

第80卷第4号  
平成15年  
12月

# 慶應醫學

Journal of The Keio Medical Society

## 綜 説

- 漢方医学における EBM (Evidence-based medicine) の現状 ..... 秋葉 哲生 ..... (125)
- 記憶はどのようにして形成されるか?—最近の話題 ..... 柚崎 通介 ..... (131)

## 原 著

- 正常組織由来色素細胞と母斑組織由来色素細胞の E-cadherin における細胞遊走能の差異 ..... 松田 就人 ..... (141)

## 話 題

- 重症肝損傷の治療の変遷—Damage control surgery— ..... 北野 光秀 ..... (151)
- アトピー性皮膚炎の漢方治療 ..... 荒浪 暁彦 ..... (152)
- 動物実験に関連する法規の見直しと研究者の責任 ..... 前島 一淑 ..... (152)
- 江戸の解剖学 ..... 秋葉 哲生 ..... (154)
- 機能的頸部郭清術 ..... 川浦 光弘 ..... (155)
- 頭頸部癌治療において neoadjuvant 化学療法とは何であったか ..... 田路 正夫 ..... (156)
- 世界の人々の健康 ..... 近藤 健文 ..... (157)
- 開業医の立場, 病院勤務医の立場 ..... 櫻岡 浩一 ..... (158)
- 皮膚科とデジタルカメラ ..... 小川 純己 ..... (159)

## 学 会 展 望

- 第8回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会抄録集 ..... (161)

## 第80巻総目次

- Key Word 索引 ..... (171)
- 著者名索引 ..... (173)

## 学 位 論 文

- 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 ..... (T279)
- ラット小腸粘膜上皮細胞における GRO/CINC-1 と Interleukin-6 の産生: 脂肪酸による修飾 ..... 吉田 英雄 ..... (T287)
- 粘膜固有層リンパ球の小腸微小血管における接着の生体観察 ..... 藤森 齊 ..... (T297)
- 培養アストロサイトにおける c-Met の産生と分泌性因子によるその調節 ..... 島崎 賢仁 ..... (T311)
- 高血圧自然発症ラットにおける腎交感神経活動と血圧および腎血流量の関係に関する研究 ..... 佐方 克史 ..... (T323)
- アデノウイルスベクターを用いた疑核への GDNF 遺伝子導入による運動ニューロン脱落防止効果の検討 ..... 齋藤康一郎 ..... (T337)

## 号 外

- 博士(医学)学位論文—内容および審査要旨— (第170号) ..... (別頁)

綜 説

## 漢方医学における EBM (Evidence-based medicine) の現状

あきば病院

秋 葉 哲 生

Key Word：漢方医学，漢方治療，医療用漢方製剤，EBM，保険診療

### 緒 言

2002年9月，日本東洋医学会は約一年間の作業の結果，「漢方治療における EBM」というタイトルをもつ 80 ページの報告書をまとめて公表した<sup>1)</sup>。報告書をまとめた背景とその内容の一部をご紹介します，わが国の漢方医学の現状につき学内関係者の理解を深めていただければ幸いです。

本稿は次の三つのテーマに絞って論じたい。第一は，報告書の背景をなす最近 40 年間の漢方医学の歴史，第二はわが国で漢方治療に関する EBM が注目されるようになった理由，第三は報告書の具体的な内容についてである。

### 過去 40 年の漢方治療の歴史

1961 年，日本政府は全国民が利用可能な新しい医療保険制度を創設した。これは国民皆保険制度としていまでも日本が世界に誇りうる新しい福祉政策であった。この制度では，すでに 20 品目の漢方生薬を漢方調剤のために保険で処方することが認められていた。したがって，日本の保険医療制度には当初から西洋医学と漢方医学とが矛盾なく並立することが想定されていた，ということができる。

1967 年には，6 種類の漢方エキス製剤がはじめて薬価基準に収載された。この製剤は基本的に今日広く普及している医療用漢方製剤と同質の製剤であり，いうまでもなく，薬価基準とは厚生大臣が保険診療で用いることを許可した製剤が掲載されているリストである。

1976 年になると，42 種類の漢方エキス製剤が新たに薬価基準に収載されて，一般の医師が漢方エキス製剤を容易に用いることができるようになり，漢方治療がひろ

く普及する重要な契機となった。

### 医療経済の拡大と副作用の問題

薬価基準に収載される医療用漢方製剤の種類は次第に増加したが，健康保険の給付をうける漢方診療がかならずしも順調に発展したわけではなかった。

1983 年，当時の厚生省の吉村厚生次官は，拡大する医療費への対策を提言した。それは，健胃消化剤，総合感冒剤，鎮痛消炎を目的とする外用貼付剤，および漢方製剤に対する保険給付をしないように保険制度を改定するという内容のものであった。この提案は実施に移されることはなかったが，医療経済の視点からの漢方製剤に対する批判として関係者に大きな反響を呼び起こした。

1996 年 3 月，厚生省は小柴胡湯に重大な副作用が判明したとして，突然の記者会見をひらき発表した。

その内容は，インターフェロンと併用しないにもかかわらず，慢性肝炎の患者に小柴胡湯を投与して，1994 年 1 月以来，間質性肺炎を発症したものが 88 例あったとするものであった。発表によると 88 例中 10 例が死亡したとされ，漢方薬が安全な薬剤であると考えていた大多数の国民に強い衝撃を与えた。この出来事は，治療薬剤の安全性という視点からの漢方製剤への批判であったととらえることができる。これまでの研究によれば，小柴胡湯による間質性肺炎の発生頻度は，約 25000 例に 1 例と推定されている。

以上の二つの出来事は，漢方治療の evidence-based medicine が確立されていないと考える人々を勢い付ける結果となり，一方では，日本東洋医学会など当該領域に関連する学術団体に大きな課題を投げかけることとなった。

## 日本東洋医学会にEBM委員会の設置

2001年6月、日本東洋医学会(石橋晃会長)はEBM委員会を設置した。委員は14名で、委員長は秋葉哲生理事が担当した。のちに、臨床研究論文を評価する役割を担う会員から募集した57名の評価委員が選任された。

委員会の設置にあたって石橋晃会長より、二年以内に委員会としての結論を出すことが求められた。このような条件から、これまで学術誌に発表された臨床論文で、医学的に高く評価されるものを分野別に収集して抄録化し報告書を作成すること、完成した報告書は会員のみならずマスコミに対しても積極的に公開する方針などが決められた。

## 臨床研究論文の収集

評価対象とした研究は、1986年から2001年に医学雑誌に発表された論文である。1986年は、わが国で漢方エキス製剤の製造に新しい基準が適用された年であった。

対象として採用する論文は次の四つの条件に適合するものとした。第一に、西洋医学的な診断病名に基づいて

適用されていること、第二に、投与終了まで連続して同一の漢方エキス製剤が投与されていること、第三に、10症例以上を扱う臨床論文であること、第四に、科学的、倫理的に致命的な問題が指摘されないことなどである。

以上の観点から、論文収集に当たっては日本漢方生薬製剤協会のデータベースを主に用いることとした。

その結果、最終的に833報の臨床論文が収集された(第1表)。分野別には、内科がもっとも多く、ついで産婦人科であった。この中には12報の二重盲検比較試験も含まれていた。

## 論文評価方法

833報の論文は57名の評価委員に分割して送られて評価を受けた。評価基準は、米国医療政策研究局(Agency for Health Care Policy and Research: AHCPR)など、西洋医学で広く用いられている基準を準用した。

評価結果には推奨の強さが含まれるが、このたびの評価ではlevel A, Bを分類1(臨床上有用である)、level C, Dを分類2(さらに研究を進めることが望ましい)とした。このような分類とした理由は、個々の医療用漢方製剤が有用であるか有用でないかを判断することは今回の事業目的に含まれないためであった。

評価欄の記載要領は別表の通りである(第2表)。

第1表 評価対象とした全論文

領域	全論文			
	論文数	試験の種類		
		二重盲検	比較試験	症例収集
消化器内科	104	6	91	7
呼吸器内科	34	1	26	7
循環器内科	32	1	27	4
腎臓内科	28	0	22	6
内分泌内科	25	0	20	5
老人科	3	0	2	1
精神神経科	29	0	25	4
産婦人科	133	0	85	48
耳鼻咽喉科	93	1	65	27
皮膚科	46	0	41	5
整形外科	21	0	18	3
泌尿器科	64	0	46	18
小児科	46	0	35	11
脳神経外科	31	2	14	15
口腔外科	25	0	15	10
眼科	11	0	8	3
放射線科	6	0	5	1
肛門科	6	0	4	2
麻酔科(ペインクリニック)	37	1	29	7
計	833	12	621	200

第2表 評価欄の記載要領

分類1	臨床のよい指標になる (推奨のレベルA, Bを包括*)
分類2	さらに研究を深めることが望まれる (推奨のレベルC, Dを包括*)
分類3	1, 2のいずれでもない。 (分類1, 分類2以外の問題点を含むような場合)

\*ここでいう、レベルA, B, C, Dは以下の内容である。

- A: 行うことを強く推奨
- B: 行うことを推奨
- C: 推奨する根拠がはっきりしない
- D: 行わないよう勧められる

## 報告書の作成

報告書は二つの部分からなっている。前編は臨床エビデンス集で、報告書の大部分を占めている。今回の報告書で目新しいところは、臨床各科の項目に加えて、漢方治療の経済性をしめす研究の項目を新設したことであった。

後編は、漢方医学の臨床研究について疫学的な視点から新しい考え方を提案した。主任執筆者は聖マリアンナ医科大学公衆衛生学教室の吉田勝美教授である。漢方医学には西洋医学と異なる臨床研究の方法論が必要である、という吉田氏の主張に賛同する漢方研究医師は少なくない。

### 漢方治療における EBM

報告書からいくつかの臨床研究を紹介する。ここでは、西洋薬が不得意な分野で漢方薬が効果を発揮すると考えられるものを取り上げる。なかには小規模な研究も含まれるが漢方薬の可能性を示すものにとらえて掲載した。さらに精度の高い本格的な臨床研究に発展させることが期待される。

#### 1. 消化不良症

いわゆる慢性胃炎の治療薬としては、多くの漢方薬が存在する。最近の消化器病学でのトピックスは、消化管運動の詳細がかなり明らかになったことである。

漢方薬の多くのものに、上部および下部消化管運動の合目的な調整作用のあることが明らかとなった。大建中湯や六君子湯はその好例である。

六君子湯の研究によれば、エックス線検査で内臓下垂傾向があったり、気力、体力が低下した症例に有効性が高い傾向が示された<sup>2)</sup>。これは伝統的な六君子湯の適用状態（六君子湯証）にほぼ一致する。試験デザインも信頼にたる研究である（第3表）。

第3表 六君子湯

文献2)	原澤茂, ほか 1998
対象	運動不全型の上腹部愁訴 296 例
試験デザイン 方法 期間 その他	二重盲検無作為化比較試験 2 週間連続投与。対照群には低用量の六君子湯 (0.033 g) を含有する顆粒 7.5 g を投与した
結果	上腹部愁訴, および全般改善度で有意差をみとめた。TJ-43 六君子湯の安全性には問題をもとめなかった。
評価	分類 1

#### 2. 過敏性腸症候群

過敏性腸症候群は、わが国でも増加しつつある疾患である。本症は心身症でもあり、治療が困難な場合も少な

第4表 桂枝加芍薬湯

文献3)	佐々木大輔, ほか 1998
対象	過敏性腸症候群 148 例
試験デザイン 方法 期間 その他	二重盲検無作為化比較試験 一日3回8週間投与。対照薬は、桂枝加芍薬湯エキス粉末 0.16 g を含有する細粒剤。8週間の検査成績および自覚症状で4または5段階評価。
結果	腹痛, 下痢に対し, 桂枝加芍薬湯投与群は対照群に対し, 有意に改善。
評価	分類 1

くない。

76 施設の共同ランダム化比較試験<sup>3)</sup>で、286 例の過敏性腸症候群が対象である。桂枝加芍薬湯は、過敏性腸症候群の腹痛, 下痢に対してとくに有効性が高かった（第4表）。

#### 3. 癒着性腸閉塞

漢方薬がもっとも用いられる疾患のひとつに、手術後の腸管癒着による腸閉塞がある。なかでもしばしば適用

第5表 大建中湯

文献4)	大藪久則, ほか 1995
対象	絞扼性イレウスが否定された癒着性イレウスで、症状が激烈でないもの
試験デザイン 方法 期間 その他	封筒法による無作為化比較試験 癒着性イレウス診断後胃管を挿入し、大建中湯 (5 g ずつ一日三回) 投与群、微温湯投与群を比較。改善傾向は継続するが、悪化傾向はロングチューブを挿入し、PGF2α などの投与を行った。 評価項目：開始 24 時間後、またはイレウス状態にある期間中のイレウスの解除の有無を評価。24 時間未解除の場合はロングチューブ挿入後の病状の推移、または手術に移行したかどうか、などで評価した。
結果	1) 有意差はないが、大建中湯群は微温湯群に比しロングチューブ移行率が低く、またその後の手術移行率も低い傾向が見られた。 2) 保存的治療での軽快率は、有意差はないが大建中湯群で良好であった (p < 0.0595)。
評価	分類 1

される漢方薬が大建中湯である。1980年の中ごろから同薬は用いられ始めたが、20世紀も終りのころになって、新しい消化管運動薬として外国で高い評価を得てからさらに広く用いられるようになった。今日では術後の消化管運動を促進する目的でも適用される。ちなみに大建中湯の出典は1800年前の古典的な医書である。

紹介する報告は、絞扼性でなく、症状が緩和な癒着性イレウスに対して、ランダム化して大建中湯投与群と比投与群に割り付け、3日間観察した結果を分析したものである<sup>4)</sup> (第5表)。

4. 骨粗鬆症

骨粗鬆症は、高齢社会である21世紀の日本で重要な疾患となっている。比較的新しい分野であるが、漢方薬にはいくつかの有望な薬物が存在している。桂枝加朮附湯について興味深い臨床報告がある<sup>5)</sup>。

51例の骨粗鬆症男女を三群にわけて、それぞれ桂枝加朮附湯、骨量減少改善薬のイプリフラボン、非ステロイド性消炎鎮痛薬オキサプロジンを投与し、9ヶ月間骨量測定とペインスコアによる疼痛の推移を観察した。その結果、桂枝加朮附湯群はイプリフラボンと同等に骨量が維持され、オキサプロジンと同等の鎮痛効果を示した(第6表)。

第6表 桂枝加朮附湯

文献5)	大竹哲也 1996
対 象	骨粗鬆症 51例 (厚生省シルバサイエンス研究班の診断基準に基づく)
試験デザイン 方法 期間 その他	非ランダム化比較試験 桂枝加朮附湯 (K) 群, Ipriflavone (I) 群, Oxaprozine (O) 群の群間比較. 8週間投与
結 果	骨粗鬆症患者の疼痛に関しては、桂枝加朮附湯, Oxaprozine の鎮痛効果は Ipriflavone より優れていた。しかし、Oxaprozine ではその疼痛改善効果にも関わらず、骨量は維持されなかった。桂枝加朮附湯は Ipriflavone と同等の骨量維持効果が認められた。
評 価	分類1

5. 易感冒状態の改善

小児の感冒罹患頻度には個人差があって、いわゆる虚弱児童は罹患頻度も高く、重症化しやすい特徴がある。

第7表 柴胡桂枝湯

文献6)	甲賀正聡 1997
対 象	反復上気道感染 (年間7回以上気道感染を反復する小児) 26例
試験デザイン 方法 期間 その他	症例収集研究 虚実中間, 腹力中等, やや腹直筋の緊張あり, 小柴胡湯証よりもやや虚証. 1年服用後2年間経過観察し, 気道感染頻度が1/2以下を有効, 1/3以下を著効とし, 4段階評価した。
結 果	1年間の服用により易感染性は改善した。
評 価	分類1

このような易感染状態の改善に用いられるものに、柴胡桂枝湯がある。

年間に七回以上の感冒症状を呈する小児を易感染児と定義して、柴胡桂枝湯を一年間だけ投与し、投与終了時の状態とその後二年間の経過観察で有効性を判定したところ、著効と有効とを合計して80.8%の児に改善効果を認めたという報告である<sup>6)</sup>。

26例と小規模な研究であるが、投与中止後二年間経過観察して有効性を判定するなど、漢方らしい工夫された研究デザインは高く評価できる(第7表)。

6. 脳血管性痴呆

痴呆症患者は、高齢化が進行するにつれてさらに増加する見通しである。抗痴呆作用を有すると推定される当帰芍薬散や釣藤散がすでに治療に用いられている。

15施設の139例の脳血管性痴呆に対して二重盲検比較試験を実施した<sup>7)</sup>。釣藤散は、8週 (p < 0.01) およ

第8表 釣藤散

文献7)	K. TERASAWA, ほか 1997
対 象	脳血管性痴呆 139例
試験デザイン 方法 期間 その他	二重盲検無作為化比較試験 釣藤散 7.5g/日 分三 12週連続内服 状態を5段階評価. 開始時, 4週後, 8週後, 12週後. 改訂長谷川式痴呆尺度など14項目で評価。
結 果	釣藤散は、本文に述べたように、複数の項目で有意差を似て改善効果を示した。
評 価	分類1

び 12 週 ( $p < 0.001$ ) での全般改善度で優れていた。また自覚症状では、全般改善度において 8 週 ( $p < 0.05$ )、12 週 ( $p < 0.01$ ) で有意差があった。精神医学的症候では、全般改善度で 4 週 ( $p < 0.05$ )、8 週 ( $p < 0.001$ )、12 週 ( $p < 0.001$ ) のすべてで改善した。自覚会話、表情、計算能力、夜間せん妄、不眠、幻覚などが改善した。12 週時点の日常生活動作の改善 ( $p < 0.05$ ) も有意差があった。8 週における衣服の着脱 ( $p < 0.05$ ) にも有意差をみとめた (第 8 表)。

## 結 語

漢方医学をはじめとする伝統医学は、21 世紀の現代でもなお有用な医療技術であろうか。われわれ漢方研究者にとって漢方医学の有用性は自明のことであるが、多くの日本の医師と医療行政担当者にとってはかならずしもそうでないというのが現状である。

漢方医学をふくむ東アジアの伝統医学がさらに発展するためには、客観的に有用性を証明することが必須の要件となろう。

われわれの先人の一人である奥田謙蔵 (1884-1961) は、1926 年にその著書で、「漢方医学と西洋医学の長所を統一して、新たな東洋医学を建設し、人類に貢献することが私の願いである」と述べた<sup>8)</sup>。その実現のためには漢方治療における EBM を確立することが不可欠である。

幸いにしてわが国の医学医療制度はそのような条件が他の諸国に比して断然整っている。医学教育に漢方医学の一部が取り入れられた今日、新時代の東洋医学がわが国からうまれて世界をリードすることを心から願うものである。

## 引用文献

- 1) 日本東洋医学雑誌別冊 EBM 特集号, 53 (別冊), 2002
- 2) 原澤茂, 三好秋馬, 三輪剛, ほか: 運動不全型の上腹部愁訴 (dysmotility-like dyspepsia) に対する TJ 43 六君子湯の多施設共同市販後臨床試験? 二重盲検群間比較法による検討. 医学のあゆみ, 187: 207-229, 1998
- 3) 佐々木大輔, 上原聡, 並木正義, ほか: 過敏性腸症候群に対する桂枝加芍薬湯の臨床効果—多施設共同無作為割付群間比較臨床試験—. 臨床と研究, 75: 1136-1152, 1998
- 4) 大藪久則, 松田昌三, 栗栖茂, ほか: 癒着性イレウス発症例に対する RANDOMIZED TRIAL による大建中湯の評価. Progress in Medicine 15: 1954-1958, 1995
- 5) 大竹哲也: 骨粗鬆症患者の骨量と疼痛に対する桂枝加朮附湯・IPRIFLAVONE・OXAPROZINE の効果. 北関東医学, 46: 139-146, 1996
- 6) 甲賀正聰: 易感染 (反復気道感染) と柴胡剤. 日本小児東洋医学研究会, 13: 71-75, 1997
- 7) Terasawa K, Shimada Y, Kita T, et al: Choto-san in the treatment of vascular dementia: a double-blind, placebo-controlled study. Phytomedicine 4: 15-22, 1997
- 8) 奥田謙蔵: 皇漢醫學の治療定則に就て. 慢性病の治療と漢方医術 (加藤玄伯著, 分担執筆). 東京, 1926

綜 説

記憶はどのようにして形成されるか？—最近の話題

慶應義塾大学医学部生理学教室

柚 崎 通 介

Key Word : memory, glutamate receptor, long-term potentiation, long-term depression, cerebellum

はじめに

記憶がどのようにして形成・蓄積され、どのようにして失われていくのか、という根源的な問題について私たちはいったいどれくらいの知識を得てきたのであろうか？記憶のメカニズムの研究は、人間が人間たりうる究極の機能を理解する、といった純粋科学的な意味のみでなく、どのようにすれば子供達の脳機能を育むことができるか、あるいは、どのようにすれば老化や疾患に伴う痴呆を防げるか、といった教育的あるいは臨床的な観点からも非常に重要な問題である。

記憶の本体は、神経細胞間の接続部であるシナプスの変化(可塑性)であると考えられている。しかし、神経活動の変化が、どのようなメカニズムでシナプスの変化に変換され貯蔵されるのか、といった基本的な問題については、依然としてわからない点が多い。丁度10年前に、私は同じテーマで総説を書いた<sup>1)</sup>。本総説では、他分野の研究者や研究者の卵の方たちを念頭に、その後の進歩の一端を概説し、さらに私たちの研究室での仕事を簡単に紹介したい。

個体の記憶と細胞の記憶

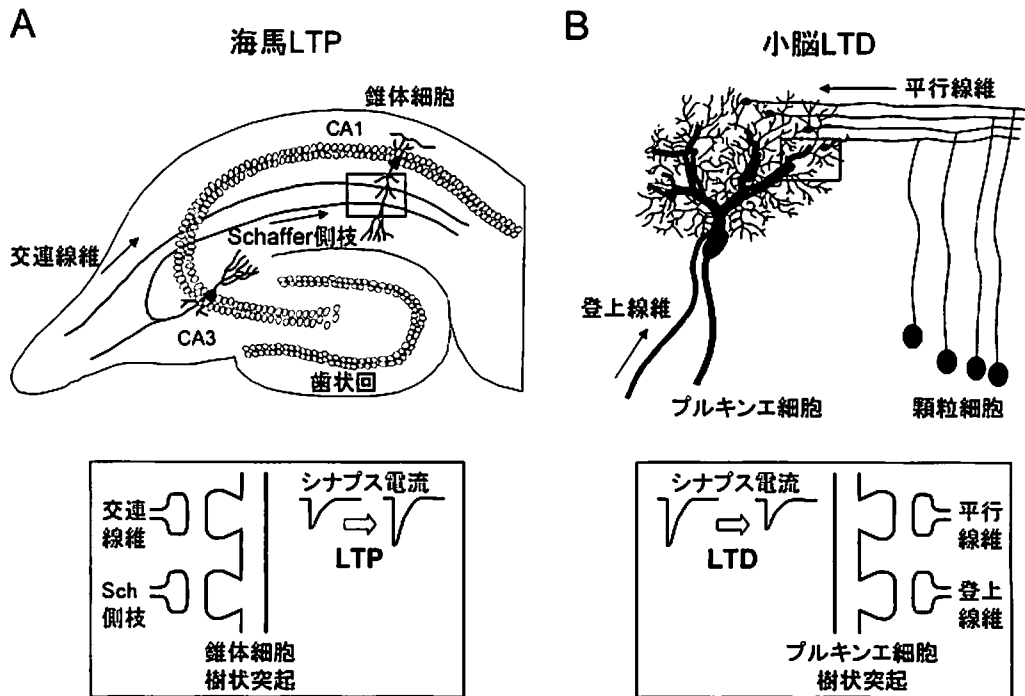
人間の記憶にはさまざまな種類があり、それぞれ性質が異なる。例えば、「非陳述記憶」は、ピアノが上手に弾けるようになる、車が運転できるようになる、などといった行動や技術に直結した記憶で、小脳が大きく関与している。これに対して「陳述記憶」は、言葉で説明できる記憶で、海馬の関与が必須である。これらの個体レベルでの記憶を、そのもとになっている神経回路や、さらにそれを支える分子のレベルで理解することが、神経科学の最大の課題である。従来は脳疾患患者の脳機能を

調べたり、動物では脳の各部位を破壊することにより、情報を得るしかなかったのだが、近年のPETやfMRIなどの機能的イメージング技術の進歩により、各種情報処理時に活性化される神経回路に関する知見は飛躍的に拡大した。

行動レベルでの記憶・学習の研究は、従来行われていたウサギ・ラットなどの動物のみでなく、遺伝子操作が容易なマウスにおいて実験パラダイムが確立しつつある。具体的には、マウスでは海馬が関与する記憶は迷路学習など空間情報の記憶をテストする。これに対して、小脳が関与する記憶は、条件づけ反射や眼球運動の調節学習としてテストすることができる。例えば、音刺激のみではマウスは瞬きをしないが、音刺激と目への直接刺激を組み合わせると、音刺激のみで瞬きをするようになる。この記憶の形成には小脳の神経回路が必須である。

細胞レベルでのシナプス可塑性のモデルとしては、長期増強(Long-term potentiation: LTP)と長期抑圧(Long-term depression: LTD)という現象がとりわけ研究されてきた。この2つの現象は海馬でも小脳でも見られるが、学習に伴って神経活動が亢進すると、海馬では神経細胞間の連絡、すなわちシナプス伝達効率が向上して、主にLTPが起き、逆に小脳ではシナプス伝達効率が低下してLTDが起きる(第1図)。学習原理として海馬では塑像の、小脳では彫像の原理を用いているといわれる所以である。

LTPとLTDが発見されてから、当然のことながらこれらの細胞レベルでの記憶が本当に個体レベルでの記憶に必要な十分であるのかを検討されてきた。例えば迷路学習を行った動物から取り出した海馬切片においてはLTPが起き易いとか、逆に生きた動物に電気刺激によりLTPを引き起こしてやると、その後の迷路学習の成績が向上するなどの実験であるが、なかなか決定的な



第1図 細胞レベルの記憶モデル-LTPとLTD A. 海馬CA1領域の錐体細胞でのLTP, 錐体細胞の樹状突起には対側の海馬から交連線維, CA3領域の錐体細胞からSchaffer側枝がシナプスを形成する. それぞれの線維が高頻度刺激されると, それぞれの線維において特異的にシナプス応答が持続的に上昇し, LTPが成立する. あるいは, 2つの線維が同時に刺激されると, 普段LTPが起きないような低頻度刺激でもLTPが起きる. これを異シナプス性LTPという. B. 小脳皮質の唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞の樹状突起には, 遠位部に顆粒細胞の軸索である平行線維が, 近位部には下オリブ核の軸索である登上線維が, それぞれシナプスを形成する. この2つの線維が同時に刺激されると, 平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス応答が長期間低下し, (異シナプス性)LTDが成立する.

因果関係を示す証拠はなかった. しかし, 遺伝子ノックアウトマウスを初めとする遺伝子操作技術の進歩により, 個体レベルでの記憶・学習と神経回路レベルでのLTP・LTD, さらにそれを支える分子のレベルでの知見とが, 後述するように直接に関連付けられるようになってきた. これは近年の記憶の研究分野での, 大きな進歩である.

### 短い記憶と長い記憶

記憶は保持時間の長さからは, 短期記憶と長期記憶に大きく分類される. 長期のシナプス可塑性は, 新規蛋白合成やRNAを阻害すると, 形成されないが, 短期のシナプス可塑性は影響を受けないことが, さまざまな動物種の多くの学習課題において証明されている. 脳切片(海馬)を用いた研究でも, 遺伝子発現の不必要な早期

LTP(1~3時間持続)と, 必要な後期LTP(24時間以上持続)が存在する. 小脳LTDにも同様に保持時間と遺伝子発現依存性により, 2種類のLTDがある<sup>2)</sup>.

#### 1. 長期記憶

##### 1) 記憶遺伝子

学習刺激に伴い, 神経細胞内でmRNA発現量が増加する遺伝子群には, 刺激後に速やかに変化し, 新規蛋白合成を必要としない「最初期遺伝子」と, ゆっくり変化しmRNAの発現に新規蛋白合成を必要とする「後期遺伝子」との2つのカテゴリーがある. 海馬LTPにおけるDifferential display法の結果からは, 30~40種類の最初期遺伝子の変動し, そのうち10~15種類が転写因子であると推定されている<sup>3)</sup>.



## 2) 転写因子— zif268 と CREB

転写因子の中ではとりわけ zif268 が海馬 LTP 発現とよく相関する。実際に、zif 268 ノックアウトマウスにおいては、海馬での早期 LTP は正常であるが、後期 LTP が特異的に障害され、同時に個体レベルでの記憶の長期保持も障害されず、zif 268 の mRNA 発現上昇が長期記憶の形成に必要であることが示された<sup>4)</sup>。一方、小脳 LTD においても junB, c-fos などの転写因子が特異的に上昇するが、この現象と LTD や個体小脳での記憶形成との因果関係は未だに不明である<sup>5)</sup>。

転写因子の中では、mRNA の発現量自体は変化しないが、cyclic AMP response element binding protein (CREB) も、学習刺激に関連して特異的に活性化される<sup>6)</sup>。CREB は、さまざまな酵素によりリン酸化されて活性化されるが、学習刺激の場合は、カルシウム—カルモデュリンキナーゼ IV (CaMKIV) によるリン酸化が主体である<sup>6)</sup>。ハエやアメフラシにおいては CREB の機能を阻害すると長期記憶の形成が阻害されることが証明された。マウスにおいては 3 種類の CREB 遺伝子がある。CREB $\alpha$  と  $\Delta$  の 2 重ノックアウトマウスでは、予想通り海馬 LTP や迷路学習障害が報告された<sup>5)</sup>。ただし最近になり、この結果はむしろマウスの系統に依存した人工的な現象であり、また CREB $\alpha$ ,  $\Delta$ ,  $\beta$  の 3 重ノックアウトマウスでは LTP も個体レベルでの長期記憶の形成も正常であるとの報告が出てきている<sup>7)</sup>。しかし、下等動物とは違い、哺乳類では CREB 以外にも、cyclic AMP response element modulator (CREM) や ATF-1 が同様の機能を持っていることが分かっている。CREB のノックアウトマウスでは、CREM の発現量が代償的に上昇しているため、この結果から、CREB が哺乳類で長期記憶の形成に関与していることを否定はできない。

一方、CREB 信号系の抑制分子も神経活動に依存して活性化される。これらの分子はハエやアメフラシでの学習課題において、短期記憶から長期記憶への固定化を妨げる。マウスの場合、C/EBP 転写因子のうち  $\delta$  や、抑制型  $\beta$ 、さらにそれと協調して働く ATF4 は CREB 信号系を阻害しており、これらの長期記憶抑制因子を取り除くと、長期 LTP の発現や個体レベルでの長期記憶の形成が亢進し、「頭のよい」マウスとなる<sup>8)</sup>。

## 3) 転写因子以外の最初期遺伝子

転写因子以外の最初期遺伝子としては、機能が不明の分子 Arc, 神経伝達物質受容体の集積に関与する Homer $\gamma$  や Narp, さらに細胞外基質の分解酵素である

tissue plasminogen activator (tPA) などが海馬 LTP と相関することが知られている。これらの遺伝子 mRNA の上昇と記憶形成との因果関係も近年次第に明らかになってきた<sup>9)</sup>。例えば Arc に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドをラットの海馬に注入すると、後期 LTP や個体レベルでの長期記憶の形成が阻害される。tPA 遺伝子のノックアウトマウスでも同様の報告があり、逆に tPA を過剰発現するトランスジェニックマウスでは後期 LTP や長期記憶が亢進する。

脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor : BDNF) は、mRNA 発現に新規蛋白合成を必要としない、という点では最初期遺伝子に分類されるが、発現の時間経過は非常に遅く、神経活動が亢進してから 2~4 時間後以降に上昇してくる<sup>10,11)</sup>。海馬 LTP のみでなく小脳 LTD の後にも特異的に BDNF mRNA 発現が上昇することを私たちは見出した<sup>11)</sup>。また神経活動に応じた BDNF 蛋白の分泌亢進も報告されている。BDNF のノックアウトマウスや BDNF と BDNF 受容体 TrkB との結合を阻害すると、海馬における早期 LTP は正常であるが、後期 LTP が障害される。TrkB のホスホリパーゼ C 活性化部位を変異させたノックインマウスは、BDNF ノックアウトマウスと似た所見を示すことから、BDNF はホスホリパーゼ C $\gamma$  を介してイノシトール 3 リン酸受容体から細胞内 Ca を放出させ、これがおそらく CaMKIV を活性化し、CREB のリン酸化につながるものであろうと想定されている<sup>12)</sup>。

## 4) 今後の展望

学習刺激に伴う遺伝子群の発現量の変動が、単なる神経活動に付随した現象に過ぎないのか、長期記憶の固定化に因果関係があるのか、という問題は長年の課題であったが、近年のマウス遺伝子操作の進歩により、少なくともいくつかの遺伝子は、短期記憶から長期記憶の固定化に必要なかつ十分な、「メモリースイッチ」として働いていることが明らかになりつつある。しかし、どのようなプログラムのスイッチを On にするのが未だにわからない。例えば CREB が、どの遺伝子の発現を調節しているのだろうか？前述の zif 268 の転写調節領域には 2 個の CREB の結合部位があるが、このような遺伝子は無数にある。また多くのメモリースイッチ分子は、他の経路のスイッチも兼ねていることが多く、話しはさらに難しい。例えば CREB や C/EBP などは神経細胞死プログラムのスイッチとしても働いていることが明らかになっている。

一方、成熟したマウスを、「豊かな環境」に置くと、

海馬の歯状回での神経細胞の新生が亢進し、また LTP も置きやすくなることが分かってきた<sup>13)</sup>。神経細胞の新生と長期記憶の成立との関係についての研究は、これからの課題である。

## 2. 短期記憶

数時間以内の持続時間しかない、遺伝子発現に依存しない短期の記憶はどのようにして起きるのであろうか？これまで細胞レベルにおいて早期 (1~3 時間以内) の LTP や LTD の成立機構が詳細に研究されてきた。これらの所見が、個体レベルでの短期記憶を少なくとも部分的には反映していることが、近年のノックアウトマウスの結果から明らかになってきた。

### 1) 記憶素子としてのグルタミン酸受容体

哺乳類の中樞神経系での速い (ミリ秒単位) 神経伝達はグルタミン酸受容体 (glutamate receptor : GluR) により担われている。神経細胞間の伝達効率の変化とは、まさに GluR 信号伝達経路の変化である。そういった意味で、GluRこそが、脳における伝達素子と同時に「記憶素子」である。

GluR は薬理学的性質により、大きく  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) 型、カイニン酸型、と N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型に分類される。この他にイオンチャンネルを持たない代謝型 GluR がある。速い神経伝達はこのうち、AMPA 型により担われている。AMPA 型 GluR は遺伝子としては GluR1 から 4 までの 4 種類があり、脳においてはこれらのサブユニットが会合して一つの AMPA 受容体チャンネルを形成する。細胞内の粗面小胞体において、おそらくさまざまなサブユニットが、特異的に会合して細胞表面に輸送され、さらに特定のシナプスに定着するものと考えられているが、その過程については未だに分かっていない点が多い。

近年、GluR のリガンド結合部位の部分蛋白質の結晶化が成功し、X 線にて構造解析が行われことにより、リガンドと GluR の結合や脱感作の過程についての理解が大幅に進んだ<sup>14)</sup>。リガンド結合型イオンチャンネルでは、リガンドが結合した後に、チャンネル部分の立体構造が変化して、イオンが通過できるように開口する。この過程はゲート機構と呼ばれ、イオンチャンネルの非常に重要な基礎的な性質である。例えばある種の遺伝性てんかんは、Na チャンネルの突然変異により、僅か数ミリ秒の開口の遅れにより起きる。しかし GluR のゲート機構についてもほとんど分かっていない。最近私たちは、自然発症

ミュータントマウスの解析を通して、GluR のゲート機構や会合機構について新しい知見を得つつある。興味のある読者は他の総説を参照されたい<sup>15,16)</sup>。

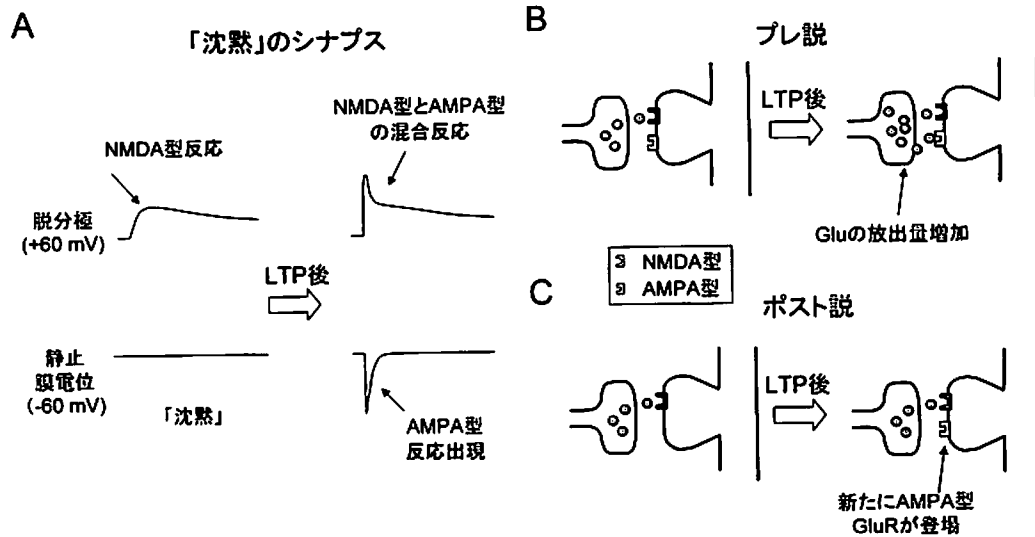
### 2) 後ろか前か—沈黙のシナプスは語る (第2図)

海馬 LTP において、グルタミン酸を介するシナプスの伝達効率が亢進する分子機構としては、シナプス前部からのグルタミン酸の放出量に変化するか (プレ説)、あるいはシナプス後部に存在する GluR の性質や数に変化するか (ポスト説)、の 2 つの可能性がある。プレ説とポスト説については、研究者が 2 陣営に分かれて果てしなく議論が続いており、未だに結論は出ていない。

いずれの説においても、海馬の CA1 野など多くの脳部位においては、LTP の成立機序として、シナプス後部における NMDA 型 GluR の活性化が、非常に重要な働きを果たすという点は共通している。AMPA 型やカイニン酸型と異なり、NMDA 型 GluR は静止膜電位付近 (-60~-80 mV) ではシナプス応答には関与しない。これは NMDA 型 GluR のチャンネル部分が、細胞外に存在する Mg イオンにより塞がれているからである。神経活動が亢進し、神経細胞が十分に脱分極した時のみ、Mg イオンが外れて、NMDA 型 GluR を介する遅いシナプス電流が観測される。NMDA 型 GluR を介するシナプス電流のもう一つの大きな特徴は、AMPA 型と異なり、Ca イオンを非常に通過させることである。その結果、シナプス後部での細胞内の Ca 濃度が局所的に上昇し、さまざまな Ca 依存性の細胞内信号伝達系を活性化する。このように、膜電位依存性に活性が変化する NMDA 型 GluR は、細胞の興奮状態の検知器としての役割を果たすと考えられる。

プレ説をとる場合、シナプス後部での NMDA 型 GluR の活性化に引き続いて、シナプス後部から前部に逆行性の信号を想定する。逆行性の分子としては一酸化窒素やアラキドン酸、platelet activating factor などが知られている。最近、一酸化窒素はシナプス前部においてグアニルシクラーゼを活性化し、産生された cGMP は phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) の産生を増やし、PIP<sub>2</sub> はシナプス小胞のエンドサイトーシスとリサイクルを亢進させ、その結果グルタミン酸の放出量を増やすことが分かった<sup>17)</sup>。

一方、ポスト説では、NMDA 型 GluR の活性化に引き続いてプロテインキナーゼが活性化され、GluR そのものがリン酸化の基質として修飾されると考えられる。例えば、GluR1 サブユニットがリン酸化されると、チャンネルの性質が変化して、イオンを通しやすくなったり



第2図 「沈黙」のシナプスは語る A.通常のシナプスに、弱い刺激を与えると、静止膜電位付近では全く応答が見られないシナプスがあり、「沈黙」のシナプスと呼ばれる。シナプスが形成されていることは、シナプス後膜を脱分極させた状態では、NMDA 受容体を介した遅いシナプス電流が観測されることで確認できる。LTP を引き起こすような刺激をシナプスに与えると、このようなシナプスにおいても、静止膜電位付近で AMPA 型のシナプス応答が見られるようになる。B, C 沈黙のシナプスの二つの解釈。プレ説 (B) では、シナプス後膜には元から AMPA 型と NMDA 型 GluR が存在しているが、シナプス間隙に於けるグルタミン酸濃度が低い場合、感受性の低い AMPA 型は活性化されないために「沈黙」のシナプスとして振る舞うと考える。LTP 誘導刺激により、シナプス前部よりのグルタミン酸放出量が増加すると、AMPA 型 GluR も活性化される。ポスト説 (C) では、NMDA 受容体しか存在しないシナプスが「沈黙」のシナプスであると考えられる。LTP 誘導刺激後に、このようなシナプスに新たに AMPA 型 GluR が組み込まれる。

(コンダクタンスの上昇)、チャンネル開口確率が上昇することが示されている。

近年、沈黙のシナプス (Silent synapse) の解釈を巡って、再びプレ説とポスト説の衝突があった (第2図)<sup>19)</sup>。沈黙のシナプスというのは、NMDA 型のシナプス応答 GluR のみがみられるシナプスで、静止膜電位付近では全くシナプス応答がなく、神経細胞を脱分極させた時にのみ、NMDA 型 GluR 由来の遅いシナプス電流が観測される。面白いことに LTP が成立すると、沈黙のシナプスは消失し、静止膜電位付近では AMPA 型 GluR 由来の速いシナプス応答と、脱分極側では AMPA 型と NMDA 型の複合型の応答が観測される。この現象は、ポスト説の立場からは、NMDA 型 GluR しか発現していなかったシナプスに、LTP 刺激により新たに AMPA 型 GluR が組み込まれるためであると考えられる (第2図 C)。最近、細胞内 Ca 濃度上昇により、カルシウム・カルモデュリンキナーゼ II (CaMKII) が活性化されると、GluR1 サブユニットがシナプス後部に特異的に輸送されることが示され<sup>19)</sup>、ポスト説を強く支持している。

個体レベルにおいても、GluR1 が、神経活動亢進に伴って、新たにシナプス後部に輸送されることが証明された<sup>20)</sup>。また、GluR1 のリン酸化状態は、シナプス後膜に輸送された GluR1 の安定した発現を規定するらしい。実際に、GluR1 のリン酸化部位を変異させたノックインマウスでは、LTP や個体での海馬依存性学習が障害される<sup>21)</sup>。

一方、プレ説の立場からは、AMPA 型 GluR はグルタミン酸に対する感受性が NMDA 型 GluR よりも低いので、局所的なグルタミン酸濃度が低いと、シナプスに AMPA 型 GluR があっても、見かけ上 NMDA 型 GluR しかない Silent synapse として振る舞うと解釈される (第2図 B)。そして LTP 刺激により、シナプス前膜よりグルタミン酸放出量が増え、新たに多くの AMPA 型 GluR が反応するようになり、Silent synapse が消失する。LTP 後に GluR1 サブユニットがシナプス後部に輸送されることが証明されてから、プレ説の旗色はやや悪い。しかし、高頻度刺激により LTP を引き起こしたあとの早い時期 (10~20 分) においては、

プレ説を支持する証拠は多い。従って、LTP 成立後の時間的経過や、刺激パターンによって、シナプス前部と後部の関与は変化する可能性があり、必ずしもプレ説とポスト説は相反的關係ではないだろう。

### 3) エンドサイトーシス過程としての LTD

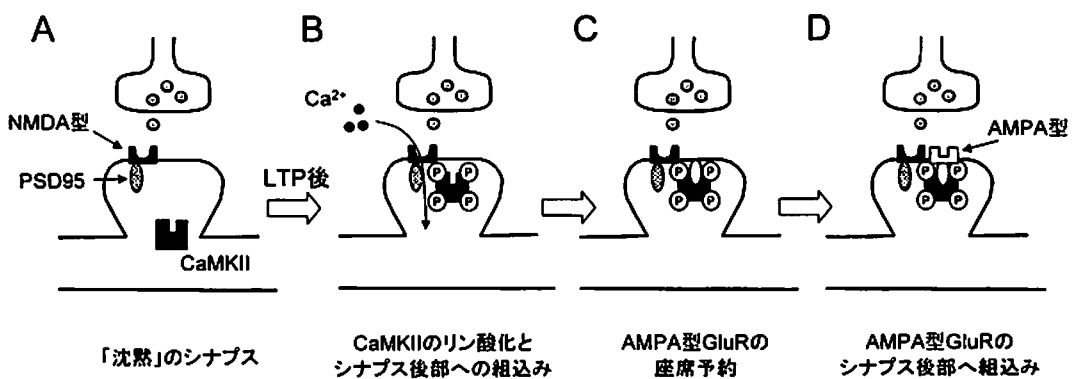
このように CA1 領域における海馬 LTP の実態は、シナプス後膜への新たな GluR の輸送による、という考え方が主流となってきた。逆に、LTD では、シナプス後膜からの GluR の消失により起こることを示す証拠が増えてきた。LTP では、GluR1 サブユニットが選択的に細胞表面に輸送されるが、LTD では、GluR2 サブユニットが選択的に細胞表面からエンドサイトーシスにより取り除かれると考えられている。GluR2 サブユニットのカルボキシル末端には、リン酸化状態により 2 種類の蛋白質（リン酸化されていない状態では GRIP, リン酸化されると PICK1）が結合する。いずれの蛋白質が結合するかにより、GluR2 サブユニットがシナプス後膜上に安定して存在できるか、エンドサイトーシスされるかが規定されるという仮説である。海馬と小脳の LTD において、ともに GluR2 サブユニットのエンドサイトーシスが亢進することが確認されている<sup>22,23)</sup>。ただし、この詳しい分子機構には不明な点が多い。例えば、そもそも海馬と小脳の LTD では、誘発時の細胞内 Ca 濃度依存性が大きく異なり、細胞内信号伝達機構が共通であるとは考えにくい。また、海馬では GRIP が結合し

た GluR2 はシナプス膜表面に輸送されず、細胞内のプールに係留されるというデータが得られているが、小脳では逆に GRIP と結合した GluR2 は、シナプス後膜表面への係留に必要である。更に、後述するように、小脳 LTD の発現には、シナプス後膜に  $\delta 2$  型 GluR の存在が不可欠であるが、海馬にはそもそも  $\delta 2$  型 GluR が発現していない。

### 4) 今後の課題

短期記憶形成の分子機構については、LTP・LTD ともかなり解明が進んだ。おそらく、シナプス後膜における GluR の表面輸送やエンドサイトーシスによる、GluR の数そのものの調節が、早期 LTP・LTD の発現の実態である、という仮説の大枠は正しいであろう。ただし、GluR の選択的表面輸送やエンドサイトーシスの分子機構については未解決な問題が多い。また、このような GluR の数の調節により成立した短期記憶が、前述した長期の記憶にどのように置き換わっていくのかについては、依然として最大の謎である。海馬 CA1 領域での LTP においては、シナプス後膜で増加した GluR1 サブユニットは GluR3 サブユニットに置き換わっていくことが示されているが、どのようにして個々のシナプスが、置き換わるべきサブユニットの数を記憶しているのであろうか？

面白い仮説として、シナプス後膜の CaMKII が短期記憶から長期記憶への橋渡し分子であるという説がある



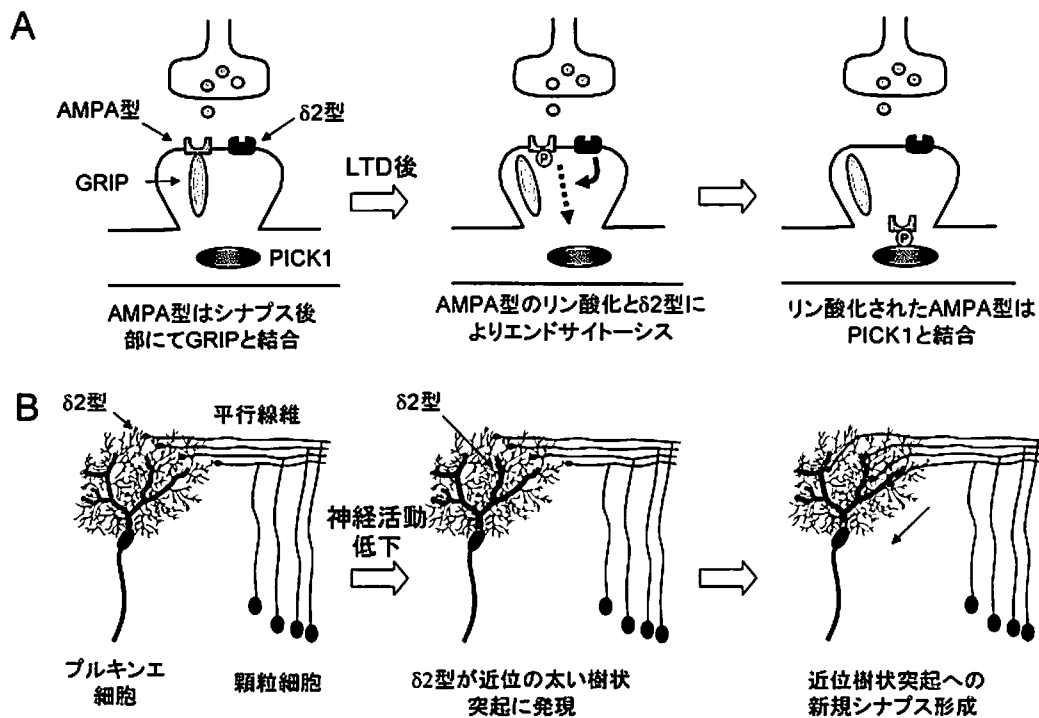
第 3 図 記憶の「座席指定券」としての CaMKII A. NMDA 型 GluR は足場蛋白質 PSD95 によりシナプス後膜に固定されている。AMPA 型 GluR が全くない場合、このシナプスは沈黙のシナプスとして振る舞う。B. LTP 誘導刺激後、NMDA 型 GluR を介して流入したカルシウムイオンは CaMKII をリン酸化し、リン酸化された CaMKII は NMDA 型 GluR に結合することにより、シナプス後膜に組み込まれる。C. CaMKII は細胞内カルシウムイオンが正常化した後も、自己リン酸化機能を通して、リン酸化状態を持続する。CaMKII には Actinin, Actin, 4.1N, SAP97 といった足場蛋白質の複合体が結合する。この複合体が AMPA 型 GluR の座席を予約する。D. AMPA 型 GluR がシナプス後膜に組み込まれる。

(第3図)<sup>24)</sup>。CaMKIIはシナプス後部の細胞内Ca濃度が上昇すると、カルモデュリンが結合して活性化型の立体構造をとる。活性化型CaMKIIは、シナプス後膜のNMDA型GluRのNR2Bサブユニットに結合することにより、シナプス後膜肥厚(PSD)に集積する。CaMKIIはActininを介して細胞骨格蛋白アクチンと結合し、アクチンは4.1NとSAP97を介してGluR1サブユニットと結合することが知られている。したがって、CaMKIIがPSDに集積すると、その分だけGluR1サブユニットがシナプスに入れることになる。つまり、CaMKIIがGluR1が入る席を確保する座席指定券の役割を果たす。CaMKIIは12個のサブユニットが会合し、お互いに自己リン酸化をするために、新規に合成されてCaMKII複合体に参加したサブユニットも、他のサブユニットによりリン酸化される。すなわち、CaMKIIは「細胞内Ca濃度が上昇した」という過去の履歴を継承

することができる。この仮説はさまざまな最新の知見を取り入れた面白い仮説であり、今後の検証が待たれる。しかしこの仮説でも、短期記憶と、遺伝子発現に依存する長期記憶との関連は、依然として不明である。

### 小脳の記憶とδ2型GluR

δ2型GluRは、小脳プルキンエ細胞に特異的に発現し、アミノ酸配列からはGluRファミリーに属する。しかし、リガンドとしてグルタミン酸は一切結合せず、また神経伝達にも直接関与しないことから、孤児受容体として扱われてきた。一方、δ2型GluRノックアウトマウスでは、小脳失調や、小脳に依存した学習が障害され、また小脳LTDも誘導できないことから、δ2型GluRは小脳での記憶の成立に不可欠な役割を果たすことが示唆されていた。しかし、その実態は長らく謎であった<sup>25)</sup>。



第4図 小脳LTDとシナプス形成におよぼすδ2型GluRのユニークな役割 A. 小脳LTDの成立機構のモデル。AMPA型GluRは、足場蛋白質GRIPにより、平行線維-プルキンエ細胞シナプス後膜に組み込まれている。LTD誘導刺激後に、プロテインキナーゼCが活性化されると、GluR2サブユニットがリン酸化され、GRIPとAMPA型GluRの結合が外れる。同時にδ2型GluRを介する未知の信号経路により、AMPA型GluRのエンドサイトーシスが起きる。リン酸化されたGluR2サブユニットは足場蛋白質PICK1と結合することにより、細胞内部に繋ぎ止められる。B. 神経活動によるδ2型GluRと平行線維分布の変化。正常成熟マウスでは、δ2型GluRは、プルキンエ細胞の遠位樹状突起に選択的に発現し、その部位に平行線維がシナプスを形成する。神経活動をテロドトキシン投与により低下させると、δ2型GluRがまず、近位樹状突起に発現する。それに引き続いて、同部位に平行線維が新規シナプスを異所性に形成する。

私たちは最近、 $\delta 2$ 型 GluR は、平行線維—小脳プルキンエ細胞シナプス後膜の GluR2 サブユニットのエンドサイトーシスを制御する働きをもっていることを見出した (第4図A)<sup>26)</sup>。 $\delta 2$ 型 GluR のリガンド結合予想部位に対する特異的抗体を投与すると、シナプス後膜の GluR2 サブユニットがエンドサイトーシスされ、シナプス応答が長期間減弱する。この状態は LTD と同じ状態である。また、成熟マウスの小脳のくも膜下腔にこの抗体を投与すると、一過性に小脳失調と運動学習障害がみられる。 $\delta 2$ 型 GluR がエンドサイトーシスを制御する過程の分子機構については、現在色々な角度から検討中である。また、この抗体が $\delta 2$ 型 GluR の機能を修飾するという事は、やはり $\delta 2$ 型 GluR には何らかの未知のリガンドが存在することを示唆するが、この点についても検討中である。

面白いことに、 $\delta 2$ 型 GluR は、シナプスの形成にも特徴的な重要な役割を果たす。まず、 $\delta 2$ 型 GluR のノックアウトマウスでは、平行線維—プルキンエ細胞シナプスの数が正常の60%前後に減少している。このシナプス形成異常は、シナプス前部の平行線維終末や、シナプス後部 (プルキンエ細胞の樹状突起上の神経棘) の数そのものには変化がなく、接触状態にあるシナプスの数のみが特異的に減少しているという点が、非常に特徴的であり、 $\delta 2$ 型 GluR はシナプスの接触状態を調節する可能性が示唆される<sup>25)</sup>。

$\delta 2$ 型 GluR は成熟動物の小脳では、プルキンエ細胞の樹状突起の遠位部分に特異的に発現し、そこに平行線維がシナプスを形成する。非常に面白いことに、成熟動物の小脳に、テトロドトキシンを投与して神経活動を低下させると、まずプルキンエ細胞の近位樹状突起に $\delta 2$ 型 GluR が異所性に発現し、それに引き続いて、平行線維シナプスが近位樹状突起に新しく形成される (第4図B)<sup>27)</sup>。このように、 $\delta 2$ 型 GluR は短期の記憶形成に関与するのみでなく、シナプスの形成・維持などの形態的な変化を介すことにより、長期の記憶形成にも関与する可能性が出てきた。

皮肉なことに、長い間、継子扱いされてきた $\delta 2$ 型 GluR が、小脳の記憶機構のみでなく、短期記憶から長期記憶形成へと橋渡しする分子機構を解明する糸口として大きく期待されている。

## おわりに

本総説では、海馬と小脳における記憶機構の最近の研究について概説した。記憶の種類により関与する脳部位

は異なり、シナプスの可塑性は恐らく脳内のあらゆる場所で起きている現象であろう。しかし海馬や小脳の特定の神経細胞で見つかった原理は他の神経細胞にもある程度敷衍できると考えられる。ただし、暗闇で落とした鍵を探すのに、探しやすいから、という理由で電燈の下だけを探している可能性を念頭に置いて、他の脳部位でのシナプス可塑性もさらに研究を進める必要がある。

紙面の都合で多くの仕事を紹介することができなかったが、この分野における私たちの興奮の状況が伝われば幸いです。10年後にまた進歩を概説する機会が来ることを楽しみにしている。

## 文 献

- 1) 柚崎通介, 御子柴克彦, 香川靖雄: 長期記憶と後期遺伝子発現—小脳の記憶モデルにおける解析. 実験医学, 12: 23-29, 1994
- 2) 柚崎通介: 小脳の「記憶」とその異常. 最新医学, 54: 140-144, 1999
- 3) Lanahan A, Worley P: Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiol Learn Mem* 70: 37-43, 1998
- 4) Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S: A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 4: 289-296, 2001
- 5) Mayford M, Kandel ER: Genetic approaches to memory storage. *Trends Genet* 15: 463-470, 1999
- 6) Kang H, Sun LD, Atkins CM, Soderling TR, Wilson MA, Tonegawa S: An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell* 106: 771-783, 2001
- 7) Balschun D, Wolfer DP, Gass P, Mantamadiotis T, Welzl H, Schutz G, Frey JU, Lipp HP: Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? *J Neurosci* 23: 6304-6314, 2003
- 8) Chen A, Muzzio IA, Malleret G, Bartsch D, Verbitsky M, Pavlidis P, Yonan AL, Vronskaya S, Grody MB, Cepeda I, Gilliam TC, Kandel ER: Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins. *Neuron* 39: 655-669, 2003
- 9) Guzowski JF: Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12: 86-104, 2002
- 10) Lu B: BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 10: 86-98, 2003
- 11) Berninger B, Schinder AF, Poo MM: Synaptic reli-

- ability correlates with reduced susceptibility to synaptic potentiation by brain-derived neurotrophic factor. *Learn Mem* 6 : 232-242, 1999
- 12) Ernfors P, Bramham CR : The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP. *Trends Neurosci* 26 : 171-173, 2003
  - 13) Kempermann G, van Praag H, Gage FH : Activity-dependent regulation of neuronal plasticity and self repair. *Prog Brain Res* 127 : 35-48, 2000
  - 14) Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E : Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395 : 913-917, 1998
  - 15) 柚崎通介：開かれた扉（ゲート）—突然変異マウスの解析が開いたグルタミン酸受容体の機能解明の扉。 *実験医学*, 18 : 1410-1413, 2000
  - 16) Yuzaki, M : New insights into the structure and function of glutamate receptors— The orphan receptor  $\delta 2$  reveals its family's secrets. *The Keio J Med* 52 : 92-99, 2003
  - 17) Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ : Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* 6 : 925-932, 2003
  - 18) Malenka RC, Nicoll RA : Silent synapses speak up. *Neuron* 19 : 473-476, 1997
  - 19) Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R : Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII : requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287 : 2262-2267, 2000
  - 20) Takahashi T, Svoboda K, Malinow R : Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. *Science* 299 : 1585-1588, 2003
  - 21) Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL : Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112 : 631-643, 2003
  - 22) Man HY, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT : Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25 : 649-662, 2000
  - 23) Matsuda S, Launey T, Mikawa S, Hirai H : Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *EMBO J* 19 : 2765-2774, 2000
  - 24) Lisman J, Schulman H, Cline H : The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3 : 175-190, 2002
  - 25) Yuzaki M : The  $\delta 2$  glutamate receptor : 10 years later. *Neurosci. Res* 46 : 11-22, 2003
  - 26) Hirai H, Launey T, Mikawa S, Torashima T, Yanagihara D, Kasaura T, Miyamoto A, Yuzaki M : New role of delta2-glutamate receptors in AMPA receptor trafficking and cerebellar function. *Nat Neurosci* 6 : 869-876, 2003
  - 27) Morando L, Cesa R, Rasetti R, Harvey R, Strata P : Role of glutamate delta-2 receptors in activity-dependent competition between heterologous afferent fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 9954-9959, 2001

原 著

## 正常組織由来色素細胞と母斑組織由来色素細胞の E-cadherin における細胞遊走能の差異

慶應義塾大学医学部形成外科学教室

(指導：中島龍夫教授)

まつ だ なる ひと  
松 田 就 人

(平成 15 年 7 月 9 日受付)

### ABSTRACT

E-cadherin is a factor that determines the migration ability of pigmented cells

*Naruhito Matsuda*

Department of Plastic and Reconstructive surgery, School of Medicine, Keio University

Both nevus cells and melanocytes are derived from the neural crest. The etiology of giant congenital nevus cell nevus (GCNN) is thought to be the cloned proliferation of melanoblasts, the precursors of melanocytes, during development and distribution in a restricted area. If the proliferation mechanism is triggered at an early developmental stage, the area of distribution is large and GCNN is produced. Melanocytes, on the other hand, usually migrate into the epidermis and settle there, and they are reported to strongly express E-cadherin during the migration process. Nevus cells, however, are unable to migrate into the epidermis, and many of them remain in the dermis. We used cultured epidermis-derived pigment cells (EDPCs) and cultured dermis-derived pigment cells (DDPCs) obtained from tissues collected from 23 patients with GCNN and investigated the migration of DDPCs *in vitro* after forced expression of E-cadherin. Immunocytochemistry, Western blotting, and RT-PCR showed that the EDPCs expressed E-cadherin, but the DDPCs did not. An experiment using a Boyden chamber showed that migration of both pigmented cells depends on the presence of E-cadherin. Based on these findings, E-cadherin expression appeared to be necessary for pigment cells to move from the dermis into the epidermis, and cells that express E-cadherin appeared to be capable of moving into epidermis where E-cadherin is expressed.

**Key Word :** E-cadherin, pigmented cell, migration, Boyden chamber, nevus

母斑細胞とメラノサイトは、ともに神経堤由来である。先天性巨大色素性母斑は胎生期にメラノサイトの前駆細胞であるメラノブラストが、皮膚に分布していく過程で外的、内的因子の影響を受けて増殖能の高いクローンが生じるために、一定領域に色素細胞が分布することによって生じる。この増殖機構が早期に起これば、その分布領域は広くなり、先天性巨大色素性母斑が生じる。一方、メラノサイトは通常、真皮内には留まらず表皮内に移動

し定着する。この移動の過程で細胞接着因子である E-カドヘリンを強く発現することが報告されている。ところが、母斑細胞の多くは表皮内に移動できず、真皮内に留まっている。我々は 23 人の先天性巨大色素性母斑の患者から採取した組織より得た培養表皮由来色素細胞、ならびに培養真皮由来色素細胞を用いて、E-カドヘリンの有無による培養真皮由来色素細胞の表皮への遊走能の変化を *in vitro* で検討した。結果は免疫染色、



Western blotting, RT-PCR において培養表皮由来色素細胞は E-カドヘリンを発現しており、培養真皮由来色素細胞は E-カドヘリンを発現していなかった。Boyden chamber においては、E-カドヘリンの有無により細胞遊走能に違いがみられた。本研究の結果より真皮に存在する色素細胞は、真皮から表皮に移動するためには、E-カドヘリンの発現が必要で、E-カドヘリンは色素細胞の局在を決定する可能性が示唆された。

メラノサイトは胎生期の神経冠に由来する、メラノサイトの前駆細胞であるメラノプラストとして、背部から腹部へ向かって間葉組織中を移動し、胎生 10 週頃までには表皮内へ侵入し定着する。この過程でメラノプラストの移動と増殖には、SCF と KIT, エンドセリン B と エンドセリンレセプター B などが関与する<sup>1,2)</sup>。一方、母斑細胞は胎生期にメラノサイトの前駆細胞であるメラノプラストが、皮膚に分布していく過程で外的、内的因子の影響を受けて増殖能の高いクローンが生じると、その分布領域には多数のメラノサイトが到達することになる。この増殖機構が早期に起これば、その分布領域は広くなり先天性巨大色素性母斑は生じるとされている。しかし、メラノプラストが異常増殖をきたす分子機構はまだ不明である<sup>3,4)</sup>。また、メラノサイトは真皮から表皮に移動する直前に表皮角化細胞に発現している細胞接着因子である E-カドヘリンを発現し、この分子を介して周囲の表皮角化細胞からの制御を受け、表皮内に定着することが報告されている<sup>5,6)</sup>。一方、母斑細胞の多くは真皮内から表皮内に移動できず、真皮内に留まっている。この分子機構もまだ不明である。我々は母斑細胞が真皮内に数多く留まることが、先天性巨大色素性母斑の治療(外科的切除術<sup>7)</sup>、植皮術<sup>8)</sup>や tissue expander 法<sup>9)</sup>の併用、curettage 法<sup>10,11)</sup>、レーザー治療<sup>12)</sup>など)を難渋させる原因の 1 つだと考えた。そこで何らかの方法で真皮内に存在する母斑細胞を表皮内へ移動させることができれば、先天性巨大色素性母斑の治療は容易になるものと思われ、E-カドヘリンに着目し今回、*in vitro* における培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞の E-カドヘリン発現の差異、及び E-カドヘリン発現の有無によるそれぞれの色素細胞の E-カドヘリンへの遊走能につき検討した。

## 材料と方法

材料は先天性巨大色素性母斑患者 1 ヶ月～12 歳の計 23 名より本人、またはその家族の同意を得て、切除摘出した母斑組織を用いた。

## 1. 細胞培養

培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞は、それぞれ母斑切除術の際生じた正常皮膚と母斑組織から採取した。これら組織を 3～5 mm<sup>2</sup> に細切して 1 mM CaCl<sub>2</sub> (Fluka 社) を加えたトリプシン液 (1×) (Sigma 社) に浸し、4℃にて 18～24 時間浸漬し表皮と真皮に分けた。正常皮膚由来表皮と母斑組織由来真皮をコラゲナーゼ 1 mg/ml (和光純薬社) と 1 mM CaCl<sub>2</sub> 添加トリプシン液を 1:1 に混和した溶液に浸し、37℃、40 分間、保温した<sup>13)</sup>。その後、2 倍量の細胞培養液 Ham's F-12、10% ウシ胎児血清、1% ストレプトマイシン、b-FGF 3 ng/ml、ホルボール 12-ミリストート 13-アセタート 10 ng/ml (Sigma 社)、コレラトキシン 1 μg/ml (Calbiochem 社) を加え、1 mM CaCl<sub>2</sub> 添加トリプシン液の反応を中和し、ピペッティングし、1000 rpm、5 分間遠心し、細胞を回収した。細胞培養液に浮遊させ 10 cm<sup>2</sup> のプラスチックディッシュにそれぞれ播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて培養した。表皮角化細胞や線維芽細胞の混入を除去するために約 50% のコンフルエントになった段階でジェネティシン 100 μg/ml (Sigma 社) を細胞培養液に加え 7～10 日程度培養した。その後、もとの細胞培養液で培養し、表皮由来色素細胞と真皮由来色素細胞を作製した。継代は 1 mM CaCl<sub>2</sub> 添加トリプシン液処理にて行い、3～5 継代目の細胞を以下の実験に用いた<sup>14,15)</sup>。

## 2. 免疫細胞化学的検索

スライドガラス上でそれぞれの細胞を培養し、細胞が接着した時点で室温にて 10 分間アセトン固定し、10 分間室温にて風乾させた。一次抗体は Hachisuka H et al. や Palazzo J et al. らの方法を参考にして、ヒトとの交叉反応があることを確認したウサギポリクローナル抗ウシ S-100 蛋白抗体 (Dako 社)、ウサギポリクローナル抗ラット NSE 抗体 (Polysciences 社)、二次抗体はビオチン化抗ウサギ IgG 抗体 (Vector 社) を用いて免疫染色を行った<sup>16,17)</sup>。E-cadherin の免疫染色は一次抗体としてマウスモノクローナル抗ヒト E-cadherin 抗体 (BD Biosciences 社)、二次抗体はビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Vector 社) を用いて免疫染色を行った。細胞の発色には 3 アミノ 9 エチルカルバゾール (AEC) を用い、赤色に発色させた。

## 3. Western blotting

培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞からのタンパク質の抽出方法は、培養表皮由来色素細胞と培養

真皮由来色素細胞のタンパク質固定を行うため、10% TCA (Sigma 社) 溶液を用いて室温で 30 分間静置した。その後、固定した細胞を剥がし、4°C、3000 rpm で 10 分間遠心し沈殿物のみ回収し、PBS 1 ml と 100% TCA 100  $\mu$ l を混和した溶液を加え、氷中で 30 分間静置しさらにタンパク質の固定を行った。4°C、15000 rpm で 10 分間遠心し沈殿物のみ回収した。完全に TCA 溶液を取り除いた後、サンプルバッファを加え、4°C、13000 rpm で 10 分間遠心し、上清液のみを回収した。

また、細胞膜上の E-カドヘリンは 0.25% トリプシン-EDTA 液 (Sigma 社) 処理により破壊されるが、1 mM CaCl<sub>2</sub> を添加したトリプシン液で処理をしても破壊されないと報告されている<sup>18)</sup>。これを確認するために培養表皮由来色素細胞に対し、PBS で洗浄後、0.25% トリプシン-EDTA 液と 1 mM CaCl<sub>2</sub> 添加トリプシン液をそれぞれの細胞に加え、37°C、10 分間保温し、1000 rpm、5 分間遠心し上清液を捨て、残った沈殿物を上述と同様の手順でタンパク質の抽出を行い、E-カドヘリンの有無を Western blotting で確認した。

一次抗体は TBS で 2500 倍希釈したマウスモノクローナル抗ヒト E-カドヘリン抗体 (BD Biosciences 社) を用い、二次抗体以降は Vectastain Elite ABC Kit (Vector 社) の手順に従って行った。

#### 4. RT-PCR

培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞からそれぞれの全 RNA の単離はアイソゲン (和光純薬社) を用いて行った。培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞のそれぞれから単離した全 RNA と、RT-PCR kit (Takara 酒造社) を用いて、RT-PCR を行った。サイクル数は、アニーリングの時間が 60 秒、伸長反応の温度と時間が 72°C、90 秒を 1 回とし 40 回行った。それぞれの合成された cDNA 長、アニーリングの温度、プライマーの塩基配列は以下の通りである<sup>19)</sup>。

E-カドヘリン；653bp,60°C,forward：5'-AGCCATGGCCCTTGGAG-3', reverse：5'-CCAGAGGCTCTGT CACCTTC-3',  $\alpha$ -カテニン；300 bp,50°C, forward：5'-GTCATTCACGTAGTCACCTCA-3', reverse：5'-TTC TGACATCAAAATCCTCTGTC-3',  $\beta$ -カテニン；668 bp,60°C,forward：5'-AAGGTCTGAGGAGCAGCTTC-3', reverse：5'-TGGACCATAACTGCAGCCTT-3', Boyden chamber：

孔の大きさが 8  $\mu$ m の膜 (Millipore 社) を用いて、膜の上側に PBS で 100 倍希釈したマトリゲル (Becton

Dickinson Labware 社) を、底面に 100  $\mu$ l/ml+2 mM CaCl<sub>2</sub> に調整したリコンビナントヒト E-カドヘリン蛋白 (R&D Systems 社) をそれぞれ 37°C、30 分間保温しコーティングした。lower chamber に細胞培養液を 200  $\mu$ l 入れ、コーティングした膜をのせ upper chamber を取り付け、upper chamber に 1 mM CaCl<sub>2</sub> 添加トリプシン液で処理した細胞を回収し、1000 rpm、5 分間遠心し、上清液を捨て細胞数が 10<sup>5</sup>個/200  $\mu$ l になるように細胞培養液で調整して、200  $\mu$ l 入れた。その後、37°C、6 時間保温し、膜を取り出し上側の遊走しなかった細胞を綿棒で拭き取り、PBS 2 ml で洗浄後、20%ホルマリン 1 ml で 30 分間室温固定した。蒸留水 2 ml で洗浄し、ギムザ染色を行った<sup>20)</sup>。

膜底面をリコンビナントヒト E-カドヘリン蛋白でコーティングした場合としていない場合の培養表皮由来色素細胞及び、培養真皮由来色素細胞の E-カドヘリン側への細胞遊走能を観察するとともに、1 mM CaCl<sub>2</sub> 添加トリプシン液処理で細胞膜上の E-カドヘリンを温存した場合と 0.25% トリプシン-EDTA 液処理で細胞膜上の E-カドヘリンを破壊した場合の培養表皮由来色素細胞についても E-カドヘリン側への細胞遊走能を観察した。

## 結 果

表皮由来色素細胞と真皮由来色素細胞は上記条件下で良好に培養可能であった。培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞の両方で S-100 蛋白と NSE が 95% 以上の細胞で赤色に染まり陽性であった。このことにより、培養した細胞が色素細胞であることが示唆された (第 1 図 A, B, C, D, E, F, G, H)。E-カドヘリンについては、培養表皮由来色素細胞で細胞が赤色に染まり発現していたが、培養真皮由来色素細胞では発現していなかった (第 1 図 I, J)。

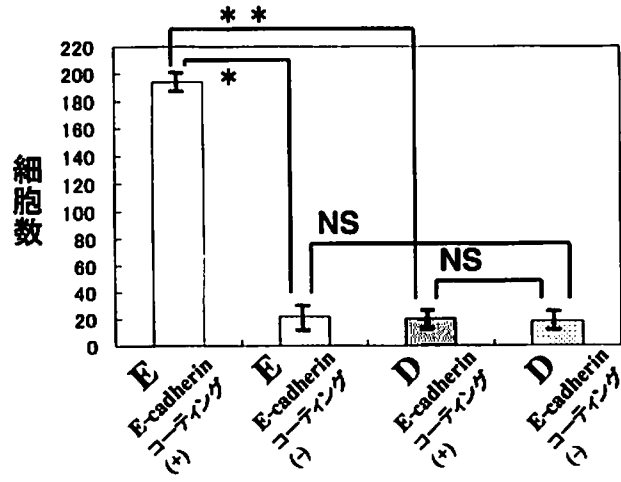
Western blotting 及び、RT-PCR においても、培養表皮由来色素細胞で E-カドヘリンは発現していたが、培養真皮由来色素細胞では E-カドヘリンは発現していなかった (第 2 図 A, B)。

$\alpha$ -カテニン及び $\beta$ -カテニンは、培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞の両方で発現していた (第 2 図 C, D)。

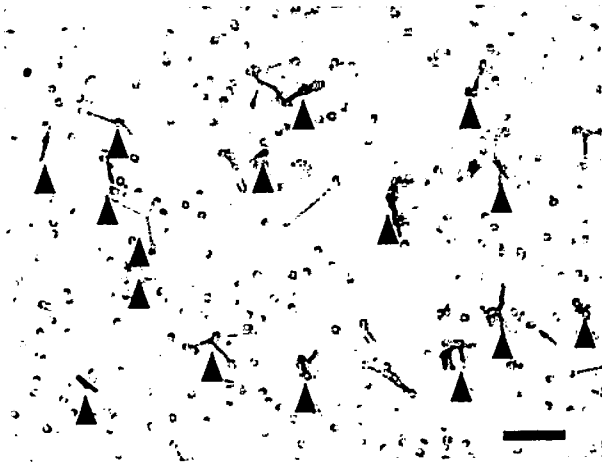
このことから培養真皮由来色素細胞は E-カドヘリンのみ欠落していて、それ以降の刺激伝達に必要な  $\alpha$ -カテニン及び  $\beta$ -カテニンは温存されていることがわかった。

