問題を解決する必要があるとの認識が再確認された。

以上より本研究では相乗作用の機序についてはさらなる検討が必要であるものの、低用量のFTYとFKの併用投与により、明らかに移植臓器の生着延長効果が得られており、治療域が狭い他の薬剤の投与量の削減も期待できるので、臨床応用の可能性が示された点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹

微生物学 小安 重夫 内科学 石井 裕正

病理学 岡田 保典 微生物学 石川 博通

学力確認担当者: 北島 政樹、小安 重夫

審査委員長: 小安 重夫

試問日: 平成14年11月12日

Injured corneal epithelial cells promote myodifferentiation of corneal fibroblasts.

(角膜実質細胞の筋線維芽細胞への変化に及ぼす角膜上皮細胞の影響)

中村 邦彦

内容の要旨

[目的] 傷害された角膜上皮細胞からの液性因子が、角膜実質細胞の収縮力の増加、増殖、そして筋線維芽細胞への変化に影響するかを検討した。

[方法] 白色家兎の角膜実質細胞と角膜上皮細胞を、液性因子のみ交通可能な共培養系にて培養した。実質細胞はインサートディッシュ内に滴下したコラーゲンゲル上に培養して、これとコンパニオンプレート上に上皮細胞を培養したもの、上皮細胞を培養した後に部分的に剥離して傷害を加えたもの、上皮細胞のないものを組み合わせて、無血清の培地にて共培養した。実質細胞によるコラーゲンゲルの収縮は、ゲルの厚さの変化を計時的に測定し初日と比較した。6日間培養後、実質細胞数を測定した。筋線維芽細胞数はマーカーである α smooth muscle actin (α -SMA) を指標として免疫染色にて決定した。共培養後、3日目と6日目に採取した培養液中のTGF- β 1とTGF- β 2の濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて測定した。角膜上皮の生物学的挙動変化を決定する指標として、mesenchymal cellsのマーカーであるVimentinの発現を免疫組織化学的に検出した。同様の過程をanti-panspecific-TGF- β antibodyの存在下でも行った。

[結果] 剥離された領域は、1日で周囲より移動した上皮細胞で覆われ、同領域の上皮細胞はしだいに形態を変えて行き、4日目には渦を描くようになりVimentin陽性の細胞を多くみとめた。剥離を行わなかったプレートでは、正常な形態を保っており、Vimentin陽性の細胞はわずかであった。傷害された上皮細胞との共培養のゲルは、傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に収縮した。 α -SMAの陽性率は障害された上皮細胞との共培養のゲルが、傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に高かった。実質細胞数は傷害された上皮細胞との共培養のゲルで、障害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に多かった。培養液中のTGF- β 2の濃度は共培養3日目と6日目のどちらでも、実質細胞と傷害された上皮細胞との共培養で、実質細胞と傷害されない上皮細胞との共培養と実質細胞単独培養より有意に高かった。TGF- β 1については検出限界以下であった。Anti-panspecific-TGF- β antibodyの存在下では、これらの差はみとめられなかった。

[結論] 障害された上皮細胞から分泌される液性因子が実質細胞の筋線維芽細胞への変化を促進し、これにTGF- β が強く関与していることが示唆された。

論文審査の要旨

近年、エキシマレーザーによるphotorefractive keratectomy (PRK) と呼ばれる屈折矯正手術が行われてきたが、術後に角膜実質の創傷治癒反応として角膜混濁がみられる。これは角膜実質細胞が線維芽細胞を経て筋線維芽細胞に変化し、この細胞が創の収縮や瘢痕形成にかかわっているためといわれている。一方現在広く行われているlaser in-situ keratomileusis (LASIK) は角膜上皮を温存する事によって、PRKによって生じる副作用を軽減する事ができる。この事実は角膜上皮が角膜実質の創傷治癒に関与していることを示唆している。そこで本研究では、白色家兎の角膜実質細胞をコラーゲンゲル上で上皮細胞と液性因子のみ交通可能な共培養系にて培養して、傷害された角膜上皮細胞からの液性因子が、角膜実質細胞の収縮力の増加、増殖、そして筋線維芽細胞への変化に影響するかを検討した。その結果、傷害された上皮細胞はしだいに形態を変えてVimentin陽性の細胞を多くみとめ、傷害された上皮細胞との共培養のゲルは傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に収縮した。また α -SMA陽性率は傷害された上皮細胞との共培養のゲルの方が、傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に高く、実質細胞数は傷害された上皮細胞との共培養のゲルの方が、傷害されない上皮細胞との共培養のゲルと実質細胞単独のゲルより有意に多かった。さらに培養液中のTGF- β 2の濃度は実質細胞と傷害された上皮細胞との共培養で実質細胞と傷害されない上皮細胞との共培養と実質細胞単独培養より有意に高かった。Anti-panspecific-TGF- β antibodyの存在下ではこれらの差は認められなかった。

審査に当たり、皮膚組織での研究と比べ、in vitroの結果がin vivoの結果によく合致しているが角膜では皮膚との違いはどうか、また傷害されない上皮細胞との共培養にても角膜実質細胞の筋線維芽細胞への変化がみられるのはどうしてかなどいくつかの質問がなされた。これらの質問に対し、角膜では皮膚と比べ無血管組織であり血液を介した影響が少ないためin vitroの結果がin vivoの結果によく合致すると思われるとの回答があった。また傷害されない上皮細胞との共培養での角膜実質細胞の筋線維芽細胞への変化についてはin vitroでは完全に健全な角膜上皮を再現する事が出来ていない為であり、in vivoでは生じていないと思われると回答された。また液性因子としてTGF- β のみ検討されているが、それ以外のものとの影響はないのかとの議論がなされた。これに対し、TGF- β 以外にも多くの液性因子が関わっていると思われるが、文献上これらの多くは最終的にはTGF- β を介していると言われていると回答があった。また、コラーゲンゲルの高さの現象を収縮の指標としているが、matrix metalloproteinaseの誘導によりゲルが融解した可能性についてはどうかとの議論がなされた。これに対しては、通常TGF- β は細胞外基質の生成に働くのであまり考えられないが、今回の実験では判定出来ないとの回答がなされた。またゲルの最大高のみを測定しているが複数点による測定と、ゲルの高さの相対的な比較ではなく絶対値での比較をした方がよい、測定しえたTGF- β と同等のTGF- β を直接、実質細胞に作用させた実験を加えた方がよいとの意見があった。

本研究は今後検討が必要な点もあるが、PRK術後の角膜混濁の原因を明らかにした点、眼科学上意義のある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 小口 芳久
病理学 岡田 保典 皮膚科学 西川 武二
形成外科学 中島 龍夫 解剖学 相磯 貞和
学力確認担当者: 北島 政樹、岡田 保典
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成14年11月27日

Bone Marrow-Derived Regenerated Cardiomyocytes (CMG Cells)

Express Functional Adrenergic and Muscarinic Receptors.

(骨髄間葉系幹細胞由来の再生心筋細胞 (CMG細胞) における
アドレナリン・ムスカリン受容体の発現および機能解析)

伯野 大彦

内容の要旨

近年、多能性幹細胞の心筋細胞への分化能が明らかとなり、再生心筋細胞移植が心不全の新たな治療法として模索されている。当教室の牧野らはDNAの脱メチル化剤5-azacytidineを用いて、マウス骨髄間葉系幹細胞 (CMG細胞) を胎仔心室筋型の表現形を有する心筋細胞に分化誘導しうるとを報告した。生体心では、細胞肥大、心拍数、心収縮力の調節に際してアドレナリン α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D})、 β_1 、 β_2 受容体、ムスカリン M_1 、 M_2 受容体が重要な役割を果たしている。本研究では分化誘導後のCMG細胞におけるこれらの受容体の経時的発現、シグナル伝達機能、各薬剤に対する細胞応答につき検討した。[方法] (1) 5-azacytidineによる分化誘導前後の各受容体の発現をRT-PCR法にて解析した。(2) 分化後2週におけるphenylephrine (Phe) 刺激およびprazosin前投与によるERK1/2のリン酸化をWestern blot法で観察した。Phe刺激後の細胞面積、周囲長を測定した。(3) isoproterenol (Iso) 刺激およびpropranolol (Pro) 前投与による細胞内cAMP含量をradioimmunoassayにて測定した。Iso刺激時、およびPro、CGP20712A (β_1 選択的遮断薬)、ICI118551 (β_2 選択的遮断薬) 前投与時の自律拍動数、収縮距離、収縮率、収縮速度を解析した。(4) Phe、Iso刺激によるANP、BNPのmRNA発現を観察した。(5) carbachol刺激時、およびatropine、AFDX116 (M_2 選択的遮断薬) 前投与時の細胞内IP₃生成量を測定した。

