

慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

綜 説

- リハビリテーション医学教育の現状と課題—卒前教育を中心に— ……木村 彰男 ……(65)
 - ビスホスフォネートが骨粗鬆症患者の腰痛におよぼす効果 ……岩本 潤・竹田 毅 ……(71)
- ## 講 座
- 膝関節靭帯損傷 ……松本 秀男 ……(77)
 - 脳卒中の急性期・回復期・維持期のリハビリテーションと介護保険 ……正門 由久・大田 哲生・木村 彰男 ……(87)

原 著

- 成人型・最重症アトピー性皮膚炎の中医学煎じ薬治療と、その効果判定—成人型アトピー性皮膚炎の煎じ薬治療とその効果— ……玉田 耕一 ……(95)
- 慶應関連病院における内分泌・臨床化学検査の共通基準範囲 ……武井 泉・小口 修司・石橋みどり・石田 浩二・関口 仁・菊池 春人・渡邊 清明・佐々木昭子・今村 ちさ・高加 国夫・五内川里子・青木 芳和・加野象次郎・小林 照明・宮崎 直子 ……(105)

話 題

- 変貌する循環器診療の中で伝えたいこと ……小山 卓史 ……(111)
- 反復性膝蓋骨脱臼の新しい病態 ……野村 栄貴 ……(111)
- さらばモートン病 ……星野 達 ……(112)
- 生殖医療技術の進歩と生命倫理 ……小澤 伸晃 ……(113)
- 骨折と最小侵襲手術 ……山中 一良 ……(114)

学 位 論 文

- 経頭蓋磁気刺激の抗うつ効果と神経生理学的予測因子について ……前田 典子 ……(T163)
- 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 ……(T177)
- 抗体の制御する細胞表面βアミロイド前駆体蛋白の新規神経細胞障害機能 ……須藤 遥 ……(T187)
- 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 ……(T213)
- 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 ……(T225)
- ラット硝子体中に投与したL-ドーパによる一酸化窒素の発生と組織学的変化—メラニン顆粒の有無による相違— ……小林 幸 ……(T239)
- 腸管からのエンドトキシン吸収に及ぼすエタノール投与の影響に関する検討 ……玉井 博修 ……(T247)
- 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 ……(T257)
- 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 ……(T269)

号 外

- 博士(医学)学位論文—内容および審査要旨—(第169号) ……(別頁)

第 83 回慶應医学会総会 第 11 回慶應ライフフォーラム

日 時：平成 15 年 11 月 14 日(金) 午後 3 時～午後 6 時 30 分

場 所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階大会議室

主 催：慶應医学会

共 催：慶應義塾大学理工学部・医学部

- 3：00 開会の辞 副会長 相磯 貞和
挨拶 会長 北島 政樹医学部長
- 3：05～3：40 総会議事, 三四会奨励賞授与式

シンポジウム『システム生物学 – 生体を捉える新しい手法とその展望 –』

3：40～4：10

I. メタボローム解析と生体シミュレーション

富田 勝 (慶應義塾大学先端生命科学研究所)

4：10～4：40

II. 機能応答性蛍光プローブの開発とバイオイメーキングへの応用

岡 浩太郎 (慶應義塾大学理工学部生命情報学科)

4：40～5：00 休 憩

5：00～5：30

III. ガス分子の生成・受容系による新しい生体制御機構

末松 誠 (慶應義塾大学医学部医化学)

5：30～6：00

IV. 心臓のモデリングシミュレーションとシステム生物学

松田哲也 (京都大学大学院情報学研究科)

6：00～6：30

V. 心肺機能シミュレーションの臨床応用

倉智嘉久 (大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学)

入場無料・参加自由

問合わせ先：慶應医学会事務局

新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部内

電話 03-5363-3736 FAX 03-3226-5748

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

綜 説

リハビリテーション医学教育の現状と課題—卒前教育を中心に—

慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンター

木 村 彰 男

Key Word : リハビリテーション医学, 卒前卒後教育, モデル・コア・カリキュラム, 共用試験, 専門医

はじめに

医師の卒前卒後教育が大きな変革期を迎えている^{1,2)}. すなわち卒前教育では, モデル・コア・カリキュラムの導入, 共用試験の実施などが図られ, 卒後教育では初期研修(スーパーローテーション)の義務化がまさに始まろうとしている. これらは便宜上, 卒前教育と卒後教育とに分けられているが, それぞれ独立したものではなく一連の医学教育改革として位置付けられている.

ところでリハビリテーション(以下, リハビリ)医学の教育については本誌でも1990年に千野³⁾が総説として述べているが, 上記のような最近の教育改革のうねりは想像以上に激しく, リハビリ医学における教育にも多大な影響が出ている. 本稿ではリハビリ医学教育の現状と課題を紹介すると共に, 教育改革によるリハビリ医学への影響とそれに対する取り組みについて言及したい.

1. リハビリ医学卒前教育の現状

1) 卒前教育の概要

日本リハビリ医学会発行の「リハビリテーション医学白書」⁴⁾を基に, 以下にリハビリ医学の卒前教育の現状を紹介する. この基礎資料は1990年代後半のもので, 最新のものではなく, また流動的な現状から今後さらに変わりうる可能性があることをお断りしておく.

本塾医学部では平成7年よりリハビリ医学講座を設置しているが, 全国的に見た場合, 講座に関しては, 国立3校, 私立8校の計11校で, 横ばいの状態である. 一方, 診療科を有する大学に関しては26校で増加傾向にあり, さらに中央診療部門としてリハビリ部などが設けられている大学も増加しつつある.

リハビリ医学の授業時間数に関しては, 第1表⁵⁾の通りで, 時間数の平均は私立の方が国公立の約2倍となっており, 講義のみでなく実習も実施している大学が圧倒的に多いという特徴が見られる. 日本リハビリ医学会が

第1表 リハビリ医学の授業時間数⁵⁾

平 均	講 義 の み	講 義 + 実 習 (講 義)	(実 習)
国立 14.6±2.5 (2~64)	12 校	30 校	
A	0	7 (23.7±3.0)	6 (29.7±3.1)
B	1 (4.0)	3 (8.8±1.8)	0
C	11 (4.0±0.4)	20 (5.9±0.9)	24 (5.3±1.1)
公立 15.5±6.9 (3.3~54)	0	8	
A		1 (10.5)	2 (15.0±8.5)
B		1 (6.0)	1 (34.0)
C		6 (4.0±2.8)	5 (12.0±4.4)
私立 30.6±5.1 (3~117.5)	4	25	
A	2 (24.0±2.1)	10 (21.6±4.2)	12 (31.6±5.0)
B	0	2 (27.0±2.1)	0
C	2 (3.2±0.5)	12 (4.8±0.7)	13 (11.3±2.6)

A : リハビリテーション医学が独立教育科目, B : 他の複数科との共同枠, C : 他の単科との共通枠

提示しているリハビリ医学卒前教育の具体的カリキュラム⁶⁾の各大学における実施状況からは、大学間において格差が見られ⁷⁾、カリキュラムとしては運動学や障害学、理学療法、脳血管障害や脊髄損傷などに重点が置かれていることがわかる。今後モデル・コア・カリキュラムの制定にともない、大学間の格差が是正されてゆくことが期待されるが、そのためには講座の拡充およびそれに伴う教員の充実などが望まれる。

2) 本塾医学部におけるリハビリ卒前教育

本塾医学部におけるリハビリの講義は、系統講義5コマ(1コマは90分)の他に、運動器系・神経系などの臓器別の講義の一部が割り当てられている。ポリクリは1週間組まれており(第2表)、その間には月が瀬リハビリセンターへ出向いての1泊2日での実習も含まれている。この他に後述する入学直後に行うEarly Exposure Program (EEP)⁸⁾の実施施設としても、リハビリ関連から多くの施設が参加している。これらのリハビリ医学の卒前教育は、他大学にくらべて非常に中身が濃いと言えよう。しかしながら高齢化社会を迎え、その必要性が従来にも増している分野と言うことを考えると、より一層の充実が望まれる。

なお、本塾では卒前カリキュラムに関して既に改革が実施されており、ポリクリの充実、実施時期の問題などを中心に改善が進んでいる。今後は更に全国における医学教育の改革を視野に入れながら、本塾医学部に適したカリキュラムを確立することが大切と思われるが、その際にリハビリ医学教育に付いても、より充実した内容と

するべく十分な検討が必要と考えられる。

2. 医学部卒前教育の改革とリハビリ医学⁹⁾

今後の医学教育の目指すべき目標として、患者中心の医療を実践でき、コミュニケーション能力に優れ、倫理的問題の把握と対処が可能で、幅広く質の高い臨床能力を身につけた医療人の育成ということが強調されている¹⁰⁾。このような目標は、WHOの国際障害分類¹¹⁾に基づいて、患者の機能障害のみならず、能力低下、社会的不利にわたるまでのあらゆる問題を解決するべく横断的な医学・医療を展開するという、まさにリハビリ医学の原点そのものであり、この意味でもリハビリ医学の重要性が従来にも増して高まりつつあると言える。

1) 医学教育モデル・コア・カリキュラム作成の経緯

平成11年に公表された21世紀医学・医療懇談会第4次報告には、「医学・医療の社会的ニーズの多様化に伴い、様々な人材の育成が必要となり、そのためには精選された基本的内容を重点的に履修させるコア・カリキュラムを確立させ、学生が主体的に選択履修できる科目を拡充・多様化することが必要である」という記述が見られる。これを受ける形でモデル・コア・カリキュラム作成作業が行われ、「医学・歯学教育の在り方に関する調査研究協力者会議」の報告書である「21世紀における医学・歯学教育の改善方策について—学部教育の再構築のために—」の中に、「医学教育モデル・コア・カリキュラム—教育内容ガイドライン—」¹²⁾が収録され、平成13年3月に公表されるにいたった¹³⁾。

2) モデル・コア・カリキュラムにおけるリハビリ医学

医学教育モデル・コア・カリキュラムのガイドライン¹⁴⁾では、リハビリ医学は「診療の基本」のうちの「基本的診療知識」の一項目として、臨床検査、麻酔、介護と在宅医療、緩和医療などと同列に扱われている。リハビリの基本を学ぶということを一一般目標として、その到達目標として具体的に7つの目標が挙げられているが、そのうちの4項目に関しては臨床実習なども通じた上での卒業までに到達すべく目標として位置付けられている(第3表)。内容的にはリハビリの概念と適応を中心とした総論的な理解が目標となっており、脳卒中などの各論に関してはここでは取り上げられていない。

各論については、「人体各器官の正常構造と機能、病態、診断、治療」の中で、例えば第4表に示すように脳血管障害においてそのリハビリに対する理解の必要性が言及されている。同様に、頭部外傷、脳性麻痺、脊髄損傷、骨・関節疾患、慢性関節リウマチの各疾患においては、リハビリについて触れられているが、パーキンソン

第2表 本塾医学部リハビリ科ポリクリスケジュール

月曜日	午前	オリエンテーション ＜クルズ＞リハビリ概論 ＜クルズ＞リハビリ関連職種の種類
	午後	＜クルズ＞リハビリ処方書の書き方 病棟実習
火曜日	午前	外来見学 病棟実習
	午後	理学療法実習 作業療法実習 言語療法実習
水曜日	午前	電気診断学実習(筋電図、神経伝導検査など)
	午後	(グランドラウンドなどポリクリではなく学年全体のスケジュール)
木曜日	終日	月が瀬リハビリテーションセンターでの実習(受持ち患者診察、カンファレンス参加、装具実習、神経因性膀胱検査、嚥下造影検査など)
金曜日	終日	月が瀬リハビリテーションセンターでの実習(木曜日と同じスケジュールに加え試験)
土曜日	午前	レポート提出

第3表 モデル・コア・カリキュラムにおけるリハビリテーション¹¹⁾

リハビリテーション
一般目標： リハビリテーションの基本を学ぶ。
到達目標： 1) リハビリテーションの概念と適応を説明できる。 2) リハビリテーションチームの構成を理解し、医師の役割を説明できる。 3) 福祉・介護との連携におけるリハビリテーションの役割を説明できる。 △4) 障害を機能障害、能力低下、社会的不利に分けて説明できる。 △5) 日常生活動作（ADL）の評価ができる。 △6) 理学療法、作業療法と言語療法を概説できる。 △7) 主な歩行補助具、車椅子、義肢と装具を概説できる。
<注> △印のついたものは卒業時までの到達目標

第4表 モデル・コア・カリキュラムにおける脳・脊髄血管障害¹¹⁾

脳・脊髄血管障害
到達目標： 1) 脳血管障害（脳梗塞、脳内出血、くも膜下出血）の病態、症候と診断を説明できる。 2) 一過性脳虚血発作の病態を概説できる。 △3) 脳血管障害の治療とリハビリテーションを概説できる。 △4) 脊髄血管障害を概説できる。
<注> △印のついたものは卒業時までの到達目標

ン病や筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症などの神経疾患、末梢神経疾患、筋疾患、心筋梗塞、呼吸器疾患などにおいては、残念ながらリハビリへの言及はなされていない。一方、医学の各領域に関係するリハビリ医学の性質上、他の色々な項目でリハビリの必修分野に関する項目を見出すことができる。例えば、「基本事項」のうちの「コミュニケーションとチーム医療」の中では、チーム医療に関する教育目標が示されており、その内容はまさにリハビリ医学の教育における必須のものと言える。この他にも中枢神経系と末梢神経系の構成、神経系の電気生理学的検査、言語障害と構音障害、関節可動域検査と徒手筋力検査、四肢の主要筋群の運動や神経支配、問題志向型診療録（POMR）など、リハビリに必要な知識に関しては様々な項目で取り上げられている。リハビリ医学からの系統だった項目立てという観点からは検討の余地があるが、この様にモデル・コア・カリキュラム全体として見た場合には、リハビリ医学の卒前教育にお

いて必要な知識のかなりの範囲がカバーされていると言えよう。抜けている項目に関しては、後述する選択性カリキュラムの工夫などによる対応が望まれる。

リハビリに関するモデル・コア・カリキュラムで気になる点は、多くの具体的目標に△印がつけられていること、すなわち学部での早い時期ではなく卒業時までの到達目標として位置付けられている点である。確かに理学療法・作業療法など、実際の臨床実習の場面で学ぶ方が効果的な項目が多いのも事実であるが、より早期の臨床実習前に必要な基礎知識である国際障害分類¹¹⁾などの基本的事項も卒業時までの到達目標となっており、検討課題と言える。

ところでコア・カリキュラムは画一化した医学教育の導入と取られがちであるが、ガイドラインではそのような意図はなく、必須の内容の精選であることが強調されている。この観点から各大学にその教育理念と学生のニーズに基づいた個性ある独自のプログラムの準備を求め、多くの選択制カリキュラムの導入があわせて提唱されている。リハビリ医学も選択制カリキュラムに含まれているが、リハビリ医学の臨床実習の果たす役割は大きく、より効果的な教育が実施できるような努力と工夫が必要と思われる。そのためにはモデル・コア・カリキュラムで目指している、指導医と研修医などによって構成される診療チームの一人として学生が実習できる診療参加型実習（クリニカルクラークシップ）や、小人数でのチュートリアルの導入などが効果的と考えられる。とは言うものの、ただでさえ講座も専門医も少ないリハビリ医学の分野でのこの様なシステムの導入は極めて難しく、比較的環境の良い本塾医学部においてさえその実施は至難の業と思われる。各大学の実体に沿った形での対応をせざるを得ないのが現状と言えよう。

3) 共用試験

医学教育モデル・コア・カリキュラムを受けて、学生が臨床実習を始める前に実施する共用試験²⁾の導入が図られており、既に平成14年度よりトライアルが開始されている。トライアルを通じて共用試験の様々な問題点が明らかになりつつあるが、リハビリ医学については、共用試験のうちコンピューターによる試験（Computer Based Testing：CBT）の実施時期に関連しての出題範囲の問題が挙げられる。モデル・コア・カリキュラムにおけるリハビリ医学の各到達目標の多くが、臨床実習の時期に位置付けられているために、果たしてどれだけの項目が共用試験の出題範囲として適切かどうかは悩むところである。CBTの実施される臨床実習開始前までに、実際にどこまでリハビリ医学の教育が済んでいるかは各

大学によってバラツキがあり、前述の私学と国公立におけるカリキュラムの内容や時間数の差も、CBTの実施にあたっては問題になると思われる。

その他の共用試験における問題点としては、客観的臨床能力試験 (Objective Structured Clinical Examination: OSCE) の実施の問題が挙げられる。いわゆる診療の態度と技能をみる OSCE の重要性は疑いのないところであるが、リハビリ医学において、どのように OSCE を実施するかも今後の大きな課題と言えよう。

4) Early Exposure Program (EEP)

医学部卒前教育の改革は、急速に進歩する医学・医療の発展に追いつくべく膨大な知識をどのように学生に教えるかが重要な課題であるが、それにも増して医師としての倫理をどのように教育するかは極めて大事な問題と言える。

近年各大学で学生ができるだけ早い時期に医学・医療の現場を身を持って体験し、その動機付けを試みる Early Exposure Program (EEP)⁹⁾が実施されているが、EEPには倫理面の教育の一手段としての役割が期待されている。現在 EEP は全国 80 の医科大学・医学部のうち実に 79 大学で実施されており、その実施時期は 1 年次が圧倒的に多い。EEP の内容としては医療現場での体験実習が主体となっており、具体的には大学付属病院・関連施設での看護並びに介護の実習の形で行われている場合が多い。リハビリ病院を始め、特別養護老人ホームや重症心身障害児施設、社会福祉施設など医療のみならず福祉との接点となる施設で実施されているケースも多く、EEP に医師としての動機付けだけでなく、社会倫理面における教育効果も期待されていることが窺い知れる。このような観点からも、医学部早期教育におけるリハビリ医学の貢献が大いに期待される。

3. リハビリ医学卒後教育の現状と課題

医学部卒前の教育改革に対し、卒後教育¹⁰⁾の改革に関しては、まだ不確定な要素も多く、本稿が上梓される頃には状況が変化しているかも知れない。そのようなことを念頭に入れながら、ここでは卒後研修必修化と専門医の広告の問題に限りリハビリ医学卒後教育について言及したい。

1) 卒後研修必修化

平成 16 年度より導入という臨床研修の必修化は目前に迫っており、多くの解決すべき問題が山積みしている一方、待ったなしでその対応を求められているのが偽らざる現状といえる。特に全国最大の研修施設である本塾大学病院では、研修医数の削減に伴う多くの改革、改善

を必要とされると同時に、模範となる研修プログラムの構築をするべく、来春を目指して関係各位の必死の作業と努力が続けられている¹⁵⁾。

リハビリ医学はプライマリ・ケアを中心に見据えた今回の研修制度では残念ながら必修科として参加することはできず、今後リハビリ医学専攻の医師をどの様に確保してゆくかが課題と言える。幸い本塾の卒後研修では、地域医療の一環としてリハビリ医学が組み込まれる方向で検討されており、研修医にリハビリ医学の重要性を教育する機会が与えられるが、むしろ全国的にはリハビリ医学の研修機会のないプログラムの方が大多数であると思われ、リハビリ医学への認識の後退が懸念される。

2) 専門医制度

厚生労働省の示した規制緩和により、専門医の広告が条件付きで可能となり、各医学会で専門医表示の方針が加速されている。専門医性を柱に診療報酬の見直しにも結びつく改革の端緒と思われ、リハビリ医学にとってもその専門性を大いにアピールできる時期が到来したと言える。本邦の専門医制度は、学会認定医制協議会、日本医学会、日本医師会による三者懇談会による議論が重ねられた後、学会認定医制協議会が 2001 年より発展的に専門医認定制協議会と改組され、検討が続けられている。専門医認定制協議会では各医学会の専門医を 3 群にわけているが、リハビリ専門医は基本的領域である第 I 群に相当することが承認されている。現在、日本リハビリ医学会では専門医を広告できるように、その基準を満たすべく専門医制度の見直し、他の学会の専門医制度との整合性が図られており、近々厚生労働大臣に専門医の届出をする予定である¹⁶⁾。尚、専門医認定制協議会は、2002 年 12 月より中間法人日本専門医認定医制機構に再び改組されている。日本リハビリ医学会では専門医の広告に関する作業と併行して、卒後教育のガイドラインの見直しが行われているが、専門医制度の改革の一連の流れの中で、従来、地域・施設により差のあった卒後教育の是正、標準化がはかられ、リハビリ専門医として恥ずかしくない医師が養成される土壌が整いつつあると言える。質の面ではこの様に改善がはかられているが、今後は需要を満たすだけの専門医を都市部のみでなく地方にも供給できるように地域による格差をなくしてゆくことが、リハビリ医学・医療に求められる課題と言えよう。

おわりに

卒前教育を中心に医学教育の改革とそれに関連するリハビリ医学の諸問題について述べたが、文中でも言及し

たようにリハビリ医学は今後の医学教育の目標とも深く関係しており、卒前卒後教育におけるその役割はますます大きくなってゆくものと思われる。リハビリ医学を専攻している医師は勿論のこと、医学教育に携わる全ての関係者が、この様な医学教育改革の流れに乗り遅れることなく、その目的を十分に理解して、迅速かつ適切に対応して改革が実りあるものと成るべく努力するように期待して止まない。

文 献

- 1) 堀 原一：米国における医学教育の現状から見たわが国の医学教育の構造改革はか当面する諸問題. JAMA 日本語版, 2月号: 98-102, 2002
- 2) 福島 統：これからの医学教育－コア・カリキュラムと共用試験. 臨床リハ, 10: 985-989, 2001
- 3) 千野直一：リハビリテーション医学教育の現状. 慶應医学, 67: 461-465, 1990
- 4) 木村彰男：リハビリテーション医学教育の動向－リハビリテーション医学卒前教育, リハビリテーション医学白書, pp20-26, 2003
- 5) リハビリテーション医学卒前教育・診療に関するアンケート調査報告 (1996). リハ医学, 34: 247-254, 1997
- 6) 医学教育委員会：リハビリテーション医学卒前教育カリキュラム (案). リハ医学, 30: 368-373, 1993
- 7) 大学医学部長院長会議：平成 13 年度 (2001 年) 医学教育カリキュラムの現状, 2002
- 8) 木村彰男, 鹿島晴雄：大学におけるリハビリテーション医学教育の現状－EEP とリハビリテーション医学－. 総合リハ, 27: 1169-1171, 1999
- 9) 木村彰男：医学部卒前教育の改革とリハビリテーション医学. 総合リハ, 30: 403-407, 2002
- 10) 医学・歯学教育の在り方に関する調査研究協力者会議報告：21 世紀における医学・歯学教育の改善方策について－学部教育の再構築のために－, 2001
- 11) World Health Organization: International Classification of Impairments, Disabilities and Handicaps (ICIDH). World Health Organization (WHO), Geneva, 1980
- 12) 医学における教育プログラム研究・開発事業委員会：医学教育モデル・コア・カリキュラム－教育内容ガイドライン－. 医学・歯学教育の在り方に関する調査研究協力者会議報告：21 世紀における医学・歯学教育の改善方策について－学部教育の再構築のために－ (別冊), 2001
- 13) 佐藤達夫：医学教育モデル・コア・カリキュラム. 総合リハ, 30: 397-402, 2002
- 14) 江藤文夫：リハビリテーション医学教育の動向－リハビリテーション医学卒後教育, リハビリテーション医学白書, pp26-33, 2003
- 15) 慶應大学病院は必修化でどうなる？－河瀬斌氏に聞く. 週間医学界新聞 no.2536: 13 (S 5), 2003
- 16) 椿原彰夫, 石神重信：専門医, 認定医制の諸問題－専門医制の諸問題. リハビリテーション医学白書, pp34-37, 2003

綜 説

ビスホスフォネートが骨粗鬆症患者の腰背痛におよぼす効果

慶應義塾大学医学部スポーツクリニック

いわもと じゅん たけだ つよし
岩 本 潤・竹 田 毅

ABSTRACT

Efficacy of treatment with bisphosphonates for back pain
in patients with osteoporosis

Jun Iwamoto, Tsuyoshi Takeda

Department of Sports Medicine, School of Medicine, Keio University

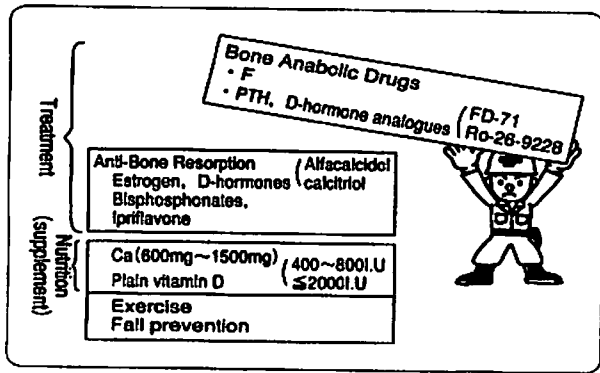
In Japan, three types of bisphosphonates, such as etidronate, alendronate, and risedronate, are available in the treatment of osteoporosis. The efficacy of these bisphosphonates for increasing bone mineral density (BMD) and preventing osteoporotic fractures in patients with osteoporosis has been established; etidronate increases lumbar BMD and prevents incident vertebral fractures, while alendronate and risedronate increase lumbar and femoral neck BMD and prevent incident vertebral fractures and hip fractures. In addition, it has been reported that all of these bisphosphonates have the potential to prevent or relieve back pain in patients with spinal osteoporosis. The mechanism for the prevention or reduction in back pain in patients with osteoporosis by treatment with bisphosphonates remains uncertain. However, available evidence suggests that the prevention of deterioration of bone architecture or the reductions in bone resorption and/or production of interleukins and prostaglandins may contribute to the reduction in back pain in patients with spinal osteoporosis. Bisphosphonates may be useful agents to prevent disability in elderly osteoporotic patients by relieving osteoporosis-related back pain as well as preventing osteoporotic fractures. The aim of osteoporosis treatment should be to prevent or relieve back pain as well as to prevent osteoporotic fractures, subsequently improving quality of life (QOL).

Key Word: ビスホスフォネート, 骨粗鬆症, 骨吸収, 腰背痛, Quality of life (QOL)

はじめに

高齢化社会を迎え、骨粗鬆症が社会的な問題となっている。骨粗鬆症は「低骨量と骨組織の微小構造の破綻により、骨の脆弱性が増加し、骨折しやすくなる」疾患であり、高齢女性に多発する。脊椎と大腿骨頭部の骨折や腰背痛は寝たきりの原因となり、高齢者の自立を阻む大きな要因となりうる。したがって、骨粗鬆症による骨折を予防することはもちろん腰背痛を軽減することは、健康寿命確保のうえで極めて重要と考えられる。

食事や運動などの生活習慣が発症の素地となる「いわゆる生活習慣病としての骨粗鬆症」の予防さらにはその治療については、カルシウムやビタミンの摂取不足を改善し、physical activityを高め、しかもその状態を維持することが基本である。しかし、診断基準^{1,2)}に基づいて「骨粗鬆症」と診断された場合や、「骨量減少症」でも骨代謝マーカー測定の結果、以後の急激な骨量減少が予想される場合には薬物による治療が行われる。第1図は骨粗鬆症に対する栄養、運動、薬物による治療法を体系化したものである³⁾。これによると、運動や栄養、さらには薬物として骨吸収抑制剤の有用性はすでに確立



第1図 21世紀における骨粗鬆症治療体系。運動や栄養、さらには薬物として骨吸収抑制剤の有用性はすでに確立され、近い将来、新しい骨形成促進剤が臨床的に使用可能となる見込みである(文献3を改変して引用)。

され、近い将来、新しい骨形成促進剤が臨床的に使用可能となるであろうことが示されている。

骨粗鬆症の治療薬として、ビスホスフォネートは第一選択薬となっている。本邦で骨粗鬆症薬として使用可能なビスホスフォネートには、エチドロネート、アレンドロネート、リセドロネートがある。海外の大規模試験では、エチドロネートは脊椎の骨密度を増加させ、脊椎圧迫骨折の発生率を減少させるのみであるが、アレンドロネートとリセドロネートは脊椎と大腿骨頸部の骨密度を増加させ、脊椎圧迫骨折と大腿骨頸部骨折の発生率を減少させることが報告されている⁴⁻¹²⁾。このように、ビスホスフォネートの骨折予防に対する有用性はすでに確立されている。

近年の骨粗鬆症治療の目標は、骨密度増加や骨折予防は当然として、除痛ひいてはQuality of life (QOL)の向上をも重視する方向に移しつつある¹³⁾。日常診療ではビスホスフォネートが骨粗鬆症の主症状である腰背痛を軽減することはしばしば経験されるが、未だ確立された治療法となっていない。本稿では、骨粗鬆症患者における腰背痛対策-特にビスホスフォネートの有用性についてディスカッションする。

骨粗鬆症患者の腰背痛

骨粗鬆症に伴う腰背痛は、脊椎椎体骨折、脊椎椎体骨折後の偽関節、脊椎椎体変形、円背に伴う慢性筋肉疲労の4つの病態に起因するとされている¹³⁾。

骨粗鬆症患者では、外傷がなくとも、そして日常生活動作での軽微な外傷でも脊椎椎体骨折が生じることがあ

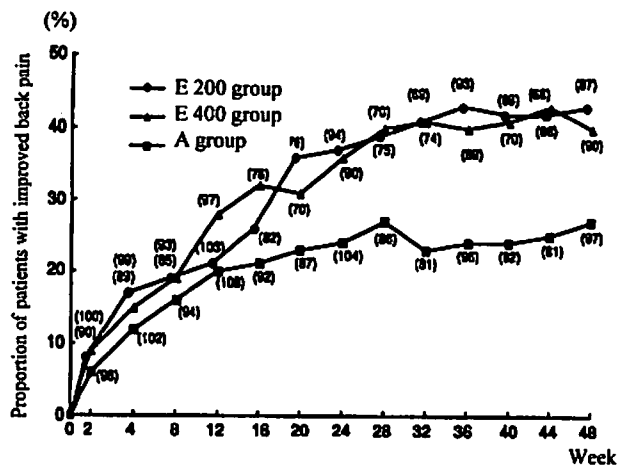
る。骨折による疼痛の程度は、臥床を余儀なくされるものから、日常生活が自立できるものまでさまざまである。また骨折による疼痛は急性あるいは亜急性発症であり、適切な治療がなされれば通常1~3カ月で軽快する。しかし、脊椎椎体骨折が癒合しないまま偽関節が形成されると、体幹を後屈するたびに骨折部に動きが生じ、頑固な腰背痛が持続する。

脊椎椎体内の骨梁が断裂して生じる椎体変形によっても、腰背痛が生じるとされている。その機序は明らかではないが、われわれは椎体変形に伴う椎間関節の不適合のみならず、悪性腫瘍の溶骨性骨転移による骨痛の発生機序と同様に¹⁴⁾、椎体内での骨吸収や骨梁の断裂(microfractures)により誘導された炎症性細胞から分泌されるInterleukin (IL), Prostaglandin (PG)やTumor necrosis factor (TNF)などの関与をも想定している^{15,16)}。

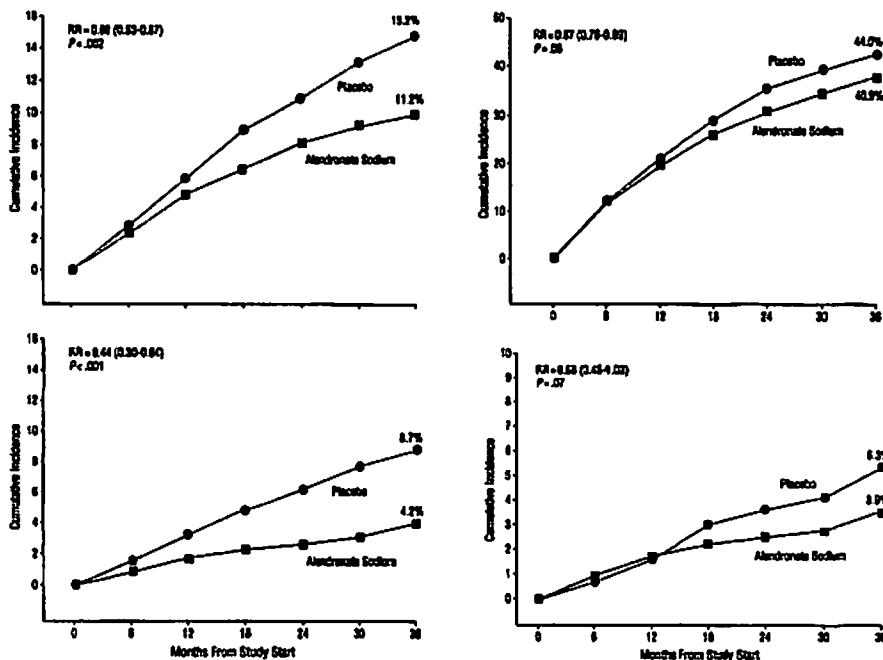
また円背では、姿勢を保持しようと腰背筋に慢性的な疲労が起り、筋肉性の疼痛を生じる。

ビスホスフォネートが骨粗鬆症患者の腰背痛におよぼす効果

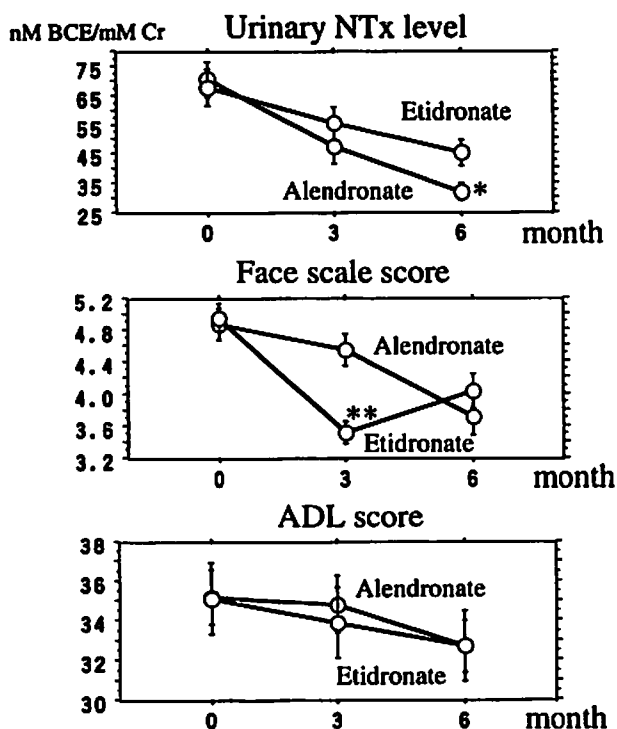
ビスホスフォネートが腰背痛を軽減し、活動性を高めることは日常診療でしばしば経験されるものの、これに関するまとまった報告は少ない。エチドロネートは、退



第2図 エチドロネートが腰背痛におよぼす影響。エチドロネートは、退行期骨粗鬆症患者において、6カ月頃から腰背痛が改善された患者数を増加させる(文献17を改変して引用)。E200 group: エチドロネート200 mg/日投与群, E400 group: エチドロネート400 mg/日投与群, A group: アルファカルシドール1 µg/日投与群。()内は対象症例数

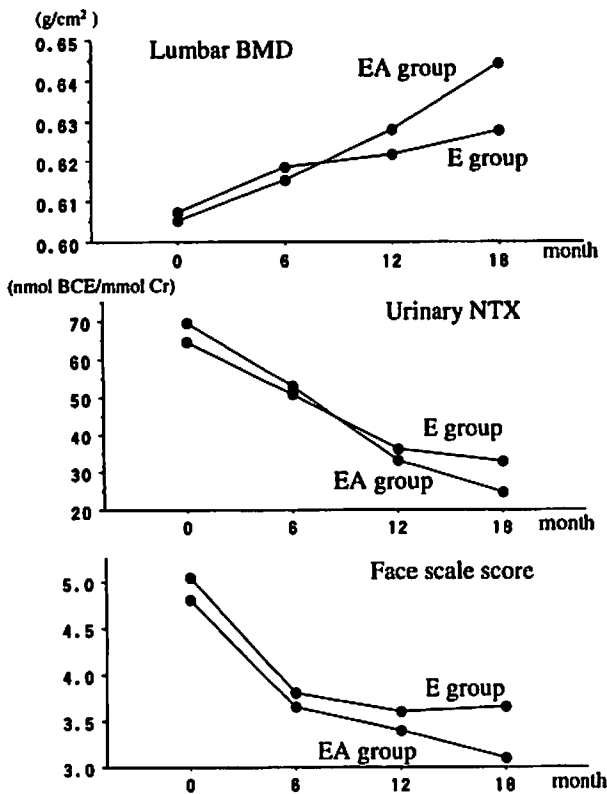


第3図 アレンドロネートが活動性や腰背痛におよぼす効果。アレンドロネートは、脊椎圧迫骨折を有する閉経後の女性において、長期にわたって、腰背痛のため1日または7日以上ベッド療養を要した患者数（左上：1日以上，左下：7日以上），7日以上活動性の制限を要した患者数（右上）や1日以上腰背痛の悪化した患者数（右下）を減少させる（文献19を改変して引用）。RR：relative risk, ()内は confidence interval



行期骨粗鬆症患者において、6カ月頃から腰背痛が改善された患者数を増加させることが報告されている（第2図）¹⁷⁾。また、腰背痛の改善に関して、リエセドロネートもエチドロネートと同等の効果があることが報告されている¹⁸⁾。一方、アレンドロネートは、脊椎圧迫骨折を有する閉経後の女性において、長期にわたって、腰背痛のためベッド療養を要した患者数、活動性の制限を要した患者数や腰背痛の悪化した患者数を減少させることが報告されている（予防効果）（第3図）¹⁹⁾。投与後6カ月を過ぎてからあらわれるこれらの効果は、主として骨梁

第4図 エチドロネートとアレンドロネートが骨吸収、腰背痛および活動性におよぼす効果。エチドロネートとアレンドロネートは、閉経後の腰背痛を有する骨粗鬆症女性において、骨吸収を抑制し、腰背痛（Face scale scoreで評価：scoreが高いほど疼痛は大きい）を軽減し、日常生活上の活動性（ADL scoreで評価：scoreが低いほど活動性は高い）を増加させる（文献20を改変して引用）。NTX：cross-linked N-terminal telopeptides of type I collagen, ADL：activities of daily living. *P<0.01 vs etidronate group. **P<0.001 vs alendronate group by unpaired t-test.



第5図 エチドロネートからアレンドロネートへの switching の効果。閉経後の骨粗鬆症患者において、12カ月のエチドロネート治療の後、アレンドロネートへの switching によって、腰椎骨密度はさらに増加し、尿中 NTX 値はさらに減少し、これに伴い腰痛（Face scale score で評価：score が高いほど疼痛は大きい）は一層軽減する（文献 26 を改変して引用）。E 群：18カ月のエチドロネート治療群，EA 群：12カ月のエチドロネート治療後，6カ月のアレンドロネート治療群，BMD：bone mineral density，NTX：cross-linked N-terminal telopeptides of type I collagen

構造の改善に関連するものと思われる。

またわれわれも、閉経後の骨粗鬆症患者（年齢：63～84歳）において、エチドロネートとアレンドロネートは、比較的早期から尿中 cross-linked N-terminal telopeptides of type I collagen (NTX) 値を減少させ、腰痛（Face scale score）を軽減し、Activities of daily living (ADL) を向上させることを見いだしている（第4図）²⁰。大林らも高齢骨粗鬆症患者において、アレンドロネートが比較的早期から QOL の score を改善することを報告している²¹。われわれの研究では、アレンドロネート投与群では尿中 NTX 値の減少率と Face scale score の減少率に有意な正の相関がみられた

が、エチドロネート投与群ではこの有意な相関はみられなかった。したがって、比較的早期からみられる腰痛軽減には、アレンドロネートでは骨吸収抑制が強く関与し、エチドロネートでは骨吸収抑制とそれ以外の機序も関与することが示唆される。関節炎モデルラットを用いた研究で、エチドロネートが IL-6、IL-12 や PG E₂ の産生を抑制することにより、疼痛閾値を上げたとする報告²²⁻²⁴から推測すると、エチドロネートによる腰痛軽減には IL や PG などの産生抑制も関与する可能性がある。なおアレンドロネートでは、関節リウマチ患者において、IL-1、IL-6、TNF-α などの値が減少したとする報告がある²⁵。

さらにわれわれは、閉経後の骨粗鬆症患者（年齢 60～83歳）において、12カ月のエチドロネート治療の後、アレンドロネートへの switching によって、腰椎骨密度はさらに増加し、尿中 NTX 値はさらに減少し、これに伴い腰痛は一層軽減することを報告している（第5図）²⁶。この研究では、アレンドロネートの骨密度、尿中 NTX 値、腰痛に対する効果は、エチドロネートによる尿中 NTX の減少率が 50%以上の患者よりも、50%未満の骨吸収抑制が少ない患者で著明であった。このことは、閉経後の骨粗鬆症患者において、エチドロネートの骨吸収抑制効果の小さい例に対するアレンドロネートへの switching の有用性を示唆している。

ビスホスフォネートが腰痛を軽減する機序は明らかにはされていない。われわれの研究では、新鮮脊椎椎体骨折や脊椎椎体骨折による偽関節を有する患者は含まれていなかったため、腰痛の原因として脊椎椎体内の骨梁の断裂とそれによる椎体変形や慢性筋肉疲労などによる疼痛が考えられた。このうちビスホスフォネートにより比較的短期間のうちにみられた疼痛の軽減は、椎体内での骨吸収抑制やサイトカイン（IL など）および PG などの産生抑制などによるものではないかと推測している。これまでに、アレンドロネートが特発性大腿骨頭壊死症患者において疼痛を軽減すること²⁷、パミドロネートが骨粗鬆症による脊椎圧迫骨折患者において腰痛を軽減すること²⁸、パミドロネートやエチドロネートが悪性腫瘍の骨転移を有する患者において骨痛を軽減すること²⁹⁻³¹、さらにはリセドロネートが骨 Paget 病患者の骨痛を軽減すること^{32,33}が報告されており、これらはビスホスフォネートの骨痛抑制効果を示唆するものであり、ビスホスフォネートが骨粗鬆症の主症状である腰痛を軽減しうるとするわれわれの見解を支持するものと考えられる。

おわりに

世界一の長寿国である本邦では、今後さらに、骨粗鬆症患者は増加することが予想される。骨粗鬆症対策は健康寿命確保のうえで極めて重要である。近年の骨粗鬆症治療の目標は、骨密度増加や骨折予防という事実を踏まえながらも、腰痛軽減ひいてはQOLの向上に向かっている。したがって、骨折を予防し、さらには腰痛を軽減するビスホスフォネートの必要性はますます高まるものと考えられる。

文 献

- 1) Orimo H, Sugioka Y, Fukunaga M, Muto Y, Hotokebuchi T, Gorai I, Nakamura T, Kushida K, Tanaka H, Ikai T, Oh-hashii Y : Diagnostic criteria of primary osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 16 : 139-150, 1998
- 2) Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga M, Sone T, Fujiwara S, Shiraki M, Kushida K, Miyamoto S, Soen S, Nishimura J, Oh-hashii Y, Hosoi T, Gorai I, Tanaka H, Igai T, Kishimoto H : Diagnostic criteria for primary osteoporosis : year 2000 revision. *J Bone Miner Metab* 19 : 331-337, 2001
- 3) Nishii Y : Active vitamin D and its analogs as drugs for the treatment of osteoporosis : advantages and problems. *J Bone Miner Metab* 20 : 57-65, 2002
- 4) Cummings SR, Black DM, Thompson DE, Applegate WB, Barrett-Connor E, Musliner TA, Palermo L, Prineas R, Rubin SM, Scott JC, Vogt T, Wallace R, Yates AJ, LaCroix AZ : Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures. Results from fracture intervention trial. *JAMA* 280 : 2077-2082, 1998
- 5) Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, Bauer DC, Genant HK, Haskell WL, Marcus R, Ott SM, Torner JC, Quandt SA, Reiss TF, Ensrud KE : Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet* 7 : 348 : 1535-1541, 1996
- 6) Tonino RP, Meunier PJ, Emkey R, Rodriguez-Portales JA, Menkes CJ, Wasnich RD, Bone HG, Santora AC, Wu M, Desai R, Ross PD : Skeletal benefits of alendronate : 7-year treatment of postmenopausal osteoporotic women. Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 85 : 3109-3115, 2000
- 7) Storm T, Thamsborg G, Steiniche T, Genant HK, Sorensen OH : Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 322 : 1265-1271, 1990
- 8) Storm T, Steiniche T, Thamsborg G, Melsen F : Changes in bone histomorphometry after long-term treatment with intermittent, cyclic etidronate for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 8 : 199-208, 1993
- 9) Watts NB, Harris ST, Genant HK, Wasnich RD, Miller PD, Jackson RD, Licata AA, Ross P, Woodson GC III, Yanover MJ, Mysiw WJ, Kohse L, Rao MB, Steiger P, Richmond B, Chesnut CH III : Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 323 : 73-79, 1990
- 10) McClung MR, Geusens P, Miller PD, Zippel H, Bensen WG, Roux C, Adami S, Fogelman I, Diamond T, Eastell R, Meunier PJ, Reginster JY : Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. *N Engl J Med* 344 : 333-340, 2001
- 11) Reginster J, Minne HW, Sorensen OH, Hooper M, Roux C, Brandi ML, Lund B, Ethgen D, Pack S, Roumagnac I, Eastell R : Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 11 : 83-91, 2000
- 12) Harris ST, Watts NB, Genant HK, McKeever CD, Hangartner T, Keller M, Chesnut CH III, Brown J, Eriksen EF, Hoseney MS, Axelrod DW, Miller PD : Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis : a randomized controlled trial. *JAMA* 282 : 1344-1352, 1999
- 13) 林 泰史 : 骨粗鬆症に伴う腰痛とその治療法. *痛みと臨床* 3 : 162-171, 2003
- 14) 岩本 潤 : 悪性腫瘍の骨転移の骨痛抑制. *痛みと臨床* 3 : 224-230, 2003
- 15) McCarter MD, Mack VE, Daly JM, Naama HA, Calvano SE : Trauma-induced alterations in macrophage function. *Surgery* 123 : 96-101, 1998
- 16) Pasquale MD, Cipolle MD, Monaco J, Simon N : Early inflammatory response correlates with severity of injury. *Crit Care Med* 24 : 1238-1242, 1996
- 17) Fujita T, Orimo H, Inoue T, Kaneda K, Sakurai M, Morita R, Morii H, Yamamoto K, Sugioka Y, Inoue A, Hoshino Y, Kawaguchi H, Yamamoto I, Fukase M, Takaoka K. Double-blind multicenter comparative study with alfacalcidol of etidronate disodium (EHDP) in involutional osteoporosis. *Clin Eval* 21 : 261-302, 1993
- 18) 日本薬剤師研修センター : リセドロ酸ナトリウム水和物. *新薬承認情報集* 9 : 374, 2002
- 19) Nevitt MC, Thompson DE, Black DM, Rubin SR, Ensrud K, Yates AJ, Cummings SR : Effect of alendronate on limited activity days and bed disability days caused by back pain in postmenopausal women with existing vertebral fractures. *Arch Intern Med* 160 : 77-85, 2000
- 20) Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, Uzawa M : Comparative effects of treatment with etidronate and

- alendronate on bone resorption, back pain, and activities of daily living in elderly women with symptomatic vertebral fractures. *Keio J Med* 2003 (in press).
- 21) 大林浩幸, 山瀬裕彦: 一般医によるアレンドロネート (ボナロン) の高齢者原発性骨粗鬆症患者の治療効果の検討. *Osteoporosis Japan* 11: 85-91, 2003
- 22) 西角文夫, 中山達夫, 中塚正志: Etidronate (ダイドロネル) の鎮痛作用 炎症モデルを用いた検討. *薬理と治療* 26: 457-463, 1998
- 23) 西角文夫: アジュバンド関節炎ラットにおける EHDP の作用. *Osteoporosis Japan* 7: 209-212, 1999
- 24) 田中伴由紀, 中山達夫, 勝又 隆: 鎮痛作用を併せ持つ骨粗鬆症治療薬 エチドロネートの多様な薬理作用. *Bio Clinica* 16: 237-241, 2001
- 25) Cantatore FP, Acquista CA, Pipitone V: Evaluation of bone turnover and osteoclastic cytokines in early rheumatoid arthritis treated with alendronate. *J Rheumatol* 26: 2318-2323, 1999
- 26) Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, Uzawa M: Early response of alendronate after treatment with etidronate in postmenopausal women with osteoporosis. *Keio J Med* 52: 94-100, 2003
- 27) Agarwala S, Sule A, Pai BU, Joshi VR: Alendronate in the treatment of avascular necrosis of the hip. *Rheumatology (Oxford)* 41: 346-347, 2002
- 28) Gangji V, Appelboom T: Analgesic effect of intravenous pamidronate on chronic back pain due to osteoporotic vertebral fractures. *Clin Rheumatol* 18: 266-267, 1999
- 29) Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S: Transient relief of metastatic cancer bone pain by oral administration of etidronate. *J Bone Miner Metab* 20: 228-234, 2002
- 30) Glover D, Lipton A, Keller A, Miller AA, Browing S, Fram RJ, George S, Zelenakas K, Macerata RS, Seaman JJ: Intravenous pamidronate disodium treatment of bone metastases in patients with breast cancer. A dose-seeking study. *Cancer* 74: 2949-2955, 1994
- 31) Hortobagyi GN, Terhault RL, Porter L, Blayney D, Lipton A, Sinoff C, Wheeler H, Simeone JF, Seaman J, Knight RD: Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast and lytic bone metastases. *N Engl J Med* 335: 1785-1791, 1996
- 32) Siris E, Chines AA, Altman RD, Brown JP, Johnston CC Jr, Lang R, McClung MR, Mallette LE, Miller PD, Ryan WG, Singer FR, Tucci JR, Eusebio RA, Bekker PJ: Risedronate in the treatment of Paget's disease of bone: an open label multicenter study. *J Bone Miner Res* 13: 1032-1038, 1998
- 33) Miller PD, Brown JP, Siris ES, Hoseyni MS, Axelrod DW, Bekker PJ: A randomized, double-blind comparison of risedronate and etidronate in the treatment of Paget's disease of bone. *Am J Med* 106: 513-520, 1999

講座

膝関節靭帯損傷

慶應義塾大学医学部整形外科学教室

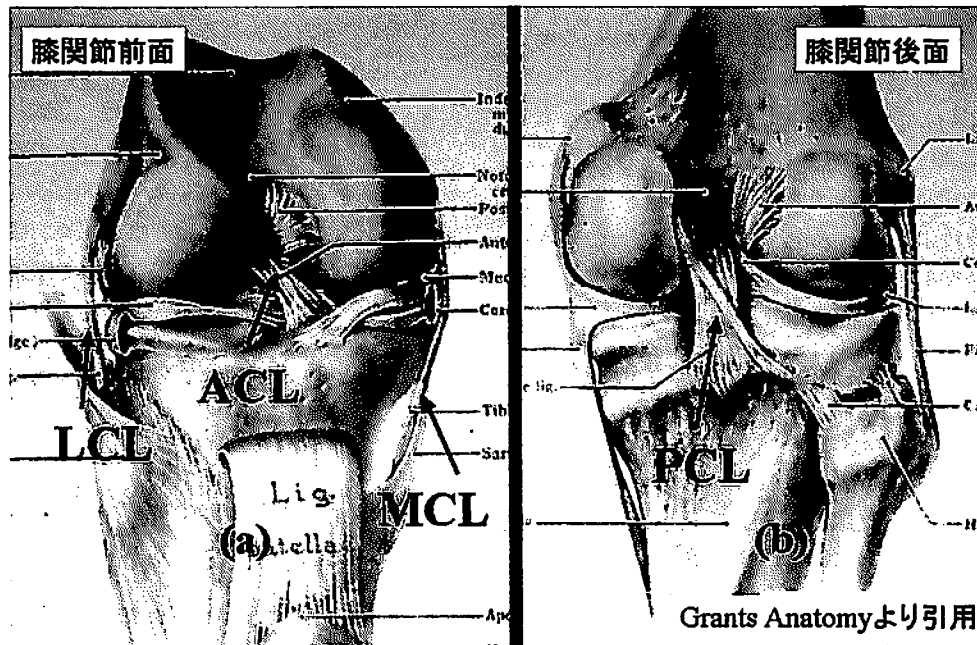
まつもと ひで お
松本秀男

Key Word : knee joint, ligament, joint instability, conservative treatment, reconstruction

概念

膝関節の運動範囲は極めて大きく、屈伸運動は起立時の完全伸展位（0°）から正座ができる深屈曲位（約150°）に及ぶ。更に、女子、小児などでは正常でも20°程度の過伸展が可能なこともある。また、屈曲位では脛骨の骨軸を中心に回転する回旋運動などのより複雑な動きも可能である。この様に大きな可動性を持つ膝関節は、その一方で起立や歩行に伴い全身の体重を支える必要があるため、荷重に耐える十分な安定性も要求される。特にスポーツ活動時には強大な外力が加わるため、

膝関節の安定性は極めて重要である。膝関節ではこの関節安定性は主として靭帯や関節包、関節周囲の筋群等の軟部支持組織により確保されている¹⁾。特に内側側副靭帯（MCL）、外側側副靭帯（LCL）、前十字靭帯（ACL）、後十字靭帯（PCL）の4つの靭帯は膝関節の安定性に不可欠である（第1図）。従って、これらの膝関節靭帯が損傷されると、その種類や程度により様々な関節不安定性が惹起される。本稿では、この膝関節靭帯の機能解剖学と靭帯損傷の病態や診断、治療法について解説する。



第1図 膝関節の解剖。(a)：膝関節前面、(b)：膝関節後面。MCL：内側側副靭帯、LCL：外側側副靭帯、ACL：前十字靭帯、PCL：後十字靭帯。文献3を改変。

膝関節靭帯の解剖と機能

1. 内側側副靭帯 (MCL)

大腿骨内側上顆から脛骨内側部の鷲足 (屈筋腱付着部) の下に付着する薄く幅をもった靭帯で膝関節の内側を這う様に走行する。膝関節に外反力が加わると緊張し、これを制御する。また、脛骨のやや前方よりに付着するため脛骨の外旋に対する制御機能も有する。膝関節伸展位で最も緊張が強く、屈曲位ではやや弛緩する。また、MCLの大腿骨付着部は糸巻状の構造をしており、膝関節を屈曲するとMCLを巻き上げる様に動くため、膝関節のほぼ全可動域である程度の緊張を保っている。内側半月板にも線維を送り、内側半月板の制動にも関与している。

2. 外側側副靭帯 (LCL)

大腿骨外側上顆から腓骨頭に大腿二頭筋に包まれるように付着する細い筒状の靭帯で大腿骨および脛骨の外側縁とはやや離れて走行する。膝関節の伸展位では緊張が強く、内反および外旋を制御する。膝関節を屈曲すると、その緊張性は急激に低下するが、ある程度の内反や外旋に対する制御作用はすべての可動域で認められる。MCLと異なり外側半月板との線維性の連続は極めて粗である。

3. 前十字靭帯 (ACL)

膝関節内の大腿骨外側顆の内壁から関節の中心を前方に向かって走行し、脛骨顆間部前方に扇状に付着する靭帯である。伸展位では脛骨関節面と約30°の角度をもっているが、膝関節を屈曲すると徐々に後方に倒れ、90°屈曲位では脛骨関節面とほぼ平行になる。前内側線維と後外側線維と呼ばれる走行の異なる2つの線維束からなり、膝関節の屈伸に伴って2つの線維束間の緊張が徐々に移り変わることで、すべての運動範囲で緊張する。脛骨の前方変位および内旋を制御する。

4. 後十字靭帯 (PCL)

膝関節内の大腿骨内側顆の内壁から脛骨顆部後方に付着する靭帯で、大腿骨内側顆の内壁を這う様に後方に向かって走行する。ACLに比べほぼ2倍の太さを有している。膝関節のほぼ全可動域で緊張し、脛骨の後方変位および内旋を制御する。

膝関節靭帯損傷の症状

1. 急性期の症状

膝関節靭帯損傷はスポーツ外傷、交通事故、高所よりの落下など、様々な原因で生じ得るが、スポーツ外傷では単独の靭帯損傷が多く、交通事故では加わる外力が大きく複雑なため、複合靭帯損傷になることが多い。どの靭帯がどの程度損傷するかは、加わった外力の方向や強さ、速さ、受傷時の膝関節の屈曲角度や回旋角度などによって様々である。また、靭帯ばかりではなく、骨折や軟骨損傷、半月板損傷を合併することもしばしばある。いずれにせよ、受傷後の急性期には損傷部位からの出血などにより腫脹が強く、疼痛のために歩行できなくなることが多い。特に膝関節内に存在するACLやPCLの損傷では関節腔内に出血するため、通常、著しい腫脹 (関節内出血) とそれに伴う強い疼痛を認める。この関節内出血は受傷後2~3時間経ってから徐々に出現することもある。この急性期の腫脹は通常、受傷後1~2週経つと徐々に消退し、出血も吸収される。これに伴って疼痛も軽減し、関節可動域も改善する。しかし、これは損傷した靭帯が修復された訳ではなく、急性期の炎症所見が鎮静化したのであり、損傷した靭帯の種類により、様々な関節不安定性が残る。

2. 内側側副靭帯 (MCL) 損傷の症状

膝関節靭帯損傷の中で最も頻度が高く、膝関節を過度に外反する力が加わると損傷する。スポーツ中に膝が身体の内側に入った状態で転倒した際などに受傷すること多い。特にスキー外傷では下腿の回旋がスキー板によって制限されているため、脛骨内旋位で転倒すると、膝が固定されて逃げられないため、MCL損傷が生じ易い。損傷部付近の強い圧痛と腫脹を認め、膝関節を外反強制すると膝関節内側のMCLに沿って疼痛を訴える。大腿骨付着部での損傷が多く、その際には付着部の疼痛を訴える。通常は炎症の鎮静化に伴い圧痛、外反時痛ともに徐々に軽減するが、付着部の圧痛は比較的長期に残存することが多い。

MCLは周囲を比較的血行のよい軟部組織に囲まれているため、自然修復能力が高く、経時的に修復され不安定性が改善する症例もあるが、最終的にはある程度の外反不安定性が残存する症例が多い。自覚的には運動をする際に「膝の内側がカクカク開くような不安定感」を訴える。MCL損傷に伴う外反不安定性はその程度によりI度~III度に分類されている。I度はMCL付着部 (通常は大腿骨付着部) に圧痛や腫脹を認めるが不安定性を

認めないもので、MCLの部分断裂であると考えられている。II度は完全伸展位では不安定性を認めないが、30°屈曲位では外反不安定性を認めるもので、通常のMCL単独損傷はこれに属することが多い。III度は完全伸展位、30°屈曲位とも外反不安定性を認めるもので、ACLやPCL損傷を合併している重度の損傷であることが多い。

3. 外側側副靭帯（LCL）損傷の症状

膝関節靭帯4本の中で、その損傷頻度が最も少ない。LCL損傷は膝関節に過度の内反力が加わると受傷するが、通常のスポーツ外傷では膝関節に加わる内反力は股関節が内旋することにより逃げてしまうためLCLの損傷は起こりにくい。逆に、比較的多いのがオートバイ乗車中の交通外傷である。オートバイは膝関節の内側に大きなエンジンが存在するため、股関節の内転、内旋が制限され、この状態で転倒すると膝関節に内反力が加わりやすい。いずれにせよ、交通事故による外傷は重篤なものが多く、LCLが単独で損傷されることは稀で、ACLやPCL損傷、更には様々な骨折などを合併することが多い。LCL損傷そのものの症状は、あぐらをかくような動作またはスポーツにおけるカッティング動作時に関節の不安定性を訴えることが多い。

4. 前十字靭帯（ACL）損傷の症状

MCL損傷に次いで頻度の高い靭帯損傷であり、スポーツ活動の継続に大きな支障を来すことが多い。脛骨に過度の前方引き出し力が加わった場合、膝関節が過伸展された場合などにも受傷するが、膝関節に過度の回旋力（内旋）が加わって受傷することが多いとされている。従って、スポーツ外傷が圧倒的に多く、ジャンプの着地時などに膝をひねった際に受傷する。ACLは膝関節内に存在するため、損傷すると関節内出血を来すことが多いが、通常は受傷後1～2週間で、腫脹や疼痛は軽減し可動域も改善する。ACL損傷に伴う関節不安定性は、脛骨全体が大腿骨に対し前方に変位する前方不安定性と脛骨外側顆が回旋しながら前方亜脱臼する前外側不安定性が知られている。この内、自覚的には前外側不安定性が問題となり、ジャンプの着地時などにgiving wayと呼ばれる「膝がはずれる感じ」を訴える。また、ACL損傷の問題点は靭帯損傷に伴う不安定性だけでなく、このgiving wayにより、関節軟骨や半月板の損傷が生じ、更にこれが繰り返されると二次性の変形性膝関節症に移行することである。

5. 後十字靭帯（PCL）損傷の症状

脛骨に過度の後方引き出し力が加わることにより受傷する。スポーツ活動中の受傷もしばしば見られるが、半数以上は交通外傷である。乗用車に乗車中に追突し、ダッシュボードが下腿の中枢部にあたり脛骨が後方に押し込まれて受傷するdashboard injuryが有名である。交通事故が多いため、様々な合併損傷に注意する必要がある。ACL損傷と同様、関節内出血を来すことが多いが、受傷後1～2週間で鎮静化する。PCL損傷に伴う関節不安定性は、脛骨全体が大腿骨に対し後方に変位する後方不安定性である。徒手的に不安定性が大きいわりにはACL損傷に比べ、自覚的には不安定性を訴えることが少なく、後方不安定性を残したままスポーツ活動を継続していることも多い。しかし、中には階段昇降などで不安定性を訴える症例も存在する。ACL損傷に比べ、二次的な関節軟骨や半月板の損傷頻度、変形性関節症への移行頻度は低い。

靭帯損傷の診断

先に述べた如く、膝関節靭帯損傷の主な症状は関節不安定性であり、損傷靭帯の組み合わせによって様々な種類の不安定性が惹起される。従って靭帯損傷の診断にはMRIなどの補助診断も有効ではあるが、最も基本となるのは徒手検査により不安定性を把握することである。

1. 外反不安定性

膝関節外反不安定性は膝関節に外反力が加わった際に内側関節裂隙（すきま）が開大するような不安定性である⁶⁾。徒手検査は完全伸展位と軽度屈曲位（20°～30°）で行う。完全伸展位ではACLやPCL、関節包などの緊張も高くなるため、MCL単独損傷では陽性となりやすく、軽度屈曲位でのみ認められることが多い。ACL損傷、PCL損傷、またはその両者を合併すると外反不安定性は極めて高度になり、完全伸展位、軽度屈曲位ともに陽性になることが多い。

2. 内反不安定性

膝関節内反不安定性は膝関節に内反力が加わった際に外側関節裂隙が開大するような不安定性である⁶⁾。LCLばかりでなく、ACL、PCL、更に膝窩筋腱の損傷を伴うことが多い。徒手検査は完全伸展位と軽度屈曲位（20°～30°）で行う。膝関節完全伸展位ではACLやPCL、関節包などの緊張も高くなるため、LCL単独損傷では内反不安定性が出にくい。軽度屈曲位における内

反不安定性が検出されれば LCL 損傷を疑うが、強い不安定性を認める場合には ACL 損傷, PCL 損傷, または膝窩筋腱損傷の合併を念頭に置く必要がある。

3. 前方不安定性

膝関節前方不安定性は脛骨に前方引き出し力が加わった際に脛骨が大腿骨に対して前方変位する不安定性である。徒手検査では軽度屈曲位(20°~30°)で行う Lachman test と 90°屈曲位で行う anterior drawer test (ADT) で検出する。ACL は全可動域で比較的良好な緊張性を保つため、通常 ACL 損傷では、いずれの test も陽性となる。しかし、損傷 ACL が顆間窩や PCL に癒着したり、関節内の線維組織の二次的な肥厚を認める様な症例では一方の test が陰性に出ることがある。また、ACL 損傷にしばしば合併する半月板のバケツ柄損傷が存在すると、その嵌頓のために前方不安定性が検出しにくいこともある。

4. 後方不安定性

膝関節後方不安定性は脛骨に後方引き出し力が加わった際に脛骨が大腿骨に対して後方変位する不安定性である。徒手検査では軽度屈曲位(20°~30°)での脛骨後方不安定性みる reverse Lachman test と 90°屈曲位での posterior drawer test (PDT) で検出する。PCL も ACL と同様、全可動域で比較的良好な緊張するため、通

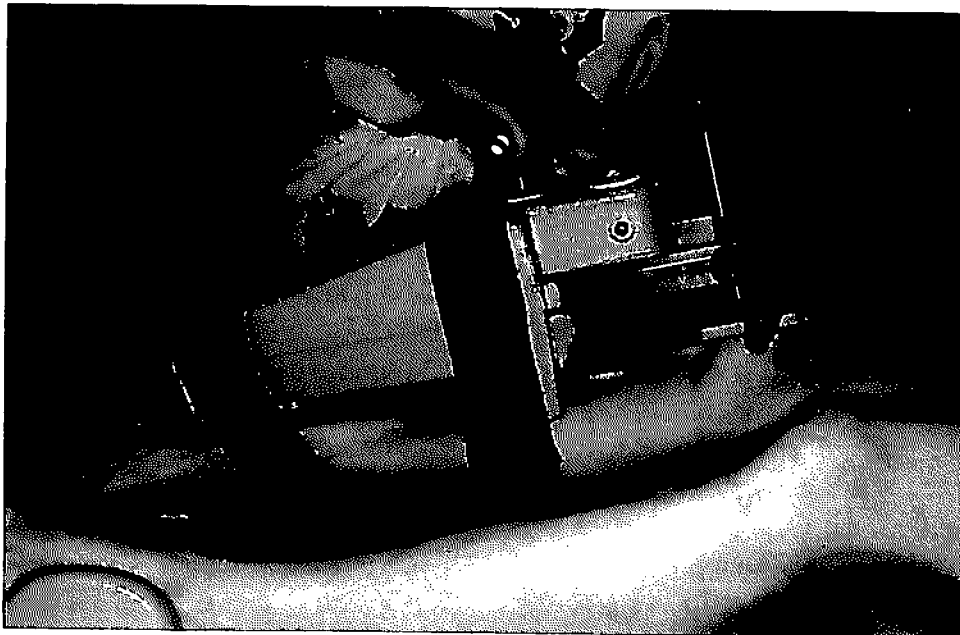
常 PCL 損傷では上述した test のいずれもが陽性となる。しかし、十分な筋弛緩の得られない例や関節内の癒着を認めるような症例では、すべてが陽性にならないこともある。また、PCL 損傷による後方不安定性と ACL 損傷による前方不安定性の鑑別が難しい症例があり、その際には重力による脛骨の後方変位の左右差を比べる posterior sagging の有無が重要な決め手になる。

5. 前外側回旋不安定性

膝関節を外反力下に屈伸すると、軽度屈曲位で脛骨外側の急激な前方亜脱臼が起こる現象である⁷⁾。ACL 損傷患者が「膝が抜ける」と訴える不安定感を最もよく再現する不安定性と考えられている。徒手検査として pivot shift test⁸⁾, jerk test, N-test など様々な方法が考案されている。Pivot shift test は膝関節伸展位から外反トルク下に膝関節を徐々に屈曲させ、徐々に前方亜脱臼した脛骨が軽度屈曲位で急激に整復される現象を見るものであり、逆に jerk test は膝関節を屈曲位から徐々に伸展させ、軽度屈曲位における脛骨の急激な前方亜脱臼を見るものである。いずれの test も屈伸の方向は異なるものの、同じ現象を検出するものである。

6. 前内側回旋不安定性

元来は前方引き出しに際し、脛骨が外旋しながら前方へ変位することを意味したが⁹⁾、現在では脛骨外旋位にお



第2図 膝関節不安定性測定装置(KT-2000)による前方不安定性の測定。脛骨中枢部に前後方向の力を定量的に加え、その際に生じる脛骨の大腿骨に対する変位を測定する。

ける前方引き出し兆候を指すことが多い。徒手検査では膝関節 90°屈曲位で下腿を外旋位で固定して前方引き出しテストを行う。現在ではその臨床的意義はあまり重視されていない。

7. 後外側回旋不安定性

脛骨が外旋しながら後方に変位する不安定性である。徒手検査では膝関節 90°屈曲位で下腿を外旋しながら後方引き出しテストを行う。PCL 及び後外側支持機構（膝関節の後外側に存在する LCL、膝窩筋腱、弓状靭帯などの総称）の損傷が関与すると言われている¹⁰⁾。

8. 不安定性の定量化

上述したように膝関節不安定性は通常徒手検査により評価されている。徒手検査は被検者の筋緊張を感知したり、屈曲角度や引き出し力を微妙に調節しながら症例ごとにきめの細かい検索をすることが可能であるが、一方で客観性に欠ける欠点がある。これまで、関節不安定性の定量化には外力を加えながら単純 X 線を撮影するストレス X 線撮影が用いられてきたが、近年、様々な膝関節不安定性測定装置が開発されている。不安定性測定装置には外力（力またはトルク）を定量的に加え、その際に生じる不安定性を X 線計測するもの¹¹⁾、②加える外力と不安定性の測定のいずれも装置で行うもの¹²⁻¹³⁾

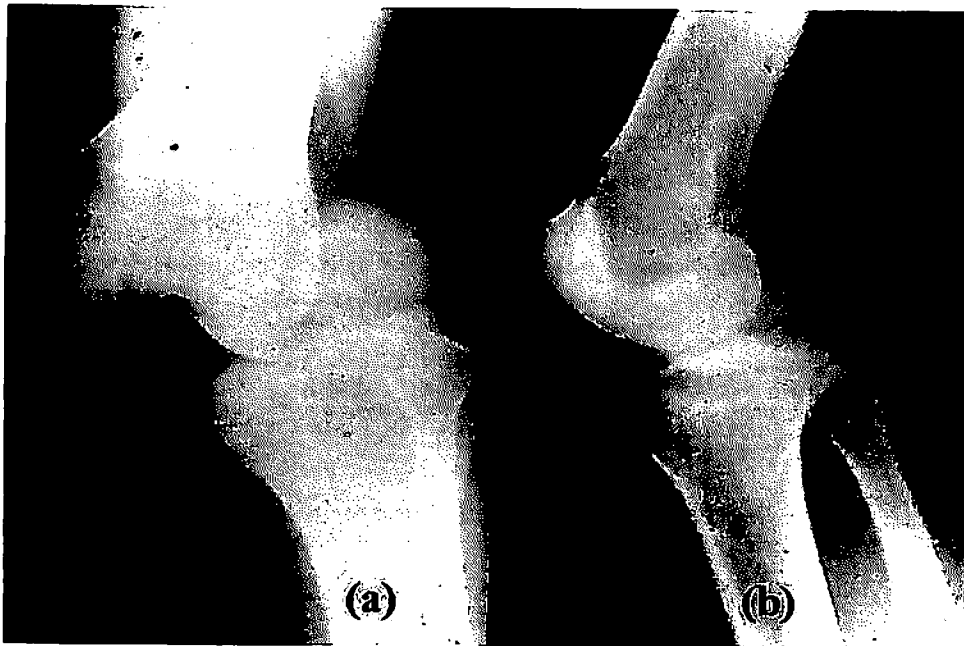
(第 2 図)、③一定の外力下に膝関節を屈伸させ、その際に生じる膝関節運動の変化を測定するもの¹⁴⁾がある。

靭帯損傷の治療

1. 急性期の治療

靭帯損傷後の急性期に最も大切なことは組織の損傷が拡大するのを防ぎながら、急性炎症症状を鎮めることである。かつては、膝関節靭帯損傷は急性期に緊急手術を行い、靭帯の縫合や再建が行われたが、この時期に手術操作を加えると、外傷による侵襲に更に手術侵襲が加わるため、可動域制限を残す症例が多い。従って、膝関節脱臼に伴う靭帯損傷（第 3 図）で徒手的に整復が不能な場合や血管損傷など緊急を要する場合でなければ、急性期の炎症症状がおさまってから手術を行う。一般に「靭帯損傷」→「歩行不能」→「緊急手術」という連想をする患者は決して少なくない。靭帯損傷受傷直後の急性期には、関節の腫脹も著しく疼痛も強いため、早期の手術を求める患者もいる。しかし、急性期に手術を行うと可動域制限を来すことが多いこと、炎症所見が鎮静化すれば、疼痛、腫脹とも徐々に軽減し、その後に手術を行った方が成績が良いことをよく説明することが大切である。

まず、ACL 損傷や PCL 損傷などで関節内出血を認める場合には、これを穿刺する。穿刺液は新鮮靭帯損傷で



第 3 図 膝関節脱臼。脛骨は大腿骨の関節面から完全に逸脱している。この様な膝関節脱臼例では通常 3~4 本の靭帯損傷を合併する。

は通常血液であるが、陳旧性の靭帯損傷や半月板損傷では黄色い関節液であることもあり、穿刺液の性状も診断に有用である。関節穿刺により腫脹が軽減し、疼痛が少し改善したところで、徒手検査により関節不安定性を可能な範囲で確認する。急性期には腫脹や疼痛が完全には除去出来ないため、十分な徒手検査が出来ず、確定診断が得られないこともある。しかし、無理な徒手検査は靭帯の損傷をかえって悪化させる場合があるので行わず、その際には急性期の炎症所見が鎮静化してから、改めて正確な診断を下す必要がある。更に、合併する骨折などを確認するため、単純 X 線写真の撮影は行っておく。

骨折を伴っている場合や、損傷組織が広範囲に及ぶ場合にはギプスなどによる外固定を要することがある。急性期のギプス固定は腫脹が強くなると患肢は相対的に圧迫され、循環障害や神経障害を来す可能性があるので注意を要する。疑わしい場合には、すぐにギプス固定を除去する。単独の靭帯損傷では、通常支柱付サポーターなどの装具を装着して、ある程度関節を運動させながら、損傷靭帯の二次損傷を予防する。損傷靭帯の種類により様々なタイプのブレースが開発されている。また、腫脹が強い場合は、松葉杖を処方して患肢は免荷とする。消炎鎮痛剤を投与し、就寝時には患肢を高挙してアイシングを行うなど、腫脹を早期に軽減させる処置も大切である。

この時期に特に大切なことは患肢の安静や免荷により筋萎縮が急激に進むので、可能な限り筋力訓練を行うことである。通常、関節を動かしながら行う筋力訓練は損傷部を刺激し、靭帯損傷を悪化させる可能性があるため、患肢を伸展位のまま足部におもりを乗せて挙上するなど、等尺性の筋力訓練が有効である。

この急性期の腫脹は受傷後 1~2 週経つと徐々に消退し、出血も吸収される。これに伴い疼痛も軽減し、関節可動域も改善する。しかし、これは損傷した靭帯が修復された訳ではなく、急性期の炎症が鎮静化したのであり、靭帯損傷に伴う関節不安定性が残る。先に述べた如く、受傷直後には疼痛や腫脹のために正確な診断が下せないことがあり、この時期に再度徒手検査などを行って、損傷靭帯の種類、程度などを再確認する。残った関節不安定性の程度と患者の職業、活動性、将来の希望などを考慮して、その後の治療方針を決定する。

2. 靭帯損傷に対する保存療法

靭帯損傷に対する保存療法は 2 つの目的に大別される。一つは新鮮靭帯損傷に対して、これを修復させることを目的とした積極的保存療法であり、もう一つは靭帯

損傷によって生じた関節不安定性を筋力トレーニングなどで代償する対症療法である。

古くから MCL 損傷に対しては積極的保存療法が行われてきた。MCL は周囲に比較的血行のよい軟部組織が豊富にあり、自然修復機転が働きやすいため、受傷直後から伸展位または軽度屈曲位で 2~3 週間のギプス固定が行われることが多い。受傷直後の出来るだけ早い時期に治療を開始し、損傷靭帯の修復を促すことが大切である。また、近年、関節の屈伸運動をさせながら外反力のみを予防する装具も開発されている。いずれにせよ、固定期間中は筋力低下が急激に進行するので、可能な限り早く、大腿四頭筋訓練などを開始することが大切である。しかし、初期には腫脹や疼痛が強いため、軽度屈曲位の等尺性運動訓練に留め、炎症所見の改善を見ながら徐々に強化する。また、急性期に無理な可動域訓練を行うと損傷部の新たな出血などにより靭帯の付着部に異所性骨化などを生じ、かえって可動域制限が強くなることもある。従って、この大腿骨付着部の腫脹や熱感などの炎症所見を認める場合には、可動域訓練は愛護的に行う。受傷後 3~4 週で、装具を装着し、関節不安定性の経過を観察しながら徐々に日常生活、スポーツ活動に復帰させる。外反不安定性の残存のために十分な復帰ができない時は手術療法も考慮する。

一方、ACL や PCL は自然修復機転がほとんど働かないとされてきたが、近年、これらも修復される可能性があることが指摘され、ACL 損傷や PCL 損傷に対しても積極的保存療法が試みられている。可動域は確保しながら、ACL 損傷に対しては脛骨の前方変位を予防する装具が、PCL 損傷に対しては脛骨の後方変位を予防する装具が開発されている。いずれも、受傷後なるべく早期から装着を開始し、筋力低下を予防しながら、靭帯の修復を待つ。しかし、関節不安定性の残存する症例も多い。

一方、陳旧性靭帯損傷に対して行われる保存療法は新鮮損傷に対して行われる様な靭帯の修復を目的とするものではなく、靭帯損傷によって生じた関節不安定性を筋力強化などにより補うことを目的とした対症療法である。ACL 損傷に伴う関節不安定性は活動性の高い症例では保存療法は難しいが、MCL 損傷や PCL 損傷では大腿四頭筋訓練によりある程度、自覚的には関節安定性が得られる。また、いずれの靭帯損傷に対しても、その不安定性を軽減する目的で装具やテーピングなども行われる。

3. 靭帯縫合術

かつては膝関節靭帯損傷に対しては急性期に縫合術が盛んに行われた。しかし、その術後成績が安定しないこ

と、急性期の手術操作により関節拘縮を来す症例が多いこと等が報告されている。現在、周囲組織の血行が比較的豊富で組織の修復に比較的有利な MCL を除いては急性期には縫合術はほとんど行われていない。

MCL 縫合術はスポーツ選手など膝関節の十分な安定性が要求される活動性の高い症例に行われる。受傷後可及的早期に MCL の損傷部を展開し、損傷した靭帯を端々縫合する。術後は縫合部の状態や縫合強度を考慮してギプスなどにより外固定を行う。通常 1~2 週程度のギプス固定後、CPM 装置を用いて可動域訓練を開始する。腫脹がおさまったら荷重歩行を許可する。活動性の高い症例が多いため、大腿四頭筋訓練度を術直後から行い、筋力低下を最大限に予防することが重要である。

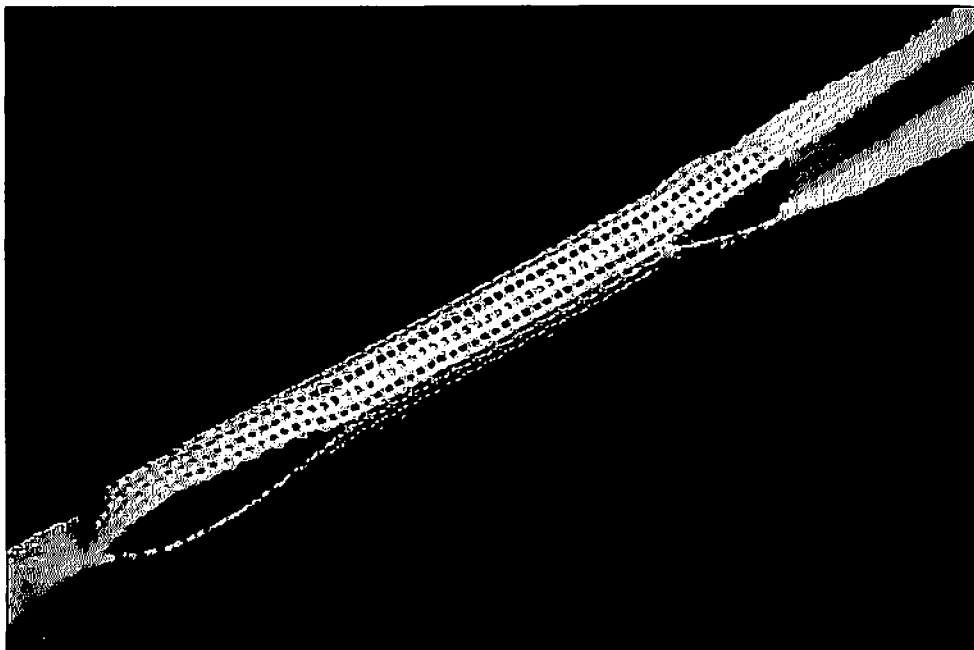
4. 靭帯再建術

陳旧性の靭帯損傷では損傷靭帯は消失したり、わずかな遺残組織を残すのみであるなど、機能的な靭帯は残っていないことが多く、縫合術は不可能である。従って、その機能を回復するためには靭帯を作り直す再建術が必要となる。また、新鮮例でも前述した様に、靭帯縫合術では十分な強度が得られず、術後成績が安定しないため、MCL の修復術を除いては再建術が行われるのが一般的である。

1) 手術適応

ACL 損傷では「靭帯損傷の症状」の項で述べたように、スポーツ活動中に giving way と呼ばれる「膝がはずれる感じ」を訴えたり、これを繰り返されることによって半月板損傷や軟骨損傷を合併するので、活動性の高い症例では手術が必要になることが多い。プロのスポーツ選手など活動性が極めて高く、早期のスポーツ復帰が必要な症例では、受傷後 2~3 週で急性期の炎症症状が鎮静化したら、MRI により ACL、他の靭帯、半月板等の状態を確認した後、手術を行う。スポーツ活動レベルがあまり高くない症例では、急性期の炎症症状が鎮静化したら、一度、日常生活に復帰させ、日常生活上でも、明らかな不安定性を訴える場合に手術を考慮する。日常生活では不安定性を訴えない場合には、徐々にスポーツ復帰させ、不安定性の症状がなければ筋力強化などの対症的保存療法を行う。日常生活では不安定性を訴えず、スポーツ活動のみ不安定性を訴える症例に対しては、スポーツの継続の意志が強い場合には手術を考慮する。

PCL 損傷や MCL 損傷では他覚的な関節不安定性が残っていても、自覚的に関節不安定感を訴える症例は比較的少なく、再建術の適応はより少なくなる。スポーツ活動性の高い症例でも、一度、スポーツ活動に復帰させ、靭帯損傷による訴えのために継続が困難な場合のみ再建



第 4 図 Leeds-Keio 人工靭帯。ポリエステル製でメッシュ構造を有し、その最大破断強度は約 2000N である。



第5図 Leeds-Keio人工靭帯によるACL再建術。ACL遺残組織の間に人工靭帯を通し、両端をステーブルで固定する。

術を行う。

2) 手術方法

関節内の靭帯であるACLやPCLの再建術は通常関節鏡視下に行われる。再建に用いられる材料(再建材料)は膝関節周囲の自家組織を用いるのが一般的である。膝蓋腱の中央1/3を骨をつけたまま採取して用いるBTB(bone-tendon-bone)といわれる方法が主流であったが¹⁵⁾、最近では膝関節の屈筋腱を用いる方法も広く用いられている¹⁶⁾。また、人工靭帯(第4図)を用いる方法やハイブリッドと呼ばれる人工靭帯と自家組織を組み合わせた方法も行われている^{17~18)}。

手術は通常全身麻酔下に駆血帯を用いて行われる。まず、関節内を関節鏡を用いて観察し、鏡視下に合併する半月板損傷や軟骨損傷に対する処置を行う。次いでACL、PCLのいずれも大腿骨、脛骨それぞれの骨付着部から関節外に向かって骨トンネルを作る。再建材料をこのトンネルに通し、その出口部でこれを固定する(第5図)。固定方法は用いる再建材料によって様々であり、スクリュー、ステーブル、エンドボタンなどの金属が用いられることが多い。MCLとLCLは関節外靭帯であるため、MCL再建術やLCL再建術では、それぞれの靭帯付着部を中心に切開を行って再建術が行われるが、骨トンネルを作製して再建材料を通し、その出口部で固

定を行うことは同様である。

3) 術後処置および後療法

術後は再建材料の種類にもよるが、通常は装具による簡単な固定を行う。駆血帯を用いて手術を行った場合には、術後下肢のしびれを訴えるが通常長くても1週間前後で消失する。関節可動域訓練は通常手術翌日よりCPM装置を用いて開始する。荷重歩行の時期は再建材料の種類や手術侵襲等によって異なるが、通常、腫脹のおさまる術後1週程度から装具をつけて許可する。

終わりに

膝関節靭帯損傷は必ずしも手術を要するわけではなく、年齢、職業、活動レベル、生活様式、意欲などを総合的に判断して治療方針を決定することが大切である。

文 献

- 1) von Kahle W, 他: 解剖学アトラス(越智淳三訳), 文光堂, 1981
- 2) von Lanz T, 他: Bein und Statik. Praktische Anatomie. (Ed) von Lanz T and Wachsmuth W, Verlag von Julius Springer, Berlin, p.202-286, 1958
- 3) Anderson JE: The lower limb. Grant's Atlas of

- Anatomy, 8th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Figure 1-129, 1983
- 4) 富士川恭輔 (編)：図説膝の臨床. Medical View 社, 1999
 - 5) Hughston JC, Andrews JR, Cross MJ, Moschi A : Classification of knee ligament instabilities. Part I : The medial compartment and cruciate ligaments. J Bone Joint Surg 58A : 159-172, 1976
 - 6) Hughston JC, Andrews JR, Cross MJ, Moschi A : Classification of the knee ligament instabilities. Part II : The lateral compartment. J Bone Joint Surg 58A : 173-179, 1976
 - 7) Matsumoto H : Mechanism of the pivot shift. J Bone Joint Surg 72B : 816-821, 1990
 - 8) Galway HR, Beaupre A, MacIntosh DL : Pivot shift : A clinical sign of symptomatic anterior cruciate insufficiency. J Bone Joint Surg 54B : 763-764, 1972
 - 9) Slocum DB, Larson RL : Rotatory instability of the knee. J Bone Joint Surg 50A : 211-225, 1968
 - 10) Suda Y, Seedhom BB, Matsumoto H et al : Reconstructive treatment of posterolateral rotatory instability of the knee : A biomechanical study. Am J Knee Surg 13 : 110-116, 2000
 - 11) 秋月 章, 和田忠彦, 安川幸広 : 膝関節前後動揺性の定量的評価法-Telos 社製器具による正常および前十字靭帯断裂膝の検討-. 関節外科, 8 : 463-469, 1989
 - 12) Daniel DM, Malcom LL, Losse G, Stone ML, Sachs R, Burks R : Instrumented measurement of anterior laxity of the knee. J Bone Joint Surg 67A : 720-726, 1985
 - 13) 松本秀男, 富士川恭輔, 竹田 毅, 他 : KT-2000 による膝関節前後不安定性の評価-その有用性と限界-. 整形外科, 45 : 759-766, 1994
 - 14) 金井洋夫, 森雄二郎, 山下博樹, 他 : 陳旧性前十字靭帯損傷膝の Pivot shift test 時における前後不安定性の検討. 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 15 : 339-343, 1994
 - 15) 黒坂昌弘, 他 : 膝前十字靭帯再建術. 膝蓋腱を用いる方法, OS-NOW 四肢スポーツ外傷の手術的治療 (林浩一郎編). メジカルビュー社, p.166-171, 1996
 - 16) 前田 朗, 他 : 膝前十字靭帯再建術. 自家半腱様筋腱, OS-NOW 四肢スポーツ外傷の手術的治療 (林浩一郎編). メジカルビュー社, p.148-153, 1996
 - 17) 松本秀男, 川久保誠, 大谷俊郎, 他 : 膝関節複合靭帯損傷再建術における再建材料の選択. 膝関節複合靭帯損傷. 骨・関節・靭帯. 10 : 835-840, 1997
 - 18) 安田和則, 大越康充, 大関一覚, 他 : 自家腱および人工材料からなる膝十字靭帯再建用ハイブリッド代用材料の開発. 膝, 17 : 128-134, 1992

講 座

脳卒中の急性期・回復期・維持期のリハビリテーションと介護保険

慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンター

正 門 由 久・大 田 哲 生・木 村 彰 男

Key Word： 脳卒中，リハビリテーション，急性期，回復期，介護保険

はじめに

介護保険は平成12年4月1日より施行された。介護サービスが老人医療制度，老人福祉制度に分立していることより生じる多くの問題に対し，介護保険は，介護を社会全体で支え，社会保険方式により，給付と負担を明らかにして，サービスを選択でき，介護を医療保険から切り離し，社会的入院の解消などを図るものである¹⁾。その基本的理念として，高齢者自立促進会議は，予防とリハビリテーション（以下リハビリと略す）の重視，医療と福祉の連携，自己選択権の尊重，民間活力，総合的・効率的サービス，在宅ケアの推進などを挙げている。

介護保険は，要介護状態または要介護になる恐れがある状態（要支援）を保険事故として給付の対象にする。要介護状態とは，身体上または精神上の障害があるために，食事，入浴，排泄などの日常生活での基本的動作の全部または一部について，厚生労働省令で定める期間にわたり継続して，常時介護状態を要すると見込まれる状態である²⁾。しかしながらなぜ，どのような原因で，どのような経過で要介護状態となったのが大変重要である。厚生労働省は，リハビリ前置主義を唱えて医療の中で十分なリハビリを行い，患者を自立または介護の程度を軽減させてから介護保険に移ることを薦めている。それには医療の中でまずリハビリ医療が必要かつ十分に提供される体制が必要であるが，医療提供体制の変革，診療報酬制度におけるリハビリに対する点数の改正，入院期間の制限，回復期リハビリ病棟の設置などリハビリ医療を取り巻く環境は劇的に変化しており，だれでもがどこでも必要な十分なリハビリ医療が急性期から提供されるような環境とは言い難い。実際に我々が介護保険におけるリハビリに関わってきた経験からも，医療の中でリハビリを受けずに自宅に退院され，不自由な生活を送っ

ておられる患者さんは少なくない。一方，医療に関わる者にとって介護保険を理解することは，大変重要で必要なことである。

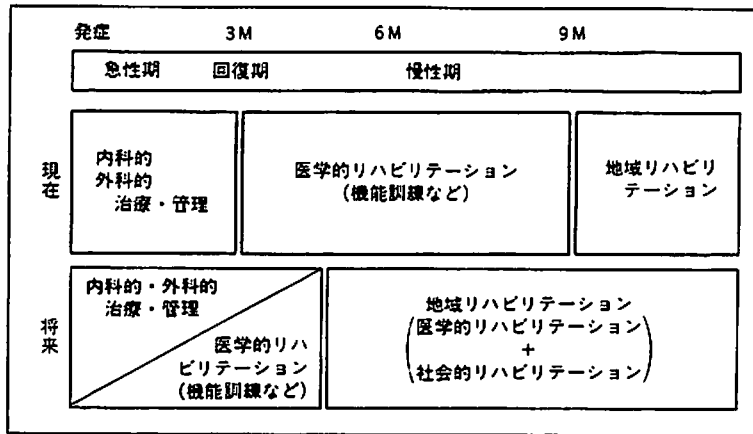
リハビリは脳卒中を例にとれば主に，医療機関でおこなわれる急性期から回復期のリハビリと，地域生活を基盤として行われる慢性期（維持期：機能を維持する時期）のリハビリに大きく分けられる（図1）³⁾。今後急性期から回復期のリハビリは主に医療保険で，介護保険におけるリハビリは維持期におこなわれるものと思われる。しかしながらそれには医療保険から介護保険までに至るスムーズな流れができ，そのどの過程でも必要かつ十分なリハビリが提供される体制を作ることが必要である。

本稿では，脳卒中を例に，急性期・回復期から維持期にいたるまでのリハビリと介護保険について述べる。

急性期のリハビリテーション

脳卒中は，BRAIN ATTACK に対処できしかもリハビリ機能の十分な病院で診断・治療を開始されるべきである。脳卒中の急性期リハビリは，治療の一部として，発症と同時に並行して開始されなければならない⁴⁾。拘縮や筋力低下などの二次的合併症がすでに起った後のリハビリでは，時期を逸することとなり，その後のリハビリに多くの時間，費用を費やさなければならないこととなる。

リハビリの開始は前述したように原則的には早ければ早いほどよく，原疾患の治療とともに開始されるべきものである。発症と同時にリハビリ科への依頼があり，リハビリ専門医と相談の上にその後のリハビリプログラムを決めることが大切である。褥瘡予防のための体位変換，ポジショニングや拘縮予防のための他動的ROM訓練は，発症当日より開始すべきであり，安全に施行できる。また，原疾患の治療とともに，併存疾患の管理や合併症



第1図 脳卒中のリハビリテーション・システム (伊藤利之: 地域リハビリテーション活動の展望—市行政の立場から—総合リハ, 28: 93-97, 2000 の第2図を出版者および著者の許可を得て転載)

第1表 Stroke Impairment Assessment Set (SIAS)

	upper extremity	tower extremity
motor		
proximal	0~5	0~5 (hip) 0~5 (knee)
distal	0~5	0~5
muscle tone		
DTRs	0~3	0~3
muscle tone	0~3	0~3
sensory		
light touch	0~3	0~3
position	0~3	0~3
range of motion	0~3	0~3
pain		0~3
trunk		
verticality	0~3	
abdominal	0~3	
higher cortical		
visuospatial	0~3	
speech	0~3	0~3
unaffected side	0~3	0~3
total	76	

DTR: deep tendon reflex

(正門由久: 急性期, 回復期, 慢性期 (機能維持期) のリハビリテーション. 診断と治療, 90 (増刊号): 13-23, 2002 の第3表を出版者の許可を得て転載)

の予防も大変重要である。肺炎, 肺塞栓, 尿路感染症, 深部静脈血栓, 不整脈, 虚血性心疾患, 消化管出血などの合併症・併存疾患が, リハビリプログラムの進行に関して影響が大きいことが1997年度に行った急性期リハビリの実態調査から判明した⁹⁾。一方, リハビリによる

早期離床は, 深部静脈血栓, 褥瘡, 拘縮, 便秘や肺炎などの予防にもなることも忘れてはならない。

現在, 座位開始の基準は, バイタルサインの安定 (全身状態が安定していること), 意識レベルが Japan coma scale にて一桁であること, 運動障害などの進行が止まっていることの3つとされている⁶⁾。しかし病態, 病型や重症度によって, 座位開始に際して注意しなければならない。

以上病棟では, 看護婦による看護プラン作成, 特に病棟でのADL介助 (食事, 排泄, 起居, 移乗), 車椅子座位, 座位の耐久性アップ, 褥瘡予防のための体位変換などが重要である。起座を開始し, 耐久性獲得後, 訓練室でのリハビリへ移行し, 患者の病態および機能に応じたリハビリプログラムが必要となる。

訓練室でのリハビリ開始に際しては, リハビリのゴールを作成し, 本格的なリハビリプログラムを作成する。その際には, 脳卒中患者の機能障害, 能力低下, 社会的不利, および医学的問題 (医学的診断, 合併症, 併存疾患) を評価することがあらためて必要である。機能障害の包括的評価尺度として, 代表的なものに脳卒中機能評価法 Stroke Impairment Assessment Set (SIAS) (表1) がある⁷⁾。これは脳卒中患者の運動障害ばかりでなく, 評価すべき機能障害の項目を網羅しており, 回復過程を追っていくことができる。能力低下, とくに日常生活動作 (Activities of Daily Living: ADL) の評価には, Barthel index や機能的自立度評価法 (Functional Independence Measure: FIM) (表2) がある⁸⁾。これらの評価によって, 経時的変化の測定や項目別のゴール

第2表 機能的自立度評価法（FIM）の評価尺度、評価項目および評価内容

評価項目	内 容（要点のみ抜粋）			
レ ベ ル	自立	介 助 者 な し	部分介助 5 監視または準備 4 最小介助 （患者自身で75%以上） 3 中等度介助 （50%以上） 完全介助 2 最大介助 （25%以上） 1 全介助 （25%未満）	介 助 者 あ り
	7 完全自立 （時間、安全性含めて）			
	6 修正自立 （補装具などを使用）			
セルフケア				
食 事	咀嚼、嚥下を含めた食事動作			
整 容	口腔ケア、整髪、手洗い、洗顔など			
入 浴	風呂、シャワーなどで首から下（背中以外）を洗う			
更衣（上半身）	腰より上の更衣および義肢装具の装着			
更衣（下半身）	腰より下の更衣および義肢装具の装着			
トイレ動作	衣服の着脱、排泄後の清潔、生理用具の使用			
排泄管理				
排 尿	排尿コントロール、器具や薬剤の使用を含む			
排 便	排便コントロール、器具や薬剤の使用を含む			
移 乗				
ベッド、椅子、車椅子	それぞれの間の移乗、起立動作を含む			
トイレ	便器へ（から）の移乗			
風呂、シャワー	風呂桶、シャワー室へ（から）の移乗			
移 動				
歩行、車椅子	屋内での歩行、または車椅子移動			
階 段	12 から 14 段の階段昇降			
コミュニケーション				
理 解	聴覚または視覚によるコミュニケーションの理解			
表 出	言語的または非言語的表現			
社会的認知				
社会的交流	他患、スタッフなどとの交流、社会的状況への順応			
問題解決	日常生活上での問題解決、適切な決断能力			
記 憶	日常生活に必要な情報の記憶			

（正門由久：急性期、回復期、慢性期（機能維持期）のリハビリテーション。診断と治療、90（増刊号）：13-23、2002の第5表を出版者の許可を得て転載）

設定に役立てることができる。

以上述べてきた脳卒中急性期でのリハビリの役割は、その適応と短期的および長期的なゴールの設定および機能予後、そのために必要な期間、退院までの見通し、外来リハビリや入院しての専門的リハビリの必要性やリハ専門病院に関する情報提供などのいわゆる‘振り分け機能’が要求される（図2）⁹⁾。これには、総合病院内での神経内科・脳神経外科・リハビリ科間の調整、リハビリ専門病院とのスムーズな連携が不可欠である。これらは、受け持ち医へのメリットとなるばかりでなく、DRG/PPS（診断群別診断群別包括支払方式）などを含めた医療保険制度の改革などで入院期間の短縮が求められている昨今大変重要なことである。また急性期リハビリや回復期、専門的リハビリの提供の有無または遅れによって、その後の介護保険での要介護度が変わってくることを再認識する必要がある。

平均在院日数は急性期病院の場合20日以下となっており、急性期のみの入院リハビリで自宅復帰できる患者は限られている。今後外来でのリハビリの充実やリハビリ専門病院との連携がますます求められるであろう。その際に適切な連携がないと、リハビリ医療を受けずに自宅復帰し、回復に必要なリハビリが提供されない危険性がある。

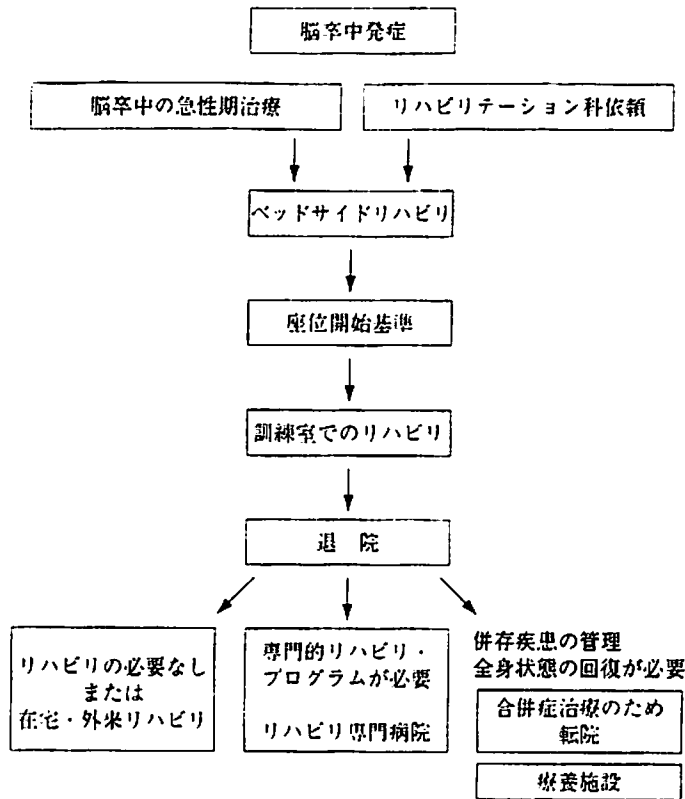
回復期のリハビリテーション

急性期を脱すると、その後回復期リハビリの開始となる。回復期ではADLの自立などを目標として、理学療法、作業療法、言語療法などを含めての総合的アプローチが展開される（図3）¹⁰⁾。

急性期を脱した患者が、然るべき集中的な回復期リハビリを受けずに在宅や介護施設へと移行し、その時点でのADLレベルで介護保険での要介護度が認定された場合、必要以上の介護給付がなされてしまうこととなる。

回復期リハビリは、平成11年度の調査から、対象患者が皮質症状を伴う重症な片麻痺が多数であったにもかかわらず、ADLを改善させ、介護度を軽減させることがわかった¹¹⁾。それゆえに回復期リハビリが適切に患者に提供される環境が必要である。その後平成12年より集中的なリハビリを目的に、診療報酬に回復期リハビリ病棟が設置され、全国でその基準を満たす病棟が増えていく。

当慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンターも回復期リハビリ病棟を2病棟開設し、従来の在宅への復帰率71%を上回る、88%の在宅復帰率を達成している。



第2図 脳卒中リハビリテーションのフローチャート (正門由久:急性期,回復期,慢性期(機能維持期)のリハビリテーション,診断と治療,90(増刊号):13-23,2002の第2図を出版者の許可を得て転載)

患者への十分なリハビリは当然ながら,患者・家族への介護指導,家屋改造の助言,介護保険の申請,利用による家族負担の軽減についての助言なども行っている¹²⁾.

維持期のリハビリテーション

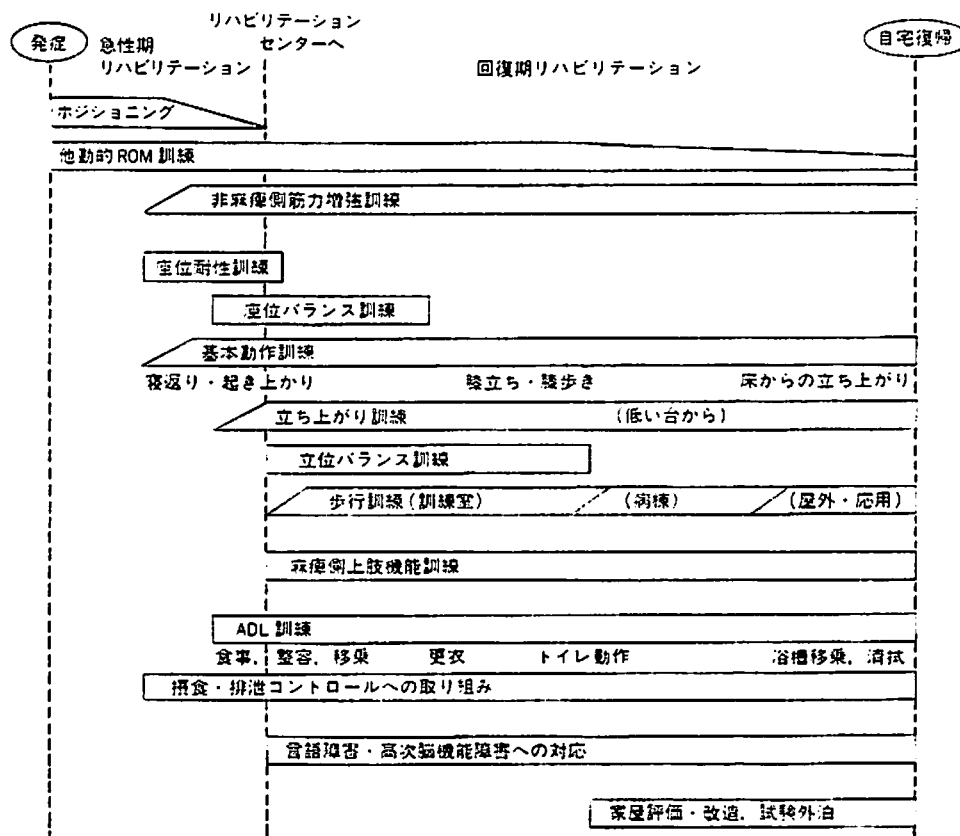
専門的・回復期リハビリの後に自宅退院となるかまたは,病院・施設での長期療養となる.自宅復帰した患者は,医療保険のなかでの外来リハビリを行う患者もいるが,その目的は,主に機能維持のためである.

維持期のリハビリの目的は日常の健康管理,機能維持および向上,社会参加の促進などである¹³⁾.特に退院時のADLのレベルに応じてのリハビリプログラムが必要である.機能が低下するのは,ADLに介助が必要な状態,Barthel indexが70点以下,FIMでは運動項目合計点が70点以下であると報告されている¹⁴⁾.しかしながらこのADLレベルの患者ばかりではなく,機能維持は,自然に行われるのではなく,患者ごとに問題点を的確に

捉えて,予測に基づいた,起りうる問題の予防に努めなければならない¹⁵⁾.患者・家族を取り巻く地域スタッフに,病態や予後の概略,予防法,訓練の禁忌の明確化,リスクへの対処法などを指導する必要がある.また維持期においても適切な医学的管理は重要である.