次に Boyden chamber で膜底面をリコンビナントヒ

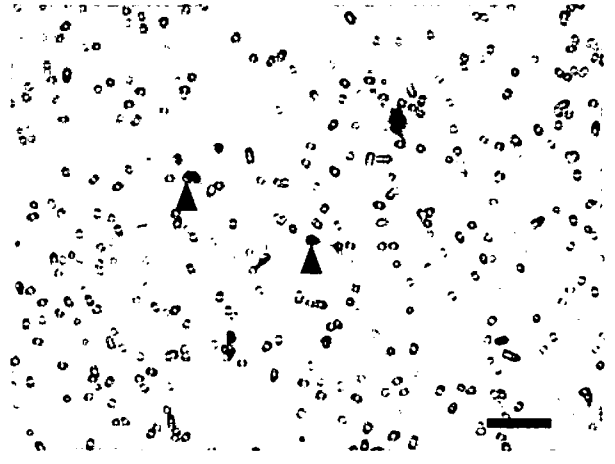
A



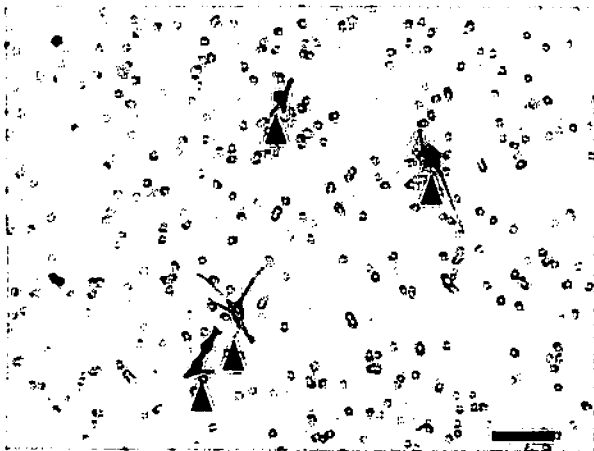
B



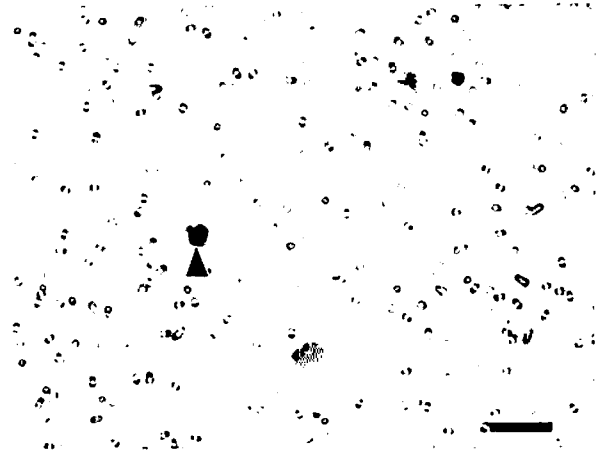
C

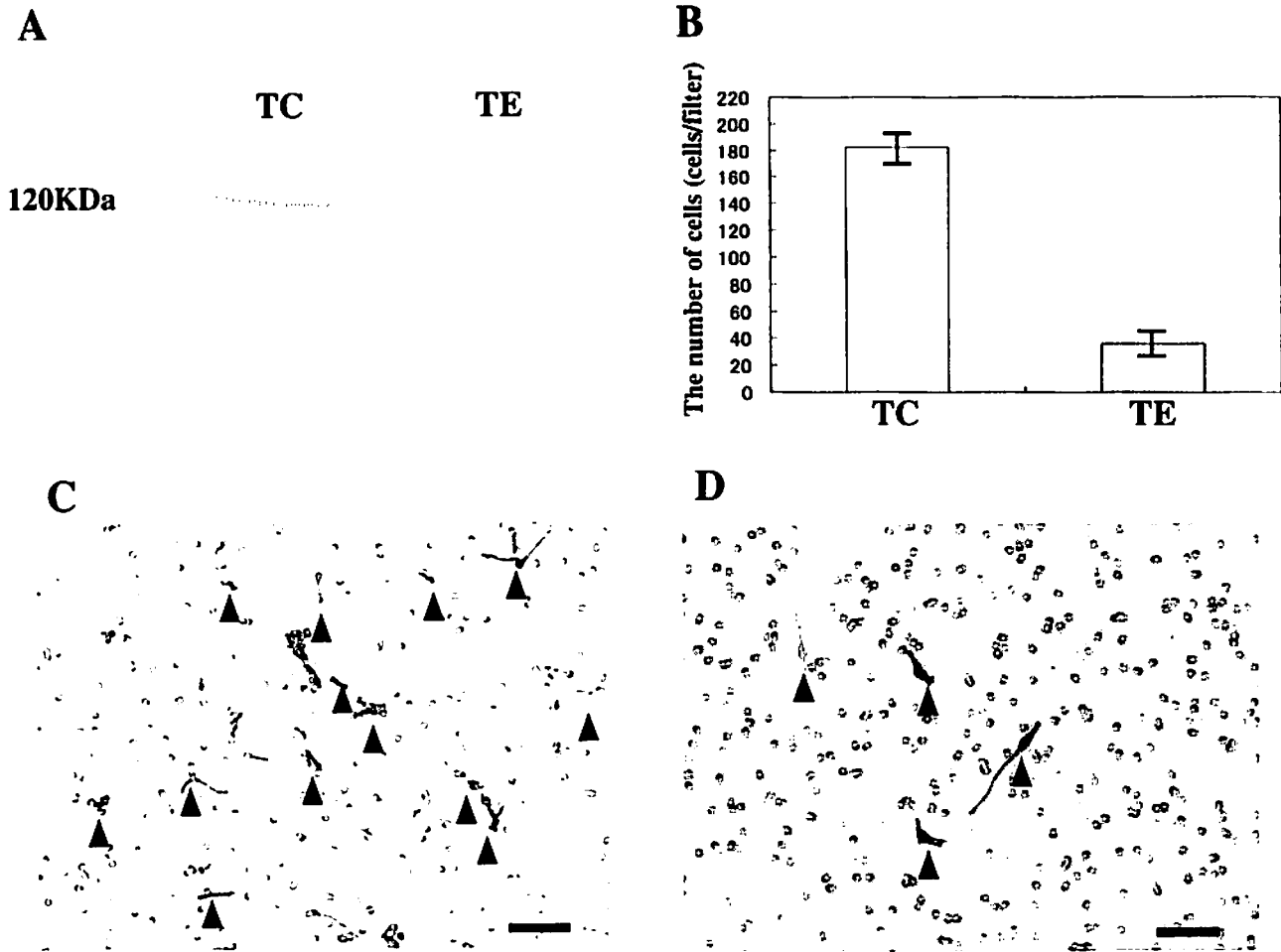


D



E





第4図 (A) 培養表皮由来色素細胞の1 mM $\text{CaCl}_2$ 添加トリプシン液処理と0.25%トリプシン-EDTA液処理によるWestern blottingの結果である。細胞膜上のE-カドヘリンは0.25%トリプシン-EDTA液処理により破壊された。(B) 培養表皮由来色素細胞の1 mM $\text{CaCl}_2$ 添加トリプシン液処理と0.25%トリプシン-EDTA液処理によるBoyden chamberの結果である。0.25%トリプシン-EDTA液処理により細胞膜上のE-カドヘリンを破壊された培養表皮由来色素細胞は、1 mM $\text{CaCl}_2$ 添加トリプシン液処理により細胞膜上のE-カドヘリンを温存された培養表皮由来色素細胞に比べて有意に細胞遊走能が減少した。P<0.01, t-検定, 統計学的有意差あり。すべての結果は異なる3検体をそれぞれ3回ずつ行って、平均±標準偏差で表した。(C) 1 mM $\text{CaCl}_2$ 添加トリプシン液処理した培養表皮由来色素細胞のBoyden chamber, (D) 0.25%トリプシン-EDTA液処理した培養表皮由来色素細胞のBoyden chamberである。TCは1 mM $\text{CaCl}_2$ 添加トリプシン液で処理した培養表皮由来色素細胞, TEは0.25%トリプシン-EDTA液で処理した培養表皮由来色素細胞である。矢印はそれぞれの細胞である。横線は50  $\mu\text{m}$ である。

第3図 (A) E-カドヘリンのコートイングの有無による培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞のBoyden chamberの結果である。培養表皮由来色素細胞で膜底面にリコンビナントヒトE-カドヘリン蛋白をコートイングした場合は、膜底面にリコンビナントヒトE-カドヘリン蛋白をコートイングしていない場合に比べて有意に細胞遊走能が増大した。膜底面にリコンビナントヒトE-カドヘリン蛋白をコートイングした場合の培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞では、培養真皮由来色素細胞が培養表皮由来色素細胞に比べて有意に細胞遊走能が減少していた。Eは培養表皮由来色素細胞, Dは培養真皮由来色素細胞である。\*P<0.01, t-検定, 統計学的有意差あり。すべての結果は異なる3検体をそれぞれ3回ずつ行って、平均±標準偏差で表した。膜底面にリコンビナントヒトE-カドヘリン蛋白をコートイングした場合の(B) 培養表皮由来色素細胞は細胞遊走数が多かった。コートイングしていない場合の(C) 培養表皮由来色素細胞の細胞遊走数は、(B)に比べてほんの少しであった。膜底面にリコンビナントヒトE-カドヘリン蛋白をコートイングした場合の(D) 培養真皮由来色素細胞の細胞遊走数は少なかった。コートイングしていない場合の(E) 培養真皮由来色素細胞も(D)と同様、細胞遊走数は少なかった。矢印はそれぞれの細胞である。横線はすべて50  $\mu\text{m}$ である。

ト E-カドヘリン蛋白でコーティングし、E-カドヘリン方向への各細胞の遊走能を解析した。リコンビナントヒト E-カドヘリン蛋白を膜底面にコーティングしない場合は、各細胞とも膜底面へはほとんど遊走しなかった (第3図 A, B, C)。リコンビナントヒト E-カドヘリン蛋白の膜底面へのコーティングにより、培養表皮由来色素細胞は膜底面の E-カドヘリン方向への細胞遊走数が有意に増大した (第3図 A, C, E)。培養真皮由来色素細胞では膜底面の E-カドヘリン方向への細胞遊走数が培養表皮由来色素細胞に比べ有意に少なかった (第3図 A, D, E)。

また、培養表皮由来色素細胞を 0.25%トリプシン-EDTA 液と 1 mM $\text{CaCl}_2$  添加トリプシン液の各々で処理した後、Western blotting を行った結果、0.25%トリプシン-EDTA 液で処理した培養表皮由来色素細胞は E-カドヘリンが破壊された。しかし、1 mM $\text{CaCl}_2$  添加トリプシン液で処理した培養表皮由来色素細胞は E-カドヘリンが温存された (第4図 A)。

この 0.25%トリプシン-EDTA 液処理による細胞膜上の E-カドヘリンの破壊により、培養表皮由来色素細胞は膜底面の E-カドヘリン方向への細胞遊走数が有意に減少した (第4図 B, C, D)。データでは記載していないが、トリプシン+EDTA 処理後に細胞を免疫染色で 12 時間まで確認したところ E-カドヘリンは破壊されたままであり、再構成されてはいなかった。トリプシン+EDTA 処理した細胞は、直ちに Western blotting や Boyden chamber に用いたので E-カドヘリンが再構成されている可能性はないと思われた。

## 考 察

メラノサイトの起源は神経堤由来である。神経堤は生体発生のごく初期に形成され、神経板および神経溝の発生直後に外胚葉と神経板との境界に出現する対称性の細胞集団で、これらは顔や首、心臓の 1 部を構成する間質や骨などの間葉系細胞、末梢神経系細胞、色素細胞 (メラノサイト)、副腎髄質などの内分泌器官構成細胞などさまざまな細胞に分化する。神経堤より発生したメラノサイトはメラノプラストと呼ばれ、まだ未分化な細胞であり、背外側を移動しながら真皮内にたどり着き、真皮内から表皮内へ移動しメラノサイトに分化する。母斑細胞の起源には諸説がある<sup>21-23)</sup>が、現在ではメラノサイトと同様、神経堤を起源とする説が有力である<sup>9)</sup>。

我々は、母斑細胞はメラノサイト同様に真皮までは分化、増殖、移動をしてくるが、真皮内に停滞することが

多い母斑細胞は、真皮内から表皮内に移動する過程でメラノサイトと比較して遊走能に何らかの違いがあるのではないかと考えた。メラノサイトは真皮内から表皮内への移動の際に E-カドヘリンの発現が特に重要であり、真皮内から表皮内に侵入する直前に、今まで発現していなかった E-カドヘリンを強く発現し、同じく E-カドヘリンを発現している表皮に侵入することが報告されている<sup>6)</sup>。また悪性黒色腫細胞は E-カドヘリンの発現の減弱または、消失することにより、表皮内から逸脱し転移能を獲得するという報告もある<sup>24,25)</sup>。これらのことから我々は表皮由来色素細胞と真皮由来色素細胞において E-カドヘリンに着目し、研究を行った。E-カドヘリンは竹市らにより 1983 年に発見された古典的 1 型カドヘリンファミリーに属する分子量約 120 kD の細胞膜 1 回貫通型の糖タンパク質で、5 つの細胞外ドメインを持ち、そこにカルシウムが結合することにより同一細胞膜面上にある E-カドヘリンと二量体を形成し、さらに異なる細胞膜上にある E-カドヘリンと基本的にはホモフィリックな結合をする  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の細胞接着因子である<sup>26,27)</sup>。さらに、細胞内領域のうち C 末側には  $\beta$ -カテニンあるいは  $\gamma$ -カテニンが結合し、これらのカテニン分子には、 $\alpha$ -カテニンが結合する。さらに  $\alpha$ -カテニンは、細胞骨格蛋白であるアクチンフィラメントと連結し、E-カドヘリンを介した細胞間接着性は調整される<sup>28)</sup>。

我々の実験で培養表皮由来色素細胞は E-カドヘリンを発現し、培養真皮由来色素細胞は E-カドヘリンを発現していなかった。Boyden chamber は堀川らの invasion assay に従って行った<sup>20)</sup>。E-カドヘリンを発現している培養表皮由来色素細胞は、E-カドヘリン方向への細胞遊走能が有意に高まった。E-カドヘリンを破壊した培養表皮由来色素細胞は、E-カドヘリン方向への細胞遊走能が有意に減少した。E-カドヘリンを発現していない培養真皮由来色素細胞は、E-カドヘリン方向への細胞遊走能はほとんどなかった。また、膜上部にマトリゲルをコーティングしないで同様の実験を行ったが、各細胞は膜底面に現れなかった。マトリゲルはラミニン、4 型コラーゲンを中心とした基底膜成分より成っているので、E-カドヘリン陽性の色素細胞が E-カドヘリン蛋白側に遊走するには、基底膜成分との接着が必要であることが示唆された。これまでに、色素細胞の遊走能を決定する因子としての E-カドヘリンの報告はない。このことから、色素細胞は真皮内から表皮内への移動に E-カドヘリンの発現が必要で、E-カドヘリンを発現している細胞は E-カドヘリンが発現している表皮に移動できると考えられた。逆を言えば、表皮に細胞が定着する

にはE-カドヘリンの発現が必要であると考えられ、E-カドヘリンの有無により色素細胞の局在が決まる可能性が示唆された。我々の実験で用いた培養表皮由来色素細胞と培養真皮由来色素細胞には、それぞれの細胞が混在している可能性があり、これは否定できない。また、現時点でメラノサイトと母斑細胞を特異的に分離するマーカーは存在しないため証明はできない。しかし、我々の主な目的は、真皮内の母斑細胞を表皮内に移動させ、治療が困難な先天性巨大色素性母斑の治療を確立させることであり、厳密にメラノサイトと母斑細胞を分けて認識する必要はないと考えている。今後、母斑細胞の特異的マーカーが見つければ、それをもとに母斑細胞にE-カドヘリンを強制発現させることで、母斑細胞を真皮内から表皮内へ移動させることができると思われ、その時は、先天性巨大色素性母斑の治療を確立させることができると考えられる。

#### 文 献

- 1) Grichnik JM, Burch JA, Burchette J, Shea CR : The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. *J Invest Dermatol* 111 : 233-238, 1998
- 2) Opdecamp K, Kos L, Arnheiter H, Pavan WJ : Endothelin signalling in the development of neural crest-derived melanocytes. *Biochem Cell Biol* 76 : 1093-1099, 1998
- 3) 斎田俊明 : 色素細胞母斑再考. *皮膚病診療*, 22 : 413-419, 2000
- 4) 斎田俊明 : メラノサイトの増殖性病変としてのメラノーマと色素細胞母斑. *色素細胞*, 18 : 249-265, 2001
- 5) Cramer SF : The origin of epidermal melanocytes. Implications for the histogenesis of nevi and melanomas. *Arch Pathol Lab Med* 115 : 115-119, 1991
- 6) Nishimura EK, Yoshida H, Kunisada T, Nishikawa SI : Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. *Dev Biol* 215 : 155-166, 1999
- 7) Gosain AK, Santoro TD, Larson DL, Gingrass RP : Giant congenital nevi : a 20-year experience and an algorithm for their management. *Plast Reconstr Surg* 108 : 622-636, 2001
- 8) Soejima K, Nozaki M, Sasaki K, Takeuchi M, Negishi N : Treatment of giant pigmented nevus using artificial dermis and a secondary skin graft from the scalp. *Ann Plast Surg* 39 : 489-494, 1997
- 9) Maves MD, Lusk RP : Tissue expansion in the treatment of giant congenital melanocytic nevi. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113 : 987-991, 1987
- 10) Moss ALH : Congenital giant naevus : a preliminary report of a new surgical approach. *Br J Plast Surg* 40 : 410-419, 1987
- 11) De Mey A, Dupuis C, Lejeune F, Lejour M : Neonatal treatment of giant naevi. *Dermatology* 185 : 300-301, 1992
- 12) Michel JL : Laser therapy of giant congenital melanocytic nevi. *Eur J Dermatol* 13 : 57-64, 2003
- 13) Gilchrist BA, Treloar V, Grassi AM, Yaar M, Szabo G et al : Characteristics of cultivated adult human nevocellular nevus cells. *J Invest Dermatol* 87 : 102-107, 1986
- 14) Alanko T, Rosenberg M, Saksela O : FGF expression allows nevus cells to survive in three-dimensional collagen gel under conditions that induce apoptosis in normal human melanocytes. *J Invest Dermatol* 113 : 111-116, 1999
- 15) Alanko T, Saksela O : Transforming growth factor beta1 induces apoptosis in normal melanocytes but not in nevus cells grown in type I collagen gel. *J Invest Dermatol* 115 : 286-291, 2000
- 16) Hachisuka H, Sakamoto F, Nomura H, Mori O, Sasai Y : Immunohistochemical study of S-100 protein and neuron specific enolase (NSE) in melanocytes and the related tumors. *Acta Histochem* 80 : 215-223, 1986
- 17) Palazzo J, Duray PH : Typical, dysplastic, congenital, and Spitz nevi : a comparative immunohistochemical study. *Hum Pathol* 20 : 341-346, 1989
- 18) Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S et al : E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes *in vitro*. *J Cell Sci* 107 : 983-992, 1994
- 19) Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N et al : Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells *in vitro*. *Oral Oncol* 37 : 65-71, 2001
- 20) Horikawa T, Norris DA, Yohn JJ, Zekman T, Travers JB et al : Melanocyte mitogens induce both melanocyte chemokinesis and chemotaxis. *J Invest Dermatol* 104 : 256-259, 1995
- 21) Garnis-Jones S, Jackson R : Origin of the nevus cell : a retrospective. *Int J Dermatol* 31 : 291-294, 1992
- 22) Magana-Garcia M, Ackerman AB : What are nevus cells? *Am J Dermatopathol* 12 : 93-102, 1990
- 23) 川村太郎 : 母斑細胞の起源と母斑症の病理発生 (1) . *皮膚臨床*, 19 : 255-262, 1977
- 24) Poser I, Dominguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R et al : Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 276 : 24661-24666, 2001
- 25) Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P et al : E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156 : 1515-1525, 2000
- 26) Takeichi M : Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251 : 1451-1455, 1991

- 27) Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M : Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature* 329 : 341-343, 1987
- 28) Ozawa M, Baribault H, Kemler R : The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 8 : 1711-1717, 1989
-

## 重症肝損傷の治療の変遷 -Damage control surgery-

腹部外傷治療の目的は、臓器出血の止血と管腔臓器穿孔の修復である。臓器出血の止血は、脾臓や腎臓では摘出などが施行されその止血は比較的容易であるが、肝臓からの出血に対する止血は時に困難となる。また、腹腔内臓器ではないが、後腹膜の血管や筋肉からの出血も止血しにくい場合がある。

従来、肝臓からの出血は肝縫合や肝切除が施行されてきた。消化器外科手術の進歩により肝臓癌に対する肝切除は安全に施行できる時代になっているが、他部位損傷を合併し手術前から出血性ショックに陥っている外傷患者に対する肝切除は安全で容易な手術とはいききれない。1960年代以降、米国の外傷医療の現場でも重症肝損傷に対して積極的に肝切除や肝縫合が施行されてきたが、その手術成績は惨憺たるものであった。死亡率は40~50%となり、肝損傷に対する肝切除は米国の外傷外科医の間では好んで使用される術式ではなくなった。

当院では前院長の山本医師の時代から、重症肝損傷に対して早期から肝切除術が施行されその手術成績は良好である。著者らの施設では、肝損傷に対する手術適応をショック例だけでなく、腹腔内出血量の増加する症例や肝静脈本幹部損傷の疑われる症例も含めている。最近10年では肝損傷ショック例の緊急開腹では死亡率は20%になるが、非ショック例では肝損傷切除に起因する死亡例は経験していない。この良好な手術成績の原因として、第一は米国では手術例の多くが銃創に起因するものであるのに対して、本邦では交通外傷など鈍的外力に起因することが多いことがあげられる。また、他の要因として、本邦では、救急センターでCTや超音波検査を自由にかつ繰り返して使用することが可能で、医療費が高く画像診断の制限されている米国ではこれが難しいことが関係している。初期診療の段階での画像診断を用いた損傷範囲や腹腔内出血の定量的判断から肝損傷の繊細な治療方針の決定が可能となる。ショックに陥る前に開腹・肝切除を施行すれば当然その治療成績は良好となる。

一方、多発外傷症例や来院まで時間のかかった症例では、救急センター搬入時すでに重篤なショックに陥っている。このような患者では血液凝固障害が発生しており、開腹・肝切除を施行すると出血傾向から収拾のつかない局面に陥る。微細な創面からも出血がおこり電気メスや縫合止血を施行しても止血できない。このような出血傾

向をともなった腹部外傷に対して米国で1980年代後半から、Damage Control Surgery という治療戦略が提唱された。

Damage control surgery (以下、DCS と略す) は生理学的異常をきたした重症胸腹部外傷患者において、その回避目的に施行される手術・一連の治療方法をさす。一般的には出血傾向、低体温、アシドーシス (これを deadly triad と呼んでいる) をきたした腹部外傷患者の治療に用いられる手法であるが、胸部外傷や四肢血管外傷にも適応が拡大されている。著者らの施設では、DCS の適応として deadly triad を用いているが、deadly triad としては

- 1) coagulopathy : 臨床的に術者が判断、または PT/APTT が正常の 50% 以上に延長
- 2) 代謝性アシドーシス : pH < 7.2
- 3) 低体温 < 35°C

のいずれかが認められたとき DCS の適応としている。

DCS の方法は Step I 初回手術 (止血・仮閉腹)、Step II 集中治療、Step III 再開腹という 3 ステップでおこなう。著者らは、Step II を基本的には ICU で施行するが、仮閉腹後すぐに ICU には移送せず、手術室でそのまま生理学的異常の是正をおこなうこともある。

肝損傷に対する Step I 初回手術では、肝切除などの複雑な術式はとらずガーゼパッキングだけをおこなう。ガーゼパッキングは肝損傷部を中心に 5~10 枚の大ガーゼを肝臓を覆うようにつめこみ圧迫止血をはかる方法である。腹腔内の容積が大きくなるので閉腹しにくくなる。閉腹も通常の方法はとらず 1 層かクリップによる簡便な方法をとる。なるべく 24 時間以内に再開腹 Step III をおこなう。Step I で確実な止血がおこなわれないと、腹腔内出血が持続し腹部はパンパンに膨張する。腹腔内圧は上昇し腹部コンパートメント症候群 (Abdominal compartment syndrome : ACS) に陥る。ACS では血圧は低下し気道内圧は上昇、尿量が減少し緊急再開腹を余儀なくされる。このように ACS をおこし再開腹した症例の予後は悪い。Step II で血圧・血液凝固能が改善し ACS もおこさなかった症例は待機的に再開腹する。肝損傷部のガーゼをはずすが再出血することは少なく、壊死組織の切除だけおこない閉腹できることが多い。

この DCS は外傷外科においては画期的な方法で、血液凝固障害をおこした重症腹部外傷においては現時点では唯一の治療戦略といえる。ただし、通常の止血方法を用いて短時間に止血できる損傷に安易にパッキングを施



行すると ACS を併発し救命できるはずの外傷患者を失うことにもなりかねない。したがって、DCS の適応は慎重におこない、外傷外科医は臓器損傷出血に対する通常の止血方法に熟知していなければならない。

北野光秀 (済生会神奈川病院 救急部・外科)

## アトピー性皮膚炎の漢方治療

アトピー性皮膚炎の治療薬はステロイド剤を中心とする免疫抑制剤です。これは誰もが認める薬ですが、免疫反応を正常化できる薬があればさらに強力な武器になります。私は十数年、アトピー治療に漢方薬を使用してきましたが、この薬に免疫正常化作用があるようです。漢方薬は十分に薬理作用が解明されていませんので、とっつきにくい薬ではありますが皮膚科ではほとんど行われていないアトピーの漢方治療についてご紹介させていただきます。

<漢方薬が異常な免疫機能を正常化する？>

アトピー性皮膚炎発症の原因の一つとして Th1/Th2 バランスが Th2 優位な状態になっていることが挙げられます。私達はアレルギー疾患が漢方薬により改善されていく過程で風邪をひきにくくなったという訴えをしばしば耳にします。また多発、慢性化していた伝染性軟属腫や尋常性ゆうぜいが急速に消失していくのを経験します。特に柴胡剤という種類の漢方薬投与により、風邪をひきにくくなる事は東洋医学の世界では当たり前の事です。これは漢方薬により Th1/Th2 バランスが是正されたためと考えるのも良いかと思えます。基礎研究でも十全大補湯、補中益気湯、梔子柏皮湯等が Th1/Th2 バランスを改善させるという報告があります。ただし十全大補湯、補中益気湯がすべての患者さんに有効かといえば、まったく違います。漢方薬は東洋医学の概念に基づいて投与されなければ無効または有害になります。以下簡単に御説明します。

<気血水の概念>

東洋医学では人間の体は気(≒自律神経系)、血(≒内分泌系)、水(≒免疫系)が密接に関わりあいながら維持されていると考えられています。このいずれかが異常になり、バランスが崩れると病気になる。アトピーはストレスで増悪したり、月経時増悪したりします。そのため免疫機能(水)を正常化するために自律神経系(気)や内分泌系(血)の治療からアプローチした方がよい場合があります。幸い漢方薬には、気・血・水の治療薬が年齢や体質に応じてたくさんあって、自律神経系-内分泌系-免疫系のネットワークバランスを総合的に改善していく事が可能です。

さて皮膚病の漢方治療は大きくわけて標治と本治があります。

<標治療法>

皮疹の症状を診て漢方薬を決定、投与する治療法を標治といいます。皮疹は紅斑→丘疹→小水疱→膿疱→湿潤→苔癬化という状態をたどり、それぞれの段階から結痂、落屑になって治癒します。漢方治療においては紅斑には黄連解毒湯や白虎加人参湯等、丘疹には十味敗毒湯や茵陳蒿湯等、小水疱には消風散や柴苓湯等、膿疱には排膿散及湯や十全大補湯等、湿潤には桂枝加黄耆湯や消風散等、苔癬化には温清飲や薊芥連翹湯等、それぞれの性状に応じた治療薬があります。

上記の薬は一部の代表的な漢方薬です。一人として同じではない個々の患者さんの皮疹に対し適切な漢方薬を選ぶことによりオーダーメイドの治療ができます。

<本治療法>

東洋医学では皮膚病はある日突然そこに生じたものではなく、体の内部の歪みのサインの一部にすぎないと考えます。アトピーを治療するためには歪みの根本的原因を探り、それを治療する漢方薬を投与しなければなりません。従って、皮膚病であっても消化器系や内分泌系治療薬に分類される漢方薬が必要になります。しかし内部の歪みといってもただ患者さんをボーとみてもなにもわかりません。そこで脈を触ったり(脈診)舌を診たり(舌診)お腹を触ったり(腹診)する診察法が発達しました。これらは東洋医学ではレントゲンや血液検査と同等に重要なものです。

特に腹診なしでは皮膚病といえども適切な漢方薬を選ぶ事はできません。腹診はわからないから嫌だとおっしゃる先生方がいらっしゃいますが、長い年月をかけて先達の一つ一つの漢方薬に対応する腹診を決めてくれているのでこれをマスターすれば投与すべき漢方薬をかなり絞り込むことができます。

私はまだまだ未熟者で大きい事は言えませんが、皮膚病治療に漢方薬を併用して以来、今では手湿疹でも漢方薬が欠かせなくなっています。まだ使用した事のない先生方、是非漢方薬を治療の選択肢に加えてみる事をお勧めします。

荒浪暁彦(あらなみクリニック)

## 動物実験に関連する法規の見直しと研究者の責任

たとえヒトの生命を救ったり健康を増進する医学研究のためであっても、動物実験に対してはさまざまな批判や反対運動があるが、慶應医学の読者には、それらを改

めて解説するまでもないであろうから、ここでは、わが国の動物実験に係る法規の見直しの現状を紹介することにします。

### 1. 動物愛護管理法と実験動物基準

動物愛護に関してもっとも基本となるわが国の法規は、昭和48年制定の「動物の保護及び管理に関する法律（動管法）」で、平成11年に改正されて「動物の愛護及び管理に関する法律（動物愛護管理法）」となった。本法は環境省が所管し、わが国においてヒトが所有または占有しているすべての動物（野生動物を除く）を対象としている。

この法律を受けて、わが国では、動物を家庭動物等（愛玩、介護、学校飼育動物等）、展示動物（動物園、水族館、サーカス、店頭販売動物等）、実験動物（試験研究、教育訓練、ワクチン製造動物等）、産業動物（食料、衣料、使役動物等、いわゆる家畜）の4群に分けて動物愛護行政を進めている。

前2者は、原則として生涯飼育続けられるべき（終生飼養）動物であるが、後2者は、特定の目的をもって育成飼育されている動物で、一般には研究材料や食料のためにある年齢に達するまでに処分される動物、つまり、終生飼養の原則が適用できない動物である。従って、これら4群の動物をひとまとめにして“愛護”しようとする動物愛護管理法は、さまざまな矛盾を抱え込まざるを得ない。

そこで、当時動管法を所管していた総理府は、この4群の動物について別々の基準を策定し、行政上の扱いに格差を設けた。実験動物に関しては、昭和55年に「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（＝実験動物基準）」が告示されている。わが国で、実験動物の福祉（保護、愛護の意味を含む）や倫理的な動物実験のための法規といえば、普通はこの実験動物基準を指す。

### 2. 欧米法規との比較

周知であろうが、欧州諸国では、倫理的な動物実験の最終責任は政府にあり、政府による動物実験者、動物実験施設、動物実験計画の3種類の認可が揃わないと動物実験は実施できない。米国とカナダでは、倫理的な動物実験の実質的な責任は教育または研究機関の長にある。動物実験計画の審査や動物実験施設の評価は、その機関の長が任命した動物実験委員会が担当する。そのため、米国の「実験動物の管理と使用に関する指針」では、動物実験に関わる研究者の責任（responsibility）が強調されている。

ところで、わが国の実験動物基準は、適正な飼育管理を通して実験動物の福祉と倫理的な動物実験の実現を目指し、基本的には動物実験に立ち入ることはない。しか

も、実験動物の福祉に関する責任は、個々の動物実験者、実験動物管理者、動物飼育者において、予算と人事の権限をもつ教育または研究機関の長である学部長や所長には及ばない。これらのことが、動物の側に立つ動物愛護団体から強く批判される点のひとつである。

しかし、動管法の第11条には動物実験について特別な条項が設けられ、「科学上の利用に供する場合には、その利用に必要な限度において、できる限りその動物に苦痛を与えない方法によってしなければならない」とされている。そして動物愛護団体の強い働きかけにも関わらず、この条文は一字一句も修正（強化）されることなく、改正された動物愛護管理法の第24条へ引き継がれた。

理由は、法規にはなんの規定もないけれども、実験動物福祉に関する研究者の自主的な規制、例えば生理学会、薬理学会、霊長類学会、実験動物学会等のわが国の諸学会がそれぞれ独自に会員が遵守すべき動物実験指針を策定し、そして、多くの大学等において動物実験計画の審査が実施されている現状を立法と行政が評価したためである。

平成11年の調査によると、わが国の大学、公的研究所、企業の86.1、55.4、58.5%が動物実験計画の審査を実施しており、今後とも審査の実施を考えていないと回答した機関はそれぞれ0.3、0.6、1.4%に過ぎなかった。医科大学に限れば、すでに平成11年当時、すべての大学で動物実験計画の審査が始まっていた。

### 3. 動物愛護管理法の見直しと研究者の責任

改正された動物愛護管理法の附則と国会決議によって、平成17年度までに本法は見直すことが義務付けられている。すでに家庭動物等の基準の改正は終わり、展示動物の基準の見直し作業が進行中である。恐らく、平成16年度には実験動物に関する検討が始まるであろう。

すでにわが国の大学等を中心に動物実験委員会の設置と動物実験計画の審査が軌道に乗っており、倫理的な動物実験に関して研究者や研究機関の長の責任を重視する北米型に近い方向の自主的な改革が進んでいる。将来の予測は難しいが、それを追認する形で日本の実験動物基準が北米型に近づく可能性が高い。

また、日、米、カナダ、欧州、ロシア等が共同で建設を進めている国際宇宙ステーションにおいては、国際法の慣例に従い、区域ごとに打ち上げ国の法律が適用される。各区域で行われる動物実験は、当然、それぞれの国の実験動物関連法規に従うことになる。国際的な調和という視点から、わが国の関連法規をある程度は諸外国（少なくとも北米2国）のそれに近づけておくことが望まれる。

ただし、北米型の法規制に向かうとしても、研究者の責任の所在の明確化、動物実験計画を審査する委員会構成の検討、予算確保の保証、さらには、新しく動物実験を始める研究者のための教育等、解決すべき問題が山積している。とくに、倫理的な動物実験の実施を研究者に求めるにあたり、反復した学生時代からの啓蒙教育が不可欠で、教育カリキュラムの見直しも必要となろう。

これに関連した動きとして、日本学術会議第7部実験動物研連(玉置憲一委員長)による動物実験施設の第三者評価機構、主に実験動物学と生理学の研究者の有志による動物実験計画審査の標準化等のための動物実験倫理研究会、実験動物医学会による実験動物基準改正案、実験動物生産者団体である日本実験動物協会等による動物施設査察制度等々の計画が進んでいる。

また、研究者は動物実験の実態を隠そうとしているという動物愛護団体の非難を背景として、動物実験の情報の開示要求が強まっている。このような情勢を考えると、倫理的な動物実験の実施に向けての研究者の真摯で積極的で多様な対応がますます必要になってくる。これらは研究の自由を阻害するものでなく、一般市民が過激な動物実験反対運動に賛同する流れを抑えるためである。倫理的な動物実験の実施と実験動物の福祉の増進のために、研究者の責任は一層重要である。

前島一淑(慶應義塾大学名誉教授)

## 江戸の解剖学

ご存知のように最初の西洋医学がわが国にもたらされたのは、まだ京都室町に名目上の幕府が存在したいわゆる戦国時代であった。布教目的で来日したイスパニアやポルトガルなどの宣教師が伝えたもので、南蛮医学と総称されている。当時のヨーロッパでは、1543年にヴェサリウスが『ファブリカ』を出版して新しい解剖学とそれに基づく医学が台頭しようとしていたが、南蛮医学はその前の時代のものであった。しかしヨーロッパ医学の雰囲気や技量は望むべくもなかったであろう。

イスパニアなどにずっと遅れて1609年に平戸に商館を開いたオランダは対日交易の新参者であった。しかしオランダにはそれら先行者に比べて決定的に有利な条件があった。旧教国ではなく新教国であったことと、オランダ商館には東インド会社と契約したヨーロッパの医師が常駐していたことのみならずである。

こころみに読者に問いたい。17世紀なかば、すなわち徳川幕府の開府半世紀後にわが国にヴェサリウスの解

剖学書が輸入されて、幕府高官の前で商館医師により解説がなされたことを想像できるか、ということである。以下はハーグに現存する日本に駐留したオランダ商館長の業務日誌である「商館長日記」の研究者が、その一部を翻訳して研究した論稿の一部である。ここにはさらにわれわれを驚かす事実も述べられている。

(1656年記事)『またこの機会に、医師は Vesalius の解剖書を用いて講義した。翌57年にも、日本人医師 Ginsouw が長崎でオランダ人医師から医学について詳しい講義をうけ、これを書き記して江戸に送っている。59年にはオランダ人医師が通詞と共に政重の邸に呼ばれ、解剖書を見せ、人体の内部を描いた絵についていろいろ説明せねばならなかった。この日政重は翌日医師と通詞が再び来て、彼の面前で豚の解剖をするのを手伝うよう希望した。この解剖は、この年には実現しなかったが、翌年政重の面前で、医師が猪を解剖し、Ambrose Pare'の本によって、すべてを詳しく教授している。』(永積 洋子：井上筑後守政重と蘭学、蘭学資料研究会研究報告、第292号(A)、81-83頁、1975年)

ここには外科の神様と尊称された15世紀ヨーロッパのアンプロワズ・パレが登場する。ちなみに、「日本人医師 Ginsouw」とは、当時幕命を奉じて長崎に赴き、オランダ医学を研究した向井元升であろう。元升は芭蕉門下のひとり向井去来の父で儒医であった。

一部が翻訳された「商館長日記」を読むと、江戸幕府の高官達は競ってオランダ商館医師の治療を受けていた。当初は年に一度商館長は江戸に参府し、将軍に拝謁することになっていたが、その一行の江戸における定宿の長崎屋には幕閣やその推薦をえた医師や高僧、謡曲師らが引きも切らずに訪れている。

かれらがこのような行動をあえてしたのは、特権的でとびきりぜいたくな流行を世間をよそに取り入れたということでも理解できるであろうか。そのような面があることは否定できないが、次のような記事をみて思わず息をのむのは私だけではないのではないか。

西暦1646年に着任した商館長ウイレルム・フェルステーヘンの日記には次のような逸話が語られている。

(1648年2月22日の記述)『代官平蔵殿が我ら婦着の十九日前に落馬して脚を折り、痛が激しいので、その求めに依り我らの外科医を派遣して接合の治療をさせた』(村上直次郎譯 長崎オランダ商館の日記 第二輯、195頁、岩波書店、1957)

代官平蔵とはその後長崎代官を世襲した末次平蔵である。彼の身边には多数の日本人医師がいたであろうにもかかわらず、骨折から19日後に商館医師の治療を乞うのである。彼に関する記述は商館日記にしばしばみられ、

日常的に商館医師の治療を受けていたことが推測される。思うに代官末次平蔵は自らの傷が骨折などをふくむものであることを自覚していたために、彼の周囲に多くいた漢方系の医師の治療をそこそこにして商館医師の治療を望んだのであろう。

この場合の平蔵の心中を忖度するに、商館医師の長所は解剖学にもとづく予後のよい治療が期待できることであつたらう。たとえそれがガレヌス流のヨーロッパ旧時代の解剖学であっても、である。ガレヌスの解剖学は彼が闘技場の医師であつたこともあって骨筋系には比較的正確であつたといわれている。平蔵は骨折に対して質の高い治療が期待できると読んだに違いない。

江戸時代初期から、わが国にヨーロッパの解剖学が流入していたことは歴史学者の間でこれまでいささか過小に評価されてきたきらいがある。わが国の漢方医学の歴史を正確に捉え、その現代的な意味を考究する作業は21世紀になってようやく始まったばかりである。今後の進展が期待される領域である。

秋葉哲生（あきば病院）

## 機能的頸部郭清術

頸部郭清術は頭頸部癌を扱うものにとって避けられない手術手技で、耳鼻咽喉科医として修得しなければならない手術のひとつである。頸部郭清術には、いろいろなバリエーションがあるが、頸部の総頸動脈や迷走神経、横隔神経を残すだけで、リンパ節を脂肪とともに胸鎖乳突筋、頸静脈や副神経ごとごとそり郭清する根治的頸部郭清術と、それらをなるべく温存する機能的頸部郭清術とに大きく分けられる。

私が入局した20年前は根治的頸部郭清術が主に行われており、その大胆な手術に圧倒されていたのを思い出す。副神経をクランプする時には肩や上腕が激しく動き、次にそれを切断した時に麻痺が生じてしまうだろうという空しさがあったが、胸鎖乳突筋を切断し頸静脈を結紮切断して脂肪とともに郭清したあとに総頸動脈や迷走神経、横隔神経が綺麗に露呈した状態をみては耳鼻咽喉科でこのような大掛かりな手術をすることに驚いたものだった。

しかし、実際に私が根治的頸部郭清術を施行した患者をフォローしていくと、肩の下垂、腕の挙上障害、頸部痛など、いろいろな障害を生じ、苦しんでいるのを目の当たりにし、この手術はかなりの犠牲を払うことになっていることに疑問を感じるようになってきた。

頸部郭清術の歴史は長く、1906年にCrileが根治的頸部郭清術を発表してから約100年の歴史がある。そ

の後、やはり神経などを温存する機能的頸部郭清術が1950年代に発表されている。しかし、根治的頸部郭清術が積極的に行われたのはやはり、癌を根絶するためにある程度の犠牲は仕方ないことと施行されてきたに違いない。10年前ぐらいの学会で機能的頸部郭清術の発表に対して、頭頸部癌に対して確立された根治的頸部郭清術があるのになにを今さら縮小手術をするのかと質問されていたことを思い出す。しかし、乳癌の乳房温存手術のように機能温存を目的とする縮小手術が今の時代の趨勢である。

6年前にカナダのトロント大学医学部耳鼻咽喉科に留学する機会を与えられ、その時に頭頸部癌の手術を多数見学することが出来た。毎週のように頸部郭清術があるのだが、根治的頸部郭清術より、機能的頸部郭清術が行われる傾向にあった。それからアメリカ耳鼻咽喉科・頭頸部外科学会のインストラクションコースで機能的頸部郭清術の講義を受講してから、私も後ればせながら5年前より本格的にこの手術に取り組んでいる。

それからの頸部郭清施行例をみると、進行癌症例が少ないこともあるが根治的頸部郭清術は1割程度となり、ほとんどを機能的頸部郭清術が占めるようになった。そのためか術後の経過は前述のような後遺症はほとんどないと言ってよいぐらい減少した。副神経や胸鎖乳突筋を温存することで郭清が甘くなるのが心配であるが、症例に対してどのような郭清が適するかよく判断すれば、術後の経過も根治的頸部郭清術と変わらないと信じている。実際、どちらに有意に成績が良いかはrandomized studyが必要になるが、未だにその報告はみられない。それは機能的頸部郭清術の郭清範囲が多岐にわたり、一つにまとめるのが難しいからかもしれない。郭清範囲は原発の腫瘍の部位、大きさやリンパ節転移の進展度によっていろいろであり、それを決めるには視診、触診、内視鏡検査や超音波、CTなどの画像診断をしっかりと行わなければならない。今後、センチネルリンパ節の探索や、分子生物学的診断が加われればさらに郭清範囲を決めやすくなることと期待している。

機能的頸部郭清術は神経、筋肉、血管を温存するために根治的頸部郭清術より手術時間がかかることが欠点である。しかし、機能的頸部郭清術のインストラクションコースでスペインのGavilan教授は“*One hour is not a high price to pay for the lifetime preservation of important structures.*”と余計にかかる時間は決して無駄ではないと述べていた。それを肝に銘じながら手術に取り組んでいる。

川浦光弘（けいゆう病院耳鼻咽喉科）

## 頭頸部癌治療において neoadjuvant 化学療法とは何であったか

医療はまさに evidence based の時代に入った。しかし、仮説 (model) の提出とその検証こそ、近代科学が拠って立つ基本原則であり、それなくして、真に有用な evidence の創出はありえないであろう。小生が携わった頭頸部癌治療のこの 20 年間は、ある学問的仮説の検証が、最も自覚的に遂行されたという意味で、医学史上まれなエポックではなかったろうか。その仮説とは、体細胞変異による耐性獲得現象に基づいた化学療法理論、いわゆる Goldie-Coldman model である。これによれば、可及的早期に化学療法を開始することが、患者の長期生存に貢献することが予想され、とりわけ、化学療法を局所治療にさきがけて開始する neoadjuvant 化学療法に、理論的根拠を与えた。80 年代はじめに cisplatin が登場すると、癌征服の夢に燃えた oncologist 達がこの領域に多く集まり、精力的に neoadjuvant 化学療法を臨床に導入していった。しかしながら 90 年代に入り、多くの無作為化対照試験の結果が集積するにしたがって、この理論の正当性を裏付ける証拠の乏しいことが、判明してきたのであった。それと軌を一にするように、我が国において、抗がん剤使用の功罪が社会問題として取り上げられ、齟齬と軋轢、混乱をみたことは、記憶に新しい。ここで仮説と検証という文脈に立ち返って、発展的な批判を試みたい。

Goldie-Coldman model は、二つの単純な命題論理から演繹される、実に単純で、数学的に比類ない美しさをもつ仮説である。二つの命題論理とは、一つは、癌細胞の耐性獲得は、抗がん剤投与に先立ってあらかじめ起こる、体細胞変異による確率的事象であること。もう一つは、微小転移巣において、癌細胞は指数関数的に増殖する、というものである。化学療法の観点からは、癌という疾患は、耐性細胞の出現により、治癒可能疾患から治癒不能疾患に、一瞬にして移行してしまう。しかし、この決定的な出来事は、二つの命題論理にしたがって数学的に計算すると、意外に早期のごく限られた期間に劇的におこりうる、というのがその骨子である。マウス白血病細胞を用いて生存曲線を調べた、Skipper の記念碑的な動物実験の結果は、この仮説にみごとな確証を与えた。

我々はまず、Goldie-Coldman model の前提となる、二つの命題論理の真偽を問うことができる。しかしながら、腫瘍巣が十分に小さいとき、細胞が指数関数的に増殖することは、腫瘍の成長を観察すれば、経験的に否定しがたい事実である。一方、耐性出現が体細胞変異によ

る確率的事象である、という命題は、十分に疑う余地はある。けれども、頭頸部の扁平上皮癌に関する限り、ある化学療法が無効になると、それ以上繰り返しても、まず効果を期待できない、つまり獲得された耐性が不可逆的である、という経験的事実があり、この命題論理を正当化しやすい (この点、乳癌等では事情は異なる。実際、昨今の乳癌の化学療法は、細胞周期による見かけ上の耐性を想定した、Norton-Simon model に根拠付けられている)。

また論理的に言えば、前提となる二つの命題論理を否定せずとも、異なる命題論理を追加することにより、仮説と結果の不一致を説明することができる。古典的には、log cell kill model がよく知られる。これは、化学療法は log cell kill であるゆえ、最後の一つの癌細胞までは死滅させられない、という化学療法限界説であるが、実験腫瘍ではあてはまらない、あるいは、微小転移のある時期に、獲得耐性によらない未知の抗がん剤抵抗性を、想定することも可能であろう。

さて、臨床の現場で実際に得られた結果は、一見意外性に富んだものであった。すなわち、neoadjuvant 化学療法により、原発巣において CR という臨床現象、つまり high log cell kill がしばしば達成される、というポジティブな事実が見られた。しかしその一方で、そうでない場合、つまり PR 以下の反応の場合には、化学療法は長期生存に貢献しない、というネガティブな結果が得られたのである。CR を見込めない化学療法を繰り返すことは、長期予後を改善する目的においては、無意味である。これはどのように解釈されるか。

議論を明快にするため、標準的な局所治療により制御されうる範囲の腫瘍構成因子を  $\alpha$  因子、制御されない範囲に存在する微小転移巣を  $\beta$  因子としよう。また、 $\alpha$  因子のみで  $\beta$  因子を含まない疾患を限局型  $\beta(-)$ 、 $\beta$  因子を含む疾患を進展型  $\beta(+)$  とする。時刻  $t$  における癌の状態を  $F_t = \{\alpha_t, \beta_t\}$  とし、診断時の状態を  $F_0 = \{\alpha_0, \beta_0\}$  とするならば、概念的に  $\beta_t = \beta(\beta_0) + \beta(\alpha)$  と記述できる。 $\beta(\beta_0)$  は  $\beta_0$  に由来する  $\beta$  成分、 $\beta(\alpha)$  は、その後新たに追加された、 $\alpha$  因子に由来する  $\beta$  成分を指す。Goldie-Coldman model は、微小転移巣を対象とした議論であることを忘れてはならない。つまり、化学療法による長期生存の利得を受けうる対象は  $\beta(+)$  型である。 $\beta(-)$  型疾患は、局所治療により治癒可能と考えられるからである。しかし、治療開始時点で両型の区別はつけられず、両型ひっくるめた全体として、長期生存の利得が得られるはずであった。したがって、model との論理的整合性を保つためには、原発腫瘍巣を含めた  $\alpha$  因子は局所制御可能であること、すなわち治癒切除可能なことが必

要条件と考えるべきであった。なぜなら、原発腫瘍巣においては、すでに指数関数的増殖期を通過して、Gompertz 型増殖を呈しているはずだからである。(ところが、臨床的な要請からは当然といえるが、neoadjuvant 化学療法は、downstaging を目的として、早くから治癒切除不能例に適応を拡大されていった。これは Goldie-Coldman model に関する仮説と検証という論理的文脈から逸脱した、異なる治療モデルと考えるべきである。これは、切除を前提とした臓器温存治療モデルにも、発展させることができる。)

さて、PR 以下の反応の場合に長期予後が改善されない、という結果は、Goldie-Coldman model により説明可能である。なぜなら、原発巣非消失部分に存在する、耐性獲得クローンに由来する  $\beta$  因子が存在していれば、化学療法による根治性は、治療開始時点で既に失われている。また  $\beta(-)$  型疾患であれば、化学療法の恩恵は考えにくいからである。真に重要なのは、neoadjuvant 化学療法が、本当に CR 反応群の長期予後を変えたのか、あるいは長期予後良好群を拾ったにすぎないのか、ということである。後者であれば、CR 反応とは単なる予後因子にすぎない。長期予後が良好な CR 反応群に、 $\beta(+)$  型疾患がどれだけ含まれていたかが、Goldie-Coldman model が成立するための、決定的な懸案事項であろう。

90 年代半ばに得られた、上咽頭癌における大規模無作為化対照試験の結果は、neoadjuvant model の信奉者に、深刻な失望をもたらしたと思われる。M0 の上咽頭進行癌の約 3 割は遠隔転移により死亡し、 $\beta(+)$  型疾患の比率が高い。化学療法感受性も高く、neoadjuvant model の試金石のような疾患と考えられた。しかし、CR 率の十分高い regimen によっても、neoadjuvant model の有効性は証明されなかったのである。一方、後に、adjuvant model の有効性がある程度示され、現在の標準治療は、放射線ないし放射線化学同時併用療法、およびそれに引き続く adjuvant 化学療法となっている。adjuvant model の neoadjuvant model に対する優位性は、Goldie-Coldman model からは演繹されない。放射線単独で開始した場合、約 2 ヶ月間  $\beta$  因子を無介入で放置してしまうことになるが、その危険より、放射線を先行させて  $\alpha$  因子制御の治療強度を高め、また  $\beta(\alpha)$  を極小化することの方が、重要であることになる。Goldie-Coldman model は、それ自体は論理的に破綻していないが、局所制御の強度を優先すべき頭頸部癌の治療モデルとしては、必ずしも有用ではない、と結論づけられよう。

neoadjuvant 化学療法は、しかし、Goldie-Coldman model を離れて、 $\alpha$  因子制御の文脈の上で生き続けた。

ひとつは、治癒切除不能癌への適応であり、(おそらくは  $\beta(-)$  型疾患において) 長期生存への貢献が示された。もうひとつは、臓器温存への貢献である。neoadjuvant 化学療法は、臓器温存という目的に、二つのしかたで貢献しようと考えている。ひとつは、手術か放射線化学併用療法か、という治療選択の決定に役立つことによる。もうひとつは、切除範囲の縮小を可能にすることによってである。後者は筆者の試みでもあるが、腫瘍辺縁部制御 (debulking) を目的とした、切除不能癌の治療モデルと類縁と考える。下咽頭?喉頭癌の治療には、喉頭機能温存という重大な課題がある。下咽頭進行癌に対する、強力な放射線化学同時併用療法の一次治療成績は、非常に良好であったが、再発率が高く、再発後の拡大切除は無力であった。原発巣の根幹部には、保存的治療に対する頑固な治療抵抗性が認められた。したがって、根幹部を含む compartment の切除が望ましいが、機能温存との両立の模索のなかで、neoadjuvant 化学療法の貢献の可能性が考えられた。患側声帯固定を伴う T3 以上の下咽頭進行癌に対しては、輪状軟骨切除が治癒切除のための必要条件である。筆者は形成外科と協力をして、輪状軟骨を切除したうえでの喉頭機能再建を模索し、切除可能な compartment を技術的に拡大してきた。放射線化学併用療法は手術をはさんで split とするか、術後に行った。 $\beta(-)$  型と思しき N2a 以下の下咽頭進行癌の high responder 数例に施行して、無再発長期生存のよい感触を得ている。

$\alpha$ 、 $\beta$  因子制御の新しい画期的な戦略として、技術的な理由で施設に限られる難点はあるが、cisplatin 大量動注化学放射線同時併用療法の導入が挙げられる。放射線領域では、重粒子線、陽子線といった特定施設での治療に加え、コンピューターによる 3 次元構築に基づいた、新しい照射法が登場しつつあるが、 $\beta$  因子制御の課題は依然として残る。

今後近い将来、診断技術の進歩により、 $\beta$  因子の有無の峻別が可能になる時代が訪れると思われる。その時、 $\beta(+)$  型疾患に対する治療として、より強力な新しい化学療法を携えて、neoadjuvant model は、再び真価を問われることになる。

田路正夫 (東京都済生会中央病院 耳鼻咽喉科)

## 世界の人々の健康

マクロスコーピックに人間集団の健康問題を考えるという公衆衛生学の立場から、世界の人々の健康状態とそこに厳然として存在する健康格差について述べてみたい。1999 年 10 月に 60 億を越えたとされる世界の人口は、

生物本来の姿である多産多死から少産少死へと人口転換の中間過程にある。即ち2001年の出生は13148万人、死亡は5655万人と推計され、7493万人の人口増加があり、2050年には世界の人口は89億人に達すると推計されている。合計特殊出生率(TFR)は2.68と減少傾向を示す一方、平均寿命は男63.9年、女68.1年と延長してきている。これらの数値は、全体としてみれば世界の人口問題は解決の兆しを示す一方、人々の健康状態も向上の方向にあることを示している。世界人口の半分は25歳未満であるが、人口の高齢化は日本を初めとする先進国に止まらない。健康水準の上昇は必然的に人口の高齢化をもたらす。世界全体でも日本と同様少子高齢化が進んでいる。特にアジア地域の高齢人口は急速に増加している。世界の60歳以上の人口は2000年の6億6百万人から2050年には19億人と3倍になると予測されている。

しかし死亡者の中で1000万人以上が5歳未満児であり、その死亡原因も呼吸器感染症、下痢症、ワクチンで予防できる疾病、マラリア等大部分が予防治療可能である。また、世界の200に近い国々の間での健康格差は、2001年の出生千人当たりの5歳未満児死亡率(U5MR)が316~3、平均寿命が男36.5~77.8年、女35.6~85.0年の間に分布しているように著しいものがあり、特にアフリカSub-Saharaの国々の健康状態が最も懸念される場所である。更に国内に置いて著しい格差を抱えている国々も多い。これらの格差は我が国の人口動態統計100年の歴史に置いて記録されている状態がこの地球の上で現存していることを示している。世界の人々の健康状態に影響を与えている要因としては、経済(貧困)、教育、ジェンダー、社会不安、戦乱等が大きい。

感染症は古今東西に亘り、人間の健康に大きな影響を与えてきているが、最近ではAIDS、結核、マラリアが特に注目されている。2001年の死亡者数は、AIDS 287万人、結核 164万人、マラリア 112万人と推計されている。古くはペスト、コレラ、天然痘に代表され、最近では新興感染症であるAIDSやSARSの流行に象徴されるように、感染症は地域に止まらず地球規模の国際問題となる可能性を常に有している。

2002年のWHOのWorld Health Reportは世界のTop 10 selected risks to healthとして、1. Underweight 2. Unsafe sex 3. High blood pressure 4. Tobacco consumption 5. Alcohol consumption 6. Unsafe water, sanitation and hygiene 7. Iron deficiency 8. Indoor smoke from solid fuels 9. High cholesterol 10. Obesityをあげている。健康に対する

危険因子として低栄養と肥満が共にあげられているように、この地球上の健康問題がいかに多様性を持っているかを示している。

以上述べたような世界の人々の間に見られる著しい健康状態の格差の解消に寄与するため、世界の先進国は、開発途上国に対して政府開発援助(ODA)を行い、また世界の多くのNGOも保健医療協力を実施している。我が国の政府レベルの保健医療協力も最近の10年間で見ても、1994年の人口・エイズに関する地球的規模問題イニシアティブ(GII)や2000年の沖縄感染症対策イニシアティブなどがあり、感染症対策や母子保健、PHC等を中心に新しい動きが見られる。一方我が国を含め先進国全体に広がるいわゆる援助疲れによるODA見直し論や国民の開発途上国に対するマイナスイメージが懸念される所である。マンパワーの面からも援助金額の面からも更に一層の充実を期待したい。

近藤健文(環境省公害健康被害補償不服審査会)

## 開業医の立場、病院勤務医の立場

私は開業医である。慶應にお世話になって早21年目、開業して9年目になる皮膚科医である。私自身も長年慶應病院勤務や出張病院の勤務医、医長も経験し、現在東京の下町で開業している身であるが、幸い先輩方のご指導もあり開業後も週一回他大学(女子医大第二病院)での外来、手術なども経験させていただいている。更に今度縁あって再び慶應病院での診療を隔週ではあるが、また診療科(漢方クリニック)は異なるが皮膚科患者(アトピー性皮膚炎)の診療に携わる機会に恵まれた。すなわち開業医の立場(いわゆる町医者)と大学病院勤務医の立場(いわゆる大学の先生)の両方の立場、目で患者の診察、治療に関わってきた若干の私なりに感じた事を述べてみたい。まずは開業医の日常から。開業とは(先生方や専門家によっても異なるかもしれないが)、毎月毎日が「外来診療」そのものである。皮膚科であるので湿疹、皮膚炎群(急性、慢性、アトピー性皮膚炎など)、白癬などを中心に毎日、毎日ご近所の方々の診察をさせていただいている。来る日も来る日もその連続である。時には小手術も施行する。時に中毒疹、薬疹やまれな疾患(類天疱瘡、天疱瘡など)にも遭遇する。悪性腫瘍も然りである。ここで開業医に問われるのはどこまでが「自分の守備範囲」かを確実に自分自身で認識する能力が必要と考えている。いつまでも治らない、あるいは診断が確定しない疾患や患者を抱え込んで症状を憎悪させる事はあってはならない事である。この判断を誤る事は開業医として許されない事と考えている。当り前の事が

当たり前のように出来る事、これがすなわち患者にとって一番良い診療、治療になる事が最も開業医として重要な事だと考えている。それからもう一つ、昔から「患者が教科書」という言葉がある。本当によく言った言葉である。開業医の立場から見ると、毎日毎日でも同じ患者を再診し、フォローアップする事が出来る。言い換えると教科書には書いていない、ほんの少しの変化でも診察時に気が付く事が出来る。臨床の場から学ぶ事が大変多いのは、開業してから実感した一番の驚きである。このように開業医の立場からは、地域住民の人々を責任を持って診療する態度と毎日毎日患者より教えていただく経験が何よりも大切な自分にとっての宝物と言えよう。

では大学病院勤務医の立場はどうか？そもそも大学病院とは医学生の研修、学問の研究及び診療の3本柱で形成されていると考えている。その中の一つとして診療の場がある。

開業医の立場（町医者）から大学病院勤務医（大学の先生）に恐れを知らずに言わせていただくと「治らない疾患も、どうにかしてほしい」との心からの願いである。良くも悪くも両方の立場から診療に携わる者として、大学病院勤務医に望む事は、「疾患の研究」と同時に研究だけでなくその研究成果が即、「臨床の場、治療」に直結する結果が強く望まれると考えている。言うは易し、行いは難しとは重々承知しているつもりだが、本当にそうになってほしい。また開業医の立場に戻ってしまったが、慶應病院と名がつくと、つくほどのその願いが切に大きくなってしまふ。

大学病院で診療に携わっている時は、何故この患者が大学へ紹介され、あるいは受診されてきたのか、そして患者が今、最も何を望んで診察を受けてられるのかを考え、診断、治療の第一歩を始める。これもしごく当り前の事である。最後になるが、今後研究と治療が当り前のように連動して、その結果が当り前に出来る慶應義塾大学病院となり、更なる発展を心より期待して話を終わりにしたい。

櫻岡浩一（櫻岡医院）

## 皮膚科とデジタルカメラ

記載皮膚科学の始祖とされる Willan 以来、皮膚科においては症状を客観視するためにいろいろな工夫がなされてきた。画家の手による精密な図譜は解剖学以来の伝統であるが、皮膚科独自のものとしては蠟細工で皮膚病変を模したムラージュがあり、これは病変の質感においては芸術的ともいえる再現性を誇っていた。ただし、これらは瞬間的にそして正確に病変をコピーしたいという

臨床家の要望をかなえるものではなかった。次に現れたのが銀塩写真であった。写真技術の発達とともに、皮膚科医にとって銀塩カメラは切っても切れないものとなった。皮膚科の臨床でもっともよく使用されたのが、リングストロボを備えた一眼レフカメラであった。これは業務用に特化しており、皮膚腫瘍など小さな病変の周囲360度からストロボを炊いて、陰影やぼけのない全てにピントがあった写真を撮影することが出来た。芸術性ばかりか立体感まで度外視されたが、記録写真として色と形をそのまま写し取ることをよしとしていた。時代は変わり、コンピュータの普及とともに画像管理から印刷、発表資料作製まで全て個人で行うことが出来るようになり、写真の分野でもデジタルカメラの利便性が認識されるようになった。

米国の統計によると、2001年から2002年にかけてニューヨークの皮膚科医（スタッフクラス）における銀塩カメラの使用率は60%から47%へ減少し、逆にデジタルカメラの使用率は25%から38%に上昇している（Dermatol Surg, 29:822-6, 2003）。デジタルカメラを使う利点は、1) その場でプリントアウト、2) 画像の汎用性、3) データベース構築、4) コストダウン、5) データ保存場所の縮小化などがあげられる。

デジタルカメラはボラロイドより高画質な画像を比較的短時間で印刷することが出来る。画像そのものがカルテ上に存在すれば、臨床所見の共有はきわめて容易となる。色素性病変の経過観察や爪白癬の治療効果判定など長期にわたって経過を追う必要があるときにはデジタルカメラは欠かせない。

画像のデジタル化は従来の35mmスライドやボラロイドカメラに比して汎用性に優れ、学会や論文への応用は言うに及ばず、ホームページ作製や遠隔診療時にも重要な役割を果たす。オリジナルデータという概念は曖昧となったが、バックアップをしてあれば万が一データが紛失してもすぐに同一のデータを復活させることが出来る。反面、サーバーのコンピュータが故障した場合、大量のデータが一瞬で消失してしまう恐れがある。

撮影した画像データはコンピュータ上でいわゆる台帳整理をする必要があるが、その際に画像管理データベースを導入することで、患者データベースを有機的に構築することができる。

デジタルカメラというと銀塩カメラに比べ高価なもので、コンピュータやプリンタも一緒に買うとなると出費が大変という印象があるかもしれない。しかし消耗品はプリンタのインクや印刷用紙程度（+電気代）で、35mmスライドやボラロイドに比べランニングコストの点でも有利であることが分かった。



マウント加工した 35 mm スライドの置き場所は悩ましい問題である。緑色のスライドケースや金属製のスライド整理棚は数年もたつと部屋の壁面を占拠してしまい、これらは捨てない限り増え続けていく。デジタルカメラでは画像ファイルの入った CD-R や DVD などメディア単位で保存すればいい。同じものを数枚ずつ作ったとしても微々たるものだ。動画技術の発達にあわせてバックアップ用メディアもどんどん長時間化している。また今後も静止画を保存するには十分余裕があるメディアが開発されるようである。

このように、デジタルカメラの利点については枚挙にいとまがないが、実際の運用や機種選びについてはいまだ決定打がなく、個々の施設で試行錯誤を繰り返しているのが実情である。

「いかに皮膚を皮膚らしい色に見せるか」

「皮膚病変の生物感をはたして再現できるか」

「小病変のアップを歪みなく写し取れるか」

「病変の存在する身体部位、病変の配列、性状などを同時に記録できるか」

これらをクリアできるデジカメを使用する必要がある。

日本の医療現場でもっとも使われてきたデジタルカメラは、ニコンの COOLPIX 900 シリーズ (現在は 4500) に代表されるスイバル式のものであったと思われる。スイバル式とはレンズユニットを 180 度以上の角度で回転させることができるタイプで、画面を見ながら自分を撮影するいわゆる自分撮りが可能なカメラである。このタイプのデジタルカメラを使うと、ファインダ

をのぞき込むことなく手術台の上から術中所見を撮影でき、側臥位褥瘡患者の患部のアップをベッドから見上げる角度で撮影することが可能となる。ニコンのデジカメは近接撮影に強く、小病変でも 10 cm 以下まで近寄って拡大像を取ることが出来る。ただし、自動焦点合わせの精度やホワイトバランスの問題、近接撮影時のフラッシュの問題などは、個々のカメラによって、またメーカーの周辺機器揃えによって異なる。

ここ数年、デジタル一眼レフカメラの開発が進み、同メーカー内で従来の銀塩カメラ用のレンズがそのまま流用できるという事で、セミプロを中心に購買層が広がってきている。デジタル一眼レフカメラでは銀塩カメラで言うところのフィルム部に当たる CCD や CMOS に大型の APS サイズのものが使用されることが多く、高画素でも十分なダイナミックレンジを得ることが出来る。皮膚科医としても予算が許せば手を出したい品々であるが、リングストロボなどのストロボ系アクセサリ類はそのままではデジタルカメラに使用できないため、細かいチューナップをしたり、あるいはデジタルカメラ専用ものを別に購入したりする必要がある。

デジタルの利点は十分行き渡っているが、実際のデジカメ撮影術やファイル管理術はまだまだ一般的ではない。皮膚科医のひいては医療業界の標準機、標準形式が確立されれば、形態学、画像診断学、遠隔医学にさらなる発展が約束されると思われる。

小川純己 (日本鋼管病院 皮膚科)

## 学会展望

### 第 8 回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会

日 時：平成 15 年 7 月 12 日（土）午後 2 時 00 分～5 時 00 分

場 所：慶應義塾大学 新教育棟 4 階 講堂 3

主 催：慶應義塾大学医学部形成外科学教室同窓会

事務局：慶應義塾大学医学部形成外科学教室内

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

14：00－14：40 症例報告 座 長 宮 坂 宗 男

14：40－15：30 特別講演「ヒト培養軟骨細胞の臨床応用」 座 長 中 嶋 英 雄  
矢永クリニック 矢 永 博 子

15：30－15：40 休憩

15：40－16：20 基礎研究 座 長 金 子 剛

16：20－17：00 手術手技・工夫 座 長 福 積 聡

14:00~14:40 症例報告

座長: 東海大学形成外科 宮坂宗男

1. 腫瘍切除後、下顎体部仮骨延長を行った一症例

慶應義塾大学形成外科, 東京歯科大学矯正科\*

○大西文夫, 緒方寿夫, 彦 坂信  
吉川嘉一郎, 佐藤博子, 矢澤真樹  
中島龍夫, 坂本輝雄\*, 一色泰成\*

高齢者、腫瘍切除後などの二期的仮骨延長例では、症例・条件に応じて治療成績は一定しないことが予想される。今回、下顎腫瘍切除後下顎体部～下顎枝欠損例に対して、体部仮骨延長治療を行い、延長部骨形成の遷延を経験した。臨床経過、組織所見より成人例での仮骨延長および延長部の骨形成に関して若干の知見を得たので報告する。症例は、55歳女性、下顎体部に二本の骨延長器を平行に装着し、延長方向を規定しつつ約25mmの骨延長を行った。延長終了後4ヶ月目、臨床的には延長部の骨形成は得られていないものの、延長器を除去しプレートによる固定保持を行った。延長部の病理組織所見は標本の一部に延長方向に平行した繊維性の骨化など、膜様骨の仮骨延長に典型的な組織所見が観察された。このため順調な骨形成が行われているものと判断しその後の骨形成を待機することとした。延長終了後10ヶ月目、画像上骨形成が認められ、下顎枝欠損に対して血管柄付き肩甲骨移植を施行した。同手術時の肉眼所見でも延長部の骨化が確認された。本症例は、成人例の仮骨延長部の骨形成には相応の期間を要する可能性を示した。今後、的確な治療計画を立てるためには、延長部骨形成を促すような工夫が必要であることを示唆するものと思われたので報告する。

(質疑応答)

Q 宮坂: 1次手術の後、再建は行ったのか。

A 緒方: 行っていない

Q 谷野: 本例では1日1mmの延長を行っており小児と同じ速度であるが、変化させなくてよいのか。

A 緒方: 延長の連続性を重視して、1日2回に分けて延長を行ったが、速度に関しては明確な文献にもとづいて決定した訳ではない。

Q 金子: 延長後の固定期間に関しては、長い方がよいか、それとも早期に負荷をかけたほうが強度が増すと考えているか。

A 緒方: 現在検討中である。確かに、固定の悪い症例でも骨の十分な強度が得られるような場合もあり、興味深い問題である。

2. 二分脊椎に合併した難治性足底潰瘍の一例

東海大学形成外科

○市川広太, 宮坂宗男

二分脊椎は胎生初期の神経管形成閉鎖障害に由来し、生下時より下肢の運動及び知覚障害が生じるため、障害レベルに関連して様々な下肢変形が発生する。また、足部変形と知覚障害のために、歩行が可能な例では足底に潰瘍を合併しやすい。変形の治療及び予防のため、整形外科医による矯正手術が施されるが、手術後も荷重面が残るため、潰瘍が発生することがあり治療に難渋する。足底の潰瘍では、創閉鎖のみならず荷重に十分耐えられる皮弁での再建が必要であり、文献的には同部の再建には長期的に見ても内側足底皮弁が最も適しているといわれる。しかし、矯正手術により既に後脛骨動脈が損傷されている場合は適応がない。二分脊椎患者に生じた難治性の慢性足底潰瘍で、既に後脛骨動脈が損傷されているため内側足底皮弁が使えない症例を経験したので、その治療経過について考察を加え報告する。

(質疑応答)

Q 中島: 本例の根本原因は知覚障害にある。知覚皮弁などを用いる他、内科的補助療法が必要であると考えます。

A 市川: 同意見である。

Q 佐藤: 中足骨の突出がある場合、切除したほうが良いのか。

A 谷野: \*関節リウマチにおいてよく行うが、中足骨の骨頭を全切除する方法があり効果的である。

Q 中嶋: 回転皮弁の縫合線が荷重部に一致したことが再発の原因になっていると考える。

3. 軟部巨細胞腫の一例

東海大学形成外科

○市川広太, 谷野隆三郎

悪性軟部巨細胞腫 (giant cell tumor of soft parts) とは、Guccion と Enzinger により 1972 年に初めて明瞭に記載された比較的稀な腫瘍で、腱鞘巨細胞腫とは異なり腱鞘との関連がなく、核異型性を示し高率に局所再発や転移を起こすと報告されている。しかしその中には予後良好な群が含まれており、その診断には難渋することが多かった。近年、こうした境界悪性群は、伝統的な悪性軟部巨細胞腫とは組織学的に明らかな相違点があり、骨巨細胞腫の類似腫瘍であることが報告されはじめた。肉腫ほどの多形性は無いが、軽度の異型性と多数の核分裂像を呈した軟部巨細胞腫を経験したので、境界悪性群について考察を加え報告する。

## 4. 臍欠損に対する臍形成術の4例

清瀬小児病院形成外科, 慶應義塾大学形成外科\*  
国立成育医療センター形成外科\*\*

○玉田一敬, 中島龍夫\*, 緒方寿夫\*  
大西文夫\*, 三澤典弘\*, 金子 剛\*\*

臍形成術は臍ヘルニア・臍突出に対する臍形成術が大半であり, 臍欠損に対する造臍術は比較的少ない。前者では自然な皺を持った臍の形成が要求されるのに対し, 後者では十分な深さを持った臍の形成が要求される点に困難を要する。最近我々は清瀬小児病院にて計4例の臍欠損症例を治療する機会を得た。内2例は腹壁破裂術後であり, 2例は臍帯ヘルニア術後であった。術式としては3例に対し宇田川らが1995年に報告した瘻痕皮弁を用いた方法を行い, 良好な結果を得ることができた。また, 残り1例には植皮を用いた手術を行い, 良好な結果を得た。各症例の概要を供覧し, 今回の治療経験から得た臍欠損症例に対する手術手技の適応, 要点及びピットフォールについて考察する。

(質疑応答)

Q 宮坂:

- (1)皮弁と植皮の使い分けは
- (2)臍の位置決めはどう行うか

A:

- (1)腹膜までの距離が短い場合は皮弁, 長い場合には植皮を使用している。
- (2)鬼塚らによる, 身長を基準にした式を用いて計算した。

Q 金子: 幼児においては皮下脂肪が少なく, 植皮法は適応になる場合は少ない。このように, 臍欠損症においては年齢要素を加味する必要があるが, その点に関しては意識しているか。

A: 症例ごとに検討している。

14:40~15:30

特別講演「ヒト培養軟骨細胞の臨床応用」

座長: 慶應義塾大学形成外科 中嶋英雄  
矢永クリニック 矢永博子

私達は僅かの耳介軟骨片からヒト軟骨細胞を迅速かつ大量に培養して正常な軟骨細胞を得ることに成功した。ついで *in vitro* で未熟な軟骨細胞に matrix を形成させてゲル状塊 (mass) とした。この方法では多くの培養軟骨細胞塊が得られるため, 従来 tissue engineering で用いられてきた artificial matrix となる scaffold を用いなくて, ヒトへの臨床応用が可能となった。

【方法】耳介後部から約  $1\text{ cm}^2$  の軟骨を採取し, collagenase 処理し, 軟骨細胞の feeder cell (CS21) を用い軟骨細胞の初代培養おこない, 次に継代培養において2~3代目の軟骨細胞を重層ゲル化培養した。培地は F-12 培地と DME 培地を等量混合したものに 10%FBS もしくは自己血

清, 増殖因子として hydrocortisone, insulin growth factor, FGF を添加した。つぎに1症例あたり, matrix を形成したゲル化した軟骨細胞塊  $2.5\text{--}10\text{ cc}$  (1 cc あたりの軟骨細胞数  $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8\text{ cell/cc}$ ) を作製した。対象症例は隆鼻, 頭蓋変形, 顔形成など12症例である。

【結果】我々の培養方法では matrix を含むゲル状の軟骨細胞が大量に作製可能であった。ゲル状の軟骨細胞を鼻, 頭蓋陥凹変形部, chin の皮下剥離部に injection することができる。また, ゲル状の軟骨細胞の利点は移植当初は柔らかいゲル状態で7~10日後に硬い軟骨組織となるのでその期間に外固定を行うことにより, 形態を整えることができることである。この結果, 移植部の形態, contour は優れ, 良好な aesthetic results が得られた。

【考察】これまで, facial augmentation には腸骨や肋軟骨などの移植が行われてきたが, donor の痛みや侵襲が大きかった。培養軟骨細胞移植法が確立されれば侵襲のすくない手術として有用であると考えられた。また, 新しい移植材料として頭蓋顔面領域に幅広く臨床応用ができると考えられた

15:30~15:40 【休憩】

15:40~16:20 基礎研究

座長: 国立成育医療センター形成外科 金子 剛

## 5. ラット骨髄由来間葉系幹細胞の分化能の差異

国立東京医療センター形成外科, 慶應義塾大学形成外科\*, 静岡赤十字病院形成外科\*\*

○佐藤博子, 貴志和生\*, 久保田義顕\*  
中島龍夫\*, 田中 宝\*\*

【目的】私たちはラットの間葉系幹細胞より単一細胞をクローニングし, その分化能の差異につき検討を行った。またラットの創に同細胞を局注し, 創に与える影響を検討した。

【方法】成獣 F344 オスラットの大腿骨より骨髄を採取し, 100種類の単一由来細胞をクローニングした。これらそれぞれの細胞を脂肪, 軟骨, 筋細胞への分化を誘導する培養液で培養した。28日目に免疫染色を行い, 分化能の評価を行った。また, 特に分化能の高い細胞をラットの切開創に局注した。

【結果】1種類の細胞において, 著名な脂肪細胞, 軟骨細胞, 筋細胞への分化が観察された。ラットの創にポリクローナルな細胞を局注することで瘻痕形成は抑制されたが, クローニングされた細胞の瘻痕形成の抑制効果は小さかった。

【考察】ラットの間葉系幹細胞には多種類の細胞が混在しており, その分化能に差異があることが確認された。また, 瘻痕形成抑制には複数の種類の細胞が必要であると考えられた。

(質疑応答)

Q 木村: 創を作成する以前に局所注射を行っているのはなぜ

か。

A 佐藤：細胞数を正確にコントロールするためである。

6. 上顎 buttress 再建の構造力学的意味について

慶應義塾大学形成外科，国立成育医療センター形成外科\*，慶應義塾大学看護医療学部\*\*

○永竿智久，中島龍夫，金子 剛\*  
小林正弘\*\*

【目的】悪性腫瘍の上顎骨浸潤症例においては，腫瘍切除にあたり上顎部分切除が行われる場合がある。その結果生じた組織欠損は，遊離皮弁を用いて再建されることが多い。またこの際に皮弁に肋骨などの骨を含め，頬骨と健常側上顎骨とを橋渡しする“buttress”の再建を行えば，再建後の頬部の陥凹変形および鼻翼部の下垂を予防することができ，良好な整容的結果を得ることが可能となる。しかし，“buttress”の再建が上顎に発生する咬合負荷に対していかなる影響を与えるかについての報告は未だなされていない。本研究は再建上顎における“buttress”の構造力学的影響を調査する目的で施行された。

【材料と方法】乾燥上顎骨標本を基準として，CADにより正常上顎モデルの作成を行う。さらにPC上でシミュレーションサージェリーを行い，上顎骨半切モデル・肋骨を用いた上顎再建モデルを作成する。これら3種類のモデルの健常側臼歯部にチタニウムよりなるインプラントを鼎立し，垂直方向に300N，水平方向に50Nの負荷をそれぞれ加える負荷実験を施行する。有限要素プログラムを用いて各モデルにおける発生応力を解析し，モデル間にて結果を比較検討する。

【結果】垂直方向負荷発生時には3モデル間にて応力分布の発生パターンは類似していたが，水平方向負荷時には上顎半切モデル・再建モデル・正常上顎モデルの順で応力が分散する傾向が認められた。

【総括】骨性組織による“buttress”再建は，臼歯部に鉛直方向負荷が作用した場合における応力発生パターンには大きな影響を与えない。しかし，同部に側方負荷が作用した場合の上顎の力学的挙動に関しては，変化を生じさせることが確認された。

7. 多血小板血漿作成におけるプロスタグランジンの有用性について

栃木県立がんセンター形成外科，慶應義塾大学形成外科\*，慶應義塾大学輸血センター\*\*，国立成育医療センター形成外科\*\*\*

○矢澤真樹，緒方寿夫\*，小山太郎\*  
中島龍夫\*，渡辺直英\*\*，半田 誠\*\*  
木村章子\*\*\*

近年，骨形成や創傷治癒の場で必要とされる各種成長因子(GF)の研究が進み，PDGF，b-FGFなどの製剤はすでに市販・臨床応用されている。一方，こうしたGFの臨床の場

における供給源として患者自身の血小板を高濃度に分離採取した多血小板血漿(Platelet Rich Plasma: PRP)が注目され，臨床応用する試みが散見される。私たちは，これらPRPのDDS(Drug Delivery System)を期待した担体の検討から，骨形成，皮膚創傷治癒への影響を*in vivo*で明らかにする一方で，PRPに含まれる成長因子の収集効率を上げる手法を工夫し，血小板沈殿物を再浮遊させる手法\*PPR(Precipitated Platelet Resuspension)の有用性を示してきた。今後，臨床検討を開始する段階に至り，われわれがPRPの調整法として提案するPPRの性能を示しながら，作成法の実際と品質調整におけるプロスタグランジンの重要性について報告し，共通プロトコールによる臨床応用への枠組みの必要性を提案する。

\*PPR: Yazawa M, Ogata H, Nakaima T, Mori T, Watanabe N, Handa M Basic Studies on the Clinical Applications of Platelet-Rich Plasma. Cell Transplant, 12, 2003 in press.