[結果と考察] (1) CMG細胞は α_{1A} 、 α_{1B} 、 α_{1D} mRNAを分化前より発現したのに対し、 β_1 、 β_2 、 M_1 、 M_2 mRNAを分化後1週より発現した。(2) Phe刺激後に濃度依存的なERKのリン酸化を認めprazosin前投与で抑制された。Phe刺激によりCMG細胞は有意に肥大した。(3) Iso刺激後のcAMP含量は著明に増加しPro前投与で抑制された。Iso刺激による拍動数の増加は、Pro、CGP20712A前投与で著明に抑制されたが、ICI118551による抑制は軽度であった。収縮能はIso刺激により有意に増強した。(4) Phe、Iso刺激後ANP、BNPのmRNA発現は有意に亢進した。(5) carbachol刺激後のIP₃生成量は著明に増加し、atropine、AFDX116の前投与で同程度抑制された。

以上より、分化後のCMG細胞はシグナル伝達機能を有する α_1 、 β_1 、 β_2 、 M_1 、 M_2 受容体を発現し、それらは細胞肥大、陽性変時・変力作用に一部関与するものと考えられた。CMG細胞は受容体発現の観点から、心筋細胞移植のドナー細胞として有力な候補となる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

当教室はこれまでマウス骨髄間葉系幹細胞を5-azacytidine処理により胎仔心室筋型的心筋細胞 (CMG細胞) に分化誘導しうるとを明らかにした。本研究では、CMG細胞におけるアドレナリンおよびムスカリン受容体の発現、シグナル伝達機能、刺激時の細胞機能について解析を行った。CMG細胞は α_1 受容体を分化誘導前より発現し、 β_1 、 β_2 、 M_1 、 M_2 受容体を分化後1週より発現した。Phenylephrine刺激により濃度依存的なERK1/2のリン酸化、有意な細胞肥大を認めた。Isoproterenol刺激後にcAMP量、自律拍動数、収縮能は有意に増加した。拍動数の増加は主に非特異的あるいは β_1 選択的遮断薬で抑制された。Carbachol刺激後にIP₃量は著明に増加し、非特異的あるいは M_2 選択的遮断薬で抑制された。以上より、分化誘導後のCMG細胞は、成熟心筋細胞と同様にシグナル伝達機能を有する α_1 、 β_1 、 β_2 、 M_1 、 M_2 受容体を発現し、 α_1 刺激薬による細胞肥大や β 刺激薬による陽性変時・変力作用に関与するものと考えられた。

審査では、まず5-azacytidineによる分化誘導効率を20~30%とした根拠が不明瞭であるとの指摘がなされた。次に、個々のCMG細胞における各受容体発現の有無に関して質問がなされた。CMG細胞を含む集団全体として解析しており個々の細胞での発現は検討していないと回答された。これに対し各細胞について免疫染色などで発現を検討すべきであったと指摘された。ついで、PhenylephrineによるERK活性化の経路について質問がなされた。新生仔心筋細胞と同様にRas/Raf-1を介した経路が考えられると回答され、これに対しそれらの経路も解析すべきであったと助言された。IsoproterenolによるcAMP増加の機序は心筋細胞数の増加か、あるいは心筋細胞の成熟度の上昇かとの質問がなされた。その区別は困難であると回答され、これに対し心筋前駆細胞を純化する必要性を指摘された。さらに、Isoproterenol刺激時の細胞機能解析は細胞移植を考慮する場合に重要であるとした上で、ムスカリン受容体の徐脈作用に関して質問がなされた。低濃度のCarbachol刺激では徐脈傾向を認めたが高濃度では頻脈となり、 M_1 、 M_2 サブタイプの比率がその原因として考えられると回答された。最後に再生心筋細胞移植の今後の展望に関して議論がなされ、再生心筋細胞の純化および移植方法の確立、催不整脈性の検討などが重要であると討議された。

以上、本研究は研究方法などに今後検討されるべき課題があるものの、マウス骨髄幹細胞由来の再生心筋細胞におけるアドレナリン、ムスカリン受容体の機能的発現および細胞応答につき明らかにし、心筋細胞移植のドナー細胞としての可能性を示した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡

外科学 四津 良平 生理学 岡野 栄之

発生・分化生物学 須田 年生 薬理学 西本 征央

学術確認担当者: 北島 政樹、四津 良平

審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成14年11月22日

Mixed chimerism and tolerance without whole body irradiation in a large animal model.

(大動物モデルにおける全身照射を使用しない混合キメリズムと免疫寛容)

淵 本 康 史

内容の要旨

現在骨髄移植の分野では低侵襲な前処置で混合キメリズムを確立するミニトランスプラントが注目されている。血液系幹細胞の生着には放射線照射または抗癌剤などによる骨髄破壊性の前処置が必要と考えられていた。しかし1997年にマウスモデルにて、大量の血液系幹細胞移植、T細胞除去、胸腺照射、短期間の免疫抑制剤の組み合わせだけで全く骨髄抑制することなく混合キメリズムの確立に成功し、これは血液系幹細胞の生着にはレシピエント骨髄内にスペースを作る必要があるという従来の概念を覆すものであった。

しかし種々の理由により、血液系幹細胞の生着はマウスにおいては大型動物ならびに人間と比較して非常に容易であり、マウスで成功した多くの前処置は大型動物ならびに人間には無効であることが多いのが事実である。この研究ではMHCの固定されたMassachusetts General Hospital (MGH) ミニブタを使って骨髄を抑制することのない低侵襲な前処置にて混合キメリズムの確立に成功した。シアトルグループ (Fred Hutchinson Center) が1997年に初めてイヌを使った大型動物モデルで非骨髄破壊の前処置 (nonmyeloablative regimen) により混合キメリズムの確立に成功した。しかしシアトルグループの前処置には低量の全身照射が必要であり、全身照射を完全に排除できたのはこの研究のみである。更にシアトルグループはminor抗原のみの異なるMHCの一致した骨髄移植であったが、全身照射を全く使用しない非骨髄抑制プロトコル (nonmyelosuppressive regimen) でhaplo-identicalのMHCの異なる骨髄移植において混合キメリズムの確立に成功した。

この研究で混合キメリズムを成功させるのに重要な点はサイトカインで動員した後にロイコフェレーシスによる末梢血幹細胞を採取するテクニックにより、このアプローチに必要な大量の血液幹細胞の摂取が可能となったことが挙げられる。またトキシンを結合した抗CD3抗体 (pCD3-CR9) を使用することにより大型動物でも生着可能なレベルまで宿主の成熟T細胞を除去することが可能となったことも重要な点である。このプロトコルでは大型動物においても殆ど副作用がおこらず、非常に低侵襲で臨床応用可能と考えられた。

また混合キメリズムの確立したブタの胸腺にドナー、レシピエントの両タイプの樹状細胞が皮質-髄質移行部に存在することが確認され、ドナー、レシピエントの両抗原に対してクローン除去がおこり、最も安定した中心性免疫寛容が獲得できたと推察された。ドナー腎は免疫抑制剤を全く使用せずに永久生着し、in vitro assayにおいてもドナー特異的免疫寛容が証明された。

臓器移植における免疫寛容やサラセミア、sickle cell anemia、慢性肉芽腫症などの非悪性血液疾患の治療で骨髄移植を利用する場合、このようにレシピエントの骨髄を破壊することのない、できるだけ低侵襲な前処置で混合キメリズムを確立することが重要と考えられる。

論文審査の要旨

混合キメリズムは非悪性血液疾患や臓器移植の免疫寛容など、治療手段として選択される疾患は多い。しかし、ドナーの血液系幹細胞の生着には、全身照射や化学療法といった骨髄抑制性の前処置が必要で、その毒性のために臨床応用が進んでいないのが現状である。本研究では主要組織適合抗原 (MHC) の固定されたミニブタを使って、T細胞除去抗体、胸腺照射の後、サイトカインで動員した末梢血幹細胞を多量に移植し、30日間サイクロスポリンを使用することによりminorならびにmajor組織適合抗原の壁を越えて混合キメリズムの確立に成功した。混合キメリズムが確立されると、ドナー皮膚移植片は長期生着した。またドナー腎は免疫抑制剤を使用することなく、永久生着を示した。本研究の方法は骨髄を抑制することなく低侵襲で臨床応用可能と思われた。

審査ではサイトカインで動員され、移植された末梢血単核球細胞の分析をすべきであるとの助言がなされた。また、2匹に移植片対宿主病 (GVHD) が認められたが、その予防のために移植するドナーの細胞からT細胞の除去を行なう方法を検討すべきであるとの質問があったが、ドナー血液幹細胞の生着にはドナーのT細胞が必要であり、MHCミスマッチの場合、生着不全となる可能性が高いとの説明がなされた。しかし純化したCD34細胞を多量に移植すれば、GVHDのないドナー細胞の生着の可能性があると指摘があった。MHCのマッチしたドナーの皮膚移植で一匹は永久生着したが、一匹は最終的には拒絶されたことに関して、皮膚特異抗原によるものであると回答されたが、一概に皮膚特異抗原のためと断定はできず、class IIの強い発現など原因は種々考えられるとの指摘があった。また皮膚の特異抗原に関しては、keratinocyteを採取し、分析すれば判明する可能性も指摘された。また、ヒトに混合キメリズムを確立しても皮膚移植と同様に臓器または組織特異的な免疫寛容が必ずしも得られない可能性も指摘された。本研究では混合キメリズムの成立に胸腺照射の重要性を強調し、幼若なブタを使用しているが、ヒトでは思春期以降胸腺は殆ど萎縮するので、臨床応用には、もう少し老齢化したブタをレシピエントに選択する必要性について述べられた。

以上のように、移植免疫寛容において齧歯類では成功する種々の方法が、大型動物、人間では成功が困難な場合が多い。本研究では抗体によるT細胞除去とサイトカインで動員した多量の末梢血幹細胞の移植による骨髄非抑制性前処置にて再現可能な大型動物モデルで混合キメリズムを確立し、免疫寛容に導いたことは、この混合キメリズムを種々の疾患の治療の手段としてさらに応用できる可能性を示唆した点において臨床上有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹

内科学 池田 康夫 微生物学 小安 重夫

微生物学 石川 博通 先端医科学 河上 裕

学力確認担当者: 北島 政樹、池田 康夫

審査委員長: 池田 康夫

試問日: 平成14年11月20日

Calmodulin kinases II and IV and calcineurin are involved in leukemia inhibitory factor-induced cardiac hypertrophy in rats.

