

第80卷第2号

平成15年

6月

## 慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

## 綜 説

- 甲状腺・副甲状腺腫に対する低侵襲性外科治療……………高見 博・池田 佳史・田島 徹吾……………(17)
- 高齢化社会における医療経済を考慮した未病対策……………都島 基夫……………(23)
- 体幹部定位放射線治療……………国枝 悦夫・武田 篤也・久保 敦司……………(33)

## 学会展望

- 第7回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会……………(37)
- 第26回慶應外科フォーラム総会抄録集……………(45)
- 慶應医学会平成14年度庶務・会計報告……………(49)

## 学位論文

- 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……………(T39)
- Phorbol myristate acetate 惹起性胃潰瘍における nuclear factor kappa B と tumor necrosis factor- $\alpha$  の役割……………竹内 哲……………(T51)
- 運動およびその中止が骨量におよぼす影響……………島村 知里……………(T63)
- 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……………(T73)
- Prostate-specific membrane antigen (PSMA) promoter/enhancer を用いた組織特異的自殺遺伝子治療……………内田 厚……………(T85)
- 全身麻酔と自律神経機能の変化—心拍変動変化からみた前投薬硫酸アトロピンと揮発性吸入麻酔薬セボフルランの影響—……………中塚 逸央 ……(T101)
- マクロファージ由来の nitric oxide による肝細胞酸化的 DNA 傷害の検討……………渡部 直行 ……(T111)
- 新生ラット摘出脳幹—脊髓標本における延髄呼吸中枢に対する橋の影響……………伊藤 洋子 ……(T123)
- 卵巣癌腹膜播種形成における MUC 1 ムチン分子の役割……………玉田 裕 ……(T133)
- ウィルムス腫瘍の WT 1 遺伝子変異と組織型および化学療法反応性に関する研究……………柴田 理恵 ……(T149)

## 号 外

- 博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第168号)……………(別頁)

綜 説

甲状腺・副甲状腺腫に対する低侵襲性外科治療

帝京大学医学部外科

高 見 博, 池 田 佳 史, 田 島 巖 吾

Key words : thyroid tumor, hyperparathyroidism, endoscopic surgery, minimally invasive surgery, intraoperative quick intact PTH assay

はじめに

低侵襲性手術 (Minimally invasive surgery) という語が一般化して久しい。患者の術後の苦痛, 愁訴を極力減らし, 退院・社会復帰を早くさせた QOL の高い, かつその結果医療費も減少させる手術をさす。そのきっかけになったのは, 外科では腹腔鏡下胆嚢摘出術である。

内分泌手術においても, 副腎手術は勿論のこと甲状腺, 副甲状腺手術でもその臨床的有用性が認知され, 脚光を浴びつつある<sup>1-6)</sup>。特に, 甲状腺・副甲状腺手術では前頸部に皮膚切開創を作製するため, 患者, 家族の QOL に対する要求も他の手術よりも大きい。

著者らは内分泌手術に関する特集を 2000 年 (54 : 1S-220S) と 2002 年 (56 : 1S-230S) の 2 回にわたり Biomedicine Pharmacotherapy に編集したので, 参照していただきたい。本稿では, 最近話題になっている低侵襲性甲状腺・副甲状腺の治療に焦点をあわせ論説する。

低侵襲性甲状腺・副甲状腺手術

低侵襲性手術は, 開放小切開手術<sup>7)</sup>, 内視鏡補助下手術<sup>8)</sup>, 完全内視鏡手術<sup>9,10)</sup>に大別される。この中で内視鏡補助下手術は開放小切開手術に近似したものが多く, ここでは開放小切開手術と完全内視鏡手術を中心に記す。

Minimally Invasive Surgical Management for Thyroid and Parathyroid Tumors  
Hiroshi Takami, MD, FACS, Yoshifumi Ikeda, MD, and Gengo Tajima, MD  
Department of Surgery, Teikyo University School of Medicine

開放小切開甲状腺手術

前頸部の大きな切開創は美容上の問題のみならず, 皮膚の知覚異常, 触覚鈍磨, 皮膚の硬結, 不快な違和感, 嚥下時の皮膚のひきつれなどをひきおこす。これらの愁訴は, 患者さんに「首に傷を作ったのだから我慢して下さい」ということで処理されてきた。しかし, 近年これらの状況に満足できない社会的風潮になってきた。

開放小切開甲状腺手術の報告は散見され, それらの術式は基本的には類似している<sup>6,8)</sup>。しかし, 著者らの方法はその中で極めて低侵襲性であると考えられる。その理由として, 第 1 に皮膚切開創は 3 cm を基本としている。第 2 に広頸筋下の皮弁を殆ど作成しない。第 3 に胸骨舌骨筋は切除しない。第 4 に甲状腺周囲の手術操作腔を最小にする, などがあげられる。状況に応じて一部, 内視鏡補助下で行うこともある。

著者らは皮膚切開創 3 cm 以下を「小切開」の定義とした。手術術式は他誌を参照されたい<sup>9)</sup>。対象は 2001 年 4 月より 2003 年 2 月までに手術した, 良性甲状腺腫 38 例 (葉切除から亜全摘), バセドウ病 10 例, 微小癌 10 例 (保存的頸部リンパ節郭清を含む) の計 58 例である (第 1 図)。良性甲状腺腫の手術時間は平均 85 分であり, 術後の反回神経麻痺, 副甲状腺機能低下症などの合併症は見られなかった。通常の方法に比べやや手術時間は長い, 術直後の疼痛, その後の頸部の愁訴は明らかに軽度であった。

甲状腺微小癌は腫瘍径 1 cm 以下と定義している。近年, 画像診断能の進歩とともに検出頻度が増加し, その手術適応が議論されつつある<sup>9,10)</sup>。手術をする場合には縮小手術をめざすわけであるため, センチネルリンパ節検出の臨床応用が考えられる。著者らは 51 例の甲状腺



第1図 バセドウ病に対する開放小切開甲状腺全摘術。  
118 gの甲状腺腫を3 cmの皮膚切開創より摘出する。

分化癌のうち48例(94.1%)にセンチネルリンパ節を検出し、sensitivity 86.7% (26/30), specificity 100% (18/18), positive predictive value (26/26), negative predictive value 91.7% (44/48)であり、4例に偽陰性がみられた<sup>11)</sup>。したがって、センチネルリンパ節の信頼性には問題を残しており、リンパ節郭清の省略化には今後の検討を要する。

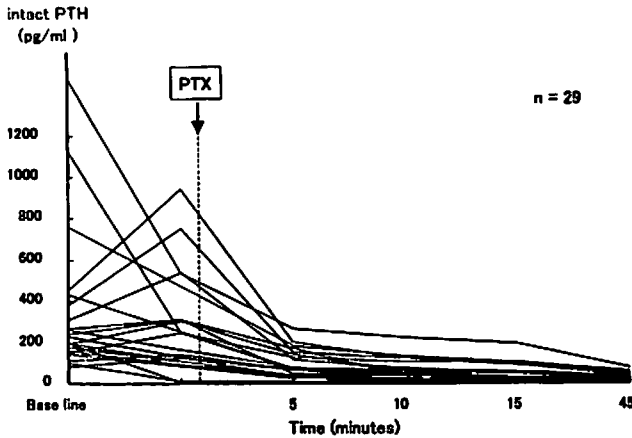
### 開放小切開副甲状腺手術

開放小切開副甲状腺手術は原発性と腎性に大別される<sup>7,12)</sup>。副甲状腺手術のこれまでのgold standardは両側頸部を検索し、副甲状腺4腺の腫大の有無を確認し、腫大腺を摘出することであった<sup>13)</sup>。しかし、近年術前の局在診断能の進歩と術中迅速 intact PTH 測定の開発により開放小切開手術が可能となった。局在診断では高解像力超音波検査とカラードップラーの改良で小さな副甲状腺腫の検出や甲状腺腫との鑑別が可能となった<sup>14,15)</sup>。

また、sestaMIBI (MIBI) シンチグラムの出現も局在診断能の向上に大きく寄与している<sup>16,17)</sup>。単発の副甲状腺腫において、鋭敏性は90%、特異性は95%-98%と考えられている<sup>17)</sup>。副甲状腺への集積はミトコンドリアが関与しているが、その他の因子もあると考えられ詳細は不詳である<sup>18)</sup>。MIBI-<sup>99m</sup>Tc サブトラクションシンチグラム、SPECT 像の併用により診断能はさらに高まる<sup>19)</sup>。しかし、原発性副甲状腺機能亢進症では2腺以上が腫大していることがあり、また500 mg以下の腫大では画像による局在診断は困難なことが多い<sup>17)</sup>。したがって、術中迅速 intact PTH 測定キットが開発され臨床的有用性が高まってきた<sup>20,21)</sup>。Intact PTHの半減期は3-4分と短く、測定時間は約10分と短いため、腫瘍摘出後、速やかに intact PTH の実測値を知り、腫瘍の完全摘出を確認できる<sup>21,22)</sup>。この測定キット(ICMA法, QuiCk-Pak System; Nichols Institute Diagnostics, CA, USA)は既存のAllegro intact PTH 測定キットと相関性は極めて高い<sup>22)</sup>。著者らは原発性副甲状腺機能亢進症31例の検索で、単腺腫29例では全例で腺腫摘出後10分で intact PTH 値は術前値の50%以下に減少し、その後45分では全例が正常域内に復した(第2図)<sup>22)</sup>。Double parathyroid carcinoma, MEN 1型症例でも intact PTH 値は腫瘍摘出により段階的に減少し、腫瘍の完全摘出後、正常域に復した。よって、本測定キットは病的副甲状腺腫が完全摘出された指標となり、必須の検査方法と考えられる。

開放小切開副甲状腺手術の手術術式は甲状腺手術に近似するが以下の点で異なる。皮膚切開は原発性では患側で2 cm、腎性では頸部中央で3 cmを原則としているが、局在診断が確実でない場合には頸部中央を切離する。頸部では側方になるほど傷の癒着はきれいになり、傷の癒着などもおこしにくい。また、副甲状腺腫は副甲状腺動静脈で栄養されているため、摘出に際しこの血管を結紮切離すると副甲状腺の被膜ごと容易に摘出される。著者らは原発性で35例、腎性で22例を小切開法で手術した。手術時間はそれぞれ、平均64分、132分であり、通常の手術より約25%長かった<sup>23,24)</sup>。しかし、術後の疼痛、不快感等は明らかに減少した。術後は血清Ca、PTH値ともに正常域にあり、嘔声などの合併症はみられず、患者の満足度は極めて高かった。

MIBIを副甲状腺手術の90-120分前に投与し、術中に微細なガンマプローブを用いて副甲状腺腫を検索する低侵襲性MIBIガイド下手術がある<sup>25)</sup>。この手術により手術時間、手術合併症、入院日数などを減少させることができる<sup>25,26)</sup>。特に、副甲状腺腫の遺残、再発による再



第2図 術中迅速 intact PTH 値の副甲状腺腫摘出後の変動 (単腺腫 29 例)。

手術症例や異所性副甲状腺腫では威力を発揮する。著者らは原発性副甲状腺機能亢進症 28 例に本術式を施行した<sup>25)</sup>。単発腺腫 26 例 (初回手術 25 例, 再手術 1 例) では 24 例がガンマプローベで局在診断された。残りの 2 例は 2 腺腫大症例であり, 腫大した 4 腺のうち 2 腺がプローベで確認された。

### 完全内視鏡甲状腺・副甲状腺手術

頭部の内視鏡手術は既存の腔のない部位に操作腔を作るため, そのアプローチの部位により特徴が大きく異なる。完全内視鏡手術には前胸部<sup>4,5)</sup>、乳腺<sup>27)</sup>、腋窩<sup>4,28)</sup>に切開創を作製する方法などがある。それぞれの術式はそれぞれの特長を有しているが, 著者らは独自に開発した前胸部法と腋窩法を行っている。

手術適応は甲状腺腫瘍では, 穿刺吸引細胞診 (ABC) で鑑別困難な濾胞性腫瘍, 大きな良性甲状腺腫, 径 1 cm 以下の微小癌, バセドウ病などである。甲状腺切除範囲は通常, 峡部までの切除とし, 側頸部のリンパ節郭清は適応としていない。副甲状腺腫では原発性の単発腺腫がよい適応であるが, 腎性症例で 4 腺摘出も可能である<sup>29)</sup>。腋窩アプローチは腋窩の径 3 cm と 5 mm の切開創をおく。前胸部法は鎖骨下 3-5 cm の部位に 3 本のトロッカー用の切開創を作る。甲状腺腫は大きいため腋窩法が適しており, 副甲状腺腫では 5 mm の切開創から摘出できる前胸部法がよい。術式は他書を参照されたい<sup>2-5, 28, 29)</sup>。著者らの開発したこれらの方法では頭部の手術操作腔は胸骨舌骨筋下層を中心に可及的小く作製しており, 大きな腫瘍でない限り胸骨舌骨筋を切離しな

い。送気圧は 4 mmHg 以下で可能であり, 術後の顔面や縦隔への皮下気腫はない。腋窩あるいは前胸部から頸部まで皮下を剥離する必要があるが, 侵襲は思いのほか少ない。良性甲状腺腫に対する腋窩法 (42 例) と前胸部 (36 例) の手術時間は, それぞれ平均 165 分, 147 分であった。単発の副甲状腺腫では腋窩法 (9 例) 平均 134 分, 前胸部法 (22 例) 91 分であった。甲状腺切除の 1 例に軽度な皮下気腫が術後 2 日目までみられたが, そのほかに術後合併症はなかった。副甲状腺機能は術後全例正常化した。低侵襲性に関しては, 術後 5 日目までの疼痛, 違和感などは開放小切開手術よりも明らかに強かった。しかし, 術後 3 ヶ月目の調査では腋窩法, 前胸部法ともに違和感, 頸部の皮膚硬結感, 知覚異常, 触覚鈍磨などの愁訴は消失した。美容上は全員, 極めて満足し, 開放小切開法よりも優れていた。

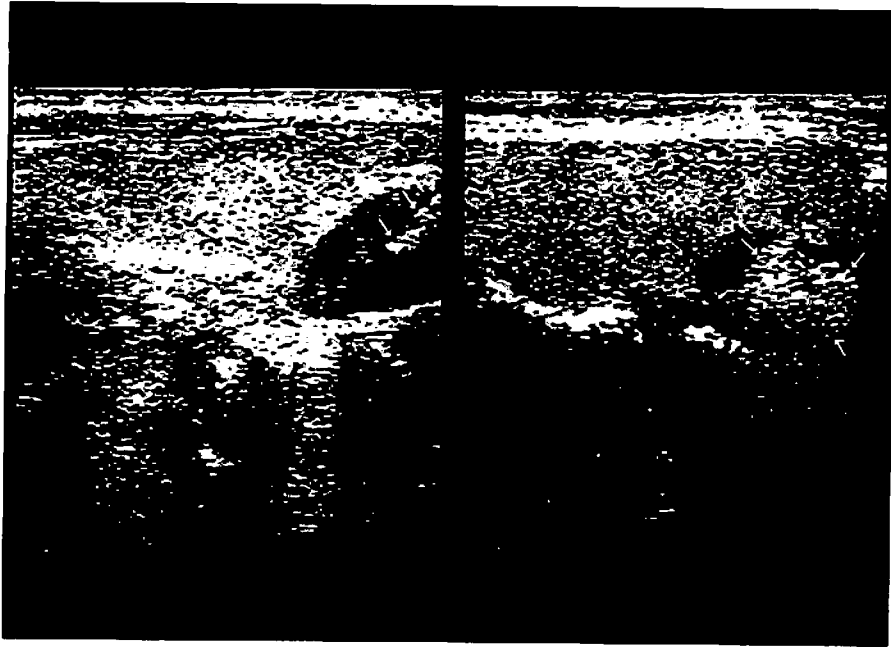
### 縦隔内副甲状腺腫に対する低侵襲性手術

正所性でない副甲状腺腫は副甲状腺機能亢進症の 7-10% の症例に見られ, 縦隔内副甲状腺腫は 1.0-2.2% の症例に存在する<sup>30)</sup>。MIBI の出現により縦隔内副甲状腺腫の局在診断は飛躍的に進歩した。

従来は胸骨縦切開や肋骨切除で行ってきた手術は侵襲の少ない胸腔鏡補助下手術にとって代わった。ガンマプローベを併用することで MIBI ガイド下手術も可能となってきた<sup>31)</sup>。手術時間は 120 分以内で施行でき, ポータブルガンマカメラやプローベを術中に用いることで腫瘍の局在を術中にさらに明確に確認できる。

### 経皮的エタノール注入療法 (PEIT)

PEIT は超音波あるいはカラードップラーを併用することで臨床的有用性が高まってきた<sup>32)</sup>。甲状腺疾患では嚢腫, 機能性甲状腺結節で主に行われてきたが, さらに適応を広げて腺腫様甲状腺腫, バセドウ病の再発, 微小癌, 乳頭癌の再発リンパ節などでも行われつつある<sup>32,33)</sup>。また, 手術不能甲状腺乳頭癌でも延命に寄与している報告がある<sup>34)</sup>。Fukunari は PEIT を施行した 2323 症例のうち, 1989 症例 (85.6%) が効果を示したという<sup>32)</sup>。恒久的嘔声, 頑固な疼痛などの手術合併症はみられなかった。必要最小限度のエタノール注入量を決めるのにカラードップラーが有用であるという。また, PEIT は熟練した術者が行うべきであり, 甲状腺被膜からのエタノールの濾出には注意すべきである<sup>35)</sup>。良性甲状腺腫においてはサイロキシン抑制療法との効果の比較が興味ある。こ



第3図 原発性副甲状腺機能亢進症の単腺腫に対する PEIT. 左図は腺腫に針(矢印)を穿刺している. 右図はエタノール注入後, 腺腫が大部分壊死化した(矢印).

の優劣は明確にされていないが, 単発の PEIT 療法で 50%以下の症例で臨床的満足度が得られ, 一方サイロキシン抑制療法では患者の主観的満足度が得られたという報告がある<sup>36)</sup>.

副甲状腺機能亢進症では, 原発性, 腎性ともにその有用性には限界があるという<sup>37,38)</sup>. その主な適応は, 併存症があり, 再手術による合併症が考えられ, 単発が腫大した症例である<sup>37)</sup>. PEIT の効果と安全性は症例によりかなり異なるが, PEIT により単発の大きな副甲状腺腫を完全に壊死に陥らせるのは困難であり, 長期的な効果には限界があるという. 著者らは PEIT 症例の適応は厳格にしており, 併存症のため手術不能症例と本人・家族が強く希望する場合に限っている(第3図). PEIT を繰り返し施行した後の副甲状腺摘出は反回神経麻痺の可能性が高まる.

### おわりに

進行した症例でない限り, 低侵襲を念頭にいたれた外科的治療が著者らの治療概念である. 今後は医療器具の進歩とともに, 手術以外に PEIT の延長線上に発展した熱凝固療法, 凍結融解壊死療法など新しいアプローチも開発されていかなければならない.

### 文 献

- 1) Gagner M, Lacroix A, Bolte E : Laparoscopic adrenalectomy in Cushing's syndrome and pheochromocytoma. *N Engl J Med* 327 : 1033, 1992
- 2) Takami H, Ikeda Y : Endoscopic thyroidectomy via an axillary and anterior chest approach. *Minimally Invasive Endocrine Surgery*. (Ed) Inaabnet WB, Gagner M, Lippincott Williams and Wilkens, Philadelphia, p56-63, 2001
- 3) Takami H, Ikeda Y : Minimally invasive thyroidectomy. *ANZ J Surg* 72 : 841-842, 2002
- 4) Ikeda Y, Takami H, Sasaki Y, Kan S, Niimi M : Endoscopic neck surgery by the axillary approach. *J Am Coll Surg* 191 : 227-234, 2000
- 5) Ikeda Y, Takami H : Endoscopic parathyroidectomy. *Biomed Pharmacother* 54 : 52-56, 2000
- 6) Miccoli P, Berti P, Conte M, Materazzi G, Galleri D : Minimally invasive video-assisted thyroidectomy. *Am J Surg* 181 : 567-570, 2001
- 7) Udelsman R, Donovan PI, Sokoll LJ : One hundred consecutive minimally invasive parathyroid explorations. *Ann Surg* 232 : 331-339, 2000
- 8) Bellantone R, Lombardi CP, Rubino F, Boscherini M, Perilli W : Minimally invasive, totally gasless video-assisted thyroidlobectomy. *Am J Surg* 177 : 342-343, 1999
- 9) 高見 博 : 甲状腺腫瘍, 生涯教育シリーズ 59. 内分泌疾患診療マニュアル (関原久彦, 高見 博, 西川哲男, 藤枝憲二, 金澤康徳, 村瀬敏郎編集). 日本医師会,

- s198-s193, 2002
- 10) 高見 博, 池田佳史: 腫瘍性病変(良性・悪性)の治療方針の基本, 甲状腺疾患治療マニュアル(高見 博, 森昌明編集). 南江堂, p.82-85, 2002
  - 11) Takami H, Sasaki K, Ikeda Y, Tajima G, Kameyama K: Sentinel lymph node biopsy in patients with thyroid carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 56: 83s-87s, 2002
  - 12) Howe JR: Minimally invasive parathyroid surgery. *Surg Clin North Am*, 80: 1399-1426, 2000
  - 13) Sosa JA, Powe NR, Levine MA, Udelsman R, Zeiger MA: Thresholds for surgery and surgical outcomes for patients with primary hyperparathyroidism: a national survey of endocrine surgeons. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2658-2665, 1998
  - 14) Fukunari N: PEI therapy for thyroid lesions. *Biomed Pharmacother* 56: 79s-82s, 2002
  - 15) Karstrup S, Hegedus L, Holm HH: Ultrasonically guided chemical parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism: a follow-up study. *Clin Endocrinol*, 38: 523-530, 1993
  - 16) Taillefer R, Boucher Y, Potvin C, Lambert R: Detection and localization of parathyroid adenomas in patients with hyperparathyroidism using a single radionuclide imaging procedure with technetium-99m-sestamibi(double-phase study). *J Nucl Med* 33: 1801-1807, 1992
  - 17) Takami H, Oshima M, Sugawara I, Satake S, Ikeda Y, Nakamura K, Kubo A: Pre-operative localization and tissue uptake study in parathyroid imaging with technetium-99m-sestamibi. *ANZ J Surg* 69: 629-631, 1999
  - 18) Satake S, Sugawara I, Watanabe M, Takami H: Lack of a point mutation of human DNA topoisomerase 2 in multidrug-resistant anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Letters* 116: 33-39, 1997
  - 19) McBiles M, Lambert AT, Cote MG, Kim SY: Sestamibi parathyroid imaging. *Semin Nucl Med*, 25: 221-234, 1995
  - 20) Skoll LJ, Drew H, Udelsman R: Intraoperative parathyroid hormone analysis: a study of 200 consecutive cases. *Clin Chem* 46: 1662-1668, 2000
  - 21) Irvin GL, Molinari AS, Figueroa C, Carneiro DM: Improved success rate in reoperative parathyroidectomy with intraoperative PTH assay. *Ann Surg* 229: 874-879, 1999
  - 22) Takami H, Sasaki Y, Ikeda Y, Tajima G: Intraoperative quick parathyroid hormone assay in the surgical management of hyperparathyroidism. *Biomed Pharmacother* 56: 26s-30s, 2002
  - 23) Takami H, Satake S, Nakamura K, Kudo A: Technetium 99m sestamibi scan is the useful procedure to locate parathyroid adenomas before surgery. *Am J Surg* 172: 93, 1996
  - 24) Takami H: Surgical management of hyperparathyroidism in view of a reliable parathyroid adenoma localization test. *Surgery* 122: 120, 1997
  - 25) Takami H, Takayama J, Ikeda Y, Tajima G: Minimally invasive radioguided parathyroidectomy. *Biomed Pharmacother* 56: 37s-40s, 2002
  - 26) Norman J, Jaffray CE, Chheda H: The false-positive parathyroid sestamibi. *Ann Surg* 231: 31-37, 2000
  - 27) Ohgami M, Ishii S, Arisawa Y, Ohmori T, Noga K, Furukawa T, Kitajima M: Scarless endoscopic thyroidectomy: breast approach for better cosmesis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 10: 1-4, 2000
  - 28) Ikeda Y, Takami H, Niimi M, Sasaki Y: Endoscopic thyroidectomy by the axillary approach. *Surg Endosc*, 15: 1362-1364, 2001
  - 29) Ikeda Y, Takami H, Niimi M, Sasaki Y: Endoscopic total parathyroidectomy by the anterior chest approach for renal hyperparathyroidism. *Surg Endosc* 16: 320-322, 2002
  - 30) Prinz RA, Lonchina V, Carnaille B, Wurtz A, Proye C: Thoracoscopic excision of enlarged mediastinal parathyroid glands. *Surgery* 116: 999-1005, 1994
  - 31) Norman J, Denham D: Minimally invasive radioguided parathyroidectomy in the preoperative neck. *Surgery* 124: 1088-1093, 1998
  - 32) Fukunari N: The role of ultrasonography and color doppler sonography in the diagnosis of thyroid disease. *Thyroidal Clin Exp* 10: 97-101, 1998
  - 33) Bennedbaek FK, Hegedus L: Percutaneous ethanol injection therapy in benign solitary solid cold thyroid nodules: a randomized trial comparing one injection with three injections. *Thyroid* 9: 225-234, 1999
  - 34) Nagasawa M, Iino Y, Yokoe T, Takei H, Maemura M, Horoguchi J, Horii Y, Matumoto H, Morishita Y: Percutaneous ethanol injection therapy for patients with inoperable thyroid papillary cancer: a report of two cases. *Int J Clin Oncol* 5: 584-287, 2000
  - 35) Monzani F, Caraccio N, Basolo F, Lacconi P, LiVolsi V, Miccoli P: Surgical and pathological changes after percutaneous ethanol injection therapy of thyroid nodules. *Thyroid* 12: 1087-1092, 2000
  - 36) Bennedbaek FN, Nielsen LK, Hegedus L: Effect of percutaneous ethanol injection therapy versus suppressive doses of L-thyroxine on benign solitary solid cold thyroid nodules: A randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 83: 830-835, 1998
  - 37) Harman CR, Grant C S, Hay I D, Hurley DL, vanHeerden JA, Thompson, GB, Reading CC, Charboneau JW: Indications, technique, and efficacy of alcohol injection of enlarged parathyroid glands in patients with primary hyperparathyroidism. *Surgery* 12: 1011-1020, 1998
  - 38) Karstrup S, Hegedus L, Holm HH: Acute change in parathyroid function in primary hyperparathyroidism following ultrasonically guided ethanol injection into solitary parathyroid adenomas. *Acta Endocrinol* 129: 377-380, 1993

綜 説

## 高齢化社会における医療経済を考慮した未病対策

慶應義塾大学  
伊勢慶応病院内科  
都 島 基 夫

Key words: 高齢化社会, 未病, 医療経済, 早期動脈硬化, 高脂血症

### はじめに

#### —健康寿命と日本未病システム学会の設立—

4千年の豊富な経験に基づく中国の医薬学の理論大系のなかで、疾病の予防が重要であることを記述した「未病思想」がある。黄帝内経では“聖人は既病を治さずして、未病を治す”と疾病の一次予防を重視する思想がみられる。未病対策としての侵襲の防御だけでなく、身体自身の生きる力を賦活させることがさらに重要であり、現代に翻訳すれば食養生、運動療法、禁煙などの健康維持増進の重要性が認識されていた<sup>1)</sup>。

循環器領域では脳梗塞、心筋梗塞などを発症すれば、壊死に陥ちいった臓器や細胞の機能は生涯にわたり欠損症状となって、quality of life (QOL) は侵されて介護が必要となる場合が多くみられる。最近、何歳まで元気で暮らせるか健康な期間を示す「健康寿命」という言葉が使われる。これも日本が世界一で男性が71.9歳、女性が77.2歳、平均すると74.5歳で、豪73.2歳、仏73.1歳と続く。2002年度の日本人の平均寿命が男性が78.1歳、女性が84.9歳である。この寿命と健康寿命の差が男性が6.2年、女性が7.7年あり、平均的にこの期間は病を患って治療をうけた後死に至ることになる。この病気の期間をびんぴん元気に過ごせたら、医療費が節約できて少子化した若い人たちの負担を減らすことができる。健康である経済効果を計算し、医療システムを改築する構想を考え、超高齢にいたってコロリンと大往生を迎える社会作りをすることを目的として、筆者らは日本未病システム学会を結成した。学会の前身は曲直部寿夫、尾前照雄元国立循環器病センター総長を会長、筆者が事務局局長、学術委員長として北京で2度(1992, 1996年)、大阪で1度(1994年)開催した3回の中西医結合動脈

硬化症血栓症一次予防国際シンポジウムと福生吉裕日本医大助教授、大内尉義東大教授らが中心となり、東京で1994年から96年にわたり3回開催した東京未病研究会で、これが合体して1997年に大阪で筆者が会長となり日本未病システム学会(第4回)として誕生した(第1図)。この学会でのテーマは「介護より前に未病対策あり」「長寿を幸せと感じる社会作り」であった<sup>2)</sup>。

### 未病とは

#### —主として循環器病の制圧と高齢者治療の視点から—

動脈硬化は生後すぐからはじまり長い経過をとり、徐々に、時には急激に進行する「沈黙の病氣」である。心血管病は臓器の予備能がなくなった時点、すなわち動脈では平均的には血管内腔が75%に狭窄した状態になると労作性狭心症などの虚血症状があらわれ、これは動脈硬化の末期症状と位置づけることができる。

老化は長年身体を使用している間、炎症などの侵襲や細胞の老化、動脈硬化などのために各臓器のもつ予備能が残り少なくなって安全域が狭くなった状態で、小さな侵襲でも予備能の少ない臓器に異常をきたし、連鎖反動的に多臓器疾患となるケースも多い。21世紀の高齢化少子化社会においては個人の健康管理を含む未病対策が医療費を節減して、医療の荒廃を救う。税に等しい介護費用や病氣になって働けなくなった患者自身の収入減、患者家族による世話を含めると、QOLを損なう状態になる前に行う未病対策は広い観点での医療経済の苦境を救うことになる。

病氣は環境と体質の相互の関与があり、遺伝子診断も現実のものになった<sup>3)</sup>。

未病医学については(1)体質や環境を含めたリスクファクターの解明、(2)病態の把握や診断、(3)発症を

# 第4回日本未病システム学会

## プログラム・抄録集

介護より前に未病対策  
長寿を幸福と感ずる社会づくり

とき 1997年11月29日(土)

ところ 大阪千里ライフサイエンスセンター5階ライフホール  
地下鉄御堂筋線(北大阪急行)千里中央駅下車 徒歩2分

疾病予防と  
医療経済を考える。  
上医は病になる前の  
未病を治す。



未病



病気



学会事務局  
〒565 大阪府吹田市藤白台5-7-1  
国立循環器病センター内科 都島基夫 気村  
TEL: 06-633-6012 (Ext 2107)  
FAX: 06-672-7486

日程 11月29日(土) 午前8時30分～午後5時  
場所 大阪 千里ライフサイエンスセンター5階 ライフホール  
3.00 会場  
講義挨拶

8:30～8:57 ワークショップ1 座長 国立循環器病センター-研究所 新見英中  
「リスクファクターと動脈硬化」  
(1) ライフスタイル改善による肥満および関連疾患の予防 東京慈恵医大健康医学センター 和田高士  
(2) インスリン抵抗性と動脈硬化 国立循環器病センター-内科 榎木正昭  
(3) 超音波法による動脈硬化診断 東京慈恵医大健康医学センター 和田高士

8:57～9:24 ワークショップ2 座長 慶應義塾大学医学部老年科 広藤信雄  
「未病における遺伝子診断」  
(1) 動脈硬化の成因における環境因子と遺伝子発現の寄与について  
—三重県紀勢町における動脈硬化の疫学的研究— 慶應義塾大学内科 中野弘美  
(2) ヒト外因系遺伝子インヒビター (TPI) 遺伝子のプロモーター  
領域の遺伝子多型 (C-397T) は血液中TFPIレベルに影響せず、  
静脈血栓症の発症と関係しない。 国立循環器病センター-病因部 加藤久雄  
(3) 骨髄異形成症候群と非小細胞性肺癌を発生し分子生物学的に  
Glutathione S-transferase (GST)1とGSTM1欠損を認めた  
一例 慶應義塾大学医学部老年科 山村 寛

9:24～9:51 ワークショップ3 座長 東京大学医学部地域看護学 金川克子  
「未病の看護および未病の意識」  
(1) 未病と看護 国立循環器病センター-看護部 上條英代子  
(2) 東洋医学における未病(亚健康)の現代医学的意義 位置医科大医学部精神医学 成市昌士  
(3) 東洋医学による未病(亚健康)の診断と治療(パイロット研究)  
位置医科大医学部精神医学 成市昌士

9:51～12:15 シンポジウム 座長 広島大学医学部第一内科教授 眞山格  
名古屋大学医学部第三内科教授 堀田 慎

### 未病の診断と予防治療

- (1) ライフスタイル診断と疾病予防 大阪大環境医学 森本孝良
- (2) 妊娠負荷時の未病の診断 大阪府母子総合医療センター 木戸口公一
- (3) 先天性ビタミンE欠乏症の分子機構 東京大薬学部 新井洋由
- (4) 血清 Helicobacter pylori 抗体と血清ペプシノゲン値による  
胃癌のリスクの評価 広島大一内 清田博重
- (5) 血管と未病—大豆蛋白質の重要性— 弘大二内 金澤武雄
- (6) 骨髄腫の遺伝的因子に関する検討 東京大老年科 藤井孝之
- (7) ホルモン補充療法の効果と副作用 日生病院婦人科 廣田恵二
- (8) 75%MT-病の遺伝子診断と発症危険因子 大阪大精神医学 成田雅俊
- (9) 未病としての糖尿病 名古屋大三内 洪 尚徳

第1図 第4回日本未病システム学会のプログラム

未然に防ぐ食事や運動療法をも含めた予防治療法の開発と実施、(4)発症したものは、機能の回復・維持・再発予防などがある。最近示された高脂血症や高血圧や糖尿病などの治療指針は、QOLの維持する健康管理の指針でもある<sup>4)</sup>。特に高齢者においては、若年者と同様のマニュアルに基づく画一的治療を行えば、たとえば、脱水による脳梗塞や喀痰による閉塞と、心臓各弁の狭窄や閉鎖不全や心・腎機能低下をもつ老人におこりやすい水の行き過ぎによる心不全とは紙一重であり、心不全が軽快しても脳梗塞を引き起こす事例は多い。この思わぬ合併症により、事後の医療費や介護費、家族の行動範囲が狭められるなどの経済的、精神的負担は莫大なものとなる。老年医学はまさに未病医学であり、若年、中年、初老期の患者に対するマニュアルに基づく治療とは異なり、個人にあったオーダーメイド医療をする必要が生じる。

### 未病と病気

病気と健康の間に未病という概念が入ることにより、何を未病とし、病気との境界をどこにおくかが問題になる(第2図)。未病は、(1)症状があっても検査データに異常がないもの、(2)検査データに異常があっても症状がないもの、という診断基準が示されている<sup>5)</sup>。前者は東洋医学的未病であり、西洋医学的未病に入れてよいか疑義が残る。患者は症状があれば気分が悪くQOLを損ない医師の元に来る。検査に異常がないことは、検査がそこまで発達していないか、手持ちの検査機器で見つからないか、精神的な異常であることを意味する。筆者は症状があれば病気として扱って検査を進めていくべきと考える。一方、後者は未病として診ていくべきである。なかでも、高脂血症や高血圧やまだ合併症のない軽症糖尿病は症状がなく、QOLも保持されており未病の概念にはいる。医師法上は病気と扱っているので医師の指示に基づき検査や治療を行い、保険医療で認められた薬物



一般公開フォーラム  
「明日の医療を求めて～高齢化社会における医療経済と未病の役割～」  
大阪府医師会生涯教育研修指定（加府県医師会会員も単位取得できます）

13:00～13:27	ワークショップ 4	田島 宮崎県立日南病院	上田正人
「骨粗鬆症一診察」			
(1) 尿中カルシウムは骨粗鬆症発症にどこまでせまられるか ～骨粗鬆症検診における通知書の骨吸収マーカー 国立療養所兵庫中央病院 嶋谷茂樹			
(2) 骨由来活性骨形成性因子（OPG）と活性骨形成因子（RANKL）の関与 とその意義 ファルコバイオシステムズ研究所 中西 守			
(3) 骨粗鬆症早期診断と予防におけるTfR-APC測定の意義 日本女子大食物 丸山千寿子			
13:27～13:54	ワークショップ 5	田島 京都大学大学院 人間・環境学研究所 家森孝男	
「骨粗鬆症一診察」			
(1) 骨粗鬆症検診システムに関する検討 東京大学医学部老年病科学 星野真二郎			
(2) 骨粗鬆症に関する生化学的医学研究 京都大学大学院人間・環境学研究所 星野真二郎			
(3) 高脂血症患者における血清脂質、血中尿酸値、および 尿酸値と動脈硬化の進展への大豆たんぱく長期摂取の影響 ～牛乳栄養との比較 市立島田市民病院 島 昌子			
14:00～14:20	会長講演	田島 京都大学医学部老年病科学教授	大内昭典
未病としての動脈硬化～動脈硬化早期診断とリスクファクター 国立循環器病センター動脈硬化代謝内科 島崎基夫			
14:20～14:50	招待講演	田島 WHO糖尿病協力センター名誉所長	赤澤好彦
これからの日本経済と医療 長崎総合研究所理事長 竹内 空			
14:50～15:20	特別講演	田島 国立循環器病センター名誉所長	尾崎保雄
保険医療の問題点 とくにDRGについて 東海大学名誉教授 島崎基夫			
15:20～17:00	フォーラム	田島 日本医科大学第二内科助教授	堀生吉博
ホノルル国際コレリ理事長 鈴木啓孔			

医療経済と未病

(1) 糖尿病予防における cost efficacy	ビーエフ研究所 河田 聡
(2) これからの保健医療「健康日本21」	国立公衆衛生院院長 古市圭治
(3) 生活習慣病(成人病)対策の推進	神奈川大学「リ」事典編集委員 成瀬謙寿
(4) スポーツと医療経済	セントラルスポーツ社長 後藤忠治

が適応となる。血糖、脂質、血圧を低下させる特定機能食品、あるいは保険適応外の大衆薬として販売されている薬物のなかには、効果がほとんどないものから医療用薬品として開発されて、開発費用の手当てができないなどの理由で大衆薬にした効果の強いものまで種々の段階がある。高血圧でも糖尿病でも、合併症を防御するために、どの医師も厳密治療（strict control）をめざしており、よく効く健康食品や大衆薬が加わることにより、

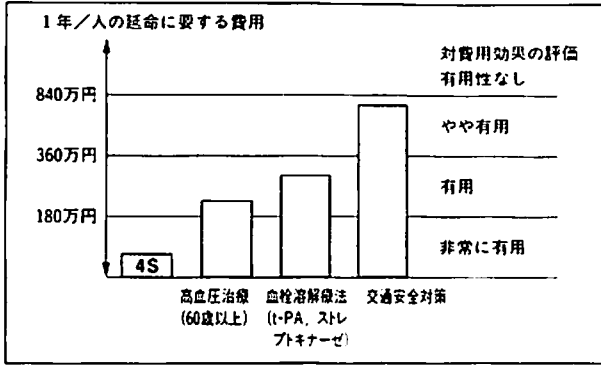
自覚症状なし	自覚症状なし 検査所見の異常あり	自覚症状あり 他覚的所見あり
健康 検査所見の異常 の指摘なし	高血圧 糖尿病 高脂血症 肥満 脂肪肝 習慣性喫煙 生活習慣に起因する異常	生活習慣病 脳梗塞 心筋梗塞 悪性腫瘍 糖尿病性細小血管症 骨折 腎臓病 症状出現後の生活習慣病
高齢 家族歴	生活習慣の異常あり 感染（ピロリ菌/HCV等） その他の検査所見異常 遺伝子異常あり	肝炎 その他の疾患
未病		

第2図 未病の図

低血糖や血圧の下がり過ぎにともなう事故が高血糖や血圧上昇よりも問題になる。院外処方箋薬局で薬剤師にほかの大衆薬や食品を勧められたと話す患者がいるが、これは患者の治療に混乱を招くだけでなく、重大な合併症を発生させる可能性がある。日本未病システム学会ではこうした事案も含めた幅広い研修により、各医療分野間調整と責任範囲も含めた医療と未病対策の知識を持つ未病認定指導士を育成する方向を検討している。全国に介護やリハビリや情報網が充実した未病センターを設立する構想も広がっている。市民公開講座である「未病フォーラム」や「食と健康フォーラム」による市民啓蒙運動を展開している。社会全体としてみんなが、QOLを保ち、死の直前まで元気で、経済的にもできるだけ他人に迷惑をかけないよう健康保持するのは当然であるという、主治医は自分という社会通念を広げることが必要である。

### 未病対策と医療経済効果

久山町研究では、経時的に肥満や高コレステロール血症や耐糖能異常が増え、高血圧や喫煙者が減る傾向を示した<sup>6)</sup>。また、糖尿病の医療費はもっとも伸びが著しく、大石ら<sup>7)</sup>によると糖尿病の医療費の伸び率は94年度は8739億円で79年度の4.4倍と他の疾患の伸び率と比べもっとも高い。これは糖尿病性腎症から腎不全になって透析に入る患者が多いのも一因で、糖尿病の合併症のないものでは1年間23万円に対し、合併症があれば44万円と約1.9倍になっていた。澤田ら<sup>8)</sup>の試算では国立循環器病センターに入院した3000人余の脳卒中発症者の急性期、慢性期の治療費、介護費などで、平均5年間に要した諸経費は個人あたり1000万円以上で、70%は介護費用であり、重症度により差が見られた。PREVENT (Prospective Randomised Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial) では長時間作用型Ca拮抗薬アムロジピンを冠動脈疾患を証明された417人に投与して治療し、対照のプラセボ群408人と3年間比較した試験である。治療群で不安定狭心症が35%、PTCA/CABGが43%減少し、エンドポイントとしては36ヶ月で31%減少させることができた。アムロジピン投与により冠動脈疾患患者100人あたり27.9人のイベントが回避され、426,462ドル、入院費用は1人あたり628ドル節約できた<sup>9)</sup>。高脂血症の冠動脈疾患患者4,444人をシンバスタチン投与群とプラセボ群に分けて5.4年(440人の死亡確認まで)の経過を見た検討では、治療群で総コレステロール値は約25%低下し、総死亡率は30%減少し、その減少は冠動脈疾患に



第3図 コストエフィカシー

よるものであった。冠動脈のイベントは34%、血行再建術を必要としたものは37%減少した。cost effectiveness (費用効果)の面では、入院費はプラセボ群で6.0億円、シンバスタチン群で4.1億円とシンバスタチン群で32%低く抑えられた(第3図)。これは、1人の患者を1年間延命させるために必要とされる費用が、約63-74万円となる<sup>10)</sup>。後藤らは運動をすることの経済効果を考察し、1)フィットネスルーム利用社員では(平均年齢40.1歳)一定期間後の平均体力年齢は30~34

歳となり、2)全社員を対象にフィットネスルームを利用頻度が高いC群は低いA群より病欠が年間で1.7日少なかった。これをGDP(国内総生産)との関係でみると、単純にみて労働者1人当たりの生産額は年間722万円、1日19,800円となり、1日病欠すると19,800円の生産ダウンとなる。3)業務成績と運動の関係については1週間2回以上運動をしている社員の業務成績評価平均以下が、10.9%と運動していない社員(21.4%)の半分である。さらに4)定期的に運動を実施している者としていない者との年間医療費請求額の差は男性では年間55,000円、女性では112,000円と運動を実施していない者の医療費が多くなっており、スポーツが健康に及ぼす効果が大きいことが示された<sup>11)</sup>。

### 循環器領域における未病診断とその管理

「無症状で進む未病としての動脈硬化」は動脈硬化性心血管病発症の温床である。(1)心血管病ではリスクファクターを明らかにし、その治療により動脈硬化の進行を止める、(2)症状が出現する前の病態を把握して、予防治療の必要性や治療法の選択を行う、(3)不安定プラー

第1表 心血管病の予防の観点からみた動脈硬化の診断モニター

1) 冠危険因子検査	
(1) 年齢, (2) 性, (3) 家族歴, (4) 高脂血症 [高LDL-C血症, 高Lp(a)血症, 高レムナント血症, small dense LDL, 低HDL-C血症等], (5) 高血圧, (6) 糖尿病, (7) 肥満 (insulin 抵抗性), (8) 習慣性喫煙, (9) 高尿酸血症, (10) 多血症, (11) 高フィブリノゲン血症, (12) 血小板凝集亢進, (13) 線溶低下(高PAI-1), (14) 高homocysteine血症, (15) 高CRP, 炎症指標の高値等	
2) 非侵襲画像診断 <診断の目的>	[正常範囲]
(1) 眼底: 細動脈硬化, 高血圧性変化, 糖尿病性網膜症	[変化なし]
(2) 単純XP: 大動脈弓の突出, 胸腹部の動脈の石灰化, 蛇行, 拡張, 大動脈弓部横径/横膈膜部胸郭横径	
(3) X線CT: 石灰化率, 壁肥厚狭窄率, 壁肥厚石灰化狭窄率 動脈瘤, 壁肥厚石灰化狭窄率	[ACI<20% SCI<10%]
(4) MRI: 壁肥厚狭窄, 潰瘍形成, 動脈瘤, MRアンギオ	[所見なし]
(5) 超音波断層: 壁肥厚, プラークの数, 広がり, 厚さ, 潰瘍, 狭窄率	[総頸動脈IMC-T<1mm, 内外頸動脈分岐部 plaque (-)]
(6) カラードプラー: 血流状態, 狭窄	
(7) RIアンギオ: 臓器, 血管の血流分布,	
(8) RIシンチグラム: 血流分布, 血小板の血管壁での活性(血小板シンチ)	
(9) サーモグラフィー: 血流に伴う温度分布	
(10) DSA: 狭窄, 閉塞, 蛇行, 拡張, 壁不整	
(11) ゼララジオグラフィー: メンケベルグ型石灰化, FHアキレス腱厚(XPにて<8mm)	
3) 生理機能検査(血管物性, 血流動態)	
(1) 脈波伝播速度(PWV): 大動脈等の血管物性の硬化性変化, sclerosis	[大動脈PWV<9.0m/sec ankle-brachial PWV<1.5m/sec]
(2) stiffness parameter β(超音波変位法): 頸, 大動脈等の血管機能, sclerosisの評価	[β<13.0]
(3) 超音波定量的脳血流測定: 血流速, 血管径, 容積弾性率, 血管抵抗 [頸動脈血流量>6.4m/s, 血流速>12cm/s]	
(4) Transcranial doppler法: 頭蓋内血流計測	
(5) 脈波, 加速度脈波: 指尖脈波等の血管壁特性, 血液流動性	
(6) Ankle Brachial Pressure Index: 閉塞性動脈硬化症, atherosclerosisの診断	[ABI>0.8]

クを安定化して、血管攣縮やプラークの破綻による出血、血栓の形成を防御して梗塞の発症を未然に防ぐ。(4)動脈硬化性心血管病を発症したものは、リハビリテーションで機能を回復し維持すると同時に、強力な予防治療を行い、再発予防を図る。特に、動脈硬化や病気で心房細動や糖尿病性微小血管症といった多くの病態が循環器未病の対象となりうる。

### 1. 早期動脈硬化の臨床モニタリング

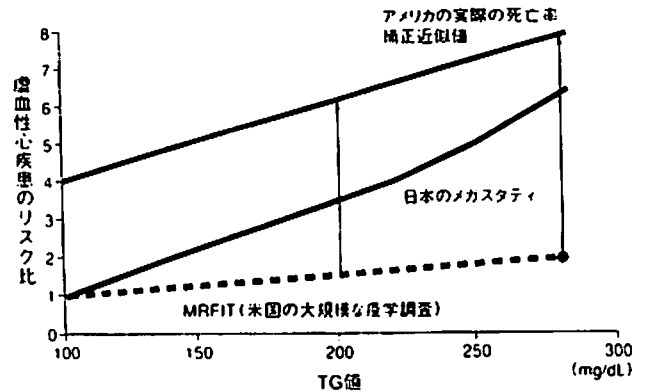
(1)動脈硬化を進行させる疾病因子の有無をあきらかにする。(2)心血管病の家族歴、年齢等のリスクファクターを調べ、その成因となる習慣性喫煙、多飲、運動不足、過食などの生活習慣を知る。従来の成績を参照して動脈硬化の進展度を推定する。70歳を越える高齢者も未病状態に位置する。(3)近年、遺伝子診断がなされるようになった。遺伝子欠損症は大きな異常が出現する可能性が高く、生活習慣は正だけでは症状の発症を止めることができない場合が多いが、生活習慣病関連の遺伝子多型の異型性に関しては未病として位置づけて予防対策を講じることが可能である<sup>3)</sup>。(4)リスクファクターが集積するシンドローム X、死の四重奏、インスリン抵抗性症候群、内臓肥満症候群などのリスクファクター集積症候群が注目されている(第1表)。

高脂血症、高血圧などのメジャーリスクファクターの治療を行った多数のメカスターでは、虚血性心疾患の一次予防や二次予防はプラセボ群と比較して、実薬により30~40%の発症は減少させられる。しかし、残りの60%以上ではイベントを阻止できなかった<sup>9,10)</sup>。これは、加齢の影響のほか、ホモシステイン、炎症反応<sup>10)</sup>などの新しいリスクファクターの存在を考える必要がある。さらに、凝固亢進、線溶低下、血小板の活性化などが生じ、種々の凝固線溶マーカーが異常を示す。

客観的に無症候の動脈硬化の存在を疑う臨床所見として、(1)角膜輪、特に比較的若年者の鮮明な角膜輪、(2)家族性高コレステロール血症では腱黄色腫の一種、アキレス腱の肥厚が診断の決めてであり、アキレス腱が厚いほど動脈硬化の進展度は強く、虚血性心疾患の危険度は増す。(3)眼瞼黄色腫、結節性黄色腫の存在、(4)触診で脈拍の硬さや左右差、触知不良や聴診上の血管雑音をみる。(5)狭心症や一過性脳虚血発作、椎骨脳底動脈循環不全、間欠性跛行などの虚血にともなう症状は、進行した動脈硬化の存在する可能性が高い。

### 2. 食後高脂血症

このことについては既に、慶應医学、動脈硬化に報告

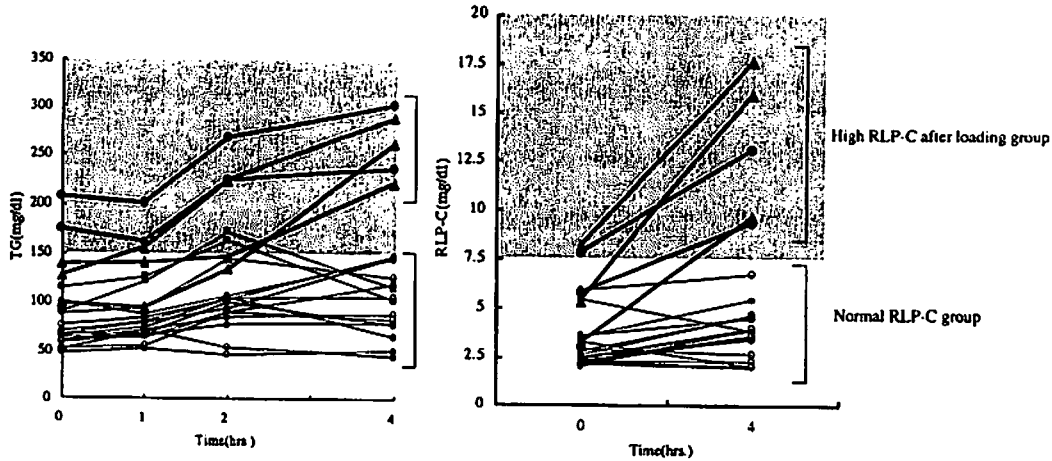


第4図 高脂血症による動脈硬化性疾患の発症のリスク比

した<sup>12,13)</sup>ので参照されたい。日本における過去の prospective study<sup>14~19)</sup>のメタアナリシスから、TCの上昇に伴う冠動脈疾患の相対危険率は欧米<sup>20)</sup>と同じ上昇カーブを示した。これに対して、TGの上昇に伴う虚血性心疾患の発症率の相対危険率は、TGが100 mg/dlを1とすると、250 mg/dlになると米国で1.7と比べて、日本人では5と急峻な上昇カーブとなり、日本人ではTGの上昇が虚血性心疾患を引き起こしやすい。日本人の虚血性心疾患による実質的死亡率が欧米の約1/4~5であるので、TG 250 mg/dl以上では実質では欧米と変わらない発症率となるが、TGが低い部分に日米間の差がみられる<sup>14)</sup>(第4図)。

これは、TG 100mg/dl前後の正常者に脂肪負荷試験を行って、冠動脈有意狭窄群と有意狭窄のない対照群とを比較した成績<sup>21)</sup>で、負荷後4~8時間のTG値が有意狭窄群では対照群に比して有意に高値であり、前値に戻るのに時間がかかる。空腹時TG値が正常であっても、食後高脂血症の例に虚血性心疾患の危険性が高い。筆者らも住民を対象にクロワッサン1個に匹敵する30gバター負荷+牛乳食で、レムナントやIDLをふくむ remnant like particles (RLP) 中の RLP-C や RLP-TG の増加、small dense LDL が脂肪負荷前や特に負荷後に著明に観察できた<sup>13)</sup>(第5図)。TG値が100 mg/dl前後でも脂肪エネルギー比や単糖類摂取量が多い欧米では、3食摂取する日中から夜にかけては食後高脂血症が持続しやすい。食後高脂血症を示すものでは、small dense LDL や高インスリン血症が合併する。虚血性心疾患の発症の日米間の差は、(1)TGの低い人達の間での発症率の差、および(2)肥満や高TG血症の頻度の差に基づくと考えられる。日常診療においてTG値が正常であっても食後2時間のTG値やRLP-C値やリポ蛋白電気泳動を測定して、食後高脂血症の有無をチェックする

- : RLP-C level  $\geq 7.5$  mg/dl in 4 hrs after Kisei-meal loading and TG level  $\geq 150$  mg/dl in fasting state.
- ▲: RLP-C level  $\geq 7.5$  mg/dl in 4 hrs after Kisei-meal loading and TG level  $< 150$  mg/dl in fasting state and  $\geq 150$  mg/dl in 4 hrs after loading.
- : RLP-C level  $< 7.5$  mg/dl and TG level  $< 150$  mg/dl in fasting state and after Kisei-meal loading.



第5図 RLP-Cの食後負荷の図

ことが必要である。脂肪摂取率の高い日系米人での虚血性心疾患の発症率は日本人の2~3倍となっており、その成因として肥満や高TG血症が多いことがある。疫学調査では、本邦においても脂肪、コレステロールの摂取量が増えており、脂肪エネルギー比が全国平均で25%を越え、大学生を対象に調査した成績では32%に達している<sup>22)</sup>。日本からカリフォルニアやハワイに移住した虚血性心疾患死亡率が日本人より3倍高い日系米人の脂肪の摂取量に近づいている<sup>23,24)</sup>ので、近い将来、日本でも虚血性心疾患の発症率が増えることが予測される。

### 3. 非侵襲的診断法による早期動脈硬化の検出

#### 1) Bモード超音波断層法

中心周波数7.5または10MHzのパルスエコープローブを用い、高解像超音波断層装置により測定する。動脈壁は内膜表面から外膜面までの厚みを内膜中膜複合体の肥厚度(intima media complex thickness, IMT: mm)として測定でき、また、プラーク(1.2mm以上の周囲と比べ膨腫した粥腫)の出現を確認する。短軸像の断面積計測により狭窄度の測定も可能である。コラーゲンなどの線維蛋白の動脈壁組織含量が多くなると高輝度に(echo-rich)、脂肪が多いと低輝度(echo-lucent)になる。頸動脈ではIMT重症度と分岐部のプラークの存在頻度とは有意の正相関を示す<sup>25)</sup>。IMT肥厚のリスクファクターは、男性、年齢、高血圧、喫煙習慣、糖尿

病、LDL-III分画(小粒子高比重LDLに相当)濃度、筆者らの成績では、非糖尿病非肥満の高血圧群でIMTはインスリン抵抗性(SSPG値)やLDL-Cと正相関、HDL-C、LDL-Cサイズを表わすLDL-C/LDL-apoB比とは逆相関を示した。多変量解析ではSSPG、収縮期血圧、HDL-Cが独立したリスクファクターとなり<sup>26)</sup>、これらをもつ病態が、血栓性脳梗塞未病ともいえる。筆者らが開発した画像カラー解析ソフトTES200-ICAPでecho-rich plaqueとecho-lucent plaque像に分類することができる。

#### 2) X線CT

contrast分解能が高いので、石灰化の検出や造影剤を用いた解析に適しているが、動脈硬化と血栓の鑑別は困難である。筆者らは総腸骨動脈分岐部を目安にその上方の腹部大動脈の単純および造影CTを行い、10mm間隔の連続したスライスで撮影したCT像により一連の大動脈硬化の観察を行って<sup>29,30)</sup>、大動脈石灰化率(ACI)、大動脈壁肥厚狭窄率(ASI)と大動脈石灰化壁肥厚狭窄率(SCI)を数値化した(十二分画法)。糖尿病では初診時における血糖値が高いほど、石灰化率、壁肥厚狭窄率が高値を示し、虚血性心臓病や脳血管障害、閉塞性動脈硬化症などの血管病がある患者では、石灰化率、壁肥厚狭窄率とも血管障害のない人より有意に高値を示した。超高速X線CT(電子ビームCT)では、最短50msecで撮影でき、心臓の静止画像が得られ、定量的な冠状動

脈石灰化の評価が可能となった<sup>31)</sup>。呼吸停止下で心電図同期（拡張期 R-R80%）3 mm 厚の撮影を行い、冠動脈領域の最大 CT 値を計測する。冠動脈造影所見との比較検討が行われ<sup>32)</sup>、冠動脈の X 線吸収値（CT 値）と冠動脈狭窄率が正相関しており、CT 値の計測から動脈硬化度が推定できる。CT における石灰化出現率は、狭窄のない例 20%、1 枝病変 66%、2 枝病変 83%、3 枝病変 92%に見られた。最近、造影剤を用いた CT coronary angiography が試みられて、呼吸停止下の二次元画像を三次元データにまとめる方法が試みられている<sup>33)</sup>。

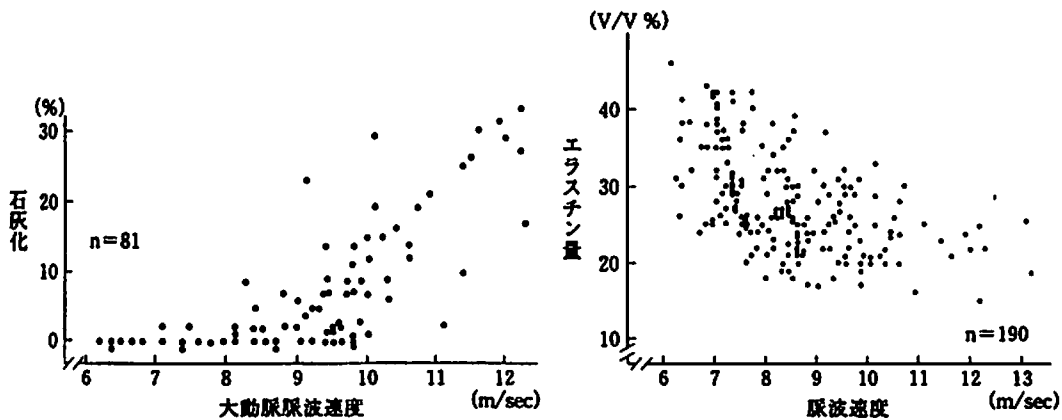
4. 磁気共鳴画像（MRA, MRI）

MR アンギオグラフィーは造影剤や RI を使わずに血管系の画像描出が可能であり、超音波断層法や X 線 CT では描出が不可能であった内頸動脈、中大脳動脈、脳底動脈領域の狭窄、閉塞の診断ができる。最近、MR を駆

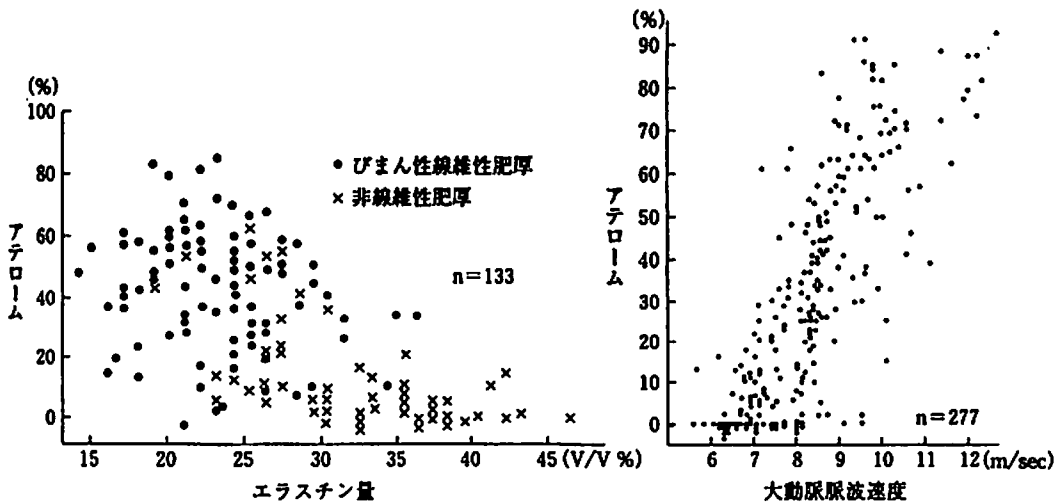
使して頸動脈、大動脈などのプラークの成分分析を条件を変えることにより、病理所見と照合して確認することが試みられている<sup>34)</sup>。Summers ら<sup>35)</sup>は T1 強調スピンエコー画像で MRI で上行大動脈の壁肥厚度が FH ホモ接合体で厚くなっていることを示したがプラークの構造は明らかにできなかった。Fayad らは T1 強調、T2 強調、Proton Density (PD) 強調画像により胸部大動脈のプラークサイズと構造について診断できるようにした。これには、velocity-selective flow-suppression preparatory pulse と結合させた高速スピンによる高速高解像画像を用いた（black-blood imaging）<sup>36)</sup>。

5. 動脈波伝播速度

過去に大動脈脈波伝播速度法（aoPWV）が開発実施され、多数の臨床的な成績が報告されている。aoPWV に寄与する臨床上的因子は、血圧、年齢、脈拍数などで



石灰化、中膜エラスチンと aoPWV<sup>37)</sup>



第 6 図 脈波速度に及ぼす大動脈壁組成

第2表 高コレステロール血症の治療目標値

危険因子の数	総コレステロール値	LDL-コレステロール値
0	240 mg/dl 未満	160 mg/dl 未満
1-2	220 mg/dl 未満	140 mg/dl 未満
3-	200 mg/dl 未満	120 mg/dl 未満
糖尿病があれば	200 mg/dl 未満	120 mg/dl 未満
脳梗塞等	200 mg/dl 未満	120 mg/dl 未満
虚血性心疾患の既往あり	180 mg/dl 未満	100 mg/dl 未満

- 危険因子
- 1 男性 45 歳以上 女性 55 歳以上
  - 2 糖尿病(耐糖能異常を含む)
  - 3 高血圧
  - 4 低 HDL-コレステロール血症
  - 5 喫煙
  - 6 冠動脈疾患の家族歴

あり、血管壁の内膜、中膜のコラーゲンの上昇、石灰化、アテローム、中膜のカルシウムの増加により aoPWV は速くなり、中膜エラスチンの増加、内膜のグリコサミンノグリカンの増加は aoPWV を低下させる<sup>37)</sup> (第6図)。糖尿病、高血圧、加齢などにもなる動脈硬化のよい指標となる。非糖尿病例より糖尿病例ではコントロールが悪い例ほど aoPWV が上昇する。筆者らは着衣の着脱なしに baPWV (上腕-足関節) が測定できる FormPWV/ABI 脈波測定装置が開発に関わり、baPWV は従来の aoPWV と強い正相関を示し、寒冷などの測定環境の影響も受けやすいことを確認した。健康住民を対象にすると、hcPWV (頸部-心)、hbPWV (上腕-心)、haPWV (足-心)、baPWV 間にはいずれも強い正相関がみられた<sup>38)</sup>。

### 未病としての動脈硬化のケア

#### 1. リスクファクターの管理、

- 1) 体重管理。高血圧、高脂血症、糖尿病では、体重の増加がコントロールを悪くする。
- 2) 和食への回帰。脂肪エネルギー比は 25% 以下にし、線維成分、 $\omega$ 3 系不飽和脂肪酸摂取などを考慮する。抗酸化食、抗血栓食など推奨されるが、多品目食摂取によるバランスのよい食事が基本である。
- 3) 運動療法。適度な有酸素運動 (20 分以上が望ましい) は微小循環をよくし、代謝の改善につながる。
- 4) 必要に応じ薬物治療を行う。

2. 動脈硬化の重症度、心血管病発症の状態などを勘案して、予防治療を考える。

動脈の攣縮や血栓などの発症因子の除去や予防も含まれる。

#### 3. プラークの安定化

promoter である脂質代謝異常を是正することがプラーク安定化につながるが、initiator の治療は、このような LDL の血管内蓄積を助長するので、高脂血症があれば血管傷害因子である血圧、糖尿病、喫煙といったリスクの管理が特に必要となる。

### おわりに -高齢者医療の危機-

高齢化社会における医学的な未病対策と問題点をあげた。社会的には平成 14 年度においては、医療費削減のために老年者の自己負担が増えたり、入院期間の短縮をめざす医療法改正が行われている。都市の大病院に比し、地方の中小病院では重症高齢者の入院の比率が高く、肺炎等の重症感染による入院も多い。この原因には、地方住民では老齢人口比が高く、独居老人も多く、さらに健康意識が都市より低く予防的治療を怠っているため救急入院の比率が高くなる。医師についても病院への送致が遅れて、早期治療を逃す事例も多くみられる。このため入院期間が延びたり、医療費を濃厚治療のために多く使う結果になる。一方では入院期間が短縮したり自己負担が増えると、高齢者では入院して急性期治療が行われた後、地方では慢性期病院の不足もあり、十分な社会復帰の準備もしないで退院ということになる。高齢者の入院中の呆けの進行、肉体的な機能の低下に対するアフターケアがないままになり、さらに重症な疾患を引き起こして短期間で再入院する可能性が高い。家人や介護士に十分なりハビリを期待することは無理なことが多く、独り歩きできなくなった状態を回復させる医療体系は現在十分に確保されていない。こうした準備がない現在進行中の一連の医療改革は医療費が低下するとは考えにくく、かえって医療費あるいは介護費の増加をひきおこす。「介護の前に未病対策あり」で、介護も医療費も同じように国民に負担がかかってくるので、老人が早めに医療機関で治療が受けられ、疾患予防のための高齢者の自立とリハビリに対する施設の拡充などの配慮を含む高齢者対策が医療費の削減には欠かせない。

## 文 献

- 1) 金 恩源：医食同源と未病思想。中西医結合・動脈硬化症・血栓症・一次予防（都島基夫，金恩源編）。第2回中西医結合・動脈硬化症・血栓症・一次予防国際シンポジウム組織委員会発行，大阪，pp574-578，1996
- 2) 都島基夫：未病としての動脈硬化—動脈硬化の早期診断とリスクファクター。日本未病システム学会誌，4：8-11，1998
- 3) 本橋佳子，丸山太郎，村田 満，中野里美，丸山千寿子，京谷晋吾，池田康夫，猿田享男，都島基夫：冠動脈疾患と Cholesteryl ester transfer protein (CETP) 遺伝子多型について。日本未病システム学会誌，6：97-99，2000
- 4) 都島基夫：動脈硬化と未病—動脈硬化の早期定量診断と予防治療—。未病の医学（今西二郎編）。医歯薬出版 K K，東京，pp82-87，2001
- 5) 金沢武道：老年医学と未病，未病をどのように発見するか。Geriatric Medicine，38：165-168，2000
- 6) 清原 裕，藤島正敏：循環器疾患と疫学 久山町 study その後。循環器専門医，3：241-244，1995
- 7) 大石まり子，柿原浩明：21世紀に向けての糖尿病の予防対策，医療経済の面から。第30回糖尿病学の進歩糖尿病の療養指導（'96 糖尿病学会編）。診断と治療社，東京，pp19-24，1996
- 8) 澤田徹：脳卒中予防における cost efficacy。日本未病システム学会誌，4：10-13，1998
- 9) Pitt B, Byington RP, Furberg CD, Hunninghake DB, Mancini J, Miller ME, Riley W, PREVENT Investigators：Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. Circulation 102：1503-1510,2000
- 10) Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Thorgeirsson G, Pyorala K, Miettinen T, Wilhelmsen L, Olsson AG, Wedel H and the Scandinavian Simvastatin Survival Study Group.：Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease：the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet 344：1383-1389，1994
- 11) 後藤忠治：スポーツと医療経済。日本未病システム学会誌，4：18-20，1998
- 12) 都島基夫：日本人における高トリグリセライド血症と動脈硬化—HDL-LDL 経路間の脂質転送蛋白 (CETP) と小粒子高密度 LDL (small dense LDL) を介した動脈硬化の形成。慶應医学，78：87-96，2001
- 13) 今村佳代子，丸山千寿子，都島基夫，京谷晋吾，中野里美，仲森隆子，丸山太郎：日常朝食型高脂肪食負荷食 Kisei-meal による食後高脂血症の評価と食後 TG-rich リポ蛋白代謝に及ぼす影響。動脈硬化，28：205-213，2001
- 14) 日本動脈硬化学会高脂血症診療ガイドライン検討委員会：高脂血症診療ガイドライン 1. 成人高脂血症の診断基準，治療適用基準，治療目標値。動脈硬化，25：1-34，1997
- 15) 小西正光，飯田 稔，内藤義彦，寺尾敦史，木山昌彦，児島三郎，島本 喬，土井光徳，小町喜男：地域・職域別にみた血清総コレステロール値の動向と循環器疾患との関連。—望ましい血清総コレステロール値について—。動脈硬化，15：1115-1123，1987
- 16) 垂井清一郎：日本人における高脂血症とその合併症。動脈硬化，18：1-16；1990 および厚生省特定疾患原発性高脂血症調査研究班，昭和61年度研究報告書
- 17) 福田安平，林知己夫，駒沢 勉，草野史朗，橋本 勉：組み合わせ要因別にみた脳卒中・心発作発生。国鉄中央管理所報，9：127-140，1985
- 18) Kitamura A, Iso H, Naito Y, Iida M, Konishi M, Folsomv AR, Saito S, Kiyama M, Nakamura M, Sankai T, Shimamoto T, Komachi Y：High-density lipoprotein cholesterol and premature coronary heart disease in urban Japanese men. Circulation 89：2533-2539，1994
- 19) Kodama K, Sasaki H, Shimazu Y：Trend of coronary heart disease and its relationship to risk factors in a Japanese population：A 26-year follow up, Hiroshima/Nagasaki Study. Jpn Circulation J 54：414-421，1990
- 20) Stamler J, Wentworth D, Neaton JD, for the MRFIT Research Group：Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? -Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial-. JAMA 256：2823-2828，1986
- 21) 池脇克則：冠動脈硬化症における脂肪負荷後のリポ蛋白代謝の検討。動脈硬化，18：887-895，1990
- 22) 都島基夫，花岡美智子，丸山千寿子，山本 実，脇 昌子，Gee DL：若年者における粥状動脈硬化性病変の進展とライフスタイルの解析に関する研究。平成8年度厚生省循環器病研究委託費による研究報告集，国立循環器病センター，森本誠文社，大阪，pp352，1997
- 23) 加藤寛夫，早瀬仁美：日本人と日系米人の健康と食生活に関する疫学的研究 (NI-HON-SAN 調査)。栄養学雑誌，47：121-130，1989
- 24) 児玉和紀，加藤寛夫：広島・長崎の固定集団における循環器疾患の予防に関する疫学的研究。日循協誌，27：203-208，1993
- 25) Bonithon-Kopp C, Touboul P-J, Berr C, Leroux C, Mainard F, Courbon D, Ducimeriere P：Relation of intima-media thickness to atherosclerotic plaque in carotid arteries.-The Vascular Aging (EVA) Study-. Arterioscler Thromb Vasc Biol 16：310-316，1996
- 26) Skoglund-Andesson C, Tang R, Bond MG, deFaire U, Hamsten A, Karpe F：LDL particle size distribution is associated with carotid intima-media thickness in healthy 50-years-old men. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19：2422-2430，1999
- 27) Suzuki M, Shinozaki K, Kanazawa A, Hara Y, Hattori Y, Tsushima M, Harano Y：Insulin resistance as an independent risk for carotid wall thickening. Hypertension 28：593-598，1996

- 28) Kornet L, Lambergts J, Hoeks APG, Reneman RS : Differences in near wall shear rate in the carotid artery within subjects are associated with different intima-media thicknesses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 : 1877-1884, 1998
- 29) 都島基夫, 藤井繁樹, 由谷親夫, 山本章, 内藤博昭 : 動脈硬化症の診断法としての X 線 CT の精度と高脂血症治療時の動脈硬化の進展. *動脈硬化*, 18 : 1091-1098, 1990
- 30) Tsushima M, Koh H, Suzuki M, Kyotani S, Waki M, Nishioeda Y, Harano Y and Omae T : Noninvasive quantitative evaluation of early atherosclerosis and the effect of monatepil, a new antihypertensive agent. An interim report. *Am J Hypertens* 7 : 154S-160S, 1994
- 31) Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R : Quantification of coronary artery calcim using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 15 : 827-832, 1990
- 32) Masuda Y, Naito S, Aoyagi Y, Yamada Z, Uda T, Morooka N, Watanabe S, Inagaki Y : Coronary artery calcification detected by CT : clinical significance and angiographic correlates. *Angiology* 41 : 1037-1047, 1990
- 33) Moshage WE, Achenbach S, Seese B, Bachmann K, Kirchgeorg M : Coronary artery stenosis : three-dimensional imaging with electrocardiographically triggered, contrast agent-enhanced electron-beam CT. *Radiology* 196 : 707-714, 1995
- 34) Shinnar M, Fallon JT, Wehrli S, Dalmacy D, Fayad ZA, Badimon JJ, Harrington E, Fuster V : The diagnostic accuracy of ex vivo MRI for human atherosclerotic plaque characterization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 : 2756-2761, 1999
- 35) Summers RM, Andrasko-Bourgeois J, Feuerstein IM, Hill SC, Jones EC, Busse MK, Wise B, Bove KE, Rishforth BA, Tucker E, Spray TL, Hoeg JM : Evaluation of the aortic root by MRI : Insights from patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation* 98 : 509-518, 1998
- 36) Fayad FA, Nahar T, Fallon JT, Goldman M, Aguinaldo JG, Badimon JJ, Shinnar M, Chesebro JH, Fuster V : In vivo MR evaluation of atherosclerotic plaque in the human thoracic aorta : a comparison with TEE. *Circulation* 101 : 2503-2509, 2000
- 37) 吉村正蔵, 長谷川元治, 中川 淑, 八木晋一, 林知己夫, 駒沢 勉, 矢部喜正, 荒井親雄, 柏倉義弘, 相沢義則, 川崎 健, 阿部正威, 木下重博 : 動脈硬化に関する研究—脈波速度法による大動脈硬化の定量的評価と病態について—. *脈管学*, 18 : 863-873
- 38) 都島基夫, 京谷晋吾, 中野里美, 本橋佳子, 仲森隆子, 丸山千寿子, 丸山太郎 : 頸動脈の Atherosclerosis と Sclerosis の早期診断とリスクファクター —住民検診における PWV と ABI と IMT の測定成績を中心に—. *日本循環器予防学会誌*, 37 : 117-124, 2002



綜 説

体幹部定位放射線治療

慶應義塾大学  
放射線科学教室

くに えだ えつ お、 たけ だ あつ や、 く ほ あつ し  
国 枝 悦 夫, 武 田 篤 也, 久 保 敦 司

ABSTRACT

Body stereotactic radiotherapy

*Etsuo Kunieda, Atsuya Takeda, Atsushi Kubo*  
School of Medicine, Keio University

From 1996, we carried out body hypo-fractionated stereotactic radiotherapy for 16 tumors of 14 patients. There were four primary lung cancer and eight metastatic lung cancer and two hepato-cellar carcinoma. Among ten cases of which respiratory movement of the tumor were observed by fluoroscopy, average movement in cranio-caudal direction was 4.4 mm. Although tumor regrowth was observed in two cases, both tumors were successively controlled by re-irradiation with stereotactic radiotherapy. Seven patients including six with metastatic lung tumors survived longer than 3-years. Two portal tumor thrombi were decreased in size and re-canalizations of the portal veins were obtained. Stereotactic radiotherapy is considered to be effective both for primary and metastatic tumors.

Key words : 定位放射線治療, 肺癌, 肝癌, 転移性腫瘍

はじめに

定位放射線照射は放射線を病変に正確に一致させて集中照射する方法で、周辺正常組織を温存して病変のみを治療する精密放射線治療の方法である。従来、脳などの病変を対象として、ガンマナイフや直線加速器を用いて、高線量の放射線を高精度に病巣局所に照射する治療法として発達してきた<sup>1,2)</sup>。これにより、正常組織への影響を少なく保ちながら、高い抗腫瘍効果を得ることができ<sup>3)</sup>。

最近では肺や肝臓などの腫瘍に対しても数回程度の小分割で定位的に治療する、小分割定位放射線治療(HSRT: hypo-fractionated stereotactic radiotherapy)が施行されつつあり、90%を越える局所制御率が認められている<sup>4-6)</sup>。

現在、施行施設が急速に増加しているが、我々は国内でも早い時期から体幹部 HSRT を限局した肺癌、肝癌

などの病変にたいして施行している。

対象と方法

慶應義塾大学病院放射線科にて、1996年10月以降に小分割定位放射線治療を施行したのは、14例16病変である。性別は男性10例、女性4例であり、年齢は40~83歳(平均68.0歳)であった。対象病変の内訳は、原発性肺腫瘍4例(扁平上皮癌2例、腺癌2例)、転移性肺腫瘍8例10病変(原発は喉頭癌、上咽頭癌、中咽頭癌、耳下腺癌、乳癌、子宮頸癌)、原発性肝細胞癌2例であった。転移性肺腫瘍においては原発巣および肺以外の転移が制御されており、肺転移2個以内のものを治療の適応とした。原発性肝細胞癌においては門脈腫瘍塞栓を対象とし、開存によりさらなる治療が施行可能となることを期待して行った。1999年以降はCT施行時、治療時とも体幹部固定フレーム:Stereotactic body frame (Elekta社)を使用した。治療計画用画像

の取得においてはCT (X-vision, 東芝) と X 線シミュレータ透視装置 (KXO-50N 東芝) を用いた。透視時、CT 撮像時、および治療時には患者に浅い呼吸を心がけてもらい、必要により横隔膜の運動を抑制する目的で腹部を圧迫した。

治療に先立ち、前後方向の X 線透視にて腫瘍を確認し、呼吸による頭尾方向の変動値を測定、それがほぼ 10 mm 以内に収まる症例を治療対象としている。

CT 撮像においては腫瘍+上下 20 mm の範囲を、患者の呼吸数に応じて 1 画像あたり 4~8 秒の時間をかけた画像 (long scan time CT : LSTCT) (2 mm 厚, 120 kVp, 50mA) を用いている。4~8 秒で 1 スライス撮像しているため、1 呼吸サイクル以上の時間をかけて 1 スlice を撮像していることになる。その他の領域においては 5 mm 厚 (120 kVp, 200 mA) にて 1 スライスあたり 1 秒の時間をかけて撮像している。これにより肺野全体を約 5 分間かけて撮像することになる。

撮影した CT 画像から三次元治療計画を行う。6 MVX 線ライナックを使用し、典型的な照射法は、毎日 3 回照射の三次元照射で、1 回 5~12 Gy で 4 回から 10 回照射した。

## 結 果

### 1. 呼吸移動

治療前の前後方向 X 線透視にて観察可能であった 10 症例での測定では、対軸方向の呼吸移動距離は平均 4.4 mm ± 3.9 mm (1~15 mm) であった。おおむね、中肺野の腫瘍では呼吸による移動は比較的少なかった。15 mm 程度の呼吸による移動が見られた症例は左下肺野に腫瘍が存在していたが、腹部圧迫器によって 10 mm 以内に減少させることが可能であった。しかしながら、症例数には含まれていないが、2 例では 10 mm 以内に呼吸運動を抑えられず、HSRT を施行できなかった。

### 2. 治療結果

原発性および転移性肺腫瘍での観察期間は 6~67 月 (平均 39.4 月, 中央値 42 月) であった。治療後 3 ヶ月から半年の CT 画像による評価では、全例で著効 (Complete Response : CR) または有効 (Partial Response : PR) がえられた。なお著効、有効の定義は日本肺癌学会の臨床・病理肺癌取扱い規約に従い、著効は CT 画像で完全に消失、かつその状態が 4 週間以上継続するもの、有効は腫瘍の 2 方向の径の積が 50% 以上縮

小したものとした。2 例において半年から一年後に局所病変の再増大がみられた。2 例とも再治療可能であり、その後の再増大をみとめていない。治療を受けた部位には画像上、限局した放射性肺炎に類する画像所見 (限局性の浸潤影など) がほぼ必発しており、正確な評価が困難な場合があった。しかしながら、ほとんど無症状であり、重篤な合併症は生じていない。

現在までに死亡原因が確認されている 4 例のうち、肺病変が原因となったのは 2 例である。一方、3 年以上の生存は 7 例でありそのうち 6 例は転移性肺腫瘍例であった。

肝細胞癌では、2 例中 2 例で門脈塞栓の開存という当初の目的を達したが原疾患の増悪により長期生存が得られずに亡くなった。

## 考 察

体幹部病変に対する HSRT は新しい治療法である。HSRT が通常の放射線治療と大きく異なるのは、標的体積が小さく、分割数が少なく 1 分割線量が多いという点である。これにより高い生物学的線量が得られ、対腫瘍効果の大幅な向上が望まれる。その一方、精度や再現性および呼吸移動への対処などが極めて重要となる。

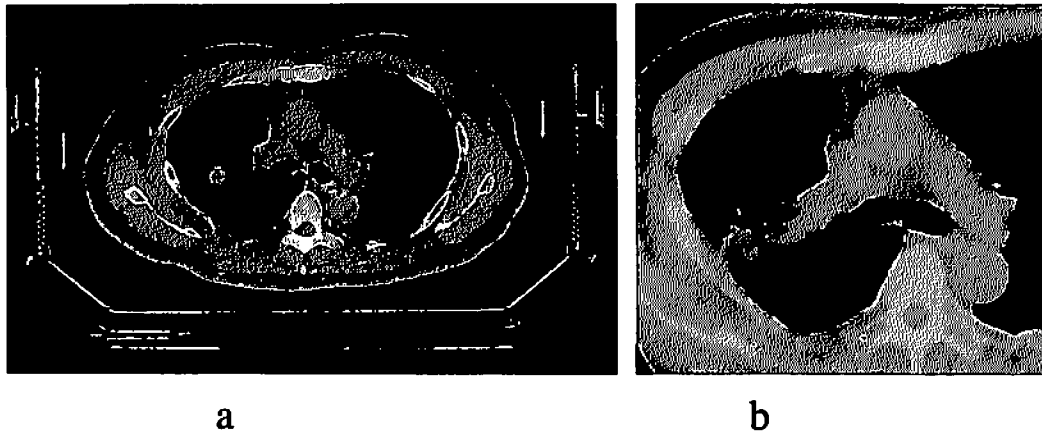
### 1. 固定方法と呼吸移動に関して

体幹部フレームによる位置再現性は良好であり、毎回の CT 施行時の観察ではおおむね 5 mm 以内の移動があるのみである。特に周囲を硬化性発泡スチロールで固めるため、体軸横断面方向での移動は比較的少ないが、一部肥満者では再現性が若干不良な場合があり、CT 施行時に照射位置の再設定が必要であった。

特に体軸方向では体の位置がやや動くことがあり、硬化性発泡スチロールによる固定のみでは不十分な場合があり得る。フレームに付属するレーザービームで体の位置をマークしておくことで対処している。

各分割治療時の毎回の CT 撮影が必要であるか否かは考慮の余地があるが、少ない回数で治療するので 1 回の位置誤差の影響も少なからず、何らかの形で毎回の確認が必要であろう。我々は治療時の照合写真も毎回の治療毎に撮影して確認している。肺野病変に関しては前後、側面の照合写真で確認できることが多いが、撮影時に呼吸停止しているわけではないので照合写真上での腫瘍の位置は呼吸運動に依存し、総合的に判断する必要がある。

呼吸移動においても患者の協力が必要である。リラッ



第1図 肺癌の定位放射線治療。(a) 治療時のCT: Stereotactic body frameに入った状態。周囲より硬化性発泡スチロールで固定するが、密度は低く、ほとんど見えない(下向き矢印)。(b) 治療後の典型的な変化(4ヶ月後)。さらに時間の経過とともに瘢痕様陰影に移行する。

クスしてもらうことが重要であり、それにより小さな呼吸が安定してできるようになる。

## 2. 肺腫瘍治療後の画像変化について

通常の coplanar radiotherapy 後の放射線有害事象のCT所見に関する研究はすでに多くなされている<sup>7,8)</sup>。一般に放射線肺臓炎を起こした局所は瘢痕化や牽引性気管支拡張により二次的感染症の好発部位となり、時には難治性の日和見感染を招く。HSRT後の画像変化は局所的には通常の放射線肺臓炎の評価からすれば重篤なものに類似しているが、画像上の変化は限局性であり、ほとんど症状を呈することはなかった。われわれの経験では、治療後初期の肺野の変化として、いわゆるすりガラス陰影と濃厚な浸潤影が照射3~4ヶ月後に認められた。すりガラス陰影は消失もしくは濃厚な浸潤影に移行した。浸潤影は縮小しつつ瘢痕様陰影に移行し、固定することが多かった。これは高線量、小分割投与によりもたらされる高い生物学的効果のためとみなされ、HSRTの対腫瘍効果の有効性を示すものと思われる。典型的な画像上の変化を第1図に示す。

## 3. 治療成績に関して

以上のように肺腫瘍に対する定位放射線照射は、局所制御の上で有用であると考えられるが、同様の報告は、国内外の数施設からも発表されている<sup>4~6,9)</sup>。特に、本検討では転移性腫瘍が比較的多い。肺転移を治療した場合としなかった場合の生存期間の比較は困難であるが、我々の経験では転移性腫瘍でも多くの長期生存例が認められ

る。治療期間も短く、侵襲性も少ないことから、症例を限定すればQOLの点からも治療の意義が十分大きいものと思われる。肝腫瘍に関しても同様に適応を限定するべきであろう。

## まとめ

我々の体幹部腫瘍に対する定位放射線治療の経験から、施行上の問題点、治療成績、治療後画像変化の要点などについて述べた。X線透視による観測では体軸方向の呼吸移動は平均で4mm程度であり、また、体幹部用フレームによる固定再現性は比較的良好であった。肺腫瘍においては14病巣中2病巣に再増大を認めたが、再治療により制御可能であった。転移性腫瘍においても適応を選ぶことにより治療意義があるものと思われた。

## 文 献

- 1) Leksell L: Sterotaxic radiosurgery in trigeminal neuralgia. Acta Chir Scand 137: 311-314, 1971
- 2) Kunieda E, Kitamura M, Kawaguchi O, Ohira T, Ogawa K, Ando Y, Nakamura K, Kubo A: New system for linear accelerator radiosurgery with a gantry-mounted video camera. Int J Radiat Oncol Biol Phys 40: 739-746, 1998
- 3) Wasserman TH et al: Stereotactic irradiation. Principles and Practice of Radiation Oncology. 3rd ed. (Ed) Perez CA, Brady LW. Lippincott-Raven, Philadelphia, 387-404, 1998
- 4) Fukumoto S, Shirato H, Shimzu S, Ogura S, Onimaru R, Kitamura K, Yamazaki K, Miyasaka K, Nishimura

- M, Dosaka-Akita H : Small-volume image-guided radiotherapy using hypofractionated, coplanar, and noncoplanar multiple fields for patients with inoperable Stage I nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer* 95 : 1546-1553, 2002
- 5) Uematsu M, Shioda A, Tahara K, Fukui T, Yamamoto F, Tsumatori G, Ozeki Y, Aoki T, Watanabe M, Kusano S : Focal, high dose, and fractionated modified stereotactic radiation therapy for lung carcinoma patients : a preliminary experience. *Cancer* 82 : 1062-70, 1998
- 6) Nagata Y, Negoro Y, Aoki T, Mizowaki T, Takayama K, Kokubo M, Araki N, Mitsumori M, Sasai K, Shibamoto Y, Koga S, Yano S, Hiraoka M : Clinical outcomes of 3D conformal hypofractionated single high-dose radiotherapy for one or two lung tumors using a stereotactic body frame. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52 : 1041-1046, 2002
- 7) Libshitz HI, Shuman LS. Radiation-induced pulmonary change : CT findings. *J Comput Assist Tomogr* 8 : 15-19, 1984
- 8) Forrest LJ, Mahler PA, Vail DM, Mackie TR, Ladd WM, Kinsella TJ : Computed tomographic evaluation of radiation pneumonitis in canine model. *Radiation Oncology Investigations* 6 : 128-134, 1998
- 9) 白土博樹他 : リニアックによる定位放射線照射 定位放射線治療の臨床的評価. *臨床放射線*, 44 : 1609-1615, 1999
-

## 学会展望

### 第7回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会

日 時：平成15年2月1日（土）午後2時00分～5時00分

場 所：慶應義塾大学 新教育棟4階 講堂3

主 催：慶應義塾大学医学部形成外科学教室同窓会

事務局：慶應義塾大学医学部形成外科学教室内

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

14：00－14：30 学術講演（I） 症例・経験 座 長 東邦大学 形成外科 大 西 清

14：30－15：00 学術講演（II） 先天異常 座 長 東海大学 形成外科 西 村 正 樹

15：00－15：10 休憩

15：10－15：50 学術講演（III） 手術手技

座 長 埼玉医科大学総合医療センター 形成外科 井 上 義 治

15：50－16：20 学術講演（IV） 工夫・臨床経験

座 長 慶應義塾大学 形成外科 田 中 一 郎

15：20－17：00 学術講演（V） 研究

座 長 国立成育医療センター 形成外科 金 子 剛

14:00~14:30 学術講演 (I) 症例・経験

座長: 東邦大学 形成外科 大西 清

1. 大胸筋皮弁採取部に巨大嚢胞を生じた1症例

平塚市民病院形成外科\*, 慶應義塾大学形成外科学教室\*\*

小林尚史\*, 佐藤博子\*, 宮本純平\*\*  
柘沢未佳子\*\*

【症例】65歳 男性

【現病歴】平成2年, 当院耳鼻科にて舌癌を指摘され, 同年舌半切術および有茎大胸筋皮弁による再建術を施行された。平成13年ごろより右胸部に皮下腫瘤を自覚するようになった。腫瘤は徐々に増大し平成14年9月19日に当科初診した。

【現症】受診時には, 18×12 cm, 胸壁と可動性のない弾性やや硬の腫瘤として触れた。

検査所見: エコー, CT, MRI, アンギオ上, 血管に乏しいが, 造影剤によって増強される部位があり, 被膜を持つ胸壁外の腫瘤であった。

【手術所見】平成14年11月13日に切除術を施行した。腫瘤は黄色の漿液および黄褐色泥状物が充満しており, 被膜は厚く後壁は肋骨, 胸壁と癒着していた。上方では鎖骨上, 側方では腋窩に達していた。病理組織上では内容物の壊死及び異物肉芽腫の形成を認めた。

【考察】嚢胞は他組織との明らかな連続性を認めず, どのような機序で生じたかは不明であった。この発生機序につき, ご検討, ご教示をお願いしたい。

2. 当院における Bowen 病と悪性腫瘍の合併例

東海大学医学部形成外科

服部慎子, 西村正樹, 谷野隆三郎

【はじめに】Bowen 病は様々な因子により発症する。多くは単発であり, 多発例では砒素との関連が疑われている。また本疾患は内臓悪性腫瘍の合併に注意を要する。今回我々は1981年から2002年までの当院において治療した Bowen 病の悪性腫瘍の合併率につき検討する。

【対象と方法】1981年から2002年までの当院において治療した Bowen 病の患者は58例で, うち多発例は3例であった。この3例中砒素との関連があったのは1例である。また, 悪性腫瘍を合併していた症例は58例中20例(34.5%)であった。悪性腫瘍の内訳は消化器系8例, 泌尿器系4例, 乳腺1例, 悪性リンパ腫1例, 皮膚癌5例, 消化器癌と悪性リンパ腫の合併が1例であった。Bowen 病の発症部位を露出部と非露出部と分け検討したところ, 悪性腫瘍の合併率は露出部では20例中7例(35.0%), 非露出部では38例中13例(34.2%)であった。

【考察】Bowen 病と悪性腫瘍の合併率が高い事実から, Bowen 病の患者を診察および治療する際, その時点で悪性

腫瘍の合併の有無を検査する必要がある。一方, 悪性腫瘍の存在が無くても, 数年経ってから悪性腫瘍の出現した症例があることから長期の観察が必要であると考えられた。

3. 巨大石灰化上皮腫の一例

東京臨海病院形成外科\*, 東邦大学形成外科\*\*

大西 清\*, 小野恭輔\*, 稲見浩平\*  
丸山 優\*\*

【目的】悪性腫瘍様外観を呈する巨大な石灰化上皮腫の一例を経験したので報告する。

【症例】31歳, 女性。約2年前より上背部に腫瘤を触知するも自覚症状なく放置。腫瘤は徐々に増大し, 疼痛出現, 易出血性となり当科を受診した。初診時, 腫瘤は直径12 cm, 高さ8 cmの弾性硬, 暗赤色隆起性で下床との癒着は認めなかった。血液生化学的検査に異常所見なし。CT検査にて腫瘤は濃染傾向が強く, 中央のLDAを囲むように淡い石灰化を呈し軟骨基質の混在が疑われた。MRI検査では内部信号不均一な著名な造影効果を有する比較的境界明瞭な腫瘍で, 僧帽筋の腫脹, 数本のfeederの流入を認めた。血管造影にてこのfeederは, 頸横動脈からの関与が確認された。骨シンチ, Gaシンチでは腫瘍部に一致して異常集積を認めるものの他部位には認めず, 胸腹部CT検査でも異常所見は認められなかった。以上より悪性軟部腫瘍を疑い, 病理医とのカンファレンスの結果, 切除, 二次再建の方針で手術を施行した。腫瘍辺縁より3 cm, 僧帽筋筋膜を含み一塊として摘出。欠損部には人工真皮を貼付した。病理組織学的検査では, 腫瘍は境界明瞭で皮下組織内に限局し, basophilic cell と shadow cell より成り, これらが富血管性の myxoid な間質を背景として島状の胞巣を形成し, basophilic cell に細胞異型は乏しく石灰化上皮腫と診断した。切除後欠損は広背筋皮弁にて修復した。

【結論】石灰化上皮腫は頻度の高い皮膚良性付随器腫瘍で, その大部分は皮下に硬く触れる長径3 cmまでの大きさの小結節である。長径10 cm以上の石灰化上皮腫の報告は検索しえた限りでは本邦に7例であった。巨大化する原因としては, 外的刺激や圧迫, 感染などが挙げられている。また近年, 悪性石灰化上皮腫の概念も確立されているが, 本例では腫瘍は皮下組織内に被膜化されて存在し, basophilic cell に異型性が乏しく良性腫瘍と診断した。

(質疑応答)

Q 中島: 手術中割を入れて確認することはできなかったのか。

A 大西: 肉眼的診断は困難であったと思われる。

病理診断にも3週間を要した。

Q 谷野: 多量に存在した石灰はどこより由来すると考えられるのか。

A 大西: 毛包由来であると思われる。

Q 田中宝：悪性石灰化上皮腫ではどの程度 surgical margin をとればよいのか。

A 大西：文献的報告は少ないが3~5 cm と思う。

#### 14:30~15:00 学術講演 (II) 先天異常

座長：東海大学 形成外科 西村正樹

#### 4. アフリカにおけるボランティア医療と唇裂形成手術 名古屋形成クリニック

上 敏明, 西澤明親

唇裂の手術において、最近は一人の医師が短期間にまとめて一つの術式を行ない、その結果を見る機会が少ないように察せられる。我々は最近、アフリカ コートディボワールにおけるボランティア医療として、唇裂の手術を継続的に行っている。そこで、同時期に一つの術式で手術を行なうことができ、興味ある結果を得たので報告する。唇裂の術式は、昨年度はミラード+三角弁法、今年度は鼻腔底ミラード、白唇部は小三角弁付直線法とするいわゆる中島法に我々の方法である赤唇部小三角弁法を行なった。白唇部の小三角弁に変え、赤唇部の小三角弁とし、白唇部は直線状の瘢痕のみ形成されることになる。

我々の方法は手術後間もないため結論は未だだすことはできないが、感触としては良好と考えられる。従来のミラード法に比し、我々の方法の利点とも考えられる部分について詳述したい。

(質疑応答)

Q 原料：給与はどこから支給されるのか。

A 上：私費である。

コメント：中島

(完全口唇裂の場合は特に) 赤唇縁に三角弁もしくは丸弁を入れる必要があると思う。

コメント：谷野

自身が手術を行うより、現地の若い医師に教育することが重要であると思う。でなければ「途上国において実験的治療を行っている。」という非難を受ける可能性がある。

コメント：金子

1 昨年のスウェーデン・イエテボリでの国際口唇裂学会においてボランティア活動に関する討論がなされた。その結果、若い医師のトレーニングの機会としてボランティア活動を利用するのは不適切であるという結論が採択された。

#### 5. 前頭筋・眼輪筋連合皮弁による眼瞼下垂症の治療

慶應義塾大学形成外科

宮本純平, 中島龍夫, 田中一郎

島田卓治, 吉川嘉一郎

重度の眼瞼下垂症の場合、現在筋膜や人工物による前頭筋への吊り上げ術が行われている。これに対し19世紀からこれらの介在物を用いず直接前頭筋を tarsus へ固定することが行われていたが、1982年の Song & Song の報告より一般的なものとなっていった。1990年代にはいり、Park, Baik, Tsai らにより次々と前頭筋と眼輪筋の線維性結合を利用した前頭筋・眼輪筋皮弁による術式の報告がみられるようになった。今回我々は Tsai の術式をもとに重度の眼瞼下垂症に対する治療を行い良好な結果を得たので報告する。fascia suspension と比べた場合の本術式の利点は donor site の犠牲がないこと、介在物を用いない dynamic な再建であるためより生理的な結果が得られることなどである。

(質疑応答)

Q 大西：

Q1：Frontal Suspension 法でも levator function は (levator に操作を加えないので) 残存していると思う。したがって levator function に期待が可能な点においては、本術式の特徴的な点とはいえないと思うが、その点に関してはどう思うか。

Q2：「lid lag が少ない」というが、それは単純に Frontal Suspension 法に比較して吊り上げ幅を少なくしているためではないのか。

A 中島：

A1：Fascia suspension に比較すると後戻りが多いため、2 mm 程度 over に固定している。

A2：Lid lag が少ないというよりも、levator function を可及的に温存しているため、動的な閉眼が可能となる。

#### 6. 三角切除による赤唇結節の形成法

慶應義塾大学形成外科\*, 国立成育医療センター形成外科\*\*

島田卓治\*, 中島龍夫\*, 吉川嘉一郎\*

安藤祐一郎\*, 柁沢未佳子\*

彦坂 信\*, 佐久間恒\*\*

口唇裂術後の二次修正時や口唇血管腫の切除の際、あるいは上口唇の瘢痕形成術施行時などに、上口唇の正中に存在すべき赤唇結節の形成に難渋することがある。以前より我々は、これを簡便な方法にて形成し、良好な結果を得ているので報告する。

上口唇のボリュームに左右差がある場合、一般的にはボリュームが多いほうから余剰分を紡錘形に切除する方法が採られる。この方法だと左右のボリュームはそろえられるが、赤唇結節の形態の対称性までも得るのは難しい。そこで我々は、余剰分を紡錘形に切除するのではなく、以下に記すように三角形に切除することにより赤唇結節の形成を行っている。まず赤唇結節の外側縁となるべきところに三角形の底辺を決め、頂点は切除する口唇のボリュームに合わせてデザインする。この横向きの三角形の底辺と下の辺のみを切開し、この三角部

分を下方に牽引して口唇の適切な切除量を評価した後、最後の1辺を切除する。これにより三角形の粘膜欠損部が生じるが、これを外側より縫合していくと、dog earが形成される。これを修正せず、そのまま内側に送り込むことにより、正中に赤唇結節となる隆起ができるわけである。

研究会では、具体例を提示しながら、その手技について詳解する。

**15:00~15:10 【休憩】**

**15:10~15:50 学術講演 (III) 手術手技**

座長：埼玉医科大学総合医療センター  
形成外科 井上義治

**7. 性同一性障害に対する乳房切除術**

埼玉医科大学総合医療センター形成外科  
井上義治, 原科孝雄, 高松亜子  
若松慶太, 大城貴文

2002年9月の性同一性障害の治療に関するガイドラインの改訂に伴い、第2段階の治療としてFTMにおける乳房切除術が比較的早期に可能となった。2002年10月~2003年1月の4ヶ月間で18例の乳房切除術を経験した。手術法は女性化乳房の手術法として開発されたDavidson変法を17例に用い、1例の著しい下垂乳房例では乳房下溝に沿う長い切開で乳房切除、乳輪乳頭は遊離移植した。Davidson変法は瘢痕が乳輪周囲に限局される利点を有するが、乳腺、脂肪の切除を比較的狭い視野で行なわざるを得ないため、でこぼこ、左右の非対称などが生じうる。本手術における注意事項、手術時間、出血量、入院期間などについて報告する。

(質疑応答)

Q 三鍋：脂肪組織と乳腺組織の割合はどの程度にしているのか。

A 井上：個人により差がある。

**8. 耳甲介残存型小耳症に対する耳介形成術**

国立成育医療センター形成外科\*, 慶應義塾大学形成外科\*\*

金子 剛\*, 佐久間恒\*, 森 文子\*  
中島龍夫\*\*

当施設では、慶應義塾大学形成外科より継続して完全低形成型小耳症の耳介形成術には組織拡張器(ティッシュエキスパンダ)を用いている。一方、耳甲介残存型小耳症においては2段階手術を行ってきた。すなわち第1期手術として、耳介後面から移行した皮弁下に、耳介上半部分の肋軟骨フレームを埋入し、第2期手術で全層植皮による耳介挙上術を行うものである。しかしながら耳甲介残存型小耳症といっても、耳甲介の大きさ、耳介上半の皮膚の余裕は症例により異なっており、耳介後面の皮膚に余裕の無い症例では、露出などの

合併症も起こりやすく、これを予防するためにフレームワークを薄くするなどの工夫が必要であり、最終的な手術結果も満足が行かないことも多かった。

そこで最近では、このような皮膚の余裕のない症例においては、エキスパンダを用いた3段階手術を行い良好な結果を得ている。すなわち、第1期手術として、耳介後面から移行した皮弁下に小エキスパンダを埋入する。皮弁拡張後に、第2期手術として肋軟骨フレームを埋入する。第3期手術として全層植皮による耳介挙上術を行うものである。術式の詳細を報告し、代表的症例を供覧する。

(質疑応答)

Q 三鍋：尿道バルンなどを用いて術中エキスパンションしたらよいのではないか。

A 金子：報告例が少なく、それは後戻りが多いためであると解釈しているので行っていない。

コメント：久保田

術中エキスパンションを行うと、真皮が裂ける場合があり、危険と考えられる。

コメント：谷野

久保田先生と同意見である。

**9. 上眼瞼全層欠損に対する新しい再建法の考案**

埼玉医科大学総合医療センター形成外科  
大城貴史, 土田幸英, 若松慶太  
井上義治, 原科孝雄

眼瞼は、眼球を保護し、角膜の乾燥を防止するために重要な役割を示している。一般的に瞼裂幅の1/4以下の欠損の場合、一次的縫合が可能であるが、外傷や悪性腫瘍などで広範囲の欠損が生じた場合には、何らかの組織補充が必要になる。特に、上眼瞼の全層欠損では、眼球保護、開閉瞼といった機能再建と整容的再建が求められる。従来、上眼瞼の全層欠損に対しては、一次的縫合が不可能な場合、Cutler-Beard bridge flapやMustarde's switch flapなどが行われるが、下眼瞼組織を用いるため、手術侵襲が大きくなり、二次的な再建が必要になる。そこで、今回我々は、上眼瞼の広範囲全層欠損に対し、患側の眼窩隔膜反転及び耳介軟骨移植による一次的再建方法を考案したので報告する。

【症例】78歳女性、平成14年1月、右上眼瞼マイボーム腺癌(5×7mm)のため、腫瘍より10mm離して、上眼瞼の全層切除を施行した。再建には、前葉-上眼瞼皮膚による伸展皮弁、瞼板-耳介軟骨、後葉-反転した眼窩隔膜を用いた。機能的、整容的にも満足されていたが、左右のアンバランスが目立つため、平成14年10月左上眼瞼下垂に対して形成術を施行した。術後経過は良好で、再発も認めていない。



(質疑応答)

Q 中島：挙筋機能を温存することができる点で優れた再建方法であると思うが、皮膚が少ない場合は前葉の進展距離には限界があるのではないか。

眼窩脂肪を引き出してその上に植皮を行ったらよいのではないか。

A 大城：そのような方法も考えられると思う。われわれは比較的前葉皮膚に余裕のある症例を選択して本法を行っている。

10. 大きな前方口蓋瘻孔を伴った顎裂に対し歯槽骨延長を行った一例

東京歯科大学矯正科\*, 慶應義塾大学形成外科\*\*, 国立成育医療センター形成外科\*\*\*, 平塚市民病院形成外科\*\*\*\*, 栃木県立がんセンター\*\*\*\*\*

坂本輝雄\*, 一色泰成\*, 緒方寿夫\*\*

中島龍夫\*, 金子 剛\*\*\*

佐藤博子\*\*\*\*, 矢澤真樹\*\*\*\*\*

【目的】近年、頭蓋顎顔面部的変形に対して仮骨延長術が日常的に応用されるようになった。今回、両側性唇顎口蓋裂による両側顎裂、口蓋瘻孔を伴う不正咬合に対して、歯列矯正と口蓋瘻孔の縮小を目的として上顎歯槽骨の移動および仮骨延長を行ったので報告する。

【症例】16才9ヶ月男子。両側性唇顎口蓋裂。当該治療の一年前、前方口蓋瘻孔に舌弁による瘻孔閉鎖術を行ったが不良な結果に終わり、大きな口蓋瘻孔(16mm×14mm)が残存した。

【方法】延長器はMartin社製Zurich type ramus distractorを矯正用バンド(左右側第2小臼歯および第1大臼歯)にろう着することにより自作し、歯牙に歯科用合着材を用いて装着した。骨切り部位は、両側とも第1大臼歯近心部とした。1週間のLatencyのあと、1日1mmの速度で左側5.0mm、右側7.5mm延長した。延長終了直後から矯正治療を開始し、骨延長施行1年後に縮小残存した口蓋瘻孔を耳介軟骨と局所皮弁を用いて閉鎖した。また、残存した顎裂部にβ-TCPと多血小板血漿(PRP)を充填した。

【結果および考察】歯槽骨延長を施行することで、以下の利点および欠点を有した。利点として、1)口蓋瘻孔の縮小が図れ、瘻孔閉鎖が容易となった。2)臨在歯の移動により顎裂部を閉鎖し欠損補綴が不要となった。一方、問題点として、今回用いた延長期の延長方法が直線方向であったので、円弧上の歯列に延長方向が一致せず、また、延長方向が規定されてしまうため、延長中に延長方向、特に垂直的に修正することができず、術後矯正に時間を要した。今後は術後矯正を考慮した延長器の開発、綿密な延長計画の立案の必要性が示唆された。

(質疑応答)

Q 井上：全治療期間はどの程度か。

A 坂本：現在治療継続中であり、未定である。

追加：一色

今後どのような症例に対して本法を適応してゆけばよいのか、形成外科サイドよりの意見を聞かせて欲しい。

回答：谷野

非常に有用な方法であると思う。顎裂部が大きく、骨移植のみでは対処できない症例に対して積極的に導入してゆきたいと思う。

15:50~16:20 学術講演(IV) 工夫・臨床経験  
座長：慶應義塾大学 形成外科 田中一郎

11. 改良型耳介形成術用プロテクターの製作

国立成育医療センター形成外科\*, 慶應義塾大学形成外科\*\*

佐久間恒\*, 金子 剛\*, 森 文子\*

中島龍夫\*\*

当施設では慶應義塾大学形成外科より継続して小耳症耳介形成術に組織拡張器(ティッシュエキスパンダ)を用いている。この利点は、側頭部皮膚を拡張しておくことで、より3次元的な肋軟骨フレームワークを用いることであり、これはエキスパンダー埋入術という小手術が1回増える欠点を補って余りあるものと考えて、一方、エキスパンダーで皮膚を伸展している間は、打撲などの不慮の事故への予防が必要であり、学校などから事故防止のため通学時にプロテクターの使用を求められることもある。また、プライバシー配慮の点からも、手術の途中経過を他人に見られないようにすることが望ましい。従来より軟性ポリエチレン樹脂製のプロテクターを特注して用いていたが、今回新たにメディックス社(義肢装具士山口和章氏)に依頼して改良を加えて作製したので報告する。

プロテクターに求められる要件は以下のごとくである。  
①十分な強度があること、②他人に危害を加える可能性がないようにパッドで覆われていること、③快適であること、ズレにくく、長時間装着しても痛くならない。家族、患児が自分で微調整できること、洗濯して清潔に保てること、④ファッション性がある。カッコがよいかあるいは逆に目立たない。これらを満たすものとして以下に述べるようなプロテクターを作成した。全体を本体とベルト部分に分割し、ベルクロで脱着式とした。本体の大きさは内径7×5.5cmとし、発泡樹脂(通称PEライト)で長円形ドーム型に形成し、内側には軟性ポリエチレンを貼り付け、通気孔を多数あけて、全体を柔らかなナイロンメッシュで包んだ。ベルトは伸縮性に富むゴムテープで作製し、ビニールスポンジ製のパッドを縫いつけ、全体を同じナイロンメッシュで包んだ。本体、ベルト共に丸洗い可能である。今後、更に低アレルギーかつ高機能な素材を用いることで改良を加え、本年度より使用を予定している。

(質疑応答)

- Q 井上：エキスパンションの最中スポーツは可能なのか。  
A 佐久間：十分な保護性があり、問題ないと思う。  
A 金子：水泳など、身体接触のないスポーツは許可している。

- Q 田中一郎：費用はいくらか  
A 佐久間：1万円程度である。

## 12. 安全確実な下顎骨関節突起骨折の内視鏡手術—術前CT像によるアプローチ法の選択

杏林大学形成外科\*, 慶應義塾大学形成外科\*\*

三鍋俊春\*, 阿川かおり\*, 須網博夫\*  
池田博生\*, 尾郷 賢\*, 緒方寿夫\*\*

従来の顎関節への耳前部切開アプローチでは顔面神経や浅側頭動脈の副損傷をきたしやすい欠点があり、この大変さが関節突起骨折の手術治療を躊躇させる一要因となっていた。アメリカからの内視鏡手術の導入により、下顎角部切開や口腔内からのアプローチで骨折部を鏡視できることが示された(前埼玉医大総合医療センター井上先生, 東邦大学大西先生, 1995)。しかし、転位骨頭の探索、整復、固定までの保持においては手技の洗練が今ひとつ進まず、手術に長時間を要したり、骨頭の固定に至らない症例があり、他施設での事件ともあいまって壁に突き当たった感があった。このとき、久留米大学田井教授の「形成外科医にとっては、1~2cmの切開線の延長は気にするべきでない」との助言に、骨折の様態に応じて、下顎角部切開の下顎後方への延長、内視鏡ライトガイド下の耳前部切開アプローチを追加・併用して、内視鏡補助下に術者は直線的に助手はモニター下に手術操作を行うことで、安全確実な骨頭の整復固定が可能になってきた。特に、術前前額断CTの骨折線の位置と傾きから最適のアプローチ法を考察したので、今回報告する。

(質疑応答)

- Q 金子：骨片には十分な血行が期待できるのか  
A 三鍋：外側翼突筋の付着を温存するよう留意しているの  
で血行は問題ないと思う。

Q 若松：耳前部切開を追加することにより、主として固定と整復のいずれに関してメリットが存在すると思われるか。

A 三鍋：双方に関してメリットが存在すると思われる。

耳前部切開を加えることにより、操作を行う向きのベクトルと観察を行う向きのベクトルのなす角度が大きくなることにより、操作が行いやすくなる。

コメント：西村

私の経験によれば、耳前部切開をさらに上に延長し、頬骨を露出した後に骨膜下に剥離露出すれば、より良好な視野が得られると思う。

## 13. 顔面骨骨折に合併する眼窩下神経障害に対する経口PGE1製剤の治療経験

慶應義塾大学形成外科

田中一郎, 島田卓治, 吉川嘉一郎  
中島龍夫

【背景と目的】プロスタグランジンE<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>)は血管拡張作用、血小板凝集抑制作用、赤血球変形能改善作用を持ち、局所の循環障害が病態の要因を成していると考えられる種々の神経疾患に有効であると言われ、糖尿病性末梢神経障害、膠原病の神経炎、頸部脊椎症、脊椎管狭窄症、顔面神経麻痺、突発性難聴、下顎矢状分割術後の神経障害、帯状疱疹神経痛、外傷性疼痛症候群、反射性交感神経萎縮症、などに使用されている。一方、頬骨骨折や眼窩床骨折に合併する眼窩下神経障害は、骨折した骨片による神経の圧迫、神経周囲の浮腫・出血や転位骨片による神経の牽引などによる、直接的な神経損傷や神経内の微小循環の障害により生ずるとされており、臨床症状として知覚鈍麻、しびれなどの知覚異常や疼痛を有し、骨折骨片の整復術を行なった症例でも、長期にわたり症状が持続して、神経障害が残存する症例も経験する。今回我々は、顔面骨骨折に合併する眼窩下神経障害に対して、神経周囲の血流改善と神経内の微小循環の改善を目的として、経口PGE1製剤(オパルモン)による治療を経験したので報告する。

【方法】対象症例は頬骨骨折4例、眼窩床骨折1例の計5例で、頬骨骨折の3例で整復術を施行した。経口PGE1製剤(オパルモン)は1日15μgを3回に分けて投与し、併用薬はビタミンB<sub>12</sub>製剤(メチコバル)を1日1500μgを使用した。投与開始時期は受傷後1-2週間後で、投与期間は1-8ヶ月であった。効果は自覚症状の改善度で評価した。

【結果】4例に自覚症状の改善が認められ、1例ではかなりの改善が得られた。服薬による合併症は認められなかった。

【考察と結論】顔面骨骨折に合併する眼窩下神経障害は自然経過によっても軽快する症例も見られる一方、骨折骨片の整復術を行なった症例でも神経障害が残存する症例もあり、神経損傷自体の程度を客観的に評価するのが難しい点より、治療の適応が問題となる。薬物による保存的療法としては、整復術の施行の有無にかかわらず、ビタミンB<sub>12</sub>製剤の投与が数少ない従来より行なわれてきた方法であった。しかし、ビタミンB<sub>12</sub>製剤の長期投与を行なっても神経障害が残存してしまう症例も見られることより、投与の適応の判断は難しいが、局所の循環障害の改善による神経障害の軽快を目的として、経口PGE1製剤は顔面骨骨折に合併する眼窩下神経障害に対して、考慮されても良い治療法と思われる。

15:20~17:00 学術講演 (V) 研究  
 座長: 国立成育医療センター 形成外科 金子 剛

14. 多血小板血漿の臨床応用—問題点と今後の展望—  
 慶応大学医学部形成外科学教室\*, 病理学教室\*\*,  
 輸血センター\*\*\*

矢沢真樹\*, 緒方寿夫\*, 木村章子\*  
 中島龍夫\*, 森 泰昌\*\*, 渡邊直英\*\*\*

【目的】近年, 血小板に含まれる各種成長因子 (GF) の骨形成や創傷治癒への寄与を期待し, 多血小板血漿 (PRP) の臨床応用が散見されるが, その効果に関する基礎的報告は乏しい。特に, ①PRPには骨形成・創傷治癒に影響を与えるだけの十分なGF濃度があるのか, ②単回局所投与で十分な臨床効果が得られるのか, ③PRP臨床応用の主目的とは何か, などの点で共通の見解は得られていない。こうした点を解明するために, PRP作成法と含まれる成長因子量, 担体, 骨形成・皮膚創傷治癒への寄与などを検討してきたので, これまでの結果を文献的な考察を加えて報告する。

【方法】①PRP作成法と含有PDGF量の測定: 遠心分離法により血小板を収集し, 必要量の血漿で再浮遊させる手法でPRPを作成しPDGF濃度を測定した。②PRPをFibrin Glueを担体として兎耳介皮下に埋入し, 担体およびPDGFの消長を検討した。③a. 骨形成への影響の検討 i 兎下顎骨欠損への適応, ii 兎頭蓋骨全層欠損への人工骨との併用で評価を試みた。b. 皮膚創傷治癒への検討 i 兎耳介皮膚欠損創への外用, ii ヒト縫合創および分層採皮層への外用, を行い組織および臨床評価を試みた。

【結果】①本法ではヒト全血10mlから0.25mlのPRP作成時, 全血の35倍のPDGF濃度が得られ, 血小板凝集抑制剤としてPGE1を添加併用した場合には約140倍の濃度が得られた。②担体としてのFibrin Glueは約1週間の自然な崩壊とPDGF含有を示した。③a. PRPを適応した骨欠損部では早期から良好な骨形成傾向を認め, 人工骨気泡に良く適応した骨化を観察できた。b. 皮膚全層欠損創では, 上皮化促進傾向が示され, 臨床的には, 一部の症例に明らかな癒痕抑制が認められた。

【考察】既報の知見の鑑み, 臨床効果を得るに十分量のGFを含むPRP作成は可能と思われた。今後, 骨形成促進作用や肥厚性癒痕抑制効果などをさらに検討し, 骨延長への応用, scarless wound healingを目的とした創治癒への応用などを検討していく予定である。

15. 下肢末梢神経のAngiosomes  
 杏林大学形成外科\*, The Royal Melbourne  
 Hospital\*\*

須網博夫\*, G. Ian Taylor\*\*

【目的】神経系と血管系の走行の相似は, しばしば神経血管束と表現されるように, よく知られている。しかし, 末梢

神経にたいして, 部分的に血液供給を記載した報告は存在するが, 包括的にその関係を図示した報告はない。約2年にわたり, Prof. Taylorの研究室において, 下肢末梢神経にたいする詳細な解剖学的研究を行ったので報告する。

【方法】成人新鮮屍体を使用し, 酸化鉛とゼラチンの懸濁液を造影剤とする全身動脈注入を行った。標本は細心の注意を払い, 坐骨・大腿・閉鎖神経にたいし, 腰・仙骨神経叢から末梢まで解剖を行った。次にレントゲン撮影に先立ち, 分枝を含めた各神経の走行すべてにわたり, 細い金属線を約5mmの間隔で巻きつけた。この金属線は, レントゲンフィルム上で神経の所在と口径を判別することを意図した。続いて, フィルムをスキャンし, コンピューター上での編集をおこなった。

【結果】TaylorとPalmerは, 1987年にAngiosome conceptを提唱した。Angiosomeとは, 1本の栄養血管により血液を供給される, 皮膚・筋肉・骨を含む3次元組織ブロックのことである。下肢の神経もまた, 栄養血管により区域的に血液供給を受けており, このconceptを適用することが可能であった。さらに, 神経の各angiosomeにたいして, 遊離血管付神経移植の適合性に基づく分類 (Taylor, 1976) を用いて, 5型に分類した。

【考察】遊離血管付神経移植のドナーや神経血管束を含めた皮弁の挙上には, 神経と血管が伴行していることが必要とされる。この条件を満たす下肢の神経には, 伏在神経遠位部, 大腿神経外側広筋枝, 深腓骨神経遠位部, 後大腿皮神経が考えられた。

(質疑応答)

Q 井上芳治: (神経移植について) 血管柄付神経移植を行うことにあえてメリットが存在するのか。

A 須網: 放射線照射部位など, 母床の血行が不良な部分に関しては有用性があると考えます。

Q 三鍋: 神経のangiosomeを決定するに当たっては, 末梢のレベルの血管が筋肉の場合と比較して観察しにくく, 苦勞すると思われるが, その点に関してどうか。

A 須網: 指摘のとおりである。その点に関して難渋した。

16. 母斑細胞とメラノサイトのE-cadherinの発現の差異  
 慶應義塾大学形成外科

松田就人, 貴志和生, 中島龍夫

【目的】E-cadherinは主に, 表皮細胞に発現することが知られている。メラノサイトは神経提に由来し, 真皮を通り表皮内に遊走してくるが, 表皮に入る前にE-cadherinを発現し, 最終的に分化する。我々は, 母斑細胞は表皮にも存在するが, 主に真皮内に多く留まっていることに着目し, *in vivo*で母斑細胞がE-cadherinを発現しているか否かを調べるとともに, 各細胞が培養下にE-cadherinを発現するか否かを検討した。

【材料と方法】ヒト巨大色素性母斑切除術の際に得られた組織を、O.C.T compound に包埋し急速凍結した後、7 μm の凍結切片をアセトン固定し、抗 E-cadherin 抗体を用いて免疫染色を行った。一部の組織は、0.25% trypsin-EDTA で処理し、表皮と真皮に分け、それぞれを collagenase と 0.25% trypsin-EDTA の 1:1 溶液でさらに処理し、遠心後、上清を除去し、10% FBS, cholera toxin 1 μg/ml, PMA 10 ng/ml, b-FGF 3 ng/ml を添加した HamF-12 培地内に浮遊させ、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 下に培養を開始した。約 50% の confluent に達した時点で、geneticin 100 μg/ml を培地に加え、4-7 日間 37℃ で培養した。その後前述の培地に戻し、それぞれの細胞を培養し、E-cadherin の発現を観察した。

【結果】組織的に真皮母斑細胞は E-cadherin を発現しておらず、表皮メラノサイトでは E-cadherin が発現していた。また培養下では、真皮由来色素細胞は E-cadherin を発現しておらず、表皮由来色素細胞は E-cadherin を発現していた。

【結論】E-cadherin を用いて母斑細胞とメラノサイトを分離できる可能性が示唆された。

(質疑応答)

Q 谷野：本研究は臨床的にはどのように応用可能であるのか。  
A 松田：真皮内に存在する色素細胞に E カドヘリンを発現させることが可能になれば、abrasion などにより色素細胞を除去することが可能となるであろう。

コメント：佐々木

本研究の結果は母斑の診断に応用できると思う。生後数週 of 乳児の母斑において、生検を行えば、その細胞上の E カドヘリンの発現の有無により、今後の色素性細胞の挙動が推測できるからである。

#### 17. 母斑細胞母斑の治療時期の検討 (遅め希望)

医療法人社団慶光会大城クリニック\*, 日本医用レーザー研究所\*\*, 慶応義塾大学形成外科\*\*\*

佐々木克己\*, 大城俊夫\*\*, 安田昇平\*  
藤井俊史\*, 大城貴史\*\*\*

【はじめに】当院では、1974 年から 2002 年まで 3126 症例の母斑細胞母斑を治療している。従来母斑細胞母斑の患者は、生後早期に産婦人科、小児科や皮膚科医らの診察を受けても 1 才過ぎてから来院する症例が多かった。当院の来院時年齢で分類すると 1 才未満 116 例、1 才から 10 才未満 527 例と明らかに 1 才以降での来院が多い。

【目的】今回、母斑細胞母斑のレーザー治療開始時期は、

いつが最適なのかを検討した。

【対象及び方法】過去 3 年間来院し、治療後半年以上経過観察できた母斑細胞母斑の症例を対象とした。そのうち 6 ヶ月未満に治療を開始した 8 例と 6 ヶ月以降 1 才未満に開始した 9 例を比較検討した。使用したレーザーは、ウルトラパルス炭酸ガスレーザー：ULTRAPULSE 5000™ (COHERENT；USA) 波長 10600 nm, 50 W, 300 mj/cm<sup>2</sup>, 1 msec CPG 使用と Q スイッチルビーレーザー：Spectrum RD-1200™ (Palomar, USA) 波長 694 nm, 8 J/cm<sup>2</sup> 5 φ とアレキサンドライとレーザー Super LPIR (Cynosure, USA) 波長 755 nm, 16 J/cm<sup>2</sup> 10 φ である。評価は、肉眼的観察と absorption spectra を行い色調及び面積の 50% 改善度に至るまでの治療回数と治療期間を記録した。

【結果】色調及び面積の 50% 改善度に至るまでの平均治療回数は、6 ヶ月未満は 2.5 回に対し 6 ヶ月から 1 才未満は 7.1 回であった。平均治療期間は、前者が 4.6 ヶ月に対し後者は 17.3 ヶ月であった。

【考察】母斑細胞母斑は、生後 6 ヶ月未満に開始した症例で 6 ヶ月以降 1 才未満に比べ平均治療回数と平均治療期間の両方とも p<0.05 で有意の差が見られた。母斑細胞母斑は、太田母斑と異なり個体差があり治療成績は一定しないものの 6 ヶ月未満で治療開始することで治療回数や治療期間を大幅に短縮することが可能と考えられる。その主な要因としては、レーザー光の感受性、進速度、皮膚の厚さ、皮下脂肪の厚さ、毛胞の数、皮脂腺の数、皮膚 GAG の変化、創傷治癒などの因子が挙げられる。

今回代表的な症例を供覧し検討の結果を報告する。

(質疑応答)

Q 中島：乳児背部の色素性母斑をレーザーで治療する場合、一回の治療時間はどの程度か。

A 佐々木：炭酸ガスレーザーを使用する場合、約 20 分間である。

瘻痕化しないよう深さには十分注意しつつ行う。

Q 貴志：瘻痕の赤みが色相変化の測定に影響を及ぼしているのではないか？

A 佐々木：測定結果に直接影響はないと考える。

コメント：中島

キュレージとレーザーで適応に関して住み分けを行うのではなく、症例に応じて適宜両者を組み合わせるのが良いと思う。

## 学会展望

### 第26回慶應外科フォーラム総会

日 時：2003年1月18日（土）13：00～18：30

場 所：東京コンファレンスセンター

主 催：慶應外科フォーラム

事務局：〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

慶應義塾大学医学部一般消化器外科内

13：00	開会の辞	会 長 北 島 政 樹
13：05～13：47	学術講演（I）1～6	座 長 下 山 豊
13：47～14：29	学術講演（II）7～12	座 長 白 部 多可史
14：29～15：04	学術講演（III）13～17	座 長 西 海 孝 男
15：04～15：25	- 休 憩 -	
15：25～16：07	学術講演（IV）18～23	座 長 大 石 崇
16：07～16：49	学術講演（V）24～29	座 長 掛 札 敏 裕
16：49～17：00	- 休 憩 -	
17：00～18：00	特別講演 『胃癌治療—反省からの新たなる展開—』 鹿児島大学医学部第一外科 教授 愛 甲 孝	司 会 北 島 政 樹
18：15～18：25	前田賞受賞式	
18：25	閉会の辞	会 長 北 島 政 樹

### 1. 胃原発性 GIST 再発例に対する STI571 の使用経験

国立病院東京医療センター外科

木村成卓, 磯部 陽, 長崎和仁  
徳山 丞, 和田則仁, 北條 隆  
浦上秀次郎, 星屋泰則, 島田 敦  
大石 崇, 池内駿之, 窪地 淳

はじめに: GIST 再発例に対する分子標的治療薬 STI571 の有用性が本邦でも報告されつつある。今回、われわれも胃原発性 GIST 術後再発例で PR の効果を得たので報告する。