(質疑応答)

Q 金子：他にPGを使用している施設は存在するか。

A 当施設のみである。

Q 金子：血小板1細胞あたりに含有される成長因子量にばらつきはないのか。

A 海外文献によれば，大体共通している。

8. 皮膚縫合創への多血小板血漿 (PRP) の応用

国立成育医療センター形成外科，栃木県立がんセンター形成外科\*，慶應義塾大学形成外科\*\*，慶應義塾大学輸血センター\*\*\*

○木村章子，矢澤真樹\*，緒方寿夫\*\*  
中島龍夫\*\*，渡辺直英\*\*\*，半田 誠\*\*\*

【目的】各種成長因子(b-FGF, TGF-β, EGF, PDGFなど)の皮膚創傷治癒への寄与を検討する報告は少ない。これらの成長因子を多く含む多血小板血漿の皮膚創傷治癒への寄与を検討するため，ラットの縫合創をモデルとして実験を行った。

【方法】ラット背部に作成した2本の線状創(皮膚全層，長さ6cm)を縫合創モデルとした。ラットは2群にわけ，1つ目の群では，1本は単純縫合のみ，もう1本には縫合前に創縁側壁にフィブリン糊を塗布し(n=15)，2つ目の群では，片方に縫合前に前述の如くフィブリン糊塗布，もう一方にはPRP含有フィブリン糊を同様に塗布した(n=15)。縫合および上記処置後，3・7・14日後にそれぞれの縫合部皮膚を検体として採取し，組織形態の検討，および各群内の2つの創で張力(breaking strength)を比較検討した。使用したPRPは，同系ラット15匹より得た35mlの全血から既報の方法で作成した。

【結果】張力測定の結果は，14日目に，縫合のみに対して

フィブリン塗布創が、またフィブリン塗布に対してPRP塗布創が、有意に張力を増していた。組織所見は、PRP塗布創は他2つの創に比べ、7日目で表皮基底層の再生の進行と、真皮層での成したコラーゲン組織の増加が認められた。また、14日目で、PRP塗布創では深層で新生血管が多数認められた。

【考察】PRPは、皮膚線状創の治癒過程において、なんらかの影響を及ぼすことが確認された。

(質疑応答)

Q 玉田：7日目に有意差が存在せず、14日目になり初めて有意差が出現するのに、“早期”というの適切ではないと思う。

Q 金子：Fibrin糊は実験の間中付着しているのか。

A 付着している。

16：20～17：00 手術手技・工夫

座長：立川共済病院形成外科 福積 聡

### 9. 胸背動静脈をinterpositional graftとして利用した遊離血管柄付き肩甲骨移植の試み

国立成育医療センター形成外科

○佐久間恒, 木村章子, 金子 剛

血管柄付き肩甲骨移植は骨への血行が良好であると同時に、十分な厚みと強度が得られることから、インプラントの植立を考慮した上下顎硬性再建に適している。しかし、特に上顎再建においては、肩甲骨下動静脈まで用いても血管茎の長さが不足することが多く、移植床血管や血管茎を通すルートを選択を工夫したり、静脈移植が必要とされてきた。今回われわれは、遊離血管柄付き肩甲骨移植による上顎歯槽堤再建において、肩甲骨の栄養血管である肩甲骨回旋動静脈と移植床との間に胸背動静脈を間置することで、血管茎の十分な延長を行うことができた。この方法の利点としては(1)同一術野内でグラフトの採取が可能であり、ドナーの犠牲が少ないこと、(2)動脈は動脈で、静脈は静脈で置換するため生理的であること、(3)十分な長さが得られ、口径の選択がある程度可能となること、(4)前鋸筋枝の分岐部を用いて骨弁の血管茎との口径差を調節し得ること、(5)あらかじめ胸背動静脈の遠位に骨弁の栄養血管を吻合することで阻血時間の短縮が図れること、などが挙げられる。欠点としては血管吻合箇所が増えることによる術後血栓のリスクの増大や手術時間の延長などが挙げられる。以上の方法を用いた実際の症例を供覧し、文献的考察を加えて報告する。

(質疑応答)

Q 一色：成長期の小児においては再建を行わないと上顎の変形が著名になる。本実験はそのことをも立証した意義があると思う。

### 10. 網状植皮術におけるフィブラストスプレーの効果

静岡赤十字病院形成外科

○田中 宝, 玉田一敬, 服部典子

網状植皮術は採取する皮膚が節約できることに加え、植皮床に感染を併発し浸出液が多い場合や植皮床が複雑な形をしている場合でも良好な生着が得られるという利点を有する。しかし、シート植皮に比べ整容的に劣ること、創治癒に時間がかかること、収縮の程度が強いことなどの欠点を有している。われわれは網状植皮部に術後1日目よりヒトb-FGF製剤(フィブラストスプレー、科研製薬)を連日噴霧する事によりこれらの欠点が改善されるか試みた。

症例1：58歳男性、左足背熱傷、苛性ソーダにて左足関節部熱傷受傷後、他院にて約2ヶ月間保存的に治療受けるが、改善しないため当院紹介となった。創部は膿性の浸出液をみとめ、コントロール不良の糖尿病が基礎疾患にあった。血糖コントロールとデブリードマンを施行後植皮術を施行した。植皮部は約1週間で上皮化終了し拘縮を残さなかった。

症例2：78歳男性、閉塞性動脈硬化症による左足潰瘍。度々足背部に潰瘍を形成し保存的に治療されていたが難治性であった。術前よりフィブラストスプレーを使用した。術当日も肉芽はやや不良であった。しかし植皮後良好に経過し治癒した。

症例3：74歳男性、壊死性筋膜炎による右下腿皮膚壊死。創部にMRSA感染認めた。深筋膜を含めてデブリードマン施行後分層植皮術を施行した。植皮時は創部の陥凹が著明であったが上皮化と同時に陥凹の改善を認めた。

症例4：44歳男性、血液透析用内シャント造設術後創し開。露出血管周囲に肉芽の増生を認めた後植皮術を施行した。7日目にほぼ上皮化が終了した。感染創に対しては網状植皮が適応となるが、フィブラストスプレーを併用することにより①植皮の生着が良くなる②上皮化が促進される③網目状の肥厚性癬瘡が抑制される④感染のコントロールが容易⑤植皮部の陥凹が改善するなどの効果が得られた。

### 11. 外傷性耳垂裂の修復手術

しぶや道玄坂形成クリニック、名古屋形成クリニック\*

○西澤明親, 上 敏明\*

外傷性耳垂裂はピアス装着による合併症として日常我々が遭遇する機会が多い。重いピアスの装着や脱衣時の引っ掛かりにより無理な外力が加わることで耳垂が裂け、耳垂裂となるものと推察される。耳垂は顔面の一部とも言え、目立つ部分であり、その修復に際し整容的に配慮した手術法が要求される。最近、我々は外傷性耳垂裂の修復手術において、耳垂の表面は直線法、裏面にはZ形成術を行い良好な結果を得ている。本報告では手術法の詳細と共に若干の文献的考察を加えたい。

(質疑応答)

Q 金子：耳後面に形成したZ皮弁の大きさが相違している症例があるが、なぜか。

A 裂が非対称である場合が多いためである。

12. 両側不完全唇裂—デザインの違いによる術後評価—  
慶應義塾大学形成外科

○彦坂 信, 中島龍夫, 大西文夫  
玉田一敬, 佐久間恒

我々は過去23年間に193例の両側性唇裂の手術を行った。このうち最初の14年間は小三角弁法、後の9年間は直線法に基づく術式にて行われた。現在ひろく採用されている両側性唇裂の手術では、上唇結節の形成を外側唇からのmucocutaneous flapで行っており、この方法では人中部のwhite roll直上に横方向の目立ちやすい術後瘢痕が生じる。そこで我々は、外側唇からはmucosal flapを挙上し、横方向の縫合線をvermilion borderの下端に一致させる術式の

変更を考案し、現在これを広く両側性唇裂の症例に適応している。今回、我々は、この術式の有効性を、比較的変形の程度が均一である両側対称性不完全唇裂の症例に限定してその経過観察した外観から評価し、新たな術式にてより目立ちにくい術後瘢痕を生じるとの結果を得たので、ここに報告する。

(質疑応答)

Q 大城：なぜ3例のみ行ったのか。

A 調査の材料となる写真が完備している症例が不足していたからである。

Q 谷野：東海大学では2年前よりMulliken法を導入しているが、横方向の傷が目立つとは思わない。術後2年以上経過してさらに瘢痕が目立つことがあると考えられるのか。

A 中島：症例数が少ないのではっきりとしたことは言えないが、術後経過とともに瘢痕が明確化してくる傾向があるように思える。

慶 應 医 学

第 80 卷 総 目 次

平 成 15 年

Journal of The Keio Medical Society

Volume 80

2003



## 第 1 号

### 綜 説

最近の慢性透析療法の動向 .....黒田 重臣.....( 1)

### 学 会 展 望

第53回慶應義塾大学伊勢慶應病院医学会 .....( 9)

### 学 位 論 文

慢性心房細動症例に対する電氣的除細動後の心房電気生理学的指標の変化 .....佐藤 俊明.....(T 1)

日本人のケラトエピセリン関連角膜ジストロフィの分子遺伝学および免疫組織学的解析 .....小西美奈子.....(T13)

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

### 号 外

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

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

## 第 2 号

### 綜 説

甲状腺・副甲状腺腫に対する低侵襲性外科治療 .....高見 博・池田 佳史・田島 敏吾.....( 17)

高齢化社会における医療経済を考慮した未病対策 .....都島 基夫.....( 23)

体幹部定位放射線治療 .....国枝 悦夫・武田 篤也・久保 敦司.....( 33)

### 学 会 展 望

第 7 回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会 .....( 37)

第26回慶應外科フォーラム総会抄録集 .....( 45)

慶應医学会平成 14 年度庶務・会計報告 .....( 49)

### 学 位 論 文

炎症性サイトカインの混合投与によるラット視床下部室傍核における

一酸化窒素代謝産物の変化 .....脇田 哲矢.....(T39)

Phorbol myristate acetate 惹起性胃潰瘍における nuclear factor kappa B と

tumor necrosis factor- $\alpha$  の役割 .....竹内 哲.....(T51)

運動およびその中止が骨量におよぼす影響 .....島村 知里.....(T63)

レチノイン酸によるトロンボポイエチン発現促進機構

—分化誘導療法による血小板増多症例からの考察— .....金城謙太郎.....(T73)

Prostate-specific membrane antigen (PSMA) promoter/enhancer を用いた

組織特異的自殺遺伝子治療 .....内田 厚.....(T85)

全身麻酔と自律神経機能の変化—心拍変動変化からみた前投薬硫酸アトロピンと

揮発性吸入麻酔薬セボフルランの影響— .....中塚 逸央.....(T101)

マクロファージ由来の nitric oxide による肝細胞酸化的 DNA 傷害の検討 .....渡部 直行.....(T111)

新生ラット摘出脳幹—脊髄標本における延髄呼吸中枢に対する橋の影響 .....伊藤 洋子.....(T123)

卵巣癌腹膜播種形成における MUC 1 ムチン分子の役割 .....玉田 裕.....(T133)

ウィルムス腫瘍の WT 1 遺伝子変異と組織型および化学療法反応性に関する研究 .....柴田 理恵.....(T149)

### 号 外

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

### 第 3 号

#### 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背痛におよぼす効果 ……………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 4 号

#### 綜 説

- 漢方医学におけるEBM (Evidence-based medicine) の現状 ……………秋葉 哲生……(125)  
記憶はどのようにして形成されるか?—最近の話題 ……………柚崎 通介……(131)

#### 原 著

- 正常組織由来色素細胞と母斑組織由来色素細胞のE-cadherinにおける細胞遊走能の差異 ……………松田 就人……(141)

#### 話 題

- 重症肝損傷の治療の変遷—Damage control surgery— ……………北野 光秀……(151)  
アトピー性皮膚炎の漢方治療 ……………荒浪 暁彦……(152)

動物実験に関連する法規の見直しと研究者の責任	前島 一淑	(152)
江戸の解剖学	秋葉 哲生	(154)
機能的頸部郭清術	川浦 光弘	(155)
頭頸部癌治療において neoadjuvant 化学療法とは何であったか	田路 正夫	(156)
世界の人々の健康	近藤 健文	(157)
開業医の立場, 病院勤務医の立場	櫻岡 浩一	(158)
皮膚科とデジタルカメラ	小川 純己	(159)

### 学位展望

第8回慶應義塾大学形成外科同門会学術集会抄録集		(161)
第80巻総目次		(167)
Key Word 索引		(171)
著者名索引		(173)

### 学位論文

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	(T279)
ラット小腸粘膜上皮細胞における GRO/CINC-1 と Interleukin-6 の産生:		
脂肪酸による修飾	吉田 英雄	(T287)
粘膜固有層リンパ球の小腸微小血管における接着の生体観察	藤森 斉	(T297)
培養アストロサイトにおける c-Met の産生と分泌性因子によるその調節	島崎 賢仁	(T311)
高血圧自然発症ラットにおける腎交感神経活動と血圧および腎血流量の関係に関する研究	佐方 克史	(T323)
アデノウイルスベクターを用いた疑核への GDNF 遺伝子導入による		
運動ニューロン脱落防止効果の検討	齋藤康一郎	(T337)

### 号 外

博士(医学)学位論文—内容および審査要旨— (第170号)		(別頁)
-------------------------------	--	------

# Key Word 索引

第 80 卷 2003

## A

8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG).....(2) T111  
A5 neurons .....(2) T123  
accuracy.....(3) T177  
acute promyelocytic leukemia .....(2) T73  
adenovirus.....(4) T337  
adhesion molecules .....(4) T297  
adult-type atopic dermatitis .....(3) 95  
alcohol .....(3) T247  
all-*trans* retinoic acid .....(2) T73  
arteriosclerosis.....(4) T279  
astrocyte .....(4) T311  
atrial effective refractory period .....(1) T1  
atrial fibrillation.....(1) T1  
atropine .....(2) T101  
Avellino corneal dystrophy .....(1) T13

## B

bisphosphonates .....(3) 71  
Boyden chamber .....(4) 141  
brain injury .....(4) T311

## C

carbohydrate .....(2) T133  
cerebellum.....(4) 131  
chemical laboratory tests .....(3) 105  
chemosensitivity .....(2) T123  
chemotherapy .....(2) T149  
Chinese medicine .....(4) 125  
cholesterol esters.....(4) T279  
c-Met .....(4) T311  
coherence .....(4) T323  
conservative treatment.....(3) 77  
CT measurements .....(3) T177  
cyclooxygenase .....(3) T225  
cytokine .....(4) T311  
cytosine deaminase .....(2) T85

## D

decocted Chinese herbal medicine .....(3) 95  
deconditioning .....(2) T63  
diabetes mellitus .....(4) T279  
dialysis therapy .....(1) 1  
DNA damage .....(2) T111

## E

EBM .....(4) 125  
E-cadherin .....(4) 141  
electrical cardioversion.....(1) T1  
endotoxin .....(3) T247

## F

fatty acid .....(4) T287

## G

GDNF .....(4) T337  
gene polymorphism .....(1) T25  
glutamate receptor .....(4) 131  
granular corneal dystrophy.....(1) T13  
GRO/CINC-1 .....(4) T287

## H

heart rate variability .....(2) T101  
hyperlipidemia .....(1) T25  
hypertension.....(4) T323

## I

*in vivo* .....(2) T85  
insulin resistance .....(1) T25  
interleukin-6 .....(4) T287  
intestinal epithelial cell.....(4) T287  
intestinal mucosal permeability .....(3) T247  
intraatrial conduction time .....(1) T1

## J

joint instability .....(3) 77

WT1 gene .....(2) T149  
Wilms tumor .....(2) T149

W

vasodilation .....(3) T239

V

type 2 diabetes mellitus .....(1) T25  
TNF- $\alpha$  .....(1) T25  
thrombopoietin .....(2) T73  
thrombocytosis .....(2) T73  
TGF $\beta$  gene .....(1) T13

T

sympathetic nervous system .....(4) T323  
superoxide radicals .....(3) T239  
suicide gene therapy .....(2) T85  
stroke .....(3) 87  
stereotactic radiotherapy .....(3) T177  
splenic macrophage .....(2) T111  
spectral analysis .....(4) T323  
sevoflurane .....(2) T101

S

respiration .....(2) T123  
re-locatable frame .....(3) T177  
rehabilitation medicine .....(3) 65, 87  
regeneration .....(4) T311  
reference range .....(3) 105  
reconstruction .....(3) 77  
radiotherapy .....(2) 33

R

PSMA enhancer .....(2) T85  
prostate cancer .....(2) T85  
pons .....(2) T123  
polymorphism (genetics) .....(4) T279  
platelet .....(2) T73  
pigmented cell .....(4) 141  
peroxynitrite .....(2) T111  
peritoneal dissemination .....(2) T133

P

ovarian neoplasms .....(2) T133  
osteoporosis .....(3) 71

O

nucleus ambiguus .....(4) T337  
nonlinear analysis .....(4) T323  
nitric oxide .....(2) T111, (3) T239  
nevus .....(4) 141

N

mucin core peptide (MUC) .....(2) T133  
MUC1 .....(2) T133  
motoneuron .....(4) T337  
migration .....(4) T297  
migration .....(4) 141  
microvessels .....(4) T297  
memory .....(4) 131  
melanin .....(3) T239  
medical education .....(2) 65  
medical economics .....(2) 23  
MAPK .....(4) T287

M

lung cancer .....(2) 33  
long-term potentiation .....(4) 131  
long-term depression .....(4) 131  
locus coeruleus .....(2) T123  
liver injury .....(3) T247  
ligament .....(3) 77  
L-DOPA .....(3) T239  
lattice corneal dystrophy .....(1) T13  
laryngeal paralysis .....(4) T337  
lamina propria lymphocytes .....(4) T297

L

knee joint .....(3) 77  
kerato-epithelin .....(1) T13

K

# 著者名索引

第 80 卷 2003

**A**  
秋葉 哲生 ……………(4) 125, 154  
青木 芳和 ……………(3) 105  
荒波 暁彦 ……………(4) 152

**F**  
藤森 斉 ……………(4) T297

**G**  
五内川里子 ……………(3) 105

**H**  
星野 達 ……………(3) 112

**I**  
池田 佳史 ……………(2) 17  
今村 ちさ ……………(3) 105  
石橋みどり ……………(3) 105  
石田 浩二 ……………(3) 105  
石井 達哉 ……………(1) T25  
伊藤 洋子 ……………(2) T123

**K**  
加野象次郎 ……………(3) 105  
川浦 光弘 ……………(4) 155  
菊池 春人 ……………(3) 105  
木村 彰男 ……………(3) 87  
金城謙太郎 ……………(2) T73  
岸川 浩 ……………(3) T213  
北村 正幸 ……………(3) T177  
北野 光秀 ……………(4) 151  
小林 幸 ……………(3) T239  
小林 照明 ……………(3) 105

近藤 健文 ……………(4) 157  
小西美奈子 ……………(1) T13  
高加 国夫 ……………(3) 105  
小山 卓史 ……………(3) 111  
久保 敦司 ……………(2) 33  
久保田英司 ……………(3) T257  
国枝 悦夫 ……………(2) 33  
黒田 重臣 ……………(1) 1

**M**  
前田 典子 ……………(3) T163  
前島 一淑 ……………(4) 152  
正門 由久 ……………(3) 87  
松田 就人 ……………(4) 141  
松本 秀男 ……………(3) 77  
目黒 周 ……………(4) T279  
宮崎 直子 ……………(3) 105  
守本 倫子 ……………(3) T269

**N**  
中塚 逸央 ……………(2) T101  
野村 栄貴 ……………(3) 111

**O**  
小川 純己 ……………(4) 159  
小口 修司 ……………(3) 105  
大田 哲生 ……………(3) 87  
小澤 伸晃 ……………(3) 113

**S**  
齋藤康一郎 ……………(4) T337  
佐方 克史 ……………(4) T323  
櫻岡 浩一 ……………(4) 158  
佐々木昭子 ……………(3) 105

佐藤 俊明 ……………(1) T1  
関口 仁 ……………(3) 105  
柴田 理恵 ……………(2) T149  
島村 知里 ……………(2) T63  
島崎 賢仁 ……………(4) T311  
須藤 遥 ……………(3) T187

**T**  
田路 正夫 ……………(4) 156  
田島 巖吾 ……………(2) 17  
高見 博 ……………(2) 17  
武田 篤也 ……………(2) 33  
武井 泉 ……………(3) 105  
竹内 哲 ……………(2) T51  
玉田 耕一 ……………(3) 95  
玉田 裕 ……………(2) T133  
玉井 博修 ……………(3) T247  
徳山 博文 ……………(3) T225  
都島 基夫 ……………(2) 23

**U**  
内田 厚 ……………(2) T85

**W**  
脇田 哲矢 ……………(2) T39  
渡邊 清明 ……………(3) 105  
渡部 直行 ……………(2) T111

**Y**  
山中 一良 ……………(3) 114  
吉田 英雄 ……………(4) T287  
柚健 通介 ……………(4) 131

## 雜 報

### 慶應医学会例会第 1324 回

日 時 平成 15 年 9 月 9 日(火) 午後 5 時  
 場 所 新教育研究棟 講堂 1  
 演 題 A novel dendritic cell-based vaccine for cancer  
 演 者 Mark C Udey, MD, PhD  
 Chief, Dermatology Branch, Center for Cancer  
 Research, National Cancer Institute, NIH,  
 Bethesda, MD, USA  
 担 当 皮膚科学教室

### 慶應医学会例会第 1325 回

日 時 平成 15 年 9 月 10 日(水) 午後 7 時  
 場 所 新教育研究棟 講堂 3  
 演 題 Influence of the coracoacromial morphology  
 during shoulder elevation : a cadaveric study  
 演 者 Juan Armengol Barallat, MD, PhD  
 Attending at Upper Extremity Unit, Servei de  
 Cirurgia Ortopèdica i Traumatologia, Ciutat  
 Sanitària i Universitària de Bellvitge, Uni-  
 versitat de Barcelona, Barcelona, Spain  
 担 当 整形外科科学教室

### 慶應医学会例会第 1326 回

日 時 平成 15 年 9 月 10 日(水) 午後 6 時  
 場 所 新棟 11 階 中会議室  
 演 題 米国における卒前卒後の救急医学教育  
 Emergency Medicine Residency Training in  
 the United States  
 演 者 Brian Gibler, MD  
 Professor of Emergency Medicine, University  
 of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati,  
 Ohio, USA  
 担 当 医学教育統轄センター, 卒後臨床研修セミナー,  
 救急部

### 慶應医学会例会第 1327 回

日 時 平成 15 年 9 月 11 日(木) 午後 7 時  
 場 所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
 演 題 Identification and role of cardiac stem cell  
 演 者 Piero Anversa, MD  
 Director, Cardiovascular Research Institute,  
 Professor of Medicine, New York Medical  
 College, Valhalla, NY, USA  
 担 当 呼吸循環器内科教室

### 慶應医学会例会第 1328 回

日 時 平成 15 年 9 月 30 日(火) 午後 5 時  
 場 所 新棟 11 階 大会議室  
 演 題 Mothers and infants and communicative musi-  
 cality  
 演 者 Prof. Stephen Malloch  
 Macarthur Auditory Research Centre Sydney,  
 University of Western Sydney, Campbelltown,  
 NSW, Australia  
 担 当 小児科学教室

### 慶應医学会例会第 1329 回

日 時 平成 15 年 10 月 6 日(月) 午後 6 時  
 場 所 新棟 11 階 大会議室  
 演 題 The Making of a doctor : going from knowl-  
 edge and its application, to experience and wis-  
 dom  
 演 者 Harsha Rao, MD  
 Professor of Medicine, University of Pittsburgh  
 School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania,  
 USA  
 担 当 医学教育統轄センター

### 慶應医学会例会第 1330 回

日 時 平成 15 年 10 月 7 日(火) 午後 6 時  
 場 所 新教育研究棟 講堂 3  
 演 題 The burden of diabetes in the US : a warning  
 to the rest of the world  
 演 者 Harsha Rao, MD  
 Professor of Medicine, University of Pittsburgh  
 School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania,  
 USA  
 担 当 医学教育統轄センター

### 慶應医学会例会第 1331 回

日 時 平成 15 年 10 月 27 日(月) 午後 5 時  
 場 所 総合医科学研究棟 1 F ラウンジ  
 演 題 Trying to understand Down syndrome  
 演 者 Charles J Epstein, MD  
 Professor, Department of Pediatrics, University  
 of California, San Francisco, CA, USA  
 担 当 分子生物学教室

**慶應医学会例会第 1332 回**

日時 平成 15 年 11 月 25 日(火) 午後 5 時  
場所 新棟 11 階 大会議室  
演題 Infant mental health in Australia  
演者 Dr. Campbell Paul  
Associate Professor, Department of Psychiatry,  
University of Melbourne, Mental Health  
Service, Royal Children's Hospital, Parkville,  
Victoria, Australia  
担当 小児科学教室

**慶應医学会例会第 1333 回**

日時 平成 15 年 11 月 27 日(木) 午後 5 時 30 分  
場所 新教育研究棟 4 階 講堂 3  
演題 Insights into pathological fibrosis: tran-  
scriptional profiling of the scleroderma  
fibroblast  
演者 Andrew Leask, PhD  
Senior Research Scientist, Royal Free Hospital,  
University College London, London, UK  
担当 先端医科学研究所

**慶應医学会例会第 1334 回**

日時 平成 15 年 11 月 11 日(火) 午後 5 時  
場所 新棟 11 階 大会議室  
演題 Gastroesophageal reflex disease  
演者 北川 誠司先生  
Associate Professor of Pediatrics, Baylor  
College of Medicine, Houston, TX, USA  
担当 小児科学教室

**慶應医学会例会第 1335 回**

日時 平成 15 年 11 月 28 日(金) 午前 10 時 30 分  
場所 総合医科学研究棟 1 階ラウンジ  
演題 The Notch perspective : a role for  $\gamma$ -secretase in  
development and tissue renewal  
演者 Raphael Kopan, PhD  
Professor, Department of Molecular Biology  
and Pharmacology and Department of  
Medicine, Washington University, St. Louis,  
MO, USA  
担当 生理学教室

**慶應医学会例会第 1336 回**

日時 平成 15 年 12 月 2 日 (火) 午後 6 時  
場所 新教育研究棟 講堂 1  
演題 Functional neuroimaging of selective attention  
and visual awareness  
演者 Geraint Rees, MRCP, PhD  
Institute of Cognitive Neuroscience & Institute  
of Neurology, University College London,  
London, UK  
担当 精神・神経科学教室

**慶應医学会例会第 1337 回**

日時 平成 15 年 12 月 1 日(月) 午後 5 時  
場所 総合医科学研究棟 5 階会議室  
演題 Platelet and endothelial microparticle : Beyond  
thrombosis  
演者 Lawrence L. Horstman, MD, PhD  
Wallace H. Coulter Platelet Laboratory,  
Department of Medicine, University of Miami,  
Miami, FL, USA  
担当 内科学教室



## 『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、A4判の紙に貼付する。特に大きさや配置に希望のある場合は明記すること。原寸大として図に書き込まれている字の大きさは、最低1.5 mmの高さが必要である。これ以下の大きさは印刷不可。

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

13. 謝辞 できるだけ簡単にし、ここに研究費の出所なども記載する。

14. 文献 本文中では引用された順とし、“Smith<sup>1)</sup>によれば、……という報告がある<sup>2)</sup>。”のように肩に番号をふる。文献表は本文とは別とする。共著者のある場合すべての著者名を書き、スタイルはバンクーバー方式とする。論文のタイトルの文頭のみ大文字とし、あとは小文字で書く。雑誌名は公式の略号を用い、頁は最初と最後を必ず書く。(下記の例を参照する。)

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

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

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

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

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

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

17. 本誌に掲載された論文等の著作権は慶應医学会に帰属する。

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

19. 論文作成に関する参考書を下記に示すので、参照のこと。

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

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

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

20. その他 詳細に関しては事務局に問い合わせ下さい。(2003年1月)

## 「学位申請論文」投稿の手引き

### 「学位申請論文」について

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

#### 1. 学位取得の十分条件ではない。

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

#### 2. 二重投稿が回避できる。

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

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

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

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

#### 3. プライオリティーを主張することはできない。

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

### 論文作成上の注意

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

ある。

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

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

4. 英文抄録（ABSTRACT）は不要である。

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

11. 図表（写真）について：掲載する図表はオリジナルの外、すでに原著として、他誌に印刷中、あるいは出版済みの論文から引用して用いること。これら図表の主要な部分は学位申請者が、ファーストオーサーまたは主たる貢献者である論文から引用することが必要で、かつ著作権に関する許可を出版社より得たものに限る。出版社に転載許可を求める書式は編集部へ申請されたい。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お問い合わせ下さい。

(2002年5月)

用字用語の統一（括弧内は用いない）

明らか		その、それ、	(其の、夫れ)
あらゆる	(凡ゆる)	ただ	(只、唯)
あるいは	(或は)	ただし	(但し)
いう	(云う、言う)	たとえば	(例えば)
いずれ	(何れ)	ため	(為)
いたします	(致します)	ついて	(就て)
いたずらに	(徒に)	ないし	(乃至)
いただく	(頂く、戴く)	なお	(尚、猶)
いる	(居る)	ながら	(乍ら)
おいて	(於て)	など	(等)
行う	(行なう)	ならびに	(並びに)
おそらく	(恐らく)	ほとんど	(殆ど)
および	(及び)	ほぼ	(略之)
かかわらず	(拘、関、係らず)	また	(又)
かつ	(且つ)	まだ	(未だ)
かなり	(可成り)	まで	(迄)
かねて	(予て)	むしろ	(寧ろ)
ここ	(此处)	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

正直申し上げて、我々外科医にとって（他科の先生においても同じか？）会議が増えることは喜ばしいことではない。慶應医学編集委員を四津教授から引きついで1年あまり前はどちらかという気乗りのしないものであったと記憶している。しかし、それ以降、他の編集委員の先生方との時間は、それぞれの分野をリードする先生がどのような価値観をお持ちで普段の仕事をしておられるかが垣間見え、先天性心疾患の外科治療という非常に限られた専門領域の中でともすれば“専門ばか”になりがちな自分にとっては割りと楽しく充実したものとなっている。この場をお借りして感謝申し上げる次第である。

(饗庭 了)

## 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 12 月 19 日 印刷

平成 15 年 12 月 25 日 発行

編 集 者 北 島 政 樹

発 行 者

印 刷 所 学術図書出版株式会社

電話 (3948) 7516 番

印 刷 者 富 田 進

発 行 所 慶 應 医 学 会

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地

慶應義塾大学医学部企画室

電話(3353)1211(大代)内線62766

振替口座00170-7-54424番

©Published by The Keio Medical Society, 2002

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

### 複写される方へ

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

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル 学術著作権協会

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

アメリカ合衆国における複写については、次に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

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

### Notice about photocopying

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

Except in the USA

Japan Academic Association for Copyright Clearance (JAACC)

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

TEL: 81-3-3475-5618 FAX: 81-3-3475-5019 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4号別頁  
平成 15 年 12 月 25 日

# 学 位 論 文

慶 應 医 学 会

学位論文

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

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導: 猿田享男教授)

目 黒 周

(平成15年1月22日受付)

Key Word : diabetes mellitus, arteriosclerosis, cholesterol esters, polymorphism (genetics)

2型糖尿病は冠動脈疾患、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症といった動脈硬化性疾患の重要な危険因子であり<sup>1-4)</sup>、また、動脈硬化性疾患は2型糖尿病の予後を規定する重要な因子でもある。現在日本では生活習慣の変化により2型糖尿病が激増しており、動脈硬化性疾患の予防、治療は公衆衛生上ますます重要になると思われる。動脈硬化性疾患のハイリスク集団である糖尿病患者において、更にハイリスクなサブグループを特定し、早期に重点的な予防を行うことは治療の有効性を高める意味でも意義があると思われる。糖尿病患者における動脈硬化性疾患の発症には糖尿病の罹病期間や血糖コントロール状態だけでなく、高中性脂肪・低HDLコレステロールといった脂質異常<sup>5)</sup>、インスリン抵抗性<sup>6)</sup>、糖化蛋白<sup>7)</sup>などや、さらにそれらに関連した様々な遺伝子などが関与していると考えられている。現在までに多くの候補遺伝子が糖尿病と大血管合併症の関連で研究され、より効果的な治療が模索されている。

糖尿病と大血管合併症との関連で研究されている候補遺伝子のひとつにコレステロールエステル転送蛋白(cholesteryl ester transfer protein; 以下 CETP と略す)が挙げられる。CETP は476個のアミノ酸からなる親水性の糖タンパクであり、動脈硬化性疾患発症に関連していると考えられている<sup>8,9)</sup>。CETP は中性脂肪と交換に HDL コレステロールから VLDL や LDL へコレステロールエステルを転送し、コレステロール逆転送系で重要な役割を果たしている<sup>10,11)</sup>。血清 CETP の高値は

HDL コレステロールの減少<sup>12-15)</sup>、あるいは LDL コレステロールの増加と関連している<sup>16)</sup>。いくつかの研究は血清 CETP の高値が動脈硬化促進と関連していると報告しているが<sup>8,9)</sup>、逆に CETP が抗動脈硬化作用を示すという報告もある<sup>12)</sup>。このように CETP に動脈硬化促進作用があるか否かまだ結論が出ていないが、コレステロールエステルを「抗動脈硬化的」な HDL コレステロールから「動脈硬化促進的」なアポ B 含有リポ蛋白である LDL や VLDL コレステロールに転送する事が何らかの役割を果たしていると思われる。

この CETP をコードする遺伝子の多型が現在までにいくつか報告されており、その多くは血清 HDL コレステロール濃度に影響し<sup>14,15,17-19)</sup>、その結果動脈硬化のリスクと関連する<sup>20)</sup>と報告されている。これらの変異のひとつであるイントロン1の TaqIB 遺伝子多型は脂質転送活性<sup>14,15,17)</sup>や血清 HDL コレステロール濃度<sup>21)</sup>と関連すると報告されている。Ukkola らはこの遺伝子多型の B1/B1 遺伝子型がフィンランド人2型糖尿病患者の脳梗塞発症リスクと関連していると報告している<sup>22)</sup>。彼らはまた B2/B2 遺伝子型のもものは大血管障害の有病率が低いことを示した。Kuivenhoven らは CETPTaqIB 遺伝子型と冠動脈硬化の進行に有意な関連があることを示し、B1 遺伝子型が動脈硬化の危険因子である可能性を示唆している<sup>23)</sup>。最近 Durlach らはフランス人2型糖尿病患者の B2/B2 遺伝子型のもものは冠動脈疾患の有病率が低い、この遺伝子の影響は男性でのみ認められた

本論文は Meguro S, Takei I, Murata M, Hirose H, Takei N, Mitsuyoshi Y, Ishii K, Oguchi S, Shinohara J, Takeshita E, Watanabe K, Saruta T : Cholesteryl ester transfer protein polymorphism associated with macroangiopathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 156 : 151-156, 2001 の一部を含む



と報告している<sup>29)</sup>。

日本人では動脈硬化性疾患の有病率が低く、個々の動脈硬化性疾患と CETP 遺伝子多型との関連を明らかにするのは容易ではない。しかし、CETPTaqIB 遺伝子多型により生じる代謝異常は恐らく個人の全身の動脈硬化症の進展に影響を及ぼしていると考えるのが自然であろう。そこで我々は日本人の中でも動脈硬化性疾患のリスクが高い 2 型糖尿病患者においてこの遺伝子多型が血清 CETP、血清リポ蛋白濃度、また、動脈硬化性疾患全体に及ぼす影響を検討するため本研究を行った。

## 方法と対象

### 1. 対象

対象は慶應義塾大学病院に通院する 2 型糖尿病患者 182 名である (平均年齢 59.6±8.6 歳)。糖尿病の診断は 1985 年の WHO の診断基準に従った<sup>29)</sup>。すなわち空腹時血糖 140 mg/dL 以上、随時血糖 200 mg/dL 以上あるいは経口 75 g ブドウ糖負荷試験にて 2 時間後血糖 200 mg/dL 以上を以前に満たしている者を糖尿病と診断した。血清クレアチニン値が 1.5 mg/dL 以上の進行した腎障害のある患者は、腎障害による動脈硬化への影響を考慮し、本研究の対象には含めなかった。対象の構成は男性 104 名、女性 78 名であった。大血管障害の有無の判定は心筋梗塞の既往、冠動脈造影で 75% 以上の有意狭窄が認められているもの、MRI にて脳梗塞が確認されたもの、下肢切断の既往のあるものを大血管障害ありとした。無自覚性心筋虚血を見逃さないため禁忌のない限り負荷心電図を行い、異常が認められたものは負荷心筋シンチ、更に必要なものには冠動脈造影を行った。大血管障害を有する者のうち、虚血性心疾患を有する者が 12 名、脳梗塞の既往のある者が 12 名、閉塞性動脈硬化症による下肢切断の既往のある者が 2 名であった。このうち、2 名が虚血性心疾患と脳梗塞を合併しており、この結果最終的に 24 名が大血管障害を有すると診断された。残りの 158 名は大血管障害の徴候は認められなかった。尚、それぞれの患者から文書にて informed consent を得た。

また、健常人との遺伝子型頻度を比較するため、年齢をマッチさせた 333 名の健常人男性の遺伝子解析も行った。

### 2. 臨床所見

糖尿病の罹病期間は患者からの病歴聴取か、可能であればカルテ上の血糖値の記録から前述の糖尿病診断基準により決定した。高血圧は収縮期血圧 140 mmHg 以上

あるいは拡張期血圧 90 mmHg 以上、または降圧薬を内服しているものとした。高脂血症は空腹時総コレステロール濃度 220 mg/dL 以上、あるいは中性脂肪 150 mg/dL 以上、または抗高脂血症薬を内服しているものとした。また、対象には喫煙歴を聴取し、現在の状態により喫煙と非喫煙の 2 群に分けた。

### 3. 遺伝子解析

CETP 遺伝子のイントロン 1 の遺伝子型は direct polymerase chain reaction (以下 PCR と略す) amplification 法にて direct amplification buffer キット (シマズ) を用いて行った。0.5 μmol/L のプライマー (5' CAC TAG CCC AGA GAG AGG AGT GCC 3' と 5' CTG AGC CCA GCC GCA CAC ACT AAC 3')、200 μmol/L の dNTP、0.5 μL の全血、0.5 U の thermostable DNA polymerase、バッファーを総量 50 μL になるように混和した。最初の denaturation (80°C 15 分、その後 94°C 5 分) の後 94°C (5 分)、60°C (1 分)、72°C (1 分) を 40 サイクル行い、最後に伸長反応 (72°C、10 分) を行った。この PCR 産物の 8 μL と 9U の制限酵素 TaqI を用い、総量 10 μL とし、65°C 3 時間で digestion を行った。Ethidium bromide を含む 2% アガロースゲルで PCR 産物の電気泳動を行い、transilluminator にて分析した。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。

### 4. 生化学分析

一般的な臨床化学検査は自動分析機にて行った。血清 LDL コレステロール値は homogeneous assay にて測定した。血清 CETP 濃度はモノクローナル抗体を用いた ELISA 法にて測定した。尿中アルブミン排泄率 (以下 UAE と略す) は早朝第一尿で nephelometry 法にて測定した。血清 advanced glycation end-product (以下 AGE と略す) 値は carboxymethyl lysine に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA 法にて測定した<sup>26)</sup>。血清ホモシステイン値は HPLC 法にて、赤血球アルドース還元酵素値はモノクローナル抗体を用いた ELISA 法にて測定した。

### 5. 統計解析

全てのデータは統計解析ソフト StatView 5.0 (SAS) にて解析した。TaqIB 遺伝子多型間の連続変数の差は一元配置分散分析法にて解析した。中性脂肪、尿中アルブミン排泄率は偏った分布を呈するため自然対数変換を

行った後に解析した。PLSD Fisher テストにて posthoc 分析を行った。血清 CETP と血清リポ蛋白の相関は simple linear regression 分析にて行った。ハーディ・ワインバーグ平衡や大血管障害の CETP 遺伝子型でのオッズ比、95%信頼区間の計算は  $\chi^2$  検定を行った。ロジスティック回帰分析は動脈硬化危険因子の寄与を調整するために行った。尚、本文中、図表中の数値は特に記載のある場合を除いて平均値±標準偏差で表した。

## 結 果

### 1. CETPTaqIB 遺伝子型の頻度

対象とした 2 型糖尿病患者 182 名（男性 104 名、女性 78 名、年齢  $59.6 \pm 8.6$  歳）において遺伝子型頻度は B1/B1 39.6%、B1/B2 44.5%、B2/B2 15.3%であった。この頻度は年齢をマッチさせた健常日本人男性 333 名と有意差はなかった（B1/B1 31.2%、B1/B2 54.1%、B2/B2 14.7%）。B1 アリル頻度は 0.62、B2 アリル頻度は 0.38 でありハーディー・ワインバーグの法則に合致した ( $p < 0.05$ )。

### 2. 臨床指標と CETP 遺伝子型

対象とした 2 型糖尿病患者 182 名を CETPTaqIB 遺伝子型により群分けし、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（第 1 表）<sup>27)</sup>。HMG-CoA 還元酵素阻害薬を服用している患者の割合は B1/B1 7 名（9.7%）、B1/B2 6 名（7.4%）、B2/B2 2 名（6.9%）であり、各群間で有意差はなかった。2 名がフィブラート系薬剤を服用し、その他の抗高脂血症薬を服用しているものはいなかった。これまでに知られている動脈硬化危険因子である高血圧、高脂血症、喫煙の有無、血清ホモシステイン濃度も各群間で有意差は認められなかった。糖尿病性網膜症の有病率や尿中アルブミン排泄率、蛋白尿の頻度なども各群間で差は認めなかった。

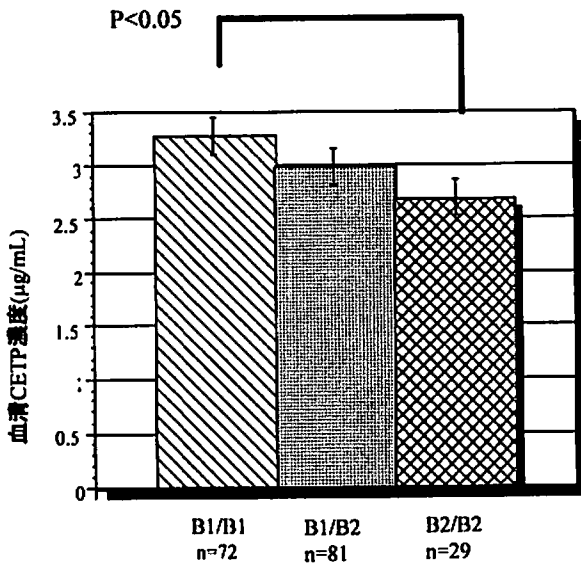
### 3. CETP 遺伝子型と血清 CETP 濃度の関連

B1 アリルを有するものでは B1 アリルを有しない者に比し有意に血清 CETP 濃度が高値であった ( $3.1 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$  v.s.  $2.7 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.05$ )。遺伝子型各群間の比較では B1/B1 群で B2/B2 群に比し有意に血清

第 1 表 コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 遺伝子型別の対象の背景

	B1/B1 (n=72)	B1/B2 (n=81)	B2/B2 (n=29)
年齢 (歳)	61.1±7.7	58.7±8.1	58.4±1.4
性別 (女/男)	33/39	38/43	7/22
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.8±4.7	23.1±4.9	22.7±2.5
糖尿病罹病期間 (年)	10.6±7.8	9.3±7.2	12.2±8.7
現喫煙 (%)	22	27	17
高脂血症 (%)	29	33	21
高血圧 (%)	39	41	45
冠動脈疾患の家族歴 (%)	18	27	40
スタチンの服用者数	7	6	2
空腹時血糖 (mmol/L)	8.2±1.9	8.9±2.4	9.0±2.5
HbA1c (%)	7.1±1.2	7.4±1.3	7.6±1.6
血清クレアチニン ( $\mu\text{mol/L}$ )	66±19	63±14	67±14
総コレステロール (mmol/L)	5.28±0.93	5.45±0.91	5.34±0.88
HDL コレステロール I (mmol/L)	1.46±0.51	1.40±0.31	1.44±0.33
LDL コレステロール (mmol/L)	3.13±0.91	3.41±0.88	3.20±0.75
中性脂肪 (mmol/L)	1.43±0.97	1.50±0.95	1.55±1.05
蛋白尿陽性率 (%)	18	18	18
Urinary Albumin Excretion (mg/g creatinin)	34.1±66.7	60.3±161	41.4±74.7
Advanced Glycation End-product (mU/mL)	3.5±1.9	3.6±2.3	3.4±1.2
グリコアルブミン (%)	22.6±5.1	22.4±5.1	23.8±6.0
ホモシステイン (nmol/mL)	9.5±2.8	10.1±4.2	10.2±2.9
アルドースレダクターゼ (ng/mg Hb)	11.5±3.3	10.9±2.2	12.5±2.5

数値は平均値±標準偏差で表示した。各群間で有意差を認めなかった。(Meguro S, et al : Atherosclerosis 156 : 151-6, 2001 の Table 1 を許可を得て転載)



第1図 コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) TaqIB 遺伝子型と血清 CETP 濃度. B1/B1 群と B2/B2 群を比較し B1/B1 群で有意に血清 CETP 濃度は高値を示した. (Meguro S, et al : Atherosclerosis 156 : 151-6, 2001 の Fig 1 を許可を得て転載)

第2表 コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 遺伝子多型と大血管障害の有病率

遺伝子型	B1/B1	B1/B2	B2/B2	計
大血管障害	(%)	(%)	(%)	
あり	15 (20.8)	7 ( 8.6)	2 ( 6.9)	24
なし	57 (79.2)	74 (91.4)	27 (93.1)	158
計	72	81	29	182

(Meguro S et al : Atherosclerosis 156 : 151-6, 2001 の Table 2 を許可を得て転載)

CETP 濃度が高値であり、遺伝子型により段階的な上昇傾向が認められた ( $p < 0.05$ , 第1図)<sup>27)</sup>.

#### 4. 血清リポ蛋白と血清 CETP 濃度の関連

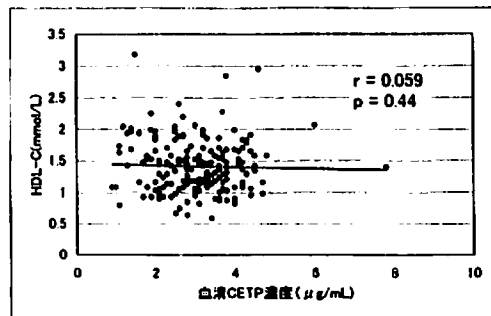
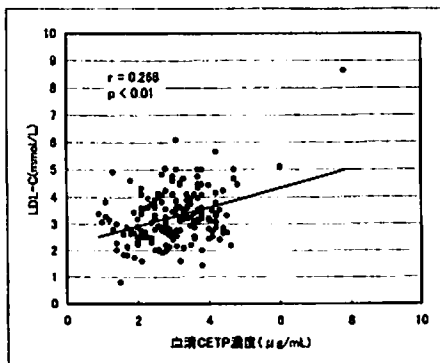
対象とした2型糖尿病患者182名全てにおいて、血清リポ蛋白と血清 CETP 濃度との関連を検討した。その結果血清 LDL コレステロール濃度は血清 CETP 濃度と有意な正相関を認めた(第2図)<sup>27)</sup>。血清 CETP 濃度と血清 HDL コレステロール濃度との間には有意な相関は認めなかった。

#### 5. 大血管障害有病率と CETP 遺伝子型

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(第2表)<sup>27)</sup>。B2/B2 遺伝子型での大血管障害を有する対象が少なく3群間での統計解析が不可能であったため、B1/B2 群と B2/B2 群のデータをプールし、B1/B1 群と比較したところ B1/B1 群は B1/B2+B2/B2 群に比べ有意に大血管障害の有病率が高かった(オッズ比 2.953, 95%信頼区間 1.250-6.977,  $p = 0.0136$ )。

#### 6. ロジスティック回帰分析

B1/B1 遺伝子型と大血管障害の有病率との間には有意な関連がみられた(オッズ比 5.38,  $p = 0.009$ )。また、糖尿病の罹病期間と大血管障害の有病率の間にも有意な関連を示した(オッズ比 1.109,  $p = 0.005$ ) (第3表)<sup>27)</sup>。血清 HDL コレステロール濃度を独立変数に採用した場合も B1/B1 遺伝子型は大血管障害の有病率と有意な関連を示した(オッズ比 5.38,  $p = 0.01$ )。また、



第2図 血清コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 濃度とリポ蛋白濃度の相関. 血清 CETP 濃度は血清 LDL コレステロール濃度と有意な相関を示した. 血清 CETP 濃度は血清 HDL コレステロール濃度と有意な相関を示さなかった. (Meguro S, et al : Atherosclerosis 156 : 151-6, 2001 の Fig 2 を許可を得て転載)

第3表 大血管障害に対する危険因子によるロジスティック回帰分析

	オッズ比	p 値
年齢	1.07	0.131
男性	0.67	0.552
BMI	1.00	0.993
高血圧	1.73	0.388
高脂血症	1.22	0.751
喫煙	2.69	0.201
糖尿病罹病期間	1.1	0.005
HbA1c	1.12	0.609
CETP TaqI B1/B1 遺伝子型	5.38	0.009

B1/B1 遺伝子型、糖尿病の罹病期間と大血管障害の有病率との間に有意な関連がみられた。(Meguro S, et al: Atherosclerosis 156: 151-6, 2001 の Table 3 を許可を得て転載)

HMG-CoA 還元酵素阻害薬の内服を独立変数に採用した場合も B1/B1 遺伝子型と大血管障害の有病率との関連は依然有意であった(オッズ比 3.65, p=0.01)。

### 考 察

本研究の結果は CETP 遺伝子の TaqIB 遺伝子多型が日本人 2 型糖尿病患者の大血管障害に関連していることを示唆した。

我々の結果はこれまでの諸家の報告に比し遺伝子型の頻度が異なった<sup>22-24)</sup>。すなわち欧米白人での報告との比較では同様のアリル頻度の報告が 1 報、我々の対象と比べ B1 アリル頻度が低い報告が 2 報あった。これらの報告は対象の男女構成が異なったり、糖尿病患者を対象としたもの、冠動脈疾患の患者を対象としたものなど様々であり、アリル頻度の違いが何によるものか特定するのは困難である。対象の年齢はどの報告でも 55 歳から 60 歳に分布しており、大きな差はみられないため、対象の年齢の違いが遺伝子頻度に影響した可能性は低い。Ukkola らのフィンランド人の報告では糖尿病患者と一般集団でアリル頻度に差を認めておらず<sup>22)</sup>、我々の検討と同様の結果であった。このことから、TaqIB 遺伝子多型のアリル頻度は少なくとも糖尿病の有無により影響を受けず、むしろ人種差に影響を受ける可能性が高いと考えられた。一方、我々の日本人での検討に比し、動脈硬化性疾患の有病率が高いフィンランド人で動脈硬化性疾患のリスクの高い B1/B1 遺伝子型の頻度が日本人よりも低く報告されていることは<sup>22)</sup>、この遺伝子型の頻度の差が人種間の動脈硬化性疾患の頻度差を説明し得るも

のではないことを示唆する。しかし、異なる集団でこの遺伝子多型が動脈硬化性疾患に関わっていることが示されたことは、この遺伝子多型が動脈硬化性疾患の本質的な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が、CETP と HDL コレステロールの有意な逆相関は認めなかった。これまでの多くの研究は、血清 CETP 濃度が HDL コレステロール濃度と逆相関していると報告している<sup>14,15)</sup>。一方、日本の健康人で血清 CETP と LDL コレステロールの正相関を報告している研究もある<sup>16)</sup>。どのような要因によってこのような違いが生じるのかは依然不明である。これまでの報告は、健康人、糖尿病患者、高脂血症患者を対象としたものなど雑多であるが、その血清リポ蛋白濃度と血清 CETP との相関には一定の傾向はみられていない。ハワイ在住日系アメリカ人の CETP 欠損症を対象とした研究では、血清 CETP 濃度と血清 HDL コレステロール濃度の逆相関が示されており、人種的因子よりも環境因子が CETP とリポ蛋白濃度の関係に影響を与えているものと思われる<sup>20)</sup>。喫煙や肥満により TaqIB 遺伝子多型の血清リポ蛋白に与える影響は変化すると健康人での報告があり<sup>17)</sup>、これも環境因子の重要性を示唆する結果である。一方、糖尿病では LDL コレステロールの変性を生じやすいことが知られているが、LDL コレステロールが変性し、肝臓の受容体への結合能低下により LDL コレステロールのクリアランスが低下すれば、血中リポ蛋白組成が変化することも考えられ、酸化あるいは糖化 LDL の生成とそのクリアランスの低下が血清 CETP 濃度と血清リポ蛋白濃度の相関に影響を与えている可能性が考慮される。先述の肥満や喫煙といった因子もこういったリポ蛋白の質に影響を与える因子である。最近 Talmud らは、CETP 遺伝子 TaqIB 多型と強いアリルの相関を持つ CETP promoter 領域の tetranucleotide repeat が LDL 粒子サイズと関連していると報告した<sup>29)</sup>。小粒状高密度 LDL コレステロールは動脈硬化惹起作用が強く、酸化変性を受けやすいことが報告されており、変性コレステロールやコレステロールの粒子サイズといったものが CETP と血清リポ蛋白濃度、更には動脈硬化性疾患との関連を有する可能性を示した。

本研究では LDL コレステロールも HDL コレステロールも各遺伝子型間で有意差を認めなかった。これは B1/B1 遺伝子型で大血管障害の有病率が高かった事が CETP のリポ蛋白濃度に与える影響だけでは説明がつかないことを意味している。CETP 遺伝子多型間の血

清 CETP 濃度差は、大血管合併症への遺伝子による影響を血清 CETP 濃度の違いが説明する可能性を示唆する。しかし、その具体的なメカニズムは不明である。最近では動脈硬化の発症・進展は酸化リポ蛋白の血管内皮下への蓄積<sup>30,31)</sup>やそれらに対する炎症様反応<sup>32,33)</sup>により生じると考えられている。CETP は HDL コレステロールの減少により血管内皮下からのコレステロールエステルの逆転送を減少させたり、VLDL や LDL コレステロールといった atherogenic なリポ蛋白を増加させ、血管内皮下へのコレステロールエステルの蓄積を促進しているのかもしれない。また、リポ蛋白濃度ではなくサイズに影響を与えている可能性も否定できない。しかし、この遺伝子多型は機能の変化を伴うものではなく、CETP 遺伝子の他の多型や、lecithin cholesterol acyltransferase など近接する遺伝子と linkage disequilibrium にあるだけであるという可能性も否定はできない。

最近 Durlach らは、CETP 遺伝子多型の冠動脈疾患に対する影響は性により異なることを報告した。日本人では動脈硬化性疾患が少ないこともあり、我々の研究では大血管障害を有する対象が少なく、残念ながら男女に分けた解析は行えず、この問題を確認することはできなかった。

## 総括

コレステロールエステル転送蛋白 (CETP) 遺伝子の TaqIB 遺伝子多型が日本人 2 型糖尿病患者の血清 CETP、リポ蛋白濃度、動脈硬化性疾患に及ぼす影響を 182 名の 2 型糖尿病患者 (男性 104 名、女性 78 名、年齢 59.6±8.6 歳 (平均±標準偏差)) を対象に検討し、以下の結論を得た。

1. 日本人 2 型糖尿病患者の CETP 遺伝子 TaqIB 遺伝子多型の遺伝子型の分布は、年齢をマッチさせた健常日本人男性と有意差はなかった。これまでの欧米白人の報告と比較すると、B1 アリルの頻度が日本人で高い可能性が示唆された。

2. CETPTaqIB 遺伝子多型の B1 アリルを有するものは B1 アリルを有しない者に比し血清 CETP 濃度が高値であった。その傾向は B1 ホモ遺伝子型の者でさらに顕著であった。

3. B1/B1 遺伝子型の者は他の遺伝子型に比して動脈硬化疾患の有病率が有意に高値であった。

4. 血清 CETP 濃度は血清 LDL コレステロール値と有意な正の相関を示したが、遺伝子型による動脈硬化性疾患の有病率の違いは血清リポ蛋白濃度のみでは説明で

きなかった。

以上の結果から CETPTaqIB 遺伝子多型 B1/B1 遺伝子型は 2 型糖尿病患者の動脈硬化における遺伝的危険因子であることが示唆された。この遺伝子多型が動脈硬化と関連する機序として、血清リポ蛋白濃度の変化のみではない別の要因が関与している可能性が示唆された。

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、猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際し直接御指導いただきました慶應義塾大学病院中央検査部、武井泉講師、村田満講師に深く感謝致します。さらに御協力、御助言を頂きました慶應義塾大学医学部内科腎内分泌代謝研究室、慶應義塾大学病院中央検査部の諸先生方に感謝致します。

本論文の内容の一部は第 42 回日本糖尿病学会 (1999 年横浜)、第 59 回アメリカ糖尿病学会 (1999 年サンディエゴ) にて発表した。

## 文 献

- 1) Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M : Diabetes and atherosclerosis : an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 3 : 463-524, 1987
- 2) Laakso M, Lehto S : Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Reviews* 5 : 294-315, 1997
- 3) Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M : Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction [see comments]. *N Engl J Med* 339 : 229-234, 1998
- 4) Laakso M : Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 48 : 937-942, 1999
- 5) Lehto S, Ronnema T, Haffner SM, Pyorala K, Kallio V, Laakso M : Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. *Diabetes* 46 : 1354-1359, 1997
- 6) Reaven GM : Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev* 75 : 473-486, 1995
- 7) Vlassara H : Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes* 46 Suppl2 : S19-S25, 1997
- 8) Bhatnagar D, Durrington PN, Channon KM, Prais H : Mackness MI. Increased transfer of cholesteryl esters from high density lipoproteins to low density and very low density lipoproteins in patients with angiographic evidence of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 98 : 25-32, 1993
- 9) Foger B, Luef G, Ritsch A, Schmidauer C, Doblinger A, Lechleitner M, Aichner F, Patsch JR : Relationship of high-density lipoprotein subfractions and cholesteryl ester transfer protein in plasma to carotid

- artery wall thickness. *J Mol Med* 73 : 369-372, 1995
- 10) Hesler CB, Tall AR, Swenson TL, Weech PK, Marcel YL, Milne RW : Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma. *J Biol Chem* 263 : 5020-5023, 1988
  - 11) Yen FT, Deckelbaum RJ, Mann CJ, Marcel YL, Milne RW, Tall AR : Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity by monoclonal antibody. Effects on cholesteryl ester formation and neutral lipid mass transfer in human plasma. *J Clin Invest* 83 : 2018-2024, 1989
  - 12) Tall AR : Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 34 : 1255-1274, 1993
  - 13) Tall AR : Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 86 : 379-384, 1990
  - 14) Hannuksela ML, Liinamaa MJ, Kesaniemi YA, Savolainen MJ : Relation of polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene to transfer protein activity and plasma lipoprotein levels in alcohol drinkers. *Atherosclerosis* 110 : 35-44, 1994
  - 15) Kuivenhoven JA, de KP, Boer JM, Smalheer HA, Botma GJ, Seidell JC, Kastelein JJ, Pritchard PH : Heterogeneity at the CETP gene locus. Influence on plasma CETP concentrations and HDL cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 560-568, 1997
  - 16) Kinoshita M, Teramoto T, Shimazu N, Kaneko K, Ohta M, Koike T, Hosogaya S, Ozaki Y, Kume S, Yamanaka M : CETP is a determinant of serum LDL-cholesterol but not HDL-cholesterol in healthy Japanese. *Atherosclerosis* 120 : 75-82, 1996
  - 17) Freeman DJ, Griffin BA, Holmes AP, Lindsay GM, Gaffney D, Packard CJ, Shepherd J : Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Associations between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler Thromb* 14 : 336-344, 1994
  - 18) Tamminen M, Kakko S, Kesaniemi YA, Savolainen MJ : A polymorphic site in the 3' untranslated region of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene is associated with low CETP activity. *Atherosclerosis* 124 : 237-247, 1996
  - 19) Bu X, Warden CH, Xia YR, De MC, Puppione DL, Teruya S, Lokensgard B, Daneshmand S, Brown J, Gray RJ, Rotter JI, Lusis AJ : Linkage analysis of the genetic determinants of high density lipoprotein concentrations and composition : evidence for involvement of the apolipoprotein A-II and cholesteryl ester transfer protein loci. *Hum Genet* 93 : 639-648, 1994
  - 20) Hill SA, McQueen MJ : Reverse cholesterol transport-a review of the process and its clinical implications. *Clin Biochem* 30 : 517-525, 1997
  - 21) Bernard S, Moulin P, Lagrost L, Picard S, Elchebly M, Ponsin G, Chapuis F, Berthezene F : Association between plasma HDL-cholesterol concentration and TaqIB CETP gene polymorphism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Lipid Res* 39 : 59-65, 1998
  - 22) Ukkola O, Savolainen MJ, Salmela PI, von DK, Kesaniemi YA : DNA polymorphisms at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) are associated with macro-and microangiopathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Genet* 46 : 217-227, 1994.
  - 23) Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de KP, McPherson R, Bruschke AV, Lie KI, Kastelein JJ : The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group [see comments]. *N Engl J Med* 338 : 86-93, 1998
  - 24) Durlach A, Clavel C, Girard-Globa A, Durlach V : Sex-dependent association of a genetic polymorphism of cholesteryl ester transfer protein with high-density lipoprotein cholesterol and macrovascular pathology in type II diabetic patients. *J. Endocrinol. Metab.* 84 : 3656-3659, 1999
  - 25) World Health Organization ; Diabetes Mellitus : Report of a WHO Study Group. Geneva, World Health Org, 1985 (Tech. Rep. Ser, no 727)
  - 26) Ono Y, Aoki S, Ohnishi K, Yasuda T, Kawano K, Tsukada Y : Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 41 : 131-137, 1998
  - 27) Meguro S, Takei I, Murata M, Hirose H, Takei N, Mitsuyoshi Y, Ishii K, Oguchi S, Shinohara J, Takeshita E, Watanabe K, Saruta T : Cholesteryl ester transfer protein polymorphism associated with macroangiopathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 156 : 151-156, 2001
  - 28) Zhong S, Sharp DS, Grove JS, Bruce C, Yano K, Curb JD, Tall AR : Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels [see comments]. *J Clin Invest* 97 : 2917-2923, 1996
  - 29) Talmud PJ, Edwards KL, Turner CM, Newman B, Palmieri JM, Humphries SE, Austin MA : Linkage of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene to LDL particle size : use of a novel tetranucleotide repeat within the CETP promoter [In Process Citation]. *Circulation* 101 : 2461-2466, 2000
  - 30) Burchfiel CM, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K, Hwang LJ, Fong KO, Marcus EB : Incidence and predictors of diabetes in Japanese-American men. The Honolulu Heart Program. *Ann Epidemiol* 5 : 33-43, 1995
  - 31) Davies MJ : Stability and instability : two faces of

coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White  
Lecture 1995. *Circulation* 94 : 2013-2020, 1996  
32) Falk E, Shah PK, Fuster V : Coronary plaque disruption. *Circulation* 92 : 657-671, 1995.

33) Watanabe T, Haraoka S, Shimokama T : Inflammatory and immunological nature of atherosclerosis. *Int J Cardiol* 54 Suppl : S51-60, 1996

---

学位論文

ラット小腸粘膜上皮細胞における GRO/CINC-1  
と Interleukin-6 の産生：脂肪酸による修飾

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

よし だ ひで へい  
吉 田 英 雄

(平成 15 年 3 月 24 日受付)

Key Word: intestinal epithelial cell, fatty acid, GRO/CINC-1, interleukin-6, MAPK

小腸粘膜上皮細胞 (intestinal epithelial cells: IEC) は食物の吸収のみならず、小腸内腔の微生物や食物由来の抗原に対し、最前線での生体防御機構として機能している。さらに、小腸粘膜上皮細胞はサイトカインを産生し、また抗原提示細胞のように抗原を修飾し、分泌型多量体 IgA の輸送に関与し、積極的に腸管免疫ネットワークに関与している。これら上皮細胞由来の cell line もまた interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6) などの幾つかの炎症性サイトカインを分泌していることが知られている<sup>1-4)</sup>。Growth-regulated oncogene  $\alpha$  (GRO  $\alpha$ ) や IL-8 は C-X-C ケモカインに分類され、炎症反応の場において好中球の活性化と遊走に重要な役割を果たしている<sup>5)</sup>。グラム陰性菌、グラム陽性菌やクリプトスポリジウムが小腸粘膜上皮細胞に侵入した場合、C-X-C ケモカインが活性化することが今までに報告されている<sup>6-8)</sup>。小腸粘膜上皮細胞は IL-6 を産生することが McGee らにより報告され<sup>2,9)</sup>、コレラ毒素が IL-6 産生を著しく増加させることが知られている<sup>9,10)</sup>。IL-6 は炎症反応において重要なだけでなく B 細胞の IgA 分泌を促進させる点においても重要な役割を果たしていると考えられている<sup>11)</sup>。炎症性サイトカインである interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) は小腸粘膜上皮細胞に作用すると IL-6 の分泌を増強し、両者の同時投与は IL-6 分泌をより一層増強させることが報告されている<sup>9)</sup>。これらの報告からいえることは、小腸粘膜上皮細胞は IL-8 や IL-6 の起源

として重要であり、分泌されるサイトカインは腸管の炎症や免疫と密接に関わっているということである。

一方、食物から摂取される脂肪は免疫機能を修飾することが知られている<sup>12-14)</sup>。

また飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸がリンパ球機能に変化を与えることが *in vitro*, *in vivo* での研究で報告されている<sup>14-17)</sup>。腸管リンパ管に存在するリンパ球の機能は脂肪の吸収に大きく影響され<sup>18)</sup>、オリーブ油の摂取は、T リンパ球のパイエル板にある毛細血管後細静脈での移動を亢進させることが報告されている<sup>19)</sup>。以上から脂肪の吸収は免疫担当細胞の活性化を介して、腸管免疫に影響を与えることは想像されるが、小腸粘膜上皮細胞は脂肪への暴露により、どのように免疫機能に影響を与えるかはあまり知られていない。

IEC-6 は、ラット小腸粘膜上皮細胞から確立された細胞で *in vitro* での研究で頻回に使用される、非腫瘍性細胞で、形質転換することなく、寿命を持った細胞である。また、核、ゴルジ体、小胞体の形態が小腸粘膜上皮細胞、特に正常小腸陰窩細胞に似ている、つまり *in vivo* でのラット小腸粘膜細胞に共通する部分が多いとされている。分化した小腸上皮細胞は、寿命が短すぎるなどの点から形質転換なしでは培養が困難である。このため小腸に関しては、正常小腸陰窩細胞で *in vitro* の研究を行っているのが現状である。今回著者はこの細胞を使用した、まず長鎖脂肪酸投与が小腸粘膜上皮細胞から産生、放出される growth-regulated oncogene/cytokine-

本論文は Yoshida H, Miura S, Kishikawa H, Hirokawa M, Nakamizo H, Nakatsumi R, Suzuki H, Saito H, Ishii H: Fatty Acids Enhance GRO/CINC-1 and Interleukin-6 Production in Rat Intestinal Epithelial Cells. J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の一部を含む。



induced neutrophil chemoattractant-1 (GRO/CINC-1) (rat IL-8) と IL-6 にどのような影響を与えるかについて検討を行った。次に、IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1 刺激下における脂肪酸投与が GRO/CINC-1, IL-6 に与える影響を検討した。上皮細胞と小腸粘膜免疫担当細胞との相互反応を脂肪酸がいかに修飾するかを解明する上で、これらの知見は有益な情報を与えると思われた。

## 材料と方法

### 1. 細胞と培養

IEC-6 細胞は The American Type Culture Collection (Rockville, MD) より購入した。IEC-6 細胞はラット小腸粘膜上皮細胞から確立された細胞で *in vitro* での研究で頻回に使用される。この細胞の特徴として正常小腸陰窩細胞の特性と共通する部分が多いことがあげられる<sup>20)</sup>。

IEC-6 細胞を温度 37°C, 空気 95%, 二酸化炭素 5% の環境で培養した。培養液は 5% fetal bovine serum (FBS), 10 mg/L insulin, 50kU/L penicillin, 50 mg/L (DMEM) を使用した。Dish に培養されたこれらの細胞は trypsin を添加し、ゴム製スクレーパーではがし、900 g で 5 分間 4°C で遠心し細胞を回収した。これらの細胞を直径 2 cm の Dish に均一 ( $1 \times 10^4$ /dish) に撒き培養した。Subconfluence の状態に達した時点で実験に供し、脂肪酸ミセルを培養液に添加した。細胞数の正確な値は Cell Titer 96 AQ nonradioactive cell proliferation assay kit (Promega Madison, WI) を使用して、490 nm における吸光度を測定することにより算定した。さらに、propidium iodide (PI, Molecular Probes, Eugene OR) 染色を行い、PI 陽性細胞は細胞膜の傷害された細胞と判定した。

### 2. 脂肪酸の添加

添加する長鎖脂肪酸としてオレイン酸、リノール酸、アラキドン酸 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) を使用した。長鎖脂肪酸をモノグリセリドおよびタウロコール酸に混合し、5% FBS を含んだ DMEM 培養液に溶解させ、各々の濃度は長鎖脂肪酸 19.2 mmol/L, モノオレイン 9.6 mmol/L, タウロコール酸ナトリウム塩 20 mmol/L とした。これら脂肪酸ミセルの作製は Johnston と Borgström の方法<sup>21)</sup>に従った。最終的には脂肪酸ミセルの培養液中濃度が 0.01~0.2 mmol/L になるようにした。また、オクタノイン酸ミセルはオクタノイン酸 (19.2 mmol/L) (Sigma) とタウロコール酸

塩 (20 mmol/L) から作製し、リン酸緩衝液で PH7.4 に調整した。

### 3. GRO/CINC-1 と IL-6 放出の決定

IEC-6 細胞の培養上清に脂肪酸ミセルを添加後、48 時間後に培養液を回収した。この培養液をポリプロピレンチューブに入れ、-70°C 下に保存した。培養液中の GRO/CINC-1 と IL-6 の濃度は sandwich enzyme immunoassay Kit (Immuno Biological Laboratories, Gunma, Japan) を用いて ELISA 法で測定した。抗 GRO/CINC-1 抗体または抗 IL-6 抗体でコーティングした 96 穴のマイクロプレートの各ウェルに、50  $\mu$ L の検体と 50  $\mu$ L のアッセイバッファー (0.05% の Tween 20, 10 g/L の bovine serum albumin を含む 0.01 mol/L PBS, PH 7.2) を入れ、37°C 1 時間で保温した。その後、PBS で洗浄し、Fab'-horse radish peroxidase (HRP) 結合抗 GRO/CINC-1 または抗 IL-6 ウサギ IgG を添加した。37°C, 30 分の保温後再度 PBS で洗浄し、色素剤として O-フェニレンジアミンを加え、15 分間暗室に放置した。反応停止剤 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を加え、ELISA reader (NJ-2000, Inter Med., Tokyo, Japan) を用いて 490 nm の波長下で吸光度を測定した。まず吸光度-濃度標準曲線の作成を行い、測定値をこの曲線上にプロットし、培養液中濃度を決定した。

### 4. IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ と各種阻害薬の投与

IEC-6 細胞の培養液中にヒト recombinant IL-1 $\beta$  (Sigma) またはブタ TGF- $\beta$  1 (Sigma) を最終濃度 0.05~2.0  $\mu$ g/L で投与した。その 48 時間後に GRO/CINC-1 と IL-6 の濃度を測定した。さらに、IL-1 $\beta$  と TGF- $\beta$  1 の同時投与、また各種脂肪酸と組み合わせたの投与をおこなった。

次に細胞内シグナル阻害薬を脂肪酸と同時に加え、脂肪酸により刺激された GRO/CINC-1 の濃度が各種阻害薬によりどのように変化をきたすかを測定した。

今回阻害薬として phospholipase C (PLC) 阻害薬である 2-nitro-4-carboxyphenyl-N,N'-diphenylcarbamate (NCDC; Sigma), protein kinase C (PKC) 阻害薬である 1-(5-isoquinolinyisulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7; Sigma) と staurosporine (Sigma), calmodulin 阻害薬である N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalene-sulfonamide hydrochloride (W-7; Sigma) を使用した。MAPK 阻害薬として 2-[2-amino-3-methoxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-one (PD98059; Sigma), bis-[amino-[(2-aminophenyl) thio]

methylene butanedinitrite][U0126 ; BIOMOL Research Laboratory, Plymouth, PA) を使用した。

#### 5. RNA 抽出と GRO/CINC-1 と IL-6 の PCR 増幅

RNAzol (Biotex, Houston, TX) を用いて IEC-6 細胞を溶解し、クロロホルムと混合後、イソプロパノールを加え遠心し、RNA を沈降させ、上清を取り除き、エタノールで洗浄した。抽出した RNA を 15  $\mu$ l の蒸留水に溶かし、260 nm の波長を当て、吸光度より RNA 濃度を計算した。さらに RNA の純度はアガロースゲル電気泳動を行い、28 S と 18 S のバンドの出現をみることで確認した。抽出した RNA は Stratagene (La Jolla, CA) の RT-PCR kit を用いて逆転写をおこなった。次に Takara Taq kit (Takara Biochemicals, Tokyo, Japan) と以下のプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応を行った。

ラット GRO/CINC-1 のプライマーとして 5'-CTGTGCTGGCCACCAGCCGC-3'(sense) と 5'-ACAGTCCTTGGAATTCTCTG-3'(antisense) を用いた。この場合、増幅産物は 907 bp である。PCR の条件は 1) 94  $^{\circ}$ C で 3 分 incubation (initial denaturation) し、2) denaturation 94  $^{\circ}$ C 1 分, annealing 60  $^{\circ}$ C 1 分, extension 72  $^{\circ}$ C 3 分を 1 サイクルとし、合計 30 サイクル繰り返した。3) 最後に incubation を 72  $^{\circ}$ C 7 分 (final extension) 施行した。IL-6 のプライマーとして 5'-GACTGATGTTGTTGACAGCCACTGC-3'(sense) と 5'-TAGCCACTCCTTCTCTGTGACTCTAACT-3' (antisense) を用いた。増幅産物は 508 bp である。1) 94  $^{\circ}$ C で 3 分 incubation (initial denaturation) し、2) denaturation 94  $^{\circ}$ C 1 分, annealing 58  $^{\circ}$ C 1 分, extension 72  $^{\circ}$ C 90 秒を 1 サイクルとし、合計 30 サイクル繰り返した。3) 最後に incubation を 72  $^{\circ}$ C 7 分 (final extension) 施行した。増幅産物は ethidium bromide で染色し、アガロースゲル電気泳動を施行、紫外線トランスイルミネーター上で可視化した。GRO/CINC-1、IL-6 mRNA の総量はバンドの発色強度を測定することで評価した。具体的にはスキャナーでパソコンに写真を取り込み、バージョン 1.61 NIH-Image の Grayscale で発色強度を測定し、計測数値から標準偏差を求めた。総 RNA 量が一定していることを証明するため、GAPDH mRNA の PCR 増幅も同時に行った。

#### 6. MAPK 活性の計測

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は P44/42 MAPK assay kit (New England Biolabs,

beverly, MA) を用いて測定した。培養した IEC-6 細胞群を 3 プレートに分け、1 つには脂肪酸投与前、もう 1 つには投与 1 時間後、最後の 1 つには投与 3 時間後に細胞溶解液を添加した。スクレーパーで剥がし、ソニケーターで破砕し、各々総蛋白量 150  $\mu$ g を回収した。P44/42 MAPK モノクローナル抗体と反応させ、次にプロテイン A セファロースビーズと反応後、遠心した。沈降産物にキナーゼバッファー、ATP と MAPK の基質である Elk-1 fusion protein を添加し、30  $^{\circ}$ C で反応させた。これにより、活性化 MAPK はリン酸化 Elk-1 (phospho-specific Elk-1) として認められることになる。次に 3X SDS サンプルバッファーを加え反応を停止させ、タンパク質を変性させた。遠心し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) ゲルに上清を注入して電気泳動を行った。ウェスタンブロットリングは次の如くおこなった。

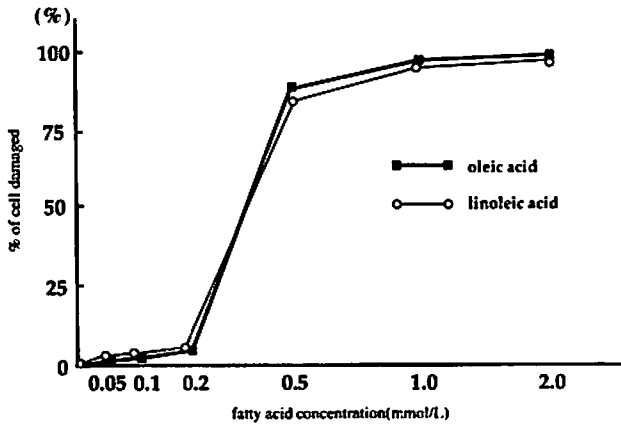
タンパク質はニトロセルロース膜に転写した。まずブロッキングバッファーと反応後、一次抗体として phospho-specific Elk-1 抗体を一晩、4  $^{\circ}$ C で反応させた。翌日 HRP-結合抗ウサギ二次抗体とマーカーを化学発光させるための HRP-結合ビオチン抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。膜を 3 回洗浄 (Tris-buffer, Tween<sup>20</sup>) し、1X LumiGLO と反応させた。膜は X 線フィルムで撮影し、脂肪酸投与前後のバンドの強さの変化を NIH-Image を用いて測定した。

#### 7. 統計学的解析

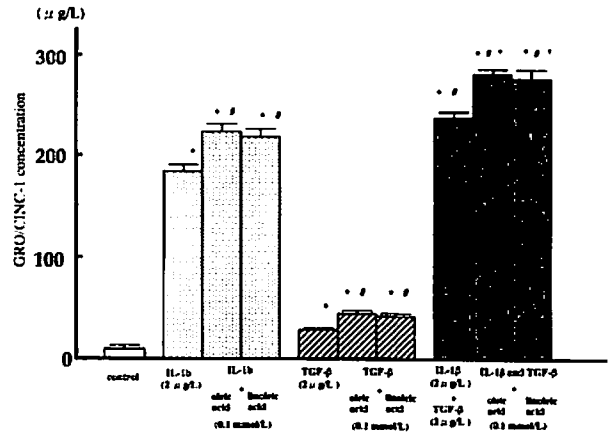
すべての結果は means  $\pm$  SEM として表し、グループ間の有意差は one-way analysis of variance (ANOVA) を用いた。有意差を認めた場合、post hoc test として Fisher's test を行った。すべての検定は  $P < 0.05$  をもって有意と判断した。

## 結 果

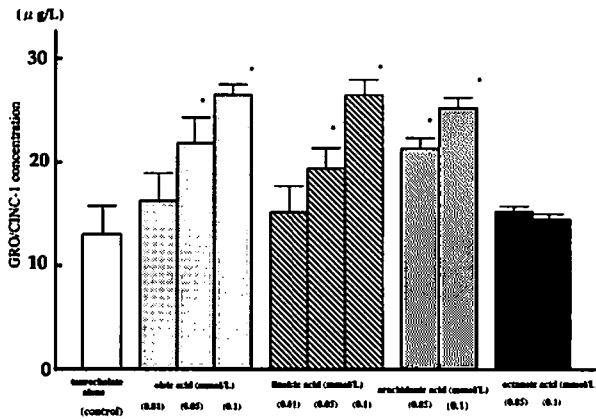
各種濃度の脂肪酸を培養上清に添加し、48 時間後に IEC-6 細胞の細胞傷害の程度を PI 陽性細胞の占める割合として測定した (第 1 図)。リノール酸とオレイン酸いずれも投与により PI 陽性細胞数が散見されるようになり、0.2 mmol/L の濃度を越えると急に増加しはじめ、0.5 mmol/L を越えると 100% に近づいた。つまり脂肪酸は低い濃度でも若干の細胞障害を示すが、0.2 mmol/L 以上の濃度になると急激にその程度が顕著となり、多くが細胞死に至るため、0.2 mmol/L 以下の濃度で投与する必要があると考えられた。また 0.1



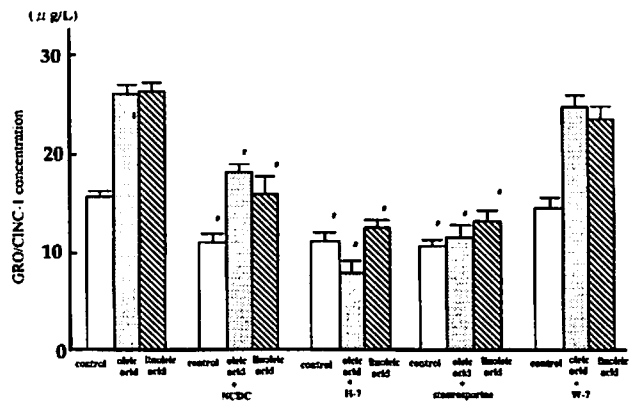
第1図 IEC-6細胞の viability に対する脂肪酸の効果。値は種々の脂肪酸濃度下における培養48時間後の傷害細胞 (propidium iodide 陽性細胞) の出現率をパーセンテージで示す (n=4)。(Yoshida H et al : J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の Fig. 1 を許可を得て転載)



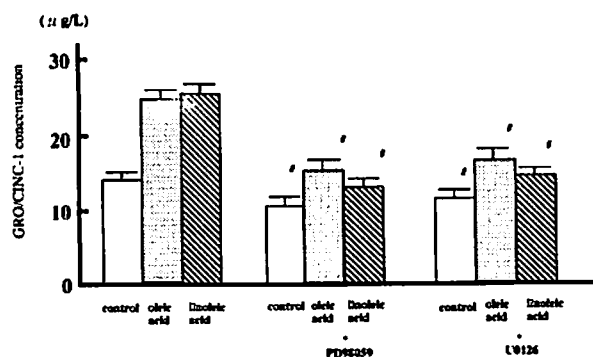
第3図 長鎖脂肪酸, TGF-β, IL-1β 投与による IEC-6細胞からの GRO/CINC-1 放出の変化。TGF-β, IL-1β, 長鎖脂肪酸 (オレイン酸, リノール酸) を投与し, 48時間培養後, ELISA 法で培養上清中の GRO/CINC-1 濃度を測定した。タウロコール酸単独投与をコントロールとした。値は means±SEM 示す。n=6。\*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群。\*P<0.05 vs. TGF-β 単独または IL-1β 単独投与。\*P<0.05 vs. TGF-β + IL-1β。(Yoshida H et al : J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の Fig. 3 を許可を得て転載)



第2図 脂肪酸が与える IEC-6細胞からの GRO/CINC-1 放出の変化。各濃度の脂肪酸投与48時間後, ELISA 法によって培養上清中の GRO/CINC-1 濃度を測定した。長鎖脂肪酸としてオレイン酸, リノール酸, アラキドン酸を用い, 中鎖脂肪酸としてオクタノイン酸を用いた。タウロコール酸 (0.1 mmol/L) 単独投与をコントロールとして用いた。値は means±SEM 示す。n=6。\*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群。(Yoshida H et al : J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の Fig. 2 を許可を得て転載)



第4図 細胞内シグナル伝達阻害薬による IEC-6細胞からの GRO/CINC-1 放出の変化。各種阻害薬として NCDC (200 μmol/L), H-7 (30 μmol/L), staurosporine (3 nmol/L) および W-7 (30 μmol/L) を投与した。長鎖脂肪酸投与下と非投与下の状態において観察した。ELISA 法で培養上清中の GRO/CINC-1 濃度を測定した。値は means±SEM 示す。n=6。\*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群もしくは脂肪酸単独投与群。(Yoshida H et al : J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の Fig. 4 を許可を得て転載)

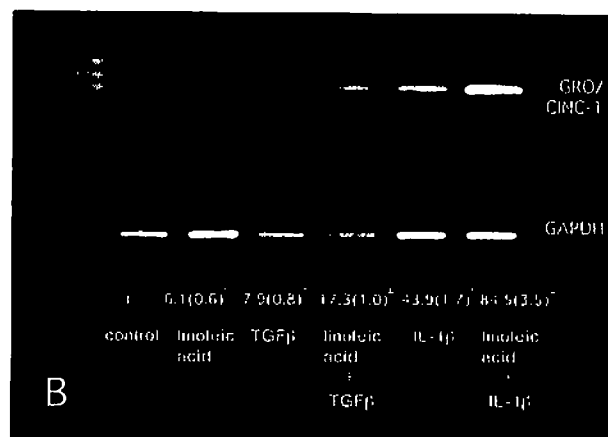
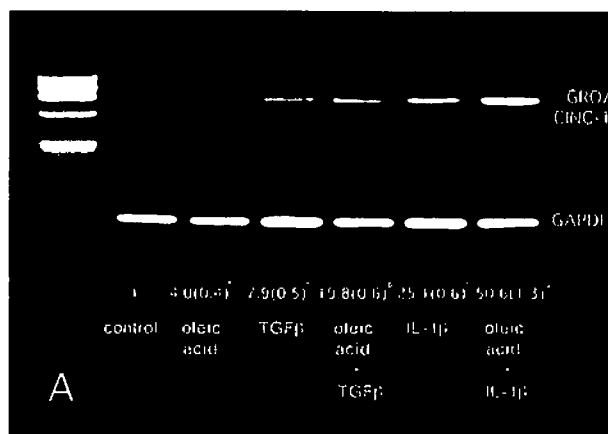


第5図 MAPK 阻害薬が与える IEC-6 細胞からの GRO/CINC-1 の放出の変化。長鎖脂肪酸投与下と非投与下において、MAPK 阻害薬である PD98059 (50 μmol/L), U0126 (20 μmol/L) を添加した。ELISA 法で培養上清中 GRO/CINC-1 の濃度を測定した。値は means±SEM. で示す。n=6。\*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群もしくは脂肪酸単独投与群。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 5 を許可を得て転載)

mmol/L の脂肪酸投与群ではタウロコール酸単独投与群 (コントロール群) と比較し、細胞数の増加に与える変化は認められなかった (オレイン酸投与群はコントロール群に対し 91.9±5.9%, リノール酸投与群はコントロール群に対し 96.3±4.0%であった)。

IEC-6 細胞の培養液中に存在する GRO/CINC-1 濃度は各種脂肪酸の投与により増加傾向を示した (第2図)。オレイン酸の培養液中濃度が 0.05 mmol/L 以上の場合、タウロコール酸単独投与群 (コントロール群) に比較して、明らかな増加を認め、濃度依存性にその増加はより顕著となった。また、タウロコール酸単独投与群と無添加群とでは有意差は認められなかった。リノール酸、アラキドン酸の投与群においても濃度依存的に増加を示した。しかし、オクタノイン酸投与群に関してはタウロコール酸単独投与群と比較して、有意差は得られなかった。

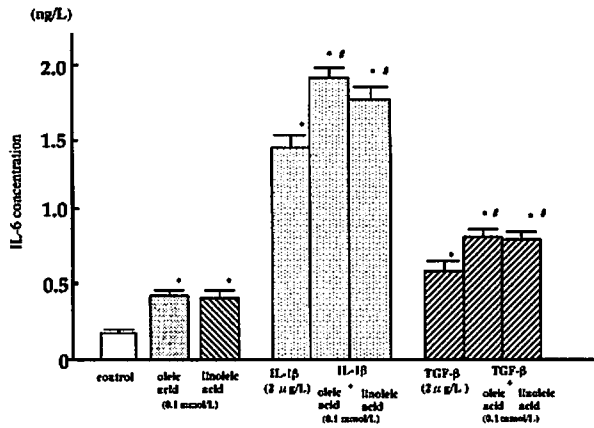
IL-1βはそれ自身単独投与で GRO/CINC-1 の濃度を増加させることが知られている。今回の実験でも 2 μg/L の IL-1β投与で GRO/CINC-1 の濃度は 181±6 μg/L を示した。TGF-βも同じく単独投与で GRO/CINC-1 の濃度を増加させることが知られており、2 μg/L の投与で GRO/CINC-1 の濃度は 30±1 μg/L を示した。オレイン酸もしくはリノール酸投与は IL-1β, TGF-β 単独投与による GRO/CINC-1 濃度の増加作用に一層の修飾を与えることが明らかとなった (第3図)。IL-1β (2 μg/L) と TGF-β (2 μg/L) の同時投与群は GRO/CINC-1 の濃度を 243±6 μg/L と著明に増加させたが、



第6図 IEC-6 細胞に脂肪酸, TGF-β, IL-1β投与6時間後の GRO/CINC-1 mRNA 発現の比較。IL-1β (2 μmol/L), TGF-β (2 μmol/L) および図 A ではオレイン酸 (0.1 mmol/L), 図 B ではリノール酸 (0.1 mmol/L) を投与した。GRO/CINC-1 mRNA 発現の強さを RT-PCR 法にて検討した。GRO/CINC-1 mRNA は 907 bp で認められる。NIH-Image を用いて発色強度を測定した。値は means±SEM. で示す。n=4。\*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群。\*P<0.05 vs. TGF-β 単独または IL-1β 単独投与群。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 6 を許可を得て転載)

さらにオレイン酸を添加すると、280±6 μg/L となり、リノール酸を添加した場合、275±8 μg/L に達した。

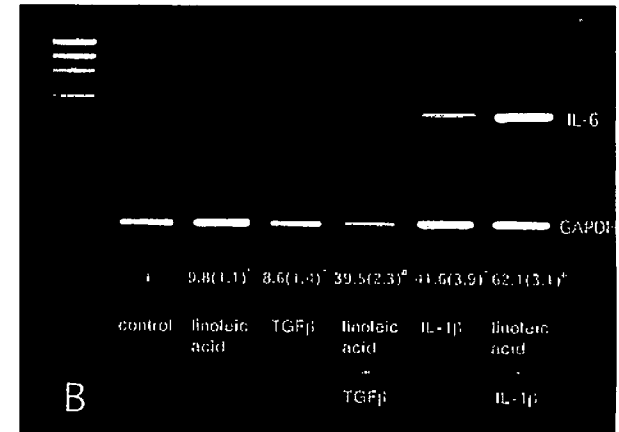
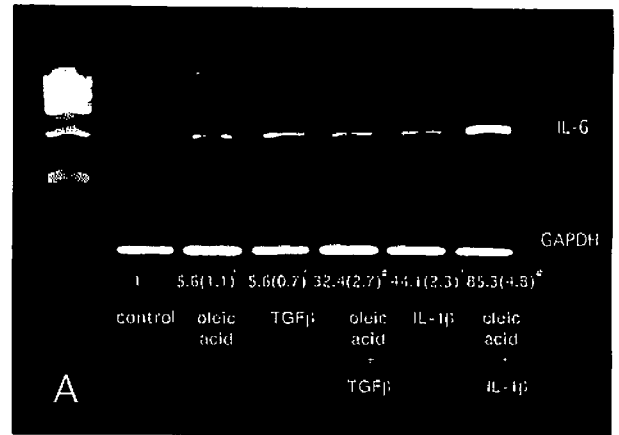
IEC-6 細胞から放出される GRO/CINC-1 に対し、細胞内シグナル阻害薬の効果を検討した (第4図)。タウロコール酸単独投与群 (コントロール群) では PLC 阻害薬である NCDC (200 μmol/L) と PKC 阻害薬である H-7 (30 μmol/L), staurosporine (3 nmol/L) の投与により GRO/CINC-1 濃度の低下を認めた。一方、calmodulin 阻害薬である W-7 (30 μmol/L) の投与では GRO/CINC-1 濃度に変化を与えなかった。また、オ



第7図 長鎖脂肪酸, TGF-β, IL-1βの組み合わせ投与による IEC-6 細胞からの IL-6 放出の変化. TGF-β, IL-1β, 長鎖脂肪酸 (オレイン酸, リノール酸) を投与し, 48 時間培養後, ELISA 法で培養上清中の IL-6 濃度を測定した. タウロコール酸単独投与をコントロールとした. 値は means±SEM. で示す. n=6. \*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与とコントロール群. \*\*P<0.05 vs. TGF-β 単独または IL-1β 単独投与群. (Yoshida H et al : J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の Fig. 7 を許可を得て転載)

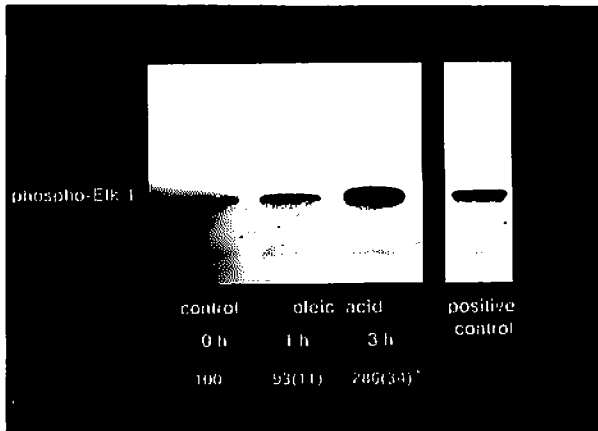
レイン酸またはリノール酸刺激により増加した GRO/CINC-1 濃度は NCDC, H-7, staurosporine の投与により, 更に大きな抑制効果を受け, 阻害薬投与前のコントロール群とほぼ同レベルまで下がった. W-7 の投与による有意な抑制はなかった. 次に MAPK 阻害薬として PD98059 (50 μmol/L), U0126 (20 μmol/L) を使用し, 検討をおこなった (第5図). これら MAPK 阻害薬の投与はタウロコール酸単独投与群 (コントロール群) において, IEC-6 細胞から放出される GRO/CINC-1 濃度を有意に抑制させた. オレイン酸もしくはリノール酸投与群においては, 上昇した GRO/CINC-1 濃度はこれら MAPK 阻害薬の投与により, より大きな抑制効果を認めた.