介護保険でリハビリテーション

リハビリ医療の立場から見ると,現在の要介護状態になる前に過去に以上のように述べてきたリハビリを受けたことがあるか,その効果はどうだったかが大変重要である.リハビリによって介護の程度が軽減できたはずであるのに,過去にリハビリが行われていないのであれば,介護保険よりリハビリ医療を優先させる必要がある.例えば,脳卒中片麻痺により,中等度の介助を要する場合には,リハビリを施行しないで自宅に帰った患者であれば,在宅でのリハビリによりADLが自立することもあり得る.また同じ状態の患者でも,十分な専門的リハビリを



第3図 脳卒中のリハビリテーションの流れ (問川博之, 正門由久, 木村彰男, 他: 脳卒中—急性期から自宅復帰まで 総合リハ, 25: 905-929, 1997 の図を出版者および著者の許可を得て転載)

施行されたのちの自宅退院であれば、リハビリは機能維持、悪化の防止のために行われる^{14,15)}。

つまり、同じ要介護状態にみえても、疾病や障害自体の性質により、ADLなどの改善が困難な「真の要介護状態」と、適切なリハビリを提供することによって要介護状態が改善される「仮の要介護状態」があると考えられる。前者では介護負担を最小限にするための工夫と合併症発生の予防、現状の維持および悪化防止のためのプログラムが、後者では状態に合わせたADL向上のためのプログラムが重要となる。これらの見極めが非常に重要である^{14,15)}。

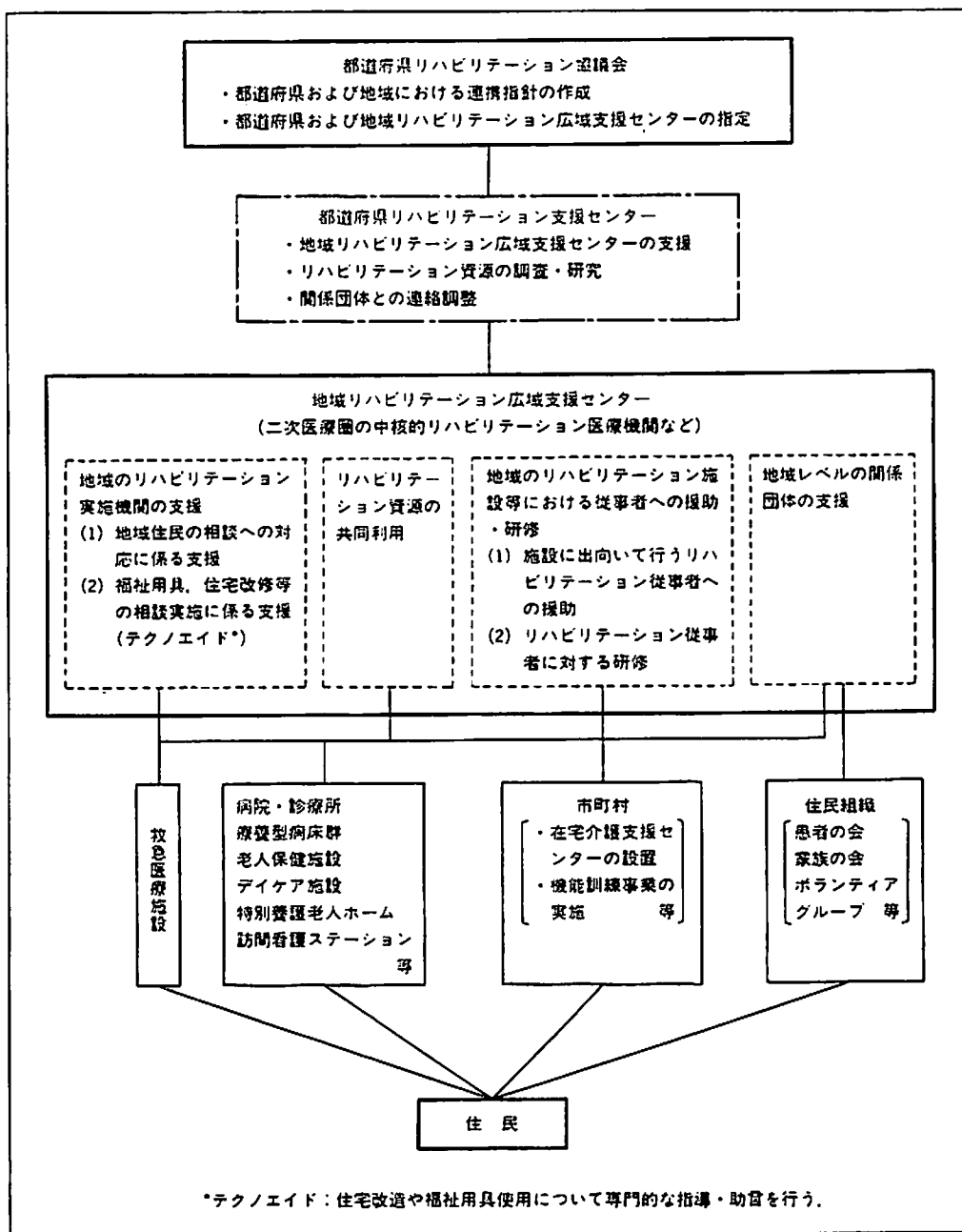
また、要介護状態において、「できない」原因や理由を明らかにすることも重要である。「仮の要介護状態」をもたらしている要因を十分に見極め、適切な対応を行うことにより機能の改善が得られる場合が少なくない。そのためには専門的な医学的知識や技術が必要である。そして、これにより要介護状態にある利用者の介護度が軽減されれば、利用者本人および介護者にとって大変よ

いことであると同時に介護保険制度自体にとっても限られた資源の効率的運用という点から重要なことであると考えられる。こうした側面にリハビリ医学・医療の寄与が期待される。

厚生労働省は要介護度に応じたサービス事例の基本的な考え方として、要介護状態の軽減もしくは悪化の防止、または要介護状態となることの予防・リハビリの重視、総合的かつ効率的なサービスの利用、在宅の重視を挙げている。

リハビリテーション体制の整備

地域におけるリハビリの実施にあたって、脳卒中などの疾患が急性期から回復期を経て維持期へと移行する全過程を通じて、患者に継続してリハビリ医療が提供され、関連する施設・在宅サービスが適切に提供されるよう、医療機関と保健・福祉の各サービス機関等が相互に十分な連携を持つことが重要である¹⁶⁾。

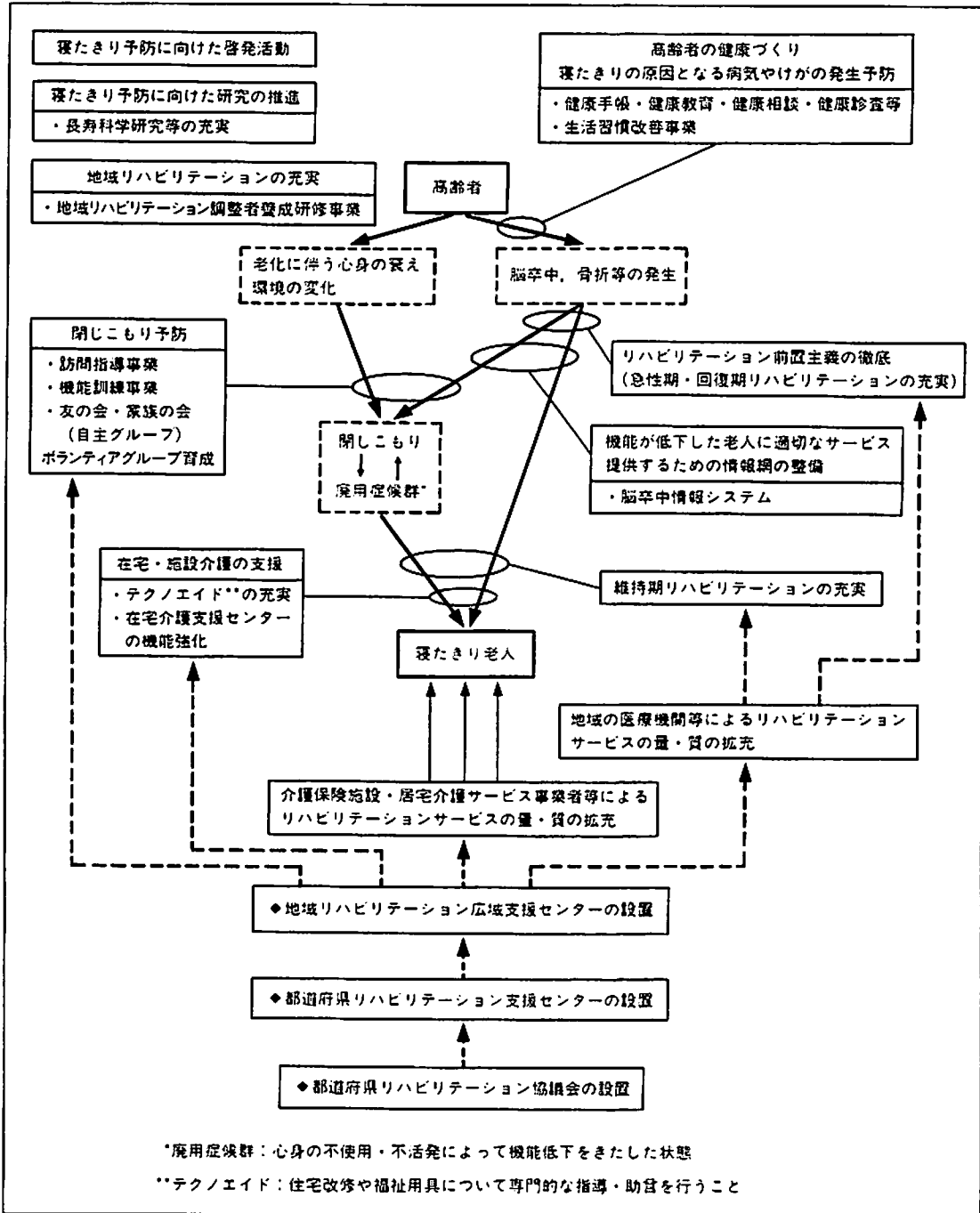


第4図 地域リハビリテーション支援体制 (則安俊昭：介護保険とリハビリテーション関連事業、総合リハ、28：17-22, 2000の第1図を出版者および著者の許可を得て転載)

維持期に至る前の、急性期、回復期のリハビリが適切になされているか否かが、その後の維持期リハビリの効果や、日常生活における要介護状態に大きく影響するため、地域において質・量ともに十分なりハビリが提供されることがきわめて重要である。医療機関におけるリハビリ機能の強化や住民の相談窓口の強化が求められてい

る。

そこで平成10年度都道府県事業として都道府県リハビリ協議会の設置と都道府県リハビリ支援センターの指定を行い、平成11年度から、二次医療圏ごとに地域リハビリ広域支援センターを指定する「地域リハビリ支援体制整備推進事業」が実施されている(図4)。



第5図 介護予防対策のイメージ (則安俊昭：介護保険とリハビリテーション関連事業、総合リハ、28：17-22、2000の第2図を出版者および著者の許可を得て転載)

一方、高齢者が寝たきりになるのを防ぐには、保健事業としての疾病予防、閉じこもり予防対策の意味合いも含めた機能訓練、地域活動としてのボランティアグループや患者会などの自主グループの支援・育成、また福祉

施策としての生きがい対策等さまざまな働きかけ、リハビリ医療および福祉サービスが質・量ともに提供できる体制の確立が必要である (図5)¹⁶⁾。

おわりに

医療制度改革, 診療報酬改定, 介護保険の施行とリハビリを取り巻く状況は刻々と変化している。脳卒中が発症したその日より適切なリハビリが開始され, 回復期, 専門的リハビリ, 維持期と進んでいくことが, その後の要介護度を軽減させることになる。残念ながら, 多くの病院では十分なリハビリ医療が提供されず, 発症後寝かせきりにされる症例がいまだに多い。今後リハビリ医療のさらなる充実によって, 医療の中でスムーズな連携システムが出来上がっていくことが望まれる。

文 献

- 1) 堤 修三: 公的介護保険制度創設の背景, 総合リハ, 28: 5-10, 2000
- 2) 介護保険専門員標準テキスト. 厚生省高齢者ケアサービス体制整備検討委員会, 長寿開発センター, 1998
- 3) 伊藤利之: 地域リハビリテーション活動の展望-市行政の立場から-総合リハ, 28: 93-97, 2000
- 4) 正門由久, 千野直一: 急性期のリハビリテーション, 1) 脳血管障害, 介護保険制度とリハビリテーション, 総合臨床, 48: 1277-1281, 1999
- 5) 千野直一, 石神重信, 正門由久, 他: 脳血管障害の急性期リハビリテーション医療の実態とその効果に関する調査研究. 日本公衆衛生協会, 平成10年3月
- 6) 近藤克則, 戸倉直実, 二木 立: 脳卒中リハビリテーションの実践 (1) 座位訓練とそのリスクの管理. 総合リハ, 18: 929-934, 1990
- 7) Chino N, et al: Stroke Impairment Assessment Set (SIAS)-a new evaluation instrument for stroke patients. リハ医学, 31: 119-125, 1994
- 8) 千野直一, 里宇明元, 園田 茂, 他: 脳卒中患者の機能評価 SIAS と FIM の実際, シュプリンガー, 1997
- 9) 大川嗣雄, 石神重信, 安井信之, 他: パネルディスカッション1. 脳卒中急性期リハは是か非か, リハ医学, 29: 501-506, 1992
- 10) 間川博之, 正門由久, 木村彰男, 他: 脳卒中-急性期から自宅復帰まで 総合リハ, 25: 905-929, 1997
- 11) 千野直一, 石神重信: 脳血管障害の回復期リハビリテーションに関する調査研究. 厚生省長寿研究報告書, 平成12年3月
- 12) 大田哲生, 木村彰男: 回復期リハビリテーション病棟-在宅へつなげるリハの展開 当院における取り組みと提言V. 臨床リハ, 12: 229-233, 2003
- 13) 里宇明元: リハ外来の目標とリハ医の役割. 脳卒中リハビリテーション外来診療 (臨床リハ別冊), pp196-204, 1997
- 14) 里宇明元: 介護保険と脳卒中リハビリテーション. 脳卒中マニュアル (エキスパートナース MOOK30), 照林社, pp158-167, 1998
- 15) 正門由久, 千野直一: 介護保険とリハビリテーション 要介護状態の見極め方のポイント 臨床リハ, 7: 1168-1175, 1998
- 16) 則安俊昭: 介護保険とリハビリテーション関連事業. 総合リハ, 28: 17-22, 2000

原 著

成人型・最重症アトピー性皮膚炎の中医学煎じ薬治療と、その効果判定
—成人型アトピー性皮膚炎の煎じ薬治療とその効果—

東京都立大久保病院 東洋医学科

たま だ こう いち
玉 田 耕 一

(平成 15 年 4 月 7 日受付)

ABSTRACT

The judgment of the effect about administered decocted Chinese herbal medicines on the adult-type, atopic dermatitis with severe skin lesion

Koh-ichi Tamada

Department of Oriental Medicine, Tokyo Metropolitan Ohkubo Hospital

We investigated the effect of six decocted Chinese herbal medicines, Seihi-to, Seihi-to with minor change (Seihi-to-kagen), Shoufu-san, Shoufu-san plus large amount of calcium sulfate, Huang's experienced regimen, and Huang's regimen with minor change in thirty patients suffered from adult-type atopic-dermatitis (AD), which is severe skin lesion spread on whole surface of the body. One adequate Chinese herbal medicine was selected by Oriental Medicine based analysis method for each patient. We chose the AD score to estimate the effect of each Chinese herbal medicine. The AD scores were recorded everyday by each patient and the AD scores before administration of Chinese herbal medicine and those of after administration were compared respectively. The AD scores reduced to below one-second within six months in 6 out of 11 cases (54.5%) with the treatment of Seihi-to, in 6 out of 6 (100%) with Seihi-to-kagen, in 1 out of 2 (50%) with Shoufu-san, in 10 out of 14 (71.4%) with Shoufu-san plus, in 1 out of 1 (100%) with Huang's regimen and in 8 out of 9 (88.9%) with Huang's changed regimen. Finally, skin lesions of 26 out of 28 cases (92.9%) were significantly improved and the dosage of steroid significantly decreased in twenty seven cases (96.4%). Those findings suggested that the adequate Chinese herbal medicines by Oriental Medicine based analysis method might be positively useful as a combination medicine with steroid ointment for anti-severe, hard-to-cured AD

Key Word : adult-type atopic dermatitis, decocted Chinese herbal medicine

成人型・最重症アトピー性皮膚炎（以下 AD と略す）は難治性で、さまざまな治療に抵抗し、短期的には最も有効なステロイド外用剤の長期塗布により、特に顔面を中心に皮膚が薄くなり、かえって発赤が増強したり、突然の休業によるステロイドリバウンドによって皮膚症状が極端に悪化した例が報告され、ステロイド外用剤使用の是非をめぐる、社会問題までも引き起こしたことは

記憶に新しい。ステロイドという言葉にも拒否反応を示す患者も多く、ステロイド外用剤の使用を拒否し、民間療法を試みて、さらに AD 症状を悪化させる例も数多いと思われる¹⁾。当院東洋医学科にもステロイド外用剤、経口抗アレルギー剤などで十分な効果が認められないために、それら以外の治療法を求めて、多数の AD 患者が受診している。このような患者の中で、当院来院後に

さまざまな漢方エキス製剤を投与しても改善が認められず、煎じ薬を希望する症例に、中医学煎じ薬治療を試み、その効果を独自の視点から判定し、検討した。

対象と方法

1. 対象

対象は平成10年10月から平成14年7月までに、当院東洋医学科を受診した男性19例、女性11例、計30例である。全例で皮膚科専門医により、成人型・最重症ADと診断されている。煎じ薬開始年齢は20歳以下が5例、21~30歳が16例、31~40歳が6例、41歳以上が3例、最年少は15歳、最年長は70歳であった。

2. 煎じ薬

煎じ薬は中医学処方から3方剤を選び、できる限り保険適応生薬での構成とするために、1部の生薬を変更した加減を創った。

1) 清皮湯²⁾ 単位: g

生地黄10, 丹参, 赤芍薬, 茵陈蒿, 地膚子, 薏苡仁各8, 白朮, 当归 各6, 黄芩, 茯苓, 梔子 各5

(赤芍薬は芍薬と読み替えて、保険適応生薬とした)

2) 清皮湯加減

生地黄10, 赤芍薬8, 当归6, 川芎5 (以上 四物湯), 黄芩5, 梔子5, 白朮6, 茯苓5, 茵陈蒿8, 薏苡仁8, 苦参6

3) 消風散³⁾

荆芥6, 防风9, 当归6, 生地黄12, 苦参6, 蒼朮6, 蝉退6, 胡麻仁6, 牛蒡子6, 知母6, 生甘草3, 木通6, 石膏12 (先煎)(石膏増量:30)

(胡麻仁のみが保険適応外である。加減は石膏の増量のみにとどめた)

4) 黄煌(南京中医薬大学)経験方

生地黄30, 桃仁15, 柴胡, 生甘草, 阿膠 各12, 防风, 黄芩, 荆芥 各10

5) 黄煌経験方加減

茵陈蒿8, 荆芥10, 生甘草6, 防风10, 黄芩10, 苦参6, 生地黄12, 桃仁15, 阿膠12 (後下), 麦門冬, 天門冬 各6

原則として皮膚の赤み, 熱感の強い症例に清皮湯(加減)を, かゆみの非常に強い例に消風散(石膏増量)を, 皮膚の乾燥で悪化する例には黄煌経験方(加減)をファーストチョイスとし, 薬物効果や証の変化にそって, 3つの方剤, 3つの加減方の中から, 煎じ薬を選び直した。

第1表 アトピースコア(ADスコア)の計算方法

A 症状 (0; なし, 5; 重症)			
赤み	頭頸部 0~5点	体幹 0~5点	四肢 0~5点
熱感	頭頸部 0~5点	体幹 0~5点	四肢 0~5点
かゆみ	頭頸部 0~5点	体幹 0~5点	四肢 0~5点
湿潤面	頭頸部 0~5点	体幹 0~5点	四肢 0~5点
4項目について, 各部位ごとに点数をつけ, 合計したものをAD症状指数(a)とする			
B ステロイド外用剤 (t; 塗布回数)			
ウィーク群	頭頸部 1×t	体幹 1×t	四肢 1×t
ストロング群	頭頸部 2×t	体幹 2×t	四肢 2×t
ストロングゲスト群	頭頸部 3×t	体幹 3×t	四肢 3×t
ステロイド剤の種類によって, 1~3点×塗布回数を, 各部位ごとに点数をつけ, 合計したものをステロイド外用剤使用指数(b)とする			
C 生活度 (1; 不満足 3; 満足)			
睡眠	1~3点	食欲	1~3点
意欲	1~3点		
生活度を3項目について, 点数化したものを, 生活度改善指数(c)とする			
アトピースコア(ADスコア): a+b-c			

ステロイド外用剤は禁止せず, そのまま本人の使用に任せた。症状の改善に伴って, 煎じ薬1日分を2日に分けて飲む, などの減量を行なった。

3. AD皮膚症状, ステロイド外用剤使用頻度, 量, および生活の質についての点数化(第1表, 第1図)

1) AD症状指数

皮膚の赤み, 熱感, かゆみ, 湿潤化した皮膚面積の4項目を, それぞれの項目別にマイナス1~5点を, 頭頸部, 体幹部, 四肢について部位別に点数をつけ, 合計したものをAD症状指数とし, 毎日, 本人がその日の点数をつけることとした。

2) ステロイド外用剤使用指数

ステロイド外用剤を, 抗炎症作用, 抗アレルギー作用の強さから便宜上3群に分け, ウィーク群をマイナス1点, ストロング群をマイナス2点, ストロングゲスト群をマイナス3点として, ステロイド外用剤を塗布した場合, ステロイド作用の強さの点数に塗った回数を掛け算し, 頭頸部, 体幹部, 四肢について別々に点数をつけ, 合計したものをステロイド外用剤使用指数(ステロイド指数)とした。毎日本人が, その日の点数をつけることとした。

3) 生活改善度指数

睡眠, 食欲, 意欲(学習上, 仕事上など)の3項目について, プラス1~3点を, 毎日本人がつけ, 生活改善度指数とした。

第1図 アトピースコア記録

日付	症状	部位 (0-5)			マイナス 合計	食欲 (1-3)	意欲 (1-3)	睡眠 (1-3)	合計	使用薬 (飲み)	使用薬 (塗り)	ステロイド 使用
		頭首	体	手足								
月 日	かゆみ											
	赤み											
	熱感											
	渗出物											
月 日	かゆみ											
	赤み											
	熱感											
	渗出物											
月 日	かゆみ											
	赤み											
	熱感											
	渗出物											
月 日	かゆみ											
	赤み											
	熱感											
	渗出物											

第2図 漢方治療のための質問表

質問	はい	中間	いいえ	点数
①体質は筋肉質ですか	6	3	0	
②かた太りのほうですか	6	3	0	
③皮膚はつやがありますか	8	4	0	
④おなかは弾力的で緊張感がありますか	8	4	0	
⑤食べ過ぎても平気なほうですか	6	3	0	
⑥食事のスピードは速いほうですか	6	3	0	
⑦1日でも便秘をすると不快なほうですか	6	3	0	
⑧暑さ寒さに強いほうですか	6	3	0	
⑨手足の冷えはありませんか (*)	6	3	0	
⑩活動的ですか	6	3	0	
⑪あまり疲れないほうですか (*)	6	3	0	
⑫声は力強いほうですか	8	4	0	
⑬行動には常に余裕がありますか	8	4	0	
⑭胃薬は苦いほうが飲みやすいですか	6	3	0	
⑮寝汗はかかないですか (*)	8	4	0	
	合計点			

それぞれの項目に点数を記入して下さい

中間：中間の場合と、返事が出来ない場合も入れて下さい

*⑨、⑪、⑮については「はい」と答えた場合、手足の冷えはない、疲れにくい、寝汗はかかないことを意味しています

4) アトピースコア (ADスコア)

AD症状指数とステロイド指数を合計し、生活改善度指数を引き算したものをアトピースコア (ADスコア) とした。

今回の調査では、薬剤の有効判定基準は、①ADスコアが薬剤投与前の1/2以下に改善する ②治療者から見て、皮膚所見の改善が明確に認められる、の2項目を満たした症例を有効例とした。

4. 虚実判定

虚実判定には小山氏式虚実診断質問表を用いた (第2図)。

5. 高感度CRP⁴⁾

AD患者の皮膚炎症程度の指標として血清中高感度CRPを6例で測定し、煎じ薬治療前後での値の変化を調査した (症例13, 22, 25, 26, 29, 30)。同時にAD患者血清中LDH値、末梢血好酸球数も、治療前後の変化を調べた。

結 果

1. AD患者の初診前、初診時データ (第2表)

30例のAD患者について、性別、発病年齢、合併症、皮膚所見、初診前治療薬、効果などを第2表に示した。発病期は学童期に発症が2例、成人発症が5例、23例

は乳幼児期から皮膚病変が明確に認められた。合併症では他のアレルギー疾患を20例で認めた。当院初診時前の内服薬について、記録の残った範囲で調べ、それらの効果を問診より判定した。ステロイド内服薬、免疫抑制剤内服薬以外で効果有りと考えられたのは、症例2の当帰飲子、黄連解毒湯、症例21の梔子柏皮湯、黄連解毒湯、症例23の六味丸、麦門冬湯、消風散、温清飲であった(以上すべて漢方エキス製剤)。抗ヒスタミン剤とステロイド合剤のセレスタミンは4例に用いられ、すべて効果不十分であった。強ミノCやノイロトロピン注射は、かゆみをやや改善した。その他の西洋薬、漢方薬は有効とは考えられなかった。

2. AD患者初診後データ (第3表)

当院初診時、終診時年月日、初診時年齢、虚実スコア、診察所見、煎じ薬投与前の当院使用薬、煎じ薬名とそれら投与前後のADスコア変化などを第3表に示した。虚実スコアで30以下の虚証は1例、31~40の虚証に近い中間証は10例、41~50の中間証は12例、51~60の実証に近い中間証は5例、61以上の実証は2例であった。当院受診中の煎じ薬前の使用薬では、症例15の黄連解毒湯で発赤の軽度減少を認め、症例17の黄連解毒湯、温清飲、治頭瘡一方でかゆみの軽度減少を認めた。症例28の十味敗毒湯でかゆみの軽度減少、症例30の消風散、黄連解毒湯でADスコアの軽度改善を認めた(以上すべて漢方エキス製剤)。しかしADスコアが1/2以下に減少する(改善する)ような有効例は、いずれのエキス製剤にも認めなかった。

3. 各煎じ薬使用例数と有効率 (第4表)

各煎じ薬の有効率を第4表に示した。清皮湯は11例が内服し、6例に有効(54.5%)であった。清皮湯加減は内服した6例全例が有効であった。消風散は2例中1例に有効(50.0%)、消風散石膏増量は13例で14回の内服機会があり、10回で有効(71.4%) (症例12は2回内服)であった。なおプレドニゾロン20mg/dayを1週間連日内服し、引き続き1週間の隔日内服終了後に消風散石膏増量を継続中の症例21、25はAD症状の再悪化を認めないが、今回は統計から除外した。黄氏経験方は1例で有効(症例9)、黄氏加減方は9例で8例に有効であった(88.9%)。煎じ薬内服以前に消風散エキス製剤を使用し、無効であった10例中7例で消風散(石膏増量)が有効であった(70.0%)。症例3、5、20はステロイド外用剤を使用せずに、煎じ薬のみで改善した。また症例19は煎じ薬効果はADスコア上では不十分であるが、ステロイド使用量は減少し、煎じ薬とステロイド外用剤の相乗効果が認められた。症例6では消風散石膏増量は無効であったが、黄氏加減方は有効性を認めた。しかし慢性蕁麻疹が出現し、煎じ薬の副反応によって悪化した可能性が否定できないため、煎じ薬の内服を中止した。その他の症例では煎じ薬の副反応は認めず、連日内服が可能であった。

分であるが、ステロイド使用量は減少し、煎じ薬とステロイド外用剤の相乗効果が認められた。症例6では消風散石膏増量は無効であったが、黄氏加減方は有効性を認めた。しかし慢性蕁麻疹が出現し、煎じ薬の副反応によって悪化した可能性が否定できないため、煎じ薬の内服を中止した。その他の症例では煎じ薬の副反応は認めず、連日内服が可能であった。

4. 虚実、瘀血、皮膚乾燥と各煎じ薬有効率 (第5表)

虚実スコア、瘀血の程度、皮膚乾燥の程度と各方剤の有効率を第5表に示した。瘀血は30例全例で認められたが、ここでは舌診で明らかな静脈怒張を認めるか、皮膚色が広い範囲で赤黒色、あるいは赤紫色の症例のみを瘀血(+)とした。同様に皮膚乾燥も湿の強い3例を除き(症例23、25、26)、27例に認められたが、乾燥が非常に強く、かつ乾燥で症状が悪化する例を、乾燥強とした。清皮湯は乾燥の強い4例中1例のみが有効で(25.0%)、乾燥の少ない7例では、5例に有効であった(71.4%)。清皮湯加減は虚実にかかわらず有効率が高いが、特に瘀血(+)で、皮膚乾燥の少ない症例に多く用いて有効であった。消風散加石膏増量は実証傾向例に有効率が高く、また瘀血(+)で、乾燥の少ない6例中5例に有効であった(83.3%)。黄氏加減方は虚証傾向群に多く用い、有効で、また乾燥強6例全例で有効であった。

5. 煎じ薬治療前後の患者血清中高感度CRP値、LDH値、好酸球数

煎じ薬治療前後の患者血清中高感度CRP値、LDH値、末梢血好酸球数の変化を第6表に示した。検討した6例全例で、ADスコアの改善、および高感度CRP値、LDH値、好酸球数の減少を認めた。

考 按

ADは日本皮膚科学会、および厚生(労働)省の診断基準があり、重症度分類も広く用いられている^{6,9)}。今回検討した30例はAD診断基準を満たし、また最重症型に属する。ADは原因不明で、特に最重症型はさまざまな治療に抵抗性で、治療に難渋することはよく経験するところである。日本皮膚科学会、および厚生省研究班の治療指針では、中等症以上には副腎皮質ステロイド外用剤が第1選択薬とされ^{6,7)}、筆者も賛同するところである。ステロイド外用剤は、その抗炎症作用、抗アレルギー作用(ステロイド作用)の強さから5群に分けら

第2表 AD患者の初診前，初診時データ（1998～2002）

NO	性	発病年齢	合併症	皮膚色 乾燥度	治療薬（D：煎じ薬） （D以外はすべてエキス製剤）	効果判定
1)	M	乳幼児期より 27歳頃から悪化	喘息，アレルギー性鼻炎 結膜炎，直腸脱，イレウス	赤白 少	シクロフォスファミド ケトチフェン，エメダスチン	効果あり，副作用出現 効果不十分
2)	M	幼児期より	花粉症	赤白 少	当帰飲子，黄連解毒湯	やや有効
3)	M	乳幼児期より 11歳から悪化	喘息，アレルギー性結膜炎	赤黒 強	当帰飲子合黄連解毒湯（D） クロルフェニラミン	あまり効果なし？ 効果不十分
4)	M	乳幼児期より	喘息？アレルギー性結膜炎	赤白 少	オキサミド，ジスロン	効果不十分
5)	M	乳幼児期より 18歳頃から悪化	花粉症	赤黒 強	黄連解毒湯，桔梗石膏 消風散，柴苓湯，茵陳蒿湯 強ミノC，ノイロトロピン ケトチフェン，エピナスチン クロルフェニラミン，スプラタスト	効果不十分 効果不十分 ややかゆみ減少 効果不十分 効果不十分
6)	F	6歳頃より 19歳頃から悪化	喘息，慢性ジンマシン 花粉症	赤白 少	抗アレルギー剤（内容不明）	効果不十分
7)	M	乳幼児期より 20歳頃から悪化	喘息	赤黒 少	ジスロン	効果不十分
8)	M	30歳頃から悪化	なし	赤黄 少	ケトチフェン，メキタジン 強ミノC	効果不十分 ややかゆみ減少
9)	M	乳幼児期より 11歳頃から悪化	アレルギー性鼻炎，結膜炎	赤黒 強	メキタジン	効果不十分
10)	M	乳幼児期より	花粉症	赤黄 強	竜胆瀉肝湯，温清飲，消風散 抗アレルギー剤（内容不明）	効果不十分 効果不十分
11)	M	乳幼児期より	喘息，アレルギー性鼻炎 結膜炎	赤黒 強	黄連解毒湯，十味敗毒湯 アゼラスチン，クロルフェニラミン	効果不十分 効果不十分
12)	M	68歳から	アレルギー性鼻炎，高血圧症	紫白 中	セレスタミン（1錠/day）	効果不十分
13)	F	乳幼児期より 出産後に悪化	喘息，花粉症，橋本病	赤黒 少	オキサミド，エメダスチン	効果不十分
14)	F	乳幼児期より	花粉症	赤黄 中	黄連解毒湯，桔梗石膏，当帰飲子 ケトチフェン，エピナスチン，ジスロン	効果不十分 効果不十分
15)	F	幼児期より	なし	紫白 少	治頭瘡一方 ケトチフェン，クロルフェニラミン	悪化 効果不十分
16)	M	乳幼児期より	アレルギー性結膜炎	赤白 少	オキサミド，クロルフェニラミン	効果不十分
17)	F	幼児期より	アレルギー性鼻炎，結膜炎 喘息	赤白 中	柴胡瀉肝湯，柴胡桂枝湯 補中益気湯，消風散，荊芥連翹湯	悪化 効果不十分
18)	F	乳幼児期より 30歳頃から悪化	なし	赤黒 中	トラニラスト，セレスタミン	効果不十分
19)	F	乳幼児期より 18歳頃から悪化	花粉症	赤白 少	当帰飲子，補中益気湯 柴胡瀉肝湯	効果不十分 効果不十分
20)	M	26歳頃から悪化	花粉症	赤白 少	アレンドロン，セレスタミン	効果不十分
21)	F	21歳頃から悪化 28歳時ステロイド 外用剤中止後悪化	なし	紫白 中	梔子柏皮湯，黄連解毒湯	有効
22)	M	6歳頃より悪化	なし	赤黒，少	不明	
23)	M	乳幼児期より 26歳頃から悪化	統合障害	赤黒 湿	六味丸，麦門冬湯，消風散，温清飲	やや有効
24)	M	20歳頃から出現 32歳頃から悪化	なし	赤白 少	桔梗石膏 セレスタミン	効果不十分 効果不十分
25)	F	幼児期より 30歳頃から悪化	なし	赤白 湿	ステロイド内服 漢方薬（内容不明）	有効（中止後再発） 効果不十分
26)	F	幼児期より 27歳頃から悪化	アレルギー性鼻炎	赤黒 湿	ビタミンC 漢方薬（内容不明）	効果不十分 効果不十分
27)	M	幼児期より	アレルギー性結膜炎	赤白，強	不明	
28)	F	53歳頃から出現	寒冷ジンマシン	赤白 強	温清飲，当帰飲子	やや有効？
29)	M	幼児期より	なし	赤黒 強	温清飲，桔梗石膏	効果不十分
30)	M	幼児期より 26歳頃から悪化	なし	赤黒 少	荊芥連翹湯，当帰飲子 十味敗毒湯	効果不十分 効果不十分

第3表 AD患者の当院初診後データ（1998～2002）

	初診年月日 終診年月日	年齢	虚実 (スコア)	舌診	脈診	腹診	煎じ薬投与前薬 (エキス製剤)	煎じ薬 (開始年月, 判定年月)	ADスコア変化
1)	'98.10.16 '02. 2. 1	34	42	赤紫色 舌苔少	やや細で数	腹直筋緊張 臍下部軟弱	治頭瘡一方, 白虎人參湯, 温清飲 黄連解毒湯, 越婢加朮湯 オキサミド, エピナスチン	清皮湯 ('99.3~5) 清皮湯加減 ('99.5~11)	45⇒<20 <20⇒<10
2)	'98.12.18 '99. 8. 2	20	59	赤紫色 舌苔少	中, 数 やや浮	腹直筋緊張 臍下部軟弱	黄連解毒湯 スプラタスト	清皮湯 ('99.3~4)	35⇒<10
3)	'99. 1. 6	21	59	赤色 舌苔少	実	腹直筋緊張	白虎加入參湯, 越婢加朮附湯 黄連解毒湯	清皮湯 ('99.3~8) 消風散 ('99.9~12) 黄氏加減 ('99.12~'00.5) 清皮湯 ('99.3~5)	45⇒35~40 35~40 40⇒15 30⇒8
4)	'99. 1.20 '99. 4.25	19	34	赤色	やや細で数	腹直筋緊張 臍下部軟弱	白虎人參湯, 越婢加朮附湯 黄連解毒湯	清皮湯加減 ('99.4~10) 消風散石膏増量 ('00.3~6) 消風散石膏増量 ('01.1~2) 黄氏加減 ('01.2~6) (ジンマシン出現で煎じ一時中止)	30⇒15 15⇒<10 38⇒22 22⇒<20
5)	'99. 3.31	28	66	赤紫色 舌苔少	実	腹直筋緊張 臍下部軟弱	温清飲, 着連解毒湯	清皮湯 ('99.11~'00.2) 黄氏經驗 ('00.2~6) 黄氏加減 ('00.6~12) 清皮湯 ('99.11~'00.6) 黄氏加減 ('00.6~9)	45⇒35 35⇒23 23⇒<15 30⇒15 15⇒5
6)	'99. 5.25	29	46	赤色 白舌苔	中, 数	特記すべき ことなし	白虎人參湯, 消風散, 治頭瘡一方 黄連解毒湯, オキサミド クロルフェニラミン, スプラタスト	清皮湯 ('99.11~'00.2) 黄氏經驗 ('00.2~6) 黄氏加減 ('00.6~12) 清皮湯 ('99.11~'00.6) 黄氏加減 ('00.6~9)	45⇒35 35⇒23 23⇒<15 30⇒15 15⇒5
7)	'99. 5.31 '01.12.19	24	39	赤紫色 舌苔少	やや細で数	腹直筋緊張 臍下部軟弱	黄連解毒湯, 消風散	清皮湯 ('99.3~6) 消風散石膏増量 ('99.9~'00.1) 消風散石膏増量 ('00.6~7) 消風散石膏増量 ('00.9~10) 黄氏加減 ('00.10~'01.1) 清皮湯加減 ('00.1~6)	45⇒<40 45⇒20 20⇒<10 45⇒<8
8)	'99. 7. 5 '00. 5.29	30	56	赤色 舌苔少	中, 数	腹直筋緊張 臍下部軟弱	黄連解毒湯, 白虎人參湯	清皮湯 ('99.11~'00.2) 黄氏經驗 ('00.2~6) 黄氏加減 ('00.6~12) 清皮湯 ('99.11~'00.6) 黄氏加減 ('00.6~9)	45⇒35 35⇒23 23⇒<15 30⇒15 15⇒5
9)	'99. 9.28	30	30	赤紫色 舌苔少	やや細, 数	腹直筋緊張 臍下部軟弱	黄連解毒湯, メキタジン オキサミド (悪化), クロルフェニラミン	清皮湯 ('99.3~6) 消風散石膏増量 ('99.9~'00.1) 消風散石膏増量 ('00.6~7) 消風散石膏増量 ('00.9~10) 黄氏加減 ('00.10~'01.1) 清皮湯加減 ('00.1~6)	45⇒35 35⇒23 23⇒<15 30⇒15 15⇒5 25⇒<20 28⇒2 30⇒30 30⇒6 35⇒<10
10)	'99.10.12 '01. 9.19	26	34	赤紫色 舌苔少	やや細, 数 やや浮	腹直筋緊張 臍下部軟弱	黄連解毒湯	清皮湯 ('99.3~6) 消風散石膏増量 ('99.9~'00.1) 消風散石膏増量 ('00.6~7) 消風散石膏増量 ('00.9~10) 黄氏加減 ('00.10~'01.1) 清皮湯加減 ('00.1~6)	45⇒35 35⇒23 23⇒<15 30⇒15 15⇒5 25⇒<20 28⇒2 30⇒30 30⇒6 35⇒<10
11)	'99.10.26 '00.10. 1	31	58	赤色 白舌苔	実, 数	腹直筋緊張	白虎人參湯, 越婢加朮附湯 黄連解毒湯	清皮湯 ('99.3~6) 消風散石膏増量 ('99.9~'00.1) 消風散石膏増量 ('00.6~7) 消風散石膏増量 ('00.9~10) 黄氏加減 ('00.10~'01.1) 清皮湯加減 ('00.1~6)	40⇒25 25⇒<20 28⇒2 30⇒30 30⇒6 35⇒<10
12)	'00. 5.23 '01. 1.12	70	32	赤紫色 舌苔少	やや細, 数	小腹不仁	温清飲, 黄連解毒湯 (煎じ中断後再発)	清皮湯 ('99.3~6) 消風散石膏増量 ('99.9~'00.1) 消風散石膏増量 ('00.6~7) 消風散石膏増量 ('00.9~10) 黄氏加減 ('00.10~'01.1) 清皮湯加減 ('00.1~6)	25⇒<20 28⇒2 30⇒30 30⇒6 35⇒<10
13)	'00.12. 6	44	34	赤紫色 静脈怒張	やや細, 数	臍下部軟弱	温清飲, 黄連解毒湯 オキサミド	清皮湯 ('99.3~5)	30⇒10
14)	'99. 3.10 '99. 6.17	26	36	赤色 静脈怒張	やや細, 数	臍下部軟弱	温清飲, 黄連解毒湯 クロルフェニラミン	清皮湯 ('99.3~5)	30⇒10
15)	'99. 3.16 '99. 7.21	18	46	赤色 白舌苔	中, 数	臍下部軟弱	黄連解毒湯 (発赤やや軽減)	清皮湯 ('99.3~5)	30⇒10
16)	'99. 5.26 '99.11.15	21	36	赤色 舌苔少	やや細, 数	腹直筋緊張 臍下部軟弱		清皮湯 ('99.3~5)	30⇒10
17)	'01. 2.13	15	46	赤色 舌苔少	やや細, 数	腹直筋緊張	黄連解毒湯, 温清飲, 治頭瘡一方 (すべてかゆみや軽減)	清皮湯 ('99.3~5)	30⇒10
18)	'02. 4.22	30	46	赤色 白舌苔	やや細	特記すべき こと無し	黄連解毒湯, 消風散	清皮湯 ('99.3~5)	30⇒10
19)	'01.10.29	25	46	赤色 舌苔少	中, 数	腹直筋緊張	黄連解毒湯, 消風散 十味敗毒湯	清皮湯 ('99.3~5)	30⇒10

20)	'02. 1.22	35	46	赤紫色	中, 数	腹直筋緊張	消風散	消風散石膏増量 ('02.3~8)	35⇒15
21)	'02. 4.15	30	45	赤紫色 静脉怒張	中, 数	腹直筋緊張 腓下部軟弱		黄氏加減 ('02.4~5) プレドニゾン (2 週間内服) 消風散石膏増量 ('02.5~9) 消風散石膏増量 ('02.7~9)	52⇒32⇒48 48⇒<5 ~<10 40⇒10
22)	'02. 5.22	24	62	赤紫色 舌苔少	実, 緊	腹直筋緊張	消風散, 桔梗石膏	消風散石膏増量 ('02.7~9)	25⇒<10
23)	'02. 7. 8	23	44	赤紫色 白黄舌苔	中, 数	腹直筋緊張		消風散石膏増量 ('02.7~9) プレドニゾン (2 週間内服) 消風散石膏増量 ('02.2~8) 清皮湯加減 ('02.6~9)	42⇒<10 35⇒<5 ~<10 40⇒<10
24)	'02. 7.23	34	42	淡赤色	中, 数	腹直筋緊張		消風散石膏増量 ('01.9~11)	30⇒25
25)	'02. 2.18	31	38	赤色	粗, 数	腹直筋緊張		黄氏加減 ('01.9~'02.8) 黄氏加減 ('02.6~9)	25⇒15 30⇒15
26)	'02. 6.25	28	32	灰色舌苔 赤色	粗, 数	腹直筋緊張		黄氏加減 ('02.8~9)	30⇒15
27)	'01. 8.29	17	50	舌苔少 赤色	中	腹直筋緊張	消風散	清皮湯加減 ('01.5~8)	35⇒15
28)	'99. 8.25	54	36	舌苔少 赤紫色	粗, 数	腓下部軟弱	十味敗毒湯 (やや有効)		
29)	'02. 8.19	37	44	舌苔少 薄紫色	やや粗	腹直筋緊張	消風散		
30)	'01. 4.23	27	54	舌苔少 赤色	やや粗, 数 沈	腹直筋緊張	消風散, 黄連解毒湯 40⇒35		

第4表 各煎じ薬使用例数と有効率 (1998~2002)

	使用例数	有効例数	有効率 (%)
清皮湯加減	6	6	100
清皮湯	11	6	54.5
消風散	2	1	50.0
消風散石膏増量	14	10	71.4
黄氏経方	1	1	100
黄氏加減	9	8	88.9

れるが、それらを“強いステロイド、弱いステロイド”と患者に説明することは、患者の誤解を招く可能性がある。“強い、弱い”はステロイド作用の強弱ではなく、副反応のそれと誤解された場合、“強い”外用剤の使用がためられる、あるいは“弱い”外用剤は安全性が高い、と誤解されて、長期に、漫然と使用される危険性がある。ADのような慢性、難治性疾患に対しては、患者がどのように感じ、理解するか、といった心理学的配慮、インフォームドコンセントが重要と思われる。ADスコアを毎日、患者自身に記録していただいたことは、病氣、投薬の内容、使用方法などの理解を深めたと考えられる。1時点のみでは主観的な記録、点数化ではあるが、1個人の長い時間経過記録の中では、1個人記録の現在と過去の比較は、客観性があると考えられる。興味深いことに、皮膚症状が一番悪い時期のADスコアは、それぞれ30~40点であり、あまり個人差が認められなかった。ADスコア記録はそれぞれの個人の主観で行なわれるが、毎日記録することで、スコアはより個人差の少ない、客観的性のある方向へ導かれると考えられる。ADスコア記録は患者が、現在の自分の皮膚状況理解を深めるだけではなく、治療者も理解しやすくなり、共通理解が得やすい方法の1つと思われる。皮膚症状の改善が数字で表わされることは、患者自身の治療の励みにもなったと考えられる。今回の調査では皮膚表面乾燥状態は、季節の影響が大きいと判断し、AD症状指数に含めなかった。

ADは激しい皮膚炎が存在するにもかかわらず、CRPは0.32mg/dl以下の正常値であることが大多数である。他の血清中の炎症マーカーも正常範囲で、AD皮膚症状、所見以外には、炎症程度の指標に乏しい。今回6例ではあるが、煎じ薬治療前、治療3ヶ月以上経過後で高感度CRP値を測定し、全例で高感度CRP値の減少を認めた。ADスコアも全例で1/2以下に改善しており、高感度CRPは、AD患者血清中炎症マーカーの1つとして有用と考えられた。患者血清中LDH値、末梢血好

第5表 虚実, 癩血, 皮膚乾燥と各煎じ薬有効率 (%) (1998~2002)

虚実スコア	<40				41~50				51<			
	+		-		+		-		+		-	
癩血	強	低	強	低	強	低	強	低	強	低	強	低
清皮湯加減	2/2 (100) 1例は湿				2/2 (100) 1例は湿				1/1 1/1 (100) (100)			
清皮湯	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)		2/2 (100)				0/2 (0)	1/1 (100)		
消風散	1/1 (100)								0/1 (0)			
消風散石膏増量	2/3 (66.7)				2/2 (100)	0/1 (0)	2/4 (50)		2/2 (100)	1/1 (100)		1/1 (100)
黄氏経験方	1/1 (100)											
黄氏加減	3/3 (100)	1/1 (100)			1/1 (100)	0/1 (0)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)			

第6表 AD患者血中CRP, LDH, 好酸球数の煎じ薬治療前後変化

症例	CRP		LDH		好酸球数	
	前	後	前	後	前	後
	ng/ml	ng/ml	IU/ml	IU/ml	個/ul	個/ul
13	543	378	223	167	519	192
22	2490	256	418	254	1445	493
25	2170	399	457	350	296	200
26	430	135	415	341	3108	1600
29	190	90	319	211	672	259
30	1600	230	599	308	4473	829

酸球数もAD症状軽快とともに、6例全例で低下しており、高感度CRPとともにAD症状改善の、患者血液中の指標の1つになると思われた。

AD治療に漢方エキス製剤の効果が乏しかったことから、煎じ薬を積極的に取り上げた。ADに通常用いられる方剤は、大きくは温清飲系と消風散系に分けられるが、それらに加え皮膚乾燥改善を主目的とした煎じ薬を創り、それぞれの効果を比較した。清皮湯²⁾は全体として涼血、滲水作用を持ち、重症型尋常性乾癬に用いて著効を認めたことから、乾燥性ADにも有効ではないかと考え、AD治療薬として取り上げた。期待に反し虚証、実証共に効果不十分例が多く(有効6:効果不十分5)、乾燥の強い例では25.0%の有効率であった。症例16の煎じ薬治療継続不能の原因が、保険適応外生薬の使用(自己負担)であったことから、加減を創った。加減は

丹参を川芎に置き換えて四物湯の方位とし、地膚子を苦参に変更したが、予想以上の効果であった。全体として温清飲系の方剤で、中間証で癩血の強い症例に用いるとよいと考えられるが、清熱利水作用の地膚子が、止痒作用は強いが清熱乾燥作用も持つ苦参に置き換えられたことは、より乾燥の少ないADに適していると考えられる。湿熱の強い症例23, 26には著効を示した。消風散は症例7で石膏増量により、著効を認めたために、主に石膏増量で処方した。ADに桔梗石膏の有効性が認められており⁸⁾、石膏量は加減できることが望ましい。この意味でも煎じ薬は有用と考えられる。消風散エキス製剤無効10例中7例で煎じ消風散(石膏増量)が有効であり、生薬量の多寡による効果の違いと考えられた。消風散有効例は実証傾向群に多く、また癩血(+)で皮膚乾燥の少ない症例で有効性が高いと思われた。黄氏経験方は南京中医薬大学教授、黄氏の創作であり、主に皮膚乾燥の強いADに用いられる。この方剤には阿膠が含まれ、皮膚表面の乾燥を改善するが、柴胡が含まれており、“柴胡で清熱すると燥清による傷陰が表れる恐れのある場合には茵陳蒿で代用する⁹⁾”とあるため、加減方を創った。麦門冬、天門冬も加え、滋陰効果を強めることによって、加減一陰煎亀板膠石膏¹⁰⁾に相当する方剤をめざした。陰証傾向患者群では4例全例に有効で、主に中間から陰証で、乾燥の強い例に用いる方剤と思われた。症例12は平成12年6月、7月に消風散石膏増量で著明に改善したため来院せず、治療が中断したが、同年9月に再発し、今度は消風散石膏増量では改善せず、

黄氏加減方に変更して改善した。9月からは皮膚の乾燥を訴えており、季節による皮膚表面の証の変化と考えられた。ADの3方剤の選択基準として、今回の結果より、虚熱乾の例には黄氏加減、虚熱湿には清皮湯加減、虚寒乾には黄氏加減、虚寒湿には清皮湯加減、実熱乾には消風散石膏増量、実熱湿も消風散石膏増量、実寒乾には黄氏加減、実寒湿には清皮湯加減が推奨されると思われた。

ADの証は非常に難解であるが、中医学的には榮気や衛気の不足、瘀血、津液不足、あるいは過剰の入り混じった状態が皮膚表面に表出したものと考えられる。皮膚表面の色調の悪さは、脾胃の虚からの榮気不足が考えられ、またADの皮膚にはブドウ球菌やヘルペスウイルス感染症が多いことは、衛気不足が考えられる。小児期には食事アレルギーによると考えられるADが存在するが、これらも榮気、あるいは衛気不足としても理解できる^{11,12)}。ステロイド外用剤長期塗布は皮膚の瘀血状態を悪化させる。さらに症例1, 4, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 26, 28の11例は、やせて虚弱でのが渴き、舌は赤く、舌苔は少なく、脈は細で数と、中医学的には腎陰虚もあると考えられた。症例7で3カ月間、煎じ薬消風散と六味丸エキス製剤を同時に服用したが、相乗効果は認めず、石膏増量によって改善した。漢方医学的診察では、腹証で臍下部の軟弱を認める例が多かった。症例12, 28は小腹不仁と考えられたが、その他の例では軟弱の説明が困難であった。ADは中医学的にも、漢方医学的にも、何らかの虚の存在が背景にあり、それによって発症し、また悪化する可能性が考えられた¹³⁾。

ADは難治性で、いくつもの病態が混在し、病態理解が困難で、煎じ薬で生薬量を加減したり、いくつかの方剤を組み合わせたりしなければ、効果をあげることは難しいと思われた。ステロイド外用剤は依然としてAD治療のファーストチョイスではあるが、有効性の高い漢方煎じ薬とステロイドの併用療法は、相乗効果により、ステロイドの必要期間や必要量を減じる可能性が示され、積極的に試みるべき治療法と考えられた。

結 語

1. 30例の成人型・最重症型AD治療のために中医学処方から、温清飲系の清皮湯（加減）、消風散（石膏増量）、および滋陰効果の強い黄氏経験方（加減）を選び、煎じ薬として内服治療した。

2. アトピースコア（ADスコア）を考案し、AD症状の重症度、ステロイド外用剤の使用状況、および日常生活のQOLを客観的に数値化し、同一患者の経時的変化を記録した。

3. 28例中26例で、いずれかの方剤内服により、ADスコアが6ヶ月以内に1/2以下に減少した（著明改善）。患者血清の高感度CRP測定を6例で行ない、煎じ薬内服治療前後で、6例全例にCRP値の低下を認めた。難治性AD治療に、煎じ薬治療が有用であることが客観的に示された。

4. ステロイド外用剤と煎じ薬の併用療法は積極的に薦められる。

文 献

- 1) 竹原和彦：アトピー性皮膚炎の民間療法・アトピービジネスの実態。日本医事新報、3966：22-28, 2000
- 2) 張璠榮：新編・中医学（基礎編）。源草社、p106, 1997
- 3) 伊藤 良, 山本 巖：中医学処方解説。神戸中医学研究会編。医歯薬出版、p304-306, 1982
- 4) 斗成陽子, 千田美智子, 小山富子, 小山田, 斎藤憲祐, 市原清志, 河合 忠：潜在異常値除去法による高感度CRP測定法のためのCRP基準値設定の試み。臨床病理、49：178-182, 2001
- 5) 日本皮膚科学会「アトピー性皮膚炎の定義・診断基準」。日皮会誌、104：1324, 1994
- 6) 山本昇壯：アトピー性皮膚炎の診断基準および治療ガイドライン（案）の作成。平成8年度厚生省長期慢性疾患総合研究事業アレルギー総合研究、125-130, 1999
- 7) 川島 眞, 滝川雅弘, 中川秀巳, 古江増隆, 飯島正文, 飯塚一, 伊藤雅章, 塩原哲夫, 竹原和彦, 玉置邦彦, 宮地良樹, 橋本公二, 吉川邦彦：日本皮膚科学会編「アトピー性皮膚炎治療ガイドライン」。日皮会誌、110：1099-1104, 2000
- 8) 藤原二郎, 福田みどり, 井上佳子, 斎藤佳子：アトピー性皮膚炎—ステロイドからの離脱と石膏の効果。日本東洋医学雑誌、52：507-514, 2002
- 9) 伊藤 良：漢薬の臨床応用。中山医学院編（神戸中医学研究会訳・編）。医歯薬出版、p141-143, 1979
- 10) 塩谷雄二, 寺澤捷年, 喜多敏明：成人型アトピー性皮膚炎の漢方治療。日本東洋医学雑誌、50：673-681, 2000
- 11) 石井正光：食と漢方薬による難治性アトピー性皮膚炎の漢方治療。日本東洋医学雑誌、51：978-996, 2001
- 12) 有田昌彦：食物アレルギーの原因と食事療法。栄養管理の研究、18：211-269, 1991
- 13) 岡部俊一：アトピー性皮膚炎の漢方治療—アトピーの本体は皮膚の陰虚。日本東洋医学雑誌、51：973-996, 2001

原 著

慶應関連病院における内分泌・臨床化学検査の共通基準範囲

¹⁾慶應義塾大学医学部中央臨床検査部, ²⁾けいゆう病院臨床検査科,
³⁾国立病院東京医療センター臨床検査科, ⁴⁾東京済生会中央病院臨床検査科, ⁵⁾埼玉社会保険病院,
⁶⁾神奈川県予防医学協会, ⁷⁾東京通信病院臨床検査科, ⁸⁾伊藤病院臨床検査科
武井 泉¹⁾・小口修司¹⁾・石橋みどり¹⁾・石田浩二¹⁾・関口 仁¹⁾・菊池春人¹⁾・渡邊清明¹⁾・
佐々木昭子²⁾・今村ちさ³⁾・高加国夫⁴⁾・五内川里子⁵⁾・青木芳和⁶⁾・加野象次郎⁷⁾・
小林照明⁷⁾・宮崎直子⁸⁾

(平成 15 年 5 月 15 日受付)

ABSTRACT

Reference ranges of endocrine, lipid and chemical laboratory tests
at Keio University affiliated hospitals

*Izumi Takei¹⁾, Shuji Oguchi¹⁾, Midori Ishibashi¹⁾, Koji Ishida¹⁾, Hitoshi Sekiguchi¹⁾, Haruhito Kikuchi¹⁾,
Kiyooki Watanabe¹⁾, Akiko Sasaki²⁾, Chisa Imamura³⁾, Kunio Kohka⁴⁾, Satoko Gonaikawa⁵⁾,
Yoshikazu Aoki⁶⁾, Shojiro Kano⁷⁾, Teruaki Kobayashi⁷⁾ and Naoko Miyazaki⁸⁾*

¹⁾Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University, ²⁾Clinical Laboratory, Keiyu Hospital, ³⁾Department of Clinical Laboratory, National Tokyo Medical Center, ⁴⁾Department of Clinical Laboratory, Saiseikai Central Hospital, ⁵⁾Department of Clinical Laboratory, Saitama Social Insurance Hospital, ⁶⁾Clinical Laboratories, Kanagawa Health Service Association, ⁷⁾Department of Clinical Laboratory, Tokyo Teishin Hospital, ⁸⁾Department of Clinical Laboratory, Ito Hospital

The reference ranges of endocrine, lipid and chemical parameters have been variably decided at each laboratory of Keio University affiliated hospitals. This may lead to inappropriate evaluation of these laboratory data for clinical decision making. We have, therefore, attempted to establish standard reference ranges of blood samples at 21 Keio University affiliated hospitals. Blood samples were collected from 192 healthy persons, who were selected according to the criteria of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The samples were subjected to common hematological tests performed mainly by automated methods. Statistical analyses were performed with non-parametric alternative method, and the standard reference ranges were expressed as mean±2SD. The results were as follows : free-T3 2.0-4.5 pg/ml, free-T4 0.7-1.8 ng/dl, TSH 0.3-4.5 µIU/ml, fasting plasma glucose 80-110 mg/dl, HbA1C 4.0-5.5 %, total cholesterol 135-240 mg/dl, HDL-cholesterol 40-100 mg/dl, triglyceride 30-100 mg/dl, uric acid 3.0-7.0 mg/dl, creatinine 0.7-1.1mg/dl in men, 0.4-0.8mg/dl in women, calcium 8.5-10.2 mg/dl, inorganic phosphate 2.8-4.6 mg/dl. The majority of obtained standard reference ranges were closely related to Japanese standard values given in textbooks or previous reports of academic guidelines. Thus, the reference ranges reported here might be useful for accurate clinical assessment of endocrine, lipid and chemical data in Keio University affiliated hospitals.

Key Word : chemical laboratory tests , reference range

KEMS (Keio Endocrine Metabolite Survey) 研究会は慶應義塾大学医学部の関連病院(21施設)の内分泌・脂質・化学検査にたずさわる検査技師などが、内分泌・脂質・化学検査の標準化や病院相互の検査技術の向上、拡充および情報交換を図ることを目的に平成11年6月より活動を行っている。平成12年度と13年度の過去2回、本研究会で実施した関連病院の検査サーベイにおいて、多くの検査項目で、測定値に差がほとんどないにもかかわらず、基準範囲の設定が施設間で異なるために、臨床的正常値・異常値が各施設で同じように適切に評価されない可能性がサーベイ検査結果より示された。このため、関連病院の基準範囲の施設間差を是正する必要性が生じ、関連病院共同作業の下で、成人の検査基準範囲を設定し共有化することとした(第1表)。検査の基準範囲を一定にすることで、患者および医師が関連病院間を転院あるいは異動した際にも、同一基準値でデータの評価が可能となり、臨床的有用性が向上すると考えた。さらに、患者転院時の無駄な再検査を防ぎ負担も軽減されることが予想された。

以上の理由で、今回関連病院の内分泌・脂質・化学検査の基準範囲を統一することを目的に本研究活動を行った。

対 象

基準範囲設定のための血液提供者は、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)-C28Aに準じて選出した。その中、条件が不明確であった飲酒量、喫煙本数、Hgbの値、肝機能項目の種類(AST, ALT, γ -GTPの3項目)について血液研究会で独自に詳細条件を追加設定され¹⁾、それ以外についてはNCCLS-C28Aの規定に従った(第2表)。慶應関連病院21施設において、本条件を満たした成人192名(男性91名、女性101名)を対象とした。これら対象よりFree-T3, Free-T4, TSH, 血糖, HbA1c, 尿酸, クレアチニン, 総コレステロール, 中性脂肪, HDL-コレステロール, カルシウム, 無機リンを対象項目として測定を行った。

方 法

1. 検体採取時期

平成13年9月から基準範囲設定のための説明がなされた後、平成14年1月までの間、各施設による任意期間と検体採取が文書同意の上で行われた。

第1表 推奨基準範囲

検 査 項 目	推奨基準範囲
血糖	80~110 mg/dl
HbA1c	4.0~5.5 %
カルシウム	8.5~10.2 mg/dl
無機リン	2.8~4.6 mg/dl
尿酸	3~7 mg/dl
クレアチニン	男性 0.7~1.1 mg/dl 女性 0.4~0.8 mg/dl
総コレステロール	135~240* mg/dl
HDL-コレステロール	*40~100 mg/dl
中性脂肪	30~150* mg/dl
F-T3	2.0~4.5 pg/ml
F-T4	0.7~1.8 ng/dl
TSH	0.3~4.5 μ IU/ml

*:日本動脈硬化学会の動脈硬化性疾患診療ガイドラインを参考

2. 測定検査項目

測定は血中、Free-T3, Free-T4, TSH, 血糖, HbA1c, 尿酸, クレアチニン, 総コレステロール, 中性脂肪, HDL-コレステロール, カルシウム, 無機リンであり、その他に末梢血, Na, K, Cl, BUN, LDL-コレステロール, AST, ALT, γ -GTP, Al-P, CK, 尿酸, 尿蛋白を測定した。

3. 検体の測定法

各施設は各々で選定した対象者について基準範囲:設定項目と一般検査項目を測定することとし、同一検体の複数施設での測定は今回行わなかった。また、測定は全項目について各自施設の自動測定法を採用した。

第2表 基準範囲設定のための血液提供者の選出基準

以下に示すNCCLSのガイドラインに準ずる条件を満たし、本人の同意が得られた者とした。

- 既往歴なし
- 血圧正常
(最高血圧 159 mmHg 以下, 最低血圧 94 mmHg 以下)
- 肥満度正常
(BMI=22に相当する体重を理想体重とし、その $\pm 10\%$ 以内)
- 飲酒(2合/日以下)、喫煙(20本/日以下)とする
- 尿糖, 尿蛋白陰性, 血糖値 110 mg/dl 以下, BUN 22 mg/dl 以下
- Hgb 正常 (男性 13.0 g/dl 以上, 女性 11.0 g/dl 以上)
- 肝機能項目 (AST, ALT, γ -GTP) 正常

4. 結果の集計法

各施設で各々対象を選出して測定した結果を1ヶ所に集約し, 施設間での比較は行わなかった. また, 統計処理は分析機種や試薬別では行わずにサンプルを1母集団として取り扱った. その手法は各項目別に平均値および標準偏差(±3SD)を求め, 2回反復切断を施行したものとしないものについてパラメトリック, ノンパラメトリックなどの統計処理を行い, 推奨基準範囲の設定とした.

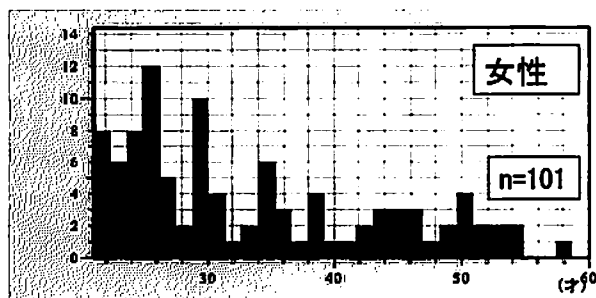
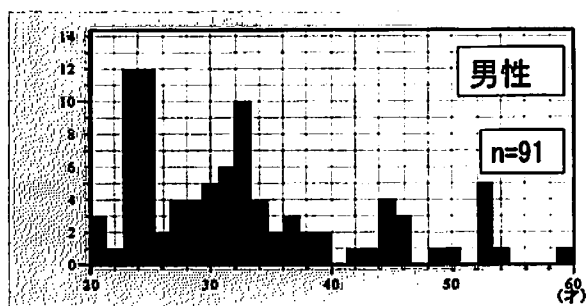
結 果

1. 対象検体の年齢分布

21施設における男女別年齢分布を第1図に示す. 年齢は20歳より60歳までとし男性は30代, 女性は20代に母集団のピークが認められた.

2. 基準範囲

各項目の濃度分布を第2図に示した. Free-T3の濃度分布は性差が認められるが153名を対象としたノンパラメトリック法による基準範囲は2.1~4.5 pg/mlであった. Free-T4法の算出された基準範囲はノンパラメトリック法で0.8~1.8 ng/dlであった.



第1図 対象検体の年齢分布

今回の基準範囲設定においてはノンパラメトリック法を原則として統計処理を行ったが, TSHは対数変換により正規分布に近くなると見なせることから, 対数正規分布としてパラメトリック法で基準範囲を算定した. TSHの基準範囲は0.4~4.1 μ IU/mlであった. 血糖の基準範囲はノンパラメトリック法では下限値80 mg/dl, 上限値109 mg/dlが得られた. HbA1Cはほぼ正規分布が得られ, 分布からノンパラメトリック法で求められた基準範囲は4.1~5.5%となった. 尿酸は男性が3.2~8.1 mg/dl, 女性が2.8~5.7 mg/dl, 全体では2.9~7.4 g/dlと算出された. クレアチニンは男性が0.7~1.1 mg/dl, 女性が0.4~0.8 mg/dl, 全体では0.5~1.1 mg/dlであった.

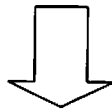
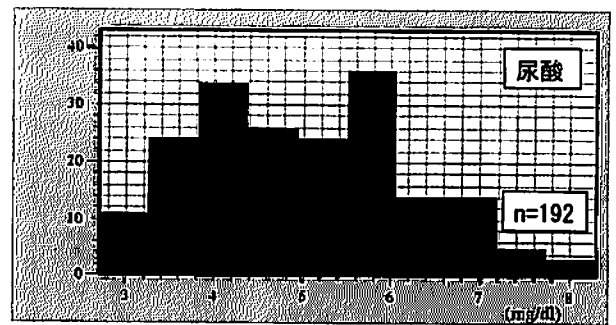
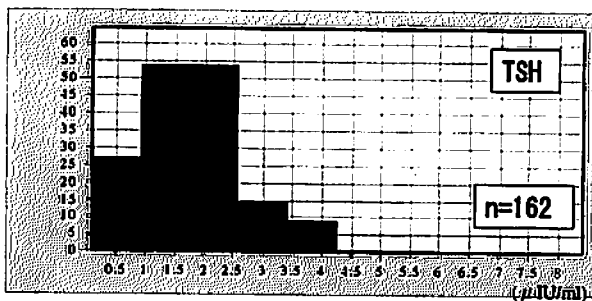
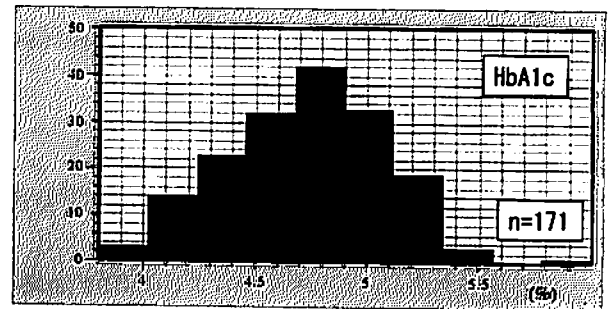
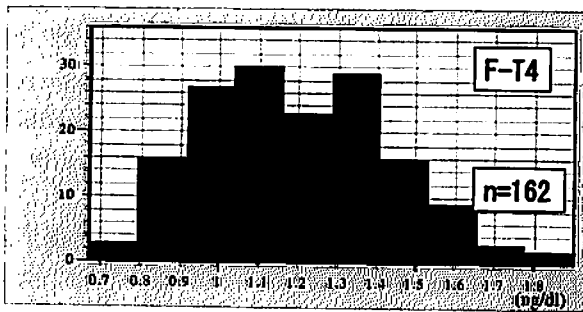
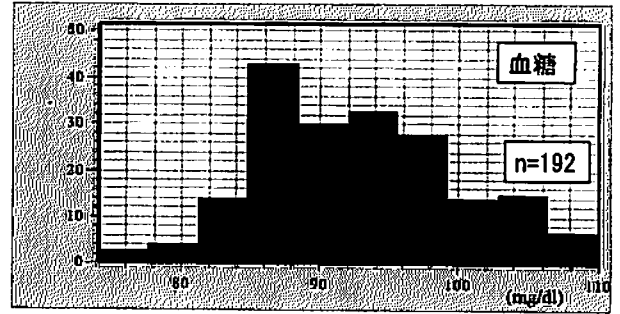
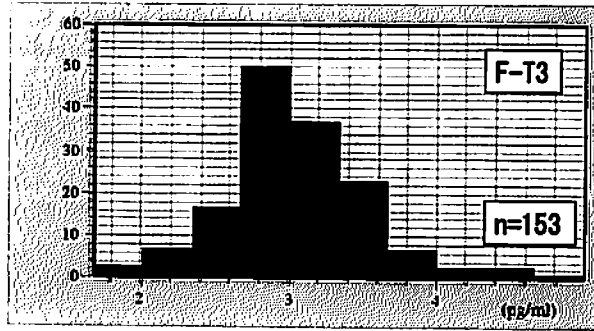
今回の検討で総コレステロールは137~242 mg/dlであった. HDLコレステロールは, 男性が42~88 mg/dl, 女性が48~108 mg/dl, 全体では43~104 mg/dlであった. 中性脂肪は男性が33~193 mg/dl, 女性が29~150 mg/dl, 全体では31~170 mg/dlであった.

カルシウムは8.5~10.2 mg/dlであった. 無機リンは2.8~4.6 mg/dlであった.

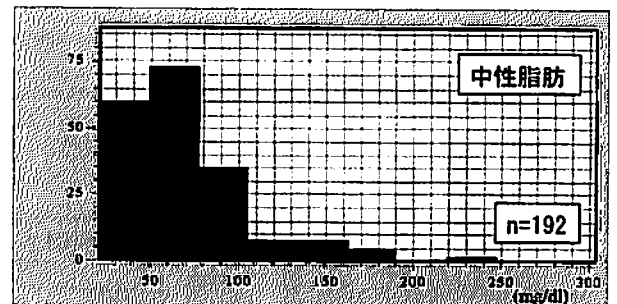
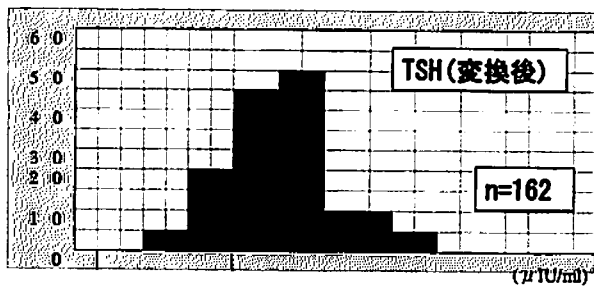
なお, 全項目について平均値および標準偏差±3SDの2回反復切断前後で有意な差は認められなかったため, 統計処理上, 反復切断なしでの基準範囲設定を採用した. いずれの項目においても従来の基準範囲を大きく逸脱するものはなかった²⁻⁵⁾.

考 察

我々が行った過去のサーベイの結果, 内分泌, 脂質, 化学検査の測定値は施設間で差が少なかったため, 研究会においては施設間の測定値の比較は行わず, 共通の基準範囲を設定することを主な目的とした. 今回の基本的検査の基準値範囲は, (1)母集団の選出基準をNCCLSの定義に準じて厳密に規定したこと, (2)使用分析機および試薬が異なること, (3)複数施設各々が測定した結果を一括して統計処理を行ったことの3点が従来の基準範囲設定法と大きく異なる. また, 本研究の統計処理に基本的にノンパラメトリック法および標準偏差±3SDの反復切断なし法を採用したが, これは各施設が共通基準範囲設定に参加しやすい条件設定を配慮するうえで, 各自施設の日常検査環境を無理に変更せずに, 各々の現行法での実測値を尊重したことがその理由である. さらに, 統計学的手法のみに固執せず, 臨床的観点から結果を総合的に判断・評価して慎重に決定することも重要と



<パラメトリック法>

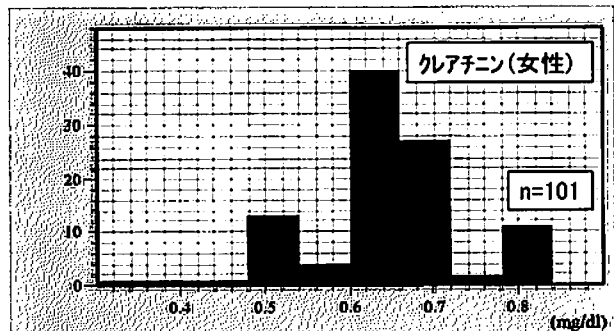
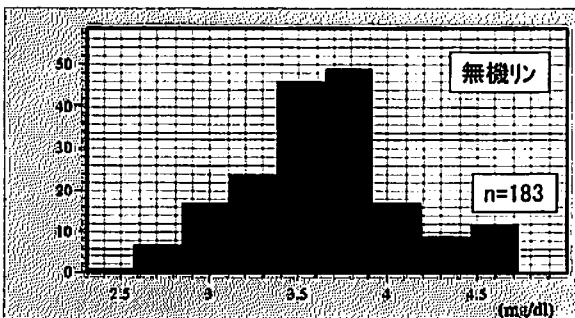
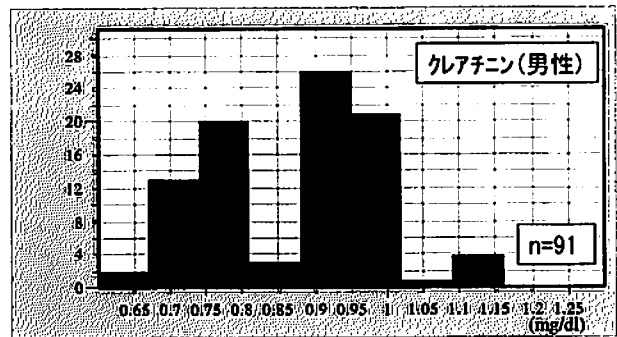
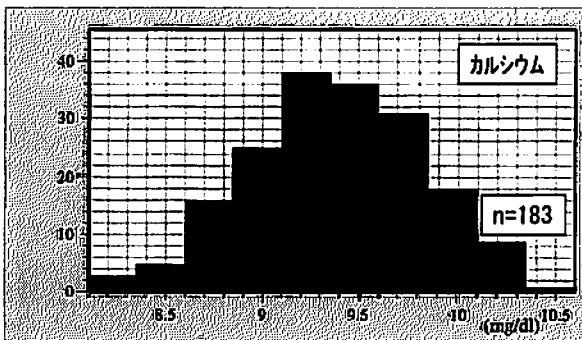
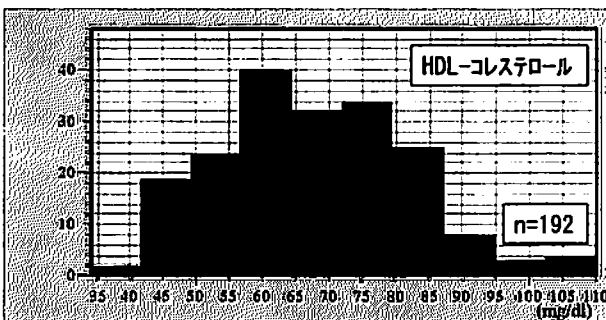
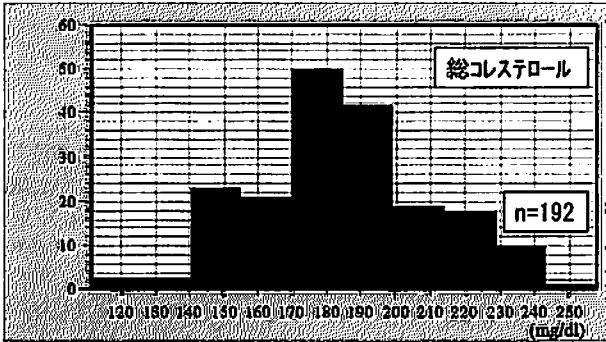


第2図 各項目の濃度分布

考え, 利用しやすさや使い勝手も考慮した。これまでも一地域における基準範囲の検討が行われているが今後このような共通の基準範囲設定は推進されていく可能性が高く, 今回の試みは興味ある結果と思われた⁶⁻¹⁰⁾。

Free-T3 推奨基準範囲はサーベイの臨床評価の結果と同じく, 2.0~4.5 pg/ml に設定した。Free-T4 は同じく 0.7~1.8 ng/dl に設定した。TSH は臨床コメントを参考にし, 下限は低めに上限は低からず高からずの値でかつ覚えやすい数値を考慮し, 0.3~4.5 μ IU/ml とした。空腹時血糖は日本糖尿病学会糖尿病診断委員会のガイドライン¹¹⁾を参考にし, 70~110 mg/dl が妥当と考えた。なお血糖の 2000 年サーベイでは施設間変動係数が 2.2% 以下と方法 (電極法, 酵素法) によらず測定値の収束が得られている HbA1C は測定機器間差はあるが, 新機種では基準範囲の上限を 5.5% とする施設が多い。これらをふまえ基準範囲を 4.0~5.5% とした。

尿酸は日本痛風核酸代謝学会のガイドライン¹²⁾および専門医の提案をふまえ, 性差の区別無く 3.0~7.0 mg/dl とした。クレアチニンは男性 0.7~1.1 mg/dl, 女性 0.4~0.8 mg/dl と男女別に設定した。総コレステロールは日本動脈硬化学会の動脈硬化性疾患診療ガイドライ



第 2 図 各項目の濃度分布 (続き)

ン2002¹³⁾を参考にし、135~240 mg/dlと提案した。同じくHDL-コレステロールは専門医の意見の下に40~100 mg/dlとした。中性脂肪は30~150 mg/dlをガイドラインを参考に提案した。カルシウムは算出結果から8.5~10.2 mg/dlとした。無機リンも算出結果より2.8~4.6 mg/dlとした。

結 論

慶應義塾大学の関連病院21施設による甲状腺、糖尿病、脂質及び化学の共通基準範囲を設定した。従来の教科書的基準範囲と大きく逸脱する項目は見られず、ほぼ満足いく成績であった。因みに、慶應義塾大学病院ではすでに平成14年10月1日からこの新共通基準範囲を採用した。しかし、本研究の最終目的は慶應義塾大学関連全施設が臨床的に混乱なく新共通基準範囲に移行し、臨床に活用していくことであり、関連病院の臨床医の先生方や検査技師のご理解とご協力を是非お願いする次第である。

文 献

1) 渡邊清明：慶應関連病院における血液検査の共通基準。慶應医学, 77: 257-262, 2000

2) 金井 泉, 金井正光：各種臨床検査の基準範囲一覧表。1.血液検査。臨床検査法提要。改訂30版 金原出版, p.3, 1998
 3) 巽 典之：臨床血液検査。基準値ハンドブック。南江堂, p.249-339, 1998
 4) 三輪史朗：血液検査。臨床検査技術全書3。医学書院, p.534-542, 1972
 5) 金山昭平：全国の健康な臨床・衛生検査技師を中心とした血液正常値の現状（日本臨床衛生検査技師会血液正常値設定委員会編）。日本臨床衛生検査技師会, p.1-221, 1985
 6) 大澤 進：臨床検査測定値の標準化 生化学項目の標準化 千葉県での実践。臨床検査, 46巻: 877-882, 2002
 7) 秦 暢宏：千葉県における施設間の検査及び基準値統一事業に関する考察。歯科学報, 101: 567, 2001
 8) 市原文雄, 川島 徹, 大澤 進, 才藤純一, 秋庭靖男, 麻生裕康, 真々田賢司, 梅宮敏文：共通管理試料を用いた千葉県臨床検査値統一化事業について。医学検査, 50: 1228-1231, 2001
 9) 岩増良雄：広島県における多施設の標準化の試み。臨床化学, 30 (Suppl.2): 143b, 2001
 10) 木村 雅：三重県における臨床化学統一基準範囲と施設間是正の動向。慶應医学, 75: 308, 1998
 11) 葛谷 健：糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告。糖尿病, 42: 385-401, 1999
 12) 日本痛風・核酸代謝学会：高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第一版。p.15-17, 2002
 13) 日本動脈硬化学会：動脈硬化性疾患診断ガイドライン, 2002

変貌する循環器診療の中で伝えたいこと

近年の医療技術の加速度的進歩には目を見張るものがあり、大学を離れ市中病院での日常臨床に追われる身にとっては、追従するのも容易でない状況である。現在でも私が師と仰ぐ、呼吸循環器内科元助教授（後に老年科教授）の中村芳郎先生の、心臓病患者の聴診をはじめとする身体所見の取り方に始まる診断学に憧れ、最も内科医らしい内科医を輩出する診療科と考え、循環器内科の門をたたいてから既に14年が過ぎた。当時から、リウマチ性心疾患の減少により、弁膜症の診療が循環器診療の中でその比重を減らしてはいたが、その後の10余年の間に、食生活の欧米化の影響を受けて増加する虚血性心疾患と、その治療技術の目覚ましい進歩とがあいまって、循環器診療の主体は明らかに虚血性心疾患の診療に大きく軸足を移した。私が研修医の時代には、急性心筋梗塞の患者が入院してくれば、基本的には安静にして見守ることしかなく、遅れて出現してくる諸々の合併症にひとつひとつ対応するという対症療法的な治療しかなかった。それが、現在では、救急外来から直ちに血管造影室に運ばれ、冠動脈インターベンション治療が施される。それにより、その後の心筋梗塞の合併症の出現頻度を著しく低下させ、入院翌日より心臓リハビリを開始することが可能となり、入院期間の著しい短縮にもつながっている。現在の循環器診療の最も華やかな部分であることに間違いない。当然の結果として、若い研修医達の循環器内科を志す動機が、我々の頃とは明らかに違ってきている。虚血性心疾患の診断には、聴診はあまり重要でなく、冠動脈造影が最も信頼できる診断手段であり、その技術が治療にも直結するため、若者達はひたすら冠動脈造影を目指すという構図となっている。少し大きき言い方をすれば、循環器内科医が聴診器を置いて、その手にカテを持ち替えるという、循環器内科の世界の大きな転換点に今我々はあるのかもしれない。近年急速に発展を始めた再生医療も、循環器内科領域で臨床応用がまさに始まろうとしており、その応用の手段として、冠動脈インターベンションの技術が重要な役割を果たすことは間違いない。循環器の診療が今後もカテを中心に回っていくというその流れは変わる事はないと思われる。私自身もまがりなりにも冠動脈インターベンションに関わる身ではあるが、自らが目指した循環器内科医の姿とのギャップを多少感じながら、後身の指導にもあたっている。ただ、その中でやはり伝えたい事は、治療技術よりも、む

しろ治療に至るまでのプロセスを重視した考え方であり、冠動脈インターベンションが、診断から治療適応の決定、そしてさらに治療とすべてのプロセスを循環器内科医自らで行えてしまうという特殊性を、意識する必要があると思うからである。循環器内科医の内科医としての部分を重視し、少なくとも初期の段階の教育では、私が憧れた内科医らしい循環器内科医を育てることを心掛けたいと考えている。

小山卓史（永寿総合病院 循環器科）

反復性膝蓋骨脱臼の新しい病態

反復性膝蓋骨脱臼の治療の歴史は古い。Streubel が1866年に120例の病態について報告し、1920年頃までには現在の手術法のほとんどが報告されていた。反復性膝蓋骨脱臼の原因として多くの先天的解剖学的因子が報告され、手術法に至っては100種類以上も報告されてきた。手術法は近位リアライメント、遠位リアライメント、外側解離術、内側縫縮術などに大別される。1936年にHauserが遠位リアライメント手術の代表である脛骨粗面骨片内側移行術を報告して以後大きな変化はなかった。各手術成績は良好で再脱臼は希であると報告されてきたにも関わらず、問題点も指摘する報告も実は多かったのである。再脱臼の他、再脱臼はないものの膝蓋骨不安定感の残存、内側亜脱臼、膝蓋大腿関節症、膝屈曲制限などである。Hughston (1984) は反復性膝蓋骨脱臼の治療はRoux (1888) やKrogius (1904) らの考え方は今日でも変わらないと述べた。手術法が100種類以上にもなることに多くの膝外科医が疑問を感じつつもEBMがないために1940年以前の手術法が今日まで行われてきたといつてよい。

1980年代に内側膝蓋大腿靭帯の解剖学的報告がなされ、ついで1993年に同靭帯のバイオメカニクス的研究から膝蓋骨脱臼を防ぐ第一制御因子であることが判明した。この報告がこの疾患における新しい病態の解明にせまる第一歩であった。膝蓋骨内側支持組織は内側膝蓋支帯、内側膝蓋大腿靭帯、内側膝蓋脛骨靭帯、内側膝蓋半月靭帯により構成される。1993年から2000年にかけて6つのバイオメカニクス的研究から内側膝蓋大腿靭帯は膝蓋骨内側支持組織の内、膝蓋骨外側制動の50～60%を担い、第一制御因子と判明した。さらには臨床的にもこの靭帯の損傷が証明されることが必須であったが、1992年から2000年にかけて5つの研究から急性

膝蓋骨脱臼の90%以上に内側膝蓋大腿靭帯の大腿骨付着部での損傷が証明された。そして筆者は1999年反復性膝蓋骨脱臼の全例において内側膝蓋大腿靭帯不全があることを証明した。したがって1990年代の10年間はバイオメカニクス的研究および臨床的研究から膝蓋骨脱臼における内側膝蓋大腿靭帯の重要性が判明した期間とあってよいであろう。

過去の手術方法を踏襲してきた多くの膝外科医にとっては、内側膝蓋大腿靭帯という新しい病態の出現により混乱が生じているのが現状である。筆者は1992年以後、新しい手術法として内側膝蓋大腿靭帯再建術を開発し良好な成績を発表してきた。最近では雑誌Arthroscopy(2003, 19(5):E47)に詳細な手術方法を発表している。手術成績の報告はまだ世界的にも少なく、決定的な評価を得るまでには至っていないが、いま世界はこの靭帯に最大の関心を寄せている。反復性膝蓋骨脱臼の原因として多くの先天的解剖学的因子も当然関わってくるため、内側膝蓋大腿靭帯とそれらを組み合わせた病態解明も今後当然必要となるであろう。しかしながら、膝蓋骨内側支持組織の第一制御因子であり、膝蓋骨脱臼時に極めて高率に損傷する内側膝蓋大腿靭帯の病態解明とそのアプローチにより、本疾患に対する決定的な治療法が今後10年の間に導き出されるに違いない。

野村栄貴(川崎市立川崎病院 整形外科)

さらばモートン病

モートン病は、足趾の固有趾神経が足底横靭帯に圧迫されて起きる絞扼性神経障害であり、学生の試験問題にもよく出る有名な病気である。しかし整形外科医でさえ、第3、第4趾間(第2、第3趾間)がしびれる神経障害という程度の認識しかなく、体系的治療法が確立されているとは言い難い。手術法も、靭帯切離や神経剥離はよいほうで、神経切除(!)などというかなり野蛮な方法がいまだに行われている。いずれも対症療法というべきであり、病因を追求して治療するという理念が感じられない。筆者は外反母趾とアーチ研究を専門とする足の外科医であるが、外反母趾と凸足変形(第2～第4中足骨頭が下前方に下がる変形の暫定名称)の合併例の治療として第2、第3、第4中足骨を後上方に持ち上げる斜め骨切り術を外反母趾手術と同時にを行い、術前にあったモートン病様のしびれがきれいに治った症例に遭遇し、この斜め骨切り術を単独でモートン病の治療に応用できないかと考えた。元来この斜め骨切り術は、凸足変形で前足部足底の痛みと腓胝を伴う症例に適応があるのだが、モートン病の症状をもつ患者さんの足をその方角から見

てみると、程度の差はあるものの、ほとんど全てが凸足変形を呈していることに気づいた。つまりモートン病とは凸足変形がひきおこす症状のひとつとして位置づけられることになる。さらに、両足尖のしびれを訴える高齢者の多くは腰部脊柱管狭窄症あるいは末梢循環障害として片づけられているのだが、詳細に観察してみると、しびれが第2趾から第4趾に局限している症例が実に多いではないか。このような症例では活動性が低いため前足部足底の痛みや腓胝こそ目立たないが、足のレントゲンを撮影してみると、かなりの確率で凸足変形を発見できることもわかった。そこで痛みや腓胝のある(外反母趾を伴わない)凸足変形で、第2～第4趾のしびれ、すなわちモートン病症状を伴う症例に対して斜め骨切り術を単独で行ってみたところ、足底の痛みと腓胝だけでなく、しびれも予想通り見事に消失した。つまりモートン病を罹患神経に全く触れずに治療できたわけである。病因を考えれば、当然至極な治療法であり、どうして今まで行われなかったのか不思議なくらいであるが、足の解剖学的構造を正常化することが治療にあたっていかに重要であるかを再確認でき、原点復帰まさに目から鱗が落ちる思いがした。こんなところにくどくど書き連ねる前にさっさと発表して英文で書け、というおしかりの声が今にも聞こえてきそうだが、大学勤務でもない一介の臨床医の哀しさで、残念ながらその後症例数がさっぱり増えていない。論理的確信に臨床的実績がついてこないわけである。日本足の外科学会で、外反母趾に引っかけた3例ほど小出しにしてみた際にも、まず名称の問題でたたかれ、大方のお歴々のご理解は得られなかったようであった。本邦(および英語圏)では、名称はともあれ、この変形の概念の普及から始めなければならない、と痛感した次第である。現在、他大学の足研究班の若手にも根回しをして同志を増やし、いつの日か大きなclinical entityとして認めてもらえるよう鋭意努力中である。

わが整形外科領域でもご多分に漏れず再生医療や遺伝子研究にばかり注目が集まっているが、日常扱っている疾患のすぐまわりにもたくさんの盲点が潜んでいる。これら最先端の研究を生業としない(できない)われわれ一般臨床医にできる医学への貢献は、こういった盲点の中から新たな疾患の概念を拾い、地道に育て上げてゆくことではないかと思う。

星野 達(稲城市立病院 整形外科)

生殖医療技術の進歩と生命倫理

近年の生殖医療技術の進歩は挙児を希望する不妊症患者に福音をもたらしたが、その一方で生殖概念や一般的な社会通念を根底から覆す論議を生み出している。そのなかで近い将来に解決すべき問題のひとつとして、第三者からの配偶子や胚の提供あるいは代理母といった生殖技術を不妊治療にどう適応していくかという課題が挙げられる。人工授精、体外受精といった生殖技術は従来であれば妊娠は不可能であったカップルに対して児を設ける機会を提供しているが、特に体外での雄性雌性配偶子による受精ならびにその体外培養を可能とした体外受精の技術導入により、理論的には1個の精子、1個の卵子さらに正常な子宮が存在すれば子供をつくるのが可能となっている。そのため配偶子が欠如したり子宮が摘出された、本来であれば全く子供が期待できないようなカップルに対しても第三者からの協力を得て子供をつくるのが技術的には全く問題なくなっている。日本でも、これまでは提供された精子を用いた人工授精のみが行われていたが、今後は第三者の精子、卵子を用いた体外受精などが普及していくことが予想されている。

本来、子供は父親の精子、母親の卵子より誕生し遺伝的に両親と繋がっており、母親の子宮の中で発育や成熟が成され出生に至り、出生後はその両親が社会的な養育の責任を負っている。第三者の配偶子や子宮を用いた不妊治療はこれら従来考えられていた親の有する役割を分断することとなり、子供や親をどう定義すべきかという根本的な問題にも直結している。すなわち遺伝学的な関係を重視するのか、その場合精子と卵子のどちらに優位性を置くのか、また子供を出産したものが母親であるのか、あるいは妊娠前に配偶子や子宮の提供などを明記した契約書が親子関係を決定するのか、簡単に結論の出る問題では到底あり得ない。また将来的にはクローンによる受胎も可能になることを考えると問題はかなり複雑で深刻であり、これらの医療技術が即座に認可されることは避けるべきであり、十分な論議と冷静な判断が必要であることは間違いない。一部の医療者は不妊治療を希望するカップルの人権を尊重し、卓越した医療技術を即座に行使する権利を主張するとも考えられるが、自然や神の領域として委ねられていた生命の創造に対して人為的な介入を可能にした生殖医療技術の使用にあたっては、やはり社会あるいは人類全体の承認が必要であり個人的に決定されることでは決してない。

最近になり生まれてくる子供の人権を尊重した対処が重要であるとの見解がクローズアップされている。すなわち精子や卵子、受精卵などの提供を受けて生まれた子

供に対して遺伝的な親を知る権利を認めようということである。これまで我が国で行われていた精子提供による人工授精では基本的には匿名性の原則が根底にあり、不妊治療の実施あるいは患者夫婦の同意や提供者の確保のためにも必要条件と考えられてきた。もちろん提供者の確保のために出生児の権利が帳消しにされるのは言語道断であるが、現況ではこれまでの慣習を打破することにより親子関係がきわめて危険な状態に陥る可能性を否定はできない。一方で真実は真実として子供に正しい情報を提供することは、出生に対して疑問を持つ子供だけでなく不安に狼狽える両親に対しても救済となる可能性は十分あることより検討の余地があるのも事実である。そのためには不妊治療を受けた親子に対するカウンセリング制度の充実や社会全体の意識改革が必要であるのは当然であるが、万人の同意を得るのは容易ではない。

また生殖医療技術は当初不妊症に対する治療として研究が進んだのであり、その恩恵を受けるのは不妊症のカップルに限定されるはずであったが、体外受精の技術導入は未婚であっても同性婚のカップルであっても提供者が存在さえすれば子供がくれる道を切り開いている。今後治療を受ける対象患者をどう限定していくか議論されていくと思われるが、やはり最終的には親や子の定義作りから行わなければならないのかもしれない。そのうえで子供や治療を望む人たちの人権がどのようにしたら保証されるかを考慮する必要がある。一方で配偶子や子宮の提供は近親者でなければ無償で行うことは実際には不可能であり、体外受精の適応の拡大により生殖医療は精子バンクなどと提携したビジネスとしての側面が強調されていくと危惧される。

さらに現在体外受精の技術を応用して、重篤な遺伝病を回避するという大義名分の下に受精卵を用いて遺伝的検索を行う着床前診断に対する開発が進められている。その是非は別として遺伝的に良好な胚を選択するという考え方は、今後の展開によっては優性思想へと結びついていく危険性をはらんでいる。精子の選別、卵子の選別、さらには受精卵診断による胚の遺伝的選別が行われ、不必要な配偶子や胚を廃棄する権利が本当に我々に認められるのか疑問ではある。一方で妊娠中期に行われる羊水検査などによる出生前診断が社会的に認められて、それよりも早期に行われる着床前診断の方が制限されるのは理解し難いことでもある。生命の誕生や胎児の人権をいつから認めるべきかなどと併せて明確な基準設定が必要であるが、両者より結果的に行われる行為は出生後では絶対に許されないものであることを忘れてはならない。

これまで医学の進歩は常に何人にも歓迎されると信じられてきたが、生殖医学においては現在の加速度的に進

歩していく医療技術は一般人の社会常識をはるかに越えており、現在では体外受精が登場した際には誰も予想しなかった様々な問題が生じている。生殖医療は新たな生命が誕生するという点で他の医療とは明らかに異なっており、その医療技術の臨床への導入においては倫理的にも道徳的にも解決すべき課題は多い。もちろん法的な規制を含む社会的なルール作りが早急に検討されることが望ましいが、法の制定は社会的な容認を意味することより多方面からの慎重な討議が不可欠である。またクローン胚を使用した実験など研究面においても今後解決すべき課題は多いが、我々医療研究者は医学の進歩に貢献する使命を背負っており、そのなかで人類全体に真の恒久的な幸せをもたらす道を探っていかなければならない。

小澤伸晃（国立成育医療センター）

骨折と最小侵襲手術

最近、骨折治療に関する分野でも「最小侵襲手術」という用語が目につくようになってきた。「最小侵襲手術」についての明確な定義はないが、従来行われてきた手術方法と同等の効果をより小さな侵襲で得る手術方法、と解される。骨折治療の分野における最小侵襲手術の目的は、骨折部あるいはその周囲組織に対する侵襲の軽減、皮切の縮小、自家骨移植に対する代替手段などである。

骨折治療の原則は古くから、整復・固定・後療法といわれ、現在でも変わることはない。かつての骨接合術は、転位を解剖学的に整復し、強固固定に固定することにより一時的骨癒合を得ることを第一としていた。しかし、そのため展開が大きくなり、骨折部あるいは周囲組織に対する損傷が大きく、術中出血、骨癒合不全、隣接関節の拘縮、抜釘後の再骨折などを生じる原因ともなっていた。Ender 釘、Küntcher 釘などの髓内釘は、侵襲の小さい骨接合法として利用されてきたが、回旋や短縮に対する固定性が弱いという欠点があった。しかし現在では、流通している髓内釘の多くが骨折部の短縮や回旋を防止するための横止めスクリューが利用できるように改良されており、単純な骨折のみならず粉碎骨折も適応となるため、大腿骨、脛骨、上腕骨などの長幹骨骨折の治療手段としては髓内釘が第一選択となっている。大腿骨遠位骨幹端粉碎骨折など、従来の髓内釘では治療の難しかった部についても、膝関節内から刺入する逆行性髓内釘により適応が拡大した。一方、侵襲が大きいとされていた

プレート骨接合法についても、骨折部から離れた部位から骨表面にプレートを挿入し小皮切からスクリュー固定をする minimally invasive plate osteosynthesis (MIPO) という手法が開発され普及しつつある。骨膜や周囲組織を損傷せず骨癒合が比較的早いいため、髓内釘の使用しにくい大腿骨や脛骨の骨幹端粉碎骨折などに利用されている。前腕骨骨幹部骨折に対する MIPO は、目に触れやすい前腕部の手術痕が小さく患者の満足度は高い。

その他、骨折治療の分野で最小侵襲手術と考えられるいくつかの手法がある。経皮的ピンニングは基本的な小侵襲手術法であり、手指の骨折や小児の非荷重関節付近の骨折に多用されているが、手技の工夫により、より効果的な治療をめざしたものがある。骨性髄指に対する石黒法、中手骨骨折に対する Foucher 法、橈骨遠位端骨折に対する Kapandji 法、鎖骨骨折に対する経皮ピンニングなどである。また、経皮的スクリュー固定は、小皮切からスクリューを刺入し骨折を固定する方法であるが、大腿骨頸部内側骨折、脛骨顆部骨折、足関節果部骨折、上腕骨通頸骨折、舟状骨骨折などに応用されている。その他、経皮的鋼線締結法は膝蓋骨骨折に対し行われている。

骨欠損を伴う骨折では骨移植が必要な場合があるが、自家骨の代替材料を用いれば採骨という侵襲を減らすことができる。代替材料としてはハイドロキシアパタイトなどが使用されてきた。リン酸カルシウムペーストは調合後の数分間はペースト状でありその後徐々に硬化する。骨欠損部の形状に合わせて補填することができるため近年急速に普及している。

このように、最小侵襲手術は現在骨折治療の重要なキーワードである。大腿骨頸部内側骨折に対する人工骨頭置換術でさえ数 cm の皮切で行っている施設もある。最小侵襲手術は、術野が狭く従来法に比較すると技術的難易度は高い。手術に由来する合併症を生じた場合、その侵襲は最小から最大に変化する。そのため術者には十分な解剖学的知識、手術法に対する知識と技量が要求されることは言うまでもない。今後は手術手技・機器の開発に加え、BMP、FGF など増殖因子の臨床応用、超音波の新鮮骨折への応用などによる骨癒合促進技術の開発が期待される。

山中一良（済生会神奈川県病院 整形外科）

雜 報

慶應医学会例会第 1315 回

日 時 平成 15 年 5 月 15 日(木) 午後 6 時
場 所 新教育棟 2 階 講堂 1
演 題 The use of laser in urologic surgery with emphasis on prostatic surgery
演 者 Mostafa M Elhilali, MD
Department of Urology, Royal Victoria Hospital, Montreal, Quebec, Canada
担 当 泌尿器科学教室

慶應医学会例会第 1316 回

日 時 平成 15 年 5 月 9 日(金) 午後 6 時
場 所 北里講堂
演 題 Bedside cardiology
演 者 Jules Constant, MD
Associate Professor of Medicine, Division of Cardiology, Department of Medicine, State University of New York at Buffalo, Buffalo, NY, USA
担 当 内科学教室

慶應医学会例会第 1317 回

日 時 平成 15 年 5 月 27 日(火) 午後 5 時
場 所 教育研究棟 2 階 講堂 1
演 題 Using a mouse model to assess Dsc1 function *in vivo*
演 者 Peter Koch, PhD
Assistant Professor, Departments of Dermatology and Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA
担 当 皮膚科学教室

慶應医学会例会第 1318 回

日 時 平成 15 年 6 月 2 日(月) 午後 6 時
場 所 新棟 11 階 大会議室
演 題 アメリカ医学生のやる気はどこから？
演 者 赤津 晴子博士
Assistant Professor, Department of Medicine, Division of Endocrinology and Metabolism, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA
担 当 医学教育統轄センター

慶應医学会例会第 1319 回

日 時 平成 15 年 6 月 20 日(金) 午後 6 時
場 所 新棟 11 階大会議室
演 題 Restorative grafting to the CNS : Better in injury than disease?
演 者 Lars Olson, MD, PhD
Professor and Chairman, Department of Neuroscience, Kalorinska Institute, Stockholm, Sweden
担 当 整形外科学教室

慶應医学会例会第 1320 回

日 時 平成 15 年 6 月 24 日(火) 午後 6 時
場 所 新教育研究棟 2 階 講堂 1
演 題 Complementary and integrative medicine in the United States : implications for collaboration with Japanese colleagues
演 者 David Eisenberg, MD
Director, Osher Institute, Division for Research and Education in Complementary and Integrative Medical Therapies, Harvard Medical School, Boston MA, USA
担 当 ツムラ東洋医学寄附講座

慶應医学会例会第 1321 回

日 時 平成 15 年 7 月 8 日(火) 午後 5 時 30 分
場 所 新棟 11 階大会議室
演 題 肥満研究最前線：レプチンの基礎研究と臨床応用
演 者 小川 佳宏教授
東京医科歯科大学, 難治疾患研究所, 分子代謝医学分野
担 当 小児科学教室

慶應医学会例会第 1322 回

日 時 平成 15 年 7 月 18 日(金) 午後 6 時
場 所 新教育研究棟 4 階 セミナールーム 5
演 題 医薬品と健康食品の相互作用について
演 者 大西 憲明博士
京都薬科大学病院, 薬学教室助教授
担 当 ツムラ東洋医学寄附講座

慶應医学会例会第 1323 回

日 時 平成 15 年 7 月 29 日(火) 午後 5 時
場 所 総合医科学研究棟 6 階会議室
演 題 Melanoma specific human CD8 T cells before
and after peptide vaccination
演 者 Daniel E Speiser, MD
Assistant member, Ludwig Institute for Cancer
Research, Lausanne branch University of
Lausanne, Lausanne, Switzerland
担 当 先端医科学研究所

第12回クリニカル・ビデオフォーラム (C.V.F) のご案内と演題募集

第12回クリニカル・ビデオフォーラムを下記の通り開催いたします。多数ご参加下さるようお願い申し上げます。

—記—

会 期：2004年2月14日(土) 午前9時より午後5時頃まで

会 場：東京国際フォーラム レセプションホール (A・B)
東京都千代田区丸の内3-5-1 (最寄駅：JR線有楽町駅, 東京駅)
TEL 03-5221-9000 (代表)

主 題：低侵襲性治療のための最先端画像
—Cutting edge of imaging for minimally invasive therapy—

要 望 演 題：(応募)

新たな治療手技と診断工夫

1. Interventional Radiology

2. Novel technique for current imaging and modern treatment

一 般 演 題：(応募)