症例: 38 歳男性。2001 年 10 月 30 日胃体部原発の 18×10cm の GIST 対し胃全摘, 脾臓併切除を施行。切除腫瘍の免疫染色では CD34, CD117 が陽性, SMA, S100 が陰性であった。2002 年 4 月中旬, 左腰部部に突出する腫瘍が出現し, 食欲低下と摂食困難のため 5 月 9 日再入院した。入院時, 肝, 腎機能の低下を認め, 腹部超音波検査で肝左葉外側区域に 77×66 mm, 肝門部に 72×59 mm の腫瘍を認め, 腹部 CT で肝左葉, 肝門部, 左側腹部, 左腎背側等に巨大な腫瘍を認めた。以上より, GIST 術後の肝, 腹膜転移と診断し, tyrosine kinase 阻害剤である STI571 の 400 mg/日経口投与を 5 月 16 日より開始した。なお, 本剤は GIST に対し未承認であるため, 治療前に院内倫理委員会の承認を得た。投与開始 2 日後には食欲が出現し, 食事摂取も良好となり, 11 日後の腹部超音波検査で, 肝左葉外側区域と肝門部の腫瘍の縮小が確認され (縮小率 52%), 5 月 29 日退院となった。2 か月後 (7 月 12 日) の腹部 CT では各転移果の縮小 (縮小率 51%) と嚢胞性変化が認められ, また 4 か月後 (9 月 26 日) の腹部 CT では縮小率 71% となり, 治療効果は PR と判定された。6 ヶ月後の現在, 治療を継続中であり, 再燃の徴候を認めていない。なお, 薬物有害反応は grade I の嘔気と浮腫のみで, 前者は自然軽快し, 後者は数日の休薬で消失した。

結語: 胃原発性 GIST 術後肝, 腹膜再発例に対し, STI571 を投与して PR の抗腫瘍効果と臨床症状の著明な改善を得た。その効果は投与後速やかに発現し持続的であり, STI571 は GIST 再発例に対する有力な治療薬になり得ることが示唆された。

### 2. 十二指腸 GIST 切除後, 多発肝転移に対する STI-571 治療が有効であった一例

伊勢原協同病院外科

横山剛義, 篠田政事, 中安邦夫  
飯尾 宏, 西岡道人, 武田尚一郎  
別所 隆

同病理

梶原 博

Gastrointestinal stromal tumor (以下, GIST) は, 消化管の間葉系腫瘍を広く含む概念である。最近その治療法は従

来の外科的療法に加え c-kit 陽性の GIST に対する STI-571 (イマチニブ) 内服投与の有効性が報告されており注目を集めている。

今回われわれは, 十二指腸 GIST 切除後の多発肝転移に対し, STI-571 投与が有効だった一例を経験したので, 若干の文献的考察を加え報告する。

症例: 32 歳男性。既往歴, 家族歴: 特記すべきことなし。

現病歴: 平成 12 年 5 月中旬より右上腹部に腫瘤触知。6 月 9 日, 当院入院。諸検査にて十二指腸第二部壁外に 12 cm の腫瘤を認め 6 月 27 日, 臍頭十二指腸切除術を施行した。腫瘍細胞は紡錘形であり, 細胞異型は乏しく, 各種組織免疫抗体法を施行したところ, SMA, desmin では染色されなかったが, 筋原性マーカー (caldesmon, calponin) で染色されたため, smooth muscle type に分類される GIST と診断された。また c-kit は陽性であった。平成 13 年 7 月の CT にて多発肝転移を認め, 平成 14 年 2 月, 国立がんセンター中央病院受診。同年 4 月 16 日より STI-571 400 mg/day 内服開始。現在に至るまで治療続行するも, 治療中止に至る有害事象は認めなかった。

結果: 投与 5 ヶ月時点で主治医判定: 縮小率 52%; PR であった。

### 3. c-Kit 陽性 GIST に対しメシル酸イマチニブが著効を認めた 1 症例

慶応義塾大学医学部外科

林田 哲, 上田政和, 河地茂行  
田辺 稔, 相浦浩一, 若林 剛  
大谷吉秀, 島津元秀, 久保田哲朗  
北島政樹

目的: 胃原発・多発性肝転移をきたした Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST) の症例に対し, メシル酸イマチニブを使用し, 著明な効果を認めたため報告する。

症例: 症例は 58 歳男性。胃噴門部後壁に粘膜下腫瘍を指摘され, 1998 年 12 月 9 日噴門側胃切除術施行。切除検体は免疫組織学的に c-Kit 及び CD34 いずれも陽性であり, GIST と診断。術後経過観察中, 肝 S7 区域に径 40 mm 大の転移性病変指摘され, 2001 年 2 月 1 日肝右葉切除術施行。しかし同年 12 月 28 日施行の MRI にて, 残肝に最大径 15 mm の多発性肝転移果を 25 個以上指摘された。これに対し, メシル酸イマチニブ (Glivec®) 800 mg/日の投与開始後 2 ヶ月にて, 多数の肝転移果は大部分消失。1 cm 以下の転移を 3 つ同定するのみであった。さらに投与開始 5 ヶ月後の MRI にて完全寛解を認め, 投薬を終了したが, 投与開始 11 ヶ月を経た現在においても, 病変の再発を認めていない。

考察: c-kit 遺伝子は受容体型チロシンキナーゼをコードしており, この突然変異が GIST の発生に関与している可能性が指摘されている。今回チロシンキナーゼ阻害薬であるメシル酸イマチニブ投与にて著効を得たことにより, GIST に

に対する有効な治療法である可能性が示唆された。

#### 4. 高度リンパ節転移を伴った胃内分泌細胞癌の 1 例

水戸赤十字病院外科

千葉斉一, 諏訪達志, 佐々木貴浩  
星川竜彦, 山口 博, 内田智夫  
佐藤宏喜, 古内孝幸, 竹中能文  
佐久間正祥

同病理検査科

堀真佐男

はじめに：胃内分泌細胞癌は全胃癌中の約 0.1~0.2%と比較的稀な疾患で、比較的早期より高度な脈管侵襲を伴い、非常に予後の悪い疾患とされている。胃内分泌細胞癌の 1 例を経験したので 2002 年までの詳細の判明した本邦報告 88 例を集計し、通常の胃癌と比較して病理学的悪性度について検討して報告する。

症例：75 歳の女性で、平成 14 年 5 月の検診にて胃透視異常を指摘され当院内科受診。上部消化管内視鏡にて胃体上部に 2 型病変を認め、生検にて胃内分泌細胞癌と診断され、7 月に当科入院、胃全摘 (D2+α)、脾胆嚢合併切除術を施行した。手術所見にて肝転移・腹膜播種は認めなかったが、病理組織学的所見にて 14v リンパ節に転移を認め、最終診断は胃癌取り扱い規約上、pT2 (ss), pN3, sH0, sP0, pM1 (LYM), fStageIVであった。術後 5 ヶ月の現在 TS-1 を内服しており、再発兆候は認められていない。

考察及び結論：本邦で報告された胃内分泌細胞癌 88 例と胃癌集計例とを比較検討した結果、内分泌細胞癌は通常の胃癌に比べてリンパ管侵襲 (p<0.01) 及び静脈侵襲 (p<0.01) を高率に起こし、リンパ節転移 (P<0.01)、肝転移 (P<0.05) も多かった。深達度によって層別化して両疾患群の差について検討すると、特に T2 までの症例において通常の胃癌に比べてリンパ節転移 (p<0.01)、肝転移 (p<0.01) を高率に認めた。一方 T3 以上の症例ではリンパ節転移、肝転移共に差は認められなかった。また 2cm 以下のものでも通常の胃癌と比較して T2 以上のことが多く (p<0.05)、早期の内分泌細胞癌が粘膜下腫瘍様の形態をとることと結びつくと考えられた。そして以上のことは、胃内分泌細胞癌は比較的早期よりリンパ節転移・肝転移を高率に引き起こし予後が悪いといった今まで報告されてきた事実を統計学上裏付けるものと考えられた。本症例においても今後の慎重な経過観察が必要であると考えられる。

#### 5. 当院における腹腔鏡併用幽門側胃切除術の経験

川崎市立川崎病院外科

一色聡一郎, 田淵 悟, 清水宏之  
大森 泰, 石井誠一郎, 納賀克彦

慶應義塾大学医学部外科

北川雄光

当院では平成 11 年より早期胃癌に対する低侵襲手術として腹腔鏡併用幽門側胃切除術を導入し、これまで 28 例を経験した。その手技と成績につき検討し報告する。

対象および方法：M または L 領域の早期胃癌のうち、日本胃癌学会による胃癌治療ガイドラインに定められた縮小手術 A の適応となる症例を対象とし、患者のインフォームド・コンセントが得られたものに対して腹腔鏡併用幽門側胃切除術を施行した。Hand-assist は行わず、血管処理および郭清を腹腔鏡下に行ったのち、5 cm 程度の小開腹創をおいて標本摘出および吻合を行った。

結果：平成 11 年 12 月より平成 14 年 10 月までに 28 例の腹腔鏡併用幽門側胃切除術を施行した。開腹へ移行した症例はなかった。郭清度は D01 例, D17 例, D1+α12 例, D28 例であった。再建方法は全例 B-I で、15 例が Circular stapler を用いた機械吻合、13 例が手縫いであった。術後合併症として 4 例で吻合部狭窄を認めたが、いずれも保存的に軽快した。1 例は術後壊疽性胆嚢炎 (無石性) を併発し、第 2 病日に緊急手術を行った。切除検体の病理組織では M15 例, SM11 例, MP2 例であり、pN026 例, pN12 例 (MP, SM2 各 1 例) であった。術後観察期間は短い、今のところ再発は認めていない。

結論：腹腔鏡併用幽門側胃切除術は根治性と低侵襲性を兼ね備えた有用な術式であるが、手術時間の短縮とさらなる安全性の向上が今後の課題である。また、長期成績および適応拡大に関しては今後慎重に検討する必要がある。

#### 6. 上部進行胃癌に対する腹腔鏡下噴門側胃亜全摘術

多摩丘陵病院外科

白部多可史, 今井達郎, 千葉洋平  
川久保雅祥

最近では一部の施設において幽門側胃癌に対しては腹腔鏡下に D2 郭清を伴う幽門側胃亜全摘術が積極的に行われるようになってきた。しかし、上部胃癌に対する 2 群郭清は HALS を併用して行ったとの報告が一部にみられるものの完全腹腔鏡下に郭清した報告はほとんどない。われわれは 4 例の上部進行胃癌に対して脾摘を伴った D2 郭清を完全腹腔鏡下に施行し、その後 6 cm の小開腹下に有茎空腸を間置して再建する手技を確立したので報告する。最初に胃・結腸間膜の切離を脾下極まで進めた後、脾臓の背側に廻りこんで脾尾部脾臓を後腹膜より脱転した後、脾尾部に接して左胃大網動脈及び脾動脈を切断する。続いて脾臓と上部胃を牽引脾体尾部と切り離しながらを腹腔動脈の根部に達する。さらに幽門口側で大彎側の胃辺縁動脈を処理して 4d リンパ節のある程度胃壁より切離して大彎の切除ラインを決定した後、肝胃間膜を切開し、3 番リンパ節の幽門寄りを胃壁より切り離して視野を展開し、総肝動脈領域を郭清する。続いて腹腔動脈根部を郭清した後、食道を全周性に露出し最後に 11 番の郭清を追加して上部胃癌に対する D2 郭清を終了する。再

建は上腹部に置いた小開腹創より噴門側胃を亜全摘し結腸後に挙上した有茎空腸を間置した。手術時間は平均354.5分、出血量は平均418gで術中・術後の合併症はなく、術後在院日数は平均14.5日であった。4例中1例で腹膜播種を経験しており、正確な術前の深達度診断が要求されるが、深達度MPの進行胃癌に対する標準術式の一つになりうる可能性があると思われた。

座長まとめ—学術講演 (I)(1~6)

聖母病院 下山 豊

消化管間葉系腫瘍は平滑筋腫瘍などと考えられてきたが、免疫組織学的な検索等の進展により Gastrointestinal stromal tumor : GIST という概念にまとめられるようになった。また、それらの多くが c-kit を高発現し、Cajal の介在細胞由来であることが示唆されている。従来これらの腫瘍の根治は手術療法に限られ、進行・再発例に有効な治療手段は存在しなかった。最近、CML の治療を目的とし、Bcr-Abl tyrosine kinase 阻害剤として創薬されたメシル酸イマチニブが c-Kit tyrosine kinase をも阻害することが明かとなり、その GIST に対する効果が注目を集めている。本セッションでは術後再発をきたした GIST に対してイマチニブを使用し、PR あるいは CR が得られた 3 症例が報告された。将来の GIST に対する治療戦略の確立に向けて極めて有益かつ示唆に富む発表であった。次いで、肉眼的に根治切除を行い得た高度進行胃内内分泌細胞癌症例が提示された。内分泌細胞癌は通常の胃腺癌に比べ悪性度が高いことが知られているが、同症例では術後に TS-1 による補助化学治療が行われ再発兆候は認められていない。今後の経過が注目される。最後に胃癌に対する腹腔鏡下胃切除術を積極的に行っている 2 施設からその経験についての報告がなされた。胃癌に対して腹腔鏡下胃切除術が標準手術となるか否かはまだ確定していないが、近未来にはある部分に関してはその可能性が大と考えられる。その点で非常に示唆に富む報告であった。

## 7. 肝癌に対する凍結融解壊死療法 (Cryoablation)

慶應義塾大学医学部外科

赤津知孝, 若林 剛, 田邊 稔  
上田政和, 島津元秀, 相浦浩一  
河地茂行, 吉田 昌, 滝川 穰  
橋本健夫, 松浦芳文, 阿部雄太  
城戸 啓, 林田 哲, 八木 洋  
伊藤康博, 宮田量平, 北島政樹

**目的:** 肝癌に対して凍結融解壊死療法 (Cryoablation) を施行したので報告する。

**対象および方法:** 当科では 2002 年 1 月 22 日から 12 月 2 日までに肝細胞癌 43 例, 転移性肝癌 9 例に Cryoablation

を施行した (男 35 例, 女 17 例, 平均年齢 66.2 歳) 0 基礎疾患は C 型肝炎 32 例, B 型肝炎 6 例, Child-Pugh 分類は A34 例, B18 例であった。前治療歴なしが 20 例, ありが 32 例 (平均 2.3 回, 最高 8 回) であった。

**結果:** 治療した腫瘍の総個数は 97 個であり (最大は 6 個, 13 例は 3 個以上), 腫瘍径は平均 26.5 mm であった (最大は 95 mm, 38 個は 30 mm 以上)。アプローチは経皮 22 例, 胸腔鏡下 7 例, 腹腔鏡下 3 例, 小開腹 16 例, 開腹 4 例であった。局所再発は 4 例 (7.7%), 局所再発腫瘍数は 4 個 (4.1%) であった。合併症は腹腔内出血 4 例, 血小板減少 (輸血あり) 4 例, 創離解 1 例, 皮下血腫 2 例, 肝不全 1 例であった。

**考察および結論:** 初期成績として腫瘍に対する良好な局所制御率を認めた。大きなサイズ, 個数の多い腫瘍, 肝内主要脈管に接する腫瘍も治療が可能であった。また, 過去に複数の治療歴を有する再発癌に対しても有効であった。比較的短期入院による治療が可能であり, 経皮的治療 (局麻下) では他の熱凝固療法とは異なり疼痛が皆無であった。

## 8. 当科における肝細胞癌に対する生体部分肝移植

慶應義塾大学医学部外科

赤津知孝, 島津元秀, 若林 剛  
田邊 稔, 星野 健, 河地茂行  
吉田 昌, 渡辺稔彦, 渋谷慎太郎  
橋本健夫, 滝川 穰, 下島直樹  
阿部雄太, 金田宗久, 城戸 啓  
新谷恒弘, 林田 哲, 八木 洋  
秋吉沢林, 伊藤康博, 井上史彦  
宮田量平, 森川康英, 北島政樹

**目的:** これまで当科で施行した生体部分肝移植 57 例のうち肝細胞癌 4 例について検討した。

**対象および方法:** 年齢は 50 歳から 57 歳, 基礎疾患は B 型肝炎 2 例, C 型肝炎 2 例であった。Child-Pugh 分類は B1 例, C3 例, 肝障害度は B1 例, C3 例であった。3 例はミラノ基準を満たしていた。いずれの症例も術前に肝外転移, 主要脈管への浸潤を認めなかった。移植の理由は肝予備能の低下による根治不能 2 例, 再発肝細胞癌 1 例, incidental tumor 1 例であった。

**結果:** 腫瘍の進行度は Stage I 2 例, Stage III 1 例, Stage IV A 1 例であった。術前後の補助化学療法は Stage IV A の 1 例に行った。病理組織学的には高分化型 2 例, 中分化型 2 例, 脈管侵襲陰性 3 例, 陽性 1 例であった。予後については, 4 例中 3 例は術後 5 ヶ月から 29 ヶ月で肝炎および肝細胞癌の再発を認めず生存中である。しかし, 組織学的に中分化型, 脈管侵襲陽性であった 1 例は肺に転移し切除を施行したが, 再度の転移により移植後 12 ヶ月で死亡した。

**結論:** 生体肝移植においてもミラノ基準を満たせば良好な



成績が期待できるが、さらに生体肝移植独自の移植適応を確立する必要がある。今後の課題として、免疫抑制軽減の工夫や補助化学療法の開発などが挙げられる。

## 9. 自己免疫性膵炎の 3 例

### 公立福生病院外科

河島俊文, 諸角強英, 宮崎洋史  
古川秋生, 仲丸 誠

はじめに：自己免疫の関与が推測される膵炎が自己免疫性膵炎として注目され各種病態や画像所見の検討が行われている。膵腫大および膵管の狭細化を伴った自己免疫性膵炎の 3 例を経験したので若干の文献的考察を加えて報告する。

症例 1：67 歳、男性。平成 14 年 1 月より全身搔痒感が出現し、3 月 23 日に近医を受診した。軽度の黄疸を認め腹部 CT を施行したところ、閉塞性黄疸、膵癌疑いにて当院紹介され受診となった。眼球結膜に軽度黄疸を認めた。腹部症状は認めなかった。血液生化学検査では、軽度黄疸、肝胆道系酵素の上昇、 $\gamma$ グロブリンの上昇、IgG の上昇を認めた。腹部 CT では膵臓びまん性腫大を認めており、ERCP 上、膵管、下部総胆管、右肝内胆管の狭窄、左肝内胆管の不整像を認め原発性硬化性胆管炎の可能性も疑われた。

症例 2：38 歳、女性。平成 13 年 9 月頃より上腹部痛が出現し近医に通院していた。同年 10 月末より上腹部痛の増悪を認めたため近医にて精査したところ膵腫大を認めたため平成 13 年 11 月 16 日当院を紹介され受診となった。貧血黄疸認めず。左上側腹部痛あり腹膜刺激症状は認めなかった。血液生化学検査では、 $\gamma$ グロブリンの上昇、IgG の上昇を認めた。腹部超音波、腹部 CT では膵臓びまん性腫大を認めており、ERCP 上、膵管の狭細像を認めた。

症例 3：65 歳、男性。平成 13 年 11 月頃より糖尿病にて内服治療中、平成 14 年 9 月 10 日より腹痛が出現し、9 月 13 日に近医を受診した。腹部 CT 上、膵腫大、膵嚢胞を指摘され当科紹介され受診となった。黄疸貧血は認めなかった。腹部所見は認めなかった。血液生化学検査では  $\gamma$ グロブリンの上昇、IgG の上昇を認めた。腹部超音波、腹部 CT では膵臓びまん性腫大を認めており、ERCP 上、膵管の狭細化を認めた。以上の所見より自己免疫性膵炎の可能性が示唆され 3 症例ともステロイド治療を開始した。いずれもステロイド治療は有効で腹部 CT にて膵臓のサイズの正常化、ERCP 上膵管の狭細化の改善を認めた。われわれは膵管狭細化を伴った自己免疫性膵炎の 3 例を経験したので報告する。

## 10. 教室における肝臓治療の新しい流れ

### 慶應義塾大学一般・消化器外科

瀧川 穰, 若林 剛, 田邊 稔  
河地茂行, 上田政和, 島津元秀  
北島政樹

背景：原発性肝細胞癌の 9 割以上がウイルス性肝障害を背景肝として発症しており、根治的治療がなされた患者の約 8 割が 5 年以内に再発を来すため、一人の肝癌患者に対し何度も治療を行う必要がある。こうしたことから現在 ablation を中心とした各種の局所治療法が急速に普及している。しかし、切除や他の局所治療を含めた肝臓に対する治療体系を確立することが必要である。

目的：教室では低侵襲かつ局所根治的な低侵襲肝臓手術を提唱し、肝細胞癌治療の体系化を行う。

方法：1995. 7~2002. 9 までに施行した低侵襲肝臓手術（内視鏡下肝切除：ER、内視鏡下 ablation：EA、経皮的 ablation：PA、小開腹下肝切除/ablation：ML）の治療成績と、凍結治療を導入した 2002. 1~2002. 9 までに当科で行った肝臓治療の内訳を検討した。低侵襲肝臓手術の術式選択は、まず、腫瘍ごとに切除か ablation かを決め、次にそのアプローチ法（best approach）を決めた。切除は内視鏡下（腹腔鏡・胸腔鏡）→小開腹→開腹の順で、ablation は経皮的→内視鏡下→小開腹の順で best approach を決めた。Ablation の方法は、マイクロ波（2 cm>）、ラジオ波（3 cm>）、凍結治療（3 cm<）を選択した（best modality）。

結果：1995. 7~2002. 9 までに 120 例の低侵襲肝臓手術を行った。局所再発率は 4.2%（5/120）で、累積 3 年生存率は 92.9%であった。合併症として 1 例（0.8%）に肝不全を認めた他は、重篤なものはなかった。2002. 1~2002. 9 までに 117 例の肝臓患者を治療したが、内訳は開腹肝切除 11%、TAE 29%、肝動注 3%、肝移植 1%で、低侵襲肝臓手術が全体の 56%を占めた。

結論：低侵襲肝臓手術は低侵襲な肝臓の局所根治的治療として有効であった。今後、当科では低侵襲肝臓手術と肝移植を軸とした肝細胞癌治療を行って、長期成績の向上を目指す。

## 11. 著明な膵管内進展をきたした非機能性膵内分泌腫瘍の一例

### 慶應義塾大学医学部外科

市村真也, 菅沼和弘, 瀧川 穰  
赤津知孝, 和田真弘, 若林 剛  
相浦浩一, 田邊 稔, 北川雄光  
久保田哲朗, 北島政樹

症例は 43 歳男性。糖尿病にて近医で 1 年前より加療を受けていた。糖尿病精査での CT、超音波検査にて膵体部の腫瘤と尾側膵管の著明な拡張を指摘され、膵体部癌の疑いで当院紹介となった。入院後の精査にて膵体部に径 15 mm の比較的境界明瞭な類円形の腫瘍を認め、尾側膵管の著明な拡張を認めた。CT 及び血管造影で hypervascular な腫瘍であり、ERCP、EUS にて主膵管内に腫瘍が進展している可能性が指摘された。入院時 CEA5.7, CA19-9 19, DUPAN-2<25, エラスターゼ 263 と腫瘍マーカーはほぼ正常範囲であった。膵内分泌腫瘍の可能性を疑い、ホルモン検索を施行

するも明らかな異常を認めず、頭部CTや頭部超音波検査も施行したが、多発性内分泌腫瘍症は否定的であった。膵体部の非機能性内分泌腫瘍を疑い手術を施行した。開腹所見では膵体部に約2cm大のelastic hardな腫瘍を認め、多臓器への浸潤は明らかではなかったが膵管癌は否定出来なかったために、周囲リンパ節郭清を含めた尾側膵切除術を施行した。切除検体では最大断面1.4×1.0cmの黄色調腫瘍であり、主膵管内に約1cmにわたり膵頭方向に腫瘍栓を形成していた。術中迅速病理にて泡沫状の胞体を有する異型細胞が、線維化した間質を伴って浸潤性に増殖している所見を認めたが、確定診断を得なかった。術後の病理診断にて組織学的に腫瘍細胞が索状または胞巣状に増殖しており、硝子化の目立つ間質を伴い、内分泌腫瘍の所見であった。細胞異型は乏しいが、浸潤性増殖が認められ静脈浸潤も伴い、Well differentiated endocrine carcinomaに相当する像であった。術後経過は良好で第14病日に退院した。膵内分泌腫瘍は全膵腫瘍の約5%と比較的稀な腫瘍でありなかでも非機能性腫瘍は内分泌腫瘍の約15%であり大変まれであり症状もないことから非常に進んだもしくは転移を伴った状態で発見される事が多い。当症例は著明な膵管内進展という特異な形式で发育した非機能性膵内分泌腫瘍であり、手術的に根治切除が可能であった。若干の文献的考察を加え、報告する。

## 12. SLE患者に発症した腹腔内出血を伴う特発性胆嚢出血の1例

慶應義塾大学医学部外科 4NB team

萩生田純, 河地茂行, 井上史彦  
岡林剛史, 渋谷慎太郎, 清水芳政  
池田 正, 北島政樹

症例は39歳女性。23歳時SLEと診断され、33歳時からは慢性腎不全にて維持透析が導入されていた。1ヶ月前より紅斑の増悪、抗ds-DNA抗体値の上昇を認め、ステロイド増量(5→10mg)され当院内科通院中であった。6日前より自覚した心窩部痛が増強し、軽快を認めないため当院救急外来を受診した。来院時、右上腹部に限局した圧痛と反跳痛を認めたが、筋性防御は認めなかった。腹部CT検査上・肝表面の腹水貯留、胆嚢の腫大と内部にモザイク状の胆嚢内容を認め、腹部超音波検査上はdebrisと考えられた。また、壁肥厚は軽度であった。末梢血及び生化学検査ではWBC10800・CRP2.2であり、黄症や肝機能の異常は認めなかった。入院後、徐々に疼痛が増強し、腹部全体の筋性防御も出現したため、急性胆嚢炎・汎発性腹膜炎の診断のもと、緊急手術を施行した。開腹所見では、腹腔内広汎に中等量の凝血塊を伴う血性腹水を認めた。腹腔内を注意深く観察したところ、胆嚢体部に漿膜の裂傷を認め、持続的な出血を認めた。穿孔は認めず、他に出血源と考えられるような異常を認めなかった。胆嚢壁は薄化し非常に脆弱であり、debrisと思われた胆嚢内容は大量の凝血塊で、結石は認めなかった。胆

嚢摘出術を施行し、胆道造影にて異常がないことを確認後、洗浄ドレナージを行い手術を終了した。病理組織学的検査では、壁全層にわたる広汎な出血とともに粘膜から筋層にかけての高度な好中球浸潤を認め、SLEによる血管炎の増悪に伴う胆嚢出血が考えられた。

胆嚢出血の報告例は、高度の炎症に伴う出血性胆嚢炎が散見されるが、膠原病に伴う血管炎を基盤とした胆嚢出血は非常に稀である。また本症では、胆嚢の過度な緊満によると思われた裂傷により腹腔内出血を伴っており、この点でも稀な症例と考えられた。本症例を含め、特発性胆嚢出血の基礎疾患との関係、診断方法につき文献的考察を加え報告する。

座長まとめ-学術講演(II)(7~12)

多摩丘陵病院外科 白部多可史

肝胆膵領域の6題の座長を勤めさせて頂きました。大学からの発表が5題と福生病院の発表でしたが、大学からは肝臓グループが中心となって行っている最新の肝臓癌の治療法が発表され大変興味深く拝聴いたしました。特にCryoablationは以前学会で若林先生が発表されたのを聞いて以来興味を持っておりましたが、今後手術成績を凌ぐ可能性のある安全な治療法のように感じました。外科医も単に手術だけしていればよい時代は終わったことを改めて感じさせられました。また究極の治療法である生体肝移植に関しても安全性が高まっていることを実感いたしました。余談になりますが、移植は膨大な医療費の増大を招くことになるので、移植に否定的な人も多い現状で保険診療となっていることには疑問を感じています。また、福生病院の発表はトピックな自己免疫性膵炎に関してで、同一施設で3例も見つかったことは病気を知っているか否かで診断率も変わってくるのではないかと思います。常日頃の勉強が大事だと反省させられました。大学の2題の症例報告も大変珍しい疾患で勉強になりました。演者の方は皆さん大変よく勉強されていると思いましたが、敢えて苦言を呈すると肝臓治療に関して発表された方々が発表時間を守らず大幅な時間超過でした。どんなに内容が濃くてもそれを時間内にまとめることも学会発表で要求されている能力の一つであることを認識して頂きたいと感じました。

## 13. 鏡視下に切除し得た大きな乳腺腫瘍の1例

国立埼玉病院外科

石本祐子, 朝戸 裕, 田中 彰  
早津成夫, 原 彰男, 牛島康榮

国立療養所多磨全生園外科 牛田知宏

10cm大の大きな乳腺腫瘍に対し乳房に大きな傷を残さない事を目的に、内視鏡的に切除し得たので報告する。

症例は39歳の独身女性。6年前に右乳腺のB領域の線維

腺腫と診断されていた。その後徐々に増大し受診。乳頭下から内下領域にかけて表面平滑、弾性硬の腫瘤を認めた。大胸筋との可動性は良好だが、皮膚との可動性はやや制限されている。葉状腫瘤を疑ったが画像診断では境界明瞭で表面平滑な腫瘤であり、内部は均一であった。穿刺生検での検病理検査でも線維腺腫であり、巨大線維腺腫と診断した。ご本人と相談の上、鏡視下乳腺腫瘍切除術を行った。

手術は平成 14 年 11 月 1 日に全身麻酔下に行なった。乳腺の外上部辺縁を切開し大胸筋膜の前面に達し、手動的に乳腺の裏面の一部を剥離しさらに 10 mm の内視鏡をセットしたビジポートを使用して乳腺と腫瘤の裏面を剥離しながら乳腺の尾側縁に達する。次いで PDB バルーンを挿入、拡張して乳腺の裏面に作業空間の作成し、トラカールを挿入して気腔する。ビジポートをトラカールを通して気腔内に挿入し乳腺の裏面の剥離を進め作業空間を広げる。乳房の外側より気腔内にトラカールを挿入し超音波凝固切開装置を使用してさらに乳腺裏面の剥離を進める。乳腺腫瘍の境界全体を乳腺の裏面より確認した後、腫瘤の剥離を開始した。乳房下縁外側よりもトラカールを挿入し腫瘤の内側面の剥離を行った。腫瘍直上の皮膚は腫瘤による圧迫で菲薄化していたが剥離は問題なく施行可能であった。腫瘤の境界は明瞭で剥離も比較的容易であり、最後に残った死角部も容易に手動的に剥離された。剥離された腫瘤はエンドキャッチ II を使用して回収を試みたが作業空間が狭くリングが開かない為、袋のみを挿入し、その中に回収した。袋の開口部を皮膚切開創より引き出しその中でパンチを使用して腫瘤を細かく碎きながら体外に引き出した。ドレーンは挿入せず閉創し手術を終了した。

14. 術前に悪性の診断で治療した乳腺良性病変の 2 例

平塚市民病院外科

坂田道生, 金井歳雄, 高林 司  
中川基人, 松本圭五, 関みな子  
中村 威, 鈴木淳司, 田野敦子  
宮沢直人

同病理

赤坂喜清, 亀山香織

目的：術前に悪性の診断で治療した乳腺良性病変の 2 例を経験したので報告し、このような症例について検討する。

症例 1：44 歳の女性。1998 年 7 月 6 日径 9 cm 大の左乳房の悪性葉状腫瘍疑いにて単純乳房切除術を施行。病理組織学的には、phyllodes tumor, borderline lesion であった。手術時にはみられなかったが、8 月中旬頃から右乳房に腫瘤が出現増大、C 領域を中心に 7×8 cm の表面平滑で硬い腫瘤を触知した。US, CT 上葉状腫瘍の再発転移を疑う所見が得られ、腫瘤は急速に出現増大していることから、ただちに 9 月 18 日単純乳房切除術を行った。病理組織学的検索の結果、著明な線維化と xantbogranuloma を伴う乳腺症の所見を認め、乳腺症による腫瘤形成と考えられた。現在術後 4 年経過し無再発生存である。

症例 2：42 歳女性、左乳腺腫瘍で来院。左 6 時方向に 1 cm 大の腫瘤を触知。US にて隣接する 2 個の 4 mm 大腫瘤を伴い、DCIS が疑われた。細胞診にて class V が得られ、乳癌の診断で quadrantectomy+腋窩郭清を行った。病理組織検査では腫瘤は線維腺腫であり、FA 周囲の duct papillomatosis が細胞診で異型腺管に見えたと考えられた。現在術後 4 ヶ月で外来フォローアップしている。

考察：症例 1 では術前に穿刺細胞診を行うべきであったかどうか、症例 2 では穿刺吸引細胞診の結果をどう判断すべきであったか、が問題になると思われる。いずれの症例も、経過・病理所見を正確に説明し、ご理解をいただいている。

15. ステレオガイド下針生検（マンモトーム<sup>®</sup>）21 例の経験

慶應義塾大学外科

麻賀創太, 池田 正, 神野浩光  
三井洋子, 武藤 剛, 和田真弘  
北島政樹

慶應義塾大学病院中央放射線技師室 穴山道子

はじめに：近年、乳癌検診にマンモグラフィーが導入される傾向があり、石灰化病変が指摘される機会が多くなっている。このうち触診、超音波検査で腫瘤を指摘できない石灰化病変は、その位置の特定が困難であるために診断に苦慮していた。ステレオガイド下針生検（マンモトーム<sup>®</sup>）はこうした病変に対する診断手技として開発された。

対象と方法：2002 年 4 月から 2002 年 12 月までに、マンモグラフィーで Category 3~5 の石灰化を認めるものの、触診、超音波検査で明らかな異常を指摘できない症例 21 例に対してステレオガイド下針生検（マンモトーム<sup>®</sup>）を施行した。麻酔は 1%キシロカインと同 E 入りを併用し（各 10 ml）、少なくとも 2 切片以上の検体を採取した。採取後はただちに軟 X 線撮影を行い、目的とする石灰化部分が採取されていることを確認したのち、病理診断に提出した。

結果：症例は全例女性、年齢は 26 歳~65 歳（平均 46.5 歳）であった。所要時間は 38 分~138 分（平均 63.5 分）で、採取した検体は 2 本~32 本（平均 6.9 本）であり、全例で石灰化部分が採取可能であった。病理診断結果は、浸潤性乳管癌 1 例、DCIS2 例、乳腺症 16 例であった。しかし、papillary lesion と診断され摘出生検を要したものが 1 例、石灰化した線維性結合織のみが採取され、乳腺組織が採取できなかったものが 1 例存在した。なお合併症については、再穿刺を要したものが 2 例あり、うち 1 例は創の延長のため縫合を要したが、後出血、あるいは乳房の変形を認めた症例はなかった。

考察：ステレオガイド下針生検は、触診、超音波検査で明らかな異常を指摘できない Category 3~5 の石灰化に対する有用な診断法であると考えられた。

16. 当院におけるセンチネルリンパ節生検 (色素法単独) の検討

けいゆう病院外科

迫田哲平, 嶋田昌彦, 石川廣記  
山本健太郎, 関 博章, 亀谷武彦  
松本秀年, 森 光生

**目的:** 当院における乳癌のセンチネルリンパ節 (SN) 生検の結果より, 腋窩リンパ節郭清の縮小, 省略の可能性を検討した。

**対象と方法:** 2000年1月より2002年10月までに当科で手術を受けた原発乳癌のうち, 術中にSN生検を行ったN0およびN1乳癌136例を対象とした。さらに, 2000年1月から2000年12月までの37例を前期症例とし, 2001年1月から2002年10月までの99例を後期症例として比較検討した。SNの同定は1%パテントブルーを腫瘍の周囲に2-3ml注入後, 約5分間のマッサージを行い, その約10分後に青染したリンパ管を辿り, 青染したリンパ節をSNとした。原則として, Level II以上の腋窩リンパ節郭清を行ったが, 前期症例で1例, 後期症例で14例はSNのみの郭清とした。

**結果:** 前期症例37例中30例(81%), 後期症例99例中95例(96%)にSNを同定することができた。SNを同定できなかった症例とSNのみの郭清を行った症例を除くと, 正診率は前期症例29例中23例(79%), 後期症例81例中80例(99%)であり, 偽陰性率は前期症例28例中6例(21%), 後期症例は68例中1例(1.5%)であった。偽陰性の7例の永久組織診断によるリンパ節転移の個数は1個が2例, 2個が3例, 3個が2例であり, 4個以上の症例は認められなかった。SN生検で陽性とされた14例中9例はSNのみに転移が認められた。凍結標本で陰性と診断された97症例のSNのうち3例は, 永久標本で微小転移が認められた。

**考察:** SNの同定には色素法単独よりもRI併用法が優れているとする報告が多いが, アイソトープを使用することや, 設備等の問題があり, 一般病院での施行は困難である場合が多い。手技を習熟することにより同定率, 正診率および偽陰性率は明らかに改善し, 色素法単独でも腋窩リンパ節郭清を縮小, 省略することは可能であると考えられる。

17. ヨード不染帯診断におけるPink Color signの臨床的有用性の検討

川崎市立川崎病院外科

大森 泰, 石井誠一郎, 納賀克彦  
国立アルコール症センター久里浜病院内科

横山 顕

**目的:** 食道ヨード不染帯診断において不染帯の色調・形状・

大きさが質的診断に有用であるとの報告は多数あるが, ヨード不染帯像の計時的変化については報告が無い。我々はヨード染色後2分程度の時間経過とともに不染帯に出現するピンク色の色調変化に注目し, これをPink Color sign (PCsign) と呼称しその臨床的有用性を検討した。

**対象と方法:** 対象は1996-2001年に経験した明瞭なヨード不染帯221例である。これらに1.2%ヨード液によるヨード染色を行い, ヨード染色後2~3分後の不染帯色調変化を観察しピンク色の色調変化の無い場合はPCsign(-), 不染帯の一部にピンク色の変化がみられた場合にPCsign(+), 不染帯全体に色調変化がみられた場合はPCsign(++ )とした。全例に生検による組織学的診断を行い, 扁平上皮癌の場合はEMRを施行し病理学的診断を行った。

**結果:** ヨード不染帯は異形上皮112例, 扁平上皮癌109例138病巣(m1:75病巣m2:43病巣m3:20病巣)である。異形上皮例では病変径9mm以下91病巣, 10~19mm17病巣, 20mm以上4病巣のうちPCsign陽性は10~19mmの3病巣のみである(陽性率2.7%)。扁平上皮癌例では病変径9mm以下の29病巣中PCsign(+)は17病巣, PCsign(++ )は9病巣(陽性率93.1%), 10~19mmの47病巣中PCsign(+)は27病巣, PCsign(++ )は15病巣(陽性率89.5%), 20mm以上の62病巣中PCsign(+)は19病巣, PCsign(++ )は11病巣(陽性率88.7%)であった。明瞭なヨード不染帯ではPCsign(++ )例は全例が癌であり, PCsign陽性にて癌と診断できる感度は90.0%(124/138), 特異性は97.3%(109/112)であった。特に9mm以下の病変では感度93.1%特異性100%であった。癌症例の通常観察像の病変色調を正常, 白濁・血管透見不良, 淡い発赤, 発赤に分類し, PCsignとの関連をみるとPCsignの強弱は病変の赤さに相関し, 病型では0-IIbより0-IIcに陽性傾向が認められた。

**考察:** PCsignはヨード不染帯の癌診断において極めて高い感度・特異度を示した。PCsignを危険なヨード不染帯の内視鏡所見とされている5mm以上, 明瞭な黄白色, 不整形に併用することで, 9mm以下の小不染帯診断では確実に簡便な癌診断能が得られ, ヨード染色使用早期食道癌スクリーニングに極めて有用である。

座長まとめ-学術講演(III)(13~17)

静岡赤十字病院外科 西海孝男

演題13は良性乳腺腫瘍に対する鏡視下切除術が報告された。今回の発表では, 大きな腫瘍を小さな創部から回収するのに, 袋を使用してその中で細切しており, 術野のcontaminationを防ぐ工夫がなされていた。

演題14はABCでの診断が困難な乳腺腫瘍2例が報告された。症例1は葉状腫瘍が疑われる巨大な乳腺腫瘍であり, 少なくともcore-needle biopsyが必要であったと考えられる。また対側乳房に出現した腫瘍を葉状腫瘍の転移と予測し

たのは、evidenceに乏しい判断という指摘があった。症例2は画像診断でDCISが疑われており、Bq+Axを行う前に浸潤性とEICを確認するためにprobe lumpectomyを施行するべきである。

演題15はステレオガイド下のマンモトームによる生検の報告である。マンモグラフィー併用検診が今年から本格的にスタートしたことから、微小石灰化のみの非触知乳癌が増加すると考えられており、マンモトームの需要は高まっているが、高額な器械であり保険も適用されないことから、一般病院が購入するものではなく地域の基幹病院が1台所有するという形が現実的であろう。

演題16は色素法単独でのセンチネルリンパ節生検の成績が報告された。諸家の報告のように検査開始当初と比較すると同定率、正診率ともに大幅に向上しており、術者の技量に診断率が左右されるという問題点がある。

演題17は早期食道癌スクリーニングにおけるPink Color Signというユニークな診断法が報告された。この検査の場合も微妙な色調の変化を肉眼的にカテゴリー分類するという熟練を要する検査法であり、普及するには何らかの数値化を行って客観的に成績の比較検討を行うことが必要であろう。

#### 18. リンパ節転移で発見された小腸癌の一切除例

大田原赤十字病院外科

半田 寛, 松井淳一, 伊澤祥光  
松田純一, 田村明彦, 赤松秀敏  
岡 昭一, 雨宮 哲, 古泉桂四郎

症例は77歳、男性。平成14年2月中旬より便秘傾向となり近医受診し、右下腹部腫瘍と貧血を認め当院紹介。同年5月7日精査加療目的で入院となった。既往歴・家族歴に特記すべきことはなかった。入院時、右下腹部に径約10cmの可動性良の圧痛を伴う硬い腫瘍を触知した。この腫瘍は日によって移動した。CT, US, MRIなどで腸間膜由来の平滑筋腫瘍あるいはGISTを最も疑った。また胆嚢結石を合併していた。腹腔鏡下に腫瘍切除と胆摘術が可能と考え、5月15日腹腔鏡補助下小腸切除+胆嚢摘出術を施行した。手術は4ポートで行い、まず腫瘍が小腸間膜にあり小開腹で切除可能であることを確認した。胆嚢摘出を行った後、臍の上下、正中で小切開し、腫瘍と小腸を引き出した。小腸に小さな硬い全周性の腫瘍があり、小腸癌・巨大なリンパ節転移と診断し、SMA近傍のリンパ節を含め、回盲部から約40cmの部位から口側の小腸約80cmを切除した。小腸には全周性の2型の腫瘍があり、腸間膜の腫瘍は小鶏卵大のリンパ節が多数連なった形態をしていた。病理組織学的には細胞異型が顕著で大型の異型核や多数の核分裂像が認められ、最終的に小腸癌(低～中分化型腺癌ss, INFB, ly1, v2)と診断された。小腸原発性の癌は全消化管癌中の0.1～0.3%とされており5年生存率は15～24%程度と報告されている。本症例のように巨大なリンパ節転移を腹部腫瘍として触知した

報告は我々が検索し得た範囲にはなかった。本症例は術後経過は順調でUFT400mg/日内服を続けており、約半年リンパ節転移や肝転移、腹膜播種などの再発を認めていない。

#### 19. 腹腔鏡下に切除し得た膵尿管遺残症の1例

清水市立病院外科

嶋田俊之, 川口正春, 飯野一郎太  
山崎将典, 谷口正美, 松田 巖  
古川和男

はじめに：尿管遺残とは、胎生期の尿管が出生後も膀胱と膵の間に管腔として遺残する状態で、繰り返す膵炎や腹腔内膿瘍の原因となることがある。基本的手術方法は下腹部正中切開下の尿管の切除である。今回我々は、尿管遺残症に対して腹腔鏡下に切除し得た症例を経験したので報告する。

症例：28歳、男性。主訴：腹部全体の痛み、既往歴、家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：2002年5月8日頃より膵周囲の痛みが出現。徐々に腹部全体に広がってきたため5月10日当院を受診した。その間食事は摂取しており、嘔気、嘔吐、下痢など明らかな消化器症状は呈していなかった。

受診時現症：身長171.5cm、体重65kg、血圧124/72mmHg、脈拍66、整、体温39℃、腹部全体の自発痛、圧痛、反跳痛を認め、下腹部には筋性防御を認めた。血液生化学的所見では、WBC8800/μl、CRP5.0mg/dlと炎症反応を認めた。腹部CT、超音波検査上、下腹部正中腹壁内に炎症を伴う管状に連なる異常所見を認めた。以上から膵尿管遺残症による腹痛と診断し、入院にて保存的加療とした。入院後は抗生剤投与、局所のドレナージにて腹痛、炎症ともに改善。待機的に手術を施行した。

手術手技：全身麻酔下に膵の高さで右鎖骨中線上より開腹法にて12mmのトロッカーを挿入。これより腹腔鏡を挿入し内部を観察。さらに右上腹部に5mm、右下腹部に10mmのトロッカーを挿入した。内視鏡下に正中膵靱帯、両側外側膵靱帯を切離、膵直下まで剥離とした。気腹を止め腹腔外より膵下縁に小切開を置き、膵尿管を完全に切除とした。術後経過は良好で術後第5病日に軽快退院となった。病理学的所見では炎症所見のみで悪性所見は認めなかった。

結語：膵尿管遺残症に対して、腹腔鏡下に切除し得た1例を経験したので報告した。

20. 大網内ヘルニア嵌頓の2例

東京歯科大学市川総合病院外科

浅原史卓, 佐藤道夫, 石井良幸  
小川信二, 正村 滋, 田中豊治  
安藤暢敏

大網内ヘルニア嵌頓の2例を経験したので報告する。

症例1: 31歳, 女性, 既往歴, 家族歴は特記事項なし。  
2000年5月15日突然腹痛を自覚し近医受診し入院となった。腹部CTにて腸管の拡張および高度の浮腫性変化を認めた。絞扼性イレウスが疑われ, 5月16日当院紹介受診となった。下腹部を中心に疼痛, 軽度圧痛を認めるも, 筋性防御は見られなかった。入院時血液検査にてWBCのみ12100/mm<sup>3</sup>と異常値を示した。腹部単純X線検査および超音波検査で, 著明な小腸の拡張を認め, 絞扼性イレウスの診断で緊急開腹術を施行した。腹腔内の癒着は認めず, 大網の径10cmの欠損孔にTreitz靭帯より120cmの小腸が60cm嵌頓していた。腸管の虚血性変化はごく軽度であったため, 絞扼を解除し欠損孔を閉鎖するのみとした。

症例2: 57歳, 男性, 既往歴, 家族歴は特記事項なし。  
2002年10月30日突然下腹部痛を自覚し当院受診。入院時血液検査にてWBCのみ14400/mm<sup>3</sup>と高値を示した。腹部単純X線検査および造影CT検査で小腸の軽度の拡張のみ認めたものの, 下腹部を中心に強い疼痛, 圧痛および筋性防御を認めたため, 絞扼性イレウスが疑われた。緊急で腹腔鏡下観察を施行し, 小腸の虚血性変化および血清腹水を認めたため開腹となった。S状結腸癌が存在したが, 大網および小腸との癒着は認めなかった。大網の径2cmの欠損孔にTreitz靭帯より180cmの小腸が全長150cm嵌頓していた。救命を優先し小腸切除術のみを施行した。

考察: 絞扼性イレウスの原因として, 小腸の大網の欠損孔への嵌頓も考慮すべきである。

21. 腹腔鏡下手術により解除しえた腸結核による腸閉塞の一例

国立霞ヶ浜病院外科

高橋麻衣子, 壁島康郎, 亀山哲章  
戸泉 篤, 田村洋一郎, 影山隆久

症例は, 65歳・女性, 腹痛・嘔吐を主訴とし平成14年3月14日緊急入院となった。既往として, 57年前に肺結核に対し左胸郭形成術を施行されている。腹部レントゲン上, 大小様々な石灰化像とsubileusを認めたため, 禁飲食とし経過観察とした。症状改善したため, 3月18日より飲水開始したが, 3月20日より再び腹痛・嘔吐出現した。ガストログラフィンによる注腸造影では特記すべき所見はなかった。3月25日に大腸内視鏡施行したところ, 回腸末端に全周性の狭窄を認めた。3月29日の小腸造影でも同様の所見を認めた。以上の所見より石灰化した腸管膜リンパ節による回腸

末端の狭窄がileusの原因と考えられた。排便はあるものの, 飲水増加に伴い症状の増悪をきたすため, 手術が必要と判断し4月4日腹腔鏡下ileus解除術を施行した。手術所見では, Bauhin弁より約2センチ及び100センチの位置に石灰化した腸間膜リンパ節と大網より作られた索状物による回腸狭窄を認めた。この部位よりも口側の小腸に拡張を認めた。この2ヶ所の索状物を切離した。創の一部を延長し, 回腸を体外へ脱転したのち, これらの狭窄を解除した小腸内腔が一横指以上あることを触診にて確認した。その後, 石灰化した腸間膜リンパ節を可及的に切除し手術を終了した。病理組織学的所見では, 摘出したリンパ節は高度の石灰化を伴い繊維性組織に置換されていたため, 陳旧性結核症と診断した。術後経過は良好で4月7日から飲水, 4月8日から食事摂取を開始し, 4月18日軽快退院となった。腸結核(石灰化した腸間膜リンパ節)により引き起こされたileusを腹腔鏡下手術により解除しえた症例を経験したので若干の文献的考察を加え報告する。

22. 小腸結核の1例

慶應義塾大学伊勢慶應病院外科

今井 俊, 萬谷京子, 山本 裕  
米川 甫

患者は83歳男性, 平成14年9月12日, 食欲不振, 体重減少を主訴として当院を受診し, 精査・加療目的にて当科入院となった。視触診上, 腹部膨満を認め, 右上腹部に可動性を有する弾性軟の半手拳大腫瘍を触知した。腹部単純X線写真では, 大腸内に少量のガスを認めた。血液データ上, CRPの上昇(8.09 mg/dl)と著明な低栄養(TP 5.1 g/dl, Ch-E92IU/l, T-Chol 86mg/dl)を認めた。腹部CT検査で, 右上腹部腸管に造影効果を有する5.5cm大の腫瘤様病変およびその口側腸管の内腔の拡張を認めた。小腸造影では, 回腸末端部の1 loop口側に狭窄が疑われた。血管造影では, tumor stain およびその他の異常所見は認めなかった。10月10日, 小腸腫瘍疑いにて手術を施行したところ, 回腸末端部から115cm口側かつTreitz靭帯から315cm肛側に, 腸間膜側を主座とする約10×7×5cm大の腫瘤および中等量の漿液性腹水の貯留を認めた。腫瘤占拠部位の腸間膜, 小腸漿膜面には多数の粟粒大白色結節が散在した。術中迅速病理診断にて, 白色結節には肉芽腫成分が散見され, 白色結節および腹水には悪性細胞を認めなかった。小腸腫瘍疑いの手術診断にて, 小腸部分切除術を施行した。摘出標本の肉眼的所見では, 強い屈曲を伴う約3cmにわたる狭窄を認め, 狭窄部の粘膜には粘膜のびらん, 脱落を認めた。病理組織学的には, 病変部にZiehl-Neelsen染色で抗酸菌を認め, 乾酪性肉芽腫の形成, Langhans巨細胞の存在より, 小腸結核と診断した。術後経過は良好で, 第22病日に独歩退院した。小腸結核は比較的稀な疾患であり, 文献的考察を加えて報告する。

23. 直腸癌 T3/T4 症例に対する術前化学療法

慶應義塾大学医学部一般消化器外科学教室

落合大樹, 渡邊昌彦, 長谷川博俊  
西堀英樹, 青木成史, 吉馴健太郎  
柳 在勲, 矢部信成, 岡林剛史  
高野正太・北島政樹

**目的:** 進行直腸癌に対して CPT-11+5-FU+LV 併用術前化学療法を試みたので, その治療成績と副作用について検討した。

**対象:** 2001 年 8 月から 2002 年 7 月までの 1 年間に T3/T4 の直腸癌 (Ra, Rb) を対象に, 前化学療法の既往がなく, PS が 0~2 で, 主要臓器の機能に異常を認めない 75 歳以下で, 本治療を受けることについて文書で同意が得られた 22 例につき, 術前化学療法を施行した。

**方法:** 投与方法は外来で, L-LV250mg/m<sup>2</sup>を 120 分で点滴静注し, 開始 60 分後から 5-FU500mg/m<sup>2</sup>を緩徐に静注し, 1-LV 終了後 CPT-1180 mg/m<sup>2</sup>を 90 分で点滴静注した。Day1, 8, 15 に施行し, Day22 を休業として 1クールとした。これを 2クール施行し, 手術を施行した。1クール終了後に評価し, PD であれば化学療法を中止し手術を施行した。

**結果:** 22 例 (男性 15 例, 女性 7 例) 登録された。年齢は 34 歳から 75 歳で中央値 60 歳であった。肛門歯状線からの距離は 1 cm から 10 cm までで, 中央値は 5 cm であった。腹会陰直腸切断術は 12 例, 低位前方切除術が 10 例であった。化学療法施行前の T3 は 18 例, T4 は 4 例, N (+) が 19 例, N (-) が 3 例であった。病理組織学的病期では T レベルで 40% (9/22), N レベルでは 53% (10/19) 病期低下させた。Grade3 以上の有害事象は, 2 名に白血球減少を認め, 1 週間の延期を余儀なくされたが全 22 例で完遂した。術後合併症は, 4% (1/22) に創感染を認め, 20% (2/20) に術後縫合不全を認めた。

**結論:** 以上より本術前化学療法は, 患者負担が少なく, 外来での施行が十分可能であった。53% に病期低下を認めた。本療法は今後の進行直腸癌に対する新しい治療戦略となる可能性がある。

座長まとめ一学術講演 (IV)(18~23)

国立病院東京医療センター外科 大石 崇

演題 18 は, 消化器癌のなかでは稀な小腸癌が報告された。巨大なリンパ節転移が存在し, 術前診断を困難にした一例である。

演題 19 では, 膀胱尿管道残症に対し, 膿瘍や炎症を管理した後で, 腹腔鏡補助下の切除が行われている。切除後の腹膜修復の必要性について討論が行われた。

演題 20 は, 大網内ヘルニア嵌頓について 2 例の報告であ

る。絞扼性イレウスの原因としては稀なものである。絞扼性イレウスを強く疑う病態において, 気腹を行うことの危険性も討議された。

演題 21 は陳旧性結核の癒着によるイレウスが報告された。術前に狭窄部位の診断が適切に行われたため, 腹腔鏡補助下にイレウスが解除されている。

演題 22 は, 活動性の小腸結核の報告である。腫瘤を形成する病態であったことなどから, 術前, 小腸腫瘍を疑い切除が行われている。近年, 腸結核を診断する機会が少なくなっているなかで, 非定型抗酸菌感染症との鑑別の困難さが指摘された。

演題 23 は T3/T4 直腸癌に対する, CPT-11+5-FU+LV の三剤併用による術前化学療法である。重篤な副作用も少なく, 22 例全例において投与が完遂されており, 患者負担の少ない新しい治療戦略と思われた。著明な腫瘍縮小効果の得られた症例もあったが, Phase II Study として, プロトコルを延長することはせず, 切除術が行なわれている。

24. 救命しえた超高齢者腹部大動脈瘤破裂の 1 例

浜松赤十字病院外科

大住幸司, 奥田康一, 西脇 眞  
龍村俊樹, 清野徳彦, 福本和彦  
安藤幸史

はじめに: 近年高齢化社会を迎え, 高齢者の腹部大動脈瘤症例も増加傾向にある。術式や術後管理の進歩により, 待期的手術の手術死亡率は高齢者でも数%とされているが, 動脈瘤破裂症例の手術成績は極めて不良で, 高齢者ではさらに不良とされている。今回われわれは救命しえた 91 歳の腹部大動脈瘤破裂症例を経験したので報告する。

**症例:** 91 歳, 女性。2002 年 3 月 7 日夜間突然, 腰痛, 腹痛, 下痢, 嘔吐出現し, 症状軽快しないため当院受診した。腹部 CT にて腹部大動脈瘤破裂と診断され緊急手術施行した。来院時, 血圧 100/62 mmHg であったが, 手術室入室時ショックとなった。手術時間は 3 時間 53 分, 出血量は血腫も含め 3745 ml であった。術中より DIC となり, 止血困難で術後 2 時間でショックとなったが, 昇圧剤にて徐々に血圧上昇した。難治性胸水に対し, CHF を導入し全身状態改善していった。8POD 気管切開術施行したが, 21POD 人工呼吸器離脱, 22POD より食事開始した。50POD 退院可能となったが, 家族の都合で, 81POD 退院した。

**考察:** 高齢者の手術においては術後合併症の予防が重要であるが, 緊急手術, 侵襲の大きな手術においてはその発生率が高率となる。今回われわれは CHF を導入することにより, 呼吸器合併症を軽減し, 救命しえたと考えられた。

25. Blue toe 症候群を伴う小径腹部大動脈瘤の1手術例

済生会中央病院外科

村山剛也, 茂木克彦, 石飛幸三  
米山公康, 戸枝弘之, 今津嘉宏  
菊山成博, 大山廉平

**目的:** 腹部大動脈瘤の手術適応は、多くの施設で径4~5 cm以上とされ、破裂予防がその目的である。今回われわれは、Blue toe 症候群を伴う径3 cmの腎動脈下腹部大動脈瘤に対し、塞栓症の治療目的に手術を施行した1例を経験した。腹部大動脈瘤手術で、塞栓症治療目的の報告例は稀である。そこで、若干の文献的考案とともに報告する。

**症例:** 60歳男性。2002年4月より両足指のチアノーゼ・虚血性潰瘍を認めた。次第に増悪し、当科受診。各種画像検査で、径3.5 cmの腹部大動脈瘤、壁血栓を指摘され、それによる塞栓症と診断された。径3.5 cmと小径だったが、塞栓症治療の目的で、2002年6月19日Y型人工血管置換術施行した。術中所見として、嚢状の瘤が数個連なり、内腔は部分的に解離、潰瘍やアテロームも認めた。塞栓の原因として、矛盾しない所見であった。術後経過は良好で足指切断は免れ、外来経過観察していくうちに足指のチアノーゼ、潰瘍も改善した。

**考案:** 本症例のように、上流に療病変など原因病変が存在するBlue toe 症候群に対する治療法としては、内服療法、手術、血管内治療が考えられる。内服療法はワーファリンなどの抗凝固、線溶療法が主となるが、コレステロール塞栓の場合には無効である。また、こうしたアテローム病変に対するステントグラフト挿入術は、いまだコンセンサスが得られていないばかりか、禁忌とする意見すらある。本症例のような腹部大動脈瘤は、アテローム性病変として捉え、径4 cm以下であっても、積極的に手術を考えるべきと考えられた。

26. プロテインS欠乏症を伴うSMV血栓症の1例

慶應義塾大学医学部外科

井上史彦, 松本賢治, 渡辺昌彦  
西堀英樹, 高野正太, 秋好沢林  
金田宗久, 新谷恒弘, 渋谷慎太郎  
北島政樹

SMV血栓症は比較的まれではあるが、生命を脅かし得る疾患である。本疾患の治療の中核は迅速な診断と、血流の改善あるいは腸管の外科的切除とされている。今回われわれは救命し得た、プロテインS欠乏症を伴うSMV血栓症の1例を経験したので、若干の文献的考察を加えて報告する。

**症例:** 52歳、男性。

**既往歴:** 48歳時に上矢状静脈洞血栓症、脳出血、下肢深部静脈血栓症、プロテインS欠乏症を指摘されている。

**主訴:** 臍下部痛

**現病歴:** 2002年9月10日頃より心窩部痛を認め、近医にて投薬を受けるも改善を認めなかった。徐々に下腹部痛も生じたために9月17日、当院救急外来を受診した。

**入院後経過:** 同日施行した腹部造影CT検査及び腹部超音波検査にてSMVに血栓を認め、またSMVの血流が確認できなかったことからSMV血栓症と診断し、ヘパリンの持続投与を開始した。翌日の腹部CT上も改善を認めず血管造影を施行、SMAにカテーテルを留置し、ウロキナーゼの持続動注を開始した。しかしSMVの開存を得られず、9月19日に経皮経肝的に門脈カテーテルを留置し、ウロキナーゼによる血栓溶解療法を施行した。その後ウロキナーゼの門脈内投与、ヘパリンの全身投与にて徐々に症状の改善を認め、10月4日に経口摂取を開始した。しかし、その後小腸の通過障害を認め、保存療法にて改善を認めなかったため、10月23日腹腔鏡補助下小腸部分切除術を施行した。術後経過良好であり、現在ワルファリンにて抗凝固療法を施行中である。

**考察と結語:** 治療開始した時点ですでに発症後1週間を経過しており、抗凝固療法にて十分な効果を得ることができなかった。SMV血栓症に対しては時期を逸さない経皮経肝抗凝固療法が必要と考えられた。

27. 修正大血管転位術後に発症した saddle embolism の1例

慶應義塾大学医学部外科

秋好沢林, 松本賢治, 井上史彦  
金田宗久, 新谷恒弘, 渋谷慎太郎  
北島政樹

**症例:** 15歳男性。1歳半検診時で心雑音を指摘され、その後の精査にて修正大血管転位、両大血管解剖学的右室起始、心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、解剖学的僧帽弁閉鎖不全、肺動脈弁及び弁下狭窄、左肺動脈末梢性狭窄と診断され、当院小児科で加療されていた。チアノーゼの増悪と労作性呼吸困難改善目的のため、2002年8月26日にBidirectional cardiopulmonary shunt, Right-sided atrioventricular valvuloplasty, ASD enlargement, Permanent pacemaker implantationを行った。術後8日目に右大腿痛、動脈拍動の消失を認めた。動脈造影にて大動脈は下腸間膜動脈分岐部直下で完全閉塞し、両側腸骨動脈は描出されなかった。また、右腎下極以外は両腎とも血流低下を認めた。同日、塞栓除去術を施行し、術中よりCHDFを導入した。術後経過良好にて、塞栓除去術6日目にCHDFを離脱し、腎機能も徐々に改善を認めた。本症例に考察を加えて報告する。



## 28. 成人鼠径ヘルニアに対する Kugel パッチの手技とその考察

荻窪病院外科

高原武志, 村井信二, 半田真一  
中村明彦, 山内秀夫

成人鼠径ヘルニアでは、Tension Free のメッシュパッチによる修復が一般的な術式となりつつある。我が国では、PHS 法や Plug 法が多く用いられており、両者とも、Underlay パッチをヘルニア門に挿入し、Onlay パッチを鼠径管後壁の補強に使用している点では共通している。これらの方法により従来に比べて局所の突っ張り感が軽減し、日帰り手術が可能となったと言われている。しかし、鼠径管を解放してヘルニア嚢を処理するために、ヘルニア門以外の鼠径管後壁が脆弱化し特に恥骨縁での内鼠径ヘルニアとしての再発や、解剖学的に大腿ヘルニアの合併を完全に予防できない点は、無視できない。今回我々が使用した Kugel パッチは Kugel によって開発されたポリプロピレンの Underlay パッチであり、腹膜前腔のみを剥離し、鼠径管を全くさわらないことに大きな特徴がある。内鼠径輪直上で 3 cm の皮膚切開を置き、腹膜前腔にてヘルニア嚢を剥離し、腹膜前腔を広く剥離し、大腿輪を含めて Kugel パッチで被覆する。腹膜前腔において、指や鉤、ガーゼ挿入などのよってかなり広い空間を確保し、Cooper 靭帯を確認する。示指をポケットに挿入し、拇指と第 3 指を用いてパッチを曲げ、まず内側より挿入し、ついで外側に入れて形状安定コイルによって伸びたパッチが腹膜前腔にまんべんなく伸展していることを確認する。腹膜前腔ではどこにも固定せず、縦切開した横筋筋膜を閉鎖するとき、これと非吸収糸を用いてパッチを一針だけ固定する。これらの操作によって、腸骨鼠径神経の損傷はほとんど起きておらず、術後の創痛の軽減に影響を及ぼしている。Sac の切除は必須ではないとしているが、パッチの周りにスリップする危険があるので外鼠径ヘルニアの sac は切除している。大腿輪もカバーできるため大腿ヘルニア症例にも用いることが可能であり、鼠径ヘルニア術後の大腿ヘルニアの予防にも役立つと考えられた。Kugel パッチは形状記憶リングが装着されており、他のパッチで問題となっている Underlay パッチの完全な伸展が狭い視野でも可能となった。手術時間は平均で約 40 分で、PHS や Plug に比べて違和感などの術後の愁訴が少ない傾向が見られた。再発率に関しては、当院での長期的データはまだないが、Kugel は 808 例に行い再発率は 0.62% との報告がある。わが国でもこの方法は鼠径ヘルニアの新たな術式の一つになりうると考えた。

## 29. 医療の質向上活動 (MQI) を利用することで成功した日帰り鼠径ヘルニア手術の立ち上げ

練馬総合病院外科

井上 聡, 夏 錦言, 高原哲也  
飯田修平

当院では平成 8 年から、TQM (Total Quality Management) として、医療の質向上活動 (MQI=Medical Quality Improvement) を職種横断的に病院全体で行っている。今回われわれは今年の MQI 活動プロジェクトの 1 つとして日帰り鼠径ヘルニア手術の開始を取りあげ日帰り手術の体制を整えることに成功した。

日帰り手術は患者の選択肢のひとつとして、また病床の有効利用、医療費の抑制などのため今後増加すると予想されている。しかし、現在それほど普及していないのは、日帰り手術センターのような専門部門がない施設では多くの障害があるからである。

われわれは外科医、外来・手術室・病棟看護師、薬剤師、医事課、事務などからなるチームをつくりこれらの問題点を解決した。最大の問題点は今までのやり方を変えたくないという抵抗勢力の存在であった。しかし、当院では MQI で取り組むことは病院あげての課題だというコンセンサスができていたので、当初予想よりスムーズに立ち上げる事ができた。

最初に過去に当院で鼠径ヘルニア手術を受けた患者にアンケートを行った。平均 10 日間の入院で、患者の満足度は概して高かった。このことは長期入院をいとわぬ高齢者には必ずしも日帰り手術は必要でないことを示している。仕事が忙しい人や、介護などで家を離れられない人のために手術の選択肢のひとつとして用意することが重要である。また日帰り手術の概念が世間にあまり普及していないので、日帰り手術はやはりなんとなく不安という患者も多く 1 泊 2 日コースも用意することにした。

MQI を使うことにより医師以外の視点からの意見を多く採り入れることができ、手早く手術体制を整えることができたので報告する。

座長まとめ—学術講演 (V) (24~29)

川崎市立川崎病院外科 掛札敏裕

演題 24 は 91 歳の腹部大動脈瘤破裂で、CHF などの集中治療により救命、退院した報告である。本邦での最高齢の可能性もあり、学術誌への投稿が期待される。

演題 25 は通常手術対象外とされる小さな腹部大動脈瘤でも、blue toe 症候群を呈する場合は手術を施行すべきという報告である。同様の症候群を呈する shaggy aorta でも置換術が推奨されており、腹部大動脈瘤の手術適応について大きさだけではないと考えさせられる報告である。

演題 26 は SMV 血栓症に対して、経皮経肝的に門脈カテーテルを留置し血栓溶解を施行した報告である。非常に優れた方法であり、今後積極的に施行されるべきと考えられる。なお、プロテイン S 欠乏症は家族性の発症も考えられ、その検索も必要であろう。

症例 27 は特異な原因による saddle embolism の報告である。発症から治療までの時間が重要な疾患であり、瀉血や CHDF、灌流などが適切に行われる必要があることが報告さ

れた。

演題 28 は鼠径ヘルニアに対する Kugel バッチという新しい手技の報告で、同じ tension free の PHS や Plug に比し大腿ヘルニアの予防が可能で違和感が少ない利点があり、今後普及が期待される手技である。

演題 29 は日帰り鼠径ヘルニア手術の実施に至るまでの経緯の報告で、まだ日帰り手術を実施していない施設では大いに参考になるものと考えられた。

## 慶應医学会平成14年度庶務・会計報告

平成15年2月4日(火)第5会議室において、午後2時より理事会・評議員会が開かれ、平成14年度庶務・会計決算報告ならびに平成15年度予算が承認された。

承認事項の詳細は会の通りである。

○会費：年額5,000円(ただし、無給教員と大学院生は3,000円)

○平成14年度庶務報告(平成14年1月1日～12月31日)

会 員：2,599名(学内845名,学外1,754名)

物故会員：計92名

古川 明 (6),	尾崎 健 (8),	福島 清 (9),	恒松暢之助 (10),	大谷 亮一 (10),
宮坂 助次 (10),	小野 正治 (11),	真弓 篤 (11),	佐伯 政雄 (12),	山下 久雄 (12),
上松陽之助 (14),	根本 一郎 (14),	杉浦 殖 (14),	尾崎 格治 (15),	金田 好生 (17),
太田 俊彦 (17),	小池 昇 (18),	大野 治夫 (18),	近藤 肇 (18),	外山 敏夫 (18),
稲留 秀彦 (18),	山岡 三郎 (18),	王金 茂 (18),	大迫 嘉徳 (19),	網島 宗一 (19),
篠 肇 (19),	藤井 秀一 (21),	岡山 謙一 (21),	榊 英彦 (21),	丸山 正夫 (21),
三原庸太郎 (21),	中山 博 (22),	川内 拓郎 (22),	阿部倉敏男 (22),	義江 正義 (23),
小川 泰正 (23),	影山 圭三 (23),	吉澤 久雄 (23),	小此木 丘 (24),	蜂谷 徹夫 (24),
宮崎 柏 (25),	本田 正節 (25),	中村 嘉三 (26),	豊田 安彦 (26),	茅野 英孝 (27),
山口 英明 (27),	滝 晃 (27),	菅野 卓郎 (27),	山添 孝明 (28),	長野 政雄 (28),
石川 敬 (29),	市毛登志雄 (29),	守屋美喜雄 (30),	阿部 孝平 (30),	栗田 棟夫 (30),
西川 忍 (31),	浜田 宏 (31),	松井 一郎 (31),	田村 昭蔵 (32),	深瀬 邦雄 (32),
村越 充明 (32),	松田 三和 (33),	上石 英明 (33),	蔵本 鄰 (34),	岡本 正夫 (35),
森 廉一郎 (35),	相沢 和郎 (35),	馬場 正三 (36),	海老原貴一 (36),	吉崎 總 (36),
杉山 繁 (37),	五明 秀 (52),	池田 圭朗 (67),	井田 直美(専1),	山藤 政夫(専2),
中込 勤(専4),	工藤みゆき(特),	藤田 成孝(特),	崎尾 英子(特),	高山 泰子(特),
大村 寿一(特),	篠原 央(特),	大塚 俊郎(特),	永井 純(特),	向井 力(特),
早川 祐三(特),	大溝 晴史(特),	五十嵐完治(特),	松本 守弘(特),	太田 辰男(特),
河村 栄二(特),	山辺 知巳(特)			

総 会：(第82回)平成14年11月8日(金)午後3時開会

シンポジウム『ナノバイオテクノロジー』(慶應ライフフォーラムと合同開催)を開催した。

例 会：62回開催(平成14年1月1日～12月31日)

理事会・評議員会：平成14年2月19日(火)＜平成13年度決算報告＞

平成14年10月30日(水)＜平成14年度中間報告＞

平成14年12月25日(水)＜新理事・評議員・監事決定＞

編集会議：毎月第2または第3木曜日

雑 誌：『慶應医学』第79巻1号～5・6号(合併号)まで発刊

○平成 15 年度事業計画（平成 15 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

- 1) 学術雑誌『慶應医学』編集発行
- 2) 慶應医学会総会（平成 15 年 11 月 14 日予定）
- 3) 慶應医学会例会，年約 50 回開催（慶應医師会・The Keio Journal of Medicine と 共催）
- 4) 理事会・評議員会，毎年 2 回（中間報告・決算報告）開催
- 5) 定例編集会議，必要に応じて開催

○平成 14 年度会計決算報告（平成 14 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

収入の部				支出の部			
勘定科目	予算(A)	実績(B)	差額(B)-(A)	勘定科目	予算(A')	実績(B')	差額(B')-(A')
補助金収入	1,600,000	1,600,000	0	原稿費	3,000,000	360,000	△ 670,000
会費収入	9,500,000	10,335,000	835,000	編集委員委嘱費		1,680,000	
広告料収入	700,000	595,440	△ 104,560	査読費	290,000		
掲載料収入	9,700,000	12,652,447	2,952,447	業務委託費	16,909,200	16,911,300	2,100
雑収入	80,000	45,799	△ 34,201	論文掲載補助費	3,000,000	1,560,000	△ 1,440,000
				発送費	1,500,000	1,649,960	149,960
				会議費	120,000	431,860	311,860
				学会費	3,000,000	2,566,703	△ 433,297
				事務費	1,300,000	803,080	△ 496,920
				備品費	100,000	44,100	△ 55,900
				雑費	100,000	-	-
				予備費	1,500,000	0	△ 1,500,000
当期収入合計	21,580,000	25,228,686	3,648,686	当期支出合計	30,529,200	26,297,003	△ 4,232,197
前期繰越収支差額	25,383,634	25,383,634	0	当期収支差額	△8,949,200	△1,068,317	7,880,883
収入合計	46,963,634	50,612,320	3,648,686	次期繰越収支差額	16,434,434	24,315,317	7,880,883

\*平成 14 年度より，公益法人会計基準に準拠した決算書フォームに変更した。

○平成 15 年度予算（平成 15 年 1 月 1 日～12 月 31 日）

収入の部			支出の部		
勘定科目	平成 14 年度予算	平成 15 年度予算	勘定科目	平成 14 年度予算	平成 15 年度予算
繰越金	25,383,634	25,791,071	原稿料，査読料	3,000,000	600,000
補助金	1,600,000	1,600,000	業務委託費	16,909,200	8,000,000
会費収入	9,500,000	9,500,000	論文掲載補助費	3,000,000	600,000
広告料収入	700,000	600,000	発送費	1,500,000	600,000
掲載料収入	9,700,000	1,600,000	会議費	120,000	100,000
雑収入	80,000	50,000	学会費	3,000,000	3,000,000
			事務費	1,300,000	1,100,000
			備品費	100,000	100,000
			雑費	100,000	100,000
			予備費	1,500,000	1,500,000
			支出計	30,529,200	15,700,000
			次期繰越収支差額	0	23,441,071
合計	46,963,634	39,141,071	合計	30,529,200	39,141,071

\*平成 15 年度予算については，旧フォームの決算書で理事会・評議員会の承認を受けた。

○慶應医学会役員

(任期：平成15年1月1日～平成16年12月31日)

会 長 北島 政樹  
理 事 相磯 貞和 (副会長)  
石川 博通 (会計担当)  
小口 芳久 (渉外担当)  
池田 康夫 (総務担当)  
監 事 小川 聡  
末松 誠  
編集委員 饗庭 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 ◎は編集委員長

○評議員

(任期：平成15年1月1日～平成16年12月31日)

岡田 保典  
小林 紘一  
武田 純三  
末舛 恵一  
矢部 裕  
岡島 重孝

○慶應医学会会則 (昭和59年11月改訂)

第1条：本会は慶應医学会と称する。

第2条：本会の目的は医学の進歩と啓発を図るにある。

第3条：本会は慶應義塾大学医学部の出身者、関係者ならびに本会の目的に賛同する医師およびその他の者で組織する。

第4条：本会に会長1名、副会長1名、理事若干名を置く。会長は医学部長があたり、理事は評議員の選挙により、また副会長は理事の互選により決める。副会長と理事の任期は2年とする。但し、重任を妨げない。

第5条：本会に監事2名を置く。監事は会長が指名し、任期は2年とする。

第6条：本会に評議員若干名を置く。評議員は会長が委嘱し、任期は2年とする。

第7条：本会の事務所は慶應義塾大学医学部内に置く。

第8条：本会は毎年1回総会を開き、また随時例会を開く。本会の会員、あるいは理事会が承認した者でなければ本会の主催する諸学会で研究業績を発表することが出来ない。

第9条：本会は学術雑誌『慶應医学』を刊行して会員に無料で配布し、また有料で会員以外にも頒布する。

第10条：本会の経費は会費、その他の収入を当てる。会費の額は理事会および評議員会において決定し、総会の承認を受ける。

第11条：本会の会計年度は毎年1月1日から始まり、同年12月31日に終る。

第12条：理事は毎年度の収支決算書を作成し、監事の監査を受けたのち、評議員会の承認を経て総会に報告しなければならない。

第13条：本会則は総会の決議を経なければ変更することが出来ない。

## 雜 報

### 慶應医学学会例会第 1305 回

日 時 平成 15 年 1 月 8 日(水) 午後 6 時 30 分  
 場 所 新棟大会議室  
 演 題 Psychosocial issues of the orofacial pain patient  
 演 者 Charles R. Carlson, PhD  
 Professor of Psychology and Joint Professor of Dentistry, Director of Clinical Training, Department of Psychology, Director of Research and Behavioral Medicine, Orofacial Pain Center, University of Kentucky, Lexington, KY, USA  
 担 当 歯科・口腔外科学教室

### 慶應医学学会例会第 1306 回

日 時 平成 15 年 2 月 20 日(木) 午後 6 時 30 分  
 場 所 本館臨床講堂  
 演 題 Microvascular responses to hypercholesterolemia and ischemia-reperfusion  
 演 者 D. Neil Granger, PhD  
 Chairman and Professor, Department of Physiology, Louisiana State University Health Sciences Center, Shreveport, LA, USA  
 担 当 内科学教室

### 慶應医学学会例会第 1307 回

日 時 平成 15 年 2 月 26 日(水) 午後 7 時 00 分  
 場 所 新教育研究棟 4 階 講堂 3  
 演 題 Fixation of humeral head fractures by a new proximal humeral nail  
 演 者 Dr. Hans-Werner Stedtfeld  
 "Chief Surgeon" of the Trauma Department of the Klinikum Nurnberg in Nurnberg, Bavaria, Germany  
 担 当 整形外科科学教室

### 慶應医学学会例会第 1308 回

日 時 平成 15 年 2 月 28 日(金) 午後 4 時 00 分  
 場 所 新教育研究棟 2 階 講堂 1  
 演 題 Plasticity of hematopoietic stem cells  
 演 者 Fritz Melchers, PhD  
 Department of Cell Biology, University of Basel, Basel, Switzerland  
 担 当 微生物学・免疫学教室

### 慶應医学学会例会第 1309 回

(開催中止)

日 時 平成 15 年 2 月 26 日(水) 午後 6 時 30 分  
 場 所 セミナールーム 5  
 演 題 Clinical experience of fentanyl patch on cancer pain management in Germany  
 演 者 Lukas Radbruch, MD  
 Pain Clinic, Department of Anaesthesiology, University of Cologne, Germany  
 担 当 麻酔学教室

### 慶應医学学会例会第 1310 回

日 時 平成 15 年 3 月 11 日(火) 午後 7 時 30 分  
 場 所 総合医科学研究棟 3 階会議室  
 演 題 ARDS: controversies in management  
 演 者 Thomas R. Martin, MD  
 Professor of Medicine, Chief of Medicine and Director, Primary and Specialty Medicine Service Line, VA/Puget Sound Medical Center, Seattle, WA, USA  
 担 当 救急部・内科学教室

### 慶應医学学会例会第 1311 回

日 時 平成 15 年 3 月 14 日(金) 午後 5 時 00 分  
 場 所 新棟中会議室  
 演 題 Why people develop antinuclear antibodies  
 演 者 John A Hardin, MD  
 Professor, Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine of Yeshiva University, Bronx, New York, USA  
 担 当 内科学教室

### 慶應医学学会例会第 1312 回

日 時 平成 15 年 3 月 17 日(月) 午後 7 時 00 分  
 場 所 中央棟 5 階 カンファレンスルーム  
 演 題 Present and future treatments of degenerative disc disease  
 演 者 Scott D Boden, MD  
 Professor of Orthopaedic Surgery, Director, Emory Spine Center, Emory University School of Medicine, Decatur, GA, USA  
 担 当 整形外科科学教室

慶應医学会例会第 1313 回

日時 平成 15 年 4 月 15 日(火) 午後 7 時 00 分  
場所 新棟大会議室  
演題 Management of Combined Injuries in the  
Upper Extremity  
演者 Andrew W. P. Lee, MD, FACS  
Professor of Surgery Chief, Division of Plastic  
Surgery, University of Pittsburgh School of  
Medicine, Pittsburgh, PA, USA  
担当 整形外科学教室

慶應医学会例会第 1314 回

日時 平成 15 年 4 月 11 日(金) 午後 6 時 00 分  
場所 新棟 11 階 大会議室  
演題 Family Medicine と医学教育  
演者 神保真人博士  
Assitant Professor of Family Medicine,  
Jefferson Medical College, Thomas Jefferson  
University, Philadelphia, PA, USA  
担当 医学教育統轄センター

## 編集後記

学位取得過程の変更に伴い慶應医学の形態が大きく変わりつつあり、編集委員もまだ戸惑っている段階で読者の皆様も不安に思っていることも多いと考えています。この変更自体もある意味では日本における医学・医療領域の変動と密接に関連しており不可逆的な変化である面を含んでおります。今後は、従来の学位申請論文を整えるという役割から慶應義塾大学医学部で胎動しつつある基礎研究や発展しつつある臨床研究を読者の皆様へ伝達する役割へと比重が移り変わって行くことにならざるを得ないと考えております。読者の皆様方のご理解・ご協力とご指導を期待しておりますので、お気づきになられたことは是非とも編集委員会にお知らせ下さい。

(上田 政和)

## 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 6 月 19 日 印刷

平成 15 年 6 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・複製・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 2.5 cm ずつ、左右を約 3 cm ずつあける。外国語の原語綴り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、“Smith”によれば、……という報告がある<sup>23)</sup>。”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,  $\mu m$ , mm, cm, m, km。面積:  $mm^2$ ,  $cm^2$ ,  $m^2$ ,  $a = m^2 \times 10^2$ ,  $ha = a \times 10^2$ 。容積:  $m^3$ ,  $mm^3$ , ml, dl, l。質量: pg, ng,  $\mu g$ , 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);  $\mu V$ , mV, V, kV, MV, (ampere);  $\mu A$ , mA, A, kA, (ohm);  $m\Omega$ ,  $\Omega$ , k $\Omega$ , M $\Omega$ , (watt);  $\mu W$ , mW, W, kW, MW, (farad); pF,  $\mu F$ 。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てください。(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勧めする。

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卷第2号別頁  
平成 15 年 6 月 25 日

# 学位論文

慶應医学会

学位論文

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

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

脇 田 哲 矢

(平成 14 年 6 月 6 日受付)

Key words : paraventricular nucleus, nitric oxide synthase, tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interferon gamma

1980年に内皮細胞由来平滑筋弛緩因子として Furchgottらが想定した物質は<sup>1)</sup>、その後ガス状ラジカルである一酸化窒素 (Nitric Oxide 以下 NO と略す) であることが判明した<sup>2)</sup>。NO 合成酵素 (Nitric oxide synthase 以下 NOS と略す) は、L-アルギニンと分子状酸素を基質とし、NADPH, FMN, FAD, テトラヒドロビオプテリン ((6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin 以下 H<sub>4</sub>B と略す) を補酵素として、L-シトルリンと NO の生成を触媒する酵素である。NOS には 3 種のアイソフォームが存在する。主として中枢・末梢神経、副腎髄質に分布する神経型 NOS (neuronal NOS 以下 nNOS と略す) と血管内皮細胞に存在し血管弛緩作用を持つ血管内皮型 NOS (endothelial NOS 以下 eNOS と略す) は構成型 NOS であり、通常は不活性型として存在し細胞質 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇時にカルモジュリンを介して活性化される。一方、誘導型 NOS (inducible NOS 以下 iNOS と略す) は通常状態では発現しておらず、炎症刺激によりマクロファージ、白血球、脳グリア細胞などで誘導される。iNOS はカルモジュリン親和性が強いいため、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度非依存性の酵素活性を有する。さらに iNOS は high output NO 合成系とよばれ、一度誘導されると大量の NO を合成し NO の局所濃度を著しく上昇させる<sup>3)</sup>。

NO 供与体や NO 合成阻害薬を用いた実験により、NO の中枢神経系における様々な生理学的作用が検討されてきた。中枢神経系の血管の拡張作用以外にも、海馬

における記憶の長期増強 (long term potentiation)<sup>4)</sup> や小脳のプルキンエ細胞での長期抑圧 (long term depression)<sup>5)</sup> 等のシナプスの可塑性に関する報告がなされている。しかし、その一方で、NO は炎症反応において同時に産生されるスーパーオキシドと反応し酸化力の強いペルオキシナイトライトとなる。ペルオキシナイトライトは細胞膜の脂質過酸化を引き起こし、DNA に傷害を起こすことが知られている<sup>6)</sup>。このような神経毒性としての性質から、脳外傷<sup>7)</sup>、アルツハイマー病<sup>8)</sup>、AIDS 脳症<sup>9)</sup> などの中枢神経系の疾患に関与する可能性が示唆されている。

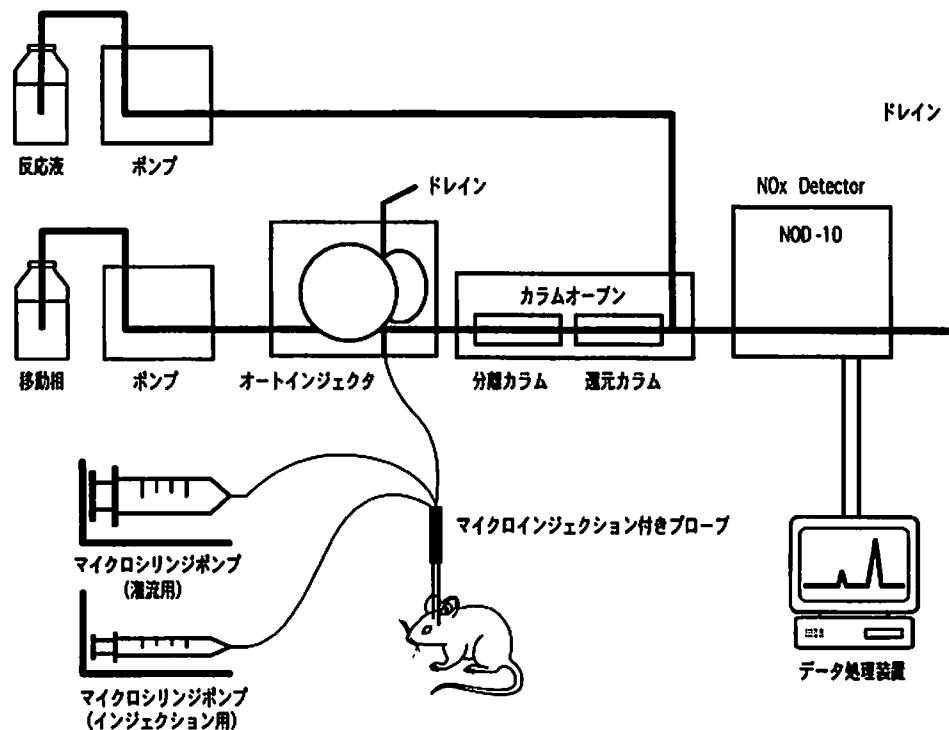
iNOS を発現させる物質として、外因性としては細菌毒素であるリポポリサッカライド (lipopolysaccharide 以下 LPS と略す)、内因性としては炎症性サイトカインがあげられる<sup>10)</sup>。腫瘍壊死因子 α (以下 TNFα と略す)、インターロイキン β (以下 IL-1β と略す)、インターフェロン γ (以下 IFNγ と略す) などは後者に含まれ、炎症性疾患発症時に局所での産生が増加する。炎症性サイトカインの産生は免疫担当細胞のみではなく、中枢神経系細胞自身も産生し、さらにはそのレセプターも有しているため<sup>11,12)</sup>、各種培養グリア細胞において炎症性サイトカインの産生、炎症性サイトカイン投与による iNOS の誘導と NO の産生が報告されている<sup>10,13,14)</sup>。また、ラットに LPS を全身投与すると、視床下部において IL-1β と TNFα のレベルが上昇し<sup>15)</sup>、視床下部室傍核 (paraventricular nuclei, 以下 PVN と略す) の iNOS

本論文は、Wakita T, Shintani F, Yagi G, Nozawa S, Asai M : Combination of inflammatory cytokines increases nitrite and nitrate levels in the paraventricular nucleus of conscious rats. Brain Res 905 : 12-20, 2001 の一部を含む。

mRNA の転写を促進することが報告されている<sup>16)</sup>。これらのことから LPS による iNOS 誘導においても、内因性因子である炎症性サイトカインが関わってくることが示唆される。しかしながら今日まで *in vivo* において、LPS の関与なしに炎症性サイトカインのみによる iNOS 誘導の直接証拠は報告されていない。本研究<sup>17)</sup>では無麻酔自由行動下のラットを用い、炎症性サイトカインを PVN へ注入し NO の代謝産物である亜硝酸イオン（以下 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と略す）と硝酸イオン（以下 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> と略す）の経時的な変化をマイクロダイアリシス法により観察することにより、内因性の炎症性サイトカインが NO 産生に作用をしているかを検討した。さらにサイトカイン投与時の NO 産生に iNOS の関与の有無の検討を、マイクロダイアリシス法、RT-PCR、免疫組織化学法を用いて検討を行った。

## 対象および方法

6 週齢の Sprague-Dawley 系ラット（体重 240～260 g）を三協ラボサービス（静岡）より購入した。ラットは 12 時間の昼夜間隔、室温制御（23～25℃）、自由摂食摂水条件のもとで飼育した。実験は「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」（1988）に準拠してとり行った。合成ヒト型 IL-1β（specific activity 20 million U/mg protein）は大塚製薬（徳島）から提供された。合成マウス型 TNFα（specific activity : 20 million U/mg protein）、合成ラット型 IFN-γ（0.9 million U/mg）、aminoguanidine hemisulfate salt（以下アミノグアニジンと略す）は Sigma（St. Louis, MO, USA）から購入した。ウサギ型抗ラット iNOS ポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology 社（Santa Cruz, CA, USA）より購入した。その他の試薬に関しては記載のない限り和光化学（大阪）より購入した。



第1図 無麻酔自由行動下におけるラットのマイクロダイアリシス法による NO 代謝産物の測定装置。ラット頭部にマイクロダイアリシス用側管付きプローブを挿入し、灌流はハンクス液微速ポンプを用いて流速 1 μl/分で行った。灌流液は 20 分毎に自動回収した。NO detector-HPLC system により、各灌流液中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の濃度測定を行った。試料は最初のカラムで NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> に分離された。二つ目のカラムは還元カラムであり、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を NO<sub>2</sub><sup>-</sup> に変化させた。その後試料中に存在するそれぞれの NO<sub>2</sub><sup>-</sup> をグリース反応により発色し、540 nm の吸光度計で測定した。灌流開始 3 時間で、サイトカインの脳実質への投与を行った。サイトカインは、TNFα、IL-1β、そして IFNγ を個別あるいは組み合わせたものを、2 μl の 0.1% 牛血清アルブミンを含む滅菌生理的食塩水に溶解し、注入用微量ポンプを動力として、0.2 μl/分の速度で投与した。



1. ラット PVN における NO 代謝産物の経時的計測

1) 手術方法

61 匹のラット腹腔内にペントバルビタール (50 mg/kg) を投与し、十分な麻酔深度を確認した。頭部を脳定位固定装置に固定し頭蓋を露出、大泉門より後方 1.7 mm、左 2.6 mm の位置にドリルを用いて穿孔した。マイクロダイアリス・プローブ (以下プローブと略す) を挿入するためのガイドシャフト (MI-AG-8, 外径 0.7 mm, エイコム京都) を垂直軸より 15 度外側へ傾斜させ、骨表面より深さ 6.9 mm まで挿入、固定した<sup>10)</sup>。術後は個別のケージにて 6 日間飼育し、手術前の体重を維持していることを指標として回復を確認した。

2) マイクロダイアリス法による NO 代謝産物の測定

回復確認後、エーテル吸入麻酔下にてプローブを挿入した。プローブは炎症性サイトカイン投与のための側管が付いたもの (MI-A-I-8-02, エイコム) を用いた。プローブ挿入から 24 時間後、脱気したハンス液 (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.338 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH7.4) をプローブ内灌流に用いた。あらかじめ灌流液からは NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> が検出されないことを確認した。灌流は 1 μl/分で行い、灌流液は 20 分毎に自動回収した。試料は NO detect-or-HPLC system (ENO-10, エイコム) により NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の濃度測定を行った。試料を最初のカラムで NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> に分離し、二番目のカドミウムを利用した還元カラムで NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を NO<sub>2</sub><sup>-</sup> に変化させた。その後、試料中に存在するそれぞれの NO<sub>2</sub><sup>-</sup> をグリース反応によって紫に発色させ 540 nm の吸光度計で測定した。吸光度は接続したコンピューターを用いて記録・解析した (Power Chrom, AD Instruments, Castle Hill, Australia) (第 1 図)。

検量線は亜硝酸ナトリウム溶液と硝酸ナトリウム溶液を用いて求めた。さまざまな濃度の亜硝酸ナトリウム溶液と硝酸ナトリウム溶液にプローブを浸し、上記システムにてプローブの透折回収率を算出した結果、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> は 47±2%, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は 50±2% という回収率を得た (n=10)。

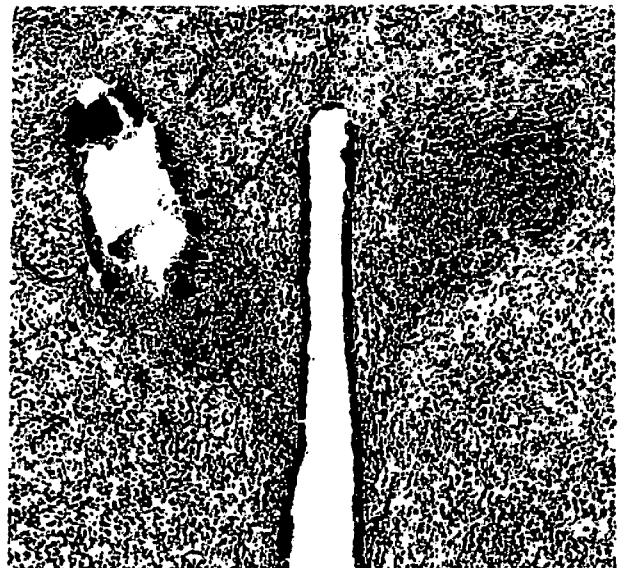
3) サイトカインの投与

PVN への灌流開始から 3 時間後、NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の値が連続 3 回の計測でほぼ一定であることを確認した後、サイトカインを PVN へ投与した。サイトカインは単独、あるいは混合したものを 2 μl の 0.1% 牛血清アルブミンを含む滅菌生理的食塩水に溶解した。それぞれのサイトカイン溶液はプローブの側管から 0.2 μl/分の速度で注入した。本実験の前に、ラット PVN に対する炎症性サ

イトカインの投与量を決定するために、各群 3 匹ずつサイトカイン単独投与の予備実験を行った。TNFα については 0.2 ng, 2 ng, 10 ng, の三段階の濃度にて単独投与を行い、投与後 8 時間 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 値を計測した。IFNγ については 0.2 ng, 2 ng の二段階の濃度を、また、IL-1β については 0.2 ng, 2 ng, 10 ng の三段階の濃度を投与した。予備実験の結果から、TNFα 10 ng, IFNγ 2 ng, IL-1β 2 ng を本実験の濃度として用いた。

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> が NOS によって産生されることを確認する目的で、NOS 阻害剤であるアミノグアニジンをサイトカイン投与 3 時間後に腹腔内投与した。アミノグアニジンは 30 mg/kg を 0.5 ml の生理的食塩水に溶解し、対照群には同量の生理的食塩水を用いた。

さらにプローブの挿入位置を確認するため組織学的検索を行った。ラットに高容量のペントバルビタールで深麻酔し、経心臓的に 10% のホルマリン液を用いて脳を灌流固定した。脳を摘出し、30% 蔗糖を含む 3.7% ホルムアルデヒド溶液で後固定した後、厚さ 50 μm にて前額断連続切片を作製しクレシルバイオレットを用いてニッスル染色を行った (第 2 図)。6 匹のラットでは、プローブの先端の位置が PVN の外隔から 300 μm 以上離れていたため、実験結果から除外した。



第 2 図 マイクロダイアリス終了後のラット脳冠状断標本。実験終了後にプローブの位置の確認を行った。経心臓的に 3.7% のホルムアルデヒドにて脳を灌流固定した。前額断で厚さ 50 μm に薄切し、ニッスル染色を行った。中央に第三脳室と両側の PVN があり、左側 PVN にプローブ先端の痕が確認された (倍率 40 倍)。6 匹のラットではプローブの先端から PVN までの距離が 300 μm 以上離れていたため、実験結果から除外した。

## 2. 半定量 RT-PCR を用いた iNOS mRNA の検出

ラット 3 匹の PVN に混合サイトカインを注入し、半定量 RT-PCR を用いて iNOS mRNA の変化を調べた。混合サイトカイン (TNF $\alpha$ ; 10 ng, IL-1 $\beta$ ; 2 ng, IFN $\gamma$ ; 2 ng) は、前述実験と同様にブローブ側管を介してラットに投与した。投与 6 時間後に断頭し脳を摘出、実験まで -80°C で保存した。対照群 3 匹には 0.1% 牛血清アルブミンを含む生理的食塩水を投与した。

脳はクライオスタットにて前額断連続 50  $\mu$ m に薄切した。室傍核近傍にブローブ挿入痕が存在するのを確認し、それを中心に直径 2 mm のステンレスチューブで円型に打ち抜いた。連続切片 10 枚から組織を採取し、TRIzol (Life Technologies, Rockville, MD, USA) を用いて total RNA を抽出した。total RNA 量は吸光度計にて計測し、その溶液が 1  $\mu$ g/ $\mu$ l になるよう調整した。RT-PCR 反応は Takara RNA PCR kit (タカラバイオ株式会社, 京都) を用いた。逆転写反応は、30°C 10 分、55°C 30 分、そして 99°C で 5 分間加温した。iNOS 固有のプライマー (forward, 5'-ACAACGTGGAGAAAACCCAGGTG-3', reverse, 5'-ACAGCTCCGGGCATCGAAGACC-3'), 内部コントロールのグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 以下 GAPDH と略す) のプライマー (forward, 5'-CACGGCAAGTTCAATGGCACA-3'; reverse, 5'-GAATTGTG-AGGGAGAGTGCTC-3') を加えて、96°C 30 秒の変性反応、65°C 60 秒のアニーリング反応、72°C 90 秒の伸長反応を 1 サイクルとし、計 25 サイクルの PCR 反応を行った<sup>19)</sup>。

PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドにて染色、Molecular Imager FX<sup>®</sup> (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) にて各バンドの発現強度を測定した。

なお吸光度計で算出された total RNA 量には誤差が生じやすいため、半定量実験を行う際には、GAPDH のバンドの出現強度が各試料間で同一になるように total RNA 溶液の希釈濃度を補正した。

## 3. 免疫組織化学による iNOS 蛋白質の同定

5 匹のラットに 3 種混合サイトカインを、4 匹の対照群には 0.1% 牛血清アルブミンを含む生理的食塩水を前述と同様の方法で投与した。投与から 8 時間後、ペントバルビタール深麻酔を施し、心臓より 0.1 M phosphate buffer saline (以下 PBS と略す) および 4% paraformaldehyde/0.1 M PBS を灌流した。脳を摘出し、同液にて 4°C で 24 時間後固定し、30% ショ糖/0.1

M PBS に置換した後、クライオスタットを用いて厚さ 20  $\mu$ m の連続切片を作製した。

切片は 0.05 M PBS にて洗浄後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含むメタノールにて内因性ペルオキシダーゼを不活性化させた。バックグラウンドを除去するため 1.5% ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で処理をした。一次抗体に抗 iNOS 抗体 (希釈倍率 2000 倍) を室温で一晩反応させた。二次抗体以降は、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) 付属の HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体を用い、反応時間は 30 分とした。0.05 M PBS で 3 回の洗浄後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (以下 DAB と略す) と 7 分間反応させ、褐色に発色させた。観察は光学顕微鏡を用いて行い、PVN を含む連続する 2 枚の切片における DAB 発色細胞を計算した。PVN を含むことは、免疫組織化学染色を施行した前後の切片にニッスル染色で PVN が存在することにより確認した。

## 4. 統計

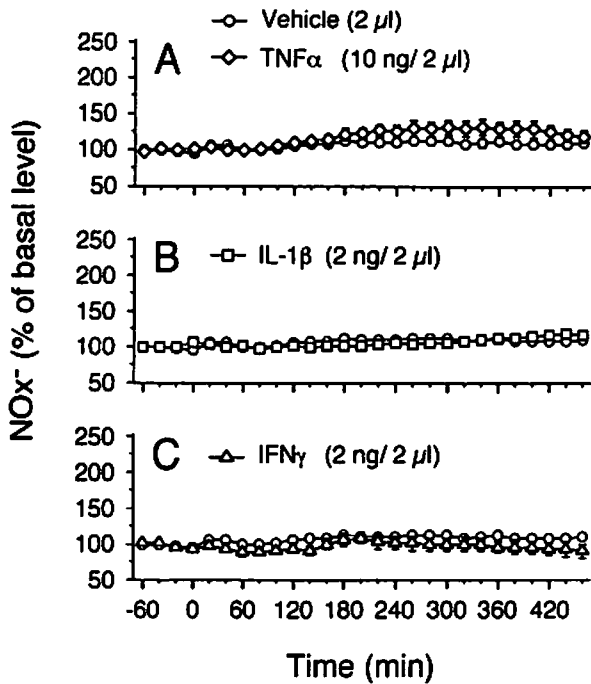
結果は平均値 $\pm$ 標準誤差として示した。統計学的有意差はマイクロダイアリス実験の測定値については repeated ANOVA を用いて行った。半定量 RT-PCR 実験と免疫組織化学実験の結果は、Student's t-test を用いて統計処理を行った。両検定とも 5% を有意水準とした。

## 結 果

### 1. 炎症性サイトカインの投与によるラット PVN での NO 代謝産物の変化

マイクロダイアリス法を用いて得られた灌流液中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の和を NO 代謝産物として NO<sub>x</sub><sup>-</sup> と定義した。NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の基礎値は、サイトカイン投与直前に回収した 3 回の灌流液試料中のそれぞれの値を平均して求めた。NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の基礎値は、それぞれ 8.0 $\pm$ 0.6 と 44.1 $\pm$ 1.5 pmol/20  $\mu$ l、NO<sub>x</sub><sup>-</sup> の基礎値は 52.2 $\pm$ 1.9 pmol/20  $\mu$ l だった (n=40)。計測された NO<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO<sub>3</sub><sup>-</sup> の基礎値の比は、18.0 $\pm$ 1.1% だった。

まず初めに 3 種類の炎症性サイトカイン投与量の決めるための予備実験を行った。TNF $\alpha$  は 0.2 ng, 2 ng, 10 ng, の 3 段階の濃度にて投与を行ったが、すべての濃度において計測 8 時間では、炎症性サイトカインを含まない対象群と比較して NO<sub>x</sub><sup>-</sup> 値の変化は認められなかった。また IFN $\gamma$  は 0.2 ng と 2 ng の 2 種類の濃度で投与を行ったが、変化は認められなかった。ゆえに、



第3図 炎症性サイトカイン単独投与刺激でのラットPVNにおけるNO代謝産物の変化。TNF $\alpha$  10 ng (A), IL-1 $\beta$  2 ng (B), IFN $\gamma$  2 ng (C)をPVNへ投与した。対照群には、同量の0.1% BSA入りの生理的食塩水を投与した。マイクロダイアリシス法にて、PVNでのNO $_2^-$ とNO $_3^-$ を20分おきに計測し、その和をNO $_x^-$ と定義した。サイトカイン投与前の基礎値は、52.2 $\pm$ 1.9 pmol (n=40)であり、その値からの変化率をグラフに示した。TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ すべての単独投与群において、NO $_x^-$ 値は480分間有意な変化を示さなかった。(Wakita T et al : Brain Res 905 : 12-20, 2001の第1図を、許可を得て転載。)

TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ともに高い濃度を本実験の投与量とした。IL-1 $\beta$ についても0.2 ng, 2 ng, 10 ngの3種類の濃度で検討したところ、IL-1 $\beta$  10 ngの投与によりNO $_x^-$ 値の上昇を僅かに観察した。そこでNO $_x^-$ 値を上昇させなかった2 ngをIL-1 $\beta$ 濃度とし本実験を行った。

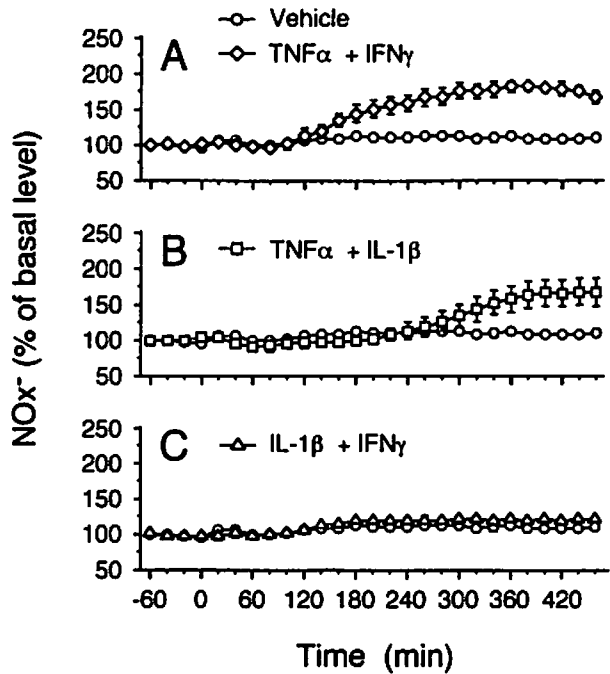
これらの濃度を用いて、TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ の単独投与を行いPVNにおけるNO $_x^-$ 値の変化を投与後連続8時間測定したが、対照群と比較していずれの群においてもNO $_x^-$ 値の有意な変化は認められなかった(第3図)。

次に2種類の炎症性サイトカインを組み合わせ投与した。TNF $\alpha$  10 ngとIFN $\gamma$  2 ngを混合した場合、PVNの灌流液中のNO $_x^-$ 値は投与後160分より漸増し始め、380分後に最大値をとり、対照群の1.8倍となった(第4図A)。またTNF $\alpha$  10 ngとIL-1 $\beta$  2 ngを混合したところ、NO $_x^-$ 値は投与後300分より漸増し、

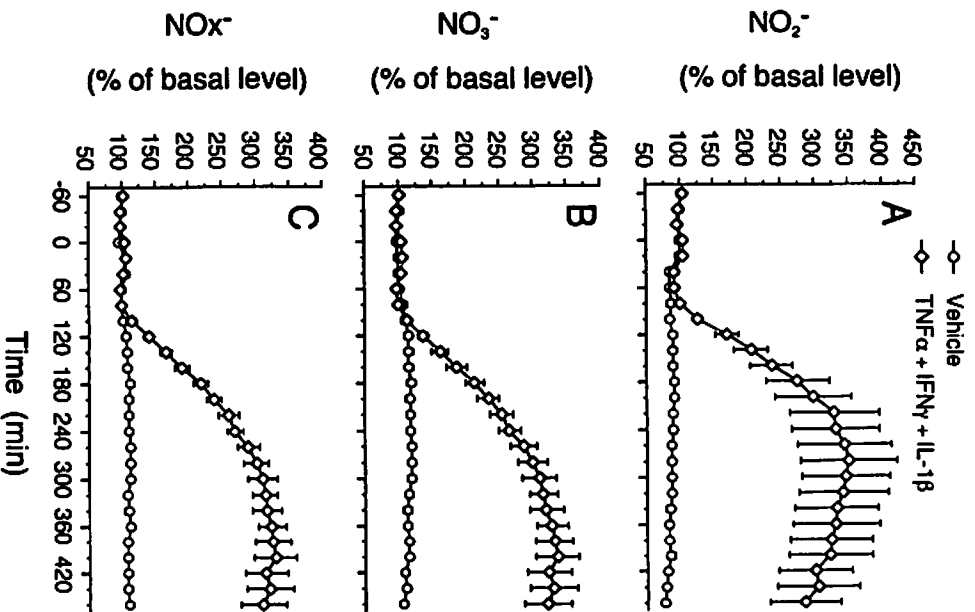
440分後に最大値をとり、対照群の1.7倍となった(第4図B)。すなわち、TNF $\alpha$ とIFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ とIL-1 $\beta$ の間には相乗効果が観察された。それに対し、IL-1 $\beta$  2 ngとIFN $\gamma$  2 ngのPVNへ投与では単独投与と同様にNO $_x^-$ 値の変化が認められなかった(第4図C)。

3種の炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$  10 ng, IL-1 $\beta$  2 ng, IFN $\gamma$  2 ng)を混合してPVNへ投与した場合の灌流液中のNO $_2^-$ , NO $_3^-$ , およびNO $_x^-$ 値の変化を第5図に示した。NO $_2^-$ , NO $_3^-$ は対照群と比較してそれぞれ120分後、140分後より漸増した。また、NO $_x^-$ 値も投与後120分より有意な漸増が認められ、400分後で最大となり、その値は対照群の3.3倍であった。

そこで、3種混合投与と2種混合投与のNO $_x^-$ 値を統計的に比較したところ、3種混合群とTNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ 混合群の間では、投与後120分より実験終了の460分まで有意に高く(第4図Aと第5図C)。また、TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$ 混合群、IL-1 $\beta$ +IFN $\gamma$ 混合群との間においても、



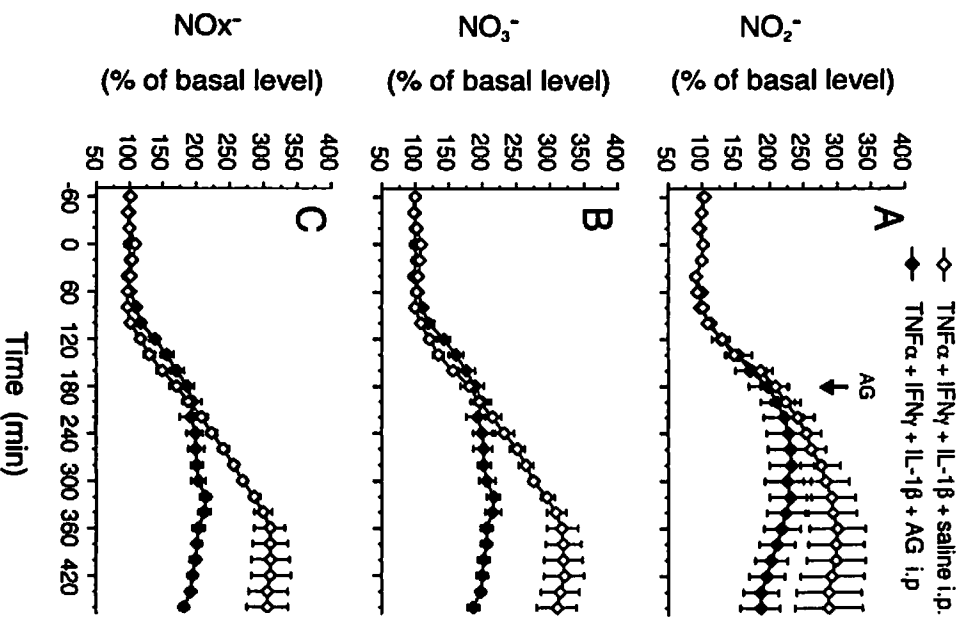
第4図 炎症性サイトカイン2種混合投与刺激でのラットPVNにおけるNO $_x^-$ 値の変化。TNF $\alpha$  10 ngとIFN $\alpha$  2 ngの混合投与においては、投与後120分までは対照群と比較しNO $_x^-$ 値の変化は認められないが、140分より有意な漸増を示し、380分後に最大値である投与前基礎値の1.8倍となった。(A)。TNF $\alpha$  10 ngとIL-1 $\beta$  2 ngの混合投与においては、投与後300分よりNO $_x^-$ 値の有意な漸増が認められ、440分で投与前基礎値の1.7倍となった(B)。IL-1 $\beta$  2 ngとIFN $\gamma$  2 ngの混合投与は、480分の観察中に対照群との有意な差は認められなかった(p<0.05)。(Wakita T et al : Brain Res 905 : 12-20, 2001の第2図を、許可を得て転載。)



第5図 炎症性サイトカイン3種混合投与刺激でのラットPVNにおけるNO代謝産物(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値(A), NO<sub>3</sub><sup>-</sup>値(B) and NO<sub>x</sub><sup>-</sup>値(C))の変化. TNFα 2 ng, IL-1β 2 ngとIFNγ 2 ngをラットPVNに混合投与した. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>値はそれぞれサイトカイン投与後100分と140分から対照群と比較して有意な増加を示した. NO<sub>x</sub><sup>-</sup>値は投与後120分から有意な増加をはじめ, 400分後に投与前基礎値の3.3倍となった(p<0.05). (Wakita T et al: Brain Res 905:12-20, 2001の第3図を, 許可を得て転載)

NO<sub>x</sub><sup>-</sup>値は120分後から実験終了まで有意な差がみられた。(第4図B, Cと第5図C)

これらの結果におけるNO<sub>2</sub><sup>-</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>, およびNO<sub>x</sub><sup>-</sup>値の上昇が, NOSの作用であることを検討するため, 3種混合サイトカイン投与3時間後にテミノグ्रेसゾン30 mg/kgを腹腔内投与した. 生理的食塩水を腹腔内注射した対照群と比較したところ, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>はそれぞれ, テミノグ्रेसゾン投与から120分後(サイトカイン投与より300分後)と60分後(サイトカイン投与より240分後)より実験終了まで有意な低下が観察された(第6図A, B). NO<sub>x</sub><sup>-</sup>値はテミノグ्रेसゾン投与か

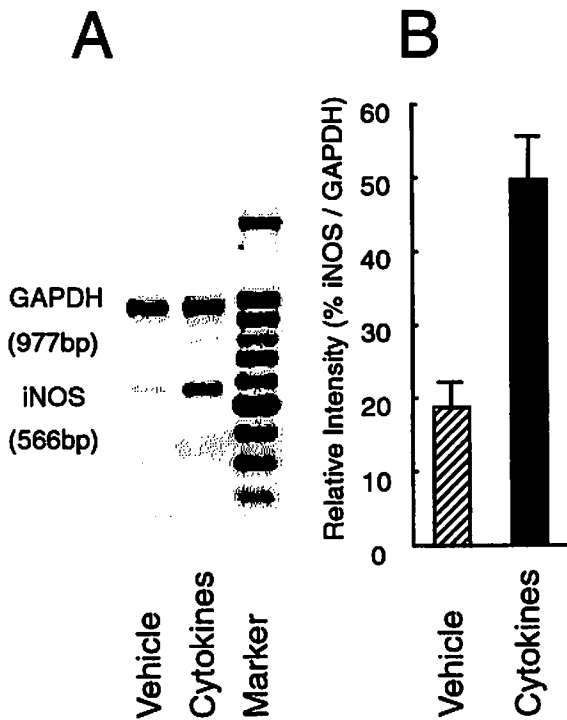


第6図 サイトカイン刺激後のNO代謝産物へのテミノグ्रेसゾンの効果. 混合した炎症性サイトカイン(TNFα 10 ng, IL-1β 2 ng, IFNγ 2 ng)をラットPVNに投与し, 3時間後にテミノグ्रेसゾン溶液(30 mg/kg)の腹腔内投与を行った. 対照群には同量の生理的食塩水を投与した. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値は, 対照群と比較して有意な効果が認められなかったが(A),とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>値とNO<sub>x</sub><sup>-</sup>値はAG投与後80分より効果が認められ, 460分まで効果は持続した(p<0.05). (Wakita T et al: Brain Res 905:12-20, 2001の第4図を, 許可を得て転載)

ら80分後(サイトカイン投与より260分後)より実験終了まで有意な低下が観察された(第6図C). テミノグ्रेसゾンを投与した際にも2.1倍のNO<sub>2</sub><sup>-</sup>値上昇が認められたが, 対照群の3.0倍(サイトカイン投与340分後)に比べ有意に抑制された.