オレイン酸, リノール酸刺激 6 時間後の GRO/CINC-1 mRNA 量の変化を RT-PCR 法を使って検討した (第6図). さらに IL-1β, TGF-β 単独刺激, またこれらサイトカインと脂肪酸の同時投与 6 時間後の変化も検討した. コントロール群では GRO/CINC-1 mRNA はほとんど認めることができなかった. 第6図 A のオレイン酸または TGF-β 単独投与では弱いながらもバンドを認め, IL-1β 単独投与では強く認められた. この結果は ELISA で得られた結果と一致していた. オレイン酸と TGF-β あるいは IL-1β との同時投与は



第8図 IEC-6 細胞に脂肪酸, TGF-β, IL-1β 投与 6 時間後の IL-6 mRNA 発現の比較. IL-1β (2 μmol/L), TGF-β (2 μmol/L) および図 A ではオレイン酸 (0.1 mmol/L), 図 B ではリノール酸 (0.1 mmol/L) を投与した. IL-6 mRNA 発現の強さを RT-PCR 法にて検討した. IL-6 mRNA は 508 bp で認められる. NIH-Image を用いて発色強度を測定した. 値は means±SEM. で示す. n=4. \*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与とコントロール群. \*\*P<0.05 vs. TGF-β 単独または IL-1β 単独投与群. (Yoshida H et al : J Nutr 131 : 2943-2950, 2001 の Fig. 8 を許可を得て転載)

TGF-β, IL-1β 単独投与に比較し, バンドの増強を認めた. 第6図 B で示したリノール酸投与においてもオレイン酸と同様の結果が得られた. IEC-6 細胞の培養上清に長鎖脂肪酸 (オレイン酸, リノール酸) さらには TGF-β, IL-1β を組み合わせて投与し, 投与 48 時間後における培養液中 IL-6 濃度を測定した (第7図). オレイン酸またはリノール酸を 0.1 mmol/L の濃度で投与した時, タウロコール酸単独投与群 (コントロール群) に比較し, IL-6 濃度は有意な上昇を示した. しかし, オクタノイン酸の投与群では有意差は認められなかった.



第9図 脂肪酸が与える IEC-6 細胞の MAPK 活性の変化。オレイン酸投与前、1 時間後および 3 時間後に MAPK リン酸化反応をウエスタンブロット法で測定した。発色強度を NIH-Image を用いて測定した。コントロールを 100 とした。値は means $\pm$ SEM で示す。n=4。\*P<0.05 vs. タウロコール酸単独投与群。(Yoshida H et al: J Nutr 131: 2943-2950, 2001 の Fig. 9 を許可を得て転載)

IL-1 $\beta$  単独投与群 (2  $\mu$ g/L) は IL-6 濃度が 1.44  $\pm$  0.09 ng/L と著明な上昇を認めた。TGF- $\beta$  単独投与群でも 0.60  $\pm$  0.08 ng/L に達した。オレイン酸またはリノール酸と IL-1 $\beta$  との組み合わせ投与群ではそれぞれ IL-6 濃度は 1.93  $\pm$  0.07 ng/L, 1.77  $\pm$  0.09 ng/L であった。TGF- $\beta$  と長鎖脂肪酸の組み合わせ投与群でも TGF- $\beta$  単独投与群より更なる増強を認めた。脂肪酸, TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  投与 6 時間後の IL-6 mRNA 量の変化を調べた (第 8 図)。第 8 図 A ではオレイン酸, TGF- $\beta$  投与でバンドの増強を認めた。IL-1 $\beta$  単独投与においても有意なバンドの増強を示した。そして、脂肪酸+IL-1 $\beta$  の投与は、単独投与よりも増強を示した。第 8 図 B のリノール酸投与においても、脂肪酸+IL-1 $\beta$  の投与は、単独投与よりも増強を示した。つまり、ほぼオレイン酸と同様の結果が得られた。IEC-6 細胞の MAPK の活性化により、Elk-1 fusion protein のリン酸化反応が起こる。この変化をオレイン酸投与前後で検討した。ウエスタンブロットを用い、MAPK の活性化の程度を Elk-1 のリン酸化反応の程度として検討した。投与前および投与 1 時間後では有意差は認められなかったが、3 時間後では有意な増強を認めた (第 9 図)。

## 考 察

小腸粘膜上皮細胞は絶えず栄養分を含む様々な物質に暴露されている。また、上皮細胞は炎症や病原菌などに反応してサイトカインを放出することはよく知られている<sup>1,22)</sup>。しかし、正常環境において小腸粘膜上皮は種々の物質にどのような反応を示すかはあまり知られていない。不飽和脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸はいずれもリポ蛋白のサブクラスで重要な位置を占め、食物中にも豊富に含まれている。それゆえ、著者はこれらの脂肪酸を選択し、上皮細胞への反応を検討することとした。そして小腸粘膜上皮細胞は長鎖脂肪酸の刺激により、GRO/CINC-1, IL-6 のような炎症性サイトカインの分泌を増加させることを明らかにした。種々の脂肪酸がリンパ球、マクロファージ等の免疫反応を修飾することが報告されている<sup>18,23,24)</sup>。著者らの教室でもオレイン酸の吸収が小腸リンパ管内のリンパ球を刺激することを報告している<sup>19)</sup>。長鎖不飽和脂肪酸は上皮細胞からのサイトカイン分泌を刺激することで、小腸粘膜の炎症反応を調節していることが本研究により強く示唆された。また、中鎖脂肪酸は直接門脈に運ばれ、上皮細胞では代謝を受けないと考えられている<sup>25)</sup>。興味深いことに、今回の研究においても IEC-6 細胞では中鎖脂肪酸がサイトカインの分泌に変化を与えなかった。

ラット GRO/CINC-1 は 72 個のアミノ酸から成り、IL-8 スーパーファミリーの一つとされている<sup>26)</sup>。GRO/CINC-1 の作用の一つとして、好中球の運動分泌能の活性化があり、当研究室において *in vivo* の実験系で証明している<sup>27)</sup>。IL-8 は顆粒球、内皮細胞、線維芽細胞、T 細胞、角質細胞、マクロファージから分泌される<sup>28)</sup>。そして小腸粘膜上皮細胞からも分泌されている<sup>1,6)</sup>。また、短鎖脂肪酸である酪酸も小腸上皮細胞を刺激して、IL-8 産生能を修飾している可能性がある<sup>29)</sup>。さらに、酪酸は IL-1 $\beta$  または LPS (lipopolysaccharide) との同時投与により強い IL-8 分泌を誘導することが報告されている<sup>29)</sup>。今回の研究から IEC-6 細胞は長鎖脂肪酸で刺激されると、IL-6 分泌を増強することが証明された。IL-6 は急性炎症反応、マクロファージの分化、T 細胞増殖の誘導を含む幅広い作用を有している<sup>30)</sup>。また IL-6 は単独<sup>11)</sup> もしくは IL-5 との組み合わせで、パイエル板の B 細胞に IgA 産生を惹起することが知られている。長鎖脂肪酸は上皮細胞からの GRO/CINC-1 や IL-6 のような炎症性サイトカインの分泌を促進する。即ち、今回の検討より長鎖脂肪酸はこれら 2 つのサイトカイン

分泌を介して、感染防御を含む小腸免疫機構に重要な役割を果たしていることが示唆された。

IEC-6細胞はIL-1 $\beta$ もしくはTGF- $\beta$ 刺激を受けるとIL-6分泌を増強し、両者の同時刺激では、一層強く分泌を増強するとMcGeeらは報告している<sup>31)</sup>。今回の研究から、脂肪酸+IL-1 $\beta$ または脂肪酸+TGF- $\beta$ の投与により、GRO/CINC-1やIL-6はより強く分泌されることが証明された。コントロール対脂肪酸単独投与による上昇程度に比べ、サイトカイン単独対脂肪酸+サイトカイン投与による上昇程度はより大きかった。IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 刺激に対し、相乗作用もしくは強い修飾作用を脂肪酸は与えるものと考えられた。C-X-Cケモカインの分泌に至る細胞内伝達機構は脂肪酸刺激による場合とサイトカイン刺激による場合とでは異なる可能性が考えられた。高濃度のIL-1は活動期の炎症性腸疾患、病原性大腸菌感染時、実験的に誘発された大腸炎で認められる<sup>31)</sup>。IL-1やIL-6と同様TGF- $\beta$ も炎症反応に関与している<sup>32,33)</sup>。著者の今回の研究から、サイトカイン刺激下の小腸上皮細胞は、さらに長鎖脂肪酸刺激を受けるとC-X-Cケモカイン、IL-6の分泌を有意に促進することが示唆された。つまり、粘膜の炎症反応においても、脂肪酸への暴露は重要な役割を果たしていると考えられた。著者らの研究室では、オレイン酸を多く含有した食事をラットに摂取させ、腸間膜リンパ節などの小腸免疫機構にどのような効果を与えるかについて報告しているが<sup>34)</sup>、食物中の脂肪酸は腸管リンパ組織の免疫学的機能を修飾し、クローン病をはじめとする炎症性腸疾患の病態を左右する重要な因子であると考えられる。

脂肪酸刺激からサイトカイン産生に至る細胞内シグナル伝達経路を検討する目的で種々のシグナル阻害薬をIEC-6細胞に投与した。脂肪酸刺激のない状態ではGRO/CINC-1の産生はphospholipase C (PLC) 阻害薬であるNCDC<sup>35)</sup>およびprotein kinase C (PKC) 阻害薬であるH-7やstaurosporine<sup>36)</sup>により一部抑制された。つまり、GRO/CINC-1の産生にPLC、PKCの活性化が一部関与していることを示している。一方脂肪酸刺激で誘導されたGRO/CINC-1は、NCDCおよびH-7、staurosporineにより大きく抑制された。これは脂肪酸刺激を介してGRO/CINC-1が産生される細胞内伝達経路にはPLCとPKCが非常に重要な役割を果たしていることを示している。生理学的にPKCはジアシルグリセロールにより活性化される。ジアシルグリセロールはPLCによるホスファチジルイノシトール4,5-2リン酸の加水分解の結果発生し、副産物として、1,4,5-イノシトール3リン酸(IP3)が生じる。IP3はカルシ

ウムの移動に関与している。しかし、興味深いことに脂肪酸刺激で誘導されたGRO/CINC-1はカルモジュリン阻害薬であるW-7投与では有意な抑制はみられなかった。この点については今後も検討の必要性があると思われる。

MAPKファミリーであるERK1とERK2は細胞外シグナル調節キナーゼであり、蛋白のリン酸化を通して細胞の機能を修飾している。そして様々な方法で遺伝子発現を調節している。例えば、ERK1/2はp90rskとp62YCFをリン酸化する。p90rskは蛋白合成を刺激するS6キナーゼであり、p62YCFはc-fos転写を増強する転写因子である<sup>37)</sup>。消化管ではMAPKシグナル伝達経路の活性化は傷害を受けた粘膜の治癒に重要な役割を果たしていると思われる。Salmonella typhimurium感染によるMAPKの活性化は、AP-1とnuclear factor- $\kappa$ B転写の活性化を誘導し、続いてIL-8を含む炎症性サイトカインの合成を促すことがHobbieらにより証明された<sup>38)</sup>。また、tumor necrosis factor- $\alpha$ 刺激は、p38MAPKの抑制を介してIL-6産生を抑制するとの報告もある<sup>39)</sup>。IEC-6細胞における脂肪酸刺激下のGRO/CINC-1産生は、MAPK阻害薬(PD98059, U0126)<sup>40,41)</sup>により強く抑制されることが今回の研究で認められた<sup>42)</sup>。即ち長鎖脂肪酸に暴露された小腸上皮細胞において、ERK1/2刺激とサイトカイン産生との間に密接な関連している可能性が示唆されたが、その詳細な経路の解明には今後の研究が必要である。

## 総 括

外界と生体との境界であり、第一線の生体防御機構の場である小腸粘膜上皮細胞が、長鎖脂肪酸吸収の際に腸管免疫ネットワークに与える変化を、*in vitro*の系で検討した。その結果、上皮細胞は長鎖脂肪酸の刺激で、炎症性サイトカイン(GRO/CINC-1, IL-6)の分泌を増加させることが明らかとなった。しかし、中鎖脂肪酸の刺激では増加を示さなかった。TGF- $\beta$ またはIL-1 $\beta$ 投与でもこれらサイトカイン分泌は増加するが、長鎖脂肪酸の同時投与は相加的効果を与え、さらなる増強を示した。上皮細胞からの炎症性サイトカイン分泌には長鎖脂肪酸刺激下では、細胞内シグナルとしてPLCとPKCが重要な因子であることが認められた。さらに、上皮細胞内MAPKの活性化が証明され、MAPK阻害薬の同時投与はGRO/CINC-1の有意な低下を示した。即ち脂肪酸刺激とサイトカイン合成にはMAPKが深く関わっている可能性が示唆された。以上のことから、脂肪酸と

腸管の炎症とは密接に関係しており、炎症性腸疾患をはじめとする腸炎の治療において、食事療法の重要性を認識することはもちろんのことであるが、今後も腸管炎症の発症機序と増悪因子の解明に努め、サイトカインまたはその活性経路を制御する薬剤の開発を進めていく必要があると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲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石井裕正教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり直接御指導いただきました防衛医科大学校内科学第二講座三浦総一郎教授に深謝申し上げます。また、貴重な御助言、御協力をいただきました研究室の諸先生方に深謝いたします。

本研究の一部は第84回日本消化器病学会総会（1998年横浜）、第40回日本消化器病学会大会（1998年東京）、第29・30回日本消化吸収学会（1998年東京、1999年岐阜）、American Gastroenterological Association（1998年ニューヨーク、1999年オーランド）にて発表した。

#### 文 献

- 1) Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF : Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 105 : 1689-1697, 1993
- 2) McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR : Transforming growth factor- $\beta$  enhances interleukin-6 secretion by intestinal epithelial cells. *Immunology* 77 : 7-12, 1992
- 3) McGee DW, Beagley KW, Aicher WK, McGhee JR : Transforming growth factor $\beta$  and IL-1 $\beta$  act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J Immunol* 151 : 970-978, 1993
- 4) Jung HC, Eckmann L, Yang S, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF : A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95 : 55-65, 1995
- 5) Baggiolini M, Dewald B, Moser B : Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol* 55 : 97-179, 1994
- 6) Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J : Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 61 : 4569-4574, 1993b
- 7) McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL : Salmonella typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers : transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* 123 : 895-907, 1993
- 8) Laurent F, Eckmann L, Savidge TC, Morgan G, Theodos C, Naciri M, Kagnoff MF : Cryptosporidium parvum infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokine. *Infect Immun* 65 : 5067-5073, 1997
- 9) Bromander AK, Kjerrulf M, Holmgren J, Lycke N : Cholera toxin enhances alloantigen presentation by cultured intestinal epithelial cells. *Scand J Immunol* 37 : 452-458, 1993
- 10) McGee DW, Elson CO, McGhee 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, 1993b
- 11) Beagley KW, Eldridge JH, Lee F, Kiyono H, Everson MP, Koopman WJ, Hirano T, Kishimoto T, McGhee JR : Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J Exp Med* 169 : 213-2148, 1989
- 12) Kelley DS, Nelson GJ, Serrato CM, Schmidt PC, Branch LB : Effect of type of dietary fat on indices of immune status of rabbit. *J Nutr.* 118 : 1376-1384, 1988
- 13) Gurr MI : The role of lipids in the regulation of the immune system. *Prog Lipid Res* 22 : 257-287, 1983
- 14) Erickson KL : Dietary fat modulation of immune response. *Int J Immunopharmacol* 8 : 529-543, 1986
- 15) Cuthbert JA, Lipsky PE : Promotion of human T lymphocyte activation and proliferation by fatty acids in low density and higher density lipoproteins. *J Biol Chem* 261 : 3620-3627, 1986
- 16) Cuthbert JA, Lipsky PE : Lipoproteins may provide fatty acids necessary for human lymphocyte proliferation by both low density lipoprotein receptor-dependent and-independent mechanisms. *J Biol Chem* 264 : 13468-13474, 1989
- 17) Tebbey PW, Buttke TM : Molecular basis for the immunosuppressive action of stearic acid on T cells. *Immunology* 70 : 379-386, 1990
- 18) Miura S, Imaeda H, Shiozaki H, Ohkubo N, Tashiro H, Serizawa H, Tsuchiya M, Tso P : Increased proliferative response of lymphocytes from intestinal lymph during long chain fatty acid absorption. *Immunology* 78 : 142-146, 1993
- 19) Tsuzuki Y, Miura S, Kurose I, Suematsu M, Higuchi H, Shigematsu T, Kimura H, Serizawa H, Hokari R, Akiba Y, Yagita H, Okumura K, Tso P, Granger DN, Ishii H : Enhanced lymphocyte interaction in postcapillary venules of Peyer's patches during fat absorption in rats. *Gastroenterology* 112 : 813-825, 1997
- 20) Quaroni A, Wands J, Trestad TL, Isselbacher KJ : Epithelial cell cultures from rat small intestine. *J Cell Biol* 80 : 245-265, 1979



- 21) Johnston JM, Borgstrom B : The intestinal absorption and metabolism of micellar solutions of lipids. *Biochim Biophys Acta* 84 : 412-423, 1964
- 22) Gibson P, Rosella O : Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells *in vitro* : response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut* 37 : 536-543, 1995
- 23) Bates EJ, Ferrante A, Harvey DP, Poulos A : Polysaturated fatty acids increase neutrophil adherence and integrin receptor expression. *J Leukoc Biol* 53 : 420-426, 1993
- 24) Yongqin L, Ferrante A, Poulos A, Harvey DP : Neutrophil oxygen radical generation. Synergistic responses to tumor necrosis factor and mono/polyunsaturated fatty acids. *J Clin Invest* 97 : 1605-1609, 1996
- 25) Greenberger VJ, Rodgers JB, Isselbacher KH : Absorption of medium and long chain triglycerides : factors influencing their hydrolysis and transport. *J Clin Invest* 45 : 217-227, 1966
- 26) Watanabe K, Kinoshita S, Nakagawa H : Purification and characterization of cytokine-induced neutrophil chemoattractant produced by epithelioid cell line of normal rat kidney (NRK-52E cell). *Biochem Biophys Res Commun* 161 : 1093-1099, 1989
- 27) Suzuki H, Suematsu M, Miura S, Liu YY, Watanabe K, Miyasaka M, Tsurufuji S, Tsuchiya M : Rat CINC/gro : a novel mediator for locomotive and secretagogue activation of neutrophils *in vivo*. *J Leukoc Biol* 55 : 652-657, 1994
- 28) Oppenheim JJ, Zachariar COC, Mukaida N, Matsushima K : Properties of the novel inflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9 : 617-648, 1991
- 29) Fusunyan RD, Quinn JJ, Ohno Y, MacDermott RP, Sanderson IR : Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1 $\beta$  and lipopolysaccharide. *Pediatr Res* 43 : 84-90, 1998
- 30) Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T : Biology of multifunctional cytokines : IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 4 : 2860-2867, 1990
- 31) Ligumsky M, Simon PL, Karmeli F, Rachmilewit D : Role of interleukin-1 in inflammatory bowel disease-enhanced production during active disease. *Gut* 31 : 686-689, 1990
- 32) Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey JR, Moses HL : Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type b. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86 : 1578-1582, 1989
- 33) Koyama S, Podolsky DK : Differential expression of transforming growth factor  $\alpha$  and  $\beta$  in rat intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 83 : 1768-1773, 1989
- 34) Serizawa H, Miura S, Imaeda H, Tanaka S, Kimura H, Tsuzuki Y, Han JY, Toda K, Hamada Y, Tsuchiya M, Ishii H : Reversal of altered intestinal mucosal immunity in rats fed elemental diet by supplementation of oleic acid. *J Gastroenterol Hepatol* 11 : 811-818, 1996
- 35) Nakaki T, Roth BL, Chuang DM, Costa E : Phasic and tonic components in 5HT<sub>2</sub> receptor-mediated rat aorta contraction : Participation of Ca<sup>2+</sup> channels and phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther* 234 : 442-446, 1985
- 36) Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y : Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 266 : 1265-1268, 1991
- 37) Takahashi M, Berk BC : Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin-sensitive kinase. *J Clin Invest* 98 : 2623-2631, 1996
- 38) Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE : Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 159 : 5550-5559, 1997
- 39) Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Haegeman G, Cohen P, Fiers W : The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumor necrosis factor. *EMBO J* 15 : 1914-1923, 1996
- 40) Dionne S, D'Agata ID, Ruummele FM, Levy E, St-Louis J, Srivastava AK, Levesque D, Seidman EG : Tyrosine kinase and MAPK inhibition of TNF- $\alpha$  and EGF-stimulated IEC-6 cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 242 : 146-150, 1998
- 41) Choi C, Xu X, Oh JK, Lee S J, Gillespie Y, Park H, Jo H, Benveniste EN : Fas-induced expression of chemokines in human glioma cell : involvement of extracellular signal-activated protein kinase. *Cancer Res* 61 : 3084-3091, 2001
- 42) Yoshida H, Miura S, Kishikawa H, Hirokawa M, Nakamizo H, Nakatsumi R, Suzuki H, Saito H, Ishii H : Fatty acids enhance GRO/CINC-1 and interleukin-6 production in rat intestinal epithelial cells. *J Nutr* 131 : 2943-2950, 2001

学位論文

粘膜固有層リンパ球の小腸微小血管における接着の生体観察

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：石井裕正教授)

ふじもり ひとし  
藤 森 齊

(平成 15 年 3 月 25 日受付)

Key Word lamina propria lymphocytes, adhesion molecules, microvessels, migration

リンパ球はリンパ組織のみならず非リンパ組織内をも循環し、その循環動態は免疫現象の中で重要な役割を担っている<sup>1,2)</sup>。抗原感作を受けていないナイーブリンパ球は恒常的に血管系・リンパ系を介して二次リンパ組織間を循環しており、リンパ球が二次リンパ組織において抗原と出会う確率を高めている。ナイーブリンパ球はリンパ節やパイエル板内の背の高い内皮細胞を持つ高内皮細胞静脈 (HEV: high endothelial venule) の血管壁を通り抜けてリンパ節及びパイエル板内に移動し、リンパ管から胸管を経て大循環に戻り、体内を再循環する。このようなリンパ組織への回帰現象をホーミングと呼ぶ。リンパ球のホーミングはランダムにおこるものではなく、明確な特異性を有しており、それはリンパ球-血管内皮細胞間の認識機構により緻密に制御されている<sup>3,4)</sup>。一方、メモリーリンパ球やエフェクターリンパ球は非リンパ組織の血管内皮に migration することが知られている<sup>3,5)</sup>。

消化管粘膜は腸管内の微生物や食物由来の抗原物質による生物学的侵襲のみならず、物理・化学的傷害作用からも生体を保護するとともに、必要な栄養物を選択的かつ積極的に吸収し、また生体内にある有害な物質を排除するという、高度に分化したバリア機能を有している。粘膜表面が暴露されている微生物抗原や食物抗原に対して、免疫反応を誘導する担当リンパ装置を腸管関連リンパ組織 (GALT: gut-associated lymphoid tissue) と呼ぶ。腸管由来の免疫芽球が腸管壁および GALT に特異的に migration することが、動物の生体観察により

これまで報告されてきた<sup>6-8)</sup>。しかし、腸管リンパ球がパイエル板や腸管粘膜にどのように migration するか、そしてその際にどのような分子機構が働くかに関しては解明されていない。

一般的に、白血球の血管内皮細胞への結合から浸潤に至る過程は4つのステップからなると考えられている。すなわち、1) L-セレクチンによる弱い結合から rolling に至るステップ、2) ケモカインなどによるインテグリンの接着機能活性化のステップ、3) 活性化されたインテグリンによる強い接着のステップ、4) 内皮細胞間をすりぬけ組織へ浸潤するステップ、である。パイエル板の傍濾胞域 T 細胞領域には postcapillary venule (PCV) がありリンパ球の侵入門戸となっている。マウス腸管リンパ系では、リンパ球表面の  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン及び血管内皮上の mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) との結合が特異的ホーミングレセプターとして機能することが知られている<sup>9-11)</sup>。MAdCAM-1 はパイエル板 HEV へのリンパ球の接着を阻害する MECA-367 抗体が認識する HEV 上の mucosal addressin として同定された免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖蛋白質である。VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) や ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) と相同性のある免疫グロブリン様ドメイン1で  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと結合し、ムチン様ドメインで L-セレクチンと結合するユニークな構造をもっている。しかし、リンパ球の migration では、単一の接着分子が全ての機能を担ってい

本論文は、Fujimori H, Miura S, Koseki S, Hokari R, Komoto S, Hara Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Ishii H : Intravital observation of adhesion of lamina propria lymphocytes to microvessels of small intestine in mice. Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の一部を含む。

るのでなく、複数の接着分子がお互い補い合いながら機能していると考えられており、腸管におけるリンパ球と HEV 内皮との反応には、L-セレクトイン及び CD11a/CD18 分子も関与していることが明らかにされてきた<sup>12-14)</sup>。さらに最近、好中球の血管内皮上における rolling に、L-セレクトインのみならず、P-セレクトインおよび E-セレクトインが関わることを報告された<sup>15)</sup>。

パイエル板は腸管免疫機構の誘導部位 (inductive site) であるが、その実効部位 (effector site) を構成するのが粘膜固有層や腸管上皮の免疫担当細胞群である。小腸粘膜固有層は、病的な状態でないにもかかわらず、リンパ球が豊富に存在して免疫応答のエフェクター機能を発揮しており、いわゆる生理的な条件下で炎症細胞浸潤が常にみられている部位である。粘膜固有層はパイエル板で感作され分化した IgA<sup>+</sup>B 細胞が IgA 形質細胞に最終分化する場所であり、その際には Th2 細胞から分泌される IL-5, IL-6, IL-10 などのサイトカインが関与している。粘膜固有層 T 細胞はパイエル板で受けたと同じ感作抗原の刺激を再び受けるとサイトカインを産生したり、直接的に細胞傷害性 (cytotoxic) に働き、エフェクター機能を発揮する。粘膜固有層 T 細胞は末梢血中とは相違し、増殖反応性が低く、高度に分化したものと考えられている。同時に活性化された状態にあり、サイトカインの産生能や細胞傷害性が非常に強いといわれている<sup>16)</sup>。Jalkanen ら<sup>17)</sup>は、粘膜固有層から分離されたリンパ球のうち、小径のリンパ球は腸粘膜及び末梢リンパ節の双方の HEV に接着するが、immunoblast は主に腸粘膜の HEV に接着する傾向があることを報告した。さらに最近、彼らは、immunoblast の腸粘膜 HEV における接着が、抗  $\beta 7$  インテグリンモノクローナル抗体により、ほぼ完全に抑制されることを示した<sup>18)</sup>。しかし、粘膜固有層リンパ球の接着に関する彼らの実験は凍結切片を用いた *in vitro* のアッセイであり、浮遊細胞中のリンパ球が本来の生理的な migration を反映しない可能性がある<sup>19)</sup>。これまでに粘膜固有層リンパ球 (LPLs) が腸管のパイエル板及び粘膜固有層自体にどのようにホーミングするか *in vivo* で観察した報告はない。

今回の実験は、リンパ球の migration を生体顕微鏡を用いて観察することにより、(1) 脾臓 T リンパ球と粘膜固有層 T リンパ球という由来の異なるリンパ球が、腸管パイエル板および粘膜固有層にどのように migration するか、(2)  $\alpha 4$  インテグリン、 $\beta 7$  インテグリン、CD11a, MAdCAM-1, 及び L-セレクトインがどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。

## 対象および方法

### 1. リンパ球採取と T 細胞の分離

実験には標準 chow diet で飼育した BALB/c 雌性マウス (8 週齢) を使用した。実験動物の取り扱いには慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに準拠し、これを遵守した。

脾臓リンパ球 (SPL) は Barret らの報告に従って分離した<sup>20)</sup>。すなわち、脾臓を機械的に破碎し、赤血球を lysis buffer (リン酸/塩酸アンモニウム) で溶血させ、残った細胞浮遊液を洗浄し実験直前まで 5% fetal calf serum を含む RPMI 1640 (pH 7.4, GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) 溶液を含む氷冷試験管内で保存した。粘膜固有層リンパ球 (LPL) は Davies らの報告による方法を使用し分離した<sup>21)</sup>。すなわち、反転した小腸を 4 等分し、パイエル板を切除した後、5% fetal calf serum を含む 45 ml の Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free Hanks' balanced salt solution (HBSS; GIBCO) 溶液 (50 ml チューブ) に移し、37°C の恒温室で 45 分間、150 rpm で振盪させた。振盪後、細胞浮遊液を除去し、残った小腸を 90 U/ml の コラゲナーゼ type 1 (Sigma, St Louis, MO) を含んだ HBSS に移し、37°C で 25 分間、緩徐に攪拌した。攪拌後の細胞浮遊液をナイロンメッシュで濾過し、遠沈した。LPL は 44% と 70% の Percoll (Pharmacia, Sweden) の比重遠心により採取した。20°C, 1800 rpm で 20 分間遠心した後、44% と 70% Percoll の境界に集積した細胞を採取し、洗浄後、RPMI に再浮遊した。

T 細胞分画の分離は、ナイロンウールカラム (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) を用いて行った。1% fetal calf serum 加 RPMI 3 ml 中に  $2 \times 10^7$  個のリンパ球を含んだ懸濁液を 1 g のナイロンウールカラムに添加し 37°C で 1 時間 incubation して、T cell rich 分画を得た。

### 2. リンパ球の Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) による蛍光標識

Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDSE; Molecular Probes, Eugene, OR) 15.6 mM の濃度で dimethylsulfoxide に溶解し、実験に使用するまで、-80°C で 300  $\mu$ l ずつ保存した。リンパ球  $1 \times 10^7$  個を、保存溶解液 20  $\mu$ l を 20 ml の RPMI で希釈した溶液中 37°C の恒温槽で 30 分間 incubation し、標識した。標識されたリンパ球を遠心沈殿させ、2 度洗浄し

た後、0.2 ml の溶液に再浮遊させ 30 分以内に使用した。CFDSE は細胞質の esterase で加水分解された後、安定な蛍光色素 carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) となり細胞質蛋白と結合することにより細胞内に留まる<sup>22)</sup>。

### 3. 小腸パイエル板及び絨毛粘膜におけるリンパ球 migration の観察

マウスを sodium pentobarbital (50 mg/kg) 腹腔内麻酔下に正中切開にて開腹した。パイエル板観察には、回腸末端 5 cm を選んでプラスチック板上に展開した。腸管は 37°C の生理食塩水を持続的に滴下することで温度と湿度を保った。小型電気メスにて小腸に 2 箇所の小切開を加えた後、Krebs-Ringer 液 (pH 7.4) を管腔に注入し、食物残渣を取り除いた。小腸の管腔内圧はループの口側から vinyl tube を通して 37°C の Krebs-Ringer 液を注入することで 15 cmH<sub>2</sub>O を維持し、小腸の可動性を最小限にし解像度の良い観察画面を得た。パイエル板の微小循環を漿膜側から TV ビデオ記録装置を装着した倒立型生体顕微鏡 (Diaphot, TMD-2s: Nikon, Tokyo, Japan) で、10 倍または 20 倍の対物レンズを用いて観察し、S-VHS のビデオテープに記録した<sup>23)</sup>。周辺腸管及び腸間膜は Krebs-Ringer 液を浸した綿ガーゼで覆った。蛍光標識したリンパ球は蛍光を 470~490 nm で励起し 520 nm のフィルターを通して contrast-enhancing unit 付の silicon-intensified target image tube camera (C-2400-08, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu city, Japan) を装着した蛍光顕微鏡にて TV モニター上に映し、観察した。CFSE で標識したリンパ球 (1×10<sup>7</sup>個/0.2 ml) を同系マウスの頸静脈から 3 分かけて注入した。標識された T 細胞とパイエル板の微小血管との interaction は経時的に最初の 20 分間、以後 10 分間隔で 40 分まで観察した。血管壁に沿って転がるリンパ球を 'rolling lymphocytes' と定義した。注入 10 分後、postcapillary venule に流入するリンパ球を 1 分間観察し、rolling したリンパ球の割合を計測した。血管壁に接着し 30 秒以上同一部位に留まるものを 'sticking lymphocytes' と定義し、1 mm<sup>2</sup> あたりの数を計測した。

また、小腸絨毛におけるリンパ球の migration を粘膜面から観察した。回腸の腸間膜付着面の対側に沿って小型電気メスで切開し、プラスチック板に展開して粘膜面から観察し、蛍光標識されたリンパ球の動態を蛍光顕微鏡下に観察した<sup>24)</sup>。この方法により、小腸粘膜絨毛頂部が楕円形に描出され、微小血管が観察された。血管壁

に沿って転がるリンパ球を 'rolling lymphocytes' と定義し、リンパ球注入 10 分後に 1 分間観察して、rolling したリンパ球の割合を計測した。パイエル板観察と同様、30 秒以上同一部位に留まるリンパ球を 'sticking lymphocytes' と定義した。

### 4. 抗接着分子抗体と百日咳毒素の関与

次にリンパ球を各種接着分子の中和抗体と incubation し、微小血管における循環動態を観察した。各種接着分子に対する中和抗体 L-セレクチン (MEL-14)、 $\alpha$  E インテグリン (M 290)、 $\beta$  7 インテグリン (Fib 27)、CD11a (M17/4) は PharMingen Co. (San Diego, CA) から、 $\alpha$  4 インテグリンに対する中和抗体 (PS/2) は American Type Culture Collection (Manassas, VA) からそれぞれ購入した。またコントロールとして、ラット IgG (R35-95, Pharmingen) を同条件で使用した。1×10<sup>7</sup>個のリンパ球を抗体 100  $\mu$ g/ml の濃度の抗体とともに注入前に 30 分間 incubation した。別の実験では抗 MAdCAM-1 抗体 (MECA 367, Pharmingen, 2 mg/kg) を 0.2 ml 生理食塩水に溶解し、リンパ球注入 30 分前に頸静脈より投与した。また抗 MAdCAM-1 抗体 F(ab)<sub>2</sub> fragment の効果も検討し、コントロールとしては非中和抗体である MECA-89 (PharMingen) を使用した。さらにリンパ球を百日咳毒素 (PTX, 100 ng/ml; List Biological Lab, Campbell, CA) と 37°C で 2 時間 incubation し、PTX 感受性シグナル伝達系がリンパ球と微小血管との反応にどのように関与しているかを検討した。

### 5. 組織学的検査

小腸粘膜における MAdCAM-1 の表出を LSAB (labeled streptavidin biotin) 法を用いて免疫組織学的に検討した。小腸を取り出し、PLP (periodate.lysine-paraformaldehyde) 溶液固定した後 OCT (optimum cutting temperature) コンパウンド (Miles Inc., Elkhart, IN) に浸漬して凍結した。6  $\mu$ m のクリオスタット切片を poly-L-Lysin コートされたスライドグラスに貼付し 20°C で 1 時間乾燥した。切片を 1% の Triton X を含んだ Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 内で 5 分間洗浄した後、5% ヤギ血清入り PBS 内で incubation した。抗 MAdCAM-1 モノクローナル抗体を PBS で 50 倍希釈し、4°C で一晩反応させた。切片はビオチン化された抗ラット IgG 抗体 (Amersham International plc., Buckinghamshire, England) 室温 1 時間 incubation した後、FITC 結合

streptavidin (Amersham International plc) と室温で30分間反応させた。それぞれの段階で切片は1% bovine serum albumin を含んだPBSで洗浄した。切片はグリセロールゼリーで封入し、蛍光顕微鏡(BX60, Olympus, Tokyo)で観察した。

## 6. Tリンパ球の接着分子解析

T細胞浮遊液を0.2%ウシ血清アルブミン及び0.1% NaN<sub>3</sub>を含むHBSSで洗浄した。以後の細胞処理には、この溶液を使用し4℃が保たれるようにした。蛍光免疫染色は、25 µl 溶液中 2×10<sup>6</sup>個のリンパ球を含む浮遊液をリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体1 µgとincubationした。使用したモノクローナル抗体はL-セレクチン(MEL-14)、α4インテグリン(R1-2)、αEインテグリン(M290)、β7インテグリン(FIB27)、CD11a(M17/4)、α4β7インテグリン(DATK-32)、CD4(RM4-5)、CD8(53-6.7)、CD69(H1.2F3)、CD45RB(16A)、γδTCR(GL3)(PharMingen)を使用した。30分間のincubation後、リンパ球を400 µlのHBSSで2000 rpm、5分間の遠心で3回洗浄した。コントロールには、アイソタイプを一致させた関連のない抗体を使用した。1次抗体結合リンパ球をFITC結合抗ラット/ハムスターIgG抗体で標識した。Flow cytometryの解析はFACSsort(Becton Dickinson, Mountain View, CA)を使用した。検体解析の際にはpropidium iodideを5 µg/mlの濃度で加えて、陽性の細胞を死細胞として解析から除外した。

## 7. 統計解析

全ての結果は平均値±標準偏差で示した。統計はANOVAとFisher's post-hoc testを用いた。p<0.05を統計学的有意差ありとした。

# 結 果

## 1. リンパ球表面接着分子の解析

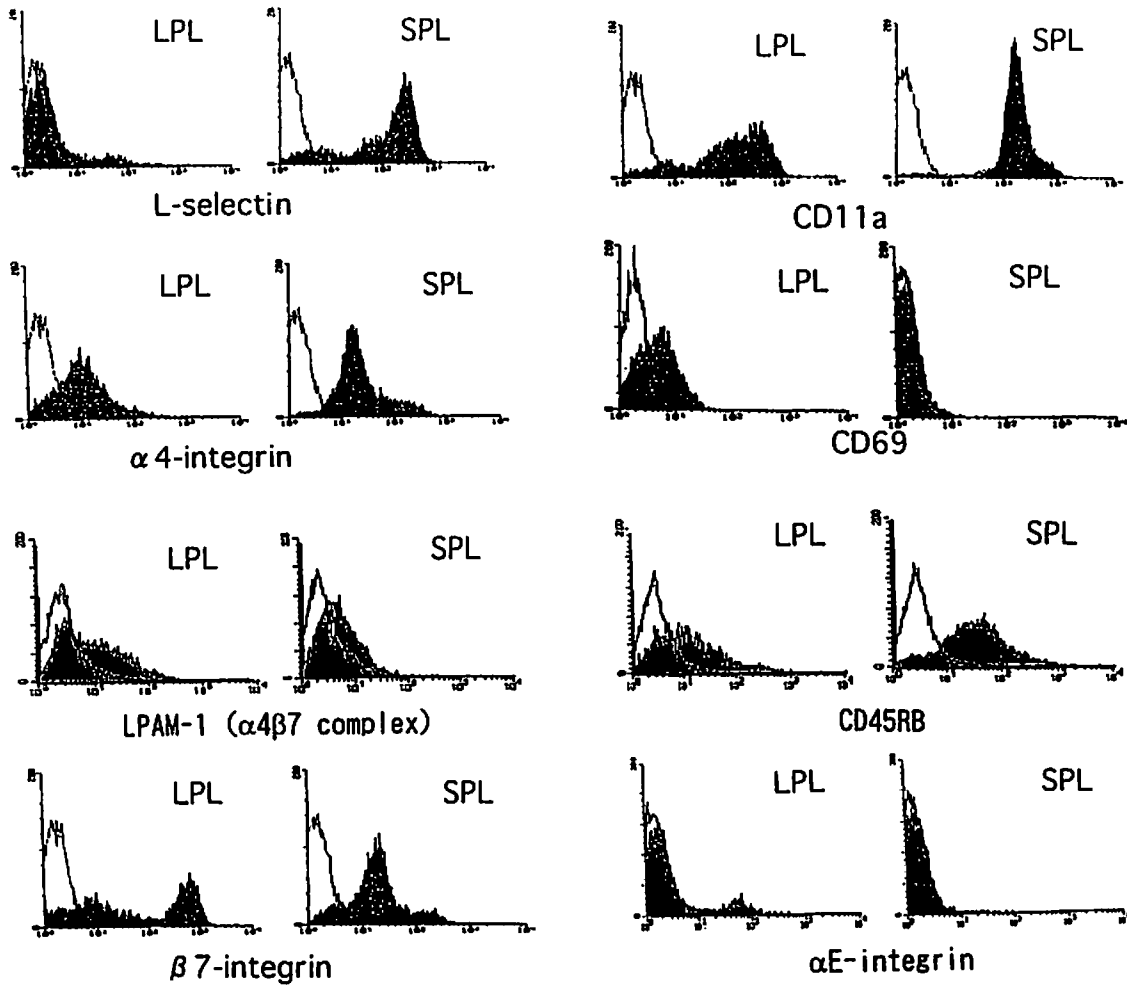
LPL及びSPLにおけるCD69とCD45RB及び各種細胞接着分子(L-セレクチン、α4インテグリン、αEインテグリン、β7インテグリン、CD11a)の表出を特異的モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーにより解析した。LPLは54.4%がCD4陽性、33.9%がCD8陽性で、SPLでは56.1%がCD4陽性、31.1%がCD8陽性であった。LPLの10%にαEインテグリンが、3%にγδTCRの発現がみられ、上皮間リンパ球(IEL)の混入が考えられたが、SPLでは発現を認めなかった。

第1図に示したように、L-セレクチンはSPLにおいてLPLより強く発現していたが、β7インテグリン及びvery-early-activation antigen(CD69)の表面発現は、LPLにおいてSPLより強く発現がみられた。ナイーブマーカーであるCD45RBはLPLでは弱発現であったが、SPLでは強く発現していた。また、LPLではCD11aの発現がSPLより弱かった。α4インテグリンの発現に有意差はなかったが、α4β7インテグリンのcombinatorial epitopeに対する抗体DATK-32の解析ではLPLで有意に強発現していた。

## 2. バイエル板 postcapillary venule における Tリンパ球の interaction

小腸バイエル板におけるTリンパ球とpostcapillary venule(PCV)との反応を蛍光顕微鏡で観察した。観察中、少数のSPLが短時間血管壁と反応し(rolling)、それらは血管壁から離れて血流中に戻るか、血管壁に強固に接着した。第1表に示した如く、リンパ球注入10分後に流入するリンパ球数は、SPLとLPLとの間で有意差は認めなかった。SPL注入10分後のrolling lymphocytesの割合は約70%で、この割合は20分後まで持続した。67%のrolling SPLはその後に血管壁から離れた。これに対して、リンパ球注入10分後のrolling LPLの割合はSPLの場合より著明に低値であった(第1表)。バイエル板PCVにおけるrolling SPLの割合は、L-セレクチン、α4インテグリン、β7インテグリンに対するモノクローナル抗体の処理により著明に減少した。また、rolling SPLの割合は抗MAdCAM-1抗体の処理においても著明に減少した。抗CD11a抗体に対する抗体処理ではPCVにおけるrolling SPLの割合は変化を認めなかったが、rollingしたリンパ球のほとんどが(約93%)が血管壁から離れていった。第2図は注入30分後にバイエル板の微小血管に接着したリンパ球の顕微鏡写真の像である。SPLがバイエル板PCVに選択的に接着するのに対して、LPLではほとんど接着が見られていない。第3図Aはバイエル板PCVにおけるSPLとLPLの接着数の経時的変化を示したものである。リンパ球数は微小血管中及び血管壁に沿って接着したものを含んでいる。接着するSPLの数はリンパ球注入10分後まで増加し、30分後以降は細胞が血管壁を通りぬけてしまうためプラトーとなる。それに対してPCVに接着するLPLの数は少数で、観察期間中に増加することはなかった。

各種接着分子がリンパ球のバイエル板PCVにおける接着にどのように関わっているかを明らかにするために、



第1図 粘膜固有層 T リンパ球, 及び脾臓 T リンパ球表面における各種接着分子 (L-セレクトリン,  $\alpha 4$  インテグリン,  $\beta 7$  インテグリン, CD11a, 及び  $\alpha E$  インテグリン) と CD69 及び CD45RB の発現をフローサイトメトリーで解析した。  $2 \times 10^6$  個のリンパ球をまず抗マウス抗原に対するモノクローナル抗体 (L-セレクトリン (MEL-14),  $\alpha 4$  インテグリン (R1-2),  $\beta 7$  インテグリン (FIB27), LPAM-1 (DATK-32), CD11a (M17/4), CD69 (H1-2F3), CD45RB (16A), 及び  $\alpha E$  インテグリン (M290)) と incubate した。 それらを  $1 \mu\text{g}$  の FITC 標識した抗ラット IgG もしくは抗ハムスター IgG と反応させた。 FACSsort (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いてフローサイトメトリーを施行した。 生細胞のデータを CONSORT ソフトウェアを用いて解析した。 最低 4 匹の T 細胞を検討し、代表的データを示した。 (Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 1. を許可を得て転載)

接着分子に対する中和抗体の抑制効果を検討した。 第3図Bはリンパ球注入20分後において接着したSPLの数と抗接着分子抗体の効果を示したものである。 バイエル板PCVにおけるSPLの接着数は、抗L-セレクトリン、抗 $\alpha 4$  インテグリン、抗 $\beta 7$  インテグリン、抗CD11a抗体の処理により有意に減少した。 また接着リンパ球数はレシピエントのマウスに抗MAdCAM-1抗体をあらかじめ投与することにより著明に減少した。

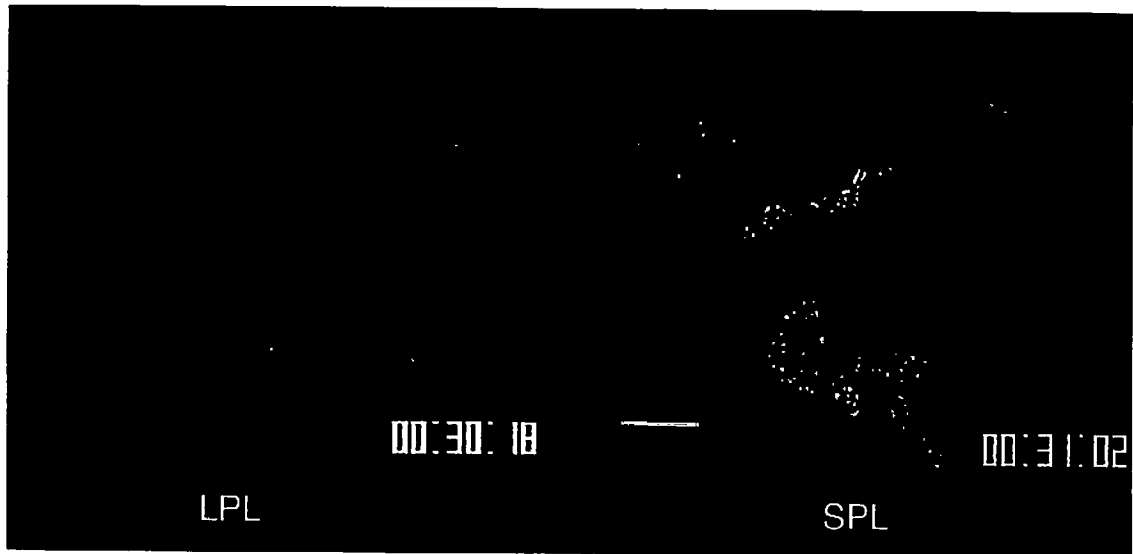
### 3. 小腸絨毛粘膜における T リンパ球の微小血管への接着

次に小腸絨毛粘膜における SPL と LPL の微小血管への interaction を粘膜側から観察した第4図は回腸粘膜絨毛の頂部の微小血管に接着した T リンパ球の顕微鏡写真である。 左の写真の如く、多数の LPL が注入20分以内に絨毛頂上の微小血管に接着した。 それに対して右の写真に示したように同時間帯では SPL はほとんど接着しなかった。 第2表に示したように、注入10分間

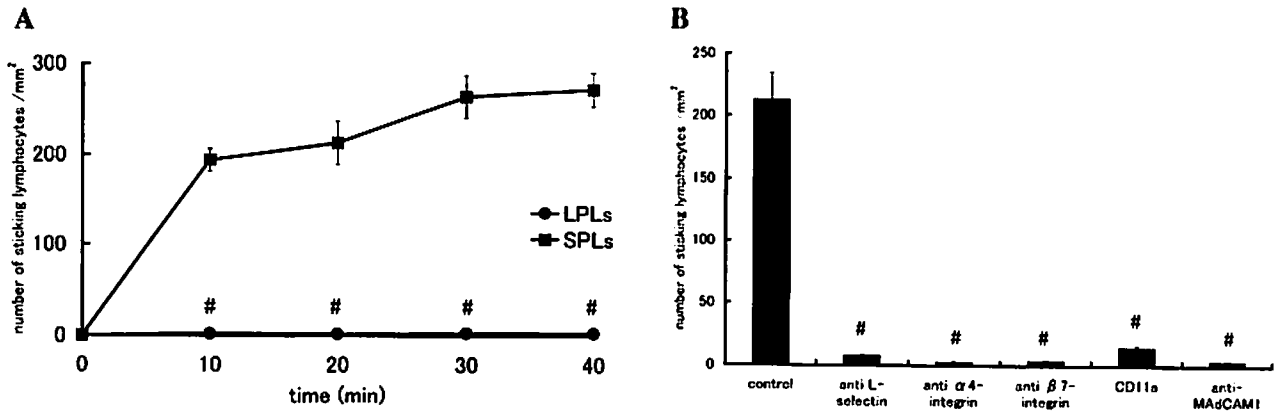
第1表 バイエル板 postcapillary venule と Tリンパ球との相互作用と抗接着分子抗体の影響

	バイエル板 PCV に流入した リンパ球数 (counts/min)	PCV 上を rolling した リンパ球の割合 (%)	Rolling したリンパ球の うち血管壁を離れたリン パ球の割合 (%)
LPLs	42.8±6.4	8.0±4.1	92.5±7.8
SPLs	51.1±5.5	69.6±4.6*	67.4±8.2*
SPLs+anti-L-selectin mAb	52.6±4.5	2.0±0.2 <sup>‡</sup>	53.0±6.3
SPLs+anti-α4-integrin mAb	45.1±4.7	5.2±0.2 <sup>‡</sup>	88.8±1.8*
SPLs+anti-β7-integrin mAb	53.6±9.8	9.9±1.3 <sup>‡</sup>	92.6±4.0*
SPLs+anti-CD11a mAb	41.5±6.0	60.5±8.2	92.6±3.6*
SPLs+anti-MAdCAM-1 treatment	50.0±7.9	4.5±0.5 <sup>‡</sup>	88.9±8.2*

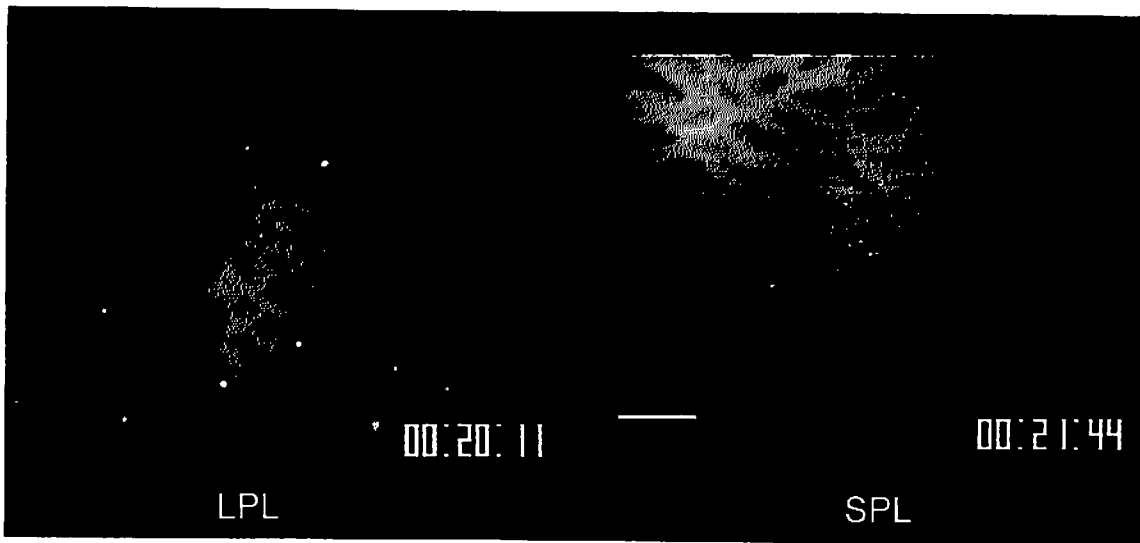
1×10<sup>7</sup>個のリンパ球をレシピエントマウスの頸静脈より3分以上かけて注入した。バイエル板におけるリンパ球の動態及び微小血管壁との相互作用をS-VHSビデオテープで経時的に記録した。血管壁に接触するが壁に沿って動くリンパ球をrolling lymphocytesと定義した。リンパ球注入10分後にpostcapillary venuleに流入した細胞数を1分間計測し、rolling lymphocyteの割合を算出した。Rolling lymphocytesのうち再び血管壁を離れたリンパ球の割合も測定した。また、リンパ球を、接着分子に対する中和抗体100 µg/mlとあらかじめ30分間反応させた後にレシピエントに注入し、観察をおこなった。中和抗体には、L-セレクチン(MEL-14)、α4インテグリン(PS/2)、β7インテグリン(FIB27)、CD11a(M17/4)を使用した。さらに抗MAdCAM-1抗体(MECA-367, PharMingen, 2 mg/kg)を0.2 mlの生理食塩水に溶解して、リンパ球注入30分前にレシピエントの頸静脈から注入して観察を行った。\*P<0.05 vs SPL. <sup>‡</sup>P<0.05 vs LPL. 平均値±標準誤差で表した(n=6)。 (Fujimori S et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Table 1. を許可を得て転載)



第2図 CFSEで標識した粘膜固有層Tリンパ球(左)及び脾臓Tリンパ球(右)1×10<sup>7</sup>個注入30分後のマウスバイエル板 postcapillary venule 観察画面。Bar : 100 µm (Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 2. を許可を得て転載)



第3図 A) マウスバイエル板 postcapillary venule に接着した LPL 及び SPL の数の経時変化。観察画面の 1 mm<sup>2</sup> において血管内と血管壁に接しているリンパ球数を計測した。\*P<0.05 vs SPL. 平均値±標準誤差で示した (n=6)。B) 注入 20 分後のバイエル板 postcapillary venule における SPL の接着に対する各種接着分子抗体の効果。SPL をあらかじめ L-セレクトリン (MEL-14), α4 インテグリン (PS/2), β7 インテグリン (FIB27) に対するモノクローナル抗体 (100 μg/ml) で処理した。別の実験ではリンパ球注入 30 分前レシピエントマウスに抗 MAdCAM-1 抗体 (体重 1 kg あたり 2 mg) を投与した。\*P<0.05 vs コントロール。平均値±標準誤差で示した (n=6)。(Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 3. を許可を得て転載)



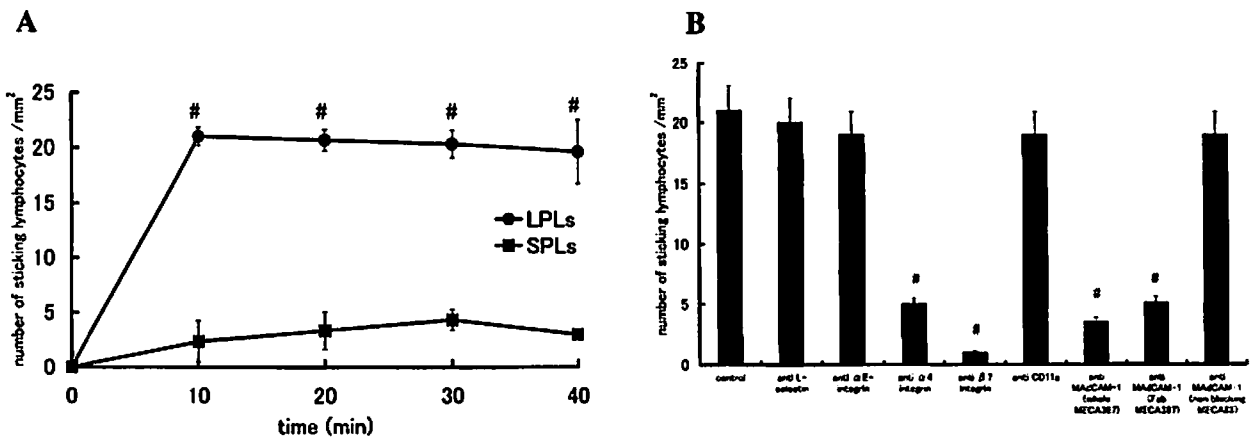
第4図 CFSEで標識した粘膜固有層 T リンパ球 (左) 及び脾臓 T リンパ球 (右) 1×10<sup>7</sup>個注入 20 分後のマウス小腸粘膜微血管観察画面。絨毛頂部毛細血管を粘膜面から観察した。Bar : 100 μm (Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 4. を許可を得て転載)



第2表 小腸絨毛粘膜微血管へのTリンパ球の接着と抗接着分子抗体の影響

	粘膜微血管に流入する リンパ球数 (counts/min)	Rolling するリンパ球 の割合 (%)	Rolling したリンパ球の うち血管壁を離れたリン パ球の割合 (%)
SPLs	32.2±8.7	14.6±2.0	93.4±5.0
LPLs	29.0±6.2	37.0±5.6*	79.4±4.9*
LPLs+anti-L-selectin mAb	25.0±5.6	36.2±4.6	79.8±3.4
LPLs+anti- $\alpha$ E-integrin mAb	28.7±3.7	33.4±4.2	79.4±6.1
LPLs+anti- $\alpha$ 4-integrin mAb	26.9±8.8	10.3±1.0*	80.0±9.0
LPLs+anti- $\beta$ 7-integrin mAb	26.9±1.0	14.0±2.3*	96.2±3.1*
LPLs+anti-CD11a mAb	23.4±4.2	30.5±6.0	76.4±6.9
LPLs+anti-MAdCAM-1 treatment	26.0±3.0	9.0±1.4*	86.2±3.4

1×10<sup>7</sup>個のリンパ球をレシピエントマウスの頸静脈から3分以上かけて注入した。粘膜微血管におけるリンパ球の動態及び微血管壁との相互作用をS-VHSビデオテープで経時的に記録した。血管壁に接触するが壁に沿って動くリンパ球をrolling lymphocytesと定義した。リンパ球注入10分後に粘膜微血管に流入した細胞数を1分間計測し、rolling lymphocytesの割合を算出した。Rolling lymphocytesのうち再び血管壁を離れたリンパ球の割合も測定した。また、リンパ球を、接着分子に対する中和抗体100 µg/mlとあらかじめ30分間反応させた後にレシピエントに注入した。中和抗体には、L-セレクトリン(MEL-14)、 $\alpha$ Eインテグリン(M290)、 $\alpha$ 4インテグリン(PS/2)、 $\beta$ 7インテグリン(FIB27)、CD11a(M17/4)を使用した。さらに抗MAdCAM-1抗体(MECA-367, PharMingen, 2 mg/kg)を0.2 mlの生理食塩水に溶解して、リンパ球注入30分前にレシピエントの頸静脈から注入して観察を行った。\*P<0.05 vs SPL.\*P<0.05 vs LPL单独。平均値±標準誤差で表した(n=6)。(Fujimori S et al: Gastroenterology 122: 734-744, 2002のTable 2.を許可を得て転載)



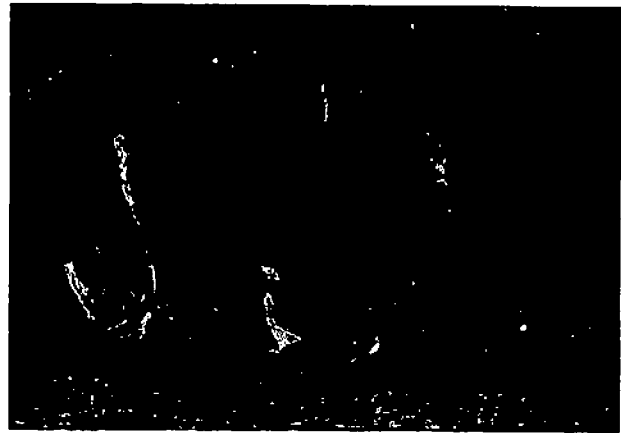
第5図 A) 粘膜絨毛頂部微血管に接着したSPL及びLPLの数の経時変化。\*P<0.05 vs SPL. 平均値±標準誤差で示した(n=6)。B) 注入20分後の絨毛頂部微血管におけるLPLの接着に対する各種接着分子抗体の効果。LPLをあらかじめL-セレクトリン(MEL-14)、 $\alpha$ Eインテグリン(M290)、 $\alpha$ 4インテグリン(PS/2)、 $\beta$ 7インテグリン(FIB27)及びCD11a(M17/4)に対するモノクローナル抗体(100 µg/ml)で処理した。別の実験ではリンパ球注入30分前レシピエントマウスに抗MAdCAM-1抗体(体重1 kgあたり2 mg, MECA367及びF(ab)<sub>2</sub>フラグメント)を投与した。同条件で、MAdCAM-1に対する非中和抗体(MECA-87)も使用した。\*P<0.05 vsコントロール。平均値±標準誤差で示した(n=6)。(Fujimori H et al: Gastroenterology 122: 734-744, 2002のFigure 5.を許可を得て転載)

に粘膜微小血管に流入するリンパ球数は SPL と LPL とで有意差はなかった。注入後 10 分後の rolling SPL の割合は約 15%であったのに対し、LPL の場合は高値であった。その後、約 79%の rolling LPL が粘膜微小血管から離れて血流に戻った。それに対して SPL の絨毛粘膜微小血管における接着は一過性であることが多く、そのほとんどは血管壁から離れた。第 5 図 A は小腸絨毛粘膜における SPL と LPL の接着数の経時的变化を示したものである。注入 40 分後には LPL の接着は  $19.7 \pm 2.9$  cells/mm<sup>2</sup> に対して、SPL では  $3.0 \pm 0.3$  cells/mm<sup>2</sup> であった。百日咳 (PTX) 毒素で処理した LPL では絨毛微小血管上を rolling する割合に有意な変化は認めなかったが ( $29.4 \pm 2.8$  %), 40 分後の LPL の接着はほとんど認めなかった ( $0.4 \pm 0.2$  cells/mm<sup>2</sup>)。

リンパ球を接着分子に対するモノクローナル抗体で処理した場合も LPL が注入 10 分後に流入する数は有意差を認めなかった (第 2 表)。腸粘膜で rolling する LPL の割合は、抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体及び抗  $\beta 7$  インテグリン抗体による処理で著明に減少した。抗 MAdCAM-1 抗体をレシピエントに投与した際にも rolling LPL の割合は減少した。また抗  $\beta 7$  インテグリン抗体処理の場合には rolling LPL が血管壁から離れていく割合が顕著に増加した (約 96%)。第 5 図 B は LPL の絨毛粘膜における接着に対する各種接着分子の中和抗体の効果を示したものである。注入 20 分後の LPL の接着数はコントロールで  $21.2 \pm 2.1$  cells/mm<sup>2</sup> であったが、抗  $\beta 7$  インテグリン抗体の処理によりその数は著明に減少した。また抗 MAdCAM-1 抗体の MECA-367 投与の場合、完全型および F (ab')<sub>2</sub> フラグメント抗体のいずれにおいても、LPL の interaction は著明に抑制された。  $\alpha 4$  インテグリンをブロックする抗体 PS/2 の処理でも LPL の接着は抑制された。それに対し、  $\alpha E$  インテグリン、L-セレクチン及び CD11a に対する抗体処理では LPL の接着に変化を認めなかった。また、MAdCAM-1 の非中和抗体である MECA-89 も LPL の接着に変化を与えなかった。

#### 4. 免疫組織化学による MAdCAM-1 の局在

小腸における MAdCAM-1 分子の発現を組織学的に検討したところ、MAdCAM-1 は主に粘膜筋板直上の粘膜固有層の血管内皮に認められた。しかし、第 6 図に示したように、絨毛の突出部の微小血管にも MAdCAM-1 の表出が認められた。ただし、MAdCAM-1 は絨毛の微小血管に均一に認められたのではなく、血管の一



第 6 図 小腸絨毛における MAdCAM-1 発現を免疫組織化学的に観察した。1 次抗体には MECA 367 を使用した。次に切片をビオチン化した抗ラット IgG と反応させ、FITC-ストレプトアビジンで標識し、蛍光顕微鏡下に観察した。MAdCAM-1 は主に小腸粘膜筋板直上の粘膜固有層の血管に発現したが、絨毛突起の微小血管にも明らかな発現が観察された。(Fujimori H et al : Gastroenterology 122 : 734-744, 2002 の Figure 6. を許可を得て転載)

部分が MAdCAM-1 陽性となる所見であった。

## 考 察

今回の実験で我々は粘膜固有層リンパ球の小腸粘膜におけるホーミングが脾臓リンパ球と明らかに相違することを示した<sup>25)</sup>。この違いは腸粘膜におけるナイーブリンパ球とメモリー/エフェクターリンパ球の分布の違いに関連している可能性がある<sup>3,26)</sup>。抗原によるリンパ球の刺激はナイーブリンパ球の動態を変化させ、例えば腸管由来免疫芽球が小腸に migration するように、エフェクターリンパ球が非リンパ組織や他の特異的実効組織に効果的に migration するようになる。今回の実験では粘膜固有層リンパ球のほとんどが CD69 陽性であったのに対し、脾臓 T リンパ球は CD69 陰性かつ CD45RB 陽性であり、この結果はこれまでの報告と合致する<sup>27,28)</sup>。最近の in situ の実験でリンパ球がパイエル板に、メモリー/エフェクターリンパ球が粘膜固有層のような非リンパ組織に migration する機構が解明されたが、使用されていたのは腸管由来の細胞でなく、マウスのリンパ節由来のリンパ球もしくは TK1 リンパ腫細胞であった<sup>13,29)</sup>。

パイエル板 HEV 特有のフェノタイプ (L-selectin ligand<sup>30)</sup>, MAdCAM-1<sup>31)</sup>, ICAM-1<sup>32)</sup>) とそれに対応

するナイーブリンパ球のフェノタイプ (L-selectin<sup>hi</sup>,  $\alpha 4\beta 7^{\text{lo-mcd}}$ , LFA-1<sup>+</sup>) はパイエル板 HEV をリンパ球が通過するのに必要な関係を築いている<sup>29</sup>。Bargatzte ら<sup>13)</sup> はナイーブリンパ球がパイエル板 PCV に接着するには、L-セレクチンによる rolling,  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンによる減速、それに続いて活性化された LFA-1 による停止という一連の過程があることを示した。また彼らは MAdCAM-1 が  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンとも L-セレクチンとも相互作用することを示した。今回の実験において無刺戟脾臓 T リンパ球のパイエル板における動態はナイーブリンパ球の動態と一致している。脾臓リンパ球とパイエル板 HEV との相互作用が、L-セレクチン、 $\alpha 4$  インテグリン、 $\beta 7$  インテグリン及び MAdCAM-1 に対する抗体によりほぼ完全に抑制されることは HEV における複数の接着分子が関与していることを示している。一方、粘膜固有層リンパ球が  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンを表面発現しているにもかかわらずパイエル板 HEV とほとんど相互作用しないことは注目に値する。この結果は、LPL とフェノタイプが類似する TK-1 cell (L-selectin<sup>lo-nex</sup>,  $\alpha 4\beta 7^{\text{hi}}$ , LFA-1<sup>+</sup>) がパイエル板 HEV に強固に接着するというこれまでの報告と一致しない。これはリンパ球の HEV における接着が接着分子の表面発現以外の要素に影響を受けていることを示している。これに関しては接着を誘発するケモカインが *in vivo* におけるリンパ球の migration を制御していることが示されているが<sup>30-32)</sup>、ケモカインの正確な機能はいまだ不明である。また、リンパ球がパイエル板 HEV に接着した後、HEV をすり抜けて間質に移動し、やがてはリンパ管に流入する動態を *in vivo* で観察した報告は極めてまれである。後者に関しては永田らの貴重な報告があり<sup>33)</sup>、本実験系においても一部リンパ管に流入する様子が観察された。

小腸粘膜固有層の微小血管において MAdCAM-1 が表面発現しているが、L-セレクチンリガンドの発現は欠如していることが知られている<sup>9,27,29)</sup>。今回の実験において小腸粘膜固有層の微小血管における MAdCAM-1 の表面発現は、Streeter ら<sup>9)</sup>によるこれまでの報告と一致しており、MAdCAM-1 が LPL のホーミングに重要な役割を果たしていることを示している。MAdCAM-1 と  $\alpha 4\beta 7$  との結合は、腸粘膜由来免疫芽球が小腸粘膜固有層に migration する特性を説明する<sup>13,27,34)</sup>。粘膜固有層リンパ球が絨毛粘膜の微小血管に選択的に接着することが本実験で観察されたが、脾臓リンパ球は同部位ではほとんど接着しなかった。このことは小腸粘膜のリンパ球が腸管にホーミングするという特徴と合致する。絨毛粘膜の微小血管における LPL の接