要望演題以外で本フォーラムに適していると思われるもの。テーマは自由です。

発 表 形 式：VTR (VHS, S-VHS) もしくはPC (動画) に限ります。(スライド不可)

演題締め切り：2003年9月12日(金)

当番世話人：岡崎 正敏 (福岡大学医学部教授 放射線医学教室)

代表世話人：北島 政樹 (慶應義塾大学医学部教授 外科)

常任世話人：草野 正一 (防衛医科大学校教授 放射線科)

西元寺克禮 (北里大学医学部教授 内科)

幕内 博康 (東海大学医学部教授 外科)

宮野 武 (順天堂大学医学部教授 小児外科)

顧 問：片山 仁 (順天堂大学医学部名誉教授)

比企 能樹 (北里大学医学部名誉教授)

平松 京一 (慶應義塾大学医学部客員教授)

(五十音順)

お問い合わせ：福岡大学医学部放射線医学教室 第12回CVF事務局

〒814-0180

福岡県福岡市城南区七隈7-45-1

TEL：092-801-1011 (内線3415)

FAX：092-864-6652

e-mail：mokazaki@fukuoka-u.ac.jp

事務局担当：東原秀行・柳澤映子

クリニカル・ビデオフォーラム ホームページ：<http://www.c-v-f.com>

『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、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、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「慶應医学」編集室

TEL 03(5363)3736 (直通)

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

受付時間：平日 午前 9：00～午後 5：00

(土曜日は受付をしません)

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

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

論文原稿の作成上の注意

1. **原稿** 文章は現代かなづかいにしたがって平仮名混じりとする。A4判の白紙に横書き（35字/行×23行の約800字詰）で、上下を約2.5cmずつ、左右を約3cmずつあける。外国語の原語綴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、A 4 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²³⁾。”のように肩に番号をふる。文献表は本文とは別とする。共著者のある場合すべての著者名を書き、スタイルはバンクーバー方式とする。論文のタイトルの文頭のみ大文字とし、あとは小文字で書く。雑誌名は公式の略号を用い、頁は最初と最後を必ず書く。（下記の例を参照する。）

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

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

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

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

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

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

20. その他 詳細に関しては事務局に問い合わせ下さい。 (2003年1月)

「学位申請論文」投稿の手引き

「学位申請論文」について

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

1. 学位取得の十分条件ではない。

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

2. 二重投稿が回避できる。

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

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

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

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

3. プライオリティーを主張することはできない。

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

論文作成上の注意

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

ある。

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

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へ申請されたい。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。この書式も編集部へ申請されたい。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）		

編集後記

IC や IT の進歩、コンピューターの普及によりこの 10 年間で私達の仕事も大きな変換を強いられてきた。手書きのポスターで学会発表したり、スライドの写植に時間を費やすこともなくなった。発表の直前まで内容の作成、訂正を繰り返すことができる。世界中の研究者といつても情報交換ができる。なんとも便利となったが、そのかわり自由な時間がなくなった。世界中で共通の情報を簡単に入手できるようになり、専門家としての的確で必要不可欠・十分な情報を選択して患者様にご提供しなければならなくなった。かつての「細かいことは言わず何でも任せろ」タイプの医師は訴訟の対象となり、「お客さま商売」タイプの医師がもてるようになった。中小病院でできない金のかかる特殊医療を行ってきた大学病院も、今や包括医療の渦中となり、常に医療保険とのせめぎ合い。大学病院の特殊性を打ち出すには高度先進医療の取得など、相当な労力が必要となった。学生教育には今まで以上の労力を必要とされ、研修医の労働は 1 日 8 時間、その教育も大きな変換期にある。教育に人手が必要だがそのような余裕はない。診療の合間になんとか工夫して作り上げてきた研究は通用しなくなり、お金と時間をかけた研究しか評価されない傾向となった。全国どの大学の先生に尋ねても返って来る返事は皆同じで、「大学の（に）いる）メリットはない」と、大学に人が集まらなくなった。みんなが疲れている時代のような気がする。

「慶應医学」も大きな変換期にあり、この現代の荒波を乗り越えるために何かを模索している。個人主義が尊重されるにも関わらず、今まで以上にみんながモチベーションを高め、一致した目的意識を共有しなければなら

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
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

平成 15 年 9 月 19 日 印刷

平成 15 年 9 月 25 日 発行

編集者 北島政樹
発行者 北島政樹
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製・作製・転載すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

ない時期にある。

こんな暗い時期に私の所属していた医学部ヨット部が約 10 年ぶりに東医体で優勝した。久しぶりの明るい話題であった。関係者の皆様、おめでとうございます。

(齋藤 英胤)

複写される方へ

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

〒107-0052 東京都港区赤坂 9-6-41 乃木坂ビル 学術著作権協会

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

アメリカ合衆国における複写については、次に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

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

Notice about photocopying

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

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

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

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

In the USA Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

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

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

慶應医学 第80巻第3号別頁
平成 15 年 9 月 25 日

学 位 論 文

慶 應 医 学 会

学位論文

経頭蓋磁気刺激の抗うつ効果と神経生理学的予測因子について

慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室

(指導：鹿島晴雄教授)

前田典子

(平成14年6月11日受付)

Key Word : transcranial magnetic stimulation, cortical excitability, neurophysiology, treatment, depression

経頭蓋磁気刺激 (transcranial magnetic stimulation, 以下 TMS) は、扱いが比較的簡便なこと、副作用が非常に少ないこと、そして多岐にわたる研究分野に応用できることから、開発された 1980 年代中¹⁾から関心が非常に高まりつつある。現在では、低次・高次脳機能の研究 (特定の機能が脳のどの部位で処理されているか、脳の領域間の空間的・時間的連絡 (connectivity) がどうなっているかなど)²⁾、大脳皮質興奮性を測定することによる神経・精神疾患の病態生理の研究^{3,4)}、あるいは精神神経疾患に対する臨床試験が行われている^{5,6)}。特にうつ病の電気けいれん療法 (electroconvulsive therapy, ECT) に代替し得る身体療法のひとつとして関心が高まりつつある。また、近年、うつ病の病態生理や情動の神経回路に関する研究が、健常者や脳器質障害、感情障害患者の神経心理学的、あるいは脳画像研究や動物モデルを用いた基礎研究により飛躍的に進展したことから TMS の発展も相互に関連している^{7,8)}。

TMS は電磁誘導の原理 (1831 年, Faraday による) に基づいており、電気刺激と異なりパルス磁界によって誘導される電場によって組織内にイオン電流 (渦電流) を引き起こす。TMS による磁場は距離と対数的に減衰し、理論的には脳表から約 2 cm の深度の神経細胞までしか脱分極することはできない。渦電流は磁界の強さだけでなく、コイルの大きさや形状、コイルから刺激部

位までの距離、刺激部位とその近辺の組織の形状と性状に影響を受ける。TMS の種類としては単発 TMS、二発 TMS と反復 TMS (repetitive TMS, 以下 rTMS) がある。単発 TMS は 5~10 秒程度の不規則な間隔で繰り返される刺激を、二発 TMS は数~数百ミリ秒の刺激間隔 (interstimulus interval, 以下 ISI) で施行される二発の刺激を、また rTMS は一定の速度で反復される刺激すべてを指す。rTMS は刺激頻度によって、二種類に大別され、1 Hz 以下の頻度のものを低頻度 rTMS (slow, あるいは low-frequency rTMS)、1 Hz より高い頻度のものを高頻度 rTMS (fast, あるいは high-frequency rTMS) と呼ぶ。一般に低頻度 rTMS は大脳皮質興奮性を減少させ、けいれん誘発の危険性が低く^{3,9)}、一方、高頻度 rTMS は大脳皮質興奮性を増大させ、けいれん誘発の危険性がより高い^{3,9)}。

おそらく TMS の治療的应用で最も注目されている精神神経疾患はうつ病であろう。過去の研究により、1. 右半球は陰性感情と引きこもり (withdrawal) を、そして左半球は陽性感情と積極性を担い¹⁰⁾、2. うつ病において前頭葉 (特に左側) の脳血流・脳代謝が低下しており¹¹⁾、3. 背外側前頭前野皮質 (dorsolateral prefrontal cortex, 以下 DLPFC) は感情調整に重要とされる辺縁系との連絡が非常に密であり⁹⁾、4. 健常者における前頭前野皮質 (prefrontal cortex, 以下 PFC)

本論文は Maeda F, Gangitano M, Thall M, Pascual-Leone A : Inter- and intra-individual variability of paired-pulse curves with transcranial magnetic stimulation (TMS). Clin Neurophysiol 113 : 376-382, 2002, Maeda F, Keenan J, Tormos JM, Topka H, Pascual-Leone A : Interindividual variability of the modulatory effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on cortico-spinal excitability. Exp Brain Res 133 : 425-430, 2000, および Maeda F, Keenan J, Pascual-Leone A : Interhemispheric asymmetry of motor cortical excitability as measured by transcranial magnetic stimulation in major depression. Br J Psychiatry 177 : 169-173, 2000 の一部を含む。

への rTMS は陰性、あるいは陽性気分を惹起し¹²⁾、5. 電気けいれん療法 (electroconvulsive therapy, 以下 ECT) の臨床効果において PFC の機能の調整が重要な役割を果たしていること¹³⁾が報告されている。以上のように、うつ病では前頭葉の活動性が異常であり左・右前頭葉の活動性が左右非対称であること、また前述のように高頻度 rTMS が大脳皮質興奮性を一般的に増大させ、低頻度 rTMS が減少させることから、現在では、一般的に左 DLPFC 刺激では高頻度、右 DLPFC 刺激では低頻度 rTMS が効果的であり、高刺激強度、2 週間あるいはそれ以上の治療期間 rTMS を行うのが最も効果があると考えられている。

しかし、これまでのところ、研究間、患者間で治療改善率にばらつきがあり¹⁴⁾、治療に非常に反応する患者と、まったく反応しない患者あるいはかえって増悪する患者に二分される傾向がある。このような改善率のばらつきの要因は、患者層 (うつ病の評価尺度上同じ得点でも神経生理学的に均一とは限らない)、rTMS に対する反応性の個人差 (個人によって同じ rTMS に対して同様の大脳皮質興奮性の変化を示すとは限らない)、刺激部位 (後述のような現在一般的に用いられている決定法では個人の脳構造、大きさが加味されない) などが考えられるが依然不明であり、rTMS のパラメータは任意に決められているのが現状である。最適なパラメータを設定して治療改善率を高めるためにはうつ症状とともに変動する定量的な指標があることが望ましい。しかし現時点では、治療効果の判定は他の治療法と同様、ハミルトンうつ病評価尺度 (Hamilton Depression Rating Scale, 以下 HDRS) など臨床的尺度を用いて重症度を測定することが多い。こうしたことから、定量的に測定が可能な脳波や画像、内分泌系の異常所見がうつ症状の変動とともにどのように変化するか (ステート・マーカー)、あるいは治療前のこれらの異常が治療効果 (TMS, 抗うつ薬, ECT) を予測しうるのかといった研究が近年行われてきているものの、依然一定の見解は得られていない^{5,8,14,15)}。

TMS を用いた検査は筋電図を用いて測定されるため刺激部位が運動野に限局されるものの、定量的に神経生理学的な測定をすることが可能である¹⁶⁾。また、最近ではわずかながらさまざまな神経疾患や精神疾患の病態生理の研究に用いられつつある¹⁶⁾。さらに、同じ磁気刺激装置で治療と評価を行うことができることから簡便で都合がよく、臨床の場で利用しやすい技法である。一方、うつ病における薬物反応性を予測しうる症状として、精神運動抑制があげられるという報告がある¹⁵⁾。この精神

運動抑制を伴ううつ病、あるいはうつ病一般において、左半球優位 (DLPFC, 基底核などを含む神経系) の機能障害があり¹⁷⁾、うつ症状の改善とともにこの機能障害が改善することが知られている⁸⁾。これに関連して、TMS を用いた運動野の神経生理学的検査は、うつ病の病態生理、また rTMS 治療の評価による変化を検出するのに有用な技法である可能性がある。

そこでわれわれは、うつ病への rTMS の治療効果を検討するとともに、うつ病における神経生理学的異常が TMS を用いて検出可能か、TMS を用いた運動野皮質興奮性に治療予測効果があるのか、画像研究で示唆されている左右非対称と治療による改善が TMS 検査による大脳皮質興奮性でも検出可能かどうかを検討した。また、前述したようにこれまでのところ rTMS のうつ病における治療効果はばらつきがあり、この一つの要因として rTMS に対する反応性に個人差がある可能性があること、つまり、同じ高頻度 rTMS に対して大脳皮質興奮性が増大する者と減少する者がいる可能性があげられる。画像研究で示唆されているようにうつ病の改善とともに左前頭葉優位の活動性低下の消失が認められるとすると、一般的に左 DLPFC の機能低下があるといわれているうつ病患者の左 DLPFC に高頻度 rTMS を施行した場合、興奮性が増大する変化を示した患者のうつ症状が改善し、そうでない患者は改善しないことが予測される。そして、rTMS 治療により症状が改善した患者群は大脳皮質興奮性の左右非対称性も正常化することも予測される。

本研究では、まず健常者における TMS 反応の特徴を調べた。二発 TMS 技法は運動野に磁気刺激を与え、運動野内の皮質内興奮性を測定する技法であり、この技法によって測定される大脳皮質興奮性が健常者において左右対称であるかどうか、また再現性があるかどうかを検討した (研究 1)¹⁸⁾。そして、健常者が様々な頻度の rTMS にどう反応するか、高頻度 rTMS は大脳皮質興奮性を一概に増大させるのか、あるいは個人差が大きいのかを運動誘発電位 (motor evoked potential, MEP) を測定して検討した (研究 2)¹⁹⁾。これらの健常者のデータと比較して、うつ病患者の左右半球の大脳皮質興奮性はどうなっているか、左右非対称であるのか (研究 3)²⁰⁾、rTMS 治療によってどのように変化するか、治療反応者と非反応者の間で違いが認められるのかを検討した (研究 4)²¹⁾。さらに、左 DLPFC (うつ病では一般的に活動性が低下しているとされる領域) に興奮性が増大する患者と減弱する患者で rTMS 治療の反応性の違いを検討した (研究 5)²²⁾。

研究方法

1. 被験者

いずれの研究も対象は健常者、あるいは大うつ病患者で、ハーバード大学ベス・イスラエル・ディーコネス医療センター内の倫理委員会の認可を得（rTMSを施行する場合はさらに Food and Drug Administration の Investigational Device Exempt を得た）、同意書に署名を得て行った。被験者はいずれも心身に異常なしと診断され（うつ病患者の場合は大うつ病の診断以外異常なし）、TMS に対する禁忌を認めなかった。対象のうつ病患者は DSM-IV (Diagnostic Statistic Manual) と SCID (Structured Clinical Interview for DSM-III-R) により単極型大うつ病と診断され²³⁾、今エピソード中、十分量の抗うつ剤 3 種以上に 6 週間以上反応せず（難治性）、28 項目 HDRS²⁴⁾ 上 18 点以上の者であった。さらに、活発な希死念慮、TMS の経験、物質乱用の既往のある患者を除外し、患者の全内服薬を TMS 施行開始前 2 週間以上（fluoxetine の場合は 4 週間以上）中止した。

それぞれの研究は以下の被験者を対象として行った。

1) 研究 1 健常者における二発 TMS 曲線測定

健常者 10 名（男性 5 名、20～50 歳、平均 30.3 歳、右利き 9 名（エジンバラ利き手質問紙表による）25）を対象とした。

2) 研究 2 健常者における rTMS 反応測定

健常者 22 名（男性 12 名、20～45 歳、平均 27.8 歳、右利き 22 名）を対象とした。

3) 研究 3 うつ病患者における二発 TMS 曲線測定

うつ病患者 8 名（男性 5 名、19～78 歳、平均 46.8 歳、右利き 7 名）と健常対照者 8 名（男性 6 名、21～75 歳、平均 44.9 歳、右利き 8 名）を対象とした。

4) 研究 4 うつ病患者における二発 TMS 曲線の治療による変化

うつ病患者 18 名（男性 10 名、19～78 歳、平均 51.1 歳、右利き 14 名）を対象とした。

5) 研究 5 うつ病患者における rTMS 反応と rTMS 治療効果との相関

うつ病患者 53 名（男性 27 名、27～78 歳、平均 47 歳、右利き 47 名）を対象とした。

2. 機器と準備

二発 TMS 曲線測定の検査には Magstim 社 (Wales, UK) の Magstim 200 を 2 台とこれらを連結する

bistim module を、rTMS 反応測定の検査と rTMS 治療には同社の Magstim Super Rapid を用いた。刺激コイルは直径 70 mm の 8 の字型コイルを全研究を通じて用いた。刺激部位は、二発 TMS 曲線測定、rTMS 反応測定、あるいは rTMS 治療の刺激強度を決定する際に必要な運動閾値の測定の際には運動野「至適部位」、治療の際には左 DLPFC とした。至適部位は、国際臨床神経生理学会の規定に基づき測定筋で最大の MEP が得られる部位と定めた（通常、脳波の国際 10～20 法で C3 あるいは C4)²⁶⁾。DLPFC は簡便で比較的信頼性と再現性があることから従来よりほとんどの TMS 治療で用いられてきた方法に基づき^{5,14)}、至適部位から矢状方向に 5 cm 前方の位置と定めた（中前頭回の中央部、ブロードマン領域の 46 野と 9 野の境界部に相当)²⁷⁾。被験者は全身の筋がなるべく弛緩するように座位をとり、刺激部位を記すためにキャップをかぶった。刺激半球の対側の手首には径 30 mm の円形アースと指筋（第一背側骨間筋、first dorsal interosseous, 以下 FDI, あるいは短母指外転筋、abductor pollicis brevis, 以下 APB）には 30 mm の間隔で表面電極 (Nicolet Biomedical, Madison, WI, USA) をつけた。測定された MEP は増幅され（感度 200 $\mu\text{V}/\text{div}$ 、フィルタ 20～1000 Hz; Dantec, Skovlunde, Denmark)、A-D 変換後（2000 サンプル/秒; CED Income, Cambridge, UK, あるいは PowerLab, AD Instruments Limited, Grand Junctions, CO, USA) 解析した。

3. 運動閾値

まず、刺激コイルを頭表に正接させ誘導電流がほぼ中心溝に直角でかつ前方に流れるように置いた（前内側方向）。運動閾値は、国際臨床神経生理学会の規定に基づき最大振幅が 50 μV 以上の MEP が 50% 以上の確率で誘発される最小刺激強度と定義された²⁶⁾。筋電図上筋収縮が全く認められない状態で約 10 秒毎に TMS を施行した。

4. 二発 TMS 曲線測定

最も一般的に用いられている方法論により行った²⁸⁾。刺激強度は運動閾値を決定した後、第一発 (conditioning stimulus, CS) を運動閾値の 80%、第二発 (test stimulus, TS) を最大振幅約 0.8 mV の MEP を誘発する値に設定した。条件は CS のみ、TS のみ、あるいは ISI が 1, 3, 6, 8, 10, 12 ms の二発刺激であり、8 秒毎に無作為の順序で施行した。それぞれの条件は計 10 試行ずつであった。どの半球から検査を始めるかの

順序は被験者間で異なり、つりあうように調整した。

5. rTMS 反応測定

運動閾値を決定後、ある特定頻度(1, 10, 15, あるいは20 Hz)のrTMSの前と後に、運動閾値の120%の刺激強度で単発TMSを10回施行しMEPを収集した。rTMSは計240パルス、4分間をかけて行った。rTMS総計時間を一定にするために刺激の持続時間と休止時間をrTMSの頻度によって調整した。

6. rTMS 治療

初日のTMS検査結果とうつ病の重症度を知らされていない研究者が高頻度rTMSを左DLPFCに治療を目的として施行した。rTMSのパラメータは10 Hzで毎分8秒(80パルス)、計20分(1600パルス)、運動閾値の90%の刺激強度であった。

7. 臨床評価

TMS検査や治療に直接携わらない専門家がHDRSを用いて行った。rTMS治療後にも評価を行った場合には治療前に比べ尺度上50%以上の改善を認めた患者を治療反応者と定義した。

8. 研究のデザイン

1) 研究1 健常者における二発TMS曲線測定

二発TMS曲線測定を計2回、2週間隔で繰り返した。

2) 研究2 健常者におけるrTMS反応測定

1, 10, 15, あるいは20 Hzの頻度のrTMSを施行し、施行する順序は被験者間で異なり、つりあうように調整した。それぞれ異なるrTMS反応測定の検査の間には10分間の休憩を設けた。

3) 研究3 うつ病患者における二発TMS曲線測定

二発TMS曲線の測定をうつ病患者と健常対照者に対して行った。対照群は患者群の結果をうけ、最も左右半球の有意差が少なかった1, 12 ms, そして最も有意差が大きかった6msのみ施行した。またうつ病患者の臨床評価を行った。

4) 研究4 うつ病患者における二発TMS曲線の治療による変化

臨床評価と二発TMS曲線測定をrTMS治療の前後に行った。

5) 研究5 うつ病患者におけるrTMS反応とrTMS治療効果との相関

初日にまず10 HzのrTMSに対するMEP反応を測定し、その翌日からrTMS治療を施行した。臨床評価

は治療前、直後、治療終了2週間後に行った。また、なるべく二重盲検に近い形の研究デザインとするために以下のことを行った。現行のシャム、あるいはコントロールには様々な問題がある。研究者と患者の接触を避けることは不可能であり、研究者、患者共にシャムTMSかどうかかわかってしまう。したがって我々は研究2の結果で10 HzのrTMSでは約半数の健常者の皮質-脊髄興奮性が増大し、残りの者では減少したことから(予備的にうつ病患者で調べたところ、同様の結果が得られた)、また、過去の画像研究などにより、うつ病患者では特に左前頭葉の活動性の低下が認められることから、患者に約半数の者が皮質-脊髄興奮性が増大し、残りの半数は減少すると予想されること、また興奮性が増大する者の方がrTMS治療に反応する可能性があることを告げた。また、患者と研究者にrTMS反応の検査結果を知らせないことにより、患者、研究者ともにrTMS治療に反応する可能性が半々である(研究2の結果を受けて半々とした)というバイアスをかけ、なるべく二重盲検に近い形の研究デザインとした。

9. 統計的解析

MEP値はそれぞれのサンプル点を正の値に変換後、MEP曲線下の面積を測定した。

二発TMS技法の解析は二発TMSか単発TSによって誘発されたMEPの最大振幅を測定し、それぞれの条件ごとに平均値を求めた。その後TS-誘発MEP値に対する二発TMS-誘発MEPの割合を求めた(負の値は大脳皮質間抑制機構、正の値は大脳皮質間促進機構を反映)。

rTMS反応の解析は、それぞれの頻度のrTMS前と後に収集した10のMEPの平均値を求め、最終的にrTMS後の平均MEP値をrTMS前の平均MEP値に対するパーセンテージに変換して行った。

臨床効果の解析は治療前に比べHDRS尺度上50%以上の改善を認めた患者の割合、また全体でHDRSの変化率を求めた。

統計はそれぞれの研究結果の項でも述べるとおり、分散分析(repeated measures analysis of variance, ANOVA)や相関、信頼度係数(reliability coefficient, 以下RC; Spearman-Brown formula, $2r/(1+r)$), t検定(paired t-test), Post hocの検定(Bonferroni法)を状況に応じて行った。また、 $p < 0.05$ を有意とした。

研究結果

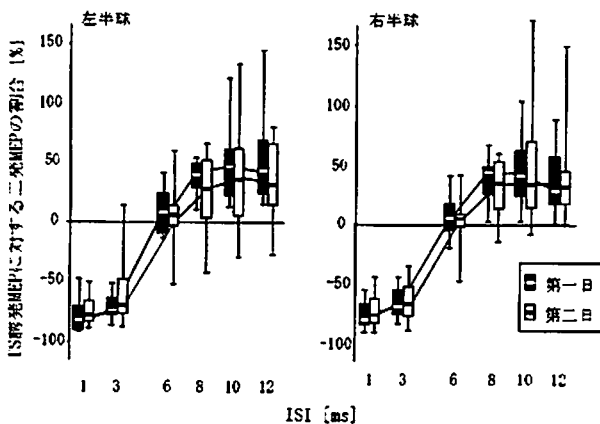
1. 副作用

全研究を通じて何らかの TMS が施行された 101 名のうち、13 名の被験者が軽度の頭痛を経験したが、鎮痛剤によって速やかに改善した。認知機能障害やけいれんなど、他の副作用は認められなかった。研究 5 で rTMS 治療をうけた 53 名のうち、5 名の患者が精神症状増悪のため途中で脱落した。

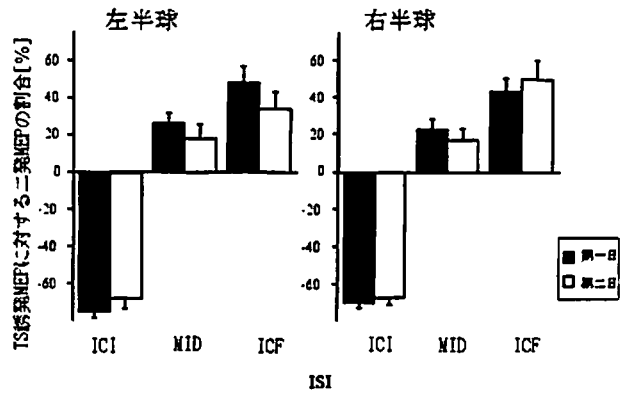
2. 研究 1：健常者における二発 TMS 曲線測定

1) 二発 TMS 曲線

それぞれの ISI (1, 3, 6, 8, 10, 12 ms) を Y 軸、[二発 TMS によって誘発された MEP の大きさ]/[単発 TMS (TS と同じ刺激強度、閾上刺激) によって誘発された MEP の大きさ] × 100 - 100 と算出した数値を Y 軸としてプロットした二発 TMS 曲線を第 1 図に示した。データ解析のパワーを高めるため、解析には機序別に ISI を 3 群に分類した (1 と 3 ms：「皮質間内抑制 (intracortical inhibition, 以下 ICI)」, 6 と 8 ms の ISI は「中間 (以下 MID)」, 10 と 12 ms の ISI：「皮質間内促進 (intracortical facilitation, 以下 ICF)」)。それぞれの ISI 群 (ICI, MID, ICF) をプロットした棒グラフを第 2 図に示した。2 (検査日：第一, 第二) × 2



第 1 図 第一, 二日の二発 TMS 曲線。左図は左半球, 右図は右半球。Y 軸は [二発 TMS によって誘発された MEP の大きさ]/[単発 TMS (TS と同じ刺激強度, 閾上刺激) によって誘発された MEP の大きさ] × 100 - 100 によって算出された数値。箱の上下限はそれぞれ 25, 75 パーセンタイルを示す。箱中の水平線は中央値を指す。垂直の誤差線は平均データの幅を指す。(Maeda F et al : Clin Neurophysiol 113 : 376-382, 2002 の第 1 図を, 許可を得て転載)



第 2 図 第一, 二日の ICI, MID, ICF の棒グラフ。左図は左半球, 右図は右半球。Y 軸は第 1 図と同様。垂直の誤差線は SE を示す。(Maeda F et al : Clin Neurophysiol 113 : 376-382, 2002 の第 2 図を, 許可を得て転載)

(半球：左, 右半球) × 3 (ISI 群：ICI, MID, ICF) 分散分析を施行したところ、3 方向性の交互作用 (3-way interaction) を認めた ($F(2, 38) = 6.60, p = 0.004$)。ISI 群の主の効果 (main effect) も認めた ($F(2, 38) = 145.55, p = 0.0001$)。他の主の効果, あるいは 2 方向性の交互作用はいずれも有意ではなかった。いずれの ISI 群も他の 2 群と有意な差を認めた ($p = 0.0001$)。3 方向性の交互作用は ICF の 2 (検査日：第一, 第二) × 2 (半球：左, 右半球) による有意な 2 方向性の交互作用によるものであった ($F(1, 19) = 6.90, p = 0.017$)。他の ISI 群 (ICI, MID) では有意な交互作用を認めず、また 3 群いずれにおいても主の効果認めなかった。

2) 再現性

第一日と第二日の再現性をみるために対応のある t 検定を行ったところ、いずれの半球, ISI 群 (左半球-ICI, 左半球-MID, 左半球-ICF, 右半球-ICI, 右半球-MID, 右半球-ICF) においても第一, 二日間に有意差を認めなかった (第 1 表 a, 左側)。さらにこれが個人間のばらつきによることではないことを確認する目的でそれぞれの半球, ISI 群における第一日と第二日の相関と RC を求めた (第 1 表 a, 右側)。左半球では 1, 3 ms において有意な相関と高い RC を認め、右半球においては 1, 3, 6 ms において有意な相関と高い RC を認めた。これによって ICI の方が再現性があることを確認した。

3) 左右半球

左右の対称性をみるために対応のある t 検定を行ったところ、いずれの検査日, ISI 群 (第一日-ICI, 第一日-MID, 第一日-ICF, 第二日-ICI, 第二日-MID, 第二日-ICF) においても左右半球に有意差を認めなかった (第

第1表 二発 TMS 曲線の再現性と左右半球差

a

ISI [ms]	左半球	右半球	半球	ISI [ms]	r	p	RC	
ICI MID ICF	0.13 0.25 0.22	0.32 0.27 0.38	左半球	1	0.78	0.008	0.88	
				3	0.76	0.01	0.86	
				6	0.33	0.34	0.50	
				8	0.55	0.09	0.71	
				10	0.40	0.25	0.57	
				12	0.43	0.20	0.60	
				右半球	1	0.70	0.02	0.82
					3	0.91	0.0002	0.95
					6	0.97	0.0001	0.98
					8	0.41	0.23	0.58
					10	0.44	0.20	0.61
					12	0.62	0.05	0.77

b

ISI [ms]	第一日	第二日	検査日	ISI [ms]	r	p	RC	
ICI MID ICF	0.36 0.74 0.76	0.96 0.94 0.47	第一日	1	0.86	0.001	0.92	
				3	0.88	0.0008	0.94	
				6	0.77	0.0009	0.87	
				8	0.77	0.0008	0.87	
				10	0.88	0.0007	0.94	
				12	0.74	0.01	0.85	
				第二日	1	0.73	0.01	0.84
					3	0.85	0.001	0.92
					6	0.97	0.0001	0.98
					8	0.82	0.003	0.90
					10	0.80	0.005	0.89
					12	0.80	0.005	0.89

a. 二発 TMS 曲線の再現性. 左図：それぞれの ISI 群における第一日と第二日の比較検定 (p 値). 右図：それぞれの ISI 群における第一日と第二日の相関 (r, p 値), 信頼度係数 (RC). ICI : 1, 3 msISI, MID : 6, 8 msISI, ICF : 10, 12 msISI. b. 二発 TMS 曲線の左右半球差. 左図：それぞれの ISI 群における左半球と右半球の比較検定 (p 値). 右図：それぞれの ISI 群における左半球と右半球の相関 (r, p 値), 信頼度係数 (RC). ICI : 1, 3 msISI, MID : 6, 8 msISI, ICF : 10, 12 msISI. (Maeda F et al : Clin Neurophysiol 113 : 376-382, 2002 の第 1, 2 表を, 許可を得て転載)

1 表 b, 左側). さらにそれぞれの検査日, ISI 群における左半球と右半球の相関と RC を求めた (第 1 表 b, 右側). 第一, 二日ともにすべての ISI において有意な相関と高い RC を認めた. これによっていずれの検査日, ISI 群においても左右差がないことが示された.

これらの結果から, 健常者において二発 TMS 技法は再現性 (特に ICI) があり, 二発 TMS 曲線は左右対称であることが示唆された.

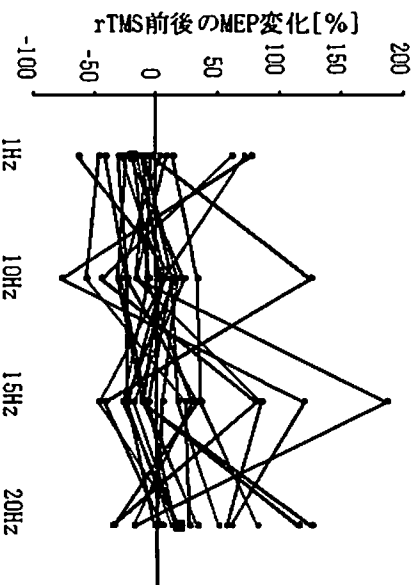
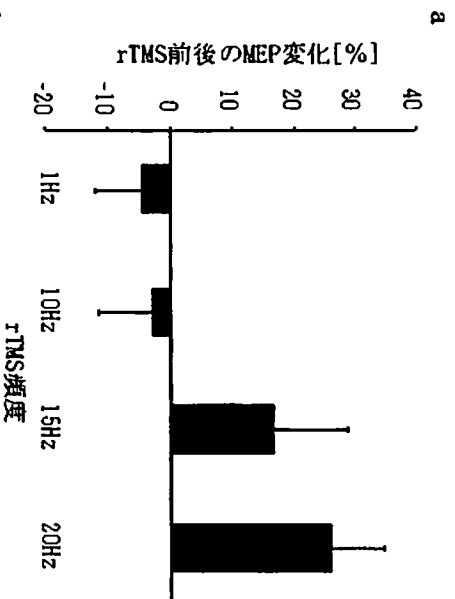
3. 研究 2 : 健常者における rTMS 反応測定

1) rTMS による皮質-脊髄興奮性への影響

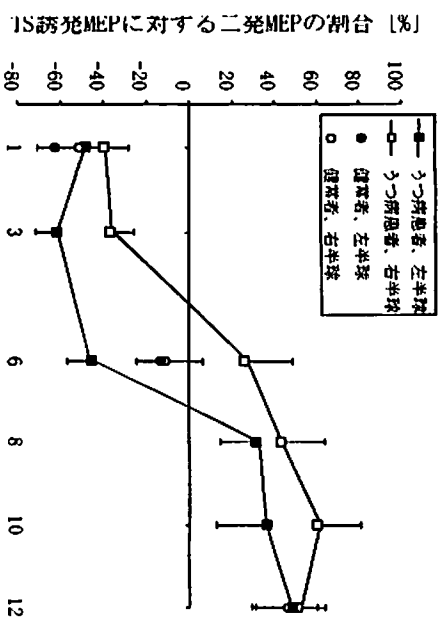
第 3 図 a に MEP 値がそれぞれの rTMS によってどう変化したかを示した. rTMS 前後の MEP 値の変化が

rTMS の頻度によって異なる傾向を認めた (1 方向性分散分析 ; $F(3,63)=2.404, p=0.076, \eta^2=0.103$). さらにそれぞれの rTMS 頻度間で Bonferroni 法で検定を行ったところ, 1 Hz と 20 Hz の間でのみ有意な差を認めた ($p<0.05$). また, それぞれの頻度の rTMS 前後で MEP 値の変化が 0 値から異なるかを検定したところ, 20 Hz のみ有意差を認めた ($t(21)=2.871, p=0.009, \eta^2=0.8$).

これらの結果から, rTMS の頻度が高くなるにつれ, 前後の MEP 値によって測定される運動野の大脳皮質-脊髄興奮性がより頻度依存的に増加する傾向を認めることが示唆された. しかし, 第 3 図 b に示したように, 個人差が大きいことがわかる.



第3図 頻度別 rTMS 前後の MEP の変化. a. rTMS 前後の MEP の大きさの変化をバーセンサーであらわしたものの、グループ平均、垂直の誤差線は SE を示す. b. 個人の rTMS 前後の MEP の変化. (Maeda F et al: Exp Brain Res 133: 425-430, 2000 の第 1 図を、許可を得て転載)

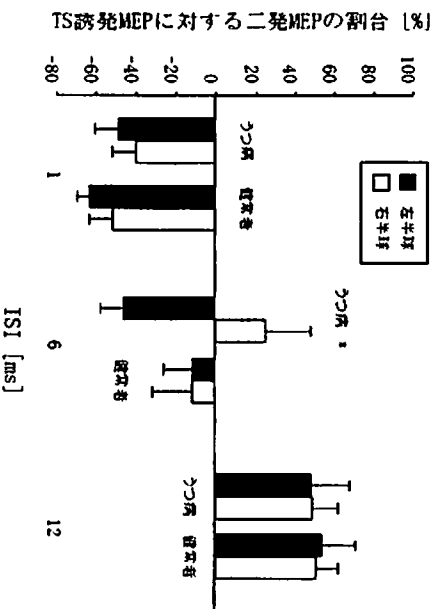


第4図 患者群と健康群における二発 TMS 曲線. Y 軸は第 1 図と同様、垂直の誤差線は SE を示す. (Maeda F et al: Br J Psychiatry 177: 169-173, 2000 の第 2 図を、許可を得て転載)

施行したところ、やはり ISI の主の効果のみ認めた ($F(2,14) = 29.98, p < 0.0005, \eta^2 = 0.811$)。Post hoc の検定に Bonferroni 法 ($\alpha = 0.017$) を行ったところ、いずれの ISI も他のどの ISI とも有意に異なった。

3) 群間比較

さらに患者群と健康群の比較を行った (第 5 図)。健康群では 1, 6, 12 ms の ISI のみを測定したことから、解析には両群の 1, 6, 12 ms のみを含めた。この解析では 2 方向性の交互作用を認めた ($F(2,14) = 7.66, p = 0.006, \eta^2 = 0.523$)。左右半球の非対称性を計算し、3



第5図 患者群と健康群の左右半球の 1, 6, 12 ms のみを図にしたもの。Y 軸は第 1 図と同様、垂直の誤差線は SE を示す。* : $p < 0.001$. (Maeda F et al: Br J Psychiatry 177: 169-173, 2000 の第 3 図を、許可を得て転載)

4. 研究 3：うつ病患者における二発 TMS 曲線測定

1) 臨床評価

患者群の HDRS 得点は平均 30.5 点 (SD = 4.41) であった。

2) 二発 TMS 曲線

患者群と健康群におけるそれぞれの ISI における二発 TMS 曲線は第 4 図に示すとおりである。患者群において 2 (半球：左, 右半球) × 6 (ISI : 1, 3, 6, 8, 10, 12 ms) ANOVA を施行したところ、ISI の主の効果のみ認めた ($F(5,35) = 17.18, p < 0.0005, \eta^2 = 0.711$)。

Post hoc の検定に Bonferroni 法 ($\alpha = 0.003$) を行ったところ、1 ms は 10, 12 ms と、3 ms は 8, 10, 12 ms の値と有意に異なった。次に健康群において 2 (半球：左, 右半球) × 3 (ISI : 1, 6, 12 ms) ANOVA を

つの ISI の群間比較 (Bonferroni corrected, $\alpha = 0.017$) を行ったところ, 6ms で患者群 ($M = -1.05$, $SD = 62.54$) と健常群 ($M = -0.2$, $SD = 2.60$) の間に有意な差を認めた ($t(7) = 5.23$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.796$).

4) 臨床評価との相関

いずれの ISI でも臨床評価との相関を認めなかった.

これらの結果から, 健常群は大脳皮質間内興奮性が左右対称であり, うつ病患者は大脳皮質間内興奮性が左右非対称 (右半球 > 左半球) であることが示唆された.

5. 研究 4: うつ病患者における二発 TMS 曲線の治療による変化

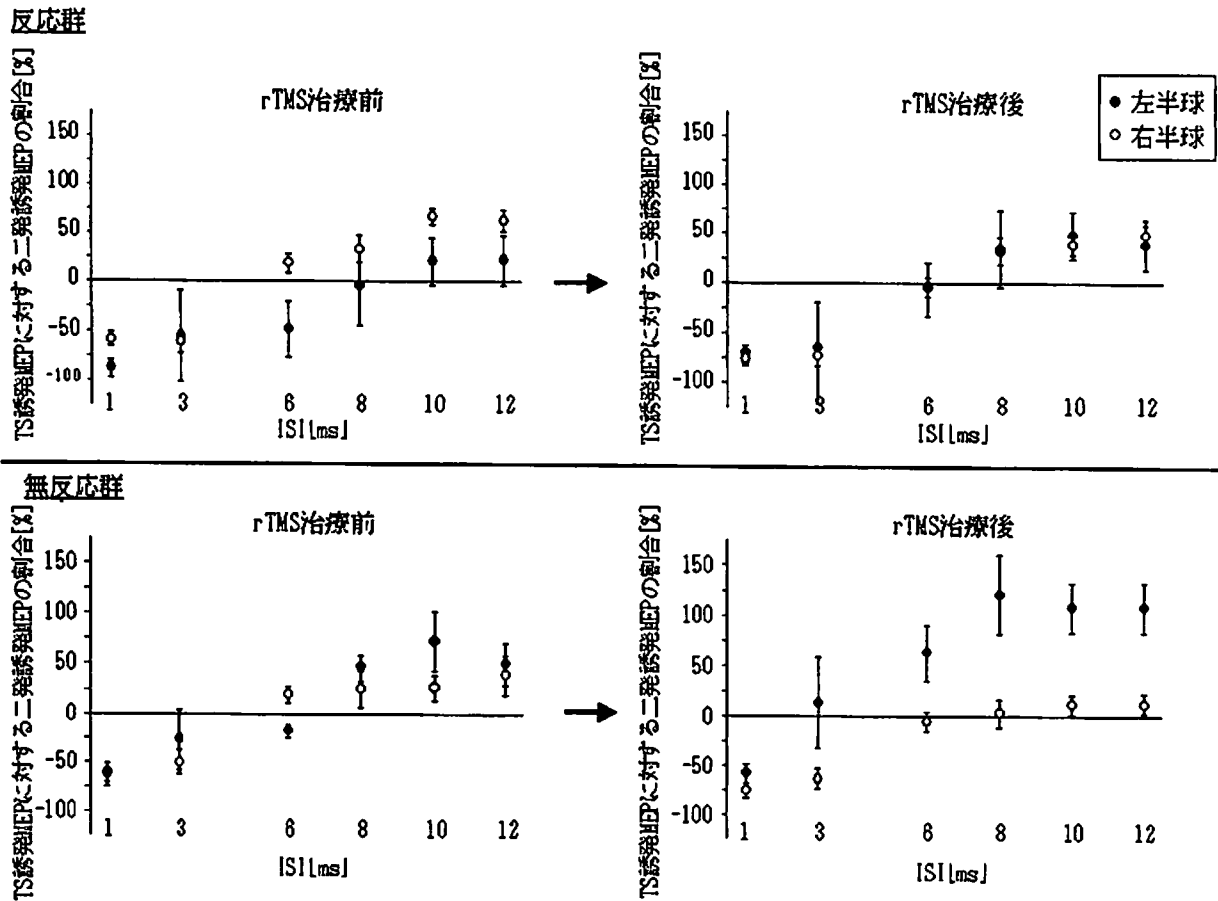
1) 臨床評価

治療前のベースライン HDRS 得点は全体で 33.28 点 ($SE = 1.53$), 反応群 ($N = 5$) で 32.2 点 ($SE = 1.59$), 無反応群 ($N = 13$) で 33.69 点 ($SE = 2.05$) であり,

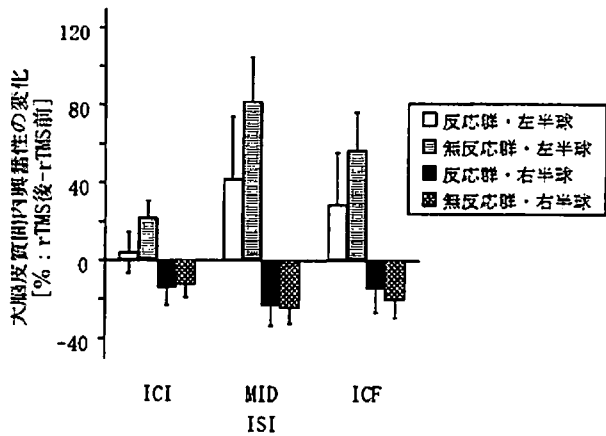
群間で有意差を認めなかった. 治療後の HDRS 得点は全体で 25.33 点 ($SE = 2.53$), 反応群で 14.4 点 ($SE = 1.50$), 無反応群で 29.54 点 ($SE = 2.64$) であった. rTMS 治療により, 全体における HDRS の得点は有意な低下 (うつ病の改善) を認めた ($t(17) = 4.181$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.51$). HDRS 得点の低下率は全体で 24.94% ($SE = 6.11$), 反応群で 55.69% ($SE = 2.81$), 無反応群で 13.11% ($SE = 5.54$) であった.

2) 二発 TMS 曲線

反応群, 無反応群の rTMS 治療前後の二発 TMS 曲線は第 6 図に示すとおりである. また, ISI の分類は 1, 3 ms を ICI, 6 ms を MID, 8, 10, 12 ms を ICF とし, 第 7 図は抑制群 (ICI), 中間群 (MID), 促通群 (ICF) に分類し, rTMS 治療による影響をみたものである. 第 7 図を概観してもわかる通り, 左半球は反応群・無反応群とも正の値を示すことから rTMS 自体は同側の左半球に大脳皮質興奮性の増大効果, 対側の右半球は両



第 6 図 反応群と無反応群における rTMS 治療前後の二発 TMS 曲線. Y 軸は第 1 図と同様. 垂直の誤差線は SE を示す. (前田典子: 臨床脳波 44: 73-79, 2000 の第 5 図イを, 許可を得て転載)



第7図 反応群と無反応群におけるISI群別のrTMS治療の影響。垂直の誤差線はSEを示す。ICI：1, 3 msISI (抑制群), MID：6 msISI (中間群), ICF：8, 10, 12 msISI (促進群)

群とも負の値を示すことから減少効果を及ぼすことがわかる。反応群と無反応群を比較すると治療前の状態とrTMSの影響の程度が主に異なる。

3) ICI

2 ([グループ間変数]rTMS治療への反応：反応群, 無反応群) × 2 ([グループ内変数]検査日：rTMS治療前, 後) × 2 ([グループ内変数]半球：左, 右半球) ANOVAを施行したところ, 3方向性の交互作用や主の効果を認めなかった。唯一, 検査日 × 半球の2方向性の交互作用を認めた ($F(1,16)=4.482, p<0.05, \eta^2=0.219$)。これはrTMS治療後の興奮性が, 左半球が右半球よりも大きいことによるものであった ($t(17)=2.18, p<0.05, \eta^2=0.652$)。

4) MID

2 ([グループ間変数] rTMS治療反応：反応群, 無反応群) × 2 ([グループ内変数] 検査日：rTMS治療前, 後) × 2 ([グループ内変数] 半球：左, 右半球) ANOVAを施行したところ, 3方向性の交互作用や主の効果を認めなかった。しかし二つの2方向性の交互作用を認めた。まず検査日 × 半球の2方向性の交互作用を認めた ($F(1,16)=12.96, p<0.005, \eta^2=0.219$)。これはそれぞれrTMS治療前, 後の左右半球, そしてそれぞれ左, 右半球のrTMS治療前後の興奮性が有意に異なることによるものであった (すべて $p<0.05$, Bonferroni corrected)。また, rTMS治療反応 × 半球の2方向性の交互作用を認めた ($F(1,16)=7.72, p<0.01, \eta^2=0.325$)。これは左半球の興奮性

が反応群, 無反応群とで有意に異なること ($t(16)=-2.46, p<0.05$)。また反応群の左右半球の興奮性が有意に異なること ($t(4)=-7.03, p<0.005$) によるものであった。

5) ICF

2 ([グループ間変数] rTMS治療反応：反応群, 無反応群) × 2 ([グループ内変数] 検査日：rTMS治療前, 後) × 2 ([グループ内変数] 半球：左, 右半球) ANOVAを施行したところ, 3方向性の交互作用や主の効果を認めなかった。しかし二つの2方向性の交互作用を認めた。まず検査日 × 半球の2方向性の交互作用を認めた ($F(1,16)=11.23, p<0.005, \eta^2=0.412$)。これは左半球の興奮性がrTMS治療前後で有意に異なること ($t(17)=-2.47, p<0.05$)。またrTMS治療後の興奮性が左右半球で有意に異なること ($t(17)=3.81, p<0.001$) によるものであった。また, rTMS治療反応 × 半球の2方向性の交互作用も認めた ($F(1,16)=16.06, p<0.001, \eta^2=0.501$)。これは無反応群において左半球の興奮性が右半球のそれと比べて有意に大きいこと ($t(12)=5.087, p<0.001$)。また反応群において右半球の興奮性が左半球のそれと比べて有意に大きいこと ($t(5)=-3.229, p<0.05$) によるものであった。さらに, 半球の主の効果も認めた ($F(1,16)=4.37, p<0.05, \eta^2=0.214$)。

6) rTMS治療による二発TMS曲線の変化と臨床評価との相関

ICI, MID, ICFそれぞれの治療による左, あるいは右半球の興奮性の変化とHDRSの得点の変化に相関を認めなかった。また, 興奮性の左右非対称性の治療による影響とHDRS得点の変化の間にも相関を認めなかった。

これらの結果は, 治療前の左半球の大脳皮質興奮性が低ければ低いほど, あるいは右半球が高ければ高いほどうつ病が改善し得ること (特にICFにおいて), また, 治療によって左半球の大脳皮質興奮性は増大し, 右半球は減少 (ICI, MID) あるいは未変化 (ICF) であること, 治療反応群は治療によって左右非対称性が消失するのに対し, 無反応群では非対称性が増大すること (左半球 > 右半球) を示唆している。

6. 研究5：うつ病患者におけるrTMS反応とrTMS治療効果との相関

1) 治療前評価

rTMSによりMEPが5%以上増大した患者は「増大群」, rTMSによりMEPが5%以上減少した患者は

「減少群」, 両群にあてはまらない患者は「未変化群」に分類した。治療を完了した48名のうち, 初日の検査結果上26名が「増大群」, 20名が「減少群」, 2名が「未変化群」に分類された。ベースラインのHDRS得点は全体で31.9点 (SD=6.79), 増大群で29.15点 (SD=6.03), 減少群で33.9点 (SD=7.51) であり, 群間で有意差を認めなかった。

2) 症状改善率

全体のHDRS得点上の症状改善率は治療終了直後で25.0% (SD=25.8), 終了2週間後では20.0% (SD=29.7) であった。増大群と減少群の症状改善率は第8図aに示すとおりであり, 終了直後 ($t(44) = -2.86, p < 0.006, \eta^2 = 0.16$), 終了2週間後 ($t(44) = -2.39, p < 0.02, \eta^2 = 0.12$) 共に群間で有意差を認め

た。

3) 治療反応者率

全体の治療反応者率は治療終了直後で23.91% (11/46名), 終了2週間後には18.18% (10/46名) であった。増大群と減少群の治療反応者率は第8図bに示すとおりであり, 終了直後には群間で有意差 ($X^2(1) = -5.29, p < 0.05$) を, 終了2週間後には有意傾向 ($X^2(1) = 3.07, p < 0.07$) を認めた。

4) rTMSの影響と臨床効果との相関

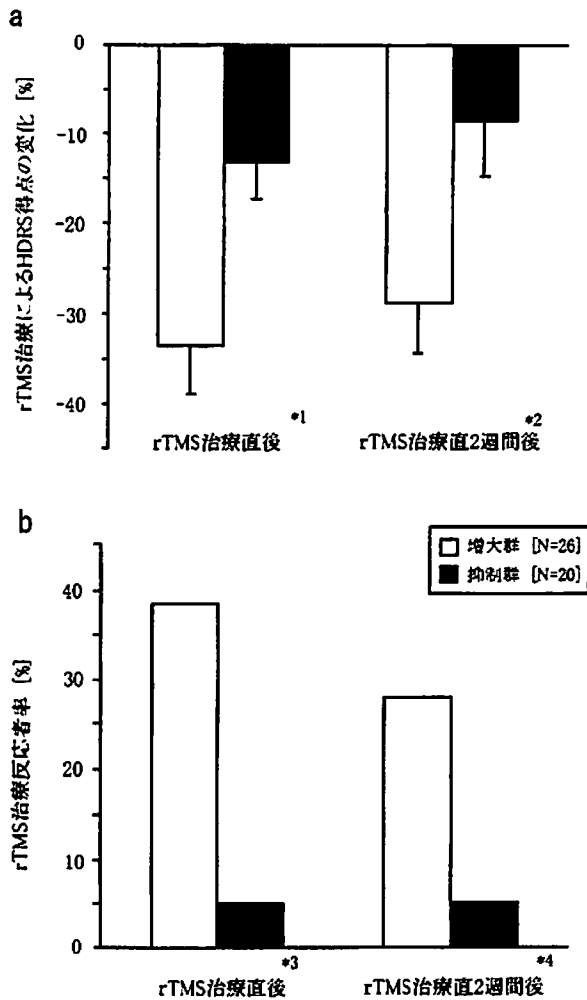
左運動野への10Hz rTMS前後のMEP値の変化は全体で7.54% (SD=54.02), 増大群で46.464% (SD=2.81), 減少群で-30.34% (SD=20.50) であった。これはHDRS得点の減少率と相関し, rTMS治療終了直後には-0.58 ($p < 0.0005, r^2 = 0.35$), 終了2週間後には-0.44 ($p < 0.006, r^2 = 0.19$) であった。

これらの結果から, rTMSで興奮性の増大効果を示した患者の方が左DLPFCへのrTMS治療により反応し, 左半球の皮質-脊髄興奮性の増大が著しいほど症状の改善が著しいことが示唆された。

考 察

本研究ではTMSを用いてうつ病の病態生理と治療効果の検討を行った。まず健常者において, 二発TMS曲線および運動野の大脳皮質興奮性が左右対称であり, 再現性があることを確認した¹⁸⁾。また, rTMS頻度依存性に有意な皮質脊髄興奮性の増大を認めるものの個人差が大きいこと, これまで考えられていたように高頻度 (例, 10Hz) のrTMSにおいて必ずしも増大するのではなく被験者によって増大する者と減少する者がいることが示された¹⁹⁾。また, うつ病患者においては, 二発TMS曲線によって測定される大脳皮質興奮性に左右差があり, 左半球が有意に低下していること²⁰⁾, そしてrTMS治療に反応した者においてのみ左右差が消失し, 正常化することが示された²¹⁾。さらに, 高頻度 (10Hz) rTMSによって興奮性が増大する患者の方が活動性の低下している左DLPFCに高頻度rTMS治療を施行することにより抑うつ症状が改善するという結果が得られた²²⁾。

過去の研究では大うつ病において左半球優位に前頭前野の活動性低下を認め, これは抗うつ薬治療により改善することが報告されている²³⁾。また, 脳卒中や外傷などの器質性障害で抑うつ症状を認める患者は左半球優位に異常があるという報告も数多くある²⁴⁾。また, 依然議論があるものの, 左半球が陽性感情と積極性を, 右半球が陰性症状と引きこもりを担うことが健常者, 脳器質障害



第8図 rTMS治療による抗うつ効果。a. rTMS治療直後とrTMS治療2週間後におけるHDRS得点の減少率。*1: $p < 0.006$, *2: $p < 0.02$ 。b. rTMS治療直後とrTMS治療2週間後における治療反応者率。*3: $p < 0.05$, *4: $p < 0.07$ 。

を伴った患者を対象とした研究で繰り返し報告されている¹⁰⁾。TMSを用いた我々の研究では、単極性大うつ病における大脳皮質興奮性には左右差があり、左半球優位に低下することが明らかとなった。

この研究で用いた二発 TMS によって MEP を測定する技法は、脊髄から末梢の興奮性に影響されることなく大脳皮質興奮性を特異的に測定することができ、神経生理学的機序が最も研究されていることから最も良く用いられる技法である²⁸⁾。一般的な施行方法としては、運動野に 1~20 ms 程度の間隔で二発の刺激を一つのコイルから与え、第一発は皮質にのみ影響を与えるように MEP を誘発しない強度の刺激、第二発は皮質-脊髄系を伝導するように MEP を誘発する強度の刺激とし、第一発 (CS) が第二発 (TS) を条件付けする²⁹⁾。二発 TMS によって誘発される MEP は、それぞれの TMS の刺激強度が一定でも、ISI を変えることのみで、(TS と同じ刺激強度の) 単発 TMS によって誘発される MEP より減少、あるいは増大する。MEP が減少するような刺激間隔 (1~4 ms) は大脳皮質内の抑制機構を、MEP が増大するような刺激間隔 (7~20 ms) は促進機構を反映しているといわれており、抑制系は主に γ -アミノ酪酸 (γ -amino butiric acid, 以下 GABA) やドーパミン、促進系は主にグルタミン酸が関与していることがこれまでの研究で知られている³⁾。

また、精神運動制止はうつ病の中核症状としてよく知られている。精神運動制止における運動障害の程度はうつ病の亜型分類に役立ち、三環系抗うつ薬の治療効果を予測し得るといわれている¹⁵⁾。しかしその病態生理は依然不明である。画像研究では精神運動制止に伴って左側優位の基底核、前帯状皮質、前頭前野皮質などの代謝、血流量の低下が報告されており、精神運動制止の病態生理を説明する一つの仮説としては、認知、情動、運動を担う基底核-視床-皮質系の中でも認知または運動、あるいは双方の系の異常が想定されている^{17,31)}。また、脳内の 80% のドーパミンは基底核で生成されており、これはセロトニンによって調整されていること³²⁾、背側縫線核から線条体、前頭前野への投射経路はセロトニンを介して緊張性・律動性の運動活動を担うことから³³⁾、精神運動制止はセロトニン、あるいはドーパミン、あるいは両者の神経伝達物質の異常による可能性がある。

ここで報告した一連の研究で、運動野の大脳皮質興奮性における異常が確認されたことは、運動系の異常が生理学的に存在することを支持するものである。しかし、我々のデータからは大脳皮質興奮性のどの系 (抑制系、あるいは促進系)、あるいはどの伝達物質が関与してい

るかを同定することはできない。また、精神運動制止の評価尺度を用いなかったことから、臨床的症状と神経生理学的測定との関係を調べることは残念ながらできない。異常が最も顕著であった 6 ms はちょうど、大脳皮質抑制系と促進系の混合する ISI であり、抑制系と促進系の均衡に異常があることが示唆される。また、セロトニンに関しては、二発 TMS 曲線によって左半球有意の大脳皮質抑制系の増大を認めたことは、セロトニン作動薬による二発 TMS 曲線の大脳皮質抑制系減弱作用³⁴⁾、うつ病のセロトニン減少仮説^{7,17)}、緊張性・律動性の運動活動の障害や停止時にみられるセロトニンニューロンの発火の減少・消失³⁵⁾、そして精神運動制止状態にあるうつ病患者にみられる左半球優位性の異常画像所見¹⁷⁾と一致する。TMS を用いてうつ病の病態生理を検討した研究では、うつ病相における優位半球の運動後促進の減弱^{35,36)}とうつ症状改善に伴う運動後促進障害の消失³⁷⁾を報告したものがあつた。運動負荷後促進は手指の運動を一定時間行い、その前後の MEP 反応を経時的に調べ、MEP が運動負荷前に比し増大する現象をさす。その機序は、動物実験でみられるテタヌス性微小刺激後の長期増強や抑制と関連し、シナプス伝達効率を調整することによるものと考えられている³⁵⁾。この左半球有意の大脳皮質興奮性の低下と治療による改善は我々の結果と一致するものである。

ドーパミン系に関しては、我々は過去の知見と矛盾した結果を得た。健常者における過去の TMS 研究ではドーパミン作動薬の投与により二発 TMS 曲線の抑制系の増大と促進系の減弱³⁸⁾、そしてドーパミン低下により筋活動抑制が短縮することが観察されている³⁹⁾。筋活動抑制は、興奮経路とは独立した抑制機構を調べる検査として知られており、その機序については依然不明なことが多いが、GABA とドーパミン系皮質抑制機構が関与していると考えられている。うつ病において左半球優位に基底核 (脳内のドーパミンの 80% を生成) の障害が認められ、精神運動制止に相対的ドーパミン欠如が関与していることが報告されている¹⁷⁾。したがってうつ病では左半球の二発 TMS 曲線で抑制系の減弱と促進系の増大、そして筋活動抑制の短縮が観察されるはずである。しかし、うつ病を対象とした過去の TMS 研究はこうしたドーパミン機能を調べる TMS 検査とうつ病におけるドーパミンの相対欠如という概念と矛盾する結果を得ており、筋活動抑制の延長 (したがってドーパミンの相対的亢進) を報告している⁴⁰⁾。また、我々の研究も二発 TMS 曲線によって左半球優位の大脳皮質抑制系の増大と促進系の減弱を認め、これも過去の健常者における TMS 研究の

報告とうつ病の左半球優位のドーパミン欠如という報告と矛盾している。この矛盾に関しては抗うつ薬の長期服用による脳への慢性的影響などの要因が考えられるが、今後うつ病のドーパミン欠如を再検討する研究とTMSの作用機序を解明する研究の双方が必要であろう。

次に大脳皮質興奮性がrTMS治療に反応したうつ病患者で正常化(左右差の消失)したことについてであるが、これは過去の画像研究と一致するものである。うつ病では前帯状皮質では容量の減少とこれに伴う代謝率の低下が認められ、これは治療によって改善しないのに対し、DLPFC(特に左側)の活動性の低下は治療に反応し、抑うつ症状の改善とともに正常化することが報告されている^{8,29)}。またTMSを用いて運動閾値を経時的に測定した研究では、左DLPFCへの高頻度rTMS治療とともに左運動閾値の低下、つまり神経細胞膜の興奮性の増大が認められ⁴⁾、これは高頻度rTMSによる同側の興奮性が増大することを示している。我々の結果は、これらの報告と同様大脳皮質興奮性の異常がうつ病の素因よりも状態像を反映していることを示すものである。また、抑うつ症状の改善しなかった患者、あるいは症状がさらに増悪した患者では、二発TMS技法によって測定される大脳皮質興奮性の左右差がさらに増大し、左右差の反転(左半球優位の興奮性の増大)が認められた。これは治療前の左右差が一般のうつ病患者と異なり既に反転している可能性、あるいはrTMSに対する感受性が過度である可能性が挙げられる。しかし、この二発TMS曲線の結果は、左DLPFCへの高頻度(10Hz)rTMSにより皮質脊髄興奮性の増大と抑うつ症状の改善に相関が認められた我々の他の研究の結果と矛盾するものである。これについては、対象数が少なかったこと、対象の生理学的特徴が異なっていたこと、大脳皮質内興奮性と皮質脊髄興奮性では異なった特徴を示す可能性があることなど、様々な可能性が考えられるが、うつ病患者の特徴(運動障害など)を詳細に調べていないこと、前者の研究では10Hz rTMSに対する皮質-脊髄興奮性の反応を調べていないこと、後者の研究では左右半球の二発TMS曲線を調べていないこと、rTMSの作用機序の研究が完全に理解されていないことから、この結果の矛盾をこれ以上説明することはできない。今後、うつ病患者の症状の詳細な評価、様々なTMS検査の治療前後での施行、また、TMSの作用機序解明のためのさらなる研究が望まれる。

また、我々の研究で左手利きの対象者が混在していたことについてであるが、これが今回の我々の結果に影響を与えた可能性は低いと思われる。過去のうつ病の

TMS研究、画像研究と一致する所見であること、我々の研究で健常者における二発TMS曲線に左右差が認められず、利き手の違いで差がなかったこと¹⁸⁾、過去の研究で唯一利き手によって違いが認められたのは運動閾値であるが、これもその後の同じ研究班による研究でそうではないことが報告されたこと⁴²⁾がこの根拠となっている。

最後にrTMS治療効果についてであるが、本研究で示したrTMS治療による抑うつ症状の有意な改善は、左DLPFCへの高頻度rTMS治療に抗うつ効果があるとする過去の研究に一致するものである。しかし、我々の研究における改善率(治療反応者率、症状改善率ともに約25%)は過去の報告(約15~60%)^{5,19)}と比較して低かった。その理由としては、治療抵抗性うつ病患者を対象としたこと、過去に頻回にECTが施行された患者が多かったこと、患者の治療開始前の症状が重度であったことなどが考えられる。なお、身体療法はプラセボ反応率が高いこと⁴³⁾、また治療抵抗性うつ病患者のプラセボ反応率が低いことが知られており^{5,19)}、こうしたことから我々の研究(研究5の方法の項参照)では、二重盲検に近くなるよう研究デザインを工夫した。このこともこれまでの研究報告よりも治療反応率が低くなったことにつながったものと思われる。

総 括

本研究ではうつ病における大脳皮質興奮性とTMSの治療的効果の検討を行った。まず、うつ病患者において、二発TMS曲線によって測定される大脳皮質興奮性に健常者とは異なり左右差があり、左半球が有意に低下していることを示した。そしてrTMSには抗うつ効果があり、rTMS治療に反応するうつ病患者では大脳皮質興奮性の左右差が消失し、正常化することを示した。またrTMSは、少なくとも短期的安全性は高いと思われた。これらの結果は、TMSがうつ病に対する神経生理学的検査法のひとつになり得ること、また治療法のひとつになり得ることを示唆している。

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精神神経科学教室鹿島晴教授に深甚なる謝意を表します。また本研究にご協力いただきましたハーバード大学ベス・イスラエル・ディーコネス医療センター神経内科学教室アルバロ・バスカル・レオーネ助教授ほか、TMS研究室員一同に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Barker AT, Jalinous R, Freeston IL : Non-invasive magnetic stimulation of the human motor cortex. *Lancet* 1 : 1106-1107, 1985
- 2) Pascual-Leone A, Walsh V, Rothwell J : Transcranial magnetic stimulation in cognitive neuroscience-virtual lesion, chronometry, and functional connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 10 : 232-237, 2000
- 3) Pascual-Leone A, Tormos JM, Keenan JP, Tarazona F, Canete C, Catala MD : Study and modulation of cortical excitability with transcranial magnetic stimulation. *J Clin Neurophysiol* 15 : 333-343, 1998
- 4) 前田典子：うつ病患者の磁気刺激による分析。臨床脳波, 44 : 73-79, 2002
- 5) Wassermann EM, Lisanby SH : Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation : a review. *Clin Neurophysiol* 112 : 1367-1377, 2001
- 6) 前田典子, 武井茂樹, 三村将, Pascual-Leone A : 電気けいれん療法 (ECT) および経頭蓋磁気刺激法 (TMS) の現在 : [3] TMS の今日の応用, 精神科治療学, 17 : 477-490, 2002
- 7) Manji HK, Drevets WC, Charney DS : The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7 : 541-547, 2001
- 8) Davidson RJ, Pizzagalli D, Nitschke JB, Putman J : Depression : perspectives from affective neuroscience. *Annu Rev Psychol* 53 : 545-574, 2002
- 9) Wassermann EM : Risk and safety of repetitive transcranial magnetic stimulation : report and suggested guidelines from the International Workshop on the Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation, June 5-7, 1996. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 108 : 1-16, 1998
- 10) Davidson RJ : Cerebral asymmetry, affective style, and psychopathology. *Cerebral Hemisphere Function in Depression*. (Ed) Kinsbourne M, American Psychiatric Press, Washington, p. 1-22, 1988
- 11) Drevets WC : Functional neuroimaging studies of depression : the anatomy of melancholia. *Annu Rev Med* 49 : 341-361, 1998
- 12) Maeda F, Dubeau M-C, Koski L, Lisanby SH : Transcranial magnetic stimulation investigations of mood disorders. *Brain Imaging in Affective Disorders*. (Ed) Soares J, Marcel Dekker Press, New York, p. 19-52, 2003
- 13) Sackeim HA, Luber B, Katzman GP, Moeller JR, Prudic J, Devanand DP, Nobler MS : The effects of electroconvulsive therapy on quantitative EEG : relationship to clinical outcome. *Arch Gen Psychiatry* 53 : 814-824, 1996
- 14) George MS, Lisanby SH, Sackeim HA : Transcranial magnetic stimulation : applications in neuropsychiatry. *Arch Gen Psychiatry* 56 : 300-311, 1999
- 15) Joyce PR, Paykel ES : Predictors of drug response in depression. *Arch Gen Psychiatry* 46 : 89-99, 1989
- 16) Maeda F, Pascual-Leone A : Transcranial magnetic stimulation : studying motor neurophysiology of psychiatric disorders and their treatment. *Psychopharmacology* 168 : 359-376, 2003
- 17) Sobin C, Sackeim HA : Psychomotor symptoms of depression. *Am J Psychiatry* 154 : 4-17, 1997
- 18) Maeda F, Gangitano M, Thall M, Pascual-Leone A : Inter-and intra-individual variability of paired-pulse curves with transcranial magnetic stimulation (TMS). *Clin Neurophysiol* 113 : 376-382, 2002
- 19) Maeda F, Keenan J, Tormos JM, Topka H, Pascual-Leone A : Interindividual variability of the modulatory effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on cortico-spinal excitability. *Exp Brain Res* 133 : 425-430, 2000
- 20) Maeda F, Keenan J, Pascual-Leone A : Interhemispheric asymmetry of motor cortical excitability as measured by transcranial magnetic stimulation in major depression. *Br J Psychiatry* 177 : 169-173, 2000
- 21) Maeda F, Keenan JP, Freund S, Birnbaum R, Vaccaro B, Pascual-Leone A : Transcranial magnetic stimulation studies of cortical excitability in depression. *Biol Psychiatry* 47 : 169S, 2000
- 22) Maeda F, Keenan JP, Freund S, Sampson S, Vaccaro B, Birnbaum R, Pascual-Leone A : Transcranial magnetic stimulation (TMS) in the treatment of depression : predictive value of modulatory effects on cortico-spinal excitability. *Proceedings of International Society for Transcranial Stimulation Annual Meeting, Chicago, USA, P.27, 2000*
- 23) First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JB : Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID). American Psychiatric Press, Washington DC, 1997
- 24) Hamilton M : Development of a rating scale for primary depressive illness. *Br J Soc Clin Psychol* 6 : 278-296, 1967
- 25) Oldfield RC : The assessment and analysis of handedness : the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 9 : 97-113, 1971
- 26) Rossini PM, Barker AT, Beradelli A, Caramia MR, Caruso G, Cracco RQ, Dimitrijevic MR, Katayama Y, Lucking CH, Maertens de Noordhout AL, Marsden CD, Murray NMF, Rothwell JC, Swash M, Tomberg C : Non-invasive electrical and magnetic stimulation of the brain, spinal cord and roots : basic principles and procedures for routine clinical application. Report of an IFCN committee. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 91 : 79-92, 1994
- 27) Herwig U, Padberg F, Unger J, Spitzer M, Schonfeldt-Lecuona C : Transcranial magnetic stimulation in therapy studies : examination of the reliability of "standard" coil positioning by neuronavigation. *Biol Psychiatry* 50 : 58-61, 2001

- 28) Kujirai T, Caramia MD, Rothwell JC, Day BL, Thompson PD, Ferbert A, Wroe S, Asselman P, Marsden CD : Corticocortical inhibition in human motor cortex. *J Physiol* 471 : 501-519, 1993
- 29) Kennedy SH, Evans KR, Kruger S, Mayberg HS, Meyer JH, McCann S, Arifuzzman AI, Houle S, Vaccarino FJ : Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. *Am J Psychiatry* 158 : 899-905, 2001
- 30) Soares JC, Mann JJ : The functional neuroanatomy of mood disorders. *J Psychiatr Res* 31 : 393-432, 1997
- 31) Dolan RJ, Bench CJ, Brown RG, Scott LC, Friston KJ, Frackowiak RS : Regional cerebral blood flow abnormalities in depressed patients with cognitive impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55 : 768-773, 1992
- 32) Carlsson A : The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11 : 490-493, 1959
- 33) Jacobs BL, Fomal CA : 5-HT and motor control : A hypothesis. *Trends Neurosci* 16 : 346-352, 1993
- 34) Werhahn KJ, Forderreuther S, Straube A : Effects of the serotonin 1B/1D receptor agonist zolmitriptan on motor cortical excitability in humans. *Neurology* 51 : 896-898, 1998
- 35) Samii A, Wassermann EM, Ikoma K, Mercuri B, George MS, O'Fallon A, Dale JK, Straus SE, Hallett M : Decreased postexercise facilitation of motor evoked potentials in patients with chronic fatigue syndrome or depression. *Neurology* 47 : 1410-1414, 1996
- 36) Shajahan PM, Glabus MF, Gooding PA, Shah PJ, Ebmeier KP : Reduced cortical excitability in depression. Impaired post-exercise motor facilitation with transcranial magnetic stimulation. *Br J Psychiatry* 174 : 449-454, 1999
- 37) Shajahan PM, Glabus MF, Jenkins JA, Ebmeier KP : Postexercise motor evoked potentials in depressed patients, recovered depressed patients, and controls. *Neurology* 53 : 644-646, 1999
- 38) Ziemann U, Bruns D, Paulus W : Enhancement of human motor cortex inhibition by the dopamine receptor agonist pergolide : evidence from transcranial magnetic stimulation. *Neurosci Lett* 208 : 187-190, 1996
- 39) Hallett M : Transcranial magnetic stimulation. Negative effects. *Adv Neurol* 67 : 107-113, 1995
- 40) Steele JD, Glabus MF, Shajahan PM, Ebmeier KP : Increased cortical inhibition in depression : a prolonged silent period with transcranial magnetic stimulation (TMS). *Psychol Med* 30 : 565-570, 2000
- 41) Triggs WJ, McCoy KJ, Greer R, Rossi F, Bowers D, Kortenkamp S, Nadeau SE, Heilman KM, Goodman WK : Effects of left frontal transcranial magnetic stimulation on depressed mood, cognition, and corticomotor threshold. *Biol Psychiatry* 45 : 1440-1446, 1999
- 42) Triggs WJ, Subramaniam B, Rossi F : Hand preference and transcranial magnetic stimulation asymmetry of cortical motor representation. *Brain Res* 835 : 324-329, 1999
- 43) Kaptchuk TJ, Goldman P, Stone DA, Stason WB : Do medical devices have enhanced placebo effects? *J Clin Epidemiol* 53 : 786-792, 2000

学位論文

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

慶應義塾大学医学部放射線科学教室

(指導：久保敦司教授)

北村正幸

(平成14年8月20日受付)

Key Word : re-locatable frame, stereotactic radiotherapy, CT measurements, accuracy

定位放射線照射 (stereotactic irradiation) は、放射線ビームを高精度に制御し、病巣には高線量投与を行う一方、周囲正常組織線量は最小限とすることを目標とする放射線治療法である。現在、主として中枢神経系病変に対して行われる。高線量1回照射法を定位手術的照射 (stereotactic radiosurgery), 定位的手法で行う分割照射を定位放射線治療 (stereotactic radiotherapy), 両者を総称して定位放射線照射 (stereotactic irradiation) と呼ぶ。

1960年代後半に半球状に配置した179個のCo-60線源から γ 線を1つの焦点に収束させるコバルト治療装置がSwedenの脳神経外科医Leksellら^{1,2)}によって開発された。その後、頭頂部分を除いて201個のCo-60線源を5列配置した商用ガンマユニット装置 (ガンマナイフ)³⁾が米国等を中心に広まった。本邦でも2001年度末までに30台以上が稼働している。これまでに脳動静脈奇形、聴神経腫瘍、髄膜腫および転移性脳腫瘍等の多数の症例が蓄積され、その有用性が示されている⁴⁻⁶⁾。

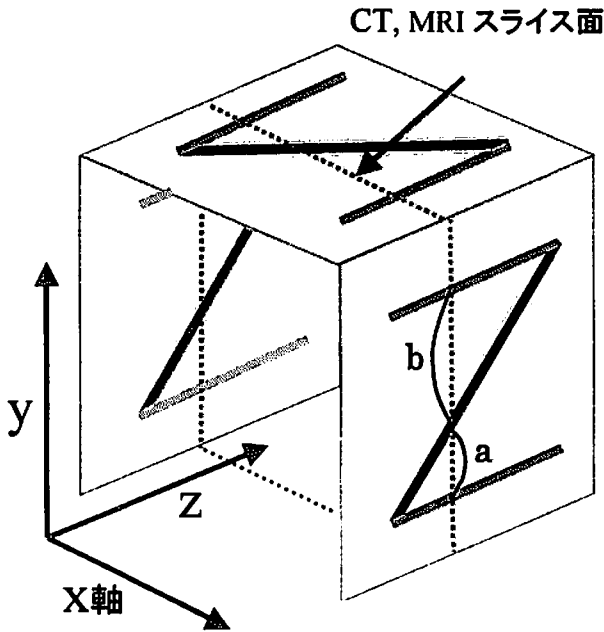
一方、医療用直線加速器 (リニアック) を利用した定位放射線照射は、1974年にLarsson⁷⁾によりはじめて本格的に放射線治療へ応用された。リニアックは汎用の放射線治療装置として普及しており、多少の装置付加で定位照射が可能になる。ガンマユニットと異なり放射性同位元素を使用しないので定期的な線源交換が不要であ

る。また、リニアックでは、より大きな病変まで治療可能となる等の利点がある。

最近の画像装置の進歩により、腫瘍の局在範囲についての正確な情報が得られるようになってきている。定位手術的照射ではフレームシステムにインジケータを装着してCT等の画像検査を行い病巣座標を得る。我々の使用しているレクセルフレームにおいては、体軸横断面がx, y平面となりz軸が頭尾方向となる座標軸を用いる。箱形インジケータの3面にはZ字型のロッドが埋め込まれ、これを含めた断層画像では左右上の各面に沿ってそれぞれ3点が表れる。これらの点の座標から断層面が決定され、その画像上の任意の位置の空間座標も決定できる (第1図)。

このような幾何学的な手法を基に、様々な技術的改良が加わってフレームに固定された対象に関しては、汎用リニアックによっても誤差1mm以内の高精度で照射が可能となってきた⁸⁾。しかし、腫瘍が視神経や聴神経などと接している場合、1回照射である定位手術的照射をおこなうと、接する健常神経組織に障害が起こる可能性がある。そこで、従来の放射線治療で用いられてきた分割照射の手法を導入することは障害を避けるために有用と考えられる⁹⁻¹⁰⁾。しかし、分割照射では治療期間が数日から数週間に長期化する。従来、定位手術的照射で用いられている固定法は頭蓋骨をフレームシステムにネ

本論文は 北村正幸, 国枝悦夫, 川口 修, 安藤 裕, 茂松直之, 柴 秀行, 久保敦司: 油圧式アームを使った定位放射線治療用着脱式固定システムの開発とCTによる精度測定. 日本放射線腫瘍学会誌 14 : 107-112, 2002 および Etsuo Kunieda, Masayuki Kitamura, Osamu Kawaguchi, Takayuki Ohira, Kouichi Ogawa, Yutaka Ando, Kayoko Nakamura and Atsushi Kubo : New system for linear accelerator radiosurgery with a gantry-mounted video camera. International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics 40 : 739-746, 1998 の一部を含む。



第1図 座標系と座標値測定原理. CTやMRIで装着する箱形インジケータの各面にあるZ字ロッドは、断層画像では3点として描出される. この3点の間隔比(a:b)から、中央の点の空間座標を算出し、これらから病巣中心等の空間座標も得られる.

ジで固定をするため侵襲的であり、分割照射の期間中フレームを装着していることは患者にとって大きな負担になる. 一方、これまで一般的に使用されている非侵襲的固定法の再現性は十分とはいえない. よって着脱式でありながら高い再現性が期待できる非侵襲的固定法の開発が望まれた.

我々はこれまでにレクセルフレームシステムおよびガントリ内蔵のCCDカメラと定位フレームシステムを使

用した位置ぎめ機構 (BEPS: Beam's Eye Positioning System)^{16,17)}を開発している. さらに、この機構と整合する着脱式の非侵襲的固定装置を開発した.

本論文では、我々の開発した、位置ぎめ機構と非侵襲的固定装置による定位放射線治療法について述べ、その照射精度および位置再現性を、ファントム実験と新たに考案した基準点による測定法により評価した.

方 法

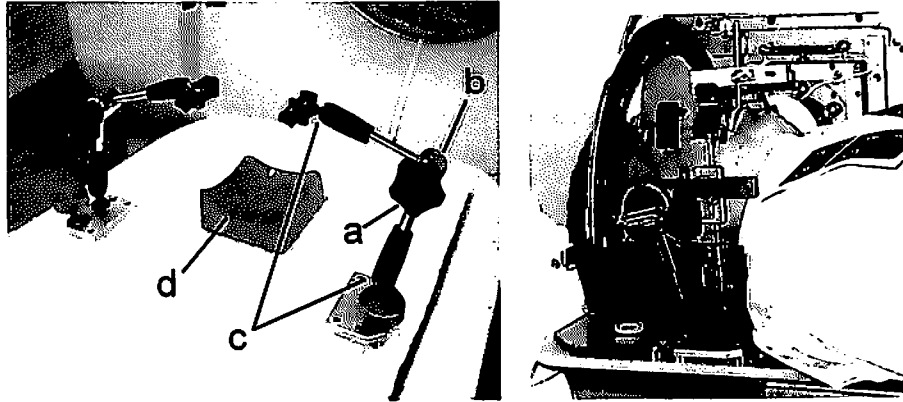
1. 着脱式固定システム

着脱式固定システムはレクセルフレームを基に作られており、フレームと歯型バーおよび角度調節器で患者頭部を固定し、自在型油圧アームで固定台に保持する構造である.

歯科医と歯科技工士によって、個々の患者ごとに上顎の形態を基にアクリル樹脂製の歯型を作成した. 患者は治療に先立って歯科外来を受診し、歯科医が印象材によって上顎歯型を採取した. 歯科技工士が印象材から得られた石膏歯型を使ってアクリル樹脂歯型を作成した. 歯型には歯表面の曲面に沿った若干の「かえし」を残しているので自然には脱落し難い. さらに、歯型をY字型金属芯材にレジン樹脂で固定し、その下顎面のレジン樹脂表面に加工して4点程度の下顎歯の当たる支持点(浅い窪み)を作成した(第2図A). なお、治療歯や部分義歯など負担を避けるべき歯に対しては、アクリル樹脂歯型の一部にカットを入れる加工を行った. 完成後、患者は再度歯科外来を訪れ、歯型バーを口腔内に装着して微調整を行った. 歯型バーをレクセルのベースフレームに固定するために、接続調節器(角度調節器)を使用した. 治療期間中、歯型バーと角度調節器は一体化した



第2図 A:歯型バーの上顎面. B:歯型ブロック(北村正幸他 日本放射線腫瘍学会誌 14, 107-112, 2002のFig. 1より許可を得て転載)



第3図 油圧アームによる固定台 (A:左). アクリル板の左右に油圧アームを取り付けてある. ハンドル (a) 操作によりシリンダー (b) 内の油圧が高まりボールジョイントが固定される. 枕 (d) は, 固定されていない. 治療位置ぎめ時には定位手術用アークを取り付ける (B:右). (北村正幸他 日本放射線腫瘍学会誌 14, 107-112, 2002 の Fig. 2 より許可を得て転載)

「歯型ブロック」として分離せずに用いた (第2図B).

治療計画に先立ってCTを撮影した. CT寝台上で, 患者自身に歯型バーを装着してもらい, さらに角度調節器を取り付け, ベースフレームに装着した. ベースフレームと頭部が適切な位置になるように角度調節器で調整した. 続いて患者固定台上の2本の油圧アームでベースフレームを保持し, 頭部全体を固定した. 患者頭部を乗せる枕は頭頸部放射線治療用のポリウレタン製のものを改造した. この枕はアクリル板に対して固定されていない.

油圧アームは関節部分にシリンダーが内包される構造となっており, ハンドルを回すことでシリンダー内の油圧が調節される. アームシャフト内はシリンダーの内部と連続しているため, ハンドルを締めるとシリンダー内の油圧が高まり, アームシャフト内を伝わって両端のボールジョイントを圧迫固定する. すなわち, ハンドルを回すことでアーム全体がそのままの位置で固定される (第3図A).

固定作業の完了後, ベースフレームにレクセルCT用箱形インジケータを装着して治療計画CT撮影を行った. 病巣を描出するために適宜造影CTを行い, 加えて精度測定用に, 両側耳小骨および鶏冠上端の位置で, 必要最低限の範囲を1mm厚ヘリカル撮影した. 撮影された画像を基に標的体積を定め, 治療計画を決定した.

治療時には, リニアック治療寝台上で, CT撮影時と同様に患者を固定した. 病巣座標値を参照して, 病巣位置が中心になるようにした定位手術用アークをベースフレーム上に取り付け (第3図B).

2. 位置ぎめ機構 (BEPS法)

リニアックガントリ内の光照射野光源と同一位置にCCDビデオカメラを設置した. 光照射野光源は放射線発生源と光学的に一致する. 従って, CCDビデオカメラから観察する画像は, あたかも放射線発生源からビーム方向を見ていることになるのでBeam's Eye Monitorと呼ぶ.

ベースフレームに取り付けて使うアークと呼ばれる器具は, もともと脳外科で定位的生検を行うときに用いられる. アークは, その円弧中心に病巣位置を合わせれば, 円弧上の任意の角度から生検針を刺入しても, 半径だけ進めた生検針先端は一点に達するという幾何学的な仕組みとなっている. この原理を光学的な手法によって定位照射に応用した.

ターゲット指示器は, 凸レンズとターゲットマーク (十字線) からなる. CCDカメラからは, 凸レンズを通したターゲットマークの虚像を観察する. この虚像が, 深さ方向でアークの半径と等しい深さに結ばれるように, 凸レンズとターゲットマークの位置は調整されている. 虚像の十字線中心はアーク円弧の中心と一致する. 従って, CCDカメラから見たターゲットマーク虚像は, どの角度からでもアーク中心すなわち病巣中心と見なすことができる.

このターゲットマークの中心がCCDビデオ画面の中央 (すなわちビーム中心) と一致するように寝台を操作した. この作業を, ガントリを回転させ, 患者頭部に対し正面と側面から行うことで病巣中心をリニアックのアイソセンタに一致させた.

3. 装置側精度測定

固定装置以外の装置側の精度測定として BEPS 法での位置測定精度と位置合わせ精度を求めた。基準となる模擬ターゲットの空間座標は直接的には確定困難なので、X線撮影とCT撮影による測定の平均値と標準偏差を検討した。

1) 位置測定精度

直径3mmのタングステン球をベースフレームに固定して模擬ターゲットとした。脳血管撮影用の箱形インジケータをベースフレームに装着し、正面と側面から位置ぎめ参照用X線フィルムを撮影した。このフィルムから模擬ターゲットの空間座標を算出した。

CT (Xvision/GX 東芝製) を使った位置測定を行った。1mm厚、1mm送り、撮影範囲径240mm、512×512画素の条件で4シリーズのCT撮影を行った。再現性を評価するためベースフレームと模擬ターゲットはそれぞれのシリーズ撮影毎にCT寝台への着脱を繰り返した。また、CT寝台についてもシリーズ毎に床からの高さを変化させた。

X線撮影での位置測定は、一連のシリーズ毎にベースフレームと模擬ターゲットを着脱させた。ターゲット位置毎に3回測定を行った。

2) 位置合わせ精度

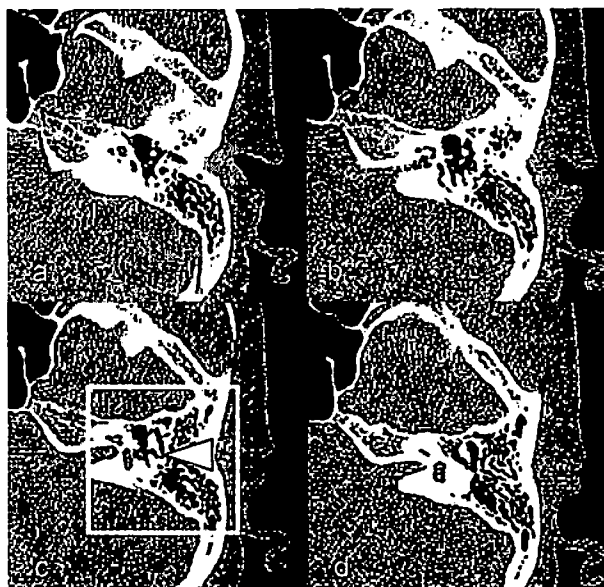
治療寝台を水平回転角0度(ガントリ回転面に垂直)の位置にして模擬ターゲットを覆った状態のまま、X線フィルム撮影により測定された空間座標値のみを用いてリニアックのアイソセントラへ位置ぎめした。位置ぎめ後、誤差を測定するために位置評価フィルムを曝写した。

以後、x、y、z座標軸および増加方向を、それぞれ患者の右側から左側、背側から腹側、尾側から頭側とする。誤差測定はガントリを回転させて前後および左右方向から撮影した位置評価フィルムによって行った。3ターゲットに対し、それぞれ4回の測定をおこなった。

4. 固定システム精度測定

臨床例においては治療期間中に、週1回以上の品質管理用CT撮影を施行した。両側耳小骨と鶏冠頂点を位置変動の基準点とし、CT用箱形インジケータを装着した状態で1mm厚ヘリカルCTを撮影した。

キヌタ骨体短脚先端は中耳の内壁に対して、画像上の接点を持つように見えるので基準点とした(第4図)。スライス位置によって接点が不明瞭な場合は、キヌタ骨体短脚の軸延長線と中耳壁との交点を基準点とした。鶏冠についても1mm厚ヘリカル撮影を行い、鶏冠頂点



第4図 位置精度測定用CT画像(1mm厚撮影)。キヌタ骨体短脚先端は中耳の内壁に対し接点のように見える(c:白抜き矢頭)。(北村正幸他 日本放射線腫瘍学会誌 14, 107-112, 2002のFig. 4より許可を得て転載)

の中央を基準点とした。

1998年2月から2001年2月までに耳小骨・鶏冠のCT撮影による位置精度測定を延べ26回、7名の定位放射線治療の対象患者(男性4名、女性3名、14~68才、1名の横紋筋肉腫再発例以外は、すべて聴神経腫瘍)に対して行った。なお、初期の2名については、鶏冠撮影が行われていないので鶏冠測定値は5名19回分のものである。CT画像をパーソナルコンピュータに取り込み、耳小骨-中耳壁接点、鶏冠頂点の基準点と同時撮影されたインジケータのマーカーを測定し、我々の開発したソフトウェアで座標値を算出した。個々の患者の基準点につき、初回撮影を基準とし、以後の撮影から得られた座標値との差分を変動値とした。

結 果

1. 装置側精度測定結果

1) 位置測定精度

X線撮影とCT撮影による模擬ターゲットの座標測定の平均値と標準偏差を第1表と第2表に示す。X線撮影ではターゲット位置の標準偏差はおよそ0.1mmであった。一方、CTによる測定ではz座標方向での標準偏差が最大0.8mmであった。そのため、以降の測定ではX線撮影法による座標値の平均をターゲット位置とみなし

第1表 X線による模擬ターゲット座標測定結果

Target	X-ray localization (mm)		
	x	y	z
1	103.1±.1	97.6±.1	95.5±.1
2	123.7±.1	84.9±.1	86.7±.1
3	60.4±.1	127.3±.1	73.9±.1

(Kunieda E et al : Int J Radiat Oncol Biol Phys 40 : 739-746, 1998の Table 1 より許可を得て転載)

第2表 CTによる模擬ターゲット座標測定結果

Target	CT localization (mm)		
	x	y	z
1	103.0±.4	97.3±.3	96.0±.8
2	123.5±.4	84.6±.3	87.3±.7
3	60.0±.4	126.9±.1	74.2±.4

(Kunieda E et al : Int J Radiat Oncol Biol Phys 40 : 739-746, 1998の Table 1 より許可を得て転載)

第3表 位置ぎめ後の模擬ターゲット位置のアイソセンタからの誤差

Target	Positioning error (mm)		
	Δx	Δy	Δz
1	0.10	0.12	0.15
2	0.08	0.12	0.26
3	0.18	0.16	0.26

(Kunieda E et al : Int J Radiat Oncol Biol Phys 40 : 739-746, 1998の Table 2 より許可を得て転載)

第4表 基準点間の距離

	Mean (mm)	S.D. (mm)
Rt.-Lt. Incus Distance	0.11	0.70
Rt. Incus-Crista Galli	-0.33	0.94
Lt. Incus-Crista Galli	0.40	0.58

(北村正幸他 日本放射線腫瘍学会誌14, 107-112, 2002の Table 1 より許可を得て転載)

第5表 基準点の移動

(mm)	Crista Galli				Right Incus				Left Incus			
	x	y	z	D	x	y	z	D	x	y	z	D
Mean	-0.52	-0.18	0.5	1.62	0.14	-0.25	0.4	1.96	-0.09	-0.32	0.17	1.46
S.D.	0.9	1.51	1.11	1.46	1.11	1.14	1.25	1.78	1.17	1.65	1.71	1.47

$$D = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2}$$

(北村正幸他 日本放射線腫瘍学会誌14, 107-112, 2002の Table 2 より許可を得て転載)

た。

2) 位置合わせ精度

位置ぎめ後の模擬ターゲット位置のアイソセンタからの誤差を2乗平均平方根により第3表に示す。全シリーズの測定でターゲットの位置ぎめの誤差は最大でも0.3 mm以下であった。

2. 固定システム精度測定結果

耳小骨および鶏冠を基準点とする本測定法の妥当性評価のため、7名のCT撮影26回における左右耳小骨間距離の変動と、鶏冠の座標データのあるものについては鶏冠と耳小骨間距離を計算した(第4表)。平均0.5 mm未満、標準偏差1 mm未満であった。

CT撮影による基準点(耳小骨-中耳壁接点、鶏冠頂点)座標変動値の測定結果を第5表に示す。いずれの基準点の座標値においてもx, y, z各方向での変動値は平均1 mm未満、標準偏差2 mm未満であった。また、各方向の変動値から距離の変動を求めた。平均と標準偏差はいずれも2 mm未満であった。また、3基準点の座標より平面が定まるため、頭蓋の回転が測定できる。各平面の法線ベクトルを求め、治療計画時のCTと2回目以降の品質管理用CTでの法線ベクトルより頭蓋の回転角度を求めた。第6表に重心の移動とともに各品質管理用CTでの回転角度を示す。重心の移動、回転角度は平均でそれぞれ約0.7 mm, 1.0度であった。

考 察

1. BEPS 照準法について

定位手術的照射、定位放射線治療ともに、照準のために我々の使用しているBEPS法は、ガントリから見てアイソセンタ位置にできる標的位置の虚像(仮想標的)を目標に位置設定をするために、しばしば誤差要因となりうる壁面設置の光照準器(レーザーポインター)を必要としない。また、BEPS法ではターゲット位置を示す仮想標的は、フレームおよび頭部の若干の回転に対して

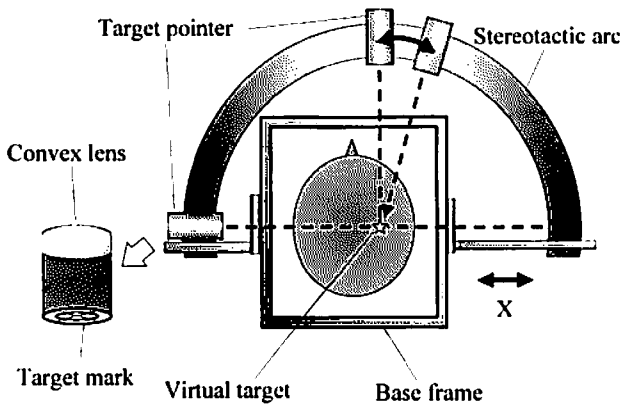
第6表 基準点の重心と回転角度

QT-CT	Center (mm)	Angle (degree)
KS-1	1.1	0.9
NS-1	0.7	0.4
NS-2	0.2	0.9
NS-3	0.2	0.4
ST-1	1.1	1.7
ST-2	1.0	0.9
ST-3	0.7	1.4
ST-4	1.4	2.1
ST-5	0.6	1.0
YS-1	0.8	1.3
YS-2	0.5	1.2
SK-1	0.9	0.7
SK-2	0.4	0.5
Mean	0.68±0.35	1.0±0.49

品質管理 CT のみを列挙した。(北村正幸他 日本放射線腫瘍学会誌14, 107-112, 2002の Table 3 より許可を得て転載)

原理的に不動である。すなわち、任意の方向に回転するターゲット指示器が概ねガントリの方向と合致し、レンズ視野内にターゲットマークがとらえられれば、その状態のままアイソセンタへの位置あわせが正確に行える(第5図)。同じ理由で、体重による寝台のたわみについても考慮する必要がない。

実際の位置ぎめは、モニター上の CCD カメラ画像を



第5図 ターゲット指示器のレンズによる虚像(仮想標的)はアークの中心に結ばれる。(北村正幸他 日本放射線腫瘍学会誌14, 107-112, 2002の Fig. 3 より許可を得て転載)

見ながら十字線を画面中央に合わせる簡便な作業であり数分程度で行える。この着脱式固定法を使用した場合、1回の治療に要する時間は、入室から退室まで15分程度の短時間であるが、これは固定時に厳密にフレームの角度を調整する必要のない BEPS 法の利点によるところが大きい。また、我々の固定法は BEPS 法で使用するレクセルフレームシステムに適合するように作られており、両者は相互に補完的である。

2. 装置の精度測定結果について

BEPS 法を用いた装置側の精度を評価するために行った位置測定精度と位置合わせ精度は、それぞれ 0.1 mm 以内、0.3 mm 以内という高い精度が得られた。

3. 着脱式固定システムについて

定位放射線治療における非侵襲的頭部固定法は、主に従来の頭部治療で用いられてきたフェースマスク型樹脂製シェルを使用した方式¹⁸⁻²¹⁾、外耳道と鼻根部で固定する方式²²⁾、歯型を利用した方式⁹⁻¹⁴⁾などが報告されている。単なるシェル固定は毎回の治療で最大 5 mm 程度の動きがあり、再現性は比較的不良である。上顎歯列は複雑な凹凸を持つ頭蓋骨の一部と考えられるので、これを歯型固定して再現性を高める方式がある。歯型を利用する方式には、GTC フレーム (Gill-Thomas-Cosman Frame System)¹⁰⁾に代表されるように、歯型と一体になったフレームに頭部をベルト固定する「頭部を固定装置に合わせる」方式が多いが、我々はより自然な位置で固定ができるように「固定装置を頭部に合わせる」方式を考案した。また、我々の着脱式固定法は、レクセルシステムのベースフレームを使用しているため、座標取得用インジケータが流用できる。また、レクセルフレームシステムを基に作られた BEPS 法が適応でき、さらに加えて若干の精度維持のための特徴がある。

一般に歯型による固定方法は、頭蓋を支える枕部分と歯型が一体となり、それに対して頭部を固定する方式が多い。これでは固定された枕部分と歯型に頭部を合わせる際に、患者の歯列や頭部に負担を生じる可能性がある。我々は、より自然な状態で固定することを目指し、まず、患者に軽量の歯型のみを装着してもらって、それを自在油圧アームで固定することとした。頭部を固定装置に合わせるのではなく、固定装置を後から歯型に取り付ける固定方式なので、患者が寝た自然の位置での固定が可能になる。

我々の方式では、頭部重量はすべて枕にかかるので、歯型への重量負荷はない。歯型の役割は患者頭部の回転

的な動きを防止することにあるので、油圧アームにより十分な強固な固定が得られる。また、歯型には硬性アクリル樹脂を用いたので再現性が期待され、義歯や治療歯への歯型接触を避けるような調整も行える。

4. 耳小骨・鶏冠を用いた精度測定法について

定位放射線治療では聴神経腫瘍など、比較的肉眼的腫瘍体積が明瞭な病変を対象とすることが多い。しかし、その場合でも標的体積はCT画像上で一般にある程度の大きさがあり、場合によっては辺縁が明瞭でないこともあり得る。腫瘍内部の画像は造影状態に左右され、検査毎の断面の角度も全く同一にはなりえない。そのために肉眼的腫瘍体積そのものを再現性測定の基準とすることは不十分と思われた。

そのため、病変以外の定点を再現性の指標とする方法を考案した。断層画像で観察される境界線はほとんどが曲線であり定点は特定し難い。今回用いた両側キヌタ骨体短脚と鶏冠の基準点は頭蓋内ではほぼ移動がないと考えられ、定義が明確でありコントラストの点でも優れている。定位放射線治療の対象となる聴神経腫瘍などの手術操作においても破壊されることは稀であるために、基準点に適していると言える。また、CT撮影時にインジケータを併用することで、マーカの位置を参照して座標値として基準点の位置を得て、3次元的な頭蓋の移動、回転を測定できる。

定位照射における再現性の精度測定に、頭蓋内の骨性定点によるCT実測の報告はなく、正面と側面の単純撮影で個人別の定点を決定し、そのずれを目視的に測定している場合が多い^{10,12,18,19,21)}。CT測定の報告では肉眼的腫瘍体積の中心や個人別に設定された定点による測定がなされており^{14,15,20)}、詳細な定量的評価、検証が困難である。

我々の測定では、左右耳小骨間の距離の変動値は、平均0.11 mm 標準偏差0.70 mmであった。今回のCT撮影におけるFOV (field of view) は300 mmなので0.59mm/画素となり、標準偏差は1.19画素に相当する。我々は耳小骨などの基準点は頭蓋に対して動かないと仮定し、フレームに対する頭蓋の動きを測定している。この際の基準点間の距離は一定と見なされるため、その変動は測定系の誤差を表しているものと考えられる。

誤差を生じる要因としては、画像から基準点をプロットする作業時に生じる以外に、画素の大きさ、CTスライス厚(1 mm)に伴うものが考えられる。これらと比較して基準点間距離の変動は十分に小さく、本測定法で得られるフレームに対する基準点の座標の精度は十分高

いものと考えられた。

5. 固定システム精度測定結果について

耳小骨や鶏冠の変動の標準偏差についてはいずれも2 mm未満であった。実際の治療では、誤差を考慮して臨床標的体積に3 mm程度の辺縁マージンを確保するようにしているので許容される結果と考えられる。また、健康保険における定位放射線治療の実施前提に「照射中心点に対して2 mm以内の照射精度を満たすこと」があげられているが、この基準も満たしている。

3基準点の重心移動は平均0.68 mm、標準偏差0.35 mmであったが、これらは3基準点の座標値や距離の変動よりも平均・標準偏差とも小さかった。重心の変動の方が小さいことは、3基準点に変動を生じさせている要素が平行移動によるものより、回転によるものが大きいことを示唆している。角度調節器等やフレーム固定によって歯型全体が動く場合は平行移動になりやすいと考えられるので、回転による誤差は歯型装着の不完全さによって生じている可能性が高い。

3基準点の角度変動は平均で1度程度であった。左右耳小骨間距離を110 mmと考え、角度1度により生じる耳小骨の移動は約1 mmとなる。これに重心移動が加わって3基準点の変動が2 mm未満となったと考えて矛盾はない。

一般に、3基準点を含めた頭蓋の位置の変動は平行移動と回転による和と考えられる。今回、回転がより大きな誤差要因であったが、これは歯型固定に共通したことなのか、我々の方法に特有の問題なのかは疑問として残る。他の歯型固定法と比較が必要であるが、位置変動をこのように立体的に論じた報告はこれまでなかった。

6. 今後の課題

歯型固定では、歯列がない場合に固定が困難である。そのような場合、義歯がしっかりしていれば義歯に対して歯型を作成し、位置設定時には下顎をベルトで補助的に固定する方法などが考えられる。あるいは、精度を確保する観点から上顎に人工歯根のインプラントを埋め込み、フレームシステムとの接続に使うという方法もありうる。若干の侵襲性を伴うが、着脱性があるので日常生活への支障は少ないであろう。また、レクセルフレームシステムは、本来、頭部重量を直接支えるために強固な構造が求められるため一定の重量がある。しかし、我々の固定法では頭部重量は枕にかかるのでフレームへの頭部重量の負荷はない。従って、幾何学的精度が保てれば、これらのフレームシステムはプラスチック樹脂製でも

かまわない。今後、精度の改善と伴にフレームシステムの軽量化を図りたい。

(奨励研究 A) によった。

総 括

歯型と油圧アームを使った着脱式の頭部固定装置による定位放射線治療システムの開発と、頭蓋内の基準点を定期的に CT 撮影した結果によるシステムの再現性の評価をおこなった。

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、さらに左右の油圧アームにより固定した。レクセルフレームを利用して、我々がこれまで使用している位置決めシステムを活かすことができ、頭蓋内の解剖学的基準点の座標を得ることができた。

測定法の妥当性を評価するために、両側耳小骨と鶏冠頂点の 3 基準点間距離を算出した。これらの変動は平均 0.5 mm 未満、標準偏差は 1 mm 未満であった。

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。両側の耳小骨(キヌタ骨短脚)と鶏冠の頂点を位置的変動の基準点とし、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 1 mm 未満、標準偏差 2 mm 未満であった。距離の変動と標準偏差はいずれも 2 mm 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 0.7 mm, 1.0 度であった。

以上の結果より、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、治療装置の精度と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される範囲と思われた。

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放射線科学教室久保敦司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国枝悦夫講師、装置の作成にご協力いただいた研究機器開発室の江田敏雄氏、歯型の作成を担当された歯科口腔外科の柴秀行医長および歯科技工士の方々、放射線治療を担当する放射線技師の方々に深謝いたします。

第 1, 2 および 3 表は Kunieda 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。

本研究の一部は第 57 回日本医学放射線学会総会にて発表した。本研究の一部は平成 7 年度文部省科学研究助成金

文 献

- 1) Leksell L : Cerebral radiosurgery. I. Gammathalamotomy in two cases of intractable pain. *Acta Chir Scand* 134 : 585-595, 1968
- 2) Leksell L : The stereotaxic method and radiosurgery of the brain. *Acta Chir Scand* 102 : 316-319, 1951
- 3) Leksell DG : Stereotactic radiosurgery. Present status and future trends. *Neurol Res* 9 : 60-68, 1987
- 4) Yamamoto M, Jimbo M, Ide M, Tanaka N, Lindquist C, Steiner L : Long-term follow-up of radiosurgically treated arteriovenous malformations in children : report of nine cases. *Surg Neurol* 38 : 95-100, 1992
- 5) Linskey ME, Lunsford LD, Flickinger JC, Kondziolka D : Stereotactic radiosurgery for acoustic tumors. *Neurosurg Clin N Am* 3 : 191-205, 1992
- 6) Steiner L, Lindquist C, Adler JR, Torner JC, Alves W, Steiner M : Clinical outcome of radiosurgery for cerebral arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 77 : 1-8, 1992
- 7) Larsson B, Liden K, Sarby B : Irradiation of small structures through the intact skull. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 13 : 512-534, 1974
- 8) 国枝悦夫, 北村正幸, 川口 修, 大平貴之, 茂松直之, 藤内武徳, 安藤 裕, 久保敦司, 河瀬斌 : 汎用医用ライナックは高精度定位的照射に使用可能か? ガントリと治療台の幾何学的精度の検討. *日医放*, 58 : 86-90, 1998
- 9) Theodorou K, Kappas C, Tsokas C : A new non-invasive and relocatable immobilization frame for fractionated stereotactic radiotherapy. *Radiother Oncol* 47 : 313-317, 1998
- 10) Gill SS, Thomas DG, Warrington AP, Brada M : Relocatable frame for stereotactic external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20 : 599-603, 1991
- 11) Kalapurakal JA, Ilahi Z, Kepka AG, Bista T, Goldman S, Tomita T, Marymont MH : Repositioning accuracy with the Laitinen frame for fractionated stereotactic radiation therapy in adult and pediatric brain tumors : preliminary report. *Radiology* 218 : 157-161, 2001
- 12) Laing RW, Thompson V, Warrington AP, Brada M : Feasibility of patient immobilization for conventional cranial irradiation with a relocatable stereotactic frame. *Br J Radiol* 66 : 1020-1024, 1993
- 13) Kooy HM, Dunbar SF, Tarbell NJ, Mannarino E, Ferraro N, Shusterman S, Bellerive M, Finn L, McDounough CV, Loeffler JS : Adaptation and verification of the relocatable Gill-Thomas-Cosman frame in stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30 : 685-691, 1994

- 14) Meeks SL, Bova FJ, Wagner TH, Buatti JM, Friedman WA, Foote KD : Image localization for frameless stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46 : 1291-1299, 2000
 - 15) Bova FJ, Buatti JM, Friedman WA, Wendenhall WM, Yang CC, Liu C : The University of Florida frameless high-precision stereotactic radiotherapy system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38 : 875-882, 1997
 - 16) 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
 - 17) 国枝悦夫, 和田 允, 伊東久夫, 久保敦司 藤内武徳, 菊池宏 : ガントリ内ビデオカメラを用いたライナック定位照射の位置決め法. *日放腫会誌* 8 : 77-81, 1996
 - 18) Hamilton RJ, Kuchnir FT, Pelizzari CA, Sweeney PJ, Rubin SJ : Repositioning accuracy of a noninvasive head fixation system for stereotactic radiotherapy. *Med Phys* 23 : 1909-1917, 1996
 - 19) Karger CP, Jakel O, Debus J, Kuhn S, Hartmann GH : Three-dimensional accuracy and interfractional reproducibility of patient fixation and positioning using a stereotactic head mask system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49 : 1493-1504, 2001
 - 20) Willner J, Flentje M, Bratengeier K : CT simulation in stereotactic brain radiotherapy-analysis of isocenter reproducibility with mask fixation. *Radiother Oncol* 45 : 83-88, 1997
 - 21) Kortmann RD, Becker G, Perelmouter J, Buchgeister M, Meisner C, Bamberg M : Geometric accuracy of field alignment in fractionated stereotactic conformal radiotherapy of brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43 : 921-926, 1999
 - 22) 大平貴之, 成高平治, 戸谷重雄 : 再装着可能型定位脳アダプター利用による CT/MRI stereotaxis. *機能的脳神経外科* 29 : 93-101, 1990
-

学位論文

抗体の制御する細胞表面 β アミロイド前駆体蛋白の
新規神経細胞障害機能

慶應義塾大学医学部薬理学教室

(指導：西本征央教授)

須藤 暹

(平成14年8月22日受付)

Key Word : amyloid precursor protein, antibody-induced neuronal death, A β polypeptide, Alzheimer's disease.