2. PVNにおける炎症性サイトカイン投与後のiNOS mRNA発現

3種の炎症性サイトカイン(TNFα 10 ng, IL-1β 2 ng, IFNγ 2 ng)を投与し, PVNにおけるiNOS mRNAの発現をRT-PCRを用いて検討した. iNOS mRNAと



第7図 半定量的RT-PCRを用いたラットPVNにおけるiNOS mRNAの発現。混合した炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$  10 ng, IL-1 $\beta$  2 ng, IFN $\gamma$  2 ng)をラットPVNに投与し、6時間後に脳を摘出した。PVNをパンチアウトし、mRNAを抽出しRT-PCRを行った。(A) iNOS mRNAとGAPDH mRNAのバンドはそれぞれ566 bpと970 bpに認められた。サイトカイン投与群におけるiNOS mRNAは対照群のそれと比較し増加を示した。マーカーは、100 bp-DNA ladder markerである。(B) GAPDH mRNAのバンドを標準として用いてiNOS mRNAの半定量化を行った。サイトカイン投与群(n=3)においては、iNOS mRNA/GAPDH mRNAの値は、49.7 $\pm$ 5.7%であり対照群(n=3)の18.7 $\pm$ 3.4%に対して有意な上昇が認められた(p<0.05)。(Wakita T et al: Brain Res 905: 12-20, 2001の第5図を、許可を得て転載。)

GAPDH mRNAのRT-PCR産物は、アガロースゲル上でそれぞれ予測された566 bpと970 bpのバンドに分離された。iNOS mRNAのバンドは対照群においても認められたが、サイトカイン投与群におけるiNOS mRNAの発現は対照群より強く認められた(第7図A)。

GAPDH mRNAとの比によってiNOS mRNAの発現量を標準化すると、iNOS/GAPDH bands比はサイトカイン投与群(n=3)で49.7 $\pm$ 5.7%、対照群(n=3)で18.7 $\pm$ 3.4%となり、両群間の発現量には有意差が認められた(t=4.530, df=4, p<0.05)(第7図B)。

### 3. PVNにおけるiNOS蛋白質の免疫組織化学的検索

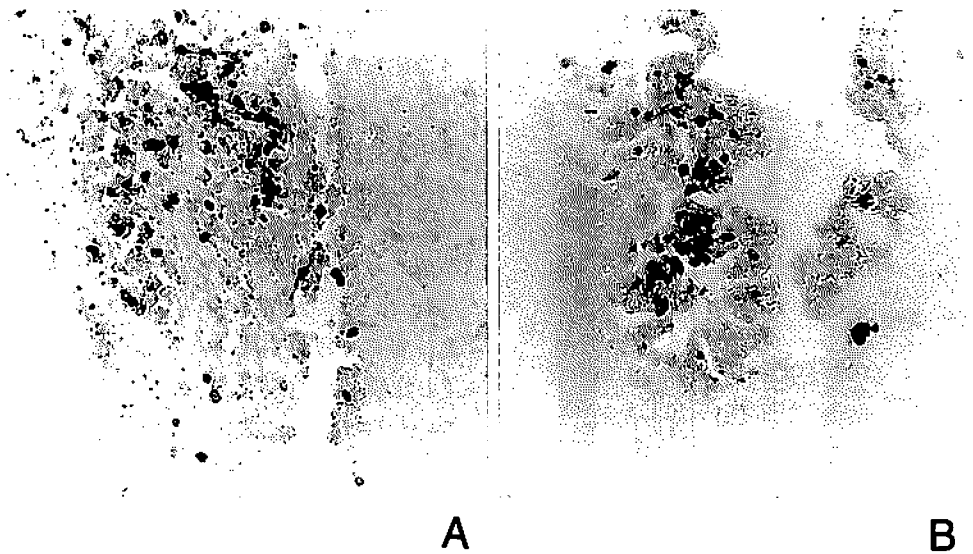
炎症性サイトカイン3種(TNF $\alpha$  10 ng, IL-1 $\beta$  2 ng, IFN $\gamma$  2 ng)を投与後のPVNにおけるiNOSの蛋白質の検出を、免疫組織化学法にて行った。プローブ挿入部の先端を中心に抗iNOS抗体陽性の細胞が認められた(第8図A)。しかし、対照群においても、iNOS陽性細胞が認められたため(第8図B)、炎症性サイトカイン投与群(n=5)と対照群(n=4)において、PVNを含む連続する2枚の切片の抗iNOS抗体陽性細胞をカウントし比較した。炎症性サイトカイン投与群における陽性細胞数は184.6 $\pm$ 28.7SE、対照群においては166.5 $\pm$ 6.5 SEであった。両群間における抗iNOS陽性細胞数に有意な差は認められなかった。(t=0.547, p=0.601)

### 考 察

NOは微量でも組織内において生理学的作用を持ち、かつ拡散性と短い半減期を持つため、局所的かつ経時的に産生量を計測する必要がある。本研究ではマイクロダイアリシス法とグリース反応を組み合わせNO代謝産物を測定する方法を確立し実験を行った。Ishizukaらは非麻酔下のラットPVNにおけるNO $_2^-$ 、NO $_3^-$ イオンを本研究と同様の方法で計測し報告しているが、速度1 $\mu$ l/分で灌流し回収は10分おきに回収した結果、基礎値はNO $_2^-$ は3.6 $\pm$ 1.0 pmol、NO $_3^-$ は27.8 $\pm$ 4.6 pmolであった<sup>20)</sup>。いずれも本研究の結果とほぼ相違ないものであった。

本研究では複数の炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$  10 ngとIFN $\gamma$  2 ng, TNF $\alpha$  10 ngとIL-1 $\beta$  2 ngあるいは3種混合)をPVNに投与した場合、同部位でのNO代謝物産生の亢進がみられた。NO $_2^-$ 、NO $_3^-$ ともに、2時間の無反応期の後、緩やかな上昇が6時間に渡り持続的に認められた。ShintaniらはNMDA receptorの刺激によってcNOSが活性化された結果、NOの代謝産物が刺激後5分以内で一過性に増加することを報告している<sup>21)</sup>。したがって、サイトカイン投与からNO $_3^-$ 値が上昇を始めるまでに2時間程度の時間を要しているのは、構成型NOSが活性化されたのではなく、iNOS蛋白質が合成された結果であるという仮説を想定した。

また、TNF $\alpha$ とIFN $\gamma$ をPVNへ単独投与した場合、NO $_3^-$ 値の変化は認められなかったが、混合投与することによりNO $_3^-$ 値は上昇した。この理由として、TNF $\alpha$ とIFN $\gamma$ のiNOSのプロモーターの共刺激によるものと想定もできる。iNOSのDNA配列のプロモーター領域にはIFN $\gamma$  activation site (GAS)、IFN $\gamma$ -response ele-



第8図 抗 iNOS 抗体によるラット PVN の免疫組織学的染色標本。混合した炎症性サイトカインを PVN に投与し 8 時間後に灌流固定した。PVN 近傍にて冠状断 20  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製した。一次抗体としてラット抗 iNOS 抗体を使用し、ABC 法を用いて DAB にて発色した。抗 iNOS 抗体陽性細胞はマイクロダイアリスプローブ挿入部近傍に出現した (A)。対照として 0.1% 牛血清アルブミンを含む生理的食塩水を投与した群 (B) と比較検討したところ、陽性細胞数に有意な差は認められなかった (サイトカイン投与群  $n=5$ , 対照群  $n=4$ )。 (倍率 100 倍) (Wakita T et al : Brain Res 905 : 12-20, 2001 の第 6 図を、許可を得て転載。)

ment ( $\gamma$ -IRE), nuclear factor kB (NFkB) binding site, AP-1 binding site や TNF response element が存在する。なかでも、NFkB binding site は、iNOS 遺伝子発現に深く関与すると考えられており、 $\gamma$ -IRE 領域を共刺激することによってその発現は強調される<sup>22)</sup>。TNF $\alpha$  は TNF $\alpha$  receptor-associated factor 2 (TRAF2) を介して、NFkB と AP-1 を活性化させ<sup>23)</sup>、IFN $\gamma$  は  $\gamma$ -IRE の活性を上昇させることから、協調的に iNOS の発現に関与していると思われた。また IL-1 $\beta$  も TNF $\alpha$  receptor-associated factor-6 (TRAF6) を介して NFkB を活性化する<sup>24)</sup>ため、IL-1 $\beta$  と IFN $\gamma$  の混合投与では有意な NO 産生は認められないものの、3 者同時投与によってその効果が相乗的に増強されている。以上の事から、本実験における NO 代謝産物の産生増加は、炎症性サイトカインによる iNOS の活性上昇の結果であると考え、これを実験的に証明するため本研究では、(1) サイトカインによる NO $_2^-$  値の産生が iNOS 選択的阻害剤で抑制、(2) サイトカイン刺激による PVN での iNOS mRNA 増加の有無 (3) サイトカイン刺激による PVN での iNOS 蛋白質合成を調べた。

最初に、NO $_2^-$  値を計測しながら、iNOS の選択的阻害薬であるアミノグアニジン投与したところ、NO $_2^-$  値の上昇は有意に抑制された。LPS でラットの海馬を刺激し NO $_2^-$  値を計測すると、NO $_2^-$  値は基礎値の 7 倍の

上昇を示した。アミノグアニジン 100 mg/kg (高濃度) の投与により NO $_2^-$  値の上昇が完全に抑制可能であるため、アミノグアニジン投与量を増量することで NO $_2^-$  値の上昇を完全に抑制できると報告されている<sup>25)</sup>。アミノグアニジンは iNOS の選択的抑制剤であるが、高濃度を用いた場合には特異性を失い cNOS の作用も抑制する。つまり、iNOS に対する IC50 は cNOS の 1/20 であるが<sup>26)</sup>、高濃度の場合には cNOS への作用は無視できない。本研究では完全な阻害作用は示さず NO $_2^-$  値の上昇が認められた。低濃度のアミノグアニジンを用いたため iNOS に対して選択的な作用を得たと考えているが、アミノグアニジン投与後の上昇について cNOS の影響を否定できず、今後の検討を要する。

次に、炎症性サイトカインを PVN に投与した時、iNOS mRNA の転写が促進されるか否かを半定量 RT-PCR を用いて解析した。iNOS mRNA は、炎症性サイトカインを投与した PVN で発現量が増加することから、炎症性サイトカイン投与時に認められた NO 代謝産物の増加は iNOS の活性化によるものであると考えられる。しかし、iNOS mRNA の発現は炎症性サイトカインを投与していない対照群においてもわずかに認められた。我々は予備実験として、手術操作を加えていないラットの PVN の iNOS mRNA を同様に半定量 RT-PCR にて検索したが検出されなかった。ラットの脳に外傷を加え

ると iNOS mRNA の発現増加がみられることから<sup>2)</sup>、ガイドの挿入、プローブの挿入、対照液の注入などの実験操作による脳の外傷が原因で、炎症性サイトカインを投与しなかった群においても、iNOS mRNA の発現が認められたと考えられる。

第三に PVN における iNOS 蛋白の発現を、抗 iNOS 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。PVN に挿入したプローブの先端周囲に抗 iNOS 抗体陽性細胞が多く認められ、iNOS が投与部位に局在することが分かった。しかし、対照群においても抗 iNOS 抗体陽性細胞が認められ、抗 iNOS 抗体陽性細胞数において炎症性サイトカイン投与群と対照群の間で統計学的有意差を認めなかった。この理由として以下の二つが考えられる。本実験ではマイクロダイアリス法を用いて炎症性サイトカインの PVN への投与により NO 代謝産物の増加が観察された。この結果は個体における経時的变化であり、基礎値をもとに増加した変化率を上昇としてグラフに示したものである。一方、個体間を比較する免疫組織化学法は個体間の分散が大きい経時的变化を測定するにはあまり鋭敏ではないと考えられた。また、たとえ抗 iNOS 抗体陽性細胞数は同等であっても、個々の細胞中で iNOS 活性には差がある可能性があるため蛋白レベルでの差を検出することは困難であった。

一方、蛋白レベルでの iNOS の発現量の差に比して NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値がサイトカイン投与群で有意に高値を示した可能性として、炎症性サイトカインと LPS の投与によって、NOS の補酵素である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の細胞内濃度が上昇し、その結果として NOS を介した NO 代謝産物産生が上昇するという報告を考慮する必要がある<sup>27,28)</sup>。この報告を元に本実験を解釈するなら、混合した炎症性サイトカインは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量の上昇を介して NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値の産生増加をおこした可能性があり、サイトカイン投与をした PVN の抗 iNOS 抗体陽性細胞数の増加がコントロール群と比較して認められなかったことと合致する。本実験結果では、iNOS 蛋白質量の上昇を完全には証明できず、さらには nNOS や eNOS の活性上昇を完全に否定することは困難であった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の動態も含めた今後の検討が必要であると思われた。

前述したようにラット腹腔内に LPS を投与すると PVN に iNOS 遺伝子が発現する<sup>16)</sup>。我々も予備実験として、0.1 mg/kg の LPS を腹腔内投与後 PVN における NO 代謝産物の測定を行ったが、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値は 7 時間後に基礎値の 3 倍となった。LPS は脳血管関門 (blood-brain barrier) の透過性に影響し、LPS が直接 PVN に作用するという可能性も考えられるもの<sup>29)</sup>、LPS

を腹腔内に投与することにより PVN において IL-1β や TNFα が増加することが知られており<sup>16)</sup>、今回の実験データを考え合わせると、LPS は視床下部で炎症性サイトカインの産生を促し、NO 産生に寄与しているとも考えられる。また同様に、脳外傷の受傷部位における iNOS の活性の上昇<sup>7,30)</sup>は、炎症性サイトカインの産生を介した反応の結果である事が考えられる。しかし、Holmin らは外傷により IL-1β と TNFα は発現するが、IFNγ mRNA の発現が認められないと報告している<sup>31)</sup>。我々のデータでは IL-1β と TNFα 混合投与により NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値は上昇し、さらに IFNγ を同時投与することにより相乗的に NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値を高めることから、IFNγ が炎症性サイトカインとして脳内で何らかの役割を担っている可能性が示唆された。ラットの培養アストロサイトは TNFα の投与により IFNγ 蛋白を産生することが知られており<sup>32)</sup>、ラット PVN における IFNγ 受容体蛋白合成も確認されている<sup>33)</sup>。一方で、リンパ球由来の IFNγ と質量に違いがある神経由来の IFNγ<sup>34)</sup>が存在し、ラット視床下部ニューロンで生物学的活性<sup>35,36)</sup>が確認されている。今後どのような条件で IFNγ が産生されるのを検討していく必要がある。

また本研究において PVN における iNOS 発現細胞の同定はなされていない。既報告<sup>37)</sup>よりミクログリアの関与の可能性が考えられるが、中枢神経における NO の作用という視点からも今後の研究で解明していきたいと考えている。

本実験において、ラット PVN における NO 代謝産物の増加は複数の炎症性サイトカインの相乗効果であった。この事から中枢神経系の炎症疾患における NO を介した細胞障害反応には複数の炎症性サイトカインが相乗効果を持って関与している可能性が高いと考えられた。中枢神経疾患に対する抗サイトカイン作用を持つ薬剤の開発が期待されているが、その時にも複数のサイトカインが協調的に働いている事に留意が必要であろう。

## 総 括

PVN における NO 産生への炎症性サイトカインの関与を調べるため、無麻酔行動下ラットにマイクロダイアリス法を用いて NO 代謝産物を測定する実験系を確立し、炎症性サイトカインを投与した後の変化を計測した。炎症性サイトカインとして TNFα 10 ng、IL-1β 2 ng と IFNγ 2 ng を用いたが、それぞれを単独で PVN へ投与しても計測 8 時間まで NO<sub>2</sub><sup>-</sup>値に変化は認められなかった。しかし、2 種類のサイトカインを同時に投与

したところ、TNF $\alpha$  10 ng と IFN $\gamma$  2 ng の組み合わせでは、NO $_2^-$ 値は140分後から上昇が始まり、380分で開始時の値の1.8倍に達した。また、TNF $\alpha$  10 ng と IL-1 $\beta$  2 ng の組み合わせでは、NO $_2^-$ 値は、投与後340分から上昇が認められ、440分には開始時の値の1.7倍に到達した。それに対し、IL-1 $\beta$  2 ng と IFN $\gamma$  2 ng は NO $_2^-$ 値に変化を与えなかった。しかし、3種類のサイトカインを混合投与した場合、NO $_2^-$ 値は120分後から上昇が認められ、400分後には3.3倍に達した。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 NO $_2^-$ 値は有意に抑制された。混合サイトカイン投与群では、iNOS の mRNA が対照群と比較し有意に多く発現していることが確認された。また密度に有意差を認めなかったものの免疫組織化学的検討よりサイトカイン投与部位近傍での iNOS 陽性細胞の存在が確認できた。以上の結果より、炎症性サイトカインの混合投与により、PVNにおいて iNOS を介して NO が産生されることが示唆された。

本稿を終えるにあたり、懇切なご指導とご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志朗教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に際して直接御指導いただきました慶應義塾大学医学部精神神経科学教室新谷太助手と、実験の機会を与えてくださいました前慶應義塾大学医学部精神神経科学教室浅井昌弘教授に深く感謝いたします。さらに、多大なるご助言を頂きました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室の杉原一廣先生、日本医科大学生理学教室佐久間康夫教授、近藤保彦助手、ならびに教室員の諸先生方に感謝いたします。

本研究の一部は第77回日本生理学会(2000年、横浜)で発表した。本研究の一部は1999年度慶應義塾大学医学部研究奨励費による。

## 文 献

- 1) Furchgott RF, Zawadzki JV : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373-376, 1980
- 2) Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524-526, 1987
- 3) Dawson TM, Snyder SH : Gases as biological messengers : nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14 : 5147-5159, 1994
- 4) O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O : Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation : evidence for nitric oxide as a pos-

- sible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88 : 11285-11289, 1991
- 5) Daniel H, Hemart N, Jaillard D, Crepel F : Long-term depression requires nitric oxide and guanosine 3' : 5' cyclic monophosphate production in rat cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 8 : 1079-1082, 1993
- 6) Yermilov V, Rubio J, Ohshima H : Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite *in vitro* and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett.* 376 : 207-210, 1995
- 7) Sinz EH, Kochanek PM, Dixon CE, Clark RS, Carcillo JA, Schiding JK, Chen M, Wisniewski SR, Carlos TM, Williams D, DeKosky ST, Watkins SC, Marion DW, Billiar TR : Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J Clin Invest* 104 : 647-656, 1999
- 8) Dorheim MA, Tracey WR, Pollock JS, Grammas P : Nitric oxide synthase activity is elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 205 : 659-665, 1994
- 9) Bukrinsky MI, Nottet HS, Schmidtayerova H, Dubrovsky L, Flanagan CR, Mullins ME, Lipton SA, Gendelman HE : Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes : implications for HIV-associated neurological disease. *J Exp Med* 181 : 735-745, 1995
- 10) Simmons ML, Murphy S : Cytokines regulate L-arginine-dependent cyclic GMP production in rat glial cells. *Eur J Neurosci* 5 : 825-831, 1993
- 11) Woodroffe MN : Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 45 : S6-10, 1995
- 12) Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S : Cytokines and their receptors in the central nervous system : physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol Ther* 69 : 85-95, 1996
- 13) Chao CC, Lokensgard JR, Sheng WS, Hu S, Peterson PK : IL-1-induced iNOS expression in human astrocytes via NF- $\kappa$ B. *Neuroreport* 8 : 3163-3166, 1997
- 14) Romero LI, Tatro JB, Field JA, Reichlin S : Roles of IL-1 and TNF- $\alpha$  (in endotoxin-induced activation of nitric oxide synthase in cultured rat brain cells. *Am J Physiol* 270 : R326-332, 1996
- 15) Kakizaki Y, Watanobe H, Kohsaka A, Suda T : Temporal profiles of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the plasma and hypothalamic paraventricular nucleus after intravenous or intraperitoneal administration of lipopolysaccharide in the rat : estimation by push-pull perfusion. *Endocr J* 46 : 487-496, 1999
- 16) Harada S, Imaki T, Chikada N, Naruse M, Demura H : Distinct distribution and time-course changes in neuronal nitric oxide synthase and inducible NOS in the paraventricular nucleus following lipopolysaccharide injection. *Brain Res* 821 : 322-332, 1999



- 17) Wakita T, Shintani F, Yagi G, Nozawa S, Asai M : Combination of inflammatory cytokines increases nitrite and nitrate levels in the paraventricular nucleus of conscious rats. *Brain Res* 905 : 12-20, 2001
- 18) Paxinos G, Watson C : *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, London, 1999
- 19) Okamoto H, Ito O, Roman RJ, Hudetz AG : Role of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in endotoxin-induced cerebral hyperemia. *Stroke* 29 : 1209-1218, 1998
- 20) Ishizuka Y, Ishida Y, Jin QH, Shimokawa A, Saita M, Kato K, Kunitake T, Hanamori T, Mitsuyama Y, Kannan H : Abdominal vagotomy attenuates interleukin-1 $\beta$ -induced nitric oxide release in the paraventricular nucleus region in conscious rats. *Brain Res* 789 : 157-161, 1998
- 21) Shintani F, Kanba S, Nakaki T, Sato K, Yagi G, Kato R, Asai M : Measurement by *in vivo* brain microdialysis of nitric oxide release in the rat cerebellum. *J Psychiatry Neurosci* 19 : 217-221, 1994
- 22) Zhang H, Chen X, Teng X, Snead C, Catravas JD : Molecular cloning and analysis of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter in aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 55 : 1873-1880, 1998
- 23) Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M : Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades : bifurcation of nuclear factor- $\kappa$ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 9792-9796, 1997
- 24) Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV : TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383 : 443-446, 1996
- 25) Yamada K, Komori Y, Tanaka T, Senzaki K, Nikai T, Sugihara H, Kameyama T, Nabeshima T : Brain dysfunction associated with an induction of nitric oxide synthase following an intracerebral injection of lipopolysaccharide in rats. *Neuroscience* 88 : 281-294, 1999
- 26) Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR, Currie MG : Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 233 : 119-125, 1993
- 27) Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H : Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. *J Exp Med* 172, 1599-1607 1990
- 28) Sakai N, Kaufman S, Milstien S : Parallel induction of nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis by cytokines in rat glial cells. *J Neurochem*. 65895-902, 1995
- 29) Quagliariello VJ, Ma A, Stukenbrok H, Palade GE : Ultrastructural localization of albumin transport across the cerebral microvasculature during experimental meningitis in the rat. *J Exp Med* 174 : 657-672, 1991
- 30) Stojkovic T, Colin C, Le Saux F, Jacques C : Specific pattern of nitric oxide synthase expression in glial cells after hippocampal injury. *Glia* 22 : 329-337, 1998
- 31) Holmin S, Schalling M, Hojeberg B, Nordqvist AC, Skeftruna AK, Mathiesen T : Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. *J Neurosurg* 86 : 493-504, 1997
- 32) Xiao BG, Link H : IFN- $\gamma$  production of adult rat astrocytes triggered by TNF- $\alpha$ . *Neuroreport* 9 : 1487-1490, 1998
- 33) Robertson B, Kong G, Peng Z, Bentivoglio M, Kristensson K : Interferon-gamma-responsive neuronal sites in the normal rat brain : receptor protein distribution and cell activation revealed by Fos induction. *Brain Res Bull* 52 : 61-74, 2000
- 34) Olsson T, Kelic S, Edlund C, Bakhtiet M, Hojeberg B, van der Meide PH, Ljungdahl A, Kristensson K : Neuronal interferon-(immunoreactive molecule : bioactivities and purification. *Eur J Immunol* 24 : 308-314, 1994
- 35) Kiefer R, Kreutzberg GW : Gamma interferon-like immunoreactivity in the rat nervous system. *Neuroscience* 37 : 725-734, 1990
- 36) Bentivoglio M, Florenzano F, Peng ZC, Kristensson K : Neuronal IFN- $\gamma$  in tuberomammillary neurones. *Neuroreport* 5 : 2413-2416, 1994
- 37) Kitamura Y, Takahashi H, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Nomura Y, Taniguchi T : In vivo induction of inducible nitric oxide synthase by microinjection with interferon- $\gamma$  and lipopolysaccharide in rat hippocampus. *Glia* 18 : 233-243, 1996

学位論文

Phorbol myristate acetate 惹起性胃潰瘍における  
nuclear factor kappa B と tumor necrosis factor- $\alpha$  の役割

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

竹内 哲

(平成14年6月29日受付)

Key Word : gastric ulcer, phorbol ester, nuclear factor kappa B, tumor necrosis factor- $\alpha$ , protein kinase

胃潰瘍の発生機序に関してはいまだ不明の点が多い。著者らの教室では、長年にわたり種々の実験胃潰瘍モデルを用いてその病態生理の解明を試みてきた。それは山口・土屋らによる、腹腔神経節をクロトン油などで刺激し腹部諸臓器に微小循環障害による出血性病変をきたす研究にはじまるが、とくに自律神経障害と胃粘膜病変に着目し、石膏拘束潰瘍モデルを用いストレス負荷時の自律神経の過剰刺激と胃潰瘍の発症の関係につき検討してきた<sup>1,2)</sup>。さらに自律神経過剰刺激による胃粘膜病変形成過程を解明する目的で、胃の自律神経に直接、反復電気刺激を加えることにより胃粘膜に出血性病変を惹起するモデルを作り、その形成過程における虚血・再還流に伴う微小循環障害および活性酸素の役割などにつき報告してきた<sup>3-5)</sup>。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、本菌の感染がどのように組織傷害に関与しているかは不明である。胃の実験潰瘍モデルとしては水浸ストレス潰瘍、エタノール潰瘍などの急性潰瘍モデルや酢酸潰瘍のような慢性潰瘍モデルが従来より知られている。水浸ストレス潰瘍は石膏拘束潰瘍と同様にストレスによる自律神経系を介した胃粘膜傷害の発生機序の解明に用いられ<sup>6)</sup>、またエタノール潰瘍は、胃粘膜におけるサイトプロテクション低下の機序の検討などに用いられている<sup>7)</sup>。一方、酢酸潰瘍は慢性潰瘍モデルとして、臨床の場でしばしば遭遇するヒトの慢性再発性胃潰瘍の発症および治癒過程を解明するうえで、繁用されてきたモデルである。この潰瘍モ

デルは、H<sub>2</sub> ブロッカーやプロトンポンプインヒビターなどの抗潰瘍薬の効果の判定や、非ステロイド系抗炎症薬による胃潰瘍治癒を遷延化させる機序の解明などに用いられている<sup>8-10)</sup>。またその潰瘍形成過程に微小循環障害が関与していること、炎症が惹起される際に産生される活性酸素や Interleukin-1 (IL-1)、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) のような炎症性サイトカインが様々な局面で役割を演じていることが明らかとされてきた<sup>11-13)</sup>。しかし、これらの実験潰瘍モデルの潰瘍形成過程においては、多くの因子が相互に複雑に影響していることが考えられ、活性酸素や炎症性サイトカインなどの産生に関する *in vivo* での細胞内シグナル伝達機構およびそれに伴う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。このため潰瘍形成に至る過程における細胞内シグナル伝達機構に関し、容易に情報が得られる確実で再現性のある胃潰瘍モデルが必要である。

クロトン油の有効成分であるホルボールエステル (phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)) はプロテインキナーゼC (PKC) を活性化し<sup>14,15)</sup>、種々の組織において炎症を惹起したりまた組織の増殖を促進する物質として知られている<sup>16-18)</sup>。PMA は種々の細胞表面に存在する特異的レセプターを介して直接 PKC を活性化し、それに伴うシグナル伝達を誘導する<sup>19,20)</sup>。Fretland ら<sup>21)</sup> は、消化管において、モルモットの直腸内への PMA 投与により生じる急性直腸炎が著明な好中球の浸

本論文は、Takeuchi T, Miura S, Wang L, Uehara K, Mizumori M, Kishikawa H, Hokari R, Higuchi H, Adachi M, Nakamizo H, Ishii H : Nuclear Factor- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  Mediate Gastric Ulceration Induced by Phorbol Myristate Acetate. Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の一部を含む。

潤と関係していることを実証した。また近年、nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) はPMAにより惹起される炎症における様々な細胞活性化過程においてその基本的な役割を果たしており、接着分子の発現にもその活性化を要すると考えられている<sup>22)</sup>。以上の知見から、PMAはPKCおよびNF- $\kappa$ Bを活性化することにより炎症を惹起する物質であることが明らかとなった。そこで著者は、PMAをラットの胃に投与することによっても、PKCおよびNF- $\kappa$ Bの活性化が生じ、これにより惹起された炎症および組織傷害により胃潰瘍が形成されるのではないかと考え、この経路による胃潰瘍が、新しい実験潰瘍モデルになり得るかどうかにつき本実験で検討することとした。

NF- $\kappa$ Bは複数のサブユニットから構成され、様々な炎症性サイトカイン、接着分子、ケモカインを速やかに活性化する。少なくとも5個の異なる遺伝子がNF- $\kappa$ Bをコードしており、多くの場合、NF- $\kappa$ B二量体はRelA (p65)とNF- $\kappa$ B1 (p50)またはNF- $\kappa$ B2 (p52)から構成されている<sup>23,24)</sup>。多くの細胞でNF- $\kappa$ B二量体はその活性化の阻害サブユニットであるI $\kappa$ Bと結合した状態で不活性細胞質複合体より分離される。NF- $\kappa$ Bが活性化される際、I $\kappa$ Bはリン酸化を受け、それに引き続きユビキチン化され、プロテアゾーム依存性経路を介し速やかに分解される<sup>25-29)</sup>。この経路により活性化されたNF- $\kappa$ B複合体は核内へ移動し、ターゲット遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域内にある特異的なDNA配列に結合し、転写を誘導することが知られている。

最近、Helicobacter pyloriの感染後に、胃粘膜内にInterleukin-8 (IL-8)の増加を伴うNF- $\kappa$ Bの活性化が生じるという報告が散見される<sup>29-31)</sup>。これらの報告は、胃粘膜内におけるNF- $\kappa$ Bの活性化が胃粘膜傷害の病態生理に関与していることを示唆している。しかしながら、生体内においてNF- $\kappa$ Bの活性化が胃潰瘍の誘発に直接関係するかどうかについての研究は現在までなされていない。

多くの細胞でNF- $\kappa$ Bの活性化はIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ などの遺伝子を含むproinflammatory cytokineの遺伝子発現を誘導するという意味において極めて重要である<sup>32,33)</sup>。特にTNF- $\alpha$ は急性炎症反応の主要なメディエーターであり、感染や炎症などの、多くの病的状態において産生される<sup>34-36)</sup>。In vitroではTNF- $\alpha$ は多くの細胞でネクロシスやアポトーシスによる細胞死を誘発することも証明されている<sup>37-41)</sup>。NF- $\kappa$ Bの活性化はTNF- $\alpha$ の作用、特にTNF- $\alpha$ によって誘発され

る細胞障害過程に介在しているものと考えられている<sup>42)</sup>。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TNF- $\alpha$ の役割は明らかではない。

そこで本研究においては、①PMA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製し、そのモデルにおいて胃粘膜内のNF- $\kappa$ Bの活性化が生じるかどうかにつき検討する。②このモデルにおける胃潰瘍形成過程において、NF- $\kappa$ BとTNF- $\alpha$ が果たす役割につき解明する、以上のことを目的として検討を行った。

## 研究方法

### 1. 動物と胃潰瘍作成

本動物実験は「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」に準拠し施行した。実験動物としてはウィスター系雄性ラット200~250gを使用し、実験の24時間前より絶食とし自由に飲水のみ摂取可能とした。ペントバルビタールナトリウム30mg/kg麻酔下に腹部を5cm正中切開した。そこより胃を視野上に引き出して展開し、PMA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 1-50  $\mu$ g またはその溶媒である20%アルコールをマイクロシリンジにて腺胃前壁の漿膜下に注入し、再び閉腹した。

### 2. 肉眼的および組織学的評価

PMAまたは溶媒を注入後、異なる時間間隔(1h, 3h, 6h, 12h, 24h, 48h, 3 days, 1 wk, 2wk)でペントバルビタールナトリウム(50mg/kg)麻酔下に無痛性にラットを屠殺した。開腹後、胃を速やかに除去し、大彎側より展開した。生食にて洗浄し、コルク板にピン固定した。胃粘膜表面を肉眼的に評価した。PMAによる胃粘膜傷害を組織学的に確認するため、胃体部を切除し、10%ホルマリンにて1時間固定後、パラフィンにて包埋した後、染色を施行した。組織切片は光学顕微鏡下に観察し、以下に示す組織傷害スコアにもとづき5段階に評価した。0=正常; 1=表層の斑状のびらん; 2=胃壁の厚さの1/3以下の深さの局所的な壊死とうっ血; 3=胃壁の厚さの1/3以上の深さに及ぶが全層に達しない局所的な壊死とうっ血; 4=胃壁全層におよぶ広汎な壊死とうっ血。

### 3. 各種阻害剤の投与

本モデルにおけるPKCの活性化を検討するため、PKC阻害剤のcalphostin C (5  $\mu$ g) (Sigma) をPMA

と同時に胃壁漿膜下に局注した。PMA 惹起性胃潰瘍形成過程における NF- $\kappa$ B の役割を検討するために、NF- $\kappa$ B 阻害剤である pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) (Sigma) (100 mM), proteasome inhibitor (MG132 ; Z-Leu-Leu-Leu-CHO, BIOMOL Research Lab. Inc., Plymouth Meeting, PA, USA) (0.5  $\mu$ M) と NF- $\kappa$ B decoy (15 mM) をそれぞれ PMA と同時に胃壁漿膜下に局注した。合成した double-stranded oligodeoxynucleotides である NF- $\kappa$ B decoy の塩基配列は以下のとおりである<sup>49)</sup>。

5'-CCTTGAAGGGATTTCCCTCC-3'

3'-GGAAGCTTCCCTAAAGGGAGG-5'

オメプラゾール (Mitsubishi Pharma Co. Ltd., Osaka) は使用直前に蒸留水に溶解した。オメプラゾール投与群では、前処置として PMA 局注 3 日前よりオメプラゾール (30mg/kg/day) を連日胃内投与した。

潰瘍形成における TNF- $\alpha$  の役割を検討するために、抗 TNF- $\alpha$  抗体による潰瘍阻害実験を施行した。抗マウス TNF- $\alpha$  抗体 (G281-2626 ; Rat IgG1, PharMingen, San Diego, CA, USA) を 0.005-0.5  $\mu$ M の濃度で胃粘膜内に PMA と同時に局注した。無関係な isotype の合致した抗体 (R3-34 ; Rat IgG1, PharMingen) を対照として使用した。

#### 4. NF- $\kappa$ B の活性化

NF- $\kappa$ B の活性化は、PMA 局注後の胃粘膜において、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) および in situ fluorescence DNA binding assay により検討した。

EMSA を施行するにあたり、PMA 局注後のラット胃をペントバルビタール麻酔下に、異なる時間間隔 (15 分~6 時間) で摘出した。腺胃を氷上で 10 mM HEPES (pH7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM ethylene glycol-bis- $\beta$ -aminoethyl ether-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA), 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) に 2  $\mu$ g/ml の antipain, chymostatin, pepstatin, leupeptin をそれぞれ加えたバッファー 3.5  $\mu$ l/mg 中でホモジネートした。溶液を遠心分離 (8000  $\times$  g, 2 min, 4 $^{\circ}$ C) し細胞質を含む上清を除去後、冷凍保存した。核ペレットを 20 mM HEPES (pH7.9), 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF に 2  $\mu$ g/ml の antipain, chymostatin, pepstatin, leupeptin をそれぞれ加えたバッファー 1.5  $\mu$ l/mg 中で再度均質化した

後、振盪攪拌した (20 min, 4 $^{\circ}$ C)。核分画溶液を遠心分離 (14000  $\times$  g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) し核内抽出液の一部を -80 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。ゲルシフトアッセイを施行するにあたり、FITC-labeled synthetic double-stranded oligodeoxynucleotides (AGTTGAGGGGACTTTCC CAGGC) を作成した。核抽出液 20  $\mu$ g に 1 pmol の標識 NF- $\kappa$ B 合成ヌクレオチドを加え、室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後 6% のポリアクリルアミドゲルを用い、4 $^{\circ}$ C, 160V で 2 時間電気泳動を行った。スーパーシフトアッセイを行うために、核抽出液に抗 p50 抗体および抗 p65 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を 20  $\mu$ g 加え、室温で 30 分間インキュベートし、その後標識 NF- $\kappa$ B 合成ヌクレオチドを加えインキュベートした。競合阻害効果につき検討するため、100 倍量の無標識 NF- $\kappa$ B 合成ヌクレオチドを試料に加えた。蛍光強度はコンピュータイメージアナライザーを装備した蛍光レーザー स्क्यान装置 (FluorImager 575 ; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) にて測定した。

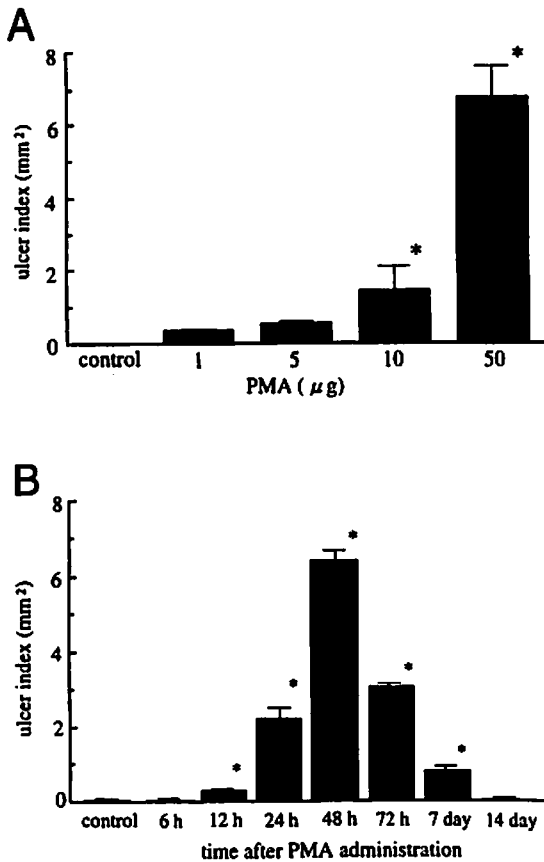
In situ fluorescence DNA binding assay を施行するため、ラット胃を PMA 局注 3 時間後にペントバルビタール麻酔下に摘出した。胃粘膜に付着した残渣を生理食塩水で洗浄除去後、過ヨウ素酸リジンパラホルムアルデヒド溶液にて 8 時間固定した。HEPES バッファー pH7.4 で 3 回洗浄した後、1 mg/ml の DNase I (Sigma) を含む HEPES バッファーを用い 30 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。3 回洗浄後、さらに、0.25% の牛血清アルブミン (Sigma), 100  $\mu$ g/ml の polydeoxyinosinic-polydeoxycytidylic acid (poly [dI-dC]) (Sigma), 20  $\mu$ g/ml の polydeoxycytidylic acid (poly dC) (Sigma) に 1ng/ml の NF- $\kappa$ B の結合部位に相同の塩基配列を有する FITC-labeled synthetic double-stranded oligodeoxynucleotides (5'-TGG GGA CTC TCC CTT TGG GAA CAG TTA TGC AAA ATA GCT CTG-3'-FITC) を加えた反応液で暗所にて 30 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。NF- $\kappa$ B の結合の特異性は NF- $\kappa$ B に一致する cold oligonucleotides との競合により確認した。試料を再度洗浄し、スライドガラス上に無蛍光のカバーガラスを静置した。63 倍の油浸レンズを有する倒立型蛍光顕微鏡上に設置した MRC600 共焦点顕微鏡にて共焦点像を得た。エミッションフィルターで 488 nm に励起したマルチラインアルゴンレーザー (25 mW) を単一の蛍光発色を得るために使用した。

5. 統計学的解析

すべての結果は平均値±標準誤差で表した。各群間の差はANOVAの分散分析を行い、Fisher's post hoc testで解析した。p<0.05を統計学的有意差ありとした。

結 果

第1図(A)は異なる量のPMAを漿膜下に局注し、48時間後の胃粘膜傷害を肉眼的に観察し、検討したものである。PMAは用量依存性に胃粘膜傷害を惹起し、10µg以上で肉眼的に明らかな傷害を生じ、特に50µgで著明な傷害を生じた。潰瘍は胃内のPMA局注部

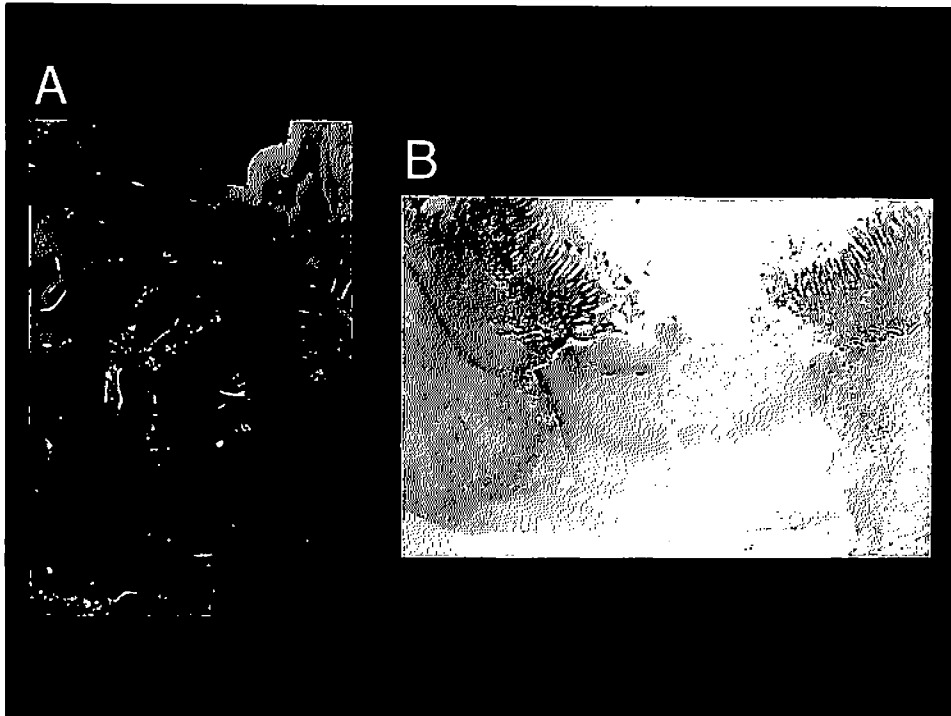


第1図 PMA局注後の胃潰瘍の形成。(A)異なる量のPMAを胃漿膜下に局注し、48時間後の胃粘膜を肉眼的に観察し、潰瘍係数として評価した。潰瘍係数は粘膜の傷害面積(mm²)で表した。PMAを腺胃前壁の漿膜下層に局注した。また溶媒(20% ethanol in saline)をコントロールとして局注した。(B)PMA(50µg)局注後の潰瘍係数(胃粘膜傷害面積)の時間経過による変化。p<0.05でPMA単独で局注した場合と比較し、統計学的有意差ありとした。すべての結果は5匹のラットの平均値±標準誤差で表した。(Takeuchi T et al: Dig Dis Sci 47: 2070-8, 2002のFig. 1を許可を得て転載)

位に一致して認められた。第1図(B)はPMA50µgを局注後の胃粘膜傷害範囲の時間経過による変化を示したものである。粘膜傷害はPMA局注12時間後に明らかとなり、48時間後に最大となった。その後、潰瘍径は減少し、14日後には癒痕となった。第2図(A)に示すように、PMA50µgの局注後48時間で、著明な深い潰瘍が生じた。また第2図(B)に示すように、胃粘膜切片の組織学的検査では、同量のPMAにより、筋層の破壊を伴う深く広い範囲の粘膜壊死が生じることが示された。これらの所見に基づき、その後の実験では50µgのPMAを用いて検討を行った。PMA50µgを局注後の経時的な組織学的観察では、局注6時間後より粘膜上皮側よりびらんが生じ、時間経過とともに漿膜側へと進展する潰瘍像を認めた(結果呈示せず)。

第3図(A)はオメプラゾール、calphostin CおよびNF-κB阻害剤(PDTC, MG132, NF-κB decoy)のPMA投与48時間後の潰瘍形成における肉眼的阻害効果を示している。潰瘍形成はプロトンポンプ阻害剤のオメプラゾールでは阻害されなかったがcalphostin Cによって著明に阻害された。NF-κB阻害剤であるPDTC, MG132およびNF-κB decoyもまたPMAによる潰瘍形成を著明に抑制した。第3図(B)は潰瘍形成における抗TNF-α抗体の効果もPMA投与48時間後に検討したものである。PMA単独投与では7.3mm²であったulcer indexは、0.05µMの抗TNF-α抗体の同時投与にて4.8mm²と有意に低下し、抗TNF-α抗体は用量依存性にPMA惹起性潰瘍形成を抑制した。第1表はPMA局注48時間後の胃粘膜における各種阻害剤の効果を組織学的傷害スコアを用いて示したものである。肉眼的に観察した場合と同じように、オメプラゾールはPMAにより惹起される組織学的変化に影響を及ぼさなかった。対照的にPMAにより惹起される組織学的傷害は、calphostin Cと各種NF-κB阻害剤で著明に抑制された。また抗TNF-α抗体の投与によっても著明な抑制効果が認められた。

第4図はFITC-labeled NF-κB consensus oligodeoxynucleotidesを用いたEMSAにより確認されたPMA局注後の胃粘膜における、NF-κBの活性化を示している。第4図(A)が示すように、コントロールと比較して、PMAによりNF-κB結合能は著明に増加した。偏位したDNA-protein複合体のバンドがNF-κBであることを証明するために、PMAを局注した胃粘膜からの核抽出液にsupershift assayを施行した。抗p50および抗p65抗体を加えインキュベートした試料では偏位したバンドの蛍光強度が減少し、スーパーシフトした。

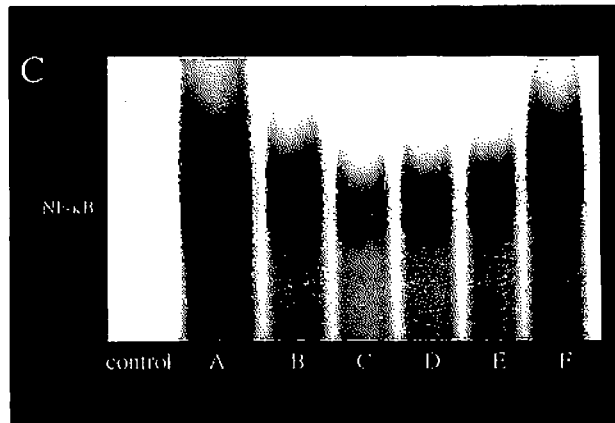
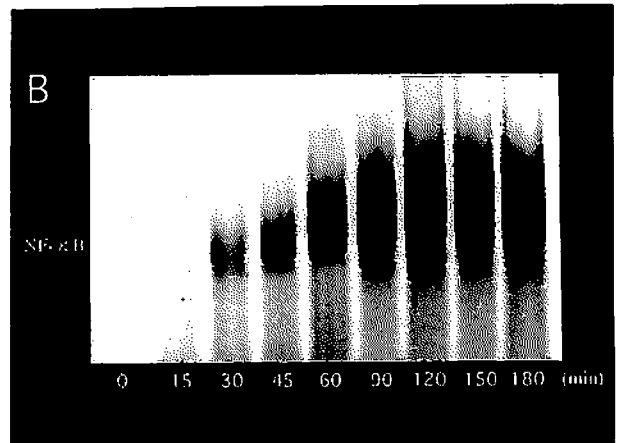
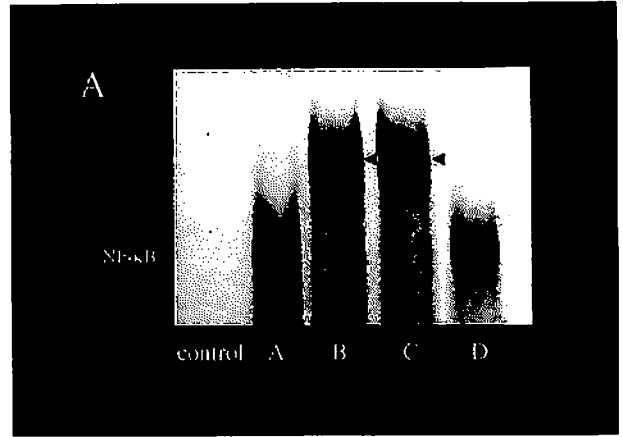
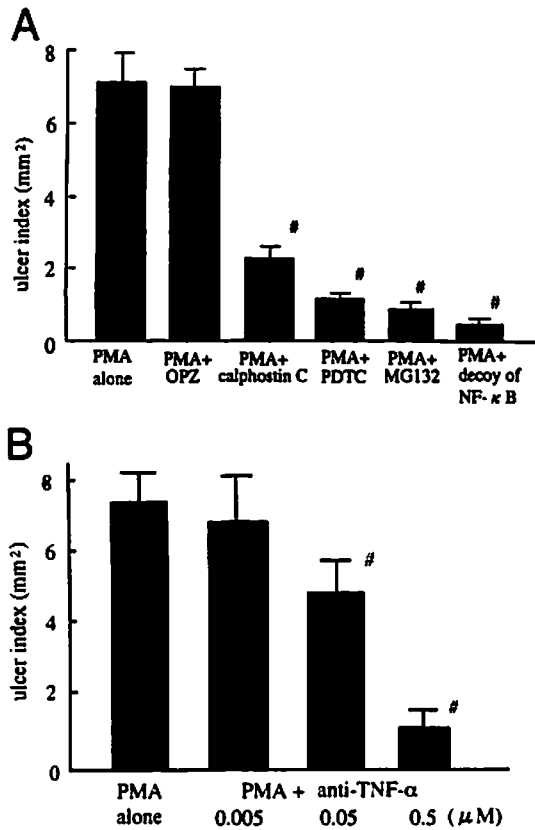


第2図 PMA 惹起性胃潰瘍の組織学的所見。(A) PMA (50 µg) 局注 48 時間後の典型的な胃粘膜の全体像である。浮腫性の粘膜に囲まれた活動性の潰瘍を認める (arrowhead)。(B) H-E 染色されたラット胃粘膜の顕微鏡写真 (×40) である。PMA (50 µg) 局注 48 時間後で潰瘍が発現した。筋層の破壊を伴う、深く広範な粘膜壊死を認める。(Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Fig. 2 を許可を得て転載)

第1表 PMA 局注 48 時間後のラット胃粘膜病変の組織学的傷害スコア：各種阻害剤の影響

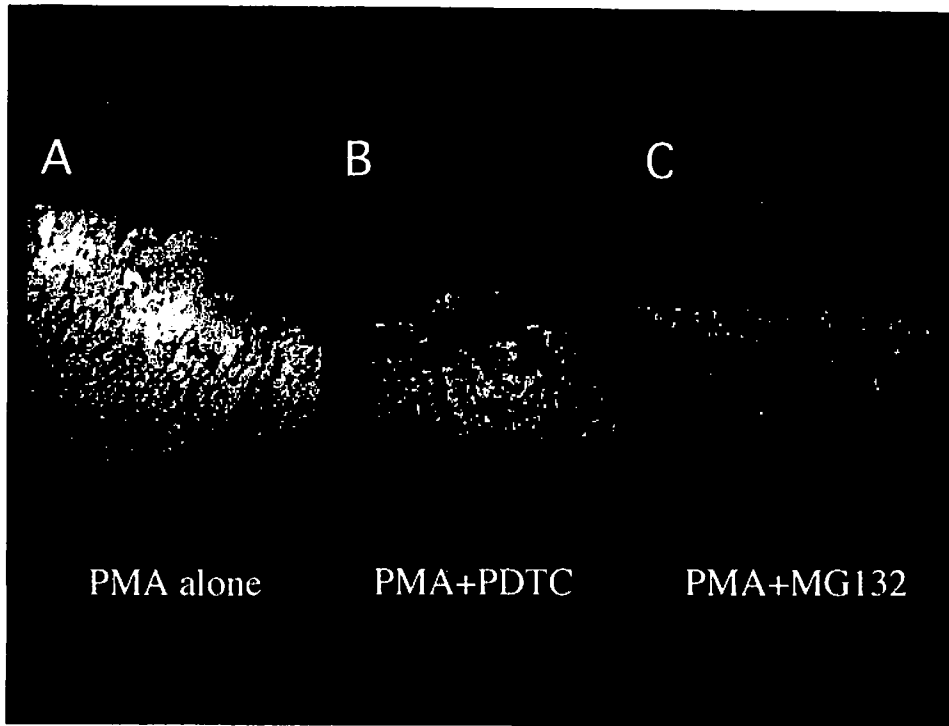
	組織傷害スコア
PMA only (50 µg)	3.8±0.2
PMA + omeprazole	3.6±0.2
PMA + calphostin C	2.6±0.4*
PMA + pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC)	2.2±0.2*
PMA + MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO)	1.4±0.2*
PMA + decoy of NF-κB	1.0±0.3*
PMA + anti-TNF-α antibody	2.0±0.4*

\* $p < 0.05$  vs PMA only 平均値±標準誤差で表した (n=5)。ヘマトキシリン・エオジン染色を施行した組織切片を光学顕微鏡下に観察し、以下に示す組織傷害スコアにもとづき五段階に評価した。0=正常；1=表層の斑状のびらん；2=胃壁の厚さの 1/3 以下の深さの局所的な壊死とうっ血；3=胃壁の厚さの 1/3 以上の深さに及ぶが全層に達しない局所的な壊死とうっ血；4=胃壁全層におよぶ広汎な壊死とうっ血。オメプラゾールは、30 mg/kg/day を 3 日間経口投与した。calphostin C (5 µg), PDTC (100 mM), MG132 (0.5 µM) と NF-κB decoy (15 mM) は、PMA と同時に局注した。抗 TNF-α 抗体は、0.5 µM の濃度で PMA と同時に局注した。(Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Table 1 を許可を得て転載)



第3図 PMA 惹起性胃潰瘍に対する各種阻害剤の効果。  
 (A) PMA 惹起性胃潰瘍の形成面積に対する各種阻害剤の影響。潰瘍係数は PMA (50 μg) 局注 48 時間後に測定した。オメプラゾール (30mg/kg/day) は PMA 局注 3 日前より連日胃内に投与した。calphostin C (5 μg), NF-κB 阻害剤 (pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC ; 100 mM), Z-Leu-Leu-Leu-CHO (MG132 ; 0.5 μM), NF-κB decoy (15 mM)) を胃粘膜に PMA と同時に局注した。(B) PMA (50 μg) 局注 48 時間後に肉眼的に評価した抗 TNF-α 抗体の影響。抗 TNF-α 抗体もまた PMA と同時に局注した。p<0.05 で PMA 単独で局注した場合と比較し、統計学的有意差ありとした。すべての結果は 5 匹のラットの平均値±標準誤差で表した。(Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Fig. 3 を許可を得て転載)

第4図 EMSA による NF-κB 活性化および各種阻害剤による抑制効果。FITC 標識 NF-κB consensus oligonucleotide を用い、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) により評価した。PMA を局注した胃粘膜における NF-κB の活性化。(A) NF-κB の発現を確認するため、PMA を局注した胃粘膜に対し、抗 p50 および p65 抗体を用いた supershift assay を施行した。DNA タンパク複合体が偏移したバンドによって示されている (arrowhead)。結合反応の特異性は過剰量の無標識 NF-κB consensus oligonucleotide (competitive inhibitor) によってまた確かめられた。コントロールとして、溶媒 (20% ethanol) を局注した (A : PMA only, B : PMA+anti-p50, C : PMA+anti-p65, D : competitive inhibitor)。(B) PMA (50 μg) 局注後の NF-κB 活性化の時間経過。0 : 局注前。(C) PMA 局注 3 時間後における NF-κB 結合活性に対する各種阻害剤の抑制効果。calphostin C (5 μg), PDTC (100 mM), MG132 (0.5 μM), NF-κB decoy (15 mM), 抗 TNF-α 抗体 (0.5 μM) を PMA と同時に胃粘膜に局注した (A : PMA only, B : PMA+calphostin C, C : PMA+PDTC, D : PMA+MG132, E : PMA+decoy of NF-κB, F : PMA+anti-TNF-α antibody)。4 回の阻害実験より得られた同様の結果から、典型的な写真を示した。(Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Fig. 4 を許可を得て転載)



第5図 In situ fluorescence DAN binding assay により観察された PMA 局注胃粘膜における NF- $\kappa$ B 活性化の分布. NF- $\kappa$ B の結合部位に相同な塩基配列を有する FITC-labeled oligodeoxynucleotides を用いた. (A) PMA (50  $\mu$ g) を腺胃前壁の漿膜下層に局注後の顕微鏡写真である. 局注 3 時間後において著明な NF- $\kappa$ B 活性化が、主に腺胃の PMA 局注分位近傍の中央部に生じた ( $\times 100$ ). (B) PMA 局注 3 時間後における、PMA により惹起性された NF- $\kappa$ B 活性化の PDTC (100 mM) による抑制効果. (C) PMA 局注 3 時間後における、MG132 (0.5  $\mu$ M) による阻害効果. 3 回の実験より得られた同様の結果より、典型的な写真を示す. (Takeuchi T et al : Dig Dis Sci 47 : 2070-8, 2002 の Fig. 5 を許可を得て転載)

バンドが出現した. 結合作用の特異性は、過剰量の unlabeled NF- $\kappa$ B consensus oligodeoxynucleotides を加えた試料において、バンドの蛍光強度の減少が生じたことから証明された. 第4図 (B) は、PMA 局注後の時間経過における NF- $\kappa$ B 結合能の変化を示している. PMA 局注 30 分後に NF- $\kappa$ B の活性化が生じ始め、時間経過とともに 3 時間後まで増加し続けた. 3 時間後における増加した NF- $\kappa$ B 結合能は、calphostin C および NF- $\kappa$ B 阻害剤である PDTC, MG132 および NF- $\kappa$ B decoy にて著明に抑制された (第4図 (C)). しかしながら、PMA により惹起される NF- $\kappa$ B の活性化は抗 TNF- $\alpha$  抗体では著明な抑制を認めなかった (第4図 (C)).

さらに、胃粘膜における NF- $\kappa$ B 活性化の分布を調べる目的で、胃粘膜切片に NF- $\kappa$ B 結合部位に相同な塩基配列を有する FITC 標識オリゴヌクレオチドを用い、in situ fluorescence DAN binding assay を施行した.

PMA 投与 1, 2 時間後では明らかな NF- $\kappa$ B 活性化を認めなかったが (結果呈示せず), 5A 図に示すように PMA 投与 3 時間後に PMA 局注部位近傍の腺胃粘膜の中央部を中心に NF- $\kappa$ B の著明な活性化が認められた. しかし、コントロールでは著明な NF- $\kappa$ B 活性化は見られなかった (結果呈示せず). 第5B 図および第5C 図で示すように、PMA によって惹起された NF- $\kappa$ B の活性化は PDTC および MG132 により著明に阻害された. また NF- $\kappa$ B が活性化された部位の強拡大 ( $\times 630$ ) では、主に核に移動した NF- $\kappa$ B の活性化像を認めたが、細胞質にも NF- $\kappa$ B の活性化像は認められた (結果呈示せず).

## 考 察

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。本研究の結果、PMAが胃粘膜内の転写因子であるNF- $\kappa$ Bを活性化することおよびNF- $\kappa$ Bの活性化に引き続き生じるTNF- $\alpha$ の産生が、PMA惹起性胃潰瘍の形成過程における組織傷害の一因となっていることが示された。胃潰瘍の形成過程は、Shay<sup>44</sup>が提唱した攻撃因子と防御因子のbalance theoryが有名である。Helicobacter pyloriの発見により粘膜傷害機序をbalance theoryのみで論じることが困難となつてはきたものの、攻撃因子としての胃酸分泌と、また防御因子である胃粘膜の血流調節の破綻による粘膜微小循環傷害が胃粘膜傷害の主な決定因子として重要な位置を占めることは、実験的に惹起された潰瘍における研究結果から明らかである<sup>4,5,9,11,45-49</sup>。しかしながら、本研究においてはオメプラゾールによる酸分泌抑制に伴う胃粘膜保護作用は十分ではなく、傷害の大きさや程度を軽減することはできなかった。このことはPMAの潰瘍誘発作用は胃酸に起因するものではない可能性を示唆している。

PKCはセリンとスレオニンの蛋白質リン酸化を促進する幾つかのリン脂質依存性のアイソエンザイムを代表し、細胞内シグナル伝達の鍵をにぎる物質である<sup>20,50,51</sup>。ホルボールエステルはPKCを活性化することが知られており、生理的活性物質であるジアシルグリセロールに似た作用を有するため、PKCは転写因子やサイトカインの活性化などのPMAによって活性化される生物学的作用の発現経路に介在していると考えられている<sup>50,51</sup>。不活性化状態で細胞質に存在するNF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B複合体は、活性化されたPKCによる直接的なI- $\kappa$ Bリン酸化により解離される。これは細胞表面上で活性化されたPKCが単純でかつ直接的に核内に作用する手段となっている<sup>51</sup>。本研究における、PKCのregulatory siteに作用するcalphostin CによるNF- $\kappa$ B活性化の著明な抑制は、PKCがI- $\kappa$ Bのリン酸化、分解とそれに引き続くNF- $\kappa$ Bの核内への過剰移行による潰瘍誘発作用に影響を及ぼしている可能性を示唆している。本研究において、漿膜側から投与したPMAがどのように粘膜側の細胞へ作用するかについての正確な機序は明らかではないが、1つの可能性として、in situ DNA-binding assayによりPMA投与3時間後に胃粘膜の上皮側の胃腺領域でNF- $\kappa$ Bの活性化を認めたことより、漿膜側から投与したPMAが濃度勾配により粘膜側へ浸透し、そこで最も感受性の高い細胞が粘膜上皮側領域の細胞であったため同部位のNF- $\kappa$ B活性化を強くきたした可能性が考えられた。また他の可能性として、PMA局注が自律神経刺激などを介して胃粘膜微小循環障害を引き起こし、その結果産生された炎症性メディエーターが粘膜組織に作用し、

さら微小循環障害を悪化させた可能性も考えられる。実際、胃粘膜血流をレーザードップラー法を用いて測定すると、PMA局注後1時間以内に血流の低下が認められ、NF- $\kappa$ B阻害剤であるPDTC、MG132、NF- $\kappa$ B decoyによりこの血流の低下は抑制された(結果呈示せず)。EMSAによる実験結果よりNF- $\kappa$ BはPMA局注後早期(30分以内)より胃壁で活性化を認めるにもかかわらず、組織学的には3時間後に主として粘膜上皮側の胃腺領域で観察されることより、PMA局注によって早期に胃壁にNF- $\kappa$ B活性化が生じるが、その後の微小循環障害が粘膜側においてさらにNF- $\kappa$ B活性化を増強させ、胃粘膜上皮側のびらんへ進展してゆく可能性が考えられた。正確なNF- $\kappa$ Bの産生源はこの実験においては同定されていないが、胃粘膜内の多種の細胞が、この反応に関わっていると考えられる。Teshimaら<sup>52</sup>は、活性酸素依存性のNF- $\kappa$ B活性化がモルモット胃粘膜上皮細胞および胃小窩細胞で生じることを実証した。最近、NF- $\kappa$ B活性化が、炎症性サイトカインと過酸化水素で刺激した純粋培養ラット胃壁細胞でも生じることが証明された<sup>53</sup>。このように、胃粘膜細胞におけるNF- $\kappa$ B活性化と炎症反応の密接な関係は、特にHelicobacter pyloriの感染に関係していると考えられている。Keatesら<sup>31</sup>はHelicobacter pyloriを感染させた胃粘膜上皮細胞と、IL-1 $\beta$ を付加した胃粘膜上皮細胞のそれぞれで転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化が生じ、NF- $\kappa$ Bの核内への移行に引き続き、IL-8のメッセンジャーRNAとタンパク量の増加が誘導されることを報告した。彼らはまた、Helicobacter pyloriに感染した人胃生検組織の上皮細胞の細胞質と核内における活性化されたNF- $\kappa$ Bの存在をp65に対するモノクローナル抗体( $\alpha$ -p65)を用いた蛍光染色にて証明した。Sharmaら<sup>30</sup>はNF- $\kappa$ BとNF-IL-6がIL-8の遺伝子発現の活性化に不可欠であり、cag陽性株によって表出されたpicB決定因子がNF- $\kappa$ Bを介したIL-8表出を増加させる調節において、非常に重要な役割を果たしていることを示した。

PDTCはNF- $\kappa$ Bの活性化やupstream regulatory binding siteにおけるNF- $\kappa$ Bの相互作用を強く阻害し、その結果NF- $\kappa$ Bを介した転写活性を抑制する<sup>31,54</sup>。本実験において、著者は、NF- $\kappa$ Bの活性化と胃粘膜傷害の直接的な関係をPDTCがその傷害を著明に抑制することにより示した。著者はまた、MG132による26Sプロテアゾームの選択的阻害とその結果としてのNF- $\kappa$ B活性化の阻害が、PMA局注によって生じる胃潰瘍形成を著明に抑制することを、肉眼的および組織学的スコアの劇的な減少を指標として明らかにした。これらの所見

は、PMA による急性胃潰瘍の形成が、*in situ* での NF- $\kappa$ B の強い活性化を介していることを示している。しかし、組織傷害が生じる上で、その下流領域で起きている現象の正確な機序は完全には解明されていない。

NF- $\kappa$ B の活性化は TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6、iNOS などの様々な炎症惹起物質や走化性物質の活性化を誘導する<sup>65)</sup>。NF- $\kappa$ B に反応する遺伝子は白血球内皮細胞相互作用の原因となる接着分子の転写もまた調節している。NF- $\kappa$ B の活性化は TNF- $\alpha$  のシグナリングに関わる第一段階の一つであり<sup>39,42)</sup>、その活性化は TNF- $\alpha$  の影響、特に TNF- $\alpha$  により惹起される細胞傷害過程に介していると考えられている。IL-1 と TNF- $\alpha$  もまた NF- $\kappa$ B を活性化する、これは、それらのサイトカインが自身の発現量の自己調節を行うためであり、炎症反応の規模が増大することの原因になっていると考えられている<sup>66)</sup>。しかしながら、本研究における著者の結果においては、抗 TNF- $\alpha$  抗体は NF- $\kappa$ B の活性化を抑制しないことを示している。これは TNF- $\alpha$  が粘膜傷害において、主に NF- $\kappa$ B 活性化の下流域に関わっている可能性があることを示唆している。ヒト胃粘膜生検組織における TNF- $\alpha$  の産生は、*Helicobacter pylori* 感染例の方が非感染例と比較して多いことが報告されている<sup>57)</sup>。その急性催炎症性の作用に加えて、*in vitro* で TNF- $\alpha$  は壊死やアポトーシスにより細胞死を誘発することでも知られている。事実、TNF- $\alpha$  が胃上皮細胞に直接、細胞毒性作用を及ぼすことが、LPS で処理されたラットの胃粘膜細胞でその生存率の低下を認めたことや、また胃粘膜細胞に直接 TNF- $\alpha$  を加えて培養した系において、TNF- $\alpha$  の濃度の上昇に伴い細胞の生存度が低下したことにより示された<sup>60)</sup>。

本研究によって、*in vivo* で NF- $\kappa$ B が胃粘膜傷害を起し得るということが初めて実証された。今後、胃粘膜内の PMA 惹起性胃潰瘍形成過程における、NF- $\kappa$ B と TNF- $\alpha$  の活性化後にその下流で生じている正確な機序を解明していくことが必要であると考えられる。

## 総 括

Phorbol ester を胃壁漿膜下に投与することにより胃粘膜に生じた急性潰瘍の発生機序を検討することにより以下の結論を得た。

1. PMA の胃粘膜への局注後約 24 時間で著明な潰瘍が生じ、約 72 時間後には治癒段階に至ることにより、PMA 投与によって生じる本胃潰瘍は急性胃潰瘍モデルのひとつであると考えられた。

2. 本潰瘍はプロトンポンプ阻害剤にて抑制されなかったことより、本潰瘍の形成過程における胃酸の関与は否定的であった。

3. PKC 阻害剤である calphostin C にて潰瘍の形成が抑制されたことより PMA により直接活性化された PKC が、本潰瘍の形成初期段階に関与していることが明らかとなった。

4. NF- $\kappa$ B 阻害剤である PDTC、MG132、NF- $\kappa$ B decoy により潰瘍形成が著明に抑制されたことより本潰瘍の形成過程において、PKC により活性化された NF- $\kappa$ B が中心的役割を果たしていることが示された。

5. 抗 TNF- $\alpha$  抗体投与による本潰瘍の抑制効果は軽度であったことより、本潰瘍における TNF- $\alpha$  は、その NF- $\kappa$ B 活性化の作用よりも、NF- $\kappa$ B によって活性化された様々な炎症性サイトカインのひとつとして、その炎症誘発過程の下流域で主な役割を果たしているものと考えられた。

最近、*Helicobacter pylori* による胃潰瘍形成過程に NF- $\kappa$ B の関与を示す報告が認められる。本研究によって、*in vivo* で NF- $\kappa$ B が胃粘膜傷害を起し得ること、およびその下流の TNF- $\alpha$  の活性化が胃潰瘍発生に重要であることを初めて実証した。本潰瘍モデルは潰瘍発生機序を解明する有用な手段となる可能性が考えられた。

本稿を終えるに当たり、御指導、後校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を遂行するにあたり直接御指導をいただいた防衛医科大学校内科学第二講座三浦総一郎教授に深謝申し上げます。本研究に御協力と御助言をいただきました研究室各位に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 土屋雅春：Irritation syndrome と消化性潰瘍、生体反応とアグレッション、日本医学館、p.117-120、1994
- 2) 土屋雅春、織田正也、中村正彦、渡辺勲史、永田博司、柏崎一男、大塚友二：ラット胃粘膜微循環の自律神経統御について－特に実験的ストレス潰瘍発生機構に関連して－、日本消化器病学会雑誌、78：1000-1014、1981
- 3) 鈴木雅之、末松 誠、三浦総一郎、永田博司、森下鉄夫、織田正也、土屋雅春：急性胃粘膜病変形成時の活性酸素産生における xanthine oxidase 系および好中球の役割、日本消化器病学会雑誌、85：835-842、1988
- 4) Fukumura D, Kurose I, Miura S, Tsuchiya M, Ishii H：Oxidative stress in gastric mucosal injury：role of platelet-activating factor-activated granulocytes. *J Gastroenterol* 30：565-571、1995

- 5) Fukumura D, Kurose I, Miura S, Serizawa H, Sekizuka E, Nagata H, Tsuchiya M, Ishii H : Role of endothelin-1 in repeated electrical stimulation-induced microcirculatory disturbance and mucosal damage in rat stomach. *J Gastroenterol Hepatol* 11 : 279-285, 1996
- 6) Sugitani A, Donahue PE, Doyle MD, Anan K, Nyhus LM : The ipsilateral organization of the afferent nerves to the stomach. *J Surg Res* 54 : 212-221, 1993
- 7) Lacy ER, Ito S : Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandine. *Gastroenterology* 83 : 619-625, 1982
- 8) Ito A, Kakizaki M, Nagase H, Murakami S, Yamada H, Mori Y : Effects of H<sub>2</sub>-receptor antagonists on matrix metalloproteinases in rat gastric tissues with acetic acid-induced ulcer. *J Pharmacobiodyn* 14 : 285-291, 1991
- 9) Yamamoto O, Okada Y, Okabe S : Effect of a proton pump inhibitor, omeprazole, on gastric secretion and gastric and duodenal ulcers or erosions in rats. *Dig Dis Sci* 29 : 394-401, 1984
- 10) Wang JY, Yamasaki S, Takeuchi K, Okabe S : Delayed healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats by indomethacin. *Gastroenterology* 96 : 393-402, 1989
- 11) Tarnawski A, Hollander D, Stachura J, Krause WJ, Eltorai M, Dabros W, Gergely H : Vascular and microvascular changes—key factors in the development of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Clin Gastroenterol* 12 : S148-157, 1990
- 12) Motilva V, Martin MJ, Luque MI, Alarcon de la Lastra C : Role of polymorphonuclear leukocyte and oxygen-derived free radicals in chronic gastric lesion induced by acetic acid in rat. *Gen Pharmacol* 27 : 545-550, 1996
- 13) Takahashi S, Shigeta J, Inoue H, Tanabe T, Okabe S : Localization of cyclooxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcer in rats. *Am J Physiol* 275 : G1137-1145, 1998
- 14) Nishizuka Y : The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308 : 693-698, 1984
- 15) Ashendel CL : The phorbol ester receptor : a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 822 : 219-242, 1985
- 16) Takeuchi T, Miura S, Wang L, Uehara K, Mizumori M, Kishikawa H, Hokari R, Higuchi H, Adachi M, Nakamizo H, Ishii H : Nuclear Factor- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  Mediate Gastric Ulceration Induced by Phorbol Myristate Acetate. *Dig Dis Sci* 47 : 2070-8, 2002
- 17) Bourin MC, Delescluse C, Fustenberger G, Marks F, Schweizer J, Klein-Szanto AJP, Prunieras M : Effect of phorbol esters on guinea pig skin *in vivo*. *Carcinogenesis* 3 : 671-676, 1982
- 18) Griffiths RJ, Woods BE, Li S, Blackman A : Pharmacological modification of 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation and epidermal cell proliferation in mouse skin. *Agents Actions* 25 : 344-351, 1988
- 19) Niedel JE, Kuhn LJ, Vandenbark GR : Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 36-40, 1983
- 20) Nishizuka Y : The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334 : 661-665, 1988
- 21) Fretland DJ, Widomski DL, Levin S, Gaginella TS : Colonic inflammation in the rabbit induced by phorbol-12-myristate-13-acetate. *Inflammation* 14 : 143-150, 1990
- 22) Eck SL, Perkins ND, Carr DP, Nabel GJ : Inhibition of phorbol ester-induced cellular adhesion by competitive binding of NF- $\kappa$ B *in vivo*. *Mol Cell Biol* 13 : 6530-6536, 1993
- 23) Siebenlist U, Franzoso G, Brown K : Structure, regulation and function of NF- $\kappa$ B. *Ann Rev Cell Biol* 10 : 405-455, 1994
- 24) Baeuerle PA, Baltimore D : NF- $\kappa$ B : ten years after. *Cell* 87 : 13-20, 1996
- 25) Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin Jr AS : Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I $\kappa$ B $\alpha$  : a mechanism for NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell Biol* 13 : 3301-3310, 1993
- 26) Palombella V, Rando O, Godberg A, Taniatis T : The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* 78 : 773-785, 1994
- 27) Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U : Control of I $\kappa$ B- $\alpha$  proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267 : 1485-1488, 1995
- 28) Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S : I $\kappa$ B- $\beta$  regulated the persistent response in a biphasic activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* 80 : 573-582, 1995
- 29) Munzenmaier A, Lange C, Glocker E, Covacci A, Moran A, Bereswill S, Baeuerle PA, Kist M, Pahl HL : A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 159 : 6140-6147, 1997
- 30) Sharma SA, Tummuru MK, Blaser MJ, Kerr LD : Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J Immunol* 160 : 2401-2407, 1998
- 31) Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelley CP : *Helicobacter pylori* infection activates NF- $\kappa$ B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 113 : 1099-1109, 1997
- 32) Kopp EB, Ghosh S : NF- $\kappa$ B and Rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 58 : 1-27, 1995
- 33) Busam K, Gieringer C, Freudenberg M, Hohmann H-P : *Staphylococcus aureus* and derived exotoxins induce nuclear factor kappa B-like activity in murine

- bone marrow macrophages. *Infect Immun* 60 : 2008-2015, 1992
- 34) Beutler B, Grau GE : Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med* 10 : S423-S425, 1993
- 35) Vassalli P : The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol* 10 : 411-452, 1992
- 36) Tracey KJ, Cerami A : Tumor necrosis factor : a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med* 45 : 491-503, 1994
- 37) Baker SJ, Reddy EP : Transducers of life and death : TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 12 : 1-9, 1996
- 38) Bour ES, Ward LK, Cornman GA, Isom HC : Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in hepatocytes in long-term culture. *Am J Pathol* 148 : 485-495, 1996
- 39) Laster SN, Wood JG, Goding LR : Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic form of cell lysis. *J Immunol* 141 : 2629-2634, 1988
- 40) Reid TR, Torti FM, Ringold GM : Evidence for two mechanisms by which tumor necrosis factor kills cells. *J Biol Chem* 264 : 4583-4589, 1989
- 41) Woods KM, Chapes SK : Three distinct cell phenotypes of TNF-induced cytotoxicity and their relationship to apoptosis. *J Leukocyte Biol* 53 : 37-44, 1993
- 42) Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ : Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- $\alpha$ . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 100 : 1853-1862, 1997
- 43) Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T : In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor- $\kappa$ B binding site prevents myocardial infarction. *Nature Med* 3 : 894-899, 1997
- 44) Shay H : Etiology of peptic ulcer. *Am J Dis N Series* 6 : 29-49, 1961
- 45) Bunce KT, Daly MJ, Humphray JM, Stables R : H2-receptor antagonists protect against aspirin-induced gastric lesions in the rat. *Agents Actions* 11 : 167-170, 1981
- 46) Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Drozdowicz D, Kwiecien S, Pajdo R, Bielanski W, Hahn EG : Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 398 : 147-158, 2000
- 47) Jacobson ED : Circulatory mechanisms of gastric mucosal damage and protection. *Gastroenterology* 102 : 1788-1800, 1992
- 48) Lazaratos S, Kashimura H, Nakahara A, Fukutomi H, Osuga T, Urushidani T, Miyauchi T, Goto K : Gastric ulcer induced by submucosal injection of ET-1 : role of potent vasoconstriction and intraluminal acid. *Am J Physiol* 265 : G491-G498, 1993
- 49) Sato N, Kawano S, Tsuji S, Ogihara T, Yamada S : Gastric blood flow in ulcer diseases. *Scand J Gastroenterol Suppl* 208 : 14-20, 1995
- 50) Gschwendt M, Furstenberger G, Leibersperger H, Kittstein W, Lindner D, Rudolph C, Barth H, Kleinschroth J, Marme D, Schachtele C, Marks F : Lack of an effect of novel inhibitors with high specificity for protein kinase C on the action of the phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on mouse skin *in vivo*. *Carcinogenesis* 16 : 107-111, 1995
- 51) Stabel S, Parker PJ : Protein kinase C. *Pharmacol Ther* 51 : 71-95, 1991
- 52) Teshima S, Rokutan K, Nikawa T, Kishi K : Guinea pig mucosal cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system. *Gastroenterology* 115 : 1186-1196, 1998
- 53) Puschmann AJ, Dehne K, Page S, Classen M, Schepp W : In purified rat parietal cells NF- $\kappa$ B is activated by proinflammatory cytokines and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Gastroenterology* 114 : A1173, 1998 (Abstract)
- 54) Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA : Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor  $\kappa$ B activation in intact cells. *J Exp Med* 175 : 1181-1194, 1992
- 55) Jour'dheuil D, Morise Z, Conner EM, Kurose I, Grisham MB : Oxidant-regulation of gene expression in the chronically inflamed intestine. *Keio J Med* 46 : 10-15, 1997
- 56) Barnes PJ, Karin M : Nuclear factor- $\kappa$ B : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336 : 1066-1071, 1997
- 57) Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJH, Tytgat GNJ : Mucosal tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 29 : 425-429, 1994
- 58) Fiorucci S, Antonelli E, Migliorati G, Santucci L, Morelli O, Federici B, Morelli A : TNF alpha processing enzyme inhibitors prevent aspirin-induced TNF $\alpha$  release and protect against gastric mucosal injury in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 12 : 1139-1153, 1998

学位論文

運動およびその中止が骨量におよぼす影響

慶應義塾大学医学部整形外科学教室

(指導：戸山芳昭教授)

しま じら ち さと  
島 村 知 里

(平成 14 年 9 月 18 日受付)

Key words : exercise, growing rats, bone mineral content, deconditioning

高齢化社会を迎え、骨粗鬆症が社会的に大きな関心を集める疾患の一つとなっており、その予防あるいは治療については医学的にも重要な命題となっている。しかし、この点に関しては各研究分野でそれぞれ様々な議論があり、一定の見解が得られていないのが現状である。

運動が骨代謝動態におよぼす影響についても例外ではない。たとえば、老年期における骨粗鬆症の危険性は、主に成長期の最大骨量によって決定され、この時期における最大骨量を高めることが、加齢に伴う骨量減少や骨折に対する最も有効な予防法であるとの先行研究がある<sup>1-6)</sup>。たしかに Vuori ら<sup>7)</sup>や Heinonen ら<sup>8)</sup>をはじめとする多くの報告<sup>9-16)</sup>が、成長期は骨格が運動に反応しやすく、この時期の身体活動は最大骨量を決定する最重要因子の一つと考えている。しかし成長期に運動により獲得された骨量が、運動を止めたり、身体活動が減少する成人期あるいは老年期に至るまでの間維持されるか否かについては必ずしも明らかになっておらず、否定的な臨床研究も散見される。因みに Vuori ら<sup>7)</sup>は、若年女性において前腕の筋力訓練により前腕骨密度は増加したが、訓練の中止によりその密度は訓練開始のレベルまで減少したと報告している。また Dalsky ら<sup>10)</sup>は、閉経後の女性において荷重運動により腰椎の bone mineral content (BMC) は運動開始時より有意に増加したが、運動中止後には運動開始時のレベルまで戻ったとしている。本邦においても岩本ら<sup>19)</sup>が、骨量の維持には運動の継続が必要であることを示唆する報告をしている。これらの研究結果は、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を示唆している。とはいいながら運動と骨量の関係、特に運動の中止が骨代謝におよぼす影響に

ついての研究はきわめて少ない。

動物を対象とした基礎的研究も少なく、LeBlanc ら<sup>20)</sup>の「成熟ラットにおいて自由運動により全身のカルシウム量は増加したが、運動を中止するともとのレベルまで減少した」との報告や、Yeh ら<sup>21)</sup>の「growth spurt を過ぎた若年雌ラットにおいて、トレッドミル走行により獲得された骨量が運動中止により失われた」との報告などが散見されるにすぎず、骨のサイズの増大がみられる growth spurt の時期に、運動により獲得された骨量が、運動の中止や運動の頻度や強度の減少により維持されるか減少するか、あるいは全く失われるか否かなどについてはいまだ明らかにはされていない。

一方、近年、成長期のラットにおいてトレッドミル運動に対する海綿骨の反応は、脛骨の近位部と遠位部および腰椎でそれぞれ異なることが報告された<sup>22)</sup>。すなわち、「運動により脛骨近位部と遠位部のみで海綿骨量は増加したが、腰椎では有意には増加せず、脛骨についてもその増加率は近位部より遠位部の方が大きい」との報告である。これが事実とすれば、運動を負荷した成長期のラットにおいて、その後の運動の中止や運動量の減少に対する骨の反応も部位によって異なるものと推測されるが、これに関する報告は見あたらない。

本研究の目的は、growth spurt 時期の若齢ラットを対象として、中強度トレッドミル走行運動が脛骨の近位部・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追試するとともに、その後の運動強度や頻度の減少、さらには運動の中止による影響を部位別に検討し、その知見を骨粗鬆症の臨床に資することにある。

本論文は Shimamura C, Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, Abe H, Toyama Y : Effect of decreased physical activity on bone mass in the exercise trained young rats. J Orthop Sci 7 : 358-363, 2002 の一部を含む。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

5週齢のWistar系雌性ラット35匹(日本クレア社)を用いた。飼育環境は、温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、照明時間は8時から20時の12時間照明方式の無菌室で、個別ケージ( $25\times 18\times 34\text{ cm}^2$ )内とした。水道水と固型飼料(CE-2:日本クレア社)は、自由摂取させた。環境に適応させるため1週間の予備飼育期間をおいた後、6週齢となったラットを無作為に各々5匹ずつの7群に分けた。すなわち、7週間の運動負荷群(7EX群)、7週間の非運動負荷群(7CN群)、11週間の運動負荷群(11EX群)、7週間の運動負荷後に4週間の運動中止(cessation of exercise)群(7EX4C群)、7週間の運動負荷後に4週間の運動頻度(frequency)減少群(7EX4F群)、7週間の運動後に4週間の運動強度(intensity)減少群(7EX4I群)、そして11週間の非運動負荷群(11CN群)の7群である。運動は、小動物用トレッドミル(シナノ製作所)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。後半の4週間については、7EX4F群における運動の頻度は週1日に、7EX4I群における運動の強度は毎分12mに減少させた。以上の実験は北里研究所病院西館動物実験室内で行われ、本プロトコールは北里研究所西館実験動物管理委員会により認可を受け、慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿っておこなわれた。

### 2. 体重測定

実験期間中、すべてのラットに対し、週に一度、体重測定をおこなった。

### 3. 骨代謝マーカーおよび骨代謝関連ホルモンの測定

7週または11週の運動負荷実験終了時に、代謝ケージを用いて24時間尿を採取した後、エーテル吸入麻酔下に下大静脈より採血を行った。骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリンを免疫酵素アッセイ(住友製薬株式会社、大阪)により測定した。骨形成マーカーである血清オステオカルシンは、ラジオイムノアッセイ(BTI、米国)により測定した。また、血中 $1,25\text{-dihydroxyvitaminD}_3$ はラジオレセプターアッセイ(ヤマサ醤油株式会社、千葉)、ラット副甲状腺ホルモンはラジオイムノアッセイ(Immutopics、カナダ)により測定した。

### 4. 大腿骨長の計測

尿および血液を採取した後、下大静脈より全血採血を行い犠死させ、右大腿骨を摘出した。ノギス(誤差 $0.03\text{ mm}$ )を用いて大腿骨全長を3回計測し、その平均値を大腿骨長とした。

### 5. 骨量測定

屠殺後、右脛骨と第5腰椎を摘出した。骨から軟部組織を剥離し、各々の骨を空気中で $20\text{ mm}$ 厚の亚克力板上に置き、Lunar社製DPX-L小動物用モードを用いてscanningを3回ずつ行った。測定条件は、Voltage: $76.0\text{ kVp}$ 、Current: $150\text{ }\mu\text{A}$ 、Collimation of fine、Sample size of  $0.15\times 0.3$ 、Sample interval of  $1/64$ とし、Scan Widthは $15\text{ mm}$ 、Scan Lengthは脛骨で $50\text{ mm}$ 、第5腰椎で $20\text{ mm}$ とした。脛骨については、全体、近位部 $1/3$ 、骨幹部 $1/3$ および遠位部 $1/3$ についてBMCを測定した。第5腰椎については、全体のBMCを測定した。ただし、3回の測定の平均値をBMCとして採用した。再現性は、5匹のラットの5回の測定の変動係数( $\text{CV}=100\times\text{standard deviation}/\text{mean}$ )により評価した。BMC測定の変動係数CV値は $2.0\%$ 未満であった。

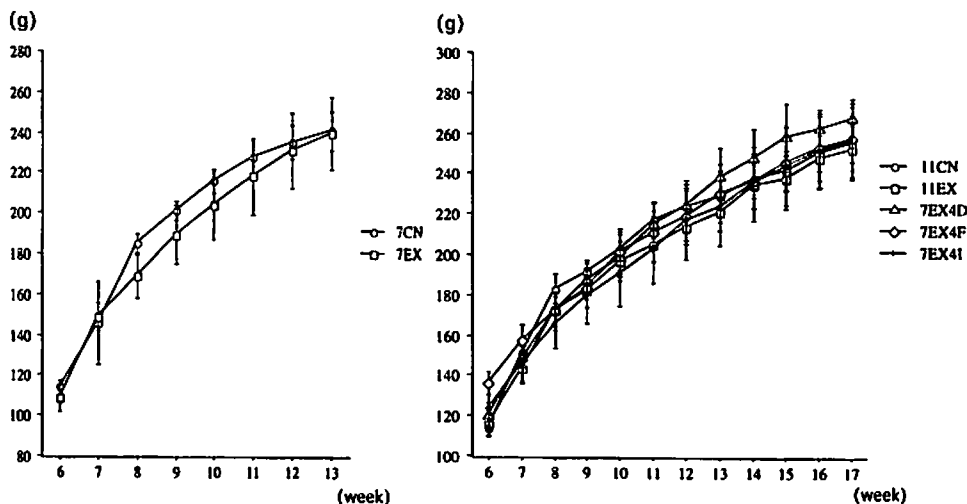
### 6. 統計解析

すべてのデータは、平均 $\pm$ 標準偏差で表記した。7CN群と11CN群の体重の変化は、one way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurementsを用いて検定した。7EX、11EX、7EX4C、7EX4Fおよび7EX4I群の実験中の体重におよぼす運動、運動の中止および運動の強度と頻度の減少の影響はtwo-way ANOVA with repeated measurementsを用いて検定した。すべての群間の脛骨と第5腰椎のBMC、大腿骨長、骨代謝マーカーおよび骨代謝関連ホルモンの比較をANOVA with Fisher protected least significant difference testを用いて行った。統計解析は、Macintosh computerでStat View J-5.0を用いて行った。すべての検定で、危険率 $0.05$ 未満を統計学的に有意差ありとした。

## 結 果

### 1. 体重の変化

すべての群の体重の変化を第1図に示す。7CN群と11CN群において、体重は経時的に増加した( $P<0.05$ , one-way ANOVA)。7EX群と11EX群における体重



第1図 体重の経時的変化。7CN群および11CN群は、有意な体重の増加を示した ( $P < 0.05$ , one-way ANOVA)。また、7EX群と7CN群、11EX群、7EX4C群、7EX4I群、7EX4F群および11CN群の各群間の体重変化に有意差はなかった (two-way ANOVA)。(Shimamura C et al: J Orthop Sci 7: 358-363, 2002 より許可を得て Fig. 1 を転載)

第1表 全測定結果

	7EX (n=5)	7CN (n=5)	11EX (n=5)	7EX4C (n=5)	7EX4I (n=5)	7EX4F (n=5)	11CN (n=5)
骨代謝マーカー							
尿中デオキシピリジノリン (nmol/mmolCr)	61±5*	70±2	43±6	56±10***	50±12	50±5	48±3***
血清オステオカルシン (ng/ml)	43±5*	34±5	34±2**	27±2***	31±3	31±2	28±3
大腿骨長 (cm)	3.22±0.08*	3.14±0.03	3.26±0.10**	3.14±0.04***	3.19±0.02	3.16±0.02	3.16±0.02
1,25-dihydroxyvitaminD <sub>3</sub> (pg/ml)	37.6±1.4*	22±7	25.8±4.1**	20.1±2.5***	23.2±1.6	23.5±5.6	18.9±4.2***
PTH (pg/ml)	29.8±2.7*	51±24	40±3.7**	66.6±18.4***	50±10.3	53.4±11	58±6
BMC							
脛骨全体 (mg)	176±12*	142±7	218±9**	182±13***	189±9*****	191±24*****	182±10
脛骨近位部 (mg)	84±4	76±2	101±2**	90±9***	90±5***	90±15**	90±1
脛骨骨幹部 (mg)	35±2*	24±3	49±6**	41±2***	39±3***	39±5***	39±1
脛骨遠位部 (mg)	56±7*	42±7	68±3**	51±3***	60±4*****	62±9**	52±3
第5腰椎 (mg)	59±53	53±12	73±10	72±7	72±10	76±6	76±7

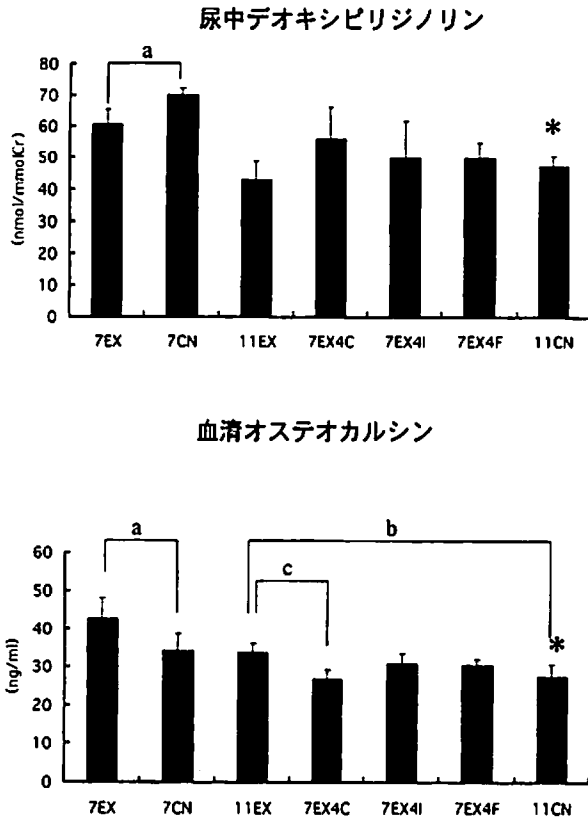
すべての結果を群別に平均±標準偏差で表した (ANOVA with Fisher PLSD). \*:  $P < 0.05$  vs 7CN, \*\*:  $P < 0.05$  vs 11CN, \*\*\*:  $P < 0.05$  vs 11EX.

の経時的変化は、それぞれ7CN群と11CN群と有意差はなかった (two-way ANOVA)。7EX4C、7EX4Fおよび7EX4I群における体重の経時的変化も、11CN群と有意差はなかった (two-way ANOVA) (第1図)。

## 2. 骨代謝マーカー

すべての群の骨代謝マーカーを第1表および第2図

に示す。11CN群は7CN群と比較して血清オステオカルシン、尿中デオキシピリジノリンとも有意に低値を示した ( $P < 0.05$ )。7EX群は7CN群と比較して、尿中デオキシピリジノリン値は有意に低値を示し、血清オステオカルシンは有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。11EX群では11CN群に比較して、オステオカルシンは有意に高値を示し ( $P < 0.05$ )、尿中デオキシピリジノリンは

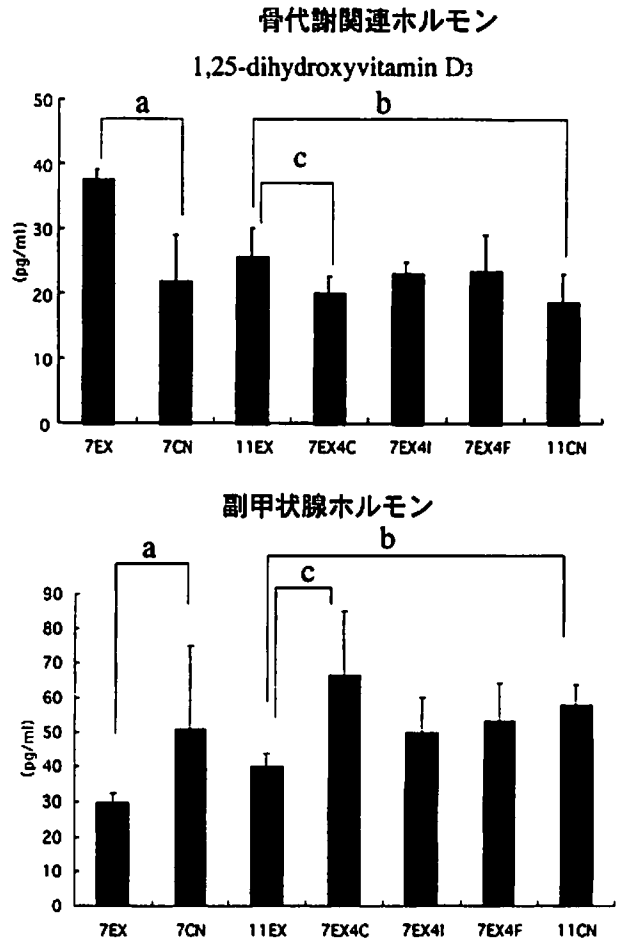


第2図 骨代謝マーカー。尿中デオキシピリジノリンは、7EX群が7CN群と比較して有意に低値を示したが、11EX群、7EX4C群、7EX4I群、7EX4F群および11CN群の各群間に有意差はなかった(ANOVA with Fisher PLSD)。血清オステオカルシンは、7EX群、11EX群がそれぞれ7CN群、11CN群と比較して有意に高値を示し、7EX4C群は11EX群と比較して有意に低値であった(ANOVA with Fisher PLSD)。a:  $P < 0.05$  vs 7CN, b:  $P < 0.05$  vs 11CN, c:  $P < 0.05$  vs 11EX, \* $P < 0.05$  vs 7CN。

低値の傾向を示した。7EX4C群は11EX群と比較して、血清オステオカルシン値は有意に低値を示したが( $P < 0.05$ )、尿中デオキシピリジノリン値は高値の傾向を示した。7EX4C群は7EX4F群および7EX4I群と比較して血清オステオカルシン値は低値の傾向を示し、また尿中デオキシピリジノリン値は高値の傾向を示した(第1表、第2図)。

### 3. 骨代謝関連ホルモン

すべての群の1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>および副甲状腺ホルモンの値を第1表および第3図に示す。1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>については、7EX群およ



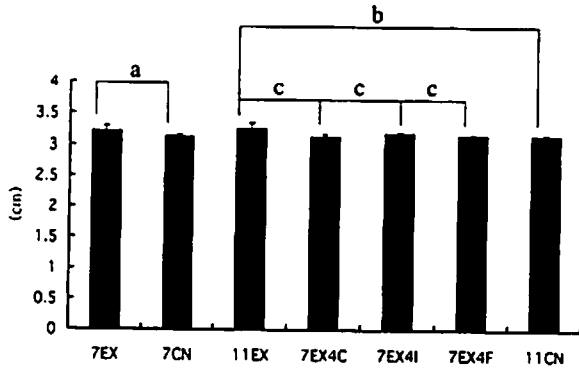
第3図 骨代謝関連ホルモン。7EX群および11EX群はそれぞれ7CN群および11CN群と比較して1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>は有意に高値を示し、副甲状腺ホルモンは有意に低値を示した。また、7EX4C群は11EX群と比較して1,25dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>は有意に高値を示し、副甲状腺ホルモンは有意に低値を示した(ANOVA with Fisher PLSD)。a:  $P < 0.05$  vs 7CN, b:  $P < 0.05$  vs 11CN, c:  $P < 0.05$  vs 11EX。

び11EX群はそれぞれ7CN群および11CN群と比較して有意に高値を示した( $P < 0.05$ )。副甲状腺ホルモンについては、7EX群および11EX群は、それぞれ7CN群および11CN群と比較して有意に低値を示した( $P < 0.05$ )。また、7EX4C群は11EX群と比較して有意に高値を示した( $P < 0.05$ ) (第1表、第3図)。

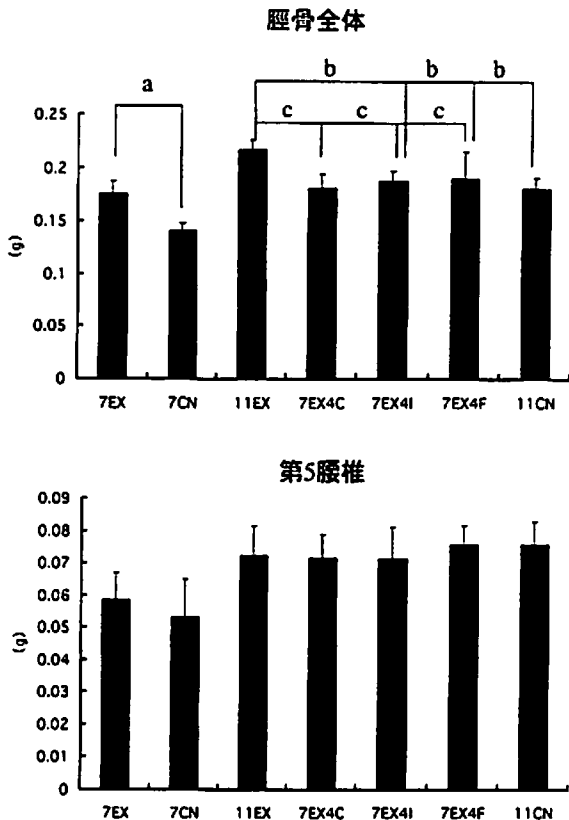
### 4. 大腿骨長

すべての群の大腿骨長を第1表および第4図に示す。7EX群と11EX群の大腿骨長は、それぞれ7CN群と11CN群と比較して有意に高値であった( $P < 0.05$ )。7EX4C、7EX4Fおよび7EX4I群における大腿骨長は、

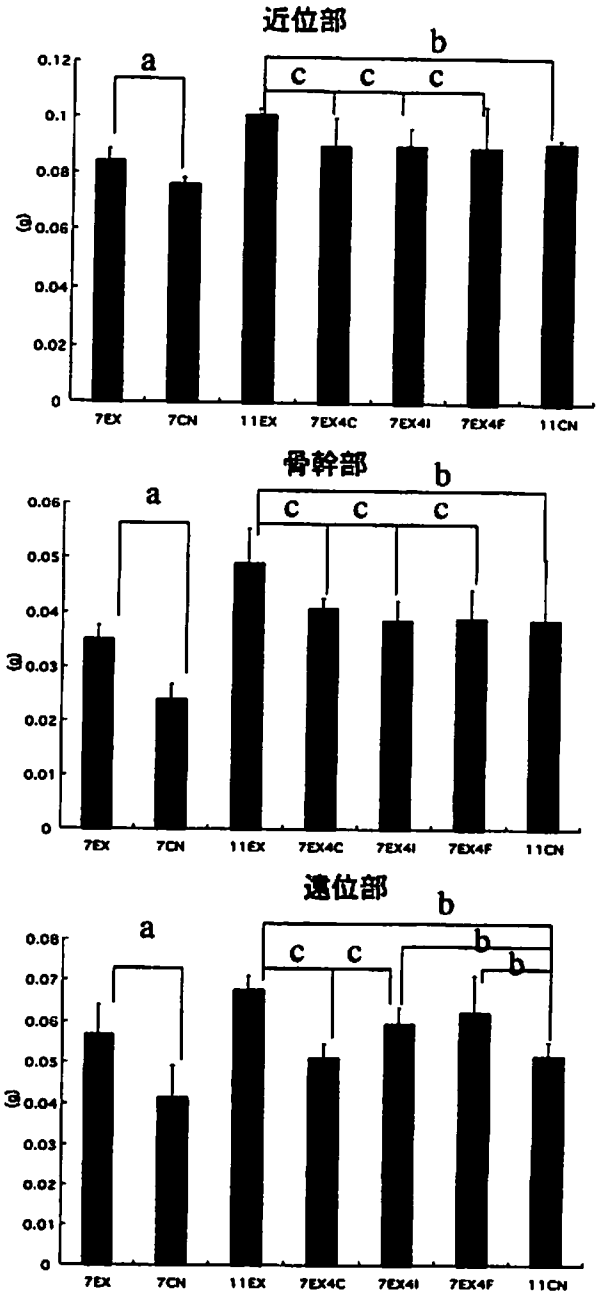




第4図 大腿骨長。大腿骨長は、7EX群が7CN群と比較して有意に高値を示し、11EX群は11CN群、7EX4C群、7EX4F群および7EX4I群と比較して有意に高値を示した(ANOVA with Fisher PLSD)。7EX4C群、7EX4F群および7EX4I群は、11CN群と有意差はなかった(ANOVA with Fisher PLSD)。a:  $P < 0.05$  vs 7CN, b:  $P < 0.05$  vs 11CN, c:  $P < 0.05$  vs 11EX。



第5図 脛骨全体および第5腰椎のBMC。脛骨全体のBMCは、7EX群、11EX群がそれぞれ7CN群、11CN群と比較して有意に高値を示し、11EX群は11CN群、7EX4C群、7EX4F群および7EX4I群と比較して有意に高値を示した(ANOVA with Fisher PLSD)。7EX4F群および7EX4I群は、11CN群と比較して有意に高値を示した(ANOVA with Fisher PLSD)。第5腰椎のBMCは全ての群間で有意差はなかった。a:  $P < 0.05$  vs 7CN, b:  $P < 0.05$  vs 11CN, c:  $P < 0.05$  vs 11EX。BMC: bone mineral content。



第6図 脛骨の近位部、竹幹部および遠位部のBMC。BMCは、すべての部位において7EX群、11EX群がそれぞれ7CN群、11CN群と比較して高値を示し、近位部と竹幹部において11EX群は11CN群、7EX4C群、7EX4F群および7EX4I群と比較して有意に高値を示した(ANOVA with Fisher PLSD)。遠位部において11EX群は11CN群、7EX4C群と比較して有意に高値を示したが、7EX4F群、7EX4I群は11CN群と有意差はなかった(ANOVA with Fisher PLSD)。a:  $P < 0.05$  vs 7CN, b:  $P < 0.05$  vs 11CN, c:  $P < 0.05$  vs 11EX。BMC: bone mineral content。

11EX 群と比較して有意に低値であり ( $P < 0.05$ ), 11CN 群と有意差はなかった (第1表, 第4図).

## 5. BMC

すべての群における脛骨全体と第5腰椎におけるBMCを第1表および第5図に示す. 7EXと11EXにおける脛骨全体のBMCは, それぞれ7CN群と11CN群と比較して有意に高値であった ( $P < 0.05$ ). 7EX4C群における脛骨全体のBMCは11EX群と比較して有意に低値であったが ( $P < 0.05$ ), 11CN群と有意差はなかった. 7EX4F群と7EX4I群における脛骨全体のBMCは, 7EX4C群と比較して高値の傾向を示した. 一方, 第5腰椎のBMCはすべての群間で有意差はなかった (第1表, 第5図).

すべての群の, 脛骨の近位部, 骨幹部および遠位部におけるBMCを第1表および第6図に示す. 7EX群と11EX群における脛骨の近位部, 骨幹部および遠位部のBMCは, それぞれ7CN群と11CN群と比較して有意に高値であった ( $P < 0.05$ ). 特に, 11EX群における各部位でのBMCは, 11CN群と比較して, 近位部で11.0%, 骨幹部で25.6%, 遠位部で30.8%高かった. 7EX4C群の脛骨の近位部, 遠位部および骨幹部におけるBMCは11EX群と比較して有意に低値であったが ( $P < 0.05$ ), 11CN群と比較して有意差はなかった. 7EX4F群と7EX4I群の脛骨の近位部, 骨幹部におけるBMCは, 11EX群と比較して有意に低値であったが ( $P < 0.05$ ), 11CN群と比較して有意差はなかった. 7EX4F群と7EX4I群の脛骨遠位部のBMCは11CN群と比較して有意に高値であり ( $P < 0.05$ ), 7EX4C群と比較して高値の傾向を示した (第1表, 第6図).

## 考 察

本研究では, 体重の経時的変化から, 成長期, 特にgrowth spurtの時期のラットを対象とした研究であると考えられる. また, 7週間非運動負荷群 (7CN群) と11週間非運動負荷群 (11CN群) を比較すると, 脛骨と腰椎のBMCおよび大腿骨長は増加し, 血清オステオカルシンと尿中デオキシピリジノリンが減少したことから, ラットは急速な骨成長をした後で骨代謝回転が徐々に減少している状態にあったことが想定される.

本研究では, 運動の強度は最大酸素摂取量の50~60%に相当する中強度と考えられる. 中強度のトレッドミル走行運動により脛骨では骨量の増加が認められ, 大腿骨ではその差はわずかながらも有意に骨長の増加が認め

られたが, 腰椎では有意な骨量の変化はみられなかった. 四つ足動物では, トレッドミル走行時に脛骨と大腿骨は腰椎よりも大きな荷重を受けることは知られている. ラットにおいて脛骨や大腿骨などの荷重骨は, 腰椎のような非荷重骨と比較して, 運動に対する反応性が高いという報告が散見される<sup>23-25)</sup>. 本研究の結果は, これら過去の研究結果と同様に, 荷重運動は骨量の増加をもたらすという概念を支持し, growth spurtの時期における荷重運動は, 骨成長と骨形成を促進し, 骨量と骨の大きさを増加させることが確認された.

11週間の運動によるBMCの平均増加率は脛骨近位部では11.0%, 脛骨骨幹部では25.6%, 脛骨遠位部では30.8%であった. このことは, トレッドミル走行運動に対する脛骨の反応が, 脛骨遠位部で最も大きく, 逆に近位部で最も小さいことを示唆している. 脛骨遠位部はラットにおいてトレッドミル走行中にもっとも荷重点に近いこと, 近位部や骨幹部と比較してより大きな荷重を受けるとされている<sup>22)</sup>. したがって, 本研究でも, トレッドミル運動に対する脛骨の骨量増加が荷重点に最も近い遠位部で最大であったことから, トレッドミル運動では受ける荷重が大きいほど骨量の増加は大きいものと考えられた. また一般に, 脛骨近位部および遠位部は海綿骨に富み, 骨幹部は皮質骨に富んでいることが知られている. 特にラットでは, 皮質骨は脛骨遠位部では近位部と比較して厚いなどの特徴がある<sup>26)</sup>. 成長期のラットにおいて, トレッドミル運動に対する骨の反応は海綿骨より皮質骨の方が強いことも報告されている<sup>22)</sup>. このため本研究において, 脛骨近位部と比較して遠位部および骨幹部骨量の増加がより大きかったもう一つの理由として, 脛骨遠位部と骨幹部が近位部と比較してより皮質骨が豊富であることが考えられた.

一方, 運動が骨におよぼす影響について詳細に調べた研究は少なく<sup>27, 28)</sup>, 運動が骨量の増加をもたらすメカニズムは明らかにされていない. Frost<sup>29)</sup>は, 骨にはmechanoreceptorが存在し, 力学的負荷が閾値に達すると骨形成と骨吸収を促進または抑制させる説 (mechanostat theory) を提唱している. すなわち, 力学的負荷の増加は骨形成を刺激し, 骨吸収を抑制させ, 反対にその減少は骨形成を抑制し, 骨吸収を促進すると述べている. Bourrinら<sup>30)</sup>は, 9週齢の成長期の雄性ラットにおいて, 5週間のトレッドミル走行運動は脛骨近位部の骨形成の促進と骨吸収の抑制により海綿骨の骨量が増加すると報告している. またYehら<sup>31)</sup>は, 14月齢の老齢雌性ラットにおいて, 6週間のトレッドミル走行運動は脛骨近位部の骨吸収を抑制し海綿骨量を増加させる

と報告している。彼らはまた、6週齢の成長期のラットにおいて5週間のトレッドミル走行運動は外骨膜面の骨形成により皮質骨量を増加させることも報告している<sup>32)</sup>。本研究では、運動による脛骨の骨量増加は、骨代謝マーカーの測定結果から骨吸収の抑制と骨形成の促進によるものと考えられた。本研究では、形態計測を行っていないながらも、代謝マーカーの結果によってFrostが提唱したmechanostat theory, すなわち力学的負荷の増加は骨形成を刺激し、骨吸収を抑制するという説を支持するものと考えられる。

運動が骨量におよぼす作用として、ホルモンなどを介した全身性作用と荷重や筋力などの力学的負荷による局所性作用が挙げられるが、運動による骨量の増加には局所性作用が重要とする報告<sup>23,32)</sup>が多く、全身性作用については一定の見解は得られていない。本研究で、運動による骨量の増加には1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>の増加と副甲状腺ホルモンの減少が関与することが明らかとなった。すなわち、荷重負荷により骨形成が刺激され、血清から骨にカルシウムが移動することにより一過性低カルシウム血症となり、これに反応して1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>値が上昇して腸管からのカルシウム吸収を増加させる。さらに、これに反応して副甲状腺ホルモン値が低下して骨吸収が抑制され、これらの結果から骨量が増加するものと推測した。しかし、全身性にこれらのホルモン値が変化しても、腰椎において骨量の有意な変化がみられなかったことから、比較的短期間の運動で骨量の増加を得るには荷重負荷が重要であり、局所性の荷重負荷と全身性の1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>や副甲状腺ホルモンなどのカルシウム代謝関連ホルモンの両方の作用が骨量の増加をもたらしたと考えられた。

運動の中止や運動の強度ないし頻度の減少が骨量におよぼす影響についての報告は少ない<sup>33,34)</sup>。特に、運動の中止に関する動物実験の報告では、Yehら<sup>21)</sup>が、growth spurt後の若年の雌性ラットを用いた実験で、骨形成の低下と骨吸収の増加により、8週間のトレッドミル運動で得られた骨量は4週間の運動の中止により失われると述べている。本研究では、7週間の運動後に4週間運動を中止させた結果、脛骨骨量と大腿骨長は非運動群と有意差のないレベルまで減少した。これらの結果は、運動により獲得された骨量はgrowth spurtの時期においても、それ以降の時期においても失われることを示している。本実験のようなgrowth spurtの時期のラットを用いて運動中止が骨代謝におよぼす影響を検討した研究は見あたらない。本研究における骨代謝マーカーの測定結果で、骨形成の有意な低下と骨吸収の上昇傾向

がみられたことは、骨形成の低下がその病態において重要な役割を担っていると考えられた。Yehらの研究と本研究の結果は必ずしも一致するとは限らないが、これらの結果はFrostが提唱したmechanostat theory, すなわち力学的負荷の減少は骨形成を抑制し、骨吸収を促進するという説を支持するものと考えられる。

一般臨床で、不動化や免荷により1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>値は低下し、副甲状腺ホルモン値は増加することは知られているが<sup>35)</sup>、本研究においても同様に7週間の運動後に4週間運動を中止させた結果、カルシウム代謝関連ホルモンの中で、1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>は非運動群と有意差のないレベルまで減少し、副甲状腺ホルモンは非運動群と比較して有意に増加した。つまり荷重運動の中止は、荷重運動が骨量の増加をもたらすのと逆のメカニズムが考えられた。すなわち、荷重運動の中止により骨形成が抑制され、骨からカルシウムが血清中に移動することにより一過性高カルシウム血症となり、これに反応して1,25-dihydroxyvitaminD<sub>3</sub>値が低下して腸管からのカルシウム吸収を減少させる。さらにこれに反応して副甲状腺ホルモン値が上昇し、骨吸収が促進され、これらの結果により骨量が減少するものと推測した。

また、運動の強度ないし頻度の減少に関する研究の報告も見あたらない。本研究では、運動により得られた脛骨の骨量は運動中止により脛骨近位部、骨幹部、遠位部とも失われたが、強度や頻度の減少に対するそれらの反応は部位により異なることが明らかとなった。すなわち、運動の強度や頻度の減少により脛骨近位部、骨幹部では運動で得られた骨量は失われるが、遠位部では維持される可能性がある。その機序として、脛骨遠位部は荷重点に最も近く、かつ皮質骨が厚いという事実から、脛骨遠位部ではたとえ運動強度や頻度が減少しても骨量を維持するのに十分な荷重を受けていたために骨量が維持されたものと推測した。

臨床的には、老年期における骨粗鬆症の危険性は、主に成長期の最大骨量によって決定され、この時期に運動などにより最大骨量を高めることが、加齢に伴う骨量減少や骨折に対する最も有効な予防法であるとされてきた。本研究は、骨粗鬆症の予防において、成長期に運動により最大骨量を高めることに加えて、運動を継続することの重要性について明らかにした点で、意義のあるものと考えられる。すなわち、骨粗鬆症の予防に対して、運動により最大骨量を高めた後も、運動を継続するよう指導すべきであることを強調したい。

## 総 括

1. 中強度のトレッドミル走行運動と、運動の中止および運動の強度ないし頻度の減少が、成長期ラットの脛骨や腰椎の骨量、骨代謝マーカーおよび骨代謝関連ホルモンにおよぼす影響について検討した。

2. 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は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。

3. 成長期のラットにおいて、中強度の走行運動による脛骨の骨量増加は脛骨遠位部で最も大きく、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近位部、骨幹部、遠位部の部位により異なることが示唆された。

4. 運動の中止により、運動により獲得された骨量は脛骨近位部、骨幹部および遠位部のすべての部位で失われることが明らかとなった。

5. 運動の強度や頻度の減少により、運動により獲得された骨の反応は脛骨近位部、骨幹部および遠位部で異なることが示唆された。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る可能性がある。

6. 以上から、成長期のラットの脛骨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かとなった。このため運動により獲得された骨量を維持するには、運動を継続する必要がある。

7. 本研究は、骨粗鬆症の予防における運動の位置づけを明らかにした点で、意義のあるものと考えられる。

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整形外科教室戸山芳昭教授に深謝いたします。また本研究において直接の御指導を賜りました慶應義塾大学医学部スポーツクリニック竹田毅助教授、岩本潤博士に深甚なる謝意を表します。さらに本研究を遂行するにあたりご協力いただきました北里研究所病院整形外科阿部均博士、北里研究所動物実験センターの山田高也先博士に感謝いたします。

なお、本研究の一部は、第38回関東整形災害外科学会(東京、1999)、第19回日本骨形態計測学会(北九州、1999)、第17回日本骨代謝学会(大阪、1999)、第14回

日本整形外科学会基礎学術集会(奈良、1999)、21th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research(St Louis、1999)において発表した。

## 文 献

- 1) Kulak CA, Bilezikian JP : Osteoporosis : preventive strategies. *Int J Fertil Womens Med* 43 : 56-64, 1998
- 2) Ott SM : Editorial : attainment of peak bone mass. *J Clin Endocrinol Metab* 71 : 1082A-C, 1990
- 3) Laurence R, Gillian H, Vanya P, Lynda F, Rowena R, David C : Determinants of peak bone mass : Clinical and genetic analyses in a young female Canadian cohort. *J Bone Miner Res* 14 : 633-643, 1999
- 4) Matkovic V, Fontana D, Tominac C : Factors that influence peak bone mass formation : A study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. *Am J Clin Nutr* 52 : 878-888, 1990
- 5) Kroger H, Kotaniemi A, Kroger L, Alhava E : Development of bone mass and bone density of the spine and femoral neck-a prospective study of 65 children and adolescents. *Bone Miner* 23 : 171-182, 1993
- 6) Matkovic V : Calcium and peak bone mass. *J Intern Med* 231 : 151-160, 1992
- 7) Vuori I : Peak bone mass and physical activity : a short Review. *Nutr Rev* 54 : 11-14, 1996
- 8) Heinonen A, Oja P, Kannus P, Sievanen H, Manttari A, Vuori I : Bone mineral density of female athletes in different sports. *Bone Miner* 23 : 1-14, 1993
- 9) Bass S, Pearce GJ, Bradney M, Hendrich E, Delmas PD, Harding A, Seeman E : Exercise before puberty may confer residual benefits in bone density in adulthood : studies in active prepubertal and retired female gymnasts. *J Bone Miner Res* 13 : 500-507, 1998
- 10) Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Morton L, Barker D : Childhood growth, physical activity, and peak bone mass in women. *J Bone Miner Res* 10 : 940-947, 1995
- 11) Courteix D, Lespessailles E, Peres SL, Obert P, Benhamou CL : Effect of physical training on bone mineral density in prepubertal girls : a comparative study between impact-loading and non-impact-loading sports. *Osteoporos Int* 8 : 152-158, 1998
- 12) Kannus P, Haapasalo H, Sankelo M, Sievanen H, Pasanen M, Heinonen A, Oja P, Vuori I : Effect of starting age of physical activity on bone mass in the dominant arm of tennis and squash players. *Ann Intern Med* 123 : 27-31, 1995
- 13) Slemenda CW, Miller JZ, Hui SL, Reister TK, Johnston CC Jr : Role of physical activity in the development of skeletal mass in children. *J Bone Miner Res* 6 : 1227-1233, 1991
- 14) Slemenda CW, Reister TK, Hui SL, Miller JZ,

- Christian JC, Johnston CC Jr : Influences on skeletal mineralization in children and adolescents : evidence for varying effects of sexual maturation and physical activity. *J Pediatr* 125 : 201-207, 1994
- 15) Teegarden D, Proulx WR, Kern M, Sedlock D, Weaver CM, Johnston CC, Lyle RM : Previous physical activity relates to bone mineral measures in young women. *Med Sci Sports Exerc* 28 : 105-113, 1996
- 16) Welten DC, Kemper HC, Post GB, Van Mechelen W, Twisk J, Lips P, Teule GJ : Weight-bearing activity during youth is a more important factor for peak bone mass than calcium intake. *J Bone Miner Res* 9 : 1089-1096, 1994
- 17) Vuori I, Heinonen A, Sievanen H, Kannus P, Pasanen M, Oja P : Effects of unilateral strength training and detraining on bone mineral density and content in young women : a study of mechanical loading and deloading on human bones. *Calcif Tissue Int* 55 : 59-67, 1994
- 18) GP, Stocke KS, Ehsani AA, Slatopolsky E, Lee WC, Birge JB : Weight-bearing exercise training and lumbar bone mineral content in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 108 : 824-828, 1988
- 19) Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S : Effect of exercise training and detraining on bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J Orthop Sci* 6 : 128-132, 2001
- 20) LeBlanc AD, Enans HJ, Johnson PC, Jhingran S : Changes in total body calcium balance with exercise in the rat. *J Appl Physiol* 55 : 201-204, 1983
- 21) Yeh JK, Aloia JF : Deconditioning increases bone resorption and decreases bone formation in the rat. *Metabolism* 39 : 659-663, 1990
- 22) Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF : Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* 24 : 163-169, 1999
- 23) Yeh JK, Aloia JF, Tierney JM, Sprints S : Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat : determined by dual energy X-ray absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 52 : 234-238, 1993
- 24) Mosekilde LI, Thomsen JS, Orhii PB, McCarter RI, Mejia W, Kalu DN : Additive effect of voluntary exercise and growth hormone treatment on bone strength assessed at four different skeletal sites in an aged rat model. *Bone* 24 : 71-80, 1999
- 25) Yeh JK, Aloia JF, Chen MM : Growth hormone administration potentates the effect of treadmill exercise on bone formation but not on the vertebrae in middle-aged rats. *Calcif Tissue Int* 54 : 38-43, 1994
- 26) Ito H, Ke HZ, Jee WSS, Sakou T : Anabolic responses of an adult cancellous bone site to prostaglandin E2 in the rat. *Bone Miner* 21 : 219-236, 1993
- 27) 勝田 茂ら : 成長期の骨に及ぼす運動の効果. *病態生理* 9 : 576-578, 1990
- 28) Chen MM, Yeh JK, Tierney JM, Sprintz S : Effect of treadmill exercise on tibial cortical bone in aged female rats : a histomorphometry and dual energy X-ray absorptiometry study. *Bone* 15 : 313-319, 1994
- 29) Frost HM : The mechanostat : a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and non mechanical agents : *Bone Miner* 2 : 73-85, 1987
- 30) Bourrin S, Palle S, Pupier R, Vico L, Alexandre C : Effects of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *J Bone Miner Res* 10 : 1745-1752, 1995
- 31) Yeh JK, Aloia JF, Chen MM, Tierney JM, Sprintz S : Influence of exercise on cancellous bone of the aged female rat. *J Bone Miner Res* 8 : 1117-1125, 1993
- 32) Yeh JK, Liu CC, Aloia JF : Effects of exercise and immobilization on bone formation and resorption in young rats. *Am J Physiol* 264 : E182-E189, 1993
- 33) Kiuchi A, Arai Y, Katsura S : Detraining effects on bone mass in young male rats. *Int J Sports Med* 19 : 245-249, 1998
- 34) Porr CA, Kronfield DS, Lawrence LA, Pleasant RS, Harris PA : Deconditioning reduces mineral content of the third metacarpal bone in horses. *J Anim Sci* 76 : 1875-1879, 1998
- 35) Yeh JK, Aloia JF : Effect of physical activity on calciotropic hormones and calcium balance in rats. *Am J Physiol* 258 : E263-E268, 1990
- 35) Yeh JK, Aloia JF : Effect of physical activity on calciotropic hormones and calcium balance in rats. *Am J Physiol* 258 : E263-E268, 1990

学位論文

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—

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：池田康夫教授)

金 城 謙太郎

(平成 14 年 9 月 30 日受付)

Key Word : all-trans retinoic acid, thrombopoietin, thrombocytosis, acute promyelocytic leukemia, platelet

白血病の治療は複数の強力な抗癌剤により白血球細胞を完全に死滅させる“total cell kill”の概念に基づき、治療を目指して行なわれている。殺細胞効果を有する抗癌剤は、腫瘍細胞のみならず正常細胞にも作用するために往々にして骨髄抑制による致命的な感染症や出血症状を惹起することが臨床的に大きな問題となっている。さらに抗癌剤により再発を繰り返す難治性の白血病の予後は極端に悪く、これら抗癌剤による治療の問題点を克服し、白血病の治療成績をより向上させるために新たな概念の治療法の開発が望まれている。このような背景の中で、1988年に上海のWang博士により提唱された急性前骨髄球性白血病(acute promyelocytic leukemia: APL)に対するビタミンA誘導体、オールトランス型レチノイン酸(all-trans retinoic acid: ATRA)を用いた分化誘導療法は、初発APL症例を高率に寛解導入したと報告され注目された<sup>1)</sup>。さらなる追試により、ATRA療法はその有効性が全世界で確証され、現在では白血球細胞を成熟分化させることにより、最終的にア

ポトーシスを誘導し細胞を死滅させる分化誘導療法として確立され、APLの第一選択療法となった<sup>2,3)</sup>。

約99%のAPL症例は、特異的な(15;17)転座を有し、その結果、15番染色体上に位置するPML(promyelocytic leukemia)遺伝子と、17番染色体上に位置するレチノイン酸受容体 $\alpha$ (RAR $\alpha$ )遺伝子が相互に転座し、PML/RAR $\alpha$ キメラ遺伝子を形成する<sup>4)</sup>。APLは白血球細胞の形態として、細胞質にアズール顆粒、アウエル小体を有することを特徴とし、発症時にほぼ全ての症例において播種性血管内凝固症候群(Disseminated Intravascular Coagulation; DIC)を合併する<sup>5,6)</sup>。ATRAはAPL細胞の分化を誘導すると同時にDICをも改善させるために、APLにおける生命予後はATRAが導入されてから著しく改善した。しかしながら、症例を重ねるにつれて白血球増多を契機とし、肺水腫を伴い死に至るレチノイン酸症候群<sup>7)</sup>、血小板増多症<sup>7,8)</sup>などのATRAによる副作用が報告されるようになった。我々の教室では本邦でも早い時期からATRAを導入し、

本論文は、Kinjo K, Kizaki M, Takayama N, Michikawa N, Oda A, Okamoto S, Tahara T, Kato T, Miyazaki H, Ikeda Y: Serum thrombopoietin and erythropoietin levels in patients with acute promyelocytic leukaemia during all-trans retinoic acid treatment. Br J Haematol 105: 382-387, 1999の一部を含む。

略号 APL : 急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia)  
ATRA : オールトランス型レチノイン酸 (all-trans retinoic acid)  
TPO : トロンボポイエチン (thrombopoietin)  
c-Mpl : トロンボポイエチン受容体  
PML : promyelocytic leukemia 遺伝子  
RARs : レチノイン酸受容体 (Retinoic acid receptors)  
RXRs : レチノイン酸 X 受容体 (Retinoic acid X receptors)  
RARE : レチノイン酸応答領域 (Retinoic acid responsive element)  
EPO : エリスロポイエチン (erythropoietin)  
EMSA : electrophoretic mobility shift assay

APLの治療を行なっているが、一部に ATRA による治療経過中に血小板の一過性増多を示す症例が存在することを明らかにしている<sup>9)</sup>。しかしながら、ATRA による血小板増多機構については今だ不明であり、本研究は、ATRA 投与下における血小板増多機序の解明を試みた。

近年、血小板産生調節機構に關与するサイトカインとしてトロンボポイエチン (thrombopoietin: TPO) 遺伝子がクローニングされ<sup>10-15)</sup>、巨核球、及び血小板造血の主要因子であることが証明された。TPO は、主として肝臓、腎臓、骨髓、脾臓で産生され<sup>16)</sup>、血中濃度は主に巨核球、血小板上に発現する c-Mpl (TPO 受容体) による吸着により制御されている<sup>17,18)</sup>。血小板減少を伴う動物モデル<sup>19)</sup>、再生不良性貧血症例などにおいて骨髓間質細胞における TPO の mRNA 発現増加を認めること<sup>20)</sup> から、腎臓、肝臓とは異なる機構で発現制御がおこなわれると考えられている<sup>16,20)</sup>。

ATRA はその標的遺伝子をレチノイン酸応答領域 (Retinoic Acid Responsive Element: RARE) を介して転写活性を上昇させると報告されている<sup>21)</sup>。ATRA のレセプターである RARs (Retinoic Acid Receptors) と RXRs (Retinoic acid X receptors) がヘテロダイマーを形成し<sup>21)</sup>、RARE に結合した状態で ATRA はリガンドとして RARs に結合する<sup>22)</sup>。ATRA がレセプターに結合すると転写抑制因子群であるコリプレッサー群が解離するに代わり、転写活性因子群であるコアクチベーター群が ATRA レセプター複合体に結合し、標的遺伝子の転写を活性化する<sup>23)</sup>。さらに、RARE の大多数が任意の 5 塩基を中間に挟んだ (A/G) G (G/T) TCA からなる 6 塩基配列の繰り返し配列 (DR5) であることが報告されている<sup>24)</sup>。しかしながら、現在までのところ血小板増加に關与する ATRA 標的遺伝子の報告はなく、本研究は臨床的に ATRA 療法中の APL 症例にみ

られる血小板増多機序として、ATRA が造血に關与する各種サイトカイン、特に TPO 遺伝子発現増強に直接寄与することで、血小板増多をきたす可能性について検討した。

本研究においては、第一に APL 患者における ATRA 療法中の各種血清サイトカイン濃度を測定し、血小板増多と患者血清サイトカイン濃度の相関を検討した<sup>9)</sup>。さらに、骨髓間質細胞において、血小板の産生調節を司るサイトカインである TPO の発現が ATRA 刺激により増強され得るのか否か、また、TPO 遺伝子のプロモーター領域に RARE として機能する配列が存在し、その領域を介した ATRA による TPO 遺伝子の転写活性増強の有無につき検討を加えることで、ATRA が骨髓間質細胞において直接 TPO の発現増強を介し、血小板数上昇を促進するかについても検討を加えた。

## 方 法

### 1. 患者

1992年5月から1996年10月に、慶應義塾大学医学部内科学教室において、15番、17番の染色体転座及び、PML/RAR $\alpha$  融合遺伝子の存在を確認し、形態的に French-American-British 分類において APL<sup>9)</sup> と診断され、同意を得た 41 症例のうち、血小板増多を示した 5 症例について ATRA 投与中に経時的に採取した血清中の各種サイトカイン濃度を測定した。患者症例の詳細は第 1 表に記した。全ての患者は ATRA 45 mg/m<sup>2</sup>/日内服により、完全寛解に至った。完全寛解の定義は、骨髓単核球中、芽球が 5% 未満、かつ、末梢血液検査において、白血球数 3×10<sup>9</sup>/l 未満、Hb 8g/dl 以上、血小板数 100×10<sup>9</sup>/l とした。白血球増多を認めた 3 症例 (第 1 表、症例 1, 2, 3) はレチノイン酸症候群を予

第 1 表 ATRA 療法を施行した APL 症例の一覧

Patient	Age (yr)	Sex	ATRA		Complete remission (d)	Chemotherapy	Platelet transfusion	Platelet counts (×10 <sup>9</sup> /l)		
			Dose (mg/d)	Duration (d)				Before treatment	Maximum	(d)
1	59	F	60	56	56	+	-	148	739	(46)
2	19	F	60	43	43	+	+	33	336	(30)
3	44	M	80	45	45	+	-	102	365	(38)
4	57	F	60	28	28	-	-	222	317	(29)
5	30	F	60	43	43	-	-	27	599	(32)

初発 APL 患者 5 名に対し、完全寛解に導入されるまで ATRA を経口にて投与した。症例 1, 2, 3 に対しては白血球増加の為、化学療法を追加し、症例 2 に対しては血小板減少の為、血小板輸血を施行した。(Kinjo K et al: Br J Haematol 105: 382-387, 1999 の Table 1 を許可を得て改変。)

防するためにダウノルピシン (DNR) 40 mg/m<sup>2</sup> を2日間静注後、エノシタラピン (BHAC) 200 mg/m<sup>2</sup> を3日間静注した。各種血清サイトカイン濃度の評価のため、患者肘静脈より採血し、測定まで-80度にて血清を凍結保存した。

## 2. 血清各種サイトカイン濃度測定

血小板数調整機構に関与する可能性があると考えられるインターロイキン3 (IL-3)、IL-6、IL-11、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、幹細胞因子 (SCF)、エリスロポイエチン (EPO) をELISAキット (R & D system社, Mineapolis, Min. U.S.A.) により測定した。血清サイトカイン濃度は、3回ずつ測定した平均値を算出し、測定方法はキット添付測定法説明文書に従った。患者血清TPO濃度の測定はTaharaらの報告<sup>24)</sup>に沿ってサンドイッチELISA法にて測定した。血清TPO濃度も、前述のように、3回測定した平均を測定値とした。

## 3. 統計学的解析

ATRA療法中のAPL症例における各種サイトカイン血清濃度と血小板数の関係は、Friedman nonparametric testにより解析した<sup>25)</sup>。また、血清TPO濃度、血清EPO濃度と血小板数との相関関係につき、spearman rank correlation testにより解析した。また、これらの解析にはStatView 4.0統計ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) softwareを用いた。

## 4. 細胞培養と試薬

SV40 largeT抗原を導入して不死化した、正常ヒト骨髓間質細胞株KM101細胞<sup>26)</sup> (千葉大学医学部、張ヶ谷博一博士より供与) 及び、ヒト肝細胞腫細胞株HepG2細胞 (JCRB Cell Bank, 東京, 日本) は、10%ウシ胎仔血清 (Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) と100U/m ベニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco-BRL) 含むαMEM (Gibco-BRL) にて37度、5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。付着した細胞を継代時、または細胞解析時にはリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS; Gibco-BRL) で2度洗浄した後、0.4%トリプシン (Gibco-BRL) を加え、培養、もしくは細胞解析に用いた。ATRA (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) はエタノールにて10<sup>-2</sup>Mとし、-20度にて保存し適宜培養液にて濃度調整した。

## 5. RT-PCR法、及び定量RT-PCR法

KM101細胞を0.5%ウシ血清アルブミン (Gibco-BRL) と100U/ml ベニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco-BRL) 含むαMEM (Gibco-BRL) にて37度、5%CO<sub>2</sub>の条件下で8時間培養後、10<sup>-6</sup>M ATRAを添加し、継続的に2, 4, 8時間培養した。その後、細胞の全RNAをアイソジェンRNA抽出キット (日本ジーン, 東京) を用いて精製し、1 µgの全RNAよりcDNAをスーパースク립トII RNase H逆転写酵素 (Gibco-BRL) を用いて合成した。定量RT-PCR法はTaqman PCR Core Reagentキット (Perkin Elmer Cetus, Emeryville, CA, USA) を用いて添付説明文書に従った。Taqman PCR法によるTPOの定量はプライマーとして sense 5'-TTC ACA GCA GAC TGA GCC AGT G-3' と antisense 5'-AGC TAA AGT CCA CAG CAG GCA-3' 並びに Taqman プローブとして 5'-AGA GGT TCA CCC TTT GCC TAC ACC TGT CCT-3' の5' 終末に6-carboxy fluorescein (FAM) を、3' 終末に6-carboxy-tetramethyl rhodamine (TAMRA) を標識して用いた。対照となるβ-actinの発現量はTaqman β-actin Control Reagents (Perkin Elmer Cetus) を使用した。また、増幅条件として50度2分、95度10分後、95度15秒のディネーター反応と60度1分のアニーリング兼エクステンション反応を96-well thermal cycler 付属ABI Prism 7700 sequence detector (Perkin Elmer Cetus) を用いて40サイクル施行した。測定値はSequence Detector v01.6 software (Perkin Elmer Cetus) を用いて添付説明文書に従って解析した。

## 6. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA法) とRARα蛋白合成法

KM101細胞を10<sup>-6</sup>M ATRA存在下、非存在下の条件で48時間培養し、Dignam変法<sup>27)</sup>にて細胞蛋白の調整をした。EMSA法に使用する1本鎖オリゴヌクレオチドを次のように合成した。TPO遺伝子5'側プロモーター領域に存在し、RARs結合配列 (A/G) G (G/T) TCAに相同性のあるTPO-RARE野生型オリゴヌクレオチド: 5'-TGATG GGaTCA AGGTC AGGcCA GGA AG-3'、とそのTPO-RAREのRARs結合配列に7塩基変異を含むTPO-RARE変異型オリゴヌクレオチド (mutant TPO-RARE): 5'-TGATG GacctA AGGTC AacctA GGAAG-3'の1本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、100度3分にてアニールし、T4ポリヌクレオチドカインースを用いて[γ-<sup>32</sup>P] ATPにてラベルしプローブとした。その後、1 ngの放射線標識したプローブと5



μg の細胞抽出物を 20 mM Hepes (pH 7.9), 0.5 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 50 mM KCl, 1 μg poly dI : dC (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden), 非放射線標識プローブを含む 20 μl 溶液にて 25 分間室温で反応させ、ポリアクリルアミドゲル上に展開させた後、ろ紙上に移動し乾燥させた。反応後は X 線フィルムに感光させて解析した。

RARα 蛋白合成は、pSG5-hRARα プラスミド (京都大学ウイルス研究所, 梅園和彦博士より供与) を RNA 合成の鋳型として, TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) を用いて行なった。合成された蛋白は, 抗 RARα 抗体を用いてウエスタンブロット法にて確認した。

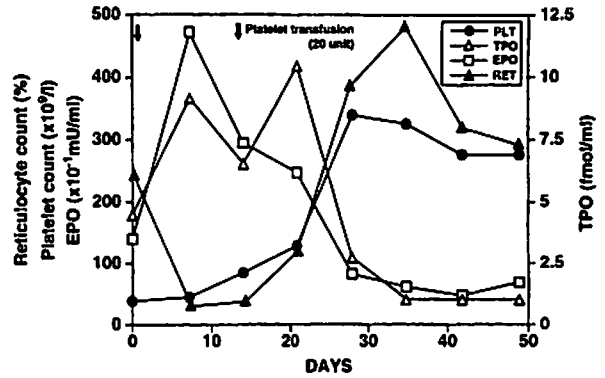
7. 遺伝子導入とレポーターアッセイ法

ヒト TPO 遺伝子プロモーター領域を含むルシフェラーゼレポータープラスミドとして TPO 遺伝子の -1318 から +100 (転写開始地点を 0 とした。) までの 5'側プロモーター配列上に存在する TPO-RARE 配列を含み, その下流にルシフェラーゼ発現領域を持つ pLUC-TPO-RARE プラスミドを使用した (東京医科歯科大学, 北嶋繁孝博士より供与<sup>26)</sup>)。また, pLUC-TPO-RARE プラスミドの TPO-RARE 配列部位を QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて変異型 TPO-RARE 配列 TGATG GacctA AGGTC AacctA に変異させた mutant pLUC-TPO-RARE を作成した。レポータープラスミドである pLUC-mock, pLUC-TPO-RARE, pLUC-mutant-TPO-RARE は内在性レポーターアッセイコントロールプラスミドである hpRL-tk vector (Promega) と共に Effectene (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) を用いて KM101 細胞に遺伝子導入された。5 × 10<sup>6</sup> 個の KM101 細胞を遺伝子導入前日に 6 穴プレートで培養し, 遺伝子導入 24 時間後に 10<sup>-6</sup>M ATRA にて, 48 時間培養した。その後, 細胞を dual luciferase assay system (Promega) を用いて細胞融解させ, Lumat luminometer (EG & G BERTHOLD, Stammwerk Wildbad) を用いてルシフェラーゼレポーター解析を施行した。

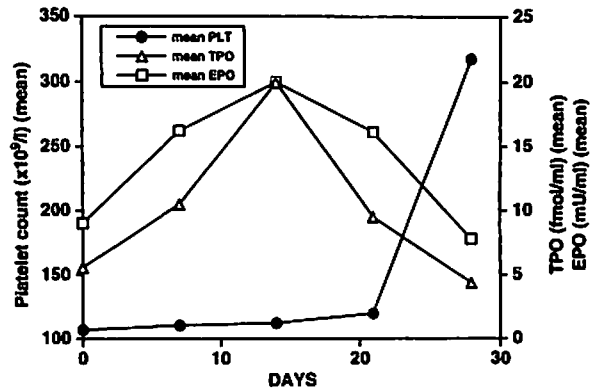
結 果

1. ATRA 療法による APL 症例の臨床経過と血小板増多

ATRA により加療した APL5 症例において血清中の TPO 濃度, サイトカイン濃度, 末梢血中の血小板数, 網状赤血球数を約 7 日間隔で測定した。全ての症例は



第1図 APL 患者 (症例 2) における血小板数, 網状赤血球数と血清 TPO, EPO 濃度の経時的変化。ATRA 療法を施行した APL 症例 (症例 2) の血清 TPO, EPO 濃度, 網状赤血球数 (RET), 血小板数 (PLT) を示す。血清 TPO 濃度, 血清 EPO 濃度は ELISA 法により経時的に測定した。(Kinjo K et al : Br J Haematol 105 : 382-387, 1999 の Fig. 1 の一部を許可を得て転載。)



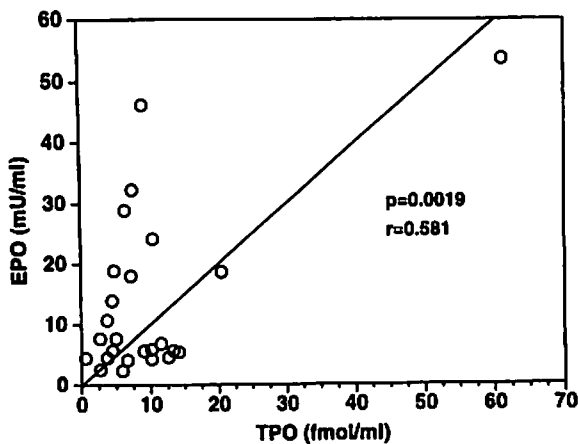
第2図 ATRA 療法を施行した APL 全 5 症例における平均血小板数と血清 TPO, EPO 濃度の推移。ATRA 療法を施行した APL5 症例の血清 TPO と EPO 濃度を ELISA 法により測定した。患者は ATRA45mg/m<sup>2</sup> を連日投与され, 完全寛解に導入された。測定値はそれぞれの平均を示し, 標準偏差はいずれも平均の 10%以内であった。ATRA 投与後 16 日目以降の血清 TPO 値減少と血小板数増加は逆相関した。(Kinjo K et al : Br J Haematol 105 : 382-387, 1999 の Fig. 2 の一部を許可を得て転載。)

ATRA 投与後平均 43 日目 (28 日目から 56 日目) で完全寛解に導入され, 3 症例 (症例 1, 2, 3) は ATRA 症候群の予防として化学療法を追加された (第 1 表)。DIC は全ての症例で認められたが, ATRA 投与後 10 日以内に改善した。ATRA 投与前平均血小板数は 106.4 × 10<sup>9</sup>/l (27-222 × 10<sup>9</sup>/l) で ATRA 投与後, 徐々

に血小板数増加を認め、約20日目より急激な増加を認め、約29~46日目(平均35日目)で $471.2 \times 10^9/l$ ( $317 \sim 739 \times 10^9/l$ )と最高値に達した(第1図、第2図)。

## 2. ATRA療法中血清TPO濃度の推移

ATRA治療中、血小板増多を認めたAPL5症例における、血清TPO濃度について検討を加えた。第1図、第1表に示すようにNo.2の症例ではATRA治療前の血小板数 $33 \times 10^9/l$ であったが、ATRA投与後30日目には最大数 $336 \times 10^9/l$ に達した。ATRA療法前における血清TPO濃度は $4.56 \text{ fmol/ml}$ であったが、投与後7日目に $9.24 \text{ fmol/ml}$ 、14日目の血小板輸血後には一過性に減少を認め、21日目には最大値 $10.40 \text{ fmol/ml}$ に上昇した。その後TPO値はATRA投与前値より減少するに従い血小板数の上昇を認めた。また、全ての症例において、ATRA療法中の血清TPO濃度と血小板数は同様の挙動を示した(図2)。ATRA投与前、平均血清TPO濃度は $5.47 \text{ fmol/ml}$ ( $2.60 \sim 9.07 \text{ fmol/ml}$ )で、ATRA投与後約16日目をピークとして上昇し、平均血清TPO濃度は $20.92 \text{ fmol/ml}$ まで上昇した。ピークを過ぎると平均血清TPO濃度は減少し、血小板数の増加とともに治療前値へと下降した。ピーク後の平均血清TPO濃度の減少と、血小板数増加は統計上有意差を認めた( $P < 0.05$ , 第2図)。



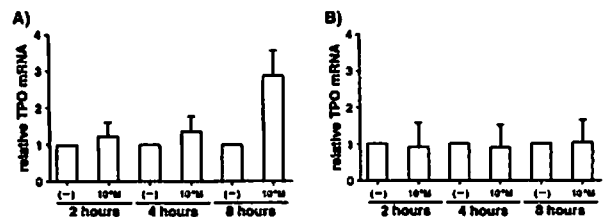
第3図 ATRA療法中のAPL5症例の血清TPO、EPO濃度の関係。ATRA療法中のAPL5症例の血清TPO、EPO濃度の相関関係を示す。血清TPO濃度は血清EPO濃度と正の相関関係を示した( $r=0.581$ ,  $P=0.0019$ )。(Kinjo K et al: Br J Haematol 105:382-387, 1999のFig. 3の一部を許可を得て転載。)

## 3. 血清サイトカイン濃度と血小板数

ATRA療法を受けたAPL5症例(第1表)について、血清IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, SCF, EPO濃度をELISA法により測定した。血清EPO濃度は一過性に上昇し、ATRA投与後平均15.6日目(10~20日目)に平均最大値 $24.54 \text{ mU/ml}$ ( $2.41 \sim 53. \text{ mU/ml}$ )に上昇した(第1図、第2図)。その後、血清EPO濃度は治療前値へと下降した。また、全5症例において、ピーク後の平均血清EPO濃度の減少と網赤血球数の増加、血小板数の増加は統計上有意差を認めた( $P=0.0399$ , 第2図)。さらに平均血清TPO濃度と平均血清EPO濃度の推移は類似しており(第3図)、統計学的有意差( $r=-0.581$ ,  $P=0.0019$ )を認めた。また、全5症例において、血清IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, SCF濃度の変化は認めず、ATRA療法中の血小板上昇との関連は見出せなかった。

## 4. 骨髄間質細胞におけるATRAによるTPOの発現増強

ATRA療法中のAPL症例において血清TPO濃度の上昇を認めたことから、ATRAによるTPO産生の直接増強の可能性について、ヒト骨髄間質細胞由来細胞株KM101細胞と、ヒト肝細胞由来細胞株HepG2細胞を用いて解析した。KM101細胞、HepG2細胞をATRAで種々の時間(2, 4, 8時間)刺激し、RT-PCR法、定量的PCR法にてTPO mRNA発現レベルを検討した。KM101細胞において、時間、濃度依存性にTPO mRNAの発現増強を認めたが(第4図(A))、HepG2細胞では有為な差異は認めなかった(第4図(B))。KM101細胞において、TPO mRNAレベルはATRA非刺激のコントロールと比較して、 $10^{-6} \text{ M}$  ATRA 8時



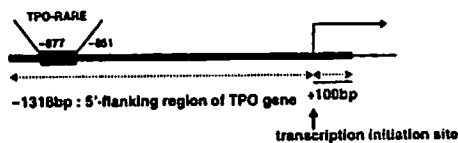
第4図 定量RT-PCR法による骨髄間質細胞株、KM101細胞(A)と肝細胞腫細胞株、HepG2細胞(B)におけるTPO mRNAレベルの発現解析。KM101細胞(A)とHepG2細胞(B)は0.5%ウシ血清アルブミンを含む $\alpha$  MEMにて8時間培養後、 $10^{-6} \text{ M}$  ATRAを添加、または非添加し、2, 4, 8時間培養した。培養後、定量RT-PCR法(Taqman PCR法)により、TPO mRNA発現レベルを解析した。なお、コントロールとして $\beta$ -actin mRNAを同様に測定し、TPO mRNA測定値を補正した。

間刺激後に約3倍増加した(第4図(A)). すなわち, ATRAにより骨髄間質細胞株 KM101 細胞における TPO 遺伝子発現が mRNA レベルで増強されていることが確認された.