着が生理的なホーミングではなく毛細血管における mechanical trapping によるものである可能性があるが、リンパ球を PTX で処理した場合この接着が抑制されたことから、LPL の接着は cell trapping というより PTX 感受性の G 蛋白を介した細胞内伝達に関与していることが示唆された。また小腸から細胞を分離する際のコラゲナーゼ処理が LPL の表面抗原を変化させることにより LPL のホーミングパターンに影響を与えている可能性があるが、著者の予備実験では、脾臓切片をコラゲナーゼ処理した後に採取した場合も脾臓リンパ球のパイエル板 PCV への接着に変化はなかった。またリンパ球が粘膜固有層に侵入した後に接着分子発現に変化が起こり、LPL と SPL の接着パターンの差を導いているという可能性も考えられた。

今回の実験結果は LPL の粘膜固有層微小血管との接着に  $\alpha 4$  インテグリンが関与していることを示している。しかし、抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体はパイエル板 PCV の場合とは異なり LPL と絨毛微小血管との相互作用をパイエル板 PCV との場合とは異なり、完全には抑制しなかった。この事実は粘膜固有層における TK1 細胞の接着が抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体により完全に抑制されたとされる Berlin らの報告とは異なっている。それと同様に抗 MAdCAM-1 抗体が LPL と粘膜微小血管との相互作用を完全には抑制しなかった。抗  $\alpha E$  インテグリン抗体処理では接着の抑制が見られなかったことから、抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体、および抗 MAdCAM-1 抗体処理の実験において LPL に  $\alpha E\beta 7$  細胞の混入はなかったものと考えられた。 $\alpha 4$  インテグリンおよび MAdCAM-1 以外の接着分子が LPL T 細胞と粘膜固有層微小血管との相互作用に関与している可能性がある。著者らは以前、ラット腸管リンパ管由来の T リンパ球が LPS 処理した腸粘膜の粘膜下血管に接着し、その接着は  $\alpha 4$  インテグリン、そして一部  $\beta 2$  インテグリンを介していることを報告した<sup>24)</sup>。これらの実験や本実験結果からリンパ球と血管内皮の相互作用は、小腸における観察部位 (パイエル板 PCV, 粘膜下組織の血管および粘膜絨毛の微小血管) により多様性があることが示された。

GALT の形成には、 $\beta 7$  インテグリンが重要な役割をはたしていることが指摘されている。Wagner ら<sup>35)</sup> は  $\beta 7$  インテグリン欠損マウスの小腸粘膜固有層では CD4+ 細胞が著明に少数であることを報告した。本実験において小腸絨毛突起の微小血管における LPL の相互作用には  $\beta 7$  インテグリンが深く関与していることが示された。粘膜の微小血管に流入したリンパ球数に有意差はなく、 $\beta 7$  インテグリン抗体による接着抑制は生体

内で LPL が死活してしまったためではないと考えられた。腸粘膜ではリンパ球の  $\beta 7$  インテグリンの発現や機能が MAdCAM-1 への接着を決定する主要な因子であるが、 $\beta 7$  インテグリンの表面発現のレベルだけでは MAdCAM-1 に接着する傾向は説明できない。この  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンの発現レベルと MAdCAM-1 との接着との矛盾が顕著に見られるのは NK 細胞においてである。NK 細胞は中等度のレベルの  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンを発現しているが、他のリンパ球と比べると MAdCAM-1 との接着力は弱い<sup>36)</sup>。今回の生体観察では細胞数が不足するため粘膜固有層 T リンパ球をさらにサブタイプに分離して観察することはできなかったが、サブセットによる migration の相違はいずれ比較する必要があると考えられる。

今回著者は、リンパ球が脾臓由来か小腸粘膜固有層由来か、及び腸管関連リンパ組織の血管内皮か非リンパ組織における血管内皮かにより、リンパ球と血管内皮細胞との相互作用が明らかに相違することを *in vivo* での実験で示した。LPL は小腸絨毛突起の微小血管に主に  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと MAdCAM-1 の結合を介して選択的に接着するが、SPL は主にパイエル板の postcapillary venule に接着する。この接着反応の選択性は、リンパ球及び血管内皮における特有の接着分子の表面発現により一部説明できる。しかし、*in vitro* における表面発現は *in vivo* の状況と必ずしも一致しているとはいえず、リンパ球の migration の機構を正確に理解するためには、ケモカインの関与を含めさらなる研究が必要と考えられた。

## 総 括

今回の実験で著者は、マウスリンパ球の腸管微小血管への接着を生体顕微鏡で観察することにより、パイエル板と粘膜固有層との間では、さらに LPL と SPL との間ではリンパ球の微小血管内皮への接着に大きな相違があることを明らかにした。すなわち

1. FACS 解析による LPL と SPL の表面分子発現の比較検討では、L-セレクチン、CD45RB、CD11a は SPL で強く発現がみられたが、 $\beta 7$  インテグリン、CD69 は LPL において強く発現が見られ、LPL がより活性化された状態であることが示唆された。また  $\alpha 4\beta 7$  インテグリンの combinatorial epitope は LPL で有意に強発現が見られた。

2. パイエル板 postcapillary venule での生体観察では、SPL は有意な rolling および接着数増加を認めたが

LPL ではほとんど認めなかった。また SPL を L-セレクチン、 $\alpha 4$  インテグリン、 $\beta 7$  インテグリン、CD11a に対するモノクローナル抗体で処理した場合、またはマウスを抗 MAdCAM-1 抗体で前処置した場合には、接着数は著明に減少し、SPL のパイエル板への接着にはこれらの分子の共同作用が必要であることが示唆された。

3. 一方小腸絨毛粘膜における観察では、LPL は SPL に比べて有意に多く絨毛頂部の微小血管に rolling および接着を認めた。同部位での rolling LPL の割合および接着数は抗  $\alpha 4$  インテグリン抗体や抗  $\beta 7$  インテグリン抗体での抑制、あるいは抗 MAdCAM-1 抗体での前処置によってのみ有意に減少を示し、腸粘膜固有層での  $\alpha 4\beta 7$  インテグリン-MAdCAM-1 の組み合わせの重要性が示唆された。

4. 小腸における MAdCAM-1 発現を組織学的に検討したところ、小腸粘膜固有層内の粘膜筋板直上の血管内皮に発現していたが、絨毛頂部の微小血管にも表出が認められた。

以上より、LPL は小腸粘膜固有層の微小血管に、 $\alpha 4\beta 7$  インテグリンと MAdCAM-1 の結合を介して選択的に接着することが生体観察にて明らかにされた。

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、本研究を直接御指導頂きました防衛医科大学校内科学第二講座三浦総一郎教授に深甚なる謝意を表します。さらに解析に御協力を頂きました東京大学農学部農学生命科学研究科上野川修一教授、八村敏志助教教授に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は、99th American Gastroenterological Association (1998 年 New Orleans), 20th European Conference on Microcirculation (1998 年 Paris), 10th International Congress of Mucosal Immunology (1999 年 Amsterdam) において発表した。

また本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金、慶應義塾大学医学部研究症例費および厚生労働省食物アレルギー基金によった。

## 文 献

- 1) Pabst R, Westermann J: Lymphocyte traffic to lymphoid and non-lymphoid organ in different species is regulated by several mechanisms. Adhesion Molecules, Chemokines and Lymphocyte Trafficking. (ED) Hamann A, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1997
- 2) Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian

- UH : Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 187 : 205-216, 1998
- 3) Butcher EC, Picker LJ : Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272 : 60-66, 1996
  - 4) Girard J-P, Springer TA : High endothelial venules (HEVs) : specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 16 : 449-457, 1995
  - 5) Mackay CR : Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5 : 423-427, 1993
  - 6) Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P : The gut-associated lymphoid system : nature and properties of the large dividing cells. *Eur J Immunol* 4 : 435-443, 1974
  - 7) Rose ML, Parrott DMV, Bruce RG : Migration of lymphoblasts to the small intestine. II. Divergent migration of mesenteric and peripheral immunoblasts to sites of inflammation in the mouse. *Cell Immunol* 27 : 36-46, 1976
  - 8) Smith ME, Martin AF, Ford WL : Migration of lymphoblasts in the rats. Preferential localization of DNA-synthesizing lymphocytes in particular lymph nodes and other sites. *Monogr. Allergy* 16 : 203-232, 1980
  - 9) Streeter PR, Berg EL, Rouse BTN, Bargatze RF, Butcher EC : A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331 : 41-46, 1988
  - 10) Briskin MJ, McEvoy LM, Butcher EC : MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and IgA1. *Nature (Lond.)* 363 : 461-464, 1993
  - 11) Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC :  $\alpha 4\beta 7$  integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74 : 185-195, 1993
  - 12) Arbones ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF : Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin (CD62L) deficient mice. *Immunity* 1 : 247-260, 1994
  - 13) Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC : Distinct roles of L-selectin and integrins  $\alpha 4\beta 7$  and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ : The multistep model confirmed and refined. *Immunity* 3 : 99-108, 1995
  - 14) Steeber DA, Green NE, Sato S, Tedder TF : Lymphocyte migration in L-selectin-deficient mice. Altered subset migration and aging of the immune system. *J Immunol* 157 : 1096-1106, 1996
  - 15) Robinson SD, Frenette PS, Rayburn H, Cumiskey M, Ullman-Cullere M, Wagner DD, Hynes RO : Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 : 11452-11457, 1999
  - 16) Kelsall, B. and Strober, W : *Mucosal Immunology* (ED) Ogra, PL. et al, Academic Press, San Diego, p293-317, 1999
  - 17) Jalkanen S, Nash GS, de los Toyos J, MacDermott RP, Butcher EC : Human lamina propria lymphocytes bear homing receptors and bind selectively to mucosal lymphoid high endothelium. *Eur J Immunol* 19 : 63-68, 1989
  - 18) Salmi M, Andrew DP, Butcher EC, Jalkanen S : Dual binding capacity of mucosal immunoblasts to mucosal and synovial endothelium in humans : Dissection of the molecular mechanisms. *J Exp Med* 181 : 137-149, 1995
  - 19) Walter S, Micheel B, Pabst R, Westermann J : Interaction of B and T lymphocyte subsets with high endothelial venules in the rat : binding *in vitro* does not reflect homing *in vivo*. *Eur J Immunol* 25 : 1199-1205, 1995
  - 20) Barret TA, Gajewski TF, Danielpour D, Chang EB, Beagley KW, Bluestone JA : Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J Immunol* 149 : 1124-1130, 1992
  - 21) Davies MD, Parrott DM : Preparation and purification of lymphocytes from the epithelium and lamina propria of murine small intestine. *Gut* 22 : 481-488, 1981
  - 22) Suematsu M, Delano FA, Poole D, Engler RL, Miyazaki M, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW : Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Lab. Invest.* 70 : 684-695, 1994
  - 23) Miura S, Tsuzuki Y, Fukumura D, Serizawa H, Suematsu M, Kurose I, Imaeda H, Kimura H, Nagata H, Tsuchiya M, Ishii H : Intravital demonstration of sequential migration process of lymphocyte subpopulations in rat Peyer's patches. *Gastroenterology* 109 : 1113-1123, 1995
  - 24) Miura S, Tsuzuki Y, Kurose I, Suematsu M, Shigematsu T, Kimura H, Higuchi H, Serizawa H, Yagita H, Okumura K, Granger DN, Ishii H : Endotoxin stimulates lymphocyte-endothelial interactions in rat intestinal Peyer's patches and villus mucosa. *Am J Physiol* 271 : G282-G292, 1996
  - 25) Fujimori H, Miura S, Koseki S, Hokari R, Komoto S, Hara Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Ishii H : Intravital obserbation of adhesion of lamina propria lymphocytes to microvessels of small intestine in mice. *Gastroenterology* 122 : 734-744, 2002
  - 26) Mackay CR : Immunological memory. *Adv Immunol* 53 : 217-265, 1993
  - 27) Picker LJ, Butcher EC : Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10 : 561-591, 1992
  - 28) Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR : The activa-

- tion antigen CD69. *Stem Cells* 12 : 456-465, 1994
- 29) Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC :  $\alpha 4$  integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 80 : 413-422, 1995
- 30) Campbell JJ, Butcher EC : Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12 : 336-341, 2000
- 31) Warnock RA, Campbell JJ, Dorf ME, Matsuzawa A, McEvoy LM, Butcher EC : The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* 191 : 77-88, 2000
- 32) Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP, Agace WW : Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment : Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 192 : 761-768, 2000
- 33) Nagata H, Miyairi M, Sekizuka E, Morishita T, Tatemichi M, Miura S, Tsuchiya M : *In vivo* visualization of lymphatic microvessels and lymphocyte migration through rat Peyer's patches. *Gastroenterology*. 106 : 1548-1553, 1994
- 34) Schweighoffer T, Tanaka Y, Tidswell M, Erle DJ, Horgan KJ, Luce GEG, Lazarovits AI, Buck D, Shaw S : Selective expression of integrin  $\alpha 4\beta 7$  on a subset of human CD4+ memory T cells with hallmarks of gut-tropism. *J Immunol* 151 : 717-729, 1993
- 35) Wagner N, Löhler J, Kunkel EJ, Ley K, Leung E, Krissansen G, Rajewsky K, Muller W : Critical role for  $\beta 7$  integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382 : 366-370, 1996
- 36) Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, Berg EL, Butcher EC : A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with  $\beta 7$  integrins and memory differentiation. *J Immunol* 156 : 3727-3736, 1996
-

学位論文

培養アストロサイトにおける c-Met の産生と分泌性因子によるその調節

慶應義塾大学医学部外科学教室

(指導：河瀬誠教授)

しまざき けんじ  
島崎 賢仁

(平成 15 年 5 月 14 日受付)

Key Word : c-Met, astrocyte, regeneration, brain injury, cytokine

化学発癌剤で処理されたヒト骨肉腫細胞から met と名付けられた癌原遺伝子が発見され<sup>1)</sup>, met の過剰発現が NIH3T3 の変異株で多く認められた<sup>2)</sup>. c-met 癌原遺伝子産物である c-Met は膜貫通レセプター型チロシンキナーゼであることが明らかになったが, そのリガンドは不明であった<sup>3)</sup>. その後, c-Met は, 肝細胞増殖因子 (hepatocyte-growth-factor ; HGF) の細胞膜表面受容体として同定された<sup>4,5)</sup>. HGF は種々の細胞に対して, mitogen, motogen, morphogen として作用することが知られている<sup>6-8)</sup>. HGF と c-Met は中枢神経系においても産生されることが報告されており<sup>9-12)</sup>, ヒト脳組織においては, 腫瘍性または反応性アストロサイトが c-Met を産生しており, 正常アストロサイトはこれを産生していないことが報告された<sup>13,14)</sup>. また, c-Met および HGF の mRNA または蛋白産生が astrocytoma の組織および細胞に認められたという, いくつかの報告がなされた<sup>15-17)</sup>. これらの結果は, c-Met が腫瘍進展過程または神経再生過程においてニューロン-グリアまたはグリア-グリア間の重要な mediator である可能性を示唆する.

アストロサイトは神経系においてニューロンの支持細胞であり, 特有の神経栄養効果を持つ. これまでに, 脳損傷時に損傷部位に供給される fibroblast growth factor (FGF), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの種々の分泌性因子が, アストロサイトからの神経成長因子 (nerve growth factor ; NGF) の分泌や, 非 NGF 型神経栄養因子の産生を刺激することで, アストロサイトが持つコリン作動性ニュー

ロンへの神経栄養効果を増強することが報告されている<sup>18-20)</sup>. これら分泌性因子で活性化されたアストロサイトは損傷されたニューロンの生存を支持し, 損傷された神経回路網の再構築を促進すると考えられている. 中枢神経系の再生過程における c-Met の役割を明らかにするために, アストロサイトにおける c-Met の産生と分泌性因子によるその調節を検討した.

実験方法

1. アストロサイト初代培養系の作成

アストロ初代培養系の作成は Yoshida らの方法に準じた<sup>20)</sup>. なお動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して施行した. 顕微鏡下に無菌的にラット (Wistar albino) 新生仔の海馬を摘出し, 髄膜, 血管, 脈絡叢を除去したあと, ステンレスメッシュ (孔径 200  $\mu$ m) を通して細片化し, 10% fetal calf serum (FCS) および gentamicin (GM) 40 mg/L を添加した minimum essential medium (MEM) を用い, poly-L-lysine (PLL) でコーティングした culture flask (Greiner, Frickenhausen, Germany) 内で初代培養した. 細胞培養はすべて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>, 飽和水蒸気下で行った. 0.05% trypsin 処理により 2 回の継代後の培養細胞を本実験に用いた.

2. 免疫蛍光二重染色による c-Met の検出

アストロサイトを PLL にてコーティングした 24-well plate (IWAKI, Tokyo) 内の coverslip 上に

本論文は, Shimazaki K, Yoshida K, Hirose Y, Ishimori H, Katayama M and Kawase T : Cytokines regulate c-Met expression in cultured astrocytes. Brain Research 962 : 105-110, 2003 の一部を含む.

0.7x10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup>の細胞密度にて播種し、10% FCS および GM 40 mg/L を添加した MEM (10% FCS-MEM) にて3日間培養後、Hank's balanced salt solution (HBSS) で2回洗浄し、以下の1)~8)に示す分泌性因子を添加した10%FCS-MEMを用い、さらに48時間培養した。1) 無添加; 2) acidic FGF (25 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); 3) basic FGF (25 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); 4) IL-1 $\beta$  (50 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA, USA); 5) TNF- $\alpha$  (100 ng/ml, Dainippon Pharmaceutical, Osaka); 6) transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1; 10 ng/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA); 7) epidermal growth factor (EGF; 100 ng/ml, Chemicon International, Temecula, CA, USA); 8) HGF (10 ng/ml, TOYOBO, Osaka). 培養細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、5% bovine serum albumin (BSA) でブロッキングした後、1次抗体に rabbit polyclonal anti-mouse c-Met antibody (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 2次抗体に fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:200, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) を用いて免疫染色した。さらに、1次抗体に mouse monoclonal anti-porcine glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1:200, Chemicon International, Temecula, CA, USA), 2次抗体に rhodamine-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:100, Organon Teknika, Durham, NC, USA) を用いて免疫二重染色した。染色した培養細胞を封入し、蛍光顕微鏡で鏡検した。

### 3. Western blot 法による c-Met の検出

アストロサイトを PLL にてコーティングした culture dish (Corning, Corning, NY, USA) 上に 0.7x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度にて播種し、10%FCS-MEM にて3日間培養後、HBSS で2回洗浄し、以下の1)~8)に示す分泌性因子を添加した10% FCS-MEM を用い (5 ml/dish), さらに48時間培養した。1) 無添加; 2) acidic FGF (25 ng/ml); 3) basic FGF (25 ng/ml); 4) IL-1 $\beta$  (50 U/ml); 5) TNF- $\alpha$  (100 ng/ml); 6) TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml); 7) EGF (100 ng/ml); 8) HGF (10 ng/ml). 培養終了後、アストロサイトを HBSS で2回洗浄し、cell scraper を用いて細胞融解液 (20 mM Tris, 15 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF, 1 kU/ml

aprotinine, 10  $\mu$ g/ml leupeptin) 100 $\mu$ l 中に回収した。回収した細胞を sonicator にて破碎し、遠心 (10000 rpm, 5 分間) した後の上清を、蛋白濃度 6 mg/ml となるように細胞融解液に希釈し、アストロサイト抽出液とした。蛋白定量は BSA を標準として蛋白定量キット (Pierce, Rockford, IL, USA) にて行った。アストロサイト抽出液を等量の Tris-sodium dodecyl sulfate- $\beta$ -mercaptoethanol seprazol (Enprotech, New York, NY, USA) にて希釈して8分間煮沸した。2~15%濃度勾配 polyacrylamide gel (Daiichi Chemicals, Tokyo) にアストロサイト抽出液を 10  $\mu$ l/lane (30  $\mu$ g protein/lane) 泳動し、polyvinylidene difluoride membrane (Daiichi Chemicals, Tokyo) に転写した。転写膜を1次抗体として rabbit polyclonal anti-mouse c-Met antibody (1:100), 2次抗体として horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:1000, BioMakor, Rehovot, Israel) を反応させた。HRP を chemiluminescence reagent (NEN, Boston, MA, USA) により化学発光させ c-Met を検出した。

### 4. Image analyzing system を用いた c-Met の半定量

アストロサイト抽出液の Western blot 法にて得られた c-Met のバンドを image scanner (GT-8000, EPSON, Nagano) にて取り込み、Macintosh および image analyzer (LUZEX-F, Nireco, Tokyo) から構成される system により解析した。バンドの濃度を 256 段階 (0~255) に数値化し、バンドの面積と濃度を乗じた値 (以下、Area\*Dense と略す) を算出し、アストロサイト抽出液中の c-Met を半定量した。

### 5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法による c-met および HGF mRNA の検出

アストロサイトを PLL にてコーティングした 6-well plate (IWAKI, Tokyo) 内の coverslip 上に 0.5x10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> の細胞密度にて播種し、10%FCS-MEM にて3日間培養後、HBSS で2回洗浄し、以下の1)~4)に示す分泌性因子を添加した10% FCS-MEM を用い、さらに0~28時間培養した。1) 無添加; 2) acidic FGF (25 ng/ml); 3) basic FGF (25 ng/ml); 4) HGF (10 ng/ml). 培養終了後、Trizol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) を用いて、Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform 法により、全 RNA を抽出した。2  $\mu$ g の全 RNA を、random hexamer と M-MuLV reverse transcriptase を含む First-Strand cDNA



Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) を用いて、逆転写し、cDNA を合成した。c-met, HGF および内因性陽性コントロール glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) 各々に特異的なプライマー各 0.2  $\mu$ M と cDNA 混合液 1  $\mu$ l を、1.25 U の Taq polymerase (Z-Taq; TaKaRa Shuzo Co., Otsu, Japan) を含む PCR 反応液 50  $\mu$ l に添加し、programmable heating block (MJ Reserch, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて PCR を施行した。PCR 反応液 5  $\mu$ l を 2% アガロースゲル上で電気泳動した。PCR 産物を ethidium bromide で染色し、検出した。PCR 産物を、Macintosh および EDAS 120 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) からなる system を用いて、取り込み、解析した。データは c-met/GAPDH 比および HGF/GAPDH 比として算出し、c-met および HGF mRNA 量を半定量した。

#### 6. プライマーおよび PCR プロトコール

PT-PCR に使用した合成オリゴヌクレオチドプライマーは以下の通りである。

HGF mRNA に対する特異的プライマーは 5'-GGGG AATGAGAAATGCAGTCAG-3' (1920-1941) および 5'-CCTGTATCCATGGATGCTTC-3' (2215-2234)、c-met mRNA に対する特異的プライマーは 5'-ACAGT GGCATGTCAACATCGCT-3' (2413-2434) および 5'-GCTCGGTAGTCTACAGATTC-3' (3049-3068)、GAPDH mRNA に対する特異的プライマーは 5'-CCTG CACCACCAACTGCTTAGC-3' (517-538) および 5'-GCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3' (734-755)。

HGF と c-met に対する PCR プロトコールは、変性反応を 98°C 10 秒間、アニーリングを 56°C 10 秒間、伸長反応を 72°C 10 秒間行い、このサイクルを 35 回繰り返した。GAPDH に対する PCR プロトコールは、変性反応を 98°C 10 秒間、アニーリングを 62°C 10 秒間、伸長反応を 72°C 10 秒間行い、このサイクルを 25 回繰り返した。HGF、c-met、GAPDH mRNA に対して予測される PCR 産物はそれぞれ 314, 655, 239 base pairs である。

#### 7. 統計

データは平均値±標準偏差で示した。多群間の比較は one-way ANOVA にて有意差がみとめられたものに対して Fisher's PLSD を施行した。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. 免疫蛍光二重染色による培養アストロサイトにおける c-Met の産生の検討

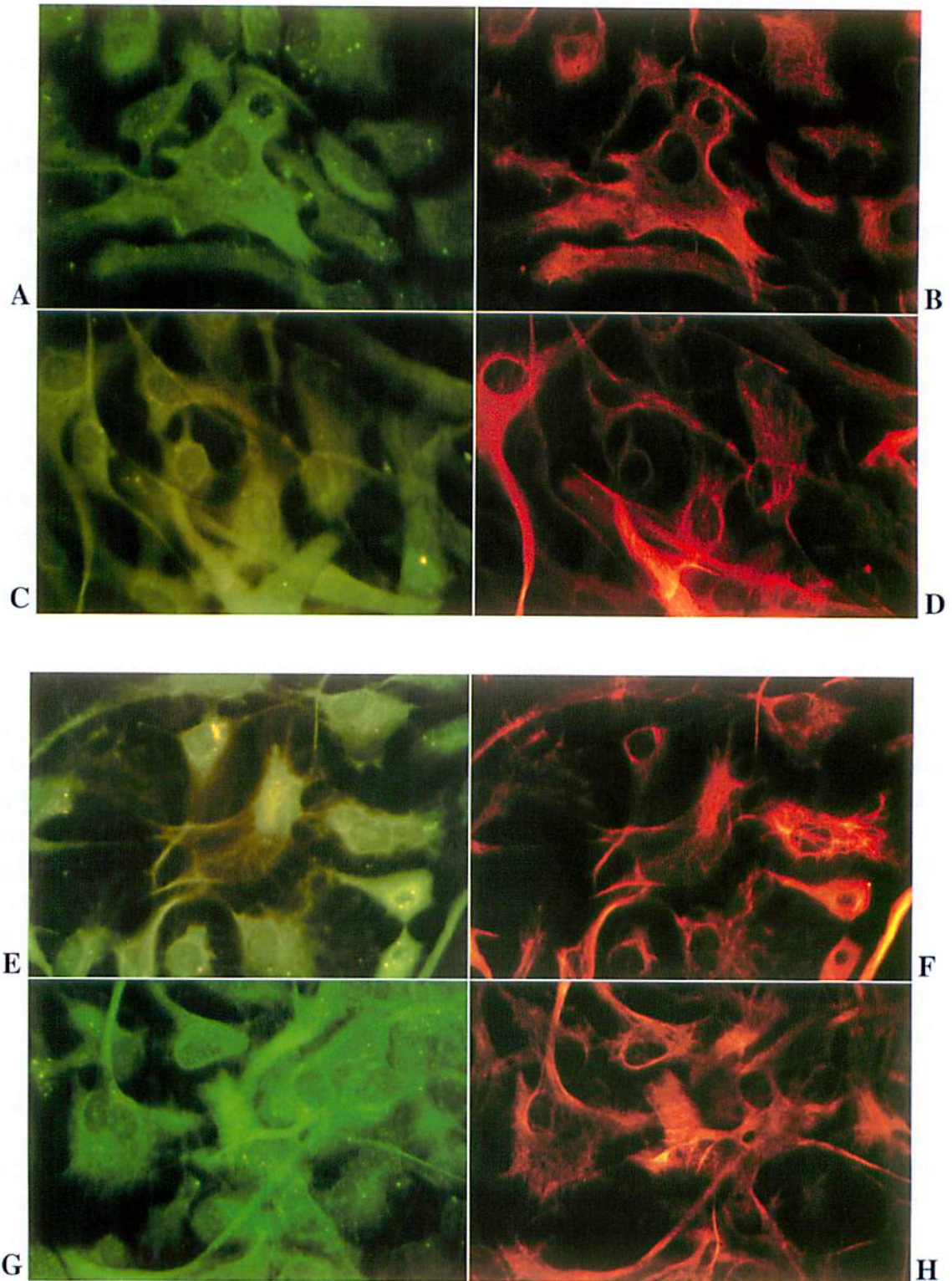
免疫蛍光二重染色により培養細胞において c-Met が検出された (第 1 図 A)。c-Met 陽性細胞は GFAP 陽性細胞と同一であることが示された (第 1 図 B)。このことから c-Met は培養アストロサイトにおいて産生されることが明らかにされた。c-Met の染色パターンは種々の分泌性因子により影響を受けないことが示され (第 1 図 C, E, G, I, K, M, O)。

### 2. Western blot 法による培養アストロサイトにおける c-Met の産生の検討

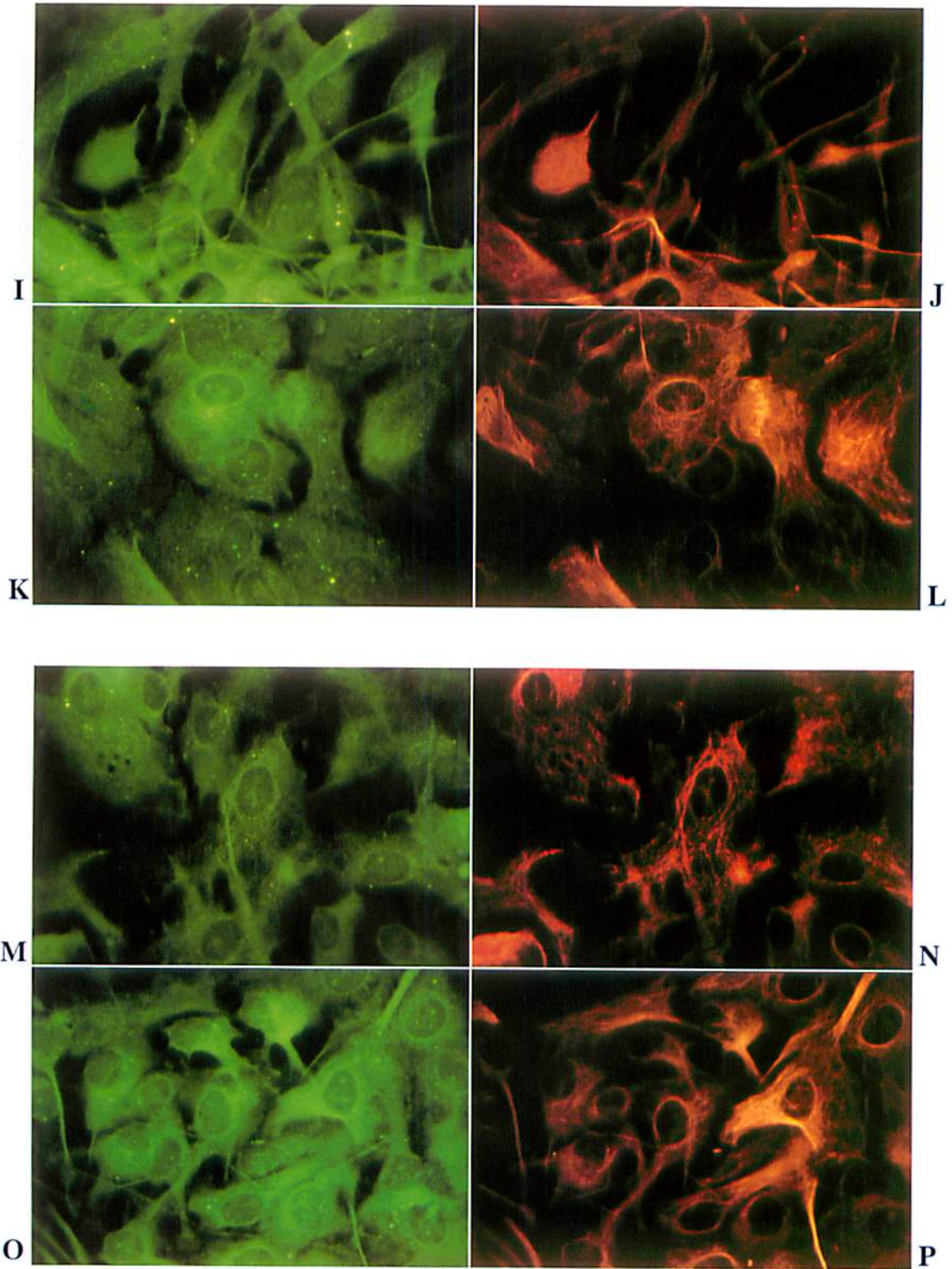
Western blot 法により、培養アストロサイトにおける c-Met が検出された。培養アストロサイトは 145 および 170 kD isoform の c-Met を産生していることが明らかにされた (第 3 図)。無処理のアストロサイト抽出液を、1~12 mg/ml の蛋白濃度となるよう細胞融解液で希釈し、Western blot 法により検出された 145 および 170 kD c-Met isoform のバンドから image analyzer を用いて Area\*Dens を算出した。アストロサイト抽出液の蛋白濃度と Area\*Dens は直線関係にあることが判明した (第 2 図 A, B)。Image analyzer を用い、無処理のアストロサイトにおける c-Met の産生量に対する分泌性因子で処理したアストロサイトにおける c-Met の産生量の比を比較し c-Met 産生量を半定量した結果、170 kD isoform の産生は aFGF, bFGF により有意に増強され、HGF により有意に減弱されることが明らかにされた (第 4 図 A)。145 kD isoform の産生は種々の分泌性因子により有意な変化を示さなかった (第 4 図 B)。

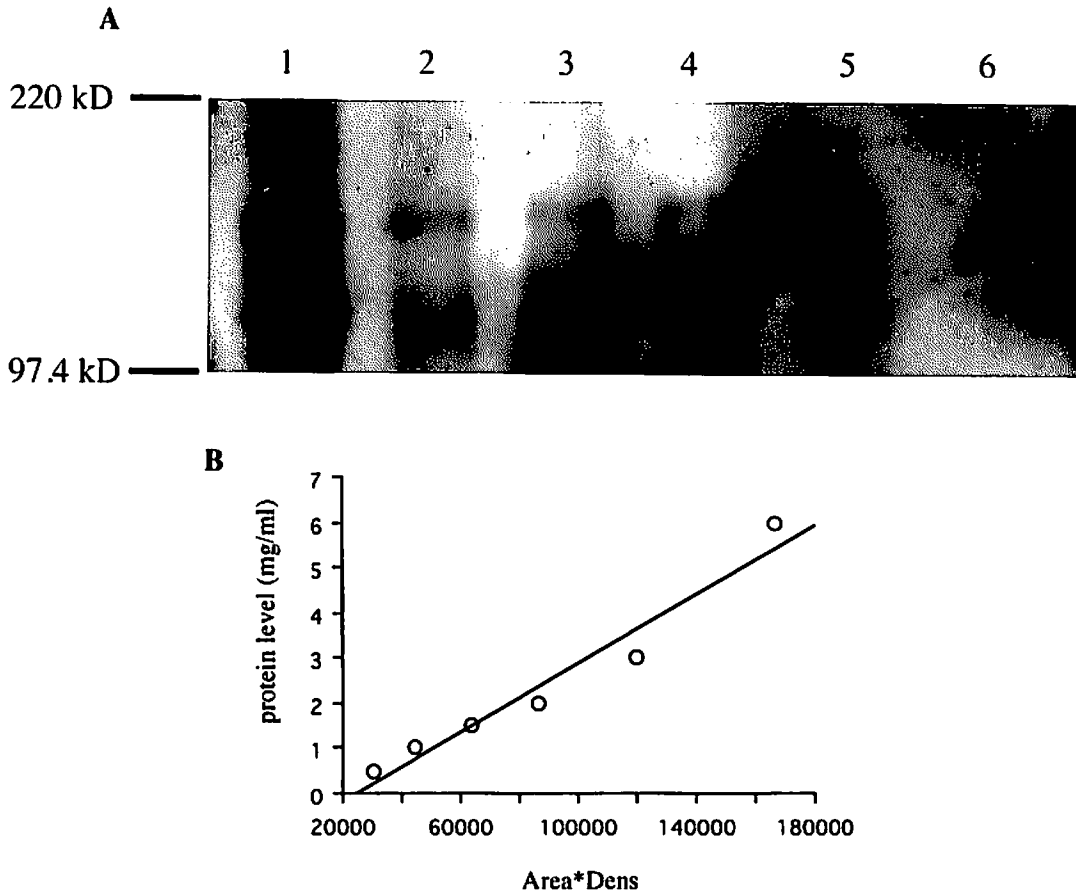
### 3. RT-PCR による培養アストロサイトにおける c-met 発現の検討

RT-PCR により、培養アストロサイトにおける c-met の発現が明らかにされた (第 5 図)。また、培養アストロサイトにおける HGF の遺伝子の発現も明らかにされた (第 5 図)。内因性陽性コントロール GAPDH の mRNA 量に対する c-met mRNA 量の比 c-met/GAPDH を比較し半定量した結果、aFGF, bFGF, HGF は c-met の発現を有意に増強させた (第 6 図 A)。c-met mRNA の産生量は aFGF, bFGF, HGF の刺激後 3 時間で最大になることが観察された (第 7 図 A)。HGF mRNA の

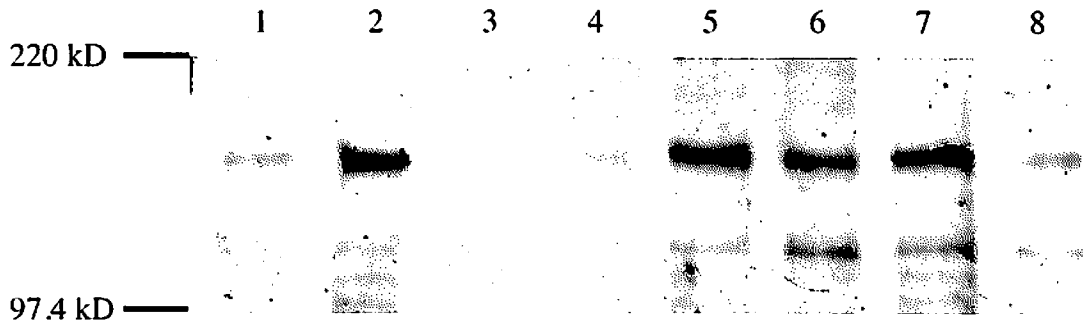


第1図 培養アストロサイトにおける c-Met (A, C, E, G, I, K, M, O) と GFAP (B, D, F, H, J, L, N, P) 免疫蛍光二重染色. A, B. 分泌性因子無添加 (control). C, D. acidic FGF 添加. E, F. TNF- $\alpha$  添加. G, H. IL-1 $\beta$  添加. I, J. basic FGF 添加. K, L. TGF- $\beta$ 1 添加. M, N. EGF 添加. O, P. HGF 添加. (倍率 160 倍) (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 1 より許可を得て一部を転載.)

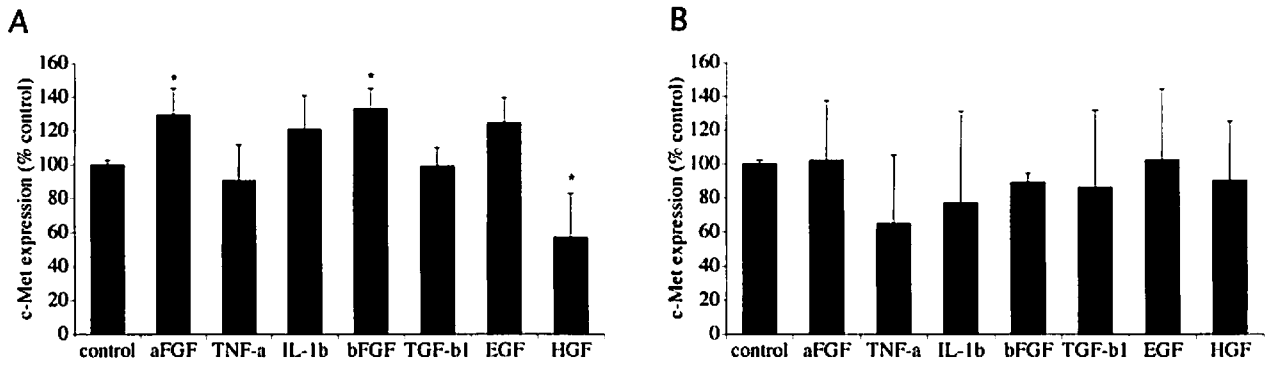




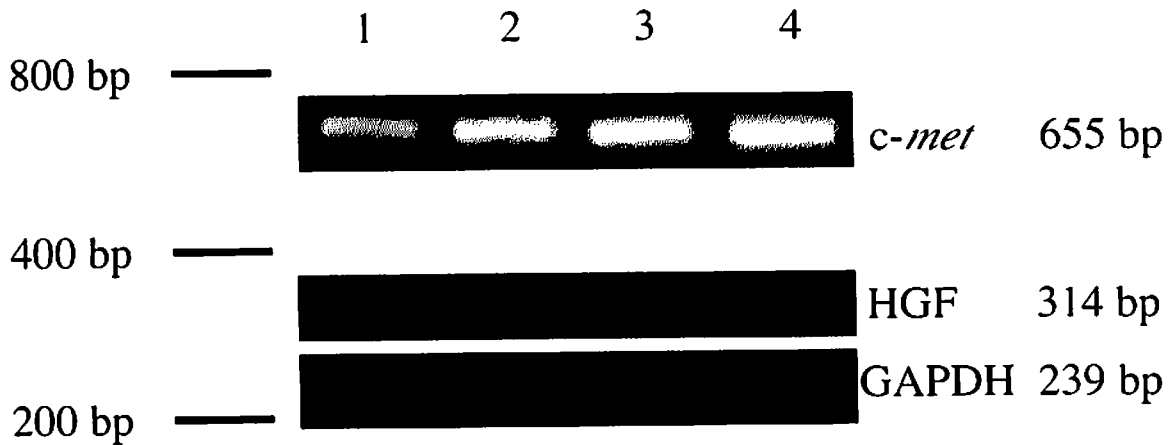
第2図 培養アストロサイトにおけるc-MetのWestern blot法-画像解析による定量。A. 無処理アストロサイト抽出液を蛋白濃度で希釈系列を作成しWestern blot法で解析。1) 6 mg/ml, 2) 3 mg/ml, 3) 2 mg/ml, 4) 1.5 mg/ml, 5) 1 mg/ml, 6) 0.5 mg/ml。B. 蛋白濃度とArea\*Densとの相関関係 (adjusted R<sup>2</sup>=0.95)



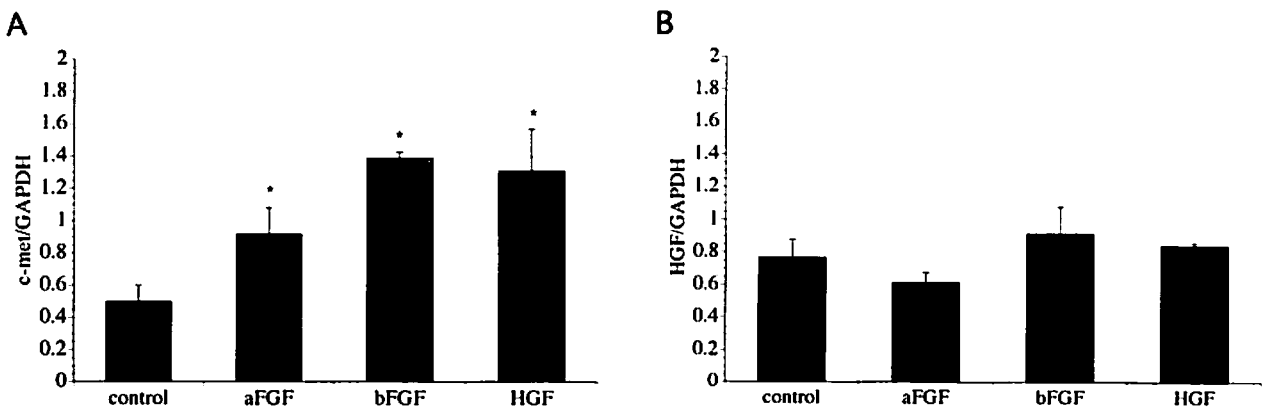
第3図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおけるc-MetのWestern blot法による解析。1) control, 2) acidic FGF, 3) TNF-α, 4) IL-1β, 5) basic FGF, 6) TGF-β1, 7) EGF, 8) HGF. (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 2より許可を得て転載。)



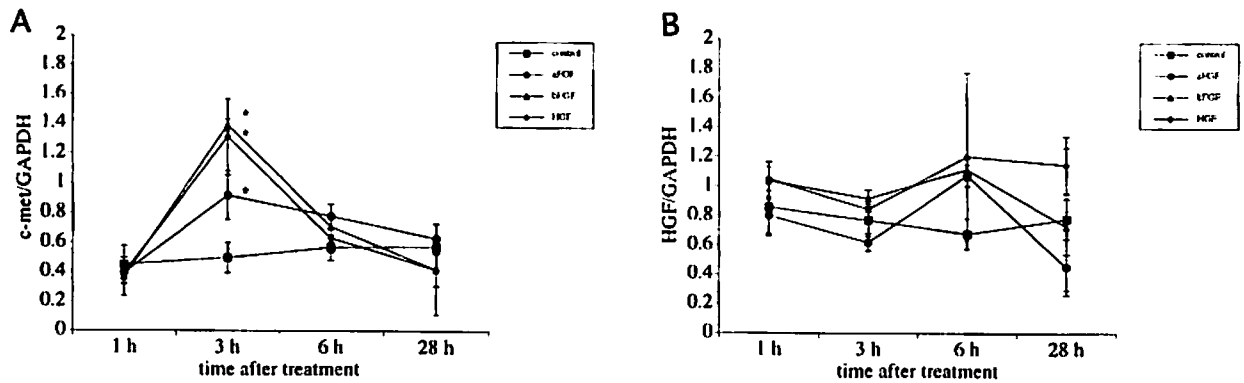
第4図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおける c-Met を Western blot 法・画像解析にて定量し、無処理群 (control) との比率をパーセントで表示。A. 170-kD isoform. Control と比較して\* :  $p < 0.05$ . B. 145-kD isoform. (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 2 より許可を得て一部を転載.)



第5図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおける *c-met*, HGF mRNA の RT-PCR による解析。1) control, 2) acidic FGF, 3) basic FGF, 4) HGF. (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 3 より許可を得て転載.)



第6図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおける *c-met*, HGF mRNA を RT-PCR・画像解析にて定量し、無処理群 (control) と比較し表示 (刺激後3時間)。A. 内因性陽性コントロール GAPDH の mRNA 量に対する *c-met* mRNA 量の比 *c-met*/GAPDH を求め半定量した結果。Control と比較して\* :  $p < 0.05$ . B. 内因性陽性コントロール GAPDH の mRNA 量に対する HGF mRNA 量の比 HGF/GAPDH を求め半定量した結果。 (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 3 より許可を得て一部を転載.)



第7図 各種分泌性因子により刺激した培養アストロサイトにおける c-met, HGF mRNA 産生量の時間経過による変化. A. c-met mRNA. Control と比較して\*: p<0.05. B. HGF mRNA. (Shimazaki K, et al : Brain Research 962 : 105-110, 2003 Fig. 3 より許可を得て一部を転載.)

産生量は種々の分泌性因子により影響を受けなかった (第6図B, 第7図B).

### 考 察

本研究において、ラット海馬の培養アストロサイトにおける c-Met 蛋白の産生が、免疫蛍光二重染色と Western blot 法により初めて示された。これまでに c-Met 蛋白の産生は、ミクログリア<sup>9,11)</sup>、ニューロン<sup>12)</sup>、glioma 組織<sup>13-15, 17, 21)</sup>、glioma cell lines<sup>15, 16, 22)</sup>において報告があり、c-met mRNA の産生は、ミクログリア<sup>12)</sup>、ニューロン<sup>12, 23)</sup>、アストロサイト<sup>12)</sup>、glioma cell lines<sup>16, 17, 22, 24)</sup>において報告がある。HGF のアストロサイトにおける産生も報告されている<sup>11)</sup>。しかし、ラット海馬の培養アストロサイトにおける c-Met 蛋白の産生はこれまで報告がみられなかった。

本研究で使用した培養細胞は GFAP 陽性細胞で構成されている。これらの培養細胞は Yoshida ら<sup>20)</sup>による方法により得られ、95%以上がアストロサイトであり、培養アストロサイトと特徴づけるに十分である。これら培養アストロサイトは、継代操作により機械的および酵素的に刺激される。刺激され、活性化状態にある培養アストロサイトは NGF および他の神経栄養因子を産生しており、神経栄養因子の産生は、脳損傷時に供給されると考えられる分泌性因子により増加する<sup>18-20)</sup>。それゆえ、この培養細胞は脳損傷後の中枢神経系の再生過程のアストロサイトにおける c-Met の産生とその調節を検討するのに適したものと考えられる。もちろん、アストロサイトは *in vivo* では *in vitro* とは異なった活動をするが、これら活性化されたアストロサイトは、分泌性因子に対

するアストロサイトの反応を検討するに有用であると考えられる。本研究において、分泌性因子は、アストロサイトにおける NGF および他の神経栄養因子の産生を最大限引き出すと考えられる濃度で使用した<sup>18-20)</sup>。HGF は、培養肝細胞における DNA 合成を刺激する至適濃度で使用した<sup>6, 7)</sup>。

これまでに c-Met には種々の isoform が報告されている。主に産生されるのは、50 kD の  $\alpha$  subunit と 145 kD の  $\beta$  subunit からなる 190 kD isoform である<sup>25)</sup>。この isoform は 170 kD immature protein (prepro c-Met protein) から glycosylation と proteolytic cleavage により産生される<sup>26)</sup>。もうひとつの 170 kD isoform は alternative splicing により産生され、これは細胞外ドメインに 18 アミノ酸が付加されている<sup>27)</sup>。一方、カルボキシ側を欠いた 130 と 140 kD isoform も産生され、これは細胞内チロシンキナーゼドメインを欠く<sup>28)</sup>。190 と 140 と alternative splicing により産生された 170 kD isoform は細胞膜上に存在し<sup>25-28)</sup>、前駆体 170 kD isoform は細胞質内に存在し<sup>26)</sup>、130 kD isoform は可溶性である<sup>28)</sup>。

本研究で使用した rabbit polyclonal anti-mouse c-Met antibody は、マウス Met 蛋白のカルボキシ末の 28 個のペプチドに対する抗体である<sup>29)</sup>。それゆえ、この抗体は 190 kD isoform の 145 kD  $\beta$  subunit または alternative splicing により産生された 170 kD isoform および細胞質内に局在する前駆体 170 kD isoform を検出できるが、カルボキシ末を欠く 130 および 140 kD isoform は検出できない。

免疫蛍光二重染色により、培養アストロサイトにおける c-Met の染色パターンは種々の分泌性因子により影

響を受けないことが示され、検出された c-Met の細胞内局在は分泌性因子の影響を受けないのではないかと考えられた。検出された c-Met は、細胞膜上の 190 kD isoform の 145 kD  $\beta$  subunit または alternative splicing により産生された 170 kD isoform および細胞質内に局在する前駆体 170 kD isoform の可能性がある。今後、細胞外ドメインの違いを認識する抗体を使った免疫染色や、細胞内局在について、共焦点レーザー蛍光顕微鏡等を用いた厳密な解析を行うなどの検討を要する。

Western blot 法により、検出された 170 kD isoform は、細胞質内に局在する前駆体 170 kD isoform もしくは alternative splicing により産生された 170 kD isoform の可能性がある。これらを区別するには、細胞外ドメインの違いを認識する抗体を使った免疫染色や Western blotting を行うなど、今後の検討を要する。

本研究において、培養アストロサイトにおける c-Met の 170 kD isoform の産生が aFGF, bFGF により増強されることが示された。また、c-met mRNA の産生も aFGF, bFGF により増強されることが示された。産生が増強された 170 kD isoform が前駆体蛋白であると仮定すると、活性化されたアストロサイトにおいて、分泌性因子は c-met mRNA および c-Met 蛋白の産生を増加させ、HGF に対する反応性を up-regulate する可能性が考えられる。

HGF は c-Met のチロシンリン酸化を刺激し<sup>5)</sup>、c-Met の下流のシグナル伝達を刺激し<sup>30)</sup>、種々の細胞への作用を発現することが知られている。組織損傷時に放出されることが知られている炎症性サイトカインである IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$ 1, EGF, HGF, ステロイドホルモンが、human carcinoma cell lines における 8 kb c-met mRNA の産生レベルに著しく影響することが報告されている<sup>31)</sup>。また、c-met 遺伝子が血清、HGF や TPA により誘導され、その誘導は転写レベルであることが報告されている<sup>32)</sup>。

詳細な分子機構は未だ明らかではないが、HGF は、産生が増強された c-Met を刺激し、シグナル伝達経路を活性化させることにより、活性化アストロサイトによる神経栄養効果が増強する可能性が考えられる。今後、シグナル伝達経路に関して、詳細な検討が必要とされる。

別の分子機構も推測されている。座骨神経の損傷後に Schwann 細胞が c-Met を産生していることが免疫組織化学的分析で認められたという報告がなされている<sup>33)</sup>。この報告では、座骨神経損傷後の c-Met の産生の増強は、座骨神経損傷部位遠位部の Schwann 細胞表面における HGF の濃度を上げるメカニズムであり、recruit

された HGF は Schwann 細胞に作用せず、直接ニューロンに作用し神経再生を促進するのではないかと推測している。しかしながら、中枢神経系でも同様のメカニズムがアストロサイトとニューロンの間に存在するかは明らかでない。

HGF と c-met の mRNA の産生が胎生期、発達期、成体の脳に認められ、HGF が神経栄養因子として中枢神経系の発達および再生過程に関与する可能性が報告されている<sup>23, 34, 35)</sup>。また、HGF と c-Met の産生がラット海馬のニューロンに認められたが、HGF が autocrine か paracrine に作用するかは不明である<sup>10)</sup>。一方、HGF と c-Met の産生が astrocytoma に認められ、autocrine loop が、腫瘍形成と浸潤、転移、増殖に関与しているのではないかと報告がなされている<sup>14, 16, 17, 22)</sup>。

HGF は培養アストロサイトにおける c-met mRNA と c-Met 蛋白の産生に対して対立する反応を引き起こした。HGF も c-met mRNA の産生を増強し、c-Met 蛋白の産生を増強し、HGF はさらに c-Met を刺激するのかもしれない。HGF mRNA の産生は分泌性因子により影響を受けなかったが、HGF は活性化されたアストロサイトにおいて autocrine により作用する可能性が考えられる。その後、HGF は negative feedback により c-Met の合成を抑制する可能性が考えられる。なぜなら、本研究において、外因性の HGF の刺激後 3 時間においては mRNA の産生は増強するが、6 時間～28 時間後には元のレベルまで低下し、その後 48 時間後には蛋白レベルで mature な c-Met 190 kD isoform の産生量に変化はないものの、c-Met の前駆体の可能性のある 170 kD isoform の産生が減弱しており、これらの変化は、RT-PCR は初期の転写の増強を、Western blotting は後期の蛋白合成の抑制を見ている可能性があるからである。この可能性については、Western blotting, RT-PCR により分泌性因子刺激後 3 時間～48 時間での mRNA および蛋白双方の産生量を調べるなど、今後の検討を要する。

以上、培養アストロサイトにおいて c-Met の産生が認められた。c-Met は、分泌性因子により産生の調節を受けることにより、HGF に対する反応性を up-regulate される可能性があることが示唆された。HGF により c-Met のシグナル伝達経路が活性化されることで、アストロサイトの持つ神経栄養効果が増強する可能性があり、c-Met が中枢神経系の再生過程に関与していることが示唆された。

## 総括

中枢神経系の再生過程における c-Met の役割を明らかにするために、脳損傷時に損傷部位に供給される FGF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  などの種々の分泌性にて刺激した培養アストロサイトにおける c-Met の産生を、免疫蛍光二重染色, Western blot 法, RT-PCR にて検討した。培養アストロサイトにおける c-Met および *c-met* mRNA の産生量を指標とし、上記の分泌性因子による影響を検討することにより、以下の結果を得た。

1. 免疫蛍光二重染色による検討により、培養アストロサイトにおいて c-Met の産生が認められた。c-Met の染色パターンは分泌性因子により影響を受けないことが示唆された<sup>36)</sup>。今後、細胞内局在について共焦点レーザー蛍光顕微鏡等を用いた厳密な解析を進める予定である。

2. Western blot 法による検討により、培養アストロサイトにおける c-Met の産生が明らかにされた。また、培養アストロサイトは 145 および 170 kD isoform の c-Met を産生していることが明らかにされた。170 kD isoform の産生は aFGF, bFGF により有意に増強され、HGF により有意に減弱されることが認められたが<sup>36)</sup>、145 kD isoform の産生は分泌性因子により有意な変化を示さなかった。Western blot 法の結果より、分泌性因子により産生の調節を受けた 170 kD isoform が、細胞質内に局在する前駆体 170 kD isoform もしくは alternative splicing により産生された 170 kD isoform であるかについては、細胞外ドメインの違いを認識する抗体を使った免疫染色や Western blotting により今後の検討を行う予定である。

3. RT-PCR による検討により、培養アストロサイトにおける *c-met* mRNA の産生が明らかにされた。aFGF, bFGF, HGF は *c-met* mRNA の産生を有意に増強させた。c-met mRNA の産生量は aFGF, bFGF, HGF の刺激後 3 時間で最大になることが観察された<sup>36)</sup>。

4. RT-PCR による検討により、培養アストロサイトにおける HGF mRNA の産生も明らかにされた<sup>36)</sup>。HGF mRNA の産生量は分泌性因子により影響を受けなかった。

以上、培養アストロサイトにおいて c-Met の産生が認められた。c-Met は、分泌性因子により産生の調節を受けることにより、HGF に対する反応性を up-regulate される可能性があることが示唆された。HGF により c-Met のシグナル伝達経路が活性化されること

で、アストロサイトの持つ神経栄養効果が増強する可能性があり、c-Met が中枢神経系の再生過程に関与していることが示唆された。

## 謝辞

稿を終えるに当たり、本研究に終始懇篤なるご指導、ご高閲を賜りました慶應義塾大学医学部外科学教室河瀬斌教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を直接ご指導いただきました吉田一成講師に深謝いたします。さらに多大なご協力をいただきました脳神経外科研究室の諸先生方に感謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金（基盤研究 (C) (2) (No. 08671615)、奨励研究 (A) (No. 10770691)) の援助を受けた。

## 文献

- 1) Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF : Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 311 : 29-33, 1984
- 2) Cooper CS, Tempest PR, Beckman MP, Heldin CH, Brookes P : Amplification and overexpression of the met gene in spontaneously transformed NIH3T3 mouse fibroblasts. *EMBO J* 5 : 2623-2628, 1986
- 3) Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF : Mechanism of met oncogene activation. *Cell* 45 : 895-904, 1986
- 4) Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiećik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA : Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the *c-met* proto-oncogene product. *Science* 251 : 802-804, 1991
- 5) Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM : Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 6 : 501-504, 1991
- 6) Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y : Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest* 81 : 414-419, 1988
- 7) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T : Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett* 224 : 311-316, 1987
- 8) Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA : Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the *c-met* proto-oncogene product. *Biochim Biophys Acta* 1155 : 357-371, 1993



- 9) Di Renzo MF, Bertolotto A, Olivero M, Putzolu P, Crepaldi T, Schiffer D, Pagni CA, Comoglio PM : Selective expression of the Met/HGF receptor in human central nervous system microglia. *Oncogene* 8 : 219-222, 1993
- 10) Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K, Nakamura T : Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain : implication as neurotrophic factor. *Brain Res Mol Brain Res* 32 : 197-210, 1995
- 11) Yamada T, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Prat M, Comoglio PM, McGeer PL, McGeer EG : Immunohistochemistry with antibodies to hepatocyte growth factor and its receptor protein (c-MET) in human brain tissues. *Brain Res* 637 : 308-312, 1994
- 12) Yamagata T, Muroya K, Mukasa T, Igarashi H, Momoi M, Tsukahara T, Arahata K, Kumagai H, Momoi T : Hepatocyte growth factor specifically expressed in microglia activated Ras in the neurons, similar to the action of neurotrophic factors. *Biochem Biophys Res Commun* 210 : 231-237, 1995
- 13) Hirose Y, Kojima M, Sagoh M, Murakami H, Yoshida K, Shimazaki K, Kawase T : Immunohistochemical examination of c-Met protein expression in astrocytic tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 95 : 345-351, 1998
- 14) Nabeshima K, Shimao Y, Sato S, Kataoka H, Moriyama T, Kawano H, Wakisaka S, Koono M : Expression of c-Met correlates with grade of malignancy in human astrocytic tumours : an immunohistochemical study. *Histopathology* 31 : 436-443, 1997
- 15) Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF : Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 57 : 5391-5398, 1997
- 16) Moriyama T, Kataoka H, Tsubouchi H, Koono M : Concomitant expression of hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator and c-met genes in human glioma cells *in vitro*. *FEBS Lett* 372 : 78-82, 1995
- 17) Yamamoto S, Wakimoto H, Aoyagi M, Hirakawa K, Hamada H : Modulation of motility and proliferation of glioma cells by hepatocyte growth factor. *Jpn J Cancer Res* 88 : 564-577, 1997
- 18) Kamiguchi H, Yoshida K, Sagoh M, Sasaki H, Inaba M, Wakamoto H, Otani M, Toya S : Release of ciliary neurotrophic factor from cultured astrocytes and its modulation by cytokines. *Neurochem Res* 20 : 1187-1193, 1995
- 19) Kamiguchi H, Yoshida K, Wakamoto H, Inaba M, Sasaki H, Otani M, Toya S : Cytokine-induced selective increase of high-molecular-weight bFGF isoforms and their subcellular kinetics in cultured rat hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* 21 : 701-706, 1996
- 20) Yoshida K, Gage FH : Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res* 538 : 118-126, 1991
- 21) Rosen EM, Laterra J, Joseph A, Jin L, Fuchs A, Way D, Witte M, Weinand M, Goldberg ID : Scatter factor expression and regulation in human glial tumors. *Int J Cancer* 67 : 248-255, 1996
- 22) Moriyama T, Kataoka H, Seguchi K, Tsubouchi H, Koono M : Effects of hepatocyte growth factor (HGF) on human glioma cells *in vitro* : HGF acts as a motility factor in glioma cells. *Int J Cancer* 66 : 678-685, 1996
- 23) Jung W, Castren E, Odenthal M, Vande Woude GF, Ishii T, Dienes HP, Lindholm D, Schirmacher P : Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain. *J Cell Biol* 126 : 485-494, 1994
- 24) Welch WC, Kornblith PL, Michalopoulos GK, Petersen BE, Beedle A, Gollin SM, Goldfarb RH : Hepatocyte growth factor (HGF) and receptor (c-met) in normal and malignant astrocytic cells. *Anticancer Res* 19 : 1635-1640, 1999
- 25) Tempest PR, Stratton MR, Cooper CS : Structure of the met protein and variation of met protein kinase activity among human tumour cell lines. *Br J Cancer* 58 : 3-7, 1988
- 26) Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Cooper CS, Rosa C, Comoglio PM : Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4 : 1383-1388, 1989
- 27) Rodrigues GA, Naujokas MA, Park M : Alternative splicing generates isoforms of the met receptor tyrosine kinase which undergo differential processing. *Mol Cell Biol* 11 : 2962-2970, 1991
- 28) Prat M, Crepaldi T, Gandino L, Giordano S, Longati P, Comoglio P : C-terminal truncated forms of Met, the hepatocyte growth factor receptor. *Mol Cell Biol* 11 : 5954-5962, 1991
- 29) Rong S, Bodescot M, Blair D, Dunn J, Nakamura T, Mizuno K, Park M, Chan A, Aaronson S, Vande Woude GF : Tumorigenicity of the met proto-oncogene and the gene for hepatocyte growth factor. *Mol Cell Biol* 12 : 5152-5158, 1992
- 30) Faletto DL, Kaplan DR, Halverson DO, Rosen EM, Vande Woude GF : Signal transduction in c-met mediated motogenesis. *Exs* 65 : 107-130, 1993
- 31) Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, Zarnegar R : Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones : evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* 9 : 2045-2052, 1994
- 32) Boccaccio C, Gaudino G, Gambarotta G, Galimi F, Comoglio PM : Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *J Biol Chem* 269 :

12846-12851, 1994

- 33) Hashimoto N, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Mashimo T, Noguchi K : Expression of HGF and cMet in the peripheral nervous system of adult rats following sciatic nerve injury. *Neuroreport* 12 : 1403-1407, 2001
- 34) Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C : Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the *c-met* tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* 123 : 223-

235, 1993

- 35) Thewke DP, Seeds NW : Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor, *c-met*, and tissue-type plasminogen activator during development of the murine olfactory system. *J Neurosci* 16 : 6933-6944, 1996
- 36) Shimazaki K, Yoshida K, Hirose Y, Ishimori H, Katayama M, Kawase T : Cytokines regulate c-Met expression in cultured astrocytes. *Brain Res* 962 : 105-110, 2003

学位論文

高血圧自然発症ラットにおける腎交感神経活動と  
血圧および腎血流量の関係に関する研究

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田享男教授)

佐 方 克 史

(平成 15 年 5 月 15 日受付)

Key Word : hypertension, sympathetic nervous system, spectral analysis, coherence, nonlinear analysis

腎臓は豊富な交感神経支配を有しており、この神経終末は輸入・輸出細動脈、尿細管、傍糸球体装置等に分布し、腎循環動態・腎機能を巧みに調節している<sup>1)</sup>。腎交感神経活動 (renal sympathetic nerve activity, 以下 RSNA と略す) が亢進すると、腎血流量の低下 (腎動脈の収縮)、水・Na 再吸収の亢進およびレニン分泌の亢進を介して体液量増大と総末梢血管抵抗の増加を招き血圧上昇をもたらす。ヒト本態性高血圧症やそのモデルである高血圧自然発症ラット (以下 SHR と略す) では交感神経活動の亢進が報告されている<sup>2,3)</sup>。このことは RSNA の周波数成分の変化で血管平滑筋細胞や傍糸球体細胞などの機能が変わり、血圧調節にも影響を与える可能性を示唆する。高血圧の発症・維持における交感神経系の重要性は、高血圧モデル動物の高血圧発症前に両側腎神経を完全に切除しておくことと高血圧の発生を防止できることから理解される。

また、交感神経系は圧受容器反射を介して瞬時に精巧に血圧を調節している<sup>4,5)</sup>。交感神経系および血圧調節の中枢である延髄腹外側野の吻側領域 (rostral ventrolateral medulla, 以下 RVLM と略す) には、自発放電するニューロン (神経細胞) が含まれる。RVLM ニューロンの電気活動が亢進すると脊髄中間外側核を経て下行性に心、腎、細動脈などへの末梢交感神経活動を亢進させ、血圧上昇をもたらす。

血圧が上昇すると、頸動脈洞や大動脈弓などの圧受容器はこれを瞬時に機械的信号としてとらえ、求心性神経を通じて延髄背側にある孤束核の活動を亢進させ、延髄腹外側野の尾側領域に興奮が伝わる。そこから GABA を神経伝達物質とする抑制性ニューロンが RVLM まで上行し、RVLM の電気活動を低下させることにより、遠心性交感神経活動を減弱させて血圧を下げるというネガティブ・フィードバック・システムとなっている。これが圧受容器反射である。

近年スペクトル解析により、血圧や心拍数の調節における自律神経支配の状態に関するさまざまな情報が得られてきている。Janssen ら<sup>6)</sup>は低酸素血症における RSNA と腎血流量との関連を無麻酔のウサギで検討し、RSNA の変動のうち高周波成分は血管収縮に寄与し、低周波成分は腎血流量の変動 (オシレーション) に寄与すると報告している。また Brown ら<sup>7)</sup>は、正常血圧ラットにおいて RSNA と血圧は 0.4Hz において密接に関連していると報告している。しかし高血圧などの病態モデルにおいて、RSNA と血圧および腎血流量を同時記録し、スペクトル解析した研究は未だなされていない。そこで本研究では、無麻酔ラットの RSNA と血圧、腎血流量および心拍数を同時記録することにより、RSNA の微細な変化 (特に 1.0 Hz 以下の低周波成分) が血圧および腎血流量をどのように調節しているか、また高血

本論文は、Sakata K, Kumagai H, Osaka M, Onami T, Matsuura T, Imai M, Saruta T : Potentiated sympathetic nervous and renin-angiotensin systems reduce nonlinear correlation between sympathetic activity and blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 106 : 620-625, 2002 の一部、および佐方克史、熊谷裕生、大坂元久、松浦友一、大島直紀、早川弘一、猿田享男 : スペクトル解析により分析した腎交感神経活動と血圧および腎血流量との相関は、正常血圧と高血圧ラットとで異なる。 *血圧*, 7 : 663-669, 2000 の一部を含む。

圧動物の神経性循環調節に異常があるとすれば、正常血圧との違いは何かをスペクトル解析と伝達関数(線形解析)を用いて検討した。対象として、ヒト本態性高血圧症のモデルである高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた。

また一酸化窒素(以下 NO と略す)合成酵素は血管内皮・血管平滑筋・血管運動中枢・腎臓などに幅広く存在し、循環調節にきわめて重要な役割を果たすことが示されている<sup>9)</sup>。高血圧は循環調節の異常によりもたらされることから、NOが高血圧の発症・維持に大きな役割を果たす可能性がある。そこで、もし高血圧ラットの循環調節に異常があるならば、それはNO系の異常によるものではないかという仮説を立てた。これを検証するために、NOの基質であるL-アルギニンの投与によりRSNAと血圧および腎血流量の相関関係がどのように変化するかも検討した。

生体の循環調節は決して線形ではなく、閉ループ(closed-loop)でかつ様々な因子がからみ合った非線形系の複雑な制御システムをなしている。線形とはグラフの形が直線となるものことで、 $y = ax + b$ の式であらわされる。この式はaとbを実数としたとき、変数yが変数xの一次関数であることを意味している。これによりグラフを描くと、aとbの値によってさまざまな図形となるが、いずれも直線となる。これに対して、グラフ化しても線形とならない式を非線形という。生体の心血管系パラメータの関係は非線形で、カオス的なゆらぎの成分が含まれることがわかってきた<sup>10-12)</sup>。カオスとは、決定論的に制御されているにもかかわらず一見無秩序に見えるものであり、時間的変動(力学系)の位相軌道が周期的でない場合をいう。一見規則正しく見える心電図や血圧の波形の繰り返しも、詳細に調べると不規則な変動要素が内在している。心拍周期や一拍ごとの収縮期血圧値を時系列的に記録すると、それらは平均値のまわりにきわめて不規則な変動(ゆらぎ)を示す。これらの時系列信号は完全に周期的ではなく、逆にホワイトノイズのような完全にランダムな信号でもなく、内部にはある定まった周期をもつリズムが存在する。

このように生体にとっての正常状態とは、生体を制御するさまざまなシステムがカオス的で、非線形性が高く、「複雑である」状態といえる<sup>13)</sup>。この非線形性によって、生体はさまざまな刺激に対応する柔軟性を得ていると考えられる。逆に心拍変動、脳波などの非線形性が低下し「複雑さ」が失われると、重症不整脈やけいれんが生じることが知られている。心筋梗塞後に心拍変動の非線形性が低下している患者は予後が悪く<sup>14)</sup>、また心拍変動の

非線形性の低下は心室細動に先行すると報告されている<sup>15)</sup>。しかしながら、高血圧動物において、循環調節の線形性と非線形性が正常血圧動物と比較してどう変化しているかは明らかにされていない。

以上のことより生体の神経性循環調節をとらえるのに線形解析のみでは不十分であると考え、閉ループにおいて非線形の相互関係の定量化が可能な新しい解析法である mutual information 法(相互情報量)<sup>16,17)</sup>を用いて、非線形解析も行った。これらの方法により、高血圧動物の神経性循環調節について線形と非線形解析を組み合わせた分析と統合が可能となった。またこれまで循環調節の非線形性低下と不良な予後とを結びつける因子は明らかでないため、これらを結びつける因子のひとつは交感神経亢進であろうという仮説を立て、これを検証した。

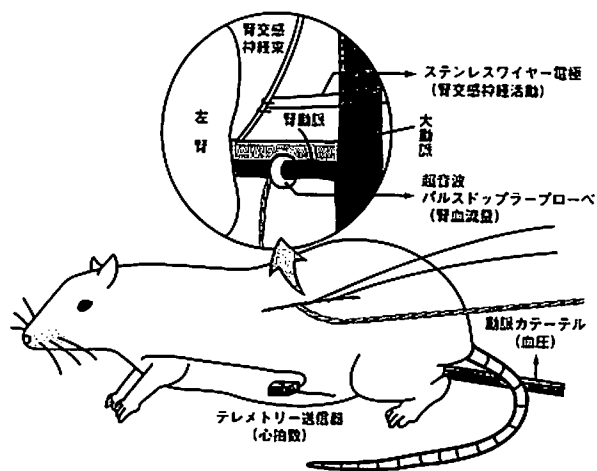
## 方 法

本研究は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに準拠し、これを遵守した。

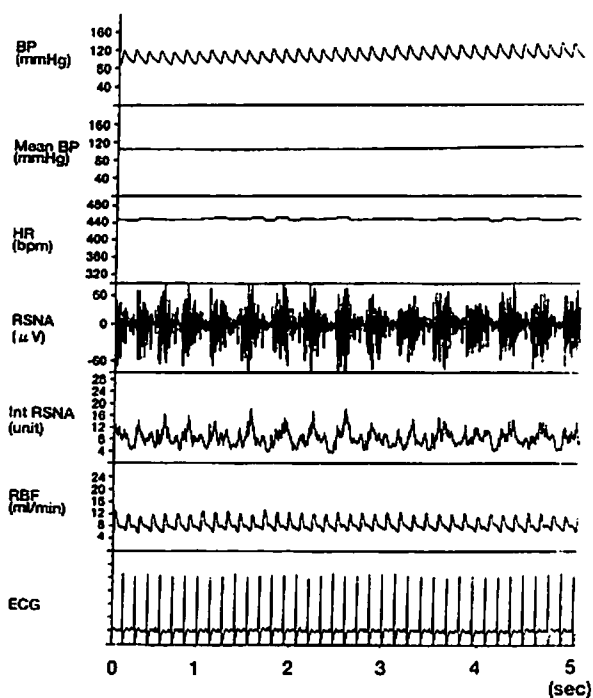
### 1. 血圧、心電図(心拍数)、RSNA、腎血流量の記録

動物は15週齢の雄ウイスター・キョート・ラット(以下WKYと略す)とSHRを用いた(各n=7)。ペントバルビタール麻酔下(30 mg/kg 静脈内投与、5 mg/kg 静脈内投与を適宜追加)に、大腿動脈にカテーテル(PE-50, Clay Adams, USA)を挿入し、また心電図記録のために腹部皮下にテレメトリーの送信器(TA10EA-F20, Data Science, USA)を埋め込んだ。次に左後腹膜を切開し顕微鏡下に左腎交感神経束をはく離し、直径0.02 mmのスチンレスワイヤー双電極(A-M System Inc, USA)を装着した<sup>3,18)</sup>。さらにRSNAと同側の左腎動脈にも超音波パルスドップラープローブ(1.0 mm 20 MHz, CBI Co, USA)を装着し<sup>19)</sup>、シリコンゲル(Sil-Gel 604A and B, Wacker-Chemie, Germany)で固定した(第1図)。

手術終了後24時間以上経過し、無麻酔状態にあることを確認後ラットケージに入れて安静状態で実験開始とした。大腿動脈に挿入したカテーテルは血圧トランスデューサー(TP-200T, 日本光電, 東京)に接続して血圧を測定した(AP-611G, 日本光電)。またテレメトリーの受信器(RPC1, Data Science, USA)により得られた心電図波形のR-R間隔から瞬時心拍数を得た。交感神経の電極は高インピーダンス・プローブ(JB101J, 日本光電)を通じて差動アンプ(AVB-10, 日本光電, band pass filter; 50 から 1000 Hz)に接続してRSNAを増



第1図 実験方法の模式図。15週雄ウイスター・キョート・ラット(WKY)と高血圧自然発症ラット(SHR)を用い、ペントバルビタール麻酔下で大動脈に血圧測定用のカテーテルを挿入し、また皮下にテレメトリー送信器を埋め込み瞬時心拍数を得る。次に左後腹膜アプローチにより左腎交感神経束にステンレスワイヤー電極を装着し、さらに同じ左側の腎動脈にもドップラー血流計を装着しシリコンゲルで固定する。



第2図 無麻酔状態で記録したWKYの各パラメータの実記録。上から血圧(BP)、平均血圧(Mean BP)、心拍数(HR)、腎交感神経活動(RSNA)の原波形、RSNAの積分値(Int RSNA)、腎血流量(RBF)、心電図(ECG)を表す。(佐方克史, 他: 血圧, 7: 663-669, 2000の第1図を許可を得て転載)

幅し、オシロスコープ(VC-10, 日本光電)で観察した。得られた神経信号は時定数20 msecで積分化し、これを定量に用いた。また超音波パルスドップラープローブはドップラー血流計(PDV-20, Crystal Biotech, USA)に接続し、腎血流量を測定した。このようにして得られた血圧、心電図、RSNAの積分値、腎血流量の4つのパラメータを、アナログーデジタル変換装置(PowerLab, ADI, Australia)を用いて、2000 Hzで6分30秒間以上同時記録した(第2図)。心拍数はBergerらの方法を用いて心電図のR波から64 Hzのサンプリングで再構成した<sup>20)</sup>。心拍数以外の時系列記録は、それに合せてスプライン補間し最終的に64 Hzでサンプリングした。

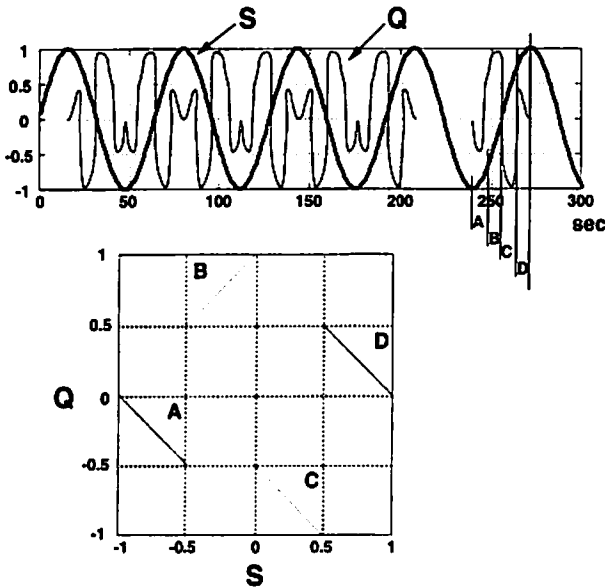
## 2. 伝達関数

得られた4つのパラメータ(血圧、瞬時心拍数、RSNAの積分値、腎血流量)について、スペクトル解析(高速フーリエ変換)を行った。スペクトル解析はWelch's法<sup>21)</sup>を用いることにより、4096点(64秒)毎のデータを9~13回50%オーバーラップさせて計算した。

伝達関数は、ある周波数における2つのパラメータ間の入出力の関係を算出する線形の解析法である<sup>22)</sup>。たとえばRSNAを入力とし、血圧を出力と仮定し、伝達関数からコヒーレンス、ゲイン、フェーズを算出した。コヒーレンスとは関連度関数のことで、入力と出力との間の線形の相関性をみるものであり、入力と出力のクロススペクトルの2乗を、入力のパワースペクトルと出力のパワースペクトルで除して算出した。0.5以上で有意に相関ありと判断され、線形性が高いほど1に近づく。一次回帰でいえば $r^2$ に相当する。ゲインはシステムの出力に対する入力の反映度、利得をあらわし、入力と出力のクロススペクトルを入力のパワースペクトルで除して算出した。一次回帰でいえば直線の傾きに相当する。フェーズは位相関数のことで、出力側と仮定したパラメータの入力側のパラメータに対する時間的遅れを意味し、角度(radian)で表現される。

## 3. 相互情報量

相互情報量法は1987年Fraserら<sup>16)</sup>により発案されたシステムの線形性を仮定しない解析法<sup>17)</sup>、物理・数学の領域では主要な解析法の一つである。相互情報量は確率論で定義される情報エントロピー(ある事象の結果の意外性を数値化したもの)の一種で、モデルの線形性を仮定せずに2変量間の相関を定量化するものである。