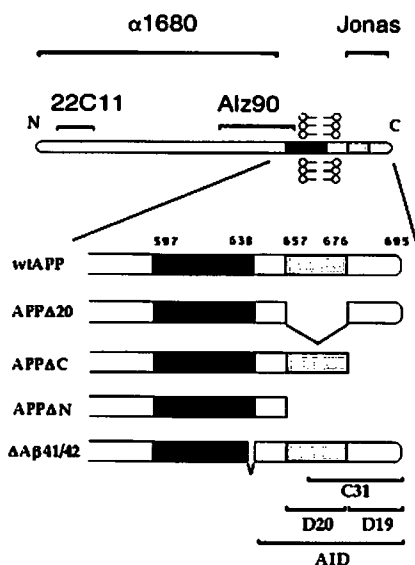
アルツハイマー病は、最もよくみられる神経変性疾患であり、進行性の神経脱落と老人斑の沈着により特徴づけられる。老人斑の主な構成要素はA β アミロイドであり、それはAmyloid precursor protein (APP)と名付けられた膜貫通型前駆体蛋白質から切り取られて産生される。Kangら(1987)によって695残基で構成されるAPP695が同定された¹⁾のに続き、少なくとも10のアイソフォームが同定され、それら全ては単一の遺伝子の選択的スプライシングから生じている²⁾。

家族性アルツハイマー病(familial Alzheimer's disease; FAD)の遺伝学的研究は、APPの構造変化がアルツハイマー病を起こすことを明らかにしたが、それは、あるFAD症例がAPP695のV642残基のI、FあるいはG変異、またはK595/M596残基のNL変異を持っているという発見に基づいている³⁾。これらの変異はアルツハイマー病の形質に連鎖し⁴⁾、それらがアルツハイマー病の遺伝的原因であることが示された。しかしながら、如何にFADにリンクした変異がアルツハイマー病の特有の病態を引き起こすかについてはほとんど理解されていない。Yamatsujiら(1996)は、APPの3つのV642変異体が神経細胞毒性を起こすかを調べ、FADの原因変異体を不死化神経細胞F11に発現すると、アポトーシスによる細胞死を誘導することを見出した⁵⁾。

この知見は、他の複数の研究グループによって確認された⁶⁻⁸⁾。更に、APP、あるいは、Presenilin-2 (PS2)のFAD変異体による細胞死は、制御されうる可能性があり、制御標的の少なくとも一つは、神経細胞特異的3量体G蛋白質Goによると考えられることも発見された^{5,6,9)}。これらの観察は、野生型APPは神経細胞死の調節に関連して生理的機能を持っており、その機能異常がFADの脳における異常な神経脱落に寄与しているのではないかということを示唆していた。

このような研究背景で、私は、野生型APPの細胞死関連機能を解析するために本研究を行った。変異を持たない全長の野生型APPの*in vivo*における機能については、従来、ほとんど何も知られていない。細胞増殖と神経突起伸長機能が見い出されたが¹⁰⁻¹³⁾、それは可溶性APP (sAPP)、つまり、APPの細胞外部分に関するもの、あるいは、A β ポリペプチドに関するものであった。しかしながら、APP遺伝子欠失マウスが中枢神経系の発生異常をきたしたこと^{14,15)}あるいは、von Kochら(1997)の研究¹⁶⁾で、APPとAPPに非常に類似するAmyloid precursor-like protein-2 (APLP2)の両者を破壊したマウスの所見から示唆されるように、野生型APPはA β の前駆体としての役割という病理的側面の他に、胎生期における神経発生において生理的な機能をも

本論文は、Sudo H, Jiang H, Yasukawa T, Hashimoto Y, Niikura T, Kawasumi M, Matsuda S, Takeuchi Y, Aiso S, Matsuoka M, Murayama Y, Nishimoto I : Antibody-regulated neurotoxic function of cell-surface β -amyloid precursor protein. *Mol Cell Neurosci* 16 : 708-723, 2000 の一部、および Sudo H, Hashimoto Y, Niikura T, Shao Z, Yasukawa T, Ito Y, Yamada M, Hata M, Hiraki T, Kawasumi M, Kouyama K, Nishimoto I : Secreted A β does not mediate neurotoxicity by antibody-stimulated amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 282 : 548-556, 2001 の一部を含む。



第1図 本研究で使用した抗体の認識部位, および組み換え変位体 APP の構造, APP のドメイン構造. 使用した抗体は Alz90 抗体, APP695 の細胞外 511-608 残基を認識するマウスモノクローナル抗体; 22C11, APP695 の細胞外 66-81 残基を認識するマウスモノクローナル抗体; α1680, APP695 の細胞外 1-591 残基を認識するラットモノクローナル抗体; Jonas 抗体, APP695 の細胞内 643-695 残基を認識するマウスモノクローナル抗体である. APP 変異体の構造については, 黒, 灰色, 薄い灰色の領域はそれぞれ Aβ1-42 領域, His657-Lys676 ドメイン(ドメイン 20; D20), Met677-Asp695 ドメイン(ドメイン 19; D19), にそれぞれ一致している. AID 及び C31 に関しては本文を参照. なお, APP エンドサイトーシスシグナル配列 NPTY はドメイン 19 に含まれ, ドメイン 20 には存在しない. (Sudo H et al: Biochem Biophys Res Commun 282: 548-56, 2001 の第3図を許可を得て転載, 一部改変)

つ可能性が非常に大きい. この考えを支持し, Qiu ら (1995) は海馬の神経細胞において細胞表面の APP はそのアイソフォームに依存した様式で神経突起の伸長を刺激することを観察した¹⁷⁾. Coulson ら (1997) と Gillian ら (1997) は独立に細胞表面の APP は神経の接着において機能を持つことを発見した^{18,19)}. Perez ら (1997) は細胞に存在する APP が神経生存, 軸索形成, 樹状突起形成に寄与することを報告した²⁰⁾. ここに私は, 抗 APP 抗体は APP695 を過剰発現する不死化神経細胞, ならびに, 初代培養神経細胞に細胞死を誘導することを報告する. そして, これらの抗体が細胞表面の APP に作用していることを明らかにし, 更に, その根底にある分子機構について解析した.

従来確立された APP の持つ機能とは Aβ の前駆体としてのものであるため, そのメカニズムとして考えられる最も簡単な考え方は, 抗体の結合した APP が Aβ を産生し神経細胞死を起こすというものである. 従来, Aβ はアルツハイマー病の病因と密接な関連性を有するものとして研究されてきた. 事実, AβX-42 (Aβ 42) の沈着はアルツハイマー病患者大脳で最も早期から観察される異常であり²¹⁾, *in vitro* で初代培養神経細胞を Aβ で処理すると細胞死を生じる^{22,23)}. しかし, *in vivo* での神経脱落における Aβ の関与は, これまで証明されてこなかった²⁴⁻²⁶⁾. 従って, 本研究では, 抗 APP 抗体の誘導する細胞死が, 分泌された Aβ によって介在されているかについても検討した. そして, 複数の証拠が, 抗 APP 抗体の誘導する野生型 APP を介した神経型細胞死は, Aβ の産生を介していないことを明らかにした.

本研究は, 細胞表面の野生型 APP が神経細胞死を制御するという新規の機能を見出し, かつ, 野生型 APP の神経細胞死誘導機能が Aβ を介していないという証拠を与えるものである.

なお, 第1図²⁰⁾に本研究で使用した抗体の認識部位, および組み換え変異体 APP の構造, APP のドメイン構造について示した.

実験方法

1. 遺伝子と試薬

野生型 APP 遺伝子は, pcDNA1 プラスミドに挿入したマウス APP695cDNA 全長を用いた. APP-ED (APP1-591) cDNA は部位特異的変異誘導キット (Stratagene, La Jolla, CA, USA) により作成し, 変異 DNA 配列はシーケンスにより確認した. APPΔ20 および APPΔC については (Hashimoto ら, 2000)³⁰⁾ に記述されている. APPΔN については (Nishimoto ら, 1993)³¹⁾ に記述されている. APPΔAβ41/42 は (Yamatsuji ら, 1996)⁹⁾ に記述されている V642I-APPΔ41/42 から作成した (第1図参照). α1680 抗体は協和発酵 (町田, 東京) の好意により提供された. この抗体は大腸菌で産生させた GST 融合 APP1-591 組み換え体に対して作成された抗体で, GST は認識せず APP1-591 を特異的に認識する. α1680 原液は全蛋白質濃度 1 mg/ml のハイブリドーマ培養上清であり実験においては, 特に言及しない限り原液の 1/10 濃度でこれを使用した. 原液中の α1680 の濃度は約 5 μg/ml と測定された. α1680 をエピトープ吸着するために大腸菌産生

GST 融合 APP1-591 蛋白質を用意し室温下 8 時間 Glutathione-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) と混合して APP1-591 結合 Glutathione-beads を得た。室温下で 8 時間 APP1-591 結合 Glutathione-beads, あるいは、非結合 Glutathione-beads (それぞれ 500 μl/tube) を α1680 と混合した。ビーズを遠心により沈澱させた後、上清を F11/APP 細胞の培地に α1680 を加えたのと同様に加えた。この上清は免疫染色にも用いた。ブロッキングの後、染色されたシートを HRP 標識した抗ラット免疫グロブリン抗体で処理し化学蛍光バンドを ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech) により探知した。22C11 と Alz90 抗体 (Alz90Ab) は Roche Diagnostics (Basel, Switzerland) から購入した。ビーズに不動化した Alz90 抗体を作成するために 10 μl の Alz90 抗体溶液 (100 μg/ml) を Protein G-Sepharose, あるいは、対照の Glutathione-Sepharose (各々 500 μl) と共に室温で 8 時間保温した。この溶液を F11/APP 細胞の培地に全て加えた (最終濃度 1 ml/well), 培養プレートを 1 rpm で CO₂ 培養器内で 6 時間震盪し、培地を HamF-12 に交換後、更に 66 時間培養した。抗マウス IgG 抗体である 5183-1304 抗体は Biogenesis (Brentwood, NH, USA) から購入した。この抗体は PBS による透析をした後に使用した。もう一つの IgM 型抗マウス IgG 抗体は SANBIO (Uden, The Netherlands) から購入し、この抗体は透析をしなくて使用した。ビオチン標識抗マウス IgG (H+L) ウサギ IgG は IBL (栃木) から、アビジンは Wako Life Science (大阪) から購入した。22C11 の Fab 断片は Pierce のキットにより作成した。メーカーの指導書に従い、50 μg の 22C11 を室温下で一晩持続攪拌によりビーズに不動化したパラインで処理しその上清を Fab+Fc 溶液として回収した。免疫プロット解析により 22C11 は Fab と Fc に切断されたことを確認した。これによると酵素処理前の 22C11 の濃度と比較して切断したサンプルは 2 倍濃度の Fab 断片と 1 倍濃度の Fc 断片を含んでいた。Glutathione-ethyl-ester (GEE) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した。Aβペプチドは Bachem (Bubendorf, Switzerland) から購入した。Ac-DEVD-CHO, および、Ac-DEVD-MCA は Peptide Inc. (大阪) から購入した。PTX は Calbiochem (San Diego, CA, USA) から購入した。PTX の不活化は 90 °C, 1 時間加熱して行った。

2. 細胞培養

F11 細胞は、過去の研究 (Yamatsuji ら, 1996)⁵⁾ に記載されているように HamF-12 (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) に 18%FBS (FBS; HyClone, Logan, UT, USA) と抗生物質を加えた培地 (HF-18%) にて培養した。Bu695 細胞は大阪大学 K. Yoshikawa 博士の好意による提供を受け、DMEM (Life Technologies) に 10%FBS と抗生物質を加えた培地にて培養した。野生型 APP 発現 F11 細胞 (F11APP) は次のようにして確立した。野生型 APP cDNA を pBabe/puro (puromycin 抵抗性遺伝子) と共にリポフェクション法 (APP cDNA 9 μg, pBabe/puro 1 μg, LipofectAMINE (GIBCO, Gaithersburg, MD, USA) 10 μl) にて F11 細胞に遺伝子導入した。14 μg/ml の puromycin により抵抗性を有する細胞を選別し、4~5 週間後コロニーを 5 μg/ml の 22C11 による免疫染色にて解析、高発現のコロニーを限界希釈にてサブクロニングした。野生型 APP あるいは変異型 APP の F11 細胞に対する一過性の遺伝子導入では F11 細胞を 7×10⁴ 個/well の密度で 6-well のプレートに播き、HF-18%培地にて 12~16 時間培養した。これに野生型 APPcDNA を血清非存在下に 3 時間遺伝子導入した (1 μg APPcDNA, 2 μl LipofectAMINE, 4 μl Plus reagent; GIBCO)。さらに HF-18%下に 18 時間培養した後、細胞を血清非存在下の Ham's-F12 培地のもとで抗体で処理した。細胞死の測定は抗体処理 48 時間後にトリパンブルー染色にて行った。

初代培養マウス大脳皮質神経細胞の培養は poly-L-lysine と laminin の両者でコートされた 6-well プレート (SUMILON, 秋田) にて行った。この作成法では培養細胞の 98%を神経細胞が占める。Poly-L-lysine をコートされたプレート (SUMILON) も同様に使った。神経細胞を 1.25×10⁵ 個/well の密度で播き、抗 APP 抗体、非特異的 IgG, Aβ1-42 にて血清非存在下、高濃度グルコース含有 DMEM (Life Technologies) (hDMEM) に N2 supplement を加えた培地 (hDMEM-N2) 下で (4.5 mg/ml glucose を含む DMEM, N2 supplement: 5 μg/ml insulin, 100 μg/ml transferrin, 6.3 ng/ml progesterone, 16 μg/ml putrescine, 5.2 ng/ml selenite をそれぞれ最終濃度とした; Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 処理した。抗体処理 72 時間後、細胞死をトリパンブルー染色で測定した。N2 supplement に代えて 5%馬血清 (HS; HyClone) (hDMEM-HS) を用いた実験もある。

初代培養ヒトアストロサイトは Bio Whittaker

(Walkersville, MD, USA) から得た。培地は ABM [Astrocyte's basal medium あるいは CCMD190 (Clonetics Media Department Laboratory)] に 5% FBS, 20 ng/ml EGF, 25 µg/ml progesterone, 50 µg/ml transferrin, amphotericin/gentamicin を加えたものを用いた。実験においては細胞を poly-L-lysine-coated プレート (SUMILON) に 1.25×10^5 個/well の密度で播いた。24 時間の成長培地での培養後、5% FBS を含む hDMEM に培地を交換し抗 APP 抗体で処理した。5% HS を FBS の代わりに用いた時も同様な結果を得た。

3. 細胞死測定

F11 細胞, F11/APP 細胞, Bu695 細胞の細胞死は血清非存在下にて測定した。細胞死はトリパンブルー染色により以下のように行った。私は、トリパンブルー染色法が惹起された細胞死を正確に反映していることを確認するために、この測定に二つの異なるプロトコルを使った。(i) 細胞をピペッティングにより傷めないように剥がし、懸濁液として回収した。全細胞を正確に集めるために PBS で各 well を洗い洗浄液も細胞懸濁液に加えた。位相差顕微鏡下に well を観察し、残った細胞がないことを確認した後、0.1% トリパンブルー溶液 (Sigma, Aldrich) (最終濃度 0.02%) を懸濁液に加え 37°C で 15 分保温した。(ii) 細胞をピペッティングにより傷めないように剥がした後、室温で 50 µl の 0.4% トリパンブルー溶液を 200 µl の細胞懸濁液に加えた (最終濃度 0.08%)。染色した細胞をトリパンブルー溶液をいれてから 3 分以内に数えた。両方のプロトコルは同様な結果を与えた。細胞死率は全細胞数に対するトリパンブルーで染色された細胞数の割合 (%) として決定した。したがって、これらの方法で測定した細胞死率は、接着している細胞と、接着していない細胞の両者を対象としている。抗体処理をしなかった時の基礎細胞死率は実際に基礎レベルで惹起されている細胞死を反映し、細胞を剥がしたことにより起きた人為的なものではない。というのは、in situ で細胞をトリパンブルーで染めると鏡検下に同様な割合の染色陽性の死細胞が見出されるからである。さらに、この方法で測った細胞死率は、Cell Counting Kit-8 (Wako Pure Chemical Industries, 東京) を使った WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] によって測定した生細胞率と線型に逆相関した³²⁾。TUNEL アッセイをするにあたっては細胞を poly-L-lysine で被覆したスライ

ドに播いた。DNA ラダー測定は Takara (京都) のキットを用いて行った。Hoechst 染色では細胞は Hoechst 33258 (Sigma) (最終濃度 5 µM) で一分間処理した。

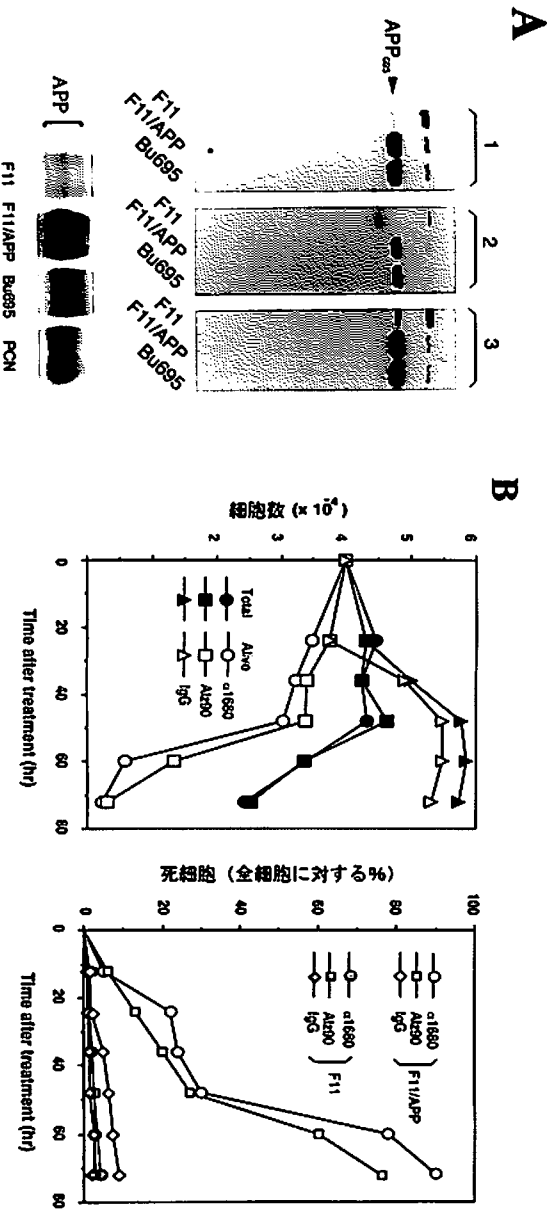
4. 免疫染色

初代培養神経細胞表面の蛋白質を免疫染色するために、細胞を氷冷 2% パラフォルムアルデヒド、および、0.2% グルタルアルデヒド/PBS で 4°C で 2.5 時間処理し、氷冷 PBS で 10 分間洗浄を 3 回くり返して固定した。さらに 3% BSA/PBS にて洗浄後、細胞を室温下で 2 時間、3% BSA/PBS 存在下にて 1 次抗体 (10 µg/ml 抗 APP 抗体あるいは非特異的マウス IgG) で処理し、PBS による 10 分間の洗浄を 3 回行った。2 次抗体は 42 µg/ml の FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Sigma, St Louis, MO, USA) で、3% BSA/PBS 存在下、室温下で 1 時間処理し、4°C で 10 分間の PBS による洗浄を 3 回くり返した。株化細胞の細胞表面蛋白質の免疫染色では、細胞を 2% パラフォルムアルデヒド、及び、0.2% グルタルアルデヒド/PBS で室温で 1 時間処理し、室温下に PBS で 10 分間の洗浄を 3 回くり返すことにより固定した。他の点では初代培養細胞の染色と同様に行った。株化細胞でも初代培養神経細胞においても、10 µg/ml の 22C11 を処理すると、細胞表面の APP の染色は飽和した。

5. 免疫プロット解析

細胞培地中の Aβ の免疫プロットは以下のように行った。細胞懸濁液を Tris/Tricine ゲル電気泳動を (Giambarella ら, 1997)⁹⁾ に記述されているように行った。エレクトロブロッティングした後、プロットしたシートを 1 µg/ml 抗 Aβ1-40 ポリクローナル抗体 (Pharmingen, San Diego, CA, USA) 及び 1 µg/ml 抗 Aβ1-42 ポリクローナル抗体 (Pharmingen)、および、2 次抗体 [1/5000, HRP-標識羊抗ウサギ IgG (H+L), Bio-Rad] の混合物で解析した。細胞 APP の免疫ブロッキングは以下のように実施した。各細胞の細胞懸濁液を 22C11, α1680, Alz90 抗体、を 1 次抗体とし、2 次抗体として 1/5000 希釈 HRP 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使って、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて行った。

本研究の全ての実験は少なくとも 3 回、独立した処理によってくり返され、それぞれが本質的に同じ結果を与えた。統計学的解析は Student's t-test によって行った。



第2図 抗APP抗体のF11及びF11/APP細胞に対する効果。(A) F11/APP及びBu695細胞に発現したAPP695の免疫ブロット解析。上のパネルでは各50µgのF11, F11/APP, Bu695細胞の細胞懸濁液を用いてSDS-PAGEを行い, Aβ290抗体(5µg/ml; パネル1), α1680(1/10希釈; パネル2), 22C11(5µg/ml; パネル3)で免疫ブロット解析した。F11のα1680免疫ブロット解析においてのみ観察された90-100kDaのバンドは再現性がなかった。下のパネルではF11, F11/APP, Bu695, 初代培養大脳皮質神経細胞(PCN)懸濁液のSDS-PAGEを行い, 抗APP抗体処理したF11/APP細胞の細胞死の時間依存性。(右)細胞(F11/APP, オープンシンボル; F11, 斜線シンボル)をα1680(×1/10), Aβ290(1µg/ml), 非特異的IgG(1µg/ml)で処理した。(左)F11細胞を抗体処理した後の各時間後における全細胞数及び生存細胞数を示した。細胞死率をトリパンブルー染色法で測定した。右パネルでは左パネルと同様しかし独立した実験で得られたデータに基づいて細胞死率を測定した。各値は3回の独立した実験の平均値である。各々の標準偏差は各値の5%未満である。示した結果は同様な3回の実験結果における代表的なものである。(C) F11/APP細胞死に対する抗体吸着の効果。F11/APP細胞を抗体吸着処理したα1680あるいは抗体吸着処理過程の対照操作したα1680はα1680をそれぞれ1/10希釈率で用いた。挿入図は抗体吸着処理したα1680あるいは抗体吸着処理したα1680抗体による免疫ブロット解析の結果を示している。各値は3回の独立した実験の平均値±標準偏差を示している。(D) F11/APP細胞における精製抗APP抗体の用量作用曲線。F11/APP細胞を示したような各濃度の精製抗APP抗体で処理し, 処理後72時間にて細胞死率をトリパンブルー染色法により測定した。各数値は16:708-723, 2000の第1図を許可を得て転載。一部改変)

第2図 抗APP抗体のF11及びF11/APP細胞に対する効果。(A) F11/APP及びBu695細胞に発現したAPP695の免疫ブロット解析。上のパネルでは各50µgのF11, F11/APP, Bu695細胞の細胞懸濁液を用いてSDS-PAGEを行い, Aβ290抗体(5µg/ml; パネル1), α1680(1/10希釈; パネル2), 22C11(5µg/ml; パネル3)で免疫ブロット解析した。F11のα1680免疫ブロット解析においてのみ観察された90-100kDaのバンドは再現性がなかった。下のパネルではF11, F11/APP, Bu695, 初代培養大脳皮質神経細胞(PCN)懸濁液のSDS-PAGEを行い, 抗APP抗体処理したF11/APP細胞の細胞死の時間依存性。(右)細胞(F11/APP, オープンシンボル; F11, 斜線シンボル)をα1680(×1/10), Aβ290(1µg/ml), 非特異的IgG(1µg/ml)で処理した。(左)F11細胞を抗体処理した後の各時間後における全細胞数及び生存細胞数を示した。細胞死率をトリパンブルー染色法で測定した。右パネルでは左パネルと同様しかし独立した実験で得られたデータに基づいて細胞死率を測定した。各値は3回の独立した実験の平均値である。各々の標準偏差は各値の5%未満である。示した結果は同様な3回の実験結果における代表的なものである。(C) F11/APP細胞死に対する抗体吸着の効果。F11/APP細胞を抗体吸着処理したα1680あるいは抗体吸着処理過程の対照操作したα1680はα1680をそれぞれ1/10希釈率で用いた。挿入図は抗体吸着処理したα1680あるいは抗体吸着処理したα1680抗体による免疫ブロット解析の結果を示している。各値は3回の独立した実験の平均値±標準偏差を示している。(D) F11/APP細胞における精製抗APP抗体の用量作用曲線。F11/APP細胞を示したような各濃度の精製抗APP抗体で処理し, 処理後72時間にて細胞死率をトリパンブルー染色法により測定した。各数値は16:708-723, 2000の第1図を許可を得て転載。一部改変)

結 果

1. 抗 APP 抗体は F11/APP 細胞に細胞死を誘導する
 野生型 APP の機能を解析するために、神経系の神経細胞に発現する野生型 APP695 を過剰発現した F11 細胞を確立し (第 2 図 A)³⁹⁾, F11 細胞の親株と比較した。F11 細胞は胎生 13 日のラット初代培養神経細胞をマウス神経芽細胞腫 N18TG2 と細胞融合することにより不死化した細胞で、活動電位の発生を含む神経細胞特異的な機能を維持し、初代培養神経のモデルの中で最もよく確立したものの一つである³⁴⁾。モノクローナル抗体 $\alpha 1680$ は APP の細胞外ドメインである APP1-591 を認識する抗体であるが、 $\alpha 1680$ で F11/APP 細胞を処理すると処理後 72 時間で 80~90% の細胞が死滅した (第 2 図 B)³⁹⁾。死細胞数は 24 時間後では少ないが 48 時間後には顕著に増加し始めた。野生型 APP695 を安定発現させた他の F11 細胞クローンにおいても $\alpha 1680$ は同様な時間経過で同様な程度の細胞死を誘導した (データは示していない)。対照として、たとえ処理後 72 時間であっても、非特異的 IgG は、ほとんど F11/APP 細胞に細胞死を誘導せず、 $\alpha 1680$ を F11 細胞に処理しても細胞死は惹起されなかった。F11/APP 細胞を非特異的 IgG で処理すると第 2 図 B 左パネルに示すように、細胞数はむしろ増加し処理前より少し高いレベルの飽和状態に達した。この現象は培地を新しくしたことに起因すると考えられる。

次に、Glutathione beads に不動化した GST 融合 APP1-591 抗原によって吸着処理した $\alpha 1680$ の効果を調べた。吸着処理をした $\alpha 1680$ で 72 時間処理したが細胞死はほとんど惹起されなかった (第 2 図 C)³⁹⁾。対照のモック吸着 $\alpha 1680$ を、 $\alpha 1680$ を Glutathione beads に同様に吸着処理することにより作成したが、これは、吸着処理前の $\alpha 1680$ に匹敵する細胞死誘導効果を示した。HRP 標識抗ラット IgG 抗体を用いて吸着処理、あるいは、モック吸着処理後の抗体溶液を免疫ブロット解析したが、この操作により、抗体は効果的に吸着されていることが判明した (第 2 図 C 挿入図)。これらの結果により F11/APP 細胞に細胞死を誘導したのは抗 APP 抗体であって、抗体溶液の溶媒や他の不純物ではないことが明らかとなった。

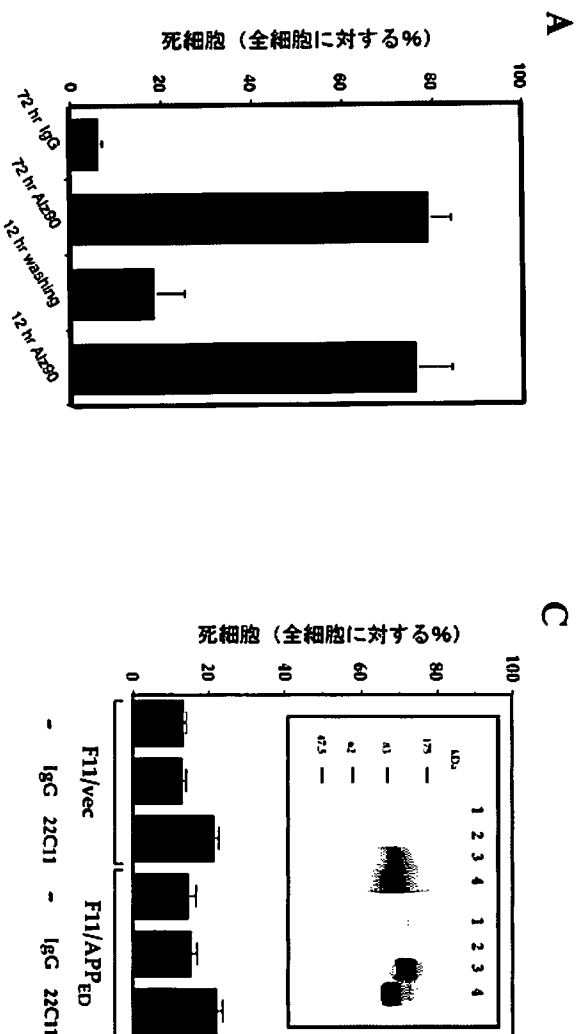
APP 細胞外ドメインに対する精製抗体の効果を第 2 図 D³⁹⁾ に示す。使用した抗体は Alz90 抗体、APP695 の細胞外 511-608 残基を認識するマウスモノクローナル抗体; 22C11、APP695 の細胞外 66-81 残基を認識

するマウスモノクローナル抗体; $\alpha 1680$ 、APP695 の細胞外 1-591 残基を認識するラットモノクローナル抗体; Jonas 抗体、APP695 の細胞内 643-695 残基を認識するマウスモノクローナル抗体である。精製 $\alpha 1680$ は F11/APP 細胞に最も強力に細胞死を起こし、その誘導効率は 72 時間で 90% 以上であった。その誘導効率は、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理の場合、72 時間で 90% 以上であった。Alz90 抗体と 22C11 の細胞死を起こす efficacy は、同じ 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、この約 1/2 であった。第 2 図 B に示したとおり Alz90 抗体により誘導された F11/APP 細胞死の時間経過は、本質的に $\alpha 1680$ のそれと同じであり、Alz90 抗体は、親株である F11 細胞に細胞死を誘導できなかった。これらの抗体の中で、Alz90 抗体は、APLP2 を認識せず、APP のみを認識する抗体として知られており³⁵⁾、したがって APP はこれらの抗体で共通に認識される唯一の抗原である。したがって、これらの結果は、抗体の APP に対する結合が細胞死を惹起したことを示している。APP の細胞内領域を認識する Jonas 抗体の効果も調べたところ、APP 細胞外ドメインを認識する抗体と対照的に、Jonas 抗体は F11/APP 細胞に細胞死を誘導しなかった。この結果は抗 APP 抗体は APP の細胞外領域に作用して、細胞死を誘導していることを示唆している。

したがって、観察された抗 APP 抗体の誘導する神経細胞死を起こす機序として 2 つの可能性がありうる。抗体は、(i) 細胞表面の APP に作用したか、あるいは (ii) 培地中の APP に作用したかである。後者の可能性は、すなわち、抗体が栄養因子として存在していた分泌型 APP (sAPP) を吸収することによって細胞死を誘導したという意味である。sAPP が、非神経細胞に対してではあるが、細胞の栄養因子として機能することは以前から知られている^{36,37)}。しかしながら、私は、この可能性は低いと推測した。培養上清中の sAPP 濃度は F11/APP 細胞より F11 細胞の方が低いと推測されるため、もしそのような場合であるならば、抗 APP 抗体は F11 細胞にも同等あるいはそれ以上に強く細胞死を誘導しなければならない。にもかかわらず、実際には、F11 細胞に効果的に細胞死を誘導できる抗体はなかったからである。

2. 抗 APP 抗体は sAPP でなく細胞表面の APP に作用している

どちらの分子機構で、抗 APP 抗体が細胞死を誘導するのかを決定するために、以下の一連の実験を行った。最初に、培地をくり返し洗うことにより可溶性の因子を



第3図 抗APP抗体は細胞表面のAPPに作用することによりF11/APP細胞死を誘導する。(A) F11/APP細胞を最初の12時間、1時間おきに培地交換をくり返し、その後無血清Ham-F12下にて60時間培養し(12hr washing)、細胞死率を実験開始後72時間で測定した。F11/APP細胞を最初の12時間だけ1µg/mlのAlz90抗体(12hr Alz90)にて処理するか、72時間1µg/mlの非特異的IgG(72hr IgG)にて処理した。図に示したすべての数値は3~10回の独立した実験の平均値±標準偏差を示している。(B) F11/APP細胞を72時間、事前に混合したAlz90(最終1µg/ml)と不活化Protein Gペーを積めたマイクロインサートの存在下にて72時間培養した。細胞死率をトリパンブルー染色法にて測定した(Alz90+PG-beads)。また細胞を、事前に混合したAlz90(最終1µg/ml)と不活化グルタチオンペーのみを積めたマイクロインサートインサートの存在下にて(G-beads)72時間培養した。インサート内の培地と細胞に直接する培地の間に効率的な行き来があることを確かめるために、非特異的IgGあるいはAlz90抗体(最終各1µg/ml)をペー非存在インサート培地内に加え72時間F11/APP細胞を培養し、細胞死率を同様な方法で測定した。最上段のパネルは各状況の説明している。中段のパネルは各々の処理をしたウェルで接着している細胞を位相差顕微鏡で観察した時の代表的な像である。(C) APP-ED(F11/APP-ED)を過剰発現したF11細胞、pcDNAだけを遺伝子導入した対照F11細胞(F11/vec)、非特異的IgG(2.5µg/ml)、あるいは無処理(-)で72時間処理した。他の実験と同様細胞死率をトリパンブルー測定で測った。挿入図はpcDNA(レーン2)、APP695(レーン3)、APP-ED(レーン4)を遺伝子導入したF11細胞の細胞懸濁液(右4レーン:20µg/レーン)及び培地(左4レーン:20µl/レーン)中のAPPを2.5µg/ml 22C11と1/5000 HRPラベル抗マウスIgG抗体により免疫フロッツしたものを示す。左の数値は分子量を示す。(Sudo H et al: Mol Cell Neurosci 16: 708-723, 2000の第2図を許可を得て転載。一部改変)

取り除くことの効果を調べた (第3図A)³³⁾。実験開始後最初の12時間、F11/APP細胞を1時間に1回の割合で培地を交換したが、この操作によって細胞死率はほとんど増加しなかった。一方Alz90抗体で12時間処理すると、ほとんどの細胞において、その後3日間で細胞死が誘導された。もし抗APP抗体が培地からsAPPを吸収することで細胞死を誘導したならば、APP由来の想定される分泌性因子の効果を極小とすると考えられる培地のくり返し交換もまた、細胞死を誘導したはずである。

次に、F11/APP細胞からは隔離されているがsAPPに作用することは可能なAlz90抗体の効果を調べた。Protein-G-Sepharoseによって前処理したAlz90を(ビーズを除去せずに)、底にマイクロフィルターを持つウェルインサート上に積めた。F11/APP細胞をこのウェルインサート下に72時間処理したが、細胞死は誘導されなかった(第3図B)³³⁾。抗体を結合したビーズがsAPPと接触することを保証するために、処理最初の24時間、培養プレートをCO₂培養器の中で緩やかに(1rpm)震盪した。これらの条件下で72時間おいた後、ウェル外にあるビーズは見い出されなかった。対照として、Alz90抗体をGlutathione-Sepharoseで前処理した混合物を積めたコントロールインサート下に、F11/APP細胞を同様に培養したところ細胞死が誘導された。それは、Alz90抗体を単に加えただけのウェルインサートの下に誘導される細胞死と同程度であった。一方、インサートにGlutathione-Sepharose、あるいは、IgGを加えてもほとんど細胞死は生じなかった。使用したインサートは、3μmの孔があり培地中の可溶性蛋白がビーズ結合Alz90抗体に相互作用することは可

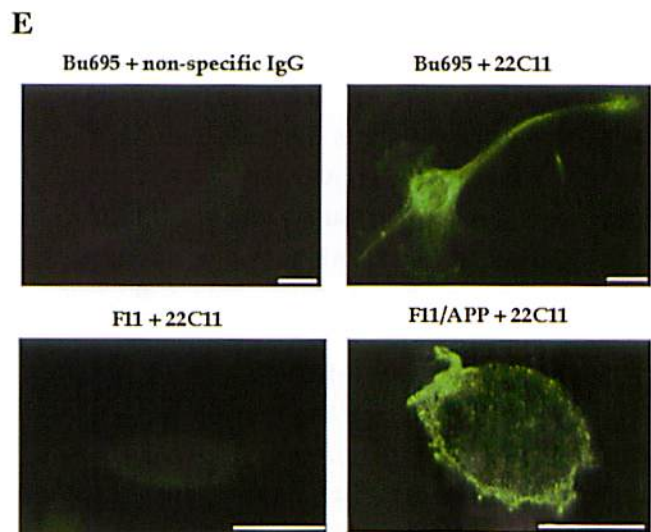
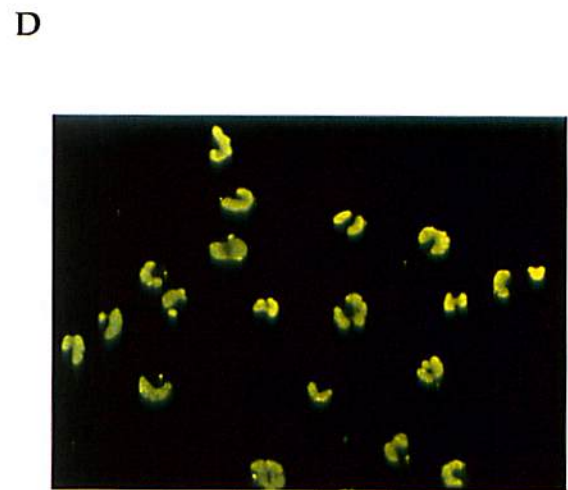
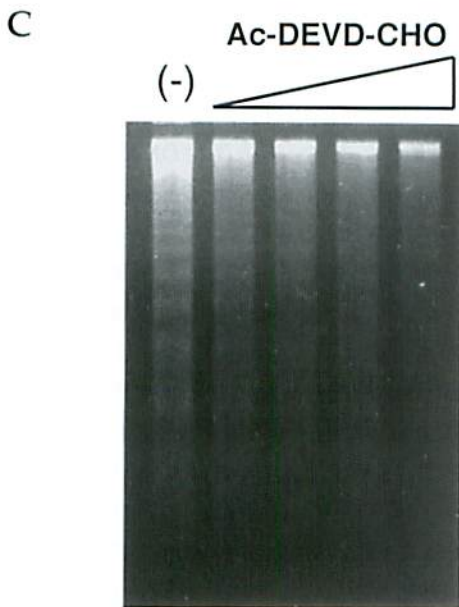
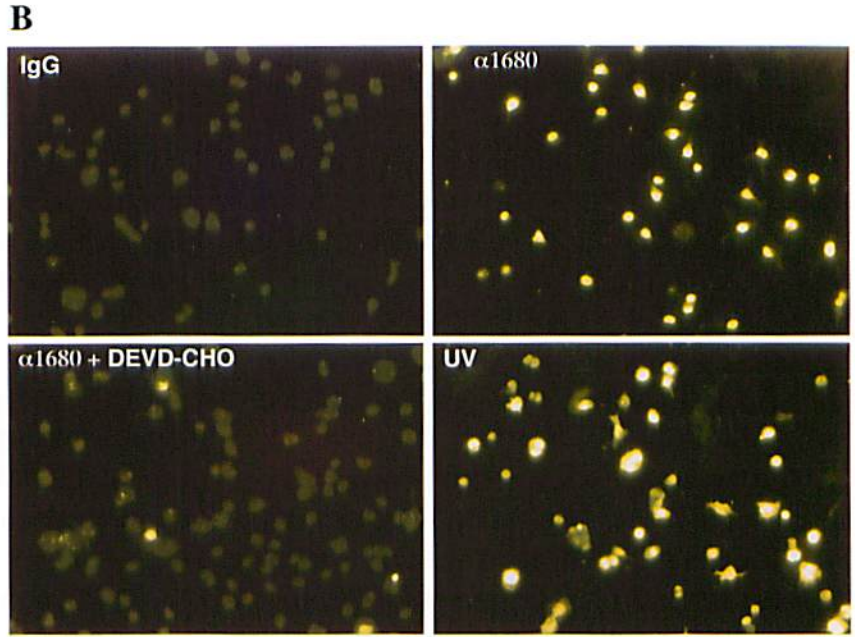
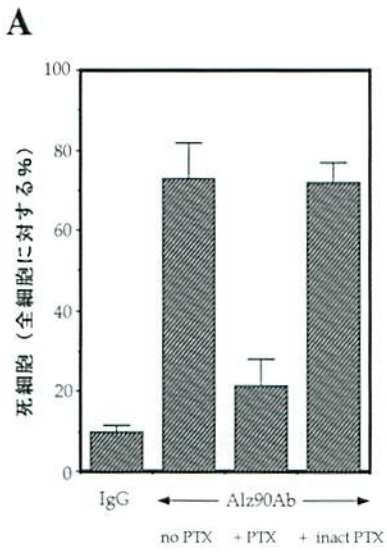
第1表 Bu695細胞に対する抗APP抗体の効果

	細胞死率 (%)	
	F11/APP	Bu695
IgG	5.0±0.5	5.2±1.0
Alz90抗体	87.0±2.0	5.8±2.0
Alz90抗体+Ac-DEVD-CHO	25.0±6.4*	6.2±1.6
Alz90抗体+Ac-DEVD	79.0±5.2	5.7±2.3
Ac-DEVD-CHO	7.2±1.8	5.6±1.0
Ac-DEVD	7.0±1.5	7.6±1.5

Bu695細胞に対する抗APP抗体の効果 F11/APP細胞あるいはBu695細胞は1μg/mlの非特異的IgGあるいはAlz90抗体により10μM Ac-DEVD-CHOあるいはAc-DEVD (C端修飾を欠くAc-DEVD)の存在下または非存在下に72時間処理し細胞死をトリパンブルー染色により測定した。10μM Ac-DEVD-CHOあるいはAc-DEVDのみも陰性対照として調べた。*P<0.01; Alz90抗体の誘導する細胞死と比較してStudent's t-testによって有意差あり。(Sudo H et al: Mol Cell Neurosci 16, 708-723, 2000の第1表を許可を得て転載、一部改変)

能だが、Alz90抗体がF11/APP細胞に作用することは、ビーズが孔を通らないために不可能である。実際、培養後の培地を抗IgG抗体を用いて免疫プロットしたが、Alz90抗体/Protein-G-Sepharoseを積めたインサートによって処理した細胞の(インサートを除いた、72時間後の)培地中には測定可能な量のAlz90抗体は含まれていなかった。一方、Alz90抗体とコントロールであるGlutathione-Sepharoseを積めたインサートによって処理した細胞の(インサートを除いた、72時間後の)培地中には、ビーズの入っていないインサートに単にAlz90抗体を加えただけの処理をした細胞の培地

第4図 抗APP抗体によるF11/APP細胞死の特徴。(A) PTXの効果。F11/APP細胞を無処理(no PTX), 0.5 μg/ml PTX (+PTX), 0.5 μg/ml 不活性化PTX (+intactPTX)によって24時間処理し、さらに1 μg/ml Alz90抗体により72時間処理し、細胞死をトリパンブルー染色法で測定した。数値は独立した3回の実験の平均値±標準偏差を示している。(B) TUNEL染色。F11/APP細胞を非特異的IgG (1 μg/ml, 左上)あるいはα1680 (×1/10右上)によって24時間処理し染色しこれをTUNEL法によりFITCラベルdUTPで染色した。左下のパネルは10 μM Ac-DEVD-CHOの存在下にα1680 (×1/10)によって処理したF11/APP細胞をTUNEL染色した。右下のパネルはUV (320 μJ/cm²×10s)照射したF11/APP細胞をTUNEL染色した。これらの図は少なくとも3回の同様な実験から代表的な視野あるいは結果を示したものである。(C) DNAのラダー化。F11/APP細胞を各々の濃度のAc-DEVD-CHOの存在下あるいは非存在下[(-)]に24時間Alz90抗体(1 μg/ml)にて処理し得られた細胞サンプルをDNAラダーアッセイした。Ac-DEVD-CHOの濃度は0.1, 1, 10, 100 μM (左から右へ)である。(D) 抗APP抗体により誘導されたF11/APP細胞核の形態。この図はα1680処理したF11/APP細胞をTUNEL染色しその核を示したものである。アポトーシスを起こした細胞の核に典型的な核濃縮、核切断、核断片化が観察できる。このような形態変化はおおむね、抗APP抗体処理後24~32時間で誘導された。(E) Bu695, F11, F11/APP細胞表面APPの免疫染色。膜非穿孔の細胞を22C11及び非特異的IgGにより免疫染色した。Alz90抗体による染色でもここに挙げたと同様な染色像を得た。これらの蛍光像とBの像は同じ条件下にて得られた。スケールバーは20 μmを示す。(Sudo H et al: Mol Cell Neurosci 16: 708-723, 2000の第3図を許可を得て転載、一部改変)



に存在した量に匹敵する Alz90 抗体が含まれていた (データは示していない)。以上の免疫プロットの結果は次のことを示している。(i) Alz90 抗体は Glutathione-Sepharose を積めたウェルインサートのマイクロフィルターを実際に通過する；(ii) Alz90 抗体は Protein-G-Sepharose を積めたウェルインサートのマイクロフィルターを通過できない。抗体の分子量が約 150 kDa であり、対して sAPP は 97 kDa であるから sAPP もまた、マイクロフィルターを通ると考えられる。これらの結果は細胞死を誘導するには抗 APP 抗体と細胞表面の APP が直接に相互作用することが必要であるということを示している。

抗 APP 抗体が sAPP に結合して細胞死を誘導しないことを直接示すために、次に、APP の細胞外ドメイン全長にほぼ相当する APP1-591 (APP-ED) を過剰発現した F11 細胞における抗 APP 抗体の効果を調べた。これらの細胞では APP-ED は F11/APP 細胞における APP と同程度に発現していたのであるが、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの濃度の 22C11 では、非特異的 IgG と同様に、ほとんど細胞死を誘導しなかった (第 3 図 C)³¹。

これら複数の蓄積した証拠に基づき、私は、抗 APP 抗体は、細胞表面の APP に直接作用して神経細胞死を惹起すると結論した。このことは、APP が細胞表面において受容体様の機能を持つことを示している。

3. APP を発現したグリア系細胞に対する抗 APP 抗体の効果

次に、抗 APP 抗体の細胞死をもたらす効果について別の細胞系で検討した。この実験においては、F11/APP 細胞と同程度に APP695 を発現している別のタイプの細胞を調べるように注意した。F11 細胞における内因性の APP は、抗体依存性細胞死を誘導するには量的に不十分と考えられるので、細胞あたりの APP の発現レベルは、抗 APP 抗体の細胞死誘導作用の有無を決定する重要な因子であると考えられる。私は、免疫プロット解析から、F11/APP 細胞とその APP695 発現レベルが同等であった Bu695 細胞を使った (第 2 図 A)。Bu695 細胞は GFAP 陽性ヒト anaplastic astrocytoma 由来細胞株に APP695 cDNA を導入し安定発現させた細胞である³⁰。

Bu695 細胞において、非特異的 IgG による処理と比較して、Alz90 抗体は細胞死率を増加させることはできなかった (第 1 表)³⁰。一方、上に記述したように、Alz90 は、F11/APP 細胞では高い細胞死誘導効果をもつことが再度確認された。これらのデータは APP が引

き金となるアポトーシスは神経細胞系の細胞では働いているが、グリア細胞系の細胞では働いていない細胞内プログラムによって介在されている可能性を示唆している。そうでなければ、抗 APP 抗体誘導性細胞死を抑制するグリア系細胞特有の分子機構が存在している可能性が考えられる。いずれにせよ、抗 APP 抗体誘導性細胞死が神経系細胞にみられ、グリア系細胞でみられなかったことは極めて重要である。

4. 抗 APP 抗体による F11/APP 細胞死の特徴

次に、抗 APP 抗体による F11/APP 細胞の死の特徴を調べた。第 4 図 B³⁰は TUNEL 染色の結果を示している。F11/APP 細胞を非特異的 IgG によって処理した時、事実上核が TUNEL 陽性を示した細胞はなかった。それに対して紫外線を照射すると事実上照射されたすべての細胞において DNA 断片化が生じた。細胞を α 1680 で処理すると 80~90%の細胞で処理後 24 時間にて核に DNA 断片化を生じた。もう一つの対照実験として、膜透過性細胞内カスパーゼ阻害剤である Ac-DEVD-CHO は α 1680 の起こす DNA 断片化能力を消失させた。これは、抗 APP 抗体は F11/APP 細胞においてカスパーゼとカスパーゼ依存性 DNAase を含む細胞内プログラムを活性化するというを示唆している。更に、Ac-DEVD-CHO の存在下、あるいは、非存在下において、F11/APP 細胞を α 1680 で 24 時間処理した時の DNA ラダーリングについて調べた。細胞から抽出した DNA がヌクレオソーム単位の断片に分断され、180 bp 単位のラダーを形成することはアポトーシスの決定的な特徴の一つである³⁰。第 4 図 C³⁰に示したように α 1680 を F11/APP 細胞に処理すると 180 bp の DNA ラダーリングを生じ、更に、これは Ac-DEVD-CHO を加えることにより阻害された。高濃度の Ac-DEVD-CHO を加えるほどより強い DNA ラダーリングの阻害が観察された。また、 α 1680 で F11/APP 細胞を処理した時、TUNEL 染色での細胞の核形態についても調べた。抗体処理後 24 時間から 36 時間にかけて、事実上、全ての細胞がその核を変化させた。観察された核変化は、核濃縮、核切断、核断片化等であった (第 4 図 D)³⁰。これらの特徴はすべて、アポトーシスの特徴である。

Ac-DEVD-CHO による DNA 断片化の阻害効果に一致して、抗 APP 抗体による細胞死はこのカスパーゼ阻害剤で抑制された (第 1 表)。10 μM の Ac-DEVD-CHO は Alz90 抗体の誘導する細胞死を顕著に減少させた。対照として、C 端をアルデヒド修飾していない細胞不透

過性の Ac-DEVD は同じ濃度で抗体の誘導する細胞死を阻害する効果を持たなかった。これらの結果は抗 APP 抗体がアポトーシスを誘導することにより細胞死を起こすことだけでなく、DEVD ペプチドの阻害効果は細胞内の標的に作用することによっていることを示している。

一方、Bu695 細胞を Alz90 抗体で処理しても DNA ラダーは認められず、TUNEL 陽性の核もほとんど出現しなかった（データは示していない）。対照として紫外線を Bu695 細胞に照射すると 180 bp 単位の DNA ラダー形成を認め、TUNEL 陽性細胞の増加も認めた（データは示していない）。これは、α1680 抗体の場合も同じ結果であり、この抗体は Bu695 細胞に細胞死を誘導できなかった（Bu695 細胞において非特異的 IgG の誘導する生細胞率を 100% としたとき、α1680 抗体の誘導する細胞死は Ac-DEVD-CHO の非存在下、あるいは、存在下にて各々、119% ± 4%、及び、104 ± 2%）。Bu695 細胞を α1680 抗体で処理しても TUNEL 測定による DNA 断片化は生じなかった（データは示していない）。これらの結果は Bu695 細胞はアポトーシスを誘導する機構を備えているが、抗 APP 抗体には抵抗性を持つことを示している。Bu695 細胞における全 APP 量と細胞表面の APP 発現は F11/APP 細胞や初代培養神経細胞のそれらと同等であったことは繰り返し強調されなければならない（第 2 図 A 及び 4 E）³⁰。

5. 初代培養神経細胞の抗 APP 抗体による細胞死

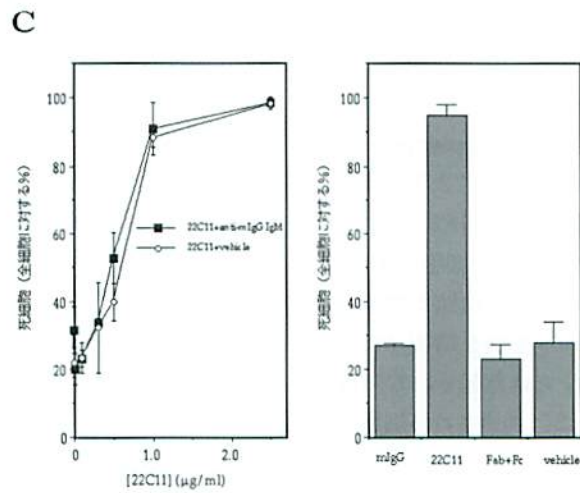
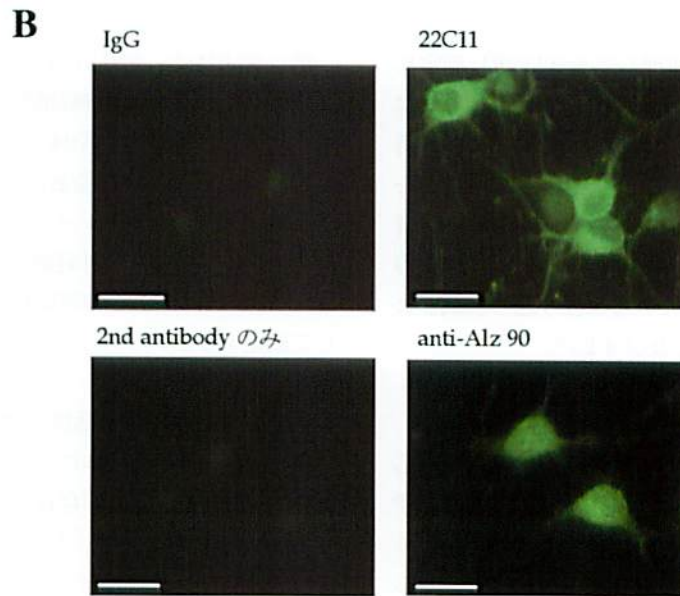
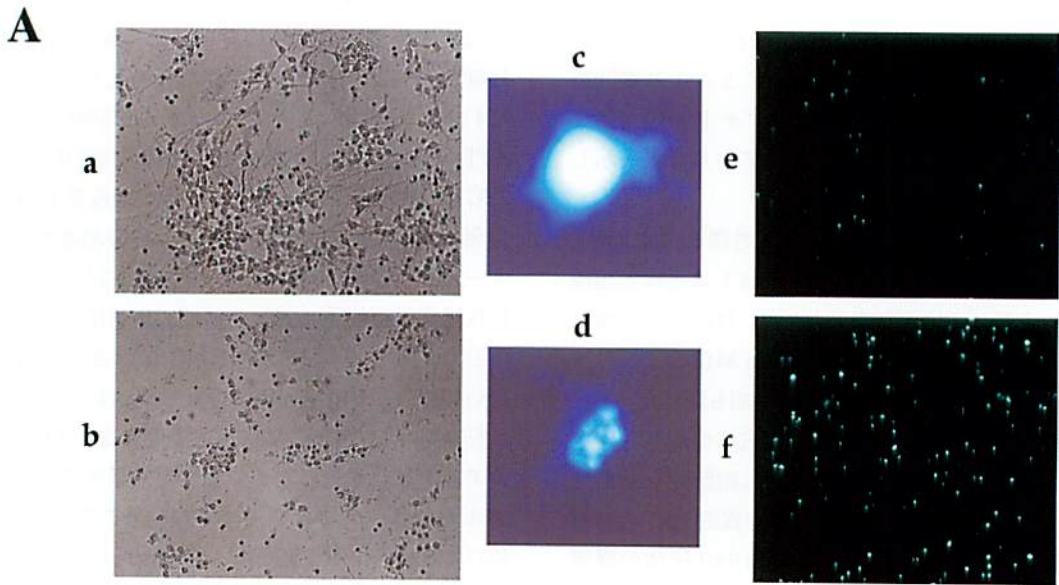
次に、初代培養神経細胞が抗 APP 抗体と同様に反応するのかを検討した。初代培養神経細胞は、F11/APP 細胞や Bu695 細胞と同程度の APP を発現している（第 2 図 A）。初代培養神経細胞を抗 APP 抗体である 22C11、Alz90 抗体で処理すると、N2 supplement を含む培地（hDMEM-N2）の存在下に、有意に細胞死率が増加した。対照の非特異的 IgG は、hDMEM-N2 のみと比較して、有意な効果は認められなかった（第 6 図 A）³⁰。22C11 による細胞死誘導は N2 supplement に比較して HS の存在によって増強された [72 時間後の値で、hDMEM-HS 存在下での細胞死率は 96.9 ± 0.5%、しかるに同条件で hDMEM-N2 存在下での細胞死率は、77.3 ± 3.6%（3 回の独立した実験での平均値 ± 標準偏差）]。第 5 図 A³⁰ は、初代培養神経細胞を精製 Alz90 抗体で処理すると、非特異的 IgG では惹起されない細胞死が誘導されることを示している。誘導される細胞死は核分断、神経突起変性、プレート面からの剥離等の典型的なアポトーシスの特徴を伴う。

Alz90 抗体は APLP2 を認識せずに APP を選択的に認識するので、これらのデータは特異的 APP 刺激が神経細胞にアポトーシス型の細胞死をもたらすことを示している。APLP2 は APP に対する相同性が高い分子で APP とほぼ同じ組織分布や細胞内発現を示す³⁰。22C11 もまた同様に、初代培養大脳皮質神経細胞に神経突起脱落、退縮、プレート面からの剥離等を伴うアポトーシス型の細胞死をもたらす。22C11 と Alz90 共に、初代培養神経細胞に対し、時間、用量依存的に細胞死を生じる。しかるに非特異的 IgG はほとんど毒性を持たない（22C11 の用量作用依存性の活性については第 5 図 C を参照）。対照として各々の濃度の 22C11 は、初代培養アストロサイトに対して細胞死効果を持たなかった。アストロサイトでは処理後 72 時間での細胞死率は、0 及び 2.5 µg/ml の 22C11、2.5 µg/ml の非特異的 IgG で、各々、6.2 ± 2.9%、3.2 ± 0.4%、8.1 ± 1.9%（独立な 3 回の実験の平均値 ± 標準偏差）であった。

第 5 図 B³⁰ は、22C11 及び Alz90 抗体による膜非穿孔条件での、初代培養神経細胞の免疫染色を示している。初代培養神経細胞は細胞体と神経突起の表面に APP を発現していた。神経細胞表面に有意に APP が存在していることは複数のグループによる報告と一致しており⁴⁰⁻⁴²、また初代培養神経細胞においてもやはり、APP は抗 APP 抗体による神経細胞死の細胞表面調節因子として機能するという考えにも合致している。

6. APP の抗体による活性化機序の検討

細胞表面 APP が抗体によって活性化されることは、天然の APP リガンドが存在し、その作用を抗体が模倣するという推測を生む。しかしながら、APP の抗体による活性化が、抗体特有のクロスリンクによるものならば、APP の活性化もまた、抗 APP 抗体特有のものと考えられ、天然に APP リガンド分子が存在する可能性は極めて低くなる。抗体による APP の活性化が、抗体によるクロスリンクによるものか、受容体のリガンド分子が誘導するような二量体化や多量体化によるものかを区別することは通常容易ではない。しかし私は、以下の検討を行って両者の区別を試みた。抗体による抗原分子のクロスリンクとは典型的には IgM クラスの抗体が誘導する現象である。IgG クラスの抗体は通常の条件では抗原分子のクロスリンクをほとんど誘導しないが、これに IgM クラスの抗 IgG 抗体を添加することによって、特異的に誘導することができる^{43,44}。22C11 は IgG クラスの抗体であるため、それが APP を活性化する作用機序は、22C11 による APP 分子の二量体化もしくは多量



体化であって、クロスリンクとは異なるものと推察されるが、この考えを更に実証するため、22C11 単独の作用と、IgM クラスの抗 IgG 抗体存在下の 22C11 の効果を比較した。二種類の異なる抗マウス IgG 抗体(IgM) の存在下で 22C11 による初代培養神経細胞死誘導が增強されることは見い出されなかった [第 5 図 C の左パネルは 5183-1304 抗体; もう一つの抗マウス IgG 抗体 (IgM) のデータは示していない]。更なる確認として、10 $\mu\text{g/ml}$ のビオチン化抗 IgG 抗体と 20 $\mu\text{g/ml}$ avidin の混合物の、22C11 誘導性細胞死に対する効果も検討した。avidin は 4 個の biotin に結合できるため 22C11 に結合したビオチン化抗 IgG 抗体は IgM と同様なクロスリンクを惹起するからである。この実験でも、ビオチン化抗 IgG 抗体と 20 $\mu\text{g/ml}$ avidin の混合物添加による、22C11 誘導性細胞死の增強は観察されなかった (データは示していない)。これらの結果は 22C11 による APP の活性化は、いわゆる抗体によるクロスリンクではなく、APP の二量体化あるいは多量体化で達成されるものであることを示している。

APP の二量体化が 22C11 による活性化に必要なことを示すために、22C11 の Fab 断片が、インタクトな 22C11 と同様に神経細胞死を誘導できるか否かを検討した。第 5 図 C³⁹⁾の右パネルは、初代培養神経細胞において、22C11 の Fab 断片は、神経細胞死を誘導する能力を失ったことを示している。Fab 断片は APP を認識できることは確認されている (データは示していない)。これらのデータは、IgG クラスの抗体である 22C11 は、おそらく APP を二量体化させるが、二量体化した APP と 22C11 の複合体が更にクロスリンクされて、細胞死シグナルが惹起されているわけではないという考えを支

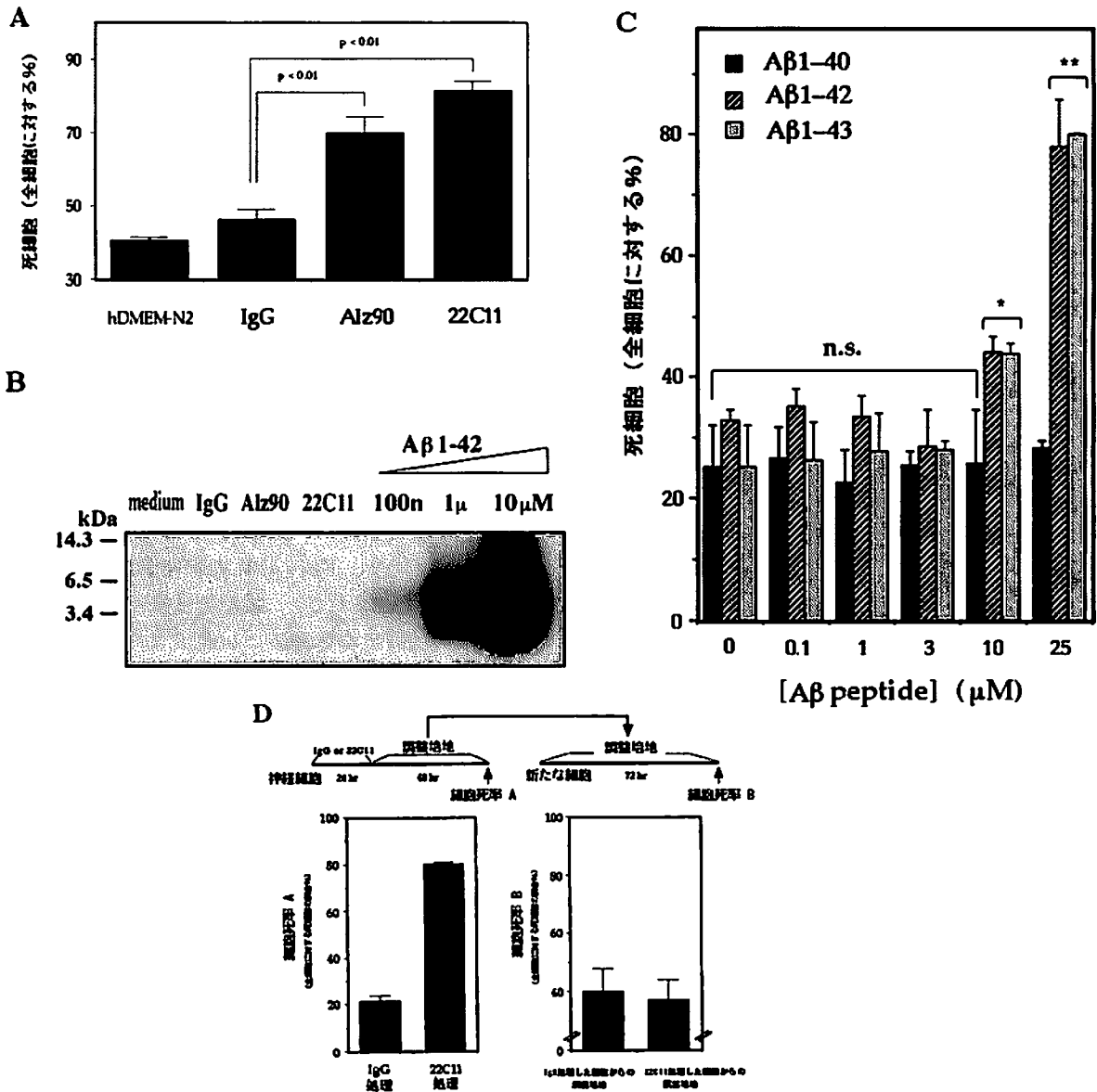
持している。これらの検討から、抗体による APP の活性化は、抗体特有のクロスリンクによるものではなく、したがって、抗体以外に APP を二量体化させるリガンド分子であれば APP を活性化できることを示し、APP の天然リガンドが存在する可能性を示している。

7. 受容体様分子として APP の発するシグナルの特徴

APP が細胞表面の受容体様に機能しているかを更に調べるために、細胞表面の受容体からのシグナルを伝達する 3 量体 G 蛋白質の特異的阻害剤である百日咳毒素 (PTX) の、抗 APP 抗体誘導性細胞死に対する効果を調べた (第 4 図 A)³⁹⁾。私の所属する研究室や他の研究室は、これまで、哺乳類の APP、及び、ショウジョウバエの APP ホモログである APPL の細胞内シグナルの一つは PTX 感受性 Go 蛋白を介したものであると示唆してきた^{31, 42, 45, 46)}。F11/APP 細胞を PTX の存在下に Alz90 抗体で処理すると、細胞死は顕著に抑制された。対照として PTX を処理前に 90°C にて 1 時間処理すると PTX の抗体の誘導する細胞死に対する阻害効果はほとんど観察されなくなった。これは PTX による阻害がこの毒素の触媒活性によっていることを示し、APP が抗体依存性に発する細胞内シグナルを PTX 感受性 G 蛋白が介在していることを示している。

次に、抗酸化剤である GEE の抗 APP 抗体による神経細胞死に対する効果を検討した (第 7 図上)²⁹⁾。Rohn らは、22C11 の誘導する神経細胞死は GEE によって抑制されたと報告した⁴⁷⁾。これに一致し、1 mM の GEE は血清存在下 (第 7 図 A)²⁹⁾、あるいは、N2 supplement 存在下にて (第 7 図 B)²⁹⁾、22C11 による神経細胞死を有意に抑制した。GEE による抑制は N2 supple-

第 5 図 抗 APP 抗体の初代培養大脳皮質神経細胞に対する効果。(A) 初代培養大脳皮質神経細胞を 2 $\mu\text{g/ml}$ 非特異的 IgG (a, c) あるいは Alz90 抗体 (b, d) によって 72 時間処理した。a 及び b では 4 回の同様な独立した実験において位相差顕微鏡で観察された代表的な視野を示した。c と d では Hoechst33258 による染色で明らかとなった抗体処理細胞の代表的な核の形を示した。e と f では初代培養神経細胞を 2 $\mu\text{g/ml}$ の非特異的 IgG (e) あるいは Alz90 抗体で 24 時間処理し、TUNEL 法によって断片化した DNA を染色した。3 回の独立した実験の結果から代表的なものを示した。(B) 初代培養大脳皮質神経細胞表面における APP の発現。膜非穿孔の初代培養神経細胞を 10 $\mu\text{g/ml}$ 22C11 (22C11), Alz90 (抗 Alz90) あるいは非特異的 IgG (IgG) を 1 次抗体とし、FITC ラベルゴート抗マウス IgG 抗体 (1/100 希釈) を 2 次抗体として免疫染色した。さらに別の対照実験として神経細胞を 2 次抗体のみで染色した。スケールバーは 20 μm を示している。(C) 抗 APP 抗体を抗マウス IgG 抗体によってクロスリンクする、あるいは抗 APP 抗体を Fab 断片化することの効果。左パネルでは初代培養神経細胞を 5 $\mu\text{g/ml}$ 抗マウス IgG 抗体 5183-1304 の存在下あるいは非存在下に漸増する各濃度の 22C11 により 72 時間処理した。細胞死をトリパンブルー染色法にて測定した。右パネルでは初代培養神経細胞を 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ($\approx 17\text{nM}$) 22C11 (22C11), 非特異的マウス IgG (mIgG), 22C11 酵素切断断片である約 34 nM の Fab と約 17 nM の Fc 混合液 (Fab+Fc), 酵素処理用バッファのみ (vehicle) にて 72 時間処理した。細胞死をトリパンブルー染色法で測定した。どちらのパネルの値も 3 回の独立した実験結果の平均値 \pm 標準偏差を示している。(Sudo H et al: Mol Cell Neurosci 16, 708-723, 2000 の第 4 図を許可を得て転載、一部改変)



第6図 抗 APP 抗体による神経細胞死は Aβ を介しているかの検討。A: 抗 APP 抗体の毒性。初代培養神経細胞を無処理 (hDMEM-N2), 2.5μg/ml 非特異的 IgG (IgG), Alz90 抗体 (Alz90), 22C11 によって hDMEM-N2 存在下に 72 時間処理した。細胞死測定はトリパンブルー染色による。この結果の全ての値は独立して行った 3 回の実験の平均値±標準偏差を示している。p<0.01 は Student's t-test による。B: 抗 APP 抗体処理した神経細胞の培養上清に含まれる Aβ ペプチドの免疫ブロット解析。初代培養大脳皮質神経細胞を 2.5 μg/ml 22C11, 抗 Alz90 抗体 (Alz90), 非特異的 IgG (IgG) により 72 時間処理した。さらにもう一つの対照として抗体による処理をしていない神経細胞の培養上清 (hDMEM-N2) も同様に調べた。培養上清は Tris/Tricine ゲル電気泳動し抗 Aβ1-40 抗体と抗 Aβ1-42 抗体の混合物で解析した。培地に含まれる Aβ ペプチドを半定量化するために濃度既知の合成 Aβ1-42 溶液を同じゲルの中で電気泳動した。同様な実験を互いに独立に処理した実験由来のサンプルを用いて 4 回行ったが結果は同様であった。C: Aβ ペプチドの毒性効果。初代培養神経細胞を表示した濃度の Aβ1-40, Aβ1-42, Aβ1-43 で血清非存在 hDMEM-N2 下に 72 時間処理した。細胞死をトリパンブルー染色測定で測った。*p<0.05, *p<0.01 は Student's t-test による。n.s., 有意差なし。D: 抗体処理した神経細胞由来培養上清の新たな神経細胞に対する効果。初代培養神経細胞を 2.5 μg/ml 22C11 あるいは非特異的 IgG (IgG) により 24 時間処理した。培地を hDMEM-N2 に交換した後、細胞を 48 時間培養した。22C11 あるいは IgG 処理による神経細胞の細胞死率はトリパンブルー染色法によって抗体処理後 72 時間で測定した (左パネル, 細胞死率 A)。22C11 あるいは IgG 処理細胞の培地交換後 48 時間培養しその後回収した培養上清に 4.5 mg/ml glucose を加えた。この培養上清を新しい細胞に処理し 72 時間後、細胞死をトリパンブルー染色法で測定した (右パネル, 細胞死 B)。同様な実験を 3 回行った。(第6図 B 以外は Sudo H et al: Biochem Biophys Res Commun 282: 548-56, 2001 の第1図を許可を得て転載、一部改変)

ment 存在下において減弱していた。血清存在下に 1 μg/ml 22C11 が誘導する神経細胞死は GEE の存在下にてほぼ完全に抑制された。

これらの結果は、APP が抗体依存性に誘導する細胞死シグナル伝達経路には、PTX 感受性 3 量体 G 蛋白の活性化とフリーラジカルの産生が含まれていることを示している。そして、APP が、*in vitro* で G 蛋白共役受容体様の様式で機能すること⁴⁵⁾を考えると、細胞表面の APP^{33, 40, 42)}は細胞表面受容体のような機能を持っている可能性が高い。

8. 細胞外に分泌される Aβ は、APP 誘導性神経細胞死を介在しない

次に、以下に述べる一連の実験で、APP が抗体依存性に誘導する神経細胞死を APP から分泌される Aβ が介在するか否かにつき検討した。

1) 抗 APP 抗体の誘導する細胞死に伴う培地中の Aβ

抗体処理した神経細胞から分泌された Aβ ペプチドの濃度が神経細胞死を生じるに十分な濃度であるかを調べた。第 6 図 A²⁹⁾の実験において、抗 Aβ40、及び、抗 Aβ42 抗体による免疫プロット解析の結果、22C11、及び、Alz90 抗体処理し細胞死をおこした神経細胞の培地中には Aβ ペプチドは検出されなかった。本免疫プロットでは、Aβ は 100 nM の濃度までは確実に検出されるため、この結果は、同培地中には Aβ は、Aβ40、Aβ42 のいずれも、100 nM 以上には含まれていないこと示す(第 6 図 B)。一方、Aβ1-40、Aβ1-42、Aβ1-40 のいずれも、3 μM 以下の濃度では初代培養神経細胞に細胞死を誘導しなかった(第 6 図 C)²⁹⁾。Aβ1-40 ではより高濃度でも神経毒性は観察されなかった。10 μM 以上の濃度における Aβ1-42、Aβ1-43 の神経細胞毒性は本質的には同等であった。

22C11 とは対照的に、Aβ ペプチドの毒性は血清の存在下で弱められたことは特記に値する [Aβ 処理により 72 時間での時点で、80.2±6.0%の初代培養神経細胞が細胞死を惹起するが、hDMEM-HS 存在下では、Aβ 処理後 72 時間での時点で、57.4±4.9%へ細胞死率が有意に減少する(3 回の独立した実験での平均値±標準偏差) 第 7 図 C と第 7 図 D を参照]。これまでの報告には Aβ1-42 による細胞死の用量作用曲線を血清存在下で調べたものはない。本研究で観察された N2 supplement 存在下での Aβ1-42 の誘導する細胞死の用量作用曲線は他の研究室のデータと一致する⁴⁶⁾。

これらのデータは抗 APP 抗体の誘導する細胞死は神経細胞からの分泌された Aβ によって介在されているの

ではないことを示す第一の証拠を提示する。

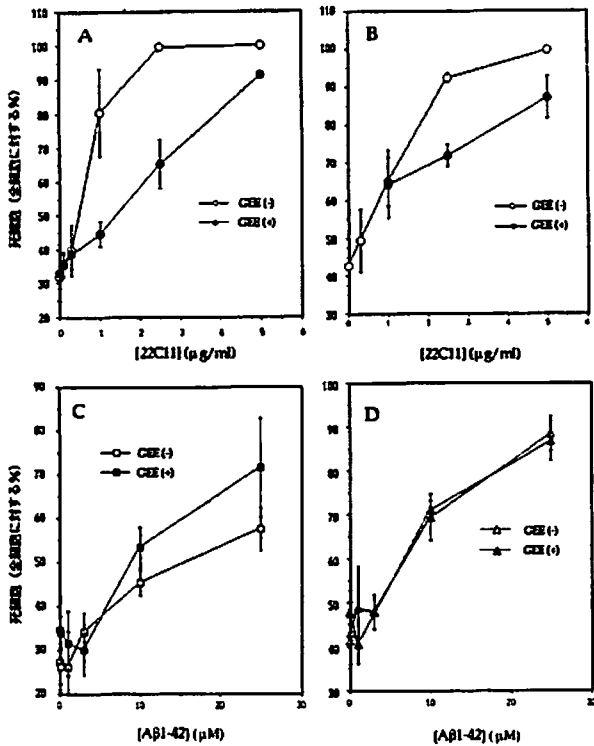
2) 細胞死を発生した神経細胞由来の培養上清の効果

次に、抗 APP 抗体処理された神経細胞の培養上清が神経毒性を持つか否かについて検討した。この目的のためには、それ自身神経毒性のある抗 APP 抗体を培養上清から除去しなければならない。予備的検討により、抗 APP 抗体を処理しないで 72 時間培養した神経細胞から回収した培養上清に抗体除去のための処理を行うと、もはや培地は神経細胞を健常維持できず、3 日間で 70%以上の細胞死を誘導してしまうことが明らかとなった。このため、他の方法でこの課題を解決することを試みた。

まず、初代培養神経細胞を 2.5 μg/ml 22C11 にて 24 時間処理し、培地を新しいものに交換することで抗体を除去した。そして細胞死を抗体処理開始から 72 時間後に測定した。これと共に、培養後半 2/3 に当たる 24 時間から 72 時間の間の 48 時間分の培養上清を回収し、これを新鮮な神経細胞に処理し、培養上清による処理開始後 72 時間で細胞死を測定した。この培養上清は、22C11 を処理され、確かに、高度の細胞死を起こした神経細胞から得たものであったが(第 6 図 D²⁹⁾、左パネル)、対照の培養上清で処理したものと比較して、この 22C11 で処理した神経細胞由来の培地で処理した新たな神経細胞において細胞死の増加は、ほとんど観察されなかった(第 6 図 D 右パネル)。抗体の誘導する細胞死の大部分は、抗体処理後 24 時間と 72 時間の間の培養後半 2/3 で生じており(抗体処理後の細胞死率は 24 時間後で 2.5 μg/ml の IgG で 31.6±6.7%、2.5 μg/ml の 22C11 で 37.9±8.0% [3 回の独立した実験の平均値±標準偏差]に過ぎず、これらの細胞死率の間に有意差はない)、これらの結果は、抗 APP 抗体が誘導する神経細胞死を可溶性因子が介在している可能性は極めて低いことを示している。

3) Aβ1-42 による神経細胞死に対する GEE と血清の効果

次に、膜透過型抗酸化剤である GEE の Aβ1-42 による神経細胞死に対する効果を調べ、これを抗 APP 抗体による神経細胞死に対する GEE の効果と比較した(第 7 図上と第 7 図下を参照)²⁹⁾。第 7 図上に示した馬血清、および、N2 supplement 下の GEE の 22C11 の誘導する細胞死を抑制する効果とは対照的に、血清存在下(第 7 図 C)、あるいは、N2 supplement 存在下(第 7 図 D)の両条件で、GEE は Aβ1-42 による毒性を弱めな



第7図 GEEのAβ1-42あるいは抗APP抗体による神経細胞死に対する効果。初代培養神経細胞を漸増する各濃度のAβ1-42で1mM GEE存在あるいは非存在下、hDMEM-HS (C)あるいはhDMEM-N2 (D)存在下に処理した。細胞死をトリパンブルー染色法にて処理後72時間で測定した。これと平行して初代培養神経細胞を1mMのGEEの存在下あるいは非存在下にて各々の濃度の22C11で処理し、72時間後に細胞死をトリパンブルー染色によって測定した。この実験もhDMEM-HS (A)あるいはhDMEM-N2 (B)の2条件で行った。(Sudo H et al: Biochem Biophys Res Commun 282: 548-56, 2001の第2図を許可を得て転載、一部改変)

かった。これらの結果は抗APP抗体はAβ1-42とは異なるメカニズム、あるいは、少なくともAβ1-42によるメカニズムに含まれない機構をその下流に含むことを示している。この結果は、抗APP抗体は分泌されたAβ1-42を介さず神経毒性を発揮するという考えに対するもう一つの有力な証拠を与えられられる。

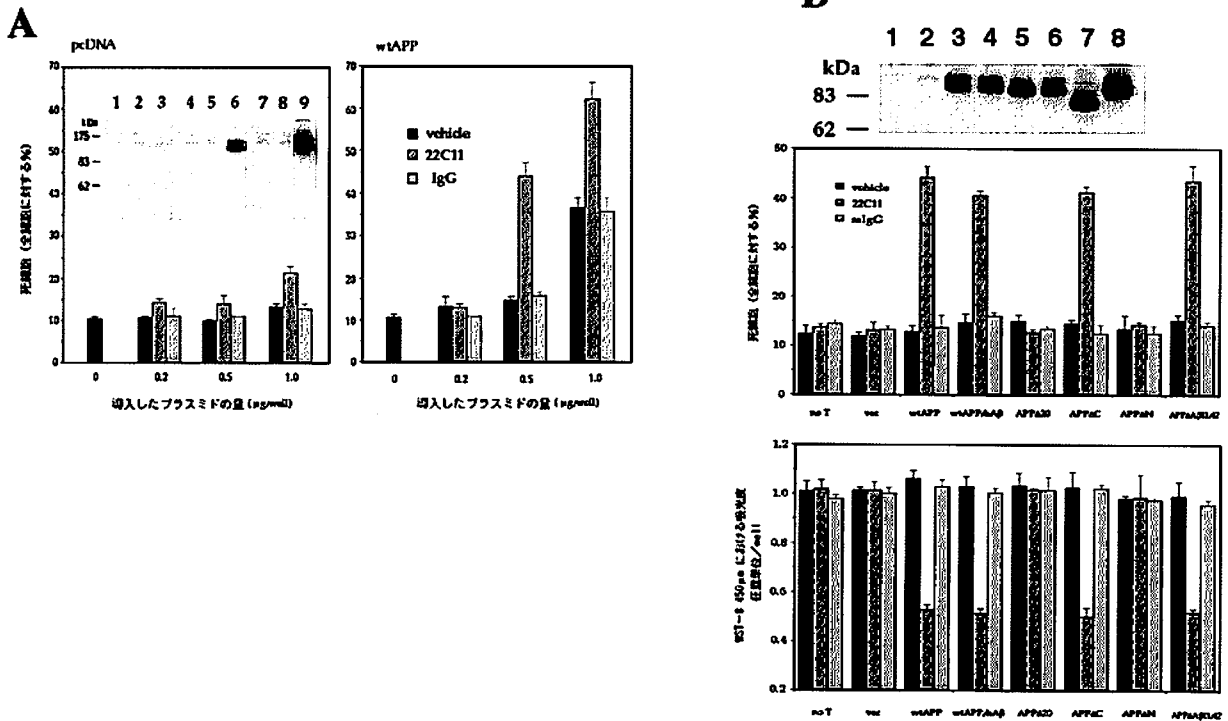
8. APP誘導性神経細胞死の責任を担うAPP領域はAβ42ドメインではなく、APPの細胞内ドメインである

抗APP抗体処理で細胞死が惹起されない不死化神経細胞株であるF11細胞に、一過性に野生型APP cDNAを導入した時、抗APP抗体は細胞死を誘導できるか、

もしそうならAPPのどのドメインが細胞死誘導に寄与しているのかを調べた。既に上に記載したように、F11細胞に野生型APPを安定的に発現した場合、F11細胞は抗APP抗体依存性の細胞死誘導能を獲得するため、野生型APPを一過性に発現しても抗APP抗体は細胞死を誘導できると予想される。

F11細胞に0.5 μg/mlの野生型APP cDNAを発現すると、22C11によって有意に細胞毒性が誘導された。この細胞死は、同じ条件で、非特異的IgGでは誘導されなかった(第8図A右パネル)²⁹⁾。野生型APP cDNAを0、あるいは、0.2 μg導入した時、あるいは、0.2、0.5 μgの空ベクター (pcDNA) だけを導入した時、22C11依存性の細胞死は誘導されなかった(第8図A)²⁹⁾。22C11依存性の細胞毒性は、細胞生存率測定法であるMTTアッセイの改良法であるWST-8アッセイで確認した。私の所属する研究室では、WST-8がもたらす細胞生存率はトリパンブルーによる細胞死率と高度に逆相関することを確立している。0.5 μgの野生型APP cDNAを細胞に導入すると、22C11による処理でWST-8細胞生存率に有意な減少を生じた(第8図B最下段パネル左から3番目のカラム)²⁹⁾。細胞生存率の低下は非特異的IgGでは観察されなかった。細胞死の結果に一致して、APPは0.5 μgの遺伝子導入の時は十分に発現していたが、0あるいは0.2 μgを遺伝子導入した時は全くあるいはほとんど発現していなかった(第8図A挿入図)²⁹⁾。これらの結果は、野生型APPを安定発現させたF11細胞には抗APP抗体は細胞死を誘導するが、もとのF11細胞では誘導しなかったという第2図の実験結果に合致し、ここで再び、APPが抗APP抗体の誘導する細胞死を介在する直接的な証拠を確認した。

1.0 μgの野生型APP cDNAを遺伝子導入し組み換え野生型APPが過剰発現した時、抗体が存在しなくても有意な細胞死を生じたことは特記に値する(0.5 μg野生型APPを遺伝子導入した時と比較して約20%の増加;第8図A右パネル)。同じ条件下でpcDNAを同様に遺伝子導入しても細胞死率は増加しなかった(第8図A左パネル)。したがって、野生型APPの過剰発現は、抗体を必要とせずに細胞毒性を発揮することになる。これと並んで、1 μgの野生型APP cDNAを遺伝子導入した時、抗体依存性の細胞死率は更に上昇した(0.5 μgの野生型APPを遺伝子導入した時と比較して約20%の増加)。既に別の研究で、この野生型APPの過剰発現による細胞毒性はAPPのC端ドメインMet677-Asn695 (Domain19)によることが明らかにされてい



第8図 一過性に野生型 APP 及び変異型 APP を導入した F11 神経系細胞に対する 22C11 の毒性。A：抗 APP 抗体毒性の遺伝子導入依存性。F11 神経系細胞に表示した量の pcDNA（左パネル）あるいは野生型 APP 全長（右パネル）を導入した。これらを PBS のみ（ビークル,黒棒）、2 μg/ml マウス IgG (IgG, 灰色棒)、2 μg/ml 22C11 (22C11, 斜線棒) によって処理した。抗体処理 48 時間後、細胞死測定をトリパンブルー染色にて行った。挿入図は 0.2 μg/ml DNA（レーン 1, 何もいれず；レーン 2, pcDNA；レーン 3, 野生型 APPcDNA）、0.5 μg/ml DNA（レーン 4, 何もいれず；レーン 5, pcDNA；レーン 6, 野生型 APPcDNA）あるいは 1 μg/ml DNA（レーン 7, 何もいれず；レーン 8, pcDNA；レーン 9, 野生型 APPcDNA）を F11 細胞に導入してその細胞懸濁液中の APP を 2.5 μg/ml 22C11 によって免疫プロットした結果である。左の数値は分子量を示している。B：さまざまな APP 組み換え変異体の抗 APP 抗体神経毒性を媒介する効果。F11 細胞に、遺伝子導入なし (no T)、0.5 μg の pcDNA (vec)、野生型 APP cDNA、各 APP 変異体 cDNA をそれぞれ遺伝子導入し、これらを PBS（ビークル、黒棒）、2 μg/ml マウス IgG (IgG, 灰色棒)、2 μg/ml 22C11 (22C11, 斜線棒) で処理した。細胞死を抗体処理後 48 時間でトリパンブルー染色法により測定した（中のパネル）。細胞生存率もまた抗体処理後 48 時間で WST-8 測定により測定した（下のパネル）。上のパネルは F11 細胞に 0.5 μg の pcDNA（レーン 2）、野生型 APP（レーン 3）、野生型 APP/hAβ（レーン 4）、APPΔ20（レーン 5）、APPΔC（レーン 6）、APPΔN（レーン 7）、APPΔAβ41/42（レーン 8）をそれぞれ遺伝子導入し、その細胞懸濁液（各レーン 20 μg）の中に含まれる APP を 2.5 μg/ml の 22C11 で免疫プロットした結果である。レーン 1 は増殖期にある F11 細胞のサンプルを示している。左の数値は分子量を示している。（Sudo H et al : Biochem Biophys Res Commun 282 : 548-56, 2001 の第 3 図を許可を得て転載、一部改変）

る³⁰⁾。

次に、抗体依存性の野生型 APP の毒性のみ観察される 0.5 μg cDNA 導入プロトコールを使って、抗体依存性に神経細胞死をおこす APP のドメインを調べた。（第 1 図および第 8 図 B 参照）F11 細胞に Aβ 領域である 41 番と 42 番残基を欠いた APP を導入し、(wtAPP ΔAβ41/42)、22C11 で処理すると、F11 細胞に野生型 APP を遺伝子導入し、22C11 で処理した時にみられた

のと同等の強さの細胞死が生じた。このことは、ヒト化 Aβドメインを持つマウス野生型 APP (wtAPP/hAβ) の場合も同様であった。マウスとヒトの APP695 の Aβ 領域は 3 残基が異なっている [各々、601 残基 (Aβ 第 5 残基) の Gly と Ala、606 残基 (Aβ 第 10 残基) の Phe と Tyr、609 残基 (Aβ 第 13 残基) の Arg と His]。今回の結果は野生型 APP、および、野生型 APP/hAβ とともに 22C11 依存性細胞毒性を同程度発揮することを

示している。対照的に、野生型 APP cDNA で細胞内ドメイン His657-Lys676 (ドメイン 20) を欠いたもの (wtAPP Δ 20) を細胞に導入すると、22C11 は細胞死を全く増強しなかった。これに対して、22C11 はドメイン 19 を欠いた野生型 APP (wtAPP Δ C) を導入した細胞に細胞死を誘導し、その強度は、野生型 APP を導入した細胞に 22C11 処理がもたらすのと同等であった。対照の IgG では、wtAPP Δ C を導入した細胞に細胞死を誘導できなかった。これらの結果は、ドメイン 20 が APP の抗体刺激による細胞毒性の責任領域であることを示しているが、この考えに合致して、野生型 APP の His657 以降の C 末端を欠いたもの (wtAPP Δ N) を導入した細胞において、やはり、22C11 は細胞死を誘導できなかった。導入された野生型 APP とその変異体は、F11 細胞に同程度発現していた (第 8 図 B 上パネル)²⁹⁾。これらの結果は、細胞死誘導の責任を担うドメインは A β 1-42 領域ではなく細胞内ドメインの特定の領域であることを示している。

考 察

私は、本研究で、抗 APP 抗体が細胞表面の APP に直接作用し神経細胞死を引き起こすことを示した。その知見は、神経細胞において膜貫通型の野生型 APP は分子レベルで細胞表面細胞死調節因子として、抗体依存性に受容体様機能を発揮することを意味している。これまでのところ野生型 APP の機能についての情報は極めて限られたものであった。APP は増殖と神経突起伸長に関わるかもしれないが (緒言参照)、その効果は可溶性 APP のものである。膜結合型 APP が選択的にシナプスに局在することは膜貫通型 APP が正常神経生理において何らかの機能を持つことを示唆している。Storey ら (1996) は、APP が、神経突起の活発に動く部分ではなく静的な神経細胞表面に存在することを報告している⁴¹⁾が、これは APP は比較的安定した機能を神経細胞表面で営んでいることを示唆している。これまで、複数のグループが、各々独立して APP が神経において細胞表面受容体様機能を担っていることを言及した。APP の受容体様機能について知見を見出したのは、私が所属する研究室のチームである³¹⁾。その後、同グループは、*in vitro* のリポソーム系を用いて、(i) 野生型 APP は、共に再構成された Go を、抗体依存性に活性化する機能を持つこと、(ii) Gi を APP と共に再構成した場合は Gi を活性化できないこと、(iii) 家族性アルツハイマー病の原因となる 3 種類の V642 変異体において (抗体

の必要なく) 恒常的に Go を活性化すること、を示した^{45,49)}。Russo ら (1998) は、同様な概念を見つけたが、それは、野生型 APP は核内転写因子を活性化する細胞質アダプターである Fe65 と相互作用し、家族性アルツハイマー病に関係した APP は Fe65 との相互作用が変化するというものであった⁵⁰⁾。Brouillet ら (1999) は、1993 年の Nishimoto らの発見 (APP は、His657-Lys676 を介して Go に結合し、Gi には結合しない)³¹⁾ を再確認すると共に、脳の細胞膜標本において、野生型 APP を 22C11 で処理すると G 蛋白の活性化状態が変化することを明らかにした⁴²⁾。これらの報告から明らかにされてきた知見を更に掘り下げて、本研究は、野生型 APP は神経細胞死を細胞外から調節する細胞膜表面分子としての機能を持つことを示している。F11 細胞における内因性 APP がこの機能を示せないことは存在量が足りなく細胞死が生じるほど細胞内メカニズムを活性化し続けることができないことに起因すると考えられた。

本研究で検出された野生型 APP の機能の生理的関連性は、現在のところ不明である。抗 APP 抗体が初代培養神経細胞においてその作用を持つことは、この APP の機能が何らかの生理的関連性を持つことを示唆するが、この機能を活性化する天然のリガンドが見つかるまでそのようには結論できない。最近、Torroja ら (1999) は、ショウジョウバエの APP ホモログである APPL がその細胞内ドメインの APP における Go 結合ドメインに相当する領域を介して細胞表面受容体様機能を持つことを明らかにした⁴⁶⁾。彼らはまた、APPL の細胞内ドメインの生理的機能を調節する天然のリガンドが存在していることも推定した。本研究は、APP もまた、天然のリガンドによって調節される生理機能を持つことを支持している。天然のリガンドの存在に関わる議論として、この APP の介在する細胞死誘導機構が、抗体特有のクロスリンキングによるものであるか否かを議論することもまた重要である。抗体による分子クロスリンキングは細胞表面 Fc 受容体 (FcR) について最もよく調べられてきた。FcR に IgG が結合しても FcR のクロスリンキングはほとんど生じないが、IgM か、あるいは、IgG 及び IgG の二次抗体 (IgM) の混合物によって FcR のクロスリンキングが最もよく誘導されることが示されてきた。従って、本研究では、22C11 (マウス IgG) の誘導する神経細胞死が、抗マウス IgG 抗体 (IgM) を加えた時に増強されるか否か、更に、4 分子のビオチンに結合する avidin を使ってクロスリンクした 22C11 の細胞死誘導作用が増強されるか否かを検討し、APP が抗体依存性に神経細胞死を誘導するには、IgG クラスの

抗 APP 抗体が APP に結合することで十分であることを明らかにした。抗 APP 抗体を Fab 断片化すると細胞死を起こす能力が消えるという結果とあわせると、これらの実験結果は、APP の抗体による刺激はおそらく 2 量体化を促進し、この状態の APP を更にクロスリンクしてもほとんど増強効果はないことを示唆している。したがって、この APP の機能は抗体だけがクロスリンクによって誘導できるような限定的なものではなく、EGF が EGF 受容体に誘導する⁵¹⁾ように APP を 2 量体化するようなりガンドが、活性化できる生理的な機能である可能性が高い。細胞死が抗体にはよらない APP の 2 量体化によって誘導できるか否かを調べることは魅力的であり、それは 2 量体化が誘導可能な分子と APP cDNA を融合した遺伝子を作成することで可能である。現在、私の研究室では、そのような検討が進行中である。

生理的関連性と同様にこの機能の病理的関連性、すなわち、アルツハイマー病との関連性もまた調べるに値する課題である。孤発性アルツハイマー病は APP のいかなる突然変異とも関係していないため、APP の突然変異以外のしかるべき原因が大多数の孤発性アルツハイマー病の根底にはあるに違いない。Aβ の産生がすべてのアルツハイマー病にみられることを考えると、APP をめぐる異常がすべてのアルツハイマー病に存在していることは確実である。したがって、野生型 APP を持つ個体に起きる孤発性アルツハイマー病での APP 異常は孤発性アルツハイマー病の中心的原因である可能性が高い。これまで、そのような APP 異常は結果として認められる Aβ の産生であり Aβ の沈着と考えられて来た。その最大の理由は、Aβ 産生が APP の唯一の機能と考えられて来たからである。しかし、本研究により、APP は Aβ を産生する以外の機能を持つことが見いだされた。孤発性アルツハイマー病の可能な原因の一つが、この機能における APP 刺激システムの異常である可能性は高い。野生型 APP が抗体依存性に誘導する出力は、家族性アルツハイマー病の原因となる APP 変異体の出力と同じであるからである。しかし、*in vivo* においてこれを支持する証拠はまだない。今後、マウスやサルの脳室内に抗 APP 抗体を投与して、*in vivo* で神経脱落や大脳萎縮が起こるか否かを検討することが重要である。抗 APP 抗体による神経細胞死は同期して発生すると考えられるため、脳炎様異常が起こると予想される。

本研究は、APP の抗体依存性細胞死誘導機構を詳しく検討するものではないが、特異抗体の結合した APP による細胞死は PTX によって阻害され、不活化された PTX では阻害されず、Ac-DEVD-CHO で阻害されるが、

細胞不透過性 DEVD では阻害されず、細胞透過性抗酸化剤 GEE により抑制されることを明らかにしている。これらのデータは、抗体によって引き起こされる野生型 APP による細胞死は、PTX 感受性 G 蛋白質と活性酸素種が介在して、DEVD 感受性カスパーゼ、すなわちアポトーシスを実行するシステインプロテアーゼが遂行する細胞死であることを示している。このことは、家族性アルツハイマー病変異体の APP や PS2 が誘導する細胞死が PTX 感受性 G 蛋白質を介したアポトーシスであるという報告^{5,6,30)}によく一致している。したがって、APP の抗体依存性細胞死誘導機能を介在する PTX 感受性 G 蛋白質は 3 種類の Gi と 1 種類の Go の内のいずれであるか、PTX 感受性 G 蛋白質が如何にしてカスパーゼを調節するか、そして活性化されるカスパーゼのアイソフォームは何かなどを明らかにすることは重要である。その後の私の所属する研究室における研究により、APP の抗体依存性細胞死誘導機構として、まず Go 蛋白質を介すること⁵²⁾、単量体型 G 蛋白質である Cdc42, Rac, MAP キナーゼキナーゼキナーゼの一つである Ask-1, 広義 MAP キナーゼの一つ c-Jun N 端キナーゼ, NADPH オキシダーゼ, カスパーゼ 9 および 3 の活性化を介していること (投稿中) が明らかにされた。一方、Mbebi (2002) らによる研究⁵³⁾においては、APP の抗体依存性細胞死誘導機構はカルモジュリン、カルバインの活性化、カルモジュリン依存性キナーゼ-IV および転写因子である CREB のダウンレギュレーションを介するとされている。

また野生型 APP を発現すると神経生存に正あるいは負いずれに影響するかは論争されている段階であることは附記しておくべきであろう。Perez (1997) らは野生型の神経細胞は APP を欠いた神経細胞よりも細胞死に抵抗性であることを観察した²⁰⁾。Xu ら (1999) は、野生型 APP の発現は神経細胞株 B103 の P53 による細胞死に対して防御効果があること、家族性アルツハイマー病 APP 変異体にはこの作用がないことを報告した⁵⁴⁾。一方、本研究以外に、野生型 APP の発現は、非刺激状態でアポトーシスを増加させることがいくつかのグループから報告されている。Nishimura ら (1998)⁵⁵⁾ および、Bursztajn ら (1998)⁵⁶⁾ はそれぞれ独自に野生型 APP をウイルスによる過剰発現すると初代培養神経細胞に変性を生じることを報告した。また Wolozin ら (1996)⁹⁾ および、Zhao ら (1997)⁴⁾ は、野生型 APP の安定的過剰発現は PC12 細胞の血清除去によるアポトーシスの促進を、程度は小さいものの、有意に増強することを観察した。したがってまた、本研究が明らかにした

抗体の結合した野生型 APP によって誘導される細胞死を、抗体の結合していない野生型 APP が恒常的に持っている機能と区別することは必要であろう。

抗 APP 抗体が、初代培養神経細胞において細胞死を起こすという研究は他にもある (Rohn ら, 2000; Mbebi ら, 2002)。Rohn らの研究⁴⁷⁾は、私の研究とは独立に行われ、Mbebi らの研究⁶⁰⁾は私の研究に基づいて行われている。Rohn らの研究と私の研究の比較では次のことが重要である。(i) Rohn らの研究では、APP にも APLP2 にも親和性のある抗 APP 抗体が使われたため、抗 APP 抗体は APP を介して細胞死を誘導しているのか APLP2 を介しているのか不明である。私の研究では、APP を認識し APLP2 を認識しないことの確立した抗体が使われているので、抗 APP 抗体は APP を介して細胞死を誘導していることが証明されている。後に、Mbebi らの研究で、ノックアウトマウス由来の神経細胞を使って、抗体は、APP を介しても APLP2 を介しても細胞死を誘導できることが明らかにされた。(ii) 私の研究では、抗体の作用は細胞表面の APP によって伝達され、可溶性 APP を介するものではないことが証明されているが、Rohn らの研究では、標的となる APP について不明のままとされている。(iii) Rohn らの研究では、APP のクロスリンキングが細胞死を引き起こす可能性に言及するのみで、細胞死誘導機能が抗体による APP のクロスリンキングに限定される可能性が高いか否かの検討はなされていない。既に議論したように、私の研究では、APP の 2 量体化が本質的であり、抗体によるクロスリンキングは APP の 2 量体化以上の効果をもたらしてはいないと考えられる。(iv) Rohn らの研究は、しかしながら、本研究には欠けている価値ある情報を与えている。彼等は、22C11 は、神経細胞死以外に、神経突起の特定の領域に限定して局在化した神経突起変性をもたらすことを見出した。これは APP の神経障害性シグナルの少なくとも一つは核を通過しないということを示唆している。彼等はまた、APP のシグナルに対して PTX が阻害効果を持つことを未発表データとして記載している。APP による神経突起退縮に PTX が阻害効果を持つことは大変興味深い。成長円錐には特に Go が多く存在している。また、神経突起伸長時にグアニンヌクレオチドによって Go を活性化する、あるいは Go を過剰発現すると、突起伸長が促進されることが報告されている⁵⁷⁾。更に、軸索修復過程には GAP-43 が重要であり、これは成長円錐に局在し、Go を活性化する⁵⁸⁾。逆に、軸索ガイダンスにおいて、成長円錐が反発因子であるコラプシン I や NI35 と出会うと