(白血病阻止因子誘発性心肥大におけるカルモデュリン依存性キナーゼII、IVおよびカルシニューリンの役割)

加藤 隆弘

内容の要旨

当教室ではこれまでIL-6ファミリーの白血病阻止因子(LIF)が心肥大を誘発すること、成獣ラット心筋細胞においてLIFによりL型カルシウム(Ca)電流および細胞内Ca濃度が増大することを報告してきた。一方、近年の研究により、カルモデュリン依存性リン酸化酵素カルモデュリンキナーゼI、IV(CaMKI、CaMKIV)およびカルモデュリン依存性脱リン酸化酵素カルシニューリン(CN)がフェニレフリン誘発性心肥大形成に重要な働きをすることが報告された。以上のことから本研究ではLIFによる心肥大形成にこれらCa感受性酵素が関与しているのではないかと考え、ラット培養心筋細胞を用いてLIFによる心肥大反応におけるCaMKII、CaMKIVおよびCNの役割について検討した。パッチクランプ法によりCa電流はLIF刺激後15分で最大となることを確認した。Ca感受性色素Fluo-4を用いた測定ではLIF刺激により細胞内Ca濃度は増大し刺激後15分で最大となった。LIF刺激によりCaMKIIおよびCaMKIVのリン酸化酵素活性、およびCNの脱リン酸化酵素活性は刺激後15分後に最大となった。転写因子NFAT-3はCNにより脱リン酸化され核へ移行することが知られている。LIFはNFAT-3ルシフェラーゼ活性を3倍に増大し、この作用はCNの阻害薬サイクロスポリン(CsA: 50ng/ml)により完全に阻害された。L型Caチャネル遮断薬ニカルジピン(Ni)およびベラパミル(Ve)はLIF刺激によるCaMKII、CaMKIVおよびCNの活性化をほぼ完全に阻害した。NiおよびVeはLIF刺激による $[^3\text{H}]$ -フェニルアラニン(Phe)取り込み増大を阻害した。免疫沈降ウエスタンブロット法では、LIFはホスホリパーゼC- γ 1(PLC)をリン酸化しなかった。ラジオイミュノアッセイ法によるイノシトール3リン酸(IP3)の測定ではLIF刺激ではIP3の増大はみられず、Ca増大に対するPLCの関与は否定された。LIFはc-fos(30分)、BNP(1時間)、skeletal α -actin(24時間)、ANP(24時間)の発現を誘導し、CaMKII、CaMKIV阻害薬のKN62(10 μ mol/L)はその誘導を部分的に阻害した。KN62はLIFによる $[^3\text{H}]$ -Phe取り込み増大を濃度依存性に阻害した。LIF刺激によるc-fos、ANP、およびBNP(1時間)の発現誘導はCNの阻害薬FK506、CsAいずれの影響も受けなかったが、CsAにより刺激後2時間から24時間でのBNPの発現が抑制された。CsAはLIFによる $[^3\text{H}]$ -Phe取り込み増大を部分的に阻害した。以上を総合して、LIFは心筋細胞においてL型Ca電流を増大させることによりCaMKII、CaMKIVおよびCNを活性化し、これらの活性化はLIFによる心筋細胞肥大形成において重要な役割を果たしていることが示された。

論文審査の要旨

近年の研究により、CaMKI、CaMKIVおよびcalcineurin(CN)などのカルシウム(Ca)感受性酵素が心肥大形成に重要な働きをすることが注目されている。しかしながら白血病阻止因子(LIF)のようなgp130受容体を介するシグナル伝達においてはCaシグナルを作動させることは報告されていない。本研究では、LIFによる心肥大形成にCa感受性酵素が関与しているかを明らかにすることを試みた。その結果、LIFは胎生ラット培養心筋細胞においてL型Ca電流を増大させることによりCaMKII、CaMKIVおよびCNを活性化し、これらの活性化はLIFによる心筋細胞肥大形成において重要な役割を果たしていることが示された。

審査においては、まずLIFによるL型Ca電流増大の機序に関して、LIFの直接的作用によるものか、それともCaMKII、CaMKIVおよびCNの活性化により引き起こされたものが不明確であることが指摘された。これに対し、CaMKII、CaMKIVおよびCNさらにはPKA、PKC、PI3K、JAK、p38MAPK、チロシナーゼの阻害剤のいずれを用いてもLIFによるL型Ca電流増大は抑制されないこと、そしてその後の実験からL型Caチャネル α サブユニットのC末端に2つのMAPK認識配列があり、LIFによるL型Ca電流増大はそのうちの1つがMAPKによりリン酸化されることにより引き起こされることが示されたと回答された。続いて、細胞内Ca濃度測定において、その蛍光指示薬に定量性を出せるFura2を使用すべきであったとの指摘がなされた。Fura2は成獣ラット培養心筋細胞では良く取り込まれたが、胎生ラット培養心筋細胞では取り込み不良であったためと回答された。さらにFluo4を使用するならば、コントロールを設定し半定量化する工夫をするべきであったとの指摘がなされた。Ca濃度測定に関しては、心筋細胞の持つ拍動という特性が測定値に影響する可能性も指摘された。NFAT-3ルシフェラーゼアッセイではpositive controlとして用いられたイオノフォアは非生理的であり、より生理的なcontrolが望ましいとされた。臨床的意義についての審査も行なわれ、日常臨床で使用されているCaチャネル阻害剤の心肥大抑制における有用性の一部を説明するものと回答された。最後にLIFの持つ既知の心肥大作用機序と比較して、本研究で示されたカルシウム感受性酵素を介する機序の占める割合が質問された。これに対し $[^3\text{H}]$ -Phe取り込み増大や細胞面積増大に対する抑制作用の程度からMAPK系がメインであり、他がそれぞれ部分的に関与しているものと考えられると回答された。以上のように、本研究はさらに改善する点を残しているものの、心筋細胞肥大作用におけるLIFの新しい作用機序を明らかにした点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
外科学 四津 良平 医化学 末松 誠
生理学 金子 章道 内科学 池田 康夫
学力確認担当者: 北島 政樹、四津 良平
審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成14年12月18日

日本人のケラトエピセリン関連角膜ジストロフィの 分子遺伝学および免疫組織学的解析

小西 美奈子

内容の要旨

常染色体優性遺伝角膜ジストロフィは、角膜混濁の進行により視力低下をきたす疾患で、顆粒状角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィI型、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィなどに分類されてきた。1988年に顆粒状角膜ジストロフィと格子状角膜ジストロフィの両方の特徴を有するアペリノ角膜ジストロフィが報告され、1997年には上記4疾患がTGFBI遺伝子の変異によって発症することが報告された。本研究では対象を慶應義塾大学病院眼科において顆粒状角膜ジストロフィ、格子状角膜ジストロフィI型、ライス・ビュックラース角膜ジストロフィと診断された39症例とし、分子遺伝学的解析、遺伝子変異と臨床所見の関連の検討、TGFBI遺伝子産物であるケラトエピセリンの抗体を用いた免疫組織染色を含む病理組織所見の検討を行った。

[分子遺伝学的解析] TGFBI遺伝子の変異の有無を調べた結果、今まで顆粒状角膜ジストロフィと診断されていた症例の多くがR124H変異をもち、R555W変異は1例にしか認めず、格子状角膜ジストロフィは全例R124C変異をもっていた。また1例は新規のR124L変異をもち、病理組織学的には表在型顆粒状角膜ジストロフィであった。

[遺伝子変異と臨床所見の関連] R124H変異は角膜上皮びらんの既往がなく、角膜所見は円形・星芒状混濁が主なタイプと角膜表層のびまん性混濁が主体で深層の星芒状混濁を認めないタイプの2つに分類された。R555W変異は角膜表層の微細な顆粒状混濁が特徴で幼少時より角膜上皮びらんを認めた。R124C変異は格子状角膜混濁と角膜表層のびまん性混濁が特徴であった。R124L変異は幼少時より再発性角膜上皮びらんを生じ、角膜表層の地図上混濁により早期に視力が低下した。