第3図 相互情報量の概念。ある変数SとQという変数が図のような関係にあるとき、従来の線形解析では有意な1本の回帰直線を引くことができず、相関がないということになる。しかし、相互情報量では順次小さな区画、たとえばA、B、C、Dと分けてゆき、そのおのこの区画の中で相関があるかどうかを決定していく。小さな区画での相関は区画の大きさに応じて重みをもたせて最終的に合算して評価する。相互情報量は0~1の値をとり、0.047以上で有意な相関と判断される。(大坂元久、他：Ther Res19：1845-1851, 1998の第2図を許可を得て改変、転載)

ここでは簡単に概念だけ示すが、SとQという変数が第3図のような関係にあるとき、従来の線形解析では有意な一本の回帰直線をひくことができず、線形の相関がないということになる。しかし、相互情報量では順次小さな区画にわけていき、そのおのこの区画の中で相関があるかを決定していく。小さな区画での相関は区画の大きさに応じて重みを持たせて、最終的に合算して評価する。相互情報量は0から1の値をとり、0.047以上で有意に相関ありと判断される<sup>17)</sup>。第3図の例では完全相関で、相互情報量は1となる。

本研究では、RSNAと血圧の間、RSNAと腎血流量の間の線形および非線形の相関を算出するために、相互情報量を計算した。相互情報量は1組の時系列  $\{x(t)\}$  と  $\{y(t)\}$  につき、 $y(t+T)$ の値が  $x(t)$ にどの程度依存しているのかを計測するものである。Tは遅延時間で、これらのデータ長は2のべき数であった。一般的な一対の系(S, Q)を  $[s, q] = [x(t), y(t+T)]$  で表した。この系の相互情報量  $I(S, Q)$  は、「xがsという値をとる

時、yの値qを、平均してどれくらいの情報量で予測できるのか」ということを定量化している。

$$I(S, Q) = \int P_{sq}(s, q) \log [P_{sq}(s, q) / P_s(s) P_q(q)] ds dq$$

この式でSとQは2つの系を、 $P_s(s)$ と $P_q(q)$ はおのおのsとqの値における確率密度関数を、 $P_{sq}(s, q)$ はsとqの値をとる時の結合確率密度関数を表す。(S, Q)に対して相互情報量が大きければ大きいほど、SとQの相互依存は大である。

本実験では、RSNA、血圧(BP)、腎血流量(RBF)の時系列を  $RSNA(t)$ ,  $BP(t)$ ,  $RBF(t)$  で表す。データ長は2の14乗点とした。64 Hzでサンプリングしたため、これは256(=2<sup>8</sup>/64)秒に相当した。SとQが全く同一ならば、それらの相関は完全であるはずである。その時データ長が2<sup>n</sup>ならば、相互情報量  $I(S, Q) = n$  である。それはこのアルゴリズムが離散データに対して計算する制約による。すなわち2つの同一な時系列の相互情報量はnである。したがって相互情報量はnを正規化し、つまりnによって除し、データ長によらず完全相関が1になるようにした。

相互情報量を用いるもう一つの利点は、これまで閉ループの実験系では解決できなかった2変量間の相関の方向性を決定できること、つまりあるパラメータと別のパラメータのどちらが先に起こっているかがわかることである。血圧の時系列  $Q = BP(t)$  が、RSNAの時系列  $RSNA(t)$  より、 $t_0$ だけの遅延時間(time delay)で出現すると仮定する。最大相互情報量は、 $RSNA(t)$  と、時間  $t_0$ だけ進ませた血圧の時系列データ  $BP(t+t_0)$  との間の相互情報量が最大になると考えられる。そこでTを-5秒から5秒まで0.25秒ずつ移動させながら  $RSNA(t)$  と  $BP(t+T)$  の相互情報量を計算し、最大の相互情報量をとる時の  $T (= T_{max})$  を求めた。その時Tは  $t_0$ に等しい。それゆえ、もし  $t_0 = T_{max}(RSNA, BP)$  が正ならば、RSNAがBPよりも  $t_0$ だけ生理学的に先行していると定義した。

#### 4. 実験プロトコール

実験1：スペクトル解析・伝達関数(線形解析)から分析したWKYとSHRの神経性循環調節(RSNAと血圧、RSNAと腎血流量との相関関係)の相違。

ラットから得られた4つのパラメータ(血圧、瞬時心拍数、RSNAの積分値、腎血流量)について、それぞれスペクトル解析を行い、さらにRSNAと血圧、RSNAと腎血流量との相関関係を調べるため、RSNA(入力)から血圧(出力)、RSNA(入力)から腎血流量(出力)への伝達関数(特にコヒーレンス)を求め、

WKY と SHR とで比較した。

実験 2：SHR に対する L-アルギニン注入による神経性循環調節への影響。

当教室の Jimbo ら<sup>23)</sup>は、L-アルギニンは NO 産生を介して交感神経系を抑制すると報告した。SHR (n = 8) において、RSNA と血圧および腎血流量の相関の線形性が NO によりどのように影響されるか調べるために、NO の基質である L-arginine hydrochloride (50 μmol/kg/分)を 60 分間かけて持続静注し、その前後で RSNA と血圧および腎血流量の伝達関数を計算した。

実験 3：相互情報量（線形および非線形解析）から分析した WKY と SHR の神経性循環調節の相違（RSNA と血圧、RSNA と腎血流量との相関関係）と各パラメータ間の相関の方向性。

0~0.10 Hz において RSNA と血圧、RSNA と腎血流量の相互情報量を計算し、0.047 以上の有意な相関関係が認められるかを計算した。相互情報量は線形および非線形を合せた解析法であるため、実験 1 でのコヒーレンス（線形性）の結果と併せて WKY と SHR の線形性、非線形性を比較した。また RSNA と血圧、RSNA と腎血流量の 2 変量間の相関の方向性を相互情報量の遅延時間から求めた。

## 5. 統計学的解析

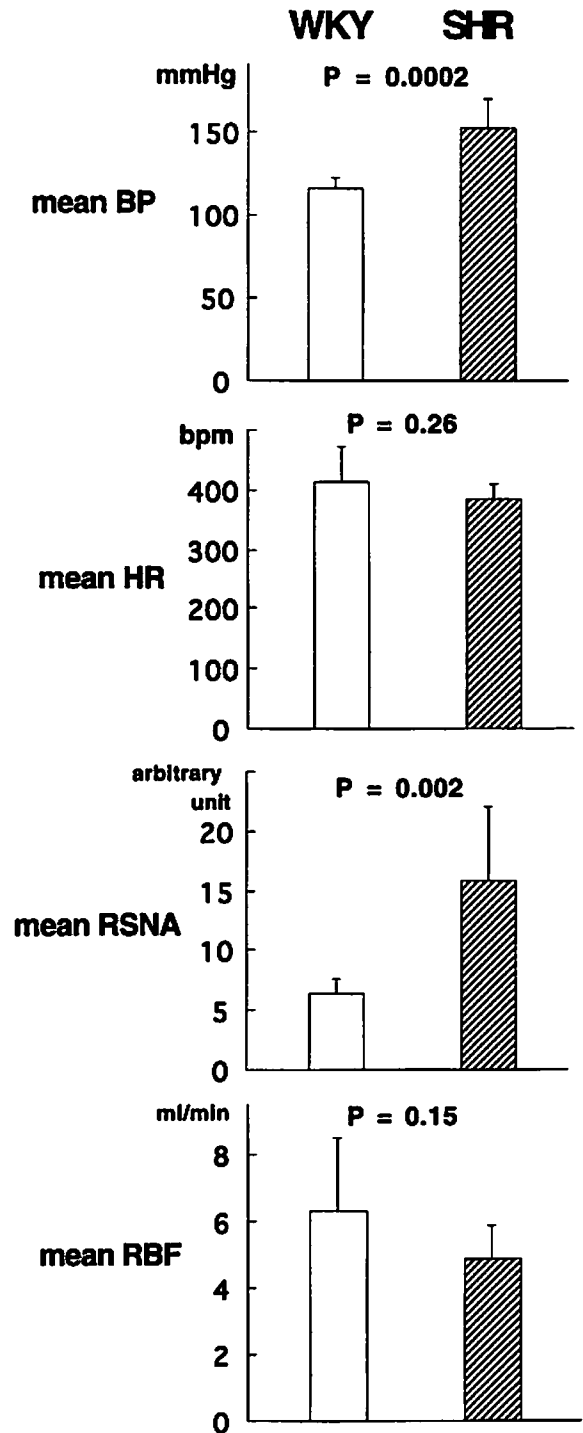
すべての測定値は平均±標準誤差で表した。各群間の有意差検定は Student's t-test を用いた。統計学的有意差は P<0.05 とした。

## 結 果

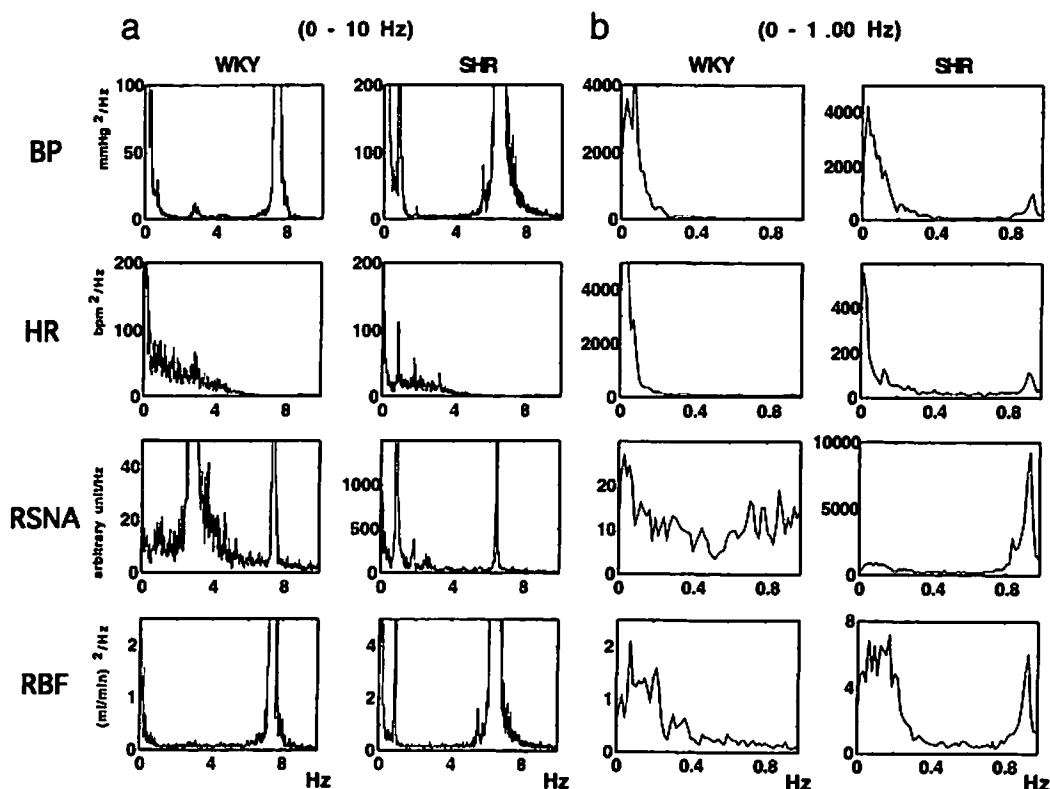
### 1. スペクトル解析・伝達関数による解析

第 4 図に各パラメータの平均値を示す。SHR では高い血圧にもかかわらず、RSNA は WKY より有意に大であった。心拍数と腎血流量は SHR と WKY とで差がなかった。

各パラメータのパワースペクトルを示す(第 5 図)。左側に 0~10 Hz の間の血圧、心拍数、RSNA、腎血流量を示す(第 5 図 a)。6-8Hz の成分は心拍数に一致したピーク、1~2 Hz の間は呼吸成分に一致したピークと考えられる。呼吸成分以下の周波数の RSNA に注目すると、0.05 と 0.80 Hz 付近の低周波成分に WKY、SHR とともに高いパワー値が認められた。そこで 0~1.00 Hz でのパワースペクトルを調べた(第 5 図 b)。RSNA では 0.05 と 0.80 Hz 付近にピークがみられた。たて軸のパワー値は SHR の方が 0.80 Hz 付近において



第 4 図 各パラメータの平均値 (各 n = 7)。SHR (斜線) では平均血圧 (mean BP) が高いにもかかわらず、腎交感神経活動 (mean RSNA) は亢進していた。(佐方克史, 他: 血圧, 7: 663-669, 2000 の第 2 図を許可を得て転載)



第5図 無麻酔で記録した血圧 (BP), 心拍数 (HR), 腎交感神経活動 (RSNA) の積分値, 腎血流量 (RBF) のパワースペクトル. a は 0~10 Hz の周波数帯域の情報. 6~8 Hz の成分は心拍数に一致したピーク, 1~2 Hz は呼吸成分に一致したピークである. b は 0~1.00 Hz の情報. いずれのパラメータにおいても 0.05 Hz と 0.80~0.90 Hz 付近に WKY, SHR ともに高いピークが認められる. (佐方克史, 他: 血圧, 7: 663-669, 2000 の第3図を許可を得て転載)

著明に高くなっていた. 血圧や心拍数においても 0.05 と 0.80 Hz 付近に高いパワー値を認めたので, 0~1.00 Hz の範囲で RSNA と血圧, 腎血流量との相互関係を伝達関数を用いて検討した.

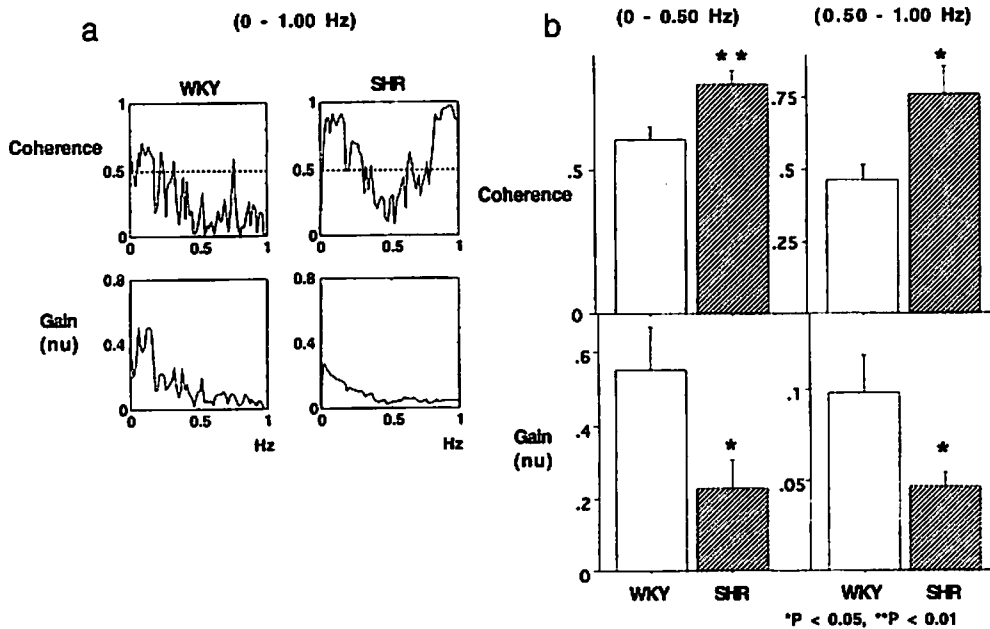
まず RSNA と血圧との関係を示す. 第6図 a は RSNA と血圧の伝達関数の一例である. RSNA から血圧への伝達関数のコヒーレンスは, WKY, SHR とも 0.05 と 0.80 Hz において 0.5 以上の有意なピークが認められたが, SHR の方がより広い周波数帯域でコヒーレンスが高かった. 一方, ゲインは両群 0.05 Hz 付近で大きい値を示したが, WKY の方が大きかった. 第6図 b に 7 例ずつの結果をまとめたグラフを示す. 0~1.00 Hz を 0.05 Hz と 0.80 Hz のピークをふくむ 0~0.50, 0.50~1.00 Hz に分けると, RSNA と血圧とのコヒーレンスは 0~0.50, 0.50~1.00 Hz いずれの帯域でも SHR の方が有意に高く, ゲインは WKY で有意に大きかった.

次に RSNA から腎血流量への伝達関数の一例を示す (第7図 a). こちらもコヒーレンスは 0.05 と 0.80 Hz において両群とも 0.5 以上の有意な相関が認められたが, SHR の方がより広い周波数帯域で高かった. ゲインも両群とも 0.05 Hz 付近で大きい値を示したが, WKY の方がより大きかった. 第7図 b に 7 例ずつの結果をまとめたグラフを示す. RSNA と腎血流量の伝達関数でも, コヒーレンスは 0~0.50, 0.50~1.00 Hz において SHR の方が有意に高く, ゲインは WKY で有意に大きかった.

図には示さないが, SHR において血圧から腎血流量への伝達関数のコヒーレンスは高く (0.92 ± 0.06), WKY と差はなかった. RSNA と血圧, RSNA と腎血流量との関係は low-pass filter となっていたが, 血圧と腎血流量との関係は high-pass filter となっており, Wittmann らの報告と一致した<sup>24)</sup>. また血圧と腎血流量との比から計算した腎血管インピーダンス (周波数を考

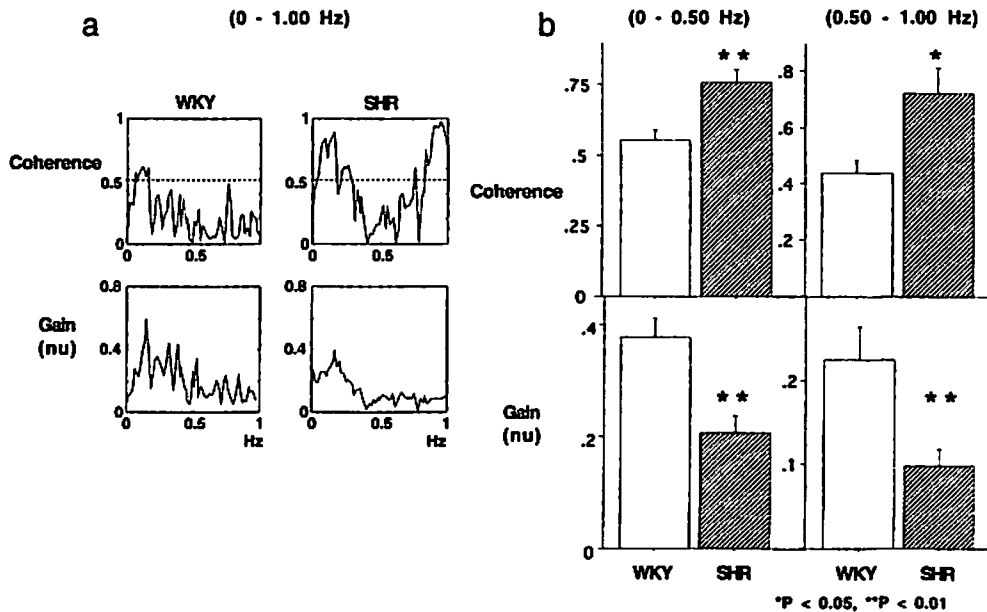


### RSNA vs BP

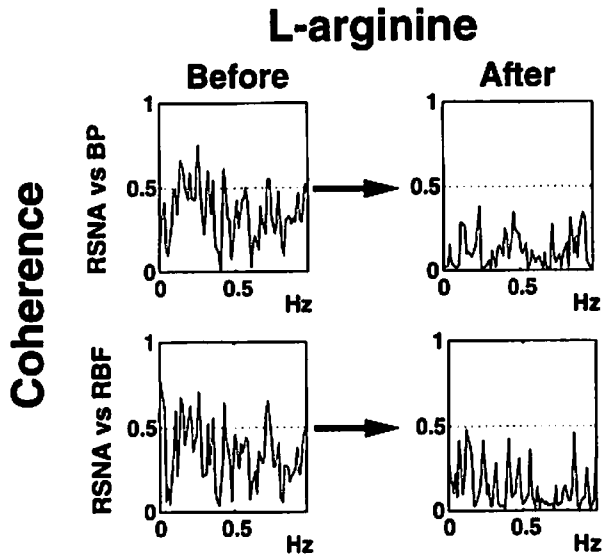


第6図 腎交感神経活動 (RSNA, 入力) から血圧 (BP, 出力) への伝達関数 (a は1例ずつの代表例, b は7例ずつのまとめ)。コヒーレンスはWKY, SHRとも0.05と0.80 Hzでピークがみられ、コヒーレンス値0.5以上の有意な相関が認められたが、SHRの方が有意にコヒーレンスが高く、RSNAと血圧の相関の線形性がより高いことを意味する。ゲインは0.05 Hz付近で大きい値を示し、WKYの方が有意に大きかった。(Sakata K et al : Circulation 106 : 620-625, 2002の第2図を許可を得て転載)

### RSNA vs RBF



第7図 RSNA (入力) から腎血流量 (RBF, 出力) への伝達関数 (a は1例ずつの代表例, b は7例ずつのまとめ)。コヒーレンスはWKY, SHRとも0.05と0.80 Hzでピークがみられたが、SHRの方が有意に高かった。ゲインは0.05 Hz付近で大きい値を示し、有意にWKYの方が大きかった。(佐方克史, 他: 血圧, 7 : 663-669, 2000の第5図を許可を得て改変, 転載)



第8図 SHRにL-アルギニン (nitric oxideの基質)を60分間持続静注した前後での、伝達関数のコヒーレンスの変化。RSNAと血圧 (BP)、RSNAと腎血流量 (RBF)との相関のコヒーレンスはL-アルギニン静注により有意に低下した。(Sakata K et al : Circulation 106 : 620-625, 2002の第3図を許可を得て改変、転載)

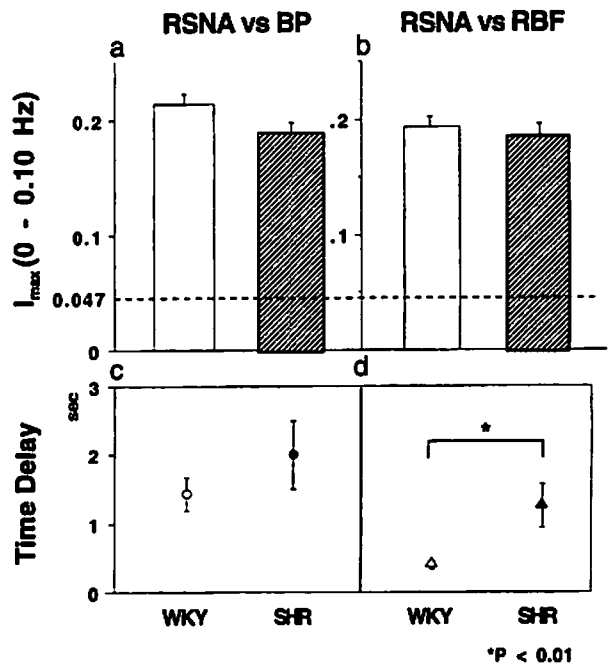
慮に入れた血管抵抗)は、0.50~1.00 HzにおいてSHRでWKYより有意に高かった ( $14.49 \pm 1.60$  vs  $8.76 \pm 1.11$ ;  $P < 0.05$ )。

### 2. SHRに対するL-アルギニン注入

SHRにL-arginineを60分持続静注すると、RSNAは有意に減少し ( $13.6 \pm 2.3$  vs  $11.9 \pm 1.8$  AU;  $P < 0.05$ )、腎血流量は有意に増加した ( $6.2 \pm 0.9$  vs  $6.6 \pm 0.9$  ml/min;  $P < 0.05$ )。血圧と心拍数は変化しなかった。L-arginine投与によりRSNAと血圧および腎血流量との相関のコヒーレンスは有意に低下したが(第8図)、ゲインは変化しなかった。血圧と腎血流量との高いコヒーレンスは、L-arginine投与によっても変化しなかった ( $0.94 \pm 0.04$  vs  $0.88 \pm 0.05$ ;  $P = 0.20$ )。後者の結果は正常血圧の犬における報告と一致した<sup>25)</sup>。これは血圧を変化させないL-arginine量を投与したことで、血圧と腎血流量の波形が基本的に同一であり、コヒーレンスは変化しにくいことによるためと思われる。

### 3. 相互情報量による解析

相互情報量を用いた結果を第9図に示す。0~0.10 HzにおけるRSNAと血圧との間の相互情報量 (a)は、

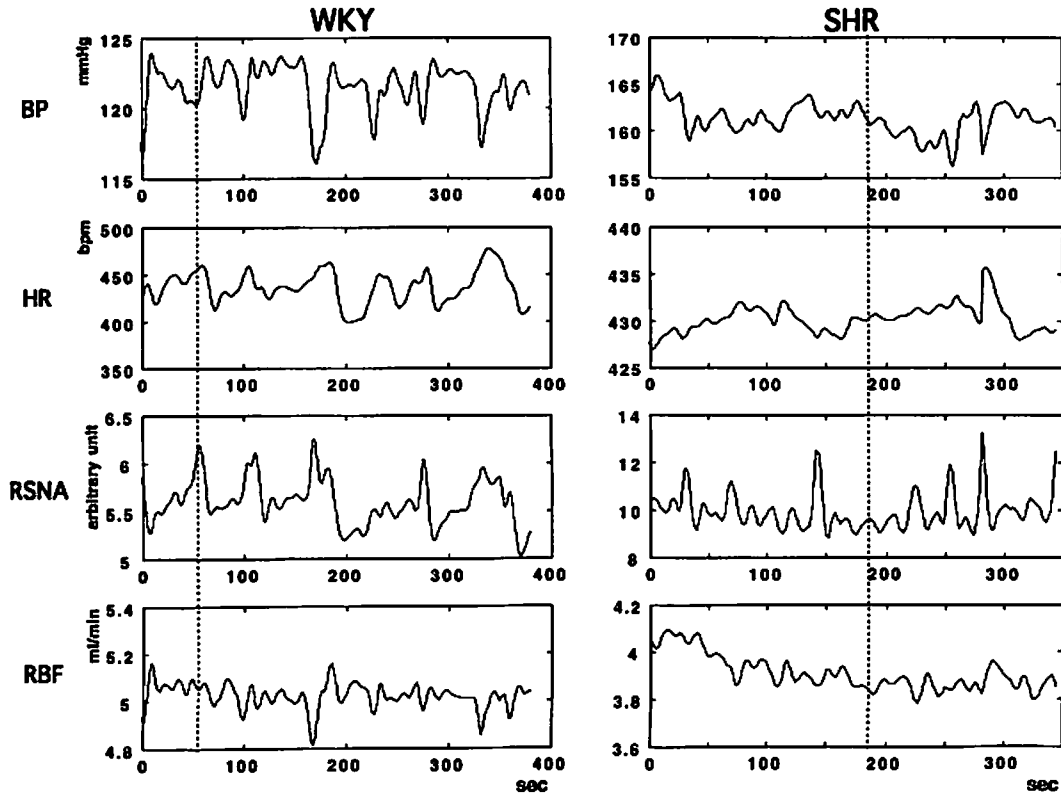


第9図 相互情報量により算出した、0~0.10 HzにおけるRSNAと血圧 (BP)の相関 (a)およびRSNAと腎血流量 (RBF)の相関 (b)。WKYもSHRも最大相互情報量 ( $I_{max}$ )は0.047より大であり、有意な線形および非線形相関が認められた。WKYとSHRでは差がなかった。cとdは、0~0.10 HzにおけるRSNAと血圧との間、腎血流量との間の遅延時間 (Time Delay)。遅延時間の定義からこれらの値が正なので、RSNAは血圧に先行していることがわかり、遅延時間はWKYとSHRでは差がなかった (c)。またRSNAは腎血流量に先行しており、遅延時間はSHRの方がWKYより長かった (d)。(Sakata K et al : Circulation 106 : 620-625, 2002の第4図を許可を得て転載)

WKYでもSHRでも0.047より大であり、有意な線形および非線形相関があることが認められた。WKYとSHRで差がなかった。SHRにおいてRSNAと血圧の間の線形性がWKYより高いことから(第6図)、非線形性は低下していることが推察された。同様に、RSNAと腎血流量の相互情報量(第9図b)も0.047より大で有意な相関性が認められ、こちらもWKYとSHRでは差がなかった。

遅延時間 (time delay) のデータから、0~0.10 Hzにおいては、RSNAが血圧よりも2秒ほど先行していた(第9図c)。遅延時間はWKYとSHRで差がなかった。RSNAは腎血流量にも先行しており(第9図d)、その遅延時間はSHRの方が長かった。

第10図のように、同時記録した実波形をhigh cutして0~0.10 Hzでの波形を描くと、RSNAが血圧や腎



第10図 無麻酔で記録した実波形を high cut して 0~0.10 Hz の情報を取り出した波形。腎交感神経活動 (RSNA) が血圧 (BP) や腎血流量 (RBF) より先行していることが示され、相互情報量から得られた遅延時間の結果を支持する。(Sakata K et al : Circulation 106 : 620-625, 2002 の第5図を許可を得て改変, 転載)

血流量より先行していることがわかり、相互情報量から得られた遅延時間の結果を支持した。

### 考 察

これまでラットの RSNA をスペクトル解析した研究はいくつかみられるが<sup>(8,26,27)</sup>、その成分が何を意味しているかについてまだ統一した見解はない。本研究で筆者は、スペクトル解析によりラットの RSNA に4つのピークを検出した。末梢交感神経活動には心拍に同期した活動（無麻酔ラットでは6~8 Hzに相当）と、呼吸運動に同期した活動（無麻酔ラットでは1~2 Hzに相当）の2つの周期的活動が存在することが知られている。これまで DiBona ら<sup>1)</sup>が腎神経への直接電気刺激によるレニン分泌、尿細管 Na 再吸収、腎血流量低下の周波数ごとの感受性の違いを報告しているが、これらの実験は麻酔下で行われいずれも 0.50~1.00 Hz 以上の高い周波数を外から与えた結果であった。本研究ではそれよりも

遅い周波数の RSNA の機能についての検討をするために、無麻酔でしかも神経に何も刺激を与えない状態で、6分30秒以上記録し解析をおこなった。その結果、1.00 Hz 以下の周波数帯域において2つのピークが認められ (0.05 Hz, 0.80 Hz)、かつそれが血圧、腎血流量と強い相関性を有することを伝達関数から示すことができた。それぞれの成分の起源と役割については現在まだ不明であるが、0.05 Hz 成分は尿細管-糸球体フィードバックに関わっているという報告があり<sup>20)</sup>、またそのゆっくりとした周波数からレニン分泌に関わっていることも推測される<sup>1)</sup>。0.80 Hz 成分は本研究で腎血流量との相関性が高く、かつ腎血管インピーダンスも上昇していることから、心拍変動とは異なるゆっくりとした血管のオシレーションをあらわしているのではないかと推測している。いずれにしてもそれぞれの周波数成分でのゲインも異なることから、別々の機能を司っている可能性があり、それぞれの周波数における機能を明らかにするために、今後さらなる検討を要する。

次に、伝達関数のコヒーレンスから、SHR ではWKY と比べ、RSNA と血圧、RSNA と腎血流量との線形性が有意に高いことが示された。この結果から、SHR では血圧および腎血流量の調節が交感神経系により大きく、線形に依存していることが示唆された。さらに0~0.10 HzにおけるRSNA と血圧および腎血流量との相互情報量は、WKY、SHR とともに0.047より大であり、有意な相関関係が認められた。WKY とSHR の相互情報量は差がなく、SHR では線形性が高いことから、SHR はWKY と比べ非線形性が低下していることが示唆された。一方、WKY では線形性が低く非線形性が高い、すなわちさまざまなシステムを用いて循環調節がより柔軟に行われていると考えられた。非線形性が高い方が不整脈や心血管事故が少ないことが臨床データから示されており<sup>13-15,29)</sup>、本研究の結果を支持する。本研究では交感神経系やレニン-アンジオテンシン系の亢進したSHR をモデルとし、RSNA を直接、記録・定量しえたことから、高い線形性、低い非線形性と不良な予後を結びつけている要因のひとつとして交感神経系の亢進が考えられた。

またL-アルギニン投与により、RSNA と血圧および腎血流量のコヒーレンスが低下した結果から、NO系の異常もSHRの循環調節の線形性を高めている一因であると推測された。すなわち、NOは内皮依存性血管拡張作用の他にRSNAを中枢性あるいは末梢性に低下させる作用もあると報告され<sup>29)</sup>、線形性を低下させていると推測される。さらに圧受容器からの求心性迷走神経を除神経した正常血圧のイヌでは非線形性が低下し、交感神経活動が亢進していることから<sup>12)</sup>、圧受容器反射が正常の非線形性、「複雑さ」を構成している一要素であると考えられる。事実SHRでは圧受容器反射は障害されている<sup>3)</sup>。

以上のことより、SHRにおける高い線形性および低い非線形性は、制御システムが一つまたは二つの調節系(交感神経系やレニン-アンジオテンシン系)のみに強く依存している、または正常な調節系(NOや圧受容器反射)が障害されていることによると推察された。

伝達関数のゲインに関しては、SHRではWKYに比べ有意に小さかった。この機序としては、SHRでは高血圧にもかかわらずRSNAが亢進しているが、それによる腎血管の過剰収縮が起らないよう、腎交感神経から腎血管への伝達が鈍くなっているためであると推測される<sup>30)</sup>。SHRの腎血流量がWKYと同等という結果は、この推測を支持する。ゲインがSHRで小さくなっているその他の理由としては、SHRでの①血管内皮の障害

(NO系の低下)、②血管平滑筋細胞のカルシウム・チャンネルの開口確率の低下、③受容体の異常や脱感作、細胞内情報伝達機構の障害などが挙げられる。

相互情報量を用いるもう一つの利点として、これまで閉ループでは解決できなかった2変量間の相関の方向性を決定できることが挙げられる。心血管系のコントロールは血圧、心拍数、交感神経活動などのパラメータからなる閉ループを形成しており、かつ各パラメータが他に与える影響が複雑なため、これまで各パラメータ間の相互関係・方向性を正確に評価することはきわめて困難であった。本研究では相互情報量の遅延時間のデータから、0~0.10 Hzにおいては、RSNAは腎血流量に先行しており、その遅延時間はSHRの方が長かった。RSNAから腎血流量までの遅延時間が長いという結果と、SHRのRSNAと腎血流量の伝達関数のゲインが小さいという結果は、RSNAから腎血流量への情報伝達に障害がみられる現象として一致した結果であると考えている。WKYにおいてRSNAは腎血流量に480 ms先行していたという結果は、腎交感神経を外因性に刺激してから670 ms後に腎血流量が低下したというGuildらの報告ともほぼ一致する<sup>31)</sup>。Somlyoらの神経伝達物質の伝達時間の成績とも矛盾しない<sup>32)</sup>。

また0~0.10 Hzにおいては、RSNAが血圧よりも先行していることが示された。遅延時間はWKYとSHRで差がなかった。もし血圧が先行しているならば圧受容器反射を介してRSNAが減少するはずなので、今回の結果のようにRSNA上昇が血圧上昇より先行しているという結果は、0~0.10 Hzの周波数帯域に圧受容器反射に従わないシステムが存在していることを示唆する。これまで交感神経活動は、圧受容器反射を介して血圧の変動に瞬時に対応していると考えられてきた。しかし遅延時間の結果から、圧受容器反射には支配されない0.10 Hz未満のゆっくりしたRSNAのオシレーションがあり、血圧、腎血流量の変動との相関性も高く、しかもそれらに先行していることがわかった。第10図の0.10 Hz未満の原波形も、RSNAが血圧、腎血流量より先行していることを示しており、遅延時間のデータと一致する。Taylorら<sup>33)</sup>も正常血圧のヒトにおいて、血圧と心拍数の低周波帯域には、圧受容器反射とは独立した系があることを最近報告した。以上のことより、0.10 Hz未満の血圧、腎血流量の変動は交感神経由来で、しかもその交感神経活動は末梢で発生するのではなく<sup>34)</sup>、中枢神経系(例えばRVLM)で発生している可能性が考えられた。

本研究のこれまでの報告と異なる点は、(1)技術的

に困難であるため行われたことがなかった、ラットでの同側の RSNA と腎血流量を血圧、心拍数とともに無麻酔・安静状態で同時記録した点。(2) 循環調節の解明においてシステムを開ループにする必要がなく、閉ループのまま解析できた点。(3) RSNA の広範囲の周波数帯域を観察するために 2000 Hz でサンプリングし、かつ 6 分 30 秒以上安定した記録をおこなうことで 64 秒毎のフーリエ変換を 11 回行うことが可能となり (Welch's 法)、信頼性の高い周波数解析ができた点。(4) 相互情報量により非線形系を含めた解析が可能となり、閉ループのままでもパラメータ間の方向性を明らかにできた点などがあげられる。

臨床的に交感神経活動が亢進するとレニン-アンジオテンシン系の亢進、動脈硬化の進展、血管肥厚、冠血管のスパズムなどを介して心血管系イベントのリスクをふやすことがよく知られている<sup>35)</sup>。本研究においても交感神経活動の亢進が、高い線形性/低い非線形性と不良な予後を結びつける因子であることが示唆された。それゆえ交感神経活動を亢進させず、かつ神経性循環調節の線形性を低下させ非線形性を亢進させる降圧薬は、今後高血圧患者の予後を改善できる可能性があることを示唆する。さらに心不全モデルや糖尿病性腎症モデルなどにおける循環調節の異常、またそれらに対する薬剤の効果を検討することで、各病態の患者の予後をより改善する薬剤を探索することにつながると期待される。

## 総括

正常血圧ラット (WKY) および高血圧自然発症ラット (SHR) において、無麻酔状態で記録した腎交感神経活動 (RSNA) と血圧、および RSNA と腎血流量の相関関係を伝達関数、および相互情報量を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. SHR では高い血圧にもかかわらず、RSNA は WKY より有意に大きく、腎血流量は差がなかった。
2. スペクトル解析により RSNA のピークは、WKY、SHR とともに 0.05、0.80、1~2、6~8 Hz でみられ、パワー値は、0.80 Hz において WKY に比べ SHR で著明に大きかった。
3. RSNA の 1.00 Hz 以下の低周波成分 (特に 0.05 Hz と 0.80 Hz) が血圧および腎血流量の変動と高い相関性 (コヒーレンス、線形性) を示した。
4. SHR では WKY と比べ、RSNA と血圧および腎血流量との相関のコヒーレンス (線形性) が高く、逆にゲインは小さかった。

5. SHR では、L-arginine 投与により RSNA は有意に抑制され、RSNA と血圧および腎血流量とのコヒーレンスも有意に低くなった。

6. 線形解析の伝達関数と非線形解析の相互情報量を組み合わせることにより、SHR の RSNA と血圧および腎血流量の相関の線形性は WKY と比較して亢進し、非線形性は低下していることを示した。

7. 0.10 Hz 未満においては、RSNA が血圧および腎血流量に先行するという圧受容器反射にとらわれない制御系を見出した。

以上の結果から、RSNA の低周波成分 (特に 0.05 Hz と 0.80 Hz) が血圧および腎血流量の変動の調節に重要で、SHR では血圧および腎血流量が交感神経系により大きく線形に依存しており、一方 WKY は非線形性が高い、つまりより多くのシステムが作動して柔軟な調節を行っていることが示唆された。また 0.10 Hz 未満においては、RSNA が血圧および腎血流量に先行しており、低周波領域における循環制御のリズムには中枢神経系由来の交感神経活動が関与していることが推測された。

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猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導、御校閲いただきました慶應義塾大学医学部内科学教室熊谷裕生講師ならびに日本医科大学老人病研究所生命情報解析科大坂元久講師に深謝いたします。さらに、本研究に御協力いただきました内科学教室腎臓研究室の諸先生方に感謝いたします。

本研究の要旨の一部は、第 22 回日本高血圧学会総会 (高松、1999 年)、第 43 回日本腎臓学会総会 (名古屋、2000 年)、18th Annual Meeting of International Society of Hypertension (Chicago, 2000)、54th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of Council for High Blood Pressure Research of American Heart Association (Washington D.C., 2000) において発表した。

## 文 献

- 1) DiBona GF, Kopp UC : Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77 : 75-197, 1997
- 2) Esler M, Jennings G, Korner P, Willett I, Dudley F, Hasking G, Anderson W, Lambert G : Assessment of human sympathetic nervous system activity from measurements of norepinephrine turnover. *Hypertension* 11 : 3-20, 1988
- 3) Kumagai H, Averill DB, Ferrario CM : Renal nerve activity in rats with spontaneous hypertension : effect of converting enzyme inhibitor. *Am J Physiol*

- 263 : R109-115, 1992
- 4) Chalmers J, Pilowsky P : Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *J Hypertens* 9 : 675-694, 1991
  - 5) Ferrario CM, Averill DB : Do primary dysfunctions in neural control of arterial pressure contribute to hypertension? *Hypertension* 18(Suppl.I) : I-38-I-51, 1991
  - 6) 熊田 衛, 照井直人, 桑木共之, 曹 偉華 : Ventrolateral Medulla と循環系の神経性調節. *Ther Res* 14 : 963-997, 1993
  - 7) Janssen BJA, Malpas SC, Burke SL, Head GA : Frequency-dependent modulation of renal blood flow by renal nerve activity in conscious rabbits. *Am J Physiol* 273 : R597-608, 1997
  - 8) Brown DR, Brown LV, Patwardhan A, Randall DC : Sympathetic activity and blood pressure are tightly coupled with at 0.4 Hz in conscious rats. *Am J Physiol* 267 : R1378-1384, 1994
  - 9) Cooke JP, Dzau VJ : Nitric oxide synthase : Role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 48 : 489-509, 1997
  - 10) Babloyantz A, Destexhe A : Is the normal heart a periodic oscillator? *Biol Cybern* 58 : 203-211, 1988
  - 11) Kobayashi M, Musha T : 1/f Fluctuation of heart-beat period. *IEEE Trans Biomed Eng* 29 : 456-457, 1982
  - 12) Wagner CD, Mrowka R, Nafz B, Persson PB : Complexity and "chaos" in blood pressure after baroreceptor denervation of conscious dogs. *Am J Physiol* 269 : H1760-1766, 1995
  - 13) Goldberger AL : Non-linear dynamics for clinicians : chaos theory, fractals, and complexity at the bedside. *Lancet* 347 : 1312-1314, 1996
  - 14) Huikuri HV, Makikallio TH, Peng CK, Goldberger AL, Hintze U, Moller M : Fractal correlation properties of R-R interval dynamics and mortality in patients with depressed left ventricular function after an acute myocardial infarction. *Circulation* 101 : 47-53, 2000
  - 15) Skinner JE, Pratt CM, Vybiral T : A reduction in the correlation dimension of heartbeat intervals precedes imminent ventricular fibrillation in human subjects. *Am Heart J* 125 : 731-743, 1993
  - 16) Fraser AM, Swinney HL : Independent coordinates for strange attractors from mutual information. *Physiol Rev* A33 : 1134-1140, 1986
  - 17) Osaka M, Yambe T, Saito H, Yoshizawa M, Ito T, Nitta S, Kishida H, Hayakawa H : Mutual information discloses relationship between hemodynamic variables in artificial heart-implanted dogs. *Am J Physiol* 275 : H1419-1433, 1999
  - 18) Sakata K, Kumagai H, Osaka M, Onami T, Matsuura T, Imai M, Saruta T : Potentiated sympathetic nervous and renin-angiotensin systems reduce nonlinear correlation between sympathetic activity and blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 106 : 620-625, 2002
  - 19) Haywood JR, Shaffer RA, Fastenow C, Fink GD, Brody MJ : Regional blood flow measurement with pulsed Doppler flowmeter in conscious rat. *Am J Physiol* 241 : H273-278, 1981
  - 20) Berger RD, Akselrod S, Gordon D, Cohen RJ : An efficient algorithm for spectral analysis of heart rate variability. *IEEE Trans Biomed Eng* 33 : 900-904, 1986
  - 21) Bendat JS, Piersol AG : *Random Data : Analysis and Measurement Procedures*, 2nd ED, Wiley, New York, 1986
  - 22) 砂川賢二, 杉町 勝 : 制御理論に基づく血圧制御系の解析. *循環制御*, 15 : 75-82, 1994
  - 23) Jimbo M, Suzuki H, Ichikawa M, Kumagai K, Nishizawa M, Saruta T : Role of nitric oxide in regulation of baroreceptor reflex. *J Auton Nerv Syst* 50, 209-219, 1994
  - 24) Wittmann U, Nafz B, Ehmke H, Kirchheim HR, Persson PB : Frequency domain of renal autoregulation in the conscious dog. *Am J Physiol* 269 : F317-322, 1995
  - 25) Just A, Ehmke H, Wittmann U, Kirchheim HR : Tonic and phasic influences of nitric oxide on renal blood flow autoregulation in conscious dogs. *Am J Physiol* 276 : F442-449, 1999
  - 26) Persson PB, Stauss H, Chung O, Wittmann U, Unger T : Spectrum analysis of sympathetic nerve activity and blood pressure in conscious rats. *Am J Physiol* 263 : R1348-1355, 1992
  - 27) Kenney MJ : Frequency characteristics of sympathetic nerve discharge in anesthetized rats. *Am J Physiol* 267 : R830-840, 1994
  - 28) Holstein-Rathlou NH, Wagner AJ, Marsh DJ : Tubuloglomerular feedback dynamics and renal blood flow autoregulation in rats. *Am J Physiol* 260 : F53-68, 1991
  - 29) 大坂元久 : 循環器系のゆらぎ解析の意義. *Ther Res* 21 : 1736-1738, 2000
  - 30) 佐方克史, 熊谷裕生, 大坂元久, 松浦友一, 大島直紀, 早川弘一, 猿田享男 : スペクトル解析により分析した腎交感神経活動と血圧および腎血流量との相関は, 正常血圧と高血圧ラットとで異なる. *血圧*, 7 : 663-669, 2000
  - 31) Guild SJ, Austin PC, Navakatikyan M, Ringwood JV, Malpas SC : Dynamic relationship between sympathetic nerve activity and renal blood flow : a frequency domain approach. *Am J Physiol* 281 : R206-212, 2001
  - 32) Somlyo AP, Somlyo AV : Flash photolysis studies of excitation contraction coupling, regulation, and contraction in smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 52 : 857-874, 1990
  - 33) Taylor JA, Eckberg DL : Fundamental relations between short-term RR interval and arterial pressure oscillations in humans. *Circulation* 93 : 1527-1532,

1996

- 34) Koh J, Brown TE, Beightol LA, Ha CY, Eckberg DL :  
Human autonomic rhythm : vagal cardiac mechanism in tetraplegic subjects. *J Physiol* 474 : 483-495,

1994

- 35) Julius S : Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension* 21 : 886-893, 1993
-

学位論文

アデノウイルスベクターを用いた疑核への GDNF 遺伝子導入による  
運動ニューロン脱落防止効果の検討

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室

(指導：小川 郁教授)

さいとう こういちろう  
齋 藤 康一郎

(平成 15 年 6 月 23 日受付)

Key Word : adenovirus, GDNF, nucleus ambiguus, laryngeal paralysis, motoneuron

悪性腫瘍に対する頭頸部手術の際など、症例によっては迷走神経あるいは反回神経の損傷が避けられない。また、食道癌、肺癌、甲状腺癌の手術中の損傷や腫瘍の直接の浸潤、大動脈瘤の手術中の損傷、あるいは気管内挿管など様々な原因で迷走神経あるいは反回神経の損傷・麻痺が生じる<sup>1,2)</sup>。麻痺が片側の場合、患者は声門閉鎖不全に起因する嘔声や嚥下障害といった症状に悩まされ、QOLの低下した生活を強いられることになる。しかしながら現在、片側反回神経麻痺に対する外科的治療は、神経吻合術や神経筋弁の甲状披裂筋への移植術を除き、声帯注入術、甲状軟骨形成術、披裂軟骨内転術など、いずれも声帯を静的に内転させる術式であり、声帯の再運動化を目的とはしていない<sup>3)</sup>。さらに注入術に関しては、容易かつ安全に注入でき、声帯内に長期間留置可能という理想的な注入物質はいまだなく、甲状軟骨形成術に関しては声門後方の間隙に対しては効果が薄いとされている<sup>4)</sup>。披裂軟骨内転術に関しても、声帯萎縮のある症例には適さず<sup>5)</sup>、術後に声門浮腫を生じるリスクも高い<sup>6)</sup>など、どれも決定的な術式とはいえない状況にある。また、これらの声帯を静的に内転させる術式では、術後も声の高さのコントロールは不良である<sup>6)</sup>。一方、両側反回神経麻痺の症例も、反回神経麻痺症例の1割程度存在するが、両側反回神経麻痺の7~8割の患者は声門狭窄による呼吸困難を訴え、緊急気管切開などを要する症例もあり、慎重な対応が必要となる。呼吸の問題だけでなく、患者の多くがさらに嘔声も伴う<sup>2)</sup>。呼吸困難が

主症状の場合、必要とあれば気管切開施行の後、Woodman手術<sup>7)</sup>やCO<sub>2</sub>レーザーによる声帯切除術<sup>8)</sup>などの声門開大術が行われているが、どの術式も気道を広げる代償として、音声は氣息性が強くなることは避けられない。嘔声が主症状の場合、前述のような片側反回神経麻痺に準じた治療が選択されるが、この場合、気道がさらに狭くなるという危険を伴う。つまり、患者は良好な音声を犠牲にして気道を確保し、気管切開孔を閉鎖するか、あるいは良好な音声を獲得する代わりに気道の狭窄という危険にさらされ、時に気管切開孔を閉鎖できない状況を受け入れるか、いずれかの選択をしなければならず、そのどちらをも両立する治療法は存在しない状況にある。現状ではこのような患者の症状や要求にあわせて慎重に治療が選択されているが<sup>2)</sup>、いずれにしても呼吸・発声機能を両立させるためには、静的に声帯位や声帯の形態を変えるだけでは不十分であり、患者のQOLの改善のためには、声帯の再運動化が最も理想的と考えられる。また正常音声を得るには、声帯のボリューム、弾性、声門抵抗が必要であり、さらに純音を得るためには対称性も必要といわれており<sup>9)</sup>、このためにも、声帯の再運動化が目標となることは明らかである。声帯運動の回復を目的とした術式として、切断した反回神経の端々吻合<sup>10,11)</sup>、頸神経ワナと反回神経の端々吻合<sup>12~15)</sup>や、横隔神経と反回神経の後筋枝との選択的な吻合術<sup>16)</sup>、頸神経ワナと反回神経の内転筋枝との選択的な吻合術<sup>9)</sup>、前頸筋を用いた神経筋弁の甲状披裂筋への移植術<sup>17~19)</sup>も検

本論文は、Saito K, Shiotani A, Watabe K, Moro K, Fukuda H, Ogawa K : Adenoviral GDNF gene transfer prevents motoneuron loss in the nucleus ambiguus. Brain Res 962 : 61-67, 2003 の一部を含む。



討されているが、神経損傷後の筋萎縮や疑核の運動ニューロンの脱落、神経吻合後の声門閉鎖筋と開大筋の過誤支配<sup>20,21)</sup>あるいは吻合後のモーターユニットの減少<sup>10,11)</sup>といったさまざまな問題があるため、思わしい結果には至っておらず、現状では喉頭の動きを回復させる安定した術式とはまだ認められていない。

一方これまでに、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin (NT)-3、ciliary neurotrophic factor (CNTF)、そして glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) といった神経栄養因子あるいはこれらを組み込んだアデノウイルスベクターが、新生仔齧歯類の神経切断による顔面神経核、脊髄前角の運動ニューロンの変性脱落防止に有効と報告されている<sup>22-28)</sup>。成体齧歯類においては、BDNF や GDNF 蛋白の投与が脊髄神経引き抜き損傷後の運動ニューロン脱落防止に有効であり<sup>29-31)</sup>、さらに GDNF を組み込んだアデノウイルスベクターの投与が顔面神経の引き抜き損傷後の運動ニューロン脱落防止に有効であることが示されている<sup>32)</sup>。これまで神経内科領域において、これら神経栄養因子の投与は、アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、といった神経変性疾患の治療に有効性が期待されてきた。しかしながら、神経栄養因子蛋白では、生体内では代謝されやすく半減期が短い、血液脳関門を効率よく通過しない、その全身投与では副作用を生じやすく、脳室内への直接投与では十分量を神経細胞へ供給できないといった問題点があった<sup>33)</sup>。近年、これらを解決する治療法として、脳内で神経栄養因子を合成させる遺伝子治療が注目され、AD に対する nerve growth factor (NGF) 遺伝子を用いた治療<sup>34)</sup>、PD モデル動物に対する GDNF 遺伝子を用いた治療<sup>35)</sup>、運動ニューロン脱落モデル動物に対する NT-3、CNTF、BDNF あるいは GDNF 遺伝子を用いた治療<sup>25,27,28,36)</sup>など急速に研究が進んでいる<sup>37)</sup>。

反回神経麻痺に対する遺伝子治療の可能性に関しては、ラット反回神経麻痺モデルに対する、Insulin-like growth factor I (IGF-I) 遺伝子の甲状披裂筋への投与が、筋の萎縮の防止と運動神経終末の形態維持に有効であることが報告されている<sup>38,39)</sup>。しかし、反回神経麻痺における大きな問題点のひとつである疑核運動ニューロン脱落に対する遺伝子治療に関しては報告がない。本研究では、迷走神経あるいは反回神経損傷後の運動ニューロン脱落に対する遺伝子治療の可能性を検討するため、成体ラット迷走神経除去モデルを用いて、GDNF 遺伝子の導入による疑核運動ニューロン脱落防止効果について検討した。

Choline acetyltransferase (ChAT) は、神経伝達物質に関連した蛋白であり、神経損傷後速やかに免疫反応性が減弱することがわかっている<sup>29)</sup>。また、Nitric oxide synthase (NOS) 活性は傷害された運動ニューロンにおいて誘導され、その脱落開始に重要な役割を果たすと考えられている<sup>40-42)</sup>。さらに、顔面神経引き抜き損傷後の GDNF 遺伝子導入により、顔面神経核の運動ニューロンにおける ChAT の免疫反応性が改善し、NOS 活性が抑制されることが報告されている<sup>32)</sup>。損傷された迷走神経運動ニューロンに対する神経栄養因子の遺伝子導入の効果を検証するため、本研究ではさらに、これら ChAT の免疫反応性および NOS 活性の変化についても検討した。

## 材料と方法

### 1. アデノウイルスベクターの作製

ベクターとしては、神経細胞のような、休止期や分裂増殖の遅い細胞にも高率に遺伝子導入が可能で、導入遺伝子が宿主細胞の染色体外に存在するため安全性が高い<sup>43-45)</sup>という特徴をもち、近年神経系への遺伝子導入に最も有効なベクターのひとつとされている非増殖型アデノウイルスベクター<sup>46)</sup>を使用した。

作製には三宅らの開発した COS-TPC 法を用いた<sup>47-49)</sup>。増殖に必要な初期遺伝子の E1、E3 領域を欠損した 5 型アデノウイルスゲノムを含むコスミドベクター (pAxCawt) に、培養されたヒト胎児星状細胞より得たヒト GDNF cDNA あるいは  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を挿入し、制限酵素消化済みのアデノウイルスゲノム DNA-TPC (terminal protein complex) と共に 293 細胞に導入した。293 細胞内での相同組み替えにより、非増殖型組み換えアデノウイルスベクター (順に AxCAhGDNF, AxCALacZ) を得、さらに CsCl にて濃縮した。なお、pAxCawt は、E1 欠損領域に、Swal cloning site 及び、その 5' 端の CAG (cytomegalovirus-enhancer-chicken $\beta$ -actin hybrid) プロモーター、3' 端の rabbit globulin poly (A) sequence が組み込まれている。

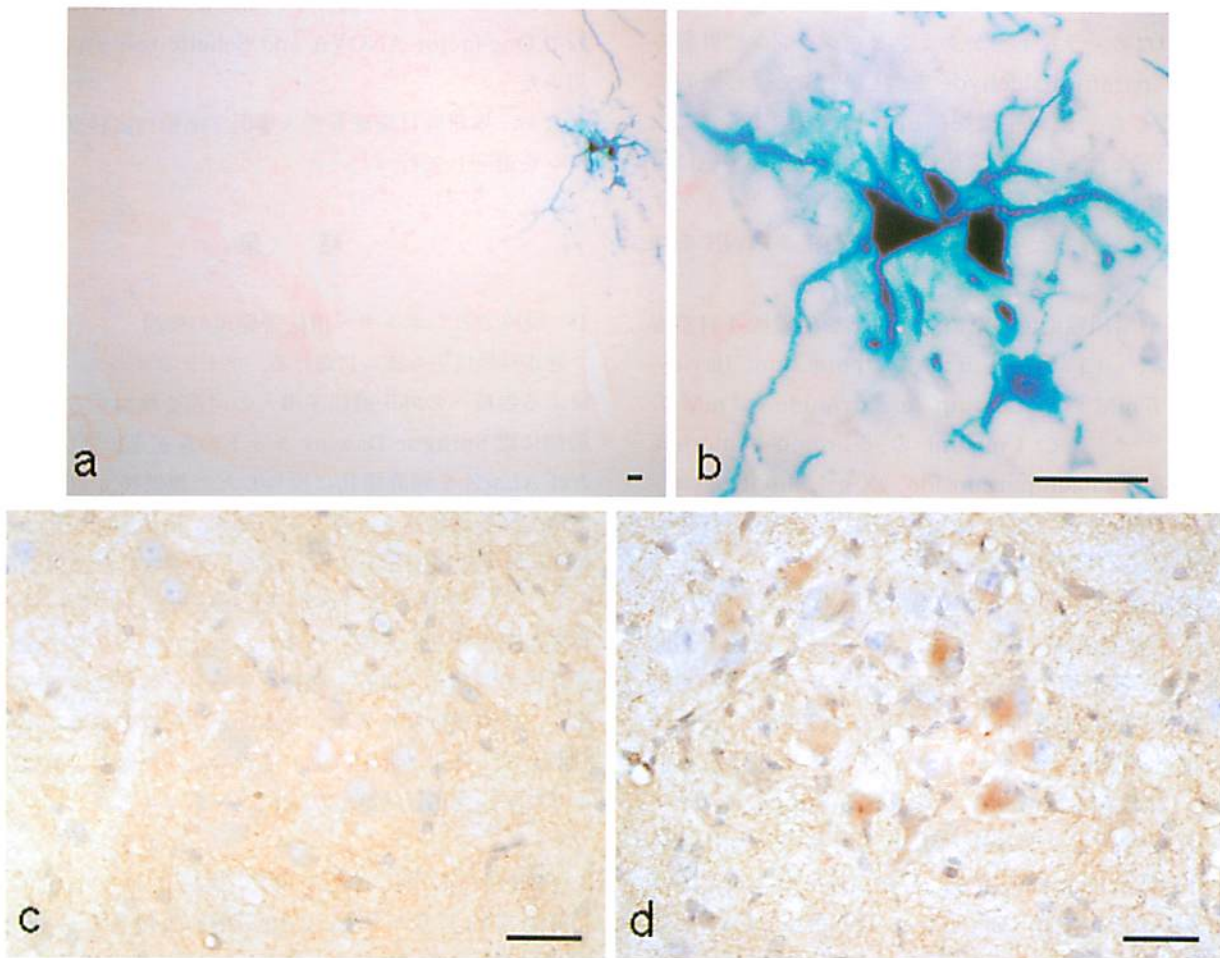
### 2. アデノウイルスベクターの導入

遺伝子の導入は、直接脳幹へ投与するのではなく、耳鼻咽喉科手術時の術野での操作を想定し、また逆行性軸索輸送を利用して<sup>32,50,51)</sup>脳幹でもとくに患側の疑核に特異的に GDNF 遺伝子を発現させることを意図して、神経除去断端より投与を行った。

雄 Sprague Dawley ラット (12 週齢, 340~360 g) を, ケタミン (100 mg/kg, i.p.) とキシラジン (10 mg/kg, i.p.) による麻酔下に手術を行った. 顕微鏡下に左頸静脈孔を露出し, 止血鉗子を用いて迷走神経を抜去した. 抜去後直ちに 10  $\mu$ l の AxCAhGDNF ( $1 \times 10^{10}$  pfu/ml), AxCALacZ ( $1 \times 10^{10}$  pfu/ml) あるいは phosphate buffered saline (PBS) を頸静脈孔に投与し, 処置後の頸静脈孔をゼラチンスポンジ (Spongel, Yamanouchi, Tokyo, Japan) の小片で覆ったうえで閉創した. ラットは, 処置後 4 日, 1 週, 2 週, 4 週の時点で, 下記のように評価した.

### 3. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

AxCAhGDNF 投与後 4 日に, 致死量のケタミンを腹腔内投与後, ラットの疑核を含む脳幹を摘出した. Total RNA を, RNA isolation reagent (TRIZOL, Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて抽出し, DNase (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Invitrogen) にて処理した. 一度の PCR に対し, first strand cDNA を 380 ng の total RNA から random primer および SUPERSCRIPT II reverse transcriptase (Invitrogen) を使用して作製した. PCR 反応は, cDNA template, 200  $\mu$ M の dNTPs, 2 mM の MgCl<sub>2</sub>, 0.2  $\mu$ M の primer と 25  $\mu$ /ml の Taq DNA polymerase



第 1 図 外来遺伝子の疑核での発現. 脳幹組織の X-gal 酵素組織染色 (a, b) を示す. 頸静脈孔にて迷走神経を抜去し, AxCALacZ の投与後 4 日で疑核の運動ニューロンが X-gal で明瞭に染色された. (a) 低倍率 ( $\times 40$ ) の脳幹組織像および (b) 高倍率 ( $\times 300$ ) の処置側疑核組織像である. 処置後 1 週での GDNF の免疫組織染色 (c, d) を示す. それぞれ非処置側 (c) および処置側 (d) の疑核組織像である. 迷走神経の抜去後に AxCAhGDNF を投与すると, 処置側の疑核運動ニューロンが GDNF 免疫組織染色で強陽性となった. (c) と (d) は同一切片である. ( $\times 200$ ) Bars = 50  $\mu$ m. (Saito K et al : Brain Res 962 : 61-67, 2003 の Figure 1 を許可を得て転載)

を含む PCR buffer (TaKaRa, Osaka, Japan) を用いて施行した。PCR には、アデノウイルス由来のヒト GDNF cDNA に特異的な oligonucleotide primer (forward, 5'-ATGAAGTTATGGGATGTCGT-3'; reverse, 5'-TCACCAGCCTTCTATTTCTG-3') を用いた。PCR 反応は、変性反応を 95°C 1 分間、アニーリングを 55°C 1 分 30 秒間、伸長反応を 72°C で 1 分 30 秒間行い、これを 40 サイクル施行した。反応産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、ethidium bromide で染色して 511 bp の産物を検出した<sup>49)</sup>。ネガティブコントロールとして、RT 未施行の RNA サンプルおよび非処置側の脳幹組織に RT を施行したサンプルの PCR を行った。

#### 4. 組織学的検討

酵素組織染色、免疫組織染色および運動ニューロン数の算定のため、ラットをケタミンとキシラジンで麻酔の上、4% paraformaldehyde を含む PBS で経心臓的に灌流固定した。脳幹組織を摘出の上、同固定液にて 2 時間後固定を行った。酵素組織染色と免疫組織染色に用いた検体は、30% sucrose を含む PBS でクライオプロテクションを行った上、16 μm 厚で連続凍結切片を作製した。

X-gal 酵素組織染色のため、ラットを処置後 4 日で灌流固定し、凍結切片を 5 mM の potassium ferricyanide, 5 mM の potassium ferrocyanide, 2 mM の MgCl<sub>2</sub>, そして 1 mg/ml の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, Invitrogen) を含む PBS と 37°C で一晩反応させた。切片を洗浄の後、エオシンで対比染色を行った。

免疫組織染色には、ABC 法を用いた。GDNF と ChAT の免疫組織染色のため、ラットを処置後 1 週間で灌流し、凍結切片を 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む PBS で前処置し、0.1% Triton X-100 を含む PBS (T-PBS) で洗浄した後、3% normal goat serum を含む T-PBS で処置した。ABC blocking kit (Vector, Burlingame, CA) で処置した後、ウサギ抗 GDNF ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotech., CA) あるいはウサギ抗 ChAT ポリクローナル抗体 (Chemicon, Temecula, CA) と希釈率 1:1000 で 4°C で反応させた。続いてビオチン標識抗ウサギ IgG と希釈率 1:100 で反応させ、ABC reagent (Vector) と反応の後、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行った。

NOS 活性を表す NADPH diaphorase 酵素組織染色のため<sup>41,42)</sup>、ラットを処置後 2 週で灌流し、凍結切片を

0.1% Triton X-100 を含む pH 8.0 の 0.1M Tris-HCl buffer で洗浄し、1 mg/ml nitroblue tetrazolium (Sigma) を含む pH 8.0 の 0.1M Tris-HCl buffer と 37°C で 3 時間反応させた。

運動ニューロン数の算定のため、脳幹組織をパラフィン包埋し、7 μm 厚で連続切片を作成した。5 切片ごと (28 μm 間隔) の検体を脱パラフィンの上、トルイジンブルーで染色した。左右両側の疑核を確認できる切片において、明瞭な核、核小体を認める疑核運動ニューロンを 20 切片でカウントした。疑核運動ニューロンは最大径が 21.8 ± 4.96 μm<sup>52)</sup> で、今回の検討では 5 切片毎に 28 μm 間隔で算定したため複数切片での重複算定は無いものとしてデータを解析した。

データは 4 検体の平均値 ± S.D. (それぞれ処置後 2 週と 4 週) で評価し、統計学的有意差の検討には 3 群比較で One-factor ANOVA and Scheffe test (n=4) を用いた。

なお、本研究は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインを遵守して行った。

## 結 果

### 1. 疑核でのレポーター遺伝子発現の検討

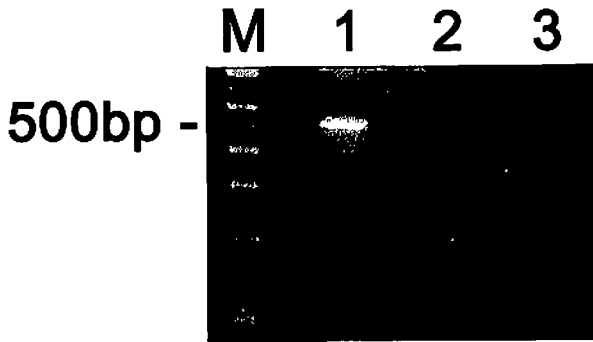
迷走神経抜去モデルにおける、アデノウイルスベクターによる疑核への外来遺伝子導入の可否を検討するため、最初に雄 Sprague Dawley ラットの左迷走神経抜去後、AxCALacZ を頸静脈孔に投与した。処置後 4 日で、処置側の疑核運動ニューロンが、軸索、樹状突起を含め、X-gal 酵素組織染色により、明瞭に染色された (第 1 図 a, b)。この結果から、迷走神経抜去モデルにおいて、神経の損傷断端から取り込まれたウイルスベクターを、逆行性軸索輸送によって運動ニューロンの細胞体まで運搬し、外来遺伝子を発現させることが可能であることが判明した。なお、非処置側の運動ニューロンの染色は認められず、発現は処置側に選択的であった。

### 2. 疑核での GDNF 遺伝子発現の検討

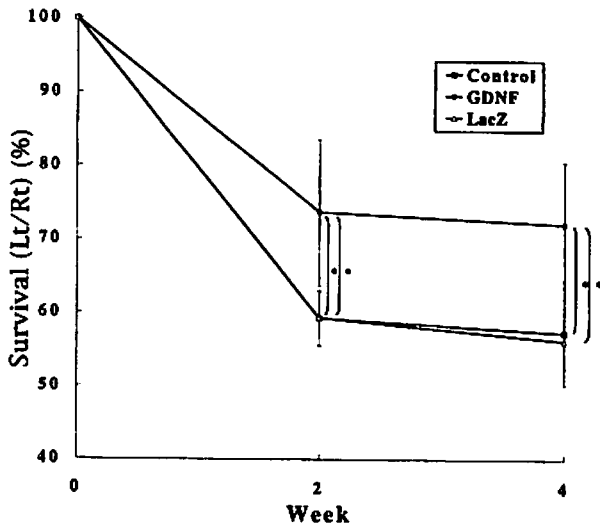
続いて同モデルに AxCAhGDNF を投与し、外来 GDNF 遺伝子の発現を、GDNF に対する RT-PCR および免疫組織染色で検討した。

処置後 4 日で、RT-PCR により処置側の疑核を含む脳幹組織から、ウイルスにより導入されたヒト GDNF mRNA を検出した (第 2 図)。

処置後 1 週間で、処置側の疑核において GDNF に対する明瞭な免疫染色が認められた (第 1 図 c, d)。



第2図 迷走神経抜去と AxCAhGDNF 投与後4日での脳幹組織の RT-PCR 解析。Lane M：サイズマーカー、lane 1：RT (+) の処置側脳幹組織、lane 2：RT (-) の処置側脳幹組織、lane 3：RT (+) の非処置側脳幹組織、の解析結果を示す。(Saito K et al : Brain Res 62 : 61-67, 2003 の Figure 2 を許可を得て転載)



第3図 迷走神経抜去後の疑核運動ニューロン脱落の時間経過。疑核において残存している運動ニューロンの比率をプロットした(処置側/非処置側)(n=4)。■：PBS 投与群、●：AxCAhGDNF 投与群、△：AxCALacZ 投与群である。平均値±S.D. (bars) を示す。統計学的検討には One-factor ANOVA and Scheffe test を用いた (\*p<0.05)。 (Saito K et al : Brain Res 962 : 61-67, 2003 の Figure 4 を許可を得て転載)

RT-PCR および、免疫組織染色において、非処置側へのウイルスベクターの感染は認められなかった。

### 3. GDNF 遺伝子導入による運動ニューロン保護効果の検討

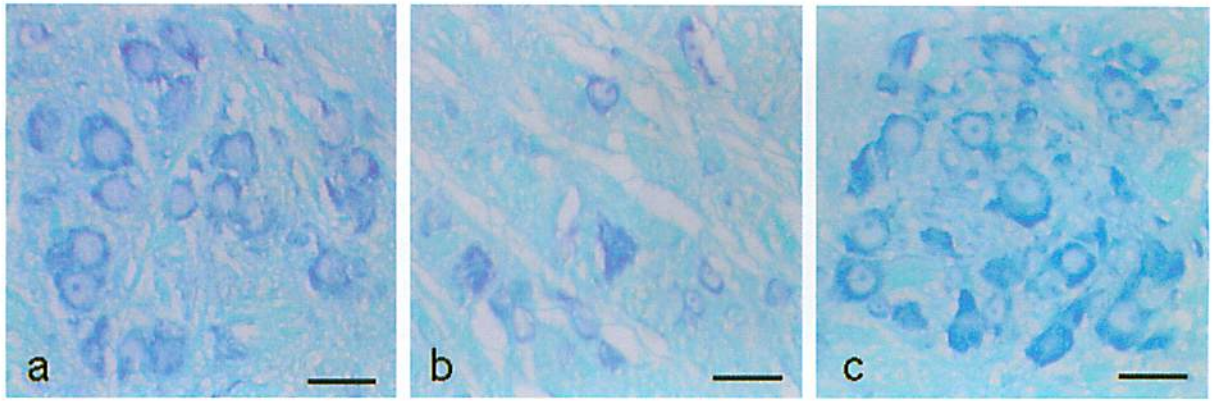
アデノウイルスベクターによる外来遺伝子の疑核への導入・発現が可能であることを確認した後、左迷走神経を抜去したラットに PBS, AxCALacZ, AxCAhGDNF を投与して GDNF 遺伝子導入による運動ニューロン保護効果を検討した。迷走神経抜去後2週あるいは4週で、PBS 投与群と AxCALacZ 投与群では、疑核において運動ニューロンの著明な縮小と脱落が認められた。4週の時点で処置側の疑核運動ニューロンの数を非処置側と比較すると PBS 投与群では  $57.3 \pm 7.1\%$ 、AxCALacZ 投与群では  $56.2 \pm 3.7\%$  と運動ニューロンの脱落を認めていた。これに対し、AxCAhGDNF 投与群では  $72.0\% \pm 8.4\%$  と有意に ( $p < 0.05$ ) 運動ニューロン脱落防止効果が認められた(第3図、第4図)。

ニューロンの NADPH diaphorase 活性は、NOS の活性と相関し<sup>53,54)</sup>、また運動ニューロンの変性とともに誘導される<sup>40-42,55,56)</sup>。AxCAhGDNF の投与により、処置側の疑核での NOS 活性の誘導が抑制されることが NADPH diaphorase 酵素組織染色により示された(第5図 a-c)。運動ニューロンの ChAT 免疫反応性は、神経損傷後に急速に減弱することが知られているが<sup>29,32,49,57,58)</sup>、AxCAhGDNF の投与により迷走神経抜去後の疑核における ChAT 免疫反応性が改善されることが示された(第5図 d-f)。PBS の投与では、神経抜去後の NOS 活性の誘導は抑制されず、ChAT 免疫反応性も改善されなかった。

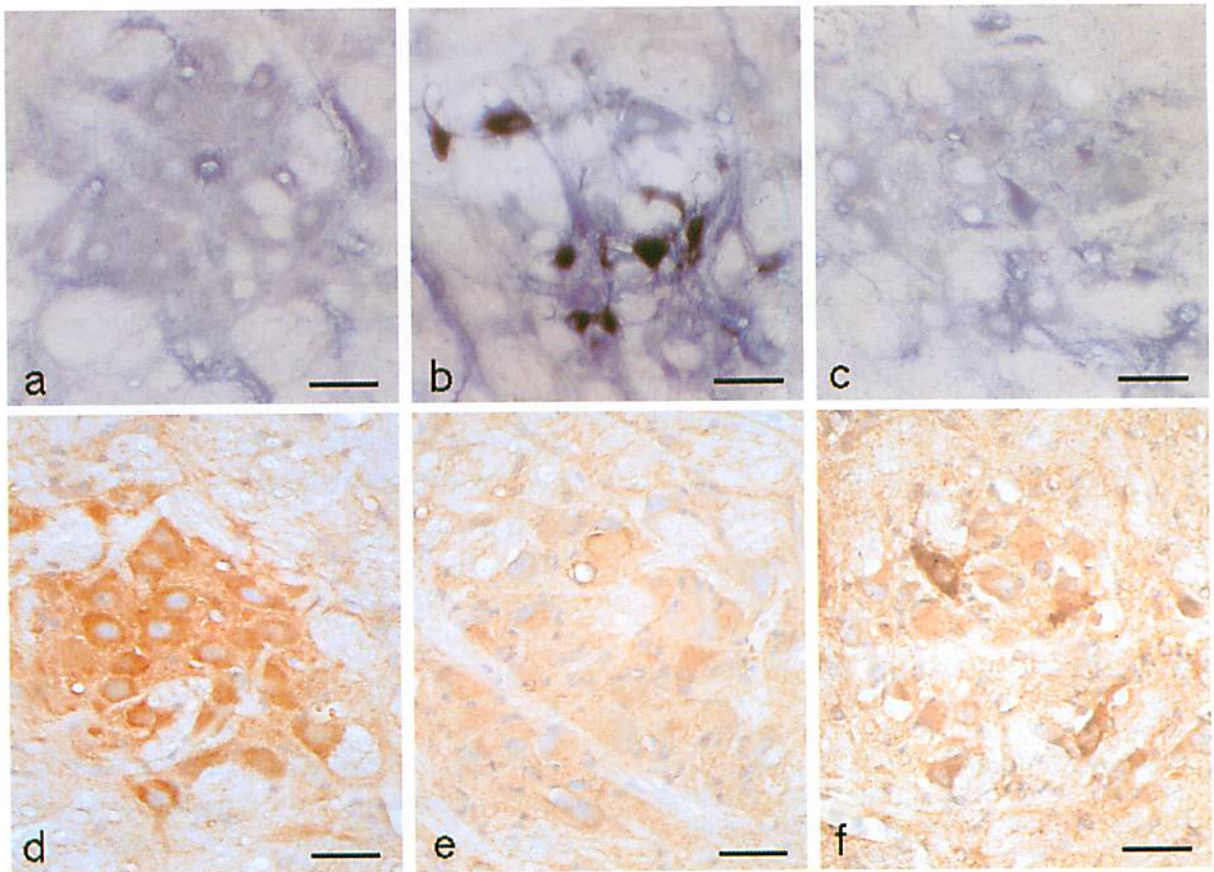
疑核において、アデノウイルスの感染に対する免疫反応を示すような炎症所見や細胞浸潤は認められなかった。

## 考 察

本研究により、AxCALacZ は迷走神経抜去により損傷された疑核運動ニューロンに  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を導入できることが示された。これは頸静脈孔を通じて拡散していったウイルスベクターが傷害された軸索断端に取り込まれ、逆行性軸索輸送に乗せて運動ニューロンの細胞体まで運搬されてウイルスベクターに組み込まれた外来遺伝子が発現するためと思われる。また RT-PCR により、外来ヒト GDNF 遺伝子 mRNA が処置側脳幹組織に存在することが確認され、免疫組織染色により、AxCAhGDNF 投与後に疑核運動ニューロンに、導



第4図 迷走神経抜去後4週の疑核運動ニューロン。PBS (a, b) あるいはAxCAhGDNF (c) を抜去後に投与した非処置側 (a) および処置側 (b, c) の疑核を示す。疑核において、アデノウイルス感染を示すような細胞浸潤や血管造成は認めなかった (c)。 (a) と (b) は同一切片である。トルイジンブルー染色。 (×200) Bars =50 μm。 (Saito K et al : Brain Res 962 : 61-67, 2003 の Figure 3 を許可を得て転載)



第5図 迷走神経抜去後14日のNADPH 酵素組織染色 (a-c) および処置後7日のChATの免疫組織染色 (d-f)。それぞれAxCALacZ (b, e) あるいはAxCAhGDNF (c, f) が投与されている。非処置側 (a, d) に比べ、AxCALacZ投与後では処置側においてNOSの強い発現(b)とChATの免疫反応性の明らかな減弱(e)が観察された。しかし神経抜去後にAxCAhGDNFを投与すると、NOSの発現が抑制され(c)、ChATの免疫反応性が改善した(f)。 (a) と (c) および (d) と (e) は、同一切片である。 (×200) Bars =50 μm。 (Saito K et al : Brain Res 962 : 61-67, 2003 の Figure 5 を許可を得て転載)

入された GDNF 遺伝子が発現していることが示された。脳神経の抜去、切断あるいは挫滅といった損傷によるニューロンの広範な変性は、処置後 2 日から 4 日で始まるということがわかっているが<sup>59)</sup>、今回の RT-PCR と免疫組織染色の結果は、AxCAhGDNF が神経損傷後にニューロンの変性開始の初期から、損傷された運動ニューロンに対して GDNF 遺伝子を導入可能であることを示している。なお、成体齧歯類では、末梢神経の切断や挫滅では運動ニューロンの脱落を認めず、末梢神経抜去によってのみ運動ニューロンの著明な脱落をおこすことが知られている<sup>41, 42, 59-61)</sup>。そこで今回は神経栄養因子を組み込んだアデノウイルスベクターによる、声帯運動ニューロン保護効果の検討に、迷走神経抜去モデルが適当と考え、これを用いた。