コラプスする現象が知られているが、このようなコラプスする現象も PTX によって阻害されるとする報告^{59, 60)}がある。つまり成長円錐、あるいは、その分化したプレシナプスには、神経突起の伸長と退縮、あるいは、軸索ガイダンス、シナプスの発芽と退縮を制御する Go の介在する機構が存在し、抗体の結合した APP がその機構を制御しうる可能性が考えられる。ネトリン-DCC 系の機能欠損マウスで脳梁欠損がみられたように、神経発生における成長円錐機能の重要性を考えれば、このことは、マウス strain にもよるが、APP ノックアウトマウスの形質の一つが脳梁の欠損であることに関係しているのではないかと考えられ、極めて興味深い。(v) 私の研究では、抗体の結合した APP は $A\beta$ の分泌を介して神経細胞死を誘導するのではないことを明らかにしたが、Rohn らや、Mbebi らの研究では検討されていない。抗 APP 抗体による処理にひき続き 70% 以上の神経細胞が死んだ時、分泌されていた $A\beta_{42}$ はせいぜい 100 nM であり、しかるに、 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-43}$ はいずれも 3 μ M 未満の濃度では細胞死を誘導しない。事実、wtAPP/h $A\beta$ を遺伝子導入した F11 細胞の培地中のヒト $A\beta_{42}$ は非刺激では 4.7 ± 1.5 pM (3 回の独立した実験における平均値 \pm 標準偏差) であり、2 μ g/ml の 22C11 刺激下では 9.6 ± 0.7 pM であった。加えて、細胞膜透過性抗酸化剤である GEE は、抗 APP 抗体による神経細胞死を抑制するが、 $A\beta_{1-42}$ による細胞死は抑制しないという結果は、APP 誘導性細胞死を $A\beta$ が介在しないことの証拠の一つであるが、GEE が $A\beta$ の誘導する神経細胞死を抑制できないということは Lockhart ら⁶¹⁾により報告されている。

本研究が、Rohn らの研究、あるいは、Mbebi らの研究に対して、優れているその他の点は、本研究では組み換え APP 導入を使った実験により、抗体依存性細胞死誘導機能の責任ドメインを同定している点である。すなわち、抗 APP 抗体の毒性を APP が伝達するには $A\beta$ 領域の第 41 残基と第 42 残基は必要ではない、必要なのは細胞内のドメイン 20 と呼ばれる His657-Lys676 領域であり、更に C 端のドメイン 19 (Met677-Asn695) も必要ではない。最近、野生型 APP の最 C 端の 31 残基のドメイン、C31 と呼ばれる部分が、神経毒性を持つということが報告⁶²⁾されているが、抗体が結合した APP は神経毒性を生じるのに C31 ドメインを使ってはいないようである。なぜならば、C31 の約 2/3 が (19 残基/31 残基) がこの機能に関しては必要ではないからである。これらの結果は以下のことを示したこれまでの複数の研究室による研究に矛盾しない。(i) 野生型

APPはドメイン20を介してPTX感受性G蛋白質Goと相互作用する³⁰。(ii)野生型APPがドメイン20を介してGoを活性化するには抗APP抗体処理が必要である⁴⁹が、家族性アルツハイマー病原因遺伝子であるV642I/F/G-APPはドメイン20を介してGoを恒常的に活性化する能力がある⁴⁹。(iii)APPのV642I変異体はドメイン20を介しPTX感受性の神経細胞死を起こす^{30,63}。(iv)最近、Passerらは、C31ではなくAβ領域以降のAPP細胞内ドメイン(AID)が細胞毒性を持つと報告した⁶⁴。また、最近、細胞内に蓄積したAβ凝集体が神経細胞死を惹起しているのではないかという研究がいくつか報告された。LaFerlaら²⁹は、細胞内にAβ1-42を過剰発現したトランスジェニックマウスにおいて顕著な神経細胞死を生じたと報告した。Chuiら²⁰は家族性アルツハイマー病原因遺伝子であるPS1変異体を過剰に発現したトランスジェニックマウスにおいてAβの細胞外沈着ではなく、むしろ細胞内に蓄積したAβ42ペプチドに相関して細胞死が生じることを示した。細胞内Aβによる介在は魅力ある考えであるが、しかしながら、本研究にてwtAPPΔAβ41/42から得られたデータは、明らかにAβ1-42領域は、抗体依存性にAPPが誘導する細胞死には必要ではなく、したがって、更に細胞内Aβ42蓄積もまた介在していないであろうことも示唆している。

このように、本研究が、野生型APPはAβに起因しない神経細胞毒性機能を持つことを示したことは極めて重要である。Aβペプチド、その中でも特に長いAβ42がアルツハイマー病の病因に関係していることは以前から示唆されてきた。実際、Aβ42の沈着はアルツハイマー病で最も早期から観察される異常である²¹。したがって、Aβ1-42を含むAβペプチドが*in vitro*で神経細胞を殺すこと^{22,23}や、細胞のAβ42分泌が家族性アルツハイマー病の原因遺伝子であるAPP、PS1、PS2の変異体を細胞に発現すると細胞のAβ分泌が増加するということが確立されてきた⁶⁵。それにもかかわらず、Aβ沈着がアルツハイマー病大脳でおきている神経細胞死の真の原因であるかどうかはいまだに決定されていない。細胞外のAβ沈着を過剰に産生するトランスジェニックマウスの研究は、Aβ沈着は神経シナプス数を減少させるが、神経細胞脱落を誘導しないことを示した^{26,27}。本研究の提示する知見においては、抗APP抗体による神経細胞死の機序に関し、抗APP抗体が作用した神経細胞から分泌されたAβの神経細胞死活性については完全には否定できないが、本研究において観察された細胞死においては限られた役割しか持っていない。

また、抗APP抗体による細胞死が神経細胞に特異的に惹起されるのか、あるいはグリア細胞にも惹起されるかという命題は極めて重要である。初代培養アストロサイトについてはtotalのAPP発現量がF11細胞と同程度(未発表データ)なので、細胞表面のAPPも極めて少ないのではないかと考えられるが、厳密には初代培養神経細胞、初代培養アストロサイトに対して(および後述のBu695細胞に対しても)細胞表面APPをビオチン標識抗APP抗体によって染色し、cell sorterによって細胞表面APPを発現する細胞の割合を決定するflow cytometric assayが必要である。しかしながら、totalの免疫プロットによるAPP発現量はF11細胞と同程度なので、おそらく初代培養アストロサイトにおいて細胞死が起こらなかったことの主因は、細胞表面APPの発現量が、F11/APP細胞や初代培養神経細胞に比較して極めて少なかったためであると考えられる。次はBu695細胞の所見である。Bu695細胞は既に記述したがGFAP陽性anaplastic astrocytoma由来細胞株にAPPを安定発現した細胞である。[Bu695細胞そのもののグリア細胞マーカーについてはわかっていない。またBu695細胞におけるGo蛋白質の発現量はF11細胞と同程度である。(未発表データ)]F11/APP細胞や初代培養神経細胞と総APP量、細胞表面APP量が同じグリア系細胞であるBu695細胞において、抗APP抗体が細胞死を誘導しなかったという結果に基づけば、グリア系細胞にはAPPが引き金となるアポトーシスを伝達する細胞内プログラムが働いていないか、あるいは、そのような細胞内プログラムは存在するが、さらにこの細胞内プログラムを抑制するグリア系細胞特有の分子機構が存在している、などの可能性が考えられる。またBu695細胞でのみ細胞死が起きない現象は、Bu695細胞特異的な現象であることは厳密には否定できない。神経細胞の特異性についてはさらに今後の詳細な検討が必要であろう。

抗APP抗体による細胞死の機序において、エンドサイトーシスとラフトの関与について検討することは重要な課題である。抗体が細胞膜表面に存在する蛋白質に細胞外から結合するとラフトへ移行しやすいことが報告されている⁶⁶。本研究において、抗体の標的となっているAPPがラフト内に存在するのか、あるいはラフト外に存在するのか、あるいはラフト外に存在するAPPが抗体結合後ラフト内に移行するのかは不明である。また膜表面抗原は抗体結合後、急速にエンドサイトーシスされることも知られている⁶⁶。したがって、抗体を結合したAPPが細胞死シグナルを出力する部位は細胞内かもし

れない。

神経細胞のどのような機能的分画が抗 APP 抗体による細胞死に関して感受性を持っているかという検討もまた重要である。本研究ではこれを直接検討してはいない。しかし、私の使用した初代培養神経細胞は各種の機能を持つ神経細胞を含むので、おそらくはほぼ全ての細胞が死滅する結果とあわせて考えると、機能の差は、抗体に対する感受性に関与しないのではないかと考えられる。

総括

以上、本研究により以下のことが結論される。(1) 抗 APP 抗体は、神経細胞、および APP を発現した神経細胞株に細胞死を誘導する。(2) 抗 APP 抗体は APP の細胞外ドメインに結合することにより細胞死を誘導する。(3) 標的となる APP は、培養液中の可溶性 APP ではなく細胞表面の APP である。(4) 抗 APP 抗体が誘導する細胞死は、神経細胞特異的である可能性が考えられ、たとえ同程度の APP が発現していてもグリア系細胞では誘導されない可能性が高い。(5) 抗 APP 抗体が誘導する細胞死は、典型的なアポトーシスである。(6) 抗 APP 抗体が誘導する細胞死は、APP の二量体化、あるいは、多量体化によると考えられ、抗体特有のクロスリンクに限定されるものではない。(7) $A\beta$ は、APP が抗体依存性に誘導する細胞死を介さない。(8) 前項に一致して、APP が抗体依存性に誘導する細胞死の責任を担う APP のドメインは $A\beta$ 1-42 領域ではなく細胞内の His657-Lys676 領域である。(9) 細胞死誘導責任領域として同定された His657-Lys676 領域を介して APP は Go と相互作用するというこれまでの複数の報告に一致して、抗 APP 抗体が誘導する細胞死は百日咳毒素で抑制される。

APP が抗体依存性に細胞死を誘導する分子機構が、神経細胞特異的な可能性が大きい点、抗体特有のクロスリンクに限定されるものではないと考えられる点、 $A\beta$ が介さない点、その代わりに、細胞内の生理的シグナル伝達機構を使っている点などは、すべて、生理的な天然の APP リガンドが存在し、このリガンドの受容体として APP が生理的な機能を発揮している可能性が高いことを示している。更に、APP の家族性アルツハイマー病変異体と同じ出力を、APP が抗体依存性に惹起できることは、ここに見いだされた APP 機能の異常としてアルツハイマー病の病態が発生しうることを示唆するものである。本研究で見いだされた APP の機能がアルツハイマー病と関係している直接の証拠はまだ見つかって

いない。しかし、これまで、 $A\beta$ 以外には、変異のない APP とアルツハイマー病の病態とを直結する分子機構は知られていなかった。変異のない APP の機能を初めて明らかにした本研究の持つ意義は極めて大きいと考えられる。本研究で見いだされた APP の新規機能の生理的関連性及び病理的関連性を明らかにすることは、正常、あるいは、アルツハイマー病という病理的状態における神経細胞の機能を理解するのに新しい道を開くと期待される。

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部薬理学教室西本征央教授、松岡正明助教授に、深甚なる謝意を表します。また御尽力頂きました薬理学教室員の方々に深謝致します。

文献

- 1) Kang J, Lemaire HG, Unterback A, Salbaum JM, Masters CL, Grezeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B: The precursor of Alzheimer disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736, 1987
- 2) SandBrink R, Masters CL, Beyreuther K: β A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem* 269: 1510-1517, 1994
- 3) Hardy J: Framing β -amyloid. *Nat Genet* 1: 233-234, 1992
- 4) Karlinsky H, Vaula G, Haines JL, Ridgley J, Bergeron C, Mortilla M, Tupler RG, Percy ME, Robitaille Y, Noldy NE, et al: Familial Alzheimer's disease and a missense mutation in codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Neurology* 42: 1445-1453, 1992
- 5) Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, Fukumoto H, Iwatsubo T, Suzuki N, Odaka A, Ireland S, Kinane TB, Nishimoto I: G-protein-mediated neuronal DNA fragmentation by familial Alzheimer's disease-associated V642 mutants of APP. *Science* 272: 1349-1352, 1996
- 6) Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B, Kusiak J W, Wasco W, D'Adamio L: Participation of presenilin2 in apoptosis: Enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274: 1710-1713, 1996
- 7) Zhao B, Chrest FJ, Horton Jr WE, Sisodia SS, Kusiak JW: Expression of mutant amyloid precursor proteins induces apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 47: 253-263, 1997
- 8) Luo JJ, Wallace W, Riccioni T, Ingram DK, Roth GS, Kusiak JW: Death of PC12 cells and hippocampal

- neurons induced by adenoviral-mediated FAD human amyloid precursor protein gene expression. *J Neurosci Res* 55 : 629-642, 1999
- 9) Giambarella U, Yamatshuji T, Matsui T, Ikezu T, Murayama Y, Levine MA, Katz A, Gautam N, Nishimoto I : G protein βγ complex-mediated apoptosis by familial Alzheimer's disease mutant of APP. *EMBO J* 16 : 4897-4907, 1997
 - 10) Schubert W, Prior R, Weidemann A, Dirckesen H, Multhaup G, Masters CL, Beyreuther K : Localization of Alzheimer βA4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res* 563 : 184-194, 1991
 - 11) Milward EA, Papadopoulos R, Fuller SJ, Moir RD, Small D, Beyreuther K, Masters CL : The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 9 : 129-137, 1992
 - 12) Mattson MP, Cheng B, Culwall AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE : β-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16 : 409-414, 1993
 - 13) Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL : A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* 14 : 2117-2127, 1994
 - 14) Muller U, Cristina N, Li Z-W, Wolfer DP, Lipp H-P, Rulicke T, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C : Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β-amyloid precursor protein gene. *Cell* 79 : 755-765, 1994
 - 15) Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJS, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce SHY, Van Der Ploeg LHT : β-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81 : 525-531, 1995
 - 16) Von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, Van Der Ploeg LH, Price LH, Price DL, Sisodia SS : Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18 : 661-669, 1997
 - 17) Qiu WQ, Ferreira A, Miller C, Koo EH, Selkoe DJ : Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci* 15 : 2157-2167, 1995
 - 18) Coulson EJ, Barrett GL, Storey E, Bartlett PF, Beyreuther K, Masters CL : Down-regulation of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease by antisense oligonucleotides reduces neuronal adhesion to specific substrata. *Brain Res* 770 : 72-80, 1997
 - 19) Gillian AM, Mcfarlane I, Lucy FM, Overly C, McConlogue L, Breen KC : Individual isoforms of the amyloid beta precursor protein demonstrate differential adhesive potentials to constituents of the extracellular matrix. *J Neurosci Res* 49 : 154-160, 1997
 - 20) Perez RG, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Koo EH : The β-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci* 17 : 9407-9414, 1997
 - 21) Iwatsubo T, Okada A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y : Visualization of Aβ₄₂(43) and Aβ₄₀ in senile plaques with end-specific Aβ monoclonals : Evidence that an initially deposited species is Aβ₄₂(43). *Neuron* 13 : 45-53, 1994
 - 22) Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW : Apoptosis is induced by β-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 7951-7955, 1993
 - 23) Gschwind M, Huber G : Apoptotic cell death induced by β-amyloid 1-42 peptide is cell type dependent. *J Neurochem* 65 : 292-300, 1995
 - 24) LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschild CC, Jay G : The Alzheimer's Aβ peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9 : 21-29, 1995
 - 25) Moechars D, Lorent K, De Strooper B, Dewachter I, Van Leuven F : Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the α-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J* 15 : 1265-1274, 1996
 - 26) Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Shenk D, Games D, Hyma BT : Aβ deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 17 : 7053-7059, 1997
 - 27) Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyaman BT : APPsw transgenic mice develop age-related Aβ deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56 : 965-973, 1997
 - 28) Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, et al : Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med* 5 : 560-564, 1999
 - 29) Sudo H, Hashimoto Y, Niikura T, Zongjun shao, Yasukawa T, Ito Y, Yamada M, Hata M, Hiraki T, Kawasumi M, et al : Secreted Aβ does not mediate neurotoxicity by antibody-stimulated amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 282 : 548-556, 2001
 - 30) Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Nishimoto I : Multi-

- ple mechanisms underlie neurotoxicity by different types of Alzheimer's disease mutations of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 275 : 34541-34551, 2000
- 31) Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Okamoto T, Murayama Y, Ogata E : Alzheimer amyloid protein precursor forms a complex with brain GTP binding protein. *Nature* 362 : 75-79, 1993
 - 32) Hashimoto Y, Jiang H, Niikura T, Ito Y, Hagiwara A, Umezawa K, Abe Y, Murayama Y, Nishimoto I : Neuronal apoptosis by apolipoprotein E4 through low-density lipoprotein receptor-related protein and heterotrimeric GTPases. *J Neurosci* 20 : 8401-8409, 2000
 - 33) Sudo H, Jiang H, Yasukawa T, Hashimoto Y, Niikura T, Kawasumi M, Matsuda S, Takeuchi Y, Aiso S, Matsuoka M, et al : Antibody-regulated neurotoxic function of cell-surface β -amyloid precursor protein. *Mol Cell Neurosci* 16 : 708-723, 2000
 - 34) Platika D, Boulos MH, Baizer L, Fishman MC : Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 : 3499-3503, 1985
 - 35) Clarris HJ, Key B, Beyreuther K, Masters CL, Small DH : Expression of the amyloid protein precursor Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Brain Res Dev Brain Res* 88 : 87-95, 1995
 - 36) Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T : Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid β /A4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 7450-7454, 1994
 - 37) Jin LW, Ninomiya H, Roch JM, Schubert D, Masliah E, Otero DA, Saitoh T : Peptides containing the RERMS sequence of amyloid β /A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J Neurosci* 14 : 5461-5470, 1994
 - 38) Hayashi Y, Kashiwagi K, Yoshikawa K : Protease inhibitors generate cytotoxic fragments from Alzheimer amyloid protein precursor in cDNA transfected glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 187 : 1249-1255, 1992
 - 39) Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 : 555-556, 1980
 - 40) Jung SS, Nalbantoglu J, Cashman NR : Alzheimer's β -amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex-vivo brain cells : A flow cytometric study. *J Neurosci Res* 46 : 336-348, 1996
 - 41) Storey E, Spurck T, Pickett-Heaps J, Beyreuther K, Masters CL : The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites. *Brain Res* 735 : 59-66, 1996
 - 42) Brouillet E, Trembleau A, Galanaud D, Volovitch M, Bouillot C, Valenza C, Prochiantz A, Allinquant B : The amyloid precursor protein interacts with G α heterotrimeric protein within a cell compartment specialized in signal transduction. *J Neurosci* 19 : 1717-1727, 1999
 - 43) Teti G, Misefari A, Venza-Teti D, La Via M F : Redistribution of mouse spleen cell Fc receptors following treatment with mouse or human aggregated immunoglobulin G. *J Reticuloendothel Soc* 33 : 287-292, 1983
 - 44) Aida Y, Onoue K : Triggering of the superoxide generation of macrophages by crosslinking of Fc gamma receptor. *J Biochem* 95 : 1067-1072, 1984
 - 45) Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, Nishimoto I : Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J Biol Chem* 270 : 4205-4208, 1995
 - 46) Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V : The drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19 : 7793-7803, 1999
 - 47) Rohn TT, Ivins KJ, Bhar BA, Cotman CW, Cribbs DH : A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis. *J Neurochem* 74 : 2331-2342, 2000
 - 48) Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS : Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F \times DP, in β -amyloid-induced neuronal death. *J Biol Chem* 274 : 19011-19016, 1999
 - 49) Okamoto T, Takeda S, Giambarella U, Matsuura Y, Katada T, Nishimoto I : Intrinsic G-coupling function of amyloid precursor protein as a novel target of V642 mutations linked to familial Alzheimer disease. *EMBO J* 15 : 3769-3777, 1996
 - 50) Russo T, Faraonio R, Minopoli G, De Candia P, Derenzis S, Zambrano N : Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *FEBS Lett* 434 : 1-7, 1998
 - 51) Lemmon MA, Schlessinger J : Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* 19 : 459-463, 1994
 - 52) Hashimoto Y, Tsuji O, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kawasumi M, Chiba T, Kanekura K, Yamada M, Tsukamoto E, et al : Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. *J Neurochem* 84 : 1-14, 2003
 - 53) Mbebi C, See V, Mercken L, Pradier L, Muller U, Loeffler JP : Amyloid precursor protein family-induced neuronal death is mediated by impairment of the neuroprotective calcium/calmodulin protein kinase IV dependent signaling pathway. *J Biol Chem*

- 277 : 20979-20990, 2002
- 54) Xu X, Yang D, Wyss-Coray T, Yan J, Gan L, Sun Y, Mucke L : Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 7547-7552, 1999
- 55) Nishimura I, Uetsuki T, Dani SU, Ohsawa Y, Saito I, Okamura H, Uchiyama Y, Yoshikawa K : Degeneration *in vivo* of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer amyloid precursor protein overexpressed by adenovirus-mediated gene transfer. *J Neurosci* 18 : 2387-2398, 1998
- 56) Bursztajn S, Desouza R, McPhee D, L Berman SA, Shioi J, Robakis NK, Neve RL : Overexpression in neurons of human presenilin-1 or a presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant does not enhance apoptosis. *J Neurosci* 18 : 9790-9799, 1998
- 57) Xie R, Li L, Goshima Y, Strittmatter SM : An activated mutant of α subunit of Go increases neurite outgrowth via protein kinaseC. *Dev Brain Res* 87 : 77-86, 1995
- 58) Strittmatter SM, Igarashi M, Fishman MC : GAP-43 amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth. *J Neurosci* 14 : 5503-5513, 1994
- 59) Goshima Y, Nakamura F, Strittmatter P, Strittmatter SM : Collapsin induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 376 : 509-514, 1995
- 60) Igarashi M, Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC : Mediation by G proteins of signals that cause collapse of growth cones. *Science* 259 : 77-79, 1993
- 61) Lockhart BP, Benicourt C, Junien JL, Privat AJ : Inhibitors of free radical formation fail to attenuate direct-amyloid25-35 peptide-mediated neurotoxicity in rat hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 39 : 494-505, 1994
- 62) Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, Salvesen GS, Koo EH, Bredesen DE : A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid β -protein precursor. *Nat Med* 6 : 397-404, 2000
- 63) Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Tanaka N, Nishimoto I : Expression of V642 APP mutant causes cellular apoptosis as Alzheimer trait-linked phenotype. *EMBO J* 15 : 498-509, 1996
- 64) Passer B, Pellegrini L, Russo C, Siegel RM, Lenardo MJ, Schettini G, Bachmann M, Tabaton M, D'Adamo L : Generation of an apoptotic intracellular peptide by γ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid β precursor protein. *J Alzheimer's Dis* 2 : 289-301, 2000
- 65) St. George-Hyslop PH : Molecular genetics of Alzheimer disease. *Semin Neurol* 19 : 371-383, 1999
- 66) Verkade P, Harder T, Lafont F, Simons K : Induction of caveolae in the apical plasma membrane of Madin-Darby Canine Kidney cells. *J Cell Biol* 148 : 727-739, 1999

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

きし かわ ひろし
岸 川 浩

(平成 14 年 11 月 11 日受付)

Key Word : transmural pressure, IL-6, intestinal epithelial cell

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。臨床的に腸管内圧を測定した報告では、過敏性腸症候群患者の空腸において腸管内圧は一過性ではあるが 50 mmHg を越える場合があることが知られているが、これら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¹⁾。腸上皮細胞にかかる圧力はズリ応力、壁張力、経壁圧の 3 つが考えられる。生体の腸管においては管腔内圧の上昇は壁張力の上昇も伴うため純粋な経壁圧のみを検討することは困難である。そこで我々は、これまでに小腸培養細胞上皮に純粋な静水圧を負荷するというモデルを用いて、*in vitro* で圧力負荷が小腸上皮細胞において 80 mmHg をピークとする細胞増殖能と DNA 合成能の亢進を示し、IL-2 の投与により更に細胞増殖の増加が認められること、この細胞増殖の細胞内シグナル伝達機構に PKC, PLC, チロシンキナーゼが関与していること、またさらに細胞増殖の際に MAP kinase を介して早期発現遺伝子である c-fos, c-myc の発現や転写因子 AP-1 の活性化を生じていることなどを報告してきた^{2,3)}。近年、機械的刺激により様々な増殖因子や炎症性サイトカインの産生が増加することが骨芽細胞、血管内皮細胞、心筋細胞などで報告されている⁴⁻⁶⁾。特に IL-6 についても動脈の血管内皮細胞においてズリ応力が IL-6 の産生を増加させるとの報告や、骨関節炎における軟骨細胞がズリ応力によって IL-6 の産生を転写レベルから有意に増加させるとの報告もあり、様々な臓

器において力学的な因子によりその放出が増加し炎症反応を修飾している可能性が示唆されている^{7,8)}。今回、著者が検討した IL-6 は炎症性サイトカインの 1 つであり当初 B 細胞刺激因子として同定され^{9,10)}、肝細胞における急性相蛋白の誘導、T 細胞の分化、造血器幹細胞の活性化などの様々な生物学的作用が知られている。また、近年、腸管においても粘膜防御機構に密接に関与しているとの報告がなされるようになり注目されている。腸管の培養細胞を用いた実験系でサルモネラ菌、TGF- β 、IL-1 β 、コレラ毒素により腸上皮細胞からの IL-6 放出が増加することが報告されており、腸管局所において腸上皮細胞が IL-6 の産生を担う重要な器官であることを示唆している¹¹⁻¹⁵⁾。また IL-6 が腸管粘膜免疫の主要な反応の場であるパイエル板からの IgA 産生に密接に関与すると報告もある¹³⁾。*In vivo* の実験系においても、絞扼性イレウスモデルを用いた検討で腸管局所の静脈血内における IL-6 濃度が上昇することが報告されており、腸管内圧上昇などの機械的刺激に反応して IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が腸管局所で増加することが示唆されている¹⁶⁾。特にこれら腸管内圧の上昇を伴う病態では粘膜上皮に損傷が生じ細菌が腸管粘膜を介して直接侵入する bacterial translocation を誘発することが知られており、小腸の閉塞や虚血再還流時における腸管局所での炎症性サイトカイン、特に IL-6 が粘膜防御機構を通じて重要な役割を担う可能性も報告されている^{17,18)}。しかし、イレウスなどの病態により惹起される

本論文は Kishikawa H, Miura S, Yoshida H, Hirokawa M, Nakamizo H, Higuchi H, Adachi M, Nakatsumi RC, Suzuki H, Saito H, Ishii H. Transmural pressure induces IL-6 secretion by intestinal epithelial cells. Clin Exp Immunol 129 : 86-91, 2002 の一部を含む。

腸管内圧の上昇が、腸上皮細胞レベルにおける炎症性サイトカイン、特にIL-6の放出にどのような影響を及ぼすのかについてこれまで全く報告されていない。

一方、IL-6発現に関与する転写因子として nuclear factor-kappa B (NF-κB), nuclear factor-interleukin-6 (NF-IL6) がこれまでに同定されている¹⁹⁻²¹⁾。外界からの刺激によりまずI-kappaBがリン酸化され、これによりNF-κBの標的遺伝子への結合が生じ他の転写因子とともに遺伝子を活性化するといわれているが、腸上皮細胞に対する物理的圧力荷荷がこれらの転写因子にいかなる変化を及ぼすかを検討した報告はみられない。

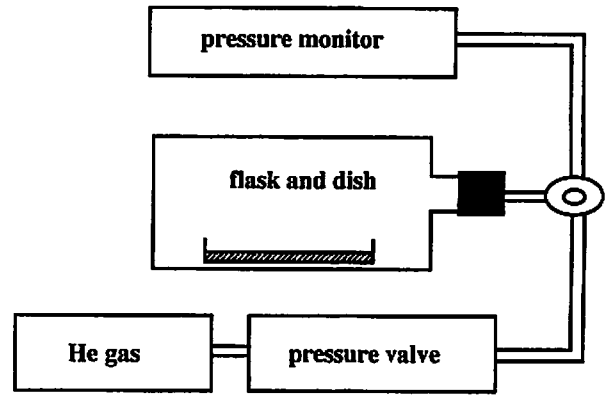
今回、著者は1) transmural pressureが腸上皮細胞に対しIL-6の産生にいかなる影響を与えるか、及び2) 圧力荷荷に伴い転写因子であるNF-κB, NF-IL6がいかなる動態を示しIL-6産生に影響を与えるかを *in vitro* の実験系において検討したので報告する。

材料と方法

1. 細胞培養および圧力荷荷装置

ラット回腸上皮細胞の IEC-18 細胞を American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から購入した。5% CO₂ の環境下で 5% fetal calf serum (FCS) 添加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地にて培養した。この細胞はラット胎児の回腸から樹立された細胞で、核型は正常で極性を保っており non transform の小腸モデルとして広く使われている細胞である。subconfluent の状態で Hishikawa²²⁾ らの報告にいくつかの改良を加えて作成した圧力荷荷装置を用いて圧力を荷荷した。密閉した特殊フラスコにヘリウムガスを注入し、培養細胞に各種圧力をかけた。圧力を荷荷する装置はフラスコをゴム栓で密封しそこから 23 ゲージ針を通し圧力モニター、ヘリウムガスポンプおよびバルブを並列に接続した。さらにフラスコ内部温度を常時 37°C に保つようにし細胞培養を行った。外因性に不活化ガスであるヘリウムガスを加えてフラスコ内圧力を適宜調節した。Boyle-Charles' law によりフラスコ内の酸素、二酸化炭素分圧、pH は一定のまま、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る²²⁾。第 1 図にこの実験系の模式図を示す。

IL-6 放出の極性は 0.4 μm の孔を有する半透膜上 (Transwell chambers Costar, Cambridge, Mass, USA) で細胞を培養して圧力を荷荷し、上層 (1.5 ml) および下層 (2.6 ml) のそれぞれにおいて IL-6 の濃度を検討

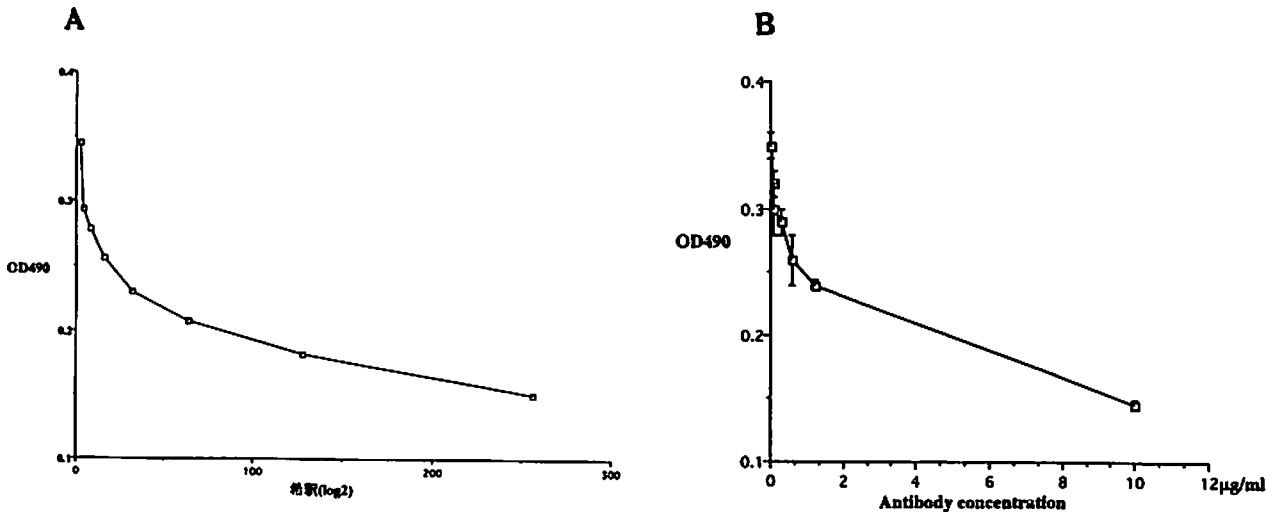


第 1 図 圧力荷荷装置の模式図。フラスコをゴム栓で密封しそこから 23 ゲージ針を通し圧力モニター、ヘリウムガスポンプおよびバルブを並列に接続した。さらにフラスコ内部温度を常時 37 度に保つようにし、その中で細胞培養を行った。外因性にヘリウムガスを加えてフラスコ内圧力を適宜調節した。

した。この条件下においては細胞の上層と下層の双方に同様の圧力荷荷がかかると考えられた。

2. IL-6 濃度の測定

培養上清中の 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 (Riken Cell Bank, 筑波, 茨城) を用いて測定した。ELISA 法による検討ではコントロール群の培養上清中における IL-6 濃度が測定感度以下となることがあり、これまでにより鋭敏な測定法として確立されている cell proliferation assay にて検討した。7TD1 cell は 5% CO₂ の環境下で 5% FCS 添加 RPMI に 0.2 mM の HEPES を加え、5ng/ml の murine recombinant IL-6 とともに培養した。対数増殖期に採取した 7TD1 cell を IL-6 を添加しない洗浄用培養液にて 3 回洗浄し、これを 96 穴のマイクロタイタープレートに 1 × 10⁵/ml の濃度で 50 μl ずつ撻き、さらに希釈系列を作成した IEC-18 の培養上清を 50 μl 投与して計 100 μl として 3 日間培養した。また、IL-6 標準物質の希釈系列を作成し同様に 7TD1 cell とともに 3 日間培養した。3 日後に非放射性細胞増殖測定キット (Promega, Madison WI, USA) を用いて細胞数の測定を行い 490 nm における optical density 値 (OD 値) をマイクロプレートリーダーにて測定した。IL-6 標準物質の希釈系列と比較し最大増殖速度の 1/2 となる点での両者の希釈倍比により IL-6 の力価を測定した。IL-6 の放出量はコントロール群の力価を



第2図 A：標準物質の代表的な希釈系列. B：抗マウス IL-6 抗体による抑制実験. 抗マウス IL-6 抗体は 7TD1 の増殖を用量依存性に抑制し、この実験系でラットの IL-6 を特異的に測定していることが示された.

1 として各検体における力価の倍率を求め、その相対変化をグラフ化した。すべての cell proliferation assay は同一希釈検体につき 3 ウェルずつ準備し triplicate にて施行した。代表的な標準物質の希釈系列を示す (第 2 図 A)。著者の検討では抗マウス IL-6 抗体 (R&D System, Minneapolis, MN, USA) はラット IL-6 による 7TD1 の増殖を特異的に抑制し、この実験系でラットの IL-6 を特異的に測定していることを示していると考えた (第 2 図 B)。

3. RT-PCR 法による IL-6 の mRNA の発現

Total RNA は RNA zol (Cinna, Biotex, Houston, TX, USA) を用いて IEC-18 細胞より抽出した。抽出した RNA 量を波長 260nm で測定し、波長 260nm および 280 nm 計測時の比率は常に 1.9 以上であることを確認した。First-strand synthesis kit (Stratagene, LA Jolla, CA, USA) にて RNA より cDNA を作成し、IL-6 の mRNA を Takara taq kit (recombinant Taq DNA polymerase; Takara Biochemicals, 東京) を用いて RT-PCR 法にて検討した。IL-6 のプライマーはサワデーテクノロジー (Tokyo) にて作成した。配列は下記のとおりである。

sense primer 5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCAC TGC-3',

antisense primer 5'-TAGCCACTCCTTCTCTGTG ACTCTAACT-3'²³⁾

想定される PCR 生成物は 508 bp であり、Programmed Thermocontrol systems (Applied Biosystems

Japan Co., 東京) にて 94°C 3 分 (initial melt), 94°C 1 分 (melt), 58°C 1 分 (anneal), 72°C 90 秒 (extension) で 35 サイクルの増幅を行い、最後に 72°C 7 分 (final extension) とした。内部標準として Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用い、IL-6 の PCR 産物と比較し半定量的な検討を行った。GAPDH のプライマーは同様にサワデーテクノロジー (東京) にて作成し、配列は下記のとおりである。

sense primer 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'
antisense primer 5'-AGATCCACAACGGATACAT T-3'²⁴⁾

想定される PCR 生成物は 309 bp であり、94°C 1 分、58°C 1 分、72°C 3 分 35 サイクルの増幅を行った。反応産物は 1.5% アガロースゲルにて電気泳動しエチジウムブロマイドにて染色し紫外線蛍光にて可視化し写真撮影した。また、これを NIH image にて pixel 数を計算しグラフ化した。

4. 阻害実験

次の塩基配列をサワデーテクノロジーにて作成し、3' 末端の 3 塩基を phosphorothioate 化した。さらにその相補する配列を作成し、95°C で 5 分間反応させその後、徐々に室温に戻してアニーリングさせた。配列は下記のとおりである。下線部は κB および mutated κB の結合部位である。

NF-κB(TFD)
5'GGGGACTTTCCGCTGGGGACTTCCAGGGG
GACTTTCC 3'

mutated NF- κ B (MUT)

5'GTCTACTTTCCGCTGTCTACTTTCCACGGT
CTACTTTCC3'²⁵⁾

これらを2 μ Mの濃度で24時間IEC18細胞と共に培養し、その後圧力を24時間負荷して培養上清中のIL-6濃度を測定した。

5. I κ B- α のWestern blot法

培養細胞をSDS sample buffer (62.5 mM Tris HCl pH6.8, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% w/v bromphenol blue)にて融解して調整した。これをSDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gelにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写、PhosphoPlus[®] I κ B- α Antibody kit (Biolabs)を用いてWestern blot法でリン酸化されたI κ B- α の発現を検討した。ブロッキングした後、1次抗体として抗phospho-I κ B抗体(希釈倍率1000倍)と4℃で一晩反応させ、2次抗体としてHRP(horse radish peroxidase)標識抗ウサギ抗体(希釈倍率2000倍)およびHRP標識抗ビオチン抗体(希釈倍率1000倍)で室温で1時間反応させた。ECLにて発色させchemiluminescence 蛍光の活動性をX線で検出して検討した。

6. NF- κ BおよびNF-IL6の活性化

NF- κ BおよびNF-IL6の結合活性はFITCでラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを使用した電気泳動度シフト法electrophoretic mobility shift assay (EMSA)で行った。培養細胞をセルスクレーパーにてはがし、PBSにて洗浄した後、氷冷したバッファーA(10 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl 10 mM, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 μ g/mlの各antipain, chymostatin, leupeptin, peptin A)に懸濁し8000gで2分間遠心して上清を取り除き、これを2回くり返した。沈澱をバッファーC(20 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 μ g/mlのantipain, chymostatin, leupeptin, peptin A)に懸濁し、20分間震盪させた後14000gで5分間遠心し、核分画成分を抽出した。20 μ gの核蛋白抽出物質と1 ngのFITC標識NF- κ Bオリゴヌクレオチド5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGG-3'²⁶⁾およびNF-IL6オリゴヌクレオチド5'-TGGGTATTATGCAATTGGAAG-3'²⁷⁾と45分間、室温で反応させた。次に50%蔗糖をサンプルに加え、非変性5%ポリアクリルアミドゲルにて

160Vで1時間、電気泳動させイメージアナライザー(FluorImager 575; Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)にて解析した。競合実験は、非標識のオリゴヌクレオチドをFITC標識オリゴヌクレオチドの50倍量用いて核蛋白と反応させ同様にイメージアナライザー(FluorImager 575)にて解析した。

7. 統計学的処理

すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。統計処理はANOVAにて解析後、Fisherのpost hoc検定を行い、 $p < 0.05$ をもって統計的有意差とした。

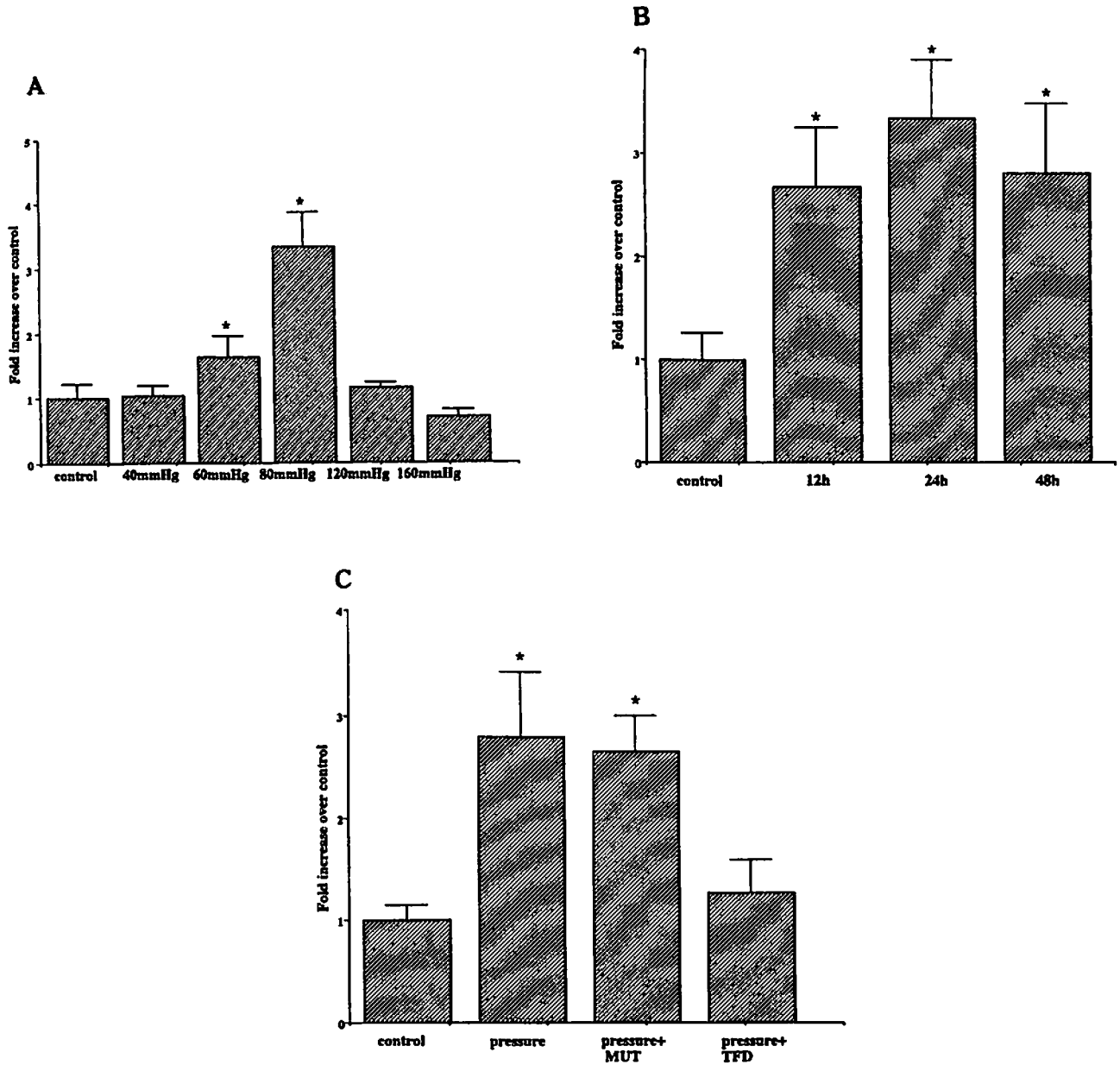
結 果

1. 圧力負荷に伴うIL-6放出の検討

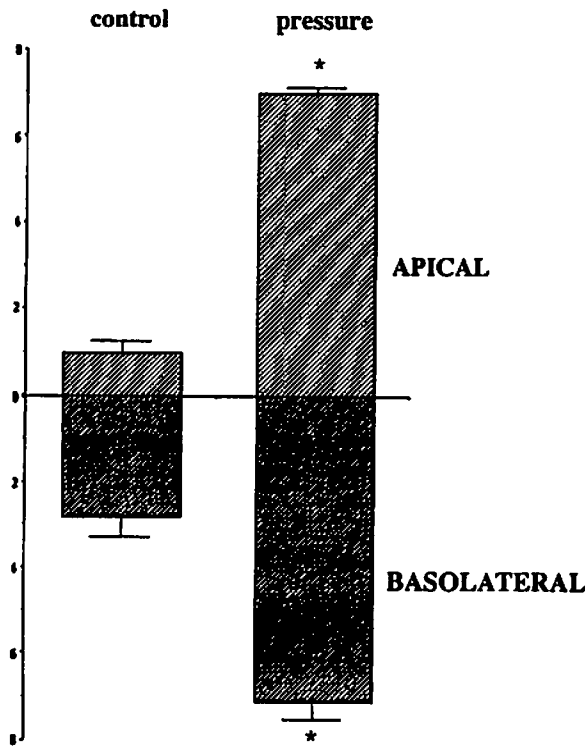
20, 40, 60, 80, 120, 160 mmHgの各種圧力負荷を24時間、IEC18細胞にかけてIL-6の培養上清中の濃度を検討した。第3A図に示したように60 mmHg以上の圧力負荷にてIL-6放出の増加が認められ80 mmHgで最高となり160 mmHgでは逆にIL-6放出の放出はコントロール群より抑制された。このことからIL-6放出のピークは80 mmHgであると考えられ、本研究においてはIL-6の産生、mRNA、転写因子の発現の変化などを80 mmHgの圧力負荷にて検討することとした。次に80 mmHgの圧力負荷を12, 24, 48時間かけてIL-6の放出を検討した(第3図B)。その結果、圧力負荷24時間後のIL-6の放出が最高であった。また、このIL-6の放出がNF- κ Bを介した経路が関与しているかどうかを検討するため2 μ MのNF- κ Bのdecoy (TFD)を圧力負荷24時間前に投与したところ、IL-6の産生は有意に抑制された。また、このIL-6の抑制効果はmutated decoy (MUT)の投与では認められなかった(第3図C)。このことから、NF- κ Bを介した経路により圧力負荷に伴うIL-6の放出が行われていることが示された。

2. 圧力負荷に伴うIL-6放出の極性に関する検討

方法に示したように0.4 μ mの孔を有する半透膜上で細胞を培養し、80 mmHgの圧力を24時間負荷し、上層、下層のそれぞれでIL-6濃度を検討した。IL-6の放出は無刺激時には基底膜側に優位であったが、圧力負荷後は上皮側、基底膜側の双方において有意に増加し、上皮側と基底膜側にほぼ同程度に放出された(第4図)。また、半透膜の上層から下層へのIL-6の移行の有無を検討するため、細胞を半透膜上で培養後、³H-mannitol



第3図 A：各種の圧力負荷時における IEC-18 細胞からの IL-6 放出の検討。20, 40, 60, 80, 120, 160 mmHg の各種圧力負荷を 24 時間、IEC18 細胞にかけて IL-6 の培養上清中の濃度を検討した。60 mmHg 以上の圧力負荷にて IL-6 放出の増加が認められ 80 mmHg で最高となり 160 mmHg では逆に IL-6 放出の放出はコントロール群より抑制された。コントロール群の IL-6 放出量を 1 とした IL-6 放出量の相対変化を示した。各 6 検体より算出した平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ vs control, (Kishikawa H et al : Clin Exp Immunol 129 : 86-91, 2002 の第 1 図より許可を得て転載)。B：80 mmHg の圧力負荷時における IL-6 産生の時間経過。12, 24, 48 時間の圧力負荷を行い IL-6 の放出を検討したところ、圧力負荷 24 時間後の IL-6 の放出が最高であった。コントロール群の IL-6 放出量を 1 とした IL-6 放出量の相対変化を示した。各 6 検体より算出した平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ vs control, (Kishikawa H et al : Clin Exp Immunol 129 : 86-91, 2002 の第 1 図より許可を得て転載)。C：NF- κ B decoy の投与による IL-6 放出への影響。2 μ M の NF- κ B の decoy (TFD) を圧力負荷 24 時間前に投与したところ、IL-6 の産生は有意に抑制された。また、この IL-6 の抑制効果は mutated decoy (MUT) の投与では認められなかった。コントロール群の IL-6 放出量を 1 とした IL-6 放出量の相対変化を示した。各 6 検体より算出した平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ vs control, (Kishikawa H et al : Clin Exp Immunol 129 : 86-91, 2002 の第 2 図より許可を得て転載)



第4図 圧力負荷に伴うIL-6の放出の極性に関する検討。0.4 μ mの孔を有する半透膜上で細胞を培養して80 mmHgの圧力を24時間負荷し、その上層および下層のそれぞれにおいてIL-6の濃度を検討した。コントロール群の上皮側へのIL-6放出量を1としたIL-6放出量の相対変化を示した。各6検体より算出した平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ vs control. (Kishikawa H et al: Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002の第3図より許可を得て転載)

を上層に添加し圧力を負荷し、24時間後に下層での 3 H活性をシンチレーションカウンターで検討したところ上層から下層への移行は5%以下であり、無視し得ることを予備実験にて確認している。

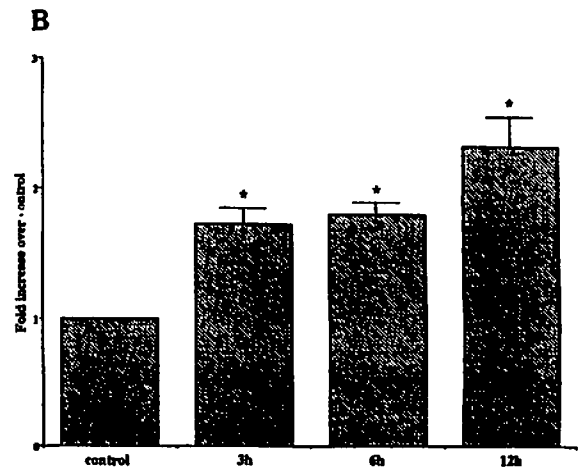
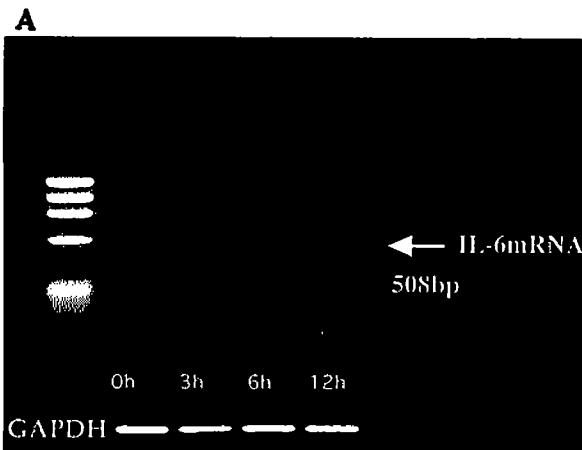
3. 圧力負荷に伴うIL-6 mRNAの変化

IL-6 mRNAはRT-PCR法により半定量的に解析した。内部標準としてGAPDHを用い、これと比較することでIL-6 mRNAの発現を検討した。IL-6のmRNAは508 bpの部位に示された。圧力負荷3時間後よりIL-6 mRNAはコントロール群と比較して発現が増強し、12時間後まで持続しており、IL-6が転写レベルで増加していることが示された。内部標準として用いたGAPDH mRNAを下段に示す(第5図A)。

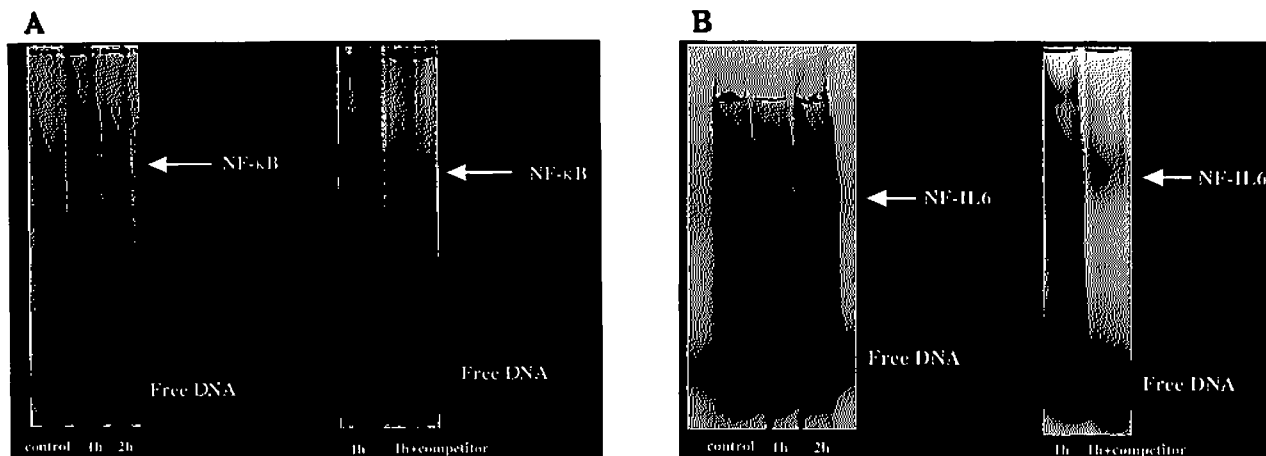
IL-6 mRNAとGAPDH mRNAのそれぞれをNIH Image 1.62 fにてpixelを計算してGAPDHとの比率を算出しグラフ化した(第5図B)。コントロール群を1とし、3、6、12時間後のIL-6 mRNAの相対変化を示した。

4. 圧力負荷に伴う転写因子(NF- κ B, NF-IL6)の検討

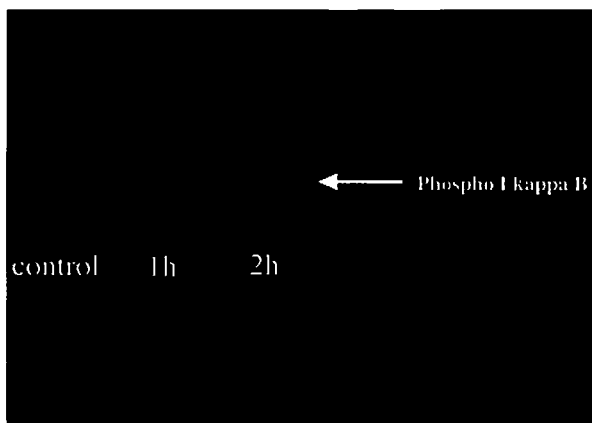
IEC-18細胞における圧力負荷によるAP-1結合活性の変化を検討するためAP-1結合配列を含むオリゴヌクレオチドを使った電気泳動度シフト法(EMSA)を行った。圧力負荷後のNF- κ B発現の変化は第6図Aに示すように1時間後では強く増強し、2時間後ではその発現



第5図 A: 圧力負荷時のIEC-18細胞におけるIL-6 mRNA発現の検討。508bpのIL-6 mRNAは圧力負荷3時間後より認められ、12時間後まで持続した。内部標準として用いたGAPDH mRNAを下段に示す。B: 内部標準としてGAPDH mRNAを用い、IL-6 mRNAとGAPDH mRNAのそれぞれをNIH imageにてpixel数を計算しグラフ化した。コントロール群を1とし、3、6、12時間後のIL-6 mRNAの相対変化を示した。各3検体より算出した平均値±標準偏差を表す。* $p < 0.05$ vs control. (Kishikawa H et al: Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002の第4図より許可を得て転載)



第 6 図 圧力負荷によるの NF- κ B および NF-IL6 の活性化. A: 圧力負荷 1~2 時間後の NF- κ B の活性化を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて FITC 標識 NF- κ B オリゴヌクレオチドを用いて検討した. 圧力負荷後の NF- κ B 発現の変化は 1 時間後では強く増強し, 2 時間後ではその発現はやや減弱した. 反応の特異性を確認するため 50 倍量の FITC 非標識のオリゴヌクレオチドとともに FITC 標識 NF- κ B オリゴヌクレオチドを反応させたところ, その発現が著明に減弱しており, これらが特異的であることが示唆された. B: 圧力負荷 1~2 時間後の NF-IL6 の活性化を electrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて FITC 標識 NF-IL6 オリゴヌクレオチドを用いて検討した. NF- κ B と同様に圧力負荷後の NF- κ B 発現の変化は 1 時間後では強く増強し, 2 時間後ではその発現はやや減弱した. NF- κ B と同様, 反応の特異性を確認するため 50 倍量の FITC 非標識のオリゴヌクレオチドとともに FITC 標識 NF-IL6 オリゴヌクレオチドを反応させたところ, その発現が著明に減弱しており, これらが特異的であることが示唆された. (Kishikawa H et al: Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002 の第 5 図より許可を得て転載)



第 7 図 圧力負荷に伴う I κ B- α リン酸化の検討. 80 mmHg での圧力負荷 1~2 時間後の phospho-I κ B (Ser32) 抗体による Western blot の結果を示す. 圧力負荷 1~2 時間後にかけて発現が増強しており I- κ B のリン酸化が亢進していることが示唆された. (Kishikawa H et al: Clin Exp Immunol 129: 86-91, 2002 の第 6 図より許可を得て転載)

はやや減弱した. また, NF-IL6 においても同様に 1 時間後をピークとする発現の増強が認められた (第 6 図 B). いずれにおいても 50 倍量の FITC 非標識の cold oligonucleotide による競合阻害実験でその発現が減弱しており, これらが特異的な反応であることを確認した.

5. I κ B- α のリン酸化の検討

リン酸化された I κ B- α に対する抗体を用い western blot 法にて圧力負荷に伴う I κ B- α のリン酸化を検討した. 圧力負荷 1~2 時間後にかけて発現が増強しており I κ B- α のリン酸化が亢進していることが示唆された (第 7 図).

考 察

今回の著者の検討から 80 mmHg の圧力負荷により小腸上皮細胞から IL-6 が放出され, これが mRNA のレベルでも増加し, しかも NF- κ B や NF-IL6 などの転写因子を介した経路で活性化されていることが示された. 腸管内圧は健常人では 50 mmHg に, 過敏性腸症候群

では一過性ではあるが 80 mmHg に達することが知られている¹¹⁾。また、Kellow らは内圧が 50 mmHg 以上に達し、主に回腸において速い速度で肛門側へ移動するタイプの波形 prolonged propagated contractions (PPCs) が過敏性腸症候群や一部の健常人における腹痛などの腹部症状と関連していることを報告しており、これら予想以上の高い腸管内圧が短時間ではあるが生理的な環境でも生じていることが考えられている。炎症性サイトカインである IL-6 はこれまでにサルモネラ菌、コレラ毒素などの感染、TGF- α や IL-1 β 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^{9-12,13)}。しかし、今回の検討から IL-6 はこれらの感染などによる刺激のみならず、イレウスなど持続的な腸管内圧の上昇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、これらの病態において IL-6 の関与を検討することは意義があると考えられた。Fevang¹⁶⁾ らは豚の小腸にループを作成し静脈圧が 50 mmHg になるまで腸管を圧迫して作成した絞扼性イレウスモデルを用い、イレウスを作成後 90 分後から腸管局所の静脈中における IL-6 産生の増加が認められ、この IL-6 の増加が栄養する動脈のクランプ単独により生じないことからこの増加が虚血によるものではなく、イレウスそのものによるものであると考察している。今回の著者の検討から *in vitro* において腸管内圧の上昇が少なくとも粘膜局所での IL-6 の放出増加をきたすことが示され、Fevang¹⁶⁾ らのイレウスモデルでの IL-6 増加のメカニズムの 1 つとして腸管内圧の上昇が関与していた可能性を十分示唆し得るものと考えた。また、小腸の閉塞機転が常在細菌叢である大腸菌の異常増殖をきたすことや、これが同時に生じる粘膜損傷のために bacterial translocation を惹起し、全身性のエンドトキシン血症を呈することが以前より知られている¹⁷⁾。一方、Rollwagen¹⁸⁾ らはマウスに経口的に投与した IL-6 が腸粘膜における細動脈の圧力こう配の破綻を改善し、虚血再還流により作成した粘膜透過性の亢進を抑制する作用があることを報告し、イレウスなどでも生じ得る bacterial translocation に対し、IL-6 が抑制的に働く可能性を示唆している。また、IL-6 が IL-1 β や TNF- α の産生を抑制し、IL-1 β の受容体を down-regulation して過剰な炎症反応の亢進を抑制するとの報告があり、IL-6 がイレウスなどの圧力の負荷によって生じた腸粘膜の損傷に対する炎症反応を適切に調節する可能性があると考えられた。他にも、臨床的に絞扼性イレウスや大腸癌などの閉塞機転による大腸イレウスのみならず過敏

性腸症候群や炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎における巨大結腸症など、様々な病態にも IL-6 が関与している可能性が考えられ、今後の検討課題と考えられた。

T1165, 7TD1, B13.29, B9 などのマウスハイブリドーマ細胞が IL-6 の測定に用いられている²⁸⁻³⁰⁾。著者は、これらの中で比較的良く使われている 7TD1 を用いて培養上清中の IL-6 のバイオアッセイを行った。このバイオアッセイ系では IL-11 によっても細胞増殖が亢進することが知られているが、その力価は IL-6 の約 1000 分の 1 と言われているため IL-6 産生への影響は少ないと考えられた。また TNF α や TGF β など一部の因子が IL-6 依存性細胞株の増殖を抑制することが知られているが²⁹⁾、これらの因子については圧力負荷に伴い有意な増加を示さないことを既に確認しており、今回の検討では無視し得ると考えた。

圧力負荷に伴う IL-6 mRNA は 6 時間後から発現が増強することが今回の検討で明らかになった。これに対し、例えばサルモネラ菌により腸上皮細胞から IL-6 は極めて早期の時相から産生され、mRNA レベルで 60 分後より増加し、また IL-6 の放出は 2 時間後より認められるとされており、著者の圧力負荷後の IL-6 の増加はこのサルモネラの刺激と異なり、より遅い時相の変化であることが理解できる¹⁴⁾。我々のこの比較的遅い時相における IL-6 の変化は小腸上皮細胞 (IEC-6) ヘコレラトキシンを投与した際の IL-6 の増加と似ており、この場合 mRNA の増加は 4 時間後より、IL-6 の放出は 12 時間後より認められ 24 時間後にプラトーに達しており我々と同様の結果であった¹⁴⁾。また、McGee¹¹⁾ らは IL-1 β とコレラトキシンが IL-6 放出に対し相乗効果を持つことを報告しているため、我々も IL-1 β を投与下で圧力負荷を行い IL-6 の放出を検討してみたが、予想と異なり相加、または相乗効果は認められなかった。この結果は Fevang らのイレウスモデルで IL-1 の上昇が認められないにもかかわらず、IL-6 の上昇が認められたという結果と合致するものであり圧力負荷という物理的ストレス下においては腸管において IL-6 が主たる粘膜防御機構に関与する可能性を示唆している。

IL-6 の放出は、小胞体、ゴルジ装置などにおける蛋白の輸送を阻害する brefeldin A, monensin の投与により抑制されることが報告されている。このことから IL-6 は他の多くのサイトカイン、ホルモンと同様に小胞体からゴルジ装置を経て細胞膜内面に移動し開口放出 (エクソサイトーシス) によって細胞外に放出されると考えられている³¹⁾。サイトカイン放出の極性に関しては、IL-6 においてはこれまでにマウスの子宮の上皮細胞や

角膜上皮細胞、腸上皮細胞などにおいて検討されてきた³²⁻³⁴⁾。腸上皮細胞では Mascarenhas³⁴⁾らが上皮側からの IL-1 β の刺激では基底膜側への優位な IL-6 の放出を認めたが、基底膜側からの TNF- α の刺激では基底膜側、管腔側の双方に IL-6 の放出を認めたと報告している。また、網膜色素上皮細胞において基底膜側からの IL-1 β 刺激では基底膜側に優位に炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8) を放出したが、上皮側からの IL-1 β 刺激ではサイトカインの放出は上皮側、基底膜側のいずれにも有意差を認めなかったとの報告がある。このように刺激や細胞の種類により IL-6 放出の極性は様々であるが、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考えられた。

今回、著者は圧力負荷により小腸上皮細胞において NF- κ B と NF-IL6 の活性化が生じることを明らかにした。なお圧力負荷に伴う NF- κ B の核内への移行については、既に抗 NF- κ B 抗体を用いた免疫組織化学にて確認されている²⁾。NF- κ B はこれまでに IL-2, IL-6, TNF- α などの様々なサイトカインや接着因子の発現に関与していることが報告されている¹⁹⁾。NF- κ B の DNA への結合は LPS や TNF により誘導され、また NF-IL6 はそれ自身の mRNA が LPS や TNF により誘導されることが知られている³⁵⁾。Parikh³⁶⁾らは IL-1 β 刺激により Caco-2 細胞からの IL-6 の放出増加すること、またこれが NF- κ B の阻害薬により抑制されることを報告しており、IL-6 の産生が NF- κ B を介した経路で活性化されることを明らかにした。IL-6 および NF- κ B に関するこれまでの報告を見てみると、Khaled²⁵⁾らはリンパ球において LPS により放出が増加する IL-6 が Rel A antisense では抑制されないにもかかわらず NF- κ B の decoy により有意に抑制されたことから NF- κ B による IL-6 遺伝子の活性化が Rel A だけではなく c-Rel にも関与している可能性を示唆し、また、Tomita³⁷⁾らは内皮細胞において TNF により産生が増加する IL-6 が NF- κ B の decoy により抑制されることを報告している。今回、著者は物理的な圧力負荷が NF- κ B と NF-IL6 を活性化するのみならず、これによる IL-6 発現の増加が NF- κ B の decoy により有意に抑制されることを示し、これが NF- κ B を介した転写経路で制御されていることを明らかにした。また、I- κ B- α のリン酸化を western blot 法にて検討し、圧力負荷に伴い I- κ B- α のリン酸化が亢進することを明らかにした。このリン酸化は I- κ B 蛋白の分解のシグナルとなっておりこれが NF- κ B を活性化し、他の転写因子とともに

に標的的遺伝子を活性化することが報告されている^{38,39)}。

以上の検討から生理的にも生じうる 80 mmHg の経壁圧が小腸上皮細胞において NF- κ B や NF-IL6 を活性化し IL-6 の放出を増加させること、また、この IL-6 の産生が NF- κ B の decoy により有意に抑制されたことから、NF- κ B を介した経路で活性化されることが明らかとなった。

総 括

圧力負荷が小腸上皮細胞からの IL-6 の産生の変化に及ぼす影響を及ぼすかを検討し以下のような結果を得た。

1. 腸上皮細胞に 40 mmHg から 160 mmHg の圧力負荷を加えたところ生理的な腸管内圧である 80 mmHg 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 80 mmHg 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。
2. 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。
3. 80 mmHg の圧力負荷において IL-6 mRNA も 3~12 時間後に発現が増強した。
4. 圧力負荷により転写因子である NF- κ B および NF-IL6 が活性化され、またこの NF- κ B の decoy で IL-6 の産生が有意に抑制された。

以上より 80 mmHg の物理的圧力負荷により小腸上皮細胞から IL-6 が放出が増加し、さらに mRNA のレベルでも増加していることが示された。また、NF- κ B や NF-IL6 などの転写因子も同時に活性化され、LPS や TNF- α による IL-6 の放出の増加と同様これが、NF- κ 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⁴⁰⁾。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深謝致します。また、直接御指導、御校閲いただいた防衛医科大学校第 2 内科三浦総一郎教授に感謝致します。さらに本研究に多大なご協力をいただきました慶應義塾大学医学部消化器内科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は平成 10 年、11 年度文部省科学研究費の補助により行われた。

本論文の内容の一部は 97th Annual Meeting of American Gastroenterological Association (1998 年, New

Orleans, USA). 第85回日本消化器病学会総会 (1999年, 長崎)において発表した。

文 献

- 1) Kellow JE, Phillips SF. Altered small bowel motility in irritable bowel syndrome is correlated with symptoms. *Gastroenterology* 92 : 1885-1893, 1987
- 2) Hirokawa M, Miura S, Kishikawa H, Yoshida H, Nakamizo H, Higuchi H, Nakatsumi RC, Suzuki H, Saito H, Ishii H. Loading of mechanical pressure activates mitogen-activated protein kinase and early immediate gene in intestinal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 46 : 1993-2000, 2001
- 3) Hirokawa M, Miura S, Shigematsu T, Yoshida H, Hokari R, Higuchi H, Kurose I, Kimura H, Saito H, Nakaki T, Ishii H. Pressure stimulates proliferation and DNA synthesis in rat intestinal epithelial cells. *Life Sci* 61 : 667-672, 1997.
- 4) Cillo JE Jr, Gassner R, Koepsel RR, Buckley MJ. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells : Implications for distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90 : 147-154, 2000.
- 5) Okada M, Matsumori A, Ono K, Furukawa Y, Shioi T, Iwasaki A, Matsushima K, Sasamura S. Cyclic stretch upregulates production of interleukin - 8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 : 894-901, 1998.
- 6) Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, Takahashi T, Kato T, Ogawa S. Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 84 : 1127-1136, 1999.
- 7) Sterpetti AV, Cucina A, Morena AR, Di Donna S, D'Angelo LS, Cavallaro A, Stipa S. Shear stress increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells. *Surgery* 123 : 212-217, 1993.
- 8) Mohtai M, Gupta MK, Donlon B, Ellison B, Cooke J, Gibbons G, Schurman DJ, Smith RL. Expression of interleukin-6 in osteoarthritic chondrocytes and effects of fluid-induced shear on this expression in normal human chondrocytes *in vitro*. *J Ortho Res* 14 : 67-73, 1996.
- 9) Kishimoto T. The biology of interleukin 6. *Blood* 74 : 1-10, 1989.
- 10) Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, Simpson RJ. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 : 9679-9683, 1986.
- 11) McGee DW, Elson CO, McGee JR. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells : mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect Immun* 61 : 4637-4644, 1993.
- 12) McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGee JR. Transforming growth factor- β and IL-1 β act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Immunol* 151 : 970-978, 1993.
- 13) Goodrich ME, McGee DW. Effect of intestinal epithelial cell cytokines on mucosal B-cell IgA secretion : enhancing effect of epithelial-derived IL-6 but not TGF- β on IgA+ B cells. *Immunol Lett* 1999 ; 67 : 11-4.
- 14) Weinstein DL, O'Neill BL, Metcalf ES. Salmonella typhi stimulation of human intestinal epithelial cells induces secretion of epithelial cell-derived interleukin-6. *Infect Immun* 65 : 395-404, 1997.
- 15) Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, Deitch EA. The gut : a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 4 : 193-199, 1995.
- 16) Fevang J, Ovrebo K, Svanes K, Rokke O. Endotoxin and cytokine release in strangulation obstruction and in partial occlusion of the mesenteric artery in pigs. *Eur Surg Res* 31 : 26-38, 1999.
- 17) Roscher R, Oettinger W, Beger HG. Bacterial microflora, endogenous endotoxin, and prostaglandins in small bowel obstruction. *Am J Surg* 155 : 348-355, 1988.
- 18) Rollwagen FM, Li YY, Pacheco ND, Dick EJ, Kang YH. Microvascular effects of oral interleukin-6 on ischemia/reperfusion in the murine small intestine. *Am J Pathol* 156 : 1177-1182, 2000.
- 19) Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. Transcription factors NF-IL-6 and NF- κ B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 10193-10197, 1993.
- 20) Palombella V, Rando O, Godberg A, Taniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 78 : 773-785, 1994.
- 21) Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I κ B- α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 267 : 1485-1488, 1995.
- 22) Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Hayashi M, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Pressure promotes DNA synthesis in rat cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 93 : 1975-1980, 1994.
- 23) Osawa H, Yambe H, Inuma H, Miyata M, Sasaki T, Kaizuka M, Tamura N, Tsunoda S, Fujita Y, Kanazawa T. TGF- β upregulates interleukin 6 production by rat glomerular epithelial cells *in vitro*.

- Nephrol Dial Transplant ; 10 : 1592-1597, 1995.
- 24) Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Yang T, Marumo F. Expression of endothelin-3 mRNA along rat nephron segments using polymerase chain reaction. *Kidney Int* 44 : 1273-1280, 1993.
 - 25) Khaled AR, Edward J. Butfiloski, Eric S. Sobel, and Joel Schiffenbauer. Use of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides to inhibit NF- κ B expression and lymphocyte function. *Clin Immunol Immunopathol* 86, 170-179, 1998
 - 26) Peng HB, Libby P, and Liao JK. Induction and stabilization of I- κ B α by nitric oxide mediates inhibitor of NF- κ B. *J Biol Chem* 270, 14214-14219, 1995
 - 27) Christopher HS, Hui-Jian Zhang, Michael B. Armstrong, Ray V. Rajotte, Jacques Maclouf, and R. Paul Robertson. Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 1788-1793, 1998
 - 28) McGee DW, Bamberg T, Vitkus SJ, McGee JR. A synergistic relationship between TNF- α , IL-1 β , and TGF- β 1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial cell line. *Immunology* 86 : 6-11, 1993.
 - 29) Schwabe M, George W. Cox, Maria Carla Bosco, Rainer Prohaska, and Hsiang-Fu Kung. Multiple cytokines inhibit interleukin-6-dependent murine hybridoma/plasmacytoma proliferation. *Cell Immunol* 168 : 117-121, 1996.
 - 30) McGee DW, Vitkus SJD. IL-4 enhances IEC-6 intestinal epithelial cell proliferation yet has no effect on IL-6 secretion. *Clin Exp Immunol* 105 : 274-277, 1996.
 - 31) Anna Rubartelli, Federico Cozzolino, Marina Talio, Roberto Sitia. A novel secretory pathway for interleukin-1 β , a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* 9 : 1503-1510, 1990.
 - 32) Jacobs AL, Sehgal PB, Julian J, Carson DD. Secretion and hormonal regulation of interleukin-6 production by mouse uterine stromal and polarized epithelial cells cultured *in vitro*. *Endocrinol* 131 : 1037-1046, 1992.
 - 33) Holtkamp GM, Rossem MV, Vos AFD, Peek BWR, Kijlstra A. Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 112 : 34-43, 1998.
 - 34) Mascarenhas JO, Goodrich ME, Eichelberger H, McGee DW. Polarized secretion of IL-6 by IEC-6 intestinal epithelial cells : differential effects of IL-1 β and TNF- α . *Immunol Invest* 25 : 333-340, 1996.
 - 35) Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL-6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9 : 1897-1906, 1990.
 - 36) Parikh AA, Salzman AL, Kane CD, Fischer JE, Hasselgren PO. IL-6 production in human intestinal epithelial cells following stimulation with IL-1 beta is associated with activation of the transcription factor NF-kappa B. *J Surg Res* 69 : 139-144, 1997.
 - 37) Tomita N, Morishita R, Tomita S, Yamamoto K, Aoki M, Matsushita H, Hayashi S, Higaki J, and Ogihara T. Transcription factor decoy for nuclear factor - κ B inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of interleukin-6 and intracellular adhesion molecule-1 in endothelial cells. *J Hypertensions* 16 : 993-1000, 1998.
 - 38) Jobin C, Haskill S, Mayer L, Panja A, and Sartor B. Evidence for altered regulation of I- κ B α degradation in human colonic epithelial cells. *J. Immunol.* 158 : 226-234, 1997.
 - 39) Thanos D, Maniatis T. NF- κ B : A lesson in family values. *Cell* 80 : 529-532, 1995
 - 40) Kishikawa H, Miura S, Yoshida H, Hirokawa M, Nakamizo H, Higuchi H, Adachi M, Nakatsumi RC, Suzuki H, Saito H, Ishii H. Transmural pressure induces IL-6 secretion by intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 129 : 86-91, 2002

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

とく やま ひろ ぶみ
徳 山 博 文

(平成 14 年 11 月 29 日受付)

Key Word : renal artery stenosis, angiotensin II, prostaglandin, chymase, cyclooxygenase

腎臓は心拍出量の約五分の一の供給を受け、体液調節をつかさどる重要な臓器である。さらに、腎臓はさまざまな血管作動性因子を産生し、とくに腎臓から分泌される代表的な血管作動性因子であるレニン¹⁾は、腎血管の狭窄に伴う腎血管性高血圧の発症因子としてきわめて重要である。すなわち、腎臓が虚血に陥るとレニン-アンジオテンシン系が賦活化され、糸球体濾過を保持することにより血液浄化を行うが、同時に全身血管の収縮を起し、高血圧を誘発する。近年、このような腎血管の狭窄が、糖尿病や高脂血症など動脈硬化性疾患の罹患率の増加に伴い増える傾向にあり、とくに両側の腎動脈狭窄では、腎不全に至ることがしばしば見られる。このような腎障害は、欧米では末期腎不全の約 20% を占めると報告されているが²⁾、新規透析導入者数が年間 35000 人を超える本邦においても、食生活の欧米化やさらなる人口の高齢化に伴い、腎障害の原因としてきわめて重要となってきた。

腎動脈の狭窄は、高血圧や腎不全を起こす重要な病態であるにもかかわらず、その病態生理に関してはいまだ不明な点が多い。Goldblatt³⁾の研究以来、片側腎動脈の狭窄モデルである 2 腎 1 クリップ高血圧ラットにおいて、腎内レニン-アンジオテンシン系は虚血側腎の腎血行動態に大きな影響を与えることが明らかにされた。一方、近年、非虚血側腎において、組織レニンおよびレ

ニン mRNA が抑制されているにもかかわらず、組織アンジオテンシン (以下、Ang と略す) II は不変⁴⁾あるいは増加し⁵⁾、腎血行動態に影響を与えることが示唆されている。この機序として、Zou ら⁶⁾は循環血液中の Ang II が非虚血側腎組織内に取り込まれることを報告した。一方、Ang II 生成の観点からみると、Ang I から Ang II への変換を行う酵素としてアンジオテンシン変換酵素 (以下、ACE と略す) が重要とされているが、近年、キマーゼも同様の役割をになうことが示された。キマーゼは肥満細胞の分泌顆粒に存在するセリンプロテアーゼであるが⁶⁾、これまでの報告では、心臓⁷⁾、血管⁸⁾の組織 Ang II 生成に重要な役割を果たしているとされる。一方、Murakami らは、正常犬の腎組織の Ang II 生成および腎血行動態において、キマーゼの関与は少ないと報告している⁹⁾。しかしながら、慢性腎虚血において、ACE 経路および非 ACE 経路としてのキマーゼの動態、ならびに組織 Ang II 生成における寄与に関しては、臨床的にもきわめて重要であるにもかかわらず、今まで検討されていない。さらに、腎内 Ang II の腎血行動態ならびに尿中ナトリウム (以下、Na と略す) 排泄に与える影響に関する評価は十分になされていない。

従来より、腎血行動態の障害に対し、プロスタグランジン E2 (以下、PGE2 と略す) およびプロスタグランジン I2 (以下、PGI2 と略す) などの血管作動性因子

本論文は、Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T : Stenosis-Dependent Role of Nitric Oxide and Prostaglandin in Chronic Renal Ischemia. *Am J Physiology* 282 : F859-865, 2002 の一部、Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T : Distinct Role of Intrarenal Cyclooxygenase-1/2 in Chronic Unilateral Renal Ischemia. *Nephron* 92(1) : 183-191, 2002 の一部、および Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, Wakino S, Saruta T : Differential Regulation of Elevated Renal Angiotensin II in Chronic Renal Ischemia. *Hypertension* 40(1) : 34-40, 2002 の一部を含む。

が腎機能保持に関与することが報告されている¹⁰⁾。PGは腎血行動態の維持およびNa排泄作用を有し、腎血管性高血圧において活性化された循環血液中および組織Ang IIに拮抗する役割を果たしている¹¹⁾。一方、PGは腎血管性高血圧ではレニン分泌を亢進させ、少なからず高血圧の維持に関与することが報告されている¹²⁾。このような相反する成績に関して、PG生成系としてのサイクロオキシゲナーゼ(以下、COXと略す)にはCOX-1とCOX-2の二つのサブタイプが存在し、異なる機能を果たすことが示された。すなわち、COX-1は各臓器に通常状態において存在しPG産生を行っているが、COX-2は炎症¹³⁾や低Na食¹⁴⁾などにより誘導されると報告されている。最近の報告では、COX-2が腎臓の緻密斑¹⁵⁾や皮質集合管¹⁶⁾に通常状態でも存在することが明らかにされた。しかしながら、虚血性腎症において、PG産生経路としてのCOX-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。

以上の背景から、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。すなわち、片側腎動脈狭窄による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Ang II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阻害薬を用いて評価を行った。

方 法

1. 対象

体重11から13kgの雄雑種犬計40匹を実験に供した。すべての実験は動物委員会のガイドラインにしたがって行った。

すべての雑種犬に対し、ペントバルビタール(30mg/kg、静注)麻酔下において実験を行った。気管内へ挿管し、人工呼吸器を装着した。全身血圧を測定するため、タイゴンカテーテル(Tygon, U.S. Stoneware, Akron, OH, USA)を右腸骨動脈に無菌的に挿入した。挿入したカテーテルは皮下を通した後、頸部背側、両肩甲骨間より表皮下に取り出した。持続補液および薬剤投与のために7-Frカテーテルを左橈骨静脈に挿入した。また、採尿のために、7-Frのバルーンカテーテル(クリエートメディック社製、横浜)を経尿道的に膀胱に挿入した。

2. 血行動態の測定

動脈内カテーテルは圧トランスジューサー(TP-400 T, 日本光電社製、東京)に接続し、全身血圧ならびに心拍数を測定した。すべての血行動態の成績はアナログ-デジタル変換装置(Macintosh Laboratory System; Analog Digital Instruments Pty., Ltd. Castle Hill, NSW, Australia)でデジタル化した後、コンピュータで解析した¹⁶⁾。腎血行動態の評価として、腎血漿流量(以下、RPFと略す)はパラアミノ馬尿酸クリアランス、糸球体濾過率(以下、GFRと略す)はイヌリンクリアランスより求めた。濾過係数(以下、FFと略す)はRPFとGFRとの比から算出した。Na排泄の指標には、単位時間あたりの尿中Na排泄量(以下、UNaVと略す)ならびにUNaVをGFRで除したNa排泄分画(以下、FENaと略す)を用いた。

3. 組織Ang I, Ang II, ACE活性

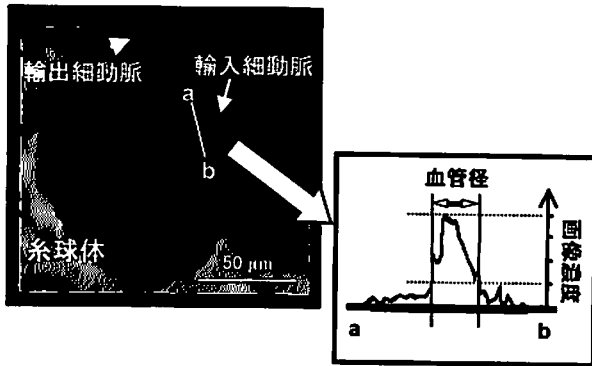
組織Ang I, Ang II, ACE活性の測定のため、生検にて腎皮質組織を採取した¹⁷⁾。組織Ang I, Ang II測定にはAng-RIAキット(Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA)を用いた。組織ACE活性は、ACE colorキット(ACEカラー、富士レビオ、東京)を用い測定した¹⁸⁾。

4. 腎組織PGE₂, PGI₂, トロンボキサン(以下、TXと略す)A₂の測定

腎組織PGE₂, PGI₂, TXA₂の測定には、微小透析法を用いた¹⁹⁾。腎皮質のPGE₂, PGI₂の測定のため、微小透析チューブ(管径0.5mm, transmembrane diffusion cutoff, 10 kD; エイコム社製、京都)を腎表面から2mmの深さに刺入した。腎内において、PGI₂は6-keto-PGF_{1α}へ、TXA₂はTXB₂へ速やかに代謝されるため、それぞれ6-keto-PGF_{1α}, TXB₂を測定した。チューブ内はリンゲル液(147 mEq/L Na, 4 mEq/L K, 5 mEq/L Ca, 156 mEq/L Cl)で、2 μl/minの速度で灌流した。この速度でPGE₂, 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂の回収率は、おのおの72±3%, 70±3%, 70±3%であった。PGE₂, 6-keto-PGF_{1α}およびTXB₂はラジオイムノアッセイにより測定した²⁰⁾。

5. 生体内ニードル型CCDカメラ

組織Ang IIの慢性腎虚血における腎微小循環調節における役割を直接観察するため、生体内ニードル型CCDカメラ(VMS-1210, 日本光電社製)を用いた^{18, 21)}。本システムは、ニードル型CCDカメラ装置とビデオ記



第1図 生体内 CCD カメラを用いた腎糸球体、輸入・輸出細動脈画像。点 a から b への直線に沿って幅 15 μm の画像濃度の平均値を縦軸に示す (右)、画像濃度の最小値から最大値への 4 分割点における画像濃度曲線との交差点を血管系と見なした。(Tokuyama H et al: Hypertension 40: 34-40, 2002 の第 1 図を許可を得て転載)

録装置から成り、CCD カメラ装置先端部の CCD カメラ探子は Gradient-Index レンズ (直径 4.5 mm, 倍率 700 倍) とその外環を取り巻く 18 本の光ファイバーにより構成されている。外部のハロゲンランプ (150 W) から光ファイバーを介して先端周囲にある対象を照射し、その光で写し出された血管像をレンズにより 700 倍に拡大し、単板 CCD 素子 (電荷結合素子, 約 40 万画素) に結像させ、出力信号を電気信号に変換した。この電気信号をテレビ信号 (NTSC) に変換し、モニター上に映像化すると同時に、画像情報をビデオカセットレコーダーで録画した。

腎皮質部に CCD カメラ探子を刺入し、糸球体を確認できたところで固定した。血流の方向により、輸入・輸出細動脈を確認した (第 1 図, 左)。輸入、輸出細動脈径の評価は、録画された画像をコンピューター (Power Mac 8500/120 AV) により経時的に測定した。血管径の測定は、糸球体の近傍で血管壁に直交する線に沿って約 15 μm の幅での画像濃度を平均化し、その平均値の最小値と最大値の差の 4 分の 1 を最小値に加えた値に交わる点の間隔を血管径とみなした (第 1 図, 右)^{18, 21)}。

6. 慢性腎虚血犬モデル実験手技

麻酔下において側腹切開し、両側腎を表層に露出したのち、電磁血流計を左腎動脈に装着した。その後、微小透析チューブを腎皮質に刺入し、180 分の安定時間をおき、全身血圧、腎血行動態の測定 (RPF, GFR)、微小透析法による腎組織 PG および組織生検による組織

Ang の測定を行った。CCD カメラにより輸入、輸出細動脈径を測定した。その後、シルバークリップを左腎動脈の電磁血流計装着部より中枢側に装着し、左腎動脈血流が 90% 減少するように電磁血流計でモニターしながらクリップ内径を調節した。

7. プロトコール

慢性腎虚血 4 週後においても虚血前と同様に、全身血圧測定、採尿、微小透析灌流液採取および組織生検を行った。採尿に関しては両側の尿管に経尿管的に 7-Fr カテーテルを挿入し、虚血側腎、非虚血側腎別々に採尿した。

1) 組織レニン-アンジオテンシン系が腎血行動態に果たす役割

アンジオテンシン受容体拮抗薬であるオルメサルタン²²⁾ (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, n=6; 三共, 東京) を腎動脈に投与し、組織レニン-アンジオテンシン系が腎血行動態に果たす役割を検討した。

慢性腎虚血前のコントロール期において、上記薬剤投与後 60 分間にわたり、全身および腎血行動態、尿中 Na 排泄量の評価を行った。慢性腎虚血作成後 4 週時点において、同様のプロトコールで再度評価し比較検討した。さらに、慢性腎虚血作成前・後の各時期において、オルメサルタン投与による輸入、輸出細動脈径の変化を生体内ニードル型 CCD カメラを用い観察した。

2) 腎組織 Ang II 生成経路の検討

腎組織 Ang II 生成経路の検討のため、ACE 阻害薬であるシラザプリラート (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, n=6; エーザイ, 東京) およびキマーゼ阻害薬のキモスタチン²³⁾ (1 mg/kg, n=6; シグマ, セントルイス, MO) を腎動脈に投与し、腎血行動態に与える影響をクリアランス法を用いて評価した。また、上記薬剤投与 60 分後に腎組織を生検にて採取し、腎組織 Ang II を測定した。

腎組織 Ang II 生成におけるキマーゼの関与を評価するため、[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I (n=6, ペプチド研究所, 大阪) を用いた²⁴⁾。すなわち、[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I はキマーゼによって Ang II へ変換されるが、ACE によって変換されないことより²⁴⁾、[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I 投与による組織 Ang II の生成は、組織キマーゼの活性を示すと考えられる⁹⁾。この特性を利用して、慢性腎虚血 4 週における [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 nmol/kg) の腎動脈投与による腎組織 Ang II 産生への影響を検討した。投与後の腎血行動態に対する効果はクリアランス法を用いて評価し、さらに、投与 10 分後に腎組織を生検にて採取し、腎組織 Ang II を測定

した。

さらに、キモスタチン (1 mg/kg)を腎動脈へ投与した後、同様に[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I (0.1, 1, 10, 50 nmol/kg; n=4) の腎血行動態ならびに腎組織 Ang II 含量に与える影響を評価した。

3) 慢性腎虚血における腎 COX-1, COX-2 の役割および腎間質 COX が組織レニン-アンジオテンシン系に及ぼす影響

慢性腎虚血における腎 COX-1, COX-2 の腎血行動態に果たす役割を評価する目的で、非選択的 COX 阻害薬であるスルピリン²⁹⁾ (1mg/kg, n=6; 第一製薬, 東京)あるいは選択的 COX-2 阻害薬である NS398 (1 mg/kg, n=6; シグマ, セントルイス, MO, USA) を使用した。

慢性腎虚血作成前のコントロール期において、上記薬剤の経静脈的投与を行い、60 分後に全身および腎血行動態の評価、ならびに微小透析法による灌流液採取を行った。慢性腎虚血 4 週においても同様のプロトコールで検討を行った。さらに、腎間質 COX が組織レニン-アンジオテンシン系に及ぼす影響を評価するため、スルピリンあるいは NS398 の投与 60 分後、腎皮質組織を採取し、組織 Ang I, Ang II を定量した。

8. 統計

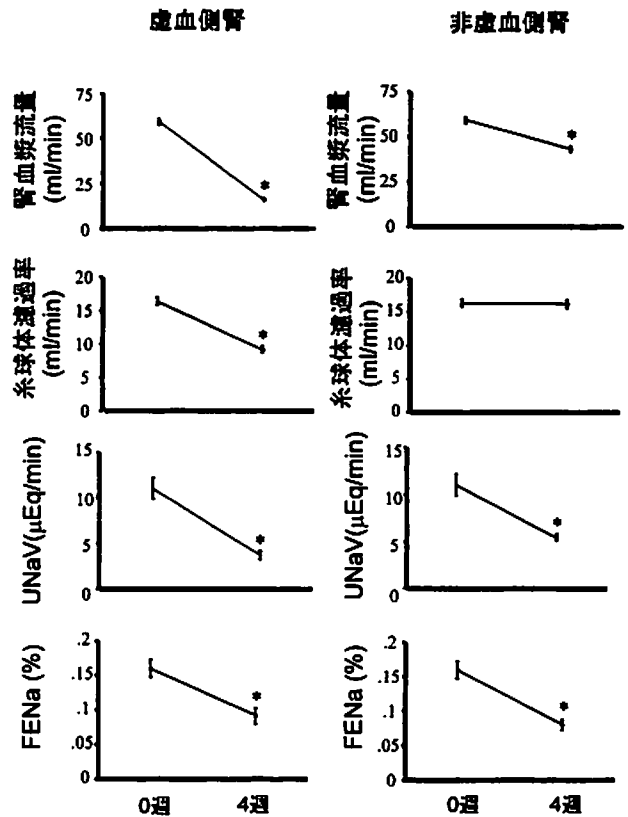
本文および図表中の数値は、すべて平均値±標準誤差で表した。統計解析は二元配置分散分析法を用い、危険率 5%未満の場合を統計学的に有意差ありとした。有意差を認めた場合には Scheffe-test で群間比較した。危険率 5%未満の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1. 慢性腎虚血が全身および腎血行動態に及ぼす影響

虚血 4 週後、全身血圧は軽度の上昇がみられた (112 ±1 から 128 ±2 mmHg, p<0.01, n=40)。血漿レニン活性は 1.7 ±0.1 から 8.1 ±0.8 ng/ml/h (p<0.01, n=40) へと著明な増加がみられ、血清 Ang II も有意に増加した (108.2 ±28.2 から 219.8 ±30.9 pg/ml, p<0.01, n=40)。

RPF ならびに GFR は 4 週の腎動脈狭窄により、虚血側腎において著明な減少を示した (RPF, 59 ±2 から 16 ±1 ml/min, p<0.01, n=40; GFR, 17 ±1 から 8 ±1 ml/min, p<0.01, n=40) (第 2 図)。非虚血側腎においては、GFR は変化せず、RPF は代償せずむしろ減少した (59 ±2 から 45 ±1 ml/min, p<0.01, n=40)。



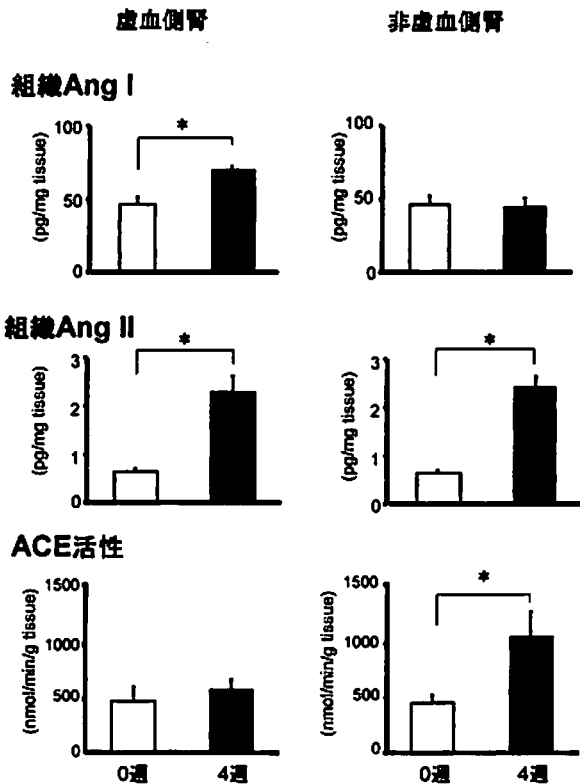
第 2 図 慢性片側腎虚血 4 週における虚血側腎、非虚血側腎の腎血行動態ならびに Na 排泄の変化。虚血前の 0 週に対し*は P<0.01 を示す。UNaV, 尿中 Na 排泄量。FENa, 尿中 Na 排泄分画。(Tokuyama H et al: Nephron 92(1): 183-191, 2002 の第 1 図を許可を得て転載)

FF は虚血側腎、非虚血側腎とも上昇を示した(虚血側腎, 0.29 ±0.01 から 0.53 ±0.03, p<0.01; 非虚血側腎, 0.29 ±0.01 から 0.38 ±0.02, p<0.01, n=40)。

UNaV は、虚血側腎 (11.6 ±0.7 から 3.2 ±0.2 μEq/min, p<0.01, n=40)、非虚血側腎 (11.6 ±0.7 から 5.1 ±0.3 μEq/min, p<0.01, n=40) とともに減少した。UNaV を GFR で補正した FENa も減少した (虚血側腎, 0.16 ±0.01 から 0.08 ±0.01%, p<0.01, n=40; 非虚血側腎, 0.16 ±0.01 から 0.08 ±0.01%, p<0.01, n=40) (第 2 図)。

2. 慢性腎虚血による腎組織 Ang I, Ang II, PGE2, PGI2, TXA2 含量の変化

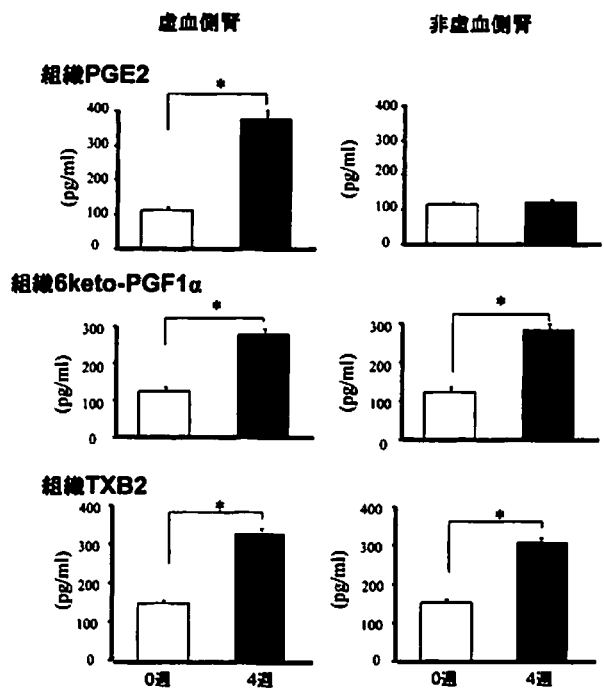
慢性腎虚血により、虚血側腎の組織 Ang I (48 ±2 から 69 ±2 pg/mg tissue, p<0.01, n=40) ならびに Ang II 含量 (0.70 ±0.04 から 2.26 ±0.19 pg/mg



第3図 慢性片側腎虚血4週における虚血側腎、非虚血側腎の組織アンジオテンシンI、アンジオテンシンII含量およびアンジオテンシン変換酵素活性の変化。虚血前の0週に対し*はP<0.01を示す。Angはangiotensin、ACEはアンジオテンシン変換酵素を表す。(Tokuyama H et al: Hypertension 40: 34-40, 2002の第3図を許可を得て転載)

tissue, p<0.01, n=40)は増加した(第3図)。非虚血側腎では組織Ang I含量に変化はみられなかったが(p>0.5, n=40)、組織Ang IIは虚血側腎と同様に著明に増加した(0.68±0.04から2.45±0.19 pg/mg tissue, p<0.01, n=40)。組織ACE活性は虚血側腎では変化がみられなかったが、非虚血側腎において増加した(490±40から1080±80 nmol/min/g tissue, p<0.01, n=40)。

腎組織PGE2濃度は、虚血側腎では3倍の増加を示したが(114±7から375±25 pg/ml, p<0.01, n=18)、非虚血側腎では変化がみられなかった(p>0.05, n=18)(第4図)。腎組織6-keto-PGF1αおよびTXB2濃度は、虚血側腎(6-keto-PGF1α, 126±7から280±10 pg/ml, p<0.01, n=18; TXB2, 152±10から329±13 pg/ml, p<0.01, n=18)、非虚血側腎(6-



第4図 慢性片側腎虚血4週における虚血側腎、非虚血側腎のプロスタグランジンE2、6-keto-prostaglandin F1α、トロンボキサンB2の変化。虚血前の0週に対し*はP<0.01を示す。PGはprostaglandinを、TXはthromboxaneを表す。(Tokuyama H et al: Nephron 92(1): 183-191, 2002の第2図を許可を得て転載)

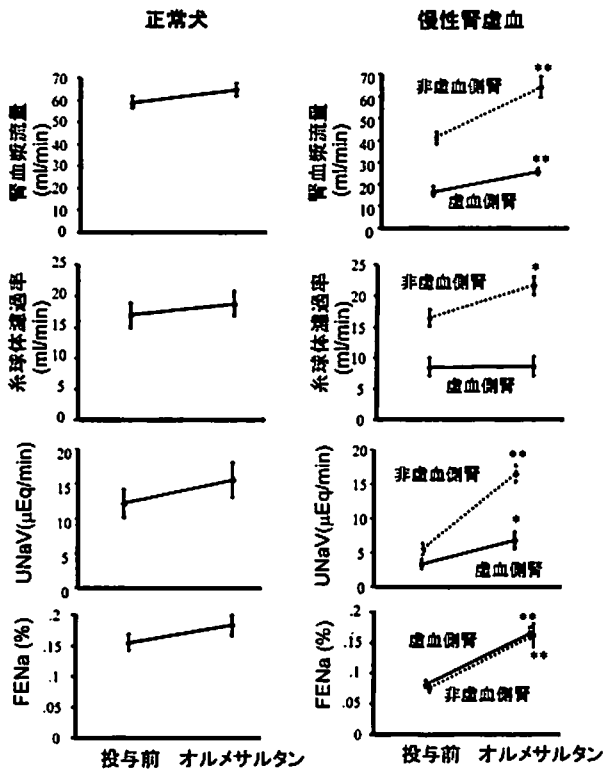
keto-PGF1α, 124±8から284±9 pg/ml, p<0.01, n=18; TXB2, 152±10から308±12 pg/ml, p<0.01, n=18)ともに増加した。

3. 組織レニン-アンジオテンシン系が腎血行動態に果たす役割

1) アンジオテンシン受容体拮抗薬を用いた検討

正常犬において、本研究で使用した30 μg/kgのオルメサルタンは血圧に影響を及ぼさなかった。RPF、GFRならびにFENaは増加傾向を示したが、有意な変化はみられなかった(第5図)。

慢性腎虚血犬においても、30 μg/kgのオルメサルタンは全身血圧に影響を及ぼさなかった(p>0.1, n=6)。虚血側腎では、GFRは変化しなかったが、RPF、UNaVならびにFENaを有意に改善させた(RPF, 17±2から26±2 ml/min, p<0.01, n=6; UNaV, 3.3±0.7から6.8±1.3 μEq/min, p<0.05, n=6; FENa, 0.08±0.01から0.17±0.01%, p<0.01, n=6)(第5



第5図 正常犬および慢性片側腎虚血4週におけるオルメサルタンの腎血行動態およびNa排泄に及ぼす影響。投与前に対し**はP<0.01, *はP<0.05を示す。(Tokuyama H et al: Nephron 92(1): 183-191, 2002の第6図を許可を得て転載)

図)。同様に、非虚血側腎においても、RPF, UNaV, FENaのみならずGFRも改善がみられた(RPF, 41±3から64±5 ml/min, p<0.01, n=6; GFR, 17±2から22±2 ml/min, p<0.05, n=6; UNaV, 5.5±0.9から16.5±1.3 μEq/min, p<0.01, n=6; FENa, 0.08±0.01から0.16±0.02%, p<0.01, n=6)。FFは両側腎において減少傾向を示した(虚血側腎, 0.53±0.08から0.34±0.07, p>0.1; 非虚血側腎, 0.42±0.07から0.35±0.05, p>0.1, n=6)。

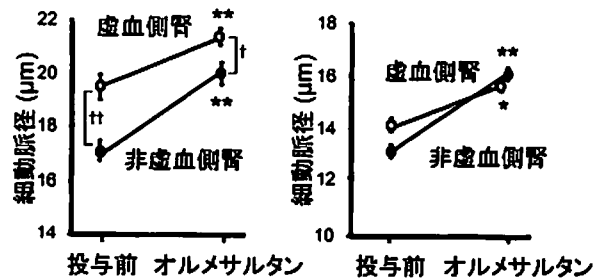
2) 生体内ニードル型CCDカメラによる腎細動脈径の変化の観察

正常犬において、本研究で使用した量のオルメサルタンは輸入、輸出細動脈径に影響を与えなかった(輸入細動脈, 16.1±0.5から16.9±0.6 μm, p>0.2, n=6; 輸出細動脈, 13.6±0.4から14.3±0.5 μm, p>0.2, n=6)。

慢性腎虚血では、虚血側腎において、オルメサルタンは輸入細動脈を9±2% (19.5±0.4から21.3±0.1 μm,

輸入細動脈径

輸出細動脈径



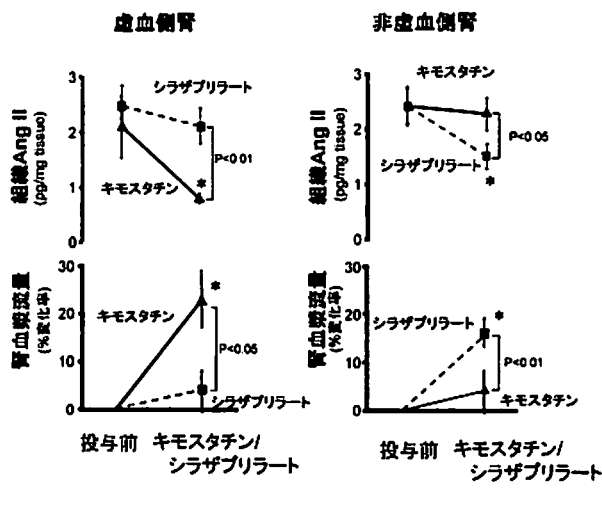
第6図 慢性片側腎虚血4週におけるオルメサルタンの腎微小循環に及ぼす影響。投与前に対し**はP<0.01, *はP<0.05を示す。'はP<0.01, 'はP<0.05を示す。(Tokuyama H et al: Hypertension 40: 34-40, 2002の第4図を許可を得て転載)

p<0.01, n=4), 輸出細動脈を10±1% (14.1±0.4から15.6±0.4 μm, p<0.05, n=4) 拡張させた(第6図)。非虚血側腎では、薬剤投与前の輸入細動脈径(17.0±0.5 μm, n=4)は虚血側腎より有意に小であったが(p<0.01), 輸出細動脈径(13.2±0.5 μm, n=4)は虚血側腎, 非虚血側腎で差異を認めなかった(p>0.2)。さらに、非虚血側腎ではオルメサルタン投与による輸入・輸出細動脈の拡張反応は虚血側腎に比し増強していた(輸入, 18±1%, p<0.01; 輸出, 22±2%, p<0.01)。

4. 組織 Ang II 生成経路の検討

1) 組織 Ang II 生成経路

組織 Ang II 生成経路の検討のため、ACE阻害薬であるシラザプリラートならびにキモスタチン阻害薬であるキモスタチンを投与し、腎血行動態および組織 Ang II 含量の変化を観察した。その結果、シラザプリラート投与により、組織 Ang II は虚血側腎では減少傾向を示したが、有意な減少ではなく(p>0.5, n=6), RPFの変化も認めなかったのに対し(4±4%, n=6; p<0.05 vs. キモスタチン), 非虚血側腎では組織 Ang II の減少(2.42±0.32から1.50±0.22 pg/mg tissue, p<0.05, n=6)とともにRPFの増加がみられた(16±3%, p<0.05, n=6)(第7図)。一方、キモスタチン投与により、組織 Ang II は虚血側腎において減少し(2.10±0.56から0.80±0.09 pg/mg tissue, p<0.05, n=6), 非虚血側腎では不変であった(p>0.5, n=6)(第7図)。これと平行して、RPFは虚血側腎では、キモスタチン投与により増加したが(23±6%, n=6, p<0.05 vs.