[病理組織学的検討] マッソントリクローム染色、コンゴレッド染色、抗ケラトエピセリン抗体 (KE-2 (C末端側の抗体)、KE-15 (N末端側の抗体)) による免疫組織染色を行った。全例で抗ケラトエピセリン抗体による免疫組織染色は陽性であったが、コンゴレッド染色で偏光陽性を呈するアミロイドはマッソントリクローム染色で赤く染まらず、KE-2は陽性だがKE-15は陰性であった。偏光陰性の非アミロイドの沈着物はマッソントリクローム染色で赤く染色され、KE-2、KE-15の両者が陽性であった。

以上より顆粒状角膜ジストロフィと診断されていた日本人の症例のほとんどがR124H変異すなわちアペリノ角膜ジストロフィであることが判明し、ケラトエピセリン関連角膜ジストロフィにおいて角膜沈着物はケラトエピセリンを含み、ケラトエピセリンのN末端側の有無もしくは構造変化がアミロイドの形成に関連している可能性が示唆された。

論文審査の要旨

常染色体優性遺伝角膜ジストロフィは従来角膜の病変により4疾患に分類されていたが、近年この4疾患がTGFBI遺伝子の変異によって発症することが報告された。本研究では慶應義塾大学病院眼科に通院中の4種類の角膜ジストロフィ39症例につき、分子遺伝学的解析、遺伝子変異と臨床所見との関連の検討、TGFBI遺伝子産物であるケラトエピセリンの抗体を用いた免疫組織染色を含む病理組織所見の検討を行った。結果は今まで顆粒状角膜ジストロフィと診断されていた症例の多くがR124H変異をもち、R555W変異は1例のみであった。格子状角膜ジストロフィは全例R124C変異であった。R124H変異は臨床所見から2つのタイプに分類された。R555W変異、R124C変異、R124H変異、R124L変異のそれぞれの臨床的所見を明らかにした。病理組織学的には全例で抗ケラトエピセリン抗体による免疫組織染色は陽性であったが、コンゴレッド染色において偏光顕微鏡下で複屈折を呈するアミロイドはマッソントリクローム染色で赤く染まらず、KE-2は陽性だが、KE-15は陰性であった。以上より顆粒状角膜ジストロフィと診断されていた日本人の症例のほとんどがR124H変異すなわちアペリノ角膜ジストロフィであることが判明し、ケラトエピセリン関連角膜ジストロフィにおいて角膜沈着物はケラトエピセリンを含み、ケラトエピセリンのN末端側の有無もしくは構造変化がアミロイドの形成に関連している可能性を示唆した。

審査にあたり、ケラトエピセリンの作用と存在について質問がなされた。これに対し、その作用は細胞外マトリックスで細胞接着や遊走に関与しており、その存在部位は、眼組織以外の組織でもこの遺伝子産物は存在し、細胞外マトリックスを構成しているとの回答がなされた。ケラトエピセリンは他の分野ではbigly-3と呼ばれているのでそれも記載した方が良いとの提案があった。またケラトエピセリンのN末端側の有無がアミロイドの形成に関わると考えているのかとの質問にたいして、本研究のgenotypeとphenotypeが一致しない理由について議論がなされた。アペリノ角膜ジストロフィの細隙灯顕微鏡所見での分類の意味と分類したタイプ間で時間がたつと相互に移行することはないかとの質問がなされた。これにたいし、アペリノ角膜ジストロフィ自体の診断には分類はあまり意味はないが、種々の角膜所見が同じ遺伝子変異で生じていることがわかり、またタイプ間での移行は沈着物の生じるレベルが病理組織上異なっているので移行の可能性は少ないと考えられるとの回答がなされた。本研究は日本人のケラトエピセリン関連角膜ジストロフィの分子遺伝学および免疫組織学的解析を行うことにより、日本人の常染色体優性遺伝角膜ジストロフィを再分類した眼科学上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 小口 芳久
病理学 岡田 保典 分子生物学 清水 信義
生理学 金子 章道 皮膚科学 西川 武二
学力確認担当者: 北島 政樹、岡田 保典
審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成14年11月19日

慢性心房細動症例に対する電気的除細動後の心房電気生理学的指標の変化

佐藤 俊明

内容の要旨

心房細動は、洞調律時に発作的に出現し自然停止する発作性心房細動と、遷延し洞調律が認められない慢性心房細動に分類されるが、発作性心房細動の約20%は慢性心房細動に移行する。心房細動が慢性化する過程では「電気的リモデリング」と呼ばれる心房筋の一連の電気生理学的変化が進み、より心房細動が遷延しやすい環境が生ずる。その影響は心房細動除細動後にも及ぶ。心房細動持続時間の長い症例では除細動後の心房細動再発率が高い。その機序が電気的リモデリングの回復過程と関連するか否かは不明である。また心房細動遷延後に徐拍化を目的としてverapamilが投与された症例において、verapamil投与が電気的リモデリングの進行を阻止できるかどうかについても知られていない。

方法 1) 慢性心房細動症例15例において、電気的除細動施行後1、24時間後の右房有効不応期と心房内伝導時間 (SI-P時間およびP波幅) を計測し、心房細動の既往がない対照群の計測値と比較するとともに、心房細動持続時間と各指標との相関について調べた。2-1) 慢性心房細動発生後にverapamilの経口投与が開始された症例とverapamil投与歴のない慢性心房細動の症例において、電気的除細動1、24時間後の右房単相性活動電位持続時間、右房有効不応期を比較するとともに、2-2) 一部の慢性心房細動症例に対し除細動1、24時間後にverapamilを静脈内投与し、投与前後の右房有効不応期を比較した。

結果 1) 慢性心房細動除細動後の右房有効不応期は心房細動の既往がない対照群に比べ有意に短く、SI-P時間およびP波幅は有効に長かった。除細動後24時間の間に右房有効不応期は有意に延長したが、24時間後においてもSI-P時間およびP波幅の有意な回復は認めなかった。2) 心房細動持続時間が長い症例ほど、除細動後24時間の右房有効不応期およびP波幅の回復が遅れていた。3) 心房細動遷延後にverapamilの経口投与が開始された症例では、verapamil投与歴のない症例に比べ電気的除細動後の単相性活動電位持続時間および右房有効不応期は有意に短かった。また、慢性心房細動除細動後に、verapamilが静脈内投与された群では右房有効不応期が有意に短縮した。

結論 慢性心房細動除細動後、心房不応期と心房内伝導時間の異常が遷延し、心房細動持続が遷延した症例ほど除細動後の電気生理学的指標の回復が遅延することが示された。心房細動遷延後開始されたverapamilの経口投与により、また除細動後のverapamilの静脈内投与により、電気的リモデリングが進行した心房筋の不応期は短縮する可能性が示された。心房細動の治療においては、発生後早期の停止が重要であり、慢性化する前からverapamil投与を考慮する必要性が示唆された。

論文審査の要旨

慢性心房細動は心不全や血栓塞栓症などの合併症を生じ、心房細動持続時間の長い症例では除細動後の心房細動再発率が高い。心房細動持続時間と電気的リモデリングの回復過程との関連は不明であり、心房細動遷延後に投与されたL型Caチャンネル遮断薬であるverapamilが心房電気生理学的指標へ及ぼす効果についても知られていない。申請者は、ヒトにおいて慢性心房細動電気的除細動後の心房電気生理学的指標の変化を計測し、対照群の指標と比較検討した。慢性心房細動除細動後の右房有効不応期は心房細動の既往がない対照群に比べ短く、心房内伝導時間は長かった。心房細動持続時間が長い症例ほど、除細動後24時間の右房有効不応期およびP波幅の回復は小さかった。心房細動遷延後にverapamilの経口投与が開始された症例では、verapamil投与歴のない症例に比べ電気的除細動後の単相性活動電位持続時間および右房有効不応期は短かった。また、慢性心房細動除細動後にverapamilが静脈内投与された群では右房有効不応期が短縮した。心房細動の治療においては、発生後早期の停止が重要であり、電気的除細動を考慮する症例でverapamil投与を控える必要性を示した。

審査において本研究の新知見の総括が求められ、電気的リモデリングの回復過程と心房細動持続時間との関連を明らかにし、電気的リモデリングが生じた心房筋に対するL型Caチャンネル遮断薬の有効性の限界を示したことでであると説明された。症例の性別に偏りがあるとの指摘があった。Verapamil静脈内投与前後での不応期の比較に用いた統計学的方法について問われた。両群の比較についてはpaired student T testをもちいたと説明し指標が正規分布していることを確認した。臨床におけるverapamilの心房細動症例への適応につき問われた。発作性心房細動症例に対してverapamilを積極的に投与するが、慢性心房細動例で除細動を考慮する症例では投与を控える。一方、除細動せず心拍数調節を行なう症例ではverapamil投与の適応があると説明された。Verapamilが除細動後の心房細動再発へ及ぼす影響についても問われた。Verapamil投与群では再発率が高い傾向を認めたが、再発予防のため追加投与されたその他の抗不整脈薬の影響もあるとの説明がなされた。電気的リモデリングにより変化した膜イオンチャンネルへ及ぼす抗不整脈薬の薬理学的効果を検討するだけでなく、電気的リモデリングがgap junctionに及ぼす影響とそれに対する治療も考慮すべきであるとの助言がなされた。