迷走神経抜去により、疑核運動ニューロンの著明な脱落を認めたが、これは顔面神経抜去後の顔面神経核あるいは脊髄神経抜去後の脊髄前角と同様の変化であった<sup>32, 49)</sup>。AxCAhGDNF を投与したラットでは、AxCALacZ あるいは PBS を投与したラットに比べ、処置後 2 週、4 週で有意に運動ニューロンの脱落が防止された。加えて、AxCAhGDNF 投与により、損傷された疑核運動ニューロンにおいて、NOS 活性が抑制された。NOS 活性は、迷走神経切断により迷走神経背側運動核と疑核において誘導され、その活性は神経損傷後 10 日前後がピークであることがわかっており<sup>55, 56)</sup>、NOS 活性の誘導は運動ニューロンの脱落がおこる際に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>40-42)</sup>。NOS 活性は反回神経の切断あるいは挫滅により疑核運動ニューロンでも誘導される<sup>62)</sup>。Nitroarginine あるいは N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) といった NOS の阻害剤により神経抜去後の NOS 活性の誘導およびその後の運動ニューロンの脱落が防止されることも報告されている<sup>41, 63)</sup>。これらのことから、今回の結果により、AxCAhGDNF の投与には、迷走神経あるいは反回神経損傷後の疑核運動ニューロンを保護する効果があることが示唆された。ChAT 免疫反応性は、顔面神経あるいは脊髄神経抜去後に 1 週間程度で急速に減弱することが知られており<sup>29, 32, 49, 57, 58)</sup>、また顔面神経切断後の成体ラットにおいて、GDNF の局所あるいは皮下投与により ChAT 免疫反応性が改善すると報告されている<sup>58)</sup>。さらに、顔面神経あるいは脊髄神経抜去後の AxCAhGDNF 投与により、ChAT 免疫反応性が改善することも報告がある<sup>32, 49)</sup>。今回、迷走神経抜去後の AxCAhGDNF の投与においても、疑核における ChAT 免疫反応性を改善する効果が認められ、やはり運動ニュー

ロンに対する保護効果を示していると思われた。発現した GDNF は、疑核を含む運動神経核で胎生期に発現しており<sup>64)</sup>、顔面神経核では神経損傷後に誘導される<sup>65)</sup>こともわかっている GDNF- $\alpha$  及び Ret を介して、あるいは GDNF- $\alpha$  及び神経細胞接着分子の NCAM を介して<sup>66, 67)</sup> autocrine 及び paracrine で<sup>49)</sup>作用したと考えられる。本研究の X-gal 酵素組織染色の結果でも決して疑核全てのニューロンに外来遺伝子が導入・発現していたわけではなかったが、paracrine でも作用すると考えられることから、遺伝子導入されたニューロンから発現した GDNF により疑核全体のニューロン脱落防止効果が発現したと思われる。しかし今後は、神経への導入効率の高い adeno-associated virus (AAV) ベクターによる遺伝子導入<sup>68)</sup>との比較や、より強力なプロモーターの開発、さらに Hepatocyte growth factor (HGF)<sup>69)</sup> など運動ニューロン保護作用のある他の神経栄養因子との比較や複数の神経栄養因子の同時投与など様々な条件を検討する必要があるだろう。

ニューロンの脱落后、残存ニューロンで筋肉を再支配することが、喉頭の神経麻痺後の過誤支配の一因と考えられている<sup>20, 21)</sup>。アデノウイルスを用いた GDNF による遺伝子治療は、頭頸部手術に際しての反回神経あるいは迷走神経損傷時に、損傷部位にベクターを投与する事で運動ニューロンの脱落防止や喉頭筋の過誤支配の防止に有効となる可能性があると思われた。反回神経の端々吻合術後、喉頭筋の筋電図上では喉頭筋に過誤支配が認められない場合であっても、神経損傷後のモーターユニットの減少により、筋電図波形の、振動数、振幅が減少し、再運動化した声帯の動きも正常側に比べて動きが小さいことが報告されている<sup>10, 11)</sup>。GDNF 遺伝子の導入は、このような神経吻合術に併用すれば、運動ニューロンの減少を防止してモーターユニット数を保ち、より理想的な声帯の再運動化を得られる可能性があると思われる。神経吻合術後、筋電図上の神経再生電位は、術後 5~6 週で認められる<sup>10)</sup>。また神経損傷後の運動ニューロンでの ChAT 免疫反応性は、損傷後 7 週まで徐々に減弱することも知られていることから<sup>57)</sup>、損傷後の運動ニューロンの減少をくい止めるのに、損傷から 2 ヶ月程度は、大変重要な期間と推察できる。本研究では、単回のウイルスベクターの投与で、少なくとも処置後 4 週まで長期にわたり効果が認められており、数週間の効果を得るために多数回の投与を要しないことは臨床的にも大変有用と思われる。また、神経吻合術後、声帯運動が回復するまでには 10~11 週かかることも報告があり<sup>10)</sup>、今後、遺伝子導入効果の持続期間をさらに検討することは有意

義と考えられる。これに伴い、ベクターの長期的な投与による炎症反応を含めた免疫応答に関する検討を行うことは、今後臨床応用を考えていく上でも欠かせないと思われる。本研究は、反回神経あるいは迷走神経の切断症例への応用を主なターゲットとしているが、最近ウイルスベクターの反回神経への注入によっても、導入した遺伝子の疑核での発現が可能なが報告されており<sup>60)</sup>、外傷あるいは術中操作による神経の挫滅症例や特発性麻痺といった神経非切断症例に対しても、本研究の応用・発展の可能性が十分にあるといえる。

## 総 括

ラット迷走神経抜去による疑核運動ニューロン脱落誘発モデルに対し、非増殖型アデノウイルスベクターを用いてGDNF遺伝子を疑核に導入し、その効果を検討した<sup>70)</sup>。

1. 成体ラット迷走神経抜去による疑核運動ニューロン脱落誘発モデルに対し、頸静脈孔の神経損傷断端より非増殖型アデノウイルスベクターを用いて外来遺伝子の疑核への選択的導入に成功した。

2. 同モデルに対し、GDNF遺伝子の疑核への導入を行い、導入後4週まで運動ニューロン脱落防止効果を認めた。

3. GDNF遺伝子導入により、迷走神経障害後の、疑核におけるNOS活性発現の抑制およびChAT免疫反応性の改善効果を認めた。

4. 将来的に、迷走神経・反回神経の傷害された症例に対して遺伝子導入を行い、疑核運動ニューロン脱落を防止する治療を行えるようになる可能性が示唆された。

稿を終えるに当たり、ご指導、ご高関を賜った慶應義塾大学耳鼻咽喉科学教室小川郁教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に当たり、終始懇切に多大なるご指導かつ激励を賜りました慶應義塾大学耳鼻咽喉科学教室塩谷彰浩講師に心より感謝いたします。また本研究に貴重なご指導、ご助言をいただきました東京都神経科学総合研究所の渡部和彦先生に深謝いたします。

本研究の要旨の一部は、第13回および第14回日本喉頭科学会、第102回日本耳鼻咽喉科学会総会、2001 Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Research Forumにおいて発表した。

## 文 献

- 1) 齋藤康一郎, 塩谷彰浩, 大久保啓介, 茂呂和久, 荒木幸仁, 池田麻子, 福田宏之, 小川郁: 片側性喉頭麻痺症例の臨床的観察. 日気食会報, 印刷中
- 2) 齋藤康一郎, 塩谷彰浩, 大久保啓介, 茂呂和久, 荒木幸仁, 池田麻子, 福田宏之, 小川郁: 両側性反回神経麻痺症例の臨床的観察. 喉頭, 15: 23-27, 2003
- 3) Isshiki N: Progress in laryngeal framework surgery. Acta Otolaryngol 120: 120-127, 2000
- 4) Hartl DM, Brasnu DF: Recurrent laryngeal nerve paralysis: Current concepts and treatment: Part III-Surgical options. Ear Nose Throat J 80: 17-21, 27-28, 2001
- 5) Hoffman HT, McCulloch TM: Anatomic considerations in the surgical treatment of unilateral laryngeal paralysis. Head Neck 18: 174-187, 1996
- 6) Rice DH: Laryngeal reinnervation. Laryngoscope 92: 1049-1059, 1982
- 7) Woodman DG: A modification of the extralaryngeal approach to arytenoidectomy for bilateral abductor paralysis. Arch Otolaryngol 43: 63-65, 1946.
- 8) Dennis DP, Kashima H: Carbon dioxide laser posterior cordectomy for treatment of bilateral vocal cord paralysis. Ann Otol Rhinol Laryngol 98: 930-934, 1989.
- 9) Zheng H, Li Z, Zhou S, Cuan Y, Wen W: Update: laryngeal reinnervation for unilateral vocal cord paralysis with the ansa cervicalis. Laryngoscope 106: 1522-1527, 1996
- 10) Mu LC, Yang SL: Electromyographic study on end-to-end anastomosis of the recurrent laryngeal nerve in dogs. Laryngoscope 100: 1009-1017, 1990
- 11) Rubio A, Fernandez MR, Figols J, Rama J: Experimental study on neurotomy of the recurrent laryngeal nerve in dogs. J Laryngol Otol 110: 748-753, 1996
- 12) Crumley RL, Izdebski K: Voice quality following laryngeal reinnervation by ansa hypoglossi transfer. Laryngoscope 96: 611-616, 1986
- 13) Crumley RL: Update: Ansa cervicalis to recurrent laryngeal nerve anastomosis for unilateral laryngeal paralysis. Laryngoscope 101: 384-388, 1991
- 14) Green DC, Berke GS, Graves MC: A functional evaluation of ansa cervicalis nerve transfer for unilateral vocal cord paralysis: future directions for laryngeal reinnervation. Otolaryngol Head Neck Surg 104: 453-466, 1991
- 15) Olson DE, Goding GS, Michael DD: Acoustic and perceptual evaluation of laryngeal reinnervation by ansa cervicalis transfer. Laryngoscope 108: 1767-1772, 1998
- 16) Mahieu HF, van Lith-Bijl JT, Groenhout C, Tonnaer JA, de Wilde P: Selective laryngeal abductor reinnervation in cats using a phrenic nerve transfer

- and ORG 2766. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 119 : 772-776, 1993
- 17) Tucker HM : Reinnervation of the unilaterally paralyzed larynx. Ann Otol Rhinol Laryngol 86 : 789-794, 1977
  - 18) Tucker HM, Rusnov M : Laryngeal reinnervation for unilateral vocal cord paralysis : long-term results. Ann Otol Rhinol Laryngol 90 : 457-459, 1981
  - 19) Goding GS : Nerve-muscle pedicle reinnervation of the paralyzed vocal cord. Otolaryngol Clin North Am 24 : 1239-1252, 1991
  - 20) Crumley RL : Mechanisms of synkinesis. Laryngoscope 89 : 1847-1854, 1979
  - 21) Flint PW, Downs DH, Coltrera MD : Laryngeal synkinesis following reinnervation in the rat : Neuroanatomic and physiologic study using retrograde fluorescent tracers and electromyography. Ann Otol Rhinol Laryngol 100 : 797-806, 1991
  - 22) Houenou LJ, Oppenheim RW, Li L, Lo AC, Prevet D : Regulation of spinal motoneuron survival by GDNF during development and following injury. Cell Tissue Res 286 : 219-223, 1996
  - 23) Lapchak PA, Jiao S, Miller PJ, Williams LR, Cummins V, Inouye G, Matheson CR, Yan Q : Pharmacological characterization of glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) : implications for GDNF as a therapeutic molecule for treating neurodegenerative diseases. Cell Tissue Res 286 : 179-189, 1996
  - 24) Lindsay RM : Neuron saving schemes. Nature 373 : 289-290, 1995
  - 25) Baumgartner BJ, Shine HD : Targeted transduction of CNS neurons with adenoviral vectors carrying neurotrophic factor genes confers neuroprotection that exceeds the transduced population. J Neurosci 17 : 6504-6511, 1997
  - 26) Baumgartner BJ, Shine HD : Neuroprotection of spinal motoneurons following targeted transduction with an adenoviral vector carrying the gene for glial cell line-derived neurotrophic factor. Exp Neurol 153 : 102-112, 1998
  - 27) Giménez YRM, Revah F, Pradier L, Loquet I, Mallet J, Privat A : Prevention of motoneuron death by adenovirus-mediated neurotrophic factors. J Neurosci Res 48 : 281-285, 1997
  - 28) Gravel C, Gotz R, Lorrain A, Sendtner M : Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor leads to long-term survival of axotomized motor neurons. Nature Med 3 : 765-770, 1997
  - 29) Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, Nakayama C, Noguchi H : BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. Exp Neurol 144 : 273-286, 1997
  - 30) Li L, Wu W, Lin LFH, Lei M, Oppenheim RW, Houenou LJ : Rescue of adult mouse motoneurons from injury-induced cell death by glial cell-line derived neurotrophic factor. Proc Natl Acad Sci USA 92 : 9771-9775, 1995
  - 31) Novikov L, Novikova L, Kellerth JO : Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons *in vivo*. Neuroscience 79 : 765-774, 1997
  - 32) Sakamoto T, Watabe K, Ohashi T, Kawazoe Y, Oyanagi K, Inoue K, Eto Y : Adenoviral vector-mediated GDNF gene transfer prevents death of adult facial motoneurons. NeuroReport 11 : 1857-1860, 2000
  - 33) 村松慎一 : パーキンソン病に対する遺伝子治療. 臨床神経, 41 : 1157-1159, 2001
  - 34) Castel-Barthe MN, Jazat-Poindessous F, Barneoud P, Vigne E, Revah F, Mallet J, Lamour Y : Direct intracerebral nerve growth factor gene transfer using a recombinant adenovirus : effect on basal forebrain cholinergic neurons during aging. Neurobiol Dis 3 : 76-86, 1996
  - 35) Kordover JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Brown WD, Holden JE, Pyzalski R, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Deglon N, Aebischer P : Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. Science 290 : 767-773, 2000
  - 36) Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F, Schmalbruch H, Kahn A : Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. Nature Med 3 : 429-436, 1997
  - 37) Gimenez YRM : Gene therapy strategies in neurodegenerative diseases. Histol Histopathol 16 : 883-893, 2001
  - 38) Shiotani A, O'Malley Jr. BW, Coleman ME, Alila HW, Flint PW : Reinnervation of motor endplates and increased muscle fiber size after human insulin-like growth factor I gene transfer into the paralyzed larynx. Hum Gene Ther 9 : 2039-2047, 1998
  - 39) Shiotani A, O'Malley Jr. BW, Coleman ME, Flint PW : Human insulinlike growth factor I gene transfer into paralyzed rat larynx : single vs. multiple injection. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 125 : 555-560, 1999
  - 40) Estévez AG, Spear N, Manuel SM, Barbeito L, Radi R, Beckman JS : Role of endogenous nitric oxide and peroxynitrite formation in the survival and death of motor neurons in culture. Prog Brain Res 118 : 269-280, 1998
  - 41) Ruan RS, Leong SK, Yeoh KH : The role of nitric oxide in facial motoneuronal death. Brain Res 698 : 163-168, 1995
  - 42) Wu W : Expression of nitric-oxide synthase (NOS) in injured CNS neurons as shown by NADPH



- diaphorase histochemistry. *Exp Neurol* 120 : 153-159, 1993
- 43) Kremer EJ, Perricaudet M : Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer. *Br Med Bull* 51 : 31-44, 1995
- 44) Slack RS, Miller FD : Viral vectors for modulating gene expression in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 6 : 576-583, 1996
- 45) 瀬戸口靖弘, 三浦夕美子 : アデノウイルスベクターの開発とその応用. *医学のあゆみ*, 177 : 995-1000, 1996
- 46) Davidson BL, Bohn MC : Recombinant adenovirus : A gene transfer vector for study and treatment of CNS diseases. *Exp Neurol* 144 : 125-130, 1997
- 47) Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakaki T, Sugano S, Saito I : Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucl Acid Res* 23 : 3816-3821, 1995
- 48) Miyake S, Makimura M, Kanegae Y, Harada S, Sato Y, Takamori K, Tokuda C, Saito I : Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 1320-1324, 1996
- 49) Watabe K, Ohashi T, Sakamoto T, Kawazoe Y, Takeshima T, Oyanagi K, Inoue K, Eto Y, Kim SU : Rescue of lesioned adult rat spinal motoneurons by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci Res* 60 : 511-519, 2000
- 50) Finels F, Giménez YRM, Barkats M, Samolyk ML, Robert JJ, Privat A, Revah F, Mallet J : Specific and efficient gene transfer strategy offers new potentialities for the treatment of motor neurone diseases. *NeuroReport* 7 : 373-378, 1995
- 51) Ghadge GD, Roos RP, Kang UJ, Wollmann R, Fishman PS, Kalynych AM, Barr E, Leiden JM : CNS gene delivery by retrograde transport of recombinant replication-defective adenoviruses. *Gene Ther* 2 : 132-137, 1995
- 52) 半谷公彦, 榎本啓一, 小林吉史 : ラット内喉頭筋, 疑核神経細胞の生後変化. *喉頭*, 7 : 133-138, 1995
- 53) Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH : Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 7797-7801, 1991
- 54) Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR : Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 2811-2814, 1991
- 55) Gonzalez MF, Sharp FR, Sagar SM : Axotomy increases NADPH-diaphorase staining in rat vagal motor neurons. *Brain Res Bull* 18 : 417-427, 1986
- 56) Jia YS, Wang XA, Ju G : Nitric oxide synthase expression in vagal complex following vagotomy in the rat. *NeuroReport* 5 : 793-796, 1994
- 57) He JW, Hirata K, Kuraoka A, Kawabuchi M : An improved method for avulsion of lumbar nerve roots as an experimental model of nitric oxide-mediated neuronal degeneration. *Brain Res Protoc* 5 : 223-230, 2000
- 58) Yan Q, Matheson C, Lopez OT : In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motoneurons. *Nature* 373 : 341-344, 1995
- 59) Søreide AJ : Variations in the axon reactions after different types of nerve lesion. *Acta Anat* 110 : 173-188, 1981
- 60) Koliatsos VE, Price WL, Pardo CA, Price DL : Ventral root avulsion : an experimental model of death of adult motor neurons. *J Comp Neurol* 342 : 35-44, 1994
- 61) Lowrie MB, Vrbova G : Dependence of postnatal motoneurons on their targets. *Trend Neurosci* 15 : 80-84, 1992
- 62) Bamba H, Uno T, Koike S, Shogaki K, Hisa Y : Induction of nitric oxide synthase activity in nucleus ambiguus motoneurons after injury to the rat recurrent laryngeal nerve. *Acta Otolaryngol* 120 : 327-329, 2000
- 63) Wu W, Li L : Inhibition of nitric oxide synthase reduces motoneuron death due to spinal root avulsion. *Neurosci Lett* 153 : 121-124, 1993
- 64) Mikaelis Á, Livet J, Westphal H, De Lapeyriere O, Ernfor P : A dynamic regulation of GDNF-family receptors correlates with a specific dependency of cranial motor neuron subpopulations during development. *Eur J Neurosci* 12 : 446-456, 2000
- 65) Burazin TC, Gundlach AL : Up-regulation of GDNF- $\alpha$  and c-ret mRNA in facial motor neuron following facial nerve injury in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 55 : 331-336, 1998
- 66) Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF : The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113 : 867-879, 2003
- 67) Sariola H, Saarna M : Novel function and signaling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116 : 3855-3862, 2003
- 68) Rubin AD, Hogikyan ND, Sullivan K, Boulis N, Feldman EL : Remote delivery of rAAV-GFP to the rat brainstem through the recurrent laryngeal nerve. *Laryngoscope* 111 : 2041-2045, 2001
- 69) Sun W, Funakoshi H, Nakamura T : Overexpression of HGF retards disease progression and prolongs life span in a transgenic mouse model of ALS. *J Neurosci* 22 : 6537-6548, 2002
- 70) Saito K, Shiotani A, Watabe K, Moro K, Fukuda H, Ogawa K : Adenoviral GDNF gene transfer prevents motoneuron loss in the nucleus ambiguus. *Brain Res* 962 : 61-67, 2003

慶應医学 第80卷第4号号外  
平成15年12月25日

# 博士（医学）学位論文

内容および審査要旨

第170号

慶應義塾大学

### 論文の内容および審査要旨公表

本学では大学院医学研究科博士課程修了の次の者に対し、博士（医学）の学位を授与したので学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定により、その論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨を公表する。

慶應義塾大学

学位授与年月日号 学位記	氏名	生年月日
平成15年9月8日 慶大博士乙第3716号	上原慶太	昭和42年5月20日
同同 第3717号	藤森 齊	昭和43年2月15日
同同 第3718号	前田典子	昭和45年10月10日
同同 第3719号	山本百合恵	昭和45年1月22日
同同 第3720号	吉田英雄	昭和42年9月6日
平成15年10月20日 慶大博士乙第3725号	岩田憲治	昭和28年1月26日
同同 第3726号	内田智夫	昭和33年6月20日
同同 第3727号	岡本 晋	昭和39年10月24日
同同 第3728号	齋藤康一郎	昭和44年6月21日
同同 第3729号	佐方克史	昭和41年7月15日
同同 第3730号	島崎賢仁	昭和42年5月10日
同同 第3731号	須田義朗	昭和37年3月10日
同同 第3732号	芹田良平	昭和37年8月24日
同同 第3733号	武藤章弘	昭和39年2月28日
同同 第3734号	森田慶久	昭和43年5月21日
同同 第3735号	山本聖一郎	昭和39年10月11日
平成15年11月10日 慶大博士乙第3737号	岩橋和裕	昭和42年8月16日
同同 第3738号	是木茂幸	昭和42年6月7日

学位授与年月日号	氏名	生年月日
平成15年11月10日 慶大博士乙第3739号	永橋正一	昭和37年4月25日
同同 第3740号	原由里子	昭和45年2月4日
同同 第3741号	久松理一	昭和41年12月23日
同同 第3742号	堀内極	昭和42年3月19日
同同 第3743号	森末淳	昭和41年11月5日

## 目 次

上原 慶太	Significant Role of Ceramide Pathway in Experimental Gastric Ulcer Formation in Rats. (実験的胃潰瘍形成過程におけるceramide pathwayの役割) ..... 5
藤森 斉	粘膜固有層リンパ球の小腸微小血管における接着の生体観察 ..... 6
前田 典子	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 ..... 7
山本百合恵	Expression and subcellular distribution of the active form of c-Src tyrosine kinase in differentiating human endometrial stromal cells. (ヒト子宮内膜脱落膜化における活性化型c-Srcチロシンキナーゼの発現と 細胞内局在変化) ..... 8
吉田 英雄	ラット小腸粘膜上皮細胞におけるGRO/CINC-1とInterleukin-6の産生： 脂肪酸による修飾 ..... 9
岩田 憲治	Intraportal perfusion of prostaglandin E <sub>1</sub> attenuates hepatic postischaemic microcirculatory impairments in rats. (ProstaglandinE <sub>1</sub> 門脈内投与によるラット肝虚血再灌流後の微小循環障害の改善) ..... 10
内田 智夫	INDUCTION OF INDEFINITE SURVIVAL OF FULLY ALLOGENEIC CARDIAC GRAFTS AND GENERATION OF REGULATORY CELLS BY INTRATRACHEAL DELIVERY OF ALLOANTIGENS UNDER BLOCKADE OF THE CD40 PATHWAY. (マウス心移植実験におけるアロ抗原経気管投与とCD40経路の遮断による 免疫寛容の誘導) ..... 11
岡本 晋	マウス慢性大腸炎モデルの開発とCD4アナログによる粘膜内CD4陽性細胞を 標的とした新たな免疫統御療法の検討 ..... 12
齋藤康一郎	アデノウイルスベクターを用いた疑核へのGDNF遺伝子導入による 運動ニューロン脱落防止効果の検討 ..... 13
佐方 克史	高血圧自然発症ラットにおける腎交感神経活動と血圧および腎血流量の関係 に関する研究 ..... 14
島崎 賢仁	培養アストロサイトにおけるc-Metの産生と分泌性因子によるその調節 ..... 15
須田 義朗	Gait Analysis of Patients With Neurogenic Intermittent Claudication. (神経性間欠跛行の歩行分析) ..... 16
芹田 良平	Sevoflurane preconditions stunned myocardium in septic but not healthy isolated rat hearts. (セボフルランは正常心ではなく敗血症摘出ラット心のスタン心筋を プレコンディションする) ..... 17
武藤 章弘	1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> Induces Differentiation of a Retinoic Acid-Resistant Acute Promyelocytic Leukemia Cell Line (UF-1) Associated With Expression of p21 <sup>WAF1/CIP1</sup> and p27 <sup>KIP1</sup> . (1,25α水酸化ビタミンD <sub>3</sub> によるサイクリン依存性キナーゼインヒビターを介する 急性前骨髄球性白血病の分化誘導機構の解析) ..... 18
森田 慶久	Critical Oxygen Delivery in Conscious Septic Rats under Stagnant or Anemic Hypoxia. (低心拍出量性及び貧血性低酸素症下における、意識下敗血症ラットの 臨界酸素供給量) ..... 19
山本理一郎	The Role of Tumor Necrosis Factor-α and Interleukin-1β in Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Small Intestine. (ラット小腸虚血再灌流障害におけるtumor necrosis factor-αおよび interleukin-1βの役割) ..... 20

岩橋 和裕	Expression of the exocytotic protein syntaxin in mouse oocytes. (マウス卵子における開口放出関連蛋白質syntaxinの発現について) .....	21
是木 茂幸	Xanthine oxidase-derived oxygen radicals play significant roles in the development of chronic pancreatitis in WBN/Kob rats. (自然発症慢性膵炎モデルラット(WBN/Kobラット)の膵組織障害における xanthine oxidaseにより産生される活性酸素の関与) .....	22
永橋 正一	AMMONIA AGGRAVATES STRESS-INDUCED GASTRIC MUCOSAL OXIDATIVE INJURY THROUGH THE CANCELLATION OF CYTOPROTECTIVE HEAT SHOCK PROTEIN 70. (胃内アンモニアによるストレス性胃粘膜傷害増強機序 -粘膜保護的HSP70発現抑制の介在-) .....	23
原 由里子	Exposure to fatty acids modulates interferon production by intraepithelial lymphocytes. (脂肪酸投与が上皮内リンパ球のインターフェロン産生に及ぼす影響) .....	24
久松 理一	Interferon-inducible Gene Family 1-8U Expression in Colitis-associated Colon Cancer and Severely Inflamed Mucosa in Ulcerative Colitis. (潰瘍性大腸炎を母地とした大腸癌粘膜および慢性炎症粘膜における Interferon-inducible Gene Family 1-8Uの発現) .....	25
堀内 極	Expression of Granzyme B in Human Articular Chondrocytes. (関節軟骨細胞におけるGranzyme Bの発現) .....	26
森末 淳	The Role of Nitric Oxide after a Short Period of Liver Ischemia-Reperfusion. (肝虚血再灌流における一酸化窒素の意義) .....	27

# Significant Role of Ceramide Pathway in Experimental Gastric Ulcer Formation in Rats.

(実験的胃潰瘍形成過程におけるceramide pathwayの役割)

上原 慶太

## 内容の要旨

著者らは、以前にphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 惹起性胃潰瘍モデルを作成し、PMAが胃粘膜内の転写因子であるNF- $\kappa$ Bを活性化し、引き続き生じるTNF- $\alpha$ の産生がPMA惹起性胃潰瘍の形成過程における組織傷害発生に関与していることを明らかにしてきた。一方、ceramideなどのスフィンゴ脂質は非常に生物活性の高い化合物で、細胞間接着や分化増殖を含めた多様な細胞代謝過程に関与していることが明らかにされている。しかし、胃粘膜中におけるceramideとNF- $\kappa$ B活性化との相互関係に関する報告はみられず、ceramide類似体がアポトーシスを誘発することは以前から知られているが、胃潰瘍の発生過程におけるceramide形成とアポトーシスおよび胃粘膜傷害との関連についてin vivoでの検討はなされていない。そこで本研究は、1) 実験的胃潰瘍発生過程において胃粘膜中でのceramide形成が関与するかどうか、またその増加が胃粘膜細胞のアポトーシスに役割をはたすか、2) 胃潰瘍の形成過程で、ceramide発現がNF- $\kappa$ Bをはじめとする転写調節因子の活性化にいかに関与しているかを検討する目的で行った。

本研究ではWistar系雄性ラットを用いた。PMAと同時にceramide合成阻害薬であるfumonisins B1 (FB1)、アポトーシス阻害薬であるcaspase1/4、caspase3/7の阻害薬をラット胃漿膜下に局注することでPMAによる潰瘍の抑制が認められた。Ceramideの発現は主にC18とC24の2種類であり、いずれもFB1投与で抑制されたが、NF- $\kappa$ B阻害薬であるPDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) やNF- $\kappa$ B decoyの投与では有意な抑制を認めなかった。また胃内のNF- $\kappa$ B、AP-1の発現はいずれもFB1投与にて抑制された。胃粘膜細胞のアポトーシスはceramide濃度の上昇と平行して増加したが、FB1、caspase1/4、caspase3/7の阻害薬にてアポトーシス抑制が認められた。しかしPDTC、NF- $\kappa$ B decoyの同時投与ではその抑制は認められなかった。

本研究によりPMA惹起性胃潰瘍においてceramideの胃粘膜におけるde novo合成が増加しそれが潰瘍形成に関与していること、およびceramideがNF- $\kappa$ Bを活性化していること、アポトーシスを増加させることが示された。しかし、NF- $\kappa$ B活性化を抑制しても、この潰瘍モデルのアポトーシス増加を抑制できなかったことにより、NF- $\kappa$ Bとアポトーシスの経路は別々に潰瘍形成に関与している可能性がある。以上より、本研究は胃潰瘍形成に伴うceramide pathwayの重要性を明らかにし、潰瘍形成機序を解明する有用な情報を提供したと考えられた。

## 論文審査の要旨

Ceramideなどのスフィンゴ脂質は、細胞間接着や分化増殖を含めた多様な細胞過程に関与していることが明らかにされている。本研究ではphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 惹起性胃潰瘍モデルにおいて胃潰瘍形成過程におけるceramide pathwayの関与について検討し細胞内シグナル伝達機構の解明を試みた。Ceramide合成阻害薬であるfumonisins B1 (FB1)、およびアポトーシス阻害薬にてそれぞれ潰瘍の抑制が認められた。Ceramideは胃潰瘍形成過程において増加し、FB1投与にて抑制されるが、NF- $\kappa$ B阻害薬では抑制されなかった。NF- $\kappa$ B、AP-1の発現はFB1投与にて抑制された。更に胃潰瘍形成に伴いアポトーシスの増加を認め、FB1、アポトーシス阻害薬では抑制された。しかしNF- $\kappa$ B阻害薬では抑制されなかった。以上より胃潰瘍形成過程におけるceramideの関与、更にceramideが転写因子であるNF- $\kappa$ B、AP-1を活性化し、アポトーシスを増加させることが示されたが、転写因子とアポトーシスの経路とは別々に関与していることが示唆された。

審査では、潰瘍部と非潰瘍部でのceramideの発現を比較検討したか指摘され、今回提示していないが、発現に有意差は認められたと回答された。C18とC24 ceramideの経時的変化の違いについて指摘され、今後脂肪酸の炭素鎖の違うceramideを実際に投与し炎症、潰瘍への評価をすることでceramideの機能の違いを検討していくと回答された。今回の潰瘍モデルはアポトーシス主体かどうか質問がなされ、潰瘍形成に伴うアポトーシスの増加、FB1による抑制よりアポトーシスが主体である可能性が示唆されると回答された。Histological damage scoresの定義について質疑され、潰瘍段階でのスコアを追加すべきと助言された。AP-1の作用機序について質問がなされ、AP-1については抗体を使用して検討していないためNF- $\kappa$ Bと同様の機序かは不明だが、文献的にceramideがc-junを活性化しAP-1のDNA結合能を高める報告もあり、ceramide発現後NF- $\kappa$ Bと異なるシグナルの可能性もあると回答された。人の胃生検組織でのceramideの測定が可能であるのか質問がなされ、組織量が少なく脂質抽出自体が難しいが、*Helicobacter pylori*、胃癌とceramideが関与する文献報告もあり今後臨床での応用を考慮して検討していくと回答された。

以上のように、本研究は今後、更に検討すべき課題を残してはいるが、実験的胃潰瘍形成過程においてin vivoでのceramide pathwayの関与を明らかにしたことは消化器病学上、有意義な研究であると評価された。

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

試問日: 平成15年7月26日

# 粘膜固有層リンパ球の小腸微小血管における接着の生体観察

藤 森 齊

## 内容の要旨

リンパ球はリンパ組織および非リンパ組織を常に循環し、免疫防御の重要な役割を担っている。リンパ球の組織へのホーミングはランダムに起こるものではなく特異性を有しており、近年リンパ球-血管内皮細胞間の認識機構が明らかにされてきた。腸管のリンパ装置はGALT (gut-associated lymphoid tissue) と呼ばれ、免疫機構の誘導部位であるパイエル板と実効部位である粘膜固有層および腸管上皮のリンパ系細胞からなる。小腸粘膜固有層には生理的条件下においてもリンパ球が豊富に存在し、エフェクター機能を発揮しているが、これまでに粘膜固有層Tリンパ球 (lamina propria lymphocyte、以下LPL) が腸管のパイエル板および粘膜固有層自体にマイグレーションするかどうかについてはin vivoで観察した報告はない。本研究において、蛍光色素CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) を用いてマウスリンパ球の腸管微小血管への接着を生体顕微鏡で観察することにより、パイエル板と粘膜固有層の間では、さらにLPLと脾臓Tリンパ球 (splenocyte、以下SPL) の間ではリンパ球の微小血管内皮への接着に大きな相違があることを明らかにした。すなわち

1. FACS解析によるLPLとSPLの表面分子発現の比較検討では、L-セレクトリン、CD45RB、CD11aはSPLで強く発現がみられたが、 $\beta 7$ インテグリン、CD69はLPLにおいて強く発現が見られ、LPLがより活性化された状態であることが示唆された。また $\alpha 4\beta 7$ インテグリンのcombinatorial epitopeはLPLで有意に強発現が見られた。
2. パイエル板postcapillary venuleでの生体観察では、SPLは有意なrollingおよび接着数増加を認めたがLPLではほとんど認めなかった。またSPLをL-セレクトリン、 $\alpha 4$ インテグリン、 $\beta 7$ インテグリン、CD11aに対するモノクローナル抗体で処理した場合、またはマウスを抗MAdCAM-1抗体で前処置した場合には、接着数は著明に減少し、SPLのパイエル板への接着にはこれらの分子の共同作用が必要であることが示唆された。
3. 一方小腸絨毛粘膜における観察では、LPLはSPLに比べて有意に多く絨毛頂部の微小血管にrollingおよび接着を認めた。同部位でのrolling LPLの割合および接着数は、抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体や抗 $\beta 7$ インテグリン抗体での抑制、あるいは抗MAdCAM-1抗体での前処置によってのみ有意に減少を示し、腸粘膜固有層での $\alpha 4\beta 7$ インテグリン-MAdCAM-1の組み合わせの重要性が示唆された。
4. 小腸におけるMAdCAM-1発現を免疫組織化学的に検討したところ、小腸粘膜固有層内の粘膜筋板直上の血管内皮に発現していたが、絨毛頂部の微小血管にも表出が認められた。

以上より、SPLがパイエル板postcapillary venuleに接着するのに対して、LPLは $\alpha 4\beta 7$ インテグリンとMAdCAM-1の結合を介して小腸粘膜固有層の微小血管に選択的に接着することが生体観察にて明らかにされた。

## 論文審査の要旨

これまでに粘膜固有層リンパ球が腸管にどのようにホーミングするかをin vivoで観察した報告は見られない。本研究では、マウスリンパ球のmigrationを生体顕微鏡を用いて観察することにより、脾臓Tリンパ球 (SPL) と粘膜固有層Tリンパ球 (LPL) とが腸管パイエル板および粘膜固有層にどのようにmigrationするか、さらに各種接着分子がどのように関与しているかを検討した。SPLはパイエル板postcapillary venuleでrollingおよび接着を認めたのに対して、LPLではほとんど認められなかった。一方、LPLはSPLに比べて小腸絨毛頂部の微小血管に有意に多くrollingおよび接着を認めた。同部位でのrollingおよび接着は抗 $\alpha 4$ インテグリン抗体、抗 $\beta 7$ インテグリン抗体、抗MAdCAM-1抗体の処理によって抑制された。また、この接着はLPLを百日咳毒素 (PTX) で処理した際にも抑制された。FACSの解析では、LPLはSPLに比較して $\beta 7$ インテグリンを強発現していた。また免疫組織化学的に小腸絨毛頂部の微小血管にMAdCAM-1の発現を認めた。以上より、LPLは小腸粘膜固有層の微小血管に選択的に接着し、その接着には $\alpha 4\beta 7$ インテグリンとMAdCAM-1との結合が大きな役割を果たしており、また、この接着がPTX処理でも抑制されたことから、G蛋白関連細胞内伝達シグナルを介した反応であることが示唆された。

審査では、まず本研究のoriginalityについて質疑がなされたが、LPLの腸管におけるmigrationを、実際にin vivoで観察したことであり、さらに小腸絨毛の微小血管での接着が血管径の狭小化に伴う機械的接着でなく、接着分子や細胞内伝達シグナルを介した化学反応であることを証明したことであることが確認された。また、LPLに $\alpha E$ インテグリン (10%) や $\gamma 8$ TCR (3%) の発現が見られているのは明らかに上皮間リンパ球 (IEL) の混入であるのでその旨を明確に記載すべきとの指摘があった。加えて、LPLの採取手技、特にコラゲナーゼの処理が、L-セレクトリン等の表面発現や血管内皮細胞との反応を変化させる可能性があることが指摘された。これに対して申請者はその可能性を完全に否定することは困難であるが、SPLにコラゲナーゼ処理した場合には表面発現やmigrationのパターンに変化がなかったことを述べた。また、LPLをPTX処理した場合に接着が抑制された結果に関して、PTX処理によるリンパ球の膜変形能の変化なども関連している可能性を考慮する必要があるとの指摘もなされた。LPLの小腸粘膜微小血管での接着にLFA-1とICAM-1との接着が関わっているかとの質問には、ICAMも絨毛の血管に発現しているが、本実験では抗CD11a抗体で接着が抑制されなかったことから関連が薄いと考えられたと応答された。さらには、生体観察の時間を延長して、リンパ球がパイエル板および小腸粘膜の間質にmigrationし、リンパ管にdrainageされるまでを比較検討すべきとの提案もなされた。

以上、本研究はいくつかの検討すべき課題を残しているが、LPLの小腸粘膜微小血管で接着に $\alpha 4\beta 7$ インテグリンとMAdCAM-1との結合が重要であることをin vivoで示した点で消化器病学上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正  
外科学 北島 政樹 微生物学 石川 博通  
微生物学 小安 重夫 医化学 末松 誠  
学力確認担当者: 北島 政樹  
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成15年7月8日



# 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

## 内容の要旨

経頭蓋磁気刺激 (TMS) は年々感心が高まりつつある技法であり、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・時間的連絡がどうなっているかなど)、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に用いられ、またそれによる精神神経疾患の治療についての臨床試験が行われている。TMSの治療の応用ではうつ病が最も注目されているが、これまでのところ、研究間、患者間で有効率にばらつきがあり、その機序もなお不明である。治療効果の判定は他の治療法と同様臨床的尺度を用いることが多いが、治療効果のより客観的な評価の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。TMSを用いて皮質興奮性を測定する神経生理学的検査は、うつ病の病理生理の検討ならびにTMSによる治療の客観的な評価のための有用な技法である可能性がある。

以上のことから本研究では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。TMSを用いた技法としては、健常者とうつ病例に二発TMS法 (運動閾上のTMSによる運動誘発電位 (MEP) がその前1~20msに与えられる閾下のTMSによって条件付けされることで、大脳皮質間内の興奮性を特異的に測定する技法。) と、反復TMS (rTMS) 反応検査 (さまざまな頻度のrTMSを与えその反応をMEPの大きさの変化によって測定。通常高頻度 (> 1 Hz) では大脳皮質興奮性が増大、低頻度 (≤ 1 Hz) では減少。) を行い、またうつ病例において左背側前頭前野皮質 (DLPFC) に高頻度 (10Hz) rTMS治療を2週間行った。

これらの一連の研究で、まず健常者において二発TMS法によって測定される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。また、rTMSでは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、従来考えられていたとは異なり被験者によって増大する者と減少する者が認められた。うつ病例においては、大脳皮質興奮性に左右差があり、過去の画像研究と一致して左半球が有意に低下していること、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。さらに、高頻度 (10Hz) rTMSによって興奮性が増大する症例において、活動性の低下している左DLPFCに高頻度rTMS治療を行う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。またrTMSのうつ病に対する治療効果に関しては、過去の研究と比べ若干有効率は低かったものの有意な改善効果を認めた。

これらの結果はTMSが、治療に反応する症例や治療効果に関係するパラメーターの選択に役立ち、TMSによる神経生理学的指標が治療効果と一致して値が変動することを示している。さらに、TMSがうつ病の治療法のひとつになり得ることを示唆している。

## 論文審査の要旨

近年、経頭蓋磁気刺激 (TMS) はうつ病の治療とその病態生理の解明において注目されている。本研究は、健常者とうつ病例を対象として二発TMS法と反復TMS法 (rTMS) を行い、またうつ病例において左背側前頭前野皮質 (DLPFC) に高頻度rTMS治療を2週間実施し、うつ病の病態生理と治療効果の検討を行ったものである。まず健常者においては、二発TMS法によって測定される大脳皮質興奮性が左右対称で再現性があり、rTMSの頻度に依存した皮質脊髄興奮性の増大を認めるものの個人差も大きいことが確認された。うつ病例では、大脳皮質興奮性に左右差があり、rTMS治療の反応例においてのみ正常化すること確かめられた。さらに高頻度rTMSにより興奮性が増大する症例において、活動性の低下している左DLPFCに高頻度rTMS治療を行うことにより、うつ症状が改善するという結果を得ている。これらの結果は、TMSがうつ病の治療法として検討しうるものであるとともに、TMSが治療に反応する症例や治療効果を客観的に評価するための有用な技法である可能性を示唆している。

審査ではまずオープン研究であることから、真の効果判定が困難である可能性が指摘された。倫理面およびかかる物理的療法では完全な盲験試験は困難であるため、本研究では実施方法の工夫とともに、臨床症状の評価者、生理学的検査の実施者、治療者をそれぞれブラインドにすることにより二重盲験に近い試みをしたとの回答がなされた。またうつ病例の神経生理学的所見の違いが抑制系と促進系の混在する点でのみ認められたことに関して考察が求められたが、過去の文献や本研究からはその理由について言及できず今後の課題とされた。さらにrTMS治療の非反応例においてのみ通常の皮質興奮性の非対称性が増大することと、不変例、増悪例との関係が指摘されたが、これも今後の課題とされた。この点と関連して、前頭葉の神経生理学的所見の左右対称性とうつ病の因果関係について指摘があり、うつ病における左右非対称性は健常者、脳器質障害例、うつ病例を対象としたこれまでの行動的、脳機能画像的所見と一致するとの回答がなされた。最後にうつ病の左前頭葉の興奮性の増大が臨床症状の改善につながるのであれば、皮質興奮性を増大させるような二発TMS刺激を治療として応用しうる可能性が指摘され、この臨床的価値についても今後の課題とされた。

以上、今後さらなる詳細なTMSの至適治療パラメーターの検討や、うつ病と皮質興奮性の特異的な因果関係についての検討が求められるものの、神経生理学的所見に基づくうつ病の病態生理と症状の関係の解明と、本邦では先駆的な研究領域であるrTMSの治療効果を明らかにした点で価値のある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 精神神経科学 鹿島 明雄  
外科学 河瀬 斌 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7月2日

# Expression and subcellular distribution of the active form of c-Src tyrosine kinase in differentiating human endometrial stromal cells.

(ヒト子宮内膜脱落膜化における活性化型c-Srcチロシンキナーゼの発現と細胞内局在変化)

山本 百合恵

## 内容の要旨

子宮内膜間質細胞の分化すなわち脱落膜化における細胞内シグナル伝達経路についてはいまだに不明の点が多い。われわれはチロシンキナーゼの関与した経路を想定し、ヒト子宮内膜間質細胞のin vitro脱落膜化過程においてc-Srcチロシンキナーゼ活性が上昇することを報告してきた。c-SrcはC末端近傍チロシン残基が脱リン酸化されると活性化し、近年この部位を認識するモノクローナル抗体clone28が作製された。本研究ではclone28を用いてc-SrcチロシンキナーゼC末端近傍チロシン残基 (Tyr530) の脱リン酸化とキナーゼ活性上昇およびc-Srcの細胞内局在変化について検討した。

ヒト子宮内膜組織より細胞を分離、estradiolおよびprogesteroneの存在または非存在下にて培養し、in vitroで脱落膜化を誘導した。一方、マウス繊維芽細胞NIH-3T3に対してEGF刺激またはc-Src発現ベクターの遺伝子導入を行った。各細胞抽出液から作製したc-Src免疫複合体、ならびに培養子宮内膜間質細胞、NIH-3T3細胞、子宮内膜/脱落膜組織からの抽出タンパクをclone28によるウエスタンブロットに供した。また、c-Src免疫沈降物をin vitro kinase assayに供した。さらに、月経周期各期の子宮内膜と妊娠脱落膜組織に対してclone28による免疫組織化学染色を、培養子宮内膜間質細胞には蛍光染色を行った。

Clone28は、EGF刺激によってNIH-3T3細胞に誘導された活性化型c-Srcを認識し、ウエスタンブロットによるclone28との反応性とin vitro kinase assayによるc-Srcキナーゼ活性の挙動が一致した。培養脱落膜化細胞では活性化型c-Src発現レベルが非脱落膜化細胞よりも増強し、キナーゼ活性は上昇していた。Clone28によるウエスタンブロットでは60kと約50kの2つのバンドが検出されたが、60kのバンドがc-Src免疫沈降物およびNIH3T3細胞に過剰発現させたc-Srcのバンドと一致した。内膜組織由来の蛋白抽出液のウエスタンブロットでは、妊娠脱落膜の活性化型c-Src発現は非妊娠子宮内膜に比して増強していた。免疫組織染色では妊娠脱落膜は非妊娠子宮内膜に比してclone28で増強し、間質細胞の活性化型c-Srcは脱落膜化に伴って核辺縁から細胞質へ分布が変化していた。培養子宮内膜間質細胞の免疫蛍光染色においても、活性化型c-Srcは非脱落膜化細胞の核辺縁に局在したが、脱落膜化により細胞質全体に分布した。

本研究は、in vitroおよびin vivo双方の子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程において、c-SrcがTyr530の脱リン酸化を通して活性化すること、ならびに活性化型c-Srcが核辺縁より細胞質全体へ局在変化することを明らかにした。以上より、c-Srcの活性化がヒト子宮内膜の脱落膜化過程に深く関与する可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

ヒト子宮内膜の脱落膜化は妊娠の成立・維持に必須である。子宮内膜間質細胞はestradiolおよびprogesteroneの存在下で脱落膜化し、多くの生理活性物質を産生するが、その分化過程で活性化される細胞内シグナル伝達経路については不明の点が多い。本研究では、c-Srcのキナーゼ活性上昇のメカニズムのひとつであるC末端近傍チロシン残基の脱リン酸化に着目し、in vitroに加えin vivoでの子宮内膜脱落膜化においても同様のメカニズムによりc-Srcチロシンキナーゼが活性化するか否かを検討し、同時に活性化型c-Srcの細胞内局在変化についても解析を行った。その結果、ヒト子宮内膜の脱落膜化においてc-SrcがTyr530の脱リン酸化を通じて活性化し、活性化型c-Srcの発現が増強すること、また、ヒト子宮内膜の脱落膜化において、活性化型c-Srcが核辺縁から細胞質全体に局在変化することを明らかにした。これにより、Tyr530の脱リン酸化によるc-Srcの活性化および活性化型c-Srcの細胞内局在変化が、ヒト子宮内膜の脱落膜化に深く関与することが示唆された。

審査ではまず、clone28を用いたウエスタンブロットの一部において、2つのバンドが認められることについて質問がなされた。これに対し複数の報告を引用しながら、分子量の小さい方のバンドは活性化型c-Srcの分解産物である可能性が高いとの説明がなされた。次に、子宮内膜脱落膜化におけるc-Srcの細胞内局在変化について、細胞質全体に分布するようになると核辺縁に局在していたものは消失するのか、という質問がなされた。これについては消失はしないものの減弱している可能性がある旨回答された。また、c-Src活性化と子宮内膜脱落膜化との因果関係の根拠について問われた。これに対しては、恒常的に活性化している癌遺伝子産物v-Srcが細胞の形質転換能を有するというこれまでの知見から考察すると、c-Srcの活性化がアクチンを基礎とした細胞骨格と接着斑形成を制御することを通じて脱落膜細胞特有の形態変化に寄与する可能性が考えられ、c-Src活性化は脱落膜化の要因に推定されると回答された。さらに、腺細胞と間質細胞の鑑別方法について質問がなされた。腺細胞のサイトケラチン染色と間質細胞のビメンチン染色で判定し、蛍光顕微鏡による判定でpurityは95%以上であると回答された。このほか、EGF刺激下での活性化型c-Srcの細胞内局在変化についても検討・補足すべきであると助言された。

以上のように、本研究はさらに検討すべき点はあるものの、子宮内膜の脱落膜化機構の一端を解明した点と細胞分化におけるc-Srcチロシンキナーゼの関与を明らかにした点で、生殖生理学・細胞生物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 産婦人科学 吉村 泰典  
産婦人科学 野澤 志朗 病理学 岡田 保典  
解剖学 相磯 貞和  
学力確認担当者: 北島 政樹、野澤 志朗  
審査委員長: 野澤 志朗

試問日: 平成15年7月15日

# ラット小腸粘膜上皮細胞における GRO/CINC-1とInterleukin-6の産生：脂肪酸による修飾

吉田 英雄

## 内容の要旨

小腸粘膜上皮細胞は食物の吸収のみならず、外界に対し最前線の生体防御を行い、異物や細菌への免疫応答を担っている。インターロイキン (IL) -6やIL-8を産生、放出し炎症や免疫に密接な関わり合いを持っている。また、食物から吸収される脂肪酸は、免疫担当細胞を活性化させることで免疫機能を修飾する。しかし、粘膜上皮細胞が脂肪に暴露されることによる免疫機能への影響はあまり知られていない。著者はこの点に着目し、ラット小腸粘膜上皮細胞 (IEC-6細胞) を使用し、*in vitro*モデルで研究を行った。長鎖脂肪酸投与により、IEC-6細胞から産生、放出されるIL-6やGRO/CINC-1 (rat IL-8) の変化を検討した。上皮細胞と腸管免疫担当細胞との相互反応を脂肪酸がいかに修飾するのかを解明する目的で、subconfluentの状態になったIEC-6細胞に各種長鎖脂肪酸 (オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸) または中鎖脂肪酸 (オクタノイン酸) を添加した。さらに腸管の炎症に関与しているサイトカインとしてIL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ を添加した。添加48時間後培養上清中のIL-6やGRO/CINC-1濃度をサンドイッチELISAで測定し、添加6時間後のIEC-6細胞中のIL-6やGRO/CINC-1 mRNAの発現をRT-PCR法で検討した。また、添加1及び3時間後のIEC-6細胞中のMAPK (mitogen-activated protein kinase) 活性をウエスタンブロットで検討した。培養上清中のIL-6やGRO/CINC-1濃度は、長鎖脂肪酸の添加群では非添加群に比較し、有意な上昇を認めたが、中鎖脂肪酸の投与群は非投与群と有意差は認められなかった。IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ の単独添加でもIL-6やGRO/CINC-1濃度は著明な上昇を示し、さらに長鎖脂肪酸を加えることで、より一層の上昇を示した。IEC-6細胞中のIL-6やGRO/CINC-1 mRNAの発現は長鎖脂肪酸の単独添加で増強を示し、IL-1 $\beta$ またはTGF- $\beta$ の単独添加でも増強を示した。脂肪酸とサイトカインを同時に添加することで、より一層の増強を示した。MAPKは長鎖脂肪酸添加1時間後では非添加群と有意差はなかったが、3時間後ではバンドの増強を認めた。

Phospholipase C、Protein kinase C、MAPK阻害薬を加え、GRO/CINC-1の変化を検討すると、その産生、分泌は有意に抑制された。しかし、calcium/calmodulin阻害薬では抑制されなかった。これらの結果から、長鎖脂肪酸は、小腸粘膜の炎症下において上皮細胞からの炎症性サイトカインの分泌を促進していることが考えられ、脂肪摂取と腸管の炎症性変化との間に密接な関係が示唆された。

## 論文審査の要旨

小腸粘膜上皮細胞は食物吸収と異物に対する生体防御を行っている。さらに、サイトカインを産生し、積極的に腸管免疫ネットワークにも関与している。一方、脂肪の消化吸収は免疫担当細胞の活性化を介して、腸管免疫に影響を与えることが想像される。しかし小腸粘膜上皮細胞が脂肪に暴露されることにより、どのように免疫機能に影響を与えるかはあまり知られていない。本研究では*in vitro*モデルを用いて、この点についての検討をおこなった。ラット小腸粘膜上皮細胞 (IEC-6) を実験に供した。長鎖脂肪酸の培養液中濃度が0.2mmol/Lを越えると傷害細胞数は急な増加を示した。長鎖脂肪酸、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1投与でGRO/CINC-1とIL-6のmRNA発現量と培養液中濃度は上昇を示した。さらに脂肪酸とサイトカイン (IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1) の同時投与は相乗効果が得られた。脂肪酸投与により上昇したGRO/CINC-1濃度はprotein kinase C (PKC) 阻害薬、phospholipase C (PLC) 阻害薬、MAPK阻害薬投与により大きく抑制された。MAPK活性は脂肪酸投与3時間後に有意な増強を認めた。結論として小腸粘膜上皮細胞は脂肪酸刺激下で、各種サイトカインの産生を増強し、粘膜免疫を修飾することが考えられた。またPKC、PLC、MAPKが活性化経路に関与することが示唆された。

審査ではまず、サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1) 単独投与に対する脂肪酸+サイトカイン同時投与のGRO/CINC-1濃度の上昇程度は、コントロールに対する脂肪酸単独投与の上昇程度に比べ大きいことが指摘され、その理由が求められた。それに対して、脂肪酸刺激がサイトカインによる細胞内シグナルを修飾する、サイトカイン受容体数を増加させる、親和性を高める等の作用が考えられるとの回答がなされた。ついで細胞内シグナル阻害薬の検討においては、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1刺激下での抑制効果もみるべきであったとの助言があった。また脂肪酸による細胞障害はどのような機序によるのかとの質問がなされた。これに対し、脂肪酸は細胞膜の不安定を引き起こすことが予想されるものの、今回の実験では、アポトーシス、ネクローシスの判定は行っていないとの回答がなされた。さらに0.2mmol/L以下の濃度でも細胞障害は起きていると考えるべきとの指摘がなされた。臨床応用への質疑がなされ、長鎖脂肪酸の摂取の抑制が腸管の炎症を抑制することにつながることで、サイトカインのコントロールが重要であるとの認識が確認された。しかし、同時に*in vitro*での培養液中脂肪酸濃度が*in vivo*での小腸内脂肪酸濃度とどのような関係にあるのか今後検討すべき問題点も指摘された。

以上より本研究には、今後、なお検討すべき課題が残るものの、小腸粘膜上皮細胞の免疫担当細胞としての役割と脂肪酸の修飾効果に新たな知見を与える研究として、消化器免疫学の分野において価値のある論文と評価された。

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  
学力確認担当者: 北島 政樹  
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成15年7月23日

# Intraportal perfusion of prostaglandin E<sub>1</sub> attenuates hepatic postischaemic microcirculatory impairments in rats.

(ProstaglandinE<sub>1</sub>門脈内投与によるラット肝虚血再灌流後の微小循環障害の改善)

岩田 憲治

## 内容の要旨

## 論文審査の要旨

(緒言) 肝移植の術後早期における肝機能不全(primary graft nonfunction (PGN) 発生の最大の要因は虚血再灌流障害であるとされる。この虚血再灌流障害のメカニズムとして、再灌流時の微小循環系における白血球・血管内皮の相互作用が重要な役割を演じているといわれているが、まだ不明な点も多い。一方、肝移植の臨床においては、prostaglandinE<sub>1</sub> (以下PGE<sub>1</sub>) が使用されているが、PGE<sub>1</sub>の肝細胞保護作用の機序に関しては十分明らかになってはいない。今回、門脈バイパス併設ラット全肝虚血再灌流における微小循環障害に対するPGE<sub>1</sub>の門脈内投与効果を、白血球・血管内皮の相互作用—特に白血球、接着分子(ICAM-1) に関して検討を加えた。

(方法) Wistar系雄性ラットを用いて脾臓を左側腹部皮下に固定し脾臓皮下固着モデルを作成し、4週間後門脈バイパスが完成した後、60分全肝虚血再灌流実験を行った。遮断中に門脈より灌流を行い、その操作により単クランプ群、乳酸化リングル灌流群、PGE<sub>1</sub>灌流群(0.1μg/kg/minで持続的に投与)の3群に分け、遮断解除後生体顕微鏡下にラットの肝微小循環を観察した。蛍光色素のcarboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) およびpropidium iodide (PI) を用いて白血球および障害細胞を染色し、肝類洞壁および終末肝細静脈への白血球膠着数、白血球速度、灌流類洞率、障害細胞数を3群間で比較検討した。また、再灌流後に肝を摘出し、抗ラットICAM-1抗体(1A29)を用いて肝免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡にて肝類洞壁上のICAM-1の発現を観察し、3群間で比較検討した。

(結果) PGE<sub>1</sub>投与群では再灌流後の肝類洞壁および終末肝細静脈への白血球膠着が減少し、白血球速度および灌流類洞率が改善し、PI陽性細胞が減少した。また再灌流60分後においてICAM-1が肝類洞壁に発現していたが、PGE<sub>1</sub>投与群では発現が抑制された。

(考察) 肝虚血再灌流障害の機序にはサイトカインの産生とそれに続く微小循環障害が重要な役割をしているとされ、Kupffer細胞からのサイトカインの産生をPGE<sub>1</sub>が抑制するという報告、再灌流後の好中球の活性酸素産生がIL-1によりup-regulateされているという報告、サイトカインがICAM-1 mRNAをup-regulateするという報告がある。今回の結果から肝類洞壁、終末肝細静脈での白血球膠着はPGE<sub>1</sub>により直接的に、またはICAM-1の発現を抑制することにより間接的に減少し、再灌流後の微小循環障害が軽減されると考えられた。

(結論) 肝虚血再灌流にともなう微小循環障害および肝細胞障害は、PGE<sub>1</sub>投与により軽減したが、その機序として、活性酸素、接着分子の発現を介した、白血球・血管内皮相互反応の制御が示唆された。

本研究はラット60分全肝虚血モデルにおいて、遮断中に門脈からプロスタグランジンE<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) を0.1μg/kg/hrで持続的に投与し、肝虚血再灌流後の微小循環障害に対するPGE<sub>1</sub>の効果を、生体顕微鏡による白血球ならびに障害細胞の観察および肝免疫組織化学染色によるICAM-1の発現の観察により検討を加えたものである。

今回の研究では、遮断中のPGE<sub>1</sub>の門脈内投与により、肝虚血再灌流後、肝類洞壁および終末細静脈への白血球膠着が減少し、白血球速度および灌流類洞率が改善し、PI陽性細胞数が減少した。また、再灌流後の血管内皮の接着分子ICAM-1の発現が抑制された。このことから、肝虚血再灌流後の微小循環障害は、遮断中のPGE<sub>1</sub>の門脈内投与により軽減し、その機序として白血球、ICAM-1の発現を介した白血球・血管内皮相互反応の制御が示唆された。

審査では、まず、肝虚血再灌流後の腸管うっ血を防ぐために、門脈バイパス作成の工夫を行い、モデルとして脾臓皮下固着ラットを用いた点が良いとされた。その上で、肝類洞壁および終末細静脈への白血球膠着に対するPGE<sub>1</sub>の抑制機序に関して質問があった。これに対し、白血球側の接着分子であるLFA-1とICAM-1に対するPGE<sub>1</sub>の効果を比較した文献によりPGE<sub>1</sub>がICAM-1の発現のみを抑制したとしており、PGE<sub>1</sub>は血管内皮側のICAM-1の発現を抑制することにより白血球の膠着を抑えたと考えられるとの説明があった。また、白血球に関して、その変形能、弾力性に対するPGE<sub>1</sub>の効果のさらなる検討が望ましいとの指摘があった。PI陽性障害細胞に関しては、小葉内の分布zonationの問題が質問された。これに対し、zone 2-3ではその分布が明らかであったが、zone 1に関しては明らかでなく、その理由として、生体顕微鏡による肝表面からの観察は門脈域の観察が困難であり、HE染色標本による切除断面の所見との比較が必要ではないかとの説明があった。また、PI陽性障害細胞とは肝細胞なのか、あるいは他の細胞も含まれるのかを検討すべきとの指摘があった。さらに、白血球の膠着した部位と細胞障害部位が異なる点に関して質問され、類洞血流の途絶した領域にも障害細胞が存在するためとの説明があったが、サイトカインなどの直接的な細胞障害の可能性もあり、さらなる検討を要するとされた。図の記載に若干の不備が指摘された。肝免疫組織化学染色によるICAM-1の発現に関しては、PGE<sub>1</sub>投与後、再灌流後のICAM-1のタンパク量の変化をWestern blot法などで経時的定量的に評価するのが望ましいとされた。また、ICAM-1の肝小葉内における発現部位の検討も必要ではとの指摘もうけた。以上本研究はいくつかの検討されるべき点はあるものの、PGE<sub>1</sub>門脈内投与による肝虚血再灌流後の微小循環障害軽減の機序として白血球、ICAM-1の発現を介した白血球・血管内皮相互反応の制御を示した点で有意義な論文とされた。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
内科学 石井 裕正 医化学 末松 誠  
病理学 岡田 保典  
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7月26日

# INDUCTION OF INDEFINITE SURVIVAL OF FULLY ALLOGENEIC CARDIAC GRAFTS AND GENERATION OF REGULATORY CELLS BY INTRATRACHEAL DELIVERY OF ALLOANTIGENS UNDER BLOCKADE OF THE CD40 PATHWAY.

(マウス心移植実験におけるアロ抗原経気管投与とCD40経路の遮断による免疫寛容の誘導)

内田 智夫

## 内容の要旨

臓器移植における拒絶反応の抑制には、副作用のない特異的な免疫寛容を得る方法が理想である。拒絶反応にはT細胞の活性化が必要で、これにはMHC class IIによる抗原提示のほかに共刺激シグナルのひとつであるCD40/CD40 ligand (CD40L) 経路が重要な役割をしていると考えられている。一方、従来より、アロ抗原の経口投与による免疫寛容の誘導が知られているが、経気管投与による研究はほとんど認められない。本研究は、マウスの異所性心移植実験において、アロ抗原の経気管投与と抗CD40L抗体の併用による、移植心生着の延長効果を検討することを目的とした。

生後8~12週の雄性マウスC57BL/10 (H2b)、CBA (H2k)、BALB/c (H2d) を使用した。C57BL/10から取り出した心臓の上行大動脈、肺動脈をそれぞれ、CBAの腹部大動脈と下大静脈に顕微鏡下に端吻吻合し、移植心の生着状態を触診で判定した。無処置では移植心は7日で拒絶された (n=5)。移植7日前にCBAにC57BL/10の脾細胞液を気管内投与すると、移植心のmedian survival time (MST) は74日に延長した。マウスCD40Lに対するハムスターmAbであるMR-1を移植7日前にCBAに腹腔内投与するとMSTは54日であった。脾細胞液の気管内投与とMR-1を併用すると、MSTは200日以上と著明に延長した。さらにそのCBAマウスにC57BL/10とBALB/cの皮膚移植を同時に行ったところ、移植皮膚のMSTはC57BL/10が>60日、BALB/cが14日で、有意にC57BL/10が延長しており、operational toleranceが得られたことが確認された。移植心の病理標本では200日以上経過しても白血球の浸潤は軽度で、冠動脈の内膜肥厚は認められなかった。前処置後7日経過したCBAマウスを犠牲死させ、その脾細胞液を新たに別のCBAマウスの尾静脈より注入するtransferモデルでも、移植心の生着延長効果があり、7日間という短期間でregulatory cellが誘導されることが確認された。脾細胞の代わりにアロ抗原としてK<sup>b</sup> peptideを経気管投与した場合でも、移植心の長期生着が得られた。CBAとC57BL/10のリンパ球混合試験では、コントロールに比較して前処置した群で有意に増殖が抑制された。前処置により培養液中のIL-4、IL-10は変化せず、IL-2、IFN- $\gamma$  が低値を示し、Th1細胞の抑制を介した機序が示唆された。

我々の実験における免疫寛容の誘導には、bronchus associated lymphoid tissue (BALT) が関与していると推測される。粘膜免疫の機序の解明にかかわる興味ある結果であり、また臓器移植の臨床に応用できる可能性がある。

## 論文審査の要旨

移植免疫に関して経口免疫寛容を応用した研究は多いが、経気管免疫寛容に着目した研究はほとんど認められない。本研究では、マウスの心移植実験モデルにおいて、donorの脾細胞を経気管投与することによりdonor specificに免疫寛容が誘導されることが発見された。さらに抗原提示細胞とT細胞間の共刺激シグナルであるCD40ligandに対する抗体を併用すると、移植心の著明な生着延長が得られた。脾細胞の代わりにK<sup>b</sup> peptideを用いても同様の効果が得られアロ抗原の間接認識を支持する結果であった。またtransferモデルでも免疫寛容が誘導され、regulatory cellの存在が確認できた。

審査ではまず、脾細胞の経気管投与により免疫寛容が得られるメカニズムについて質問があった。蛍光色素で標識した脾細胞の追跡では、気管リンパ節や脾臓には全く集積せず、蛍光ビーズの投与実験では主に肺のマクロファージと樹状細胞に取り込まれることより、経気管投与した脾細胞はすぐに分解されてそのpeptideがBALT内の抗原提示細胞により処理される機序が考えられると説明された。さらに経静脈投与や経口投与ではMSTが14日程度にしかならず、投与経路が重要であると補足があった。また、K<sup>b</sup> peptideの投与だけでD<sup>b</sup>など他のMHCの反応がなぜ抑制されるのかとの質問があり、linked suppressionが考えられると回答された。Regulatory cellは主にどの分画かとの質問に対して、別の実験結果よりCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、樹状細胞が有力候補であるとの推論が述べられた。さらにCD80、CD86、CTLA4経路を抗体によりブロックすると経気管投与による免疫寛容が抑制されると報告されているが、CD40、CD40ligand経路の遮断と効果が異なる理由について質問された。他の動物移植モデルでは両経路を同時に遮断して初めて拒絶反応が抑制されるという報告もあり、まだ不明な点が多いと説明があった。拒絶された場合の所見は前処置により違いがあるのかとの質問があり、HE染色による病理検査しか行っていないが、明らかな差はなく、一般にリンパ球の浸潤と冠動脈の肥厚が認められると回答された。経気管投与とMR1の併用でのみIFN $\gamma$ が抑制される理由について質問があったが、Th1の抑制が推測されるが、細胞相互の作用は不明な点が多いと説明された。また、ELISA法についてBrdUを用いた測定であると確認がなされた。

なお、移植心の循環動態について質問があり、冠動脈から冠静脈、さらに右心房、右心室へ血液が還流し、心拍出量は少量であると回答された。また移植心の機能評価としてエコーやECGによるより客観的な判定が望ましいとの助言があった。

一連の実験は移植免疫に関してきわめて興味のある結果を示しており、さらに発展した研究が期待されると高く評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹  
外科学 四津 良平 微生物学 小安 重夫  
微生物学 石川 博通  
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7月17日

# マウス慢性大腸炎モデルの開発とCD4アナログによる粘膜内CD4陽性細胞を標的とした新たな免疫統御療法の検討

岡 本 晋

## 内容の要旨

クローン病は消化管に慢性的な炎症を生じる原因不明の疾患であるが、その特徴として病変部組織において活性化したT細胞や単球/マクロファージが著明に浸潤していることが挙げられる。当教室では、クローン病患者の回腸末端の病変部位においてT cell receptor (TCR) Vβ5.2/5.3を発現するCD4陽性細胞が特異的に活性化されていることを見出し、さらにラット慢性大腸炎モデルにおける抗CD4抗体の炎症抑制効果を報告した。抗CD4抗体は実際にクローン病患者において臨床治療が行われているが、ヒトにおける使用はCD4陽性細胞を高度に減少させAIDS様の免疫不全状態を引き起こす場合があり、投与量や投与方法が大きく制限され大きな成果があがっていない。本研究ではCD4陽性細胞を標的としたクローン病の新しい免疫統御療法の開発を目的とし、マウスCD4分子V1ドメインのCDR3領域のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドであるCD4アナログを動物モデルに投与し、その慢性大腸炎抑制効果を検討した。

まず、当教室で開発したラットTNB免疫大腸炎をマウスに応用し、再現性の高いマウス大腸炎モデルを作成した。炎症惹起後1週間以内に57%が死亡し、生存マウスの摘出大腸標本では肉眼的に著明な発赤・充血、深い潰瘍形成が認められた。組織学的には結腸と直腸全域にわたるびらん、粘膜下層・固有筋層における炎症性細胞浸潤が認められ、炎症が貫壁性の部位も非連続性に認められた。免疫組織学的検討では浸潤細胞はCD4陽性細胞が優位であり、RT-PCR法によるサイトカイン産生パターンの検討では、IFN-γ、TNF-αとも著明な発現増加が認められた。また炎症惹起後6週の大腸組織においても炎症像は持続し慢性の経過をたどることが示唆された。これらの所見はヒト炎症性腸疾患、なかでもクローン病に類似するものと考えられた。

一方、CD4アナログ投与群では死亡率は16%に減少し、肉眼的・組織学的にも炎症は著明に抑制され、炎症性サイトカインのmRNAの発現も低下していた。大腸LPLにおけるCD4陽性細胞のサブセットをフローサイトメトリー法にて検討した結果、大腸炎群ではCD45RB<sup>+</sup>細胞の割合が上昇しているのに対し、CD4アナログ投与群ではこの上昇がみられず、無処置対照マウスと同様CD45RB<sup>+</sup>細胞が優位であった。一方、抗CD4抗体投与群ではCD4アナログ投与群とほぼ同様の炎症抑制効果を示したが、CD4陽性細胞のサブセットの検討ではCD45RB<sup>+</sup>細胞が完全に消失しており、CD4アナログとは異なる機序にて炎症を抑制していることが示唆された。

以上より、CD4アナログはクローン病におけるCD4陽性細胞を標的とした免疫統御療法において、抗CD4抗体に代わる新しい治療法として有用である可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

クローン病の発症機序には粘膜内CD4陽性細胞が重要な役割を果たしている。本研究ではCD4陽性細胞を標的とした新たな治療の開発を目的とし、新たに作製したマウスTNB免疫大腸炎モデルにおいてCD4分子のmimicであるCD4アナログを投与し、その大腸炎抑制効果を従来の抗CD4抗体の効果と比較検討した。TNB免疫大腸炎群では炎症粘膜組織内の著明なCD4陽性細胞の浸潤とIFN-γ、TNF-αの発現増加が認められ、57%のマウスが死亡した。これに対しCD4アナログ投与群では死亡率は減少し、肉眼的・組織学的にも炎症は著明に抑制され、炎症性サイトカインの発現も低下していた。大腸粘膜内CD4陽性細胞のサブセットの検討では、大腸炎群ではCD45RB<sup>+</sup>細胞の割合が上昇しているのに対し、CD4アナログ投与群ではこの上昇がみられず、無処置対照マウスと同様CD45RB<sup>+</sup>細胞が優位であった。一方、抗CD4抗体投与群ではCD4アナログとほぼ同様の炎症抑制効果を示したが、CD45RB<sup>+</sup>細胞が完全に消失しており、CD4アナログとは異なる機序にて炎症を抑制していることが示唆された。

審査ではまずTNB免疫大腸炎の腸炎発症機序が明確でないとの指摘があり、上昇した抗TNF抗体によるADCCが関与していないかが問題となった。過去の報告からもTNBはTh1型CD4陽性細胞による遅延型過敏反応を引き起こすハプテンであり、本実験においても同様の機序が推測されるが詳細な検討は行っていないと回答された。機序の解明には大腸炎マウス由来CD4陽性細胞のtransferの実験が有用であるとの助言がなされた。つぎにTNB免疫大腸炎とヒトクローン病の病理所見の類似性につき質問がなされ、病変の形態にはマウスの個体差も大きく典型例以外ではびまん性にびらん主体の炎症を持つマウスも見られたが、Th1型CD4陽性細胞が主体をなす炎症であるという機序を考え合わせクローン病のモデルとなりうると回答された。つぎにCD4アナログの炎症抑制機序につき質問がなされ、メモリー・エフェクター細胞上のCD4分子とTCR complexあるいはCD45分子との会合を阻害する機序が推測されているものの詳細は不明であり、今後の検討課題であると回答された。さらに粘膜内CD4陽性細胞を標的としたクローン病治療の現状につき質問がなされ、全身のCD4陽性細胞の減少という副反応が問題となっているが抗原認識部位の異なるヒト化抗体が新たに作成され、欧米では臨床治療が進行中であると回答された。

以上、本研究にはなお検討すべき点が残るものの、クローン病の発症機序における粘膜内CD4陽性細胞の重要性を示し、CD4陽性細胞を標的とした新たな免疫療法開発の可能性を示唆した点に意義があり、消化器病学および臨床免疫学の分野において価値のある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正  
外科学 北島 政樹 微生物学 石川 博通  
微生物学 小安 重夫  
学力確認担当者: 北島 政樹  
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成15年9月6日

# アデノウイルスベクターを用いた疑核へのGDNF遺伝子導入による 運動ニューロン脱落防止効果の検討

齋藤 康一郎

## 内容の要旨

反回神経麻痺患者は、嗄声、嚥下障害、呼吸困難といった症状に悩まされる。現状では静的に声帯位を変える術式が主体で、これは発声、嚥下、呼吸すべての機能を理想的に回復させる術式とはいえない。声帯の再運動化ができれば問題を解決できると考えられるが、神経吻合術は術後の声門閉鎖筋と開大筋の過誤支配などの問題のため安定した術式とは認められていない。声帯再運動化が成功していない原因の一つとして疑核運動ニューロンの脱落が関与していると考えられる。本研究では非増殖型アデノウイルスベクターを用いて神経栄養因子の一つであるglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 遺伝子を迷走神経損傷後の疑核に導入し、その効果について検討した。さらに、損傷された運動ニューロンで誘導されるnitric oxide synthase (NOS) および、神経損傷後速やかに免疫反応性が減弱するcholine acetyltransferase (ChAT) に関してもGDNF遺伝子導入の効果を検討した。

12週齢の雄Sprague Dawleyラットの左迷走神経を頸静脈孔にて抜去して疑核運動ニューロン脱落誘発モデルを作製し、ヒトGDNFcDNAあるいは $\beta$ -galactosidase遺伝子を組み込んだ非増殖型組み換えアデノウイルスベクター（順にAxCAhGDNF、AxCALacZ）およびphosphate buffered saline (PBS) を頸静脈孔より投与した。AxCALacZ投与群では、X-gal酵素組織染色により処置側疑核運動ニューロンが明瞭にラベルされた。AxCAhGDNF投与群では、同ニューロンがGDNF免疫染色で明瞭に染色され、RT-PCRにより処置側脳幹組織からヒトGDNF mRNAの発現を認めた。処置後2週と4週の時点で脳幹パラフィン切片にトルイジンブルー染色を行い、左右の疑核運動ニューロンを算定して検討したところ、2週、4週とも、AxCAhGDNF投与群では他の二群に比べ、有意に運動ニューロンの脱落が防止されていた。さらにAxCAhGDNF投与により、処置側疑核でのNOS活性誘導の抑制、ChAT免疫反応性の改善を認めた。

本研究により、非増殖型アデノウイルスベクターを用い、迷走神経抜去断端から逆行性軸索輸送にのせて、疑核に遺伝子を導入、発現させることが可能であることが示された。またAxCAhGDNFの投与には、迷走神経抜去による疑核運動ニューロンの脱落を防止し、保護する効果があることが示された。将来的に、迷走神経・反回神経が損傷された症例に対して遺伝子導入を行い、疑核運動ニューロンの脱落を防止する治療を行えるようになる可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

反回神経・迷走神経損傷後の疑核運動ニューロンの脱落は、反回神経麻痺治療として理想的な声帯の再運動化不成功の原因の一つと考えられる。そこで本研究ではラット迷走神経抜去による疑核運動ニューロン脱落誘発モデルを用い、非増殖型アデノウイルスベクターによるglial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) 遺伝子導入の運動ニューロン脱落防止効果を検討した。方法として、X-gal酵素組織染色、GDNF及びChATに対する免疫染色、hGDNFに対するRT-PCR、疑核運動ニューロンの算定及びNADPH diaphorase酵素組織染色を用いた。その結果、GDNF遺伝子の疑核への選択的導入による疑核運動ニューロンの脱落防止・保護効果を認めた。

審査では、まずアデノウイルス-GDNF系の選択について、神経系への導入効率が高いAAVベクターや、運動ニューロンに対する神経保護効果が高いHGFの利用も、今後は検討していく必要があると助言があった。また、蛋白の直接投与でも投与方法によっては有効であるとコメントされた。さらに、GDNFのレセプターに対する理解を問われ、疑核を含む運動神経核で胎生期に発現し、顔面神経核でも神経損傷後に誘導されるGDNF- $\alpha$ 及びRetの関与が推測されると回答した。これに対し、GDNFのレセプターとしてNCAMも働いていること、疑核でのこれらレセプターの誘導及びGDNFの作用機序についても今後は研究を進める必要があると指摘があった。また、X-gal酵素組織染色陽性細胞の割合について質問がなされた。今回は導入効率の詳細な検討は行わなかったが、発現したGDNFはautocrineだけでなくparacrineでも奏功すると考えられ、また細胞数としての導入効率だけでなく、プロモーターの強さなど総合的に効果を高める研究を進める必要があると回答した。ウイルス排除の反応の有無についての質問に対しては、少なくとも4週までトルイジンブルー染色による切片を検討した結果では、明らかな炎症細胞浸潤や脳軟化の所見は認めなかったと回答した。これに対し、臨床応用に際しては重要なポイントであり、今後長期的にも詳細な検討が必要であろうとコメントされた。また、本モデルの反回神経麻痺モデルとしての妥当性が問われ、反回神経麻痺の病態とは異なるが、本研究では確実な脱落を誘発するため神経抜去モデルを用いたと回答した。また、今後さらに長期的に、強力に効果を期待できる方法について問われ、ベクターの種類だけでなく、免疫抑制剤の併用や複数のneurotrophic factorの同時導入など検討していく必要があると回答した。

以上、本研究は今後改善、追加すべき点があるものの、反回神経麻痺に対する新しい治療法を確立するための重要な研究であり、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  
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之  
外科学 河瀬 斌  
学力確認担当者：北島 政樹、仲嶋 一範  
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成15年9月17日

# 高血圧自然発症ラットにおける腎交感神経活動と血圧 および腎血流量の関係に関する研究

佐 方 克 史

## 内容の要旨

腎交感神経活動 (RSNA) は腎循環・腎機能を巧みに調節しており、RSNAの亢進は体液量増大と総末梢血管抵抗の増加を招き高血圧をもたらす。そこでRSNAの微細な変化が血圧および腎血流量をどう調節しているか、その相関関係をスペクトル解析と伝達関数を用いて正常血圧ラット (WKY) と高血圧自然発症ラット (SHR) で比較検討した。また高血圧において、循環調節の線形性と非線形性が正常血圧と比べてどう変化しているかは明らかではない。一般に心拍変動や脳波などの非線形性が低下し複雑さが失われると、重症不整脈やけいれんが生じることが知られている。そこで非線形解析である相互情報量を用いて、神経性循環調節の線形性と非線形性がWKYとSHRでどのように異なるかを比較検討した。

(対象と方法) 15週齢の雄のWKYとSHRを用い、血圧、心拍数の他に同側のRSNAと腎血流量をステンレスワイヤー電極と超音波パルスドップラープローブにより無麻酔状態で同時記録し、2000Hzで6分30秒以上A/D変換器に取り込んだ。得られたデータを線形解析であるスペクトル解析により分析し、さらにRSNAと血圧およびRSNAと腎血流量の伝達関数 (コヒーレンス、ゲイン) を求めた。また非線形解析である相互情報量を用いて、RSNAと血圧および腎血流量の相関関係と2変量間の方向性も検討した。