5. 合成 RAR $\alpha$  蛋白と TPO 遺伝子プロモーター領域上の潜在的 RARE 配列との結合

すでに報告されたように RAR $\beta$ <sup>29)</sup> や RAR $\alpha$  遺伝子<sup>30)</sup> に代表されるレチノイン酸応答遺伝子は, その遺伝子の 5'側プロモーター領域に RARs, RXRs などのレチノイン酸受容体が結合する RARE が存在し, ATRA 刺激により, 応答遺伝子の発現増強を認める. そこで, TPO 遺伝子の 5'側プロモーター領域をデータベースサーチ上, 検索 (MOTIF program, 京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター) したところ, RAR $\beta$  の 5'側プロモーター領域に存在する  $\beta$ RARE と 2 塩基相違する (英小文字) 潜在的 RARE (以下, TPO-RARE: 5'-GGaTCA AGGTC AGGcCA-3') を見出した. この TPO-RARE は最も高頻度に存在する RARE (DR5) 配列とは 3 塩基相違した (第5図). そこでウサギ網状赤血球を利用した *in vitro* 合成法で野生型 RAR $\alpha$  を合成し, ウェスタンブロット法にて蛋白の分子量を確認後, 放射性同位元素でラベルした 2 本鎖 TPO-RARE プローブとの結合を EMSA 法にて解析し

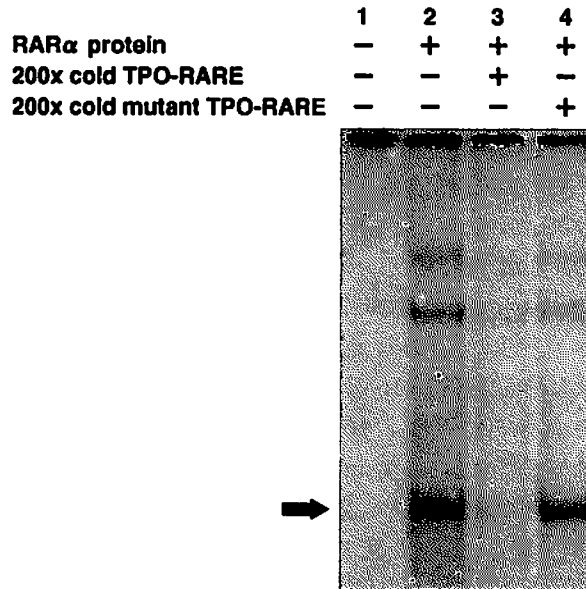
A. TPO-RARE in the promoter region of TPO gene



B. RARE sequences

RARE (DR5)	(A/G)G(G/T)TCA	NNNNN	(A/G)G(G/T)TCA
TPO-RARE	GGaTCA	AGGTC	AGGcCA
mutant TPO-RARE	GacctA	AGGTC	AacctA
$\beta$ RARE	GGTTCA	CCGAA	AGGTCA

第5図 TPO 遺伝子 5'側プロモーター領域に存在するレチノイン酸応答領域 (RARE). (A) pLUC1318 プラスミドは TPO 遺伝子 5'側プロモーター領域 -1318 塩基から転写開始領域 +100 塩基を含み, TPO-RARE 配列は TPO 遺伝子 5'側プロモーター領域の -877 から -861 に位置する. (B) 代表的な RARE (DR5), TPO-RARE, 変異型 TPO-RARE (mutant TPO-RARE),  $\beta$ RARE の塩基配列.  $\beta$ RARE は代表的な RARE (DR5) の一つで, RAR $\alpha$  遺伝子の 5'側プロモーター領域に存在する. TPO-RARE の塩基配列において, 英小文字は代表的な RARE (DR5) と相違する塩基を示す.

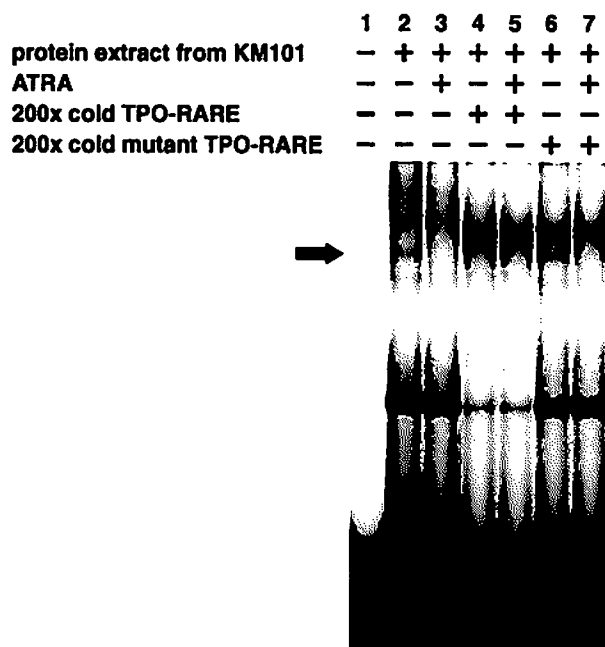


第6図 合成 RAR $\alpha$  蛋白と TPO-RARE プローブとの結合. RAR $\alpha$  蛋白はウサギ網赤血球 *in vitro* 合成法により作成し, 合成 RAR $\alpha$  蛋白と [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] により放射線標識された TPO-RARE プローブとの複合体を検出した (レーン2, 矢印). 200 倍の放射線非標識 TPO-RARE を添付すると, 競合し, 蛋白複合体が消失した (レーン3). 200 倍の放射線非標識変異型 TPO-RARE を添付すると競合せず, 蛋白複合体が検出された (レーン4, 矢印).

た (第6図). 放射線標識した TPO-RARE プローブと野生型 RAR $\alpha$  蛋白複合体の存在が確認され (第6図, レーン2, 矢印), 200 倍量の非放射線標識 TPO-RARE プローブ添加による競合の結果プローブ蛋白複合体が消失し (第6図, レーン3), 200 倍の非放射線標識 mutant TPO-RARE プローブ (mutant TPO-RARE) 添加では競合されず, プローブ蛋白複合体が変化しなかった (第6図, レーン4). これらの結果より, *in vitro* において野生型 RAR $\alpha$  蛋白は特異的に TPO-RARE と結合することが示唆された.

6. KM101 細胞蛋白抽出物と TPO-RARE の結合, 及び ATRA による結合変化

TPO-RARE とヒト骨髄間質細胞蛋白との結合を確認するため, KM101 細胞の蛋白抽出物を使用して EMSA 法を施行した (第7図). 放射線標識した TPO-RARE プローブと, KM101 細胞の蛋白抽出物との複合体を確認した (第7図, レーン2, 6, 矢印). 200 倍の非放射線標識 TPO-RARE プローブを添加すると競合によりプローブ蛋白複合体が消失し (第7図, レーン4, 5), 200

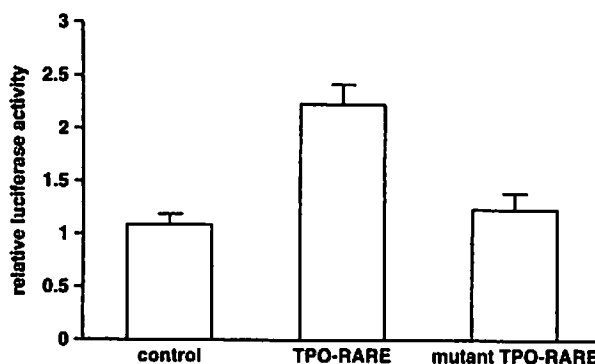


第7図 KM101細胞蛋白抽出物とTPO-RAREプローブ複合体との結合。KM101細胞蛋白抽出物と放射線標識されたTPO-RAREプローブとの蛋白プローブ複合体をEMSA法により検出した(レーン2, 矢印), 200倍の放射線非標識TPO-RAREを添付すると, 競合し, 蛋白複合体が消失した(レーン4)が, 200倍の放射線非標識変異型TPO-RAREを添付すると, 競合せず, 蛋白複合体が検出された(レーン6)。 $10^{-6}$ M ATRA刺激では, 蛋白複合体が消失した(レーン3)。 $10^{-6}$ M ATRA存在下での200倍の放射線非標識TPO-RARE添付(レーン5), 200倍の放射性非標識変異型TPO-RARE添付(レーン7)を図中に示す。

倍の非放射線標識 mutant TPO-RARE プローブ添加では競合されず, プローブ蛋白複合体に変化を認めなかった(第7図, レーン6)。興味深いことに,  $10^{-6}$ M ATRA 刺激48時間培養後のKM101細胞蛋白抽出物では放射線標識したTPO-RAREプローブと, 蛋白抽出物の複合体が消失した(第7図, レーン3, 5, 7)。これらの結果によりTPO-RAREはKM101細胞蛋白抽出物と結合し, ATRA刺激によりその結合に変化が生じることが明らかにされた。

#### 7. ATRA刺激によるTPO-RAREを介したTPO遺伝子転写活性化機構

ATRA刺激によるTPO-RAREを介したTPO遺伝子転写活性化を評価するため, TPO-RAREを含むTPO遺伝子プロモーター領域(-1318から+100塩基まで)



第8図 ATRAによるTPO遺伝子転写活性増強。レポーターベクターであるpLUC vector, pLUC-TPO-RARE, pLUC-mutant-TPO-RAREをコントロールベクターであるhpRL-TKベクターと共にKM101細胞に遺伝子導入し,  $10^{-6}$ M ATRAを48時間刺激した。その後, ルシフェラーゼレポーター解析法にて, ルシフェラーゼ活性を測定し, コントロールとしてATRA非刺激時の値で補正後, ルシフェラーゼ活性の相対値をグラフに示した。

にルシフェラーゼ発現遺伝子を結合させたプラスミドであるpLUC-TPO-RAREと, TPO-RARE部位を変異型に改変したpLUC-mutant-TPO-RAREを作製した(第5図)。遺伝子導入効率の補正を行なうため, 上記プラスミドとhpRL-TKベクターを同時にKM101細胞に遺伝子導入後,  $10^{-6}$ M ATRAにより48時間刺激し, ルシフェラーゼ相対活性を解析した。pLUC-TPO-RAREを遺伝子導入した細胞では, ATRA刺激により, 約2.2倍のルシフェラーゼ活性上昇を認めた(第8図)。一方, pLUC-mutant-TPO-RAREの遺伝子導入した細胞では約1.2倍の活性上昇に留まった(第8図)。これらの結果により骨髄間質細胞においてATRAがTPO-RAREを介しTPO遺伝子の転写活性を直接上昇させることが示唆された。

#### 考 察

TPOは巨核球産生, 血小板産生の主要なサイトカインとされ<sup>10-15)</sup>, 血清TPOレベルは血小板または骨髄中の巨核球の特異的受容体であるc-Mplとの結合により主に調整されている<sup>17,18)</sup>。骨髄移植後症例<sup>31)</sup>, 血小板減少症例<sup>32)</sup>, 再生不良貧血症例<sup>33)</sup>において骨髄間質細胞でのTPO発現が増強することが知られており, 血小板数が骨髄におけるTPO発現レベルを直接調節していると考えられているが, その機序は不明であった。

最近, ATRAによるAPLの分化誘導療法中に一過

性に血小板増多を認めた APL 症例が報告されたが<sup>7,8)</sup>, それら症例における血小板増多機構や TPO の関与については言及されておらずその機序は不明である。したがって、本研究においては ATRA による新たな TPO 産生調節機構の存在を明らかにするために、まず、ATRA による APL の分化誘導療法を施行した臨床例における血小板数等の末梢血の変動を検討し、さらに、ELISA 法を用いて、主として血小板産生調節に係わる TPO を始めとした各種サイトカインの血清濃度を測定した<sup>9)</sup>。ATRA 治療の初期の 10 から 20 日後に血清 TPO 濃度の上昇が血小板数増加に先行して認められ、20 日以降の血小板数の急上昇に伴い、TPO 濃度が低下した。増加した血小板について、APL 症例で、PML/RAR $\alpha$  染色体が消失するのが ATRA 投与後平均 31.2 日目、PCR 法で PML/RAR $\alpha$  が消失するのが ATRA 投与後平均 47.6 日目であり、正常クローン由来の血小板が発現するのはそれら以降と考えられる<sup>34)</sup>。また、興味深いことに、同時に血清 EPO 濃度の上昇、網状赤血球数増加は、血清 TPO 濃度や血小板数の変動に類似した時間的挙動を呈した。EPO は TPO と細胞内におけるシグナル伝達がクロスすることが知られ、巨核球前駆細胞の増殖、分化を促進させることが報告されている<sup>35)</sup>。また、EPO と TPO が構造上類似していること<sup>36)</sup>、ATRA により EPO 遺伝子の転写活性増強を認めたことより<sup>37)</sup>、ATRA により EPO 発現増強が生じ、血小板増加に一部関与している可能性も考えられた。

ヒトにおける TPO の発現は肝臓、腎臓にて恒常的であるが、血小板数減少時に骨髓間質細胞で高発現することが報告されている<sup>16,20)</sup>、同時に本研究において、APL 患者で ATRA 治療経過中に血小板数の増加に伴い血清 TPO 濃度の増加を認めたことより、ATRA が直接骨髓間質細胞に作用し、TPO の発現増強を介して血小板数増加をきたすと仮説を立て検証を行なった。ヒト骨髓間質細胞株 KM101 細胞とヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 細胞を用い、定量 RT-PCR 法により ATRA 投与前後での TPO mRNA 発現を比較したところ、骨髓間質細胞株で ATRA による TPO 発現上昇が認められた。本研究では KM101 細胞、HepG2 細胞を用いたが、それ以外の正常ヒト骨髓細胞、正常ヒト肝細胞についても更に詳細な検討を加えるべきと考えられる。また、ATRA による TPO の発現増強機構をより明確にするため、TPO 遺伝子の 5'側プロモーター領域をデータベースにより検索したところ、5 塩基を挟む直列 6 塩基配列、(A/G)G(G/T)TCA から構成される RARE (DR5) と 3 塩基異なり、かつ、RAR $\beta$  遺伝子の 5'プロモーター領

域に存在する RARE ( $\beta$ RARE) と 2 塩基の差異をもつ RARE (TPO-RARE : 5'-GGaTCA AGGTC AGGcCA-3') を見出した<sup>21,29)</sup>。近年、RA-binding protein II 遺伝子や、ets-1 遺伝子の 5'側プロモーター領域に RARE と数塩基変異を認めるレチノン酸応答領域を介した ATRA による転写活性増強が報告されているが<sup>38,39)</sup>、我々も ATRA レセプターである RAR $\alpha$  蛋白が特異的に TPO-RARE に結合することを EMSA 法により確認した。さらに、骨髓間質細胞株 KM101 細胞の蛋白抽出物と TPO-RARE が特異的に結合し、ATRA によりプローブ蛋白複合体の結合変化が生ずることを EMSA 法により確認した。これらの結果から、骨髓間質細胞において、ATRA により TPO-RARE に結合する細胞抽出物由来蛋白複合体の変化が明らかになった。一方、ATRA は RARE に結合するレセプター (RARs, RXRs) に定常状態で結合している転写抑制因子群 (コリプレッサー) を遊離させ、転写活性因子群 (コアクチベーター) を結合させることで ATRA 応答遺伝子の転写活性を上昇させると報告されている<sup>23)</sup>。EMSA 法にて、ATRA 刺激により  $\beta$ RARE プローブと ATRA 耐性 APL 細胞株蛋白抽出物との結合が変化せず、ATRA 感受性 APL 細胞株において細胞蛋白プローブ複合体の結合変化が生じ、RAR $\alpha$  遺伝子発現が増強されたとの報告と同様に<sup>40)</sup>、本研究においても、ATRA によって、転写因子群を含めたプローブ蛋白複合体の結合変化が生じて、TPO-RARE を介する TPO 遺伝子発現調節機構が存在すると予想されるが、この点に関しては今後詳細な検討を要すると考える。

最後に、骨髓間質細胞において、TPO 遺伝子のプロモーター領域に存在する TPO-RARE の機能につき検討した。TPO-RARE を含む 5'側プロモーター領域配列とルシフェラーゼ発現遺伝子を組み込んだベクター pLUC-TPO-RARE を、骨髓間質細胞株 KM101 細胞へ遺伝子導入し、ATRA 刺激の有無でルシフェラーゼ活性を測定することで、骨髓間質細胞での ATRA による TPO-RARE 配列を介する TPO 遺伝子転写活性を検討した。pLUC-TPO-RARE を導入した KM101 細胞において ATRA 刺激後、約 2.2 倍のルシフェラーゼ活性上昇を認めた。一方、TPO-RARE 配列を変異させた mutant TPO-RARE を含む pLUC-mutant-TPO-RARE を導入した細胞ではルシフェラーゼ活性の上昇が約 1.2 倍に留まった。これらの結果から TPO-RARE を介した TPO 遺伝子の発現が増強される機構の存在が証明された。

本研究は ATRA による分化誘導療法を施行した

APL症例において、血小板数増加と血清TPO濃度上昇が相関関係を有する事を初めて明らかにした。さらに、骨髓間質細胞において、TPOの5'側プロモーター領域に存在するRAREを見出すとともに、ATRAによる直接的なTPO遺伝子の発現増強機序を立証した。

## 総 括

ATRAによる分化誘導療法中のAPL症例における血小板増多と、血清サイトカイン濃度、特に血清TPO濃度との関係をELISA法により検討した。更に正常骨髓間質細胞株を用いてATRAによる直接的なTPO遺伝子の転写活性の調節機構について検討した。

1. ATRAによる分化誘導療法中のAPL症例の血小板増多につき、各種血清サイトカイン濃度を測定し、血小板数増加症例ではATRAの投与後に血清TPOが上昇することを明らかにした。

2. 骨髓間質細胞株においてATRA刺激によるTPOのmRNAレベルでの発現上昇を明らかにした。また、肝細胞株ではATRA刺激によるTPO発現の変化は認められなかった。

3. TPO遺伝子の5'側プロモーター領域にRAR $\alpha$ が特異的に結合するレチノイン酸応答領域であるTPO-RAREを新たに見出し、骨髓間質細胞株抽出蛋白とTPO-RAREとの結合がATRAにより変化することを明らかにした。

4. 骨髓間質細胞株においてレポーターアッセイ法により、TPO-RAREを介したATRAによる直接的なTPO遺伝子の転写活性増強を明らかにした。

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、骨髓間質細胞においてATRAによる直接的なTPO遺伝子の転写活性の増強、発現増強により、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、血小板増多及び、TPO発現調節機構においてATRAが重要な役割を担う事を示唆するとともに、巨核球、血小板造血機能に新たな知見を付け加えるものと考えられた。

稿を終えるに当たり、本研究の機会を与えて頂き、また、御指導、御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室、池田康夫教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室、木崎昌弘講師、宮川義隆博士、東京電力病院内科、内田秀夫先生に深謝します。また、検体提供、保存や、本研究遂

行にあたり、御協力いただきました慶應義塾大学医学部内科血液研究室の諸兄に心より感謝いたします。

本研究の一部は、第42回米国血液学会、第43回米国血液学会、第42回日本臨床血液学会、第30回国際実験血液学会にて発表した。

## 文 献

- 1) Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu LX, Zhou L, Gu HT, Wang ZY : Use of all-*trans* retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72 : 567-572, 1988
- 2) Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballarini P, Berger R, Fenaux P, Degos L : All-*trans* retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood* 76 : 1704-1709, 1990
- 3) Warrell RP Jr, Frankel SR, Miller WH Jr, Sheinberg DA, Itri LM, Hittelman WN, Vyas R, Andreeff M, Tafuri A, Jakubowski A, Gabrilove J, Gordon MS, Dmitrovsky E : Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-*trans*-retinoic acid). *N Engl J Med* 324 : 1385-1393, 1991
- 4) Kanamaru A, Takemoto Y, Tanimoto M, Murakami H, Asou N, Kobayashi T, Kuriyama K, Ohmoto E, Sakamaki H, Tsubaki K, Hiraoka H, Yamada O, Oh H, Saito K, Matsuda S, Minato K, Ueda T, Ohno R : All-*trans* retinoic acid for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 85 : 1202-1206, 1995
- 5) de The H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A : The t (15 ; 17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor  $\alpha$  gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347 : 558-561, 1991
- 6) Warrell RP Jr, de The H, Wang ZY, Degos L : Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 329 : 177-189, 1993
- 7) Losada R, Espinosa E, Hernandez C, Dorticos E, Hernandez P : Thrombocytosis in patients with acute promyelocytic leukaemia during all-*trans* retinoic acid treatment. *Br J Haematol* 95 : 704-705, 1996
- 8) Kentos A, Le Moine F, Crenier L, Capel P, Meyer S, Muus P, Mandelli F, Feremans W : All-*trans* retinoic acid induced thrombocytosis in a patient with acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 97 : 685, 1997
- 9) Kinjo K, Kizaki M, Takayama N, Michikawa N, Oda A, Okamoto S, Tahara T, Kato T, Miyazaki H, Ikeda Y : Serum thrombopoietin and erythropoietin levels in patients with acute promyelocytic leukaemia during all-*trans* retinoic acid treatment. *Br J Haematol* 105 : 382-387, 1999

- 10) Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li Y-S, Lu HS, Martin F, Chang M-S, Samal B, Nichol JL, Swift S, Johnson MJ, Hsu R-Y, Parker VP, Suggs S, Skrine JD, Merewether LA, Clogston C, Hsu E, Hokom MM, Hornkohl A, Choi E, Pangelinan M, Sun Y, Mar V, McNinch J, Simonet L, Jacobsen F, Xie C, Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trollinger D, Sieu L, Padilla D, Trail G, Elliott G, Izumi R, Covey T, Crouse J, Gracia A, Xu W, Del Castillo J, Biron J, Cole S, Hu MC-T, Pacifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Bosselman RA : Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 77 : 1117-1124, 1994
- 11) de Sauvage FL, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang W-J, Oles KJ, Hultgren B, Solberg LA, Jr, Goeddel DV, Eaton DL : Stimulation of megakaryopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369 : 533-538, 1994
- 12) Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AFT, Mathews SL, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC : Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*. *Nature* 369 : 565-568, 1994
- 13) Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopoulou T, Foster DC : Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 369 : 568-571, 1994
- 14) Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, Methia N, Breton-Gorius J, Cosman D, Vainchenker W : cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 369 : 571-574, 1994
- 15) Kato T, Ogami K, Shimada Y, Iwamatsu A, Sohma Y, Akahori H, Horie K, Kokubo , Kudo Y, Maeda E : Purification and characterization of thrombopoietin. *J Biochem (Tokyo)* 118 : 229-236, 1995
- 16) Sungaran R, Markovic B, Chong BH : Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using *in situ* hybridization. *Blood* 89 : 101-107, 1997
- 17) Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC : Thrombopoietin in thrombocytopenic mice : evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. *Blood* 87 : 567-573, 1996
- 18) Kuter DJ, Rosenberg RD : The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 85 : 2720-2730, 1995
- 19) McCarty JM, Sprugel KH, Fox NE, Sabath DE, Kaushansky K. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* 86 : 3668-3675, 1995
- 20) Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, Kuga T, Kuroda H, Kusakabe T, Sasaki K, Fujikawa K, Kato J, Kogawa K, Koyama R, Niitsu Y : Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. *Blood* 92 : 46-52, 1998
- 21) Umesono K, Murakami KK, Thompson CC, Evans RM : Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65 : 1255-1266, 1991
- 22) Mader S, Leroy P, Chen JY, Chambon P : Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J Biol Chem* 268 : 591-600, 1993
- 23) Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391 : 811-814, 1998
- 24) Tahara T, Usuki K, Sato H, Ohashi H, Morita H, Tsumura H, Matsumoto A, Miyazaki H, Urabe A, Kato T. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum : serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haematological disorders. *Br J Haematol* 93 : 783-788, 1996
- 25) Glantz SA : *Primer of Biostatistics*, 3rd Ed, McGraw-Hill, New York, p. 353-365, 1992
- 26) Harigaya K, Handa H : Generation of functional clonal cell lines from human bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 3477-3480, 1985
- 27) Dignam JP, Lebowitz RM, Roeder RG : Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11 : 1475-1489, 1983
- 28) Kamura T, Handa H, Hamasaki N, Kitajima S : Characterization of the human thrombopoietin gene promoter. A possible role of an Ets transcription factor, E4TF1/GABP. *J Biol Chem* 272 : 11361-11368, 1997
- 29) de The H, Vivanco-Ruiz MM, Tiollais P, Stunnenberg H & Dejean A : Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* 343 : 177-180, 1990
- 30) Leroy P, Nakshatri H, Chambon P : Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 10138-10142,

1991

- 31) Ishida A, Miyakawa Y, Tanosaki R, Wakui M, Ueno H, Watanabe R, Awaya N, Tahara T, Kato T, Miyazaki H, Oda A, Kizaki M, Okamoto S, Ikeda Y. Circulating endogenous thrombopoietin, interleukin-3, interleukin-6 and interleukin-11 levels in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 65 : 61-69, 1996
- 32) Kimura F, Nakamura Y, Sato K, Wakimoto N, Kato T, Tahara T, Yanada M, Nagata N, Motoyoshi K : Cyclic change of cytokines in a patient with cyclic thrombocytopenia. *Br J Haematol* 94, 171-174, 1996
- 33) Schrezenmeier H, Griesshammer M, Hornkohl A, Nichol JL, Heimpel H, Kubanek B, Raghavachar A : Thrombopoietin serum levels in patients with aplastic anaemia : correlation with platelet count and persistent elevation in remission. *Br J Haematol* 100 : 571-576, 1998
- 34) Nakajima H, Kizaki M, Takayama N, Kawai Y, Watanabe K, Okamoto S, Ikeda Y : Proposals for the objective indices for evaluating the differentiation of leukemic cells by all-*trans* retinoic acid in the patients with acute promyelocytic leukemia. *Jpn J Clin Hematol* 37 : 208-213, 1996
- 35) Ishibashi T, Koziol JA, Burstein SA : Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes *in vitro*. *J Clin Invest* 79 : 286-289, 1987
- 36) Kaushansky K : Thrombopoietin : the primary regulator of platelet production. *Blood* 86 : 419-431, 1995
- 37) Kambe T, Tada-Kambe J, Kuge Y, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, Sasaki R : Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer. *Blood* 96 : 3265-3271, 2000
- 38) Astrom A, Pettersson U, Chambon P, Voorhees JJ : Retinoic acid induction of human cellular retinoic acid-binding protein-II gene transcription is mediated by retinoic acid receptor-retinoid X receptor heterodimers bound to one far upstream retinoic acid-responsive element with 5-base pair spacing. *J Biol Chem* 269 : 22334-22349, 1994
- 39) So EN, Crowe DL : Characterization of a retinoic acid responsive element in the human ets-1 promoter. *IUBMB Life* 50 : 365-370, 2000
- 40) Shao W, Benedetti L, Lamph WW, Nervi C, Miller WH Jr : A retinoid-resistant acute promyelocytic leukemia subclone expresses a dominant negative PML-RAR alpha mutation. *Blood* 89 : 4282-9, 1997
-



学位論文

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) promoter/  
enhancer を用いた組織特異的自殺遺伝子治療

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室

(指導：村井 勝教授)

うち た あつし  
内 田 厚

(平成 14 年 11 月 21 日受付)

Key Word : suicide gene therapy, PSMA enhancer, cytosine deaminase, prostate cancer, *in vivo*

米国における統計によると、前立腺癌は男性の全悪性新生物中、罹患率 1 位、死亡率 2 位である。近年、本邦においても前立腺癌は著明な増加傾向にあり<sup>1)</sup>、黒石らによると 2015 年の前立腺癌死亡数は 1995 年の 2.93 倍に増加するであろうと予測されている<sup>2)</sup>。

前立腺癌患者に対する内分泌療法は Huggins らが報告して以来<sup>3)</sup>、全身的な治療法として広く普及している。しかし骨転移を伴う前立腺癌においては、治療開始後平均 12 ヶ月から 18 ヶ月で内分泌療法耐性が出現し、最終的に癌の増殖を制御することが不可能となる<sup>4,5)</sup>。したがって前立腺癌の長期予後を改善する方法として、内分泌療法にかわる、もしくはそれに併用する新たな治療法の開発が求められている。

外来遺伝子を個体内に導入発現させることによって効果を発揮する遺伝子治療は、Cline らにより報告されて以来<sup>6)</sup>最も注目される新技術の一つである。抗真菌剤 5-fluorocytosine (5-FC) を、抗腫瘍作用を有する 5-fluorouracil (5-FU) に変換する cytosine deaminase (CD) や、抗ウイルス剤である gancyclovir をリン酸化合物に変換させる thymidine kinase (TK) など、プロドラッグを代謝して傷害性を誘導する自殺遺伝子治療は、Mullen, Austin, Culver らにより 1990 年代前半に相次いで報告された<sup>7-9)</sup>。これらの自殺遺伝子治療では、遺伝子が導入された細胞のみでなく、周囲に存在する非

遺伝子導入細胞にも殺細胞効果が認められ (bystander 効果)、遺伝子導入効率の限られる癌治療に適する特性と考えられる。

遺伝子の発現には、RNA polymerase II が一連の転写因子の修飾を受けて、遺伝子上流に位置する transcription initiation site に結合する必要がある。この遺伝子上の結合領域は promoter 配列と呼ばれ、promoter 配列以外に遺伝子発現に関与する領域を転写調節領域と呼ばれる。遺伝子の転写、翻訳は、1. 関与する転写因子の発現量と DNA 上の結合配列の存在、2. 遺伝子に結合しているヒストン蛋白などの結合状態、3. 転写調節領域の塩基のメチル化、4. messenger RNA の安定性、など多岐の要因によって影響される。転写調節領域のうち、遺伝子との位置関係や塩基配列の方向に依存せず正の転写活性をもつ遺伝子配列は、特に enhancer と呼ばれる。真核生物の多くの遺伝子はこの enhancer 配列によって細胞特異的な発現を規定されている。cytomegarovirus (CMV) promoter/enhancer は、多くの哺乳動物の細胞内で最も強力な転写調節活性を持つが、肝臓内の腫瘍に対する遺伝子導入動物実験モデルで用いられ、重篤な肝障害が生じたことが報告されている<sup>10,11)</sup>。癌細胞特異的に外来遺伝子を発現させる方法として腫瘍マーカーの発現調節機構を利用することは副作用を減らす上で極めて有用であると考えられ、結腸

本論文は Uchida A, O'Keefe DS, Bacich DJ, Molloy PL and Heston WD : *In vivo* suicide gene therapy model using a newly discovered prostate-specific membrane antigen promoter/enhancer : a potential alternative approach to androgen deprivation therapy. *Urology* 58 : 132-9, 2001 より Elsevier Science, Inc. の許可を得て引用した。 (© 2001, Elsevier Science, Inc.) また、本論文は Wiley-Liss, Inc. の許可を得て (© 2000, Wiley-Liss, Inc.), O'Keefe DS, Uchida A, Bacich DJ, Watt FB, Martorana A, Molloy PL and Heston WD : Prostate-specific suicide gene therapy using the prostate-specific membrane antigen promoter and enhancer. *Prostate* 45 : 149-157, 2000 の一部を転載した。

癌に対して carcinoembryonic antigen (CEA)<sup>12)</sup>, 肝癌に対して alpha-fetoprotein (AFP)<sup>13)</sup>, そして前立腺癌に対しても prostate specific antigen (PSA) の promoter/enhancer を用いた自殺遺伝子療法が報告されており<sup>14-16)</sup>, 一部ですでに臨床試験が行われている<sup>17)</sup>.

Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) は前立腺上皮細胞の細胞膜に発現する約 100 kD の糖蛋白で<sup>18)</sup>, folate hydrolase<sup>19)</sup>, N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase<sup>20)</sup>活性を持つ。これらの活性はいずれも基質中のグルタミン酸残基を加水分解する点で共通である。細胞膜上の PSMA にモノクローナル抗体が結合することにより PSMA-抗体複合体は細胞内に取り込まれることが知られ<sup>21)</sup>, この現象は internalization と呼ばれている。transferrin receptor は鉄の細胞内輸送に関わる膜蛋白で、PSMA と 54% の相同性をもち<sup>18)</sup>, 同様に抗体の結合で internalizaion をおこすことから、PSMA も葉酸、もしくは他の物質の細胞内輸送に関与すると考えられている<sup>22)</sup>。現在臨床的に最も有用な前立腺腫瘍マーカーである PSA は前立腺上皮が産生する分泌蛋白であり、アンドロゲン存在下で分泌亢進し、逆に内分泌療法下では抑制される<sup>23,24)</sup>。そのため遺伝子治療への応用に当たっては、promoter/enhancer 構造の遺伝子工学的改変により内分泌療法との併用の試みがなされている<sup>25,26)</sup>。一方、PSMA は前立腺上皮細胞の構造蛋

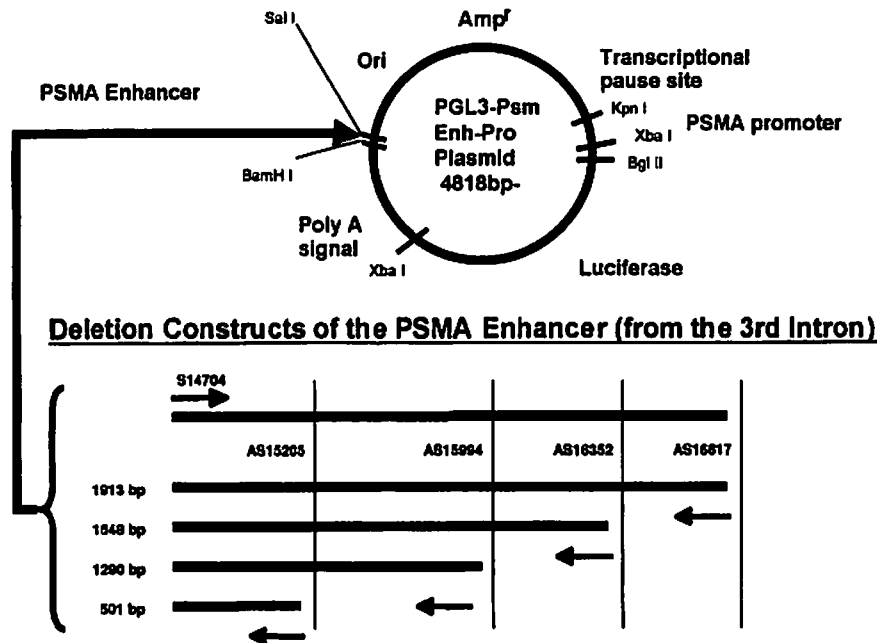
白であり、内分泌療法によりむしろ発現が増強することから<sup>27)</sup>, 将来の臨床応用可能な前立腺癌マーカーとしてだけでなく、治療における分子標的として有望である<sup>28)</sup>。

第 11 番染色体短腕に位置する PSMA の遺伝子構造は共同研究者の O'Keefe らにより解明された<sup>29)</sup>。我々はさらに PSMA 遺伝子の発現を制御する enhancer 領域を PSMA 遺伝子の第 3 イントロン中に見出した。本研究は、PSMA enhancer の前立腺癌細胞における活性、および特異性について検証するとともに、自殺遺伝子治療モデルを用いて臨床応用への可能性について検討する事を目的とした。

## 実験の方法

### 1. 細胞株と細胞培養

ヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞<sup>30)</sup>, 結腸癌細胞株 HCT8 細胞<sup>31)</sup>, 前立腺癌細胞株 LNCaP 細胞<sup>32)</sup>を American Type Culture Collection (ATCC ; Rockvill, MD, USA) より購入した。これらの細胞を 2 mM の L-glutamine (Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA) と 10% ウシ胎児血清 (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA) を含む RPMI 1640 培地 (Life Technologies Inc.) で 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。ヒト肺癌細胞株 H157 を同じく ATCC より購入し、2 mM L-



第 1 図 PSMA enhancer の deletion construct と Firefly luciferase 発現プラスミドの構造。Firefly luciferase の転写は同遺伝子の上流に組み込まれた PSMA promoter および下流に組み込まれた PSMA 第 3 イントロン由来 deletion construct により調節される。

glutamine, 1.5 g/l sodium bicarbonate, 4.5 g/l glucose, 10 mM HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid), 1.0 mM sodium pyruvate と 10% FBS を混じた RPMI 1640 にて培養した。LNCaP 細胞のホルモン不応性サブタイプである C4-2 細胞<sup>29)</sup>を UroCor Laboratories (Oklahoma City, OK, USA) より購入し、LNCaP 細胞と同様の条件で培養した。

## 2. PSMA enhancer の deletion construct の作製

PSMA 遺伝子配列 (Genebank accession number : AF007544) の上流 1064 塩基配列 (-1244 より -180 nts) を PSMA promoter として、Firefly luciferase 発現ベクターである pGL3-Basic プラスミド (Promega, Madison, WI, USA) に組み込まれた pGL3-B-PSM<sup>29)</sup>を以下の実験に用いた (第 1 図)。PSMA promoter の cloning における PCR には genomic DNA NA1944 (Coriell Cell Repositories, Camden, NJ, USA) を鋳型として用いた。この DNA はヒト染色体 11pter-cen が転座によりハムスター染色体に挿入された体細胞ハイブリッドで、ヒト染色体 11q に位置する PSMA に相同性のある遺伝子配列を、PCR template に混じらないために使われた。次に下記のごとく BamHI site をもつ他種類の primer を用いて、領域の異なる PSMA enhancer の deletion construct を作製した。PCR 産物を制限酵素 BamHI にて処理し、先の pGL3-B-PSM または pGL3-promoter (Promega, SV40 promoter を含む enhancer を含まない対照プラスミド) の BamHI site に挿入した。PCR には

S14704 : 5'CGCGGATCCGCCTTCTAAAATGAGTTGGG3' を sense primer とし、

AS 15205 : 5'CGCGGATCCCAACATAGTGAACACGTC3' (501bps)

AS 15573 : 5'CGCGGATCCTGAGAAAAGATTGCCAACGC3' (869 bps)

AS 15994 : 5'CGCGGATCCATTAGGTTCCAAAGGAAGCC3' (1290 bps)

AS 16352 : 5'CGCGGATCCGGCTACTACATAAGTATAAGTC3' (1648 bps)

AS 16617 : 5'CGCGGATCCATGACACCAAAGCTTAGGG3' (1913 bps)

を antisense primer として使用した (下線は primer 中にデザインされた BamHI site, 括弧内は増幅された PCR 産物の塩基数)

## 3. PSMA promoter/enhancer の転写調節活性解析

24 well plate に各細胞を 24 時間培養し、約 50% confluency で Lipofectamine PLUS Reagent (Life technologies) を用いて先の deletion construct をもつ 400 ng のプラスミドと、100 ng の pRL プラスミド (SV40 promoter, enhancer により Renilla luciferase を発現するプラスミド, Promega) とともに Optimem (Gibco BRL) 培地で遺伝子導入した。遺伝子導入の 2 日後に細胞融解液を回収し、luciferase assay まで -20℃ で凍結保存した。luciferase 活性の定量には Dual Luciferase Kit (Promega) を用いた。対照プラスミドとして、pGL3-Basic (promoter なし), pGL3-Control (SV40 promoter/SV40 enhancer), pGL3-promoter (SV40 promoter のみ) を用いた。全ての条件で 3 つの異なるサンプルを作り、Firefly luciferase 活性測定値を Renilla luciferase 活性測定値で除した値を遺伝子導入効率補正後 Firefly luciferase 活性とし、3 サンプルの平均を計算して各条件間で比較した。

## 4. 前立腺特異的 CD 遺伝子発現ベクターの作製

真核生物の翻訳開始シグナルを持つべく改変された大腸菌 cytosine deaminase 遺伝子 cod A (Genebank accession number : S56903) を持つ pCD プラスミドから、制限酵素 XbaI で切り出した改変 codA (以下 CD 遺伝子) を、XbaI で消化して luciferase 遺伝子を除去した pGL3-B-PSM-Enh1648 に組み換えた。この際、改変 CD を発現するべき sense 方向、ならびにその逆方向 (antisense) にサブクローニングされたプラスミド、それぞれ pPSM/CD-sense, pPSM/CD-antisense を作製し、以下の実験に用いた。

## 5. 一過性遺伝子導入と細胞傷害性試験

24 well plate を用いて各細胞を 24 時間培養し、pPSM/CD-sense, pPSM/CD-antisense, もしくは SV40 promoter/enhancer の転写制御下で  $\beta$ -galactosidase を発現する pSV- $\beta$ -gal プラスミド (Promega) で、前述のごとく遺伝子導入を行った。遺伝子導入の 48 時間後から各種濃度の 5-FC を細胞に暴露して 3 日間培養し、細胞傷害性を MTS Assay (CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) にて定量した<sup>30)</sup>。同様に親株細胞における 5-FU, 5-FC の感受性を測定し、遺伝子導入細胞と比較した。5-FC の暴露開始と同時に pSV- $\beta$ -gal プラスミドにて遺伝子導入した細胞を in situ X-gal 染色法で染色し、遺伝子導入効率を計測した。

## 6. in situ X-gal 染色法

24 well plate に培養された細胞から培養液を拭き除去した後、0.05% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mi, USA) の 10 mM phosphate buffer saline (PBS) 溶液 (PH 7.4) を加え、15 分間室温にて固定した。固定液を吸引除去し、PBS を各ウェルに添加して室温で 10 分間の攪拌洗浄し、これを 3 回繰り返した。その後 X-gal 溶液 5 mM ferricyanide (Sigma-Aldrich Co.), 5 mM ferrocyanide (Sigma-Aldrich Co.), 2 mM magnesium chloride (Sigma-Aldrich Co.) と、1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indol- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Co.) 溶液を 24 well plate に添加し、37°C で一晩反応させた。顕微鏡下で少なくとも 1000 個の細胞を観察し、青色に染色された細胞を陽性としてその比率を計算した。対照として遺伝子導入していない細胞、pPSM/CD-sense プラスミドで遺伝子導入した細胞を同様の方法で処理し、非特異的染色のないことを確認した。

## 7. 遺伝子導入細胞の CD 活性の定量

100 mm 培養皿にて C4-2 細胞、H157 細胞を 24 時間前培養し、前述と同様の方法で pPSM/CD sense、もしくは pPSM/CD-antisense プラスミドを一過性遺伝子導入した。48 時間後に、細胞を trypsin 処理して細胞 pellet として回収し、-20°C で保存した。110  $\mu$ l の蒸留水を加えて 5 回の凍結融解を繰り返し細胞を破壊した後、14000 g、4°C、30 分の遠心分離で上清を回収した。このうち 10  $\mu$ l を蛋白定量に用い、残る 100  $\mu$ l を酵素活性定量に用いた。蛋白定量には BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いた。3 mM 5-FC を含むリン酸緩衝液 900  $\mu$ l それぞれ 100  $\mu$ l の細胞融解液を混じ、分解される 5-FC の濃度を分光光度計で測定した。西山らの方法<sup>35)</sup>に従い、波長 290 nm および 250 nm の吸光度 A290、A250 を同時に測定して 5-FC (mM) = 0.119  $\times$  A290 - 0.025  $\times$  A255 を計算した。

1 mg の細胞融解液により 1 分あたりに分解される 5-FC の量 (nM) をもって CD 活性 1 U と定義した。後述の安定遺伝子導入細胞の CD 酵素活性も同様に測定した。

## 8. 安定遺伝子導入 C4-2 細胞のクローニング

pPSM/CD-sense もしくは pPSM/CD-antisense プラスミドを、Selectavectra-Neo プラスミド (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) とともに C4-2 細胞の

遺伝子導入に用いたのち、750  $\mu$ g/ml の活性 G418 (Life Technologies) を含んだ培養液で 3 週間の培養を行った。選択された細胞のコロニーをクローニングし、抽出した DNA を用いて PCR で CD 遺伝子の存在を確認した。さらに選択された細胞について CD 酵素活性を定量し、5-FC に対する感受性を後述の方法で測定した。

## 9. 安定遺伝子導入細胞の 5-FC 細胞傷害試験

クローニングされた各々  $9.0 \times 10^3$  の安定遺伝子導入細胞を、48 well plate に 24 時間前培養し、50% confluency の細胞に対して異なる濃度の 5-FC の暴露を 3 日間継続した。MTS Assay を用いて細胞数を定量し、IC50 を算出した。

## 10. CD 発現細胞の 5-FC 暴露による Bystander 効果の検討

24-well plate 上で、CD 発現安定遺伝子導入 C4-2 細胞を親株 C4-2 細胞 に対して 0, 20, 40, 60, 80, 100% の割合で混合し、各ウェルに計  $2.5 \times 10^4$  個の細胞数として 24 時間前培養した。500  $\mu$ M の 5-FC を含む培地で 4 日間培養したのち、細胞数を MTS assay にて定量して IC50 を測定した。対照のため同様に CD 非発現 (antisense) 安定遺伝子導入 C4-2 細胞を親株 C4-2 細胞 に混合して同じ条件で実験を行った。

## 11. 培地を介した殺細胞効果の検討

$1.2 \times 10^5$  個の CD 発現安定遺伝子導入 C4-2 細胞を 6 well plate に 24 時間培養し、0, 500, または 1000  $\mu$ M の 5-FC を混じた培養液に交換して 3 日間培養を続けた。培養液を回収して trypsin 処理ののち細胞を回収し、trypan blue 法で細胞数を計測した。回収した培養液を 4°C で毎分 1500 回転で 5 分間遠心し上清を回収した。回収した各々の上清 250  $\mu$ l を、あらかじめ 24 時間培養した 24 well plate 上の培養液 250  $\mu$ l 中の  $2.5 \times 10^4$  個/well の親株 C4-2 細胞 に添加した。4 日間培養後、細胞数を MTS assay にて定量した。対照のため、CD 非発現 (antisense) 安定遺伝子導入 C4-2 細胞を同様に用いた。また同時に、回収した培養液のかわりに新鮮な培養液を添加する親株 C4-2 細胞 の対照実験も行った。

## 12. ノードマウス皮下腫瘍モデルにおける遺伝子導入前立腺癌細胞に対する 5-FC の抗腫瘍効果

*in vitro* にて PSMA enhancer/promoter の制御により CD を発現する遺伝子導入 C4-2 細胞 (CD sense)、

同じ遺伝子発現調節配列を持ちながら CD 遺伝子をアンチセンス方向に挿入されているため遺伝子発現しない遺伝子導入 C4-2 細胞 (CD antisense), および無処置の親株 C4-2 細胞をそれぞれ 33 匹ずつ, 計 99 匹のヌードマウス (BALB/c nu/nu, Charles-River Laboratories, Inc., Boston, MA, USA) に移植した。移植には  $5.0 \times 10^6$  個の細胞を 0.5 ml の matrigel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) に混じて各マウスの左季肋部皮下に皮下注射する方法で行った。CD antisense 群のうち腫瘍の生着を確認できなかった 1 匹を実験から除外した。残りの 98 匹に対して腫瘍移植 7 日後より以下の治療を行った。すなわち, 上記の 3 群を各々 5-FC 投与群, 生理食塩水投与群に分け, 第 1 群として親株 C4-2 細胞移植, 5-FC 治療群 (parental, 5-FC), 第 2 群として親株 C4-2 細胞移植, 生理食塩水治療群 (parental, saline), 第 3 群として CD sense 移植, 5-FC 治療群 (CD sense, 5-FC), 第 4 群として CD sense 移植, 生理食塩水治療群 (CD sense, saline), 第 5 群として CD antisense 移植, 5-FC 治療群 (CD antisense, 5-FC), 第 6 群として CD-antisense 移植, 生理食塩水治療群 (CD antisense, saline) の計 6 群を設けた。5-FC 治療群には, 0.5 から 0.75 ml の 5-FC 生理食塩水溶液 (24 mg/ml) の 1 日 2 回の腹腔内投与 (600 mg/kg) を 21 日間継続した。対照の生食治療群にはマウスの体重にあわせて同様に 0.5 ml から 0.75 ml の生理食塩水を腹腔内投与した。各週毎にマウスの体重, 腫瘍径を計測した。予測腫瘍重量  $W$  (mg) は 3 方向の腫瘍直径 (長径  $L$ , 短径  $M$ , 厚さ  $N$ ) (mm) から

$$W = 0.5 \times L \times M \times N$$

の近似式を用いて計算した。さらに治療開始 21 日後に腫瘍を切除し, その湿重量を計測した。治療の前で眼窩静脈より採血し, ACTIVETM PSA Kit (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA) を用いて血清 PSA 値を測定した。切除した腫瘍を 10% 緩衝ホルマリン, および 70% エタノールで固定, パラフィン切片に包埋した。通常のヘマトキシリン-エオジン法で染色して鏡検した。

### 13. 統計学的分析

予測腫瘍重量と実測腫瘍重量, および血清 PSA 値はそれぞれ 1 次回帰分析にて相関性を検討した。腫瘍重量の群間の違いは 6 群から 2 群を選ぶすべての組み合わせで Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。この際, 有意水準を 5% とするため, Bonferroni の方法に基づいて個々の検定で  $p < 0.003$  ( $= 0.05/\%C_2$ ) を有

意とした。

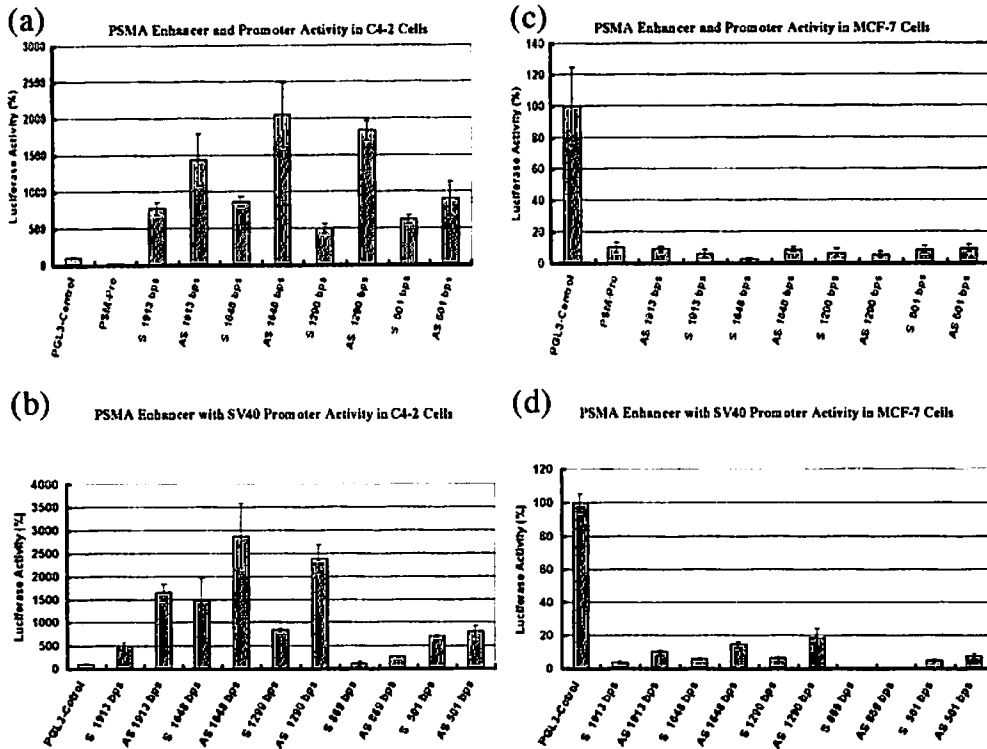
## 結 果

### 1. PSMA promoter/enhancer の転写調節活性解析

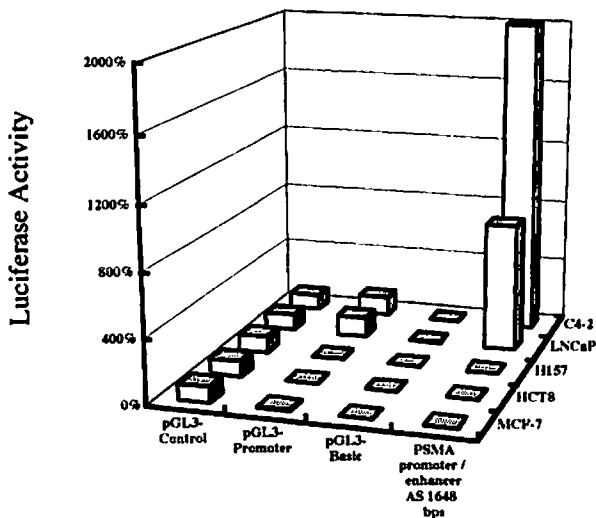
PSMA 遺伝子の第 3 イントロン中の塩基配列の中で, 最も活性の高い enhancer を同定するため, C4-2 細胞と MCF-7 細胞を用いて luciferase assay を行った (第 2 図)。前立腺癌細胞株である C4-2 細胞では, PSMA promoter と組み合わせて検討した deletion construct のうち antisense 方向に挿入された 1.6 kb (AS 1648bps) の転写調節活性が最も強く, PSMA promoter 単独に比較して約 100 倍で, SV40 promoter と SV40 enhancer の組み合わせ (pGL3 Control) より約 20 倍の reporter 活性であった (第 2 A 図)。さらに AS 1648 bps は SV40 promoter と組み合わせた場合 (SV40 promoter/PSMA enhancer) SV40 promoter 単独 (SV40 promoter only) に比して 130 倍の活性増強が認められ (data not shown), pGL3 Control (SV40 promoter/SV40 enhancer) よりも 29 倍活性が高かった (第 2 B 図)。一方, PSMA promoter/enhancer は乳癌細胞株 MCF-7 細胞ではほとんど転写調節活性を持たず, SV40 promoter/PSMA enhancer の組み合わせでも同様であった。PSMA を発現しない肺癌細胞株 H 157, 結腸癌細胞株 HCT8 でも同様で, PSMA enhancer の 1648 bps の deletion construct と PSMA promoter との組み合わせによる転写調節活性は pGL3 Control に比してそれぞれ 0.8%, および 0.9% だった (第 3 図)。PSMA promoter/enhancer は前立腺癌細胞株 LNCaP では pGL3 Control (SV40 promoter/SV40 enhancer) の 8 倍の reporter 活性を示した。

### 2. 一過性遺伝子導入細胞の 5-FC による殺細胞効果

次に PSMA promoter/enhancer の制御下で自殺遺伝子である大腸菌由来 CD を発現するベクター pPSM/CD-sense, および同遺伝子を反対方向 (antisense) に挿入した非発現性の対照プラスミド pPSM/CD-antisense を各細胞に一過性遺伝子導入し, 細胞傷害性試験にて 5-FC の感受性を調べた。pPSM/CD-sense プラスミドで遺伝子導入された C4-2 細胞では in situ X-gal 染色法により測定された遺伝子導入効率が 8% の条件下で, 5-FC の  $IC_{50}$  が 200  $\mu$ M から 300  $\mu$ M となった (第 1 表)。一方, 非遺伝子導入, または対照プラスミド pPSM/CD-antisense で遺伝子導入された細胞では各細胞ともに 5-FC の  $IC_{50}$  は 10 mM 以上で, C4-2 細



第2図 PSMA enhancer領域の発現調節活性の解析。pGL3-Controlプラスミド(SV40 promoter+enhancer)の遺伝子導入による luciferase 活性を100%としたときの、PSMA enhancer領域の各欠失変異DNA断端の発現調節活性(遺伝子導入効率を補正した luciferase 活性)を示した。(棒グラフの値は平均値, エラーバーは標準偏差。) enhancerが luciferase 遺伝子と同方向に挿入されたものを“S”, 反対方向に挿入されたものを“AS”と記した。(a) 前立腺癌C4-2細胞では、PSMA promoter, もしくは(b) SV40 promoterにPSMA enhancerを加えた場合、最大300倍までの reporter 活性増加が認められ、pGL3-Controlの20倍に相当した。それに対して(c)(d) MCF-7細胞では明らかな活性変化は認められなかった。この結果よりPSMA enhancerのAS 1648 bpsの塩基配列を最大の発現調節活性部位と同等した。(O’Keefe DS, et al. Prostate 45 : 149-157, 2000の第3図を許可を得て転載)



第3図 luciferase assayによる、各種細胞株中におけるPSMA promoter/enhancer(AS 1648bps)の活性。pGL3-Basic(promoterなし), pGL3-Promoter(SV40 promoterのみ)とpGL3-Control(SV40 promoter/SV40 enhancer)を対照として用い、pGL3-Controlの活性を100%とした時の他群の値を示した。PSMA promoter/PSMA enhancer(AS 1648bps)は前立腺癌由来のLNCaP, C4-2細胞ではSV40 promoter/SV40 enhancerに比してそれぞれ8, 20倍の活性を有する一方、MCF-7(乳癌由来), HCT8(大腸癌由来), H157(肺癌由来)細胞では、それぞれ0.5%, 0.9%, 0.8%であった。(Uchida A, et al. Urology 58 : 132-139, 2001の第1図を許可を得て転載)

第1表 各細胞における5-FU, 5-FCの感受性の比較

Cell line	Tissue origin	Activity of PSM enhancer	PSMA expression	IC <sub>50</sub> 5-FU (μM)	IC <sub>50</sub> parental (μM)	IC <sub>50</sub> 5-FC PSMA/CD (μM)	Ratio IC <sub>50</sub> of 5-FC (parental)/(PSMA/CD)	Transfection efficiency
C4-2	Prostate	20	+	1-5	15000	200-300	>50	8
LNCaP	Prostate	8	+	1-10	15000	1000-2000	10	5
H157	Lung	-	-	1-10	>20000	>10000	<2	10
HCT8	Colon	-	-	1-5	20000	15000	<2	6
MCF-7	Breast	-	-	1-5	10000	10000	<2	15

5-FU, 5-FCに対する各細胞の感受性はほぼ同様であった。しかし、pPSM/CD-sense プラスミドが遺伝子導入された時、C4-2, LNCaP 細胞では5-FCに対する感受性がそれぞれ50倍, 10倍に増強した。その際の遺伝子導入効率はそれぞれ8%, 5%と、低値であった。一方非前立腺癌由来の細胞では、pPSM/CD-sense プラスミドが遺伝子導入された場合にも5-FCに対する感受性には変化を認められなかった。(O'Keefe DS, et al. Prostate 45: 149-157, 2000 の第1表を許可を得て転載)

胞においては、CD発現プラスミドの導入により5-FCに対して50から75倍程度の感受性の増強が得られた。このconstructはPSMAを発現しないH157, HCT8, MCF-7細胞では5-FCへの感受性にほとんど影響を与えなかった。

### 3. 安定遺伝子導入細胞のクローニングとCD酵素活性、5-FCによる殺細胞効果

pPSM/CD-sense と SelectaVecta-Neo プラスミドで安定遺伝子導入したC4-2細胞を選択培地を用いて選択し、3つの異なったクローンを得た。それぞれのクローンからDNAを抽出し、PCRにてすべてのクローンでCD遺伝子陽性が確認された。各クローンでのCD酵素活性を定量したところ、3つのクローンではほぼ等しく

0.4 Uの活性が認められた。続いて5-FCに対する感受性を調べるため5-FCによる細胞傷害試験を行った。3つのクローンはいずれも250から300 μMと、同様のIC<sub>50</sub>を示した。これらの実験で対照としてpPSM/CD-senseの代わりにpPSM/CD-antisenseを用いて安定遺伝子導入C4-2細胞を選択し、少なくとも3つのクローンを得た。これらのクローンはすべてCD遺伝子を鋳型としたPCRで陽性であったが、5-FCのIC<sub>50</sub>は親株C4-2細胞と同様に10 mM以上であり、遺伝子導入による5-FCに対する感受性の増強は認められなかった。このようにしてPSMA promoter/enhancerの制御下でCDを発現する安定遺伝子導入C4-2細胞、およびその対照としてのCD非発現性のC4-2細胞が得られた。これらのうち1クローンずつを用いて以下の実験を行った。

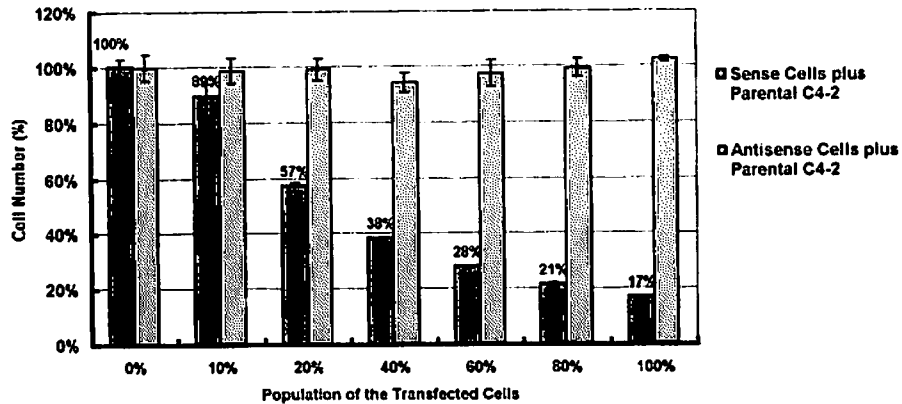
### 4. CD発現細胞の5-FC暴露によるBystander効果の検討

CD発現細胞に共存する非発現細胞に対する5-FCの増殖抑制効果を確認した(第4図)。非遺伝子導入細胞に対しては増殖抑制効果が認められない濃度である500 μMの5-FCをpPSM/CD-senseによる安定遺伝子導入C4-2細胞(CD発現C4-2細胞)に暴露すると、細胞増殖は17%に抑制された。同じ条件でCD発現C4-2細胞を親株細胞と混合培養した。前者を全体に対して10%, 20%, 40%, 60%, 80%の割合で混合し500 μM 5-FCに暴露すると親株細胞100%(遺伝子導入細胞0%)に比してそれぞれ89%, 57%, 38%, 28%, 21%の増殖抑制効果が認められた。いずれの条件でも遺伝子導入細胞の割合と同等、ないしはより多くの細胞増殖抑制効果が見られた一方、pPSM CD-antisense 遺伝子導入細胞と親株細胞を混ぜることによって行った同様の実験では、5-FCによる増殖抑制効果は認められなかった。5-FCを含まない培養条件ではこれら3者の細胞数に違いは見られなかった。以上より、CD発現細胞の5-FCへの暴露によって、混合培養した親株細胞、すなわちCD非発現細胞にも増殖抑制効果が現れることが確認された。

### 5. 培地を介した殺細胞効果の検討

上記のbystander効果について、培養液を介して増殖抑制効果が伝達されるかを検討した。CD発現C4-2細胞に500 μM, または1000 μMの5-FCを3日間暴露し、trypan blue法で細胞数を計測した結果、CD安定遺伝子導入C4-2細胞数は5-FCを含まない培養液中に比してそれぞれ6%, 8%であった。これらの培養液上清を回収し、5-FCを含まない等量の新鮮な培地にて

**Bystander Effect**  
Incubated with 5-FC for 4 Days



第4図 CD 発現細胞と、共存する非発現細胞に対する5-FCの増殖抑制効果 (bystander 効果)。非遺伝子導入C4-2細胞には増殖抑制効果のない500 μMの5-FCをpPSM/CD-senseプラスミドによる安定遺伝子導入C4-2細胞 (CD発現C4-2細胞)に暴露すると、細胞増殖は17%に抑制された。CD発現C4-2細胞と親株C4-2細胞を20%、40%、60%、80%の割合で混合し500 μM 5-FCを投与すると親株細胞100% (遺伝子導入細胞0%)に比してそれぞれ57%、38%、28%、21%の増殖抑制効果が認められた。いずれの条件でも遺伝子導入細胞の割合よりも多くの細胞増殖抑制効果が見られた一方、pPSM/CD-antisense遺伝子導入細胞 (CD非発現C4-2細胞)と親株細胞を混じることによって行った同様の実験では、5-FCによる増殖抑制効果は認められなかった。

24時間前培養された親株C4-2細胞に4日間暴露を続けると (5-FCを含まない培養液に比して) それぞれ10%、6%に細胞増殖が抑制された (第5図)。対照として新鮮培養液を加えた親株細胞と、5-FCを含まない条件でCD遺伝子導入C4-2細胞を培養した後回収した上清とを加えた親株細胞の増殖を観察したが、それらには増殖抑制効果はなかった。また比較のため行ったCD非発現 (antisense) C4-2細胞の培養後の5-FCを混じた培養液上清には、同様に親株細胞の増殖抑制効果は認められなかった。

6. ノードマウス移植遺伝子導入C4-2細胞に対する5-FCによる抗腫瘍効果

ノードマウスに移植されたCD発現C4-2細胞に対する5-FCの抗腫瘍効果を検討した。計98匹のノードマウスのうち、6匹 (第1群の1匹、第2群の3匹、第5群の1匹、第6群の1匹) は外傷による死亡、もしくは衰弱のため実験から除外された。観察期間中の各群ごとの予測腫瘍重量は第6図のように推移した。第1、3、5群には1回600 mg/kgを1日2回、計21日間腹腔内投与し、第2、4、6群には同じ容量の生理食塩水 (マウス体重1gあたり0.025 ml) の腹腔内注射を行った。実験終了時、腫瘍径3方向の計測による腫瘍予測

重量と実測重量を一次回帰法により比較し、回帰式は

$Y = 1.03 \cdot X + 322$ ,  $r = 0.954$  (Y: 実測腫瘍重量 (mg), X: 予測腫瘍重量 (mg) r: 相関係数)であった。各群における実測腫瘍重量の分布は第7図の通りであった。第3群 (sense, 5-FC) の実測腫瘍重量は他群と比して有意に小さかった ( $p < 0.0001$ )。

腫瘍マーカーである血清PSAは第3群 (sense, 5-FC) では治療前の平均濃度4.6 ng/mlから治療後0.4 ng/mlと減少した。一方、他のすべての群では治療後PSA値は上昇した (第2表)。治療後、第3群 (sense, 5-FC) のPSA値は他のどの群と比しても有意に低かった ( $p < 0.003$ )。治療後のPSA値と腫瘍実測重量との一次回帰分析により、 $Y = 0.12 X - 22$ ,  $r = 0.93$  (Y: 血清PSA値 (ng/ml), X: 腫瘍重量 (mg), r: 相関係数)の回帰式が得られ、両者の高い相関性が示された (第8図)。

7. 組織学的検討

切除した腫瘍の肉眼的観察では300 mg以上の腫瘍は出血による赤色調の外観であった。第3群 (sense, 5-FC) の腫瘍はいずれも白色調で、出血は認められなかった (第9図 (a))。ヘマトキシリンエオジン染色による病理組織学的検査では第3群の腫瘍内に癌細胞は



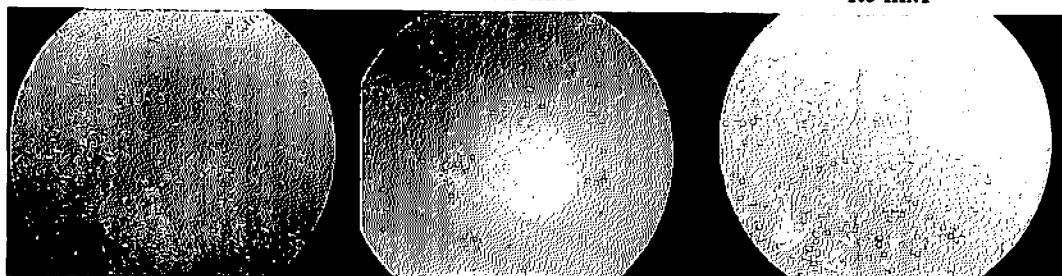
## Medium-Transduced Cytotoxicity on Parental C4-2 Cells

### Medium from C4-2 Cells Transfected with pPSM/CD-Sense

5-FC = 0 mM

0.5 mM

1.0 mM

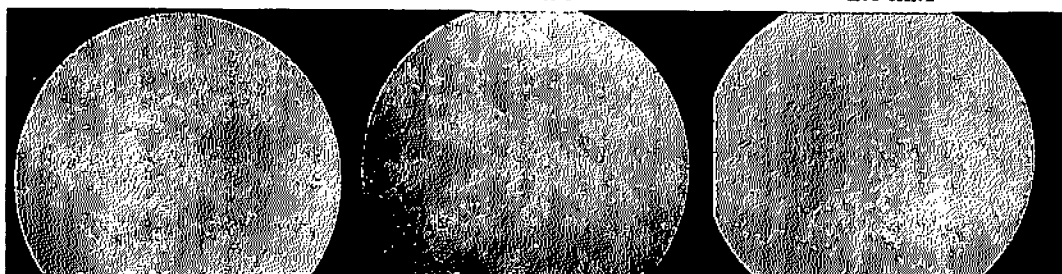


### Medium from C4-2 Cells Transfected with pPSM/CD-Antisense

5-FC = 0 mM

0.5 mM

1.0 mM



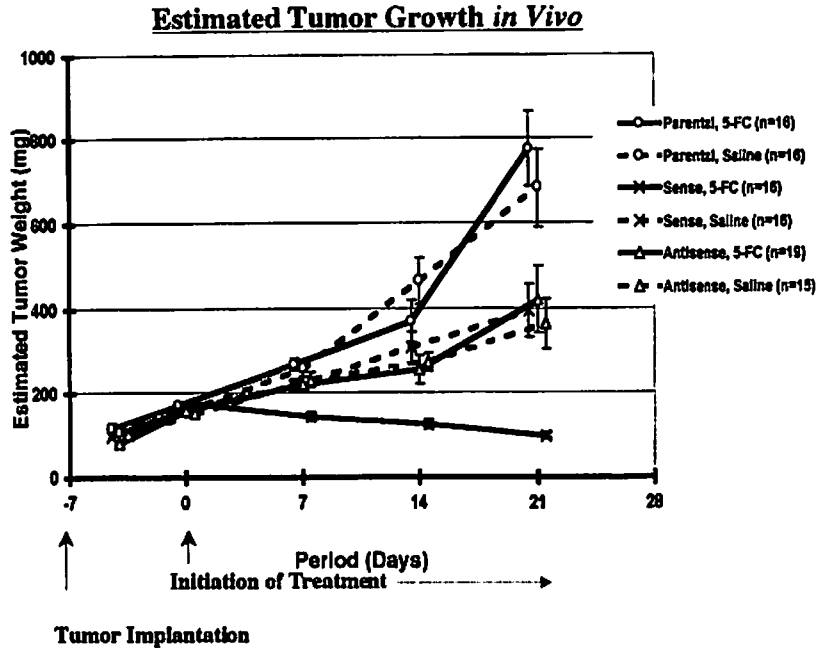
第5図 培地を介した殺細胞効果の検討。6 well plateで500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ Mの5-FCをCD発現C4-2細胞に暴露したところ通常の培地に比べてそれぞれ6%, 8%に細胞増殖が抑制された。この培地を回収して遠心し、等量の培地で前培養された親株C4-2細胞に暴露して3日間培養を続けた。5-FC濃度500  $\mu$ M由来、1000  $\mu$ M由来の培地を加えたC4-2細胞は、5-FCを含まない培地を加えたC4-2に比してそれぞれ10%, 6%に細胞増殖が抑制された。一方、対照としてCD非発現C4-2細胞(CD antisense)を同様の条件で培養したが、5-FC濃度500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M由来の培地ともに細胞増殖抑制効果は認められず、この培地上清を親株C4-2細胞に加えても細胞数は5-FC濃度0  $\mu$ M由来の培地と比して同等であり、明らかな細胞増殖抑制は認められなかった。

著明に減少し、硝子変性が見られた。(第9図(c))。これに対し他群では低分化型前立腺癌の典型的な間質の増生、腫瘍内出血などの組織像が観察された(第9図(b))。

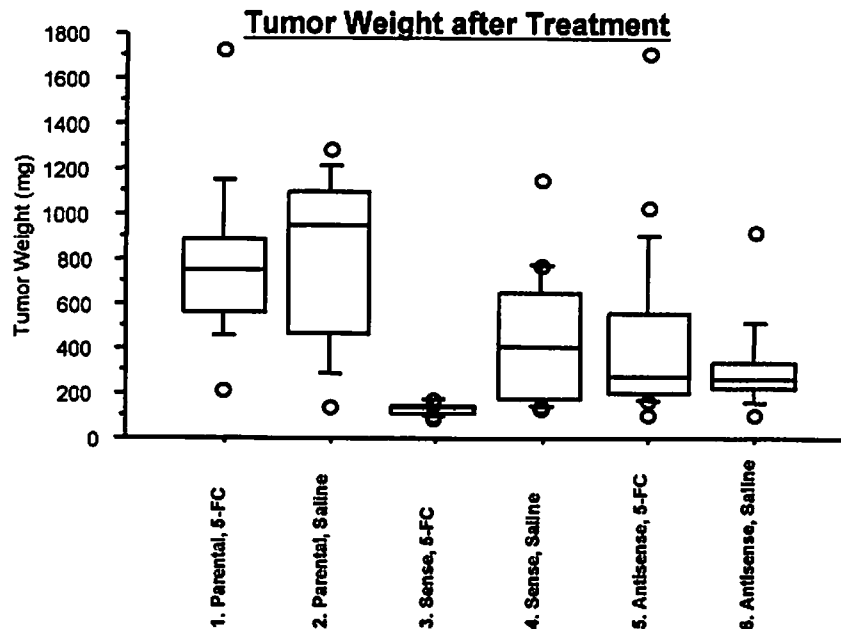
## 考 察

PSMAは前立腺上皮の細胞膜に発現する糖蛋白で<sup>36)</sup>前立腺癌で過剰発現していることが知られている。IsraeliらによりPSMAのmRNAの塩基配列が解明され<sup>37)</sup>、O'Keefeらにより19個のイントロン、20個のエクソン構造からなる、約20 kbの領域にわたるPSMA遺伝子の全構造が上流1.2 kbの領域のpromoter配列とともに解明された<sup>38)</sup>。今回、PSMA遺伝子の第3イントロン中に前立腺癌細胞特異的なenhancer活性の存

在することが見出されたが、Wattらはさらにアンドロゲン不在下ではこの活性が3から6倍に増加することを示した<sup>39)</sup>。現在前立腺マーカーとして広く臨床で用いられているprostatic acid phosphatase (PAP)やPSAのenhancerはアンドロゲン不在下で抑制される<sup>38,39)</sup>。さらに前立腺癌におけるPSA、PAPの発現は正常前立腺上皮に比して低い<sup>40)</sup>。一方、PSMAの発現が男性ホルモンの遮断により増幅される事が実験的に<sup>27)</sup>証明され、分化度の低い前立腺癌に強い発現が見られる傾向にあることが報告されている<sup>41)</sup>。このようなことからPSMAは内分泌療法下でも有用な前立腺特異的な分子標的となり得る。WattらによるとLNCaP、LAPC-4、PC-3、DU145などの前立腺癌細胞株におけるPSMA enhancerの活性は、PSMA蛋白の発現レベルに相関し、PSMA enhancerとPSMA promoterを組



第6図 ムードマウス皮下移植後の各群における、腫瘍径から計算された予測腫瘍重量。各群の点とエラーバーはそれぞれ平均値、標準誤差を示す。治療開始前は各群で平均腫瘍重量に差は見られなかった。治療開始後、第3群では平均腫瘍重量の減少が認められたが、他群では増加し第3群との間に有意差を認めた ( $p < 0.003$ )。 (Uchida A, et al. Urology 58 : 132-139, 2001 の第2図を許可を得て転載)



第7図 実験終了時の各群における実測腫瘍重量。各群の box は50%のデータを含む範囲、whisker は75%を含む範囲 (interquartile range (IQR)) を、box 中の線は平均値を示す。第1から第6群までの群の腫瘍重量の中央値はそれぞれ第1群 760 mg、第2群 956 mg、第3群 154 mg、第4群 428 mg、第5群 278 mg、第6群 278 mg で、第3群 (sense, 5-FC) の腫瘍は他のどの群よりも有意に小さかった ( $p < 0.0001$ )。 Uchida A, et al. Urology 58 : 132-139, 2001 の第3図を許可を得て転載

第2表 ノードマウス皮下腫瘍モデルの各群における治療前後の血清 PSA 濃度

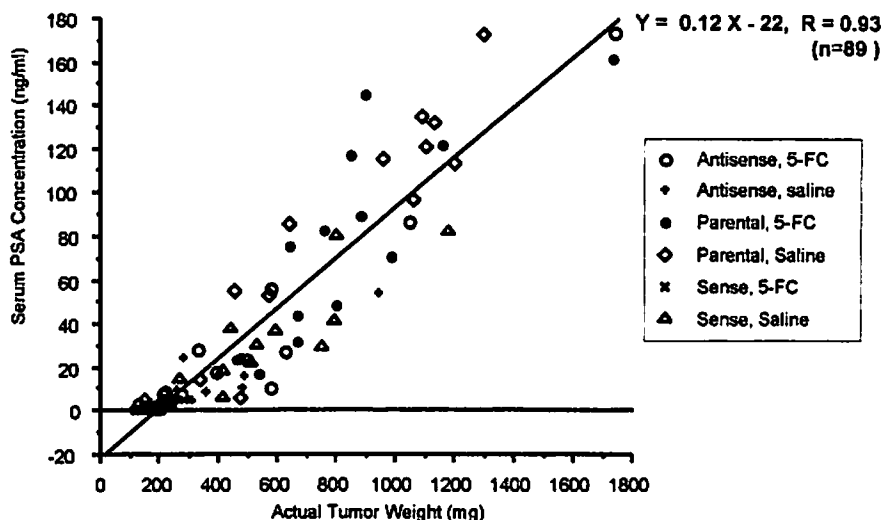
		血清 PSA 濃度 (ng/ml)	
		Day 0	Day 21
Group 1	parental, 5-FC	3.4±2.9	70.3±12.7
Group 2	parental, saline	3.2±1.8	85.0±54.0
Group 3	sense, 5-FC	4.6±2.4	0.4±0.4
Group 4	sense, saline	5.2±3.8	25.3±25.9
Group 5	antisense, 5-FC	4.8±2.0	30.6±46.0
Group 6	antisense, saline	4.6±3.4	10.4±14.2

(mean±SD)

治療前の各群の平均血清 PSA 濃度はほぼ同様であった (3.2 ng/ml から 5.2 ng/ml)。治療後、血清 PSA 濃度は第3群でのみ低下し、第3群とその他の群の比較において有意な差が認められた ( $p < 0.003$ )。 (Uchida A, et al. Urology 58: 132-139, 2001 の第1表を許可を得て転載)

### Linear Regression Analysis

Tumor weight vs Serum PSA Concentration

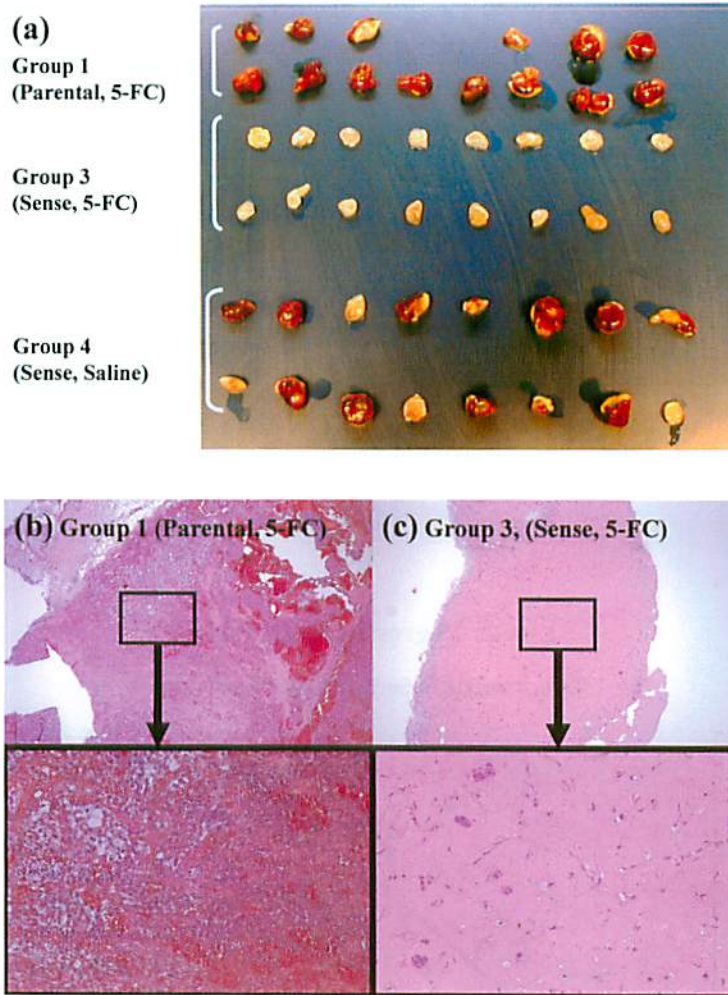


第8図 摘出された腫瘍の湿重量 (X) と宿主動物の血清 PSA (Y) 値の関係。一次回帰分析により、 $Y = 0.12X - 22$ 、(相関係数 0.93) の回帰式が得られた。

み合わせた場合、PSMA を発現しない細胞株では活性は確認されなかった。その一方で PSMA enhancer が別の前立腺特異的 promoter として知られる Probasin promoter と組み合わされた場合には、胎児腎細胞由来 HEK293 細胞で、低いが無視できない活性が見られた<sup>37)</sup>。今回の我々の検討では、PSMA enhancer は SV40 promoter と組み合わせても組織特異性を保つことが示唆されたが、未だ十分な細胞種で検証されてい

いため、CD 遺伝子治療における細胞傷害性実験には PSMA enhancer と PSMA promoter を組み合わせて用いた。

PSMA の細胞内ドメインを認識するモノクローナル抗体である 7E11<sup>36)</sup>を用いた研究によると、PSMA の発現は前立腺に比して非常に弱いながら、腎、十二指腸、唾液腺、脳組織の一部に認められている<sup>27, 42)</sup>。近年、PSMA に相同性を持つ蛋白として N-acetylated alpha-



第9図 (a)：摘出腫瘍の肉眼所見。上段、中段、下段の2列ずつはそれぞれ第1群 (parental, 5-FC)、第3群 (sense, 5-FC)、第4群 (antisense, 5-FC) の腫瘍、第3群 (sense, 5-FC) の腫瘍は全て白色調で、出血は認められなかった。それに対し他群の腫瘍の多くは、出血に伴って赤色を呈していた。(b)、(c)：摘出腫瘍の顕微鏡所見、HE染色、弱拡大(×4)、強拡大像(×400)。左下(b)、右下(c)はそれぞれ第1群 (parental, 5-FC)、第3群 (sense, 5-FC) の中央値の重量を示した腫瘍。第3群の腫瘍はほとんどエオジン好性の非細胞性成分に置換されていた。それに対し他群では低分化型線癌の組織像として出血壊死、線維増生などの所見が認められた。(Uchida A, et al. Urology 58: 132-139, 2001の第4図を許可を得て転載)

linked acidic dipeptidase II (NAALADaseII)と NAALADase Lなどが発見され、PSMA 遺伝子との塩基配列の相同性はそれぞれ81%、54%と報告されている<sup>43)</sup>。reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、あるいはノーザンブロットによる解析では、NAALADaseIIは精巣、卵巣、脾臓など、NAALADase Lは十二指腸、脾臓、精巣などで発現すると考えられる<sup>43)</sup>。これらの蛋白にはPSMAと共通の細胞内ドメインは見られず、7E11との交差反応性はないと考えられるが、細胞外ドメインを認識する多くのPSMAのモノクローナル抗体とこれらの蛋白との交差

反応性は明らかでない。また、PSMA enhancerがこれらの蛋白の発現に関わっているかも今のところ不明である。よって、将来PSMA enhancerを用いて遺伝子治療を実用化するには、前立腺以外の臓器でPSMA enhancerがどの程度の活性を有するか、さらに詳細に検討する必要があるだろう。

前立腺癌細胞株C4-2はLNCaP細胞より作られたsublineであり<sup>33)</sup>、腫瘍マーカーであるPSA、PSMAを発現し、男性ホルモン非依存性に増殖するため<sup>44)</sup>、ホルモン療法耐性前立腺癌の適切なモデルと考えられている。Ruokonenらが指摘するように、リポソームを用

いた LNCaP 細胞への遺伝子導入は困難であり<sup>45)</sup>, *in vivo*において *in situ*  $\beta$ -galactosidase assay で LNCaP, C4-2 細胞の遺伝子導入効率を検討した我々の結果も同様であった。そのため本研究では動物実験において、最終的に安定遺伝子導入された C4-2 細胞を用いた。一般に安定遺伝子導入細胞では導入遺伝子の発現は導入された部位でのクロマチンの立体構造、ヌクレオソームの構造、周囲のメチル化の状態などに依存する。しかしながら導入遺伝子の十分な発現には promoter/enhancer の活性が必要不可欠である。*in vitro*における安定遺伝子導入 C4-2 細胞は、一過性遺伝子導入とほぼ同様の 300  $\mu$ M 以下の IC<sub>50</sub>を示した。この数値は、抗真菌剤として 5-FC の通常使用量で得られるヒト血中濃度 (500  $\mu$ M)<sup>46)</sup>に比して低い値であった。これらの結果から、*in vitro*と同様の遺伝子導入効率を得られれば、臨床においても CD の腫瘍内発現とそれに続く通常投与量の 5-FC 投与により十分な治療的効果を期待できる。

5-FC は CD によって 5-FU に変換され、標的細胞内で 5-fluorouridine 5'-triphosphate となり、リボ核酸 (RNA) の合成の際に取り込まれて RNA の機能を阻害する一方、5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate に変換されることでデオキシリボ核酸 (DNA) の合成の課程で thymidylate synthetase に対して拮抗的に働き、細胞増殖抑制効果を発揮する。5-FU 代謝の基礎的研究の成果から、前立腺癌患者に対する 5-FU の低用量持続投与と放射線、あるいはインターフェロンの併用による 5-FU の感受性増強効果が報告され<sup>47,48)</sup>, 5-FU の臨床的意義が見直されている。また Kanai らは、uracil を uridine monophosphate (UMP) に変換する大腸菌由来 uracil phosphoribosyltransferase (UPRP) 遺伝子を癌細胞内に導入することにより、5-FU に対する感受性が増強されることを示した<sup>49)</sup>。さらに Erb らは UPRP と CD の融合遺伝子を導入する実験モデルで、5-FC の殺細胞効果の増強に成功した<sup>50)</sup>。このように 5-FU の代謝を修飾する他治療との併用により CD 自殺遺伝子治療のさらなる改良が進められている。

今回の我々の検討では、*in vitro*において PSMA enhancer が前立腺癌特異的に自殺遺伝子の効果を発揮させた。また、ヌードマウスを用いた C4-2 細胞皮下腫瘍モデルでも同様に、前立腺癌の著明な縮小効果が認められ、宿主動物の血清 PSA 値、組織学的検討により治療効果が確認された。よって今回検証した PSMA promoter/enhancer は、前立腺特異的な遺伝子治療に有用であることが示された。最近の報告では、PSMA は通常の血管に発現しないものの、癌の新生血管に発現

していることが免疫組織化学的に確認されている<sup>42,51-53)</sup>。PSMA enhancer が腫瘍血管内でも活性を有するならば、他の悪性腫瘍の新生血管を標的とした遺伝子治療にも応用される可能性がある。また PSMA の生理的機能を理解する事は、普遍的な癌の増殖、特に血管新生の機序を解明する上で重要である。PSMA を用いた組織特異的な癌治療の臨床応用に向けて、enhancer と転写因子をはじめとした核蛋白との関連、PSMA の発現調節機構の解明などが今後の研究課題である。

## 総 括

PSMA enhancer の前立腺癌細胞における活性、および特異性を検証し、自殺遺伝子治療モデルを用いて臨床応用への可能性を検討し、以下の結果を得た。

1. PSMA enhancer として、強力な遺伝子転写活性を持つ 1.6 kb の領域を PSMA 遺伝子第 3 イントロン中に見出した。この enhancer の活性は前立腺由来細胞特異的であった。

2. PSMA promoter/enhancer の転写調節下に CD を発現させるプラスミドを用いて種々の癌細胞に遺伝子導入した。低濃度の 5-FC の暴露により前立腺癌細胞株に特異的な殺細胞効果が認められた。

3. ヌードマウスに移植された CD 遺伝子導入 C4-2 細胞に対して、5-FC による腫瘍縮小効果が得られたことから PSMA promoter/enhancer は *in vivo*でも転写活性を有することが確認された。

これらの結果から PSMA promoter/enhancer は前立腺癌を標的とした遺伝子治療のために有用であり、将来の臨床応用の可能性を示すものである。

本稿を終えるにあたり、御指導、御高閲を賜りました慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室村井勝教授に深謝いたします。また、多大なる御支援と御助言を頂きました国立病院東京医療センター泌尿器科齊藤史郎先生、防衛医科大学校泌尿器科吉村一良先生、慶應義塾大学泌尿器科堀口裕先生に感謝致します。さらに本研究直接の御指導、御支援を頂きました米国 The Cleveland Clinic Foundation, Department of Cancer Biology の Dr. Warren D.W. Heston, Dr. Denise S. O'Keefe, Dr. Dean J. Bacich, Dr. C. T. Powell に感謝の意を表します。

本研究は CaPCURE (WDWH) および U.S. Army Medical Research Acquisition Activity, Ft. Detrick, MD ; Grant numbers : DAMD 17-00-1-0043, DAMD 17-99-1-9523. より研究費を得た。

文 献

- 1) The Research Group for Population-based Cancer Registration in Japan : Cancer incidence and incidence rates in Japan in 1992-93 : estimates based on data from seven population-based cancer registries. *Jpn J Clin Oncol* 28 : 641-647, 1998
- 2) 黒石哲生, 広瀬かおる, 田島和雄, 富永祐民 : 日本の癌死亡の将来予測. *がん・統計白書*. 篠原出版, 東京, p. 171-185, 1999
- 3) Huggins C and Hodges CV : Studies on prostatic cancer. 1. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research* 1 : 293-7, 1941
- 4) Chodak GW, Vogelzang NJ, Caplan RJ, Soloway M and Smith JA : Independent prognostic factors in patients with metastatic (stage D2) prostate cancer. The Zoladex Study Group. *Jama* 265 : 618-621, 1991
- 5) The Leuprolide Study Group : Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer. The Leuprolide Study Group. *N Engl J Med* 311 : 1281-1286, 1984
- 6) Cline MJ, Stang H, Mercola K, Morse L, Ruprecht R, Brown J and Salser W : Gene transfer in intact animals. *Nature* 284 : 422-5, 1980
- 7) Mullen CA, Kilstrup M and Blaese RM : Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine : a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 33-37, 1992
- 8) Austin EA and Huber BE : A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma : cloning, sequencing, and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase. *Mol Pharmacol* 43 : 380-387, 1993
- 9) Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH and Blaese RM : In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256 : 1550-1552, 1992
- 10) Brand K, Arnold W, Bartels T, Lieber A, Kay MA, Strauss M and Dorken B : Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther* 4 : 9-16, 1997
- 11) van der Eb MM, Cramer SJ, Vergouwe Y, Schagen FH, van Krieken JH, van der Eb AJ, Rinkes IH, van de Velde CJ and Hoeben RC : Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther* 5 : 451-458, 1998
- 12) Richards CA, Austin EA and Huber BE : Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen : identification and use with cytosine deaminase for tumor-specific gene therapy. *Hum Gene Ther* 6 : 881-893, 1995
- 13) Macri P and Gordon JW : Delayed morbidity and mortality of albumin/SV40 T-antigen transgenic mice after insertion of an alpha-fetoprotein/herpes virus thymidine kinase transgene and treatment with ganciclovir. *Hum Gene Ther* 5 : 175-182, 1994
- 14) Blackburn RV, Galoforo SS, Corry PM and Lee YJ : Adenoviral transduction of a cytosine deaminase/thymidine kinase fusion gene into prostate carcinoma cells enhances prodrug and radiation sensitivity. *Int J Cancer* 82 : 293-297, 1999
- 15) Gotoh A, Ko SC, Shirakawa T, Cheon J, Kao C, Miyamoto T, Gardner TA, Ho LJ, Cleutjens CB, Trapman J, Graham FL and Chung LW : Development of prostate-specific antigen promoter-based gene therapy for androgen-independent human prostate cancer. *J Urol* 160 : 220-229, 1998
- 16) Hall SJ, Mutchnik SE, Chen SH, Woo SL and Thompson TC : Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir therapy leads to systemic activity against spontaneous and induced metastasis in an orthotopic mouse model of prostate cancer. *Int J Cancer* 70 : 183-187, 1997
- 17) Herman JR, Adler HL, Aguilar-Cordova E, Rojas-Martinez A, Woo S, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC and Scardino PT : In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate : a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 10 : 1239-1249, 1999
- 18) Israeli RS, Powell CT, Fair WR and Heston WD : Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 53 : 227-230, 1993
- 19) Pinto JT, Suffoletto BP, Berzin TM, Qiao CH, Lin S, Tong WP, May F, Mukherjee B and Heston WD : Prostate-specific membrane antigen : a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2 : 1445-1451, 1996
- 20) Carter RE, Feldman AR and Coyle JT : Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuro-peptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 749-753, 1996
- 21) Liu H, Rajasekaran AK, Moy P, Xia Y, Kim S, Navarro V, Rahmati R and Bander NH : Constitutive and antibody-induced internalization of prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 58 : 4055-4060, 1998
- 22) Heston WD : Characterization and glutamyl preferring carboxypeptidase function of prostate specific membrane antigen : a novel folate hydrolase. *Urology* 49 : 104-112, 1997
- 23) Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO and Trapman J : Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* 271 : 6379-6388, 1996

- 24) Cleutjens KB, van der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW and Trapman J : An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol* 11 : 148-161, 1997
- 25) Suzuki S, Tadakuma T, Kunitomi M, Takayama E, Sato M, Asano T, Nakamura H and Hayakawa M : Liposome-mediated gene therapy using HSV-TK/ganciclovir under the control of human PSA promoter in prostate cancer cells. *Urol Int* 67 : 216-223, 2001
- 26) Suzuki S, Tadakuma T, Asano T and Hayakawa M : Coexpression of the partial androgen receptor enhances the efficacy of prostate-specific antigen promoter-driven suicide gene therapy for prostate cancer cells at low testosterone concentrations. *Cancer Res* 61 : 1276-1279, 2001
- 27) Israeli RS, Powell CT, Corr JG, Fair WR and Heston WD : Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 54 : 1807-1811, 1994
- 28) Gong MC, Chang SS, Watt F, O'Keefe DS, Bacich DJ, Uchida A, Bander NH, Reuter VE, Gaudin PB, Molloy PL, Sadelian M and Heston WD : Overview of evolving strategies incorporating prostate-specific membrane antigen as target for therapy. *Mol Urol* 4 : 217-222, 2000
- 29) O'Keefe DS, Su SL, Bacich DJ, Horiguchi Y, Luo Y, Powell CT, Zandvliet D, Russell PJ, Molloy PL, Nowak NJ, Shows TB, Mullins C, Vonder Haar RA, Fair WR and Heston WD : Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. *Biochim Biophys Acta* 1443 : 113-127, 1998
- 30) Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S and Brennan M : A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51 : 1409-1416, 1973
- 31) Tompkins WA, Watrach AM, Schmale JD, Schultz RM and Harris JA : Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* 52 : 1101-1110, 1974
- 32) Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA and Murphy GP : LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43 : 1809-1818, 1983
- 33) Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S and Chung LW : Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines : role of bone stromal cells. *Int J Cancer* 57 : 406-412, 1994
- 34) Cory AH, Owen TC, Barltrop JA and Cory JG : Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3 : 207-212, 1991
- 35) Nishiyama T, Kawamura Y, Kawamoto K, Matsu-mura H, Yamamoto N, Ito T, Ohyama A, Katsuragi T and Sakai T : Antineoplastic effects in rats of 5-fluorocytosine in combination with cytosine deaminase capsules. *Cancer Res* 45 : 1753-1761, 1985
- 36) Horoszewicz JS, Kawinski E and Murphy GP : Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res* 7 : 927-935, 1987
- 37) Watt F, Martorana A, Brookes DE, Ho T, Kingsley E, O'Keefe DS, Russell PJ, Heston WD and Molloy PL : A tissue-specific enhancer of the prostate-specific membrane antigen gene, FOLH1. *Genomics* 73 : 243-254, 2001
- 38) Zelivianski S, Comeau D and Lin MF : Cloning and analysis of the promoter activity of the human prostatic acid phosphatase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 245 : 108-112, 1998
- 39) Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput JA, Brinkmann AO and Trapman J : The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol* 5 : 1921-1930, 1991
- 40) Hakalahti L, Vihko P, Henttu P, Autio-Harmainen H, Soini Y and Vihko R : Evaluation of PAP and PSA gene expression in prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma using northern-blot analyses, in situ hybridization and immunohistochemical stainings with monoclonal and bispecific antibodies. *Int J Cancer* 55 : 590-597, 1993
- 41) Wright GL, Jr., Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, Konchuba A, Schellhammer PF and Moriarty R : Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology* 48 : 326-334, 1996
- 42) Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD and Cordon-Cardo C : Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res* 3 : 81-85, 1997
- 43) Pangalos MN, Neefs JM, Somers M, Verhasselt P, Bekkers M, van der Helm L, Fraiponts E, Ashton D and Gordon RD : Isolation and expression of novel human glutamate carboxypeptidases with N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity. *J Biol Chem* 274 : 8470-8483, 1999
- 44) Chung LW : The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surv* 23 : 33-42, 1995
- 45) Ruokonen M, Shan JD, Hedberg P, Patrikainen L and Vihko P : Transfecting well-differentiated prostatic cancer cell line LNCaP. *Biochem Biophys Res Commun* 218 : 794-796, 1996
- 46) Petersen D, Demertzis S, Freund M, Schumann G and Oellerich M : Individualization of 5-fluorocytosine therapy. *Chemotherapy* 40 : 149-156, 1994

- 47) Marshall ME, Wolf M, O'Rourke M, Barnett TC and Crawford ED : Treatment of stage D2 hormone refractory carcinoma of the prostate with 5-fluorouracil and Roferon-A : a Southwest Oncology Group study. *Cancer Biother Radiopharm* 11 : 119-123, 1996
- 48) Shinohara N, Demura T, Matsumura K, Toyoda K, Kashiwagi A, Nagamori S, Ohmuro H, Ohzono S and Koyanagi T : 5-fluorouracil and low-dose recombinant interferon-alpha-2a in patients with hormone-refractory adenocarcinoma of the prostate. *Prostate* 35 : 56-62, 1998
- 49) Kanai F, Kawakami T, Hamada H, Sadata A, Yoshida Y, Tanaka T, Ohashi M, Tateishi K, Shiratori Y and Omata M : Adenovirus-mediated transduction of *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene sensitizes cancer cells to low concentrations of 5-fluorouracil. *Cancer Res* 58 : 1946-1951, 1998
- 50) Erbs P, Regulier E, Kintz J, Leroy P, Poitevin Y, Exinger F, Jund R and Mehtali M : In vivo cancer gene therapy by adenovirus-mediated transfer of a bifunctional yeast cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase fusion gene. *Cancer Res* 60 : 3813-3822, 2000
- 51) Liu H, Moy P, Kim S, Xia Y, Rajasekaran A, Navarro V, Knudsen B and Bander NH : Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium. *Cancer Res* 57 : 3629-3634, 1997
- 52) Chang SS, Reuter VE, Heston WD, Bander NH, Grauer LS and Gaudin PB : Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 59 : 3192-3198, 1999
- 53) Chang SS, O'Keefe DS, Bacich DJ, Reuter VE, Heston WD and Gaudin PB : Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. *Clin Cancer Res* 5 : 2674-2681, 1999
-



学位論文

全身麻酔と自律神経機能の変化—心拍変動変化からみた  
前投薬硫酸アトロピンと揮発性吸入麻酔薬セボフルランの影響—

慶應義塾大学医学部麻酔学教室

(指導：武田純三教授)

なか つか いた ち  
中 塚 逸 夫

(平成14年11月29日受付)

Key Word : heart rate variability, sevoflurane, atropine

全身麻酔の目的の一つに有害反射の抑制がある。手術操作に伴う侵害刺激に対する、自律神経系の過度な反射によって生じる様々な生体反応を抑制することが目的である。交感神経系の反応としては血圧や心拍数の上昇があり、心筋虚血のある症例では重篤な結果を生じやすい。一方、腹腔内や胸腔内操作に伴って副交感神経系の反応が増強される場合があり、極端な徐脈や心停止を生じる可能性もある。安全な全身麻酔管理を行うために、麻酔前投薬の硫酸アトロピンや揮発性麻酔薬によって有害反射の抑制を行うが、その作用については定量的な解析は行われてこなかった。

硫酸アトロピンはムスカリンレセプターにおいてアセチルコリンと拮抗することにより、副交感神経を遮断する。その用法として唾液、気道分泌の抑制や副交感神経反射の抑制があり、麻酔前投薬として用いられる理由である。しかし、成人において麻酔前投薬として用いられる通常量(0.5 mg)では副交感神経反射は抑制できないとも報告されている<sup>1)</sup>。

一方、揮発性麻酔薬による自律神経系の抑制の程度については定量化が難しく、定性的な検討のみが行われてきた。このため、臨床麻酔においては交感神経系の抑制は血圧低下や心拍数減少などの循環系の反応をもとに評価されることが多いが、副交感神経系が同時に抑制された場合には作用が拮抗するため、交感神経系と独立して定量化することは困難であった。

一拍ごとの心拍のゆらぎ、つまり心拍変動は自律神経系と密接な関係があることから、そのスペクトル解析が自律神経系の評価に導入され、連続的かつ非侵襲的に定量化することが可能となった。特に、循環器領域で虚血性心疾患の病態を検討する際に、自律神経機能の変動が大きな意義を持つことが本法によって解明され、心拍変動解析の臨床的意義が示されている<sup>2)</sup>。スペクトル解析によると、心拍変動の高周波数成分(0.15-0.4 Hz)には副交感神経系が関与し、低周波数成分(0.04-0.15 Hz)には交感神経、副交感神経の両者が関与しているといわれる。つまり、各周波数成分を求めることで交感神経ならびに副交感神経機能の定量的評価が可能となる<sup>3-6)</sup>。

さらに、呼吸運動は副交感神経系を介し、心拍変動の主に高周波数成分に影響する。つまり、呼吸運動という入力に対する副交感神経性の出力が心拍変動の高周波数成分といえる。それゆえ無呼吸による副交感神経系への入力の低下は高周波数成分の低下をもたらし、その程度をみることで副交感神経系の抑制の程度を間接的に推量可能と考えられる。

本研究では、麻酔中の有害反射防止の効果を検討するため、麻酔前投薬としての硫酸アトロピンと、揮発性麻酔薬の一つであるセボフルランの自律神経系に与える作用を、心拍変動を用いて検討した。特に、セボフルラン麻酔下では、無呼吸にすることによる心拍変動の変化か

本論文は、Nakatsuka I, Ochiai R, Takeda J : Changes in heart rate variability in sevoflurane and nitrous oxide anesthesia : effects of respiration and depth of anesthesia. J Clin Anesth 14 : 196-200, 2002 の一部、および中塚逸夫、落合亮一、武田純三 : 前投薬量の硫酸アトロピンが心拍変動に与える影響. 日本臨床生理学会雑誌 32 : 307-311, 2002 の一部を含む。

ら副交感神経系の評価を行った<sup>6)</sup>。

### 対象と方法

#### 1. 対象

循環系、特に心電図異常がなく、全身状態の良好 (ASA physical status I-II) な成人全身麻酔予定手術患者を対象とし、研究1では18名、研究2では7名について検討した(第1表、第2表)。患者にはあらかじめ本研究の趣旨を説明し、同意を得た。

#### 2. 方法

症例は手術前夜より禁食とし、術前に鎮静薬・鎮痛薬ならびに循環系に影響を与える薬剤は投与しなかった。

##### 1) 研究1:

測定は、硫酸アトロピン筋注前 (Pre-Atropine: 対

照値) と、硫酸アトロピン 0.5 mg の筋注 30 分後 (Post-Atropine) に行った。測定項目は、100 連続の心電図 RR 間隔、非観血的動脈圧および呼吸数で、安静仰臥位で測定を行った。心拍データは右鎖骨下と左前胸部の位置に貼付した心電図電極から、GMS 社製心拍データ収集装置 SRRMEMO を用い、心拍変動解析用の心電図信号を 1msec の精度で記録した。

##### 2) 研究2:

麻酔前投薬として、手術室入室 90 分前にラニジジン 150 mg を内服投与した。麻酔の導入はチオペンタール 4 mg/kg で行い、スキサメトニウム 1 mg/kg 静注後、気管挿管をした。全身麻酔の維持には亜酸化窒素 67%、酸素 33% とセボフルラン 2% を吸入した。麻酔中は人工呼吸を行い、換気回数を毎分 15 回とし、終末呼気二酸化炭素分圧が 30-35 mmHg に維持されるよう一回換

第1表 患者背景 (研究1)

患者 No.	年齢 (歳)	身長 (cm)	体重 (kg)	性別 (M/F)	疾患
1	30	154	54	F	子宮筋腫
2	40	149	46	F	子宮筋腫
3	59	158	57	F	手根管症候群
4	29	169	61	F	卵巣嚢腫
5	33	163	70	M	正中神経損傷
6	38	163	60	F	子宮筋腫
7	46	167	64	M	手根中手関節症
8	39	176	76	M	胆石症
9	57	172	59	M	膀胱腫瘍
10	44	152	57	F	子宮筋腫
11	43	154	44	F	肩関節脱臼
12	35	155	53	F	卵管開口部閉鎖
13	33	151	65	F	子宮筋腫
14	34	162	48	F	卵巣嚢腫
15	30	166	59	F	卵巣嚢腫
16	45	169	68	M	膀胱腫瘍
17	46	152	57	F	子宮筋腫
18	47	160	54	F	乳癌
平均±標準誤差	40±2	161±2	58±2	5/13	

第2表 患者背景 (研究2)

患者 No.	年齢 (歳)	身長 (cm)	体重 (kg)	性別 (M/F)	疾患
1	43	156	50	F	胆石症
2	50	157	53	F	乳癌
3	40	159	54	F	乳癌術後乳房再建
4	26	174	64	M	外傷性肩関節炎
5	39	173	67	M	胆石症
6	43	154	46	F	卵巣嚢腫
7	25	163	60	M	肩関節脱臼
平均±標準誤差	38±3	162±3	56±3	3/4	

気量を調節した。全身麻酔中には、心電図、非観血的動脈圧、経皮的動脈血酸素飽和度、呼吸二酸化炭素分圧、呼吸セボフルラン濃度、体温をモニターした。

術中モニターの心電図と独立して、心拍変動解析用の心電図信号を、研究1と同様の方法で記録し、以下に示す測定時点で、それぞれ50連続のRR間隔を求めた。

同時に、国際10-20法に基づいて脳波電極を、Fp1, Fp2, C3ならびにC4の位置、不関電極としてA1, A2に貼付し、脳波を連続して測定し、脳波が安定した時点で各測定を行った。

測定は、(1)手術室入室後、安静仰臥位時(Awake)、(2)気管挿管後15分以上の後、2%セボフルラン吸入中の安定した時(Sevo-2)、(3)セボフルラン濃度を上げ、平坦脳波が出現した時(Sevo-IC)の3点で行った。Sevo-2とSevo-ICでは人工呼吸中(Resp)と安静呼吸位での無呼吸時(Apnea)のものを記録した。

### 3. 心拍変動の解析：

心拍データを最大エントロピー法と最小二乗法に基づいたソフトウェア(MemCalc, 諏訪トラスト社製)を用いて周波数解析し(Appendix 1)、得られたスペクトルより0.04 Hzから0.15 Hzの領域(低周波数領域：low frequency；LF)、0.15 Hzから0.4 Hzの領域(高周波数領域：high frequency；HF)を求め、さらに両者の比LF/HFを算出した。

研究1ではさらに、代表的な時間領域解析法のSDNN(心電図RR間隔の標準偏差)とRMSSD(隣接したRR間隔の差を二乗したものの平均の平方根)<sup>7)</sup>を算出した(Appendix 2)。

### 4. 統計処理：

データは平均±標準誤差で表した。統計学的検定として、研究1では、血圧、心拍数に対してはpaired t-testを、SDNN, RMSSD, LF, HF, LF/HFに対してはWilcoxon signed-rank testを用いた。研究2では覚醒、麻酔深度による差に関してはFriedman検定とTukey法による多重比較を行った。呼吸の有無の差に関してはWilcoxon signed-rank testを用いた。それぞれ危険率5%未満をもって有意差ありとした。

## 結 果

研究1：硫酸アトロピン筋注前後の呼吸循環系の変化を第3表に示す。収縮期血圧は124 mmHgから130 mmHgに、心拍数は68/分から75/分へと有意に増加

第3表 収縮期血圧、心拍数、呼吸数の変化(研究1)

	Pre-Atropine	Post-Atropine
収縮期血圧 (mmHg)	124±3	130±3*
心拍数 (beats/min)	68±2	75±4*
呼吸数 (/min)	15.4±0.8	15.3±0.7

平均±標準誤差 n=18

\*: p<0.05 vs Pre-Atropine

(中塚逸夫, 他：日本臨床生理学会雑誌32：307-311, 2002のTable 1を許可を得て転載, 一部改変)

第4表 SDNN, RMSSD, LF, HF, LF/HFの変化(研究1)

	Pre-Atropine	Post-Atropine
SDNN (msec)	32.5±2.2	30.7±3.4
RMSSD (msec)	27.1±3.1	21.6±2.9
LF (msec <sup>2</sup> )	262±51	323±74
HF (msec <sup>2</sup> )	271±45	153±51*
LF/HF	1.5±0.3	4.2±1.0*

平均±標準誤差 n=18

\*: p<0.05 vs Pre-Atropine

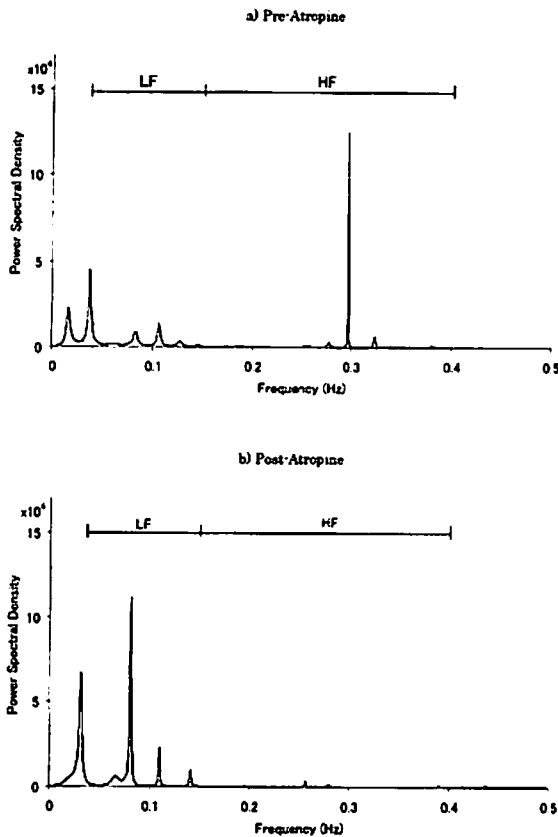
SDNN：standard deviation of R-R intervals, RMSSD：root mean square of successive R-R differences, LF：integrated power of heart rate variability in low frequency (0.04-0.15 Hz) band, HF：integrated power of heart rate variability in high frequency (0.15-0.4 Hz) band, LF/HF：LF to HF ratio

(中塚逸夫, 他：日本臨床生理学会雑誌32：307-311, 2002のTable 2を許可を得て転載, 一部改変)

したが、呼吸数に変化はなかった。

SDNNとRMSSDには硫酸アトロピンの筋注前後で変化はみられなかった(第4表)。LFは筋注前後で変化はなかったが、HFは271±45 msec<sup>2</sup>から153±51 msec<sup>2</sup>へと約1/2に有意に低下、LF/HFは1.5±0.3から4.2±1.0へと有意に増加した(第4表)。第1図のa) Pre-Atropine, b) Post-Atropineに、硫酸アトロピン投与前後のパワースペクトル(心拍の変動を周期信号の和で表現し、その成分の周波数と強さを曲線で表したもの)の一例を示す。a)は硫酸アトロピン投与前のパワースペクトルであり、呼吸数(この症例では約0.3 Hz, 18回/分)に一致してHF領域にピークが認められる。一方、b)は硫酸アトロピン筋注後のもので、投与前と比較して副交感神経系が関与するHF領域のパワーが低下している。

研究2：Sevo-2とSevo-ICでの呼吸終末セボフルラン濃度はそれぞれ1.89±0.02%と3.68±0.09%であった。無呼吸時の記録に45±2秒を要したが、無呼吸中に経



第1図 硫酸アトロピン投与前後のパワースペクトル (中塚逸央, 他: 日本臨床生理学雑誌 32: 307-311, 2002 の Fig. 1 を許可を得て転載, 一部改変)

第5表 血圧, 心拍数の変化 (研究2)

	Awake	Sevo-2	Sevo-IC
収縮期血圧 (mmHg)	128±4	97±3*	100±3*
拡張期血圧 (mmHg)	72±4	57±3*	55±2*
心拍数 (beats/min)	73±4	64±3	72±4

平均±標準誤差 n=7 \* : p<0.05 vs Awake (Nakatsuka I et al : J Clin Anesth 14: 196-200, 2002 の Table 1 を許可を得て転載, 一部改変)

皮的酸素飽和度が95%以下に低下した症例はなかった。血圧は収縮期, 拡張期血圧とも覚醒時と比較して麻酔中は有意に低下したが, 心拍数には変化がみられなかった (第5表)。

第6表に心拍変動の変化を示す。LFは覚醒時と比較して2%セボフルラン吸入時, 平坦脳波出現時にそれぞれ1/60, 1/150に低下, HFはそれぞれ1/40, 1/130に低下した。平坦脳波出現時には, セボフルラン2%吸入時と比較して低下傾向にあったが有意な差ではなかった。

2%セボフルラン吸入時には無呼吸にしてもLFは変化しなかったが, HFは無呼吸時に低下した。平坦脳波出現時にはLF, HFともに呼吸による差はみられなかった。LF/HFは2%セボフルラン吸入時に無呼吸にすることにより増加する傾向がみられたが, 有意な差ではなかった。

## 考 察

本研究では, 麻酔前投薬量の硫酸アトロピンは心拍変動の低周波数成分には影響を与えず, 高周波数成分のみを低下させた。またセボフルラン麻酔は, 高周波数, 低周波数成分ともに著明に減少させ, セボフルランの濃度に依存する傾向があった。さらに心拍変動の高周波数成分は2%セボフルラン吸入時には無呼吸によって減少するが, 脳波が平坦となるような深麻酔時には呼吸の有無による変化のないことが示された。低周波数成分は呼吸の有無による変化がみられなかった。

心拍変動の0.04-0.15 Hzの低周波数成分は, 交感神経活動によって生じた血圧変動 (Mayer wave) が副交感神経性の圧受容体反射を介し心拍変動として現れたものとされ, 交感神経活動と副交感神経活動の両者に影響を受ける<sup>3-5)</sup>。これより高い0.15-0.4 Hzの高周波数成分は呼吸と関連し副交感神経活動を反映する<sup>3-5)</sup>。呼吸運動に伴い胸腔内圧が変動し, その結果静脈還流量も変動するが, これらの因子が呼吸運動に伴う血圧変動をもたらす。この血圧変動に対する迷走神経を介した圧受容体反射や心房受容体反射によって高周波数成分は生じる。さらに, 胸郭運動とは無関係に呼吸中枢から迷走神経への直接刺激でも心拍変動の高周波数成分が発生する<sup>8,9)</sup>。以上のことから, 低周波数成分と高周波数成分の比であるLF/HFは交感神経, 副交感神経のバランスの指標となるとされている<sup>4,5)</sup>。

### 1. 硫酸アトロピンの影響

麻酔導入時に生じる有害反射として, 喉頭展開や気管挿管に伴う迷走神経反射が知られている。迷走神経を完全に遮断するためには20~40 µg/kgの硫酸アトロピンが必要といわれている<sup>10,11)</sup>。これは本研究で検討した0.5 mgの2~4倍量となるが, 麻酔前投薬として用いられる通常量の0.5 mgでも心拍変動に反映する副交感神経抑制は有意に生じることが示された<sup>12)</sup>。

本研究では筋注投与30分後の検討を行った。血漿濃度は筋注後8.7分~13分で最高となるが, 心拍数は30分後に最大となると報告されている<sup>13,14)</sup>。つまり, 作用

第6表 心拍変動の変化(研究2)

		No.	Awake	Sevo-2	Sevo-IC
LF (msec <sup>2</sup> )	Resp	1	289	5.0	7.4
		2	775	5.1	4.8
		3	22	1.6	2.0
		4	4520	10.8	19.0
		5	309	6.0	11.0
		6	127	14.6	9.2
		7	2468	100	1.6
	平均±標準誤差		1215±636	20.5±13.4*	7.9±2.3*
	Apnea	1		9.0	12.0
		2		6.0	2.6
		3		4.1	0.57
		4		35.3	6.6
		5		31.5	2.0
		6		12.3	5.6
7			24.8	4.8	
平均±標準誤差			17.6±4.8	4.9±1.4	
HF (msec <sup>2</sup> )	Resp	1	348	36.2	14.0
		2	1208	11.4	13.0
		3	180	5.4	6.4
		4	2943	43	8.3
		5	112	39.7	6.7
		6	35	6.4	3.0
		7	1942	36.1	2.0
	平均±標準誤差		967±423	25.5±6.4*	7.6±1.7*
	Apnea	1		8.5	37.0
		2		4.1	8.9
		3		2.3	1.0
		4		17.1	3.9
		5		4.7	1.4
		6		2.8	2.3
7			28.3	1.8	
平均±標準誤差			9.7±3.7 <sup>†</sup>	8.1±5.0	
LF/HF	Resp	1	0.83	0.14	0.54
		2	0.64	0.45	0.37
		3	0.12	0.29	0.32
		4	1.5	0.25	2.3
		5	2.8	0.15	1.7
		6	3.6	2.3	3.1
		7	1.3	2.8	0.83
	平均±標準誤差		1.5±0.5	0.9±0.4	1.3±0.4
	Apnea	1		1.1	0.32
		2		1.5	0.29
		3		1.8	0.56
		4		2.1	1.7
		5		6.7	1.5
		6		4.5	2.4
7			0.87	2.7	
平均±標準誤差			2.6±0.8	1.4±0.4	

\* : p<0.05 vs Awake, <sup>†</sup> : p<0.05 vs Resp LF : integrated power of heart rate variability in low frequency (0.04-0.15 Hz) band, HF : integrated power of heart rate variability in high frequency (0.15-0.4 Hz) band, LF/HF : LF to HF ratio (Nakatsuka I et al : J Clin Anesth 14 : 196-200, 2002 の Table 2 を許可を得て転載, 一部改変)

部位濃度は筋注投与後30分に最大となることから、筋注30分後に測定した本研究の結果は、硫酸アトロピンの心拍変動に及ぼす最大効果を示しているものと考えられる。

このような副交感神経抑制は、心拍数の増加や口渴感といった臨床症状からも推定される。硫酸アトロピンは中枢性には副交感神経緊張性であり、特に低用量では徐脈、HFの増加をきたすが<sup>15)</sup>、0.5mgの筋注量は末梢性ムスカリン受容体の遮断作用が中枢性の作用より大であると推測される。

SDNNとRMSSDは代表的な時間領域解析法であり、SDNNはRR間隔の変動を、RMSSDはRR間隔の差の変動を表す。また、SDNNは全周波数の変動を反映するがRMSSDは高周波数領域の変動を反映するとされる<sup>7)</sup>。研究1においてSDNNとRMSSDに変化はみられなかったが、これは短いデータから分解能の高い安定したスペクトルが得られるという特長をもつ最大エントロピー法<sup>16)</sup>による周波数解析と比較して感度が劣るためと考えた。実際、SDNNとRMSSDは短期間の記録にも用いられるが、一般的には時間領域解析法は長期間の記録の解析に適している<sup>7)</sup>ためと考えられた。