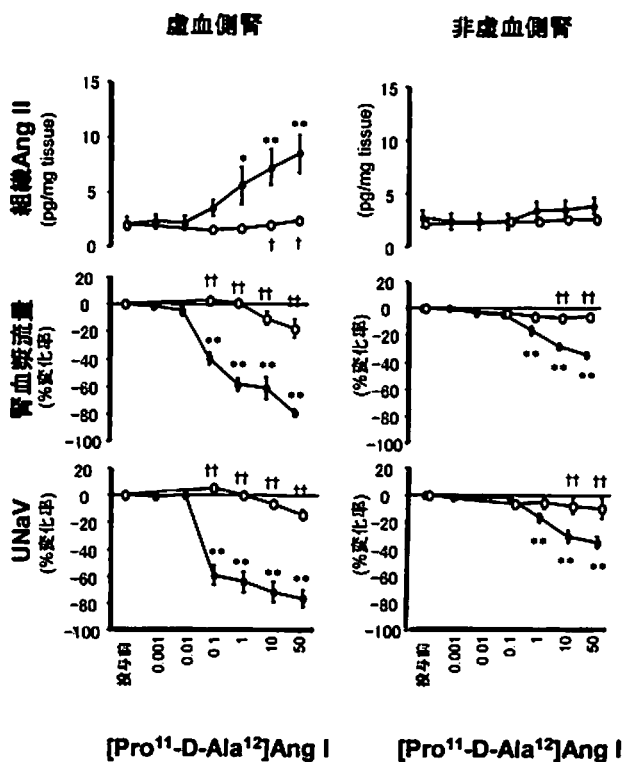


第7図 慢性片側腎虚血4週におけるキモスタチンおよびシラザプリラートの組織アンジオテンシンII含量および腎血行動態に及ぼす影響。投与前に対し*はP<0.05を示す。Angはangiotensinを表す。(Tokuyama H et al: Hypertension 40: 34-40, 2002の第5図を許可を得て転載)

シラザプリラート), 非虚血側腎では改善を認めなかった(1±2%, n=6; p<0.01 vs. シラザプリラート), なお, 使用した投与量のシラザプリラート, キモスタチンは, 全身血圧, 血漿レニン活性に影響を与えなかった。

2) 慢性腎虚血におけるキマーゼの役割

キマーゼの作用をうけてAng IIを産生する[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I投与による組織Ang II含量の変化および腎血行動態に及ぼす影響を観察した。全身血圧は10 nmol/kgならびに50 nmol/kgの[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I投与により軽度の上昇にとどまった(10 nmol/kg, 3±2%, p<0.05, n=6; 50 nmol/kg, 9±1%, p<0.01, n=6)。虚血側腎において, 組織Ang IIは0.1 nmol/kgの[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iにより上昇傾向を示し(2.13±0.53から3.55±0.77 pg/mg tissue p=0.16, n=6), 1nmol/kgでは有意に上昇した(5.60±1.70 pg/mg tissue, p<0.05)(第8図)。さらに投与量の増加に伴い, 用量依存性に組織Ang II含量は上昇し, 50 nmol/kgの投与量では4倍に上昇した(8.50±1.71 pg/mg tissue, p<0.01)。これと平行して, RPFも0.1 nmol/kgの[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iにより減少がみられ(-40±5%, p<0.01, n=6), 以後も用量依存性に低下した(1 nmol/kg, -59±5%; 10nmol/kg, -61±8%; 50 nmol/kg, -80±3%)。Na排泄に対しても, 0.1 nmol/kgの[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iは



第8図 慢性片側腎虚血における[Pro¹¹-D-Ala¹²]angiotensin Iによる組織アンジオテンシンII含量, 腎血行動態および尿Na排泄量への影響。虚血側腎では, [Pro¹¹-D-Ala¹²]angiotensin Iの投与により組織Ang II含量の増加とともに腎血漿流量, 尿Na排泄量(UNaV)の減少が観察された(●)。一方, キモスタチン前投与後によりこれらの反応は著明に抑制された(○)。非虚血側腎では, [Pro¹¹-D-Ala¹²]angiotensin Iによる反応は減弱していた。投与前に対し**はP<0.01, *はP<0.05を示す, キモスタチン非使用に対し'†'はP<0.01, '††'はP<0.05を示す。Angはangiotensinを表す。(Tokuyama H et al: Hypertension 40: 34-40, 2002の第6図を許可を得て転載)

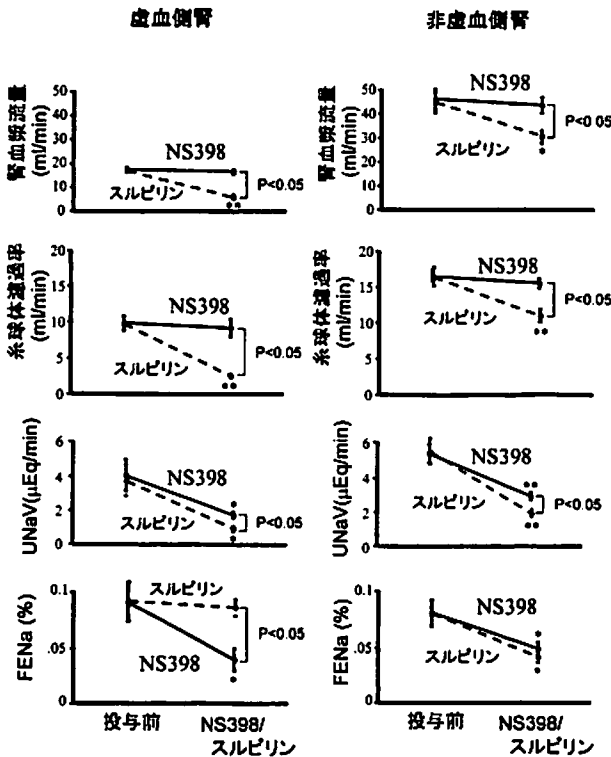
UNaVを有意に減少させ(-59±7%, p<0.01, n=6), さらなる投与量の増加により用量依存性にUNaVを減少させた(1 nmol/kg, -64±8%; 10nmol/kg, -72±8%; 50 nmol/kg, -77±6%)。虚血側腎におけるこれらの反応は, キモスタチンの前投与により著明に抑制された(第8図, 白丸, n=4)。

一方, 非虚血側腎では, [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iは組織Ang II含量に影響を与えなかった。RPFの減少の割合も虚血側腎に比し著明に減弱しており, 50nmol/kgの投与量では虚血側腎の50%の低下にとどまった(34±1%, p<0.01 vs. 虚血側腎)。

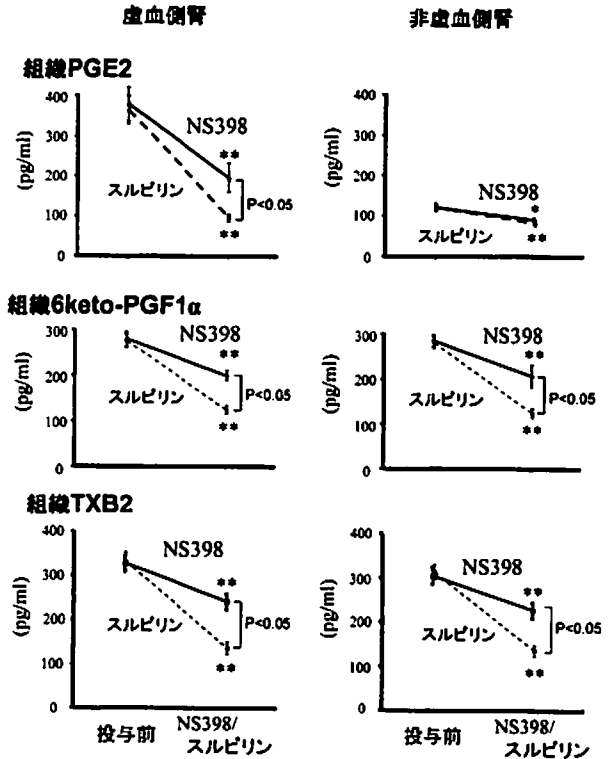
5. 慢性腎虚血におけるCOX-1/2の役割

COX-1 および COX-2 経路により産生された PG の腎血行動態および Na 排泄に果たす役割を検討するため、COX-2 選択的阻害薬の NS398 および COX 非選択的阻害薬のスルピリンを用いた。

正常犬において、スルピリン、NS398 ともに RPF、GFR ならびに FENa に影響を及ぼさなかった。慢性腎虚血において、虚血側腎では、スルピリンは RPF (17 ± 1 から 6 ± 1 ml/min, p < 0.01, n = 6), GFR (10 ± 1 から 3 ± 1 ml/min, p < 0.01, n = 6) および UNaV (3.8 ± 0.9 から 0.9 ± 0.2 μEq/min, p < 0.05, n = 6) を著しく減少させた (第 9 図)。FENa には変化がみられず、FF は減少傾向を示した (0.58 ± 0.08 から 0.43 ± 0.04, p = 0.1, n = 6)。一方、NS398 は RPF ならびに GFR に影響を与えず、UNaV (4.0 ± 0.9 から 1.7 ± 0.2 μEq/min, p < 0.05, n = 6) および FENa (0.09 ± 0.02 から 0.04 ± 0.01%, p < 0.05, n = 6) を減少させた。非虚血側腎における検討では、スルピリンは RPF (45 ±



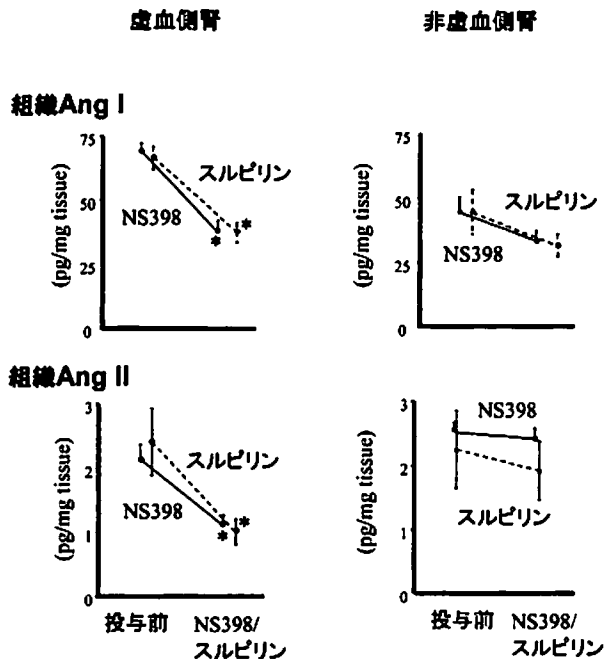
第 9 図 慢性片側腎虚血 4 週におけるサイクロオキシゲナーゼ-1 およびサイクロオキシゲナーゼ-2 阻害が腎血行動態および Na 排泄に及ぼす影響。投与前に対し**は P < 0.01, *は P < 0.05 を示す。(Tokuyama H et al : Nephron 92(1) : 183-191, 2002 の第 3 図を許可を得て転載)



第 10 図 慢性片側腎虚血 4 週におけるサイクロオキシゲナーゼ-1 およびサイクロオキシゲナーゼ-2 阻害が腎組織プロスタグランジン E2, 6-keto-prostaglandin F1α, トロンボキサン B2 に及ぼす影響。投与前に対し**は P < 0.01, *は P < 0.05 を示す。PG は prostaglandin を、TX は thromboxane を表す。(Tokuyama H et al : Nephron 92(1) : 183-191, 2002 の第 4 図を許可を得て転載)

4 から 31 ± 3 ml/min, p < 0.05, n = 6) ならびに GFR (16 ± 1 から 11 ± 1 ml/min, p < 0.01, n = 6) を減少させたが、NS398 は影響を与えなかった。UNaV はスルピリンによる減少の程度 (5.5 ± 0.8 から 1.9 ± 0.2 μEq/min, p < 0.01, n = 6) が NS398 による度合いより大であったが (5.4 ± 0.5 から 2.9 ± 0.3 μEq/min, p < 0.01, n = 6) (p < 0.05), GFR で UNaV を補正した FENa は同程度の変化を示した (スルピリン, 0.08 ± 0.01 から 0.04 ± 0.01%, p < 0.05, n = 6 ; NS398, 0.08 ± 0.01 から 0.05 ± 0.01%, p < 0.05, n = 6)。

スルピリンならびに NS398 は、慢性腎虚血により増加した虚血側腎 PGE2 を著明に減少させたが、その程度はスルピリンで大であった (第 10 図)。また、虚血側腎、非虚血側腎において増加した 6-keto-PGF1α ならびに TXB2 のスルピリンによる減少は、NS398 による減少の度合いを上まわった。なお、使用した投与量の



第11図 慢性片側腎虚血4週におけるサイクロオキシゲナーゼ-2阻害が組織アンジオテンシンI, アンジオテンシンIIに及ぼす影響。投与前に対し*は $P < 0.01$ を示す。Angはangiotensinを表す。(Tokuyama H et al: Nephron 92(1): 183-191, 2002の第5図を許可を得て転載)

スルピリン, NS398では, 全身血圧に影響を与えなかった。

6. Ang II生成におけるCOXの役割

慢性腎虚血により増加した虚血側腎組織Ang I含量はスルピリンおよびNS398により同程度に抑制された(スルピリン, 69 ± 5 から 38 ± 4 pg/mg tissue, $p < 0.01$, $n=6$; NS398, 70 ± 3 から 38 ± 4 pg/mg tissue, $p < 0.01$, $n=6$) (第11図)。同様に, 腎組織Ang II含量も両薬剤により減少し, その程度は同等であった(スルピリン, 2.46 ± 0.53 から 1.05 ± 0.20 pg/mg tissue, $p < 0.01$, $n=6$; NS398, 2.12 ± 0.26 から 1.13 ± 0.14 pg/mg tissue, $p < 0.01$, $n=6$)。一方, 非虚血側腎ではスルピリン, NS398とも組織Ang I, Ang II含量に影響を与えなかった。血漿レニン活性はスルピリン, NS398投与で変化はみられなかった。

考 察

片側腎動脈狭窄は, 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疾患である。従来, 片側腎動脈狭窄の病態の検討は, Goldblatt²⁾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, 当該側の腎機能ならびに血管作動性因子の動態に大きな影響を与えることは広く知られている²⁶⁾。一方, 非狭窄側腎においても, 狭窄側腎より分泌されるAng II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。しかしながら, 虚血側腎・非虚血側腎における腎血行動態と, 腎内血管作動性因子による内部環境との関係は詳細に検討されていない。本研究は, 一側腎虚血により, 虚血側腎のみならず非虚血側腎においても腎機能の低下が生じることを示した。従来, 一側腎動脈の狭窄により対側腎が肥大し, その機能を代償することが臨床で知られている。また, Truongらは片側腎動脈狭窄ラットにおいて, 非狭窄側腎は組織学的に過形成することを報告している²⁷⁾。これとは対照的に, 2腎1クリップ腎血管性高血圧ラットモデルにおいて, 非狭窄側腎は腎機能を代償しないと報告もあり^{4, 28)}。一定の見解が得られていない。そこで, 本研究では, 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, 定量的に狭窄した。その結果, 全身血圧の上昇は軽度であり, 観察された腎血行動態および腎間質血管作動性因子の動態の変化は, 虚血に伴うものが主体と考えられた。この点に関して, 一側腎動脈狭窄が50%になるように作成したモデルにおいても, 90%狭窄でみられた変化より弱いものの, 同様の傾向が観察された²⁹⁾。したがって, 本研究モデルでは, 腎動脈の狭窄度に依存した腎血行動態ならびに腎内血管作動性因子の変化が認められた。

慢性腎虚血において, 虚血側腎のみならず非虚血側腎においても, 血行動態の変化をきたす機序の詳細は明らかでない。本研究は, 虚血側腎のみならず非虚血側腎においても組織Ang IIが増加することを示した(第3図)。さらに, 虚血側腎のみならず非虚血側腎においても濾過係数の上昇がみられたことより, 組織Ang IIの作用を示唆するものと考えられた。これらの成績より, Ang II作用を抑制することにより, 腎内Ang IIの活性が腎血行動態に影響を与えているか否かを, アンジオテンシン受容体拮抗薬であるオルメサルタンを用いて検討した。その結果, 正常犬において, 血圧ならびに腎血行動態に影響を与えない量のオルメサルタンは, 慢性腎虚血において虚血側腎, 非虚血側腎ともに濾過係数の低下傾向を伴う腎血行動態の改善をもたらした(第5図)。さらに,

糸球体血行動態の中心的役割を占める輸入、輸出細動脈を、CCDカメラを用いて直接的に評価したところ、虚血側腎、非虚血側腎ともに、オルメサルタンは輸入、輸出細動脈をほぼ同程度に拡張させた(第6図)。したがって、同程度の輸入、輸出細動脈拡張は、濾過係数を低下させることを示した Carmines らの報告³⁰⁾とあわせて、本研究は慢性腎虚血において、腎組織 Ang II が重要な役割を果たしていることを示す結果と考えられた。一方、2腎1クリップ高血圧モデルにおいて、非虚血側腎では TXA₂ の生成が増加し、TXA₂ が非虚血側腎の腎血行動態を代償しないことに関与しているという報告があり²⁸⁾、本研究においても非虚血側腎において TXB₂ の生成の増加がみられた(第4図)。しかしながら、TXA₂ は腎輸入細動脈を優位に収縮させ、濾過係数を低下させることより³¹⁾、慢性腎虚血に伴う腎血行動態の変化を説明しうる中心的因子ではないと考えられた。

生体内 CCD カメラによる観察で、オルメサルタンによる輸入、輸出細動脈の拡張の程度が、非虚血側腎に比し虚血側腎で減弱していた(輸入細動脈、 $9 \pm 2\%$ vs. $18 \pm 1\%$; 輸出細動脈、 $10 \pm 1\%$ vs. $22 \pm 2\%$)(第6図)。この反応性の相違の機序として、虚血側腎における著明な PGE₂ 濃度の上昇が関与することが示唆された(第4図)。さらに虚血側腎では、腎灌流圧の低下により、輸入細動脈にのみ存在する筋原性収縮反応³²⁾が減弱しており、非虚血側腎に比し、虚血側腎輸入細動脈の基礎血管径の開大に関与することが考えられた(第6図、投与前)³³⁾。したがって、虚血側腎では PG および筋原性収縮反応などの因子が、基礎血管緊張ならびに組織 Ang II による腎動脈反応性に影響していることが考えられた。

近年の研究により、組織 Ang II 生成経路には、様々な経路が存在することが明らかになった^{7,8)}。とくに腎臓では、Ang II は血液中より高濃度に存在し³⁴⁾、腎局所における Ang II 生成経路について注目されつつある⁵⁾。すなわち、Murakami らは、正常犬では Ang I から Ang II への変換に ACE が重要な役割を果たしていることを示した⁹⁾。さらに、この報告では ACE 以外の変換経路の存在もわずかであるが示唆しており、なかでもキマーゼが正常犬の腎臓における Ang I から Ang II への変換の約 1 割を担うことを示した。本研究では、慢性腎虚血における虚血側腎ならびに非虚血側腎での Ang II 産生経路を、ACE 阻害薬であるシラザプリラートならびにキマーゼ阻害薬であるキモスタチンを用いて検討した。その結果、非虚血側腎において、シラザプリラートにより腎組織 Ang II 含量が低下したが、キモス

タチンでは影響されなかった。さらに、RPF の各薬剤に対する反応も同様の結果を示したことより、非虚血側腎では Ang I から Ang II の変換にキマーゼよりもむしろ ACE 活性が重要な役割を果たしていることが示された。この点に関して、Navar らは、ラットに Ang II を持続静注し、血清中 Ang II を高値に維持した状態では、腎組織 ACE が増加することを報告していることから³⁵⁾、虚血側腎より産生された Ang II が、非虚血側腎において ACE 活性の亢進を介して Ang II 産生を増加させる可能性が推定される。一般に、Ang II の産生律速酵素は ACE でなくレニンであるとされているが、組織特異的に発現調節がされている組織 Ang 産生系においては、ACE が重要な役割を果たしていることが示唆されている⁴⁾。このような腎局所における Ang II 産生とは別個に、Zou らはラットに Ang II を静注することにより、Ang 受容体を介して Ang II が腎内に internalization することを報告した⁵⁾。本研究においても、血清 Ang II は慢性腎虚血において増加しており、血清 Ang II の増加が腎組織 Ang II 上昇に一部寄与する可能性も考えられた。したがって、非虚血側腎における組織 Ang II 含量の増加は、ACE 活性を介した産生増加や、腎組織による血液からの Ang II の取り込みなどの要因が血液-腎の濃度勾配を形成すると推測された。

本研究は、虚血側腎の Ang II 産生系が非虚血側腎とは大きく異なることを明らかにした。すなわち、虚血側腎では Ang II 産生がキモスタチンで強く抑制されるのに対し、シラザプリラートの影響は軽微で、RPF に対する影響もキモスタチンによる変化が著明に大であった(第7図)。さらに、キマーゼにより特異的に Ang II への変換を受けるが、ACE では変換されない [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I²⁰⁾を用いて腎組織 Ang II 含量および RPF への影響を検討したところ、虚血側腎では [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I の用量依存性に腎 Ang II 含量の増加を示し、それとともに RPF および尿 Na 排泄の低下をもたらした(第8図)。これらの変化はキモスタチンの前処置にて著明な抑制を受けたことを考え合わせると、一側慢性腎虚血時の虚血側腎では、組織 Ang II 含量の増加に、ACE 活性以上にキマーゼが関与することが考えられた。一方、非虚血側腎における [Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang I に対する反応から、キマーゼを介する Ang II 産生系の活動性は低いものと思われた。

キマーゼは ACE とならんで Ang II 産生経路として重要であるが、とくに病的状態でその活性亢進と病状との関連が推察されている。すなわち、キマーゼは心筋虚血³⁶⁾、動脈硬化³⁷⁾、心不全³⁸⁾などの病態で誘導され、さ

らに Shiota らは、血管障害において血管キマーゼが賦活され、生成された組織 Ang II が組織リモデリングに関与していると報告している³⁹⁾。一方、Jin らは、腎血管性高血圧モデルにおいて、高血圧の発生に血管壁 ACE が関与し、キマーゼの関与は少ないと報告している⁴⁰⁾。一方、腎臓では移植腎⁴¹⁾、急速進行性糸球体腎炎⁴²⁾、IgA 腎症⁴³⁾において、キマーゼと腎障害との関連を示唆する報告が出されているが、直接キマーゼ活性を検討した研究はない。さらに、組織キマーゼはキマーゼ含有細胞からの脱顆粒により活性化されるため、組織キマーゼ活性の評価には、組織ホモジェネートなどの手法では、分泌顆粒にあるキマーゼを過大評価することも考えられる²⁹⁾。そこで、本研究では、活性化を受けたキマーゼによって [Pro¹¹-D-Ala¹²] Ang I が Ang II へ変換される特性²⁹⁾を利用して、腎内におけるキマーゼ活性の指標として [Pro¹¹-D-Ala¹²] Ang I 投与による組織 Ang II 含量の変化およびその腎血行動態への影響を検討した。その結果、産生された Ang II が RPF ならびに尿 Na 排泄に影響を与えていることが示された。いかなる機序により虚血側腎においてキマーゼ活性が亢進するかに関して、詳細は明らかでない。しかしながら、キマーゼが心筋虚血³⁶⁾において誘導されるとする報告や、無酸素状態下において心筋組織からの Ang II 依存性ノルエピネフリン遊離は、キモスタチンにより抑制されるとした Maruyama らの報告もあり²⁹⁾、慢性腎虚血においてもキマーゼが誘導されることと関連するものと推察された。実際、酸化ストレスによりキマーゼが誘導されるとの報告もあり⁴⁴⁾、今後この方面からの検討も必要と考えられた。また、虚血側腎、非虚血側腎で組織 Ang II 生成経路が異なり、本研究ならびに著者が最近報告した研究における ACE 阻害薬とアンジオテンシン受容体拮抗薬での腎血行動態に与える作用の差異⁴⁵⁾が、腎臓の長期的影響にいかなる差異をもたらすかについては、今後の検討が必要と考えられた。

腎は PG 合成の主要な場であり、腎血行動態や Na 排泄に関与することが知られている。本研究では、虚血側腎において PGE2 および PGI2 が増加し (第 4 図)、スルピリンにより生成を阻害することにより、腎血行動態が障害された (第 9 図)。一方、非虚血側腎では PGI2 が増加し、さらにスルピリン投与により PGI2 のみならず PGE2 も減少し、腎血行動態は障害された。これらの結果より、PGE2 ならびに PGI2 は慢性腎虚血において、虚血側腎、非虚血側腎ともに腎血行動態の維持、Na 排泄に重要な役割を果たしていることが考えられた。さらに、正常犬において、PG 合成阻害は腎血行動態や

Na 排泄に影響を与えなかったことを考慮すると、慢性腎虚血では虚血側腎、非虚血側腎のいずれにおいても、腎 PG 合成系が亢進し、その結果、低下した腎機能を代償する方向に働くものと考えられた。非虚血側腎において、PGE2 と PGI2 が異なった動態を示した機序は明らかでないが、腎血管性高血圧において増加した腎組織 Ang II は、PGI2 の生成のみを刺激するとの報告もある⁴⁶⁾。また、虚血側腎において、スルピリンは FENa に影響を及ぼさなかった (第 9 図)。これは、スルピリンが GFR を著しく減少させたため、Na 排泄の評価に少なからず影響を与えたことが考えられた。さらに、スルピリンにより FF が減少傾向であり、このことにより輸出細動脈内血漿膠質浸透圧を減少させ、Na 再吸収を減少させたことも考えられた⁴⁷⁾。

近年、PG 生成系としての COX には二つのサブタイプが存在することが報告され、生理的ならびに病的役割についての検討が行われている。すなわち、COX-1 は通常状態において存在し、腎血行動態の維持に関与するが、COX-2 はサイトカインなどの様々な刺激によって誘導されるのみならず、腎では緻密斑や皮質集合管に存在することが明らかとなった。さらに、腎 COX-2 は 2 腎 1 クリップ腎血管性高血圧モデルの狭窄側腎において誘導されることが報告されており^{12, 48)}、COX-2 の腎での役割が示唆されている。一方、Gross らは COX-2 選択的阻害薬存在下においても圧利尿は障害されないことを報告しており⁴⁹⁾、腎における COX-1 および COX-2 の相対的役割については十分には理解されていない。本研究は、虚血側腎で増加した PGE2 および PGI2 が、COX-2 選択的阻害薬の NS398 により減少したことから、虚血側腎では COX-2 を介する PG の生成が示された。また、非虚血側腎においても、NS398 により PGE2, PGI2 産生量が減少したことより、非虚血側腎の PG 産生系においても同様に COX-2 の関与が考えられた。これらの COX-2 を介する PG 産生の変化は、腎血行動態 (RPF, GFR) には影響を与えず、Na 排泄、とくに FENa の変化をもたらした。一方、正常犬において、NS398 は腎血行動態および Na 排泄に影響しなかった。以上の結果から、慢性腎虚血では COX-2 活性の亢進が起り、腎 PG 産生の増加をもたらす。Na 排泄の方向に働いており、同時に産生された Ang II の作用に拮抗することが考えられた。また、スルピリンでは腎血行動態ならびに尿 Na 排泄の両者に影響を及ぼしたのに比し、NS398 は尿 Na 排泄を選択的に抑制した。この結果は、COX-2 由来の PG が尿細管により選択的に作用することを示唆するものと思われた。実際、COX-2 が通常状

態において、血管壁よりもむしろ緻密斑や皮質集合管などの尿細管に分布するとの報告と合致する結果と考えられる。一方、NS398は腎血行動態に影響を与えなかったが、スルピリンでは影響を受けたことより、血管壁ではむしろCOX-1の影響が大である可能性が考えられた。しかしながら、COX-1が尿細管に対して作用するか否かについては、本研究では明らかにされておらず、今後の検討が必要である。

PGは血管抵抗性調節やNa代謝に関与するのみならず、種々の血管作動性因子に対しても影響を及ぼすことが報告されている¹²⁾。従来、腎血管性高血圧患者に対し、COX阻害薬が降圧とともに血中レニン活性の低下をもたらすことが指摘されていたが⁵⁰⁾、近年、レニン分泌とCOX-2との関連が示唆されるようになった。すなわち、Wangらは腎血管性高血圧モデルにおいて、COX-2の阻害がレニンを抑制することを報告した⁴⁸⁾。さらに、Castropらは、COX-2由来のPGは緻密斑におけるレニンの生成に重要であることを示した⁵¹⁾。本研究では、虚血側腎で増加した組織Ang IならびにAng IIは、COX-2阻害薬のNS398により著しく抑制されることを示した(第11図)。この結果は、COX-2阻害によりレニン産生が抑制され、アンジオテンシノーゲンからAng Iへの変換が阻害されたことによるものと推察された。したがって、COX-2の阻害によるAng II生成抑制は、オルメサルタン投与によって得られた成績(第5図)を考慮すると、腎機能に対して良好な影響を与える可能性が考えられる。しかしながら、COX-2阻害による腎機能への影響をみた成績(第9図)は、Ang II生成抑制による間接的な効果よりも、むしろ、PG産生抑制による直接的な増悪作用の方が大であることを示すものと思われた。一方、非虚血側腎では、COX-2阻害は組織Ang I、Ang IIを抑制しなかった。これは、非虚血側腎において増加した組織Ang IIがレニン生成を抑制するため⁹⁾、COX-2阻害による影響を受けないものと考えられた⁴⁷⁾。

総 括

片側腎動脈を狭窄させて慢性腎虚血犬を作成し、血管作動性因子の動態およびその役割について検討し、以下の結果を得た。

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

Ang II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アンジオテンシン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Ang II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Ang IIに変換されるAng I基質[Pro¹¹-D-Ala¹²]Ang Iを腎動脈内に投与したところ、虚血側腎ではAng II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。

本稿を終えるにあたり、懇切な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室猿田享男教授に深く感謝いたします。また、本研究を直接御指導いただきました、林晃一講師に心より感謝いたします。ならびに御協力、御助言をいただきました研究室各員に深く感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、第22回(高松、1999年)と第23回日本高血圧学会(福岡、2000年)、第42回(横浜、1999年)と第43回(名古屋、2000年)と第44回日本腎臓学会(大阪、2001年)、18th International Society of Hypertension (Chicago, 2000)、33rd Annual Meeting of American Society of Nephrology (Toronto, 2000)において発表した。

本研究の一部は平成10、11年度文部省科学研究費補助金(奨励研究(A)、課題番号10770531)による。

文 献

- 1) Preston RA, Epstein M: Ischemic renal disease: an emerging cause of chronic renal failure and end-

- stage renal disease. *J Hypertens* 15 : 1365-1377, 1997
- 2) Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF : Studies on experimental hypertension : I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 59 : 347-379, 1934
 - 3) Mendelsohn FAO : Failure of suppression of intrarenal angiotensin II in the contralateral kidney of one clip, two kidney hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 7 : 219-223, 1980
 - 4) Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG : Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 20 : 763-767, 1992
 - 5) Zou LX, John DI, Von Thun AM, Hymel A, Ono H, Navar LG : Receptor-mediated intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 28 : 669-677, 1996
 - 6) Reilly CF, Tewksbury DA, Schechter NM : Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J Biol Chem* 257 : 8619-8622, 1982
 - 7) Urata H, Healy B, Stewart RW : Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* 66 : 883-890, 1990
 - 8) Okunishi H, Miyazaki M, Toda N : Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens* 2 : 277-284, 1984
 - 9) Murakami M, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Hayashi K, Saruta T : Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int* 52 : s132-s135, 1997
 - 10) DeForrest J, Knappenberger R, Antonaccio M, Ferrone R, Creekmore J : Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat. *Am J Cardiol* 49 : 1515-1517, 1982
 - 11) Stahl RAK, Helmchen U, Paravicini M, Ritter LJ, Scholl MP : Glomerular prostaglandin formation in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol* 247 : F975-F981, 1984
 - 12) Hartner A, Goppelt-Strube M, Hilgers KF : Coordinate expression of cyclooxygenase-2 and renin in the rat kidney in renovascular hypertension. *Hypertension* 31(part 2) : 201-205, 1998
 - 13) Goppelt-Strube M : Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52 : 213-222, 1995
 - 14) Harris RC, Mckanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD : Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increase with salt restriction. *J Clin Invest* 94 : 2504-2510, 1994
 - 15) Vio CP, Cespedes C, Gallardo P, Masferrer JL : Renal identification of cyclooxygenase-2 in a subset of thick ascending limb cells. *Hypertension* 30(pt 2) : 687-692, 1997
 - 16) Naitoh M, Suzuki H, Murakami M, Matsumoto A, Ichihara A, Nakamoto H, Saruta T : Effects of oral AVP antagonists OPC-21268 and CPC-31260 on congestive heart failure in conscious dogs. *Am J Physiol* 267 : H2245-H2254, 1994
 - 17) Naitoh M, Suzuki H, Arakawa K, Matsumoto A, Ichihara A, Matsuda H, Kubota E, Murakami M, Nakamoto H, Saruta T : Role of kinin and renal ANG II blockade in acute effects of ACE inhibitors in low-renin hypertension. *Am J Physiol* 272 : H679-687, 1997
 - 18) Matsuda H, Hayashi K, Arakawa K, Naitoh M, Kubota E, Honda M, Matsumoto A, Suzuki H, Yamamoto T, Kajiya F, Saruta T : Zonal heterogeneity in action of angiotensin-converting enzyme inhibitor on renal microcirculation : role of intrarenal bradykinin. *J Am Soc Nephrol* 10(11) : 2272-2282, 1999
 - 19) Siragy HM, Howell NL, Ragsdale NV, Carey RM : Renal interstitial fluid angiotensin modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion, and renin inhibition. *Hypertension* 25 : 1021-1025, 1995
 - 20) Powell WS : Rapid extraction of oxygenated metabolites of arachidonic acid from biological samples using octadecylsilyl silica. *Prostaglandin* 20 : 947-957, 1980
 - 21) Yamamoto T, Hayashi K, Tomura Y, Tanaka H, Kajiya F : Direct *in vivo* visualization of renal microcirculation by intravital CCD videomicroscopy. *Exp Nephrol* 9 : 150-155, 2001
 - 22) Koike H, Sada T, Mizuno M : In vitro and *in vivo* pharmacology of olmesartan medoxomil, an angiotensin II type AT1 receptor antagonist. *J Hypertens* 19 (Supple 1) : S3-S14, 2001
 - 23) Maruyama R, Hatta E, Yasuda K, Smith NC, Levi R : Angiotensin-converting enzyme-independent angiotensin formation in a human model of myocardial ischemia : modulation of norepinephrine release by angiotensin type 1 and angiotensin type 2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 294 : 248-252, 2000
 - 24) Hoit BD, Shao Y, Kinoshita A : Effects of angiotensin II generated by an angiotensin converting enzyme-independent pathway on left ventricular performance in the conscious baboon. *J Clin Invest* 95 : 1519-1527, 1995
 - 25) Okudaira H : Challenge studies of a leukotriene receptor antagonist. *Chest* 111 : 46S-51S, 1997
 - 26) Mai M, Hilgers KF, Wagner J, Mann JF, Geiger H : Expression of angiotensin-converting enzyme in renovascular hypertensive rat kidney. *Hypertension* 25 : 674-678, 1995
 - 27) Truong LD, Farhood A, Tasby J, Gillum D : Experimental chronic renal ischemia : Morphologic and

- immunologic studies. *Kidney Int* 41 : 1676-1689, 1992
- 28) Himmelstein SI, Klotman PE : The role of thromboxane in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension in rats. *Am J Physiol* 257 : F190-F196, 1989
 - 29) Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T : Stenosis-Dependent Role of Nitric Oxide and Prostaglandin in Chronic Renal Ischemia. *Am J Physiology* 282 : F859-865, 2002
 - 30) Carmines PK, Morrison TK, Navar LG : Angiotensin II effects on microvascular diameters of *in vitro* blood-perfused juxtamedullary nephrons. *Am J Physiology* 251 : F610-F618, 1986
 - 31) Hayashi K, Loutzenhiser R, Epstein M : Direct evidence that thromboxane mimetic U44069 preferentially constricts the afferent arteriole. *J Am Soc Nephrol* 8 : 25-31, 1997
 - 32) Hayashi K, Epstein M, Loutzenhiser R : Pressure-induced vasoconstriction of renal microvessels in normotensive and hypertensive rats : studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Circ Res* 65 : 1475-1484, 1989
 - 33) Inscho EW, Carmines PK, Cook AK, Navar LG : Afferent arteriolar responsiveness to altered perfusion pressure in renal hypertension. *Hypertension* 15 : 748-752, 1990
 - 34) Navar LG, Harrison-Bernard LM, Imig JD, Wang CT, Cervenka L, Mitchell KD : Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT1 receptor blockade. *J Am Soc Nephrol* 10 (Suppl 129) : S266-S272, 1999
 - 35) Navar LG, Von Thun AM, Zou L, el-Dahr SS, Mitchell KD : Enhancement of intrarenal angiotensin II levels in 2 kidney 1 clip and angiotensin II induced hypertension. *Blood Press Suppl* 2 : 88-92, 1995
 - 36) Laine P, Kaartinen M, Penttila A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT : Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation* 99 : 361-369, 1999
 - 37) Uehara Y, Urata H, Sasaguri M, Ideishi M, Sakata N, Tashiro T, Kimura M, Arakawa K : Increased chymase activity in internal thoracic artery of patients with hypercholesterolemia. *Hypertension* 35 (1 Pt 1) : 55-60, 2000
 - 38) Holtz J : Pathophysiology of heart failure and the renin-angiotensin-system. *Basic Res Cardiol* 88 Suppl 1 : 183-201, 1993
 - 39) Shiota N, Okunishi H, Takai S, Mikoshiba I, Sakonjo H, Shibata N, Miyazaki M : Tranilast suppresses vascular chymase expression and neointima formation in balloon-injured dog carotid artery. *Circulation* 99 : 1084-1090, 1999
 - 40) Jin D, Takai S, Shiota N, Miyazaki M : Roles of vascular angiotensin converting enzyme and chymase in two-kidney, one clip hypertensive hamsters. *J Hypertens* 16 : 657-664, 1998
 - 41) Yamada M, Ueda M, Naruko T, Tanabe S, Han YS, Ikura Y, Ogami M, Takai S, Miyazaki M : Mast cell chymase expression and mast cell phenotypes in human rejected kidneys. *Kidney Int* 59(4) : 1374-1381, 2001
 - 42) Toth T, Toth-Jakatics R, Jimi S, Ihara M, Urata H, Takebayashi S : Mast cells in rapidly progressive glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 10(7) : 1498-1505, 1999
 - 43) Ehara T, Shigematsu H : Contribution of mast cells to the tubulointerstitial lesions in IgA nephritis. *Kidney Int* 54(5) : 1675-1683, 1998
 - 44) Rapala KM, Kozik A, Travis J : Effect of oxidation of beta-amyloid precursor protein on its beta-secretase cleavage. *J Pept Res* 52(4) : 315-320, 1998
 - 45) Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Takamatsu I, Tatematsu S, Ozawa Y, Wakino S, Saruta T : Differential Regulation of Elevated Renal Angiotensin II in Chronic Renal Ischemia. *Hypertension* 40(1) : 34-40, 2002
 - 46) Breyer MD, Badr KF : Arachidonic acid metabolites and the kidney, in *The Kidney* edited by Brenner MB, W.B.Saunders Company pp754-788, 1996
 - 47) Tokuyama H, Hayashi K, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Okubo K, Ozawa Y, Saruta T : Distinct Role of Intrarenal Cyclooxygenase-1/2 in Chronic Unilateral Renal Ischemia. *Nephron* 92(1) : 183-191, 2002
 - 48) Wang JL, Cheng HF, Harris RC : Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension* 34 : 96-101, 1999
 - 49) Gross JM, Dwyer JE, Knox FG : Natriuretic response to increased pressure is preserved with COX-2 inhibitors. *Hypertension* 34 : 1163-1167, 1999
 - 50) Jackson EK, Oates JA, Branch RA : Indomethacin decreases arterial blood pressure and plasma renin activity in rats with aortic ligation. *Circ Res* 49 : 180-185, 1981
 - 51) Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A : Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J Am Soc Nephrol* 12 : 867-874, 2001

学位論文

ラット硝子体中に投与したL-ドーパによる一酸化窒素の発生と組織学的変化
—メラニン顆粒の有無による相違—

慶應義塾大学医学部眼科学教室

(指導：小口芳久教授)

こばやし さち
小林 幸

(平成14年12月8日受付)

Key Word : L-DOPA, melanin, superoxide radicals, nitric oxide, vasodilation.

メラニンとは眼組織において虹彩、毛様体、網膜色素上皮、脈絡膜に存在し、光に対するフィルター、紫外線や可視光線の吸収、電子伝達系としての作用がある。また、特殊な環境下では活性酸素としての酸化作用を持つ^{1,2)}。生体内のカテコールアミンであるチロシンや、これがチロシナーゼにより変化して生成するドーパは重合して、さまざまなメラニン前駆物質を経て、ユメラニンやフェオメラニンといったメラニンになる³⁾。そして、最終的には蛋白質と重合し代謝される³⁾。このドーパの重合過程では、光照射や酸素負荷により、スーパーオキシド(O_2^-)⁴⁾や一酸化窒素(NO)⁵⁾が発生することが報告されている。さらに両者は非酵素学的に瞬時に反応しパーオキシナイトライト($ONOO^-$)という、細胞毒性を有する分子種を生成する。

L-ドーパはパーキンソン病に対して世界的に用いられている治療薬である。近年、L-ドーパを用いた小児の弱視に対する治療法が、Leguireらによって試みられた⁶⁾。弱視眼に対するL-ドーパの治療効果が視覚路のどの部分に働いているのか、現在のところ明確ではないが、Leguireらは、カテコールアミンに弱視眼の脳皮質支配領域の抑制を減弱させる効果があるためと推測している⁶⁾。一方で、Gottlobらは、それが網膜に対する直接効果であると推測している⁷⁾。もし、L-ドーパが網膜に直接作用するならば、その効果は一体、どのような化学作用によるものか、また、眼組織にどのような作用をもたらしているのか興味を持たれた。

AkeoらはL-ドーパの眼組織への影響について、牛の網膜色素上皮細胞(RPE)を用いて研究し、その結果、L-ドーパから発生する O_2^- がRPEに細胞毒性を発揮し、細胞周期に対してもメラニン顆粒を有するものと有しないものとで異なる影響を与えることを報告している^{4,8)}。したがって前述したようなL-ドーパを介したNOの生成が実際に起こるとすれば、これを治療薬として投与する場合に O_2^- とNOの同時生成による $ONOO^-$ など細胞毒性の可能性を考慮する必要が生じる。しかしながらL-ドーパの自動酸化とメラニン生成過程でのNO生成過程については直接証明がなされていないため、*in vitro*および*in vivo*においてこの検出を行うことを本研究の主な目的とした。

方法

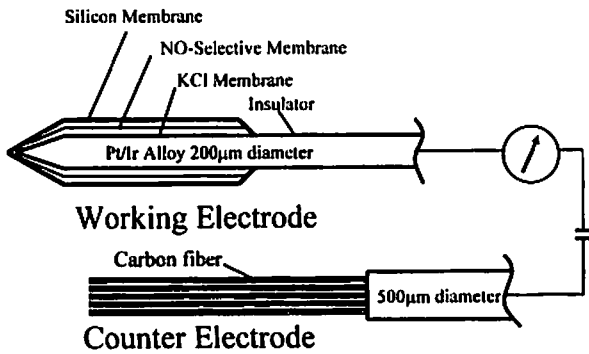
1. 実験1. *In vitro*におけるNOの発生

1) 実験材料

L-ドーパとphosphate buffered saline (PBS)は、Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO)より入手した。NO消去薬の2-4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (carboxy-PTIO)はDojindo Laboratories Co. (熊本)より購入した。

Dulbecco's Modified Eagle's Medium phenol red free (DMEM)はGibco Laboratories (Grand Island, NY)から、径35 mmの培養皿はCorning Glass

本論文は、Amaki SK, Oguchi Y, Ogata T, Suzuki T, Akeo Kiyoshi, Hiramitsu T : L-DOPA Produced Nitric Oxide in the Vitreous and Caused Greater Vasodilatation in the Choroid and the Ciliary Body of Melanotic Rats than in those of Amelanotic Rats. *Pigment Cell Research* 14 : 256-263. 2001の一部を含む。



第1図 NOの測定に用いた微小電極⁹⁾。不感電極(Counter Electrode)はカーボンでできている。感電極(Working Electrode)は径0.2mmのプラチナ(90%)とイリジウム(10%)から成り、3層の膜(塩化カルシウム膜、NO感受性膜、シリコン膜)でコーティングされている。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 1を、許可を得て転載)

Works (Corning, NY) から購入した。

NOモニターはInter Medical Co. 製(NO-501)(東京)を用いた⁹⁾。

NOモニターの原理は感電極と不感電極の間で起こるピコアンペア(pA)単位の電流を測定することにある(第1図)。測定された電流は増幅され、記録器により記録される。

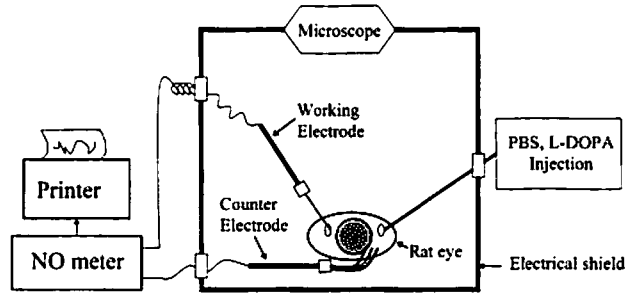
2) 培養皿中のNO測定

NO測定はDMEMの入った培養皿中で行われた。培養皿の蓋には、感電極と不感電極を通すガラスチューブを挿入するため、径2mmの孔を2つ開けた。さらに、L-ドーパ注入のための小孔を開けた。培養皿に感電極と不感電極を設置し、パラフィルム[®]により密閉し、ノイズ遮蔽装置内に置いた。DMEMで5段階(5, 29.9, 79.4, 152.7, 249 µM)に希釈したL-ドーパを、攪拌しながら、2分毎、濃度順に培養皿中に投与した。培養皿中に発生するNOを電極法で経時的にモニターし、記録した。79.4および249 µMのL-ドーパ注入による発生する電流測定は、追加5回の再検を行った。また、L-ドーパ(249 µM)投与6分後にNO消去薬であるcarboxy-PTIO¹⁰⁾(249 µM)を注入し、電流変化を記録した。

2. 実験2. *In vivo*におけるNOの発生

1) 実験材料

実験動物として生後6週令雌の有色ラット、Dark Agouti (DA) ラットを2匹、および、白色ラット、



第2図 硝子体腔におけるNO測定の方法。感電極を硝子体腔に挿入し、不感電極は下眼瞼結膜円蓋部に置いた。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 2を、許可を得て転載)

Wistar ラットを2匹用いた。いずれも日本 SLC 株式会社(静岡)から購入した。

NOモニターはInter Medical Co.製(NO-501)(東京)を用いた¹⁰⁾。

2) ラット硝子体中のNO測定

DA ラット2匹(4眼)、Wistar ラット2匹(4眼)を対象とした。

ラットは塩酸ケタミン(5~10 µg/g)の筋注、および、塩酸オキシプロカインの点眼により麻酔した。8倍希釈ボビドンヨードを点眼し、消毒した後、上方角膜輪部の1mm後極側に25ゲージ針で感電極とL-ドーパの挿入口を作成した。L-ドーパの挿入口から、30ゲージ針を用いて硝子体腔に20 µlのPBS、または、L-ドーパ(20 mM)を注入し、発生するNOを電極法で経時的にモニターし、記録した(第2図)。拡散電流が基線に戻るのを待ち、約5分毎、同薬剤連続3回の注入を1セットの実験とした。電極は非常に繊細であり、必要に応じて新しく取り替えた。従って、DAラット、Wistarラットともに1眼を2セットのPBS投与に用い、3眼を5セットのL-ドーパ投与に用いた。

3. 実験3. L-ドーパ投与による*in vivo*の組織学的変化

1) 実験材料

ラットは生後6週令雌のDAラット5匹、および、Wistarラット5匹を用いた。いずれも実験2と同様に得られた。

L-ドーパ、および、PBSは実験1と同様に得られた。

2) 組織学的検討

DAラット5匹(5眼)、Wistarラット5匹(5眼)を対象とした。両種ラットとも、2眼をPBS投与に用い、3眼をL-ドーパ投与に用いた。ラットは、塩酸ケ

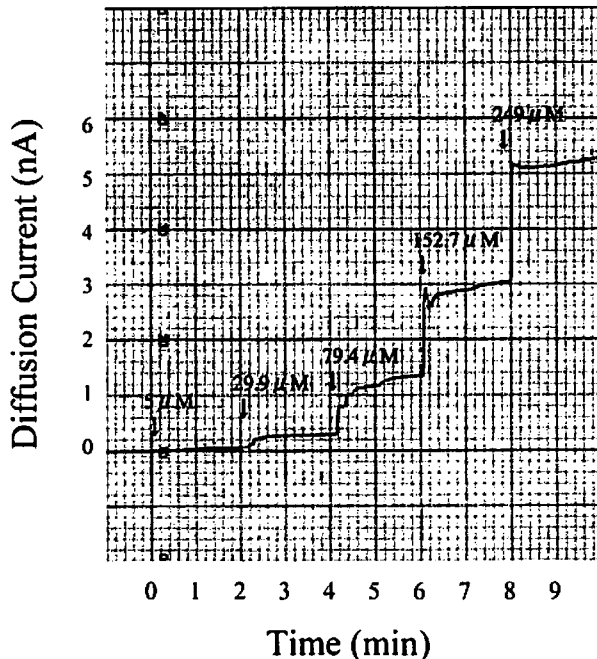
タミン (5~10 $\mu\text{g/g}$) の筋注、および、塩酸オキシブプロカインの点眼により麻酔した。8倍希釈ポビドンヨードを点眼し、消毒した後、上方の角膜縁より約1mm後部の位置から30ゲージ針を用いて、硝子体腔に20 μl のPBS、または、L-ドーパ (20 mM) を注入した。投与後、眼球表面にオフロキサシン眼軟膏を塗布し、感染を予防した。

投与は、第1日目、および、第3日目に行った。第5日目にクロロフォルムでラットを麻酔し屠殺した後、眼球を摘出した。眼球を摘出する際、薬剤を注入した穿刺部位に9~0シルク糸で印をつけた。眼球には水晶体を避けてメスで割を入れ、等張ホルマリンにより固定した。その後、パラフィンに包埋し、顕微鏡切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE染色) を行った。糸により印をつけた穿刺部位の反対側の毛様体や後極部網脈絡膜を観察した。

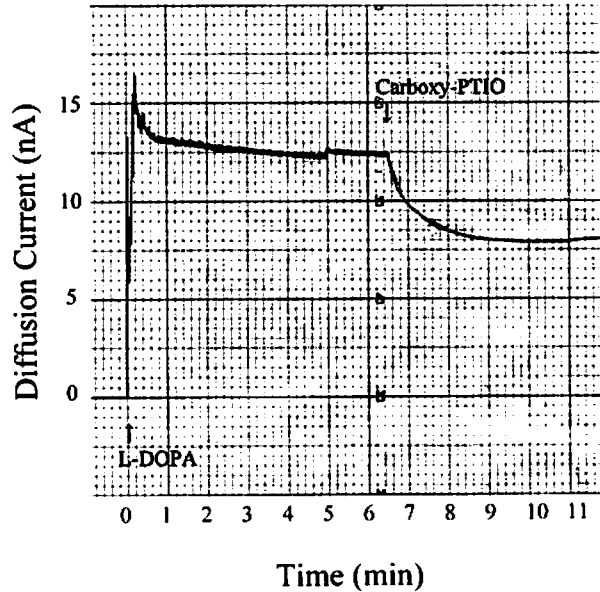
結果

1. 実験1. *In vitro* におけるNOの発生

密閉された培養皿中にL-ドーパを注入すると、注入



第3図 *In vitro* におけるL-ドーパによる非酵素学的NO生成の検出。L-ドーパを注入すると、NOが発生した(20%酸素下)。L-ドーパを加えていくと、濃度に依存して発生するNOは増加した。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 3を、許可を得て転載)



第4図 *In vitro* におけるL-ドーパによるNO生成に対するcarboxy-PTIOの抑制効果。L-ドーパ (249 μM) を注入後、carboxy-PTIO (249 μM) を加えると、2.5分後には電流が64%まで低下した。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 4を、許可を得て転載)

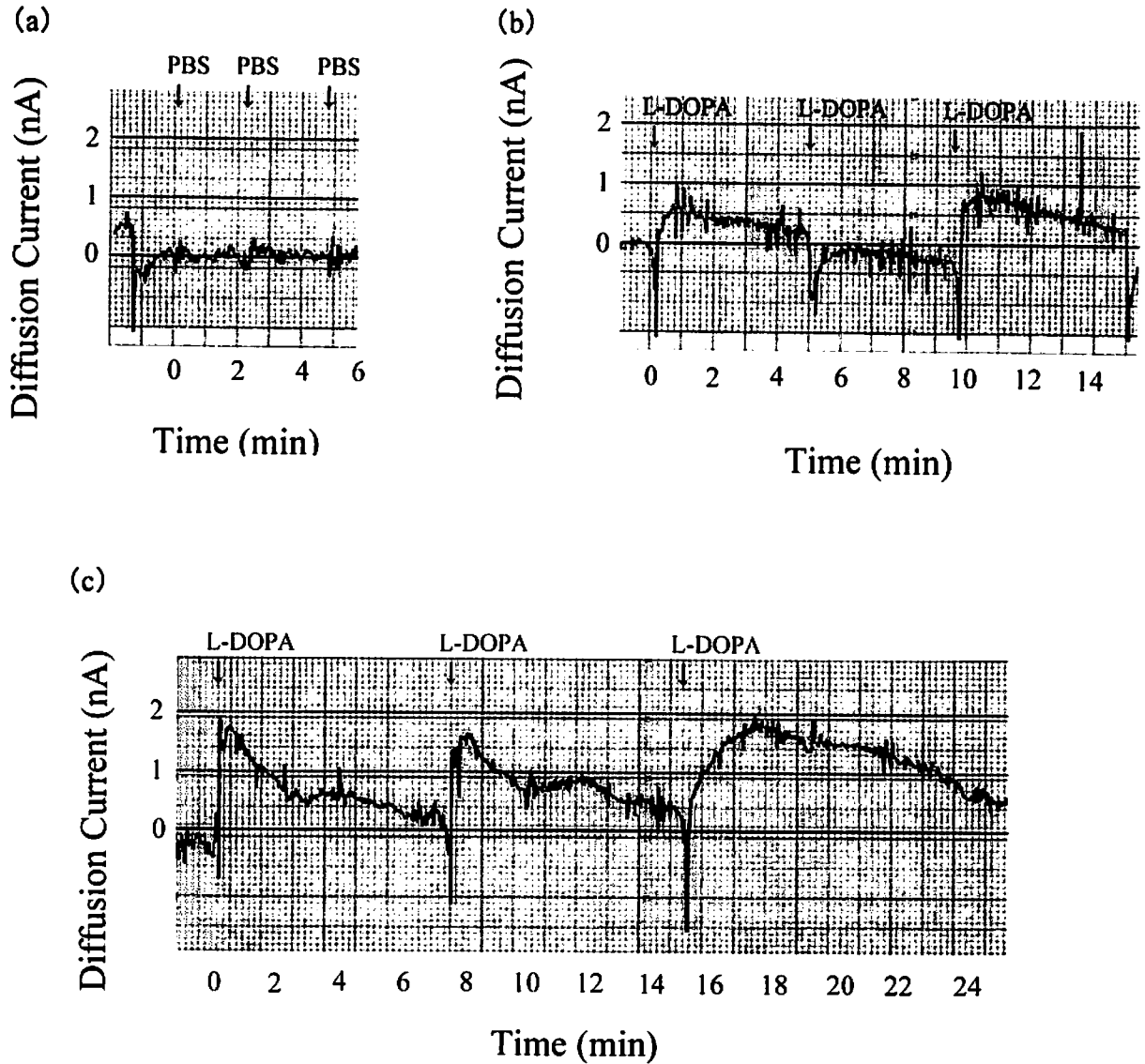
後2分で拡散電流が確認された。その拡散電流は注入したL-ドーパの濃度に比例して増加していた(第3図)。NO消去薬であるcarboxy-PTIO (249 μM) はL-ドーパ (249 μM) が発生する電流を64%に低下させた(第4図)。6回測定した79.4および249 μM のL-ドーパから発生した拡散電流の平均値は、それぞれ495および1670 pAであった(第1表)。

2. 実験2. *In vivo* におけるNOの発生

NOモニターの感電極と不感電極をラット硝子体中に挿入した後、20 mMのL-ドーパ、または、PBS (20 μl) を硝子体中に注入した。1眼あたり連続3回の投与を一連とし、発生する拡散電流を経時的にモニターし、記録した。

ノイズ遮蔽装置は設置されていたが(第2図)、顕微鏡による観察下での操作のために外部からの影響を十分に遮蔽できず、電流の波形にはartifactである振幅が多く捉えられた。小刻みな振幅は持続的に検出されていたartifactである。L-ドーパ、または、PBSやL-ドーパを硝子体に注入すると、大きな負のartifactが検出されたが、すぐに零点へ戻った。

PBSを硝子体中に注入した実験では、拡散電流は検



第5図 L-ドーパによる *in vivo* での NO 生成の検出. (a) PBS (DA ラット), (b) L-ドーパ 20 mM (Wistar ラット), (c) L-ドーパ 20 mM (DA rat). (Amaki SK, et al : Pigment Cell Research 14 : 256-263, 2001 の Fig. 5 を, 許可を得て転載)

第1表 74.9 および 249 μM の L-ドーパを注入した場合に生じる拡散電流の値

L-ドーパ (μM)	拡散電流 (pA)						平均値 (pA)
74.9	400	430	520	720	480	420	495 \pm 119
400	1490	1570	1600	2380	1580	1400	1670 \pm 356

74.9 および 249 μM の L-ドーパを注入する実験は, 各々 6 回ずつ再検された. 拡散電流の平均値は注入する L-ドーパの濃度に比例して上昇した. (Amaki SK, et al : Pigment Cell Research 14 : 256-263, 2001 の Table 1 を, 許可を得て転載)

出されなかった（第5図a）。L-ドーパを硝子体中に注入した実験では、各眼とも同様なパターンで、拡散電流が3回とも検出され、一定の値まで発生し減衰していた（第5図b, c）。その値は白色ラット（第5図b）より有色ラット（第5図c）に高く認められた。

3. 実験3. L-ドーパ投与による *in vivo* の組織学的変化

L-ドーパの投与により、毛様体血管の拡張は有色ラット（第6図a）と白色ラット（第6図b）の両者に認められたが、有色ラットにおいて著しかった。有色ラットの脈絡膜血管は毛様体血管と同様に拡張していたが（第7図a）、それと比較して、白色ラットの脈絡膜血管は拡張の程度が低かった（第7図b）。

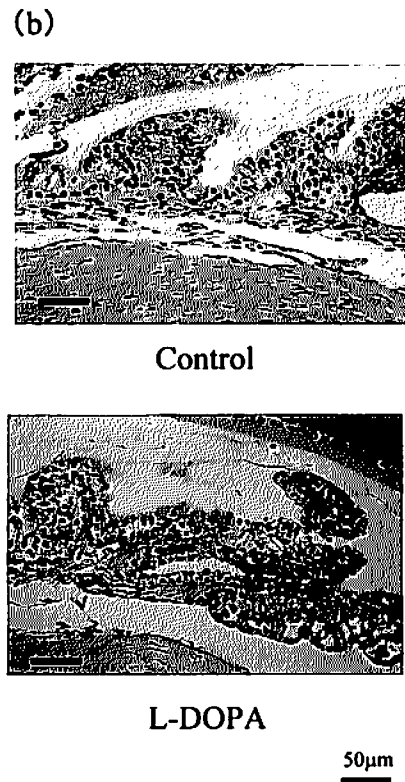
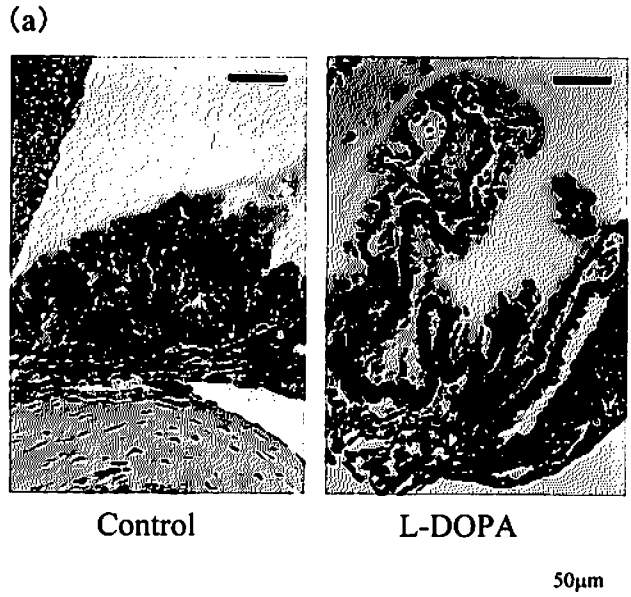
考 案

Akeoらは、*in vitro*の実験系において、L-ドーパを培養液中で攪拌することで酸素と反応し、非酵素学的にアミノ基からNOが発生することを示している⁹⁾。実験1において、密閉された培養皿中にL-ドーパを注入した場合、発生する電流は濃度に比例して増加していた。NO消去薬であるcarboxy-PTIO¹⁰⁾ (249 μM)はL-ドーパ(249 μM)が発生する電流を64%に低下させていた。

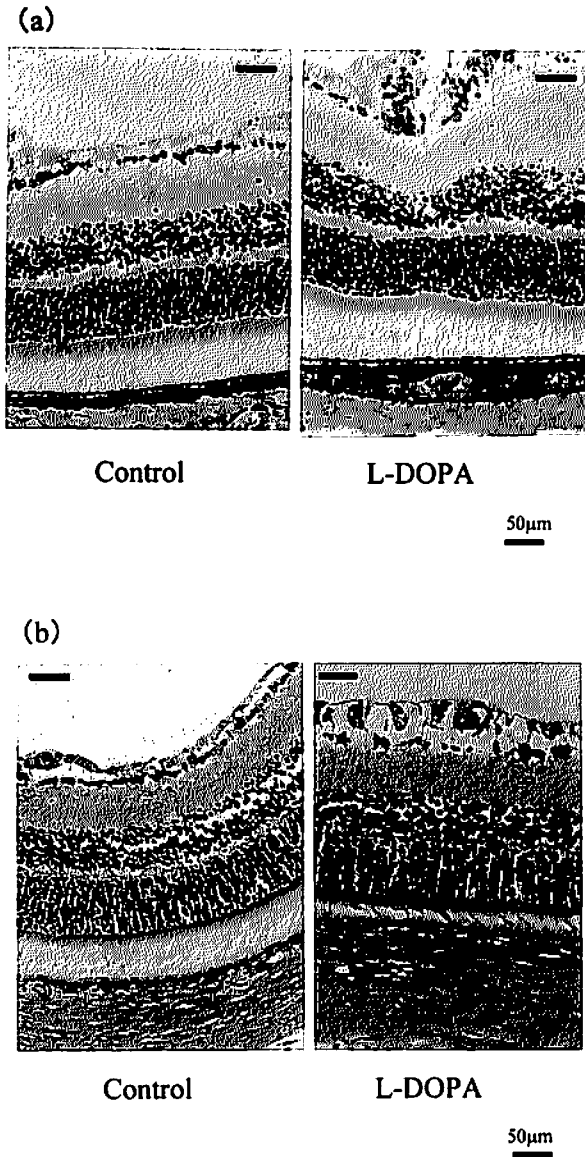
Ichimoriら⁹⁾は50 μMのS-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP)によって発生する20 pAの電流が70 nMのNOに相当し、30 μMのcarboxy-PTIOによって消去されると報告している。しかしながら、carboxy-PTIOそのものも0.1 mMのSNAPによって発生する電流の20%に相当する電流を生み出している⁹⁾とされている。温度、pH、酸素濃度を一定にして行った本実験における電流の36%はNOによるものであるが、残りの電流は非特異的なものと思われる。ただし、この実験結果に影響されるような窒素化合物(NO₂⁻やNO₃⁻)は、この電極には影響していないと考えられる⁹⁾。

実験2において、ラット眼内にL-ドーパを注入した場合、一定のNOが発生した後、減衰し、濃度依存的ではなかった。NOはガス分子であり、網膜と脈絡膜の間の関門を貫通し、迅速に眼組織に深く浸透していく可能性があり、密閉された容器中の場合と異なる結果を生じたと考えられる。

本研究では実験2に示すように、DAラットとWistarラットを比較した場合、前者の方が後者よりも多くNOが発生していた。これに対しAkeoらは、*in vitro*の実験系において、培養RPEはL-ドーパを取り



第6図 L-ドーパ注入後5日目の組織学的変化（虹彩）。(a) DAラット (b) Wistarラット。L-ドーパ投与により、いずれにも血管拡張が認められたが、血管拡張の程度は、DAラットの方がWistarラットより著明であった。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 6を、許可を得て転載)



第7図 L-DOPA注入後5日目の組織学的変化(網脈絡膜)。(a) DAラット (b) Wistarラット。L-DOPA投与により、いずれにも血管拡張が認められたが、前者のほうが後者よりも血管拡張が強かった。(Amaki SK, et al: Pigment Cell Research 14: 256-263, 2001のFig. 7を、許可を得て転載)

込み、発生する内因性のNOを抑制すること¹¹⁾、有メラニン培養RPEが無メラニンのものに比べて、内因性NOを抑制することを示している¹¹⁾。In vivoとin vitroの実験系で、このように対照的な結果が出た理由は不明であるが、外因性に投与されたL-DOPAがin vivoで生成するO₂⁻の量が、高酸素濃度に曝露された培養系より低く、NOの寿命が延長した可能性や、L-DOPA自体

がin vivoでの代謝により生じるNO₂⁻、NO₃⁻などのNO前駆体が、培養系よりも多く生成した可能性などが考察される。

L-DOPAは10%酸素濃度下での培養RPEの増殖刺激をする⁴⁾。また、低酸素濃度下でのL-DOPAの投与はG2+M期の細胞数を増やし、RNA/DNA比の増加を来す¹²⁾。これらの研究において、低酸素下や光刺激のない場合にはL-DOPAがアミンの酸化によって産生されたNOを介して細胞代謝を高めていることが推定された。一方、高酸素下⁴⁾や光刺激¹³⁾のある場合には培養RPEに対して毒性を有することが報告されている。これらの成績はNOの細胞機能に及ぼす影響が酸素分圧に大きく依存しており、その分圧が高いほど細胞毒性が強くなることを示唆している。L-DOPAはメラニン形成過程で分子状酸素の存在に依存してO₂⁻を発生し¹⁴⁾、さらにO₂⁻はNOと結合することによりONOO⁻となり、Fenton反応に依存しないヒドロキシラジカルの発生源となることが知られている^{14,15)}。今回の組織学的所見では、L-DOPA投与群で明確な組織変化は認められなかったが、ONOO⁻を介した蛋白質の変性、特にニトロチロシンなどの生成などの微妙な変化がなかったかどうかについては、今後、免疫組織学的に考察する必要があると思われた。

本実験において、黒色ラットでNO生成が高く、血流増加所見が示唆された理由の全容は不明であるが、メラニン色素と活性酸素種の相互作用を考慮すると極めて興味深い所見である。メラニン色素にはチロシンからの生成過程が異なるユーメラニンとフェオメラニンの2種類がある¹⁶⁾。前者は黒色で後者は黄色や赤茶色である。生体内では混合した形で存在する¹⁷⁾。一般的に前者は紫外線から人体の皮膚を守る役割をもち、一方で、後者はその機能を欠き、むしろ光障害を引き起こすと考えられている¹⁸⁾。2者のうち、ユーメラニンはO₂⁻に対する強力なスカベンジャーとして作用するのに対し、フェオメラニンはむしろprooxidantとして作用し脂質成分の過酸化反応を増悪させることが報告されている¹⁹⁾。これは恐らくフェオメラニンのprooxidantとしての反応と考えられた。つまり、ユーメラニンがO₂⁻に対する効果的なスカベンジャーとして働くのに対し、フェオメラニンのprooxidantとしての反応には、O₂⁻とNO関連物質が仲介として働くであろうと考えられている²⁰⁾。脈絡膜のメラノサイトはユーメラニンとフェオメラニンを混合した形で有し、その割合によって虹彩の色調が異なる¹⁶⁾。一方、興味深いことに、眼球の色素上皮細胞であるRPEはユーメラニンのみを主に含む¹⁶⁾。したがってこ

のような有色ラットと白色ラットにおける脈絡膜メラニンの組成に量的、質的な違いを勘案すると、本実験で前者においてより大きな NO シグナルを検出できたのは、L-ドーパの自動酸化で生成する O_2^- をユーマニンが消去し、NO の実効濃度がみかけ上高くなった可能性を考える必要がある。また、黒色人種の脈絡膜メラニンの量が白色人種と比較して約 2 倍存在するのに対し、RPE のメラニン量に差は無かったという報告がある²¹⁾。つまり、黒色人種と白色人種では、脈絡膜メラニンの違いは量的にも質的にもあり、一方で RPE のメラニンの違いは量的にも質的にも殆どないということになる。この脈絡膜メラノサイトと色素上皮細胞のメラニンの違いは、発生学的にそれぞれ神経堤細胞と神経上皮細胞の 2 つの異なる起源を有することに起因する。脈絡膜メラノサイトの起源である神経堤細胞は、皮膚や毛髪にも分布する。これらの色素形成傾向は、人種間で異なる。一方で、黒質などの中枢神経系の色素構造へ分布する神経上皮細胞を起源とする RPE で人種間の違いが認められないことは、発生学的にも驚くことではない²¹⁾。

パーキンソン病治療薬である L-ドーパや、緑内障関連薬としてのエピネフリンなどのカテコールアミンは、広く臨床的に用いられている。本実験により L-ドーパの自動酸化に伴う O_2^- や NO の生成が投与を受けた宿主のメラニン生成特性により異なることが明らかになった。本薬剤を臨床で使用する場合にその効果や副作用の出現の重要な決定因子になるかどうかを今後さらに検討すべきであると思われる。

総括

本研究では、ラット硝子体中に投与した L-ドーパによる NO の発生と組織学的変化を検討し、以下を明らかにした。

1. 密閉容器中に L-ドーパを注入すると、NO が発生した。
2. ラット硝子体中に L-ドーパを注入すると、NO が発生した。それは白色ラットより有色ラットの方が著明であった。
3. ラット硝子体中に L-ドーパを注入すると、毛様体および脈絡膜の血管が拡張した。それは白色ラットより有色ラットの方が著明であった。

以上の結果より、ラット硝子体中に L-ドーパを注入すると NO が発生し、毛様体および脈絡膜の血管が拡張することが明らかになった。

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眼科学教室小口芳久教授、ならびに、浜松医科大学光量子医学研究センター平光忠久教授に深甚なる謝意を表します。また、御指導、御助言を賜りました川崎市立川崎病院福田純也先生、杉浦仁先生、尾形徹也先生、国立高崎病院眼科明尾潔先生に深謝いたします。さらに、適切な御助言、御協力をいただきました教室の諸先生に感謝いたします。

本研究の一部は、第 103 回日本眼科学会（千葉、1999 年）、1999 Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (Fort Lauderdale, 1999 年) において発表した。

なお、本研究の一部は平成 10 年度～平成 12 年度科学研究費補助金の基盤研究 (c) (2) によった（課題番号：10671641）。

文 献

- 1) Sealy RC, Puzyna W, Kalyanraman B, Felix CC : Identification by electron spin resonance spectroscopy of free radicals produced during autoxidative melanogenesis. *Biochim Biophys Acta* 800 : 269-276, 1984
- 2) 原一夫, 大橋勝 : メラノサイトとメラニン色素. メラノサイト病変—病理組織の見方と鑑別診断—. (財)名古屋大学出版会, p.1-4, 1997
- 3) Boulton M : Melanin and the RPE : The Retinal Pigment Epithelium. Oxford University Press, Oxford, p.68-85, 1998
- 4) Akeo K, Ebenstein DB, and Dorey CK : Dopa and oxygen inhibit proliferation of retinal pigment epithelial cells, fibroblasts and endothelial cells *in vitro*. *Exp. Eye Res* 49 : 335-346, 1989
- 5) Hollocher, TC, and Hibbs JB Jr : The nitrogen cycle. In : Feilisch M, and Stamler J. *Methods in Nitric Oxide Research*. Part III. John Wiley & Sons, New York, p.120-121, 1996
- 6) Leguire LE, Rogers GL, Bremer DL, Walson P, Hadjiconstantinou-Neff M : Levodopa and childhood amblyopia. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 29 : 290-298, 1992
- 7) Gottlob I, Stangler-Zuschrott E : Effect of levodopa on contrast sensitivity and scotomas in human amblyopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 776-780, 1990
- 8) Akeo K, Tanaka Y, and Okisaka S : A comparison between melanotic and amelanotic retinal pigment epithelial cells *in vitro* concerning the effects of L-DOPA and oxygen on cell cycle. *Pigment Cell Res* 7 : 145-151, 1994
- 9) Ichimori K, Ishida H, Fukahori M, Nakazawa H, and Murakami E : Practical nitric oxide measurement

- employing a nitric oxide-selective electrode. *Rev Sci Instrum* 65 : 2714-2718, 1994
- 10) Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohno M, Sasamoto K, Miyazaki K, Ueda S, and Maeda H : Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.NO through a radical reaction : *Biochemistry* 32 : 827, 1993
 - 11) Akeo K, Amaki S, Suzuki T, and Hiramitsu T : Melanin granules prevent the cytotoxic effects of L-DOPA on retinal pigment epithelial cells *in vitro* by regulation of NO and superoxide radicals. *Pigment Cell Res* 13 : 80-88, 2000
 - 12) Sarna T : Properties and function of the ocular melanin-a photophysical view. *J Photochem Photobiol B, Biol* 12 : 215-258,1992
 - 13) Dorey CK., Delori FC, and Akeo K : Growth of cultured RPE and endothelial cells is inhibited by blue light but not green or red light. *Curr Eye Res.* 9 : 549-559, 1990
 - 14) Wittbjer A, Odh G, Rosengren E, Rorsman H : Enzymatic and non-enzymatic oxygenation of tyrosine. *Pigment Cell Res* 9 : 92-95, 1996
 - 15) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, and Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitrite oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1620-1624, 1990
 - 16) Prota G, Hu DN, Vincensi MR, McCormick SA, Napolitano A : Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors. *Exp Eye Res* 67 : 293-299, 1998
 - 17) Kanda T, Akeo K, Murakami A, Karasawa Y, Okisaka : The effects of dopa and oxygen on RNA concentrations in cultured embryonal retinal pigment epithelial cells. *J Jpn Ophthalmol Soc* 99 : 1123-1126, 1995
 - 18) Krol ES, Liebler DC : Photoprotective Actions of Natural and Synthetic Melanins. *Chem Res Toxicol* 11 : 1434-1440, 1998
 - 19) Ezzahir A : The influence of melanins on the photoperoxidation of lipids. *J Photochem. Photobiol B3* : 341-349, 1989
 - 20) Sarna T, Menon IA, and Sealy RC : Photoinduced oxygen consumption in melanin systems II. Action spectra and quantum yields for pheomelanins. *Photochem Photobiol* 39 : 805-809, 1984
 - 21) Weiter JJ, Delori FC, Wing GL, Fitch KA : Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : 145-152, 1986

学位論文

腸管からのエンドトキシン吸収に及ぼすエタノール投与の
影響に関する検討

慶應義塾大学医学部内科学教室
(指導: 石井裕正教授)

たま い ひろ なお
玉 井 博 修

(平成 14 年 12 月 26 日受付)

Key Word : endotoxin, alcohol, intestinal mucosal permeability, liver injury.

エンドトキシンはグラム陰性桿菌の細胞壁の構成成分の一つであり、生体では主に腸管内に存在する。腸管より吸収されたエンドトキシンは肝の Kupffer 細胞で処理され、その際 TNF α などのサイトカインが放出され肝障害の進展に関与すると考えられている^{1,2)}。四塩化炭素 (CCl₄) によるラットの薬物性肝障害モデルにおいても、腸管由来のエンドトキシンの関与が報告されている³⁾。

アルコール性肝障害においてエンドトキシンの関与の報告は多い。すなわち、アルコール性肝障害患者では、しばしばエンドトキシン血症が観察される^{4,5)}。動物実験においても、エタノール含有飼料の持続的胃管投与により作成されるアルコール性肝障害ラットモデルでは肝に炎症や線維化がみられ、その時に血中のエンドトキシン値が上昇すること⁶⁾、そして抗生物質の投与により血中のエンドトキシン値が低下し、肝障害が抑制されることが報告されている^{7,8)}。

重症アルコール性肝炎では肝不全の進行に加え、腎不全や脳症など劇症肝炎に類似した多臓器不全が認められ、多くは発症より 1 ヶ月以内に死亡する。この重症アルコール性肝炎の発生および進展にも腸管由来のエンドトキシンの関与が想定され⁹⁾、その治療手段としてエンドトキシン吸着療法がしばしば行われ、救命率をあげたとの報告もある。以上の事実により腸管由来のエンドトキシンが、アルコール性肝障害の発生機序に深く関与して

いることが示唆される。

アルコールとエンドトキシンの相互作用についての報告は多く、慢性エタノール投与がエンドトキシン惹起性肝障害を増悪させることが動物実験により明らかにされている。たとえば、慢性エタノール投与ラットでは、経静脈的なエンドトキシンの投与により肝類洞内に膠着する白血球数が増加し、血清 ALT 値が増悪する¹⁰⁾。そして、組織学的にも慢性エタノール投与群のラットでエンドトキシン惹起性肝障害が増強している¹¹⁾。さらに単独では肝微小循環障害を生じない程度の少量のエタノール投与でもエンドトキシン血症がある時には、肝微小循環障害を生じることが報告されている¹²⁾。これらのことから、エンドトキシンが、肝微小循環障害を介したアルコール性肝障害の進展に深く関与していることが想定される。

さらに、近年米国やヨーロッパでは非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis ; NASH) が注目され、その発生機序に腸管由来のエンドトキシンが関与する可能性が指摘されている^{13,14)}。NASH は飲酒がなくてもアルコール性肝障害と類似の病理所見を呈する肝病変であり、肥満や糖尿病の症例にみられることが多く、さらに肥満の治療のために腸管バイパス手術をした症例ではより高率に出現する。腸管バイパス手術をした症例では腸内細菌が増殖しエンドトキシン血症を生じやすいと考えられる。そしてそれらの症例に抗生物質を投与することにより肝障害が軽減したことが報告されている¹⁵⁾。

本論文は Tamai H, Kato S, Horie Y, Ohki E, Yokoyama H, Ishii H : Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 24 (3) : 390-4, 2000 の一部および Tamai H, Horie Y, Kato S, Yokoyama H, Ishii H : Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 26 (8 Suppl) : 75S-80S, 2002 の一部を含む。

この様に NASH とアルコール性肝炎とは脂肪肝とエンドトキシン血症という共通点をもち類似の病変をきたす原因となっている可能性があり興味深い。

アルコール性肝障害患者においてエンドトキシン血症の出現をきたす機序として、アルコールによる網内系機能の低下にともなうエンドトキシン処理の遅延¹⁶⁻¹⁸⁾、アルコール摂取による腸管からのエンドトキシン吸収の亢進^{4,9)}などが報告されているが、後者の機序についてはまだ十分に解明されていないのが現状である。現在までの報告ではアルコールによる腸管の透過性の変化に関し、アルコール依存症患者での腸管透過性の亢進¹⁹⁾、さらに動物実験において急性および慢性のエタノール投与後の腸管の透過性の亢進が報告されている²⁰⁻²³⁾。エンドトキシンの腸管からの吸収については、*in vitro* の系でエタノール濃度依存性に小腸粘膜でのエンドトキシンの吸収が増加することが報告されているが²⁴⁾、エタノールによりエンドトキシン吸収が変化するか否かを *in vivo* の系で詳細に検討した報告はない。そこで本研究では、急性および慢性のエタノール投与が、腸管の透過性および腸管からのエンドトキシンの吸収にどの様な影響をおよぼすかにつき、*in vivo* の系において実験動物により検討した。

材料と方法

1. 実験動物

本研究は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿って行なった。急性エタノール投与実験は、体重約 250 g の Wistar 系雄性ラットを用いた。また慢性エタノール投与実験では体重約 150 g の Wistar 系雄性ラットを Lieber²⁵⁾らの方法に従い、総カロリーの 35% のエタノールを含む液体飼料またはその等カロリーを炭水化物で置換した対照飼料で 4 週間 pair-feeding し、16 時間禁食後実験に供した。以下に述べる実験の手技はネブプター麻酔下 (30 mg/ml i.p) で行い、嚴重な滅菌操作下に行なった。

2. 実験計画

1) 急性エタノール投与によるエンドトキシンの腸管からの吸収の変化

10 mg/kg 体重の lipopolysaccharides (LPS; *Escherichia Coli*: 0111:B4; Sigma, St.Louis, MO, USA) を 10 ml/kg 体重の蒸留水または 5% ないし 20% (w/v) エタノールに溶解して胃管より投与した。経口投与後 0, 30, 60, 120, 180, 240 分到大腿静脈

よりヘパリン採血し、分離した血清をマイクロプレート上でアルカリ処理²⁶⁾した後、エンドスペー (生化学工業, 東京) でエンドトキシン値を測定した。エンドトキシンの吸収に及ぼす小腸粘膜の変化の影響を検討するため、採血終了後、近位小腸 (胃の肛側 1~4 cm) および遠位小腸 (回腸末端の口側 1~4cm) を採取し 10% ホルマリンに固定後病理組織学的に検討した。

2) 急性エタノール投与のエンドトキシン処理能への影響

10 µg/kg 体重の LPS を経静脈的に投与したラットに、経口的に蒸留水または 20% エタノールを 10 ml/kg 体重投与し、投与後 0, 30, 60, 120, 180, 240 分到大腿静脈よりヘパリン採血し、上記と同様に血中エンドトキシン値を測定した。

3) 急性エタノール投与の腸管透過性におよぼす影響
ラットを開腹後、プラスチックチューブ (ATOM Intravenous Catheter For Cut-Down 3Fr, アトム社, 東京) を胃前庭部より穿刺し胃内に挿入した後、先端を十二指腸内に留置し、チューブより 2 g/kg 体重の 20% (w/v) エタノールまたは同量の蒸留水を注入し、30 分後にチューブ先端よりやや口側を結紮した。チューブより生食 10 ml にて腸管を洗浄後、回腸末端を結紮し、FITC にて蛍光ラベルした分子量 4000 D および 20000 D のデキストラン (FD4, FD20) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 125 mg を 5 ml の生食に溶解しチューブより腸管ループ内に投与した。FD4 および FD20 の腎臓からの排泄を防止するため両側腎動静脈を結紮した²⁷⁾。FD4 または FD20 投与後 0, 15, 30, 60 分まで大腿静脈より採血し、蛍光分光光度計 (RF-5300 PC 島津製作所, 京都) で測定した蛍光強度により血漿中の FD4 または FD20 濃度を推定した。

4) 慢性エタノール投与の腸管透過性におよぼす影響
4 週間慢性エタノール投与したラットまたはペア飼育したコントロールラットに、急性モデルと同様に十二指腸内に留置したプラスチックチューブより FD4 125 mg を 5 ml の生食に溶解し腸管ループ内に投与した。FD4 投与後 0, 15, 30, 60 分まで大腿静脈より採血し、血漿中の FD4 値を測定した。実験終了後、近位小腸 (胃の肛側 1~4 cm) 遠位小腸 (回腸末端の口側 1~4 cm) を採取した。小腸の一部は 10% ホルマリンにて固定後 Hematoxylin-Eosin (HE) 染色し顕微鏡にて観察した。さらに、小腸の一部は 2.5% グルタルアルデヒドで前固定し、カルノフスキー液で洗い、オスミウム酸液で後固定、エタノール脱水を行いエボン包埋した。超薄切切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色後、電顕によ

り小腸の組織学的変化を検討した。

5) 慢性エタノール投与によるエンドトキシンの腸管からの吸収の変化

4週間慢性エタノール投与したラットまたはベア飼育したコントロールラットに 20 mg/kg 体重の LPS 液 (1 mg/ml 蒸留水) を胃管より投与した。大腿静脈より 0, 30, 60, 120, 180, 240 分まで採血し、血清中のエンドトキシン値を上記の方法にて測定した。

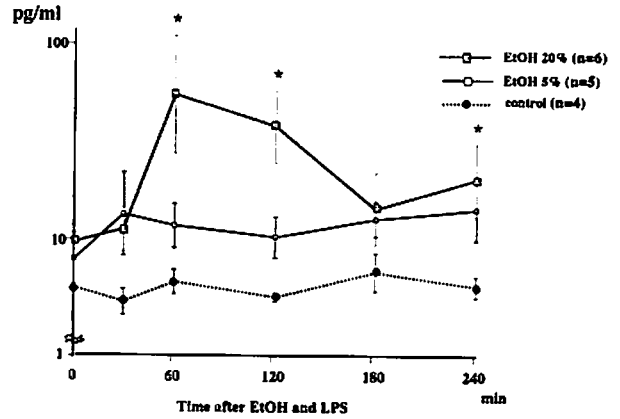
3. 統計処理

すべての数値は平均値±標準誤差をもって表示した。群間の平均値の比較は ANOVA を用いた。p 値が 0.05 未満を有意差があるとした。

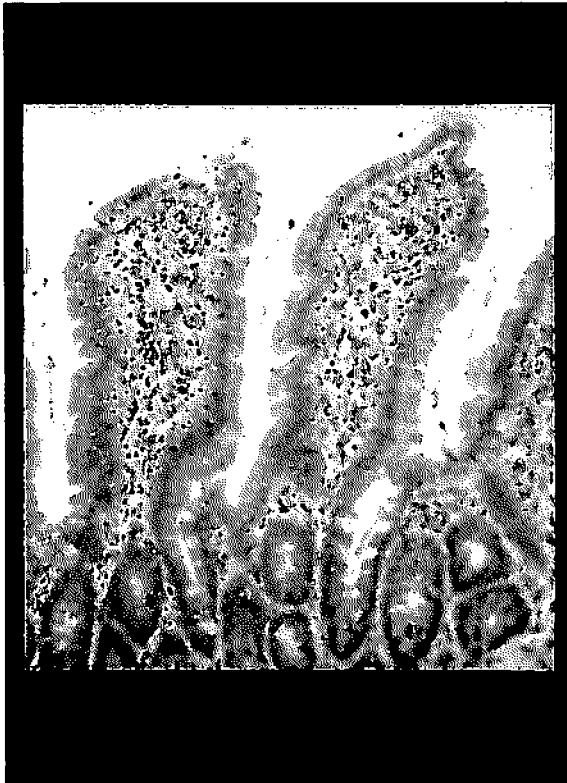
結 果

1. 急性エタノール投与によるエンドトキシンの腸管からの吸収の変化

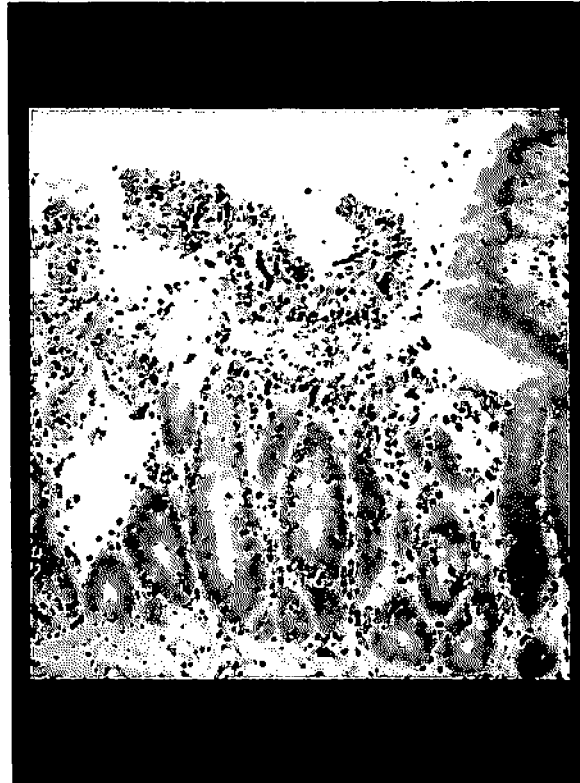
コントロール群では LPS 経口投与後、血清エンド



第1図 ラットに LPS (10 mg/kg 体重) を胃管より投与した後の血清中のエンドトキシン値の経時変化。コントロール群ではエンドトキシン濃度の上昇は認めなかったが、20%エタノール投与群では 60 分をピークとする有意なエンドトキシン濃度の上昇を認めた。* $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al : Alcohol Clin Exp Res. 24 (3) : 390-4, 2000 の Fig. 1 より許可を得て転載)

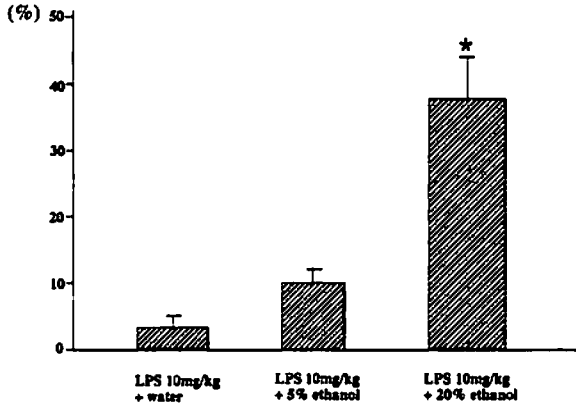


LPS10mg/kg + water

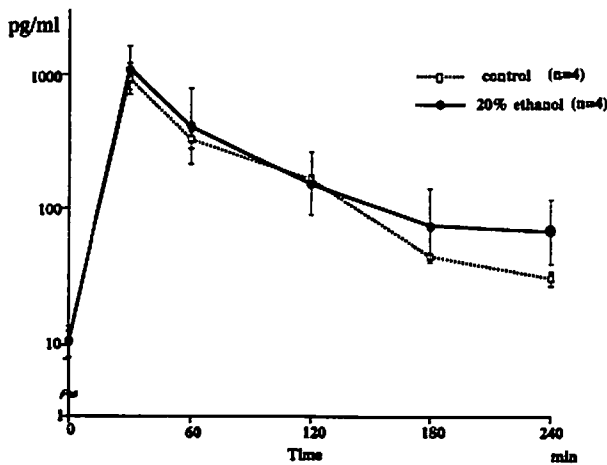


LPS10mg/kg + 20% ethanol

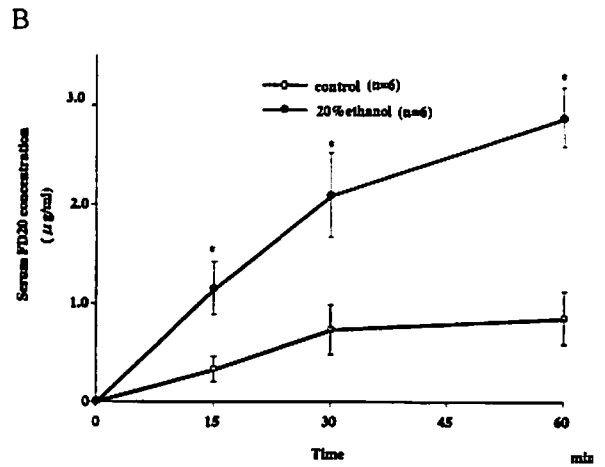
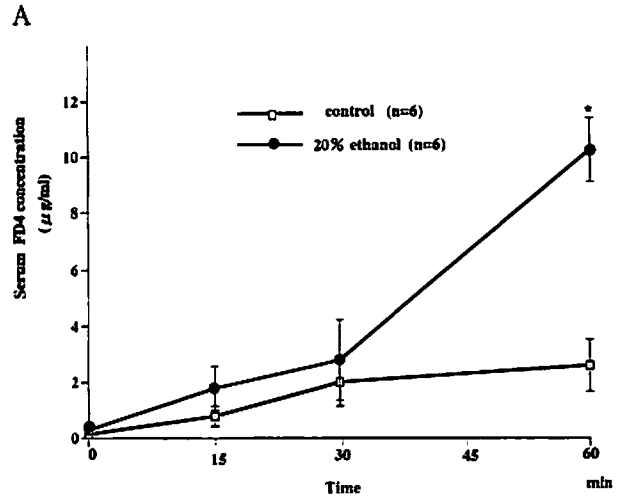
第2図 ラットに蒸留水または 20%エタノールに溶解した LPS (10 mg/kg 体重) を胃管より投与後 240 分の時点で近位小腸の光顕像 (HE 染色×200)。20%エタノールを投与した群では小腸上皮の脱落を伴う出血性びらんを高頻度に認めた。* $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al : Alcohol Clin Exp Res. 24(3) : 390-4, 2000 の Fig. 2 より許可を得て転載)



第3図 エタノールとLPSのおよぼす近位小腸粘膜への影響。ラットに蒸留水または5%または20%エタノールに溶解したLPS(10mg/kg体重)を胃管より投与後240分の時点での近位小腸のびらんを伴う小腸粘膜の割合を示す。近位小腸のびらんの面積はエタノールの濃度により増加した。*p<0.05 vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 24 (3): 390-4, 2000のFig. 3より許可を得て転載)



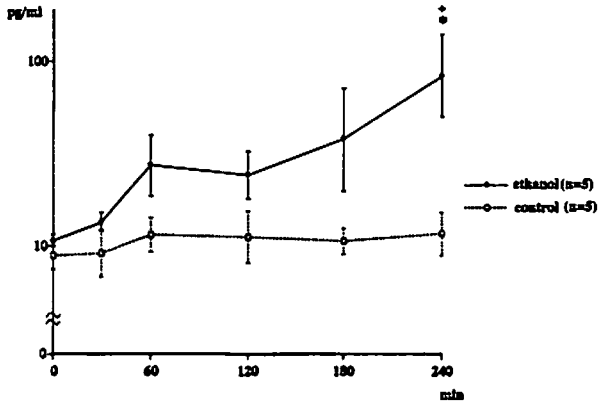
第4図 血中エンドトキシン濃度のクリアランスにおよぼす経口エタノール投与の影響。急性エタノール投与ラットおよびコントロールラットに10µg/kg体重のLPSを経静脈的に投与した後の血中エンドトキシン値の経時変化を示す。エタノール投与群とコントロール群でエンドトキシンの血中からの消失には有意な差を認めず、急性エタノール投与時のエンドトキシンの上昇は、エンドトキシンの処理系の遅延によるものでないこと示唆された。*p<0.05 vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 24 (3): 390-4, 2000のFig. 4より許可を得て転載)



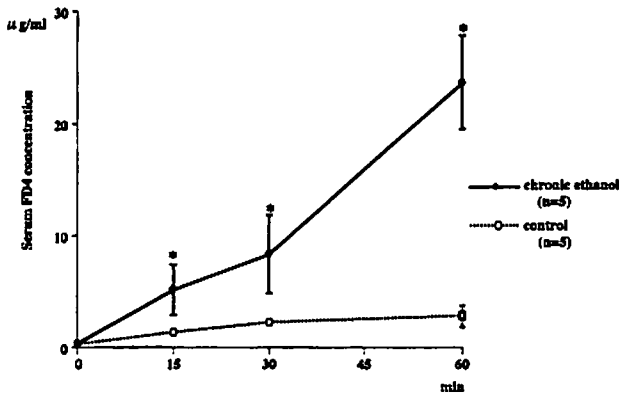
第5図 急性エタノール投与によるラット小腸の非特異的腸管透過性の変化。急性エタノール投与ラットではFD4およびFD20に対する腸管の透過性がコントロールラットに比べ有意に上昇した。*p<0.05 vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 24 (3): 390-4, 2000のFig. 5 Fig. 6より許可を得て転載)

キシンの濃度の増加は全例で認めなかった。5%エタノール投与群では群間では平均値に有意差は認めないが、エンドトキシン濃度の増加を認める例が5例中1例あり、20%エタノール投与群では60分をピークとするエンドトキシン濃度の有意な増加を認めた(第1図)。

LPS投与後60分ではコントロール群、20%エタノール投与群ともに光顕的には変化はみられなかった。投与後240分で小腸の粘膜は、コントロール群ではほとんど変化はみられなかったが、20%エタノール投与群では近位小腸に出血、びらん等の変化がみられた(第2図)。近位小腸のびらんの面積は高濃度(20%)エタノール投与により有意に増加した(第3図)。



第6図 慢性エタノール投与による消化管からのエンドトキシン吸収の変化。慢性エタノール投与ラットではコントロールラットに比べて20 mg/kg 体重のLPSを胃管より投与後240分後の血清エンドトキシン値は有意に上昇した。 $*p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al : Alcohol Clin Exp Res. 26 (8 Suppl) : 75S-80S, 2002 の Fig. 2 より許可を得て転載)



第7図 慢性エタノール投与によるFD4に対するラット小腸の腸管透過性の変化。慢性エタノール投与ラットではFD4に対する腸管の透過性がコントロールラットに比べて有意に上昇した。 $*p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al : Alcohol Clin Exp Res. 26 (8 Suppl) : 75S-80S, 2002 の Fig. 3 より許可を得て転載)

2. 急性エタノール投与の血中エンドトキシン消失速度に及ぼす影響

経静脈的なLPSの投与後の血中エンドトキシン濃度は30分後にピークに達し以後漸減していったが、その消失速度はエタノールを投与した群とコントロール群で有意な差を認めなかった(第4図)。

3. 急性エタノール投与による腸管透過性の変化

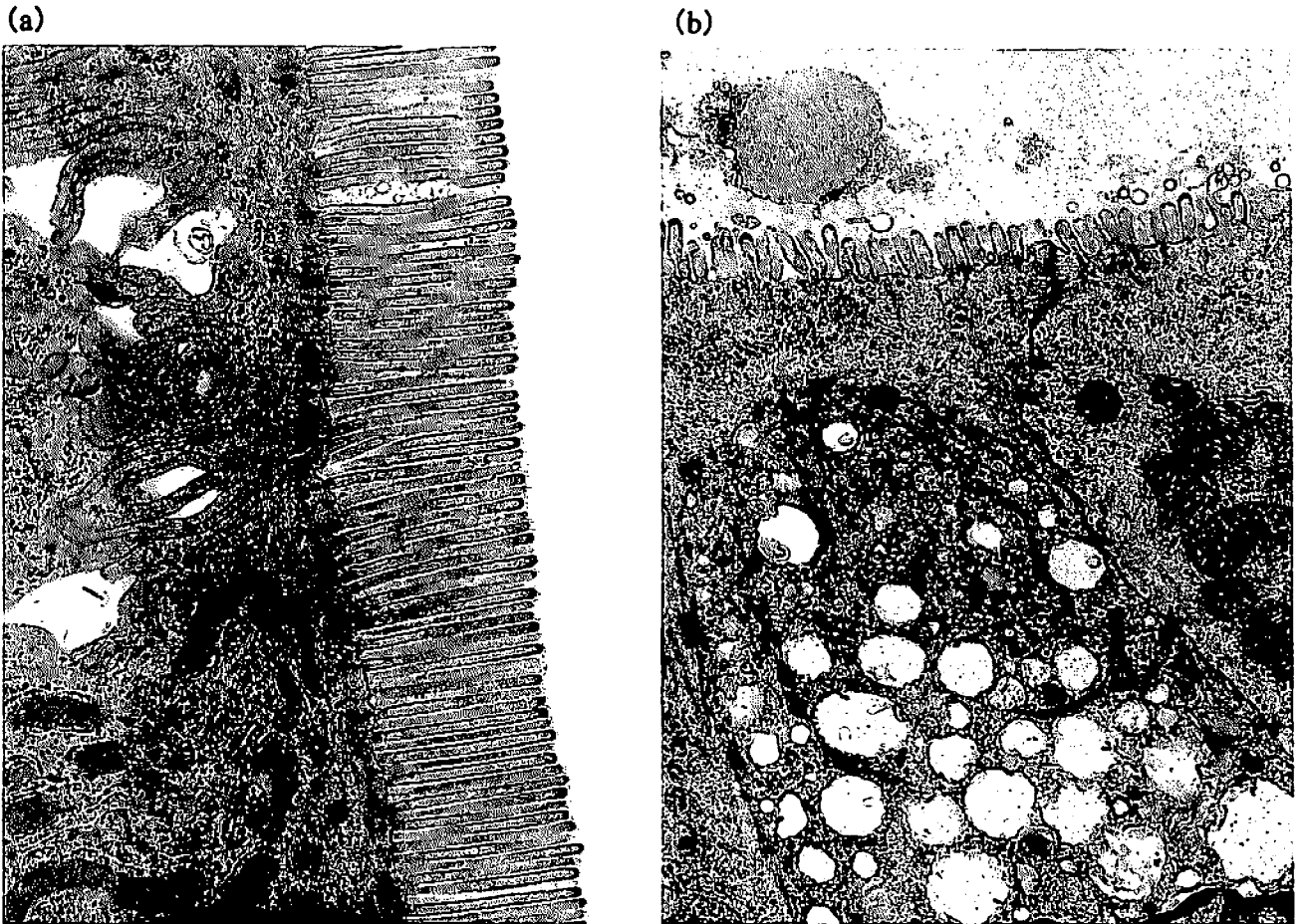
FD4投与後60分の時点で急性エタノール投与ラット(10.2±1.1 µg/ml)ではコントロールラット(2.6±0.9 µg/ml)に比べ有意に血中FD4濃度が高値であり、さらに、急性エタノール投与ラットではFD20投与後15分、30分、60分のいずれの時点においてもコントロールラットに比べ有意に血中FD20濃度が高値であった。(第5図)。急性エタノール投与ラット、コントロールラットとも小腸のびらん、出血等の変化は光顕上みられなかった。

4. 慢性エタノール投与によるエンドトキシン吸収の変化

LPS投与前の血清エンドトキシン値はコントロールラット、慢性エタノール投与ラットの間で有意差を認めなかった。コントロールラットでは20 mg/kg 体重のLPSを胃管より投与240分後まで血清エンドトキシン値は上昇しなかったが、慢性エタノール投与ラットでは投与前に比べてLPS投与60分後より血清エンドトキシン値の上昇傾向を認め、240分後には有意な上昇を認めた。さらに、慢性エタノール投与ラットではLPS投与240分後の血清エンドトキシン値がコントロールラットに比べて有意に高かった(第6図)。

5. 慢性エタノール投与ラットにおける腸管透過性の変化

FD4投与後15分、30分、60分のいずれの時点においても、慢性エタノール投与ラットではコントロールラットに比べ有意に血中FD4濃度は上昇した。(第7図)。慢性エタノール投与ラットの腸管の組織学的検討では遠位小腸の微絨毛の高さがコントロールラットに比べて低く、また小腸上皮細胞における小胞体の変性を認めた(第8図)。



第8図 コントロールラット (8-a) および慢性エタノール投与ラット (8-b) の小腸上皮組織の電顕像 (×10000). 慢性エタノール投与ラットではコントロールラットにくらべ遠位小腸の微絨毛の高さの減少が見られ, 小胞体の変性も認めた. * $p < 0.05$ vs. control (Tamai H et al: Alcohol Clin Exp Res. 26 (8 Suppl): 75S-80S, 2002 の Fig. 4 より許可を得て転載)

考 察

本研究では, 急性にエタノール投与したラットにおいて LPS 経口投与後に血中のエンドトキシン値が有意に上昇することを明らかにした. さらに, 急性エタノール投与は経静脈的に投与したエンドトキシンの血液中からの消失, すなわち処理能には影響を及ぼしていないことが示唆され, 急性エタノール投与による血中エンドトキシン上昇には, 網内機能の低下よりもむしろ腸管からのエンドトキシン吸収の亢進が強く関与していることが示唆された. また, 慢性エタノール投与ラットにおいてもコントロールラットに比べ腸管透過性が亢進しており, LPS 投与後の血清エンドトキシン値がコントロールラットに比べ有意に上昇することが明らかとなった.