以上のように、本研究には今後の課題がいくつか残されたが、慢性心房細動の再発機序の解明および心房細動治療の研究に貢献する価値がある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
生理学 金子 章道 外科学 四津 良平
臨床麻酔学 武田 純三 薬理学 西本 征央
学力確認担当者: 北島 政樹、金子 章道
審査委員長: 金子 章道

試問日: 平成14年12月27日

Phorbol myristate acetate惹起性胃潰瘍における nuclear factor kappa BとTumor necrosis factor- α の役割

竹内 哲

内容の要旨

胃潰瘍の発生機序に関しては、未だ不明の点が多い。近年、*Helicobacter pylori*が、消化性潰瘍の成因の一つとして注目されてきたが、どのように組織傷害に関与しているかは不明である。また、現在まで種々の実験潰瘍モデルにより胃潰瘍の形成過程の検討が行なわれたが、活性酸素や炎症性サイトカイン産生に関するin vivoでの細胞内シグナル伝達機構に関する研究は少ない。起炎性物質であるホルボールエステル (phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)) は、直接プロテインキナーゼC (PKC) を活性化しそれに伴うシグナル伝達を誘導するが、その際にnuclear factor kappa B (NF- κ B) はPMAにより惹起される炎症過程において基本的な役割を果たすと考えられる。またTNF- α は急性炎症反応の主要なメディエーターであるが、NF- κ Bの活性化はTNF- α によって誘発される細胞傷害過程に介在している可能性が考えられている。しかし、胃粘膜傷害の形成過程、特に生体内での実験的胃潰瘍形成におけるNF- κ BとTNF- α の役割は明らかではない。そこで本研究においては、PMAを胃壁の漿膜下に局注することにより誘発される新たな実験的胃潰瘍モデルを作成し、その胃潰瘍形成過程におけるNF- κ BとTNF- α の役割を解明することを目的として検討を行った。

本研究ではウイスター系雄性ラットを用いた。ラット胃漿膜下に局注したPMAは容量依存性に胃潰瘍を誘発し、局注48時間後に最大となった。潰瘍形成はPKC阻害剤であるcalphostin CおよびNF- κ B阻害剤であるpyrrolidinedithiocarbamate、proteasome inhibitor (MG132)、NF- κ B decoyにより肉眼的および組織学的に著明に抑制された。また抗TNF- α 抗体の投与によってもPMA惹起性潰瘍形成は著明に抑制された。PMA局注部位に一致した胃粘膜において、潰瘍が顕性化する以前にNF- κ Bの活性化が生じていることが、in situ fluorescence DNA binding assayとelectrophoretic mobility shift assayにより観察され、またcalphostin Cおよび各種NF- κ B阻害剤でNF- κ Bの活性化が抑制されることも確かめられた。一方、抗TNF- α 抗体はNF- κ Bの活性化を抑制しなかった。

本研究により胃漿膜下へのPMAの局注により潰瘍が形成されることが、肉眼的および組織学的に初めて示された。またin vivoでPMAが胃粘膜内の転写因子であるNF- κ Bを活性化すること、およびNF- κ Bの活性化に引き続き生じるTNF- α の産生が、PMA惹起性胃潰瘍の形成過程における組織傷害発症に重要であることが明らかにされた。近年、*Helicobacter pylori*による胃潰瘍誘発過程においても、NF- κ Bの活性化とそれに伴う炎症性サイトカインの産生が生じていることが報告されており、本モデルはNF- κ B活性化に伴う潰瘍形成機序を解明する有用な手段となると考えられた。

論文審査の要旨

胃潰瘍の発生機序は、未だ不明の点が多く、その発症過程におけるin vivoでの細胞内シグナル伝達機構および細胞内での転写機構に関する直接的な研究はほとんどなされていない。そこで本研究では、プロテインキナーゼC (PKC) および転写因子であるnuclear factor kappa B (NF- κ B) を活性化し、シグナル伝達を誘導するホルボールエステル (phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)) を胃漿膜下に局注し、その潰瘍形成過程における細胞内シグナル伝達機構の解明を試みた。PMA惹起性胃潰瘍はPKCおよびNF- κ Bの阻害薬にて抑制され、またTumor necrosis factor- α (TNF- α) の阻害薬にても抑制された。更に、in situ fluorescence DNA binding assayとelectrophoretic mobility shift assayにより胃粘膜内でのNF- κ Bの活性化が認められ、またNF- κ Bの阻害薬によりその活性化が抑制されたことより、本潰瘍モデルはPMAによるPKC、NF- κ Bの活性化およびそれにより産生されるTNF- α により惹起される可能性が考えられ、胃潰瘍発生過程におけるNF- κ BおよびTNF- α の役割を解明する一助となる可能性が示唆された。

審査では、今回の実験モデルにおいてPMAを用いた理由を質問され、PMAの直腸内への投与により急性炎症を生じる報告があり、またPMAがPKCおよびNF- κ Bを介したシグナル伝達を誘導することも報告されていたため、胃にPMAを投与することにより胃潰瘍が生じた場合、その形成過程の解明に有用ではないかと考えたためと回答された。PMA投与後の潰瘍形成過程を質問され、PMA投与6時間後に胃粘膜上皮側に生じたびらんが、時間経過とともに漿膜側へと進展すると回答された。漿膜下へ投与したPMAにより粘膜上皮側よりNF- κ Bの活性化およびびらんが生じる機序が質問され、さらにNF- κ BおよびTNF- α の産生細胞を同定すべきではないかと指摘された。漿膜下へ投与したPMAは粘膜側へ浸透し、胃粘膜細胞のNF- κ Bを活性化し、炎症性サイトカインや接着分子などの産生および微小循環障害が粘膜上皮側に生じ、炎症が惹起されるのではないかと。ただし、本実験ではNF- κ BやTNF- α の産生細胞は同定されておらず、微小循環障害についても検討をしていないため、正確な発生機序は不明であると回答された。本実験ではNF- κ B活性化以降の潰瘍形成過程の検討が不十分であり、時間経過、NF- κ B活性化の炎症惹起過程における変化、微小循環障害形成過程を含めて、今後詳細な検討が必要であると指摘された。

以上のように、本研究は今後、更に検討すべき課題を残してはいるが、PMA惹起性胃潰瘍モデルにおいてin vivoにおける細胞内シグナル伝達機構と胃潰瘍形成過程を直接関連付けたことは消化器病学にとって有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正
外科学 北島 政樹 医化学 末松 誠
病理学 岡田 保典 解剖学 相磯 貞和
学力確認担当者：北島 政樹
審査委員長：北島 政樹

試問日：平成14年11月13日

Characterization of Structures with T-Lymphocyte Aggregates in Ileal Villi of Crohn's Disease.

(クローン病回腸絨毛内におけるT-リンパ球の集簇)

長 沼 誠

内容の要旨

Crohn病は原因不明の炎症性腸疾患の1つであり、典型的病変を呈さない場合には診断に難渋することが多い。特にCrohn病の診断基準の1つである非乾酪性肉芽腫は検出されないことも多く、このことがCrohn病の診断を困難にしていると考えられる。診断効率を上げるため、これまでに内視鏡学的・病理学的研究が行われてきているが、Crohn病の好発部位である回腸粘膜についての研究は少ない。

本研究において、著者はCrohn病の回腸粘膜絨毛内にリンパ球集簇が存在するのを見いだした。本研究では、まず回腸絨毛内リンパ球集簇がCrohn病に特異的な所見であるかについて検討した。32例のCrohn病患者の回腸粘膜を手術時・内視鏡生検時に採取し、リンパ球集簇の有無の検索をおこなった。その結果手術検体18例中14例、内視鏡下生検14例中7例で本集簇が認められたが、他の炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎・腸管ペーチェット病、腸結核)や健常回腸粘膜では検出されなかった。次にリンパ球集簇について免疫組織化学的検討をおこなった。本集簇はTリンパ球で構成され、CD4陽性、CD45RO陽性細胞が優位であり、CD19陽性、Bリンパ球は認められず、従来のリンパ濾胞やパイエル板のリンパ球のphenotypeとは異なっていた。また集簇内にCD68陽性のマクロファージが認められ、その一部でCrohn病の病態形成に重要なサイトカインであると考えられているIL-18陽性細胞が認められた。さらにCrohn病診断における本集簇の有用性について明らかにするため、Crohn病患者における回腸絨毛内リンパ球集簇と非乾酪性肉芽腫の検出率について検討を加えた。32例中回腸絨毛内リンパ球集簇が検出された症例は21例(66%)、非乾酪性肉芽腫は19例(60%)に認められた。非乾酪性肉芽腫が検出されなかった13例中7例(54%)で回腸絨毛内リンパ球集簇が認められた。非乾酪性肉芽腫、回腸絨毛内リンパ球集簇のいずれか、または両方検出された症例は32例中26例、81%と高率であった。また回腸に病変が認められない大腸型Crohn病4例中2例で回腸絨毛内リンパ球集簇が認められたことや、回腸絨毛内リンパ球集簇陽性例と陰性例では臨床背景、内視鏡所見について明らかな差は認められなかったことより、粘膜の炎症の程度や病気の活動性とは関係なく本集簇が認められる可能性があると考えられた。