## 2. セボフルラン麻酔と無呼吸の影響

石川らは覚醒時と1MAC(50%の患者が加刀刺激によって動かない吸入麻酔薬の最小肺泡濃度)セボフルラン+50%亜酸化窒素吸入時を比較し、セボフルラン麻酔により心拍変動の低下を認めたが低周波数成分がより著明に低下したと報告している<sup>17)</sup>。また藤里らは、手術後にセボフルラン濃度を2.0MACから0.5MACへと低下させた時の心拍変動の変化を検討し、低周波数成分はセボフルラン濃度の低下に伴い増加しているが、高周波数成分には変化がなかったとしている<sup>18)</sup>。これは本研究の結果と異なるが、本研究では手術侵襲が加わっていないのに比べ、彼らの研究では手術による疼痛刺激が交感神経系の反応に影響を及ぼした可能性がある。

Kohら<sup>19)</sup>によると、フェンタニル麻酔中に高頻度ジェット換気を行った場合、胸郭運動の停止とともに心拍変動の高周波数成分が消失したと報告しており、胸郭運動が心拍変動に与える影響は大きいといえる。無呼吸中の心拍変動を調べた研究としては、脳死患者を対象としたKawamotoらの研究がある<sup>20)</sup>。これによると脳死患者の無呼吸テスト時に、心拍変動の低周波数成分の増加と高周波数成分/低周波数成分比の低下を認めたが、高周波数成分は変化しなかった。またウサギを用いた研究で、1.1~1.2%のイソフルラン麻酔では、無呼吸時に心拍変動の低周波数成分の増加がみられたが、脳血流を遮断し

た脳障害時には無呼吸時に、イソフルラン麻酔の換気時、無呼吸時と比較し高周波数成分の低下がみられている<sup>21)</sup>。

本研究では2%セボフルラン+67%亜酸化窒素吸入時にはHFが無呼吸時に低下したが、脳波が平坦となる深麻酔時には無呼吸によるHFの変化は見られなかった。一般に無呼吸による変化としては、胸郭運動の停止、高二酸化炭素血症、低酸素血症の3つがあげられる。このうち胸郭運動の停止は付随する血圧変動の消失から心拍変動の高周波数成分の低下をもたらす。高二酸化炭素血症、低酸素血症は交感神経系の刺激により心拍変動の低周波数成分の増加をもたらすと考えられる。さらに高二酸化炭素血症と低酸素血症については呼吸中枢の活動が高まることにより呼吸中枢から迷走神経への刺激が増し、心拍変動の高周波数成分の増加をきたす<sup>89)</sup>ことが考えられる。今回の研究では経皮的酸素飽和度が95%以下になった症例がなく、低酸素血症については考慮しなくてよいので、胸郭運動の停止と高二酸化炭素血症に関して心拍変動の各周波数成分別に考察する。

### 1) 高周波数成分に対する無呼吸の影響

Sevo-2でHFが無呼吸時に低下したのは、Kohら<sup>19)</sup>の高頻度ジェット換気時、つまり呼吸数が周波数解析の対象となった周波数域外の時の心拍変動の変化と一致することによるものと考えられる。一方、呼吸中枢の刺激により生じる部分に関しては、無呼吸中のPaCO<sub>2</sub>の増加が少なかったためや、麻酔による呼吸中枢のPaCO<sub>2</sub>上昇に対する応答性の減弱などの理由により、HFの呼吸運動に由来する部分の減少を補えるほどには増加しなかったものと考えられる。PaCO<sub>2</sub>の増加に関しては、無呼吸による増加は最初の1分間に約9.8mmHgとされるが<sup>22)</sup>、本研究では無呼吸時間が45秒と短かったため、高二酸化炭素性応答が生じなかったものと考えられる。

平坦脳波が出現するSevo-ICで無呼吸によるHFの変化がみられなかったのは、深麻酔により心拍変動の圧受容体反射を介する部分が著明に抑制されたためと考えられる。2%セボフルランと67%亜酸化窒素麻酔時には、麻酔前と比較して圧受容体反射の感受性が昇圧テストで68%、降圧テストで29%低下したとされ<sup>23)</sup>、Sevo-IC時にはさらなる低下が予想される。また、脳死患者では無呼吸による心拍変動の高周波数成分の変化がみられないと報告されている<sup>19)</sup>。Sevo-ICでは、脊髄機能も麻酔により抑制されているという点で脳死状態と異なるが、ともに脳活動が著明に抑制されていることより同様の結果となったものと考えられる。

### 2) 低周波数成分に対する無呼吸の影響

LFにはSevo-2, Sevo-1Cともに呼吸の有無による変化がみられなかった。呼吸数や一回換気量の心拍変動の低周波数成分に与える影響は一定しない<sup>24,25)</sup>。前述した高頻度ジェット換気時<sup>19)</sup>や脳虚血ウサギの無呼吸中<sup>21)</sup>には心拍変動の低周波数成分に有意な変化は認められていない。また、脳死患者<sup>20)</sup>やウサギのイソフルラン麻酔時<sup>21)</sup>には、無呼吸により心拍変動の低周波数成分は増加したと報告されている。後二者では無呼吸によりPaCO<sub>2</sub>が40~50 mmHgほど増加しており、高碳酸血症性応答により交感神経系の緊張が高まっていると考えられる。一方、本研究では無呼吸によるPaCO<sub>2</sub>の増加は10 mmHg以下と考えられる<sup>22)</sup>ので、PaCO<sub>2</sub>の増加による交感神経系の賦活化が弱く、LFやLF/HFに増加がみられなかったものとする。

### 3. 臨床的意義

硫酸アトロピンは、歴史的にはジエチルエーテル麻酔時の気道、口腔内分泌増加作用を抑制するために投与されていたが、現行のセボフルランには分泌増加作用がないため、分泌抑制を目的としての投与の意味は小さい。また術前の口渇感や筋注投与に伴う疼痛が不快なことから、その必要性が再評価されつつある。また、本研究においてセボフルラン麻酔下でHFが1/40から1/130に低下するのに対し、前投薬量の硫酸アトロピンによるHFの低下は約1/2とわずかであることから、迷走神経反射の抑制についても十分ではないと考えられる。

全身麻酔に必要な要素として無意識、鎮痛、不動化(筋弛緩)、自律神経系の安定化(有害反射の防止)がある。一方、吸入麻酔薬の力価を表すのにMAC(50%の患者が加刀刺激によって動かない吸入麻酔薬の最小肺胞濃度)、MAC-BAR(50%の患者の加刀刺激による血圧上昇反応や脈拍数の増加反応を抑制する最小肺胞濃度)、MAC-awake(50%の患者が呼びかけに応答する最小肺胞濃度)などがあるが、それぞれ不動化、鎮痛と自律神経系の安定化、無意識と関係がある。一般にはMAC-awake<MAC<MAC-BARの関係があるが、フェンタニルなどの麻薬を併用するとそれぞれの変化の度合いが異なるため<sup>26,27)</sup>、意識レベル、鎮痛レベル、不動化レベル、自律神経機能ごとに評価する必要が出てくる。心拍変動は非侵襲的に交感神経、副交感神経機能を独立して評価できることから、周術期の自律神経機能評価に有用と思われる。

63.5%の亜酸化窒素吸入下のセボフルラン麻酔では、95%の患者が加刀刺激によって動かないセボフルランの濃度(ED95, 吸入麻酔薬の力価としてはMAC95)

は0.94%とされるが<sup>28)</sup>、臨床的にはより高濃度のセボフルランが手術中の循環動態を安定させるために必要となる。実際、60%亜酸化窒素吸入下で加刀刺激に対する交感神経系の反応を抑制するセボフルランの濃度(MACBAR95)は3%以上とされている<sup>27)</sup>。副交感神経の抑制に関しても、本研究の結果より、セボフルラン2%+亜酸化窒素67%という吸入麻酔単独ではまだその反応は維持されているが、更に抑制する目的で、脳波が平坦化するような深麻酔を維持することは、覚醒遅延やコストの問題がある。そのため麻酔中の自律神経系を安定化するためには、吸入麻酔薬単独で対処するより硫酸アトロピンやフェンタニルなどを適宜併用するのが望ましいと思われる。

本研究では平均約40歳の患者を対象として心拍変動の変化を検討したが、心拍変動には年齢による影響が見られるため、年齢層ごとに硫酸アトロピンやセボフルランに対する心拍変動の変化を検討する必要性もあると思われる。また、心拍変動の日内変動による影響やセボフルラン麻酔下における硫酸アトロピンの投与の影響なども今後の検討課題としたい。

### 総 括

全身麻酔を受ける患者の心拍変動の変化を明らかにするため、前投薬としての硫酸アトロピン投与前後およびセボフルラン麻酔中の心拍変動を観察し、以下の結果のような結果を得た。

1. 硫酸アトロピン0.5 mgの前投与により、手術入室時の心拍変動の高周波数成分は約1/2に低下したが低周波数成分には変化がなかった。
2. セボフルラン2%と亜酸化窒素67%吸入時には麻酔前と比較し、低周波数成分は1/60に高周波数成分は1/40に低下した。また脳波が平坦となる高濃度セボフルラン(3.68±0.09%)麻酔時には低、高周波数成分はそれぞれ1/150と1/130に低下し、自律神経機能の著明な低下を認めた。
3. セボフルラン2%と亜酸化窒素67%吸入時にみられた人工呼吸停止による心拍変動の高周波数成分の低下が、脳波が平坦となる高濃度セボフルラン吸入時にはみられず、セボフルランによる平坦脳波出現時には副交感神経系が著明に抑制されていることが示唆された。
4. 高濃度セボフルラン麻酔は覚醒遅延やコストの問題があり、麻酔中の自律神経系を安定化するためには、術中硫酸アトロピンやフェンタニルの併用が望ましい。

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麻酔学教室武田純三教授に深甚なる謝意を表します。また本研究に際し直接御指導をいただきました慶應義塾大学医学部麻酔学教室落合亮一助教授に深謝いたします。

Appendix 1<sup>29)</sup> :

最大エントロピー法 (MEM) においてパワースペクトル密度 (PSD)  $P(f)$  ( $f$ =frequency) は等サンプリング間隔  $\Delta t$  として  $P_m$  (次数  $m$  の予測誤差フィルターの出力) と  $\gamma_{mk}$  (対応するフィルター係数,  $m=0,1,2,\dots,M$ ;  $M$  は最適フィルター次数) の値を用いて式(1)のように計算される。

$$P(f) = \frac{P_m \Delta t}{\left| 1 + \sum_{k=-m}^m \gamma_{mk} \exp(-i2\pi f k \Delta t) \right|^2} \quad (1)$$

ここで  $P_m$  と  $\gamma_{mk}$  は Burg のアルゴリズムを用い Yule-Walker 方程式を解くことによってえられる。

最適フィルター次数  $M$  を決定するために MEMPSD の  $m$  依存性が調べられ、情報量基準 (FPE, AIC, CAT) を求めさらに特性相関時間 (CCT) が導入される。情報量基準が極小となる  $m$  の内 CCT 以下のものや CCT 周囲のものであっても主要な周期が得られないものは除かれ最適フィルター次数  $M$  が決定される。

原時系列の基底変動は正弦関数と余弦関数の線形結合によって得られる式(2)のように表され、MEMPSD から得られる主要周期  $T_n (= 1/f_n, n = 1, 2, \dots, N_p)$  を用いることにより線形化される。そして式(2)のパラメータ  $a_0, a_n, b_n$  は最小二乗法により決定する。

$$x_{uv}(t) = a_0 + \sum_{n=1}^{N_p} \gamma_{nk} \{ a_n \sin(2\pi f_n t) + b_n \cos(2\pi f_n t) \} \quad (2)$$

Appendix 2 :

$$SDNN = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (RR_i - RR_{avg})^2}{N}}$$

$$RMSSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N-1} (RR_i - RR_{i+1})^2}{N-1}}$$

ただし、

$RR_i = i$  番目の RR 間隔

$RR_{avg} =$  平均 RR 間隔

$N =$  RR 間隔の数

文 献

- 1) Moyers JR : Preoperative medication. Clinical anesthesia. (Ed) Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 519-533, 1997
- 2) Lombardi F, Sandrone G, Pernpruner S, Sala R, Garimoldi M, Cerutti S, Baselli G, Pagani M, Malliani A : Heart rate variability as an index of sympathovagal interaction after acute myocardial infarction. Am J Cardiol 60 : 1239-1245, 1987
- 3) Pomeranz B, Macaulay RJB, Caudill MA, Kutz I, Adam D, Gordon D, Kilborn KM, Barger AC, Shannon DC, Cohen RJ, Benson H : Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. Am J Physiol 248 : H151-H153, 1985
- 4) Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, Sandrone G, Malfatto G, Dell'Orto S, Piccaluga E, Turiel M, Baselli G, Cerutti S, Malliani A : Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. Circ Res 59 : 178-193, 1986
- 5) Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S : Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. Circulation 84 : 482-492, 1991
- 6) Nakatsuka I, Ochiai R, Takeda J : Changes in heart rate variability in sevoflurane and nitrous oxide anesthesia : effects of respiration and depth of anesthesia. J Clin Anesth 14 : 196-200, 2002
- 7) Heart rate variability : standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Circulation 93 : 1043-1065, 1996
- 8) Al-Ani M, Forkins AS, Townend JN, Coote JH : Respiratory sinus arrhythmia and central respiratory drive in humans. Clin Sci Colch 90 : 235-241, 1996
- 9) Horner RL, Brooks D, Kozar LF, Gan K, Phillipson EA : Respiratory-related heart rate variability persists during central apnea in dogs : mechanisms and implications. J Appl Physiol 78 : 2003-2013, 1995
- 10) Medigue C, Girard A, Laude D, Monti A, Wargon M, Elghozi JL : Relationship between pulse interval and respiratory sinus arrhythmia : a time-and frequency-domain analysis of the effects of atropine. Pflugers Arch 441 : 650-655, 2001
- 11) Hayano J, Sakakibara Y, Yamada A, Yamada M, Mukai S, Fujinami T, Yokoyama K, Watanabe Y, Takata K : Accuracy of assessment of cardiac vagal tone by heart rate variability in normal subjects. Am J Cardiol 67 : 199-204, 1991
- 12) 中塚逸夫, 落合亮一, 武田純三 : 麻酔前投薬量の硫酸アトロピンが心拍変動に与える影響. 日本臨床生理学雑誌, 32 : 307-311, 2002
- 13) Kentala E, Kaila T, Kanto J : Intramuscular atropine



- in elderly people : pharmacokinetic studies using the radioreceptor assay and some pharmacodynamic responses. *Pharmacol Toxicol* 65 : 110-113, 1989
- 14) Kentala E, Kaila T, Iisalo E, Kanto J : Intramuscular atropine in healthy volunteers : a pharmacokinetic and pharmacodynamic study. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 28 : 399-404, 1990
  - 15) Montano N, Cogliati C, Porta A, Pagani M, Malliani A, Narkiewicz K, Abboud FM, Birkett C, Somers VK : Central vagotonic effects of atropine modulate spectral oscillations of sympathetic nerve activity. *Circulation* 98 : 1394-1399, 1998
  - 16) 日野幹雄 : MEM (最大エントロピー法). スペクトル解析. 朝倉書店, p210, 1977
  - 17) 石川岳彦, 木村智政, 鍋物修 : 心拍変動に及ぼすセボフルレン/笑気麻酔の影響. 循環制御, 10 : 101-105, 1989
  - 18) 藤里正視, 大和田哲郎, 稲葉英夫, 水口公信 : 心拍変動からみた吸入麻酔薬の自律神経機能に与える影響. 麻酔, 43 : 665-671, 1994
  - 19) Koh J, Shinzawa M, Kosaka Y : Effect of high-frequency jet ventilation on heart rate variability. *J Anesth* 10 : 120-124, 1996
  - 20) Kawamoto M, Sera A, Kaneko K, Yuge O, Ohtani M : Parasympathetic activity in brain death : effect of apnea on heart rate variability. *Acta Anaesthesiol Scand* 42 : 47-51, 1998
  - 21) Kawamoto M, Kaneko K, Hardian, Yuge O : Heart rate variability during artificial ventilation and apnea in brain-damaged rabbits. *Am J Physiol* 40 : H410-H416, 1996
  - 22) 小林毅之, 横山和子 : 麻酔下無呼吸による動脈血液ガスの経時的变化. 麻酔, 43 : 1130-1134, 1994
  - 23) Tanaka M, Nishikawa T : Arterial baroreflex function in humans anaesthetized with sevoflurane. *Br J Anaesth* 82 : 350-354, 1999
  - 24) 内藤威 : 心拍動揺解析におけるエネルギー指標一体位と呼吸数を変えた実験から一. 麻酔, 40 : 275-284, 1991
  - 25) Brown TE, Beightol LA, Koh J, Eckberg DL : Important influence of respiration on human R-R interval power spectra is largely ignored. *J Appl Physiol* 75 : 2310-2317, 1993
  - 26) Katoh T, Uchiyama T, Ikeda K : Effect of fentanyl on awakening concentration of sevoflurane. *Br J Anaesth* 73 : 322-325, 1994
  - 27) Katoh T, Kobayashi S, Suzuki A, Iwamoto T, Bito H, Ikeda K : The Effect of fentanyl on sevoflurane requirements for somatic and sympathetic responses to surgical incision. *Anesthesiology* 90 : 398-405, 1999
  - 28) Katoh T, Ikeda K : The minimum alveolar concentration (MAC) of sevoflurane in humans. *Anesthesiology* 66 : 301-303, 1987
  - 29) Sawada Y, Ohtomo N, Tanaka Y, Tanaka G, Yamakoshi K, Terachi S, Shimamoto K, Nakagawa M, Satoh S, Kuroda S, Imura O : New technique for time series analysis combining the maximum entropy method and non-linear least squares method : its value in heart rate variability analysis. *Med Biol Eng Comput* 35 : 318-322, 1997

学位論文

マクロファージ由来の nitric oxide による肝細胞酸化 DNA 傷害の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

わた なべ なお ゆき  
渡 部 直 行

(平成 14 年 12 月 13 日受付)

Key words : splenic macrophage, nitric oxide, peroxy-nitrite, DNA damage, 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)

ウイルス、細菌および寄生虫感染やアスベスト暴露などによる慢性的な炎症状態が、宿主の発癌リスクを高めることは多くの研究から明らかであり、肝臓病学の領域においても慢性肝疾患は肝細胞癌の発生母地であることが知られている。慢性肝疾患において肝細胞の壊死-再生のサイクルの病的な亢進と不規則再生が肝発癌の原因となると考えられている<sup>1,2)</sup>。

Nitric oxide (以下 NO) が血管内皮由来の平滑筋弛緩因子として発見され、その後極めて多くの研究がなされた結果、NO が消化器病の領域において平滑筋弛緩、粘膜血流調節、分泌調節機構に関与していること、肝疾患においても血行動態、肝障害、抗腫瘍活性などの様々な病態生理に関することが明らかになってきた<sup>3-6)</sup>。

一般に constitutive type NO 合成酵素 (以下 cNOS) を介して微量の NO が産生された場合と、inducible type NO 合成酵素 (以下 iNOS) を介して多量の NO が産生された場合ではその代謝及び生物学的活性が異なるとされている。微量の NO は主に cGMP 濃度を上昇させることで細胞傷害を抑制し、さらに組織修復や再生に関係する可能性がある。反面、多量の NO の放出は種々な機序を介して細胞、組織傷害や炎症を助長するという、いわゆる NO の二面性が指摘されている。

肝臓に炎症が生じている状態、すなわち肝炎や肝硬変に罹患している場合にはヒトや動物の体内で、炎症細胞から放出される活性酸素の過剰産生が認められている<sup>7)</sup>。特に、肝硬変症において、活性酸素の一つである NO の過剰産生が、血清中に認められており、Guarner ら<sup>8)</sup>によると健康人の NO のレベルに比して、肝硬変患者

で有意に高値であり、また腹水を伴う非代償性肝硬変患者で特にその上昇が著しいと報告されている。また、肝硬変患者の血清 NO 値は血清エンドトキシンと正の相関を示し、抗生物質投与によるエンドトキシン血症改善とともに NO 値は低下することから、NO 産生はエンドトキシン血症と密接に関与することも示されている<sup>9)</sup>。この場合に肝臓内における NO 産生細胞として、内皮細胞<sup>9,10)</sup>、Kupffer 細胞<sup>11)</sup>、好中球<sup>12)</sup>、肝細胞<sup>13)</sup>、マクロファージ<sup>14)</sup>、伊東細胞<sup>15)</sup>が考えられ、cNOS を介した NO 産生は内皮細胞で、iNOS を介した NO 産生は主に Kupffer 細胞、肝細胞、好中球、マクロファージで行われると考えられる。これらの個々の NO 産生能は、病態によって異なり、Rockey<sup>16,17)</sup>らによると、肝硬変においては内皮細胞由来の cNOS の低下が報告されている。Kupffer 細胞は、グラム陰性の細菌性エンドトキシン lipopolysaccharide (以下 LPS) 単独、さらには interleukin-1 (以下 IL-1)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (以下 TNF- $\alpha$ )、Interferon- $\gamma$  以下 IFN- $\gamma$  などの炎症性サイトカインを加えることにより、よりいっそう活性化され iNOS を発現し、多量の NO を産生する<sup>18,19)</sup>。一方、肝細胞は LPS 単独刺激では NO を産生しないが IL-1、TNF- $\alpha$  といったサイトカインの同時添加にて iNOS を発現し、多量の NO を産生するとされ、事実、Kupffer 細胞との共培養にても肝細胞が NO を産生することが報告されている<sup>20,21)</sup>。また、伊東細胞に関しても LPS、IL-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  刺激により iNOS を発現し NO を産生することが報告されている<sup>15)</sup>。多量に放出された NO は、細胞傷害因子として働き、DNA 合成、蛋白質合

本論文は、Watanabe N, Miura S, Zeki S, Ishii H : Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide. Free Radical Biology Medicine. 30 (9) : 1019-1028, 2001 の一部を含む。

成、ミトコンドリアエネルギー代謝を抑制することで、腫瘍細胞や正常細胞に対して傷害作用を有することが知られている<sup>22-26)</sup>。

一方、肝臓へ遊走するマクロファージも有力な NO 産生源として注目される。エンドトキシンにより肝傷害が生じる際には、脾臓に存在するマクロファージは肝臓に遊走し、肝傷害に重要な役割を担っているということが今までの研究より想定されており<sup>27)</sup>、実験的に摘脾した際には、脾マクロファージの出現をおさえ、LPS によって惹起された肝傷害が軽減されたという報告が見られる<sup>28)</sup>。教室の Mizukami<sup>29)</sup>らにおいても脾臓を摘出したラットにおいて、LPS によって生じた肝類洞内の活性酸素をおさえ、肝類洞内皮細胞の傷害をおさえたという報告を行っている。さらにこのような活性化されたマクロファージは、NO だけでなく O<sub>2</sub><sup>-</sup>も産生し、その結果放出された O<sub>2</sub><sup>-</sup>は NO と反応し短時間で ONOO<sup>-</sup>となりこれが強力な細胞毒性を持つことが報告されている<sup>30)</sup>。Wink<sup>31)</sup>らは NO 関連物質が核酸に傷害を与え、DNA に変異を起こす事を証明しており、また deRoja Walker<sup>32)</sup>は、サイトカインで NOS を誘導したマクロファージの DNA 中において、脱アミノ化と酸化的傷害の両方を認めている。これらの研究より、エンドトキシン血症の時に脾マクロファージは肝に遊走し、肝細胞を死にいたらしめる傷害性因子の一つとなる可能性が考えられる。それゆえに、炎症が持続した状態下で肝臓においてマクロファージ由来の NO 関連物質が肝細胞の DNA 変異にどのように関与しているかを明らかにすることは臨床的にも重要と考えられる。

しかし、脾臓由来のマクロファージが刺激下で、どの程度 NO を産生し、その産生された NO が実際に肝細胞傷害を引き起こす重要な因子として働いているか否かの詳細については不明である。したがって本研究では、活性化された脾マクロファージを肝細胞と共培養することによって NO の産生、放出能にどのような変化が生じるか、さらに活性化された脾マクロファージより産生された NO が肝細胞に酸化的 DNA 傷害を生じさせるかどうかについて検討し、これらの研究を通じて脾マクロファージの肝細胞傷害における役割とそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 細胞の単離と培養法

すべての実験は、本医学部における動物実験ガイドラインにもとづいて行なわれた。200~250 g のウイスター

系雄性ラットから肝細胞と脾マクロファージを分離した<sup>33,34)</sup>これらの細胞のうち、トリパンブルーテストで 95%以上の viability のある細胞のみを実験に使用した。肝細胞は分離後コラーゲンコートプレート上にまき、すべての細胞を 37℃、5%CO<sub>2</sub>の湿条件下で培養を行った。10% fetal calf serum (FCS, Gibco Laboratories, USA) と 100 IU/ml ペニシリンと 100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した培養液 Dulbecco's modified Eagle medium (以下 DMEM, Gibco Laboratories) を使用した<sup>35,36)</sup>。また研究に使用された添加物、培養液、プラスチック製剤はエンドトキシン濃度が 0.1 ng/ml 以下であることを Limulus Amebocyte Lysate Test Kit で測定し確認した。

まず単培養において、分離された脾マクロファージを LPS (Sigma Chemical Co, USA) 1 µg/ml および IFN-γ (Serotec Oxford, UK) 1000 units/ml で刺激をした。共培養の系においては、脾マクロファージを LPS か IFN-γ のいずれかで 8 時間刺激をした。培養液を洗浄後、肝細胞を 1 対 1 の割合に加えて 24 時間共培養した。共培養後に 8 時間、16 時間、24 時間と蛍光顕微鏡下の観察と生化学的測定を経過を追って施行した。NO の関与を検討するために、NO の合成阻害薬 N<sup>ε</sup>-monomethyl-L-arginine (以下 L-NMMA, Sigma Chemical Co) を 100 µM の濃度で、また比較的 iNOS に選択的な阻害薬である aminoguanidine (Sigma Chemical Co) を 10 µM の濃度で<sup>37,38)</sup>、脾マクロファージと共培養した肝細胞に添加した。活性酸素の役割を評価するために superoxide dismutase (以下 SOD, Sigma Chemical Co) 300 units/ml を脾マクロファージと共培養した肝細胞に添加した。またもう一つの実験系では、NO と O<sub>2</sub><sup>-</sup>を産生する SIN-1 (100 µM-10 mM, Alexis Co, Läufelfingen, Switzerland) および peroxynitrite (10 µM-1 mM, Alexis Co) を単培養液に添加した。

### 2. iNOS および nitrotyrosine の二重免疫蛍光法

iNOS および nitrotyrosine の分布を特異的モノクローナル抗体を使用して二重免疫蛍光法で観察した。8 穴のチャンパー (Nunc Inc., Naperville, IL) に培養した脾マクロファージと共培養した肝細胞を phosphate-buffered saline (以下 PBS) で 3 回洗浄した後、30 分間 4%パラホルムアルデヒドにて固定した。PBS で 3 回以上洗浄して 0.1% TritonX を含む PBS で 5 分間培養した。チャンパーは PBS で洗い、iNOS に対するマウスモノクローナル抗体 (N32020, Transduction Laboratories, KY; final concentration 20 µg/ml) お

よび nitrotyrosine に対するウサギポリクローナル抗体 (Upstate Biotechnology Inc., NY ; final concentration 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 1% BSA を含む PBS で細胞を 60 分間 4°C で培養した。1% BSA を含む PBS で細胞を 3 回以上洗浄した後、FITC 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL) とローダミン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Chemicon International Inc., Temecula, CA) を 1% BSA を含む PBS で室温で 30 分間反応させた。細胞を再び洗浄し、チャンパーにカバーガラスをのせ、緑色 (iNOS), 赤色 (nitrotyrosine) の蛍光を 63X のレンズ (Diaplot, TMD-25 : Nikon, Tokyo, Japan) を装着した共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Bio Rad, Watford, UK) にて観察した。

### 3. 培養液中の nitrite と nitrate の濃度

Granger<sup>36)</sup>らの方法に従って、脾マクロファージと共培養した肝細胞の培養液中の nitrite と nitrate の濃度を測定した<sup>39)</sup>。Nitrate は大腸菌由来の nitrate 還元酵素によって nitrite に還元されたものを測定した。100  $\mu\text{l}$  の培養液を、0.1 M HEPES buffer (PH 7.4), 0.3 M ammonium formate, 0.05 units/ml の大腸菌由来の nitrate 還元酵素 (Sigma Chemical Co) を含む反応液 500  $\mu\text{l}$  で、60 分間 37°C で培養した。培養後に反応液は遠心器で遠心し、そして上清に 1 ml の Griess 反応液を添加した。543 nm で吸光度を測定し、nitrite と nitrate の培養液濃度は、sodium nitrite (Sigma Chemical Co) と sodium nitrate (Sigma Chemical Co) の種々の濃度により作成した標準曲線から決定した。

### 4. 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG)/deoxyguanosine (dG) の測定

DNA は DNA isolation kit (和光純薬) を用い、sodium iodide 法にて培養肝細胞から抽出した。肝細胞から抽出した DNA の 8-OH-dG/dG (dG に対する 8-OH-dG の比) を測定するために、培養肝細胞を一度スクレープして洗浄し、再び培養液に浮遊させたあと、1600 rpm で 5 分間勾配遠心器にかけた。この操作により肝細胞と脾マクロファージを効率良く分離することができた。肝細胞は 5  $\mu\text{M}$  の propidium iodide (以下 PI) で培養し、PI 陽性細胞を除外して実験に用いた。すなわち PI 陰性細胞は、細胞膜の傷害のない細胞であり、これらを DNA の分離解析に使用した。この方法により、傷害のある肝細胞と傷害のない肝細胞と区別し、傷害のない肝細胞を脾マクロファージと共培養した。このよう

に抽出された DNA を用いて、Tris-HCl buffer に溶解した標準液を基準として、Kasai らの方法<sup>40)</sup>に従い 8-OH-dG/dG を測定した。8-OH-dG の測定は、高速液体クロマトグラフィー電気化学測定器 (HPLC) を用いて行ない、dG の測定は UV 検出器 (SHIMADZU JAPAN) で測定した。測定法は、電極 Model 1 5011 高感度セル (設定電位 0.15V [electrode 1] と 0.30 V [electrode 2]) と電極 Model 2 5020 ガードセル (設定電位 0.35 V) を接続した電気化学測定器クーロケム II (ESA, USA) を用いて、ここに検体を 50  $\mu\text{l}$  注入し、8-OH-dG の測定を行った。感度は R=50 nA, OUTPUT=1 V で測定した。また dG の測定は、UV 検出器で吸光度 290 nm で測定を行った。

### 5. 単鎖 DNA の検出

DNA の傷害 (単鎖 DNA) を見るために、アクリジンオレンジ (以下 AO, Molecular Probes Inc) 染色を行った。AO は、塩酸加水分解によって、核 DNA 二重鎖の解離によって生成した単鎖 DNA を、異染性に蛍光染色することができる。AO は、単鎖 (異染性赤色蛍光,  $\gamma$  650 nm) および二重鎖 DNA (正染性緑色蛍光,  $\gamma$  525 nm) の同時蛍光が染色可能な点でメリットがある。つまり、単鎖および二重鎖の肝細胞 DNA を視覚化することができ、二本鎖 DNA の時は、測光 525 nm で緑色蛍光となるのに対して単鎖 DNA と RNA は、測光 650nm で赤色蛍光となる。これらの特性にて AO は種々の細胞で単鎖、二本鎖 DNA と RNA を検出するのに用いられている。8 穴のチャンパーに培養した肝細胞を 30 分間 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。そして PBS で洗浄した後、0.1% TritonX, 0.08N HCl, 0.88% NaCl, 0.0039% EDTA 中で 5 分間 4°C で反応させた。PBS で洗浄したあと、細胞をさらに 5 Kunits/ml RNase (Type-1A, Sigma Chemical Co) で 37°C で 60 分間処理した。PBS で洗浄したあと、細胞をさらに 2 N HCl で 30°C で 8 分間処理し、それを 0.1 N HCl で数秒間冷却した。再度 PBS で洗浄したあと、細胞は室温で 15 分間、30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の AO にて染色した。細胞を再び洗浄しチャンパーにカバーガラスを乗せ観察した。緑色 (二本鎖 DNA) および赤色 (単鎖 DNA) の蛍光が各々共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察された。単鎖 DNA は 400 倍の倍率の 1 視野当たりで、赤色蛍光を発する細胞として計測し、全部で 10 視野を選んで各々の平均を算出した。

6. 統計

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて6回の平均を求め、satnadard errorで表現した。有意差の検定は Scheffe's post hoc test にて解析し、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

結 果

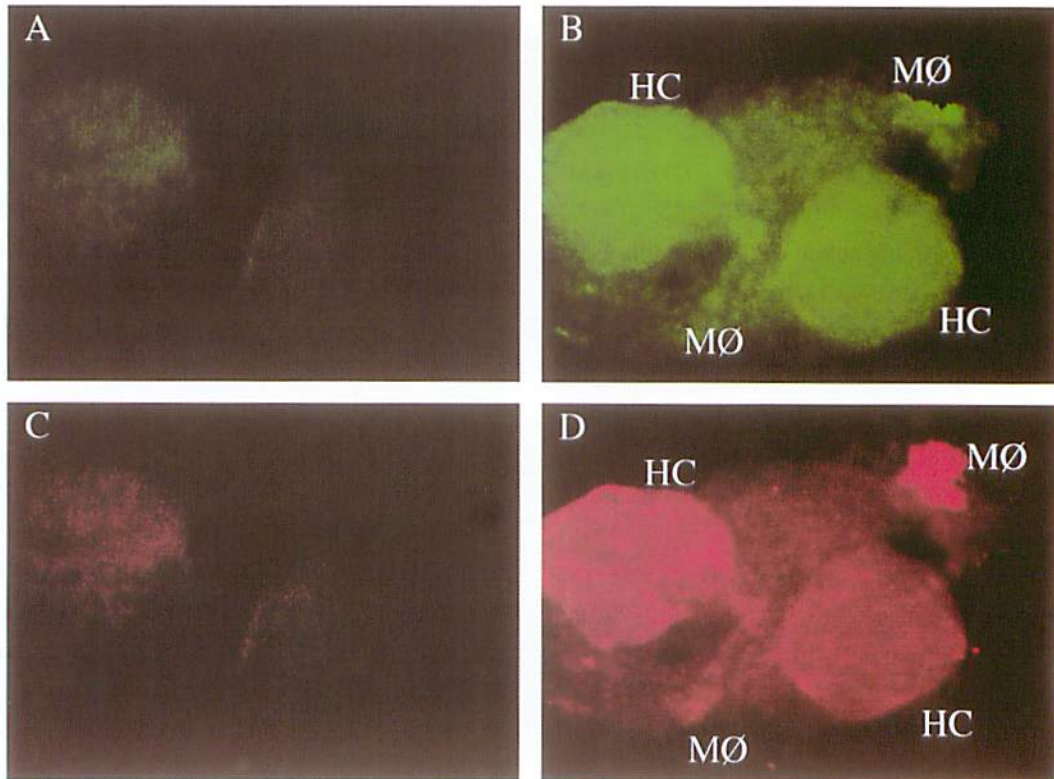
1. 肝細胞と脾マクロファージの共培養後の iNOS および nitrotyrosine の局在

第1図は、共培養した肝細胞と脾マクロファージにおける、iNOS および nitrotyrosine の局在を示したもので、二重免疫蛍光法で特異的モノクローナル抗体を使用して観察した。共培養せずに単離培養された肝細胞では抗 iNOS モノクローナル抗体 (第1図A) および抗

nitrotyrosine モノクローナル抗体 (第1図C) により共にほとんど染色されなかった。一方、8時間LPSで刺激した脾マクロファージと8時間共培養した肝細胞はiNOS抗体にて緑色に染色され、また脾マクロファージも緑色にiNOS抗体で染色された(第1図B)。また共培養した後の nitrotyrosine を示す赤色蛍光も、肝細胞と脾マクロファージの両方で増強しているのが観察された(第1図D)。

2. 培養液中の8時間後の nitrite と nitrate の濃度

第1表は、培養液中の8時間後の nitrite と nitrate の濃度を示した。これは脾マクロファージの単独培養、肝細胞との共培養、あるいは種々の試薬を投与しての測定結果を示す。脾マクロファージの単培養においては、無刺激の脾マクロファージ培養液中の nitrite と nitrate



第1図 肝細胞 (HC) と脾マクロファージ (MØ) における iNOS および nitrotyrosine の二重免疫蛍光法。脾マクロファージと共培養しない単離培養された肝細胞 (A & C) と、LPSで8時間刺激した脾マクロファージと共培養した肝細胞 (B & D) 際の iNOS (緑色) および nitrotyrosine (赤色) の二重免疫蛍光法。

Panel A : iNOS で染色された肝細胞。

Panel B : iNOS で染色された肝細胞と LPS で刺激した脾マクロファージ。

Panel C : nitrotyrosine で染色された肝細胞。

Panel D : nitrotyrosine で染色された肝細胞と LPS で刺激した脾マクロファージ。

( $\times 400$ ). (Watanabe N et al : Free Radical Biology Medicine. 30 (9) : 1019-1028, 2001 の Fig. 1 より許可を得て転機)

第1表 脾マクロファージの培養液中の nitrite と nitrate 濃度。肝細胞と共培養した場合、及び、種々の試薬を添加した際の影響。

	Nitrite and nitrate level ( $\mu\text{mole/l}$ )	
	Hepatocyte (-)	Hepatocyte (+)
None	12.3 $\pm$ 1.3	15.6 $\pm$ 1.5
M $\emptyset$	16.1 $\pm$ 2.0	19.2 $\pm$ 1.8
LPS-M $\emptyset$	56.5 $\pm$ 2.3*	187.0 $\pm$ 10.6**
+L-NMMA	19.0 $\pm$ 2.0*	136.7 $\pm$ 6.8**
+AG	18.0 $\pm$ 1.8*	118.0 $\pm$ 10.8**
+SOD	44.3 $\pm$ 2.2*	164.9 $\pm$ 12.3**
IFN- $\gamma$ -M $\emptyset$	56.0 $\pm$ 2.0*	153.3 $\pm$ 12.0**
+L-NMMA	18.3 $\pm$ 5.0**	105.4 $\pm$ 11.4***
+AG	17.5 $\pm$ 0.5**	102.9 $\pm$ 13.3***
+SOD	53.0 $\pm$ 1.9*	145.9 $\pm$ 13.9**

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて6回の平均を求め、standard error で表現した。Hepatocyte (-)：肝細胞と共培養しない場合、Hepatocyte (+)：肝細胞と共培養した場合、None：何も添加しない場合、M $\emptyset$ ：脾マクロファージ、LPS-M $\emptyset$ ：LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) で8時間刺激した脾マクロファージ、IFN- $\gamma$ -M $\emptyset$ ：IFN- $\gamma$  (1000 units/ml) で8時間刺激した脾マクロファージ、L-NMMA：N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine (100  $\mu\text{M}$ )、AG：aminoguanidine (10  $\mu\text{M}$ )、SOD：superoxide dismutase (300 units/ml)。\* $p$ <0.05 vs None, \* $p$ <0.05 vs LPS-M $\emptyset$ , \* $p$ <0.05 vs IFN- $\gamma$ -M $\emptyset$ , \* $p$ <0.05 vs Hepatocyte (-)。脾マクロファージの培養液中の nitrite と nitrate 濃度は、種々の試薬を添加した後、8時間後に測定した。(Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30 (9): 1019-1028, 2001 の table 1 より許可を得て転載)

濃度は、観察中大きな変化は認められなかった。しかし LPS で刺激した脾マクロファージでは約4倍、IFN- $\gamma$  で刺激した脾マクロファージでも約4倍の上昇が認められた。肝細胞と共培養して8時間後、LPS で刺激した脾マクロファージで、無刺激脾マクロファージの単培養に比べて約10倍、IFN- $\gamma$  で刺激した脾マクロファージでも約8倍の上昇が認められた。これらの nitrite と nitrate 濃度の上昇は単培養あるいは共培養のいずれにおいても L-NMMA や aminoguanidine の処置によって抑制された。しかし、SOD の投与によっては、単培養または共培養のいずれにおいても抑制されなかった。一方、LPS で刺激した単培養の肝細胞の nitrite と nitrate 濃度は、コントロールに対して上昇せず 23.3 $\pm$ 1.3 ( $\mu\text{mole/l}$ ) にとどまった (この値は図に示していない)。

### 3. 肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG 測定法

肝細胞の DNA を用いて、8-OH-dG/dG につき HPLC で測定した代表的な結果を第2図に示す。我々の予備実験の結果では、肝細胞の DNA 障害は脾マクロファージとの共培養16時間後に発現し、24時間後に有意となる成績が得られた。それゆえに、本実験においては DNA 抽出前に24時間 LPS で刺激した脾マクロファージと肝細胞を共培養した。この第2図において、8-OH-

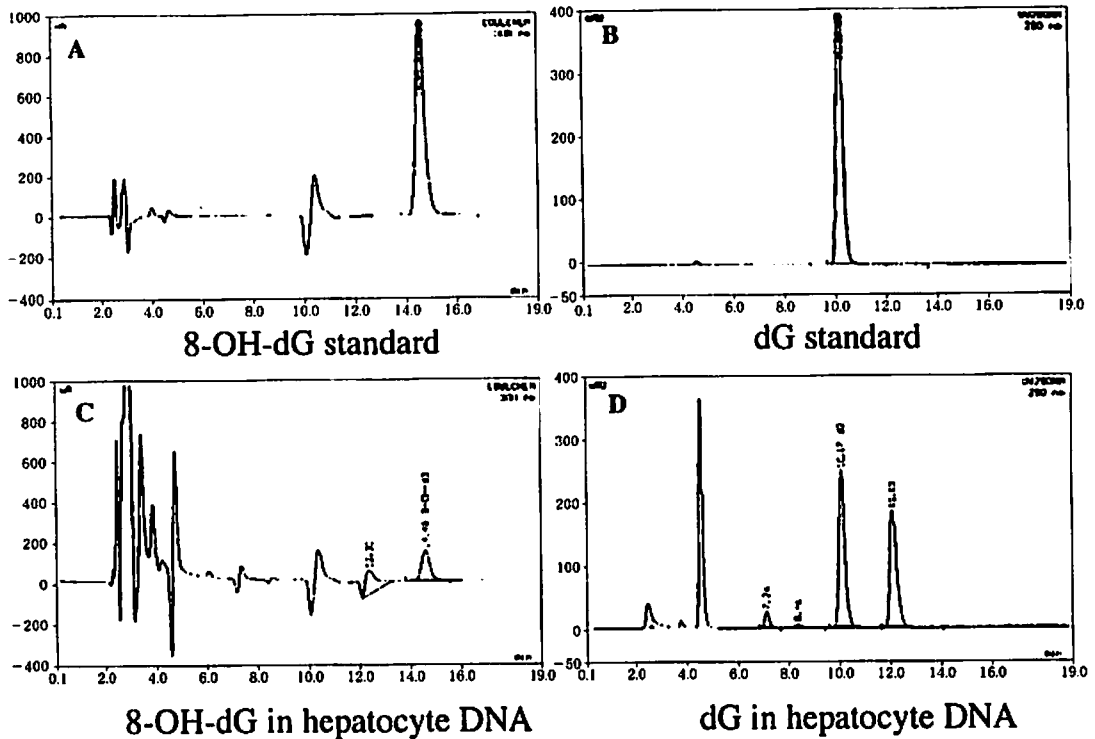
dG は14~15分に、dG は約10分のところに標準物質が出現しており、その部位に当たる範囲を検体において測定し計算した。この実験において、LPS で刺激した脾マクロファージと肝細胞を共培養した後、肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG 値は 4.81 $\pm$ 0.67 であった。

### 4. 肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG 測定値

第2表は、肝細胞 DNA の 8-OH-dG/dG と PI 陽性細胞を、24時間脾マクロファージと共培養した場合、さらに種々の試薬を投与した場合に分けて表示をした。細胞膜の破壊を示す PI 陽性細胞数の%は、LPS で刺激した脾マクロファージと共培養した後に上昇を認めた。それゆえ生き残った細胞のみを 8-OH-dG/dG を測定するために使用した。活性化されていない無刺激の脾マクロファージとの共培養では、肝細胞での 8-OH-dG/dG は上昇を認めなかった。一方、LPS や IFN- $\gamma$  で刺激した脾マクロファージと24時間共培養した肝細胞は、著明な上昇を認めた。L-NMMA, aminoguanidine, SOD はともに、LPS や IFN- $\gamma$  で刺激した脾マクロファージで培養した肝細胞の 8-OH-dG/dG の上昇を有意に抑制した。

### 5. 肝細胞の単鎖 DNA (AO 染色)

第3図に、LPS で刺激した脾マクロファージと、24

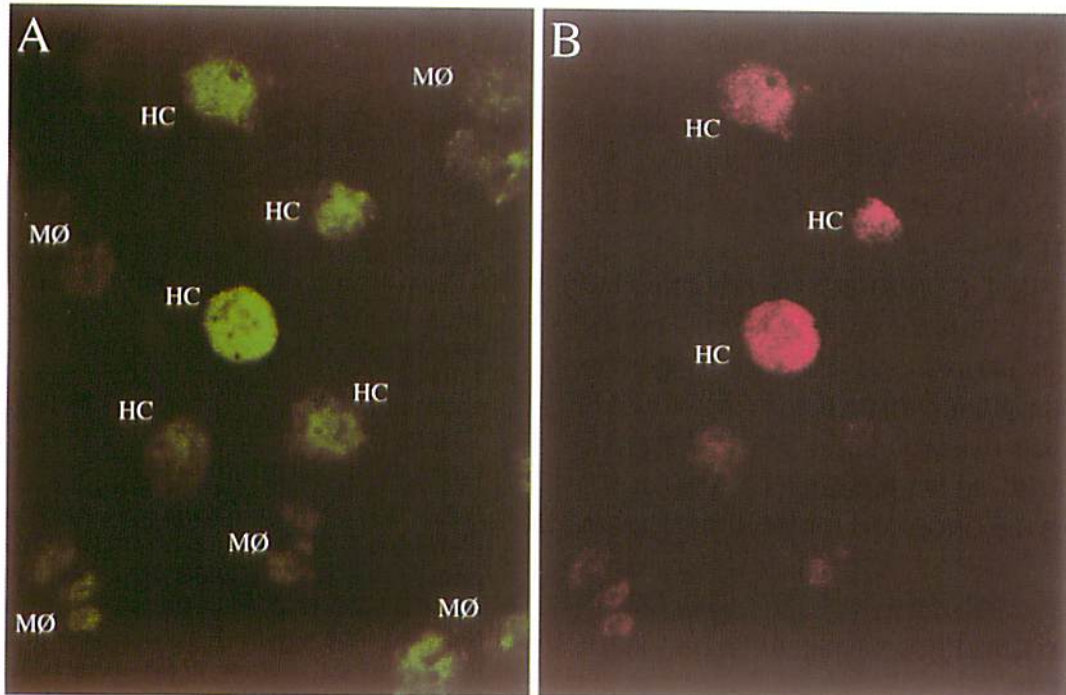


第2図 肝細胞のDNAを用いて、8-OH-dG/dGにつきHPLCで測定した代表的な結果。この図において、8-OH-dGは14-15分に、dGは約10分のところに標準物質が出現しており、その部位に当たる範囲を検体において測定し計算した。(Watanabe N et al : Free Radical Biology Medicine. 30 (9) : 1019-1028, 2001 の Fig. 2より許可を得て転載)

第2表 肝細胞DNAの8-OH-dG/dGとPI陽性細胞の比率。単独で培養した場合と24時間脾マクロファージと共培養した場合、さらに種々の試薬を投与した場合の影響。

	8-OH-dG/dG ratio in hepatocytes ( $\times 10^{-5}$ )	PI-positive hepatocytes (%)
None	1.05 $\pm$ 0.20	2.90 $\pm$ 0.50
MØ	1.30 $\pm$ 0.17	3.10 $\pm$ 0.60
LPS-MØ	4.81 $\pm$ 0.67 *	22.50 $\pm$ 2.60*
+ L-NMMA	2.27 $\pm$ 0.20 * <sup>†</sup>	8.20 $\pm$ 1.30* <sup>†</sup>
+ AG	2.19 $\pm$ 0.22 * <sup>†</sup>	9.30 $\pm$ 1.70* <sup>†</sup>
+ SOD	2.82 $\pm$ 0.25 * <sup>†</sup>	11.10 $\pm$ 1.50* <sup>†</sup>
IFN- $\gamma$ -MØ	6.65 $\pm$ 0.55 *	24.30 $\pm$ 2.10 *
+ L-NMMA	2.55 $\pm$ 0.33 **	12.50 $\pm$ 2.00**
+ AG	3.09 $\pm$ 0.35 **	10.80 $\pm$ 1.20**
+ SOD	3.90 $\pm$ 0.45**	14.30 $\pm$ 1.40**

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて6回の平均を求め、satnadard errorで表現した。8-OH-dG : 8-hydroxy-deoxyguanosine. dG : deoxyguanosine. 8-OH-dGとdGは高速液体クロマトグラフィー電気化学測定器とUV検出器で測定した。\* $p < 0.05$  vs None, <sup>†</sup> $p < 0.05$  vs LPS-MØ, <sup>‡</sup> $p < 0.05$  vs IFN- $\gamma$ -MØ. 8-OH-dG/dGの比は、共培養した後24時間後に測定した。(Watanabe N et al : Free Radical Biology Medicine. 30 (9) : 1019-1028, 2001 の table 2より許可を得て転載)



第3図 LPSで刺激した脾マクロファージ(MØ)と、24時間共培養した肝細胞(HC)のAO染色写真。緑色蛍光(A)は、二本鎖DNAと結びついたAOを示し、赤色蛍光(B)は、単鎖DNAと結びついたAOを示す。(×1260)(Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30(9):1019-1028, 2001のFig. 3より許可を得て転載)

第3表 活性化された脾マクロファージと共培養した後24時間の肝細胞の単鎖DNA

	Rate of hepatocytes with single stranded DNA (%)
None	4.8±0.6
MØ	5.4±1.0
LPS-MØ	43.2±4.8*
+L-NMMA	19.2±2.5**
+AG	21.0±2.6**
+SOD	19.8±2.1**
IFN-γ-MØ	45.1±3.3*
+L-NMMA	18.9±2.1**
+AG	16.5±1.7**
+SOD	14.2±1.3**

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて6回の平均を求め、satnadard errorで表現した。肝細胞の単鎖DNAの比率は、AO染色で施行した。\*p<0.05 vs None, \*\*p<0.05 vs LPS-MØ, #p<0.05 vs IFN-γ-MØ。肝細胞の単鎖DNAの比率は、添加後24時間で測定した。(Watanabe N et al: Free Radical Biology Medicine. 30(9):1019-1028, 2001のtable 3より許可を得て転載)

時間共培養した肝細胞のAO染色写真を示した。蛍光(A)は、脾マクロファージと肝細胞の核内中のAOで染まった二本鎖DNAを示し、蛍光(B)は、そのうち特に核内中のAOで染まった単鎖DNAを示した。これより蛍光(A)で染色されていた脾マクロファージは、蛍光(B)では傷害を受けなかったために染色されておらず、また傷害を受けなかった肝細胞も蛍光(B)では染色されなかった。これらの写真から、蛍光(A)を発する全肝細胞中のうち傷害を受けたであろう蛍光(B)を発する肝細胞の比率を計算して、単鎖DNAの割合として第3表に示した。肝細胞のみ24時間培養した時は単鎖DNA比率は、上昇を認めなかった。また無刺激の脾マクロファージは、単鎖DNAの肝細胞の割合を上昇させなかった。しかし、LPSやIFN-γで刺激した脾マクロファージと24時間共培養した肝細胞では、単鎖DNAの比は著明に上昇を認めた。また第3表には、活性化された脾マクロファージと共培養した後24時間の肝細胞の単鎖DNA比率に対する種々の薬物の効果をあらわした。L-NMMA, aminoguanidine, SODは、LPSやIFN-γで刺激した脾マクロファージで培養した肝細胞の単鎖DNA比率の上昇を抑制した。さらに活性化された脾マクロファージと共培養した後の肝細胞DNA変化に



おける活性酸素の役割を見るために、NOとO<sub>2</sub><sup>-</sup>両者を産生するSIN-1の効果や、ONOO<sup>-</sup>の効果、およびSIN-1やONOO<sup>-</sup>投与下でのSODの効果につき検討した。

6. SIN-1やONOO<sup>-</sup>投与の肝細胞DNAの8-OH-dG/dGに対する影響

第4表はSIN-1やONOO<sup>-</sup>投与の肝細胞DNAの8-OH-dG/dGに対する影響を示した。SIN-1 (>1 mM)やONOO<sup>-</sup> (>100 μM)と24時間培養後、肝細胞の8-OH-dG/dGは用量依存的に上昇を認めた。SODを加えることにより10 mMのSIN-1で培養した肝細胞における8-OH-dG/dGの上昇効果を著明に抑制したが、1 mMで培養したONOO<sup>-</sup>ではその抑制効果は認められなかった。

7. SIN-1やONOO<sup>-</sup>投与の肝細胞の単鎖DNA出現比率に与える影響

第5表はSIN-1や、ONOO<sup>-</sup>投与が、AO染色にて評価した肝細胞の単鎖DNA出現比率に与える影響を示した。SIN-1 (>1 mM)やONOO<sup>-</sup> (>100 μM)を投与し24時間培養後、肝細胞の単鎖DNA比率は著明に上昇を認めた。SODを加えることにより10 mMのSIN-1で培養した肝細胞の単鎖DNA比率を著明に抑制したが、1 mMで培養したONOO<sup>-</sup>による単鎖DNA比率に

第4表 SIN-1やONOO<sup>-</sup>投与の肝細胞DNAの8-OH-dG/dGに対する影響。

	8-OH-dG/dG ratio in hepatocytes (×10 <sup>-5</sup> )
None	1.21±0.14
SIN-1	
100 μM	1.30±0.12
1 mM	5.71±0.99*
10 mM	10.71±1.42*
SIN-1(10 mM)+SOD	4.36±1.24**
peroxynitrite	
10 μM	1.61±0.12
100 μM	11.71±0.99*
1 mM	24.65±2.30*
Peroxynitrite (1 mM)+SOD	20.33±1.87*

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて6回の平均を求め、satnadard errorで表現した。SIN-1, peroxynitrite, SODを肝細胞培養液に添加し、24時間後の8-OH-dG/dGを測定した。\*p<0.05 vs None, \*p<0.05 vs SIN-1. (Watanabe N et al : Free Radical Biology Medicine. 30 (9) : 1019-1028, 2001のtable 4より許可を得て転機)

第5表 SIN-1やONOO<sup>-</sup>投与が、肝細胞の単鎖DNA出現比率に与える影響。

	Rate of hepatocytes with single stranded DNA (%)
None	4.5±0.5
SIN-1	
100 μM	4.6±0.4
1 mM	38.6±4.4 *
10 mM	60.3±7.8 *
SIN-1(10 mM)+SOD	22.1±2.2 **
peroxynitrite	
10 μM	4.8±0.4
100 μM	60.5±4.4 *
1 mM	82.6±6.5
Peroxynitrite (1 mM)+SOD	78.5±9.3*

数値は、異なるラットから各々取り出した細胞を用いて6回の平均を求め、satnadard errorで表現した。SIN-1, peroxynitrite, SODを肝細胞培養液に添加し、24時間後の肝細胞の単鎖DNA出現比率を測定した。\*p<0.05 vs None, \*p<0.05 vs SIN-1. (Watanabe N et al : Free Radical Biology Medicine. 30 (9) : 1019-1028, 2001のtable 5より許可を得て転機)

対しては抑制効果を示さなかった。

考 案

本研究の結果より、活性化された脾マクロファージが、肝細胞のDNAに傷害を与えることが明らかになった。教室のKuroseらは、NOの選択的合成阻害薬L-NMMAを加えることによって、肝細胞<sup>33)</sup>と肝癌細胞<sup>35,41)</sup>の両者でKupffer細胞によって生じたミトコンドリアの障害を減少したことを報告した。今回の研究にて、活性化されたマクロファージの培養液中に過剰なNO産生を認め、脾マクロファージや肝細胞内でのiNOS発現を認めた。さらにNO合成阻害薬が、マクロファージにより惹起された肝細胞変化、すなわちnitro-tyrosineの形成とDNA傷害を抑制したことを示した。これらの結果を考え合わせると、LPSやIFN-γで刺激された脾マクロファージによってiNOSの発現が亢進し、多量のNOを生じた結果、肝細胞傷害を引き起こしたと想定される。サイトカインや脂質メディエーターや活性酸素などの種々のメディエーターは炎症が生じた肝臓において多量に放出されることが知られており<sup>7,42)</sup>、とくにIFN-γやTNF-αは、マクロファージによるNO産生を刺激する物質として知られている。これらはさらに、炎症を起こした肝臓や他の臓器において細胞傷害を引き起こす物質を誘導すると考えられている<sup>43,44)</sup>。

NO依存性のTNF-αの役割は知られているが、NO依

存性および NO 非依存性の IFN- $\gamma$  による肝細胞傷害については未だ詳細が明らかでない。そこで本研究では、IFN- $\gamma$  の NO 産物に対する影響とそれに引き続く肝細胞傷害について LPS と比較して検討を加えた。IFN- $\gamma$  で刺激した脾マクロファージと肝細胞の共培養液中では、LPS で刺激した脾マクロファージと同様に 8 時間で nitrite と nitrate 濃度の上昇を認めた。さらに、肝細胞 DNA 傷害は NO 合成阻害薬で効果的に抑制を認めた。これらの結果は、肝細胞に対する IFN- $\gamma$  で刺激をした脾マクロファージの傷害性がやはり過剰に産生された NO に依存していることを示している。これまでの研究結果と考え合わせ、これらの成績からエンドトキシン血症の際に、脾臓や肝臓の炎症細胞が LPS で直接刺激されるという以外に、活性化されて遊走してきた脾マクロファージが、炎症により増加した IFN- $\gamma$  により、間接的に NO 依存性に肝細胞傷害を起こすという傷害経路が考えられた。NO とその酸化的代謝物の一つである ONOO $^-$  は種々のステップにて肝細胞のミトコンドリアのエネルギー代謝を抑制する。一般的に、細胞の ATP 減少は虚血再灌流によってもたらされる細胞傷害の特徴であるが、ミトコンドリアの ATP 合成の崩壊は、種々の活性酸素によって引き起こされる傷害により肝細胞死を導く<sup>45)</sup>。したがってミトコンドリア障害は、NO や ONOO $^-$  によって肝細胞傷害が惹起される際の大きな要因となると考えられる。とくに ONOO $^-$  は NO と O $_2^-$  から産成され、非常に毒性の強い活性酸素となる<sup>46)</sup>。本研究で最も重要な所見の一つは、SOD や NO 合成阻害剤が、活性化された脾マクロファージと共培養した後に見られた肝細胞 DNA 傷害を抑制したことであるが、このことは NO と O $_2^-$  の両者の代謝経路がこのモデルでの肝細胞傷害に役割を果たすことを示している。またこの結果は、ONOO $^-$  が、活性化されたマクロファージによる肝細胞傷害の発生に一役買っている可能性を示唆しており、この仮説は、活性化脾マクロファージと共培養した肝細胞において nitrotyrosine の存在が免疫蛍光染色から明らかにされた事実によっても支持される。しかし nitrotyrosine は ONOO $^-$  に特異的なものでない<sup>47)</sup>。我々は、このモデルにおいて、ONOO $^-$  が直接肝細胞傷害に関与していると断定することはできない。しかし、やはり本実験で NO と O $_2^-$  を放出し結果的に ONOO $^-$  を産生する SIN-1 を加えることにより、効率的に肝細胞 DNA 傷害を生じたという結果から、ONOO $^-$  は NO 依存性の肝傷害の主要な成因の一つであると考えられる。

LPS で刺激されたマクロファージに由来した大量の NO が肝細胞ミトコンドリア障害を引き起こす可能性が、

これまでの成績<sup>33)</sup>および本研究の結果から考えられる一方、共培養中の肝細胞自体が NO を放出する可能性は残されている。さらに、活性化された脾マクロファージのみならず肝細胞自体が iNOS を産生していることも免疫蛍光染色によって示されている。しかし肝細胞単独での nitrite と nitrate の培養液濃度は、たとえ LPS や IFN- $\gamma$  で刺激後であっても変化は認められなかった。肝細胞のみでは多量の NO を産生する可能性は少ないと考えられる。ところが一方、本研究では、活性化された脾マクロファージ単独より肝細胞と共培養した場合の方が nitrite と nitrate の培養液濃度は高く、この共培養中の NO は、NO 阻害薬や SOD により効果的に阻害された。これらの結果は、LPS や IFN- $\gamma$  によって活性化された脾マクロファージによって放出されるメディエーターが肝細胞に iNOS の産生を刺激した可能性があり、これは以前の報告に一致している<sup>21,48)</sup>。マクロファージは、LPS や IFN- $\gamma$  の刺激に反応して、IL-1 や TNF- $\alpha$  などを含む種々の炎症性メディエーターを産生し放出することが知られている。一方、LPS とこれらのメディエーターが混在した場合には肝細胞に iNOS を生じることが示されている<sup>21,48)</sup>。教室の Kurose<sup>33)</sup>らサイトカイン刺激により産生された肝細胞由来の NO の一部が肝臓のミトコンドリアの機能を抑制する可能性を報告した。したがって、活性化された脾マクロファージによって誘導された肝細胞 iNOS が、この共培養の系において肝細胞傷害を惹起させる要因の一つとなっている可能性も否定できない。

本研究の目的の一つは、活性化された脾マクロファージによって肝細胞に重篤な傷害を引き起こした後に、残存する細胞に酸化的 DNA 傷害を生じることがどうかを明らかにすることであった。多くの臨床的知見から<sup>49-52)</sup>、肝臓の持続性の炎症に伴い傷害された多くの肝細胞は除去されるが、細胞のあるものは酸化的 DNA 傷害を受けたまま生き残ることが想定される。DNA にある C-8 基が、種々の酸化的活性物質、例えば還元剤<sup>53)</sup>、X 線<sup>54)</sup>、H $_2$ O $_2$  + アスベスト<sup>55)</sup>、H $_2$ O $_2$  + 鉄イオンを伴うポリフェノール<sup>56)</sup> などにより、生体内で水酸化され 8-OHdG になる。最近、Tannenbaum<sup>57,58)</sup>らは ONOO $^-$  を介する反応において 8-OHdG が形成されることを報告している。本研究では、LPS と IFN- $\gamma$  で刺激した脾マクロファージによって肝細胞を共培養した際に、コントロールと比較して 3~5 倍に 8-OHdG/dG 比は上昇していたが、この時点で活性化脾マクロファージと共培養後に生き残った肝細胞の数は、コントロールの肝細胞の約 40% に減少していた（データは示していない）。この際の肝細胞

内8-OHdGの上昇は、NO阻害薬やSODで阻害されることより、NOやONOO<sup>-</sup>が肝細胞DNA傷害の大きな原因であることを示唆している。また本研究におけるAO染色の結果は、活性化脾マクロファージで共培養した後に、生き残った肝細胞内での単鎖DNAの増加を示しており、それはやはりSODやNO阻害薬によって効果的に抑制された。DNA単鎖はDNA傷害のもう一つのマーカーであり、初期を示唆するかも知れない。したがって、もし肝細胞に炎症が続き慢性化した場合には、活性化されたマクロファージやその近傍に存在する肝細胞より放出されるNOおよびONOO<sup>-</sup>が、生き残った肝細胞にDNA傷害を引き起こす可能性があり、将来的な発癌にもつながるのではないかと想像された<sup>59)</sup>。

## 総 括

1. 活性化脾マクロファージと肝細胞の共培養により以下の結果を得た。

1) IFN- $\gamma$ やLPSで刺激した脾マクロファージと肝細胞の共培養液中では、8時間でnitriteとnitrate濃度の上昇を認めた。さらに、これらはNO合成阻害薬で効果的に抑制を認めた。このことにより、活性化脾マクロファージと肝細胞の共培養により、NOが産生されることが明らかとなった。

2) 免疫蛍光染色により、8時間LPSで刺激した脾マクロファージと共培養した脾マクロファージと肝細胞はiNOS抗体、nitrotyrosineを示す蛍光の両方で増強しているのが観察された。nitrotyrosineはONOO<sup>-</sup>に特異的なものでないが、ONOO<sup>-</sup>の関与が疑われた。

3) 肝細胞の酸化的DNA傷害を見るために8-OHdG/dG比を測定した。LPSとIFN- $\gamma$ で刺激した脾マクロファージによって肝細胞を共培養した際に、コントロールと比較して3-5倍に8-OHdG/dG比は上昇した。この際の肝細胞内8-OHdGの上昇は、NO阻害薬やSODで阻害された。このことより、活性化されたマクロファージや肝細胞より放出されるNOやONOO<sup>-</sup>が、肝細胞DNA傷害の大きな原因であることが示された。

4) DNA傷害のもう一つのマーカーであるDNA単鎖を見るためにAO染色を行った。その結果、活性化脾マクロファージで共培養した後に、生き残った肝細胞内での単鎖DNAの増加を示しており、それはやはりSODやNO阻害薬によって効果的に抑制された。

このことから、活性化された脾マクロファージやその近傍に存在する肝細胞より放出されるNOやONOO<sup>-</sup>が肝細胞DNA傷害の大きな原因であることが示された。

2. 活性化された脾マクロファージと共培養した後の肝細胞DNA変化における活性酸素の役割を見るために、NOとO<sub>2</sub>両者を産生するSIN-1の効果や、ONOO<sup>-</sup>の効果、およびSIN-1やONOO<sup>-</sup>投与下でのSODの効果につき検討した。

1) SIN-1 (>1 mM)やONOO<sup>-</sup> (>100  $\mu$ M)と24時間共培養後、肝細胞の8-OH-dG/dGは用量依存的に上昇を認めた。SODを加えることにより10 mMのSIN-1で培養した肝細胞における8-OHdG/dGの上昇効果を著明に抑制したが、1 mMで培養したONOO<sup>-</sup>ではその抑制効果は認められなかった。

2) SIN-1 (>1 mM)やONOO<sup>-</sup> (>100  $\mu$ M)を投与し24時間共培養後、肝細胞の単鎖DNA比率は著明に上昇を認めた。SODを加えることにより10 mMのSIN-1で培養した肝細胞の単鎖DNA比率を著明に抑制したが、1 mMで培養したONOO<sup>-</sup>による単鎖DNA比率に対しては抑制効果を示さなかった。

このことによりNOやONOO<sup>-</sup>が肝細胞DNA傷害の大きな原因であり、用量依存的に傷害されることが示された。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教授石井裕正教授に深甚なる謝意をあらわします。本研究にあたって直接御指導御助言いただきました防衛医科大学校内科学第二講座教授三浦総一郎教授に深謝致します。さらに、本研究に当たり多大な御協力いただきました消化器内科学教室の諸各先生方に厚く御礼申し上げます。本研究の一部は第32回日本肝臓病学会総会、第96回全米消化器病学会(San Francisco, 1996)第47回全米肝臓病学会(Chicago, 1996)にて発表した。本研究の一部は、1996、1997、1998年度文部省科学研究費(奨励研究A番号32612)により援助を受けた。

## 文 献

- 1) Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Omata M: Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: prospective study of 251 patients. *Hepatology* 21: 650-655, 1995
- 2) Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M, Ogura K, Niwa Y, Kawabe T, Omata M: Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B-and C-viral infection in Japan. *Hepatology* 22: 1027-1033, 1995
- 3) Stark ME, Szurszewski JH: Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 1103: 1928-1949, 1992

- 4) Whittle BJ, Moncada S : Nitric oxide : the elusive mediator of the hyperdynamic circulation of cirrhosis? *Hepatology* 16 : 1089-1092, 1992
- 5) Bomson A, Blendis LM : The nitric oxide hypothesis and the hyperdynamic circulation in cirrhosis. *Hepatology* 20 : 1343-1350, 1994
- 6) Abelmann WH : Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later : pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 20 : 1359-1363, 1994
- 7) Rosser BG, Gores GJ : Liver necrosis : Cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108 : 252-275, 1995
- 8) Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S : Increased serum nitrite and nitrate levels in patient with cirrhosis : relationship to endotoxemia. *Hepatology* 18 : 1139-1143, 1993
- 9) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S : Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524-526, 1987
- 10) Furchgott RF, Vanhoutte PM : Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3 : 2007-2019, 1989
- 11) Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, West MA, Bentz BG, Simmons RL : An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis *in vitro*. *J Exp Med* 169 : 1467-1472, 1989
- 12) Schmidt HHHW, Seifert R, Bohme E : Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B4. *FEBS Lett* 244 : 357-362, 1989
- 13) Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL : Hepatocyte produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells. *J Exp Med* 170 : 1769-1774, 1989
- 14) Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levi R, Nathan CF : Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 169 : 1011-1020, 1989
- 15) Rockey DC, Chung JJ : Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 95 (3) : 1199-1206, 1995
- 16) Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC : Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 105(6) : 741-748, 2000
- 17) Rockey DC : Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver. *Semin Liver Dis* 21(3) : 337-349, 2001
- 18) Gaillard T, Mulsch A, Busse R, Klein H, Decker K : Regulation of nitric oxide production by stimulated rat Kupffer cells. *Pathobiology* 59 (4) : 280-283, 1991
- 19) Spitzer JA : Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats. *Hepatology* 19 (1) : 217-228, 1994
- 20) Billiar TR, Curran RD, Ferrari FK, Williams DL, Simmons RL : Kupffer cell : hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J Surg Res* 48 : 349-353, 1990
- 21) Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG, Simmons RL : Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 212 : 462-471, 1990
- 22) Moncada S : The L-arginine : nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 145 : 201-227, 1992
- 23) Nathan C : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 : 3051-3064, 1992
- 24) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 3 : 109-142, 1991
- 25) Hibbs JB, Taintor RR, Varin Z, Rachin EM : Nitric oxide : a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 57 : 87-94, 1988
- 26) Stuehr DJ, Nathan CF : Nitric oxide : a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169 : 1543-1555, 1989
- 27) Ferluga J, Allison AC : Role of mononuclear infiltration cells in pathogenesis of hepatocytes. *Lancet* 2 : 610-611, 1978
- 28) Shiratori Y, Tanaka M, Umihara J, Kawase T, Shiina S, Sugimoto T : Leukotriene inhibitors modulate hepatic injury induced by lipopolysaccharide-activated macrophages. *Journal of Hepatology* 10 : 51-61, 1990
- 29) Mizukami T, Yokoyama H, Okamura Y, Ohgo H, Fukuda M, Kamegaya Y, Kato S, Ishii H : Splenectomy attenuates superoxide anion release into the hepatic sinusoids after lipopolysaccharide challenge. *Journal of Hepatology* 31(2) : 235-241, 1999
- 30) Radi R, Beckmann JS, Bush KM, Freeman BA : Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266 : 4244-4250, 1991
- 31) Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer LK : DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254 : 1001-1003, 1991
- 32) deRojas-Walker T, Tamir S, Hong Ji, Wishnok JS, Tannenbaum SR : Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage

- DNA. *Chem Res Toxicol* 8 : 473-477, 1995
- 33) Kurose I, Kato S, Ishii H, Fukumura D, Miura S, Suematsu M, Tsuchiya M : Nitric oxide mediates lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial function in cultured hepatocytes and isolated perfused liver. *Hepatology* 18 : 380-388, 1993
- 34) Kurose I, Miura S, Saito H, Tada S, Fukumura D, Higuchi H, Ishii H : Rat Kupffer cell-derived nitric oxide modulates induction of lymphokine-activated killer cell. *Gastroenterology* 109 : 1958-1968, 1995
- 35) Kurose I, Ebinuma H, Higuchi H, Yonei Y, Saito H, Kato S, Miura S, Ishii H : Nitric oxide mediates mitochondrial dysfunction in hepatoma cells induced by non-activated Kupffer cells : An evidence implicating ICAM-1 dependent process. *J Gastroenterol Hepatol* 10 : S68-S71, 1995
- 36) Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN : Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 74 : 376-382, 1994
- 37) Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW : Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 110 : 963-968, 1993
- 38) Hasan K, Heesen B J, Corbett JA, McDaniel ML, Chang K, Allison W, Wolffenbuttel BHR, Williamson JR, Tilton RG : Inhibition of nitric oxide formation by guanidines. *Eur J Pharmacol* 249 : 101-106, 1993
- 39) Granger DL, Hibbs JBJr, Perfect JR, Durack DT : Metabolic fate of L-arginine in relation to microbostatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest* 85 : 264-273, 1990
- 40) Kasai H, Chain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootuyama A, Tanooka H : Formation of 8-hydroxyguanosine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7 : 1849-1851, 1986
- 41) Kurose I, Miura S, Fukumura D, Yonei Y, Saito H, Tada S, Suematsu M, Tsuchiya M : Nitric oxide mediates Kupffer cell-induced reduction of mitochondrial energization in syngeneic hepatoma cells : A comparison with oxidative burst. *Cancer Res* 53 : 2676-2682, 1993
- 42) Decker K : Biological active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192 : 245-261, 1990
- 43) Sheehan KC, Schreiber RB : The synergy and antagonism of interferon- $\gamma$  and TNF. *Tumor Necrosis Factor*. (Ed) Beutler B, Raven Press, New York, p. 145-178, 1992
- 44) Wong GH, Goeddel DV : *Tumor necrosis factor. Human Monocytes*. (Ed) Asherson, GL, Zembala, M, Academic Press, New York, p.195-215, 1989
- 45) Nieminen AL, Dawson TL, Gores GJ, Herman B, Lemasters JJ : Protection by acidotic pH and fructose against lethal injury to rat hepatocytes from mitochondrial inhibitors, ionophores and oxidant chemicals. *Biochem Biophys Res Commun* 167 : 600-606, 1990
- 46) Beckmann JS, Beckmann TW, Chen J, Marshall P, Freeman BA : Apparent hydroxy radical production by peroxynitrite : Implications of endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1620-1624, 1990
- 47) Eiserich JP, Cross CE, Jones AD, Halliwell B, van der Vliet A : Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* 271 : 19199-19208, 1996
- 48) Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, Madariaga, J, Simmons RL : Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 176 : 261-264, 1992
- 49) Sheldon WH, James DF : Cirrhosis following infectious hepatitis -a report of five cases, in two of which there was superimposed primary liver cell carcinoma. *Arch Int Med* 81 : 666-672, 1948
- 50) Bermann MM : Hepatocellular carcinoma, polygonal cell type with fibrous stroma -an atypical variant with favorable prognosis. *Cancer* 46 : 1448-1455, 1980
- 51) Peters RL : *Pathology of hepatocellular carcinoma. Hepatocellular Carcinoma*. (Ed) Okuda K, Peters RL, Wiley, New York, p.107-168, 1976
- 52) Anthony PP, Vogel CL, Barker LF : Liver cell dysplasia -a premalignant condition-. *J Clin Pathol* 26 : 217-223, 1973
- 53) Kasai H, Nishimura S : Hydroxylation of deoxyguanosine by the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res* 12 : 2137-2145, 1984
- 54) Kasai H, Tanooka H, Nishimura S : Formation of 8-hydroxyguanosin residues in DNA by X-irradiation. *Gann* 75 : 1037-1039, 1984
- 55) Kasai H, Nishimura S : DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. *Gann* 75 : 841-844, 1984
- 56) Kasai H, Nishimura S : Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by polyphenols and aminophenols in the presence of hydrogen peroxide an ferric ion. *Gann* 75 : 565-566, 1984
- 57) Tretyakova NY, Niles JC, Burney S, Wishnok JS, Tannenbaum SR : Peroxynitrite-induced reactions of synthetic oligonucleotides containing 8-oxoguanosine. *Chem Res Toxicol* 12 : 459-466, 1999
- 58) Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR : The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res* 424 : 37-49, 1999
- 59) Watanabe N, Miura S, Zeki S, Ishii H : Hepatocellular oxidative DNA injury induced by macrophage-derived nitric oxide. *Free Radical Biology Medicine* 30 : 1019-1028, 2001

学位論文

新生ラット摘出脳幹-脊髄標本における延髄呼吸中枢に対する橋の影響

慶義塾大学医学部内科学教室

(指導：小川 聡教授)

伊 藤 洋 子

(平成14年12月18日受付)

Key words : pons, A5 neurons, locus coeruleus, chemosensitivity, respiration

新生ラット摘出脳幹-脊髄標本は1984年 Suzue により発表された標本である<sup>1)</sup>。この標本では、高次脳機能や迷走神経からの求心性入力が存在しない状態でも周期的な呼吸性神経活動が認められる<sup>1)</sup>。さらに、この呼吸性神経活動の発火頻度は人工脳脊髄液の pH/Pco<sub>2</sub> に応じて変化する<sup>1-7)</sup>。したがって、この標本は呼吸性神経活動の産生および末梢への伝達機構ならびに細胞外 pH/Pco<sub>2</sub> に対する感受性(化学感受性)を備えた標本であるといえる。この標本で記録された呼吸性神経活動が *in vivo* の正常呼吸に相当するか否かは依然議論の余地のあるところだが<sup>8,9)</sup>、この標本は以上の理由により呼吸の神経生理学の分野において広く使用されている。

新生ラット摘出脳幹-脊髄標本において、橋は頭側延髄の腹外側に存在する呼吸中枢に対して抑制的に働いていることが知られている<sup>10-12)</sup>。この抑制作用は橋の腹外側に存在する A5 領域からのノルアドレナリン作動性出力によるものと考えられている<sup>10)</sup>。一方、橋の背側にも第4脳室底外側縁に沿ってノルアドレナリン作動性神経核である青斑核( locus coeruleus, 以下 LC と略す)が存在する。この神経核は、古典的には個体の覚醒反応やある種の情動(不安, パニック)の形成に関与していると考えられている<sup>14)</sup>。筆者らのグループは新生ラット摘出脳幹-脊髄標本において青斑核を形成しているニューロン(以下 LC ニューロンと略す)の膜電位および発火様式が呼吸性の修飾を受け、かつ高炭酸ガス性アシドーシスに対して化学シナプス伝達によらない内因性の興奮性応答を示すことを明らかにした<sup>5,6)</sup>。このことは、新

生ラット摘出脳幹-脊髄標本において LC が中枢性化学感受性を介して呼吸調節に関与している可能性を示唆する。したがって、A5 領域からの延髄呼吸中枢の抑制という従来の単純な考え方に、「化学感受性」および「LC の関与」を加味した新しい視点から呼吸中枢に与える橋の影響を見直す必要があると考え以下の検討を行った。

1) LC ニューロンの化学感受性が電気生理学的に明らかにされているのに対して<sup>5,6)</sup>、A5 領域を形成するニューロン(以下 A5 ニューロンと略す)の化学感受性については、ニューロン活性化の指標である Fos 蛋白が高炭酸ガス状態に曝露されたラットの A5 領域で発現していたという報告が存在するのみである<sup>15)</sup>。そこで、膜電位感受性色素を用いた光学的測定法<sup>16,17)</sup>および神経活動の細胞外記録法を利用して、より直接的にこの領域の化学感受性を検討することとした。膜電位感受性色素を用いた光学的測定法では、関心領域内の興奮性細胞の電気活動を多ポイントで同時に解析することが可能である。前述のとおり、LC ニューロンは高炭酸ガス性アシドーシスに対して内因性の興奮性応答を示すことがすでに電気生理学的に明らかにされている<sup>5,6)</sup>。そこで、LC と A5 領域を含む脳幹横断スライス標本を作成し、LC を positive control として A5 領域の高炭酸ガス性アシドーシスに対する反応を観察した。

2) 橋の抑制作用について検討された以前の研究<sup>10-12)</sup>では、LC が呼吸調節に関与している可能性は考慮されておらず、橋の背側に十分な注意が払われていたとは言いがたい。そこで、橋の背側にも注意を払って作成した新

Ito Y, Oyamada Y, Yamaguchi K : Age-dependent chemosensitive pontine inhibition of medullary respiratory rhythm generation in the isolated brainstem of neonatal rat. *Brain Res* 887 : 418-420, 2000 および Ito Y, Oyamada Y, Hakuno H, Yamaguchi K : Morphological analysis of developmental changes in pontine noradrenergic neuronal groups in the neonatal rat. *Brain Res* 925 : 107-109, 2002 の一部を含む

生ラット摘出脳幹-脊髄標本を用いて、延髄の呼吸中枢に与える橋の影響を再度検討することとした。

3) また、LCが化学感受性を有することおよびA5領域も化学感受性を有する可能性があることから、呼吸中枢に与える橋の影響が細胞外pH/Pco<sub>2</sub>の変化に応じて修飾される可能性があり、その点についても検討した。

4) さらに、生後日齢によって、呼吸中枢に与える橋の影響およびそれが細胞外pH/Pco<sub>2</sub>の変化によって修飾される程度の差異についても検討を加えた。

5) BezinらはラットのLCの体積は4日齢と42日齢では差がないことを報告した<sup>18)</sup>。また、Monjiらは3ヶ月齢のラットと24ヶ月齢のラットでA5ニューロンの数に明らかな相違を認めなかったと報告している<sup>19)</sup>。しかし、このような形態学的検討は新生ラットではなされていない。したがって、新生ラットにおいてA5領域とLCが経時的にどのような形態学的変化を示すかを検討し、それが延髄呼吸中枢に与える橋の影響とどのように関連しうるのかについて解析した。

## 方 法

### 1. 光学的測定法および細胞外記録法を用いたA5領域の化学感受性の検討

#### 1) スライス標本

深エーテル麻酔を施したSprague-DawleyあるいはWistarラット(1~4日齢:n=19)から、脳幹と脊髄を一塊にして取り出した(方法2-1参照)。摘出した脳幹からスライサー(DTK-1000, DSK, Kyoto, JapanあるいはVSL, WPI, FL, USA)を用いて橋横断スライス標本(厚さ300~1000μm)を作成した。LCおよびA5領域を含むスライス標本を実体顕微鏡下で第4脳室底を指標にして選別した。

#### 2) 人工脳脊髄液

人工脳脊髄液の組成はNaCl 125 mM, KCl 4.0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.0 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.0 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, ブドウ糖 30 mMとした。人工脳脊髄液を以下のいずれかの混合ガスと平衡させた。コントロールガス: 2%CO<sub>2</sub>, 98%O<sub>2</sub>, pH7.8, 高炭酸ガス性アシドーシスガス: 8%CO<sub>2</sub>, 92%O<sub>2</sub>, pH7.2。

#### 3) 光学的測定法<sup>18,17)</sup>

スライス標本(n=14)を蛍光膜電位感受性色素(di-4-ANEPPS, Molecular Probe, OR, USA; 濃度0.1 mg/ml)に15分間浸した。その標本を人工脳脊髄液で洗浄し、対物レンズ(Plan Apo 4×, NA=0.20)を取り付けた顕微鏡(Optiphot 2UD, Nikon, Tokyo,

Japan)下に設置した灌流槽内にピンで固定した。標本をコントロールガスで平衡させた人工脳脊髄液で灌流した(25~26°C, 7ml/min)。ラット脳アトラス<sup>20)</sup>を参考にしてスライス内の神経構造の概略を顕微鏡下で同定した。直流安定化電源(PD35-20, Kenwood, Tokyo, Japan)で駆動されているタングステンハロゲンランプ(250W; Oriol, CT, USA)から励起フィルター(λ=535±25 nm)とシャッターを通して標本に緑色光を照射した。スライス標本上の蛍光は吸収フィルター(λ>610 nm)を通し、高空間解像度(60×90 pixels)と高速解像度(20 ms)を有する高感度光学的測定システムMiCAM01(Brain Vision, Tsukuba, Japan)を用いて検出した。灌流液をコントロールガスで平衡させた人工脳脊髄液から高炭酸ガス性アシドーシスガスで平衡させた人工脳脊髄液に切り換えた際の各々のpixelにおける蛍光強度の変化(ΔF)を20 msec/frameの速度で連続的に記録した。アシドーシス刺激開始前を対照として蛍光強度の変化の割合(ΔF/F)を指標とすることで、スライス標本内の染色の不均等による部位毎の蛍光強度のムラを標準化した。ここで負のΔF/Fは膜の脱分極に対応する<sup>16)</sup>。関心領域のΔF/Fの時間的、空間的変化を偽色調画像で表示した。コントロールガスで平衡させた人工脳脊髄液から高炭酸ガス性アシドーシスガスで平衡させた人工脳脊髄液への切り替えをくり返し行い、各々の記録時間は1分間とした。尚、予備実験として、人工脳脊髄液を切り替えない実験を行い、その際には関心領域の蛍光強度に変化がないことをあらかじめ確認した。また、灌流槽内のpHをガラス電極で記録した。

#### 4) 神経活動の細胞外記録法

光学的測定法と同様に、スライス標本(n=5)を灌流槽内に固定しコントロールガスで平衡させた人工脳脊髄液で灌流した。記録用の電極として、外径1.0 mmのborosilicateガラス管(Clark Electromedical Instruments, GC100 TF-10, 芯入り)を縦引きプラー(PP-830, Narishige, Tokyo, Japan)を用いて細くし電極(先端内径1μm, 抵抗2 MΩ)として使用した。ガラス電極を0.2 M NaCl溶液で満した。電極から得られたシグナルを生体アンプ(AB-651J, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan; フィルター15~300 Hz)で増幅し、ペンレコーダー(WT-685G, Nihon-Kohden)上に、またスピーカーを通して音声として表した。ホルダーに取り付けた電極を顕微鏡下でスライス標本に刺入した後、マイクロマニピュレーター(MWS-31, Narishige)を用いて電極を動かし音声ガイド下にA5領域の神経活動を探索した。神経活動を発見した後、灌流液を高炭酸ガ

酸性アシドーシスガスで平衡させた人工脳脊髄液に切り換えて神経活動変化を観察した。観察後、電極先端から通電 (5  $\mu$ A, 3 分間) して記録部位のマーキングをおこなった。

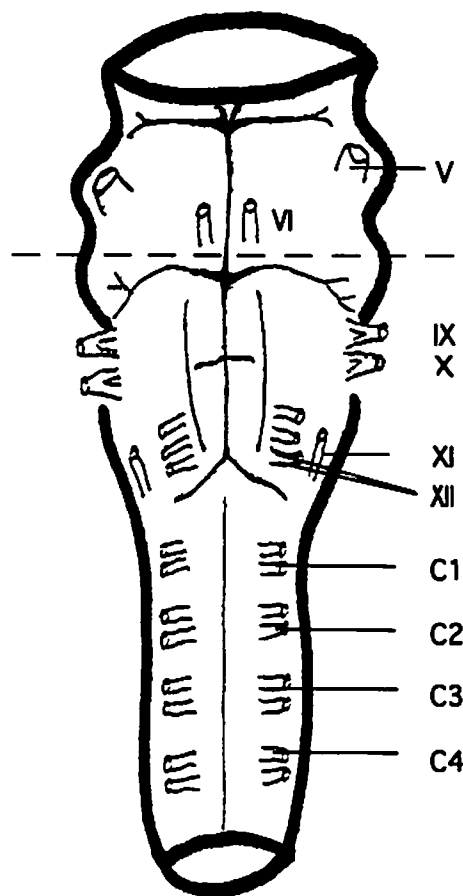
#### 5) 組織学的同定

記録後、スライス標本を 0.2% ピクリン酸, 4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 含有生理食塩水 (以下 PB と略す) からなる溶液で 48 時間固定した (4°C)。標本をパラフィン包埋した後, 25  $\mu$ m 厚の切片を作成しスライドガラス上に貼付して 60°C で一晩乾燥させた。脱パラフィン, 水和後, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加エタノール溶液に浸して (室温, 5 分間) 内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。続いて 10% ブタ血清に浸し (室温, 30 分間), 非特異反応を阻害した。切片をマウス抗 tyrosine hydroxylase 抗体 (Sigma, MO, USA, 1:50 希釈) と反応 (4°C, 一晩) させた後, horse radish peroxidase 標識抗マウス IgG ENVISION 試薬 (DAKO, Glostrup, Denmark) に浸した (37°C, 30 分間)。以上の方法によって作成した切片を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4), 3,3'-diaminobenzidine (DAB, 0.2 mg/ml) と 0.0015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて発色させた (室温, 5 分間) 後, ヘマトキシリン液で核染色 (室温, 20 秒間) を施した。脱水後, 封入し光学顕微鏡で観察した。

## 2. 呼吸性神経活動に与える橋の影響の検討

### 1) 新生ラット摘出脳幹-脊髄標本

標本の作成は基本的に Suzue の方法に従った<sup>1)</sup>。深エーテル麻酔を施した新生 Sprague-Dawley ラット (1~4 日齢: n=80) の頭部を眼窩の高さで前額断した後, 頭頂部から背部にかけて皮膚を剥離した。頭蓋骨を頭頂部から後頭部にかけて切除し, 大脳および中脳を切除した。頭蓋骨をさらに尾側に向かって切開し, 小脳及び背側延髄を露出した。両側前肢を切除した後, 体幹を横隔膜の高さで切除した。頭側を解剖用シャーレに移し, 腹側を上に向けてピンで固定した後, コントロールガスで平衡させた人工脳脊髄液で灌流した (室温)。胸郭を切除し, 食道, 気管, 肺, 及び心臓を一塊にして摘出した。実体顕微鏡下で脳神経根を切断しながら脳幹部を頭蓋底から注意深く切り離し, 続いて椎骨腹側を切除して頸部脊髄を露出した。さらに脊髄神経根を十分な長さが残るように切断した。脊髄を第 7 から 8 頸髄の高さで切断し, 脳幹及び脊髄を一塊にして摘出した (第 1 図)。尚, 小脳は小脳脚を切断する際に LC を傷つける恐れがあったため切除しなかった。第 4 脳室内のクモ膜脈絡組織を



第 1 図 新生ラット摘出脳幹-脊髄標本。点線は標本の切断部位を示す。V, VI, IV, X, XI, XII は、それぞれ、第 5, 6, 9, 10, 11, 12 脳神経根を示す。C1~C4 は第 1~4 頸髄神経前根を示す。(Y. Ito et al: Brain Res. 887: 418-420, 2000 の Fig. 1 を、許可を得て転載。一部改変)

剥離して第 4 脳室底を人工脳脊髄液で確実に灌流されるように露出した。標本を腹側を上にして灌流槽 (2.5 ml) に固定し, 蠕動ポンプ (312 MP1, Gilson, WI, USA) を用いてコントロールガス平衡人工脳脊髄液で灌流した (26~28°C, 7 ml/分)。

### 2) 記録

舌下神経根あるいは第 1~4 頸髄神経前根をガラス管電極で吸引した。これらの神経から得られた信号を増幅した後 (増幅器: AB-651J, Nihon-Kohden, フィルター 50~1000 Hz), インテグレーター (EI-601, Nihon-Kohden, 時定数 100 ms) で整流積算化し, ペンレコーダー (WT-685G, Nihon-Kohden) で記録した。呼吸性神経活動の発火頻度 (respiratory rate, 以下 RR と略す) を橋切断前後で測定した。測定は RR が安定した後の数分間で行い, その間の平均 RR (回/分) を算出



した。尚、測定中はRRの減少および呼吸性神経活動の振幅の減衰を認めなかった。橋切断前後のRRの差( $\Delta RR = \text{橋切断後のRR} - \text{橋切断前のRR}$ )を延髄呼吸中枢に与える橋の影響を示す指標として用いた。橋の切断は橋-延髄接合部で行った(第1図点線レベル)。尾側標本切断面への人工脳脊髄液の曝露を最小限にとどめ、組織の灌流と酸素化の状態が橋切断前後で同一となるように切断された橋を元の位置に残した。RRの測定は実験を通して同一神経根を用いて行った。標本を日齢(1~2日齢=Early, 3~4日齢=Late)と人工脳脊髄液の条件(コントロール, 高炭酸ガス性アシドーシス)に基づいて4グループ(Early群コントロール:n=20, Early群高炭酸ガス性アシドーシス:n=16, Late群コントロール:n=24, Late群高炭酸ガス性アシドーシス:n=20)に分類した。

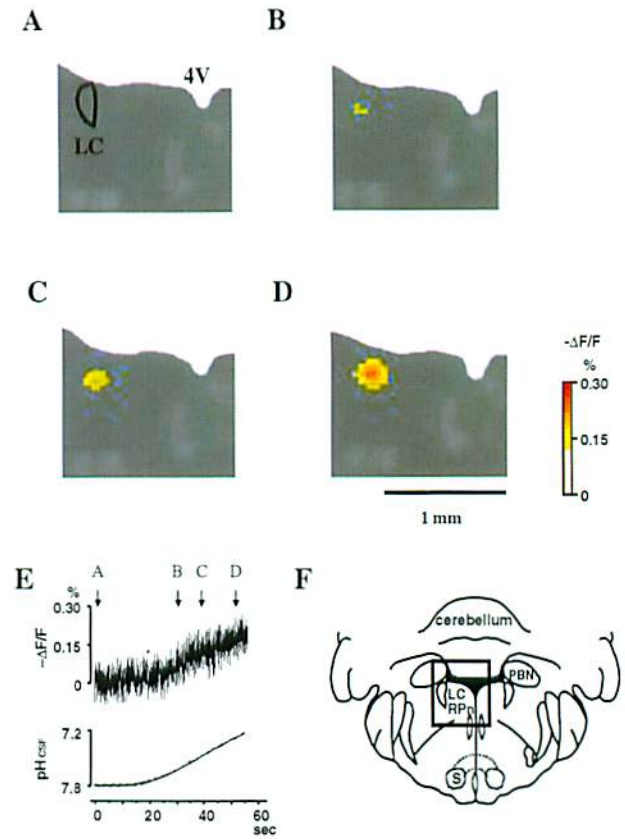
### 3. 免疫組織染色を用いたA5領域とLCの日齢による形態学的変化の検討

#### 1) 切片の作成

新生 Sprague-Dawley ラット (1~2日齢:n=10, 3~4日齢:n=9, 10日齢:n=7)に Sodium pentobarbital 30 mg/kgを腹腔内投与し深麻酔を施した。開胸し、左心室と右心室にカテーテルを挿入した。左心室に挿入したカテーテルから0.2%ピクリン酸, 4%パラホルムアルデヒド, 0.35%グルタルアルデヒドを含む0.1 M PB (4°C)を注入し脱血死させた。方法2-1と同様の手技で脳幹を取り出し、左右の混同を防ぐため正中線で矢状方向に切断した。脳幹を0.2%ピクリン酸, 4%パラホルムアルデヒドを含む0.1 M PBを用いて4°Cで48時間固定した後、橋の連続冠状切片(厚さ150  $\mu\text{m}$ )をスライサーを用いて作成した。これらの切片において以下に述べる方法でカテコラミン作動性神経を染色した。

#### 2) 染色

作成した切片を0.3% TritonX-100を含むPB (pH 7.4, 4°C)に数日間浸した。次に0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ を含むメタノール溶液に30分浸し、内因性ペルオキシダーゼを活性を阻害した。続いて10%二次抗体免疫動物血清(ヤギ血清)に10分間浸し、組織中のFcレセプターや高電荷物質との非特異的結合を阻害した。切片をマウス抗 tyrosine hydroxylase 抗体 (Sigma, 1:200希釈)と反応させた後、biotin 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Sigma, 1:200希釈)と反応させた。その後、切片を streptavidin-biotin-peroxidase-complex (DAKO, Glostrup, Denmark)の中に浸した。各々の反応時間は2



第2図 A~D: 光学的測定法によるLCの脱分極性応答の検出。スケールバーは $-\Delta F/F$ を表し脱分極の程度を示す。赤味を帯びるにつれて強い脱分極性応答であることを表している。高炭酸ガス性アシドーシスによりLCは経時的に増強する脱分極性応答を示している。4V; 第4脳室。LC; 青斑核。E: LCの $-\Delta F/F$ と人工脳脊髄液pH (pHCSF)の経時的变化。 $-\Delta F/F$ はpHCSFに8.3秒遅れて変化している。上段の矢印は左からそれぞれ図A, B, C, Dが得られた時間を表している。F: 橋スライス標本の略図。黒枠内が図A~Dに示された領域に対応している。LC; 青斑核。RPn; 縫線核。PBN; parabrachial nucleus。S; 上オリブ核。

時間(室温)とした。切片を50 mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)中で3,3-diamino-benzidine (DAB, 0.5 mg/ml)と0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ を用いて発色させた(室温, 10分間)後、スライドガラスに載せ光学顕微鏡で観察した。

#### 3) 計測法

A5領域とLCを含むすべての切片をデジタルカメラで撮影しコンピューター上に保存した。片側のA5領域に含まれる tyrosinehydroxylase 陽性細胞(A5ニューロン)の数を各切片ごとに数えA5ニューロンの総数を求めた。LC(第4脳室底の外側縁に沿った領域)に位置する tyrosinehydroxylase 陽性領域)に関しては、

- ceptibility gene and phenotypic characteristics of Wilms' tumour attributable to FWT1. *Hum Genet* 103 : 547-556, 1998
- 36) Rahman N, Arbour L, Tonin P, Renshaw J, Pelletier J, Baruchel S, Pritchard-Jones K, Stratton MR, Narod SA : Evidence for a familial Wilms' tumour gene (FWT1) on chromosome 17q12-q21. *Nat Genet* 13 : 461-463, 1996
- 37) Rahman N, Arbour L, Tonin P, Baruchel S, Pritchard-Jones K, Narod SA, Stratton MR : The familial Wilms' tumour susceptibility gene, FWT1, may not be a tumour suppressor gene. *Oncogene* 14 : 3099-3102, 1997
- 38) Yunis JJ, Ramsay NK : Familial occurrence of the aniridia-Wilms tumor syndrome with deletion 11p13-14.1. *J Pediatr* 96 : 1027-1030, 1980
- 39) Kaplinsky C, Ghahremani M, Frishberg Y, Rechavi G, Pelletier J : Familial Wilms' tumor associated with a WT1 zinc finger mutation. *Genomics* 38 : 451-453, 1996
- 40) Little MH, Williamson KA, Mannens M, Kelsey A, Gosden C, Hastie ND, Heyningen V : Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Hum Mol Genet* 2 : 259-264, 1993
- 41) Pritchard-Jones K, Rahman N, Gerrard M, Variend D, King-Underwood L : Familial Wilms tumour resulting from WT1 mutation : intronic polymorphism causing artefactual constitutional homozygosity. *J Med Genet* 37 : 377-379, 2000
- 42) Schroeder WT, Chao LY, Dao DD, Strong LC, Pathak S, Riccardi V, Lewis WH, Saunders GF : Nonrandom loss of maternal chromosome 11 alleles in Wilms tumors. *Am J Hum Genet* 40 : 413-420, 1987
- 43) Reeve AE, Sih SA, Raizis AM, Feinberg AP : Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells. *Mol Cell Biol* 9 : 1799-1803, 1989
- 44) Williams JC, Brown KW, Mott MG, Maitland NJ. Maternal allele loss in Wilms' tumour. *Lancet* 1 : 283-284, 1989
- 45) Jeanpierre C, Antignac C, Beroud C, Lavedan C, Henry I, Saunders G, Williams B, Glaser T, Junien C : Constitutional and somatic deletions of two different regions of maternal chromosome 11 in Wilms tumor. *Genomics* 7 : 434-438, 1990
-

- Med Genet 37 : 698-701, 2000
- 13) Shibata R, Hashiguchi A, Sakamoto J, Yamada T, Umezawa A, Hata J : Correlation between a specific Wilms tumour suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumour (WT). *J Med Genet* 39 : E83, 2002
  - 14) Tadokoro K, Oki N, Sakai A, Fujii H, Ohshima A, Nagafuchi S, Inoue T, Yamada M : PCR detection of 9 polymorphisms in the WT1 gene. *Hum Mol Genet* 2 : 2205-2206, 1993
  - 15) Sakamoto J, Takata A, Fukuzawa R, Kikuchi H, Sugiyama M, Kanamori Y, Hashizume K, Hata J : A novel wt1 gene mutation associated with wilms' tumor and congenital male genitourinary malformation. *Pediatr Res* 50 : 337-344, 2001
  - 16) Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J : Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor. *Pathology International* 53 : 214-220, 2003
  - 17) Little M, Holmes G, Bickmore W, Heyningen V, Hastie N, Wainwright B : DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by Denys-Drash syndrome WT1 point mutations. *Hum Mol Genet* 4 : 351-358, 1995
  - 18) Miyagawa K, Kent J, Moore A, Charlieu JP, Little MH, Williamson KA, Kelsey A, Brown KW, Hassam S, Briner J, Hayashi Y, Hirai H, Yazaki Y, Heyningen V, Hastie ND : Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour. *Nat Genet* 18 : 15-17, 1998
  - 19) Nakadate H, Yokomori K, Watanabe N, Tsuchiya T, Namiki T, Kobayashi H, Suita S, Tsunematsu Y, Horikoshi Y, Hatae Y, Endo M, Kodama Y, Eguchi H, Toyoda Y, Kikuta A, Kobayashi R, Kaneko Y : Mutations/deletions of the WT1 gene, loss of heterozygosity on chromosome arms 11p and 11q, chromosome ploidy and histology in Wilms' tumors in Japan. *Int J Cancer* 94 : 396-400, 2001
  - 20) Little MH, Prosser J, Condie A, Smith PJ, Heyningen V, Hastie ND : Zinc finger point mutations within the WT1 gene in Wilms tumor patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 4791-4795, 1992
  - 21) Gessler M, Konig A, Arden K, Grundy P, Orkin S, Sallan S, Peters C, Ruyle S, Mandell J, Li F, Cavenee W, Bruns G : Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' Tumors. *Hum Mutat* 3 : 212-222, 1994
  - 22) Little M, Wells C : A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat* 9 : 209-225, 1997
  - 23) King-Underwood L, Renshaw J, Pritchard-Jones K : Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood* 87 : 2171-2179, 1996
  - 24) Kohler B, Schumacher V, l'Allemand D, Royer-Pokora B, Grutters A : Germline Wilms tumor suppressor gene (WT1) mutation leading to isolated genital malformation without Wilms tumor or nephropathy. *J Pediatr* 138 : 421-424, 2001
  - 25) Breslow NE, Takashima JR, Ritchey ML, Strong LC, Green DM : Renal failure in the Denys-Drash and Wilms' tumor-aniridia syndromes. *Cancer Res* 60 : 4030-4032, 2000
  - 26) Pelletier J, Bruening W, Li FP, Haber DA, Glaser T, Housman DE : WT1 mutations contribute to abnormal genital system development and hereditary Wilms' tumour. *Nature* 353 : 431-434, 1991
  - 27) Kohler B, Schumacher V, Schulte-Overberg U, Biewald W, Lennert T, l'Allemand D, Royer-Pokora B, Grutters A : Bilateral Wilms tumor in a boy with severe hypospadias and cryptorchidism due to a heterozygous mutation in the WT1 gene. *Pediatr Res* 45 : 187-190, 1999
  - 28) Huff V : Genotype/phenotype correlations in Wilms' tumor. *Med Pediatr Oncol* 27 : 408-414, 1996
  - 29) Nagashima Y, Nishihira H, Miyagi Y, Tanaka Y, Sasaki Y, Nishi T, Imaizumi K, Aoki I, Misugi K : A nude mouse Wilms' tumor line (KCMC-WT-1) derived from an aniridia patient with monoallelic partial deletion of chromosome 11p. *Cancer* 77 : 799-804, 1996
  - 30) Zuppan CW, Beckwith JB, Weeks DA, Luckey DW, Pringle KC : The effect of preoperative therapy on the histologic features of Wilms' tumor. An analysis of cases from the Third National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 68 : 385-394, 1991
  - 31) Seemayer TA, Harper JL, Shickell D, Gross TG : Cytodifferentiation of a Wilms' tumor pulmonary metastasis : theoretic and clinical implications. *Cancer* 79 : 1629-1634, 1997
  - 32) Ishikawa K, Toyoda Y, Fukuzato Y, Kato K, Ijiri R, Tanaka Y. Maturation in the primary and metastatic lesions of fetal rhabdomyomatous nephroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 37 : 62-63, 2001
  - 33) Rapley EA, Barfoot R, Bonaiti-Pellie C, Chompret A, Foulkes W, Perusinghe N, Reeve A, Royer-Pokora B, Schumacher V, Shelling A, Tourrel S, Weirich A, Pritchard-Jones K, Stratton MR, Rahman N : Evidence for susceptibility genes to familial Wilms tumour in addition to WT1, FWT1 and FWT2. *Br J Cancer* 83 : 177-183, 2000
  - 34) Rahman N, Arbour L, Houlston R, Bonaiti-Pellie C, Abidi F, Tranchemontagne J, Ford D, Narod S, Pritchard-Jones K, Foulkes WD, Schwartz C, Stratton MR : Penetrance of mutations in the familial Wilms tumor gene FWT1. *J Natl Cancer Inst* 92 : 650-652, 2000
  - 35) Rahman N, Abidi F, Ford D, Arbour L, Rapley E, Tonin P, Barton B, Batcup G, Berry J, Cotter F, Davison V, Gerrard M, Gray E, Grundy R, Hanafy M, King D, Lewis I, Luethy AR, Madlensky L, Mann J, O'Meara A, Oakhill T, Skolnick M, Strong I, Variend D, Narod S, Schwartz C, Pritchard-Jones K, Stratton MR : Confirmation of FWT1 as a Wilms' tumour sus-

している可能性が示唆される。さらに家族性ウィルムス腫瘍の症例を集め 11p15 における LOH の有無を検討していく必要がある。

## 総 括

1. WT1 遺伝子における, <sup>390</sup>Arg が stop codon になつた変異とウィルムス腫瘍の組織型との関連が示唆された。この遺伝子変異を有するウィルムス腫瘍は FRN もしくは間葉成分として横紋筋成分を含む組織型を示す傾向にある。特に両側性のウィルムス腫瘍で泌尿生殖器系の奇形を合併している症例においてはこの変異は組織型だけではなく腫瘍発生にも大きく関与していると考えられる。

2. 特に間葉成分が豊富な組織型を示すウィルムス腫瘍は、化学療法を行っても腫瘍の大きさが小さくならないもしくは増大傾向を示す。これは未熟な間葉成分が成熟した成分に分化するとともに膠原線維の増生も伴うからである。ウィルムス腫瘍の化学療法前の組織診断は重要である。両側性のウィルムス腫瘍で FRN のように間葉成分として横紋筋成分が豊富な組織型を示すものは化学療法により腫瘍径が縮小しないからということで追加の化学療法を加えるのではなく早期の外科的治療が望まれる。

3. 家族性のウィルムス腫瘍では WT1 遺伝子変異が検出される症例は稀であるが、今回の我々の症例のように WT1 遺伝子変異と 11p15 の LOH が腫瘍発生に関与している事が示唆される症例もある。さらなる症例の蓄積と遺伝子解析が必要である。

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病理学教室秦順一教授（現在：国立成育医療センター研究所所長）ならびに坂元亨宇教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導いただきました慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室助手高田礼子先生（現在：聖マリアンナ医科大学予防医学教室講師）に深謝いたします。また種々の御協力を頂きました病理学教室諸兄に感謝いたします。さらに本研究の解析に用いた貴重な検体および臨床情報を提供していただいた東北大学医学部附属病院、神奈川県立こども医療センター、東京大学医学部附属病院、兵庫医科大学附属病院、埼玉県立小児医療センター、千葉県こども病院、国立成育医療センターをはじめとする諸施設の先生方に深謝いたします。

本論文の要旨は第 60 回日本病学会総会、第 91 回日本病理学会総会、第 18 回日本小児がん学会総会において発表された。

本研究に要した費用の一部は文部科学省研究費、厚生労働省がん研究助成金、慶應義塾大学医学部研究奨励費によつた。

## 文 献

- 1) Coppes MJ, Pritchard-Jones K : Principles of Wilms' tumor biology. *Urol Clin North Am* 27 : 423-433, viii, 2000
- 2) Lee SB, Haber DA : Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* 264 : 74-99, 2001
- 3) Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yegaer H, Lewis WH, Jones C, Housman DE : Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60 : 509-520, 1990
- 4) Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GAP : Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343 : 774-778, 1990
- 5) Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L, Fine RN, Silverman BL, Haber DA, Housman D : Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67 : 437-447, 1991
- 6) Kikuchi H, Akasaka Y, Nagai T, Umezawa A, Iri H, Kato S, Hata J : Genomic changes in the WT-gene (WT1) in Wilms' tumors and their correlation with histology. *Am J Pathol* 140 : 781-786, 1992
- 7) Schumacher V, Schneider S, Figge A, Wildhardt G, Harms H, Schmidt D, Weirich A, Ludwig R, Royer-Pokora B : Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 3972-3977, 1997
- 8) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会 : 小児泌尿器腫瘍。新訂版小児腫瘍組織分類図譜。金原出版、第 1 篇、1998
- 9) Wigger HJ : Fetal rhabdomyomatous nephroblastoma-a variant of Wilms' tumor. *Hum Pathol* 7 : 613-623, 1976
- 10) Maes P, Delemarre J, de Kraker J, Ninane, J : Fetal rhabdomyomatous nephroblastoma : a tumour of good prognosis but resistant to chemotherapy. *Eur J Cancer* 35 : 1356- 1360, 1999
- 11) Saba LM, de Camargo B, Gabriel-Arana M : Experience with six children with fetal rhabdomyomatous nephroblastoma : review of the clinical, biologic, and pathologic features. *Med Pediatr Oncol* 30 : 152-155, 1998
- 12) Takata A, Kikuchi H, Fukuzawa R, Ito S, Honda M, Hata J : Constitutional WT1 correlate with clinical features in children with progressive nephropathy. *J*

起こされると仮定している<sup>28)</sup>。我々の検索症例中においても WT1 遺伝子変異を認めた 5 例のうち 4 例は泌尿生殖器系の奇形を合併しており、WT1 遺伝子の機能が失われることで泌尿生殖器系の奇形が引き起こされる可能性が示唆された。

今回の我々の検索症例数は少ないものの、少なくとも両側性のウィルムス腫瘍において、390 Arg が stop codon になる WT1 遺伝子変異により正常な WT1 遺伝子の発現が喪失すること、組織学的所見、泌尿生殖器系の奇形、腫瘍発生が関連していると考えられた。ちなみに検索症例中、間葉成分として横紋筋を含む組織型を示す両側性のウィルムス腫瘍 2 症例は WT1 遺伝子変異を認めなかったが、この 2 例は泌尿生殖器系の奇形を合併していなかった。泌尿生殖器系の奇形を合併していない両側性のウィルムス腫瘍の腫瘍発生に関してはまた別のメカニズムが関与しているのかもしれない。

## 2. 両側性ウィルムス腫瘍における化学療法反応性について

日本ウィルムス腫瘍研究グループの治療プロトコールによると、片側性のウィルムス腫瘍は基本的には先に腫瘍が摘出されてから化学療法が施行されるので化学療法前後の組織型を比較することが困難である。それに対して、両側性のウィルムス腫瘍は腫瘍の生検もしくは片側の腫瘍の摘出が行われてから化学療法が施行され、その後にもう片方の腫瘍が摘出されるため、化学療法前後の組織型の比較が可能である。

両側性ウィルムス腫瘍において化学療法前後の組織型を比較すると、HE 染色においても、化学療法前の未熟な横紋筋成分が化学療法後に成熟した成分になっていることは明らかであり、それは myogenin や S-100 蛋白を用いた免疫染色によっても確認された。また化学療法後の成熟した横紋筋は Ki-67 が陰性であった。化学療法後には腫瘍細胞の成熟とともに膠原線維の増生も伴うために腫瘍径が小さくならないと考えられるが、Ki-67 陽性率の低い腫瘍に細胞周期の分裂期にある腫瘍細胞に作用する抗癌剤を投与しても効果はないと考えられる。FRN は化学療法抵抗性<sup>10,11)</sup>といわれるが、化学療法前の未熟な横紋筋細胞には効果があるので、一般的にいわれるような抗癌剤抵抗性を示す腫瘍とはいえない。腫瘍のステージに対応した化学療法は施行されるべきであるが、それに伴い腫瘍細胞の大部分は成熟した横紋筋細胞になると予想されるので、さらに追加の化学療法を行うことは合併症を引き起こすことにもなり不要であろう。FRN はウィルムス腫瘍の中でも予後良好<sup>9~11)</sup>とされて

おり、実際今回検索した症例中でも、現在治療中の 2 例を除き、腫瘍が摘出された 5 例においては現時点で再発・転移は認めていない。以上より、特に両側性ウィルムス腫瘍においては化学療法前の組織学的診断は重要であると考えられる。組織型が FRN もしくは腎芽型でも間葉成分を豊富に含む組織型を示す腫瘍においては、化学療法により腫瘍径の縮小はあまり期待できない。プロトコールに基づいた化学療法を施行した後に、もし腎臓の温存が可能であれば出来るだけ早期の外科的腫瘍摘出が望ましい。

Nagashima らはヌードマウスにおけるウィルムス腫瘍の細胞株において間葉系の細胞が筋肉への分化を示すことを証明している<sup>29)</sup>。神経芽細胞腫ほど良く知られているわけではないが、ウィルムス腫瘍も自然に分化・成熟する性質を有するのかもしれない。また、Zuppan らは手術前化学療法を施行されたウィルムス腫瘍における分化を報告している<sup>30)</sup>し、Seemayer らや Ishikawa らは化学療法後にウィルムス腫瘍の肺の転移巣が完全に成熟した成分となっていたことを報告している<sup>31,32)</sup>。化学療法によってウィルムス腫瘍における間葉系細胞が分化し、腫瘍の成熟傾向がさらに促進されるのかもしれない。今回の免疫組織化学的検討からも化学療法前の未熟な間葉成分が成熟した成分へと分化したことは明らかである。このような腫瘍の成熟は、ウィルムス腫瘍の本来の分化する性質と化学療法の効果の両方によるのだろう。

## 3. 家族性ウィルムス腫瘍の症例について

家族性ウィルムス腫瘍は全ウィルムス腫瘍の約 1% 程度の頻度である。これまでの研究では、家族性ウィルムス腫瘍の責任遺伝子とされる FWT1 や FWT2 は 17 番染色体、もしくは 19 番染色体に位置すると報告されており<sup>33~37)</sup>、家族性ウィルムス腫瘍において、WT1 遺伝子の異常が発見された例は今まで 5 例しか報告されていない<sup>26,38~41)</sup>。症例 19 では、ウィルムス腫瘍の既往のある父親と患児の生殖系列において WT1 遺伝子の同じ部位である 1168 番目の C→C/T のヘテロ接合性の変異を認め、患児の両側性の腫瘍においては同部位の 1168 C→T すなわち<sup>39)</sup>Arg が stop codon になる変異が検出された。さらにこの症例では 11p15 に位置する polymorphic marker の TH において maternal LOH が検出された。11p15 における LOH はウィルムス腫瘍の腫瘍発生に関わりがあるとされており、ウィルムス腫瘍の症例において 11p の maternal LOH を証明している報告もある<sup>15,42~45)</sup>。我々の症例においては WT1 遺伝子変異と 11p15 における maternal LOH が腫瘍発生に関与

ことで追加の化学療法が施行されていた。化学療法前に腎芽型の組織型を示した1例は、化学療法後には腫瘍構成細胞の大部分が横紋筋成分となっており、FRN様の腫瘍と診断した。7症例中5例は腫瘍摘出後再発・転移は認めていない。また2例は現在治療中である。

化学療法前の組織型と化学療法後の組織を第6図に示す。胎児性横紋筋腫型腎芽腫の組織型を示した症例において、化学療法前は小型の未熟な横紋筋細胞様腫瘍細胞が比較的密に増生しているのに対し(第6図a)、化学療法後は成熟した横紋筋細胞が腫瘍構成細胞の大部分を占めており、膠原線維の増生も伴っていた(第6図b)。

筋原性の細胞の分化を調節する蛋白である myogenin は、未熟な筋原性細胞に発現するとされ、S-100蛋白は骨格筋に発現を認める。化学療法前の腫瘍細胞は myogenin が60%以上の細胞に陽性(第7図a)であったのに対して、S-100蛋白は陰性を示した(第7図b)。化学療法後の横紋筋細胞では myogenin は陰性を示したのに対して(第7図c)、S-100蛋白は陽性であった(第7図d)。化学療法前の腫瘍細胞は増殖マーカーである Ki-67 の陽性率が高かったのに対し(第8図a)、化学療法後の横紋筋細胞は Ki-67 の陽性率が著減していた(第8図b)。

## 考 察

### 1. WT1 遺伝子変異と組織型との関連について

今回検索した46症例において、FRNの組織型を示した3症例と、間葉成分として横紋筋成分を約1/4含む組織型を示した2症例においてWT1遺伝子のエクソン9における<sup>390</sup>Argがstop codonになる同一の変異を認めた。この特異的なWT1遺伝子変異がウィルムス腫瘍の組織学的特徴に関連していることが示唆される。このナンセンス変異により、蛋白の翻訳過程において truncate された蛋白が生成されると考えられるが、このことによりWT1遺伝子のDNA結合に必要な zing finger 領域の最後の部分が失われてしまう。Zing finger 領域の最後の部分が失われることで、WT1遺伝子とその標的遺伝子に結合できなくなるということは Little らによって証明されている<sup>17)</sup>。WT1遺伝子の機能が失われることは腫瘍発生と関わりがあるとされている。Miyagawa らはWT1遺伝子の機能が失われることでウィルムス腫瘍における異所性の筋発生がおけると報告しており、このことからWT1遺伝子の正常な発現は、腎臓の後腎-間葉系幹細胞の骨格筋への分化を妨げると推測している<sup>18)</sup>。今回我々が検出したWT1遺伝子

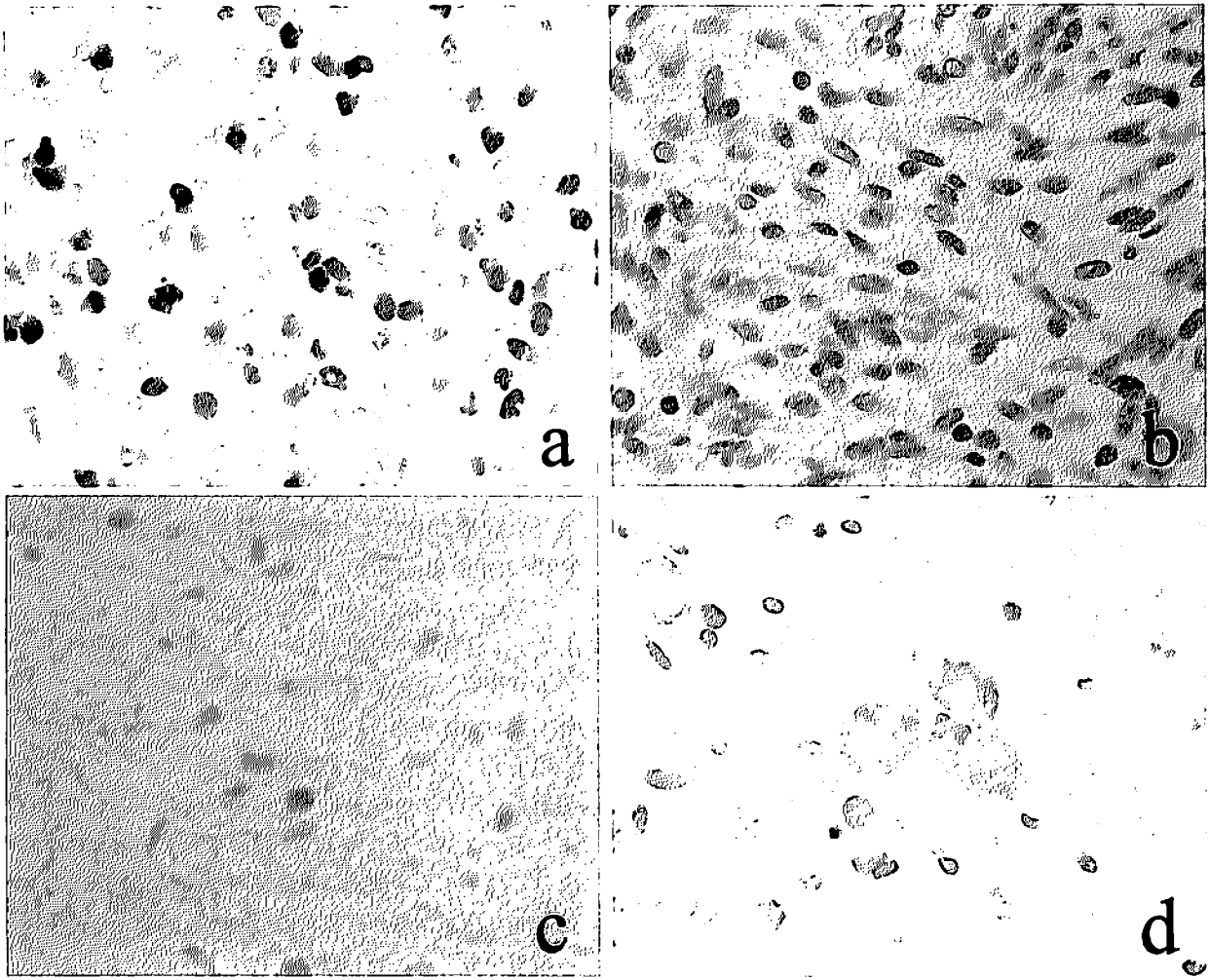
のナンセンス変異を示した症例はいずれも間葉成分として豊富に横紋筋成分を含んでおり、腫瘍細胞はWT1の免疫染色に陰性を示した。この<sup>390</sup>Argがstop codonになる変異を示す症例全てがFRNの組織型を示すとは結論づけられないが、少なくとも横紋筋成分を含む組織型との関連は示唆された。

Schumacher らは生殖系列におけるWT1遺伝子変異があるものは間葉成分優位な組織型を示す傾向があると報告している<sup>7)</sup>。我々の検索症例中、片側性の1例においては生殖系列の変異は認められなかった。しかし Nakadate らは、生殖器系におけるWT1遺伝子変異/欠失だけでなく、体細胞系のWT1遺伝子変異/欠失も間葉成分優位な組織型と関連すると報告<sup>19)</sup>しており、我々の症例においても体細胞系のWT1遺伝子変異がFRNの組織型と関連していると考えられる。

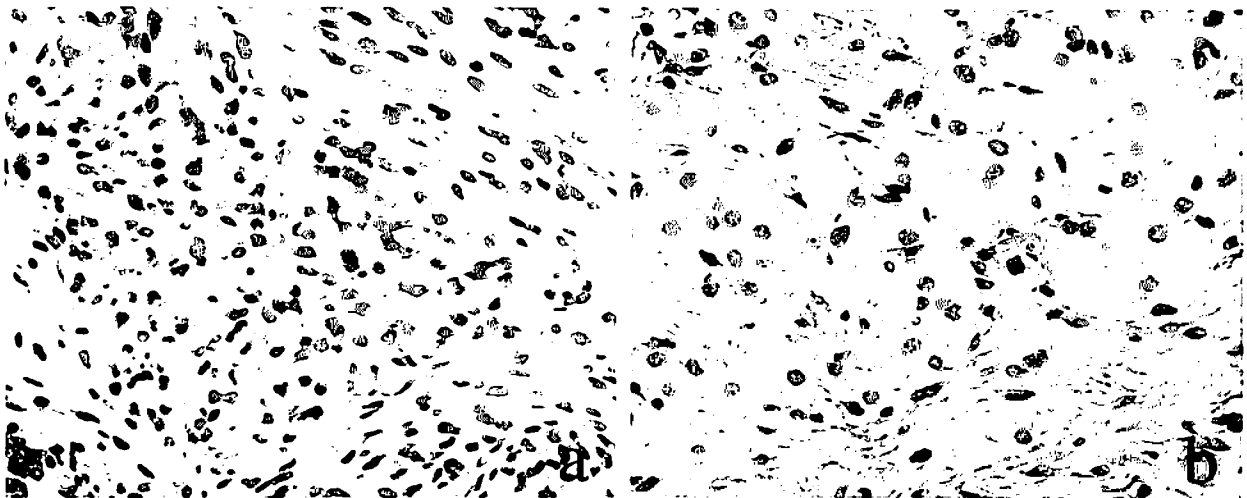
<sup>390</sup>Argがstop codonになるWT1遺伝子変異は、これまでに散発性の片側性のウィルムス腫瘍、両側性のウィルムス腫瘍、泌尿生殖器系の奇形を合併したウィルムス腫瘍において検出されている<sup>20-22)</sup>。また、前骨髄性白血病の患者<sup>23)</sup>とウィルムス腫瘍を発症していない泌尿生殖器系の奇形のみを合併した症例<sup>24)</sup>においても検出されている。文献ではこのWT1遺伝子変異を示した症例におけるウィルムス腫瘍の組織型の記載はないが、もし組織学的な記載があれば我々の今回の仮説をさらに支持する情報が得られたかもしれない。

ウィルムス腫瘍を発症していないが、生殖系列にWT1遺伝子異常を認め泌尿生殖器系の奇形を示した症例<sup>24)</sup>では経過観察中に蛋白尿を発症し、20歳時の腎生検において腎硬化症と診断された。<sup>390</sup>Argがstop codonになるWT1遺伝子変異は、腎不全を伴う症候群である Denys-Drash 症候群においてこれまで検出されていない変異ではあるが、この変異があると腎不全を引き起こす可能性はあるのかもしれない。Breslow らは無虹彩症と泌尿生殖器系の奇形を合併したウィルムス腫瘍の患児においては腎不全発症率が高いことを報告している<sup>25)</sup>。今回WT1遺伝子変異が検出された5症例は現時点では蛋白尿や腎機能低下の徴候を示していないが、今後注意深く腎機能を経過観察していく必要があると考えられる。

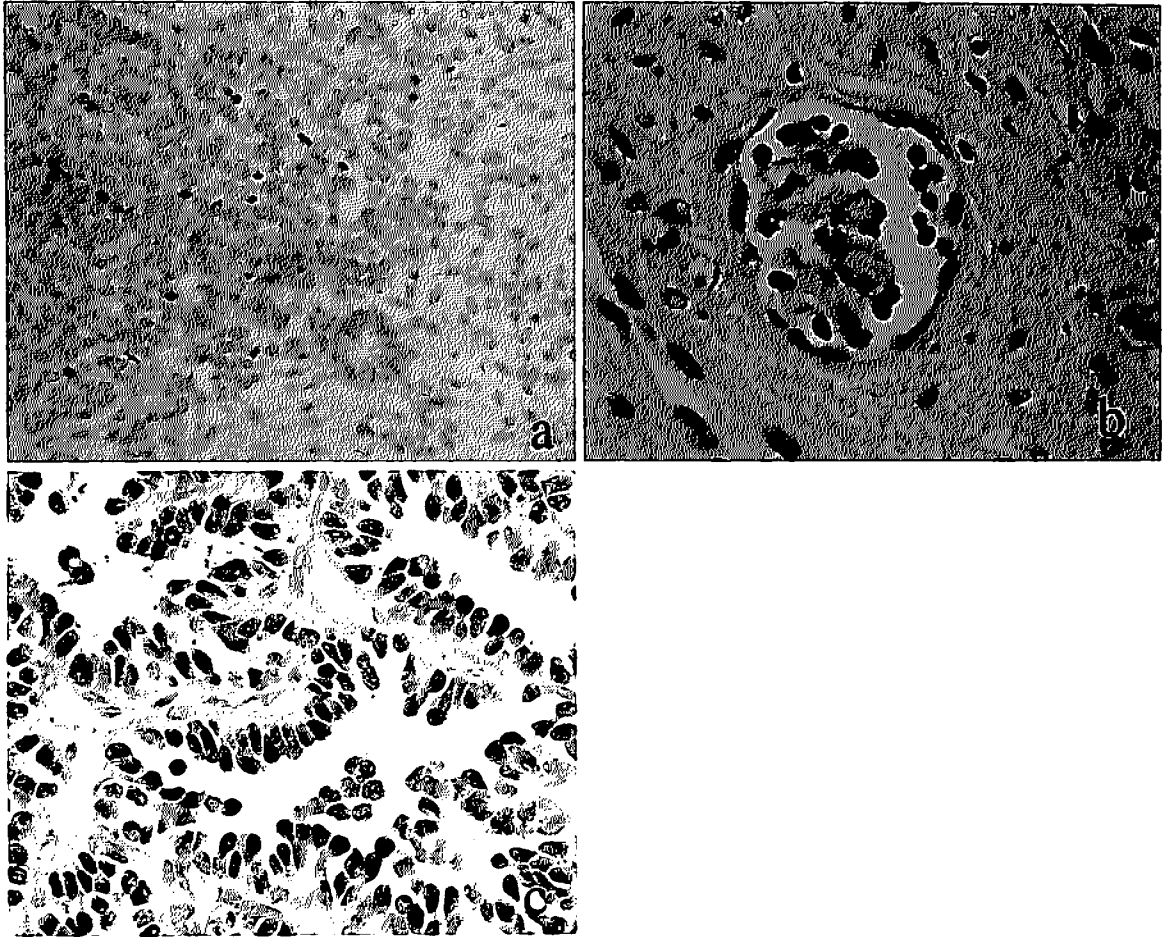
泌尿生殖器系の奇形を合併しており、腎障害の兆候は示していないウィルムス腫瘍の患者におけるWT1遺伝子変異はこれまでに5例報告されている<sup>7, 15, 26, 27)</sup>。Huff らはWT1遺伝子変異の結果生ずる truncate された蛋白は非機能性であり、正常のWT1蛋白の量が減少するというdose effectによって泌尿生殖器系の奇形が引き