(結果と考察) RSNAと血圧はSHRの方がWKYより有意に大きく、一方腎血流量は両群で差がなかった。スペクトル解析によりRSNAのピークは、0.05、0.80、1-2、6-8Hzでみられ、RSNAの1.00Hz以下の低周波成分 (特に0.05Hzと0.80Hz) が血圧および腎血流量の変動と高い相関性 (コヒーレンス) を示した。SHRではWKYと比べ、RSNAと血圧および腎血流量との伝達関数のコヒーレンス (線形性) が高く、逆にゲインは小さかった。さらに伝達関数と相互情報量を組み合わせることにより、SHRではRSNAと血圧および腎血流量の相関の線形性がWKYと比較して亢進し、非線形性は低下していることを示した。また0.10Hz未満においては、RSNAが血圧および腎血流量に先行するという圧受容器反射にとらわれない制御系を見出した。

以上の結果から、RSNAの低周波成分 (特に0.05Hzと0.80Hz) が血圧および腎血流量の変動に重要で、SHRでは血圧および腎血流量は交感神経系により大きく線形に依存しており、一方WKYは非線形性が高い、つまりより多くのシステムが作動して柔軟な調節を行っていることが示唆された。また0.10Hz未満においては、RSNAが血圧および腎血流量に先行しており、低周波領域における循環制御のリズムには中枢神経系由来の交感神経活動が関与していることが推測された。

## 論文審査の要旨

腎交感神経活動 (RSNA) は、腎血行動態に密接に関係し、血圧調節にきわめて重要な役割を果たしている。このようなRSNAの微細な変化が血圧および腎血流量の調節にどのように影響してくるのかより詳細に知るため、その相関関係をスペクトル解析と伝達関数を用い、15週齢のウイスター京都ラット (WKY) と高血圧自然発症ラット (SHR) で比較検討した。

その結果、SHRでは高血圧にも関わらずRSNAはWKYより大きく、腎血流量には差がないこと、スペクトル解析によりRSNAのピークは、WKY、SHRとも0.05、0.80、1~2、6~8Hzでみられ、パワー値は、0.80HzにおいてSHRがWKYに比し著明に大きいことを明らかにした。またRSNAの1.00Hz以下の低周波成分 (特に0.05Hzと0.80Hz) が血圧および腎血流量の変動と高い相関性を示した。SHRではWKYに比し、RSNAと血圧および腎血流量との相関性 (線形性) が高く、非線形性は低下していることが明らかにされた。さらに0.10Hz未満では、RSNAが血圧および腎血流量に先行するという圧受容器反射にとらわれない制御系を見出した。なおこのようなSHRとWKYとの差は、l-arginine投与実験においてSHRで亢進しているRSNAは有意に抑制され、RSNAと血圧および腎血流量との相関性も有意に低くなったことから、一酸化窒素 (NO) の変化が関与している可能性を示唆した。

以上の研究に関してまず問題となったことは、15週齢のWKYとSHRを用いたことである。15週齢のSHRでは血圧がかなり高く、その影響を受けて心肥大等の器質的変化が生じているため、心臓の変化がRSNAの変化に影響している可能性があると考えられた。それゆえ、血圧上昇が軽度の6~7週齢のSHRでも検討されるとよかったとされたが、この週齢での検討は技術的に実験が困難であるため、15週齢のラットでしか実験ができなかったとされた。今回の成績がSHRに特有な変化かどうかとも問題となったが、Dahl食塩感受性高血圧ラットにおいても類似した変化がみられたとされた。

次に今回の研究は、RSNAと血圧および腎血流量との相関をみているが、RSNAが刺激された場合に放出されるノルアドレナリンまたはレニン・アンジオテンシン系の変化も合わせて検討されるべきであったと助言された。また腎内における交感神経の $\alpha$ および $\beta$ 受容体の変化、さらに受容体後の伝達機構に関しても検討されればよかったと付言された。

このほかSHRにおけるRSNAの亢進およびRSNAと血圧や腎血流量との相関性がWKYに比し高かった原因として、l-arginineの注入実験により、その抑制がみられたことから、NOの変化が重要な役割を果たしているとしたが、その関与の詳細について論文中で十分考察すべきとされた。このほか論文の考察の書き方に問題点も指摘されたが、腎交感神経活動が先行して血圧および腎血流量の変化が生じることを明瞭にした点等で、腎と血圧調節の領域に大きく貢献す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  
泌尿器科学 村井 勝 内科学 小川 聡  
生理学 岡野 栄之  
学力確認担当者: 北島 政樹、村井 勝  
審査委員長: 村井 勝

試問日:平成15年7月22日



# 培養アストロサイトにおけるc-Metの産生と分泌性因子によるその調節

島 崎 賢 仁

## 内容の要旨

c-met癌原遺伝子産物であるc-Metは、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor ; HGF) の細胞膜表面受容体である。HGFは種々の細胞に対して、mitogen, motogen, morphogenとして作用する。ヒト脳組織において、腫瘍性または反応性アストロサイトはc-Metを発現し、正常アストロサイトはこれを発現していない。これより、c-Metは腫瘍進展過程または神経再生過程においてニューロン-グリアまたはグリア-グリア間の重要なmediatorであると示唆される。アストロサイトは特有の神経栄養効果を持ち、脳損傷時に損傷部位に供給されるfibroblast growth factor (FGF), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などの種々のサイトカインは、アストロサイトからの神経栄養因子の産生を刺激し、アストロサイトが持つ神経栄養効果を増強する。これらサイトカインで活性化されたアストロサイトは損傷されたニューロンの生存を支持し、損傷された神経回路網の再構築を促進すると考えられている。

中枢神経系の再生過程におけるc-Metの役割を明らかにするため、FGF, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ などのサイトカインにて刺激したラット培養アストロサイトにおけるc-Metの発現を、免疫蛍光二重染色、Western blot法、RT-PCRにて検討し、以下の結果を得た。

1. 免疫蛍光二重染色による検討により、培養アストロサイトにおいてc-Metの発現が認められた。c-Metの発現パターンや細胞内局在はサイトカインにより影響を受けないことが示された。
2. Western blot法による検討により、培養アストロサイトは145および170kD isoformのc-Metを発現していることが明らかにされた。170kD isoformの発現はaFGF, bFGFにより有意に増強され、HGFにより有意に減弱されることが認められた。
3. 免疫蛍光二重染色とWestern blot法の結果より、サイトカインにより発現の調節を受けたのは、c-Metの前駆体170kD isoformであることが明らかにされた。
4. RT-PCRによる検討により、培養アストロサイトにおけるc-met mRNAの発現が明らかにされた。aFGF, bFGF, HGFはc-met mRNAの発現を有意に増強させた。

以上より、培養アストロサイトにおいて発現が認められたc-Metは、サイトカインにより発現の調節を受けることにより、HGFに対する感受性をup-regulateされることが示唆された。HGFによりc-Metのシグナル伝達経路が活性化されることで、アストロサイトの持つ神経栄養効果が増強する可能性があり、c-Metが中枢神経系の再生過程に関与していることが示唆された。

## 論文審査の要旨

c-met癌原遺伝子産物であるc-Metは、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor ; HGF) の細胞膜表面受容体である。ヒト脳組織において、腫瘍性または反応性アストロサイトはc-Metを産生する。これより、c-Metは腫瘍進展過程または神経再生過程において重要なmediatorであると示唆される。アストロサイトは特有の神経栄養効果を持ち、脳損傷部位に供給される種々の分泌性因子は、アストロサイトからの神経栄養因子の産生を刺激し、神経栄養効果を増強する。本研究では、中枢神経系の再生過程におけるc-Metの役割を明らかにするため、種々の分泌性因子にて刺激したラット培養アストロサイトにおけるc-Metの産生を検討した。免疫蛍光二重染色により、培養アストロサイトにおいてc-Metの産生が認められた。Western blot法により、145および170kD isoformのc-Metの産生が示された。170kD isoformの産生はfibroblast growth factor (FGF) により有意に増強され、HGFにより有意に減弱された。RT-PCRにより、FGF, HGFによりc-met mRNAの産生が有意に増強されることが示された。以上より、培養アストロサイトにおいて産生が認められたc-Metは、分泌性因子により産生の調節を受けることにより、HGFに対する反応性を増強されることが示唆された。

審査では、170kD isoformは前駆体蛋白かalternatively spliced isoformかについて質問がなされた。免疫蛍光二重染色により培養アストロサイトにおけるc-Metの染色パターンは種々の分泌性因子により影響を受けないことが示され、検出されたc-Metの細胞内局在は細胞膜上で変化しないのではないかと考えられたため、170kD isoformは前駆体蛋白である可能性があるかと回答がなされた。これに対し、細胞外ドメインの違いを認識する抗体を使った免疫染色やWestern blotting、細胞内局在について共焦点レーザー蛍光顕微鏡等を用いた厳密な解析などの検討を要するとの指摘がなされた。さらに、HGFによりアストロサイトにおけるc-met mRNAとc-Met蛋白の産生が相反する反応を示したことについて質問がなされた。HGFによる刺激3時間後でのmRNA産生の増強は初期の転写の増強を、48時間後でのc-Met前駆体の可能性のある170kD isoform産生の減弱は後期の蛋白合成の抑制を見ている可能性があるかと回答がなされた。これに対し、RT-PCR, Western blottingにより分泌性因子刺激後3時間~48時間でのmRNAおよび蛋白双方の産生量の検討を要するとの指摘がなされた。

以上、本研究はさらに検討されるべき課題は残しているものの、培養アストロサイトにおいて産生が認められたc-Metは、分泌性因子により産生の調節を受けることを初めて明らかにした点で有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 河瀬 斌  
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之  
小児科学 高橋 孝雄  
学力確認担当者：北島 政樹、仲嶋 一範  
審査委員長：仲嶋 一範

試問日：平成15年7月2日

# Gait Analysis of Patients With Neurogenic Intermittent Claudication.

(神経性間欠跛行の歩行分析)

須田 義朗

## 内容の要旨

神経性間欠跛行の病態や治療法に関する報告は多いが、その歩容異常に関する報告は殆どない。本研究では大型床反力計を用いた歩行分析を手術前後に行い、神経性間欠跛行の歩容異常の解析と手術療法による改善度を検討した。また、それらが神経障害型式によって異なるか否かを検討した。

対象は手術的治療を行った腰部脊柱管狭窄症患者60例である。その内訳は、神経根型35例(男性19例、女性16例、平均年齢63.7歳)、馬尾型25例(男性16例、女性9例、平均年齢66.1歳)で、全例に後方からの除圧術を行い、神経根型の12例、馬尾型の9例に固定を加えた。手術から術後歩行分析までの期間は、それぞれ平均9.7ヵ月、7.6ヵ月であった。また、健常者50例(男性26例、女性24例、平均年齢64.4歳)を対照群とした。

これらの症例に大型床反力計を用いた多数歩連続自由歩行計測を行った。術前計測は安静後に初回計測を行い、続いて歩行不能となる直前まで歩行負荷を与え、2回目の計測を行った。術後計測は安静後に初回計測を行い、術前歩行可能距離と同じ歩行負荷を与えた後に2回目の計測を行った。それぞれの計測にて、時間距離因子(歩速、歩幅、歩隔、歩調)および山崎の定義による歩容因子(対称性、再現性、円滑性、動揺性、リズム性、衝撃性)の評価指数を算出した。

術前歩行負荷前の時間距離因子では、馬尾型の歩速、歩調が有意に低下していた。歩容因子では、神経根型、馬尾型共に前後、左右、上下方向の動揺性、前後方向の対称性、円滑性の指数が異常を示し、前後方向のリズム性、衝撃性、上下方向の対称性の指数は神経根型でのみ異常を示した。上下方向の円滑性、リズム性の指数は馬尾型で異常を示した。歩行負荷前後での比較では、神経根型で歩幅の低下、前後、左右方向の対称性の悪化を認め、馬尾型では上下方向のリズム性の悪化を認めた。術後は、時間距離因子、歩容因子共に改善が認められ、神経根型で特に著しい改善がみられた。

術前歩行負荷前の歩行分析の結果から、自覚症状の乏しい歩行開始時点で各種の歩容異常が存在し、神経障害型式によって異常のパターンが異なることが示された。これは、静的な圧迫によってすでに神経根や馬尾の機能障害を生じている可能性や患者自身が症状のにくい歩行を体得している可能性が考えられる。また、歩行負荷によって悪化する歩容因子も両者で異なっていた。手術的治療によって、殆どの歩容因子の異常は正常化し、歩行負荷による悪化も消失した。特に神経根型の症例で改善が顕著であり、臨床症状の改善度と相関していた。

大型床反力計による歩行分析は腰部脊柱管狭窄症患者の歩行の特徴を客観的、定量的に評価することができ、また手術による治療効果の評価にも有用であった。

## 論文審査の要旨

神経性間欠跛行の病態や治療法に関する報告は多いが、その歩容異常に関する詳細な報告はない。本研究では大型床反力計を用いた歩行分析を間欠跛行を有する腰部脊柱管狭窄症患者の手術前後に行い、同疾患の歩容異常の解析と手術療法による改善度を検討した。また、それらが神経障害型式によって如何に異なるかを検討した。

対象は手術的治療を行った腰部脊柱管狭窄症患者60例で、神経根型35例と馬尾型25例に分類し、健常者50例を対照群とした。大型床反力計を用いた多数歩連続自由歩行計測を術前後に安静後と歩行負荷後にそれぞれ行い、時間距離因子(歩速、歩幅、歩隔、歩調)および山崎の定義による歩容因子(対称性、再現性、円滑性、動揺性、リズム性、衝撃性)の評価指数を算出した。

術前歩行負荷前の歩行分析の結果から、自覚症状の乏しい歩行開始時点で各種の歩容異常が存在し、神経障害型式によって異常のパターンが異なることが示された。また、歩行負荷によって悪化する歩容因子も両者で異なっていた。手術的治療によって、時間距離因子や殆どの歩容因子の異常は正常化し、歩行負荷による悪化も消失した。特に神経根型の症例で改善が顕著であり、臨床症状の改善度と相関していた。

審査では、歩行分析のデータの再現性について質問された。これに対し、10例の予備実験の結果では、歩速にばらつきがあるものの他の時間距離因子や歩容因子の再現性には問題はなかったと回答された。次に神経根型の症例で術後に対照群よりも良好な値を示す因子があるのはなぜかとの質問がなされ、痛みが愁訴である神経根型の症例では手術によって痛みが消失すれば歩行の改善が良好であることを示していると回答された。また、神経根型と馬尾型で重症度の指標が異なるのはなぜかと質問されたが、不明であると回答された。次に歩行分析を臨床で今後どのように応用するのかと質問され、神経性間欠跛行と血管性間欠跛行との鑑別、神経性の中での馬尾性と神経根性の鑑別に応用可能であると回答された。次に動揺性因子の異常が術後も遺残する理由について質問され、下肢筋力低下の残存した症例で動揺性因子の回復が悪いため、これが原因の一つと考えられると回答された。これに対し、体幹筋が関与している可能性が指摘された。また、反射や筋力低下の部位等の詳細な神経学的所見を示して、臨床症状との相関を明らかにすべきと指摘された。さらに歩行分析の手法として大型床反力計を用いた理由を考察に明記した方がよいと指摘された。

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、多数の臨床例から神経性間欠跛行の歩容異常を明らかにした点が有意義であると評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭

リハビリテーション医学 千野 直一 外科学 河瀬 斌

解剖学 仲嶋 一範

学力確認担当者: 北島 政樹、千野 直一

審査委員長: 千野 直一

試問日: 平成15年9月1日

# Sevoflurane preconditions stunned myocardium in septic but not healthy isolated rat hearts.

(セボフルランは正常心ではなく敗血症摘出ラット心のスタン心筋をプレコンディショニングする)

芹田 良平

## 内容の要旨

### 背景

最近、正常心の虚血モデルにおいて、吸入麻酔薬セボフルランの長時間虚血前の投与が、梗塞領域を減少させischemic preconditioning様の保護効果があることが示されている。しかし、敗血症心を含めた傷害心筋や、短時間虚血に対して同様の保護効果が存在するかは未だ不明である。そこで、生理的な順行性摘出心灌流モデルであるworking heart modelを用いて、セボフルランの虚血前短時間曝露が、虚血再灌流傷害に対しischemic preconditioning様の保護効果を生むか否か、正常心および敗血症心で検証した。

### 方法

心臓摘出の24時間前に、91匹のラットを盲腸結紮穿孔術 (CLP) 群 (N=50) またはシャム群 (N=41) のどちらか一方に無作為に分けた。working heart model作成30分後、心拍出量、左室最大収縮圧、心筋酸素消費量、心筋酸素効率 (cardiac efficiency: CE=心拍出量×左室最大収縮圧/心筋酸素消費量) 等のベースライン測定を行った。その後、摘出心臓は15分間2%セボフルランを曝露された群と無しの群の2群に分けた後、虚血前の測定を行った。その後、15分間の完全虚血と30分間の再灌流を行い、すべての心臓における心機能、および再灌流不整脈の発生率を評価した。

### 結果

虚血前では、2%セボフルランは、シャム群に比較してCLP群において、心拍出量の有意な低下を引き起こした。虚血後では、セボフルランの前投与により、心拍出量 (16.9 vs 11.0 ml min<sup>-1</sup>)、心筋酸素効率 (11.2 vs 7.7 mmHg ml<sup>-1</sup>μO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) は両方とも有意に高く保たれ、さらに再灌流後の不整脈発生も低かった (8 vs 32%)。対照的に、正常心臓では、2%セボフルランは心保護効果を示さなかった。

### 結語

この研究により、敗血症において、スタン心筋を導くような短時間虚血前に、2%セボフルランを短時間曝露することは、心筋保護効果があることが示された。加えて、セボフルラン投与は、敗血症心筋において短時間虚血後の心筋酸素効率を改善した。また、セボフルランの前投与は、敗血症心筋の再灌流不整脈の発生を減少させた。敗血症心において、セボフルラン投与は虚血再灌流後の心収縮力のみでなく、伝導を含めた他の心機能を酸素代謝の改善を通して保護することが示された。

## 論文審査の要旨

セボフルランの心筋保護効果は、正常心の虚血モデルにおいて、主に長時間虚血で検討され、敗血症心を含めた傷害心筋や、短時間虚血に対して同様の保護効果は検討されていなかった。本研究では、生理的な順行性モデルであるworking heart modelを用いて、セボフルランの虚血前短時間曝露が、虚血再灌流傷害に対し保護効果を有するかを、正常心および敗血症心で検証した。結果として、セボフルランの前投与は、心拍出量、心筋酸素効率とともに有意に高く保った。対照的に、正常心では、セボフルランは心保護効果を示さなかった。この研究により、敗血症において、短時間虚血前の、2%セボフルラン短時間曝露は、心筋保護効果があることが示された。

審査では、ischemic preconditioning (IPC) とセボフルランによるpreconditioningの機序の関係、また、セボフルランの保護効果は特異的か、吸入麻酔薬に一般的な特性かという質問が出た。これに対し、IPCはアデノシン等の物質がK-ATP channelを介する系が知られているが、吸入麻酔薬もK-ATP channelを介する系とされており、セボフルランに特異的ではないと考えられるが、本研究ではメカニズムの解析は行っていないため、十分な検討はされなかったと回答された。次に、吸入麻酔薬の心臓への作用は、中枢神経への作用と類似したものかとの質問に対し、中枢神経への吸入麻酔薬の作用は未だ十分な見解がないため不明であるが、心抑制はカルシウムの心筋細胞内への流入を抑制することが主体であると回答された。さらに、Krebs液中の吸入麻酔薬濃度は、血液中の濃度に匹敵するか、また、セボフルランの濃度を2%とした理由について質問され、これまでの文献的考察から、Krebs液中の吸入麻酔薬濃度は、血液中の濃度に同等と考えられ、また、ラットの肺胞最小濃度 (MAC) は2.4%であるが、敗血症ではMACが約50%に低下し、これに手術に必要とされるMAC bar値1.6を掛け合わせた値として2%となると回答された。

さらに、傷害心筋として敗血症を選んだ理由と敗血症心筋の定義について質問され、敗血症は集中治療領域においてARDSと並ぶ2大重要症候群あり、敗血症の生存率を改善するには心機能を保つことが一助との報告があることを上げ、また、敗血症心筋の定義は定まっていないが炎症により拡張型心筋症に類似した形態を呈すること、その主因物質はPeroxynitrateであると回答された。また、セボフルランがpreconditioningするのであれば、正常心筋においてそれが認められない理由について質問され、IPCを示す虚血時間においても閾値が存在するのと同様に、セボフルランによるpreconditioningにも閾値があり、2%あるいは15分の曝露時間が正常心に対しては、低かったためと考えられると回答された。また、不整脈の測定方法は、心電図等を使用すべきとの指摘を受けた。

以上、本研究はさらに検討すべき課題はあるものの、摘出心筋における敗血症の心機能および吸入麻酔薬セボフルランの敗血症心筋への影響を新たに示すことができたことが、有意義で価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 臨床麻酔学 武田 純三  
内科学 小川 聡 外科学 四津 良平  
薬理学 谷川原祐介 医化学 末松 誠  
学力確認担当者: 北島 政樹、小川 聡  
審査委員長: 小川 聡

試問日: 平成15年9月2日

# 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Induces Differentiation of a Retinoic Acid-Resistant Acute Promyelocytic Leukemia Cell Line (UF-1) Associated

## With Expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p27<sup>KIP1</sup>.

(1,25α水酸化ビタミンD<sub>3</sub>によるサイクリン依存性キナーゼインヒビターを介する急性前骨髄球性白血病の分化誘導機構の解析)

武藤 章弘

### 内容の要旨

脂溶性ビタミンである、ビタミンA、ビタミンDなどは種々の組織において細胞の増殖、分化及び代謝に重要な役割を果たしている。とくに血球系細胞においては正常骨髄前駆細胞の増殖を促すが、白血病細胞の増殖を抑制し、細胞分化を誘導する。急性前骨髄球性白血病 (APL) においては、特異な染色体異常であるt(15; 17)により形成されるPML/RARα融合遺伝子が正常顆粒球の分化を抑制し、白血病の発症に深く関与していると考えられている。ビタミンAの活性型誘導体であるall-trans retinoic acid (RA) によりAPL細胞は*in vivo*でも分化が誘導されるため、分化誘導療法として臨床応用され、高い寛解導入率と化学療法とは異なる新しい概念の治療法として注目されている。しかしながら、RAによる分化誘導療法により一旦は寛解状態に導入されても、APL症例の多くは再発し、RAに対する耐性が獲得されることが知られるようになり、臨床的に大きな問題となっている。APL症例におけるRA耐性の獲得機序は詳細には解明されておらず、有効な治療法がいまなお確立されていないのが現状である。そこで本研究では、RA耐性APLの*in vitro*のモデルとして、RA耐性APL細胞株UF-1細胞を用い、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が細胞増殖、分化誘導におよぼす影響及びその分子機構について検討した。その結果1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によりUF-1細胞は細胞周期G<sub>1</sub>期に停止し、増殖が抑制されるとともに、顆粒球系細胞に分化が誘導された。all-trans RA単独存在下では分化誘導、増殖抑制効果は見られなかったが、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とall-trans RAを併用することにより、分化誘導、増殖抑制効果は増強された。細胞周期G<sub>1</sub>期停止に関わるcdkインヒビターの経時的解析では、p21<sup>WAF1/CIP1</sup>の発現はmRNAレベル、蛋白レベルともに一過性に増強したが、p27<sup>KIP1</sup>の発現はmRNAレベルでは一過性で、蛋白レベルでは発現が持続していた。all-trans RA単独存在下ではp21<sup>WAF1/CIP1</sup>、p27<sup>KIP1</sup>の発現は変化が見られなかったが、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とall-trans RAとを併用した場合p27<sup>KIP1</sup>の発現は増加していた。UF-1細胞の分化誘導、増殖抑制に関しては、細胞周期G<sub>1</sub>期停止およびp27<sup>KIP1</sup>の発現増加が重要と考えた。p27<sup>KIP1</sup>発現プラスミドを白血病細胞株HL-60細胞に遺伝子導入するとHL-60細胞が分化誘導され、骨髄性白血病細胞におけるp27<sup>KIP1</sup>の細胞分化への直接関与が示唆された。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とall-trans RAとの併用投与は、RA耐性となった再発例にも副作用の少ない分化誘導療法として効果が期待できる新しい治療法となる可能性が強く示唆された。

### 論文審査の要旨

急性前骨髄球性白血病 (APL) においては、特異な染色体異常であるt(15; 17)により形成されるPML/RARα融合遺伝子が、白血病の発症に深く関与していると考えられている。ビタミンAの活性型誘導体であるall-trans retinoic acid (RA) によりAPL細胞は*in vivo*でも分化が誘導されるため、分化誘導療法として臨床応用され、約85%と高い寛解導入率が得られるようになった。しかしながら、RAによる分化誘導療法により一旦は寛解状態に導入されても、約25%の症例でRAに対する耐性が獲得されることが知られるようになり、臨床的に大きな問題となっている。そこで本研究では、RA耐性APLの*in vitro*のモデルとして、RA耐性APL細胞株UF-1細胞を用い、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>が細胞増殖、分化誘導におよぼす影響及びその分子機構について検討した。その結果1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によりUF-1細胞は細胞周期G<sub>1</sub>期に停止し、増殖が抑制されるとともに、顆粒球系細胞に分化が誘導された。all-trans RA単独存在下では分化誘導、増殖抑制効果は見られなかったが、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とall-trans RAを併用することにより、分化誘導、増殖抑制効果は増強された。細胞周期G<sub>1</sub>期停止に関わるcdkインヒビターの経時的解析では、p27<sup>KIP1</sup>蛋白の発現が持続し、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とall-trans RAとを併用した場合p27<sup>KIP1</sup>蛋白の発現は増加していた。さらに、p27<sup>KIP1</sup>発現プラスミドを白血病細胞株HL-60細胞に遺伝子導入するとHL-60細胞が分化誘導され、骨髄性白血病細胞におけるp27<sup>KIP1</sup>の細胞分化への直接関与が示唆された。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>とall-trans RAとの併用投与は、RA耐性となった再発例にも副作用の少ない分化誘導療法として効果が期待できる新しい治療法となる可能性が強く示唆された。

審査では、UF-1細胞にRAを添加するとG<sub>1</sub>期停止が見られるにも拘わらず、MTT試験で見ると細胞は無添加時と同様に増殖しており、細胞増殖を生細胞数の計測により行うべきだったと指摘された。臨床応用を考える上で、本研究で得られた知見は、UF-1細胞以外のAPL細胞にも適合する事象であるかと問われたが、APL患者より樹立されたHL-60細胞株については1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によりp27<sup>KIP1</sup>蛋白の発現が増加するという報告があると回答された。今後臨床検体をモデルマウスに移入した*in vivo*での検討の重要性が指摘された。

以上のように、本研究では今後検討すべき課題は少なからずあるものの、RA耐性APLに対して、耐性を克服する分化誘導療法の可能性とその分子機構を検討した価値ある研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 池田 康夫

発生・分化生物学 須田 年生 先端医科学 河上 裕  
病理学 坂元 亨字

学力確認担当者：北島 政樹、須田 年生

審査委員長：須田 年生

試問日：平成15年7月9日

# Critical Oxygen Delivery in Conscious Septic Rats under Stagnant or Anemic Hypoxia.

(低心拍出量性及び貧血性低酸素症下における、意識下敗血症ラットの臨界酸素供給量)

森 田 慶 久

## 内容の要旨

### 背景

酸素消費量 ( $VO_2$ ) が酸素供給量 ( $QO_2$ ) 依存性となる臨界酸素供給量 ( $QO_{2crit}$ ) は、一般的に低酸素症の種類にかかわらず同様であることが知られている。貧血性低酸素症に対しては心拍出量の増加及び酸素摂取率の上昇という代償機構が働くが、低心拍出量性低酸素症に対しては、酸素摂取率の上昇のみが代償機構となる。しかし、微小循環から体循環にいたるまで様々な段階で循環が障害されている敗血症においては、この代償機構が健全状態と同様に働くかは不明である。敗血症においては、赤血球及び白血球の形態学的変化により毛細血管が閉塞しやすく、また組織浮腫により毛細血管間距離は拡大しているため、低心拍出量性低酸素症においてより微小循環が障害され、 $QO_{2crit}$ が高くなると考えられる。よって、循環障害、特に微小循環障害が既に存在する敗血症においては貧血性低酸素症に比して低心拍出量性低酸素症においてより微小循環が障害され、 $QO_{2crit}$ がより高くなると仮説を立て、実験を行った。

### 方法

ラットをcecal ligation and perforationにより作成した敗血症群 ( $n=12$ ) 及びコントロール群 ( $n=12$ ) に無作為に分類し、さらに24時間後、低心拍出量性低酸素群及び貧血性低酸素群に無作為に分類した。低心拍出量性低酸素症は右房に留置したバルーンカテーテルを段階的に膨らませることにより、また貧血性低酸素症はドナールラットからの血漿を用いた等量性血液希釈により作成した。 $VO_2$ は代謝ボックスにより直接測定し、 $QO_2$ は心拍出量と動脈血酸素含量から計算した。全てのデータは平均値±標準偏差で表した。 $QO_{2crit}$ 及び臨界点におけるヘモグロビン値 ( $Hbcrit$ )、はdual linear regression analysisにより計算した。統計ソフト (SPSSv7.5) を用いて、full factorial designにてデータの統計学的処理を行った。

### 結果

敗血症の有無及び低酸素症の種類に交互作用は認めなかった。敗血症群はコントロール群に比して有意に高い $QO_{2crit}$ を示したが ( $6.38 \pm 0.58$ 及び $4.00 \pm 0.66$ ml/min/100g;  $p < 0.05$ )、低心拍出量性低酸素群及び貧血性低酸素群間には有意な差を認めなかった。 $Hbcrit$ は敗血症群とコントロール群において有意差は認めなかったが、低心拍出量性低酸素群は貧血性低酸素群より有意に高かった ( $10.4 \pm 1.4$ 及び $5.2 \pm 1.4$ g/dl;  $p < 0.05$ )。

### 結論

敗血症においても健全状態と同様に、低酸素症の種類による $QO_{2crit}$ に差は認めなかった。また、急性の貧血に対して、敗血症ラットは心拍出量を増加させることにより、健全状態と同様に耐えることが示唆された。

## 論文審査の要旨

本研究は、敗血症ラットにおける臨界酸素供給量が、低酸素症の種類 (低心拍出量性低酸素症及び貧血性低酸素症) による相違が存在するかを検討したものである。敗血症による微小循環障害の存在及び低酸素症に対する代償機構の相違にもかかわらず、臨界酸素供給量に差は認められなかった。また、敗血症ラットは、既知の心機能低下にもかかわらず心拍出量を増大させる事によりコントロールラットと同様に貧血に耐え得ることが示された。

審査において、まず統計学的な解釈について質疑があった。今回、full factorial designを用いて統計学的解析を行い、敗血症の有無及び低酸素症の種類において交互反応 (interaction) を認めなかったため、結果を合わせたグループで提示した。統計学的には誤りではないが、結果を解釈する上で、個々のグループによる結果を提示したほうが優れているのではないかと指摘があった。次に臨床研究の引用文献が、本研究とどのように相関するのか質問があった。引用文献は重症患者においてヘモグロビン値を低く保つても、正常範囲に保った患者との間に死亡率には差がない事を示すものであった。本研究では敗血症による既知の心機能低下を初めとする循環障害が存在するにもかかわらず、敗血症ラットはコントロールラットと同様の臨界点におけるヘモグロビン値を示したことから、敗血症における貧血に患者が耐え得ることを示唆していると回答された。次に、本研究で用いた心拍出量の測定について (副論文の要旨)、これまでとの相違点および測定方法について質問があった。従来の方法ではheat lossが生じること、反復測定に伴うindicator volumeによる容量負荷の問題が生じることが問題点として挙げられ、本方法ではそれらが回避されていると回答された。また、実際の測定方法について説明された。最後に本研究はwhole bodyでの実験であり、実際に個体に生じている現象を捉えている点で評価された。本研究は低心拍出量性低酸素症及び貧血性低酸素症において臨界酸素供給量に相違が無かったという現象のみを捉えており、機序の解明には至っていないが、その機序には様々な可能性が考えられ、今後発展する内容であると評価された。

以上本研究は敗血症における酸素供給・需要関係が低酸素症の種類に影響されない事、また急性貧血に対して敗血症ラットはコントロールラット同様に耐え得ることが示された。機序解明という点から、今後の発展が期待される研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 臨床麻酔学 武田 純三  
内科学 小川 聡 外科学 四津 良平  
医化学 末松 誠  
学力確認担当者: 北島 政樹、小川 聡  
審査委員長: 小川 聡

試問日: 平成15年9月2日

# The Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ and Interleukin-1 $\beta$ in Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Small Intestine.

(ラット小腸虚血再灌流障害におけるtumor necrosis factor- $\alpha$ およびinterleukin-1 $\beta$ の役割)

山本 聖一郎

## 内容の要旨

小腸移植の問題点の1つとして虚血再灌流障害の制御を挙げることができる。小腸の虚血再灌流障害では、小腸粘膜の形態的障害が惹起され、粘膜の防御機構が破綻し、バクテリアルトランスローケーションが誘発され、多臓器障害へと進展する。本研究ではラットでの小腸虚血再灌流障害におけるtumor necrosis factor (以下、TNF) およびinterleukin (以下、IL) -1の意義を検討した。また、TNF- $\alpha$  およびIL-1 $\beta$ の産生阻害剤 (FR 167653) を用い、これらの炎症性サイトカインの制御が及ぼす影響を検討した。

ウイスター系雄性ラットの上前腸間膜動脈根部をマイクロ血管クリップで150分間遮断した。生食群では遮断10分前と再灌流10分前に生理食塩水 (4ml/kg) を、FR群ではFR 167653 (1 mg/kg) を静注した。コントロール群は遮断以外は生食群と同様の実験操作を施行した。生存解析では、術後30日まで観察した。Parkらの評価法を用い、再灌流前後の小腸の組織障害の程度をHE染色にて評価した。また、再灌流前後に、ヘマトクリット値、小腸内容および腸管重量、血中エンドトキシン濃度、血漿および小腸組織中のTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 濃度、血清aspartate aminotransferase (以下、AST) 値を測定した。

観察期間中の生存率は、FR群 (80%) は生食群 (30%) より有意に高値であった ( $P<0.05$ )。組織障害は、生食群で有意に高度であった ( $P<0.05$ )。脱水の指標となる腸管内容量およびヘマトクリット値はFR群で有意に低値であった ( $P<0.05$ )。再灌流120分後に生食群で上昇した血中エンドトキシン濃度はFR群では有意に抑制されていた ( $P<0.05$ )。血漿TNF- $\alpha$ 値は生食群では2段階に上昇したが、FR群では有意に低値であった ( $P<0.05$ )。更に小腸組織中のTNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ ) およびIL-1 $\beta$ 濃度 ( $P<0.05$ ) も生食群で有意に高値であった。肝障害の指標としての血清AST値は生食群で有意に高値であった ( $P<0.05$ )。

本実験では虚血再灌流後に高度の小腸粘膜障害および全身反応が観察された。再灌流後に血中エンドトキシン値が上昇したことは粘膜バリアー機能の破綻によりバクテリアルトランスローケーションが誘発されたことが示唆される。更に多臓器障害の指標の1つとして、再灌流後にAST値が上昇することが示された。これらの障害はFR群で有意に軽減されていた。本研究の結果、TNFおよびIL-1がラットの虚血再灌流障害の発生に関与し、その制御により虚血再灌流障害が軽減されることが示唆された。これらの炎症性サイトカインの制御により、小腸移植のみならず、絞扼性イレウスや上腸間膜動脈血栓症などの小腸虚血再灌流障害が関与する疾患で治療成績が改善される可能性があると考えられる。

## 論文審査の要旨

小腸の虚血再灌流障害の発生にはいくつかの因子の関与が推測されるが、中でもTNFやIL-1などの炎症性サイトカインの意義が注目される。本研究ではウイスター系雄性ラットを用い、小腸虚血再灌流障害におけるTNFおよびIL-1の意義、ならびにTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ 産生阻害剤FR167653 (FR) を投与し、これらのサイトカインの制御が及ぼす効果を検討した。その結果、生食群では再灌流後に血中エンドトキシン値が上昇し、粘膜のバリアー機能の破綻によりバクテリアルトランスローケーションが誘発された。またラット小腸組織中および血漿中のTNF- $\alpha$ 濃度は再灌流後に上昇し、小腸組織中のIL-1 $\beta$ 濃度は再灌流直前にすでに上昇していたが、FR群ではこれらのサイトカインの産生が抑制され、虚血再灌流障害が軽減され、有意に生存率が高値であった。本研究ではTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ がラットの虚血再灌流障害の発生に関与し、その制御により虚血再灌流障害が軽減されることが示された。

審査では、まず組織標本の作製のための検体採取を回腸末端から5 cmの部位に設定した理由に関して質問があり、ラット小腸の虚血再灌流障害は回腸末端で生じやすいこと、また組織障害の程度は小腸の部位によって異なるため採取部位による個体内格差を除外するため検体採取を一定の部位に定める必要性があったとの説明がなされた。また小腸組織中のIL-1 $\beta$ 濃度は再灌流直前に上昇していたが、その機序に関しての質問がなされた。文献的には小腸組織中の固有のマクロファージ系細胞以外にもエンテロサイトなどでもIL-1 $\beta$ が産生されるとされ、これらの細胞では虚血のみが刺激となりIL-1 $\beta$ が産生された可能性があるが、虚血中に腸管内で過剰に産生されたエンドトキシンも産生に関与している可能性も否定はできないと回答された。更にFRがTNF- $\alpha$ およびIL-1 $\beta$ の産生を阻害する機序に関して質問がなされ、最近の研究でこれらのサイトカインの産生や作用発現にかかわる細胞内シグナル伝達のp38 MAP kinaseを阻害する可能性が報告されていると述べられた。一方、門脈血中のサイトカインやエンドトキシンの濃度の変動、血中IL-8の推移、虚血再灌流後の他臓器障害として肝臓や肺の組織学的検索の必要性が指摘された。また小腸組織中のサイトカイン濃度をgram wet tissueではなく、gram proteinでの検討の必要性についても助言があった。

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、TNFおよびIL-1がラットの虚血再灌流障害の発生に関与し、その制御により虚血再灌流障害が軽減されることを明らかにし、これらの炎症性サイトカインの制御により小腸虚血再灌流障害が関与する疾患で治療成績が改善される可能性があること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 外科学 北島 政樹  
内科学 石井 裕正 医化学 末松 誠  
病理学 岡田 保典 救急医学 相川 直樹  
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7月8日

# Expression of the exocytotic protein syntaxin in mouse oocytes.

(マウス卵子における開口放出関連蛋白質syntaxinの発現について)

岩 橋 和 裕

## 内容の要旨

受精過程の中で起こる表層反応は、表層顆粒に含まれる加水分解酵素により透明帯外層の硬化と精子受容体に対するリガンドの不活化を引き起こす。その結果、透明帯での多精子受精の防御が完成すると考えられている。この表層反応は開口放出現象の一種であることより、近年、神経細胞にて確認されている開口放出関連蛋白質(SNARE蛋白質)が表層反応にも関与していることを示唆する報告が散見される。本研究では、SNARE蛋白質のひとつであるsyntaxinに着目し、マウス卵子でのその発現を確認することを目的とした。

ICR雌マウスを過排卵処理し、hCG投与後に回収したMetaphase II (M II) 期卵とhCG投与後にICR雄マウスと交配させ回収した前核期卵を検体として使用した。マウス卵巣およびM II期卵からの抽出蛋白質を抗syntaxinポリクロナル抗体によるウェスタンブロットに供した。M II期卵を検体としてRT-PCRを施行し、卵子に発現しているsyntaxinのアイソフォームを確認した。M II期卵と前核期卵に対して抗syntaxin抗体による免疫組織化学染色を施行、同時にFITC結合LCAにて表層顆粒を染色し、共焦点蛍光顕微鏡下に観察した。さらに、M II期卵内におけるsyntaxinの局在を確認するために、抗syntaxin抗体を用いpreembedの金コロイド法にて染色後電子顕微鏡下に観察した。

マウス卵巣および卵子の抽出蛋白質において、抗syntaxin抗体に反応した35kDaのシングルバンドを認めた。M II期卵で施行したRT-PCRではsyntaxin 4に対応するPCR産物が得られ、マウス卵子に存在するsyntaxinはtype 4のアイソフォームであることが確認された。また、M II期卵においてはsyntaxinに対する蛍光は卵細胞膜と卵表層域に認められ、表層顆粒のない部分(cortical granule free domain)に一致した非染色領域を有するなど、表層顆粒の分布によく一致していた。受精後、すなわち表層反応後の前核期卵では、syntaxinに対する蛍光が卵表層域で減弱した。免疫電顕によるM II期卵内局在の検討では、syntaxinの存在をしめす金コロイドが表層顆粒膜上と卵細胞膜上に確認された。

本研究により、マウス卵子には開口放出関連蛋白質であるsyntaxinが存在し、そのアイソフォームはsyntaxinのtype 4であることが明らかになった。また、syntaxinは表層顆粒膜上と卵細胞膜上に存在することが示唆された。これらのことより、マウス卵子の表層反応においてもSNAREのひとつであるsyntaxinが、その開口放出過程に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

表層反応は受精後に認められる最初の生理現象であり、多精子受精の防御機構として作用する。この表層反応は、神経シナプスにおける神経伝達物質の放出と同様に、開口放出の形式をとると考えられている。近年、神経細胞にて機能している開口放出関連蛋白質(SNARE蛋白質)が内分泌細胞での開口放出にも関与しているとの報告が散見される。本研究では、SNARE蛋白質の中でも、組織特異性のあるsyntaxinに着目し、マウス卵子での発現および生理作用について検討した。抗syntaxin抗体を用いたウェスタンブロットとRT-PCRの結果から、マウス卵子でのsyntaxin 4の発現が確認された。免疫染色の結果、未受精卵ではsyntaxinに対する蛍光は卵表層域に認められ、表層顆粒の分布によく一致し、受精後には卵表層域で減弱した。免疫電顕での局在の検討により、syntaxinが表層顆粒膜上と卵細胞膜上の両方に確認された。これらより、マウス卵子表層反応におけるsyntaxinの開口放出過程への関与が示唆された。

審査では、まず、本研究で用いたポリクロナル抗体の特異性に関して、抗原残基の検討や吸収試験の有用性などの助言があった。表層顆粒の染色の際、lens-culinaris-agglutinin (LCA)を使用する理由について質問がなされ、一般にレクチンは表層顆粒中の多糖類と結合することが知られており、なかでもLCAの特異性が高いとの回答があった。また、表層顆粒の意義を質問され、多精子受精の機構を含めた説明がなされた。SNARE蛋白質やG蛋白質など、膜融合に関連する種々の蛋白質について卵子での発現や機能を検討することで、表層反応の機構解明につながるなどの助言があり、今後の課題であることが確認された。次に、今回の免疫染色の結果でsyntaxinが卵細胞膜上に存在すると判断できるかの問題提起があった。これに対し、免疫染色の実験では膜上に蛍光があるかどうかの明確な判断は困難であるが、再実験の結果での染色の傾向と免疫電顕での結果をあわせ、卵細胞膜上にも存在する判断をしたと回答された。また、受精後のsyntaxinの染色像で、蛍光が消失したのか、その分布が変化したのかの確認がなされ、受精卵でのmRNAや蛋白質の発現についても検討することの必要性が指摘された。免疫電顕の結果について、syntaxinが表層顆粒膜上に存在するか顆粒内に存在するかの議論があり、免疫電顕の試料作製方法によっても染色性に差が出ることなどの指摘がなされた。最後に、表層顆粒内容としてのどのような酵素があるかの質問に対し、ovoperoxidaseなど卵子に特異的な酵素が含まれているとの回答があった。

以上のように、本研究はいくつかの検討課題は残しているものの、マウス卵子においてSNARE蛋白質syntaxin 4の発現を明らかにし、受精過程における表層反応の機構を解明する上で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 産婦人科学 吉村 泰典  
産婦人科学 野澤 志朗 小児科学 高橋 孝雄  
発生・分化生物学 須田 年生  
学力確認担当者: 北島 政樹、野澤 志朗  
審査委員長: 野澤 志朗

試問日: 平成15年10月7日

# Xanthine oxidase-derived oxygen radicals play significant roles in the development of chronic pancreatitis in WBN/Kob rats.

(自然発症慢性膵炎モデルラット (WBN/Kobラット) の膵組織障害における xanthine oxidaseにより産生される活性酸素の関与)

是 木 茂 幸

## 内容の要旨

活性酸素が細胞障害およびDNA障害を引き起こすことは知られているが、慢性膵炎における活性酸素の役割についてはいまだ不明な点が多い。今回、著者は自然発症慢性膵炎モデルラットであるWBN/Kobラットを用いて慢性膵炎においてxanthine oxidase (XOD)により産生される活性酸素の膵細胞障害への関与について検討した。

WBN/Kobラットにコントロールの飼料あるいはXOD活性を抑制するタングステンを含有する飼料を与えた。膵組織の変化、膵組織における活性酸素生成系としてのXOD活性、および活性酸素消去系としてのglutathione (GSH) 量、superoxide dismutase (SOD) 活性を測定した。さらに膵組織の酸化的核酸障害を、膵組織よりDNAを抽出し8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) /dGを測定することにより検討した。またlithostathineは膵腺房細胞で産生され膵管内に分泌される蛋白であるが、慢性膵炎では膵石の形成および慢性膵炎の進行に関与している可能性が示唆され、lithostathine mRNAの発現動態についても検討を行った。

コントロールの飼料を与えたWBN/Kobラットでは病理組織学的には12週齢から徐々に炎症性変化に伴い膵実質の脱落、壊死および線維化などの変化が起こり、24週齢にかけて線維化、腺房細胞の萎縮が著明となった。XOD活性は12週齢をピークに有意に上昇し、以後20、24週齢で低下した。GSH量は週齢とともに低下傾向を示し、20週齢以後で有意に低下した。SOD活性も週齢とともに低下傾向を示し、16週齢以後で有意に低下した。8-OH-dG/dGの割合は16週齢より有意に増加し24週齢まで続いた。lithostathine mRNAの発現をreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で半定量的に検討すると8週齢から上昇し、膵炎が比較的軽度と思われる12週齢で有意に上昇した後、膵炎がさらに進む16週齢以後は減少傾向を示し、20週齢以後で有意に低下した。タングステンを含有する飼料を4週より16週まで与えたWBN/Kobラットでは慢性膵炎の組織変化は12、16週齢で有意に抑制された。またXOD活性は8-16週齢で、8-OH-dG/dGの割合は16週齢で有意に抑制された。lithostathine mRNAの発現はタングステンを含有する飼料により16週齢まで有意に維持された。

以上の結果から、WBN/Kobラットの膵組織においてXODにより産生される活性酸素によって膵細胞障害および膵細胞の核酸の酸化的損傷が惹起されることが示唆され、慢性膵炎における成因の一つと考えられた。

## 論文審査の要旨

近年、多くの病態の発症に酸化ストレスの関与が報告されているが、慢性膵炎における活性酸素の役割についてはいまだ不明な点が多い。本研究では自然発症慢性膵炎モデルとして注目されているWBN/Kobラットを用いて、xanthine oxidase (XOD)により産生される活性酸素の関与につき検討した。WBN/Kobラットでは12週齢より慢性膵炎の組織学的変化を認め、XOD活性は8週齢より有意な上昇を認め、XOD活性により生成される活性酸素が慢性膵炎の初期の段階で組織傷害の成因に関与していることが示唆された。また膵組織中のGSH量とSOD活性は組織傷害が進行するにつれて低下し、活性酸素消去系の低下も慢性膵炎の重要な進展要因と考えられた。さらに膵組織における8-OH-dG量は膵炎の進行とともに有意に増加し、活性酸素により膵組織のDNA傷害も惹起されることが示唆された。膵組織中のlithostathine mRNAはXOD活性が上昇する8週齢より増加し、12週齢で有意な増加が認められた。lithostathineは膵液中に含有される蛋白で慢性膵炎で認められる蛋白栓の主要な構成成分であるが、近年、膵組織の再生、抗炎症作用も報告され、lithostathineは膵組織の慢性炎症に対して代償的に増加した可能性が示唆された。

審査ではまず、WBN/Kobラット血清中のamylase, prolyl hydroxylaseの変化に有意差が認められなかったことに関して質問がなされた。これに対し膵は組織量が肝臓に比べ小さく、本ラットの膵組織の炎症、線維化は血清には反映されなかった可能性があること回答されたが、血清中でモニターできる他のマーカーにつき、さらに検討すべきとの指摘がなされた。次に膵炎の組織所見の判定は、その程度に応じて0点から3点の4段階で半定量化しているものの、組織の評価基準が不明瞭であるとの指摘を受けた。基準を明確にし、その判定に病理学者の意見を取り入れるべきであるとのコメントがなされた。またDNAの酸化的損傷についてXOD活性が8-16週齢で増加し組織傷害が進行しているが、8-OH-dG量は8-12週で有意な増加が認められないことに対して質問があり、膵炎初期では膵細胞のDNA修復機構が働いており、かなり膵炎が進行してから8-OH-dG量が増加してきた可能性があること回答された。さらにXOD活性の測定にあたり、蛋白分解酵素阻害薬を使用しているもの、XDHはXODに比較的容易に変化しやすく、XODの活性の増減を評価するのにmRNAレベルで測定することが助言された。

以上、本研究は今後検討されるべき課題を残してはいるものの、慢性膵炎の発生・進展過程において、XOD活性により産生される活性酸素が膵組織傷害および核酸の酸化的損傷を惹起し、慢性膵炎における成因の一つとして重要であることを示した点で消化器病学上有意な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正  
医化学 末松 誠 外科学 北島 政樹  
病理学 岡田 保典  
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10月10日



# AMMONIA AGGRAVATES STRESS-INDUCED GASTRIC MUCOSAL OXIDATIVE INJURY THROUGH THE CANCELLATION OF CYTOPROTECTIVE HEAT SHOCK PROTEIN 70.

(胃内アンモニアによるストレス性胃粘膜傷害増強機序－粘膜保護的HSP70発現抑制の介在－)

永 橋 正 一

## 内容の要旨

目的：胃潰瘍を代表とする胃粘膜病変の発生要因に、*H.pylori* (Hp) や心理的ストレスは重要である。阪神大震災直後の症例対照研究では、胃潰瘍患者のHp抗体陽性率が非ストレス下の潰瘍患者より高率であり、ストレス潰瘍の発生機序の一つにHpの関与が指摘された。しかし、これまでストレス性胃粘膜傷害の形成過程におけるHp感染の影響についての実験的報告はみられない。Hp関連胃粘膜傷害において、本菌由来のNH<sub>3</sub>は傷害因子の一つとして重要視されている。本研究では、胃内NH<sub>3</sub>存在下における情動ストレスに対する反応をCommunication box法 (CB法) を用いて客観的に評価した。また、ストレス下において誘導されるHSP70の関与についても検討した。

材料と方法：雄性C57BL/6マウスを用い、0.01%のNH<sub>3</sub>水を投与した群 (NH<sub>3</sub>群) と対照として蒸留水を投与した群を設定し、さらにCB法により、情動ストレスを負荷する群をresponder群、負荷しない群をcontrol群とした。胃粘膜病変の評価はシドニー分類に基づきスコア化し、好中球集積の指標として胃粘膜内ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性、胃粘膜内酸化的ストレスの指標としてチオバルビツール酸反応物質 (TBARS)、胃粘膜内HSP70含量、SOD活性、還元型グルタチオン含量をそれぞれ測定した。

結果：control群 (水投与control)、NH<sub>3</sub>群 (NH<sub>3</sub>投与control) stress群 (水投与responder)、NH<sub>3</sub>+stress群 (NH<sub>3</sub>投与responder) の4群において、NH<sub>3</sub>+stress群で高度な出血性びらんを示した。MPO活性はstress群 (0.34±0.12mU/mg蛋白) でcontrol群 (0.09±0.04) と比較してさらにNH<sub>3</sub>+stress群 (0.73±0.14) ではstress群より有意に高値であった。TBARS含量はcontrol群 (0.86±0.28nmol/mg蛋白) よりstress群 (2.13±0.76) で有意に増加し、NH<sub>3</sub>+stress群 (4.71±1.34) ではstress群よりもさらに増加した。また、HSP70含量はstress群 (277.9±134.9pg/mg蛋白) で増加したが、NH<sub>3</sub>+stress (79.9±27.4) では、control群 (68.4±46.5) に比して有意な増加は認めなかった。一方、NH<sub>3</sub>群ではcontrol群と比較して有意に減少した。

考察：情動ストレスによる胃粘膜傷害の発生機序に酸化的ストレスが関与し、この時、HSP70が産生され胃粘膜を保護している可能性が考えられた。一方、Hp感染によるNH<sub>3</sub>の存在下では、HSP70の産生が抑制され、ストレス性胃粘膜傷害をさらに悪化させている可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

胃潰瘍を代表とする胃粘膜病変の発生要因として、*H.pylori* とともに情動ストレスは重要であるが、両因子の混在する病態の実験的解析はこれまでになかった。本研究では、*H.pylori*感染に伴う胃内高NH<sub>3</sub>状態を、強制的にNH<sub>3</sub>を経口投与するとともに、情動ストレスを負荷するCommunication box法 (CB法) によりシミュレーションするモデルを開発し、情動ストレスを負荷したマウスの胃粘膜傷害における胃内アンモニアの影響を検討した。その結果、情動ストレスによる胃粘膜傷害時に酸化的ストレスが関与すると同時にHSP70の産生が認められた。しかし、高NH<sub>3</sub>存在下では、HSP70の産生は抑制され、傷害をさらに悪化させている可能性が示唆された。

審査では、まず、CB法の有用性について質問された。これに対し、従来、精神薬理の領域で用いられてきた方法を、実験潰瘍学へ応用したもので、水浸拘束などと異なり、情動ストレスを受ける個体には、直接的な身体的ストレスはかからない系であり、また、senderにかける電気刺激の頻度、強度等を設定することで、定量的なストレス負荷も可能であるという点で有用であると回答された。また、胃内に投与したNH<sub>3</sub>の濃度については、既報の*H.pylori*感染下の胃内濃度を再現している点で、妥当性があると評価された。NH<sub>3</sub>投与のみで白血球が増えた理由についても質問があり、これに対しては、NH<sub>3</sub>の短期投与で直接的胃粘膜傷害は起こりにくいため、むしろNH<sub>3</sub>によるHSP70の抑制などと関連した粘膜防御因子の低下による可能性が考えられると回答された。また、白血球浸潤が起こっても、過酸化脂質が上昇していない群については、その理由が質問されたが、白血球から放出された活性酸素種が、抗酸化物質に消費された可能性が挙げられるが、今回測定したCu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>-SODと還元型グルタチオンには、差がなかったことから、それ以外の抗酸化物質の関与が考えられると回答された。また、HSP70に注目した理由については、急性期にHSP70が誘導され、HSP60などは治療期に増加すると報告されているため、HSP70に注目したと回答された。情動ストレスにNH<sub>3</sub>負荷という状況は、交感神経緊張状態におけるNH<sub>3</sub>の影響をみていることになるが、他に、どのような臨床的病態が考えられるかの質問もあり、交感神経系の強調された病態である肝硬変 (門脈圧亢進症など) の高NH<sub>3</sub>血症も同様の病態が考えられると回答された。また、HSP70の発現部位についての質問に対して、本分画では、核、ミトコンドリアは除かれており、細胞質部分を測定したと考えられ、HSP70の発現部位は細胞質であると回答された。また、雌性マウスを使用した理由を質問され、雌は性周期などがあり、ホルモンの影響を受けやすいため雄を使用したことと、実験潰瘍学では、雌の潰瘍は発生しにくいとされているためと回答された。

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、消化器診療の日常で頻りに遭遇する*H.pylori*感染下でのストレスによる胃粘膜病変を動物実験モデルにて定量的に検討し、分子シャペロンであるHSP70の関与まで言及した点で、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  
                                病理学 坂元 亨宇  
学力確認担当者：北島 政樹  
審査委員長：北島 政樹

試験日：平成15年10月7日

# Exposure to fatty acids modulates interferon production by intraepithelial lymphocytes.

(脂肪酸投与が上皮内リンパ球のインターフェロン産生に及ぼす影響)

原 由 里 子

## 内容の要旨

上皮細胞内リンパ球 (IEL) は小腸粘膜免疫において重要な役割を果たしている。脂肪酸は免疫担当細胞の機能を修飾することが知られているが、脂肪酸への接触がどのようにIELの免疫機能に影響するかという点についての詳細は不明である。この研究では、特に長鎖及び中鎖脂肪酸が、T-cell receptor (TCR) あるいはinterleukin(IL)-12/IL-18で刺激を受けたIELのinterferon(IFN)- $\gamma$ 産生をどのように修飾するかについて実験を行なった。

IELはBALB/cマウスの小腸より分離し、固相化した抗CD3モノクローナル抗体により、またはIL-12/IL-18で刺激を加えた。別の実験では抗 $\alpha$ TCRモノクローナル抗体または抗 $\gamma$ TCR抗体で刺激を加えた。刺激されたIELに脂肪酸ミセルを種々の濃度で添加し、3日間培養を行なった。長鎖脂肪酸としてアラキドン酸、リノール酸、オレイン酸、中鎖脂肪酸としてオクタノイン酸を使用した。培養上清中のIFN- $\gamma$ の産生をELISA法で測定し、RT-PCR法にてIFN- $\gamma$ mRNAの発現を検討した。

抗CD3抗体により刺激されたIELは大量のIFN- $\gamma$ を産生した。また、IELにIL-12とIL-18の両方で刺激を加えると、TCR刺激を介さず著明なIFN- $\gamma$ 産生を認めた。IFN- $\gamma$ mRNAについても抗CD3抗体またはIL-12/IL-18刺激後は発現の増加を認めた。長鎖脂肪酸添加では10 $\mu$ M以上の濃度においては濃度依存性にIFN- $\gamma$ 産生の抑制が見られ、中鎖脂肪酸添加ではIFN- $\gamma$ 産生について有意な変化は認められなかった。 $\gamma$ IELよりのIFN- $\gamma$ 産生は $\alpha$ IELに比較して非常に低かったが、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ともに長鎖脂肪酸添加時は同様の濃度依存性の抑制パターンを認めた。

本実験において、長鎖脂肪酸が、抗CD3抗体またはIL-12/IL-18で刺激を受けたIELのIFN- $\gamma$ 産生に対して抑制効果を示すという結果を得たが、長鎖脂肪酸がIELのIFN- $\gamma$ 産生を抑制する、正確な細胞内のメカニズムは知られていない。IL-12とIL-18の両者による刺激は、TCRを介して活性化されたシグナルに完全に独立してIFN- $\gamma$ 転写を誘導するという報告もあり、長鎖脂肪酸が両方の刺激が共通して関連したIFN- $\gamma$ mRNA合成を抑制すると推測された。また、 $\gamma$ IELと $\alpha$ IELの間で長鎖脂肪酸による抑制の程度が類似していることも、IELの両者の分画において同じメカニズムが働いた可能性を示唆している。一方、中鎖脂肪酸はIELよりのIFN- $\gamma$ 産生に影響を与えなかった。この相違の詳細は明らかにし得なかったが、長鎖脂肪酸が中鎖脂肪酸と異なりリンパ球膜への親和性が強いことが両脂肪酸における差異に関与していることが推測された。

以上、脂肪酸摂取時に脂肪酸への接触により腸管粘膜のIELの免疫機能が修飾される可能性が示唆された。腸管の粘膜免疫反応における脂肪酸の役割についての情報は、種々の炎症性腸管障害の病態生理における食事因子の重要性を示唆するものと思われる。

## 論文審査の要旨

腸上皮内リンパ球 (IEL) は腸管免疫において防御機構の他、腸管における生理免疫機能の調節において重要な役割を果たすと考えられている。しかし、腸管腔内の脂肪酸がIELの機能に及ぼす影響については未だ不明の点が多い。本研究では、抗CD3抗体あるいはIL-12/IL-18により刺激されたマウスIELを用いて、そのIFN- $\gamma$ 産生及び細胞増殖効果に対する長鎖及び中鎖脂肪酸の影響を比較検討した。無刺激のIELよりの培養上清からはIFN- $\gamma$ は検出されなかった。しかし、抗CD3抗体あるいはIL-12とIL-18の両方で刺激されたIELは大量のIFN- $\gamma$ を産生した。IFN- $\gamma$ mRNAについても抗CD3抗体またはIL-12/IL-18刺激後は発現の増加を認めた。長鎖脂肪酸添加では濃度依存性にIFN- $\gamma$ 産生の抑制が見られ、中鎖脂肪酸添加ではIFN- $\gamma$ 産生について有意な抑制は認められなかった。 $\gamma$ IELよりのIFN- $\gamma$ 産生は $\alpha$ IELに比較して非常に低かったが、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ともに長鎖脂肪酸添加時は同様の濃度依存性の抑制パターンを認めた。本研究において、長鎖脂肪酸摂取がIELを介して腸管免疫を直接修飾している可能性が示唆された。

審査では、脾臓やリンパ節のリンパ球で同様の実験を行なった場合に同様の結果が出る可能性もあり、IELだけでなく脾臓や末梢リンパ球についても検討すべきとの指摘があった。また、腸管腔の環境として、食物抗原だけでなく腸内細菌も考慮した場合、免疫能にどのような影響を与えるかについての質問に対し、IFN- $\gamma$ だけでなく、IL-2やTNF $\beta$ 、またTh2系のIL-5やIL-6など他のサイトカインにも影響を及ぼす可能性があり、今後の検討を要すると回答された。さらに、消化管がinflammatory conditionにある時、腸管上皮や脂肪酸にどのような変化が起こるのかという質問があった。IFN- $\gamma$ などのサイトカインの放出に伴って上皮間の結合は損傷を受け、paracellular pathwayを通じて脂肪酸を含む大きな分子の輸送を増強するために細胞間隙が開き、脂肪酸がIELと直接接触する機会が増える可能性があるという回答された。 $\alpha$ IELに比較して $\gamma$ IELよりのIFN- $\gamma$ 産生が非常に少なかった結果に関し、 $\alpha$ IELと $\gamma$ IELのpopulationの差が関与しているのではないかということ、また、今回はin vitroで実験を行なっているが、酸素濃度他、生体内の環境を考慮した条件を検討すべきではなかったかとの指摘がなされた。最後に、他の長鎖脂肪酸に比しアラキドン酸のIFN- $\gamma$ 産生抑制効果が強いという結果に対し、アラキドン酸そのものの効果なのかプロスタグランジンなどの代謝産物による効果なのか検討する上で、インドメタシンなどのcyclooxygenase阻害薬を使用することも助言された。

以上、本研究はさらに検討すべき課題を残しているが、脂肪酸への接触がIELの機能を修飾することにより粘膜免疫機能に大きな影響を及ぼす可能性が示されたという点で、炎症性腸疾患の病態生理、食事療法を考える上で消化器病学上有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正  
医化学 末松 誠 外科学 北島 政樹  
微生物学 石川 博通  
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10月11日

# Interferon-inducible Gene Family 1-8U Expression in Colitis-associated Colon Cancer and Severely Inflamed Mucosa in Ulcerative Colitis.

(潰瘍性大腸炎を母地とした大腸癌粘膜および慢性炎症粘膜における Interferon-inducible Gene Family 1-8Uの発現)

久松 理一

## 内容の要旨

潰瘍性大腸炎は再燃、緩解を繰り返す原因不明の慢性炎症性腸疾患であり、罹病期間が10年以上経過した慢性持続型潰瘍性大腸炎患者において大腸癌発癌のリスクが増加することが報告されている。慢性炎症粘膜から前駆病変である dysplasia を経て発癌する過程は散発性の大腸癌発生メカニズムである adenoma-carcinoma sequence とは異なる発癌経路を有すると考えられており、その過程において慢性持続性の炎症が重要な役割を担っていることが推測される。慢性炎症からの大腸癌発癌過程の解析は報告が少なく、今回著者は潰瘍性大腸炎からの発癌過程における遺伝子発現の変化を differential display RT-PCR (以下DD RT-PCR) 法を用いて解析した。

潰瘍性大腸炎の診断は厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班による潰瘍性大腸炎診断基準(案)の確診例とし、潰瘍性大腸炎を母地に発生した大腸癌患者5例の手術検体の癌部および非癌炎症部の組織から total RNA を抽出し DD RT-PCR を行い、癌部と非癌炎症部で発現の異なる cDNA 断片をクローニングし塩基配列を同定した。この結果 IFN inducible gene family 1-8U 遺伝子の発現が潰瘍性大腸炎を母地に発生した大腸癌組織で高発現していた。同遺伝子は散発性大腸癌の癌部においても10例全例、および一部の大腸癌細胞株でも高発現していた。これに対して正常大腸粘膜では発現を認めなかった。次に同遺伝子の非担癌潰瘍性大腸炎粘膜における発現を検討した結果、同遺伝子の発現は組織学的に高度の炎症 (Matts grade 4-5) をもつ患者に強い傾向が認められた。大腸粘膜上皮と粘膜固有層リンパ球を分離し RT-PCR で検討した結果、同遺伝子の発現の由来は慢性炎症大腸粘膜上皮が主であると考えられた。臨床的には活動性炎症を有する患者8例全例に強発現を認め一方で、緩解期の患者では6例中4例でその発現は非常に弱かった。病型分類では慢性持続型4例全例で発現していた。また同遺伝子の発現と罹患範囲および罹病期間の間には明らかな傾向は認めなかった。これらの事実は同遺伝子の発現が炎症の強さに関係していることを示唆している。このように炎症の持続期間と炎症の重症度の両者によって発癌のリスクが決定されている可能性が示唆されており、本研究で示された成績も炎症の重症度が罹病期間と同様に潰瘍性大腸炎の発癌において重要な要因であり、同遺伝子が発癌リスク群の選択に有用である可能性を示唆しているものと考えられた。

## 論文審査の要旨

罹病期間が10年以上経過した慢性持続型潰瘍性大腸炎患者において大腸癌発癌のリスクが増加することが報告されている。その過程において慢性持続性の炎症が発癌に重要な役割を担っていることが推測されているが、慢性炎症からの大腸癌発癌過程を解析した報告は少ない。本研究は潰瘍性大腸炎からの発癌過程における遺伝子発現の変化を differential display RT-PCR 法を用いて解析した。この結果 IFN inducible gene family 1-8U 遺伝子の発現が潰瘍性大腸炎を母地に発生した大腸癌5例全例で非癌部に比し高発現していた。同遺伝子は散発性大腸癌の癌部においても10例全例、および一部の大腸癌細胞株でも高発現していた。さらに同遺伝子は非担癌潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜にも発現しており、組織学的に高度の炎症 (Matts grade 4-5) をもつ患者に強い傾向が認められた。臨床的には活動性炎症を有する患者8例全例に強発現を認め一方で、緩解期の患者では6例中4例でその発現は非常に弱かった。病型分類では慢性持続型4例全例で発現していた。また同遺伝子の発現と罹患範囲および罹病期間の間には明らかな傾向は認めなかった。本研究で示された成績は炎症の重症度が遺伝子発現の変化に重要な要因であり、炎症の持続期間と重症度の両者によって潰瘍性大腸炎の発癌のリスクが決定されている可能性を示唆するものと考えられた。

審査ではまず1-8U遺伝子の生理的機能について質問があり、同遺伝子の発現は癌化における結果か原因のいずれかという説明を求められた。同遺伝子の生理的機能については現在不明であり癌化における結果か原因かという点については現在行っている強制発現細胞株および siRNA による knock down 細胞を用いた実験により今後明らかにしていくべき課題であると回答された。同遺伝子の発癌細胞株での発現で認められる多様性について質問があり、細胞の分化度の違いによって発現が変化している可能性は否定できないと回答された。また同遺伝子の臨床応用についての質問があり、潰瘍性大腸炎患者での“colitic cancer”のサーベランスにおいてハイリスクグループの選択に有用である可能性があるとの回答がなされた。さらに他の臓器における慢性炎症からの発癌(皮膚癌、肝癌)においても同遺伝子の発現を追及すべきであるという助言がなされた。最後に同遺伝子の発現を散発性の大腸癌と比較するために肉眼分類および組織型に分類したさらなる詳細な検討を続けるべきであるという助言がなされた。

以上のように、本研究は今後検討されるべき課題を残しているものの、潰瘍性大腸炎における慢性炎症から発癌に至る遺伝子発現の変化を明らかにした点で消化器病学上価値ある有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 石井 裕正  
外科 北島 政樹 医化学 末松 誠  
微生物学 石川 博通  
学力確認担当者: 北島 政樹  
審査委員長: 北島 政樹

試問日: 平成15年10月11日

# Expression of Granzyme B in Human Articular Chondrocytes.

(関節軟骨細胞におけるGranzyme Bの発現)

堀 内 極

## 内容の要旨

Granzyme Bはセリン系プロテアーゼであり、血球系細胞であるナチュラルキラー細胞と細胞障害性T細胞にのみ発現すると報告されてきた。これらの細胞が、腫瘍細胞やウイルス感染細胞などの標的細胞にアポトーシスを誘導する過程でGranzyme Bは重要な役割を演じる。一方、Granzyme Bは軟骨基質を構成するプロテオグリカンを分解する活性を持つ。そのため関節リウマチ (RA) において、関節液中や軟骨・パンヌス境界部に高濃度で存在するGranzyme Bは、関節軟骨を表面から分解することに関与する。しかしながらGranzyme Bと軟骨細胞の関係についての詳細な報告はない。そこで本研究では、軟骨細胞においてGranzyme Bが発現するという仮説を立て、そのin vivoにおける機能を検討した。またGranzyme Bとともにアポトーシス誘導に関与するPerforinについても検討を加えた。

まず免疫組織化学染色を12例のRA軟骨組織と9例の正常軟骨組織に対して行った。その結果、Granzyme B陽性細胞はRA軟骨、正常軟骨とも全例で観察され、特にRA軟骨組織では浅層により多く存在した。またin-situ hybridization、RT-PCRにより軟骨細胞にGranzyme BのmRNAが発現していることが示された。Perforinも免疫組織化学染色を行ったRA軟骨の12例、正常軟骨の9例中8例で軟骨細胞に発現していた。半定量的PCRの結果、RA軟骨細胞は正常軟骨細胞に比較して、Granzyme BとPerforin mRNAの発現が亢進していることが示された。さらにTUNEL染色とHE染色により軟骨組織中のアポトーシス軟骨細胞を検索した。アポトーシス軟骨細胞は、RA軟骨では軟骨細胞のクラスター、正常軟骨では表層で主に存在した。アポトーシス軟骨細胞の存在は電子顕微鏡により形態学的に確認した。Granzyme BとTUNELの二重染色では、軟骨細胞のクラスター内部でGranzyme BとTUNELが同時に陽性の細胞が、Granzyme Bのみ陽性細胞に接して存在する傾向が認められた。

これらの結果から、従来、血球系免疫細胞にのみ発現すると考えられていたGranzyme BおよびPerforinは関節軟骨細胞にも発現しており、とくにRA軟骨では、その発現が亢進していた。正常軟骨細胞に発現したGranzyme Bは、そのプロテオグリカン分解活性により軟骨基質のリモデリングに関与する可能性が推測された。RA軟骨細胞に過剰に発現したGranzyme Bは、酵素的に、あるいは近傍の軟骨細胞のアポトーシスを誘導することで、軟骨基質の破壊に関与している可能性が示された。

## 論文審査の要旨

Granzyme Bは血球系細胞であるナチュラルキラー細胞と細胞障害性T細胞のみに発現するとされ、これらの細胞が標的細胞にアポトーシスを誘導する過程で重要な役割を演じる。また、そのプロテオグリカン分解活性により、関節内に存在するナチュラルキラー細胞から産生されたGranzyme Bは、関節リウマチ (RA) の関節軟骨表層を酵素的に破壊するとされている。しかし血球系細胞以外でGranzyme Bの発現と機能に関する報告はほとんどなく、Granzyme Bと軟骨細胞の関係も明らかではない。そこで本研究では、関節軟骨細胞にGranzyme Bが発現するという仮説を立て、そのin vivoにおける機能を検討した。その結果、Granzyme Bは正常軟骨細胞、RA軟骨細胞の一部に発現しており、RA軟骨細胞では発現が亢進していることが示された。また、Granzyme Bを発現している軟骨細胞がクラスター内部で、隣接する軟骨細胞にアポトーシスを誘導している可能性が示された。

審査では、まずRA症例でステロイド使用群と非使用群ではGranzyme Bの発現率に有意差が存在するかについて質問された。これに対して、本研究では症例数が少なく検討は行われていないが、Granzyme Bによる関節軟骨破壊の研究において検討すべき重要な点であり今後研究を進めていきたいと回答された。次に、軟骨細胞に発現したGranzyme Bが異なった機能を発現するメカニズムについての質問に対して、生理的環境下では軟骨基質のリモデリングに関与し、RAでは過剰に発現したGranzyme Bが産生細胞周囲の軟骨基質を酵素的に破壊することに加えて、近傍の軟骨細胞へアポトーシスを誘導することを通して軟骨組織破壊に関与している可能性があるかと回答された。また、正常軟骨をHE染色のみにより判定していることに対して、軟骨基質中に存在するプロテオグリカンの状態を確認する実験の必要性が指摘された。さらにGranzyme Bが産生細胞にアポトーシス誘導を行わないメカニズムについて質問された。これに対して、軟骨細胞に関しては不明であるが、ナチュラルキラー細胞で産生されたGranzyme Bは細胞内では不活性型であり、細胞外に放出されて活性型となることから、軟骨細胞についても同様のメカニズムの可能性があると回答された。次にGranzyme B陽性細胞の発現率に関しての計測法について質問され、軟骨組織を浅層と深層に二分し、それぞれ3視野における発現細胞数を平均したものを発現率とした、と回答された。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残してはいるが、従来はナチュラルキラー細胞と細胞障害性T細胞のみに発現するとされてきたGranzyme Bが関節軟骨細胞にも発現することを証明した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭

病理学 岡田 保典 発生・分化生物学 須田 年生

リハビリテーション医学 千野 直一

学力確認担当者：北島 政樹、岡田 保典

審査委員長：岡田 保典

試問日：平成15年10月6日

# The Role of Nitric Oxide after a Short Period of Liver Ischemia-Reperfusion.

(肝虚血再灌流における一酸化窒素の意義)

森 末 淳

## 内容の要旨

【緒言】NOの作用には2面性があり、血管拡張や、血小板、白血球凝集抑制、線溶活性亢進による微小循環改善作用と、活性酸素と反応しperoxynitriteを形成するcytotoxicな作用がある。本研究では肝虚血再灌流におけるNOの役割について検討した。

【材料、方法】Wistar系雄性ラットの肝動脈、門脈を30分clampする肝虚血再灌流モデルを作製した。コントロール群としてNO合成酵素阻害薬非投与群とL-NAME投与群およびaminoguanidine投与群の計3群を設けた。肝上部大動脈より採血し全血中活性酸素、血漿中NO、血清transaminase、末梢白血球数を測定し、さらに肝摘出し病理組織学的検索を行ない、蛍光免疫染色により組織中のiNOS、nitrotyrosine発現を調べた。また、in vivo microscopeを用いて虚血再灌流時の白血球の血行動態について観察した。

【結果】コントロール群において、再灌流後血漿中NOは時間経過と共に増加し、肝組織中のiNOSとnitrotyrosineの発現を認めた。一方、NO合成酵素阻害薬投与群では、コントロール群と比較し、血漿中NOの低下とnitrotyrosineの発現減弱を認めた。血清transaminase、病理組織像、in vivo microscopeで示される微小循環障害の程度はL-NAME投与群>コントロール群>aminoguanidine投与群の順であった。再灌流後6時間でL-NAME投与群はコントロール群、aminoguanidine投与群と比較し有意な生存率の低下を認めた。

【考察】NO合成酵素を阻害することでperoxynitriteを生成するNOが減少し、肝組織中のnitrotyrosineの発現は減弱した。再灌流後の血中transaminase値の上昇は、aminoguanidine投与群で有意に軽減したのに対し、逆にL-NAME投与群では増加した。Aminoguanidine投与によりperoxynitrite生成が抑制され内皮細胞障害が軽減し、微小循環が改善されたが、L-NAMEを投与すると再灌流後、血管内皮に接着する白血球が極めて多くなり、類洞に血栓が形成され循環不良となった。L-NAME投与群は病理組織学的にもうっ血が高度であり、再灌流後の生存率も低下した。cNOS由来のNOを温存し、peroxynitrite生成を抑えることが、虚血再灌流を軽減する方法として重要で、aminoguanidineのようにiNOSを特異的阻害する薬剤は有用と考えられた。

【結論】肝虚血再灌流において、iNOS阻害によりhigh-output NOおよびperoxynitrite産生を抑制し、cNOSは阻害せず、微小循環維持に必要なNOは確保しておくことが障害軽減に重要であることが示された。

## 論文審査の要旨

肝移植、肝切除において虚血再灌流障害は切実な問題である。本研究では肝虚血再灌流におけるNOの意義をin vivoでラット肝虚血再灌流モデルを用いて検討した。

審査では、まずL-NAME投与群とaminoguanidine投与群におけるNO産生量の違いについて問われ、L-NAMEがcNOSを阻害する分の差であるとの回答がなされた。L-NAME投与群とaminoguanidine投与群でNO産生量に差が検出できなかった部分も認められたが、これはcNOSによるNO産生量が極めて微量であるほかに、各時間の群間に個体差が含まれたためと説明がなされた。またiNOS mRNA、iNOS蛋白の発現時間の推移について質疑が出され、それに対してaminoguanidineが実際に効果を表しているか質問がなされた。再灌流4時間後の肝組織免疫染色においては肝細胞、あるいはKupffer細胞の細胞質の一部が染色され、iNOSとnitrotyrosineの発現が示されていた。再灌流後4時間以内のとりわけ早期の段階でNO合成酵素阻害薬がiNOSを阻害する可能性については、虚血1時間前に麻酔をかけてNO合成酵素阻害薬を投与している段階でiNOSを誘導させるような侵襲が加わっていることや、再灌流開始の1時間半前にNO合成酵素阻害薬を投与していることも関与した可能性があると回答された。またaminoguanidineが再灌流直後から白血球の類洞内での接着を阻害した理由として、肝微小循環内では再灌流後の非常に早期から検出できないレベルのiNOSが発現し、これがNOを産生することによる微小循環への影響があることなどが説明された。全血中活性酸素産生量は、虚血再灌流の刺激を受けた白血球にルミノールを添加して生じた化学発光を測定したものであるが、NOにはsuperoxideを消去する作用があるため、再灌流直後の活性酸素産生量はaminoguanidine投与群で上昇し、一方のL-NAME投与群では、微小循環を維持する程度のNO産生も抑制するため、白血球が類洞内に多数接着する結果、肝動脈と門脈をdeclampしても、再灌流直後の血液流量が極めて少ないため活性酸素産生量は増加しなかったものと説明された。本研究は2種類のNO合成酵素阻害薬の特性を利用して、iNOSあるいはcNOS由来のNOの意義について検討しているが、aminoguanidine自身にiNOSとは無関係に微小循環を改善させる作用がないのか、またL-NAME投与群で示された微小循環障害と生存率低下についても、NOSとは無関係なcytotoxicな作用がないか、検討する必要があったと指摘された。以上、本研究では今後検討すべき課題が少なからずあるものの、肝虚血再灌流におけるNOの役割を解明する手がかりとなる有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 外科学 北島 政樹

医化学 末松 誠 内科学 石井 裕正

解剖学 相磯 貞和

学力確認担当者: 北島 政樹、末松 誠

審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成15年7月23日

 Yamanouchi

Harnal<sup>®</sup>  
**10<sup>th</sup>**  
Anniversary

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。



前立腺肥大症の排尿障害改善剤( $\alpha_1$ 受容体遮断剤)

指定医薬品、要指示医薬品(注意-医師等の処方せん・指示により使用すること)

**ハルナール<sup>®</sup>** 0.1mg  
0.2mg カプセル

塩酸タムスロシン製剤

薬価収載

■禁忌、効能・効果、用法・用量、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。

03/10作成 A4.B.01

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