以上より回腸絨毛内リンパ球集簇はCrohn病の病態形成に重要な意義を果たす可能性が示唆され、また非乾酪性肉芽腫が検出されない場合のCrohn病の補助診断として有用であることが示された。

論文審査の要旨

非乾酪性肉芽腫はCrohn病における病理学的特徴の1つであるが、内視鏡下生検での検出率は高くなく、診断に苦慮することがある。診断効率を上げるため、これまでに内視鏡学的・病理学的研究が行われてきているが、Crohn病の好発部位である回腸粘膜についての研究は少ない。

申請者はマウスIELのprogenitorであるcryptopatchがヒト腸管粘膜に存在するのについて追求する過程で、Crohn病の回腸粘膜絨毛内にリンパ球集簇が存在するのを見だし、このリンパ球がCD3陽性T細胞であることより、T lymphocyte aggregate (TLA) と名づけた。本研究ではTLAについて免疫組織化学的検討をおこない、さらにCrohn病診断に対するTLAの有用性について検討を加えた。その結果、同定したTLAのリンパ球がCD4陽性細胞であり、CD68・IL-18陽性マクロファージが認められたことより、TLAはCrohn病の病態形成に重要な意義を果たす可能性が示唆され、さらに病気の活動性と関係なく存在し、非乾酪性肉芽腫が検出されない症例の54%でTLAが検出されたことより、Crohn病の早期診断や肉芽腫が検出されない場合の補助診断としてTLAが有用であることを示した。

審査ではまず本研究がcryptopatchに端を発した研究であるにもかかわらず、主論文のintroductionで言及されていないとの指摘があった。またCrohn病の病態形成においてはIL-12が重要であり、本研究では抗IL-12抗体の免疫染色がなされていないとの指摘がされたが、サイトカインの免疫染色は困難な場合が多く、良好な結果が得られなかったと回答された。次にTLAのCrohn病病態への関与についての質問がなされ、Crohn病では活性化されたマクロファージから放出されるIL-12により、ヘルパーT細胞(Th0)がTh1細胞となり、これより放出される炎症性サイトカインが病態に関係するが、この過程でヘルパーT細胞が絨毛内に集簇し、炎症性サイトカインの放出に関与する可能性があるかと回答された。さらにTLAについての病理学的な定義について質問があり、明確な基準については今後の検討課題であるが、周囲の組織のリンパ球の密度との差が重要であるとの回答がされた。またTLAをCrohn病の診断基準とするには、他の炎症性腸疾患を含めて検討数が少ないことが指摘されたが、患者数が少ないため検体の採取が困難であること、論文作成後も現在まで症例数を増やして検討しているとの回答がされた。最後にアフタ性腸炎からCrohn病に進展した症例でTLAがアフタ性腸炎の段階で診断に結びついた例が存在するかの質問がされ、1例ではあるがアフタ性腸炎の段階でTLAが認められ、後に肉芽腫が検出されてCrohn病と診断された症例があると回答された。

以上本研究ではなお検討すべき点が残るものの、TLAがCrohn病診断に有用であること、およびCrohn病の病態形成に重要な意義を果たすことを明らかにした点に意義が認められ、消化器病学の分野において価値のある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正
外科学 北島 政樹 病理学 岡田 保典
病理学 坂元 亨宇 微生物学 小安 重夫
学力確認担当者: 北島 政樹
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成14年12月24日

電氣的除細動後の左房機能回復過程と血栓塞栓症の危険因子

南 雲 美 也 子

内容の要旨

心房細動 (Af) では、高頻度心房興奮による細胞内カルシウム過負荷が心房筋の電氣的リモデリングを引き起こす。さらに、Afが持続すると心房筋伸展やレニン・アンジオテンシン系活性化を介し、構造的リモデリングを生じ心房は拡大し、線維化などの組織学的変化が進行し、心房機能は低下しAfは永続化する。この時期になると除細動成功率は低下し、再発も多く、血栓塞栓症のリスクも増大する。早期の除細動により電氣的リモデリングは回復するが、構造的リモデリングの回復過程や可逆性は明らかにされていない。そこで本研究は、Afの電氣的除細動 (DC) 後の構造的リモデリングの回復を評価するため、左房機能指標の変化を観察し、さらにその左房機能から血栓塞栓症を予知しうるかを検討した。

[対象と方法]

1. DC後の左房機能回復過程

非弁膜症性慢性AfのDC前後に経食道心エコーを施行した36例を解析した。DC4日後、1ヶ月後、3ヶ月後に左心耳血流速度、心房収縮期左室流入血流速度最大値 (A波高)、左心耳断面積を測定した。

2. 慢性Afにおける塞栓症の危険因子

1994~1997年に経食道心エコーを施行した非弁膜症性Af75例を3年間経過観察した。年齢、持続性が発作性か、warfarin投与、抗血小板剤投与、脳梗塞の既往、高血圧、糖尿病、高コレステロール血症の合併、左房内血栓、胸部大動脈の動脈硬化の程度、左房径、左室駆出率、左心耳血流速度を調べ、単純logistic回帰分析で有意であった危険因子に、warfarin投与の有無を加えた項目で多項logistic回帰分析を行い、塞栓症発症の独立危険因子を検討した。

[結果]

1. DC後の左房機能回復過程

DC後に左心耳血流速度とA波高は1ヶ月後で有意な回復を認めたが、拡張した左心耳断面積は3ヶ月まで縮小を続けた。Af持続期間5ヶ月で2群に分けると、5ヶ月未満の短期群では1ヶ月までに各指標が改善し、長期群では3ヶ月を過ぎても回復が続いたが、短期群の1ヶ月目よりも高度な左房機能障害が持続した。

2. 慢性Afにおける塞栓症の危険因子

75例中14例が有症候性塞栓症を発症した。年齢 ($p=0.04$)、左房内血栓 ($p=0.04$)、胸部大動脈の動脈硬化 ($p=0.02$)、左心耳血流速度20cm/s未満 ($p=0.0001$) が有意な危険因子であった。これらにwarfarin投与の有無を加え多項logistic回帰分析を行ったところ、左心耳血流速度低下のみが独立危険因子であった (相対危険率12.5, $p=0.02$)。

[総括]

Afの持続が5ヶ月未満の症例では、DC後1ヶ月以内に左房機能が回復することが明らかになり、構造的リモデリングが可逆的である可能性が示唆された。慢性Afでは、左心耳血流速度低下が血栓塞栓症の危険因子であったことから、本指標を目安とした抗凝固療法の必要性が示された。

論文審査の要旨

心房細動 (Af) では、心房筋の高頻度興奮に伴う電氣的リモデリングが生じ、Afの永続化を促進するとされる。一方、Afが持続すると構造的リモデリングを生じ、心房機能は低下し、拡大した左房内で血流がうっ滞し、血栓塞栓症発症率を増大させる。早期の除細動により電氣的リモデリングは回復するが、構造的リモデリングの回復過程や可逆性は明らかにされていない。そこで本研究は、非弁膜症性慢性Afを対象に電氣的除細動 (DC) 後の構造的リモデリングの回復過程を評価し、血栓塞栓症発症の危険因子を検討した。

構造的リモデリングはDC直後より回復し、左房内血流速度からみた機能的指標の回復過程はより早く、左心耳断面積という形態的指標の縮小過程にはより長い時間を要することが判明した。また、Af持続期間の短期群は、長期群に比しDC後の回復が良好で、長期群では3ヶ月を過ぎても回復が続き、かつ回復は十分でなかった。

慢性Afでは、年齢、左房内血栓、胸部大動脈の動脈硬化、左心耳血流速度20cm/s未満が、血栓塞栓症発症の危険因子であった。これらにwarfarin投与の有無を加え多項logistic回帰分析を行った結果、左心耳血流速度低下が血栓塞栓症の独立危険因子であったことから、本指標を目安とした抗凝固療法の必要性が示された。

審査では、Afでの左房内血栓形成機序について質問があった。凝固系活性化機序の検討は行っていないが、血流うっ滞による凝固系活性化と乱流による血小板活性化の両者の関与が推測されると回答された。Af例における血栓塞栓症発症の危険因子については、warfarin投与下にプロトロンビン時間 (INR値) が維持できた群とそうでない群に分けてリスクを評価すべきであり、またINR値が維持できた場合の塞栓症発症頻度がどうであったかを検討すべきであった、との指摘があった。血栓塞栓症発症の危険因子として、左心耳血流速度を20cm/sで分けた理由についての問いに対しては、Af患者における脳梗塞発症の危険因子を検討した大規模研究SPAF-IIIで、左心耳血流速度20cm/s未満を左心耳血流速度低下と定義しており、本研究においてもこれに準拠したと回答された。さらに、Af時の心拍数と血流速度との関連性につき指摘があり、現在検討中ではあるが、Af時の平均心拍数の低下が血流速度を低下させ、血栓易形成性と関連すると考えられているとの回答があった。

以上のように、本研究では今後さらに検討されるべき点を残しているが、Afの構造的リモデリングの回復過程から、早期除細動の重要性とAf症例における左心耳血流速度低下が血栓塞栓症発症の危険因子である可能性が示唆された研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡

外科学 四津 良平 生理学 金子 章道

内科学 池田 康夫 臨床麻酔学 武田 純三

学術確認担当者: 北島 政樹、四津 良平

審査委員長: 四津 良平

試問日: 平成14年12月27日

Role of ICAM-1 in chronic ethanol consumption-enhanced liver injury after gut ischemia-reperfusion in rats.