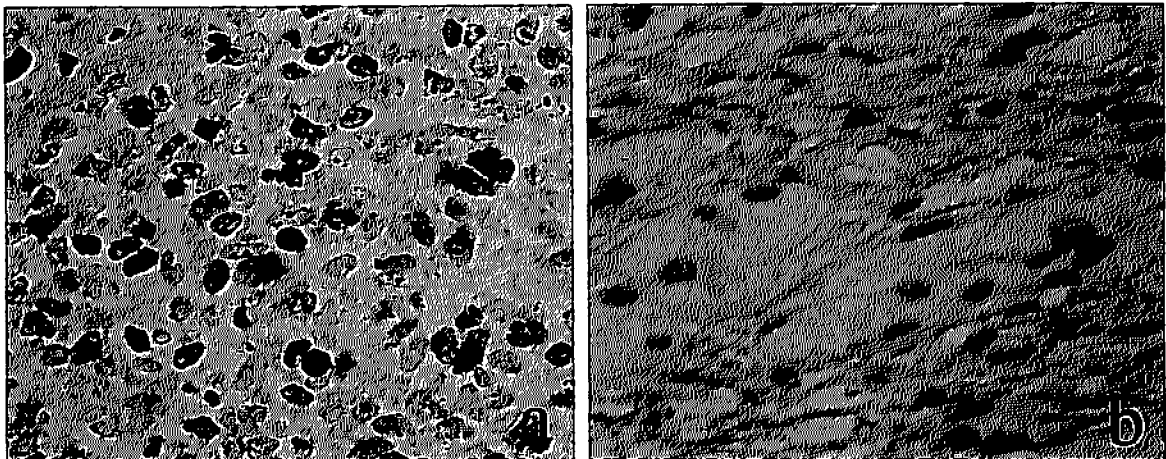
第7図 myogenin と S-100 蛋白の免疫染色. 症例 19. 倍率 200 倍. (a) 化学療法前の腫瘍細胞は myogenin 陽性である. (b) 化学療法前の腫瘍細胞は S-100 蛋白陰性である. (c) 化学療法後の腫瘍細胞は myogenin 陰性である. (d) 化学療法後の腫瘍細胞は S-100 蛋白陽性である. (Shibata et al : Pathology International, 53 : 214-220, 2003 の第 3 図を許可を得て転載)



第8図 Ki-67 の免疫染色. 症例 25. 倍率 400 倍. (a) 化学療法前の腫瘍細胞は 60% 以上が Ki-67 陽性であった. (b) 化学療法後の摘出腫瘍において Ki-67 陽性を示す腫瘍細胞は著減していた. (Shibata et al : Pathology International, 53 : 214-220, 2003 の第 4 図を許可を得て転載)

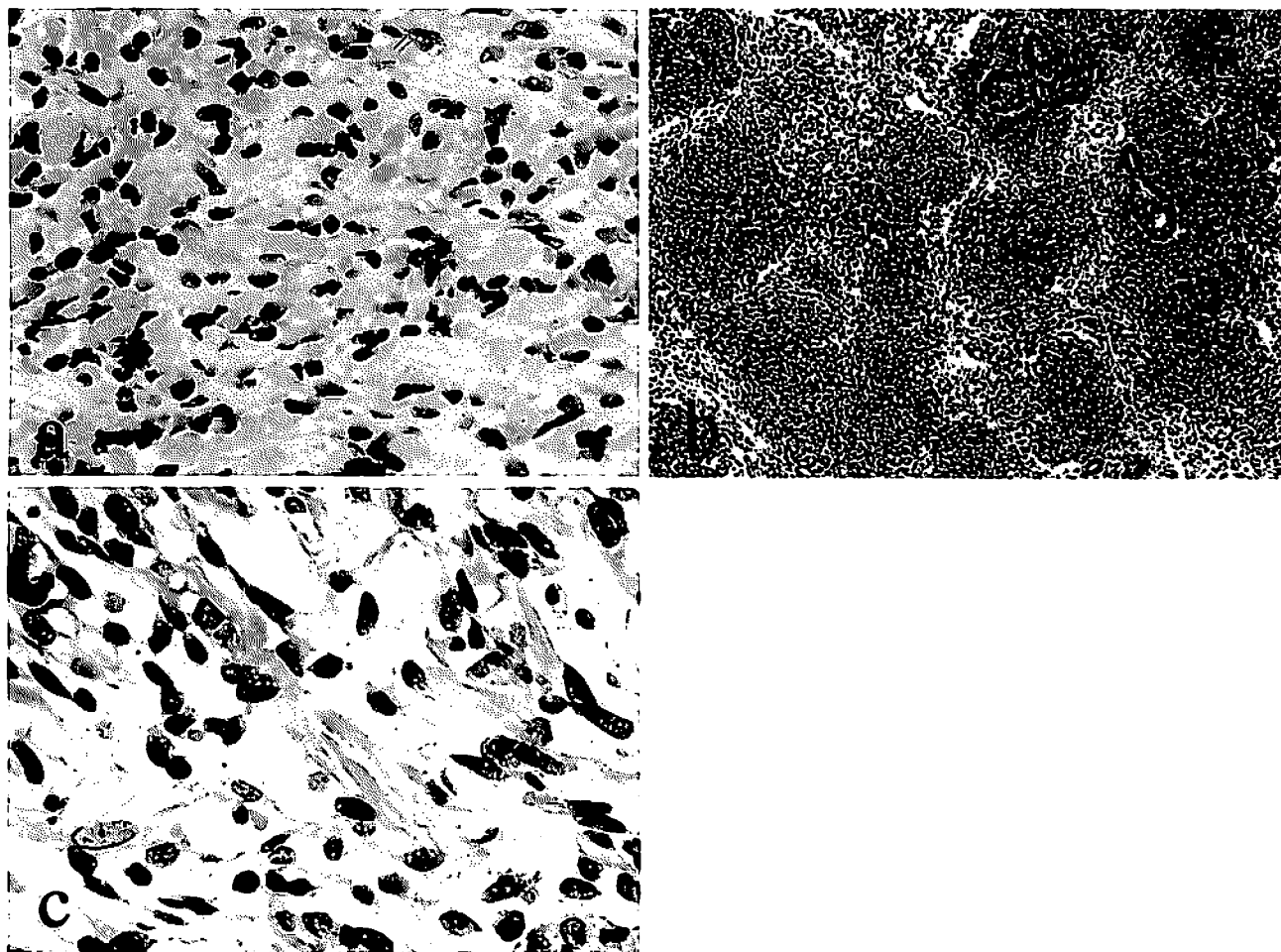


第5図 WT1の免疫染色。(a) 症例29. 腫瘍細胞はすべて陰性である(倍率100倍)。(b) aと同一標本内に存在した未熟な糸球体の足細胞はWT1陽性である(倍率400倍)。(c)上皮型の組織型を示し、WT1遺伝子変異を認めなかった症例(症例6)においては腫瘍細胞はWT1陽性を示す(倍率400倍)。(Shibata et al: Pathology International, 53: 214-220, 2003の第5図を許可を得て転載)



第6図 症例19の組織像。ヘマトキシリン・エオジン染色。(a) 化学療法前の開腹生検の組織型。未熟な横紋筋細胞が間葉成分の大部分を占めている(倍率100倍)。(b) 化学療法後の摘出腫瘍の組織像。腫瘍の構成成分は大部分が成熟した横紋筋成分となっており、膠原線維の増生を伴う(倍率100倍)。(Shibata et al: Pathology International, 53: 214-220, 2003の第2図を許可を得て転載)





第4図 WT1 遺伝子変異を示した症例の組織型。ヘマトキシリン・エオジン染色。(a) 症例 19. 未熟な横紋筋細胞が間葉成分の大部分を示す。胎児性横紋筋腫型腎芽腫の典型像である (倍率 100 倍)。(b) 症例 29. 未熟な腎芽細胞が胞巣構造をとって増殖している像を認める。少数の管腔構造も認める (倍率 40 倍)。(c) 症例 29. 間葉成分として横紋筋を認める (倍率 400 倍)。(Shibata R et al : J Med Genet 39 : E83, 2002 の第 1 図を許可を得て転載)

第 5 表 両側性ウィルムス腫瘍症例における化学療法反応性と組織型の変化

症例	年齢/性	最初に施行された化学療法	化学療法後の腫瘍の大きさ	化学療法前生検検体の組織型	化学療法後摘出腫瘍の組織型	患児の現在の状態
1	11m/M	V+A*	増大	FRN	FRN	腫瘍摘出後寛解維持
6	9m/F	V+A	縮小	上皮型	上皮型 FRN	腫瘍摘出後寛解維持
19	7m/F	V+A*	増大	FRN	FRN	腫瘍摘出後寛解維持
25	9m/M	V+A*	縮小無し	腎芽型 横紋筋成分有り	FRN	腫瘍摘出後寛解維持
26	11m/M	V+A+D*	増大	FRN	腎芽型 横紋筋成分増加	腫瘍摘出後寛解維持
29	1y/M	V+A*	増大	腎芽型 横紋筋成分有り	腎芽型 横紋筋成分増加	治療中
38	6m/F	V + A*	増大	横紋筋成分有り		治療中

FRN : fetal rhabdomyomatous nephroblastoma

V-vincristine, A-actinomycinD, D-doxorubicin

\* : さらに強力な化学療法の追加有り

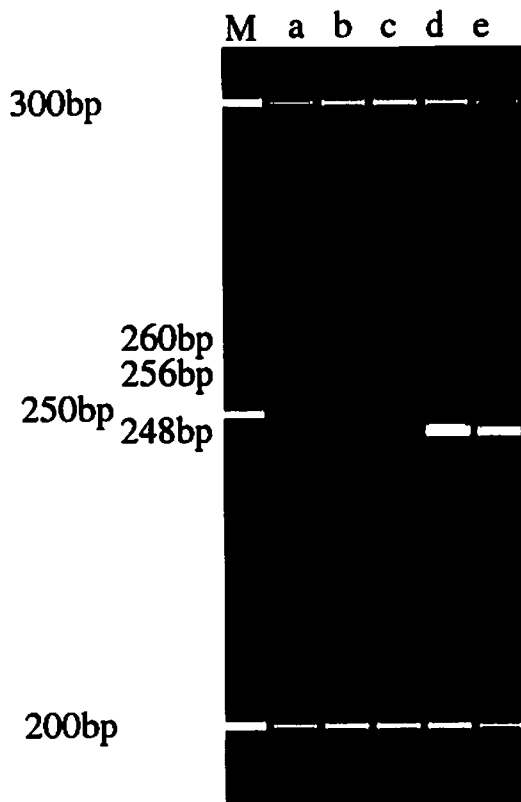
伝子変異は検出されなかった。

## 2. 変異を認めた症例における LOH の解析結果

変異を認めた5症例のうち第4表の症例4においては、WT-1Pにおいて、末梢血から分離されたDNAと両側の腫瘍から抽出されたDNAがともに124bpと132bpのバンドを示したことから retention of heterozygosity (ROH) と考えられた(第2図A)。症例2と3においても同様の結果であった。片側性の症例1においては、末梢血から分離されたDNAと非腫瘍部の腎から抽出されたDNAはWT1-Pの部位において124bpと130bpのバンドを示したのに対し、腫瘍から分離されたDNAにおいては124bpのバンドしか認めら

れなかった(第2図B)ことから、腫瘍においてLOHを示すと考えた。両側性の症例5においてもWT1におけるLOHを認めた。

家族性ウィルムス腫瘍症例(症例19)においては、D11S554, PTH, WT1-P, IGF2, H19においてはLOHは確認されなかったが、11p15に位置するTHのマーカ-において、maternal LOHを認めた。第3図に示すように、THにおいて父親の末梢血から分離したDNA(a)は248bpと256bp、母親の末梢血から分離したDNA(b)は256bpと260bpのバンドを認め、患児の末梢血から分離したDNA(c)においては父親由来の248bpと母親由来の256bpのバンドを認めた。患児の両側の腫瘍(d, e)においては父親由来の248bpのバンドしか確認されず、maternal LOHが確認された。



第3図 TH遺伝子の polymorphism の解析。11p15に存在するヒト tyrosine hydroxylase 遺伝子のイントロン1における4塩基繰り返し配列を検出するマーカ-を使用。M: 200 bp, 250 bp, 300 bpの外部マーカ-。a: 患児の父親の生殖系列。b: 患児の母親の生殖系列。c: 患児の生殖系列。d: 左側の腫瘍。e: 右側の腫瘍。(a) 父親の生殖系列では248 bpと256 bpのバンドを認める。(b) 母親の生殖系列では256 bpと260 bpのバンドを認める。(c) 患児の生殖系列では父親由来の248 bpのバンドと母親由来の256 bpのバンドを認める。(d)(e) 両側の腫瘍では母親由来の256 bpのバンドが失われている。a~eの各レーンにおける200 bpと300 bpのバンドは内部マーカ-である。

## 3. 組織学的解析

解析症例46症例中、腎芽型の組織型を呈したものが38症例、FRNの組織型を呈したものが5例、上皮型の組織型を示したものが3例である。腎芽型の症例のうち間葉成分として横紋筋成分を約1/4含んでいたものが2例、間葉成分のうち横紋筋の占める割合が1/20~1/10程度であった症例が31例、横紋筋成分を全く含んでいない症例が5例であった。

WT1遺伝子変異を認めた症例のうちFRNの組織型を示した3症例においては腫瘍構成細胞の1/2~3/4程度が横紋筋成分であった(第4図a)。2症例は腎芽型と診断された(第4図b)が、間葉成分として第4図cに示すように豊富に横紋筋成分を含んでいた。間葉成分における横紋筋成分の割合としては1/4程度であった。

WT1遺伝子変異を認めた症例においてWT1の免疫染色は陰性であった(第5図a)。これに対し、第5図aと同一標本中に含まれていた非腫瘍部内に存在した未熟な糸球体の上皮細胞やWT1遺伝子変異を認めなかった上皮型の組織型を示した腫瘍においてWT1は陽性を示した(第5図b, c)。

化学療法前後の検体について組織学的に検討が可能であった両側性ウィルムス腫瘍症例の一覧表を第5表<sup>10)</sup>に示す(症例番号は第1表に対応)。7例中、明瞭な管腔構造形成を主体とする上皮型の組織型を示した1例(症例6)では、化学療法により腫瘍径の縮小を認めた。それに対して、FRNもしくは間葉成分として横紋筋を含む腎芽型の組織型を示した腫瘍は、プロトコールに基づいた、ビンクリスチン、アクチノマイシンDを含んだ化学療法により腫瘍が縮小しない、もしくは増大する

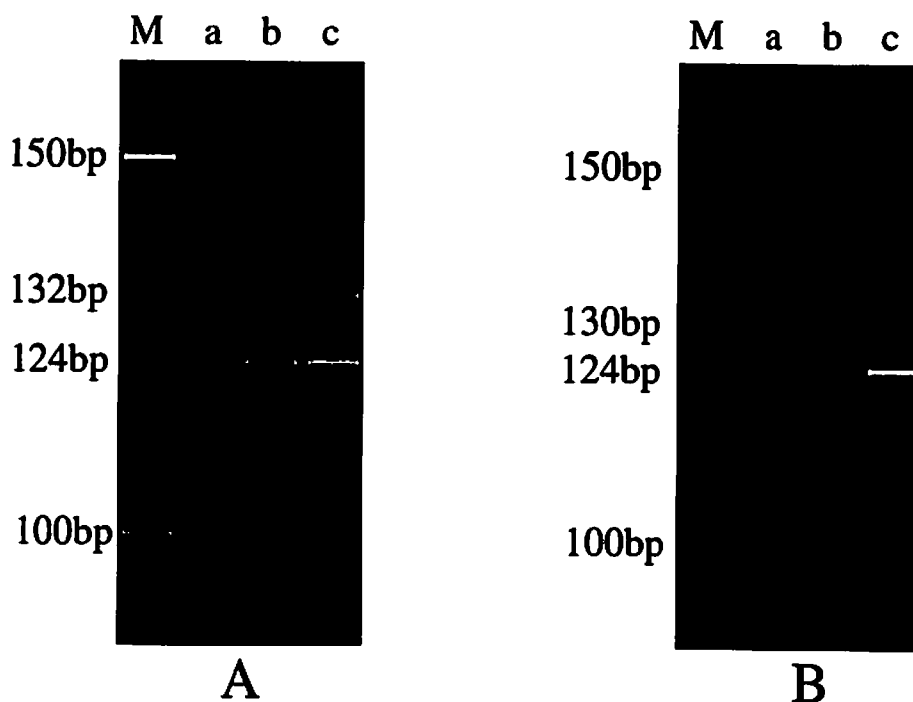
第 4 表 WT1 遺伝子変異を認めた症例

症例	年齢/性	泌尿生殖器系の奇形	両 or 片側性	組織型	WT1 遺伝子変異 生殖系列	遺伝子変異 腫瘍
19	7m/F	左卵巣発育不全	両側性	FRN	1168C→C/T	1168C→T(R390X) ROH
25	9m/M	停留睪丸 尿道下裂	両側性	腎芽型 横紋筋成分有り	1168C→C/T	1168C→T(R390X) ROH
26	11m/M	停留睪丸	両側性	FRN	1168C→C/T	1168C→T(R390X) ROH
29	1y/M	停留睪丸	両側性	腎芽型 横紋筋成分有り	1168C→C/T	1168C→T(R390X) LOH
32	1y/M	(-)	片側性	FRN	(-)	1168C→T(R390X) LOH

FRN : fetal rhabdomyomatous nephroblastoma

LOH : loss of heterozygosity

ROH : retention of heterozygosity



第 2 図 WT1 遺伝子の polymorphism の解析. エクソン 10 の 3' 末端の非コード領域における GT polymorphism を検出するマーカーである WT-1P を使用. M : 100 bp と 150 bp の外部マーカー. (A) 症例 19. a : 患児の生殖系列. b : 左側の腫瘍. c : 右側の腫瘍. 患児の生殖系列と両側の腫瘍において 124 bp と 132 bp のバンドを認める. 各レーンにおける 100 bp と 150 bp のバンドは内部マーカーである. (B) 症例 32. a : 患児の生殖系列. b : 非腫瘍部の腎. c : 腫瘍. (a) の生殖系列と (b) の非腫瘍部の腎においては 124 bp と 130 bp のバンドを認めるが (c) の腫瘍においては 124 bp のバンドしか検出されていない. (Shibata R et al : J Med Genet 39 : E83, 2002 の第 3 図を許可を得て転載)

て、患児もしくはその両親からインフォームドコンセントが得られている。またこれら全ての手技は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

5. 組織学的分析

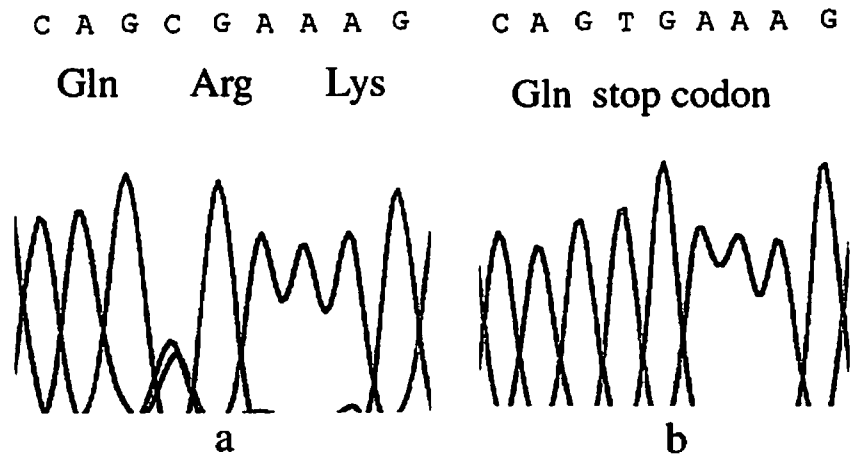
腫瘍検体は、10%ホルマリンで固定されパラフィンに包埋された。パラフィン切片に対してHE (Hematoxylin and Eosin) 染色が施された。ウィルムス腫瘍の組織学的分類は日本病理学会の分類に従った。FRNは横紋筋成分が全病巣の1/3以上を占めるものと定義し、それに対して腎芽型は未熟な腎芽細胞が胞巣構造を取って増殖している像が主体で、横紋筋成分を含む間葉成分を認めるが、横紋筋成分は全病巣の1/3以下のものと定義した<sup>9)</sup>。特に両側性の症例においては化学療法前の生検検体と化学療法後の摘出腫瘍検体において組織学的に比較検討を行った。生検の検体はいずれの症例においても開腹生検が行われており、一定量の検体が採取されていることから、腫瘍全体の組織型を表しているものと考えた。化学療法前後の腫瘍検体のパラフィン切片に対して、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法により、抗WT1抗体(希釈倍率:200倍, DAKO, Carpinteria, CA, USA), 抗S-100蛋白抗体(希釈倍率:2000倍, Dako, Kyoto, Japan), 抗myogenin抗体(希釈倍率:200倍, Santa Cruz, CA, USA), 抗Ki-67抗体(希釈倍率500倍, DAKO, Kyoto, Japan)を使用して免疫組織染色を行った。

結 果

1. PCR-direct sequence による WT1 遺伝子解析結果

46症例の解析結果を第1表に示す。解析症例中、FRNの組織型を示した3例の腫瘍と、間葉成分として横紋筋成分を約1/4含む腎芽型の2例の腫瘍においてWT1遺伝子変異を認めた。変異部位を第1図に示す。変異を認めた症例の一覧を第4表<sup>19)</sup>に示す(症例番号は第1表に対応)。両側性の4症例においてはいずれも泌尿生殖器系の奇形を合併していた。片側性の1例では合併奇形は認めなかった。検出されたWT1遺伝子変異はzing finger領域内のエクソン9における変異であり、1168番目のCがTになり、その結果390番目のアルギニンがstop codonになる変異である。変異を認めた5症例のうち両側性の4症例においては生殖系列において、腫瘍で変異を認めた部位と同じ部位、すなわち1168番目のCにおいてC/Tとなるヘテロ接合性の変異を認めた(第1図)。腫瘍に変異を認めた片側性の症例においては生殖系列に変異は認められなかった。

WT1遺伝子変異があった両側性の1症例(症例19)は家族性ウィルムス腫瘍の症例であった。この症例では小児期にウィルムス腫瘍の既往のある父親の生殖系列において患児の生殖系列と同様の1168番目のCにおいてC/Tとなるヘテロ接合性の変異を認めた。ウィルムス腫瘍の既往のない母親の生殖系列においてはWT1遺



第1図 生殖系列(a)と腫瘍(b)におけるDNA塩基配列検索の結果。(a)WT1遺伝子のエクソン9において、1168番目のC→C/Tとなるヘテロ接合性の変異が検出された。(b)腫瘍においては1168番目のC→Tの変異が認められた。これは<sup>390</sup>Argがstop codonになる変異である。(Shibata R et al: J Med Genet 39: E83, 2002の第2図を許可を得て転載)

ウィルムス腫瘍組織および腎組織をイソペンタン・ドライアイスで凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。凍結保存していた組織を細切後、SDS-ProteinaseK 法<sup>6)</sup>を用いて DNA を抽出した。

### 3. PCR-direct sequence 法による WT1 遺伝子変異の検出

#### 1) PCR による WT1 遺伝子エクソンの増幅

WT1 遺伝子のエクソン 1~10 について各エクソンの外側にエクソン全体が増幅されるようにプライマーを設定した。エクソン 2~10 について、PCR は rTaq polymerase (Toyobo, Japan)を用い、最初に  $94^{\circ}\text{C}$  3 分で加熱後、 $94^{\circ}\text{C}$  1 分、 $60^{\circ}\text{C}$  (エクソン 2, 3)/ $55^{\circ}\text{C}$  (エクソン 4~6, 8, 9)/ $58^{\circ}\text{C}$  (エクソン 7, 10) 1 分、 $72^{\circ}\text{C}$  1 分のサイクルを 30 回行い、最後に  $72^{\circ}\text{C}$  5 分加温した。エクソン 1 は GC の多い塩基配列であり、通常の PCR 法では増幅されなかったため試薬として LA Taq polymerase with GC buffer (Takara, Japan) を用い、最初に  $95^{\circ}\text{C}$  4 分で加熱後、 $95^{\circ}\text{C}$  1 分、 $60^{\circ}\text{C}$  1 分、 $72^{\circ}\text{C}$  1 分のサイクルを 30 回行い、最後に  $72^{\circ}\text{C}$  5 分加温して PCR を行った<sup>12)</sup>。PCR 反応に用いたプライマーを第 2 表<sup>13)</sup>に示す。

#### 2) 直接塩基配列決定法

1) によって得られた PCR 産物をフェノール・クロロホルム抽出後、MicrospinS-400 HR columns (Amersham Biosciences) で精製した。

精製した PCR 産物についてダイターミネーター法を用いてシーケンス反応を行った。DYEnamic ET terminator kit (Amersham Biosciences) を用いて反応させ、MegaBACE 1000 DNA Sequencing System (Amersham Biosciences) にて泳動解析を行った。シーケンス反応は  $95^{\circ}\text{C}$  20 秒、 $50^{\circ}\text{C}$  15 秒、 $60^{\circ}\text{C}$  1 分のサイクルを 30 回行い、第 2 表<sup>13)</sup>に示すようなプライマー

を用いて sense 側、antisense 側の両方について行った。

#### 3) 変異の確認

PCR-direct sequence 法により、末梢血において変異がヘテロ接合性に認められると考えられた症例においては、PCR 産物を pGEM-T vector (Pro-mega, US) にサブクローニングしクローニング産物に対して 2) と同様の反応を行って塩基配列を確認した。

### 4. Loss of heterozygosity (LOH) の解析

腫瘍組織において WT1 遺伝子の変異が検出された症例において、その部分の変異が homozygous か LOH の結果の hemizygous であるかを調べるために WT1-P という polymorphic marker を使用した。このマーカーは WT1 遺伝子のエクソン 10 の 3'側の非コード領域に存在する GT polymorphism を検出するものである<sup>14)</sup>。プライマーとして、FITC 標識した WT1P2-1 (5'-CTTACTGGGTGAGGAATCC-3') と WT1P2-2 (5'-ACAGTAATTTCAAGCAACGG-3') を使用し、PCR 産物を ALF win Fragment Analyzer (Amersham Biosciences) を使用して泳動・解析を行った<sup>13)</sup>。

解析症例中、家族性ウィルムス腫瘍の症例 1 (症例 19) においては患児の両親の末梢血の解析が可能であった。この症例においては、WT1 の他に 11p12~11p15 に存在する 5 種類の polymorphic marker, D11S554, PTH, TH, IGF2, H1915) を使用して LOH の解析を行った。使用したマーカーと反応に用いたプライマーを第 3 表に示す。D11S554, PTH, TH は WT1 と同様に、FITC 標識したプライマーを使用し、PCR 産物を ALF win Fragment Analyzer (Amersham Biosciences) を使用して泳動・解析を行った。IGF2 と H19 に関しては PCR 産物を酵素で切断後、2%アガロースゲルを用いて泳動・解析を行った。

遺伝子解析を行うことに関して、解析症例全てにおい

第 3 表 Polymorphic marker の一覧表

染色体上の位置	名称	検出法	塩基配列
11p11-12	D11S554	Short Tandem Repeat	GGTAGCAGAGCAAGACTGTC CACCTTCATCCTAAGGCAGC
11p15-2	PTH	Tetranucleotide Repeat	GTGAGTAGTTGCCGCTGAATATC CAGGAGAAGCTTTTGGAAATCAACC
11p15-5	TH	Tetranucleotide (TCAT) Repeat	CAGCTGCCCTAGTCAGCAC GCTTCCGAGTGCAGGTCACA
11p15-5	IGF2	RFLP/Apa1	CTTGGACTTTGAGTCAAATTGG CCTCCTTTGGTCTTACTGGG
11p15-5	H19	RFLP/Rsa1	TACAACCACTGCACTACCTG TGGAATGCTTGAAGGCTGCT

第1表 検索症例の一覧表

症例	年齢	組織型	両 or 片側性	泌尿生殖器系の奇形	WT1 変異	症例	年齢	組織型	両 or 片側性	奇形	WT1 変異
1	11m	FRN	両側性	無	無	24	8y	腎芽型	片側性	無	無
2	10y	上皮型	片側性	無	無	25	9m	腎芽型	両側性	有	有
3	6y	腎芽型	片側性	無	無	26	11m	FRN	両側性	有	有
4	2y	腎芽型	片側性	無	無	27	2y	腎芽型	片側性	無	無
5	2y	腎芽型	片側性	無	無	28	4y	腎芽型	片側性	無	無
6	9m	上皮型	両側性	無	無	29	1y	腎芽型	両側性	有	有
7	2y	腎芽型	片側性	無	無	30	5m	腎芽型	片側性	無	無
8	12y	腎芽型	片側性	無	無	31	8m	上皮型	片側性	無	無
9	1y	腎芽型	片側性	無	無	32	1y	FRN	片側性	無	有
10	1y	腎芽型	片側性	無	無	33	8m	腎芽型	片側性	無	無
11	8y	腎芽型	片側性	無	無	34	8y	腎芽型	片側性	無	無
12	2y	腎芽型	片側性	無	無	35	6y	腎芽型	片側性	無	無
13	4y	腎芽型	片側性	無	無	36	11m	腎芽型	片側性	有	無
14	3y	腎芽型	片側性	無	無	37	1y	腎芽型	片側性	無	無
15	1y	腎芽型	片側性	無	無	38	6m	腎芽型	両側性	無	無
16	6y	腎芽型	片側性	無	無	39	1y	腎芽型	片側性	無	無
17	2y	腎芽型	片側性	無	無	40	3y	腎芽型	片側性	無	無
18	4m	腎芽型	片側性	無	無	41	1y	腎芽型	片側性	無	無
19	7m	FRN	両側性	有	有	42	3y	腎芽型	片側性	無	無
20	2y	腎芽型	片側性	無	無	43	2y	腎芽型	片側性	無	無
21	11m	FRN	両側性	無	無	44	1y	腎芽型	片側性	無	無
22	2y	腎芽型	片側性	無	無	45	1y	腎芽型	片側性	無	無
23	4y	腎芽型	片側性	無	無	46	3y	腎芽型	片側性	無	無

FRN : fetal rhabdomyomatous nephroblastoma

第2表 PCR と sequence に用いたプライマー

Exon name	PCRe Sequence	Sequence name	Sequence
1 WT256	AGCCAGAGCAGCAGGGAGTC	SEQ1-S	GGCATCTGGGCCAAGTTAGG
WTEX1R2	CGGTCAAAGGGGTAGGAGA	SEQ1-A	CCTAGAGCGGAGAGTCCCTG
2 2B-S	TGGCTGGTTCAGACCCACTG	SEQ2-S	TGCCCCGTCTTGCGAGAGCA
2B-A	AGAGGAGGATAGCACGGAAG	SEQ2-A	GCACGGAAGAAGGGGAGAAG
3 3B-S	CCAGGCTCAGGATCTCGTGT	SEQ3-S	ATCTCGTGTCTCCCCAACC
3B-A	GGCGTCTCGTGCCTCCAAGA	SEQ3-A	GTGCCTCCAACACCTGCAT
4 4B-S	TGTGGAGGCTTGCACTTTCA	SEQ4-S	GAAGAAACAGTTGTGTATTATTTG
4B-A	GCCCTTTCTTCTAAAAGTGT	SEQ4-A	ATGGTTCAAACAGGTATAAGTTACT
5 5B-S	TCACTGGATTCTGGGATCTG	SEQ5-S	CTGGGATCTGGGGGCTTGCCA
5B-A	AGTCCTAACTCCTGCATTGC	SEQ5-A	CCCCAGGTGCCAGTCAGCAAGG
6 6B-S	AAAACCATCATTCCTCCTG	SEQ6-S	TTTCCAAATGGCGACTGTGAGC
6B-A	CAAAGAGTCCATCAGTAAGG	SEQ6-A	GGTAAGTAGGAAGAGGCAGTGC
7 7F-S	GTGCTCACTCTCCCTCAAGA	SEQ7-S	TCCCTCAAGACCTACGTGAATGTTC
7F-A	GTGAGAGCCTGGAAAAGGAGC	SEQ7-A	TTGAACCATGTTTGCCCAAGACTGG
8 8-S	AGATCCCCTTTTCCAGTATC	SEQ8-S	AGATCCCCTTTTCCAGTATC
8C'-A	CAACAACAAAGAGAATCA	SEQ8-A	AAATCAACCCTAGCCCAAGG
9 9C-S	AAGTCAGCCTTGTTGGGCCTC	SEQ9-S	CCCACATTGGTTAGGGCCGAGGCTA
9C-A	TTTCCAATCCCCTCTCATCAC	SEQ9-A	TAGGGCCGAGGCTAGACCTTCTCT
10 10C-S	CACTCGGGCCTTGATAGTTG	SEQ10-S	TTTCCAATCCCCTCTCATCAC
10C-A	GTCAGACTTGAAAGCAGTTC	SEQ10-A	TGTGCCTGTCTCTTTGTTGC

学位論文

ウィルムス腫瘍の WT1 遺伝子変異と組織型および  
化学療法反応性に関する研究

慶應義塾大学医学部病理学教室

(指導：坂元亨宇教授)

しば たり へ  
柴 田 理 恵

(平成 15 年 1 月 17 日受付)

Key Word : Wilms tumor, WT1 gene, chemotherapy

ウィルムス腫瘍は小児期に発症する悪性腎腫瘍の中ではもっとも数が多く、小児の全悪性固形腫瘍の約 8% を占める<sup>1,2)</sup>。WT1 遺伝子は、1990 年にウィルムス腫瘍の腫瘍抑制遺伝子の一つとして 11p13 領域から単離された遺伝子である<sup>3)</sup>。この遺伝子は全長約 50 kB で 10 個のエクソンからなり、分子量約 52~54 kD の蛋白質をコードしている。散発性のウィルムス腫瘍においては WT1 遺伝子変異が検出される割合は約 10% 程度とされており、それに対して、奇形を伴う WAGR 症候群ではほとんど全例に 11p13 の欠失を認め、また Denys-Drash 症候群では WT1 遺伝子の点突然変異をほぼ全例に認める<sup>4)</sup>。散発性のウィルムス腫瘍においては WT1 遺伝子変異が検出される割合は少ないものの、間葉成分優位な組織型を示すものや両側性の腫瘍を示すものでは WT1 変異を示す例が多いとする報告もある<sup>5,7)</sup>。

ウィルムス腫瘍にはいくつかの組織型があり、未熟な腎芽細胞の増生を主体とする腎芽型、明瞭な管腔構造の増生を主体とする上皮型の他に、特殊型として、胎児性横紋筋腫型腎芽腫 (fetal rhabdomyomatous nephroblastoma, FRN) と呼ばれるものなどがある<sup>8)</sup>。FRN は間葉成分として横紋筋成分が全病巣の 1/3 以上を占めるものと定義<sup>9)</sup>されており、両側性に生じることが多いことや、通常の組織型のウィルムス腫瘍より若年者に発症する事が多く、予後が良好であることなどの特

徴がある<sup>9)</sup>。しかし、予後が良好とされるものの、化学療法に抵抗性であると報告されている<sup>10,11)</sup>。

本研究では、ウィルムス腫瘍の中でも間葉成分として横紋筋を豊富に含む組織型を示すものに注目し、WT1 遺伝子変異との関連を調べた。また、FRN の組織型を示すものが予後良好とされながらなぜ化学療法抵抗性とされるかを調べた。

対象と方法

1. 対象

1998 年から 2000 年にかけて、主とし WT1 遺伝子解析目的で慶應義塾大学医学部病理学教室に腫瘍の凍結切片と、一部の症例では患児末梢血が腫瘍組織とともに提供された 46 例を用いた (第 1 表)。

両側性のウィルムス腫瘍を発症した患児の父親が小児期にウィルムス腫瘍の既往を認めた家族性の 1 症例においては患児の腫瘍と末梢血に加えて両親の末梢血の解析が可能であった。

2. DNA 抽出

各施設で患者からヘパリン採血された 10 ml の末梢血から GFX genomic blood DNA purification kit (Amersham Biosciences) を使用して DNA を抽出した。

本論文は、Shibata R, Hashiguchi A, Sakamoto J, Yamada T, Umezawa A, Hata J : Correlation between a specific Wilms tumour suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumour (WT). J Med Genet 39 : E83, 2002 の一部、Shibata R, Takata A, Hashiguchi A, Umezawa A, Yamada T, Hata J : Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor. Pathology International, 53 : 214-220, 2003 の一部による。

- Hageien E, van Vroonhoven TJM, Verbrugh HA : A cobblestone cell form human omentum : the mesothelial cell, isolation, identification, and growth characteristics. *In Vitro Cell Dev Biol* 29A : 127-134, 1993
- 46) Kishikawa T, Sakamoto M, Ino Y, Kubushiro K, Nozawa S, Hirohashi S : Two distinct patterns of peritoneal involvement shown by *in vitro* and *in vivo* ovarian cancer dissemination models. *Invasion Metastasis* 15 : 11-21, 1995
- 47) Montag AG, Jenison EL, Griffiths CT, Welch WR, Lavin PT, Knapp RC : Ovarian clear cell carcinoma : A clinicopathologic analysis of 44 cases. *Int J Gynecol Pathol* 8 : 85-96, 1989
- 48) Hanski C, Drechsler K, Hanisch FG, Sheehan J, Manske M, Ogorek D, Klussmann E, Hanski ML, Blank M, Xing PX, McKenzie IFC, Devine PL, Riecken EO : Altered glycosylation of the MUC1 protein core contributes to the colon carcinoma-associated increase of mucin bound sialyl Lewis x expression. *Cancer Res* 53 : 4082-4088, 1993
- 49) Hanski C, Hanski ML, Zimmer T, Ogorek D, Devine P, Riecken EO : Characterization of the major sialyl-Lex-positive mucins present in colon, colon carcinoma, and sera of patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 55 : 928-933, 1995
- 50) Högberg T, Carstensen J, Simonsen E : Treatment results and prognostic factors in a population-based study of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 48 : 38-49, 1993
- 51) Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, Pudney J, Anderson DJ, Toribara NW, Hill III JA : Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod* 56 : 999-1011, 1997
- 52) Van Klinken BJW, Dekker J, Buller HA, Bolos CD, Einerhand AWC : Biosynthesis of mucins (MUC2-6) along the longitudinal axis of the human gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 273 : G296-302, 1997
- 53) Dong Y, Walsh MD, Cummings MC, Wright RG, Khoo SK, Parsons PG, McGuckin MA : Expression of MUC1 and MUC2 mucins in epithelial ovarian tumors. *J Pathol* 183 : 311-317, 1997
- 54) Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilken J : Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol* 129 : 255-265, 1995
- 55) Makiguchi Y, Hinoda Y, Imai K : Effect of MUC1 mucin, an anti-adhesion molecule, on tumor cell growth. *Jpn J Cancer Res* 87 : 505-511, 1996
- 56) Suwa T, Hinoda Y, Makiguchi Y, Takahashi T, Itoh F, Adachi M, Hareyama M, Imai K : Increased invasiveness of MUC1 and cDNA-transfected human gastric cancer MKN74 cells. *Int J Cancer* 76 : 377-382, 1998
- 57) Satoh S, Hinoda Y, Hayashi T, Burdick MD, Imai K, Hollingsworth MA : Enhancement of metastatic properties of pancreatic cancer cells by MUC1 gene encoding an anti-adhesion molecule. *Int J Cancer* 88 : 507-518, 2000
- 58) Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, DeFranzo B, Kim Y, Ottensmeier C : Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium *in vitro* is partly mediated by CD44H. *Cancer Res* 53 : 3830-3838, 1993
- 59) Jentoft N : Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15 : 291-294, 1990
- 60) Bramwell ME, Wiseman G, Shotton DM : Electron microscopic studies of the CA antigen, epitectin. *J Cell Sci* 86 : 249-261, 1986
- 61) Hynes RO : Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 : 11-25, 1992
- 62) Becker JW, Erickson HP, Hoffman S, Cunningham BA, Edelman GM : Topology of cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 1088-1092, 1989
- 63) Wesseling J, van der Valk SW, Hilken J : A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell* 7 : 565-577, 1996
- 64) Braga VM, Pemberton LF, Duhig T, Gendler SJ : Spatial and temporal expression of an epithelial mucin, Muc-1, during mouse development. *Development* 115 : 427-437, 1992
- 65) Hilken J, Ligtenberg MJL, Vos HL, Litvinov SV : Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci* 17 : 359-363, 1992
- 66) Wiltshaw E, Kroner T : Phase II trial of cis-dichlorodiammineplatinum (II) (NSC-119875) in advanced adenocarcinoma of the ovary. *Cancer Treat Rep* 60 : 55-60, 1976
- 67) Bertelsen K : Tumor reduction surgery and long-term survival in advanced ovarian cancer : a DACOVA study. *Gynecol Oncol* 38 : 203-209, 1990



- Human Cell 3 : 70-75, 1990
- 24) Kikuchi Y, Miyauchi M, Kizawa I, Oomori K, Kato K : Establishment of a cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line. *J Natl Cancer Inst* 77 : 1181-1185, 1986
  - 25) Ishiwata I, Ishiwata C, Soma M, Nozawa S, Ishikawa H : Characterization of newly established human ovarian carcinoma cell line-special reference to the effects of cis-platinum on cellular proliferation and release of CA125. *Gynecol Oncol* 26 : 340-354, 1987
  - 26) Ishiwata I, Ishiwata C, Kobayashi N, Ishikawa H : Characterization of newly established cell line HUOA from a human ovarian serous cystadenocarcinoma. *Acta Obst Gynaec Jpn* 39 : 831-836, 1987
  - 27) Gum JRJ, Hicks JW, Toribara NW, Kim YS, Siddiki B : Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA : Identification of the amino terminal and overall sequence similarity to pre-pro-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 269 : 2440-2446, 1994
  - 28) Gum JR Jr., Ho JJJ, Pratt WS, Hicks JW, Hill AS, Vinall LE, Robertson AM, Swallow DM, Kim YS : MUC3 Human intestinal mucin. *J Biol Chem* 272 : 26678-26686, 1997
  - 29) Guyonnet Duperat V, Audie JP, Debailleul V, Laine A, Buisine MP, Galiegue-Zouitina S, Pigny P, Degand P, Aubert JP, Porchet N : Characterization of the human mucin gene MUC5AC : a consensus cysteine-rich domain for 11P15 mucin gene? *Biochem J* 305 : 211-219, 1995
  - 30) Desseyn JL, Guyonique-Dupera V, Porchet N, Aubert JP, Laine A : Human mucin gene MUC5B, the 10.7-Kb large central exon encodes various alternate subdomains resulting in a super-repeat. *J Biol Chem* 272 : 3168-3178, 1997
  - 31) Toribara NW, Robertson AM, Ho SB, Kuo WL, Gum E, Hicks JW, Gum J Jr., Byrd JC, Siddiki B, Kim YS : Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning. *J Biol Chem* 268 : 5879-5885, 1993
  - 32) Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T : Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene : interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 6133-6137, 1985
  - 33) Mochizuki H, Nagoya K, Yamauchi T, Takao Y, Masuko H, Sato H, Sasaki H, Itoh K, Tsukazaki K, Udagawa Y, Kobayashi T, Nozawa S : Specificity of a tumor marker (CA54/61) and its individual epitopes recognized by monoclonal antibodies, MA54 and MA61, in human tumor patients. *J Clin Lab Anal* 6 : 225-231, 1992
  - 34) Kjeldsen T, Clausen H, Hirohashi S, Ogawa T, Iijima H, Hakomori S : Preparation of characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2-6-N-Acethylgalactosaminyl (sialosyl-Tn) epitope. *Cancer Res* 48 : 2214-2220, 1988
  - 35) Narimatsu H, Iwasaki H, Nishihara S, Kimura H, Kudo T, Yamauchi Y, Hirohashi S : Genetic evidence for the Lewis enzyme, which synthesizes type-1 Lewis antigens in colon tissue, and intracellular localization of the enzyme. *Cancer Res* 56 : 330-338, 1996
  - 36) Hanai N, Shitara K, Yoshida H : Generation of monoclonal antibodies against human lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma using mice rendered tolerant to normal human lung. *Cancer Res* 46 : 4438-4443, 1986
  - 37) Magnani JL, Nilsson B, Brockhaus M, Zopf D, Steplewski Z, Koprowski H, Ginsburg V : A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. *J Biol Chem* 257 : 14365-14369, 1982
  - 38) Fukushi Y, Nudelman E, Levery SB, Hakomori S, Rauvala H : Novel fucolipids accumulating in human adenocarcinoma. III. A hybridoma antibody (FH6) defining a human cancer-associated difucoganglioside (VI3NeuAcV3III3Fuc2nLc6) . *J Biol Chem* 259 : 10511-10517, 1984
  - 39) Yamori T, Ota DM, Cleary KR, Hoffs S, Hager LG, Irimura T : Monoclonal antibody against human colonic sulfomucin : immunohistochemical detection of its binding sites in colonic mucosa, colorectal primary carcinoma and metastasis. *Cancer Res* 49 : 887-894, 1989
  - 40) Yamamoto M, Bhavanandan VP, Nakamori S, Irimura T : A novel monoclonal antibody specific for sialylated MUC1 mucin. *Jpn J Cancer Res* 87 : 488-496, 1996
  - 41) Tamaru M, Tomura K, Sakamoto S, Tezuka K, Tamatani T, Narumi S : Interleukin-1 beta induces tissue-and cell type-specific expression of adhesion molecules *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 : 1292-1303, 1998
  - 42) Jerome KR, Bu D, Finn OJ : Expression of tumor-associated epitopes on Epstein-Barr Virus-immortalized B-cells and Burkitt's Lymphomas transfected with epithelial mucin complementary DNA. *Cancer Res* 52 : 5985-5990, 1992
  - 43) Batra SK, Kern HF, Worlock AJ, Metzgar RS, Hollingsworth MA : Transfection of the human Muc1 mucin gene into a poorly differentiated human pancreatic tumor cell line, Panc1 : integration, expression and ultrastructural changes. *J Cell Sci* 100 : 841-849, 1991
  - 44) Takahashi K, Sawasaki Y, Goto T, Hata J, Mukai K : Cobblestone monolayer cells from human omental adipose tissue are possibly mesothelial, not endothelial. *In Vitro Cell Dev Biol* 25 : 109-111, 1989
  - 45) Pronk A, Leguit P, van Papendrecht HAAGM,

会 (徳島, 2000 年), 第 53 回 日本産科婦人科学会総会 (札幌, 2001 年), 第 10 回日本がん転移学会 (徳島, 2001 年), 第 30 回 日本婦人科腫瘍学会 (横浜, 2001 年) において発表した。

本研究は平成 11 年度慶應義塾大学医学部研究奨励費, 平成 13 年度慶應義塾学事振興資金による研究補助を受けた。

## 文 献

- 1) Cannistra SA : Why should the clonogenic cell assay be prognostically important in ovarian cancer? *J Clin Oncol* 9 : 368-370, 1991
- 2) Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, and Park RC : Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma : the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 9 : 1138-1150, 1991
- 3) Tamada Y, Iida S, Aoki D, Nozawa S, and Irimura T : Carbohydrate epitopes and mucins expressed by 17 human ovarian carcinoma cell lines. *Oncol Res* 11 : 233-241, 1999
- 4) Peter Russell : Surface Epithelial-Stromal Tumors of the Ovary. *BLAUSTEIN'S Pathology of the Female Genital Tract*, 4th ed. (Ed) Kurman RJ, Springer-Verlag, New York, p.705-782, 1994
- 5) Rubin SC, Wong GYC, Curtin JP, Barakat RR, Hakes TB, Hoskins WJ : Platinum-based chemotherapy of high-risk stage I epithelial ovarian cancer following comprehensive surgical staging. *Obstet Gynecol* 82 : 143-147, 1993
- 6) Einhorn N, Nilsson B, Sjovall K : Factors influencing survival in carcinoma of the ovary. Study from a well-defined Swedish population. *Cancer* 55 : 2019-2025, 1985
- 7) Kim YS, Gum J, Brockhausen I : Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconjugate J* 13 : 693-707, 1996
- 8) Lightenberg MJL, Vos HL, Gennissen AMC, Hilkens J : Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J Biol Chem* 265 : 5573-5578, 1990
- 9) Lan MS, Batra SK, Qi W-N, Metzgar RS, Hollingsworth MA : Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem* 265 : 15294-15299, 1990
- 10) Gendler SJ, Burchell JM, Duhing T, Lamport D, White R, Parker M, Taylor-Papadimitriou J : Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 6060-6064, 1987
- 11) Hilkens J, Lightenberg MJL, Vos HL, Litvinov SV : Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci* 17 : 359-363, 1992
- 12) Ando I, Kukita A, Soma G, and Hino H : A large number of tandem repeats in the polymorphic epithelial mucin gene is associated with severe acne. *J Dermatol* 25 : 150-152, 1998
- 13) Nozawa S, Tsukazaki K, Sakayori M, Jeng C-H, Iizuka R : Establishment of a human ovarian clear cell carcinoma cell line (RMG-I) and its single cell cloning. *Human Cell* 1 : 426-435, 1988
- 14) Nozawa S, Yajima M, Sasaki H, Tsukazaki K, Aoki D, Sakayori M, Udagawa Y, Kobayashi T, Sato I, Furusako S, Mochizuki H : A new CA125-like antigen (CA602) recognized by two monoclonal antibodies against a newly established ovarian clear cell carcinoma cell line (RMG-II) . *Jpn J Cancer Res* 82 : 854-861, 1991
- 15) 笹 秀典, 菊池義公, 久野 篤, 石井賢治, 永田一郎, 河合俊明, 相田真介, 杉田道夫, 杉下 匡, 天神美夫 : シスプラチン耐性卵巣癌培養細胞の細胞周期に与えるシスプラチンの影響. *Human Cell* 5 : 384-391, 1992
- 16) Ishiwata I, Ishiwata C, Soma M, Ishikawa H : Establishment of HUOCA-II, a human ovarian clear cell adenocarcinoma cell line, and its angiogenic activity. *J Natl Cancer Inst* 78 : 667-673, 1987
- 17) Lau DHM, Lewis AD, Ehsan MN, Sikic BI : Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin. *Cancer Res* 51 : 5181-5187, 1991
- 18) 酒依元子, 野澤志朗, 宇田川康博, 陳 啓子, 李 順坤, 佐久間達朗, 飯塚理八, 和田順子, 吉田茂子, 武田佳彦 : 同一の卵巣ムチン性嚢胞腺癌より樹立された 2 種の培養細胞株 (RMUG-S, RMUG-L) の細胞生物学的特性. *Human Cell* 3 : 52-56, 1990
- 19) 木寺義郎, 吉村隆宏, 大隈良成, 岩坂 剛, 杉森 甫 : ヒト卵巣ムチン性嚢胞腺癌由来細胞株 MCAS の樹立と性状. *日産婦誌*, 37 : 1820-1824, 1985
- 20) 石渡 勇, 佐藤善郎, 井口めぐみ, 時枝由布子, 石渡千恵子, 木口一成, 石川 博 : ヒト卵巣粘液性嚢胞腺癌細胞株 HMKOA の樹立と性状. *Human Cell* 12 : P59, 1999
- 21) Yamada T, Ueda M, Otsuki Y, Ueki M, Sugimoto O : Establishment and characterization of a cell line (OMC-3) originating from a human mucinous cystadenocarcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 40 : 118-128, 1991
- 22) Horowitz AT, Treves AJ, Voss R, Okon E, Fuks Z, Davidson L, Biran S : A new human ovarian carcinoma cell line : Establishment and analysis of tumor-associated markers. *Oncology* 42 : 332-337, 1985
- 23) 宇田川康博, 野澤志朗, 陳 啓子, 酒依元子, 三上幹男, 太田邦彦, 塚崎克己, 木口一成, 飯塚理八 : hCG 産生性上皮性卵巣癌株 (RTSG) の樹立とその細胞特性.

発現は、腹膜中皮細胞との接着をむしろ抑制してしまう、その原因は癌細胞が MUC1 を発現することだけにあるのだろうか。その手がかりとして、実験に用いた腹膜中皮細胞の細胞表面における分子の発現パターンを、各種抗体ならびにレクチンを用いてフローサイトメーターによって解析した。その結果、腹膜中皮細胞表面にもシアル酸で修飾された MUC1 が高発現しており、この分子は腹腔内の癒着や腸管蠕動の際の摩擦回避に役立っているのではないかと報告されていることから<sup>64,65)</sup>、腹膜中皮細胞表面に発現している sialylated MUC1 も同様の機能を有しているものと考えられた。また、本実験で示された腹膜中皮細胞表面分子の発現パターンは、Cannistra, S.A. らによって報告された結果<sup>66)</sup>と一致しており、人種や個体差を越えた共通の特徴と見なすことができる。さらに、腹膜中皮細胞には sialylated MUC1 のみならず、ヘパラン硫酸なども高発現しており、これらの分子が比較的強い陰性電荷を帯びていること、一方で卵巣癌細胞に MUC1 cDNA を遺伝子導入し sialylated MUC1 を高発現させると、中皮細胞との接着阻害が生じることなどを考え合わせると、シアル酸の有する陰性電荷同士の反発が接着阻害に重要である可能性がある。したがって、陰性電荷の主たる原因であるシアル酸が減少することで接着阻害機序が解除され、結果的に腹膜播種がおりやすくなることが想定されるため、今後、腹膜播種成立の機序を論じる際、重要な視点になるものと思われる。

卵巣明細胞腺癌は FIGO の国際進行期分類で Ic 期が最も多く、卵巣癌の中で発症率が最も高い漿液性腺癌が IIIc 期に分布しているのとは対照的である<sup>3,4)</sup>。実験結果より推察すると MUC1 ムチンは腹膜播種を抑制することから、MUC1 を高発現した癌細胞は、腹腔内で生存していく上で進展の足場を失うという点から不利である。しかしながら、一度腹膜播種が形成された場合、漿液性腺癌では一般に抗癌剤感受性が比較的高いことが知られ、ある程度病勢を抑制することができるのに対して<sup>66)</sup>、抗癌剤の奏効が期待できない明細胞腺癌<sup>67)</sup>では腹膜播種そのものを抑制することが重要と考えられ、こうした新たな治療戦略を構築するうえで MUC1 ムチンの発現の程度、すなわち本分子を介する腹膜中皮細胞との相互作用の状態を把握することが有益な情報になると思われる。この種の転移形式に起因する死亡率の高さを鑑みると、卵巣癌細胞の腹膜播種を抑制する治療戦略は、致死性の高いこの疾患に罹患した患者の予後を大きく改善する可能性がある。

## 総 括

ヒト卵巣癌由来細胞株 17 種類を用いて、各種ムチン遺伝子の発現と各種糖鎖抗原の発現をそれぞれ RT-PCR 法とフローサイトメーターを使って検討した。また、ヒト卵巣明細胞腺癌株 ES-2 を用いて、MUC1 遺伝子導入株を作製し、増殖能や腹膜播種形成能に対して MUC1 ムチンの及ぼす影響を検討した。

1. 明細胞腺癌株では、MUC1 のみを発現し、糖鎖では sLe<sup>x</sup> の発現が特徴的であった。粘液性腺癌株では、多様なムチン遺伝子と糖鎖の発現が認められた。漿液性腺癌株では、mRNA レベルで MUC1, MUC2 を発現するもののタンパクレベルでの発現は認められず、糖鎖抗原に関しても検索した限りほとんど発現が認められなかった。総じて、組織型ごとに特色のある結果を示した。

2. 細胞株に MUC1 遺伝子を導入することによって、形態の変化や *in vitro* での増殖能に影響はみられなかったが、腹膜中皮細胞との接着は有意に抑制された。

3. MUC1 遺伝子導入株は、ヌードマウス皮下における *in vivo* 造腫瘍能を促進させたが、腹腔内における播種能は抑制される傾向にあった。

以上の結果から、卵巣明細胞腺癌において MUC1 ムチンの発現は、腹膜播種形成にむしろ抑制的に作用することが判明した。また、この作用機序の重要な要因として、腹膜中皮細胞表面に MUC1 ムチンが高発現していることがあげられ、ムチン分子 MUC1 の生体内における新たな役割を明らかにした。

本稿を終えるにあたり、ご指導ならびにご校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 野澤志朗教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に対して直接のご指導をいただきました東京大学大学院薬学系研究科生体異物学教室 入村達郎教授に深謝します。実験のご協力、およびご助言をいただいた慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 青木大輔講師に御礼申し上げます。

本研究に対し、細胞株をご供与いただいた防衛医科大学校産婦人科学教室 菊地義公教授、大阪医科大学産婦人科学教室 植木實教授、同 植田政嗣助教授、石渡産婦人科病院 石渡勇博士にこの場を借りて御礼申し上げます。さらに、ご協力いただいた研究室の諸先生方に感謝いたします。また、本研究の要旨の一部は第 57 回 日本癌学会総会 (横浜, 1998 年)、第 3 回 日本産婦人科腫瘍マーカー・遺伝子診断学会 (佐賀, 1999 年)、第 58 回 日本癌学会総会 (広島, 1999 年)、第 52 回 日本産科婦人科学会総

いる可能性が考えられる。

当初、ムチン遺伝子の発現とムチン型糖鎖の発現には関連があるのではないかと予想したが、本実験結果では積極的に肯定できる証拠は得られなかった。しかしながら、これらのムチン遺伝子の発現パターンと糖鎖抗原の発現パターンを組み合わせると、卵巣癌の組織学的分類ごとに異なった発現様式を呈したことから、これらのデータは卵巣癌細胞のムチンや糖鎖抗原を合成する能力が組織型に依存した形でおこなわれていることを示唆していると考えられる。

Einhorn, N. らは、卵巣癌の予後因子のなかで臨床進行期と組織型が重要であり、組織型の重要性は腫瘍の進行度に影響することであると指摘している<sup>61</sup>。卵巣癌における MUC1 の発現量は進行期が上がるにつれ増加し、進行例での低発現は予後を良好とする因子であることが報告されており<sup>62</sup>、明細胞腺癌株がムチン遺伝子のなかでも MUC1 を特異的に発現していた本研究結果を考えると<sup>3</sup>、明細胞腺癌の臨床病態に MUC1 ムチンが深く関わっている可能性が考えられた。そこで、明細胞腺癌の病態に対する MUC1 ムチンの役割を解明するため、MUC1 の発現が最も低かった ES-2 株を使って、タンデム・リピート 22 回と 42 回の 2 種類の MUC1 cDNA の遺伝子導入株を作製した。

Wesseling, J. らは、悪性黒色腫の細胞株に MUC1 cDNA を遺伝子導入したところ、培養プレートに対する遺伝子導入株の接着性が下がることを報告していたが<sup>63</sup>、今回検索した卵巣癌細胞株 (ES-2) では、培養プレートに対する接着効率や細胞形態に変化はみられなかった (データ未提示)。このような違いは実験に用いた細胞株の由来する癌腫に起因するのではないかと考えられる。

また、MUC1 が細胞増殖を制御するという報告がなされてきたが<sup>64-67</sup>、これらの結果は相反 (促進的であったり、抑制的であったり) しており、やはり実験に使用した癌腫によって MUC1 の果たす役割が変化するのはないかと考えられる。卵巣癌の場合、MUC1 は *in vitro* では特に細胞増殖に影響をおよぼすものではないが、*in vivo* においては MUC1 遺伝子導入株がマウス皮下造腫瘍能を有意に増大させたことから、腫瘍増殖を促進する分子の 1 つとも考えられた。

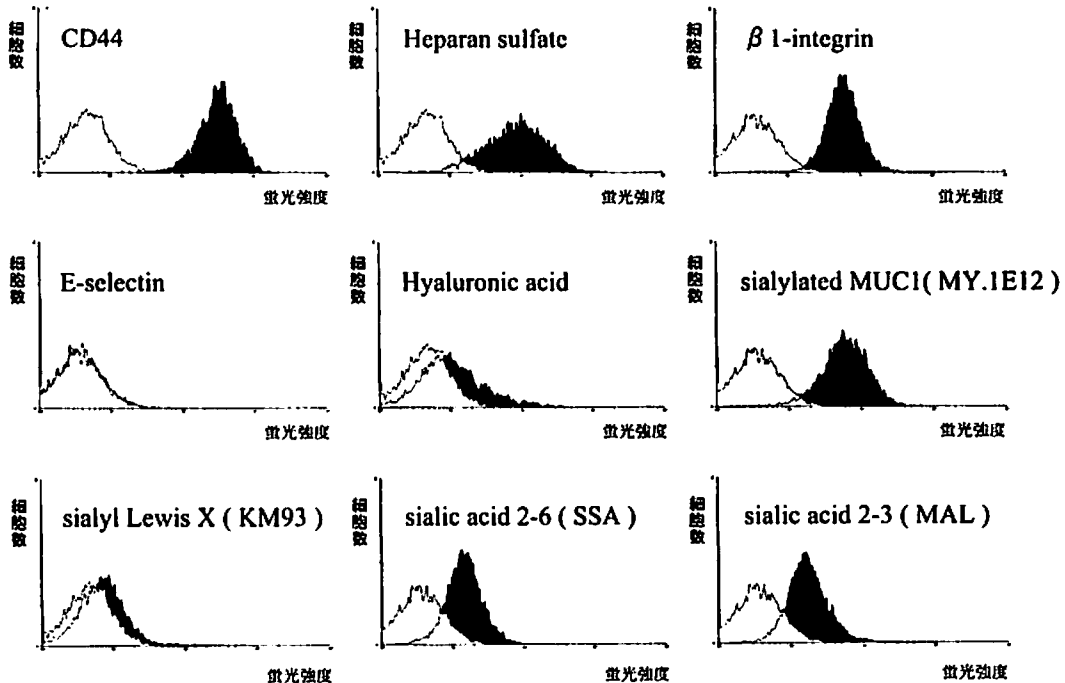
多くの卵巣癌は卵巣表面にまで浸潤し、腫瘍被膜を破綻させ、腹腔内に腫瘍細胞を播種することで腹膜表面に転移巣を形成する。本研究結果では、癌細胞表面に MUC1 が発現することにより、腹膜中皮細胞と癌細胞との接着が抑制されることを見いだした。また、ES-2/

T-42 は、ES-2/T-22 に比較して中皮細胞との接着能がさらに低下することから、MUC1 タンデム・リピートの長さも接着阻害因子としての MUC1 の機能に影響を与えることが示された。これまで卵巣癌細胞と腹膜中皮細胞との接着にかかわる分子としてヒアルロン酸結合部位を有する CD44 などが知られている<sup>68</sup>。MUC1 が腹膜中皮細胞への接着を抑制する背景としては、この分子が細胞外に進長した巨大分子であることから、物理的に接着分子とその受容体との相互作用を阻害していることが推測される。

MUC1 のムチン様領域、すなわちタンデム・リピート 1 回分の平均長はおよそ 5 nm である<sup>69</sup>。したがって MUC1 分子は、200~500 nm 細胞表面から突出している<sup>60</sup>。接着分子をはじめとする多くの膜タンパク分子の細胞外領域が 30 nm 以下であることと比較すると、いかに MUC1 分子が巨大な分子であるかが想像される<sup>61,62</sup>。実際に、癌細胞に MUC1 を高発現させると、インテグリンを介したコラーゲンなどの細胞外基質との接着能が減少すると報告されている<sup>64,65</sup>。これらの報告や本実験結果より、MUC1 は接着分子とその受容体との結合を非特異的に阻害する作用があるのではないかと考えられる。

ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 をヌードマウスの腹腔内に移植し、3 週間後に腹膜播種の程度を評価した。これまでの報告では、生じた腫瘍の重量のみで播種の程度が論じられることが多かったが、本研究では卵巣癌の腹腔内微小転移をもその評価に反映させるために、腹膜、腸間膜、大網、および子宮、卵巣を形成された腫瘍とともに摘出し、摘出組織全重量を測定することによって播種の程度を評価した。その結果、ES-2/mock は ES-2/T-22 や ES-2/T-42 などの MUC1 遺伝子導入株よりも、さらに ES-2/T-22 の方が ES-2/T-42 よりも腹膜播種の程度が強かったことから、MUC1 の発現程度のみならず MUC1 の有するタンデム・リピート数も癌細胞と腹膜中皮細胞との接着能に影響を与えると考えられた。しかしながら、*in vitro* における有意差は *in vivo* の実験では得られず、実際の腹膜播種形成の要因が接着能だけでは説明できないことも同時に示していると考えられた。さらに、同様の実験による移植後 3 週生存率を比較すると、ES-2/mock 移植群で有意に低かったことより、少なくとも腹膜播種巣の形成そのものは生存率に直接的に影響を与えたといえる。

転移の成立には、宿主細胞と癌細胞の相互作用を理解することが重要である。癌細胞表面の MUC1 ムチンの



第9図 腹膜中皮細胞表面に発現する分子。細胞は各種抗体、レクチン(第3表参照)で反応させた後、フローサイトメーター(EPICS XL)により解析した。横軸には蛍光強度の対数を示し、縦軸には細胞数を示す。

## 考 察

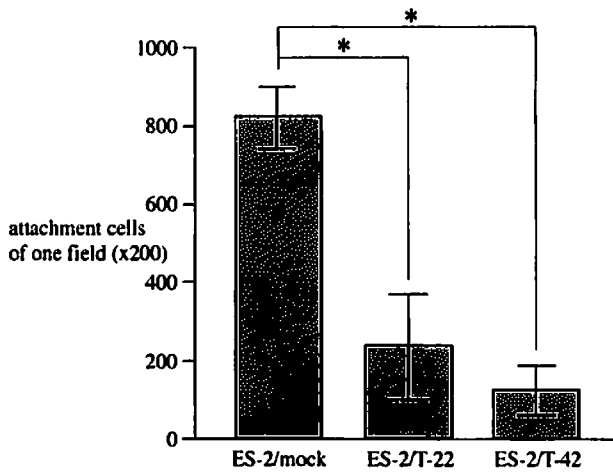
卵巣明細胞腺癌は、臨床的に罹患患者の7割近くが未産婦であったり<sup>47)</sup>、60%以上が国際進行期分類(FIGO, 1988)のI期に属したり、骨盤内の子宮内膜症を50~70%と高頻度に合併しているなど、他の組織型とは異なる特徴を有している<sup>4)</sup>。ムチン遺伝子の発現状況をみると、検索したすべての明細胞腺癌株はMUC1以外のムチン遺伝子を発現していなかった。さらに、フローサイトメーターによる細胞表面分子の解析では、sLe<sup>x</sup>の発現も明細胞腺癌には特徴的であったが、Hanski, C.らが報告しているように<sup>48,49)</sup>、MUC1分子上にはsLe<sup>x</sup>の発現が認められるため、MUC1とsLe<sup>x</sup>の発現はリンクしている可能性が考えられる。

粘液性腺癌の患者は、進行期分類のI期に分類されることが多く、腫瘍が卵巣を越えて進展しているケースは全体の5%未満である<sup>4)</sup>。Högberg, T.らが指摘しているように、腫瘍の進展が遅いものの、いったん卵巣外に進展してしまうと、つまり浸潤転移能を獲得すると最も治癒しにくい組織型である<sup>50)</sup>。本研究結果では、粘液性腺癌細胞株は多種多様なムチン遺伝子の発現ならびに糖

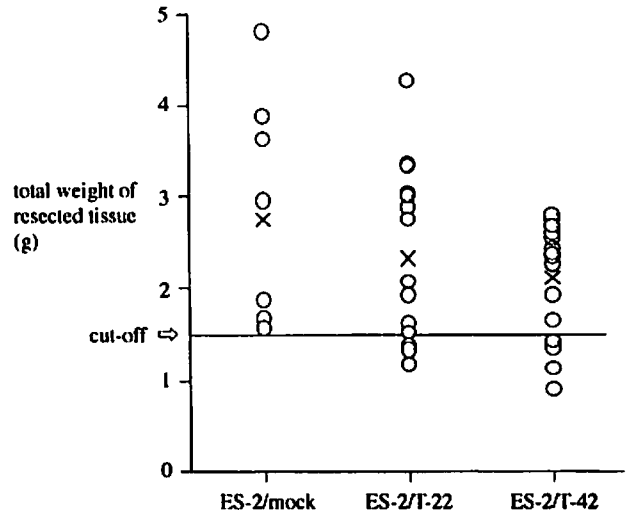
鎖抗原の発現状況を示していた。卵巣粘液性腫瘍は良性の場合、形態学的に子宮頸管腺上皮に類似した組織型であるが、悪性の場合、腸上皮に類似してくる頻度が増す。子宮頸管腺上皮に発現しているムチン遺伝子はMUC1, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6であると報告されており<sup>51)</sup>、一方腸上皮にはMUC2, MUC3, MUC4, MUC5Bが発現している<sup>52)</sup>。今回の検討では、卵巣粘液性腺癌由来の培養細胞にはMUC2とMUC3のmRNA発現が認められており、卵巣粘液性腺癌の腸上皮化生や腸上皮型の粘液性腺癌を説明する分子マーカーになる可能性を示唆している。

漿液性腺癌は、卵巣癌全体の約40~50%を占めており、最も発症率の高い組織型である。その80~85%では、開腹時すでに腹膜播種性転移を認めるという点で臨床的には明細胞腺癌や粘液性腺癌と異なっている<sup>4)</sup>。

本研究結果では、漿液性腺癌株においてMUC1とMUC2のmRNA発現が認められたものの、フローサイトメーターによる細胞表面分子の解析ではMUC1の発現は認められなかった。MUC1を認識する抗体の特異性も考えられるが、ムチン型糖鎖抗原の発現もこれらの漿液性腺癌株では全く認められなかったことから、むしろなんらかの過程でmRNAからの翻訳が阻害されて



第7図 腹膜中皮細胞に対する各 MUC1 遺伝子導入株の接着能. 24-well 培養プレートに単層培養された腹膜中皮細胞に対し, BCECF-AM DMSO で蛍光標識した ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 をそれぞれ  $5 \times 10^5$  個/1 ml D/F 培地 (FCS 無添加)/well の条件で接着させた. 接着した癌細胞は蛍光顕微鏡 200 倍率の視野にてカウントした. なお, 1 well につき視野は無作為に 10 箇所を選び, 各々の接着細胞数の平均値を 1 データとした (N=6).



第8図 ノードマウス腹腔内における各 MUC1 遺伝子導入株の増殖能. ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 を各  $2 \times 10^6$  個/1 ml HBSS に調製後, KSN ノードマウスの腹腔内に移植した. 移植 3 週間後, マウスを解剖し, 腹膜, 大網, 腸間膜, 子宮, 卵巣を形成された腫瘍とともに摘出し, 摘出組織全重量をグラフ化した. ○はマウス 1 匹あたりの結果を, ×は平均値を表す. なお, Cut off ラインは肉眼的に腹膜播種が認められない場合の摘出組織全重量 (検体中の最大値) である.

g,  $2.033 \pm 0.716$  g で, ES-2/mock の方がより重篤な腹膜播種を形成する傾向が認められた (ES-2/T-22 に対して  $p=0.1585$ , ES-2/T-42 に対して  $p=0.0562$ ). しかしながら, 第4表に示すように ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 が腹腔内移植されたマウスの 3 週生存率はそれぞれ 42.9%, 90.9%, 100% であり, ES-2/mock に比較して ES-2/T-22, ES-2/T-42 は有意に予後良好であった ( $p < 0.05$ ).

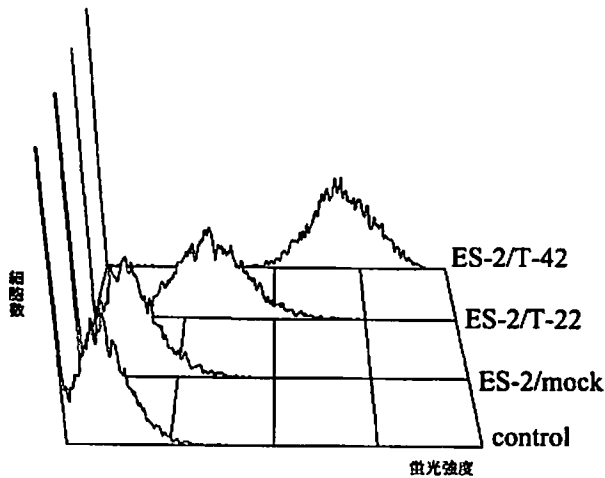
### 7. 本実験に使用した腹膜中皮細胞の性状

ヒト大網より調製した腹膜中皮細胞がいかなる分子をその細胞表面に発現しているか検索するために各種抗体ならびにレクチンを使用し, フローサイトメーターによる解析を行った (第9図). CD44,  $\beta 1$ -integrin, sialylated MUC1, heparan sulfate, sialic acid  $\alpha 2-6$  galactose 残基 (SSA にて認識される), sialic acid  $\alpha 2-3$  galactose 残基 (MAL にて認識される) は高発現しており, hyaluronic acid や sLe<sup>x</sup> は低発現, E-selectin の発現は全く認められなかった.

第4表 腹膜播種モデル (in vivo)

	ES-2/mock (n=14)	ES-2/T-22 (n=11)	ES-2/T-42 (n=11)
3-week survival (rate)	42.9% <sup>***</sup>	90.9% <sup>*</sup>	100% <sup>**</sup>

各細胞株を  $2 \times 10^6$  個/1 ml HBSS に調製後, KSN ノードマウスの腹腔内に移植した. 移植 3 週間後のマウス生存率を示す. 有意差検定は Fisher's exact probability test にておこなった. <sup>\*</sup><sup>\*\*</sup> は  $p < 0.05$  であることを示す.



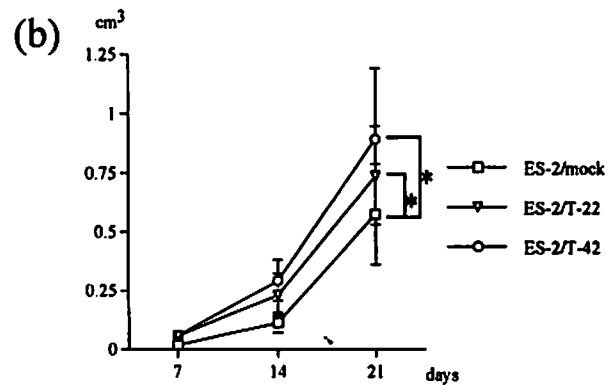
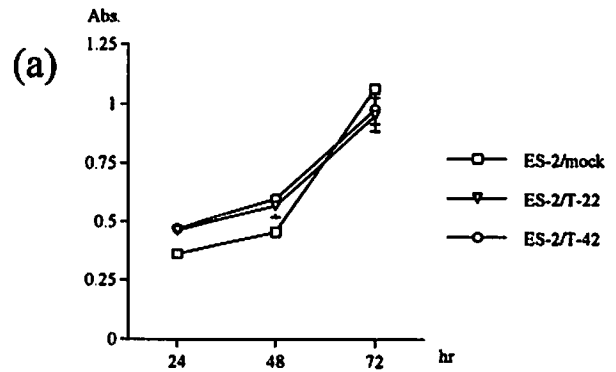
第5図 MUC1 遺伝子導入株における MUC1 ムチンの発現。フローサイトメーター解析において最も MUC1 の発現が低かった明細胞腺癌株 ES-2 を使って、遺伝子導入株 ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 を作製した。各遺伝子導入細胞は MY-1E12 抗体(シアル酸に修飾された MUC1 のタンデム・リピート部分を認識する)で反応させた後、フローサイトメーター (EPICS XL) により解析した。

#### 4. 細胞増殖に与える MUC1 ムチンの影響

3つの MUC1 遺伝子導入株の *in vitro* における細胞増殖能を検討した。WST-1 アッセイにて解析した結果を第6図 (a) に示す。*In vitro* では3つの細胞株の間に有意な差は認められなかった。しかしながら、第6図 (b) に示すように KSN ノードマウス皮下における造腫瘍能は MUC1 遺伝子導入株の方が高く、ES-2/mock と ES-2/T-22, ES-2/mock と ES-2/T-42 の間に有意な差が認められた ( $p < 0.05$ )。

#### 5. 腹膜播種能に与える MUC1 ムチンの影響 (*in vitro*)

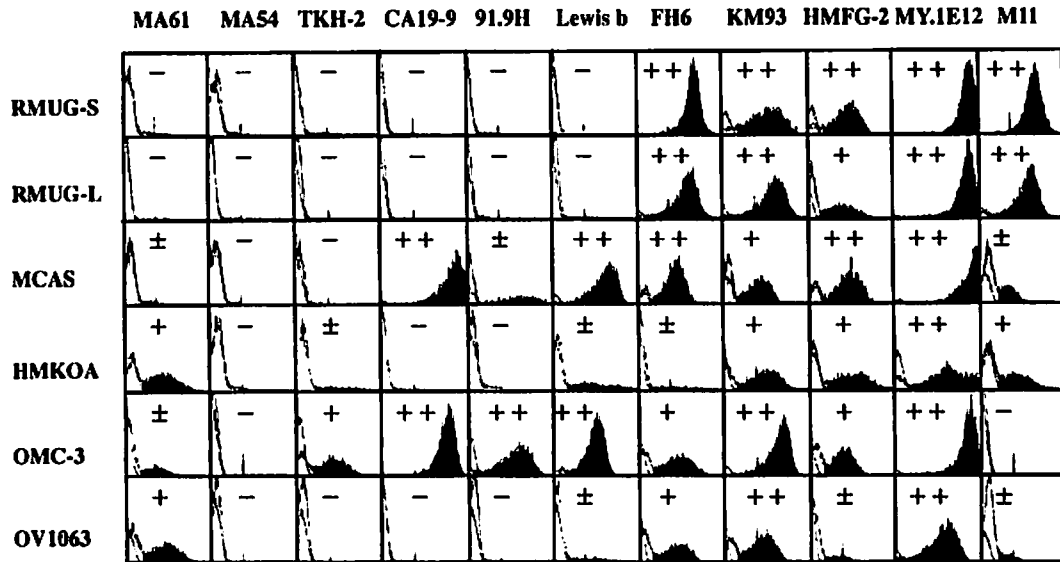
卵巣癌の特徴的な病態として腹膜播種があげられ、その *in vitro* モデルを確立するためにヒト大網より調製した腹膜中皮細胞を使用した。腹膜中皮細胞を使用するにあたって他の細胞の混入がないことを確認するため、文献にしたがって<sup>46)</sup>、抗 keratin 抗体陽性、抗 vimentin 抗体陽性、抗 factor VIII 抗体陰性であることを確認した(データ未提示)。接着実験に際して、生体内の環境に近い条件として 37°C を採用した。第7図に示すように、ES-2/mock では1視野の接着細胞数 (mean  $\pm$  SD) が  $855.8 \pm 108.6$  であるのに対して、ES-2/T-22, ES-2/T-42 はそれぞれ  $270.8 \pm 137.5$ ,  $150.2 \pm 70.1$  で MUC1 のタンデム・リピート数の増加によって接着が有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。



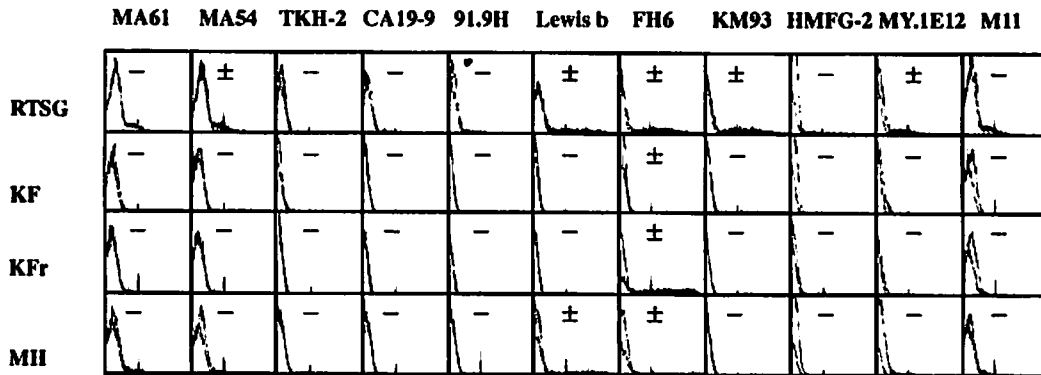
第6図 MUC1 遺伝子導入株の *in vitro*, *in vivo* における細胞増殖能。a: *in vitro* における細胞増殖能: 各  $5 \times 10^5$  個の ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 を 96-well 培養プレートに培養し、24 時間後、48 時間後、72 時間後に WST-1 試薬にて反応させた後、Microplate Reader Model 550 にて測定波長 450nm の吸光度を測定した (N=9)。b: ノードマウス皮下移植 (*in vivo*) における造腫瘍能: 各  $1 \times 10^6$  個の ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 を KSN ノードマウスに皮下移植した。移植後、7 日目、14 日目、21 日目の腫瘍容積は  $(1/2) \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$  にて算出した (N=6)。

#### 6. 腹膜播種能に与える MUC1 ムチンの影響 (*in vivo*)

ノードマウス腹腔内に細胞株を移植することにより、腹膜中皮細胞に対する各 MUC1 遺伝子導入株の接着実験の結果が *in vivo* にてどのように反映されるかを検討した。移植法として 1 ml の HBSS 液で調整した単細胞浮遊液 (single cell suspension) を腹腔内に注入した。腹膜微小転移巣も評価できるように、腹膜、大網、腸管を除く腸間膜、および子宮、卵巣を形成された腫瘍とともに摘出し、摘出した臓器と播種巣すべての重量をグラフ化したものが第8図である。ES-2/mock では  $3.118 \pm 1.239$  g (mean  $\pm$  SD) であったのに対し、ES-2/T-22, ES-2/T-42 ではそれぞれ  $2.290 \pm 1.094$



第3図 6種類の粘液性腺癌株における各種糖鎖ならびに MUC1 の発現。細胞は各種抗体で反応させた後、フローサイトメーター (Cyto-Ace 150) により解析した。横軸には蛍光強度の対数を示し、縦軸には細胞数を示す。陽性細胞の割合が5%未満を-, 5~29%を±, 30~59%を+, 60%以上を++と評価した。(Tamada Y et al : Oncol Res 11 : 233-241, 1999 の Figure 3. を一部改変, 許可を得て転載)



第4図 4種類の漿液性腺癌株における各種糖鎖ならびに MUC1 の発現。細胞は各種抗体で反応させた後、フローサイトメーター (Cyto-Ace 150) により解析した。横軸には蛍光強度の対数を示し、縦軸には細胞数を示す。陽性細胞の割合が5%未満を-, 5~29%を±, 30~59%を+, 60%以上を++と評価した。(Tamada Y et al : Oncol Res 11 : 233-241, 1999 の Figure 4. を一部改変, 許可を得て転載)

操作がなされるが 'clonal selection' による他分子の発現変化が以降の実験に影響することを回避するため、また MUC1 ムチンが細胞膜タンパク質であることを利用し、本実験ではクローニングを行うことなく cell sorter (EPICS ELITE) による遺伝子導入細胞の選別を3回行った。その結果、ES-2/T-42ではES-2/T-22の約

2倍の蛍光強度が認められ、フローサイトメーター解析に使用した抗体(MY.1E12)がタンデム・リピート上のシアル酸とペプチドを認識することから異なるタンデム・リピート数を有する MUC1 cDNA が導入され、タンデム・リピート数に応じた分子が発現していることが確認された(第5図)。



今回使用した17種類の細胞株はヌードマウスに皮下移植した際、由来する組織型に合致する組織像を呈していたため(データ未提示)、各細胞株は由来する組織型をある程度反映するものと考えられた。第1図に各種ムチン遺伝子のRT-PCRの結果を示した。MUC1(288bp)はすべての細胞株にてそのmRNAの発現が確認された。明細胞腺癌細胞株ではMUC1以外のムチン遺伝子の発現は認められず他の組織型由来細胞株と比較し特徴的であった。MUC2(441bp)の発現はMCAS, OMC-3, KF, KFr, MHにて確認されたが、漿液性腺癌細胞株ではMUC1とMUC2以外のムチン遺伝子の発現は確認されなかった。一方、粘液性腺癌細胞株では多種多様なムチン遺伝子の発現がみられ、MUC3(317bp)ではMCAS, HMKOA, OMC-3に、MUC5B(238bp)ではMCASとOMC-3に、MUC5AC(275bp)ではMCASに、MUC6(360bp)ではOMC-3にそれぞれのムチン分子mRNAの発現が確認された。なお、陽性対照であるβ-actin(154bp)はすべての細胞株に発現が確認され、また逆転写酵素反応(RT)を省略した陰性対照ではすべての細胞株でバンドの消失が確認された。

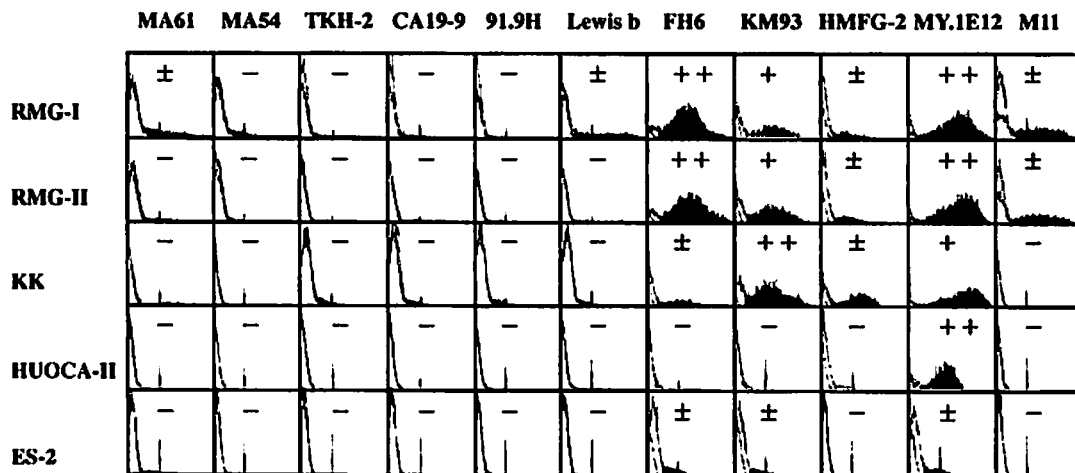
2. ヒト卵巣癌細胞株における細胞表面糖鎖ならびにMUC1ムチンの発現

第2表に提示したモノクローナル抗体を用いフローサイトメーター解析を行った結果を第2図、第3図、

第4図に示した。明細胞腺癌では発現量の程度は各細胞株により異なるものの、FH6あるいはKM93によって認識されるsLe<sup>x</sup>と、MY.1E12で認識されるsialylated MUC1の発現が共通した特徴であった(第2図)。粘液性腺癌ではsialylated MUC1, sLe<sup>x</sup>のみならず、多種多様な発現様式を呈した。MA61で認識されるTn抗原はOMC-3, HMKOA, OV1063に、TKH-2で認識されるsialyl Tn抗原はOMC-3に、Le<sup>b</sup>, sLe<sup>a</sup>, スルフォリス a はOMC-3とMCASにその発現が認められた。概してムチン分子のmRNA発現に多様性を認める細胞株ほど多様な糖鎖抗原の発現が認められる傾向がみられた(第3図)。漿液性腺癌では今回検索対象とした糖鎖抗原の発現は認められず、さらにRT-PCRでは発現がみられたMUC1ムチンについてもフローサイトメーター解析ではその発現を確認することができなかった(第4図)。なお、細胞株HTOAとHUOAに関しては増殖が著しく遅く、プレートに対する接着効率も悪いため、フローサイトメーターに供するだけの十分な細胞数が得られなかった。

3. MUC1遺伝子導入株の作製

シアル酸に修飾されたMUC1のタンデム・リピート部分を認識するMY.1E12抗体<sup>40)</sup>を使用したフローサイトメーター解析において最もその発現が低かった明細胞腺癌株ES-2を使ってMUC1遺伝子導入株を作製した。遺伝子導入細胞株の選別にあたりしばしばクローニング



第2図 5種類の明細胞腺癌株における各種糖鎖ならびにMUC1の発現。細胞は各種抗体で反応させた後、フローサイトメーター(Cyto-Ace 150)により解析した。横軸には蛍光強度の対数を示し、縦軸には細胞数を示す。陽性細胞の割合が5%未満を-, 5~29%を±, 30~59%を+, 60%以上を++と評価した。(Tamada Y et al: Oncol Res 11: 233-241, 1999のFigure 2.を一部改変, 許可を得て転載)

Mann-Whitney U-test を使用し、 $p < 0.05$  をもって有意と判定した。

9. 腹膜播種モデル (*in vivo*)

ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 を各  $2 \times 10^6$  個/1 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; 日水製薬株式会社, 東京) に調製後, それぞれ 14 匹, 11 匹, 11 匹の KSN ノードマウスの腹腔内に移植した。移植 3 週間後, マウスを解剖し, 各細胞株の腹膜播種形成能を検討した。評価法としては, 腸管を除く腸間膜, 腹膜, 大網, および子宮, 卵巣を腫瘍とともに摘出し, 摘出組織全重量を測定した。有意差検定は Mann-Whitney U-test を用いた。

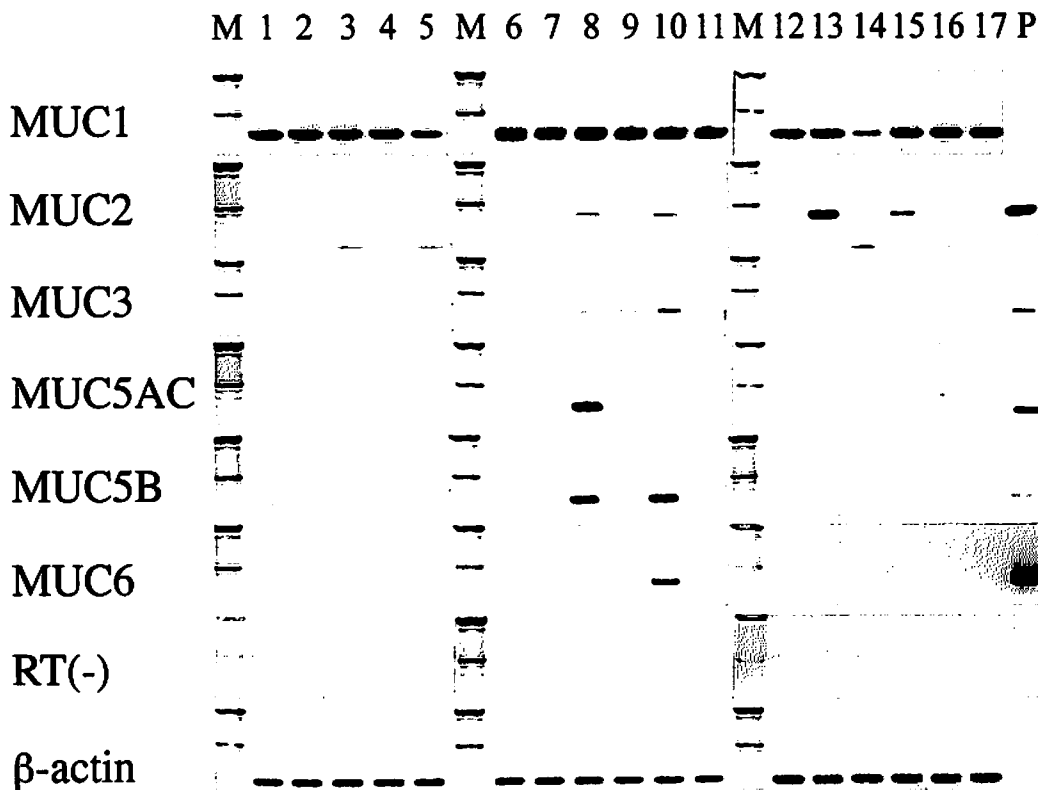
同様の実験系にて, 各細胞株のノードマウス腹腔内移植による 3 週生存率を検討した。

10. 腹膜中皮細胞表面に発現する分子の解析

フローサイトメーター解析にあたり, 上記 4. の方法で細胞を調整した。細胞は 1 次抗体またはビオチン化レクチン  $1 \mu\text{g}$  を含む  $100 \mu\text{l}$  FACS-PBS 中で氷上にて 30 分間反応させた後, FACS-PBS にて洗浄を 2 回行い, 抗体に対しては FITC 標識 2 次抗体を, ビオチン化レクチンに対しては FITC-Streptavidin を 30 分間氷上にて反応させた。2 回の洗浄の後, 30 mM propidium iodide を含む FACS-PBS  $500 \mu\text{l}$  に細胞を調製し, 生細胞 5,000 個を EPICS XL (Beckman Coulter Inc.) を用いて解析した。

結 果

1. ヒト卵巣癌由来細胞株におけるムチン遺伝子の発現 (RT-PCR)



第 1 図 17 種類のヒト卵巣癌細胞株における各種ムチン遺伝子の RT-PCR による発現解析。横軸には、M (100 bp DNA ladder) に続いて明細胞腺癌細胞株 5 株 (1, RMG-I; 2, RMG-II; 3, KK; 4, HUOCA-II; 5, ES-2), 粘液性腺癌細胞株 6 株 (6, RMUG-S; 7, RMUG-L; 8, MCAS; 9, HMKOA; 10, OMC-3; 11, OV1063), 漿液性腺癌細胞株 6 株 (12, RTSG; 13, KF; 14, KFr; 15, MH; 16, HTOA; 17, HUOA) を示す。右端の P は陽性対照 (cDNA) である。縦軸に MUC1 (288 bp), MUC2 (441 bp), MUC3 (317 bp), MUC5AC (275bp), MUC5B (238 bp), MUC6 (360 bp), RT (-) (逆転写酵素反応なし),  $\beta$ -actin (154 bp) を示す。(Tamada Y et al: Oncol Res 11: 233-241, 1999 の Figure 1. を一部改変, 許可を得て転載)

Streptavidin (ZYMED Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA) を使用した。

4. ヒト卵巣癌由来細胞株に発現する細胞表面分子の解析  
ヒト卵巣癌由来細胞株を 0.05% トリプシンと 0.02% EDTA にてプレートより剥離した後、0.1% bovine serum albumin と 0.1% sodium azide を含む phosphate-buffered saline (PBS) (以降、この溶液を FACS-PBS と呼ぶ) を使い、培養細胞数が  $5 \cdot 10^5$  cells/100 $\mu$ l となるように調製した。細胞は 1 次抗体 1  $\mu$ g を含む 100 $\mu$ l FACS-PBS 中で氷上にて 30 分間反応させた後、FACS-PBS にて洗浄を 2 回行い、FITC 標識 2 次抗体を 30 分間氷上にて反応させた。2 回の洗浄の後、30 mM propidium iodide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を含む FACS-PBS 500  $\mu$ l に細胞を調製し、生細胞 5,000 個を Cyto-Ace 150 (JASCO, 東京) にて解析した。なお、陽性細胞が 5% 未満を -, 5~29% を  $\pm$ , 30~59% を +, 60% 以上を ++ と判定した。

#### 5. MUC1 cDNA 遺伝子導入

ヒト卵巣明細胞腺癌由来細胞株 ES-2 は明細胞腺癌株のなかで最も MUC1 ムチンの発現が低かったため、本細胞を用いて MUC1 の遺伝子導入株を作製した。タンデム・リピート 22 回を含む MUC1 の全長 cDNA は O. J. Finn 博士<sup>42)</sup>より、タンデム・リピート 42 回を含む MUC1 の全長 cDNA は M. A. Hollingsworth 博士<sup>43)</sup>より供与を受け、制限酵素 *Bam*HI を用いてプラスミドベクター pCEP4 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) に組み換えたのち電気穿孔法にて MUC1 cDNA 発現ベクターを導入した。Hygromycin B (Calbiochem-Novabiochem Co., San Diego, CA, USA) 400  $\mu$ g/ml 濃度にて遺伝子導入株を選別し安定発現株を樹立した。さらに、sialylated MUC1 を認識する MY.1E12 抗体を使い、EPICS ELITE (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) を用いて cell sorting を 3 回行い、各々の細胞集団から MY.1E12 抗体陽性細胞を選別した。ベクターのみの遺伝子導入株を ES-2/mock, タンデム・リピート 22 回と 42 回を導入した株をそれぞれ ES-2/T-22, ES-2/T-42 と名付けた。

#### 6. 細胞増殖アッセイ (*in vitro*)

各  $5 \times 10^3$  個の ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 を 96-well 培養プレート (住友ベークライト, 東京) に培養し、24 時間後、48 時間後、72 時間後に WST-1

試薬 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) にて反応させた後、Microplate Reader Model 550 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて測定波長 450 nm (参照波長 655 nm) の吸光度を測定した。

#### 7. 細胞増殖アッセイ (*in vivo*)

ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 (各  $1 \times 10^6$  個/100  $\mu$ l PBS) を KSN スードマウス (KSN/nu, 5 週齢) (日本 SLC, 浜松) に皮下移植し、造腫瘍能を検討した。腫瘍容積は  $(1/2) \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$  にて算出した。なお、マウスはすべて specific pathogen free にて飼育した。マウスを用いた実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行った。

#### 8. 腹膜播種モデル (*in vitro*)

患者の同意を得て術中大網の一部を採取し、腹膜中皮細胞の調製に用いた。文献にしたがい<sup>44,45)</sup>、ヒト大網組織を 0.25% トリプシン/0.02% EDTA を含む PBS にて 37°C, 20 分間反応させ、80  $\mu$ m 孔径のメッシュを通してから D/F+20% FCS 培地を加えトリプシンを不活化し、1000 rpm, 5 分の遠心後、細胞に再度 D/F+20% FCS 培地を添加して細胞培養ボトルに移し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下にて培養した。なお継代は 5 回までにとどめた。大網組織から細胞を調製した直後のみ、抗生物質として 50  $\mu$ g/ml ampicillin sodium (Sigma Chemical Co.), 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate (Sigma Chemical Co.), 1  $\mu$ g/ml amphotericin B (Sigma Chemical Co.) を培地に加えた。

ES-2/mock, ES-2/T-22, ES-2/T-42 の各細胞の蛍光標識には  $5 \times 10^5$  個/1 ml FCS 無添加の D/F 培地に対して BCECF-AM DMSO solution (同仁化学, 熊本) を 3  $\mu$ l 添加して、37°C, 30 分間反応させた。標識された癌細胞は 1 回の洗浄をへて、再度 FCS 無添加の D/F 培地に混じた。24-well 培養プレートに単層培養された腹膜中皮細胞に対し、標識癌細胞を  $5 \times 10^5$  個/1 ml FCS 無添加の D/F 培地/well の条件で添加した。プレートは 37°C, 80 rpm で 30 分間振盪しながら培養した (Multi Shaker MS-1, 島津製作所, 東京)。培養後、すべての well を FCS 無添加の D/F 培地で満たし、Plate Seal MS-30010 (住友ベークライト, 東京) にて密閉し、プレートを逆さまにした状態で 250 rpm, 5 分間遠心し、非接着細胞を除去した。接着した癌細胞は蛍光顕微鏡 200 倍率の視野にてカウントした。なお、1 well につき視野は無作為に 10 箇所を選び、各々の接着細胞数の平均値を 1 データとした。有意差検定には

第2表 ムチン遺伝子の RT-PCR 解析に使用したプライマー対

ムチン遺伝子	塩基配列 (5'→3') 上段が sense, 下段が antisense	PCR 産物 (bp)	文 献
MUC1	CGT CGT GGA CAT TGA TGG TAC C GGT ACC TCC TCT CAC CTC CTC CAA	288	(9) (10)
MUC2	CAA GCA CAG CAC CGA TTG CTG AGT T CAC CTG GTG CGT AGT AGG TGT CGT T	441	(27)
MUC3	CTC TTC CTG GCG TCT CTA CC TCT GGC ATC TGG TCT GGA GC	317	(28)
MUC5AC	TAC AAC AAC ATC ATC ACG AGT GCG CTA GGG TGC TAG GAG CTG TCA CAG	275	(29)
MUC5B	CAT CGG CCC CCA TAA CCA CG AGG CTG CAT TCC ACG ACC TG	238	(30)
MUC6	TCA CTC CCT CAG ACC ACT CCT C GGG TGC TGG TGT CTC TAC TGG	360	(31)
β-actin	CAC TGT GTT GGC GTA CAG GT TCA TCA CCA TTG GCA ATG AG	154	(32)

(Tamada Y et al : Oncol Res 11 : 233-241, 1999 の Table 3. を一部改変, 許可を得て転載)

第3表 フローサイトメーター解析に使用した抗体およびレクチン

抗体	レクチン	特異性	アイソタイプ
MA61		Tn	IgM(κ)
MA54		sialyl Tn	IgM(κ)
TKH-2		sialyl Tn	IgG1
CA19-9		sialyl Lewis <sup>x</sup>	IgG1
91.9H		sulfo Lewis <sup>x</sup>	IgG1
anti-Lewis b		Lewis <sup>b</sup>	IgM
FH6		sialyl Lewis <sup>x</sup> (dimeric)	IgM
KM93		sialyl Lewis <sup>x</sup>	IgM
HMFG-2		underglycosylated MUC1	IgG1
MY.1E12		sialylated MUC1	IgG2a
M11		CA125	IgG1
CD44/human		CD44	IgG1
Integrin β1 chain/human		β1-integrin	IgG1
anti-Heparan sulfate		Heparan sulfate (10E4 epitope)	IgM(κ)
anti E-selectin		E-selectin	IgM
MAL		sialic acidα 2-3Gal	
SSA		sialic acidα 2-6Gal/GalNAc	

MAL, *Maackia Amurensis* leucoagglutinin; SSA, *Sambucus Sieboldiana* agglutinin; Gal, Galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine (Tamada Y et al : Oncol Res 11 : 233-241, 1999 の Table 4. を一部改変, 許可を得て転載)

2 はコスモ・バイオ株式会社 (東京) より, M11 は株式会社ティエフビー (東京) より購入した. 抗ヒト CD44 抗体 (clone : OS/37), 抗ヒト β1-integrin 抗体 (clone : SG/19), 抗 heparan sulfate 抗体 (clone : F58-10E4), ビオチン化 MAL (*Maackia Amurensis* leucoagglutinin), ビオチン化 SSA (*Sambucus*

*Sieboldiana* agglutinin) は生化学工業株式会社 (東京) より購入した. 抗ヒト E-selectin 抗体<sup>44)</sup>は玉谷卓也博士 (日本たばこ, 東京)より供与を受けた. モノクローナル抗体に対する 2次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス抗体 (CAPPEL, West Chester, PA, USA) を使用し, ビオチン化レクチンを蛍光標識するために FITC-

実験材料と方法

1. 卵巣癌由来細胞株

実験材料とした17種類のヒト卵巣癌由来細胞株の一覧を第1表に示す<sup>13-26</sup>。培地はD/F (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential mediumとHam's F-12を1:1 (v/v)混合)に10% FCS (fetal calf serum, Intergen Co., Purchase, NY, USA)を加えたものを使用した。ただし, HTOAとHUOAは20% FCSを用いた。

2. 各種ムチン分子mRNAの発現解析

各培養細胞がサブコンフルエントの状態になったところで, total RNAをUltraspec RNA kit (Biotech Lab. Inc., Houston, TX, USA)を用いて抽出した。DNAの混入を避けるためDNase I, RNase-free (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を100 U/mlの濃度で37°C, 30分処理した。Total RNA 1µgをM-MLV RTase 5 unit, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, 20 mM dithiothreitol (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0.5 mM dNTPs (Pharmacia Biotech, North Peapack, NJ, USA), 0.05 U/µl RNase inhibitor (宝酒造, 滋賀), 1 mg/ml pdT 12-18 primer (Pharmacia Biotech)を用いて, 最終容量 20 µlで37°C, 90分間, 逆転写反応を行い, 得られたcDNAの5%を鋳型としてPCR反応に供した。

PCRには0.1 U/µl Taq polymerase (Perkin-Elmer Co., Emeryville, CA, USA), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 0.2 mM dNTPs, 各種プライマー 0.25~0.5 µMを使用し, 35サイクル反応させた (RT-PCR)。各ムチン遺伝子に対するプライマーの一覧を第2表に示す<sup>9, 10, 27-32</sup>。なお, MUC3に対するプライマーはGENETYX Mac softwareを用いて設計した。熱変性を94°C, 45秒, アニーリングを60°C, 45秒, 伸長反応を72°C, 2分でPCRを行った。ただし, MUC5ACとMUC5Bに対してはアニーリングを64°Cに設定した。PCR産物は1.5% agarose gelにて電気泳動し, 分子量マーカーには100 base pair (bp) ladder (GIBCO BRL)を使用した。

3. 使用した抗体ならびにレクチン

細胞表面糖鎖の解析に使用したモノクローナル抗体およびレクチンの一覧を第3表に示す。MA61とMA54<sup>33</sup>は持田製薬株式会社 (東京)より, TKH-2<sup>34</sup>は大塚製薬株式会社 (徳島)より, 抗ルイスb (Le<sup>b</sup>)抗体<sup>35</sup>は旧ミドリ十字社 (大阪)より, KM93<sup>36</sup>は協和発酵工業株式会社 (東京)より提供を受けた。CA19-9<sup>37</sup>とFH6<sup>38</sup>はATCC (American type culture collection, Rockville, MD, USA)よりハイブリドーマ細胞を購入しその培養上清を用いた。91.9H<sup>39</sup>とMY.1E12<sup>40</sup>は東京大学大学院薬学系研究科生体異物学教室にて樹立されたハイブリドーマの培養上清を使用した。HMFG-

第1表 使用したヒト卵巣癌由来細胞株

細胞株	由来する組織型	樹立者	文献
RMG-I	明細胞腺癌	慶應義塾大学産婦人科	(13)
RMG-II	明細胞腺癌	慶應義塾大学産婦人科	(14)
KK	明細胞腺癌	防衛医科大学校産婦人科	(15)
HUOCA-II	明細胞腺癌	石渡産婦人科病院	(16)
ES-2	明細胞腺癌	ATCCより購入	(17)
RMUG-S	粘液性腺癌	慶應義塾大学産婦人科	(18)
RMUG-L	粘液性腺癌	慶應義塾大学産婦人科	(18)
MCAS	粘液性腺癌	JCRBより購入	(19)
HMKOA	粘液性腺癌	石渡産婦人科病院	(20)
OMC-3	粘液性腺癌	大阪医科大学産婦人科	(21)
OV1063	粘液性腺癌	ATCCより購入	(22)
RTSG	漿液性腺癌	慶應義塾大学産婦人科	(23)
KF	漿液性腺癌	防衛医科大学校産婦人科	(24)
KFr	漿液性腺癌	防衛医科大学校産婦人科	(24)
MH	漿液性腺癌	防衛医科大学校産婦人科	(15)
HTOA	漿液性腺癌	石渡産婦人科病院	(25)
HUOA	漿液性腺癌	石渡産婦人科病院	(26)

(Tamada Y et al : Oncol Res 11 : 233-241, 1999 の Table 2. を一部改変, 許可を得て転載)

学位論文

卵巣癌腹膜播種形成における MUC1 ムチン分子の役割

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

たま だ ゆたか  
玉 田 裕

(平成 15 年 1 月 8 日受付)

Key words : ovarian neoplasms, mucin core peptide (MUC), carbohydrate, peritoneal dissemination, MUC1

上皮性卵巣癌は骨盤内のみならず上腹部を含む広範な領域に腹膜播種による癌性腹膜炎を形成する頻度が高いため致死性の高い癌である<sup>1)</sup>。腫瘍細胞は腹腔や大網、腸管漿膜を覆う中皮細胞に接着し腫瘍結節を形成することによって、最終的には腸閉塞などをひきおこし患者を死に至らしめる。これらの腹膜播種巣を手術によって完全に除去することは不可能であり、さらに術後補助化学療法あるいは寛解導入化学療法を行ったとしても治療抵抗性の再発をきたすために進行卵巣癌の治療は困難である<sup>1,2)</sup>。また、卵巣癌はその解剖学的位置関係により早期診断が難しく、明らかな初期症状もないため他の婦人科癌より予後が悪いことに加えて、卵巣癌には様々な組織型が存在し、組織型ごとに異なる臨床的特性を有すると考えられるため画一的な治療法では予後の改善は望めない。漿液性腺癌では国際進行期分類 (the International Federation of Gynecology and Obstetrics ; FIGO, 1988) における III 期症例の割合が高く、一方粘液性腺癌や明細胞腺癌では I 期症例の割合が高い<sup>3,4)</sup>。しかしながら、漿液性腺癌ではシスプラチンを中心とした化学療法に感受性が高いものの、明細胞腺癌では抗癌剤に対する感受性が著しく低いため全体としては I 期症例が多いにもかかわらず明細胞腺癌の予後は不良である<sup>5)</sup>。このように各々の組織型ごとの病態を解析することが卵巣癌克服につながると考えられる<sup>6)</sup>。

一方、癌関連抗原の 1 つであるムチン分子は、シアリルルイス X (sLe<sup>x</sup>) やシアリルルイス a (sLe<sup>a</sup>) といった臨床腫瘍マーカーとして用いられているさまざまな糖鎖抗原が付着する糖鎖供与体としての能力をもっている。現在まで 10 数種類のムチン遺伝子がクローニング

されており、O-結合型糖鎖付着部位であるセリン、スレオニンを多数含むタンDEM・リピート (アミノ酸の繰り返し配列) を有することが構造的特徴である<sup>7)</sup>。なかでも最初にクローニングされた MUC1 分子についてはその全長配列が明らかにされており、構造的、機能的解析が進んでいる。MUC1 分子は膜貫通部位を有する糖タンパク質であり、20 個のアミノ酸から構成されるタンDEM・リピートを有している<sup>8-10)</sup>。その反復数には 30 回から 90 回の範囲で遺伝的多型性が認められており<sup>11)</sup>、acne vulgaris ではその多型性と病態との関連性が指摘されている<sup>12)</sup>。本研究ではまず、3 つの組織型 (明細胞腺癌、粘液性腺癌、漿液性腺癌) に由来する 17 種類の細胞株を用いて、ムチン遺伝子の発現ならびに糖鎖抗原の発現を解析し、組織型ごとに異なる発現パターンが見いだせるかどうかを検討した。その結果、本邦において増加傾向がうかがわれる卵巣明細胞腺癌に由来する細胞株では MUC1 分子のみの発現が認められ、他の組織型由来の培養細胞では MUC1 以外のムチン分子の発現が種々の程度で見られたことから、明細胞腺癌細胞における MUC1 分子の発現は本組織型に特徴的なパターンと考えられた<sup>3)</sup>。これまで MUC1 分子の発現と癌の予後との関わりについて多くの報告があるものの、MUC1 分子が癌の病態に果たす役割やその生物学的意義についての知見はほとんど報告されていない。そこで本研究では卵巣癌の病態、特に临床上重要視される腹膜播種に果たす MUC1 分子発現の意義についても検討を行った。

本論文は、Tamada Y, Iida S, Aoki D, Nozawa S, and Irimura T : Carbohydrate epitopes and mucins expressed by 17 human ovarian carcinoma cell lines. *Oncol Res* 11 : 233-241, 1999 の一部を含む。

- rat. *J Physiol* 354 : 173-183, 1984
- 2) Harada Y, Kuno M, Wang Y Z : Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat *in vitro*. *J Physiol* 368 : 679-693, 1985
  - 3) Kawai A, Ballantyne D, Muckenhoff K, Scheid P : Chemosensitive medullary neurones in the brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol* 492 : 277-292, 1996
  - 4) Okada Y, Muckenhoff K, Scheid P : Hypercapnia and medullary neurons in the isolated brain stem-spinal cord of the rat. *Respir Physiol* 93 : 327-336, 1993
  - 5) Oyamada Y, Ballantyne D, Muckenhoff K, Scheid P : Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the *in vitro* brainstem-spinal cord of neonatal rat. *J Physiol* 513 : 381-398, 1998
  - 6) Oyamada Y, Andrzejewski M, Muckenhoff K, Scheid P, Ballantyne D : Locus coeruleus neurones *in vitro* : pH-sensitive oscillation of membrane potential in an electrically coupled network. *Respir Physiol* 118 : 131-147, 1999
  - 7) Voipio J, Ballanyi K : Interstitial Pco<sub>2</sub> and pH, and their role as chemostimulants in the isolated respiratory network of neonatal rats. *J Physiol* 499 : 527-542, 1997
  - 8) St-John W M : Medullary regions for neurogenesis of gasping : noeud vital or noeuds vitaux? *J Appl Physiol* 81 : 1865-1877, 1996
  - 9) St-John W M : Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. *Prog Neurobiol* 56 : 97-117, 1998
  - 10) Hilaire G, Monteau R, Errchidi S : Possible modulation of the medullary respiratory rhythm generator by the noradrenergic A5 area : an *in vitro* study in the newborn rat. *Brain Res* 485 : 325-332, 1989
  - 11) Errchidi S, Hilaire G, Monteau R : Permanent release of noradrenaline modulates respiratory frequency in the newborn rat : an *in vitro* study. *J Physiol* 429 : 497-510, 1990
  - 12) Errchidi S, Monteau R, Hilaire G : Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat : an *in vitro* study. *J Physiol* 443 : 477-498, 1991
  - 13) Smith J C, Ellenberger H H, Ballanyi K, Richter D W, Feldman J L : Pre-Botzinger complex : a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254 : 726-729, 1991
  - 14) Footes S L, Bloom F E, Aston-Jones G : Nucleus locus coeruleus : New evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63 : 844-914, 1983
  - 15) Haxiu M A, Yung K, Erokwu B, Cherniack N S : CO<sub>2</sub>-induced *c-fos* expression in the CNS catecholaminergic neurons. *Respir Physiol* 105 : 35-45, 1996
  - 16) Tominaga T, Tominaga Y, Yamada H, Matsumoto G, Ichikawa M : Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods* 102 : 11-23, 2000
  - 17) Okada Y, Chen Z, Yoshida H, Kuwana S, Jiang W, Maruiwa H : Optical recording of the neuronal activity in the brainstem-spinal cord. *Adv Exp Med Biol* 499 : 113-118, 2001
  - 18) Bezin L, Marcel D, Debure L I, Ginovart N, Rousset C, Pujol J-F, Weissmann D : Postnatal development of the tyrosine hydroxylase-containing cell population within the rat locus coeruleus : topological organization and phenotypic plasticity. *J Neurosci* 14 : 7486-7501, 1994
  - 19) Monji A, Morimoto N, Okuyama I, Umeno K, Nagatsu I, Iyata Y, Tashiro N : The number of noradrenergic and adrenergic neurons in the brain stem does not change with age in male Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 641 : 171-175, 1994
  - 20) Paxinos G, Watson C : The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1982
  - 21) Sheng M, Greenberg M E : The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4 : 477-485, 1990
  - 22) Ito Y, Oyamada Y, Yamaguchi K : Age-dependent chemosensitive pontine inhibition of medullary respiratory rhythm generation in the isolated brainstem of neonatal rat. *Brain Res* 887 : 418-420, 2000
  - 23) Hakuno H, Oyamada Y, Ito Y, Yamaguchi K : Significance of locus coeruleus in regulation of respiratory activity in the isolated brainstem of neonatal rat. *Am J Respir Crit Care Med* 163 : A309, 2001
  - 24) Coates E L, Li A, Nattie E E : Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75 : 5-14, 1993
  - 25) Madden C J, Ito S, Rinaman L, Wiley R G, Sved A F : Lesions of the C1 catecholaminergic neurons of ventrolateral medulla in rats using anti-DβH-saporin. *Am J Physiol* 277 : R1063-R1075, 1999
  - 26) Ito Y, Oyamada Y, Hakuno H, Yamaguchi K : Morphological analysis of developmental changes in pontine noradrenergic neuronal groups in the neonatal rat. *Brain Res* 925 : 107-109, 2002
  - 27) Obonai T, Yasuhara M, Nakamura T, Takashima S : Catecholamine neurons alteration in the brainstem of sudden infant death syndrome victims. *Pediatrics* 101 : 285-288, 1998
  - 28) Coote J H : Noradrenergic projections to the spinal cord and their role in cardiovascular control. *J Auton Nerv Syst* 14 : 255-262, 1985
  - 29) Howe P R C : Blood pressure control by neurotransmitters in the medulla oblongata and spinal cord. *J Auton Nerv Syst* 12 : 95-115, 1985
  - 30) Kasparov S, Paton J F R : Changes in baroreceptor vagal reflex performance in the developing rat. *Pflugers Arch* 434 : 438-444, 1997

求められた A5 ニューロン数は 70~110 個であり Madden らの報告と一致した。

第 5 図に示したように、LC の体積は各日齢間で有意な差を示さなかった。一方、A5 ニューロン数は 1~2 日齢に比較し 3~4 日齢と 10 日齢で有意に減少していた。個体差を補正するために用いた A5/LC 比も同様に減少していた。以上の結果は延髄呼吸中枢に対する橋の抑制作用および高炭酸ガス性アシドーシスによるその抑制作用の増強効果が 3~4 日齢で減弱することに A5 領域からの抑制性出力の減弱が関与していることを示唆し、LC と A5 領域の機能的バランスが日齢によって変化するという前述の仮説を間接的に支持するものである (第 6 図)<sup>29)</sup>。今回の検討では LC の体積に日齢依存性変化を認めず、日齢に伴う LC の興奮性作用の増強を示唆する所見は得られなかった。LC の興奮性作用の日齢変化については更なる検討を要する。

#### 4. 臨床的意義

乳児突然死症候群 (sudden infant death syndrome: 以下 SIDS と略す) は 1 歳以下の乳児の突然死で、病理解剖、死亡状況の調査や病歴の再検討を行っても死因の特定ができないものと定義される。SIDS の発症機序は不明であるが、睡眠中の呼吸調節異常が SIDS の原因である可能性が指摘されている。Obonai らは脳幹のカテコラミン作動性神経群の異常が睡眠時呼吸障害を引き起こす可能性を報告している<sup>27)</sup>。本研究で示唆されたような A5 領域と LC というふたつのノルアドレナリン作動性神経群間の機能的バランスが生後早期に変化 (すなわち、より興奮性作用が強くなるように変化) するならば、その不完全な変化と SIDS の発症を結び付けて考えることが可能かもしれない。

呼吸調節とは直接関係はないが、交感神経活動の維持およびさまざまな血管運動反射の調整に不可欠な thoracolumbar intermediolateral cell column (以下 IMLC と略す) に A5 ニューロンは軸索を投射していることが知られている<sup>28,29)</sup>。A5 ニューロンは IMLC にある交感神経節前神経群の  $\alpha_2$ -アドレナリン受容体を活性化することによって交感神経機能を抑制する<sup>28,29)</sup>。ラットを含む多くの哺乳類では生後日齢が進むにつれて平均血圧と心拍数が増加することが知られている<sup>30)</sup>。したがって、日齢による A5 ニューロン数の減少は呼吸調節と同様に平均血圧と心拍数の発達段階における変化を説明し得る機序のひとつである可能性がある。

## 総 括

1. 膜電位感受性色素を用いた光学的測定法で、橋スライス標本における LC と A5 領域の高炭酸ガス性アシドーシスに対する反応を観察し、両者において脱分極性応答を確認した。このことは、膜電位感受性色素を用いた光学的測定法が化学感受性領域の同定に有用な方法であることを示している。

2. 神経活動の細胞外記録法によっても高炭酸ガス性アシドーシスに対する A5 領域の興奮性応答を確認した。このことは光学的測定法で得られた結果とあわせて、同領域が化学感受性を有することを示唆している。

3. 橋背側に注意を払って作成した新生ラット摘出脳幹-脊髄標本において橋の切断は呼吸性神経活動の発火頻度を増加させた。すなわち、橋は延髄呼吸中枢に対して抑制作用を及ぼしていることを確認した。

4. 延髄呼吸中枢に対する橋の抑制作用は 1~2 日齢では高炭酸ガス性アシドーシスによって増強するが、3~4 日齢ではその増強効果が消失した。また、抑制作用自体も 3~4 日齢で減弱した。このことは延髄呼吸中枢に対する橋の抑制作用が日齢および細胞外 pH/Pco<sub>2</sub> に依存していることを示している。

5. Tyrosine hydroxylase に対する抗体を用いた免疫組織化学的手法を利用して、新生ラットの A5 領域と LC の日齢に伴う形態学的変化を検討した。その結果、生後 10 日までに A5 ニューロン数は有意に減少することが明らかとなった。一方、LC 体積には日齢依存性変化を認めなかった。

6. 新生ラット摘出脳幹-脊髄標本において延髄呼吸中枢に対する橋の抑制作用および高炭酸ガス性アシドーシスによるその抑制作用の増強効果の経時的変化は A5 領域と LC 間の機能的バランスの変化に基づくものと推察された。

本稿を終えるにあたり、御校閲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、御指導、御校閲を賜りました山口佳寿博助教授に深甚なる謝意を表します。本研究に際し、直接御指導頂きました慶應義塾大学医学部内科学教室小山田吉孝先生、慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンター内科岡田泰昌講師に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Suzue T: Respiratory rhythm generation in the *in vitro* brain stem-spinal cord preparation of neonatal



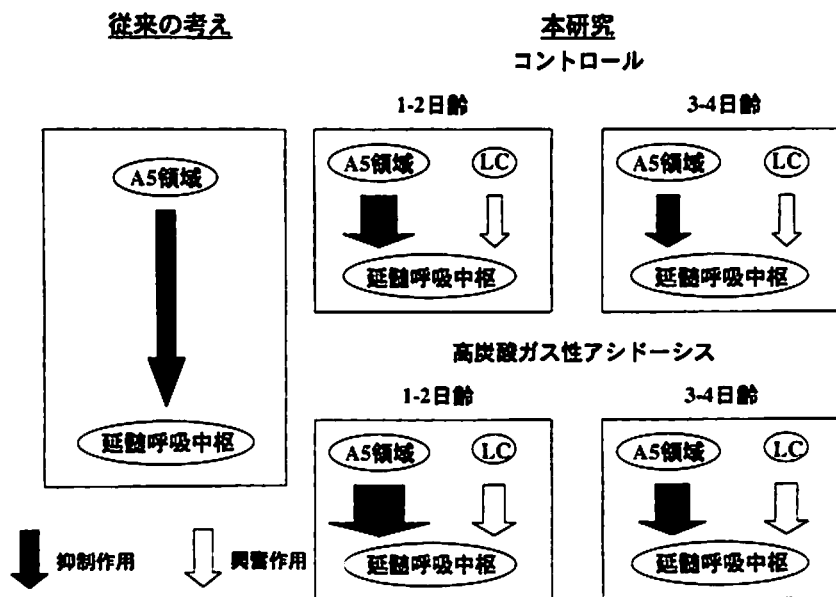
剥離し第4脳室底を露出した。このような注意を払った本研究においても、全ての群で橋の切断はRRを増加させた。したがって、新生ラット摘出脳幹-脊髄標本において延髄呼吸中枢に及ぼす橋の影響は抑制的であることが確認できた。

本研究では、橋切断前後のRRの差である $\Delta RR$ を橋の延髄呼吸中枢への影響を示す指標として用いた。 $\Delta RR$ に関して以下の3点が明らかになった。① Early群の $\Delta RR$ はコントロールより高炭酸ガス性アシドーシスで有意に大きい。②この傾向はLate群では認められない。③ Early群 $\Delta RR$ はコントロールでも高炭酸ガス性アシドーシスでもLate群に比し有意に大きい。以上の結果より延髄呼吸中枢に対する橋の抑制作用は日齢がたつにつれて減弱するものと結論した<sup>22)</sup>。Early群で認められた高炭酸ガス性アシドーシスによる橋の抑制作用の増強はA5ニューロンの神経群の高炭酸ガス性アシドーシスに起因する活性化により説明可能である。一方、Late群においては高炭酸ガス性アシドーシスによる橋の抑制作用の増強を認めなかった。このように、Early群とLate群の間で異なった現象がみられた原因のひとつとしてLCが重要な役割を果たしているものと考えた。新生ラット摘出脳幹-脊髄標本において、テトロドトキ

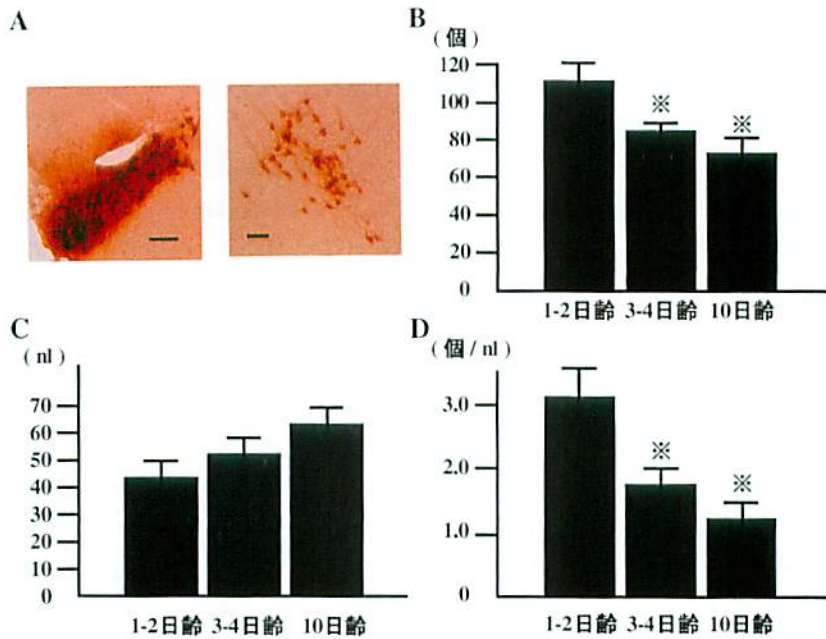
シンの微量注入による両側LCの不活性化は呼吸頻度を減少させる<sup>23)</sup>。また、アセタゾラミドの微量注入によるLCの局所酸性化はラットおよびネコの一呼吸量を増加させることが報告されている<sup>24)</sup>。これらの結果はLCが延髄呼吸中枢に対して興奮性に作用することを示唆する。以上よりLate群で橋の抑制作用が減弱していること、および同群で高炭酸ガス性アシドーシスによる抑制作用の増強を認めないことを説明するものとして以下の仮説を考えた。すなわち、A5領域からの抑制作用は1~4日齢を通じてLCからの興奮作用を上回るものの、これらA5領域からの抑制作用とLCからの興奮作用の相対的な関係が3~4日齢では1~2日齢に比してLCよりになるものと推察された<sup>22)</sup>。

### 3. A5領域とLCの日齢による形態学的変化

BezinらはSprague-Dawleyラットの片側のLCの平均体積が、4日齢と10日齢で各々61.1 nl, 74.3 nlであることを報告した<sup>18)</sup>。これらの値は本研究で測定されたほぼ同日齢のラットLCの体積と近似している(3~4日齢で51.8 nl, 10日齢で62.7 nl)。Maddenらは成熟した雄のSprague-Dawleyラットの片側A5ニューロン数が100個であったと報告している<sup>25)</sup>。本研究で



第6図 延髄呼吸中枢に与える橋の影響の仮説模式図。黒矢印は抑制作用、白抜き矢印は興奮作用を表す。左側には従来の考え方を示す。右側は本研究の結果をふまえたモデル。A5領域からの抑制作用は高炭酸ガス性アシドーシスによって増強する。ただしこの抑制作用は日齢にもなって減弱する。青斑核は呼吸中枢に対して興奮性作用をおよぼす。この興奮性作用は高炭酸ガス性アシドーシスによって増強する。延髄呼吸中枢に与える橋の影響はこのふたつの領域の総和として表される。



第5図 A: 抗 tyrosine hydroxylase 抗体を用いて染色された LC (左) と A5 領域 (右). 横線は 100 μm を表す. B: 片側の A5 ニューロン数の日齢による変化. 片側の A5 ニューロンの数は 1~2 日齢で 3~4 日齢および 10 日齢と比較して有意に多かった. ※ $p < 0.05$  で, 1~2 日齢との比較. C: 片側の LC の体積の日齢による変化. 片側の LC の体積は日齢によるグループ間で有意差は認められなかった. D: A5/LC 比の日齢による変化. A5/LC 比は 1~2 日齢で 3~4 日齢や 10 日齢よりも有意に大きかった. ※ $p < 0.05$  で, 1~2 日齢との比較. (Y. Ito et al: Brain Res. 925: 107-109, 2002 および 934: 167, 2002 の Fig. 1 を, 許可を得て転載. 一部改変)

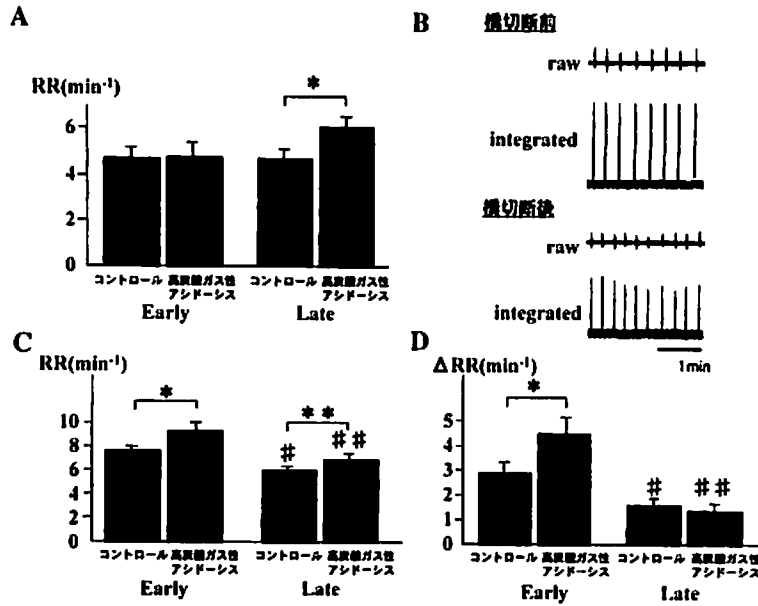
討によって明らかにされている<sup>5,6)</sup>. 本研究では膜電位感受性色素を用いた光学的測定法によって LC の高炭酸ガス性アシドーシスに対する脱分極性応答を検出することに成功した. このことは光学的測定法が化学感受性領域の同定に有用な方法であることを示すものである.