急性エタノール投与後の小腸の組織学的変化では, 投与後 240 分の時点では, 高濃度 (20% v/w) のエタノールを投与したラットでは近位小腸の出血性びらんの有意な増加を観察したが, これは Baraona ら²⁸の報告に一致するものである. エタノールによる小腸の形態学的変化の機序として, Baraona らは, エタノールと等浸透圧に調整した尿素の投与でも小腸粘膜に障害が生じることを観察し, エタノールによる浸透圧の変化が小腸の形態学的変化の一因であると報告している. 一方, Dinda^{29,30}らはエタノールにより放出されるヒスタミンやロイコトリエンに注目し, これらが小腸粘膜で微循環障害を惹起し, 粘膜障害を生じると報告している. これらのエタノールによる直接的, 間接的作用が小腸にびらんを生じさせたものと考えられる. Gardiner³¹らは

炎症性腸疾患患者において腸上皮の傷害と血中のエンドトキシン値に正の相関がみられることを報告している。したがって、急性エタノール投与により生じる出血性びらんが腸管からのエンドトキシン吸収の亢進に関与している可能性がある。

しかし、本研究で得られた結果の注目すべき点として、小腸にまだ出血性びらんが認められないエタノール投与後 60 分の時点で、血中エンドトキシンが上昇していたことがあげられる。このことよりびらん等の肉眼的に小腸組織が破壊される以前に小腸粘膜の透過性が亢進し、エンドトキシンの吸収が亢進していることが示唆される。実際、FD 4、FD20 に対する透過性はエタノール投与後 30 分の時点から亢進し³²⁾、非特異的な小腸粘膜の透過性の亢進が急性エタノール投与後にみられ、エンドトキシンの吸収の亢進に関与していると考えられる。

Draper³³⁾らは horseradish peroxidase (分子量 40,000 D) を用いた実験で、horseradish peroxidase がコントロールラットでは全く吸収されないが、12.5% のエタノールを同時投与したラットでは投与後 1 時間以内に吸収がみられることを報告している。その際エタノール投与ラットの腸上皮の電顕での観察で、十二指腸上皮の細胞間隙に peroxidase 活性を認めており、急性エタノール投与により通常では吸収されない物質がこの細胞間隙を通過し流入する可能性を指摘している。本研究で観察された急性エタノール投与による非特異的な小腸の透過性の亢進にはこの機序が関与している可能性がある。

慢性エタノール投与ラットの実験では³⁴⁾、LPS およびデキストランに対する腸管透過性が亢進していることが明らかとなり、慢性エタノール投与時の腸管の非特異的な透過性亢進の関与が示唆された。慢性エタノール投与では小腸の光顕上、びらんや上皮の脱落といった所見は認めなかった。慢性エタノール投与時のエタノール濃度は 5% (w/v) に調製しており、急性エタノール投与の実験では小腸の光顕上の変化はほとんどみられなかった濃度である。慢性エタノール投与による小腸の組織学的変化は光顕上は乏しいが^{35,36)}、Rubin らは電顕的に小腸上皮細胞のミトコンドリアの形態異常や小胞体やゴルジ体の拡大がみられることを報告している³⁷⁾。また Bode らはアルコール依存症患者の小腸組織では絨毛の高さと粘膜面積の減少がみられることを報告している³⁸⁾。今回のラットにおける検討でも遠位小腸微絨毛の高さの減少と小胞体の変性を認め、これらの報告とほぼ一致する。今回の慢性エタノール投与ラット小腸組織の検討で注目すべき点として近位小腸よりも遠位小腸でより傷害

が強かったことがあげられる。その機序は不明だが、一因として腸管内の細菌の影響が考えられる。大量飲酒者では胃酸の PH の低下などから小腸での細菌の増殖が報告されているが³⁹⁾、これらの細菌の多くにはアルコール脱水素酵素が存在し、腸管内のエタノールの酸化により大量のアセトアルデヒドが産生される⁴⁰⁾。このアルデヒドが慢性エタノール投与ラット小腸の組織変化の一因となりうることが報告されているが⁴¹⁾、大腸に近く細菌がより多く存在すると考えられる遠位小腸ではより大量のアセトアルデヒドが産生されるため近位小腸より傷害が強かった可能性が考えられる。

Nano ら⁴²⁾はラット胎児より分離した腸上皮細胞を用い、*in vitro* の実験より、エタノールがラット小腸上皮細胞の生育を抑制するであろうと推察している。これらことから、慢性エタノール投与では腺窩上皮の再生能が障害され、絨毛細胞の減少が持続して絨毛の萎縮が亢進し、結果として腸管透過性が亢進すると考えられる。このような慢性エタノール投与による小腸の変化が非特異的な透過性亢進を惹起し、デキストランやエンドトキシンといった通常では小腸からほとんど吸収されないと考えられる物質が門脈血に流入する原因となっている可能性が考えられる。

しかしながら、腸管由来のエンドトキシンの透過、吸収経路についてはなお不明の点が多い。Nolan ら⁴³⁾は *in vitro* の実験系でエンドトキシンが能動輸送により吸収されると推測しているが、一般的にはエンドトキシンの透過、吸収は受動拡散により行われると考えられている。エンドトキシンの分子量は 4000 以上であるとされ、その分子量の大きさからは細胞間隙を通る経路 (paracellular pathway) が想定されるが、近年野口ら⁴⁴⁾は様々な病態下に経腸的に LPS を投与した後の大腸、小腸上皮の電顕による観察により、大腸上皮細胞内にエンドトキシンが見い出されることを報告した。野口ら⁴⁴⁾は分子量の大きなエンドトキシンがどの様な経路で細胞内に侵入するかについては不明であるとしながらも、細胞内を通る経路 (transcellular pathway) の存在を報告しているが、小腸上皮細胞内にはエンドトキシンはほとんど見い出されなかったと報告している。この結果より彼らは、元来多くの細菌が存在する大腸の上皮細胞にはエンドトキシンを処理する機能が備わっているのに対して、大腸に比べてはるかに細菌数の少ない小腸ではその様な機能が少ないためではないかと推察している。エンドトキシンの詳細な侵入経路については今後の研究が待たれる。

一方、慢性エタノール投与による腸管透過性亢進の機

序についての報告は多い。Bjarnason¹⁹⁾らは常習飲酒者で⁵¹Cr-EDTAの透過性が亢進していることを報告し、⁵¹Cr-EDTAが細胞外に存在することから⁵¹Cr-EDTAが腸上皮の細胞間隙を選択的に通ると推察している。一方、Keshavarzian²⁰⁾らは分子量の大きさより考えて細胞間隙を選択的に通ると推察されるラクチュロースの吸収が、大酒家においても非飲酒者に比べて差がないことを報告している。KeshavarzianらはBjarnasonらとの結果の相違の原因として、⁵¹Cr-EDTAとラクチュロースの透過部位の解剖学的な違い、透過機序の違い、さらには断酒後の期間の違いを挙げている。両報告ともに胃、十二指腸の組織の検討で光顕、電顕上変化がないことを報告しているが⁵¹Cr-EDTAやラクチュロースの解剖学的透過部位については特定できていない。本研究ではpermeabilityのマーカーとしてFITCにてラベルした分子量4000Dのデキストラン(FD4)を使用した。これは⁵¹Cr-EDTAやラクチュロース(ともに約340D)にくらべ分子量が大きく、よりエンドトキシンの分子量に近い特性をもつ。今回、慢性エタノール投与によりFD4の透過性が亢進することが明らかとなったが、これは分子量の大きいエンドトキシンが細胞間隙を通過しうる可能性を示唆するものと考えられた。

近年Ma TY⁴⁵⁾らは*in vitro*の実験で低濃度(<10%)のエタノールにおいてもtight junctionの機能が破綻するがその変化は可逆性であることを報告している。このことから、tight junctionの破壊は構造的、不可逆的なものではなく、機能的、可逆的なものである可能性があると思われる。本研究において慢性エタノール投与ラットでは小腸上皮細胞のtight junctionの破壊は観察されなかった。しかし、この結果はtight junctionの機能的な傷害を否定するものではなく、慢性エタノール投与ラットにおけるデキストランやエンドトキシンの詳細な侵入経路については今後の研究が必要である。

本研究において、慢性エタノール投与ラットではコントロールラットに比べLPS(20 mg/kg体重)投与後の血清エンドトキシン値の有意な上昇が観察された。最近Mathurinら⁴⁶⁾は、慢性エタノール投与ラットでは経腸的なエンドトキシン投与により投与2時間後の門脈および全身血中のエンドトキシン値が上昇するのに対し、コントロールラットでは上昇が見られないことを報告したが、それはわれわれが得た結果を支持するものである。

以上の結果より慢性エタノール投与は腸管からのエンドトキシンの吸収を亢進させ、エンドトキシンによる肝障害の発現を誘発すると考えられる。実際慢性エタノール投与に加え、一週間LPSを経口投与したラットで

は³⁰⁾、コントロールラットにLPSを経口投与した群にくらべ血中ALP、ALT値の有意な上昇がみられており、腸管由来のエンドトキシンがアルコール性肝障害の発生機序に関与していることが示唆される。エタノールとLPSを経口投与することによりアルコール性肝障害の簡便なラットモデルが作成できる可能性があり、今後さらなる研究を続けていく必要がある。

臨床例においては、慢性的なエタノール摂取の上にさらに連続飲酒発作が加わり、急性に高濃度で大量のエタノールが腸管に加わるため、腸管からのLPSの流入が亢進し肝障害の進展に関与している可能性が考えられる。

総 括

急性および慢性エタノール投与が腸管からのエンドトキシン吸収におよぼす影響につきラットにおいて*in vivo*の系で検討した。

1. 急性エタノール投与は腸管からのエンドトキシン吸収を亢進させた。急性エタノール投与による近位小腸の出血性びらんおよび小腸における非特異的な透過性の亢進が腸管からのエンドトキシン吸収の亢進の原因と考えられた。

2. 慢性エタノール投与は小腸の非特異的な透過性を亢進させ、腸管からのエンドトキシン吸収を亢進させた。これには慢性エタノール投与による遠位小腸における微絨毛の高さの減少や細胞内小器官の変性が関与していると考えられた。臨床的なアルコール性肝障害では、このような慢性的な変化と急性の変化が組み合わさってエンドトキシン血症をきたし、肝障害の進展機序に関与していることが考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深謝いたします。また本研究の遂行に当たり直接御指導、御鞭撻をいただきました慶應義塾大学医学部消化器内科加藤眞三講師、堀江義則講師に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の一部は第33回日本肝臓学会(1997年、名古屋)、第9回ISBRA(International Society for Biomedical Research on Alcoholism)(1999年、Copenhagen, Denmark)第101回アメリカ消化器病学会(2001年、Atlanta, USA)において発表した。

文 献

- 1) McClain C, Hill D, Schmidt J, Diehl AM: Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 13: 170-

- 82, 1993
- 2) Chitturi S, Farrell GC : Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21 : 27-41, 2001
 - 3) Nolan JP, Leibowitz AI : Endotoxin and the liver. Modification of acute carbon tetrachloride injury by polymyxin B-an antiendotoxin. *Gastroenterology* 75 : 445-449, 1978
 - 4) Bode C, Kugler V, Bode JC : Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess. *J Hepatol* 4 : 8-14, 1987
 - 5) Fukui H, Brouner B, Bode JC, Bode C : Plasma endotoxin concentration in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease : reevaluation with an improved chromogenic assay. *J Hepatol* 12 : 162-169, 1991
 - 6) Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM, Yamanaka T : Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease Correlation with plasma endotoxin, prostagrandin E2, leukotriene B4, and thromboxane B2. *Am J Pathol* 142 : 367-373, 1993
 - 7) Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG : Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 108 : 218-224, 1995
 - 8) Nanji AA, Khettry U, Sadrzaeh SMH : Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver disease. *Proc Soc Exp Bio Med* 205 : 243-247, 1994
 - 9) Ishii K, Furudera S, Kumashiro R, Koga Y, Hamada T, Sata M, Abe H, Tanikawa K : Clinical and pathological features, and the mechanism of development in severe alcoholic hepatitis, especially in comparison with acute type fulminant hepatitis. *Alcohol Alcohol (Suppl)* : 97B-103B, 1993
 - 10) Ohki E, Kato S, Horie Y, Mizukami T, Tamai H, Yokoyama H, Ito D, Fukuda M, Suzuki H, Kurose I, Ishii H : Chronic ethanol consumption enhances endotoxin induced hepatic sinusoidal leukocyte adhesion. *Alcohol Clin Exp Res*. 20 (Suppl) 9 : 350A-355A, 1996
 - 11) Arai M, Nakano S, Okuno F, Hirano Y, Sujita K, Kobayashi T, Ishii H, Tsuchiya M : Endotoxin induced hypercoagulability : a possible aggravating factor of alcoholic liver disease. *Hepatology* 9 846-851, 1989
 - 12) Horie Y, Kato S, Ohki E, Tamai H, Yamagishi Y, Ishii H : Hepatic microvascular dysfunction in endotoxemic rats after acute ethanol administration. *Alcohol Clin Exp Res* 24 : 691-698, 2000
 - 13) Tilg H, Diehl AM : Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 343 : 1467-1476, 2000
 - 14) Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM : Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury : implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci* 94 : 2557-2562, 1997
 - 15) Chitturi S, Farrell GC : Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 21 : 27-41, 2001
 - 16) Shiratori Y, Teraoka H, Matano S, Matsumoto K, Kamii K, Tanaka M : Kupffer cell function in chronic ethanol-fed rats. *Liver* 9 : 351-359, 1989
 - 17) Liu YK : Phagocytic capacity of reticuloendothelial function system in alcoholics. *J Reticuloendothelial Soc* 25 : 605-613, 1979
 - 18) Ali MV : Alcohol induced depression of reticuloendothelial function in the rat. *J Lab Clin Med* 20 : 184-189, 1969
 - 19) Bjarnason I, Ward K, Peters TJ : The leaky gut of alcoholism : possible route of entry for toxic compounds. *Lancet* 1 : 179-182, 1984
 - 20) Worthington BS, Meserole L, Syrotuck JA : Effect of daily ethanol ingestion on intestinal permeability to macromolecules. *Am J Dig Dis* 23 : 23-32, 1978
 - 21) Robinson GM, Orrego H, Israel Y, Devenyi P, Kapur BM : Low molecular-weight polyethylene glycol as a prove of gastrointestinal permeability after alcohol ingestion. *Dig Dis Sci* 26 : 971-977, 1981
 - 22) Keshavarzian A, Fields JZ, Vaeth J, Holmes EW : The differing effect of acute and chronic alcohol on gastric and intestinal permeability. *Am J Gastro* 89 : 2205-2211, 1994
 - 23) Bode C, Vollmer E, Hug J, Bode JC : Increased permeability of the gut to polyethylene glycol and dextran in rats fed alcohol. *Annals New York Academy of Sciences* 837-840, 1991
 - 24) Arai M, Okuno F, Hirano Y, Kobayashi T, Ishii H, Tsuchiya M : Effect of ethanol on intestinal uptake of endotoxin *Jpn J Gastroenterol* 83 : 1060, 1986
 - 25) Lieber CS, DeCarli LM : Animal models of ethanol dependence and liver injury in rats and baboons. *Fed Proc* 35 : 1232-1236, 1976
 - 26) Tamura H, Tanaka S, Obayashi T, Yoshida M, Kawai T : A new sensitive microplate assay of plasma endotoxin. *J Clin Lab Anal* 6 : 232-238, 1992
 - 27) Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP : Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 113 : 1246-1257, 1997
 - 28) Baraona E, Pirola RC, Lieber CS : Small intestinal damage and changes in cell population produced by ethanol ingestion in the rat. *Gastroenterology* 66 : 226-234, 1974
 - 29) Dinda PK, Holitzner CA, Morris GP, Beck IT : Ethanol-induced jejunal microvascular injury in relation to histamine release in rabbits. *Gastroenterology* 104 : 361-368, 1993
 - 30) Dinda PK, Wasan S, Beck IT, Kossev P : Adaptive

- cytoprotection against ethanol-induced small intestinal mucosal injury. *Can J Physiol* 74 : 598-602, 1996
- 31) Gardiner KR, Halliday MI, Barclay GR, Milne L, Brown D, Stephens S, Maxwell RJ, Rowlands BJ : Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease *Gut* 36 : 897-901, 1995
- 32) Tamai H, Kato S, Horie Y, Ohki E, Yokoyama H, Ishii H : Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 24 : 390-394, 2000
- 33) Draper LR, Gyure LA, Hall JG, Robertson D : Effect of alcohol on the integrity of the intestinal epithelium. *Gut* 24 : 399-404, 1983
- 34) Tamai H, Horie Y, Kato S, Yokoyama H, Ishii H : Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 26(8 Suppl) : 75S-80S, 2002
- 35) Lansdown AB, Dayan AD : Alterations in crypt cell populations in the small intestine as an early toxic response to sub-acute ethanol administration. *Arch Toxicol* 59 : 448-452, 1987
- 36) Zarling EJ, Mobarhan S, Donahue PE : Effect of moderate prolonged ethanol ingestion on intestinal disaccharidase activity and histology. *J Lab Clin Med* 108 : 7-10, 1986
- 37) Rubin E, Rybak BJ, Lindenbaum J, Gerson CD, Walker G, Lieber CS : Ultrastructural changes in the small intestine induced by ethanol. *Gastroenterology* 63 : 801-814, 1972
- 38) Bode JC, Knuppel H, Schwerk W, Lorenz-Meyer H, Durr HK : Quantitative histomorphometric study of the jejunal mucosa in chronic alcoholics. *Digestion* 23 : 265-270, 1982
- 39) Bode JC, Bode C, Heidelbach R, Durr HK, Martini GA : Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse. *Hepatogastroenterology* 31 : 30-34, 1984
- 40) Seitz HK, Poschl G : The role of gastrointestinal factors in alcohol metabolism. *Alcohol Alcohol* 32 : 543-549, 1997
- 41) Persson J : Alcohol and the small intestine *Scand J Gastroenterol* 26 : 3-15, 1991
- 42) Nano JL, Cefai D, Rampal P : Effects of ethanol on an intestinal epithelial cell line. *Alcohol Clin Exp Res* 14 : 32-37, 1990
- 43) Nolan JP, Hare DK, McDevitt JJ, Ali MV : In vitro studies of intestinal endotoxin absorption. I. Kinetics of absorption in the isolated everted gut sac. *Gastroenterology* 72 : 434-439, 1977
- 44) 野口和典, 居石哲治, 笹富くるみ, 谷川久一 : 腸管での吸収の機序と肝病変における変化 *肝胆膵*, 35 : 295-302, 1997
- 45) Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H, Hoa N : Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol* 276 : G965-G974, 1999
- 46) Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H : Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology* 32 : 1008-1017, 2000

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

くばた えい し
久保田 英 司

(平成 15 年 2 月 19 日受付)

Key Word : glucocorticoid, angiotensin II, angiotensin converting enzyme, renal hemodynamics, conscious dogs

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を維持するために必須のホルモンである。とくに、循環器系の面では、内因性糖質コルチコイドの過剰状態であるクッシング症候群で、80%以上の患者に高血圧を合併することが報告されており¹⁾、逆にその欠乏状態である副腎皮質機能不全症では血圧の低下や昇圧薬に対する反応性の低下が生じることが知られており、糖質コルチコイドの末梢血管抵抗の調節における重要性が示唆されている。

これまでに、糖質コルチコイドによる血管抵抗調節の機序に関し、多くの研究がなされてきた。糖質コルチコイドによる全身血管抵抗亢進の機序としては、血管内皮でのプロスタグランジン²⁾、キニン³⁾、一酸化窒素⁴⁾といった血管拡張性物質の産生抑制や血管平滑筋におけるアンジオテンシン(以下、Angと略)II⁵⁾やカテコールアミン^{3,6)}に対する反応性亢進、細胞内シグナルの過剰反応⁶⁾ならびにAngIIの1型受容体の過剰発現⁷⁾などが関与することが報告されており、これらの作用の総和により全身血管抵抗の亢進をきたし、全身血圧が上昇するものと考えられている。

一方、全身血管抵抗の反応と対照的に、糖質コルチコイドは腎血流を増加させることが諸家により報告されている。すなわち、糖質コルチコイドの外因性投与あるいは内因性糖質コルチコイドの産生を刺激するコルチコトロピンの投与により、腎血流の増加が認められる^{1,8~10)}。したがって、糖質コルチコイドは腎抵抗血管では全身血

管と異なり、血管拡張作用を呈することが明らかとなりつつあるが¹¹⁾、その腎血管特異的な作用機序については未だに解明されていない。このような糖質コルチコイドによる腎血行動態の変化と関連して、部分腎摘による腎実質の減少¹²⁾や糖尿病腎症¹³⁾あるいは糸球体腎炎^{14,15)}といった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する作用により腎糸球体硬化を進展させ、更なる腎機能の低下を来すことが報告されている。さらに、腎機能が低下した患者において、ケト酸の食餌投与が内因性グルココルチコイドの抑制により、腎機能障害の進行を抑制したとする報告もなされており¹⁶⁾、糖質コルチコイドの腎微小循環に及ぼす作用機構を明らかにすることは腎血行動態面のみならず腎障害の進展阻止の観点からも重要と考えられる。

以上のことを踏まえて、本研究は糖質コルチコイドの腎血管拡張作用と脈管作動物質の関与の関係を検討した。

対象と方法

1. 動物

体重12~18kgの雄の雑種成犬を用い、ナトリウム65mEq/日、カリウム50mEq/日の一定食(DS-2, オリエンタル酵母)を与え、自由飲水下で飼育した。外科的処置は、ペントバルビタール(25mg/kg, 静注)による導入麻酔後、ハロセンガスによる維持麻酔下で行った。タイゴンカテーテル(Tygon, U.S. Stoneware.

本論文は Kubota E, Hayashi K, Matsuda H, Honda M, Tokuyama H, Okubo K, Naitoh M, Arakawa K, Saruta T : Role of intrarenal angiotensinII in glucocorticoid-induced renal vasodilation. Clin Exp Nephrol 5 : 186-192, 2001 の一部を含む。

Akrroon, OH, USA) を右内腸骨動脈に挿入し、全身血圧を測定した。カテーテルは皮下を通した後、頸部背側・両肩甲骨間より表皮下に露出させた。

腎組織内の各種脈管作動物質の経時的測定を容易にする目的で、側腹部に切開を加え腎臓を体腔内に嵌頓しないよう腹斜筋上に留置し、腎臓表面を皮膚で覆い縫合し、腎を表在化した。感染防止の目的で、術後1週間は抗生物質（アンピシリン1g/日、明治製薬）を経静脈的に投与し、連日ヘパリン生食（100単位/ml）にてカテーテルを管理した。なお、術後適当な間隔で採血し、血漿レニン活性（以下、PRAと略）、血漿アンジオテンシンII（以下、AngIIと略）濃度および血清クレアチニン濃度が術前値と変化を認めないものを対象とした。

すべての実験は術後4週間目以降に行った。本研究での実験手技ならびに方法は、本大学医学部動物実験指針に沿って行った。

2. 血行動態の測定

平均血圧（以下、MAPと略）ならびに腎血流量は、無麻酔無拘束のもと、1時間の安静臥床後に測定した。MAPは内腸骨動脈内カテーテルから直接トランスドューサー（TP-400T, 日本光電, 東京）に接続し測定した。得られた成績は analog-digital converter (Macintosh Laboratory System; Analog Digital Instruments Pty., Ltd. Castle Hill, NSW, Australia) で変換した後、コンピューターで解析した。採尿のために、7Frのバルーンカテーテル（クリエートメディック製, 横浜）を一時的に経尿道的に膀胱内に留置し、腎血漿流量（以下、RPFと略）および糸球体濾過率（以下、GFRと略）を各々パラミノ馬尿酸クリアランスならびにイヌリンクリアランスより求めた。腎血流量は腎血漿流量×100/(100-ヘマトクリット値)より算出し、総腎血管抵抗（以下、RVRと略）はMAP/腎血流量から求めた。濾過係数（FF）は、GFR/RPFから求めた。

3. 実験プロトコール

1) 実験 I: デキサメサゾン投与による血行動態ならびに血中・尿中脈管作動物質への影響

術後4週間以上の安定期を置いた後に、約1週間の対照期をもうけ、その最終日に血行動態・腎機能を評価した。その後デキサメサゾン（0.5 mg/kg/日）を経静脈的に7日間投与し（デキサメサゾン投与期；以下、DEX期と略）、血行動態・腎機能への影響を検討した。さらに投与終了後、7日間の回復期をもうけ、その最終日に再び血行動態・腎機能の変化を測定した。

デキサメサゾンによる腎血行動態への影響に、生体内の液性因子が関与するか否かを検討する目的で、対照期およびDEX期において、PRA、Ang II濃度、ならびに心房性Na利尿ペプチド（以下、ANPと略）への影響を検討した。さらに、膀胱内にカテーテルを挿入し、対照期ならびにDEX期に、尿中カテコールアミン3分画、尿中サイクリックGMP、ならびに尿中カリクレイン排泄量を測定した。また、尿中一酸化窒素の指標として、その代謝産物であるNO₂⁻/NO₃⁻（以下、NO_xと略）を測定した。

2) 実験 II: アデノシン A2 受容体拮抗薬に対する反応性の検討

デキサメサゾンによる腎血管拡張作用に、アデノシン A2 受容体が関与するか否かを検討する目的で、対照期ならびにDEX期においてアデノシン A2 受容体拮抗薬（KF17837, 協和発酵工業; 10 μg/kg/min）投与に対するMAPならびにRPFの急性変化を評価した。

3) 実験 III: Ang II 受容体拮抗薬に対する反応性の検討

デキサメサゾンによる腎血管拡張作用に、腎臓内のAng II作用の変化が関与するか否かを検討する目的で、対照期ならびにDEX期においてAng II受容体拮抗薬（カンデサルタン, 武田薬品工業; 0.1 mg/kg）投与に対するMAPならびに腎血行動態（RPF, GFR）の急性変化を評価した。

4) 実験 IV: 外因性 Ang II に対する反応性の検討

対照期ならびにDEX期において、Ang II（ペプチド研究所, 大阪）に対するMAPならびに腎血行動態の変化を検討した。30分間の安静の後、Ang II（1 ng/kg/分）を内腸骨静脈から持続注入ポンプ（model-975, Harvard Apparatus, USA）を用いて20分間注入し、MAPならびにRPFの変化を評価した。

5) 実験 V: 腎組織中の Ang I・II 濃度ならびにアンジオテンシン変換酵素（以下、ACEと略）活性の検討

対照期ならびにDEX期における腎組織中の液性因子を、経時的に測定するために腎表在化モデルを作製し、腎内液性因子の重要な構成因子であるAng I, Ang II濃度ならびにACE活性の測定を行った。ペントバルビタール（6 ml）静注にて麻酔を行い、経皮的に腎生検針（Biopsy-Cut Needle 451410, Bard Radiology, USA）を使用して腎組織を採取した。得られた組織片から皮質部および髄質部を分離し、直ちに-80℃で凍結保存し、後日測定に供した。組織採取は各腎臓に対し4カ所で行った。なお、静脈麻酔から腎組織採取完了まで10分以内で行った。

4. 測定方法

PRA ならびに ANP の測定はラジオイムノアッセイ (第一ラジオアイソトープおよび栄研社) で行った。カテコールアミン 3 分画はホウ酸カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分離後、三水素化インドールを使用した蛍光色素により測定した。パラアミノ馬尿酸とイヌリン濃度は比色計 (7010 型, 日立製作所, 東京) を用いて測定した。

5. 使用薬剤

カンデサルタン (アンジオテンシン II 受容体拮抗薬) ならびに KF17837 (アデノシン A2 受容体拮抗薬) は、おのおの武田薬品工業ならびに協和発酵工業より供与を受けた。これらの薬剤はジメチルスルホキシドを溶媒として用いた。なお、本研究で用いた量の溶媒の単独投与は、全身および腎血行動態に影響を与えなかった。

6. 統計

本文および図表中の数値は、すべて平均値±標準誤差で示した。統計解析に関しては、断りのないものについては分散分析を行い、有意差があった場合 Scheffe-test で群間の比較をした。また、一部の検定には Wilcoxon の符号順位検定を行った。危険率 5% 未満の場合を統計学的に有意差ありとした。

結果

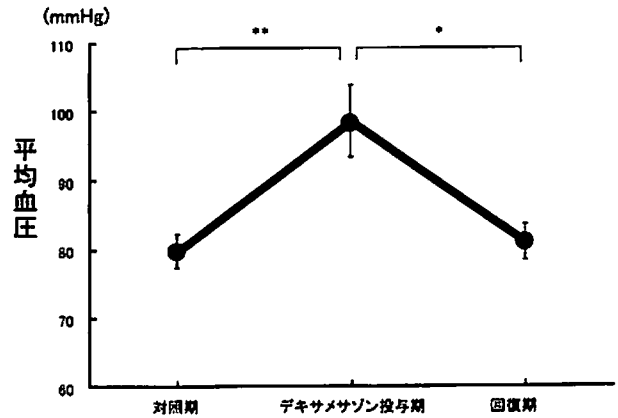
1. 実験 I: デキサメサゾンの血行動態ならびに各種脈管作動物質への影響

1) 血行動態の測定

デキサメサゾン投与により、MAP は 80 ± 2 mmHg から 98 ± 5 mmHg へと $24 \pm 7\%$ 上昇した ($p < 0.01$, $n=9$; 第 1 図)。この血圧上昇反応はデキサメサゾン投与の中止により 81 ± 3 mmHg へと投与前値に復した。

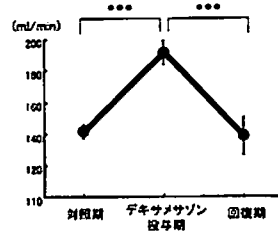
全身血圧の反応と対照的に、RPF の反応はデキサメサゾン投与により 142 ± 4 ml/min から 191 ± 7 ml/min へと $35 \pm 4\%$ の増加を示し ($p < 0.0001$, $n=19$; 第 2 図), RVR は 0.26 ± 0.01 から 0.22 ± 0.01 mmHg・min/ml へと減少した ($p < 0.05$, $n=8$)。デキサメサゾン投与中止により RPF ならびに RVR は 139 ± 12 ml/min および 0.27 ± 0.01 mmHg・min/ml へと前値まで回復した。

一方、GFR はデキサメサゾンの投与により 34 ± 1 から 38 ± 1 ml/min へと $14 \pm 2\%$ の増加に留まった ($p < 0.05$, $n=19$)。したがって、濾過係数はデキサメサゾ

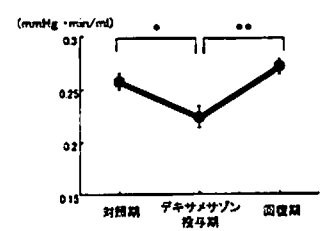


第 1 図 デキサメサゾン投与による平均血圧の変化。デキサメサゾン投与期および回復期の観測値は各期間の 7 日目の値を示す。*: $p < 0.05$ 。**: $p < 0.01$ 。

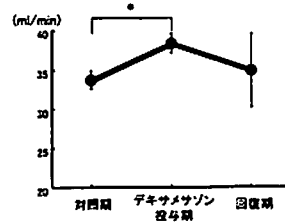
腎血漿流量



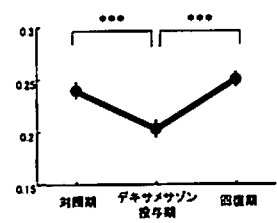
腎血管抵抗



糸球体濾過率



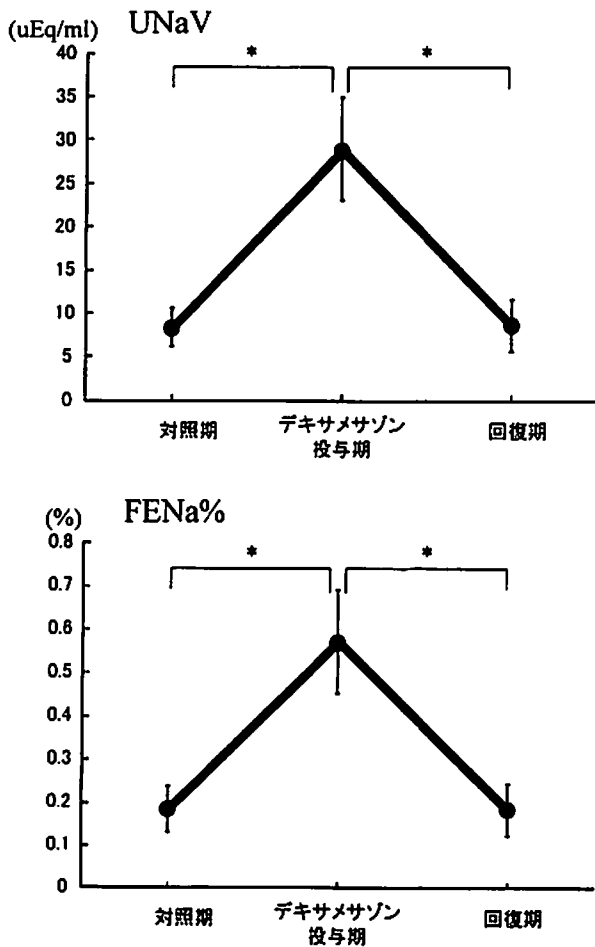
濾過係数



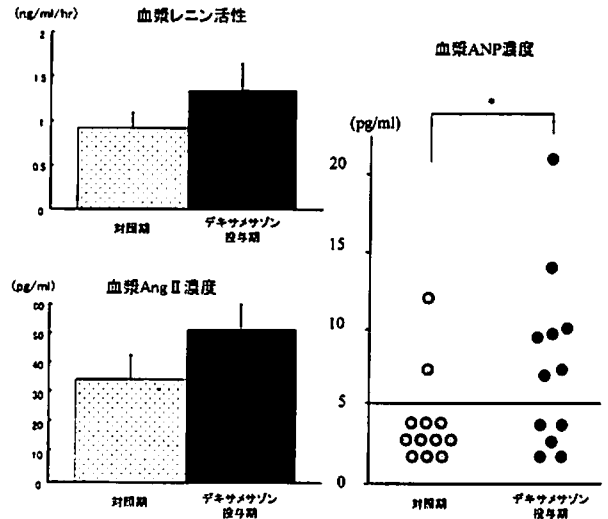
第 2 図 デキサメサゾン投与による腎血行動態の変化。デキサメサゾン投与期および回復期の観測値は各期間の 7 日目の値を示す。*: $p < 0.05$ 。**: $p < 0.01$ 。***: $p < 0.005$ 。(Kubota E et al: Clin Exp Nephrol 5: 186-192, 2001 の Fig. 1 を、許可を得て転載)

ン投与により 0.24 ± 0.01 から 0.20 ± 0.01 へと減少し ($p < 0.005$, $n=19$)、投与中止により 0.25 ± 0.01 に回復した。

尿中 Na 排泄量はデキサメサゾンの投与により 8.3 ± 2.2 μ Eq/ml から 28.9 ± 5.9 μ Eq/ml へと $249 \pm 71\%$ の増加を示し ($p < 0.05$, $n=9$; 第 3 図, 上), 投与中止により 8.6 ± 3.0 μ Eq/ml に復した。この時、FENa%は



第3図 デキサメサゾン投与による尿中Na排泄の変化。デキサメサゾン投与期および回復期の観測値は各期間の7日目の値を示す。UNaV：尿中Na排泄，FENa%：尿中Na排泄分画。*：p<0.05。



第4図 デキサメサゾン投与による血中脈管作動物質への影響。デキサメサゾン投与期の観測値は投与7日目の値を示す。Ang II：アンジオテンシンII，ANP：心房性Na利尿ペプチド。*：p<0.05。(Kubota E et al：Clin Exp Nephrol 5：186-192，2001のFig. 2を，許可を得て転載，一部改変)

デキサメサゾン投与により $0.18 \pm 0.05\%$ から $0.57 \pm 0.12\%$ へと $212 \pm 65\%$ の増加を示し ($p < 0.05$, $n = 9$ ；第3図，下)，投与中止により $0.18 \pm 0.06\%$ に復した。

2) 血中・尿中脈管作動物質の変化

PRA および血漿 AngII濃度は，いずれもデキサメサゾン投与により影響を受けなかった (PRA, $p > 0.1$, $n = 13$ ；第4図，左上；血漿 Ang II, $p > 0.1$, $n = 13$ ；第4図，左下)。一方，血漿 ANP 濃度は，デキサメサゾン投与により有意の増加を示した ($p < 0.05$, $n = 12$ ；Wilcoxon の符号順位検定にて評価；第4図，右)。

尿中への脈管作動物質の排泄のパラメーターとして，NOx，サイクリック GMP ならびにカリクレインを測定したが，いずれの項目もデキサメサゾン投与により有意な変化を認めなかった (第1表)。一方，カテコール

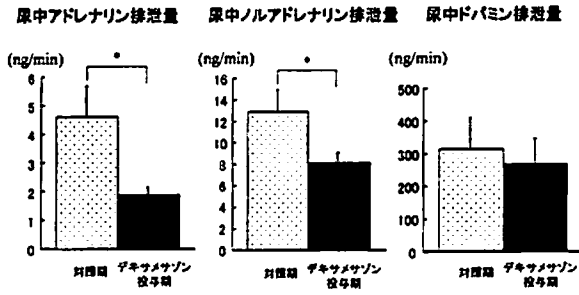
第1表 デキサメサゾン投与による尿中脈管作動物質の排泄量の変化

			対照期	DEX 期	
NOx	(nmol/min)	n=9	1.15 ± 0.32	2.50 ± 0.79	NS
サイクリック GMP	(pmol/min)	n=21	0.59 ± 0.06	0.58 ± 0.06	NS
カリクレイン	(mMCA U/min)	n=7	17.0 ± 2.8	14.6 ± 2.0	NS

デキサメサゾン投与期の観測値は投与7日目の値を示す

NOx：NO₂/NO₃⁻，DEX：デキサメサゾン，NS：有意差なし

(Kubota E et al：Clin Exp Nephrol 5：186-192，2001のTable 1を，許可を得て転載，一部改変)



第5図 デキサメサゾン投与による尿中カテコールアミン排泄量の変化。デキサメサゾン投与期の観測値は投与7日目の値を示す。*； $p < 0.05$ 。(Kubota E et al : Clin Exp Nephrol 5 : 186-192, 2001 の Table 1 を、許可を得て転載、一部改変)

第2表 デキサメサゾン投与による平均血圧ならびに腎血漿流量の変化におけるアデノシン A2 受容体拮抗薬 KF17837 の投与効果

		対照期 (n=9)	DEX 期 (n=5)
平均血圧 (mmHg)	KF17837 前	79.3±0.9	92.6±2.4
	KF17837 後	0.6±0.8	93.6±1.9
腎血漿流量 (ml/min)	KF17837 前	161.8±13.2	213.8±18.2
	KF17837 後	151.5±11.6	207.9±26.9

デキサメサゾン投与期の観測値は投与7日目の値を示す
DEX：デキサメサゾン

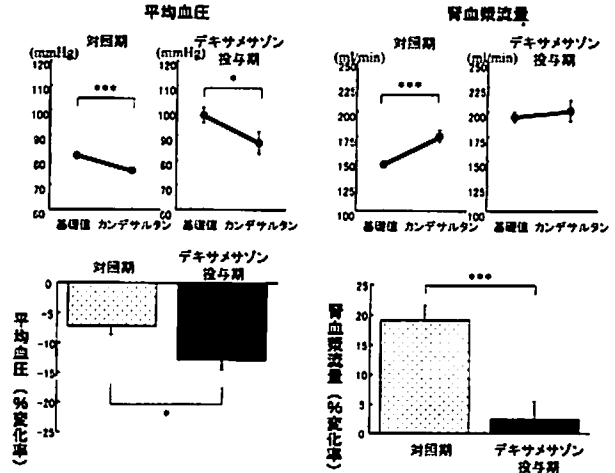
アミンでは、ノルアドレナリンおよびアドレナリンの尿中排泄がともにデキサメサゾン投与により減少した ($p < 0.05$, $n=20$ ；第5図)。

2. 実験II：アデノシン A2 受容体拮抗薬に対する反応性の検討

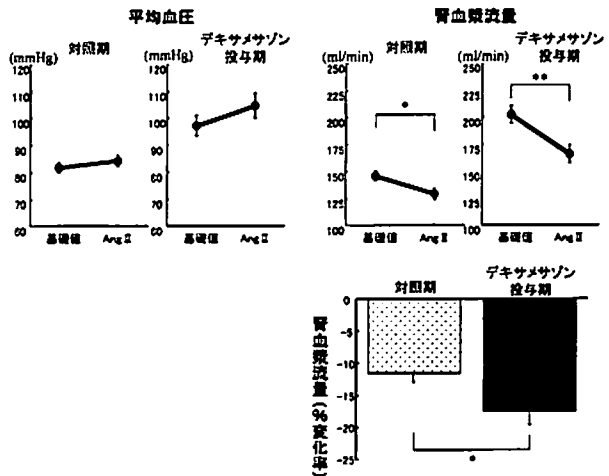
デキサメサゾン投与による腎血管拡張作用にアデノシン A2 受容体の刺激が関与するかを検討した (第2表)。対照期、DEX 期のいずれの期間においてもアデノシン A2 受容体拮抗薬投与は、MAP および RPF へ影響しなかった。

3. 実験 III：AngII受容体拮抗薬に対する反応性の検討

カンデサルタンの投与により、MAP は対照期では 82 ± 1 mmHg から 76 ± 1 mmHg へと軽度低下したが ($p < 0.005$, $n=11$)、RPF は 147 ± 3 ml/min から 175 ± 6 ml/min へと著明に増加した ($p < 0.0001$, $n=17$ ；第6図)。一方、DEX 期においては、カンデサルタン投与により MAP は 98 ± 3 mmHg から 87 ± 4 mmHg へと低下したが ($p < 0.05$)、RPF は有意な変化を示さなかった (195 ± 4 ml/min から 201 ± 10 ml/min, p



第6図 デキサメサゾン投与による平均血圧ならびに腎血漿流量の変化に対するアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (カンデサルタン) の作用。デキサメサゾン投与期の観測値は投与7日目の値を示す。*； $p < 0.05$ 。***； $p < 0.005$ 。(Kubota E et al : Clin Exp Nephrol 5 : 186-192, 2001 の Fig. 3 を、許可を得て転載、一部改変)



第7図 デキサメサゾン投与による平均血圧ならびに腎血漿流量の変化に対する外因性アンジオテンシンIIの作用。デキサメサゾン投与期の観測値は投与7日目の値を示す。Ang II：アンジオテンシンII。*； $p < 0.05$ 。**； $p < 0.01$ 。(Kubota E et al : Clin Exp Nephrol 5 : 186-192, 2001 の Fig. 3 を、許可を得て転載、一部改変)

>0.1)。

カンデサルタン投与による MAP の変化を対照期および DEX 期と比較すると、各々 $7.2 \pm 1.4\%$ 、 $12.8 \pm 1.5\%$ の減少を示し、DEX 期において降圧反応性が亢進していた ($p < 0.05$)。一方、RPF は、対照期では $19.1 \pm$

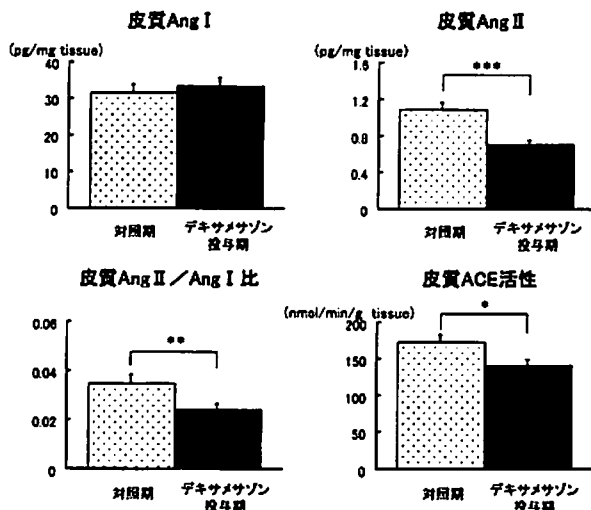
2.3%の増加を示したが、DEX 期では増加反応を示さず、MAP とは対照的に反応性が減弱していた ($p < 0.0001$)。

4. 実験 IV : 外因性 Ang II に対する反応性の検討

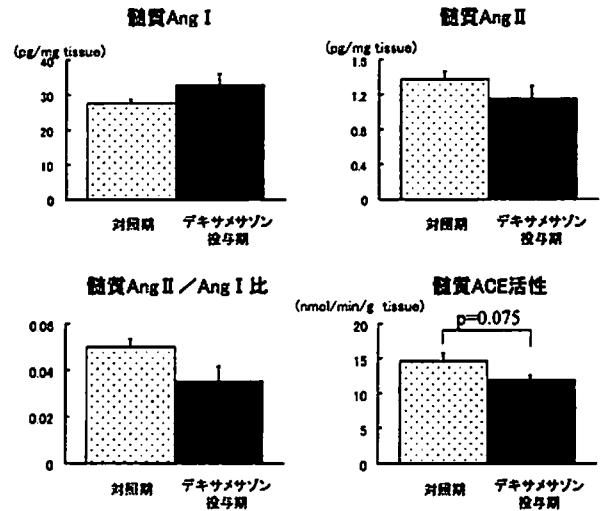
Ang II (1 ng/kg/分) の投与は、対照期および DEX 期のいずれの期間においても、MAP に対して影響を与えなかった (対照期, 82 ± 2 mmHg から 84 ± 2 mmHg, $p > 0.5$; DEX 期, 97 ± 4 mmHg から 105 ± 4 mmHg, $p > 0.5$, $n = 8$; 第7図)。一方、RPF は Ang II の投与により、対照期では 146 ± 4 ml/min から 129 ± 5 ml/min ($p < 0.05$, $n = 9$)、DEX 期でも 202 ± 7 ml/min から 166 ± 8 ml/min ($p < 0.01$) へと減少反応を示した。この Ang II 投与による RPF の減少率を対照期および DEX 期で比較すると、各々 $11.5 \pm 1.4\%$ 、 $17.5 \pm 2.0\%$ であり、DEX 期において反応性が亢進していた ($p < 0.05$)。

5. 実験 V : 腎組織中の Ang I・II 濃度ならびに ACE 活性の検討

腎皮質内の Ang I 濃度は、デキサメサゾンによる影響を受けなかった (対照期, 31.7 ± 2.1 ; DEX 期, 33.6 ± 2.0 pg/mg tissue, $p > 0.5$, $n = 7$; 第8図)。一方、腎皮質内の Ang II 濃度は、デキサメサゾンにより 1.09



第8図 デキサメサゾン投与による腎皮質中のアンジオテンシンI・II濃度ならびにアンジオテンシン変換酵素活性への影響。デキサメサゾン投与期の観測値は投与7日目の値を示す。Ang I: アンジオテンシンI, Ang II: アンジオテンシンII, ACE: アンジオテンシン変換酵素。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ 。(Kubota E et al: Clin Exp Nephrol 5: 186-192, 2001 の Fig. 4 を、許可を得て転載、一部改変)



第9図 デキサメサゾン投与による腎髄質中のアンジオテンシンI・II濃度ならびにアンジオテンシン変換酵素活性への影響。デキサメサゾン投与期の観測値は投与7日目の値を示す。Ang I: アンジオテンシンI, Ang II: アンジオテンシンII, ACE: アンジオテンシン変換酵素

± 0.07 から 0.71 ± 0.04 pg/mg tissue へと $33.2 \pm 5.5\%$ の減少を示した ($p < 0.0005$, $n = 11$)。したがって、Ang II/Ang I比は、デキサメサゾン投与により、 0.035 ± 0.003 から 0.024 ± 0.002 へと低下した ($p < 0.01$, $n = 7$)。

上記の Ang II/Ang I 比の変化より、Ang I から Ang II への変換をつかさどる ACE 活性のデキサメサゾンによる影響を検討した。腎皮質内の ACE 活性は、デキサメサゾン投与により 172.3 ± 9.3 から 141.8 ± 6.7 nmol/min/g tissue へと、 $19.5 \pm 3.5\%$ の減少を認めた ($p < 0.05$, $n = 9$)。

腎髄質においても、Ang I 濃度 (対照期, 27.7 ± 0.7 ; DEX 期, 32.9 ± 2.8 pg/mg tissue, $p > 0.5$, $n = 7$; 第9図)、Ang II 濃度 (対照期, 1.38 ± 0.07 ; DEX 期, 1.15 ± 0.14 pg/mg tissue, $p = 0.096$, $n = 7$)、ACE 活性 (対照期, 14.6 ± 1.1 ; DEX 期, 12.0 ± 0.4 nmol/min/g tissue, $p = 0.075$, $n = 7$) の測定をしたが、デキサメサゾン投与による各々の変化に腎皮質同様の傾向は見られたがいずれにおいても有意差は認めなかった。

考 案

糖質コルチコイドは全身血圧や動脈硬化など循環器系に種々の影響を与えることが知られている。とくに糖質

コルチコイドの過剰状態により生じる高血圧の成因に関しては、末梢血管抵抗の亢進が中心的役割をはたしており、その機序として血管内皮でのプロスタグランジン²⁾・キニン³⁾・一酸化窒素⁴⁾などの血管拡張性物質の産生抑制、血管平滑筋における Ang II⁵⁾・カテコールアミン^{3,5)}に対する血管反応性の亢進、ならびに血管壁 Ang II 受容体レベルでの変化^{6,7)}などが明らかにされてきている。一方、腎血行動態に対する影響は、末梢血管と異なり、腎血流量の増加をもたらす腎血管拡張作用を示すことが知られている¹¹⁾。このような糖質コルチコイドによる全身血管抵抗の亢進および腎血流の増加はいずれも数時間で認められ、3～5日以降安定化することが報告されている。Nakamoto ら³⁾も無麻酔・無拘束下の雑種成犬でデキサメサゾン投与により同様の変化を確認しており、同時に血中・尿中の脈管作動物質の変化も数日以内に生じ投与7日目以降で安定化することを報告した。しかしながら、糖質コルチコイドによるこれらの腎血行動態に対する作用の詳細な機序は明らかにされていない。以上のことをふまえ、本研究はデキサメサゾン投与7日後のデータを観測することにより、糖質コルチコイドによる腎血行動態および脈管作動物質の変化を検討した。

本研究では、デキサメサゾン投与により著明な腎血流量の増加がもたらされることが明らかにされた。この腎血流量の変化は、同時に認められる MAP の上昇に伴う二次的な増加ではなく、RVR の低下が観察されたことより腎血管の拡張に伴うものと考えられた。この結果は、糖質コルチコイド投与により FF の低下を伴う腎血流量の増加が見られるとする従来の報告と一致する結果であった¹⁰⁾。Baylis ら⁹⁾は糖質コルチコイドによる腎内微小血管行動態の変化を微小穿刺法にて検討し、腎濾過機能の中心的役割をはたす糸球体前後に存在する輸入・輸出細動脈の抵抗の変化を観察したところ、糖質コルチコイドにより両細動脈が同程度に拡張することを確認した。このような腎微小循環の変化は、糸球体内圧の指標とされる FF を低下させる方向に働くものと考えられた¹⁷⁾。

糖質コルチコイドによる末梢血管床への影響は、これまでに多くの研究があるのに対し、腎血管床への影響は今日まで十分に検討されていなかった。腎血行動態の調節は、他の臓器血流調節と異なりヘンレ尿細管の NaCl 量により輸入細動脈の抵抗調節が行われるとする尿細管-糸球体フィードバック機構が働いているが、この機構が糖質コルチコイドの腎血行動態に対する特異的な作用を説明しうるとする報告が出されている¹⁸⁾。しかしながら、糖質コルチコイドは尿細管-糸球体フィードバック機構をむしろ増強させ¹⁸⁾、輸入細動脈を収縮させて腎血流量

を減少させる方向に働くことより、尿細管-糸球体フィードバック機構への影響が腎血管拡張作用を説明しうるものではないと考えられた。一方、糖質コルチコイドによるタンパク代謝の変化により血中アミノ酸が増加し、これによる腎血流量の増加が報告されている¹⁹⁾。しかしながら、アミノ酸負荷による腎血流量の増加は GFR および FF の上昇を伴うこと、ならびに糖質コルチコイドによる血中アミノ酸の増加は投与 24～48 時間後に生じるが、腎血管拡張反応は 24 時間以内に認めることより^{11,20)}、この機序も否定的であると考えられた。

糖質コルチコイドは他の液性因子の産生あるいは作用に影響することが知られている。なかでも、循環血液中のレニン-アンジオテンシン系は糖質コルチコイドの影響を受けることが知られている²¹⁾。しかしながら循環血液中のレニン-アンジオテンシン系への影響は、むしろ賦活化される方向に働き^{5,21)}、高血圧の成因に一部関与することが示唆されている。本研究でも血漿中 Ang II 濃度は変化せず、循環血漿中の Ang II の変化が腎血管抵抗を減弱させる方向に働くことは考えがたいと思われた。一方、糖質コルチコイドは心房内の ANP mRNA を増加させ²²⁾、血中 ANP 濃度も上昇させる²³⁾ことが報告されており、本研究でも同様の結果が得られた。したがって、ANP が腎血流増加作用を示すことより²⁴⁾、デキサメサゾンによる腎血流量増加作用に関与する可能性が示唆された。しかしながら ANP の腎微小血管における作用として、輸入細動脈拡張作用とともに輸出細動脈収縮作用も有しており²⁵⁾、その結果糸球体内圧を上昇させ、FF が上昇するとされている。また ANP の細胞内二次情報伝達物質であるサイクリック GMP の尿中排泄量を測定したが、変化を認めなかった。したがって、ANP が糖質コルチコイドによる腎血管拡張作用の一部に関与する可能性はあるものの、その関与の程度は大きくないと思われた。

近年、脈管作動物質の組織内における動態およびその反応性が、循環血液中のそれとは別に調節を受けることが報告されている。とくに、腎臓内ではアンジオテンシノーゲン、レニン、ならびに ACE などのレニン-アンジオテンシン系のすべての構成因子が豊富に存在し、それらの調節が血液とは別に行われていることが明らかにされてきている^{10,26-28)}。すなわち、糖質コルチコイドは、全身の血管床において Ang II に対する反応性を亢進させることが当研究室を含めた多くの施設で示されている^{3,5)}、腎血管床では逆に低下することが報告されている¹⁰⁾。さらに、受容体レベルでの検討では、糖質コルチコイドにより糸球体の構成細胞であるメサンジウム細胞

において Ang II 受容体数の減少が生じること^{26,27)}が報告されている。このような腎 Ang II 作用の減弱は、腎微小循環では輸出細動脈有意的拡張をもたらす FF が低下することが予想される²⁹⁾。したがって、本研究では糖質コルチコイドによる腎 Ang II 作用への影響に着目し、腎循環における Ang II の作用を全身血管床と対比して検討した。

まず、内因性の Ang II に対する反応性が変化しているか否かを Ang II 受容体拮抗薬を用いて検討したところ、Ang II 受容体拮抗薬 (カンデサルタン) の急性投与による腎血管拡張作用は、デキサメサゾンにより著明に減弱した。すなわち、全身血管床とは異なり、腎内では糖質コルチコイドによりレニン-アンジオテンシン系の作用が抑制されることが示唆された。この糖質コルチコイドによる腎内レニン-アンジオテンシン系の変化の機序として、Ang II 受容体あるいはそれ以後のレベルでの反応性の減弱が関与するかを検討するために、外因性 Ang II に対する反応性を評価した。その際、腎灌流圧の変化に伴う筋原性収縮反応などの非特異的腎血管反応の影響を除外するため、全身血圧に変化を与えない量を使用した。その結果、腎血管床における外因性 Ang II に対する感受性は、デキサメサゾンによりむしろ軽度亢進していた。以上の結果より、腎臓内における内因性レニン-アンジオテンシン系の活性あるいは作用の低下が糖質コルチコイドによる腎血管拡張作用に大きな役割を果たしていることが示唆された。この糖質コルチコイドによる内因性レニン-アンジオテンシン系の作用の減弱は、外因性 Ang II に対する腎血管反応性が逆に亢進していたことを考慮すると、Ang II 受容体を含めたそれ以後の反応性の低下ではないことが推察された。

腎臓内には、Ang II が循環血液中よりも豊富に存在することが報告されており³⁰⁻³³⁾、腎組織内の Ang II が腎血行動態に影響を与えることが示唆されている^{34,35)}。したがって、糖質コルチコイドによる腎内レニン-アンジオテンシン系の活性減弱が、腎組織内の Ang II 濃度自体の低下による可能性の有無を検討した。すなわち、腎組織内の Ang II 濃度、その前駆物質である Ang I、さらに Ang I を Ang II に変換する ACE 活性を直接測定することを試みた。その際、同じ個体で経時的に観察できること、出血・腎機能低下・感染など組織採取時の侵襲が少ないこと、ならびに麻酔に伴う腎内 Ang II の増加³³⁾を最小限に抑えることなどの条件を満たすべく腎表在化モデルを作製し、経皮的に腎生検にて腎組織片を採取した。この実験モデルの妥当性・信頼性に関しては、腎血管の狭窄が生じていないか、腎交感神経系に障害が

ないかなどの問題点が懸念されるが、この点に関しては術後4週間の時点で左右の腎臓の形態に変化を認めないもの、術前と比し腎機能に変化を認めないもの、術前と比し血圧・PRA・血漿 Ang II 濃度に変化を認めないもの、術前と比し尿中カテコールアミン排泄量に変化を認めないものの4条件を満たすもので検討することとした。これら4条件を満たすものは、モデル作製したものの8割以上であった。

本研究では前述の腎表在化モデルにおける腎組織内のレニン-アンジオテンシン系の各因子を測定した。その結果、腎皮質においてはデキサメサゾンにより、組織の Ang I 濃度に変化を認めないものの、Ang II 濃度がデキサメサゾンにより 33.2±5.5% の低下を示すことが明らかとなった。したがって、Ang II/Ang I 比がデキサメサゾンにより低下することより、Ang I から Ang II への変換をつかさどる組織 ACE 活性を測定したところ、デキサメサゾンによる ACE 活性の低下が観察された。一方、腎髄質においては、組織内の Ang I、Ang II 濃度および組織 ACE 活性に有意差は認められなかった。腎血流は、その約8割が皮質を灌流しており、また全系球体の9割は皮質に存在するとされている。したがって、デキサメサゾン投与により腎皮質内 ACE 活性が低下し、腎皮質内 Ang II の産生が低下することによって皮質部を中心とした腎血流量の増加が生じる可能性が考えられた。なお、本研究はデキサメサゾンにより外因性 Ang II に対する腎血管の反応性が亢進することを示したが(第6図)、この結果は組織内 Ang II 濃度の低下が、それに対する感受性を亢進させるとの従来³⁶⁾の報告と一致する所見と思われた。

従来、Ang II の産生においてレニンによる酵素反応が重要であると考えられてきた。しかし、Ueda らは組織における Ang II 産生の律速段階は、ACE による反応である可能性を指摘しており³⁷⁾、さらに近年 ACE 阻害薬が腎循環に大きな影響を与えるとともに腎疾患の治療薬として確立されたことより^{38,39)}、腎臓内では ACE がきわめて重要な役割をはたしていることが示唆されている。本研究でも、デキサメサゾンが循環血液中の Ang II 濃度を変化させることなく腎臓内 Ang II 濃度の低下とともに腎組織内 ACE 活性を抑制したことより、腎局所における ACE が腎循環を直接調節し、腎血流の増加をもたらしたものと考えられた。以前より、ACE は腎皮質部に存在する近位尿細管に豊富に存在すること³⁹⁾や、近位尿細管腔液の Ang II 濃度が血漿の1000倍も高濃度であること³²⁾が報告されていた。一方、糖質コルチコイドの受容体結合部位が近位尿細管に豊富に存

在すること⁴⁰⁾より、糖質コルチコイドが近位尿細管を含む皮質で ACE 活性を調節し Ang II 産生に影響を与え、最終的にこの部分を中心とした腎血流の調節を行っている可能性が考えられた。この仮説は、糖質コルチコイドによる腎血流量の増加が主として皮質血流量の増加によるとの報告と一致すると思われた³⁾。また、デキサメサゾン投与により、尿中 Na 排泄量が 249±71%増加したが、GFR の増加が 14±2%に留まっていた。それに比し FENa% の増加は 212±65%に上ったことを考え合わせるとこのデキサメサゾンによる尿中 Na 排泄量の増加は、尿細管における Na 再吸収の抑制が生じていることを反映していると思われる。尿細管における Na 再吸収に関し、近位尿細管が総 Na 再吸収量の 60~70%を支配していることが知られており、また、ここでの Na 再吸収を Ang II が大きく促進することも知られている。先に述べた ACE ならびに糖質コルチコイド受容体の分布や近位尿細管腔における Ang II 濃度を考慮すると、デキサメサゾンが近位尿細管において ACE 活性と Ang II 産生に作用し尿中 Na 排泄の増加に働いている可能性も示唆された。

一方、ヒトやイヌでは心臓・血管などの組織における Ang II 産生に ACE 非依存性の経路、とくにキマーゼが ACE と同等あるいはそれ以上の役割を担っていることが報告されている。しかしながら、Murakami ら⁴¹⁾はキマーゼ特異的阻害薬であるキモスタチンを用いて検討したところ、イヌの腎皮質組織において Ang I から Ang II への変換にキマーゼの関与が少ないことを報告している。したがって、本研究において観察した腎臓内 Ang II 濃度の低下にキマーゼの果たす役割は少ないと考えられた。

腎臓内には、レニン-アンジオテンシン系以外にも種々の脈管作動物質が存在し、腎微小血行動態に影響を与えている。糖質コルチコイドによる交感神経-カテコールアミン系に対する影響に関して、糖質コルチコイドにより血中ノルアドレナリンの減少や交感神経活性の低下を認めるとの報告^{42,43)}や、そうでないとする報告⁴⁴⁾が散見され、一定の見解は得られていない。さらに、腎局所のカテコールアミン系の変化は血中よりもむしろ尿中カテコールアミン排泄量で検討すべきとも報告されている⁴⁵⁾。そこで、本研究では尿中カテコールアミンの動態を評価したところ、デキサメサゾンの投与によりその排泄量が減少することを認めた。すなわち、糖質コルチコイドにより腎交感神経活性が減弱し、その結果腎血管床が拡張する可能性が考えられた。しかしながら、カテコールアミンによる腎微小循環への影響は FF を低下させる方向

に働くことが示されており⁴⁶⁾、本研究で認められた糖質コルチコイドによる FF の低下をとともなう腎血流の増加反応に、カテコールアミン作用の減弱が作動しているか否かは、交感神経遮断薬などを用いたより詳細な検討が必要であると思われた。

従来より、腎臓ではプロスタグランジンならびにカリクレインやキニンが大量に産生されており、これらの生成を抑制すると腎血流の低下が認められる。以前に、中元ら³⁾が、無麻酔・無拘束下のイヌにおいてデキサメサゾンにより尿中プロスタグランジンが減少することを報告している。さらに、本研究において尿中カリクレインは、低下傾向であったが、その変化は有意でなく、デキサメサゾンによる腎血管拡張作用へのこれらの関与は否定的であった。さらに、腎臓におけるアデノシン、とくにアデノシン A2 受容体を介した血管拡張作用について検討したが、対照期、DEX 期ともにアデノシン A2 受容体拮抗薬の影響は明らかでなく、この機序も関与しないと考えられた。

近年腎臓内における一酸化窒素の腎血行動態に対する役割が注目されている。一酸化窒素はプロスタグランジンやキニンと同様に腎臓で多量に産生されており、腎血行動態の維持に関与している。糖質コルチコイドによる一酸化窒素生成への影響を検討した研究では、De Matteo ら²⁰⁾は糖質コルチコイドによる腎血管拡張に、腎内一酸化窒素が主な機序であるとしている。しかし、一酸化窒素合成阻害薬の前投与によっても糖質コルチコイドによる腎血管拡張作用は完全に抑制されないことより、一酸化窒素以外の機序の関与も考えられ、また本研究でもデキサメサゾン投与により尿中 NOx 排泄量および一酸化窒素の細胞内情報伝達物質であるサイクリック GMP の尿中排泄量が不変であったことから、糖質コルチコイドによる腎血管拡張作用における一酸化窒素の役割はそれほど重要とは思われない。

以上、本研究結果をまとめると、糖質コルチコイドの腎血管拡張作用に腎組織内 Ang II 産生抑制が重要な役割をはたしており、さらに腎臓におけるカテコールアミン作用の減弱や ANP 作用の増強が一部関与する可能性も考えられた。この糖質コルチコイドの循環器系への影響は、臨床面においても各種免疫疾患などの治療下で、高血圧とともに腎血流量増加として観察されている¹⁵⁾。本研究でも明らかなように、糖質コルチコイドの腎血管床に対する特異的な拡張作用は、正常腎においては FF や糸球体内圧の上昇を認めないが、腎機能が低下した状態では上昇を伴うことも報告されている¹²⁾。実際、糖尿病腎症モデル¹³⁾や部分腎摘による慢性腎不全モデル¹²⁾に

において糖質コルチコイドにより糸球体硬化による腎障害の進展が促進されるとする結果もあり、また慢性腎不全では血中の遊離コルチゾールの増加する^{47,48)}ことも報告されている。したがって、すでに腎障害が存在する病態時には、糖質コルチコイドによる糸球体内圧上昇作用と全身血圧上昇作用があいまって、腎障害の進行を加速させる可能性も残されており、腎機能低下例における糖質コルチコイドの使用に際しては、今後はこのような観点からの検討も必要であると思われる。

総 括

糖質コルチコイドの腎血行動態に及ぼす影響とその機序を、腎レニン-アンジオテンシン系を中心とする脈管作動物質の観点から検討し、以下の結果を得た。

1. デキサメサゾンの投与により、全身血圧の上昇ならびに濾過係数の低下をとまなう腎血流量の増加を認められた。

2. デキサメサゾンは、アンジオテンシンII受容体拮抗薬による全身血圧の降下作用を増強させたが、腎血流増加作用は減弱させた。

3. デキサメサゾンは、循環血液中のアンジオテンシンII濃度に影響を与えずに、腎組織内アンジオテンシン変換酵素活性の低下ならびにアンジオテンシンII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アンジオテンシン変換酵素活性を抑制する結果、腎組織内アンジオテンシンII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-アンジオテンシン系への作用は、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-アンジオテンシン系が全身循環器系とは別に調節を受けている可能性が窺えた。

本稿を終えるにあたり、懇切な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室猿田享男教授に深く感謝いたします。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内科学教室林見一講師に心より感謝します。さらに、本研究に多大の御協力と御助言をいただきました、研究室員各位に感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第40回日本腎臓学会総会(1997年、新潟)、第41回日本腎臓学会総会(1998年、東京)、および第30回アメリカ腎臓学会(1998年、フィラデルフィア、米国)において発表した。

文 献

- 1) Whitworth JA : Mechanisms of glucocorticoid-induced hypertension. *Kidney Int* 31 : 1213-1224, 1987
- 2) Handa M, Kondo K, Suzuki H, Saruta T : Dexamethasone hypertension in rats : role of prostaglandins and pressor sensitivity to norepinephrine. *Hypertension* 6 : 236-241, 1984
- 3) Nakamoto H, Suzuki H, Kageyama Y, Murakami M, Ohishi A, Naitoh M, Ichihara A, Saruta T : Depressor systems contribute to hypertension induced by glucocorticoid excess in dogs. *Journal of Hypertension* 10 : 561-569, 1992
- 4) Marumo T, Nakaki T, Nagata K, Miyata M, Adachi H, Esumi H, Suzuki H, Saruta T, Kato R : Dexamethasone inhibits nitric oxide synthase mRNA induction by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha in vascular smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* 63 : 361-367, 1993
- 5) Saruta T, Suzuki H, Handa M, Igarashi Y, Kondo K, Senba S : Multiple factors contribute to the pathogenesis of hypertension in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 62 : 275-279, 1986
- 6) Sato A, Suzuki H, Murakami M, Nakazato Y, Iwaita Y, Saruta T : Glucocorticoid increases angiotensin II type 1 receptor and its gene expression. *Hypertension* 23 : 25-30, 1994
- 7) Sato A, Suzuki H, Nakazato Y, Shibata H, Inagami T, Saruta T : Increased expression of vascular angiotensin II type 1A receptor gene in glucocorticoid-induced hypertension. *J Hypertens* 12 : 511-516, 1994
- 8) DeBermudez L, Hayslett JP : Effect of methylprednisolone on renal function and the zonal distribution of blood flow in the rat. *Circ Res* 31 : 44-52, 1972
- 9) Baylis C, Brenner BM : Mechanism of the glucocorticoid-induced increase in glomerular filtration rate. *Am J Physiol* 234 : F166-F170, 1978
- 10) Hall JE, Morse CL, Smith MJ, Jr., Young DB, Guyton AC : Control of arterial pressure and renal function during glucocorticoid excess in dogs. *Hypertension* 2 : 139-148, 1980
- 11) May CN, Bednarik JA : Regional hemodynamic and endocrine effects of aldosterone and cortisol in conscious sheep. Comparison with the effects of corticotropin. *Hypertension* 26 : 294-300, 1995
- 12) Garcia DL, Rennke HG, Brenner BM, Anderson S : Chronic glucocorticoid therapy amplifies glomerular injury in rats with renal ablation. *J Clin Invest* 80 : 867-874, 1987
- 13) Moran TJ, Kurtz SM, Vasquez JJ : Diabetic and cortisone-induced renal lesions. A morphologic and immunohistochemical study. *Lab Invest* 11, 1962

- 14) Heymann W, Grupe WE : Increase in proteinuria due to steroid medication in chronic renal disease. *J Pediatr* 74 : 356-363, 1969
- 15) Wetzels JF, Gerlag PG, Sluiter HE, Hoitsma AJ, Koene RA : Prednisone-induced fluctuations of proteinuria in patients with a nephrotic syndrome. *Nephron* 44 : 344-350, 1986
- 16) Walser M, Ward L : Progression of chronic renal failure is related to glucocorticoid production. *Kidney Int* 34 : 859-866, 1988
- 17) Carmines PK, Perry MD, Hazelrig JB, Navar LG : Effects of preglomerular and postglomerular vascular resistance alterations on filtration fraction. *Kidney Int Suppl* 20 : S229-S232, 1987
- 18) Gutsche HU, Muller-Suur R, Samwer KF, Beer G, Hierholzer K : Tubuloglomerular feedback control in kidneys of adrenalectomized rats. *Pflugers Arch* 386 : 11-19, 1980
- 19) Baylis C : Effect of amino acid infusion as an index of renal vasodilatory capacity in pregnant rats. *Am J Physiol* 254 : F650-F656, 1988
- 20) De Matteo R, May CN : Glucocorticoid-induced renal vasodilatation is mediated by a direct renal action involving nitric oxide. *Am J Physiol* 273 : R1972-R1979, 1997
- 21) Krakoff LR, Selvadurai R, Sutter E : Effect of methylprednisolone upon arterial pressure and the renin angiotensin system in the rat. *Am J Physiol* 228 : 613-617, 1975
- 22) Matsubara H, Hirata Y, Yoshimi H, Takata S, Takagi Y, Iida T, Yamane Y, Umeda Y, Nishikawa M, Inada M : Effects of steroid and thyroid hormones on synthesis of atrial natriuretic peptide by cultured atrial myocytes of rat. *Biochem Biophys Res Commun* 145 : 336-343, 1987
- 23) Weidmann P, Matter DR, Matter EE, Gnadinger MP, Uehlinger DE, Shaw S, Hess C : Glucocorticoid and mineralocorticoid stimulation of atrial natriuretic peptide release in man. *J Clin Endocrinol Metab* 66 : 1233-1239, 1988
- 24) Hintze TH, Currie MG, Needleman P : Atriopeptins : renal-specific vasodilators in conscious dogs. *Am J Physiol* 248 : H587-H591, 1985
- 25) Marin-Grez M, Fleming JT, Steinhausen M : Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 324 : 473-476, 1986
- 26) Douglas JG : Corticosteroids decrease glomerular angiotensin receptors. *Am J Physiology* 252 : F453-F457, 1987
- 27) Chansel D, Llorens-Cortes C, Vandermeersch S, Pham P, Ardaillou R : Regulation of angiotensin II receptor subtypes by dexamethasone in rat mesangial cells. *Hypertension* 27 : 867-874, 1996
- 28) Cheng HF, Becker BN, Burns KD, Harris RC : Angiotensin II upregulates type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *J Clin Invest* 95 : 2012-2019, 1995
- 29) Hall JE, Guyton AC, Smith MJ, Jr., Coleman TG : Blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake : role of angiotensin. *Am J Physiol* 239 : F271-F280, 1980
- 30) Semple PF, Cumming AM, Millar JA : Angiotensins I and II in renal vein blood. *Kidney Int* 15 : 276-282, 1979
- 31) Seikaly MG, Arant BS, Jr., Seney FD, Jr. : Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 86 : 1352-1357, 1990
- 32) Braam B, Mitchell KD, Fox J, Navar LG : Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am J Physiol* 264 : F891-F898, 1993
- 33) Siragy HM, Howell NL, Ragsdale NV, Carey RM : Renal interstitial fluid angiotensin. Modulation by anesthesia, epinephrine, sodium depletion, and renin inhibition. *Hypertension* 25 : 1021-1024, 1995
- 34) Navar LG, Rosivall L : Contribution of the renin-angiotensin system to the control of intrarenal hemodynamics. *Kidney Int* 25 : 857-868, 1984
- 35) Mitchell KD, Navar LG : Superficial nephron responses to peritubular capillary infusions of angiotensins I and II. *Am J Physiol* 252 : F818-F824, 1987
- 36) Gunther S, Gimbrone MA, Jr., Alexander RW : Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature* 287 : 230-232, 1980
- 37) Ueda S, Elliott HL, Morton JJ, Connell JM : Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 25 : 1266-1269, 1995
- 38) Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD : The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329 : 1456-1462, 1993
- 39) Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P : Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med* 334 : 939-945, 1996
- 40) Todd-Turla KM, Schnermann J, Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A, Smart A, Killen PD, Briggs JP : Distribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA along the nephron. *Am J Physiol* 264 : F781-F791, 1993
- 41) Murakami M, Matsuda H, Kubota E, Wakino S, Honda M, Hayashi K, Saruta T : Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int Suppl* 63 : S132-S135, 1997

- 42) Szemerédi K, Bagdy G, Stull R, Calogero AE, Kopin IJ, Goldstein DS : Sympathoadrenomedullary inhibition by chronic glucocorticoid treatment in conscious rats. *Endocrinology* 123 : 2585-2590, 1988
- 43) Golczynska A, Lenders JW, Goldstein DS : Glucocorticoid-induced sympathoinhibition in humans. *Clin Pharmacol Ther* 58 : 90-98, 1995
- 44) Scherrer U, Vollenweider P, Randin D, Jequier E, Nicod P, Tappy L : Suppression of insulin-induced sympathetic activation and vasodilation by dexamethasone in humans. *Circulation* 88 : 388-394, 1993
- 45) Link L, Weidmann P, Probst P, Futterlieb A : Renal handling of norepinephrine and epinephrine in the pig. *Pflügers Arch* 405 : 66-69, 1985
- 46) Kon V, Ichikawa I : Effector loci for renal nerve control of cortical microcirculation. *Am J Physiol* 245 : F545-F553, 1983
- 47) Wallace EZ, Rosman P, Toshav N, Sacerdote A, Balthazar A : Pituitary-adrenocortical function in chronic renal failure : studies of episodic secretion of cortisol and dexamethasone suppressibility. *J Clin Endocrinol Metab* 50 : 46-51, 1980
- 48) Mantanus H, Sulon J, von Frenckell R, Sepul A, Legros JJ : A study of psychological and endocrine variables on 14 patients treated by chronic haemodialysis. *Neuropsychobiology* 7 : 285-291, 1981
-

学位論文

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

慶応義塾大学耳鼻咽喉科学教室

(指導: 小川郁教授)

守本倫子

(平成 15 年 2 月 20 日受付)

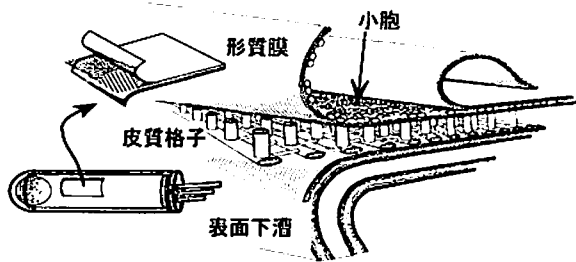
Key Word : membrane reservoir, electromotility, membrane bending, hydraulic conductivity

哺乳類の蝸牛感覚細胞には、求心性神経に支配される
内有毛細胞と遠心性神経終末を受けている外有毛細胞の
2種類が存在する。それぞれの細胞は振動体である基底
板の上に位置し、コルチ器を形成している。内・外有毛
細胞はそれぞれの上極に感覚毛を有するが、外有毛細胞
の感覚毛は蝸牛蓋膜に接している。音響信号が中耳から
蝸牛に伝わると弾性体である基底板が振動し、基底板上
の有毛細胞と蓋膜の間にずれが生じ、感覚毛も受動的に
屈曲する。有毛細胞の感覚毛先端には機械電気変換チャ
ンネルが存在するため、感覚毛の屈曲によりこのチャ
ンネルが開閉し、その結果、有毛細胞の膜電位が変化する。
内有毛細胞はこの電位の変化を直接中枢聴覚路に伝える
働きがある。一方、外有毛細胞は膜が脱分極すると収縮
し、過分極すると伸展するという特徴的な電位依存性運
動能 (electromotility) を有し¹⁾、機械的なフィードバッ
ク機構を介して基底板の共鳴を鋭くする働きがある。蝸
牛は音の高さによる周波数特異性を有しており、音の周
波数分析を行っている。従来 Bekesy が明らかにした進
行波による基底板振動が周波数分析を行っていると考え
られていたが、有毛細胞や蝸牛神経の鋭い周波数特異性
から現在では外有毛細胞の能動的運動により基底板振動
のピーク付近の振幅をさらに大きく鋭いものにするこ
とにより、聴覚閾値を低下させ周波数弁別能を高めてい
ると考えられている。つまり、外有毛細胞は聴覚におけ
る鋭敏な音感受性と高度な周波数選択性を調節することに
関わっている。

外有毛細胞は 30~80 μm 長の円柱形をした細胞であ
る。細胞側壁は特徴的な 3 層構造を呈しており、この
構造が細胞の伸縮に関係していると考えられている。3
層構造は外側から形質膜 (plasma-membrane)、皮質
格子 (cortical lattice)、表面下漕 (subsurface cister-
na) と呼ばれている (第 1 図)。最外側の形質膜は脂質
二重膜であり、電顕写真では波打った襞状構造を呈して
いる²⁾。また最内側の表面下漕は、複数の膜が層状構造
を呈している^{2,3)}。形質膜と表面下漕の間に存在する皮
質格子は太いアクチン線維とその間を交差してつなぐ細
いスペクトリン線維から成り、ばねのように動くことで
細胞骨格の役割を担っている⁴⁻⁶⁾。さらに皮質格子と形
質膜の間は柱 (pillar) とよばれる構造物により橋渡し
され、一定の力で結合している^{4,7,8)}。

外有毛細胞の電位依存性運動は 100 kHz 以上の速い
運動が可能であり、カルシウムや ATP などの化学的エ
ネルギーには依存していないとされている⁹⁾。電位依存
性運動の発生機序の詳細はまだ明らかではないが、最も
有力な仮説として領域運動能理論 (area motor model)
がある。これは細胞側壁の形質膜にある収縮タンパク
(motor 分子) が、形質細胞膜を横切る膜電位で駆動さ
れ、形質膜表面積の大きさを変化させる、とするもので
ある¹⁰⁻¹²⁾。最近この収縮タンパクが、分子生物学的にプ
レスティンと呼ばれるタンパクであり、外有毛細胞側壁
に局在していることが証明された¹³⁻¹⁵⁾。外有毛細胞側壁
の形質膜が、機械的に変形を受け、膜の緊張が増加する

本論文は、Morimoto N, Raphael RM, Nygren A, Brownell WE : Excess plasma membrane and effects of ionic amphipaths on the mechanics of outer hair cell lateral wall. *Am J Physiol* 282 : c1076-1086, 2002 の一部、Morimoto N, Nygren A, Brownell WE : Quantitative assessment of drug-induced change in OHC lateral wall mechanics. *Recent Developments in Auditory Mechanics*. (Ed) Wada H, Takasaka T, Ikeda K, Ohyama K, and Koike T, World Scientific publishing Co., Singapore, p261-267, 2000 の一部を含む。



第1図 外有毛細胞側壁の構造。外有毛細胞側壁は外側から、形質膜、皮質格子、表面下溝の3層構造からなる。

と膜容量が減少し¹⁶⁾、電位依存性運動能は減弱する¹⁷⁻¹⁹⁾。しかし、外有毛細胞は、外力による機械的変形に対して膜の浸透性を機敏に変化させ、細胞内圧を一定に保つ機構を有する^{20,21)}。この機構によって形質膜外の環境変化に対応し、電位依存性運動能、つまり音感受性を維持していると推定されている。しかしながら、電位依存性運動能を維持している膜張力や浸透性など外有毛細胞側壁形質膜の機械的特性の定量的分析は、ほとんど行われていない²²⁾。収縮タンパクによる領域運動能理論と膜の機械的特性の整合性について検討することは、外有毛細胞の電位依存性運動を解明することにつながるものと考えられる。

本研究では、外有毛細胞側壁形質膜に圧力変形を加えたときの膜表面積・体積を測定することによって、外有毛細胞形質膜における余剰膜の存在を検討した。細胞形質膜がもつ余剰膜の存在は、肺上皮細胞においても証明されており、これが機械的な力を生み出す際に重要な役割を果たすことも報告されている²³⁾。さらに、形質膜に作用し膜の形態と機械的特性を変化させることで知られているサリチル酸やクロルプロマジン^{17,24-29)}を用い、膜の張力、浸透性に対する影響を検討した。以上の結果から外有毛細胞側壁の膜特性が電位依存性運動に及ぼす効果について考察を加えた。

実験と方法

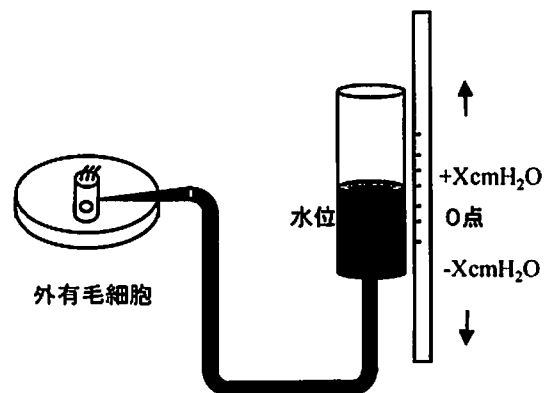
1. 外有毛細胞単離

モルモットを断頭して側頭骨を取り出し、耳胞を開放したのち、探針を用いてコルチ器を注意深く蝸牛より遊離、人工細胞外液 (135 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, PH 7.4, 浸透圧 285~290mOsm/kg) 入りの容器に浮

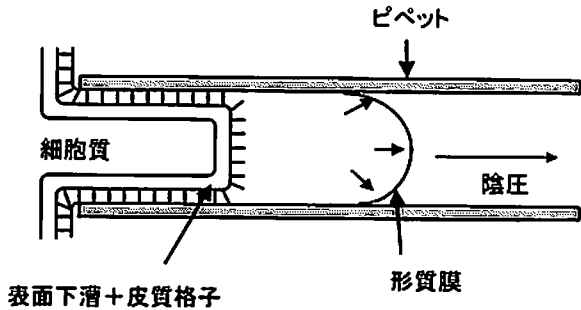
遊させた。その後、容器内をピペットでゆっくり攪拌することによって外有毛細胞を機械的に単離した。シャーレ上に外有毛細胞を含んだ溶液を少量おき、定着させるため数分間静置した。実験には単離後3時間以内で、核が細胞の底部にあり、長さ60~80 μmの円柱形状をした状態の良い細胞のみを使用した。実体顕微鏡 (Zeiss Axiovert 135 TV) 下にシャーレを設置し、100xの油浸対物レンズにて得られたイメージをビデオカメラにて記録した。外有毛細胞の側壁を内径3 μmまたは5 μmの極細のガラス管ピペットを用いて陰圧または陽圧をかけて変形させた。

2. 実験1. 陰圧負荷実験 (micropipette aspiration)

吸引用の微細ピペットはガラス管作製機器 (Mechanex 社製) にてガラス管の内径が3 μmとなるように調整した。微細ピペットと細胞外液入りのシリンダー (水柱) をチューブで連結し、全体を細胞外液で満たした (第2図)。細胞がシャーレの底部に定着した後、ピペット先端を細胞側壁のほぼ中央の位置に接するように調節した。この時の水柱の水位をシャーレの高さに一致させ (ゼロ点)、水柱をゆっくりとXcm下げると-XcmH₂Oの陰圧が細胞壁に加えられるようにした。この状態で少しずつ段階的に強い陰圧をかけていくと細胞壁はピペットの中に引き込まれ、さらにある臨界の圧力に達すると形質膜のみが内側の2層から剥離するのが観察された。そして剥離後も形質膜は徐々にピペットの内側に向かって伸展、膨隆した。伸展する形質膜と内側2層の間は細胞内液によって満たされ、風船のように膨隆した (第3図)。そして最終的には伸びている形質膜の後方が自



第2図 細胞への陰圧・陽圧負荷法。微細ピペットと水柱をチューブで連結し、細胞外液を満たす。ピペット先端を細胞側壁に接触させ、水柱を下げると陰圧がかかり、水柱を上げると陽圧がかかる。



第3図 小胞形成過程。臨界の圧力がかかると、形質膜はその下の表面下層+皮質格子より剥離し、形質膜のみがピペット内に伸展する。そして最終的には脱離して小胞を形成する。(Morimoto N et al: Am J Physiol Cell Physiol Fig. 7の一部を許可を得て転載)

然に閉鎖し、形質膜のみから成る小胞として遊離した³⁰⁾。一つの胞が遊離すると同時に次の新しい形質膜が伸び始め、再度新しい胞が形成される。こうして胞が形成、遊離する過程をビデオテープに記録して、外有毛細胞の長さ、半径、表面積、および体積と形成された胞の体積、表面積を計測した。さらに膜の形態や機械的特性を変える薬剤(10 mM サリチル酸、0.1 mM クロロプロマジン)を投与して対照との比較を行った。サリチル酸 10 mM、クロロプロマジン 0.1 mM の量を投与することにより、薬剤そのものが形質膜の形態を変化させ、電位依存性運動にも影響を与えることが報告されている^{28,31,32)}ため、本実験でも同濃度で使用した。なお胞を3個、または6個形成した後に細胞内顆粒のブラウン運動や、細胞光沢の減少が観察された場合は、その細胞は実験不適と判断し解析から除外した。

3. 実験2. 陽圧負荷実験 (micropipette fluid jet)

本実験には内径が5 μmの微細ピペットを用いた。微細ピペットおよび水柱は低浸透圧(250 mOsm/kg)に調整した人工細胞外液(135 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, PH 7.4, 浸透圧 250mOsm/kg)で満たした。細胞がシャーレの底部に定着後、ピペットの先端を細胞壁から10 μm離れた位置に固定し、水柱の水位を+20 cmH₂Oに上げて細胞壁に局所的なジェット水流を加えた。最初の数秒間はジェット水流により細胞は局所的に陥凹するが、その後細胞が全体的に腫脹し球体に近づいていった。低浸透圧溶液を用いることで、細胞形態の変化が急速かつ明瞭となった。経過中の細胞の変化を記録し、5秒ごとに細

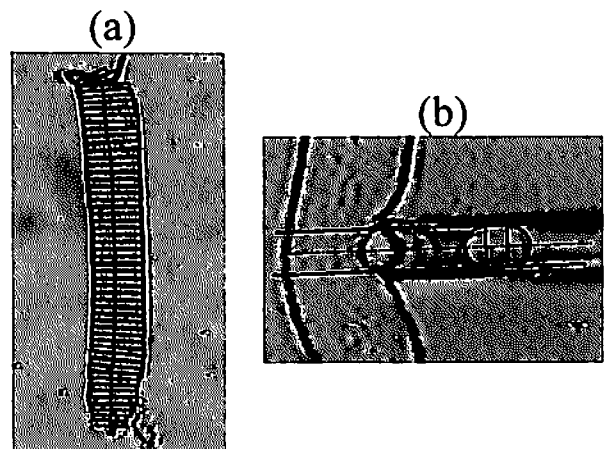
胞の長さ、半径、体積および表面積を計測した。さらに10 mM サリチル酸や0.1 mM クロロプロマジンを投与して対照と比較した。

4. 細胞形状の計測

細胞形状の計測はビデオ画像をパソコンにとり込みイメージ解析ソフト(MATLAB program, Mathworks)を用いて行った。陰圧実験では、まず画面上の細胞全体の輪郭と吸引除去した胞の輪郭を手動で5回なぞり、細胞は細胞の長軸を中心とした小さな円柱の積算と仮定し(第4a図)、胞は中央部の円柱と両端の球体の一部でできた複合体と仮定して(第4b図)それぞれの輪郭長の平均値を求めた。さらに胞を3個、6個、9個形成したところで、細胞の輪郭を再び5回ずつなぞり胞形成後の細胞輪郭長の平均値を求めた。これらの輪郭長をもとに細胞の長さ、半径、表面積、体積および胞の表面積、体積を算出した。陽圧実験では陽圧開始後5、10、15、20、25秒後の細胞を同様にして計測した。この算出法を適用した場合の誤差は、長さや半径では2%以内、表面積や体積では5%以内であった。

統計解析には一元配置分散分析とunpaired t-検定を用いた。P<0.05の場合、有意な差があると判定した。

実験に使用した動物の取扱いはBaylor College of Medicine Animal Protocol Review Committeeによって定められた規則に従った。



第4図 外有毛細胞および胞の体積、表面積の算出法。

(a) 外有毛細胞：細胞体を小さな円柱の積み重ねと見なして体積と表面積を算出した。(b) 胞：胞を円柱とその両端の球体的一部分において体積と表面積を算出した。図中で胞は微細ピペット内に引き込まれている。(Morimoto N et al: Am J Physiol Cell Physiol Fig. 1の一部を許可を得て転載)

結 果

1. 表面積の変化

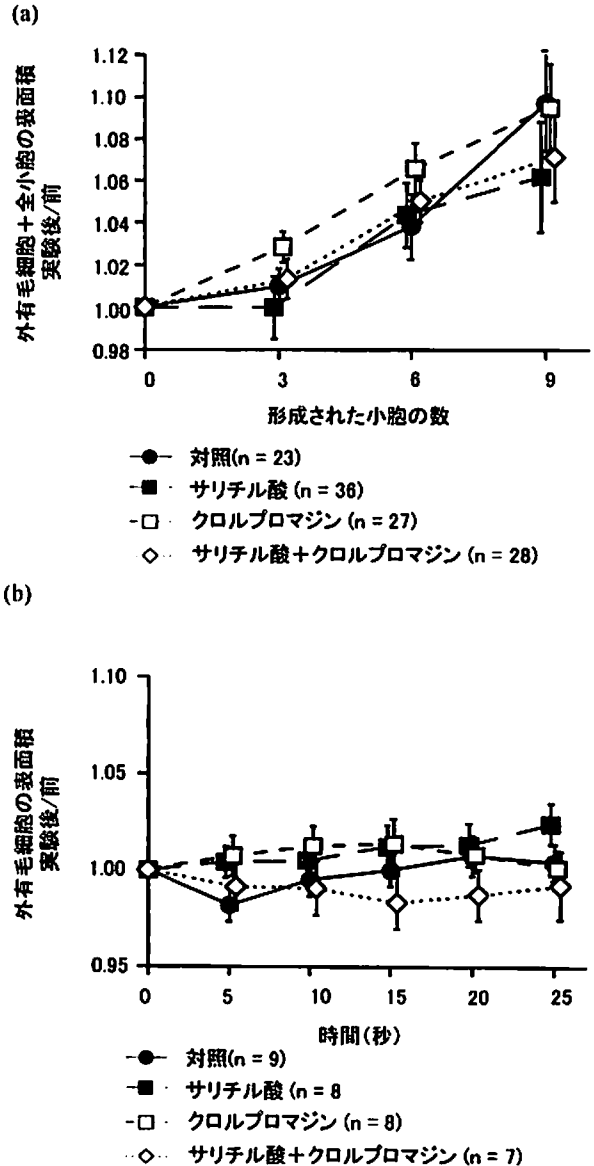
陰圧負荷実験において、小胞が3個、6個、9個と形成された時点の外有毛細胞の表面積と形成された小胞の表面積の総和を比較した(第5a図)。それぞれの時点ですべての群において、表面積の総和は実験前の外有毛細胞の表面積に比べて増加する傾向にあり、9個の小胞が形成された時には表面積の総和は実験前の細胞面積と比較して6~10%増加した。薬剤による小胞の表面積への影響を検討したが、それぞれの群間において有意差はなかった。

陽圧負荷実験では、数秒以内に水が細胞内に入りこんで膨隆し、すぐさま細胞長軸は短くなる一方、細胞短軸は長くなり球体に近い形態となった。この現象は、過去の報告と類似のものであった^{33,34)}。しかし、表面積には全く変化が認められず一定のままであった。(第5b図)。

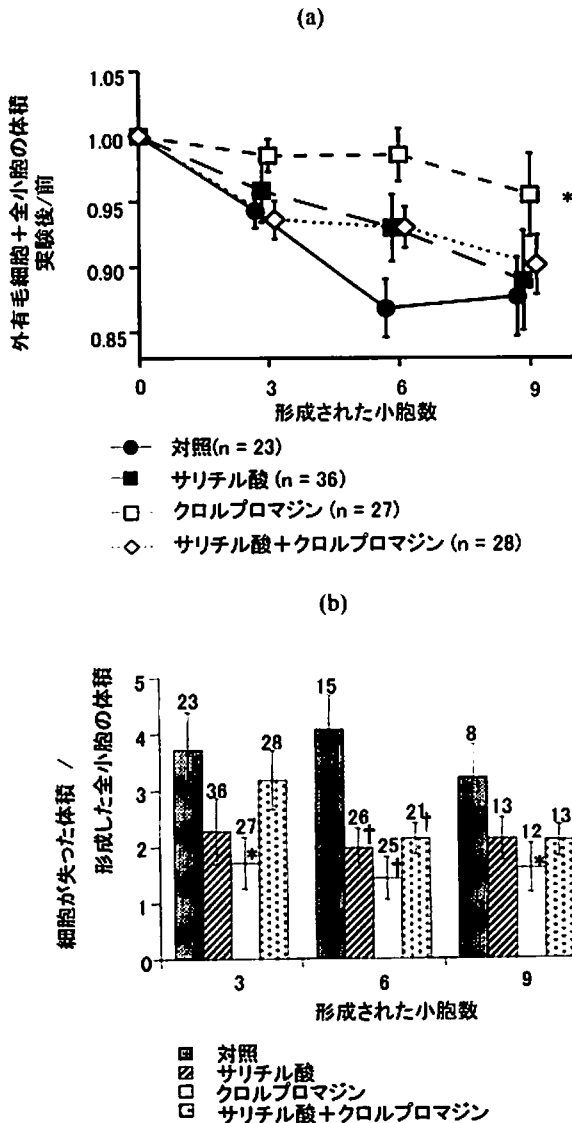
2. 体積の変化

陰圧負荷実験において、小胞が3個、6個、9個と形成された時点の外有毛細胞の体積と形成された小胞の体積の総和を比較した(第6a図)。それぞれの時点ですべての群において、体積の総和は実験前の外有毛細胞の体積に比べて減少していた。しかし9個の小胞が形成された時、対照群では実験前に比べて13%体積が減少したのに対して、0.1 mM クロルプロマジン投与した群では5%の減少しか認められなかった ($p < 0.05$, 一元配置分散分析)。さらに細胞の体積減少量と遊離した小胞の体積を比較した(第6b図)。小胞が形成された各時点で、細胞体積減少量は小胞の体積と等しいはずである(細胞が失った体積/形成した全小胞の体積=1)。しかし結果をみると、対照群における体積減少量は全小胞体積総計のほぼ3.5倍あった。このため小胞形成時に細胞質の漏出があると推測された。つまり小胞形成時に漏出して失った細胞質量は全小胞体積総計の2.5倍であった。同様に、10 mM サリチル酸投与群では全小胞体積総計の約1倍、0.1 mM クロルプロマジン投与群では約0.5倍漏出が認められ、対照群における細胞質の漏出が有意に多かった(unpaired t-検定)。小胞一個の体積は、表面積と同様に薬剤による影響は見られなかった。

陽圧負荷実験にて低浸透圧溶液を負荷すると、数秒後にはほぼ一定の速度で体積が増加した(第1表)。薬剤投与群の体積増加率は対照群のそれよりも有意に小さかった ($p < 0.05$, 一元配置分散分析)。体積増加率は膜の



第5図 圧負荷時の表面積変化 (a) 陰圧負荷時 (実験1) : 小胞形成過程での細胞+全小胞の総表面積を示す。すべての群において全表面積は陰圧負荷前より増加した。各群間の有意差は認めなかった。(SAL: サリチル酸投与群, CPZ: クロルプロマジン投与群, SAL+CPZ: サリチル酸+クロルプロマジン投与群) (b) 陽圧負荷時 (実験2) : 陽圧負荷時間の経過と共に計測した細胞の表面積を示す。すべての群において、表面積は変化しなかった。(Morimoto N et al: Am J Physiol Cell Physiol Fig. 3の一部を許可を得て転載)



第6図 圧負荷時の体積変化。(a) 陰圧負荷時の小胞形成過程における体積変化：細胞+全小胞の総体積を示す。すべての群において総体積は減少した。しかし、クロルプロマジンを投与した群では、他の群に比べて総体積の減少が有意に少なかった (* $p < 0.05$)。 (b) 細胞質漏出程度の比較：細胞質流出は、対照群において総小胞体積の2.5倍に達した。しかし、サリチル酸やクロルプロマジン投与により、細胞外流出はそれぞれ40%、20%に抑制された (* $p < 0.01$, * $p < 0.01$)。(Morimoto N et al: Am J Physiol Cell Physiol Fig. 5の一部を許可を得て転載)

第1表 陽圧負荷時の体積増加率

使用薬剤	体積変化/秒
対照	0.040
サリチル酸	0.027*
クロルプロマジン	0.028*
サリチル酸+クロルプロマジン	0.014*

低浸透圧溶液を陽圧負荷すると、数秒後にはほぼ一定の速度で体積が増加した。クロルプロマジンとサリチル酸は体積増加速度を抑制した。(* $p < 0.05$)

水浸透性と相関することが示されているため^{20, 21, 33}、この結果は10 mM サリチル酸や0.1 mM クロルプロマジンは膜透過性を減弱させることを示唆した。

3. 膜の機械的特性の変化

第2表は陰圧負荷実験で、1つの小胞を形成するのに必要な圧力と時間を表示したものである。0.1 mM クロルプロマジンが投与されていると、対照群よりも有意に低い圧力で形質膜から内側の2層が剥離し、小胞が形成された。また、1つの小胞を形成するのにかかる時間は、0.1 mM クロルプロマジン投与群では対照に比べて半分以下であった。一方、10 mM サリチル酸単独投与群では小胞形成の圧力も時間も対照群とほぼ同じであった。それぞれの群の間で小胞の大きさに有意差はなかった。これらの結果は、クロルプロマジンが小胞を形成するエネルギーを減少させることを示唆し、細胞外側壁の膜張力に影響を与えていると考えられた。

そこで、膜張力を以下の手順で算出し、検証した。膜の張力 (T (N/m)) が均一であると仮定すると、ピペット吸引部位における膜内外の圧力の平衡は

$$P_p - P_i = \frac{2T}{R_p} \quad \text{Eq. (1)}$$

(R_p ; ピペットの内径 (m), P_p ; ピペット内の吸引圧力 (N/m²), P_i ; 細胞内圧 (N/m²)) と表される。一方、ピペット吸引部位以外の場所における膜内外の圧力平衡は Laplace の法則より

$$P_i - P_o = \frac{2T}{R_c} \quad \text{Eq. (2)}$$

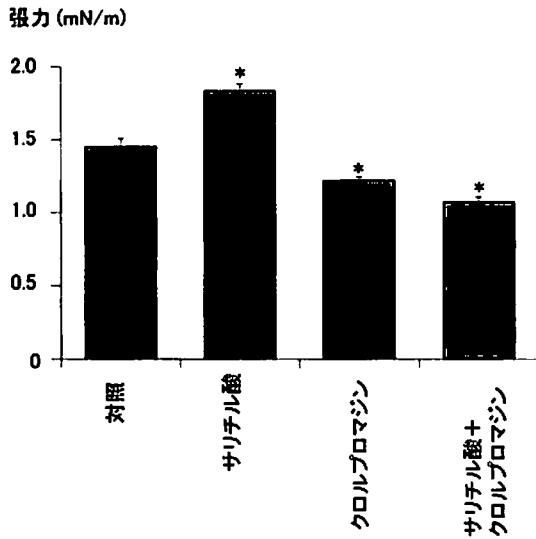
(P_o ; 細胞外圧 (N/m²), R_c ; 細胞の半径 (m), P_i ; 細胞内圧 (N/m²))

と表すことができる。Eq. 1, 2より P_i を消去すると膜張力 (T) を測定可能な P_p, P_o, R_p, R_c で導出することができる。すなわち、

第2表 小胞形成に必要な陰圧および形成に要する時間

使用薬剤	n	陰圧 (mN/m ²)	形成に要した時間 (秒)
対照	22	1.26±.10	229.18±21.6
サリチル酸	36	1.26±.07	254.57±22.7
クロルプロマジン	27	0.96±.04*	109.85±16.2*
サリチル酸+クロルプロマジン	28	0.87±.05*	64.75±11.0*

クロルプロマジン投与群は、対照群よりも低陰圧で小胞を形成した (*p<0.005 unpaired t-検定)、サリチル酸投与群における負荷陰圧は対照群と同じであった。小胞形成に要する時間はクロルプロマジン投与群では対照の48%に短縮された (*p<0.0001)。



第7図 外有毛細胞形質膜の張力。対照群に比べ、サリチル酸投与群では膜の張力が増加し、反対にクロルプロマジン投与群では減少した (*p<0.001)。形質膜張力の算出は「結果」参照。ヒストグラム上の数字はnを示す。(Morimoto N et al: Am J Physiol Cell Physiol Fig. 4の一部を許可を得て転載)

$$T = \frac{(P_p - P_o)R_c R_p}{2(R_c + R_p)} \quad \text{Eq. (3)}$$

これに計測した各数値 (P_p , P_o , R_p , R_c) を当てはめて算出した膜の張力 (T) を第7図に示す。対照群に比べ、0.1 mM クロルプロマジン投与群では膜張力が減少したが (*p<0.001, unpaired t-検定)、10 mM サリチル酸投与群では膜の張力が増加した。

考 察

モルモットの単離外有毛細胞側壁形質膜に対して、微細ピペットを用いて圧負荷実験を行った。陰圧負荷実験

で小胞が遊離した際、外有毛細胞と小胞の体積総和が減少し、小胞遊離中に細胞質が漏出していることがわかった。膜の特性を変化させるサリチル酸やクロルプロマジンを投与すると、体積総和の減少は対照に比べ抑制された。これよりサリチル酸とクロルプロマジンは細胞質漏出を抑制させると推測された。陽圧負荷実験でサリチル酸やクロルプロマジンは膜における水の浸透性を低下させることが明らかになった。よって、これら薬剤による細胞質漏出抑制は、水浸透性の低下と何らかの関係があるものと推測される。一方、陰圧負荷実験によって外有毛細胞と小胞の表面積総和は増加した。これは形質膜が余剰の膜を保持していることを示唆している。また、本研究により、サリチル酸は形質膜の張力を増加させ、反対にクロルプロマジンは形質膜の張力を減少することが明らかになった。