(ラット腸管虚血再灌流惹起性肝障害モデルにおける
慢性エタノール投与の影響とその反応におけるICAM-1の役割)

堀 江 義 則

内容の要旨

本邦でも脳死ならびに生体小腸移植が施行され、腸管の虚血再灌流 (I/R) 障害が注目されてきているが、腸管I/Rにより、腸管のみならず、肝臓、肺などその下流にある臓器が傷害を受ける。著者は、急性エタノール投与モデルにおいてラット腸管I/Rにて惹起される肝微小循環障害は、高用量エタノール投与が肝障害を増悪する一方で、低用量エタノール投与が肝障害に抑制的に作用することを報告してきたが、慢性エタノール投与のI/R障害に対する影響については不明な点が多い。今回、慢性エタノール投与が腸管I/R惹起性肝障害に与える影響と、その反応におけるintercellular adhesion molecule (ICAM) -1の役割につき検討した。

Wistar系雄性ラットを用い、Lieberらの方法により6週間エタノールのpair-feedingを行った。ラットに30分間の腸管虚血を行った後に再灌流し、60分後に生体顕微鏡下に肝微小循環における静止白血球数を観察し、血中のtumor necrosis factor (TNF) - α とエンドトキシン濃度を測定するとともに、再灌流6時間後に血漿ALT活性も測定した。さらにICAM-1の抗体を前投与し、同様の実験を行った。

コントロール群では、腸管I/Rにより全区域で静止白血球数は増加し、血中TNF- α 、エンドトキシン濃度、ALT値も上昇した。慢性エタノール投与群では、I/Rによる中間域での静止白血球数が抑制された一方で、終末肝静脈 (THV) での静止白血球数が増加した。また、慢性エタノール投与はI/Rにより惹起される血中エンドトキシン濃度、ALT値の上昇を増強したが、血中TNF- α 値の上昇には変化を与えなかった。これに対して、ICAM-1の抗体の前投与により、慢性エタノール投与によるTHVでの静止白血球数増加、エンドトキシン濃度、ALT値の上昇の増強作用は抑制された。

以上の結果より、慢性エタノール投与は、腸管I/Rによる肝微小循環障害を増強し、その後の肝細胞障害も増強することが示唆されたが、その発生・進展機序のひとつに肝におけるICAM-1の発現増強が関与している可能性が示唆された。

論文審査の要旨

慢性エタノール投与は、虚血性脳・心血管障害に影響を与えることが知られているが、慢性エタノール投与の消化管や肝・胆道系の虚血再灌流惹起性臓器障害に対する影響については不明な点が多い。本研究では、慢性エタノール投与が腸管虚血再灌流惹起性肝障害に与える影響と、その反応におけるICAM-1の役割につき検討した。腸管虚血再灌流により惹起された静止白血球数増加、血中TNF- α 、エンドトキシン濃度、ALT値上昇は、慢性エタノール投与にて中間域での静止白血球数が抑制された一方で、終末肝静脈での静止白血球数が増加し、血中エンドトキシン濃度、ALT値の上昇が増強された。抗ICAM-1抗体の前投与により、慢性エタノール投与による静止白血球数増加、エンドトキシン濃度、ALT値の上昇の増強作用は抑制され、慢性エタノール投与による腸管虚血再灌流惹起性肝微小循環障害ならびに肝細胞障害増強の機序として肝におけるICAM-1の発現増強が関与している可能性が示唆された。

審査ではまず慢性エタノール投与による肝組織の変化についての質問があり、中等度の脂肪肝が惹起され、炎症細胞浸潤はないとの説明がなされた。実験デザインにおいてnegative controlとして非特異的な免疫グロブリンの投与の必要性についての指摘があり、マウスでの検討では非特異的な免疫グロブリンは障害に影響を与えなかったと回答されたが、慢性エタノール投与ラットにおいても検討が必要と助言された。また、ALT以外の肝由来の酵素やTNF- α 以外のサイトカインの測定について質問され、文献的にIL-6などが上昇することが報告されていると回答されたが、慢性エタノール投与ラットにおいても特にアルコール脱水素酵素やIL-1の検討が必要と助言された。さらに、各区域での静止白血球に対する慢性エタノール投与の影響の相違についての説明の補足を求められ、終末肝静脈での慢性エタノール投与による静止白血球数増加にはICAM-1の関与が強いと考えられるが、中間域では接着というよりpluggingの可能性が高く、解釈には今後の検討が必要であるとの回答がなされた。腸管虚血再灌流による肝組織変化でも各区域での相違があるかとの質問がなされ、炎症細胞浸潤は軽度であり区域差はないとの回答がなされた。最後に、このモデルは実験モデルとしては興味深い、多臓器不全や重症型アルコール性肝炎などの臨床モデルからは離れた部分があり、今回のデータの矛盾点をもとに、慢性エタノール投与下でのKupffer細胞の機能の検討など新展開をすべきとのコメントがなされた。

以上のように、本研究はさらに検討すべき点が残るものの、慢性エタノール投与による腸管虚血再灌流惹起性肝微小循環障害とその後の肝細胞障害の増強、さらにその発生・進展機序におけるICAM-1の役割について初めて示したものであり、今後、アルコールによる肝・消化管循環における虚血再灌流障害についての研究の礎になるという点で消化器病学上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正
医化学 末松 誠 外科学 北島 政樹
病理学 岡田 保典 解剖学 相磯 貞和
学力確認担当者: 北島 政樹、末松 誠
審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成15年1月21日

体腔内凝血の凝固線溶系に及ぼす影響と再出血発現機序に関する検討

山本 裕

内容の要旨

外科的侵襲下における患者管理に際し、再出血は治療成績ならびに予後を左右する重要な病態の一つである。外傷や術後に再出血を来した自験例を検討した結果、再出血時、線溶系に異常を示す症例があり、それらの症例に共通した臨床像として再出血前より体腔内に多量の凝血が貯留していたことを見出した。これらの臨床所見から、再出血発現機序の解明を目的として、体腔内凝血の存在と凝固・線溶系の変動に関する臨床的検討とそれを裏付けるために実験的検討を行った。

臨床的検討の対象は鈍的外傷25例で、体腔内に出血を認めたA群と出血を認めなかったB群の2群とに分類し、経時的に主として分子マーカーを測定した。その結果、A群のFPB β_{15-42} は、14日以降まで受傷直後と同程度の、B群に比し有意に高い値が続いた。Ddimerは、A群で受傷直後の高値が14日後まで持続し、5日後から7日後までの高値はB群に比較して有意であった。

実験的検討は、雑種成犬とラットを用いて行った。1) 雑種成犬の腹腔内に自家血または同量の生理食塩水を注入し、両群の凝固線溶系の変動を観察した。さらに、肝または脾を切開し圧迫止血後、腹腔内に自家血を注入し、凝固線溶系の変動と再出血の有無を観察した。その結果、自家血を腹腔内に注入したI群において、術後4日目に腹部正中創より出血を認め、 α_2PI は108%から65%に低下した。2) ラットの腹腔内に他家血を注入したI群と、同量の生理食塩水を注入したII群とで、大網、肺、脳、肝、脾、腎の線溶活性の経時変化を標準フィブリン平板法を用いて検討した。4日目に採取した大網の、フィブリン平板の溶解窓はI群で $13.20 \pm 5.36mm^2$ 、II群で $6.50 \pm 2.00mm^2$ であり、I群で有意に大きかった。線溶活性を有する肺・脳・腎組織の、経時的な線溶活性の変化は、20~26時間後の肺組織で、I群がII群に比し強く亢進していたが、脳・腎組織では両群間に有意差を認めなかった。

体腔内出血に対して保存的治療を行った場合の再出血の臨床的重要性に着目し、その機序の解析を行った。臨床的・実験的検討から以下の結果を得た。(1) 鈍的外傷後の再出血例で、再出血前より体腔内に凝血が存在している症例があった。(2) 鈍的外傷後、体腔内に凝血が存在している症例では、局所および全身血の二次線溶が亢進し、FPB β_{15-42} 、Ddimerの高値が持続した。(3) 腹腔内に凝血を注入した雑種成犬で、腹部正中創からの再出血を認めた。(4) ラットによる動物実験では、大網が線溶活性を有することが確認された。腹腔内に凝血を注入した群で、大網と、遠隔臓器である肺の線溶活性が亢進した。以上の結果より、体腔内凝血存在時の生体の反応としての線溶発現について興味ある事実が判明した。体腔内に凝血が存在する症例では、凝血に起因する線溶活性の亢進から再出血の危険性があると考えられ、保存的治療にあたっては凝固線溶能のモニターとしてFPB β_{15-42} 、Ddimerが重要である。