Haxiu らは高炭酸ガス状態に曝露されたラットの A5 領域で Fos 蛋白が発現していることを明らかにした<sup>15)</sup>. Fos 蛋白は膜電位依存性チャネルの活性化による細胞内へのカルシウムイオン流入を主たる原因として *c-fos* 遺伝子の転写が促進されることで発現する蛋白である<sup>21)</sup>. Haxiu らの実験は A5 領域が高炭酸ガス状態に対して興奮性に応答する可能性を示唆している. しかしながら, 彼らの実験は化学シナプス伝達が保たれた状態での検討であること, Fos 蛋白の発現はあくまでも間接的な指標であるといった問題点がある. 本研究ではスライス標本を用いてシナプス伝達を極端に減少させ, 膜電位感受性色素を適用した光学的測定法および神経活動の細胞外記録法を利用することで, より直接的に A5 領域の化学感受性を検討した. これらの方法により, 高炭酸ガス性アシドーシスに対する A5 領域の脱分極性 (興奮性) 応答を検出することができ A5 領域に化学感受性が存在する

ことを説明しえた.

## 2. 延髄呼吸中枢に与える橋の影響

新生ラット摘出脳幹-脊髄標本において, 橋は延髄呼吸中枢に対して抑制的に作用すると考えられてきた<sup>10-12)</sup>. これは橋-延髄接合部での橋の切断が頸髄神経根や脳神経根より記録された呼吸性神経活動の発火頻度を増加させたことに基づいている<sup>10-12)</sup>. Hilaire らは橋の腹外側にある A5 領域の電気刺激あるいは傷害実験の結果から延髄呼吸中枢に対する橋の抑制作用が A5 領域からのノルアドレナリン作動性出力に由来することを明らかにした<sup>10)</sup>. 一方, Oyamada らは, LC ニューロンの膜電位および発火様式が呼吸活動に同期していること, および高炭酸ガス性アシドーシスに対して興奮性応答を示すことを明らかにした<sup>5,6)</sup>. このことは呼吸調節において橋背側が重要な役割を果たしている可能性を示唆している. 呼吸調節における橋背側の重要性は, 以前の研究では考慮されていなかった<sup>10-12)</sup>. 本研究では橋背側にも十分な注意を払って標本を作成し, 特に小脳脚に近接して存在する LC を傷つけないように工夫した. また橋背側が十分に灌流されるように第 4 脳室内のクモ膜脈絡組織を



第4図 A: 橋切断前の呼吸神経活動発火頻度 (RR). \* $p < 0.05$ . B: 橋切断による呼吸性神経活動の変化. 左第1頸髄神経前根から記録された呼吸性神経活動 (raw) と整流積算化された信号 (integrated) (第4日齢. 高炭酸ガス性アシドーシス). 橋切断後で発火頻度が増加している. C: 橋切断後の RR. \* $p < 0.01$ . \*\* $p < 0.05$ . \* $p < 0.05$  で early 群コントロールとの比較. \*\* $p < 0.001$  で early 群高炭酸ガス性アシドーシスとの比較. D: 橋切断前後における RR の差 ( $\Delta RR$ ). \* $p < 0.05$ . \* $p < 0.05$  で early 群コントロールとの比較. \*\* $p < 0.0001$  で early 群高炭酸ガス性アシドーシスとの比較. (Y.Ito et al: Brain Res. 887: 418-420, 2000 の Fig. 1 を, 許可を得て転載. 一部改変)

RR は高炭酸ガス性アシドーシスでコントロールに比して有意に増加していた. しかし, Early 群ではコントロールと高炭酸ガス性アシドーシスで RR に有意差を認めなかった. 高炭酸ガス性アシドーシスにおける RR は Early 群に比べ Late 群で高い傾向にあったが有意差を認めなかった ( $p = 0.060$ ).

2) 橋切断後標本における RR (第4図 B, C)

橋の切断により, 4群全てで RR の有意な増加がみられた (Early 群コントロール: 橋切断前  $4.7 \pm 0.5 \text{ min}^{-1}$  から橋切断後  $7.6 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$ , Early 群高炭酸ガス性アシドーシス: 橋切断前  $4.8 \pm 0.6 \text{ min}^{-1}$  から橋切断後  $9.3 \pm 0.7 \text{ min}^{-1}$ , Late 群コントロール: 橋切断前  $4.7 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$  から橋切断後  $6.2 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ , Late 群高炭酸ガス性アシドーシス: 橋切断前  $6.0 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$  から橋切断後  $7.2 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ ). 橋切断後の RR は Early 群, Late 群のどちらにおいてもコントロールに比し高炭酸ガス性アシドーシスで有意に増加していた. また, RR はどちらの灌流条件においても Late 群に比し Early 群で有意に高値であった.

3) 橋切断前後における RR の差 ( $\Delta RR$ ) (第4図 D)

Early 群での  $\Delta RR$  は高炭酸ガス性アシドーシスでコントロールより有意に増加していた. しかし Late 群で

は灌流条件間で有意差を認めなかった. また, どちらの灌流条件においても Early 群の  $\Delta RR$  は Late 群より有意に高値であった.

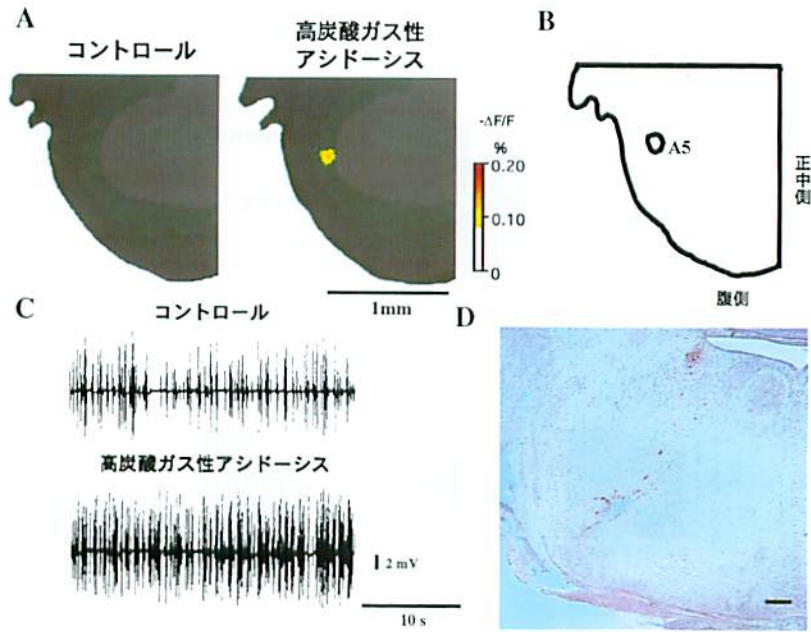
3. A5 領域と LC の日齢による形態学的変化

抗 tyrosine hydroxylase 抗体で染色された LC および A5 領域を第5図 A に示す. 片側の A5 ニューロン数は 1~2 日齢で  $110 \pm 10$  個と, 3~4 日齢の  $83 \pm 7$  個, 10 日齢の  $72 \pm 9$  個に比較し有意に多かった (第5図 B). 一方, LC の体積については日齢によるグループ間で有意差を認めなかった (1~2 日齢で  $43.1 \pm 7.0 \text{ nl}$ , 3~4 日齢で  $51.8 \pm 5.7 \text{ nl}$ , 10 日齢で  $62.7 \pm 6.9 \text{ nl}$   $p = 0.147$ ) (第5図 C). 個体差を補正する指標として定義した A5/LC 比は 1~2 日齢で  $3.2 \pm 0.5 \text{ 個/nl}$  と, 3~4 日齢の  $1.8 \pm 0.3 \text{ 個/nl}$ , 10 日齢の  $1.2 \pm 0.2 \text{ 個/nl}$  に比較し有意に高値であった (第5図 D).

考 察

1. A5 領域の化学感受性

LC ニューロンが高炭酸ガス性アシドーシスに対して脱分極性応答を示すことはパッチクランプ法を用いた検



第3図 A：光学的測定法によるA5領域の脱分極性応答の検出。スケールバーは $-\Delta F/F$ を表し脱分極の程度を示す。赤味を帯びるにつれて強い脱分極性応答であることを表している。高炭酸ガス性アシドーシスによりA5領域は脱分極性応答を示している。高炭酸ガス性アシドーシスは人工脳脊髄液pH変化後46秒経過した時点での画像。B：Aの略図。A5；A5領域。C：A5領域の細胞外記録。二相性で3~15 mVの多ユニット細胞外シグナルが認められ、高炭酸ガス性アシドーシスによって発火頻度が増加した。D：細胞外記録に用いたスライス標本の抗 tyrosine hydroxylase 抗体を用いた免疫染色像。A5領域（A5）が焼灼されている。横線は200  $\mu\text{m}$ を表す。LC；青斑核。4V；第4脳室。

以下の方法で総体積を算出した。NIHimageを用いて各切片におけるLCの面積を測定し、切片の厚さを掛けてそれぞれの切片におけるLCの体積を算出した。各切片におけるLCの体積の総和をLCの総体積とした。また、個体差を標準化するために随意的な指標としてA5/LC比（A5ニューロンの数/LCの体積）を用いた。

#### 4. 統計

全ての値は平均値±標準誤差で表示した。対応のある群間での比較はpaired t-testを用いて行った。多群間の比較はone-way ANOVAで検定した後、Fisher法を用いて施行した。危険率5%未満( $p < 0.05$ )の場合を統計学的に有意差があるものと仮定した。

## 結 果

### 1. A5領域の化学感受性

#### 1) 光学的測定法を用いた検討

Positive controlとして用いたLCの脱分極性応答は全14標本のうち8標本で認められた(第2図)。これ

らの標本におけるLCの $-\Delta F/F$ の最大値は $0.25 \pm 0.04$ %であった。一方、8標本でA5領域の脱分極性応答が認められた(第3図A, B)。なお、このうち2標本はLCの脱分極性応答を検出した標本と同一標本である。これらの標本におけるA5領域の $-\Delta F/F$ の最大値は $0.21 \pm 0.05$ %であり、LCと比較して有意差を認めなかった( $P = 0.529$ )。

#### 2) 細胞外記録法を用いた検討

すべての標本のA5領域において、二相性で振幅3~15 mVの複数のニューロンに由来する電気的活動が記録された(第3図C)。これらの神経活動の発火頻度は高炭酸ガス性アシドーシスによって著明に増加した(第3図C)。

### 2. 呼吸性神経活動に与える橋の影響

#### 1) 橋切断前標本におけるRR(第4図A)

コントロールにおいてRRはEarly群で $4.7 \pm 0.5 \text{ min}^{-1}$ 、Late群で $4.7 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ であった。高炭酸ガス性アシドーシスではRRはEarly群で $4.8 \pm 0.6 \text{ min}^{-1}$ 、Late群で $6.0 \pm 0.4 \text{ min}^{-1}$ であった。Late群において

慶應医学 第80卷第2号号外  
平成 15 年 6 月 25 日

# 博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第168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

学位授与年月日号	氏名	生年月日
平成15年 3月10日 慶大博士甲第2143号	荒木 崇志	昭和45年 7月22日
同 同 第2144号	後藤 知英	昭和44年12月26日
同 同 第2145号	座間 猛	昭和44年 3月10日
同 同 第2149号	富田 謙吾	昭和43年 1月17日
同 同 第2151号	松岡 佐保子	昭和44年 3月 5日
平成15年 3月23日 慶大博士甲第2147号	須藤 遥	昭和47年 4月 4日
同 同 第2148号	高瀬 敦	昭和42年 5月22日
同 同 第2150号	服部 英典	昭和49年 4月24日
同 同 第2088号	越智 健介	昭和48年 3月17日
同 同 第2089号	小野江 正頼	昭和44年 5月 9日
同 同 第2091号	田中 謙二	昭和47年 5月28日
同 同 第2092号	林 俊吉	昭和46年 5月24日
同 同 第2146号	柴田 理恵	昭和45年 5月20日
同 同 第2152号	渡邊 知佳子	昭和48年 1月31日
平成15年 5月12日 慶大博士甲第2156号	玉田 裕	昭和43年 5月27日
同 同 第2157号	堤 浩二	昭和40年 9月30日
同 同 第2158号	松原 由美子	昭和38年 7月19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

学位授与年月日号 学位記	氏名	生年月日
平成15年 3月10日 慶大博士乙第3673号	高橋 焯由樹	昭和43年 7月10日
同 同 第3672号	宇都 宮 啓	昭和35年 9月28日
同 同 第3674号	高橋 正彦	昭和38年10月 2日
同 同 第3675号	奈良 井 慎	昭和41年11月17日
同 同 第3676号	堀田 富士子	昭和37年 9月19日
同 同 第3677号	山内 健義	昭和44年 5月11日
同 同 第3678号	山口 啓二	昭和42年 2月27日
同 同 第3679号	渡部 直行	昭和36年10月23日
平成15年 4月14日 慶大博士乙第3680号	伊藤 洋子	昭和44年 3月 2日
同 同 第3681号	内田 厚	昭和41年 1月13日
同 同 第3682号	岸川 浩	昭和43年 7月 2日
同 同 第3683号	北村 正幸	昭和35年 7月16日
同 同 第3684号	徳山 博文	昭和39年 8月10日
同 同 第3685号	永竿 智久	昭和40年 9月30日
同 同 第3686号	中塚 逸央	昭和38年 9月26日
平成15年 5月12日 慶大博士乙第3688号	阿部 智行	昭和42年11月23日
同 同 第3690号	石川 秀樹	昭和40年 4月11日
同 同 第3691号	女屋 光基	昭和35年12月17日

学位授与年月日号	氏名	生年月日
平成15年5月12日 慶大博士乙第3692号	久保田英司	昭和39年3月1日
同 第3693号	原田裕久	昭和42年4月11日
同 第3694号	峰岸一宏	昭和42年11月24日
同 第3695号	守本倫子	昭和44年2月26日



## 目 次

荒木 崇志	カスパーゼ活性化が腎形態形成に及ぼす影響の検討	7
後藤 知英	Developmental Regulation of the Effects of Fibroblast Growth Factor-2 and 1-Octanol on Neuronogenesis : Implications for a Hypothesis Relating to Mitogen-Antimitogen Opposition. (神経細胞産生に対するFGF-2およびgap junction遮断物質1-octanolの効果は大脳壁の発生段階により調節を受ける:増殖因子と増殖抑制因子の相反作用に関する仮説)	8
座間 猛	Scaffold Role of a Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase, SKRP1, for the JNK Signaling Pathway. (MAPキナーゼホスファターゼSKRP1のJNK経路におけるスカフォールド分子としての役割)	9
富田 謙吾	Gene structure and promoter for <i>Crad2</i> encoding mouse <i>cis</i> -retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme. (マウス <i>cis</i> -retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme遺伝子である <i>Crad2</i> の、遺伝子構造及びプロモーター構造)	10
松岡佐保子	CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. (長期造血再構築能を持つ造血幹細胞におけるCD34抗原の発現の発達に伴う推移)	11
須藤 遥	抗体の制御する細胞表面 $\beta$ アミロイド前駆体蛋白の新規神経細胞障害機能	12
高瀬 敦	Gene transfer of truncated I $\kappa$ B $\alpha$ prevents tubulointerstitial injury. (安定型I $\kappa$ B $\alpha$ 遺伝子導入による尿細管間質障害の抑制)	13
服部 英典	Delayed phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in the AT1a knock-out mouse striatal neurons during middle cerebral artery occlusion and reperfusion. (AT1aノックアウトマウス線条体ニューロンにおける中大脳動脈閉塞再灌流時のp38MAPKリン酸化の遅延)	14
越智 健介	Use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen sponge. (生分解性poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen spongeを足場とした、骨芽細胞による骨再生)	15
小野江正頼	考想可視の形成機序と経過に関する精神病理学的研究	16
田中 謙二	Existence of functional $\beta_1$ - and $\beta_2$ -adrenergic receptors on microglia. (ミクログリアにおける $\beta_1$ および $\beta_2$ アドレナリン受容体の機能的発現)	17
林 俊吉	Regulation of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B ligand-induced Osteoclastogenesis by Endogenous Interferon- $\beta$ (IFN- $\beta$ ) and Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) (RANKLから誘導される破骨細胞形成は内在性のインターフェロンベータやSOCSによって制御される)	18
柴田 理恵	ウィルムス腫瘍WT1遺伝子変異と組織型および化学療法反応性に関する研究	19
渡邊知佳子	Spatial heterogeneity of TNF- $\alpha$ -induced T cell migration to colonic mucosa is mediated by MAdCAM-1 and VCAM-1. (TNF- $\alpha$ 惹起性の大腸粘膜へのTリンパ球マイグレーションに及ぼすMAdCAM-1とVCAM-1の影響)	20
巨田 裕	卵巣癌腹膜播種形成におけるMUC1ムチン分子の役割	21

堤 浩二	Effect of Post-Ischemic Hypothermia on Spinal Cord Damage induced by Transient Ischemic Insult in Rabbits. (ウサギにおける一過性脊髄虚血に対する虚血後低体温の脊髄保護効果についての 実験的検討) .....	22
松原山美子	Association between diabetic retinopathy and genetic variations in $\alpha 2\beta 1$ integrin, a platelet receptor for collagen. (血小板コラーゲン受容体 (インテグリン $\alpha 2\beta 1$ ) の遺伝子多型と糖尿病性網膜症 の関係) .....	23
高橋寿由樹	Effect of Preinfarction Angina Pectoris on ST-Segment Resolution After Primary Coronary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction. (急性心筋梗塞に対する経皮的冠血行再建術後のST偏位改善に及ぼす梗塞前狭心症 の影響) .....	24
宇都宮 啓	An epidemiological study on the effectiveness of workplace smoking control programs. (職場における喫煙対策プログラムの効果に関する疫学的研究) .....	25
高橋 正彦	Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis. (ヒト肝癌細胞におけるFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の効果) .....	26
奈良井 慎	Significance of transforming growth factor $\beta 1$ as a new tumor marker for colorectal cancer. (Transforming Growth Factor- $\beta 1$ の大腸癌に対する腫瘍マーカーとしての有用性) .....	27
堀田富士子	筋電図における運動単位動員に関する研究 ー急性期および慢性期神経原性疾患を対象としてー .....	28
山内 健義	Cyclooxygenase-2 Expression as a New Marker for Patients with Colorectal Cancer. (大腸癌におけるCyclooxygenase-2発現の意義 ー肝転移を予測するマーカーとして の可能性ー) .....	29
山口 啓二	<i>In vivo</i> measurement of superoxide in the cerebral cortex during anoxia-reoxygenation and ischemia-reperfusion. (無酸素負荷・再酸素化時および虚血再灌流時の脳表におけるスーパーオキシド 産生の <i>in vivo</i> における測定) .....	30
渡部 直行	マクロファージ由来のnitric oxideによる肝細胞酸化的DNA傷害の検討 .....	31
伊藤 洋子	新生ラット摘出脳幹ー脊髄標本における延髄呼吸中枢に対する橋の影響 .....	32
内田 厚	Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Promoter/Enhancerを用いた組織特異的 自殺遺伝子治療 .....	33
岸川 浩	機械的圧力負荷によるラット小腸上皮細胞でのIL-6産生についての検討 .....	34
北村 正幸	油圧式アームと菌型による固定装置を使った定位放射線治療システムの構築 .....	35
徳山 博文	片側慢性腎虚血における腎内血管作動性因子の動態とその役割 .....	36
永竿 智久	Finite element analysis of the stresses around endosseous implants in various reconstructed mandibular models (再建下顎においてインプラント周辺に発生する応力に関する構造力学的解析) .....	37
中塚 逸央	全身麻酔と自律神経機能の変化 ー心拍変動変化からみた前投薬硫酸アトロピンと揮発性吸入麻酔薬セボフルラン の影響ー .....	38
阿部 智行	Repair of full-thickness cartilage defects using liposomal transforming growth factor- $\beta 1$ . (Transforming growth factor- $\beta 1$ リポソームの関節内注入による関節軟骨修復) .....	39

石川 秀樹	Sialyl Lewis X analog attenuates gastric microcirculatory disturbance and gastric mucosal erosion induced by thermal injury in rats. (シアリルルイスXアナログがラットにおける熱傷で誘発される胃微小循環障害および胃粘膜病変を抑制する) .....	40
女屋 光基	Neuropathological investigation of cerebral white matter lesions caused by closed head injury. (閉鎖性頭部外傷による大脳白質病変の神経病理学的研究) .....	41
久保田英司	糖質コルチコイド投与時の腎血行動態および脈管作動物質の変化 .....	42
原田 裕久	Transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene into rat liver abrogates hepatic ischemia-reperfusion injury. (ラット肝へのインターロイキン1受容体拮抗物質遺伝子導入による虚血再灌流障害の抑制) .....	43
峰岸 一宏	Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F <sub>2α</sub> -induced luteolysis in rats. (機能的黄体退縮における白血球-内皮間相互作用と酸素ストレスの関与) .....	44
守本 倫子	蝸牛外有毛細胞膜の形状が電位依存性運動に与える影響 .....	45

# カスパーゼ活性化が腎形態形成に及ぼす影響の検討

荒木 崇志

## 内容の要旨

細胞死は、障害を受けた細胞の除去機構として、種々の疾患での役割が解明されている。一方、発生段階における形態形成にも重要である。細胞死の基本的な機構は線虫のような下等動物からほ乳類まで幅広い種において保存されており、ほ乳類の形態形成においても細胞死の実行が必要であることが推測されている。本研究では、腎臓の形態形成における細胞死の役割を検討するために、細胞死実行に重要なシステインプロテアーゼであるカスパーゼの阻害剤を腎臓の形態形成の*in vitro*でのモデルである器官培養という系に利用して検討した。

### (方法)

本研究では、細胞死実行に必要なカスパーゼの発現をリバーストランスクリプショナル (RT) -PCR法で検討した。また、カスパーゼ3の抗体を用いた免疫染色と細胞死の実行を検討するTUNEL法を胎児腎の同一切片において施行した。カスパーゼ3の阻害剤の添加による器官培養を行い、カスパーゼ活性の測定、細胞死の抑制効果を検討し、さらにケラチンの抗体を用いた免疫染色およびレクチンを用いた染色により、*in vitro*での分化を評価した。また、カスパーゼ3の上流で働くと考えられるカスパーゼ8およびカスパーゼ9の阻害剤を添加して器官培養し、分化の評価を行った。カスパーゼ9の活性化を検出する抗体を利用して、Apaf-1との二重染色を行い、その相関を検討した。

### (結果と考察)

RT-PCR法およびウエスタンブロッティング法による検討により、カスパーゼ3をはじめ種々のカスパーゼが発生段階の腎臓において発現していることが確認された。また、カスパーゼ3の阻害剤を添加すると、後腎の器官培養において、カスパーゼ活性が阻害され、培養後腎の細胞死が抑制されていることがTUNEL法で確認された。カスパーゼ阻害剤が、培養後腎の尿管芽の分岐、進展を抑制し、その結果、ネフロン様の構造物の形成も抑制することが認められた。また、培養後腎の発達面積も、細胞死を抑制しているにもかかわらず、カスパーゼ阻害剤の添加により抑制された。培養後腎の形態形成抑制効果はカスパーゼ3の上流に位置するカスパーゼ9の阻害剤によっても認められた。また、カスパーゼ9と複合体を形成し、細胞死実行に関与すると考えられているApaf-1の発現が、カスパーゼ9活性が認められる後腎間質細胞に認められた。以上の検討により、発達段階のマウス後腎において細胞死の実行が、尿管芽の分岐、進展およびネフロン様構造物の形成に重要であり、カスパーゼがその実行を担っていることが明らかとなった。

## 論文審査の要旨

細胞死が諸臓器の形態形成に関与している可能性が示唆されていることから、本研究では、腎臓の形態形成における細胞死の役割を検討した。その方法として、細胞死の実行のカスケードにきわめて重要な役割を果たしているカスパーゼの諸種阻害剤を、腎臓形成の*in vitro*でのモデルである器官培養の系に利用して検討した。その結果、細胞死を惹起する最下流のカスパーゼと考えられるカスパーゼ3をはじめ種々のカスパーゼが発生段階の腎臓に発現していることが確認された。またカスパーゼ9と複合体を形成し、細胞死の実行に関与すると考えられているApaf-1の発現が、カスパーゼ9活性が認められる後腎間質細胞に認められた。カスパーゼの諸種阻害剤を用いた検討において、カスパーゼ3の阻害剤を後腎の器官培養に添加すると、尿管芽の分岐、進展を抑制し、その結果、ネフロン様構造物の形成が抑制されることを認めた。さらにカスパーゼ3の上流に位置するカスパーゼ9の阻害剤の添加によっても同様の抑制を認めた。以上の結果から、発達段階のマウス後腎において細胞死の実行が、尿管芽の分岐、進展およびネフロン様構造物の形成に重要であり、その過程にカスパーゼが密接に関係していると結論した。

このような研究成績および結果の解釈は妥当で、腎臓形成過程における細胞死の役割を明らかにした点で意義ある研究と評価されたが、本研究に用いた胎児腎の時期、腎臓の形態形成上の変化に関する評価方法および免疫染色写真等に関して問題点が指摘された。まず用いた胎児腎に関して妊娠12日目および15日目のマウスからの胎児腎が用いられたが、もう少し早い時期での検討があれば一層良かったとされたが、腎臓が小さすぎて技術的に研究が困難なため、妊娠12日目を用いられたとされた。

次にカスパーゼ阻害剤による培養後腎の尿管芽の分岐・進展への影響に関する観察方法に関して、本研究では鏡検下で分岐数を数える方法がとられていたが、それに代る良い方法がないために、実際に分岐を数える方法をとったとされた。そのほかカスパーゼ9の活性化を生じている細胞およびApaf-1の発現をみた免疫染色において、もっと数個の細胞が観察されるべきで、また染色のバックが高いことが指摘された。この点に関しては、胎児腎切片にTUNEL染色を施行しても、細胞死のカスケードが動き始めると、かなり早く細胞が除去されるため、Apaf-1陽性細胞等が少なくなっている可能性があると考えられた。

研究方法や結果に関する指摘点のほか、論文中の語句の使い方等についても疑問点が指摘されたが、研究としては腎臓の形態形成過程における細胞死の関与を明瞭に示し、この領域の研究に貢献す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 病理学 岡田 保典  
解剖学 相磯 貞和 発生・分化生物学 須田 年生  
学力確認担当者：  
審査委員長：村井 勝

試問日：平成15年2月19日

# Developmental Regulation of the Effects of Fibroblast Growth Factor-2 and 1-Octanol on Neuronogenesis : Implications for a Hypothesis Relating to Mitogen-Antimitogen Opposition.

(神経細胞産生に対するFGF-2およびgap junction遮断物質1-octanolの効果は大脳壁の発生段階により調節を受ける：増殖因子と増殖抑制因子の相反作用に関する仮説)

後藤 知英

## 内容の要旨

【背景】大脳皮質の正常発生のメカニズムを解明し、その発生障害の原因となる因子について検討することは、大脳皮質形成異常の病態解明に不可欠である。また、種々の幹細胞の臨床応用が現実のものとなりつつある現在、多分化能を有する細胞における増殖・分化の調整機構、細胞外因子の作用などについて詳細に検討することは極めて重要である。

大脳皮質の投射ニューロンは、胎児脳室系にそって存在する脳室帯を構成する神経前駆細胞 (neural progenitor cells, NPC) から産生される。NPCはG<sub>1</sub>期において、分裂増殖を続けるか (P細胞)、分化を開始し脳室帯から大脳表層へ移動するか (Q細胞)、いずれかの運命を選択する。Q細胞となるNPCの割合をQ値とすれば、増殖因子とはQ値を低下させ、増殖抑制・分化誘導因子とはQ値を増加させるものと定義できる。本研究では、投射ニューロン産生過程における細胞増殖因子 (FGF-2) と分化誘導因子 (gap junction遮断物質である1-octanol) の作用を検討した。

【方法】胎生13日のマウス胎仔大脳壁を組織培養し、G<sub>1</sub>期におけるNPCの運命選択パターン、すなわちP値、Q値の変動を計測した。大脳皮質の発生が大脳吻外側から尾内側へと進行する現象を利用して、解析は同一切片の内側部と外側部で行い、異なる発達段階に関するデータを同時に収集した。DNA合成期の細胞を標識するS期マーカーとしてBUdRとトリチウム標識チミジンを用いた。

【結果と考察】大脳壁組織培養においては、G<sub>1</sub>期のNPCの中に、P細胞、Q細胞に加え、S期には移行せずしかも脳室帯から移動することもない細胞群が観察された。P細胞でもQ細胞でもないこれらの細胞を、本研究ではindeterminateすなわちI細胞と呼ぶことにした。I細胞の本態として、1) Q細胞であるが細胞骨格の障害により移動を開始できない、2) P細胞であるがG<sub>1</sub>期に著明に延長している、3) G<sub>0</sub>期にある、の3つの可能性を挙げた。

I細胞の一部はFGF-2によってP細胞に、1-octanolによってQ細胞となり得ることが判明した。このようなFGF-2と1-octanolの作用は、発生初期にある大脳内側部では認められず、発生後期にある外側部においてのみ認められた。以上の結果から、NPCの分裂増殖、分化誘導に関して、1) 大脳皮質発生初期においては細胞内の自律的コントロールが優勢であり細胞外因子の関与は少ない、2) 皮質発生後期においては多くの増殖抑制因子と少数の増殖因子がバランスして作用している、との仮説を提唱した。

## 論文審査の要旨

大脳新皮質神経細胞の大半を占める投射ニューロンは、神経前駆細胞 (NPC) の増殖・分化誘導により産生される。本研究では、NPCが増殖を続けるか、分化を開始するかの運命選択に関して、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2)、gap junction遮断物質 (1-octanol) が及ぼす影響を定量解析した。胎仔マウス大脳壁を組織培養すると、増殖を停止するが分化もしない細胞群 (I細胞) が出現した。I細胞の一部がFGF-2により増殖を再開すること、1-octanolによりすべてのNPCの増殖が停止、一部は分化を開始することが判明した。すなわち、FGF-2の存在下においてのみ増殖可能なNPCがあること、gap junctionによる細胞間接続がNPCの増殖に不可欠であること、が示された。これらの現象は発生後半にある大脳外側部で認められ、前半にある内側部では認められなかった。すなわち、皮質発生前半と後半ではNPCの増殖調節メカニズムが異なることが示唆された。

審査では、2種のS期マーカーによるNPCの分別標識法につき質問があり、時間差投与を利用した原理が詳細に説明された。神経細胞の移動に必要な放射状グリアが組織培養により損傷されていた可能性はないかとの質問には、特異抗体を用いた免疫組織染色により確認したとの回答がなされた。これに対し、軟膜側にDilを置き、実際に構造が維持されていることを確認することが望ましいと助言された。ついで、I細胞の本態を細胞マーカーを用いて詳細に検討できるのではないかと指摘がなされ、本研究では免疫組織染色にオートラジオグラフィを組み合わせたため、さらに細胞マーカーを追加することは技術的に困難であったと回答された。これに対し、トリチウムに代えてiododeoxyuridineを使用すると良い、との助言がなされた。また、I細胞の本態は嗅球あるいは線条体原基からの遊走細胞ではないか、との指摘があったが、いずれの部位も組織培養においては切断されていると回答された。内側部と外側部で異なる現象が観察されたのは、発達段階の差によるものではなく、線条体原基の存在など構造上の特徴が異なるためではないか、との質問がなされ、今後、同一部位で異なる胎生期に追加実験を行うことが有用と回答された。1-octanolの効果を外側部においてのみ認められたのは、細胞間接続が減少するG<sub>1</sub>期の長さが内側部よりも外側部で長いことが原因ではないか、との指摘があり、その通りであるとの回答がなされた。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき点を残すものの、NPCの分裂様式に及ぼす増殖因子・増殖抑制因子の影響を、G<sub>1</sub>期における運命選択様式の観点から定量的に記載し、I細胞という新たな概念を提示した点で、大脳皮質形成過程におけるNPCの増殖・分化誘導メカニズムに新たな知見をもたらした研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 孝雄  
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之  
内科学 福内 靖男 外科学 河瀬 斌  
学力確認担当者：  
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成15年1月25日

# Scaffold Role of a Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase, SKRP1, for the JNK Signaling Pathway.

(MAPキナーゼホスファターゼSKRP1のJNK経路におけるスカフォールド分子としての役割)

座 間 猛

## 内容の要旨

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路は、真核生物に保存され、多彩な生理過程に重要な役割を果たす。その中心はMAPK、MAPK kinase (MAPKK)、及びMAPKK kinase (MAPKKKK) の3つのキナーゼより成り立つキナーゼカスケードであり、上流のキナーゼによるリン酸化が下流のキナーゼの活性化をもたらす。一方、セリン/スレオニンホスファターゼ、チロシンホスファターゼ、そしてそれらの活性を併せ持つデュアルホスファターゼを含むいくつかのホスファターゼが、上記キナーゼの活性化に関わる部位での脱リン酸化によりMAPK経路を不活化する。デュアルホスファターゼはチロシンホスファターゼの一種であり、あるものはMAPKを特異的に脱リン酸化し不活化することからMAPK phosphatase (MKP) と呼ばれる。また、MAPK経路は各々を構成する一群のキナーゼカスケードを使い分けているものの、ある一つのキナーゼが異なるMAPK経路の上流で同時に機能している場合も多く、それ故、ある刺激に応答する個々の経路の特異性を保証する機構が必要である。その一つとしてスカフォールドタンパク (足場タンパク) によるシグナル分子複合体形成による伝達制御機構が近年注目されている。しかしながら、現在まで、如何にしてMKPがこれらのMAPKシグナル複合体に組み入れられ、あるいは特異的に相互作用するかということは明らかでない。我々は先の論文で新規のMKPであるSKRP1 (SAPK pathway-regulating phosphatase 1) がJNK MAPK経路を不活化することを報告したが、今回さらにJNK経路におけるSKRP1の関与の機構と意義を明らかにする上で解析を行った。SKRP1は*in vitro*においてJNKを脱リン酸化し、そのMAPKKであるMKK7と直接かつ特異的に結合した。キナーゼアッセイおよびレポーターアッセイにより、MKK7自身の活性およびその活性化の結果として起こるATF2の転写活性に基づいた遺伝子発現について、SKRP1はその発現量の増加に応じて抑制から増強へと変化する二相性の影響を及ぼした。また、MKK7のMAPKKKであるapoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) と特異的な結合を共沈実験により認めた。MAPKK MKK7とそのMAPKKKであるASK1との相互作用は、その及方と結合するSKRP1の発現により用量依存的に共沈の増大をもって認められた。かつ、これらに一致してASK1によるMKK7の特異的な活性化をもSKRP1依存的に増強された。以上は、SKRP1がスカフォールド分子として機能することを示唆し、またMKPがMAPKシグナル複合体の1構成要素として働くことを報告した最初の例である。

## 論文審査の要旨

MAPK phosphatase (MKP) に加え、スカフォールドタンパクによるMAPK経路のシグナル伝達制御が知られているが、現在まで、MAPKシグナル複合体におけるMKPの役割については明らかでない。スカフォールド分子は、1) あるシグナル伝達経路の構成要素のうちのいくつかと選択的に結合すること、2) キナーゼ間の物理的な橋渡しによりこれらにおけるシグナル伝達の効率を高めること、3) スカフォールド分子単独の過剰状態では逆に個々の構成要素の解離によりそのシグナル伝達経路の選択的な阻害をもたらすこと、などを特徴とするが、本研究では、新規MKPとして同定されたSKRP1について、上記スカフォールド分子としての特徴を検証した。

審査では、まず、SKRP1が細胞内にて酵素活性を有し、脱リン酸化酵素として機能し得るかとの質問があった。これに対し、細胞内に発現したSKRP1をそのタグに対する特異抗体にて免疫沈降後、pNPP (*p*-nitrophenylphosphate) を基質とした脱リン酸化酵素活性測定を行い、酵素活性を有することを認めたと回答した。さらに、SKRP1がその細胞内発現量依存的に、共発現したJNKを脱リン酸化すること、一方で優性不活性型SKRP1 C149SについてはJNKの脱リン酸化が認められなかったことも、このことを支持すると回答した。また、各々の系において異なる細胞種を用いていることに対しては、その刺激、導入遺伝子発現量を考慮した上で、最も適切な細胞種を用い再現しているが、他細胞種においても同様の結果を得ていると回答した。MAPK経路以外のキナーゼカスケードにおけるスカフォールド分子については、NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappaB) シグナルにおいて、NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) およびIKK (I $\kappa$ B kinase) と結合するIKAP (IKK-complex-associated protein) をあげた。SKRP1のloss of functionについての質問に対しては、antisenseの安定発現株を用いた系においてTNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) 刺激後のJNKリン酸化を検討したが、その結果はRNAi (RNA interference) によるknock downをも用いて詳細に検討する必要があると回答した。また、これを受け、胚性幹細胞 (ES細胞) における解析が有用であることを助言された。最後に、SKRP1が、MKK7によるJNK活性化を物理的に阻害し得るかどうかとの質問に対しては、MKK7上のSKRP1およびJNKの結合領域が異なることから、三者複合体形成については支持されるが、結晶構造解析を用いたより詳細な検討が必要であると回答した。

以上、本研究は、今後検討すべき課題が残されてはいるものの、MKPであるSKRP1が、JNK MAPK経路においてスカフォールド分子として機能し得ること、さらにJNK MAPKKであるMKK7と結合することをはじめ示し、このことはMAPK経路におけるシグナルの特異的調節機構の解明につながるものとして非常に有意義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  
医化学 末松 誠 先端医科学 河上 裕  
生理学 岡野 栄之 病理学 岡田 保典  
学力確認担当者：  
審査委員長：末松 誠

試問日：平成14年12月18日

# Gene structure and promoter for *Crad2* encoding mouse *cis*-retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme.

(マウス *cis*-retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme 遺伝子である *Crad2* の、  
遺伝子構造及びプロモーター構造)

富田 謙吾

## 内容の要旨

ビタミンA (レチノール) の活性体であるレチノイン酸は、細胞の正常分化・脊椎動物の発生・形態維持に重要であることが知られている。レチノールはレチノール脱水素酵素によりレチナールに変換され、さらにレチナール脱水素酵素によりレチナールはレチノイン酸へ変換される。そしてこの一連の酸化反応の律速段階はレチノール脱水素の過程にあることが知られているため、レチノール酸化に携わるSDR酵素群 (ミクロソームに局在) が注目を集めている。そこで著者は、マウス肝臓cDNA libraryをスクリーニングし、その1メンバーである *Crad2* cDNA をクローニングした。CRAD2はall-*trans*, 9-*cis*, 11-*cis*レチノール脱水素酵素活性を有する。さらに、マウス P1 genomic DNA libraryをスクリーニングし、*Crad2*の完全長を含む別々の2クローンを分離し解析した。CRAD2をコードする領域は約5 kbに渡り、4つのエクソンと3つのイントロンを含んでいた。全てのエクソン・イントロン境界配列はGT/AG ruleに従っていた。次に、*Crad2*の転写開始点を決定するために、Primer extension解析とRNase protection解析を施行した。翻訳開始コドンATGの87bp及び89bp上流に、近接する2つの主要な転写開始点が認められた。さらに、約7.5kbのプロモーター領域の全遺伝子配列を決定しコンピューター解析したところ、転写因子AP-1, SREBP1, HNF-1, HNF-3 $\beta$ , HSF2, NF- $\kappa$ B/Rel, CREBP, c-Myc, GATA, Ets, E2F, Oct-1の認識配列と示唆される配列が存在した。さらにFISH解析を施行し、*Crad2*は染色体10D3座に位置することが明らかとなり、SDRファミリーのレチノール脱水素酵素群が同部でクラスターを形成する可能性が示唆された。次に、Northern解析とRT-PCR解析によりCRAD2 mRNAの局在を調べた。CRAD2 mRNAは、成体マウスでは肝臓に高発現を認め、胃と小腸で軽度の発現を認めたが、他組織では、発現が認められなかった。また、CRAD2 mRNAは胚性幹細胞・初期胚では発現を認めず、後期胚の肝臓で高発現を認めた。後期胚の小腸と腎臓でも軽度の発現を認めた。本研究は、All-*trans*及び9-*cis*レチノール脱水素酵素として機能するSDR酵素遺伝子群の遺伝子構造の初めての詳細な報告である。また本研究は、レチノイン酸が関与する消化管・肝臓疾患の病態にCRAD2が関わる可能性を示唆するものである。

## 論文審査の要旨

本研究では、マウスP1 genomic DNA libraryをスクリーニングし、SDR酵素群の1メンバーである *Crad2* の、4つのエクソンと3つのイントロンを含む遺伝子構造を決定した。次に、Primer extension解析とRNase protection解析を施行し、*Crad2*の転写開始点を決定した。約7.5kbのプロモーター領域の全遺伝子配列決定により、AP-1を始めとする複数の転写因子認識配列を認めた。FISH解析にて *Crad2* が染色体10D3座に位置することが明らかとなった。Northern解析とRT-PCR解析にて、CRAD2 mRNAは成体マウス肝臓に高発現を認め、胃と小腸で軽度の発現を認めた。また、胚性幹細胞・初期胚では発現を認めなかったものの、後期胚の肝臓で高発現を認め、後期胚の小腸と腎臓でも軽度の発現を認めることが明らかとなった。審査ではまず、*Crad2*がsingle geneであることの証明がないとの指摘があった。これに対し、論文中には示さなかったものの、標識 *Crad2* cDNAをprobeとしたgenomic DNAのSouthern解析及び、FISH解析により明らかとなったと説明された。実際に肝細胞の分化についてはどのような役割を果たしているのかという質問に対しては、筆者は肝細胞分化に伴いCRAD2 mRNA発現が増強することを確認しており、最終代謝産物であるall-*trans*及び9-*cis* retinoic acidが肝細胞分化を調節することが示唆されると回答した。そして今後レチノイン酸アッセイ系の確立が必要であるとの回答がなされた。何故、cytosolic ADHではなく、microsomal retinol dehydrogenaseの検討を行ったかという質問に対しては、ADH knock out miceで完全なレチノイン酸欠乏の表現形が現れないことが近年明らかとなり、レチノール脱水素酵素として、ADHとSDRファミリーRDHとの間のredundancyが示唆されるため、SDRファミリーRDHの検討が必要であるとの回答がなされた。また、胎生期の発現の変動を検討する上で、より詳細な時系列の検討が望ましく、酸素呼吸の開始時期と発現の変動との相関、その際の各レチノール・レチナール代謝酵素の役割のredundancyに関するより詳細な解析が望まれるとの指摘がなされた。さらに、本研究を基に各種病態とレチノイン酸代謝との相関を明らかとするために、retinol dehydrogenase family、retinal dehydrogenase familyに関する総合的な研究が期待されるとの指摘がなされた。

以上のように、本研究はなお検討を要する点が残されたものの、レチノール脱水素酵素の発現動態・遺伝子構造を明らかとしたものであり、今後各種病態におけるレチノイン酸調節機序を検討する上で有意義な基礎的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 分子生物学 清水 信義

外科学 北島 政樹 解剖学 相磯 貞和

学力確認担当者:

審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成15年2月17日

# CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages.

(長期造血再構築能を持つ造血幹細胞におけるCD34抗原の発現の発達に伴う推移)

松岡 佐保子

## 内容の要旨

CD34抗原は血液細胞、血管内皮細胞、胎生期の繊維芽細胞などに発現が認められる糖蛋白であるが、CD34抗原を発現する細胞が、*in vitro*の実験系において様々な血液細胞への分化能を持つことが認められたことから、CD34抗原は未分化な造血細胞が発現している最も重要なマーカーと考えられるようになり、実際に造血幹細胞移植や遺伝子治療などの臨床に用いられている。しかし、造血幹細胞がCD34抗原を発現しているか否かは未だ明らかになっていない。我々はマウスの造血幹細胞におけるCD34抗原発現の発達に伴う推移について、最近確立された競合的長期造血再構築能アッセイ法を用いて検討した。

新生仔期マウスの骨髓細胞の移植実験では、分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34抗原陽性細胞を移植したマウスにおいて、末梢血中に移植細胞由来の血液細胞が赤血球系、B細胞系、T細胞系全てで出現を認め、分化抗原陰性c-Kit抗原陽性分画細胞中では造血再構築能をもつ造血幹細胞はCD34抗原を発現していることが明らかとなった。肝臓および脾臓の細胞でも同様に造血幹細胞にはCD34抗原の発現が認められた。胎生期(14, 16 and 18 dpc)のマウスの骨髓および脾臓の細胞を用いた実験でも、分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34陽性細胞に造血再構築能が認められた。

しかしながら成獣マウスの骨髓細胞について検討したところ、1週齢のマウスでは新生仔マウス同様に造血幹細胞でCD34抗原の発現が認められたが、その発現は加齢に伴い減弱し、16週齢ではCD34抗原陰性の細胞を移植したマウスのみ造血再構築が認められた。さらに成獣マウスの分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34陰性造血幹細胞が、新生仔のCD34陽性造血幹細胞に由来しているか否かを明らかにするため、新生仔CD34陽性造血幹細胞を移植したレシビエントマウスより移植後4週目と16週目にその骨髓細胞をソーティングしsecond transplantationを施行したところ、移植後4週目のマウスではCD34陽性細胞分画に造血幹細胞が認められていたが、移植後16週目のマウスではCD34陰性細胞分画に造血幹細胞が含まれており、新生仔マウスの分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34陽性造血幹細胞は成獣の分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34陰性造血幹細胞に由来することが明らかとなった。コロニーアッセイではマウスの週齢によらず造血前駆細胞は分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34<sup>+</sup>細胞分画に含まれていた。

以上の結果より、胎仔期および新生仔期から成獣の早期までマウスの造血幹細胞はCD34を発現しているが、以降加齢とともにその発現は次第に減弱していくことが認められた。この結果は、CD34-enriched細胞の移植や臍帯血移植など、用いられる細胞起源が多様化してきている造血幹細胞移植の臨床において、細胞起源によりその造血幹細胞の性状が異なることを示唆しており、非常に重要な意義があると考えられた。

## 論文審査の要旨

CD34抗原は未分化な造血細胞で発現している最も重要なマーカーとして、造血幹細胞移植や遺伝子治療などの臨床に用いられている。しかし、自己複製能と多分化能を有する造血幹細胞がCD34抗原を発現しているか否かは十分解明されていない。本研究ではマウス造血幹細胞におけるCD34抗原発現の発達に伴う推移を、競合的長期造血再構築能アッセイ法を用いて明らかにした。

新生仔期マウスの骨髓細胞の移植実験では、分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34抗原陽性細胞を移植したマウスにおいて、移植後3ヶ月目の末梢血中に移植した細胞由来の顆粒球系、B細胞系、T細胞系の細胞の出現を認め、造血再構築能をもつ造血幹細胞はCD34抗原を発現していることが明らかとなった。肝臓および脾臓の造血幹細胞でも同様にCD34抗原の発現が認められた。胎生期の肝臓でも、分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34抗原陽性細胞に造血再構築能が認められた。

しかしながら成獣マウスの骨髓細胞では、1-4週齢のマウスでは造血幹細胞でCD34抗原の発現が認められたが、その発現は加齢に伴い減弱し、10週齢以降ではCD34抗原陰性の細胞を移植したマウスのみ造血再構築が認められた。さらに新生仔期の骨髓CD34抗原陽性造血幹細胞を移植したレシビエントマウスより移植後4週目と16週目にそのドナー由来の骨髓細胞をソーティングして再移植した結果、移植後4週目のマウスではCD34抗原陽性細胞分画に造血幹細胞が認められていたが、移植後16週目のマウスではCD34抗原陰性細胞分画に造血幹細胞が含まれており、成獣マウスの分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34抗原陰性造血幹細胞は新生仔マウスのCD34抗原陽性造血幹細胞に由来することが明らかとなった。コロニーアッセイではマウスの週齢によらず造血前駆細胞は分化抗原陰性c-Kit抗原陽性CD34抗原陽性細胞分画に含まれていた。

以上の結果より、マウスの造血幹細胞は胎仔期から成獣の早期までCD34抗原を発現しているが、以降加齢とともにその発現は減弱していくことが認められた。

審査では造血再構築能の評価として赤血球系や血小板巨核球系の細胞を検討していない点や、移植する細胞をsingle cellにまで純化してより詳細に性状解析をすることが望ましいという指摘がなされた。また、本研究はマウスでの検討であるがヒトの造血幹細胞ではどうかという質問があり、これに対してヒトの造血細胞を免疫不全マウスなどに移植する研究で、やはりCD34抗原陰性の造血幹細胞を認めている報告があるが、その性状解析については未だ解明されていない点が多く引き続き研究していくことが重要であると解答した。本研究は造血幹細胞を経時的に詳細に解析することでその性状が変化することを極めて明確に示しており、造血幹細胞移植における幹細胞のソースが多様化している現状を考えると非常に重要な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

発生・分化生物学 須田 年生・生理学 岡野 栄之  
先端医科学 河上 裕 病理学 岡田 保典

学力確認担当者:

審査委員長: 須田 年生

試問日: 平成15年2月19日



# 抗体は細胞表面βアミロイド前駆体蛋白質の新規神経細胞障害機能

須藤 遥

## 内容の要旨

APPはβアミロイドの前駆体であり膜貫通蛋白質である。変異型APPは早期発症性アルツハイマー病の原因遺伝子である。私は、変異のない野生型APP (wtAPP) が、リガンド依存性細胞障害機能を持ち、その機能はβアミロイド (Aβ) を介したのではないことをここに報告する。F11細胞は胎生13日のラット神経細胞を不死化したものである。このF11細胞にwtAPPを過剰発現し抗APP抗体で処理すると細胞死が惹起された。F11細胞を抗体で処理しただけでは細胞死は惹起されなかった。抗APP抗体による細胞死は細胞表面のAPPを介し、分泌型APPを介してはおらず、百日咳毒素により阻害され、典型的アポトーシスである。初代培養アストロサイトやwtAPPを過剰発現したグリオーマ細胞では抗APP抗体による細胞死は惹起されず、初代培養大脳皮質神経細胞では惹起された。抗体による神経細胞死に伴う調製培地中のAβの濃度は、Aβの毒性限界より顕著に低かった。また抗体による細胞死の発生した培地でかつ抗体を含まないものを新たな神経細胞に処理しても細胞死は惹起されなかった。抗体による神経細胞死はグルタチオンエチルエステルにより阻害されたがAβによる神経細胞死は阻害されなかった。Aβ1-42産生アミノ酸配列欠失型組み換えAPPを過剰発現したF11細胞を抗体で処理しても細胞死は惹起されたが、細胞内のG<sub>o</sub>結合配列である特異的20残基欠失型組み換えAPPを過剰発現したF11細胞を抗体で処理すると細胞死は惹起されなくなった。従って、細胞表面のAPPは神経細胞死を細胞外から調節しうる因子として細胞障害機能を司っている。そして、この細胞障害機能は、Aβが介在する細胞障害とは異なる。この研究は細胞表面のwtAPPの生理的、病理的機能について、従来考えられてきたようなAβ産生をその本質とするものとは異なる新しい知見を与えるものである。

## 論文審査の要旨

アルツハイマー病アミロイド前駆体蛋白質 (APP) は、アルツハイマー病における老人斑の主要構成成分βアミロイドの前駆体であり膜貫通蛋白質である。変異型APPは家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子である。しかし、APPの生理的あるいは病理的機能については、βアミロイドあるいは分泌型APPに関与しないものはほとんど知られていない。本研究は、初代培養神経細胞やAPPを発現させた神経系株化細胞を、抗APP抗体処理すると細胞死が惹起されることを報告し、野生型APPが生体においてリガンド依存性細胞障害機能を担っており、その機序はβアミロイドを介していない可能性が高いことを明らかにした。

審査では、まず、用語の修正と文献の統一をすべきであるとの指摘があり、ならびに、序と考察で不適当と思われる文章に関する指摘もあり、これらを修正ならびに、削除することとした。次に、抗APP抗体による細胞死においてAPP二量体化とエンドサイトーシス、遺伝子導入法との関係も含めてラフトとの関係について検討すべきとの指摘がなされた。またAPPの内在化シグナル配列と、抗体による細胞死を担っている機能ドメインとの関係について質問があり、前者配列 (NPTY) は後者ドメイン内には含まれていないとした。細胞表面APPの免疫染色像について細胞内部のAPPも染色されているように見える、との指摘があった。これに対して、まず実験プロトコルから細胞内は染色されないとし、さらに文献的にこの染色像が支持されること、ほぼ全ての神経細胞が細胞表面にAPPを発現していることは確立しているとしたが、厳密には本研究で用いた細胞に対し、グリア系細胞も含めてセルソーターを用いて細胞表面にAPPを発現する細胞の割合を評価をすべきであったと指摘された。神経細胞の機能分画に関する検討の必要性、グリア系細胞での証拠が不十分との指摘もされた。抗APP抗体による細胞死のシグナル伝達機序に関する質問があり、Go、Rac、Ask-1、NADPHオキシダーゼ、カスパーゼ9、3を介していると、あるいはCREB、カルモジュリン依存性キナーゼIVの調節が関与している、と報告されていたとした。アルツハイマー病との関連では、まずFAD原因変異型APPに関する質問があった。これに対し、培養細胞に変異型APPを導入する実験によりV642変異体は抗APP抗体非存在下にて、本研究における抗APP抗体による細胞死と同じ生化学的特徴をもつ細胞死を誘導することがわかっている、とした。さらに本研究の示唆するAPPによる細胞死機序がアルツハイマー病で働いていることを示唆する所見はあるかとの質問があり、病理所見でこれを示唆するものはないとした。

以上のように、本研究は細胞表面APPに関する検討や、グリア系細胞に関する検討などさらに厳密な証拠が必要な点もあるが、野生型APPの担う機能について新たな知見を報告したことが有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 薬理学 西本 征央  
生理学 岡野 栄之 解剖学 仲嶋 一範  
内科学 福内 靖男

東京大学医学部 脳神経学 脳神経学 脳神経学 神経病理分野 井原 康夫  
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27日

# Gene transfer of truncated IκBα prevents tubulointerstitial injury.

(安定型IκBα遺伝子導入による尿細管間質障害の抑制)

高 瀬 敦

## 内容の要旨

慢性糸球体腎炎においては、尿細管間質障害の程度と腎機能の予後がよく相関することが示されており、また持続的かつ高度の蛋白尿は尿細管上皮細胞に再吸収されることによりnuclear factor-kappa B (NF-κB)の活性化をもたらす、尿細管病変を誘導することが示唆されている。我々はNF-κBの活性を部位特異的に抑制するため、安定型inhibitor kappa B alpha (IκBα)を発現したアデノウイルスベクターを構築した。尿細管間質障害モデルラットであるbovine serum albumin (BSA) 負荷蛋白尿性ラットを用いてinhibitor kappa B delta N (IκBΔN) 組み換えアデノウイルスを遺伝子導入して検討した。

(方法) 本研究ではNF-κB活性を特異的に抑えるために、NF-κBの制御蛋白であるIκBαの安定体を強制発現するための非増殖性アデノウイルスベクター (AdexIκBΔN) を作製して用いた。

腎への遺伝子導入は片腎摘ラットにあらかじめ腹部大動脈の腎動脈起始部中樞側、大腿動脈分岐部中樞側をクランプし、クランプ間に準備したアデノウイルス液をゆっくり注入して導入した。

アデノウイルスの発現確認では、まず組み換え大腸菌β-ガラクトシダーゼの発現アデノウイルスベクター (AdexlacZ) を選択的に腎臓へ注入後、各週に腎臓におけるβ-ガラクトシダーゼの発現をX-gal染色で確認した。またAdexIκBΔNの発現に関しては腎皮質から抽出したtotal RNAを用いてRT-PCRによりアデノウイルス由来IκBαの発現をRNAレベルで確認した。BSA負荷蛋白尿性ラットの作製として、6週齢、雌、Wistarラットに片腎摘施行1週間後、アデノウイルス液または生理食塩水を注入、さらに1週間後より連日2gのウシ血清アルブミン (BSA) を腹腔内投与して作製した。

各治療群のBSA負荷後に腎機能評価および病理組織変化を検討した。またBSA負荷による腎皮質でのNF-κBの活性化をelectrophoretic mobility shift assayで測定、NF-κBにより転写調節される接着因子vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-1)の発現、線維化マーカーであるtransforming growth factor-beta (TGF-β)、fibronectinの発現を観察した。

(結果と考察) X-gal染色においてAdexlacZ注入3週間後まで尿細管上皮細胞にのみ発現が認められ、糸球体、間質への発現は認められなかった。AdexIκBΔN発現はRNAレベルで注入1週間後まで認められた。また蛋白尿はBSA負荷後速やかに増加した。病理組織ではBSA負荷3週間後には有意な尿細管間質障害、間質への炎症細胞浸潤、軽度の糸球体障害を認め、腎湿重量の増加を認めた。それらの変化をAdexIκBΔN群は有意に抑制した。これらの作用機序はAdexIκBΔN遺伝子治療により腎皮質でのNF-κB活性を抑えることによるものと考えられた。またVCAM-1、TGF-β、fibronectinの発現もBSA負荷蛋白尿性ラットで増加したが、AdexIκBΔN群では有意に抑制された。

腎臓へ選択的にアデノウイルスを注入することにより、尿細管上皮細胞に特異的に遺伝子が発現することを確認し、高度蛋白尿による腎皮質でのNF-κBの活性化と尿細管間質病変の誘導が著明に抑制されることを見出した。

以上の研究により、蛋白尿による尿細管間質障害でのNF-κB活性の重要性が示され、糸球体腎炎関連の尿細管間質障害において、NF-κBをターゲットとした遺伝子治療の有用性が支持された。

## 論文審査の要旨

糸球体腎炎の増悪因子の1つとし高度の蛋白尿が重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている。その増悪機構として、尿細管に達した蛋白が尿細管上皮細胞に再吸収され、それがnuclear factor-kappa B (NF-κB)の活性化をもたらす、尿細管病変を誘導するものと推測されている。そこで本研究では、NF-κBの活性を部位特異的に抑制するため、安定型inhibitor kappa B alpha (IκBα)を発現したアデノウイルスベクターを構築し、bovine serum albumin (BSA) 負荷により尿細管間質障害を惹起させたラットへ遺伝子導入して検討した。アデノウイルスの発現確認において、腎動脈内に注入したアデノウイルスベクターは、3週間後まで尿細管上皮細胞にのみ発現が認められ、糸球体への発現はほとんど認められなかった。

片腎摘ラットにBSAを負荷すると尿蛋白は速やかに増加し、病理組織では3週間後には有意な尿細管間質障害、間質への炎症細胞浸潤および軽度の糸球体障害を認めた。このような変化はinhibitor kappa B delta N (IκBΔN) 組み換えアデノウイルスの導入により有意に抑制された。また接着因子vascular cell adhesion molecular-1 (VCAM-1)の発現や線維化マーカーであるtransforming growth factor-beta (TGF-β) およびfibronectinの発現も有意に抑制された。このことから、蛋白尿による尿細管間質障害に対し、NF-κBをターゲットとした遺伝子治療が有用であるとした。

このような研究に対して、まず糸球体障害モデルでなく、BSA負荷による尿細管間質障害モデルが用いられた理由と、このモデルでの腎障害の発生機構が問題とされた。今回の実験ではアデノウイルスベクターが用いられたが、このベクターの腎への導入において、糸球体にはあまり到達せず、尿細管上皮に到達する特徴と、BSA負荷による尿細管間質障害の発生にNF-κBの活性化が重要な役割を果たすこと等を考慮し、IκBαを発現したアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入を計画し、このモデルを用いたとされた。IκBαの遺伝子導入でNF-κBの活性が抑制され、VCAM-1、TGF-βおよびfibronectinの発現も抑制され、尿細管と間質の障害が明らかに抑制された。その際、尿蛋白量が減っていないことが疑問とされたが、使用された尿細管間質障害モデルでは、毎日BSAが負荷されていることから、尿中蛋白排泄量は腎病変と関係なく認められるとされた。なお糸球体濾過率の変化も重要であり、測定されるべきであったと付言された。このほか、今回用いたアデノウイルスベクターの欠点も考慮し、今後他のベクターを用いた検討も必要であると助言された。

以上のように本研究は、アデノウイルスベクターを用いた関係で、尿細管間質障害病変への遺伝子治療となってしまうが、研究計画や研究方法がしっかりしており、研究結果も妥当であり、腎の遺伝子治療の研究として価値ある研究と高く評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男  
泌尿器科学 村井 勝 病理学 岡田 保典  
医化学 末松 誠 病理学 坂元 亨字

学力確認担当者：  
審査委員長：村井 勝

試問日：平成15年2月19日

# Delayed phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in the AT1a knock-out mouse striatal neurons during middle cerebral artery occlusion and reperfusion.

(AT1aノックアウトマウス線条体ニューロンにおける中大脳動脈閉塞再灌流時のp38MAPKリン酸化の遅延)

服部 英典

## 内容の要旨

臨床の場では血栓溶解療法など一度閉塞した脳血管の再開通を目指す治療が広がっている。一方、脳虚血再灌流にみられる遅発性神経細胞死のメカニズムの解明が治療の面からも求められている。脳虚血再灌流後に活性化（リン酸化）されるmitogen activated protein kinase (MAPK) ファミリーはextracellular signal-regulated kinase (ERK)-1/2、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38MAPK (p38) の3つが知られている。特にp38のリン酸化阻害薬の投与で虚血領域の縮小きたすという報告もあり、そのリン酸化の上流シグナルの解明は治療法開発に貢献すると考えられる。

従来、脳虚血再灌流時にはN-methyl-D-aspartate (NMDA) レセプターからSrc、proline-rich/Ca<sup>2+</sup>-activated tyrosine kinase (Pyk-2) を介してp38のリン酸化を来たすと考えられていたが、心筋細胞・尿管細胞などではアンジオテンシンIIのレセプターであるAT1aからSrcなどを介してp38のリン酸化を来たすという報告が多数ある。そこで脳虚血再灌流時にもAT1aを介してp38のリン酸化が起こるかを検討した。

まず、AT1aノックアウトマウス (AT1aKO) とC57/B6マウス (C57/B6) を用いて中大脳動脈閉塞再灌流モデルを作成し、両群線条体におけるp38およびその上流の経時変化をウェスタンブロット (WB) 及び免疫染色法を用いて比較検討した。

リン酸化Pyk-2は偽手術も含めて再灌流後71時間までWBにより検出されマウス間で違いはなかった。一方、リン酸化p38はAT1aKOでは再灌流後5時間、C57/B6では同2時間のみ検出された。免疫組織学的検討でもリン酸化p38はC57/B6で再灌流2時間後の虚血側線条体神経細胞で陽性となり、同時期のAT1aKOでは陽性細胞はほとんど認めなかった。一方、両マウスで再灌流71時間後をピークにリン酸化p38陽性のグリア様細胞が出現し、レクチンとの二重染色、およびBrd-U腹腔内投与マウスにおけるBrd-Uとの二重染色により、この細胞がミクログリアであり、かつ増殖していることを確認した。また、直接遅発性神経細胞死にかかわるcaspase-9の活性化の時間的経過および、再灌流23時間・71時間後のTUNEL陽性細胞数は両マウスに相違を認めなかった。

以上よりAT1aKOでは脳虚血再灌流時のp38リン酸化が遅延すること、両マウス虚血線条体に再灌流71時間後、リン酸化p38陽性の増殖中のミクログリアが出現すること、AT1aKOにおけるp38リン酸化の遅延はその下流のcaspase-9の活性化、遅発性神経細胞死の時間的進行には影響を与えないことが明らかになった。今後、AT1aKOにおけるp38リン酸化の機構の解明を更に進めることが、脳虚血再灌流時の遅発性神経細胞死の阻止にむけて重要な情報を提供すると考えられた。

## 論文審査の要旨

ラクナ脳梗塞の数とAT1の一遺伝子多型 (A1166C) の間には相関関係があることが知られているが、そのメカニズムについては明らかではない。本研究では虚血再灌流時の遅発性神経細胞死の上流シグナルであるp38リン酸化の経時変化を中心にAT1aノックアウトマウスとC57BL/6マウスでウェスタンブロットおよび免疫染色により比較検討した。その結果、C57BL/6マウスに比べてAT1aノックアウトマウスではp38リン酸化のピークが3時間遅延することが判明したが、遅発性神経細胞死については遅延を認めなかった。また、再灌流後71時間出現するリン酸化p38陽性細胞がミクログリアであり、細胞分裂していることが判明した。

審査では、まずリン酸化p38陽性の神経細胞が存在する部位について質問がなされた。再灌流モデルでは虚血側線条体部位が小さくなるがそれでも常に虚血側線条体は傷害されリン酸化p38陽性神経細胞も線条体にあると回答された。また、リン酸化p38陽性細胞の同定には形態のみではなく他の染色などによっても確認する必要のあること、免疫染色のデータについてのより定量的測定や、共焦点顕微鏡による検討の必要性が指摘された。ノックアウトマウスの系統、脳血管異常や低血圧による虚血への影響の程度の違いについて質問がなされた。AT1aノックアウトマウスではC57BL/6マウスに比較して約20mmHg血圧が低いが、明らかな血管奇形は報告されていないこと、全例レーザードップラー血流計にて同程度の血流低下と再灌流後の血流の増大をある程度定量的に確認しているといえると回答された。また、虚血程度の違いはリン酸化p38の量に影響を与える可能性があるが、時間的な遅延には影響は少ないと考えられると回答された。ミクログリアに注目した理由とその意義について質問がなされた。本研究はAT1aがp38リン酸化に与える影響を調べることが目的であったが、今回得られたp38リン酸化を起こすミクログリアの知見についてもAT1aノックアウトマウスと比較する意義があると回答された。また、ミクログリアは再灌流後71時間のみ出現しその前後には見られず、細胞分裂を起こしていることから貪食細胞としての役割が予想されると回答された。また、レクチンに染まる細胞をすべてミクログリアとすることには問題があること、抗Brd-U抗体で染色する際に塩酸で核のヒストンを処理すべきであったことが指摘された。

以上より、本研究は虚血性細胞死のメカニズムについて新しい知見を加えたものと評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 福内 靖男  
外科学 河瀬 斌 生理学 岡野 栄之  
解剖学 仲嶋 一範 病理学 岡田 保典

学力確認担当者:

審査委員長: 河瀬 斌

試問日: 平成15年2月17日

# Use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen sponge.

(生分解性poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen spongeを足場とした、骨芽細胞による骨再生)

越 智 健 介

## 内容の要旨

再生医療とは、細胞を用いることで、損傷あるいは疾病に陥った組織の修復を指向するものである。骨・軟骨はヒト臓器の中で比較的容易に再生できるため、多くの臨床的治療に繋がるものとして注目を集めており、その方法論の早期確立が待たれている。そのためには、細胞・増殖因子・足場 (scaffold) という3つの問題を解決しなければならない。本研究では、骨髄間質細胞より樹立した成熟骨芽細胞株KUSA/A1と生分解性の足場poly DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen spongeを用いて、骨再生を試みた。

本株は、*in vitro*における単層培養条件下において石灰化を起こすことができる。また、高いアルカリフォスファターゼ活性、カルシウム沈着能、オステオカルシン産生能を持つと同時に、PTHホルモンに対しては低い反応性しか示さない。これらのデータから、KUSA/A1細胞は成熟骨芽細胞あるいは骨細胞であることが示唆された。またコラーゲンゲルによる*in vitro*の3次元培養系では、 $\beta$ -glycerophosphateを含まない通常の培養液条件下でも、von Kossa染色陽性の石灰化が生じた。これはKUSA/A1細胞が非常に強い骨形成能を有していることを示している。また*in vivo*においては、*in vitro*で成熟させたKUSA/A1細胞を生体内に接種することで、2日という短時間で骨基質を形成させることができた。これに対し、*in vitro*で成熟させていないKUSA/A1細胞を接種した場合には、骨基質形成までに約2週が必要であった。これらの結果から、より迅速な骨形成を実現するためには、成熟骨芽細胞の利用が有効であることが示唆された。またdiffusion chamberや $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を導入したKUSA/A1細胞の検討から、この細胞の接種により生じる骨はKUSA/A1細胞によって直接的に生じるものであり、その過程には強力な液性の骨形成因子が関与していることが示唆された。またKUSA/A1細胞に相当するヒト細胞を単離する際の指標とするため、KUSA/A1細胞の表面マーカーの解析を行なった。この結果からも、KUSA/A1細胞が成熟骨芽細胞あるいは骨細胞であることが示唆された。

一方、コラーゲンゲルで覆われたpoly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen spongeは骨再生に適した足場と考えられている。今回KUSA/A1細胞とPLGAスポンジを組み合わせることで、高密度の骨梁構造を持ち、かつ意図した通りの形状を持つ骨を再構築することが可能となった。この再生骨は悪性化の所見もなく、また造血細胞や破骨細胞をその内部に含んでいることから、生理的にも機能している正常骨であることが明らかとなった。

本研究の結果から、成熟骨芽細胞と適切なscaffoldを組み合わせたことが、任意の形状の骨を再生するのに非常に適しており、骨再生の基礎的研究や骨欠損・難治性骨折の新たな治療法開発のための有効な手段となり得ることが示された。

## 論文審査の要旨

再生医療とは、細胞を用いることで、損傷あるいは疾病に陥った組織の修復を指向するものである。特に骨・軟骨は早期に臨床的治療に繋がるものとして注目を集めているが、そのためには用いる細胞・足場といった問題をまず解決しなければならない。本研究では、骨髄間質細胞より樹立した成熟骨芽細胞株KUSA/A1と、生分解性の足場poly DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) -collagen spongeを用いて骨再生を試みた。

*In vivo*, *in vitro*における検討から、本株が膜性骨化を経る成熟骨芽細胞株であり、従来知られている如何なる骨芽細胞株よりも強力な骨形成能を保持していることが明らかとなった。またこの骨形成能は、*in vitro*で本株を成熟させた場合により強力に発揮された。つまり臨床において要求される迅速な骨形成を実現するためには、より成熟した骨芽細胞の利用が有効と考えられた。また本株とPLGAスポンジを組み合わせることで、高密度の骨梁構造と生理機能を持ち、かつ意図した通りの形状を持つ正常骨を再構築することが可能となった。本研究の結果から、成熟骨芽細胞と適切な足場を組み合わせることが、骨再生の基礎的研究や骨欠損・難治性骨折の新たな治療法開発のための有効な手段となり得ることが示された。

審査では、まず本株がどの程度未分化な状態を保っているのかが質問された。これに対し、具体的な検討は難しいため正確には不明であると回答された。また本株による骨化は、本当に軟骨性骨化を経ないのかと質問された。これに対し、分子生物学的検討は行っていないものの、*in vivo*における骨形成の如何なる時点においても軟骨組織が観察されないため、膜性骨化と考えられると回答された。また本株が分泌している骨形成因子についての質問に対しては、BMP-4, 7などの分泌は確認されているものの、本株は膜性骨化を経ることからBMP以外の因子の関与が大きいのではないかと回答された。さらに、骨形成細胞の絶対的なマーカーは存在しうるかとの質問がなされた。これに対し、骨芽細胞は分化における可塑性が大きいため難しいのではないかと回答された。最後に、臨床応用するためにはどのような方法がよいかと質問された。これに対し、細胞は患者本人の骨髄間質細胞をそのまま使うのではなく、何らかの方法によって骨形成細胞を濃縮したものをを使うのがよい。その細胞を適切な足場に播種し、骨欠損部位に直接移植すべきと考えられるが、その方法論に関してはまだまだ研究の余地があると回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しており、臨床応用するためには更なる研究が必要であるものの、成熟骨芽細胞と適切な足場の組み合わせという新たな方法論により、基礎・臨床での骨再生医学への道を拓い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

病理学 岡田 保典 生理学 岡野 栄之  
発生・分化生物学 須田 年生 リハビリテーション医学 千野 直一  
学力確認担当者：

審査委員長：岡田 保典

試問日：平成15年1月8日

# 考想可視の形成機序と経過に関する精神病理学的研究

小野江 正頼

## 内容の要旨

考えが文字になって見える考想可視は精神分裂病（統合失調症）に生じる比較的稀な症状として知られているが、症状の範囲や臨床的意義は十分には明らかにされていない。本研究の目的は、考想可視の形成機序と経過を症候学的、精神病理学的な立場から分析し、診断や治療への応用の可能性を検討することである。

対象は、経過中に考想可視症状およびその関連症状、すなわち考えが文字によらず映像になって見える、他人の考えが文字になって見えるといった症状を示し、DSM-IVの精神分裂病診断基準を満たした13例（男性4例、女性9例）である。その精神病理学的検討により、以下の結果を得た。

1. 症状出現時の平均年齢は36.2±8.8歳（25～54歳）、発病からの平均罹病期間は9.3±8.4年（0～29年）であった。
2. 症状の出現する場所は、外部空間に生じたものは5例、内部空間に留まったものは8例であった。
3. 随伴症状については、言語性幻聴が全例にみられ、うち考想化声は11例、音楽幻聴は1例であった。妄想は10例、強迫は9例に認められた。
4. 症状の出現形式に関しては、動きを伴うものは6例、伴わないものは7例であった。出現時に実行意識を伴うものは4例、対話に近い形式を取るものは3例であった。内容の自己所属性は12例で保たれていた。

以上の結果と、幻視・視覚表象、自分の思考内容が感覚化する点で共通する考想化声、考想化声と構造が似る強迫に関する従来の知見を合わせ検討し、考想可視の形成機序と経過につき以下の結論を得た。

1. 考想可視は、精神分裂病がより進行した段階において、自生思考、強迫現象、幻聴、視覚表象などよりも遅れて、視覚領域に現れる言語性幻覚である。
2. 考想可視は、体験の自己所属性と実行意識を指標とすると、自我障害の進展に応じて、①考えを書字化せずにはられない確認強迫、②意味や記号を含む内部空間の視覚表象、③内部および外部の空間に文字が見える考想可視、といった3段階を経過すると推測された。さらに外部空間のさせられ体験の形式に変化する段階の存在が示唆された。
3. 考想可視の形成には、考想化声よりさらに低い人格水準において、主体が自らの体験を確認し、自己所属性をつなぎとめようとする一種の自助努力が含まれていると考えられた。

さらに臨床においては、考想可視は自我障害の進行を表す指標として、あるいは薬物の治療効果を判定する指標としても用いられ得る可能性があることを指摘した。

考想可視は稀な現象であるが、強迫と幻覚の接点に位置する症状であり、精神分裂病の症状形成を精神病理学的立場から検討する手がかりになると思われた。

## 論文審査の要旨

本論文は、精神分裂病（統合失調症）の比較的稀な症状である考想可視の形成機序と経過を精神病理学的に分析し、診断や治療への応用の可能性を検討したものである。考想可視症状および関連症状を有する13例を、幻視・視覚表象、考想化声、強迫と精神病理学的に比較、検討し、以下の結論を得ている。1. 考想可視は、精神分裂病がより進行した段階で、自生思考、強迫現象、幻聴、視覚表象に遅れて、視覚領域に現れる言語性幻覚である。2. 考想可視は、自我障害の進展に応じて、①考えを書字化せずにはられない確認強迫、②意味や記号を含む内部空間の視覚表象、③内部および外部の空間に文字が見える考想可視、の3段階を経過する。3. 考想可視の形成には、考想化声より低い人格水準において、主体が自らの体験を確認し自己所属性を維持しようとする自助努力が関与している。考想可視は自我障害の進行や薬物治療の効果を判定する指標として用い得る。

審査では、まず考想可視の発現について、年齢、家族歴、文化的差異に関し質問がなされ、年齢よりも疾患の進行程度と関連すること、家族歴との関連はないこと、英語圏での報告は少ないが日本語の表音文字でも症状が生じることより文化的差異はないと回答された。また分裂病の特定の群に出現する傾向については、そのような傾向はみられないと答えられ、随伴症状として音楽幻聴が少ないことに対しては、音楽幻聴自体の頻度の少なさによるものと説明された。また本症状と言語幻聴や考想化声との関連について構造の類似から本症状はそれらの亜型とみなしうるとの回答があった。次いで、脳機能との関連について、脳器質疾患での同様症状の出現の有無、症状出現時の脳波所見につき質問がなされ、脳器質疾患では同様症状は見られず、症状出現に異常脳波所見はないと答えられた。本症状は自己に関する脳機能に関係するのではとの指摘があり、前頭葉機能およびその左右差との関連が問われ、側頭葉拡大、側頭葉内側萎縮などの報告はあるが一定の見解はないとの回答がなされた。今後の研究の方向として、症例を集積し画像検査など脳機能との関連を検討するべきであるとの助言があり、また本症状は、その特徴からみて脳損傷に直接関連する脱落症状ではなく、刺激症状と考えられるのではとの示唆があった。

審査の結果、本研究は主として症状の記述的検討に基づいたものであり、脳機能との関連など将来の検討課題が残されているものの、頻度の低さもあり従来ほとんど検討されていない考想可視をその関連症状との比較において精神病理学的に構造分析し、精神分裂病症状の理解に寄与した点、および考想可視が自我障害の進行や薬物治療の効果を判定する指標として用い得ることを示した点で、臨床的に価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 神経精神医学 鹿島 明雄  
内科学 福内 靖男 外科学 河瀬 敏  
生理学 金子 章道 解剖学 仲嶋 一範

学力確認担当者：

審査委員長：福内 靖男

試問日：平成14年12月25日

# Existence of functional $\beta_1$ - and $\beta_2$ -adrenergic receptors on microglia.

(ミクログリアにおける $\beta_1$ および $\beta_2$ アドレナリン受容体の機能的発現)

田 中 謙 二

## 内容の要旨

本論文では、ラット初代培養ミクログリアとラット株化ミクログリアにおける $\beta$ -アドレナリン受容体の発現を調べ、次いで $\beta$ -アドレナリン受容体が機能的であるか調べた。ミクログリアにおける $\beta$ -アドレナリン受容体mRNA全アイソタイプの有無をRT-PCR法で検討した結果、ミクログリアには $\beta_1$ -および $\beta_2$ -アドレナリン受容体mRNAが発現し、 $\beta_3$ -アドレナリン受容体mRNAは発現しなかった。受容体が機能的に働いているかを調べるために、 $\beta$ -アドレナリン受容体のセカンドメッセンジャーであるcAMP量をELISA法で測定した。ミクログリアは $\beta_1$ -アドレナリン受容体アゴニストであるドブタミンと $\beta_2$ -アドレナリン受容体アゴニストであるテルブタリンに反応し、細胞内cAMP量が増加した。この増加は、それぞれの受容体サブタイプにおける特異的アンタゴニストであるアセプトロールとブトキサミンによって完全に抑制された。このことから、ミクログリアには機能的な $\beta_1$ -および $\beta_2$ -アドレナリン受容体が発現していることがわかった。脳内における $\beta$ -アドレナリン受容体の主要な内在性リガンドはノルエピネフリンである。ミクログリアがノルエピネフリンに反応するか調べたところ、ミクログリアが $\beta_1$ -アドレナリン受容体を介してノルエピネフリンに反応し、細胞内cAMP量が増加することがわかった。また、このcAMP量増加に伴い、ミクログリアで炎症性サイトカインであるインターロイキン $1-\beta$  mRNAが誘導されることがわかった。この結果は、単球・マクロファージ系細胞では細胞内cAMP増加に伴ってインターロイキン $1-\beta$  mRNA誘導とタンパク質分泌低下がおこるという従来の報告を追試するものと思われた。心理的ストレス下では脳内でノルエピネフリンが増加すると共に、インターロイキン $1-\beta$ を含む炎症性サイトカインが増加する。脳内炎症性サイトカインの増加がストレス関連疾患であるうつ病や不安障害の病態生理に関与するので、炎症性サイトカインの主要な産生源であるミクログリアがノルエピネフリンによる細胞機能調節を受けることは、ミクログリアを介したストレス反応の修飾が存在する可能性を示唆している。

## 論文審査の要旨

本研究はストレス時における脳内の応答を明らかにするために、ノルエピネフリンとミクログリア間のシグナル伝達に着眼し、ミクログリアがノルエピネフリンに反応するか検討したものである。従来、末梢組織マクロファージには $\beta_2$ アドレナリン受容体しか存在しないために、 $\beta_2$ アドレナリン受容体に対して低親和性のノルエピネフリンがマクロファージに結合せず、むしろ高親和性のエピネフリンが結合することが報告されていた。しかし、脳内ではノルエピネフリンが優位に存在することから、脳のマクロファージ様細胞であるミクログリアがノルエピネフリンに高親和性である $\beta_1$ アドレナリン受容体が発現しているか明らかにする必要があった。ラットミクログリア培養細胞の $\beta$ アドレナリン受容体mRNAの発現をRT-PCR法で調べ、次いでmRNAの発現が認められた受容体アイソフォームが機能的に働いているかどうか、セカンドメッセンジャーであるcAMP量をELISAで測定することで確認した。結果、ミクログリアには機能的な $\beta_1$ および $\beta_2$ アドレナリン受容体が発現していることが明らかになった。またミクログリアは $\beta_1$ アドレナリン受容体を介してノルエピネフリンに反応し、細胞内cAMPを増加させることが明らかになった。

審査において、本研究で使用したミクログリア培養細胞について質問がなされた。まず、長期間培養することによる細胞の変化について問われた。脳からfreshにミクログリアを単離する方法が確立していないため検討が難しいと回答された。その方法論の確立が今後の課題とされた。次に、細胞の不均一性（すべての細胞が $\beta_1$ と $\beta_2$ アドレナリン受容体が発現するのか、一部の細胞が $\beta_1$ アドレナリン受容体が発現するのか）について問われた。不均一性について言及する前提として、実際の脳内においてミクログリアが $\beta_1$ および $\beta_2$ アドレナリン受容体が発現しているかを、免疫組織化学もしくはinsitu hybridizationによって組織学的に示される必要があると指摘された。ミクログリア培養細胞の純度をPLP/DM20 mRNAのRT-PCRだけで説明すべきではないという指摘に対して、GFAP mRNAのRT-PCRも行って検討したことが述べられた。PCRのlinearityについて記載がないため、RT-PCRの結果の信憑性に欠けるとの指摘があったが、linearityについては確認していると説明があった。ストレス反応としてノルエピネフリンの増加に加えて、HPA axisによるステロイドホルモンの影響をも加味するとストレス反応におけるミクログリアの応答への理解が深まると助言された。

以上、本研究には組織学的な検討が求められるものの、神経精神免疫科学における一つのアプローチとしてストレスとノルエピネフリン、ミクログリアの相互関係に注目し、その一端を明らかにした点で価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 神経精神医学 鹿島 明雄  
生理学 岡野 栄之 解剖学 仲嶋 一範  
内科学 福内 靖男 薬理学 西本 征央

学力確認担当者：

審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成14年12月27日

# Regulation of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B ligand-induced Osteoclastogenesis by Endogenous Interferon- $\beta$ (IFN- $\beta$ ) and Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) (RANKLから誘導される破骨細胞形成は内在性のインターフェロンベータやSOCSによって制御される)

林 俊 吉

## 内容の要旨

破骨細胞は、モノサイト/マクロファージ (M/M $\phi$ ) 系の細胞から、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、RANKL等の刺激を受けて成熟した破骨細胞へと分化する。この分化の過程には様々なサイトカインが関与しており、その中でも免疫に関与するタイプII interferon (IFN) であるIFN- $\gamma$ は破骨細胞形成に対して抑制的に働くことが知られている。一方、同様に免疫に関与するタイプI IFNであるIFN- $\alpha/\beta$ が破骨細胞の形成に及ぼす影響に関しては報告されていなかった。しかし、破骨細胞の分化や活性化にはRANKLによるNF- $\kappa$ BやAP-1の誘導が必須であることや、IFN- $\beta$ 遺伝子のpromoter領域にはNF- $\kappa$ BとAP-1のbinding siteがあることを考えあわせると、IFN- $\beta$ が破骨細胞形成に対して何らかの影響を及ぼすことが想定された。そこで本研究では、IFN- $\beta$ が破骨細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

マウスの長管骨から骨髓細胞を採取し、高濃度M-CSF存在下で3日間培養して得られたM/M $\phi$ 系の細胞を破骨細胞の前駆細胞として各種実験を行った。まず、外在性のIFN- $\beta$ は破骨細胞形成に対して抑制的に働くことが示された。次にM/M $\phi$ 系の細胞をRANKLで刺激したところ、IFN- $\beta$ が誘導されることが確認された。さらに破骨細胞形成系に抗タイプI IFN中和抗体を添加したところ、破骨細胞形成は促進された。これらより、RANKLによって誘導される内在性のタイプI IFNが破骨細胞形成に対して抑制的に働いていることが確認された。しかし、これはRANKLの本来の破骨細胞形成を誘導するという働きと拮抗する。そこで、IFN- $\alpha/\beta$ のsignaling pathwayにJAK-STAT系が存在するのに着目し、このJAK-STAT系のシグナルを阻害する、suppressor of cytokine signaling (SOCS) が関与しているのではないかと想定した。

まず、M/M $\phi$ 系の細胞をRANKLで刺激したところ、SOCS-1, -3が誘導されることが確認された。次にM/M $\phi$ 系の細胞をRANKLで前処理した後、IFN- $\beta$ で刺激したところ、STAT-1のリン酸化が抑制された。さらに、同様に処理した細胞の核extractのinterferon-stimulated response element (ISRE) に対するbinding activityについてEMSAで調べたところ、binding activityが減少していた。これらの結果はRANKLで前処理したことにより、SOCSなどのsuppressorが誘導され、IFN- $\beta$ のシグナルを阻害したことを示していた。

これらの実験結果より、RANKLによって破骨細胞形成に対して抑制的に働くIFN- $\beta$ が誘導されるが、同時に誘導されるSOCSなどのsuppressorによってIFN- $\beta$ のシグナルは阻害され、破骨細胞形成が円滑に進められるような機構が存在することが明らかとなった。

## 論文審査の要旨

破骨細胞は血球系由来の細胞であり、モノサイト/マクロファージ (M/M $\phi$ ) 系の細胞より分化する。この分化の過程には様々なサイトカインが関与していることが知られているが、タイプI IFNであるIFN- $\beta$ の作用に関しては知られていなかった。本研究では、RANKLがM/M $\phi$ 系の細胞に作用すると、IFN- $\beta$ が誘導されることを明らかにし、IFN- $\beta$ は破骨細胞形成に対して抑制的に働くことがわかった。しかし、この働きはRANKL本来の破骨細胞を誘導する作用と相反するものであり、このIFN- $\beta$ のシグナルをブロックする何らかの機構が存在すると考え、JAK-STAT系のシグナルを阻害するSOCSに注目した。実際、RANKLはM/M $\phi$ 系の細胞に作用すると、SOCS-1, -3を誘導することが確認された。また、RANKLでM/M $\phi$ 系の細胞を前処理した後にIFN- $\beta$ で刺激すると、前処理をしなかった群に比べてSTAT-1のリン酸化や、遺伝子のpromoter領域にあるISREのbinding activityが減少することがわかった。したがって、RANKLはM/M $\phi$ 系の細胞に作用して、破骨細胞形成に対して抑制的に働くIFN- $\beta$ を誘導するが、同時に誘導されるSOCSなどのsuppressorによってIFN- $\beta$ のシグナルはブロックされ、破骨細胞形成をより円滑にする機構が存在することが示唆された。

審査では、実際に使用したすべてのM/M $\phi$ 系の細胞がIFN- $\beta$ 産生能を有するか質問された。これに対し、IFN- $\beta$ の産生量は極微量なためELISA等を用いて検出する事は不可能であり、正確にはわからないが、今回の実験に用いられた細胞はほぼ同じ分化段階の細胞であり、同じ性質を持つことが予想されるため、全ての細胞でIFN- $\beta$ が産生されている可能性が高いと回答された。また、IFN- $\beta$ がどのような機序で破骨細胞形成を抑制すると考えられるかとの質問があり、まだ不明であるが核内の伝達物質が関与している可能性があるかと回答された。次に、今回の実験に使われた細胞の純度について質問され、正確には測定していないが、顕微鏡にて細胞の形態を見る限りではstromal cellのコンタミネーションは1%以下と考えられ、高純度のM/M $\phi$ が得られる系であると回答された。また、破骨細胞の成熟度は何を基準にして判断するかを質問され、fusion indexを用いるのが適当であると回答された。さらに、in vivoで破骨細胞が実際にどのように働くかを研究するよう提案された。今回の実験ではマウスを使用したか、ヒトの破骨細胞分化においても同様のことがいえるかどうかと質問された。これに対して、マウスよりもヒトの方が破骨細胞が形成されるまでの時間は長く、分化に関与するサイトカインも微妙に異なると回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、破骨細胞の分化過程にIFN- $\beta$ とSOCSが関与していることを明らかにした点は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

病理学 岡田 保典 医化学 末松 誠

発生・分化生物学 須田 年生 微生物学 小安 重夫

学力確認担当者:

審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成15年1月7日

# ウィルス腫瘍WT1遺伝子変異と組織型および化学療法反応性に関する研究

柴田 理恵

## 内容の要旨

ウィルス腫瘍は小児期に発症する悪性腎腫瘍の中でもっとも数が多く、小児の全悪性固形腫瘍の中で約8%を占める。WT1遺伝子は、1990年にウィルス腫瘍の腫瘍抑制遺伝子の一つとして11p13領域から単離されたが、散発性のウィルス腫瘍においてはWT1遺伝子変異が検出される割合は約10%程度とされている。また家族性ウィルス腫瘍におけるWT1遺伝子変異の報告例は5例のみである。ウィルス腫瘍にはいくつかの組織型があり、特殊型として胎児性横紋筋腫型腎芽腫 (fetal rhabdomyomatous nephroblastoma, FRN) と呼ばれるものがある。FRNは間葉成分として横紋筋成分が全病巣の3分の1以上を占めるものと定義されており、予後が良好とされているが化学療法に抵抗性であるという報告がこれまでなされている。本研究では、ウィルス腫瘍の中でも間葉成分として横紋筋を豊富に含む組織型を示すものに注目し、WT1遺伝子変異との関連を調べた。また、FRNの組織型を示すものがなぜ化学療法抵抗性とされるかを調べた。

主として日本ウィルス腫瘍研究グループに登録された46症例のウィルス腫瘍において、腫瘍もしくは末梢血よりDNAを抽出し、WT1遺伝子のエクソン1-10のPCRをかけ、直接塩基配列決定法によって変異の有無を検討した。変異の見つかった症例においてはpolymorphic markerを用いてWT1遺伝子におけるloss of heterozygosityの解析を行った。検索症例中両側性の腫瘍を呈した症例では、化学療法前後の組織型の変化をHE染色並びに免疫染色を行って比較検討した。

46症例中FRNの組織型を示した症例は5例、腎芽型は38例、上皮型は3例で、FRNの組織型を示した3例と間葉成分として横紋筋を含む腎芽型の組織型を示した2例の計5例において、エクソン9の1168C→T (<sup>30</sup>Arg→stop codon) の同一の変異が同定された。5例中両側性の4症例では生殖系列において1168C→C/Tのヘテロの変異を呈し、泌尿生殖器系奇形を伴っていた。腫瘍に変異を有する片側性の1例では生殖系列に変異は認めなかった。両側性の症例で化学療法前に未熟な横紋筋成分優位の組織型を示した症例は、化学療法後では横紋筋成分の分化と線維成分の増加を示した。化学療法前の未熟な横紋筋成分はKi-67が陽性であったが化学療法後では著減していた。解析症例中家族性ウィルス腫瘍を1例のみ認めたがこの症例においてはWT1遺伝子変異と11p15のLOHが検出された。

以上の結果より、WT1遺伝子における、<sup>30</sup>Argがstop codonになる変異とウィルス腫瘍の間葉成分豊富な組織型との関連が示唆された。特に両側性のウィルス腫瘍で泌尿生殖器系の奇形を合併している症例においてはこの変異は組織型だけではなく腫瘍発生にも大きく関与していると考えられた。またFRNのような間葉成分が豊富な組織型を示すウィルス腫瘍は、化学療法によって未熟な間葉成分が成熟した成分に分化するとともに膠原線維の増生も伴うため、腫瘍の大きさが小さくならないもしくは増大するということが明らかとなった。

## 論文審査の要旨

ウィルス腫瘍は小児期に発症する悪性腎腫瘍の中でもっとも数が多く、小児の全悪性固形腫瘍の約8%を占める。WT1遺伝子は、1990年にウィルス腫瘍の腫瘍抑制遺伝子の一つとして11p13領域から単離された。本研究では主として日本ウィルス腫瘍研究グループに登録された46症例のウィルス腫瘍において間葉成分として横紋筋を豊富に含む組織型を示すものに注目し、WT1遺伝子変異との関連を調べた。また、胎児性横紋筋腫型腎芽腫 (fetal rhabdomyomatous nephroblastoma, FRN) の組織型を示すものがなぜ化学療法抵抗性とされるかを調べた。

46症例中FRNの組織型を示した3例と間葉成分として横紋筋を約1/4含む腎芽型の組織型を示した2例の計5例において、エクソン9の1168C→T (<sup>30</sup>Arg→stop codon) の同一の変異が同定された。この結果よりWT1遺伝子における、<sup>30</sup>Argがstop codonになる変異とウィルス腫瘍の間葉成分豊富な組織型との関連が示唆された。FRNの組織型を示した両側性ウィルス腫瘍症例は化学療法前では未熟な横紋筋成分優位の組織型を示したが、化療後では横紋筋成分の分化と線維成分の増加を示した。化療前の腫瘍細胞はKi-67が陽性であったが化療後では著減していた。この結果よりFRNのような間葉成分豊富な組織型を示すウィルス腫瘍は、抗がん剤耐性ではなく化学療法によって未熟な間葉成分が成熟した成分に分化するとともに膠原線維の増生も伴うため、腫瘍径が縮小しないもしくは増大するということを示した。

審査では、抗がん剤により腫瘍細胞が分化誘導されるのかどうか質問された。これに対し、化学療法によって未熟な腫瘍細胞が消失し分化の良い細胞だけが残っている可能性、もしくはウィルス腫瘍自体に分化する性質を有する可能性をあげ、抗がん剤そのものによる直接的な分化誘導とは断定できないと回答された。また、LOHが証明されなかった症例をhomozygousの変異と考えるのかと質問された。これに対し、polymorphic markerによる解析のみではhomoの変異とは断定できず、今回それ以上の検索は行っていないと回答された。さらに報告例におけるWT1遺伝子変異の割合、また変異例における泌尿生殖器系の奇形の合併の頻度について質問された。これに対して、WT1遺伝子変異は散発性の症例では、約10~15%程度と報告されていること、WAGR症候群のようなWT1遺伝子変異と泌尿生殖器系の奇形がほぼ必発の症例もあり、また奇形合併の無い症例もあるが、泌尿生殖器系の形成に関与する遺伝子であり関連性は深いと回答された。最後に、検索症例中腎芽型の組織型を示した症例における横紋筋成分の割合はどの程度であったのかと質問された。これに対し、大部分の症例は間葉成分のうち横紋筋成分の占める割合は少なく、中には全く含んでいない症例も認めたこと、それに対しWT1遺伝子変異を認めた2例は横紋筋成分が豊富 (約1/4) であったと回答された。

以上のように、本研究はさらに検討すべき点を残しているが、珍しい小児腫瘍を多数集め遺伝子解析、組織学的検討を行うことにより形態学に基づいた腫瘍の性質や発生機序の解明を行った点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 病理学 坂元 亨字  
病理学 岡田 保典 泌尿器科学 村井 勝  
小児科学 高橋 孝雄 内科学 猿田 享男  
学力確認担当者：  
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成15年2月19日



# Spatial heterogeneity of TNF- $\alpha$ -induced T cell migration to colonic mucosa is mediated by MAdCAM-1 and VCAM-1.

(TNF- $\alpha$ 惹起性の大腸粘膜へのTリンパ球マイグレーションに及ぼすMAdCAM-1とVCAM-1の影響)

渡 邊 知 佳 子

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

リンパ球はリンパ組織と体循環の間に常に循環しているが、腸管へのリンパ球migrationの制御機構に関して、特に炎症時に接着分子が血管のどの部位で発現亢進し、リンパ球のリクルートにどのように関与するかの情報は極めて少ない。また、大腸と小腸は生理的機能も腸内環境も異なるが、両部位でのリンパ球migrationの差異を直接比較した成績はこれまでにみられない。炎症性サイトカインTNF $\alpha$ は、炎症性腸疾患での産生亢進が報告され、それをターゲットとした抗TNF $\alpha$ 抗体療法の臨床的有効性が注目されている。そこで本研究ではTNF $\alpha$ が腸粘膜微小血管のリンパ球の接着にどのように影響を与えるかにつき、大腸と小腸での差異や接着分子発現部位やその関与に着目し検討を行った。

実験にはBalb/cマウスを用い、脾臓および小腸粘膜固有層よりT細胞を分離した。リンパ球を蛍光色素CEDSEで標識後にマウスに投与し、大腸および小腸の微小血管への接着の動的過程を生体顕微鏡で直接観察した。またTNF $\alpha$ を投与し接着分子の腸粘膜での発現を免疫組織学的に検討するとともに、特異的中和抗体を用いて腸管炎症時のリンパ球接着に対する接着分子の関与を検討した。

その結果、TNF $\alpha$ 未投与マウスでは、脾臓よりのT細胞 (SPL) の大腸粘膜への接着はほとんど観られず、小腸粘膜固有層よりのT細胞 (LPL) の接着はわずかにみられた。TNF $\alpha$ 投与により、両者とも大腸粘膜微小血管への接着数が増加した。さらに、小腸においても大腸と同様の傾向がみられたが、TNF $\alpha$ によるLPLの接着増加の割合は大腸で有意に大きく、SPLの増加は小腸の方で著明に認められた。これらの大腸微小血管へのリンパ球の接着は、 $\alpha 4$ 、 $\beta 7$  integrin、MAdCAM-1、VCAM-1の中和抗体で抑制されたが、抗ICAM-1抗体では抑制はみられなかった。また、TNF $\alpha$ 投与により、MAdCAM-1は大腸の主に粘膜固有層の微小血管に、VCAM-1は主に粘膜下層の血管に発現が誘導されることが組織学的にみられた。MAdCAM-1の発現の亢進は大腸で強く、VCAM-1発現増加は大腸小腸ともに著明であった。FACSによる解析では、LPLではSPLに比べ $\beta 7$  integrinの発現が強く、L-selectinの発現が低下していた。

以上より、TNF $\alpha$ により惹起された大腸微小血管とTリンパ球相互作用に、MAdCAM-1とVCAM-1の両者が関与していることが示唆された。またTNF $\alpha$ 刺激下でのリンパ球接着増強の程度は小腸と大腸で異なり、それはリンパ球および腸管での接着分子発現の差によると考えられた。さらに免疫組織学的検討では、MAdCAM-1は大腸粘膜固有層、VCAM-1は粘膜下層の微小血管に主に発現増強が観察され、炎症時に、それらが相加的にリンパ球接着に関与していることが示唆された。

リンパ球の腸管へのmigrationの制御機構に関して接着分子の関与が想定されているが、大腸へのリンパ球のリクルートに接着分子がどの様に関与しているのかについての情報は極めて少ない。本研究では炎症性サイトカインTNF $\alpha$ が、腸粘膜微小血管のTリンパ球の接着にどのように影響を与えるかについて、大腸と小腸での差異にも着目し生体顕微鏡下に検討を行った。腸管粘膜固有層 (LPL) と脾臓のTリンパ球 (SPL) は、ともにTNF $\alpha$ の投与により大腸粘膜への接着数が増加する様子が観察された。血管内皮接着分子MAdCAM-1とVCAM-1の中和抗体処理でリンパ球接着数が減少することによりそれらの関与が示唆され、リンパ球表面のflow cytometry解析により対応リガンド $\alpha 4 \beta 7$ 、 $\alpha 4 \beta 1$ -integrinの発現が見られた。免疫組織学的には血管内皮接着分子間で発現部位の空間的多様性がみられ、発現増加の割合に大腸・小腸間で差異がみられた。

審査ではLPLとSPLの純度について質問があった。またLPLのflow cytometryの結果について $\beta 7$ -integrinでみられる2峰性の意味が問われた。著者は腸管粘膜の情報をメモリーしているLPLは、脾臓由来の比較的ナイーブなSPLに比べ、活性化していることが $\beta 7$ -highとlowの2峰性につながっているのではないかと回答した。また、接着分子の発現とリンパ球の接着部位について質問があり、MAdCAM-1は粘膜固有層に発現が観察され、VCAM-1が粘膜下層に発現し、実際にリンパ球との接着が観察されたと説明した。それに対し、組織学的にVCAM-1は発現血管の径が太く、固有筋層での発現が見ている可能性があるとの助言がなされた。さらに、TNF $\alpha$ 投与条件で、抗ICAM-1抗体での中和がリンパ球の接着を抑制しないという結果、さらにSPLの方がLPLより早期に接着数が定常状態になっている結果について、他臓器での接着分子発現亢進を介したリンパ球の接着増加と、それに呼応する大腸へrecirculateするリンパ球数の影響を考慮すべきではないかと助言があった。また、リンパ球のmigrationに関して、これら接着分子の検討の他にchemokine面から検討をさらに追加すべきとの指摘があった。

以上、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、in vivoでマウス大腸粘膜微小血管におけるTリンパ球-内皮間相互作用を初めて生体観察し、TNF $\alpha$ で刺激した大腸粘膜でMAdCAM-1とVCAM-1が相加的にリンパ球接着に関与していることを示したという点で炎症性腸疾患の発生機序を考える上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 石井 裕正  
外科学 北島 政樹 医化学 末松 誠  
微生物学 石川 博通 微生物学 小安 重夫  
学力確認担当者：  
審査委員長：北島 政樹

試問日：平成15年2月18日

# 卵巣癌腹膜播種形成におけるMUC1ムチン分子の役割

玉 田 裕

## 内容の要旨

[背景] 卵巣癌は明らかな初期症状もなく、またその解剖学的位置関係より早期発見が困難であることから、他の婦人科癌より予後が不良である。さらに卵巣癌には様々な組織型が存在し、組織型ごとに異なる臨床的特性を有するため画一的な治療法では予後の改善は望めない。

一方、MUC1分子は膜貫通領域を有するムチン分子の1つであり、アミノ酸残基20個の繰り返し構造 (tandem repeat) を有している。卵巣癌の発生源は大部分が表層上皮細胞にあるといわれており、その正常細胞にはMUC1ムチンの発現は認められないが、癌化によってその発現が上昇することが知られていることから、本研究では卵巣癌におけるMUC1ムチンの生物学的機能・役割の解析を行うことを目的とした。

[方法] (1) 17種類の卵巣癌細胞株 (明細胞腺癌5株、粘液性腺癌6株、漿液性腺癌6株) におけるムチン遺伝子 (MUC1, MUC2, MUC3, MUC5AC, MUC5B, MUC6) の発現をRT-PCR法にて検討した。(2) 卵巣明細胞腺癌ES-2株にMUC1 cDNA (tandem repeat22回と42回の2種類) の遺伝子導入株を作製し、①*in vitro*増殖能、ヌードマウス皮下造腫瘍能、②患者の同意を得て手術時に採取した大網より調整した腹膜中皮細胞との接着能、③ヌードマウスでの腹膜播種能につき各々検討した。(3) 腹膜中皮細胞表面に発現する分子をflow cytometerにて解析した。

[結果] (1) 明細胞腺癌5株はMUC1以外のムチン遺伝子の発現を認めなかったが、粘液性腺癌株では多様なムチン遺伝子の発現を認めた。漿液性腺癌株ではMUC1、MUC2の発現のみがみられた。(2) シアル酸修飾されたMUC1 tandem repeatを認識するMY.1E12抗体を用いて各遺伝子導入株におけるMUC1ムチンの発現を確認した。①MUC1遺伝子を導入することによって、*in vitro*における増殖能に変化は認められなかったが、ヌードマウス皮下造腫瘍能は有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。②遺伝子導入株では腹膜中皮細胞への接着能が有意に低下した ( $p < 0.05$ )。この接着阻害効果はMUC1のtandem repeat数が多いほど増大した。③遺伝子導入株ではヌードマウスにおける腹膜播種の程度は軽度であった。(3) 腹膜中皮細胞表面にはシアル酸やヘパラン硫酸など陰性電荷を有する分子の発現が高度に認められた。

[結論] ムチン遺伝子の発現には組織型ごとに特色があり、明細胞腺癌株ではMUC1のみが発現していた。MUC1ムチンの発現は、ヌードマウス皮下造腫瘍能に対しては促進的に作用するが、腹膜播種に対してはむしろ抑制的に作用することを見いだした。また、MUC1のtandem repeat数が増えるほど抑制効果は増強した。この抑制効果は腹膜中皮細胞表面がシアル酸やヘパラン硫酸などによって高度に陰性電荷を帯びているため、MUC1上のシアル酸による陰性電荷との間に生じる反発効果によるものと考えられた。

## 論文審査の要旨

近年、ムチン分子は様々な癌でその発現が予後と相関することが報告されている。卵巣においても癌化に伴いMUC1ムチンの発現の上昇が報告されていることから、MUC1ムチンの卵巣癌における役割を解析することは、臨床上の治療効果などを予測する上で有用性が高いと考えられた。一方、多様な組織型が存在することが卵巣癌の特色の1つであり、進行様式や予後などが組織型によって異なっている。そこで、本研究ではまず異なる組織型由来の17種類の卵巣癌細胞株 (明細胞腺癌5株、粘液性腺癌6株、漿液性腺癌6株) を用いて6種類のムチン遺伝子の発現がRT-PCR法にて検討された。その結果、明細胞腺癌株ではMUC1のみが発現することから本組織型に着目し、明細胞腺癌株ES-2を用いてMUC1 cDNA (tandem repeat 22回と42回の2種類) の遺伝子導入株が作製された。これらの細胞を用いた実験から、MUC1ムチンの発現はヌードマウス皮下造腫瘍能に対しては促進的に作用するが、腹膜播種に対しては抑制的に作用すること、MUC1ムチンのtandem repeat数が増えるほど腹膜播種抑制効果は増強することが明らかにされた。この腹膜播種抑制効果は、腹膜中皮細胞表面がシアル酸やヘパラン硫酸などによって高度に陰性電荷を帯びているため、MUC1ムチン上のシアル酸による陰性電荷との間に生じる反発効果によるものと考えられた。

審査ではまず、MUC1を遺伝子導入することで他分子の発現の変化がみられたかという質問に対し、各種接着分子や糖鎖抗原の発現程度には明らかな変化はみられなかったと回答された。次に、腹膜播種に関わる分子であるCD44とヒアルロン酸がES-2株に発現しているのか、またこれらの分子にMUC1 cDNAの導入がどのような影響を及ぼすのかとの質問に対しては、ES-2株は両分子とも高発現しており、MUC1ムチンはそれ自体が巨大な分子であるためこれらの分子をマスクし、両分子の接着に関与する機能を阻害している可能性があると考えている旨が述べられた。最後に、腹膜播種抑制効果の機序として陰性電荷について考察しているが接着実験においてシアリダーゼ処理を行っているのか、陽性電荷を与えたら接着抑制効果はなくなるのかとの質問に対し、論文には示していないが、MUC1遺伝子導入株をシアリダーゼ処理すると腹膜中皮細胞に対する接着数が増加したことが回答され、さらに陽性電荷を付与する実験は行われていないが、MY.1E12抗体 (抗MUC1抗体) をMUC1遺伝子導入株に結合させても接着数が増加するデータが得られていることが示された。

以上のように、本研究はいくつかの検討課題が残されているものの、卵巣癌におけるMUC1ムチンの役割を検討する過程で腹膜播種の機序の一端を解明できたことが高く評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 野澤 志朗  
病理学 岡田 保典 産婦人科学 吉村 泰典  
病理学 坂元 享宇 先端医科学 河上 裕

学力確認担当者:

審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成15年3月4日

# Effect of Post-Ischemic Hypothermia on Spinal Cord Damage induced by Transient Ischemic Insult in Rabbits.

(ウサギにおける一過性脊髄虚血に対する虚血後低体温の脊髄保護効果についての実験的検討)

堤 浩 二

## 内容の要旨

### 1. 緒言

胸部下行や胸腹部大動脈の手術においては、合併症として術中の脊髄虚血による対麻痺の発生が知られている。本研究では、虚血に曝された脊髄神経細胞に対する治療として虚血解除後に導入する低体温の神経細胞保護効果について検討した。

### 2. 対象と方法

ウサギを3群に分けた。脊髄への虚血は、左腎静脈直下の腹部大動脈を直腸温37.3℃で15分間遮断して行った。(Group 1) 脊髄への虚血をおこしたのち遮断を解除し7時間直腸温を37.3℃に保った。(Group 2) 脊髄への虚血をおこしたのち遮断を解除し、直ちに冷却を開始し、直腸温を32.5℃まで低下させこれを維持した。遮断解除後6時間経過したところで復温した。(Group 3) 虚血に曝さない対照群。Group 1, 2のウサギは、1週間生存させTarlov's scoreを用いて神経学的評価をおこなった。1週間後犠牲死させ脊髄を摘出した。Group 3のウサギは、侵襲を加えず犠牲死させ、脊髄運動神経細胞数を計測して他の群と比較した。

### 3. 結果

Group 1のTarlov's Scoreの平均値は、実験終了後12時間で4.5点、24時間で1.5点、7日目で0.5点と低下した。Group 2のそれは、実験終了後12時間で4.9点、24時間で4.6点、7日目で4.4点であった。実験終了後24時間以降の平均値は、Group 2が有意に高かった。組織学的にGroup 1では、正常な運動神経細胞は、前角領域にほとんど認められずgliosisが進行していた。Group 2においては、正常な運動神経細胞が前角領域に多数認められた。しかし虚血による変化を伴った運動神経細胞も散見された。Group 1とGroup 2の比較では、Group 2の方が、検索した全範囲で正常な運動神経細胞数が有意に多かった。Group 2とGroup 3の比較では、正常な脊髄運動神経細胞数は、一部の範囲で、Group 3の方がGroup 2に比較して有意に多かった。

### 4. 考察

虚血直後に導入する低体温には、虚血により障害を受けた脊髄運動神経細胞に保護的な効果のあることが示された。しかしその保護効果は、組織学的に評価すると部分的なものである可能性が示唆された。虚血後低体温の神経細胞保護の機序には、主として虚血解除後の過灌流そしてその後におこる低灌流の抑制、興奮性神経伝達物質の放出抑制が考えられる。

### 5. 結論

一過性虚血による脊髄虚血性障害に対して再灌流直後に導入する6時間の全身軽度低体温は、神経学的所見を改善させた。胸部下行大動脈及び胸腹部大動脈手術において大動脈遮断解除後の軽度低体温療法の導入は、術後の脊髄障害を予防する補助手段になりうると考えられた。

## 論文審査の要旨

胸部下行および胸腹部大動脈の手術における合併症として、対麻痺の発生が知られている。これは、術中におこる脊髄虚血によるものである。臨床的にこの合併症が発生すると、手術は成功しても患者の長期予後に多大な影響が出ることが知られている。この合併症を予防するために、さまざまな方法が研究されているが、いまだこの合併症を完全に予防する方法は確立されていない。現段階では、術中の脊髄虚血は、避けられないと考え本研究では、虚血に曝された脊髄神経細胞に対する治療として虚血解除後に導入する低体温の神経細胞保護効果について動物実験により神経学および組織学的に検討した。

虚血後常温群のTarlov's Scoreの平均値は、時間の経過とともに低下したが、虚血後低体温群では、観察期間中ほとんど低下しなかった。実験終了後24時間以降のTarlov's Scoreの平均値は、虚血後低体温群が有意に高かった。組織学的評価では、虚血後常温群では、正常な形態を示す運動神経細胞は、前角領域にほとんど認められずgliosisが進行していた。虚血後低体温群においては、正常な形態を示す運動神経細胞が前角領域に多数認められた。しかし虚血による変化を伴った運動神経細胞も散見された。虚血後常温群と虚血後低体温群との運動神経細胞数の比較では、虚血後低体温群の方が、検索した全範囲で有意に多かった。虚血後低体温群と対照群の比較では、一部で対照群の方が低体温群に比較して有意に多かった。

以上のような研究成績において新知見として注目されたのは、虚血直後に導入した全身低体温に神経細胞保護効果を認めたことである。そしてその機序に関して議論がなされた。虚血直後に導入する低体温には、再灌流直後におこる過灌流およびその後におこる低灌流を抑制することが虚血部位への血流を安定化させるのではないかと議論された。神経細胞が脱落した原因として運動神経細胞自体の障害なのか、または脱髄も関与しているのか、更に計測した神経細胞が実際に運動神経細胞かどうか客観性を持たせるために形態学的評価だけでなく表面抗原マーカーを使った免疫組織化学的評価の両面から検討するとより優れた論文になると思われた。本実験と実際の臨床では、虚血の状況や対麻痺の出現するまでの時間に差がある可能性が指摘されたが、実際の臨床では本実験で行ったよりも強い虚血ストレスがかかっている可能性があると考えられた。Tarlov's scoreと病理所見との関係に興味を持たれたが、動物数に限りがあり明らかとならなかった。今後の検討課題とされた。以上のように本研究における、虚血後に導入した低体温に脊髄運動神経細胞保護効果を認めた結果は、興味深くこの領域の研究の進歩に貢献する論文と高く評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 四津 良平  
整形外科学 戸山 芳昭 外科学 河瀬 斌  
内科学 福内 靖男 生理学 岡野 栄之  
学力確認担当者：  
審査委員長：戸山 芳昭

試問日：平成15年3月31日

# Association between diabetic retinopathy and genetic variations in $\alpha 2\beta 1$ integrin, a platelet receptor for collagen.

(血小板コラーゲン受容体 (インテグリン $\alpha 2\beta 1$ ) の遺伝子多型と糖尿病性網膜症の関係)

松原 由美子

## 内容の要旨

血栓形成初期過程における内皮下組織への血小板の粘着反応に関与する血小板コラーゲン受容体、 $\alpha 2\beta 1$  インテグリンの $\alpha 2$  インテグリン遺伝子のイントロン7には制限酵素Bgl IIの認識部位の有無によるBgl II (+) / (-) 遺伝子多型が存在する。エクソン7、8の遺伝子多型と連鎖不均衡にあるこの多型は、 $\alpha 2\beta 1$ の血小板膜発現量がBgl II (+) を有する個体で高いこと、高ずり速度下での $\alpha 2\beta 1$ 依存性のtype Iコラーゲンへの粘着能はBgl II (+) ホモ接合体がBgl II (-) ホモ接合体に比べて高いことが我々や他の研究グループにより明らかにされている。本研究は、この遺伝的要因の臨床的意義を解明するために糖尿病性細小血管症に着目して、血小板の関与が示唆されている糖尿病性網膜症とBgl II (+) / (-) 遺伝子多型の関係をII型糖尿病患者において検討した。

対象は網膜症 (-) の糖尿病患者、108名、網膜症 (+) の糖尿病患者、119名、健常人、169名とし、研究対象者全員から書面によるインフォームドコンセントを得た。糖尿病の診断時の年齢、HbA1C、body mass indexや性、罹病期間は網膜症 (-) と (+) 群での有意差がない対象となるように本研究をデザインした。DNAタイピングは白血球より抽出されたgenomic DNAを用いてPCR-RFLP法 (Bgl II +/-) に行った。糖尿病患者において、網膜症 (+) 群のBgl II (+) -alleleを有する患者の頻度 (69.7%) は網膜症 (-) 群のそれ (55.6%) に比し、有意に高かった ( $p=0.0270$ )。対象を罹病期間10年以上の患者に限った場合、Bgl II (+) -alleleを有する患者の頻度は網膜症 (+) 群で72.4%、網膜症 (-) 群で55.1%とその差はより大きかった ( $p=0.0102$ )。網膜症のオッズ比はBgl II (+) -allele数依存性に高くなった [罹病10年以上の場合、Bgl II (-) / (-) に対するBgl II (+) / (-)、(+ ) / (+)、のオッズ比はそれぞれ1.82 ( $p=0.0580$ )、3.41 ( $p=0.0036$ )]。年齢、性、罹病期間、body mass index、Bgl II (+) / (-) 遺伝子型を独立変数とした多変量解析により、Bgl II (+) -alleleが糖尿病性網膜症の有病率に対する独立した危険因子 ( $p=0.0397$ ) であることが認められた。また、DNAタイピング時点でのHbA1Cや高血圧、高脂血症の有病率は網膜症 (-) 群に比し、網膜症 (+) 群に高く認められたがいずれの群においてもBgl II (+) / (-) 遺伝子型による差は認められなかった。健常人群のBgl II (+) -alleleを有する個体の頻度は65.7%であった。また、他の血小板膜受容体の多型で血栓症との関係が報告されている $\beta 3$ インテグリンのPLA1/A2多型のタイピングを上記患者のうち、網膜症 (+) の患者82名と網膜症 (-) の患者72名に対して施行したが、すべてPLA1/A1型を認めた。

本研究により、Bgl II (+) / (-) 遺伝子多型は糖尿病性網膜症の有病率と関係することが明らかになった。

## 論文審査の要旨

血小板コラーゲン受容体、 $\alpha 2\beta 1$  インテグリンの $\alpha 2$  インテグリン遺伝子にはBgl II (+)/(-)遺伝子多型が存在する。このBgl II (+)を有する個体は、 $\alpha 2\beta 1$ の血小板膜発現量やコラーゲンへの粘着能が高いことが申請者らや他の研究グループにより明らかにされている。本研究は、この遺伝子多型の臨床的意義を解明するために糖尿病性細小血管症に着目して、血小板の関与が示唆されている糖尿病性網膜症とBgl II (+)/(-)遺伝子多型の関係をII型糖尿病患者において検討した。網膜症(+ )の糖尿病患者、119名、網膜症(-)の糖尿病患者、108名、健常人、169名からのDNAの遺伝子型を検討した。糖尿病の診断時の年齢、HbA1C、body mass indexや性、罹病期間は網膜症(-)と(+ )群での有意差がないように本研究をデザインした。糖尿病患者において、網膜症(+ )群のBgl II (+)-alleleを有する患者の頻度は網膜症(-)群のそれに比し、有意に高かった。この多型とHbA1Cや高血圧、高脂血症の有無の関係は認められなかった。さらにこの多型、年齢、性、罹病期間、body mass index、を独立変数とした多変量解析の結果、Bgl II (+)-alleleが糖尿病性網膜症の有病率に対する独立した危険因子であることが認められた。以上よりBgl II (+)/(-)遺伝子多型は糖尿病性網膜症の有病率と関係することが明らかになった。

審査では、本研究はcross-sectional studyと論文には記載されていたが、case-control studyであると指摘された。解析において、Kaplan-Meier法を用いることの有用性、年齢は診断時より検討時のものを対象にすること、多変量解析にはHbA1C、高血圧、高脂血症の有無の追加や遺伝子型にはダミー変数を用いるべきであるなどの指摘を受けた。健常人での多型頻度の検討を行った理由について質問をされたが、これについて糖尿病患者群との多型頻度の違い、すなわちこの多型が糖尿病と関係するかどうかを検討するために行ったと回答された。糖尿病性腎症、網膜症の診断時に高血圧に対する薬物療法や高脂血症の有無、疾患のマネージメントを熟考する重要性、網膜症診断における蛍光眼底写真の有用性などが指摘された。糖尿病性腎症、網膜症の重症度と遺伝子型の関係について質問があり、重症度により遺伝子型の頻度の分布は変わらないと回答された。今後、Bgl II (+)-alleleを有する糖尿病患者における網膜症の治療・予防に抗血小板療法が有効であるという仮説の検証のためには前向き研究、実験研究が必要であるとされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているが糖尿病性網膜症における血小板の関与には遺伝的要因による個体差の存在が認められることを初めて示唆した点において臨床的に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  
内科学 小川 聡 衛生学公衆衛生学 大前 和幸  
眼科学 小口 芳久 内科学 猿田 享男  
学力確認担当者：  
審査委員長：小川 聡

試問日：平成15年4月14日

# Effect of Preinfarction Angina Pectoris on ST-Segment Resolution After Primary Coronary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction.