1. 体積変化と膜の浸透性

外有毛細胞形質膜の水に対する透過性は、他の種類の細胞膜に比べると高くはない²⁰⁾。細胞の体積維持に水の出入りが関係していることもあり、負荷が加わらない状態では外有毛細胞の体積は変化しにくいといえる。しかし、形質膜に局所的に陰圧を負荷すると小胞遊離時に形質膜内の体積総量が減少し、陽圧下に低浸透圧溶液を負荷した時は水の流入による体積の増加が認められた。これは、形質膜が外部からの圧刺激により変形、伸展したために、その部分の水の透過性が局所的に増加したことによると推測される。膜に圧刺激を加えると、膜が伸展して一過性に小孔が生じることを示唆する報告があり³³⁾、これが水透過性亢進に関与している可能性があげられる。つまり、脂質二重膜である細胞形質膜の中では自由に脂質が動けるようなゆとりが形成されており、膜に圧を加えるとそのゆとり部分が小孔のように大きく開く³⁵⁾と考えられる。その結果、細胞外からの陰圧、陽圧負荷により水の流出入が活発になったのかもしれない。この小孔は単糖または二糖類は通過可能であるものの三糖類は通

過できないことも報告されている³²⁾ため、形成される小孔のサイズは4nm以下であろうと推測される。

一方、サリチル酸やクロルプロマジンを投与すると、膜伸展により増加する水の透過性の増加が抑制されることが明らかになった。水の透過性増加が抑制される理由として、膜の張力が低下した³⁰⁾か、小孔形成しにくくなる何らかの要因が生じたことが考えられた。サリチル酸は形質膜の外側に作用し、クロルプロマジンは形質膜の内側に作用する。さらにこれらの薬剤は外有毛細胞膜の堅さや膜脂質の流動性などの機械的特性にも影響を与えることも報告されている^{28,31)}。小胞形成時の外有毛細胞の細胞質漏出は、静止水圧を減少させるために生じるものであり、薬剤による細胞質漏出抑制は、サリチル酸は外有毛細胞の形質膜の張力を増加させ、反対にクロルプロマジンは減少させるという膜張力変化に関連していると考えられた。

2. 表面積変化

電子顕微鏡による観察によって形質膜は襞状構造を有していることが示されている²⁾。陰圧負荷によって小胞を形成したところ外有毛細胞の表面積が6~10%増加したことは、小胞形成によって形質膜の襞が伸展されたことが推測される。この襞状構造をとることによって、形質膜は余剰の膜を保持することができ³⁾、膜の伸展に伴って伸展し、増加したようにみえたと考えられる³⁰⁾。低浸透圧溶液による陽圧負荷実験では、水の流入による細胞体積の増加が見られるが、形態は変化しても、表面積は一定のままであった。このことより、この余剰な膜の存在は、体積の維持に関係しておらず、むしろ電位依存性運動に関係していることを示唆している。膜の張力は形質膜に存在している余剰な膜によって緩衝されるため³⁶⁾、前述の領域運動能理論では、細胞における領域を変化させる効率を減弱させると考えられる。しかし、最近提唱されている電位依存性運動のメカニズムとして、膜タンパク分子が並び替えることによりアコーディオンのように膜の彎曲を変化させていくという膜の彎曲運動理論がある³⁹⁾。この理論においては襞構造と余剰な膜の存在は矛盾せず、形質膜上の脂質流動性が電位や張力によって変化する点³⁾も充分説明可能である。

サリチル酸は電位依存性運動を減少させ⁴⁰⁾、その結果可逆性の難聴を引き起こすのに対し、クロルプロマジンは本実験に使用したような大量投与により、電位依存性運動を誘発する電位を変化させる³²⁾。形質膜の機械的特性は外有毛細胞の運動能に大切であると考えられている。しかしながら、形質膜に影響を与えるサリチル酸とクロ

ルプロマジンでは、電位依存性運動への効果は異なっていた。サリチル酸は形質膜の外側に、クロルプロマジンは内側に影響を与える。今回の結果から電位感受、運動機構は形質膜の外側が最も大きな役割を果たし、電位依存性運動も形質膜外側の機械的特性に影響を受けることが考えられた。しかし、この点に関しては、他にも形質膜の片側だけに選択的に作用する同種の薬剤を用いて、この仮説を支持する結果が得られるかさらに検討される必要があるだろう。

総 括

単離したモルモットの外有毛細胞に対し微細ピペットを用いて局所的な圧力（陰圧および陽圧）をかけ、細胞側壁の物理学的特性を計測した。さらに、形質膜の形態を変化させる薬剤のサリチル酸やクロルプロマジンを用いて対照群との変化を検討した。

1. 形質膜は陰圧をかけることで6~10%程引き伸ばされた。
2. サリチル酸は形質膜の張力を増加させ、反対にクロルプロマジンは張力を低下させた。
3. 細胞壁に陽圧をかけることで水の浸透性は増加した。しかし、サリチル酸やクロルプロマジン投与によりこの水の浸透性増加は抑制された。

これらの結果より、有毛細胞形質膜は余剰膜を保持しており、水の浸透性はこの余剰膜も含めた膜全体の小孔形成に起因することが示唆された。サリチル酸やクロルプロマジンは膜の張力を変化させたが、これが小孔形成の抑制に関係すると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室の小川郁教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究において直接ご指導いただいたベイラー医科大学のWilliam E Brownell教授に深謝いたします。さらに適切な御助言をいただきました九州大学医学部耳鼻咽喉科教室の中川尚志講師に感謝いたします。また、第1図はOghalai JS氏の論文より引用し、筆頭著者および共著者からの同意を得て転載させていただきました。

本論文の要旨の一部は、International Symposium on Recent Development in Auditory Mechanics (1999年7月)、第10回日本耳科学会総会(2000年10月)に発表した。

文 献

- 1) Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de RY : Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227 : 194-196, 1985
- 2) Dieler R, Shehata DW, Brownell WE : Concomitant salicylate-induced alterations of outer hair cell sub-surface cisternae and electromotility. *J Neurocytol* 20 : 637-653, 1991
- 3) Saito K : Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti : subsurface cisternae and lamellar bodies in the outer hair cells. *Cell Tissue Res* 229 : 467-481, 1983
- 4) Flock A, Flock B, Ulfendahl M : Mechanisms of movement in outer hair cells and a possible structural basis. *Arch Otorhinolaryngol* 243 : 83-90, 1986
- 5) Holley MC, Ashmore JF : A cytoskeletal spring in cochlear outer hair cells. *Nature* 335 : 635-637, 1988
- 6) Holley MC, Ashmore JF : Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. *J Cell Sci* 96 : 283-291, 1990
- 7) Arima T, Kuraoka A, Toriya R, Shibata Y, Uemura T : Quick-freeze, deep-etch visualization of the 'cytoskeletal spring' of cochlear outer hair cells. *Cell Tissue Res* 263 : 91-97, 1991
- 8) Bannister LH, Dodson HC, Astbury AR, Douek EE : The cortical lattice : a highly ordered system of sub-surface filaments in guinea pig cochlear outer hair cells. *Prog Brain Res* 74 : 213-219, 1988
- 9) Kachar B, Brownell WE, Altschuler R, Fex J : Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 322 : 365-368, 1986
- 10) Dallos P, Evans BN, Hallworth R : Nature of the motor element in electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* 350 : 155-157, 1991
- 11) Santos SJ : Harmonics of outer hair cell motility. *Biophys J* 65 : 2217-2227, 1993
- 12) Iwasa KH : A membrane motor model for the fast motility of the outer hair cell. *J Acoust Soc Am* 96 : 2216-2224, 1994
- 13) Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P : Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405 : 149-155, 2000
- 14) Ludwig J, Oliver D, Frank G, Klocker N, Gummer AW, Fakler B : Reciprocal electromechanical properties of rat prestin : the motor molecule from rat outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 4178-4183, 2001
- 15) Santos-Sacchi J, Shen W, Zheng J, Dallos P : Effects of membrane potential and tension on prestin, the outer hair cell lateral membrane motor protein. *J Physiol* 531 : 661-666, 2001
- 16) Iwasa KH : Effect of stress on the membrane capacitance of the auditory outer hair cell. *Biophys J* 65 : 492-498, 1993
- 17) Kakehata S, Santos SJ : Membrane tension directly shifts voltage dependence of outer hair cell motility and associated gating charge. *Biophys J* 68 : 2190-2197, 1995
- 18) Santos SJ, Kakehata S, Takahashi S : Effects of membrane potential on the voltage dependence of motility-related charge in outer hair cells of the guinea-pig. *J Physiol (Lond)* 510 : 225-235, 1998
- 19) Brownell WE, Shehata WE : The effect of cytoplasmic turgor pressure on the static and dynamic mechanical properties of outer hair cells. *The Mechanics and Biophysics of Hearing*. (Ed) Dallos P, Geisler CD, Matthews JW, Ruggero MA, Steele CR, Springer-Verlag, Amsterdam, p.52-60 1990
- 20) Chertoff ME, Brownell WE : Characterization of cochlear outer hair cell turgor. *Am J Physiol* 266 : C467-479, 1994
- 21) Ratnanather JT, Zhi M, Brownell WE, Popel AS : The ratio of elastic moduli of cochlear outer hair cells derived from osmotic experiments. *J Acoust Soc Am* 99 : 1025-1028, 1996
- 22) Morimoto N, Raphael RM, Nygren A, Brownell WE : Excess plasma membrane and effects of ionic amphipaths on the mechanics of outer hair cell lateral wall. *Am J Physiol* 282 : C1076-C1086, 2002
- 23) Vlahakis NE, Hubmayr RD : Invited review : Plasma membrane stress failure in alveolar epithelial cells. *J Appl Physiol* 89 : 2490-2496, 2000
- 24) Evans EA : New membrane concept applied to the analysis of fluid shear-and micropipette-deformed red blood cells. *Biophys J* 13 : 941-954, 1973
- 25) Russell I, Schuz C : Salicylate ototoxicity : Effects on stiffness and Electromotility of Outer hair cells isolated from the guinea pig cochlea. *Auditory Neurosci* 1 : 309-319, 1995
- 26) Tunstall MJ, Gale JE, Ashmore JF : Action of salicylate on membrane capacitance of outer hair cells from the guinea-pig cochlea. *J Physiol (Lond)* 485 : 739-752, 1995
- 27) Hallworth R : Modulation of outer hair cell compliance and force by agents that affect hearing. *Hear Res* 114 : 204-212, 1997
- 28) Lue AJ, Brownell WE : Salicylate induced changes in outer hair cell lateral wall stiffness. *Hear Res* 135 : 163-168, 1999
- 29) Oghalai JS, Tran TD, Raphael RM, Nakagawa T, Brownell WE : Transverse and lateral mobility in outer hair cell lateral wall membranes. *Hear Res* 135 : 19-28, 1999
- 30) Oghalai JS, Patel AA, Nakagawa T, Brownell WE : Fluorescence-imaged microdeformation of the outer hair cell lateral wall. *J Neurosci* 18 : 48-58, 1998
- 31) Oghalai JS, Zhao HB, Kutz JW, Brownell WE : Voltage- and tension-dependent lipid mobility in the outer hair cell plasma membrane. *Science* 287 : 658-661, 2000

- 32) Lue AJ, Zhao HB, Brownell WE : Chlorpromazine alters outer hair cell electromotility. *Otolaryngol Head Neck Surg* 125 : 71-76, 2001
- 33) Brownell WE, Ratnanather JT, Popel AS, Zhi M, Sit PS : Labyrinthin lateral walls : cochlear outer hair cell permeability and mechanics. (Ed) Flock A, Ottoson D, Ulfendahl M, *Active Hearing*. Elsevier Science, Amsterdam, p.167-179, 1995
- 34) Ratnanather JT, Brownell WE, Popel AS : Mechanical properties of the outer hair cell. Ed) Duifhuis H, Horst JW, van Dijk P, van Netten S, *Biophysics of Hair Cell Sensory Systems*. World Scientific, Groningen, p.199-206, 1993
- 35) Raphael RM, Waugh RE, Svetina S, Zeks B : Fractional occurrence of defects in membranes and mechanically driven interleaflet phospholipid transport. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 64 : 051913, 2001
- 36) Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M : A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *Embo J* 17 : 4283-4290, 1998
- 37) Raucher D, Sheetz MP : Membrane Expansion Increases Endocytosis Rate during Mitosis. *J Cell Biol* 144 : 497-506, 1999
- 38) Li Z, Anvari B, Takashima M, Brecht P, Torres JH, Brownell WE : Membrane tehter formation from outer hair cell with optical tweezers. *Biophys J* 82 : 1386-1395, 2002
- 39) Raphael RM, Popel AS, Brownell WE : A membrane bending model of outer hair cell electromotility. *Biophys J* 78 : 2844-2862, 2000
- 40) Shehata WE, Brownell WE, Dieler R : Effects of salicylate on shape, electromotility and membrane characteristics of isolated outer hair cells from guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 111 : 707-718, 1991
-

慶應医学 第80巻第3号号外
平成 15 年 9 月 25 日

博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第169号

慶 應 義 塾 大 学

論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科博士課程修了の次の者に対し、博士（医学）の学位を授与したので学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

学位授与年月日 学位記号	氏名	生年月日
平成15年6月9日 慶大博士甲第2162号	細 金 直 文	昭和47年5月13日
平成15年6月9日 慶大博士乙第3698号	木 全 大	昭和43年5月28日
同 同 第3699号	小 林 幸	昭和42年2月23日
同 同 第3700号	玉 井 博 修	昭和40年9月14日
同 同 第3701号	間 川 博 之	昭和39年8月9日
同 同 第3702号	林 裕 次 郎	昭和44年4月10日
同 同 第3703号	松 浦 友 一	昭和43年8月7日
同 同 第3704号	山 崎 裕 哉	昭和39年3月2日
平成15年7月14日 慶大博士乙第3706号	安 藏 慎	昭和35年10月4日
同 同 第3707号	石 川 雅 之	昭和42年12月8日
同 同 第3708号	井 上 真	昭和38年10月14日
同 同 第3709号	壁 島 康 郎	昭和44年9月13日
同 同 第3710号	佐 々 木 淳 一	昭和39年5月25日
同 同 第3711号	田 原 聰 子	昭和46年2月2日
同 同 第3712号	目 黒 周	昭和43年10月3日

目 次

細金 直文	Mechanisms for the reduction of 24,25-dihydroxyvitamin D ₃ levels and bone mass in 24-hydroxylase transgenic rats. (24-水酸化酵素トランスジェニックラットにおける血中24,25-ジヒドロキシビタミンD ₃ 濃度および骨量低下のメカニズム) 3
木全 大	Matrix Metalloproteinase Inhibitor, Marimastat, Decreases Peritoneal Spread of Gastric Carcinoma in Nude Mice. (マトリックス分解酵素阻害薬マリマスタットはヌードマウスにおける胃癌腹膜播種を抑制した) 4
小林 幸	ラット硝子体中に投与したL-ドーパによる一酸化窒素の発生と組織学的変化 ~メラニン顆粒の有無による相違~ 5
玉井 博修	腸管からのエンドトキシン吸収に及ぼすエタノール投与の影響に関する検討 6
問川 博之	電気刺激によるラット骨格筋筋疲労に関する研究 7
林 裕次郎	Three-dimensional analysis of nystagmus in benign paroxysmal positional vertigo. New insights into its pathophysiology. (良性発作性頭位めまい症の眼振3次元解析—その病態に対する新たな考察—) 8
松浦 友一	Rostral Ventrolateral Medulla Neurons of Neonatal Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. (新生児正常血圧ラット(WKY)と高血圧自然発症ラット(SHR)の延髄吻側腹外側野(RVLM)ニューロン) 9
山崎 裕哉	The Diagnosis of Lung Cancer Using 1064-nm Excited Near-infrared Multichannel Raman Spectroscopy. (近赤外マルチチャンネルラマン分光システムによる肺癌の診断) 10
安藏 慎	現代日本人小児の成長・成熟の基準値とその特性 11
石川 雅之	Changes of cervical spinal cord and cervical spinal canal with age in asymptomatic subjects. (健常者における頚髄および頚椎脊柱管の加齢変化) 12
井上 真	Survival of Allografted Pancreatic Islets in the Subretinal Space in Rats. (ラット脾臓ランゲルハンス島細胞の同種網膜下移植) 13
壁島 康郎	A Potential Important Role for Thymidylate Synthetase Inhibition on Antitumor Activity of Fluoropyrimidine and Raltitexed. (Thymidylate Synthetase阻害と抗腫瘍効果の関連—フッ化ピリミジン化合物とRaltitexed(Tomudex)を用いた検討) 14
佐々木淳	Prior burn insult induces lethal acute lung injury in endotoxemic mice : effects of cytokine inhibition. (熱傷前負荷はマウスへのエンドトキシン投与後に致死的急性肺傷害を誘発する：サイトカイン抑制の効果) 15
田原 聡子	Potassium Channel Blocker Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases Through Pyk2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Rat Cardiomyocytes. (カリウムチャンネル遮断薬はラット心筋細胞においてPyk2、EGF受容体を介してERKを活性化する) 16
目黒 周	コレステロールエステル転送蛋白遺伝子多型と日本人2型糖尿病患者における大血管合併症有病率との関連 17

Mechanisms for the reduction of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ levels and bone mass in 24-hydroxylase transgenic rats.

(24-水酸化酵素トランスジェニックラットにおける
血中24,25-ジヒドロキシビタミンD₃濃度および骨量低下のメカニズム)

細 金 直 文

内容の要旨

ビタミンDは骨・カルシウム代謝調節に重要な役割を果たすホルモンであり、1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (1 α ,25(OH)₂D₃) が活性型として作用する。ビタミンD代謝に関与する24-水酸化酵素には二つの作用があることが知られている。一つは腎臓において25-ヒドロキシビタミンD₃ (25(OH)D₃) を基質として24,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (24,25(OH)₂D₃) を産生する作用であり、もう一つは1 α ,25(OH)₂D₃を分解する作用である。われわれは24-水酸化酵素の*in vivo*における生理的な作用を明らかにする目的で24-水酸化酵素トランスジェニックラット (CYP24Tgラット) を作製し、予想外の血中ビタミンD代謝産物濃度変化や高脂血症、蛋白尿などの表現型を呈することを報告している。本研究はCYP24Tgラットにおける血中ビタミンD代謝産物濃度変化の機序および骨代謝への影響を解析する目的で行った。

CYP24Tgラットでは血中24,25(OH)₂D₃、25(OH)D₃ともに有意に低下し、血中1 α ,25(OH)₂D₃値は野生型と変わらなかった。近年、メガリンのビタミンD代謝における役割が明らかにされ、それまで遊離型の25(OH)D₃が血管側から近位尿管細胞へ取り込まれると考えられてきたが、実際にはビタミンD結合蛋白質 (DBP) と結合した25(OH)D₃が糸球体を通過された後、管腔側からメガリンを介して取り込まれることが明らかになった。そこでメガリンの発現を定量したところ野生型と有意差がなかったことからメガリンの発現低下が血中24,25(OH)₂D₃低下の原因ではないと考えられた。メガリンはアルブミンなど種々の蛋白質と結合することが知られており、またCYP24Tgではアルブミン尿を来すことから排泄されたアルブミンがDBP-25(OH)D₃複合体のメガリンを介した再吸収を競合的に阻害すると推測し、尿中25(OH)D₃排泄の有無を調べた。その結果、25(OH)D₃はCYP24Tgラットでのみ排泄が認められ、DBP排泄もCYP24Tgのみで確認された。

次に骨代謝の変化を調べた。8週齢ラットの骨量を定量したところ、CYP24Tgラットでは有意な骨密度低下が認められた。この骨密度低下は25(OH)D₃喪失による結果であるか否かを調べるため、CYP24Tgに25(OH)D₃投与を行った結果、25(OH)D₃投与群ではvehicle投与群と比較し骨量減少が起らず、組織学的にもvehicle投与群では頰骨の増加が認められたが25(OH)D₃投与群では阻害されていた。

本研究ではメガリンとアルブミンの相互作用からCYP24TgラットにおけるビタミンD代謝動態を明らかにした。また、アルブミン大量排泄時における骨病変には25(OH)D₃も有用であることを示した。

論文審査の要旨

骨・カルシウム代謝調節に重要な役割を果たす1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (1 α ,25(OH)₂D₃) は24-水酸化酵素により分解される。また、24-水酸化酵素は25-ヒドロキシビタミンD₃ (25(OH)D₃) を基質として24,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (24,25(OH)₂D₃) を産生する。この24-水酸化酵素の*in vivo*における生理作用を明らかにする目的で24-水酸化酵素トランスジェニックラット (Tgラット) を作製し表現型の解析を行った。

Tgラットでは予想外に蛋白尿を来し、また血中24,25(OH)₂D₃、25(OH)D₃値ともに有意に低下し、血中1 α ,25(OH)₂D₃値は野生型と変わらなかった。さらにTgラットでは25(OH)D₃、ビタミンD結合蛋白質 (DBP) の尿中排泄が認められた。25(OH)D₃-DBP複合体の近位尿管での取り込みに関与するメガリンの発現には変化が認められなかったことから、排泄されたアルブミンがDBP-25(OH)D₃複合体のメガリンを介した再吸収を競合的に阻害しDBP-25(OH)D₃複合体が尿中に排泄されることが明らかとなった。またTgラットでは骨量の低下が認められるが、この骨病変は25(OH)D₃の持続投与により予防されることが示された。

審査では、導入遺伝子由来の24-水酸化酵素のWestern blotや免疫染色による検出について質問された。これに対しWestern blotは試みたが発現量が少なく困難であったと回答された。また、24-水酸化酵素を薬剤などにより誘導した際に腎病変は再現されるか質問された。これに対し24-水酸化酵素を誘導可能なのは1 α ,25(OH)₂D₃のみでこれでは一過性に誘導されるが発現を持続させることはできず、長期投与では高Ca血症をきたしてしまうために困難であると回答された。次にCa、P代謝について質問された。これに対し本研究では血中、尿中の経時変化を調べただけでTgラットの病態解明のためには検討が不十分であったと回答された。また、糸球体障害、尿管障害のどちらが先に生じるのかという質問に対し、尿蛋白質をSDS-PAGEで検討した結果、低分子量の蛋白質排泄が認められないこと、尿中グルコース排泄が若齢では亢進しないことから初期には尿管機能は障害されていないと考えられると回答された。また、本研究にラットを用いた理由について質問され、当初は骨解析が主目的でありそれにはマウスよりラットが適するためと回答された。最後にこのTgラットに相当するヒトの疾患は存在するか質問され、現時点では全く報告がないと回答された。

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、24-水酸化酵素トランスジェニックラットの病態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 発生・分化生物学 須田 年生
内科学 猿田 享男 医化学 末松 誠

学力確認担当者:

審査委員長: 岡田 保典

試問日: 平成15年5月13日

Matrix Metalloproteinase Inhibitor, Marimastat, Decreases Peritoneal Spread of Gastric Carcinoma in Nude Mice.

(マトリックス分解酵素阻害薬マリマスタットはヌードマウスにおける胃癌腹膜播種を抑制した)

木 全 大

内容の要旨

【背景】胃癌の転移再発様式として腹膜播種は比較的頻度が高いが、播種を伴う症例の5年生存率は著しく低い。この理由として腹膜播種に対する有効な治療法が未だ確立されていないことが挙げられる。腫瘍の浸潤の際に細胞外マトリックスの分解過程は必須であり、マトリックス分解酵素、Matrix metalloproteinase (以下MMPと略)を抑制することで、腹膜播種を抑制できる可能性があり以下の実験を計画した。

【方法】実験1：ヌードマウス可移植性ヒト胃癌株TMK-1を用いて合成MMP阻害剤マリマスタットと既存の抗癌剤であるマイトマイシンC (MMC) の細胞増殖抑制効果をMTT assayにより検討した。

実験2：TMK-1 5×10^5 個を10匹のヌードマウスに腹腔内投与し、1週間後に薬液を入れたmini-osmotic pumpを背部皮下へ移植した。治療群5匹にはマリマスタット(9、18、27、36mg/kg/day)を、対照群5匹には溶媒であるDMSO(dimethyl sulfoxide)を投与した。4週間薬液を持続皮下投与した。その後マウスを犠牲死させ、播種結節の総重量を測定した。

実験3：同様の方法で20匹のマウスで腹膜播種を作成し、①コントロール、②マリマスタット単独(18mg/kg/day 4週間持続投与)、③MMC単独(2mg/kg/dayを7日目に1回腹腔内投与)、④両者の併用投与、の4群各5匹において実験1と同様に比較検討した。

実験4：同様の方法で4群の播種モデルを作成し、死亡するまでの間2週に1度ずつmini-osmotic pumpを交換し投与を継続した。

【結果】実験1：マリマスタットの増殖抑制率は10 μ Mで2.64%、50 μ Mで1.10%であった。またMMCは1 μ Mにて0.00%、3.0 μ Mで43.38%、10 μ Mで50.84%と濃度依存性の増殖抑制を認めた。

実験2：マリマスタット9、18、27、36mg/kg/day投与群における播種結節形成抑制率はそれぞれ39.7、63.3、89.9、85.3%であった。また9mg/kg/day投与群を除いてコントロールに比べ有意差($P < 0.05$)を認めた。

実験3：マリマスタット単独投与の播種結節総重量/コントロール群の播種結節総重量(T/C)は26.6%であり、MMC単独投与では7.2%、両者の併用では1.3%であった。治療群全てにおいて有意差($P < 0.01$)を認めた。

実験4：MMC単独投与群と併用投与群では生存期間の延長が認められた($P < 0.01$)が、マリマスタット単独投与群では有意差は認めなかった。またMMC単独投与群の1匹、併用投与群の2匹において播種結節が消失していた。

【考察】マリマスタットはヌードマウス胃癌腹膜播種モデルにおいて、播種結節の形成を抑制した。またMMCと併用することで高い治療効果を示した。これは従来の抗癌剤の投与量を減らして副作用を軽減しながらも、同様の治療効果を期待できることを示唆している。本研究により胃癌治療におけるMMP阻害剤の臨床応用の可能性が示唆された。

論文審査の要旨

1960年から1997年までに慶應義塾大学病院で施行した胃癌手術は3742件で、その13.6%に腹膜播種を認め、その5年生存率は4.8%と著しく低い。また、胃癌の再発形式のなかで腹膜播種は最も多く30%を越えている。それ故に現在腹膜播種に対する有効な治療法の開発が望まれている。

これまでの研究により腫瘍の浸潤や転移のメカニズムは多段階であり、その際に細胞外マトリックスの分解が必須であることが明らかにされている。したがってマトリックス分解酵素Matrix metalloproteinase (MMP)を抑制することで、腹膜播種の進行を抑制できる可能性が想定される。

本実験では、合成MMP阻害剤であるMarimastatを実験に供した。まずMTT assayにて本剤が殺細胞性のない安全な薬剤であることを証明し、マウス腹膜播種モデルを用いた腫瘍抑制効果判定の実験を施行した。その結果、単独投与で播種結節の増殖抑制効果が認められたものの、生存期間に有意差は認められなかった。しかし、既存の抗癌剤との併用投与にて高い腫瘍増殖抑制と生存期間の延長を認めた。

審査ではまず、TMK-1を選んだ理由とその性質について質問があった。数種類の胃癌細胞にて腹膜播種モデルを作成したが、TMK-1が最も安定して播種が形成されたこと、またこの細胞は低分化型腺癌であり、実際の臨床でも腹膜播種は低分化型腺癌が多く理に合っていることを挙げた。またこの細胞は単独ではMMPを産生しないが、線維芽細胞と共培養することで、線維芽細胞よりMMPを放出させることが確認されている。次にMMPの産生と薬剤の効果についての質問には、MMPを産生しない細胞には本剤は効きにくい、と回答された。また本剤はMMPの活性阻害と血管新生阻害の2つの作用があるが、後者の作用機序に関しては検討の余地が残されているとの指摘があった。in vivoの実験では、対象数の追加が必要なのではないかとの指摘もあったが、ヘルシンキ宣言などを考慮すると犠牲死させるマウスは必要最小限にすべきと考えた、と回答された。また播種結節に到達しているMarimastatの濃度や、その部分でのMMPのタンパク量と酵素活性などを調べれば作用機序の解明になるのではないかと助言がなされた。本実験では単独投与では生存期間に差が認められなかったことから、臨床試験を計画するにあたっては、本剤は単剤投与ではなく、既存の抗癌剤との併用投与が望ましいと結論づけた。

以上のように、本研究では作用機序についてはさらなる検討が必要であるものの、Marimastatが胃癌腹膜播種の治療薬となる可能性を示した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 石井 裕正 病理学 坂元 亨宇
先端医科学 河上 裕 解剖学 相磯 貞和
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5月13日

ラット硝子体中に投与したL-ドーパによる一酸化窒素の発生と組織学的変化

～メラニン顆粒の有無による相違～

小林 幸

内容の要旨

【目的】L-ドーパはNOを発生する。L-ドーパを投与することにより緑内障や網膜色素変性症の治療に貢献する可能性がある。本研究ではin vitroおよびin vivoでL-ドーパからのNOの発生を確認し、in vivoで組織変化を観察した。その変化とNOやO₂との関係を探る目的で、それらの阻害薬等を前投与した場合の組織変化も検討した。

【実験方法および結果】

実験1：In vitroでのNOの発生。密閉培養皿中に、5段階に希釈したL-ドーパを投与し、発生するNOを電極法で記録した。また、L-ドーパ投与後にNO消去薬を注入し、電流変化を記録した。その結果、L-ドーパ注入後2分で拡散電流が確認され、注入したL-ドーパの濃度に比例して増加した。NO消去薬はそれを64%に低下させた。

実験2：In vivoでのNOの発生。生後6週令雌の有色ラット（DA）を2匹、および、白色ラット（WS）2匹を用いた。ラットの硝子体腔にphosphate buffered saline（PBS）、または、L-ドーパを注入し、発生するNOを電極法でモニターした。その結果、拡散電流はいずれも同様なパターンで発生し、減衰していた。その値はWSよりも、DAのほうが高かった。

実験3：L-ドーパ投与によるin vivoの組織変化。生後6週令雌のDA 5匹、および、WS 5匹を用いた。ラットの硝子体腔にPBS、または、L-ドーパを注入した。投与は、第1、3日目に行い、第5日目に眼球を摘出した。顕微鏡切片を作製しHE染色を行った。毛様体血管の拡張はDAとWSの両者に認められ、DAにおいて著しかった。DAの脈絡膜血管は拡張し、血管内皮の障害と平滑筋細胞への置換が認められたが、WSの脈絡膜血管はほとんど変化がなかった。

実験4：阻害薬等の前投与によるin vivoの組織変化。ラットは生後6週令雌のDAラット6匹（10眼）を用いた。1例（1眼）にPBS、1例（1眼）にL-ドーパを硝子体中に注入した。残りの4例（8眼）にはL-ドーパを投与したが、その1時間前に、carboxy-PTIO、N（G）-nitro-L-arginine methyl ester（L-NAME）、superoxide dismutase（SOD）をそれぞれ前投与した（前投与群）。PBSまたはL-ドーパを投与した1時間後に屠殺し、切片にHE染色を行った。その結果、PBS単独投与眼に比べ、L-ドーパ単独投与眼の脈絡膜血管は拡張していた。L-ドーパ単独投与眼の視細胞外節に傷害がみられた。また、前投与群では、いずれも脈絡膜の血管拡張が抑制された。

【結論】ラット硝子体中にL-ドーパを注入するとNOが発生し、毛様体および脈絡膜の血管が拡張することが明らかになった。また、その血管拡張には、NOとO₂が関与した。

論文審査の要旨

L-ドーパはパーキンソン病に用いられ、眼科領域では弱視の治療に有効との報告がある。本研究ではL-ドーパによるNOが眼組織的にかかるとの影響を与えるかをin vitroとin vivoにつき検討した。in vitroでのNOの発生は密閉培養皿中に5段階に希釈したL-ドーパを投与し、発生するNOを電極法で記録しL-ドーパの濃度に比例して拡散電流が増加することまた、NO消去薬にて低下する事を確認した。in vivoで有色ラットと白色ラットを用い、ラット硝子体腔にphosphate buffered saline（PBS）またはL-ドーパを注入し発生するNOを観察した結果、拡散電流は濃度依存性でありその値は白色ラットよりも有色ラットの方が高値を示した。L-ドーパ投与によるin vivoの組織変化をみた実験では、ラット硝子体腔にPBSまたはL-ドーパを注入し組織片を観察した結果、毛様体及び脈絡膜の血管が拡張していた。この現象は白色ラットより有色ラットで著明であった。阻害薬等の前投与によるin vivoの組織変化をみた実験では、PBS単独投与眼に比較しL-ドーパ単独投与眼の脈絡膜血管は拡張し、前投与群では脈絡膜血管の拡張は抑制が見られた。以上の結果から、ラット硝子体中にL-ドーパを注入するとNOが発生し、毛様体及び脈絡膜血管が拡張する事が明らかとなった。

審査に当たり、実験2で拡散電流を意味する波の最初にみられる陰性波と小振幅の波またL-ドーパを硝子体中に注入したときの大きな陰性波について質問があった。これに対してこれらの波はartifactが検出された物であるとの回答がなされた。白色ラットと有色ラットにL-ドーパを注入した結果、拡散電流が有色ラットの方がその値が高値である理由は何か、またin vitroで確認する必要がないかとの質問がなされた。これに対して、in vitroは既に共同研究者が報告済みであり、その結果と今回の結果は異なるとの回答があり、これに対する解釈に関して討論がなされた。実験方法で硝子体中へのL-ドーパの量について議論がなされたがラットは水晶体が大きく硝子体中に入れる量は制限される事また手技的にも困難を伴い出血があるとNO測定値が変化することなど回答がなされた。また論文中のDOPAによるNO発生についてこれが酵素反応か非酵素反応なのか説明がされるべきとの指摘があった。

実験3で毛様体と脈絡膜の血管がL-ドーパ注入眼とPBS単独投与眼で比較するとL-ドーパ注入眼の方が拡張しているとの報告に対しても討論があった。最後に実験4の結論に対して組織の切り方、N数など種々の疑問が各委員から出され、各委員から提出された疑問、問題点につき再度書き直しこれを各委員に再度校閲し了承が得られれば審査終了という事となった。これに対して申請者は論文を改変し、審査委員の了承が得られた。本論文は申請時幾つかの問題点があったが、ラット硝子体中にL-ドーパを注入するとNOが発生し、毛様体及び脈絡膜の血管の拡張を明らかにした点で眼科学において意義のあるものと評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 小口 芳久
医化学 末松 誠 生理学 金子 章道
病理学 岡田 保典 内科学 福内 靖男
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10日

腸管からのエンドトキシン吸収に及ぼすエタノール投与の影響に関する検討

玉井 博 修

内容の要旨

アルコール性肝障害患者では、しばしばエンドトキシン血症が観察される。実験動物においても、アルコール性肝障害ラットモデルでは、血中のエンドトキシン値が上昇し、抗生物質の投与により血中エンドトキシン値が低下すると肝障害の進展も抑制されることが報告されている。これらの事実により、腸管由来のエンドトキシンがアルコール性肝障害の発生進展機序、特にその重症化に深く関与していることが示唆される。アルコール性肝障害患者でエンドトキシン血症をきたす機序として、網内系細胞の機能低下にともなうエンドトキシン処理能の低下、腸管からのエンドトキシン吸収の亢進の二つの可能性が考えられているが、後者の機序についてはまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、急性および慢性のエタノール投与が、腸管の透過性および腸管からのエンドトキシンの吸収にどのような影響をおよぼすかにつき、in vivoの系において実験的に検討した。

本研究では、まずラットに急性にエタノールを投与した後にLPSを経口投与すると血中のエンドトキシン値はエタノール非投与群に比べて有意に上昇することが明らかになった。次いで、経静脈的にLPSを投与した後の血中のエンドトキシン値はエタノール投与群とコントロール群で有意差がないことが明らかになった。以上の結果より、急性エタノール投与による血中エンドトキシン上昇には、腸管からのエンドトキシン吸収の亢進が関与していることが示唆された。急性エタノール投与後の小腸の組織学的検討では、投与後240分の時点で、近位小腸の出血性びらんの有意な増加が観察された。しかし、小腸にまだびらんが認められないエタノール投与後60分の時点で、血中エンドトキシンが上昇していたことより、びらんが形成される以前に小腸粘膜の透過性が亢進し、エンドトキシンの吸収が亢進していることが示唆された。実際、デキストラン投与でみた小腸の透過性はエタノール投与後30分の時点から亢進し、非特異的な小腸粘膜の透過性の亢進がエンドトキシンの吸収の亢進に関与していると考えられた。

次に慢性的にエタノールを投与したラットにおいて検討した。コントロール群に比べエタノール群では腸管透過性が亢進しており、LPS投与後の血清エンドトキシン値が有意に上昇することが明らかとなった。慢性エタノール投与後の小腸の光顕による観察では、びらんや上皮の脱落といった所見を認めなかったが、電顕による観察では遠位小腸微絨毛の高さの減少と小胞体の変性がみられた。この小腸の組織学的変化が非特異的な透過性亢進を惹起し、LPSおよびデキストランに対する透過性の亢進に関与している可能性が考えられた。

以上の結果より、急性および慢性的なエタノール投与は腸管からのエンドトキシンの吸収を亢進させ、エンドトキシンを介した肝障害の増悪を誘発すると考えられる。臨床的にアルコール性肝障害では、acute on chronicの状態で病態が進展するがその機序の一つにエンドトキシンが関与することが考えられた。

論文審査の要旨

アルコール性肝障害の発生機序に腸管由来のエンドトキシンが深く関与していることが報告されている。アルコール性肝障害患者では、しばしばエンドトキシン血症が観察されるがその機序として、網内系機能の低下にともなうエンドトキシン処理の遅延、腸管からのエンドトキシン吸収の亢進などが報告されているものの、後者の機序については十分に解明されていない。そこで本研究では、急性および慢性のエタノール投与が、腸管の透過性および腸管からのエンドトキシンの吸収におよぼす影響について、ラットのin vivoの系で検討した。急性エタノール投与は腸管からのエンドトキシン吸収を亢進させた。急性エタノール投与による近位小腸の出血性びらんおよび小腸における非特異的な透過性の亢進が腸管からのエンドトキシン吸収の亢進の原因と考えられた。慢性エタノール投与は小腸の非特異的な透過性を亢進させ、腸管からのエンドトキシン吸収を増加させた。これには慢性エタノール投与による遠位小腸における微絨毛の高さの減少や細胞内小器官の変化が関与している可能性が示唆された。

審査においてはまず慢性エタノール投与ラットの近位小腸での変化について質問があり、微絨毛の高さの減少は近位小腸では目立たなかったと回答された。さらに近位小腸にくらべ遠位小腸で組織変化が強い原因について質問があり、遠位小腸では近位小腸にくらべて腸内細菌量が多いため、腸内細菌によるエタノールの代謝によって生じるアセトアルデヒドが遠位小腸においてより多いことが一因となる可能性があるとの回答された。急性エタノール投与の実験でラットの腸にびらんが生じる以外の微細な変化について電顕で観察するべきであったとの指摘がなされた。

次にアルコールにより腸管透過性が亢進する機序について質問があり、アルコール自体の浸透圧の高さが小腸にびらんを生じる原因となり透過性の亢進に関与している可能性があるが、さらにアセトアルデヒドにより腸管透過性が亢進するとの報告もあるとの回答された。さらに腸管透過性を検討するためのマーカーとしてDextranを使用した理由について質問がなされ、エンドトキシンの分子量が4000D以上であることを考慮し、分子量4000DのFD4と20000DのFD20を選択したと回答された。最後に、FD4、FD20の透過性を検討するため腎動静脈を結紮することの影響やアルコール投与による網内系機能の変化、吸収のメカニズムとしてtight junctionの役割などが今後の検討課題であると指摘された。

以上のように、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、アルコール性肝障害の発生機序に関与しているエンドトキシンの腸管からの吸収がエタノール投与により亢進することを明らかに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 裕正
外科学 北島 政樹 医化学 末松 誠
微生物学 石川 博通 解剖学 相磯 貞和
学術確認担当者：北島 政樹
審査委員長：北島 政樹

試問日：平成15年4月22日

電気刺激によるラット骨格筋筋疲労に関する研究

問 川 博 之

内容の要旨

〔目的〕運動麻痺肢に対する機能的電気刺激（FES）では、筋疲労により動作維持が困難になるため、筋力が低下する前に疲労を感知する必要がある。一方、FESのように筋を直接刺激する場合は、活動化する筋線維の範囲を同定することが重要であるが、これを形態学的に確かめた報告はない。本研究ではラットの骨格筋を電気刺激した際に生じる筋疲労について、筋電信号から筋疲労を予測できる可能性を電気生理学的に検索し、さらに組織化学的手法を用いて、活動化された筋線維の広がりや筋直接刺激による疲労のメカニズムについて検討を加えた。

〔方法〕成熟Wistar系ラット54匹を材料とした。前脛骨筋およびヒラメ筋を対象に、刺激針電極と表面電極列を一体化させた小型電極を用いて、刺激周波数20Hzまたは40Hzで30秒間の持続的電気刺激を行い、等尺性張力（張力曲線）と筋活動電位の終時変化を比較した。筋活動電位の解析は10秒毎のトリガー平均加算波形を用いて行い、ピーク間振幅、陰性ピーク潜時、ならびに温度補正を加えた筋線維伝導速度を計測した。さらに、20Hzで疲労刺激を行った直後の前脛骨筋をperiodic-acid Schiff染色し、刺激電極近傍の筋線維グリコーゲンの枯渇状態から活動化された筋線維の広がりを検索した。

〔結果〕強縮刺激下の筋張力は、前脛骨筋ではいずれの刺激周波数でも有意に減少したが、ヒラメ筋20Hzではほぼ一定であり、40Hzでは20例中4例で減少を認めた。筋活動電位では、漸次進行する振幅の低下、潜時の遅延、および筋線維伝導速度の低下を認め、これらの変化は筋線維タイプや周波数によらず常に張力の減少に先行していた。振幅低下の割合は筋線維タイプと刺激周波数の違いをよく反映しており、張力が減少し始めるまでに初期値の約50%以下に低下していた。一方、筋線維グリコーゲンの消耗は、疲労刺激後の筋断面において刺激電極を中心に楔型の限局した範囲で生じた。30秒刺激した筋の強拡大像では、対照に比べて染色強度が弱く筋線維グリコーゲンが減少した状態を認めた。

〔考察〕強縮刺激下での表面筋活動電位の変化は、振幅の低下、潜時の遅延、および筋線維伝導速度の低下が特徴的であり、これらは筋線維膜の興奮性の低下と活動化された筋線維数の減少を反映していると考えられた。一方、30秒刺激した筋の染色結果は嫌気的解糖の進行を示しており、強縮刺激による筋疲労の機序に、筋線維膜に沿った電気的活動の伝播障害だけでなく、解糖による代謝産物の蓄積なども関与している可能性が示唆された。張力の減少に先行した筋活動電位の変化は、閉ループ制御において筋電信号をモニターすることにより筋疲労を感知できる可能性を示すものと考えられた。さらに、限局した範囲で筋線維が活動化されたという事実は、今回用いた刺激方法が筋直接刺激であったことを裏付けるとともに、疲労が検出された時に刺激強度を上げて張力を保つ制御方式は、刺激電極から離れた部位の筋線維の動員によるものと推察された。以上の基礎的知見は、リハビリテーション治療で行う麻痺肢の電気刺激における疲労の問題を解決する一助となり、FESの閉ループ自動制御への臨床応用が期待されるものである。

論文審査の要旨

中枢性運動麻痺肢に対する機能的電気刺激（FES）では、筋力が低下する前に疲労を感知することや、刺激によって活動化する筋線維の範囲を同定することが重要である。本研究ではラットの骨格筋を持続的に電気刺激した際に生じる筋疲労について、筋電信号から筋疲労を予測できる可能性を電気生理学的に検討し、さらにperiodic-acid Schiff染色を用いて、筋線維グリコーゲンの枯渇状態から活動化された筋線維の広がりについて検索した。その結果、張力の減少に先行した筋活動電位の変化、とくに振幅低下の割合は、筋線維タイプと刺激周波数の違いをよく反映しており、骨格筋の電気刺激において疲労を感知する目的で筋電信号をモニターすることの有用性を示すものと考えられた。また、筋線維グリコーゲンの減少は刺激電極近傍の限局した範囲で認められ、筋を電気刺激する場合に活動化される筋線維の広がりが形態学的に明らかにされて、さらに強縮刺激による筋疲労の機序に嫌気的解糖による代謝産物の蓄積なども関与している可能性が示唆された。

審査では、まず等尺性張力を測定する際の筋長の影響について質問されたが、生体長を基準としたことが回答された。また、被検筋を張力トランスデューサーに固定する方法や、筋を乾燥や疲弊から守る方法に関する技術的な問題の指摘がなされ、PAS染色の定量的評価と併せて今後の検討課題とされた。次に、筋線維タイプによる疲労のメカニズムの違いについて質問され、単一の要素では説明困難であるが、酵素活性やグリコーゲン含有量の違いが関係していると回答された。また、刺激周波数による疲労の違いについては、20Hz刺激と比べると40Hz刺激では、強縮による阻血の影響が加わるとともに、筋活動量が大きくなるために早期に疲労しやすいことが回答された。次に、強縮刺激による筋疲労に関して、興奮収縮連関を中心とした細胞内機序について説明することが求められた。これに対しては、 Na^+ - K^+ 勾配の変化によって筋線維膜の興奮性が低下すること、とくに横行小管内における K^+ の蓄積は伝導ブロックを来して筋線維深部まで活動電位が伝播しない可能性があること、また H^+ の増加によりクロスブリッジの結合が抑制されることなどが回答されたが、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出の抑制も注目すべき機序であるとの助言がなされた。

一方、本研究の独自性の総括が求められ、筋活動電位の評価に特殊電極を用いて筋線維伝導速度の測定を取り入れたことと、組織化学的手法を用いて刺激された筋線維の範囲を明らかにしたことであると回答された。さらに、FESの基礎的問題で筋疲労に関してどう考えるかとの質問がなされ、これに対しては、臨床的に張力減少による転倒を予防するために前もって疲労を感知することが重要であり、現状では筋疲労を軽減し膝折れを予防する上で下肢装具を併用したハイブリッドFESが実用的であることが示された。

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、FESの閉ループ制御において筋活動電位の振幅をモニターすることの意義と、疲労が検出された時に刺激強度を上げて張力を保つ制御方式のメカニズムの一端を明らかにした点で、リハビリテーション医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 リハビリテーション医学 千野 直・
整形外科学 戸山 芳昭 生理学 岡野 栄之
外科学 河瀬 斌 解剖学 仲嶋 一範
学術確認担当者：北島 政樹、戸山 芳昭
審査委員長：戸山 芳昭

試問日：平成15年4月22日

Three-dimensional analysis of nystagmus in benign paroxysmal positional vertigo.

New insights into its pathophysiology.

(良性発作性頭位めまい症の眼振3次元解析—その病態に対する新たな考察—)

林 裕 次 郎

内容の要旨

良性発作性頭位めまい症 (benign paroxysmal positional vertigo : BPPV) は末梢性めまい疾患のうち最も頻度の高い疾患である。種々の動物実験や臨床的観察から、本疾患の責任病巣は後半規管であると考えられている。しかし「典型的」BPPVと診断された症例においても、その眼振の性状にはばらつきがみられる。これは、BPPVの病巣が後半規管のみに局限していないことを示唆する所見と考えられる。

眼振すなわち眼球の回転運動は、回転軸と軸廻りの角速度で定義される。さらに、ある半規管を刺激するとその半規管に対し垂直な軸を中心とする眼振が誘発されることから、眼振の回転軸を求めることにより病巣推定が可能である。

本研究ではBPPVの病態を解明するため、その眼振における回転軸の解析を行った。

対象は、頭位変換眼振検査 (Dix-Hallpike法) によってBPPVに特徴的な眼振が誘発された一側性BPPV13症例 (男性4名、女性9名、年齢24~83歳、平均54.8歳) である。眼振回転軸は、赤外線CCDカメラで記録した眼振映像をもとに、独自に開発した3次元眼球運動解析アルゴリズムを用いて算出した。また全例にBPPVの理学療法 (Semont法) を施行し、その治療効果についても検討した。

回転軸解析の結果、対象としたBPPV13例は2つのグループに分けられることがわかった。一つは、患側と考えられる後半規管に対しほぼ垂直な軸を回転軸にもつ7例 (グループA) である。もう一つは、前後軸付近の回転軸をもつ6例 (グループB) である。これらの結果から、グループAの患者では病変が後半規管に局限しているのに対し、グループBの患者では病変がより複雑であることが推測された。

以上の推測は、Semont法に対する反応性が両グループで異なるという結果からも支持された。グループAの患者は全例、Semont法による治療の開始後10日以内に治癒した (平均2.4日)。一方、グループBの患者では、治癒までにより長い期間を要した (平均25.7日) ($p<0.05$)。Semont法は、後半規管内の結石を卵形嚢に排出させることを意図して考案された理学療法である。グループBにおけるSemont法の治療効果がグループAのそれに対して劣ったのは、グループBの病変が後半規管に局限していないためと解釈された。

頭部における半規管の解剖学的位置関係を考慮すると、前後軸を回転軸にもつ眼振 (すなわち純回転性眼振) は片側の三半規管すべてが同時に興奮したときに生じる。このことから、グループBの病変は三半規管すべてであり、おそらく三半規管内すべてに結石が存在する病態 (vestibular lithiasis) であることが推測された。

論文審査の要旨

良性発作性頭位めまい症 (BPPV) でみられるような回転性眼振の定量的解析は、従来の解析法では困難であった。本研究では、眼振を「ある回転軸を中心とする眼球の回転運動」であると捉え、ビデオに記録した眼振映像から回転軸と回転角速度を算出する独自の解析法 (回転軸解析法) を開発した。さらに、本法をBPPVにおける眼振の解析に臨床応用した結果、BPPVの眼振はその回転軸により2群に分類されることが判明した。一つは、後半規管に対してほぼ垂直な軸を回転軸とする症例、他の群は前後軸を回転軸とする症例である。前者の病変は後半規管に局限しているのに対し、後者では病変が後半規管に限局せず三半規管全体 (前庭結石症) と考えられた。さらに回転軸解析法は、今後種々のめまい疾患の病態解析を解明していく上で強力な武器となり得ることも示された。

審査ではまず、眼振の解析法がoriginalかとの質問がなされ、回転軸と回転角速度によって眼振の定量的解析を行ったのは本研究が初めてであり、その解析アルゴリズムも独自に開発したのもであると回答された。また、回転軸による機能的病巣推定の精度についての質問があった。本研究では、回転軸解析結果を過去の半規管計測値と照合することにより病巣推定を行ったが、実際には半規管の位置には個人差があり、より正確な病巣推定を行うためには患者自身の半規管の位置を計測する必要があると回答された。さらに、前後軸を回転軸とするBPPV症例では健側にも病変が存在したのではないかと質問があった。両側性BPPVは存在するが、本研究ではDix-Hallpike法により一側性BPPV症例のみを対象としていること、健側に病変が存在すると仮定した場合に誘発される眼振の回転軸は前後軸とはなり得ないことなどから、健側に病変が存在する可能性は低いと回答された。前庭結石症の原因についての質問に対しては、耳石器変性が原因の一つではないかと回答された。半規管内結石は耳石器から脱落し迷入した耳石であると言われている。耳石器障害により耳石の脱落が容易になり、さらにBPPVの治療機転である耳石の溶解・吸収が阻害されることで前庭結石症が生じるのではないかと説明された。解析法に関して、虹彩紋理のパターン追跡により眼球運動解析を行っているが、縮瞳散瞳の影響を受けないのか、との質問があった。これに対し、解析する動画が毎秒30枚であることから縮瞳散瞳の影響は無視できると回答された。また眼球を球体と仮定しているが実際は楕円球体であり、より正確な解析を行うためには眼球の長軸と短軸の計測値をプログラムに組み込むべきであるとの助言があった。

以上、本研究は今後改善すべき点があるものの、従来の解析法とは全く異なる視点で独自の眼振解析法を考案した点、さらにそれを臨床に応用しBPPVの病態解明に役立てた点で、臨床的にも価値ある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
外科学 河瀬 斌 眼科学 小口 芳久
解剖学 仲嶋 一範 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5月10日

Rostral Ventrolateral Medulla Neurons of Neonatal Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats.

(新生児正常血圧ラット (WKY) と高血圧自然発症ラット (SHR) の延髄吻側腹外側野 (RVLM) ニューロン)

松 浦 友 一

内容の要旨

〈緒言〉延髄吻側腹外側野 (RVLM) ニューロンは、交感神経活動や血圧調節において大きな役割を担っており、同部位にはアンジオテンシン II (Ang II) で免疫染色される神経末端やアンジオテンシン II タイプ I (AT₁) 受容体の存在が確認されている。今回、私は生後 1 から 4 日目の正常血圧ラット (WKY) と高血圧自然発症ラット (SHR) の摘出脳幹-脊髄標本を作成し、RVLM ニューロンの電気生理学的性質を比較検討した。

〈材料・方法〉生後 1 から 4 日目までの WKY と SHR の摘出脳幹-脊髄標本を作成。ホールセル・パッチクランプ法を用いて RVLM ニューロンの細胞内電位を記録した。薬理的な反応を観察するために、灌流している脳脊髄液に Ang II および AT₁ 受容体拮抗薬のカンデサルタンを加えて膜電位の変化を記録した。

〈結果と考察〉WKY (n=54) と SHR (n=89) の RVLM ニューロンの細胞内電位を記録しその電気生理学的性質を比較検討した。両群のニューロンは共に、規則発火型・不規則発火型・サイレント型の 3 種類に分類された。不規則発火型ニューロンにおいては SHR の方が WKY と比較して膜電位が有意に浅く発火頻度が有意に速いことが示された。一方、規則発火型においては同様な傾向が見られたもののその差は有意ではなかった。今回の実験から、両者の血圧の差がつく前の段階から SHR と WKY の RVLM ニューロンには電気生理学的性質の違いが存在することが示唆された。

Ang II (6μmol/L) で灌流した時、開始 1~2 分後より SHR の RVLM ニューロンは有意に脱分極し (5.4±1.1mV; n=15) 発火頻度は増加した。一方、WKY では脱分極は有意ではなかった。

カンデサルタン (0.12μmol/L) は、SHR の RVLM ニューロンを有意に過分極させ (-3.7±0.4mV; n=14)、その発火頻度を減少させた。一方、WKY ではその反応は有意ではなかった。

0.12μmol/L のカンデサルタンを前投与しておく、Ang II (6μmol/L) によって引き起こされる SHR の RVLM ニューロンの脱分極は著明に抑制された (5.4±1.1mV → 1.0±0.5mV; n=7)。この結果から、SHR の RVLM ニューロンにおける Ang II の作用は AT₁ 受容体を介することが示された。

〈結論〉RVLM ニューロンの電気生理学的性質と Ang II に対する反応は、新生児の SHR と WKY で異なっていた。カンデサルタンによって SHR の RVLM ニューロンが著明な過分極と発火頻度の減少を示したことから、SHR では内因性の Ang II が RVLM ニューロンの AT₁ 受容体に結合して、WKY よりも浅い膜電位と速い発火頻度の維持に tonic に関わっていることが示唆された。SHR におけるこれらの RVLM ニューロンの性質がその後の血圧上昇に寄与していると考えられた。

論文審査の要旨

血圧調節には脳・中枢神経系がきわめて重要な役割を果たしており、とくに延髄吻側腹外側野 (RVLM) ニューロンは、交感神経活動の調節中枢として血圧調節に欠かすことができない部位と考えられている。本研究では、RVLM ニューロンの電気生理学的性質を、高血圧自然発症ラット (SHR) と対照のウイスター京都ラット (WKY) とで比較検討し、RVLM ニューロンの高血圧の発症に果たす役割を検討した。

研究は生後 1~4 日目までの WKY と SHR の摘出脳幹-脊髄標本を作成し、ホールセル・パッチクランプ法を用いて RVLM ニューロンの細胞内電位を記録し、その電気生理学的性質を比較した。その結果、両ラット群のニューロンは共に、規則発火型、不規則発火型およびサイレント型の 3 種があること、それらの中で不規則発火型ニューロンに関して、SHR の方が WKY に比し膜電位が有意に浅く、発火頻度が有意に速いことを明らかにした。規則発火型ニューロンに関しても同様の傾向がみられた。さらにアンジオテンシン (A) II あるいは A II の I 型受容体拮抗薬を加えた灌流実験で、SHR の RVLM ニューロンは A II によって有意に脱分極し、発火頻度を増加させ、WKY と明らかに異なった。一方 A II 受容体拮抗薬は、SHR で RVLM ニューロンを有意に過分極させ、発火頻度を減少させた。また SHR においてテトロドトキシンを前投与してシナプス間の結合を遮断した状態で A II を加えると、その脱分極は、前投与しない時に比し明らかに減弱した。この結果より、A II による脱分極の反応は、前シナプス性と後シナプス性の両方の要素が組み合わさっていると結論した。

このような研究に関して、まず RVLM ニューロンの規則発火型と不規則発火型の区別がはっきりしないとされた。本研究者は細胞の大きさや樹状突起の違いで鑑別できるとしたが、その区分法をしつかりと示すべきであったと助言された。次に静止電位の測定結果に関して、脱分極の大きさを問題としたが、その測定に際してどこを基線として測定したか、基線の決め方をしつかり示すべきであったと付言された。さらに WKY に比し、SHR の RVLM ニューロンが A II に対して有意に脱分極しやすい機序が問題となった。今回の研究では A II の受容体以後の過程の検討がなされておらず、ホールセル・パッチクランプ法を用いた検討だけでなく、voltage クランプ法での検討もなされるとよかったと付言された。このほかテトロドトキシンを用いて A II の脱分極の反応の機序を検討したが、テトロドトキシンの作用の特異性に問題があり、テトロドトキシンの前投与で A II の作用機序を検討することには問題があるとされた。

以上のように本研究では、RVLM ニューロンの脱分極の測定方法やこのニューロンに対する A II の作用機序の検討方法等に検討の余地が残されたが、SHR と WKY とで RVLM ニューロンの電気生理学的性質に差があることを示し、高血圧の発症における RVLM ニューロンの重要性を明らかにした点で価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 亨男
生理学 岡野 栄之 解剖学 仲嶋 範
外科学 河瀬 斌 内科学 小川 聡
学力確認担当者: 北島 政樹、岡野 栄之
審査委員長: 岡野 栄之

試問日: 平成 15 年 5 月 19 日

The Diagnosis of Lung Cancer Using 1064-nm Excited Near-infrared Multichannel Raman Spectroscopy.

(近赤外マルチチャンネルラマン分光システムによる肺癌の診断)

山崎 裕哉

内容の要旨

画像検査の発達により、悪性腫瘍の臨床的診断法には著しい進歩が認められている。しかし今なお診断に苦慮し、針生検など侵襲的検査を行う例も少なくない。このような問題の解決のため近年注目されているのがラマン分光システムである。このシステムによる悪性腫瘍の診断について過去に報告が認められてはいるが、蛍光による計測の障害や、計測する機器の感度が問題とされてきた。今回我々は従来より感度の高いシステムの開発に着手し、またマルチチャンネル化による秒単位の計測が可能な機器の開発に成功した。さらに生体への影響の少ない近赤外レーザー光の使用により、蛍光の影響を受けずに計測が可能となった。この新たに開発されたラマン分光システムを利用して、従来計測困難とされてきた肺組織のスペクトルを測定し、ラマン分光システムの肺癌診断への有用性を検証した。

実験には癌腫を含む肺35検体を使用した。測定した各スペクトルに対してフィッティング解析を行い、さらに、判定係数を横軸に、測定ポイント数を縦軸にしたヒストグラムを作成した。実験終了後、使用された組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色標本作製し、計測されたスペクトルと病理組織所見とを比較検討した。解析により得られたヒストグラムでは、癌と非癌部の鑑別に、境界値を判定係数0.5と仮定すると、症例単位でsensitivityは91%、specificityは97%であり、過去の報告と比較して高い正診率を得た。またフィッシャーの直接確率検定では $p < 0.0001$ の有意差を得た。以上から、境界値として判定係数0.5は有効であり、ラマンスペクトルの解析により肺癌の客観的診断は可能と考えられた。またFalse negativeとなった3例の病理組織像では、いずれも間質の増生が著明であり、得られたスペクトルは、癌と非癌部の混在する病理組織像を反映したものと考えられた。なお今回の実験に使用した病理組織標本のすべてに、レーザー光照射による組織の損傷は認められず、我々が使用したラマン分光システムの組織に対する安全性も確認できた。今回我々は、1064-nmの近赤外レーザー光を使用することで、蛍光による測定への影響を回避し、今日まで測定困難と考えられてきた肺組織のスペクトル計測にはじめて成功した。今回の実験には10%ホルムアルデヒドで固定された検体を使用した。過去の報告では*in vitro*と*in vivo*での結果の相関が証明されており、直接人体を計測した場合にも同様の結果が期待できるものと考えられる。

近赤外マルチチャンネルラマン分光システムにおいて、高率に肺癌の診断が可能であるとの結論を得た。本システムは、構成する組織の客観的評価が可能であり、病理組織学的にも診断を行う上で有用と考えられる。本システムの生体への安全性は高く、*in vivo*での利用が可能と考えられる。

論文審査の要旨

ラマン分光システムは光による非侵襲的かつ客観的検査法であり、悪性腫瘍の診断に対し、近年注目されている。しかし測定の対象となる散乱線は非常に弱く、計測する機器の感度が問題とされてきた。また計測にはレーザー光を使用するため、長時間にわたる測定は人体への影響が問題となる。本研究では従来より感度の高いシステムの開発に成功し、またマルチチャンネル化により秒単位の計測が実現したことを受け、計測困難であった肺組織のスペクトルを測定し、ラマン分光システムの肺癌診断に対する有用性ならびに組織に対する安全性が示された。

審査ではまず、同一検体からなぜ複数箇所のスペクトルの計測を行い、データ解析およびヒストグラム作製に至ったのかとの質問がなされた。これに対し、現在行われている生検なども、一病変に対し複数箇所をわたり採取することが多く、ラマン分光システムが実用化された場合の臨床の現場に即した方法を選択したものであるとの回答がなされた。またホルムアルデヒドで固定された検体のみを対象とした実験だけでは、ラマン分光システムの肺癌診断への有用性や、組織に対する安全性を検証するには不十分ではないかとの指摘に対し、今回実験を行った施設の規則により、以前は固定標本以外の実験は許可されなかったが、現在は凍結標本を対象とした実験を継続して行っており、その実験においても同様の結果が得られているとの説明がなされた。さらに、癌の組織型によるスペクトルの相違については、顕微鏡下ラマン分光システムを使用した解析が必要であるとの説明がなされた。

臨床検査への応用の可能性についての質疑では、まず肺内の含気や患者の呼吸運動がスペクトル計測に影響をおよぼすのではないかととの質問がなされたが、それらは計測に全く影響のないことが確認された。またファイバースコープの使用困難な領域や臓器に対してはスペクトル計測は不可能ではないかとの指摘に対し、血管内カテーテルとラマン分光システムを併用し、腫瘍の栄養血管内にカテーテルを留置することでスペクトル計測は可能であるとの回答がなされた。腫瘍の進達度診断の可否については、mm単位ではあるが、レーザー光照射の焦点を深さ方向に調節することが可能であり、進達度についてもある程度の診断は可能であるとの説明がなされた。加えて今回の実験に使用したレーザーシステムは人体への影響は考えにくく、実際に皮膚のスペクトルも問題なく計測されてはいるが、臨床試験を行う前には、充分な動物実験の施行が望まれるとの助言がなされた。

以上のように本研究はさらに検討されるべき課題を残しているものの、ファイバースコープとの併用により臨床検査への応用が実現できれば、近赤外マルチチャンネルラマン分光システムが新たな肺癌の診断法となりうる可能性を示した点で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 放射線医学 久保 敦司
外科学 小林 紘一 内科学 小川 聡
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 亨宇
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4月28日

現代日本人小児の成長・成熟の基準値とその特性

安 藏 慎

内容の要旨

日本人小児の健康評価には、日本人固有の成長・成熟基準値が必要不可欠である。しかし、従来の基準値にはいくつかの問題点がある。1) 体重基準値(文部科学省全国調査成績)が平均値±標準偏差で表示されている、2) 7歳以降の頭囲基準値が存在しない、3) 骨成熟基準値が存在しない、などである。

本研究では、現代日本人小児の成長指標として、厚生労働省全国調査資料(男8511名、女8110名、0~7歳、1990年)、経済産業省所管の社団法人人間生活工学研究センター全国調査資料(男5654名、女4620名、7~18歳、1992~1994年)を用い、現代日本人小児の身長、体重、頭囲(0~18歳)、腹囲(腸骨稜位)、Body mass index(BMI、7~18歳)、の年齢別性別基準値を作成した。標準偏差スコアの算出には、データの分布に影響されないLMS法を用いた。また現代日本人小児の成熟指標として、日本体育協会調査資料(男1070名、女1037名、7~18歳、1986年)、都内私立女子小、中、高校生資料(2234名、9~19歳、1989年)、慶應義塾大学病院外来男子患者資料(886名、0~16歳、1985~1995年)を用い、現代日本人小児の、第1基節骨種子骨出現年齢中央値、第1中手骨骨端骨癒合完了年齢中央値、橈骨遠位端骨端骨癒合完了年齢中央値、初経年齢中央値(status-quo法)、年齢別精巢容積基準値(0~16歳)を作成した。

これらの基準値を1978~1981年日本規格協会調査成績および海外の成績と比較し、以下の成績を得た。

- 1) 頭囲：今回作成した日本人頭囲50パーセントイル値は、1978~1981年調査成績に比し、男で最大1.1cm、女で最大1.3cm増加した。日本人頭囲身長比50パーセントイル値は1978~1981年調査成績とはほぼ一致したこと、17歳男女の身長は1994年以降変化していないこと(文部科学省学校保健統計全国調査成績)から、日本人男女の頭囲の増加傾向は、身長同様に終息したと推測される。
- 2) BMI：今回作成した7~18歳日本人男子BMI50、97パーセントイル値は、1978~1981年調査成績をそれぞれ最大0.68、3.84上回り、1990年イギリス人男子基準値をそれぞれ最大0.64、2.43上回った。日本人男子における「高度肥満」の増加傾向は、イギリス人のそれを上回る。
- 3) 骨成熟、性成熟：日本人男女の第1基節骨種子骨出現年齢は、スイス人(1954~1976年チューリッヒ縦断的成長研究)に比し、男で0.7、女で1.1年早く、日本人の初経年齢は、欧米人(1986年イタリア、1988~1991年スペイン、1987~1997年アメリカ、1998~1999年イギリス)に比し0.4~0.6年早く、日本人の精巢容量3ml到達時期は、スイス人(1954~1976年チューリッヒ縦断的成長研究)に比し0.7年早かった。日本人の成熟テンポは、欧米人よりも0.5~1.0年早いことが判明した。

論文審査の要旨

本研究では、日本人小児の成長・成熟の新たな基準値を作成した。従来の基準値が、データの収集、処理、表示方法において不十分なものであったため、1) 個別データが利用可能な資料に基づくbody mass index、頭囲/身長比などの新たな基準値、2) 精巢容積、status-quo法による初経年齢など新たに収集された資料に基づく成熟指標を作成した。さらに、これら新たな基準値を、日本人に関する過去の成績および海外の成績と比較検討した。その結果、以下の3点が判明した。1) 日本人男女は、過体重化傾向にある。この傾向は男子の高度過体重者において顕著であり、イギリス人男子のそれを上回る。2) 日本人男女の頭囲のsecular trendは終息した。3) 日本人男女の性成熟、骨成熟は、白人に比し、約0.5~1.0年早い。

審査では、まず、基準値作成および国際比較に用いた資料の調査年次が一致しないとの指摘があった。今回基準値作成に用いた資料と同年代に収集された欧米人の骨成熟資料、精巢容積資料、0から18歳までを包括する頭囲資料はなく、やむをえず古い欧米人資料を比較対象とした、今回の国際比較における両者の差には、人種差に加えて日本人の早熟化の影響が含まれている可能性は否定できないと回答された。次に骨年齢判定方法において、判定基準の実例が示されておらず、判定結果の客観性の検証がなされていないとの指摘があった。種子骨出現および骨端骨癒合完了の判定は、疑いもたれるような場合には陰性と判定することとし、判定者は性別以外の情報を知らされていなかった、と回答された。また、初経年齢の検討において、都内私立学校生を対象とした調査成績を日本人の代表値とすることの妥当性について質問された。更なる検討なくして今回の成績を日本人の代表値とすることには問題があるが、東京近郊での日常診療に使用するためには、全国資料に基づく基準値よりも有用であると回答された。初経年齢が低年齢化しているように見えるのは、過去の成績の平均値を今回の成績の中央値と比較しているためではないかと指摘があり、その点に関しては今後の検討課題であると回答された。さらに、2時点の成績から頭囲のsecular trendが終息したと結論づけるのは妥当かとの質問に対し、頭囲/身長比の年代変化が見られなかったこと、身長secular trendが終息したことからこのように結論づけたが、今後18歳までを包括する日本人頭囲計測調査が行われれば確認可能と回答された。

最後に、今後の検討課題として、長頭、短頭など頭部の形状、座高下肢長比、手長/身長比など、プロポーションに関する基準値の必要性が強調された。以上のように、本研究では結論の一部について妥当性の問題はあるものの、日常診療に必要なデータを改訂、新たな基準値を作成した点で、価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 小児科学 高橋 孝雄
衛生学公衆衛生学 大前 和幸 解剖学 相磯 貞和
産婦人科学 吉村 泰典 整形外科学 戸山 芳昭
学術確認担当者：北島 政樹、大前 和幸
審査委員長：大前 和幸

試問日：平成15年5月30日

Changes of cervical spinal cord and cervical spinal canal with age in asymptomatic subjects.

(健康者における頸髄および頸椎脊柱管の加齢変化)

石川 雅之

内容の要旨

MRIは脊椎・脊髄病変の診断に際し、第一選択の画像診断法とされる。MRI画像により測定可能な脊髄面積や脊髄扁平率は圧迫性脊髄症の予後や重症度と相関すると考えられており、診断や治療の際の指標として重要であるが、対照とすべき健康者の脊髄面積や脊髄扁平率、あるいは脊髄と脊椎との関連に関するまとまった報告は少ない。本研究では無症候性健康者の頸椎MRIおよび単純X線所見を解析し、頸髄、頸椎脊柱管および両者の関係の加齢的变化を明らかにすることを目的とした。

対象は頸椎・頸髄疾患の既往のない10代から60代以上の各年代男女約20名の健康人ボランティア229名(男性118名、女性111名)である。使用したMRI機種は0.5T超伝導装置(横河メディカルシステム社製Resona)であり、spin echo法による横断像を、C3からC6の各椎体中央およびC3-4からC5-6の各椎間高位で撮像した。単純X線では頸椎中間位側面像を撮像した。得られた画像フィルムをデジタルカメラ(Nikon社製E2N)で撮像した後、パーソナルコンピュータ上で独自に開発した画像解析ソフトを用いて種々の計測を行った。測定項目はMRIでは脊髄面積および脊髄扁平率とし、単純X線ではC3からC6の脊柱管前後径、椎体前後径とした。X線撮像時に生じる拡大率による誤差を考慮して、脊柱管前後径を椎体前後径で除した脊柱管前後径比(CBR)を算出した。また、各症例の年齢、身長および体重も調査した。脊髄面積、脊髄扁平率およびCBRと年齢、身長および体重との相関、さらに脊髄面積とCBRの相関を検討した。その結果、脊髄面積は各年代ともC4高位で最大となり、各高位で男女とも20代をピークとして、加齢とともに減少傾向が見られた。脊髄面積と年齢との相関は各高位男性で-0.23から-0.47、女性で-0.31から-0.47であった。脊髄面積と身長との相関は各高位男性で0.28から0.55、女性で0.24から0.27であった。脊髄面積と体重との相関は各高位男性で0.03から0.19、女性で0.01から0.09であった。脊髄扁平率は男女とも各年代、C5-6高位で最小であった。脊髄扁平率と年齢、身長および体重との相関係数は各高位男性で-0.17から0.19、女性で-0.16から0.10であった。CBRと脊髄面積との相関係数は各高位男性で0.02から0.12、女性で0.25から0.39であった。

結論として、健康者において脊髄面積と脊柱管前後径は年齢と弱い負の相関を認められたが、脊髄扁平率は年齢と相関を認めなかった。また、脊髄面積と脊柱管前後径とは有意な相関を認めなかった。脊髄面積は年齢によりその正常値が変化することから、年代別に脊髄面積を提示した今回のデータは、圧迫性脊髄症患者の脊髄面積評価の際、有用な指標になるものと考えられる。

論文審査の要旨

脊髄の面積や扁平率は頸髄症の予後や重症度と相関すると考えられており、診断・治療における重要な指標の一つとなっている。しかしながら、対照とすべき健康者の脊髄面積や扁平率に関するまとまった報告は少なく、果たして若年者と高齢者でそれらの値に差があるかどうか明らかでない。本研究ではMRI診断に際し対照とすべき健康者の頸椎・頸髄MRI所見を各年代ごとに解析し、その基準値を明らかにするとともに、加齢の影響について分析を加えた。検討項目は脊髄面積および脊髄扁平率と年齢および身長、体重との相関、脊柱管前後径比と年齢および脊髄面積との相関とした。結果として脊髄面積は年齢と負の相関を、身長とは正の相関を認めたが、体重とは相関を認めなかった。脊髄扁平率は年齢および身長、体重とは相関を認めなかった。脊柱管前後径比は年齢と負の相関を認めたが、脊髄面積とは相関を認めなかった。結論として脊髄は加齢とともに、形状を保ちつつも、その面積は減少していくことが示唆された。また、脊髄と脊柱管の不均衡、つまり小さな脊柱管と大きな脊髄面積を有する症例が存在し、そのような症例では脊髄圧迫の危険性が高いと考えられた。

審査では、まず脊髄面積と身長との相関は身長の高い男性の方が女性に比べ強い結果となっているが、同年代男性でも身長により相関に差があるのかと質問された。これに対し、今回の調査ではこの点については検討しておらず、同年代で身長の高い群と低い群とで検討する必要があると回答された。次に脊髄面積と年齢や身長との相関の検定法について質問された。これに対し、相関は単相関で検討していると回答された。次になぜ女性の脊髄面積が30代から40代にかけて男性に比べ、大きな変化を認めているのかと質問された。これに対し、症例の偏りが原因となった可能性があると回答された。次に脊柱管前後径比を用いた意義について質問された。これに対して、X線による拡大率を考慮したことや、脊柱管前後径比により脊柱管を評価している過去の報告を参考としていると回答された。また、脊柱管前後径比については年代別に呈示されていないが、コントロールデータとして年代別に呈示すべきであると指摘された。さらに、脊髄と脊柱管との関係はMRI矢状断像を用いて脊髄と脊柱管の前後径を計測し、その比を用いて評価すべきと指摘された。いずれも検討すべき重要な点であり、今後検討を進めていくと回答された。次に、単純X線像では焦点フィルム間距離が1.5mとなっているが、撮像による拡大率はどの程度であったかと質問された。頸椎側面像では被写体フィルム間距離は約20cmであり、この場合の拡大率は約15%であると回答された。

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、圧迫性脊髄症患者の脊髄面積評価の際に、コントロールとなりうる健康者脊髄面積を年代別に提示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
放射線医学 栗林 幸夫 リハビリテーション医学 千野 直一
外科学 河瀬 斌 解剖学 仲嶋 一範
学力確認担当者: 北島 政樹、栗林 幸夫
審査委員長: 栗林 幸夫

試問日: 平成15年6月9日

Survival of Allografted Pancreatic Islets in the Subretinal Space in Rats.

(ラット脾臓ランゲルハンス島細胞の同種網膜下移植)

井 上 真

内容の要旨

【目的】本研究の目的は網膜下腔が脾臓ランゲルハンス島細胞（以下、ラ氏島細胞）移植に対して免疫特権部位であるかを検討することである。

【方法】Sprague Dawley (SD) ラットをドナーおよびレシピエントとして用いた。総胆管からカニューレを挿入し、脾臓にコラゲナーゼを注入した。小腸から分離した後、温水浴槽（38度、40分間）に留置した。消化産物を400 μ mのステンレスメッシュに通し、実体顕微鏡下で遊離した白色のラ氏島細胞を収集した。50 μ lのHamiltonシリンジに約200個のラ氏島細胞を充填させ、ポリアミドチューブを通して強膜フラップから網膜下にラ氏島細胞を注入した。対比実験として同等の細胞を結膜下に移植した。移植術後2日から60日に眼球を摘出し、パラフィンに包埋した後にインスリン、グルカゴン、サイトケラチン、ビメンチン、CD8の免疫染色を用いて検討した。

【結果】嚢胞状の網膜剥離がラ氏島細胞注入直後に認められた。一週間後からは網膜下に白色の混濁した細胞塊が検眼鏡的に随時観察され、炎症所見はなかった。組織学的検討では網膜下移植片にインスリンとグルカゴン染色陽性の内分泌細胞が移植後60日まで確認された。移植後2日後では、移植されたラ氏島細胞は軽度に傷害された網膜色素上皮細胞と神経網膜外層の間に位置していた。移植片を覆う網膜外層と移植片下の網膜色素上皮は移植7日後には境界明瞭ではなく、線維血管組織が内分泌細胞を取り囲み始めていた。線維血管組織の中の管腔細胞と残存した網膜色素上皮はサントケラチン陽性であった。線維芽細胞様細胞と網膜内のグリア細胞がビメンチンで染色された。内分泌細胞を取り囲んだ線維芽細胞様細胞は移植後7日以降のすべての移植片で観察され、経時的に密度が濃くなった。移植片内には血管新生が、移植後30日、60日に観察され、脈絡膜循環からの血液供給を示していた。CD8陽性リンパ球の浸潤は網膜下移植片、網膜、脈絡膜にはほとんど見られず、数個のCD8陽性細胞が脈絡膜内か近傍に時々認められ血液循環の中のものと考えられた。網膜下の移植片は移植後30日の中の6眼中3眼と60日後の4眼中1眼で認められなかった。移植片は線維血管組織に置換され、それぞれ1眼ずつにCD8陽性リンパ球の浸潤を認めた。対比実験として免疫特権部位ではない結膜下に同様の移植片を移植した。結膜下移植片は白色の混濁した細胞塊として結膜下に7日後、14日後はみられたが、21日後には消失した。7日後にはCD8陽性リンパ球が結膜、テノン嚢内に広範にみられた。内分泌細胞は分離し、14日後まではインスリン染色陽性であったが、単核の細胞が多数周囲に浸潤していた。浸潤した単核の細胞はほとんどCD8陽性細胞であった。

【結論】網膜下腔は脾臓ラ氏島細胞移植においてリンパ球浸潤を抑制する免疫特権部位であると示唆された。

論文審査の要旨

糖尿病の治療の1つとして脾臓ランゲルハンス島細胞（以下、ラ氏島細胞）を免疫特権部位に移植する試みが行われてきた。本研究は網膜下腔がラ氏島細胞の移植に対して免疫特権部位であるかを検討したものである。実験にはSprague Dawley (SD) ラットをドナーおよびレシピエントとして用いた。収集したラ氏島細胞を強膜フラップから網膜下に注入し、対比実験として同等の細胞を結膜下に移植した。移植術後2日から60日に眼球を摘出し、パラフィンに包埋した後にインスリン、グルカゴン、サイトケラチン、ビメンチン、CD8の免疫染色を用いて検討した。移植一週間後から網膜下に白色の混濁した細胞塊が検眼鏡的に随時観察された。組織学的には網膜下移植片にインスリンとグルカゴン染色陽性の内分泌細胞が移植後60日まで確認された。内分泌細胞を取り囲んだ線維芽細胞様細胞は移植後7日以降のすべての移植片で観察され、経時的に密度が濃くなった。CD8陽性リンパ球の浸潤は網膜下移植片、網膜、脈絡膜にはほとんど見られず、数個のCD8陽性細胞が脈絡膜内か近傍に時々認められ血液循環の中のものと考えられた。網膜下の移植片は移植後30日の中の6眼中3眼と60日後の4眼中1眼で認められなかった。移植片は線維血管組織に置換され、それぞれ1眼ずつにCD8陽性リンパ球の浸潤を認めた。一方、結膜下の移植片は白色の混濁した細胞塊として結膜下に7日後、14日後はみられたが、21日後には消失した。以上網膜下腔は脾臓ラ氏島細胞移植においてリンパ球浸潤を抑制する免疫特権部位であることが示唆された。

審査に当たり使用したSDラットの妥当性につき問題点が指摘された。また実際に糖尿病モデルを使用した実験が行われたかとの質問があった。これに対しストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットの網膜下腔にラ氏細胞を移植したが血糖の正常化は得られなかったとの回答がなされた。また遺伝的に操作したマウスを使用した方が良かったのではないかと提案がなされた。網膜下に移植された細胞は増殖が見られたかとの質問に、経時的には網膜下移植片の大きさには変化が見られないとの回答があった。また増殖細胞を検出するためにはBrdUを用いる必要があること、移植片を取り囲む線維芽細胞様細胞がビメンチンでグリア細胞由来としているがGFAPを用いるべきとの指摘があった。最後に本研究がどのように臨床应用到生かされるのかとの質問に、最初は網膜周辺部にラ氏島細胞の移植を考えていたが、最近の研究で網膜下腔に最初に移植しても同等に他の場所に免疫寛容を導入できない可能性が出てきたので、体の他の場所で網膜下腔に誘導できた免疫寛容を再現させる方法を考えたいとの回答があった。本研究は網膜下腔がラ氏島細胞移植に対して免疫特権部位であることを検討した論文であり、実験方法、臨床応用について課題は残されるが、今後の研究次第で発展性が期待される論文と評価された。

論文審査担当者 主査 眼科学 小口 芳久
内科学 猿田 享男 病理学 岡田 保典
微生物学 小安 重夫 生理学 岡野 栄之
学力確認担当者：北島 政樹、猿田 享男
審査委員長：猿田 享男

試問日：平成15年6月3日

A Potential Important Role for Thymidylate Synthetase Inhibition on Antitumor Activity of Fluoropyrimidine and Raltitexed.

(Thymidylate Synthetase阻害と抗腫瘍効果の関連
—フッ化ピリミジン化合物とRaltitexed (Tomudex) を用いた検討)

壁 島 康 郎

内容の要旨

胃・大腸癌に対する標準的化学治療は5-fluorouracil (5-FU) を基軸とし、leucovorin (LV) などとの併用療法が代表的なものとして挙げられる。5-FUは開発後40年以上を経過し、広く臨床に応用されているにもかかわらず、その作用機序や至適投与方法に関しては未だ議論が残されている。一方、新規抗癌剤のひとつであるraltitexedは5-FUの標的酵素のひとつであるthymidylate synthetase (TS) を直接阻害する薬剤であり、大腸癌をはじめとする悪性腫瘍に対して5-FUに代わりうる選択肢の一つとして注目されている。本剤は葉酸を基本骨格とする薬剤で特異的なTS阻害作用を有するため、TS阻害以外の作用機序を有する5-FUとの併用療法やTS標的薬剤の作用機序解明においても有益な薬剤と考えられる。本研究では5-FU、raltitexed、UFTを用いて、ヌードマウス可移植性ヒト腫瘍株を対象とし、投与方法・投与順序別におけるTS阻害率、RNA中の5-FU濃度 (F-RNA) と腫瘍増殖抑制率との関係について検討を施行し、これらの薬剤の至適治療方法を明らかにすることを目的とした。

BALB/cAヌードマウスを用いて、ヌードマウス可移植性ヒト胃癌株 (SC-1-NU) および大腸癌株 (HT-29) を移植し、腫瘍が一定の体積に到達した時点でマウスを群分けした。各薬剤を5日間連日投与の後、2日間休薬を1コースとし、同一薬剤または異なる薬剤の組み合わせによる2コースの治療を行った。各薬剤の投与量は教室の過去の研究による最大耐容量とし、UFTは強制経口投与、他の薬剤は腹腔内投与とした。併用投与群の各薬剤の投与量は同一薬剤投与の1/2とした。抗腫瘍効果は、腫瘍増殖曲線、実験期間中の最小T/C比 (%)、実験終了時の実測腫瘍重量により判定した。実験終了後に腫瘍を摘出し、TS阻害率およびF-RNA量を測定した。SC-1-NUはHT-29よりも各種治療法に高感受性であった。両株に対して、もっとも高い抗腫瘍効果を示したのは5-FUとraltitexedの同時併用であり、両薬剤の異時投与がこれに次いたが、投与順による効果の差は認められなかった。治療による副作用は軽微であり、実験期間中の毒性死亡は認められなかった。TS阻害率と実験終了時の腫瘍重量の間には推計学的に有意な相関関係を示され ($P=0.002$, $r=-0.604$)、TS阻害の高い腫瘍において強い抗腫瘍効果が認められたが、副作用発現に関与するF-RNAレベルと腫瘍重量の間には推計学的に有意な関係は示されなかった。フッ化ピリミジン関連薬剤の治療効果増強にはTS阻害を効果的に増加させることが必要であり、5-FUとraltitexedとの併用は、臨床的に胃癌、大腸癌に対して副作用を分散させて、抗腫瘍効果を向上させる可能性が示された。

論文審査の要旨

5-fluorouracil (5-FU) におけるbiochemical modulationは、今日の化学療法におけるひとつの重要な選択肢であるがその機序は不明な点が多い。新規抗癌剤のraltitexedは5,10-methylene tetrahydrofolateと競合し、特異的にthymidylate synthetase (TS) を阻害する。本研究ではヌードマウス可移植性ヒト癌株を対象とした実験的治療法を行い、raltitexedの特異的なTS阻害剤としての特徴を利用して5-FU、raltitexedおよびUFTの併用療法に関し、その作用機序を明らかにするためTS阻害率とRNA中の5-FU濃度 (F-RNA) の測定を行った。その結果、TS阻害率が抗腫瘍効果と推計学的に有意に相関し、TS阻害率が高い程、強い抗腫瘍効果が得られた。一方、F-RNAレベルの高値は腫瘍増殖抑制率で示される抗腫瘍効果には帰結しなかった。以上のことから、フッ化ピリミジン関連薬剤とTS阻害剤のbiochemical modulationにおいてはTS阻害を高めることにより、これと相関した高い抗腫瘍効果をもたらす結果が示された。

審査では、まずTS阻害におけるraltitexedの作用機序に関する質問があり、本剤の臨床における抗癌剤としての位置づけに関する説明を求められた。本剤は還元型葉酸担体により速やかに細胞内に取り込まれた後、ポリグルタミン酸塩に代謝され、選択性が高い強力なTS阻害活性 (約100倍) を示すと回答された。また臨床における投与方法は3週間毎に1回の静脈投与であり、単剤治療における奏効率は大腸癌における代表的な5-FU+leucovorin療法と同等で、安全性が高いことなどにより、今後の検討により臨床で用いられる可能性のある薬剤であるとの回答がされた。さらに実験2、3における5-FUとUFTによる治療群の意義についての質問がされ、臨床においてその有用性の報告が散見される、5-FUとUFTによるpharmacokinetic modulating chemotherapy (PMC) の実験モデルであるとの回答がされた。実験に用いたSC-1-NU、HT-29の本試験における選択の意図、各種癌におけるTS total量に関する質問に対しては、両株ともに5-FUに対する高感受性株であり5-FU作用機序の検討に適した材料であること、TS total量に関しては両腫瘍でその値は同等で、TSIRに関わる背景因子としての差はなかったと説明がなされた。副作用の検討に関してはリンパ球の評価もするべきであったとの助言があった。

以上、本研究はTS阻害率とF-RNA値と抗腫瘍効果との関連を解析し、フッ化ピリミジン関連薬剤の抗腫瘍効果の作用機序を明らかにした点で、臨床に即した有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹
内科学 石井 裕正 病理学 坂元 亨字
薬剤学 谷川原 祐介 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6月10日

Prior burn insult induces lethal acute lung injury in endotoxemic mice : effects of cytokine inhibition.

(熱傷前負荷はマウスへのエンドトキシン投与後に致死的急性肺傷害を誘発する：サイトカイン抑制の効果)

佐々木 淳一

内容の要旨

重症熱傷受傷後早期の生存率は、輸液療法や創傷被覆材の進歩などにより大きく改善されてきたが、後期の生存率には依然改善が認められていない。熱傷侵襲を含む外科的侵襲下にある患者の多くは、その臨床経過中にsepsis、さらに臓器不全を高率に発症し、かつ重症化することが経験される。その病態は、最初に生体へ熱傷などの侵襲が加わり、続いて感染などの二次的侵襲が加わると、生体反応が増幅されると考えられる。この仮説はtwo-hit phenomenonと呼ばれているが、その機序に関してはほとんど説明されていない。

本研究では、two-hit phenomenonに基づき、マウスに前負荷 (first hit) として熱傷侵襲を与えた後、後負荷 (second hit) として致死量未満のエンドトキシンを投与するモデル (マウス熱傷後sepsisモデル) を作製し、熱傷侵襲 (first hit) の有無によるエンドトキシン (second hit) に対する反応性の差異を、生体反応と血液・肺局所サイトカイン動態により検討した。さらに、同モデルにおいてサイトカイン産生抑制の病態への影響を検討し、two-hit phenomenon成立におけるサイトカインの関与を明らかにすることを目的とした。

最初に、BALB/cマウスを熱傷前負荷群 (麻酔下に15%Ⅲ度熱傷を加える) と無処置群 (麻酔のみ) の2群に分け、受傷後11日目に両群ともlipopolysaccharide (LPS) 10mg/kgを静注しエンドトキシン血症を生じさせた。LPS投与後経時的に定量した血液・肺組織中のtumor necrosis factor (TNF) - α 、macrophage inflammatory protein (MIP) -2値は、無処置群ではLPS投与後2時間にTNF- α 、MIP-2とも単峰性上昇を示したのに対し、熱傷前負荷群ではLPS投与後2、12時間の二峰性上昇が観察され、LPS投与後72時間の生存率低下が認められた。

次に、上記2群にサイトカイン産生抑制剤であるprednisolone 3 mg/kg/dayまたはJTE-607 100mg/kg/day (分子量約600, N-benzoyl-L-phenylalanine誘導体) をLPS投与前の熱傷後10日間連日皮下投与した群を加え、LPS投与後72時間の生存率および12時間後の肺組織像、血液・肺組織中TNF- α 、MIP-2値、肺組織中MIP-2 mRNA発現、myeloperoxidase (MPO) 値を検討した。無処置群と比べサイトカイン産生抑制剤投与群では、生存率が有意に改善し、肺組織像が正常像に近似し、血液・肺組織中TNF- α 、MIP-2値、肺組織MIP-2 mRNA発現、MPO値が有意に低下した。

以上の結果より、マウス熱傷後sepsisモデルにおいて、熱傷侵襲 (first hit) により生体がprimingされ、続くエンドトキシン血症 (second hit) により炎症性サイトカインが過剰産生され、これが臓器不全、特に急性肺傷害の発症に関与している可能性が示された。さらにこの病態がサイトカイン産生抑制剤により改善されたことから、重症熱傷治療への抗サイトカイン療法の可能性が示唆された。

論文審査の要旨

侵襲後の生体反応にみられるtwo-hit phenomenonの機序におけるサイトカインの関与を検討した。BALB/cマウスに前負荷として熱傷 (first hit) を与え、受傷後11日目にLPS (second hit) を投与した結果、LPS投与後の血液・肺組織中TNF- α 、MIP-2値は、前負荷なしではLPS投与後2時間の単峰性上昇を示したが、前負荷群では投与後2、12時間の二峰性上昇が観察された。次に、同モデルにサイトカイン産生抑制剤 (prednisolone、JTE-607) をLPS投与前の熱傷後10日間連続投与した結果、LPS投与後72時間の生存率改善、12時間後の肺組織像異常所見軽減ならびに血液・肺組織中TNF- α 、MIP-2値、肺組織中MIP-2 mRNA発現、MPO値の低下が認められた。以上より、同モデルにおいて熱傷侵襲により生体がprimingされ、続くLPS投与により炎症性サイトカインが過剰産生され、これが急性肺傷害の発症に関与している可能性が示された。

審査ではまず、実験モデルにおいてsecond hitを11日目にした理由と11日目の白血球動態などについて質問があった。熱傷患者では受傷後10日目頃からsepsisで重症になることが多くモデルではこれを考慮したこと、11日目のLPS投与前では白血球増多があるが血中サイトカインは測定限界以下であったと回答された。ついで、熱傷単独では肺にどのような変化があるかとの質問があり、実験に用いた15%Ⅲ度熱傷では明らかな変化はなかったが、30%Ⅲ度熱傷では致死的で、肺の異常や胃粘膜病変が観察されたと回答された。

さらに前負荷群におけるTNF- α とMIP-2の二峰性上昇に関して、LPS投与後12時間目のsecond peakの機序に関する質問があった。Second peakにおいてMIP-2がどこで作られたかについては、肺に白血球集積があり肺組織MIP-2の上昇があることから主に肺で作られていると考えられる。これに対して、肝臓などの細網内皮系におけるサイトカイン産生の可能性などについても検討が必要との指摘があり、現在、同一モデルを用いprimingの機序におけるIL-18の関与について検討を続けているが、前負荷群で肝臓でのIL-18低下が観察されていると回答された。抗サイトカイン療法の可能性については、現在JTE-607の第Ⅱ相臨床治験の結果解析中である。Two-hit phenomenonの病態に関してはShwartzman現象などを含めて広く検討していくことが課題であるとの指摘があった。

以上のように、本研究では機序の詳細についてさらなる検討が求められるものの、two-hit phenomenonの機序におけるサイトカインの関与が示された点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 救急医学 相川 直樹

外科学 小林 紘一 臨床麻酔学 武田 純三

外科学 北島 政樹 医化学 末松 誠

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6月18日

Potassium Channel Blocker Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases Through Pyk2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Rat Cardiomyocytes.

(カリウムチャネル遮断薬はラット心筋細胞においてPyk2、EGF受容体を介してERKを活性化する)

田原 聡子

内容の要旨

近年K⁺チャネル遮断薬 (K⁺ channel blocker, 以下KB) はリエントリーを機序とする不整脈に頻用されている。KBは外向きK⁺電流を抑制し再分極を遅延させることで活動電位を延長し、二次的にL型Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入と筋小胞体からのCa²⁺誘発性Ca²⁺放出を増加させる。細胞内Ca²⁺の増加はさまざまな細胞内シグナルを活性化することが知られている。したがって細胞内Ca²⁺増加作用をもつKBが心筋細胞においてシグナルを活性化する可能性が示唆されるが、これに関する検討はこれまで一切行われていない。

MAPK familyのセリン・スレオニンリン酸化酵素ERKは、さまざまな細胞の増殖・肥大・分化において重要な役割を果たしており、細胞内Ca²⁺の増加によって活性化される。本研究では、KBにより心筋細胞内シグナルとしてERKが活性化されるか否か、および活性化された場合、その経路を明らかにすることを目的とした。

新生児ラット心筋細胞を初代培養し、異なる4種類のKB、4-aminopyridine (以下4-AP)、E-4031、TEA、quinidineを投与した。ERKの活性化をWestern blot法、活動電位をガラス微小電極法、細胞内Ca²⁺をFluo-4による蛍光色素法により検討した。4種類のKBはいずれもERKを活性化した。一過性外向きK⁺電流I_{to}及び遅延整流外向きK⁺電流の最も早い成分I_{to}の遮断薬4-APは心筋細胞の活動電位持続時間を延長し、細胞内Ca²⁺を増加させた。4-APによるERKの活性化は細胞内外のCa²⁺キレート剤およびL型Ca²⁺チャネル遮断薬により抑制された。さらに、細胞内Ca²⁺の上昇からERK活性化に至る経路について検討し、Prolin-rich tyrosine kinase (以下Pyk2) の阻害剤であるcytochalasin D、および受容体型チロシンキナーゼ上皮成長因子受容体 (以下EGFR) の阻害剤であるAG1478によりERKの活性化が抑制され、Pyk2およびEGFRの関与が示唆された。これらは4-APによりリン酸化され、またEGFRについては、dominant negative formを心筋細胞に発現させることによりERKの活性化が抑制された。

以上より、KBは心筋細胞において活動電位持続時間を延長することにより細胞内Ca²⁺を増加させ、これに引き続いてERKを活性化させること、またその途中の経路としてPyk2、EGFRといったリン酸化酵素の活性化を介していることが明らかとなった。

これまでKBはその電気生理学的作用にのみ着目されてきた。しかしながら本研究は、KBが細胞内シグナルの活性化という作用を介し心筋細胞にさまざまな作用を持つ可能性を示唆した。

論文審査の要旨

リエントリー性不整脈の治療に使用されるK⁺チャネル遮断薬 (以下KB) は外向きK⁺電流を抑制して再分極を遅延させ、活動電位を延長することで抗不整脈作用を示す。この変化に二次的に、L型Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入と筋小胞体からのCa²⁺誘発性Ca²⁺放出を増加させる。一方、細胞内Ca²⁺の増加はさまざまな細胞内シグナルを活性化することが知られ、細胞内Ca²⁺増加作用をもつKBが、心筋細胞において細胞内シグナルを活性化する可能性が予測される。

本研究は、KBにより、心筋細胞内シグナルとして特に心肥大において重要な役割を果たしているMAPK familyのリン酸化酵素ERKが活性化されるか、またその活性化に至る経路を明らかにする目的で行われた。その結果、KBである4-aminopyridine (以下4-AP) は新生児ラット初代培養心筋細胞において活動電位持続時間を延長することにより細胞内Ca²⁺を増加させ、これに引き続きERKを活性化させること、またその途中の経路としてPyk2、EGFRといったリン酸化酵素の活性化を介していることが明らかとなった。

論文審査では主に4-APによるERK活性化におけるEGFRのtransactivationの機序、及びEGFR活性化とPyk2リン酸化との位置づけが論点となった。本研究で使用した優性抑制型EGFR (EGFR533del) はkinase domainを含むC末端側の完全欠損型であることから、4-APによるERK活性化におけるEGFRのtransactivationにはリン酸化が関与している点について考察する必要性が指摘された。また、EGFRの特異的阻害剤であるAG1478はATPの競合的阻害剤であり、阻害されるEGFR内のリン酸化部位の選択性は無いため、EGFRのリン酸化以降のERK活性化に至る経路についてはShc-Grb2-Rasを介する経路のみでなくPLC-γを介する経路の関与の可能性も考えられ、ERK活性化に至るシグナル経路について明確にする必要性も指摘された。一方、Pyk2によるEGFRのリン酸化の可能性については、Pyk2阻害剤投与下あるいは優性抑制型Pyk2の発現下における、EGFRのリン酸化・ERK活性化の観察が必須であり、Pyk2以外のリン酸化酵素 (Srcあるいは未知のリン酸化酵素など) のEGFRのリン酸化への寄与についても検討する余地があると考えられた。その他、蛍光色素を用いた細胞内Ca²⁺濃度の測定におけるCa²⁺定量性の問題、実際の生体における心肥大誘導にどの程度KBが寄与するかなどの問題も提起された。

しかしながら、本研究はこれまでその電気生理学的作用にのみ着目されてきたKBが、細胞内シグナルの活性化を介し心筋細胞にさまざまな作用を持つ可能性を初めて示唆したという点で、有意義であり、今後発展の余地があると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 小川 聡
外科学 四津 良平 医化学 末松 誠
生理学 岡野 栄之 臨床麻酔学 武田 純三
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6月23日

コレステロールエステル転送蛋白遺伝子多型と日本人2型糖尿病患者における大血管合併症有病率との関連

目 黒 周

内容の要旨

コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) はコレステロール逆転送系で重要な役割を果たしており、動脈硬化疾患の感受性遺伝子と考えられている。我々はこの遺伝子多型が血清CETP、コレステロール値、動脈硬化性疾患全体に及ぼす影響を日本人2型糖尿病患者にて明らかにするため横断的研究を行った。

[方法] 対象は慶応義塾大学病院に通院する2型糖尿病患者182名である。24人が大血管障害を有した。CETP遺伝子のイントロン1の遺伝子型はdirect polymerase chain reaction amplification法にて行った。TaqI制限酵素部位のあるアリルをB1、TaqI制限酵素部位のないアリルをB2とした。

[結果] 遺伝子型頻度はB1/B1 39.6%、B1/B2 44.5%、B2/B2 15.3%であった。アリル頻度はハーディー・ワインバーグの法則に合致した ($p < 0.05$)。対象をCETPTaqI B遺伝子型にて群分けし、臨床的指標や代謝指標との関連を検討したが群間で統計学的有意差が認められる指標はなかった。B1アリルを有するものでは有意に血清CETP濃度が高値であった。B1/B1群でB2/B2群に比べ有意に血清CETP濃度が高値であった ($p < 0.05$)。血清LDLコレステロール濃度は血清CETP濃度と有意な正の相関を認めた。血清HDLコレステロール濃度との逆相関は本研究では有意ではなかった。大血管障害の有病率はB1/B1 20.8%、B1/B2 8.6%、B2/B2 6.9%であった。B1/B1群は他の群に比べ有意に大血管障害の有病率が高かった ($p = 0.0136$)。ロジスティック回帰分析でもB1/B1遺伝子型は有意に大血管障害の有病率と相関した (オッズ比5.38、 $p = 0.009$)。血清HDLコレステロール濃度やHMGCoA還元酵素阻害薬の内服を独立変数に採用した場合も同様であった。

[考察] 本研究の結果はこの遺伝子多型が動脈硬化疾患の病因に関与している可能性を示唆している。本研究では血清CETP濃度とLDLコレステロール濃度に有意な相関を認めた。多くの研究は高血清CETPが低HDLコレステロールと関連していると報告しているが、どのような要因によってこのような差が生じるのかは明らかでない。CETP遺伝子多型間の血清CETP濃度差が、大血管合併症の発症に影響する可能性が示唆される。

[結論] 本研究は日本人2型糖尿病の大血管合併症に対しCETPTaqI B遺伝子多型が遺伝的危険因子であることを示唆した。

論文審査の要旨

2型糖尿病患者では、動脈硬化が促進されやすく、冠動脈疾患、脳梗塞あるいは閉塞性動脈硬化症といった大血管合併症を生じやすいことが明らかにされている。このような糖尿病と大血管合併症との関連で注目されている遺伝子の1つに、コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 遺伝子がある。この遺伝子はコレステロール逆転送系で重要な役割を果たしており、動脈硬化疾患の感受性遺伝子と考えられている。本研究では、この遺伝子多型が、血清CETP、コレステロール値および動脈硬化性疾患に及ぼす影響を、日本人の2型糖尿病患者において検討した。

研究対象は182名の2型糖尿病患者であり、このうち24名が臨床症状および諸検査から大血管障害を有すると考えられた。この182名と、年齢・性をマッチさせた健常者としてコレステロールや血糖の測定とともにCETP遺伝子のイントロン1の遺伝子型をPCR法で検討した。TaqI制限酵素で切断される部位のあるアリルをB1、TaqI制限酵素で切断される部位のないアリルをB2とした。その結果182名の遺伝子型頻度は、B1/B1 39.6%、B1/B2 44.5%、B2/B2 15.3%であった。この各群間で、臨床的指標や代謝指標に有意差がみられなかったが、B1アリルを有するものでは血清CETP濃度が有意に高値であった。また血清CETP濃度は血清LDLコレステロール濃度と有意な正相関を示した。大血管障害の有病率はB1/B1 20.8%、B1/B2 8.6%、B2/B2 6.9%、B1/B1遺伝子型が大血管合併症の遺伝的危険因子であることを示唆すると結論とした。

このような論文においてまず問題とされたのが、本研究で対象とされた2型糖尿病患者における大血管合併症の診断である。臨床所見と、負荷心電図、冠動脈造影あるいは脳のMRI等を参考として診断したとされたが、全員に冠動脈造影や脳のMRI等を施行しているわけではなく、診断基準がはっきりしていないことが問題であると指摘された。動脈硬化性変化に注目するならば、頸動脈エコーを全員に行うか、冠動脈の変化についてCTで精密に検査するなど対象の診断に工夫が必要であったと助言された。次に本研究者がなぜCETP遺伝子のイントロン1の遺伝子型だけに注目して研究したかが問題となった。2型糖尿病患者における大血管合併症の発症頻度に関係する遺伝子は多数あり、それらの遺伝子を十分考慮しながらどの遺伝子を検討するかを決めるべきであったとされた。本研究者は、すでにオランダ人でCETP遺伝子型と心筋梗塞の発症との間に密接な関係があることが報告されたことから、日本人でそのような関係をみるためCETP遺伝子のイントロン1の遺伝子型に注目したとされたが、研究を開始する前に十分に検討すべきであったと付言された。

研究計画のたて方や対象の選択法等、問題点が多々ある論文であったが、日本人の2型糖尿病患者における大血管合併症の発症にCETPTaqI B遺伝子が密接に関係することを明らかにした点で、この領域で価値ある論文と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 猿田 享男
外科学 四津 良平 内科学 池田 康夫
内科学 小川 聡 分子生物学 清水 信義
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6月17日

おかげさまでハルナール発売10周年。
これからも皆さまのご期待にお応えしてまいります。

10th
Anniversary
Harnal

前立腺肥大症に伴う

その排尿障害に、ハルナール。

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

〔禁忌(次の患者には投与しないこと)〕(抜粋) (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

〔効能・効果〕前立腺肥大症に伴う排尿障害

〔用法・用量〕通常、成人には坦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 (2)重篤な肝機能障害のある患者 (3)高齢者
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、貧血(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。

■その他の使用上の注意等については、製品添付文書をご参照ください。

前立腺肥大症の排尿障害改善剤(α_1 受容体遮断剤)



指定医薬品、要指示医薬品(注意-医師等の処方せん・指示により使用すること)

ハルナール[®] 0.1mg
0.2mg カプセル

塩酸タムスロシン製剤

薬価収載

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