論文審査の要旨

外傷や手術後の再出血の臨床的重要性に着目し、その発現機序を解明することを目的として、再出血を来した自験例を検討した結果、再出血時、凝固能が正常に維持されているにもかかわらず線溶系に異常を示す症例があり、それらの症例に共通した臨床像として再出血前より体腔内に多量の凝血が貯留していた。本研究では、体腔内凝血が凝固線溶系に及ぼす影響と再出血との関連を知ることを目的として臨床的・実験的検討を行い、次の結果を得た。すなわち鈍的外傷後に体腔内に凝血の存在する臨床症例では局所および全身血の二次線溶が亢進し、FPB β_{15-42} 、D dimerの高値が持続した。また腹腔内に自家血を注入した雑種成犬で術後4日目に α_2PI の低下とともに正中創より出血を認めた。さらに、ラットの大網が線溶活性を有することを確認し、腹腔内に血液を注入したラットの線溶活性をフィブリン平板で測定すると、生食注入群に比し大網と肺の溶解窓が血液注入群で有意に大きかった。体腔内に凝血が存在する症例では、凝血に起因する線溶活性の亢進から再出血の危険性が生じると考えられ、保存的治療にあたってはモニターとしてFPB β_{15-42} 、D dimerが重要であることが想定された。

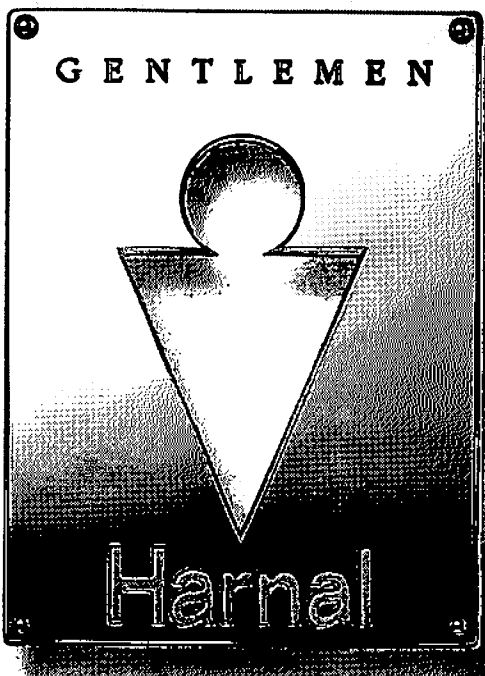
審査においては、凝血があると何故局所線溶は亢進しさらに全身の線溶系が亢進するのか、また何がt-PAをださせているのかとの質問がなされた。これに対し、体腔内に凝血が存在すると凝血周辺にt-PAが産生され、さらに凝血周辺の大網や胸・腹膜などの線溶能を有する組織の線溶活性が増強し、生理的防御機構として凝血を溶解する線溶のプロセスが活性化化する。すなわち血腫内には線溶活性の駆動源となるt-PAが含まれており、t-PAを含む凝血は吸収されて全身循環に入り、t-PAは内皮細胞を刺激してactive substanceを遊離し線溶が活性化されるものと考え、と説明された。凝固線溶系のマーカーは時代の変遷と共に変化してきているのではないか、最近の報告を含めてdiscussionする必要があると指摘された。次に、腔内に貯留した血液はなぜ凝固しにくいのか、との質問がなされた。これに対し、腹腔貯留血液の検討によると貯留早期の血液でみられるFg消失、ATIIIの著しい低下、TATの異常高値は凝固した血液を示し、ついで認められるPlg低下、 α_2PI の著しい減少、PICの異常高値は非常に強い線溶活性を示し凝固の溶解した結果を示唆するもので、一旦凝固した血液は線溶亢進により速やかに溶解するものと思われる、と回答された。次いで、大網の線溶活性の亢進はどのような細胞によるものと推測できるのかと質問され、大網のマクロファージや線溶活性との関係を考察していく必要がある、との提言がなされた。線溶活性は大網に広範に分布する肥満細胞によるものと推察されると回答された。腹腔に逸脱した赤血球が肥満細胞に接すると一酸化窒素が除去され肥満細胞の脱顆粒が活性化しhistamineやplatelet-activating factorを放出し、一方で大量出血に伴う交感神経の過剰刺激状態も加わるため、微小循環の血管内皮細胞におけるt-PA活性化は異常に亢進する可能性を指摘された。また肥満細胞は脱顆粒に際し抗トロンピン作用を有するheparinも放出するため、腹腔内の線溶活性はこれらの複合要因で異常亢進し、流動化が惹起されるものとの助言がなされた。血腫は二次線溶により再出血を繰り返さなければ、やがて吸収されresolving hematomaの経過をたどると想定されるが、本研究ではその詳細なメカニズムを解明するには至らず、今後の検討すべき課題が残されているものの、体腔内凝血存在時の凝固・線溶能の変動があきらかにされ、体腔内凝血の存在が再出血に関与している可能性を示した点で、臨床に則した有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 池田 康夫 病理学 岡田 保典
医学部 末松 誠 外科学 四津 良平
学力確認担当者: 北島 政樹、池田 康夫
審査委員長: 池田 康夫

試問日: 平成14年11月5日

前立腺肥大症に伴う

その排尿障害に、ハルナール。
出づらくて時間がかかる、夜中に何度もトイレに起きる…。そんな方に、排尿障害専門の α_1 ブロッカー！



- 前立腺・尿道平滑筋に選択的な α_1 ブロッカーです。(イヌ、in vitro)
- 処方しやすい1日1回1カプセル。
- 前立腺肥大症に伴う排尿困難、夜間頻尿、残尿感などに優れた改善効果があります。
- 副作用発現率は2.2% (104/4,724例)で、主なものはめまい、胃不快感等です。(再審査申請時)なお、重大な副作用として、失神・意識喪失、肝機能障害、黄疸が認められています。

【禁忌(次の患者には投与しないこと)】
 (1)本剤に対し過敏症の既往歴のある患者
 (2)腎機能障害のある患者[本剤の血漿中濃度が過度に上昇するおそれがある。]

(効能・効果)前立腺肥大症に伴う排尿障害
 (用法・用量)通常、成人には塩酸タムスロシンとして0.2mgを1日1回食後に経口投与する。なお、年齢、症状により適宜増減する。

(使用上の注意)(抜粋)
 1.慎重投与(次の患者には慎重に投与すること) (1)起立性低血圧のある患者[症状が悪化するおそれがある。] (2)重篤な肝機能障害のある患者[血漿中濃度が上昇するおそれがある。] (3)高齢者[「高齢者への投与」の項参照]
 2.重要な基本的注意 (1)本剤の過剰投与により血圧低下が予想されるので、投与量には注意すること。(2)立位血圧が低下することがあるので、体位変換による血圧変化に注意すること。(3)本剤による治療は原因療法ではなく、対症療法であることに留意し、本剤投与により期待する効果が得られない場合は、手術療法等、他の適切な処置を考慮すること。(4)めまい等があらわれることがあるので、高所作業、自動車の運転等危険を伴う作業に従事する場合には注意させること。(5)本剤投与開始時に降圧剤投与の有無について問診を行い、降圧剤が投与されている場合には血圧変化に注意し、血圧低下がみられたときには、減量又は中止するなど適切な処置を行うこと。
 3.相互作用【併用注意】(併用に注意すること) 降圧剤
 4.副作用 承認時及び市販後の使用成績調査における調査症例4,724例中、本剤との関連が疑われる副作用(臨床検査値異常を含む)は104例(2.2%)に発現し、主なものはめまい、胃不快感等であった。(再審査申請時) (1)重大な副作用 1)失神・意識喪失(頻度不明):血圧低下に伴う一過性の意識喪失等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止し適切な処置を行うこと。2)肝機能障害、黄疸(頻度不明):AST(GOT)上昇、ALT(GPT)上昇、黄疸等があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には、本剤の投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。
 (2)その他の副作用

	0.1~5%未満	0.1%未満	頻度不明
精神神経系	めまい、ふらふら感	立ちくらみ、頭痛、眠気	いろいろ感
循環器		血圧低下、起立性低血圧、頻脈、動悸	不整脈
過敏症 ^{*)}		痒痒感、発疹等	尋麻疹
消化器	胃不快感	嘔気、嘔吐、口渇、便秘、胃重感、胃痛、食欲不振、下痢	
その他		鼻閉、浮腫、咽下障害、尿失禁、咽頭灼傷感、全身倦怠感	味覚異常、女性化乳房、持続勃起症

注)投与を中止すること
 ■その他の使用上の注意等については、製品添付文書をご参照ください。

前立腺肥大症の排尿障害改善剤(α_1 受容体遮断剤)

指定医薬品、要指示医薬品(注意 - 医師等の処方せん・指示により使用すること)

ハルナール[®] 0.1mg
0.2mg カプセル

塩酸タムスロシン製剤 薬価収載

製造発売元[資料請求先]山之内製薬株式会社 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町2-3-11