(急性心筋梗塞に対する経皮的冠血行再建術後のST偏位改善に及ぼす梗塞前狭心症の影響)

高橋 寿由樹

内容の要旨

論文審査の要旨

## 1. 緒言

急性心筋梗塞の再疎通療法により責任冠動脈の良好な血流 (TIMI分類3度;末梢まで遅延なく造影される血流) が得られても、必ずしも心筋組織レベルの再灌流が十分に得られるとは限らず、その主因として微小循環障害が想定される。急性心筋梗塞発症前にしばしば狭心痛を認めることがあり、この梗塞前狭心症の存在は梗塞後左室機能および予後に良好な影響を及ぼすことが過去に報告されている。しかし、梗塞前狭心症の微小循環障害に及ぼす影響に関しては不明であった。本研究では心筋組織再灌流の指標としてST偏位改善率を用い、梗塞前狭心症と微小循環障害との関連を明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

初回急性心筋梗塞にて入院し、発症12時間以内に経皮的冠動脈形成術 (PTCA) によりTIMI-3血流が得られた連続96例を対象とした。非ST上昇型梗塞、PTCA前にすでにTIMI-3血流が回復していた例、脚ブロック例は除外した。PTCA前と再疎通1時間後の心電図12誘導におけるST上昇の合計を比較し、改善率 (% $\Delta$ ST) を計測した。ST改善良好群 (% $\Delta$ ST $\geq$ 50) と不良群 (% $\Delta$ ST $<$ 50) との2群に分け、梗塞前狭心症の有無を含めた患者背景因子、冠動脈造影所見、最大C反応性蛋白 (CRP) 値、院内合併症、左室造影所見などを比較検討した。

## 3. 結果

患者平均年齢は60 $\pm$ 12歳。96例中41例が発症前1週間以内に梗塞前狭心症を有した。平均% $\Delta$ STは58 $\pm$ 37%で、ST改善不良は25例に認められた。単変量解析においてST改善不良は梗塞前狭心症の欠如 ( $p=0.007$ )、前壁梗塞 ( $p=0.002$ )、入院時Killip分類 $>$ 1 ( $p=0.005$ ) と関連した。ST改善不良群では良好群と比べ、最大CRP値は高値で、かつポンプ不全、心室頻拍・心室細動、左室縮が高率に見られた。発症6ヶ月後の左室造影ではST改善不良群において左室駆出率はより低値で、拡張末期容積はより大であった。多変量解析の結果、梗塞前狭心症の欠如 (相対危険度7.3、 $p=0.002$ ) および前壁梗塞 (相対危険度9.1、 $p=0.006$ ) がST改善不良の独立規定因子であった。梗塞前狭心症を有した群ではなかった群に比べ、% $\Delta$ STは高値であった (71 $\pm$ 21 vs. 49 $\pm$ 43%、 $p=0.02$ )。ST上昇の悪化 (% $\Delta$ ST $<$ 0) は梗塞前狭心症を有した群では認められなかったのに対し、梗塞前狭心症がなかった群では13%に認められた。

## 4. 考察

本研究において梗塞前狭心症が心筋梗塞後の微小循環障害に対して保護的な影響をもたらすことが示唆された。その機序として虚血プレコンディショニングによる梗塞サイズの縮小効果に加え、梗塞前狭心症が再灌流障害に対して抑制的に作用した可能性が考えられた。

## 5. 結論

急性期PTCAによりTIMI-3血流が得られた初回急性心筋梗塞において、梗塞前狭心症の存在は再灌流後のST上昇改善と関連した。

急性心筋梗塞において再疎通療法により責任冠動脈の血行が回復したとしても、心筋組織再灌流が十分に得られない場合がある。これはno reflow現象として知られ、微小循環障害が主因である。梗塞前狭心症の存在が梗塞後左室機能や予後に良好な影響を及ぼすことが報告されているが、本研究は梗塞前狭心症が微小循環障害にも好影響を及ぼすとの仮説を立証することを目的とした。初回急性心筋梗塞にて入院し、経皮的冠動脈形成術によりTIMI分類3度の良好な血流が得られた連続96例を対象とした。ST上昇を微小循環障害の指標として用い、入院後のST偏位改善率 (% $\Delta$ ST) によりST改善良好群 (% $\Delta$ ST $\geq$ 50) と不良群 (% $\Delta$ ST $<$ 50) との2群に分けた。患者背景因子では、ST改善良好群に比べ不良群において梗塞前狭心症の欠如、前壁梗塞、入院時Killip分類 $>$ 1が多く認められた。ST改善不良群では梗塞サイズがより大きく、ポンプ不全、致死性不整脈、左室縮などの合併症がより高率に見られ、慢性期左室機能はより低下した。多変量解析の結果、梗塞前狭心症の欠如および前壁梗塞がST改善不良の有意な規定因子であった。梗塞前狭心症を有した群ではなかった群に比べ、% $\Delta$ STは高値であった。さらに経過中のST上昇の悪化は梗塞前狭心症がなかった群のみに認められた。これらの結果より、梗塞前狭心症が心筋梗塞後の微小循環障害に対して保護的な影響をもたらすことが示された。

審査では、まず、ST上昇の総和により心筋虚血の重症度を評価しているが、ST低下の総和も含めて計測した方が良いのではないかと指摘があった。ST低下は、ST上昇の鏡像変化を捉えている可能性があることからSTが上昇した誘導のみで計測したと回答された。この方法が簡便かつ有用な指標であるという欧米での報告があるとされた。実際に本指標が心筋組織灌流を反映することは証明されているかという質問に対し、心筋コントラストエコーなどを用いた他の指標と比較してもよく相関することが示されていると回答された。また、梗塞前狭心症の心筋保護効果の主な機序として虚血プレコンディショニングによる虚血耐性の獲得が想定されるが、これには早期に生じるものと種々の遺伝子、蛋白発現と関連し遅れて生じるものがあり、梗塞前狭心症の時間的考察、すなわち、狭心症の発症時期、頻度などの質的評価がなされるべきではないかという指摘があった。また、側副血行路の程度や発症前の服用薬などに相違はなかったかと問われ、梗塞前狭心症を有した群と無かった群との間で差を認めなかったとされた。TIMI分類とno reflow現象との関連性について説明を求められ、TIMI分類2度の血流しか得られなかった例のほぼ100%でno reflow現象が生じていることが報告されていて、研究対象をTIMI分類3度の血流が得られた症例に限定したとされた。

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、梗塞前狭心症と再疎通療法後の微小循環障害との関連性について明らかにした点は臨床的に有意義であり、虚血・再灌流障害の病態を把握する上で示唆に富む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 臨床麻酔学 武田 純三  
生理学 金子 章道 医化学 末松 誠  
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15年1月20日

# An epidemiological study on the effectiveness of workplace smoking control programs.

(職場における喫煙対策プログラムの効果に関する疫学的研究)

宇 都 宮 啓

## 内容の要旨

本研究においては、わが国における職場の喫煙対策の疫学的な現状を明らかにするとともに、職場の喫煙対策プログラムが従業員の喫煙率に与える効果を評価した。

ある県の非常利健診機関が定期健康診断を実施している約1,500事業所のうち、産業保健担当者を設置している531事業所を対象に、喫煙対策実施状況に関して、郵送自答式で調査を行った。

有効回答を返送してきたのは315事業所（回収率59.3%）であったが、従業員数は男性57,051人、女性19,818名の合計76,869名であった。まず事業所における喫煙対策の実施状況を分析した。次にこのデータと、定期健診時に各自が申告する喫煙状況のデータを連結し、職場のそれぞれの喫煙対策プログラムの有無による喫煙率を算定し、さらにMantel-Haenszel (M-H) 法を用いて、それぞれの対策の有効性を評価した。

その結果、以下のことが明らかになった。

1. 全体の喫煙率は、男性が53.1%、女性が12.1%で、年齢別に見ると男女とも60歳以上でやや低くなっていた。
2. 事業所における喫煙対策の状況を見ると、分煙が67.9%、喫煙時間制限が12.7%で実施されている一方で、何も規制を行っていない事業所が15.6%あった。パンフレットやポスター等による啓発を行っている事業所は40.6%、健診後の事後指導を含め喫煙者の個別指導を行っている事業所は30.2%であった。たばこ販売店や自動販売機を有する事業所は70.5%であった。禁煙講習会の開催、禁煙達成者への表彰、禁煙プログラム支援については、それぞれ実施していない事業所が90%以上であった。これらは他の先進国と比較すると、わが国の職場におけるたばこ対策の取り組みの遅れを表している。
3. M-H法により分析すると、喫煙率低下の効果は、男性では、禁煙プログラム支援により13.9%、分煙や喫煙時間制限により13.1%、女性では、分煙や喫煙時間制限により44.5%、禁煙達成者への表彰により34.6%、禁煙プログラム支援により20.6%、販売規制により20.4%、個別指導により13.4%であることがわかった。
4. 業種間の従業員の属性の違い等によるバイアスを除くため、対象を製造業に限定して同様の分析を行ったところ、喫煙率低下の効果は、男性では、分煙や喫煙時間制限により15.4%、パンフレット等による啓発及び個別指導によりそれぞれ7.7%、女性では、分煙や喫煙時間制限により36.2%、個別指導により19.6%であった。
5. 以上により、特に職場における分煙や喫煙時間制限については男女ともに、個別指導については女性に対し、喫煙率低下に効果があることが示唆された。

## 論文審査の要旨

わが国においては、男性は他の先進国に比べ喫煙率が非常に高く、女性は若年者を中心に喫煙率は増加傾向にあるなど、喫煙対策は喫煙の課題とされている。しかし成人が多く時間を過ごす職場における喫煙対策の状況やその効果については明らかになっていない。そこで本研究においては、わが国の職場における喫煙対策の疫学的な現状を明らかにするとともに、職場の喫煙対策が従業員の喫煙率に与える効果を評価した。

その結果、事業所における喫煙対策は、分煙やパンフレット等による啓発を実施している事業所は40%以上あるものの、喫煙者への禁煙プログラム提供を行っている事業所がわずかしかないなど、米国等の先進国の取り組みに比べてわが国の対策が大きく遅れていることが明らかになった。また、職場の喫煙対策と喫煙率の分析から、職場における分煙や喫煙時間制限等の喫煙規制は男女ともに、喫煙者に対する個別指導は女性に対し、喫煙率を下げる効果があることが示唆された。

審査では、まず、人数が少ない年齢階級を整理することにより、喫煙対策と喫煙率の関連性がもう少しはっきりと出たかもしれない部分があるという指摘があった。また、企業の規模により対策の行われ方が違う可能性があるためその比較が必要であるという指摘があった。個人の健診データや、企業の医療費のデータとリンクさせることにより、一層職場の喫煙対策の効果が評価できるようになるという助言があった。地域による特性や健康調査票の違いによる回答のばらつきはないのかという質問があったが、同一県における同一の健診団体が統一した様式で行った調査なので問題は少ないという回答があった。アンケートについて、健康対策の取り組みに対する事業者の熱意による回答の質の差はないのかという質問があり、1500事業者のうち産業保健担当者を設置している事業者を対象としたのであまり質の差はないと考えられるという回答があった。今後このような調査を行うときは、喫煙本数や本人の禁煙に対する意欲等を調査項目に入れた方が、対策の効果をきめ細かく評価できるといった助言があった。現在の国際的、国内的なたばこ対策の動きについての質問があり、WHOが進めているたばこ対策枠組み条約が本年5月に総会で決議される予定であること、日本ではたばこ生産者や販売者に配慮する立場があり、十分には対策が進んでいないが、少しずつ強化されてきているという回答があった。

以上、本研究についてはさらに改善すべき、あるいは検討すべき点も残されているが、わが国の職場のたばこ対策の現状をはじめて明らかにするとともに、職場において有効性のある対策を示唆しており、価値ある研究と認められた。

論文審査担当者 主査 衛生学公衆衛生学 近藤 健文  
外科学 小林 紘一 衛生学公衆衛生学 大前 和幸  
医療政策・管理学 池上 直己 内科学 小川 聡  
学力確認担当者：北島 政樹、小林 紘一  
審査委員長：小林 紘一

試問日：平成15年2月18日

# Overexpression of Bcl-2 protects human hepatoma cells from Fas-antibody-mediated apoptosis.

(ヒト肝癌細胞におけるFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の効果)

高橋 正彦

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

背景/目的: Fas抗原はアポトーシス誘導シグナルを細胞内へ伝達する細胞表層上の分子として同定され、Fasリガンド (FasL) や抗Fas抗体の刺激によって、Fas発現細胞にアポトーシスを誘導する。一方、*bcl-2*遺伝子は様々なアポトーシス誘導刺激を抑制することが報告されている。本研究は肝癌細胞株におけるFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の効果を検討することを目的とする。

方法: 実験にはヒト培養肝癌細胞株HepG2及びHCC-Tを使用した。細胞表面に存在するFas抗原発現はフローサイトメトリー法で、Bcl-2の発現はウエスタンブロッティング法を用いて検出した。抗Fas抗体およびアンチセンスオリゴヌクレオチド添加後に細胞生存率とアポトーシスの検索を行った。アポトーシスの検出はHoechst 33342による形態学的観察及びTUNEL法で行った。Bcl-2発現によって、HepG2細胞がFas誘導性アポトーシスに抵抗性となるかどうかを調べるために、HepG2を*Lac-Z*と*bcl-2*遺伝子が同時に発現するレトロウイルスベクターLZBCに感染させた。さらにHepG2でのFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の抑制効果を調べるために、ヒト*bcl-2*遺伝子を発現するプラスミドベクターを作成し、Bcl-2を持続的に発現する細胞株をクローニングした。

結果: ウエスタンブロッティングではHCC-Tに内因性Bcl-2の発現が認められたが、HepG2では検出不能であった。HCC-TはFas誘導性アポトーシスに抵抗性であったがHepG2細胞の33%はFas刺激によってアポトーシスを生じた。HCC-Tは*bcl-2*に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドのトランスフェクションによって、Fasによる刺激なしにアポトーシスを生じたことより、Bcl-2はこの細胞において細胞の生存のために必須の遺伝子であると考えられた。LZBC感染HepG2細胞において、X-galによる染色では10%がβ-ガラクトシダーゼ活性陽性を示した。抗Fas抗体添加によりX-gal陽性細胞の比率は10%から50%へと明らかに増加し、生存細胞のライセートにおけるβ-ガラクトシダーゼ活性も6倍高値を示したことから、Bcl-2を発現する肝癌細胞はFas誘導性アポトーシスに対し抵抗性を示すことが明らかになった。HepG2細胞にBcl-2を遺伝子導入して作成した細胞株Hep-Bclも、Fas誘導性アポトーシスに抵抗性を示した。

結論: Bcl-2の発現により培養肝癌細胞においてFas誘導性アポトーシスは抑制され、ある種の細胞株においてBcl-2は生存に必須であることが示された。ウイルス性肝炎はFas誘導性アポトーシスが関与していることから、Bcl-2の発現は肝炎、肝硬変を母地とする肝癌細胞の発症進展に関与している可能性が示唆された。

*bcl-2*遺伝子産物は、様々なアポトーシス誘導刺激に対して保護作用を示すことが報告されているが、Fas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の抑制効果に関しては、一定の見解は得られていない。C型ウイルス肝炎においてはFas誘導性アポトーシスの関与が報告され、また肝癌はC型慢性肝炎、肝硬変を母地として発生することから、Bcl-2遺伝子を獲得した肝細胞がFas誘導性アポトーシス刺激を回避することによって生存し、癌化要因の1つとなっている可能性が考えられる。本研究で著者は内因性Bcl-2を発現するヒト肝癌細胞株HCC-TはFas誘導性アポトーシスに抵抗性であり、また*bcl-2*遺伝子導入により、ヒト肝癌細胞株HepG2のFas誘導性アポトーシスが抑制されることを示した。ヒトBcl-2 mRNAに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド投与によるBcl-2発現抑制では、HCC-Tに対してFasの刺激なしでアポトーシスを誘導することを示した。

審査では、まずレトロウイルスの誘導効率が低いことが指摘され、実験結果に支障はないものの今後の課題であると回答された。ヒトBcl-2を遺伝子導入したHep-Bcl細胞のBcl-2発現量が低いことが指摘され、また発現の強弱で複数の細胞を選んで実験すべきとの指摘があった。Hep-Bcl細胞の発現量は比較的低値であったがFas誘導性アポトーシスは抑制されており、HepG2ではBcl-2発現量は十分であった可能性があるが、今後HepG2で高発現するプロモーターの選択など改良すべき点があると回答された。また、コントロールには目的遺伝子を含まないプラスミドのみを導入したMOCK細胞が望ましいと指摘された。Bcl-2 mRNAに対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド投与のみでHCC-Tにアポトーシスが誘導されるメカニズムについて質問があった。Bcl-2はミトコンドリアに存在しアポトーシスを抑制しているが、HCC-TにおいてはBcl-2がアポトーシス抑制だけでなく、細胞の生存に必要なミトコンドリア機能も抑制している可能性があるという回答された。今後アポトーシス細胞のミトコンドリア膜電位の低下を調べるべきとの指摘がなされた。次に本研究の臨床応用への展望について質問があった。まず肝癌細胞におけるFas誘導性アポトーシスに対するBcl-2の抑制効果について解析し、その結果をもとにアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるBcl-2発現抑制で肝癌にアポトーシスを誘導できる可能性があるという回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、肝癌細胞株におけるFas誘導性アポトーシスはBcl-2の発現により抑制されることを明らかにし、Bcl-2陽性肝癌においてはBcl-2に対する遺伝子治療の可能性を示した点で肝臓学上有意義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 坂元 亨宇 病理学 岡田 保典  
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15年2月18日

# Significance of transforming growth factor $\beta$ 1 as a new tumor marker for colorectal cancer.

(Transforming Growth Factor- $\beta$ 1の大腸癌に対する腫瘍マーカーとしての有用性)

奈良井 慎

## 内容の要旨

Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) は従来よりがんの発育進展に関与していると考えられている。生体内でTGF- $\beta$ 1の大部分は活性を持たない潜在型として存在しており、この潜在型TGF- $\beta$ 1 (Latent TGF- $\beta$ 1) が活性化して初めて機能すると考えられている。これまでに乳癌、肝細胞癌、胃癌、大腸癌などにおいて血漿中のTGF- $\beta$ 1が増加したという報告がある。しかし、これまでの報告は癌患者血漿中のLatent TGF- $\beta$ 1も含めたTGF- $\beta$ 1総量 (Total TGF- $\beta$ 1) を測定したものであり、実際に腫瘍の生物学的な特性に関与する活性型TGF- $\beta$ 1 (Active TGF- $\beta$ 1) についての報告はない。本研究では大腸癌患者血漿中のActive TGF- $\beta$ 1とTotal TGF- $\beta$ 1の濃度をそれぞれ測定し、それらの腫瘍マーカーとしての意義について検討した。大腸癌患者45例を対象として血漿中のActive TGF- $\beta$ 1濃度と、潜在型TGF- $\beta$ 1を活性化したTotal TGF- $\beta$ 1濃度をELISAを用いて測定した。23名の健常人を対照とした。さらにTotal TGF- $\beta$ 1に対するActive TGF- $\beta$ 1の比率を算出した。血漿中のActive TGF- $\beta$ 1、Total TGF- $\beta$ 1、活性化率は健常人で $9.9 \pm 5.9$  pg/ml、 $11.1 \pm 6.4$  ng/ml、 $0.12 \pm 0.10\%$ 、大腸癌患者で $21.9 \pm 12.8$  pg/ml、 $18.0 \pm 13.0$  ng/ml、 $0.15 \pm 0.09\%$ であり、Active TGF- $\beta$ 1は健常人より有意に高濃度であった ( $p < 0.001$ ; Welch's t-test)。Total TGF- $\beta$ 1も大腸癌患者において健常人より有意に高濃度であった ( $p < 0.01$ ; Welch's t-test)。一方、TGF- $\beta$ 1の活性化率は有意差を認めなかった。Active TGF- $\beta$ 1濃度、Total TGF- $\beta$ 1濃度ともにDukes分類による臨床病期と相関があり ( $p < 0.01$ ; Spearman's rank correlation test)、Active TGF- $\beta$ 1はDukes Aでは健常人と有意差を認めないが、Dukes B以上の進行度では有意に高濃度であった ( $p < 0.01$ , Welch's t-test)。Active TGF- $\beta$ 1濃度は治療切除が施行された症例では術後7日目では健常人のレベルに復した。以上より血漿中の活性型TGF- $\beta$ 1濃度は大腸癌の進行度を反映し、腫瘍マーカーとして有用であると考えられた。

## 論文審査の要旨

Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) は種々の細胞から前駆体バプチド (潜在型TGF- $\beta$ 複合体) として産生され生体内に広く分布し、活性化され初めてその作用を発揮する。また、TGF- $\beta$ 1は癌の増殖、進展および間質形成に重要な役割を担っており、これまでも数種の癌で血漿中のTGF- $\beta$ 1が増加していることが報告されている。本研究では大腸癌患者の血漿中の活性型TGF- $\beta$ 1とTGF- $\beta$ 1総量を測定し、それらの新しい腫瘍マーカーとしての意義を検討した。その結果、活性型TGF- $\beta$ 1とTGF- $\beta$ 1総量ともに大腸癌患者で健常人より有意に高値であった。さらに両者の濃度は大腸癌の進行度を反映し、治療切除後には正常値に復したことから血漿中TGF- $\beta$ 1が腫瘍マーカーとなる可能性が示された。

審査ではまず、大腸癌患者の中でも血漿TGF- $\beta$ 1濃度のばらつきが大きいことが指摘され、濃度が高い群と低い群では病理組織学的に差異が認められるかと問われたが、血漿TGF- $\beta$ 1濃度と組織型、脈管侵襲、浸潤増殖様式の検討で有意な相関は認められなかったと回答された。なお癌先進部の浸潤様式やリンパ球浸潤との関連性も今後の検討課題とされた。TGF- $\beta$ 1値を規定する因子に関しては、壁深達度が最も相関すると答えられた。血漿TGF- $\beta$ 1の由来については、癌細胞のみならず周囲の間質細胞や炎症細胞の可能性があると説明された。それに関連して癌組織と周囲組織など各々の組織のTGF- $\beta$ 1定量の必要性も求められた。いずれにせよ多少のばらつきはあるものの、進行癌において活性型TGF- $\beta$ 1が高値となる症例が多く、その増加の機序についてさらなる検討が求められた。

次にTGF- $\beta$ 1の測定系についての質疑応答があり、とくに腫瘍マーカーの基礎データとして、検体の保存期間による測定値の変化や性差、また測定系の信頼性の検討の必要性が指摘された。

最後にCEAなどの既存の腫瘍マーカーとの相関や有用性の比較についての質疑があった。TGF- $\beta$ 1は癌以外の様々な細胞から産生され、炎症でも増加するので特異性は低いものの、大腸癌術後に血漿TGF- $\beta$ 1濃度が高値である症例は再発率が高く予後が悪いといった報告もあり、術後再発の指標となる可能性があると説明された。今後は術後経過を含めたprospectiveな解析や他の腫瘍マーカーとの比較について検証が必要であると指摘された。

以上のように本研究では今後検討すべき課題は少なからずあるものの、大腸癌患者血漿中の活性型TGF- $\beta$ 1濃度を検討した初の研究であり、TGF- $\beta$ 1の腫瘍マーカーとしての可能性を示した価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
内科学 石井 裕正 病理学 坂元 亨宇  
病理学 岡田 保典 先端医科学 河上 裕  
学力確認担当者：北島 政樹、石井 裕正  
審査委員長：石井 裕正

試問日：平成15年2月8日



# 筋電図における運動単位動員に関する研究

—急性期および慢性期神経原性疾患を対象として—

堀田 富士子

## 内容の要旨

【はじめに】筋電図検査の対象となる神経原性疾患における、いわゆる「運動単位の減少」を神経生理学的に検索することを目的として、これらの患者の一定筋収縮力下での動員運動単位の研究を行った。

【対象と方法】対象は神経原性疾患の確定している男性10名の第一背側骨間筋で、いずれにも筋萎縮があり、徒手筋力検査にて3/5もしくは4/5の筋力低下を認めた。これら被検筋を筋電図検査所見より、活動性神経原性変化期とみなされる急性期群と非活動期症例群である慢性期群の2群に分けた。対照群は健康男性5名の利き手の同筋とした。

被検者は椅子座位をとり、目的筋側の upper arm を前腕回内位・示指を橈尺側外転中間位にて机の上に保持し、筋張力計にて第一背側骨間筋の収縮力を測定した。次に同筋に同心型針電極を刺入し、張力をモニターしながら50gf・150gf・300gfの等尺性収縮を5～10回ずつ行わせた。筋電計にはDantec社製Key point™を用い、データ収集・解析にはmulti MUP analysis (MMA) プログラムを使用した。

【結果】いずれの収縮力においても急性期および慢性期疾患群では健康者群と比較して動員運動単位数は50gfの時健康者群は $2.75 \pm 1.48$ 個、急性期群 $1.52 \pm 0.66$ 個、慢性期群 $1.25 \pm 0.56$ 個、150gfではそれぞれ $4.63 \pm 1.29$ 個、 $2.49 \pm 0.98$ 個、 $2.15 \pm 0.81$ 個、300gfでは $5.08 \pm 0.89$ 個、 $3.75 \pm 0.21$ 個、 $3.20 \pm 0.69$ 個で有意に少なかった ( $P < 0.01$ )。振幅・持続時間は50gf・150gf・300gfいずれにおいても有意差はなかったが、慢性期群との比較では有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。振幅、持続時間および動員運動単位数を健康者の平均値 $\pm 2SD$ を正常域として設定し、疾患群の症例から得られた個々のデータがどの程度の割合で正常域から逸脱するかを検討すると、急性期群では振幅・持続時間はデータの逸脱数が少なく有意差は得られず、一方運動単位数では150gfの場合50%、300gfの場合67%が異常領域となった。慢性期群では振幅・持続時間は異常域に含まれるデータは6～43%であったが、動員運動単位数は44～65%と高い値を示した。

【考察】筋電図検査において持続時間などの従来の運動単位活動電位パラメータでは健康者群と急性期群の有意差はなく病態像をとらえられなかったが、今回動員運動単位数パラメータの導入により急性期でも神経疾患の存在をとらえることが可能となった。一方、慢性期群では、神経再支配による動員運動単位数のみならず振幅・持続時間でも健康者群との間に有意差が認められた。このように、「力」という概念と動員運動単位数の検索を導入することによって筋電図検査の有用性をより高いものとし、本研究は運動機能障害の診断とリハビリテーション治療に貢献するものと考えられる。

## 論文審査の要旨

臨床筋電図検査では安静時自発電位の有無とともに随意収縮時の運動単位活動電位の波形評価で診断を行っている。神経原性変化では高振幅・長持続時間の波形が認められるとされているが、その病期あるいは評価時の筋収縮力の大きさによって必ずしも出現するものではない。またこの筋収縮力と運動単位活動電位の関係について定量的に示した研究はない。そこで今回は筋電図検査の対象となることの多い神経原性疾患でその病理的本質である、いわゆる「運動単位の減少」を神経生理学的に検索することを目的として、これらの患者に対し一定筋収縮力下で動員運動単位の研究を行った。対象は神経原性疾患の確定している男性10名の第一背側骨間筋で、筋電図検査所見より、活動性神経原性変化期とみなされる急性期群と非活動期症例群である慢性期群の2群に分けて検討を行った。筋電信号の解析にはDantec社製Key point™に標準装備されているmulti MUP analysis (MMA) プログラムを使用した。50gf・150gf・300gfの等尺性収縮にて得られた運動単位活動電位を各群ごとに動員運動単位数とともに振幅・持続時間を評価した。この結果、振幅・持続時間のパラメータでは健康者群と急性期群の有意差はなく病態像をとらえられなかったが、今回導入した動員運動単位数パラメータにより、慢性期群とともに急性期群でも神経疾患の存在をとらえることが可能となった。

審査では解析に使用したmulti MUP analysisのアルゴリズムがオリジナルか否か、またtemplateに対して、自動解析された波形が運動単位活動電位として何%が正しいかなどのアルゴリズムの妥当性についての内容確認の必要性を指摘された。また、もともとの筋力に差がある疾患2群について動員運動単位数に違いがあるのに同じ筋収縮力が可能な理由について質問がなされた。これに対しfiring rateによる筋出力の調整がなされている可能性があるかと回答された。さらに疾患群を2群に分類し急性期・慢性期としているが、これらのことが臨床用語と紛らわしいとの指摘があった。これについて筋電図所見による分類であるとの回答をされた。最後にこれまでの研究報告との違いについて質問されたが、従来、一般筋電図検査も含めて筋出力が最大随意筋収縮力の何%にあたるかという検討方法をとってきたが、今回の研究では筋収縮力を一定にして比較することで動員運動単位数の有意差から運動単位数の減少が推測可能となったと回答された。

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、「力」という概念と動員運動単位数の検索を導入することによって筋電図検査の有用性をより高いものとし、運動機能障害の診断とリハビリテーション治療に貢献するものと評価された。

論文審査担当者 主査 リハビリテーション医学 千野 直一  
整形外科学 戸山 芳昭 内科学 福内 靖男  
生理学 金子 章道 外科学 河瀬 斌  
学力確認担当者: 北島 政樹、戸山 芳昭  
審査委員長: 戸山 芳昭

試問日: 平成15年2月21日

# Cyclooxygenase-2 Expression as a New Marker for Patients with Colorectal Cancer.

(大腸癌におけるCyclooxygenase-2発現の意義 - 肝転移を予測するマーカーとしての可能性 -)

山内 健義

## 内容の要旨

シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase、以下COX) は、アラキドン酸代謝経路における律速酵素であり、現在2種類のアイソザイム (COX-1、COX-2) が確認されている。1990年代初頭、COXの活性を抑制することによって抗炎症作用を発揮する非ステロイド系消炎鎮痛剤の常用者において、大腸癌による死亡率が低下していたという疫学的な検討が報告され、また、COX-2の発現が正常大腸粘膜に比し、ヒト大腸癌組織において有意に高いことが確認され、COX-2と大腸癌との関連が注目された。近年、COX-2が細胞増殖因子、細胞接着因子やアポトーシス等に影響を与えるとの報告もあり、大腸癌の増殖や転移に密接に関与すると考えられるようになった。しかし、明らかな作用機序は解明されておらず、臨床的意義についても未だ明らかにされていない。本研究では、大腸癌組織におけるCOX-2の発現と臨床病理学的な諸因子および肝転移や予後との関連性を検討し、大腸癌におけるCOX-2の臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

慶應義塾大学病院において1990年から1993年までに、根治手術を施行した大腸癌症例232例を対象とした。切除標本の大腸癌組織および正常粘膜のパラフィン包埋ホルマリン固定標本を用いて、免疫組織染色によりCOX-2の発現様式を検討した。

COX-2の発現は大腸癌細胞の細胞質内に顆粒状に染色され、大腸癌組織の71.6% (166/232) に発現していた。COX-2の発現は、組織型 ( $P=0.033$ )、深達度 ( $P=0.016$ ) および臨床病期 ( $P=0.020$ ) と有意に相関を示した。対象症例の24.6% (57/232) に再発がみられ、このうち異時性肝転移は12.5% (29/232) であった。肝転移と原発巣におけるCOX-2の発現には有意な相関が認められ ( $P=0.001$ )、多変量解析により原発巣におけるCOX-2の発現は、異時性肝転移に対する独立した危険因子であることが明らかとなった ( $P=0.045$ )。さらに、COX-2の発現例では、非発現例に比し有意に予後の低下が認められた ( $P=0.002$ )。

本研究の結果、大腸癌組織におけるCOX-2の発現は生物学的悪性度の指標となり、肝転移あるいは予後を予測する腫瘍マーカーとしての臨床的意義が示唆された。さらに、大腸癌の肝転移過程においてCOX-2が何らかの役割を演じている可能性が考えられた。今後の課題として、肝転移機構におけるCOX-2の作用機序を解明し、さらにCOX-2選択的阻害剤を用いた新しい大腸癌治療の可能性について検討する必要があると考えられた。

## 論文審査の要旨

アラキドン酸代謝経路における律速酵素であるcyclooxygenase (COX) には、2種類のアイソザイム (COX-1、COX-2) が同定されているが、このうち誘導型の酵素であるCOX-2の発現と種々の癌との関連性が注目され、これまでに多くの研究が行われてきた。しかしCOX-2の作用機序は未だ解明されておらず、臨床的意義についても明らかにされていない。本研究において大腸癌におけるCOX-2の発現を免疫組織染色法を用いて臨床病理学的に検討した結果、組織型、深達度、臨床病期および異時性肝転移と有意に相関し、とくに異時性肝転移に対しては独立した危険因子であることが明らかとなった。さらにCOX-2の発現例では、非発現例に比し有意に予後の低下が認められた。これらの結果より、大腸癌組織におけるCOX-2の発現は生物学的悪性度の指標となり、肝転移あるいは予後を予測する腫瘍マーカーとしての臨床的意義が示され、大腸癌の肝転移過程においてCOX-2が重要な役割を演じていると考えられた。

審査においては、まず使用した腫瘍組織切片がいかんとして選出されたかとの質問がなされ、腫瘍組織の最深部を含む切片を使用したとの回答がなされた。次に、発現の局在に何らかの特徴がみられたかとの質問がなされ、これに対しては、COX-2の発現例においては腫瘍組織全体が比較的均一に染色され、染色部位に特徴的な局在性等は認められなかったと回答された。また、考察における腫瘍径とCOX-2の発現が相関していたという研究報告の引用に関して意見を求められ、本研究では腫瘍径の大きいものでCOX-2の発現が高頻度である傾向は認められたものの、大小の分け方に統一性が得られず、データの客観性に疑問があったため敢えて示さなかったとの説明がなされた。さらに、臨床病理学的検討においてCOX-2の発現とリンパ節転移との関連に有意差は見られなかったものの、臨床病期と有意に相関すること等からCOX-2の発現とリンパ節転移に何らかの関連があり、これが予後不良因子となる要因ではないかとの指摘も受けた。これに対しては、リンパ節転移の有無に関わらずCOX-2発現例では有意に無再発生率の低下が見られ、COX-2の発現は独立した予後不良因子と考えられたと回答された。一方、本研究においてはCOX-2の発現様式を、染色の強度、範囲にて点数化したものを用いて、発現の有無のみで検討を行っているが、個々の組織における染色の分布程度等にて、より詳細に臨床病理学的検討をする必要があったのではとの指摘がなされた。また、免疫染色の信頼性を示すため、一部の症例においてWestern blotting法にてCOX-2蛋白の発現を確認しているが、これをデータとしてより詳しく本文中に記載すべきではなかったかとの助言がなされた。さらに、本研究ではCOX-2の発現のみに着目しているが、COX-1の発現についても同様に検討する必要があったのではとの指摘もあった。

以上、本研究ではさらに若干の検討を要する点が残されたが、大腸癌におけるCOX-2発現の臨床的意義を明らかにした。とくにCOX-2発現と肝転移との間に密接な関連が示されたことより、大腸癌におけるCOX-2の役割を解明する手がかりとなる有意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 石井 裕正 病理学 坂元 亨字  
病理学 岡田 保典 医化学 末松 誠  
学力確認担当者: 北島 政樹、石井 裕正  
審査委員長: 石井 裕正

試問日: 平成15年2月10日

# In vivo measurement of superoxide in the cerebral cortex during anoxia-reoxygenation and ischemia-reperfusion.

(無酸素負荷・再酸素化時および虚血再灌流時の脳表におけるスーパーオキシド産生のin vivoにおける測定)

山口 啓二

## 内容の要旨

**【目的】** 活性酸素は再灌流障害に重要な役割を果たす。中でもスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) は一連の系として起こる活性酸素生成過程の最初の段階で産生され、かつ代謝されて毒性の高い活性酸素を生じることから、酸化ストレスのよい指標になると考えられる。我々は $O_2^-$ に特異性の高いMCLA (2-methyl-6- (p-methoxyphenyl) -3, 7-dihydroimidazo [1, 2- $\alpha$ ] pyrazin-3-one) 化学発光法を利用し、無酸素負荷・再酸素化および虚血再灌流時の脳表における $O_2^-$ の産生をin vivoで経時的に検討した。

**【対象と方法】** オス成猫33匹を対象とした。全身麻酔下に人工呼吸管理とし、大腿動脈 (血圧測定用) と舌動脈 (生食注入用) にカニコーレを挿入した。虚血負荷動物では、大腿静脈 (脱血用) にカニコーレを挿入し、両側総頸動脈に結紮用チューブを装着した。次に、頭頂頭蓋に石英ガラス頭窓を作成し、MCLAの脳表灌流で得られる化学発光とゼノン光源からの射出光を脳表照射して得られる反射光を、ビームスプリッターと光電子増倍管を備えた生体顕微鏡で同時測定した。(実験1) 無酸素負荷・再酸素化 (n=19)。90秒間100%窒素吸入を行った後、室内気に戻して40分間測定。(実験2) SOD (superoxide dismutase) 投与下の無酸素負荷・再酸素化 (n=6)。SOD脳表灌流下に実験1と同様のプロトコルを施行。(実験3) 虚血再灌流 (n=8)。15分間両側総頸動脈閉塞と脱血による低血圧 (収縮期血圧 $\leq$ 50mmHg) を行った後、再灌流して30分間測定。脳血液含量の変化による光量への影響は以下の式で補正した。(補正発光値の変化) = (化学発光測定値の変化) - k $\times$  (反射光測定値の変化) k値は舌動脈より生食を注入した際の、反射光値の最大変化に対する化学発光値の最大変化の比とした。統計的に負荷 (無酸素、虚血) 中、負荷後の補正発光値を負荷前値と比較した (有意水準はp<0.05)。

**【結果】** (実験1) 発光値は無酸素負荷中に有意に減少し、再酸素化15分、20分後に有意に増加した。(実験2) 発光値は無酸素負荷中に有意に減少したが、再酸素化後の増加は認められなかった。(実験3) 発光値は虚血中に有意に減少し、再灌流20分、25分後に有意に増加した。

**【考察】** MCLA化学発光値は無酸素負荷および虚血中は減少し、再酸素化および再灌流の後に増加した。SODで再酸素化後の発光値の増加が抑制されたことから、発光値の増加は $O_2^-$ の増加を示すと考えられた。SODは細胞内に移行しにくいことから、再酸素化後の $O_2^-$ の増加は主として細胞外で生じると考えられた。

**【結論】** 脳表の $O_2^-$ は無酸素負荷および虚血中は減少し、再酸素化および再灌流の後に増加することが明らかとなった。MCLA化学発光測定は酸化ストレス評価のよい指標になると考えられた。

## 論文審査の要旨

脳虚血再灌流障害におけるスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) の重要性が次第に明らかとなってきているが、in vivoでの連続測定法が確立しておらず、生体内における経時変化の検討は十分にはなされていない。本研究では、MCLA化学発光法を用いて脳表の $O_2^-$ の変化をin vivoで連続的に評価できる実験系を新たに開発し、無酸素負荷・再酸素化時および虚血再灌流時の $O_2^-$ の経時変化を検討した。その結果、脳表の $O_2^-$ レベルは無酸素負荷および虚血中は減少し、再酸素化および再灌流の後、早期に増加することが明らかとなった。

審査では、まずSOD投与群と非投与群で無酸素負荷中の $O_2^-$ 低下の程度に差がある理由について質問がなされた。脳表灌流ではSODは細胞外腔のみに分布し、MCLAは細胞膜にも一部分布することから、両群で発光をもたらす $O_2^-$ の局在が異なる可能性があるためと回答された。また、実際の脳梗塞モデルに近い虚血再灌流実験においてSOD等の薬剤の効果を検討すればより有用な情報が得られるであろうという助言がなされた。次に、発光に対するperoxynitriteの影響について質問がなされた。基礎実験においてNOS阻害剤を投与しても発光値の変化が認められなかったことから追加検討は行わなかったと回答された。これに対し、酸素分圧低下で赤血球などの生体リザーバーからsqueezeされる一酸化窒素 (NO) が無酸素負荷中の $O_2^-$ 低下を来した可能性も考えられるので、今後NO特異的蛍光プローブであるdiaminofluoresceinによる検討などを追加し、 $O_2^-$ 、NO、および両者から生じるperoxynitriteの関係を明らかにしてゆくことが望ましいとの助言がなされた。さらに、発光に対する酸素の影響の検討、失活させたSODやアルブミンの投与などの基礎実験を追加して発光特性を明確にする必要があるという指摘がなされた。次に、脳表での測定が実質内の変化をどの程度反映しているかという質問がなされた。再灌流期の実質内血管での $O_2^-$ 産生が報告されているが、皮質血液含量と血中の光の透過率を考えると皮質深部や白質からの発光の測定値への寄与は僅かであり、このため主として皮質表層までの変化を反映すると考えられると回答された。次に、本研究で用いた頭窓法に関して、測定上問題となりうる、脳表出血の合併、非閉鎖頭窓ゆえの脳圧の問題、脳浮腫によるMCLA灌流不全などの可能性に関して質問がなされた。手術操作とプロトコルの工夫により測定に支障が生じた例は多くなかったと回答された。これに対し、諸問題を生じうる方法ではあるがin vivoでの経時的測定が可能になるという有用性が勝るであろうとの意見がなされた。

以上のように本研究にはさらに検討されるべき課題が多く残されているが、脳表における $O_2^-$ の変化をin vivoで連続的に評価できる測定システムを新たに開発し、無酸素負荷・再酸素化時および虚血再灌流時の $O_2^-$ の経時変化をin vivoでの測定によって明らかにした点で、脳虚血における活性酸素の役割を解明する上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 医化学 末松 誠  
解剖学 仲嶋 一樹 生理学 岡野 栄之  
学術確認担当者: 北島 政樹、河瀬 斌  
審査委員長: 河瀬 斌

試問日: 平成15年2月10日

# マクロファージ由来のnitric oxideによる肝細胞酸化的DNA傷害の検討

渡部 直行

## 内容の要旨

ウイルス、細菌および寄生虫感染などによる慢性的な炎症状態が、宿主の発癌リスクを高めることは多くの研究から明らかであり、肝臓病学の領域においても慢性肝疾患は肝細胞癌の発生母地であることが知られている。Nitric oxide (以下NO) が血管内皮由来の平滑筋弛緩因子として発見され、肝疾患においても血行動態、肝傷害、抗腫瘍活性などの様々な病態生理に関することが明らかになってきた。肝臓に炎症が生じている状態では、NO過剰産生が認められており、これが細胞傷害因子として働き、腫瘍細胞や正常細胞に対して傷害作用を有することが知られている。さらに活性化されたマクロファージは、NOだけでなくO<sub>2</sub>も産生し、その結果放出されたO<sub>2</sub>はNOと反応し短時間でONOOとなり強力な細胞毒性を持つことが報告されている。エンドトキシン血症の時には脾マクロファージは肝に遊走し、肝細胞に対する傷害性因子の一つとなる可能性が考えられる。したがって本研究では、活性化された脾マクロファージを肝細胞と共培養することによってNOの産生、さらに肝細胞に酸化的DNAを生じさせるかどうかについて検討し、脾マクロファージの肝細胞傷害における役割とそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

まず、IFN- $\gamma$  やLPSで刺激した脾マクロファージと肝細胞の共培養により、NOが産生されることが明らかになり、さらに免疫蛍光染色により、ONOOの関与が疑われた。肝細胞の酸化的DNA傷害を見るために8-OHdG/dG比を測定したところコントロールと比較して有意に上昇した。DNA傷害のもう一つのマーカーであるDNA単鎖を見るためにAO染色を行ったところ、生き残った肝細胞内での単鎖DNAの増加を示しており、それはやはりSODやNO阻害薬によって抑制された。次に活性化された脾マクロファージと共培養した後の肝細胞DNA変化における活性酸素の役割を見るために、NOとO<sub>2</sub>両者を産生するSIN-1の効果や、ONOOの効果、およびSIN-1やONOO投与下でのSODの効果につき検討した。SIN-1 (> 1 mM) やONOO (> 100  $\mu$ M) と24時間共培養後、肝細胞の8-OH-dG/dG、肝細胞の単鎖DNA比率は用量依存的に上昇を認めた。以上のことより、もし肝細胞に炎症が続き慢性化した場合には、活性化されたマクロファージやその近傍に存在する肝細胞より放出されるNOおよびONOOが、肝細胞にDNA傷害を引き起こす可能性があり、将来的な発癌にもつながることが示唆された。

## 論文審査の要旨

慢性肝疾患において、肝細胞の壊死-再生のサイクルの亢進と不規則再生が、肝発癌の原因となると考えられている。また肝炎、肝硬変においては活性酸素の過剰産生が認められ、エンドトキシン血症により肝傷害が生じた際には、脾マクロファージが重要な役割を担っている。今回の研究では、IFN- $\gamma$  やLPSで刺激した脾マクロファージより、NOが産生されることが明らかとなり、肝細胞と共培養することによってNOだけでなくO<sub>2</sub>も産生しONOOとなり、産生放出される可能性が免疫蛍光染色により考えられた。さらに、肝細胞の8-OH-dG/dG、単鎖DNA比率の検討によりNOとO<sub>2</sub>の代謝経路の関与が示唆された。これは、NOとO<sub>2</sub>両者を産生するSIN-1や、ONOOを肝細胞に添加、単培養したのちの肝細胞の8-OH-dG/dG、単鎖DNA比率より、いっそう明らかとなった。以上のことより、活性化された脾マクロファージがNOやONOOを産生放出し、肝細胞に酸化的DNAを引き起こす可能性が明らかとなった。

審査においては、まず、肝細胞、脾マクロファージのpurityについて問われ、90%と88%と回答された。また、nitrite, nitrateの抑制実験にて、共培養の系の方が抑制効果が少ない理由について問われ、これは肝細胞からもnitrite, nitrateが相乗相加的に増加しており、抑制が十分にかからなかった可能性があるとして説明された。肝細胞処理、分離過程においてNOの値に影響がでないかについては、影響は少ないであろうと回答された。次に脾マクロファージの臨床的重要性について問われ、エンドトキシン血症により肝傷害が生じた際には、摘脾によって肝傷害がおさえられる可能性があるとして説明された。またこの実験理論上では、発癌を抑える可能性も考えられるも、他のサイトカインの影響やクッパー細胞を始めとする肝臓内の細胞の影響が除外されており、これらの影響を踏まえた上での検討が必要であると説明された。正常肝細胞からのNO産生能につき質問を受け、IFN- $\gamma$  やLPS単独ではNO産生は上昇せず、活性化された脾マクロファージを肝細胞と共培養することによって上昇を認めると回答された。又、肝細胞の酸化的DNA傷害はONOOのみが重要なのか、ヒドロキシラジカルが重要であり、鉄をキレートした際にはどうなるかの質問に関しては、ONOOが重要である証拠が、免疫蛍光染色の形態学的変化では不十分であり、HPLCで定量を測定する必要があったと回答された。今後、肝臓でのNOの役割については、未解決の部分もあり、今回の実験についてもなお検討すべき点が残されているが、エンドトキシン肝傷害における脾マクロファージの役割、及びこれが肝細胞におよぼす影響についてNOの関与を示した本研究は肝臓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 坂元 亨宇 病理学 岡田 保典  
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2月18日

# 新生ラット摘出脳幹-脊髄標本における延髄呼吸中枢に対する橋の影響

伊藤 洋子

## 内容の要旨

新生ラット摘出脳幹-脊髄標本は呼吸性神経活動の産生、末梢への伝達機構、細胞外pH/Pco<sub>2</sub>に対する感受性(化学感受性)を備えた標本である。この標本で橋は延髄呼吸中枢に抑制的に働くことが知られている。この抑制作用は橋腹外側のA5領域からのノルアドレナリン作動性出力に由来すると考えられている。一方、最近の研究で橋背側に存在するノルアドレナリン作動性神経核である青斑核(locus coeruleus; LC)を形成するニューロンの膜電位と発火様式が呼吸活動に同期し、高炭酸ガス性アシドーシスに対して興奮性応答を示すことが明らかにされた。また、LCの薬理的な不活性化は呼吸性神経活動を抑制し、LCが呼吸中枢に興奮性に作用している可能性が示唆された。そこでA5領域からの延髄呼吸中枢への抑制という従来の概念に「化学感受性」と「LCの関与」という考えを加味し、延髄呼吸中枢に与える橋の影響について以下の検討を行った。1) A5領域を形成するニューロン(A5ニューロン)の化学感受性を新生ラット(1~4日齢)の橋横断スライス標本において膜電位感受性色素を用いた化学的測定法と神経活動の細胞外記録法を利用して検討した。2) LCが存在する橋背側にも注意を払った新生ラット(1~4日齢)摘出脳幹-脊髄標本で橋の呼吸中枢への影響を再検討した。また、橋の呼吸中枢への影響が細胞外pH/Pco<sub>2</sub>の変化で修飾される可能性も検討した。さらに生後日齢によって、呼吸中枢に与える橋の影響およびそれが細胞外pH/Pco<sub>2</sub>の変化によって修飾される程度の差異についても検討した。3) 新生児期(1~10日齢)におけるA5領域とLCの経時的な形態学的変化を抗tyrosine hydroxylase抗体を用いた免疫組織化学的手法で検討し、それが延髄呼吸中枢に与える橋の影響とどのように関連しうるのかについて解析した。これらの検討によって以下の結果が得られた。1) 光学的測定法および細胞外記録法で高炭酸ガス性アシドーシスに対するA5領域の興奮性応答を確認した。2) 橋背側に注意を払った標本でも橋の延髄呼吸中枢に対する抑制作用を確認した。また橋の抑制作用は1~2日齢では高炭酸ガス性アシドーシスで増強した。一方、3~4日齢ではその増強効果は消失し、かつ抑制作用自体も1~2日齢に比して減弱していた。3) 生後10日齢までにA5ニューロン数は有意に減少した。一方、LCの体積に変化は認められなかった。これらの結果は、延髄呼吸中枢に対する橋の抑制作用が日齢および細胞外pH/Pco<sub>2</sub>に依存していることを示している。また、この日齢依存性は主にA5領域からの抑制性出力の減弱にともなう同領域とLC間の機能的バランスの変化に基づくものと推察された。

## 論文審査の要旨

新生ラット摘出脳幹-脊髄標本で橋は延髄呼吸中枢に抑制的に働き、この抑制作用は橋腹外側のA5領域からのノルアドレナリン作動性出力によると考えられている。最近の研究で橋背側のノルアドレナリン作動性神経核である青斑核(LC)が化学感受性を介して呼吸調節に関与し、延髄呼吸中枢に興奮性作用をおよぼしている可能性が示唆された。そこでA5領域による延髄呼吸中枢への抑制という従来の概念に「化学感受性」と「LCの関与」を加味して延髄呼吸中枢に与える橋の影響の検討を行った。その結果、新生ラット橋横断スライス標本の膜電位感受性色素を用いた光学的測定法および神経活動の細胞外記録法でA5領域の化学感受性が確認された。またLCが存在する橋背側に注意を払って作成した新生ラット摘出脳幹-脊髄標本においても橋の延髄呼吸中枢に対する作用は抑制的であった。この抑制作用は1~2日齢では高炭酸ガス性アシドーシスで増強したが、3~4日齢ではその増強効果は消失し、かつ抑制作用自体も1~2日齢に比して減弱していた。すなわち延髄呼吸中枢に対する橋の抑制作用は日齢および細胞外pH/Pco<sub>2</sub>に依存していた。抗tyrosine hydroxylase抗体を用いた免疫組織化学法で生後10日齢までにA5ニューロン数は有意に減少したがLCの体積に変化はなかった。したがって、橋の抑制作用の日齢依存性はA5領域からの抑制性出力の減弱に伴う同領域とLC間の機能的バランスの変化に基づくものと推察した。

審査では、A5領域の化学感受性についてLCからのシナプス伝達による可能性があるためA5領域とLCとの連絡を断った状態で検討すべきとの指摘があった。その際、方法論としてA5ニューロンのパッチクランプ法を用いてはどうかとの助言があった。これに対し、スライス標本ではシナプス伝達は極端に減少しているものの残存している可能性は否定できず、灌流液にTTXなどのシナプス伝達遮断物質を加えて検討することを今後の課題としたいと回答した。新生ラット摘出脳幹-脊髄標本における呼吸性神経活動の発火頻度がin vivoに比較して少ないとの指摘があったが、この標本では末梢からの入力が欠如していること、およびin vivoに比較して低温であることが影響していると考えられていると回答した。また、A5領域とLCの神経群が作用する延髄呼吸中枢のアドレノレセプターのサブタイプの同定はなされているのかとの指摘があった。これに対し、本標本に関する以前の研究でα<sub>2</sub>受容体拮抗薬がA5領域からの抑制作用を抑制したことからα<sub>2</sub>受容体が関与していることは明らかであるが、そのサブタイプは同定されていないと回答した。これに対して橋の呼吸中枢への影響の日齢依存性は受容体側の日齢変化による可能性も考えられるので、今後は受容体のサブタイプについても検討すべきとの助言がなされた。

以上、今後検討されるべき課題も指摘されたが、延髄呼吸中枢の機能調節機構の解明に意義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  
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之  
内科学 福内 靖男 外科学 河瀬 斌  
学力確認担当者：北島 政樹、仲嶋 一範  
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成15年3月17日

# Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Promoter/Enhancerを用いた 組織特異的自殺遺伝子治療

内 田 厚

## 内容の要旨

前立腺特異膜抗原（以下PSMA）は前立腺上皮細胞に発現する30kDの膜蛋白で前立腺癌細胞で過剰発現している。現在臨床で広く用いられる前立腺特異抗原（以下PSA）と異なり、PSMAの発現は抗アンドロゲン療法下で減弱せずむしろ増強することから、PSMAは前立腺癌治療の上で魅力的な標的となり得る。著者らは先にPSMA遺伝子の第3イントロン中に正の転写調節活性の存在することを発見した。本研究では、この転写調節領域が前立腺癌細胞中で強力かつ特異的に遺伝子を発現し、自殺遺伝子である大腸菌由来シトシンデアミナーゼ（以下CD）を用いた前立腺癌の遺伝子治療モデルで有用であるかを検討した。

PSMA遺伝子第3イントロンの2kb領域から、異なる長さのDNA断片をPCR法で作製し、ルシフェラーゼ発現プラスミドに組み込んだ。前立腺癌（LNCaP、C4-2細胞）及び、非前立腺癌細胞（MCF-7乳癌細胞、H157肺癌細胞、HCT8結腸癌細胞）に遺伝子導入して、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性を定量した。最大の活性を有する塩基配列をPSMAプロモーターと組み合わせて、CD発現プラスミドに組み込んだ。これを上記の癌細胞株に遺伝子導入し、プロドラッグである5-フルオロシトシン（以下5-FU）に対する感受性を殺細胞試験で定量した。さらに同プラスミドをC4-2細胞に遺伝子導入し、ヌードマウスに皮下移植して（n=16）、600mg/kgの5-FUを21日間腹腔内投与することにより腫瘍縮小効果を観察した。対照として生食投与群を設け、さらに非CD発現プラスミド導入C4-2細胞移植群、親C4-2細胞移植群も同様の条件で観察し、腫瘍重量、宿主動物の血清PSA値、腫瘍組織所見を比較した。

ルシフェラーゼアッセイによる、最大の活性をもつ1.6kb領域をエンハンサー配列として同定した。このエンハンサーはPSMAプロモーターのみと比べて約100倍に転写を増強し、活性は前立腺癌細胞特異的であった。*in vitro*での5-FUの殺細胞効果は前立腺癌細胞へのPSMAプロモーター、エンハンサー転写調節下CD発現プラスミド導入により特異的に生じた。特にC4-2細胞では、10%未満の遺伝子導入効率で50%増殖阻止濃度が300 $\mu$ M以下となり、5-FUの生理的濃度にまで感受性の増強が見られた。ヌードマウスの皮下腫瘍モデルにおいては、同プラスミド導入C4-2細胞移植群に5-FUを腹腔内投与することにより腫瘍が著明に縮小した。

以上から、PSMAエンハンサーが前立腺特異的な遺伝子発現に有用であることを示し、将来の前立腺癌遺伝子治療への応用の可能性を示唆された。

## 論文審査の要旨

内分泌療法抵抗性の前立腺癌に対し新たな治療が模索されているが、遺伝子治療はその有力な候補の一つである。癌に対する遺伝子治療では多くの場合、標的臓器への選択的な遺伝子導入、もしくは選択的な遺伝子発現が望まれる。後者の手段として、組織特異的エンハンサーを用いることが有用である。そこで本研究ではPSMA遺伝子の転写調節領域を探索し、組織特異性、前立腺癌の自殺遺伝子治療への応用の可能性が検討された。

その結果、PSMA遺伝子第3イントロンに見出されたPSMAエンハンサーは、前立腺癌LNCaP細胞とそのアンドロゲン非依存性株であるC4-2細胞で活性を有するが、3つの非前立腺癌細胞では活性を持たないことが示された。また、*in vitro*および*in vivo*において、PSMAエンハンサーの制御下で発現する大腸菌由来シトシンデアミナーゼ（CD）の遺伝子導入により、PSMA発現細胞で5-FUの殺細胞効果が発揮されることが示された。

審査においては、組織特異性を解明するため、より多くの細胞でエンハンサー活性を検討すべきと指摘された。これに対し、免疫組織染色、その他の解析結果によるとPSMAは前立腺に多く発現する一方、十二指腸、腎、唾液腺、脳、癌の新生血管などでも発現が認められることから、PSMAエンハンサーがこれらの組織中で活性を持つかさらに詳細に検討することが今後の課題であると回答された。続いて*in vivo*の実験においては安定遺伝子導入細胞が使われており、臨床的な遺伝子導入の条件との違いが指摘された。これに対し、現状では前立腺癌細胞へのリポソームを用いた一過性遺伝子導入は効率が低いため、アデノウイルスなど他のベクターを試みている事が回答された。

本実験モデルにおける非遺伝子導入細胞に対する殺細胞効果（bystander効果）の有無とその機序について質問があった。これに対し、今回の実験で細胞傷害性が細胞培養液を介して伝播することが証明され、CD遺伝子療法によるbystander効果は細胞間の接着を必要としないという、これまでの報告を裏付ける結果であったと回答された。

また前立腺癌の化学療法における5-FUの意義についての質問があった。概して前立腺癌の抗癌剤に対する感受性は低いが、5-FUの低濃度持続投与は高濃度一過性投与と異なった制癌効果を有することが近年に明らかになり、CD遺伝子治療でも、5-FUの感受性を修飾する方法、すなわち放射線、インターフェロンなどの併用療法により、さらに治療効果の向上を期待できると回答された。

以上のように、本研究ではさらに改善すべき点があるものの、前立腺癌の遺伝子治療においてPSMAエンハンサーを用いた手法が有用な選択肢になることを示した点で意義があると評価された。

論文審査担当者 主査 泌尿器科学 村井 勝  
先端医科学 河上 裕 病理学 坂元 亨宇  
分子生物学 清水 信義 産婦人科学 野澤 志朗  
学力確認担当者：北島 政樹、河上 裕  
審査委員長：河上 裕

試問日：平成15年3月19日

# 機械的圧力負荷によるラット小腸上皮細胞でのIL-6産生についての検討

岸 川 浩

## 内容の要旨

腸管は管腔内圧および腸管運動により生じる物理的圧力に常時さらされているが、物理的圧力負荷に対する腸粘膜上皮細胞の応答に関する情報はあまり知られていない。今回、著者は1) transmural pressureが腸上皮細胞に対しIL-6の産生に及ぼす影響を与えるか、及び2) 圧力負荷に伴い転写因子であるNF- $\kappa$ B、NF-IL-6が及ぼす影響を示しIL-6産生に影響を与えるかをラット回腸上皮細胞(IEC-18)を用いた*in vitro*の実験系において検討した。

密閉した特殊フラスコに不活化ガスであるヘリウムガスを注入した圧力負荷装置にて培養細胞に純粋な静水圧を負荷することのできるモデルを作成した。この装置ではフラスコ内の酸素、二酸化炭素分圧、pHは一定のままで、ヘリウムガス分圧の増加分だけ全体の圧力を増加させることが可能であり、圧による変化だけを検討することができる。IL-6濃度はIL-6依存性に増殖するマウスハイブリドーマ細胞である7TD1 cellを用いたcell proliferation assayにて検討した。腸上皮細胞に40mmHgから160mmHgの圧力負荷を加えたところ、過敏性腸症候群などにおいて生じ得る腸管内圧である80mmHgの圧力負荷において小腸上皮細胞からのIL-6の産生はピークとなった。また、この80mmHgの圧力負荷を12~48時間にわたり負荷したところ、24時間後がピークとなった。IL-6放出の極性を0.4 $\mu$ mの孔を有する半透膜上で細胞を培養して上皮側、基底膜側にてそれぞれの放出を検討したところ、コントロール群では基底膜側に優位に放出され、圧力負荷に伴い上皮側、基底膜側の双方において増加した。80mmHgの圧力負荷におけるIL-6 mRNAの発現をRT-PCR法を用いて検討したところ、6~12時間後に発現が増強した。圧力負荷により転写因子が活性化されるかを核蛋白を抽出し、FITCでラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを用いた電気泳動度シフト法electrophoretic mobility shift assay (EMSA)にて検討したところ、NF- $\kappa$ BおよびNF-IL-6の活性化が認められた。I- $\kappa$ Bのリン酸化はI- $\kappa$ B蛋白の分解のシグナルとなっており、NF- $\kappa$ Bを活性化し他の転写因子とともに標的の遺伝子を活性化するといわれているが、これをwestern blot法にて検討したところ、圧力負荷に伴いI- $\kappa$ Bのリン酸化が生じていた。またこのIL-6の放出がNF- $\kappa$ Bのdecoyで有意に抑制されたことからNF- $\kappa$ Bを介した経路で活性化されている可能性が示唆された。

以上より80mmHgの物理的圧力負荷をピークとして小腸上皮細胞からのIL-6の放出が増加し、NF- $\kappa$ BやNF-IL-6などの転写因子も同時に活性化されることが明らかになった。またこのIL-6放出の増加がNF- $\kappa$ Bを介した経路により活性化されている可能性が示された。IL-6はこれまでにコレラ菌などの感染、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインの投与により腸上皮細胞から産生が増加することが報告されている。しかし、以上の検討から、IL-6はこれらの感染などによる刺激のみならず、生理的条件下あるいはイレウスなどの病態により惹起される腸管内圧の上昇などで生じ得る腸管内圧により腸上皮細胞からの放出が亢進し、腸管の粘膜防御機構に密接にかかわっている可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

要旨 腸管は管腔内圧および腸管運動により生じる物理的圧力に常時さらされている。この腸上皮細胞への圧力の負荷が、炎症性サイトカインであるIL-6の放出に及ぼす影響を与えるかを、小腸培養細胞上皮に不活化ガスであるヘリウムガスを加えて、静水圧を負荷するというモデルを用いて検討した。その結果、80mmHgの圧力負荷において小腸上皮細胞からのIL-6の産生はピークとなった。また、この80mmHgの圧力負荷を12~48時間にわたり負荷したところ24時間後がピークとなった。IL-6放出の極性を検討したところIL-6放出はコントロール群では基底膜側に優位に放出され、圧力負荷に伴い上皮側、基底膜側の双方において増加した。mRNAの発現も3時間後から増強していた。また、NF- $\kappa$ BやNF-IL-6などの転写因子も同時に活性化され、NF- $\kappa$ BのdecoyでIL-6の放出が抑制されたことから、NF- $\kappa$ Bを介した経路により活性化されていることが明らかになった。

審査においてはまず、食物摂取などの生理的な状況下でIL-6の放出が生じ、小腸において影響を与えているのかどうかについての質問があり、80mmHgの圧力負荷は生理的条件下ではスパイク状に出現するものの本研究のように長時間にわたり持続的に生じる可能性は低く、イレウスなどの条件下ではじめて持続的な圧力負荷が生じIL-6が有意に放出されるであろうと答えられた。つぎにIL-6放出の極性を検討した実験に対し質疑がなされた。まず圧力負荷に伴い、なぜ管腔側により有意にIL-6が放出されるのかについては、細胞や刺激の経路によりIL-6放出の極性は異なるが、腸管においては上皮側からのIL-6の放出が隣接する腸上皮細胞に炎症のシグナルを伝え、粘膜防御機構を修飾するという生物学的な意義があると答えられた。また、上皮側および基底膜側に対してどのように圧力が負荷されるのかについては、いずれにも同等に圧力が負荷されていると答えられた。NF- $\kappa$ Bの核内への移行を確認したかについては、免疫組織学的な検討で確認されていると答えられた。イレウスにおけるIL-6の関与についてはどうかとの質問があり、経口的に投与されたIL-6がbacterial translocationを抑制するという報告、またIL-6が過剰な炎症反応を鎮静化する作用があるなどの報告があることからイレウスによる腸粘膜の損傷などに保護的に働く可能性があると答えられた。また、イレウスでは圧力負荷だけでなく静脈系のうっ血や腸内細菌の異常増殖など、他の因子の関与も考慮すべきであるとの指摘がなされた。

以上、本研究はいくつかの検討すべき課題を残すものの、圧力負荷に伴い小腸上皮細胞からIL-6の放出が増加することを証明し、物理的な刺激が腸管においてサイトカイン放出をきたす可能性があることを示した点で消化器病学上、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 祐正  
外科学 北島 政樹 医化学 末松 誠  
解剖学 相磯 貞和 微生物学 石川 博通  
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15年2月26日

# 油圧式アームと歯型による固定装置を使った定位放射線治療システムの構築

北村 正幸

## 内容の要旨

非侵襲的な定位放射線照射の精度向上のため、歯型と油圧アームを使った着脱式頭部固定システムを独自開発した。併せてシステムの再現性評価のため、頭蓋内の骨性基準点を使った定期的CT撮影による精度測定を行ったので、その結果について報告する。

ガンマナイフに代表される定位放射線照射は、放射線を頭蓋内小病変に集束させて病変のみを破壊する手法である。高精度のリニアック装置でも同様のことが可能なので、慶應大学では独自の方法で高精度な位置決めを可能にしたリニアック定位放射線照射を採用している。

ガンマナイフでは1回照射法が原則であるが、リニアック定位放射線照射では病変周囲の正常組織障害を軽減する目的で放射線生物学的に有利な分割照射法が可能である。しかし、分割照射法では治療期間が数週間に及ぶため従来のフレームのネジ固定は患者負担が大きいため、非侵襲的でありながら高再現性の新たな固定法の開発が必要となった。

我々は、患者個人の歯型からアクリル樹脂歯型を作成した。歯型を上顎に装着した後、レクセルベースフレームを取り付け、さらに左右から自在位置で固定できる油圧アームを使って固定した。この場合、患者は頭部を専用枕上の安定した位置に置き、その安定位置に合わせて頭部固定を行ってから位置決め器具を装着するので患者頭部の負担は少ない。また、レクセルフレームを利用することができるので、我々の位置決めシステムの利点を活かすことができ、容易かつ短時間に位置合わせが可能となった。

分割照射で最重要である位置的再現性の精度測定には軟部組織である腫瘍病変より頭蓋内にある骨性基準点を採用することが望ましいと考え、両側耳小骨と鶏冠頂点を基準点としたCT画像による精度測定法を考案した。

初めに測定法の評価として模擬ターゲットを使ってリニアック装置に関連した位置測定精度と位置合わせ精度を測定したが、位置測定精度はX線撮影では約0.1mm、CT撮影では約0.8mmであった。位置合わせ精度は0.3mm以下であった。

次に7名の分割定位放射線治療において定期的に精度測定CT撮影を行った。両側耳小骨と鶏冠の頂点を位置の変動の基準点とし、合計26回のCT撮影を行った。治療計画時の初回CT撮影での耳小骨と鶏冠頂点のx, y, z座標値を基準とすると、以後のCT撮影における座標値の変動は、平均1mm未満、標準偏差2mm未満であった。距離の変動と標準偏差はいずれも2mm未満であった。基準点重心の移動、頭蓋の回転角度は平均でそれぞれ、約0.7mm、1.0度であった。

このCT撮影による測定法の精度を確認する目的で、骨性構造内であり変動がほとんど無いと考えられる両側耳小骨と鶏冠頂点の3基準点間距離を計測した。その結果、各基準点間距離の変動は平均0.5mm未満、標準偏差は1mm未満であった。

以上より、頭蓋内骨構造を基準点とした位置精度測定法は、再現性測定法として有用であり、アクリル樹脂歯型と油圧アームを使った頭部固定システムの再現性は定位放射線治療として許容範囲と考えられる。これにより、当初の目標であった分割照射による定位放射線治療のための非侵襲的で高再現性の頭部固定法の開発は達成されたと考えられる。

## 論文審査の要旨

分割照射を用いる定位放射線治療では、治療期間が数週間に及ぶため従来の1回照射法でのネジ固定式に代えて着脱式固定法が求められる。その際の位置的再現性は、治療精度を左右する。再現性を高めるためにアクリル樹脂歯型を作製し、自在位置で固定できる油圧アームを使って患者に安楽な頭部位置を保ったまま全体を固定することができるフレキシブルな固定法を開発した。当科で以前より用いている光学的な位置合わせ方法と組み合わせることでより簡便かつ短時間に高精度の位置決めが可能となった。固定精度評価のために、基礎的精度として模擬ターゲットを用いた位置決め精度を測定した。さらに着脱式固定法の再現性を調べるために初回CTを基準にして週1回の精度測定CTを行った。この時、位置変動の基準に腫瘍病巣を定点とすることは不安定と考え、頭蓋内の骨性定点として両側耳小骨（キヌタ骨体短脚と中耳壁との接点）と鶏冠上端を採用した。これらは、ほぼ万人に存在し1点に近いCT画像を呈する。各点の初回座標を基準にし、2回目以降の座標の差分を変動とした。座標値の差分を2乗和平方根から変動距離も求めた。座標値の変動は平均1mm未満、標準偏差2mm未満であった。距離の変動と標準偏差はいずれも2mm未満であった。3基準点から重心と平面が求められる。重心移動の平均は約0.7mm、平面の回転角度は約1.0度であった。

審査では、まず、CT撮影回数が一定でないことおよびこの固定法によって治療成績の向上が得られているか、との質問があった。それに対し、CT回数が一定でないのは治療方針から生じた治療期間の長短によるためであること。現在、まだ当科の症例数が少なく正式な報告には至っていないが、本邦で同様の治療法を行っている施設からは、5年制御率90%以上というガンマナイフ等の1回照射法と同等の成績が報告されており、当科の成績もそれに近くなる見込みとの回答がなされた。次に、この分野はやや特殊でわかりにくいので、論文冒頭に座標の機構等の解説部分を少し補うべきとの指摘があった。

また、ユニークな方式によってレクセルフレームのネジ固定による侵襲性に関する問題を負担無く回避できているだろうとの評価があった。座標測定に関しても耳小骨と鶏冠による3次元測定は有効だろうと指摘された。しかし、得られた座標変動の統計的な結果、特に重心や角度について考察や評価がなされていないことが指摘された。

上顎歯列が無い人にこの治療法が困難であることについて、精度を大切にするならば人工歯根（インプラント）を埋没して接続部に使うことも可能ではないかとの指摘があった。

以上より、本研究は上記の点で検討すべき課題がいくつかあるが、定位放射線治療において非侵襲的かつ高精度な固定法を開発した点に関し独創性のあ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 放射線医学 久保 敦司  
外科学 河瀬 斌 耳鼻咽喉科学 小川 郁  
形成外科学 中島 龍夫 内科学 福内 靖男  
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15年3月19日



# 片側慢性腎虚血における腎内血管作動性因子の動態とその役割

徳山 博文

## 内容の要旨

片側腎動脈狭窄による慢性腎虚血は、腎血管性高血圧として認識される病態から、無症状の状態と、幅広い臨床様式を呈する。従来、片側腎動脈狭窄の病態の検討は、Goldblattによる2腎1クリップモデルを用いた研究以来、高血圧の成因に関する研究が中心であり、慢性腎虚血という観点から検討された研究は少ない。腎動脈狭窄による慢性腎虚血は、虚血側腎のみならず非虚血側腎において、アンジオテンシンⅡ（以下、AngⅡと略す）を中心とした血管作動性因子により影響を受けることが推測される。AngⅡ生成の観点からみると、アンジオテンシン変換酵素（以下、ACEと略す）経路および非ACE経路としてのキマーゼの動態の関与の詳細は不明である。一方、腎血行動態の障害に対し、プロスタグランジンE<sub>2</sub>（以下、PGE<sub>2</sub>と略す）およびプロスタグランジンI<sub>2</sub>（以下、PGI<sub>2</sub>と略す）などの血管作動性因子が腎機能保持に関与することが報告されている。虚血側腎において、PG産生経路としてのサイクロオキシゲナーゼ（以下、COXと略す）-1およびCOX-2が腎血行動態およびNa排泄において、それぞれどのような役割を果たしているのか不明である。本研究では慢性腎虚血における血管作動性因子の動態とその役割を検討することを目的とした。

（対象と方法） 雄雑種犬を用い、一側腎虚血の程度が90%狭窄になるように電磁血流計を用い、定量的に慢性腎虚血モデルを作成し、虚血側腎、非虚血側腎におけるAngⅡの役割およびその産生経路を、腎血行動態ならびに生体内ニードル型charge-coupled device（以下、CCDと略す）カメラを用いた腎微小循環の観点から評価した。さらに、PGの腎血行動態に及ぼす役割を選択的COX-2阻害薬および非選択的COX阻害薬を用いて検討し、以下の結果を得た。

（結果と考察）

1. 慢性腎虚血により、虚血側腎のみならず非虚血側腎においても、腎血行動態の障害ならびに尿中Na排泄の障害をもたらした。これらの変化と平行して、組織AngⅡが虚血側腎、非虚血側腎とともに増加を示した。
2. 正常犬では影響しない量のAngⅡ受容体拮抗薬のオルメサルタンは、虚血側腎、非虚血側腎ともに腎血行動態ならびに尿中Na排泄を改善した。さらに、生体内CCDカメラを用いた腎輸入、輸出細動脈の直接的観察により、オルメサルタンによる両側腎の両細動脈の拡張が認められた。
3. 慢性腎虚血により増加した腎組織AngⅡは、虚血側腎ではキマーゼ阻害薬のキモスタチンにより、非虚血側腎ではACE阻害薬のシラザプリラートにより減少した。さらに、キマーゼにより選択的にAngⅡに変換されるAngⅠ基質 [Pro<sup>11</sup>-D-Ala<sup>12</sup>] AngⅠを腎動脈内に投与したところ、虚血側腎ではAngⅡ濃度の上昇と腎血行動態の低下が観察され、この変化はキモスタチンの前投与により著明に抑制された。
4. 慢性腎虚血により腎PG産生が亢進し、COX-1由来のPGは腎血行動態の維持に関与し、COX-2由来のPGはNa排泄およびレニン生成に働くことが推定された。

以上の結果より、片側慢性腎虚血において、虚血側腎、非虚血側腎ともに腎組織レニン-アンジオテンシン系が異なった機序により活性化し、腎機能を障害することが示された。さらに、プロスタグランジン系が腎機能の低下を代償する方向に活性化されるが、一方では、虚血側腎でレニン-アンジオテンシン系の亢進にも関与することが示された。

## 論文審査の要旨

片側腎動脈狭窄による腎血管性高血圧において、狭窄腎および非狭窄腎の血行動態、腎機能、ナトリウム（Na）・水排泄機能およびアンジオテンシン（A）Ⅱやプロスタグランジン（PG）の変化を観察し、片側腎動脈狭窄による慢性腎虚血時の対側腎の代償的变化を明らかにすることを試みた。結果として片側腎動脈の90%狭窄の4週間後、狭窄した虚血側腎のみならず他側腎の血流障害および尿中Na排泄も障害された。組織AⅡは、狭窄腎でも対側腎でもともに増加した。AⅡ受容体拮抗薬の投与により、狭窄腎および対側腎とも腎血流およびNa排泄障害は改善し、糸球体の輸入細動脈・輸出細動脈の直接観察で両腎とも拡張をきたすことが確認された。虚血により増加した狭窄腎の組織AⅡはキマーゼ阻害薬により、対側腎ではA変換酵素阻害薬により減少した。このほか慢性腎虚血により腎PG産生が亢進し、サイクロオキシゲナーゼ（COX）-1由来のPGは腎血行動態の維持に関与し、COX-2由来のPGはNa排泄およびレニン産生に働くことが推定された。

これらの結果から、片側腎動脈狭窄の90%狭窄で、対側腎の代償機構は働かず腎機能は腎組織AⅡの産生亢進により悪化すること、さらに狭窄腎と対側腎とでAⅡの産生機序が異なること、また腎PG系が腎機能の低下を代償する方向に作用すると結論した。

このような研究に対してまず犬を用いて研究した理由、さらに腎動脈狭窄を90%にして虚血の変化をみたこと、次に狭窄後4週間して実験を行ったことに関して質疑があった。犬を用いたのは、実験操作がしやすく、腎動脈に電磁血流計を装着することにより目的とする狭窄度を調節できること、血液・尿等の資料を採取しやすいこと、および犬にはヒトと同様に腎にAⅠからAⅡへの変換に働く酵素であるキマーゼが存在すること等によるとされた。狭窄度を90%としたことに関しては、予備実験で50%や70%の狭窄とした場合の検討、また観察期間に関して4、8、12週間までの検討を行い、50%や70%の狭窄では、他側の血流に全く変化がみられず、90%にした場合に変化を生じることから90%としたとされた。また観察期間では4、8、12週間で大差ないことから4週間を観察期間とし、この期間であると、腎には器質的变化を生じないとされた。ただし、本研究では90%狭窄で他側腎に代償機構がみられていないので、95~99%程度の狭窄実験をするべきであったと付言された。また4週間後の一時点での検討だけでなく、4週後までの経時的な観察もあればよかったと助言された。このほか組織AⅡの役割のほか、PGE<sub>2</sub>とPGI<sub>2</sub>の変化に差があったこと、組織AⅡの増加にも関わらず一酸化窒素の産生が低下するなど降圧系の動きに興味ある変化がみられ、今後一酸化炭素を含めた検討により、病態が解明される可能性があること示唆された。以上のほか、論文のまとめ方に関して検討の余地が残されたが、研究内容は新知見に富み、腎虚血の領域に貢献する優れた論文と高く評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男  
泌尿器科学 村井 勝 医化学 末松 誠  
薬理学 西本 征央 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15年3月18日

# Finite element analysis of the stresses around endosseous implants in various reconstructed mandibular models

(再建下顎においてインプラント周辺に発生する応力に関する構造力学的解析)

永 竿 智 久

## 内容の要旨

腫瘍切除に伴い下顎骨が切除された場合、微小血管吻合手技を利用した遊離腭骨や、その他の自家骨の移植により再建がなされる場合が多い。さらに、咀嚼機能の再建にはインプラントの打ち込みと、義歯の装着が不可欠となる。インプラント周辺部には、咀嚼にあたり大きな応力が発生し、それが過度である場合種々の合併症を惹起しうる。したがって咀嚼時にインプラント周辺に発生する応力に関しては、歯科領域を中心に比較的早期より研究がなされてきた。しかし再建下顎において同様の検討を行った報告例はかつて認められない。再建下顎のインプラント治療にあたり、発生応力を計算することは、骨吸収・感染などの合併症を回避する上で重要な参考となりうるであろうと考え、本研究を施行した。

実験に使用したモデルはヒト乾燥下顎骨および乾燥腭骨標本のCTスライスデータを基本データとし、コンピューター上で作成した3次元モデルを使用した。切除範囲を7パターンに分類し、そのそれぞれが腭骨により置換されたモデルを作成した。

それぞれのモデルについて、両側の臼歯部と犬歯部にインプラントを埋入し、上部構造にてそれらを連結した。インプラントは左右2本ずつ、使用されるものとし、材質はチタニウムを想定した。これらのモデルの右臼歯部に300Nの垂直咬合圧を加えた条件で、インプラント周辺に発生する応力に関して計算を行った。計算には有限要素解析ソフトウェア (ANSYS5.6) を用いた。評価は4本のインプラントのうち、比較的大きな応力の発生する負荷側の2本に関して重点を置いて行った。その結果負荷側臼歯部周辺においては、全てのモデルにおいて最大ひずみ応力はインプラント孔の後外側に生じたが、その大きさについては、負荷側が腭骨で形成されている場合の方が、下顎骨の場合に比較してより大きな値をとる傾向が認められた。次に、負荷側犬歯部については、負荷側が下顎骨で形成されているモデルにおいては最大ひずみ応力は後外側に発生したが、腭骨上にある場合には前内側に発生し、両者の位置はまったく逆であった。これらの結果より次の事項が考察された。

まず、インプラント周辺のひずみ応力の大きさは、骨皮質の構造的相違に起因する骨皮質との接触面積が少なく、より大きな負荷を分担する必要があるほど大きな値をとりやすい。

また、下顎骨は負荷作用時における変形は比較的少ないが、腭骨は皮質骨が薄いので“しなる”ように彎曲する傾向がある。よって、これらの骨の上に存在するインプラントも異なった方向から圧力を受け、最大ひずみ応力も全く別の位置に発生する。

これらのコンピューターシミュレーションの解析結果より、インプラントを再建下顎に埋入するに当たっては、埋入の方向を変化させたり、皮質骨との接触面積を増加させるなど、通常の下顎骨に対するのとは異なる配慮が、合併症の回避のために必要であると考えられた。

## 論文審査の要旨

頭頸部悪性腫瘍切除時に下顎骨下顎骨が合併切除された場合鼻血管吻合手技を利用した自家骨遊離移植による骨再建が必要となる場合が多い。その際咀嚼機能の再建には、チタン製骨接合インプラントの埋入による義歯の装着が必要であるが、インプラント周辺の皮質骨に大きな咬合圧が発生する。そのため症例によっては骨吸収や骨破壊、感染などの合併症をおこす場合がある。

このような合併症を避けるためインプラント周辺のどの部位に、どの程度の咬合圧が発生するかを知る必要がある。歯科領域においては、無歯顎においてインプラント周辺に発生する応力に関する解析的研究が報告されているが、加齢による無歯顎症例で行われており、遊離骨移植による再建下顎は長管骨を移植材料とするため力学的特性は大きく異なってくる。

実験にはヒト乾燥下顎骨および乾燥腭骨標本を用い、CT撮影によるスライスデータを基本とし切除部が腭骨で置換された状態の三次元モデルをコンピューター上で作成した。このモデルに300Nの垂直咬合圧を加えインプラント周囲に生ずる応力を有限要素解析ソフトウェア (ANSYS5.6) で解析した。その結果インプラント周囲のひずみ応力は負荷側が腭骨で形成されている場合のほうが下顎骨で形成された場合より大きな影響を受け、応力を受ける部位も別の位置であることが判明した。これは骨皮質の構造的相違に起因するものと思われるインプラントを再建下顎に埋入する際には皮質骨との接触面積を増加させ、埋入の方向を変化させるなど通常の下顎骨とは異なる配慮があることが判明した。

審査においてはまず、本研究により求められたデータが、臨床成績とどの程度一致するののかについての質問があった。これに対し、インプラント周辺に発生する応力を実際に測定した報告が乏しく、その具体的値を得ることは困難であるが、臨床感染の発端となることの多い部位と、本研究で求めた最大ひずみ応力発生部位は一致するケースが多く、その事実が実験データの正当性を間接的に裏付けていると回答された。

次に、本研究は1個の骨標本より得られたCTデータのみで解析が行われているが、複数の下顎骨標本により、多くの再建下顎モデルを作成し検討がなされるのが望ましいとの意見に対し、下顎の形状は指摘されたとおり個人差が多い。普遍的な結論を得るには多くの個体に関して解析を行うべきであり、今後形状タイプの異なる下顎骨を対象として研究を継続してゆくとの回答があった。さらに、本研究では垂直方向負荷のみをかけているが、水平方向負荷に関して考慮する必要があるのではないかとの間に対し、水平方向負荷も垂直方向負荷と同程度に重要であり、本研究の続編として報告中であるとの回答があった。

本研究で得られたデータは咀嚼機能回復のため行う血管柄付き遊離骨移植による下顎骨再建術の際の合併症軽減のために有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 形成外科学 中島 龍夫  
整形外科学 戸山 芳昭 解剖学 相磯 貞和  
耳鼻咽喉科学 小川 郁 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、戸山 芳昭  
審査委員長: 戸山 芳昭

試問日: 平成15年2月26日

# 全身麻酔と自律神経機能の変化

—心拍変動変化からみた前投薬硫酸アトロピンと揮発性吸入麻酔薬セボフルランの影響—

中 塚 逸 央

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

麻酔前投薬としての硫酸アトロピンと、揮発性麻酔薬の一つであるセボフルランの自律神経系に与える作用を、心拍変動を用いて検討した。特に、セボフルラン麻酔下では、無呼吸にすることによる心拍変動の変化から副交感神経系の評価を行った。

### 対象

循環系、特に心電図異常がなく、全身状態の良好な成人予定手術患者を対象とし、研究1では18名、研究2では7名について検討した。

### 方法

研究1：硫酸アトロピン筋注前と、硫酸アトロピン0.5mgの筋注30分後に安静仰臥位にて100連続の心電図RR間隔を1 msecの精度で記録した。

研究2：麻酔前投薬として、手術室入室90分前にラニチジン150mgを内服投与した。麻酔の導入はチオペンタール4 mg/kgで行い、スキサメトニウム1 mg/kg静注後、気管挿管をした。全身麻酔の維持には亜酸化窒素67%、酸素33%とセボフルラン2%を吸入した。麻酔中は人工呼吸を行い、換気回数を毎分15回とし、終末気道二酸化炭素分圧が30–35mmHgに維持されるよう一回換気量を調節した。

測定は、(1)手術室入室後、安静仰臥位時、(2)気管挿管後15分以上の後、2%セボフルラン吸入中の安定した時、(3)セボフルラン濃度を上げ、平坦脳波が出現した時の3点でそれぞれ50連続のRR間隔を求めた。(2)と(3)では人工呼吸中と安静呼吸位での無呼吸時のものを記録した。

心拍データを最大エントロピー法を用いて周波数解析し、得られたスペクトルより0.04Hzから0.15Hzの領域(LF)、0.15Hzから0.4Hzの領域(HF)を求め、さらに両者の比LF/HFを算出した。

研究1-ではさらに、代表的な時間領域解析法のSDNN (standard deviation of normal to normal RR intervals；心電図RR間隔の標準偏差)とRMSSD (root mean square of successive differences；隣接したRR間隔の差を二乗したものの平均の平方根)を算出した。

### 結果：

研究1：SDNNとRMSSDには硫酸アトロピンの筋注前後で変化はみられなかった。LFは筋注前後で変化はなかったが、HFは有意に低下、LF/HFは有意に増加した。

研究2：LF、HFともに覚醒時と比較して麻酔中には有意に低下した。2%セボフルラン吸入時には無呼吸にしてもLFは変化しなかったが、HFは無呼吸時に低下した。平坦脳波出現時にはLF、HFともに呼吸による差はみられなかった。

### 結論：

前投薬量の硫酸アトロピンにより副交感神経系の抑制が認められたが、その程度はセボフルラン麻酔によるものと比較して小さかった。無呼吸による心拍変動の高周波数成分の低下は、脳波が平坦となる高濃度セボフルラン吸入時にはみられず、これがセボフルランによる副交感神経系の著明な抑制によるものであることが示唆された。

全身麻酔の目的の一つに有害反射の抑制があり、それには麻酔前投薬の硫酸アトロピンや揮発性麻酔薬が用いられる。しかし、これらの薬剤による自律神経系の抑制度を定量化するのは困難であった。本研究では、麻酔前投薬の硫酸アトロピンと揮発性麻酔薬のセボフルランの自律神経系に与える影響を、心拍変動のスペクトル解析を用いて検討した。その結果、硫酸アトロピン0.5mgの筋注により副交感神経活動は有意に抑制されるが、セボフルラン麻酔による抑制と比較すると軽度であることが明らかとなった。また、セボフルラン麻酔により交感、副交感神経両者の抑制が認められた。さらに、セボフルラン2%+亜酸化窒素67%吸入時には副交感神経の反応はまだ維持されるが、脳波が平坦化するような高濃度セボフルラン(3.68%)吸入時には著明に抑制されることが明らかとなった。

審査では、まず心拍変動の変動係数ではなくスペクトル解析を用いた理由を質問された。これに対し、スペクトル解析は短期間のデータの解析に有用であるためと回答された。次に、本研究で用いられた他の薬剤の影響について質問された。これに対し、ラニチジンは自律神経に与える影響はなく、チオペンタール、スキサメトニウムに関しては短時間作用のため影響が少ないと回答された。麻酔による脳幹、脊髄の抑制下での心拍変動による自律神経機能評価の意義について質問され、本方法は中枢のみならず、自律神経反射の系全体の機能を評価することになると回答された。心拍変動の変化と自律神経活動の対応関係について質問され、少なくとも脳波が平坦化するような深麻酔下では心拍変動がノイズレベルとなり自律神経活動も著明に抑制されていると回答された。さらに、臨床応用の際に、ある心拍変動の値に対して投与する薬剤量の対応関係についての質疑があり、現時点ではそのような対応関係はなく、投与後の反応を見て新たに対処するべきと回答された。本研究では3点での測定であったが、麻酔深度による経時的変化も検討が必要であり、また本研究の対象となった手術予定患者の術前診断名と男女比について記載するよう助言がなされた。最後に心拍変動には年齢による変化や日内変動がみられるため、年齢層によるグループ化や日内変動が本方法による自律神経機能評価に与える影響について検討が必要であると指摘がなされた。

以上のように、本研究にはさらに検討されるべき課題を残しているものの、全身麻酔時に用いられる前投薬硫酸アトロピンと揮発性麻酔薬セボフルランの自律神経の抑制度を明らかにし、臨床応用の可能性を示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 臨床麻酔学 武田 純三

内科学 小川 聡 薬理学 西本 征央

外科学 四津 良平 内科学 福内 靖男

学力確認担当者：北島 政樹、小川 聡

審査委員長：小川 聡

試問日：平成15年2月14日

# Repair of full-thickness cartilage defects using liposomal transforming growth factor- $\beta$ 1.

(Transforming growth factor- $\beta$ 1リポソームの関節内注入による関節軟骨修復)

阿 部 智 行

## 内容の要旨

関節軟骨は関節機能維持のため最も重要な組織である。いったん軟骨が損傷されると、その修復は困難とされているが、最近では成長因子を関節内に注入することにより軟骨を修復する試みがある。Transforming growth factor (以下TGF) - $\beta$ 1は*in vitro*で軟骨再生を促進することが示されている成長因子の一つである。しかし、TGF- $\beta$ 1の関節内注入については滑膜炎や軟骨マトリックス代謝障害による悪影響が危惧されており、現在まで軟骨修復を促進したという報告はない。リポソームは封入された薬剤を緩徐に漏出することにより持続的な薬効を与えること、また薬剤の急性毒性を軽減できることなどの特徴がある。本研究では、TGF- $\beta$ 1をリポソームに封入し、家兎全層軟骨欠損モデルの膝関節内に注入することにより軟骨修復を促進できるか否かについて組織学的に検討した。

53羽の日本白色種家兎の膝関節の膝蓋大腿関節面に全層軟骨欠損を作製した。1週後にTGF- $\beta$ 1リポソーム溶液を膝関節内に注入し、3週および12週後に膝関節を摘出した。軟骨欠損部に形成された修復組織を組織学的に観察し、脇谷らのscoringを用いて軟骨修復を評価した。また、修復組織中のglycosaminoglycan (以下GAG)含量を定量した。軟骨マトリックスとして重要なII型コラーゲンについては、免疫染色およびII型プロコラーゲンmRNAに対する*in situ* hybridizationを行った。

3週での観察では、TGF- $\beta$ 1を封入したリポソーム溶液を注入した群の修復組織では対照群に比ベトルイジンブルー染色による異染性が良好な厚い線維軟骨の形成が観察された。脇谷らのscoringにおいても同群は対照群に比ベ有意に低値を示し、良好な修復が得られていた。修復組織のGAG含量も同群は対照群に比ベ有意に高値を示した。また、II型コラーゲンの免疫染色および*in situ* hybridizationの結果から、対照群に比して同群においてII型コラーゲンの蛋白およびmRNAレベルでの発現が亢進していることが示された。しかしながら、TGF- $\beta$ 1封入リポソーム群の軟骨修復における組織学的な優位性は12週後には消失していた。

本研究では、TGF- $\beta$ 1封入リポソーム溶液を注入した群で軟骨修復早期と考えられる3週目に組織学的scoringおよびGAG含量の両者において軟骨修復の促進が認められた。以上の結果は、リポソームを利用した単回の関節内注入によりTGF- $\beta$ 1は軟骨修復をその早期において促進できることが証明された。

## 論文審査の要旨

関節軟骨の損傷は、関節機能を障害し、早期に変形性関節症に至る原因となる。現在、関節軟骨損傷の修復は様々な手法が行われており、その手法の一つに成長因子を関節内に注入することにより軟骨を修復する試みがある。Transforming growth factor (TGF) - $\beta$ 1は*in vitro*で軟骨再生を促進することが示されている成長因子の一つである。しかし、TGF- $\beta$ 1の関節内注入は滑膜炎や軟骨マトリックスの代謝障害による悪影響が危惧されているため関節軟骨の修復について報告がない。リポソームは封入された薬剤を緩徐に漏出することにより持続的な薬効を与えることなどの特徴がある。本研究では、TGF- $\beta$ 1をこのリポソームに封入し、家兎全層軟骨欠損モデルの膝関節内に注入することにより軟骨修復を促進できるか否かについて組織学的に検討した。その結果、モデル作製後早期例において、TGF- $\beta$ 1を封入したリポソーム溶液を注入した群では、対照群に比してglycosaminoglycan (GAG)含量が豊富でかつ軟骨様細胞がその多くを占める厚い線維軟骨の形成が観察された。また、同群の修復組織では対照群に比してII型コラーゲンの蛋白およびmRNAの発現が亢進していることが観察された。しかしながら、モデル作製後長期例において、TGF- $\beta$ 1封入リポソーム群では軟骨修復における組織学的な優位性が消失したことが示された。以上より、TGF- $\beta$ 1の関節内注入は関節軟骨修復の早期において軟骨修復を促進することが明らかとなった。

審査では、まず本実験で関節内注入したTGF- $\beta$ 1の用量が至適用量であるかについて質問された。これに対し、本研究においては予備実験で様々な用量を確認した上で、至適と考えられるTGF- $\beta$ 1の用量を使用したと回答された。また今回の実験におけるTGF- $\beta$ 1による軟骨再生のメカニズムについて質問された。これに対し、今回の実験においてはTGF- $\beta$ 1が未分化間葉系幹細胞を軟骨細胞への分化を促進した可能性が高いと回答された。また修復軟骨に対して圧力を負荷する実験が行われているかと質問された。これに対し、修復軟骨に対して荷重をかけるなどの圧力負荷実験は、軟骨修復の研究の上で検討すべき重要な点であり、今後研究を進めて行きたいと回答された。またモデル作製後長期には対照群に対する優位性が無くなることから、一時的に軟骨修復を促進していただけであり、軟骨修復を得たことにはならないのではと指摘された。これに対し、今回の実験ではTGF- $\beta$ 1が軟骨修復の早期において軟骨修復を促進する効果があることを認めたことに意義があり、さらに長期にわたり軟骨修復を得るには、今後薬剤の工夫などを検討する必要があると回答された。

以上のように、本論文ではさらに検討されるべき課題を残しているものの、TGF- $\beta$ 1の関節内注入によって関節軟骨の修復が促進され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

病理学 岡田 保典 リハビリテーション医学 千野 直一

形成外科学 中島 龍夫 発生・分化生物学 須田 年生

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15年4月2日

# Sialyl Lewis X analog attenuates gastric microcirculatory disturbance and gastric mucosal erosion induced by thermal injury in rats.

(シアリルルイスXアナログがラットにおける熱傷で誘発される胃微小循環障害および胃粘膜病変を抑制する)

石川 秀樹

## 内容の要旨

手術・外傷や熱傷などは、侵襲が直接加わる臓器のみならず遠隔臓器にも障害を及ぼす。中でも胃は典型的な標的臓器のひとつである。われわれは「急性胃粘膜病変は微小循環障害で生じ、その際白血球由来の活性酸素が深く関与する」と報告したが、接着分子の仲立ちによる白血球と血管内皮の相互作用が、この微小循環障害に重要な役割を担うと推察される。Selectinは、rollingと呼ばれる血管内皮上での白血球の作用に関与する接着分子で、selectinのリガンドであるSialyl Lewis X (SLe<sup>x</sup>)を用いて新規に開発されたSLe<sup>x</sup> analog (LX-0104)は、*in vitro*で好中球の接着を抑制する。われわれは「ストレスが誘発する急性胃粘膜病変の形成過程にはselectinが関与する」との仮説をたて、SLe<sup>x</sup> analogを用いてこの仮説を検討した。

Wistar系雄性ラットの剃毛した背部を麻酔下で熱湯に15秒間浸しⅢ度30%の熱傷を負荷するモデルにSLe<sup>x</sup> analogを熱傷後30分前及び2.5時間後に頸静脈から投与し、対照群には生理食塩水を同様に投与した。各種項目の測定は、胃粘膜病変が全てのラットで観察される時相として既にわれわれが報告した熱傷後5時間後に行った。SLe<sup>x</sup> analog群で胃粘膜病変の長径の合計が有意に少なかった。対照群の胃粘膜基底部の細静脈内皮上ではE-selectinが免疫組織化学法で明瞭に染色されたが、SLe<sup>x</sup> analog群と熱傷を負荷しない群では殆ど染色されなかった。循環血液中の白血球に由来する活性酸素値を蛍光化学発光法で測定すると、SLe<sup>x</sup> analog群・対照群とも熱傷後前に比し上昇したが、上昇の程度はSLe<sup>x</sup> analog群で有意に低かった。胃粘膜基底部の微小循環を生体内観察法で検討すると、細静脈内をrollingする白血球の割合と内皮細胞障害の指標であるMonastral blue Bの付着面積は、SLe<sup>x</sup> analog群で有意に減少した。

胃粘膜病変・白血球のrolling・血管内皮細胞障害・白血球由来の活性酸素のいずれもが熱傷後5時間後に増加(悪化)する。SLe<sup>x</sup> analogの投与でこれらすべてが軽減し、同じ時相で細静脈上のE-selectinの発現が増強することから、接着分子selectinがこれら諸因子の熱傷後における変化に深く関与することが明らかとなった。すなわち、「生体への侵襲を契機として生ずる急性胃粘膜障害は、白血球依存性の活性酸素が胃粘膜微小循環障害を引き起こすことで生ずる」とするわれわれの従来からの仮説が、接着分子の関与を確認したことで補完されるに至った。また、SLe<sup>x</sup> analogを用いた接着分子を阻害する新しい治療法は、本モデルにおいては胃粘膜微小循環障害と急性胃粘膜病変の双方を予防でき、その臨床上的有用性が期待された。

## 論文審査の要旨

生体への侵襲で惹起される急性胃粘膜病変では、胃粘膜微小循環障害と白血球由来の活性酸素が深く関与することが過去のわれわれの検討で明らかになっているが、白血球と血管内皮の相互作用による微小循環障害には、接着分子が重要な役割を担うと推察される。本研究では急性胃粘膜病変の形成過程における接着分子selectinの役割を、selectinのリガンドSialyl Lewis X (SLe<sup>x</sup>)から開発されたSLe<sup>x</sup> analog (LX-0104)を用いて検討がなされた。熱湯に浸漬してラット背部皮膚に作成したⅢ度30%熱傷の負荷5時間後では、胃粘膜微小循環における白血球のrolling・白血球由来の活性酸素が増加し、胃粘膜病変・血管内皮細胞障害が悪化した。また、細静脈上のE-selectinの発現も増強した。SLe<sup>x</sup> analogの投与でこれら全てが軽減することから、接着分子selectinが胃粘膜微小循環上の白血球のrollingに関与することで白血球由来の活性酸素が増加し、ひいては急性胃粘膜病変が生ずる機序が明示された。

審査では、本研究で用いたSLe<sup>x</sup> analogの*in vitro*における検討の詳細が問われたが、E、P-selectinへの接着阻害が確認されたこと、IL-1β刺激後のHUVECsでは2,3 SLe<sup>x</sup>と同等に顆粒球の接着を阻害したことなどが示された。白血球のrollingやMonastral blue Bの付着は、熱傷を負荷しない群のデータも示すべきであったとの指摘がなされた。また、opsonin化zymosan刺激で測定した活性酸素値は、熱傷後後に全身血流内の白血球数そのものが増加する事実を踏まえて換算表示すべしとの助言がなされたが、同一ラットにおける熱傷後前の活性酸素値で熱傷後の活性酸素値を除くことで、熱傷に対する個体差を減じて分析したと回答された。さらに、免疫組織染色法ではP-selectinの検討も必要であったと指摘されたが、各selectinが発現するまでの時間を考慮すると、熱傷後5時間後ではE-selectinがより強く関与すると思われた旨の回答がなされた。最後に、臨床応用に向けた本研究の位置づけの説明を求められ、接着分子を阻害する治療法は胃粘膜病変抑制に留まらず、広く全身で白血球依存性の微小循環障害に起因する各種臓器障害を抑制する可能性があるとの回答が、base excessやacidosisが改善する同種のSLe<sup>x</sup> analogのデータを引用してなされた。

以上のように、本研究は胃粘膜病変の形成過程における接着分子selectinの関与をSLe<sup>x</sup> analogを用いて明らかにしたことで有意義であると評価された。なお、生体内観察法を用いて微小循環の観察を行なえる実験施設が世界的に減少傾向にある事実が指摘され、同法を応用して今後さらに研究を進展させるよう助言がなされた。

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  
病理学 岡田 保典 内科学 池田 康夫  
学力確認担当者: 北島 政樹、石井 裕正  
審査委員長: 石井 裕正

試問日: 平成15年4月8日

# Neuropathological investigation of cerebral white matter lesions caused by closed head injury.

(閉鎖性頭部外傷による大脳白質病変の神経病理学的研究)

女 屋 光 基

## 内容の要旨

閉鎖性頭部外傷のうちdiffuse axonal injury (DAI)は、大脳白質の軸索の広範な断裂とされ、その形態学的基盤はretraction ball (RB)であるとされる。著者は、自ら経験した閉鎖性頭部外傷症例について神経病理学的に検討した。

1989年から1997年までの間に剖検例の中で、19歳から84歳まで(平均44歳)の、死因が閉鎖性頭部外傷による男性26例を用いた。

臨床的事項は病院の診療録、画像検査、死体検案調書を参考にした。剖検時に脳をホルマリン固定し、脳梁前部・基底核・内包などを通る前額断で約1cm厚の半球組織を切り出し、Hematoxylin-Eosin (H・E)染色、Kiüver-Barrera (K.B)染色、Holzer染色、Bodian染色、glial fibrillary acidic protein (GFAP)免疫染色を施し、標本を作成した。各々の症例について、大脳深部白質の軸索減少の程度(AD)、髄鞘の淡明化の程度(MP)、gliosisの有無・程度(GL)を判定し、diffuse brain injury (DBI)とfocal brain injury (FBI)の2群に分類した。ADはBodian染色で判定し、正常の(-)から、ほとんど軸索の認められない高度(+++)までの4段階に分類した。同様にMPはK.B染色を用い、髄鞘染色性の正常な(-)から(+++)までの4段階に分類した。Gliosisの判定にはHolzer染色とGFAP染色を用い、gliosisがみられないものを(-)とし、線維性gliosisを形成し緻密化しているものを高度(+++)とする4段階に分類した。

神経病理学的には14例がFBIで、12例がDBIと考えられた。受傷後13日までに死亡した急性期群13例ではMPが高度のものほど軸索の減少は著しかった。慢性期群ではGLとAD、GLとMPの間には一方が高度なほど他方も高度な傾向がそれぞれみられたが、FBIではDBIに比べて三者間の関連性は低かった。病変の程度は、受傷時の外力の強さに比例する傾向があった。RBは、脳梁にDBIで12例中6例、FBIでは14例中4例で認められ、髄鞘淡明化が高度なものほどretraction ballが多数出現していた。RBの出現しているDBI症例はMPも認められた。FBIでも全脳への影響を考慮する必要があった。

また皮質・髄境界部の組織の離開、diffuse vascular injuryなどに関して論述し、それぞれの病変形成メカニズムなどにつき若干の考察を行った。

以上より、DAIとは受傷時に剪断力が優位のとき生じ、RBはDAIに特異的とはいえ、FBIでも全脳への影響を考慮する必要があり、病変の程度はFBIないしDBIといった外傷の型には規定されず、受傷時の外力の強さに比例することが示された。

## 論文審査の要旨

閉鎖性頭部外傷のうちdiffuse axonal injury (DAI)は、大脳白質の軸索の広範な断裂であり、その形態学的基盤はretraction ball (RBs)であるとされる。本研究は、男性26例の閉鎖性頭部外傷を対象として、大脳白質病変を神経病理学的に検討したものである。臨床的事項は診療記録、画像検査、死体検案調書に基づいた。固定脳から脳梁前部・基底核・内包を通る前額断で約1cm厚の半球組織を切り出し、各種染色を行い、大脳深部白質の軸索減少の程度(AD)、髄鞘淡明化の程度(MP)、gliosisの有無・程度(GL)を判定した。対象はdiffuse brain injury (DBI)12例とfocal brain injury (FBI)14例に分けて検討した。急性期群13例では、MPが高度のものほどADが著しかった。慢性期群ではGLとAD、GLとMPの間に相関の傾向を認めた。FBIではDBIに比し三者間の関連性は低かった。病変の程度は受傷時の外力の強さに比例する傾向があった。RBsは、DBIで12例中6例、FBIで14例中4例にいずれも脳梁に認められ、MPが高度のものほどRBsの出現も多かった。FBIでも全脳への影響を考慮する必要があった。また皮髄境界部の組織の離開、diffuse vascular injuryに関して、その病変形成メカニズムにつき考察した。以上より、DAIは受傷時に剪断力が優位のときに生じ、RBsはDBIに特異的とはいえ、FBIでも全脳への影響を考慮する必要があり、病変の程度はDBIやFBIといった外傷の型には規定されず、受傷時の外力の強さに比例することが結論された。

審査では、まずRBsの成因に関して、軸索流の阻害以外に、急性期の脳腫脹によるoligodendrogliaの障害や受傷後の虚血による可能性もあることが指摘された。この点については今後多数例で検討したいと回答された。またβ-APPの軸索障害への特異性に関する指摘がなされた。次いで、皮髄境界部の所見に関し、外傷後の二次的なanoxiaとホルマリン固定によるartifactの可能性につき質問がなされたが、局所の小出血のないこと、所見を認めない例も多くあることから、それらの可能性は否定的であると回答された。第三に、外力の客観的な評価法が明確でないとの指摘がされたが、外傷例であり事故状況から判断せざるをえなかったと説明された。第四にfocal signが目立たない理由についての質問がなされたが、全て意識障害が前景にあり評価しえなかったのではと回答された。最後に、頭部CTによる検討が行われているが、今後は頭部MRI検査を施行することでより詳細な所見が得られるのではとの示唆があった。以上、今後の症例においては、外力の直接的影響だけでなく、外傷後の脳腫脹によるoligodendrogliaの障害に基づく軸索障害や、二次性の虚血性変化も考慮すべきであることが指摘されたが、剖検の難しい症例を多数、大切片を作成、検討し、DAIに関しても基本的な問題を指摘しており、神経病理学的にも臨床的にも有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 精神神経科学 鹿島 晴雄  
外科学 河瀬 斌 解剖学 仲嶋 一範  
法医学 村井 達哉 生理学 岡野 栄之  
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15年4月5日

# 糖質コルチコイド投与時の腎血行動態および脈管作動物質の変化

久保田 英司

## 内容の要旨

糖質コルチコイドは生体内において循環、代謝ならびに免疫などの内部環境の維持に必須のホルモンである。とくに、循環器系の面では、その増加が血圧上昇に働き、逆にその欠乏が血圧低下や昇圧薬に対する反応性低下を生じることが知られている。これまでに、糖質コルチコイドによる全身血管抵抗亢進に関して多くの研究がなされてきたが、腎臓では糖質コルチコイドは血管拡張に作用し、腎血流の増加を起こすことが明らかにされているが、その機序の詳細は明らかでない。このような腎血行動態の変化と関連して、腎機能の低下を認めた症例や動物モデルにおいて、糖質コルチコイドは腎微小循環を介して腎糸球体硬化を進展させ、さらなる腎機能の低下をきたすことも示唆されている。したがって、糖質コルチコイドの腎微小循環に及ぼす作用機序を明らかにすることは、腎血行動態のみならず腎障害の進展機序の解明にも重要と考えられる。

本研究では雑種オス成犬を用いて、デキサメサゾン（以下、DEX）（0.5mg/kg/日）を7日間投与しその前後（対照期および投与期）で腎血行動態ならびに血中・尿中脈管作動物質の変化を検討した。その結果、血圧の上昇と濾過係数の低下を伴う腎血漿流量および糸球体濾過量の増加を認めた。その際、尿中Na排泄の増加・尿中カテコラミン排泄の減少・血漿ANPの増加を認めたが、血漿レニン活性・血漿アンジオテンシン（以下Ang）Ⅱ濃度およびNOx・サイクリックGMP・カリクレインの尿中排泄には変化を認めず、DEXによる腎血行動態の変化への関与は少ないと考えられた。内因性A<sub>2</sub>受容体の関与を検討するために、各期において同受容体拮抗薬を投与したが、いずれにおいても有意な変化を認めなかった。

次に内因性レニン-Ang系の関与を検討するために、各期においてAngⅡ受容体拮抗薬を投与した。その結果、DEXはAngⅡ受容体拮抗薬の全身血圧の降下作用を増強させたが、腎血流増加作用を減弱させ、DEXが腎内AngⅡ作用を抑制することが示唆された。次に腎内レニン-Ang系の抑制がAngⅡ受容体あるいはそれ以後のレベルでの変化に基づくものであるのかを検討するために、外因性AngⅡに対する反応性を評価したところ、腎血管床における外因性AngⅡに対する感受性はむしろ亢進していた。さらに、各期において腎組織内のレニン-Ang系の構成因子を測定したが、DEXは腎組織内Ang変換酵素活性の低下ならびにAngⅡ濃度の低下をもたらした。

以上の結果より、糖質コルチコイドは腎局所でのAng変換酵素活性を抑制する結果、腎組織内AngⅡの産生を低下させ、腎血管拡張をもたらすものと考えられた。この腎局所におけるレニン-Ang系への作用は、従来から報告されている全身循環器系への作用とは異なり、腎局所でのレニン-Ang系が全身循環器系とは別に糖質コルチコイドにより調節を受けていると考えられた。

## 論文審査の要旨

糖質コルチコイドの過剰産生時あるいは過剰投与時には血圧が上昇し、利尿作用が生じることが明らかにされている。その際、全身の末梢血管抵抗は増加しているが、腎臓では糖質コルチコイドが血管拡張に働くと考えられている。しかしその詳細は明らかでないため糖質コルチコイドとしてデキサメサゾン（DX）を正常のオス成犬に投与し、血圧、腎血行動態および諸種脈管作動物質の変化を検討し、利尿促進機序を明らかにすることを試みた。

DX（0.5mg/kg/日）の正常成犬への投与は全身血圧を有意に上昇させ、尿中Na排泄を増加させた。その際腎血漿流量と糸球体濾過率（GFR）は増加し、濾過係数は低下した。諸種脈管作動物質の検討では、尿中カテコラミンの排泄減少と血漿心房性Na利尿ペプチド（ANP）の増加が生じたが、レニン活性（PRA）とアンジオテンシン（A）Ⅱ濃度の変化は有意ではなかった。尿中カリクレイン排泄や一酸化窒素（NO）の代謝物のNOxの排泄およびサイクリックGMPの排泄は有意な変化がみられなかった。しかし、腎組織中のA変換酵素活性は低下し、AⅡ濃度は低下していた。この状態でAⅡ受容体拮抗薬を投与すると、全身血圧は低下し、Na利尿は減少した。

以上の結果から、DXの投与効果は全身循環系と腎臓とで異なり、腎臓では組織中のAⅡ低下と交感神経活性の低下とで腎血管が拡張し、その影響が主となってNa利尿をきたし、ANPの増量に基づく影響は少ないと考えた。

このような研究に対し、まず研究方法で犬の腎臓を表在化して実験を行ったことの影響が懸念された。実験は手術の4週間後に腎機能等が安定していることを確認して行っており問題ないとされた。次に腎血流および腎血管抵抗の測定に関して、本研究では内臓腎動脈内カテーテルで平均血圧を測定し、腎血漿流量とGFRをパラアミノ馬尿酸およびイヌリンクリアランスで求め、総血管抵抗を平均血圧/腎血漿流量から求めた。この方法による測定と血流計等による直接法による測定値との差が問題とされた。当研究者は、予備実験で両者の比較を行って測定法の信頼性を確認した上、腎血漿流量とともにGFRおよび濾過係数を測定することも考え、クリアランス法を用いて実験したと説明された。

Na利尿の機序に関して、DXの投与に伴って尿中カテコラミンの排泄が低下したこと、腎組織中のAⅡ濃度が低下していること、さらにAⅡ受容体拮抗薬の投与でNa利尿に変化をきたさないことから、交感神経活性の低下とAⅡの低下に基づく腎血管の拡張によるものと考え、ANPの増量があっても尿中サイクリックGMPの増量がないことや、NOxの排泄が増量していないので、ANPやNOの関与は少ないとしたが、なお検討の余地が残された。

以上のほか統計処理法に関して再検討する必要があるとされたが、犬を用いてDXによるNa利尿機序をかなり明瞭にしたことで、腎循環の領域への貢献が大きい論文と高く評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男  
泌尿器科学 村井 勝 内科学 小川 聡  
医化学 末松 誠 臨床麻酔学 武田 純三  
学術確認担当者：北島 政樹、村井 勝  
審査委員長：村井 勝

試問日：平成15年4月15日

# Transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene into rat liver abrogates hepatic ischemia-reperfusion injury.

(ラット肝へのインターロイキン1受容体拮抗物質遺伝子導入による虚血再灌流障害の抑制)

原 田 裕 久

## 内容の要旨

【緒言】炎症性サイトカインInterleukin (IL) -1の受容体拮抗物質、IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)の門脈内投与によってラットの肝虚血再灌流障害は抑制される。本研究では、ラット肝へのヒトIL-1Ra遺伝子導入による虚血再灌流障害の抑制効果について検討した。

【材料、方法】ヒト分泌型IL-1RaのcDNAを発現プラスミドベクターにクローニングした。続いてIL-1Ra cDNAを挿入した発現コスミドカセットと親ウイルスゲノムのco-transfectによる相同組換えにて、組換えアデノウイルスを作製した。プラスミドDNAとカチオニックリポソームによるリポフェクション法、あるいは組換えアデノウイルスベクターによるAdex法を用いて、Wistar系雄性ラットに導入ベクターの門脈内注入による遺伝子導入を行った。遺伝子導入24時間後ラットを開腹し、70%部分肝虚血を施行、90分後再灌流した。再灌流180分後に血漿および肝組織標本において、障害程度および炎症性サイトカイン産生の評価を行った。さらに、再灌流後に非虚血肝を部分切除した致死モデルにおいて、IL-1Ra遺伝子導入の7日間生存率への影響を検討した。

【結果】IL-1Ra遺伝子導入後、ラット血中ヒトIL-1Ra濃度は、いずれの導入法においても有意に上昇し、24時間後に最高値を認めた。Adex法における血中最高濃度は、リポフェクション法の約1,000倍に達した。肝虚血再灌流180分における肝障害、および炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ とIL-6の産生は、IL-1Ra遺伝子導入によって対照と比較して有意に抑制された。二つの遺伝子導入法を比較すると、リポフェクションに比べてより高度なIL-1Ra発現の得られたAdex法において障害抑制は有意に高度であった。またAdex法による遺伝子導入は、ラットの7日間生存率を有意に改善した。

【考察】ラット肝へのIL-1Ra遺伝子導入を試みたのは本研究が初めてである。遺伝子導入は、単回の導入操作によって一定の期間持続的な目的物質の発現が得られるという大きな利点があるが、一方発現のタイミングや発現量の制御は困難であるという重大な欠陥がある。本研究ではIL-1Ra遺伝子導入によって大量のIL-1Ra発現が得られた結果、ラットの肝虚血再灌流障害は有意に抑制されたが、それによるラット生体への明らかな悪影響や、導入操作そのものによる肝障害も見られなかった。これらのことから、本研究で用いたIL-1Ra遺伝子導入の治療への応用の可能性が示唆される。

【結語】ラット肝への遺伝子導入による有意なIL-1Ra発現と、それによる肝虚血再灌流障害の抑制が示された。今後、本法による肝移植後の虚血再灌流障害の抑制を目指した応用の可能性がある。

## 論文審査の要旨

肝虚血再灌流障害の抑制は、特に肝移植の臨床における大きな課題である。本研究においては、遺伝子導入法を用いてinterleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra)を過剰に発現させることにより虚血再灌流障害の抑制を試みた。

審査では、IL-1Raの体内動態や特徴に関する質問がなされた。IL-1Raは急性炎症などの際には急性相反応物質の一つとしてすばやく大鼠に誘導されること、大量誘導時においてもIL-1受容体拮抗作用以外知られていないこと、炎症反応をコントロールするための負のフィードバック機構などの作用機序が説明された。また、AdexによるIL-1Ra遺伝子導入で、IL-1の上流に位置するとされるTNF- $\alpha$ の発現が抑制されていること、このメカニズムを問われたが、これに関してはIL-1Raの大量発現下における未知のTNF- $\alpha$ 抑制機序の存在が示唆されるが明らかでなく、また少なくともIL-1Raの主な作用機序としてTNF- $\alpha$ の抑制が重要ではない旨が説明された。さらに、TNF- $\alpha$ あるいはIL-6は肝再生に寄与することがわかっているが、IL-1Raによるこれらの抑制は肝再生にとって不利に作用しないかとの指摘がなされ、今後の重要な研究課題と考えられた。

一方、遺伝子導入の効果に関する質疑も行われた。まずは二つの導入法間での障害抑制効果の比較を表立って行うべきという指摘があった。さらにリポフェクション法では主にKupffer細胞のみに導入されているにもかかわらず、有意に障害が抑制されていることより、肝細胞自体での発現は必須ではないということかとの指摘がなされ、これに対し障害抑制効果はむしろ血中IL-1Raタンパク濃度の上昇に伴うものと考えられるため、網内系、あるいはKupffer細胞への導入でも結果的に効果が出ているものと説明された。これに関連して、経門脈的に導入ベクターを投与することの必要性が問われたが、過去の文献に倣った手法ではあるが必須ではないと説明された。

さらには、論文中の肝組織X-gal化学染色写真の質が低く、counter stainを行って脈管等の構造を明らかにするべきであり、また対照群では脈管を同等に含んだ部分を用いるべきとの指摘がなされた。一方虚血再灌流後の肝組織像においては、炎症性細胞浸潤や中心静脈領域での虚血性障害像が見られず、臨床における肝組織像と合致しない旨が指摘されたが、それに対して、急性の肝虚血再灌流は類洞のブロック機構や血行動態の急変によってむしろ門脈領域の急性障害として特徴付けられるので、それを論文中で説明すべきとの指摘もあった。

以上のように、本研究は論文中の組織標本写真や一部手法に改善すべき点が指摘され、なお検討すべき課題は残しているが、単一の遺伝子導入のみによって生体への悪影響なく肝の虚血再灌流障害を抑制し得たという点で、今後の肝移植に関する遺伝子治療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 外科学 北島 政樹  
内科学 石井 裕正 医化学 末松 誠  
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 亨字  
学術確認担当者：北島 政樹、石井 裕正  
審査委員長：石井 裕正

試問日：平成15年4月22日



# Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F<sub>2α</sub>-induced luteolysis in rats.

(機能的黄体退縮における白血球-内皮間相互作用と酸素ストレスの関与)

峰 岸 一 宏

## 内容の要旨

黄体は、胚着床に向けた子宮内膜の脱落膜変化や着床後の妊娠維持に不可欠な性ステロイドホルモンであるプロゲステロンを産生する。黄体機能不全に伴う病的な黄体退縮は、不妊症や不育症を引き起こすと考えられており、黄体の維持・退縮機構の解明は生殖内分泌学における重要なテーマの一つである。近年、黄体退縮因子であるプロスタグランジン (PG) F<sub>2α</sub>が、活性酸素の産生を誘導し、プロゲステロン産生を抑制することが明らかにされている。また、黄体退縮期に一致して黄体組織に白血球浸潤が認められている。しかしながら、黄体退縮過程における白血球集積・浸潤と黄体機能との関連や活性酸素の役割について検討した報告はない。そこで本研究では、機能的黄体退縮モデルでの白血球集積と活性酸素の役割を解明することを目的とした。

幼若Sprague-Dawleyラットの黄体機能を維持させるために偽妊娠とし、PGF<sub>2α</sub>投与により機能的黄体退縮を誘導した。黄体微小循環を生体顕微鏡により観察し、黄体細静脈における白血球接着反応を観察した。また、集積・浸潤した好中球の指標として卵巣組織ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性を測定し、機能的黄体退縮の発生は、血清プロゲステロン濃度測定により確認した。抗CD18単クローン抗体を前投与することで、CD18依存性の白血球集積・浸潤が黄体退縮に与える影響を評価した。次に、活性酸素消去酵素のsuperoxide dismutase (SOD) とカタラーゼを用いて、活性酸素が白血球集積・浸潤や黄体機能に与える影響について検討を加えた。さらに、黄体内酸素ストレスの経時的変化についてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性蛍光プローブを用いて評価した。

黄体細静脈での接着白血球数と卵巣MPO活性は、それぞれPGF<sub>2α</sub>投与後60分、120分で有意に増加し、黄体退縮期における好中球集積・浸潤が確認された。また、プロゲステロン濃度はPGF<sub>2α</sub>投与後30分に低下した後、時間依存性に低下し、機能的黄体退縮が確認された。抗CD18抗体投与は、PGF<sub>2α</sub>によって誘導された接着白血球数や卵巣MPO活性の増加、プロゲステロン濃度の低下を抑制し、集積・浸潤した好中球の黄体退縮への関与が考えられた。活性酸素消去酵素投与もPGF<sub>2α</sub>によって惹起されるこれらの変化を抑制した。黄体実質領域でのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>発生による酸素ストレスの誘導が、PGF<sub>2α</sub>投与後30分で認められた。以上より、黄体退縮初期に発生した活性酸素の影響下で、CD18依存性の白血球-内皮間相互作用を介して浸潤した好中球が黄体退縮機構に関与しているものと考えられた。黄体退縮期での微小循環動態や好中球の黄体機能への関与を明らかにしたことは、黄体機能不全の病態を解明する上で臨床上重要であると考えられた。

## 論文審査の要旨

黄体機能は着床やその後の妊娠維持に不可欠であり、その破綻に伴う黄体機能不全は、不妊・不育などの原因として考えられている。プロスタグランジン (PG) F<sub>2α</sub>が活性酸素を誘導し、プロゲステロン合成を抑制するとされ、また黄体退縮期に黄体への白血球浸潤が報告されているが、白血球集積を介する黄体退縮機構は不明である。本研究では、ラット機能的黄体退縮モデルを用いて白血球集積および活性酸素の役割について検討した。その結果、黄体退縮初期に誘導された酸素ストレスの影響下で、白血球インテグリンCD18依存性の白血球-内皮間相互作用を介して集積・浸潤した白血球、主に好中球が黄体退縮機構に関与することが示された。

審査では、まず今回用いた偽妊娠ラットについて質疑がなされた。成熟ラットは黄体の内分泌機能を持たず、妊娠ラットでは黄体退縮阻害作用を有する胎盤性ラクトゲンの影響で黄体退縮モデルの確立が困難なことから、性周期のない幼若ラットを妊娠に類似したホルモン環境である偽妊娠とした旨が回答された。さらに、偽妊娠8日目と黄体成熟期に相当し、PGF<sub>2α</sub>レセプターの発現が認められる時期であることも補足された。次に、プロゲステロン合成阻害への酸素ストレスの関与について質問がなされた。活性酸素に誘導される酸素ストレスが、黄体細胞内の黄体化ホルモンレセプターやシトクロムP450sccへの阻害作用を通じてプロゲステロン合成を阻害している旨が回答され、好中球浸潤時期での酸素ストレスの変化やcell viabilityとの関係についても検討すべきとの助言があった。さらに、好中球集積について討議がなされた。ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性のコントロールについて質問され、resident macrophageによるMPO活性を反映している可能性がある旨が回答された。また、MPO活性の意義に関連して、微小循環における好中球接着と血管外遊出がMPO活性の変化に反映されていないとの指摘があり、経時的な組織学的検討を行って確認すべきとの助言がなされた。最後に、本モデルでの黄体退縮機構について質疑がなされた。抗CD18単クローン抗体の投与量や作用機序について質問があり、さらに、抗CD18抗体投与による各パラメーターの変化が僅少であることから、CD18以外の機構の関与が指摘された。この討議に関連して、抗CD18抗体投与は、黄体細胞におけるPGF<sub>2α</sub>による初期の生物学的反応を抑制しないことから、好中球の機能的黄体退縮への関与は二次性のものと推測される旨が説明され、初期のプロゲステロン合成抑制機構の解明が重要であるとの指摘も受けた。以上より、本研究にはさらに検討すべき点はあるものの、黄体退縮における好中球集積の黄体機能への関与と、その過程における活性酸素の役割を明らかにした点で、生殖生理学上有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
産婦人科学 野澤 志朗 医化学 末松 誠  
内科学 池田 康夫 病理学 岡田 保典  
学力確認担当者: 北島 政樹、野澤 志朗  
審査委員長: 野澤 志朗

試問日: 平成15年3月11日

# 蝸牛外有毛細胞膜の形状が電位依存性運動に与える影響

守 本 倫 子

## 内容の要旨

【背景】哺乳類の蝸牛外有毛細胞が刺激音の周波数に対応した電位依存性の能動的運動能を有することが明らかになっているが、この運動能は音の感受性を増強させる重要な役割を果たしている。音響刺激により膜電位が生じると外有毛細胞膜の収縮蛋白が構造変化を起こし、その結果として細胞が伸縮する。すなわち、電位依存性運動は電気的なエネルギーによって機械的なエネルギーを生じる運動であり、細胞膜の硬さや張力などの機械的特性の影響を受けると考えられる。本研究では蝸牛外有毛細胞の電位依存性運動のメカニズムを解明するために、細胞膜に変形を加えることにより生じる外有毛細胞膜の張力などの機械的特性の変化や、それに伴う浸透性の変化を測定した。

【方法】微小ガラス管を用いて単離した外有毛細胞膜に陰圧または陽圧を負荷し、局所的に細胞膜を変形させ、その際の細胞の体積および表面積の変化を計測した。また、細胞膜の機械的特性を変化させる両親媒性薬のサリチル酸が、このような圧負荷による細胞膜の変形に与える影響についても計測した。

【結果・考察】局所的に陰圧を負荷すると細胞膜は小胞として遊離し、陽圧を負荷すると細胞は膨張した。細胞膜の表面積は小胞形成により6-10%増加した。サリチル酸を添加しても結果に有意差は認められなかった。このことより外有毛細胞膜には余剰膜が存在することが示唆された。余剰膜は膜のゆとりの部分として襞状に蓄えられており、電位依存性運動の際に収縮タンパクの構造変化に伴って表面積を増加、減少させることを可能にしていると推測された。また、局所的な圧負荷により水の浸透性が増加したが、これは局所的な圧負荷により細胞膜が変形すると細胞内の静止水圧が変化し、膜全体の小孔から水の移動が促進するためと考えられる。サリチル酸を添加すると水の浸透性増加は抑制された。サリチル酸は膜の機械的特性を変化させるため、膜を変形させても静止水圧が変化しにくくなり、その結果水の浸透性増加が抑制されるのではないかと考えられた。

【結論】外有毛細胞膜には余剰膜が存在するが、この余剰膜は電位依存性運動に対して重要な役割を担っていることが確認された。外有毛細胞は電位依存性運動を行うことによって聴覚機能の中で重要な役割を果たしており、今後様々な側面からそのメカニズムを検討することで、蝸牛全体の生理機能や病態の解明が期待できると思われる。

## 論文審査の要旨

哺乳類の蝸牛外有毛細胞が刺激音の周波数に対応した電位依存性の能動的運動能を有することが明らかになっている。本研究では外有毛細胞の電位依存性運動の機序を解明するために、モルモット単離外有毛細胞膜に微小ガラス管を用いて圧を負荷し、その際の外有毛細胞膜の張力などの機械的特性の変化や、それに伴う浸透性の変化を測定した。その結果、局所的に陰圧を負荷すると細胞膜は小胞として遊離し、陽圧を負荷すると細胞は膨張し、細胞膜の表面積は小胞形成により増加した。このことから外有毛細胞膜には余剰膜が存在することが示唆され、余剰膜は襞状に蓄えられており、電位依存性運動の際に収縮タンパクの構造変化に伴って表面積を増加、減少させることを可能にしていると推察した。また、局所的な圧負荷により水の浸透性が増加したが、これは圧負荷により細胞内圧が変化し、緊張した膜に形成された小孔から水の移動が生じるためと考えられた。細胞膜の機械的特性を変化させる両親媒性薬であるサリチル酸を添加すると水の浸透性増加は抑制された。以上の結果より、外有毛細胞膜には余剰膜が存在するが、この余剰膜は電位依存性運動に対して重要な役割を担っていると推測した。また、外有毛細胞が環境の変化に応じて膜の浸透性を変化させる機構は電位依存性運動において重要な役割を果たしていると推測した。

審査では、はじめに実験で用いた外有毛細胞の同定法について指摘があった。これに対して、実験では細胞長が60-80μmの有毛細胞を使用しており、細胞の形態から内毛細胞との区別は容易であると回答した。また、基底回転から頂回転まで配列する外有毛細胞で細胞膜の機械的特性に違いがあるか質問があったが、今回は各回転別の外有毛細胞での比較は行っておらず、今後の検討課題であると回答した。外有毛細胞の求心性神経支配についての質問に対しては、求心性神経の約95%は内毛細胞とシナプス結合しており、外有毛細胞に関与している求心性神経は約5%のみであると回答した。次にサリチル酸とクロロプロマジン投与で陰圧負荷により遊離した小胞の大きさとその形成に要する時間に違いについて質問があった。これに対しては小胞の大きさは違いがなかったが、形成に要する時間は異なっていたと回答した。陰圧負荷により細胞膜に形成されると推測した小孔の本体について質問があったが、いわゆるstretch activated channelと考えていると回答した。陽圧負荷実験で陽圧負荷直後に一旦体積が減少してから増加した理由について質問があったが、陽圧負荷により細胞内圧が上昇し、細胞質が漏出したが、その後低浸透圧溶液のために体積が増加したと回答した。

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、研究方法および内容は新知見に富み、外有毛細胞膜の電位依存性運動の機序を解明するための優れた研究と評価された。

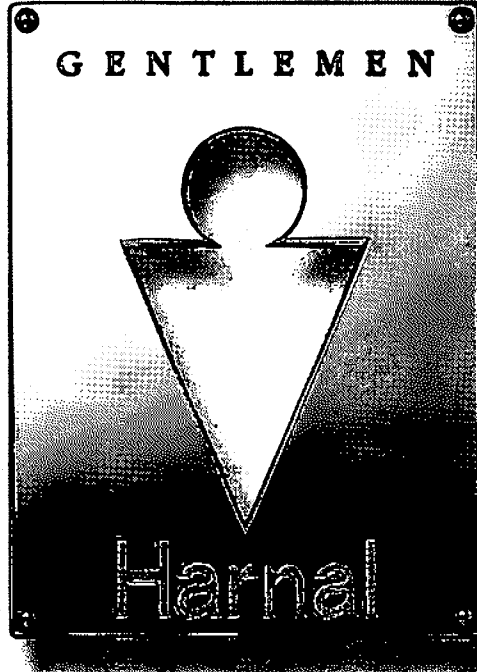
論文審査担当者 主査 耳鼻咽喉科学 小川 郁  
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之  
外科学 河瀬 斌 解剖学 相磯 貞和  
学力確認担当者：北島 政樹、仲嶋 一範  
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成15年4月17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 $\alpha_1$ ブロッカー！



- 前立腺・尿道平滑筋に選択的な $\alpha_1$ 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、眩暈	いらいら感
循環器		血圧低下、起立性低血圧、頻脈、動悸	不整脈
過敏症 <sup>※</sup>		痒痒感、発疹等	荨麻疹
消化器	胃不快感	嘔気、嘔吐、口渇、便秘、胃風感、胃痛、食欲不振、下痢	
その他		鼻閉、浮腫、咽下障害、尿失禁、咽頭灼熱感、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( $\alpha_1$ 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<sup>®</sup> 0.1mg / 0.2mg カプセル

塩酸タムスロシン製剤 薬価収載